查尔酮 Mannich 碱衍生物的合成与 AChE 抑制活性研究

许守慧 刘浩然 娄定辉 汪秋安*

(湖南大学化学化工学院 长沙 410082)

摘要 以柚皮苷为原料, 经酸催化水解、*O*-甲基化或 *O*-异戊烯基化反应、碱催化的开环反应合成了天然查尔酮卡瓦胡椒素 A (**1**)和查尔酮异戊烯基醚衍生物 **2**; 然后以查尔酮 **1** 和 **2** 为底物, 分别通过 Mannich 反应对其 3'位进行了胺甲基化修饰, 合成了 14 个未见文献报道的新型查尔酮 Mannich 碱衍生物 **3~16**. 所合成化合物的结构已由核磁共振谱、红外光谱和质谱所证实, 并对所合成的查尔酮及其 Mannich 碱衍生物进行了乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制活性测试, 结果发现查尔酮 Mannich 碱衍生物 **3~5, 9** 具有良好的 AChE 抑制活性.

关键词 查尔酮; 卡瓦胡椒素 A; Mannich 碱; 合成; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

Synthesis and AChE Inhibitory Activity of Chalcones Mannich Base Derivatives

Xu, Shouhui Liu, Haoran Lou, Dinghui Wang, Qian*

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

Abstract Chalcone flavokawain A (**1**) and chalcone prenyl ether derivative **2** were synthesized from naringin, through glycoside hydrolysis, *O*-methylation or *O*-prenylation, and base-catalyzed ring-opening reaction. Based on Mannich reaction of chalcone **1** and chalcone prenyl ether derivative **2**, fourteen new chalcone Mannich base derivatives **3~16** were synthesized. The aminomethylation occurred preferentially at 3'-C position of chalcones. The structures of all synthesized compounds were determined by MS, NMR and IR spectra. All the synthetic compounds were evaluated for acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity. The results show that chalcone mannich base derivatives **3~5, 9** exhibit good AChE inhibitory activity.

Keywords chalcone; flavokawain A; Mannich base; synthesis; acetylcholinesterases inhibitory activity

卡瓦胡椒素 A (flavokawain A, 4,4',6'-三甲氧基-2'-羟基查尔酮)是从卡瓦胡椒(*Kava*)中提取分离的天然 2'-羟基查尔酮类化合物, 是卡瓦胡椒的主要活性成分^[1]. 研究表明卡瓦胡椒素 A 对人类膀胱癌细胞具有显著的抗增殖和促凋亡作用^[2,3]. 卡瓦胡椒素 A 也是一种良好的抗氧化剂, 对大豆脂肪氧合酶(LOX)具有良好的抑制作用^[4]. 另有研究表明, 查尔酮结构中的酚羟基是清除自由基的功能基团, 具有直接捕获氧自由基的功能^[5]. 为了进一步研究卡瓦胡椒素 A (flavokawain A)的生物活性, 我们以柚皮苷为原料, 经酸催化水解、*O*-甲基化或 *O*-异戊烯基化反应、碱催化的开环反应合成了天然查尔酮卡瓦胡椒素 A (**1**)和查尔酮异戊烯基醚衍生物 **2**. 近年

来, 黄酮类含氮化合物的乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制活性已引起人们的重视^[6,7]. 含氮的 Mannich 碱结构单元是一类重要的药理活性基团, 并可以有效提高化合物的生物活性以及水溶性^[8]. 我们以查尔酮 **1** 和 **2** 为底物, 分别通过 Mannich 反应对其 3'位进行了胺甲基化修饰, 合成了 14 个未见文献报道的新型查尔酮 Mannich 碱衍生物 **3~16**. 所合成化合物的结构已由质谱(MS)、核磁共振氢谱(¹H NMR)、碳谱(¹³C NMR)和红外光谱(IR)等进行了确证, 并对所合成的查尔酮及其 Mannich 碱衍生物进行了乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制活性测试. 卡瓦胡椒素 A (**1**)和 6'-*O*-异戊烯基卡瓦胡椒素 A (**2**)及其曼尼希碱衍生物 **3~16** 的合成路线如 Scheme 1 所示.

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

Received November 14, 2013; revised December 18, 2013; published online December 23, 2013.

Project supported by the Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (No. 14JJ2048) and the National Natural Science Foundation of China (No. 21342015).

湖南省自然科学基金(No. 14JJ2048)和国家自然科学基金(No. 21342015)资助项目.

