

杨梅素衍生物的合成及抗氧化活性研究

李吉顺^{1,2,3}, 吴红林³, 朱子豪³, 吴光旭^{2,3}, 李天磊^{2,3}, 潘卫东^{1,2*}, 吴松^{3*}

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学天然产物重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 3. 中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

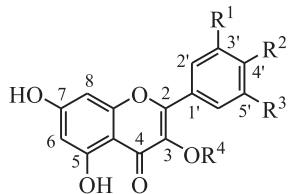
摘要:目的 设计合成杨梅素衍生物并进行体外抗氧化活性筛选。方法 以天然产物杨梅素及杨梅苷为起始原料, 通过 Mannich 反应、多步保护和脱保护方法等对其 C-3、C-5、C-7 位羟基以及 C-8 位进行选择性地结构修饰, 合成了一系列杨梅素衍生物, 采用抗总氧 DPPH 模型对其进行自由基清除试验。结果与结论 合成了 18 个未见文献报道的新化合物, 目标化合物的结构经核磁共振氢谱和碳谱、高分辨质谱确证。体外抗氧化活性试验结果显示, 11 个杨梅素衍生物具有比先导物杨梅素及杨梅苷更强的抗氧化能力。本研究发现在杨梅素 C-8 和 C-7 位修饰可以显著提高抗氧化能力, 自由基清除 IC₅₀ 值范围为 6.71 ~ 10.98 μg·mL⁻¹。本研究初步明确了杨梅素抗氧化活性关键结构和主要修饰位点, 为后续深入研究构效关系提供指导。

关键词: 黄酮醇; 杨梅素衍生物; 天然结构修饰; 抗氧化

中图分类号: R914 文献标志码: A

黄酮醇类天然产物在自然界中分布广泛, 并应用于医药、食品、保健品、化妆品等领域, 其中代表性化合物山柰酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)和芦丁(rutin)被广泛研究和应用^[1-2]。该类化合物具有抗氧化、保护心血管、抗肿瘤、抗菌、降血糖、调血脂、护肝等多种药理活性^[3]。杨梅素(myricetin)作为一种天然黄酮醇类化合物, 具有与槲皮素和山柰酚类似的母核结构^[3-4](图 1)。Bertin 等^[5]在研究不同黄酮类天然产物的抗氧化过程中发现杨梅素具有较强的抗氧化能力, 并首次证明了杨梅素能够有效减缓自由基对于人

体低密度脂蛋白和血管内皮细胞的氧化作用。目前, 以槲皮素和山柰酚为代表的黄酮醇类化合物研究相对深入, 而基于杨梅素为母核进行结构修饰的研究有限^[6-8], 尤其在杨梅素衍生物抗氧化方面构效关系的研究更少。一方面是因为杨梅素母核上具有 6 个酚羟基, 较槲皮素复杂, 且各酚羟基性质比较相近, 选择性对不同酚羟基进行结构修饰较难, 针对杨梅素结构修饰方法的报道较少。另一方面, 由于杨梅素分子结构刚性较强, 水溶性和脂溶性差, 生物利用度低等问题限制了杨梅素在药物领域的深入开发。



kaempferol: R¹ = H, R² = OH, R³ = H, R⁴ = H
quercetin: R¹ = OH, R² = OH, R³ = H, R⁴ = H
rutin: R¹ = OH, R² = OH, R³ = H, R⁴ = 6-deoxy-*α*-L-mannopyranosyl-*β*-D-glycospyranosyl
myricetin: R¹ = OH, R² = OH, R³ = OH, R⁴ = H
myricitrin: R¹ = OH, R² = OH, R³ = OH, R⁴ = 6-deoxy-*α*-L-mannopyranosyl

Figure 1 The structures of flavonoid derivatives

1 目标化合物的设计与合成路线

为了探索杨梅素类衍生物的抗氧化活性, 发

现具有较好活性和类药性的新型黄酮醇类衍生物, 本研究以杨梅素为母核, 对杨梅素 A 环和 C 环的 C-3、C-5、C-7 位羟基以及 C-8 位进行选择

收稿日期: 2020-10-31

基金项目: 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室 2019 年开放课题项目 (FAMP201903K); 贵州省科技基金项目 (黔科合平台人才[2017]5101); 国家自然科学基金项目 (81703364); 贵阳中医学院研究生工作站创新资助项目 (GNYL[2017] 008 号-7-Y)

作者简介: 李吉顺(1991-), 男(汉族), 甘肃定西人, 硕士研究生, Tel: 15286037616, E-mail: 15286037616@163.com; *通信作者: 潘卫东(1975-), 男(汉族), 江西婺源人, 博士, 研究员, 主要从事天然药物化学及结构修饰研究, Tel: 18985416575, E-mail: wdpan@163.com; 吴松(1964-), 男(汉族), 云南师宗人, 研究员, 主要从事合成药物化学研究, Tel: (010)83163542, E-mail: ws@imm.ac.cn。

性结构修饰,初步研究杨梅素不同羟基的反应活性。在不破坏发挥抗氧化作用所必需的酚羟基情况下,最大程度保持杨梅素类黄酮醇特殊单元 B 环的结构特点。主要策略是通过在 A 环和 C 环上引入杂环和多样性官能团,探索应用不同的化

学合成方法,合成了 18 个新的杨梅素衍生物,采用二苯代苦味肼基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)抗氧化模型对其进行自由基清除能力测试,探索杨梅素衍生物抗氧化活性的构效关系(图 2)。

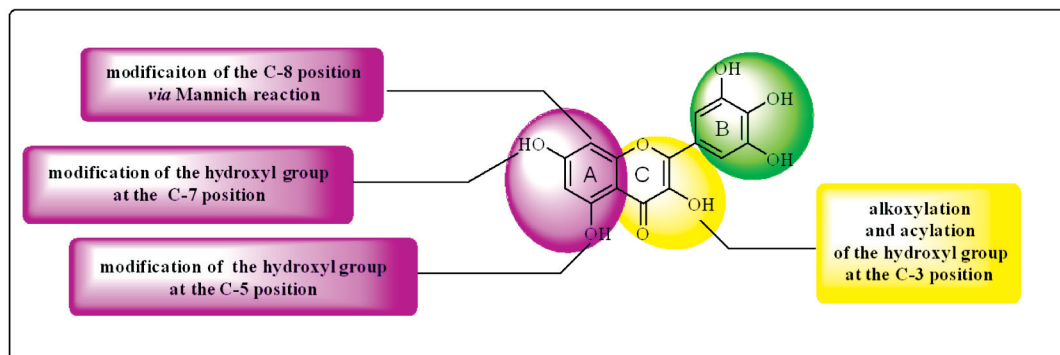


Figure 2 The design and synthesis of new flavonoid derivatives based on the myricetin scaffold

