新型槲皮素缀合物的合成与降糖活性研究

潘国军^a 肖娜^b 沈棣^a 陈明朗^a 李屹^b
 芦逵^a 杨杨^a 孟欣^{*,a} 郁彭^{*,a}

(^a 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

(^b 中国药科大学中药学院 南京 210000)

摘要 经过五步反应以 15%~46% 的总收率成功合成了 8 个新型的槲皮素缀合物 **20**~**27**。以芦丁为起始原料,经 *O*-苄基化、酸催化糖苷水解、烷基化等步骤,获得重要中间体 5,7,3',4'-四苄氧基-3-*O*-炔丙基槲皮素;再经过 Click 反应,得到槲皮素缀合物中间体 **12**~**19**,最后经催化氢化得到系列糖基、聚乙二醇(PEG)或寡聚乙二醇(OEG)与槲皮素偶联的新型缀合物。经体外 3T3-L1 脂肪细胞水平降糖活性测试,结果显示缀合物 **24**, **26** 和 **27** 具有较好的降糖活性。

关键词 槲皮素缀合物; Click 反应; 合成; 降糖活性; 脂肪细胞

Synthesis and Hypoglycemic Activity of Novel Quercetin Conjugates

Pan, Guojun^a Xiao, Na^b Shen, Di^a Chen, Minglang^a Li, Yi^b
 Lu, Kui^a Yang, Yang^a Meng, Xin^{*,a} Yu, Peng^{*,a}

(^a College of Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457)

(^b College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000)

Abstract Eight novel quercetin conjugates **20**~**27** were successfully synthesized through a concise procedure with 15%~46% overall yields by using Rutin as the starting material. After *O*-benzylation, glycoside hydrolysis and *O*-propargylation, rutin was converted to the key intermediate 5,7,3',4'-tetrabenzoyloxy-3-*O*-propargylquercetin, which subsequently 'clicked' with azido containing glycosides, poly(ethylene glycol) (PEG) or oligo(ethylene glycol) (OEG) to provide the fully protected quercetin conjugates **12**~**19**. After global deprotection, the resulting quercetin conjugates were evaluated on hypoglycemic activities at 3T3-L1 adipocyte level. The results showed that conjugates **24**, **26** and **27** exhibited good hypoglycemic effects.

Keywords quercetin conjugate; click reaction; synthesis; hypoglycemic activity; adipocyte

槲皮素(3,3',4',5,7-五羟基黄酮)属于黄酮醇类化合物,是一种天然存在的小分子植物次生代谢产物^[1~3]。它主要存在于日常食用的各种蔬菜、水果、茶以及葡萄酒中^[4],并具有抗心血管疾病、抗氧化、降血糖、抗肿瘤、抗炎、抗病毒等多种药理活性^[5~14]。另一方面,槲皮素等黄酮类化合物普遍存在水溶性差的问题,限制了其应用范围,所以改善有药用价值的化合物的水溶性问题显得至关重要。

值得一提的是,水溶性单糖或二糖来源广泛,可在体内环境中顺利降解,是一种绿色无害的药用材料。例

如葡萄糖、半乳糖、甘露糖、乳糖等,它们不仅为人体提供能量,还以糖苷的形式存在于各种组织和器官中,如大脑和神经组织等^[15],同时它们还是是一些糖蛋白的重要组成部分,参与到各种生命活动过程中。另外,聚乙二醇(PEG)或寡聚乙二醇(OEG)具有良好的生物相容性和水溶性,与药物配伍制剂可以改善药物的溶解性及靶向性等。因此,本工作通过应用“Click 反应”将槲皮素与此类分子偶联,旨在改善其水溶性,提高其生物利用度。

Click 反应是 2001 年诺贝尔化学奖获得者 Sharpless 提出的一种快速、高效、高选择性的合成方法。此反应

* Corresponding authors. E-mail: mengxin@tust.edu.cn; yupeng@tust.edu.cn

Received August 2, 2016; revised September 5, 2016; published online September 12, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21502139, 21402140) and the Science and Technology Commissioner Foundation of Tianjin (No. 15JCTPJC56200).

