

槲皮素-3-O-酰胺类衍生物的合成及其抗癌活性研究

冯亚莉, 李珂, 刘金海, 翟广玉*

郑州工业应用技术学院药学与化学工程学院, 河南 郑州 451100

摘要:目的 设计并合成槲皮素酰胺类衍生物, 并对该系列化合物进行体外抗肿瘤活性研究。方法 以廉价的芦丁为原料, 经苄基选择性保护、Williamson 成醚反应, 再经 Pd/C 催化加氢脱苄基得到目标产物, 采用 DPPH 法考察目标化合物的抗氧化活性, MTT 法考察目标化合物对人食管鳞癌细胞 EC109、人食管鳞癌细胞 EC9706、人胃癌细胞 SGC7901 及小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 的增殖抑制作用。结果 合成的 15 个槲皮素酰胺类衍生物结构均经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、ESI-MS 确证。抗氧化活性结果显示大部分目标化合物的半数清除率 (SC_{50}) 小于槲皮素或与槲皮素相当, 这提示 3-OH 不是槲皮素抗氧化活性的必需基团。抗肿瘤实验结果显示, 通过化学方法对槲皮素进行结构修饰后, 其体外抗肿瘤活性显著增强。其中, 化合物 7-6 对 EC109 细胞的抑制作用 ($\text{IC}_{50}=10.25 \mu\text{mol/L}$) 明显优于母药槲皮素 ($\text{IC}_{50}=31.884 \mu\text{mol/L}$) 和 5-FU ($\text{IC}_{50}=41.738 \mu\text{mol/L}$), 是一个很有潜力的新型抗肿瘤候选化合物。结论 15 个槲皮素-3-O-酰胺衍生物均为新化合物, 其中化合物 7-6 具有较好的抗肿瘤活性, 值得进一步研究。

关键词: 槲皮素; 酰胺; 衍生物; 合成; 抗氧化; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4133-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.005

Study on synthesis and biological activities of quercetin-3-O-amide derivatives

FENG Ya-li, LI Ke, LIU Jin-hai, ZHAI Guang-yu

School of Pharmacy and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451100, China

Abstract: **Objective** To design and synthesize quercetin amide derivatives and study the antitumor activity of these compounds *in vitro*. **Methods** The cheap rutin was used as the raw material, the benzyl group was selectively protected, the Williamson was converted into ether, and then the target product was obtained by the hydrogenation debenzoylation of Pd/C catalyst. The antioxidant activity of the target compound was investigated by the DPPH method. The inhibitory effects of the target compounds on the proliferation of human esophageal squamous cell carcinoma cell EC109, human esophageal squamous cell carcinoma cell EC9706, human gastric cancer cell SGC7901, and mouse melanoma cells B16-F10 were investigated by MTT method. **Results** The structures of the 15 quercetin amide derivatives were confirmed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and ESI-MS. The antioxidant results showed that the SC_{50} of most target compounds was smaller than or equivalent to quercetin, which suggests that 3-OH is not an essential group for the antioxidant activity of quercetin. The results of anti-tumor experiments showed that after the structural modification of quercetin by chemical methods, its anti-tumor activity was significantly enhanced *in vitro*. Among them, the inhibitory effect of compound 7-6 on EC109 ($\text{IC}_{50} = 10.25 \mu\text{mol/L}$) is significantly better than that of the parent drugs quercetin ($\text{IC}_{50} = 31.884 \mu\text{mol/L}$) and 5-FU ($\text{IC}_{50} = 41.738 \mu\text{mol/L}$). Potential new antitumor candidate compounds. **Conclusion** The 15 quercetin-3-O-amide derivatives are all new compounds. Among them, compounds 7-6 have good antitumor activity and deserve further study.

Key words: quercetin; amide; derivative; synthesis; antioxidant; antitumor activity

随着生活水平不断提高, 人们越来越愿意从天然产物中获得的化合物治疗各种疾病, 例如青蒿素、喜树碱、紫杉醇等。研究发现, 食用含有黄酮类的

食物可以预防和治疗多种疾病。槲皮素 (图 1) 是一个典型的类黄酮, 存在于许多天然食物 (苹果, 洋葱, 西兰花、葡萄、银杏、茶叶等) [1] 中。槲皮素

收稿日期: 2019-12-29

基金项目: 河南省教育厅高等学校重点科研项目 (18A360023); 郑州市高等学校名师技术技能工作室 (郑教高 [2015] 70 号)

作者简介: 冯亚莉 (1987—), 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为天然药物化学。Tel: 18530055702 E-mail: 1369185833@qq.com。

*通信作者 翟广玉 E-mail: zhaiguangyu1@sina.com

具有多方面的生理活性, 如抗氧化^[2]、抗炎^[3]、抗病毒^[4]、抗癌^[5]、预防和治疗心脑血管疾病^[6]等。流行病学和营养学家认为, 槲皮素是一种最有希望应用于疾病预防和治疗的天然化合物^[7]。由于槲皮素的生物利用度较低, 限制了其临床应用。近年来, 以槲皮素为先导化合物, 对其做结构修饰, 得到许多生物活性比槲皮素好的衍生物, 槲皮素酰胺类衍生物就是其中一类^[8]。

Mulholland 等^[9]合成了一种水溶性的槲皮素前药, 3'-*O*-*N*-羧甲基甲酰胺基槲皮素 (QC12), 已经进入 I 期临床研究发现。QC12 可以抑制人卵巢癌 A2780 细胞的生长, 并将细胞增殖阻滞在 S 后期与 G₂ 早期。

