

丹皮酚及其结构类似物的修饰与抗炎活性研究

姜玉才, 彭永练, 陈莉敏*

福建医科大学药学院, 福州 350004

摘要:以丹皮酚及其结构类似物和布洛芬为原料,通过碳二亚胺法或酰氯法合成了五种化合物(A、B、C、D和E),其中化合物B、C、D和E为新化合物。化合物的结构经IR、¹H-NMR及MS等测试技术表征确证。并用二甲苯致小鼠耳肿胀模型对其进行抗炎活性筛选。结果表明,化合物表现出明显的抗炎活性($P < 0.01$)。

关键词:丹皮酚;结构类似物;布洛芬;抗炎活性

中图分类号: R914.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.026

Modification and Anti-inflammatory Activity of Paeonol and its Structural Analogues

JIANG Yu-cai, PENG Yong-lian, CHEN Li-min*

Faculty of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

Abstract: Five compounds were synthesized by coupling paeonol or its analogues with ibuprofen using DCC method or acyl chloride method. All the synthesized compounds were new, except for compound A. The structures of all synthesized compounds were characterized by IR, ¹H NMR and mass spectrometry. Anti-inflammatory activities of the compounds were evaluated in xylene-induced mice ear swelling model. The results showed that the synthesized compounds exhibited potent anti-inflammatory activities ($P < 0.01$).

Key words: paeonol; structural analogues; ibuprofen; anti-inflammatory activity

丹皮酚(paeonol)又称牡丹酚,化学名2-羟基-4-甲氧基-苯乙酮,主要是从萝藦科植物徐长卿干燥根或全草和毛茛科植物牡丹根皮中提取分离出来的一种小分子的酚类化合物^[1]。现代医学研究证明,丹皮酚具有广泛的生物活性,例如抑菌抗炎^[2]、抗氧化^[3]、降压利尿^[4]、抗凝血^[5]、抗过敏^[6]、抗肿瘤^[7]、增加巨噬细胞吞噬细胞的活性^[8]等作用。同时关于丹皮酚及丹皮酚结构类似物例如2-羟基-5-甲氧基-苯乙酮、3-羟基苯乙酮、2-羟基苯乙酮和3-甲氧基苯酚等这些物质均有类似的生物活性^[9]。非甾体抗炎药(NSAIDs)是全世界范围内处方量最大的药物之一,但长期大剂量服用NSAIDs会引起许多不良反应,特别是消化道损伤^[10]。本文利用拼合原理将临床上常用的NSAIDs布洛芬与丹皮酚及结构类似物偶联制成孪药(其中四个为新化合物),期望偶联物能增强其解热镇痛抗炎的活性,减少布洛芬的羧基对消化道的直接刺激作用,或利用丹皮酚及结构类似物的抗氧化自由基作用减少胃溃疡的产生;增

加脂溶性,减少药物在消化道的停留时间。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AVATR330FT-IR 红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司),KBr 压片法;三重串联四级杆质谱仪(美国 G6410B);核磁共振波谱仪(BRUKER, BIO-SPIN, AVANCE III),TMS 为内标,CDCl₃ 为溶剂;WRS-1B 数字熔点仪(上海精密科学仪器有限公司)。

布洛芬(99%,国药集团化学试剂有限公司);丹皮酚(99%)、2-羟基苯乙酮(99%)、3-羟基苯乙酮(98%)、2-羟基-5-甲氧基苯乙酮(99%)、4-二甲氨基吡啶(DMAP, 99%);二环己基碳二亚胺(DCC, 99%)均购自上海晶纯生化科技股份有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 丹皮酚及结构类似物与布洛芬的缩合

以五种不同的丹皮酚及结构类似物为原料,与布洛芬反应合成种目标产物(A~E),合成路线如图

1 所示:

