

灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸衍生物的设计、合成与抗氧化活性

傅晓钟, 张伟, 王永林, 兰燕宇*, 王爱民, 周雯, 黄勇,
李靖, 邢凤晶, 刘影

(贵阳医学院药学院, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 为了设计合成具有较强神经细胞氧化损伤保护作用及较好理化性质的灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸衍生物, 以灯盏乙素苷元为先导化合物, 根据主动转运原理在改善口服药物生物利用度应用上取得的成功经验, 采用拼合设计原理在先导化合物的 4'-羟基上引入 L-氨基酸酯、醚结构, 设计、合成灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸衍生物。采用 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤模型对设计化合物进行了体外抗氧化活性评价, 同时进行了目标化合物理化性质研究。结果发现设计的化合物均具有抗氧化活性, 5 个化合物抗氧化活性优于 V_E, 灯盏乙素苷元 L-氨基酸醚类化合物在缓冲液中稳定性 ($t_{1/2}$ 9~92 h) 优于酯类衍生物 ($t_{1/2}$ 0.5 h), 灯盏乙素苷元 L-氨基酸酯类衍生物 **18**、**19** 与醚类衍生物 **22**、**24~27** 的水溶解度分别为 1 796~4 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 27.7~81.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 两者水溶性分别达到灯盏乙素的 120~280 倍和 2~6 倍。以上研究提示 L-氨基酸前药设计策略可适用于灯盏乙素苷元的结构修饰, 以获得具有较好抗氧化活性及理化性质的灯盏乙素苷元前药。

关键词: 灯盏乙素苷元; L-氨基酸; 抗氧化活性; 前药

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 05-0548-08

Design, synthesis and anti-oxidative evaluation of L-amino acid prodrugs of scutellarein

FU Xiao-zhong, ZHANG Wei, WANG Yong-lin, LAN Yan-yu*, WANG Ai-min,
ZHOU Wen, HUANG Yong, LI Jing, XING Feng-jing, LIU Ying

(School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: To design and synthesize a series of novel scutellarein 4'-L-amino acid prodrugs with more potent anti-oxidative activity and improved physicochemical properties. Scutellarein was used as lead compound, according to successful experience of improving bioavailability of oral administration drugs by active transport mechanism, principle of hybridization was used to introducing L-amino acid structural fragments at 4'-position of scutellarein to design and synthesize target scutellarein 4'-L-amino acid prodrugs. The synthetic compounds were tested on their physicochemical properties and *in vitro* anti-oxidative activity against H₂O₂ induced oxidative damage in PC12 cells. Five compounds were found to have more potent anti-oxidative activity than positive control V_E. Moreover the physicochemical properties of synthesized compounds were evaluated, and the results revealed that L-amino acid ether derivatives are more stable ($t_{1/2}$ 9-92 h) than their corresponding ester derivatives ($t_{1/2}$ 0.5 h). Water solubility of scutellarein 4'-L-amino acid ester and ether derivatives were 1 796-4 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 27.7-81.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively, in comparison with scutellarin, the solubility of compounds **18**, **19**

收稿日期: 2010-12-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81060359); 贵州省科技厅攻关计划 (黔科合 GY 字[2008]3028); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项 (黔科合社字[2010]5019); 贵州省科技厅科技计划 (黔科合计工字[2009]4001); 贵阳医学院科研项目基金资助项目 ([2009] 54).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-851-6908899, E-mail: lanyanyu@gmail.com

and **22**, **24–27** increased about 120–280 fold and 2–6 fold respectively. All these results suggested that *L*-amino acid prodrug strategy has significant potential in scutellarein prodrug design.

Key words: scutellarein; *L*-amino acid; anti-oxidative activity; prodrug

灯盏乙素 (scutellarin, **1**) 是从菊科植物灯盏细辛 (*Erigeron breviscapus*) 中提取的黄酮类成分, 具有扩张血管、增加动脉流量、降低血液黏度与外周阻力、抑制血小板凝集等作用, 临床上主要用于心脑血管等疾病的治疗^[1–3]。但由于其溶解性差 ($0.056 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 口服绝对生物利用度低 (Beagle dog, 0.4%), 严重影响了其口服应用的效果^[4, 5]。针对灯盏乙素理化性质的不足目前已报道了其多种前药化改造衍生物, 包括乙酯、苄酯、羟乙酰胺酯与聚乙二醇酯^[4, 6]。尽管这些前药类型明显改善了灯盏乙素原药的理化性质, 提高了生物活性, 但是它们仍然存在药代动力学与药效学性质的不足, 至今仍未上市或进入临床研究。

现代药效学与药代动力学研究表明, 口服灯盏乙素后其体内真正的吸收与药效形式是灯盏乙素苷元 (scutellarein, **2**), 但是灯盏乙素苷元仍存在绝对生物利用度低 (7% in rats), 不易透肠吸收等缺陷^[7, 8]。研究显示, 以中药的活性成分为先导化合物进行结构改造和发现新药是目前国内外药物化学研究的热点, 因此以灯盏乙素苷元为先导化合物进行结构修饰具有重要意义, 但目前为止仍很少见到这方面文献报道。因此, 作者认为有必要以灯盏乙素苷元为先导化合物, 进行进一步的结构修饰以期达到改善其口服生物利用度与提高治疗心脑血管疾病效果。

主动转运原理在改善口服生物利用度低的药物

口服吸收效果与疗效上的应用取得了成功, 研究表明伐昔洛韦 (*L*-valacyclovir) (**3**) 与缬更昔洛韦 (*L*-valganciclovir) (**4**) 能明显提高阿昔洛韦与更昔洛韦原药的生物利用度及抗病毒活性, 这种性质是由于两者结构中存在的 *L*-氨基酸片段使药物分子能被人类小肠黏膜上皮细胞存在的寡肽转运体-1 (hPepT1) 有效转运通过小肠黏膜而吸收^[9, 10]。

