

以白藜芦醇为结构单元的丹酚酸 A 类似物的合成及其体外抗氧化作用测定

陈妙佳, 马思明, 李洋, 贺芬, 彭俊梅, 唐国涛, 曹轩

(南华大学药物药理研究所 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 丹酚酸 A; 白藜芦醇; DPPH 抗氧化活性; Vilsmeier-Haack 反应

[摘要] 目的 以白藜芦醇为结构单元设计合成丹酚酸 A 的结构类似物, 测定其体外抗氧化作用。方法 通过简单的四步反应进行合成并确定其结构, 同时对合成的丹酚酸 A 类似物进行体外抗氧化 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)活性测试。结果 成功建立丹酚酸 A 类似物。DPPH 抗氧化活性测试结果显示化合物 d、e 和 f 的自由基清除率远大于对照品丹酚酸 A 和抗坏血酸。结论 设计合成的丹酚酸 A 类似物具备极强的抗氧化活性, 具有进一步研究的价值。

[中图分类号] R914.5

[文献标识码] A

Synthesis of salvianolic acid A analogues and determination of the free radical scavenger activity using resveratrol as the scaffold

CHEN Miaojia, MA Simin, LI Yang, HE Fen, PENG Junmei, TANG Guotao, CAO Xuan

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China & Hunan Province Cooperative Innovation Center for Molecular Target New Drug Study, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] salvianolic acid A; resveratrol; DPPH antioxidant activity; Vilsmeier-Haack reaction

[ABSTRACT] **Aim** A series of structural analogs of salvianolic acid A were synthesized with resveratrol as the scaffold and their antioxidant activity were determined in vitro. **Methods** The salvianolic acid A analogs were synthesized by four-step simple reactions. The antioxidant activity of the analogs was evaluated in vitro for 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH). **Results** The analogue of salvianolic acid A was successfully established. DPPH antioxidant activity tests showed that the free radical scavenging rates of compounds d, e and f were much higher than that of salvianolic acid A and ascorbic acid. **Conclusion** The designed and synthesized structural analogues of salvianolic acid A have strong antioxidant activity and are worthy of further research.

丹酚酸 A 是从丹参中分离得到的酚酸类化合物, 具有很强的抗氧化活性^[1-2]。研究表明, 丹酚酸 A 有望成为一种新的心脑血管保护剂^[3-4]。但是丹酚酸 A 具备双键、酯基、手性等复杂的结构, 合成难度很大。由于丹酚酸 A 在丹参中的含量很小, 如果直接从丹参中提取和纯化, 步骤复杂且产率很低。因此, 丹酚酸 A 的原料来源有限且价格昂贵, 限制了其进一步研究^[5-6]。因此合成丹酚酸 A 的结构类似物对研究丹酚酸 A 类化合物的结构以及药理活性具备重要的理论价值^[7-8]。

本文拟设计全新的丹酚酸 A 的类似物, 结构改

造如下: ①采用碳氮双键或碳氮单键替代丹酚酸 A 中的酯键, 提高化合物的稳定性; ②将其羧酸基团酯化, 提高其脂溶性; ③用廉价易得的卡比多巴取代丹酚酸 A 中的酚酸类结构片段; ④用抗氧化能力更强的白藜芦醇为结构单元取代丹酚酸 A 结构中的二苯乙烯片段^[9-10]。通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 体外模型法对所合成的丹酚酸 A 类似物进行体外抗氧化活性的测定, 为丹酚酸 A 类似物的研究提供合成思路和活性研究基础。

[收稿日期] 2021-01-17

[修回日期] 2021-04-23

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2019JJ50522); 南华大学大学生创新性实验计划项目(2018XJXZ193, X2019182)

[作者简介] 陈妙佳, 硕士研究生, 研究方向为小分子药物合成, E-mail 为 214652128@qq.com。通信作者曹轩, 博士, 讲师, 研究方向为小分子药物合成, E-mail 为 caoxuancx@gmail.com。

1 材料和方法

1.1 试剂与检测

卡比多巴、白藜芦醇及硼氢化钠均购自阿拉丁试剂有限公司; DPPH 购自百灵威试剂有限公司; 其他有机溶剂均购自湖南汇虹试剂有限公司。除三氯氧磷在使用前进行重蒸外, 其他试剂一般并未做进一步处理。¹HNMR 由湖南大学化学传感国家重点实验室检测和提供。

