

愈创木萘衍生物的设计合成及其抗氧化、抗炎活性研究

李 蕾^{a,b} 朱聪聪^{c,d} 朱全刚^{*,c,d} 陈中建^{*,c,d} 高希珂^{*,b}^(a) 上海师范大学化学与材料科学学院 上海 200234)^(b) 中国科学院上海有机化学研究所 中国科学院有机功能分子合成与组装化学重点实验室 上海 200032)^(c) 上海市皮肤病医院 上海 200443)^(d) 上海中药外用制剂创新工程技术研究中心 上海 200443)

摘要 动植物来源的愈创木萘(GA)具有抗菌、抗氧化、抗炎、抗过敏和低毒等特点,其水溶性衍生物愈创木萘磺酸钠(GAS-Na)同样具有抗炎、促进上皮细胞生长和促进伤口愈合的作用。然而,商品化活性分子 GA 和 GAS-Na 对光、热等稳定性较差。为了探索具有更高活性和稳定性的愈创木萘类生物功能分子,合成了 2,2'-二愈创木萘(BGA)和[2,2'-二愈创木萘]-1,1'-二磺酸钠(BGAS-Na),并以 GA 和 GAS-Na 为对照,评价了四个化合物的抗氧化能力,研究了其对脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的 NO 释放及细胞存活率的影响。结果表明, BGA 和 BGAS-Na 具有良好的抗氧化能力,且稳定性较 GA 和 GAS-Na 有所提升; BGAS-Na 在抗炎活性测试中具有最优的 NO 抑制率(IC₅₀ 值为 5.64 μg/mL),优于商品化分子 GAS-Na,且该抑制作用具有浓度依赖性。此外,四种化合物均不影响巨噬细胞的生长,具有较低的细胞毒性。因此, BGAS-Na 有望成为具有发展潜力的抗炎药物。

关键词 愈创木萘;愈创木萘磺酸钠;抗氧化;抗炎;细胞毒性;巨噬细胞

Design, Synthesis and Bioactivity Evaluation of Guaiazulene Derivatives with Antioxidant and Anti-inflammatory Activities

Li, Lei^a Zhu, Congcong^{c,d} Zhu, Quangang^{*,c,d} Chen, Zhongjian^{*,c,d} Gao, Xike^{*,a,b}^(a) College of Chemistry and Materials Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234)^(b) Key Laboratory of Synthetic and Self-Assembly Chemistry for Organic Functional Molecules, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)^(c) Shanghai Skin Disease Hospital, Shanghai 200443)^(d) Shanghai Engineering Research Center for Topical Chinese Medicine, Shanghai 200443)

Abstract Animal and plant-derived guaiazulene (GA) has the characteristics of antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic and low toxicity. Sodium guaiazulene sulfonate (GAS-Na), a water-soluble derivative of GA, also has the effects of anti-inflammatory, promoting epithelial cell growth and wound healing. However, the commercial active molecules GA and GAS-Na have poor stability to light and heat. Therefore, in order to explore the guaiazulene biomedical functional molecules with higher activity and stability, 2,2'-biguaiazulene (BGA) and (2,2'-biguaiazulene)-1,1'-disulfonic acid sodium (BGAS-Na) were synthesized. Compared with GA and GAS-Na, the antioxidant activities of BGA and BGAS-Na were evaluated, and their biological effects on NO release and cell viability of LPS-induced RAW 264.7 macrophages were studied. The results showed that BGA and BGAS-Na had better antioxidant capacity and improved stability compared with GA and GAS-Na; BGAS-Na had the best NO inhibition rate in the anti-inflammatory activity test (the IC₅₀ value was 5.64 μg/mL), which was better than that of the commercial molecule GAS-Na, and the inhibitory effect was dose-dependent. In addition, the four compounds did not affect the growth of macrophages and had low cytotoxicity. Therefore, BGAS-Na is expected to become a potential anti-inflammatory drug.

Keywords guaiazulene; sodium guaiazulene sulfonate; antioxidant; anti-inflammatory; cytotoxicity; macrophages

* Corresponding authors. E-mail: qgzhu@126.com; aajian818@163.com; gaoxk@mail.sioc.ac.cn

Received April 11, 2022; revised May 19, 2022; published online June 8, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22075310), and the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Nos. 19XD1424700, 20DZ2255200).

国家自然科学基金(No. 22075310)和上海市科学技术委员会(Nos. 19XD1424700, 20DZ2255200)资助项目。

愈创木萘(Guaiazulene, 以下简称 **GA**)是一种呈深蓝色的双环倍半萜化合物,是萘的一种衍生物(图 1)。**GA** 具有独特的理化性质,例如鲜亮的蓝色,可逆得失质子,高的芳香亲电反应活性等。萘的合成步骤较长^[1],而愈创木萘可从春黄菊和愈创木等植物精油中精馏得到,也存在于一些柳珊瑚类海洋生物中^[2]。**GA** 作为萘类天然产物分子,很早就被发现具有多种生物活性。经日本学者证实,**GA** 具有温和的抗炎、抗过敏、镇痛、局部麻醉和抗组胺等作用^[3]。**GA** 还是食品药品监督管理局(FDA)批准的食品、化妆品颜色添加剂,其衍生物也被报道具有抗氧化^[4]、抗菌^[5]、抗溃疡^[6]和抗肿瘤^[7]等活性。因此,愈创木萘及其衍生物具有成为药物分子的发展潜力。

在 **GA** 五元环的 3-位上通过磺化反应引入磺酸钠基团,得到水溶性的深蓝色鳞片状固体,即愈创木萘磺酸钠(简称 **GAS-Na**, 图 1)。与脂溶性的 **GA** 相比,**GAS-Na** 的亲水性更利于开发应用,目前已在临床中用作抗炎和抗溃疡药剂成分^[8]。例如,国内 **GAS-Na** 的相关药品包括,经国家药品监督管理局(NMPA)批准上市的“谷氨酰胺萘磺酸钠颗粒”,正在申报临床的在研药品“萘磺酸钠片”、“滴眼用萘磺酸钠”等多个品种。在口腔应用领域,**GAS-Na** 已作为功效型牙膏、口腔护理液、口腔膜剂及溃疡贴等产品的有效成分被广泛研究和使用的。

