

嘉南藥理科技大學

99 年度校內補助計畫結案報告

計畫編號：CN9912-子計畫一

合成具有抑制骨質疏鬆潛能異黃酮的研究

計畫主持人：汪文忠

中華民國 一〇〇年 二月 二十八日

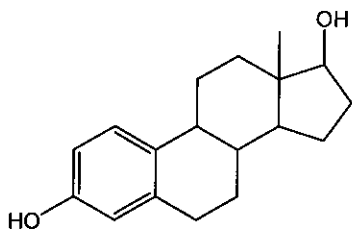


前言：

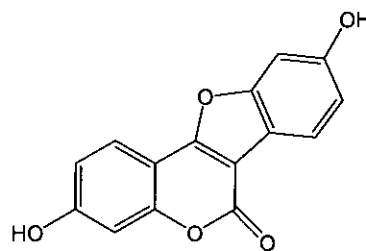
1996 年台灣調查發現，老年人口中 65 歲以上婦女發生脊椎壓迫性骨折約為 19.8%，男性為 12.5%，而髖骨骨折發生率每 10 萬人約有 200 例，全年住醫療院費用需台幣 13 億以上。因此積極預防及治療骨質疏鬆症是一重要課題。以停經後婦女而言，動物性荷爾蒙療法(hormonotherapy, HT)能增加骨質密度以降低骨折危險。然而 2002 年 7 月，美國國家衛生研究院發現，停經後婦女在使用 HT5 年後，會增加中風、心臟病、乳癌及肺栓塞等危險，因此較無害性植物性雌激素(phytoestrogens)，成為停經後婦女預防或治療骨質疏鬆症的新選擇。

植物性雌激素主要分為三大類：類異黃酮(isoflavonoid)、木質素(lignans)與 coumestanes；其中 isoflavones 雖與雌激素結構有所差異，但帶有類似

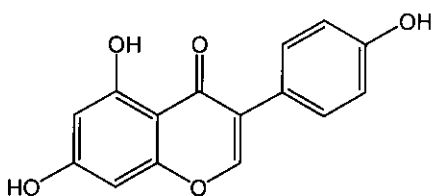
17 β -estradiol 的 2-phenylnaphthalene 的結構如下圖



