

# 莪术醇的结构修饰以及抑制黑色素含量研究

陈亮<sup>1,2,3</sup>, 陆雪莹<sup>4,5</sup>, 黄烈军<sup>2,3</sup>,  
蹇军友<sup>2,3</sup>, 金军<sup>2,3</sup>, 顾玮<sup>2,3</sup>, 苑春茂<sup>2,3</sup>, 郝小江<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>贵州大学药学院, 贵阳 550025; <sup>2</sup>贵州医科大学药用植物功效与利用国家重点实验室;

<sup>3</sup>贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014; <sup>4</sup>中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室;

<sup>5</sup>中国科学院新疆理化研究所, 乌鲁木齐 830011

**摘要:**我们利用从莪术油中分离得到的莪术醇考察对 B16 细胞黑色素的影响, 发现其对黑色素有抑制作用。为了进一步对莪术醇的化学结构进行修饰, 设计合成了 8 个莪术醇的衍生物, 其中 **2, 3, 5a, 5b, 6** 为新化合物。经筛选发现两个衍生物 **5b** 和 **6** 抑制黑色素含量比莪术醇有所增强, 但并无较大的显著性差异, 经 Graphpad prism 软件分析, 其 *P* 值均大于 0.05, 分别为 0.80 和 0.22。黑色素含量测定结果表明莪术醇环外双键经环氧化、水解及酯化后可提高其抑制黑色素含量。

**关键词:** 莪术醇; 结构修饰; B16 细胞; 抑制黑色素含量; 美白作用

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)2-0317-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.2.016

## Structural modification and inhibition of melanin content of curcumol

CHEN Liang<sup>1,2,3</sup>, LU Xue-ying<sup>4,5</sup>, HUANG Lie-jun<sup>2,3</sup>,  
JIAN Jun-you<sup>2,3</sup>, JIN Jun<sup>2,3</sup>, GU Wei<sup>2,3</sup>, YUAN Chun-mao<sup>2,3</sup>, HAO Xiao-jiang<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Guizhou University, College of Pharmacy, Guiyang 550025, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China;

<sup>3</sup>Key Laboratory of Natural Product Chemistry of Guizhou Academy of Sciences;

<sup>4</sup>The State Key Laboratory of Chemistry of Plant Resources in Arid Regions, Chinese Academy of Sciences;

<sup>5</sup>The Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

**Abstract:** Curcumol isolated from the oil of *Oleum curcumae* was identified to be inhibited melanin in B16 cells. In order to modification its structure, eight derivatives of curcumol were designed and synthesized, of which **2, 3, 5a, 5b, 6** are new compounds. As the result of screening, **5b** and **6** showed the stronger inhibitory content on melanin than curcumol, but there were no significant differences. According to Graphpad prism software analysis, their *P* values were all greater than 0.05, which were 0.80 and 0.22, respectively. The result of the melanin content measurement indicated that epoxidation followed by the hydrolyzation and esteration of the exocyclic double bond of curcumol could increase inhibitory content on melanin in B16 cells.

**Key words:** curcumol; structural modification; cell B16; inhibition of melanin content; whitening effect

莪术为姜科植物莪术、郁金、广西莪术的干燥根茎, 目前已大量人工栽培, 资源充足, 莪术醇为莪术油的主要活性成分, 在莪术油中含量 7% ~ 8%, 对莪术油药效的贡献最大<sup>[1]</sup>。文献报道莪术醇皮下注射对小鼠肉瘤 S37、宫颈癌 U14、艾氏腹水癌均有明显的抑制作用<sup>[2]</sup>。为了探索对黑色素的影响, 我

们选用黑色素瘤 (B16) 细胞, 进行了莪术醇对细胞内黑色素含量的测定并以莪术醇为前体, 对其化学结构进行修饰, 合成了系列衍生物, 以期发现新的抑制黑色素含量的化合物。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

莪术油购自江西吉安市青原区友才天然香料油有限公司; 实验所用试剂除特别说明外皆为市售分析纯试剂, 且未经纯化直接使用; B16 小鼠黑色素瘤

收稿日期: 2019-09-10 接受日期: 2019-12-25

基金项目: 中科院西部之光人才培养引进计划 (2016-QNXZ-B-5)

