新型龙胆酸衍生物的合成及其抑制酪氨酸酶活性研究

宋长伟^a 熊丽丹^b 王裕军^a 张 南^b
李 霞^a 李 颖^a 李 利^{*,c} 尹述凡^{*,a}

(^a 四川大学化学学院 成都 610064)

(^b 四川省化妆品工程技术研究中心 成都 610064)

(^c 四川大学华西医院皮肤科 成都 610041)

摘要 为发现新型的美白活性化合物,以龙胆酸甲酯、卤代烃和 α -羟基酸乙酯为原料,合成了 10 个未见文献报道的 2-羟基-5-烷(*H*)氧基苯甲酸酯类衍生物(**3a**, **3b** 和 **6a~6h**),其结构经 ¹H NMR, IR, MS 和 HRMS 确认。初步生物活性测试结果表明 **6a**, **6b**, **6e** 和 **6f** 具有较强的抑制酪氨酸酶活性,进一步药理实验表明经取代改造后的 **6a~6h**,其毒性和光学毒性都相对龙胆酸甲酯和氢醌更低。

关键词 美白; 龙胆酸甲酯; 酪氨酸酶; 毒性; 光学毒性

Synthesis and Inhibition of Tyrosinase Activity of New Gentisic Acid Derivatives

Song, Changwei^a Xiong, Lidan^b Wang, Yujun^a Zhang, Nan^b
Li, Xia^a Li, Ying^a Li, Li^{*,c} Yin, Shufan^{*,a}

(^a College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064)

(^b Sichuan Province Cosmetics Engineering Technology Research Center, Chengdu 610064)

(^c West China Hospital, Sichuan University, Dermatological Department, Chengdu 610041)

Abstract To discover new whitening active compounds, ten novel 2-hydroxy-5-alkyl(*H*)oxybenzoic ester derivatives (**3a**, **3b** and **6a~6h**) were prepared via the starting materials of methyl gentisate, alkyl halides and α -hydroxy acid ethyl ester. Their chemical structures were confirmed by ¹H NMR, IR, MS and HRMS techniques. The preliminary bioassay test demonstrated that compounds **6a**, **6b**, **6e** and **6f** had stronger inhibition of tyrosinase activity. Further pharmacological experiments showed that after substitution modification of compounds **6a~6h**, their toxicity and phototoxicity are lower than methyl gentisate and hydroquinone.

Keywords white; gentian methyl; tyrosinase; toxicity; optical toxicity

酪氨酸酶即多酚氧化酶,是二价铜离子与酶蛋白相结合的一种金属酶,广泛存在于动物、植物及真菌中^[1,2]。它也是参与黑色素合成的关键酶之一,控制着黑色素的形成过程,其活性程度对色素的沉积起主要作用^[3]。目前市场上广泛使用的许多美白祛斑产品都是通过抑制酪氨酸酶途径发挥其作用。包括龙胆酸衍生物、抗坏血酸衍生物、熊果苷和氢醌(Hydroquinone, HQ)等。但其中许多化合物已经被证实对皮肤细胞有致变等毒性作用^[4]。因此,继续寻找和发现新型、高效且安全的美白祛斑活性化合物仍是当前研究的热点。

龙胆酸即 2,5-二羟基苯甲酸(gentisic acid, MA, **2**),是从龙胆根中提取的天然活性产物,已在化妆品中作为一种常规皮肤美白剂、抗氧化剂^[5]。包括它的烷基酯类衍生物也是一种很好的美白剂。但它们对皮肤细胞的毒副作用均较强,尽管其皮肤渗透率比较低本身也是其主要缺陷之一^[6]。鉴于此,本工作以龙胆酸甲酯为先导物,将可加速皮肤细胞角质层脱落并使表面肌肤光滑、柔细的 α -羟基酸等有效结构片段引入先导物中,设计并合成了一系列 2-羟基-5-烷(*H*)氧基苯甲酸酯类衍生物 **3a**, **3b**, **6a~6h**^[7~9],期望通过有效分子片段的引入以增强其抑

* E-mail: chuandayouji217@163.com

Received January 7, 2012; revised March 14, 2012; published online May 11, 2012.