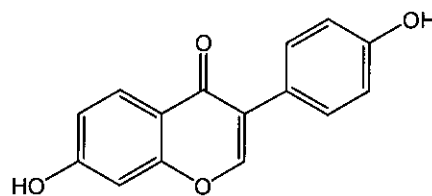
17 β -Estradiol



Coumestrol



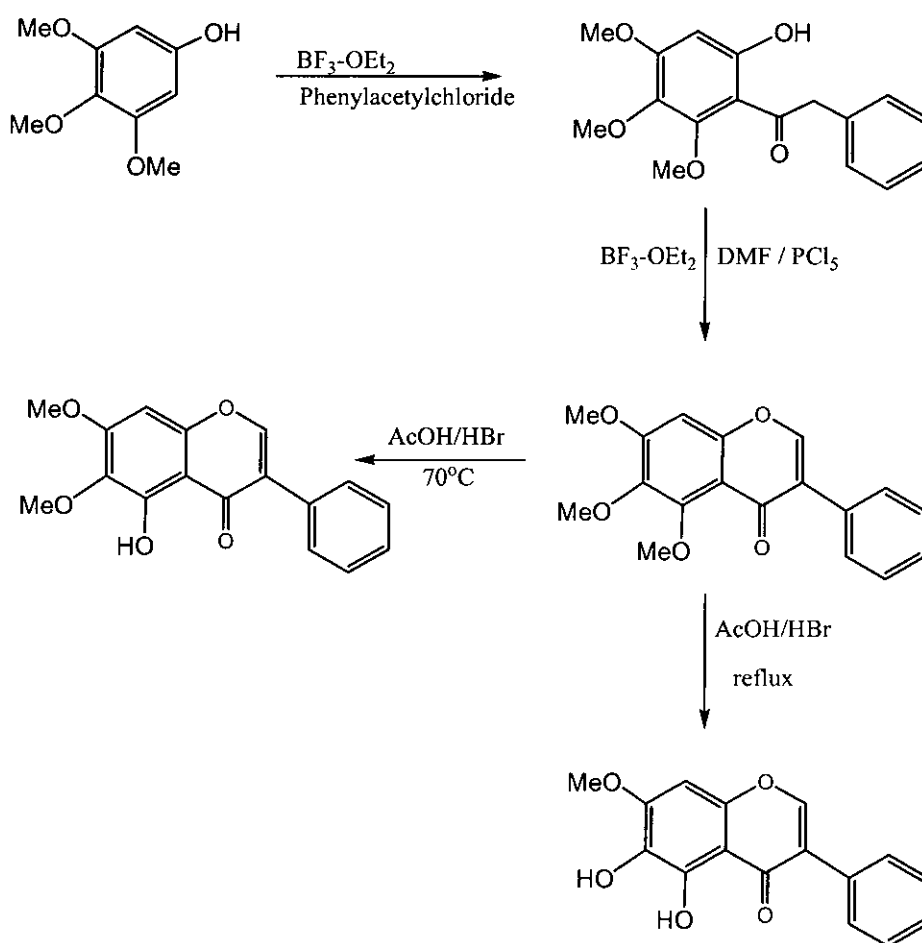
Genistein



Daidzein

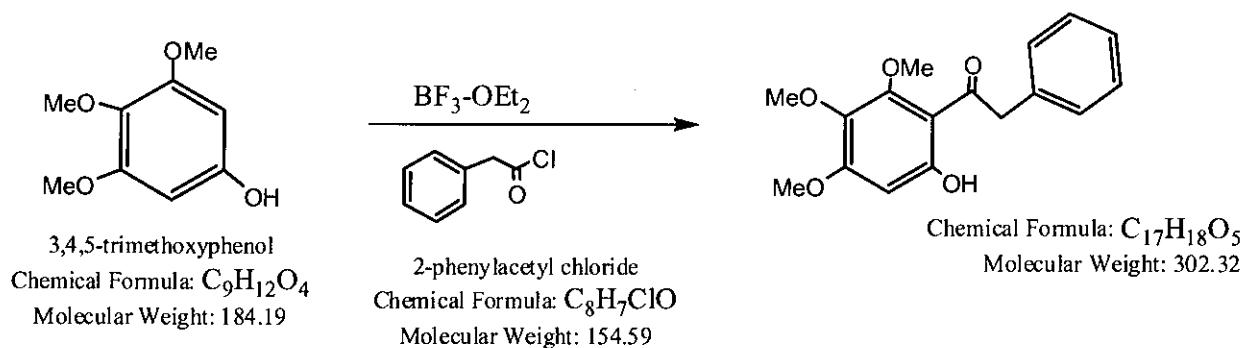


使得 isoflavones 能與 estrogen receptor 結合，活化標的細胞與刺激蛋白質的生成，產生類雌激素的作用，但強度約只有 17β -estradiol 的 1/100 至 1/1000；estrogen receptor 可分為 ER α 與 ER β 兩種 subtype。其中 isoflavones 對 ER β 有較高的結合力，在表現上能增加骨質密度，因此 isoflavones 是一種 selective receptor modulator(SERM)。在人體內有一種平衡系統維持打破和重塑的骨頭，如果破骨細胞的活性明顯高於對造骨細胞，將是一個漸進的骨骼強度的減少，導致骨質疏鬆，異黃酮具有抑制破骨細胞的活性，同時刺激造骨細胞的活性。學者^(1,2)發現 isoflavones 中 genistein 會抑制 interleukin-6 的合成，經由造骨母細胞機轉減少破骨細胞分化。另外 genistein 也被發現，能藉由細胞內鈣離子路徑抑制 protein tyrosine kinase，增加破骨細胞凋亡，減緩骨質疏鬆的發生。



