

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2021.01.006

查尔酮类衍生物的合成及其抑制酪氨酸酶活性评价

姜松周, 吕金鹏, 付莹, 杨莹, 许煌, 宋国强

(常州大学药学院, 江苏常州 213164)

摘要:以醛和酮为起始原料, 合成了一系列查尔酮类衍生物(查尔酮、4-羟基查尔酮、异甘草素、甘草素), 其结构经 NMR 表征。以这 4 种化合物为研究对象, *L*-酪氨酸为底物, 蘑菇酪氨酸酶为催化剂, 建立一个酪氨酸酶抑制剂的高通量筛选模型, 经条件优化, 最终选择 *L*-酪氨酸的浓度为 2.5 mmol/L, 蘑菇酪氨酸酶的活性为 2 000 U/mL, 反应时间为 20 min。通过此模型对蘑菇酪氨酸酶的活性进行测定, 来评价这 4 种化合物对酪氨酸酶活性的直接抑制作用, 并筛选出了抑制率最高的化合物为异甘草素, 从而为将来酪氨酸酶抑制剂的开发提供指导。

关键词:羟醛缩合; 查尔酮; 高通量筛选模型; 蘑菇酪氨酸酶; 抑制剂

中图分类号: R 914

文献标志码: A

文章编号: 2095-0411(2021)01-0035-06

Synthesis of Chalcone Derivatives and Evaluation of Their Inhibition of Tyrosinase Activity

JIANG Songzhou, LYU Jinpeng, FU Ying, YANG Ying, XU Huang, SONG Guoqiang

(School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: A series of chalcone derivatives (chalcone, 4-hydroxychalcone, isoliquiritigenin, glycyrrhizin) were synthesized using aldehydes and ketones as starting materials, and their structures were characterized by NMR. Using these four compounds as research objects, *L*-tyrosine as a substrate, and mushroom tyrosinase as a catalyst, a high-throughput screening model of tyrosinase inhibitors was established. After the optimization of conditions, the concentration of *L*-tyrosine was 2.5 mmol/L, the concentration of mushroom tyrosinase activity was 2 000 U/mL, and the reaction time was 20 min. Through this model, the activity of mushroom tyrosinase was measured to evaluate the direct inhibition of tyrosinase activity by these four compounds, and the compound with the highest inhibition rate was screened for isoliquiritigenin to provide guidance for the development of tyrosi-

收稿日期: 2020-08-04。

作者简介: 姜松周(1996—), 男, 山东烟台人, 硕士生。通信联系人: 宋国强(1969—), E-mail: sgq@cczu.edu.cn

引用本文: 姜松周, 吕金鹏, 付莹, 等. 查尔酮类衍生物的合成及其抑制酪氨酸酶活性评价[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2021, 33(1): 35-40.

nase inhibitors in future.

Key words: aldol condensation; chalcone; high throughput screening model; mushroom tyrosinase; inhibitor

黄酮类化合物在自然界中广泛存在,是许多中草药的有效成分,它的毒副作用小、药效作用广。异甘草素(2',4',4-三羟基查尔酮,Isoliquiritigenin)是甘草根中的一种黄酮类成分,也是一个重要的查尔酮衍生物,具有较强的抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抗血管生成、催眠等生物活性^[1-5],其中抗肿瘤作用是近年来研究的热点。

天然的查尔酮在植物中含量低,提取分离工艺复杂,生产成本低,不能满足市场需求。因此,建立简便合成查尔酮及其衍生物的方法,对其在医药领域的研究与开发具有重要意义。目前,查尔酮类衍生物的合成通常是采用碱催化下的 Claisen-Schmidt 缩合反应^[6],但一般条件下,多羟基醛酮中的酚羟基易被氧化,使反应产率降低^[7]。为降低羟基的氧化,研究者们报道了羟基保护及酸催化等方法^[8]。虽然酸性催化剂反应可一步完成,但是收率低,副产物多,难以分离。因此采用羟基保护的方法,并对化合物合成的反应条件进行了优化,以较高产率一步得到衍生物。