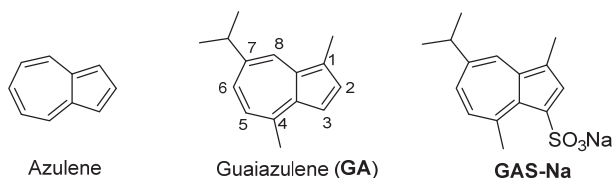


图 1 萘、愈创木萘和愈创木萘磺酸钠的结构式

Figure 1 Chemical structures of azulene, guaiazulene and sodium guaiazulene sulfonate

活性自由基诱发的氧化应激被认为是急性和慢性炎症的致病因素之一,并且在炎症的过程中,炎症部位又会产生活性氧(ROS)而加剧组织损伤。清除巨噬细胞的细胞内 ROS 是一种缓解炎症策略^[9]。因此兼具抗氧化和抗炎活性的化合物可被筛选作为潜在的抗炎药物。本文将从抗氧化和抗炎两方面研究目标化合物的生物活性。

由活性单体构建二聚体的方法在药物化学领域得到重要应用,该方法已经在开发新的抗氧化、抗癌和抗疟药等方面获得应用。Xu 课题组^[10]设计合成了数十种 β -榄香烯(β -elemene, 一种倍半萜烯天然产物)的单体衍生物及对应的二聚体衍生物,研究发现二聚体衍生物的 ROS 抑制活性优于大多数的单体化合物,且无明显的细胞毒性,对人脐静脉内皮细胞的氧化损伤具有显著保

护作用。此外,由青蒿素(Artemisinin)合成青蒿素二聚体^[11]已被证明具有比单体高 100~500 倍的抗癌活性,而且青蒿素二聚体在代谢条件下可能比单体更稳定,可在血液中保持更久的活性。因此,由愈创木萘单体合成得到二聚体是一种具有可行性的尝试。

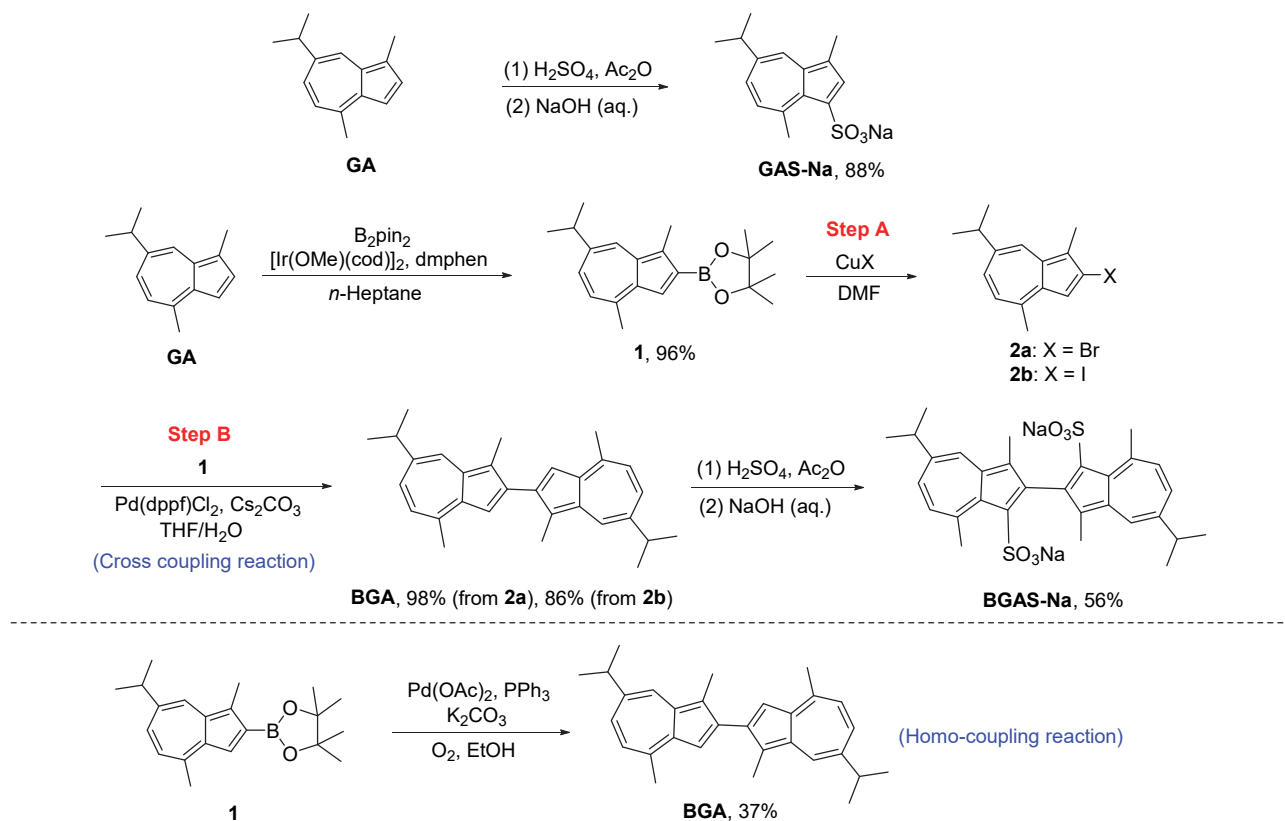
研究表明 **GA** 具有低的毒副作用^[12], **GAS-Na** 对小鼠具有极低的急性毒性^[13]。然而, **GA** 和 **GAS-Na** 都对光和热不稳定^[14],有研究报道, **GA** 等萘衍生物在室温条件下就能被空气中的氧气氧化,且在光照条件下会加速氧化过程从而形成多种副产物^[15]。因此,对 **GA** 进行化学改性来获得提升生物活性和改善稳定性的衍生物具有可行性和重要的研究价值。本文以成本相对低廉、易得且低毒的 **GA** 为原料,参考药物化学中构造二聚体的方法和有效的抗炎分子 **GAS-Na**,首次合成了一种愈创木萘二聚体的二磺酸钠盐(**BGAS-Na**),旨在获得更稳定、高效的抗炎活性分子。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