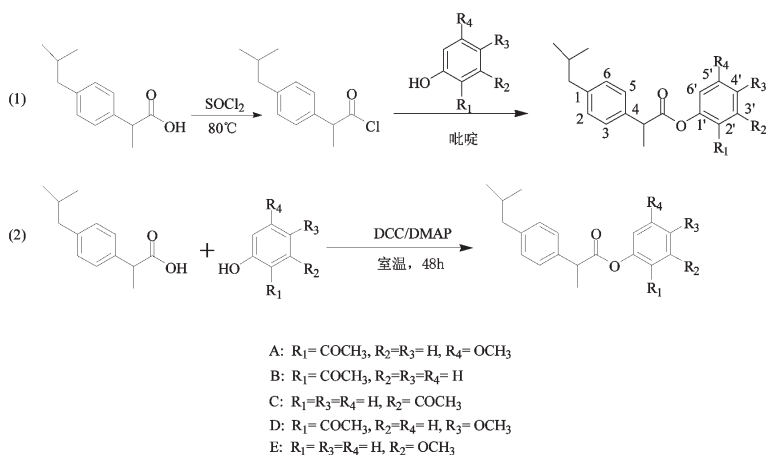


图 1 丹皮酚及结构类似物修饰的合成路线

Fig. 1 Synthetic routes of paeonol analogues

路线(1)为酰氯法:参考文献^[11]并作适当改进,将 5.0 mmol 布洛芬溶于 10 mL 氯仿,置于 50 mL 单颈瓶中,加入氯化亚砷 1.5 mL,搅拌回流 3 h,减压蒸去氯化亚砷。残留物溶解在氯仿中,冰浴冷却至 0℃,缓慢滴加丹皮酚或 2-羟基苯乙酮、3-羟基苯乙酮、2-羟基-5-甲氧基-苯乙酮、3-甲氧基苯酚 5.0 mmol 和吡啶 0.8 mL 的混合溶液,冰浴下搅拌 2 h,室温反应过夜,加入 10 mL 蒸馏水,二氯甲烷萃取(10 mL × 3),合并有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液、蒸馏水和饱和食盐水溶液洗涤,用无水硫酸镁干燥过夜。过滤,滤液浓缩,进行柱层析,洗脱液蒸去溶剂,油泵抽干,用少量的石油醚溶解,放置-20℃冰箱中过夜后,油泵抽去石油醚,得到目标化合物。

路线(2)为 DCC 法^[12]:将 5.0 mmol 布洛芬溶于 10 mL 氯仿,置于 50 mL 单颈瓶中,加入 DCC 5 mmol,室温搅拌 0.5 h,加入 DMAP 100 mg,搅拌至溶解。室温继续搅拌 0.5 h,分别加入丹皮酚或 2-羟基苯乙酮、3-羟基苯乙酮、2-羟基-5-甲氧基-苯乙酮、3-甲氧基苯酚 5 mmol,反应 48 h,过滤,滤液浓缩,进行柱层析,洗脱液蒸去溶剂,油泵抽干,得到目标化合物。

1.2.2 抗炎活性的测定^[13]

采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀法:受试化合物 A、B、C、D、E 和布洛芬均用 0.5% CMC-Na 溶液配制成 1.59×10^{-3} mol/L 的混悬液,油状物溶于总体积 5% 的二甲亚砷后混悬于 0.5% CMC-Na 溶液中。取健康 ICR 小鼠 60 只,体重 20 ± 2 g,雌雄各半,随机分为 6 组,每组 10 只,分别为模型组,阳性药组(布洛

芬),受试化合物组。给药前禁食 12 h,自由饮水。小鼠灌胃给药,给药容量为 0.2 mL/10g。给药 1 h 后将小鼠右耳廓两侧用微量进样器均匀涂布二甲苯 20 μL 致炎,左耳廓做对照。致炎 1 h 后将小鼠脱颈椎处死,沿耳廓基线取下两耳,用 7 mm 打孔器于同一部位各取下一耳片用电子天平称重,致炎耳片重量减去对照侧耳片重量即为肿胀度。将各组数据进行 t 检验,比较组间差异的显著性。并将对照组与给药组进行统计学分析处理。按下式计算抑制率(%):

$$\text{抑制率}\% = (\text{对照组平均肿胀度} - \text{给药组平均肿胀度}) / \text{对照组平均肿胀度} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 合成路线的选择

