



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103382195 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 06

(21) 申请号 201210137159. 9

A61P 19/02(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 05. 04

A61P 29/00(2006. 01)

(71) 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号

(72) 发明人 陈俐娟 魏于全

(74) 专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通合伙) 51124

代理人 武森涛 梁鑫

(51) Int. Cl.

C07D 311/58(2006. 01)

A61K 31/352(2006. 01)

A61P 11/06(2006. 01)

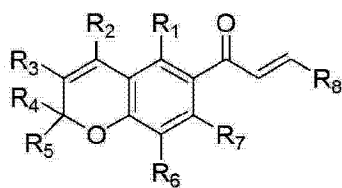
权利要求书3页 说明书18页 附图4页

(54) 发明名称

苯并吡喃查尔酮类化合物及其制备方法和用途

(57) 摘要

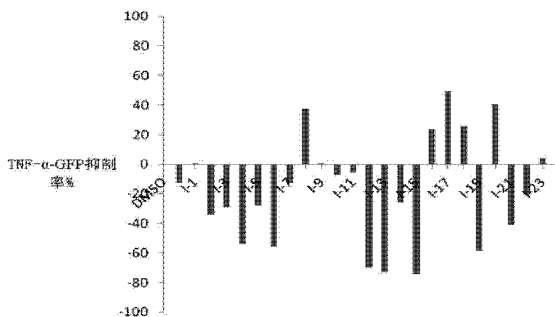
本发明涉及有机化学和药物化学领域,具体地说,涉及具有抗炎活性的苯并吡喃查尔酮类化合物及其制备方法和用途。所述苯并吡喃查尔酮类化合物具有如下结构:



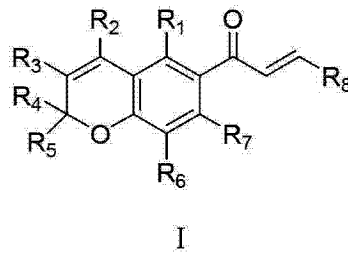
。本发明通过实验表

I

明,该化合物对炎症因子 iNOS、TNF-α 或 IL-4 具有抑制作用,可用于治疗骨关节炎、风湿性关节炎或哮喘等炎症。



1. 苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于具有如下结构:



其中,

$R_1$  为氢原子、羟基、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷基氧基、 $C_1 \sim C_6$  酰氧基;

$R_2$ 、 $R_3$  独立地为氢原子、羟基、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷基氧基、 $C_1 \sim C_6$  酰氧基或环氧;

$R_4$ 、 $R_5$  独立地为氢原子、卤素或  $C_1 \sim C_6$  烷基;

$R_6$ 、 $R_7$  独立地为氢原子、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基或  $C_1 \sim C_6$  烷氧基;

$R_8$  为带有或不带取代基的芳环基、带有或不带取代基的芳杂环基;其中取代基独立的分别为:  $-H$ 、 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CF_3$ 、 $C_1 \sim C_6$  烷基、卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、羟基或  $-N(R')_2$  (其中  $R'$  为氢原子、 $C_1 \sim C_6$  烷基、卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基)。

2. 根据权利要求 1 所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于: $R_1$  为氢原子、羟基、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基;优选的是  $R_1$  为氢原子、羟基、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基;进一步优选的是  $R_1$  为羟基、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基;最优的是  $R_1$  为羟基。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于: $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  独立地为氢原子、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基;进一步优选的是  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  独立地为氢原子。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于: $R_4$ 、 $R_5$  独立地为氢原子或  $C_1 \sim C_6$  烷基;优选的是  $C_1 \sim C_6$  烷基;进一步优选的是甲基或乙基。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于: $R_8$  为带有或不带取代基的芳基;优选的是  $R_8$  为带有或不带取代基的苯基。

6. 根据权利要求 5 所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于: $R_8$  为带有取代基的苯基,其中取代基独立的分别为: $-CN$ 、 $-OH$ 、卤素、 $-CF_3$ 、 $C_1 \sim C_6$  烷基、卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、苯基、含有 1~2 个杂原子的 5-7 元杂环或  $-N(R')_2$ ,其中所述杂原子为 N、O、S; $R'$  为氢原子、苯基、 $C_1 \sim C_6$  烷基或卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基。

7. 根据权利要求 6 所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于:取代基独立的分别为: $-OH$ 、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、苯基、含有 1~2 个杂原子的 5-7 元杂环;优选的是  $-OH$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷基氧基、苯基、含有 1 个 N 原子的 5-7 元杂环或  $-N(R')_2$ ;进一步优选的是  $-OH$ 、卤素、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、苯基、N-吡咯烷基或  $-N(R')_2$ 。

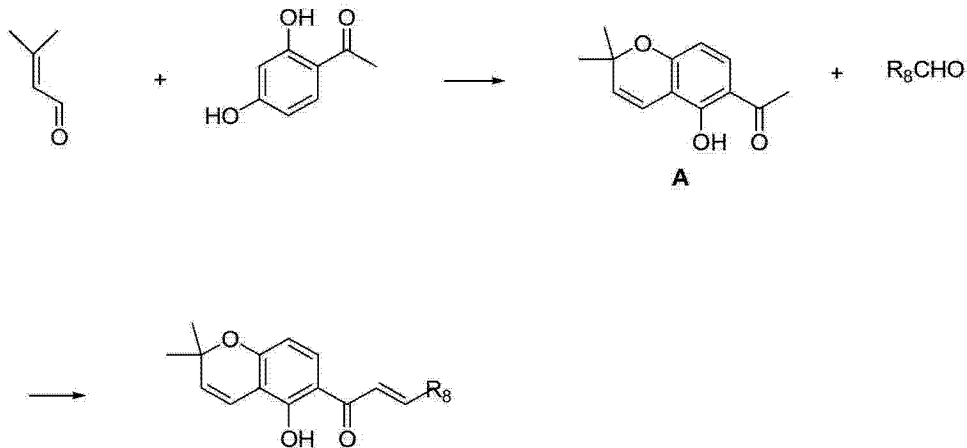
8. 根据权利要求 7 所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于: $R'$  为氢原子、苯基、甲基或乙基。

9. 根据权利要求 1-4 任一项所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于: $R_8$  为带有

或不带取代基的芳杂环基,芳杂环基的骨架为含有 1~2 个杂原子的 5-7 元杂环,所述杂原子为 N、O 或 S;优选的是所述芳杂环基的骨架为含有 1 个 N 原子的 5-7 元杂环。

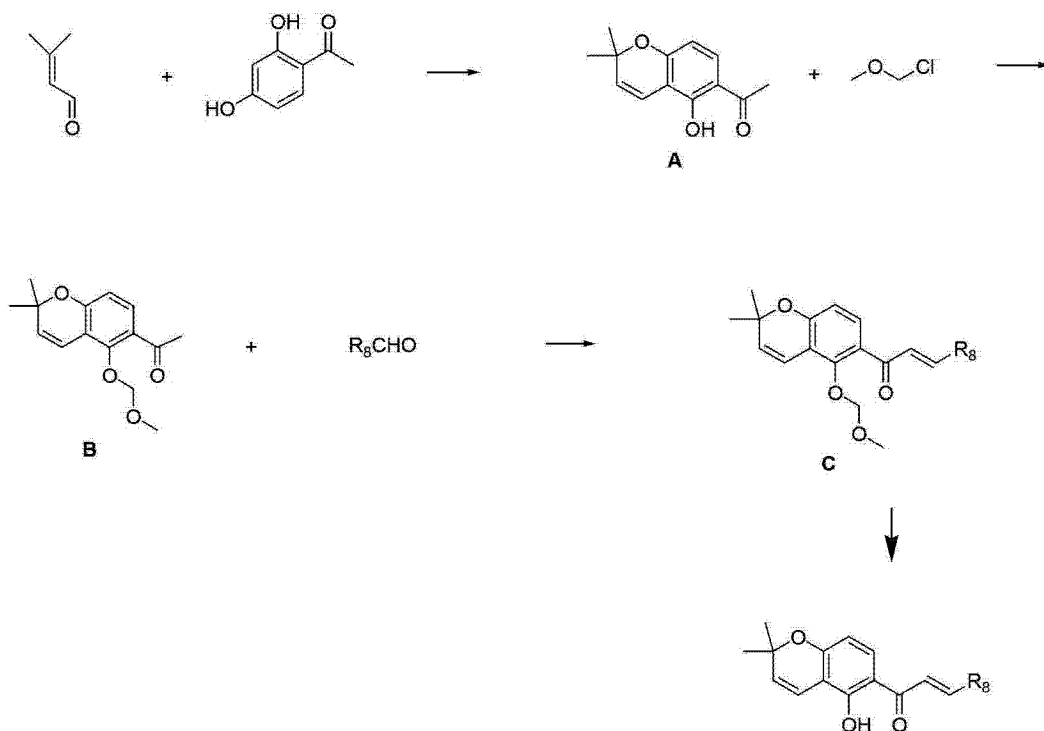
10. 根据权利要求 9 所述的苯并吡喃查尔酮类化合物,其特征在于:取代基独立的分别为: $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、卤素、 $-\text{CF}_3$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  烷基、卤素取代的  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  烷基、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  烷基氧基、苯基;优选的是  $-\text{OH}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  烷基、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  烷氧基、苯基;进一步优选的是  $-\text{OH}$ 、卤素、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、苯基。

11. 权利要求 1 所述的苯并吡喃查尔酮类化合物的合成方法,其特征在于:  
方法一合成路线如下:



2,4-二羟基苯乙酮与 3-甲基-2-烯-丁醛反应生成化合物 A, A 与苯环上羟基已被氯甲基甲醚保护的苯甲醛通过微波反应生成目标化合物;

方法二合成路线如下:



2,4-二羟基苯乙酮与3-甲基-2-烯-丁醛反应生成化合物A,化合物A经由氯甲基甲醚保护后生成的化合物B进一步与不含羟基的苯甲醛反应生成化合物C,用浓盐酸脱去其上的保护基得到目标产物;然后可将其转化为盐酸盐、磷酸盐、硝酸盐、醋酸盐或磺酸盐。