\* 通信作者 Tel: 86-871-63804492; E-mail: haoxj@mail.kib.ac.cn

细胞购自中国科学院细胞库, 目录号 TCM 2; 核磁共振仪: INOVA-400 和 600 型 (Bruker 公司, 瑞士, TMS 为内标); ESI-MS 质谱仪: 惠普 LC-MSD 型高效液相色谱-质谱联用仪。

## 1.2 莪术醇制备

将购得的 2 kg 莪术油经粗硅胶 (40 ~ 80 目) 拌

样后, 进行柱层析色谱 (石油醚: 乙酸乙酯 = 60: 1) 的分离得到含莪术醇粗品, 将所得到的粗品进行重结晶 (乙醇), 得到 185 g 白色晶体, 易溶于氯仿。

## 1.3 莪术醇衍生物的制备

莪术醇衍生物的设计合成路线见图 1。

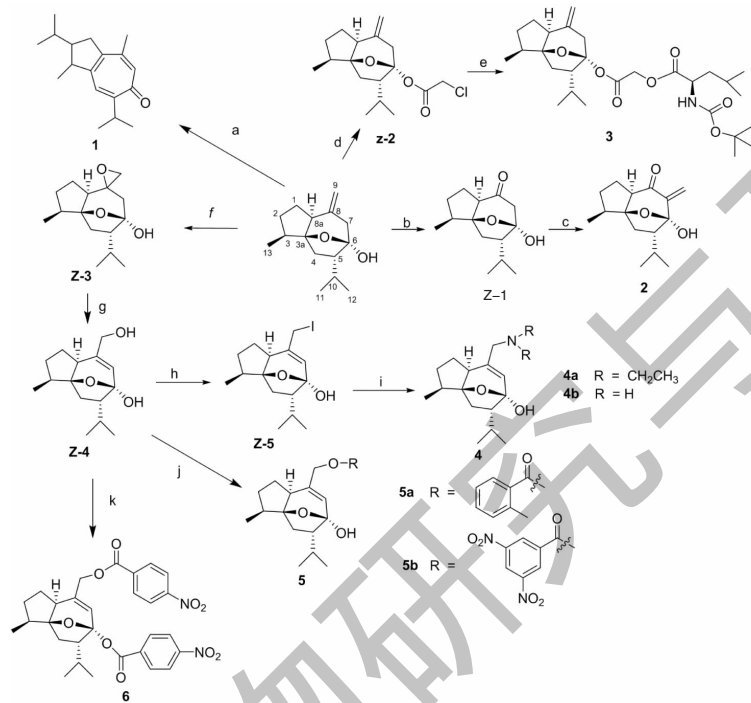


图 1 莪术醇衍生物的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of curcumol derivatives

注: 试剂及反应条件 (a) HBr, acetone, 60 °C; (b) O<sub>3</sub>, Me<sub>2</sub>S, -78 °C; (c) (BMIM) NTf<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, *i*-Pr<sub>2</sub>NH · TFA; (d) Chloroacetic anhydride, NaH, DCM; (e) BOC-L-Leucine, NaHCO<sub>3</sub>, CSF, DMF; (f) *m*-CPBA, DCM; (g) NaOH, isopropyl alcohol; (h) NIS, PPh<sub>3</sub>, DCM; (i) Diethylamine, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, 70 °C/NH<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O, 40 °C; (j) Carboxylic acid, DMAP, DCC, DCM; (k) 4-Nitrobenzoyl chloride, NaH, KI, DMF。

### 1.3.1 2,7-二异丙基-1,4-二甲基-2,3-二氢环戊烷并环庚三烯-6(1H)-酮(1)的制备

在 50 mL 反应瓶中加入 30 mL 丙酮, 再加入 5 mL 40% 的氢溴酸溶液, 在此体系中加入无水硫酸钠干燥三小时, 再加入五氧化二磷深度除水, 过滤, 得滤液<sup>[3]</sup>。将 100 mg 莪术醇溶于此滤液中, 加热回流, TLC (5% 的硫酸乙醇显色) 跟踪至反应完全, 加入饱和碳酸氢钠溶液中和体系中过量的溴化氢, 无水硫酸钠干燥后减压浓缩, 经柱色谱 (石油醚: 乙酸乙酯 = 10: 1) 得 35 mg 白色固体 (1)。

