新型黄酮半乳糖缀合物的合成与生物活性研究

娄定辉 汪钢强 夏立 陈凌 汪秋安*

(湖南大学化学化工学院 长沙 410082)

摘要 以香叶木素或野漆树苷为原料, 经过 *O*-甲基化、酸性水解、*O*-苄基化和过氧丙酮(DMDO)氧化等反应步骤, 合成了 5,7,3',4'-四甲氧基黄酮醇(1), 5,7,3'-三苄氧基-4'-甲氧基黄酮醇(2), 5,7,4'-三甲氧基黄酮醇(3), 金合欢素(4)和 5,7-二羟基-4'-苄氧基黄酮(5), 运用“点击化学”方法, 将所合成黄酮类的炔基化合物 6~10 与 β -叠氮化乙酰基半乳糖通过铜催化的 1,3-偶极环加成反应链接起来, 合成了一系列未见文献报道的新型黄酮半乳糖缀合物 11~20. MTT 蛋白染色法体外抗肿瘤细胞生物活性测试发现, 化合物 11, 13 和 20 对白血病细胞(HL-60)、肝癌细胞(SMMC-7721)、乳腺癌细胞(MCF-7)、结肠癌细胞(SW480)和肺癌细胞(A-549)具有一定的抑制活性.

关键词 黄酮类; 半乳糖缀合物; 点击化学; 合成; 生物活性

Synthesis and Biological Activity of Novel Flavonoids Galactoconjugates

Lou, Dinghui Wang, Gangqiang Xia, Li Chen, Ling Wang, Qiu'an*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract Five flavonoids 5,7,3',4'-tetramethoxyflavonol (1), 5,7,3'-tribenzyloxy-4'-methoxy flavonol (2), 5,7,4'-trimethoxyflavonol (3), acacetin (4) and 5,7-dihydroxy-4'-benzyloxyflavone (5) were synthesized from diosmetin or rhoifolin by *O*-methylation, dehydrogenation, glycoside hydrolysis, *O*-benzylation and dimethyldioxirane (DMDO) oxidation. Based on “Click chemistry”, ten novel flavonoids galactoconjugates 11~20 were synthesized in good yield using copper-mediated 1,3-dipolar cycloaddition reactions of acetylgalactose azides and alkynyl-substituted flavonoids 6~10. Their biological activities against five human cancer cell lines were evaluated by the standard MTT method. The results showed that 11, 13 and 20 exhibited moderate cytotoxicity against HL-60, SMMC-7721, MCF-7, SW480 and A-549 cancer cell lines.

Keywords flavonoids; galactoconjugates; Click chemistry; synthesis; biological activity

黄酮糖苷类化合物广泛存在于自然界, 是许多药用植物中的有效成分, 它们大多具有抗心血管疾病、抗肿瘤、抗病毒和抗氧化等生物活性^[1]. 近几年, 我们^[2~4]对黄酮糖苷的合成及生物活性进行了研究, 并筛选出了部分具有良好抗肿瘤细胞生物活性的黄酮类化合物. 糖苷类化合物的合成方法一般是由糖基给体与受体在不同的催化条件下完成. 目前, 经文献报道的糖苷类化合物的合成方法约有 20 多种, 最常用的方法有 Koenigs-Knorr 法、相转移催化法和糖基三氯乙酰亚胺酯法^[5~7]. 但任何一种糖苷类化合物的合成方法都具有一定的局限性, 无法满足糖苷类化合物多样性的要求. 以相转移催化法为例, 一般需要无水碳酸钾等弱碱性物质为催化

剂, 四丁基溴化铵为相转移催化剂, 在室温下反应 10 h 以上才能得到糖苷类化合物. 在反应过程中, 碳酸钾等碱性物质会造成溴代乙酰糖的水解, 这直接影响了糖苷化反应的收率. 同时, 溴代乙酰糖类化合物在常温下不稳定, 易分解变质, 因此最好是现制现用, 而溴代乙酰糖的制备过程较繁琐, 这也在无形中增加了糖苷类化合物的制备难度.

半乳糖(Galactose)通常以 *D*-半乳糖苷的形式存在于大脑和神经组织中, 也是某些糖蛋白的重要成分, 它具有与肝细胞表面受体蛋白(ASGP-R)结合的特性. 研究表明许多药物经半乳糖修饰后均表现出良好的肝细胞靶向性^[8]. Click 化学是 2001 年诺贝尔化学奖获得者

* E-mail: wangQA@hnu.edu.cn

Received October 18, 2012; revised December 13, 2012; published online December 18, 2012.

Project supported by the Hunan Provincial Innovation Foundation for Postgraduate (No. CX2012B160) and the Science and Technology Planning Project of Hunan Province (No. 2011FJ3214).

湖南省研究生科研创新(No. CX2012B160)和湖南省科技计划(No. 2011FJ3214)资助项目.