Reagents and conditions: (a) concentrated H_2SO_4 , CH_3CH_2OH , reflux; (b) $(CH_3)_2SO_4$, K_2CO_3 , acetone, 65 °C; (c) $(CH_3)_2SO_4$, K_2CO_3 , acetone, r.t.; (d) prenyl bromide, K_2CO_3 , acetone, 65 °C; (e) 37% $HCHO$, HNR^1R^2 , CH_3OH , H^+ , 70 °C

Scheme 1

1 结果与讨论

2'-羟基查尔酮的一个重要合成方法是利用二氢黄酮在碱性条件下的开环反应.我们以柚皮苷为起始原料,通过酸催化水解、O-甲基化和碱催化的开环反应等步骤半合成了 2'-羟基查尔酮卡瓦胡椒素 A (1). 利用柚皮素各个位置上的酚羟基活性不同, C-5 羟基与 4-位羰基形成分子内氢键, 其活性降低.在碱性条件下与硫酸二甲酯作用, 只有 C-7 和 C-4'酚羟基能进行选择性 O-甲基化.采用无水碳酸钾作为缩合剂, 异戊烯基溴与亲核试剂查尔酮酚氧负离子作用, 形成查尔酮 6'-O-异戊烯基卡瓦胡椒素 A (4,4'-二甲氧基-6'-O-异戊烯基-2'-羟基查尔酮, 2).

以查尔酮卡瓦胡椒素 A (1)和 6'-O-异戊烯基卡瓦胡椒素 A (2)为底物分别进行 Mannich 反应, 对其 3'位进行了胺甲基化修饰, 发现反应溶剂、催化剂、反应温度、反应时间以及二级胺分子结构都对该反应有着重要的影响.我们曾尝试了甲醇、乙醇、异丙醇三种溶剂中的 Mannich 反应, 发现甲醇效果较好.在甲醇为溶剂的 Mannich 反应中, 不加浓盐酸时, 只有二甲胺、四氢吡

咯、六氢吡啶等二级胺的反应体系给出约 20%的产率, 其它取代基较大的二级胺均反应不完全. 而当反应体系中的浓盐酸过多时, 反应体系复杂未能分离纯化得到预期产物.只有催化量的酸才能有效的促进反应发生, 生成预期的 Mannich 碱衍生物. 因为 Mannich 反应首先在 H^+ 的催化作用下生成亚胺正离子, 然后接受酚的亲核进攻生成 Mannich 碱, 所以加入适量的浓盐酸可以把反应时间由原来的 6 h 缩短至 1.5~2.0 h. 若延长反应时间, 在 2'-OH 的对位即 5'-位也将发生 Mannich 反应, 生成二胺甲基化产物, 因此必须时刻监测反应进程, 一旦原料反应完全即停止反应. 在该 Mannich 反应中, 能否生成相应的亚胺正离子是反应顺利进行的关键, 适宜的酸性有利于亚胺正离子的生成, 而过大的空间位阻则常常会阻碍胺醛缩合, 导致反应难以进行.

Mannich 反应产物的 ^1H NMR 谱显示是单一化合物, 表明 2'-羟基查尔酮的 Mannich 反应能区域选择性地发生在查尔酮 B 环的 C-3'位, 也就是酚羟基的邻位.可能的原因是酚羟基参与形成一个六元环的螯合过度态, 并促使邻位产物的生成. 相反, 酚羟基对位则因没有此优势,

所以反应较困难,需要较长时间才能进行反应.另一个可能的原因是因为 5'-位旁边有两个取代基,受到的空间位阻比 3'-位大,所以也有利于 3'-位优先发生 Mannich 反应.在酚的 Mannich 反应机理中,形成六元环过渡态是关键的一步,但当 N 原子上的取代基较大时,六元环不易形成,所以随着支链基团的增大,反应越来越困难.

对所合成的系列查尔酮 **1**, **2** 及 Mannich 碱衍生物 **3**~**16**,我们用羟胺三氯化铁比色法测定乙酰胆碱酯酶(AChE)的抑制活性,以甲磺酸新斯的明为阳性对照物(表 1).结果表明:16 个受试物中,查尔酮 Mannich 碱衍生物 **3**~**6**, **8**, **9** 具有较好的 AChE 抑制活性,其中查尔酮 Mannich 碱衍生物 **3**~**5**, **9** 具有良好的 AChE 抑制活性,与阳性对照物甲磺酸新斯的明的活性相近.初步的构效关系研究发现,查尔酮卡瓦胡椒素 A (**1**)和 6'-O-异戊烯基卡瓦胡椒素 A (**2**)无明显的 AChE 抑制活性,3'位进行了胺甲基化修饰的 flavokawain A 查尔酮 Mannich 碱衍生物,除 **7** 外绝大多数都有明显的 AChE 抑制活性,而经 O-异戊烯基取代的 6'-O-异戊烯基卡瓦胡椒素 A (**2**)的 3'位胺甲基化修饰的查尔酮 Mannich 碱衍生物 AChE 抑制活性明显降低.