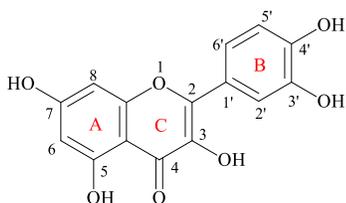


图 1 槲皮素的结构

Fig. 1 Structure of quercetin

槲皮素与正丁基异氰酸酯反应得到 3,3',4',7-*O*-四酰化的衍生物, 检测结果显示, 该化合物抑制 MCF-7 细胞增殖活性高于槲皮素^[10]。Tahsin 等^[11]合成了槲皮素谷氨酸和槲皮素丙氨酸酯, 可作为细胞生长抑制活性的最有效的共轭物, 对前列腺癌细胞有较好的抑制活性。

由于生物利用度低, 在很大程度上妨碍了槲皮素在临床上的应用。对槲皮素选择性修饰, 可以增加生物活性, 提高其生物利用度。本实验以廉价的芦丁为原料, 首先对其结构上的 3', 4' 及 7 位羟基进行选择保护, 然后在浓盐酸的乙醇溶液中水解脱掉 3 位的芸香糖苷, 得到三苺基槲皮素; 利用 Williamson 成醚反应在 3 位引入溴醋酸乙酯, 经碱水解得到三苺基槲皮素-3-*O*-乙酸, 再与各种胺类化合物发生缩合反应, 最后经催化加氢脱掉保护基, 得到 15 个槲皮素-3-*O*-酰胺类衍生物, 均为未见报道的新化合物。抗肿瘤活性实验显示, 通过化学方法对槲皮素进行结构修饰后, 其体外抗肿瘤活性显著增强。有的化合物明显优于母体槲皮素, 是很有潜力的新型抗肿瘤候选化合物。

1 仪器与试剂

400 MHz 超导核磁共振仪 (DMSO-*d*₆ 或 CDCl₃

为溶剂, 德国 Bruker 公司); UV-2550 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); ZQ24000/2695 四级杆 LC/MS 联用仪 (美国 Waters 公司); IS10 型红外光谱仪 (KBr 压片, 美国尼高力公司); RE-52AA 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); HJ-3 型恒温磁力加热搅拌器 (常州翔天实验仪器厂); SHZ-D (III) 循环水式多用真空泵 (天津华鑫仪器厂); ZW-3 型紫外分析仪 (巩义市予华仪器有限责任公司); XD-101 型倒置显微镜 (上海安亭科学仪器厂); 酶联反应检测仪 (美国 Bio Tek 公司)。

槲皮素、芦丁 (质量分数均为 98%), 河南平舆馨星生化有限公司。溴化苺, 重蒸供用, 上海晶纯试剂有限公司, 二氯甲烷, 上海晶纯试剂有限公司; 加入氢化钙回流 2 h 后, 蒸馏, 密封备用。1,1-二苺-2-苺基肼 (DPPH), 上海晶纯试剂有限公司。溴乙酸乙酯, 上海晶纯试剂有限公司; *N,N'*-二环己基碳二亚胺 (DCC), 上海晶纯试剂有限公司; 1-羟基-苺并三氮唑 (无水) (HOBt), 上海晶纯试剂有限公司; Pd/C, 国药集团化学试剂有限公司; 其他所用试剂和溶剂均为分析纯。5-氟尿嘧啶 (5-FU, 货号 F21689), 华中海威 (北京) 基因科技有限公司。