为探索 *L*-氨基酸结构的引入能否适用于灯盏乙素苷元的结构改造以期发现活性更好、口服吸收效果更好的抗心脑血管等疾病药物, 作者以灯盏乙素苷元为先导化合物, 结合核苷 *L*-氨基酸前药 *L*-valacyclovir 与 *L*-valganciclovir 的结构特征, 运用药物设计中的结构拼合原理在苷元结构的 4'-位上引入 *L*-氨基酸片段, 设计合成了 11 个灯盏乙素苷元 4'-*L*-氨基酸衍生物 (图 1), 测定了其过氧化氢诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用, 并考察了所设计前药的理化性质。所合成化合物均未见文献报道, 目标化合物的结构、药理活性以及理化性质研究结果见表 1~3。

目标化合物的合成参考文献[11]方法, 以灯盏乙素 (**1**) 为原料经过 8% 稀硫酸回流水解, 冷置、抽滤, 不溶物干燥后用丙酮提取, 后经硅胶柱色谱分离纯化, 丙酮-石油醚体系为洗脱剂, 获得纯度达 97% 的灯盏乙素苷元 (**2**)。以 *N*-Boc-*L*-氨基酸为底物通过其与 2-溴乙醇或 3-溴-1-丙醇在 4-二甲氨基吡啶 (DMAP)/*N*, *N*'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 条件下缩合得到 *N*-Boc-*L*-氨基酸 2-溴乙基酯或 3-溴丙基酯。参考文献

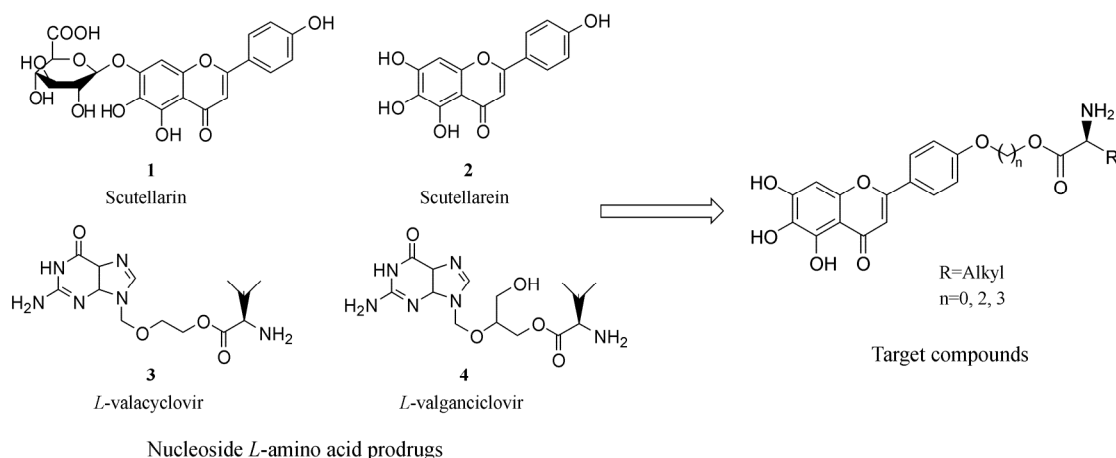
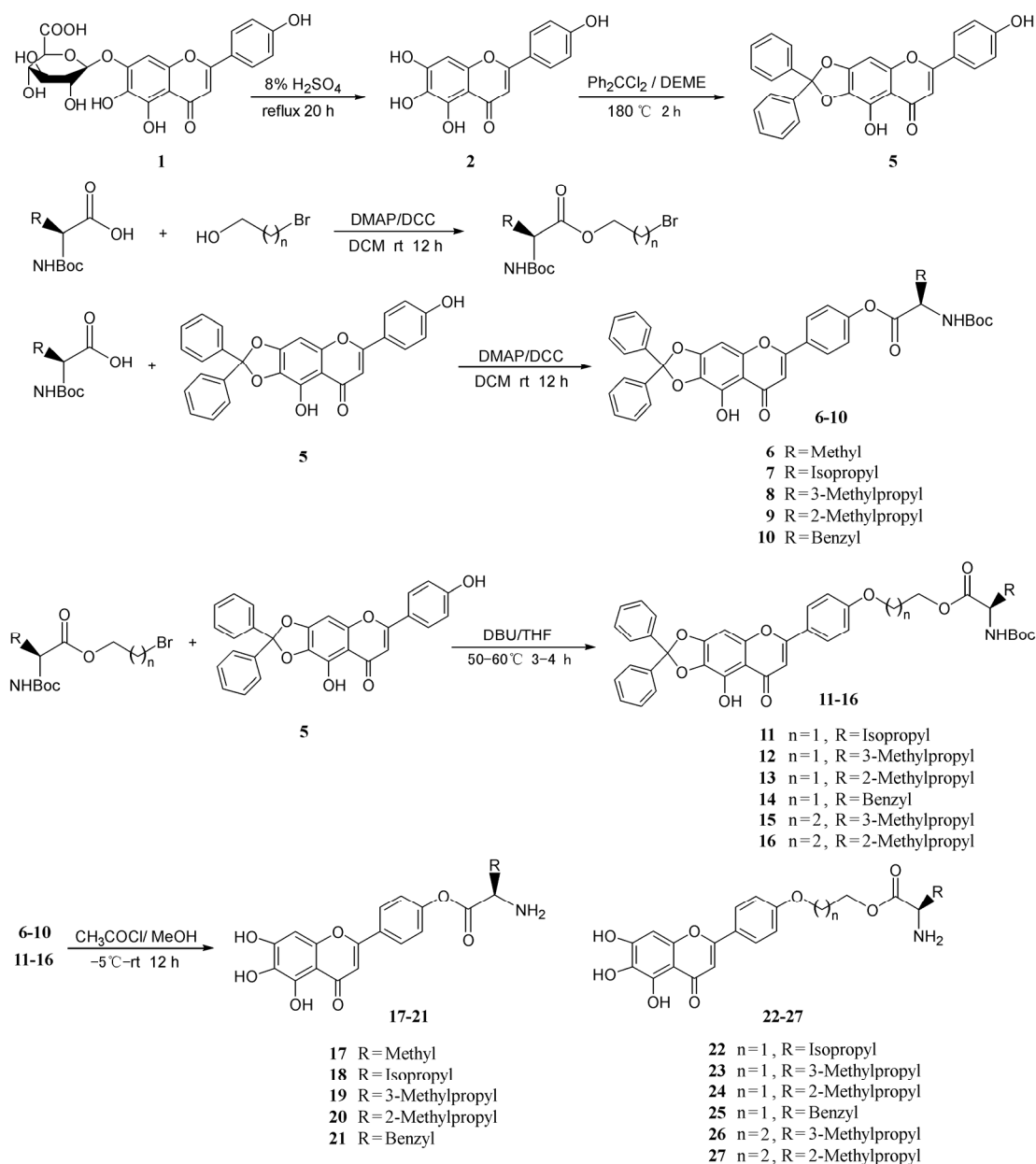