国家自然科学基金(Nos. 21502139, 21402140)及天津市科技特派员(No. 15JCTPJC56200)资助项目。

是利用 Cu(I)催化叠氮化物与端基炔进行 1,3-偶极环加成得到具有区域选择性的 1,4-二取代 1,2,3-三唑类化合物^[15,16]。本工作利用此反应为关键反应,在槲皮素结构引入糖基、PEG 或 OEG,获得了系列新型槲皮素衍生物

20~27 (Scheme 1),并在 3T3-L1 脂肪细胞水平进行葡萄糖消耗实验和荧光探针标记的 2-*D*-脱氧葡萄糖示踪实验,评价其降糖活性^[17,18],筛选出了具有良好降糖活性的新型槲皮素衍生物。

Reagent and conditions: (a) BnBr, K₂CO₃, DMF, reflux; (b) HCl, EtOH, reflux; (c) 3-bromo-1-propyne, K₂CO₃, DMF, r.t.; (d) **4~11** (Group-N₃), CuSO₄, ascorbic acid, THF/H₂O (V : V = 1 : 1); (e) H₂, Pd/C 10%, MeOH

图式 1 化合物 **20~27** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of compounds **20~27**

1 结果与讨论

以来源丰富的芦丁为起始原料, 分别经过 *O*-苄基化、酸性条件下水解糖苷键、*O*-炔丙基化步骤, 合成得到了重要中间体 3-*O*-炔丙基-5,7,3',4'-四苄氧基槲皮素 (**3**)。在苄基化保护时, 由于芦丁结构中羟基数量较多, 且反应活性不同, 一般反应条件较难实现全部苄基化。因此我们对该步反应条件进行了优化: 先将芦丁溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF), 加入碳酸钾, 升温至 45 °C, 搅拌 0.5 h, 再加入溴化苄, 密闭条件下反应 1 d。收率大大提升。之后, 反应液经抽滤、减压蒸馏, 再加入盐酸/乙醇溶液(*V*:*V*=1:10)回流 3 h, 经中和、抽滤得到粗产品 **2**, 直接用于下一步反应, 得到重要的中间体 **3**, 这三步反应的收率为 53%。

利用“Click 反应”将含有炔丙基的中间体 **3** 分别与异头位叠氮基取代的半乳糖、甘露糖、乳糖、葡萄糖、唾液酸等糖类分子偶联, 然后在 10% Pd/C 条件下催化氢化得到一系列新型槲皮素缀合物 **20**~**27**。据文献[15]报道, 在硫酸铜、抗坏血酸钠、TBAB、二氯甲烷与饱和碳酸氢钠水溶液条件下, 此反应具有较高反应收率。本工作在此基础上对反应条件进行了进一步优化, 即在硫酸铜、抗坏血酸钠、四氢呋喃水溶液条件下反应 8 h, 反应收率高达 80%~95%。

槲皮素缀合物 **20**~**27** 均为未见文献报道的全新化合物, 本工作对其进行了核磁共振氢谱(¹H NMR)、核磁共振碳谱(¹³C NMR)、高分辨质谱(HRMS)、MALDI-TOF-MS 及熔点测定。

以二甲双胍为阳性对照, 二甲亚砜(DMSO)为溶剂, 在 3T3-L1 脂肪细胞水平进行了体外糖消耗的生物活性评价(实验结果见图 1A)。缀合物 **20**~**27** 与空白组相比, 均显示较高的糖消耗作用; 但与槲皮素比较, 活性没有显著性差异。推断可能与槲皮素缀合物与槲皮素在 DMSO 溶剂中均具有良好的溶解性有关。为了研究水溶性差异对糖消耗作用的影响, 在实验中改用磷酸盐缓冲液(PBS)对化合物进行溶解和稀释, 实验结果见图 1B。结果显示槲皮素在促进糖消耗方面有显著性下降, 推断此现象可能与槲皮素在 PBS 条件下溶解性较差有关, 相比而言, 缀合物 **24**, **26**, **27** 在相同条件下则可以完全溶解并保持较好的促进糖消耗的作用。

为了更直观地评价槲皮素缀合物的降糖活性, 进一步用荧光探针标记的 2-*D*-脱氧葡萄糖荧光实验(荧光强度越强, 促进糖消耗的能力越强)评价其降糖活性, 实验结果见图 2。缀合物 **24**, **26**, **27** 荧光强度与空白组相比, 荧光更强, 与阳性对照组相比, 强度相当, 此结果进一步显示槲皮素缀合物确实有较好的降糖活性。

图 1 **20**~**27** 对脂肪细胞糖消耗的作用

Figure 1 **20**~**27** promoted glucose consumption in adipocytes (A): Dissolved in DMSO and diluted with PBS. (B): Dissolved in PBS. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001 vs. blank

图 2 二甲双胍和缀合物 **24**, **26** 和 **27** 对脂肪细胞 2-脱氧葡萄糖摄取的作用

Figure 2 Metformin as well as conjugates **24**, **26** and **27** regulated 2-NBDG uptake in adipocytes. These compounds were dissolved in PBS. **24**, **26**, **27** (10 μmol·L⁻¹), metformin (1 mmol·L⁻¹)

