

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07C 233/00 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97197431.4

[45] 授权公告日 2008 年 2 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 100369887C

[22] 申请日 1997.6.26 [21] 申请号 97197431.4

[30] 优先权

[32] 1996.6.26 [33] US [31] 08/670,284

[86] 国际申请 PCT/US1997/011213 1997.6.26

[87] 国际公布 WO1997/049667 英 1997.12.31

[85] 进入国家阶段日期 1999.2.23

[73] 专利权人 斯克里普斯研究学院

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 R·A·勒尔纳 C·-H·王

D·L·波格尔 S·H·亨克森

[56] 参考文献

JP1086884A 1989.3.31

审查员 代庆伟

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳

权利要求书 8 页 说明书 29 页 附图 14 页

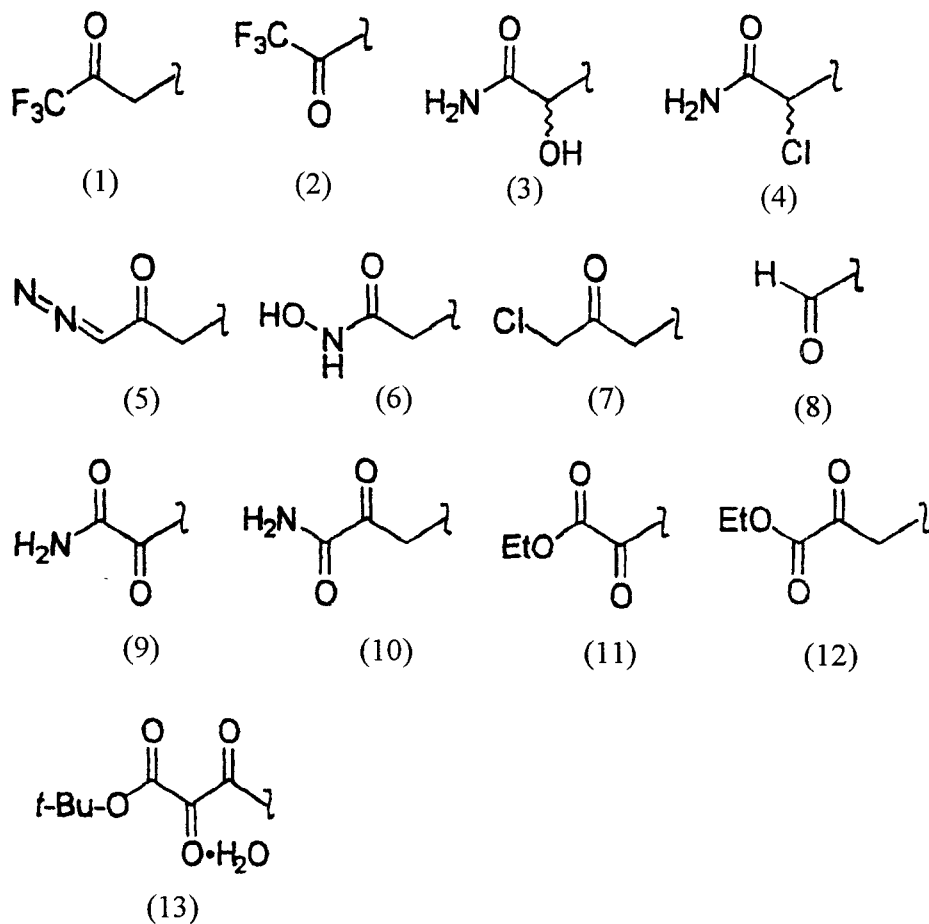
[54] 发明名称

油酰胺水解酶的抑制剂

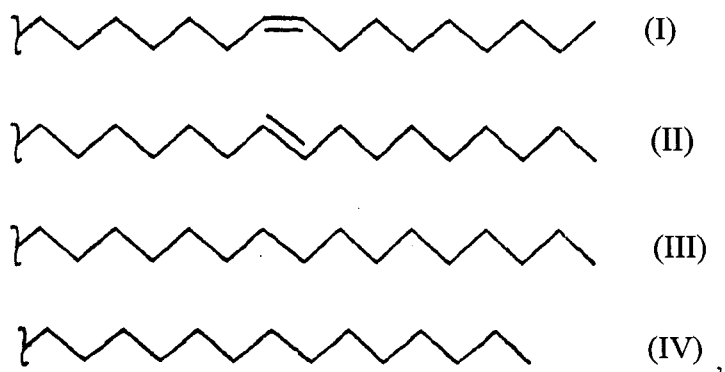
[57] 摘要

设计和合成导致内源性诱导睡眠脂质(1, 顺-9-十八烯酰胺)水解的油酰胺水解酶抑制剂。大多数有效抑制剂具有亲电子羰基, 能够可逆形成(硫代)半缩醛或(硫代)半缩酮模拟丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶催化反应的过渡态。特别是发现紧密结合的 α -羰基乙酯 8(1.4nM)和三氟甲基酮抑制剂 12(1.2nM)具有特殊的抑制剂活性。除抑制剂活性外, 某些抑制剂表现出诱导实验动物睡眠的兴奋剂活性。

1. 油酰胺水解酶抑制剂, 所述的抑制剂包含首基和共价键连接于所述首基的烃尾基, 其中所述的首基包括亲电子羰基, 并且选自由下列结构式代表的基团:



并且其中所述的烃尾基选自由下列结构式代表的基团:



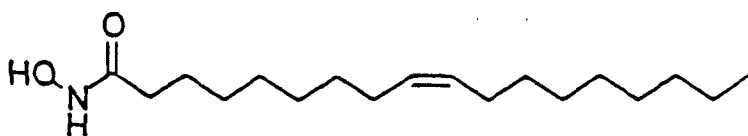
前提条件是

如果首基是式(11)的基团,则烃尾基不是式(III)或(IV)的基团,

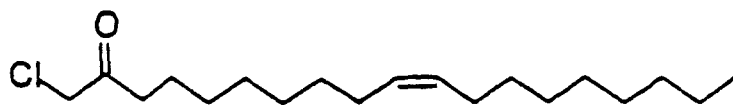
如果首基是式(1)或(2)的基团,则烃尾基不是式(III)或(IV)的基团,

如果首基是式(8)的基团,则烃尾基不是式(I)或(II)的基团。

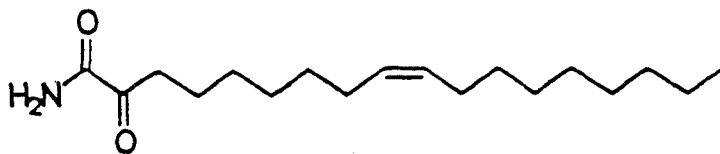
2. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑制剂:



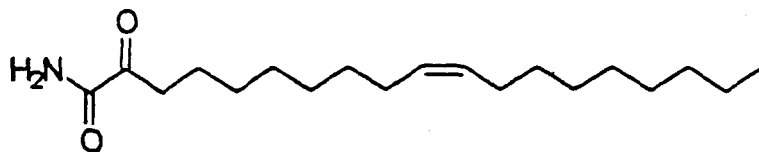
3. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑制剂:



4. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑制剂:

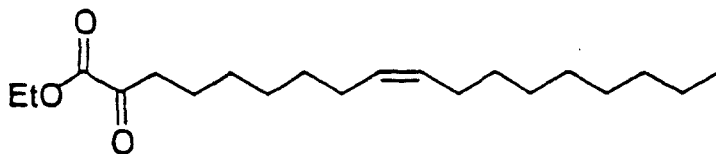


5. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑制剂:



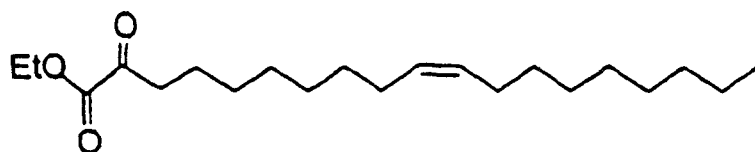
6. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑制剂

剂:



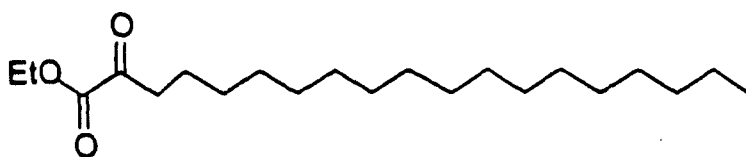
7. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑制

剂:



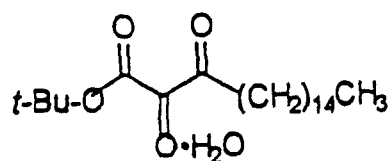
8. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑制

剂:



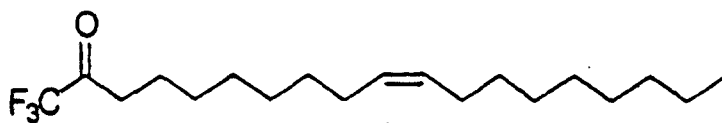
9. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑制

剂:



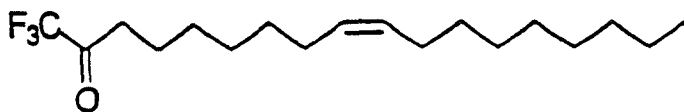
10. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑

制剂:

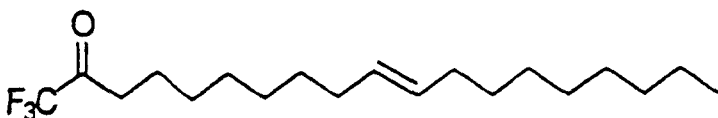


11. 由下面结构式代表的如权利要求1所述的油酰胺水解酶的抑

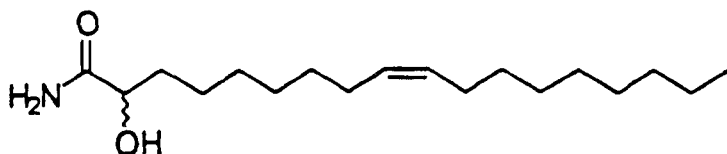
制剂:



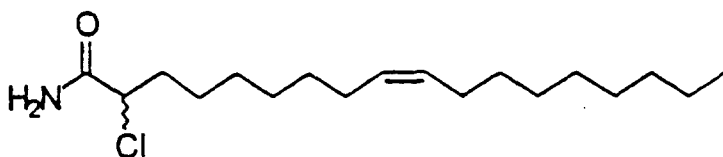
12. 由下面结构式代表的如权利要求 1 所述的油酰胺水解酶的抑制剂:



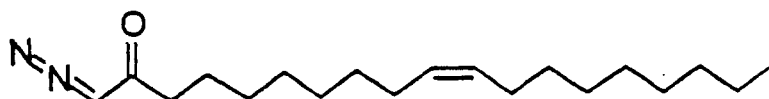
13. 由下面结构式代表的如权利要求 1 所述的油酰胺水解酶的抑制剂:



14. 由下面结构式代表的如权利要求 1 所述的油酰胺水解酶的抑制剂:

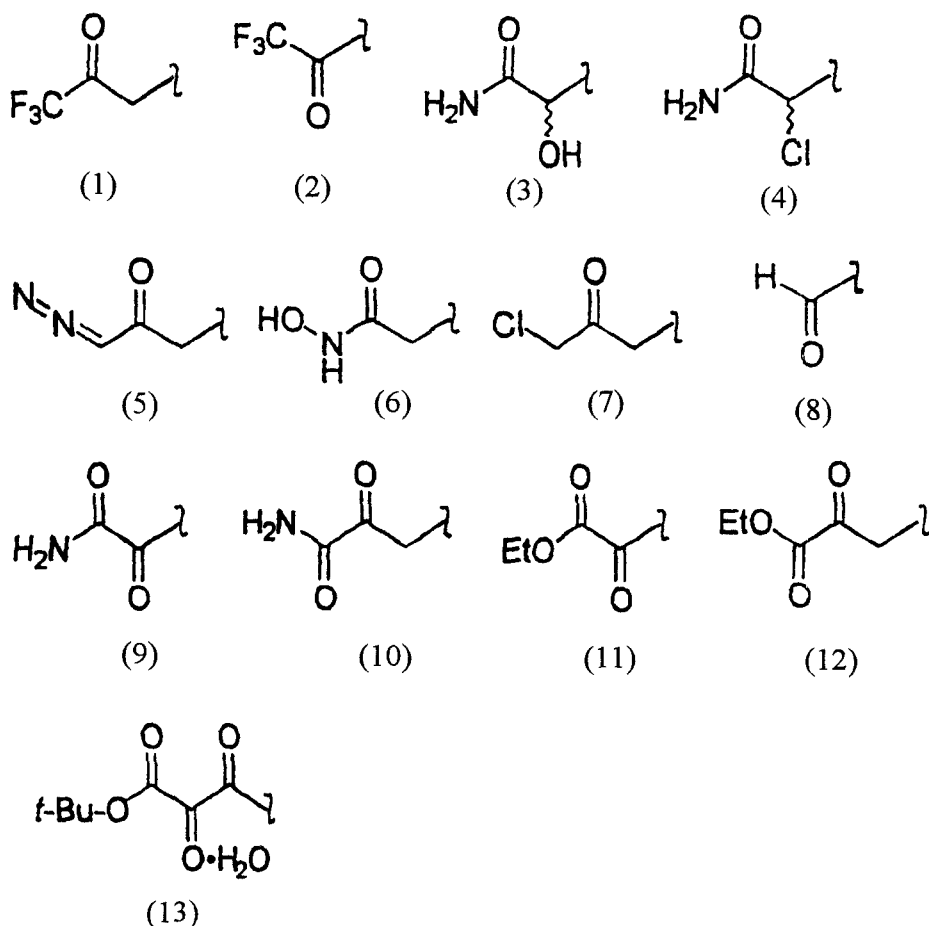


15. 由下面结构式代表的如权利要求 1 所述的油酰胺水解酶的抑制剂:

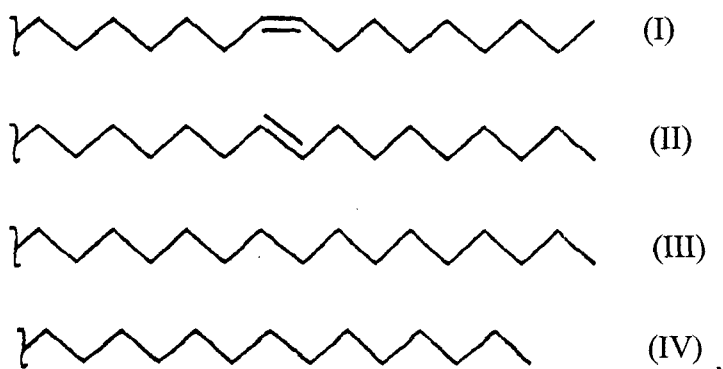


16. 下述抑制剂在制备用于抑制油酰胺水解酶的药物中的用途,

其中所述抑制剂包含首基和以共价键连接于所述的首基的烃尾基，其中所述的首基包括亲电子羰基，并且选自由下列结构式代表的基团：



并且其中所述的烃尾基选自由下列结构式代表的基团：



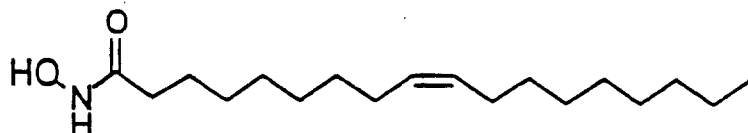
前提条件是

如果首基是式(11)的基团，则烃尾基不是式(III)或(IV)的基团，

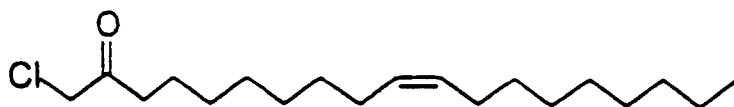
如果首基是式(1)或(2)的基团,则烃尾基不是式(III)或(IV)的基团,

如果首基是式(8)的基团,则烃尾基不是式(I)或(II)的基团。

17. 权利要求16的用途,其中所述抑制剂由下面结构式代表:



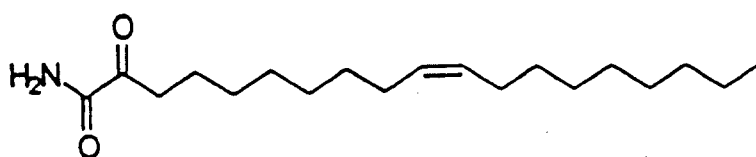
18. 权利要求16的用途,其中所述抑制剂由下面结构式代表:



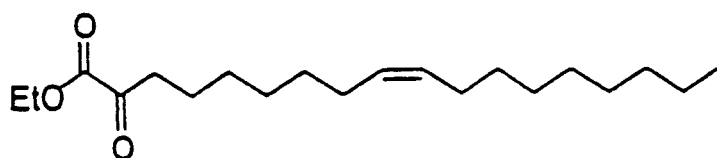
19. 权利要求16的用途,其中所述抑制剂由下面结构式代表:



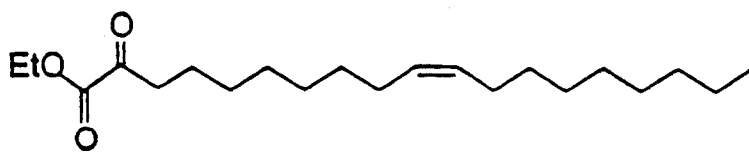
20. 权利要求16的用途,其中所述抑制剂由下面结构式代表:



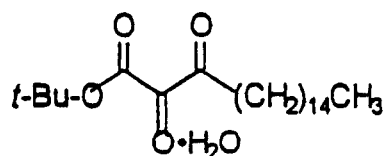
21. 权利要求16的用途,其中所述抑制剂由下面结构式代表:



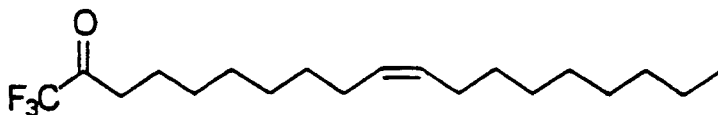
22. 权利要求16的用途,其中所述抑制剂由下面结构式代表:



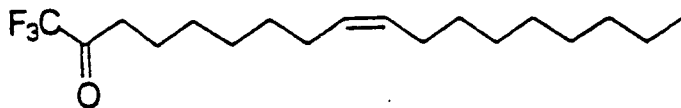
23. 权利要求 16 的用途, 其中所述抑制剂由下面结构式代表:



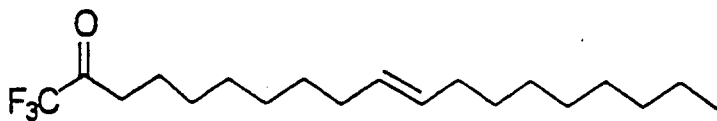
24. 权利要求 16 的用途, 其中所述抑制剂由下面结构式代表:



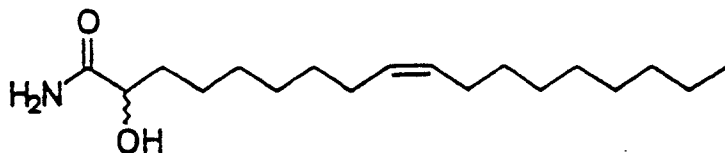
25. 权利要求 16 的用途, 其中所述抑制剂由下面结构式代表:



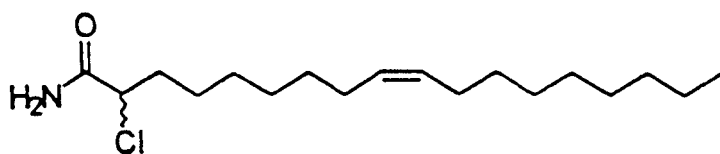
26. 权利要求 16 的用途, 其中所述抑制剂由下面结构式代表:



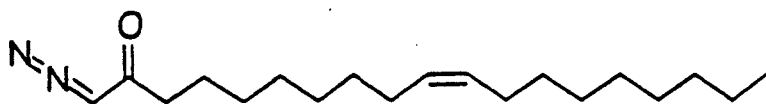
27. 权利要求 16 的用途, 其中所述抑制剂由下面结构式代表:



28. 权利要求 16 的用途, 其中所述抑制剂由下面结构式代表:



29. 权利要求 16 的用途，其中所述抑制剂由下面结构式代表：



30. 由下面结构式代表的油酰胺水解酶的兴奋剂在制备用于诱导油酰胺敏感动物睡眠的药物中用途：



油酰胺水解酶的抑制剂

本发明范围

本发明涉及油酰胺(oleamide)水解酶抑制剂以及涉及关于油酰胺诱导睡眠的兴奋剂。更确切的说,本发明涉及能够显示关于油酰胺水解酶抑制活性和/或关于油酰胺诱导睡眠的兴奋活性的过渡态模拟和机理为基础的(transition-state-mimetic and mechanism-based)的油酰胺衍生物。

本发明的背景

油酰胺(1, 顺-9-十八烯酰胺(octadenamide))是天然存在于脑组织中的一种成份, 在睡眠缺乏和睡眠恢复的状态下分别显示出它的累积和消失(Cavat et al., Science 1995, 268, 1506-1509; Lerner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1994, 91, 9505-9508; Cravatt et al., J.Am. Chem. Soc. 1996, 118, 580-590)。在特殊结构的方式上, 当以毫微摩尔量静脉注射时, 1 在动物体上已显示可诱导生理性睡眠(Caravat et al., Science 1995, 268, 1506-1509)。用存在于细胞膜上的酶(油酰胺水解酶)水解 1 可迅速将油酰胺降解成油酸(顺-9-十八烯酸)。在努力分离用于控制内源性 1 浓度的调节剂中, 发现整合膜蛋白(油酰胺水解酶)可催化油酰胺水解降解, 得到油酸(顺-9-十八烯酸)和氨(图 3), 未显示出嗜睡的活性(Cravat et al., Science 1995, 268, 1506-1509)。

已发现苯基甲磺酰氟、4,4'-二硫代二吡啶二硫化物(强二硫化物形成剂)和 HgCl_2 ($\text{IC}_{50}=700 \text{ nM}$, $\text{K}_{i,\text{app}}=37 \text{ nM}$)可抑制油酰胺水解酶, 而 1mM EDTA 却不能抑制。这表明硫醇密切参与催化过程, 所述的酶可以是半胱氨酸酰胺酶或可能是具有半胱氨酸残基活性位点的丝氨酸酰胺酶。

已介绍了变异的密切连接或不可逆的丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶抑制剂。这些包括不可逆的抑制剂如卤代甲基酮(Kettner et al., Biochemistry 1978, 17, 4778-4784; Kettner et al., Thromb. Res. 1979, 14, 969-973; C. Giordano, et al., Eur. J. Med. Chem. 1992, 27, 865-873; Rauber et al., Biochem. J. 1986, 239, 633-640; Angliker et al., Biotherm. J. 1987, 241, 871-875), Michael 受体(Hanzlik et al., J. Med. Chem. 1984, 27, 711-712)环氧化物(C. Parkes, et al., Biochem. J. 1985, 230, 509-516), O-酰基羧胺(Bromme et al., Biochem. J. 1989, 263, 861-866)和重氮甲基酮(Green et al., J. Biol. Chem. 1981, 256, 1923-1928)以及可逆过渡态模拟抑制剂如酮(Mehdi, S. Bioorg. Chem. 1993, 21, 249-259), 醛(Westerik et al., J. Biol. Chem. 1972, 247, 8195-8197), 环丙烯酮(cyclopropenones) (Ando et al., J. Am Chem. Soc. 1993, 115, 1174-1175)和缺电子羰基化合物如三氟甲基酮(Wolfenden et al., Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1976, 5, 271; Gelb et al., Biochemistry 1985, 24, 1813-1817; Imperiali; et al., Biochemistry 1986, 25, 3760-376; Koutek et al., J. Biol. Chem. 1994, 269, 22937-22940), α -酮酸衍生物(Li, z, et al., J. Med. Chem. 1993, 36, 3472-3480; Harbeson et al., J. Med. Chem. 1994, 37, 2918-2929; Peet et al., J. Med. Chem, 1990, 33, 394-407; Angelastro et al., J. Med. Chem. 1990, 33, 11-13)和三羰基化合物(Wasserman et al., J. Org. Chem. 1993, 58, 4785-4787)。

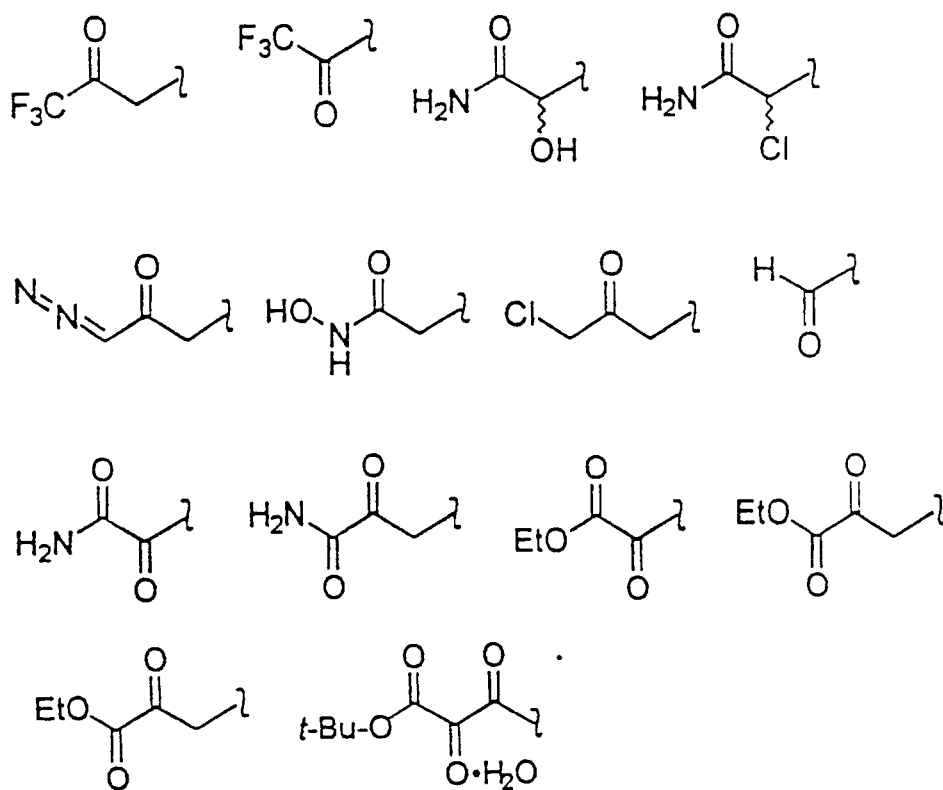
另一方面, 已报道了仅仅一种可能的特异性的油酰胺水解酶抑制剂($[S]=0.26K_m$ 时, $IC_{50}=3\mu m$)(Maurelli; et al., FEBS Lett. 1995, 377, 82-86)且到目前为止是唯一公开的研究有关脂肪酸酰胺酶的抑制剂的报告(Koutek et al., J. Biol. Chem. 1994, 269, 22937-22940)。

所需的是抑制油酰胺水解的高效油酰胺水解酶抑制剂和油酰胺诱导睡眠的兴奋剂。

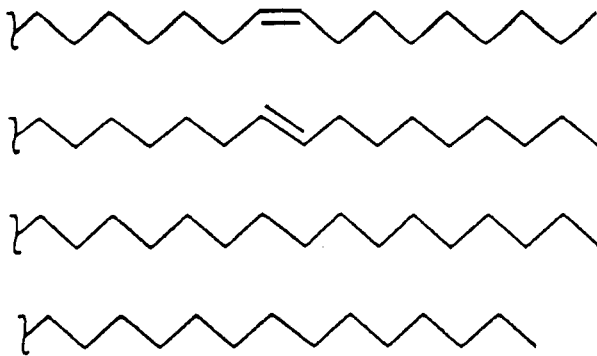
本发明简述

本发明的一个方面是涉及油酰胺水解酶抑制剂。该抑制剂被设计成在油酰胺水解酶中与活性位点半胱氨酸残基相互作用。该抑制剂作用迅速，具有选择性并效力强($K_i=13\mu\text{M}$ - 1nM)。该抑制剂用于抑制油酰胺(一种睡眠诱导因子)的水解。该抑制剂也可作为进一步鉴定油酰胺生物作用的工具。