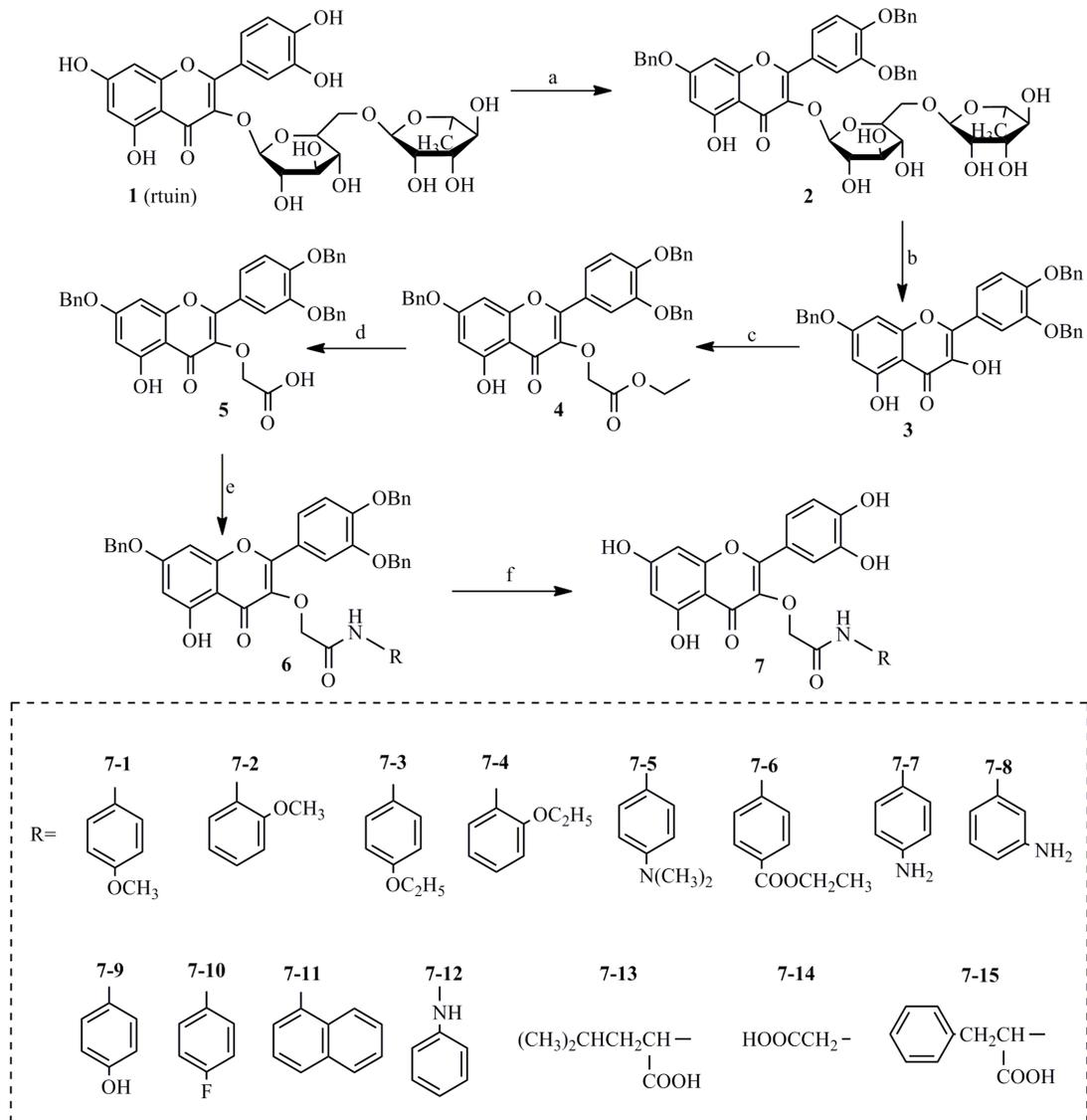
2 方法与结果

2.1 合成部分

槲皮素酰胺类衍生物的合成路线见图 2。

3',4',7-*O*-三苺基槲皮素 (3) 的合成: 将芦丁置于 80 °C 的真空干燥箱中干燥 10 h^[12,13], 脱去结晶水, 取 4.88 g (8 mmol) 芦丁溶于 40 mL *N,N*-二苺基甲酰胺 (DMF) 中, 再加入 3.86 g (28 mmol) 无水 K₂CO₃, 室温搅拌 15 min, 冰浴下慢慢滴加溴化苺 3.4 mL (28 mmol), 转室温反应 16 h。用冰乙酸调节 pH 至 6~7, 加蒸馏水 200 mL, 搅拌 3 h, 至固体析出且水变澄清。弃水层, 加入乙醇 80 mL 溶解, 再加浓盐酸 18 mL, 水浴回流 2 h, 析出大量黄色沉淀, 滤过, 水洗得到粗品, 经氯仿-甲醇重结晶得到 3.72 g 纯品 3, 收率 81.2%。

3',4',7-*O*-三苺基槲皮素-3-*O*-乙酸乙酯 (4) 的合成: 将 2.3 g (4 mmol) 干燥的化合物 3 溶于 60 mL DMF 中, 加入无水 K₂CO₃ 690 mg (5 mmol), 室温搅拌 30 min, 然后慢慢滴加溶有 735 mg (4.4 mmol) 溴乙酸乙酯的 DMF (15 mL) 溶液, 室温下反应 2 h。用冰乙酸调节 pH 至 6~7, 再用醋酸乙酯-水 (100/80 mL) 萃取 3 次, 并用饱和食盐水洗, 酯层用无水硫



Reagents and conditions: (a)DMF/K₂CO₃/BnBr; (b)HCl/EtOH; (c)BrCH₂COOEt/DMF/K₂CO₃; (d)NaOH/H₂O; (e)DCC/HOBt; (f)Pd/C/H₂

图 2 槲皮素-3-O-酰胺类衍生物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of quercetin-3-O-amide derivatives

酸钠干燥过夜，滤过、减压浓缩，过短柱（丙酮-石油醚 1 : 4）得到化合物 4（1.98 g），收率 78.6%。

3',4',7-O-三苄基槲皮素-3-O-乙酸（5）的合成：将 2.63 g（4 mmol）化合物 4 放入 150 mL 的圆底烧瓶中^[18]，加入溶有 5 g NaOH 的蒸馏水 100 mL，回流 1 h。TLC 监测反应结束，后冷至室温，以稀盐酸中和 NaOH，并调节 pH 至 2~3，然后用醋酸乙酯-水萃取，水洗调节 pH 至 5~6，弃水层，酯层减压浓缩，于烘箱中干燥后得到化合物 6（2.27 g），收率 90%。

3',4',7-O-三苄基槲皮素-3-O-酰胺类衍生物

（6）的合成：以 3',4',7-O-三苄基槲皮素-3-O-乙酰-对甲氧基苯胺（6-1）的合成为例。在圆底烧瓶中加入 1.26 g（2 mmol）化合物 5，加无水二氯甲烷 40 mL 搅拌使溶解^[14-17]，加入 2 mg（2.2 mmol）DCC 及 297 mg（2.2 mmol）HOBt，冰盐浴下搅拌 1 h。将 250.6 mg（2.2 mmol）对甲氧基苯胺用 20 mL 无水 DCM 稀释，并用恒压滴液漏斗慢慢滴加到反应瓶中，20 min 滴完，逐渐转室温搅拌 8~24 h。反应结束后，置于冰箱冷藏 0.5 h。滤过除去大部分副产物二环己基脲（DCU），滤液进行萃取，HOBt 易溶于水而被除去，有机层用无水硫酸钠干燥过夜。滤

过, 旋蒸浓缩, 加入少量丙酮, 有少量白色颗粒状固体析出, 滤过, 滤液旋干。以氯仿-甲醇重结晶, 得到淡黄色固体, 收率 71.3%。若重结晶无固体析出, 可先以丙酮-石油醚进行柱色谱纯化, 再以氯仿-甲醇重结晶即可。化合物 **6-1** 为淡黄色固体, 收率 88.1%。**6-2** 至 **6-15** 的合成方法同 **6-1**。