黄酮类化合物具有提高机体抗氧化及清除自由基的能力,其抗氧化活性可能与结构上的酚羟基有直接关系^[9]。为了最大程度地保留黄酮类化合物多酚羟基结构,多个研究组发现在黄酮母核结构中引入二甲氨基甲基可以显著改善黄酮类化合物的水溶性^[10]。为了探索 C-8 位不同官能

团对杨梅素抗氧化活性的影响,将杨梅素直接与多聚甲醛、环状仲胺经 Mannich 反应制备了 5 个新的杨梅素类衍生物。通过在 C-8 位引入环己胺、1-[(2,3,4-三甲氧基苯基)甲基]哌嗪、吗啉和 N-甲基哌嗪杂环片段,并与盐酸成盐,可显著提高该类化合物的水溶性(图 3)。

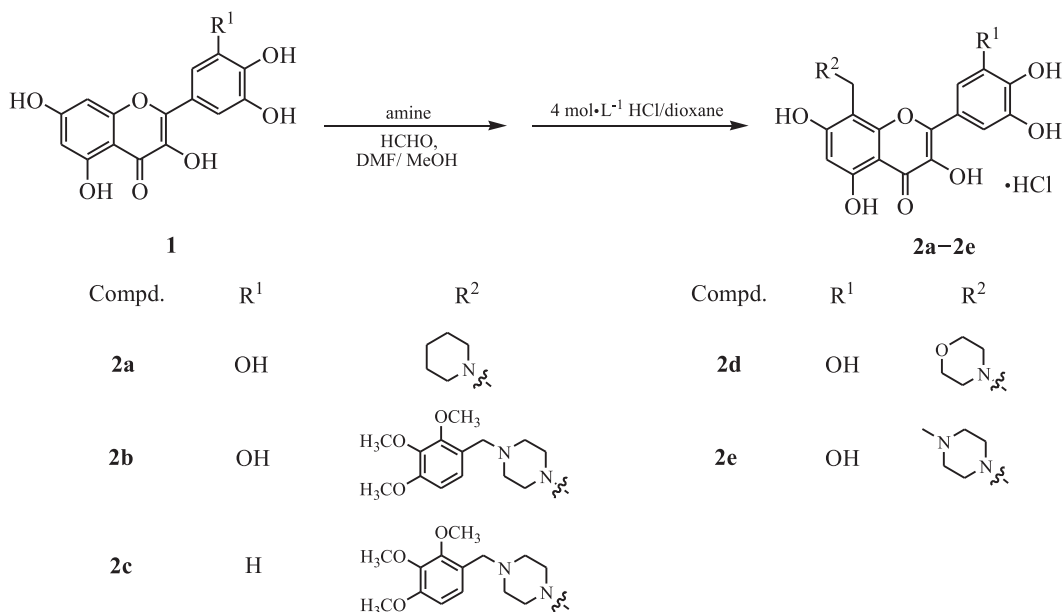


Figure 3 Synthetic route of C8-modified myricetin derivatives by Mannich reaction

选择文献报道的方法^[11],以乙醇为溶剂,通过加热促进化合物的溶解,但是该反应同时生成部分降解产物,导致目标产物难分离。通过 N,N-二甲基甲酰胺/甲醇混合溶剂体系,可以提高杨梅素的溶解度和反应选择性,再在盐酸/二氧六环溶

液中成盐得到目标产物。研究过程中发现,杨梅素 Mannich 碱衍生物在酸性条件下相对稳定,游离碱的稳定性不高,在碱性条件下易发生降解反应。通过直接成盐,不仅能改善其水溶性,还可以进一步提高该类化合物的稳定性。

黄酮具有多个化学性质非常相近的酚羟基官能团,对酚羟基进行选择性化学修饰一直是该类化合物结构改造的难点^[12]。为实现对杨梅素 C-3 位羟基的结构修饰,以杨梅苷为起始原料,通过苄基保护苷元上的 5、7、3'、4'、5' 位羟基,经盐酸

回流脱除杨梅苷糖基后暴露出活性相对较高的 3 位羟基,在碱性条件下发生烷基化或酰基化反应得到相应的衍生物。通过引入柔性饱和直链烷烃、氨基甲酸酯和苯丙酸等结构片段来改善分子的刚性,增加其分子柔性(图 4)。

