

3-[(Z)-十五碳-8-烯基]儿茶酚的全合成及其抗肿瘤血管生成活性研究

杨梅^{a,c} 何江波^a 程永现^{*,a} 蒋晟^{*,b}^a 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室 昆明 650204)^b 中国科学院广州生物医药与健康研究院 广州 510530)^c 中国科学院大学 北京 100039)

摘要 以 2,3-二甲氧基苯甲醛为原料, 经过 Barbier 偶联反应, 将邻二酚羟基的保护基从甲基保护转换成缩丙酮保护, 再经 Wittig 反应等方法合成了 3-[(Z)-十五碳-8-烯基]儿茶酚(GQ-5)。所合成化合物的结构均经 ¹H NMR, ¹³C NMR 及 MS (HRMS)进行了鉴定。采用人脐静脉内皮细胞株对 GQ-5 的抗肿瘤血管生成活性进行了评价。

关键词 漆酚; 干漆; Wittig 反应; 抗肿瘤血管生成

Synthesis of 3-[(Z)-Pentadec-8-enyl]catechol and Its Anti-angiogenesis Activity

Yang, Mei^{a,c} He, Jiangbo^a Cheng, Yongxian^{*,a} Jiang, Sheng^{*,b}^a State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)^b Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530)^c University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract 3-[(Z)-Pentadec-8-enyl]catechol (GQ-5) was produced from 2,3-dimethoxybenzaldehyde through Barbier coupling reaction, the conversion of protecting group from methyl ether to acetonidene, Wittig reaction and so on. These compounds have been confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS (or HRMS) techniques. Meanwhile, anti-angiogenesis activity of compound GQ-5 was evaluated by using HUVEC cells.

Keywords urushiol; resina toxicodendri; Wittig reaction; angiogenesis

漆树(*Rhus vernicifera*)主要分布在中国、日本和韩国等亚洲国家, 其汁液富含具有广阔商业应用价值和生物活性的漆酚^[1]。生漆经加工后的干燥品为中药干漆, 具有破血通经, 消积杀虫等功效。韩国学者发现干漆的乙醇提取物通过线粒体死亡途径诱导胃癌细胞的凋亡来治疗胃癌^[2,3], 乙酸乙酯部位提取物对人类肿瘤细胞具有细胞毒作用^[4]; 加拿大学者发现干漆具有抗氧化和肿瘤细胞毒性等活性^[5,6]; 有研究表明干漆的提取物还具有抗风湿^[7]、抑制淋巴瘤生长^[8]等作用。这些药理活性应与漆中的漆酚类化合物有一定的相关性^[6,9]。根据中医药理论, 我们推测活血破瘀中药中可能含有与“血分”相关的化学成分, 其从而可能干预肿瘤血管生成, 因此

对从干漆中分离鉴定的漆酚化合物 3-[(Z)-十五碳-8-烯基]儿茶酚(GQ-5), 进行了全合成和抗肿瘤血管生成活性研究。

漆酚是一种两性分子, 含有一个亲水性的苯二酚结构和一条疏水性的饱和或不饱和的脂肪长链, 其特殊的两性结构影响着其与生物体细胞膜蛋白的结合方式^[10,11]。漆酚的化学合成主要集中在国外^[12~17], 但是他们都没有在侧链顺/反选择性, 产率与合成成本中得到满意的结果。日本学者通过 Wittig 反应构建顺式双键合成一系列漆酚类化合物, 其顺式双键占 80%左右, 选择性低, 并且产率在 40%左右; 英国学者以邻香草醛为原料合成经过 Barbier 偶联反应, 苯环邻二酚羟基脱保护,

* E-mail: yxcheng@mail.kib.ac.cn; jiang_sheng@gibh.ac.cn

Received January 4, 2013; revised March 7, 2013; published online March 15, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. U1202222), and the State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (No. P2010-ZZ09).

国家自然科学基金(No. U1202222)、中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室(No. P2010-ZZ09)资助项目。

炔烃偶联等一系列反应得 3-[(Z)-十五碳-8-烯基]儿茶酚, 其炔烃偶联反应产率低, 同时在邻二酚羟基脱保护后进行后续反应产物易氧化变成黄色, 不易分离. 本文以 2,3-二甲氧基苯甲醛为原料, 通过 Barbier 偶联, Wittig 反应等一系列经典反应, 高产率高选择性的合成了 GQ-5, 并对合成中间体化合物通过 ^1H NMR, ^{13}C NMR 及 MS (HRMS) 表征, 目标化合物进行了抗肿瘤血管生成活性的研究. 合成路线如 Scheme 1 所示.

