

研究简报

去氢木香内酯衍生物的合成及其抗炎活性研究

李晓艺 邹秋萍 毛泽伟 李艳平*

(云南中医药大学中药学院 昆明 650500)

摘要 去氢木香内酯是一种含有多种生物活性的倍半萜化合物,广泛存在于药材云木香中。去氢木香内酯与伯胺化合物经 Michael 加成反应,合成得到 5 个新的去氢木香内酯衍生物(1~5),其结构均经¹H NMR、¹³C NMR 和 LC-MS 确证。采用小鼠巨噬细胞 Raw264.7 模型初步测试了衍生物的抗炎活性和毒性,结果表明,化合物 1 对 NO 的生成抑制率为 88±1.02%,表现出较好的抗炎活性,且在 MTT 实验中其对巨噬细胞的抑制率仅为 3.75%,几乎无细胞毒性,可作进一步研究。

关键词 去氢木香内酯 合成 抗炎活性 毒性

Syntheses and Anti-inflammatory Activities of Dehydrocostuslactone Derivatives

Li Xiaoyi, Zou Qiuping, Mao Zewei, Li Yanping*

(School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, 650500)

Abstract Dehydrocostuslactone, one of sesquiterpene lactone compounds with a variety of biological activities, is widely found in the natural drug mullein. Dehydrocostuslactone derivatives (1~5) were obtained by addition reactions of dehydrocostuslactone with primary amine compounds, and their structures were confirmed by LC-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. The anti-inflammatory activities of the derivatives were preliminarily tested using the mouse macrophage Raw 264.7 model, and the results showed that compound 1 exhibited good anti-inflammatory activity with an NO production inhibition rate of 88±1.02% and didn't show obvious cytotoxicity with a cytostatic rate of 3.75%.

Keywords Dehydrocostuslactone, Synthesis, Anti-inflammatory activity, Toxicity

天然产物去氢木香内酯(Dehydrocostuslactone)是从云木香的根中提取的倍半萜类化合物^[1]。去氢木香内酯及其衍生物具有广泛的生物活性,如抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤活性、抗病毒等作用,近年来在新药研究方面的关注度日益剧增^[2,3]。据文献报道,去氢木香内酯在治疗慢性炎症方面具有一定的疗效^[4],以胃溃疡等炎症模型相关研究发现,去氢木香内酯的抗炎活性较弱,细胞毒性较大,需对其进行结构修饰^[5-7]。

本文在前期研究基础上,为比较不同伯胺取代的衍生物生物活性的差异,对去氢木香内酯的 13-位碳上采用 Michael 加成等方法进行衍生得到系列去氢木香内酯衍生物(合成路线见图式 1)^[7-9]。采用小鼠巨噬细胞 Raw264.7 模型测试

衍生物的体外抗炎活性和毒性,期望得到具有较优抗炎活性的先导化合物,为去氢木香内酯进一步构效关系研究和药效研究提供参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Bruker AM 400 核磁共振波谱仪,TMS 为内标;高效液相三重四极杆液质联用仪;Jasco 全自动数字旋光仪;Thermo-fisher 二氧化碳培养箱。试剂和溶剂均为市售分析纯或化学纯级,二氯甲烷(DCM)使用前经干燥处理。

