[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07D307/62

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 99804461.X

[43]公开日 2001年5月16日

[11]公开号 CN 1295567A

[22]申请日 1999.3.27 [21]申请号 99804461.X

[30]优先权

[32]1998.3.27 [33]KR [31]1998/10752

[32]1999.3.16 [33]KR [31]1999/8784

[86]国际申请 PCT/KR99/00148 1999.3.27

[87]国际公布 WO99/50258 英 1999.10.7

[85]进入国家阶段日期 2000.9.26

[71]申请人 株式会社LG化学

地址 韩国汉城

[72]发明人 郑凤烈 李仁相 朴峰俊
金铃根 赵完九 宋荣淑

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

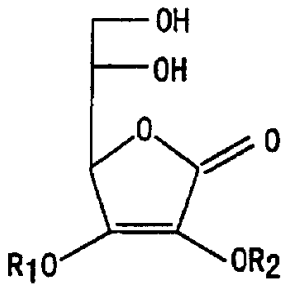
权利要求书5页 说明书21页 附图页数0页

[54]发明名称 作为新型抗氧剂的聚乙氧基化抗坏血酸衍生物及其制备方法

[57]摘要

本发明涉及以下通式Ⅰ表示的新型抗坏血酸衍生物及其制备方法：

其中：R_1和R_2是不同的，代表氢原子或者$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR_3$，而其中n是1—399的整数，$R_3$是具有1—10个碳原子的低级烷基。本发明的抗坏血酸衍生物在长时间内具有抗氧化作用，对水和大多数有机溶剂有特别好的溶解度，而且具有更高的稳定性。本发明可应用的领域包括饲料、食品、化妆品和药品。



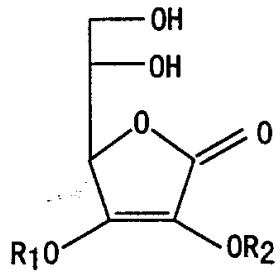
(Ⅰ)

ISSN1008-4274

00·09·28

权 利 要 求 书

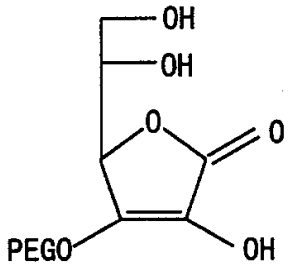
1、以下通式 I 表示的抗坏血酸衍生物：



（I）

其中：R_1 和 R_2 是不同的，代表氢原子或者$(CH_2CH_2O)_nOR_3$，而其中 n 是 2－400 的整数，R_3 是具有 1－10 个碳原子的低级烷基。

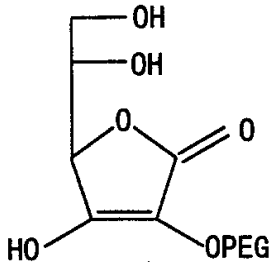
2、如权利要求 1 所述的化合物，其中，所述通式 I 表示的化合物是以下式 II 表示的化合物：



（II）

其中：PEG 代表$(CH_2CH_2O)_nOR_3$，而 n 和 R_3 与权利要求 1 中的定义相同。

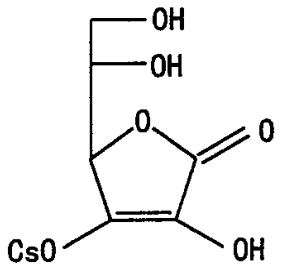
3、如权利要求 1 所述的化合物，其中，所述通式 I 表示的化合物是以下式 III 表示的化合物：



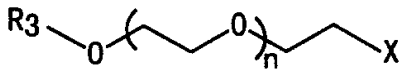
（III）

其中：PEG 与权利要求 1 中的定义相同。

4、制备如权利要求 1 所述的由通式 I 表示的抗坏血酸衍生物的方法，其特征在于，以下式 V 表示的抗坏血酸铯与以下通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物在合适溶剂中反应：



（V）



（IV）

其中：R_3 是具有 1－10 个碳原子的低级烷基，

n 是 2－400 的整数；

X 是卤原子如氯、溴、碘或者磺酸基如甲苯磺酸基、triflate 或者 tresylate。

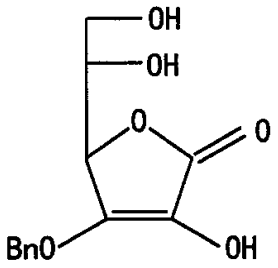
5、如权利要求 4 所述的方法，其中，使用聚乙氧基化卤或磺酸酯用

00·09·28

作式 IV 表示的化合物。

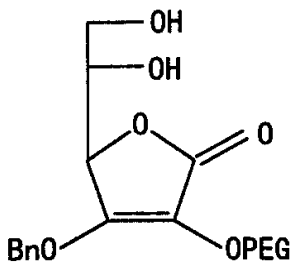
6、如权利要求 4 所述的化合物，其中，所述溶剂选自于以下组中：二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、六甲基磷酰胺、N－甲基吡咯烷酮、吡咯烷酮、二甲基乙酰胺和 1，3－二甲基－3，4，5，6－四氢－2（1H）－嘧啶酮。

7、制备如权利要求 1 所述的由通式 I 表示的抗坏血酸衍生物的方法，其特征在于，式 V 表示的化合物在溶剂中与苄基溴反应，形成通式 VI 表示的 3－O－苄基抗坏血酸，然后在溶剂中在碳酸铯存在下与 PEG－I 偶联，产生以下通式 VII 表示的 3－O－苄基－2－O－聚乙二醇－抗坏血酸，接着在催化剂存在下进行氢化，