Hz, 3H, CH₃), 3.79 (s, 3H, CH₃), 4.27 (dd, $J=3.2$, 14.4 Hz, 2H, COOCH₂), 5.30 (dd, $J=3.2$, 14 Hz, 1H, COOCH₂COO), 6.82 (d, $J=8$ Hz, 1H, ArH), 7.00 (dd, $J=3.2$, 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.33 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, ArH), 10.03 (s, 1H, ArOH), 10.34 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3402, 3248, 2991, 1727, 1678, 1629, 1467, 1401, 1290, 1227, 1198, 1096 cm⁻¹; HRMS (ESI) calcd for C₁₂H₁₄O₆ [M+H]⁺ 255.0863, found 255.0881; [M+Na]⁺ 277.0683, found 277.0703; [M+K]⁺ 293.0422, found 293.0438.

1.2.3 5-烷氧基-2-羟基苯甲酸甲酯 **4a~4d** 的合成

取 50 mg (0.30 mmol) 的龙胆酸甲酯纯品, 溶于 10 mL 丙酮, 然后依次加入 62 mg (0.45 mmol) 的 K₂CO₃, 0.51 g (0.36 mmol) 的碘甲烷, 回流搅拌反应, TLC 跟踪至反应完全, 过滤, 滤液减压浓缩, 将粗品经柱层析[淋洗液为 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚})=1:4$]分离纯化得 **4a**, 同法可得 **4b~4d**.

1.2.4 2-羟基-5-烷氧基苯甲酸酯类 **6a~6h** 的合成

取 100 mg (0.55 mmol) 的 **5a** 纯品, 溶于 10 mL CH₂Cl₂ 溶液, 然后依次加入 0.01 g (0.08 mmol) DMAP, 0.11 g (1.10 mmol) 的乙醇酸乙酯, 室温搅拌反应 5 min 后, 加入 0.11 g (0.02 mmol) DCC, 继续室温搅拌反应, TLC 监测反应, 反应完全后, 过滤, 滤液减压浓缩, 将粗产品经柱层析[淋洗液为 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚})=1:8$]得白色固体 **6a**, 同法可得 **6b~6h**.

2-羟基-5-甲氧基苯甲酸乙氧基羰基甲酯(**6a**): 白色固体, 产率 70%. m.p. 32~33 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.31 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 3.79 (s, 3H, CH₃), 4.28 (dd, $J=7.2$, 14.4 Hz, 2H, COOCH₂), 4.87 (s, 2H, COOCH₂COO), 6.94 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.12 (dd, $J=3.2$, 9.2 Hz, 1H, ArH), 7.38 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, ArH), 10.05 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3411, 2976, 2929, 2901, 1760, 1619, 1492, 1384, 1284, 1197, 1093, 1047, 880, 829, 786 cm⁻¹; HRMS (ESI) calcd for C₁₂H₁₄O₆ [M+H]⁺ 255.0863, found 255.0348; [M+Na]⁺ 277.0683, found 277.0334; [M+K]⁺ 293.0422, found 293.0105.

2-羟基-5-乙氧基苯甲酸乙氧基羰基甲酯(**6b**): 白色固体, 产率 68%. m.p. 30~31 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.31 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.40 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.65 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 4.00 (dd, $J=7.2$, 14 Hz, 2H, OCH₂), 4.28 (dd, $J=7.2$, 14.4 Hz, 2H, COOCH₂), 4.86 (s, 1H, COOCH₂COO), 6.93 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.11 (dd, $J=3.2$, 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.38 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, ArH), 10.04 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3251, 2982, 2937, 1762, 1687, 1618, 1492, 1426, 1385, 1326, 1286, 1191, 1094, 1035, 950, 831, 785 cm⁻¹; HRMS

(ESI) calcd for C₁₃H₁₆O₆ [M+H]⁺ 269.1020, found 269.1042; [M+Na]⁺ 291.0839, found 291.0854; [M+K]⁺ 307.0578, found 307.0621.

2-羟基-5-苯甲氧基苯甲酸乙氧基羰基甲酯(**6c**): 白色固体, 产率 65%. m.p. 67~68 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.31 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 4.28 (dd, $J=7.2$, 14 Hz, 2H, COOCH₂), 4.86 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.03 (s, 2H, COOCH₂COO), 6.94 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.18 (dd, $J=2.8$, 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.34~7.44 (m, 5H, ArH), 7.49 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, ArH), 10.07 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3214, 2980, 2914, 2873, 1744, 1680, 1615, 1491, 1428, 1385, 1278, 1240, 1194, 1090, 1017, 840, 787, 750, 701 cm⁻¹; HRMS (ESI) calcd for C₁₈H₁₈O₆ [M+H]⁺ 331.1176, found 331.1173; [M+Na]⁺ 353.0996, found 353.0996; [M+K]⁺ 369.0735, found 369.0717.