酚羟基与羧基的缩合方式有很多,较常用的有酰氯法和 DCC 法。其中酰氯法产物除了酰氯外均为气体,往往不需提纯即可应用,纯度好,产率高。但是如果所生成酰氯的沸点与氯化亚砷的沸点相近,则与氯化亚砷不易分离;另外此方法氯化亚砷对设备腐蚀严重,生成的酸对环境污染大。而采用 DCC 法,用 DCC 为脱水剂,DMAP 为催化剂,可以直接与酚制备得到酯,条件温和,简单方便,产率高。而且生成产物除了酯外,即为双环己基脲,它以固体状态析出,经过滤即可除去。本文前期试验中分别采用此 2 种方法合成了目标化合物,发现用酰氯法制备,产率较高,但操作步骤复杂,对环境污染较大;而采用 DCC 法,虽然产率相对较低,但操作步骤简

单,更加环保。经综合比较,最终选用 DCC 法。

表 1 DCC 法和酰氯法目标化合物的产率的比较

Table 1 Comparison of the yield of targeted compounds synthesized by DCC and acyl chloride method

目标化合物 Compound	DCC 法产率 (%) Yield with DCC method	酰氯法产率 (%) Yield with acyl chloride method
A	67.7	75.2
B	60.9	70.1
C	71.7	77.5
D	73.9	71.3
E	63.7	69.4

2.2 目标化合物 A ~ E 的结构表征:

化合物 A 白色结晶; mp. 37.1 ~ 37.6 °C; IR (KBr) ν_{\max} 1683.77 (-C = O), 1756.43 (-C = O) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.83 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-3'), 7.33 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-3, H-5), 7.15 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-2, H-6), 6.81 (1H, dd, J = 2.5 Hz, J = 8.8 Hz, H-4'), 6.47 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-6'), 4.04 [1H, m, -CH(CH₃)COO-], 3.83 (3H, s, -OCH₃), 2.49 [2H, d, J = 7.2 Hz, -CH₂CH(CH₃)₂], 2.36 (s, 3H, -COCH₃), 1.88 [1H, m, -CH(CH₃)₂], 1.67 (3H, d, J = 7.2 Hz, -CH₃), 0.92 [6H, d, J = 6.6 Hz, -(CH₃)₂]; ESI-MS [M + Na]⁺ m/z 377.2 (calcd for C₂₂H₂₆O₄, 354.4)。

化合物 B 白色固体; mp. 36.5 ~ 37.5 °C; IR (KBr) ν_{\max} 1686.80 (-C = O), 1756.43 (-C = O) cm^{-1} ; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.81 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-3'), 7.61 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.46 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-6'), 7.33 (2H, d, J = 7.9 Hz, H-3, H-5), 7.23 (1H, dd, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz, H-4'), 7.18 (2H, d, J = 7.9 Hz, H-2, H-6), 3.97 [1H, q, J = 7.1 Hz, -CH(CH₃)COO-], 2.59 (3H, s, -COCH₃), 2.50 [2H, d, J = 7.2 Hz, -CH₂CH(CH₃)₂], 1.88 [1H, m, -CH(CH₃)₂], 1.64 (3H, d, J = 7.1 Hz, -CH₃), 0.93 [6H, d, J = 6.6 Hz, -(CH₃)₂]; ESI-MS [M + Na]⁺ m/z 347.2 (calcd for C₂₁H₂₄O₃, 324.4)。

