

新型含异丁基苯甲酮类化合物的合成及抗炎活性的初步研究

杨璐¹, 史行¹, 李云兰^{1,2*}, 陈曦¹, 牛思青¹, 乔晓枝¹, 买佳琪¹, 李青山²

(1. 山西医科大学药学院, 山西太原 030001; 2. 山西中医药大学, 山西太原 030619)

摘要: 通过傅克酰基化反应、黄鸣龙还原反应合成了 20 个目标化合物, 并通过 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型测定目标化合物对细胞上清液中 NO 的抑制作用并探讨了构效关系。合成的 20 个目标化合物全部为新化合物, 其结构经 ESI-MS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 确认。体外活性实验表明, 有 18 个目标化合物在浓度为 40 μmol·L⁻¹ 时有一定的抗炎作用, 其中以 9a、8b、7c 和 9c 表现出较强的抗炎活性, 7c 和 9c 的 IC₅₀ 与阳性对照药布洛芬相当。

关键词: 异丁基苯甲酮; 合成; NO; 抗炎作用

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 02-0256-07

Synthesis and anti-inflammatory activity of novel isobutyl benzophenone derivatives

YANG Lu¹, SHI Hang¹, LI Yun-lan^{1,2*}, CHEN Xi¹, NIU Si-qing¹, QIAO Xiao-zhi¹,
MAI Jia-qi¹, LI Qing-shan²

(1. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Shanxi University of Chinese Medical, Taiyuan 030619, China)

Abstract: Twenty target compounds were synthesized by the reduction reaction of HUANG Minglong and Friedel-Crafts acylation reaction in this study. The inhibitory effects of the new compounds were tested on NO production in LPS-induced mouse macrophage RAW264.7 cells, a cellular inflammation model. The structure-activity relationships were discussed. The structures of target compounds were confirmed by ESI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. *In vitro* activity experiments showed that 18 compounds had certain anti-inflammatory effects at the concentration of 40 μmol·L⁻¹, of which 9a, 8b, 7c and 9c showed strong anti-inflammatory activities, and IC₅₀ of 7c and 9c were comparable to the positive control drug ibuprofen.

Key words: isobutylbenzophenone; synthesis; NO; anti-inflammatory effect

炎症是生物在漫长的进化过程中逐渐形成的抵御外来病原体入侵的重要保护机制, 然而近几年来越来越多的数据显示炎症并不局限于机体受到的外来细菌或病毒等的感染, 而一些非感染损伤如恶性肿

瘤和代谢性疾病如肥胖和 2 型糖尿病中也能够寻找到炎症的踪影^[1]。因此, 抗炎治疗已成为感染、创伤、代谢性疾病等的基本策略, 新型抗炎药物的研发成为研究热点^[2]。

溴酚类化合物是一类独具特色的化合物, 它具有多样的生物活性, 主要包括酶抑制、抗氧化、抗炎、抗微生物和细胞毒活性等。溴酚类化合物在海洋生物中含量低, 且采集困难, 因此限制了对生物活性的进一步研究和开发。本课题组前期对溴酚类化合物的研究过程中合成了一系列以二苯甲酮为母核的

收稿日期: 2017-12-08; 修回日期: 2018-01-03.

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目 (2014011027-1); 山西省科技计划项目 (2013031302); 山西省高校中青年拔尖创新人才计划 (2015 年); 晋药综合开发利用协同创新项目 (2017-JYXT-18).

*通讯作者 Tel: 13111066649, E-mail: liyunlanr@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1224

新型化合物, 并发现其中一些化合物对血管内皮细胞损伤有较高的保护活性, 而对抗炎活性方面研究较少^[3,4]。

本课题运用 Sybyl-X 2.0 分子对接技术, 根据炎症蛋白 COX-2 及 iNOS 在本实验室前期课题的基础上进行新的结构改造^[5], 在 A 环设计加入了异丁基及羟基、甲氧基, 并用杂环或碳链取代 B 环^[6,7] (设计思路如图 1)。异丁基在很多活性药物的设计合成中经常被引入, 比如临床上经典抗炎药物布洛芬^[8,9], 异丁基的引入可以增强药物的脂溶性, 促进药物的吸收。因此, 本课题通过引入异丁基和杂环等, 合成了系列含异丁基苯甲酮类化合物, 并对其进行抗炎活性筛选, 以期得到更高活性的新化合物并探讨其构效关系。