2-羟基-5-(4-硝基苯甲氧基)苯甲酸乙氧基羰基甲酯(**6d**): 白色固体, 产率 64%. m.p. 67~68 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.32 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.65 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 4.28 (dd, $J=7.2$, 14 Hz, 2H, COOCH₂), 4.86 (s, 2H, OCH₂PhNO₂), 5.14 (s, 2H, COOCH₂COO), 6.97 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.19 (dd, $J=3.2$, 9.2 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, ArH), 7.61 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, ArNO₂), 8.26 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArNO₂), 10.09 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3125, 2919, 2850, 2342, 1746, 1685, 1541, 1473, 1420, 1397, 1341, 1235, 1189, 1094, 1030, 855, 829, 743 cm⁻¹; HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₁₉NO₈ [M+H]⁺ 376.1027, found 376.1036; [M+Na]⁺ 398.0846, found 398.0843; [M+K]⁺ 414.0586, found 414.0539.

2-羟基-5-甲氧基苯甲酸(1-乙氧基羰基)乙酯(**6e**): 白色固体, 产率 48%. m.p. 34~36 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.30 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.66 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 3.79 (s, 3H, CH₃), 4.25 (dd, $J=7.2$, 14.0 Hz, 2H, COOCH₂), 5.32 (dd, $J=7.2$, 14.0 Hz, 1H, COOCH₂COO), 6.93 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.11 (dd, $J=3.2$, 9.2 Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, ArH), 10.12 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3261, 2977, 2939, 2835, 1751, 1683, 1618, 1493, 1456, 1385, 1366, 1284, 1229, 1098, 1038, 849, 782, 718 cm⁻¹; HRMS (ESI) calcd for C₁₃H₁₆O₆ [M+H]⁺ 269.1020, found 269.1078; [M+Na]⁺ 291.0839, found 291.0839; [M+K]⁺ 307.0578, found 307.0607.

2-羟基-5-乙氧基苯甲酸(1-乙氧基羰基)乙酯(**6f**): 浅黄色固体, 产率 65%. m.p. 72~73 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.32 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.65 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃), 3.98~4.04 (m, 2H, OCH₂), 4.25 (dd,

$J=7.2, 14.4$ Hz, 2H, COOCH_2), 5.31 (dd, $J=6.8, 14.0$ Hz, 1H, COOCHCOO), 6.922 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.10 (dd, $J=3.2, 8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.38 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, ArH), 10.09 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3261, 2983, 2943, 2877, 1751, 1682, 1617, 1495, 1367, 1286, 1229, 1182, 1098, 1043, 854, 788, 726 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 283.1176, found 283.1185; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 305.0996, found 305.1020; $[\text{M}+\text{K}]^+$ 321.0735, found 321.0748.

2-羟基-5-苯甲氧基苯甲酸(1-乙氧基羰基)乙酯(**6g**): 白色固体, 产率 64%. m.p. 31~32 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.30 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.65 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 3.79 (s, 3H, CH_3), 4.25 (dd, $J=7.2, 14.4$ Hz, 2H, COOCH_2), 5.03 (s, 2H, OCH_2Ph), 5.31 (dd, $J=6.8, 14.0$ Hz, 1H, COOCHCOO), 6.93 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.17 (dd, $J=3.2, 9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.34~7.45 (m, 5H, ArH), 7.48 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, ArH), 10.12 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3223, 2986, 2940, 1753, 1681, 1615, 1489, 1454, 1380, 1281, 1199, 1097, 1019, 860, 786, 749, 699 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 345.1333, found 345.1330; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 367.1152, found 367.1145; $[\text{M}+\text{K}]^+$ 383.0891, found 383.0887.

2-羟基-5-(4-硝基苯甲氧基)苯甲酸(1-乙氧基羰基)乙酯(**6h**): 浅黄色固体, 产率 60%. m.p. 55~56 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.30 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.65 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 4.26 (dd, $J=7.2, 14.0$ Hz, 2H, COOCH_2), 5.15 (s, 2H, $\text{OCH}_2\text{PhNO}_2$), 5.32 (dd, $J=7.2, 14.0$ Hz, 1H, COOCHCOO), 6.95 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.17 (dd, $J=3.2, 9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArNO_2), 8.26 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArNO_2), 10.15 (s, 1H, ArOH); IR (KBr) ν : 3206, 2926, 1745, 1682, 1620, 1522, 1490, 1403, 1341, 1288, 1198, 1108, 1030, 855, 828, 789, 743, 701 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 390.1183, found 390.1155; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 412.1003, found 412.0984; $[\text{M}+\text{K}]^+$ 428.0742, found 428.0727.

