

文章编号: 1674-9057(2020)01-0232-09

doi:10.3969/j.issn.1674-9057.2020.01.030

新型美白剂 4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚 的合成及其性能

苏振宁¹, 尹志刚¹, 王璞², 樊凯奇¹, 钱恒玉¹, 张同艳¹, 王瑞娟¹, 余述燕¹

(1. 郑州轻工业大学 材料与化学工程学院, 郑州 450002; 2. 上海璞萃生物科技有限公司, 上海 201506)

摘要:以 2,4-二羟基苯甲醛、3,5-二甲氧基溴苄为原料, 经过苄基化反应、Arbuzov 反应、Wittig-Horner 反应、催化加氢等过程合成了新型美白剂 4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚, 并通过¹H-NMR、¹³C-NMR 与 IR 确定其化学结构, 应用 DPPH 自由基清除实验、酪氨酸酶活性抑制实验评价其生物活性。结果表明: DPPH 自由基半清除浓度 IC₅₀ = 0.011 mmol/L, 明显低于苯乙基间苯二酚 (IC₅₀ = 0.084 mmol/L)、α-熊果苷 (IC₅₀ = 0.195 mmol/L) 和光甘草定 (IC₅₀ = 0.385 mmol/L); 以 L-酪氨酸为底物时, 对酪氨酸酶单酚酶的半抑制浓度 IC₅₀ = 0.001 37 mmol/L 明显低于苯乙基间苯二酚 (IC₅₀ = 0.005 82 mmol/L)、α-熊果苷 (IC₅₀ = 3.94 mmol/L) 和光甘草定 (IC₅₀ = 0.005 1 mmol/L); 以 L-多巴为底物时, 对酪氨酸酶二酚酶的半抑制浓度 IC₅₀ = 0.032 2 mmol/L, 低于苯乙基间苯二酚 (IC₅₀ = 0.057 5 mmol/L), 但高于光甘草定 (IC₅₀ = 0.007 6 mmol/L), α-熊果苷对酪氨酸酶二酚酶的半抑制浓度为负值, 表现为激活作用。两组数据表明新型美白剂 4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚对酪氨酸酶具有较高的抑制活性。

关键词: 美白剂; 合成; 酪氨酸酶活性抑制; 抗氧化

中图分类号: TQ243.1; TQ658.2

文献标志码: A

0 引言

健康美白肌肤是很多人追求的目标, 但人体肌肤暴露在阳光下会使表面产生很多活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)^[1], 另外, 空气中的颗粒物 PM_{2.5}、PM₁₀、汽车尾气、工业废气 (CO₂、CO、SO₂、NO_x 等)、地表臭氧以及烟灰等附着在皮肤表面都会产生 ROS^[2]。ROS 在低浓度水平时, 会激活皮肤黑素细胞增殖和酪氨酸酶基因表达, 提高黑色素的合成量; ROS 浓度蓄积升高会与皮肤细胞发生氧化应激, 造成 DNA、蛋白质、细胞器的氧化损伤, 严重时可能造成细胞凋亡或直接死亡, 进而破坏皮肤的正常结构, 引起皮肤光老化, 甚至皮

肤结构损伤^[3-4]; 而皮肤结构损伤反过来可加剧黑色素在皮肤内部沉积 (如黄褐斑、老年斑等), 更有甚者可引起细胞癌变 (黑色素瘤) 或者黑色素细胞受损伤而导致白癜风^[5]。

酪氨酸酶是一种含铜元素复合物, 属于酚类氧化酶, 在微生物、动植物和人体中含量各异^[6]。酪氨酸酶与黑色素形成有着密切联系, 人类皮肤色素沉着、黑色素瘤和神经退行性疾病等一系列肌肤问题都与黑色素形成有关^[7-8]。研究发现, 酪氨酸酶抑制剂可以明显抑制酪氨酸酶的活性, 减少黑色素生成^[9-10], 这使酪氨酸酶抑制剂成为优良美白成分而被广泛应用于护肤类化妆品中^[11-12]。然而, 黑色素可以吸收过滤紫外线保护皮肤细胞不受损

收稿日期: 2019-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21406209); 河南省研究生教育改革项目 (YXW2018D23HFJ03013); 河南省研究生教育优质课程项目 (HNYJS2018KC13)

作者简介: 苏振宁 (1990—), 男, 硕士, 化学工程与技术专业, sznclqy@163.com。

通讯作者: 尹志刚, 博士, 教授, yinck@zzuli.edu.cn。

引文格式: 苏振宁, 尹志刚, 王璞, 等. 新型美白剂 4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚的合成及其性能 [J]. 桂林理工大学学报, 2020, 40 (1): 232-240.

伤,而其本身也存在一种微观机制可有效地去除自由基^[13](尤其 ROS)以降低自由基对细胞的损伤^[14-15]。从这个意义上讲,减少黑色素形成量会削弱皮肤的保护机制,从而影响 ROS 清除。

综上,面对健康美白肤色需求,结合日常生活中无法避免的 ROS 环境,在使用美白剂注重美白效果的同时,也要兼顾 ROS 对皮肤的不良影响,减轻或者消除这种影响就需要引入抗氧化剂,以应对外源性 ROS 效应,弥补内源黑色素自身消除 ROS 机制的缺失。因此,“酪氨酸酶抑制剂在具有酪氨酸酶活性抑制作用的同时,必须具有抗氧化性”,这样才能使开发的美白产品避免出现“白癜风”斑点隐患。研究发现,很多白藜芦醇衍生物不仅具有良好美白效果,还具有抗氧化性能^[16-17],如白藜芦醇(Resveratrol)、氧化白藜芦醇(oxyresveratrol)、苯乙基间苯二酚(phenylethyl resorcinol)等(图1a—c)。Kim等^[18]设计合成了一些白藜芦醇类似物,并研究了其抗氧化性能,结果发现,带甲氧基的白藜芦醇类似物优于白藜芦醇本身或其他白藜芦醇类似物。另有文献报道,将白藜芦醇苯环上酚羟基甲基化可以增加化合物的脂溶性,有利增强其对细胞的透膜能力^[19]。二苯乙烯是白藜芦醇的基本结构,Roldos等^[20]、Cardile等^[21]和 Kageura等^[22]将其双键还原为单键,得到一批具有较高生物活性的化合物。

