



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103641713 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201310574940. 7

A61K 31/164 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 15

A61P 25/28 (2006. 01)

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路  
38 号

(72) 发明人 戚建华 杨薇 向兰

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

C07C 69/30 (2006. 01)

C07C 67/48 (2006. 01)

C07C 233/18 (2006. 01)

C07C 231/24 (2006. 01)

A61K 31/23 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

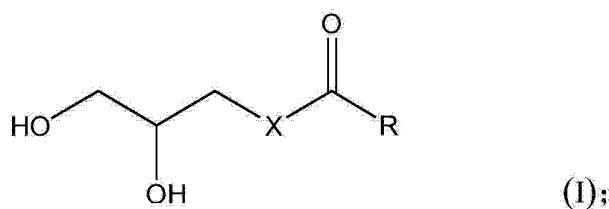
(54) 发明名称

甘油单酯衍生物的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种甘油单酯衍生物的制备方法及应用。所述制备方法,包括:将鳊鱼头干燥粉碎后置于甲醇中浸提,收集浸提液,浸提液经抽滤、浓缩得到浸提物粗样;对所述的浸提物粗样进行萃取,获得萃取液;将所述的萃取液浓缩后依次经正相硅胶色谱柱和高效液相色谱分离纯化,获得如式 (Ic) 所示的甘油单酯衍生物。本发明还公开了所述甘油单酯衍生物在制备预防、治疗神经退行性疾病的药物和食品中的应用,所述甘油单酯衍生物的结构通式如式 (I) 所示。本发明开拓了甘油单酯衍生物新的药物用途,为制备预防及治疗老年痴呆症等神经退行性疾病的药物提供了新的思路。

1. 甘油单酯衍生物在制备预防、治疗神经退行性疾病的药物和食品中的应用,所述甘油单酯衍生物的结构通式如式(I)所示:



其中, X 为 O 或 NH;

R 为碳原子数为 6 ~ 23 的直链烷基。

2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,R 为碳原子数为 9 ~ 21 的直链烷基。

3. 如权利要求 2 所述的应用,其特征在于,X 为 O 时,R 为碳原子数为 9、11、13、15 ~ 19 或 21 的直链烷基;X 为 NH 时,R 为碳原子数为 17 的直链烷基。

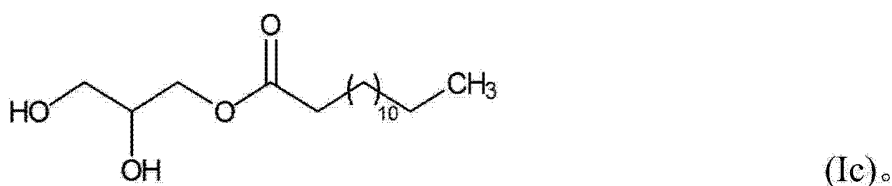
4. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的神经退行性疾病为老年痴呆症。

5. 一种甘油单酯衍生物的制备方法,包括:

(1) 将鳊鱼头干燥粉碎后置于甲醇中浸提,收集浸提液,浸提液经抽滤、浓缩得到浸提物粗样;

(2) 对所述的浸提物粗样进行萃取,获得萃取液;

(3) 将所述的萃取液浓缩后依次经正相硅胶色谱柱和高效液相色谱分离纯化,获得所述的甘油单酯衍生物,该甘油单酯衍生物的结构式如式:(Ic) 所示:



6. 如权利要求 5 的制备方法,其特征在于,所述浸提的时间为 1 ~ 2 天。

7. 如权利要求 5 的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,萃取时,先将所述的浸提物粗样用甲醇水溶液和正己烷进行溶剂分配,收集甲醇水溶液层粗样;再将所述的甲醇水溶液层粗样蒸发浓缩后用乙酸乙酯和水进行溶剂分配,得到乙酸乙酯层粗样,即所述的萃取液。

8. 如权利要求 6 的制备方法,其特征在于,所述乙酸乙酯和水的体积比为 1:2。

9. 如权利要求 5 的制备方法,其特征在于,经正相硅胶色谱柱分离时,溶剂系统为三氯甲烷:甲醇。

10. 如权利要求 5 的制备方法,其特征在于,所述高效液相色谱的分离纯化的条件为:流速为 3mL/min,溶剂体系为体积比为 80:20 到 100:0 的甲醇水溶液,时间为 60min。

## 甘油单酯衍生物的制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,尤其涉及一种甘油单酯衍生物的制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 老年痴呆症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种发生在早老及老年期、起病隐匿、以痴呆和精神行为异常为主的渐行性发展的神经系统退行性疾病。临床上表现为记忆和执行功能障碍、失语、失认、视空间技能损害以及人格和行为改变等。它是目前仅次于心脏病、肿瘤和中风,在老年人中占第四位的致死疾病。据国际阿尔茨海默协会 2012 年报告,预计到 2030 年患痴呆症人口将增加至 6600 万人,到 2050 年患者数将突破 1.15 亿人。2010 年,治疗老年痴呆症的费用消耗高达 6040 亿美元,并且在以令人担忧的速度继续增加。中国社会随着生活水平提高逐渐走向老龄化,老年痴呆症已经逐渐成为了严重威胁老年人健康的致命顽症。因此对神经退行性疾病,包括老年痴呆症在内的进行有效地预防和早期治疗,将会直接影响我国的人口质量和全民健康水平。寻找治疗老年痴呆症的药物已成为我国面临的一项重要战略问题。

[0003] 老年痴呆症的主要病理学特征为:脑萎缩、大脑皮质联合区、海马、内侧嗅皮质、杏仁核、嗅球和少数皮质下核团如前脑基底部的 Meynert 氏核、外侧下丘脑等脑区域的神经细胞的丧失、神经原纤维缠、颗粒空泡变性以及大脑内神经细胞表面由于异常的淀粉样蛋白斑沉淀而呈现的老年斑。

