

花旗松素衍生物的设计、合成及抗炎活性构效关系研究

胡春玲^{1,2*}, 周宗宝², 向远航², 彭小芝², 叶晓川², 田娟¹

¹荆楚理工学院药物合成与优化湖北省重点实验室 荆门 448000; ²湖北中医药大学药学院 武汉 430065

摘要:以邻羟基苯乙酮衍生物和苯甲醛衍生物为原料,经缩合、氧化、水解生成 A 环和/或 B 环取代的花旗松素衍生物 4a~4o。以邻氨基苯乙酮衍生物和苯甲醛衍生物为原料,经同样的方法得到 C 环改变的花旗松素衍生物 4p~4r。共设计合成 19 个化合物,其结构经核磁共振氢谱、碳谱分析确证。测定所合成化合物对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的体外抗炎活性。结果表明:A 环上的 5,7 位酚羟基是其发挥活性的关键性基团;B 环 4 位的卤素取代基对于活性影响极大,特别是氟原子的取代效果尤其显著;改变 C 环的结构都会使其炎症因子的抑制作用降低。

关键词:花旗松素衍生物;查尔酮;抗炎活性

中图分类号:R914.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.10.09

Design, Synthesis and Structure-Activity Relationship of Taxifolin Derivatives as Anti-inflammatory Agents

HU Chun-ling^{1,2*}, ZHOU Zong-bao², XIANG Yuan-hang², PENG Xiao-zhi², YE Xiao-chuan², TIAN Juan¹

¹Hubei Key Laboratory of Drug Synthesis and Optimization, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China;

²School of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: The 2-hydroxyl chalcone derivatives 3a~3o were prepared by condensation of 2'-hydroxyhyponone derivatives and phenyl aldehyde derivatives under alkali. After oxidation and hydrolysis, A and/or B-ring substituted taxifolins 4a~4o were obtained. Then C-ring varied taxifolins 4p~4r were synthesized by oxidative hydrolysis of 2'-azyl chalcone derivatives 3p~3r, which were prepared by method above. 19 compounds were synthesized and their structures were confirmed by ¹H NMR and ¹³C NMR. To best of our knowledge, 13 of them were unknown in the literature. The anti-inflammatory activity of synthesized compounds was evaluated against RAW264.7 cell in vitro. The preliminary results indicated that 4,4c,4i,4l and 4m showed good anti-inflammatory activity ($P < 0.001$). Structure-activity relationship showed that the 5,7-dihydroxyl substitution located in the A-ring was critical for anti-inflammatory activity. The 4/-fluorine substitution located in the B-ring has excellent influence. The anti-inflammatory activity reduced or disappeared when C-ring was varied.

Key words: taxifolin derivatives; chalcone; anti-inflammatory activity

花旗松素(Taxifolin)化学名为(2R,3R)-5,7,3',4'-四羟基二氢黄酮醇,最早由日本学者 Fukui 从针叶植物 *Chamaecyparis obtuse* (Sieb. et Zucc.) Endl. 叶中提取出来,为一种葡萄糖苷的苷元。后又有学者从多种植物中分离出花旗松素及其衍生物^[1,2],并开启了花旗松素的药理活性研究。结果表明,花旗松素具有良好的抗氧化、抗菌、抗肿瘤等生物活

性,其抗炎^[3,4]活性尤为显著,对某些炎症因子都具有极佳的抑制作用,引起了广泛关注。然而,花旗松素作为一类微量二氢黄酮醇类化合物,在自然界分布相对有限,提取非常困难,限制了花旗松素的广泛应用。

花旗松素是一种典型的二氢黄酮醇类化合物,这类化合物的结构为黄酮类 C-2,3 位的双键氢化后的衍生物,当 C-3 位上带有羟基时,通称为二氢黄酮醇类(Dihydroflavonols)。目前二氢黄酮醇衍生物的合成主要有下列四种方法:①查耳酮氧化闭环法^[5,6],查耳酮的氧化闭环法又被称为 AFO(Algar-Flynn-Oyamada)反应,这一方法最早被应用于黄酮

收稿日期:2017-11-22 接受日期:2018-03-13

基金项目:国家自然科学基金(31370378);荆楚理工学院药物合成与优化湖北省重点实验室开放基金资助项目(OPP2016YB05)