二、實驗方法:

6-Hydroxy-2,3,4-trimethoxyphenyl benzyl ketone(2)



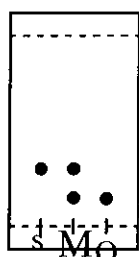
步驟:

1. 秤取 3,4,5-Trimethoxyphenol(3.67g,20mmol)置入 50ml 的三頸瓶中。
2. 抽取真空後加入氮氣(重複三次)。
3. 取 $BF_3 \cdot OEt_2$ (20ml,180mmol)加入反應瓶中。
4. 取 phenyl acetylChloride(2.9ml,22mmol)加入反應瓶中,加熱迴流,at 90 °C,1hr 後點 TLC 片觀察是否反應完成。(補充 1)
5. 冷卻後,加入冰的 D.W(15ml)洗。再倒入萃取瓶中,以 Ethyl acetate(15ml)萃取水層。再用食鹽水(brine)洗有機層,用無水硫酸鈉。
6. 經由管住層析法(EA:Hex=1:4)純化,得產物。

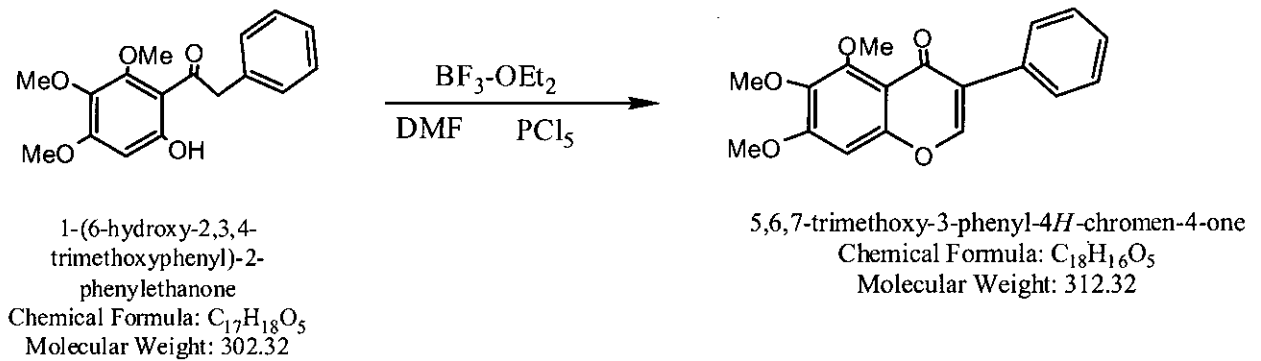
(補充 1)取一點在試管中,加 $CDCl_2$,在加 D.W 分離出有機層和水層,點有機

層,看是否反應完全。

EA:Hexane=2:3



5,6,7-Trimethoxyisoflavone(3)

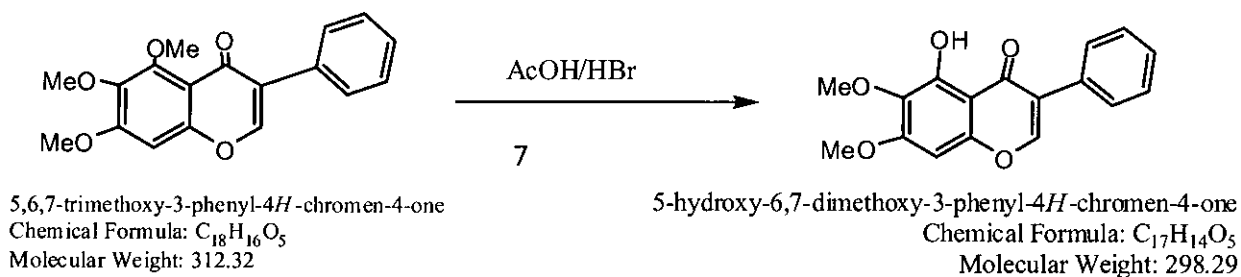


步驟:

1. 取化合物 2.(1.00g,3.3mmol)置入圓底燒瓶 25ml 中,加入 BF₃-OEt₂(2.21ml,19.21mmol)冷卻至 10°C,逐滴加入 DMF 2.8ml,攪拌約 20min。
2. 準備另一瓶圓底燒瓶 25ml 中,加入 DMF 9.4ml,冷卻至 10°C,加入 PCl₅(1.05g, 5.05mmol),約 10min。
3. 將(步驟 1)慢慢加入(步驟 2)中反應,加熱迴流 70°C,1.5hr 後,點片觀察是否反應完全。
4. 冷卻至室溫,加入冰的 D.W,產生固體後抽氣過濾(用 D.W 清洗)得產物。
5. 而剩下的溶液(少量溶於液體的產物)用 CH₂Cl₂ 溶解、萃取濃縮,以 EtOH 逼固體,抽氣過濾,的產物。



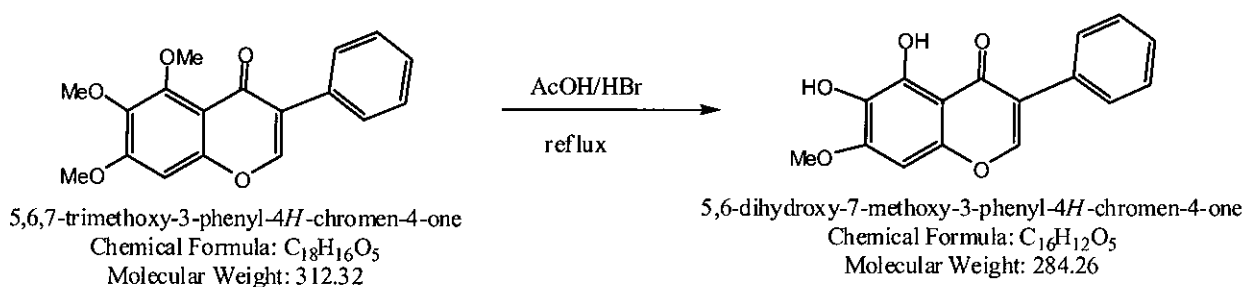
5-Hydroxy-6,7-dimethoxyisoflavone(4a)



步驟:

1. 取化合物 3(0.50g,1.6mmol)置入圓底燒瓶 25ml 內,加入冰醋酸 (10ml)。
2. 再加入 47%HBr(5ml,204mmol)接上冷凝管後加熱至 60°C,4hr 後,將其冷卻置室溫倒入冰水中,攪拌後固體析出。
3. 以抽氣過濾,固體以清水洗滌後抽真空得固體化合物(4a)。

5,6-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone(4b)



步驟:

1. 取化合物 3(0.50g,1.6mmol)置入雙頸瓶中,加入冰醋酸 (10ml,175mmol),再加入 47%的(10ml),接上冷凝管後加熱迴流 6hr 後,將其靜置冷卻至室溫倒入冰水中。
2. 攪拌後固體析出、抽氣過濾,固體以清水清洗後抽真空得固體化合物(4b)。



物 4b。

結果:

化合物 2~4a,b 從 $^1\text{H-NMR}$ 與 $^{13}\text{C-NMR}$ 鑑定結構, 如我們所推測。現已積極進行下一步水解反應, 未來將測試其活性。

參考資料:

- 1.Chen XW, Garner SC, Anderson JJB: Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:417-22。
- 2.Yoon HK, Chen K, Baylink Dj, et al: Differential effects of two protein tyrosine kinase inhibitors, tyrphostin and genistein, on human bone cell proliferation as compared with differentiation. *Calcif Tissue Int* 1998;63:243-9。
- 3.呂威捷 「類黃酮的合成方法與藥理測試」, 嘉南藥理科技大學 藥物科技研究所 碩士論文。