1 结果与讨论

1.1 化合物的合成

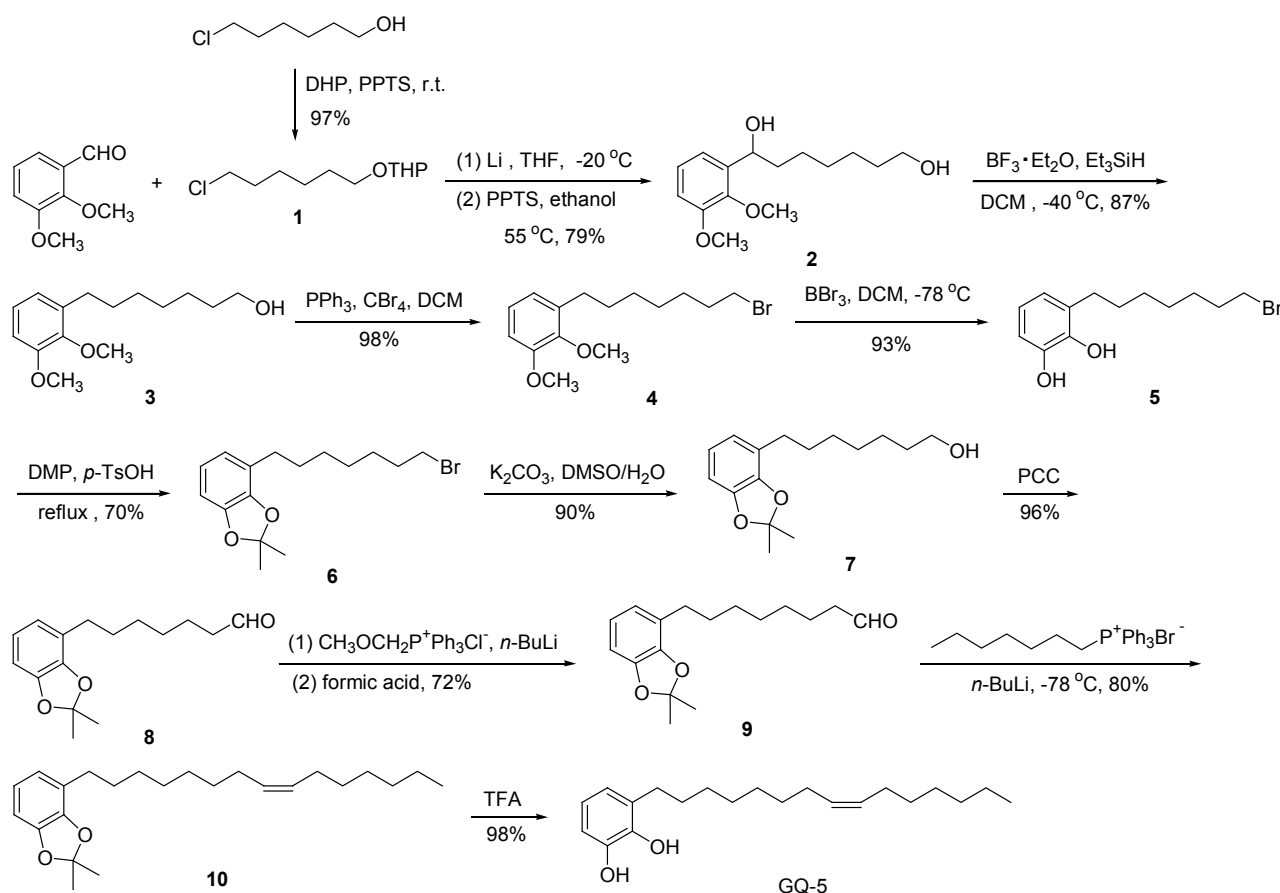
以 2,3-二甲氧基苯甲醛为原料, 与四氢吡喃(THP)保护的 6-氯己醇在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下发生 Barbier 偶联反应得化合物 **2**, 通过 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 选择性还原苄位羟基得化合物 **3**, 末端羟基溴代得化合物 **4**, 在 $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 下通过 BBr_3 脱邻二酚甲基保护高产率得化合物 **5**, 然后用丙酮又保护邻二酚羟基得化合物 **6**, 再将末端溴氧化为羟基得化合物 **7**, 通过氯铬酸吡啶盐(PCC)氧化羟基为醛基得化合物 **8**, 经过两步 Wittig 反应构建顺式双键得化合物 **10**, 最后用三氟乙酸 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 下脱丙酮又保护得 GQ-5. 每步反

应产率都在 70% 以上, 产率相对较高, 同时反相高效液相色谱(HPLC)测得 Z 式占 95%, E 式占 5%.