1.2 化合物 1 的合成

称取 69mg (0.3mmol) 去氢木香内酯置于 10mL 圆底烧瓶中,加入 5mL 无水乙醇溶解,再加

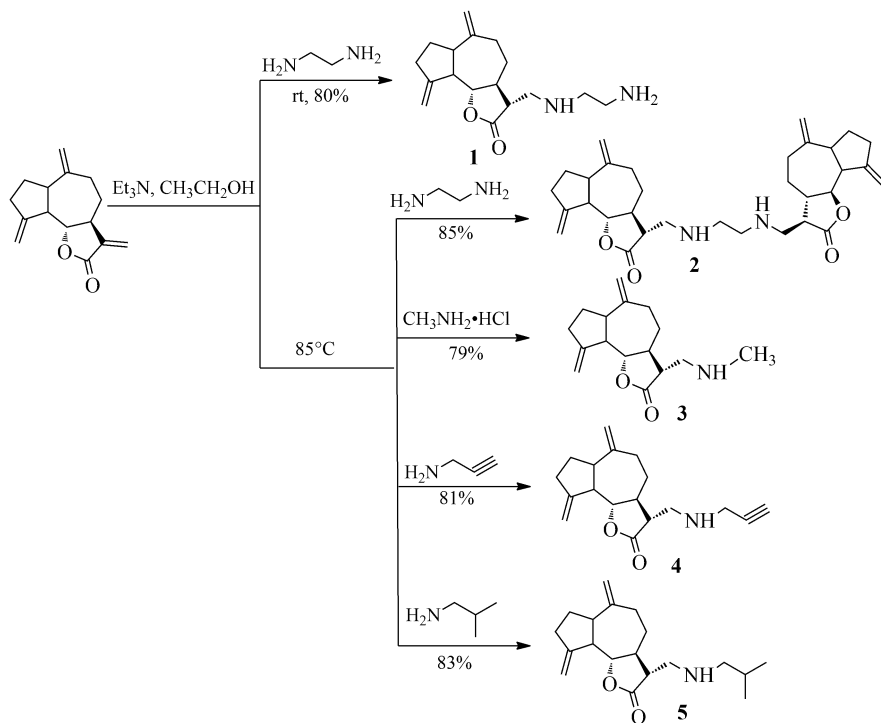
* 联系人,李艳平 E-mail: lyp8691@163.com

国家自然科学基金项目(81960777)和云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项项目(2019FF002(-005), 2018FF001(-029))资助

2022-06-08 收稿,2022-07-15 接受

入 1 滴三乙胺,最后加入 0.01mL (0.15mmol) 乙二胺,室温下反应 3~12 h。薄层色谱(TLC)检测反应完成后,将反应物倒入 20mL 冷水中,并用 DCM 萃取(10mL×3)。合并有机相并经无水硫酸钠干燥,真空浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯(体积比 1:1)为洗脱剂)分离得到白色粘稠物 69.6mg,收率 80%。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 27.6^{\circ}$ ($c = 1.1\text{mg/mL}$, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 5.16(s, 1H), 5.02(s, 1H), 4.85(s, 1H), 4.75(s,

1H), 3.96(t, $J = 9.4\text{Hz}$, 1H), 2.84~2.92(m, 2H), 2.76~2.81(m, 4H), 2.68(t, $J = 12.1\text{Hz}$, 2H), 2.42~2.52(m, 3H), 2.34~2.39(m, 1H), 2.21~2.30(m, 1H), 1.82~2.13(m, 4H), 1.28~1.37(m, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101MHz, CDCl_3) δ : 177.9, 151.8, 149.9, 112.0, 109.2, 85.7, 52.7, 52.0, 47.7, 47.6, 47.2, 45.3, 41.6, 37.7, 32.7, 32.6, 30.3; LC-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$, 理论值 291.2073, 实测值 291.1990。



图式 1 去氢木香内酯衍生物的合成

Scheme 1 Synthesis of dehydrocostuslactone derivatives

1.3 化合物 2 的合成

称取 230mg (1mmol) 去氢木香内酯置于 10mL 圆底烧瓶中,加入 5mL 无水乙醇溶解,再加入 1 滴三乙胺,最后加入 30mg (0.5mmol) 乙二胺,置于油浴上 85°C 加热回流反应 5h。TLC 检测反应完成后,冷却,然后将反应物倒入 20mL 冷水中,并用 DCM 萃取(10mL×3)。合并有机相并经无水硫酸钠干燥,真空浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯(3:7)为洗脱剂)分离得到淡黄色粘稠物 221mg,收率 85%。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 0.1^{\circ}$ ($c = 1.3\text{mg/mL}$, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 5.18(s, 2H), 5.04(s, 2H), 4.88(s, 2H), 4.76(s, 2H), 3.93~3.97(m, 2H), 2.71~2.96(m, 12H), 2.46~2.52(m, 6H), 2.30~2.41(m, 4H), 2.05~

2.15(m, 6H), 1.84~1.98(m, 4H), 1.36(t, $J = 5.4\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101MHz, CDCl_3) δ : 177.7, 151.9, 150.0, 111.7, 109.0, 85.7, 51.8, 49.3, 47.5, 47.0, 45.0, 37.7, 32.7, 32.6, 30.2; LC-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_4$, 理论值 521.3379, 实测值 521.3363。

1.4 化合物 3~5 的合成

称取 69mg (0.3mmol) 去氢木香内酯置于 10mL 圆底烧瓶中,加入 5mL 无水乙醇溶解,再加入 1 滴三乙胺,最后加入 0.5mmol 胺类化合物,置于油浴中 85°C 加热回流反应 5h。TLC 检测反应完成后,冷却,将反应物倒入 20mL 冷水中,DCM 萃取(10mL×3)。合并有机相并经无水硫酸钠干燥,真空浓缩,残余物经柱层析(石油醚/乙酸乙