酪氨酸酶又称酚氧化酶、多酚氧化酶、儿茶酚氧化酶,是一种广泛存在于微生物、动植物以及人体中的结构复杂、多亚基的含铜金属氧化酶^[9-11]。酪氨酸酶是生物体内黑色素合成的关键酶^[12],既能够催化 *L*-酪氨酸羟基化形成 *L*-多巴,然后又把 *L*-多巴氧化形成多巴醌,多巴醌类物质最终经过一系列的反应转化为黑色素^[13-14],但其在体内异常过量表达,则会引起人体的许多色素沉着性皮肤病,如黑斑、雀斑、黄褐斑等^[15]。

目前,酪氨酸酶抑制剂在药物治疗和化妆品中越来越重要^[16],如熊果苷、曲酸、氢醌、维生素 C 衍生物等,通过抑制酶促氧化来预防色素过度沉着^[17]。很多天然存在的酪氨酸酶抑制剂受到许多限制,如低活性、高毒性和不足的渗透能力。

查尔酮作为一种广泛存在于高等植物中的化合物,其包含两个带有不饱和链的芳环,许多生物活动都源于这一结构^[18]。相关文献报道,查尔酮类衍生物是一类有效的酪氨酸酶抑制剂,但其抑制酪氨酸酶活性方面还有待进一步研究。

为了发现活性更高的酪氨酸酶抑制剂,选取苯甲醛衍生物与苯乙酮衍生物反应,制备了一系列查尔酮衍生物^[19],然后建立蘑菇酪氨酸酶直接测试模型,筛选出对酪氨酸酶抑制率最高的化合物,为将来酪氨酸酶抑制剂的开发提供指导。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

AVANCEIII 400M 型核磁共振仪,德国 Bruker 公司;高效液相色谱仪 1260,美国 Agilent 公司;Infinite M1000 型多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司;SK-L330-Pro 型摇床,北京大龙公司。

薄层色谱所用硅胶 GF254,青岛海洋化工有限公司;柱色谱所用硅胶,青岛海浪硅胶干燥剂厂,规格为 0.075~0.149 mm;蘑菇酪氨酸酶,阿拉丁化学试剂有限公司;*L*-酪氨酸,BioFroxx;所有化学试剂均为分析纯。

1.2 化学合成

1.2.1 查尔酮的合成

将 1.21 g (10 mmol) 苯乙酮和 2.12 g (20 mmol) 苯甲醛溶于 50 mL 乙醇中,慢慢加入 0.5 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 80 °C 回流搅拌反应。12 h 后停止反应,浓缩,然后将反应液倒入碎冰中,0 °C 放置过夜,析出沉淀,水洗,干燥,乙醇重结晶得到淡黄色固体查尔酮 1.82 g, 收率 87.5%; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.45 ~ 7.50 (m, 3H), 7.58 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.66 ~ 7.77 (m, 2H), 7.89 ~ 7.97 (m, 3H), 8.16 (t, J = 4.2 Hz, 2H)。合成路线如图 1 所示。

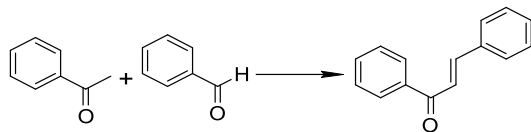


图1 查尔酮的合成路线

Fig.1 Synthetic route of chalcone

1.2.2 4-羟基查尔酮的合成

对羟基苯甲醛的酚羟基保护:将 1.22 g (10 mmol) 对羟基苯甲醛和 0.1 g 吡啶对甲苯磺酸盐 (PPTs) 溶于 50 mL 二氯甲烷中,慢慢加入 1.68 g (20 mmol) 3,4-二氢-2-吡喃,室温搅拌反应。12 h 后停止反应,加入 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液 (2 × 20 mL) 洗涤,然后用乙酸乙酯 (3 × 10 mL) 萃取,合并有机相,无水 Na_2SO_4 干燥,旋蒸脱溶,得到 1.57 g 对羟基保护后的苯甲醛 (1), 收率 76.2%。

