

橐木单体的结构改造及抗炎活性研究

季宇彬¹, 邓迪^{1,2}, 王宝琪^{1,2}, 许旭东², 田瑜^{2*}, 尚海^{2*}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 中药(天然药物)创新药物研发北京市重点实验室 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室 天然药物、健康产品的研究与开发中关村开放实验室 中药干预糖脂代谢紊乱性疾病药效评价重点实验室, 北京 100193

摘要: 目的 对橐木 *Aralia elata* 中的单体成分金盏花苷 E 进行结构改造, 并对其结构改造后的类似物进行体外抗炎活性研究。方法 以天然易得的齐墩果酸为起始原料, 经苷元 28 位羧基保护、3 位糖苷化、28 位羧基脱保护、28 位羧基酰胺化、胺基侧链酰胺化、糖基苯甲酰基脱保护、甲叉基脱保护共 7 步反应制得目标化合物, 利用巨噬细胞 RAW264.7 模型评价化合物的抗炎活性。结果 设计并合成了 10 个金盏花苷 E 的结构类似物 G1~G5 和 H1~H5, 均经谱学技术确证结构。生物活性实验结果表明, 10 个化合物对 RAW264.7 细胞呈现不同程度的抗炎活性, 其中化合物 G1~G4、H1~H3 的抗炎活性优于先导物。结论 化合物 G1~G5 和 H1~H5 均为未见文献报道的新化合物, 具有潜在的抗炎活性, 值得深入研究。

关键词: 橐木; 金盏花苷 E; 结构改造; 抗炎活性; RAW264.7 细胞

中图分类号: R284.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)07-1525-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.007

Structural modification and anti-inflammatory biological evaluation of monomeric compounds from *Aralia elata*

Ji Yu-bin¹, Deng Di^{1,2}, Wang Bao-qi^{1,2}, Xu Xu-dong², Tian Yu², Shang Hai²

1. Center of Research and Development on Life Sciences and Environment Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Beijing Key Laboratory of Innovative Drug Discovery of Traditional Chinese Medicine (Natural Medicine) and Translational Medicine, Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Key Laboratory of Efficacy Evaluation of Chinese Medicine against Glycolipid Metabolic Disorders, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Zhong Guan Cun Open Laboratory of the Research and Development of Natural Medicine and Health Products, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective Based on structural modification of monomeric compound calendulose E from *Aralia elata*, to evaluate anti-inflammatory activity of the analogues. **Methods** Applying oleanolic acid as starting material, the target compounds were prepared by seven steps reactions and evaluated for anti-inflammatory effects by RAW264.7 cells *in vitro*. **Results** Ten analogues G1—G5 and H1—H5 were synthesized. The structures of the target compounds were identified by spectrum. Pharmacological results showed that all of the compounds had different levels potency of anti-inflammatory effects in cells. In particular, compounds G1—G4 and H1—H3 showed significant anti-inflammatory activity comparing with lead compounds. **Conclusion** The new compounds G1—G5 and H1—H5 which showed potential of anti-inflammatory biological activity, had not been reported in any literatures and deserved further research.

Key words: *Aralia elata* (Miq.) Seem.; calendulose E; structural modification; anti-inflammatory activity; RAW264.7 cells

收稿日期: 2018-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81302656); 北京市自然科学基金资助项目(7144225); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-012)

作者简介: 季宇彬(1956—), 男, 博士, 教授, 主要从事药理学研究。

*通信作者 田瑜(1983—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事天然产物结构改造、生物活性及靶标研究。E-mail: ytian@implad.ac.cn
尚海(1983—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药及天然药物的研究与开发。E-mail: hshang@implad.ac.cn

辽东槲木 *Aralia elata* (Miq.) Seem., 又名龙牙槲木, 为五加科 (Araliaceae) 槲木属 *Aralia* Linn. 多年生落叶灌木, 主要分布于中国的东北地区。作为中药材槲木以根皮和茎皮入药, 用于胃炎、肝炎、关节炎等症的治疗^[1]。槲木中含有多种化学活性成分, 其中皂苷类成分具有广泛的药理作用, 包括抗肿瘤、抗心律失常、抗骨质疏松等活性^[2-4]。本课题组前期对槲木 70% 乙醇提取物的化学成分进行了系统分析, 从利用索氏提取器得到的甲醇提取部位中分离得到了齐墩果烷型五环三萜皂苷类单体成分^[5]。目前国内外对齐墩果烷型皂苷的生物学活性研究主要集中于抗肿瘤、抗骨质疏松、抗心肌缺血和心肌保护活性等方面, 抗炎等活性研究报道较少^[6-11]。此外, 据报道血小板二磷酸腺苷 (ADP) 受体亚型 P2Y₁₂ 拮抗剂如替格瑞洛等多种抗血小板药物具有抗炎及保护血管内皮功能等生物活性^[12]。本课题组在此研究基础上, 选取槲木总皂苷乙醇提取物中量较高的金盏花苷 E (图 1) 为研究对象, 对其进行结构改造, 设计合成了一系列金盏花苷 E 拼合替格瑞洛活性片段的结构类似物 G1~G5 和 H1~H5, 均为未见文献报道的新化合物; 同时采用巨噬细胞 RAW264.7 模型, 首次对这些新化合物进行体外抗炎活性评价, 以期发现具有深入研究价值的抗炎活性化合物, 为中药新药的研发奠定基础。