结果与讨论

1 目标化合物的合成

目标化合物 **4a~9c** 的合成过程见合成路线 1~3, 分别以 3 种化合物即 2,4,6-三甲氧基甲苯、2,4,6-三甲氧基苯及 2,6-二甲氧基甲苯为原料, 先在水无 AlCl_3 为催化剂的作用下与异丁酰氯发生傅克酰基化反应, 生成化合物 **2a~2c**, 然后在强碱及高温的条件下发生黄鸣龙还原反应将酮羰基还原成亚甲基, 生成化合物 **3a~3c**, 最后再进行傅克酰基化反应生成目标产物, 此步反应由于原料化合物空间位阻较大, 导致酰基化难度加大, 产率较低, 适当升高温度后产率有所上升, 但由于温度上升反应变剧烈, 且催化剂 AlCl_3 有选择性脱甲基作用, 在引入酰基的同时, 酰基邻位的甲氧基会同时脱掉, 生成的游离酚羟基与邻

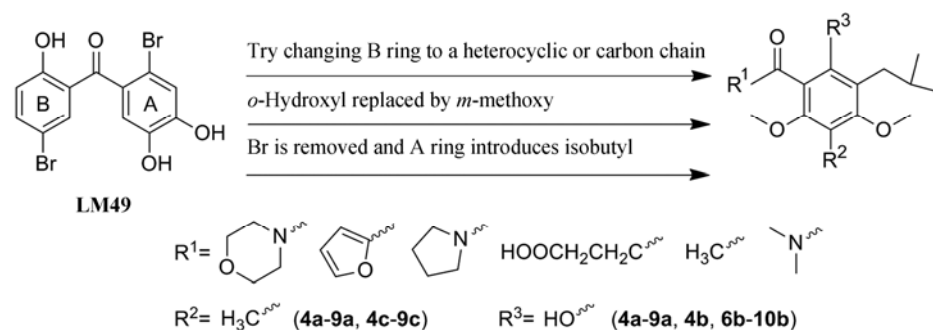
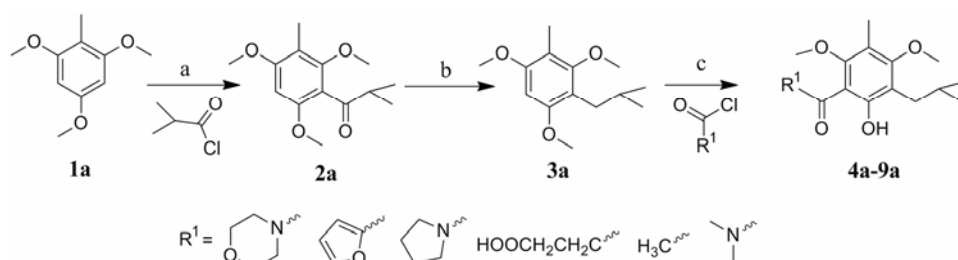
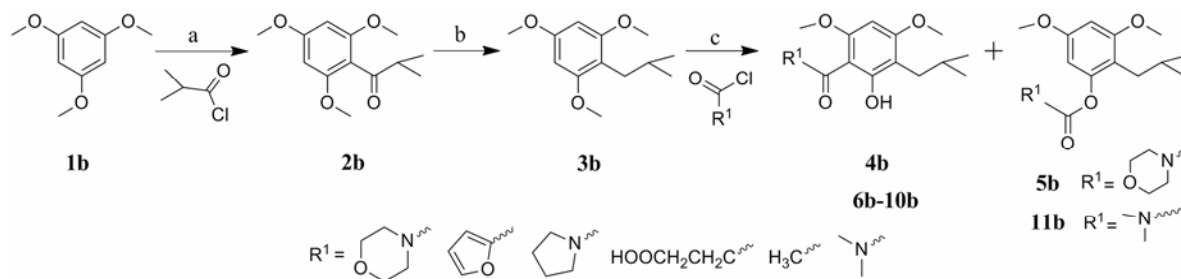


Figure 1 Molecular design of target compounds



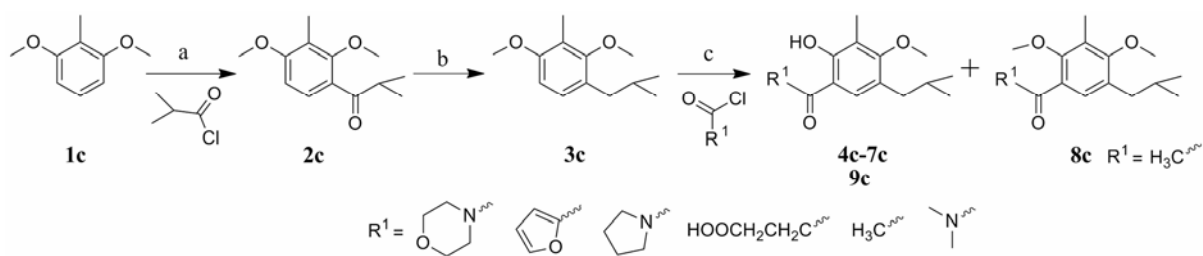
Reagents and conditions: (a) AlCl_3 , CH_2Cl_2 , rt, 6 h; (b) 80% hydrazine hydrate (4 eq), diethylene glycol, DMSO, NaOH (10%), 165–175 °C, 10 h; (c) AlCl_3 , CH_2Cl_2 , 45 °C under reflux 24 h.