[0004] 近年来,随着对 AD 不断的深入研究,防治 AD 的药物研究取得了一定的进展。目前治疗 AD 的药物品种繁多,其中对 AD 的药物治疗主要是通过抑制乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 来提高患者体内的乙酰胆碱水平,即 AChE 抑制剂。它是临床上用于治疗 AD 最早最为成熟的一类药物,经美国 FDA 批准上市的药品共有 4 种,他克林 (Tacrine)、多奈哌齐 (Donepezil)、利斯的明 (Rivastigmine)、加兰他敏 (Galantamine)。虽然他们在某种程度上能起到缓解老年痴呆症的作用,但是都有一定的毒副作用,并且不能治愈,因此,寻找针对 AD 病因的新的有效治疗药物和方法,成为当今研究的热点和难点。

[0005] 早在 1956 年,意大利神经科学家 Rita Levi-Montalcini 和美国生物化学家 Stanley Cohen 就已成功分离得到人类发现的第一个神经营养因子——神经生长因子 (Nerve Growth Factor, NGF)。近年,神经科学进展对中枢神经元变性和再生的研究为 AD 病因学和治疗开辟了新途径。NGF 具有维持神经元的数量和存活、促进神经突起生长和对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用的功能。但是,NGF 价格昂贵,并且相对分子质量大,不能透过血脑屏障 (Blood Brain Barrier, BBB),只可脑室内注射,会给患者造成神经疼痛。因此,寻找拟神经生长因子活性且可以通过 BBB 的小分子化合物,已经成为研究热点。

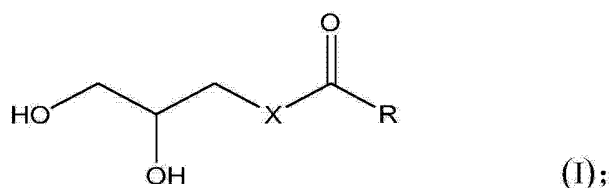
[0006] 甘油单酯,广泛存在于自然界中。其中,两个重要的甘油单酯即 2-花生酰基甘油是大麻素受体激动剂和 2-十八烯酸单甘油酯是 GPR119 受体激动剂。对于甘油单酯的活性研究也已开始受到关注。

[0007] 我国拥有丰富的海洋生物资源,对从海洋天然产物中分离新成分和寻找新药理活性化合物的研究也日益广泛起来。鳊鱼 (*Ilisha elongata*),分布在我国渤海、黄海、东海、南海,营养价值极高,含丰富的蛋白质、脂肪、钙、钾、硒;鳊鱼富含不饱和脂肪酸,具有降低胆固醇的作用,对防止血管硬化、高血压和冠心病等大有益处。鳊鱼在中国渔业史上是最早的捕捞对象之一,已有 5000 多年的历史。

## 发明内容

[0008] 本发明提供了一种甘油单酯衍生物在制备预防、治疗神经退行性疾病的药物和食品中的应用,所述甘油单酯衍生物的结构通式如式 (I) 所示:

[0009]



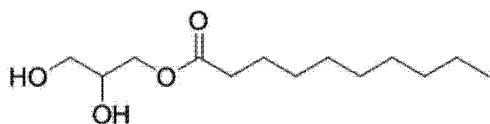
[0010] 其中, X 为 O 或 NH;

[0011] R 为碳原子数为 6 ~ 23 的直链烷基。

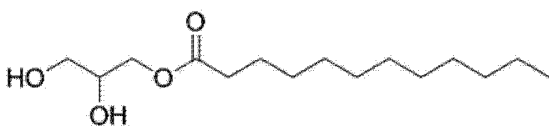
[0012] 优选的, R 为碳原子数为 9 ~ 21 的直链烷基。

[0013] 进一步优选的, X 为 O 时, R 为碳原子数为 9、11、13、15 ~ 19 或 21 的直链烷基; X 为 NH 时, R 为碳原子数为 17 的直链烷基。即,所述甘油单酯衍生物为具有以下结构式的化合物:

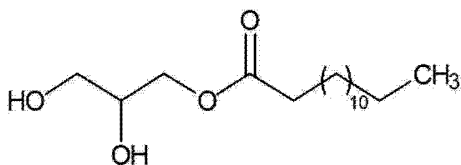
[0014]



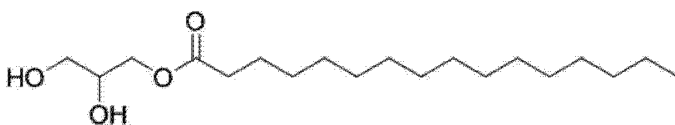
(Ia);



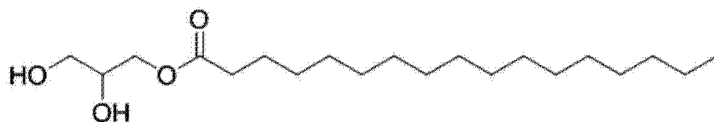
(Ib);



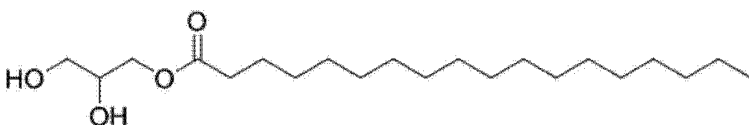
(Ic);



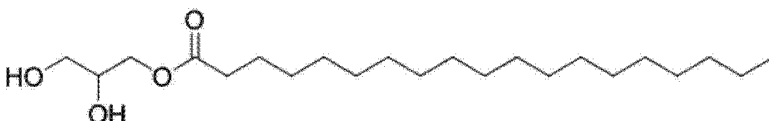
(Id);



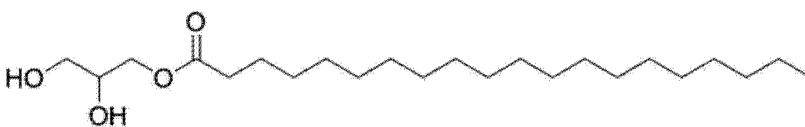
(Ie);



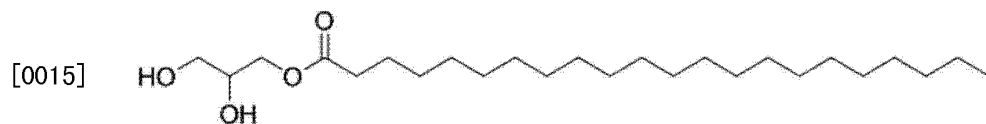
(If);