2 结论

根据设计的合成路线, 成功合成了 8 个新型槲皮素缀合物 **20**~**27**。目标化合物的结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS 和 MALDI-TOF-MS 等确证。该方法具有合成路线简单、反应条件温和、收率高等优点。细胞水平降糖活性研究表明, 槲皮素缀合物降糖作用的强弱与其本身溶解性有直接关系, 水溶性越好, 降糖作用越强。而且, 荧光探针标记的 2-*D*-脱氧葡萄糖荧光实验进一步

验证了槲皮素缀合物具有较好的降糖效果。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

循环水式真空泵, 河南省予华仪器有限公司; 集热式恒温加热磁力搅拌器, 郑州长城科工贸; 低温恒温反应浴, 巩义市京华仪器有限公司; AVANCE III-400MHz 型核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; 数字熔点仪 WRS-1B, 上海精密科学仪器有限公司. 柱层析硅胶(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.

3.2 化合物合成

α -叠氮唾液酸甲酯(**4**)参考文献[19]制备, β -叠氮甘露糖(**5**)、 β -叠氮葡萄糖(**6**)、 β -叠氮半乳糖(**7**)参考文献[20]制备, β -叠氮乳糖(**8**)参考文献[21]制备, 叠氮化三缩四乙二醇(**9**)、叠氮化聚乙二醇单甲醚 2000 (**10**)参考文献[22]制备, 11-叠氮-3,6,9-三氧杂十一烷基-半乳糖苷(**11**)参考文献[23]制备.

3.2.1 5,7,3',4'-四苄氧基槲皮素(**2**)的合成

芦丁(6.10 g, 10.00 mmol)溶于 100 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 加入无水碳酸钾(6.91 g, 50.00 mmol), 45 °C 搅拌 30 min 后加入溴化苄溶液(8.55 g, 50.00 mmol), 继续搅拌 48 h, 经薄层色谱(TLC)检测反应完全后, 过滤除去碳酸钾, 减压蒸馏除去溶剂, 粗产品直接用于下一步反应. 加入 300 mL 乙醇和 30 mL 浓盐酸, 回流反应 3 h, 冷却至室温, 饱和碳酸氢钠水溶液中和反应体系至中性, 抽滤, 洗涤滤饼, 干燥, 二氯甲烷重结晶得黄色固体 **2** 4.04 g, 两步总产率 61%. 粗产品未经分离纯化直接用于下一步反应.

3.2.2 3-炔丙氧基-5,7,3',4'-四苄氧基槲皮素(**3**)的合成

将化合物 **2** (3.00 g, 4.53 mmol)溶于 10 mL DMF, 加入无水碳酸钾(688 mg, 4.98 mmol)及溴丙炔(592 mg, 4.98 mmol), 室温搅拌过夜, TLC 检测反应完全, 减压旋蒸, 柱层析分离纯化[洗脱剂: *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=10:1)]得白色固体 **3** 2.76 g, 产率 87%. m.p. 302~305 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.86 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J*=8.8 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.59 (d, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.50~7.28 (m, 18H), 6.98 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.51 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 6.42 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.06 (s, 2H), 4.88 (d, *J*=2.4 Hz, 2H), 2.56 (t, *J*=2.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 173.6, 162.9, 159.8, 158.7, 153.6, 150.8, 148.2, 138.5, 137.1, 136.8, 136.3, 135.7, 128.80, 128.64, 128.60,

128.55, 128.48, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 127.3, 127.2, 126.6, 123.9, 122.4, 115.5, 113.7, 109.9, 98.1, 93.9, 79.2, 75.8, 71.4, 70.9, 70.8, 70.5, 59.2; MS (ESI) *m/z*: 701.2 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₄₆H₃₇O₇ [M+H]⁺ 701.2534, found 701.2531.