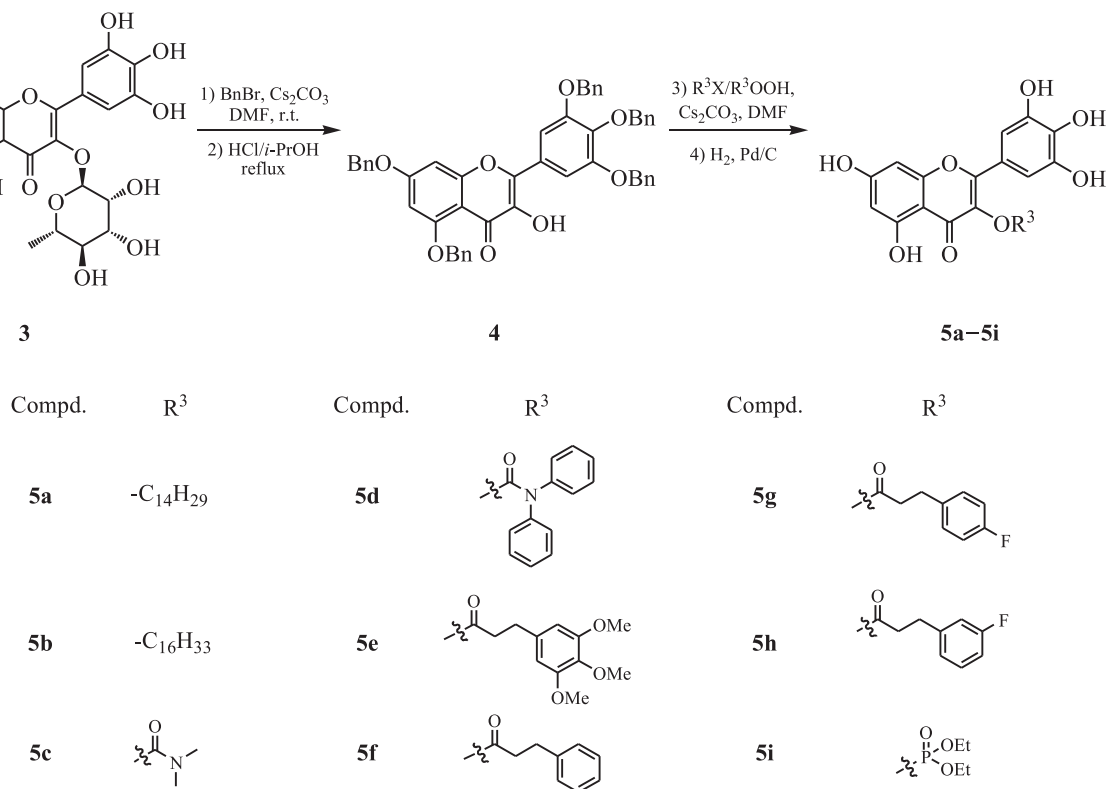


Figure 4 Synthetic route of C3-modified myricetin derivatives

杨梅素 5 位羟基可与 4 位羰基形成分子内氢键相互作用,其酸性相对于其他酚羟基较弱,故可以选用碱性较弱的碳酸钾将 5 位酚羟基选择性暴露出来,从而实现对其 5 位羟基的结构修饰。氨基甲酸酯结构可以改善药物的脂溶性,且该结构

不易被机体内的酯酶水解,可增加药物的代谢稳定性,从而延长半衰期^[13]。所以利用 5 位羟基活性较弱的特点,分别与 *N,N*-二甲基氨基甲酰氯和 *N,N*-二苯基氨基甲酰氯反应得到 5 位羟基被氨基甲酸酯修饰的衍生物(图 5)。

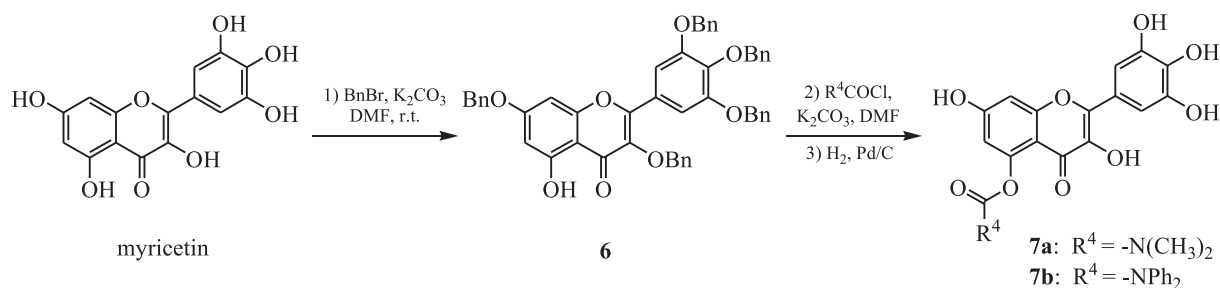


Figure 5 Synthetic route of C5-modified myricetin carbamate derivatives

由于杨梅素 7、3'、4'、5' 位羟基活性相近,实验中虽尝试与不同的碱和烷基试剂反应,均未能实现选择性修饰 7 位羟基。实验发现,全苯甲酰

基保护的杨梅素在苯硫醇/咪唑/*N*-甲基吡咯烷酮条件下,可以选择性脱掉 7 位的苯甲酰基,从而实现对其 7 位羟基的结构改造: 7 位羟基经烷基

化,再经氨水-甲醇溶液脱除其他位置的苯甲酰保

护基,得到两个异戊烯基修饰的衍生物(图6)。

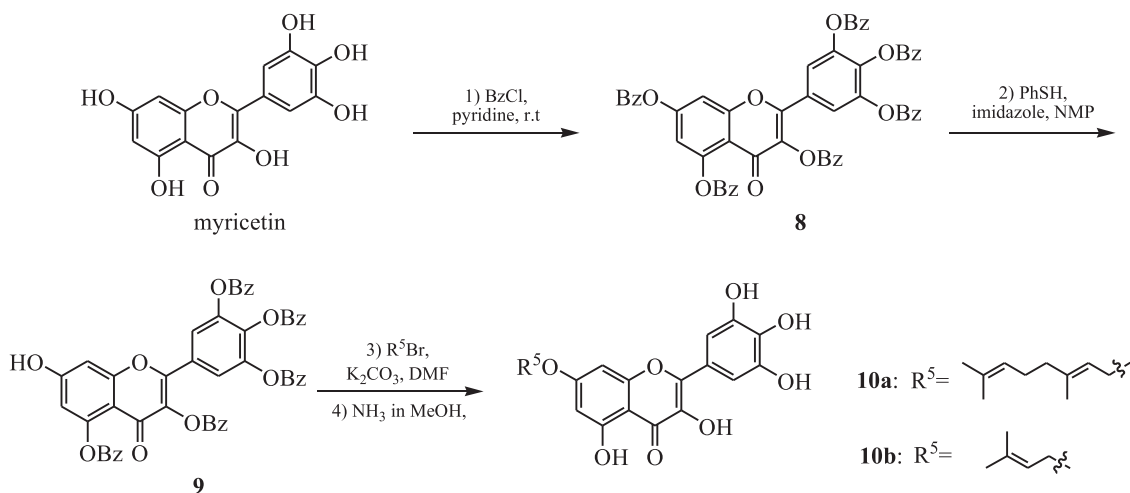


Figure 6 Synthetic route of C7-modified myricetin derivatives

2 合成实验

核磁共振氢谱和碳谱采用 WNMN - I - 500 MHz 型核磁共振波谱仪测定 (TMS 为内标);质谱采用高效液相-高分辨飞行时间质谱联用仪 (Agilent Technologies LC/MSD TOF spectrometer) 测定。杨梅素及杨梅苷均由贵州医科大学天然产物重点实验室分离并经过结构确认后使用;实验所用试剂均为市售分析纯。

2.1 杨梅素 8 位结构修饰

杨梅素 8 位结构修饰目标化合物的合成方法:将 636 mg (2.0 mmol) 杨梅素溶于 10 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 与 5 mL 甲醇的混合体系中,加入 240 μ L (2.4 mmol) 哌啶,滴加 240 μ L 质量分数为 30% 的甲醛水溶液,氮气保护下,室温搅拌反应 24 h。LC-MS 监测反应完成后,向反应液中加入冰水,有淡黄色固体析出,过滤,甲醇洗涤,将固体溶于四氢呋喃 (THF),加入 1 mL 浓度为 4 mol \cdot L⁻¹ 的盐酸二氧六环溶液,待固体析出后,过滤,乙醇洗涤,干燥,得到化合物 2a。化合物 2b ~ 2e 的合成与 2a 类似。