槲皮素-3-*O*-酰胺类衍生物 (**7**) 的合成: 以槲皮素-3-*O*-乙酰-对甲氧基苯胺 (**7-1**) 的合成作为例。将 736.9 mg 化合物 **6-1** 溶于 60 mL 二氯甲烷-甲醇 (2:1) 的混合溶液中, 加入 10% 的 Pd/C 67.2 mg。室温 0.4 MPa 压力下催化加氢反应 5 h。反应结束, 以双层滤纸滤过除去 Pd/C, 滤液浓缩, 过硅胶柱色谱, 甲醇-氯仿 (10:0.6) 洗脱, 得到淡黄色固体 **7-1**, 收率 40.8%。**7-2** 至 **7-15** 的合成方法同 **7-1**。

2.2 抗氧化实验

DPPH 溶液的配制: 准确称取 DPPH 10 mg, 在一干净小烧杯中用少量无水乙醇溶解, 转移至 250 mL 棕色量瓶中, 加入无水乙醇定容至刻度线, 得浓度为 1×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液, 避光保存, 备用^[18]。

样品溶液的配制: 准确称取样品 64 mg, 在干净小烧杯中用少量无水乙醇溶解, 转移至 1 000 mL 量瓶中, 然后加入无水乙醇定容至刻度线。即得到 64 mg/L 的样品溶液。取 4 mL 已配好的 64 mg/L 的样品溶液, 加入等体积的无水乙醇, 摇匀, 即得到 32 mg/L 的样品溶液。依法得到 16、8、4、2 mg/L 的样品溶液。

取 1 mL 不同浓度的待测样品溶液与 3 mL 1×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液, 加入到 5 mL 的玻璃试管中, 混合均匀, 室温下避光反应 30 min, 测得 517 nm 处的吸光度值 A_y 。以 1 mL 无水乙醇代替样品溶液, 测得吸光度值 A_s 。以 1 mL 样品与 3 mL 无水乙醇作为空白对照, 测得吸光度 A_0 。并按如下公式计算 DPPH 自由基清除率。计算半数清除率 (SC_{50})。

$$\text{DPPH 清除率} = 1 - (A_y - A_0) / A_s$$

2.3 抗肿瘤实验

采用 RPMI 1640 培养基将槲皮素及其酰胺类衍生物稀释成以下质量浓度: 0.5、1、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{g/mL}$ 。取对数生长期、汇合率约达到 80% 的细胞, 消化收集, 调整细胞密度为 2.0×10^4 个/mL, 每孔 200 μL 接种于 96 孔板中, 放入培养箱中培养。

待细胞贴壁生长, 实验组加入上述各浓度的待测化合物。对照组以完全培养基代替待测化合物, 每孔加入体积 200 μL , 每组设置 6 个复孔, 培养 72

h。96 孔板外围孔中加入 200 μL PBS 以减少因培养基挥发造成的实验误差。

药物干预结束后, 每孔 5 mg/mL 的 MTT 20 μL , 培养箱中孵育 4~6 h 后小心吸出孔中溶液, 向每孔中加入 DMSO 150 μL , 摇匀使沉淀充分溶解。在酶联免疫酶标仪上检测 570 nm 处各孔 A 值。实验独立重复 3 次, 取平均值。并按公式计算生长抑制率 (GI)。

$$GI = 1 - A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

根据所得结果, 利用 SPSS 19.0 计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

3 结果与讨论

3.1 化合物结构鉴定

化合物 **7-1**: 淡黄色固体, 收率 70.1%。mp 237.3~239.2 $^{\circ}\text{C}$; m/z : 463.9 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.45 (1H, s, 5-OH), 10.93 (1H, s, 7-OH), 10.11 (1H, s, NH), 9.84 (1H, s, 4'-OH), 9.41 (1H, s, 3'-OH), 7.59~7.52 (4H, m, H-2', 6', 2 \times ph-H), 6.90 (3H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5', 2 \times ph-H), 6.44 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 4.53 (2H, s, COCH_2), 3.72 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 178.1, 166.6, 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 156.0, 149.4, 145.8, 137.3, 131.8, 121.6, 120.9, 116.3, 115.9, 114.4, 104.5, 99.2, 94.2, 71.7, 55.6。

化合物 **7-2**: 淡黄色固体, 收率 67.2%。mp 257.8~259.7 $^{\circ}\text{C}$; m/z : 463.9 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.49 (1H, s, 5-OH), 10.95 (1H, s, 7-OH), 9.85 (1H, s, 4'-OH), 9.68 (1H, s, NH), 9.48 (1H, s, 3'-OH), 8.18 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-2'), 7.51 (2H, dd, $J = 19.5, 4.9$ Hz, H-5', 6'), 7.11 (2H, d, $J = 6.4$ Hz, 2 \times ph-H), 6.94 (2H, dd, $J = 18.7, 8.2$ Hz, 2 \times ph-H), 6.46 (1H, s, 8-H), 6.24 (1H, s, 6-H), 4.59 (2H, s, COCH_2), 3.84 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 177.9, 166.7, 164.8, 161.6, 156.9, 156.5, 149.5, 149.2, 145.9, 136.9, 127.2, 124.8, 121.3, 120.9, 120.8, 120.5, 116.3, 115.8, 111.6, 104.5, 99.2, 94.3, 71.9, 56.3。