1.3 酪氨酸酶活性抑制实验

采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法, 以酶联免疫检测仪于 490 nm 处检测反应产物特异性吸光度(A_{490})值. 将化合物 **1**, **3a**, **6a**~**6h** 和 HQ 用 DMSO(二甲基亚砜)溶解后, 用 0.067 mol/L, pH 6.8 磷酸缓冲液稀释配制成 6 个浓度的溶液. 反应在 96 孔培养板中进行, 总反应体系 200 μL : 0.15%的 *L*-Dopa 50 μL ; 50 U/mL 酪氨酸酶 50 μL ; 测试药物 50 μL ; 0.067 mol/L, pH 6.8 磷酸缓冲液 50 μL . 加样完毕, 将 96 孔培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 在酶标仪下测定每孔 A_{490} 值. 最后计算酪氨酸酶的抑制

率, 酪氨酸酶抑制率 = $[(A - B) - (C - D)] / (A - B) \times 100\%$. *A*: 未加中药样品的加酶混合液所测的吸光度; *B*: 未加中药样品亦未加酶的混合液所测的吸光度; *C*: 加中药样品和酶的混合液所测的吸光度; *D*: 加中药样品而未加酶的混合液所测的吸光度. 每次实验重复测试 3 次.

1.4 MTT 法检测化合物对细胞毒性

细胞毒性实验参考文献[10]进行. 培养 3T3 细胞, 收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度(由于 3T3 细胞是半贴壁细胞, 不用胰酶消化), 收集细胞, 重悬于 DMEM(低糖, 含 4.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ *L*-谷氨酰胺、110 mg 丙酮酸钠)培养液, 配成 3×10^4 个细胞/mL 的细胞悬液, 共 10 mL. 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中培养 24 h. 将配制好的浓度为 2 mg/mL 的龙胆酸衍生物 **3a**, **6a**~**6h** 和氢醌(**1**)在超净工作台中, 用 0.22 μm 的过滤器过滤水, 去除细菌. 以 DMEM 为稀释液, 制备不同浓度梯度的龙胆酸衍生物 **3a**, **6a**~**6h** 和 **1**. 按照浓度梯度从低到高(0.25~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)依次在每行中分别加入同一稀释度的 100 μL , 每个浓度各做 5 个复孔. 并用一列作为空白对照, 即只用加入 100 μL 的 DMEM 双有培养液[含 10% FBS(胎牛血清)、1%双抗]. 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中培养 24 h. 倒置显微镜下观察. 在每孔中加入浓度为 5 mg/mL MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐]液 20 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中培养 3~4 h. 吸出孔内培养液后(若药物与 MTT 能够反应, 可先弃去培养液, 用 PBS 冲 2~3 遍后, 再加入含 MTT 的培养液.)每孔加入 150 μL DMSO, 将 96 孔板置于微孔板振荡器上震荡 5 min, 使蓝色结晶物溶解. 用酶标仪在 570 nm 下检测各孔的 OD 值. $\text{RGR} = (\text{实验组平均 OD 值} / \text{空白对照组平均 OD 值}) \times 100\%$, 转化为相应的细胞毒性等级, 标准为: 0 级为 $\text{RGR} \geq 100\%$; 1 级为 75%~99%; 2 级为 50%~74%; 3 级为 25%~49%; 4 级为 1%~24%; 增殖率 ≤ 0 者为 5 级.