### 1.3.2 (3*S*, 3*aS*, 5*S*, 6*R*, 8*aR*)-3-甲基-5-异丙基-7-甲烯基-8*H*-3*a*, 6-环氧莪术-6-醇-8-酮(2)的制备

在 50 mL 反应瓶中加入 20 mL 二氯甲烷 (DCM), 加入 100 mg 莪术醇, 置于低温反应器中,

将温度设置为 -78 °C, 在此温度下搅拌 15 min<sup>[4]</sup>。随后, 利用臭氧发生装置, 向反应体系中通入臭氧, TLC (5% 的硫酸乙醇显色) 跟踪至反应完全, 加入 0.2 mL 二甲硫醚, 室温搅拌 3 h 后, 依次用饱和亚硫酸氢钠, 饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥后减压浓缩, 经柱色谱 (石油醚: 乙酸乙酯 = 10: 1) 得 48 mg 无色透明液体 (Z-1)。

在 25 mL 反应瓶中, 依次加入 2 mL 1-丁基-3-甲基咪唑二(三氟甲基磺酰)酰亚胺 ((BMIM) NTf<sub>2</sub>), 中间体 Z-1 (19 mg, 0.08 mmol), 多聚甲醛 (5 mg, 0.16 mmol) 及催化剂三氟乙酸二异丙基胺盐 (*i*-Pr<sub>2</sub>NH · TFA) (18 mg, 0.08 mmol), 70 °C 下反应<sup>[5,6]</sup>, TLC (5% 的硫酸乙醇显色) 跟踪至反应完全, 依次用 1 N 的盐酸水溶液, 1 N 的氢氧化钠水溶液,

饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,刮板,得 17 mg 白色固体(**2**)。

### 1.3.3 2-((3*S*,3*aS*,5*S*,6*R*,8*aS*)-3-甲基-5-异丙基-8-甲烯基八氢-6*H*-3*a*,6-环氧莜术-6-醇)-2-氧代乙基 BOC-L 亮氨酸(**3**)的制备

在 50 mL 反应瓶中,加入 20 mL 二氯甲烷(DCM),加入莜术醇(300 mg,1.27 mmol)及氢化钠(NaH)(305 mg,12.7 mmol),室温搅拌 30 min,随后加入氯乙酸酐(543 mg,3.2 mmol),室温搅拌<sup>[4]</sup>,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,加水淬灭,依次用饱和酒石酸,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,经柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=100:1)得 257 mg 无色透明液体(**Z-2**)。

在 25 mL 反应瓶中,加入 10 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),再依次加入中间体 **Z-2**(22 mg,0.071 mmol),BOC-L 亮氨酸(17 mg,0.071 mmol),碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)(6 mg,0.071 mmol)以及催化量的氟化铯(CSF),室温搅拌 15 min,随后加热至 70 °C 反应,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,加水淬灭,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,经柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=30:1)得 28 mg 无色透明液体(**3**)。

### 1.3.4 (3*S*,3*aS*,5*S*,6*S*,8*aS*)-3-甲基-5-异丙基-8-(*N,N*-二乙基-氨基甲基)-1,2,3,4,5,8*a*-六氢-6*H*-3*a*,6-环氧莜术-6-醇(**4a**)的制备

在 100 mL 反应瓶中,加入 50 mL 二氯甲烷(DCM),加入莜术醇(1 g,4.24 mmol)及间氯过氧苯甲酸(1.096 g,6.36 mmol),室温下搅拌<sup>[4]</sup>,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,依次用饱和亚硫酸氢钠,饱和碳酸氢钠,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,得粗品中间体(**Z-3**),将其溶于 30 mL 异丙醇中,加入氢氧化钠(512 mg,12.72 mmol),70 °C 下反应,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,依次用饱和酒石酸,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,经柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=3:1)得 744 mg 白色固体(**Z-4**)。

在 50 mL 反应瓶中,加入 20 mL 二氯甲烷(DCM),依次加入中间体 **Z-4**(300 mg,1.2 mmol),*N*-碘代丁二酰亚胺(NIS)(405 mg,1.8 mmol)及三苯基膦(PPh<sub>3</sub>)(471 mg,1.8 mmol),室温下搅拌<sup>[7]</sup>,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,经柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=15:1)得 264 mg 浅黄色液体(**Z-5**)。