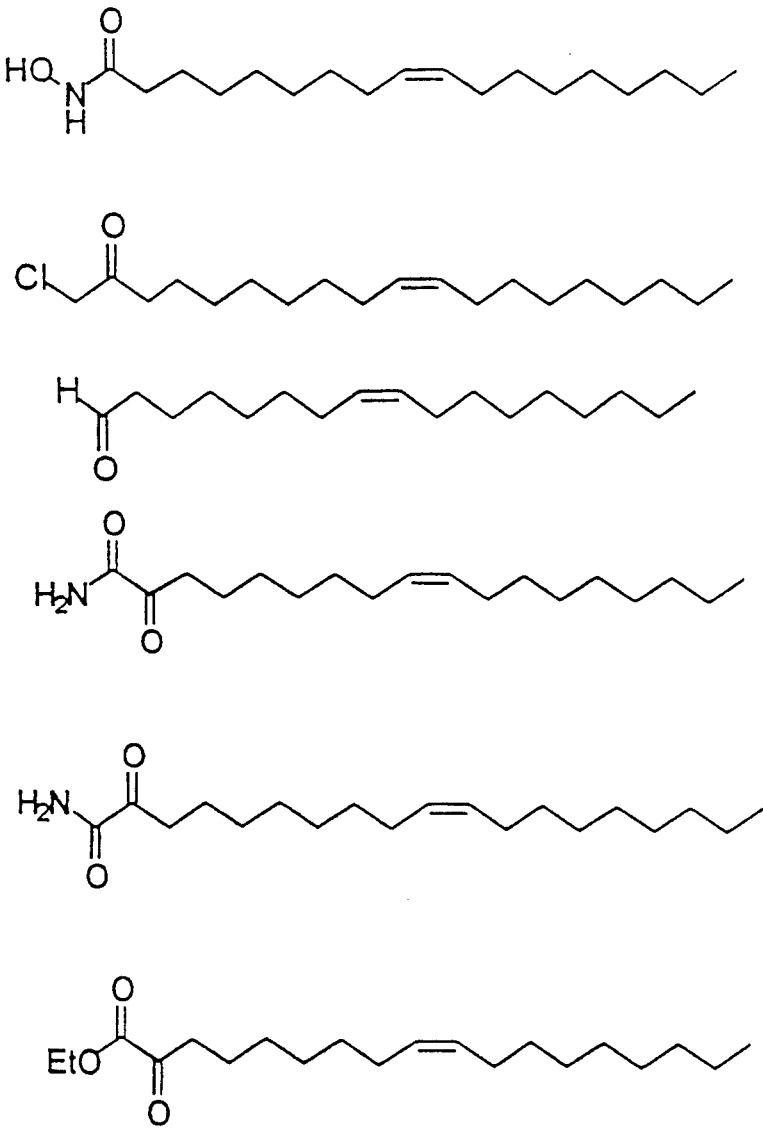
该抑制剂为包含首基和烃尾基的构型。首基以共价连接烃尾上并包括亲电子的羰基。优选首基选自由下列结构式代表的基团：



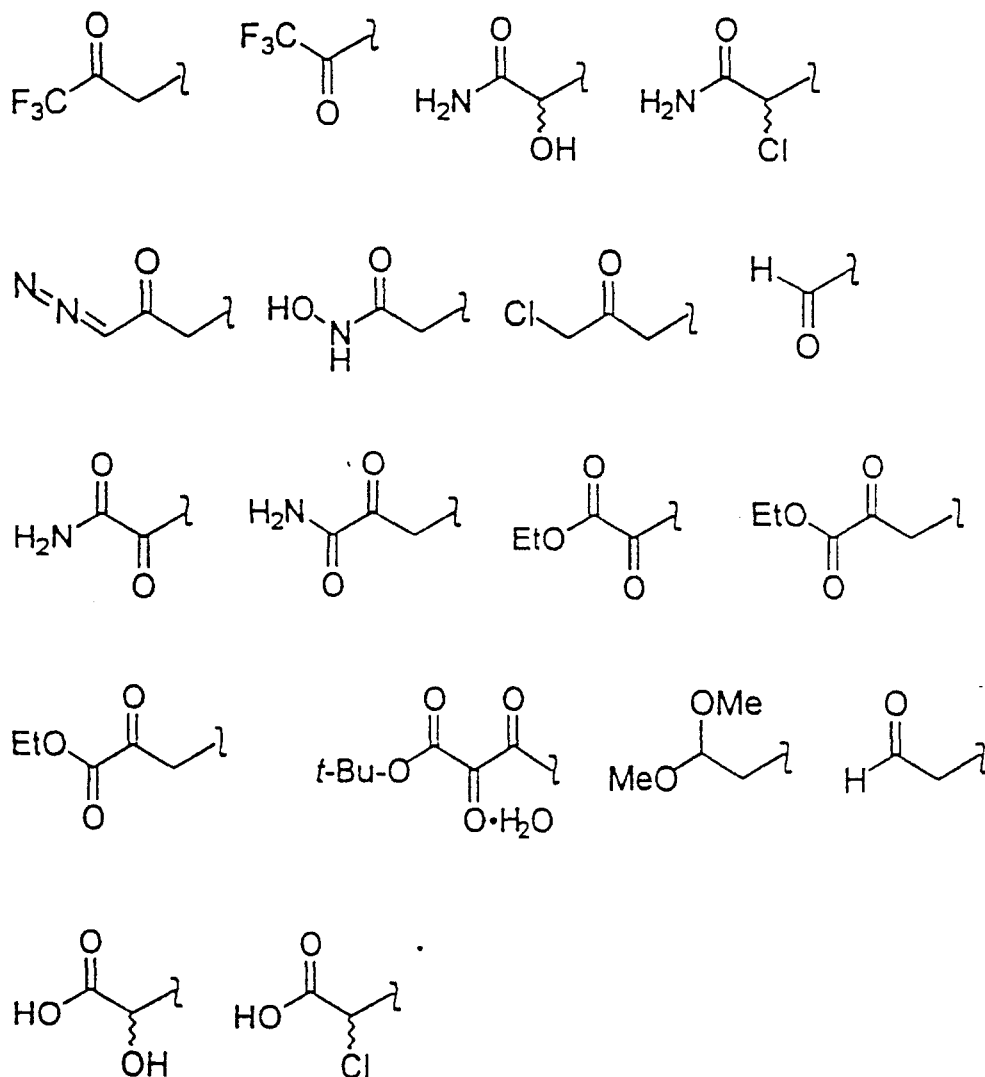
优选的烃尾基选自由下列结构式代表的基团：



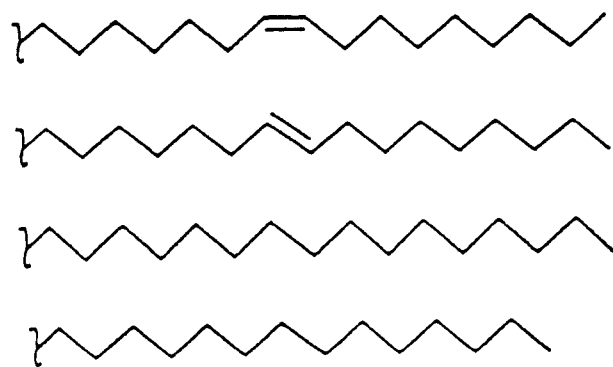
优选的抑制剂包含如下:



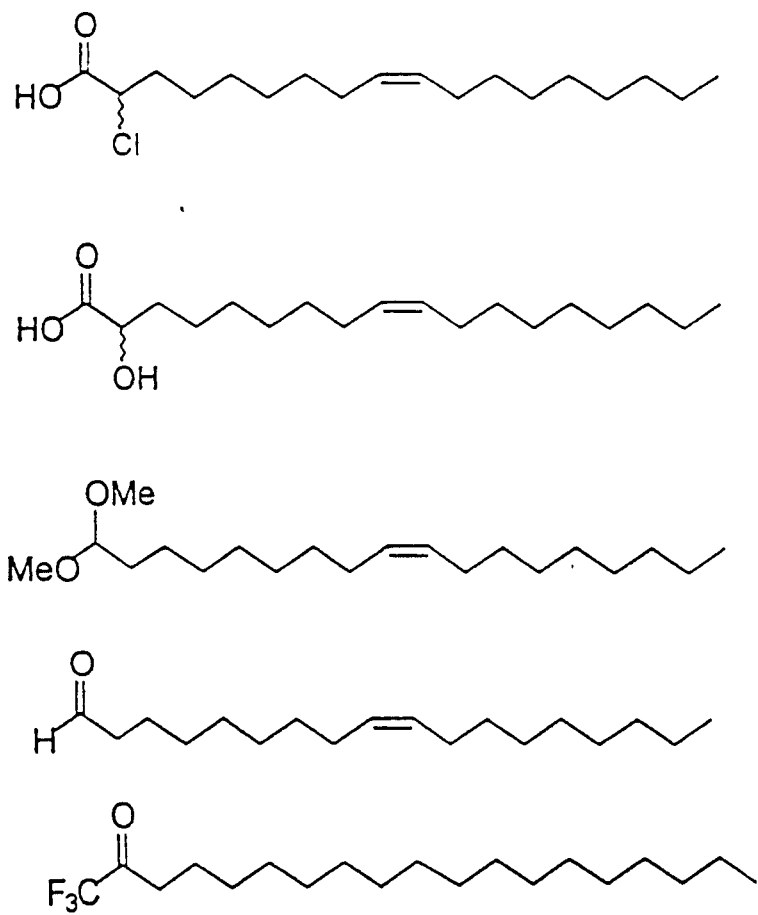
本发明的另一方面涉及抑制与油酰胺水解有关的油酰胺水解酶的方法。该方法应用油酰胺水解酶与抑制剂接触或结合的作用。该抑制剂包含有首基和以其共价键连接的烃尾基的构型。首基包括亲电子的羰基。优选首基选自由下列结构式代表的基团：



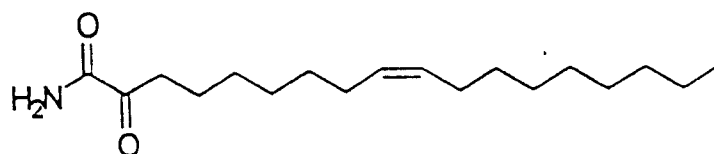
优选的烃尾基选自由下列结构式代表的基团：



上述方法中应用的优选抑制剂包括上述列举的抑制剂和下面的其它的抑制剂:



本发明的另一方面涉及在对油酰胺敏感动物中诱导睡眠的方法。更确切的说, 本发明该方面涉及对油酰胺敏感动物给予有效剂量的油酰胺水解酶兴奋剂。优选的兴奋剂由下列结构式代表:



图表简介

图 1 表示 22 个油酰胺水解酶抑制剂具有的抑制常数($K_{i,app}(\mu M)$); 对油酰胺而言, $K_m=5\pm 2\mu M$ 。

图 2 表示向 CD_3OD 或丙酮- d_6 中的亲电子羰基定量加入 CD_3OD 或 D_2O 并建立的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据。数据显示了水合程度和抑制剂羰基的相对亲电子性。预计趋势如下: $11>12>8>6\geq 4$ 。这些趋势有代表性的 11 和 12 在 CD_3OD 中全部转化成它们的半缩醛而其余的抑制剂表现出降低的半缩醛, 形成与其预期的亲电子性的一致性:

11(100%)、12(100%)、8(75%)、6(48%)和 4(47%)。

图 3 表示经油酰胺水解酶使油酰胺水解降解得到油酸(顺-9-十八烯酸)和氨。

图 4 表示化合物 6(Molar)抑制油酰胺水解酶催化剂油酰胺 1 降解 ($1/\text{速率}(\text{min}/\mu M)$)活性的 dixon 图。

图 5 表示化合物 11(Molar)抑制油酰胺水解酶(速率 ($\mu M/\text{min}/100\mu L$))的能力。

图 6 表示由化合物 12 竞争油酰胺水解酶抑制性($1/v$ ($\text{min}/\mu M$))的 Lineweaver-Burke 图。

图 7 表示油酰胺水解酶分解化合物 1 对 pH 相对速率曲线图的 pH-透率相关依从(pH-rate dependent)性, 相应显示出明显的活性位点 pK_a

5.4、9.7 和 10.3。速率最大值出现在 pH 10.0。

图 8 表示 a) 在木瓜蛋白酶和其它半胱氨酸或丝氨酸蛋白酶中存在的常见中间体(O' Leary et al., Biochemistry 1974, 13, 2077-2081); b) 抑制剂 3-15 可能的作用方式。

图 9 表示中间体和抑制剂 3、6、7、8、10、24 和 26 的化学合成路线。

图 10 表示从 α -羟基酸 18 化学合成化合物 27 的方法并显示了三氟甲基酮抑制剂 12、13、14 和 15，其中 $R = C_{16}H_{32}$ -单-不饱和烃，如图 1 所示。

图 11 表示氢化饱和的化合物 11 的化学合成路线。

图 12 表示测定 pH-速率曲线所用的方程。从使用标准最小二乘法方法近似曲线的线性部分得到速率。这些速率对 pH 再作图并用加权非线性最小二乘法表示的过程，取近似值。

本发明详细描述

公开了一系列有效的过渡态模拟和机理为基础的油酰胺水解酶抑制剂 2-22(图 1-2; 9-10 和 11)及其特征。这些抑制剂可用于探测和弄清 1 作为一类新型生物信号试剂的原始成员(prototypical member)和油酰胺水解酶在其调节中作为重要的有效因子所起的作用。

使用离子选择性电极测定产生的氨，确定抑制剂的有效性，所述的氨是作为经油酰胺水解酶的膜限制制剂 $100\mu\text{M}$ 水解油酰胺($\sim 20K_m$)的结果。发现油酰胺的 K_m 为 $5\pm 2\mu\text{M}$ 。由 Dixon 方法(图 4-6)确定抑制常数。经溶解性限制，在高浓度所有试验的抑制剂均能取得 100%抑制性及没有一种抑制剂表现出两种或更多种具有不同 K_i s 分开的活性位点的多样抑制行为特性。因为两种或更多种不同的酶连接具有几乎一致亲和力的 22 种独立抑制剂的可解性是太小了，所以这强烈暗示下面制备中的单一酶起着大于 90%的所观察到的油酰胺水解酶活性的作用。

最有效的抑制剂(图 1)具有亲电羰基, 能够可逆地形成(硫代)半缩醛或(硫代)半缩酮以模拟丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶催化反应(图 8)的过渡态。发现抑制剂的相对效力符合预期在紧连的 α -酮乙酯 8(1.4nM)和三氟甲基酮抑制剂 12(1.2nM)中反应的羰基富积的亲电子特性。在昆虫卵发育素酯酶(Linderman et al., Rev. Pestic. Toxicol. 1991, 1, 261-9)和 anandaminase (Koutek et al., J. Biol. Chem. 1994, 269, 22937-22940)的抑制剂中已观察到羰基亲电子性和连接常数之间的类似的相关性。然而, 在系列最强亲电子性的成员中, 三羰基抑制剂 11 在 150nM 下有相对较弱的结合。该现象可能是大体积的叔-丁酯和酶之间减弱了硬脂基相互作用的结果或是在 C-3 时 SP^2 特性的部分原因, 天然底物无此特性。

抑制剂羰基的水合程度和相对的亲电子特性通过 NMR 分析可以容易, 准确测定, 并发现它们已符合预期的趋势(如 $11 > 12 > 8 > 6 \geq 4$)。三羰基抑制剂 11 的中间羰基完全水合成试剂和特征化。分离剩余的抑制剂, 其特征在于它们的羰基结构未水合, 包括有反应活性的三氟甲基酮。利用 1H NMR 和 ^{13}C NMR 确立和分别定量将 CD_3OD 或 D_2O 加入到 CD_3OD 和丙酮- d_6 中的亲电子性羰基中(图 2)。这些趋势中有代表性的 11 和 12 完全转化成 CD_3OD 中的半缩醛, 而其余的试剂表现出降低的半缩醛形成, 与预期的亲电子性相一致性: 11(100%)、12(100%)、8(75%)、6(48%)和 4(47%)。