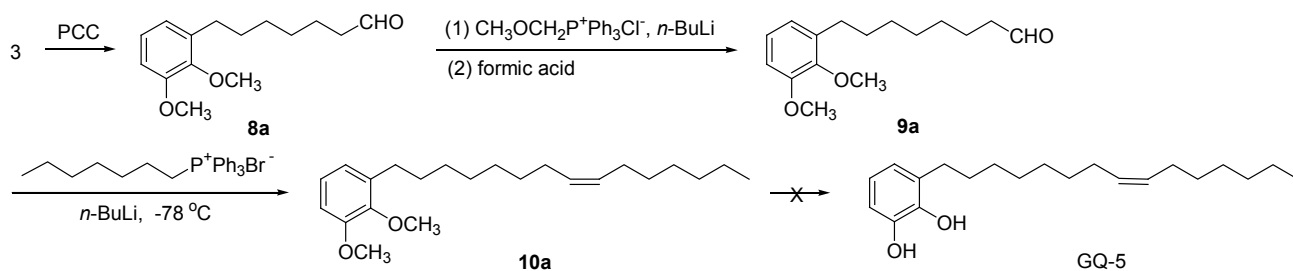
在选定 Scheme 1 中路线为本文合成目标物 GQ-5 最终路线前, 我们尝试过 Scheme 2 所显示的路线, 但在对化合物 **10a** 进行脱甲基得 GQ-5 的反应中, 我们发现双键 Z/E 式比例发生改变, 或者双键被加成等现象. 脱甲基保护结果总结如表 1.

1.2 生物活性

GQ-5 源自具有活血破瘀作用的中药干漆, 且是其主要成分, 人脐静脉内皮细胞(HUVEC: human umbilical vein endothelial cell)是研究肿瘤血管生成的重要模型. 我们发现 GQ-5 可显著抑制 HUVEC 的增殖($\text{IC}_{50}=0.25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、迁移($0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)(图 1)与成管($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)(图 2). 同时 GQ-5 对多种肿瘤细胞株具有较强的细胞毒性, 其结果分别是 HL-60 ($\text{IC}_{50}=0.9\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Jurkat ($\text{IC}_{50}=0.7\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), K562 ($\text{IC}_{50}=4.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), U937 ($\text{IC}_{50}=5.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), HepG2 ($\text{IC}_{50}=18.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), MCF7 ($\text{IC}_{50}=40.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), SGC7901 ($\text{IC}_{50}=18.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).



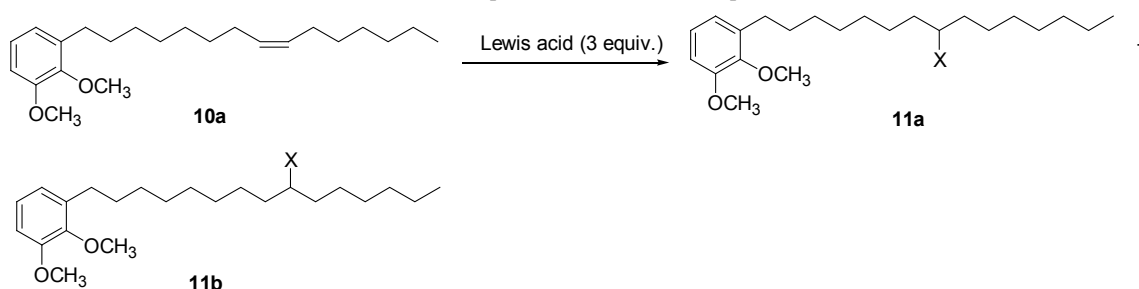
Scheme 1



Scheme 2

表 1 化合物 10a 的脱保护结果

Table 1 The deprotection results of compound 10a



脱甲基试剂	反应结果	产物	产率/%
BBr_3	双键被溴加成	11a : 11b = 1.1 : 1	32
AlCl_3	双键被氯加成	11a : 11b = 1.5 : 1	30
$(\text{CH}_3)_3\text{SiH}/\text{NaI}$	双键被碘加成	11a : 11b = 1.13 : 1	56
NaSEt^a	高温下 Z 式比例减少	GQ-5 (<i>Z/E</i> = 1.05 : 1)	67

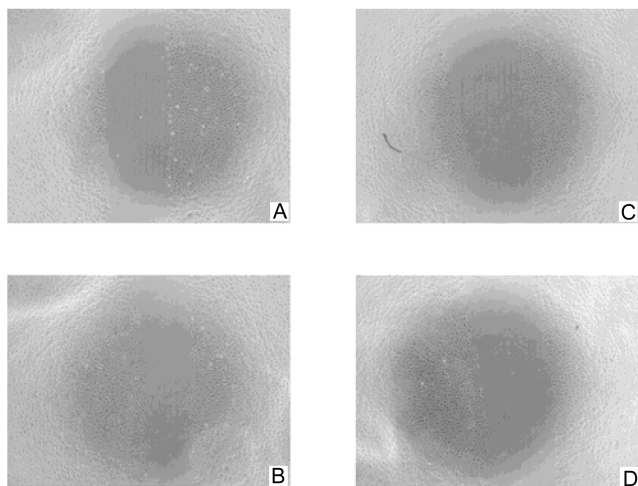
^a NaSEt: 44 equiv.

