

阿魏酸薄荷酯的合成与体外总抗氧化能力

郝东, 杨欣欣, 张江华, 陈桂荣, 包永睿, 孟宪生*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:**研究阿魏酸薄荷酯的合成方法及其体外总抗氧化能力。**方法:**以香兰素为原料,通过与中间体丙二酸单薄荷酯发生缩合反应合成阿魏酸薄荷酯,并通过法和铁离子还原(FRAP)法对其总抗氧化能力进行了测定。**结果:**经过三步反应合成得到了阿魏酸薄荷酯,化合物未见报道,结构经¹H-NMR 和 MS 得到确证,在试验浓度范围内具有一定的抗氧化能力,但比阿魏酸弱。**结论:**阿魏酸薄荷酯具有抗氧化活性,其合成方法适用于其他阿魏酸酯或阿魏酸酰胺衍生物的合成。

[关键词] 阿魏酸; 阿魏酸薄荷酯; 合成; 抗氧化能力

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0095-04

[doi] 10.11653/syjf2013150095

Synthesis and Measuring Total Antioxidant Ability *in vitro* of Menthyl Ferulate

HAO Dong, YANG Xin-xin, ZHANG Jiang-hua, CHEN Gui-rong, BAO Yong-rui, MENG Xian-sheng*

(College of Pharmacy Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To study synthesis and total antioxidant ability *in vitro* of menthyl Ferulate.

Method: The vanillin was used as raw material and menthyl hydrogen malonate was used as intermediate, condensation reaction between them was used to synthesize menthyl ferulate, and the ferric reducing ability of plasma (FRAP) method was used to measure its total antioxidant ability *in vitro*. **Result:** Menthyl ferulate was obtained through three steps reaction route, this compound has not reported, its structure was confirmed by ¹H-NMR and MS. Menthyl ferulate showed the antioxidant ability in the trial concentration range, but weak than ferulic acid. **Conclusion:** Menthyl ferulate has antioxidant activity, the synthetic method is applicable to other ferulic acid ester or ferulic acid amide derivatives.

[Key words] ferulic acid; menthyl ferulate; synthesis; antioxidant ability

阿魏酸(ferulic acid, FA)是自然界普遍存在的一种酚酸,分子结构中含有不饱和和双键和羟基,是阿魏、川芎、当归、升麻、木贼等多种活血化瘀中药的有效成分之一,被应用于心脑血管疾病的治疗^[1]。目

前研究表明,动脉粥样硬化、癌症、白内障、老年黄斑等疾病的发生与内源或外源性活性氧类的侵袭有关^[2-3],因此抗氧化损伤是防治这些疾病的关键。阿魏酸具有很好的抗氧化活性^[4-5],对过氧化氢、超氧自由基、羟自由基、过氧化亚硝基都有强烈的清除作用,能促进清除自由基的酶的产生,增加谷胱甘肽转硫酶和醌还原酶的活性,并抑制酪氨酸酶活性,来调节人体生理机能。此外,阿魏酸的毒性还很低,因而是一个很具开发潜力的天然活性分子。由于阿魏酸分子的极性很大,不易透过生物膜而被机体吸收,从而限制了阿魏酸的进一步应用。为提高阿魏酸的脂溶性并保持低毒性,同时提高阿魏酸的稳定性,本文用薄荷醇对阿魏酸中的羧基进行成酯修饰,合成

[收稿日期] 20121206(009)

[基金项目] “十一五”“重大新药创新”科技重大专项(2010ZX09401-304-105C)

[第一作者] 郝东,讲师,从事药物设计、开发与合成研究, Tel: 0411-87586012, E-mail: haodong454@sina.com

[通讯作者] *孟宪生,教授,硕士生导师,从事药物分析及药物多组分研究, Tel: 13700002653, 0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com

了未见报道的化合物阿魏酸薄荷酯,结构得到确证,并用 FRAP 法对其总抗氧化能力进行了测定。

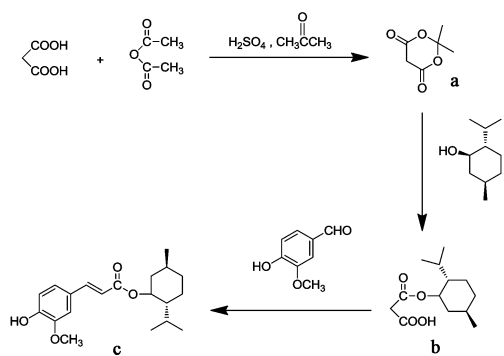
1 材料

1.1 试剂 阿魏酸(阿拉丁试剂,纯度 >99%),丙二酸(阿拉丁试剂,纯度 AP),(-)-薄荷醇(阿拉丁试剂,纯度 >99%),TPTZ(2,4,6-三吡啶基-S-三嗪,阿拉丁试剂,纯度 >99%),其他试剂均为市售分析纯。实验用蒸馏水为三级水。

