

一种脂溶性异黄酮化合物的晶体结构及抗氧化活性研究

延 玺* 任占华 吕沙沙 李玉梅 司书峰

(北京师范大学化学学院, 北京 100875)

摘要: 本文合成了 5-甲基-7-羟基-4'-甲氧基异黄酮, 采用 IR, UV, ^1H NMR, 和元素分析对其结构进行了表征, 并利用 X 射线单晶衍射仪测定了该化合物的晶体结构。用紫外光谱法研究了它们对超氧阴离子自由基和 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical 简称 DPPH $\cdot$)的清除活性。实验结果表明 5-甲基-7-羟基-4'-甲氧基异黄酮化合物($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_4$)属于三斜晶系, 空间群为 $P\bar{1}$ 。 $a=0.822\ 55(2)$ nm, $b=0.931\ 23(2)$ nm, $c=1.045\ 47(2)$ nm, $\alpha=89.043\ 2(2)^\circ$, $\beta=69.195\ 0(10)^\circ$, $\gamma=66.979\ 0(10)^\circ$, $Z=2$, $V=0.681\ 99(3)$ nm 3 , $D_c=1.375$ g $\cdot$ cm $^{-3}$, $F(000)=296$, $R_1=0.044\ 4$, $wR_2=0.115\ 6$, 而且该化合物具有较好的清除羟基自由基和超氧自由基的作用。

关键词: 异黄酮衍生物; 脂溶性; 抗氧化; 自由基; 晶体结构

中图分类号: O625.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2011)06-1133-05

Crystal Structure and Antioxidant Activities of One Fatty Soluble Isoflavones Derivatives

YAN Xi* REN Zhan-Hua LÜ Sha-Sha LI Yu-Mei SI Shu-Feng

(College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: The fat-soluble isoflavone derivatives: 5-methyl-7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone (L2) were synthesized and their structures were characterized by IR, UV, ^1H NMR, single crystal X-ray diffraction and elemental analysis. The scavenging activities of L2 on superoxide anion free radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH $\cdot$) were measured by ultraviolet spectrophotometry. The experiment result shows that, the crystal ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_4$) belongs to triclinic space group $P\bar{1}$ with unit cell constants $a=0.822\ 55(2)$ nm, $b=0.931\ 23(2)$ nm, $c=1.045\ 47(2)$ nm, $\alpha=89.043(2)^\circ$, $\beta=69.195\ 0(10)^\circ$, $\gamma=66.979\ 0(10)^\circ$, $V=0.681\ 99(3)$ nm 3 , $Z=2$, $D_c=1.375$ g $\cdot$ cm $^{-3}$, $F(000)=296$, $R=0.044\ 4$, $wR=0.115\ 6$. The compound L2 can scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH $\cdot$) and superoxide anion free radical effectively. CCDC: 821767.

Key words: isoflavone derivatives; fatty soluble; antioxidant activity; free radical; crystal Structure

异黄酮类化合物广泛分布于多种植物中, 是许多中草药的有效成分, 具有明显的抗心率失常^[1]、抗缺氧缺血、解痉挛、抗骨质疏松^[2]、植物雌激素^[3]、抑制癌细胞生长^[4]、抗氧化作用^[5]。自由基可以引起人类多种病变, 如癌症、衰老、冠心病、白内障以及一些其它疾病, 因而, 如何有效地抑制和清除人体内过多的自由基, 是促进人类健康和延长人类寿命、提高人们生

活质量的一项有意义的研究^[6]。为此, 我们在这方面做了一些探讨, 合成了 5-甲基-7-羟基-4'-甲氧基异黄酮(L2)。采用 IR, UV, ^1H NMR, 和元素分析对其结构进行了表征, 并利用 X 射线单晶衍射仪测定了该化合物的晶体结构。用紫外光谱法研究了 L2 对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、和 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH $\cdot$)的清除活性; 利用荧光光谱法研究了 L2、清