1.40 g (6.8 mmol) 1 和 0.41 g (3.4 mmol) 苯乙酮溶于 50 mL 乙醇,慢慢加入 0.5 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 80 °C 回流搅拌反应。12 h 后停止反应,浓缩脱溶,少许二氯甲烷溶解,滴加稀盐酸至微酸性,然后用二氯甲烷萃取,浓缩干燥,羟醛缩合得到 0.94 g 4-(四氢-2H-吡喃)氧基查尔酮 (2), 收率 89.5%。将 0.94 g (3.1 mmol) 产物 2 溶于 50 mL 乙醇中,加入 0.1 g PPTs,室温搅拌,脱去保护,冷冻,过滤,乙醇重结晶后得到黄色晶体 4-羟基查尔酮 0.64 g, 收率 92.8%; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.84 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.58 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.63 ~ 7.67 (m, 1H), 7.70 ~ 7.75 (m, 4H), 8.11 (t, J = 4.2 Hz, 2H), 10.11 (s, 1H)。合成路线如图 2 所示。

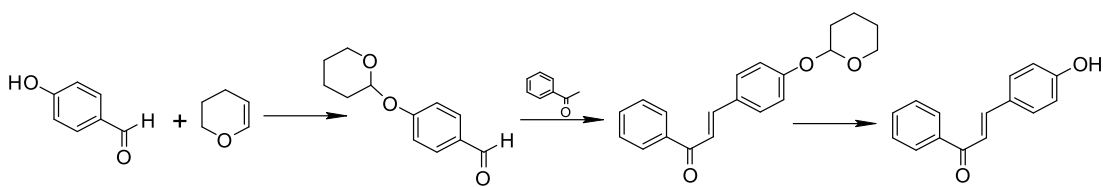


图2 4-羟基查尔酮的合成路线

Fig.2 Synthetic route of 4-hydroxychalcone

1.2.3 异甘草素的合成

按照上述 1.2.2 酚羟基保护的方法,取 0.79 g (3.4 mmol) 4-羟基保护后的 2,4-二羟基苯乙酮 (3) 和 1.36 g (6.6 mmol) 的 1, 经羟醛缩合反应得到 1.32 g 产物 4, 收率 94.3%, 脱保护后得到 0.71 g 黄色针状固体异甘草素, 收率 89.9%; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.32 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.44 (dd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 2.4 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 6.4 Hz, 4H), 8.19 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 10.20 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 10.69 (s, 1H), 13.65 (s, 1H)。合成路线如图 3 所示。

1.2.4 甘草素的合成

按照上述 1.2.2, 1.2.3 的方法,得到产物 4, 取 1.23 g (2.9 mmol) 产物 4, 将其溶于 10 mL 乙醇溶液中, 再加入 10 mL 硫酸溶液 (20%), 80 °C 回流 7 h, 然后蒸发浓缩, 加水并用碳酸氢钠溶液中和, 用乙酸

乙酯萃取,合并有机相,无水 Na_2SO_4 干燥,旋蒸脱溶,残余物经柱层析(洗脱剂: $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚})=1:2$)分离得到淡黄色晶体甘草素 0.61 g,收率 82.4%; $^1\text{H NMR}(400\text{ MHz},\text{DMSO}-d_6)$ δ :2.62 (dd, $J_1=16.6\text{ Hz},J_2=3.0\text{ Hz},1\text{H}$),3.11(dd, $J_1=16.8\text{ Hz},1\text{H}$),5.43(dd, $J_1=12.8\text{ Hz},J_2=2.8\text{ Hz},1\text{H}$),6.34(d, $J=2.0\text{ Hz},1\text{H}$),6.51(dd, $J_1=8.8\text{ Hz},J_2=2.0\text{ Hz},1\text{H}$),6.79(d, $J=8.8\text{ Hz},2\text{H}$),7.32 (d, $J=8.4\text{ Hz},2\text{H}$),7.65(d, $J=8.4\text{ Hz},1\text{H}$)。合成路线如图 4 所示。

