

β -丁香烯代谢产物和结构改造的研究

孙静芸 于琳 陈萍 谢强敏* 唐法娣* 卞如濂*

(浙江省中医药研究所, 杭州; *浙江医科大学, 杭州)

提要 从 β -丁香烯代谢产物中分离得到一种有药理活性的化合物, 经光谱分析及化学反应证明其结构为 β -丁香酮(8)。根据代谢产物的化学结构以及构-效关系理论, 对 β -丁香烯进行了结构改造研究, 结果得到一种活性较强的半合成产物, 为无定形长丝状物, 其结构被鉴定为 β -丁香烯醇(3)。

药理实验表明化合物(8)及(3)对豚鼠离体气管平滑肌均有较强的松弛作用, 化合物(3)还能明显抑制组织胺和乙酰胆碱诱发的豚鼠哮喘, 其作用持久而毒性低, 可望成为一种新型的平喘药物。

关键词 β -丁香酮; β -丁香烯醇; β -丁香烯

β -丁香烯(β -caryophyllene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene bicyclo[7.2.0]undec-4-ene)为菊科植物艾(*Artemisia argyi* Lévl. et Vant)的干燥叶片, 经水蒸气蒸馏提得的艾叶油中平喘有效成分之一⁽¹⁾。经药理筛选, 发现它对离体气管平滑肌几乎没有松弛作用, 但口服后平喘疗效与艾叶油相近。为了弄清它在生物体内代谢产物的化学结构和构-效关系, 我们采用了薄层层析法分离、光谱分析法、还原和氘代反应鉴定了由人工胃、肠液温育豚鼠的胃、肠内容物及人体尿液中分离得到的活性代谢产物。根据所获得的化学结构信息, 对 β -丁香烯进行了结构改造和药理研究。

材料和方 法

一. 仪器

GC-ms 4021 型、MAT-111 型、JMS-D 300 和 MAT-44 ss 四极质谱仪。色谱条件 SE-54, 毛细管柱 20 M, 内径 0.25 mm, 柱温 100~220°C, 6°C/min, 分流比 1:10, 载气:氮 1 kg/cm²。质谱条件。电子能量 70 eV, 接口温度 250°C, 离子流温度 240°C。红外光谱仪 PE-599 B。核磁共振氢谱仪 JEOL PS-100 和 WP-80-SY。核磁共振碳谱仪 AM-400。熔点测定仪为 Kofler 微量熔点测定仪。

二. 试剂

所用试剂均为分析纯。硅胶 GF 254 为青岛海洋化工厂产品。

三. 实验材料

艾叶油和牡荆油有化学结构完全相同的有效单体 β -丁香烯, 平喘作用也完全一致。由于艾叶油价格较贵, 所以我们用牡荆油分离的 β -丁香烯为研究材料。

β -丁香烯的制备 减压分馏装置 30×1000 mm 的填料塔, 填料用 3×3×0.1 mm 不锈钢压延孔环。真空精馏牡荆油, 收集 115~118°C/1.07 kPa(8 mmHg)馏分, 再经 LBC-1 离心薄层层析仪, 石油醚洗脱, GC 检识, 回收溶剂, 得无色的油状物。其 IR, MS, ¹HNMR, $[\alpha]_D$ 与文献^(1,2)报道的完全一致。

四. 代谢产物的分离方法

采用液液萃取法。代谢产物先用石油醚萃取，残留物再用乙醚萃取，萃取液用无水硫酸钠干燥，回收溶剂。以 TLC 干板分离，石油醚—乙醚(1:1)展开，取下 Rf 值相应部位的硅胶，洗脱后，得代谢物 I, II, III。