（VI）

其中：Bn 是苄基，



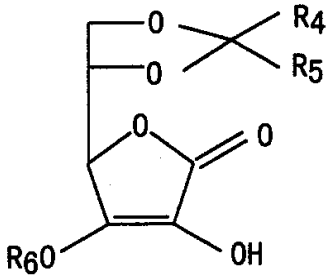
（VII）

其中：Bn 与上述定义相同；

PEG 是$(CH_2CH_2O)_nOR_3$，而其中 n 和 R_3 的定义同上。

8、如权利要求 7 所述的方法，其中，所述溶剂选自于以下组中：二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、六甲基磷酰胺、N－甲基吡咯烷酮、吡咯烷酮、二甲基乙酰胺和 1，3－二甲基－3，4，5，6－四氢－2（1H）－嘧啶酮。

9、制备如权利要求 1 所述的由通式 I 表示的抗坏血酸衍生物的方法，其特征在于，以下通式 VIII 表示的化合物与如上所定义的通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物在碱存在下于溶剂中反应，然后用酸催化剂水解，



（VIII）

其中：R_4 和 R_5 可相同或不同，独立地代表氢原子、甲基或乙基、或者 R_4 和 R_5 结合形成$-(CH_2)_m-$（其中 m 是 4 或 5）；R_6 是氢原子、苄基或者对甲氧基苄基。

10、如权利要求 9 所述的方法，其中，选择以下组中的一种或多种金属盐作为碱：氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯和氢化钠。

11、如权利要求 9 所述的方法，其中，所述溶剂选自于以下组中：二

甲基甲酰胺、二甲基亚砜、六甲基磷酰胺、N一甲基吡咯烷酮、吡咯烷酮、和二甲基乙酰胺。

12、如权利要求 9 所述的方法，其中，所述酸催化剂选自于以下组中：盐酸、硫酸、对甲苯磺酸、樟脑磺酸和乙酸。

13、如权利要求 9 所述的方法，其中，在用酸催化剂进行催化水解之前另外进行催化剂还原反应步骤。

14、如权利要求 13 所述的方法，其中，所述催化剂选自于以下组中：钯、钯一炭、铂黑和二氧化铂。

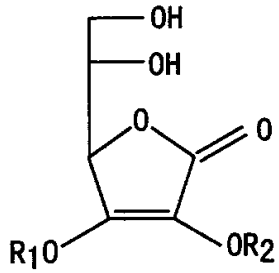
00·09·26

说　明　书

作为新型抗氧剂的聚乙氧基化抗坏血酸衍生物及其制备方法

发明领域

本发明涉及以下通式 I 表示的新型抗坏血酸衍生物及其合成方法：



（I）

其中：R_1 和 R_2 是不同的，代表氢原子或者$(CH_2CH_2O)_nOR_3$（其中 n 是 2—400 的整数，R_3 是具有 1—10 个碳原子的低级烷基）。

背景技术

在生物系统中，L—抗坏血酸是最有效的天然抗氧剂之一，因为它可以清除活性氧物质和自由基。

众所周知，作为亲水性抗氧剂，L—抗坏血酸具有增白作用，而且通过作为脯氨酸羟基酶的辅助因子发挥作用而在提高胶原合成中起到关键性的作用（Quaglino, D. Jr.等人，J. Bio. Chem. 272, 345, 1997）。

但是，L—抗坏血酸在某些需要长时间的抗氧化作用的产品中的使用受到限制，这是因为 L—抗坏血酸的低稳定性，其容易被热、光和空气分解。

00·09·26

因此，已进行了许多研究以开发出一些保持抗氧化作用并同时具有更高稳定性的抗坏血酸衍生物。具体而言，已有人公开了一些提高 L－抗坏血酸的稳定性的常规方法，其是将 L－抗坏血酸的 2－或 3－羟基化学修饰为其他取代基（第 5,143,648、4,780,549 和 4,177,445 号美国专利，昭 52－18191 号日本专利，以及第 91－8733 号韩国专利公开）。

另一方面，L－抗坏血酸作为一种亲水性抗氧剂，实际上不溶于油和脂肪（如色拉油和猪油），因此必须开发出在水和有机溶胶中具有相对较好溶解度的新型抗坏血酸衍生物，以用于食品和化妆品中作为抗氧剂。

目前市售的抗坏血酸衍生物的例子包括 L－抗坏血酸－6－棕榈酸酯、2，6－二棕榈酸酯和 6－硬脂酸酯，L－抗坏血酸－3－O－乙基以及 L－抗坏血酸－2－磷酸酯的镁盐，而且它们已被用作化妆品中的成分（第 91－8733 号韩国专利公开，第 5,143,648 和 7,179,445 号美国专利）。

在这些例子中，L－抗坏血酸－6－棕榈酸酯、2，6－二棕榈酸酯和 6－硬脂酸酯是相对较为亲脂性的抗坏血酸衍生物。虽然这些抗坏血酸衍生物是化学稳定的，但是由于它们在生物系统中快速降解而在保持抗氧化作用上有一定的限制。

基于该背景，本发明的发明人进行了广泛而深入的研究，并研制出新型的抗坏血酸衍生物，该衍生物通过在 L－抗坏血酸的 2－或 3－羟基处引入聚乙二醇基团而在水和大多数有机溶剂中都具有较好的溶解度。另外，本发明包括具有高稳定性而且在长时间中具有抗氧化作用的新型抗坏血酸衍生物。