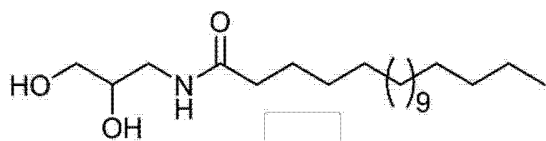
(Ig);



(Ih);

或  
(Ii);

[0016]



(II)。

[0017] 本发明的甘油单酯衍生物在老年痴呆症的体外筛选模型 PC12 细胞中具有显著的拟神经生长因子活性,因此,可以以有效剂量的甘油单酯衍生物作为活性成分,添加药学上

可接受的载体、稀释剂等,制备预防、治疗老年痴呆症等神经退行性疾病的药物。

[0018] 所述药学上可接受的载体是指药学上常规的载体,包括淀粉、蔗糖、微晶纤维素等填充剂,淀粉浆、羟丙纤维素、明胶、聚乙二醇等粘合剂,硬脂酸镁、微粉硅胶、聚乙二醇类等湿润剂,聚山梨脂、卵磷脂等吸收促进剂,伯洛沙姆、脂肪酸山梨坦、聚山梨脂等表面活性剂,还可以加入香味剂、甜味剂等其它辅剂。

[0019] 本发明所述的甘油单酯衍生物可以以单位剂量形式给药,给药途径为肠内给药或非肠内给药,包括口服、肌肉注射、皮下注射、静脉注射等。

[0020] 药物的剂型可以是固体制剂、半固体制剂、液体制剂等,包括片剂、丸剂、粉剂、分散片、小药囊剂、酏剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂、软胶囊、硬胶囊、无菌注射液、搽剂、栓剂等。

[0021] 上述各种剂型可采用常规方法进行制备。

[0022] 当然,也可以以有效剂量的甘油单酯衍生物为活性成分,添加食品上可接受的载体、稀释剂等,制备预防、治疗老年痴呆症等神经退行性疾病的食品。

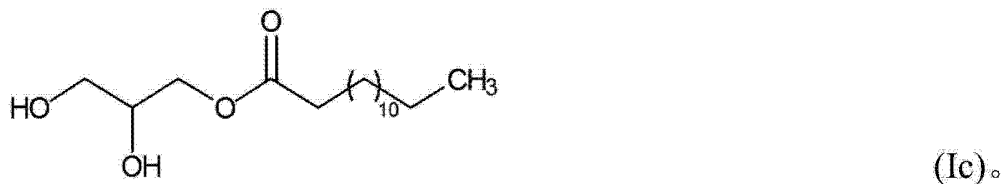
[0023] 本发明还提供了一种甘油单酯衍生物的制备方法,包括:

[0024] (1) 将鳊鱼头干燥粉碎后置于甲醇中浸提,收集浸提液,浸提液经抽滤、浓缩得到浸提物粗样;

[0025] (2) 对所述的浸提物粗样进行萃取,获得萃取液;

[0026] (3) 将所述的萃取液浓缩后依次经正相硅胶色谱柱和高效液相色谱分离纯化,获得所述的甘油单酯衍生物,该甘油单酯衍生物的结构式如式(Ic)所示:

[0027]



[0028] 为充分的将活性成分浸出,所述浸提的时间为1~2天,优选为2天。

[0029] 浸提时,鳊鱼头与甲醇的重量体积比为1:10~20(g/ml),优选为1:13(g/ml)。

[0030] 步骤(2)中,萃取时,先将所述的浸提物粗样用甲醇水溶液和正己烷进行溶剂分配,收集甲醇水溶液层粗样;再将所述的甲醇水溶液层粗样蒸发浓缩后用乙酸乙酯和水进行溶剂分配,得到乙酸乙酯层粗样,即所述的萃取液。通过甲醇水溶液和正己烷进行溶剂分配可以去除极性较小的成分,再通过乙酸乙酯和水进行溶剂分配可去除极性较大的成分,从而得到含目标化合物的成分。其中,优选的,所述甲醇水溶液与正己烷的体积比为1:1~2,更优选为1:1,其中,甲醇水溶液中,甲醇与水的体积比为80:20;所述乙酸乙酯和水的体积比为1:1~2,更优选为1:2。

[0031] 经正相硅胶色谱柱分离时,溶剂系统为三氯甲烷:甲醇,其中,三氯甲烷:甲醇(v/v)=100:0, 99:1, 95:5, 50:50, 0:100。采用该溶剂系统可以快速有效的分离浸提液样品,收集的为三氯甲烷:甲醇=95:5洗脱部分。

[0032] 所述高效液相色谱的分离纯化的条件为:流速为3mL/min,溶剂体系为体积比为80:20到100:0的甲醇水溶液,时间为60min。

[0033] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0034] 本发明的甘油单酯衍生物均具有拟神经生长因子的活性,尤其是 1-O-(十八酰)甘油,诱导 PC12 细胞产生的神经突起分化率达到 57%,因此,本发明的甘油单酯衍生物可以在制备预防、治疗老年痴呆症等神经退行性疾病药物和食品中获得应用。

[0035] 本发明的甘油单酯衍生物的来源可以是可食用鱼头,保证了其安全性。另外,本发明还提供了甘油单酯衍生物尤其是 1-O-(十四酰)甘油的制备方法,能够从鳙鱼头中分离纯化得到,制备方法简单,纯化得到的 1-O-(十四酰)甘油在 PC12 细胞模型中表现出拟神经生长因子活性,为预防和治疗老年痴呆症等神经退行性疾病的新药研发具有重要的现实意义。此外,鳙鱼头具有来源广泛,可食用等优点,对预防和治疗老年痴呆症等神经退行性疾病的新药及食品开发具有重要意义。

## 附图说明

[0036] 图 1 为实施例 1 制备的甘油单酯化合物的拟神经生长因子的活性图;

[0037] 图 2 为化合物 I-a ~ I-i 的拟神经生长因子的活性图;