化合物 C 黄色油状物; IR (KBr) ν_{\max} 1689.82 (-C = O), 1762.49 (-C = O) cm^{-1} ; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.77 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-4'), 7.49 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-5'), 7.33 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-2'), 7.31 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3, H-

5), 7.17 (2H, d, J = 7.9 Hz, H-2, H-6), 7.01 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-6'), 4.02 [1H, q, J = 7.1 Hz, -CH(CH₃)COO-], 2.50 [2H, d, J = 7.2 Hz, -CH₂CH(CH₃)₂], 2.36 (s, 3H, -COCH₃), 1.88 [m, 1H, -CH(CH₃)₂], 1.67 (3H, d, J = 7.2 Hz, -CH₃), 0.92 [6H, d, J = 6.6 Hz, -(CH₃)₂]; ESI-MS [M + Na]⁺ m/z 347.2 (calcd for C₂₁H₂₄O₃, 324.4)。

化合物 D 黄色油状物; IR (KBr) ν_{\max} 1683.77 (-C = O), 1759.46 (-C = O) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.32 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-3'), 7.30 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-3, H-5), 7.17 (2H, d, J = 7.9 Hz, H-2, H-6), 7.02 (1H, dd, J = 3.0 Hz, J = 8.9 Hz, H-6'), 6.92 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-5'), 4.00 [1H, q, J = 7.1 Hz, -CH(CH₃)COO-], 3.83 (3H, s, -OCH₃), 2.48 [2H, d, J = 7.2 Hz, -CH₂CH(CH₃)₂], 2.30 (3H, s, -COCH₃), 1.88 [1H, m, -CH(CH₃)₂], 1.67 (3H, d, J = 7.1 Hz, -CH₃), 0.91 [6H, d, J = 6.6 Hz, -(CH₃)₂]; ESI-MS [M + Na]⁺ m/z 377.2 (calcd for C₂₂H₂₆O₄, 354.4)。

化合物 E 黄色油状物; IR (KBr) ν_{\max} 1687.67 (-C = O), 1754.26 (-C = O) cm^{-1} ; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.33 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-3, H-5), 7.24 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.17 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-2, H-6), 6.77 (1H, dd, J = 2.2 Hz, J = 8.3 Hz, H-6'), 6.63 (1H, m, H-4'), 6.58 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-2'), 3.95 [1H, q, J = 7.1 Hz, -CH(CH₃)COO-], 3.79 (3H, s, -OCH₃), 2.50 [2H, d, J = 7.2 Hz, -CH₂CH(CH₃)₂], 1.90 [1H, m, -CH(CH₃)₂], 1.63 (3H, d, J = 7.1 Hz, -CH₃), 0.94 [6H, d, J = 6.6 Hz, -(CH₃)₂]; ESI-MS [M + Na]⁺ m/z 335.2 (calcd for C₂₀H₂₄O₃, 312.4)。

2.3 目标化合物(A ~ E)的抗炎活性

A ~ E 对小鼠耳廓二甲苯致炎的抑制作用见表 2。由表 2 数据可以看出, A ~ E 的抗炎活性均强于模型对照 CMC-Na 组和阳性对照布洛芬组。

化合物 A ~ E 均为布洛芬的酯缩合产物, 进入体内后存在一个水解释放的过程, 到达最高有效的血药浓度时间慢于布洛芬。而本文的抗炎活性测试均在给药后 1 h 进行, 目标化合物可能尚未完全水解。因此后期计划进行目标化合物的体内释放度的实验, 确定目标化合物的释放度与时间的关系, 从而找出血药浓度的达峰时间, 进一步确认化合物的抗炎活性强弱。至于布洛芬分子中羧基“隐藏”后对

表 2 目标化合物对二甲苯致炎小鼠耳肿胀的影响 ($n = 10$, $(\bar{x} \pm s)$)

Table 2 Effects of targeted compounds on ear-swelling of mice induced by xylene ($n = 10$, $(\bar{x} \pm s)$)