本发明涉及新型的稳定抗坏血酸。

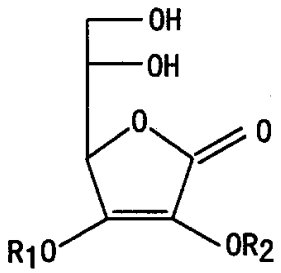
本发明的目的是提供能够克服常规方法所面临的障碍的新型抗坏血酸衍生物。

本发明通过在 L－抗坏血酸的 2－或 3－羟基处引入聚乙二醇基团而解决了上述问题。本发明还提供在水和大多数有机溶剂中都具有良好溶解度、稳定性更高、而且对酪氨酸酶具有抑制作用的新型抗坏血酸衍生物。

本发明的再一个目的是提供制备所述抗坏血酸衍生物的方法。

发明公开

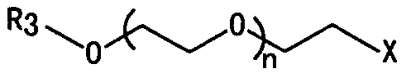
本发明的目的是通过制备以下通式 I 所代表的抗坏血酸衍生物来实现的：



（I）

其中：R_1 和 R_2 是不同的，代表氢原子或者$(CH_2CH_2O)_nOR_3$（其中 n 是 2－400 的整数，R_3 是具有 1－10 个碳原子的低级烷基）。

在通式 I 所代表的抗坏血酸衍生物中，其中 R_1 是$(CH_2CH_2O)_nOR_3$（其中 n 和 R_3 的定义同上）而 R_2 是氢原子的衍生物是如下制备的：以下通式 V 表示的抗坏血酸铯与以下通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物在合适溶剂中反应：

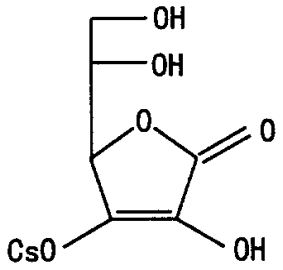


（IV）

其中：R_3 是具有 1－10 个碳原子的低级烷基，

n 是 2－400 的整数；

X 是卤原子（如氯、溴、碘）或者磺酸基（如甲苯磺酸基、triflate 或者 tresylate）。

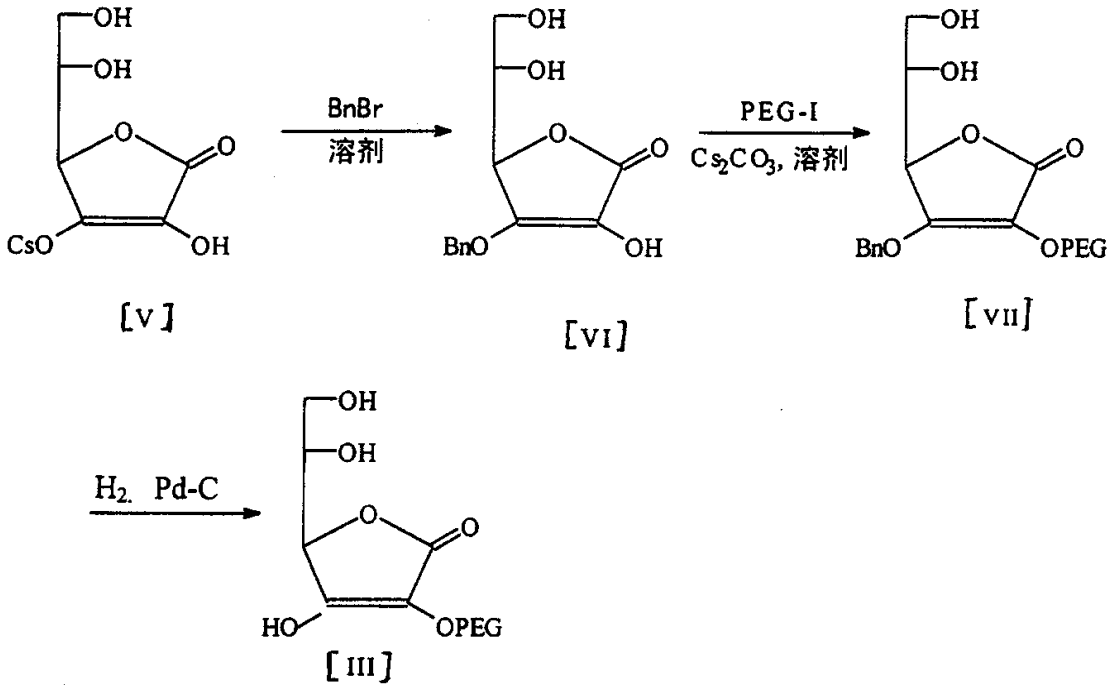


（V）

另外，在通式 I 所代表的抗坏血酸衍生物中，其中 R_1 是氢原子而 R_2 是$(CH_2CH_2O)_nOR_3$（其中 n 和 R_3 的定义同上）的衍生物是如下制备的：如合成路线 1 所示，式 V 表示的抗坏血酸铯在溶剂中与苄基溴反应，形成以下通式 VI 表示的 3－O－苄基抗坏血酸，反应物然后在溶剂中在碳酸铯存在下与 PEG－I 偶联，产生以下通式 VII 表示的 3－O－苄基－2－聚乙二醇－抗坏血酸，接着在催化剂存在下进行氢化。

00·09·26

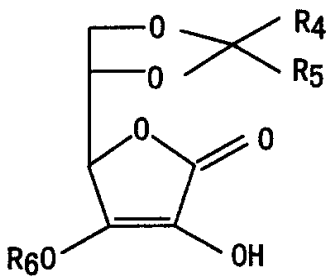
合成路线 1



其中：Bn 是苄基；

PEG 是$(CH_2CH_2O)_nOR_3$（其中 n 和 R_3 的定义同上）。

再者，通式 I 表示的化合物是如下制备的：以下通式 VIII 表示的化合物与通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物在碱存在下反应，然后在酸性条件下水解。