3.2.3 1-[*N*-1-(α -*N*-乙酰神经氨酸甲酯)]-4-[3-*O*-亚甲基-(5,7,3',4'-四苄氧基槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(**12**)的合成

称取化合物 **3** (301 mg, 0.43 mmol)、化合物 **4** (144 mg, 0.43 mmol)、硫酸铜(69 mg, 0.43 mmol)及(+)-*L*-抗坏血酸钠(85 mg, 0.43 mmol)于 25 mL 圆底烧瓶中, 加入四氢呋喃/水(*V*:*V*=1:1) 10 mL, 室温搅拌 10 h, 减压蒸馏除去溶剂, 柱层析分离纯化[洗脱剂: *V*(二氯甲烷):*V*(甲醇)=30:1)]得黄色固体 **12** 320 mg, 产率 72%. m.p. 124.3~124.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.47 (s, 1H), 7.99 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.83 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 7.73~7.59 (m, 3H), 7.57~7.30 (m, 18H), 7.19 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 6.96 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 6.73 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 5.34 (d, *J*=5.2 Hz, 1H), 5.30~5.07 (m, 10H), 4.59 (d, *J*=6.4 Hz, 1H), 4.33~4.31 (m, 2H), 3.94~3.71 (m, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.67~3.54 (m, 2H), 2.99 (dd, *J*=12.8, 4.0 Hz, 1H), 1.97~1.92 (m, 1H), 1.89 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 172.7, 171.5, 167.3, 163.2, 159.6, 158.6, 152.6, 150.7, 148.1, 143.2, 139.0, 137.6, 137.3, 137.2, 136.5, 129.0, 128.92, 128.88, 128.85, 128.68, 128.51, 128.37, 128.27, 128.12, 128.05, 128.0, 127.5, 123.2, 122.2, 114.6, 114.0, 109.3, 98.3, 94.7, 89.6, 75.4, 70.7, 70.5, 70.4, 69.0, 66.6, 64.3, 64.1, 53.8, 52.1, 23.3; MS (ESI) *m/z*: 1049.3 [M+H]⁺; HRMS (ESI) calcd for C₅₈H₅₇N₄O₁₅ [M+H]⁺ 1049.3815, found 1049.3819.

3.2.4 1-[*N*-1-(α -*N*-乙酰神经氨酸)]-4-[3-*O*-亚甲基-槲皮素]-[1,2,3]-三唑(**20**)的合成

将化合物 **12** (200 mg, 0.19 mmol)溶于 10 mL 甲醇, 加入 10% Pd/C (40 mg), 通入氢气, 室温搅拌 12 h, 滤除钯碳, 用 2 mol·L⁻¹氢氧化钾水溶液调 pH 至 9~10, 继续搅拌 2 h, 用阳离子树脂调 pH 至中性, 过滤, 浓缩滤液, 柱层析分离纯化[洗脱剂: *V*(乙酸乙酯):*V*(甲醇):*V*(水)=10:1:0.1)]得黄色固体 **20** 105 mg, 产率 82%. m.p. 152.7~152.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ : 8.16 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.37 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.84 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.19 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.10~3.77 (m, 5H), 3.77~3.54 (m, 2H), 3.41~3.21 (m, 1H), 2.11~2.05 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ : 179.8, 175.4, 165.8, 163.0, 159.0, 158.4, 149.6, 145.9,

137.2, 124.2, 122.8, 122.7, 117.0, 116.4, 105.9, 99.8, 94.8, 76.3, 72.4, 70.0, 68.8, 65.6, 64.5, 53.5, 41.1, 22.7; HRMS (ESI) calcd for $C_{29}H_{29}O_{15}N_4$ $[M-H]^-$ 673.1635, found 673.1627.

3.2.5 1-[N-1-(β -D-甘露糖)]-4-[3-O-亚甲基-(5,7,3',4'-四氧基槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(**13**)的合成

化合物 **13** 的合成方法同化合物 **12**, 以化合物 **5** 为原料得浅黄色固体, 产率 91%. m.p. 190.9~191.8 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.34 (s, 1H), 7.87 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J=8.4$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.65 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.53~7.32 (m, 18H), 7.23 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.28~5.26 (m, 7H), 5.19 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 5.06 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 5.00 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.63 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.89~3.87 (m, 1H), 3.74~3.72 (m, 1H), 3.62~3.60 (m, 1H), 3.55~3.40 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.8, 163.2, 159.6, 158.6, 152.5, 150.7, 148.2, 139.4, 137.6, 137.3, 137.2, 136.5, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 128.0, 127.4, 124.9, 123.3, 122.3, 114.4, 114.1, 109.4, 98.3, 94.7, 86.4, 80.8, 73.6, 71.0, 70.7, 70.6, 70.5, 70.4, 66.7, 64.7, 61.5; MS (ESI) m/z : 906.3 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for $C_{52}H_{48}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 906.3233, found 906.3227.

