

芒柄花素磺化物的合成、溶解性能及降脂保肝活性

王秋亚^{1,2}, 孟庆华^{1#}, 张尊听^{1*}, 田振军³, 刘辉³

(1. 陕西师范大学药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062;
2. 渭南师范学院化学化工系, 渭南 714000; 3. 陕西师范大学体育学院, 陕西 西安 710062)

摘要:以芒柄花素为先导化合物, 利用磺化反应合成了具有降脂保肝活性的水溶性新化合物芒柄花素-3'-磺酸钠, 通过 IR、NMR、元素分析对其结构进行了表征。采用紫外分光光度法测定了芒柄花素-3'-磺酸钠的溶解度和正辛醇/水分配系数; 采用高脂饮食诱导大鼠高脂模型, 进行了降脂保肝的药理活性试验。实验结果表明芒柄花素-3'-磺酸钠不仅具有良好的水溶性, 而且具有好的降脂保肝活性。

关键词: 芒柄花素; 芒柄花素-3'-磺酸钠; 降脂; 保肝

中图分类号: R916.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 04-0386-04

Synthesis, solubility, lipids-lowering and liver-protection activities of sulfonated formononetin

WANG Qiu-ya^{1,2}, MENG Qing-hua¹, ZHANG Zun-ting^{1*}, TIAN Zhen-jun³, LIU Hui³

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Weinan Teachers College, Weinan 714000, China; 3. Sport Institute, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: A water-soluble compound, sodium formononetin-3'-sulfonate with good lipid-lowering and liver-protection activities was synthesized. It was synthesized by sulfonation reaction, and its structure was characterized by IR, NMR and elemental analyses. The solubility of sodium formononetin-3'-sulfonate in water and *n*-octanol/water partition coefficient were determined by UV spectrophotometry. The lipid-lowering and liver-protection activities of sodium formononetin-3'-sulfonate were tested by using rat's high fat model induce by feeding with high fat food. The results showed that sodium formononetin-3'-sulfonate not only had favorable water solubility but also had good lipid-lowering and liver-protection activities.

Key words: formononetin; sodium formononetin-3'-sulfonate; lipid-lowering; liver-protecting

异黄酮化合物芒柄花素 (formononetin, 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮), 广泛分布于甘草、葛根、降香檀、紫穗槐、红三轴草等豆科植物中^[1-4], 具有抗肿瘤、抗菌、解痉挛、降血脂、抗心律不齐、改善雌激素水平^[5, 6]、抗脂质过氧化和抑制螺旋杆菌等药理活性^[7, 8], 临床还被用作利尿剂。但由于异黄酮分子结

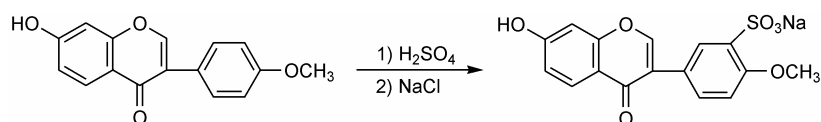
构的限制, 溶解性差, 导致在体内吸收和代谢方面存在多种问题, 如生物利用度不高、服用量大、体内吸收缓慢、7~15天才能见效^[9, 10]、无法制成注射剂。为了开发新型水溶性异黄酮类药物, 作者曾利用磺化反应合成了大豆苷元-3'-磺酸钠^[11]、单甲氧基大豆苷元-3'-磺酸钠^[12]、双甲氧基大豆苷元-3'-磺酸钠^[13]及尼泊尔鸢尾苷元-3'-磺酸钠^[14], 并对其药理活性进行了研究。本文以芒柄花素为先导化合物, 利用磺化反应合成了水溶性化合物芒柄花素-3'-磺酸钠 (合成路线图 1), 通过IR、NMR、元素分析对其结构进行了表征, 此外测定了芒柄花素-3'-磺酸钠的溶解度和

收稿日期: 2008-11-18.

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (107138); 渭南师范学院 2008 科研资助项目 (08YKZ006).