Figure 1 Designed *L*-amino acid ester prodrug of scutellarein as anti-oxidative agents

[12]方法, 将灯盏乙素苷元与催化量 DMAP 溶于适量二甘醇二甲醚 (DEME) 中, 加入等摩尔量的二氯二苯甲烷, 将体系升温至 180 °C, 回流反应 2 h 后将溶剂减压蒸出, 残余物用硅胶柱色谱分离纯化, 氯仿-甲醇体系为洗脱剂, 得到 6, 7-二苯缩酮保护灯盏乙素苷元中间体 (5)^[13]。将 5 溶解于四氢呋喃 (THF) 中, 加入 *N*-Boc-*L*-氨基酸和 DMAP, 滴加含有 DCC 的 THF 溶液, 室温反应 12 h, 体系过滤, 滤液蒸尽, 残余物以石油醚-乙酸乙酯-二氯甲烷 7:1:5 (v/v) 为洗脱剂, 硅胶柱色谱分离, 得到 6, 7-二苯缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-*N*-Boc-*L*-氨基酸酯 (6~10), 将所得产物溶解于乙酸乙酯中经乙酰氯-甲醇体系在低温下

(0~5 °C) 脱去二苯缩酮及 *N*-Boc 保护基得到目标化合物 (17~21)^[14]。将 *N*-Boc-*L*-氨基酸 2-溴乙基酯或 3-溴丙基酯与缩酮保护灯盏乙素苷元 (5) 置于干燥 THF 溶液中, 加入 1, 8-二氮杂二环-双环 [5, 4, 0]-7-十一烯 (DBU), 将体系升温至 50~60 °C, 反应 3~4 h, 产物转化完全后将体系中溶剂蒸尽, 残余物以石油醚-乙酸乙酯-二氯甲烷 7:2:5 (v/v) 为洗脱剂, 硅胶柱色谱分离, 得到 6, 7-二羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-*L*-氨基酸乙基醚或丙基醚 (11~16)^[15], 所得化合物按前法经乙酰氯-甲醇体系脱去二苯缩酮及 *N*-Boc 保护基得到目标化合物 (22~27) (合成路线图 1)。所得化合物的波谱数据见表 1。