12. 权利要求1-10任一项所述的苯并吡喃查尔酮类化合物的可药用盐。

13. 权利要求1-10任一项所述的苯并吡喃查尔酮类化合物或其可药用盐在制备对炎症因子iNOS、TNF- $\alpha$ 或IL-4的抑制剂中的用途。

14. 权利要求1-10任一项所述的苯并吡喃查尔酮类化合物或其可药用盐在制备治疗骨关节炎、风湿性关节炎或哮喘的用途。

15. 一种抗炎的药用组合物,含有权利要求1-10任一项所述的苯并吡喃查尔酮类化合物或其可药用盐。

## 苯并吡喃查尔酮类化合物及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及有机化学和药物化学领域,具体地说,就是具有抗炎活性的苯并吡喃查尔酮类化合物及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 查尔酮类化合物是一类存在于甘草、红花等药用植物中的天然有机化合物,由于其分子结构具有较大的柔性,能与不同的受体结合,因此具有广泛的生物活性,如:抗肿瘤、抑制和清除氧自由基、抗菌、抗病毒、抗溃疡和解痉挛等生物活性。

[0003] 查尔酮类化合物对肿瘤和炎症的治疗作用,可能是通过其对 NF- $\kappa$ B 信号传递系统的抑制作用实现的。NF- $\kappa$ B 能调节多种参与炎症反应的细胞因子、粘附分子和蛋白酶类的基因转录过程,与炎症的发生密切相关。NF- $\kappa$ B 的活化能够促进炎症因子的表达,反过来炎症因子使 NF- $\kappa$ B 的活性进一步增强,从而使炎症的发生加重。目前,人们正试图通过阻断 NF- $\kappa$ B 的激活来达到治疗炎症的目的,临床上常用糖皮质激素、阿斯匹林及水杨酸盐等均为 NF- $\kappa$ B 抑制剂。

[0004] 异戊烯基化的查尔酮,由于其分子的基本骨架中存在一个异戊烯基化的侧链(如异戊烯基、香叶基、2,2-二甲基吡喃等),表现出更多、更强的令人感兴趣的生理活性。

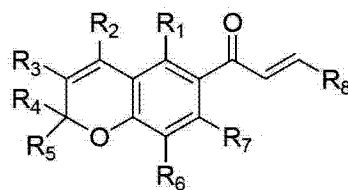
[0005] 苯并吡喃类查尔酮是异戊烯基化查尔酮类化合物中的一类,其是自二十世纪六十年代以来在植物中所发现的。该类化合物结构特点为在查尔酮的母核的 A 环或 B 环上至少有一个苯并吡喃取代基,其主要存在于植物的根,皮,根茎,树干,心木,种子和叶子之中。由于近年来不断发现该类化合物丰富的生物活性作用,目前苯并吡喃类查尔酮类天然产物成为药物化学领域研究的热点之一。苯并吡喃环的存在大大增加了这类化合物相应的生物活性,其对炎症因子 iNOS, TNF- $\alpha$  和 IL-4 都具有较强的抑制作用,在制备治疗骨关节炎、风湿性关节炎和哮喘药物方面具有较大的应用前景。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种新型结构的抗炎药物,苯并吡喃查尔酮类化合物或其可药用盐。

[0007] 本发明的苯并吡喃查尔酮类化合物具有如下结构:

[0008]



I

[0009] 其中,

[0010]  $R_1$  为氢原子、羟基、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、 $C_1 \sim C_6$  酰氧基;

[0011]  $R_2$ 、 $R_3$  独立地为氢原子、羟基、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷基氧基、 $C_1 \sim C_6$  酰氧基或环氧；

[0012]  $R_4$ 、 $R_5$  独立地为氢原子、卤素或  $C_1 \sim C_6$  烷基；

[0013]  $R_6$ 、 $R_7$  独立地为氢原子、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基或  $C_1 \sim C_6$  烷氧基；

[0014]  $R_8$  为带有或不带取代基的芳环基、带有或不带取代基的芳杂环基；其中取代基独立的分别为： $-H$ 、 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CF_3$ 、 $C_1 \sim C_6$  烷基、卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、羟基或  $-N(R')_2$ （其中  $R'$  为氢原子、 $C_1 \sim C_6$  烷基、卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基）。

[0015] 作为本发明优选的方案：上述苯并吡喃查尔酮类化合物中， $R_1$  为氢原子、羟基、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基；优选的是  $R_1$  为氢原子、羟基、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基；进一步优选的是  $R_1$  为羟基、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基；最优的是  $R_1$  为羟基。

[0016] 作为本发明优选的方案：上述苯并吡喃查尔酮类化合物中， $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  独立地为氢原子、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基；进一步优选的是  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  独立地为氢原子。

[0017] 作为本发明优选的方案：上述苯并吡喃查尔酮类化合物中， $R_4$ 、 $R_5$  独立地为氢原子或  $C_1 \sim C_6$  烷基；优选的是  $C_1 \sim C_6$  烷基；进一步优选的是甲基或乙基。

[0018] 作为本发明优选的方案：上述苯并吡喃查尔酮类化合物中， $R_8$  为带有或不带取代基的芳基；优选的是  $R_8$  为带有或不带取代基的苯基。

[0019] 作为本发明优选的方案：上述苯并吡喃查尔酮类化合物中， $R_8$  为带有取代基的苯基，其中取代基独立的分别为： $-CN$ 、 $-OH$ 、卤素、 $-CF_3$ 、 $C_1 \sim C_6$  烷基、卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷基氧基、苯基、含有 1～2 个杂原子的 5-7 元杂环或  $-N(R')_2$ ，其中所述杂原子为 N、O、S； $R'$  为氢原子、苯基、 $C_1 \sim C_6$  烷基或卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基。

[0020] 作为本发明优选的方案：上述苯并吡喃查尔酮类化合物中， $R_8$  取代基独立的分别为： $-OH$ 、卤素、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、苯基、含有 1～2 个杂原子的 5-7 元杂环；优选的是  $-OH$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、苯基、含有 1 个 N 原子的 5-7 元杂环或  $-N(R')_2$ ；进一步优选的是  $-OH$ 、卤素、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、苯基、N-吡咯烷基或  $-N(R')_2$ 。

[0021] 进一步优选的是  $R'$  为氢原子、苯基、甲基或乙基。

[0022] 作为本发明优选的方案： $R_8$  为带有或不带取代基的芳杂环基，芳杂环基的骨架为含有 1～2 个杂原子的 5-7 元杂环，所述杂原子为 N、O 或 S；优选的是所述芳杂环基的骨架为含有 1 个 N 原子的 5-7 元杂环。作为优选的方案：取代基独立的分别为： $-CN$ 、 $-OH$ 、卤素、 $-CF_3$ 、 $C_1 \sim C_6$  烷基、卤素取代的  $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、苯基；优选的是  $-OH$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $C_1 \sim C_6$  烷基、 $C_1 \sim C_6$  烷氧基、苯基；进一步优选的是  $-OH$ 、卤素、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、苯基。

[0023] 本发明还提供了上述苯并吡喃查尔酮类化合物的可药用盐：盐酸盐、磷酸盐、硝酸盐、醋酸盐或磺酸盐。

[0024] 本发明还提供了上述苯并吡喃查尔酮类化合物或其可药用盐在制备对炎症因子 iNOS、TNF- $\alpha$  或 IL-4 的抑制剂中的用途。

[0025] 本发明还提供了上述苯并吡喃查尔酮类化合物或其可药用盐在制备治疗骨关节炎、风湿性关节炎或哮喘的用途。

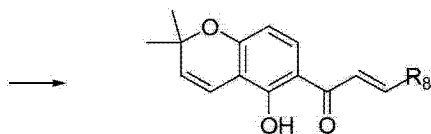
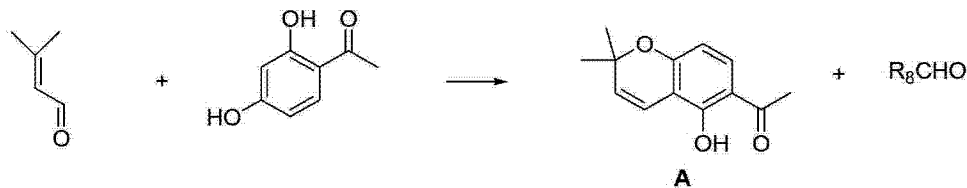
[0026] 本发明还提供了一种抗炎的药用组合物，含有上述任一种或多种苯并吡喃查尔酮

类化合物或其可药用盐。

[0027] 上述苯并吡喃查尔酮类化合物的合成方法如下：

[0028] 方法一合成路线：

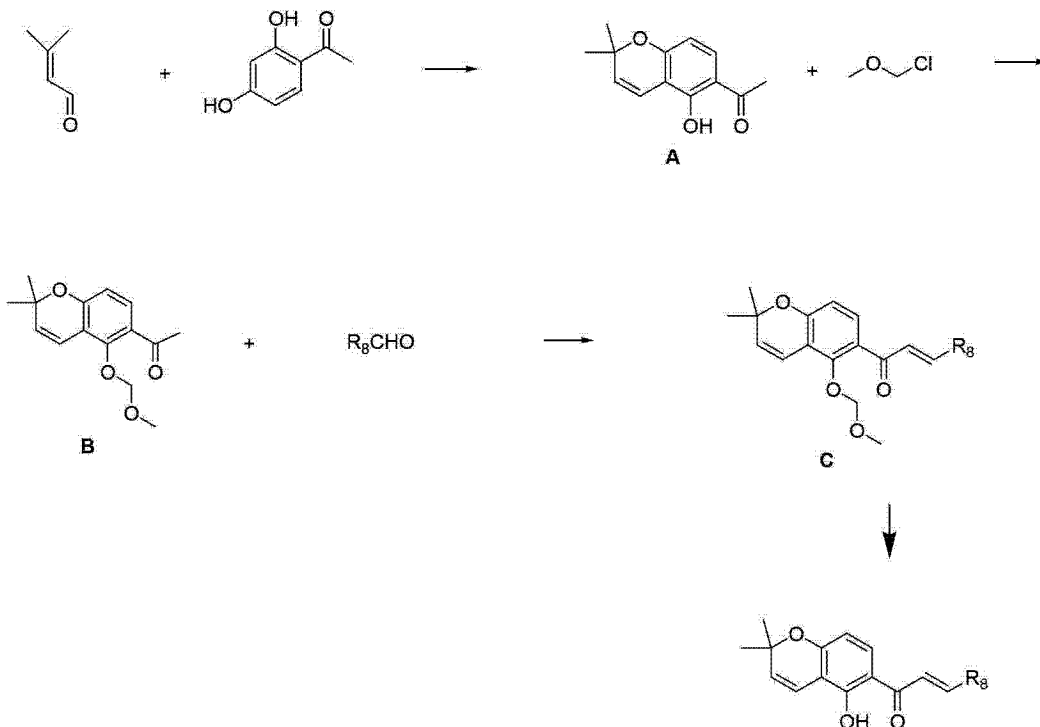
[0029]