Scheme 1 Synthetic route of compounds **4a-9a**



Reagents and conditions: (a) AlCl_3 , CH_2Cl_2 , rt, 2 h; (b) 80% hydrazine hydrate (4 eq), diethylene glycol, DMSO, NaOH (10%), 165–175 °C, 10 h; (c) AlCl_3 , CH_2Cl_2 , 45 °C under reflux 24 h.

Scheme 2 Synthetic route of compounds **4b-11b**



Reagents and conditions: (a) AlCl_3 , CH_2Cl_2 , rt, 2 h; (b) 80% hydrazine hydrate (4 eq), diethylene glycol, DMSO, NaOH (10%), 165–175 °C, 10 h; (c) AlCl_3 , CH_2Cl_2 , 45 °C under reflux 24 h.

Scheme 3 Synthetic route of compounds **4c–9c**

位的羰基形成分子内氢键^[10], 具体步骤见实验部分。

目标化合物经 ESI-MS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 确认, 其收率、理化常数及波谱数据见表 1、2。

2 细胞毒性检测

目标化合物 **4a~9a**、**4b~11b**、**4c~9c** 生存率实验结果见表 3, 从实验结果来看, 各目标化合物与空白对照组相比, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 目标化合物均未对 RAW264.7 细胞的生存率产生影响, 细胞存活率均在 85% 以上, 而先导化合物 LM49 在 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下细胞存活率仅为 19.92%。此结果提示, 含异丁基苯甲酮类化合物在 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 基本没有毒性, 安全性显著提高。

3 抗炎作用初步研究

以已上市的非甾体抗炎药布洛芬和先导化合物 LM49 为阳性对照药, 采用 Griess 法测定 20 个化合

物抗炎初步活性, 目标化合物抗炎活性初筛结果见表 4, 结果表明大部分化合物都有一定的抗炎活性, 虽然均弱于先导化合物 LM49, 但化合物 **7c** 和 **9c** 的 IC_{50} 分别为 $33.2\pm 0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $35.8\pm 0.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与阳性对照药布洛芬相当。

4 分子对接

分子对接结果见图 2 和 3, 结果显示 **7c** 对 COX-2 的对接分数 (8.47) 优于 iNOS (5.00), 提示其抗炎靶点有可能是 COX-2; 分子对接结果 (图 2) 显示化合物 **7c** 结构中的羧基与 COX-2 中的 His75 (键长 2.74 Å)、Arg499 (键长 1.91 Å) 存在氢键结合, 提高了与受体蛋白的亲合力, 为进一步研究抗炎作用机制提供了思路。

5 小结

本实验合成了 20 个新型异丁基苯甲酮类化合物,

Table 1 The physical and ESI-MS data of target compounds

| Compd. | Formula | Property | log <i>P</i> | Yield/% | mp/°C | MS (ESI) [M+H] ⁺ <i>m/z</i> |
|------------|---|--------------------|--------------|---------|---------|--|
| 4a | C ₁₈ H ₂₇ NO ₅ | White solid | 3.18 | 21 | 145–147 | 338 |
| 5a | C ₁₈ H ₂₂ O ₅ | Light yellow solid | 3.36 | 42 | 103–105 | 319 |
| 6a | C ₁₈ H ₂₇ NO ₄ | White solid | 3.57 | 44 | 136–138 | 322 |
| 7a | C ₁₇ H ₂₄ O ₆ | White solid | 2.51 | 34 | 121–123 | 325 |
| 8a | C ₁₅ H ₂₂ O ₄ | Colorless oil | 4.37 | 65 | – | 267 |
| 9a | C ₁₆ H ₂₅ NO ₄ | White solid | 2.93 | 29 | 78–80 | 296 |
| 4b | C ₁₇ H ₂₅ NO ₅ | White solid | 2.60 | 12 | 147–149 | 324 |
| 5b | C ₁₇ H ₂₅ NO ₅ | White solid | 3.05 | 12 | 68–70 | 324 |
| 6b | C ₁₇ H ₂₀ O ₅ | Light yellow solid | 2.87 | 63 | 87–89 | 305 |
| 7b | C ₁₇ H ₂₅ NO ₄ | White solid | 3.01 | 11 | 113–115 | 308 |
| 8b | C ₁₆ H ₂₂ O ₆ | White solid | 0.58 | 25 | 199–201 | 311 |
| 9b | C ₁₄ H ₂₀ O ₄ | Light yellow oil | 3.87 | 6 | – | 253 |
| 10b | C ₁₅ H ₂₃ NO ₄ | White solid | 2.43 | 11 | 95–97 | 282 |
| 11b | C ₁₅ H ₂₃ NO ₄ | Colorless oil | 3.13 | 10 | – | 282 |
| 4c | C ₁₇ H ₂₅ NO ₄ | White solid | 3.12 | 15 | 47–49 | 308 |
| 5c | C ₁₇ H ₂₀ O ₄ | White solid | 3.48 | 24 | 122–124 | 289 |
| 6c | C ₁₇ H ₂₅ NO ₃ | Colorless oil | 3.59 | 46 | – | 292 |
| 7c | C ₁₆ H ₂₂ O ₅ | White solid | 1.11 | 13 | 79–81 | 295 |
| 8c | C ₁₅ H ₂₂ O ₃ | Light yellow oil | 4.28 | 8 | – | 251 |
| 9c | C ₁₅ H ₂₃ NO ₃ | Colorless oil | 2.29 | 45.3 | – | 266 |