当三氟甲基酮 12、13、14 和 15 以水溶液形式存在几乎完全为水合物时, 可认为这些化合物以可逆共价键酶-抑制剂半缩酮配合物连接酶, 如在弹性蛋白酶(Takahasi et al., J. Mol. Biol. 1988, 201, 423-428)和 α -糜蛋白酶(Liang et al., Biochemistry 1987, 26, 7603-7608)结构研究中以及一系列丝氨酸蛋白酶(Imperiali et al., Biochemistry 1986, 26, 3760-3767)连接到肽基三氟甲基酮中所示。虽然 α -羰基酰胺 6 和 7 在溶液中可能至少以一部分 SP^2 酮类存在, 但在蛋白酶活性位点上已观察到 α -羰基酰胺完全是 SP^3 。类似地, 在半胱氨酸蛋白酶木瓜蛋白酶活

性位点上醛连接成硫代半缩醛(Mackenzie et al., Biochemistry 1986, 25, 2293-2298; Schultz et al., FEBS Lett, 1975, 50, 47-49)。尽管 16、17 和 18 的结构类似于偕二醇,但它们较弱地抑制油酰胺水解酶则进一步证实这些抑制剂为(硫)-半缩酮连接而不是偕二醇(水合酮)的假设。我们注意到虽然有反应活性羰基的亲电子性似乎在支配这些抑制剂连接油酰胺水解酶的亲和力上起很大作用,但也可能存在其它因素,使这些化合物对油酰胺水解酶的亲和力受到影响。当醛 4 和 α -羰基酰胺 7 呈现同等的亲电子性时, α -羰基酰胺连接得更紧密,因此说明在酶和酰胺官能度之间有额外的互相作用,可能是附加的氢键。类似的是虽然三氟甲基酮有更高的亲电子性,但 α -酮酯 8 和三氟甲基酮 12 具有同等的连接紧密程度。

有趣的是,发现在类似油酰胺 C-2 的位置加入一个羰基的醛 5 比类似油酰胺 C-1 的位置加入醛羰基的 4 具有强 5 倍的连接紧密程度。也观察到 α -酮酯系列的抑制剂,其在油酰胺 C-2 加入亲电子性羰基与 C-1 的对比(8 对比 9)将增加 6 倍的连接亲和力。在 α -羰基酰胺或三氟甲基酮中未见这种差异。在这些抑制剂种类中,在油酰胺位置 C-2 键接亲电羰基与 C-1 的对比可得到同等效应的抑制剂。这说明对油酰胺 C-1 对比 C-2 的羰基位置而言,有微妙连接方式差异的可能性。

这些研究也揭示了油酰胺水解酶显示出约 10 倍优选于脂肪酸抑制剂,该抑制剂在 9 位含有顺式双键立体化学结构,类似于天然底物,该趋势在三氟甲酮系列中表现得最清楚,其中含有顺式双键的 12 比含有反式双键的 14 或饱和的衍生物 15 的连接紧密程度约大一个数量级。

大多数潜在的不可逆抑制剂(3、19-21)在上至溶解度的浓度下,于第一个 15 分钟孵化中,并未表现出可测出的抑制剂活性依赖时间的关系。氯甲基酮 3 已表现出与时间无关,但仍为中等抑制活性($K_i=0.7\mu\text{M}$),这与在认定为活性位点的半胱氨酸和酮之间形成可逆的(硫代)半缩酮(Bell et al., Advan. Phys. Org. Chem. 1966, 4, 1-29, 在此作参考)或可逆的、非共价键的酶-抑制剂配合物相一致。存在于邻位氯

取代基将增加羰基的亲电子性, 有利于亲核进攻。2-氯代油酸(20, $K_i=0.3\mu\text{M}$)也呈现出可逆的连接, 它的连接方式可能类似于油酸($K_i=6\mu\text{M}$)。重氮甲基酮 21 连接的更弱($K_i=18\mu\text{M}$)。

这样观察到的事实说明 1 可构成一类脂肪酸一级酰胺生物信号分子的原件, 其中功能的差异和选择性源于烷烃链的长度以及位置、立体化学和不饱和程度。

发现酶催化油酰胺水解的速率依赖于呈现活性位点 pK_a s 的 5.4、9.7 和 10.3 的 pH(图 7)。独特的 pH 速率的依赖分布图, 对 PMST 的油酰胺 K_m 和抑制性结果与 Maurelli 结果一致(Maurelli; et al., FEBS Lett. 1995, 377, 82-86; Mackenzi et al., Biochemistry 1986, 25, 2293-2298), 认为在此存在油酰胺水解酶(来自大鼠肝脏膜部分)及 anandamide 酰氨基水解酶(来自小鼠成神经细胞瘤细胞培养的膜部分)是相同的酶, 经过种间变异。然而, 缺乏顺序数据或纯化酶, 后者常常难于获得具有整合膜的蛋白, 这有待于证明。然而, 我们的结果相当不同于另一个关于 anandamide 酰氨基水解酶在 pH 6 和 8 呈现最大速率的活性的报道(Desarnaud et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 6030-6035)以致也有证据支持体内脂肪酸酰胺水解的许多酶模式。在 pH 10.0 测定抑制剂时, 在所述 pH 的油酰胺水解酶活性为我们测定条件下的最大值。

兴奋剂活性

本发明的另一方面涉及对油酰胺敏感动物给予有效剂量的油酰胺水解酶兴奋剂诱导睡眠的方法。优选兴奋剂是化合物 6。将化合物 6 溶解于矿物油中并经腹膜内注射将有效剂量注入大鼠的腹膜内。监视睡眠 4 小时。用标准的电生理学方法测定总睡眠时间。观察到随睡醒期减少而深度慢波睡眠(SWS)增加。SWS 增加约 30%并观察到睡醒减少的类似百分比。

抑制剂合成

通过已知的方法或改变已知方法从油酸制备许多的抑制剂(图9)。使从油酸衍生的酰氯[3 当量(COCl_2), CH_2Cl_2 , 25 °C, 3 小时]与羟胺或重氮甲烷反应得到 2 和 21 及使油酸与胍(1.1 当量, 2.2 当量 EDCI, 0.2 当量 DMAP, CH_2Cl_2 , 25 °C, 19 小时)直接缩合得到 22。用无水 1N HCl-EtOAc 处理 21(25 °C, 10 分钟, 92%)得到干净的 3。正如所述从油酸直接制备醛 4(Mancuso et al., J.Org. Chem. 1978, 43, 2480-2482)和一起的二甲基乙缩醛 16(Marx et al., J.Med. Chem. 1989, 32, 1319-1322)。衍生于油酸的烯醇物(LDA, THF)与 CCl_4 或 O_2 经阱(trap)吸收分别得到 20(Snider et al., J.Org. Chem. 1987, 52, 307-310)和 18(Konen et al., J. Org. Chem. 1975, 40, 3253-3258), 经过酰氯产生[3 当量(COCl_2), CH_2Cl_2 , 25 °C, 3 小时]和与 NH_4OH 水溶液缩合转化成相应的一级酰胺 19 和 17。

通过 α -羟基酰胺 17 (PDC)和 α -羟基酸 18 (Dess-Martin)氧化反应, 随后形成乙酯, 制备在类似于油酰胺 C-2 而不是 C-1 的位置带有亲电子性羰基的基于 C-18 油酸的 α -羰基酰胺 6 和 α -酮酯 8(图9)。直接从相应的十八碳羧酸、油酸和硬脂酸, 使用改良的 Dakin-West 反应 (Buchanan et al., Chem. Soc. Rev. 1988, 17, 91-109)制备类似于油酰胺 C-1 的位置带有亲电子性羰基的相应 α -酮酯 9 和 10(图9)。通过 Wolff 重排 21(cat. AgOB_2 , CH_3OH , 25 °C, 2.5 小时, 82%)提供甲酯 23 得到增加一个碳的油酸来制备类似长度的 α -羰基酰胺 7。根据对 6 详细方法(图9)水解甲酯, 随后转化 C-19 羧酸 24 成 α -羰基酰胺。

将相应的羧酸转化成有关的酰基氯并继之用 TFAC-吡啶处理的一步操作来制备三氟甲基酮抑制剂 12、13、14 和 15 包括在含有 9-顺烯的 C-18 液体的 C-2 位置上加入亲电子羰基的 13(Boivin et al., Tetrahedron Lett. 1992, 23, 1285-1288)(6 当量/8 当量, Et_2O , 0.75-2 小时, 54-79%)(图10)。 α -羟基酸 18[$\text{Pb}(\text{OAc})_4$, 1.1 当量, 25 °C, 苯, 50m.]的氧化裂解得到醛 5。再进一步氧化(NaClO_2)得到用于制备 13

的酸 27。

根据 Wasserman 的详细方法可以制备三羰基抑制剂 11(Wasserman et al., Tetrahedron Lett. 1992, 33, 6003-6006)。在双(三甲基硅烷基)乙酰胺(BSA)存在下, 用(三苯磷亚基)乙酸叔-丁酯[tert-butyl (triphenylphosphoranylidene) acetate] (29)处理衍生于十六烷酸的酰氯, 随后用臭氧氧化得到 11(图 11)。

已开发出作用于内源性诱导睡眠脂质(1, 顺-9-十八烯酰胺)水解的油酰胺水解酶的有效酶抑制剂, 提供了深入了解所述酶的机理及基础作用以开发控制和调节睡眠有关药剂。

合成方法(protocols)

总则

用 Perkin-Elmer 241 分光光度计 UV 测定旋光度, 用 Beckmann DU-70 分光计记录可见光谱。用 Bruker AMX-400 和 AMX-500 光谱仪在 400 和 500MHz 记录 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱。用 VG ZAB-ZSE 质谱仪在快速原子轰击(FAB)条件下记录高分辨质谱(HRMS)。用 70-230 目硅胶进行柱层析。用 Merck Art. 5744 (0.5mm)进行制备的 TLC。

化合物 1 的合成

通过 Cravatt 等(Science 1995, 268, 1506-1509)的方法制备化合物 1。

化合物 4 的合成

通过 Mancuso, A.J 等(J.Org, Chem. 1978, 43, 2480-2482)的方法制备化合物 4。

化合物 15 的合成

通过 Koutek, B 等(J.Biol. Chem. 1994, 269, 22937-22940)的方法制

备化合物 15。

化合物 16 的合成

通过 Maxx, M.H 等(J. Med. Chem. 1989, 32, 1319-1322)的方法制备化合物 16。

化合物 18 的合成

通过 Konen 等(J. Org. Chem. 1975, 40, 3253-3258)的方法制备化合物 18。

化合物 20 的合成

通过 Snider 等(J. Org. Chem. 1987, 52, 307-310)的方法制备化合物 20。

化合物 29 的合成

通过 Cooke 等(J. Org. Chem. 1982, 47, 4955-4963)的方法制备化合物 29。

N-羟基-9Z-十八烯酰胺(2)的合成

在 N₂ 下, 将油酸(250 μ L, 0.79mmol, 1 当量)溶解在无水 CH₂Cl₂ (4ml) 中并冷却至 0 °C。缓慢加入草酰氯(2M 在 CH₂Cl₂ 中、1.2ml、2.4mmol、3 当量)。温热溶液至 25 °C 并在暗处搅拌 3 小时。真空除去溶剂并冷却烧瓶至 0 °C。缓慢加入过量的 EtOAc 中的羟胺(使用前由 50%NaOH 溶液将盐酸盐提取到 EtOAc 中)。真空除去溶剂并层析(SiO₂, 1.5 x 13cm, 33-66% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 N-羟基-9Z-十八烯酰胺 2, 为白色固体(104mg, 45%): mp 61-62 °C; ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 5.28-5.20 (m, 2H), 2.00-1.91 (m, 6H), 1.50 (p, 2H, J=6.8 Hz), 1.22-1.19 (m, 20H), 0.80 (t, 3H, J=6.9 Hz); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 173.0,

130.9, 130.8, 33.8, 33.1, 30.9 (2), 30.6, 30.5, 30.4, 30.33 (2), 30.26, 30.19, 28.2, 26.8, 23.8, 14.5; IR (薄层) $\cdot V_{\max}$ 3276, 2999, 2917, 2849, 1665, 1621, 1463, 1428, 1117, 1067, 968 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 320.2577 ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}_2 + \text{Na}^+$ 所需值 320.2565)。

1-氯-10Z-十九烯-2-酮(3)的合成

在 25 $^{\circ}\text{C}$, 用 EtOAc(4.0ml, 4.0mmol, 3.5 当量)中的 1M HCl 处理样品 21 (347mg, 1.13mmol, 1 当量)10 分钟, 然后真空浓缩混合物。层析(SiO_2 , 3 x 13cm, 5% EtOAc-己烷)得到 3 (328mg, 92%)为澄清油状物:

^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 5.29-5.21 (m, 2H), 4.18 (s, 2H), 2.48 (t, 2H, $J=7.3$ Hz), 1.93 (m, 4H), 1.50 (p, 2H, $J=7.1$ Hz); 1.31-1.21 (m, 20H), 0.81 (t, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 204.5, 130.9, 130.8, 49.3, 40.3, 33.1, 30.9, 30.8, 30.6, 30.5, 30.40, 30.37, 30.19, 30.17 (2), 28.1, 24.6, 23.8, 14.5; IR (薄层) $\cdot V_{\max}$ 2925, 2854, 1722, 1463, 1403, 1260, 1101, 796, 723 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA) m/z 315.2468 ($\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{OCl} + \text{H}^+$ 所需值 315.2455)。

8Z-十七烯(5)的合成

在 25 $^{\circ}\text{C}$, N_2 下用 $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (197mg, 0.44mmol 1.1, 当量)处理在无水苯(1.6ml)中 18 (120mg, 0.40mmol, 1 当量)溶液并搅拌反应混合物 50 分钟。加入水(2ml)并用 EtOAc (6 x 2ml)提取水层。干燥(Na_2SO_4)有机层, 过滤并真空浓缩。层析(SiO_2 , 2 x 13cm, 1-5% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 5 (68mg, 67%), 为澄清油状物。光谱特征与文献描述的一致 (Doleshall et al., Tetrahedron Lett. 1977, 381-382; Kemp et al., J. Am. Oil Chem. Soc. 1975, 52, 300-302)。

2-氧代-9Z-十八烯酰胺(6)的合成

用 PDC (51mg, 0.13mmol, 5 当量)处理 Ar 下在无水 DMF(0.13ml)