Scheme 1 Synthetic route of target compounds

Table 1 Physical properties and spectral data of target compounds

Compd.	Total yield/%	IR/cm ⁻¹	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	ESI-MS (<i>m/z</i>)	HR-MS Calcd. (Found)
17	35.70	3 064, 2 925, 2 361, 1 740, 1 668, 1 610, 1 579, 1 503, 833	12.62 (br s, 1H, 5-OH), 10.74 (br s, 1H, 7-OH), 8.73 (br s, 1H, 6-OH), 8.29 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.98 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.67 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.43 (m, 1H, COCHNH ₂), 1.33 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H, CH ₃)	356.1 [M-H] ⁻	358.092 7 (358.092 1) C ₁₈ H ₁₆ NO ₇ [M+H] ⁺
18	23.68	3 071, 2 969, 2 361, 1 766, 1 655, 1 618, 1 579, 1 503, 839	12.59 (br s, 1H, 5-OH), 10.61 (br s, 1H, 7-OH), 8.65 (br s, 1H, 6-OH), 8.18 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.95 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.65 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.20 (d, <i>J</i> = 4.4 Hz, 1H, COCHNH ₂), 2.38-2.33 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 1.12 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, CH ₃), 1.08 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, CH ₃)	384.2 [M-H] ⁻	386.124 0 (386.123 4) C ₂₀ H ₂₀ NO ₇ [M+H] ⁺
19	41.44	3 068, 2 959, 2 361, 1 767, 1 660, 1 582, 1 503, 835	12.57 (br s, 1H, 5-OH), 10.76 (br s, 1H, 7-OH), 8.74 (br s, 1H, 6-OH), 8.17 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.93 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.71 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.27 (m, 1H, COCHNH ₂), 1.96-1.79 (m, 3H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂), 1.05-1.01 (m, 6H, 2×CH ₃)	398.1 [M-H] ⁻	400.136 9 (400.139 1) C ₂₁ H ₂₂ NO ₇ [M+H] ⁺
20	40.20	3 070, 2 967, 2 361, 1 767, 1 651, 1 574, 1 503, 838	12.57 (br s, 1H, 5-OH), 10.78 (br s, 1H, 7-OH), 8.76 (br s, 1H, 6-OH), 8.17 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.94 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.65 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.25 (m, 1H, COCHNH ₂), 2.07 (m, 1H, CH(CH ₃)C ₂ H ₅), 1.62-1.59 (m, 1H, CH ₂ CH ₃ -1H), 1.41-1.37 (m, 1H, CH ₂ CH ₃ -1H), 1.06 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H, CH(CH ₃)), 0.97 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃)	398.1 [M-H] ⁻	400.136 9 (400.139 1) C ₂₁ H ₂₂ NO ₇ [M+H] ⁺
21	30.24	3 069, 2 965, 2 361, 1 757, 1 658, 1 587, 1 502, 836	12.58 (br s, 1H, 5-OH), 10.69 (br s, 1H, 7-OH), 8.83 (br s, 1H, 6-OH), 8.17 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.41-7.32 (m, 5H, Ph-5H), 7.18 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.90 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.63 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.59 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 1H, COCH), 3.25-3.20 (m, 2H, CH ₂ Ph)	432.3 [M-H] ⁻	434.124 0 (434.123 4) C ₂₄ H ₂₀ NO ₇ [M+H] ⁺
22	18.06	3 061, 2 966, 2 361, 1 747, 1 661, 1 507, 1 366, 1 241, 832	12.71 (br s, 1H, 5-OH), 10.62 (br s, 1H, 7-OH), 8.48 (br s, 1H, 6-OH), 8.13 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.13 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.83 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.62 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.66-4.63 (m, 1H, CH ₂ OCO-1H), 4.49-4.46 (m, 1H, CH ₂ OCO-1H), 4.34 (m, 2H, Ar'OCH ₂), 3.95 (m, 1H, COCH), 2.18-2.14 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 0.98 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 3H, CH ₃), 0.94 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H, CH ₃)	428.2 [M-H] ⁻	430.150 2 (430.149 6) C ₂₂ H ₂₄ NO ₈ [M+H] ⁺
23	27.15	3 059, 2 959, 2 361, 1 748, 1 660, 1 607, 1 505, 1 366, 1 243, 833	12.70 (br s, 1H, 5-OH), 10.65 (br s, 1H, 7-OH), 8.52 (br s, 1H, 6-OH), 8.03 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.11 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.84 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.63 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.59-4.57 (m, 1H, CH ₂ OCO-1H), 4.49-4.45 (m, 1H, CH ₂ OCO-1H), 4.35-4.33 (m, 2H, Ar'OCH ₂), 3.99 (m, 1H, COCH), 1.72-1.70 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 1.64-1.59 (m, 2H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂), 0.83 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 6H, 2×CH ₃)	442.1 [M-H] ⁻	444.165 8 (444.165 3) C ₂₃ H ₂₆ NO ₈ [M+H] ⁺
24	25.49	3 062, 2 965, 2 361, 1 747, 1 660, 1 608, 1 505, 1 367, 1 239, 833	12.75 (br s, 1H, 5-OH), 10.75 (br s, 1H, 7-OH), 8.53 (br s, 1H, 6-OH), 8.03 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.11 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.83 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.64 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.66-4.63 (m, 1H, CH ₂ OCO-1H), 4.47-4.44 (m, 1H, CH ₂ OCO-1H), 4.33 (m, 2H, Ar'OCH ₂), 3.98 (m, 1H, COCH), 1.89 (m, 1H, CH(CH ₃)C ₂ H ₅), 1.47-1.44 (m, 1H, CH ₂ CH ₃ -1H), 1.30-1.23 (m, 1H, CH ₂ CH ₃ -1H), 1.05 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H, CH(CH ₃)), 0.90 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃)	442.2 [M-H] ⁻	444.165 8 (444.165 3) C ₂₃ H ₂₆ NO ₈ [M+H] ⁺
25	45.50	3 065, 2 965, 2 361, 1 746, 1 658, 1 597, 1 502, 1 369, 1 242, 834	12.71 (br s, 1H, 5-OH), 10.65 (br s, 1H, 7-OH), 8.56 (br s, 1H, 6-OH), 8.04 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.23 (m, 5H, Ph-5H), 7.10 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.84 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.62 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.51-4.10 (m, 2H, CH ₂ OCO), 4.35-4.32 (m, 1H, COCH), 4.24-4.17 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂), 3.24-3.16 (m, 1H, CH ₂ Ph-1H), 3.09-3.04 (m, 1H, CH ₂ Ph-1H)	476.1 [M-H] ⁻	478.150 2 (478.149 6) C ₂₆ H ₂₄ NO ₈ [M+H] ⁺
26	19.93	3 065, 2 959, 2 361, 1 746, 1 656, 1 608, 1 505, 1 368, 1 244, 832	12.72 (br s, 1H, 5-OH), 10.58 (br s, 1H, 7-OH), 8.44 (br s, 1H, 6-OH), 8.03 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.13 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.84 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.61 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.33 (m, 2H, CH ₂ OCO), 4.18 (m, 2H, PhOCH ₂), 3.98 (m, 1H, COCH), 2.13-2.10 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CH ₂ O), 1.71-1.58 (m, 3H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂), 0.87 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 6H, 2×CH ₃)	456.2 [M-H] ⁻	458.181 5 (458.180 9) C ₂₄ H ₂₈ NO ₈ [M+H] ⁺
27	21.22	3 068, 2 964, 2 361, 1 743, 1 657, 1 608, 1 505, 1 367, 1 243, 832	12.72 (br s, 1H, 5-OH), 10.58 (br s, 1H, 7-OH), 8.44 (br s, 1H, 6-OH), 8.13 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{3,5}), 7.13 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H _{2,6}), 6.83 (s, 1H, Ar-H ₈), 6.61 (s, 1H, Ar-H ₃), 4.37 (m, 2H, CH ₂ OCO), 4.17 (m, 2H, PhOCH ₂), 3.97 (m, 1H, COCH), 2.13-2.10 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CH ₂ O), 1.45-1.40 (m, 1H, CH(CH ₃)), 1.27-1.21 (m, 2H, CH ₂ CH ₃), 0.89-0.83 (m, 6H, 2×CH ₃)	456.2 [M-H] ⁻	458.181 5 (458.180 9) C ₂₄ H ₂₈ NO ₈ [M+H] ⁺