[0030] 2,4-二羟基苯乙酮与3-甲基-2-烯-丁醛反应生成化合物A,A与苯环上羟基已被氯甲基甲醚保护的苯甲醛通过微波反应生成目标化合物；

[0031] 方法二合成路线：

[0032]



[0033] 2,4-二羟基苯乙酮与3-甲基-2-烯-丁醛反应生成化合物A,化合物A经由氯甲基甲醚保护后生成的化合物B进一步与不含羟基的苯甲醛反应生成化合物C,用浓盐酸脱去其上的保护基得到目标产物；然后可将其转化为盐酸盐、磷酸盐、硝酸盐、醋酸盐或磺酸盐。

[0034] 本发明通过体外抑制实验表明,苯并吡喃查尔酮类化合物I对由脂多糖诱导的一

氧化氮和一氧化氮合酶具有抑制作用。

[0035] 本发明通过卡拉胶诱导的爪肿胀模型实验表明, 苯并吡喃查尔酮类化合物 I 具有抗炎作用。

[0036] 本发明通过小鼠关节炎模型实验表明, 苯并吡喃查尔酮类化合物 I 具有优良的抗炎活性。

[0037] 本发明通过 Elisa 实验表明, 苯并吡喃查尔酮类化合物 I 对 TNF- $\alpha$  具有较强抑制作用。

[0038] 本发明通过绿色荧光蛋白标记实验表明, 苯并吡喃查尔酮类化合物 I 能够抑制炎症因子 IL-4。

[0039] 本发明通过动物药效实验, 确定查尔酮衍生物 I 或其药学组合的小鼠使用剂量范围是 1-100mg/kg/day。本领域技术人员容易根据现有技术换算出人用剂量范围。

[0040] 根据本发明, 上述所示化合物及其药学组合以药学上可接受的制剂形式存在: 片剂、口服剂、栓剂、滴丸剂、大输液、小针、冻干粉针、胶囊剂、气雾剂、分散片、软膏, 包括各种缓释、控释剂型或纳米制剂; 以单位剂量形式给药, 注射包括静脉注射、肌肉注射、皮下注射和穴位注射。

#### 附图说明

[0041] 图 1 化合物 I-2、I-4、I-6、I-8 对角叉菜胶诱导的爪肿胀的影响图。

[0042] 图 2 化合物 I-2 对佐剂性关节炎的治疗作用。图 A 为关节炎评分图; 图 B 为给药期间小鼠体重波动图。

[0043] 图 3 为 HE 染色病理切片观察图。3A 为模型组; 3B 和 3C 为给药组, 化合物 I-2 浓度分别为 10mg/kg 和 25mg/kg; 3D 为阳性对照组; 3E 为正常组。

[0044] 图 4 流式细胞仪分析化合物 I (10  $\mu$ M) 对炎症因子 IL-4 的抑制率。

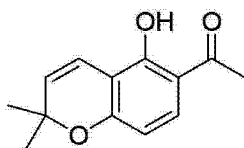
[0045] 图 5 流式细胞仪分析化合物 I (10  $\mu$ M) 对肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  的抑制率。

[0046] 图 6 ELISA 分析化合物 I (10  $\mu$ M) 对肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  的抑制率。

[0047] 实施例 12, 2-二甲基-5-羟基-6-乙酰基-2H-1-苯并吡喃 (A) 的合成

[0048] 将 6.08g (40mmol) 2,4-二羟基苯乙酮加入到 100mL 圆底烧瓶中, 以 4mL 干燥吡啶溶解, 滴加 4.20mL (44mmol) 3-甲基-2-烯-丁醛后于 115 $^{\circ}$ C 回流 12h。后处理: 减压蒸去吡啶, 剩余物以 150mL 水洗, 乙酸乙酯 (200mL $\times$ 3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 30:1) 得黄色固体 4.70g, 收率 54.3%。 $^1$ H NMR (400MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.45 (s, 6H), 2.54 (s, 3H), 5.57 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.33 (d, 1H, J=8.8 Hz), 6.70 (d, 1H, J=10.0Hz), 7.51 (d, 1H, J=8.8Hz), 12.98 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 217 (ES $^-$ )。

[0049]



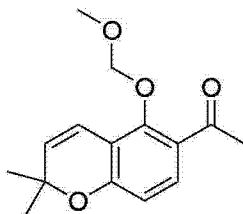
[0050] 实施例 22, 2-二甲基-5-甲氧基甲醚-6-乙酰基-2H-1-苯并吡喃 (B) 的合成

[0051] 将 10.9g (50mmol) 化合物 A 溶于 100mL N,N-二甲基甲酰胺溶液中, 加入纯度为



60% 的 NaH4. 00g (100mmol), 滴加 7. 50mL (100mmol) 氯甲基甲醚后于室温下反应 2h。后处理: 将反应物倾入 500mL 水中, 乙酸乙酯 (300mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩得黄色液体 8. 89g, 收率 67. 8%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1. 44 (s, 6H), 2. 57 (s, 3H), 3. 52 (s, 3H), 5. 01 (s, 2H), 5. 67 (d, 1H, J=10. 0Hz), 6. 61 (d, 1H, J=8. 8Hz), 6. 66 (d, 1H, J=10. 0Hz), 7. 51 (d, 1H, J=8. 4Hz)。MS (ES), m/z: 261. 3 (ES<sup>-</sup>)。

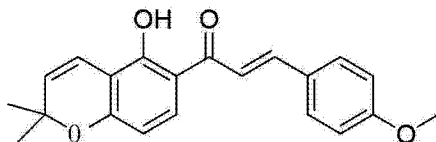
[0052]



[0053] 实施例 33', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-4-甲氧基查尔酮 (I-1)

[0054] 于 25mL 茄形瓶中加入 262. 3mg (1mmol) 化合物 B, 136. 1mg (1mmol) 对甲氧基苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65° C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=50 :1) 得橙色固体 262. 3mg, 收率 78%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1. 47 (s, 6H), 3. 86 (s, 3H), 5. 58 (d, 1H, J=10. 0Hz), 6. 37 (d, 1H, J=8, 8Hz), 6. 74 (d, 1H, J=10. 0Hz), 6. 93 (d, 2H, J=8. 4Hz), 7. 43 (d, 1H, J=15. 6Hz), 7. 60 (d, 2H, J=8. 8Hz), 7. 71 (d, 1H, J=8. 8Hz), 7. 84 (d, 1H, J=15. 2Hz), 13. 80 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 335 (ES<sup>-</sup>)。

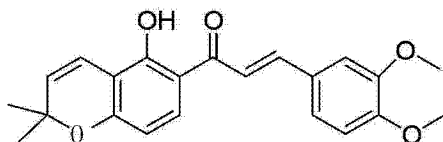
[0055]



[0056] 实施例 43', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-3,4-二甲氧基查尔酮 (I-2)

[0057] 于 25mL 茄形瓶中加入 262. 3mg (1mmol) 化合物 B, 166. 2mg (1mmol) 对 3,4-二甲氧基苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=15 :1) 得橙色固体 302. 3mg, 收率 83%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1. 47 (s, 6H), 3. 94 (s, 3H), 3. 97 (s, 3H), 5. 57 (d, 1H, J=10. 0Hz), 6. 38 (d, 1H, J=8, 8Hz), 6. 75 (d, 1H, J=10. 0Hz), 6. 90 (d, 1H, J=8. 4Hz), 7. 16 (d, 1H, J=2. 0Hz), 7. 24 (d, 1H, J=2. 0Hz), 7. 41 (d, 1H, J=15. 2Hz), 7. 72 (d, 1H, J=8. 8Hz), 7. 82 (d, 1H, J=15. 2Hz), 13. 79 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 365 (ES<sup>-</sup>)。

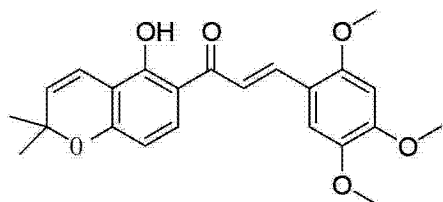
[0058]



[0059] 实施例 53', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-2,4,5-三甲氧基查尔酮 (I-3)

[0060] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg (1mmol) 化合物 B, 196.2mg (1mmol) 对 2,4,5-二甲氧基苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 15 : 1) 得浅黄色固体 321.6mg, 收率 81%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.47 (s, 6H), 3.92 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 5.58 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.36 (d, 1H, J=8.8Hz), 6.53 (s, 1H), 6.75 (d, 1H, J=10.0Hz), 7.11 (s, 1H), 7.50 (d, 1H, J=15.2Hz), 7.71 (d, 1H, J=8.8Hz), 8.15 (d, 1H, J=15.2Hz), 13.94 (s, 1H). MS (ES), m/z : 395 (ES<sup>-</sup>).

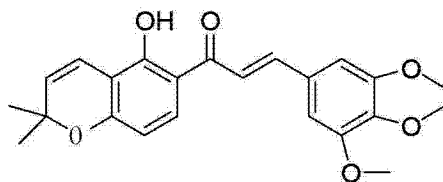
[0061]



[0062] 实施例 63', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-3,4,5-三甲氧基查尔酮 (I-4)

[0063] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg (1mmol) 化合物 B, 196.2mg (1mmol) 对 3,4,5-二甲氧基苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 15 : 1) 得橙色固体 309.2mg, 收率 78%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.47 (s, 6H), 3.90 (s, 3H), 3.93 (s, 6H), 5.59 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.38 (d, 1H, J=8.8Hz), 6.75 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.87 (s, 1H), 7.42 (d, 1H, J=15.2Hz), 7.72 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.78 (d, 1H, J=15.6Hz), 13.71 (s, 1H). MS (ES), m/z : 395 (ES<sup>-</sup>).