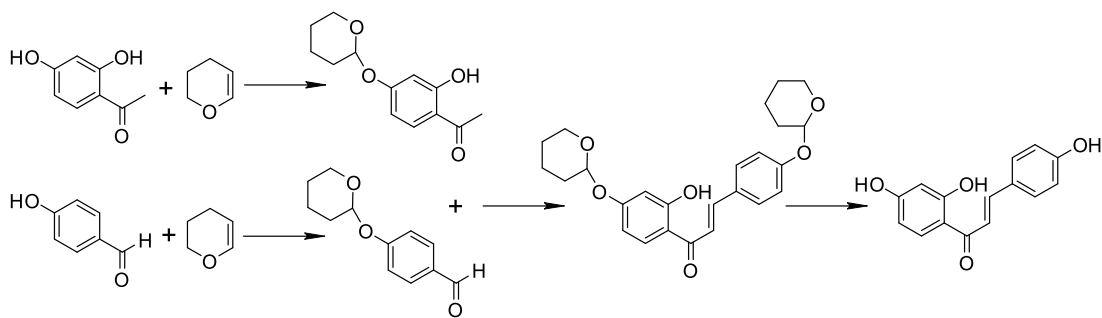


图 3 异甘草素的合成路线

Fig.3 Synthetic route of isoliquiritigenin

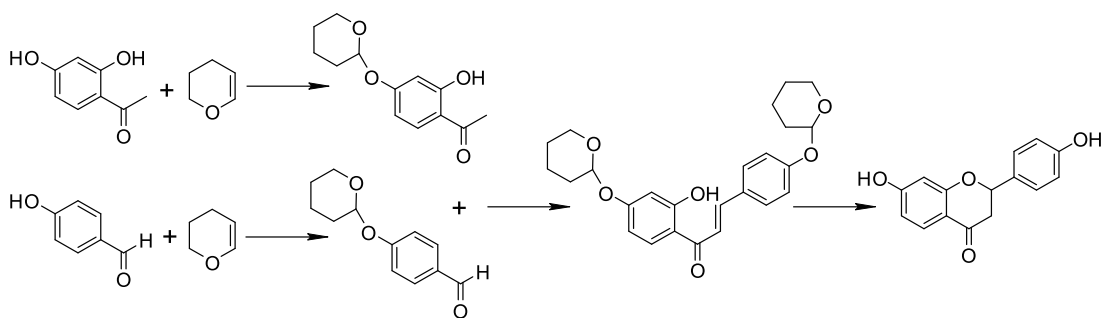


图 4 甘草素的合成路线

Fig.4 Synthetic route of glycyrrhizin

1.3 酪氨酸酶活性测定

进行蘑菇酪氨酸酶活性直接测定,来检查上述化合物对酪氨酸酶活性的直接影响,选取熊果苷作为阳性对照,每组做 3 个复孔。将 114.6 μL pH 为 6.5 的 PBS,4 μL 蘑菇酪氨酸酶,1.4 μL 待测化合物溶液,混匀,加入 96 孔板,震荡摇匀 3 min 后,加入 80 μL L-酪氨酸,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育一定时间,492 nm 测其吸光度,各化合物对酪氨酸酶活性抑制率的计算式为

$$R = [(A - B) - (C - D)] / (A - B) \times 100 \quad (1)$$

式中: A 为仅存在酪氨酸酶时的吸光度; B 为既不存在化合物也不存在酪氨酸酶时的吸光度; C 为同时存在化合物和酪氨酸酶时的吸光度; D 为仅存在化合物时的吸光度。

2 结果与讨论

在实验中发现,随着一些条件的改变,如底物 L -酪氨酸浓度、蘑菇酪氨酸酶浓度、反应时间,酶对底物的水解率也会有一定的变化,最终会影响对化合物抑制酪氨酸酶活性的评估。因此,为了筛选出高活性的酪氨酸酶抑制剂,接下来主要研究蘑菇酪氨酸酶直接测定模型的条件优化。