Table 2 ^1H NMR and ^{13}C NMR data of target compounds. $^{\text{①}}\text{CDCl}_3$ as deuterated solvent; $^{\text{②}}\text{DMSO}-d_6$ as deuterated solvent

| Compd. | ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 or $\text{DMSO}-d_6$) δ | ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 or $\text{DMSO}-d_6$) δ |
|------------|--|--|
| 4a | $^{\text{①}}6.54$ (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.68–3.37 (m, 8H), 2.41 (dd, $J = 12.8, 6.7$ Hz, 1H), 2.04 (dd, $J = 12.5, 7.9$ Hz, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.79–1.66 (m, 1H), 0.82 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H). | 156.57, 156.43, 153.00, 149.12, 115.33, 111.61, 93.25, 66.89, 55.77, 55.72, 45.01, 44.29, 32.98, 28.89, 22.84, 22.61, 8.95. |
| 5a | $^{\text{①}}7.88$ (s, 1H), 6.98 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.63 (dd, $J = 3.5, 1.5$ Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.10 (qd, $J = 12.7, 7.2$ Hz, 2H), 1.73–1.61 (m, 1H), 1.41 (s, 3H), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.76 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). | 193.93, 180.83, 170.29, 170.12, 149.85, 147.73, 117.69, 112.63, 108.27, 87.26, 62.08, 56.60, 56.51, 30.31, 27.37, 23.73, 22.38, 22.29. |
| 6a | $^{\text{①}}6.53$ (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 3.36–3.29 (m, 2H), 2.40 (s, 1H), 2.07 (s, 1H), 1.95–1.89 (m, 2H), 1.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.85 (s, 3H), 1.80–1.67 (m, 1H), 0.82 (s, 3H), 0.80 (s, 3H). | 156.10, 155.97, 151.60, 148.93, 114.15, 110.50, 93.05, 55.66, 55.58, 46.19, 46.00, 32.50, 28.26, 25.39, 24.48, 22.47, 8.96. |
| 7a | $^{\text{②}}6.36$ (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.91 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.82 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.27–2.18 (m, 1H), 2.14–2.04 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 1.79 (tt, $J = 13.5, 6.7$ Hz, 1H), 0.87 (s, 3H), 0.85 (s, 3H). | 177.98, 170.01, 156.65, 156.47, 148.94, 114.82, 111.03, 93.43, 55.79, 55.73, 32.90, 28.84, 28.73, 28.66, 22.60, 8.94. |
| 8a | $^{\text{①}}7.26$ (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.24–2.20 (m, 1H), 2.05 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 1.94 (s, 3H), 1.81 (tq, $J = 13.5, 6.8$ Hz, 1H), 0.87 (s, 3H), 0.86 (s, 3H). | 168.95, 156.61, 156.43, 149.04, 114.69, 110.89, 93.23, 55.71, 55.68, 33.04, 28.72, 22.66, 20.63, 9.02. |
| 9a | $^{\text{①}}6.35$ (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 2.54 (dd, $J = 12.9, 6.7$ Hz, 1H), 2.16–2.08 (m, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.81 (dp, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 1H), 0.87 (s, 6H). | 156.48, 156.34, 154.27, 149.41, 115.50, 111.70, 93.11, 55.76, 55.70, 36.81, 36.37, 32.94, 28.88, 22.80, 22.56, 8.93. |
| 4b | $^{\text{①}}8.80$ (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 3.82 (s, 6H), 3.77–3.53 (m, 8H), 2.45 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.88 (dp, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 1H), 0.89 (s, 3H), 0.87 (s, 3H). | 168.22, 161.05, 157.36, 155.23, 110.98, 101.74, 86.65, 67.04, 55.51, 55.41, 31.50, 29.72, 28.30, 22.57. |
| 5b | $^{\text{①}}6.33$ (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.27 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.77–3.52 (m, 8H), 2.34 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.80 (dt, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 0.87 (s, 3H), 0.86 (s, 3H). | 159.12, 158.51, 153.46, 150.50, 115.36, 99.10, 96.36, 66.78, 66.64, 55.55, 55.38, 44.89, 44.16, 32.53, 28.77, 22.68. |
| 6b | $^{\text{①}}11.09$ (s, 1H), 7.56 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.52 (dd, $J = 3.5, 1.7$ Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.47 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.90 (dp, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H). | 183.43, 162.74, 160.13, 158.88, 152.82, 144.47, 116.73, 110.82, 109.14, 104.51, 85.82, 54.50, 54.43, 30.13, 27.15, 21.53. |