GAS-Na, **BGA** 和 **BGAS-Na** 的合成路线如 Scheme 1 所示。以 **GA** 为起始原料, $[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{cod})]_2$ 为催化剂和 4,7-二甲基-1,10-菲咯啉(dmphen)为配体^[16],利用直接 C—H 键活化硼化反应得到 2-位频哪醇硼酸酯取代的 **GA** 中间体 **1**。然后首先尝试文献报道的自偶联反应,利用中间体 **1** 一步合成得到 **BGA**^[17],但收率较低(37%, Scheme 1)。本研究采用两步反应以最高 83%(表 1)的总收率得到 **BGA**,即先通过 **1** 与 CuX 反应生成愈创木萘的卤代物 **2**,再利用 **1** 和 **2** 的 Suzuki 交叉偶联反应高收率得到 **BGA**。需要指出的是,卤代反应(Step A)时,文献中碘代物 **2b** (Lit.^[16] 65%)的产率比溴代物 **2a** (Lit.^[16] 55%)更高,而我们的结果是溴代物 **2a** 比碘代物 **2b** 的产率更高。从表 1 可以看出溴代物 **2a** 经 Suzuki 偶联反应(Step B)生成 **BGA** 的转化率(98%)也比使用碘代物 **2b** (86%)更高。这可能是由于在 Suzuki 反应过程中,碘代物 **2b** 比溴代物 **2a** 更易发生氧化加成反应,因此在用碘代物 **2b** 进行反应时,观察到有少量脱碘产物生成,导致通过碘代物 **2b** 制备 **BGA** 的产率较低。因此,通过制备溴代物可以更高产率得到 **BGA**。

最后, **BGA** 经过磺化反应,中和反应和重结晶提纯,得到目标产物 **BGAS-Na**。同脂溶性的 **BGA** 相比, **BGAS-Na** 保持了磺酸钠盐的水溶性。**GAS-Na** 同样由 **GA** 经过磺化反应直接合成得到^[18]。利用 ¹H NMR, ¹³C NMR, IR 光谱, MS 和 HRMS 表征了目标化合物的化学结构。研究发现, **BGA** 和 **BGAS-Na** 室温避光保存一年仍保持固体粉末状,薄层色谱(TLC)未见明显杂质点,



图式 1 GAS-Na, BGA 和 BGAS-Na 的合成路线
Scheme 1 Synthesis routes of GAS-Na, BGA and BGAS-Na

表 1 愈创木萘卤代物 **2a** 和 **2b** 在 Step A 和 Step B 中的收率和转化率

Table 1 Yields and the conversion of **2a** and **2b** in step A and step B

Compd.	X	Yield/%		
		Step A ^a	Step B ^b	Total yield ^c
2a	Br	85	98	83
2b	I	53	86	46

^a The yields of **2a** and **2b** in Step A. ^b The yields of **BGA** generated from **2a** and **2b** in Step B. ^c The total yields calculated by multiplying the yields of Steps A and B.

相同条件下保存的 **GA** 和 **GAS-Na** 则呈现为绿色粘稠液体, TLC 监测几乎完全变质. 这表明 **GA** 二聚体及其磺酸钠盐衍生物的稳定性相较于 **GA** 单体及其磺酸钠盐衍生物有了明显提升. 由于 Nozoe 等^[15]系统研究了萘类衍生物的自氧化现象, 发现愈创木萘在 100 °C 的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中自氧化产生了 25 种可分离产物, 这些化合物大多数是萘醌、茛酮、萘醌或二聚体等形式. 因此, 我们分析二聚体 **BGA** 的稳定性提升可能原因为: (1)愈创木萘的氧化产物存在多种二聚体形式, 这也说明了其二聚体产物稳定性更好; (2)形成二聚体后, 共轭程度的增加能够提升其稳定电荷的能力.

1.2 体外抗氧化能力

本研究使用两种方法来测定 **GA**, **BGA**, **GAS-Na** 和

BGAS-Na 四种化合物的体外抗氧化能力, 分别为 FRAP (Ferric reducing antioxidant power)法和 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)自由基清除法. 其中, FRAP 法反映电子转移能力而没有自由基参与, 但电子转移也是自由基清除的一种机制; 而 DPPH 自由基清除法是一种常用的检测自由基清除效果的方法. 因此, 我们使用 FRAP 法结合 DPPH 自由基清除法来研究四种化合物的体外抗氧化能力.

1.2.1 FRAP 法测定抗氧化能力

FRAP 法是由 Benzie 和 Strain^[19]于 1996 年提出的一种灵敏且准确的总抗氧化能力测试方法. 在酸性条件下, 抗氧化物能够将 Fe^{3+} -TPTZ (Ferric-tri-pyridyl-triazine)还原为蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ, 其最大吸收波长为 593 nm. 因此在 593 nm 处测定生成的蓝色 Fe^{2+} -TPTZ 的吸光度即可评估样品中的总抗氧化能力. 我们采用该法测试了 **GA**, **BGA**, **GAS-Na** 和 **BGAS-Na** 四个化合物的相对抗氧化能力. 结果如图 2 所示, 二聚体 **BGA** 的相对抗氧化能力为 70.80, 显著高于 **GA** (35.68), 说明愈创木萘是一种有效的抗氧化片段, 在其 2 号位形成二聚体不会降低抗氧化能力. 两个磺酸钠盐 **GAS-Na** 和 **BGAS-Na** 的相对抗氧化能力分别为 20.35 和 17.83, 均低于 **GA**, 这可能是由于 FRAP 法的酸性测试环境使磺酸钠盐水解

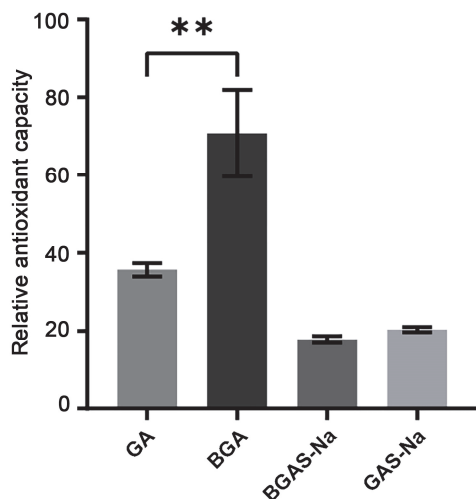


图2 FRAP法测定化合物的相对抗氧化能力

Figure 2 Determination of antioxidant capacity of compounds by FRAP method

Data are given as mean ± SEM. Statistical analysis is performed by one-way analysis of variance (ANOVA). ** $P < 0.01$

成磺酸, 而磺酸根作为强拉电子基团, 使 GA 和 BGA 分子骨架的电子云密度降低, 其对应的还原性降低, 即抗氧化能力降低. 四个化合物的抗氧化能力测试数值列于辅助材料中的表 S1.