*通讯作者 Tel: 86-29-85303940, Fax: 86-29-85303774,
E-mail: zhangzt@snnu.edu.cn

#该作者现在陕西中医学院工作.



Scheme 1 Synthetic route of sodium formononetin-3'-sulfonate

正辛醇/水分配系数, 并进行了降脂保肝的药理活性试验。溶解度和正辛醇/水分配系数及药理活性实验结果表明: 芒柄花素-3'-磺酸钠具有良好的水溶性, 能够显著降低高脂大鼠血清和肝脏中胆固醇含量, 降低肝酶活性, 具有良好的降脂保肝作用。修饰改性的芒柄花素-3'-磺酸钠不仅克服了芒柄花素水溶性差的弊端, 而且为进一步开发降脂保肝新药提供了理论依据。

结果与讨论

1 溶解度与正辛醇/水分配系数的测定

药物吸收的前提是在吸收部位呈溶解状态, 故水溶性是吸收的先决条件。在芒柄花素的分子结构中引入磺酸根, 其水溶性得到了很大改善, 芒柄花素-3'-磺酸钠在水中的溶解度为 4.09, 正辛醇/水分配系数也由 1.82 降低到-1.99 (表 1)。通常, 小分子盐型药物在体液中有良好的溶解性, 一般经细胞间的水性通道透过生物膜。芒柄花素-3'-磺酸钠具有良好的水溶性, 使其可开发成注射剂型的新药。

2 药理活性实验结果

2.1 肝组织的脂质和形态学变化

光镜下观察, 正常组大鼠肝细胞基本无异常变化, 肝细胞内无脂滴堆积, 模型组肝组织增大, 颜色发白发黄。肝细胞存在不同程度水肿和坏死, 多数肝细胞内可见大量的脂滴脂泡, 肝小叶结构紊乱, 肝细胞空泡样变性、融合。芒柄花素磺酸钠组肝细胞内脂滴和脂泡减少, 和模型组比较有明显改善, 颜色也趋于正常对照组。

2.2 芒柄花素-3'-磺酸钠对大鼠肾脏、睾丸脂肪垫重和肝指数的影响

经过高脂膳食后, B 组中大鼠肾脏脂肪垫和睾丸脂肪垫重量明显增加。给予芒柄花素-3'-磺酸钠后, D 组大鼠肾脏脂肪垫和睾丸脂肪垫重显著低于 B 组, 肝指数也显著低于 B 组, 说明芒柄花素磺酸钠可减少

脂肪堆积 (表 2)。

Table 2 The detection results of the weight of renal, testis adipose pad and liver index in rats of each group

Group	Weight of adipose pad /g	Weight of testis adipose pad /g	Liver index
A	1.6 ± 0.68	1.8 ± 0.29	0.25 ± 0.056
B	3.2 ± 0.25*	2.7 ± 0.43*	0.34 ± 0.049*
C	1.3 ± 0.72 [#]	1.9 ± 0.28 [#]	0.22 ± 0.015 [#]
D	2.2 ± 0.47***	2.0 ± 0.54***	0.26 ± 0.044 [#]
E	2.2 ± 0.67***	1.8 ± 0.57***	0.28 ± 0.053

$n = 8$. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ vs normal group (A); [#] $P < 0.05$ vs model group (B)

2.3 芒柄花素-3'-磺酸钠对大鼠血清脂质的影响

由表 3 可见, 大鼠连续给予高脂饲料后, B 组血清中 TC、TG、LDL-C 含量明显增加, HDL-C 明显降低, 说明高血脂模型已经形成, 给予芒柄花素-3'-磺酸钠后与 B 组相比, D 组 TC 降低 ($P < 0.01$), HDL-C 升高 ($P < 0.05$), LDL-C 降低 ($P < 0.05$), 表明芒柄花素-3'-磺酸钠对高脂大鼠血脂具有明显的降脂效果。

Table 3 The detection results of TC, TG, HDL-C and LDL-C in rat serum of each group