收稿日期: 2010-11-08。收修改稿日期: 2011-02-26。

国家自然科学基金(No.20271008)、北京市重点学科基金、北京师范大学测试中心基金资助项目。

*通讯联系人。E-mail: yanxi@bnu.edu.cn, Tel: 010-58806200, Fax: 010-58802075

除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的活性。结果表明,脂溶性异黄酮 L2、对以上 3 种自由基都有好的清除活性,是一种有潜在开发价值的异黄酮衍生物。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

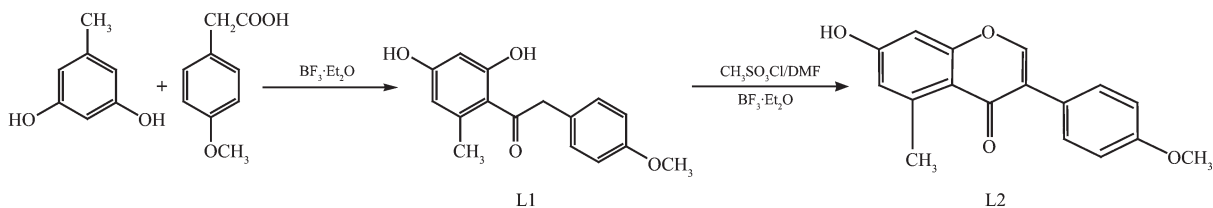
Nicolet 170SX FRIR 红外分析仪, Cintra 10e 紫外可见分光光度计, RF-5301PC 荧光光度计, Elementar VarioEL 型元素分析仪, 500 Brüker 核磁共振波谱仪, X-6 显微熔点仪, SZ-93 自动双重水蒸馏器, ZF-C 型三用紫外分析仪。三氟化硼乙醚溶液(A.R., 北京长阳化工厂), 甲烷磺酰氯(C.R., 北京金龙化学试剂有限公司), 对甲氧基苯乙酸(A.R., 上海达瑞精细化学品有限公司), 3,5-二羟基甲苯(浙江三门腾龙化工有限公司), 其他试剂均为分析纯试剂, 使用前按需要进行纯化。

1.2 2-甲基-4,6-二羟基-4'-甲氧基脱氧安息香(L1)和(L2)的制备^[7]

称取 8.3 g (0.05 mol) 对甲氧基苯乙酸和 6.2 g (0.05 mol) 3,5-二羟基甲苯置于 100 mL 三口烧瓶中, 加入 30 mL 新蒸的 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 溶液(溶剂和催化剂), N_2 保护于 80 °C 反应 6 h。冷却至室温, 旋蒸回收大部分的 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 将残余物倒入 400 mL 冰水中, 静置, 过滤, 沉淀用稀 NaHCO_3 水溶液洗涤, 得黄

色粗产品。用水重结晶, 得到白色固体产品 5.44 g, 产率: 40%。m.p. 104~105 °C; IR(KBr, ν/cm^{-1}): 3 415.2 (-OH), 1 626.8 (-CO-); ^1H NMR(acetone, 500 MHz, δ/ppm): 2.24 (s, 3H, -CH₃), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 4.40 (s, 2H, -COCH₂-), 6.23 (s, 1H, 4-H), 6.28 (s, 1H, 6-H), 6.85 (d, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.21 (d, 2H, 2'-H, 6'-H)。元素分子按 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ 计算(%): C, 70.57; H, 5.92; 实验值(%): C, 70.59; H, 5.88。证实为 2-甲基-4,6-二羟基-4'-甲氧基脱氧安息香化合物。