图 1 人脐静脉内皮细胞的迁移
Figure 1 The migration of HUVEC

(A) 0 h, control; (B) 6 h, control; (C) 0 h, GQ-5 ($0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (D) 6 h, GQ-5 ($0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

2 结论

本文以高产、高选择性的方法合成了漆酚化合物 GQ-5。实验表明该化合物不仅对多种肿瘤细胞株具有较强的细胞毒性，且可抑制 HUVEC 增殖及肿瘤新生血管形成，因此 GQ-5 可作为多靶点抗肿瘤药物先导化合

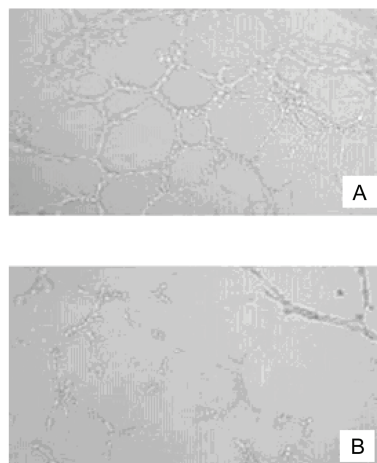


图 2 人脐静脉内皮细胞的成管
Figure 2 The tube formation of HUVEC

(A) 7 h, control; (B) 7 h, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

物进行进一步结构优化。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker 400 MHz 核磁共振仪; Bruker 500 MHz 核磁共振仪; Kompact Axima-CFR MALDI 质谱仪; Agilent

TOF-6210 型高分辨质谱仪; 柱层析硅胶为 H 型(青岛海洋化工厂, 200~300 目). 实验中所用到的无水溶剂(THF, CH₂Cl₂)均按照溶剂手册标准操作处理; 其他所用试剂均为市售的分析纯.

3.2 实验方法

3.2.1 2-[(6-氯己基)氧基]四氢-2-吡喃(1)的合成

在冰水浴下, 将 8.78 mmol 3,4-二氢吡喃缓慢滴入到 7.32 mmol 6-氯己醇与 0.22 mmol 4-甲基苯磺酰吡啶的 10 mL 二氯甲烷溶液中. 滴毕, 反应液在室温下继续反应 2 h. TLC 检测反应完成后, 加入饱和 NaHCO₃ 溶液, 充分震荡后分液收集有机相溶液, 并用饱和 NaCl 溶液洗涤. 有机相无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸除溶剂后得 2.35 g 无色透明液体 **1**^[18], 产率 97%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.32~1.57 (m, 10H, CH₂), 1.62~1.78 (m, 4H, CH₂), 3.30~3.36 (m, 1H), 3.42~3.49 (m, 3H), 3.65~3.71 (m, 1H), 3.77~3.82 (m, 1H), 4.50~4.52 (m, 1H, OCHO); MS (EI) m/z : 221.12 (M+H)⁺.

3.2.2 1-(2,3-二甲氧基苯基)-1,7-二醇(2)的合成

将 6.39 mmol 2,3-二甲氧基苯甲醛和 7.67 mmol 2-[(6-氯己基)氧基]四氢-2-吡喃溶于 22.5 mL THF 中形成混合溶液, 在氩气保护下于 0 °C 将该混合溶液缓慢滴入装有 14.7 mmol 锂块(0.5 mm)的反应瓶中. 滴加完毕后, 反应液降温至 -20 °C, 并在 -20 °C 下反应 6 h. TLC 检测反应完成后, 过滤反应剩余的锂块, 滤液加乙醚稀释, 经饱和 NH₄Cl 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸除溶剂得黄棕色油状液体. 该产物与 0.64 mmol PPTS 共溶解于 20 mL MeOH/THF ($V:V=4:1$) 混合溶剂中, 于 55 °C 加热反应 5 h, TLC 检测反应完成后, 反应液直接减压蒸除溶剂, 所得粗产物通过柱层析分离提纯得 1.35 g 淡黄色液体 **2**^[1] [洗脱剂为: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=3:1$], 产率 79%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.34~1.35 (m, 4H, CH₂), 1.46~1.55 (m, 4H, CH₂), 1.68~1.83 (m, 2H, CH₂), 2.45 (s, 1H, OH), 3.60 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, CH₂O), 3.86 (s, 3H, CH₃), 4.91 (t, $J=6.4$ Hz, 1H, ArCH), 6.83 (dd, $J=8.0, 1.2$ Hz, 1H, ArH), 6.93 (dd, $J=8.0, 1.2$ Hz, 1H, ArH), 7.04 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH); MS (EI) m/z : 269.17 (M+H)⁺.