3.2.6 1-[N-1-(β -D-甘露糖)]-4-[3-O-亚甲基-槲皮素]-[1,2,3]-三唑(**21**)的合成

将化合物 **13** (200 mg, 0.22 mmol)溶于 10 mL 甲醇, 加入 10% Pd/C (40 mg), 通入氢气, 室温搅拌 12 h, 滤除钯碳, 浓缩滤液, 柱层析分离纯化[洗脱剂: V (乙酸乙酯): V (甲醇): V (水)=30:1:0.1]得黄色固体 **21** 114 mg, 产率 95%. m.p. 175.8~179.5 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.31 (s, 1H), 7.51~7.47 (m, 2H), 6.87 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.22 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 3.89~3.42 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.3, 164.6, 161.7, 156.8, 156.7, 149.1, 145.6, 142.7, 136.6, 125.0, 121.6, 121.2, 116.1, 115.8, 104.6, 99.1, 94.1, 86.3, 80.8, 73.6, 70.9, 66.7, 65.2, 61.5; HRMS (ESI) calcd for $C_{24}H_{22}O_{12}N_3$ $[M-H]^-$ 544.1209, found 544.1194.

3.2.7 1-[N-1-(β -D-葡萄糖)]-4-[3-O-亚甲基-(5,7,3',4'-四氧基槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(**14**)的合成

化合物 **14** 的合成方法同化合物 **12**, 以化合物 **6** 为原料得黄色固体, 产率 89%. m.p. 121.7~122.1 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.39 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.73 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.51~

7.33 (m, 18H), 7.24 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.57 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.39 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 5.30~5.17 (m, 11H), 4.64 (s, 1H), 3.81~3.68 (m, 2H), 3.47~3.25 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.8, 163.2, 159.6, 158.6, 152.5, 150.7, 148.2, 143.2, 139.4, 137.7, 137.3, 137.2, 136.5, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.4, 124.4, 123.2, 122.4, 114.4, 114.1, 109.3, 98.3, 94.7, 88.0, 80.5, 77.4, 72.6, 70.7, 70.6, 70.5, 70.3, 70.0, 64.5, 61.2; MS (ESI) m/z : 906.3 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for $C_{52}H_{48}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 906.3233, found 906.3231.

3.2.8 1-[N-1-(β -D-葡萄糖)]-4-[3-O-亚甲基-槲皮素]-[1,2,3]-三唑(**22**)的合成

化合物 **22** 的合成方法同化合物 **21**, 以化合物 **14** 为原料得黄色固体, 产率 93%. m.p. 182.6~183.4 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.35 (s, 1H), 7.52 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 6.89 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.55 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.07~3.12 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.3, 164.7, 161.8, 156.8, 156.7, 149.2, 145.7, 143.1, 136.6, 124.5, 12.6, 121.2, 116.2, 115.8, 104.6, 99.1, 94.1, 88.0, 80.5, 77.5, 72.5, 70.0, 65.2, 61.3; HRMS (ESI) calcd for $C_{24}H_{22}O_{12}N_3$ $[M-H]^-$ 544.1209, found 544.1216.

3.2.9 1-[N-1-(β -D-半乳糖)]-4-[3-O-亚甲基-(5,7,3',4'-四氧基槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(**15**)的合成

化合物 **15** 的合成方法同化合物 **12**, 以化合物 **7** 为原料得黄色固体, 产率 92%. m.p. 129.9~130.2 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.35 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.72 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.51~7.33 (m, 18H), 7.23 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.51 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.28~5.12 (m, 8H), 5.17 (s, 2H), 5.01 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.71 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.07~4.02 (m, 1H), 3.79~3.49 (m, 5H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.8, 163.2, 159.6, 158.6, 152.4, 150.7, 148.2, 139.4, 137.7, 137.3, 137.2, 136.5, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.4, 124.1, 123.3, 122.3, 114.5, 114.1, 109.4, 98.3, 94.7, 88.6, 78.9, 74.2, 70.7, 70.6, 70.5, 70.4, 69.9, 68.9, 64.6, 60.8; MS (ESI) m/z : 906.3 $[M+H]^+$; HRMS (ESI) calcd for $C_{52}H_{48}N_3O_{12}$ $[M+H]^+$ 906.3233, found 906.3231.

3.2.10 1-[N-1-(β -D-半乳糖)]-4-[3-O-亚甲基-槲皮素]-[1,2,3]-三唑(**23**)的合成

化合物 **23** 的合成方法同化合物 **21**, 以化合物 **15** 为原料得浅黄色固体, 产率 96%. m.p. 110.0~110.2 °C;

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.35 (s, 1H), 7.51 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 6.88 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.22 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 5.50 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.10~4.02 (m, 1H), 3.82~3.54 (m, 5H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.3, 164.6, 161.8, 156.8, 156.6, 149.2, 145.7, 143.2, 136.7, 124.2, 121.6, 121.2, 116.2, 115.8, 104.7, 99.1, 94.1, 88.6, 78.9, 74.2, 69.8, 69.0, 65.2, 60.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_{12}\text{N}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 544.1209, found 544.1184.