在 25 mL 反应瓶中,加入 10 mL 四氢呋喃(THF),依次加入中间体 **Z-5**(100 mg,0.276 mmol),二乙胺(43 μL,0.414 mmol)及碳酸钾(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)(57 mg,0.414 mmol),70 °C 下反应<sup>[8]</sup>,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,加水淬灭,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,经柱色谱(石油醚:丙酮=20:1)得 77 mg 浅黄色透明液体(**4a**)。

### 1.3.5 (3*S*,3*aS*,5*S*,6*S*,8*aS*)-3-甲基-5-异丙基-8-氨基-1,2,3,4,5,8*a*-六氢-6*H*-3*a*,6-环氧莜术-6-醇(**4b**)的制备

在 25 mL 反应瓶中,加入中间体 **Z-5**(132 mg,0.365 mmol)及 14 mL 氨水,40 °C 下反应<sup>[8]</sup>,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,减压浓缩,经柱色谱(三氯甲烷:甲醇=20:1)得 48 mg 白色固体(**4b**)。

### 1.3.6 (3*S*,3*aS*,5*S*,6*S*,8*aS*)-3-甲基-8-羟甲基-5-异丙基-8-[(2-甲基-苯甲酰氧基)甲基]-1,2,3,4,5,8*a*-六氢-6*H*-3*a*,6-环氧莜术-6-醇(**5a**)的制备

在 25 mL 反应瓶中,加入 10 mL 二氯甲烷(DCM),再依次加入中间体 **Z-4**(31 mg,0.4 mmol),邻甲基苯甲酸(20 mg,0.15 mmol),二环己基碳二亚胺(DCC)(76 mg,0.369 mmol)及催化量 4-二甲氨基吡啶(DMAP),室温下搅拌<sup>[9]</sup>,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,依次用饱和碳酸氢钠,饱和酒石酸,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,经柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=10:1)得 32 mg 无色透明液体(**5a**)。

### 1.3.7 (3*S*,3*aS*,5*S*,6*S*,8*aS*)-3-甲基-8-羟甲基-5-异丙基-8-[(3,5-二硝基-苯甲酰氧基)甲基]-1,2,3,4,5,8*a*-六氢-6*H*-3*a*,6-环氧莜术-6-醇(**5b**)的制备

在 25 mL 反应瓶中,加入 15 mL 二氯甲烷(DCM),再依次加入中间体 **Z-4**(103 mg,0.41 mmol),3,5-二硝基苯甲酸(104 mg,0.49 mmol),二环己基碳二亚胺(DCC)(253 mg,1.23 mmol)及催化量 4-二甲氨基吡啶(DMAP),室温下搅拌<sup>[9]</sup>,TLC(5%的硫酸乙醇显色)跟踪至反应完全,依次用饱和碳酸氢钠,饱和酒石酸,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,经柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=10:1)得 106 mg 白色固体(**5b**)。

### 1.3.8 (3*S*,3*aS*,5*S*,6*S*,8*aS*)-3-甲基-8-羟甲基-5-异丙基-1,2,3,4,5,8*a*-六氢-6*H*-3*a*,6-环氧莜术-6-醇对硝基苯甲酸二酯(**6**)的制备

在 50 mL 反应瓶中,加入 15 mL *N,N*-二甲基甲

酰胺 (DMF), 依次加入中间体 **Z-4** (158 mg, 0.627 mmol), 氢化钠 (NaH) (150 mg, 6.27 mmol) 及催化量碘化钾 (KI), 室温搅拌 15 min, 随后加入对硝基苯甲酰氯 (348 mg, 1.88 mmol), 室温下搅拌<sup>[4,9]</sup>, TLC(5% 的硫酸乙醇显色) 跟踪至反应完全, 加水淬灭, 依次用饱和酒石酸, 饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥后减压浓缩, 经柱色谱(石油醚: 乙酸乙酯 = 10:1) 得 137 mg 白色固体 (**6**)。