2 结论

以柚皮苷为原料,经酸催化水解、O-甲基化或 O-异戊烯基化反应、碱催化的开环反应和 Mannich 反应,合成了 14 个未见文献报道的新型查尔酮 Mannich 碱衍生物 **3**~**16**.对所合成的查尔酮及其 Mannich 碱衍生物进行了乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制活性测试,结果表明,查尔酮 Mannich 碱衍生物 **3**~**5**, **9** 具有良好的 AChE 抑制活性.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点在 XRC-1 型显微熔点仪上测定(温度计未校正);NMR 用 Bruker Am-400 型核磁共振仪测定(溶剂 CDCl₃ 或 DMSO-*d*₆, TMS 为内标);MS 用 Agilent 1100 液-质联用仪或 ZAB-HS 型仪测定记录;IR 用 FD-5DX 仪(KBr 压片法)测定;UV1902PC 型紫外分光光度计(上

海奥谱勒科技有限公司);薄层和柱层析用硅胶均为青岛海洋化工厂产品.所用试剂和溶剂为化学纯和分析纯.

3.2 柚皮素(naringenin)的合成

柚皮苷(20.0 g, 34.5 mmol)溶于 150 mL 热乙醇中,缓慢滴加 10 mL 浓 H₂SO₄,回流搅拌反应 4 h,薄层色谱(TLC)监测反应,待原料点消失后,停止反应.冷却至室温,将反应液慢慢倾入冰水中并剧烈搅拌,立即有大量黄色固体析出,抽滤并烘干固体,得粗品柚皮素 9.1 g.甲醇重结晶得淡黄色固体 8.4 g, 90%. m.p. 249~251 °C (文献值^[9]: 248~250 °C).

3.3 卡瓦胡椒素 A (flavokawain A, **1**)的合成

在 100 mL 的三颈烧瓶中加入柚皮素(1.0 g, 3.7 mmol),加入 30 mL 无水丙酮溶解,然后加入无水 K₂CO₃ (2.0 g, 14.7 mmol), 65 °C 下加热回流 1 h 后,缓慢滴加 (CH₃)₂SO₄ (1.1 mL, 11.7 mmol) 的丙酮溶液 10 mL,继续搅拌回流,反应 24 h 后停止反应,滤除固体,旋转蒸除部分溶剂,经硅胶柱层析[洗脱剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=10:1]纯化,得淡黄色固体 0.68 g,产率 59%. m.p. 112~114 °C (文献值^[10]: 109~112 °C). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.77 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.79 (s, 3H, 4-OCH₃), 3.85 (s, 3H, 6'-OCH₃), 5.89 (d, *J*=4.0 Hz, 1H, 5'-H), 6.04 (d, *J*=4.0 Hz, 1H, 3'-H), 6.86 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.50 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.72~7.73 (m, 2H, α-H and β-H); MS *m/z* (FAB⁺): 315 [M+1]⁺.

3.4 4,4'-O,O-二甲氧基-6'-O-异戊烯基-2'-羟基查尔酮(**2**)的合成

在 100 mL 的三颈烧瓶中加入柚皮素(1.0 g, 3.7 mmol)溶于 30 mL 无水丙酮,然后加入无水 K₂CO₃ (1.75 g, 12.7 mmol),室温下搅拌 1 h 后,缓慢滴加(CH₃)₂SO₄ (1.0 mL, 11.7 mmol)的丙酮溶液 10 mL,继续室温下搅拌反应 3.5 h, TLC 追踪反应,待原料点消失后,停止反应,滤除固体,旋转蒸除溶剂,乙醇重结晶得白色针状物 7,4'-二甲氧基-5-羟基二氢黄酮 0.96 g,产率 87%. m.p. 167~168 °C (文献值^[11]: 167~168 °C).

表 1 化合物 **1**~**16** 对乙酰胆碱酯酶的半数抑制浓度

Table 1 Half-inhibitory concentration of compounds **1**~**16** to AChE

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)
3	4.19±0.32	8	17.4±1.3	13	158.2±10.4
4	2.89±0.27	9	6.49±0.39	14	482.4±56.2
5	6.04±0.58	10	167.6±8.7	15	84.3±5.3
6	23.5±2.19	11	119.4±12.1	16	412.4±78.7
7	523.6±37.2	12	532.2±12.6	甲磺酸新斯的明 ^a	1.38±0.12

^a Used for positive control.

将上述 7,4'-二甲氧基-5-羟基二氢黄酮(0.6 g, 1.63 mmol)溶于 20 mL 无水丙酮中, 加入无水 K_2CO_3 (1.1 g, 7.8 mmol), 于 65 °C 下加热回流 1 h 后, 缓慢滴加异戊烯基溴 (0.24 mL, 2.0 mmol) 的丙酮溶液 5 mL, 继续搅拌回流反应. TLC 追踪反应, 待原料点消失后, 停止反应, 滤除固体, 旋转蒸除部分溶剂, 经硅胶柱层析[洗脱剂: $V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯})=50:1$]纯化, 得到橙黄色固体 0.72 g, 收率 89%. m.p. 112~114 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.69, 1.79 (each s, 6H, CH_3), 3.76, 3.77 (each s, 6H, OCH_3), 4.47 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, CH_2), 5.56 (t, $J=14$ Hz, 1H, $CH=$), 5.89 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 3'-H), 6.02 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 5'-H), 6.82 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.45 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, 2-H, 6'-H), 7.67 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, α -H), 7.92 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, β -H), 14.5 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 17.3 (CH_3), 24.8 (CH_3), 54.7 (4-OMe), 54.5 (4'-OMe), 64.5 (OCH_2), 90.9 (5'-C), 92.7 (3'-C), 98.9 (1'-C), 113.3 (3-C, 5-C), 117.9 ($=CH$), 124.6 (1-C), 127.5 (α -C), 129.0 (2-C, 6-C), 138.8 ($(CH_3)_2C=$), 141.2 (β -C), 160.2 (4-C), 160.9 (6'-C), 165.0 (2'-C), 167.7 (4'-C), 191.8 ($C=O$); MS m/z (FAB $^+$): 369 $[M+1]^+$.