1- [3,5,7-三羟基-4-氧代-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃-8-基] 甲基} 哌啶盐酸盐 (2a): 淡黄色固体, 421.0 mg, 收率 47%, mp: 215 ~ 217 $^{\circ}$ C。HR-MS m/z : 416.1352 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₁H₂₂NO₈。¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 8.61 (s, 2H), 6.75 (s, 1H), 4.86 (s, 2H), 3.48 ~ 3.40 (m, 4H), 1.81 ~ 1.75 (m, 4H), 1.36 ~ 1.24 (m, 2H)。¹³C-NMR (125 MHz, pyri-

dine-*d*₅) δ : 177.6, 165.7, 163.6, 156.1, 148.6, 148.3, 138.8, 124.4, 122.8, 109.1, 104.7, 99.1, 96.1, 53.5, 50.5, 24.3, 22.4。

1- [3,5,7-三羟基-4-氧代-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃-8-基] 甲基} 4-(2,3,4-三甲氧基苄基) 哌啶二盐酸盐 (2b): 淡黄色固体, 308.2 mg, 收率 23%, mp: 218 ~ 219 $^{\circ}$ C。HR-MS m/z : 597.1998 [M + H]⁺, 分子式为 C₃₀H₃₃N₂O₁₁。¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 8.50 (s, 2H), 7.45 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.72 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.52 ~ 3.50 (m, 4H), 3.24 ~ 3.19 (m, 4H)。¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 177.8, 165.3, 163.0, 156.2, 153.7, 148.5, 136.5, 136.2, 127.7, 124.4, 124.1, 124.0, 120.0, 109.4, 108.5, 99.2, 98.7, 61.9, 61.2, 56.5, 55.7, 51.5, 51.4, 50.4, 50.0, 44.1。

1- [3,5,7-三羟基-4-氧代-2-(3,4-二羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃-8-基] 甲基} 4-(2,3,4-三甲氧基苄基) 哌啶二盐酸盐 (2c): 淡黄色固体, 430.7 mg, 收率 33%, mp: 220 ~ 222 $^{\circ}$ C。HR-MS m/z : 581.2142 [M + H]⁺, 分子式为 C₃₀H₃₂N₂O₁₀。¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 8.77 (s, 1H), 8.45 (d, J = 8.6 HZ, 1H), 7.50 ~ 7.43 (m, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.72 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.54 (t, J = 4.9 Hz, 4H), 3.23 (t, J = 5.0 Hz, 4H)。¹³C-NMR (125 MHz, pyri-

dine- d_5) δ : 177.7, 165.4, 163.0, 155.3, 153.8, 147.8, 143.0, 138.6, 127.9, 122.5, 119.8, 117.6, 116.5, 108.6, 99.3, 99.0, 61.9, 61.2, 56.5, 55.6, 51.4, 50.4, 50.1, 44.1。

4- $\{$ [3,5,7-三羟基-4-氧代-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃-8-基]甲基 $\}$ 吗啉盐酸盐(**2d**):淡黄色固体,335.8 mg,收率37%,mp:198~199 $^{\circ}\text{C}$ 。HR-MS m/z :418.1132 $[M+H]^+$,分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_9$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, pyridine- d_5) δ : 8.49 (s, 2H), 6.75 (s, 1H), 4.64 (s, 2H), 3.98~3.95 (m, 4H), 3.27~3.25 (m, 4H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, pyridine- d_5) δ : 165.6, 163.2, 148.6, 138.7, 136.5, 136.4, 136.2, 124.4, 124.3, 124.1, 109.2, 97.0, 65.8, 57.9, 52.8, 51.3。

1-甲基-4- $\{$ [3,5,7-三羟基-4-氧代-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃-8-基]甲基 $\}$ 哌嗪二盐酸盐(**2e**):淡黄色固体,361.5 mg,收率36%,mp:208~209 $^{\circ}\text{C}$ 。HR-MS m/z :431.1452 $[M+H]^+$,分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, pyridine- d_5) δ : 8.42 (s, 2H), 6.78 (s, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.40~3.32 (m, 8H), 2.78 (s, 3H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, pyridine- d_5) δ : 177.9, 165.0, 162.4, 156.2, 150.6, 150.1, 148.5, 136.6, 136.4, 124.5, 124.3, 109.6, 104.9, 101.1, 99.3, 53.9, 50.8, 50.4, 43.7。

2.2 杨梅素3位羟基修饰

杨梅素3位结构修饰目标化合物的合成方法:将37.1 g(80.0 mmol)杨梅苷(**3**)和156.5 g(480 mmol)碳酸铯溶于200 mL DMF中,0.5 h内滴加58 mL(480 mmol)溴苄,氮气保护下,室温搅拌24 h。LC-MS监测反应完成后,加入300 mL乙酸乙酯稀释,过滤,300 mL乙酸乙酯洗涤固体,滤液用水洗涤(100 mL \times 3),无水硫酸钠干燥,减压浓缩得红棕色粘稠物。将红棕色粘稠物溶解于300 mL异丙醇中,加入3 mL浓盐酸,回流15 min,继续搅拌至原料反应完全,过滤,滤饼用乙醇洗涤(50 mL \times 2),以乙酸乙酯重结晶,过滤,干燥得46.7 g淡黄色固体中间体**4**,收率76%。

将768.1 mg(1.0 mmol)中间体**4**,391.4 mg(1.2 mmol)碳酸铯和333 μL (1.2 mmol)溴代十四烷溶于10 mL DMF中,氮气保护下,室温搅拌24 h。LC-MS监测反应完成后,过滤,向滤液中加入冰水,析出固体,过滤,乙醇洗涤,得到白色固

体,将其溶于15 mL四氢呋喃-水(体积比2:1)混合体系中,加入200.3 mg质量分数为10%的钯炭,常压催化氢化过夜。LC-MS监测反应完成后,经0.2 μm 的有机膜过滤,蒸除溶剂,干燥,得到化合物**5a**。化合物**5b**~**5d**的合成与**5a**类似。

将768.1 mg(1.0 mmol)中间体**4**,178.6 mg(1.2 mmol)3,4,5-三甲氧基肉桂酸,288.2 mg(1.5 mmol)1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDCI)和10 mg 4-二甲氨基吡啶(DMAP)溶于15 mL二氯甲烷中,氮气保护下,室温搅拌12 h。TLC监测反应完成后,加入20 mL二氯甲烷,依次经水(100 mL \times 3)、0.5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 稀盐酸(100 mL \times 3)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,蒸除溶剂,得类白色固体,将其溶于15 mL四氢呋喃-水(体积比2:1)混合体系中,加入100.6 mg质量分数为10%的钯炭,常压催化氢化过夜。LC-MS监测反应完成后,经0.2 μm 的有机膜过滤,蒸除溶剂,干燥,得到化合物**5e**。化合物**5f**~**5i**的合成与**5e**类似。