*通信作者 Tel:86-27-68890101; E-mail:huchunling2007@126.com

类化合物的合成。但是这种方法具有无可避免的缺点:反应步骤过多,后处理麻烦,产率低,无法进行大批量的合成。②氢化还原法^[7],该法可以得到纯度较高的二氢黄酮醇类化合物。但是,作为原料的黄酮醇类化合物不易得到,同时不适用于不同类别的

二氢黄酮醇衍生物。③生物合成法^[8],这种方法对于设备要求苛刻,成本高且只能得到特定的二氢黄酮醇,无法推广使用。④水解法^[9],二氢黄酮醇苷在植物体内的含量一般比二氢黄酮醇低,难以得到大量的二氢黄酮醇苷,故此方法极为少见。

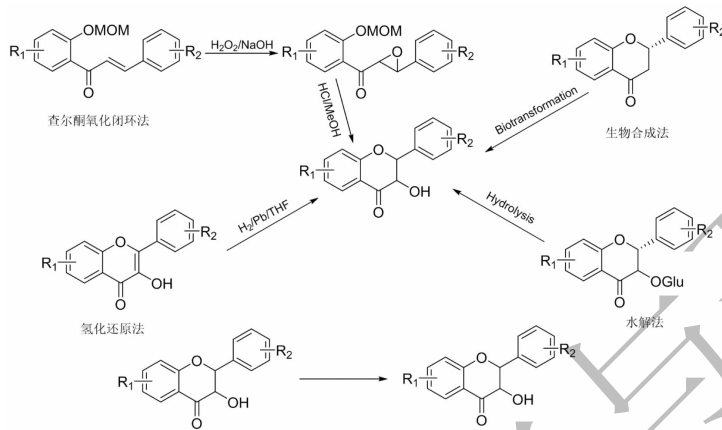


图1 文献的合成方法和本文的合成路线

Fig. 1 The synthetic approaches reported in literature and used in this paper

本文利用课题组前期开发的合成花旗松素衍生物的新方法^[10],选用邻羟基(或邻氨基)查尔酮衍生物为原料,对花旗松素衍生物进行化学合成及结构修饰研究,得到A、B、C环修饰的花旗松素衍生物,并通过炎性细胞因子进行活性评价,探讨结构与抗炎活性之间的关系,为进一步设计新的抗炎活性二氢黄酮醇类化合物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

400 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker Advance-400 FT,德国 Bruker 公司);WRS 微机熔点仪(上海世诺物理光学仪器有限公司);re-52aa 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);zf-i 型紫外分析仪(上海精科有限公司)。苯甲醛衍生物、邻羟基苯乙酮衍生物、邻氨基苯乙酮衍生物、氢氧化钠(粒状)、二乙胺、30% H_2O_2 、THF、乙酸乙酯、石油醚(60~90)等,所有试剂除特殊说明均为分析纯。

花旗松素(中国食品药品检定研究所);小鼠巨噬细胞 RAW264.7(武汉大学细胞典藏中心);胎牛血清(美国 Gibco 公司);RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);DMSO(美国 Gibco 公司);脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司);ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 邻羟基查耳酮衍生物的合成^[11-13]

依次将邻羟基苯乙酮衍生物(10.0 mmol)、苯甲醛衍生物(10.0 mmol)溶解于30 mL 95%的乙醇中,搅拌使其溶解完全,缓慢滴入15 mL 15%的NaOH溶液,室温条件下继续搅拌24 h;溶液颜色由开始的浅黄色逐渐变深,直至变为深红色。反应完毕后,缓慢向反应体系中滴加36%的乙酸直至pH=6,有大量黄色固体生成,继续搅拌30 min,过滤,洗涤,干燥,所得固体无需纯化用于下一步实验。

1.2.2 A环和/或B环修饰花旗松素衍生物的合成

将相应的2'-羟基查耳酮衍生物(1.0 mmol)、二乙胺(3.0 mmol)和15 mL无水四氢呋喃加入50 mL圆底烧瓶中,搅拌均匀,缓慢滴加0.3 mL 30% H_2O_2 (3.0 mmol),滴加完毕后保持温度在-5℃以下,继续搅拌直至TLC检测反应完全,缓慢向反应体系中加入20 mL冷水,静置直至固体沉淀完全,过滤,冷水洗涤,干燥,粗产品用石油醚和乙酸乙酯重结晶得目标产物4,4a~4o。