#### 1.4 莪术醇衍生物抑制黑色素含量的测定

所合成的莪术醇衍生物 **1**、**2**、**3**、**4a**、**4b**、**5a**、**5b**、**6**, 采用 NaOH 裂解法测定细胞内的黑色素含量<sup>[10]</sup>。将处于对数生长期的 B16 细胞消化, 接种于 6 孔板中, 浓度为  $2 \times 10^5$  个/孔, 并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。待细胞完全贴壁后用药, 并继续培养 72 h。弃去上清液, PBS 洗涤 2 次, 使用细胞刮收集细胞后每孔加入细胞裂解液 200 μL。于 4 °C 充分裂解 40 min 后, 12 000 rpm 离心 20 min。转移上清至 EP 管测定蛋白浓度。沉淀物中加入 190 μL 1 mol/L 的 NaOH(含 10% DMSO) 裂解液, 并于 80 °C 水浴 1 h 充分溶解后, 在 405 nm 处测定吸光值, 最终的黑色素含量使用相对蛋白浓度归一化处理。计算公式为黑色素相对含量 = (OD<sub>405</sub> 样品/蛋白浓度)/(OD<sub>405</sub> 空白/蛋白浓度) × 100%, 每个样品重复 3 次进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 莪术醇的结果表征

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.87 (s, 2H, H-9), 2.55 (m, 2H, H-7), 2.14 (m, 2H, H-4), 1.00 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H, H-12), 0.90 (d, *J* = 4 Hz, 3H, H-11), 0.86 (d, *J* = 4 Hz, 3H, H-13); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 144.8 (C-8), 113.0 (C-9), 104.7 (C-6), 88.2 (C-3a), 56.4 (C-5), 54.6 (C-8a), 39.5 (C-3), 38.9 (C-7), 34.8 (C-4), 31.0 (C-2), 28.8 (C-10), 28.3 (C-1), 23.2 (C-11), 21.6 (C-12), 12.5 (C-13); HR-ESI-MS: *m/z* 259.1667 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>Na, 259.1669)。与文献<sup>[11-13]</sup> 中莪术醇的核磁数据比较, 确定所得晶体化合物为莪术醇。

### 2.2 莪术醇衍生物的结果表征

化合物 **1** 白色固体, 收率 33%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.08 (s, 1H, H-6), 7.00 (s, 1H, H-9), 3.46 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-11), 3.07 (p, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-4), 2.81 (dd, *J* = 16.7, 7.7 Hz, 1H, H-2), 2.54 (dd, *J* = 16.7, 11.5 Hz, 1H, H-2), 2.22

(s, 3H, H-14), 1.92 (m, 1H, H-3), 1.73 (m, 1H, H-6), 1.17 (d, *J* = 3.1 Hz, 3H, H-15), 1.16 (d, *J* = 3.1 Hz, 3H, H-12 or H-13), 1.04 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-12 or H-13), 0.99 (d, *J* = 2.0 Hz, 3H, H-17 or H-18), 0.98 (d, *J* = 2.2 Hz, 3H, H-17 or H-18); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 185.3 (C-8), 158.6 (C-7), 151.8 (C-5), 144.9 (C-1), 144.8 (C-10), 138.8 (C-9), 130.7 (C-6), 48.7 (C-3), 46.7 (C-4), 38.6 (C-2), 29.7 (C-11), 28.3 (C-16), 25.0 (C-14), 22.6 (C-12), 22.4 (C-13), 21.7 (C-17), 21.6 (C-18), 14.2 (C-15); HR-ESI-MS: *m/z* 281.1873 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>ONa, 281.1876)。

化合物 **2** 白色固体, 收率 85%; mp. 109.1 ~ 111.6 °C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -105 (c 0.0019, CH<sub>3</sub>OH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 227 (0.53) nm; IR (KBr) ν<sub>max</sub> 3391 (O-H), 1685 (C=O), 1621 (C=C) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.25 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-1'), 5.72 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-1'), 0.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-11), 0.86 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, H-10), 0.82 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 200.8 (C-8), 144.6 (C-7), 121.9 (C-1'), 105.4 (C-6), 86.2 (C-3a), 59.9 (C-5), 56.5 (C-8a), 40.9 (C-3), 35.4 (C-4), 31.0 (C-2), 29.8 (C-9), 27.1 (C-1), 22.4 (C-11), 20.6 (C-10), 11.6 (C-12); HR-ESI-MS: *m/z* 273.1459 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>Na, 273.1461)。