在 25 mL 的圆底烧瓶中加入 0.272 g 2-甲基-4,6-二羟基-4'-甲氧基脱氧安息香化合物(1 mmol), 用 6.0 mL 干燥的 DMF 溶解, 逐滴加入 1.5 mL 新蒸的 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 溶液, 缓慢加热至 50 °C。另取 0.2 mL $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ 溶于 2.7 mL DMF 中。将此淡黄色溶液缓慢加入到上述反应体系中, 70 °C 反应 6 h。冷却, 倒入 100 mL 冷水中, 产生红棕色沉淀, 过滤, 用水洗涤, 干燥, 乙醇/丙酮(1:2)重结晶, 得到浅黄色粉末 0.39 g, 产率: 70%。m.p. 122.4~124.2 °C; IR(KBr, ν/cm^{-1}): 3 438.0 (-OH), 1 634.2 (-CO-); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz, δ/ppm): 2.86 (s, 3H, -CH₃), 3.86 (s, 3H, -OCH₃), 5.34 (s, 1H, OH), 6.67 (s, 1H, 8-H), 6.72 (d, 1H, 6-H), 6.98 (d, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.46 (d, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.82 (s, 1H, 2-H)。元素分析按 $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_4$ 计算(%): C, 72.33; H, 5.272; 实验值(%): C, 72.34; H, 4.99。



1.3 化合物 L2 晶体结构的测定

以乙醇为溶剂, 配制适量的 L2 饱和溶液, 并在室温下缓慢挥发, 6 周后析出适合于单晶结构测试的浅粉红色晶体。选取大小为 0.30 mm×0.26 mm×0.10 mm 的单晶, 在 BRUCKER SMART 1000 CCD 衍射仪上, 以 $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda=0.071\,073\text{ nm}$) 为 X 射线源, 石墨单色器, 利用 φ - ω 扫描方式在室温下收集衍射数据。分子结构采用 SHELXS-97^[8] 程序由直接法解出, 并用 SHELXL-97^[9] 程序对非氢原子坐标及其各向异性温度因子进行基于 F^2 的全矩阵最小二乘法修正。

1.4 化合物 L2 对超氧阴离子自由基的清除^[10-11]

在 10 mL 比色管中, 加入 $\text{pH}=8.2$, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Tris-HCl 缓冲溶液 5 mL, 然后依次加入不同体积的 $1\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 L2 溶液, 最后加入 0.1 mL $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液, 用蒸馏水定容到 10 mL, 摇匀。25 °C 恒温下静置 4 min。然后立即测定其在 319 nm 波长处的紫外吸光度 A , 加入化合物 L2 的体积从 0 μL 开始, 体积间隔为 1 μL , 一直测到紫外吸收峰将近消失为止。

测吸光度值 A 时分别以对应浓度的化合物 L2 的 Tris-HCl 缓冲溶液为参比, 测吸光度值 A_0 时以相应 Tris-HCl 缓冲溶液作为参比。

1.5 化合物 L2 对 DPPH 自由基的清除^[11]

以乙醇为溶剂, 分别配置 $1\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 L2 溶液和 $1\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DPPH· 溶液。然后

在各个 10 mL 比色管中分别加入 2 mL DPPH· 溶液和一定体积的化合物 L2 溶液, 摇匀反应 30 min 后, 于 517 nm 处测定其吸光度。测吸光度值 A 时以各相应浓度的化合物溶液作参比, 测定吸光度值 A_0 时以乙醇溶液为参比。