5,7-二羟基-3-十四烷氧基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃酮(**5a**):淡黄色固体,437.1 mg,收率85%,mp:182~183 $^{\circ}\text{C}$ 。HR-MS m/z :515.2641 $[M+H]^+$,分子式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_8$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ : 7.18 (s, 2H), 6.36 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 3.90 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.73~1.70 (m, 2H), 1.29~1.26 (m, 25H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, methanol- d_4) δ : 180.2, 165.8, 163.1, 158.5, 158.4, 146.8, 138.8, 137.9, 122.1, 109.3, 99.7, 94.6, 74.1, 33.1, 30.9, 30.8, 30.6, 30.5, 27.1, 23.7, 14.4。

5,7-二羟基-3-十六烷氧基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃酮(**5b**):淡黄色固体,493.3 mg,收率91%,mp:171~173 $^{\circ}\text{C}$ 。HR-MS m/z :543.2947 $[M+H]^+$,分子式为 $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_8$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) δ : 7.19~7.10 (m, 2H), 6.36 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 3.90 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.71 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.29~1.25 (m, 29H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, methanol- d_4) δ : 180.1, 165.7, 158.5, 158.4, 146.7, 138.8, 109.3, 99.7, 94.6, 74.1, 33.1, 30.8, 30.6, 30.5, 27.0, 23.7, 14.5。

3-[(二甲基氨基)氧基]-5,7-二羟基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃酮(**5c**):淡黄色固

体, 323.6 mg, 收率 83%。HR-MS m/z : 390.0815 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{18}H_{15}NO_9$ 。 1H -NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ : 7.70 ~ 7.65 (m, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.76 (s, 3H)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, methanol- d_4) δ : 178.0, 166.8, 163.4, 158.5, 158.4, 154.7, 148.8, 140.4, 132.7, 109.7, 105.7, 100.6, 95.5, 37.4, 37.2。

3-[(二苯基氨基)氧基]-5,7-二羟基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4H-苯并吡喃酮 (**5d**): 淡黄色固体, 430.9 mg, 收率 81%, mp: 120 ~ 121 °C。HR-MS m/z : 514.1127 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{28}H_{19}NO_9$ 。 1H -NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ : 7.38 ~ 7.20 (m, 10H), 6.97 ~ 6.92 (m, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.54 (s, 1H)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, methanol- d_4) δ : 177.4, 166.9, 163.4, 158.5, 158.4, 153.3, 150.9, 148.9, 143.9, 140.6, 136.6, 136.4, 132.4, 130.3, 121.1, 109.9, 105.6, 100.7, 95.5。

5,7-二羟基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-3-(3,4,5-三甲氧基苯乙氧基)-4H-苯并吡喃酮 (**5e**): 淡黄色固体, 235.5 mg, 收率 87%, mp: 195 ~ 197 °C。HR-MS m/z : 541.1339 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{27}H_{24}O_{12}$ 。 1H -NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ : 6.97 (s, 2H), 6.53 (s, 2H), 6.42 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.72 (s, 3H), 2.97 ~ 2.94 (m, 4H)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, methanol- d_4) δ : 177.2, 171.9, 166.3, 163.1, 158.6, 158.4, 154.4, 147.1, 138.5, 137.9, 137.3, 131.4, 120.9, 108.8, 106.5, 105.2, 100.2, 95.0, 61.1, 56.5, 36.5, 31.9。

5,7-二羟基-3-苯乙氧基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4H-苯并吡喃酮 (**5f**): 淡黄色固体, 209.2 mg, 收率 46%, mp: 213 ~ 215 °C。HR-MS m/z : 451.1026 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{24}H_{18}O_9$ 。 1H -NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ : 7.26 ~ 7.16 (m, 5H), 6.95 ~ 6.86 (m, 2H), 6.46 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.02 ~ 2.96 (m, 4H)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, methanol- d_4) δ : 177.2, 171.9, 166.3, 163.1, 158.7, 158.6, 147.0, 141.5, 138.5, 131.4, 129.5, 129.2, 127.3, 120.9, 108.8, 100.2, 95.0, 36.2, 31.5。

3-(4-氟苯乙氧基)-5,7-二羟基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4H-苯并吡喃酮 (**5g**): 淡黄色固体, 341.4 mg, 收率 73%, mp: 204 ~ 205 °C。HR-MS m/z : 469.0937 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{24}H_{17}FO_9$ 。

1H -NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ : 7.19 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 6.96 ~ 6.93 (m, 4H), 6.40 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 2.96 ~ 2.93 (m, 4H)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, methanol- d_4) δ : 171.7, 166.2, 163.8, 163.0, 158.6, 158.5, 138.4, 137.4, 131.4, 131.0, 130.9, 120.8, 116.1, 115.9, 108.8, 95.0, 36.1, 30.6。

3-(3-氟苯乙氧基)-5,7-二羟基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4H-苯并吡喃酮 (**5h**): 淡黄色固体, 360.7 mg, 收率 77%, mp: 202 ~ 203 °C。HR-MS m/z : 469.0926 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{24}H_{17}FO_9$ 。 1H -NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ : 7.23 (dd, J = 14.2, 8.7 Hz, 1H), 6.95 (dd, J = 15.9, 8.9 Hz, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.88 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.02 ~ 2.96 (m, 4H)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, methanol- d_4) δ : 177.1, 166.2, 163.0, 158.6, 147.0, 144.3, 138.4, 131.4, 131.2, 125.1, 120.8, 116.2, 116.0, 114.0, 108.8, 105.2, 100.1, 95.0, 35.9, 31.2。

5,7-二羟基-4-氧代-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4H-苯并吡喃-3-基二乙基次膦酸酯 (**5i**): 淡黄色固体, 156.9 mg, 收率 35%, mp: 203 ~ 205 °C。HR-MS m/z : 455.0740 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{19}H_{19}O_{11}P$ 。 1H -NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ : 6.97 (s, 2H), 6.37 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.17 ~ 4.11 (m, 4H), 1.27 ~ 1.24 (m, 6H)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, methanol- d_4) δ : 177.3, 166.2, 163.1, 158.4, 147.0, 138.3, 132.4, 120.8, 109.4, 105.4, 100.0, 96.4, 94.9, 66.4, 16.3 (d, J = 4.0 Hz, 1C), 16.2 (d, J = 4.0 Hz, 1C)。

