

新型苯并噁唑酮衍生物W3D的含量测定及体内抗炎活性研究

杨红¹, 史新阳², 张玥², 罗捷然², 唐莉^{2*}, 李青山^{1*}

1. 山西中医药大学 基于炎症反应的重大疾病创新药物山西省重点实验室, 山西 晋中 030619

2. 山西医科大学 药学院, 山西 太原 030001

摘要: 目的 建立全新结构化合物4-(5'-二甲氨基)-萘磺酰氧基苯并噁唑酮(W3D)的含量测定方法, 并对其在体内抗炎活性评价。方法 采用Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以甲醇-水(75:25)为流动相, 体积流量1.0 mL·min⁻¹, 检测波长257 nm, 柱温28 °C, 测定W3D的峰面积, 建立其含量测定方法; 采用二甲苯致小鼠耳肿胀模型评价化合物W3D(25.000、12.500、6.250、3.125 mg·kg⁻¹)体内抗炎活性。结果 供试品主峰专属性良好, 在1~100 μg·mL⁻¹线性关系良好(R²=0.999 9), 精密度、重复性、稳定性的RSD分别为0.61%、0.19%、0.84%, 回收率为99.55%(RSD=0.81%); 与对照组比较, W3D各剂量组耳肿胀率均显著下降(P<0.05、0.01), 12.5 mg·kg⁻¹组抑制率可达53.88%, 优于阳性药塞来昔布。结论 建立的HPLC法简便、准确, 且专属性好, 可用于W3D的含量检测; W3D具有较好的体内抗炎活性, 作为新结构抗炎小分子化合物具有深入研究的价值。

关键词: 4-(5'-二甲氨基)-萘磺酰氧基苯并噁唑酮(W3D); 高效液相色谱(HPLC); 含量测定; 抗炎; 耳肿胀

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)06-1249-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.06.011

Determination of a novel benzoxazolone derivative W3D and evaluation its anti-inflammatory activity *in vivo*

YANG Hong¹, SHI Xinyang², ZHANG Yue², LUO Jieran², TANG Li², LI Qingshan¹

1. Shanxi University of Chinese medicine, Shanxi Key Laboratory of Innovative Drug for the Treatment of Serious Diseases Basing on the Chronic Inflammation, Jinzhong 030619, China

2. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: **Objective** To establish a method for determining the content of the novel compound 4-(5'-dimethylamino)-naphthalenesulfonyl-2(3H)-benzoxazolone (W3D), and to evaluate the anti-inflammatory activity *in vivo*. **Methods** HPLC method was performed on the Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of methanol-water (75 : 25) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 257 nm and the column temperature was 28 °C. Xylene-induced mouse ear swelling model was used to evaluate the anti-inflammatory activity of W3D (25.000, 12.500, 6.250, and 3.125 mg·kg⁻¹) *in vivo*. **Results** Under the above chromatographic conditions, the compound W3D could be completely separated. The linear range was 1—100 μg·mL⁻¹ (R² = 0.999 9). RSD of precision, repeatability and stability were 0.61%, 0.19% and 0.84% respectively, and the average recovery was 99.55% (RSD = 0.81%). Compared with control group, the ear swelling rate of each dose group of W3D significantly decreased (P < 0.05, 0.01), and the inhibition rate of the 12.5 mg·kg⁻¹ group reached 53.88%, which was better than the positive drug celecoxib. **Conclusion** The analytical method was simple, accurate and specific which could be used on the determination of the content of compound W3D. As a new compound with determinate anti-inflammatory activity *in vivo*, it was worth to carry out further research.