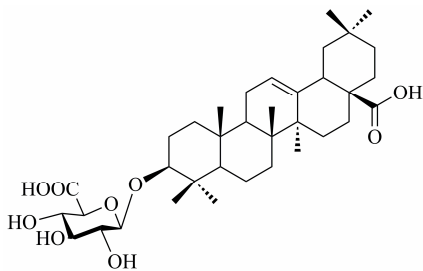


图 1 辽东槲木中的金盏花苷 E

Fig. 1 Calendulose E from *A. elata*

1 仪器与试剂

艾卡 (IKA®) C-MAG HS 7 型磁力搅拌器 [艾卡 (广州) 仪器设备有限公司]; 梅特勒-托利多 (METTLER TOLEDO AL104) 电子天平 [梅特勒-托利多 (北京) 精密仪器有限公司]; Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪 [布鲁克 (北京) 科技有限公司]; 赛默飞世尔 (ThermoFisher) LTQ-Orbitrap XL 液质联用仪 (赛默飞世尔科技有限公司); CO₂ 恒温培养箱 (日本 Sanoy 公司); IX51 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS 公司); KC junior 微孔板分光光

度计 (Biotek 公司)。

D-葡萄糖 (质量分数 99.5%)、D-半乳糖 (质量分数 99.5%)、D-木糖 (质量分数 98%)、L-阿拉伯糖 (质量分数 99.5%)、L-鼠李糖 (质量分数 99.5%) 均购自国药集团化学试剂有限公司; 齐墩果酸 (质量分数 >98%, 绵阳东方源生物科技有限公司); 溴苄 (BnBr)、1-羟基苯并三氮唑 (HOBT)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐 (EDCI)、AMBERLITE IR-120 (阳离子交换树脂) 以及各种胺等均购于 Energy Chemical 公司; N-硝基-L-精氨酸甲酯 (L-NAME)、脂多糖 (LPS)、N-1-萘基乙二胺盐酸盐购自 Sigma 公司; 磺胺、磷酸购自国药集团化学试剂有限公司; 常规试剂市售分析纯和化学纯, 柱色谱用硅胶及薄层色谱用硅胶 G、H、GF₂₅₄ (青岛海洋化工有限公司)。小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 购于美国 ATCC 公司。

2 方法与结果

2.1 目标化合物的设计

本实验设计的目标化合物是图 2 中的化合物 G1~G5 和 H1~H5, 通过对金盏花苷 E 的 28 位进行结构改造, 连接含有替格瑞洛的活性片段, 同时 3 位用不同的糖基体进行替换, 以考察结构改造对金盏花苷 E 活性的影响。其中, 化合物 G1~G5 为苷元 28 位羧基连接含有双羟基保护的替格瑞洛活性片段, 3 位葡萄糖醛酸基给体分别替换为葡萄糖基 (G1)、半乳糖基 (G2)、木糖基 (G3)、阿拉伯糖基 (G4)、鼠李糖基 (G5); 化合物 H1~H5 为苷元 28 位羧基连接双羟基的替格瑞洛活性片段, 3 位葡萄糖醛酸基给体分别替换为葡萄糖基 (H1)、半乳糖基 (H2)、木糖基 (H3)、阿拉伯糖基 (H4)、鼠李糖基 (H5)。

2.2 合成路线的设计

本实验对化合物的合成采用一条 7 步反应的路线, 见图 2。以齐墩果酸 (A) 为起始原料, 经苄基保护 (B)、Lewis 酸催化糖苷化 (C1~C5)、催化氢化脱苄基保护 (D1~D5)、酰胺化 (E1~E5)、胺基侧链酰胺化 (F1~F5)、糖基苯甲酰基脱保护 (G1~G5) 以及脱去甲叉基保护, 最终得到目标化合物 H1~H5。

2.3 合成方法

金盏花苷 E 类似物的合成反应路线见图 2。

2.3.1 糖基给体的合成 参考文献报道的合成方法^[13-14], 分别以葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、