[0038] 图 3 为甘油单酯衍生物 I-f 和 II 的拟神经生长因子活性图;

[0039] 图 4 为化合物 I-f 的拟神经生长因子活性的剂量依赖图;

[0040] 图 5 为加入化合物 I-f 经 48 小时后 PC12 细胞神经突起的显微图片;

[0041] 图 6 为加入化合物 I-f 48 小时后,细胞存活率与剂量关系图;

[0042] 其中, C :阴性对照 0.5%DMSO,阳性对照 NGF :40ng/mL。

## 具体实施方式

[0043] 下面结合附图和具体实施例作进一步的说明。

[0044] 实施例 1 1-O-(十四酰)甘油的制备

[0045] (1) 粉碎和浸提:

[0046] 冻干后鳙鱼头 158g 粉碎,用 2L 甲醇(工业级)室温下震荡浸提 48h。抽滤、浓缩后,得到甲醇浸提物粗样 23.7g。

[0047] (2) 萃取、分离和纯化:

[0048] 将鳙鱼头甲醇浸提物粗样(23.7g)用 80%的甲醇水溶液和正己烷(体积比=1:1)进行溶剂分配,所得的 80%的甲醇水溶液层样品进行旋转蒸发,得到浓缩物。浓缩物再用乙酸乙酯和水(体积比=1:2)进行溶剂分配,得到乙酸乙酯层样品后进行旋干,浓缩(712mg)。浓缩物经正相硅胶色谱(silica gel,200-300 目)柱分离(溶剂系统为三氯甲烷:甲醇(v/v)=100:0,99:1,95:5,50:50,100%甲醇),得到活性部分(4.8mg)(收集的为三氯甲烷:甲醇=95:5 洗脱部分)。将活性成分进行高效液相色谱纯化(流速为 3mL/min,溶剂体系为体积比为 80:20 到 100:0 的甲醇水溶液,时间为 60min),得到纯净的甘油单酯化合物 1(1.7mg)。

[0049] 对制备得到的甘油单酯化合物 1 的理化特征及化学结构的定性鉴定:

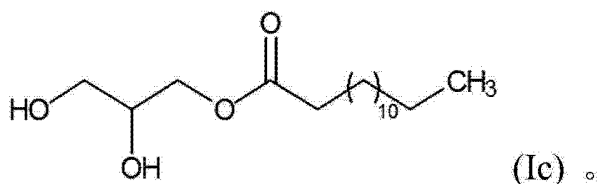
[0050] 甘油单酯化合物 1 的化学结构经  $^1\text{H}$  NMR、MS 测试,并与文献数据对比后确定。

[0051] 甘油单酯化合物 1:白色固体, $^1\text{H}$  NMR(500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ =4.21(dd, 1H, J=4.5, 11.5 Hz), 4.14(dd, 1H, J=6.3, 11.3Hz), 3.93(m, 1H), 3.69(dd, 1H, J=4.0, 11.5Hz), 3.60(dd, 1H, J=6.0, 11.5Hz), 2.35(t, 2H, J=7.8Hz), 1.62(m, 2H), 1.26(s, 20H), 0.88(t, 3H, J=7.0Hz), ESI

-TOF-MS  $m/z$  325  $[M+Na]^+$ .

[0052] 经结构鉴定,这种甘油单酯化合物 1 为 1-O-(十四酰)甘油 (1-O-(myristoyl) glycerol), 结构式为:

[0053]



[0054] 实施例 2 甘油单酯衍生物的合成制备

[0055] 以下通过对该类若干具体化合物制备实例的实施方式和附图再对本发明的上述内容作进一步的详细说明,但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于下述的实例,凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

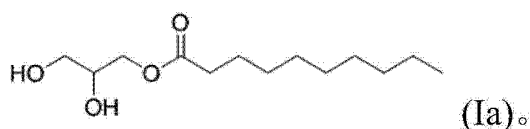
[0056] 1、化合物 I-a :1-O-(十酰)甘油

[0057] 将一定比例的甘油 (12g, 130mmol), 对甲苯磺酸 (0.7g), 丙酮 (20mL, 270mmol), 正己烷 (50mL) 加入带有温度计、分水器和回流冷凝管的 250mL 三口烧瓶中, 加热升温至回流。当分水器中水量基本恒定时停止反应, 得到丙酮缩甘油中间体。降至室温时, 取中间体 750mg, 加入十烷酸 (800mg, 4.6mmol) 在 30mL 正己烷中升温回流反应。分水器中水面恒定时, 停止反应, 加入 2mol/L HCl (12mL), 室温下搅拌脱保护, 抽滤, 水洗至中性, 干燥后得化合物 I-a。

[0058] 化合物 I-a : 白色固体 (684mg):  $^1H$  NMR (500MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 4.21 (dd, 1H,  $J$ =4.0, 11.4Hz), 4.14 (dd, 1H,  $J$ =5.9, 11.4Hz), 3.94 (m, 1H), 3.69 (dd, 1H,  $J$ =4.0, 11.4Hz), 3.60 (dd, 1H,  $J$ =5.9, 11.4Hz), 2.35 (t, 2H,  $J$ =7.8Hz), 1.63 (m, 2H), 1.26 (m, 12H), 0.88 (t, 3H,  $J$ =7.0Hz); ESI-TOF-MS  $m/z$  247  $[M+H]^+$ .

[0059] 经结构鉴定, 化合物 I-a 为 1-O-(十酰)甘油, 结构式为:

[0060]



[0061] 2、化合物 I-b :1-O-(十二酰)甘油

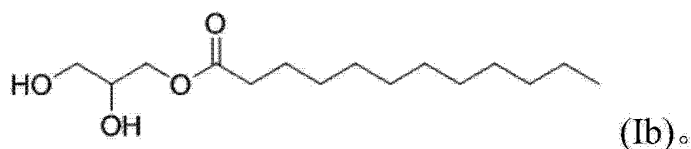
[0062] 合成方法同化合物 I-a, 反应投料为: 中间体 (810mg), 十二烷酸 (1g, 5mmol), 得到化合物 I-b。

[0063] 化合物 I-b : 白色固体 (930mg):  $^1H$  NMR (500MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 4.21 (dd, 1H,  $J$ =4.4, 11.5Hz), 4.14 (dd, 1H,  $J$ =6.0, 11.5Hz), 3.93 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H,  $J$ =4.4, 11.5Hz), 3.60 (dd, 1H,  $J$ =6.0, 11.5Hz), 2.35 (t, 2H,  $J$ =7.5Hz), 1.61 (m, 2H), 1.26 (m, 16H), 0.88 (t, 3H,  $J$ =7.0Hz); ESI-TOF-MS  $m/z$  275  $[M+H]^+$ .