Key words: 4-(5'-dimethylamino)-naphthalenesulfonyl-2(3H)-benzoxazolone; HPLC; content determination; anti-inflammatory; ear edema

收稿日期: 2022-11-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81602976); 山西省应用基础研究项目(201901D211350)

第一作者: 杨红, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为化合物质量标准及其抗炎活性研究。E-mail: yanghong@163.com

*共同通信作者: 唐莉, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药物设计合成及其活性研究。E-mail: tangli70201@163.com

李青山, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物设计合成及其机制研究。E-mail: sxyqlqs@163.com

4-(5'-二甲氨基)-萘磺酰氧基苯并噁唑酮(W3D, 结构见图1)为课题组设计合成的具有较强体外抗炎活性的新结构化合物, 其对脂多糖(LPS)诱导的小鼠RAW264.7细胞NO释放的半数抑制浓度(IC₅₀)值为17.67 μmol·L⁻¹, 对白细胞介素(IL)-6释放的IC₅₀值为8.608 μmol·L⁻¹, 对IL-1β释放的IC₅₀值为20.07 μmol·L⁻¹, 与临床用药塞来昔布(对NO、IL-6、IL-1β释放的IC₅₀为17.89、36.04、17.94 μmol·L⁻¹)活性相当^[1]。本实验建立了化合物W3D含量的HPLC测定法, 并进一步评价其体内抗炎活性, 以评估其开发为新型抗炎药物的潜力。

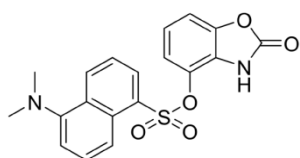


图1 W3D的结构
Fig. 1 Structure of W3D

1 材料

1.1 主要仪器

LC-2030 高效液相色谱仪(日本岛津公司); 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 400S 型超声波清洗机(深圳超洁科技实业有限公司); AR224CN 型电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司)。

1.2 药物及主要试剂

W3D 对照品(批号 20180412, 至少经过 3 次重结晶获得, 质量分数大于 99%)、W3D 供试品(批号 20190514、20200113、2020052)、中间体(4-羟基苯并噁唑酮, 批号 20190425, 质量分数 99%)均由山西医科大学药物化学教研室提供; 塞来昔布胶囊(辉瑞制药有限公司, 批号 J20140072); 甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司化工分公司); 乙腈(色谱纯, 天津市科密欧公司); 水为超纯水。

1.3 动物

ICR 小鼠 48 只, 体质量(20±2)g, 购自山西医科大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK(晋)2009-0001。实验过程符合动物伦理要求。

2 方法与结果

2.1 化合物 W3D 的含量测定

2.1.1 色谱条件 以 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱; 选择甲醇-水(75:25)为流动相; 设置体积流量为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 28 °C; 以 10 μL 为

进样量于 257 nm 波长下检测吸收峰。

2.1.2 溶液配制 W3D 对照品溶液: 精密称取 W3D 对照品适量, 甲醇溶解, 摇匀, 制成 0.5 mg·mL⁻¹ 对照品母液; 取母液 1 mL, 置 10 mL 量瓶, 甲醇定容, 摇匀, 即得^[2]。

W3D 供试品溶液: 精密称取 W3D 供试品 50 mg, 置 100 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀; 取该溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶, 甲醇定容, 摇匀, 即得^[3]。

中间体(4-羟基苯并噁唑酮)溶液: 精密称取 10 mg 中间体置 10 mL 量瓶, 甲醇定容, 摇匀, 即得。

2.1.3 线性关系试验 精密量取对照品母液适量, 用甲醇配制成 100.0、50.0、25.0、12.5、5.0、1.0 μg·mL⁻¹ 的系列 W3D 对照品溶液, 经 0.22 μm 有机滤膜滤过后进样检测, 以峰面积和对照品浓度进行线性回归, 得回归方程 $y=22\ 188x+9\ 091.5$ ($R^2=0.999\ 9$), 结果表明化合物 W3D 在 1~100 μg·mL⁻¹ 线性关系良好。

2.1.4 定量限、检测限考察 精密量取 W3D 对照品母液适量, 稀释至 0.01~0.50 μg·mL⁻¹, 经 0.22 μm 有机滤膜滤过后进样测定。结果显示当信噪比 (S/N) = 10 时, 定量限为 2 ng ($n=5$, $RSD=1.5%$); 当 $S/N=3$ 时, 检测限为 0.4 ng。

2.1.5 回收率试验 精密称取 W3D 供试品适量, 配制质量浓度为 40、50 和 60 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 经 0.22 μm 有机滤膜滤过后进样检测, 按外标法计算回收率。平均回收率为 99.55%, RSD 为 0.81%, 符合要求。