1.2.2 DPPH 自由基清除法测定抗氧化能力

DPPH 是一种以 N 为中心的稳定自由基, 其乙醇溶液呈紫色, 最大吸收波长为 517 nm. 当 DPPH 溶液中加入自由基清除剂时, 其未成对电子被配对, 溶液颜色变浅, 呈黄色或淡黄色, 在 517 nm 处的吸光度变小, 其变化程度与自由基清除程度呈线性关系. 1997 年 Kourounakis 等^[20]发现当 GA 的浓度为 DPPH 的 2 倍时, 共处理 3 h 后 DPPH·清除率达 50%, 说明 GA 具有较好的抗氧化活性. 在相同实验条件下测试了四个化合物在与 DPPH 共处理 0.5 和 3 h 后的自由基清除效果变化, 以 GA 为活性对照组.

如图 3 所示, 所有化合物与 DPPH 作用 3 h 时的自由基清除率较 0.5 h 时均有明显提升. 作用 3 h 时, BGA 达到 84.21% 的自由基清除率, BGAS-Na 达到 58.02% 的自由基清除率, 而 GA 的 DPPH·清除率为 32.20%. 四个化合物在不同时间的自由基清除率数据参见辅助材料中的表 S2. 总体来看, BGA 和 BGAS-Na 在清除自由基方面均较 GA 有显著提升($P < 0.01$ 或 $P < 0.0001$), 且明显优于商用分子 GAS-Na. 四个化合物对 DPPH 自由基的清除效果虽具一定的延迟性, 但作用 0.5 和 3 h 时, 四个化合物对 DPPH·的清除率从高到低排序均为: BGA > BGAS-Na > GA > GAS-Na, 且 GA 二聚体及其磺酸钠衍生物的自由基清除能力均远高于 GA 单体及其磺酸钠盐, GA 单体及 GA 二聚体均略高于对应的磺酸钠盐

衍生物.

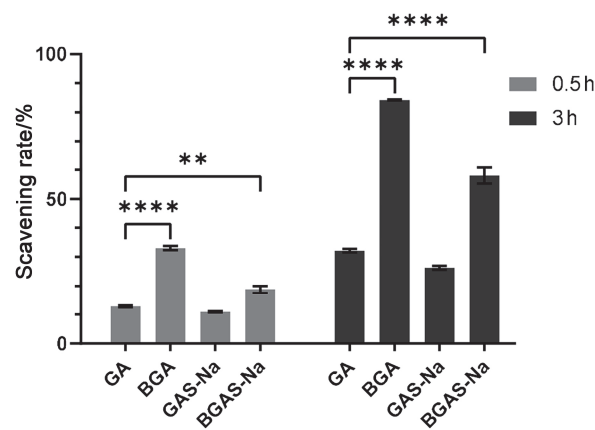


图3 化合物在不同作用时间下对 DPPH 自由基的清除率

Figure 3 Scavenging rate of compounds on DPPH free radicals at different action times

Data are given as mean ± SEM. Statistical analysis is performed by Two-way analysis of variance (ANOVA). ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

DPPH 自由基清除法的测试结果与 FRAP 法测试结果一起证明愈创木萘 2-位自聚得到的二聚体能够提升愈创木萘的抗氧化能力, 其对应的二磺酸钠盐衍生物也具有较好的自由基清除效果.

1.3 抗炎活性与细胞毒性

脂多糖(LPS)是致病性革兰氏阴性细菌外壁层的主要成分^[21], 可以刺激巨噬细胞产生促炎因子来促进炎症反应. 一氧化氮(NO)是一种生物信使分子, 其生成依赖于诱导性一氧化氮合酶(iNOS), 适量的 NO 在调节平滑肌、平衡血流速度等生理过程中起重要作用, 然而高浓度的 NO 自由基分子会导致肿瘤、炎症等病症. 研究表明, 巨噬细胞 RAW 264.7 经过 LPS 刺激或诱导后会生成高浓度的 NO, 在体内表现出炎症部位的组织损伤. Griess 法是检测 NO 最常用且最简单的方法之一^[22], 它是依据化学家 Griess 在 1879 年描述的重氮化反应进行, 其原理为磺胺与亚硝酸盐(NO 的代谢产物)反应产生重氮盐, 然后与萘基乙二胺发生偶联反应, 生成紫色的偶氮化合物(最大吸收波长为 540 nm), 最后通过测试吸光度来计算 NO 浓度, 从而评估炎症程度.

首先建立 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 体外炎症模型, 随后在该模型基础上施加不同浓度的四种化合物, 采用 Griess 试剂法检测不同组别巨噬细胞产生的 NO 浓度. 图 4a 表明, 空白组(不给 LPS 刺激且不给药)几乎不产生 NO 炎症因子, 模型组(只给 LPS 刺激但不给药)产生的 NO 浓度最高(46.74 $\mu\text{mol/L}$), 当加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 BGAS-Na 后 NO 浓度有了明显降低(37.62 $\mu\text{mol/L}$), NO 抑制率为 19.5%(图 4e), 而当 BGAS-Na 的给药量增加至 5 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率分别增长到

46.3%和 93.0%, IC_{50} 值为 $5.64 \mu\text{g/mL}$. 因此, **BGAS-Na** 能显著抑制 NO 炎症因子的产生, 且抑制效果具有浓度依赖性. 图 4 的 NO 浓度及抑制率的具体数值列于辅助材料中的表 S3. 由图 4b, 4c, 4d 可看出 **GAS-Na**, **BGA** 和 **GA** 对 NO 浓度的影响均无明显的浓度依赖性. 如图 4e 所示, 在相同浓度下, 四个化合物中对 NO 释放的抑制作用最强的均是 **BGAS-Na**, 且与其余三个化合物均具有显著性差异, 这说明 **BGAS-Na** 的抗炎作用明显优于其它三个化合物. 2001 年, Guarrera 等^[23]使用紫外线诱发的红斑作为炎症模型, 研究发现意大利市售的含 **GAS-Na** 的 Veralga azulene[®]凝胶的抗炎活性与 OTC(非处方药)氢化可的松乳膏相当. 然而, 不同给药浓度下, **BGAS-Na** 的 NO 抑制率远高于 **GAS-Na** ($P < 0.01$ 或

$P < 0.0001$), 由此说明 **BGAS-Na** 的抗炎效果优异. 从图 4e 还可看出 **BGA** 和 **GA** 在不同浓度下的 NO 抑制率没有规律性且表现一般. 因此, **BGAS-Na** 是一种优于商用活性成分 **GAS-Na** 的潜在高效抗炎化合物.