3.2.3 7-(2,3-二甲氧基苯基)庚烷-1-醇(3)的合成

在氩气保护下, 将 3.73 mmol 化合物 **2** 溶于 10 mL 干燥 CH₂Cl₂ 中, 降温至 -40 °C 后, 滴加 14.9 mmol Et₃SiH 反应 30 min 后, 再滴加 22.4 mmol BF₃·Et₂O, 继续反应 1 h 后, 撤去冷浴, 反应液自然升温至室温, 并在室温中搅拌 10 h. 反应完成后, 加入 5 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液淬灭反应, 用乙醚萃取 3 次, 收集所有有机相溶液

并经饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸除溶剂后, 粗产物通过柱层析分离提纯得 817 mg 无色液体 **3**^[1] [洗脱剂为: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=5:1$], 产率 87%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.31~1.35 (m, 6H, CH₂), 1.54~1.61 (m, 4H, CH₂), 2.61 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, ArCH₂), 3.81 (s, 3H, CH₃), 3.85 (s, 3H, CH₃), 6.76 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 6.97 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH); MS (EI) m/z : 253.18 (M+H)⁺.

3.2.4 1-(7-溴庚基)-2,3-二甲氧基苯(4)的合成

将 3.18 mmol 化合物 **3** 和 4.78 mmol CBr₄ 溶于 13 mL CH₂Cl₂ 中, 在 0 °C 下, 加入 4.78 mmol PPh₃, 剧烈搅拌反应 15 min 后, 置于室温下继续 4 h, 反应瓶中有白色固体产生. 反应结束后, 过滤分离, 滤饼用少量 CH₂Cl₂ 洗涤 3 次后收集所有滤液, 减压蒸除溶剂后所得粗产物通过柱层析分离提纯得 1.00 g 黄色油状液体 **4**^[1,19], 产率 98%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.35~1.47 (m, 6H, CH₂), 1.56~1.63 (m, 2H, CH₂), 1.82~1.89 (m, 2H, CH₂), 2.62 (t, $J=7.6$ Hz, ArCH₂), 3.40 (t, $J=6.8$ Hz, CH₂Br), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 6.77 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 6.98 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH); MS (EI) m/z : 316.09 (M+H)⁺.

3.2.5 3-(7-溴庚基)苯基-1,2-二醇(5)的合成

先将 3.14 mmol 化合物 **4** 溶于 12 mL CH₂Cl₂ 中并冷却至 -78 °C, 再于氩气保护下, 缓慢滴入 12.5 mL BBr₃ (1 mol·L⁻¹ in CH₂Cl₂) 溶液. 滴加完毕后撤去冷浴, 反应液自然升温至室温, 继续反应 2 h. TLC 检测反应完成后, 将反应液再次冷却至 -78 °C, 加入 25 mL 去离子水淬灭反应. 反应液在室温下搅拌 30 min 后倒入 250 mL 烧杯中, 用饱和 NaHCO₃ 溶液调节 pH 至 7.0. 反应液用二氯甲烷萃取(50 mL×3), 所得全部有机相溶液经无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸除溶剂后得 8.34 g 黄色油状液体 **5**^[1], 产率 93%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.30~1.48 (m, 6H, CH₂), 1.58~1.66 (m, 2H, CH₂), 1.82~1.89 (m, 2H, CH₂), 2.61 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, ArCH₂), 3.41 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, CH₂Br), 5.44 (s, 1H, ArOH), 5.70 (s, 1H, ArOH), 6.69~6.73 (m, 3H, ArH); MS (EI) m/z : 288.06 (M+H)⁺.

3.2.6 4-(7-溴庚基)-2,2-二甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(6)的合成

将 27.8 mmol 2,2-二甲氧基丙烷加入到含有 2.78 mmol 化合物 **5** 和 0.445 mmol 对甲苯磺酸的 10 mL 甲苯溶液中, 并在氩气保护下加热回流反应 24 h. 反应所产生的 CH₃OH 用无水 CaCl₂ 吸收. TLC 检测反应完成后, 将反应液冷却至室温, 加 1 mol/L NaHCO₃ 水溶液洗涤 (5 mL×3). 有机相溶液经饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水

Na₂SO₄干燥,减压蒸除溶剂后,所得粗产物通过柱层析分离得636 mg 橙色油状物[洗脱剂: *V*(石油醚):*V*(环己烷)=25:1],产率70%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.30~1.49 (m, 6H, CH₂), 1.58~1.64 (m, 2H, CH₂), 1.67 (s, 6H, CH₃), 1.82~1.89 (m, 2H, CH₂), 2.55 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, ArCH₂), 3.41 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, CH₂Br), 6.58~6.62 (m, 2H, ArH), 6.71 (t, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 25.9, 28.1, 28.5, 28.99, 29.3, 29.5, 32.8, 33.9, 106.0, 116.9, 120.6, 121.8, 123.8, 145.3, 146.8; MS (EI) *m/z*: 328.09 (M+H)⁺.