Sharpless 提出的一种快速、高效、高选择性合成大量新化合物的可靠方法^[9]. 其中用端基炔和叠氮化合物的 1,3-偶极环加成反应, 在 Cu(I)催化下可得到区域选择性的 1,4-二取代的 1,2,3-三唑类, 是“Click”化学最典型的代表^[10]. 1,2,3-三唑环也是重要的药理活性基团. 5,7,3',4'-四甲氧基黄酮醇(1), 5,7,3'-三苄氧基-4'-甲氧基黄酮醇(2), 5,7,4'-三甲氧基黄酮醇(3), 金合欢素(4)和 5,7-二羟基-4'-苄氧基黄酮(5)(芹菜素)是 5 种具有良好抗肿瘤活性的黄酮类化合物^[11,12]. 为了筛选出活性更高、具有细胞靶向作用和药物代谢动力学更好的新型黄酮类药物. 我们将黄酮类化合物 1~5 与半乳糖通过 1,4-二取代的 1,2,3-三唑环连接, 合成了一系列新型黄酮半乳糖缀合物 11~20. 并用 MTT 蛋白染色法对所合成的

黄酮半乳糖缀合物进行了体外抗肿瘤细胞生物活性测试. 系列新型黄酮半乳糖缀合物的合成路线见 Scheme 1.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

熔点在 XRC-1 型显微熔点仪上测定, 温度未加校正; NMR 用 Bruker Am-400 型核磁共振仪测定(溶剂 CDCl₃ 或 DMSO-*d*₆, TMS 为内标); 质谱用 Agilent 1100 液-质联用仪或 ZAB-HS 型仪测定记录; 红外光谱用 FD-5DX 仪(KBr 压片)测定; 柱层析用硅胶(青岛海洋化工厂产品). 所用试剂和溶剂为化学纯或分析纯; 要求无水的溶剂均经除水和重蒸处理.

Scheme 1

香叶木素(diosmetin)按文献以橙皮苷为原料制备^[13]。野漆树苷(rhoifolin)、7,5,4'-三甲基黄酮醇(3)和金合欢素(4)按文献^[14]由柚皮苷制备。叠氮乙酰化半乳糖参考文献^[15]制备。

1.2 7,5,3',4'-四甲氧基黄酮(21)的合成

香叶木素(5.0 g, 16.6 mmol)溶解于 100 mL 丙酮中, 然后加入无水碳酸钾(31.1 g, 0.22 mol), 65 °C 加热回流搅拌 0.5 h 后, 缓慢滴加硫酸二甲酯(8.1 mL, 0.09 mol), 继续回流反应 6 h。TLC 监测反应过程, 当原料点消失时停止反应。过滤除去碳酸钾残渣, 蒸除溶剂, 剩余物用丙酮重结晶, 得亮黄色固体 3.2 g, 产率 57%。m.p. 190~192 °C[文献值^[16]: 190~194 °C]; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 3.93 (s, 3H, CH₃), 3.96 (s, 3H, CH₃), 3.97 (s, 3H, CH₃), 3.98 (s, 3H, CH₃), 6.57 (s, 1H, 3-H), 6.38 (s, 1H, 6-H), 6.62 (s, 1H, 8-H), 6.97 (d, $J=8.8$ Hz, 2'-H), 7.30 (d, $J=2.6$ Hz, 1H, 5'-H), 7.52 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, 6'-H); MS (FAB⁺) m/z : 343.3 [M+H]⁺。

1.3 7,5,3',4'-四甲氧基黄酮醇(1)的合成

将 21 (1.5 g, 4.6 mmol)溶于 140 mL 二氯甲烷/丙酮 (4:3)混合溶剂中, 加入碳酸钠/碳酸氢钠缓冲溶液 200 mL(其中有 Na₂CO₃ 8 g, NaHCO₃ 3.8 g 和 200 mL 水), 在室温下剧烈搅拌, 然后缓慢滴加 12 g 过硫酸氢钾复合盐的水溶液 140 mL, 大约 6 h 滴加完毕, 室温反应 15 h 过夜。次日再缓慢滴加 12 g 过硫酸氢钾复合盐的水溶液 140 mL, 大约 6 h 滴加完毕, 继续在室温条件下反应 15 h。在整个滴加和反应过程中, 始终保持反应体系的 pH 大约为 9。TLC 监测反应过程, 待原料点消失后停止反应, 静置分层, 分离出有机相, 用二氯甲烷洗涤水相, 合并有机相, 分别用饱和硫代硫酸钠和饱和食盐水各洗涤 3 次, 无水硫酸镁干燥, 过滤。最后将 5 mg 对甲苯磺酸加入滤液中, 在室温下搅拌反应约 1 h, 旋除溶剂, 剩余物用无水甲醇/二氯甲烷重结晶, 得黄色固体 1.40 g, 产率 90%。m.p. 172~176 °C[文献值^[17]: 195~197 °C]; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.96 (s, 3H, CH₃), 3.99 (s, 3H, CH₃), 4.08 (s, 3H, CH₃), 4.09 (s, 3H, CH₃), 6.56 (s, 1H, 3-OH), 6.37 (s, 1H, 6-H), 6.91 (s, 1H, 8-H), 7.01 (s, 1H, 5'-H), 7.81 (d, $J=6.4$ Hz, 2H, 2',6'-H); MS (FAB⁺) m/z : 359.3 [M+H]⁺。