1.2 白藜芦醇的合成

将 3.0 g 白藜芦醇加入三口烧瓶中, 加入 15 mL N, N-二甲基甲酰胺 (N, N-Dimethylformamide, DMF), 磁力搅拌使其溶解。另加 30 mL DMF 于烧杯中, 在通风橱内缓慢滴入 8 mL 三氯氧磷 (phosphorus oxychloride, POCl₃), 小心搅拌, 溶液由无色变成淡棕色。室温下上述反应液放置于恒压滴液漏斗中趁热滴入三口烧瓶中, 搅拌 2~3 h 直至整个溶液变成凝胶状固体。冰浴下, 将 120 mL 水逐滴加入三口烧瓶, 必要时采用机械搅拌过夜。有大量黄色固体析出, 产物收率 92%。

1.3 卡比多巴的酯化

将 4.0 g 卡比多巴加入 150 mL 三口烧瓶中。加入 50 mL 甲醇溶液。通入干燥浓盐酸并加热搅拌, 回流 2.5~6.0 h。同时用薄层色谱 (Thin Layer Chromatography, TLC) 确定反应终点 (水: 丙酮=1:20)。反应结束后将液体倒进梨形烧瓶, 减压去除产物中的 HCl 气体和溶剂, 得到卡比多巴酯化粗产物。

1.4 丹酚酸 A 类似物 a、b、c 的合成

在烧瓶中加入 500 mg 白藜芦醇和 50 mL 甲醇溶液, 加入 1 mL 卡比多巴酯化产物, 于 65 °C 回流 3 h。同时用监测反应 (乙酸乙酯: 石油醚=1:3)。将溶剂蒸发后, 硅胶柱纯化产物 (洗脱剂甲醇: 二氯甲烷=1:30), 得到丹酚酸 A 类似物 a、b、c。

产物 a 熔点: 134~135 °C, ¹HNMR (400 MHz, Methanol-d₄): δ8.50 (s, 1H), 7.51-7.41 (m, 2H), 7.31 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.90 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.82 (dd, J=8.0 Hz, 2H), 6.71 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.68-6.60 (m, 1H), 6.57 (d, J=2.4 Hz, 1H), 6.52 (dd, J=8.0 Hz, 1H), 6.26 (d, J=2.4 Hz, 1H), 3.72 (d, J=2.4 Hz, 3H), 3.01 (dd, J=16.0 Hz, 2H), 1.44 (s, 3H), 产物收率 35.8%。

产物 b 熔点: 134~136 °C, ¹HNMR (400 MHz, Methanol-d₄): δ8.52 (d, J=4.0 Hz, 1H), 7.51-7.42 (m, 2H), 7.32 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.91 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.88-6.79 (m, 2H), 6.74-6.69 (m, 1H),

6.67 (d, J=2.4 Hz, 1H), 6.58 (d, J=2.4 Hz, 1H), 6.54 (dd, J=8.0 Hz, 1H), 6.27 (d, J=2.4 Hz, 1H), 4.18 (q, J=8.0 Hz, 2H), 3.04-2.92 (m, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.24 (dd, J=8.0 Hz, 3H), 产物收率 18.0%。

产物 c 熔点: 136~138 °C, ¹HNMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ8.51 (s, 1H), 7.50-7.42 (m, 2H), 7.31 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.90 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.86-6.77 (m, 2H), 6.71 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.60-6.49 (m, 2H), 6.25 (d, J=2.4 Hz, 1H), 3.05-2.88 (m, 2H), 1.42 (s, 3H), 1.28-1.21 (m, 3H), 1.18 (d, J=8.0 Hz, 3H), 产物收率 13.8%。

1.5 丹酚酸 A 类似物 d、e、f 的合成

在烧瓶中加入甲醇 20 mL 和 8.8 mg 丹酚酸 A 类似物 a~c, 再加入约 3 倍的硼氢化钠, 搅拌大约 20 min。加水 20 mL 并调节 pH 为微酸性 (约为 6) 后用乙酸乙酯 (30 mL×3) 萃取。用无水硫酸钠干燥, 旋干所得液体。得到丹酚酸 A 类似物 d、e、f。