3.5 4,4',6'-三甲氧基-3'-二甲胺甲基-2'-羟基查尔酮(3)的合成

在 100 mL 单口瓶中加入 20 mL 无水甲醇, 卡瓦胡椒素 A (160 mg, 0.5 mmol), 搅拌下依次滴加 37% 的甲醛水溶液(230 μ L, 3.0 mmol), 40% 的二甲胺水溶液(380 μ L, 3.0 mmol), 3 滴浓盐酸. 升温至 70 °C 回流, TLC 跟踪反应, 1.5 h 后原料点消失, 停止反应, 冷却至室温. 旋转蒸出甲醇, 残留粘稠物加水稀释后用二氯甲烷(20 mL $\times$ 3)萃取, 合并有机相并用饱和食盐水(40 mL $\times$ 3)洗涤, 无水 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 旋转蒸除溶剂, 经硅胶柱层析[洗脱剂: $V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯})=1:1$]纯化, 得黄色针状晶体 153 mg, 收率 81%. m.p. 121~123 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.33 (s, 6H, NCH_3), 3.60 (s, 2H, CH_2N), 3.85 (s, 3H, 4'- OCH_3), 3.90 (s, 3H, 4- OCH_3), 3.92 (s, 3H, 6'- OCH_3), 6.02 (s, 1H, 5'-H), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.49 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.54 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.67 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, β -H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 44.9 (NCH_3), 51.8 (CH_2N), 55.4 (4- OCH_3), 55.7 (4'- OCH_3), 55.8 (6'- OCH_3), 86.2 (5'-C), 105.2 (3'-C), 108.1 (1'-C), 114.3 (3-C, 5-C), 125.9 (1-C), 128.2 (α -C), 130.1 (2-C, 6-C), 142.6 (β -C), 160.8 (4-C), 161.2 (6'-C), 162.5 (2'-C), 163.0 (4'-C), 193.4 ($C=O$). HRMS (ESI) calcd for $C_{21}H_{25}NO_5$ $[M+H]^+$

372.1811, found 372.1820.

3.6 4,4',6'-三甲氧基-3'-二乙胺甲基-2'-羟基查尔酮(4)的合成

与化合物 3 的合成方法相同, 得黄色针状晶体, 收率 72%. m.p. 94~96 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.11 (t, $J=8.0$ Hz, 6H, NCH_2CH_3), 2.30~2.51 (m, 4H, NCH_2CH_3), 3.79 (s, 2H, CH_2N), 3.84 (s, 3H, 4'- OCH_3), 3.85 (3H, s, 4- OCH_3), 3.86 (s, 3H, 6'- OCH_3), 6.02 (s, 1H, 5'-H), 6.89 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.14 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, α -H), 7.50 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, β -H), 7.53 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 2-H, 6-H). HRMS (ESI) calcd for $C_{23}H_{29}NO_5$ $[M+H]^+$ 400.2124, found 400.2138.

3.7 4,4',6'-三甲氧基-3'-二正丙胺甲基-2'-羟基查尔酮(5)的合成

与化合物 3 的合成方法相同, 得黄色针状晶体, 收率 75%. m.p. 83~85 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.87 (t, $J=7.2$ Hz, 6H, $NCH_2CH_2CH_3$), 1.48~1.62 (m, 4H, $NCH_2CH_2CH_3$), 2.47 (t, $J=6.8$ Hz, 4H, $NCH_2CH_2CH_3$), 3.77 (s, 2H, CH_2N), 3.82 (s, 3H, 4'- OCH_3), 3.83 (s, 3H, 4- OCH_3), 3.84 (s, 3H, 6'- OCH_3), 6.01 (s, 1H, 5'-H), 6.89 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.08 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.47 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, β -H), 7.50 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2-H, 6-H). HRMS (ESI) calcd for $C_{25}H_{33}NO_5$ $[M+H]^+$ 428.2437, found 428.2442.