| 7b | $^{\text{①}}9.64$ (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 3.42 (s, 2H), 2.45 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.05–1.97 (m, 1H), 1.97–1.77 (m, 4H), 0.89 (s, 3H), 0.87 (s, 3H). | 168.35, 160.87, 157.27, 156.02, 110.30, 103.52, 86.52, 55.37, 31.51, 29.71, 28.27, 22.58, 14.13. |
| 8b | $^{\text{②}}13.82$ (s, 1H), 12.09 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.22 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.52 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.35 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.81 (dt, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 0.82 (s, 3H), 0.81 (s, 3H). | 203.81, 174.01, 163.74, 162.76, 161.67, 108.10, 104.58, 87.15, 55.92, 55.79, 30.57, 28.03, 27.51, 22.39. |
| 9b | $^{\text{①}}6.20$ (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.41 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.89 (dp, $J = 13.8, 6.8$ Hz, 1H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H). | 202.64, 157.64, 156.48, 155.83, 118.26, 113.48, 95.25, 62.84, 55.73, 32.55, 32.22, 28.90, 22.64. |
| 10b | $^{\text{①}}8.96$ (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.02 (s, 6H), 2.45 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.89 (dp, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 1H), 0.89 (s, 3H), 0.87 (s, 3H). | 169.67, 160.82, 157.03, 155.59, 110.57, 102.46, 86.52, 55.42, 55.38, 31.49, 29.71, 28.27, 22.55. |
| 11b | $^{\text{①}}6.31$ (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.29 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.11 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 2.35 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.81 (dp, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 0.87 (s, 3H), 0.86 (s, 3H). | 159.10, 158.44, 154.72, 150.85, 115.45, 99.24, 96.20, 55.55, 55.37, 36.77, 36.38, 32.50, 28.78, 22.64. |
| 4c | $^{\text{①}}6.96$ (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (m, $J = 12.4$ Hz, 6H), 3.61 (m, $J = 14.2$ Hz, 2H), 2.31 (dd, $J = 13.1, 7.1$ Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.79 (dp, $J = 13.5, 6.8$ Hz, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H). | 156.58, 153.04, 148.49, 127.76, 125.98, 119.67, 107.54, 66.82, 55.67, 44.97, 44.27, 39.73, 29.28, 22.60, 9.41. |
| 5c | $^{\text{①}}7.66$ (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.45 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.97–1.79 (m, 1H), 0.94 (s, 3H), 0.93 (s, 3H). | 182.70, 156.42, 155.66, 152.92, 147.11, 129.60, 123.92, 122.05, 120.51, 117.35, 112.13, 62.54, 39.10, 28.70, 22.53, 8.90. |
| 6c | $^{\text{①}}6.95$ (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.60 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.50 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.33 (s, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.96 (ddt, $J = 19.7, 13.3, 6.7$ Hz, 4H), 1.82 (m, 1H), 0.89 (s, 3H), 0.88 (s, 3H). | 156.54, 152.68, 148.75, 127.58, 126.28, 119.84, 107.32, 55.67, 46.45, 46.36, 39.74, 29.21, 25.93, 25.07, 22.61, 9.51. |
| 7c | $^{\text{②}}6.97$ (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.93 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.83 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.28 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.80 (dt, $J = 13.4, 6.8$ Hz, 1H), 0.88 (s, 3H), 0.87 (s, 3H). | 177.90, 170.12, 156.59, 148.32, 127.83, 125.55, 119.17, 107.85, 55.71, 39.55, 29.03, 28.86, 28.64, 22.51, 9.42. |
| 8c | $^{\text{①}}7.34$ (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.62 (s, 3H), 2.46 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.91 (dp, $J = 13.6, 6.9$ Hz, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.90 (s, 3H). | 200.04, 161.37, 157.51, 130.66, 129.27, 128.61, 125.12, 61.90, 60.45, 38.86, 30.45, 29.27, 22.57, 9.80. |
| 9c | $^{\text{①}}6.95$ (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 2.30 (d, $J = 21.5$ Hz, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.82 (dp, $J = 13.5, 6.8$ Hz, 1H), 0.90 (s, 3H). | 156.54, 154.31, 148.83, 127.60, 126.19, 119.75, 107.37, 55.67, 39.65, 36.82, 36.39, 29.27, 22.58, 9.40. |