化合物 **7-3**: 淡黄色固体, 收率 64.5%。mp 205.4~207.3 $^{\circ}\text{C}$; m/z : 477.9 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.47 (1H, s, 5-OH), 10.94 (1H, s, 7-OH), 10.12 (1H, s, NH), 9.84 (1H, s, 4'-OH), 9.44 (1H, s, 3'-OH), 7.59~7.54 (4H, m, H-2', 6', 2 \times ph-H),

6.93~6.87 (3H, m, H-5', 2×ph-H), 6.46 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 4.54 (2H, s, COCH₂), 3.99 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, CH₃CH₂), 1.32 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 178.1, 166.6, 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 155.27, 149.4, 145.8, 137.3, 131.7, 121.6, 120.9, 116.3, 115.9, 114.8, 104.5, 99.2, 94.2, 71.7, 63.6, 15.2。

化合物 7-4: 淡黄色固体, 收率 59.7%。mp 226.3~228.1 °C; m/z : 477.9 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.49 (1H, s, 5-OH), 10.96 (1H, s, 7-OH), 9.77 (1H, s, 4'-OH), 9.48 (1H, s, 3'-OH), 8.24 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-2'), 7.55 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6'), 7.48 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-5'), 7.08 (2H, d, $J = 4.0$ Hz, 2×ph-H), 6.98~6.90 (2H, m, 2×ph-H), 6.47 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 4.57 (2H, s, COCH₂), 4.11 (2H, q, $J = 6.9$ Hz, CH₃CH₂), 1.31 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.9, 166.8, 164.9, 161.6, 156.9, 156.5, 149.5, 148.2, 145.9, 136.9, 127.4, 124.7, 121.2, 120.9, 120.7, 120.0, 116.4, 115.8, 112.6, 104.4, 99.2, 94.3, 72.2, 64.5, 14.9。

化合物 7-5: 淡黄色固体, 收率 45.2%。mp 241.2~243.3 °C; m/z : 476.9 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.48 (1H, s, 5-OH), 10.94 (1H, s, 7-OH), 9.97 (1H, s, NH), 9.86 (1H, s, 4'-OH), 9.43 (1H, s, 3'-OH), 7.56 (2H, d, $J = 5.6$ Hz, H-2', 6'), 7.48 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, 2×ph-H), 6.92 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, 5'-H), 6.71 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 2×ph-H), 6.46 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-6), 4.52 (2H, s, CH₂), 2.86 (6H, s, 2×CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 178.1 (C=O), 166.2 (CH₂C=O), 164.8, 161.6, 156.9, 156.4, 149.4, 147.8, 145.8, 137.3, 128.5, 121.6, 121.4, 120.9, 116.3, 115.9, 113.1, 104.5, 99.2, 94.2, 71.8 (CH₂), 40.9 (2CH₃)。

化合物 7-6: 淡黄色固体, 收率 72.5%。mp 294.9~296.8 °C; MS, m/z : 505.9 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.43 (1H, s, 5-OH), 10.90 (1H, s, 7-OH), 10.59 (1H, s, NH), 9.80 (1H, s, 4'-OH), 9.45 (1H, s, 3'-OH), 7.95 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 2×ph-H), 7.61~7.54 (2H, m, 2×ph-H), 6.91 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.46 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 4.65

(2H, s, COCH₂), 4.30 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, CH₃CH₂), 1.32 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 178.0, 167.8, 165.8, 164.9, 161.6, 156.9, 156.3, 149.4, 145.8, 143.1, 137.2, 130.7, 125.2, 121.6, 120.9, 119.4, 116.3, 116.0, 104.4, 99.3, 94.2, 71.7, 60.9, 14.7。

化合物 7-7: 淡黄色固体, 收率 29.3%。mp 219.9~221.9 °C; MS, m/z : 448.9 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.48 (1H, s, 5-OH), 10.94 (1H, s, 7-OH), 9.83 (1H, s, 4'-OH), 9.44 (1H, s, 3'-OH), 8.32 (1H, s, NH), 7.60~7.51 (2H, m, H-2', 6'), 7.29 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 2×ph-H), 6.92 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.50 (3H, dd, $J = 5.2$ Hz, 2×ph-H, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 4.99 (2H, s, NH₂), 4.50 (2H, s, COCH₂)。 ¹³C-NMR (100MHz, DMSO-*d*₆) δ : 178.1, 166.0, 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 149.4, 145.8, 145.7, 137.3, 127.8, 121.7, 121.6, 120.9, 116.3, 115.9, 114.3, 104.5, 99.2, 94.2, 71.8。

化合物 7-8: 淡黄色固体, 收率 22.6%。mp 195.4~197.6 °C; MS, m/z : 448.9 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.45 (1H, s, 5-OH), 10.96 (1H, s, 7-OH), 10.01 (1H, s, NH), 9.86 (1H, s, 4'-OH), 9.44 (1H, s, 3'-OH), 7.55 (2H, dd, $J = 5.5, 2.1$ Hz, H-2', 6'), 7.01 (1H, s, H-5'), 6.98~6.90 (2H, m, 2×ph-H), 6.75 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, ph-H), 6.46 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, ph-H), 6.30 (1H, dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.15 (2H, s, NH₂), 4.53 (2H, s, COCH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 178.2, 166.7, 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 149.6, 149.4, 145.8, 139.3, 137.4, 129.5, 121.6, 120.9, 116.3, 115.9, 110.2, 107.6, 105.4, 104.4, 99.3, 94.2, 71.9。