CCK-8 (Cell Counting Kit-8)法是一种用于测定细胞增殖或毒性实验中活细胞数目的高灵敏度、无放射性的比色检测法. 由于巨噬细胞产生 NO 可能会受待测化合物的细胞毒性影响, 因此, 我们用 CCK-8 法检测各化合物在不同浓度下对巨噬细胞生长的影响, 以此考察四个化合物对小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 的细胞毒性. 如图 5 所示, 用抗炎活性测试中对应浓度梯度的待测化合物与巨噬细胞共培养 24 h 后, 细胞存活率均约为 100%, 说明四个化合物对巨噬细胞均无明显的细胞毒性.

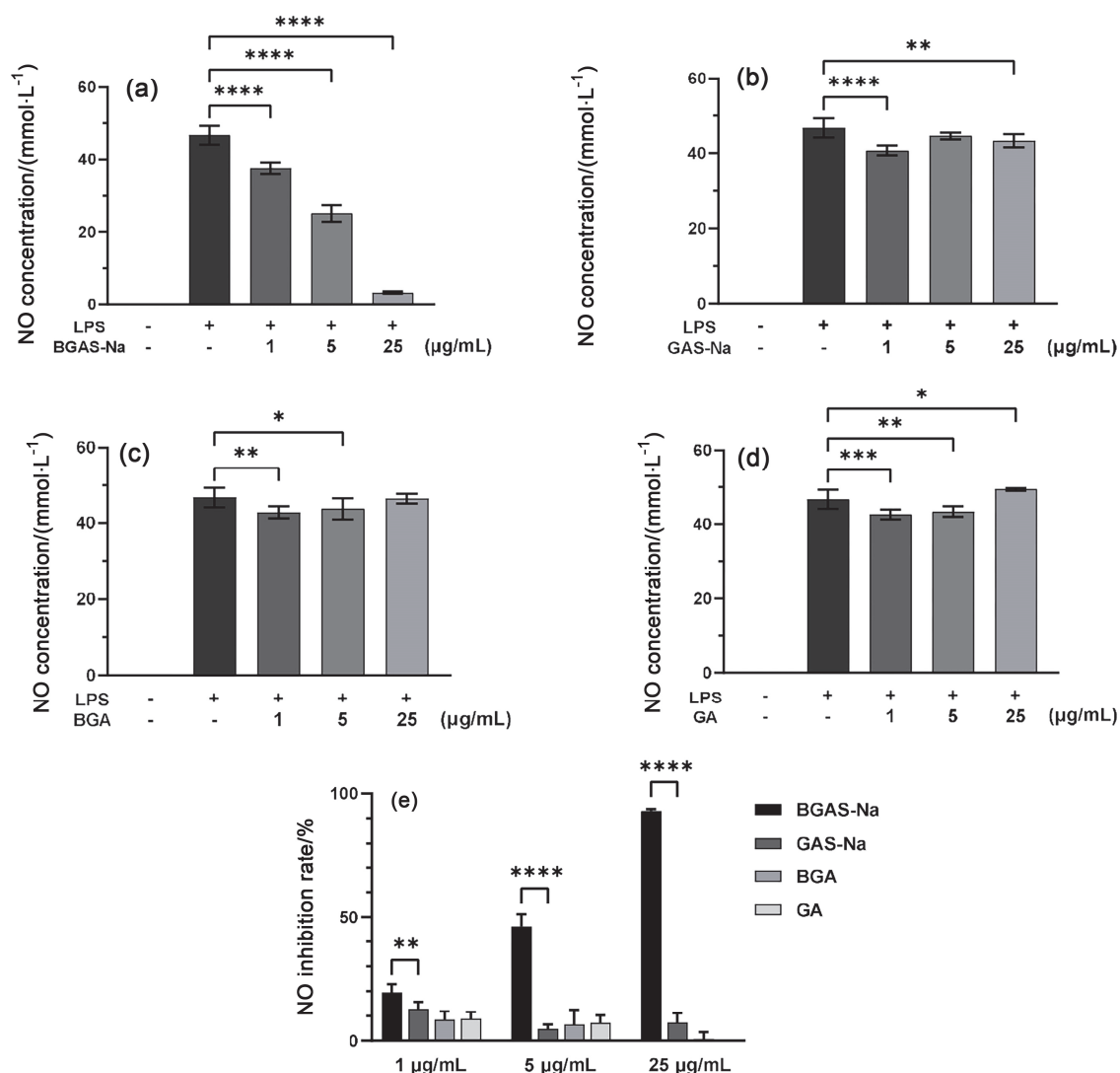


图 4 化合物对 LPS 激活的 RAW 264.7 细胞产生 NO 的影响

Figure 4 Effects of compounds on NO production in LPS-activated RAW 264.7 Cells

Data are given as mean $\pm$ SEM. Figure 4a-4d show the substances added in different experimental groups. All concentration units are $\mu\text{g/mL}$. Figure 4e shows the inhibition rate of the compounds on the production of NO at different concentrations * indicates significant difference ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, and $****P < 0.0001$)

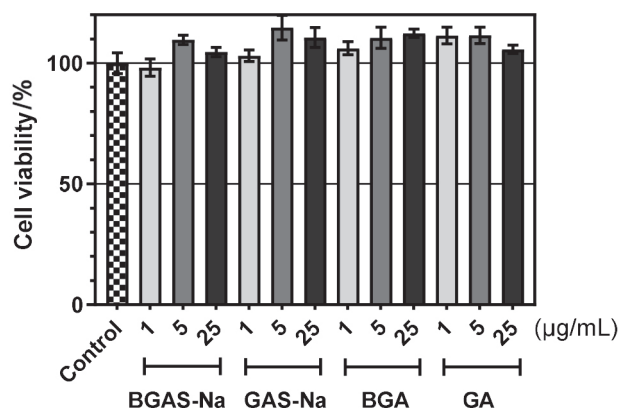


图5 化合物对巨噬细胞 RAW 264.7 细胞存活率的影响

Figure 5 Effects of compounds on the cell viability of macrophage RAW 264.7 cells