1.2.3 C环结构改变的花旗松素衍生物的合成

首先将邻氨基苯乙酮衍生物和苯甲醛衍生物反应,按照1.2.1的操作方法制备中间体2'-氨基查耳酮衍生物;然后依次取2'-氨基查耳酮衍生物(1.0 mmol)、二乙胺(3.0 mmol)和15 mL无水四氢呋喃

加入 50 mL 圆底烧瓶中,按照 1.2.2 的方法合成 C 环结构改变的花旗松素衍生物,所得固体沉淀完全后,过滤,冷水洗涤,干燥,粗产品用石油醚和乙酸乙酯重结晶得目标产物 4p~4r。

1.2.4 抗炎活性实验

取对数生长期的 RAW264.7 细胞,用胰蛋白酶消化后,取含 1% 胎牛血清的 H-DMEM 培养基制成 8×10^4 个/mL 单细胞悬液,以每孔 100 μ L 均匀接种于 96 孔板中,置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱培养,12 h 后

弃去旧培养基。加入含 LPS(1 μ g/mL) 的完全培养基,继续培养 24 h,造模完成。将所有化合物进行分组,按照 5、10、20 μ M 三个浓度给药。给药后 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱中培养,24 h 后收集细胞上清,离心后按 ELISA 试剂盒检测炎症因子 TNF- α 的含量。

2 结果

2.1 目标化合物的合成

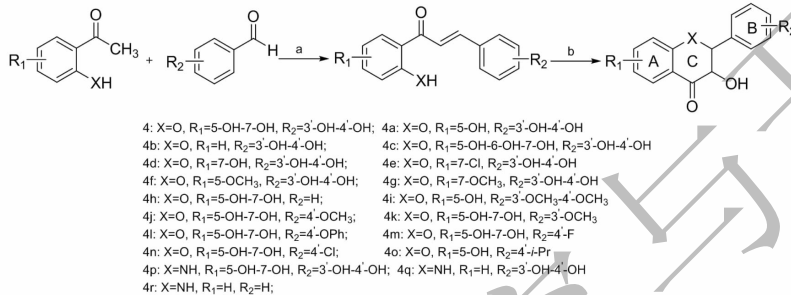


图 2 花旗松素衍生物的合成

Fig. 2 Synthetic route for the synthesis of taxifolin derivatives

注:试剂和条件:(a) NaOH, C₂H₅OH, r.t., 24h; (b) H₂O₂, (C₂H₅)₂NH, THF, -5 $^{\circ}$ C, 2 h。

Note: Reagents and conditions: (a) NaOH, C₂H₅OH, r.t., 24h; (b) H₂O₂, (C₂H₅)₂NH, THF, -5 $^{\circ}$ C, 2 h.

2-(3/, 4/-二羟苯基)-3, 5, 7-三羟基色满-4-酮(4)^[14]: 白色固体, 产率 70%。mp. 229 ~ 230 $^{\circ}$ C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.91 (s, 1H), 10.83 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.75 (s, 2H), 5.92 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.77 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.99 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.51 (dd, *J* = 6.2, 11.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 198.25, 167.23, 163.77, 163.01, 146.22, 145.38, 128.48, 119.84, 115.56, 100.94, 96.43, 95.43, 83.51, 72.01。

2-(3/, 4/-二羟苯基)-3, 5-二羟基色满-4-酮(4a)^[15]: 白色固体, 产率 67%。mp. 201 $^{\circ}$ C ~ 204 $^{\circ}$ C, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.01 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 6.89 ~ 7.24 (m, 3H), 5.74 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.17 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.54 (dd, *J* = 12.4, 2.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 196.86, 162.19, 157.20, 145.86, 145.69, 135.43, 129.42, 120.05, 115.58, 115.41, 112.26, 111.04, 105.45, 83.26, 72.61。

2-(3/, 4/-二羟苯基)-3-羟基色满-4-酮(4b)^[15]: 白色固体, 产率 59%。mp. 101 ~ 104 $^{\circ}$ C, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.05 (s, 1H),

9.00 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.09 ~ 7.11 (m, 2H), 6.95 ~ 6.80 (m, 2H), 5.68 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.10 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.60 (dd, *J* = 11.6, 3.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 194.24, 156.38, 145.86, 145.69, 136.49, 129.42, 128.38, 121.78, 120.05, 118.27, 118.25, 115.58, 115.41, 83.26, 73.06。