化合物 7-9: 淡黄色固体, 收率 58.1%。mp 289.1~291.3 °C; m/z : 449.9 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.48 (1H, s, 5-OH), 10.96 (1H, s, 7-OH), 10.02 (1H, s, NH), 9.88 (1H, s, 4'-OH), 9.45 (1H, s, 3'-OH), 9.28 (1H, s, ph-OH), 7.61~7.52 (2H, m, H-2', 6'), 7.44 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, 2×ph-H), 6.96~6.88 (1H, m, 5'-H), 6.73 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 2×ph-H), 6.45 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 4.53 (2H, s, COCH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 178.1, 166.4, 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 154.2, 149.4, 145.8, 137.3, 130.3, 121.8, 121.6, 120.9, 116.3, 115.9, 115.6, 104.4, 99.2, 94.2, 71.7。

化合物 **7-10**: 淡黄色固体, 收率 35.7%。mp 265.7~267.6 °C; m/z : 451.9 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.46 (1H, s, 5-OH), 10.95 (1H, s, 7-OH), 10.31 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, NH), 9.85 (1H, s, 4'-OH), 9.42 (1H, s, 3'-OH), 7.70 (2H, dd, $J = 9.0$, 5.0 Hz, H-2', 6'), 7.59~7.52 (2H, m, 2 \times ph-H), 7.18 (2H, t, $J = 8.9$ Hz, 2 \times ph-H), 6.91 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.46 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 4.58 (2H, s, COCH₂); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.1, 167.1, 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 149.4, 145.8, 137.2, 135.2, 135.1, 121.9, 121.8, 121.6, 120.9, 116.3, 115.9, 104.5, 99.3, 94.2, 71.6。

化合物 **7-11**: 淡黄色固体, 收率 48.3%。mp 143.1~145.2 °C; m/z : 483.9 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.53 (1H, s, 5-OH), 10.97 (1H, s, 7-OH), 10.41 (1H, s, NH), 9.89 (1H, s, 4'-OH), 9.46 (1H, s, 3'-OH), 8.13 (1H, dd, $J = 5.9$, 3.6 Hz, 2'-H), 7.97 (1H, dd, $J = 5.9$, 3.5 Hz, H-6'), 7.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, ph-H), 7.74 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, ph-H), 7.65~7.51 (5H, m, 5 \times ph-H), 6.95 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5', ph-H), 6.49 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.26 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 4.75 (2H, s, COCH₂); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.2, 167.9, 164.9, 161.6, 156.9, 156.5, 149.5, 145.9, 137.3, 134.2, 133.3, 128.6, 128.3, 126.6, 126.5, 126.1, 126.1, 122.9, 122.2, 121.6, 120.9, 116.3, 116.0, 104.5, 99.3, 94.3, 79.7, 71.9。

化合物 **7-12**: 淡黄色固体, 收率 52.4%。mp 203.7~205.5 °C; m/z : 448.9 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.59 (1H, s, 5-OH), 10.93 (1H, s, 7-OH), 10.00 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, CONH), 9.88 (1H, s, 4'-OH), 9.39 (1H, s, 3'-OH), 7.80 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, NH), 7.62~7.53 (2H, m, H-2', 6'), 7.14 (2H, t, $J = 7.9$ Hz, 2 \times ph-H), 6.92 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.79~6.69 (3H, m, 3 \times ph-H), 6.45 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 4.61 (2H, s, COCH₂); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.0, 168.0, 164.7, 161.7, 156.8, 156.3, 149.6, 149.4, 145.8, 136.8, 129.1, 121.7, 121.1, 119.0, 116.1, 115.9, 112.7, 104.5, 99.2, 94.1, 70.4。

化合物 **7-13**: 淡黄色固体, 收率 53.7%。mp 164.4~166.5 °C; m/z : 471.9 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.62 (1H, s, COOH), 12.52 (1H,

s, 5-OH), 10.94 (1H, s, 7-OH), 9.84 (1H, s, 4'-OH), 9.41 (1H, s, 3'-OH), 8.31 (1H, s, NH), 7.57~7.48 (2H, m, H-2', 6'), 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 4.51 (1H, d, $J = 14.6$ Hz, NHCH), 4.37 (2H, d, $J = 14.7$ Hz, COCH₂), 1.63 (2H, dt, $J = 14.3$, 4.4 Hz, NHCHCH₂), 1.58~1.51 (1H, m, CH₃CHCH₃), 0.88 (6H, dd, $J = 19.0$, 6.3 Hz, 2 \times CH₃)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.1 (C = O), 174.1 (COOH), 168.2 (CH₂, C = O), 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 149.4, 145.8, 137.1, 121.6, 120.9, 116.2, 115.8, 104.4, 99.2, 94.2, 71.3, 50.3 (NHCH), 24.7 (NHCHCH₂), 23.3 (CH₃CH), 21.7 (2CH₃)。

化合物 **7-14**: 淡黄色固体, 收率 62.8%。mp 267.3~269.2 °C; m/z : 415.8 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.56 (1H, s, COOH), 12.52 (1H, s, 5-OH), 10.95 (1H, s, 7-OH), 9.83 (1H, s, 4'-OH), 9.42 (1H, s, 3'-OH), 8.43 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, NH), 7.56~7.47 (2H, m, H-2', 6'), 6.91 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 4.45 (2H, s, COCH₂), 3.87 (2H, d, $J = 5.9$ Hz, NHCH₂); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.7 (C = O), 176.1 (COOH), 173.3 (CO-NH), 169.5, 166.4, 161.6, 161.2, 154.1, 150.6, 141.4, 126.3, 125.7, 121.1, 120.6, 109.2, 103.9, 98.9, 75.7, 45.7。