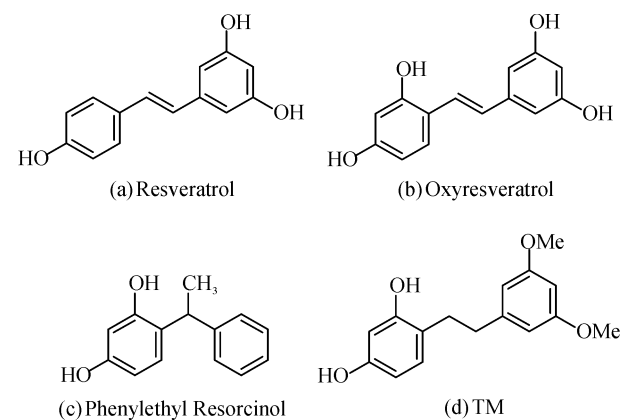


图1 白藜芦醇、氧化白藜芦醇、苯乙基间苯二酚和目标分子的结构式

Fig. 1 Structures of resveratrol, oxyresveratrol, phenylethyl resorcinol and TM

本文详细研究了白藜芦醇及其衍生物的结构与生物活性^[23-24],在此基础上设计合成了一种新型美白剂4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚(图1d),并应用 DPPH 自由基清除、酪氨酸酶活性抑

制等实验评价了合成产物的抗氧化性和对酪氨酸酶的抑制活性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:2,4-二羟基苯甲醛(99%)、3,5-二甲氧基苄溴(97%)、苄溴(98%)、亚磷酸三乙酯(98%)、甲醇钠(99%)、Pd/C(5% Pd)、THF(99.5%)、DMF(99.8%)、DPPH(96%)、酪氨酸酶(25 000 U)、L-多巴(99%)、L-酪氨酸(99%)、DMSO-d₆(99.9%),均为上海麦克林生化科技有限公司生产;无水碳酸钾(99%)、无水硫酸钠(99%)、NH₄Cl(99.5%)、磷酸二氢钠(99%)、磷酸氢二钠(99%)均为天津市科密欧化学试剂有限公司生产;乙腈(99%)、乙酸乙酯(99%)、甲醇(99%)、丙酮(99%)、甲苯(99%)均为天津津东天正化学试剂有限公司生产。

主要仪器:Thermo Fisher Orbitrap 质谱仪、Thermo Fisher Nicolet 红外光谱仪,赛默飞世尔科技有限公司;BrukerAvance 400 核磁共振仪,德国 Bruker 公司;TU-1900 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;RE-2000E 旋转蒸发器、FSA-6B 循环真空水泵,郑州长城科工贸有限公司。

1.2 美白剂4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚的合成

1.2.1 2,4-二苄氧基苯甲醛(中间体I)的合成 室温下,在100 mL三口瓶中加入无水乙腈37.5 mL,搅拌下加入2,4-二羟基苯甲醛7.5 g(54.35 mmol)、无水碳酸钾9.01 g、苄溴9.76 g(57.08 mmol)后,搅拌1 h,将反应混合物缓缓升温至82℃,继续搅拌5 h。冷却至室温,将反应混合物倒入冰水中,用乙酸乙酯(3×25 mL)萃取,合并萃取液,经水洗、无水硫酸钠干燥,蒸馏回收乙酸乙酯,干燥至恒重,得到白色固体产品(中间体I)14.50 g,收率84%。

中间体I:m.p. 95~97℃; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.25 (d, J=0.8 Hz, 1H, CHO), 7.70 (d, J=8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (m, 10H, Ar-H), 6.92 (d, J=2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.75 (dd, J=8.8, 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 5.28 (s, 2H, CH₂), 5.22 (s, 2H, CH₂); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ: 187.61, 165.52, 162.62, 136.83,

136.66, 130.35, 129.02, 128.99, 128.61, 128.48, 128.44, 128.01, 119.04, 108.13, 100.84, 70.29, 40.57, 40.36, 40.15, 39.94, 39.74, 39.53, 39.32。

1.2.2 3,5-二甲氧基苯甲基膦酸二乙酯(中间体II)的合成 室温下,在100 mL三口瓶中加入3,5-二甲氧基苄溴 14.00 g(60.58 mmol)、亚磷酸三乙酯 20.13 g(121.16 mmol),搅拌,将反应混合物缓慢加热至135 ℃,保持12 h,反应完全后于90 ℃减压蒸馏,回收剩余的亚磷酸三乙酯,得到棕色液体产品(中间体II)15.72 g,收率90%。

中间体II:¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆)δ: 6.49(t, *J*=2.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.40(dd, *J*=4.4, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 3.98(m, 4H, CH₂), 3.74(s, 6H, CH₃), 3.19(t, *J*=11.6 Hz, 2H, CH₂), 1.20(m, 6H, CH₃);¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆)δ: 160.8, 160.7, 134.8, 134.7, 108.3, 108.2, 98.7, 98.6, 61.8, 61.7, 55.4, 33.6, 32.3, 16.5, 16.4。

1.2.3 (1E)-(2,4-二甲氧基)-2-(3,5-二甲氧基)苯乙烯(中间体III)的合成 在150 mL三口瓶中加入甲醇钠 1.47 g, 0 ℃时在氮气保护条件下,加入中间体II(6.52 g, 22.62 mmol)与THF(30 mL)的混合溶液,室温下搅拌1 h,在0 ℃条件下,缓慢加入中间体I(7.20 g, 22.64 mmol)与THF(30 mL)的混合溶液,搅拌至反应完全(12 h),将反应混合物倒入冷却(0 ℃)的饱和NH₄Cl溶液中,搅拌30 min,分出有机相,水层用(3×25 mL)乙酸乙酯萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,回收溶剂,得到棕色液体产品(中间体III)7.84 g,收率85%。