1.4 4'-甲氧基-5,7,3'-三苄氧基黄酮(22)的合成

香叶木素(5.0 g, 16.6 mmol)溶解于 100 mL 丙酮中, 然后加入无水碳酸钾(31.1 g, 0.22 mol), 65 °C 加热回流搅拌 1.5 h 后, 缓慢滴加溴化苄(3.0 mL, 23.0 mmol), 继续回流反应 10 h。过滤除去碳酸钾残渣, 旋除溶剂, 剩余物用丙酮重结晶, 得亮黄色固体 5.6 g, 产率 62%。

m.p. 152~155 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.95 (s, 3H, OCH₃), 5.11 (s, 2H, C⁵-OCH₂Ph), 5.23 (s, 4H, C⁷-OCH₂Ph, C^{3'}-OCH₂Ph), 6.48 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 6-H), 6.59 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 8-H), 6.51 (s, 1H, 3-H), 6.97 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, 5'-H), 7.30~7.61 (m, 17H, 15H-Bn-Ar-H, 2'-H, 6'-H); MS (FAB⁺) m/z : 571.6 [M+H]⁺。

1.5 4'-甲氧基-5,7,3'-三苄氧基黄酮醇(2)的合成

2 的合成方法同 1, 以 22 为原料得黄色固体, 产率 87%。m.p. 158~160 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.96 (s, 3H, OCH₃), 5.13 (s, 2H, C⁵-OCH₂Ph), 5.24 (s, 4H, C⁷-OCH₂Ph, C^{3'}-OCH₂Ph), 6.49 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 6-H), 6.59 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.01 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, 5'-H), 7.81 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 2'-H), 7.53 (d, $J=2.8$, 4.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.30~7.64 (m, 15H, 15H-Bn-Ar-H); IR (KBr) ν : 3548, 3414, 3140, 2034, 1637, 1617, 1516, 1400, 1259, 1224, 1159, 1137, 1105, 834, 737, 697, 619, 535, 481 cm⁻¹; MS (FAB⁺) m/z : 587.6 [M+H]⁺。

1.6 4'-O-苄氧基芹菜素(5)的合成

取 50 mL 三口瓶, 加入野漆树苷(2.31 g, 4.0 mmol), 无水 K₂CO₃ (0.69 g, 5.0 mmol), 在氮气保护下, 加入无水 DMF 20 mL, 室温搅拌 0.5 h, 在慢慢滴加 BnBr (0.6 mL, 5.0 mmol), 在 90 °C 下搅拌 8 h。反应结束后, 将反应液冷至室温, 倒入 200 mL 冷水中。过滤, 滤饼用 50 mL 乙醇溶解, 在缓慢滴加浓硫酸(3 mL), 加热并回流 2 h。反应结束后, 将反应液冷至室温并过滤, 滤饼分别用饱和 KHCO₃ 溶液和水洗, 然后干燥, 最后得到的粗品用硅胶柱层析分离[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=4:1], 得到黄色固体 0.9 g, 产率为 63%。m.p. 304~306 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.92 (s, 1H, OH-5), 10.93 (s, 1H, OH-7), 8.04 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.33~7.49 (m, 5H, OCH₂C₆H₅), 7.19 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.88 (s, 1H, H-3), 6.52 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, H-8), 6.21 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, H-6), 5.23 (s, 2H, OCH₂C₆H₅); MS (FAB⁺) m/z : 361.3 [M+H]⁺。

1.7 3-O-炔丙基-5,7,3',4'-三甲氧基黄酮(6)的合成

将化合物 1 (340 mg, 1.0 mmol)溶于 100 mL 丙酮中, 再加入 552 mg (4.0 mmol)无水 K₂CO₃, 加热回流搅拌 30 min 后, 再向反应液中滴加溴丙炔 0.2 mL, 反应 12 h 后点板, 当发现没有原料点时停止反应。放置冷却反应液, 滤掉 K₂CO₃ 残渣, 再减压旋除溶剂。用乙酸乙酯重结晶, 干燥, 得白色固体 312 mg, 产率 79%。m.p. 148~150 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 4.98 (d, $J=2.4$ Hz, 2H, CH₂), 6.36 (d, $J=2.4$ Hz,

1H, 6-H), 6.52 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 8-H), 6.98 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, 5'-H), 7.83 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, 2'-H), 7.73 (dd, $J=1.2, 1.5$ Hz, 1H, 6'-H); MS (FAB⁺) m/z : 397.4 [M+H]⁺.

1.8 1-[N-1-(2,3,4,6-乙酰基-β-D-半乳糖)]-4-[3-O-亚甲基-(5,7,3',4'-四甲氧基黄酮醇)]-[1,2,3]-三唑(11)的合成

将化合物 **6** (396 mg, 1.0 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 然后加入 CuSO₄·5H₂O (25 mg, 0.1 mmol), TBAB (322 mg, 1.0 mmol), 维生素 C (35 mg, 0.2 mmol), 叠氮乙酰化半乳糖 (746 mg, 2.0 mmol), 搅拌均匀后, 加入 20 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液, 常温搅拌反应过夜. 反应液用二氯甲烷萃取 3 次, 干燥过滤, 减压旋除溶剂, 经硅胶柱层析[洗脱剂: $V(\text{石油醚})/V(\text{乙酸乙酯})=1:3$], 得白色粉末状晶体 648 mg, 产率 85%. m. p. 142~145 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.85, 2.01, 2.05, 2.26 (each s, 12H, OAc), 3.91, 3.93, 3.95, 3.99 (each s, 12H, OCH₃), 4.14~4.19 (m, 1H, 5''-H), 4.20~4.22 (m, 2H, 6''-H), 5.18~5.29 (m, 3H, 2''-H, CH₂), 5.54~5.60 (m, 2H, 3''-H, 4''-H), 5.83 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, 1''-H), 6.37 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 6-H), 6.53 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, 8-H), 6.98 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, 5'-H), 7.71 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 2'-H), 7.78 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 6'-H), 8.25 (s, 1H, CH); HRMS (FAB) calcd for C₃₆H₃₉N₃O₁₆Na [M+Na]⁺ 792.2228, found 792.2219.