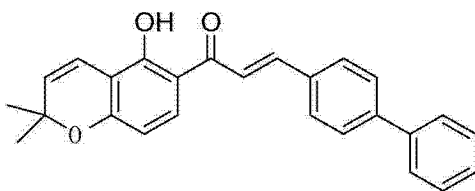
[0064]



[0065] 实施例 73', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-4-苯基查尔酮 (I-5)

[0066] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg(1mmol) 化合物 B, 196.2mg(1mmol) 对 4- 苯基苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65° C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 =50 :1) 得橙色固体 309.8mg, 收率 81%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.47 (s, 6H), 5.60 (d, 1H, J=10.0 Hz), 6.39 (d, 1H, J=8.8Hz), 6.76 (d, 1H, J=10.0Hz), 7.39 (d, 1H, J=7.6Hz), 7.46-7.49 (2H, m), 7.59 - 7.68 (5H, m), 7.72-7.77 (3H, m), 7.90 (d, 1H, J=15.2Hz), 13.72 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 381 (ES-).

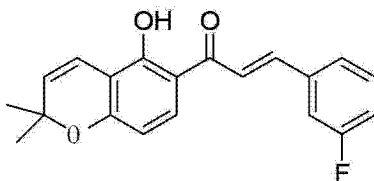
[0067]



[0068] 实施例 83', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-3-氟查尔酮 (I-6)

[0069] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg(1mmol) 化合物 B, 124.1mg(1mmol) 对 3- 氟苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65° C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 =15 :1) 得黄色固体 240.4mg, 收率 74%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.47 (s, 6H), 5.60 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.39 (d, 1H, J=8.8Hz), 6.76 (d, 1H, J=10.0Hz), 7.10-7.14 (1H, m), 7.33-7.41 (3H, m), 7.53 (d, 1H, J=15.6Hz), 7.70 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.80 (d, 1H, J=15.2Hz), 13.58 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 323 (ES-)

[0070]

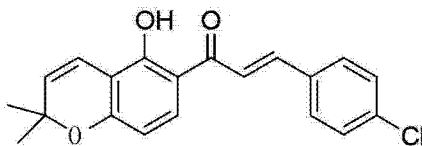


[0071] 实施例 93', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-4-氯查尔酮 (I-7)

[0072] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg(1mmol) 化合物 B, 140.6mg(1mmol) 对 4- 氯苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65° C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 =50 :1) 得橙色固体 279.6mg, 收率 82%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.47 (s, 6H), 5.59 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.38 (d, 1H, J=8.8Hz), 6

. 74(d, 1H, J=10.0Hz), 7.39(d, 1H, J=8.4Hz), 7.52(d, 1H, J=15.2Hz), 7.57(d, 2H, J=8.8Hz), 7.70(d, 1H, J=8.8Hz), 7.80(d, 1H, J=15.6Hz), 13.68(s, 1H). MS(ES), m/z: 339(ES<sup>-</sup>).

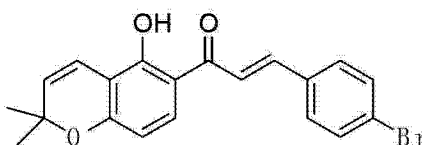
[0073]



[0074] 实施例 103', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-4-溴查尔酮(I-8)

[0075] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg(1mmol) 化合物 B, 185.0mg(1mmol) 对 4-溴苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=30:1) 得橙色固体 304.3mg, 收率 79%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47(s, 6H), 5.59(d, 1H, J=10.0Hz), 6.38(d, 1H, J=8.8Hz), 6.74(d, 1H, J=10.0Hz), 7.49-7.57(5H, m), 7.69(d, 1H, J=8.8Hz), 7.78(d, 1H, J=15.2Hz), 13.60(s, 1H). MS(ES), m/z: 383(ES<sup>-</sup>).

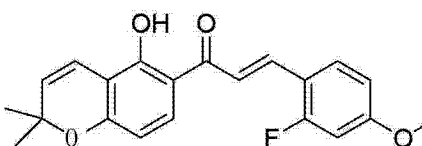
[0076]



[0077] 实施例 113', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-2-氟-4-甲氧基查尔酮(I-9)

[0078] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg(1mmol) 化合物 B, 154.1mg(1mmol) 对 2-氟-4-甲氧基苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=40:1) 得橙色固体 283.5mg, 收率 80%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47(s, 6H), 3.85(s, 3H), 5.58(d, 1H, J=10.0Hz), 6.37(d, 1H, J=8.8Hz), 6.66(dd, 1H, J=12.4Hz, 2.4Hz), 6.74(d, 2H, J=9.6Hz), 7.53(d, 1H, J=8.4Hz), 7.58(d, 1H, J=5.2Hz), 7.69(d, 1H, J=9.2Hz), 7.89(d, 1H, J=15.6Hz), 13.75(s, 1H). MS(ES), m/z: 353(ES<sup>-</sup>).

[0079]

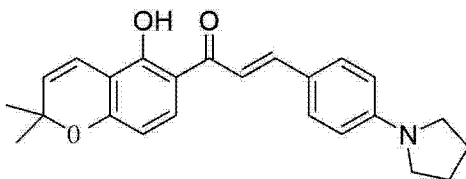


[0080] 实施例 123', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-4-吡咯查尔酮(I-10)

[0081] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg(1mmol) 化合物 B, 175.2mg(1mmol) 对 4-吡咯苯甲

醛,以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理:将反应物倾入 100mL 水中,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥。过滤,浓缩,于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇,20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65℃ 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩,柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=20:1) 得橙色固体 292.9mg, 收率 78%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.47 (s, 6H), 2.04 (q, 4H, J=6.0Hz), 3.35 (d, 4H, J=6.0Hz), 5.57 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.35 (d, 1H, J=8.8Hz), 6.55 (d, 2H, J=8.0Hz), 6.75 (d, 1H, J=10.0Hz), 7.32 (d, 1H, J=15.2Hz), 7.53 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.72 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.85 (d, 1H, J=15.2Hz), 14.10 (s, 1H). MS (ES), m/z: 374 (ES<sup>-</sup>).

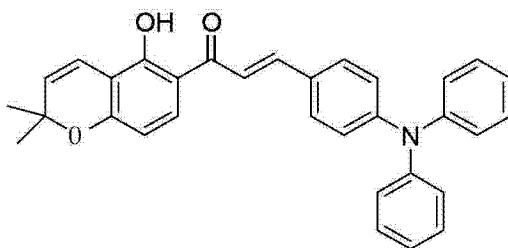
[0082]



[0083] 实施例 133', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-4-二苯胺查尔酮 (I-11)

[0084] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg (1mmol) 化合物 B, 273.3mg (1mmol) 4-二苯胺基苯甲醛,以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理:将反应物倾入 100mL 水中,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥。过滤,浓缩,于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇,20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65℃ 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩,柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=50:1) 得橙色固体 359.9mg, 收率 76%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.47 (s, 6H), 2.54 (s, 1H), 5.58 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.36 (d, 1H, J=9.2Hz), 6.74 (d, 1H, J=10.0Hz), 7.01 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.09 - 7.16 (5H, m), 7.29 - 7.33 (4H, m), 7.40 (d, 1H, J=15.2Hz), 7.48 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.69 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.81 (d, 1H, J=15.6Hz), 13.76 (s, 1H). MS (ES), m/z: 474 (ES<sup>+</sup>).

[0085]

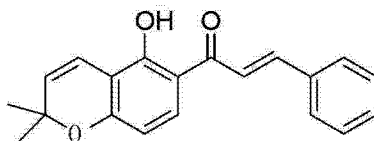


[0086] 实施例 143', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基查尔酮 (I-12)

[0087] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg (1mmol) 化合物 B, 106.1mg (1mmol) 苯甲醛,以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理:将反应物倾入 100mL 水中,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥。过滤,浓缩,于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇,20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65℃ 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩,柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=60:1) 得橙色固体 245.1mg, 收率 80%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.47 (s, 6H), 5.59 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.38 (d, 1H, J=9.2Hz), 6.75 (d,

1H, J=10.0Hz), 7.42-7.43(3H, m), 7.55(d, 1H, J=15.6Hz), 7.64-7.66(2H, m), 7.12(d, 1H, J=8.8Hz), 7.86(d, 1H, J=15.6Hz), 13.68(s, 1H). MS(ES), m/z:305(ES<sup>-</sup>).

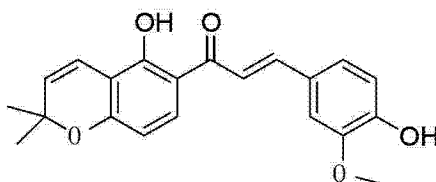
[0088]



[0089] 实施例 153', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2',4-二羟基-3-甲氧基查尔酮(I-13)

[0090] 于 25mL 茄形瓶中加入 218.3mg(1mmol) 化合物 A, 196.2mg(1mmol) 羟基经氯甲基甲醚保护后的 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛, 200mg(0.6mmol) 相转移催化剂四丁基溴化铵, 20% 氢氧化钠水溶液 6mL。将装有空气冷凝管的上述茄形瓶置于 MCL-III 型微波合成仪中, 于脉冲电流下反应 5min。后处理: 生成物以 150mL 乙酸乙酯溶解后, 有机相用稀盐酸水溶液洗至中性, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 B 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=6:1) 得黄色固体 126.9mg, 收率 36%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47(s, 6H), 3.98(s, 3H), 5.59(d, 1H, J=10.0Hz), 5.92(s, 1H), 6.37(d, 1H, J=8.8Hz), 6.75(d, 1H, J=10.0Hz), 6.95(d, 1H, J=8.4Hz), 7.12(d, 1H, J=1.6Hz), 7.22(dd, 1H, J=8.0, 1.6Hz), 7.39(d, 1H, J=15.6Hz), 7.71(d, 1H, J=8.8Hz), 7.80(d, 1H, J=15.2Hz), 13.79(s, 1H). MS(ES), m/z:353(ES<sup>+</sup>).