中 17 (8mg, 0.027mmol, 1 当量)溶液并在 25 °C 搅拌反应混合物 1 小时。用水(2ml)处理粗品反应物并用 Et₂O (4 x 2ml)提取水层。干燥(Na₂SO₄)有机层, 过滤并真空浓缩。层析(SiO₂, 1 x 3cm, 20-66% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 6 (6mg, 70%)的白色固体及部分回收的起始原料(2mg, 26%)。对于 6: mp 85-86 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.79 (br, 1H), 5.47 (br, 1H), 5.37-5.28 (m, 2H), 2.89 (t, 2H, J=7.4 Hz), 2.02-1.93 (m, 4H), 1.59 (p, 2H, J=7.2 Hz), 1.39-1.24 (m, 20H), 0.86 (t, 3H, J=6.8 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 198.6, 161.9, 130.1, 129.6, 36.5, 31.9, 29.7, 29.5(2), 29.3(2), 28.9(2), 27.2, 27.1, 23.1, 22.7, 14.1; IR (薄层) · V_{max} 3391, 2915, 2850, 1716, 1668, 1470, 1400, 1108 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-CsI) m/z 428.1547 (C₁₈H₃₃NO₂+Ca⁺所需值 428.1566)。

2-氧-10Z-十九烯酰胺(7)的合成

在 25 °C 用 o-Ph(CO₂)I(OAc)₃ (174mg, 0.41mmol, 3 当量)处理无水 CH₂Cl₂ (2.8ml)中的 26 (42mg, 0.14mmol, 1 当量)溶液并搅拌反应混合物 1.5 小时。用 10% NaOH 水溶液(30ml)处理混合物并用 EtOAc (3 x 30ml)提取水层。干燥(Na₂SO₄)有机层, 过滤并真空浓缩。层析(SiO₂, 1.5 x 13cm, 10-20% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 7 (24mg, 57%)的白色固体: mp 69-70 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.82 (br, 1H), 5.68 (br, 1H), 5.36-5.28 (m, 2H), 2.88 (t, 2H, J=7.4 Hz), 1.98 (m, 4H), 1.58 (p, 2H, J=7.0 Hz), 1.28-1.24 (m, 20H), 0.85 (t, 3H, J=6.9 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 198.7, 162.0, 130.0, 129.7, 36.5, 31.9, 29.74, 29.66, 29.5, 29.3(2), 29.2, 29.1, 29.0, 27.2, 27.1, 23.1, 22.7, 14.1; IR (薄层) · V_{max} 3395, 3217, 2922, 2850, 1718, 1672, 1601, 1469, 1406, 1115 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 332.2570 (C₁₉H₃₅NO₂+Na⁺所需值 332.2565)。

2-氧-9Z-十八烯酸乙酯(8)的合成

在 25 °C, N₂ 下, 用 o-Ph(CO₂)I(OAc)₃(287mg, 0.68mmol, 2 当量)

处理在无水 CH_2Cl_2 (1.1ml) 中的 18 (102mg, 0.34mmol, 1 当量) 溶液并搅拌 1 小时。用 10% NaOH 水溶液 (20ml) 处理反应混合物并用 EtOAc (3 x 20ml) 提取。干燥 (Na_2SO_4) 有机层, 过滤并真空浓缩。将残留物溶解在无水 CH_2Cl_2 (1.5ml) 中并在 N_2 下冷至 0°C 。缓慢加入草酰氯 (2M 在 CH_2Cl_2 中, 0.5ml, 1.0mmol, 3 当量)。温热反应混合物至 25°C 并在暗处搅拌 3 小时, 之后用真空除去溶剂并加入无水 EtOH (5ml)。层析 (SiO_2 , 2 x 10cm, 1-5% EtOAc-己烷梯度洗脱) 得到 8 (36mg, 33%) 的澄清油状物: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.37-5.27 (m, 2H), 4.29 (q, 2H, $J=7.2$ Hz), 2.81 (t, 2H, $J=7.3$ Hz), 1.98 (m, 4H), 1.61 (p, 2H, $J=7.1$ Hz), 1.36-1.24 (m, 21H), 0.86 (t, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 194.8, 161.3, 130.1, 129.6, 62.4, 39.3, 31.9, 29.8, 29.5(2), 29.3(2), 28.92, 28.56, 27.2, 27.1, 22.9, 22.7, 14.1, 14.0; IR (薄层) $\cdot V_{\text{max}}$ 2925, 2854, 1729, 1462, 1260, 1056 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-CsI) m/z 457.1706 ($\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_3 + \text{Cs}^+$ 所需值 457.1719)。

2-氧代-10Z-十九烯酸乙酯(9)的合成

在 25°C , Ar 下, 用 DMAP (4mg, 0.03mmol, 0.1 当量)、无水吡啶 (77 μl , 0.95mmol, 3 当量) 和草酰氯乙酯 (71 μl , 0.64mmol, 2 当量) 处理无水 THF (0.2ml) 中的油酸 (100 μl , 0.32mmol, 1 当量) 溶液。搅拌反应混合物 24 小时, 之后加入另一份 DMAP (46mg, 0.37mmol, 1.1 当量), 吡啶 (80 μl , 0.95mmol, 3 当量), 草酰氯乙酯 (80 μl , 0.64mmol, 2 当量) 和 THF (0.5ml)。在 25°C 再搅拌反应混合物 24 小时, 然后温热至 40°C 48 小时, 之后真空浓缩溶剂。层析 (SiO_2 , 2 x 13cm, 0-10% EtOAc-己烷) 得到 9 (46mg, 43%) 的澄清油状物; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.36-5.28 (m, 2H), 4.29 (q, 2H, $J=7.1$ Hz), 2.80 (t, 2H, $J=7.3$ Hz), 1.99 (m, 4H), 1.60 (m, 2H), 1.36-1.20 (m, 23H), 0.85 (t, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 194.8, 161.2, 130.0, 129.7, 62.4, 39.3, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3(2), 29.2, 29.0, 28.9, 27.2, 27.1, 22.9, 22.7, 14.1, 14.0; IR

(薄层) · $V_{\max}$ 2925, 2854, 1730, 1465, 1260, 1059 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-CsI) m/z 471.1875 ($\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_3 + \text{Cs}^+$ 所需值 471.1888).

2-氧-十九烯酸乙酯(10)的合成

在 25 °C, Ar 下, 用 DMAP(4mg, 0.03mmol, 0.1 当量)、无水吡啶(85 μl , 1.1mmol, 3 当量)和草酰氯乙酯(79 μl , 0.71mmol, 2 当量)处理无水 THF(0.2ml)中的硬脂酸(101mg, 0.36mmol, 1 当量)溶液。搅拌反应混合物 24 小时, 之后真空浓缩溶剂。层析(SiO_2 , 2 x 13cm, 5-10% EtOAc-己烷)得到 10 (35mg, 30%), 为白色固体物: mp 43-44 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4.29 (q, 2H, $J=7.2$ Hz), 2.80 (t, 2H, $J=7.4$ Hz), 1.60 (p, 2H, $J=7.2$ Hz), 1.35 (t, 3H, $J=7.1$ Hz), 1.33-1.23 (m, 28H), 0.86 (t, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 194.8, 161.2, 62.4, 39.3, 31.9, 29.7 (7), 29.6, 29.40, 29.35, 29.28, 28.9, 23.0, 22.7, 14.1, 14.0; IR (薄层) · $V_{\max}$ 2916, 2848, 1733, 1472, 1463, 723 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 363.2885 ($\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_3 + \text{Na}^+$ 所需值 363.2875).

3-氧-2,2-二羟基十八烷酸叔-丁酯(11)的合成

用 Oxone (249mg, 0.41mmol, 1.6 当量)处理 THF- H_2O (2:1; 3ml)中的 28(161mg, 0.26mmol, 1 当量)的溶液并在 25 °C 搅拌反应混合物 7 小时。加水(30ml)并用 EtOAc (3 x 30ml)提取水层。合并有机层, 干燥(Na_2SO_4), 过滤并真空浓缩。层析(SiO_2 , 2 x 15cm, 10-20% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 11 (65mg, 64%)的白色固体物: mp 49-51 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 6.96 (s, 2H), 2.17 (t, 2H, $J=7.4$ Hz), 1.49-1.38 (m, 11H), 1.22 (s, 24H), 0.84 (t, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 205.6, 174.5, 94.2, 81.5, 35.6, 33.6, 31.3, 29.0(3), 28.9, 28.8, 28.72, 28.70, 28.53, 28.46, 27.4(2), 24.5, 22.9, 22.1, 13.9; IR (薄层) · $V_{\max}$ 3440, 2914, 2849, 1728, 1471, 1371, 1260, 1122, 831, 718 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 409.2925 ($\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_5 + \text{Na}^+$ 所需值 409.2930).

1,1,1-三氟-10Z-十九烯-2-酮(12)的合成

在N₂下将油酸(100μl, 0.32mmol, 1当量)溶解于无水CH₂Cl₂ (1.5ml)中并冷却至0℃。缓慢加入草酰氯(CH₂Cl₂中2M, 0.47ml, 0.94mmol, 3当量)。将反应混合物温热至25℃并在暗处搅拌3小时, 之后真空除去溶剂。在25℃加入无水Et₂O (2.2ml)、三氟乙酸酐(270μl, 1.9mmol, 6当量)和吡啶(0.2ml, 2.5mmol, 8当量)并搅拌溶液45分钟, 之后被冷却至0℃。加入H₂O(30ml)骤停反应并用CH₂Cl₂(3 x 30ml)提取水层。干燥(Na₂SO₄)有机层, 过滤并真空浓缩。层析(SiO₂, 1.5 x 13cm, 5% EtOAc-己烷中含1%Et₃N)得到8 (75mg, 71%)的澄清油状物: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.37-5.28 (m, 2H), 2.68 (t, 2H, J=7.3 Hz), 1.98 (m, 4H), 1.65 (p, 2H, J=7.1 Hz), 1.29-1.25 (m, 20H), 0.86 (t, 3H, J=6.9 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 191.6 (d, J=17 Hz), 130.0, 129.5, 115.6 (q, J=145 Hz), 36.3, 31.9, 29.8, 29.6, 29.5, 29.3(2), 29.1, 29.0, 28.7, 27.2, 27.1, 22.7, 22.4, 14.1; IR (薄层) · V_{max} 2926, 2855, 1766, 1467, 1404, 1261, 1208, 1153, 1039, 802, 709 cm⁻¹; ESIMS m/z (M⁺) 334。

1,1,1-三氟-9Z-十八烯-2-酮(13)的合成

在N₂下, 将无水CH₂Cl₂ (1.8ml)中的27 (101mg, 0.38mmol, 1当量)的溶液冷却至0℃并用草酰氯(CH₂Cl₂中2M, 0.56ml, 1.1mmol, 3当量)滴加处理。将反应混合物温热至25℃并搅拌3小时, 之后真空除去溶剂。在25℃加入无水Et₂O (2.5ml), 三氟乙酸酐(0.32ml, 2.3mmol, 6当量)和无水吡啶(0.12ml, 1.5mmol, 4当量)并搅拌溶液2小时, 之后被冷至0℃。用水(30ml)处理反应混合物并用EtOAc (3 x 30ml)提取水层。干燥(Na₂SO₄)有机层, 过滤并真空浓缩。层析(SiO₂, 2x 15cm, 10% EtOAc-己烷中含1%Et₃N)得到13 (65.5mg, 54%)的澄清油状物: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.39-5.26 (m, 2H), 2.69 (t, 2H, J=7.2 Hz), 1.99 (m, 4H), 1.66 (m, 2H), 1.35-1.24 (m, 18H), 0.86 (t, 3H, J=6.9 Hz); ¹³C

NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 191.4, 130.5, 129.1, 115.6 (q, J=146 Hz), 36.3, 31.9, 29.7, 29.5, 29.3(3), 29.2, 28.3, 27.2, 26.8, 22.7, 22.3, 14.1; IR (薄层) $\cdot V_{\max}$ 2926, 2855, 1765, 1462, 1209, 1154, 1024 cm⁻¹; ESIMS m/z (M+Na⁺) 343.

1,1,1-三氟-10E-十九烯-2-酮(14)的合成

在 N₂ 下, 将无水 CH₂Cl₂(3.5ml)中的反油酸(204mg, 0.72mmol, 1 当量)的溶液冷却至 0 °C 并用草酰氯(CH₂Cl₂ 中 2M, 1.1ml, 2.2mmol, 3 当量)处理。温热反应混合物至 25 °C, 搅拌 3 小时, 之后真空除去溶剂。在 25 °C 加入无水 Et₂O (5ml), 三氟乙酸酐(0.6ml, 4.3mmol, 6 当量)和无水吡啶(0.23ml, 2.8mmol, 4 当量)并搅拌溶液 1 小时, 之后冷却至 0 °C。用 H₂O (30ml)处理混合物并用 EtOAc (3 × 30ml)提取水层。干燥 (Na₂SO₄)有机层, 过滤并真空浓缩。层析(SiO₂, 2x 13cm, 5-10% EtOAc-己烷中含 1%Et₃N 梯度洗脱)得到 14 (190mg, 79%)的澄清油状物: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.41-5.31 (m, 2H), 2.68 (t, 2H, J=7.3 Hz), 1.94 (m, 4H), 1.64 (p, 2H, J=6.9 Hz), 1.28-1.24 (m, 2OH), 0.86 (t, 3H, J=6.6 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 191.5 (q, J=35 Hz), 130.6, 130.1, 115.6 (q, J=291 Hz), 36.3, 32.6, 32.5, 31.9, 29.7, 29.5(2), 29.3, 29.2, 29.1, 28.8, 28.7, 22.7, 22.4, 14.0; IR (薄层) $\cdot V_{\max}$ 2925, 2855, 1765, 1466, 1208, 1152, 967, 709 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 334.2475 (C₁₉H₃₃OF₃-H⁺ 所需值 334.2484)。

2-羟基-9Z-十八烯酰胺(17)的合成

在 N₂ 下, 将无水 CH₂Cl₂ (0.7ml)中的 18(52mg, 0.18mmol, 1 当量)的溶液冷却至 0 °C 并用草酰氯(CH₂Cl₂ 中 2M, 0.22ml, 0.44mmol, 3 当量)处理。使溶液温热至 25 °C 并在暗处搅拌 3 小时, 真空除去溶剂并将酰基氯冷至 0 °C。用过量浓 NH₄OH 水溶液处理样品。层析(SiO₂, 1.5 x 10cm, 66-100% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 17 (31mg, 60%)的白色固体

物: mp 103-104 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 6.37 (br, 1H), 5.64 (br, 1H), 5.36-5.28 (m, 2H), 4.12 (t, 1H, $J=3.8$ Hz), 2.66 (br, 1H), 2.02-1.94 (m, 4H), 1.86-1.77 (m, 1H), 1.68-1.59 (m, 1H), 1.43-1.24 (m, 20H), 0.86 (t, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 176.6, 130.0, 129.7, 71.9, 34.8, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3(2), 29.2, 29.1, 27.2, 27.1, 24.9, 22.7, 14.1; IR (薄层) $\cdot V_{\max}$ 3381, 3289, 2917, 2848, 1637, 1461, 1417, 1331, 1074 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA) m/z 298.2760 ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}_2 + \text{H}^+$ 所需值 298.2746)。