化合物 **7-15**: 淡黄色固体, 收率 46.5%。mp 189.7~191.6 °C; MS, m/z : 505.9 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.55 (1H, s, COOH), 12.49 (1H, s, 5-OH), 11.04 (1H, s, 7-OH), 9.91 (2H, s, 3',4'-OH), 8.32~8.26 (1H, m, NH), 7.52~7.45 (2H, m, H-2', 6'), 7.26~7.17 (5H, m, 5 \times ph-H), 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.44 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-6), 4.52 (1H, dd, $J = 13.0$, 8.0 Hz, NHCH), 4.38 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, COCH₂), 3.15~2.97 (2H, m, NHCHCH₂); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.9 (C = O), 173.2 (COOH), 167.9 (CH₂C = O), 164.8, 161.6, 156.8, 156.3, 149.5, 145.8, 137.9, 136.7, 129.7, 128.6, 126.8, 121.4, 120.8, 116.3, 115.8, 104.4, 99.2, 94.2, 71.0 (COCH₂), 53.8 (NHCH), 37.3 (PhCH₂)。

3.2 槲皮素酰胺类衍生物的抗氧化活性

不同质量浓度下的槲皮素及其衍生物对 DPPH 自由基的清除活性见表 1。

表 1 槲皮素酰-3-O-酰胺衍生物的 DPPH 清除作用 (SC₅₀) 和对不同肿瘤细胞的增殖抑制作用 (IC₅₀)

Table 1 Clearance rate on DPPH (SC₅₀) and proliferation inhibition rate on different tumor cells (IC₅₀) of quercetin-3-O-amide derivatives

编号	SC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	DPPH 自由基	EC109	EC9706	B16-F10	SGC7901
7-1	25.42	—	—	129.142±1.231	—
7-2	19.12	96.706±1.653	61.183±1.454	91.021±1.627	145.180±1.830
7-3	20.46	—	58.039±1.444	—	—
7-4	21.50	44.264±1.327	167.276±1.904	118.138±1.753	157.776±1.879
7-5	20.92	27.228±1.115	149.828±1.855	171.642±1.914	—
7-6	18.88	10.250±0.716	65.646±1.535	75.298±1.582	—
7-7	34.75	58.195±1.418	41.845±1.275	103.444±1.668	—
7-8	34.77	64.412±1.463	76.175±1.535	219.383±1.995	—
7-9	19.67	109.059±1.692	176.22±1.901	84.957±1.675	—
7-10	27.88	149.216±1.830	183.894±1.921	117.18±1.725	202.049±1.962
7-11	31.54	51.238±1.396	59.744±1.462	51.296±1.396	111.264±1.732
7-12	38.99	—	—	84.856±1.582	—
7-13	68.75	112.832±1.326	129.208±1.173	142.391±1.098	165.210±1.264
7-14	58.56	156.215±1.389	138.650±1.459	176.391±1.437	161.540±1.128
7-15	49.27	51.207±1.415	—	—	—
槲皮素	18.66	31.884±0.984	142.189±1.274	182.358±1.741	—
5-FU		41.738±0.734	78.431±1.008	62.562±0.910	182.115±1.374

从表 1 中可以看出这些化合物对 DPPH 自由基均有一定的清除作用，且呈剂量依赖性。通过对表中的数据进行分析，有如下规律：

(1) 随着样品浓度的增大，槲皮素及其衍生物对 DPPH 自由基清除能力递增，呈现剂量依赖性。

(2) 有 6 个化合物的 SC₅₀ 在 18.34~21.50 $\mu\text{mol/L}$ ，与槲皮素的 SC₅₀ 相当 (18.66 $\mu\text{mol/L}$)。这提示，3-OH 不是槲皮素抗氧化活性的必需基团 (图 3)。

有 6 个化合物的 SC₅₀ 均在 25.42~38.99 $\mu\text{mol/L}$ ，它们较槲皮素少了 1 个羟基，其清除自由基活性略低于槲皮素也是正常的。

文献研究显示^[19]，槲皮素具有较强的抗氧化性可以归功于 2 个部分：(i) B 环的儿茶酚羟基结构；(ii) C 环的 2,3 位双键与 4 位羰基形成共轭体系。当槲皮素的衍生物取代的是 3'-OH 或 4'-OH 时，其抗氧化活性相对于槲皮素均明显降低。也有文献报道^[20]，3-OH 和 5-OH 的存在对其抗氧化活性也很重要。Mainini 等^[21]对槲皮素脂肪酸酯的抗氧化活

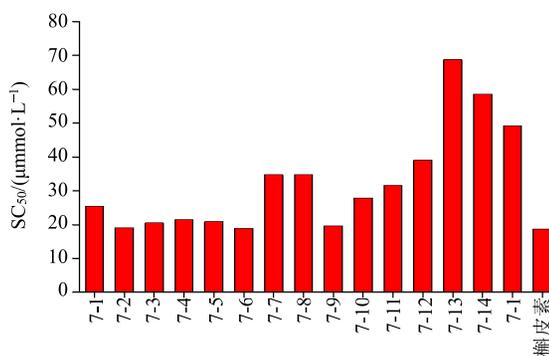


图 3 槲皮素-3-O-酰胺类衍生物抗氧化活性比较

Fig. 3 Comparison of antioxidant activity by some quercetin-3-O-amide derivatives

性进行了初步研究，认为 3-OH 与槲皮素的生物学活性具有显著的相关性。然而，根据本实验结果，有 9 个化合物的 SC₅₀ 均与槲皮素相当，有 15 个化合物的 SC₅₀ 略大于槲皮素，当槲皮素的 3-OH 被取代后，对其抗氧化活性的影响并不大。这提示 3-OH 不是槲皮素抗氧化活性的必需基团。

3.3 抗肿瘤活性

槲皮素及其衍生物对 4 种肿瘤细胞人食管鳞癌细胞 EC109、人食管鳞癌细胞 EC9706、人胃癌细胞 SGC7901 及小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 的抑制作用见表 1。通过对表中数据分析, 得出以下结果。