中间体III:¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7.41(m, 12H, Ar-H), 7.09(m, 1H, Ar-H), 6.82(d, *J*=2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.68(dd, *J*=8.8, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.65(d, *J*=2 Hz, 2H, Ar-H), 6.41(t, *J*=2 Hz, 1H, Ar-H), 5.21(s, 2H, CH₂), 5.13(s, 2H, CH₂) 3.76(s, 6H, CH₃);¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆)δ: 161.14, 159.80, 157.35, 140.41, 137.60, 137.26, 128.94, 128.91, 128.37, 128.33, 127.89, 119.29, 107.29, 104.19, 101.30, 99.77, 70.17, 69.59, 55.60, 40.69, 40.40, 40.20, 39.99, 39.78, 39.57, 39.26。

1.2.4 4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚(TM)的合成 在100 mL三口瓶中加入中间体III(3 g, 6.63 mmol),甲醇丙酮混合溶剂(*V/V*=1/4)

50 mL, 5% Pd/C 0.61 g, 密闭反应体系,氮气置换3次后通入氢气,缓慢加热到60 ℃,开始氢化,常压条件下反应至体系不再吸收氢气。过滤,滤饼用(3×25 mL)上述甲醇丙酮混合溶剂萃取,回收催化剂,萃取液合并,回收溶剂,残留物经柱层析纯化,得到黄色透明液体,加入100 mL丙酮中,搅拌30 min,过滤,干燥至恒重,得到米白色固体产品1.31 g,收率72%。

4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚:m.p. 76~78 ℃。IR(KBr), *v*/cm⁻¹: 3 132, 2 925, 1 615, 1 521, 1 431, 1 144, 815。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆)δ: 6.81(d, *J*=8 Hz, 1H, Ar-H), 6.34(m, 4H, Ar-H), 6.16(dd, *J*=8, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 3.31(s, 6H, OCH₃), 2.72(m, 4H, CH₂)。HRMS(ESI) calcd for C₁₆H₁₈O₄[M+H]⁺ 274.120 5, found 275.115 0。

1.3 DPPH 自由基清除活性测定

通过测定二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基的清除能力评价4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚(TM)的抗氧化活性,并将3种常见美白剂苯乙基间苯二酚(Phenylethyl Resorcinol, PR)、α-熊果苷(Alpha-Arbutin, AA)、光甘草定(Glabridin, GLA)作为阳性对照。参照Mensor等^[25]的方法,用无水乙醇将TM和PR、AA、GLA分别配制成不同浓度的溶液作为待测液,DPPH用无水乙醇配置成0.2 mmol/L的溶液。在3 mL测活体系中,依次加入1 mL待测液、2 mL DPPH溶液,1 mL待测液、2 mL无水乙醇,1 mL无水乙醇、2 mL DPPH溶液,于比色皿中混合均匀,静置30 min,分别测定3组体系517 nm处的吸光度A_i、A_j、A₀,每组测定3次取平均值,并计算清除率

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%。$$

1.4 酪氨酸酶抑制活性测定

对酪氨酸酶的活性抑制作用包括对单酚酶和二酚酶的抑制,参考文献[26],对4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚(TM)的酪氨酸酶活性抑制作用作出评价,并将3种常见美白剂苯乙基间苯二酚(phenylethyl resorcinol, PR)、α-熊果苷(alpha-arbutin, AA)、光甘草定(glabridin, GLA)作为阳性对照。以L-酪氨酸为底物,探究目标化合物对酪氨酸酶单酚酶的抑制作用;以L-多巴为底物,探究目

标化合物对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用。配制 pH = 6.8、0.5 mol/L 的 PBS 缓冲液，将 TM 和 PR、AA、GLA 分别溶解于 DMSO 中，用 PBS 缓冲液稀释至不同浓度作为待测液，DMSO 浓度为 3%，酪氨酸酶利用 PBS 缓冲液配制为酶活力为 50 U/mL 的溶液，利用 PBS 缓冲液将 L-酪氨酸和 L-多巴分别配制为 6、0.5 mmol/L 的溶液作为底物溶液。在 3 mL 测活体系中，依次加入 0.5 mL 底物溶液、0.5 mL 待测溶液、1.5 mL PBS 缓冲液、0.5 mL 酪氨酸酶溶液，0.5 mL 底物溶液、0.5 mL 待测溶液、2 mL PBS 缓冲液，0.5 mL 底物溶液、2 mL PBS 缓冲液、0.5 mL 酪氨酸酶溶液，0.5 mL 底物溶液、2.5 mL PBS 缓冲液，于比色皿中混合均匀(需加有酶溶液的体系，在 30 ℃ 恒温水浴锅中水浴 15 min 后，再加入酶溶液)，分别测定 4 组体系 475 nm 处的吸光度 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 ，每组测定 3 次取平均值，并计算酪氨酸酶抑制率：

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}\right) \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚的合成设计

通过对白藜芦醇衍生物的研究，确定了目标化合物 TM 的结构，即 4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚。本文采用逆合成分析法^[27-30]得出合成 TM

所需要的起始中间体及相关原料：将 TM 添加官能团^[28]，变成中间体 A (图 2)，对 A 进行双键切断^[29]得到两类合成子 (Synthon)：2,4-二羟基苯甲叉基片段 (Synthon 1 和 Synthon 3) 和 3,5-二甲氧基苯甲叉基片段 (Synthon 2 和 Synthon 4)。