产物 d 熔点: 170~173 °C, ¹HNMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ8.48 (s, 1H), 7.45 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.30 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.89 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J=8.0 Hz, 3H), 6.24 (s, 1H), 3.71 (d, J=4.0 Hz, 3H), 2.98 (dd, J=16.0 Hz, 2H), 1.44 (d, J=12.0 Hz, 3H), 产物收率 92%。

产物 e 熔点: 172~174 °C, ¹HNMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ8.51 (s, 1H), 7.46 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.31 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.90 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.87-6.75 (m, 3H), 6.75-6.62 (m, 2H), 6.61-6.44 (m, 2H), 6.25 (d, J=2.4 Hz, 1H), 4.18 (q, J=8.0 Hz, 2H), 3.35 (p, J=2.4 Hz, 3H), 2.98 (q, J=12.0 Hz, 2H), 1.43 (s, 3H), 产物收率 89%。

产物 f 熔点: 175~178 °C, ¹HNMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ8.56 (d, J=4.0 Hz, 1H), 7.51 (d, J=8.0 Hz, 2H), 7.37 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.96 (d, J=16.0 Hz, 1H), 6.88 (d, J=8.0 Hz, 3H), 6.75 (dt, J=8.0 Hz, 2H), 6.6-6.53 (m, 3H), 6.31 (d, J=2.4 Hz, 1H), 4.19 (q, J=8.0 Hz, 1H), 3.01 (q, J=12.0 Hz, 2H), 2.10 (d, J=4.0 Hz, 1H), 1.46 (d, J=4.0 Hz, 3H), 1.29 (d, J=8.0 Hz, 3H), 1.23 (d, J=8.0 Hz, 3H), 产物收率 90%。

1.6 DPPH 法测定抗氧化活性

DPPH 储备液的制备: 称取 5 mg DPPH 试剂, 加少量的无水乙醇溶解, 得到紫色液体, 并且将其定量转移至 10 mL 的容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度线; 然后用移液管吸取 2 mL 试液置于 100 mL

容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度线,摇匀得到 DPPH 储备液,放到 4 ℃ 冰箱中冷藏备用。待测样品的制备:称取 1 mg 丹酚酸 A 类似物 a~f,用少量的无水乙醇使其溶解,并定量转移至 10 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度线。随后用移液管在 10 mL 容量瓶中准确吸取 1 mL 试液置于 100 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容,摇匀,得到待测样品 a。再用上述方法分别制得待测样品 b~f。对照品的制备:用移液管吸取 4 mL DPPH 标准液放入 10 mL 的容量瓶中,随后加乙醇定容至刻度线。

1.7 DPPH 清除率的测定

在 10 mL 容量瓶中,先加入 4.0 mL 的 DPPH 溶液,随后加入 4.0 mL 的待测试液,再用无水乙醇定容至刻度线,摇匀。立即用待测液将 1 cm 比色皿润洗,之后在 517 nm 波长处测其光密度值(OD₁),再在室温避光保存 30 min 后测光密度值(OD₂)。对照试验为只加 4.0 mL DPPH 的乙醇溶液,测其光密

度值(OD₃)。同理,用上述方法分别测定其他待测样品的光密度值(OD)。重复测定 3 次,取其平均值作为最后结果。将所测得的清除率与维生素 C 标准品的清除率比较。按下式计算自由基清除率 $K(\%) = (\text{实验组 OD}_1 - \text{实验组 OD}_2) / \text{空白组 OD}_3 \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 丹酚酸 A 类似物的合成

丹酚酸 A 类似物的合成如图 1 所示。在白藜芦醇的结构中采用 Vilsmeier-Haack 反应引入醛基,再将卡比多巴的羧酸基团酯化。最后,将酯化产物与白藜芦醇进行醛胺缩合即得丹酚酸 A 类似物 a、b、c。考虑到碳氮双键有可能不稳定,将碳氮双键还原为碳氮单键,最终获得丹酚酸 A 类似物 d、e、f。