Group	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹
A	0.97 ± 0.20	0.55 ± 0.26	0.91 ± 0.39	0.26 ± 0.06
B	2.64 ± 0.50*	0.70 ± 0.18	0.49 ± 0.24	0.46 ± 0.24*
C	1.02 ± 0.19 [#]	0.54 ± 0.09	0.64 ± 0.09	0.18 ± 0.66 [#]
D	1.55 ± 0.39* [#]	0.52 ± 0.08	0.73 ± 0.27***	0.19 ± 0.09***
E	1.54 ± 0.58* [#]	0.54 ± 0.16	0.67 ± 0.23	0.24 ± 0.14* [#]

$n = 8$. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ vs normal contrasting group (A); [#] $P < 0.05$ vs model group (B)

2.4 芒柄花素-3'-磺酸钠对大鼠肝酶活性的影响

谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 的增高是肝脏功能受到损害的间接表现, 也是传统判定肝功能损害的指标之一。通过表 4 可看出, 本实验的模型组谷丙转氨酶和谷草转氨酶明显增高, 加芒柄花

Table 1 The solubility and *n*-octanol/water partition coefficient of formononetin and sodium formononetin-3'-sulfonate

Compd.	Solubility /g (100 g H ₂ O) ⁻¹	<i>n</i> -Octanol / water partition coefficient			
		C _w /mg·L ⁻¹	C _o /mg·L ⁻¹	K _{ow}	lgK _{ow}
Formononetin	No soluble	47.12	3 089.48	65.57	1.82
Sodium formononetin-3'-sulfonate	4.09	4 375.58	45.08	0.009 0	-1.99

素-3'-磺酸钠后与模型组比较, D 组 ALT 和 AST 显著降低 ($P < 0.05$), 趋向正常, 说明芒柄花素-3'-磺酸钠具有好的保肝活性。

Table 4 The detection results of hepatic enzymes activities in rats of each group

Group	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	GGT/U·L ⁻¹
A	70.00 ± 24.54	136.16 ± 33.16	95.16 ± 19.12	1.00 ± 0.63
B	113.66 ± 40.65**	148.66 ± 29.20**	162.83 ± 33.55**	2.00 ± 0.89
C	48.66 ± 19.89 [#]	74.16 ± 15.91 [#]	95.83 ± 31.01 [#]	1.17 ± 0.75
D	49.83 ± 18.51***	83.00 ± 22.61***	123.83 ± 30.57 [#]	1.33 ± 0.95
E	51.50 ± 6.71 [#]	82.00 ± 25.46 [#]	119.33 ± 36.87 [#]	1.67 ± 0.81

$n = 8$. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ vs normal group (A); [#] $P < 0.05$ vs model group (B)

结论

以异黄酮类天然药物单体芒柄花素为先导化合物, 利用磺化反应合成了水溶性新化合物芒柄花素-3'-磺酸钠, 并采用 IR、NMR、元素分析对其结构进行了表征。此外, 采用紫外分光光度法测定了芒柄花素-3'-磺酸钠的溶解度和正辛醇/水分配系数。实验结果证明: 在芒柄花素的分子结构中引入磺酸根, 其水溶性得到了很大改善, 能够克服芒柄花素水溶性差所带来的弊端。降脂保肝药活性试验表明: 芒柄花素-3'-磺酸钠能够显著降低高脂大鼠血清和肝脏中胆固醇含量, 降低肝酶活性, 具有良好的降脂保肝作用。水溶性新化合物芒柄花素-3'-磺酸钠的合成成为开发注射剂型的降脂保肝新药提供了理论依据。

实验部分

Nicolet 170SX FT-IR 红外光谱仪 (KBr 压片); Bruker AM-300 超导核磁共振仪; PE-2400 元素分析测量仪; 东芝 Toshiba-TBA-120FR 全自动生化分析仪; 紫外-可见分光光度计 (北京普析 TU-1810); 芒柄花素 (陕西慧科植物开发有限公司); 其他化学试剂均为市售分析纯。