双键主要通过 Wittig^[31]、Grignard^[32] 及 Wittig-Horner^[33] 反应构建。Wittig 反应副产物三苯基磷氧化物难以除去，造成分离提纯困难，且所用的三苯基磷对环境污染较大；Grignard 反应中，金属镁需要特殊处理，步骤复杂，在制备 Grignard 试剂时会因其自身偶联导致副产物增加；相比之下，Wittig-Horner 反应是用亚磷酸三乙酯代替三苯基磷制得磷叶立德，磷酸酯碳负离子的亲核性很强，在温和条件下即可与多种醛、酮进行亲核加成；反应生成的副产物磷酸盐 $[(RO)_2POO]^- Na^+$ 易溶于水，使之极易从反应混合体系中迅速分离，后处理相对更为简单，因此 Wittig-Horner 反应更适合于化合物 A 的合成^[34-35]。

通过以上分析，暂时得出 Synthon 1~4 分别对应等效化合物 B、II、IV、V (图 2a)。经过结构分析，化合物 B 为一种常见原料，可直接购得；化合物 II 则可通过亚磷酸三乙酯与市售化合物 C 合成得到；化合物 IV 因无法形成所需要的磷酸酯碳负离子(磷酸酯碳负离子的亲核性很强，酚羟基氢原子不能与之共存)，而被舍弃；化合物 V 实际存在，因化合物 IV 无法形成对应的碳负离子，无研究价

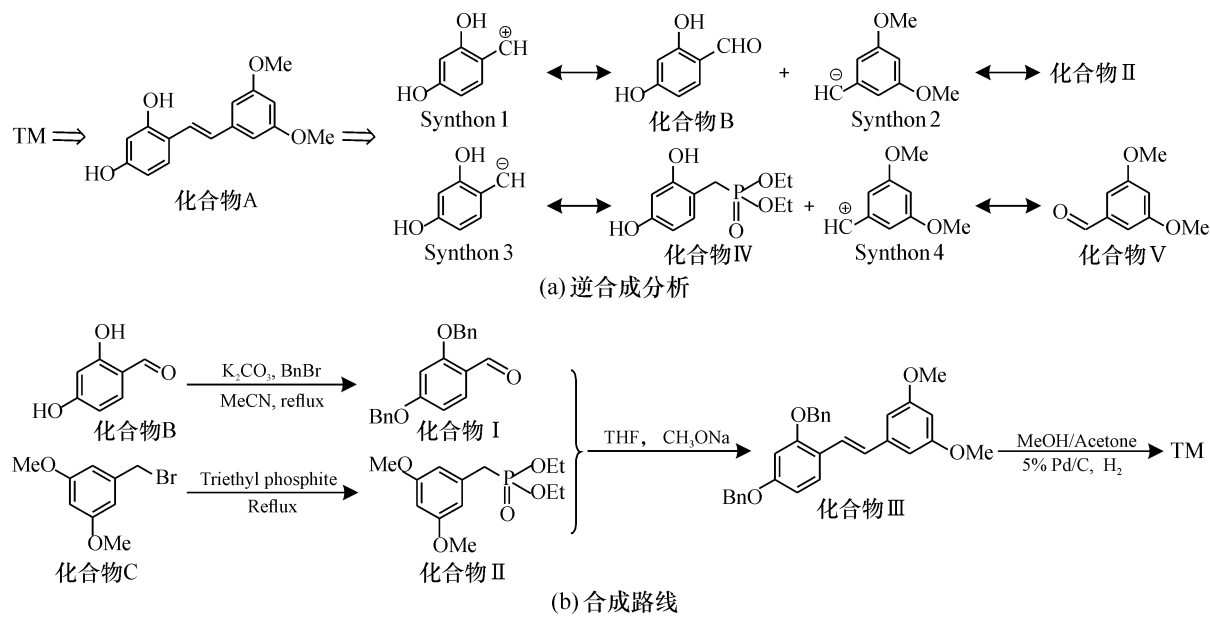


图 2 目标分子的逆合成分析与合成路线

Fig. 2 Reverse synthetic analysis and synthesis of TM

值。由此确定由化合物 B 与化合物 II 进行反应,但化合物 B 上的酚羟基依旧会对由化合物 II 形成的磷叶立德结构产生干扰,为此,对化合物 B 分子中的酚羟基应该加以保护,结合中间产物 A 合成过程中的催化氢化影响,选择形成二苄基醚来保护羟基^[36-37]。由此形成 TM 最终合成路线(图 2b)。

2.2 合成工艺探讨

2.2.1 中间体 I 合成条件确定 中间体 I 的合成过程为酚羟基经苄基醚保护的过程,参考文献[38-39],合成过程可以按照 S_N2 过程进行:2,4-二羟基苯甲醛与碳酸钾作用形成芳氧基负离子,再从溴原子背面进攻苄溴中心碳原子,形成取代产物;也可以按照 S_N1 历程进行:即 2,4-二羟基苯甲醛与碳酸钾作用形成的芳氧基负离子与苄溴解离的苄基正离子直接作用形成苄基醚(保护基)。故该合成过程中反应速率及收率与苯氧负离子、苄溴碳正离子的浓度都有很大关系。本文考察了溶剂种类、投料比、碳酸钾用量等因素对中间体 I 收率的影响,结果见表 1~3。

表 1 溶剂种类对中间体 I 收率的影响

Table 1 Effect of kinds of solvent on the yield of Intermediate I

序号	溶剂	收率/%
1	丙酮*	27.8
2	乙腈	73.1
3	DMF	79.5

注: $n(2,4\text{-二羟基苯甲醛}):n(\text{苄溴}):n(\text{碳酸钾})=1.00:1.00:1.00$, 反应时间 6 h, 反应温度 82 ℃; * 作溶剂为回流反应。