（VIII）

其中：R_4 和 R_5 可相同或不同，独立地代表氢原子、甲基或乙基、或者 R_4

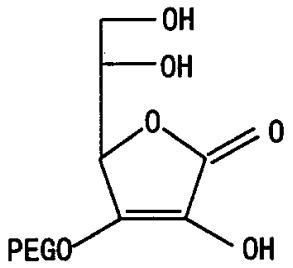
和 R_5 结合形成-$(CH_2)_m$-（其中 m 是 4 或 5）；R_6 是氢原子、苄基或者对甲氧基苄基。

具体而言，本发明解释如下。

本发明涉及抗坏血酸衍生物，其中抗坏血酸的 2－或 3－羟基被聚乙氧基化以提高稳定性。

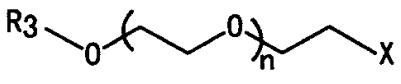
制备本发明之抗坏血酸衍生物的方法可大致分为两个步骤：（1）制备抗坏血酸的 5，6－O－缩醛或缩酮后，在碱存在下于经保护的抗坏血酸的 3－位处引入聚乙二醇基团，然后除去缩醛或缩酮，以制备抗坏血酸衍生物，以及（2）未经保护的抗坏血酸直接与聚乙氧基化的关键中间体偶联，产生最终加成物。

首先，制备最终产物而不取代在抗坏血酸的 5，6－位置处的两个羟基的方法是如下进行的：以下通式 V 表示的抗坏血酸铯与以下通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物在合适的溶剂中反应，形成通式 I 表示的化合物（其中 R_1 是 PEG，而 R_2 是氢原子）。该化合物用以下通式 II 表示：



（II）

其中：PEG 是$(CH_2CH_2O)_nOR_3$（其中 n 和 R_3 的定义同上）。

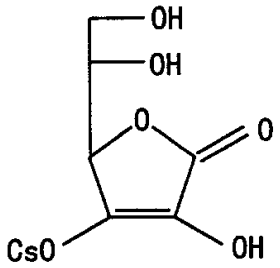


（IV）

其中：R_3 是具有 1－10 个碳原子的低级烷基；

n 是 2—400 的整数；

X 是卤原子（如氯、溴、碘）或者磺酸基（如甲苯磺酸基、triflate 或 tresylate）。



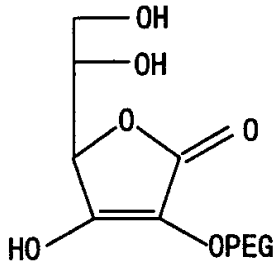
（V）

通式 IV 表示的化合物用 PEG_n-X 表示。

该反应中所用的溶剂选自于二甲基亚砜（DMSO）、二甲基甲酰胺（DMF）、六甲基磷酰胺（HMPA）、N—甲基吡咯烷酮、吡咯烷酮、二甲基乙酰胺（DMAC）和 1，3—二甲基—3，4，5，6—四氢—2（1H）—嘧啶酮（DMPU），它们可单独或者以混合形式使用。

通式 V 表示的本发明化合物是如下制备的：在水中用碳酸铯处理抗坏血酸，然后添加异丙醇进行结晶。

制备本发明之抗坏血酸衍生物的其他方法是使用在 5，6—二羟基位置处未经保护的抗坏血酸作为起始物。其是如下制得的：如上述合成路线 1 所示，以下式 V 表示的化合物与苄基溴在溶剂中反应，形成以下通式 VI 表示的 3—O—苄基抗坏血酸，然后反应物在碳酸铯存在下与 PEG—I 偶联，产生通式 VII 表示的 3—O—苄基—2—O—聚乙二醇基—抗坏血酸，接着进行催化氢化。通式 III 表示的化合物：



（III）

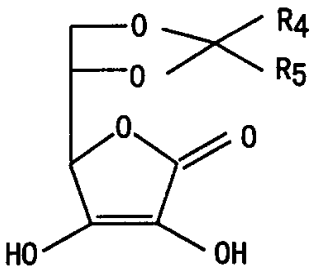
其中：PEG 与上述定义相同。

该反应中所用的溶剂选自于二甲基亚砜（DMSO）、二甲基甲酰胺（DMF）、六甲基磷酰胺（HMPA）、N－甲基吡咯烷酮、吡咯烷酮、二甲基乙酰胺（DMAC）和 1，3－二甲基－3，4，5，6－四氢－2（1H）－嘧啶酮（DMPU），它们可单独或者以混合形式使用。

制备通式 I 表示的化合物的其他方法如下：首先合成抗坏血酸的 5，6－缩醛或缩酮基团，然后在抗坏血酸的 3－羟基位置处引入 PEG 基团，接着脱除缩醛或缩酮保护基。更具体而言，制备通式 II 表示的抗坏血酸衍生物的方法按照以下顺序步骤：

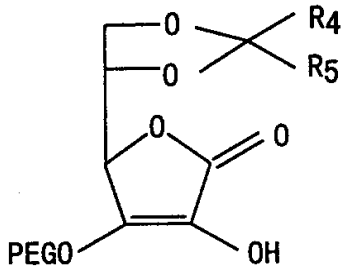
以下通式 IX 表示的抗坏血酸的 5，6－缩醛或羧酮衍生物在合适溶剂中与通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物反应，形成以下通式 X 表示的化合物。