其结构经 ESI-MS、 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 确认, 且全部为新化合物。所有目标化合物对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子 NO 的抑制作用均为首次报道, 初步研究结果显示, 18 个目标化合物在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下有一定的抗炎作用, 且细胞毒性较小, 安全性高。化合物 **9a**、**8b**、**7c** 和 **9c** 表现出较强的抗炎活性,

NO 抑制率 **7c** > **9c** > **8b** > **9a**, **7c** 和 **9c** 的 IC_{50} 分别为 $33.2 \pm 0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $35.8 \pm 0.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 虽低于先导化合物 LM49, 但与阳性对照药布洛芬相当。结果表明, 含异丁基苯甲酮类化合物有一定的抗炎作用, 且结构中含有酰胺基团时, 其活性明显升高, 酰胺基 > 丁酸基 > 杂环, 但是当苯环上取代基增多时, 位阻增

Table 3 The survival rate of target compounds ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Ibuprofen was positive reference compound; LM49 was a lead compound

| Compd. | Survival rate/% | Compd. | Survival rate/% |
|-----------|-----------------|------------|-----------------|
| 4a | 98.72 | 8b | 98.32 |
| 5a | 91.09 | 9b | 99.97 |
| 6a | 99.14 | 10b | 97.21 |
| 7a | 97.12 | 11b | 100.08 |
| 8a | 100.63 | 4c | 97.70 |
| 9a | 96.82 | 5c | 100.16 |
| 4b | 100.34 | 6c | 97.93 |
| 5b | 98.02 | 7c | 98.65 |
| 6b | 99.39 | 8c | 96.03 |
| 7b | 98.40 | 9c | 98.76 |
| Ibuprofen | 95.32 | LM49 | 19.92 |
| LPS | 78.44 | | |

Table 4 The inhibition rate of target compounds. Ibuprofen was a positive reference compound; LM49 was a lead compound; ^aAverage value by three independent experimental measurements; ^bMean \pm SD ($n=2$); N.D.: Not detection^[11]

| Compd. | Inhibition rate/% ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a | IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^b | Compd. | Inhibition rate/% ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a | IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^b |
|-----------|---|---|------------|---|---|
| 4a | 7.68 | N.D. ^c | 8b | 50.91 | 41.8 ± 0.3 |
| 5a | – | N.D. | 9b | 14.86 | N.D. |
| 6a | 10.35 | N.D. | 10b | 20.23 | N.D. |
| 7a | 4.92 | N.D. | 11b | 43.05 | N.D. |
| 8a | – | N.D. | 4c | 39.89 | N.D. |
| 9a | 50.09 | N.D. | 5c | 39.64 | N.D. |
| 4b | 14.83 | N.D. | 6c | 30.20 | N.D. |
| 5b | 15.98 | N.D. | 7c | 72.00 | 33.2 ± 0.6 |
| 6b | 20.42 | N.D. | 8c | 43.10 | N.D. |
| 7b | 27.83 | N.D. | 9c | 53.45 | 35.8 ± 0.7 |
| Ibuprofen | 54.08 | 37.6 ± 6.9 | | | |
| LM49 | N.D. | 8.6 ± 2.5 | | | |

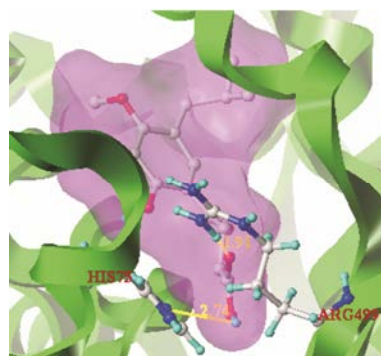
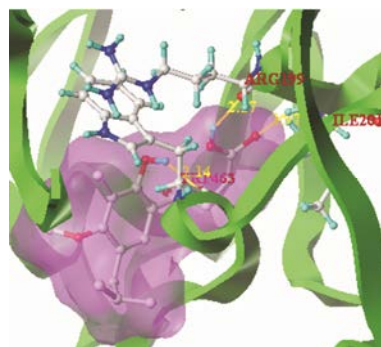
大, 活性下降, 此类化合物的构效关系为进一步寻找高活性抗炎化合物提供了依据。