表 2 反应物投料比对中间体 I 收率的影响

Table 2 Effect of ratio of reagents on the yield of Intermediate I

序号	$n(2,4\text{-二羟基苯甲醛}):n(\text{苄溴})$	收率/%
1	1.00:1.00	73.1
2	1.00:1.05	77.2
3	1.00:1.10	78.1
4	1.00:1.15	78.9

注: $n(2,4\text{-二羟基苯甲醛}):n(\text{碳酸钾})=1.00:1.00$, 反应时间 6 h, 反应温度 82 ℃。

表 3 无水碳酸钾用量对中间体 I 收率的影响

Table 3 Effect of dosage of potassium carbonate on the yield of Intermediate I

序号	$n(2,4\text{-二羟基苯甲醛}):n(\text{碳酸钾})$	收率/%
1	1.0:1.0	77.2
2	1.0:1.1	80.2
3	1.0:1.2	83.5
4	1.0:1.3	79.1

注: $n(2,4\text{-二羟基苯甲醛}):n(\text{苄溴})=1.0:1.05$, 反应时间 6 h, 反应温度 82 ℃。

由表 1 可知,丙酮作溶剂时中间体 I 产率很低(27.80%),这是因为丙酮沸点仅 56.5 ℃,即使回流反应,温度较低,反应不充分。乙腈与 DMF 作溶剂时中间体 I 的收率较高,分别为 73.1%、79.5%,但使用 DMF 作溶剂时,后处理过程繁琐,产品中易夹带溶剂,不易除净,因此后续实验中均选择乙腈作为反应溶剂。

由表 2 可知,苄溴比例增加,中间体 I 收率有所提高,但不太明显,苄溴易挥发,且对眼睛具有较强刺激性,结合经济因素,选择投料比为 $n(2,4\text{-二羟基苯甲醛}):n(\text{苄溴})=1.00:1.05$ 比较合适。

由表 3 可知,随着无水碳酸钾用量的增加,中间体 I 收率先增后降,主要原因是碳酸钾用量增加,酚氧基负离子增多有利于反应发生,但碳酸钾过多时,酚氧基负离子可能与自身醛基发生反应,形成副产物。因此,选择碳酸钾的用量为 $n(2,4\text{-二羟基苯甲醛}):n(\text{碳酸钾})=1.0:1.2$ 较为适宜。

2.2.2 中间体 II 合成条件确定 亚磷酸三乙酯常温常压下为液体,因此在合成中间体 II 过程中,使用过量亚磷酸三乙酯作为溶剂,有利于 3,5-二甲氧基苄溴的完全反应。合成反应为典型的 Arbuzov 重排反应^[40],一般要求较高反应温度与较长反应时间。因此,本文主要考察了反应温度、反应时间对中间体 II 收率的影响,结果见表 4~5。

表 4 反应温度对中间体 II 收率的影响

Table 4 Effect of temperature on the yield of Intermediate II

序号	反应温度/℃	收率/%
1	125	64.9
2	135	70.6
3	145	71.3
4	155	71.9

注: 反应时间 8 h。

表 5 反应时间对中间体 II 收率的影响

Table 5 Effect of reaction time on the yield of Intermediate II

序号	反应时间/h	收率/%
1	8	70.6
2	10	78.4
3	12	89.3
4	14	90.7

注: 反应温度 135 ℃。

由表 4 可知,中间体 II 收率随着温度的升高有所提高,但不太明显,温度高使热能损耗增加,工业化成本就越高;温度过高还会影响回流平稳状态,生成的溴乙烷气体容易冲料,综合考虑,选择

反应温度为 135 ℃。

由表 5 可知，收率随着反应时间延长而提高，但是当反应时间达到 12 h 时，继续延长时间，收率提高不太明显，同时，高温反应持续时间越长热能损耗也越多，考虑工业化成本，选择反应时间为 12 h 比较合适。

2.2.3 中间体Ⅲ合成条件确定 中间体Ⅲ的合成过程中，中间体Ⅱ中与磷原子直接相连的亚甲基在强碱甲醇钠(大部分文献采用氢化钠作为碱)作用下，脱去质子，生成碳负离子，接着与中间体Ⅰ醛基发生亲核加成反应，其加成产物消除磷酸二乙酯形成中间体Ⅲ(一种烯烃)。考察了溶剂种类、中间体Ⅰ与中间体Ⅱ不同投料比以及碱用量对中间体Ⅲ收率的影响，结果见表 6~8。

表 6 溶剂种类对中间体Ⅲ收率的影响

Table 6 Effect of kinds of solvent on the yield of Intermediate Ⅲ

序号	溶剂	收率/%
1	甲苯	67.5
2	THF	78.1
3	DMF	80.2

注： $n(\text{Ⅰ}):n(\text{Ⅱ}):n(\text{NaOMe})=1.00:1.00:1.00$ ，反应温度 0 ℃，反应时间 12 h。

表 7 反应物投料比对中间体Ⅲ收率的影响

Table 7 Effect of ratio of reagents on the yield of Intermediate Ⅲ

序号	$n(\text{Ⅰ}):n(\text{Ⅱ})$	收率/%
1	1.00:1.00	78.1
2	1.00:1.05	81.6
3	1.00:1.10	82.1
4	1.00:1.15	82.4

注： $n(\text{Ⅰ}):n(\text{甲醇钠})=1.00:1.00$ ，反应温度 0 ℃，反应时间 12 h。

表 8 甲醇钠用量对中间体Ⅲ收率的影响

Table 8 Effect of dosage of sodium methoxide on the yield of Intermediate Ⅲ

序号	$n(\text{Ⅰ}):n(\text{甲醇钠})$	收率/%
1	1.0:1.0	81.6
2	1.0:1.1	82.2
3	1.0:1.2	84.8
4	1.0:1.3	81.5