2 结果与讨论

2.1 晶体结构的描述

化合物的晶体衍射数据、主要键长和键角分别列于表 1 和表 2, 图 1 为化合物 L2 的分子结构图。CCDC:821767。

表 1 L2 的晶体衍射数据

Table 1 Crystal data and structure refinement for L2

Empirical formula	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	Absorption coefficient / mm ⁻¹	0.098
Formula weight	282.28	$F(000)$	296
Temperature / K	296(2)	Crystal size / mm	0.34×0.10×0.06
Wavelength / nm	0.071 073	θ range for data collection / (°)	2.11 to 27.62
Crystal system	Triclinic	Limiting indices	$-8 \leq h \leq 10, -11 \leq k \leq 12, -12 \leq l \leq 13$
Space group	$P\bar{1}$	Reflections collected / unique (R_{int})	6 031 / 3 111 (0.014 6)
a / nm	0.822 55(2)	Completeness to $\theta=27.62^\circ$ / %	98.1
b / nm	0.931 23(2)	Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
c / nm	1.045 47(2)	Max. and min. transmission	0.994 1 and 0.967 4
α / (°)	89.043(2)	Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
β / (°)	69.195 0(10)	Data / restraints / parameters	3 111 / 0 / 193
γ / (°)	66.979 0(10)	Goodness-of-fit on F^2	1.063
Volume / nm ³	0.681 99(3)	Final R indices ($I>2\sigma(I)$)	$R_1=0.044$ 4, $wR_2=0.115$ 6
Z	2	R indices (all data)	$R_1=0.069$ 6, $wR_2=0.130$ 8
Calculated density / (g·cm ⁻³)	1.375	Largest diff. peak and hole / (e·nm ⁻³)	176 and -156

表 2 化合物 L2 的键长和键角

Table 2 Bond lengths (nm) and bond angle (°) for L2

C(1)-O(1)	0.141 4(2)	C(6)-C(7)	0.138 6(2)	C(11)-C(12)	0.146 0(2)
C(2)-C(7)	0.136 9(2)	C(8)-C(9)	0.133 1(2)	C(12)-O(2)	0.123 15(18)
C(2)-O(1)	0.137 12(17)	C(8)-C(12)	0.146 2(2)	C(13)-C(14)	0.137 3(2)
C(2)-C(3)	0.137 4(2)	C(9)-O(3)	0.134 65(18)	C(14)-O(4)	0.135 28(18)
C(3)-C(4)	0.137 2(2)	C(10)-O(3)	0.136 91(17)	C(14)-C(15)	0.139 3(2)
C(4)-C(5)	0.138 7(2)	C(10)-C(13)	0.138 6(2)	C(15)-C(16)	0.137 6(2)
C(5)-C(6)	0.137 3(2)	C(10)-C(11)	0.140 0(2)	C(16)-C(17)	0.150 1(2)
C(5)-C(8)	0.148 6(2)	C(11)-C(16)	0.142 3(2)		
C(7)-C(2)-O(1)	124.58(15)	C(9)-C(8)-C(5)	120.35(14)	C(11)-C(12)-C(8)	115.73(13)
C(7)-C(2)-C(3)	119.23(15)	C(12)-C(8)-C(5)	120.31(14)	C(14)-C(13)-C(10)	117.99(14)
O(1)-C(2)-C(3)	116.18(14)	C(8)-C(9)-O(3)	125.33(14)	O(4)-C(14)-C(13)	123.57(14)
C(4)-C(3)-C(2)	120.79(16)	O(3)-C(10)-C(13)	114.48(13)	O(4)-C(14)-C(15)	116.45(14)
C(3)-C(4)-C(5)	121.04(16)	O(3)-C(10)-C(11)	121.67(13)	C(13)-C(14)-C(15)	119.98(14)
C(6)-C(5)-C(4)	117.30(15)	C(13)-C(10)-C(11)	123.85(14)	C(16)-C(15)-C(14)	122.44(14)
C(6)-C(5)-C(8)	120.94(15)	C(10)-C(11)-C(16)	116.86(13)	C(15)-C(16)-C(11)	118.86(14)
C(4)-C(5)-C(8)	121.75(15)	C(10)-C(11)-C(12)	119.09(13)	C(15)-C(16)-C(17)	118.16(14)
C(5)-C(6)-C(7)	122.03(16)	C(16)-C(11)-C(12)	124.04(13)	C(11)-C(16)-C(17)	122.98(14)
C(2)-C(7)-C(6)	119.61(16)	O(2)-C(12)-C(11)	123.95(14)	C(2)-O(1)-C(1)	117.96(13)
C(9)-C(8)-C(12)	119.34(14)	O(2)-C(12)-C(8)	120.32(14)		