结果与讨论

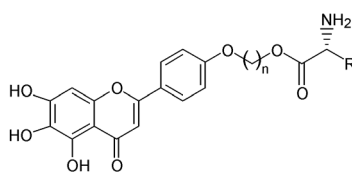
按照参考文献^[16]方法, 采用过氧化氢致 PC12 细胞氧化损伤模型评价所设计化合物细胞毒性及对 PC12 细胞氧化损伤的保护效果。由实验结果 (表 2) 可知设计的灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸前药细胞毒性均较小 ($TC_{50} > 1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用 PC12 细胞后其 LDH 释放量明显增加, 灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸前药能显著降低过氧化氢作用细胞后升高的 LDH 水平, 并且作用呈浓度依赖性 (1~20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 在 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度条件下化合物 **19**、**20**、**24**~**26** 抗氧化活性明显优于 V_E ($P < 0.05$), 其中 **19**、**20** 抗氧化活性最高。初步构效关系研究发现, 酯类化合物 **17**~**20** 结构中随着 L-氨基酸部分烃基体积增加, 其抗氧化活性有增强趋势, 但相似的抗 HBV 活性变化趋势在醚类化合物 **22**~**25** 结构改变中并未观察到, 提示灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯类前药抗氧化活性受氨基酸部分烃基体积影响大于其相应的醚类前药; 比较 **23** 与 **26**、**24** 与 **27** 抗氧化活性, 可以看出灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸乙基醚的抗氧化活性优于其相应的丙基醚衍生物。

按照文献方法^[4, 17], 对合成的灯盏乙素苷元衍生物进行了理化性质研究。由试验结果 (表 3) 可知设计的灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯类化合物 **18**、**19** 水溶性 (1 796~4 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 明显优于灯盏乙素 14.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 达到 120~280 倍, 4'-L-氨基酸醚类化合物 **22**~**27** 水溶性 (27.7~81.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为灯盏乙素的 2~6 倍, 即氨基酸酯类化合物水溶性明显优于相应的醚类化合物。稳定性研究发现, 灯盏乙素苷元

Table 3 The physical-chemical properties for scutellarein L-amino acid ester prodrug and reference compounds. ^aApparent participation coefficient values ($\log P_{app}$) were carried out in *n*-octanol/phosphate buffer (pH 7.4) at 37 °C

Compd.	Stability in PBS $t_{1/2}/\text{h}$		Solubility / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\log P_{app}^a$
	pH 2.0	pH 7.4		
Scutellarin	—	—	14.4 ^[4]	-2.56 ^[4]
18	41	0.5	4 100	1.32
19	46	0.5	1 796	0.38
22	> 120	58.0	72.5	1.24
24	> 120	9.5	41.1	1.37
25	> 120	18.0	35.9	1.27
26	> 120	92.0	81.1	1.63
27	> 120	17.0	27.7	1.31

Table 2 The leakage rate of LDH of the scutellarein 4'-L-amino acid prodrugs and reference compounds. ^aThe LDH leakage assay of the tested compounds on PC12 cells treated with the defined concentrations for 24 h by MTT assay; ^bEach value indicates the mean \pm S.E. of two samples ($n = 4$); ^c $P < 0.001$ vs control; ^d** $P < 0.01$ vs H_2O_2 group, *** $P < 0.001$ vs H_2O_2 group; ^e $P < 0.05$ vs V_E group (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)



Compd.	<i>n</i>	R	MTT assay $TC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	LDH release rate on PC12 cell /%		
				The concentration for each compounds ^a		
				1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Control	—	—			30.53 \pm 1.49 ^b	
H_2O_2 (1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	—	—			80.47 \pm 1.13 ^c	
V_E	—	—		51.00 \pm 2.51 ^{**}	48.64 \pm 3.75 ^{***}	45.61 \pm 0.82 ^{***}
Scutellarin	—	—	> 1 000	47.67 \pm 3.15 ^{**d}	41.47 \pm 1.56 ^{***}	38.7 \pm 1.94 ^{***d}
17	0	Methyl	> 1 000	70.98 \pm 1.58	69.84 \pm 3.95	59.53 \pm 2.90 ^{**}
18	0	Isopropyl	> 1 000	58.40 \pm 2.37 ^{***}	48.14 \pm 2.19 ^{***}	46.49 \pm 2.69 ^{***}
19	0	3-Methylpropyl	> 1 000	47.73 \pm 1.54 ^{***}	41.36 \pm 1.32 ^{***}	40.39 \pm 1.04 ^{***e}
20	0	2-Methylpropyl	> 1 000	54.61 \pm 2.12 ^{**}	46.74 \pm 4.47 ^{**}	37.80 \pm 0.28 ^{***e}
21	0	Benzyl	> 1 000	47.83 \pm 1.09 ^{***}	42.40 \pm 1.55 ^{***}	41.00 \pm 1.31 ^{***}
22	2	Isopropyl	> 1 000	51.23 \pm 0.87 ^{***}	44.36 \pm 2.84 ^{***}	43.21 \pm 1.64 ^{***}
23	2	3-Methylpropyl	> 1 000	48.48 \pm 3.11 ^{***}	44.42 \pm 2.47 ^{***}	41.97 \pm 2.43 ^{***}
24	2	2-Methylpropyl	> 1 000	45.02 \pm 1.42 ^{**}	43.56 \pm 3.12 ^{***}	41.63 \pm 0.61 ^{***e}
25	2	Benzyl	> 1 000	52.63 \pm 1.67 ^{***}	48.90 \pm 1.17 ^{***}	42.33 \pm 0.90 ^{***e}
26	3	3-Methylpropyl	> 1 000	54.02 \pm 1.50 ^{***}	47.96 \pm 1.56 ^{***}	41.41 \pm 0.70 ^{***e}
27	3	2-Methylpropyl	> 1 000	61.79 \pm 1.57 ^{**}	57.37 \pm 3.41 ^{***}	56.51 \pm 1.04 ^{***}