由通式 X 表示的化合物，在酸催化剂存在下脱除抗坏血酸之 5，6－羟基位置处的缩醛或缩酮基团，以制得通式 II 表示的抗坏血酸衍生物：



（IX）

其中：R_4和R_5与上述定义相同。



（X）

其中：R_4、R_5和 PEG 与上述定义相同。

优选的是，所选择的本发明通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物具有 150－20000、更优选 300－1000 的分子量。另外，作为通式 IV 中的烷基，R_3 的具体例子包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正甲基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基和正二苯乙酮基（n-desyl）。卤原子的例子包括氯、溴和碘。磺酸基的例子包括甲苯磺酸基、triflate 和 tresylate。

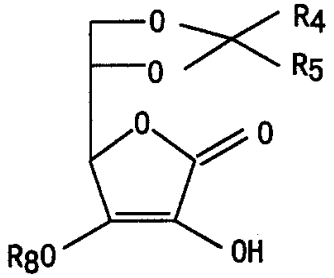
通式 X 表示的化合物是如下制得的：在合适碱存在下，使通式 IX 表示的抗坏血酸的 5，6－O－缩醛或缩酮衍生物和通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物进行偶联反应。该反应所用的碱包括氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、或氢化钠。另外，反应溶剂包括二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、六甲基磷酰胺、N－甲基吡咯烷酮、吡咯烷酮或二甲基乙酰胺。优选的是，使用碱和溶剂时反应温度在 10－90℃的范围，反应时间在 1－24 小时范围内。

在抗坏血酸的 5，6－缩醛或缩酮衍生物的 3－位进行 O－烷基化，由此制得的通式 X 表示的化合物用酸处理，以脱除在抗坏血酸的 5－或 6－位羟基处的缩醛或缩酮基团，然后通过合适的分离和纯制步骤制得通

式 II 表示的聚乙氧基化抗坏血酸衍生物。

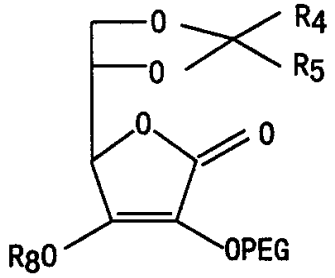
上述水解反应优选在有酸催化剂存在时进行。酸催化剂的例子包括盐酸、硫酸、对甲苯磺酸、樟脑磺酸或乙酸。反应溶剂的例子包括甲醇、乙醇、二氯甲烷、1，2－甲氧基乙烷或四氢呋喃。另外，优选反应在 0－70℃下进行 1－12 小时。

再者，制备通式 II 表示的抗坏血酸衍生物的方法是，合成抗坏血酸的 5，6－缩醛或缩酮基团，然后在抗坏血酸的 3－羟基位置处引入 PEG，接着脱除缩醛或缩酮基团。使用上述方法是用于制备通式 III 表示的抗坏血酸衍生物。具体而言，上述方法是，以下通式 XI 表示的化合物与通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物在碱存在下反应，产生通式 XII 表示的化合物，然后进行催化氢化，形成以下通式 XIII 表示的化合物；最后水解通式 XIII 表示的化合物，由此制得通式 III 表示的所希望的化合物。



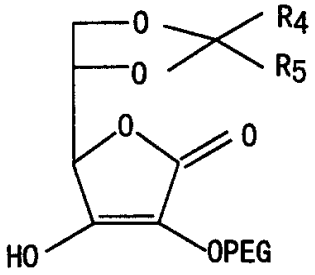
（XI）

其中：R_4 和 R_5 与上述定义相同，R_8 是苄基或对甲氧基苄基。



（XII）

其中：R_4、R_5、R_8 和 PEG 与上述定义相同。



（XIII）

其中：R_4、R_5和 PEG 与上述定义相同。

通式 XI 表示的化合物是如下制得的：用苄基或对甲氧基苄基选择性保护 3－位羟基，上述保护基团可通过催化氢化脱除。为增强选择性烷基化反应，应仔细选择合适的溶剂和温度。溶剂的例子包括二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、N－甲基吡咯烷酮、甲基乙基酮、丙酮、甲醇或四氢呋喃。

碱的例子包括碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、氢化钠或叔丁基烷氧基钾盐。

优选的是，反应温度在 5－50℃的范围，反应时间在 1－12 小时范围内。

通式 XII 表示的化合物是如下制得的：在碱存在下，使通式 XI 表示的化合物与通式 IV 表示的聚乙二醇衍生物进行偶联反应。碱的例子包括氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯或氢化钠。

通式 XII 表示的化合物进行还原，形成通式 XIII 表示的化合物，然后水解，制得通式 III 表示的 PEG－抗坏血酸衍生物。

水解反应在有酸催化剂存在时进行，该酸催化剂的例子包括盐酸、硫酸、对甲苯磺酸和樟脑磺酸或乙酸。水解反应所用的溶剂的例子包括甲醇、乙醇、1，2－甲氧基乙烷和四氢呋喃。优选的是，反应温度在 0－70℃的范围内，而反应时间在 1－12 小时的范围内。

还原反应适当地在催化剂存在下于有机溶剂中进行，所述溶剂例如是甲醇、乙醇或乙酸乙酯，而所述催化剂例如是钯、钯－炭、铂黑和氧化铂。

现通过以下实施例更为具体地描述本发明，但本发明不限于这些实施例中。

实施本发明的最佳方式

制备例 1：PEG－I（IV）的合成

将由文献方法（Zalipsky, S.等人，Eur, Polym. J., 19, 1177, 1983）制得的 PEG_{550}－Cl（3.1 g, 5.45 mmol）溶解在 5 ml 丙酮中，然后添加碘化钠。回流反应混合物 24 小时，然后冷却至室温。减压除去溶剂后，用二氯甲烷稀释残留物。用 5%亚硫酸氢钠洗涤该溶液，然后用二氯甲烷萃取分离的水层。在硫酸钠上干燥经萃取的有机层，并减压浓缩，得到 3.3 g（产率 95%）的 PEG_{550}－I 化合物（通式 IV），其为油状物。