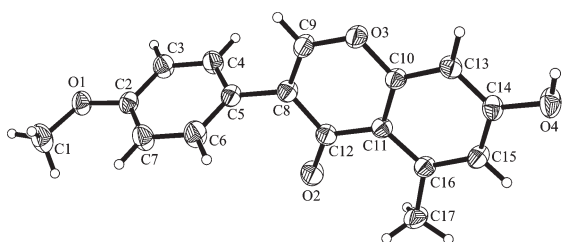


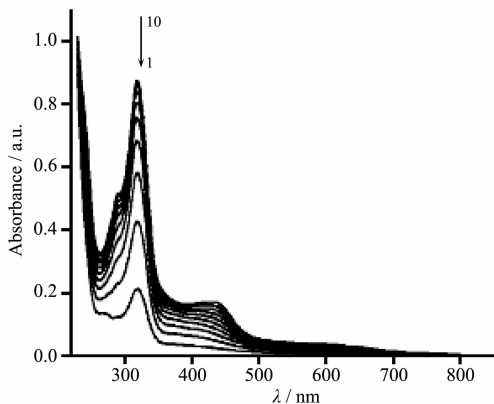
图 1 化合物 L2 的分子结构图

Fig.1 Molecular structure of compound L2

2.2 化合物 L2 清除超氧自由基的研究

超氧阴离子自由基是一类很广泛的活性氧自由基,它的产生途径也很多,但能稳定产生超氧阴离子自由基的方法却不是很多,本文采用邻苯三酚在碱性体系中发生自氧化的方法产生超氧阴离子自由基以供实验检测用。邻苯三酚在酸性环境中相当稳定,而在碱性条件下能迅速自氧化,并在自氧化过程中产生超氧阴离子自由基 (Superoxide Anion Free Radical,SAFR),此 SAFR 继续加速其自氧化反应,如果及时清除 SAFR,就会抑制其自氧化反应速率。

实验条件的确定:邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化,放出 SAFR,生成有色中间产物。初始溶液呈黄棕色,几分钟后变绿色,几小时后转为黄色,这是因为生成的中间产物不断氧化的结果。从图 2 吸收曲线可知,邻苯三酚自氧化积累的初始中间产物在 319 nm 处有一明显吸收峰,而且在三十几分钟内只看到这个明显的中间产物峰。后随自氧化的继续,中间产物的积累,几小时后此峰转移到 440 nm 附近。本实验选择自氧化的初始阶段,所以选定 319 nm 作为测试波长,4 min 为自氧化反应紫外吸



Line 1~10: time at 0.5, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 and 36 min respectively

图 2 邻苯三酚在碱性体系中的自氧化光谱变化图

Fig.2 Changes of spectra of pyrogallol in basic system self oxidizing

收光谱的测试时间。清除率计算公式为:

$$E = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

图 3 为不同浓度的化合物 L2 对超氧阴离子自由基的清除率图,从图中可以看到,随着 L2 浓度的增加其对超氧阴离子自由基的清除率值也增加,L2 对超氧阴离子自由基清除的 IC_{50} 值为 $14.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,说明 L2 具有较强的抗氧化性,是一种有效的超氧阴离子自由基清除剂。

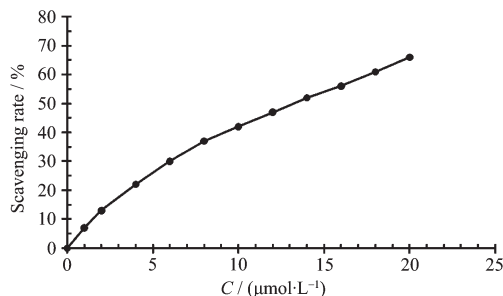
图 3 在不同浓度下 L2 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率曲线

Fig.3 Scavenging rate curves of L2 on superoxide anion free radicals at different concentration