2.1.6 精密度试验 按“2.1.2”项下方法配制 W3D 对照品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样, 连续测定 6 次, 计算峰面积的 RSD 值^[4]。结果表明, 峰面积的 RSD 为 0.61% ($n=6$), 系统适用性良好。

2.1.7 稳定性试验 取 W3D 供试品溶液经 0.22 μm 有机滤膜滤过后, 在 0、2、4、8、12 h 分别进样测定^[5], 记录 W3D 峰面积并计算 RSD 值。结果显示在 12 h 内, W3D 峰面积的 RSD 为 0.84% ($n=5$), 说明化合物 W3D 供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.8 专属性试验 分别取 6 份 W3D 供试品母液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 于下述条件破坏: ①碱性条件: 加入 0.1 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液 1 mL, 60 °C 水浴 4 h 后加入 0.1 mmol·L⁻¹ HCl 溶液调至中性, 甲醇定容, 混匀; ②酸性条件: 加入 0.1 mmol·L⁻¹ HCl 溶液 1 mL, 60 °C 水浴 4 h 后, 加入 0.1 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液调至中性, 甲醇定容, 混匀; ③氧化条件:

加入30% H₂O₂溶液1 mL, 60 °C水浴4 h, 甲醇定容, 混匀; ④高温条件: 将供试品置于120 °C油浴中48 h, 甲醇定容, 混匀; ⑤光照条件: 将供试品置于4 500 lx强光下照射12 h, 甲醇定容, 混匀; ⑥W3D及中间体混合物: 取中间体溶液1 mL加入到含1 mL W3D供试品母液的量瓶中, 甲醇定容, 混匀^[6-7]。取上述溶液经0.22 μm有机滤膜滤过后, 进样检测, 见图2。结果表明在上述破坏条件下, W3D可与降解物分离, 专属性良好。

2.1.9 重复性试验 配制W3D供试品溶液6份, 经0.22 μm有机滤膜滤过后进样测定, 计算得化合物W3D平均质量分数为99.35%, RSD为0.19%, 重复性良好。

2.1.10 含量测定 分别精密称取3批W3D供试品, 配制成供试品溶液。另取1份W3D对照品, 同法配制成对照品溶液。上述溶液经0.22 μm有机滤膜滤过后, 分别进样测定, 按外标法以峰面积计算供试品质量分数。结果如表1所示, 3批供试品质量分数均>99.5%。

表1 供试品质量分数(n=3)

Table 1 Mass fraction of test sample (n=3)

批号	质量分数/%
20190514	99.6
20200113	99.5
20200522	99.6

2.2 W3D对二甲苯致小鼠耳肿胀的抑制活性

取ICR小鼠48只, 随机分为6组, 每组8只, 分别为对照组(给予生理盐水)、W3D(25.000、12.500、6.250、3.125 mg·kg⁻¹)组、阳性药塞来昔布(25 mg·kg⁻¹)

组。各组小鼠按上述剂量分别ig给药1 h后, 参照文献方法^[8]在小鼠右耳涂抹0.05 mL二甲苯, 左耳不作处理。30 min后将小鼠处死, 在小鼠左右耳同一部位用打孔器取下耳片, 称质量, 计算肿胀率及抑制率。

$$\text{肿胀率} = (\text{右耳质量} - \text{左耳质量}) / \text{左耳质量}$$

$$\text{抑制率} = (\text{对照组肿胀率} - \text{给药组肿胀率}) / \text{对照组肿胀率}$$

实验结果统计学分析均采用SPSS 19.0软件进行处理, 耳片质量与肿胀率以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验。

结果如表2所示, 与对照组比较, 各给药组耳肿胀率均显著下降($P < 0.01$), W3D可显著抑制小鼠耳肿胀而呈现出体内抗炎活性, 且当给药剂量为12.5 mg·kg⁻¹时抑制率可达53.88%, 优于阳性药物塞来昔布。