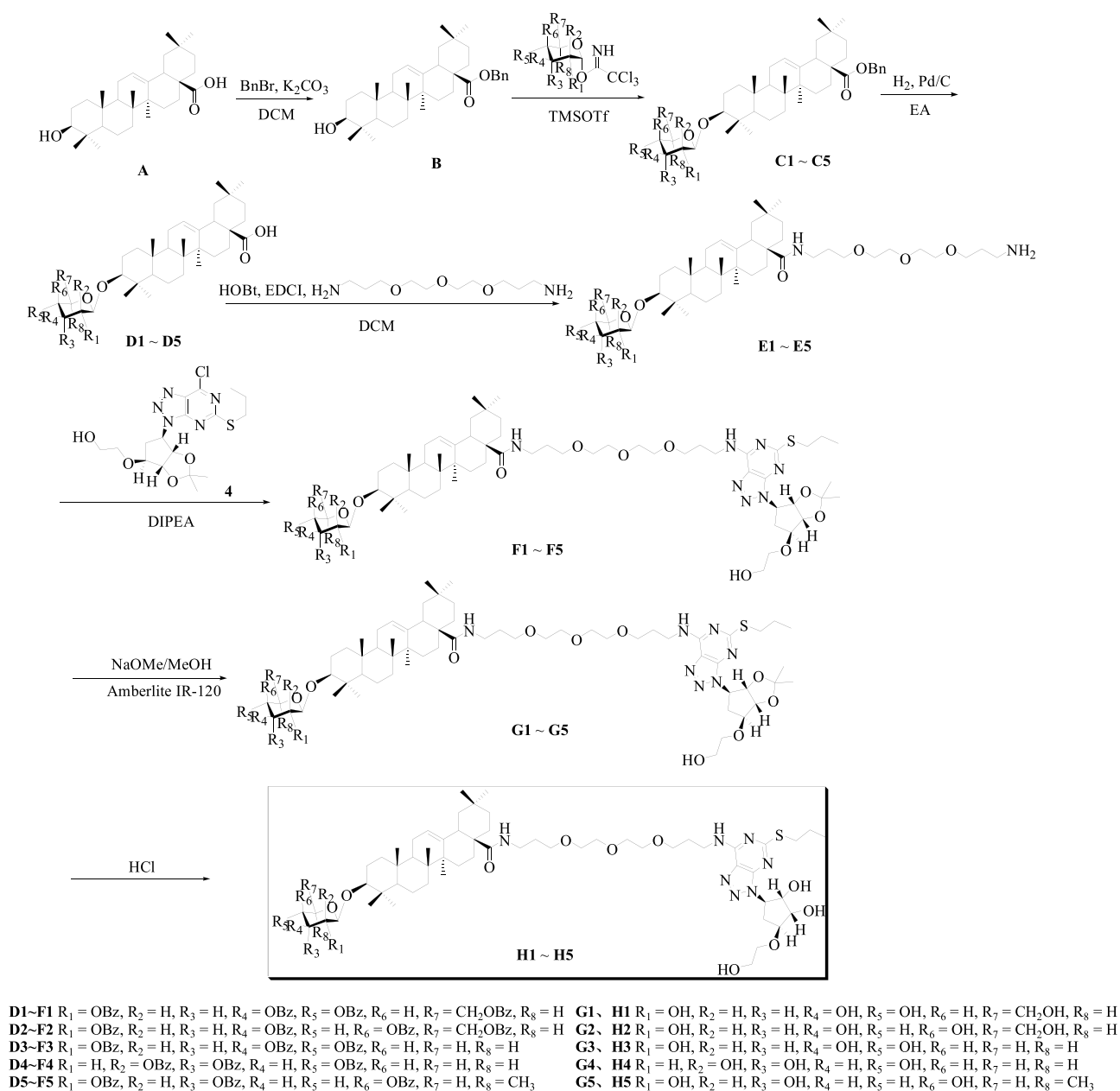


图 2 金盏花苷 E 类似物的合成路线

Fig. 2 Synthetic routes of calendulose E analogues

鼠李糖为原料, 采用经典的 Schmidt 法分别制备得到葡萄糖基三氯乙酰亚胺酯给体 (a, 收率 76%)、半乳糖基三氯乙酰亚胺酯给体 (b, 收率 73%)、木糖基三氯乙酰亚胺酯给体 (c, 收率 70%)、阿拉伯糖基三氯乙酰亚胺酯给体 (d, 收率 65%)、鼠李糖

基三氯乙酰亚胺酯给体 (e, 收率 68%)。

2.3.2 中间体 B 的合成 于 500 mL 圆底烧瓶中准确称取齐墩果酸 (10.0 g, 21.8 mmol), 加入 300 mL 二氯甲烷。依次加入四丁基溴化铵 (0.8 g, 2.5 mmol) 以及 50 mL 碳酸钾 (7.4 g, 53.6 mmol) 水溶液, 搅

拌均匀。冰浴下滴加溴苄 (3.2 mL, 26.8 mmol), 滴毕升温至室温, 过夜反应。反应结束后分液, 有机相依次用 0.1 mol/L 的稀盐酸、饱和碳酸氢钠水溶液、饱和氯化钠水溶液洗涤, 合并有机层, 无水硫酸镁干燥, 抽滤, 滤液浓缩, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (8:1) 洗脱, 分别得到白色固体 **B** (10.8 g, 收率 91%)。

2.3.3 中间体 C1~C5 的合成 分别于 100 mL 圆底烧瓶中准确称取中间体 **B** (3.3 g, 6.0 mmol) 和 **a** (5.8 g, 7.9 mmol), 或 **b** (5.8 g, 7.9 mmol), 或 **c** (4.8 g, 7.9 mmol), 或 **d** (4.8 g, 7.9 mmol), 或 **e** (5.0 g, 7.9 mmol) 加入 50 mL 无水二氯甲烷溶解, 加入 0.5 g 粉末状 0.4 nm 分子筛, 在氮气保护下室温搅拌反应 1 h, 随后加入催化量的 Lewis 酸 TMSOTf (60 μ L, 0.3 mol) 继续反应 2 h, 直至 TLC 监测反应结束, 展开剂为石油醚-醋酸乙酯 (8:1)。加入 1.0 mL 三乙胺淬灭反应。滤过除掉分子筛, 滤液浓缩, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (10:1) 洗脱分别得到白色固体 **C1~C5**。**C1**: 7.0 g (收率 79.5%, 下同); **C2**: 7.3 g (83.0%); **C3**: 6.4 g (82.1%); **C4**: 6.9 g (88.5%); **C5**: 6.7 g (83.8%)。