3.2.7 7-(2,2-二甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-4-基)庚醇(7)合成

将2.00 mmol 化合物6和4.00 mmol K₂CO₃溶于8 mL DMSO/H₂O (*V*:*V*=1:2)混合溶液中,加热回流反应24 h. TLC检测反应完成后,反应液加入10 mL去离子水稀释,用1 mol/L HCl水溶液调节pH至7.0,乙醚萃取三次(10 mL×3),收集有机相用饱和NaCl溶液洗涤(5 mL×3),经无水Na₂SO₄干燥,滤液通过减压蒸除溶剂后得475 mg 淡黄色油状液体7,产率90%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.35 (m, 6H, CH₂), 1.50~1.63 (m, 4H, CH₂), 2.54 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, ArCH₂), 3.63 (t, *J*=6.4 Hz, 2H, CH₂OH), 6.57~6.62 (m, 2H, ArH), 6.70 (t, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 25.7, 25.8, 29.2, 29.3, 29.5, 32.7, 63.0, 106.0, 116.9, 120.6, 121.8, 123.9, 125.3, 146.7; HRMS (EI) calcd for C₁₆H₂₃O₃ [M-H]⁺: 263.1647, found 263.1649.

3.2.8 7-(2,2-二甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-4-基)庚醛(8)的合成

将溶有1.24 mmol 化合物7的30 mL无水CH₂Cl₂溶液滴加到含有1.87 mmol 氯铬酸吡啶盐(PCC)和804 mg 4 Å分子筛的60 mL无水CH₂Cl₂溶液中,室温下反应2 h后溶液变成黑色. TLC检测反应完成后,反应液过滤,用少量乙醚洗涤滤饼数次,收集全部滤液并减压蒸除溶剂,所得粗产物通过柱层析分离提纯得到无色油状液体8[洗脱剂: *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=20:1],产率93%; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.34~1.38 (m, 4H, CH₂), 1.58~1.65 (m, 4H, CH₂), 1.66 (s, 6H, CH₃), 2.41 (td, *J*=7.2, 1.6 Hz, 2H, CH₂CHO), 2.54 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, ArCH₂), 6.58~6.61 (m, 2H, ArH), 6.68~6.72 (t, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH), 9.75 (t, *J*=1.6 Hz, 1H, CHO); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 22.0, 25.8, 28.9, 29.3, 43.8, 106.1, 116.9, 120.6, 121.8, 123.7, 145.4, 146.9, 202.4; HRMS (EI) calcd for C₁₆H₂₁O₃ [M-H]⁺: 261.1491, found 261.1492.

3.2.9 8-(2,2-二甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-4-基)辛醛(9)合成

在0 °C于氩气保护下,将0.86 mL *n*-BuLi (2.06 mmol)溶液(2.4 mol·L⁻¹ in THF)缓慢滴加到含有2.06 mmol CH₃OCH₂P⁺PhCl⁻的4 mL THF溶液中.反应30 min后,反应液变成红色,再将2 mL溶有1.03 mmol 化合物8的THF溶液滴加到该反应液中,室温搅拌过夜. TLC检测反应结束后,加5 mL饱和氯化铵溶液淬灭反应,用Et₂O萃取(10 mL×3),收集全部的有机相溶液经饱和NaCl溶液洗涤,无水Na₂SO₄干燥后,滤液减压蒸除溶剂,粗产物用1 mL CH₂Cl₂溶解后滴加1.9 mL甲酸,室温下反应3 h. TLC检测反应完成后,加入3 mL去离子水稀释,用饱和NaHCO₃调节pH至7.0, Et₂O萃取(3 mL×3),收集全部有机相溶液并经适量饱和NaCl水溶液洗涤,无水Na₂SO₄干燥,减压蒸除溶剂后,所得粗产物通过柱层析分离提纯得204 mg 无色油状液体9^[17][洗脱剂: *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=25:1],产率为72%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.31~1.34 (m, 6H, CH₂), 1.57~1.65 (m, 4H, CH₂), 1.66 (s, 6H, CH₃), 2.41 (td, *J*=7.2, 1.6 Hz, 2H, CH₂CHO), 2.53 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, ArCH₂), 6.57~6.62 (m, 2H, ArH), 6.70 (t, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH), 9.76 (t, *J*=1.6 Hz, 1H, CHO); MS (EI) *m/z*: 277.17 (M+H)⁺.