3.2.11 1-[*N*-1-(β -*D*-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-*D*-吡喃葡萄糖)]-4-[3-*O*-亚甲基-(5,7,3',4'-四苄氧基槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(16)的合成

化合物 16 的合成方法同化合物 12, 以化合物 8 为原料得黄色固体, 产率 81%. m.p. 108.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.40 (s, 1H), 7.89 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.54~7.32 (m, 18H), 7.23 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 5.68 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.59 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 5.27~5.14 (m, 11H), 4.91 (s, 1H), 4.82 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.70~4.67 (m, 2H), 4.56 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 3.88 (dd, $J=15.2, 9.2$ Hz, 1H), 3.79~3.75 (m, 1H), 3.66~3.50 (m, 8H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 172.8, 163.2, 159.6, 158.6, 152.5, 150.7, 148.2, 139.4, 137.6, 137.3, 137.2, 136.5, 129.0, 128.9, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 127.4, 124.4, 123.3, 122.4, 114.5, 114.1, 109.3, 104.3, 98.3, 94.7, 87.5, 80.3, 78.3, 76.1, 75.7, 73.7, 72.3, 71.0, 70.8, 70.6, 70.5, 70.4, 68.6, 64.5, 60.9; MS (ESI) m/z : 1068.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_{17}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1068.3761, found 1068.3759.

3.2.12 1-[*N*-1-(β -*D*-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-*D*-吡喃葡萄糖)]-4-[3-*O*-亚甲基-槲皮素]-[1,2,3]-三唑(24)的合成

化合物 24 的合成方法同化合物 21, 以化合物 16 为原料得浅黄色固体, 产率 91%. m.p. 103.4~103.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.39 (s, 1H), 7.53 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.90 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 5.67 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.28 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 3.98~3.44 (m, 12H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.3, 164.7, 161.7, 156.8, 156.7, 149.2, 145.7, 143.2, 136.6, 124.5, 121.6, 121.2, 116.2, 115.8, 104.6, 104.3, 99.1, 94.1, 87.5, 80.3, 78.3, 76.1, 75.7, 73.7, 72.3, 71.0, 68.6, 65.1, 60.9, 60.5; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{17}\text{N}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 706.1737, found 706.1744.

3.2.13 1-[*N*-1-(3,6,9-三氧杂-十一-1-醇)]-4-[3-*O*-亚甲基-(5,7,3',4'-四苄氧基槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(17)的合成

化合物 17 的合成方法同化合物 12, 以化合物 9 为原料得白色固体, 产率 92%. m.p. 109.3~109.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.88 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.37 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.36~6.96 (m, 20H), 6.80 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.42 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.59~3.49 (m, 12H); MS (ESI) m/z : 920.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 920.3753, found 920.3755.

3.2.14 1-[*N*-1-(3,6,9-三氧杂-十一-1-醇)]-4-[3-*O*-亚甲基-槲皮素]-[1,2,3]-三唑(25)的合成

化合物 25 的合成方法同化合物 21, 以化合物 17 为原料得浅黄色固体, 产率 92%. m.p. 135.7~138.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.88 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.35 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.44 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.75 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.63~3.49 (m, 12H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ : 178.4, 164.3, 161.6, 157.3, 156.9, 148.3, 144.7, 142.8, 135.8, 125.6, 121.6, 121.4, 115.4, 114.9, 104.5, 98.4, 93.4, 72.2, 70.1, 70.0, 69.9, 68.8, 64.0, 60.8, 49.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 582.1694, found, 582.1676.

3.2.15 1-[*N*-1-(聚乙二醇单甲醚 2000)]-4-[3-*O*-亚甲基-(5,7,3',4'-四苄氧基槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(18)的合成

化合物 18 的合成方法同化合物 12, 以化合物 10 为原料得白色固体, 产率 89%. m.p. 113.2~113.3 $^{\circ}\text{C}$; MALDI-TOF-MS calcd for $\text{C}_{137}\text{H}_{220}\text{O}_{52}\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2740.4691, found 2740.4682. 粗产品未经分离纯化直接用于下一步反应.