^1H－NMR（$CDCl_3$）δ 3.76 (t, J=6.9 Hz, 2H), 3.67 (bs, $-OCH_2CH_2-$), 3.56 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.27 (t, J=6.9 Hz, 2H)

制备例 2：抗坏血酸铯（V）的合成

将抗坏血酸（5 g, 28.4 mmol）溶解在 20 ml 水中，然后在 0－5℃下缓慢添加碳酸铯（4.63 g, 14.2 mmol）。二氧化碳气体产生完全停止后，在反应混合物中缓慢添加 40 ml 的异丙醇，并静置数小时。过滤沉淀物，并干燥，产生 8.4 g（产率 95%）的标题化合物，其为白色固体。

实施例 1：3－O－PEG_{550}－抗坏血酸（II）的合成

将抗坏血酸（560 mg, 3.18 mmol）溶解在 4 ml 二甲基亚砜中，然后添加碳酸铯（518 mg, 1.59 mmol）。20 分钟后，在反应混合物中添加由制备例 1 中制得的 PEG_{550}－I（1.94 g, 2.65 mmol, IV），并在 60℃下加热 18 小时。减压除去二甲基亚砜。用二氯甲烷稀释浓缩溶液。过滤盐，并减压浓缩残留的溶液。在硅胶上通过柱色谱纯制浓缩物，得到 1.23 g 的标题化合物（产率 66%），其为粘稠油状物。

^{1}H－NMR（$CDCl_3$）δ 4.78 (m, 1H), 4,67 (d, J=2.1 Hz, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.8-3.5 (bs, -OCH_2CH_2-), 3.38 (s, 3H)

实施例 2：2－O－PEG_{550}－抗坏血酸（III）的合成

（1）3－O－苄基抗坏血酸（VI）的合成

将抗坏血酸（10 g, 56.8 mmol）溶解在 60 ml 的二甲基亚砜中，然后添加碳酸铯（9.25 g, 28.4 mmol）。20 分钟后，在反应混合物中添加苄基溴（6.75 ml, 56.8 mmol），并在 50℃下加热 18 小时。将反应混合物冷却至室温，并用二氯甲烷（150 ml）稀释，以使盐沉淀。残留的溶液减压浓缩，然后在硅胶上通过柱色谱纯制，得到 7.2 g（产率 48%）的标题化合物。

^{1}H－NMR（$CDCl_3$）δ 7.3 (m, 5H), 5.51 (d, J=11.7 Hz, 1H), 5.43 (d, J=11.7 Hz, 1H), 4.64 (d, J=1.8 Hz, 1H), 4.2-3.0 (m, 7H)

（2）3－O－苄基－2－O－PEG_{550}－抗坏血酸（VII）的合成

将3－O－苄基－抗坏血酸（0.5 g, 1.88 mmol）溶解在4 ml的二甲基亚砜中，然后添加碳酸铯（3.6 mg, 0.94 mmol）。20分钟后，在反应混合物中添加PEG_{550}－I（1.12 g, 1.7 mmol），并在60℃下加热1.5小时。将反应混合物冷却至室温，并添加二氯甲烷和水，然后分离各层。用二氯甲烷萃取经分离的含水层，在硫酸钠上干燥有机层并减压浓缩。浓缩物在硅胶上通过柱色谱纯制，制得830 mg（产率61%）的标题化合物，其为蜡状液体。

^1H－NMR($CDCl_3$) δ 7.4 (m, 5H), 5.62 (d, J=11.7 Hz, 1H), 5.56 (d, J=11.7 Hz, 1H), 4.70 (d, J=2.1 Hz, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.8-3.5 (bs, $-OCH_2CH_2-$), 3.38 (s, 3H)

（3）2－O－PEG_{550}－抗坏血酸（III）的合成

将上述步骤（2）中制得的 3－O－苄基－2－O－PEG_{550}－抗坏血酸（4.04 g, 5 mmol）溶解在甲醇（40 ml）中，然后添加10%钯－炭（400 mg）。在室温下于氢气中搅拌反应混合物 2 小时。过滤反应混合物，并用甲醇洗涤。减压浓缩滤液，得到 3 g（产率 85%）的标题化合物，其为蜡状油。

^1H－NMR（$CDCl_3$） δ 4.01 (br, t, J=4.8 Hz, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.60 (br, t, 2H), 3.5 (bs, $-OCH_2CH_2-$), 3.23 (s, 3H)

00·09·25

实施例 3：3－O－PEG_{350}－抗坏血酸（II）的合成

（1）将 21.62 g（0.1 mol）的 5，6－O－异亚丙基抗坏血酸（IX）溶解在 150 ml 的二甲基亚砜中，并在室温下添加 8.29 g（0.06 mol）碳酸钾和 46.0 g（0.1 mol）的 PEG_{350} 碘（IV）。在室温下进一步搅拌反应混合物 1 小时，然后在 50℃下温热 4 小时。冷却至室温后，用 100 ml 二氯甲烷稀释反应混合物。用 50 ml 的 10%氯化钠水溶液洗涤溶液 3 次，然后在无水硫酸镁上干燥。过滤后，减压浓缩残留物，并用柱色谱（SiO_2，270－400 目，二氯甲烷/甲醇＝15/1，v/v）纯制，由此制得 44.95 g 的 5，6－O－异亚丙基－3－O－PEG_{350}－抗坏血酸（X），其为蜡状油性化合物（产率 82%）。