1.5 光毒性实验

光毒性实验参考文献[11]进行. 收集处于对数生长期的 3T3 细胞, 细胞计数后, 将 3T3 细胞转移到 96 孔板中, 培养基调节细胞浓度, 保证每个孔中含有大约 1×10^4 个细胞. 将 96 孔板放置在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h. 吸出培养液, 在每个孔中加入 150 μL 的 PBS 溶液洗两次. 分别用 8 种不同浓度, 100 μL 的受试物处理细胞(每个浓度作 6 个孔); 受试物先溶解于易溶的溶剂中, 再用培养基稀释到指定浓度. 将 96 孔板放置在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养 1 h. 阳性组室温下暴露在 UVA (1.7 mW/cm^2 , 即 5 J/cm^2) 下 50 min 以评价光毒性; 阴性组室温下放置于黑暗环境中 50 min(如果条

件允许, 最好用风扇吹动空气避免 96 孔板上形成水珠). 吸出受试液, 然后在每个孔中加入 150 μL 的 PBS 洗两次. 在每个孔中加入 100 μL 培养基, 将 96 孔板放置在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养 18~22 h. 取出 96 孔板, 在显微镜下观察细胞形态学变化(主要是细胞大小, 形状和大概的贴壁细胞数量). 吸出培养基, 在每个孔中加入 150 μL 的中性红培养液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 将 96 孔板放置在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养 3 h. 吸出中性红培养液, 在每个孔中加入 150 μL 的 PBS 洗一次; 再在每个孔中加入 150 μL 的解吸附液($V_{\text{水}}:V_{\text{乙醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=49:50:1$). 室温下震荡平板 10 min. 在 540 nm 波长下读取吸光度, 检测细胞对中性红的吸收情况(反映细胞活性). 确定以光刺激因子(PIF 值)为基础的预测模型: 通过分析有光照(UVA+)和无光照(UVA-)两种情况下获得的细胞毒性浓度反应曲线, 确定能抑制 50% 细胞活性的受试物浓度(EC_{50})来计算光刺激因子(PIF): $\text{PIF} = \text{EC}_{50}(\text{UVA-})/\text{EC}_{50}(\text{UVA+})$. 评价标准为: 如果 $\text{PIF} < 2$: 预测无潜在光毒性; 如果 $\text{PIF} > 5$: 预测有潜在光毒性; 如果 PIF 在 2~5 之间, 需要重新进行证实实验再判断. 受试物在 UV+ 下有细胞毒性, UV- 条件下无细胞毒性时, 如果阴性组所使用的浓度已经达到最高受试浓度(C_{max}), 可计算 $>\text{PIF}$ (如果只获得一个 $>\text{PIF}$, 那么任何 $>\text{PIF} > 1$ 的值都能提示有潜在的光毒性: $>\text{PIF} = C_{\text{max}}(\text{UV-})/\text{EC}_{50}(\text{UV+})$).

2 结果与讨论

2.1 合成

根据文献[12]合成了 **4a~4d**. 实验发现, 用丙酮作溶剂时, 只得到 5-位羟基上的烷基化产物, 主要原因可能是一方面 2 位羟基旁位阻较大的原因, 另一方面 2 位羟基容易与羰键形成分子内氢键导致 2-位羟基上的烷基化反应相当困难. 当碳酸钾和龙胆酸甲酯、卤代烷按物质的量比 1:1:1 投料, 龙胆酸甲酯反应不完全; 增大卤代烃的用量产率提高也不明显, 而增大碳酸钾的用量, 可增加龙胆酸甲酯的反应产率; 实验结果表明当碳酸钾和龙胆酸甲酯、卤代烃投料比为 1.5:1:1.2 时, 可获得较高的产率. 在化合物 **5a~5d** 的合成过程中, 水解温度在 60~65 $^{\circ}\text{C}$ 时, 原料可以彻底水解, 达到一个很高的水解产率. 参考文献[13], 用 DCC-DMAP 方法合成了 **6a~6d**. 在合成过程中, 发现如果将 DCC 的同时投料改为在酸、醇和 DMAP 投完搅拌一段时间后再加入, 可以获得较高的产率, 而且副产物的量也很少.

2.2 波谱分析

2.2.1 ^1H NMR 谱图

所合成的化合物 **3a**, **3b**, 苯环上 2 位上的酚羟基质

子化学位移都出现在 δ 9.98~10.15 之间, 5 位上的酚羟基质子化学位移出现在了 δ 10.34~10.39 之间. 在 δ 6.81~7.46 范围内均有苯环上 3 个氢的化学位移. 而所合成的化合物 **6a~6h**, 化学位移在 δ 10.34~10.39 之间均已消失, 提示 5 位上的羟基已被取代, 而化学位移在 δ 9.98~10.15 之间仍然保持了苯环 2 位上的酚羟基质子化学位移.