[0064] 经结构鉴定, 化合物 I-b 为 1-O-(十二酰)甘油, 结构式为:

[0065]





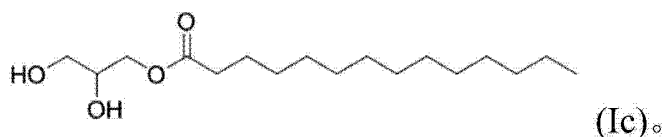
[0066] 3、化合物 I-c : 1-O-(十四酰)甘油

[0067] 合成方法同化合物 I -a, 反应投料为: 中间体 (355mg), 十四烷酸 (0.5g, 2.2mmol), 得到化合物 I-c。

[0068] 化合物 I-c : 白色固体 (510mg) :  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 4.21 (dd, 1H,  $J$ =4.3, 11.5Hz), 4.14 (dd, 1H,  $J$ =6.2, 11.5Hz), 3.93 (m, 1H), 3.69 (dd, 1H,  $J$ =4.3, 11.5Hz), 3.60 (dd, 1H,  $J$ =6.2, 11.5Hz), 2.35 (t, 2H,  $J$ =7.8Hz), 1.63 (m, 2H), 1.25 (m, 20H), 0.88 (t, 3H,  $J$ =7.0Hz) ; ESI-TOF-MS  $m/z$  303  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0069] 经结构鉴定, 化合物 I-c 为 1-O-(十四酰)甘油, 结构式为:

[0070]



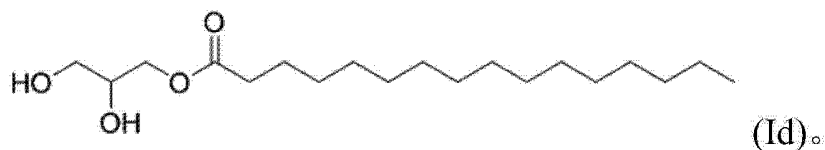
[0071] 4、化合物 I-d : 1-O-(十六酰)甘油

[0072] 合成方法同化合物 I -a, 反应投料为: 中间体 (630mg), 十六烷酸 (1g, 3.9mmol), 得到化合物 I-d。

[0073] 化合物 I-d : 白色固体 (880mg) :  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 4.21 (dd, 2H,  $J$ =4.3, 11.5Hz), 4.15 (dd, 2H,  $J$ =5.9, 11.5Hz), 3.93 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H,  $J$ =4.3, 11.5Hz), 3.60 (dd, 1H,  $J$ =5.9, 11.5Hz), 2.35 (t, 2H,  $J$ =7.5Hz), 1.63 (m, 2H), 1.25 (m, 24H), 0.88 (t, 3H,  $J$ =7.0Hz) ; ESI-TOF-MS  $m/z$  331  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0074] 经结构鉴定, 化合物 I-d 为 1-O-(十六酰)甘油, 结构式为:

[0075]



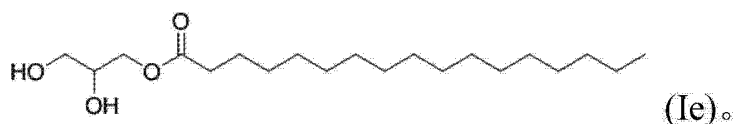
[0076] 5、化合物 I-e : 1-O-(十七酰)甘油

[0077] 合成方法同化合物 I -a, 反应投料为: 中间体 (290mg), 十七烷酸 (0.5g, 1.8mmol), 得到化合物 I-e。

[0078] 化合物 I-e : 白色固体 (460mg) :  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 4.21 (dd, 1H,  $J$ =4.3, 11.5Hz), 4.15 (dd, 1H,  $J$ =6.0, 11.5Hz), 3.93 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H,  $J$ =4.3, 11.5Hz), 3.61 (dd, 1H,  $J$ =6.0, 11.5Hz), 2.35 (t, 2H,  $J$ =7.5Hz), 1.63 (m, 2H), 1.25 (m, 26H), 0.88 (t, 3H,  $J$ =7.0Hz) ; ESI-TOF-MS  $m/z$  345  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0079] 经结构鉴定, 化合物 I-e 为 1-O-(十七酰)甘油, 结构式为:

[0080]



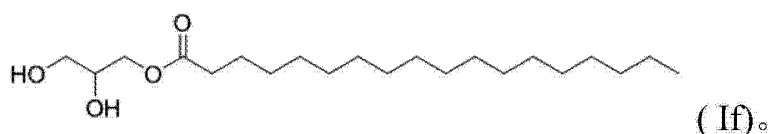
[0081] 6、化合物 I-f :1-O-( 十八酰 ) 甘油

[0082] 合成方法同化合物 I -a, 反应投料为 : 中间体 (565mg), 十八烷酸 (1g, 3.5mmol), 得到化合物 I-f。

[0083] 化合物 I-f : 白色固体 (840mg) :  $^1\text{H}$  NMR(500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 4.21 (dd, 2H,  $J=4.3, 11.8\text{Hz}$ ), 4.17 (dd, 2H,  $J=6.2, 11.8\text{Hz}$ ), 3.93 (m, 1H), 3.69 (dd, 1H,  $J=4.3, 11.8\text{Hz}$ ), 3.60 (dd, 1H,  $J=6.2, 11.8\text{Hz}$ ), 2.35 (t, 2H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 1.63 (m, 2H), 1.25 (m, 28H), 0.88 (t, 3H,  $J=6.8\text{Hz}$ ) ; ESI-TOF-MS  $m/z$  359  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0084] 经结构鉴定, 化合物 I-f 为 1-O-( 十八酰 ) 甘油, 结构式为 :