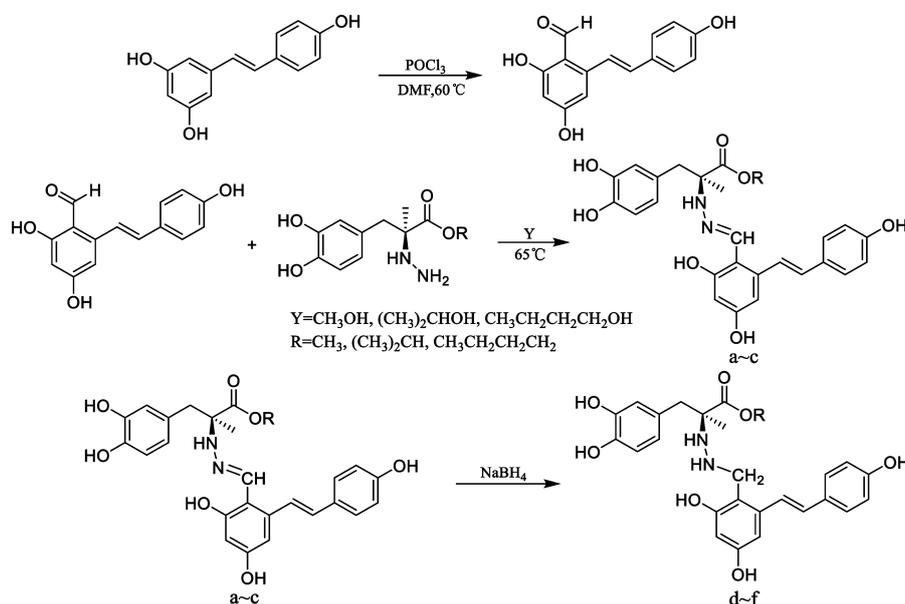


图 1 化合物 a-f 的合成路线

2.2 DPPH 法测定丹酚酸 A 类似物的抗氧化活性

丹酚酸 A 类似物 d、e、f 均表现出了较强的抗氧化活性,而丹酚酸 A 类似物 a、b、c 抗氧化活性很差(图 2),可能是由于在水中容易分解导致的。经过硼氢化钠的还原后,碳氮双键转变为碳氮单键,提高了化合物的稳定性,其抗氧化活性相差 4 倍以上。此外,丹酚酸 A 类似物 d、e、f 的抗氧化活性明显强于对照品抗坏血酸以及丹酚酸 A。

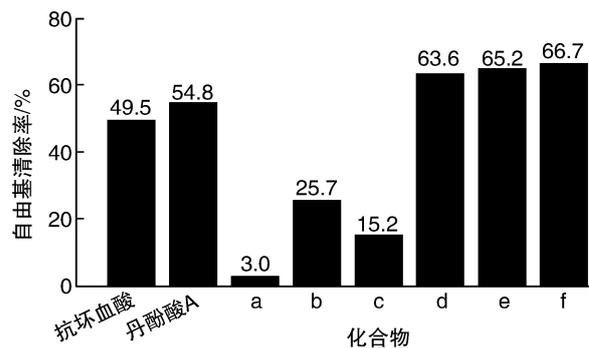


图 2 DPPH 法测定丹酚酸 A 类似物的自由基清除率

3 讨 论

丹酚酸 A 的结构可视为酚酸类化合物与二苯乙烯类化合物两个结构单元的酯化反应产物。由于丹酚酸 A 的结构中具备不稳定的酯键,在体内容易水解开环,而且由于其中含有羧酸基团,使得其分子的穿膜能力大大下降,使得其很难进入细胞内而发挥其药理作用。如果采用酰肼键替代丹酚酸 A 中的酯键,可进一步稳定其结构,此外若将其羧酸基团酯化,可提高其脂溶性,增加其穿膜能力,增强其药效。丹酚酸 A 的结构中的二苯乙烯结构中为芪四酚结构,具有 4 个羟基,从而具备较好的清除自由基能力。但类似结构的白藜芦醇具备芪三酚结构,其抗氧化能力更强。白藜芦醇是一种天然多酚类物质,生理活性很多^[11-13],其抗氧化能力在多酚类中是较强的,可以用来预防冠心病,保护心血管^[14-15]。研究表明,其抗氧化能力的重要基团是 4'-羟基,使得其抗心血管氧化能力提升,类似的结构还有紫檀芪等,因此如果采用芪三酚的结构片段替代丹酚酸 A 结构片段中的芪四酚结构,有可能获得更强抗氧化活性的丹酚酸 A 类似物^[16]。

经过 Vilsmeier 反应在其芳环上引入醛基,是目前在芳环上引入甲酰基的常用方法。其反应机理为 DMF 与三氯氧磷反应,产生亲电的 N⁺,随后 N⁺进攻白藜芦醇中含有两个羟基的苯环的邻位,即苯环上的 2 位碳,经水解、氧化得到目标产物白藜芦醛。实验采用 DMF 作溶剂的情况下,只需常温就可以反应,不但产物收率较高,而且直接加水后产物析出呈现亮黄色,一般无需纯化即可投入下一步使用。