2.3.4 中间体 D1~D5 的合成 分别于 100 mL 圆底烧瓶中准确称取中间体 **C1** 或 **C2** (3.4 g, 3.0 mmol), 或 **C3** 或 **C4** (3.0 g, 3.0 mmol), 或 **C5** (3.0 g, 3.0 mmol) 加入 30 mL 醋酸乙酯溶解, 预通氮气 3 min 后, 加入 10% Pd/C 催化剂 1.5 mg, 随后开始通氢气, 外浴 80 $^{\circ}$ C 下缓慢升温至回流反应 3 h, 直至 TLC (展开剂为石油醚-醋酸乙酯 4:1) 监测反应结束。滤过除掉钯碳, 滤液浓缩, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 洗脱分别得到白色固体 **D1~D5**。**D1**: 2.6 g (83.3%); **D2**: 2.8 g (89.7%); **D3**: 2.4 g (88.2%); **D4**: 2.5 g (91.9%); **D5**: 2.3 g (84.6%)。

2.3.5 中间体 E1~E5 的合成 分别于 50 mL 圆底烧瓶中准确称取中间体 **D1** 或 **D2** (1.50 g, 1.45 mmol), 或 **D3** 或 **D4** (1.30 g, 1.45 mmol), 或 **D5** (1.33 g, 1.45 mmol) 加入 15 mL 无水二氯甲烷溶解, 随后加入 HOBT (0.2 g, 1.46 mmol) 和 EDCI (0.28 g, 1.46 mmol), 室温下搅拌反应 1 h 后, 于冰浴下滴加 4,7,10-三氧-1,13-十三烷二胺 (14.5 mmol) 室温下继续反应 4 h。TLC (展开剂为石油醚-醋酸乙酯 5:1) 监测反应完全后, 依次用稀盐酸、饱和和碳

酸氢钠水溶液、饱和氯化钠水溶液洗, 无水硫酸钠干燥过夜。抽滤, 减压蒸干, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (8:1) 洗脱分别得到白色固体 **E1~E5**。**E1**: 1.35 g (75.4%); **E2**: 1.27 g (71.0%); **E3**: 1.27 g (79.4%); **E4**: 1.19 g (74.4%); **E5**: 1.23 g (75.9%)。

2.3.6 中间体 3 的合成 在 250 mL 圆底烧瓶中准确称取酒石酸替格瑞洛 (5.0 g, 21.20 mmol), 4,6-二氯-5-氨基-2-丙硫基嘧啶 (9.3 g, 25.32 mmol) 和 1,4-二氧六环 150 mL, 搅拌 5 min; 加入三乙胺 (12.2 g, 10.59 mmol), 110 $^{\circ}$ C 加热回流搅拌反应 24 h。冷却至室温, TLC (展开剂为石油醚-醋酸乙酯, 3:1) 监测反应完全后, 用 1 mol/L 盐酸调至 pH 呈中性, 用饱和氯化钠溶液 (2 $\times$ 100 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸除溶剂, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (4:1) 洗脱得到白色粉末中间体 **3** (7.3 g, 56.9%)。

2.3.7 中间体 4 的合成 在 250 mL 圆底烧瓶中准确称取中间体 **3** (7.0 g, 16.70 mmol), 再加入乙酸 (5.6 mL, 100.20 mmol) 和醋酸乙酯 100 mL, 搅拌下继续滴加 20 mL 亚硝酸钠 (1.28 g, 18.37 mmol) 水溶液, 滴毕, 冰浴反应 8 h。TLC (展开剂为石油醚-醋酸乙酯 3:1) 监测反应完全后, 用饱和碳酸钾溶液调至 pH 值为 8, 有机层用饱和氯化钠溶液洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 蒸除溶剂, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 石油醚-醋酸乙酯 (4:1) 洗脱得到黄色油状物质中间体 **4** (5.9 g, 81.9%)^[15-16]。

2.3.8 中间体 F1~F5 的合成 分别于 50 mL 圆底烧瓶中准确称取中间体 **E1** 或 **E2** (1.00 g, 0.85 mmol), 或 **E3** 或 **E4** (0.94 g, 0.85 mmol), 或 **E5** (0.95 g, 0.85 mmol), 以及中间体 **4** (0.37 g, 0.85 mmol)。加入 100 mL 二氯甲烷搅拌并溶解; 缓慢滴加 *N,N*-二异丙基乙胺 (0.94 mmol), 滴毕, 于 10 $^{\circ}$ C 下反应 10 h。TLC (展开剂为二氯甲烷-甲醇 15:1) 监测反应完全后, 用 1 mol/L 盐酸调至 pH 中性, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 二氯甲烷-甲醇 (20:1) 洗脱得到白色粉末 **F1~F5**。**F1**: 0.57 g (43.5%); **F2**: 0.63 g (47.3%); **F3**: 0.72 g (56.7%); **F4**: 0.69 g (54.3%); **F5**: 0.61 g (47.7%)。