五. TLC 检查

用 0.2% CMC 硅胶 GF 254 板，0.5% 香草醛显色。

六. 动物

豚鼠(浙江医科大学动物室供给)。

七. 按药典配方配制人工胃、肠液。

实验与结果

一. β -丁香烯的代谢实验

(一) 体外模拟实验

1. 胃液组 取胃液三份，每份 170 ml，其中一份作为对照组；另二份加 β -丁香烯 300 mg。在 37°C 水浴上，振摇 2 h 后，分离其转化物。

2. 胃—肠液组 分别取胃液、肠液各三份，每份 170 ml，首先将胃液按胃液组法进行实验，每份的分离物分别加入到肠液，再按胃液组法进行实验和分离。

3. 肠液组 取三份肠液，每份 170 ml，按胃液组法进行实验和分离。

(二) 豚鼠灌胃后代谢物的分离

先后共取豚鼠 55 只，分成三组。第一组预先结扎胃与肠的交界处；第二组不预以结扎；第三组肠部直接给药。2 h 后，分别取胃、胃—肠和肠内容物，进行代谢物的分离。

(三) 二人口服药物前、后 24h 尿液中代谢物的分离

β -丁香烯胶囊(每粒 30 mg)，口服，每日二次，每次五粒。分别收集服药前和停药后 24 h 的尿液，然后进行分离。

二. 代谢物的分离结果

Tab 1. Results of metabolites separation

Metabolic experiments		TLC		
		I Rf 0.76	II Rf 0.58	III Rf 0.05
Artificial	Gastric juice	Purple	—	Rose
	Gastrointestinal juice	Purple	—	Rose
	Intestinal juice	Purple	—	—
Guinea-pigs	Contents in stomach	Purple	Golden	Rose
	Contents in stomach and intestines	Purple	Golden	Rose
	Contents in intestines	Purple	—	—
Human body	Urine before drug administration	—	—	—
	Urine after drug administration	Purple	Golden	Rose
Control		—	—	—

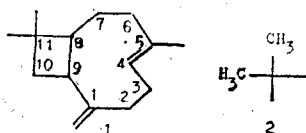
三. 代谢物的光谱分析

代谢物 I 无色油状物，经 GC—MS 检识， m/z 204(M^+), 189, 161, 133, 119, 107,

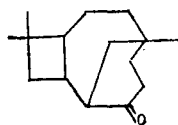
93, 81, 69, 55, 与 β -丁香烯的质谱完全一致。证明是在体内未被转化的原形药物。

代谢物 II 白色絮状物, 是人体和豚鼠代谢物之一。药理筛选对豚鼠离体平滑肌有收缩作用, 未作深入研究。

代谢物 III 黄色粘稠油状物, 是有活性的代谢物。经 GC-MS 检测, MS m/z 220(M^+), 202($M^+ - H_2O$), 205($M^+ - Me$), 187($M^+ - H_2O - Me$), 172(187 - Me), 159(187 - $CH_2 = CH_2$), 145(172 - $CH_2 = CH_2 + 1H$), 131(159 - $CH_2 = CH_2$), 105(131 - $CH \equiv CH$), 91(145 - C_4H_6), 55($CH_2 - CH - C \equiv O^+$)。IR(KBr) 1710 cm^{-1} 处有一个强的吸收峰, 说明有一 $C=O$ 结构。还原反应后, 该峰消失, 进一步证实了有酮型结构的存在。在 β -丁香烯⁽¹⁾的结构中有两个双键三个 α -H, 羰基的位置可能在 2, 3, 6 位上。根据质谱碎片峰和氘代反应后, 质谱出现(m/z)223(M^+)221(M^+), 说明了有活泼氢的存在, 羰基应在 2 位上。又质谱(m/z)55($CH_2 - CH - C \equiv O^+$), 证明该酮是一个环酮。另外 ¹HNMR 在 δ 0.96 ppm 处的信号, 相当 6 个质子, 表明两个甲基连结在同一个碳上, 又该信号为单峰, 说明该两个甲基所连结的碳为季碳, 故应有如下结构式(2)。红外光谱支持了这种结构, 在 1380 cm^{-1} 峰裂为双峰, 肯定了偕二甲基的存在。



根据已知分子离子峰 220(M^+) 和 ¹HNMR 谱给出的氢原子数, 其含碳数应是 15, 求出 ($M+1$)%, 查 Beynon 表, 确定分子式为 $C_{15}H_{24}O$, 不饱和度应为 4, 扣除已肯定的结构碎片及不饱和度, 代谢物 III 可能有如下结构(8)。



(8)

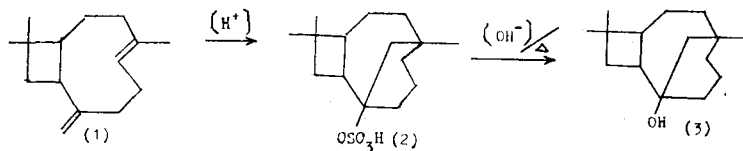
根据上述 IR, MS, ¹HNMR, 还原和氘代反应的光谱数据和文献^(3~4)所推断的化合物结构(8)是成立的。同时, 也符合 Hansch 方程式⁽⁷⁾。用 TLC 检识为一个斑点。