1.9 1-[N-1-(β-D-半乳糖)]-4-[3-O-亚甲基-(5,7,3',4'-四甲氧基黄酮醇)]-[1,2,3]-三唑(16)的合成

在反应瓶中加入 20 mL 无水甲醇和少许的钠块, 保持 pH 在 8~9. 然后加入化合物 **11** (100 mg, 0.13 mmol), 反应液立即变成亮黄色. 在室温条件下搅拌反应 4 h 后, TLC 监测直至反应终点. 旋除溶剂, 经硅胶柱层析[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=1:2$], 得浅黄色固体 82 mg, 产率 92%. m. p. 188~190 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.63~3.65 (m, 1H, 4''-H), 3.66~3.72 (m, 3H, 2''-H, 3''-H, 5''-H), 3.72~3.76 (m, 2H, 6''-H), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (t, $J=5.6$ Hz, 1H, OH), 5.48 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, OH), 5.12 (s, 2H, CH₂), 5.38 (d, $J=4.4$ Hz, 1H, OH), 5.47 (d, $J=6.4$ Hz, 1H, OH), 5.48 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, 1''-H), 6.49 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 6-H), 6.83 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.01 (d, $J=9.6$ Hz, 2H, 5'-H), 7.67 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2',6'-H), 8.32 (s, 1H, CH); HRMS (FAB) calcd for C₂₈H₃₁N₃O₁₂Na [M+Na]⁺ 624.1806, found 624.1811.

1.10 4'-甲氧基-3-O-炔丙基-5,7,3'-三苄氧基黄酮(7)的合成

7 的合成方法同 **6**, 以 **2** 为原料得白色固体, 产率 84%. m. p. 148~150 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ :

2.17 (s, 1H, CH), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 4.86 (s, 2H, CH₂), 5.11 (s, 2H, C⁵-OCH₂Ph), 5.24 (s, 2H, C⁷-OCH₂Ph), 5.27 (s, 2H, C^{3'}-OCH₂Ph), 6.47 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, 6-H), 6.55 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.00 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, 5'-H), 7.82 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, 2'-H), 7.73 (dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, 1H, 6'-H), 7.30~7.64 (m, 15H, 15H-Bn-Ar-H); IR (KBr) ν : 3733, 3468, 2321, 2047, 1651, 1608, 1519, 1498, 1399, 1348, 1323, 1281, 1261, 1227, 1158, 1123, 1105, 1041, 1014, 828, 733, 696, 622 cm⁻¹; MS (FAB⁺) m/z : 625.7 [M+H]⁺.

1.11 1-[N-1-(2,3,4,6-乙酰基-β-D-半乳糖)]-4-[3-O-亚甲基-(4'-甲氧基-5,7,3'-三羟基黄酮醇)]-[1,2,3]-三唑(12)的合成

将化合物 **7** (312 mg, 0.5 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 然后加入 CuSO₄·5H₂O (12.5 mg, 0.05 mmol), TBAB (161 mg, 0.5 mmol), 维生素 C (18 mg, 0.1 mmol), 叠氮乙酰化半乳糖 (373 mg, 1.0 mmol), 搅拌均匀后, 加入 20 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液, 常温搅拌反应过夜. 反应液用二氯甲烷萃取三次, 干燥过滤, 减压旋除溶剂, 经硅胶柱层析[洗脱剂: $V(\text{石油醚})/V(\text{乙酸乙酯})=1:2$], 得白色粉末状晶体 426 mg.

将上述白色粉末状晶体 100 mg 加到 100 mL 三口烧瓶中, 然后加入 120 mg 5% Pd/C 和甲醇-四氢呋喃混合溶剂[$V(\text{甲醇}):V(\text{四氢呋喃})=1:1$] 30 mL, H₂ 保护下常温反应 5 h, TLC 点板监测反应, 当原料点消失, 停止反应, 过滤钯碳, 旋除溶剂, 经硅胶柱层析[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=1:3$], 得浅黄色固体 52 mg, 产率 78%. m. p. 138~140 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.73, 1.92, 1.97, 2.16 (each s, 12H, OAc), 5.38~5.43 (m, 2H, 6''-H), 3.84 (s, 3H, 4'-OCH₃), 5.24~2.27 (m, 1H, 2''-H), 4.08 (dd, $J=4.6, 4.8$ Hz, 1H, 3''-H), 3.97~3.99 (m, 1H, 4''-H), 5.17~5.19 (m, 2H, CH₂), 5.56 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, 1''-H), 4.09~4.12 (m, 1H, 5''-H), 6.20 (s, 1H, 6-H), 6.40 (s, 1H, 8-H), 7.02 (d, $J=4.3$ Hz, 1H, 5'-H), 7.46 (dd, $J=1.6, 1.6$ Hz, 2H, 6'-H, 2'-H), 8.38 (s, 1H, CH), 9.38 (s, 1H, OH), 10.89 (s, 1H, OH), 12.65 (s, 1H, OH); HRMS (FAB) calcd for C₃₃H₃₃N₃O₁₆Na [M+Na]⁺ 750.1759, found 750.1755.