2.3.9 目标化合物 G1~G5 的合成 分别于 50 mL 圆底烧瓶中准确称取中间体 **F1** (540 mg, 0.33 mmol), 或 **F2** (540 g, 0.33 mmol), 或 **F3** (494 mg,

0.33 mmol), 或 **F4** (494 mg, 0.33 mmol), 或 **F5** (498 mg, 0.33 mmol), 溶于适量的干燥甲醇和二氯甲烷 (体积比为 3:1) 中, 加入 5.5 mL 甲醇钠甲醇 (1 mol/L) 溶液, 室温反应 6 h。TLC (展开剂为二氯甲烷-甲醇 8:1) 监测反应完全后, 再用阳离子交换树脂调节 pH 至中性, 抽滤蒸干。残余物通过硅胶柱色谱纯化, 二氯甲烷-甲醇 (10:1) 洗脱得到白色粉末 **G1**~**G5**。 **G1**: 260 mg (64.7%); **G2**: 328 mg (81.6%); **G3**: 306 mg (78.3%); **G4**: 281 mg (71.8%); **G5**: 267 mg (67.6%)。

2.3.10 目标化合物 H1~H5 的合成 分别于 50 mL 圆底烧瓶中准确称取中间体 **H1** (206 mg, 0.17 mmol), 或 **H2** (206 mg, 0.17 mmol), 或 **H3** (201 mg, 0.17 mmol), 或 **H4** (201 mg, 0.17 mmol), 或 **H5** (204 mg, 0.17 mmol), 加入 20 mL 甲醇溶解, 缓慢滴加盐酸 (1 mol/L), 室温下搅拌 2 h。TLC (展开剂为二氯甲烷-甲醇 10:1) 监测反应完全后, 除去甲醇, 醋酸乙酯-水萃取, 有机层用饱和碳酸钾溶液调至 pH 8, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 二氯甲烷-甲醇 (15:1) 洗脱得到白色粉末 **H1**~**H5**。 **H1**: 161 mg (80.9%); **H2**: 154 mg (77.4%); **H3**: 139 mg (71.6%); **H4**: 147 mg (75.8%); **H5**: 151 mg (76.6%)。

2.4 体外抗炎活性研究

取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 用刮刀刮下, 离心, 吹打细胞制成细胞悬液, 在血细胞计数板上进行细胞计数。用培养基将细胞悬液浓度调整至 2×10^6 个/mL, 将此细胞悬液按 100 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板。细胞贴壁 4 h 后, 加入 1 mg/mL 化合物, 孵育 2 h 后, 加入终浓度为 10 μ g/L 的 LPS100 μ L/孔, 对照孔加 100 μ L 培养基, 继续在孵箱中孵育 24 h。L-NAME (终质量浓度为 0.05 mg/mL) 作为阳性对照药物。取出细胞板, 取上清 100 μ L/孔置于酶标板中, 再加 Griess 试剂 (A 液为 0.5 g 磺胺用 5% 的磷酸溶液溶解并定容至 50 mL; B 液为称取 50 mg N-1-萘基乙二胺盐酸盐, 用三蒸水溶解并定容至 50 mL; A 液与 B 液分别装在棕色瓶中, 临用前二者等体积混合即 Griess 试剂) 100 μ L/孔等体积混合, 微型振荡器上振荡 1 min, 于酶标仪 540 nm 波长处测定各孔吸光度 (*A*) 值, 并通过测得的 *A* 值得到各化合物对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞抑制 NO 释放的浓度。

3 结果与讨论

3.1 目标化合物实验数据

化合物 **G1**: 白色粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 1 236.718 5 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 9.93 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.59~5.61 (1H, m, O-CH-), 5.39~5.44 (2H, m, N-CH-, H-12), 4.96 (2H, m, O-CH-, Glu-H-1'), 4.60~4.62 (1H, m, Glu-H-3'), 4.30~4.40 (1H, m, Glu-H-2'), 4.23~4.28 (2H, m, Glu-H-4', 5'), 4.02~4.07 (2H, m, Glu-H-6'), 3.30~4.00 (21H, m, $8 \times -CH_2-O-$, $2 \times -CH_2-N-$, -CH-O-), 3.38~3.41 (1H, dd, $J = 11.4$, 4.2 Hz, H-3), 3.21~3.24 (2H, m, S-CH₂-), 3.08~3.11 (1H, dd, $J = 13.2$, 4.8 Hz, H-18), 2.90~2.95 (2H, m, -CH₂-), 2.80~2.84 (2H, m, -CH₂-), 1.59 (3H, s, CH₃), 1.33 (6H, s, $2 \times CH_3$), 1.27 (3H, s, CH₃), 1.05 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 1.02 (3H, s, CH₃), 0.92~0.94 (9H, m, $3 \times CH_3$), 0.86 (3H, s, CH₃)。