实验部分

用 X-4 数字显示显微熔点仪测定熔点 (温度未校正); 核磁共振仪为 Bruker Av-400 型, TMS 为内标; 质谱仪为 API-QTRAP 3200 液相色谱质谱联用仪测定; 常压柱色谱用 200~300 目硅胶, 薄层色谱用 GF254 硅胶, 均为青岛海洋化工厂产品; 所用试剂均为分析纯。

1 化学合成

1.1 2-甲基-1-(2,4,6-三甲氧基-3-甲基-苯基)-丙酮 (2a) 的制备 取 2,4,6-三甲氧基甲苯 5 g 于 100 mL 量瓶中, 加入二氯甲烷 20 mL, 再加入无水 AlCl_3 (1.1 eq), 冰浴 10 min, 缓慢滴加异丁酰氯 (1.3 eq), 室温反应

**Figure 2** The docking surface of **7c** with COX-2 and hydrogen bonding with key amino acids**Figure 3** The docking surface of **7c** with iNOS and hydrogen bonding with key amino acids

6 h, TLC 检测反应完全, 加入适量冰水及 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 稀盐酸终止反应^[12, 13], 体系分层后用 20 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥过夜, 减压旋除溶剂, 柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯=16:1, V:V) 即得淡黄色油状液体 4.5 g, 收率: 65%。

化合物 **2b**、**2c** 按照此法合成。

1.2 2-异丁基-1,3,5-三甲氧基-4-甲基苯 (3a) 的制备 取一缩二乙二醇 30 mL 和 DMSO 15 mL 于 100 mL 圆底烧瓶中, 缓慢加热至 115°C , 蒸馏 0.5 h 除水, 完毕后再加入上步制得的化合物 **2a**, 待溶解后缓慢加入过量的 80% 水合肼, 120°C 下冷凝回流 2 h。完毕后调节油浴温度降至 70°C , 加入 NaOH 4.5 g, 待 NaOH 完全溶解后升温至 130°C 蒸馏除水, 然后去掉蒸馏装置, 改成回流装置, 加热至 165°C 反应 10 h, TLC 监测反应进程。待反应结束后, 冷却至室温, 加浓盐酸调节 pH 至酸性^[14, 15]。用石油醚萃取 3 次, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥过夜, 减压旋除溶剂, 柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯=60:1, V:V) 即得黄色油状液体, 收率 43%。

化合物 **3b**、**3c** 按照此法合成。

1.3 (2-羟基-3-异丁基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯基)-吗啉-4-甲酮 (4a) 的制备 取 300 mg 上步合成的 **3a** 于

50 mL 圆底烧瓶中, 加入二氯甲烷 15 mL, 搅拌使其溶解, 再缓慢加入无水 AlCl_3 (1.3 eq), 冰浴 10 min, 然后在冰浴条件下, 缓慢滴加吗啉甲酰氯 (1.3 eq), 缓慢升温至 45°C , 回流反应 24 h, TLC 监测反应进程, 反应结束后, 加入适量冰水及 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 稀盐酸终止反应, 体系分层后用 20 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机层, 无水硫酸钠干燥过夜, 减压旋除溶剂, 柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯=10:1, V:V) 即得白色固体 **4a**^[16], 产率约为 14%。

化合物 **5a**~**9a** 均按照此方法合成。

1.4 (2-羟基-3-异丁基-4,6-二甲氧基苯基)-吗啉-4-甲酮 (4b) 的制备 制备方法与 **4a** 类似, 改用 2,4,6-三甲氧基苯为原料, 二氯甲烷为溶剂, 纯化方法为柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯=8:1, V:V), 得到白色固体 **4b**, 产率约为 17%。

化合物 **6b**~**10b** 均按照此方法合成。

1.5 吗啉-4-羧酸-2-异丁基-3,5-二甲氧基苯基酯 (5b) 的制备 **5b** 是制备 **4b** 过程中柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯=8:1, V:V) 得到的副产物, 白色固体, 产率约为 9%。

1.6 N,N-二甲基氨基甲酸-2-异丁基-3,5-二甲氧基苯基酯 (11b) 的制备 **11b** 是制备 **10b** 过程中柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯=10:1, V:V) 得到的副产物, 无色油状液体, 产率约为 10%。