1.12 1-[N-1-(β-D-半乳糖)]-4-[3-O-亚甲基-(4'-甲氧基-5,7,3'-三羟基黄酮醇)]-[1,2,3]-三唑(17)的合成

17 的合成方法同 **16**, 以 **12** 为原料得浅黄色固体, 产率 93%. m. p. 189~192 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.43~3.46 (m, 1H, 4''-H), 3.48~3.52 (m, 3H, 6''-H, 3''-H), 3.70 (d, $J=6.8$ Hz, 1H, 5''-H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (t, $J=6.4$ Hz, 1H, 2''-H), 4.68 (br, 1H,

OH), 5.15 (s, 2H, CH₂), 5.24 (s, 1H, OH), 5.38 (s, 1H, OH), 5.45 (s, 2H, 2OH), 5.46 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, 1''-H), 6.18 (s, 1H, 6-H), 6.38 (s, 1H, 8-H), 7.05 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, 5'-H), 7.61 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 8.32 (s, 1H, CH), 12.70 (s, 1H, OH); HRMS (FAB) calcd for C₂₅H₂₅N₃O₁₂Na [M+Na]⁺ 582.1336, found 582.1342.

1.13 5,7,4'-三甲氧基-3-O-炔丙基黄酮醇(8)的合成

8的合成方法同**6**,以**3**为原料得浅黄色固体,产率94%; m.p. 189~190 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.32 (t, $J=2.0$ Hz, 1H, CH), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.9 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 4.97 (d, $J=2.0$ Hz, 2H, CH₂), 6.36 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 6-H), 6.52 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 8-H), 7.01 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3',5'-H), 8.12 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, 2',6'-H); MS (FAB⁺) m/z : 367.4 [M+H]⁺.

1.14 1-[N-1-(2,3,4,6-四乙酰基- β -D-半乳糖)]-4-[3-O-亚甲基-(5,7,4'-三甲氧基黄酮醇)]-[1,2,3]-三唑(13)的合成

13的合成方法同**11**,以**8**为原料得浅黄色固体,产率58%; m.p. 181~183 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.86 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.27 (s, 3H, OAc), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 4.12~4.22 (m, 3H, 6''-CH₂, 5''-H), 5.20~5.28 (m, 3H, 3-OCH₂, 3''-H), 5.55~5.62 (m, 2H, 2''-H, 4''-H), 5.83 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 1''-H), 6.37 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 6-H), 6.53 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 8-H), 7.01 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3',5'-H), 8.10 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2',6'-H), 8.24 (s, 1H, CH); HRMS (FAB) calcd for C₃₅H₃₇N₃O₁₅Na [M+Na]⁺ 762.2123, found 762.2118.

1.15 1-[N-1-(β -D-半乳糖)]-4-[3-O-亚甲基-(5,7,4'-三甲氧基黄酮醇)]-[1,2,3]-三唑(18)的合成

18的合成方法同**16**,以**13**为原料得浅黄色固体,产率92%. m.p. 208~210 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.47~3.57 (m, 4H, 4''-H, 6''-H, 3''-H), 3.70 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, 2''-H), 3.80 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, OH), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 4.02 (t, $J=9.2$ Hz, 1H, 5''-H), 4.73 (br, 1H, OH), 4.80 (br, 1H, OH), 5.11 (s, 2H, 3-OCH₂), 5.29 (br, 1H, OH), 5.47 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, 1''-H), 6.49 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 6-H), 6.79 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.05 (d, $J=9.6$ Hz, 2H, 3',5'-H), 8.01 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, 2',6'-H), 8.26 (s, 1H, CH); HRMS (FAB) calcd for C₂₇H₂₉N₃O₁₁Na [M+Na]⁺ 594.1700, found 594.1696.

1.16 7-O-炔丙基金合欢素(9)的合成

9的合成方法同**6**,以**4**为原料得黄色固体 100 mg,

产率 79%. m.p. 184~186 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 12.84 (s, 1H, 5-OH), 7.84 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.03 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.59 (s, 1H, 3-H), 6.57 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 8-H), 6.44 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 6-H), 3.9 (s, 3H, 4'-OCH₃), 2.05 (d, $J=2.4$ Hz, 2H, OCH₂), 2.59 (t, $J=2.8$ Hz, 1H, CCH); MS (FAB⁺) m/z : 323.3 [M+H]⁺.

1.17 1-[N-(2,3,4,6-四-O-乙酰基- β -D-半乳糖)]-4-(7-O-亚甲基金合欢素)-[1,2,3]-三唑(14)的合成

14的合成方法同**11**,以**9**为原料得浅黄色固体,产率70%. m.p. 92 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 12.82 (s, 1H, 5-OH), 7.95 (s, 1H, trizole-H), 7.83 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.01 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.43 (s, 1H, 3-H), 5.84 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 1''-H), 5.29 (s, 2H, OCH₂), 5.55 (t, $J=9.8$ Hz, 2H, 6''-CH₂), 4.07~4.16 (m, 4H, sugar-H), 3.89 (s, 3H, 4'-OCH₃), 1.87 (s, 12H, COCH₃); IR (KBr) ν : 3931, 3550, 3413, 3140, 2169, 2038, 1752, 1657, 1638, 1616, 1499, 1400, 1336, 1313, 1298, 1263, 1220, 1168, 1111, 1063, 1027, 949, 918, 836, 774, 713, 627, 591, 542, 481 cm⁻¹; HRMS (FAB) calcd for C₃₃H₃₃N₃O₁₄Na [M+Na]⁺ 718.1861, found 718.1870.