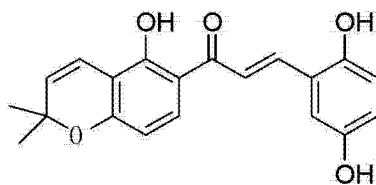
[0091]



[0092] 实施例 163', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2',2,5-三羟基查尔酮(I-14)

[0093] 于 25mL 茄形瓶中加入 218.3mg(1mmol) 化合物 A, 266.2mg(1mmol) 羟基经氯甲基甲醚保护后的 2,5-二羟基苯甲醛, 200mg(0.6mmol) 相转移催化剂四丁基溴化铵, 20% 氢氧化钠水溶液 6mL。将装有空气冷凝管的上述茄形瓶置于 MCL-III 型微波合成仪中, 于脉冲电流下反应 5min。后处理: 生成物以 150mL 乙酸乙酯溶解后, 有机相用稀盐酸水溶液洗至中性, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=30:1) 得黄色固体 111.7mg, 收率 33%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47(s, 6H), 5.76(d, 1H, J=10.0Hz), 6.42(d, 1H, J=9.2Hz), 6.63(d, 1H, J=10.0Hz), 6.77(s, 2H), 7.79(d, 1H, J=15.6Hz), 8.09-8.13(2H, m), 8.93(s, 1H), 9.67(s, 1H), 14.02(s, 1H). MS(ES), m/z:337(ES<sup>-</sup>).

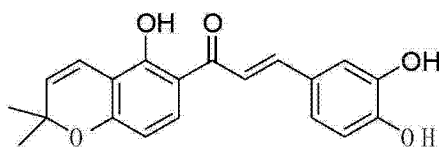
[0094]



[0095] 实施例 173', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2',3,4-三羟基查尔酮 (I-15)

[0096] 于 25mL 茄形瓶中加入 218.3mg(1mmol) 化合物 A, 266.2mg(1mmol) 羟基经氯甲基甲醚保护后的 3,4-二羟基苯甲醛, 200mg(0.6mmol) 相转移催化剂四丁基溴化铵, 20% 氢氧化钠水溶液 6mL。将装有空气冷凝管的上述茄形瓶置于 MCL-III 型微波合成仪中, 于脉冲电流下反应 5min。后处理: 生成物以 150mL 乙酸乙酯溶解后, 有机相用稀盐酸水溶液洗至中性, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 25:1) 得黄色固体 128.6mg, 收率 38%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47(s, 6H), 5.58(d, 1H, J=10.0Hz), 6.36(d, 1H, J=7.6Hz), 6.74(d, 1H, J=9.6Hz), 6.89(d, 1H, J=7.2Hz), 7.11(d, 1H, J=6.4Hz), 7.18(s, 1H), 7.37(d, 1H, J=14.8Hz), 7.69(d, 1H, J=8.0Hz), 7.73(d, 1H, J=7.2Hz), 13.78(s, 1H)。MS(ES), m/z: 337(ES<sup>-</sup>)。

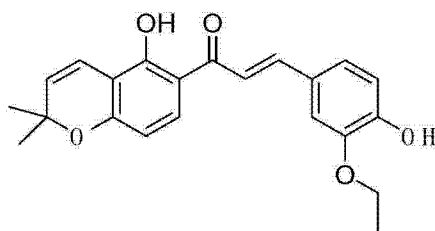
[0097]



[0098] 实施例 183', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2',4-二羟基-3-乙氧基查尔酮 (I-16)

[0099] 于 25mL 茄形瓶中加入 218.3mg(1mmol) 化合物 A, 210.2mg(1mmol) 羟基经氯甲基甲醚保护后的 4-羟基-3-乙氧基苯甲醛, 200mg(0.6mmol) 相转移催化剂四丁基溴化铵, 20% 氢氧化钠水溶液 6mL。将装有空气冷凝管的上述茄形瓶置于 MCL-III 型微波合成仪中, 于脉冲电流下反应 5min。后处理: 生成物以 150mL 乙酸乙酯溶解后, 有机相用稀盐酸水溶液洗至中性, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 25:1) 得黄色固体 124.6mg, 收率 34%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47(s, 6H), 4.17(q, 2H, J=6.8Hz), 5.59(d, 1H, J=10.0Hz), 6.00(s, 1H), 6.37(d, 2H, J=9.2Hz), 6.74(d, 1H, J=10.0Hz), 6.95(d, 1H, J=8.4Hz), 7.11(d, 1H, J=1.6Hz), 7.21(dd, 1H, J=8.0, 2.0Hz), 7.38(d, 1H, J=15.6Hz), 7.71(d, 1H, J=8.8Hz), 7.80(d, 1H, J=15.2Hz), 13.80(s, 1H)。MS(ES), m/z: 367(ES<sup>+</sup>)。

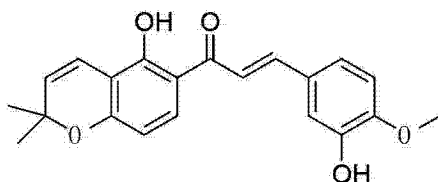
[0100]



[0101] 实施例 193', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2',3-二羟基-4-甲氧基查尔酮 (I-17)

[0102] 于 25mL 茄形瓶中加入 218.3mg(1mmol) 化合物 A, 196.2mg(1mmol) 羟基经氯甲基甲醚保护后的 3-羟基-4-甲氧基苯甲醛, 200mg(0.6mmol) 相转移催化剂四丁基溴化铵, 20% 氢氧化钠水溶液 6mL。将装有空气冷凝管的上述茄形瓶置于 MCL-III 型微波合成仪中, 于脉冲电流下反应 5min。后处理: 生成物以 150mL 乙酸乙酯溶解后, 有机相用稀盐酸水溶液洗至中性, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65℃ 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=9:1) 得黄色固体 125.8mg, 收率 37%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47(s, 6H), 3.95(s, 3H), 5.58(d, 1H, J=10.0Hz), 5.66(s, 1H), 6.37(d, 1H, J=8.8Hz), 6.74(d, 1H, J=10.0Hz), 6.87(d, 1H, J=8.4Hz), 7.13(dd, 1H, J=8.4, 1.6Hz), 7.28(d, 1H, J=1.2Hz), 7.41(d, 1H, J=15.2Hz), 7.70(d, 1H, J=8.8Hz), 7.78(d, 1H, J=15.6Hz), 13.80(s, 1H)。MS(ES), m/z: 351(ES<sup>-</sup>)。

[0103]

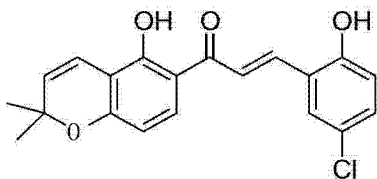


[0104] 实施例 203', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2',2-二羟基-5-氯查尔酮 (I-18)

[0105] 于 25mL 茄形瓶中加入 218.3mg(1mmol) 化合物 A, 220.6mg(1mmol) 羟基经氯甲基甲醚保护后的 5-氯-2-羟基苯甲醛, 200mg(0.6mmol) 相转移催化剂四丁基溴化铵, 20% 氢氧化钠水溶液 6mL。将装有空气冷凝管的上述茄形瓶置于 MCL-III 型微波合成仪中, 于脉冲电流下反应 5min。后处理: 生成物以 150mL 乙酸乙酯溶解后, 有机相用稀盐酸水溶液洗至中性, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65℃ 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=15:1) 得黄色固体 103.5mg, 收率 29%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO) δ: 1.22(s, 6H), 5.76(d, 1H, J=10.0Hz), 6.43(d, 1H, J=8.8Hz), 6.63(d, 1H, J=10.0Hz), 6.94(d, 1H, J=8.4Hz), 7.30(dd, 1H, J=8.4, 2.4Hz), 7.98(d, 1H, J=15.6Hz), 8.08(d, 1H, J=10.0Hz), 8.11(s, 1H), 8.21(d, 1H, J=9.2Hz), 13.93(s, 1H)。MS(ES), m/z: 355(ES<sup>-</sup>)。

[0106]

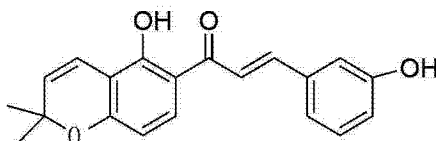




[0107] 实施例 213', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2',3-二羟基查尔酮 (I-19)

[0108] 于 25mL 茄形瓶中加入 218.3mg (1mmol) 化合物 A, 166.2mg (1mmol) 羟基经氯甲基甲醚保护后的 3-羟基苯甲醛, 200mg (0.6mmol) 相转移催化剂四丁基溴化铵, 20% 氢氧化钠水溶液 6mL。将装有空气冷凝管的上述茄形瓶置于 MCL-III 型微波合成仪中, 于脉冲电流下反应 5min。后处理: 生成物以 150mL 乙酸乙酯溶解后, 有机相用稀盐酸水溶液洗至中性, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 15:1) 得黄色固体 106.4mg, 收率 33%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47 (s, 6H), 5.76 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.38 (d, 1H, J=8.8Hz), 6.74 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.89 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.11 (s, 1H), 7.21 (d, 1H, J=7.6Hz), 7.27 (t, 1H, J=8.0Hz), 7.51 (d, 1H, J=15.6Hz), 7.70 (d, 1H, J=9.2Hz), 7.78 (d, 1H, J=15.6Hz), 13.65 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 321 (ES<sup>-</sup>)。

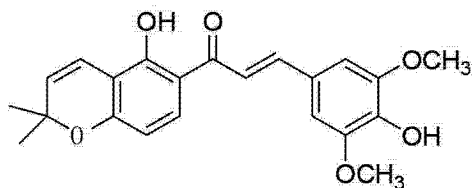
[0109]



[0110] 实施例 223', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2',4-二羟基-3,5-二甲氧基查尔酮 (I-20)

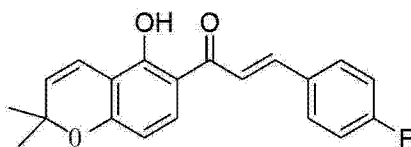
[0111] 于 25mL 茄形瓶中加入 218.3mg (1mmol) 化合物 A, 166.2mg (1mmol) 羟基经氯甲基甲醚保护后的 4-羟基-3,5-二甲氧基苯甲醛, 200mg (0.6mmol) 相转移催化剂四丁基溴化铵, 20% 氢氧化钠水溶液 6mL。将装有空气冷凝管的上述茄形瓶置于 MCL-III 型微波合成仪中, 于脉冲电流下反应 5min。后处理: 生成物以 150mL 乙酸乙酯溶解后, 有机相用稀盐酸水溶液洗至中性, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 15:1) 得黄色固体 137.7mg, 收率 36%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47 (s, 6H), 3.97 (s, 6H), 5.59 (d, 1H, J=10.0Hz), 5.86 (s, 1H), 6.38 (d, 1H, J=9.2Hz), 6.75 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.89 (s, 2H), 7.39 (d, 1H, J=15.2Hz), 7.72 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.79 (d, 1H, J=15.2Hz), 13.79 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 383 (ES<sup>+</sup>)。