4'-L-氨基酸酯类化合物稳定性低于相应的醚类衍生物, 尤其是在中性条件下酯类化合物降解半衰期 ($t_{1/2}$) 0.5 h, 相应的醚类化合物降解半衰期 ($t_{1/2}$) 9~92 h, 该结果提示灯盏乙素苷元 L-氨基酸酯类前药吸收过程中稳定性较差, 可能分解为灯盏乙素苷元从而使其生物利用度相对原药无明显提高, 苷元 L-氨基酸醚类前药吸收过程中较稳定, 其生物利用度相对原药可能有较大提高。两类化合物的表观脂水分配系数 ($\log P_{app}$) 0.38~1.63 均优于灯盏乙素 (-2.56)。以上研究结果表明设计的化合物有进一步研究价值, 尤其是醚类衍生物, 今后工作中将进行其药代动力学行为及其体内活性研究。

实验部分

核磁共振用 Varian Mercury 400 型核磁共振仪记录, TMS 内标; 质谱用 Waters ACQUITY TQD 超高效液相色谱-质谱联用仪测定; 高分辨质谱用 Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer, FT-ICRMS 高分辨质谱仪 (APEX II, Bruker) 测定; 红外光谱用 Bruker Tensor 27 型红外光谱仪测定; 色谱检测用 LC-10AVP 高效液相色谱仪 (Shimadzu, Japan) 测定, 色谱柱 Hadera ODS-2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); Bio-Rad 680 型酶标仪 (Bio-Rad, America); 薄层色谱硅胶 H (青岛海洋化工), 灯盏乙素 (以灯盏细辛药材为原料提取, HPLC 纯度 90%), *N*-Boc-L-氨基酸 (纯度 98%) 购自上海吉尔生化有限公司, 二氯二苯甲烷购自南京康满林化工有限公司, DMAP、DEME 购自国药集团上海化学试剂有限公司。分离用硅胶为 200~300 目, 其余试剂为分析纯。PC12 细胞株购自中国医学科学院医药生物技术研究所以; 维生素 E 购自 Sigma 公司; DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 高糖培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 购自 Sigma 公司; LDH 测定试剂盒购自南京建成科技有限公司。

1 目标化合物的合成

1.1 灯盏乙素苷元 4'-L-缬氨酸酯

1.1.1 6, 7-二羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 (5) 将灯盏乙素苷元 0.2 g (0.7 mmol) 溶于 10 mL 二甘醇二甲醚 (DME) 中, 加入 DMAP 0.1 g (0.81 mmol) 和二氯二苯甲烷 0.49 g (21 mmol), 180 °C 下回流反应 2 h。溶剂减压蒸尽, 残余物经硅胶柱色谱分离 (洗脱剂: 氯仿-甲醇 80 : 1 v/v) 得浅棕黄色粉末状固体 0.22 g,

mp 250~252 °C, 收率 68.4%。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.57 (br s, 1H, 5-OH), 10.41 (br s, 1H, 4'-OH), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H_{3,5}), 7.56~7.53 (m, 4H, Ph-H), 7.46~7.44 (m, 6H, Ph-H), 7.04 (s, 1H, Ar-H₈), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H_{2,6}), 6.83 (s, 1H, Ar-H₃); ESI-MS (*m/z*): 449.1 [M-H]⁻。

1.1.2 6, 7-二羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-N-Boc-L-缬氨酸酯 (7) 缩酮保护的灯盏乙素苷元 (30 mg, 67 μmol) 溶于 5 mL 四氢呋喃 (THF) 中, 加入 *N*-Boc-L-缬氨酸 (18.6 mg, 81 μmol) 和 DMAP (4 mg, 33 μmol)。然后加入 3 mL *N,N*-二环己基碳二亚胺 (DCC) (17 mg, 81 μmol) 的 THF 溶液, 室温搅拌条件下反应 14 h。TLC 监测至原料转化完全后, 减压浓缩残余物以石油醚-乙酸乙酯-二氯甲烷 (7 : 1 : 5) 为洗脱剂, 硅胶柱色谱分离得黄色油状目标产物即缩酮保护的灯盏乙素苷元 4'-L-缬氨酸酯衍生物 30.6 mg, 产率 83%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H_{3,5}), 7.62~7.60 (m, 4H, Ph-H), 7.42~7.40 (m, 6H, Ph-H), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar'-H_{2,6}), 6.62 (s, 1H, Ar-H₈), 6.57 (s, 1H, Ar-H₃), 5.08 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, NHBoc), 4.21~4.18 (m, 1H, CHNH), 2.34 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.47 (s, 9H, 3×CH₃), 1.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 0.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃); ESI-MS (*m/z*): 645.1 [M-H]⁻。