化合物 **G2**: 白色粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 1 236.718 6 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 9.93 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.59~5.61 (1H, m, O-CH-), 5.40~5.44 (2H, m, N-CH-, H-12), 4.94~4.96 (1H, m, O-CH-), 4.88 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, Gal-H-1'), 4.60~4.61 (1H, m, Gal-H-3'), 4.46~4.51 (3H, m, Gal-H-2', 4', 5'), 4.19 (1H, dd, $J = 3.5$, 9.8 Hz, Gal-H-6'a), 4.15 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, Gal-H-6'b), 3.46~4.00 (21H, m, $8 \times -CH_2-O-$, $2 \times -CH_2-N-$, -CH-O-), 3.38~3.40 (1H, dd, $J = 12.0$, 4.2 Hz, H-3), 3.21~3.24 (2H, m, S-CH₂-), 3.08~3.11 (1H, dd, $J = 13.2$, 4.2 Hz, H-18), 2.89~2.95 (2H, m, -CH₂-), 2.80~2.84 (2H, m, -CH₂-), 1.59 (3H, s, CH₃), 1.33 (3H, s, CH₃), 1.31 (3H, s, CH₃), 1.28 (3H, s, CH₃), 1.05 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 0.99 (3H, s, CH₃), 0.92~0.94 (9H, m, $3 \times CH_3$), 0.88 (3H, s, CH₃)。

化合物 **G3**: 白色粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 1 206.707 5 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 9.93 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.59~5.61 (1H, m, O-CH-), 5.39~5.43 (2H, m, N-CH-, H-12), 4.94~4.96 (1H, m, O-CH-), 4.84~4.85 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Xyl-H-1'), 4.38~4.41 (1H, m, Xyl-H-3'), 4.23~4.26 (2H, m, Xyl-H-5'), 4.16~4.19 (1H, m, Xyl-H-2'), 4.01~4.07 (1H, m, Xyl-H-4'), 3.47~4.00 (21H, m, $8 \times -CH_2-O-$, $2 \times -CH_2-N-$,

-CH-O-), 3.35~3.37 (1H, dd, $J = 11.4, 4.8$ Hz, H-3), 3.21~3.23 (2H, m, S-CH₂-), 3.07~3.10 (1H, dd, $J = 13.2, 4.2$ Hz, H-18), 2.90~2.95 (2H, m, -CH₂-), 2.80~2.84 (2H, m, -CH₂-), 1.60 (3H, s, CH₃), 1.32~1.33 (6H, m, 2×CH₃), 1.27 (3H, s, CH₃), 1.05 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 1.01 (3H, s, CH₃), 0.93~0.94 (9H, m, 3×CH₃), 0.90 (3H, s, CH₃)。

化合物 **G4**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 1 206.707 6 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ : 9.93 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.60~5.61 (1H, m, O-CH-), 5.39~5.43 (2H, m, N-CH-, H-12), 4.94~4.96 (1H, m, O-CH-), 4.78 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, Ara-H-1'), 4.43~4.46 (1H, m, Ara-H-3'), 4.32~4.34 (2H, m, Ara-H-5'), 4.23~4.26 (1H, m, Ara-H-2'), 4.16~4.19 (1H, m, Ara-H-4'), 3.50~4.20 (21H, m, 8×-CH₂-O-, 2×-CH₂-N-, -CH-O-), 3.33~3.36 (1H, dd, $J = 11.4, 4.2$ Hz, H-3), 3.21~3.23 (2H, m, S-CH₂-), 3.08~3.11 (1H, dd, $J = 13.2, 3.0$ Hz, H-18), 2.89~2.94 (2H, m, -CH₂-), 2.80~2.84 (2H, m, -CH₂-), 1.60 (3H, s, CH₃), 1.33 (3H, s, CH₃), 1.29 (3H, s, CH₃), 1.26 (3H, s, CH₃), 1.05 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 0.98 (3H, s, CH₃), 0.93~0.95 (9H, m, 3×CH₃), 0.90 (3H, s, CH₃)。

化合物 **G5**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 1 220.723 1 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ : 9.93 (1H, m, -NH-), 7.40 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.59~5.61 (1H, m, O-CH-), 5.39~5.44 (2H, m, N-CH-, H-12), 4.59 (1H, m, Rha-H-1'), 4.48~4.50 (1H, m, Rha-H-3'), 4.31~4.35 (2H, m, Rha-H-2', 4'), 4.23~4.26 (1H, m, Rha-H-5'), 3.60~4.10 (21H, m, 8×-CH₂-O-, 2×-CH₂-N-, -CH-O-), 3.21~3.24 (2H, m, S-CH₂-), 3.14~3.17 (1H, m, H-3), 3.08~3.09 (1H, m, H-18), 2.89~2.95 (2H, m, -CH₂-), 2.79~2.84 (2H, m, -CH₂-), 1.67~1.68 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, CH₃), 1.59 (3H, s, CH₃), 1.33 (3H, s, CH₃), 1.25 (3H, s, CH₃), 1.06 (3H, t, $J = 7.8$ Hz, CH₂-CH₃), 0.92~0.94 (12H, m, 4×CH₃), 0.88 (3H, s, CH₃), 0.81 (3H, s, CH₃)。

化合物 **H1**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 1 196.686 6 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ : 9.85 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.80~5.84 (1H, m, O-CH-), 5.43~5.48 (2H, m, N-CH-, H-12), 4.95~4.96 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Glu-H-1'),