酯(1:1)为洗脱剂)分离得到目标产物。

化合物 **3**: 淡黄色油状物, 收率 79%; $[\alpha]_D^{20} + 30.2^\circ$ ($c = 1.1 \text{ mg/mL}$, MeOH); ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 5.16 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.96 (t, $J = 9.3 \text{ Hz}$, 1H), 2.84~2.90 (m, 2H), 2.71~2.81 (m, 2H), 2.35~2.52 (m, 6H), 2.20~2.26 (m, 1H), 1.99~2.13 (m, 2H), 1.82~1.99 (m, 3H), 1.27~1.38 (m, 1H); ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ : 177.9, 151.8, 149.9, 112.0, 109.2, 85.8, 52.0, 50.1, 47.4, 47.1, 45.3, 37.7, 36.8, 32.7, 32.6, 30.3, 30.2; LC-MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$: $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_2$, 理论值, 262.1807, 实测值 262.1824。

化合物 **4**: 淡黄色油状粘稠物, 收率 81%; $[\alpha]_D^{20} + 15.7^\circ$ ($c = 1.2 \text{ mg/mL}$, MeOH); ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 5.17 (s, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 3.44 (t, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 2H), 2.96~3.00 (dd, $J = 4.2, 4.3 \text{ Hz}$, 1H), 2.85~2.90 (dd, $J = 6.5, 6.6 \text{ Hz}$, 2H), 2.81 (t, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H), 2.37~2.53 (m, 4H), 2.27~2.33 (m, 1H), 2.23 (t, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H), 1.98~2.14 (m, 2H), 1.81~1.96 (m, 3H), 1.28~1.39 (m, 1H); ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ : 177.7, 151.8, 149.9, 112.0, 109.3, 85.8, 81.8, 71.8, 52.0, 47.6, 47.2, 46.8, 45.3, 38.7, 37.7, 32.7, 32.6, 30.3; LC-MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$: $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_2$, 理论值 286.1807, 实测值 286.1841。

化合物 **5**: 淡褐色油状粘稠物, 收率 83%; $[\alpha]_D^{20} + 25.9^\circ$ ($c = 1.4 \text{ mg/mL}$, MeOH); ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 5.17 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.95 (t, $J = 9.4 \text{ Hz}$, 1H), 2.84~2.89 (m, 2H), 2.73~2.81 (m, 2H), 2.34~2.52 (m, 6H), 2.21~2.30 (m, 1H), 1.99~2.13 (m, 2H), 1.82~1.95 (m, 2H), 1.70~1.75 (m, 2H), 1.27~1.37 (m, 1H), 0.89 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 6H); ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ : 178.0, 151.8, 150.0, 111.9, 109.2, 85.7, 58.3, 52.0, 48.2, 47.5, 47.2, 45.4, 37.7, 32.7, 32.6, 30.3, 28.3, 20.7, 20.6; LC-MS m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$: $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NO}_2$, 理论值 304.2277, 实测值 304.2278。

1.5 抗炎活性测试

1.5.1 细胞毒性

将冻存的 RAW264.7 细胞迅速解冻后吸入含 10mL DMEM 培养基(含 10% FBS、1% 双抗)的

培养皿中, 放置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。对细胞进行换液或传代, 实验用 3~5 代。将细胞传代后, 每个培养皿中加入 5mL 左右磷酸缓冲液(PBS), 用移液枪轻轻吹打细胞, 直至培养皿上的细胞被全部吹打下来。细胞计数后按照所需细胞密度(1×10^5 个/孔)进行稀释, 之后按每孔 100 μL 加入细胞悬液。振荡均匀, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24h。吸出 96 孔板中细胞悬液, 每孔加入 100 μL 已配制好的不同浓度的样品溶液。继续放入培养箱中培养 24h。取出 96 孔板, 避光加入 MTT(每孔 10 μL), 继续放入培养箱中培养 4h, 弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液。振荡均匀, 于 490nm 处测定 OD 值, 计算细胞抑制率。

1.5.2 NO 含量检测

以地塞米松(Dexamethasone)为阳性对照, 采用细菌脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 验证模型评价化合物抑制 NO 产生的活性。取对数期生长的 RAW264.7 细胞(1×10^5 个/mL, 100 μL /孔)接种于 96 孔培养板中, 设空白对照组, LPS 模型组(加入终浓度为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS), 待测化合物组(同时加入药物和终浓度为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS), 地塞米松组(终浓度为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ LPS), 37°C 、5% CO_2 培养 24h 后, 收集培养上清液, 采用 Griess 法检测各上清液中 NO 含量。

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的合成

胺类化合物很容易与 α, β -不饱和酸酯发生 Michael 加成反应。最初的设想是伯胺与两分子去氢木香内酯发生反应, 但是在实验过程中, 除乙二胺外, 其他伯胺均只能得到衍生物 **3~5**。对反应条件进行了筛选, 结果发现, 不管是升高反应温度, 延长反应时间, 还是更换催化剂(1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯(DBU), N, N -二异丙基乙胺(DIPEA), p -TsOH, AcOH, K_2CO_3), 均未得到叔胺衍生物。原因可能是由于母核分子空间位阻比较大, 难以实现第 2 次 Michael 加成。