1 芒柄花素-3'-磺酸钠的合成

称取 3.0 g 芒柄花素置于 25 mL 烧瓶中, 加入 12 mL 浓 H₂SO₄ 在 50 °C 水浴下反应 1 h, 倒入 100 mL 饱和 NaCl 水溶液中, 析出白色沉淀, 静置 2 h, 过滤, 再用饱和 NaCl 水溶液洗沉淀至中性, 将滤出的沉淀物用 100 mL 水溶解, 称取 4.0 g NaCl 固体加入溶液中, 出现混浊, 加热溶解, 静置过夜, 析出白色固体。重复盐析 3 次, 得白色针状晶体, 100 °C 真空干燥, 产率 79.8%。该化合物易溶于水, mp 305 °C (分解)。IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3 440.2, 1 653.0, 1 497.6, 1 462.3,

1 371.0, 1 265.1, 1 192.1, 1 095.4, 1 022.3。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 8.31 (1H, s, H-C₂), 7.88 (1H, s, H-C₂), 7.98 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-C₆), 7.04 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-C₅), 7.49 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-C₅), 6.96 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-C₆), 6.90 (1H, s, H-C₈), 3.80 (s, 3H, C₄-OCH₃)。 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 175.07 (C-4), 163.15 (C-7), 157.93 (C-8a), 156.30 (C-2), 153.66 (C-4'), 134.88 (C-3'), 131.69 (C-5), 129.45 (C-1'), 127.66 (C-3), 123.62 (C-6'), 123.48 (C-4a), 116.95 (C-6), 115.74 (C-2'), 112.20 (C-5'), 102.65 (C-8), 56.31 (-CH₃)。元素分析结果 (%), 计算值): C 51.93 (51.69), H 3.01 (2.90)。

2 溶解度与正辛醇/水分配系数的测定

按照文献^[15]方法, 分别建立了芒柄花素和芒柄花素-3'-磺酸钠工作曲线, 测定了芒柄花素-3'-磺酸钠在水中的溶解度。另外, 分别测定了芒柄花素和芒柄花素-3'-磺酸钠达到平衡时在正辛醇相中的浓度 C_o (mg·L⁻¹) 和在水相中的浓度 C_w (mg·L⁻¹), 根据正辛醇/水分配系数 $K_{ow} = C_o/C_w$ 求得了芒柄花素和芒柄花素-3'-磺酸钠的 K_{ow} 值及 lg K_{ow} 值。

3 药理活性实验

3.1 实验动物及分组

选用 SD 雄性大鼠 50 只 (陕西省中医研究院实验动物中心, 动物质量合格证号: 陕医动证字 08-004 号), 8 周龄, 体重 180~220 g, 动物室内温度 20~29 °C, 相对湿度 40%~55%, 大鼠自由饮水、进食, 分笼饲养, 每笼 5 只。实验动物购回正常喂养 1 周后, 随机分为 5 组, 即正常对照组 (A)、模型组 (B)、正常对照组加芒柄花素磺酸钠 (C)、模型组加芒柄花素磺酸钠 (D) 和模型组加辛伐他汀 (E), 每组 10 只。

3.2 模型复制及标本制作

实验动物 A 组和 C 组喂普通饲料; 其余各组均喂高脂饲料。高脂饲料配方: 大鼠标准饲料中添加 1.0% 胆固醇, 0.35% 胆酸钠, 5.0% 猪油, 0.61% 丙基硫氧嘧啶; 前 3 天按 700 ku·kg⁻¹ 的总剂量分 3 次给予维生素 D 灌胃。从第 4 周开始 A、B、C 三组每天灌服生理盐水 20 mL·kg⁻¹, D 组每天灌服芒柄花素磺酸钠 67.5 mg·kg⁻¹, 用蒸馏水稀释为 2 mL 灌胃。E 组每只每天灌服辛伐他汀 9 mg·kg⁻¹, 用蒸馏水稀释为 2 mL 灌胃。实验期间大鼠自由进水摄食, 第 8 周末禁食 12 h。