4.78~4.79 (1H, m, O-CH-), 4.59~4.61 (1H, m, Glu-H-3'), 4.40~4.45 (1H, m, Glu-H-2'), 4.24~4.30 (2H, m, Glu-H-4', 5'), 4.01~4.09 (2H, m, Glu-H-6'), 3.50~3.98 (21H, m, 8×-CH₂-O-, 2×-CH₂-N-, -CH-O-), 3.38~3.41 (1H, dd, $J = 11.4, 4.2$ Hz, H-3), 3.16~3.27 (2H, m, S-CH₂-), 3.08~3.11 (1H, dd, $J = 13.2, 4.2$ Hz, H-18), 2.95~3.00 (2H, m, -CH₂-), 2.67~2.72 (2H, m, -CH₂-), 1.32 (3H, s, CH₃), 1.28 (3H, s, CH₃), 1.00~1.04 (6H, m, 2×CH₃), 0.94 (3H, s, CH₃), 0.93 (3H, s, CH₃), 0.92 (3H, s, CH₃), 0.86 (3H, s, CH₃)。

化合物 **H2**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 1 196.686 9 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ : 9.86 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.79~5.83 (1H, m, O-CH-), 5.44~5.48 (2H, m, N-CH-, H-12), 4.88 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Gal-H-1'), 4.78~4.79 (1H, m, O-CH-), 4.61~4.62 (1H, s, Gal-H-3'), 4.45~4.52 (3H, m, Gal-H-2', 4', 5'), 4.19 (1H, dd, $J = 3.5, 9.8$ Hz, Gal-H-6'a), 4.15 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, Gal-H-6'b), 3.50~4.07 (21H, m, 8×-CH₂-O-, 2×-CH₂-N-, -CH-O-), 3.37~3.40 (1H, dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz, H-3), 3.16~3.26 (2H, m, S-CH₂-), 3.08~3.11 (1H, dd, $J = 13.2, 3.6$ Hz, H-18), 2.95~3.00 (2H, m, -CH₂-), 2.67~2.72 (2H, m, -CH₂-), 1.31 (3H, s, CH₃), 1.28 (3H, s, CH₃), 1.02 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 0.98 (3H, s, CH₃), 0.92~0.94 (9H, m, 3×CH₃), 0.88 (3H, s, CH₃)。

化合物 **H3**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 1 166.676 3 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ : 9.86 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.77~5.81 (1H, m, O-CH-), 5.43~5.46 (1H, s, N-CH-, H-12), 4.84~4.85 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, Xyl-H-1'), 4.75~4.79 (1H, m, O-CH-), 4.35~4.43 (2H, m, Xyl-H-5'), 4.22~4.27 (2H, m, Xyl-H-2', 3'), 4.16~4.20 (1H, m, Xyl-H-4'), 3.60~4.10 (21H, m, 8×-CH₂-O-, 2×-CH₂-N-, -CH-O-), 3.34~3.37 (1H, dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz, H-3), 3.17~3.27 (2H, m, S-CH₂-), 3.07~3.10 (1H, dd, $J = 13.2, 3.6$ Hz, H-18), 2.95~3.00 (2H, m, -CH₂-), 2.68~2.72 (2H, m, -CH₂-), 1.31 (3H, s, CH₃), 1.27 (3H, s, CH₃), 1.01~1.03 (6H, m, 2×CH₃), 0.92~0.94 (9H, s, 3×CH₃), 0.89 (3H, m, CH₃)。

化合物 **H4**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 1 166.676 3

$[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 9.86 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.79~5.83 (1H, m, O-CH-), 5.42~5.50 (2H, m, N-CH-, H-12), 5.76~5.81 (2H, m, O-CH-, Ara-H-1'), 4.45~4.50 (1H, m, Ara-H-3'), 4.38~4.43 (2H, m, Ara-H-5'), 4.18~4.22 (1H, m, Ara-H-2'), 3.47~4.06 (22H, Ara-H-4', $8\times-CH_2-O-$, $2\times-CH_2-N-$, -CH-O-), 3.33~3.35 (1H, dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz, H-3), 3.15~3.27 (2H, m, S-CH₂-), 3.07~3.10 (1H, dd, $J = 13.2, 3.0$ Hz, H-18), 2.95~3.00 (2H, m, -CH₂-), 2.67~2.71 (2H, m, -CH₂-), 1.28 (3H, s, CH₃), 1.26 (3H, s, CH₃), 1.02 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 0.96 (3H, s, CH₃), 0.92~0.94 (9H, m, $3\times CH_3$), 0.89 (3H, s, CH₃)。

化合物 **H5**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 1 180.694 0 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 9.86 (1H, m, -NH-), 7.41 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, -NH-CO-), 5.80~5.87 (1H, m, O-CH-), 5.42~5.51 (2H, m, N-CH-, H-12), 4.63 (1H, s, Rha-H-1'), 4.49~4.51 (1H, m, Rha-H-3'), 4.37~4.41 (2H, m, Rha-H-2', 4'), 4.33~4.34 (1H, m, Rha-H-5'), 3.60~4.10 (21H, m, $8\times-CH_2-O-$, $2\times-CH_2-N-$, -CH-O-), 3.18~3.25 (2H, m, S-CH₂-), 3.13~3.15 (1H, m, H-3), 3.07~3.09 (1H, m, H-18), 2.96~2.98 (2H, m, -CH₂-), 2.62~2.71 (2H, m, -CH₂-), 1.66~1.67 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH₃), 1.24 (3H, s, CH₃), 1.03 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 0.93~0.94 (6H, m, $2\times CH_3$), 0.92 (3H, s, CH₃), 0.90 (3H, s, CH₃), 0.87 (3H, s, CH₃), 0.80 (3H, s, CH₃)。