(1) 槲皮素及其衍生物对 4 种肿瘤细胞具有一定的抑制作用, 且有部分目标化合物的抑制作用明显强于母药槲皮素。

(2) 对照品 5-FU 对其中 3 种肿瘤细胞有较好的抑制作用, EC109 ($IC_{50}=41.738 \mu\text{mol/L}$)、EC9706 ($IC_{50}=78.431 \mu\text{mol/L}$) 和 B16-F10 ($IC_{50}=62.562 \mu\text{mol/L}$); 母药槲皮素仅对 EC109 细胞的抑制作用较为显著 ($IC_{50}=31.884 \mu\text{mol/L}$), 对其他 3 种肿瘤细胞的抑制作用不理想。槲皮素对 EC109 细胞的抑制作用强于 5-FU, 是 1 个很有潜力的抗肿瘤候选化合物。

(3) 化合物 7-6 是 15 个目标化合物中活性最好的。化合物 7-6 对 EC109 的抑制作用 ($IC_{50}=10.25 \mu\text{mol/L}$) 明显优于母药槲皮素 ($IC_{50}=31.884 \mu\text{mol/L}$) 和 5-FU ($IC_{50}=41.738 \mu\text{mol/L}$); 其对 2 种肿瘤细胞 EC9706 及 B16-F10 的抑制作用也均强于母药槲皮素。本课题组将对化合物 7-6 进行更进一步的活性考察。

参考文献

[1] Shia G J, Li Y, Cao Q H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1085-1099.

[2] Osorio E, Perez E G, Areche C, *et al.* Why is quercetin a better antioxidant than taxifolin? Theoretical study of mechanisms involving activated forms [J]. *J Mol Model*, 2013, 19(5): 2165-2172.

[3] Vengadeshprabhu K, Somasundaram A, Rajarajan A T, *et al.* Molecular targets of quercetin with anti-inflammatory properties in atopic dermatitis [J]. *Discovery Today Drug*, 2016, 21(4): 632-639.

[4] Shyamala G, Andrea N F, Adam T C, *et al.* Quercetin inhibits rhinovirus replication *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antiviral Res*, 2012, 94(3): 258-271.

[5] Rauf A, Imran M, Khan I A, *et al.* Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(11): 2109-2130.

[6] Boots A W, Haenen G R, Bast A, *et al.* Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2/3): 325-337.

[7] Alka G, Kavita B, Indira R, *et al.* Quercetin: A wonder bioflavonoid with therapeutic potential in disease management [J]. *Asian Pacific J Tropical Dis*, 2016, 6(3): 248-252.

[8] Massi A, Bortolini O, Ragno D, *et al.* Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1270-1289.

[9] Mulholland P, Ferry D, Anderson D, *et al.* Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin [J]. *Annals Oncol*, 2001, 12: 245-248.

[10] Hoang T K D, Huynh T K C, Nguyen T D. Synthesis, characterization, anti-inflammatory and anti-proliferative activity against MCF-7 cells of *O*-alkyl and *O*-acyl flavonoid derivatives [J]. *Bioorg Chem*, 2015, 63: 45-52.

[11] Tahsin F K, Maria V C, Min-sung L E, *et al.* Rational design and structure-activity relationship studies of quercetin-amino acid hybrids targeting the anti-apoptotic protein Bcl-xL [J]. *Org Biomol Chem*, 2017, 15(37): 7956-7976.

[12] Qadeer K P, Shahabuddin M. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial properties of morin complexes [J]. *J Coord Chem*, 2011, 64(12): 2117-2129.

[13] Fedora G, Ortensia I P, Mordocco R A, *et al.* Quercetin derivatives as novel antihypertensive agents: Synthesis and physiological characterization [J]. *Eur J Pharm SCI*, 2016, 82(82): 161-170.

[14] Rameshthangama P, Chitra J P. Synergistic anticancer effect of green synthesized nickel nanoparticles and quercetin extracted from *Ocimum sanctum* leaf extract [J]. *J Mater Sci Technol*, 2018, 34(3): 508-522.

[15] Osonga F J, Onyango J O, Sadik O A, *et al.* Synthesis and characterization of novel flavonoid derivatives via sequential phosphorylation of quercetin [J]. *Tetrahedron Lett*, 2017, 58(15): 1474-1479.

[16] Yang S L, Jiang W N, Tang Y, *et al.* Sensitive fluorescent assay for copper (II) determination in aqueous solution using quercetin-cyclodextrin inclusion [J]. *RSC Adv*, 2018, 8: 37828-37834.

[17] Wu C L, Cheng L, Li Y, *et al.* Syntheses of the ammonium salts of 7-carbamate derivatives of quercetin [J]. *Lett Org Chem*, 2007, 4(5): 366-369.

- [18] Gu C, Stashko M A, Puhl-Rubio A, *et al.* Inhibition of inositol polyphosphate kinases by quercetin and related flavonoids: A structure/activity analysis. [J]. *J Med Chem*, 2019, 2(3): 1-20.
- [19] Kim M K, Park K S, Lee C, *et al.* Enhanced stability and intracellular accumulation of quercetin by protection of the chemically or metabolically susceptible hydroxyl groups with a pivaloxymethyl (POM) promoiety [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(24): 8597-8607.
- [20] Madhukar M, Sawraj S, Saharm P D. Design, synthesis and evaluation of mutual prodrug of 4-biphenylacetic acid and quercetin tetramethyl ether (BPA-QTME) as gastrosparing NSAID [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45(6): 2591-2596.
- [21] Mainini F, Contini A, Nava D, *et al.* Synthesis, molecular characterization and preliminary antioxidant activity evaluation of quercetin fatty esters [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2013, 90(11): 1751-1759.