3.2.10 Z-4-(十五碳-8'-烯基)-2,2-二甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(10)化合物的合成

氩气保护下,将0.825 mL *n*-BuLi (1.98 mmol, 2.4 mol·L⁻¹ in THF)缓慢滴加到4 mL含1.98 mmol 溴化庚基三苯基磷的-78 °C的THF溶液中,反应液逐渐变成砖红色.继续反应1 h后,逐滴加入2 mL含有0.99 mmol 化合物9的THF溶液,-78 °C下再继续反应1.5 h,然后自然升温至室温,并在室温下反应5 h. TLC检测反应完成后,加入5 mL饱和氯化铵溶液淬灭反应,溶液用Et₂O萃取(10 mL×3),收集全部有机相溶液经饱和NaCl溶液洗涤,无水Na₂SO₄干燥,减压蒸除溶剂后,所得粗产物通过柱层析分离提纯得284 mg 无色粘稠液体10^[12][洗脱剂: *V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=20:1],产率80%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.89 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.29~1.33 (m, 16H, CH₂), 1.59~1.62 (m, 2H, CH₂), 1.67 (s, 6H, CH₃), 1.98~2.03 (m, 4H, CH₂), 2.54 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, ArH), 5.34~5.39 (m, 2H, CH=CH), 6.58~6.63 (m, 2H, ArH), 6.71 (t, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 14.1, 22.6, 25.9, 27.2, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.6, 29.7, 29.8, 31.8, 32.6, 106.0, 116.9, 120.6, 121.8, 124.0, 129.8与129.9为顺式双键上两碳, 130.3和130.4为反式双键上两碳, 145.4, 146.8; MS

(EI) m/z : 358.28 (M+H)⁺.

3.2.11 11,3-[(8Z)-十五碳烯基]儿茶酚(GQ-5)化合物的合成

将 0.75 mmol 化合物 **10** 溶解于 2 mL CH₂Cl₂ 中, 在 0 °C 下逐滴加入 1 mL 三氟乙酸, 滴加完毕后, 置于室温下反应 2 h. TLC 检测反应完成后, 反应液直接旋转蒸发除去溶剂, 所得粗产物用 5 mL 乙醚溶解后, 加 3 mL 去离子水, 用饱和 NaHCO₃ 溶液调节 pH 至 5.0~6.0. 分液所得水相溶液再用乙醚萃取(5 mL×2), 收集全部乙醚溶液, 经适量饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 所得滤液减压蒸除溶剂后得 234 mg 淡黄色粘稠液体 GQ-5^[1,12], 产率 98%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.87~0.90 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH₃), 1.28~1.31 (m, 16H, CH₂), 1.57~1.1.61 (m, 2H, CH₂), 1.94~2.02 (m, 4H, CH₂C=CCH₂), 2.60 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, ArCH₂), 5.08 (brs, 2H, ArOH), 5.31~5.38 (m, 2H, CH=CH), 6.70~6.72 (m, 3H, ArH), ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 4.0, 22.6, 27.2, 27.2, 28.8, 29.0, 29.1, 29.2, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 31.7, 112.8, 120.1, 122.1, 129.3, 129.8 与 129.9 为 Z 式双键上两 C, 130.3 与 130.4 为 E 式双键上两 C, 141.8, 143.0; HRMS (ESI) calcd for C₂₁H₃₃O₂ [M-H]⁺: 317.2481, found 317.2480; HPLC [柱型: Dikma; 柱温: 25 °C; 检测器及波长: 215 nm; 流动相: $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 95 : 5$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μ L]; 保留时间 $t_1=11.672$ min (E 式产物), 保留时间 $t_2=13.705$ min (Z 式产物); 峰面积比可得 $Z/E=95/5$.

3.3 GQ-5 的抗肿瘤血管生成活性测试

3.3.1 HUVEC 增殖抑制实验

药物抑制 HUVEC 增殖实验是按照文献方法^[20]. 简单而言, 以 1000 HUVECs/孔将细胞接种到 96 孔板中, 在加不同浓度的药物(药物溶解在 DMSO)前, 细胞贴壁 20 h. 在 37 °C 孵育 96 h 后, 细胞用 MTT 试剂处理, 测定细胞活力, 以 IC₅₀ 值表示活性强度.

3.3.2 HUVEC 迁移能力实验

HUVEC 细胞迁移能力实验是按照文献方法进行的^[21]. HUVEC 以 3×10^5 /孔接种到 24 孔板中, 并用完全培养基于 37 °C 含 5%CO₂ 培养, 24 h 后, 细胞换用低浓度血清(0.5%FBS)培养 24 h. 然后每孔 HUVEC 以水平方式用 P100 吸液管尖端进行划痕, 随机选择三个含划痕的视野, 采用配备有相机的荧光倒置显微镜, 在刚换新鲜培养基时对每孔划痕进行图像获取. 继续孵育 6 h, 采取上面相同的方法对划痕进行图像获取. 细胞迁移能力的分析可以通过比较对照和受试药物(0.1 μ mol·L⁻¹) 6 h 前后划痕变化而确定.