^{1}H－NMR（$CDCl_3$）δ 4.58 (m, 3H), 4.26 (m, 1H), 4.15 (t, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.8-3.5 (bs, -OCH_2CH_2-), 3.38 (s, 3H), 1.35 (d, 6H)

（2）将 44.95 g（0.082 mol）的 5，6－O－异亚丙基－3－O－PEG_{350}－抗坏血酸（X）溶解在 140 ml 的甲醇中，然后将反应混合物冷却至 0℃。滴加 105 ml 的 2 M HCl。将反应混合物缓慢温热至 25℃，并在室温下搅拌 3 小时。用碳酸氢钠中和反应混合物，然后减压蒸发水和甲醇。残留物用柱色谱（SiO_2，二氯甲烷/甲醇＝20/1，v/v）纯制，得到 37.50 g 的 3－O－PEG_{350}－抗坏血酸（II）（产率 90%）。

^{1}H－NMR（$CDCl_3$）δ 4.78 (m, 1H), 4.67 (d, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.8-3.5 (bs, -OCH_2CH_2-), 3.38 (s, 3H)

（3）用已知方法（J. Med. Chem. 31, 793, 1988）制备 5，6一异亚丙基抗坏血酸（IX）。具体而言，在丙酮（500 g）和 88.06 g（0.5 mol）L一抗坏血酸的混合物中添加 8.64 g（0.11 mol）乙酰氯，然后在室温下进一步搅拌反应混合物 12 小时并过滤。用冷丙酮洗涤残留物，然后干燥，由此制得 84.51 g 的白色固体（产率 78.2%）。

（4）根据以下两步合成法由聚乙二醇单甲基醚制备 PEG_{350} I（IV）：（i）将 350.0 g（1.0 mol）的聚乙二醇单甲基醚溶解在 1 升的甲苯中，然后通过共沸蒸馏干燥。在该溶液中添加 303.57 g（3.0 mol）的三乙胺，然后在 10℃下缓慢添加 228.78 g（1.2 mol）对甲苯磺酰氯，并在该温度下搅拌反应混合物 1 小时，在 25℃下继续搅拌 3.5 小时。过滤后，减压蒸馏滤液，然后用 400 ml 水稀释。用 50 ml 正己烷萃取水溶液，然后用 1 升二氯甲烷萃取。有机层用无水硫酸镁干燥，然后过滤并减压蒸馏，制得 494.10 g（产率 98%）的 $PEG_{350}OTS$，其为无色液体。（ii）将如上制得的 494.10 g（0.98 mol）$PEG_{350}OTS$ 溶解在 850 ml 丙酮中。在室温下向该溶液中缓慢添加 218.87 g（1.47 mol）的碘化钠。将反应温度升高至 50℃，并搅拌 8 小时，以使反应完全。将反应混合物冷却，过滤，并减压蒸馏。残留物溶解在二氯甲烷中，并用水洗涤。经分离的有机层在无水硫酸镁上干燥，过滤，然后减压蒸馏，制得 432.72 g（产率 96.0%）的 PEG_{350} I。

^1H—NMR（$CDCl_3$）δ 3.8-3.5 (bs, $-OCH_2CH_2-$), 3.38 (s, 3H), 3.24 (t, 2H)

实施例 4：2－O－PEG_{350}－抗坏血酸（III）的合成

（1）将 8.29 g（0.06 mol）的碳酸钾添加至 30.63 g（0.1 mol）5，6－O－异亚丙基－3－O－苄基抗坏血酸（XI）于 150 ml 二甲基亚砜中的溶液内，并搅拌反应混合物 30 分钟。添加 46.0 g（0.1 mol）的 PEG_{350} I（IV），并在 50℃下使反应混合物温热 2 小时。冷却至室温后，用 100 ml 二氯甲烷稀释反应混合物，并用 50 ml 的 10%氯化钠水溶液洗涤 3 次。有机层用无水硫酸镁干燥，并过滤。滤液减压蒸馏，并通过柱色谱（二氯甲烷/甲醇＝10/1，v/v）纯制，产生 54.9 g（产率 86.0%）的油状混合物（XII）。

（2）将 54.9 g（0.086 mol）的 5，6－O－异亚丙基－3－O－苄基－2－O－PEG_{350} 抗坏血酸（XII）溶解在 80 ml 的甲醇中，然后在该溶液中添加 10%pd-C（1.37 g）。反应混合物在氢气氛中搅拌 2 小时。过滤催化剂，并减压浓缩残留溶液，制得 43.14 g（产率 91.5%）的 5，6－O－异亚丙基－2－O－PEG_{350} 抗坏血酸（XIII）。

（3）将 5，6－异亚丙基－2－O－PEG_{350} 抗坏血酸（XIII）43.14 g（0.079 mol）溶解在 140 ml 甲醇中，然后在 0℃下向反应溶液中添加 114 ml 的 2 M HCl。添加完成后，将反应混合物温热至 25℃，并搅拌 3 小时。用碳酸氢钠中和反应混合物，并减压蒸发水和乙醇。经浓缩的残留物用柱色谱（二氯甲烷/甲醇＝20/1，v/v）纯制，产生 36.33 g（产率 90.5%）的 2－O－PEG_{350} 抗坏血酸（III）。

^{1}H－NMR（$CDCl_3$） δ 4.01 (m, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.60 (m, 2H), 3.5 (bs, -OCH_2CH_2-), 3.23 (s, 3H)