1.18 1-[N-(β -D-吡喃半乳糖)]-4-[7-O-亚甲基金合欢素]-[1,2,3]-三唑(19)的合成

19的合成方法同**16**,以**14**为原料得土黄色固体 59 mg, 产率 78%. m.p. 193~195 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.92 (s, 1H, 5-OH), 8.4 (s, 1H, trizole-H), 8.0 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.1 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.9 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, 6-H, 8-H), 6.5 (s, 1H, 3-H), 5.5 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 2''-OH), 5.3 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, 3''-OH), 5.27 (s, 2H, OCH₂), 5.0 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, 4''-OH), 4.7 (t, $J=5.6$ Hz, 1H, 1''-H), 4.6 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, 6''-OH), 4.03~4.08 (m, 1H, sugar-H), 3.85 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.7~3.4 (m, 5H, sugar-H); IR (KBr) ν : 3774, 3412, 3233, 2044, 1637, 1617, 1503, 1400, 1255, 1167, 1121, 885, 831, 624, 532, 488 cm⁻¹; HRMS (FAB) calcd for C₂₅H₂₅N₃O₁₀Na [M+Na]⁺ 550.1438, found 550.1445.

1.19 4'-O-苄基-7-O-炔丙基芹素(10)的合成

10的合成方法同**6**,以**5**为原料得黄色固体,产率80%. m.p. 192~194 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 12.83 (s, 1H, 5-OH), 7.83 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.41~7.44 (m, 5H, C₆H₅), 7.07 (d, $J=12.0$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.58 (s, 1H, 3-H), 6.56 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 8-H), 6.43 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, 6-H), 5.15 (s, 2H, CH₂), 4.76 (d, $J=2.4$

Hz, 2H, OCH₂), 2.59 (t, $J=2.4$ Hz, 1H, CCH); MS (FAB⁺) m/z : 399.4 [M+H]⁺.

1.20 1-[*N*-(2,3,4,6-四-*O*-乙酰基- β -D-半乳糖)]-4-[7-*O*-亚甲基芹素]-[1,2,3]-三唑(15)的合成

化合物 **10** (0.1 g, 0.25 mmol) 溶解于 20 mL 二氯甲烷中, 然后分别加入 TBAB (8 mg, 0.025 mmol), 抗坏血酸 (44 mg, 0.25 mmol), CuSO₄·5H₂O (0.063 mg, 0.025 mmol), 叠氮半乳糖 (0.186 g, 0.5 mmol) 和 20 mL 饱和碳酸氢钠水溶液. 在室温条件下反应 12 h, TLC 监测反应终点, 原料点消失后静置分层, 二氯甲烷洗涤水相 3 次, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤有机相 3 次, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 旋除溶剂, 粗品用硅胶柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚})=1:2$], 得到黄色固体 110 mg.

在 50 mL 反应瓶中加入上述黄色固体 50 mg 和 10% 的 Pd/C 50 mg. 反复抽真空 3 次, 使 H₂ 充满整个反应瓶. 然后用注射器加入 10 mL 无水乙酸乙酯和 10 mL 无水甲醇, 室温反应过夜, TLC 监测反应终点. 反应结束后过滤, 并反复用无水乙酸乙酯和无水甲醇洗涤 Pd/C. 滤液旋干, Pd/C 晾干后回收. 粗品用硅胶柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚}):V(\text{二氯甲烷})=1:1:1$], 得到黄色固体 34 mg. 产率为 84%. m.p. 213~215 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 12.88 (s, 1H, 5-OH), 10.45 (s, 1H, 4'-OH), 7.53 (s, 1H, trizole-H), 7.88 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.18 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.49 (s, 2H, 6-H, 8-H), 6.38 (s, 1H, 3-H), 5.76 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 1''-H), 5.24 (s, 2H, OCH₂), 5.56 (t, $J=9.8$ Hz, 2H, 6''-CH₂), 4.09~4.18 (m, 4H, sugar-H), 1.77 (s, 12H, COCH₃). HRMS (FAB) calcd for C₃₂H₃₁N₃O₁₄Na [M+Na]⁺ 704.1704, found 704.1707.

1.21 1-[*N*-(β -D-吡喃半乳糖)]-4-[7-*O*-亚甲基芹素]-[1,2,3]-三唑(20)的合成

20 的合成方法同 **16**, 以 **15** 为原料得黄色固体, 产率 81%. m.p. 162~164 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.98 (s, 1H, 5-OH), 10.41 (s, 1H, 4'-OH), 8.44 (s, 1H, trizole-H), 7.96 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 6.95 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.93 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 8-H), 6.87 (s, 1H, 6-H), 6.50 (s, 1H, 3-H), 5.52 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 2''-OH), 5.29 (s, 2H, OCH₂), 5.05 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, 3''-OH), 4.71 (t, $J=6.0$ Hz, 1H, 1''-H), 4.66 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, 4''-OH), 4.08~3.47 (m, 6H, sugar-H). HRMS (FAB) calcd for C₂₄H₂₃N₃O₁₀Na [M+Na]⁺ 536.1281, found 536.1277.