3.8 4,4',6'-三甲氧基-3'-吡咯烷甲基-2'-羟基查尔酮(6)的合成

与化合物 3 的合成方法相同, 得黄色针状晶体, 收率 53%. m.p. 104~106 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.75~1.85 (m, 4H, NCH_2CH_2), 2.62 (t, $J=9.2$ Hz, 4H, CH_2NCH_2), 3.80 (s, 2H, CH_2N), 3.85 (s, 3H, 4'- OCH_3), 3.87 (s, 3H, 4- OCH_3), 3.88 (s, 3H, 6'- OCH_3), 6.01 (s, 1H, 5'-H), 6.90 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.36 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.53 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.61 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, β -H); IR (KBr) ν : 3452, 2033, 1615, 1512, 1397, 1324, 1233, 1150, 982, 826, 620, 538, 517, 494, 464 cm^{-1} . HRMS (ESI) calcd for $C_{23}H_{27}NO_5$ $[M+H]^+$ 398.1967, found 398.1974.

3.9 4,4',6'-三甲氧基-3'-吗啡啉甲基-2'-羟基查尔酮(7)的合成

与化合物 3 的合成方法相同, 得黄色针状晶体, 收率 91%. m.p. 154~156 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.56 (t, $J=13.6$ Hz, 4H, CH_2NCH_2), 3.67 (s, 2H, CH_2N), 3.71 (t, $J=4.0$ Hz, 4H, CH_2OCH_2), 3.85 (s, 3H,

4'-OCH₃), 3.89 (s, 3H, 4-OCH₃), 3.92 (s, 3H, 6'-OCH₃), 6.02 (s, 1H, 5'-H), 6.92 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.52 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.54 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.68 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, β -H). HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₇NO₆ [M+H]⁺ 414.1917, found 414.1914.

3.10 4,4',6'-三甲氧基-3'-*N*-甲基哌嗪甲基-2'-羟基查尔酮(8)的合成

与化合物 **3** 的合成方法相同, 得黄色针状晶体, 收率 84%. m.p. 84~86 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.27 (s, 3H, NCH₃), 2.36 (t, $J=9.2$ Hz, 4H, NCH₂CH₂), 2.52 (t, $J=13.6$ Hz, 4H, CH₂NCH₂), 3.72 (s, 2H, CH₂N), 3.85 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.87 (s, 3H, 4-OCH₃), 3.88 (s, 3H, 6'-OCH₃), 6.01 (s, 1H, 5'-H), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.36 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.53 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.61 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, β -H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 45.9 (NCH₃), 51.1 (CH₂N), 52.6 (CH₂NCH₂), 54.9 (NCH₂CH₂), 55.4 (4-OMe), 55.6 (4'-OMe), 55.9 (6'-OMe), 86.3 (5'-C), 103.7 (1'-C), 108.7 (3-C, 5-C), 114.3 (1-C), 126.1 (α -C), 128.8 (2-C, 6-C), 130.1 (β -C), 142.9 (4-C), 160.3 (6'-C), 161.3 (2'-C), 161.9 (4'-C), 193.6 (C=O). HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₃₀N₂O₅ [M+H]⁺ 427.2233, found 427.2243.

3.11 4,4',6'-三甲氧基-3'-六氢吡啶甲基-2'-羟基查尔酮(9)的合成

与化合物 **3** 的合成方法相同, 得黄色针状晶体, 收率 89%. m.p. 110~112 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.38~1.50 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂), 1.60 (t, $J=4.0$ Hz, 4H, CH₂NCH₂), 2.45~2.64 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂), 3.70 (s, 2H, CH₂N), 3.79 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.84 (s, 3H, 4-OCH₃), 3.85 (s, 3H, 6-OCH₃), 6.01 (s, 1H, 5'-H), 6.89 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.17 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.51 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.53 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, β -H). HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₉NO₅ [M+H]⁺ 412.2124, found 412.2136.

3.12 4,4'-二甲氧基-6'-*O*-异戊烯基-3'-二甲胺甲基-2'-羟基查尔酮(10)的合成

在 100 mL 的圆底烧瓶中加入化合物 **2** (200 mg, 0.54 mmol), 无水甲醇 15 mL, 37%的甲醛水溶液(300 μ L, 4 mmol), 3 滴浓盐酸, 加热至 70 °C回流, 待原料溶解后加入 40%的二甲胺水溶液(420 μ L, 3.3 mmol), 继续回流. TLC 追踪反应, 待原料点消失后, 冷却, 减压回收溶剂, 残留物加水稀释后用 5%氢氧化钠溶液碱化, 二氯甲烷萃取(15 mL $\times$ 3), 合并有机层, 用饱和氯化钠溶液(20 mL $\times$ 3)洗涤, 无水硫酸镁干燥. 减压回收溶剂,