[0085]



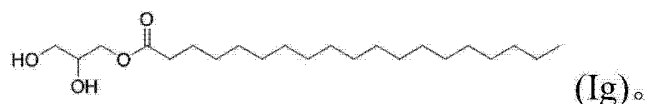
[0086] 7、化合物 I-g :1-O-( 十九酰 ) 甘油

[0087] 合成方法同化合物 I -a, 反应投料为 : 中间体 (435mg), 十九烷酸 (0.8g, 2.7mmol), 得到化合物 I-g。

[0088] 化合物 I-g : 白色固体 (620mg) :  $^1\text{H}$  NMR(500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 4.22 (dd, 1H,  $J=4.3, 11.5\text{Hz}$ ), 4.15 (dd, 1H,  $J=5.8, 11.5\text{Hz}$ ), 3.93 (m, 1H), 3.71 (dd, 1H,  $J=4.3, 11.5\text{Hz}$ ), 3.61 (dd, 1H,  $J=5.8, 11.5\text{Hz}$ ), 2.34 (t, 2H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 1.63 (m, 2H), 1.25 (m, 30H), 0.88 (t, 3H,  $J=7.0\text{Hz}$ ) ; ESI-TOF-MS  $m/z$  373  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0089] 经结构鉴定, 化合物 I-g 为 1-O-( 十九酰 ) 甘油, 结构式为 :

[0090]



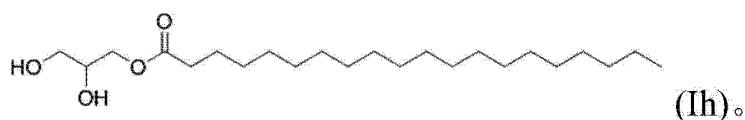
[0091] 8、化合物 I-h :1-O-( 二十酰 ) 甘油

[0092] 合成方法同化合物 I -a, 反应投料为 : 中间体 (516mg), 二十烷酸 (1g, 3.2mmol), 得到化合物 I-h。

[0093] 化合物 I-h : 白色固体 (830mg) :  $^1\text{H}$  NMR(500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 4.23 (dd, 1H,  $J=4.3, 11.5\text{Hz}$ ), 4.15 (dd, 1H,  $J=6.2, 11.5\text{Hz}$ ), 3.93 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H,  $J=4.3, 11.5\text{Hz}$ ), 3.62 (dd, 1H,  $J=6.2, 11.5\text{Hz}$ ), 2.35 (t, 2H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 1.63 (m, 2H), 1.25 (m, 32H), 0.88 (t, 3H,  $J=7.0\text{Hz}$ ) ; ESI-TOF-MS  $m/z$  387  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0094] 经结构鉴定, 化合物 I-h 为 1-O-( 二十酰 ) 甘油, 结构式为 :

[0095]



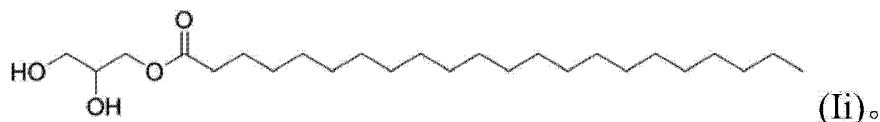
[0096] 9、化合物 I-i :1-O-(二十二酰)甘油

[0097] 合成方法同化合物 I -a, 反应投料为: 中间体 (370mg), 二十二烷酸 (0.8g, 2.3mmol), 得到化合物 I-i。

[0098] 化合物 I-i :白色固体 (720mg):  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4.22 (dd, 1H,  $J=4.3, 11.5\text{Hz}$ ), 4.15 (dd, 1H,  $J=6.2, 11.5\text{Hz}$ ), 3.93 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H,  $J=4.3, 11.5\text{Hz}$ ), 3.61 (dd, 1H,  $J=6.2, 11.5\text{Hz}$ ), 2.35 (t, 2H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 1.63 (m, 2H), 1.25 (m, 36H), 0.88 (t, 3H,  $J=7.0\text{Hz}$ ); ESI-TOF-MS  $m/z$  437  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

[0099] 经结构鉴定, 化合物 I-i 为 1-O-(二十二酰)甘油, 结构式为:

[0100]



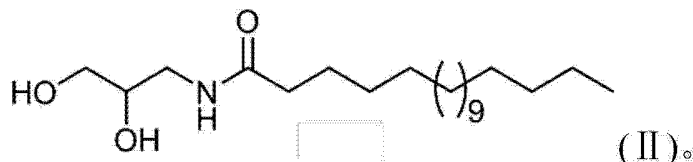
[0101] 10、化合物 II :N-(2,3-二羟基)硬脂酰胺

[0102] 将 3-氨基-1,2-丙二醇 (183mg, 2.02mmol), 二氯甲烷 (150mL), 羟基苯并三氮唑 (273mg, 2.02mmol), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (388mg, 2.02mmol), 三乙胺 (1.4mL, 10.1mmol) 加入 250mL 圆底烧瓶中。将十八烷酸 (453mg, 1.68mmol) 在 8h 内缓慢加入到圆底烧瓶中, 室温反应 24 小时。反应结束后旋干溶剂, 通过正相柱 (溶剂系统为: 100% 氯仿, 氯仿: 甲醇 = 9:1) 分离纯化, 得到化合物 II。

[0103] 化合物 II :白色固体 (380mg):  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.44 (m, 1H), 3.24 (m, 2H), 3.09 (m, 2H), 1.95 (t, 2H,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 1.35 (m, 2H), 1.00 (m, 28H), 0.62 (t, 3H,  $J=7.0\text{Hz}$ ); ESI-TOF-MS  $m/z$  358  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0104] 经结构鉴定, 化合物 II 为 N-(2,3-二羟基)硬脂酰胺, 结构式为:

[0105]