3.3.3 HUVEC 成管实验

HUVEC 成管实验按照文献方法进行^[22]. 收获汇合的 HUVEC, 并用低浓度的血清培养基 250 mL 稀释 (4.5×10^4 HUVECs), 含药物 10 μ mol·L⁻¹, 将其种到 24 孔板, 并设对照组, 37 °C 孵育 7 h, 然后用装备有照相机的倒置荧光显微镜, 随机选择 3 个视野进行图像获取, 比较药物和对照组图像中管状结构以评价药物对成管的影响.

3.4 细胞毒实验

肿瘤细胞毒实验按照文献四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT 法)方法进行^[23,24]. 简单而言, 人肿瘤细胞株接种至 96 孔板, 贴壁 12 h 后, 加药. 对于悬浮性细胞, 接种后立即加药, 细胞密度为 $1 \sim 2 \times 10^5$ /孔. 每种细胞株与不同浓度的药物共同孵育 48 h, 计算细胞活力, 顺铂和紫杉醇为阳性药.

References

- [1] Tyman, J. H. P.; Schofield, B. G.; Khor, C. H. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *120*, 101.
- [2] Kim, J. H.; Kim, H. P.; Jung, C. H.; Hong, M. H.; Hong, M. C.; Bae, H. S.; Lee, S. D.; Park, S. Y.; Park, J. H.; Ko, S. G. *Int. J. Mol. Med.* **2006**, *18*, 201.
- [3] Kim, J. H.; Go, H. Y.; Jin, D. H.; Kim, H. P.; Hong, M. H.; Chung, W. Y.; Park, J. H.; Jang, J. B.; Jung, H.; Shin, Y. C.; Kim, S. H.; Ko, S. G. *Cancer Lett.* **2008**, *265*, 197.
- [4] Kim, J. H.; Jung, C. H.; Jang, B. H.; Go, H. Y.; Park, J. H.; Choi, Y. K.; Hong, S. I.; Shin, Y. C.; Ko, S. G. *Am. J. Chin. Med.* **2009**, *37*, 609.
- [5] Kitts, D. D.; Lim, K. T. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* **2001**, *64*, 357.
- [6] Lee, J. C.; Lim, K. T.; Yang, M. S.; Jang, Y. S. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *34*, 250.
- [7] Lee, J. D.; Huh, J. E.; Jeon, G. S.; Yang, H. R.; Woo, H. S.; Choi, D. Y.; Park, D. S. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 268.
- [8] Huang, C. P.; Fang, W. H.; Lin, L.; Chiou, R. Y.; Kan, L. S.; Chi, N. H.; Chen, Y. R.; Lin, T. Y.; Lin, S. B. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *227*, 331.
- [9] Lee, J. C.; Lee, K. Y.; Kim, J.; Na, C. S.; Jung, N. C.; Chung, G. H.; Jang, Y. S. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 1383.
- [10] Kozubek, A.; Tyman, J. H. P. In *Studies in Nature Products Chemistry*, Vol. 30, Ed.: Atta-Ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, **2005**, pp. 111~190.
- [11] Kozubke, A.; Tyman, J. H. P. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1.
- [12] Kamiya, Y.; Saito, W.; Miyakoshi, T. *J. Oleo Sci.* **2002**, *51*, 473.
- [13] Miyakoshi, T.; Kobuchi, H.; Niimura, N.; Yoshihiro, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 2560.
- [14] Kamiya, Y.; Miyakoshi, T. *J. Oleo Sci.* **2001**, *50*, 865.
- [15] Tyman, J. H. P.; Mehet, S. K. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *126*, 177.
- [16] Tyman, J. H. P.; Khol, C. H. *Chem. Ind.* **1974**, 740.
- [17] Sargent, M. V.; Wangchareontrakul, S.; Jefferson, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, 431.
- [18] Guan, J.; Kyle, D. E.; Gerena, L.; Zhang, Q.; Milhous, W. K.; Lin, A. J. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2741.
- [19] Halim, H.; Locksley, H. D.; Memon, J. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 2331.

- [20] Chen, Y.; Chen, S. P.; Lu, X.; Cheng, H.; Ou, Y. Y.; Cheng, H. M.; Zhou, G.-C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1851.
- [21] Sato, Y.; Rifkin, D. B. *J. Cell Biol.* **1988**, *107*, 1199.
- [22] Merchan, J. R.; Chan, B.; Kate, S.; Schnipper, L. E. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 388.
- [23] Mosmman, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
- [24] Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M. J.; Fine, D. L.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 589.

(Li, L.; Fan, Y.)