1.2 仪器 Bruker ACF-500 MHz 核磁共振仪(TMS 为内标,瑞士 Bruker 公司),HP1100LC/MSD 质谱仪(美国 Agilent 公司),UV-2800 型紫外分光光度计(日本岛津有限公司),RE-5298A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),BS-300+型电子天平(上海友声衡器有限公司),JD60-4 型 1/万 电子分析天平(沈阳龙腾电子有限公司),HH-S 型数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限公司),SHZ-D(III)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司),WD-9403F 型紫外透射反射分析仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 阿魏酸薄荷酯的合成 参考有关合成阿魏酸衍生物文献,本文设计并通过实验确定了一条较为理想的合成路线,如图 1 所示,获得了目标化合物阿魏酸薄荷酯。



a. 丙二酸亚异丙酯; b. 丙二酸单薄荷酯; c. 阿魏酸薄荷酯

图 1 阿魏酸衍生物合成路线

2.1.1 丙二酸亚异丙酯(a)的制备^[6-7] 向 250 mL 的圆底烧瓶中加入 60 mL 醋酸酐,然后加入 52 g 丙二酸溶于醋酸酐中(溶解不完全),将反应瓶放入冰水浴中,搅拌下加入 2 mL 浓硫酸,反应 20 min 后将反应瓶从冰浴中取出,加入 40 mL 丙酮,于 20 ~ 25 °C 下反应 4 h。反应液颜色变化:白色→淡黄色→橘黄色。将反应瓶放入冰箱中冷冻,过夜。室温下融化后,分批抽滤,滤饼用水洗涤至白色,得到粗品 37.78 g。将粗品放入圆底烧瓶中,加入 20 mL 丙

酮,在 40 ~ 45 °C 的水浴中回流,固体不能完全溶解,不断加入丙酮至 48 mL 时,固体全部溶解,形成橘黄色澄清透明的溶液。按丙酮-水(4:3)的比例加入水 36 mL 进行重结晶,在加入水的过程中,不断有白色结晶析出。抽滤,然后将滤饼放入真空干燥箱中,在 40 °C 下干燥 4 h 后取出,得到白色针状晶体 28.34 g, mp 91.2 ~ 92.5 °C (Dec.) (文献值^[8] 92.0 ~ 96.0 °C);收率 48.77%。

2.1.2 丙二酸单薄荷酯(b)的制备^[9] 将丙二酸亚异丙酯 11.05 g 与薄荷醇 11.95 g(摩尔比 1:1)加入到 250 mL 圆底烧瓶中,加入甲苯 75 mL 作为溶剂,在 118 °C 下回流(回流冷凝管套干燥管),TLC 监测反应,反应完全后,蒸除甲苯,得到淡黄色油状液体,放置过夜。称质量 14.41 g,收率 77.61%。

2.1.3 阿魏酸薄荷酯(c)的制备^[10-11] 在 100 mL 圆底烧瓶中加入丙二酸单薄荷酯 4.03 g 和香兰素 1.02 g(摩尔比 2.5:1),吡啶 3 mL,甲苯 40 mL,常温下搅拌溶解后加入哌啶 2 滴,在 100 °C 下回流,TLC 监测反应,待反应结束后,蒸干甲苯和吡啶后密封,置于冰箱中冷冻过夜。解冻后向烧瓶中加入 60 mL 乙醚搅拌溶解,依次用饱和 NaHCO₃ 溶液(50 mL × 3)、10% HCl 溶液(20 mL × 2)、饱和 NaCl 溶液(50 mL × 2)洗涤有机层,分出有机层,加入适量的无水硫酸钠干燥过夜。旋蒸除乙醚,得棕红色油状液体 2.78 g。用短硅胶柱进行柱分离(洗脱剂乙酸乙酯-石油醚 1:8),最后得浅黄绿色油状液体 2.36 g。收率,52.08%。¹H-NMR(DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 9.48(s, 1H, Ar-OH), 7.49-7.46(d, 1H, J = 15.00, HC =), 6.41 ~ 6.38(d, 1H, J = 15.00, = CH), 3.77(s, 3H, H₃CO-), 7.26-7.27(d, 1H, 2'-Ar-H), 7.03-7.05(dd, 1H, 4'-Ar-H), 6.73-6.74(d, 1H, 5'-Ar-H); MS(ESI) m/z 331.0 [(M - 1)⁺]。