[0106] 实施例 3 甘油单酯衍生物的生物活性

[0107] 研究发现, 在神经退行性变的动物模型中, NGF 能阻止或减少神经元的退变, 一定程度可阻止 AD 进展, 具有促进神经营养和神经保护作用。PC12 细胞就是一个被广泛运用模拟神经元的成功体外模型。它来源于大鼠肾上腺髓质的嗜铬细胞瘤, 与交感神经元和感觉神经元一样, 起源于神经嵴, 经 NGF 处理后, 细胞停止增殖, 生长出神经突起, 表现为成熟交感神经元样细胞表型。因此, 采用 PC12 细胞生物活性鉴定系统, 从天然产物中筛选具有拟神经生长因子活性的有效成分, 将成为预防和治疗老年痴呆症的有效药物。

[0108] 实验方法:

[0109] (1) PC12 细胞的培养: 在含 10mL DMEM 培养基 (其中含 10% 马血清、5% 胎牛血清) 的 100mm 培养皿中, 接入  $20 \times 10^4$  个 PC12 细胞, 两天后更换一次培养基, 再过三天继代。先用 5mL PBS 将细胞洗两次, 再加入 10mL PBS 于培养皿中, 在  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的二氧化碳培养箱内培养 10 分钟, 轻轻吹洗, 并转移到 15mL 的一次性离心管, 800rpm 离心 5min 后, 血球计数

板上计数。24 孔细胞培养板每孔试先加入 1mL 含血清的 DMEM 培养基,每孔接  $2 \times 10^4$  个细胞,CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 小时后准备进行活性测试。

[0110] (2) 活性测试:以 0.5%DMSO 为阴性对照,NGF((SIGMA, 货号为 SLBD6256V)40ng/mL 为阳性对照,将实施例 1 制备的甘油单酯化合物配置成不同浓度的 DMSO 溶液。用 1mL 含 0.5%DMSO 和样品的 DMEM 溶液(不含血清)将 24 孔细胞板的每孔原培养基取代后,放入 37℃,5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。倒置显微镜下每隔 24 小时、连续 6 天观察细胞形态变化,记录细胞的神经突起分化率(神经突起长于胞体直径一倍的细胞数目与视野下总细胞数目的比值),每个视野下约 100 个细胞,随机选取 3 处,并统计作图分析。

[0111] (3) 实验结果:

[0112] 图 1 为实施例 1 甘油单酯化合物的拟神经生长因子的活性图:加入不同浓度实施例 1 制备的甘油单酯化合物经 48 小时后 PC12 细胞的神经突起分化率,在 10 μM 的浓度下,加入甘油单酯化合物 48 小时后,PC12 细胞的神经突起显著伸长,达到 42% 的神经突起分化率,说明甘油单酯化合物具有拟神经生长因子的活性。

[0113] 在有效浓度范围内,甘油单酯化合物 I-a ~ I-i 和 II 在加入 48 小时后,样品均显示出较明显的拟神经生长因子活性。图 2 为甘油单酯衍生物 I-a ~ I-i 的拟神经生长因子活性图:加入 10 μM 化合物 I-a ~ I-i 经 48 小时后 PC12 细胞的神经突起分化率,其中化合物 I-f 的活性比其它甘油单酯衍生物的活性更有优势。图 3 为甘油单酯衍生物 I-f 和 II 的拟神经生长因子活性图:加入 10 μM 化合物 I-f 和 II 经 48 小时后 PC12 细胞的神经突起分化率,其中化合物 I-f 的活性比 II 的活性更有优势。

[0114] 以化合物 I-f 为例,0.5% 的 DMSO 作为阴性对照,NGF40ng/mL 为阳性对照,化合物 I-f 的神经突起伸长活性的有效浓度范围是 1 ~ 30 μM,其中在最佳浓度 10 μM 的条件下,诱导 PC12 细胞产生的神经突起分化率达到 57%,活性最显著(见图 4 和图 5)。其中,图 4 为加入化合物 I-f 经 48 小时后 PC12 细胞的神经突起分化率随剂量增加的变化(C:阴性对照 0.5%DMSO,阳性对照 NGF:40ng/mL,化合物 I-f 的浓度:1 ~ 30 μM)。图 5 为化合物 I-f 加样 48 小时后 PC12 细胞神经突起的显微照片(a:0.5%DMSO 为阴性对照,b:NGF40ng/mL 为阳性对照,c:化合物 I-f,10 μM)。

[0115] 实施例 4 甘油单酯化合物 I-f 的毒性研究

[0116] 实验方法:细胞培养以及加样方法同实施例 3,加样后 48h,吸取掉培养基,并加入 500 μL 含有浓度为 0.2mg/mL MTT 的 DMEM 溶液(不含血清)。放入培养箱中培养 2h,2h 后吸走培养基,加入 200 μL DMSO。振摇 15min 后,于酶标仪上测定吸光度。

[0117] 图 6 是化合物 I-f 加样 48 小时后 PC12 细胞存活率的剂量关系图,I-f 在浓度为 3 μM 时没有毒性作用,10 μM 时还有促进细胞生长的作用,但在 30 μM 时,表现出了一定的毒性作用。