化合物 **3** 无色透明液体, 收率 78%; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -40 (c 0.003, CH<sub>3</sub>OH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 205 (0.79) nm; IR (KBr) ν<sub>max</sub> 3451 (N-H), 3382 (O-H), 1778 (C=O), 1757 (C=O), 1719 (C=O), 1646 (C=C) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.89 ~ 4.87 (m, 2H, H-2'), 4.67 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-9), 4.51 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-9), 4.43 ~ 4.38 (m, 1H, H-4'), 1.44 (s, 9H, H-11', H-12' and H-13'), 0.99 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H-11), 0.96 (dd, *J* = 6.1, 3.6 Hz, 6H, H-7' and H-8'), 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-12), 0.86 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 172.8 (C-3'), 164.4 (C-1'), 155.4 (C-9'), 144.1 (C-8), 113.4 (C-9), 110.1 (C-6), 90.0 (C-3a), 79.9 (C-10'), 61.5 (C-2'), 54.5 (C-5), 52.0 (C-8a), 51.9 (C-4'), 41.6 (C-5'), 39.4 (C-3), 36.8 (C-7), 33.4 (C-2), 30.8 (C-4), 28.3 (C-11', C-12' and C-13'), 28.3 (C-1), 24.8 (C-10),

23.0 (C-6'), 22.7 (C-7' and C-8'), 21.7 (C-11), 21.4 (C-12), 12.2 (C-13); HR-ESI-MS:  $m/z$  530.309 1 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>Na, 530.308 8)。

**化合物 4a** 浅黄色透明液体, 收率 90%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.76 (s, 1H, H-7), 3.10 (d,  $J$  = 13.1 Hz, 1H, H-9), 2.77 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1H, H-9), 2.61 (s, 2H, H-1'), 2.40 (s, 2H, H-1''), 1.02 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 12H, H-11, H-12, H-2' and H-2''), 0.90 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 143.1 (C-8), 126.0 (C-7), 103.4 (C-6), 87.0 (C-3a), 59.5 (C-9), 56.8 (C-5), 50.3 (C-8a), 47.0 (C-1' and C-1''), 40.3 (C-3), 36.7 (C-4), 31.2 (C-2), 31.0 (C-10), 27.4 (C-1), 22.7 (C-11), 21.4 (C-12), 11.8 (C-13), 11.6 (C-2' and C-2''); HR-ESI-MS:  $m/z$  308.258 4 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>2</sub>, 308.258 4)。

**化合物 4b** 白色固体, 收率 53%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.97 (s, 2H, N 上氢), 6.15 (s, 1H, H-7), 3.72 (d,  $J$  = 14.6 Hz, 1H, H-9), 3.63 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H, H-9), 1.01 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 3H, H-12), 0.99 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, H-11), 0.86 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 136.33 (C-8), 127.54 (C-7), 103.83 (C-6), 87.33 (C-3a), 58.62 (C-5), 50.53 (C-8a), 42.20 (C-9), 40.17 (C-3), 35.94 (C-4), 31.30 (C-2), 30.44 (C-10), 27.52 (C-1), 22.68 (C-11), 21.90 (C-12), 11.82 (C-13); HR-ESI-MS:  $m/z$  252.195 4 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>2</sub>, 252.195 8)。

**化合物 5a** 无色透明液体, 收率 71%。 $[\alpha]_D^{25}$  30 (c 0.002 7, CH<sub>3</sub>OH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (1.49), 231 (1.11) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3 374 (O-H), 1 720 (C=O), 1 662 (C=C), 1 602, 1 576, 1 488, 1 458, 738 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 7.93 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-7'), 7.48 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, H-5'), 7.37 ~ 7.27 (m, 2H, H-4' and H-6'), 5.97 (s, 1H, H-7), 4.86 ~ 4.71 (m, 2H, H-9), 2.59 (s, 3H, H-8'), 1.02 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, H-11), 0.99 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, H-12), 0.88 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 166.6 (C-1'), 139.7 (C-3'), 138.2 (C-8), 132.0 (C-5'), 131.7 (C-4'), 130.3 (C-2'), 129.9 (C-7'), 128.3 (C-6'), 125.9 (C-7), 103.0 (C-6), 85.9 (C-3 $\alpha$ ), 65.7 (C-9),

59.2 (C-5), 49.6 (C-8 $\alpha$ ), 40.1 (C-3), 36.3 (C-4), 31.3 (C-10), 30.8 (C-2), 27.4 (C-1), 22.3 (C-8'), 21.0 (C-11), 20.9 (C-12), 11.2 (C-13); HR-ESI-MS:  $m/z$  393.203 3 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na, 393.203 6)。