2.1 蘑菇酪氨酸酶活性确定

参照相关文献,固定底物 *L*-酪氨酸的浓度为 2.5 mmol/L,按照上述 1.3 的方法,选取 7 个梯度的蘑菇酪氨酸酶,分别为 250, 500, 1 000, 2 000, 4 000, 6 000, 8 000 U/mL。分别向 96 孔板中加入 80 μ L 的 *L*-酪氨酸、4 μ L 酶和 116 μ L PBS,每个酶活性做 3 个复孔,空白组加 200 μ L PBS,对照组加 80 μ L *L*-酪氨酸和 120 μ L PBS。以 *L*-酪氨酸水解率与酶活性的对数值为坐标作图,结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出,当蘑菇酪氨酸酶的活性为 2 000 U/mL 时,*L*-酪氨酸的水解率达到 80% 左右,因此选择蘑菇酪氨酸酶的活性为 2 000 U/mL,进行下一步的实验。

2.2 反应时间确定

按照上述 2.2 的方法,向 96 孔板中加入 80 μ L 浓度为 2.5 mmol/L 的 *L*-酪氨酸、4 μ L 活性为 2 000 U/mL 的蘑菇酪氨酸酶和 116 μ L PBS,分别反应 5, 10, 20, 30, 40 min。以 *L*-酪氨酸水解率与反应时间为坐标作图,结果如图 6 所示。

从图 6 可以看出,当反应时间为 20 min 时,*L*-酪氨酸的水解率达到 80% 左右,因此选择反应时间为 20 min,来进行下一步化合物的筛选。

2.3 酪氨酸酶抑制剂筛选

按照上述 1.3 的方法,来测定上述合成的 4 种化合物的抑制率。选择 *L*-酪氨酸的浓度为 2.5 mmol/L,蘑菇酪氨酸酶的活性为 2 000 U/mL,反应时间为 20 min,各化合物的浓度为 4 μ mol/L。根据式(1),计算出各化合物对酪氨酸酶的抑制率,结果见表 1。

从表 1 看出,熊果苷的抑制率最高,根据阳性化合物的抑制率,也可以进一步验证蘑菇酪氨酸酶直接测定模型的可行性。合成的 4 种化合物中,异甘草素的抑制率最高,仅次于阳性化合物,因此准备用异甘草素进行下一步的细胞实验,来研究具体作用机制。