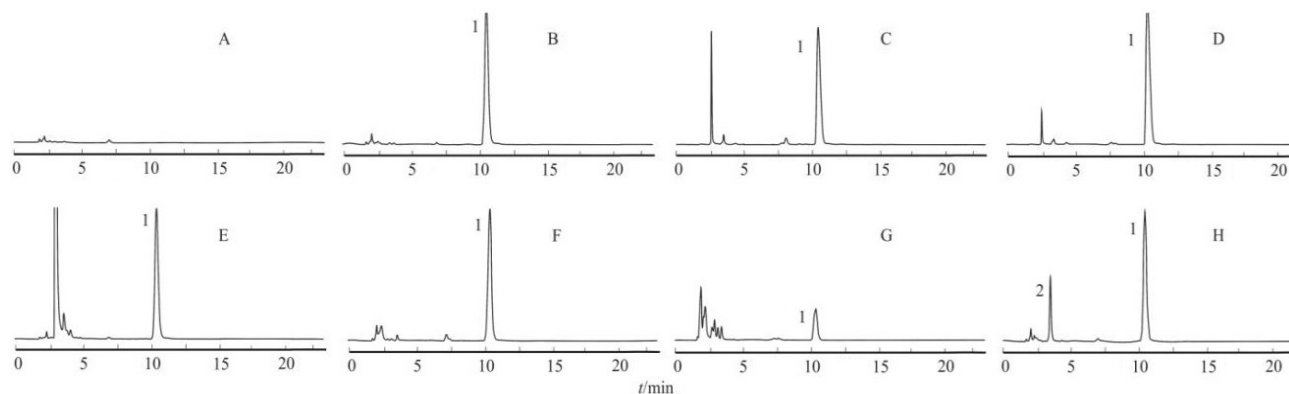
3 讨论

3.1 流动相的确定

对化合物W3D的溶解度研究结果显示, W3D微溶于甲醇、乙腈, 难溶于水; 此外前期溶出试验显示, 化合物W3D在pH 1.2及pH 4.5的溶出介质中易降解, 不宜加酸。因此本课题组在分别测试了甲醇与水为流动相、乙腈与水为流动相后, 选择系统筛选甲醇与水的比例来考察化合物W3D色谱行为的差异, 最终确定了流动相为甲醇-水(75:25)。

3.2 专属性试验

化合物W3D在强酸、强碱、高温、氧化及强光5种破坏条件下均可被降解, 且在上述液相条件下, 降解产物及中间体可与化合物主峰完全分离, 专属性良好。由于化合物结构中含有磺酰氧基、酯基,



A-甲醇; B-W3D对照品; C-碱破坏; D-酸破坏; E-氧化破坏; F-高温破坏; G-光破坏; H-W3D及中间体混合物; 1-W3D; 2-中间体
A-methanol; B-W3D reference substance; C-destroyed by alkali; D-destroyed by acid; E-destroyed by oxidation; F-destroyed by heat; G-destroyed by light; H-mixture of W3D and intermediate

图2 降解产物及中间体的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of degradation products and intermediate

表2 W3D对小鼠耳肿胀的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Effect of W3D on mouse ear edema ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	左耳/mg	右耳/mg	肿胀率/%	抑制率/%
对照	—	8.89±1.51	21.75±2.38	144.97±10.28	—
塞来昔布	25.000	10.63±1.30	21.13±1.25	100.56±18.14**	30.65±12.52
W3D	3.125	8.38±0.74	18.00±1.69	114.98±8.08**	20.69±5.58
	6.250	8.25±0.71	16.50±1.20	100.79±16.60**	30.48±11.46
	12.500	9.50±0.93	15.75±3.01	67.44±36.31**	53.88±24.83
	25.000	9.38±0.52	16.75±2.43	78.34±21.28**	45.97±14.68

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

其在强酸、强碱条件下易发生水解而断裂,因此对该化合物保存时需注意避免强酸强碱;在光照条件下W3D降解率为78.3%,提示化合物W3D应避光保存或通过制成制剂以改善其光稳定性。

3.3 含量测定方法比较

化合物W3D具有萘、含氮杂环、磺酰氧基等共轭基团,紫外吸收强,故可采用UV法测定其含量,结果显示在2.5~20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,化合物W3D线性良好。本实验采用HPLC法测定化合物的含量,其线性范围为1~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,相比UV法定量范围更宽。