3.2.16 1-[*N*-1-(聚乙二醇单甲醚 2000)]-4-[3-*O*-亚甲基-槲皮素]-[1,2,3]-三唑(26)的合成

化合物 26 的合成方法同化合物 21, 以化合物 18 为原料得浅黄色固体, 产率 93%. m.p. 81.2~81.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.95 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.42 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.39 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.21 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.48 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J=5.2$ Hz, 3H), 3.63~3.35 (m, 174H), 3.31~3.30 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ : 179.9, 165.9, 163.2, 158.7, 158.4, 149.8, 146.2, 144.2, 137.2, 127.0, 123.0, 122.8, 116.8, 116.3, 106.0, 99.8, 94.8, 73.0, 71.6, 71.5, 71.4, 70.2, 65.5, 59.1, 51.4; MALDI-TOF-MS calcd for $\text{C}_{137}\text{H}_{220}\text{O}_{57}\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2380.2818, found 2380.2822.

3.2.17 1-[N-1-(1-(β -D-半乳糖)-3,6,9-三氧杂-十一烷基)-4-[3-O-亚甲基-(5,7,3',4'-四氧基槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(**19**)的合成

化合物 **19** 的合成方法同化合物 **12**, 以化合物 **11** 为原料得浅黄色固体, 产率 82%. m.p. 102.1 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.34 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.50 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.36~6.96 (m, 20H), 6.83 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.48 (t, $J=4.40$ Hz, 2H), 4.26 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 4.01~3.97 (m, 1H), 3.87 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 3.79~3.50 (m, 18H); MS (ESI) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1082.4; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{64}\text{N}_3\text{O}_{16}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1082.4281, found 1082.4279.

3.2.18 1-[N-1-(1-(β -D-半乳糖)-3,6,9-三氧杂-十一烷基)-4-[3-O-亚甲基-槲皮素)]-[1,2,3]-三唑(**27**)的合成

化合物 **27** 的合成方法同化合物 **21**, 以化合物 **19** 为原料得浅黄色固体, 产率 90%. m.p. 130.4~132.0 °C; ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.91 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.37 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.15 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.48 (t, $J=4.0$ Hz, 2H), 4.26 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 4.01~3.97 (m, 1H), 3.87 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 3.79~3.50 (m, 18H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ : 178.3, 164.3, 161.5, 157.2, 156.8, 148.2, 144.6, 142.8, 135.8, 125.7, 121.6, 121.5, 115.4, 115.0, 104.5, 103.5, 98.5, 93.5, 75.2, 73.4, 71.2, 69.9, 69.9, 69.0, 68.8, 68.2, 64.1, 61.2, 49.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{16}\text{N}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 720.2258, found 720.2237.

3.3 生物活性测试

在生理状态下, 检测了化合物 **20**~**27** 对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗以及 2-D-脱氧葡萄糖摄取的影响. 以二甲双胍作为阳性对照.

3.3.1 脂肪细胞糖消耗的实验

将分化成熟生长状态良好的脂肪细胞接种于 48 孔培养板中(2×10^5 cell/孔), 细胞生长至约 80% 密度时, 将培养基换成不含糖的 KRHB 液同步化 4 h. 分组如下:

(1)空白组, 化合物组(DMSO 溶解, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 和 Metformin ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)温育 30 min 后, 再加入葡萄糖(终浓度为 $11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后, 于 37 °C 再孵育 4 h. (2)空白组, 化合物组(PBS 溶解, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 Metformin ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)温育 30 min 后, 再加入葡萄糖(终浓度为 $11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后, 于 37 °C 再孵育 4 h.

用葡萄糖测定试剂盒测定细胞上清液中葡萄糖的含量, 通过计算葡萄糖浓度差值即为脂肪细胞葡萄糖的消耗量.

3.3.2 脂肪细胞 2-D-脱氧葡萄糖摄取的实验

将分化成熟生长状态良好的脂肪细胞, 接种于 48 孔培养板中(2×10^5 cell/孔), 细胞生长至约 80% 密度时, 将培养基换成不含糖的 KRHB 液同步化 4 h. 分组如下: 空白组, 化合物组(PBS 溶解, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 Metformin ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)温育 30 min 后, 再加入葡萄糖(终浓度为 $11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后, 于 37 °C 再孵育 0.5 h. 用 PBS 清洗后, 加 100 μL 的 2-D-脱氧葡萄糖(2-NBDG) ($500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)探针, 于 37 °C 避光孵育 1 h. 用冷的 PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 200 μL 的 KRHB, 在 480 nm 激发波长和 515 nm 发射波长下用荧光显微镜拍照.