Data are given as mean $\pm$ SEM

2 结论

设计合成了一种愈创木萘的二聚体 **BGA**, 并制备了 **BGA** 的二磺酸钠盐衍生物 **BGAS-Na**, 二者的稳定性较 **GA** 和 **GAS-Na** 均有明显提升. 分别用 FRAP 法和 DPPH 自由基清除法测试了 **GA**, **BGA**, **GAS-Na** 和 **BGAS-Na** 四个化合物的体外抗氧化能力. 综合两种抗氧化活性检测方法的结果, **BGA** 具有最优的抗氧化活性, **BGAS-Na** 在 DPPH 自由基清除试验中也表现出优于 **GA** 和 **GAS-Na** 的抗氧化能力. 因此, 愈创木萘是一种有效的抗氧化片段, 其 2-位形成的二聚体具有强的抗氧化能力. 在 LPS 激活的小鼠巨噬细胞炎症模型中, **BGAS-Na** 具有最优的抗炎效果, 优于商用活性分子 **GAS-Na**, 在 5 $\mu\text{g/mL}$ 时对 NO 炎症因子达到约 50% 的抑制效果, 且具有浓度依赖性. 此外, 四个化合物对巨噬细胞均无明显的细胞毒性. 研究表明, **BGAS-Na** 具有成为优秀抗炎药物的发展潜力, 其体内生物活性实验和具体的抗炎机制有待进一步研究.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振(^1H NMR, ^{13}C NMR)由日本 JEOL 400 核磁共振波谱仪测定, 采用 CDCl_3 或 CD_3OD 作为溶剂, TMS 作为内标. IR 由 Thermo Fisher Nicolet FT-IR spectrometer 型红外分析仪测定. 高分辨质谱由 Thermo Scientific Q Exactive HF Orbitrap-FTMS 质谱仪测定. 熔点由上海申光 SGW X-4 显微熔点仪测定. 吸光度由美国多功能酶标仪 PerkinElmer EnVision 测定.

愈创木萘(**GA**, 98%), 艾览(上海)化工科技有限公司; DPPH, 上海麦克林生化科技有限公司; 总抗氧化能力检测试剂盒(FRAP 法)、一氧化氮(NO)检测试剂盒和

LPS (TLR4 激活剂), 碧云天; CCK-8 检测试剂盒, 大连美仑生物技术有限公司.

3.2 合成方法

3.2.1 5-异丙基-3,8-二甲基萘-1-磺酸钠(**GAS-Na**)的合成

取愈创木萘(793.2 mg, 4 mmol)加入 50 mL 三颈烧瓶中, 加入 2 mL 醋酸酐, 常温下搅拌使愈创木萘完全溶解. 将烧瓶置于冰水浴下, 缓慢滴加 1 mL 浓 H_2SO_4 和 2 mL 醋酸酐的混合溶液. 滴加完毕后, 缓慢升至室温, 反应 4 h. TLC 监测反应完全, 将反应瓶置于冰浴中, 缓慢滴加 NaOH 水溶液, 调 pH 至 8~9, 有深蓝色固体析出. 过滤得到蓝色固体, 接着用石油醚和少量水洗掉脂溶性杂质和过量无机碱, 最后用无水乙醇重结晶得到 1.0565 g 蓝色固体 **GAS-Na**^[18b], 产率 88%. m.p. 121~123 $^{\circ}\text{C}$ (Lit.^[18b] 159~161 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.26 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.54 (dd, $J=11.0, 1.8$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=11.1$ Hz, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.12 (hept, $J=6.8$ Hz, 1H), 2.58 (s, 3H), 1.38 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); IR (KBr) ν : 3425, 2956, 2923, 1639, 1541, 1463, 1372, 1193, 1121, 1084, 1064, 1011, 647 cm^{-1} .

3.2.2 2-(7-异丙基-1,4-二甲基萘-2-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼烷(**1**)和 2-溴-7-异丙基-1,4-二甲基萘(**2a**)的合成

参考文献[16], 取愈创木萘(993 mg, 5.0 mmol), 联硼酸频那醇酯(1.32 g, 5.2 mmol), 4,7-二甲基-1,10-菲咯啉(10 mg, 0.05 mmol)于 50 mL Schlenk 瓶中, 抽换 N_2 三次, 在手套箱中称取催化剂 $[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{cod})]_2$ (17 mg, 0.025 mmol)于反应管中, 在 N_2 氛围下加入超干正庚烷 15 mL, 110 $^{\circ}\text{C}$ 加热回流反应 3 h, TLC 监测反应完全. 恢复室温后, 加水淬灭, 乙酸乙酯萃取三次, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩后进行硅胶柱层析[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=20: 1]得到 1.56 g 蓝色固体 **1**, 产率 96%. m.p. 91~93 $^{\circ}\text{C}$ (Lit.^[16] 71~74 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.46 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.49 (dd, $J=10.5, 1.7$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.20 (hept, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 1.57 (s, 12H), 1.53 (d, $J=6.9$ Hz, 6H).

参考文献[16], 取 CuBr (473.4 mg, 3.3 mmol)于 250 mL 单口瓶中, 加入 20 mL DMF, 加热至 90 $^{\circ}\text{C}$, 溶液由浅绿色变成棕褐色, 在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 5 min 后缓慢加入 **1** (972.8 mg, 3.0 mmol)的 DMF 溶液(20 mL), 90 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h. 冷却至室温后, 将反应液倒入水中, 用硅藻土滤去金属盐, 同时用大量水洗掉 DMF, 滤液用乙酸乙酯萃取, 有机相为蓝紫色, 留在硅藻土上的蓝紫色产物同样用乙酸乙酯溶解, 合并乙酸乙酯有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥,

浓缩后进行硅胶柱层析,石油醚为洗脱剂,最终得到 704.8 mg 蓝紫色油状物 **2a**, 产率 85%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.16 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 7.46 (dd, $J=10.6, 1.6$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.09 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.10 (hept, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.78 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 1.36 (d, $J=6.9$ Hz, 6H)。化合物 **2b** 的合成同 **2a**, 蓝紫色油状物, 产率 53%, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.44 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.59 (dd, $J=10.6, 1.9$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.28 (hept, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 1.60 (d, $J=6.9$ Hz, 4H)。