卡比多巴的酯化过程需要在反应过程中通入浓盐酸来催化反应,因为 L-甲基多巴不溶于甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇,也有采用惰性溶剂中添加催化量的 SOCl₂ 等卤化剂来催化反应,但实验中发现添加 SOCl₂ 反应时间需要 1~2 天,反应时间长。本实验中采用通入干燥的 HCl 气体回流反应,3~5 h 就可反应完全。

醛胺缩合反应可直接在醇溶液条件下加热回流 3 h。由于产物 a、b、c 的结构中碳氮双键只连有一端芳香环,使得整个的 N 上负电共轭较差,从而导致缩合产物很容易水解,在柱层析时大部分会分解。在后续实验中,直接在反应后体系中加入硼氢化钠进行还原,之后再行柱层析,产物收率显著提高。

综上,本文所设计的丹酚酸 A 类似物 d、e、f 均具有很强的抗氧化活性,强于对照品抗坏血酸以及丹酚酸 A。推测活性提升极有可能是由于采用了白

藜芦醇芪三酚的结构片段替代丹酚酸 A 结构片段中的芪四酚结构。这说明所设计的丹酚酸 A 类似物具备进一步研究和开发的潜力,为丹酚酸类化合物的结构设计与药理作用提供基础。

[参考文献]

- [1] 李思谦,章顺楠,周立红,等. 丹参中酚酸类成分及在水溶液中降解转化研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 192(4): 109-117.
- [2] WANG X, WANG C, ZHANG L, et al. Salviolic acid A shows selective cytotoxicity against multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26(2): 210-223.
- [3] ZHANG G, CUI G, TONG S, et al. Salviolic acid A alleviates the renal damage in rats with chronic renal failure[J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34(2): e201900204.
- [4] LIU C D, LIU N N, ZHANG S, et al. Salviolic acid A prevented cerebrovascular endothelial injury caused by acute ischemic stroke through inhibiting the Src signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(3): 370-381.
- [5] CHEN B, HUANG C, ZHANG Y, et al. Salvia bowleyana dunn root is a novel source of salviolic acid B and displays antitumor effects against gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 817-827.
- [6] DENG C, WANG Y, HUANG F, et al. SmMYB2 promotes salviolic acid biosynthesis in the medicinal herb salvia miltiorrhiza[J]. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(11): 1688-1702.
- [7] YANG Y, ZHANG L, LA X, et al. Salviolic acid A inhibits tumor-associated angiogenesis by blocking GRP78 secretion[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2019, 392(4): 467-480.
- [8] YE R, SUN L, PENG J, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of dexamethasone-salviolic acid B conjugates and nanodrug delivery against cisplatin-induced hearing loss[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(6): 3115-3130.
- [9] YIN X, FAN H, CHEN Y, et al. Integrative omic and transgenic analyses reveal the positive effect of ultraviolet-B irradiation on salviolic acid biosynthesis through upregulation of SmNAC1[J]. *Plant J*, 2020, 104(3): 781-799.
- [10] BI L, CHEN J, YUAN X, et al. Salviolic acid A positively regulates PTEN protein level and inhibits growth of A549 lung cancer cells[J]. *Biomed Rep*, 2013, 1(2): 213-217.
- [11] QIU J M, QIN C F, WU S G, et al. A novel salviolic acid A analog with resveratrol structure and its antioxidant activities in vitro and in vivo[J]. *Drug Dev Res*, 2021, 82(1): 108-114.
- [12] TIAN B, LIU J. Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application[J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100(4): 1392-1404.
- [13] 刘远波,王霞,包太成,等. 白藜芦醇激活 SIRT1 抑制高糖诱导的神经细胞凋亡[J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(2): 152-157.
- [14] PEI R, SI T, LU Y, et al. Salviolic acid A, a novel PI3K/Akt inhibitor, induces cell apoptosis and suppresses tumor growth in acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59(8): 1959-1967.
- [15] 潘迎峰,张建兵,丁洁,等. 丹酚酸 A 的药理研究进展[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(4): 294-295.
- [16] BAUR J A, SINCLAIR D A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(6): 493-506.

(此文编辑 蒋湘莲)