3.3 检测方法

3.3.1 肝组织的脂质和形态学变化测定 切取肝组织用冰生理盐水冲洗, 滤纸吸干后, 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察肝组织

形态学变化。

3.3.2 大鼠肾脏、睾丸脂肪垫重和肝指数的测定 各组实验大鼠麻醉后, 开腹快速取出肝脏、肾脏脂肪垫和睾丸脂肪垫, 立即置于生理盐水中冲洗淤血, 滤纸吸干, 电子天平称重。

3.3.3 大鼠血清脂质的测定 各组实验大鼠麻醉后, 腹主动脉取血, 放入离心管中用冷冻高速离心机 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $20\ \text{min}$ 制备血清。大鼠血清中胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C) 的活性在全自动生化分析仪上采用一步酶法、二步酶法和胆固醇酯酶氧化酶法检测。

3.3.4 大鼠肝酶活性 (ALT、AST、ALP 和 GGT) 的测定 各组实验大鼠麻醉后, 腹主动脉取血, 离心取上清液, 在全自动生化分析仪上采用一步酶法、二步酶法和胆固醇酯酶氧化酶法测定肝谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 和谷氨酰氨基转移酶 (GGT)。

3.4 统计学处理

数据采用均数 \pm 标准差表示, 统计学处理采用 SPSS 12.0 统计软件包分析。 t 检验, 显著性水平采用 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平。

References

- [1] Lapeik O, Hill M, Cerny I, et al. Immunoanalysis of isoflavonoids in *Pisum sativum* and *Vigna radiate* [J]. *Plant Sci*, 1999, 148: 111–119.
- [2] Hutabarat LS, Greenfield H, Mulholland M. Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 886: 55–63.
- [3] Li WD, Kan LM. An approach to the chemical composition of *glycyrrhiza pallidiflora maxim* [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2000, 16: 223–226.
- [4] Rong H, Stevens JF, Deinzer ML, et al. Identification of isoflavones in the roots of *Pueraria lobata* [J]. *Planta Med*, 1984, 64: 620–627.
- [5] Han ZK. Studies on the isoflavonic phytoestrogens controlling animal endocrine function and performance [J]. *Rev China Agric Sci Technol* (中国农业科技导报), 1999, 1: 61–66.
- [6] Zhao YF, Wu YN, Wang XQ. Research progress of phytoestrogen [J]. *Food Sci* (食品科学), 1999, 7: 6–8.
- [7] Howes JB, Sullivan D, Lai N, et al. The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of post menopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia [J]. *Atherosclerosis*, 2000, 152: 143–147.
- [8] Fukai T, Marumo A, Kaitou K, et al. Anti-helicobacter pylori flavonoids from licorice extract [J]. *Life Sci*, 2002, 71: 1449–1463.
- [9] Tang LJ, Qiao PX, Zhang LY. Study on synthesis of daidzein-PVP solid dispersions and external dissolubility [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24: 778–782.
- [10] Ji QE, Wei YL. Synthesis of isoflavone for drugs that affect the cardiovascular system [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24: 906–911.
- [11] Liu QG, Zhang ZT, Xue D. Syntheses, crystal structures and activity of sulfonated daidzein [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2003, 24: 820–825.
- [12] Zhang ZT, Liu QG, Liu XH, et al. Syntheses, crystal structures and biological activity of monomethylated daidzein sulfonates [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 2002, 60: 846–1853.
- [13] Zhang ZT, Wang QY, He Y, et al. Syntheses, crystal structures and biological activity of bimethylation daidzein sulfonates [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2005, 26: 2247–2253.
- [14] Zhang ZT, Guo YN, Liu QG. Syntheses and crystal structures of $[\text{Na}(\text{H}_2\text{O})](\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_6\text{SO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_6\text{SO}_3)\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [J]. *Chin J Chem*, 2004, 22: 971–977.
- [15] Wang QR, Zhu WR. Determination of the water solubility and *n*-octanol/water of prednisone acetate [J]. *J YuLin Teach Coll* (Nat Sci) (玉林师范学院学报) (自然科学版), 2007, 28: 39–41.