3.2.3 7,7'-二异丙基-1,1',4,4'-四甲基-2,2'-二萘(BGA)的合成

取 **1** (340.5 mg, 1.05 mmol), **2a** (277.2 mg, 1 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (36.6 mg, 0.05 mmol)和 Cs₂CO₃ (977.5 mg, 3 mmol)于 50 mL Schlenk 管中,抽换 N₂ 三次,在 N₂ 氛围下加入 12 mL 的现蒸四氢呋喃(THF)和 3 mL 用 N₂ 鼓泡的 H₂O, 室温反应 24 h。TLC 监测反应结束后,将反应液倒入水中,石油醚萃取,无水 Na₂SO₄ 干燥,浓缩后进行硅胶柱层析[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=50:1],最终得到 387.9 mg 绿色固体,产率 98%。m.p. 168~169 °C (Lit.^[17] 167~167.5 °C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.30 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.42 (dd, $J=10.6, 1.8$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.13 (hept, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.89 (s, 3H), 2.72 (s, 3H), 1.40 (d, $J=6.9$ Hz, 6H)。

3.2.4 5,5'-二异丙基-3,3',8,8'-四甲基-[2,2'-二萘]-1,1'-二磺酸钠(BGAS-Na)的合成

以 **BGA** (276.2 mg, 0.7 mmol)为原料,合成步骤同第 3.2.1 节,得到 234.3 mg 紫色固体 **BGAS-Na**, 产率 56%。m.p. >320 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.25 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J=11.2, 2.0$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J=11.2$ Hz, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.09 (hept, $J=6.8$ Hz, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.37 (d, $J=6.9$ Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ : 152.0, 148.0, 143.1, 138.4, 135.7, 135.3, 133.8, 131.8, 127.1, 124.0, 38.8, 29.0, 24.9, 11.8; IR (KBr) ν : 3426, 2956, 2923, 2865, 1688, 1635, 1540, 1461, 1369, 1285, 1212, 1160, 1119, 1031, 912, 811, 759, 637, 541 cm⁻¹; HRMS (ESI) calcd for C₃₀H₃₃O₆Na₂S₂ [M+H]⁺ 599.1508, found 599.1506。

3.3 活性测试方法

3.3.1 抗氧化能力测试方法(FRAP 法)

用二甲基亚砷充分溶解精密称取的四种待测化合物,分别配制成 0.2345 mmol/L **BGAS-Na**, 0.5342 mmol/L **GAS-Na**, 0.2726 mmol/L **BGA**, 0.4258 mmol/L **GA** 溶液,备用。称取总抗氧化能力检测试剂盒提供的

FeSO₄•7H₂O, 用二甲基亚砷配制成 100 mmol/L 的溶液,分别稀释为 50, 10, 5, 2.5, 1.5, 0.75 mmol/L。在 96 孔板的每一个孔加入 180 μ L 现配的 FRAP 工作液,再加入 6 个浓度梯度的 FeSO₄•7H₂O 标准溶液各 5 μ L, 每个浓度平行 6 个复孔,并设置空白对照组(5 μ L 蒸馏水)和阳性对照组(5 μ L 的 1 mmol/L Trolox 溶液),轻轻混匀,37 °C 下孵育 3 min 后在 593 nm 处测定吸光度,计算得到标准曲线。同标准曲线测定方法,测定四种化合物,平行 6 复孔。另外,还需配制不含 FRAP 工作液的对照组,用于检测不同浓度下样品溶液本身在 593 nm 处的吸光度。最后将实验组吸光值带入标准曲线求出对应的总抗氧化能力。相对抗氧化能力=总抗氧化能力/样品浓度。

3.3.2 抗氧化能力测试方法(DPPH 自由基清除法)

用无水乙醇配制 0.2 mmol/L 的 DPPH 母液,再用无水乙醇或二甲基亚砷配制 0.4 mmol/L 的 **BGAS-Na**, **GAS-Na**, **BGA**, **GA** 溶液,均 0~4 °C 下避光保存。在 96 孔板中加入 100 μ L DPPH 溶液和 100 μ L 不同化合物溶液,混匀,于室温下放置 0.5 h 后,用酶标仪测定 517 nm 处的吸光度,记作 A_s。在 3 h 后跟踪 517 nm 处吸光度的变化。同理,在 96 孔板中加入 100 μ L 化合物溶液和 100 μ L 无水乙醇,混匀,于室温下放置一段时间后测定吸光度,记作 A₀。在 96 孔板中加入 100 μ L DPPH 溶液和 100 μ L 无水乙醇,混匀,于室温下放置一段时间后测定吸光度,记作 A_c。每个测试组均设置 3 个复孔。根据公式:清除率(%)=[1-(A_s-A₀)/A_c] $\times$ 100, 计算化合物对 DPPH 的清除率。

3.3.3 Griess 法检测化合物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞炎症模型的抑制作用

小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 细胞株用内含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM (dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基于 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养,细胞呈对数生长,每 24 h 更换培养基,细胞生长至 80%~90% 传代。待细胞传至 3 代,状态稳定后,以 5 $\times$ 10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔板,孵育 24 h。加入配制好的不同浓度的化合物,共培养 1 h。孵育结束后,给药组和模型对照组加入 LPS (100 ng/孔),空白组加入完全培养基,继续培养 24 h,收集上清液,具体步骤按照 NO 试剂盒说明书操作。540 nm 处测吸光度,并计算 NO 的含量及抑制率。NO 浓度是根据预先建立的 NO 浓度与 OD 值之间的线性关系(标准曲线)计算得到,抑制率(%)=[(模型组 NO 浓度-给药组 NO 浓度)/模型组 NO 浓度] $\times$ 100。

3.3.4 CCK-8 法检测化合物对巨噬细胞 RAW 264.7 细胞活力的影响

取生长对数期的巨噬细胞用一次性刮铲刮拭,用吸

管吹打至呈单个细胞分散. 通过细胞计数取相应细胞数, 并加入相应培养基, 以 5×10^4 个/mL 的密度种至 96 孔板, 每孔 100 μ L, 孵育 24 h. 给药组分别加入化合物 BGAS-Na, GAS-Na, BGA, GA 各 1, 5, 25 μ g/mL 浓度, 每组 5 个复孔; 空白对照组加入相应体积的细胞培养液, 继续孵育 24 h. 弃 96 孔板上层培养基, 加入 10% 的 CCK-8 无血清 DMEM 液 100 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 细胞培养箱孵育 45 min, 用酶标仪测 450 nm 处 OD 值, 计算细胞存活率. 细胞存活率(%)=(给药组 OD 值/空白对照组 OD 值) $\times$ 100.