2.2 阿魏酸薄荷酯体外总抗氧化能力的测定 采用 FRAP 法^[12](ferric reducing ability of plasma, FRAP)对阿魏酸薄荷酯的体外抗氧化能力进行测定。FRAP 法测定的是样品总抗氧化能力,其原理是在酸性条件下抗氧化物还原 Fe³⁺ 与 2,4,6-三吡啶基三嗪配合物(ferric-tripyridyltriazine, Fe³⁺-TPTZ)产生蓝色的 Fe²⁺-TPTZ, Fe²⁺-TPTZ 在 593 nm 处有最大吸收。在此波长下,通过测定反应液的吸光度(A),即可获得受试样品的总抗氧化能力。绘制 FeSO₄ 标准曲线,由 A_{反应后} 与 A_{反应前} 的差值在标准曲线上获得与受试样品相应的 FeSO₄ 的浓度(μmol · L⁻¹),定义为 FRAP 值。FRAP 值越大,表明被抗氧

化物质还原所得的 FeSO_4 越多,即抗氧化物质的抗氧化活性越强。

2.2.1 FRAP 工作液的配制 精确称取 0.156 1 g TPTZ 置于干燥的烧杯中,加 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶解,移至 50 mL 的量瓶中,用 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 定容至刻度,制成 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPTZ 溶液。将 25 mL 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 3.6 的醋酸钠缓冲液、2.5 mL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPTZ 溶液、2.5 mL 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 溶液混合得到 FRAP 工作液。

2.2.2 FeSO_4 标准曲线的绘制 分别吸取 0.3 mL 浓度为 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 FeSO_4 标准液至 6 个试管中,加入 2.7 mL 预热至 37 $^\circ\text{C}$ 的 FRAP 工作液,混匀,37 $^\circ\text{C}$ 下反应 20 min,于 593 nm 处测定其 A,用水调零,每个浓度测定 3 次,结果取平均值,绘制标准曲线。

2.2.3 样品的测定 用 50% 的乙醇-水做溶剂配制 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿魏酸薄荷酯溶液做供试样品。分别取每个浓度供试样品 0.1 mL,加入 1.8 mL FRAP 工作液,再用水加至 5 mL,混匀,37 $^\circ\text{C}$ 下反应 20 min,于 593 nm 处测定其 A,用 10% 的乙醇-水调零。样品的抗氧化活性用 FRAP 值来表示。每个浓度测定 3 次,结果取平均值。

2.2.4 对照品的测定 用 50% 的乙醇-水做溶剂配制浓度分别为 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿魏酸溶液做对照品。分别取每个浓度对照品 0.1 mL,加入 1.8 mL FRAP 工作液,再用水加至 5 mL,混匀,37 $^\circ\text{C}$ 下反应 20 min,于 593 nm 处测定其 A,用 10% 的乙醇-水调零。对照品的抗氧化活性用 FRAP 值来表示。每个浓度测定 3 次,结果取平均值。

3 结果

本文以香兰素为原料,按照图 1 所示合成路线,经过 3 步反应,合成得到了未见报道的化合物阿魏酸薄荷酯,并通过 $^1\text{H-NMR}$ 和 MS 确证了结构,总收率为 19.71%。

通过 Excel 软件,求得 FeSO_4 标准曲线的线性回归方程为 $Y = 0.002X + 0.322$, $R^2 = 0.999$ 。阿魏酸和阿魏酸薄荷醇酯对铁离子的还原能力如表 1。

由表 1 数据看出,当浓度 $> 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时阿魏酸有很强的抗氧化能力,当浓度 $> 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时阿魏酸薄荷醇酯有很强的抗氧化能力,同浓度下,阿魏酸薄荷醇酯的抗氧化能力不及阿魏酸,但同时也说明阿魏酸薄荷醇酯的稳定性要比阿魏酸强。

表 1 阿魏酸薄荷醇酯总抗氧化能力

浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	FRAP 值*	
	阿魏酸	阿魏酸薄荷醇酯
25	14.5	0.5
50	17.5	25
100	104	55
200	317.5	177.5
400	684.5	327
600	1 120.5	477.5
800	1 458	610.5
1 000	1 739	710.5

注:* 为达到相同吸光度的 FeSO_4 浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 值 (在 FeSO_4 标准曲线上求出)。