2.3 化合物 L2 清除 DPPH· 自由基的研究

1,1-二苯基-2-苦肟基自由基分光光度法,在国内外广泛应用于清除自由基物质的研究与天然抗氧化试剂的筛选^[12-16]。DPPH·是一种十分稳定的有机自由基,即便在室温溶液中也很有安定,其乙醇溶液在 515 nm 处具有特征的紫红色吸收峰,当存在自由基清除剂时,由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,其褪色程度与其所接受的电子数成定量关系,因而可用分光光度法进行定量分析,以分光光度法测定加入不同浓度的抗氧化剂或待测样品后的吸光度的分析法是一种筛选自由基清除剂的简便方法^[11-18]。清除率公式为:

$$E = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

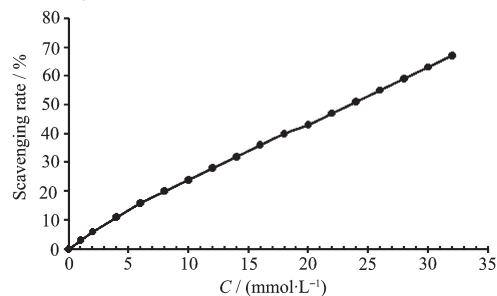


图 4 在不同浓度下 L2 对 DPPH· 的清除率曲线

Fig.4 Scavenging rate curves of L2 on DPPH· at different concentration

由图可以看到,L2都对DPPH·同样有一定的清除活性,通过对不同浓度的L2对DPPH·的清除率曲线可知,L2对DPPH·清除率的 IC_{50} 值为 $24.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] SHAO Guo-Xian(邵国贤), MO Ruo-Ying(莫若莹), WANG Cun-Ying(王存英), et al. *Acta Pharm. Sinica (Yaoxue Xuebao)*, **1980**,**15**(9):28-37
- [2] ZHOU Yun(周耘), WAN Wei-Qin(万维勤), ZHANG Wei-Dong(张卫东), et al. *Chinese J. Med. Chem. (Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi)*, **2000**,**10**(3):177-180
- [3] Norman R F, Audrey S B, Geoffrey A. C. *J. Pharm. Sci.*, **1975**,**64**(5):717-754
- [4] Richard A D, Daneel F. *Phytochemistry*, **2002**,**60**(3):205-211
- [5] Rakesh P P, Brenda J B, Jack H C, et al. *Free Radi. Bio. Med.*, **2001**,**31**(12):1570-1581
- [6] YUE Bao-Zhen(岳宝珍), ZHOU Ze-Wei(周则卫), CAI Meng-Shen(蔡孟深). *Chemical Journal of Chineses Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **1990**,**11**(1):99-101
- [7] Sheldrick G M. *SHELXS97 and SHELXL97*, University of Göttingen, German, **1997**.
- [8] YAN Xi(延玺), WU Fu-Li(吴福丽), ZHENG Ze-Bao(郑泽宝). *Acta Chim. Sinica(Huaxue Xuebao)*, **2005**,**63**(4):332-336
- [9] WANG Ju-Cun(王巨存), XING Guo-Sheng(邢国胜), HU Wen-Duo(胡文铎). *Chinese Pharm. J. (Zhongguo Yaoxue Zazhi)*, **1994**,**29**(1):23-25
- [10] BAO Zhi-Juan(保志娟), FANG Yun-Shan(方云山), DING Zhong-Tao(丁中涛), et al. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(Guangpu Shiyanshi)*, **2005**,**22**(2):253-256
- [11] PENG Chang-Lian(彭长连), CHEN Shao-Wei(陈少薇), LIN Zhi-Fang(林植芳). *Progress in Biochemistry and Biophysics (Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan)*, **2000**,**27**(6):658-661
- [12] ZHAO Ai-Yun(赵爱云), HU Bo-lu(胡博路), HANG Hu(杭瑚), et al. *Natural Product Research and Development(Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa)*, **2000**,**12**(3):42-44
- [13] Badami S, Gupta M K, Suresh B. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**,**85**:227-230
- [14] Lu Y R, Yeap F L. *Food Chemistry*, **2001**,**75**(2):197-202
- [15] Aljadi A M, Kamaruddin M Y. *Food Chemistry*, **2004**,**85**(4):513-518
- [16] Wright J S, Johnson E R, Dilabio G A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**,**123**(6):1173-1183