2-(3/, 4/-二羟苯基)-3, 5, 6, 7-四羟基色满-4-酮(4c)^[16]: 白色固体, 产率 66%。mp. 254 ~ 256 $^{\circ}$ C, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.99 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 6.98 ~ 7.14 (m, 3H), 6.52 (s, 1H), 5.67 (s, 1H), 5.03 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 12.0, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 195.93, 159.34, 154.48, 153.94, 145.86, 145.69, 132.72, 128.84, 120.05, 115.58, 115.41, 101.11, 94.85, 83.73, 72.35。

2-(3/, 4/-二羟苯基)-3-羟基-5, 7-二甲氧基色满-4-酮(4d)^[15]: 白色固体。mp. 179 ~ 180 $^{\circ}$ C, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.99 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 6.98 ~ 7.14 (m, 3H), 5.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.85 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.72 (d, *J* = 3.6 Hz,

1H), 5.03 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.49 (dd, $J = 11.2, 3.6$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.84 (s, 3H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 189.70, 165.13, 163.70, 161.70, 145.86, 145.69, 128.84, 120.05, 115.58, 115.41, 103.70, 93.80, 93.10, 83.25, 72.50, 56.13, 55.87。

2-(3/, 4/-二羟苯基)-3-羟基-7-氯色满4-酮(4e): 白色固体, 产率 62%。mp. 166 ~ 168 °C, 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.11 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.55 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.89 ~ 7.24 (m, 4H), 5.70 (s, 1H), 5.06 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 11.6$, 1H), 3.91 (s, 3H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 195.39, 155.33, 145.86, 145.69, 135.79, 129.42, 127.06, 126.96, 120.05, 119.76, 119.12, 115.58, 115.41, 83.26, 73.06。

2-(3/, 4/-二羟苯基)-3-羟基-5-甲氧基色满4-酮(4f): 白色固体, 产率 68%。mp. 172 ~ 174 °C, 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.09 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 6.89 ~ 7.24 (m, 3H), 5.70 (s, 1H), 5.03 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 12.0$, 1H), 3.91 (s, 3H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 195.92, 159.87, 157.04, 145.86, 145.69, 135.09, 129.42, 120.05, 115.58, 115.41, 113.16, 108.88, 107.47, 83.26, 72.61, 56.45。

2-(3/, 4/-二羟苯基)-3-羟基-7-甲氧基色满4-酮(4g)^[15]: 白色固体, 产率 55%。mp. 154 ~ 155 °C, 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.02 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 6.08 ~ 6.14 (m, 2H), 6.98 ~ 7.14 (m, 3H), 7.88 (s, 1H), 5.71 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.51 (dd, $J = 11.6, 2.4$ Hz, 1H), 3.78 (s, 3H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 194.22, 167.40, 162.72, 145.88, 145.79, 129.42, 129.10, 120.05, 115.59, 115.11, 112.00, 111.25, 101.65, 83.16, 73.16, 55.64。

2-苯基-3,5,7-三羟基色满4-酮(4h)^[14]: 白色固体, 产率 57%。mp. 177 ~ 180 °C, 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.91 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 5.94 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.19 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.64 (dd, $J = 6.4, 11.2$ Hz, 1H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 198.05, 167.28, 164.27, 163.53, 136.86, 128.66, 128.32, 127.99, 101.24, 96.72, 96.07, 83.10, 71.70。

2-(3/, 4/-二甲氧苯基)-3,5,7-三羟基色满4-酮(4i)^[14]: 白色固体, 产率 61%。mp. 169 ~ 170 °C, 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.90 (s, 1H), 11.01 (s, 1H), 6.89 ~ 7.07 (m, 3H), 5.90 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.79 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.65 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.97 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.49 (dd, $J = 12.4, 4.0$ Hz, 1H), 3.89 (s, 6H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 197.64, 167.28, 164.27, 163.48, 148.66, 148.21, 129.50, 120.57, 111.15, 111.05, 101.24, 96.72, 96.07, 83.60, 72.41, 56.03, 55.95。