2.3 杨梅素 5 位结构修饰

杨梅素 5 位结构修饰目标化合物的合成方法: 将 8.0 g (25.2 mmol) 杨梅素和 25.1 g (181.4 mmol) 碳酸钾溶于 150 mL DMF 中, 0.5 h 内滴加 21.5 mL (181.4 mmol) 溴苄, 氮气保护下, 室温搅拌 24 h。LC-MS 监测反应完成后, 加入 200 mL 乙酸乙酯稀释, 过滤, 用 300 mL 乙酸乙酯洗涤, 滤液用水洗涤 (300 mL \times 3), 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得类白色固体, 乙醇洗涤 (50 mL \times 2), 乙酸乙酯重结晶, 过滤, 干燥, 得到 10.5 g 淡黄色固体中间体 **6**, 收率 54%。

将 768.6 mg (1.0 mmol) 中间体 **6**、280 mg (1.2 mmol) *N,N*-二苯基氨基甲酰氯和 200 mg (1.2 mmol) 碳酸钾溶于 10 mL DMF 中, 氮气保

护下,室温搅拌 24 h。LC-MS 监测反应完成后,过滤,向滤液中加入冰水,析出固体,过滤,乙醇洗涤,得白色固体,将其溶于 15 mL 四氢呋喃-水(体积比 2:1)混合体系中,加入 50 mg 质量分数为 10% 的钯炭,常压催化氢化过夜。LC-MS 监测反应完成后,经 0.22 μm 的有机膜过滤,蒸除溶剂,干燥,得到化合物 **7a**。化合物 **7b** 的合成与 **7a** 类似。

3,7-二羟基-4-氧代-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃-5-基二甲氨基甲酸酯(**7a**):淡黄色固体,305.4 mg,收率 78%。HR-MS m/z : 390.0817 [$M + H$]⁺,分子式为 C₁₈H₁₅NO₉。¹H-NMR(500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 8.18 (s, 2H), 7.07 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 3.26 (s, 3H), 3.06 (s, 3H)。¹³C-NMR(125 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 173.1, 163.9, 159.0, 150.9, 150.8, 148.6, 140.0, 138.5, 136.6, 136.5, 136.3, 124.6, 124.5, 124.3, 123.7, 110.3, 109.1, 101.3, 37.7, 37.6。

3,7-二羟基-4-氧代-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃-5-基二苯基氨基甲酸酯(**7b**):淡黄色固体,425.8 mg,收率 83%, mp: 143 ~ 144 °C。HR-MS m/z : 514.1132 [$M + H$]⁺,分子式为 C₂₈H₁₉NO₉。¹H-NMR(500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 8.21 (s, 2H), 7.60 ~ 7.47 (m, 5H), 7.26 ~ 7.22 (m, 5H), 6.99 (s, 1H), 6.91 (s, 1H)。¹³C-NMR(125 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 173.6, 164.4, 159.4, 154.6, 151.3, 149.2, 146.7, 140.7, 139.1, 137.2, 137.1, 136.9, 130.6, 125.3, 125.0, 124.8, 110.8, 109.7, 102.2。

2.4 杨梅素 7 位的结构修饰

杨梅素 7 位结构修饰目标化合物的合成方法:将 3.18 g(10 mmol)杨梅素溶于 50 mL 吡啶中,在 0 °C 条件下缓慢滴加 8.4 mL(72 mmol)苯甲酰氯,氮气保护下,室温搅拌 1 h。LC-MS 监测反应完成后,向反应体系加入冰水,析出白色固体,过滤,乙醇洗涤,干燥后,将得到的白色固体(**8**)溶于 100 mL *N*-甲基吡咯烷酮(NMP)中,加入 100 mg(1.47 mmol)咪唑,滴加 50 mL 浓度为 0.24 mmol·mL⁻¹苯硫酚的 *N*-甲基吡咯烷酮溶液,约 1 h 滴完。LC-MS 监测反应完成后,加入冰水,用二氯甲烷萃取(100 mL × 3),合并有机层,无水硫酸钠干燥,减压浓缩得红棕色粘稠物,粗产品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比 300:1),得到 5.45 g 黄色固体中间体 **9**,收率

65%。

将 1.68 g(2.0 mmol)中间体 **9**、330 mg(2.4 mmol)碳酸钾和 520.2 μL (2.4 mmol)香叶基溴溶于 20 mL DMF 中,氮气保护下,室温搅拌 0.5 h。LC-MS 监测反应完成后,过滤,向滤液中加入冰水,析出固体,过滤,乙醇洗涤,得到白色固体,将其溶于 10 mL THF,加入 2 mL 浓度为 7 mol·L⁻¹ 氨的甲醇溶液,室温搅拌 48 h。LC-MS 监测反应完成后,用浓度为 0.5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液调 pH 值至 7.0,加入冰水,析出淡黄色固体,过滤,乙醇洗涤,粗品经硅胶柱色谱分离纯化(二氯甲烷-甲醇,体积比 20:1),得到化合物 **10a**。化合物 **10b** 的合成与 **10a** 类似。

7-[(4,8-二甲基-2-戊-3,7-二烯-1-基)氧基]-3,5-二羟基-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃酮(**10a**):黄色固体,254.4 mg,收率 28%, mp: 180 ~ 181 °C。HR-MS m/z : 455.1698 [$M + H$]⁺,分子式为 C₂₅H₂₆O₈。¹H-NMR(500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 8.24 (s, 2H), 6.64 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 5.61 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 5.17 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.15 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.10 ~ 2.07 (m, 2H), 1.74 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.58 (s, 3H)。¹³C-NMR(125 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 177.5, 165.3, 162.6, 157.4, 150.8, 146.6, 136.6, 136.5, 136.3, 125.0, 124.5, 124.4, 124.2, 120.2, 108.9, 105.9, 98.5, 93.2, 66.5, 40.3, 27.2, 26.4, 18.4, 17.3。

3,5-二羟基-7-[(4-甲基戊-3-烯-1-基)氧基]-2-(3,4,5-三羟基苯基)-4*H*-苯并吡喃酮(**10b**):黄色固体,193.3 mg,收率 25%, mp: 197 ~ 198 °C。HR-MS m/z : 387.1068 [$M + H$]⁺,分子式为 C₂₀H₁₈O₈。¹H-NMR(500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 8.29 (s, 2H), 6.65 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.56 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.69 (s, 6H)。¹³C-NMR(125 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 177.7, 165.2, 162.4, 157.5, 149.9, 147.7, 138.6, 136.4, 124.4, 120.1, 119.7, 109.2, 105.8, 94.1, 93.1, 66.4, 26.6, 19.0。