**化合物 5b** 白色固体, 收率 58%; mp. 58.0 ~ 60.1 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  19 (c 0.002 1, CH<sub>3</sub>OH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 206 (1.28) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3 386 (O-H), 1 735 (C=O), 1 629 (C=C), 1 596, 1 546, 1 461, 721 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 9.19 (t,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, H-5'), 9.11 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 2H, H-3' and H-7'), 6.05 (s, 1H, H-7), 5.05 ~ 4.89 (m, 2H, H-9), 1.03 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, H-12), 0.99 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, H-11), 0.89 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 163.1 (C-1'), 149.6 (C-4' and C-6'), 138.0 (C-8), 134.2 (C-2'), 130.2 (C-3' and C-7'), 129.7 (C-5'), 123.2 (C-7), 103.7 (C-6), 86.7 (C-3a), 68.3 (C-9), 59.9 (C-5), 50.3 (C-8a), 40.7 (C-3), 36.9 (C-4), 32.0 (C-2), 31.5 (C-10), 28.3 (C-1), 23.0 (C-11), 21.6 (C-12), 11.9 (C-13); HR-ESI-MS:  $m/z$  469.157 6 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na, 469.1581)。

**化合物 6** 白色固体, 收率 40%; mp. 67.8 ~ 69.0 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  32 (c 0.002 5, CH<sub>3</sub>OH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (2.08), 259 (2.01) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  1 743 (C=O), 1 724 (C=O), 1 607 (C=C), 1 528, 1 460, 873, 835, 718 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 8.39 (t,  $J$  = 8.9 Hz, 4H, H-4', H-6' and H-4'', H-6''), 8.34 ~ 8.29 (m, 4H, H-3', H-7' and H-3'', H-7''), 6.35 (s, 1H, H-7), 4.99 ~ 4.92 (m, 2H, H-9), 1.09 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, H-12), 1.02 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, H-11), 0.98 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 164.1 (C-1'), 161.4 (C-1''), 150.8 (C-5'), 150.8 (C-5''), 136.5 (C-8), 136.0 (C-2'), 135.6 (C-2''), 130.9 (C-3' and C-7'), 130.8 (C-3'' and C-7''), 126.3 (C-7), 123.7 (C-4' and C-6'), 123.7 (C-4'' and C-6''), 106.2 (C-6), 89.3 (C-3a), 66.7 (C-9), 58.3 (C-5), 49.6 (C-8a), 39.9 (C-3), 34.6 (C-4), 31.1 (C-2), 30.3 (C-10), 27.5 (C-1), 21.9 (C-11), 21.0 (C-12), 11.1 (C-13); HR-ESI-MS:  $m/z$  573.184 6 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>Na, 573.184 4)。

## 2.3 细胞内黑色素含量测定

表1 细胞内黑色素含量测定 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Determination of melanin content in cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 化合物<br>Compound          | 浓度<br>Concentration<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 细胞内黑色素含量<br>Intracellular melanin<br>content(% of control) |
|--------------------------|--|--|
| 阴性对照<br>Negative control | -  | 100.00 $\pm$ 11.66   |
| 8-甲氧基补骨脂素<br>8-MOP       | 50   | 196.97 $\pm$ 6.28  |
| 莪术醇<br>Curcumol          | 1  | 87.24 $\pm$ 7.03   |
| <b>1</b>                 | 1  | 100.70 $\pm$ 2.41  |
| <b>2</b>                 | 1  | 97.30 $\pm$ 6.50   |
| <b>3</b>                 | 1  | 104.28 $\pm$ 1.94  |
| <b>4a</b>                | 1  | 104.97 $\pm$ 1.56  |
| <b>4b</b>                | 1  | 96.64 $\pm$ 7.05   |
| <b>5a</b>                | 1  | 108.28 $\pm$ 5.27  |
| <b>5b</b>                | 1  | 85.75 $\pm$ 5.52   |
| <b>6</b>                 | 1  | 80.14 $\pm$ 0.89   |