辅助材料(Supporting Information) 中间体 **3**、目标产物 **20**~**27** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Seo, M. J.; Lee, Y. J.; Hwang, J. H.; Kim, K. J.; Lee, B. Y. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *11*, 1308.
- [2] Kim, C. S.; Kwon, Y.; Choe, S. Y.; Hong, S. M.; Yoo, H.; Goto, T.; Kawada, T.; Choi, H. S.; Joe, Y.; Chung, H. T.; Yu, R. *Nutr. Metab. (Lond)* **2015**, *12*, 33.
- [3] Mahmood, M. F.; Hassan, N. A.; El Bassossy, H. M.; Fahmy, A. *PLoS One* **2013**, *8*, e63784.
- [4] Hertog, M. G.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Fehily, A. M.; Sweetnam, P. M.; Elwood, P. C. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1996**, *5*, 673.
- [5] Shoskes, D. A.; Nickel, J. C. *Urologic Clinics North Am.* **2011**, *38*, 279.
- [6] Liu, K.; Mei, F.; Wang, Y. P.; Xiao, N.; Yang, L. L.; Wang, Y. L.; Li, J.; Huang, F.; Kou, J. P.; Liu, B. L.; Qi, L. W. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 551.
- [7] Bhadada, S. V.; Vyas, V. K.; Goyal, R. K. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 221.
- [8] Casado-Díaz, A.; Anter, J.; Dorado, G.; Quesada-Gómez, J. M. J. *Nutr. Biochem.* **2016**, *32*, 151.
- [9] Stefek, M.; Karasu, C. *Rejuvenation Res.* **2011**, *14*, 525.
- [10] Mei, Q. G.; Yuan, W. C.; Wang, C. *Chin. J. Org. Chem.* **2015**, *35*, 70 (in Chinese). (梅青刚, 袁伟成, 王淳, 有机化学, **2015**, *35*, 70.)
- [11] 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.)
- [12] Yan, X.; Liu, H. Q.; Zou, Y. Q.; Ren, Z. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 1534 (in Chinese). (延玺, 刘会青, 邹永青, 任占华, 有机化学, **2008**, *28*, 1534.)
- [13] Teng, Y. O.; Zhao, H. Y.; Wang, J.; Liu, H.; Gao, M. L.; Zhou, Y.; Han, K. L.; Fan, Z. C.; Zhang, Y. M.; Sun, H.; Yu, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 145.
- [14] Sun, H.; Li, Y. S.; Zhang, X. T.; Lei, Y. N.; Ding, W. N.; Zhao, X.; Wang, H. M.; Song, X. T.; Yao, Q. W.; Zhang, Y. M.; Ma, Y.; Wang, R.; Zhu, T.; Yu, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4567.
- [15] Lou, D. H.; Wang, G. Q.; Xia, L.; Chen, L.; Wang, Q. A. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 535 (in Chinese). (娄定辉, 汪钢强, 夏立, 陈凌, 汪秋安, 有机化学, **2013**, *33*, 535.)

- [16] Zhao, Z. G.; Wang, X. H.; Shi, Z. C.; Cheng, Y. Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, *34*, 1110 (in Chinese).
(赵志刚, 王晓红, 石治川, 程玉宇, 有机化学, **2014**, *34*, 1110.)
- [17] Xiao, N.; Mei, F.; Sun, Y.; Pan, G. J.; Liu, B. L.; Liu, K. *Planta Med.* **2014**, *80*, 993.
- [18] Pan, G. J.; Zhao, L. B.; Xiao, N.; Yang, K.; Ma, Y. T.; Zhao, X.; Fan, Z. C.; Zhang, Y. M.; Yao, Q. W.; Lu, K.; Yu, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 674.
- [19] Weiwer, M.; Chen, C. C.; Kemp, M. M.; Linhardt, R. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 10.1002/ejoc.200900117.
- [20] Hanessian, S.; Saavedra, O. M.; Mascitti, V.; Marterer, W.; Dehriein, R.; Mak, C. P. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3267.
- [21] Tso, K. K.; Leung, K. K.; Liu, H. W.; Lo, K. K. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4557.
- [22] Michalina, P.; Florence, C. D.; Alain, M.; Stanislaw, P. *Carbohydr. Res.* **2015**, *414*, 51.
- [23] Zhang, S.; Moussodia, R. O.; Sun, H. J.; Leowanawat, P.; Muncan, A.; Nusbaum, C. D.; Chelling, K. M.; Heiney, P. A.; Klein, M. L.; André, S.; Roy, R.; Gabius, H. J.; Percec, V. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 10899.

(Zhao, C.)