3 抗氧化活性评价试验

杨梅素抗氧化作用包括:阻止自由基链的引发、阻止自由基生成、阻断脂质过氧化等过程^[14-15]。DPPH 是一种比较稳定的脂性自由基,氮上有一个游离电子,其乙醇溶液呈紫色,在

515 nm 处有最大吸收峰。加入抗氧化剂以后, DPPH 能够捕捉一个电子与游离电子配对, 紫色褪去, 在 515 nm 处的吸收消失, 褪色程度与其接受的电子数成定量关系。依据此原理, 对合成的杨梅素衍生物进行 DPPH 抗氧化模型的抗氧化活性筛选, 用分光光度计检测 DPPH 与试样液反应后吸光值的变化, 能够反映出试样提供电子、清除自由基抗氧化的能力。

取两只 25 mL 的容量瓶, 分别配制质量浓度为 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DPPH 无水乙醇溶液及 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的杨梅素衍生物无水乙醇溶液, 保存备用。量取 2 mL 配制好的 DPPH 无水乙醇溶液和 2 mL 无水乙醇于具塞试管中混合, 暗处室温反应 0.5 h 后在 515 nm 处测吸光值, 平行 3

次, 取平均值, 作为空白 OD。量取 2 mL 配制好的 DPPH 无水乙醇溶液和 2 mL 杨梅素衍生物样品溶液于具塞试管中混合, 暗处室温反应 0.5 h 后在 515 nm 处测吸光值, 平行 3 次, 取平均值, 作为样品 OD。根据公式: 样品对脂性自由基 DPPH 清除率(%) = (空白 OD - 样品 OD) / 空白 OD $\times 100\%$, 计算各化合物对 DPPH 的清除率。自由基清除剂清除 DPPH 自由基(以下简称自由基)的活性与 DPPH 溶液在 515 nm 处吸光值呈线性相关, 是检测活性物质清除自由基的常用方法, 亦是评价天然产物抗氧化活力的重要指标, 杨梅素衍生物自由基清除率测定参照文献[15]的方法, 以回归方程计算得到杨梅素衍生物的自由基半数清除浓度, 结果见表 1。

Table 1 The scavenging effect of DPPH free radical by different myricetin derivatives

Compd.	Scavenging rate/%	IC ₅₀ / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Compd.	Scavenging rate/%	IC ₅₀ / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
2a	51.78	6.71	5g	5.21	-
2b	37.23	-	5h	13.17	-
2c	46.73	-	5i	-	-
2d	68.25	8.58	7a	47.29	-
2e	40.59	-	7b	19.04	-
5a	42.27	-	10a	71.09	10.98
5b	30.41	-	10b	56.67	9.04
5c	45.36	-	myricetin	36.14	-
5d	7.89	-	myricitrin	37.33	-
5e	43.59	-	vitamin C	-	3.72
5f	-4.74	-			

结果表明, 先导化合物杨梅素和杨梅苷在 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下自由基清除率分别为 36.14% 和 37.33%。筛选 18 个合成的杨梅素衍生物, 终浓度为 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其中 11 个目标化合物 **2a**、**2b**、**2c**、**2d**、**2e**、**5a**、**5c**、**5e**、**7a**、**10a** 和 **10b** 表现出较杨梅素和杨梅苷更好的自由基清除活性, 清除率大于 50% 的共有 4 个化合物(**2a**、**2d**、**10a** 和 **10b**), 其中化合物 **2d** (68.25%) 和 **10a** (71.09%) 的自由基清除活性最高。通过建立化合物浓度与自由基清除率的线性回归方程, 计算了清除率大于 50% 的四个化合物的半数清除浓度(IC₅₀), 其 IC₅₀ 值分别为 $6.71 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**2a**)、 $8.58 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**2d**)、 $10.98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**10a**) 和

$9.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**10b**)。与杨梅素相比, 在杨梅素 C-8 和 C-7 位修饰的衍生物可以显著提高其抗氧化能力(如化合物 **2a**、**2d**、**10a** 和 **10b**), 具有进一步开发利用的优势, 值得深入研究。

4 结果与讨论

本研究利用杨梅素及杨梅苷为起始原料, 通过 Mannich 反应、多步保护和脱保护等方法, 对其 C-3、C-5、C-7 位羟基以及 C-8 位进行选择性的结构修饰, 合成了一系列新的杨梅素衍生物。抗总氧 DPPH 模型抗氧化活性试验结果显示, 11 个杨梅素衍生物具有比先导物杨梅素及杨梅苷更强的抗氧化能力, 其中 4 个衍生物的自由基半数清

除浓度的 IC_{50} 值为 $6.71 \sim 10.98 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

依据目前实验结果,可以初步明确杨梅素抗氧化活性的关键结构及其修饰位点,为后续深入研究活性构效关系提供指导。在实验过程中发现:3位羟基对于抗氧化活性较为重要,酯化或烷基化可能使活性降低甚至丧失,提示3位羟基可能对清除自由基有直接作用;在7位引入异戊烯基或香叶烯基等亲脂性官能团,可以增加杨梅素抗氧化活性,通过引入这样的柔性脂溶性官能团可能改善黄酮醇母核结构的刚性,是值得进一步结构修饰的位点;在8位采用 Mannich 反应引入氨甲基使得杨梅素的抗氧化能力增加,并通过成盐等形式,可显著改善化合物的溶解性。通过引入具有较好脂溶性的官能团如氨基甲酸酯、异戊烯基和氨甲基等,从而改善杨梅素的水溶性或者脂溶性等问题,可以显著提高该类化合物的抗氧化活性。在后续的研究中,将以7位和8位为关键修饰位点,通过与其他具有抗氧化活性结构片段连接,进一步对其抗氧化活性进行深入研究。

参考文献:

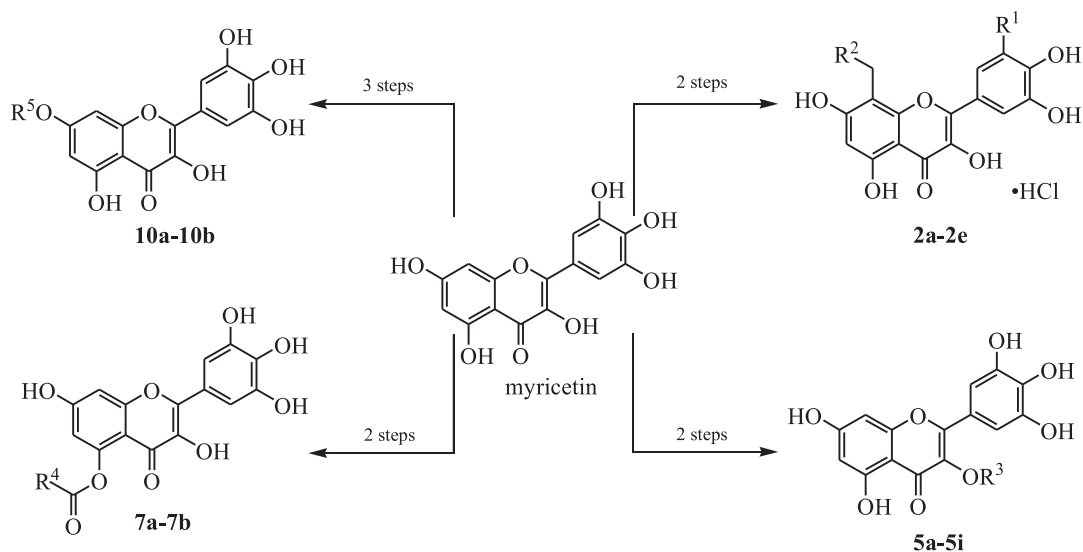
- [1] 王潞,周云英. 杨梅素抗感染、抗炎及抗氧化活性研究进展[J]. 中草药,2019,50(3):778-784.
WANG L, ZHOU Y Y. Research progress on anti-infective, anti-inflammatory, anti-oxidant activities of myricetin[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(3):778-784.
- [2] VEITCH N C, GRYER J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins[J]. Nat Prod Rep, 2011, 28(10):1626-1695.
- [3] REIS J, GASPAR A, MILHAZES N, et al. Chromone as a privileged scaffold in drug discovery: recent advances[J]. J Med Chem, 2017, 60(19):7941-7957.
- [4] GASPAR A, MATOS M J, GARRIDO J, et al. Chromone: a valid scaffold in medicinal chemistry[J]. Chem Rev, 2014, 114(9):4960-4992.
- [5] BERTIN R, CHEN Z, MARIN R, et al. Activity of myricetin and other plant-derived polyhydroxyl compounds in human LDL and human vascular endothelial cells against oxidative stress[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 82:472-478.
- [6] 朱哲,杨悟新,强烈应,等. 二氢杨梅素结构修饰研究进展[J]. 亚太传统医药,2012,8(4):172-174.
- [7] 阮祥辉,赵洪菊,张橙,等. 含哌嗪胺类杨梅素衍生物的合成及生物活性[J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(6):1197-1204.
RUAN X H, ZHAO H J, ZHANG C, et al. Syntheses and bioactivities of myricetin derivatives containing piperazine acidamide moiety[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2018, 39(6):1197-1204.
- [8] 李普,陈英,夏榕娇,等. 含喹啉杨梅素衍生物的合成及生物活性[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(5):909-917.
LI P, CHEN Y, XIA R J, et al. Syntheses and bioactivities of myricetin derivatives containing quinoxaline[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2019, 40(5):909-917.
- [9] SAK K. Dependence of DPPH radical scavenging activity of dietary flavonoid quercetin on reaction environment[J]. Mini-Rev Med Chem, 2014, 14(6):494-504.
- [10] NGUYEN T B, WANG Q, GUERITTE F. An efficient one-step synthesis of piperidin-2-yl and pyrrolidin-2-yl flavonoid alkaloids through phenolic Mannich reactions[J]. Eur J Org Chem, 2011, 35:7076-7079.
- [11] HELGREN T R, SCIOTTI R J, LEE P, et al. The synthesis, antimalarial activity and CoMFA analysis of novel aminoalkylated quercetin analogs[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(2):327-332.
- [12] CHEN J W, ZHU Z Q, HU T X, et al. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(7):667-672.
- [13] 林琳. 奥司米韦及其氨基甲酸酯型前药的合成研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009.
LIN L. Synthesis of oseltamivir and carbamate-type prodrugs[D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2009.
- [14] 刘军军,刘金兰,李帅. 拳参黄酮与VC、芦丁协同抗氧化作用研究[J]. 化学与生物工程, 2014, 31(6):34-35.
LIU J J, LIU J L, LI S. Study on synergistic antioxidant activities of flavonoids from *Polygonum bistorta* L. with VC or Rutin. chemistry and bioengineering. 2014, 31(6):34-35.
- [15] 张秀娟,黄清玲,季宇彬. 杨梅素的药理活性研究进展[J]. 天津药学,2008,20(5):57-59.

Synthesis and antioxygenic activity evaluation of myricetin derivatives

LI Ji-shun^{1,2,3}, WU Hong-lin³, ZHU Zi-hao³, WU Guang-xu^{2,3}, LI Tian-lei^{2,3},
PAN Wei-dong^{1,2*}, WU Song^{3*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Guizhou University of Traditional Chinese, Guiyang 550025, China;
2. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University,
Guiyang 550014, China; 3. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of
Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College,
Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: A series of myricetin derivatives were synthesized by selective structural modification of the C-8, C-3, C-5 and C-7 position of myricetin. Five myricetin derivatives (**2a – 2e**) were prepared by Mannich reaction with paraformaldehyde and secondary cyclic amine. With myricitrin as a starting material, the protection of the hydroxyl groups and hydrolysis of the glycoside under the acidic conditions, then the alkylation at the C-3 position and debenzylation gave the desired products (compounds **5a – 5i**). Two carbamates, compounds **7a** and **7b**, were generated from the modification of myricetin at the C5-position in the presence of *N,N*-dimethylcarbamoyl chloride and *N,N*-diphenylcarbamoyl chloride, respectively. Two isopentenyl-modified derivatives **10a** and **10b** were prepared by the modification of myricetin through a three-step reaction at the C7-position hydroxyl group. These compounds were characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HR-MS. Their radical scavenging properties were evaluated by DPPH model. The results of antioxidant activity *in vitro* showed that 11 compounds had stronger antioxygenic activities than myricetin and myricitrin. Aminomethylation of myricetin at the C8-position and C7-substituted derivatives exhibited pronounced radical scavenging potency with IC₅₀ values ranging from 6.71 μg · mL⁻¹ to 10.98 μg · mL⁻¹ towards quenching DPPH radical, and these compounds were more potent radical scavengers than myricetin.



Key words: flavonoid; myricetin derivative; structural modification; antioxygenic activity