经硅胶柱层析[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=2:1], 得淡黄色固体 136 mg, 收率 59%. m.p. 130~132 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.74, 1.82 (each s, 6H, CH₃), 2.69 (s, 6H, NCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 4.14 (s, 2H, CH₂N), 4.59 (d, $J=7.2$ Hz, 2H, OCH₂), 5.58 (t, $J=14.0$ Hz, 1H, CH=), 5.99 (s, 1H, 5'-H), 6.85 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H and 5-H), 7.47 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, 2-H and 6-H), 7.72 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, α -H), 7.87(d, $J=15.6$ Hz, 1H, β -H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 17.3 (CH₃), 24.9 (CH₃), 41.8 (NCH₃), 48.0 (CH₂N), 54.4 (4-OMe), 55.2 (4'-OCH₃), 64.8 (OCH₂), 86.3 (5'-C), 104.9 (3'-C), 113.4 (1'-C), 117.1 (3-C and 5-C), 123.9 (CH=), 126.8 (1-C), 127, 2 (α -C), 129.2 (2-C and 6-C), 139.7 ((CH₃)₂C=), 142.4 (β -C), 160.6 (6'-C), 163.1 (4-C), 163.9 (2'-C), 165.4 (4'-C), 192.1 (C=O). HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₃₁NO₅ [M+H]⁺ 426.2280, found 426.2273.

3.13 4,4'-二甲氧基-6'-*O*-异戊烯基-3'-二乙胺甲基-2'-羟基查尔酮(11)的合成

与化合物 **10** 的合成方法相同, 得淡黄色固体, 收率 84%. m.p. 130~132 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.42 (t, $J=15.4$ Hz, 6H, NCH₂CH₃), 1.73, 1.81 (each s, 6H, CH₃), 2.99~3.17 (m, 4H, NCH₂CH₃), 3.79, 4.00 (each s, 6H, OCH₃), 4.12 (s, 2H, CH₂N), 4.58 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, OCH₂), 5.57 (t, $J=15.0$ Hz, 1H, CH=), 5.99 (s, 1H, 5'-H), 6.85 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.47 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.71 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, α -H), 7.88 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, β -H), 10.7 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 13.1 (NCH₂CH₃), 17.3 (CH₃), 24.8 (CH₃), 45.9 (NCH₂CH₃), 54.4 (CH₂N), 54.5 (4-OCH₃), 55.1 (4'-OCH₃), 64.8 (OCH₂), 86.5 (5'-C), 104.7 (3'-C), 113.3 (1'-C), 117.5 (3-C and 5-C), 121.4 (CH=), 127.3 (1-C), 129.0 (α -C), 129.2 (2-C and 6-C), 141.1 ((CH₃)₂C=), 142.1 (β -C), 160.4 (6'-C), 161.7 (4-C), 161.7 (2'-C), 163.4 (4'-C), 192.3 (C=O); IR (KBr) ν : 3315, 3116, 2914, 2850, 1614, 1579, 1511, 1440, 1421, 1252, 1098, 832, 611 cm⁻¹. HRMS (ESI) calcd for C₂₇H₃₅NO₅ [M+H]⁺ 454.2593, found 454.2595.

3.14 4,4'-二甲氧基-6'-*O*-异戊烯基-3'-二正丙胺甲基-2'-羟基查尔酮(12)的合成

与化合物 **10** 的合成方法相同, 得黄色针状晶体, 收率 82%. m.p. 107~109 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.86 (t, $J=14.8$ Hz, 6H, NCH₂CH₂CH₃), 1.49~1.59 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₃), 1.70, 1.75 (each s, 6H, CH₃), 2.46 (t, $J=15.2$ Hz, 4H, NCH₂CH₂CH₃), 3.72 (s, 2H, CH₂N), 3.83

(s, 6H, OCH₃), 4.54 (d, $J=6.4$ Hz, 2H, OCH₂), 5.47 (t, $J=12$ Hz, 1H, CH=), 6.01 (s, 1H, 5'-H), 6.88 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.30 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, α -H), 7.49 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, β -H), 7.54 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 9.76 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 11.9 (NCH₂CH₂CH₃), 18.3 (CH₃), 19.4 (NCH₂CH₂CH₃), 25.8 (CH₃), 48.6 (CH₂N), 55.4 (4-OCH₃), 55.6 (4'-OCH₃), 55.8 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 65.8 (OCH₂), 87.8 (5'-C), 104.5 (3'-C), 110.1 (1'-C), 114.2 (3-C, 5-C), 119.7 (CH=), 126.9 (1-C), 128.4 (α -C), 129.9 (2-C, 6-C), 138.0 ((CH₃)₂C=), 142.6 (β -C), 158.9 (6'-C), 160.9 (4-C), 161.1 (2'-C), 161.2 (4'-C), 193.8 (C=O). HRMS (ESI) calcd for C₂₉H₃₉NO₅ [M+H]⁺ 482.2906, found 482.2917.