2.2 抗炎活性

从表 1 中可以看出, 化合物 **1** 在浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时抗炎活性较好, 且细胞毒性相较于地塞米松组更低; 化合物 **2** 对 NO 生成的抑制作用较强, 但其细胞毒性也较高; 化合物 **3~5** 对 RAW264.7 细胞均具有一定的细胞毒性, 抗炎活性相对较好。

表 1 化合物的体外抗炎活性

Tab. 1 <i>in vitro</i> anti-inflammatory activity of compounds			
化合物	给药浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	细胞抑 制率/%	NO 生成量 抑制率/%
1	12. 5	3. 75 $\pm$ 2. 83	88 $\pm$ 1. 02
	25	38. 75 $\pm$ 4. 04	79 $\pm$ 0. 93
2	12. 5	43. 57 $\pm$ 2. 79	96 $\pm$ 0. 84
	25	86. 65 $\pm$ 9. 00	99. 31 $\pm$ 1. 03
3	12. 5	45. 00 $\pm$ 0. 71	89 $\pm$ 1. 01
	25	51. 25 $\pm$ 2. 83	89 $\pm$ 1. 02
4	12. 5	39. 75 $\pm$ 1. 14	90 $\pm$ 1. 01
	25	42. 75 $\pm$ 3. 06	90 $\pm$ 1. 56
5	12. 5	23. 75 $\pm$ 2. 12	90 $\pm$ 1. 03
	25	41. 67 $\pm$ 2. 83	92 $\pm$ 1. 02
地塞米松	10	12. 75 $\pm$ 2. 12	74 $\pm$ 0. 86

3 结论

本文通过 Michael 加成反应对倍半萜类天然产物去氢木香内酯进行了结构修饰,合成得到 5 个新的衍生物,并发现该类衍生物具有潜在的抗炎活性,且毒性较低。为了进一步研究取代基对分子生物活性的影响,更多衍生物的制备及活性

研究正在进行中。

参 考 文 献

[1] 马强,陈洁,熊书,等. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (02): 200~207.

[2] Zhi L, He Q, Sha S C, et al. Parasitol. Res. , 2012, 110 (6): 2125~2130.

[3] Lin X, Peng Z, Su C. Int. J. Mol. Sci. , 2015, 16 (5):10888.

[4] Sarwar A, Enbergs H. Pak. J. Pharm. Sci. , 2007, 20(3): 175~179.

[5] 谢余,李奇娟,王战国,等. 中国新药杂志, 2019, 28 (22): 2754~2760.

[6] Zheng H, Chen Y, Zhang J, et al. Chem. Biol. Interact. , 2016, 250: 68~77.

[7] 钱伟,徐溢,王昌瑞,等. 天然产物研究与开发, 2012, 24 (12): 1857~1865.

[8] Ding Y H, Fan H X, Long J, et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. , 2013, 23(22): 6087~6092.

[9] Cala A, Zorrilla J G, Rial C, et al. J. Agric. Food Chem. , 2019, 67(38): 10764~10773.

[28] Marasini B P, Rahim F, Perveen S, et al. Bioorg. Chem. , 2017, 70: 210~221.

[29] Wu P P, He H, Ma H, et al. Bioorg. Chem. , 2021, 107: 104580.

[30] Yuan Y X, Pei J F, Lai L H. Curr. Pharm. Des. , 2013, 19 (12): 2326~2333.

[31] Xu Y J, Wang S W, Hu Q W, et al. Nucl. Acids Res. , 2018, 46(W1): W374~W379.

[32] Jerome E, Diogo S M, Andreas F T, et al. J. Chem. Inf. Model. , 2021 61(8): 3891~3898.

[33] Trott O, Olson A J O. Comput. Chem. , 2009, 31(2): 455~461.

(上接第 232 页)

[22] Konishi H, Nagase H, Manabe K. Chem. Commun. , 2015, 51(10): 1854~1857.

[23] Ajay V, Sangit K. Org. Lett. , 2016, 18(17): 4388~4391.

[24] Wang L, Xie Y B, Huang N Y, et al. ACS Catal. , 2016, 6 (6): 4010~4016.

[25] Kuppusamy B, Thanasekaran P, Ahamed A J. Eur. J. Org. Chem. , 2017, 2017(19): 2806~2813.

[26] Prakash R, Gogoi S. Adv. Synth. Catal. , 2016, 358(19): 3046~3649.

[27] Kopelman P, Bryson A, Hickling R, et al. Int. J. Obesity, 2007, 31: 494~499.