经 Graphpad prism 软件分析, 各组之间对比, 均无显著性差异, 其中与阴性对照组相比, 化合物 **1**、**2**、**3**、**4a**、**4b**、**5a**、**5b**、**6** 以及莪术醇的  $P$  值分别为 0.94、0.78、0.63、0.60、0.74、0.40、0.19、0.13、0.23。由含量测定结果首次发现, 先导化合物莪术醇具有一定美白作用, 8 个衍生物中有 2 个衍生物的抑制黑色素含量的作用超过莪术醇。中间体 **Z-4**, 9 位羟基上接入 3,5-二硝基苯甲酸 (**5b**), 成酯键后作用比莪术醇强; 中间体 **Z-4**, 9 位羟基和半缩酮羟基上都接入对硝基苯甲酰氯 (**6**) 成酯键后作用也比莪术醇强, 而且也比化合物 **5b** 的作用强。而中间体 **Z-4**, 9 位羟基上接入邻甲基苯甲酸 (**5a**), 成酯键后作用则明显降低, 比莪术醇弱。由此可见 **Z-4** 中间体羟基上引入苯环上具有吸电子基团的苯甲酸成酯键后的抑制黑色素含量的作用要优于引入苯环上具有给电子基团的苯甲酸。莪术醇在酸性条件下发生开环重排得到的衍生物 **1**, 针对半缩酮羟基的修饰, 得到的衍生物 **3**, 莪术醇经过臭氧化, 再经过 mannich 反应, 得到具有  $\alpha, \beta$  不饱和酮结构的衍生物 **2**, 以及引入含氮基团得到的衍生物 **4a** 和 **4b**, 其作用均比莪术醇弱。

## 3 结论

本文首次发现莪术醇具有抑制 B16 细胞中黑色素的活性, 具有一定的美白作用。以莪术醇为前体, 制备了 8 个系列衍生物, 其中 **2**、**3**、**5a**、**5b**、**6** 为新化合物, 经抑制黑色素含量的测定, 其中衍生物 **5b**

和 **6** 的抑制黑色素含量的作用要优于莪术醇。经初步的构效关系分析可知, 在中间体 **Z-4** 羟基上引入苯环上具有吸电子基团的苯甲酸成酯键后的抑制黑色素含量的作用要优于引入苯环上具有给电子基团的苯甲酸。研究结果对于莪术醇的结构修饰及其美白作用的深入研究具有一定的参考价值。

## 参考文献

- Li Y, Wu JH, Xie YH. On research progress of zedoary turmeric oil[J]. J Shaanxi Univ Chin Med(陕西中医药大学学报), 2017, 40:118-121.
- Zhong ZF, Chen XP, Wu T. Research progress of curcumol [J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21:2959-2960.
- Ma X. Structural modification of curcumol [D]. Dalian: Dalian University of Technology(大连理工大学), 2010.
- Fan YM. Isolation of PPBS from *Garcinia multiflora* and structural optimization of curcumol that a novel wnt signaling pathway activator[D]. Guizhou: Guixiang University(贵州大学), 2016.
- Juliana AV, Daniel FZ, Paulo JSM, et al. Efficient a-methylation of carbonyl compounds in ionic liquids at room temperature[J]. Synlett, 2009, 1:75-78.
- Alejandro B, Kyle DJ and Brian TC. Efficient, direct a-methylation of carbonyls mediated by diisopropylammonium trifluoroacetate[J]. Chem Commun, 2010, 46:1715-1717.
- Indranil C, Roland F, Armido S. Formation of isoxazolidines by enantioselective copper-catalyzed annulation of 2-nitropyridine with allylstannanes [J]. Angew Chem Int Ed, 2011, 50:11257-11260.
- Qiu F, Li TX, Wang SJ, et al. A curcumol derivative against herpes simplex virus HSV(一种抗单纯疱疹病毒 HSV 的莪术醇衍生物): CN201210060471. 2[P]. 2012-03-09.
- Guo P, Wang YW, Weng BX, et al. Synthesis, anti-tumor activity, and structure-activity relationships of curcumol derivatives[J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(1):53-58.
- Ozdemir E, Demirkazik A, Gursoy S, et al. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on morphine analgesia and tolerance in rats[J]. Gen Physiol Biophys, 2017, 36:415-422.
- Hui Z, Ning K, Feng Q, et al. Four novel metabolites from microbial transformation of curcumol by *Cunninghamella blakesleana*[J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55:451-454.
- Hikino K, Meguro K, Sakurai Y, et al. The structure of curcumol[J]. Chem Pharm Bull, 1965, 13:1484-1485.
- Inayama S, Gao JF, Hariyama K, et al. The absolute stereostructure of curcumol isolated from *Curocuma wenyujin*[J]. Chem Pharm Bull, 1984, 32:3783-3786.