1. 还原反应 取代谢物 III, 溶于甲醇, 加入 $NaBH_4$ 少许, 常温振摇, 得到的产物用醋酸乙酯萃取, 回收溶剂。残余物的 IR 检测结果, 1710 cm^{-1} 峰消失, 在 (3400 cm^{-1}) 处出现较强的吸收峰, 说明羰基已被还原为 $-OH$ 基。

2. 氘代反应 取代谢物 III, 加入 NaOH 醇溶液, 再加入 D_2O 2 ml, 室温进行氘代反应。将氘代产物用醋酸乙酯抽取, 浓缩。通过 GC-MS 检识, 发现氘代不完全。继续在抽取物中加入 Na_2O_2 少许, 在密闭系统用油泵抽, 上接氦气球, 在侧颈用针头注入 D_2O 2 ml, 加热 130°C, 4 h 后, 用醋酸乙酯抽取, 浓缩。作 GC-MS, 发现(m/z); 221(M^+), 223(M^+), 说明了活泼氢的存在。

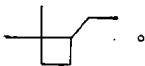
四. β -丁香烯的结构改造

按照 Markownikov 规则, 将 β -丁香烯进行酸加成。在该反应条件下, 生成的 $ROSO_3H$ 中, 再加入少量碱, 水解成羟基化合物。反应式如下:

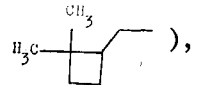



取 β -丁香烯 40 ml, 加入 45% H_2SO_4 200 ml, 趁热振摇至室温。反应 0.5 h 后, 加入 10 倍量水, 振摇呈乳浊液, 使之水解。先用石油醚萃取, 再用醋酸乙酯萃取, 回收溶剂, 残余物放置冰箱内, 呈现混有长丝状物的粘稠黄色油状物。然后, 以 95% 乙醇溶解, 加水稀释至 1000 ml, 用 NaOH 调至碱性, 减压, 加热回流继续水解 1 h, 蒸去乙醇和大部分水。冷却, 转移到分液漏斗内, 用水洗至中性, 置于冰箱中冷却。将胶状物均匀涂铺在硅胶 CMC 干板上, 待油被吸收后, 收取干板表层上析出的丝状物, 以升华法精制, 得无定形丝状物, mp 88~90°C。

光谱分析 MS m/z 222(M^+), 207($M^+ - CH_3$), 204($M^+ - H_2O$), 189($M^+ - CH_3 - H_2O$),

179 ($M^+ - C_3H_7$), 111 为基峰 

IR(KBr) cm^{-1} 3400($-OH$), 2960, 2860($-CH_3$), 2926, 2850 ($-CH_2$), 1440, 1465

($-CH$), 1385~1380(d, ) , 1100~1017($-CO-$)。

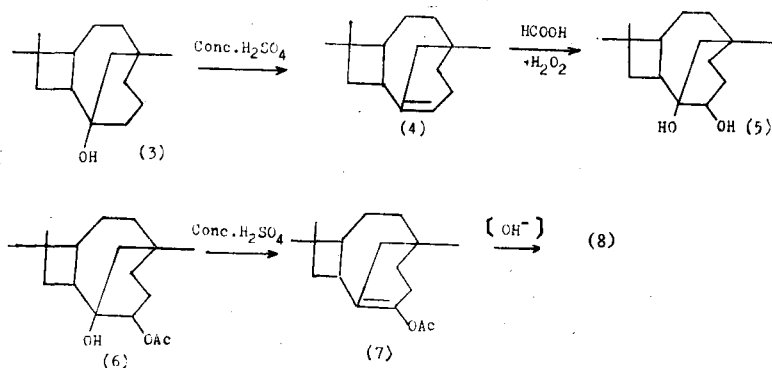
1H NMR δ ppm 0.95 (3 H, s, $-CH_3$); 1.01(6 H, s, ); 1.05~1.66(16 H, m, $-CH_2$, $-CH$); 2.20(1 H, D_2O 交换后消失, $-OH$)。

^{13}C NMR $CDCl_3$ δ ppm 71.0(s), 48.8(t), 45.0(d), 39.7(s), 38.8(t), 37.3(t), 36.8(d), 35.0(s), 34.5(t), 33.3(q), 30.6(q), 22.2(t), 20.8(q), 20.7(t), 20.7(t)。

根据上述光谱数据, 证明半合成物(3)与文献⁽⁶⁾报道的一致, 为 β -丁香烯醇 (β -caryophyllene alcohol)。

五. 代谢物 III 的半合成

为了进一步确证代谢物 III 的结构, 根据文献^(3~5)方法, 按如下路线进行合成:



Scheme 1. Route for synthesis of compound(8)