1.1.3 灯盏乙素苷元 4'-L-缬氨酸酯 (18) 冰盐浴下, 依次将甲醇 (27 μL, 667 μmol) 和乙酰氯 (39 μL, 556 μmol) 加入到 2 mL 乙酸乙酯中, 保持冰盐浴搅拌反应 3 h, 将之前得到的缩酮保护的灯盏乙素苷元 4'-L-缬氨酸酯衍生物 (30.6 mg, 55.6 μmol) 溶于 1.5 mL 乙酸乙酯后, 加至上述反应体系中, 继续保持冰盐浴反应 2 h 后逐渐将反应温度升至室温, 反应 12 h, 有橘黄色沉淀附壁, 反应体系经超声、离心后, 所得沉淀用乙酸乙酯洗涤 3 次得橘黄色油状目标产物 12 mg, 产率 56.1%。目标化合物的光谱分析数据见表 1。

1.1.4 目标化合物 17、19~21 的合成 目标化合物 17、19~21 分别以 *N*-Boc-L-丙氨酸、*N*-Boc-L-亮氨酸、*N*-Boc-L-异亮氨酸、*N*-Boc-L-苯丙氨酸以及 6, 7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元为原料, 按照化合物 18 的方法合成。目标化合物 17~21 的光谱分析数据见表 1。

1.2 灯盏乙素苷元 4'-L-缬氨酸乙基醚 (22)

1.2.1 *N*-Boc-L-缬氨酸-2-溴乙基醚 将 *N*-Boc-L-缬氨酸 (4.35 g, 20 mmol)、2-溴乙醇 (3.84 g, 25 mmol), 置于 40 mL 干燥二氯甲烷中, 加入 *N,N*-二甲胺基吡

啉 (0.20 g, 1.6 mmol), 室温搅拌至溶解完全, 缓慢滴加含有 DCC (4.12 g, 20 mmol) 的 30 mL 二氯甲烷溶液, 滴毕, 体系于室温条件下反应 24 h。滤去体系中的不溶物, 减压蒸除溶剂, 残余物加入 30 mL 乙酸乙酯, -10 °C 静置 2 h, 滤除不溶物, 滤液依次用 1% 盐酸溶液、0.5% NaHCO₃ 溶液、饱和食盐水溶液洗涤, 无水 MgSO₄ 干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 残余物用硅胶柱色谱分离纯化 (洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 15:1), 得无色油状目标产物 3.21 g, 产率 49.8%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.20~4.27 (m, 3H), 3.77 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 2.13 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)。ESI-MS (*m/z*): 224.1 [M+H]⁺。

1.2.2 6, 7-二羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-*N*-Boc-*L*-缬氨酸乙基醚 (11) 6, 7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 (50 mg, 110 μmol), 溶于 3 mL *N*-甲基吡咯烷酮 (NMP) 中, 然后加入 *N*-Boc-*L*-缬氨酸-2-溴乙基酯 (41.0 mg, 167 μmol)、碳酸铯 (36.2 mg, 110 μmol) 和 4 Å (1 Å = 0.1 nm) 分子筛数粒, 80 °C 下搅拌反应 4 h。滤出体系中分子筛后加入 5 mL 三氯甲烷, 然后用 0.5% 盐酸溶液洗 5 次, 除去 NMP, 有机层分出, 无水硫酸镁干燥, 溶液减压浓缩, 残余物以石油醚-乙酸乙酯-二氯甲烷 7:2:5 为洗脱剂, 硅胶柱色谱分离得浅黄色油状目标产物 23 mg, 收率 32%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar'-H_{3,5}), 7.63~7.60 (m, 4H, Ph-H), 7.44~7.37 (m, 4H, Ph-H), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar'-H_{2,6}), 6.63 (s, 1H, Ar-H₈), 6.57 (s, 1H, Ar-H₃), 5.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NHBoc), 4.57~4.48 (m, 2H, CH₂OCO), 4.28~4.25 (m, 3H, Ar'OCH₂, CHNH), 1.87~1.83 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃); ESI-MS (*m/z*): 692.2 [M-H]⁻。

1.2.3 灯盏乙素苷元 4'-*L*-缬氨酸乙基醚 (22) 冰盐浴下, 依次将甲醇 (16 μL, 400 μmol) 和乙酰氯 (20 μL, 333 μmol) 加入到 2 mL 乙酸乙酯中, 保持冰盐浴搅拌反应 3 h, 将之前得到的 6, 7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元 4'-*N*-Boc-*L*-缬氨酸乙基醚 (23 mg, 33.1 μmol) 溶于 1.5 mL 乙酸乙酯后, 加到上述反应体系中, 继续保持冰盐浴反应 2 h, 逐渐将反应温度升至室温, 反应 12 h, 有橘黄色沉淀附壁, 反应体系经超声、离心后所得沉淀用乙酸乙酯洗涤 3 次得橘黄色油状目标产物 8 mg, 收率 56.3%。目标化合物的光谱分析数据见表 1。

1.2.4 目标化合物 23~27 的合成 目标化合物 23~27 分别以 *N*-Boc-*L*-亮氨酸、*N*-Boc-*L*-异亮氨酸、*N*-Boc-*L*-苯丙氨酸以及 6, 7-羟基缩酮保护灯盏乙素苷元为原料, 按照化合物 22 的方法合成。目标化合物 23~27 的光谱分析数据见表 1。

2 体外抗氧化活性评价

2.1 细胞毒性试验

将 PC12 细胞消化为单个细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10⁴ 个/mL, 接种于 96 孔板 (100 μL/孔), 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。待细胞贴壁后吸去上清, 加入含浓度梯度稀释药物 (1、10、50、100 μmol·L⁻¹) 的培养液, 置培养箱中继续培养。于加药后 24 h, 吸去上清, 加入含 MTT (0.25 mg·mL⁻¹) 无血清培养基, 培养 4 h, 吸去培养液, 加入 100 μL DMSO 振荡使 Formazan 结晶溶解, 490 nm 测定各孔吸光度值以计算细胞半数毒性浓度 (TC₅₀)。实验结果见表 2。