（4）用已知方法（Tetrahedron, 52, 1293, 1996）制备 5，6－O－异亚丙基－3－O－苄基抗坏血酸（XI）。

实验例 1：对酪氨酸酶的抑制作用

由 Sigma Co.购得从蘑菇中提取的酪氨酸酶。将底物 L－酪氨酸溶解在磷酸盐缓冲液（0.05 M 浓度，pH 6.8, 1.5 mM）中，然后将 0.01 ml 该溶液添加在 0.3 ml 的分光光度计比色杯中，接着添加浓度为 0.06 mM 的辅助因子多巴。在混合溶液中添加式 II 和 III 表示的两种化合物，然后进一步添加磷酸盐缓冲液至 0.1 ml。接着，在底物溶液中添加 0.1 ml 的酶溶液，该溶液包含 60 U 酪氨酸酶/ml 磷酸盐缓冲液。然后制备仅包含磷酸盐缓冲液的空白样品。反应在 37℃下进行 10 分钟。使用分光光度计（Beckman DU-7500）测量 475 nm 处的吸光度，以计算对酪氨酸酶的抑制作用。测定 50%抑制浓度时的 IC_{50} 值。如下所示计算抑制率，其结果见下表 1。

抑制率（%）＝[(A－B)/A]×100

其中：A 为不包含抑制剂的溶液在 475 nm 处的吸光度

B 为包含抑制剂的溶液在 475 nm 处的吸光度

00·09·26

表 1：抗坏血酸衍生物对酪氨酸酶的抑制作用（IC_{50}）

	IC_{50}（$\times 10^{-3}$ M）
实施例 3	9.80
实施例 1	7.06
实施例 4	1.97
实施例 2	7.06
3－O－Et－维生素 C	9.80
维生素 C（得自于 Fluka Co.）	0.47

实验例 2：新型抗坏血酸衍生物的自由基清除作用

如下所示测定由实施例 1－4 制备的一些化合物的自由基清除作用。

用 1，1－二苯基－2－苦基－偕腙肼（DPPH）方法（Blois, M. S., Nature, 1958, 181, 1190）进行测量。DPPH 是相对较稳定的自由基，其在 517 nm 处有最大吸收。在清除自由基时，在该波长下测量其吸收度。在使用前将从 Sigma Co.购得的 DPPH 溶解在甲醇中，其浓度为 0.15 mM。

首先，将 100μl 如实施例 1－4 制备的一些化合物的浓溶液（10^{-1}－10^{-6} M）放置在 96 孔板的各孔中。添加 100μl 的 DPPH 溶液，在室温下放置混合物，以使用微量板读数器（Bio Tek EL-340）测量在 517 nm 处的吸收。然后制备包含 100μl 甲醇的空白溶液代替上述化合物。用样品处理后吸收度变为空白溶液的一半时的化合物浓度以 IC_{50} 表示。用样品处理后，分别比较 30 分钟和 24 小时后的结果，如下表 2 所示。

表 2：抗坏血酸衍生物的自由基清除效果（$\times 10^{-5}$ M）

	反应 1 小时	反应 24 小时
实施例 3	78.7	5.9
实施例 1	423.6	112.9
实施例 4	7.9	5.9
实施例 2	7.9	4.2
3－O－Et－维生素 C	9.8	9.8
维生素 C（得自于 Fluka Co.）	3.4	3.4

由上述表 2 的结果可以看出，本发明之抗坏血酸衍生物的自由基清除作用较活性状态的维生素 C 的差，该活性维生素 C 的抗坏血酸 2－OH 和 3－OH 未被取代，但优于 3－O－Et－维生素 C 这种常规的抗坏血酸衍生物。如 2－O－PEG_{350} 抗坏血酸和 2－O－PEG_{550} 抗坏血酸的两种化合物，其在抗坏血酸的 2－位处被聚乙氧基化，它们在最短的时间内表现出优异的自由基清除作用，而无论分子量的大小。同时，如 3－O－PEG_{350} 抗坏血酸和 3－O－PEG_{550} 抗坏血酸的两种化合物，其在抗坏血酸的 3－位处被聚乙氧基化，则根据分子量和时间产生明显不同的自由基清除作用，这两种化合物保持它们的自由基清除作用。

实验例 3：抗坏血酸衍生物在水溶液中的稳定性

测定由实施例 1－4 制备的一些化合物在水溶液中的稳定性。

首先，用实施例 1－4 的化合物和抗坏血酸分别制备 0.1％的水溶液。用 HPLC 测量 40℃下经过 8 周后抗坏血酸衍生物随 pH 而发生的抗坏血

酸衍生物含量的变化。结果用下式计算：

回收率（%）＝（8 周后的试验值 / 初始试验值）×100

结果见下表 3 所示。

表 3

	回收率（%）			
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
实施例 3	91.4	89.2	85.4	63.5
实施例 1	78.5	70.8	61.3	42.5
实施例 4	90.8	89.5	84.3	59.8
实施例 2	91.1	89.9	85.7	62.4
3－O－Et－维生素 C	91.0	89.1	86.0	65.0
维生素 C（得自于 Fluka Co.）	38.2	27.5	-	-

由表 3 的结果可以看出，本发明的新型抗坏血酸衍生物在水溶液中的稳定性要长于 Vc 的。

工业应用性

如上具体描述，本发明的抗坏血酸衍生物在长时间内具有抗氧化作用，对水和有机溶剂有相对较好的溶解度，而且在水溶液中具有更高的稳定性。另外，本发明的抗坏血酸衍生物具有低毒性和高的热稳定性，可在饲料、食品、化妆品和药品中用作原料。