3 结 论

本研究以醛和酮为原料,合成了 4 种查尔酮类衍生物,通过建立蘑菇酪氨酸酶直接测定模型来筛选

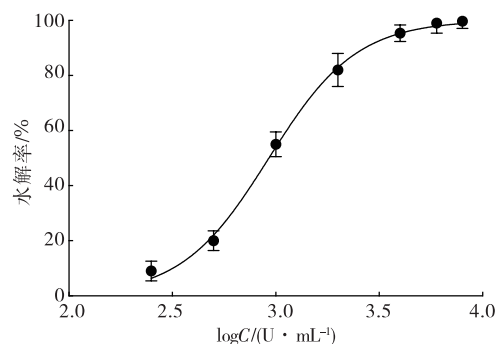


图 5 酶活性对 *L*-酪氨酸水解率的影响

Fig.5 Effect of enzyme concentration on *L*-tyrosine hydrolysis rate

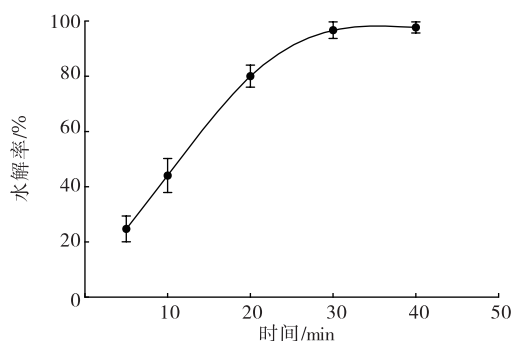


图 6 反应时间对 *L*-酪氨酸水解率的影响

Fig.6 Effect of reaction time on *L*-tyrosine hydrolysis rate

表 1 各化合物对酪氨酸酶活性的抑制率

Table 1 Inhibition rate of each compound on tyrosinase activity

化合物	抑制率/%	SD 值
熊果苷	79	2.45
异甘草素	70	3.27
甘草素	8	1.63
查尔酮	7	1.63
4-羟基查尔酮	45	4.08

其中高效的酪氨酸酶抑制剂。在实验中发现,底物 *L*-酪氨酸浓度、蘑菇酪氨酸酶浓度以及反应时间的变化都会影响到实验结果,因此,从这 3 个条件入手,对模型条件进行了优化,最终选取 *L*-酪氨酸的浓度为 2.5 mmol/L,蘑菇酪氨酸酶的活性为 2 000 U/mL,反应时间为 20 min。用此条件来测定合成的化合物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用,从而得到各个化合物的抑制率,并筛选出了抑制率最高的化合物为异甘草素,为将来酪氨酸酶抑制剂的开发提供指导,同时还可以进一步研究异甘草素是否通过抑制酪氨酸酶活性来影响色素代谢。

参考文献:

- [1]崔誉荣,李德芳,鞠宝,等. 四种甘草黄酮类化合物体外抗肿瘤作用研究[J]. 食品科技, 2010, 7(1): 88-92.
- [2]CHIN Y W, JUNG H A, LIU Y, et al. Anti-oxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*glycyrrhiza glabra*) [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(12): 4691-4697.
- [3]KIM J Y, PARK S J, YUN K J, et al. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 584(1): 175-184.
- [4]HARAGUCHI H, ISHIKAWA H, MIZUTANI K, et al. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retro-chalcones in *Glycyrrhiza inflata* [J]. Bioorg Med Chem, 1998, 6(3): 339-347.
- [5]LEE C K, SON S H, PARK K K, et al. Isoliquiritigenin inhibits tumor growth and protects the kidney and liver against chemotherapy-induced toxicity in a mouse xenograft model of colon carcinoma[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106(3): 444-451.
- [6]NADKARNI D R, WHEELER T S. Condensation of aromatic aldehydes with resacetophenone[J]. J Chem Soc, 1938, 140(1): 1320-1322.
- [7]陈万木,郭宏雄. 环上取代基对苯乙酮和苯甲醛缩合反应的影响[J]. 合成化学, 1999, 7(4): 422-426.
- [8]关丽萍,尹秀梅,全红梅,等. 羟基查尔酮类衍生物的合成[J]. 有机化学, 2004, 24(10): 1274-1277.
- [9]SANCHEZ F A, RODRIGUEZ J N, GARCIA C F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. Biochimica ET Biophysica Acta, 1995, 1247(1): 1-11.
- [10]SONG K K, HUANG H, HAN P, et al. Inhibitory effects of cis-and trans-isomers of 3, 5-dihydroxystilbene on the activity of mushroom tyrosinase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(1): 1147-1151.
- [11]KIM Y J, UYAMA H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(15): 1707-1723.
- [12]HALABAN R, PATTON R S, CHENG E, et al. Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway[J]. J Biol Chem, 2002, 277(1): 14821-14828.
- [13]COOKSEY C J, GARRATT P J, LAND E J, et al. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(42): 26226-26235.
- [14]ZHANG X D, HU X, HOU A J, et al. Inhibitory effect of 2, 4, 2', 4'-tetrahydroxy-3-(3-methoxy-2-butenyl)-chalcone on activity and melanin biosynthesis[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2009, 32(1): 86-90.
- [15]CHANG T S, DING H Y, LIN H C. Identifying 6, 7, 4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(10): 1999-2001.
- [16]SEO S Y, SHARMA V K, SHARMA N. Mushroom tyrosinase: recent prospects[J]. Agric Food Chem, 2003, 51(10), 2837-2853.
- [17]陈清西,林建峰,宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(2): 274-282.
- [18]OHAD N, RAMADAN M, SOLIMAN K, et al. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers[J]. Phytochemistry, 2004, 65(10): 1389-1395.
- [19]于晓宇,何小英,郑锦鸿. 4, 2'-羟基查尔酮及其类似物的合成[J]. 汕头大学医学院学报, 2009, 22(1): 4-6.

(责任编辑:殷丽莉)