2-氯-9Z-十八烯酰胺(19)的合成

在 N_2 下, 将无水 CH_2Cl_2 (0.7ml) 中的 20 (48mg, 0.15mmol, 1 当量) 的溶液冷却至 0 °C 并用草酰氯 (CH_2Cl_2 中 2M, 0.23ml, 0.46mmol, 3 当量) 处理。使溶液温热至 25 °C 并在暗处搅拌 3 小时, 之后真空除去溶剂。冷却粗品酰氯至 0 °C 并用过量浓 NH_4OH 水溶液处理。层析 (SiO_2 , 1.5 x 10cm, 20-33% EtOAc-己烷梯度洗脱) 得到 19 (37mg, 78%) 的黄色固体物: mp 49-50 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 6.49 (br, 1H), 5.92 (br, 1H), 5.36-5.27 (m, 2H), 4.29 (m, 1H), 2.12-1.86 (m, 6H), 1.53-1.16 (m, 20H), 0.85 (t, 3H, $J=6.9$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.9, 130.1, 129.6, 60.6, 35.5, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3(2), 29.0, 28.7, 27.2, 27.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (薄层) $\cdot V_{\max}$ 3383, 3183, 3001, 2921, 2850, 1657, 1465, 1412, 1240, 1100 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA) m/z 316.2415 ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{NOCl} + \text{H}^+$ 所需值 316.2407)。

1-重氮-10Z-十九烯-2-酮(21)的合成

在 N_2 下, 将油酸 (1.0ml, 3.2mmol, 1 当量) 溶解于无水 CH_2Cl_2 (15ml) 中。冷却溶液至 0 °C 并加入草酰氯 (CH_2Cl_2 中 2M, 4.8ml, 9.6mmol, 3 当量)。温热反应混合物至 25 °C 并在暗处搅拌 3 小时。真空除去溶剂, 之后用无磨砂玻璃接口将酰氯转移至烧瓶中并冷却至 0 °C。加入过量的在 Et_2O 中的重氮甲烷 (从 50% KOH 水溶液中的 N-亚硝基甲脒制得并

用 KOH 片干燥)。在 0 °C 搅拌反应混合物 1 小时, 然后温热至 25 °C 过夜。用 EtOAc (60ml) 稀释溶液和用饱和 NaHCO₃ 水溶液(60ml)和饱和 NaCl 水溶液(60ml)洗涤。干燥(Na₂SO₄)有机层, 过滤和真空浓缩。层析(SiO₂, 4.0 x 16cm, 5-10% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 21 (0.89g, 92%) 的黄色油状物: ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 5.72 (br, 1H), 5.29-5.21 (m, 2H), 2.23 (m, 2H), 1.94 (m, 4H), 1.50 (p, 2H, J=6.9 Hz), 1.23-1.20 (m, 20H), 0.81 (t, 3H, J=6.9 Hz); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 198.8, 130.9, 130.8, 41.6, 33.1, 30.9, 30.8(2), 30.6, 30.5, 30.4(2), 30.3, 30.2, 28.1(2), 26.5, 23.8, 14.5; IR(薄膜) V_{max} 3083, 2924, 2854, 2102, 1644, 1463, 1372, 1144 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/z 307.2738 (C₁₉H₃₄N₂O+H⁺所需值 307.2749)。

N-氨基-9Z-十八烯酰胺(22)的合成

在 N₂ 下, 0 °C, 用 EDCI (267mg, 0.90mmol, 1.1 当量)和 DMAP(20mg, 0.16mmol, 0.21 当量)处理无水 CH₂Cl₂ (12ml)中的油酸 (250μl, 0.79mmol, 1 当量)和胍一水合物(42μl, 0.87mmol, 1.1 当量)的溶液, 之后在 25 °C 搅拌反应混合物 7 小时。加入另一份 EDCI (269mg, 0.91mmol, 1.1 当量)并在 25 °C 再搅拌反应物 12 小时, 之后真空除去溶剂。层析(SiO₂, 3 x 18cm, 20-100% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 22(123mg, 52%)的白色固体物: mp 95-96 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.94 (s, 1H), 5.36-5.27 (m, 2H), 2.23 (t, 2H, J=7.6 Hz), 1.98 (m, 4H), 1.63 (p, 2H, J=7.0 Hz), 1.27-1.24 (m, 20H), 0.86 (t, 3H, J=6.7 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 169.7, 130.0, 129.7, 34.1, 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.3(2), 29.23, 29.19, 29.12, 27.21, 27.17, 25.4, 22.7, 14.1; IR (薄膜)V_{max} 3201, 2917, 2848, 1595, 1410, 1184, 1090, 927, 717, 671 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 297.2916 (C₁₈H₃₆N₂O+H⁺所需值 297.2906)。

10Z-十九烯酸甲酯(23)的合成

在 N_2 下, 将苯甲酸银(21.8mg, 0.095mmol, 0.1 当量)和无水 Et_3N (0.19ml, 1.36mmol, 1.4 当量)溶液滴加到 1-重氮基-10Z-十九烯-2-酮(21, 298mg, 0.97mmol, 1 当量)的无水甲醇(1.5ml)的溶液中并在 25 °C 搅拌反应物 2.5 小时。用 $EtOAc$ (30ml)稀释反应混合物并用 1N HCl 水溶液(30ml)和饱和 $NaHCO_3$ 水溶液(30ml)洗涤。干燥(Na_2SO_4)有机层, 过滤并真空浓缩。层析(SiO_2 , 3 x 15cm, 1-5% $EtOAc$ -己烷梯度洗脱)得到 23(246mg, 82%)的澄清油状物: 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 5.35-5.27 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.27 (t, 2H, $J=7.6$ Hz), 1.97 (m, 4H), 1.59 (p, 2H, $J=7.3$ Hz), 1.26-1.24 (m, 22H), 0.85 (t, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 174.3, 129.9, 129.8, 51.4, 34.1, 31.9, 29.74, 29.70, 29.5, 29.3(2), 29.2(2), 29.1(2), 27.2(2), 24.9, 22.6, 14.1; IR (薄膜) V_{max} 2925, 2854, 1744, 1465, 1436, 719 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 311.2969($C_{20}H_{38}O_2+H^+$ 所需值 311.2950)。

10Z-十九烯酸(24)的合成

在 25 °C, 用 $LiOH \cdot H_2O$ (250mg, 5.96mmol, 3 当量)处理 THF- CH_3OH-H_2O (3:1:1; 7ml)中的 23(620mg, 2.0mmol, 1 当量)的溶液并搅拌反应混合液 3 小时。加入 1N HCl 水溶液(60ml)酸化反应混合物并用 $EtOAc$ (2 x 60ml)提取水层(2 x 60ml)。干燥有机层(Na_2SO_4), 过滤并真空干燥。层析(SiO_2 , 4 x 15cm, 10-100% $EtOAc$ -己烷梯度洗脱)得到 24 (510mg, 86%)浅黄色油状物: 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 5.37-5.28 (m, 2H), 2.32 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 1.98 (m, 4H), 1.61 (p, 2H, $J=7.3$ Hz), 1.27-1.25 (m, 22H), 0.86 (t, 3H, $J=6.9$ Hz); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 180.4, 130.0, 129.8, 34.1, 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.3(2), 29.2(2), 29.0(2), 27.20, 27.17, 24.6, 22.7, 14.1; IR (薄膜) V_{max} 2925, 2854, 1711, 1466, 1412, 1260, 1093, 1019, 938, 801, 722 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 319.2605 ($C_{19}H_{36}O_2+Na^+$ 所需值 319.2613)。另外, 通过 Doleshall. G. 的

方法可制备本化合物(Tetrahedron. Lett. 1980, 21, 4183-4186)。

2-羟基-10Z-十九烯酸(25)的合成

在 Ar 下, 在 -55 °C 从无水 THF(2ml) 中的二异丙胺(0.4ml, 2.9mmol, 4.5 当量)和正-Buli (2.3M, 1.1ml, 2.5mmol, 4 当量)制备 LDA 的新鲜溶液。在 -55 °C 将 THF(0.5ml) 中的 10Z-十九烯酸(24, 188mg, 0.63mmol, 1 当量)和无水 HMPA (0.11ml, 0.63mmol, 1 当量)的溶液滴加到 LDA 溶液中。逐渐温热反应混合物至 25 °C 并在 50 °C 温热 30 分钟。再将反应混合物冷至 25 °C 之后, 向溶液吹入 O₂ 20 分钟。用 1N HCl 水溶液(30ml)处理混合物并用 EtOAc(3 × 30ml)提取水层。干燥(Na₂SO₄)有机层, 过滤并真空浓缩。层析(SiO₂, 2 × 13cm, 50-100% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 25 (96mg, 49%)的白色固体物: mp 53-54 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.36-5.28(m, 2H), 4.24 (dd, 1H, J=7.5 Hz, 7.6 Hz), 1.98 (m, 4H), 1.83 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.47-1.24 (m, 22H), 0.86 (t, 3H, J=6.8 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 179.8, 130.0, 129.7, 70.2, 34.0, 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.33, 29.31(2), 29.22, 29.19, 27.20, 27.16, 24.8, 22.7, 14.1; IR (薄层) · V_{max} 3512, 2917, 2849, 1704, 1467, 1293, 1274, 1251, 1212, 1143, 1079, 1041, 918, 726, 648 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 335.2574 (C₁₉H₃₅O₃+Na⁺所需值 335.2562)。

2-羟基-10Z-十九烯酰胺(26)的合成

在 N₂ 下, 将无水 CH₂Cl₂ (1.5ml) 中的 25(71mg, 0.23mmol, 1 当量)溶液冷至 0 °C 并用草酰氯(CH₂Cl₂ 中 2M, 0.34ml, 0.68mmol, 3 当量)滴加处理。温热反应混合物至 25 °C 并在暗处搅拌 3 小时。真空除去溶剂, 冷却残留物至 0 °C, 并加入过量的浓 NH₄OH 水溶液(2ml)。层析(SiO₂, 1.5 × 13cm, 50-66% EtOAc-己烷梯度洗脱)得到 26 (53mg, 75%)的白色固体物: mp 101-102 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.36 (br, 1H), 5.65 (br, 1H), 5.36-5.28 (m, 2H), 4.12 (dd, 1H, J=7.9 Hz, 8.0 Hz), 1.99 (m,

4H), 1.81 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.43-1.24 (m, 22H), 0.86 (t, 3H, $J=6.9$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 176.6, 130.0, 129.8, 71.9, 34.8, 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3(3), 29.2, 27.20, 27.16, 24.9, 22.7, 14.1; IR (薄层) $\cdot V_{\max}$ 3383, 3290, 2917, 2849, 1644, 1467, 1426, 1331, 1075 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-NaI) m/z 334.2731 ($\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{NO}_2 + \text{Na}^+$ 所需值 334.2722).

8Z-十七烯酸(27)的合成

在 $25\text{ }^\circ\text{C}$, N_2 下, 用去离子 H_2O (2.5ml) 中的 NaClO_2 (80%, 208mg, 2.3mmol, 9 当量) 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (250mg, 1.8mmol, 7 当量) 溶液滴加处理 5 (66mg, 0.26mmol, 1 当量) 和 2-甲基-2-丁烯 (1.6ml, 15.1mmol, 58 当量) 的 tBuOH (6.5ml) 的溶液。使反应混合物再搅拌 15 分钟, 之后真空浓缩。用水 (30ml) 处理残留物并用 EtOAc (3 x 30ml) 提取水层。干燥 (Na_2SO_4) 有机层。过滤并真空浓缩。层析 (SiO_2 , 2 x 13cm, 10-20% EtOAc -己烷梯度洗脱) 得到 27 (66mg, 95%) 的澄清油状物。光谱特征与文献描述一致 (Miralles et al., *Lipids* 1995, 30, 459-466; Couderc et al., *Lipids* 1995, 30, 691-699)。

3-氧代-2-(三苯磷亚基)十八烷酸酯(28)

在 N_2 下, 将无水 CH_2Cl_2 (2ml) 中的十六烷酸 (103mg, 0.40mmol, 1 当量) 的溶液冷却至 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 并用草酰氯 (CH_2Cl_2 中 2M, 0.6ml, 1.2mmol, 3 当量) 处理。在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 搅拌溶液 3 小时, 之后真空除去溶剂。在 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 用苯 (3ml) 中的粗品酰氯溶液滴加处理在无水苯 (3ml) 中的 (三苯磷亚基) 乙酸叔-丁酯 (Cooke et al., *J. Org. Chem.* 1982, 47, 4955-4963) 29, 167 mg, 0.44mmol, 1.1 当量) 和双(三甲基甲硅烷基)乙酰胺 (195 μl , 0.79mmol, 2 当量) 的溶液。温热反应混合物至 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 并搅拌 1.5 小时, 之后真空除去溶剂。层析 (SiO_2 , 2 x 15cm, 10-20% EtOAc -己烷梯度洗脱) 得到 28 (193mg, 78%) 的澄清油状物: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.67-7.61 (m,

6H), 7.49-7.37 (m, 9H), 2.82 (t, 2H, $J=7.6$ Hz), 1.55 (p, 2H, $J=7.0$ Hz), 1.23-1.21 (m, 24H), 1.04 (s, 9H), 0.86 (t, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 197.7 (d, $J=6$ Hz), 167.3 (d, $J=13$ Hz), 132.9 (d, 6C, $J=9$ Hz), 131.3(3), 128.4 (d, 6C, $J=12$ Hz), 127.4 (d, 3C, $J=96$ Hz), 78.4, 71.2 (d, $J=114$ Hz), 40.0, 31.9, 29.70(8), 29.66, 29.3, 28.1(3), 25.9, 22.7, 14.1; IR (薄层) $\cdot V_{\max}$ 3426, 2923, 2852, 1665, 1551, 1438, 1363, 1302, 1173, 1106, 1081, 746, 690 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-CsI) m/z 615.3959 ($\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{O}_3\text{P}+\text{H}^+$ 所需值 615.3967)。

连接常数的测定

使用离子选择氨电极(ATI/Orion)直接测定随反应产物形成的氨来评价这些化合物对油酰胺水解的效力。通过 Dixon 方法测定除油酸外的所有 K_i s。(使用公式 $K_i = -X_{\text{int}}/[1+[S]/K_m]$ 在恒定底物浓度下将 $[I]$ 的加权线性近似对 $1/\text{速率}$ 曲线图的 X 截距可转化成 K_i)。从速率的非线性加权最小二乘法近似对底物和抑制剂浓度的关系曲线可得到油酸 K_i 。在调至 pH 10.0 的 10ml 50mM CAPS 缓冲液(Sigma)中恒速搅拌进行测定, 酶催化油酰胺水解速率的 pH 是最大的值。在涉及 Dixon 分析的所有情况中底物浓度是 $100\mu\text{M}$ 。在底物浓度范围 10- $100\mu\text{M}$ 测定油酸 K_i 。在加入 50mM CAPS 缓冲液之前将底物和抑制剂溶解于 DMSO 中, 产生 1.67%的最终 DMSO 分析浓度。上至 20% DMSO 浓度仅表现出较小的对速率的作用。在无抑制剂存在下将酶浓度调节至产生大约 $0.2\mu\text{M}/\text{min}$ 速率, 用 7-10 分钟观察产生氨的速率。