3.3.5 统计方法

采用 GraphPad 9.0 软件对所得数据进行 one-way 和 two-way ANOVA 方差分析以及 Dunnett 多重比较检验显著性, 显著水平为 0.05.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **1**, **2a**, **2b**, GAS-Na, BGA, BGAS-Na 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, MS 和 HRMS 谱图和生物活性测试数据. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] (a) Gao, H.-L.; Yang, X.-D.; Xin, H.-S.; Gao, T.-Z.; Gong, H.-G.; Gao, X.-K. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 2680 (in Chinese). (高洪磊, 杨笑迪, 辛涵申, 高铁阵, 龚和贵, 高希珂, 有机化学, **2018**, *38*, 2680.) (b) Hou, B.; Li, J.; Xin, H.; Yang, X.; Gao, H.; Peng, P.-Z.; Gao, X.-K. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 788 (in Chinese). (侯斌, 李晶, 辛涵申, 杨笑迪, 高洪磊, 彭培珍, 高希珂, 化学学报, **2020**, *78*, 788.)
- [2] (a) Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Konosu, S. *Experientia* **1981**, *37*, 680. (b) Seo, Y.; Rho, J.-R.; Geum, N.; Yoon, J. B.; Shin, J. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 985.
- [3] (a) Yamasaki, H.; Irino, S.; Ocire, Z.; Uda, A.; Uchida, K.; Ohno, H.; Saito, N.; Kondo, K.; Jinzenji, K.; Yamamoto, T. *Folia Pharmacol. Jpn.* **1958**, *54*, 362. (b) Yamasaki, H.; Kondo, K.; Uda, T.; Yamamoto, T.; Endo, K. *Folia Pharmacol. Jpn.* **1960**, *56*, 1249.
- [4] Pratsinis, H.; Haroutounian, S. *Nat. Prod. Lett.* **2002**, *16*, 201.
- [5] Wang, D.-L.; Dong, Z.; Xu, J.; Li, D. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1559 (in Chinese). (王道林, 董哲, 徐姣, 李帝, 有机化学, **2013**, *33*, 1559.)
- [6] Cao, T.; Li, Y.; Yang, Z.; Yuan, M.; Li, Y.; Yang, H.; Feng, Y.; Yin, S. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, *88*, 264.
- [7] (a) Wada, T.; Maruyama, R.; Irie, Y.; Hashimoto, M.; Wakabayashi, H.; Okudaira, N.; Uesawa, Y.; Kagaya, H.; Sakagami, H. *In Vivo* **2018**, *32*, 479. (b) Uehara, M.; Minemura, H.; Ohno, T.; Hashimoto, M.; Wakabayashi, H.; Okudaira, N.; Sakagami, H. *In Vivo* **2018**, *32*, 541. (c) Ayaz, F.; Yuzer, A.; Ince, T.; Ince, M. *Inflammation* **2020**, *43*, 1009.
- [8] (a) Yanagisawa, T.; Kosakai, K.; Tomiyama, T.; Yasunami, M.; Takase, K. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1990**, *38*, 3355. (b) Zhao, Y.-T.; Cai, C.-M.; Yang, S.-Z. *Med. Inf.* **2020**, *33*, 51 (in Chinese). (赵亚婷, 蔡春梅, 杨树忠, 医学信息, **2020**, *33*, 51.) (c) Guarrera, M.; Turbino, L.; Rebora, A. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2001**, *15*, 481.
- [9] Wei, Q.; Su, Y.; Xin, H.; Zhang, L.; Ding, J.; Chen, X. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2021**, *13*, 56719.
- [10] (a) Chen, J.; Duan, W.; Bai, R.; Yao, H.; Shang, J.; Xu, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3407. (b) Chen, J.; Wang, R.; Wang, T.; Ding, Q.; Khalil, A.; Xu, S.; Lin, A.; Yao, H.; Xie, W.; Zhu, Z.; Xu, J. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 443.
- [11] (a) Posner, G. H.; Ploypradith, P.; Parker, M. H.; O'Dowd, H.; Woo, S.-H.; Northrop, J.; Krasavin, M.; Dolan, P.; Kensler, T. W.; Xie, S.; Shapiro, T. A. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4275. (b) Fröhlich, T.; Çapcı Karagöz, A.; Reiter, C.; Tsogoeva, S. B. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 7360.
- [12] Andersen, F. A. *Int. J. Toxicol.* **1999**, *18*, 27.
- [13] Utsumi, N.; Wang, Y.; Sato, S.; Yamaguchi, Y. *Jpn. J. Oral Biol.* **1975**, *17*, 311.
- [14] Shimizu, H.; Hayashida, S.; Wagatsuma, N. *Yakugaku Zasshi* **1988**, *108*, 1203.
- [15] (a) Matsubara, Y.; Takekuma, S.-I.; Yokoi, K.; Yamamoto, H.; Nozoe, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 1415. (b) Nozoe, T.; Takekuma, S.-I.; Doi, M.; Matsubara, Y.; Yamamoto, H. *Chem. Lett.* **1984**, *13*, 627.
- [16] Narita, M.; Murafoji, T.; Yamashita, S.; Fujinaga, M.; Hiyama, K.; Oka, Y.; Tani, F.; Kamijo, S.; Ishiguro, K. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 1298.
- [17] Sato, Ohki; Sakai, Ryuto *Heterocycles* **2018**, *96*, 1259.
- [18] (a) Zhang, L.-Y.; Yang, F.; Shi, W.-Q.; Zhang, P.; Li, Y.; Yin, S.-F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5722. (b) Peet, J.; Selyutina, A.; Bredihhin, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 1653.
- [19] Brahmi, F.; Nury, T.; Debbabi, M.; Hadj-Ahmed, S.; Zarrouk, A.; Prost, M.; Madani, K.; Boulekbache-Makhlouf, L.; Lizard, G. *Antioxidants* **2018**, *7*, 184.
- [20] Kourounakis, A. P.; Rekka, E. A.; Kourounakis, P. N. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 938.
- [21] Chen, S.; Zhu, H.; Sun, J.; Zhu, L.; Qin, L.; Wan, J. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *22*, 1049.
- [22] Moshage, H.; Kok, B.; Huizenga, J. R.; Jansen, P. L. *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 892.
- [23] Guarrera, M.; Turbino, L.; Rebora, A. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2001**, *15*, 486.

(Lu, Y.)