注： $n(\text{Ⅰ}):n(\text{Ⅱ})=1.00:1.05$ ，反应温度 0 ℃，反应时间 12 h。

由表 6 可知，甲苯作溶剂时，收率较低，主要原因在于甲醇钠不溶于甲苯，致使碳负离子浓度很低，因此产率较低。相比之下，THF 与 DMF 作为溶剂时，中间体Ⅲ的收率较高，分别为 78.1% 和 80.2%，但 DMF 作溶剂时，处理过程繁琐，产品中易夹带溶剂而不易除净，因此后续实验中均选择

THF 作为反应溶剂。

由表 7 可知，随着中间体Ⅱ比例增加，一定程度上会提高反应收率，但提高幅度不太明显，且中间体Ⅱ合成原料较为昂贵，综合考虑，本文选择投料比为 $n(\text{Ⅰ}):n(\text{Ⅱ})=1.00:1.05$ 。

由表 8 可知，随着甲醇钠用量的增加，反应收率先增后降，可能是由于甲醇钠过量会破坏中间体Ⅱ的结构，因此选择甲醇钠的用量为 $n(\text{Ⅰ}):n(\text{甲醇钠})=1.0:1.2$ 。

2.2.4 目标化合物(TM)合成条件确定 将中间体Ⅲ中苄基脱去，同时将苯环之间的乙烯双键还原为单键。催化氢化脱苄基反应应用 5% Pd/C 作催化剂，在温和条件下即可实现，且不会对原料中甲氧基造成影响。此类型反应多为吸热和分子数增加的反应，较高温度和较低压力对反应有利，用 Pd/C、H₂ 脱苄基同时会将乙烯双键还原，简化了合成工艺^[41]。实验发现，溶剂的极性、反应温度与催化剂用量对催化氢化反应的影响非常大。因此，考察了溶剂种类、反应温度及催化剂用量对收率的影响，结果见表 9~11。

表 9 溶剂种类对 TM 收率的影响

Table 9 Effect of kinds of solvent on the yield of TM

序号	$V_{\text{丙酮}}/V_{\text{甲醇}}$	收率/%
1	甲醇	35.2
2	2	43.4
3	4	55.1
4	6	51.8

注： $m(5\% \text{ Pd/C}):m(\text{Ⅲ})=1:2$ ，反应温度 50 ℃，反应时间 12 h。

表 10 反应温度对 TM 收率的影响

Table 10 Effect of temperature on the yield of TM

序号	反应温度/℃	收率/%
1	50	55.1
2	55	58.3
3	60	62.7
4	65	62.9

注：溶剂为丙酮/甲醇($V/V=4/1$)， $m(5\% \text{ Pd/C}):m(\text{Ⅲ})=1:2$ ，反应时间 12 h。

表 11 催化剂用量对中间体 TM 收率的影响

Table 11 Effect of dosage of Pd/C on the yield of TM

序号	$m(5\% \text{ Pd/C}):m(\text{Ⅲ})$	收率/%
1	1.00:20.0	62.7
2	1.00:10.0	71.8
3	1.00:8.0	72.1
4	1.00:4.0	72.3

注：反应温度 60 ℃，反应时间 12 h。

由表 9 可知,随着混合溶剂中丙酮用量增加,目标产物收率提高,这可能是因为原料在丙酮中溶解性较大,混合溶剂中加入丙酮提高了原料的溶解,产物的收率增大。但当丙酮与甲醇体积比超过 4:1 时, TM 收率反而下降,这可能是由于丙酮用量过大,会被催化氢化,造成催化剂额外消耗,因此本文选择混合溶剂丙酮/甲醇 = 4/1 (体积比) 作为后续研究的反应溶剂。

由表 10 可知,随着反应温度的升高, TM 收率也逐渐升高, 60 ℃ 以后, 收率升高幅度趋于平缓, 因此本文选择反应温度为 60 ℃。

由表 11 可知,随着催化剂用量增加, TM 收率也随之增高, 当催化剂用量为 $m(5\% \text{ Pd/C}) : m(\text{Ⅲ}) = 1.00 : 10.0$ 时, TM 收率最高, 达到 71.8%, 继续增加催化剂用量, TM 收率增高的幅度较小, 考虑经济成本, 本文选择催化剂用量为 $m(5\% \text{ Pd/C}) : m(\text{Ⅲ}) = 1.00 : 10.0$ 。

2.2 性能研究

2.2.1 目标化合物(TM)对 DPPH 自由基的清除作用 TM 与阳性对照组清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 如表 12 所示, 清除 DPPH 自由基能力的强弱顺序为: $\text{TM} > \text{PR} > \text{AA} > \text{GLA}$, PR、AA、GLA 作为现在市场上美白效果较为优良的美白剂, 都表现出较强的 DPPH 自由基清除活性。即具有较强的抗氧化性, TM 经过与这几种美白剂进行对比, 表现出更强的抗氧化性。

2.2.2 目标化合物对酪氨酸酶活性的抑制作用以 L-酪氨酸为底物时, TM 与阳性对照组对酪氨酸酶单酚酶抑制活性的 IC_{50} 见表 13。TM 与阳性对照

组对酪氨酸酶单酚酶都表现为抑制作用。抑制活性强弱顺序为: $\text{TM} > \text{GLA} > \text{PR} > \text{AA}$, 通过对比, 证明了 TM 对酪氨酸酶单酚酶优良的抑制活性。

以 L-多巴为底物时, TM 与阳性对照组对酪氨酸酶二酚酶抑制活性的 IC_{50} 见表 14。TM 与阳性对照组中 PR、GLA 对酪氨酸酶二酚酶都表现为抑制作用, 抑制活性由强到弱的顺序为: $\text{GLA} > \text{TM} > \text{PR}$, 而 AA 没有抑制活性, 对酪氨酸酶二酚酶表现为激活作用。通过对比, 也证明了 TM 对酪氨酸酶二酚酶具有比较强的抑制活性。

表 14 TM 对酪氨酸酶单酚酶抑制效应
Table 14 Effects of synthetic products on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase

序号	样品	$\text{IC}_{50} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
1	TM	0.032 2
2	PR	0.057 5
3	GLA	0.007 6

3 结论与展望

本文以 2,4-二羟基苯甲醛、3,5-二甲氧基苄溴为原料, 设计合成了目标产物 4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚。目标产物合成路线简单, 虽然用到了氢气, 但是在常压状态下进行反应, 条件温和、实验操作简便。经过核磁、质谱等分析方法鉴定, 最终产物结构符合目标产物。

经过 DPPH 自由基清除活性与酪氨酸酶抑制活性测定实验, 目标产物与阳性对照组都呈现出较好的 DPPH 自由基清除活性与较好的酪氨酸酶抑制活性。在实验过程中, 目标化合物清除 DPPH 自由基能力最强, 其 IC_{50} 为 0.011 mmol/L; 对酪氨酸酶单酚酶抑制活性也最强, 其 IC_{50} 为 0.001 37 mmol/L。苯乙基间苯二酚(PR)、 α -熊果苷(AA)、光甘草定(GLA)^[42-45] 已经被证实是美白效果优良的美白剂, 可知, 目标化合物不仅具有优良的美白活性, 而且同时具备更强的抗氧化性。4-(3,5-二甲氧基苯乙基)-1,3-苯二酚(TM)的合成成为具有酪氨酸酶抑制活性、抗氧化性协同作用的新型美白剂设计合成提供了参考, 但能否作为化妆品美白功效成分和药物成分, 还需对其细胞毒性作更深入的研究。

参考文献:

[1] Wang Y, Hao M M, Sun Y, et al. Synergistic promotion on

表 12 TM 对 DPPH 自由基的清除效应

Table 12 Effects of synthetic products on DPPH free radical scavenging

序号	样品	$\text{IC}_{50} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
1	TM	0.011
2	PR	0.084
3	AA	0.195
4	GLA	0.385

表 13 TM 对酪氨酸酶单酚酶抑制效应

Table 13 Effects of synthetic products on the monophenolase activity of mushroom tyrosinase

序号	样品	$\text{IC}_{50} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
1	TM	0.001 37
2	PR	0.005 82
3	AA	3.940
4	GLA	0.005 1

- tyrosinase inhibition by antioxidants [J]. *Molecules*, 2018, 23 (1): 106. doi: 10.3390/molecules23010106.
- [2] Puri P, Nandar S K, Kathuria S, et al. Effects of air pollution on the skin: a review [J]. *Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology*, 2017, 83 (4): 415–423.
- [3] 徐大勇, 宋玉果. 谷胱甘肽对氧自由基介导的细胞信号传导的调节 [J]. *卫生毒理学杂志*, 2001, 15 (1): 52–54.
- [4] Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A, et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review [J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2014, 30 (7): 513–523.
- [5] 赵保路, 黄可泰. 自由基与皮肤老化 [J]. *生命的化学*, 1991, 11 (5): 32–34.
- [6] Parvez S, Kang M, Chung H S, et al. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries [J]. *Phytotherapy Research*, 2007, 21 (9): 805–816.
- [7] Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017, 32 (1): 403–425.
- [8] Nesterov A, Zhao J F, Jia Q. Natural tyrosinase inhibitors for skin hyperpigmentation [J]. *Drugs of the Future*, 2008, 33 (11): 945–954.
- [9] Liu S H, Pan I H, Chu I M. Inhibitory effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol on tyrosinase activity and melanogenesis [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30 (6): 1135–1139.
- [10] Lee S Y, Baek N, Nam T G. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31 (1): 1–13.
- [11] 贾爱群, 孙洋, 王建新. 美白剂的发展现状及其黑色素抑制机理的研究进展 [J]. *日用化学工业*, 2001, 31 (1): 41–44.
- [12] Smit N, Vicanova J, Pavel S. The hunt for natural skin whitening agents [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10 (12): 5326–5349.
- [13] 蔡昆達. 以光激发黑色素来清除细胞环境中之活性氧之探讨 [D]. 台北: 国立中央大学, 2011.
- [14] Nofsinger J B, Liu Y, Simon J D. Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, 32 (8): 720–730.
- [15] Tada M, Kohno M, Niwano Y. Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2010, 46: 224–228.
- [16] Gülçin I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure activity insight [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2010, 11 (1): 210–218.
- [17] Bukowiecka-Matusiak M, Turek L A, Wozniak L A. Natural phenolic antioxidants and their synthetic derivatives [J]. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, 2014, 243 (3): 4047–4061.
- [18] Kim S, Ko H, Park J E, et al. Design, synthesis, and discovery of novel *trans*-stilbene analogues as potent and selective human cytochrome P450 1B1 inhibitors [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, 45 (1): 160–164.
- [19] 丁德军. 基于双键修饰的白藜芦醇类似物的癌预防活性及其机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
- [20] Roldos V, Nakayama H, Rolón M, et al. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: in silico, in vitro and in vivo activity studies [J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2008, 43 (9): 1797–1807.
- [21] Cardile V, Lombardo L, Spatafora C, et al. Chemo-enzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2005, 33: 22–33.
- [22] Kageura T, Matsuda H, Morikawa T, et al. Inhibitors from rhubarb on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages: structural requirements of stilbenes for the activity [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2001, 9 (7): 1887–1893.
- [23] Xiao Y, Chen H F, Song C, et al. Pharmacological activities and structure-modification of resveratrol analogues [J]. *Pharmazie*, 2015, 70: 765–771.
- [24] Chatsumpun N, Chuanasa T, Sritularak B, et al. Oxyresveratrol: structural modification and evaluation of biological activities [J]. *Molecules*, 2016, 21 (4): 489. doi: 10.3390/molecules21040489.
- [25] Mensor L L, Menezes F S, Leitão G G, et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method [J]. *Phytotherapy Research*, 2001, 15: 127–130.
- [26] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2003, 18 (6): 491–496.
- [27] 李江胜, 李浔, 黄朋勉, 等. 逆合成分析法在精细有机合成工艺学教学中的应用 [J]. *广州化工*, 2010, 38 (7): 254–255.
- [28] 嵇耀武. 有机物合成路线设计技巧 [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 6–17.
- [29] 斯图尔特·沃伦. 有机合成 切断法探讨 [M]. 丁新腾, 译. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1986: 141–147.
- [30] 薛永强, 张蓉. 现代有机合成方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 130.
- [31] Vedejs E, Marth C F. Mechanism of the wittig reaction; the role of substituents at phosphorus [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1988, 110 (12): 3948–3958.
- [32] Surrey A R. Grignard reaction [M] // Name reactions in or-