2-(4/-甲氧苯基)-3,5,7-三羟基色满4-酮(4j)^[14]: 白色固体, 产率 63%。mp. 140 ~ 142 °C, 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.91 (s, 1H), 10.85 (s, 1H), 7.40 ~ 7.44 (m, 2H), 6.92 ~ 7.15 (m, 2H), 6.04 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.73 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.93 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.42 (dd, $J = 12.4, 4.0$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 197.98, 167.21, 164.09, 163.43, 159.50, 129.65, 128.10, 113.91, 101.24, 96.72, 96.07, 84.18, 73.18, 55.35。

2-(3/-甲氧苯基)-3,5,7-三羟基色满4-酮(4k)^[14]: 白色固体, 产率 62%。mp. 134 ~ 136 °C, 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.02 (s, 1H), 10.98 (s, 1H), 6.92 ~ 7.15 (m, 2H), 7.40 ~ 7.44 (m, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.68 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.69 (dd, $J = 11.6, 3.6$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 197.98, 167.21, 164.09, 163.43, 159.50, 129.65, 128.10, 113.91, 101.24, 96.72, 96.07, 84.18, 73.18, 55.35。

2-(2/, 3/, 4/-三羟苯基)-3,5,7-三羟基色满4-酮(4l): 白色固体, 产率 56%。mp. 169 ~ 171 °C, 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.88 (s, 1H), 10.84 (s, 1H), 7.10 ~ 7.44 (m, 5H), 7.06 ~ 6.99 (m, 4H), 6.10 ~ 6.25 (m, 2H), 6.05 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.75 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.85 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.43 (dd, $J = 12.0, 3.6$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H); 13 C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 198.05, 167.28, 164.27, 163.53, 156.74, 155.19, 132.10, 129.87, 129.35, 124.49, 120.50, 118.69, 101.24, 96.72, 96.07, 84.18, 73.18。

2-(4/-氟苯基)-3,5,7-三羟基色满4-酮(4m)^[17]: 白色固体, 产率 66%。mp. 213 ~ 215

$^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.89 (s, 1H), 10.78 (s, 1H), 7.02 ~ 7.10 (m, 2H), 6.88 ~ 6.92 (m, 2H), 5.94 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.79 (s, 1H), 4.97 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 12.4$, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 198.05, 167.28, 164.27, 163.57, 163.53, 161.56, 131.12, 131.09, 127.02, 126.95, 115.17, 115.01, 101.24, 96.72, 96.07, 83.56, 73.18。

2-(4/-氯苯基)-3,5,7-三羟基色满-4-酮(4n): 白色固体, 产率 61%。mp. 189 ~ 192 $^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.01 (s, 1H), 10.98 (s, 1H), 7.09 ~ 7.14 (m, 2H), 6.91 ~ 6.99 (m, 2H), 5.94 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.69 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.87 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.29 (dd, $J = 12.0, 3.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 198.05, 167.28, 164.27, 163.53, 134.11, 132.29, 128.75, 128.67, 101.24, 96.72, 96.07, 83.56, 73.18。

2-(4/-异丙苯基)-3,5,7-三羟基色满-4-酮(4o): 白色固体, 产率 62%。mp. 156 ~ 157 $^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.94 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.09 ~ 7.14 (m, 2H), 6.91 ~ 6.99 (m, 2H), 6.12 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.70 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.35 (dd, $J = 12.0, 3.6$ Hz, 1H), 2.68 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 1.20 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 198.07, 167.31, 164.30, 163.55, 148.94, 132.67, 126.06, 125.56, 101.24, 96.72, 96.07, 83.56, 73.18, 33.61, 24.00。

2-(3/,4/-二羟苯基)-3,5,7-三羟基-2,3-二氢喹啉-4(1H)-酮(4p): 白色固体, 产率 55%。mp. > 300 $^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.85 (s, 1H), 10.75 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 6.98 ~ 7.14 (m, 3H), 5.90 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.85 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.79 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 4.29 (dd, $J = 13.2, 4.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 199.04, 164.32, 163.88, 153.45, 145.37, 145.32, 136.30, 120.53, 116.42, 115.41, 100.54, 97.27, 95.56, 72.00, 61.41。

2-(3/,4/-二羟苯基)-3-羟基-2,3-二氢喹啉-4(1H)-酮(4q): 白色固体, 产率 57%。mp. 225 ~ 228 $^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.01 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 6.08 ~ 7.24 (m, 6H), 5.97 (d,