2.2.2 IR 谱图

所合成的化合物 **3a**, **3b**, **6a~6h** 中, 3420 或 3200 cm^{-1} 附近出现宽而强的 O—H 伸缩振动吸收峰; 2990 cm^{-1} 左右区域系甲基、亚甲基、次甲基碳氢键伸缩振动吸收峰; 1620~1750 cm^{-1} 范围内出现酯基中 C=O 的吸收峰; 1600~1450 cm^{-1} 为苯环的骨架伸缩振动峰; 1275~650 cm^{-1} 也出现了苯环上 C—H 变形振动的吸收峰.

2.2.3 HRMS 谱图

目标化合物 **3a**, **3b**, **6a~6h** 质子峰都以准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 或 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$ 基峰的形式出现, 说明化合物均较稳定. HRMS 检测结果与目标化合物的分子组成一致.

2.3 生物活性实验

2.3.1 酪氨酸酶活性抑制实验

酪氨酸酶活性抑制实验结果如表 1 所示. 从表 1 的数据可以看出 **6a**, **6b**, **6e**, **6f** 表现出比较明显的抑制酪氨酸酶活性作用. 而 **3a**, **6c**, **6d**, **6g**, **6h** 虽然抑制酪氨酸酶活性作用不够显著, 可能是其溶解度低导致的晶体析出现象, 但实验中发现其可能会与多巴反应.

2.3.2 MTT 法检测化合物对细胞毒性

MTT 法检测化合物对细胞毒性实验结果如表 2 所示. 从表 2 的数据中可以看出未经过取代保护的 **3a** 与原料药 **1** 和氢醌毒性相比, 变化不大, 都具有较强的细胞毒性, 而经过 5 位取代保护的 **6a~6h** 可以看出毒性测定结果明显较低, 尤其是化合物 **6b~6d**, **6f**, **6g** 可以看出具有很低的药物毒性. 从目标化合物的结构上可以看出把苯环 5 位上的羟基进行取代保护后可以明显降低目标化合物的细胞毒性.

2.3.3 光毒性实验

各化合物对细胞光毒性实验测定结果如表 3 所示. 从表 3 的数据中可以看出, 化合物 **6b**, **6e~6g** 具有较低的光学毒性, 化合物 **6a**, **6c**, **6d**, **6h** 无潜在的光学毒性. 从目标化合物结构可以看出同样将苯环 5 位羟基进行取代保护可以明显减小目标化合物的光毒性, 而未经保护的化合物 **3a** 则具有较强的光毒性, 但它们均较氢醌与先导物龙胆酸甲酯的毒性明显要低. 进一步的药理毒理研究仍在进行中.

表1 目标化合物不同浓度对酪氨酸酶活性抑制百分率的测定结果

Table 1 The measured results of different concentrations of target compounds on tyrosinase activity inhibition percentage

化合物	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	62.5 µg/mL
HQ	31.51±0.90	12.32±1.03	—	—	—	—
1	20.85±0.40	17.06±0.59	6.16±0.66	—	—	—
3a	17.06±1.78	11.37±0.76	—	—	—	—
6a	4.98±0.28	36.01±1.73	33.65±1.21	21.56±0.87	15.88±0.67	13.74±0.64
6b	—	—	28.67±0.32	40.52±0.56	25.82±0.22	14.45±0.18
6c	—	—	18.00±0.13	10.18±0.08	11.13±0.09	8.77±0.09
6d	—	1.89±0.06	7.81±0.16	9.24±0.13	9.95±0.19	11.61±0.24
6e	60.43±1.89	49.05±1.36	36.02±1.41	28.43±0.96	23.45±1.24	19.19±0.63
6f	—	—	27.25±0.43	25.59±0.07	11.61±0.04	4.50±0.03
6g	—	27.25±0.86	23.93±0.74	7.58±0.61	7.34±0.12	0.23±0.05
6h	5.92±0.33	21.56±0.84	18.89±0.61	12.80±0.26	12.08±0.16	9.00±0.15