[0112]



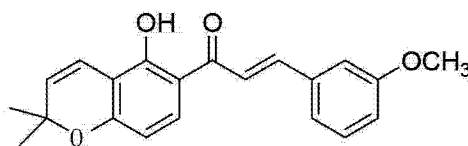
[0113] 实施例 233', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-4-氟查尔酮 (I-21)

[0114] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg (1mmol) 化合物 B, 124.1mg (1mmol) 对 4-氟苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=15:1) 得黄色固体 249.7mg, 收率 77%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47 (s, 6H), 5.59 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.38 (d, 1H, J=8.8Hz), 6.74 (d, 1H, J=10.0Hz), 7.10 (t, 2H, J=8.8Hz), 7.47 (d, 1H, J=15.6Hz), 7.62-7.65 (2H, m), 7.70 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.82 (d, 1H, J=15.6Hz), 13.65 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 323 (ES<sup>-</sup>)。[0115]



[0116] 实施例 243', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-3-甲氧基查尔酮 (I-22)

[0117] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg (1mmol) 化合物 B, 136.1mg (1mmol) 对 3-甲氧基苯甲醛, 以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理: 将反应物倾入 100mL 水中, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩, 于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇, 20% 的稀盐酸溶液 2mL, 65°C 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗, 乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=15:1) 得黄色固体 272.5mg, 收率 81%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.47 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 5.59 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.38 (d, 1H, J=9.2Hz), 6.74 (d, 1H, J=10.0Hz), 6.95 (dd, 1H, J=8.4, 2.4Hz), 7.15 (s, 1H), 7.23 (d, 1H, J=9.2Hz), 7.32 (t, 1H, J=8.0Hz), 7.52 (d, 1H, J=15.6Hz), 7.71 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.82 (d, 1H, J=15.6Hz), 13.65 (s, 1H)。MS (ES), m/z: 335 (ES<sup>-</sup>)。[0118]

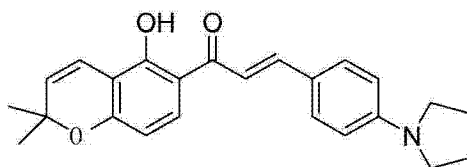


[0119] 实施例 253', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-4-二乙胺基查尔酮 (I-23)

[0120] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg (1mmol) 化合物 B, 177.2mg (1mmol) 对 4-二乙胺基

苯甲醛,以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理:将反应物倾入 100mL 水中,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥。过滤,浓缩,于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇,20% 的稀盐酸溶液 2mL,65℃ 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩,柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=15:1) 得黄色固体 286.9mg,收率 76%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.23(6H, m), 1.47(s, 6H), 3.40(q, 4H, J=7.2Hz), 5.57(d, 1H, J=10.0Hz), 6.35(d, 1H, J=9.2Hz), 6.65(d, 2H, J=8.8Hz), 6.75(d, 1H, J=10.0Hz), 7.31(d, 1H, J=15.6Hz), 7.52(d, 1H, J=8.8Hz), 7.71(d, 1H, J=9.2Hz), 7.83(d, 1H, J=15.2Hz), 14.10(s, 1H). MS(ES), m/z: 378(ES+).

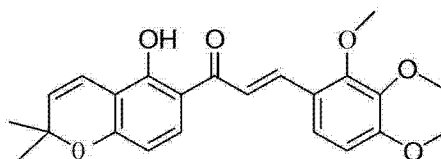
[0121]



[0122] 实施例 263', 4'-(2,2-二甲基吡喃)-2'-羟基-2,3,4-三甲氧基查尔酮 (I-24)

[0123] 于 25mL 茄形瓶中加入 262.3mg (1mmol) 化合物 B, 196.2mg (1mmol) 对 2,3,4-三甲氧基苯甲醛,以 15mL 甲醇溶解。滴加浓度为 50% 氢氧化钾水溶液 4mL, N<sub>2</sub> 保护下室温反应 24h。后处理:将反应物倾入 100mL 水中,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥。过滤,浓缩,于浓缩后含有中间体 C 的物质中加入 3mL 甲醇,20% 的稀盐酸溶液 2mL,65℃ 下回流 1h。该反应物以 30mL 水洗,乙酸乙酯 (20mL×3) 萃取,饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩,柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=15:1) 得黄色固体 305.2mg,收率 77%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.44(s, 6H), 3.90(d, 6H, J=9.2Hz), 3.97(s, 3H), 5.58(d, 1H, J=10.0Hz), 6.37(d, 1H, J=8.8Hz), 6.72(d, 1H, J=8.8Hz), 6.75(d, 1H, J=10.0Hz), 7.37(d, 1H, J=8.8Hz), 7.60(d, 1H, J=15.2Hz), 7.70(d, 1H, J=9.2Hz), 8.03(d, 1H, J=15.6Hz), 13.84(s, 1H). MS(ES), m/z: 397(ES+).

[0124]



[0125] 实施例 27 化合物 I 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放的 NO 的抑制作用

[0126] 1、方法:细胞按  $5 \times 10^3$ /孔接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ l,贴壁 4h 后,加入 10  $\mu$ M 浓度的化合物 I-1 至 I-24 (正常对照孔或模型对照孔加入等体积的培养基) 孵育 2h,再加入 LPS 使终浓度为 1  $\mu$ g/mL 孵育 22h,正常组加入生理盐水。Griess 法测定上清中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的含量,用以反应 NO 水平。吲哚美辛作为阳性对照。

[0127] 2、结论

[0128] 表 1 是化合物 I (10  $\mu$ M) 对 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 细胞释放的 NO 的抑制率。结果表明化合物 I-2、I-4、I-6、I-8 对 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 细胞释放的 NO 的有很好

的抑制作用。

[0129] 表 1

[0130]

样品编号	一氧化氮抑制率 (%) ±SD	样品编号	一氧化氮抑制率 (%) ±SD
吲哚美辛	59.2+2.1		
I-1	26.6+13.6	I-13	52.8+5.8
I-2	78.4+4.6	I-14	72.5+6.7
I-3	40.5+11.3	I-15	69.5+4.8
I-4	80.2+5.9	I-16	70.2+5.3
I-5	41.6+12.5	I-17	63.7+6.3
I-6	71.9+8.4	I-18	61.2+5.4
I-7	66.2+6.1	I-19	46.4+5.9
I-8	81.4+8.0	I-20	51.2+7.1
I-9	51.3+5.4	I-21	61.5+2.4
I-10	62.8+5.1	I-22	66.5+5.6
I-11	36.2+1.9	I-23	56.7+7.7
I-12	62.9+5.1	I-24	63.7+3.5

[0131] 实施例 28 化合物 I-2、I-4、I-6、I-8 对 iNOS 活性影响

[0132] 1、方法 :RAW264.7 细胞培养在 25cm<sup>2</sup> 细胞瓶中,待长至 50% 左右时,更换含 5 μg/L LPS 的培养基培养 24h,用 D-Hanks 漂洗 3 次,刮取细胞、离心、重悬。将细胞 5×10<sup>3</sup>/孔接种于 96 孔板中,贴壁 4h 后,给药组加入不同浓度的 I-2、I-4、I-6、I-8 药液,空白对照组加入等体积培养基,孵育 8h 后直接取该 96 孔板用荧光酶标仪检测。

[0133] 2、结论

[0134] 表 2 是化合物 I-2、I-4、I-6、I-8 对一氧化氮合酶活性影响。结果表明四个化合物对一氧化氮合酶的活性的抑制作用均好于阳性对照物吲哚美辛。

[0135] 表 2

[0136]

化合物	吲哚美辛	I-2	I-4	I-6	I-8
iNOS/IC <sub>50</sub> (μM)	20.0	7.9	6.2	5.4	17.8

[0137] 实施例 29 化合物 I-2、I-4、I-6、I-8 对卡拉胶诱导的小鼠足肿胀的抑制作用

[0138] 1、方法：雄性 ICR 小鼠（体重 18-22g），于温度 22℃，相对湿度 55.5% 的树脂笼子中以 12h 制昼夜交替饲养 2 周，并任意给以食物和水。实验组和对照组小鼠均给以 0.5% 羧甲基纤维素钠和蒸馏水的混合溶液。吲哚美辛（10mg/kg）溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液中作为阳性对照。

[0139] 实验组小鼠分别于腹腔注射 I-2、I-4、I-6、I-8（10mg/kg），对照组小鼠注射吲哚美辛。30min 后，实验组和对照组均于小鼠皮下注射 1% 的卡拉胶致炎。致炎后 1h 以千分尺测量致炎足爪的厚度，然后每隔 1h 测量一次，共测量 5 次。最后，以致炎前后足足厚度的差值计算肿胀度，并计算各组用药对肿胀的抑制率。

[0140] 2、结论

[0141] 图 1 是化合物 I-2、I-4、I-6、I-8 对角叉莱胶诱导的爪肿胀的影响图。结果表明给药 4h 后，足肿胀达到最大值时，以 I-2（10mg/kg）为治疗药物的实验组足肿胀程度最小，说明该化合物能很好抑制足肿胀。

[0142] 实施例 30 化合物 I-2 对佐剂性关节炎的治疗作用

[0143] 1、方法：将 12 周雌性 Lewis 大鼠随机分为 6 组，于大鼠尾巴基部皮内注射完全弗氏佐剂（CFA），每天测量关节的肿胀度，每三天测量一次体重。于佐剂免疫 14 天后，大鼠随机分为 4 组，其中，一组继续注射甲基纤维素溶液，一组注射 10mg/kg 吲哚美辛，另外两组分别按照 10mg/kg 和 25mg/kg 给药。正常对照组小鼠每天注射甲基纤维素溶液，为期 21 天。