目标化合物 Compound	剂量(mg/kg) Dosage	肿胀度(mg) Swelling degree	抑制率(%) Inhibition rate
CMC-Na	-	9.5 ± 2.2	-
布洛芬 Ibuprofen	7.1	6.6 ± 1.8*	30.5
A	11.2	3.5 ± 1.2**	63.2
B	10.3	5.3 ± 1.9**	44.2
C	10.3	5.4 ± 1.5**	43.2
D	11.2	4.0 ± 1.6**	57.9
E	9.9	5.1 ± 1.8**	46.3

注:与 CMC-Na 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与布洛芬组比较, ** $P < 0.05$

Note: Compare with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compare with ibuprofen, ** $P < 0.05$

胃粘膜的损害是否减少,也将在后期进行实验进一步确认。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2000, 193.
- Kim HS, Kim AS, Lee JM, *et al.* A mixture of *Trachelospermum caulis* and *Moutan cortexradicis* extracts suppresses collagen-induced arthritis in mice by inhibiting NF-(B and AP-1. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(3): 420-429.
- Peng LH, Liu S, Xu SY, *et al.* Inhibitory effects of salidroside and paeonol on tyrosinase activity and melanin synthesis in mouse B16F10 melanoma cells and ultravioletB-induced pigmentation in guinea pig skin. *Phytomedicine*, 2013, 20(12): 1082-1087.
- Zhang JZ (张竞之), Chen XY (陈小忆), Jin WX (金伟孝), *et al.* Effects of paeonol on activity and changes of HU-

VEC-C in patients with blood stasis syndrome of hypertension. *J Liaoning Univ TCM* (辽宁中医药大学学报), 2012, 14(6): 29-31.

- Fu PK, Wu CL, Tsai TH, *et al.* Anti-inflammatory and anti-coagulative effects of paeonol on LPS-induced acute lung injury in rats. *eCAM*, 2012, 2012: 1-12.
- Kim SH, Kim SA, Park MK, *et al.* Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and TNF- α . *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(2): 279-287.
- Wang B, Yan G. Structure and antitumor (LOVO) activity of *Cortex moutan* heteroglycan and curcumin. *Carbohydr Polym*, 2011, 86: 520-525.
- Chen BD, Ning ML, Yang GS. Effect of paeonol on antioxidant and immune regulatory activity in hepatocellular carcinoma rats. *Molecules*, 2012, 17: 4672-4683.
- Chen BY (陈炳阳), Yue RC (岳荣彩), Liu F (刘芳), *et al.* Acetophenones and antioxidant activity in *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. *J Pharm Sci*, 2013, 31(5): 351-354.
- Laine L, Smith R, Min k, *et al.* Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006, 3(43): 751-767.
- Zhen YM (赵一玫), Xia D (夏丹), Ai CP (艾彩萍), *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activities of ibuprofen derivatives. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2005, 15(6): 360-363.
- Han YP (韩永萍), Lu J (卢晶), Zhang H (张欢), *et al.* Study on the preparation of salicylate ester of chitoooligosaccharide by DCC condensation method and its anti-bacterial function. *Chem World* (化学世界), 2011, 3: 155-159.
- Ao GZ (敖桂珍). Studies on design, synthesis and anti-inflammatory activity of (-substituted *p*-methyl sulfonyl propionic acid and related compounds. Nanjing: China Pharmaceutical University (中国药科大学), PhD. 2002.

(上接第 853 页)

- Bai Y (白雁), Gong HY (龚海燕), Song RL (宋瑞丽), *et al.* Quantitative analysis on extracts by water and ethanol in *Rhizoma Dioscoreae* by near-infrared diffuse reflection spectroscopy. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学),

2010, 27: 166.

- Gong HY (龚海燕), Hu YN (胡亚楠), Xei CX (谢彩侠), *et al.* Rapid determination of moisture in Fructus Corni by near infrared spectroscopy. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 118.