2.2 对过氧化氢损伤 PC12 细胞的保护作用

选取对数生长期 PC12 细胞, 以每孔 100 μL, 5×10⁴~10×10⁴ 个/mL 种植于 96 孔培养板中, 将培养板置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。实验分为正常对照组、阳性对照组、加药组。过滤培养基后, 取细胞板, 小心吸去培养液, 换液加药。正常对照组每孔加入 100 μL 的 DMEM 培养液; 模型组每孔加入含有 1 000 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 的培养液 100 μL, 阳性对照组每孔加入含有 1 000 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 及 20 μmol·L⁻¹ 维生素 E 的培养液 100 μL; 加药组每孔加入含有 1 000 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 及 1、10、20 μmol·L⁻¹ 受试化合物的培养液 100 μL, 作用 PC12 细胞 6 h 后用酶标仪检测 490 nm 波长处每孔吸光度值, 计算 LDH 释放率。LDH 释放率 (%) = 上清液 LDH / (上清液 LDH + 裂解液 LDH) × 100%。每个浓度平行 3 孔, 实验重复 3 次。数据采用 SPSS (13.0) 统计软件进行分析, 实验结果见表 2。

3 理化性质测试

3.1 稳定性测定

分别取灯盏乙素苷元 4'-*L*-缬氨酸酯、醚衍生物 3 mg, 溶于 3 mL 甲醇制成储备液, 取 1 mL 甲醇储备液置于 25 mL 容量瓶, 用 37 ± 1 °C 水浴预热的 pH 2.0 及 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液定溶至刻度, 将容量瓶置于 37 ± 1 °C 水浴中, 于不同时间点取样, HPLC 法测定 (流动相: 甲醇-0.1%磷酸 50:50~100:0 v/v), 考察其浓度变化, 计算化合物的降解半衰期 (*t*_{1/2})。实验结果见表 3。

3.2 溶解度测定

取灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯、醚衍生物 3 mg, 用 pH 7.4 的缓冲溶液溶解, 密闭, 20 °C 放置 8 h, 不时振摇, 饱和液静置 1 h 后, 用适当比例的甲醇稀释, 测吸光度, 测定 3 次, 取平均值, 用标准曲线计算其浓度, 得溶解度。实验结果见表 3。

3.3 脂水分配系数的测定

取灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸酯、醚衍生物 3 mg, 分别加入 2 mL 的 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 溶液和 2 mL 正辛醇, 密闭, 混旋 10 min, 离心, 分层, 取上层 (正辛醇层) 与下层 NaCl 溶液分别稀释 5 倍后, 测吸光度, 测 3 次, 取平均值。根据标准曲线得相应的醇相与水相浓度 ($C_{醇}$ 与 $C_{水}$), 计算表观脂水分配系数 $\text{Log}P_{app}$ 值, 实验结果见表 3。

致谢: 高分辨质谱由兰州大学功能有机分子国家重点实验室协助测定, 在此表示诚挚的感谢。

References

- [1] Liu H, Yang XL, Wang Y, et al. Protective effects of scutellarin on superoxide-induced oxidative stress in rat cortical synaptosomes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24: 1113–1117.
- [2] Chen XX, He B. Effects of breviscapine on the changes in antioxidant enzyme activity induced by cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1998, 7: 91–93.
- [3] Xu QY, Li XX. Influence of DZXX injection on blood viscosity in patients with high blood viscosity [J]. *New Drugs Clin Rem (新药与临床)*, 1995, 14: 233.
- [4] Cao F, Guo JX, Ping QN, et al. Prodrugs of scutellarin: ethyl, benzyl and *N, N*-diethylglycolamide ester synthesis, physicochemical properties, intestinal metabolism and oral bioavailability in the rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29: 385–393.
- [5] Ge QH, Zhou Z, Zhi XJ, et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of breviscapine in Beagle dogs [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2003, 34: 618–620.
- [6] Lu J, Cheng CM, Zhao XG, et al. PEG-scutellarin prodrugs: synthesis, water solubility and protective effect on cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45: 1731–1738.
- [7] Chen X, Cui L, Duan X, et al. Pharmacokinetics and metabolism of the flavonoid scutellarin in humans after a single oral administration [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 1345–1352.
- [8] Che QM, Pan LY, Chen Y, et al. Study on pharmacokinetics of scutellarein in rats [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2007, 42: 1418–1421.
- [9] Birger B, Nielsen CU, Steffansen B, et al. Transport of peptidomimetic drugs by the intestinal di/tri-peptide transporter PepT1 [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2002, 90: 285–296.
- [10] Isabel RA, Hamelore D. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 23: 434–440.
- [11] Che QM. A method for preparation of scutellarein: CN, 1683357A [P]. 2005-10-19.
- [12] Chaim G, Yakir K, Haussner A. A novel method for the facile synthesis of depsipeptides [J]. *Tetrahedron Lett*, 1979, 20: 3811–3814.
- [13] Chen ZW, Hu YZ, Wu HH, et al. Synthesis and vasorelaxation action of flavonoid [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 1001–1007.
- [14] Li D, Yang HS, Xie LG, et al. Synthesis of *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-2-acetylthiazole-4-carboxamide and its analogues [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2010, 30: 238–243.
- [15] Fu XZ, Jiang SH, Li C, et al. Design and synthesis of novel *bis* (*L*-amino acid) ester prodrugs of 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA) with improved anti-HBV activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 465–470.
- [16] Hong H, Liu GQ. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin [J]. *Life Sci*, 2004, 74: 2959–2973.
- [17] Zhou QS. The Synthesis, Characterization and Pharmacokinetics of Scutellarin-PEG Conjugates (灯盏乙素-PEG 酯的合成、性质及药动学研究) [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006.