3.15 4,4'-二甲氧基-6'-O-异戊烯基-3'-吡咯烷甲基-2'-羟基查尔酮(13)的合成

与化合物 **10** 的合成方法相同, 得橙黄色固体, 收率 64%. m.p. 80~82 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.66 (s, 3H, CH₃), 1.66~1.71 (m, 4H, NCH₂CH₂), 1.74 (s, 3H, CH₃), 2.56 (t, $J=9.2$ Hz, 4H, CH₂NCH₂), 3.69 (s, 2H, CH₂N), 3.77, 3.80 (each s, 6H, OCH₃), 4.51 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, OCH₂), 5.49 (t, $J=12.4$ Hz, 1H, CH=), 5.94 (s, 1H, 5'-H), 6.82 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H and 5-H), 7.44 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2-H and 6-H), 7.56 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.59 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, β -H); IR (KBr) ν : 3321, 3113, 2962, 2927, 2850, 1610, 1582, 1556, 1511, 1422, 1255, 1146, 829, 563. HRMS (EI) calcd for C₂₇H₃₃NO₅ 451.2359, found 451.2360.

3.16 4,4'-二甲氧基-6'-O-异戊烯基-3'-吗啡啉甲基-2'-羟基查尔酮(14)的合成

与化合物 **10** 的合成方法相同, 得橙黄色固体, 收率 90%. m.p. 190~192 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.70, 1.77 (each s, 6H, CH₃), 2.50 (t, $J=13.6$ Hz, 4H, CH₂NCH₂), 3.58 (s, 2H, CH₂N), 3.64 (t, $J=9.2$ Hz, 4H, CH₂OCH₂), 3.78, 3.42 (each s, 6H, OCH₃), 4.53 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, OCH₂), 5.53 (t, $J=13.6$ Hz, 1H, CH=), 5.94 (s, 1H, 5'-H), 6.83 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H and 5-H), 7.45 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.63 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.75 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, β -H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 18.3 (CH₃), 25.9 (CH₃), 49.9 (CH₂N), 53.3 (CH₂NCH₂), 55.4 (4-OCH₃), 55.6 (4'-OCH₃), 65.6 (OCH₂), 67.1 (CH₂OCH₂), 87.3 (5'-C), 104.9 (3'-C), 107.0 (1'-C), 114.3 (3-C, 5-C), 118.9 (CH=), 126.0 (1-C), 128.4 (α -C), 130.0 (2-C and 6-C), 139.5 ((CH₃)₂C=), 142.2 (β -C), 161.2 (6'-C), 161.4 (4-C), 163.9 (2'-C), 164.9 (4'-C), 193.2 (C=O); IR (KBr) ν : 3305, 3116, 2933, 2911, 2847, 1604,

1556, 1511, 1451, 1422, 1226, 1105, 829, 599. HRMS (ESI) calcd for C₂₇H₃₃NO₆ [M+H]⁺ 468.2386, found 468.2393.

3.17 4,4'-二甲氧基-6'-O-异戊烯基-3'-N-甲基哌嗪甲基-2'-羟基查尔酮(15)的合成

与化合物 **10** 的合成方法相同, 得淡黄色固体, 收率 79%. m.p. 144~146 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.68, 1.74 (each s, 6H, CH₃), 2.19 (s, 3H, NCH₃), 2.38 (t, $J=9.2$ Hz, 4H, NCH₂CH₂), 2.53 (t, $J=13.6$ Hz, 4H, CH₂NCH₂), 3.61 (s, 2H, CH₂N), 3.78, 3.79 (each s, 6H, OCH₃), 4.51 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, OCH₂), 5.49 (t, $J=13.6$ Hz, 1H, CH=), 5.93 (s, 1H, 5'-H), 6.83 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.45 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.53 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.58 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, β -H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 17.3 (CH₃), 24.8 (CH₃), 44.9 (NCH₃), 48.9 (CH₂N), 51.6 (CH₂NCH₂), 53.9 (4-OCH₃), 54.3 (4'-OCH₃), 54.5 (NCH₂CH₂), 64.6 (OCH₂), 86.4 (5'-C), 103.7 (3'-C), 106.7 (1'-C), 113.2 (3-C, 5-C), 118.0 (CH=), 125.2 (1-C), 127.4 (α -C), 129.0 (2-C, 6-C), 138.1 ((CH₃)₂C=), 141.2 (β -C), 159.8 (6'-C), 160.2 (4-C), 162.2 (2'-C), 163.0 (4'-C), 192.3 (C=O); IR (KBr) ν : 3318, 3113, 2936, 2837, 2786, 1604, 1559, 1511, 1436, 1421, 1226, 1143, 832, 557 cm⁻¹. HRMS (ESI) calcd for C₂₈H₃₆N₂O₅ [M+H]⁺ 481.2702, found 481.2696.