3.4 体内抗炎作用

二甲苯致小鼠耳肿胀模型是经典的急性炎症模型,具有造模方法简便、致炎机制与临床常见急性炎症相似、复制成功率高且实验动物价格低廉等优点^[9],常用于新化合物的体内抗炎活性评价。因此,本研究采用该方法对化合物W3D进行了体内抗炎活性评价,结果显示,化合物W3D的耳肿胀抑制率明显优于阳性药塞来昔布。至此,本课题组已在体内外2个水平对化合物W3D进行了抗炎活性评价,其均表现出良好的抗炎活性,且较阳性药塞来昔布更优。

本实验建立了化合物W3D的含量测定方法,该方法简便、重复性好,且较UV法更精确,专属性更好。化合物W3D体内外抗炎活性较高,具有进一步开发为新型抗炎药物的潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 罗捷然, 赵蓓, 唐莉, 等. 化合物W3D通过调控TLR4-MyD88-NF- κ B通路抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子的释放[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(7): 977-982.

Luo J R, Zhao B, Tang L, et al. Inhibitory effect of compound W3D on LPS-induced release of inflammatory mediators of RAW264.7 cells through TLR4-MyD88-NF- κ B signaling pathway [J]. Chin Pharm Bull, 2018, 34(7): 977-982.

[2] 袁丽丽, 王海翔, 洪桑桑, 等. 高效液相色谱法测定辣椒中的辣椒碱类成分 [J]. 农产品加工, 2017(4): 45-47, 51.

Yuan L L, Wang H X, Hong S S, et al. Determination of capsaicinoids in chili peppers by HPLC [J]. Farm Prod Process, 2017(4): 45-47, 51.

[3] 樊启猛, 张旭, 陈丹, 等. RP-HPLC法同时测定7个产地天麻中5种成分 [J]. 中成药, 2017, 39(4): 782-786.

Fan Q M, Zhang X, Chen D, et al. Simultaneous determination of five constituents in *Gastrodiae Rhizoma* from seven growing areas by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(4): 782-786.

[4] 毕彤, 董海荣, 朱磊. HPLC法测定黄芩苷化学原料药中主成分的含量及有关物质 [J]. 承德医学院学报, 2019, 36(3): 192-195.

Bi T, Dong H R, Zhu L. Content determination of principal component and related substances in baicalin chemical raw material by HPLC [J]. J Chengde Med Coll, 2019, 36(3): 192-195.

[5] 毕嘉益, 芦红代, 程思谟, 等. HPLC法测定枸橼酸西地那非原料药的含量及有关物质 [J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(7): 527-530, 575.

Bi J Y, Lu H D, Cheng S M, et al. Detection of the contents of sildenafil citrate and related substances by HPLC [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2015, 32(7): 527-530, 575.

[6] 马冰洁, 侯朋艺, 曾颜, 等. HPLC测定双硫仑原料药中的有关物质并考察其稳定性 [J]. 华西药学杂志, 2015, 30(1): 94-96.

Ma B J, Hou P Y, Zeng Y, et al. Determination of the related substances in disulfiram by HPLC and investigation of the stability [J]. West China J Pharm Sci,

- 2015, 30(1): 94-96.
- [7] 阮文静, 柯尊军, 杨博, 等. HPLC法测定达克替尼含量及有关物质 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(7): 822-825.
Ruan W J, Ke Z J, Yang B, et al. Determination of dacomitinib and related substances by HPLC [J]. Chin J New Drugs, 2020, 29(7): 822-825.
- [8] 陈凯, 窦月, 孟凡刚, 等. 板蓝根抗炎作用有效部位初步筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 200-203.
Chen K, Dou Y, Meng F G, et al. Preliminary screening of anti-inflammatory fraction of *Isatidis Radix* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2012, 18(6): 200-203.
- [9] 谷捷, 李鑫, 余黄合, 等. 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(5): 32-35.
Gu J, Li X, Yu H H, et al. Establishment of acute inflammation mice models with ear edema induced by dimethylbenzene [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2016, 36(5): 32-35.

[责任编辑 兰新新]