$J = 2.4$ Hz, 1H), 5.89 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.80 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 4.32 (dd, $J = 13.2, 3.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 195.89, 148.73, 145.37, 145.32, 136.30, 133.30, 128.79, 120.67, 120.53, 118.95, 116.57, 116.42, 115.41, 71.98, 61.41。

2-苯基-3-羟基-2,3-二氢喹啉-4(1H)-酮(4r)^[18]: 白色固体, 产率 60%。mp. 158 ~ 160 $^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.45 ~ 8.04 (m, 3H), 7.22 ~ 7.29 (m, 4H), 6.88 ~ 6.94 (m, 2H), 5.77 (s, 1H), 5.34 (s, 1H), 4.57 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 4.29 (d, $J = 13.2$, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 195.89, 148.73, 138.13, 133.30, 128.81, 128.79, 128.15, 127.51, 120.67, 118.95, 116.57, 71.98, 60.76。

辅助材料(Supporting information): 化合物 4, 4a ~ 4r 的原始 NMR 谱图。

2.2 化合物的生物活性测试

花旗松素衍生物抗炎活性结果见表 1。

表 1 目标化合物对 RAW264.7 细胞的体外抗炎活性 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Anti-inflammatory activity of target compounds against RAW264.7 cell in vitro ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	TNF- α	组别 Group	TNF- α
LPS	100 \pm 4.19	4i	56.08 \pm 4.36 * * *
Taxifolin	54.67 \pm 2.24 * * *	4j	73.64 \pm 3.54 * *
4	53.18 \pm 1.41 * * *	4k	65.65 \pm 3.65 * *
4a	84.55 \pm 2.23 *	4l	57.56 \pm 1.84 * * *
4b	88.36 \pm 1.69	4m	18.72 \pm 1.27 * * *
4c	22.98 \pm 2.69 * * *	4n	92.45 \pm 2.67
4d	70.22 \pm 2.13 * *	4o	90.58 \pm 3.37
4e	93.83 \pm 2.58	4p	68.34 \pm 2.83 * *
4f	82.97 \pm 2.83 *	4q	84.33 \pm 2.42 *
4g	72.98 \pm 2.93 * *	4r	82.65 \pm 2.51 *
4h	73.91 \pm 1.76 * *	0	0

注: 与 LPS 刺激组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。
Note: Compare with LPS group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

实验结果采用 SPSS19.0 统计软件对所测数据进行分析, 各组间比较采用单因素方差分析检验。

3 讨论

3.1 邻羟基查尔酮衍生物

取代邻羟基苯乙酮 1a ~ 1o 与苯甲醛衍生物 2a ~ 2o 在碱性条件下进行缩合得到中间体查尔酮衍生物 3a ~ 3o, 该方法成本低, 收率高, 反应条件温

和,是合成取代查尔酮的常用方法。

3.2 A环和/或B环修饰花旗松素衍生物

目前花旗松素衍生物的合成通常采用经典的AFO反应^[19]。该反应存在两个主要问题:①邻羟基查耳酮在H₂O₂作用下转化为环氧化物中间体,在碱性条件下酚氧负离子对环氧化物进行亲核进攻,环化为二氢黄酮醇,但是该产物极易氧化为黄酮醇,导致收率下降。②若环氧化物中的酚氧负离子进攻羰基 α -位,则生成副产物五元环的橙酮。上述两个因素使得此类化合物的合成困难,副产物高、收率低且价格昂贵。本课题组前期对AFO反应进行了改进,特别对反应条件进行了优化,从而得到合成花旗松素衍生物的新方法^[10]。本文采用该方法在无水THF中,温度保持-5℃,在H₂O₂/DEA体系下,保持2'-羟基(或氨基)查耳酮:DEA:H₂O₂ = 1:3:3摩尔比,使取代查耳酮高效地转化为花旗松素衍生物**4a**~**4o**。

3.3 C环结构改变的花旗松素衍生物

黄酮类化合物主要是以不同的C环结构进行区分命名的。因此,独特的C环结构对于花旗松素衍生物而言十分重要。采用生物电子等排体的方法,我们将邻羟基苯乙酮衍生物替换为邻氨基苯乙酮衍生物,在碱性条件下缩合得到中间体邻氨基查耳酮衍生物**3p**~**3r**,最后在新方法的基础上,合成了一系列C环改变的花旗松素衍生物**4p**~**4r**。