[0144] 小鼠断颈处死后，取其肢腕关节及后肢踝关节，经 10% 中性福尔马林固定，5% 硝酸溶液脱钙后，石蜡包埋，切片，H&E 染色。

[0145] 2、结论

[0146] 图 2 为化合物 I-2 不同浓度（10mg/kg 和 25mg/kg）对佐剂性关节炎的治疗作用。图 2A 为关节炎评分图；图 2B 为给药期间小鼠体重波动图。结果表明，化合物 I-2 对关节炎的治疗作用与药物浓度有关，25mg/kg 较 10mg/kg 治疗效果好。当其浓度为 25mg/kg 时，小鼠关节炎评分较小，与治疗组相当；经治疗后小鼠体重增长最多。

[0147] 图 3 为 HE 染色病理切片观察图。3A 为模型组；3B 和 3C 为给药组，化合物 I-2 浓度分别为 10mg/kg 和 25mg/kg；3D 为阳性对照组；3E 为正常组。与正常组对照，两个浓度的化合物 I-2 均有清除炎症细胞的作用，并且在给药组中，浓度为 25mg/kg 的实验组效果最好。

[0148] 实施例 31 化合物 I 对炎症因子 IL-4 的抑制作用

[0149] 1、方法：取转 IL-4-GFP 基因报告小鼠脾脏细胞，加到 PBS 溶液中，冰浴。培养皿中研碎脾脏，加入 PBS 离心。去上清，加 2-3mL 红细胞裂解液，吹打，静置。加 10ml 预先配置好的 FBS 的 1640 培养液，过滤，离心。去上清，加配好的培养液混匀得到悬液。在总样体积中加入稀释后细胞因子 IL-2、IL-4 和抗体 ConA。将细胞  $4 \times 10^6$ /孔接种于 96 孔板中，同时加入预先用 FBS 稀释的化合物 I，于 37℃，CO<sub>2</sub> 浓度 5% 的环境中培养 48h。

[0150] 48h 后，收集所培养的细胞进行 CD-4 染色，然后进行流式细胞仪检测。

[0151] 2、图 4 为流式细胞仪分析化合物 I（10 μM）对炎症因子 IL-4 的抑制率。结果表明化合物 I 对炎症因子 IL-4 均有较强抑制作用，其中以化合物 I-14、I-15 抑制效果最好，说明该类化合物在由炎症因子 IL-4 引起的疾病方面具有重要治疗作用。

[0152] IL-4-GFP 抑制率(%)=100×(加化合物后 IL-4-GFP 比率-负对照 IL-4-GFP 比率)

/ 负对照 IL-4-GFP 比率

[0153] 实施例 32 化合物 I 对炎症因子 TNF- $\alpha$  的抑制作用

[0154] 1、方法：取转 TNF- $\alpha$ -GFP 基因报告小鼠加到 PBS 溶液中，冰浴。培养皿中研碎脾脏，加入 PBS 离心。去上清，加红细胞裂解液，吹打，静置。加预先配置的 FBS 的 1640 培养液，过滤，离心。去上清，加配好的培养液混匀得到悬液。在总样体积中加入稀释后细胞因子 TNF- $\alpha$  和抗体 ConA。将细胞  $4 \times 10^6$ /孔接种于 96 孔板中，同时加入预先用 FBS 稀释的化合物 I，于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，CO<sub>2</sub> 浓度 5% 的环境中培养 48h。

[0155] 48h 后，收集所培养的细胞进行 CD-4 染色，然后进行流式细胞仪检测。

[0156] 2、结论

[0157] 图 5 流式细胞仪分析化合物 I (10  $\mu\text{M}$ ) 对肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  的抑制率。结果化合物 I 大部分对 TNF- $\alpha$  有较强抑制作用。

[0158] TNF- $\alpha$  抑制率(%) =  $100 \times (\text{加化合物后 TNF-}\alpha \text{ 比率} - \text{负对照 TNF-}\alpha \text{ 比率}) / \text{负对照 TNF-}\alpha \text{ 比率}$

[0159] 实施例 33 化合物 I 对炎症因子 TNF- $\alpha$  的抑制作用

[0160] 1、方法：按照人肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒说明书上操作，最后在酶标仪上测定吸光度并分析数据。

[0161] 图 6 ELISA 分析化合物 I (10  $\mu\text{M}$ ) 对肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  的抑制率。结果表明化合物 I 大部分对 TNF- $\alpha$  有较强抑制作用。

[0162] TNF- $\alpha$  抑制率(%) =  $100 \times (\text{加化合物后 TNF-}\alpha \text{ 比率} - \text{负对照 TNF-}\alpha \text{ 比率}) / \text{负对照 TNF-}\alpha \text{ 比率}$ 。