1.7 (2-羟基-5-异丁基-4-甲氧基-3-甲基-苯基)-吗啉-4-甲酮 (4c) 的制备 制备方法于 **4a** 类似, 改用 2,6-二甲氧基甲苯为原料, 二氯甲烷为溶剂, 纯化方法为柱色谱分离 (石油醚-乙酸乙酯=10:1, V:V), 得到白色固体 **4c**, 产率约为 15%。

化合物 **5c**~**9c** 均按照此方法合成。

2 细胞毒性的检测

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 5% CO_2 、 37°C 孵箱中培养 24 h, 然后分别加入样品 (终浓度为 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和脂多糖 (LPS) (终质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 24 h 后吸净细胞上清液后, 在各孔中加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基噻唑基四唑 (MTT) $10\text{ }\mu\text{L}$ 及无血清培养基 $100\text{ }\mu\text{L}$, 继续避光培养 4 h 后, 轻轻吸弃孔内液体, 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡使细胞内结晶充分溶解, 于酶标仪 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 A 值。通过以下公式计算出各组的生存率: 生存率 (%) = $A_{\text{样品组}}/A_{\text{空白组}}\times 100\%$ 。

3 抗炎作用初步研究

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 5% CO_2 、

37°C 孵箱中培养 24 h, 换成无血清培养基, 同时加入样品 (终浓度为 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 LPS (终质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 后, 再培养 24 h, 然后吸取细胞上清液 $50\text{ }\mu\text{L}$, 用 Griess 法测定上清液中 NO 含量, 按“抑制率 (%) = $(A_{\text{样品组}} - A_{\text{模型组}})/(A_{\text{空白组}} - A_{\text{模型组}})\times 100\%$ ”计算样品对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 NO 生成的抑制作用。

4 分子对接实验

分子对接所使用的蛋白质晶体结构来源: <http://www.rcsb.org/pdb/PDB> 数据库, 编号为 3LN1 (COX-2)、4CX7 (iNOS), 利用 Sybyl-X 2.0 软件中 Applications 模块下的 Dock-ligands 程序进行分子对接, 除特殊说明, 所选参数均为系统默认值。

References

- [1] Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014, 7: 25-34.
- [2] Xiang YF. Anti-inflammatory Activity Screening Essay of a New Derivant of Ibuprofen and Preliminary Mechanism Research (新型布洛芬衍生物的抗炎活性筛选及机制初步研究) [D]. Changsha: Central South University, 2014.
- [3] Lu WS, Guan HS, Xu SS, et al. Research progress on biological activity of marine bromophenols [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2010, 29: 56-63.
- [4] Zheng FL, Ban SR, Fei XE, et al. Synthesis of (furan-2-yl) (phenyl) methanones and their inhibitory effects on VSMC proliferation [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2011, 21: 256-261.
- [5] Pan MH, Lai CS, Wang YJ, et al. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72: 1293-1303.
- [6] Duan AX, Chen J, Liu HD, et al. Applications and developments of molecular docking method [J]. *J Anal Sci* (分析科学学报), 2009, 25: 473-477.
- [7] Cho H, Yun CW, Park WK, et al. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives [J]. *Pharmacol Res*, 2004, 49: 37-43.
- [8] Rainsford KD. Fifty years of ibuprofen: advancing pain and fever management [J]. *Int J Clin Pract*, 2013, 67 (S178): 1-2.
- [9] Song N, LI YX, Sun X, et al. Synthesis of (\pm) ibuprofen sugar derivatives [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2004, 39: 105-109.
- [10] Wang QA, Wu Z, Liu L, et al. Synthesis of citrus bioactive polymethoxyflavonoids and flavonoid glucosides [J]. *Chin J*

- Org Chem (有机化学), 2010, 30: 182–188.
- [11] Hu JP, Li YL, Shi HY, et al. Design, synthesis and evaluation of a novel BRD4 protein inhibitors [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1568–1577.
- [12] Ma XL, He YY, Lv ZG. Synthesis process of 1-(4-methyl phenyl)ethanol [J]. Sci Technol Chem Ind (化工科技), 2015, 23: 5–8.
- [13] Jang SJ, Ji HB, Wu J. Research on acylation of 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene with acetyl chloride [J]. J Xi'an Univ Technol (西安理工大学学报), 2011, 27: 97–101.
- [14] Han GD, Ma ZY. Huang-Minlon Reduction [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2009, 29: 1001–1017.
- [15] Guo ZX, Wang HF, Xin CW, et al. Synthesis of antifolate alimta [J]. Chin J of Org Chem (有机化学), 2006, 26: 546–550.
- [16] Zhang CG, Guo C. Regioselective demethylation catalyzed by $AlCl_3$ [J]. J Sichuan Norm Univ (Nat Sci) (四川师范大学学报 自然科学版), 2006, 29: 625–626.