3.4 化合物的生物活性分析

以LPS介导炎症反应,诱导巨噬细胞释放大量的炎症因子,各种炎症因子之间相互联系、彼此影响不断地自分泌或旁分泌,从而使炎症反应进一步加重。TNF- α 是炎症反应中最早出现的重要炎性因子之一,在炎症反应初期有较强的致炎作用。本文采用ELISA法测定花旗松素衍生物作用于LPS诱导下RAW264.7细胞的TNF- α 分泌量,进行抗炎活性评价。体外抗炎活性数据见表1。结果表明:化合物**4**,**4c**,**4i**,**4l**和**4m**表现出较强的抗炎活性($P < 0.001$),差异极其显著。其中**4**与母体花旗松素活性相当,说明合成的化合物**4**与天然提取的花旗松素在抗炎活性上不存在显著的差异,消除构型可能对抗炎活性的影响。化合物**4c**和**4m**强于阳性对照花旗松素及**4**,抗炎活性显著,是最有潜力的化合物。化合物**4i**和**4l**强于刺激组,但弱于阳性对照花旗松素,说明B环酚羟基的醚化后其活性会稍微降低,羟基越多活性越好,去掉酚羟基,其活性会降低。

3.5 构效关系分析

通过表1数据并结合本课题组前期的研究,我

们发现:对A环进行修饰时,化合物**4**的抗炎活性与阳性对照花旗松素相当。化合物**4c**的炎症因子抑制作用最强,而其它几种化合物(**4a**~**4g**)低于阳性花旗松素组,但这一结果表明对于花旗松素衍生物而言,A环上的5,7位酚羟基是其发挥活性的关键性基团。

对B环进行修饰时,化合物**4i**和**4l**的活性要优于**4j**,**4k**,其抑制效果与**4**相差不多,推断B环酚羟基的醚化对活性影响并不大,但去掉酚羟基,其活性会降低。化合物**4n**和**4o**都表现出较差的抑制作用,但化合物**4m**却表现极佳,是抗炎效果最好的化合物,这说明B环4'位的取代基对于活性影响极大,氟取代效果最好。

化合物**4p**~**4r**的抗炎效果明显弱于化合物**4**及阳性对照花旗松素组,这一结果表明改变C环的结构都会使其炎症因子的抑制作用降低,保留花旗松素衍生物C环的完整性对于保持其抗炎活性至关重要。

总之,A环上的5,7位酚羟基是其发挥活性的关键性基团,羟基越多活性越好;B环4'位的取代基对于活性影响是极大的,特别是氟原子的取代效果尤其显著;改变C环的结构都会使其炎症因子的抑制作用降低。

4 结论

本文设计合成了19个花旗松素衍生物,其中7个化合物未见文献报道。对所合成化合物进行结构表征以及抗炎活性评价。结果表明化合物**4**,**4c**,**4i**和**4m**表现出较强的炎性因子(TNF- α)抑制活性。根据抗炎活性数据,分析得出花旗松素衍生物的抗炎构效关系:①A环的结构对于抗炎活性是很重要的,5,7位酚羟基对于抗炎活性是必须的,在花旗松素衍生物A环6位增加一个酚羟基,其抗炎活性也随之增强。②对于花旗松素衍生物来说,B环的结构对其活性影响是显著的,其中当B环4'位被氟原子取代时,其抗炎活性会增强。③花旗松素衍生物的C环结构是其发挥抗炎作用的必需结构,对于C环的结构改变都会使其抗炎活性降低。这些研究结果有助于进一步设计新的抗炎活性药物。

参考文献

- 1 Liu TT(刘婷婷),Yuan QP(袁其朋). Separation and purification of Taxifolin from *Larix gmelini* sawdust using process planning of column chromatography [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2016,28:1093-1101.
- 2 Yang H(杨惠),Ding LF(丁林芬),Tu WC(涂文超),et