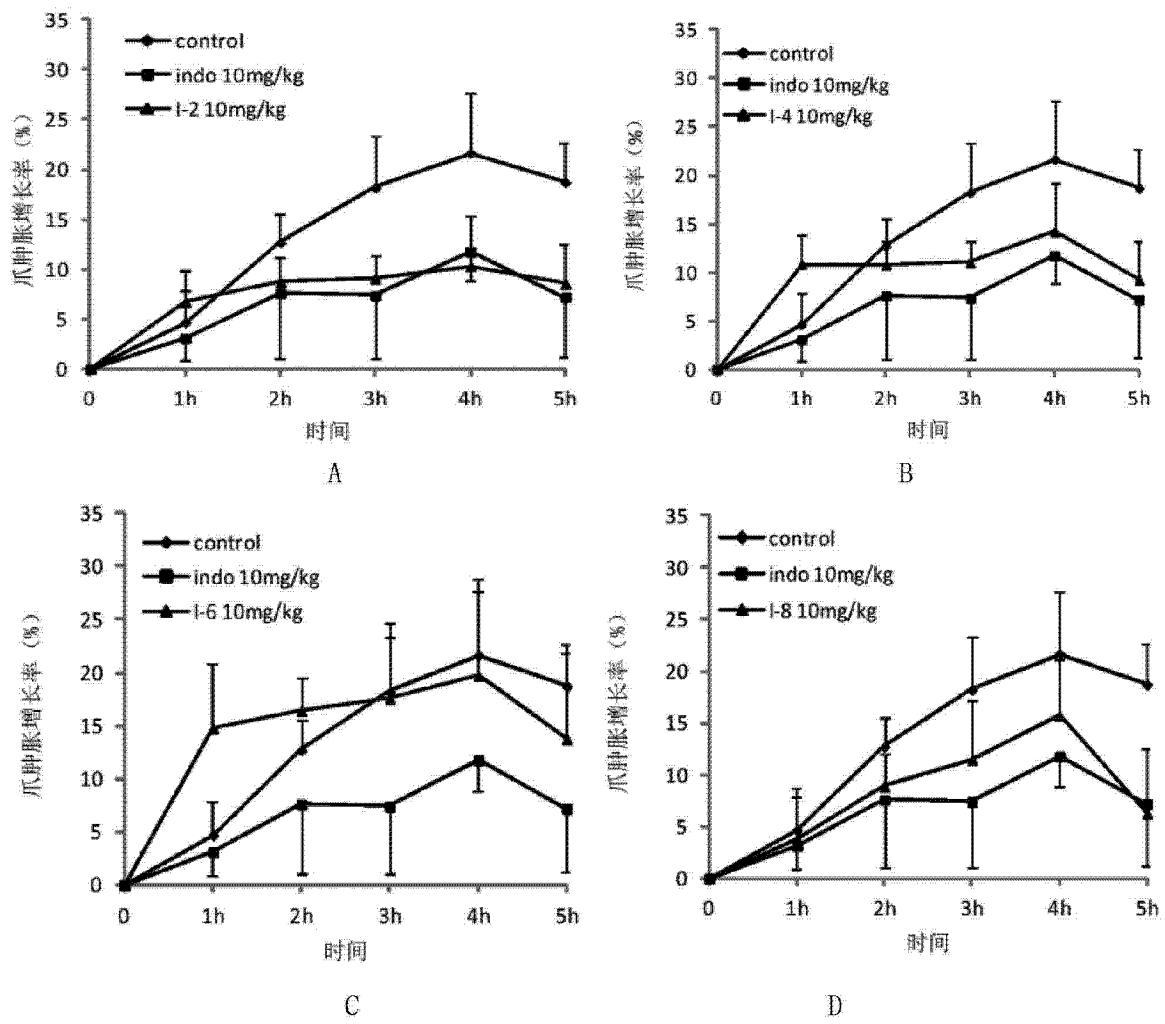


图 1

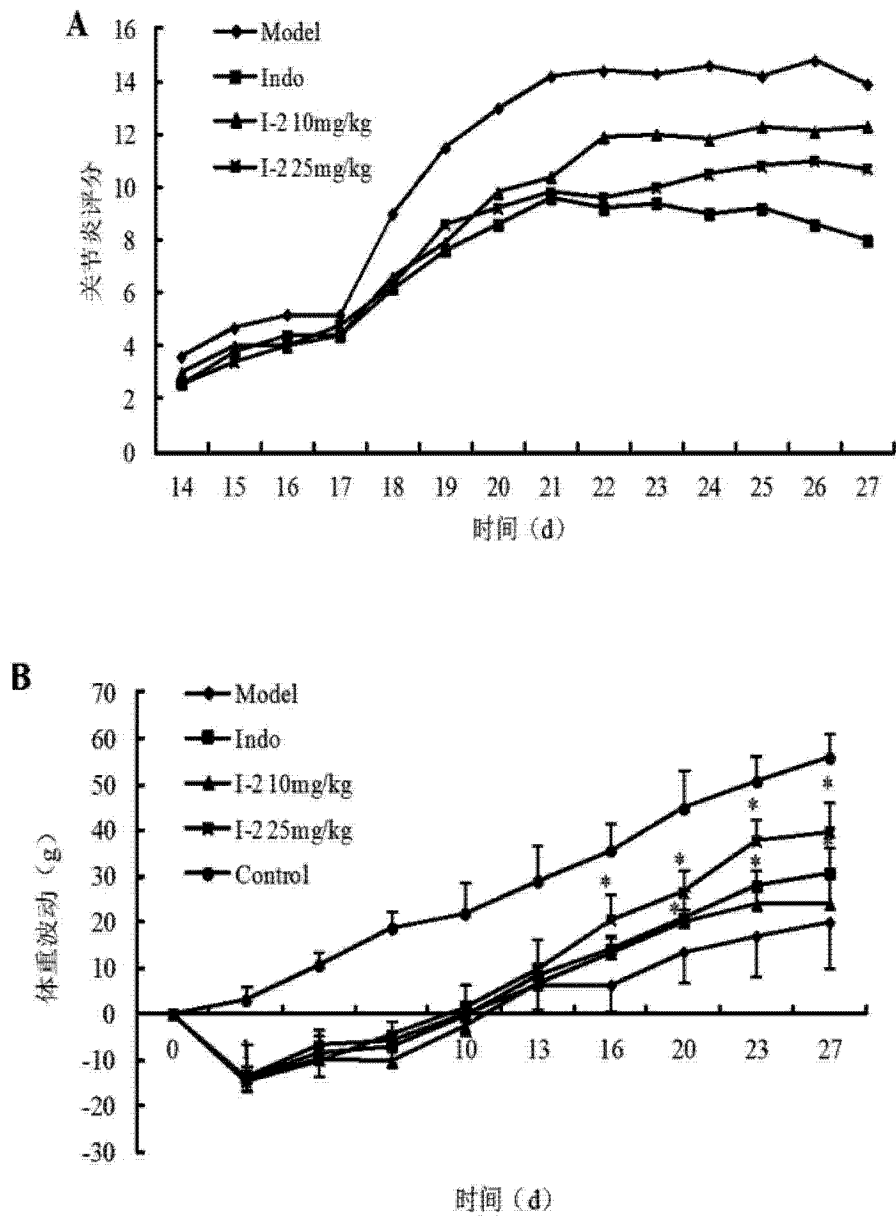


图 2



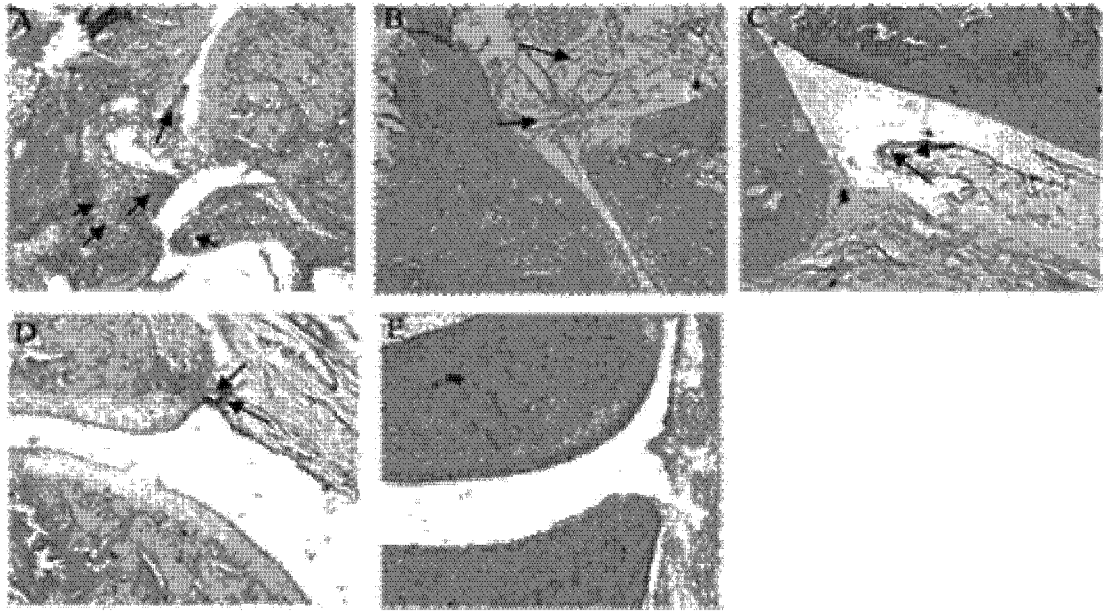


图 3

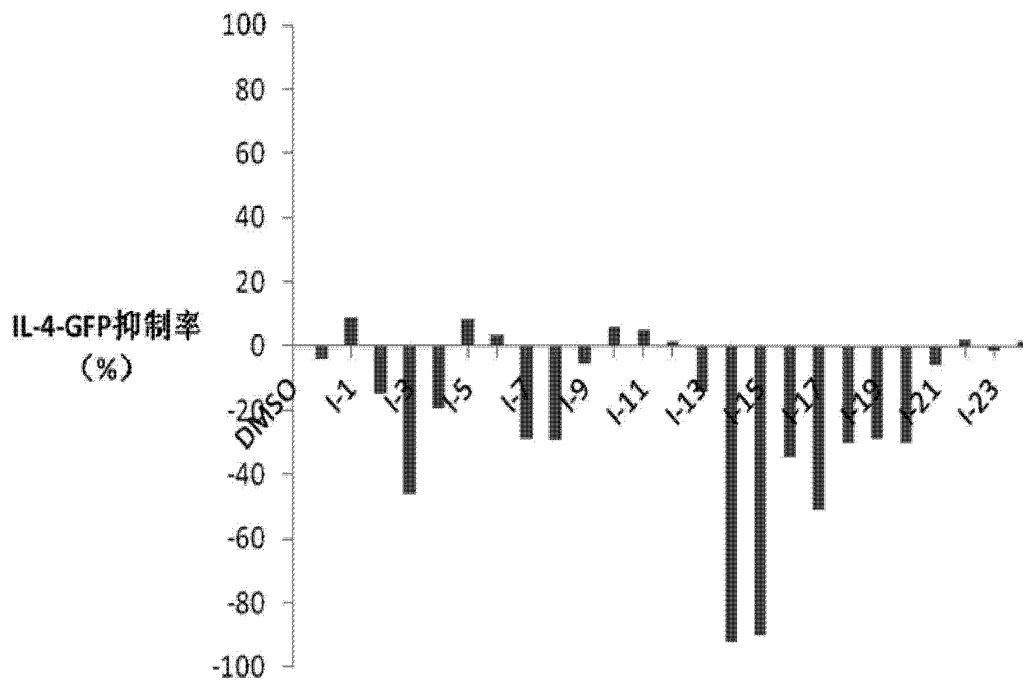


图 4

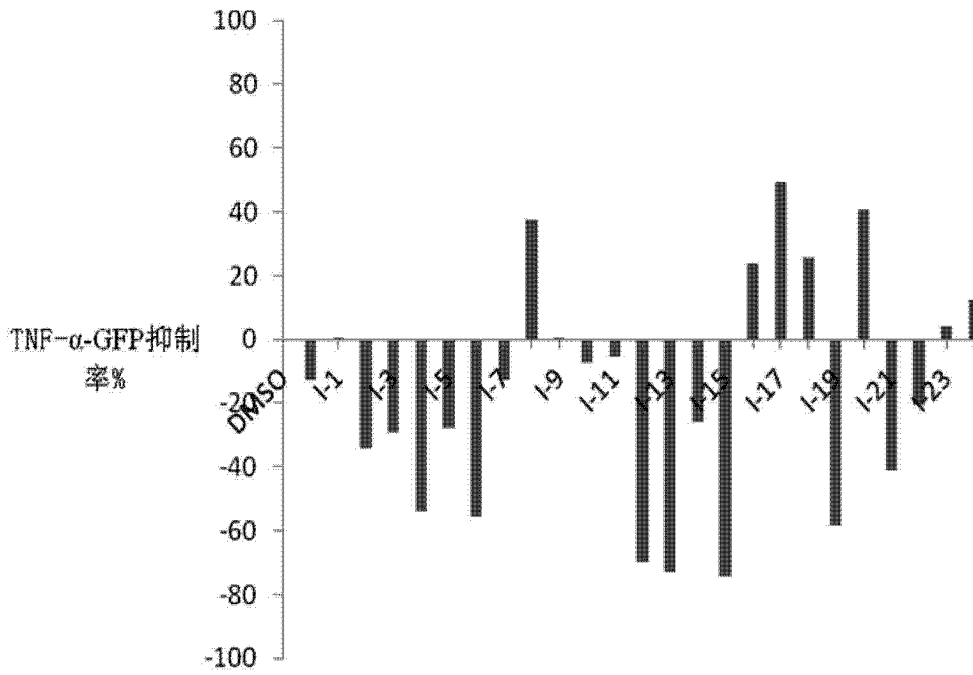


图 5

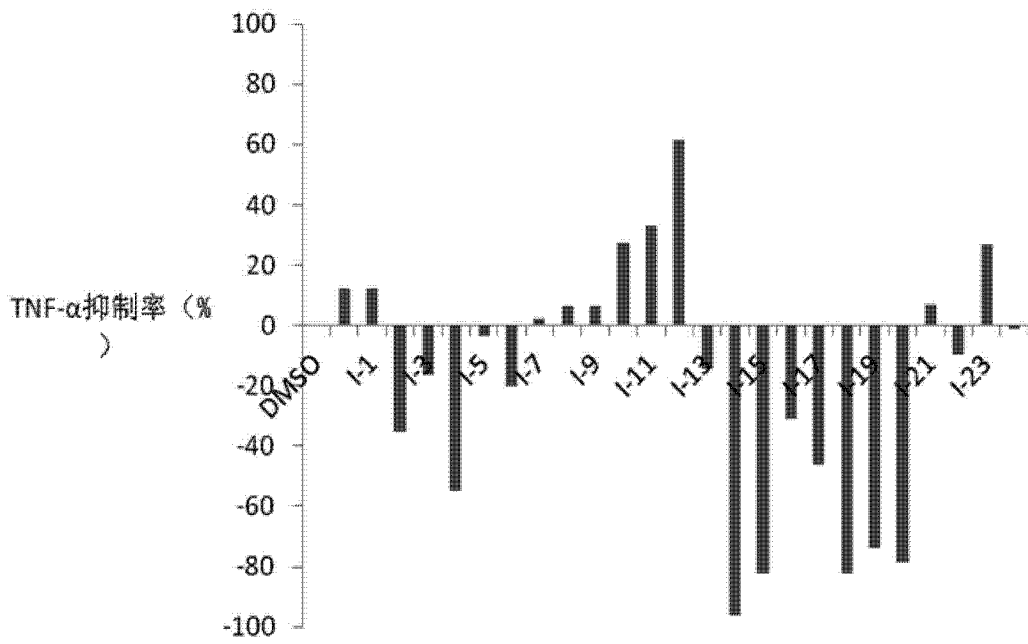


图 6