所使用的酶为来自小鼠肝脏的粗品, 非均匀、含生物膜的制剂。煮沸酶 5 分钟使其无活性。在溶解度限度内, 所有抑制剂在大于 $100K_i$ 浓度时均获得 100%抑制活性。在无加入的油酰胺存在下, 未发现可测得的活性。同样, 在这样 pH 无酶存在下, 从 $100\mu\text{M}$ 油酰胺仅测得非常小的产生氨速率。这说明在粗品酶制剂中观察到催化油酰胺水解活性是从单一蛋白引起。

从4个独立分析中得到平均 K_m 值作为测定油酰胺的 K_m 。在 Lineweaver-Burke 图中从加权线性近似适合数据中得到各自独立的 K_m 值。通过非线性方法测定油酸抑制的结果可得到第5个同时产生的 K_m 。用标准 Michaelis-Menten 动力学方程处理适合的速率数据(在水情况下, 当第二底物浓度为恒定时, 将 Ping Pong BiBi 动力学速率方程简化成简单的 Michaelis-Menten-like 方程)。在 30-100 μ M 范围内, 反应速率基本具有取决于底物浓度的零序。

因为我们还不能够测定存在于酶样品中油酰胺水解酶的数量, 所以我们在此不能取 V_{max} 值。我们的抑制数据提示酶浓度应低于 2mM, 因为较高酶浓度可引起溶液中抑制剂的明显消耗, 在 $[E] \gg K_i$ 的限度情况下, 引起明显测定的 K_i 值为 $[E]/2$ 。因为 1nM 是测定的最低抑制恒量。所以 $[E] < 2nM$ 。

对 K_{is} 带来的误差值, 应考虑由数据的误差处理扩散(propagation)衍生的拟合良好度评价。它们不必是再现性的标志。然而, 在重复实验的情况下, 正如在此给出明显误差值所预计的, 其结果是在统计范围内。

pH-速率相关性

将粗品酶加到有适当 pH, 含 5%DMSO 的 20ml 缓冲液中的 200 μ M 油酰胺(约为溶解度极限)的溶液中。(高达 20%DMSO 浓度仅对酶速度具有最小的作用)。使用 50mM 柠檬酸钠/Bis-tris 缓冲液作为 pH 4-9 范围的数据取值点。使用 50mM Bis-tris/CAPS 作为 8-11 范围的数据取值点。在 pH 12, 设定溶液为自身缓冲液。在定期间隔中, 除去 1ml 等份, 用 9ml pH 14 缓冲液稀释。用对照已知标准校定的连接 720A 计(Orion)的离子选择氨电极(Orion)测试氨浓度。从使用标准最小二乘法相应曲线的线性部分得到速率。这些速率对 pH 再作图并采用加权非线性最小二乘法(Connors, K. A., Binding Constants; Wiley: New York. 1987, pp 385-395)与图 12 的方程拟合(Fersht, A., Enzyme Structure and

Mechanism; W.H.Freeman and Co.: New York. 1985, pp 157 Connors, K.A., Binding Constants; Wiley: New York. 1987, pp 385-395).

在两个 pKa 为紧密靠拢的情况中(小于 1 个单位), 在溶液中存在充分混合的各种酶。在这样的条件下, 实际上未观察到那种酶在理论上表现出速率最大值, 因为最有活性的酶类也达不到这样高的丰富程度。正是这个原因用简单图解方法测定 pKa, 可以与在此给出的 9.7 和 10.3 pH 单位值不一致。

大规模(12-14 只大鼠肝脏)肝质膜的制备

将 12-14 只大鼠肝切成片, 置于 300ml 1mM NaHCO₃ 中。渗滤被切成小片的肝溶液并用另外的 300ml 的 1mM NaHCO₃ 洗涤。除去任何明显连接的组织。将肝转移至新鲜的 800ml 的 1mM NaHCO₃ 中, 搅拌, 然后以 400ml 等份转移至混和器中, 合并混和的肝液, 并经 8 层干酪布(cheesecloth)过滤。用 1mM NaHCO₃ 稀释至 1.0L 并在 4 °C 6000 rpm 离心 20 分钟(Beckman JA-17 rotor)。倾出上清液, 在 1mM NaHCO₃ 重新悬浮片状物, 合并并用 dounce 匀浆器匀浆。重复离心, 倾折和再悬浮/匀浆, 得到最终的约 90ml 体积。将匀浆物加到 2 体积量的 67% 蔗糖中, 充分混合, 并转移到超离心相配管中。用 30% 蔗糖加到管顶部, 在 27000 旋转 2 小时(SW-28 rotor)。从蔗糖梯度中除去中间黄色带, 合并, 在 1mM NaHCO₃ 中重新悬浮并用 dounce 匀浆器匀浆。在 4 °C, 于 17000 rpm 进一步离心样品 45 分钟(JA-17 rotor)。除去上清液, 在 100mM Na₂CO₃ 中再悬浮片状物, 用 dounce 器匀浆并放置冰上 30 分钟。在 27000 rpm 离心溶液 1 小时(SW-28 rotor), 倾出上清液并在 15ml 50mM Tris HCl, pH 7.4(含有 1mM EDTA)中再悬浮片状物, 用 dounce 匀浆器匀浆。将该原料分成若干等份, 在 -78 °C 冷冻备用。每份酶样品仅冷冻一次。

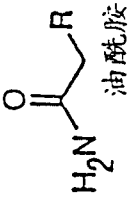
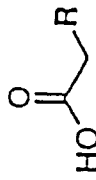
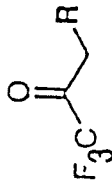
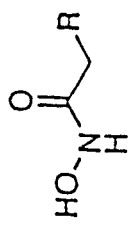
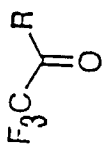
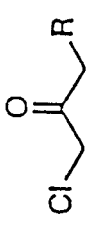
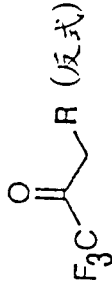
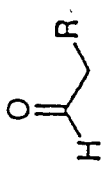
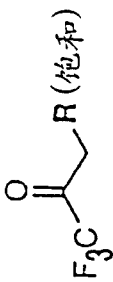
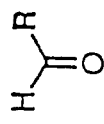
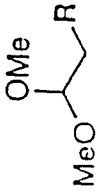
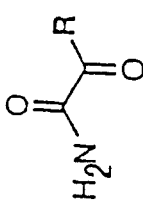
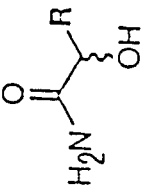
1	 油酰胺	$K_m = 5 \pm 2 \mu M$	$R = \text{---} \text{C}_{16}\text{H}_{32}$	
#	抑制剂	$K_{i,app} (\mu M)$	#	抑制剂 $K_{i,app} (\mu M)$
油酸		6.0	12	 0.0012 ± 0.0004
2		5 ± 1	13	 0.002 ± 0.0006
3		0.7 ± 0.3	14	 0.009 ± 0.003
4		0.19 ± 0.06	15	 0.023 ± 0.007
5		0.04 ± 0.01	16	 > 300
6		0.016 ± 0.005	17	 > 100

图 1A

7		0.017 ± 0.006	18		5 ± 2
8		0.0014 ± 0.0005	19		> 100
9		0.009 ± 0.003	20		0.3 ± 0.1
10		0.012 ± 0.003	21		13 ± 4
11		0.150 ± 0.040	22		不溶

图 1B

Agent	¹ H or ¹³ C NMR 信号	CDCl ₃ (δ)	CD ₃ OD (δ)	丙酮-d ₆ (δ)	丙酮-d ₆ + D ₂ O (δ) ^a
4	¹ H (α-CH ₂)	2.40	2.42, 1.56	2.41	未变
	¹ H (CHO)	9.73	9.69 (53%), 4.46 (47%)	9.71	未变
	¹³ C (C=O)	202.8	204.7, 99.9	202.5	未变
6	¹ H (α-CH ₂)	2.89	2.81 (52%), 1.75 (48%)	2.83	未变
	¹³ C (¹ C=O)	161.9	165.2, 176.2	163.4	未变
	¹³ C (² C=O)	198.6	200.0, 100.1	200.0	未变
8	¹ H (α-CH ₂)	2.81	2.81 (25%), 1.78 (75%)	2.79	未变
	¹³ C (¹ C=O)	161.3	162.5, 172.4	162.1	未变
	¹³ C (² C=O)	194.8	195.8, 100.0	195.1	未变
12	¹ H (α-CH ₂)	2.68	— (0%), 1.65 (100%)	2.87 (91%), 1.75 (9%)	2.82 (9%), 1.60 (91%)
	¹³ C (C=O)	191.6	97.3	192.3, 94.2	93.8
	¹³ C (CF ₃)	115.6	125.2	116.5, 125.2	125.0

^a7% D₂O 丙酮-d₆ .