- al. Two new iridoids from *Viburnum congestum* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 4:543-548.
- 3 Hossam MA, Fahad MA, Ahmed E, et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Chrozophora tinctorial* [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 13:74-80.
 - 4 Win T, Htwe, TT, Shwe HH, et al. Lavandulyl flavanones from the stems of *Hypericum calycinum* L. [J]. *Chem Biodivers*, 2012, 9:1198-1204.
 - 5 Crozier A, Delrio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds [J]. *Aspects Med*, 2010, 31(6):446-467.
 - 6 Sinha S, Lopes DH, Du Z, et al. Lysine-specific molecular tweezers are broad-spectrum inhibitors of assembly and toxicity of amyloid proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133:16958-16969.
 - 7 Mecocci P, Polidori MC, Praticó D. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822:631-638.
 - 8 Sato M, Murakami K, Uno M, et al. Site-specific inhibitory mechanism for amyloid β 42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the lys residues [J]. *J Bio Chem*, 2013, 288:23212-23213.
 - 9 Shi L(石磊), Ban SR(班树荣), Feng YE(冯秀娥), et al. Synthesis and antitumor activities of flavanone derivative [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2010, 20:176-180.
 - 10 Zhou ZB(周宗宝), Wang H(王红), Tao KQ(陶凯奇), et al. A facile method to prepare dihydroflavonol derivatives [J]. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2016, 36:2841-2845.
 - 11 Wang QF(王巧峰), Chen H(陈惠), Liu P(刘鹏), et al. Asymmetric epoxidation of α,β -enone catalyzed by chiral amine [J]. *Chin. J. Org. Chem* (有机化学), 2009, 29:1617-1620.
 - 12 Dyrager C, Wickström M, Fridén-Saxin M, et al. Inhibitors and promoters of tubulin polymerization: Synthesis and biological evaluation of chalcones and related dienones as potential anticancer agents [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2011, 19:2659-2665.
 - 13 Zheng Y, Wang X, Gao S, et al. Synthesis and antifungal activity of chalcone derivatives [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29:1804-1810.
 - 14 Jiang WJ, Ishiuchi KI, Furukawa M, et al. Stereospecific inhibition of nitric oxide production in macrophage cells by flavanonols: synthesis and the structure-activity relationship [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2015, 23:6922-6929.
 - 15 Jiang WJ, Kitanaka S, Takamiya T, et al. Stereospecific inhibition of nitric oxide production in macrophage cells by flavanonols: Synthesis and the structure-activity relationship [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2017, 25:4277-4284.
 - 16 Piccinelli AL, De Simone F, Passi S, et al. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (Burrito), a folk paraguayana tea [J]. *J Agr Food Chem*, 2004, 52:5863-5868.
 - 17 Chemler JA, Yan Y, Leonard E, et al. Combinatorial mutasynthesis of flavonoid analogues from acrylic acids in microorganisms [J]. *Org Lett*, 2007, 9:1855-1858.
 - 18 Gao F, Johnson KF, Schlenoff JB. Ring closing and photooxidation in nitrogen analogues of 3-hydroxy flavones [J]. *J Chem Soc Perkin 2*, 1996, 2:269-273.
 - 19 Algar J, Flynn JP. A new method for the synthesis of flavonols [J]. *Proc Roy Irish Acad*, 1934, B42:1-8.

(上接第 1810 页)

- 7 Jia YW, Shen J, Xie HT, et al. Analysis of plasma protein binding of helicid using equilibrium dialysis method: an investigation on species differences [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:30-35.
- 8 US Food and Drug Administration. FDA guidance for industry, bioanalytical method validation (Draft Guidance) [S]. Boekville, MD, USA, 2013.
- 9 Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma clearance [J]. *J vet Pharmacol Therap*, 2004, 27:415-425.
- 10 Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma terminal half-life [J]. *J vet Pharmacol Therap*, 2004, 27:427-439.
- 11 Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Volumes of distribution [J]. *J vet Pharmacol Therap*, 2004, 27:441-453.
- 12 Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Bioavailability and its assessment [J]. *J vet Pharmacol Therap*, 2004, 27:455-466.
- 13 Gu Y, Wang GJ, Sun JG, et al. Quantitative determination of ginsenoside Rh2 in rat biosamples by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47:2257-2268.
- 14 Xie HT, Wang GJ, Sun JG, et al. Pharmacokinetic characterization of ginsenoside Rh2, an anticancer nutrient from ginseng, in rats and dogs [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 818:167-173.
- 15 Jia YW, Li X, Xie HT, et al. Analysis and pharmacokinetics studies of gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol in dogs using ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 99:83-88.
- 16 Chen Z, Jiang Xh, Ren J, et al. Investigation on pharmacokinetics of helicid in rats [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33:2662-2666.