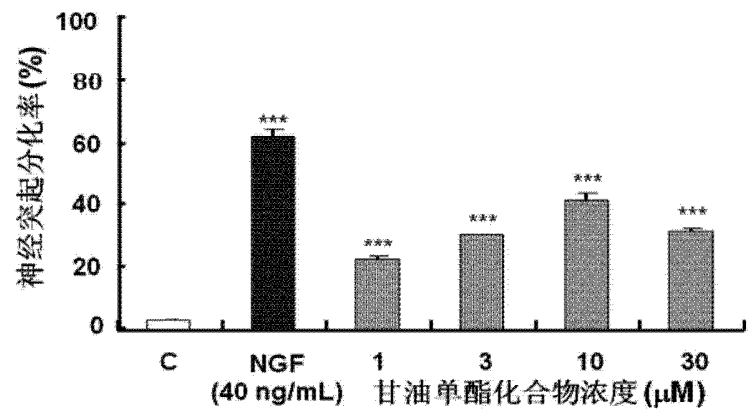


图 1

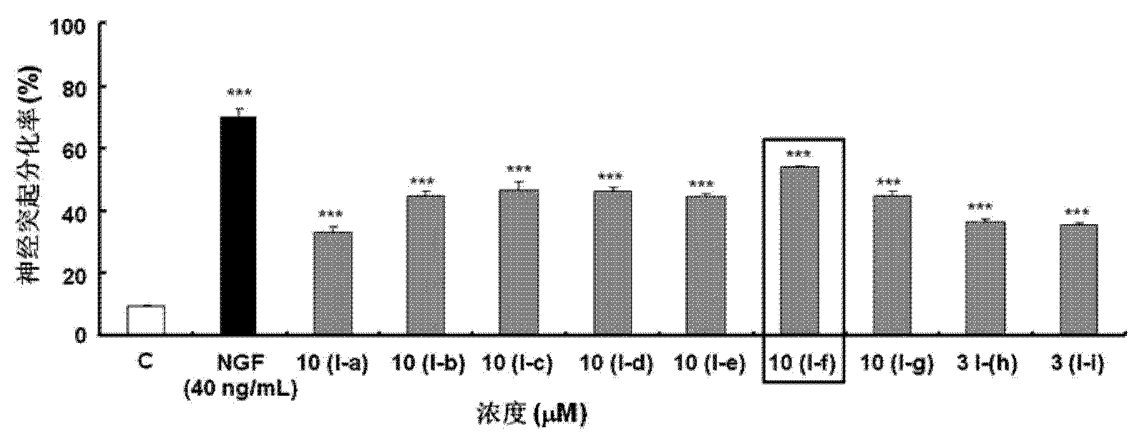


图 2

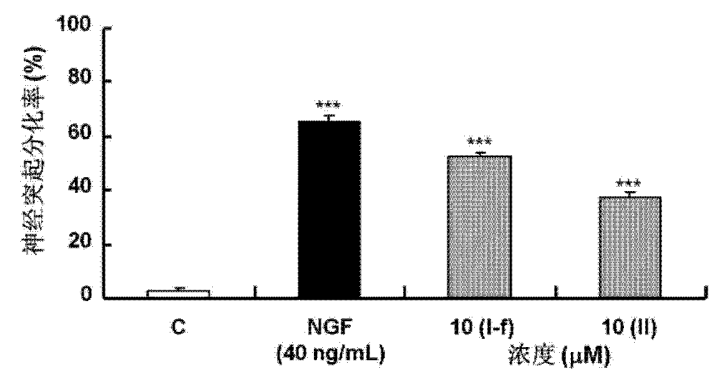


图 3

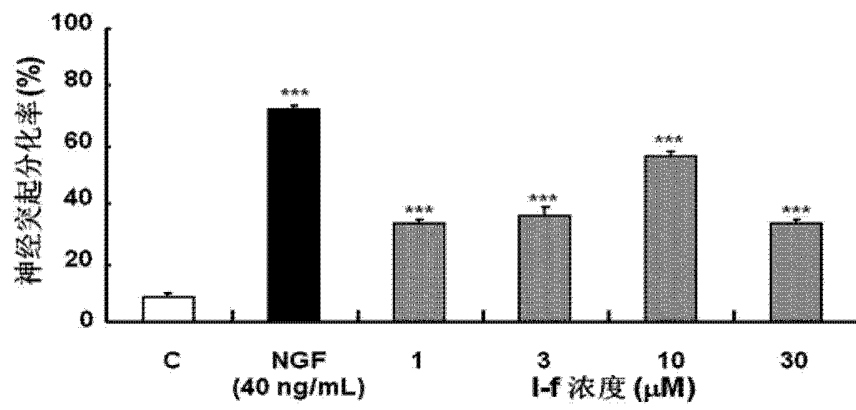


图 4

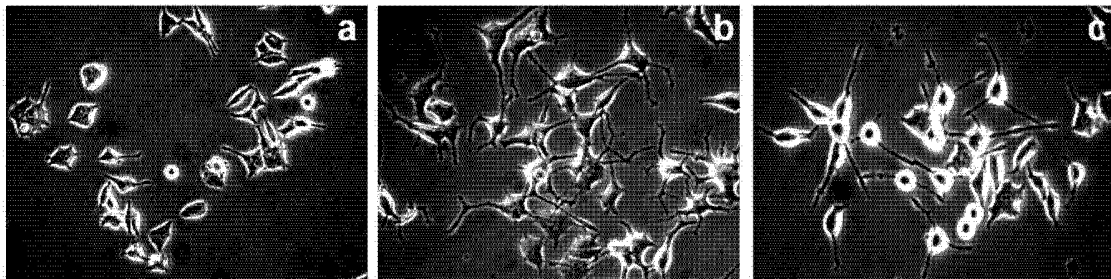


图 5

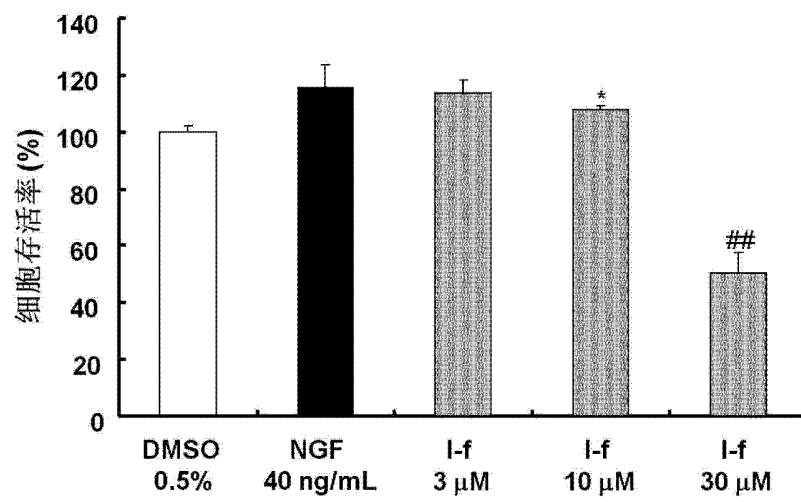


图 6