表2 目标化合物毒性的测定结果

Table 2 The results of target compounds of toxicity determination

化合物	250 µg/mL		62.5 µg/mL		15 µg/mL		3.75 µg/mL		1 µg/mL		0.25 µg/mL	
	RGR/%	细胞毒性等级	RGR/%	细胞毒性等级	RGR/%	细胞毒性等级	RGR/%	细胞毒性等级	RGR/%	细胞毒性等级	RGR/%	细胞毒性等级
HQ	30.30	3	35.43	3	39.28	3	45.34	3	47.51	3	56.17	2
1	31.41	3	34.37	3	44.60	3	48.26	3	51.40	2	72.85	2
3a	22.44	3	29.77	3	32.52	3	39.37	3	42.63	3	50.07	2
6a	57.27	2	61.79	2	72.65	2	77.26	1	82.63	1		0
6b	62.26	2	71.20	2	86.28	1	94.28	1		0		0
6c	66.52	2	72.68	2	74.49	1	79.21	1	84.23	1		0
6d	54.31	2	66.27	2	75.33	1	81.26	1	88.23	1		0
6e	54.33	2	58.84	2	62.13	2	74.83	1	78.15	1	72.81	1
6f	60.46	2	67.69	2	76.41	1	79.32	1	78.86	1		0
6g	54.49	2	57.50	2	68.38	2	76.47	1	73.33	1		0
6h	69.45	2	68.83	2	78.24	1	80.94	1	82.75	1	86.30	1

表3 目标化合物光毒性的测定结果^a

Table 3 The results of target compounds of phototoxicity determination

化合物	HQ	1	3a	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h
PIF 值	27.782	11.054	9.385	*1.0	1.331	*1.0	*1.0	1.385	1.067	2.674	*1.0

^a 受试物在最高受试浓度仍然没有显示任何细胞毒性(阳性和阴性的读数均成直线), 用“PIF=*1.0”表示无潜在光毒性。

致谢 本工作中的酪氨酸酶活性抑制及其毒性和光毒性实验由四川省化妆品工程技术研究中心实验室完成, 所有谱图和相关数据由四川大学分析测试中心提供, 在此表示衷心的感谢。

References

- [1] Soliman, K.; Ohad, N.; Ramadam, M.; Snait, T.; Tal, P.; Jacob, V. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2676.
- [2] Sabrina, O.; Delphine, R.; Sebastien, B.; Anne, M. M.; Eric, P.; Ahcene, B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 329.
- [3] Kim, Y. J.; Joo, E. C.; Motoichi, K.; Hiroshi, V.; Shiro, K. *Bio-macromolecules* **2004**, *5*, 474.
- [4] Zhang, C.-X.; Yin, H.-P. *Chin. J. Biochem. Pharm.* **2005**, *26*, 2 (in Chinese). (张春香, 尹鸿萍, 中国生物药物杂志, **2005**, *26*, 2.)
- [5] Rainer, K. U.; Martin, A. P. *Carbohydr. Res.* **2000**, *325*, 72.
- [6] Ernest, V. C.; Cecil, K.; Heino, H.; Hansruedi, G. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 663.
- [7] Li, K.-L.; Chen, L.-Z.; Liu, W.-Z.; Lei, G.-L.; Zhang, Y.-Z. *China Pharmacist* **1998**, *1*, 1 (in Chinese). (李开兰, 陈立中, 刘文芝, 雷观鲁, 张谊芝, 中国药师, **1998**, *1*, 1.)
- [8] Yang, Y.-W.; Zhu, Y. J. *Environ. Health* **2010**, *27*, 8 (in Chinese). (杨艳伟, 朱英, 环境与健康杂志, **2010**, *27*, 8.)
- [9] Stephen, H.; Oscar, M. S.; Vincent, M.; Wolfgang, M. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3267.
- [10] (a) Hamid, R.; Rotshteyn, Y. *Toxicol. In Vitro* **2004**, *18*, 5. (b) Zheng, Y.-T.; Bi, K.-L. *J. Immunol.* **1992**, *8*, 226 (in Chinese). (郑永唐, 黄昆龙, 免疫学杂志, **1992**, *8*, 266.)
- [11] (a) Ministry of Health of the People's Republic of China *Hygienic Standard Cosmetics* **2007**, p. 115 (in Chinese). (中华人民共和国卫生部, 化妆品卫生规范, **2007**, p. 115.) (b) EC EU67/548/EEC Appendix V B. 41 In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test OECD guideline for testing of chemicals, **2000**.
- [12] Yan, Y.; Qin, B.; Ren, C.-L.; Chen, X.-Y.; Yip, Y. K.; Ye, R. J.; Zhang, D. W.; Su, H. B.; Zeng, H.-Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5869.
- [13] Li, Q.-R.; Gu, C.-Z.; Yin, H.; Zhang, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2005**, *25*, 11 (in Chinese). (李前荣, 顾承志, 尹浩, 张毅, 有机化学, **2005**, *25*, 11.) (Zhao, C.)