图 2

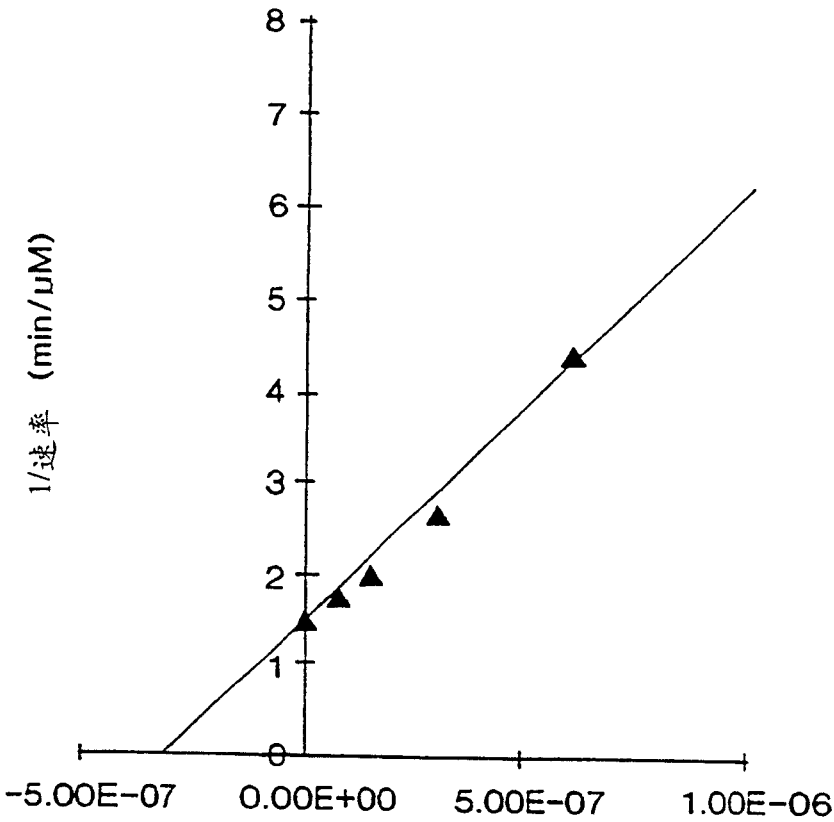


图 4

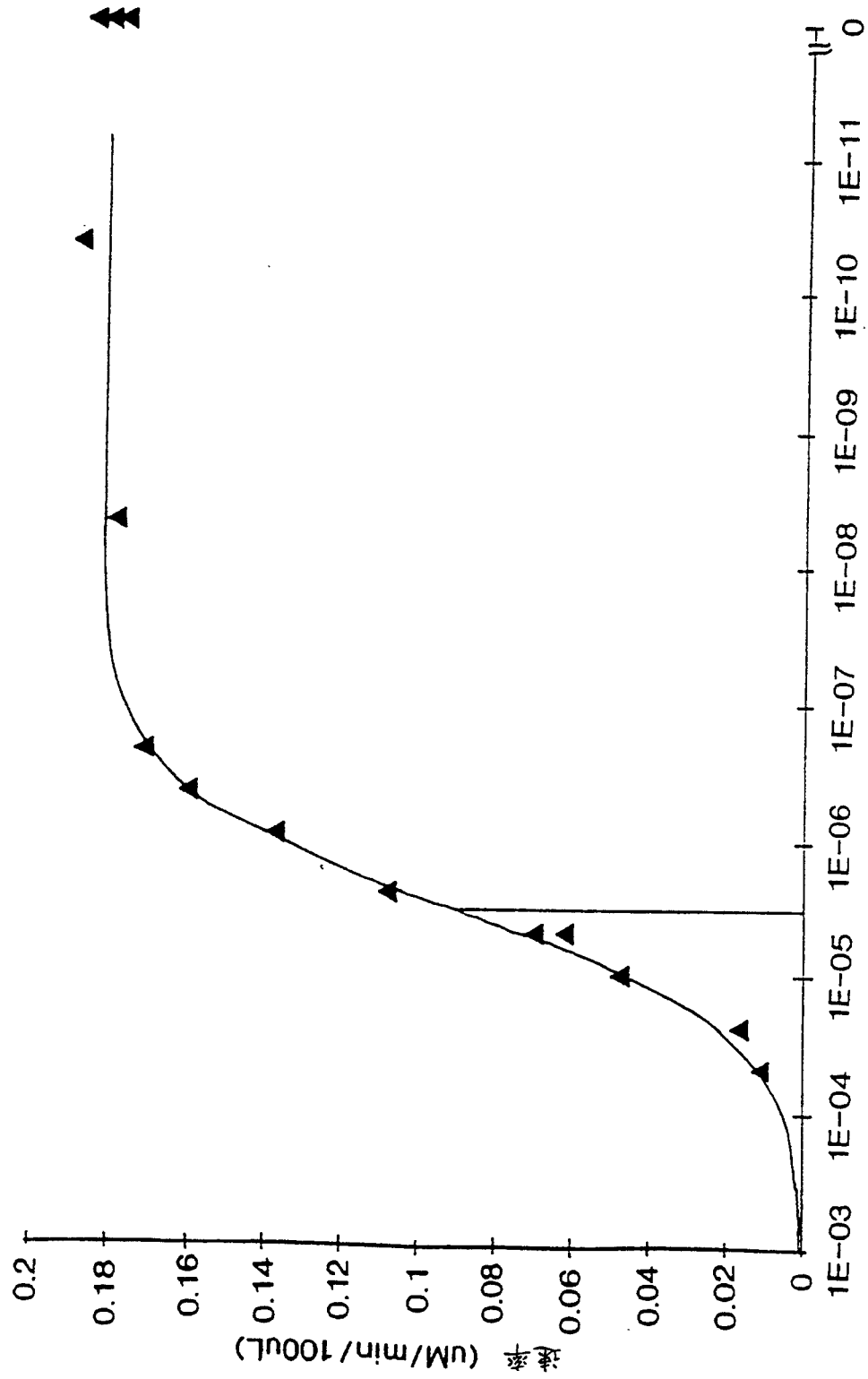


图 5

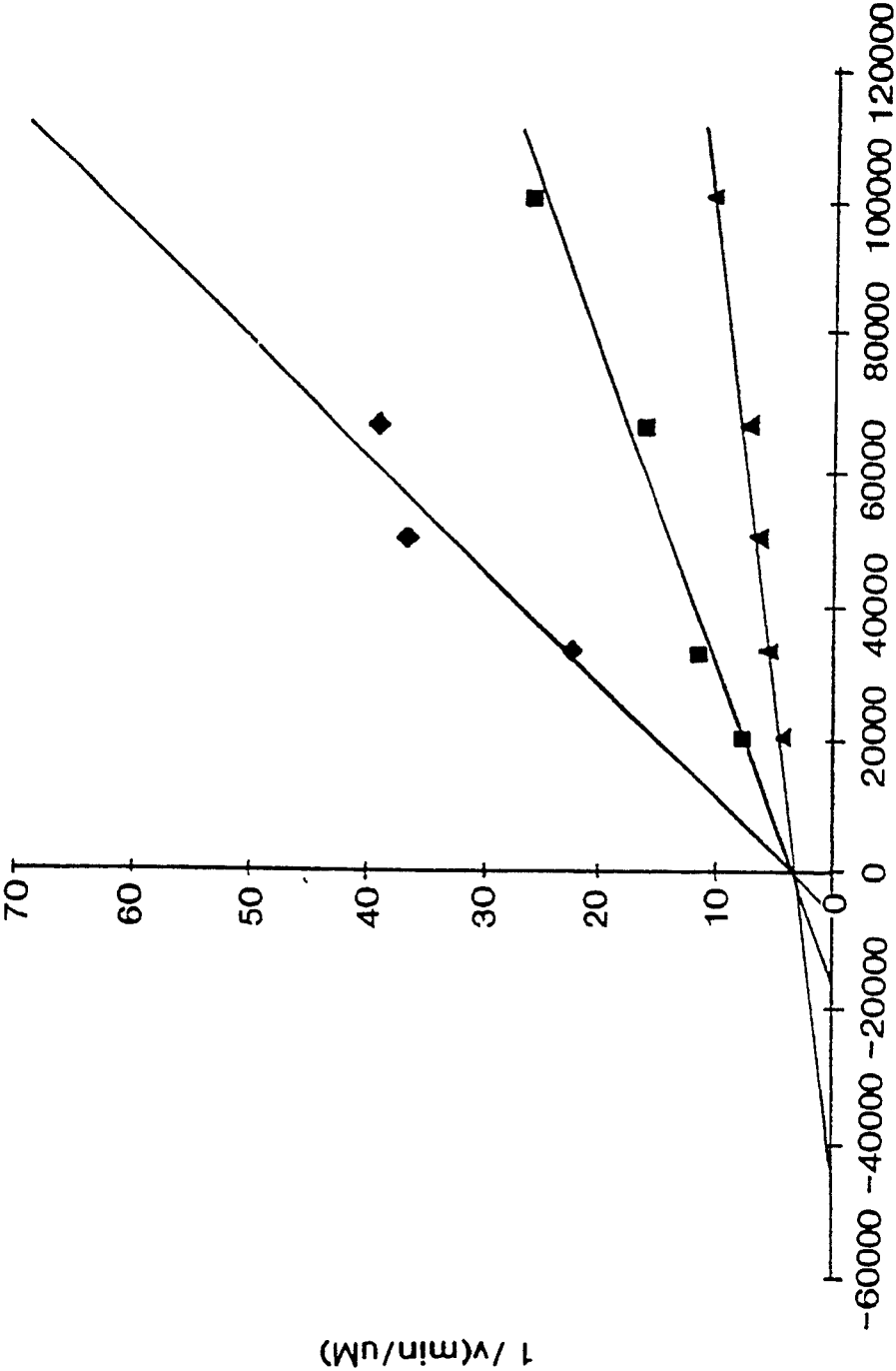


图 6

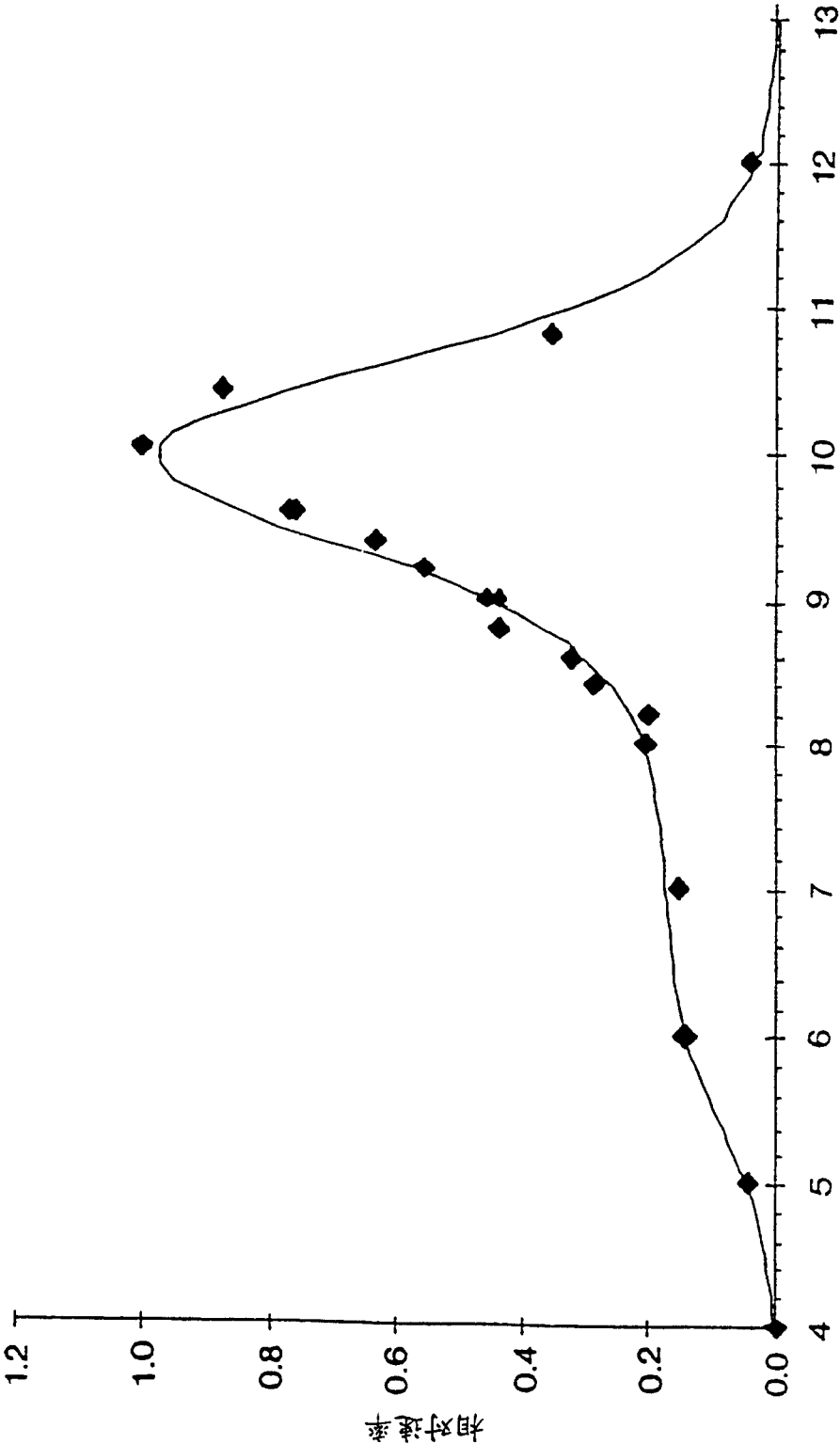


图7

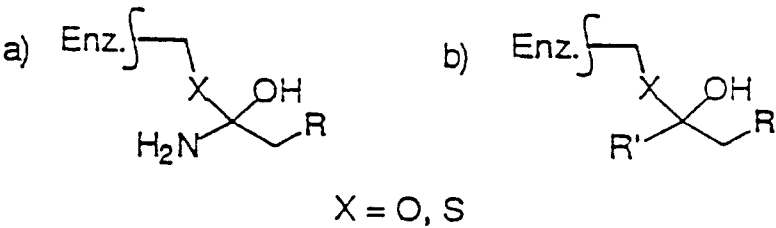


图 8

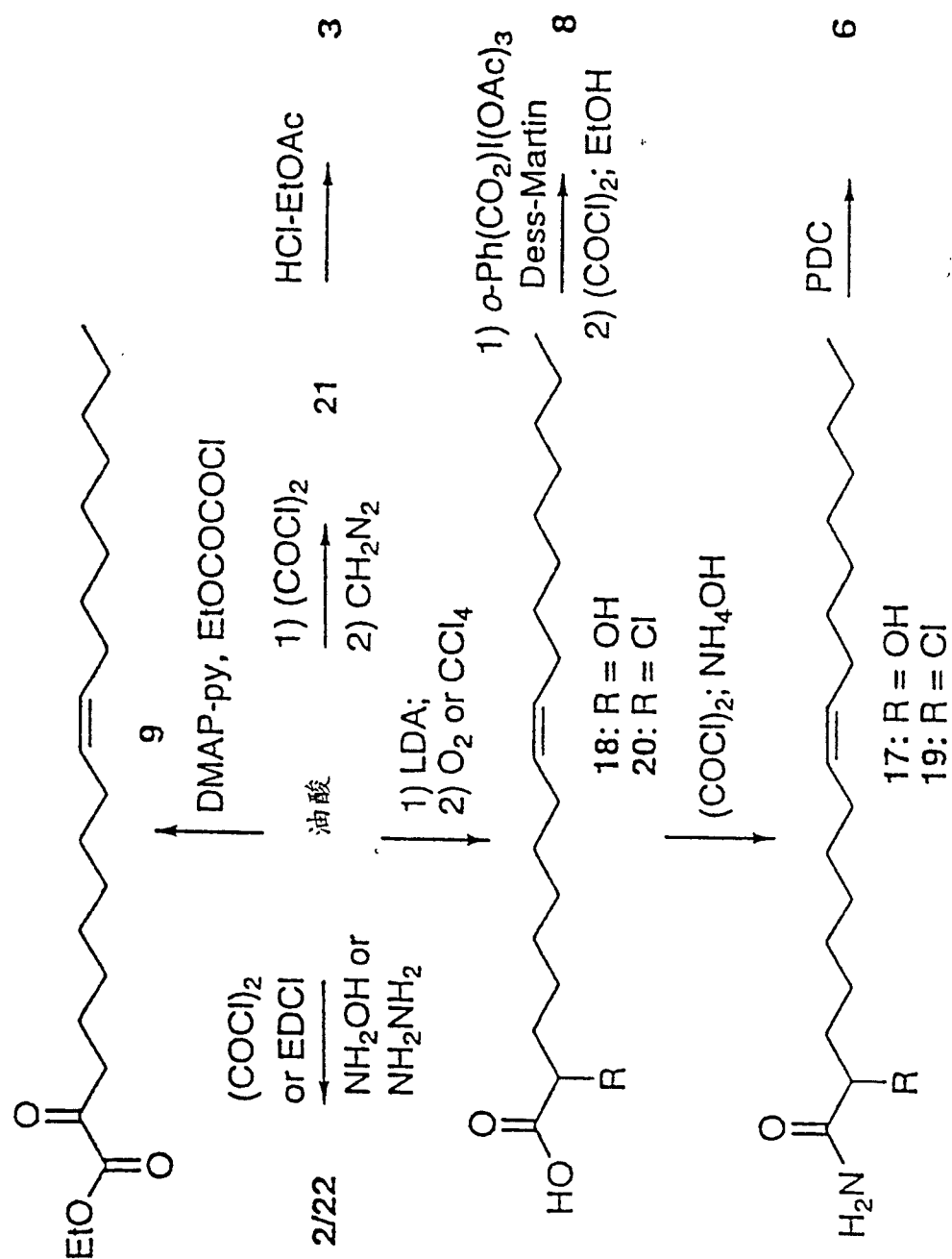


图 9A

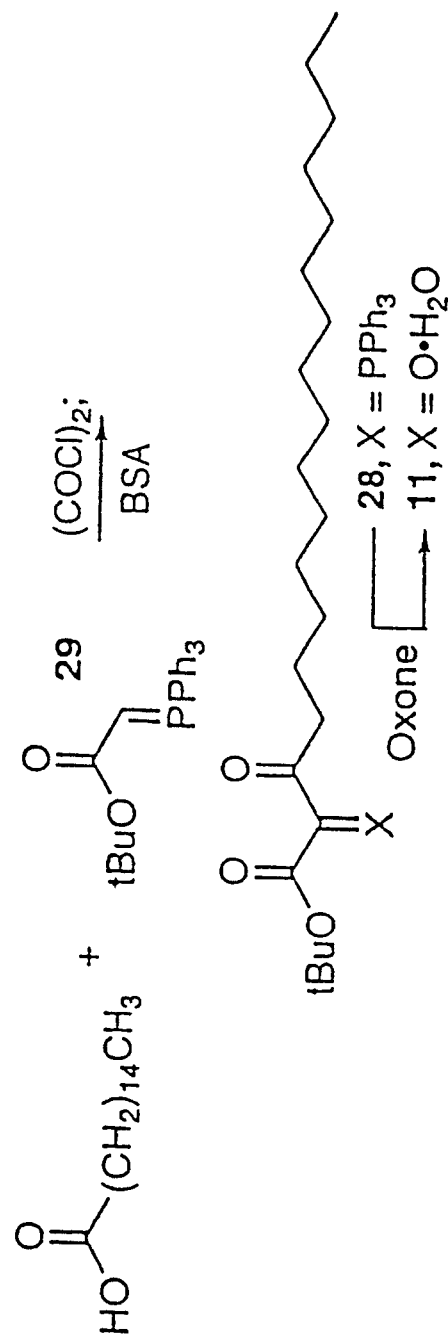


图 11

$$Rate = \frac{[H^+]^3 v_{H_3E} + [H^+]^2 K_1 v_{H_2E} + [H^+] K_1 K_2 v_{HE} + K_1 K_2 K_3 v_E}{[H^+]^3 + [H^+]^2 K_1 + [H^+] K_1 K_2 + K_1 K_2 K_3}$$

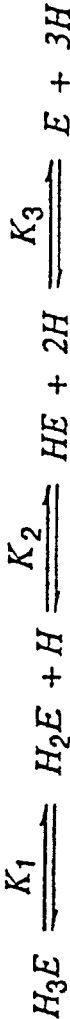


图 12