3.2 细胞学实验结果

以金盏花苷 E (质量浓度 1 mg/mL) 和 *L*-NAME (质量浓度 0.05 mg/mL) 为阳性对照, 在 1 mg/mL 质量浓度下, 通过细胞学实验考察了结构类似物 **G1~G5** 和 **H1~H5** 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞产生 NO 的抑制活性。结果见表 1。

3.3 构效关系总结

生物活性实验结果表明, 10 个结构类似物在 1 mg/mL 质量浓度下均呈现出不同程度抑制 NO 产生的抗炎活性, 其中化合物 **G1~G4**、**H1~H3** 的活性优于先导化合物金盏花苷 E。初步的构效关系研究表明: 1) 先导化合物金盏花苷 E 发挥抗炎作用, 而苷元部分的 28 位羧基成酰胺后, 得到的类似物均有不同程度的抗炎作用, 提示羧基结构并非为抗炎活性的必需基团; 2) 当金盏花苷 E 糖基部分的葡萄糖醛酸基替换为葡萄糖基、半乳糖基、木糖基、

表 1 榉木单体金盏花苷 E 类似物的抗炎活性结果

Table 1 Anti-inflammatory activity screening results of calenduloside E analogues from *A. elata*

组别	NO 浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	1.80
模型	12.10 ^{###}
<i>L</i> -NAME	1.90 $\pm$ 0.21 ^{**}
金盏花苷 E	3.80 $\pm$ 0.05 [*]
G1	2.10 $\pm$ 0.35 [*]
G2	1.80 $\pm$ 0.09 [*]
G3	2.90 $\pm$ 0.20
G4	3.20 $\pm$ 0.03 [*]
G5	8.70 $\pm$ 0.17
H1	1.80 $\pm$ 0.04 [*]
H2	1.70 $\pm$ 0.11 ^{**}
H3	3.00 $\pm$ 0.15
H4	4.70 $\pm$ 0.57
H5	5.50 $\pm$ 0.18

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

阿拉伯糖基后, 对抗炎活性影响较大, 提示该先导物糖基部分对活性产生较大的影响。所半合成的目标化合物均为未见文献报道的化合物, 为深入开展先导物金盏花苷 E 的抗炎活性研究奠定基础, 具有深入研究的价值。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [2] 孙桂波, 李 锐, 周丽玲, 等. 龙牙榉木化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 中国新药与临床药理, 2003, 14(2): 139-141.
- [3] 孙桂波, 徐惠波, 温富春, 等. 龙牙榉木总皂苷对缺氧再给氧心肌细胞损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(9): 1092-1094.
- [4] Kochetkoy H K. Chemical constituent of *Aralia elata* [J]. *Dokl Akad Nauk*, 1963, 50(6): 1289.
- [5] 张家鑫, 田 瑜, 钟晓明, 等. 辽东榉木三萜皂苷类化学成分的研究 [J]. 中国药房, 2013, 24(15): 1380-1382.
- [6] 孙桂波, 徐惠波, 温富春, 等. 去葡萄糖竹节参皂苷 IVa 对心肌电生理特性的影响 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(11): 1407-1408.
- [7] 孙桂波, 徐惠波, 温富春, 等. 去葡萄糖竹节参皂苷 IVa 抗实验性心律失常作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 20(5): 377-380.
- [8] 崔现军, 李 明, 鲁卫星. 龙牙榉木总皂苷对大鼠心肌

- 缺血再灌注 CD40L 表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(5): 323-326.
- [9] Xi S G, Zhou G H, Zhang X X, *et al.* Protective effect of total aralosides of *Aralia elata* (Miq) seem (TASAES) against diabetic cardiomyopathy in rats during the early stage, and possible mechanisms [J]. *Exp Mol Med*, 2009, 41(8): 538-547.
- [10] Liu Y, Liu J F, Liu Z H, *et al.* The antitumor effects of araloside A extracted from the root bark of *Aralia elata* on human kidney cancer cell lines [J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2011, 5(4): 462-467.
- [11] 任 丽, 路宝庭, 刘 洋. 一种天然三萜皂苷的化学合成和抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21(4): 280-285
- [12] Schrottmaier W C, Kral J B, Badrnya S, *et al.* Aspirin and P2Y₁₂ inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes [J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114(3): 478-489
- [13] Schmidt R R, Michael J. Facile synthesis of α - and β -O-glycosyl imidates; Preparation of glycosides and disaccharides [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1980, 19(9): 731-732
- [14] 郑利刚, 刘 洋, 刘永祥, 等. 单糖活性给体合成方法的改进 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(5): 352-354.
- [15] Tu W, Fan J, Zhang H T, *et al.* Synthesis and biological evaluation of cyclopentyl-triazolol-pyrimidine (CPTP) based P2Y₁₂ antagonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(1): 141-146.
- [16] 李小东, 廖祥伟, 蒲道俊, 等. 替格瑞洛的合成工艺改进 [J]. 合成化学, 2016, 24(11): 994-997.