1.22 生物活性测试

采用 MTT(噻唑蓝)蛋白染色法对合成化合物 **11**~**20** 进行体外抗肿瘤细胞 HL-60(白血病细胞)、SMMC-7721(肝癌细胞)、A-549(肺癌)、MCF-7(乳腺癌细胞)和 SW480(结肠癌细胞)的活性筛选. 以顺铂(MW300)和紫杉醇作为阳性对照.

实验流程如下: (1)接种细胞: 用含 10% 胎牛血清的培养液(DMEM 或者 RPMI1640)配成单个细胞悬液, 以每孔 5000~10000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μ L, 贴壁细胞提前 12 h 接种培养. (2)加入待测化合物溶液(固定浓度 40 μ mol/L 初筛, 在该浓度对肿瘤细胞生长抑制在 50% 附近的化合物设 5 个浓度进入梯度复筛), 每孔终体积 200 μ L, 每种处理均设 3 个复孔. (3)显色: 37 摄氏度培养 48 h 后, 每孔加 MTT 溶液 20 μ L. 继续孵育 4 h, 终止培养, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加 200 μ L 的 SDS 溶液(10%), 过夜孵育(温度 37 °C), 使结晶物充分融解. (4)比色: 选择 595 nm 波长, 酶联免疫检测仪(Bio-Rad 680)读取各孔光吸收值, 记录结果, 以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法(Reed and Muench 法)计算化合物的 IC₅₀ 值.

2 结果与讨论

以来源丰富易得的香叶木素或野漆树苷为原料, 分别经 *O*-甲基化、酸性条件下的糖苷水解, *O*-苄基化保护和过氧丙酮(DMDO)氧化等反应步骤, 合成得到了 5,7,3',4'-四甲氧基黄酮醇(**1**), 5,7,3'-三甲氧基-4'-甲氧基黄酮醇(**2**), 5,7,4'-三甲氧基黄酮醇(**3**), 5,7-二羟基-4'-甲氧基黄酮醇(**4**)(金合欢素)和 5,7-二羟基-4'-苄氧基黄酮醇(**5**). 在由黄酮转变为黄酮醇的关键步骤中, 我们改进了过氧丙酮(DMDO)氧化的反应方法^[18]. 由于过氧丙酮在常温下不稳定, 通常其丙酮溶液也只能在 -20 °C 左右的条件下短期保存, 加之制备过氧丙酮较为繁琐, 需用到大量的干冰-丙酮作制冷剂, 在冷却条件下生成含过氧丙酮的丙酮溶液. 因此, 我们先将黄酮类化合物原料溶解于二氯甲烷/丙酮($V:V=4:3$)混合液中, 然后再加入碳酸钠/碳酸氢钠的缓冲溶液, 始终保持反应体系的 pH 值在 9 左右. 分批缓慢滴加过硫酸氢钾复合盐的水溶液, 使反应生成的过氧丙酮立即参与不饱和双键的环氧化反应, 最后采用对甲苯磺酸对环氧化物进行水解, 得到黄酮醇类化合物, 其产率达到 80% 以上.

将上述所合成的经苄基保护具有游离酚羟基的黄酮类化合物 **1**~**5** 分别与 3-溴丙炔在碳酸钾作用下, 在 3-或 7-位发生醚化反应生成含末端炔基的黄酮类化合物 **6**~**10**. 只要控制好 K₂CO₃ 的用量, 5 位不发生醚化反应. 这是由于 5-位酚羟基与 4-位羰基形成分子内氢

键, 大大降低了亲核取代反应活性。

运用“点击化学”反应方法, 将所合成的黄酮类炔基化合物 **6**~**10** 分别与 β -叠氮化乙酰基半乳糖通过铜催化的 1,3-偶极环加成反应链接起来, 然后, 在氢气中以 10% Pd/C 为催化剂去掉苄基, 得到系列乙酰化黄酮半乳糖缀合物 **11**~**15**, 最后在甲酸钠/甲醇弱碱性条件下, 脱掉糖分子结构上的乙酰基, 得到黄酮半乳糖缀合物 **16**~**20**。叠氮化合物和端基炔的环加成反应早在 20 世纪早期就有报道, 但反应合生成 1,4-和 1,5-二取代三唑两种混合物。后来使用 Cu(I) 催化剂可得到区域选择性的 1,4-二取代的三唑且产率可达 99%。反应时间由原来的 18 h 缩短为 8 h。我们参考文献采用 CuSO₄ 和抗坏血酸的催化体系^[19,20], 先将黄酮类炔化物溶解于二氯甲烷中, 然后依次加入相转移催化剂 TBAB 和饱和碳酸氢钠水溶液。浓度为 0.1 mol·L⁻¹ 五水硫酸铜的水溶液溶解抗坏血酸固体于另一锥形瓶中, 溶液由蓝色变成淡黄色, 再加入少量饱和碳酸氢钠水溶液, 溶液立即变成棕黄色, 搅拌均匀后再将其加入到反应体系中。反应体系中加入碳酸氢钠饱和水溶液, 可中和反应体系中过量的抗坏血酸以阻止醚键发生断裂, 使反应在弱碱性条件下进行, 经多次实验证明, 当抗坏血酸与五水硫酸铜物质的量的比为 5:1 时, 不会发生醚键断裂, 而 Cu(II) 可充分还原为 Cu(I), 是最佳反应投料比。