- ganic chemistry, s. l.: Academic Press, 1961: 124 – 125.
- [33] Boutagy J, Thomas R. Olefin synthesis with organic phosphonate carbanions [J]. Chemical Reviews, 1974, 74 (1): 87 – 99.
- [34] 丁刘刚, 晏日安, 黄雪松, 等. 白藜芦醇合成过程中双键形成方法的研究 [J]. 现代食品科技, 2007, 23 (1): 48 – 49.
- [35] S · K · 南迪, 刘吉云, A · M · 涅斯捷罗夫, 等. 皮肤增白 (增亮) 化合物系列 [P]. 中国: CN102838460A, 2012 – 12 – 26.
- [36] Wuts P G M. 有机合成中的保护基——羟基 (含 1,2-二醇, 1,3-二醇) 的保护 [M]. 许胜, 译. 上海: 华东理工大学出版社, 2016: 86 – 141.
- [37] 武钦佩, 李善茂. 保护基化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 69 – 71.
- [38] 丁敬敏, 丁漪. 在 S_N2 反应中为什么 Nu 从背面进攻 [J]. 大学化学, 2000, 15 (2): 43 – 44.
- [39] 文婕英. 关于卤代烃取代反应历程的判断 [J]. 甘肃教育, 2007: 63 – 64.
- [40] 李晓霞, 晏日安, 段翰英. 白皮杉醇的合成 [J]. 精细化工, 2011, 28 (5): 475 – 478.
- [41] 戴云生, 董守安, 潘再富, 等. 催化氢解脱苄基 Pd/C 催化剂的研究和应用 [J]. 工业催化, 2011, 19 (4): 7 – 10.
- [42] 郝谜谜, 王艳, 刘园园, 等. 苯乙基间苯二酚抑制黑色素形成的机理研究 [J]. 日用化学工业, 2018, 48 (5): 293 – 298.
- [43] 孙雷, 姚德立, 姚德坤, 等. α -熊果苷的研究进展 [J]. 中国林副特产, 2016 (3): 87 – 90.
- [44] 骆从艳, 慕春海, 王园姬, 等. 光甘草定抑制酪氨酸酶及体外抗氧化活性的研究 [J]. 中药材, 2010, 33 (11): 1776 – 1780.
- [45] 王瑞雪, 赵珍, 钟雁, 等. 几种常用美白剂协同作用研究 [J]. 日用化学工业, 2014, 44 (10): 572 – 576.

Synthesis and properties of a novel whitening agent 4-(3,5-dimethoxyphenethyl)-1,3-benzenediol

SU Zhen-ning¹, YIN Zhi-gang¹, WANG Pu², FAN Kai-qi¹, QIAN Heng-yu¹, ZHANG Tong-yan¹,
WANG Rui-juan¹, YU Shu-yan¹

(1. College of Material and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;
2. Shanghai Pucui Biotechnology Co. Ltd, Shanghai 201506, China)

Abstract: A novel whitening agent 4-(3,5-dimethoxyphenethyl)-1,3-benzenediol was synthesized from 2,4-dihydro-xybenzaldehyde and 3,5-dimethoxybromobenzyl by benzylation reaction, Arbuzov reaction, Wittig-Horner reaction and catalytic hydrogenation reaction. The chemical structure was determined by ^1H NMR, ^{13}C NMR and IR. The biological activities were evaluated by DPPH free radical scavenging assay and tyrosinase activity inhibition assay. The DPPH free radical semi-scavenging concentration of the title compound ($\text{IC}_{50} = 0.011 \text{ mmol/L}$) was significantly lower than that of phenethyl resorcinol ($\text{IC}_{50} = 0.084 \text{ mmol/L}$), α -arbutin ($\text{IC}_{50} = 0.195 \text{ mmol/L}$) and glabridin ($\text{IC}_{50} = 0.385 \text{ mmol/L}$). When L-tyrosine was used as the substrate, the semi-inhibitory concentration of the title compound against tyrosinase monophenolase ($\text{IC}_{50} = 0.00137 \text{ mmol/L}$) was significantly lower than that of phenethyl resorcinol ($\text{IC}_{50} = 0.00582 \text{ mmol/L}$), α -arbutin ($\text{IC}_{50} = 3.94 \text{ mmol/L}$) and glabridin ($\text{IC}_{50} = 0.0051 \text{ mmol/L}$). When L-dopa was used as a substrate, the semi-inhibitory concentration of the title compound against tyrosinase diphenolase ($\text{IC}_{50} = 0.0322 \text{ mmol/L}$) was lower than that of phenethyl resorcinol ($\text{IC}_{50} = 0.0575 \text{ mmol/L}$), but higher than that of glabridin ($\text{IC}_{50} = 0.0076 \text{ mmol/L}$). The semi-inhibitory concentration of α -arbutin to tyrosinase diphenolase is negative, which is manifested by the activation of tyrosinase diphenolase. These results indicate that the title compound has a higher inhibitory activity against tyrosinase.

Key words: whitening agent; synthesis; inhibition of tyrosinase activity; antioxidant