4 讨论

阿魏酸具有很低毒性,用低毒性的薄荷醇对阿魏酸的羧基进行成酯修饰可提高脂溶性,有利于阿魏酸透过生物膜被机体吸收,并保持低毒性,同时亦可提高阿魏酸的稳定性。本文以香兰素为原料间接合成阿魏酸薄荷醇酯的方法反应条件简单、操作简便、原料廉价易得,合成路线亦适于其他阿魏酸衍生物如阿魏酸酯、阿魏酸酰胺的制备。本文中,阿魏酸薄荷醇酯在试验浓度范围内有明显的抗氧化活性,但其活性不及阿魏酸。实验结果说明,苯环上的酚羟基是发挥抗氧化活性的关键官能团,但抗氧化活性亦受分子结构中羧基官能团存在形式的影响,具体的关系还需进一步研究。

自由基可引起人体组织衰老、诱发心血管疾病、癌症等,阿魏酸是一个很具开发潜力的天然抗氧化活性分子,对其进行结构修饰和改造,有望找到低毒、活性强的抗氧化物,应用于医药、食品和化妆品中。

[参考文献]

- [1] Srinivasan M, Sudheer A R, Pillai K R, et al. Influence of ferulic acid on γ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes [J]. Toxicology, 2006, 228(2/3):249.
- [2] 何华,李先宽,丁璞,等. 五味子红色素抗氧化活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):140.
- [3] 党翠芝,黄小燕,杨庆雄,等. 灯盏细辛的抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17):100.
- [4] Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, et al. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats [J]. Cancer Lett, 2000, 157(1):15.

HPLC 测定九节茶肿痛宁乳膏中异嗪皮啉与迷迭香酸的含量

欧余航, 李杰, 陈强*
(福建中医药大学, 福州 350122)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定九节茶肿痛宁乳膏中异嗪皮啉与迷迭香酸含量。方法: 采用 Hypersil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 以 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 检测波长 330 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹。结果: 异嗪皮啉在 4.06 ~ 64.96 mg·L⁻¹ 线性关系良好 (r = 0.999 9), 平均回收率 100.48%, RSD 0.73%; 迷迭香酸在 12.3 ~ 196.8 mg·L⁻¹ 线性关系良好 (r = 0.999 3), 平均回收率 101.98%, RSD 1.5%。结论: 方法简单、准确、重复性好, 能有效的控制该制剂的质量。

[关键词] 九节茶肿痛宁乳膏; 异嗪皮啉; 迷迭香酸;

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0098-04

[doi] 10.11653/syjf2013150098

Determination of Isofraxidin and Rosmarinic Acid in *Sarcandra Zhongtongning* Cream by HPLC

OU Yu-hang, LI Jie, CHEN Qiang*

(Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the HPLC method for the determination of isofraxidin and rosmarinic acid in *Sarcandra Zhongtongning* cream. **Method:** The chromatographic separation was performed on Hypersil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column. Acetonitrile with 0.1% formic acid-0.1% formic acid was used as mobile phase. Detection wavelength was at 330 nm, column temperature was maintained at 30 °C, the flow rate was

[收稿日期] 20121109(003)

[基金项目] 福建省科技厅重点项目(201110003)

[第一作者] 欧余航, 硕士研究生, 从事天然药物有效成分的分离和分析研究, Tel: 15980273947, E-mail: 68279441@qq.com

[通讯作者] * 陈强, 研究员, 从事中药制剂和新药研究, Tel: 0591-22861043, E-mail: cq@fjtcu.edu.cn

[5] Ogiwara T, Satoh K, Kadoma Y, et al. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22 (5):2711.

[6] Zhouen Z, Side Y, Weizhen L, et al. Mechanism of reaction of nitrogen dioxide radical with hydroxycinnamic acid derivatives; a pulse radiolysis study [J]. *Free Radic Res*, 1998, 29 (1):13.

[7] 靳通收, 赵瑞巧, 王爱卿, 等. 水中“一锅”合成 7,7-二甲基-4-(3-氯苯基)-5-氧代-3,4,5,6,7,8-六氢香豆素的洁净方法 [J]. *化学试剂*, 2006, 28 (10):621.

[8] Davidson D, Bernhard S A. The structure of medrulum's supposed B-lactonic acid [J]. *J Am Chem Soc*, 1948, 70:3426.

[9] Youngha Ryu, A Ian Scott. Self-condensation of activated malonic acid half esters; a model for the decarboxylative Claisen condensation in polyketide biosynthesis [J]. *Tetrahedron Letters*, 2003(44):7499.

[10] 赵亚军, 焦玉国. 3,5-二甲氧基苯乙醛和丙二酸单乙酯的 Knoevenagel 缩合 [J]. *高等学校化学学报*, 1997, 18(8):1312.

[11] 胡惟孝, 夏春年. 一种一锅法咖啡酸衍生物的方法. 中国; CN 1730460A [P]. 2010-06-18.

[12] Benzie I F F, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power' the FRAP assay [J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239 (3):70.

[责任编辑 邹晓翠]