取 β -丁香烯醇 2 g, 加浓硫酸少许, 振摇, 进行脱水反应, 用乙醚萃取。醚液用水洗至中性, 回收乙醚, 得淡黄色粘稠油状物。TLC 检识, 石油醚展开, 得 Rf 值为 0.76 的脱水产物。然后加 HCOOH 和 H₂O₂, 摇匀, 放置 4 h, 加适量水, 于 80°C 水浴回流 4 h, 冷却, 用乙醚萃取, 萃取液用水洗至中性, TLC 检识, 石油醚展开, 得 Rf 值 0.083 的羟化产物。依次加入醋酐、吡啶, 室温放置 24 h, 用乙醚萃取, 回收溶剂。残余物用石油醚—醋酸乙酯 (85:15) 展开, 得 Rf 值 0.21 淡黄色粘稠的酰化物。继续以浓硫酸脱水, 碱水解, 醚萃取。按代谢物 III 法进行干板制备, 分离得到的黄色粘稠油状物, 通过 GC—MS 检测, m/z 220 (M⁺), 202, 205, 187, 172, 159, 105, 91, 55。与代谢物 III 的 MS 图谱、GC 的保留值完全一致。

六. 药理实验结果

(一) β -丁香烯对豚鼠离体气管平滑肌几乎无松弛作用。

(二) β -丁香烯体内代谢物 III 以及代谢物 III 的半成品, 对豚鼠气道平滑肌松弛作用显著增强。

(三) β -丁香烯结构改造后的半成品 β -丁香烯醇(3), 具有较强的豚鼠离体气道平滑肌松弛作用, PD₂=4.36 (n=6); 在组织胺和乙酰胆碱诱发的豚鼠哮喘, 0.2 g/kg 灌胃给药, 能使全部动物 (n=8) 不发生喘息, 其作用持续时间长于 6 h。

(四) β -丁香烯醇(3), 小鼠灌胃半数致死量 LD₅₀>10.8 g/kg 说明毒性极小。

讨 论

根据 Hansch 方程式推算代谢物 III 的 $\log p < \beta$ -丁香烯, A > β -丁香烯, C << β -丁香烯。证明了 β -丁香烯相当于前体药物在体内经过胃转化为具有巯基的活性成分后发挥疗效作用。半合成的 β -丁香烯醇, 增加了羟基, 因而, 使 LD₅₀ 增大, 毒性减小, 平喘作用时间延长, 为平喘药物结构改造提供了新的依据。

致谢 周维善教授、刘星楷副教授对本文热情指导。

参 考 文 献

1. 防治慢性气管炎艾叶油研究协作组. 艾叶油平喘有效成份的研究. 医药工业 1977; 10:8.
2. 日本香料协会编. ラルベンスベダドル集成. 1973:38~39.
3. Terpenoids and Steroids. 1982; 11:30~31.
4. Bohlmann F. und zdero C. Neue Sesquiterpene aus *Artemisia koidzumic*. *Phytochemistry* 1980; 19:149.
5. Sykes P. 著(王世椿译). 有机化合物反应机理指南. 第1版. 北京: 科学出版社, 1983:203~233.
6. 林启寿. 倍半萜类及其衍生物. 中草药成分化学. 第1版. 北京: 科学出版社, 1977:511.
7. Hansch C and Clayton JM. Lipophilic character and biological activity of drug II: the parabolic case. *Pharm. Sci* 1973; 62:1.

STUDIES ON METABOLITES AND STRUCTURAL MODIFICATION OF β -CARYOPHYLLENE

SUN Jing-Yun, YU Lin, CHEN Ping, XIE Qiang-Min*, TANG Fa-Di* and BIAN Ru-Lian*

(Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou; *Zhejiang Medical University, Hangzhou)

ABSTRACT A pharmacologically active substance obtained from the metabolites of β -caryophyllene was characterized as caryophyllone(8) on the basis of

spectral analyses and chemical evidence. Consideration of the structures of the metabolites and the structure-activity theory led to the successful structural modification of β -caryophyllene to give an active hemisynthetic product(3).

Pharmacological experiments showed that compounds(8) and (3) have a potent relaxation effect on isolated trachea of guinea pigs and compound(3) has a potent and long-acting inhibitory effect on guinea pig asthma induced by histamine and acetylcholine. Its LD_{50} was found to be higher than 10.8 g/kg. Compound(3) holds promise as a new anti-asthmatic drug.

Key words β -caryophyllone; β -caryophyllene alcohol; β -caryophyllene