所合成的系列黄酮半乳糖缀合物 **11**~**20** 均为未见文献报道的新化合物, 其结构已由质谱(MS)、核磁共振氢谱(¹H NMR)和红外光谱(IR)等进行了确证。并用 MTT 进行了体外抗肿瘤细胞生物活性筛选。以顺铂

表 1 化合物 **11**~**20** 对不同肿瘤细胞株的半数抑制浓度[IC₅₀/(μ mol·L⁻¹)]

Table 1 Half-inhibitory concentration [IC₅₀/(μ mol·L⁻¹)] of compounds **11**~**20** to different tumor cell lines

化合物	白血病 (HL-60)	乳腺癌 (MCF-7)	肺癌 (A-549)	肝癌 (SMMC-7721)	结肠癌 (SW480)
11	22.17	18.12	>40	>40	20.21
12	>40	>40	>40	>40	>40
13	31.42	15.87	>40	>40	>40
14	>40	>40	>40	>40	>40
15	>40	>40	>40	>40	>40
16	>40	>40	>40	>40	>40
17	>40	>40	>40	>40	>40
18	>40	>40	>40	>40	>40
19	>40	>40	>40	>40	>40
20	1.17	6.02	25.73	23.67	25.59
顺铂	1.69	20.82	14.09	12.49	18.85
紫杉醇	<0.008	<0.008	<0.008	<0.008	<0.008

(DDP, MW300)和紫杉醇(taxol)为阳性对照, 结果见表 1, 半数抑制浓度 IC₅₀ 值表明, 化合物 **11** 对白血病细胞(HL-60)、乳腺癌细胞(MCF-7)和结肠癌细胞(SW480)具有一定的抑制活性。化合物 **13** 对白血病细胞(HL-60)和乳腺癌细胞(MCF-7)具有一定的抑制活性。化合物 **20** 对白血病细胞(HL-60)和乳腺癌细胞(MCF-7)具有良好的抑制作用, 对肝癌细胞(SMMC-7721)、肺癌(A-549)和结肠癌细胞(SW480)具有一定的抑制活性。

References

- [1] Pietta, P. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035.
- [2] Cai, S.-L.; Wu, Z.; Wu, J.; Wang, Q.-A.; Shan, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, 32, 560 (in Chinese). (蔡双莲, 吴峥, 吴进, 汪秋安, 单杨, 有机化学, **2012**, 32, 560.)
- [3] Wang, Q.-A.; Wu, Z.; Liu, L.; Zou, L.-H.; Luo, M. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, 30, 1682 (in Chinese). (汪秋安, 吴峥, 刘莉, 邹亮华, 罗茗, 有机化学, **2010**, 30, 1682.)
- [4] Liu, J.-D.; Chen, L.; Cai, S.-L.; Wang, Q.-A. *Carbohydr. Res.* **2012**, 357, 41.
- [5] Sameer, U.; Jared, T. S. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4582.
- [6] Yang, W.-Z.; Sun, J.-S.; Lu, W.-X.; Li, Y.; Shan, L.; Han, W.; Zhang, W.-D.; Yu, B. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 6879.
- [7] Mohammed, K.; Rajae, Z.; Christian, R. *Tetrahedron* **2011**, 52, 4738.
- [8] Giguere, D.; Sato S.; St-Pierre C.; Sira's S.; Roy R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1668.
- [9] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 2004.
- [10] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
- [11] Matsuda, H.; Kogami, Y.; Nakamura, S.; Sugiyama, T.; Veno, T.; Yoshikawa, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2835.
- [12] Jean-Baptiste, D.; Flore, D.; Lionel, V.; Christine, B.; Geraldine, C.-S.; Gilles, C.; Jennifer, M. G.; Ian T. J.; Karine, N.; Kurt, H.; Denis, B. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 2790.
- [13] Shan, Y.; Li, G.-Y.; Wang, Q.-A.; Li, Z.-H. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, 28, 1024 (in Chinese). (单杨, 李高阳, 汪秋安, 李忠海, 有机化学, **2008**, 28, 1024.)
- [14] Wu, Z.; Cai, S.-L.; Fan, W.-J.; Wang, Q.-A. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, 32, 560 (in Chinese). (吴峥, 蔡双莲, 范文金, 汪秋安, 有机化学, **2012**, 32, 560.)
- [15] Hanessian, S.; Saavedra, O. M.; Mascitti, V.; Marterer, W.; Dehriein, R.; Mak, C. P. *Tetrahedron* **2001**, 57, 3267.
- [16] Maurizio, B.; Roberta, B.; Fernanda, C.; Giancarlo, F. *Tetrahedron* **2010**, 66, 6047.
- [17] Mamta, M.; Shruti, S.; Pritam, D. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 2591.
- [18] Adams, W.; Golsh, D.; Hadjirapolou, L.; Patonay, T. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 7292.
- [19] Dong, J. L.; Kalyaneswar, M.; Paul, W. R. H.; Margaret, A. B.; Stephen, B. H. K. *Org. Lett.* **2009**, 11, 5270.
- [20] Alexander, V. N.; Ekaterine, A. S.; Nina, A. L.; Andrew, S. S.; Mikhail, A. L.; Irina, V. B.; Irina, P. B.; Alexey, Y. F. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 4196.

(Li, L.; Lu, Z.)