3.18 4,4'-二甲氧基-6'-O-异戊烯基-3'-六氢吡啶甲基-2'-羟基查尔酮(16)的合成

与化合物 **10** 的合成方法相同, 得橙黄色固体, 收率 89%. m.p. 121~123 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.26~1.41 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂), 1.47~1.52 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂), 1.64, 1.69 (each s, 6H, CH₃), 2.42 (t, $J=13.6$ Hz, 4H, CH₂NCH₂), 3.56 (s, 2H, CH₂N), 3.75, 3.76 (each s, 6H, OCH₃), 4.47 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, OCH₂), 5.41 (t, $J=13.2$ Hz, 1H, CH=), 5.93 (s, 1H, 5'-H), 6.80 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.34 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, α -H), 7.41 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.49 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, β -H), 12.61 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 18.3 (CH₃), 24.1 (NCH₂CH₂CH₂), 25.8 (CH₃), 25.8 (NCH₂CH₂CH₂), 52.3 (CH₂N), 54.0 (4-OCH₃), 55.4 (4'-OCH₃), 55.6 (CH₂NCH₂), 65.7 (OCH₂), 87.6 (5'-C), 104.1 (3'-C), 109.3 (1'-C), 114.2 (3-C, 5-C), 119.5 (CH=), 126.6 (1-C), 128.3 (α -C), 130.0 (2-C, 6-C), 138.4 ((CH₃)₂C=), 142.5 (β -C), 159.5 (6'-C), 161.1 (4-C), 161.6 (2'-C), 162.1 (4'-C), 193.7 (C=O); IR (KBr) ν : 3315, 3138, 2917, 2850, 1620, 1575, 1540, 1460, 1421, 1121, 1098, 826, 602 cm⁻¹. HRMS (ESI) calcd for C₂₈H₃₅NO₅ [M+H]⁺ 466.2593,

found 466.2584.

3.19 乙酰胆碱酯酶抑制活性测定

3.19.1 酶原提取

新鲜小鼠大脑与 4 °C 磷酸盐缓冲液(PBS) (0.1 mol/L, pH=7.4) 1 : 9 (w/V)混合匀浆, 冷冻离心后 (12000 r/min, 4 °C)取上清, 用 PBS 稀释一倍后, 于-70 °C冰箱中保存备用^[12].

3.19.2 抑制活性测定

样品处理: 将待测化合物溶于吐温-80, 配成约含 2%吐温-80 的溶液, 再用 2%吐温-80 稀释成 5 个适合的浓度.

羟胺三氯化铁比色法^[13]测定 AChE 抑制活性: 氯化乙酰胆碱配成 4 mol·L⁻¹, 待测化合物 3~16 分别溶于吐温-80, 用去离子水稀释至含 2%吐温-80, 再用 2%吐温-80 溶液稀释成 5 个适合的浓度, 采用甲硫酸新斯的明 (Neoserine methyl sulfate)作为阳性对照药. 加入适量的 PBS、水、乙酰胆碱、溶剂、合成化合物和酶液, 在 37 °C水浴中孵 30 min 后, 取出至冰浴中, 加入 1 mL 碱性羟胺(1 mol·L⁻¹), 混匀后加入 0.5 mL 盐酸(4 mol·L⁻¹), 混匀, 再加入 0.5 mL 5%三氯化铁, 混匀, 3000 r/min 离心 6 min, 取上清液比色, 以蒸馏水调零, 测量各样品管的吸光度. 以 Bliss 法计算化合物对乙酰胆碱酯酶的半数抑制浓度(IC₅₀).

References

- [1] Dharmaratne, H. R. W.; Nanayakkara, N. P. D.; Khan, I. A. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 429.
- [2] Tang, Y. X.; Simoneau, A. R.; Xie, J. J. *Cancer Prev. Res.* **2008**, *1*, 439.
- [3] Zi, X. L.; Simoneau, A. R. *J. Cancer Res.* **2005**, *65*, 3479.
- [4] Wu, D.; Yu, L.; Nair, M. G.; Ramsewak, R. S. *Pytochem.* **2002**, *9*, 41.
- [5] Wu, J.-Z.; Li, W.-L.; Yang, S.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 2141 (in Chinese).
(吴建章, 李物兰, 杨树林, 有机化学, **2012**, *32*, 2141.)
- [6] Luo, W.; Su, Y.-B.; Wang, C.-J. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7275.
- [7] Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Monjas, L.; Rademann, J.; Rodríguez-Franco, M. I. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1303.
- [8] Joshi, D.; Field, J.; Murphy, J.; Zask, A. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 450.
- [9] Wu, Z.; Cai, S.-L.; Fan, W.-J.; Wang, Q.-A. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 1296 (in Chinese).
(吴峥, 蔡双莲, 范文金, 汪秋安, 有机化学, **2012**, *32*, 1296.)
- [10] Aponte, J. C.; Verastegui, M.; Malaga, E. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6230.
- [11] Chu, H. W.; Wu, H. T.; Lee, Y. J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *60*, 2647.
- [12] Liu, A.-L.; Guang, H.-M.; Du, G.-H.; Li, M.-Y. *Sci. China, Sci. Life* **2007**, *37*, 503 (in Chinese).
(刘艾林, 光红梅, 杜冠华, 李铭源, 中国科学 C 辑: 生命科学, **2007**, *37*, 503.)
- [13] Zhou, J. F.; Xu, G. B.; Fang, W. J. *Biomed. Environ. Sci.* **2002**, *15*, 177.

(Lu, Y.)