

忍冬苷的合成及其对雷公藤甲素诱导肝损伤的保护作用

刘芳¹, 舒积成², 潘景行², 张锐², 刘建群^{2*}

(1. 江西萍乡高等专科学校化工系, 江西 萍乡 337055;

2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**研究忍冬苷的合成方法及其对雷公藤甲素诱导的肝损伤的保护作用。**方法:**以来源丰富的新橙皮苷为原料,经 I₂ 脱氢, AlCl₃ 脱甲基, 制得忍冬苷;采用雷公藤甲素诱导的人系 L02 肝细胞损伤模型评价忍冬苷的保肝作用。**结果:**合成了忍冬苷并发现其对雷公藤甲素诱导的肝损伤具有很好的保护作用。**结论:**合成方法简便可行、收率高、成本低,适合工业化生产;忍冬苷对雷公藤甲素诱导的肝损伤具有很好的保护作用。

[关键词] 忍冬苷; 合成; 雷公藤甲素; 肝损伤保护

[中图分类号] R284.3; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0072-04

Synthesis of Lonicerin and its Protective Effect on Liver Cell Injured by Triptolide *in vitro*

LIU Fang¹, SHU Ji-cheng², PAN Jing-hang², ZHANG Rui², LIU Jian-qun^{2*}

(1. Department of Chemistry, Pingxiang College, Pingxiang 337055, China;

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** Study on the synthesis of lonicerin and its protective effect on liver cell injured by triptolide. **Method:** Lonicerin was synthesized with neohesperidin through dehydrogenation and demethylation by iodine and aluminum trichloride respectively and its protective effect on L02 cell injured by triptolide *in vitro* was evaluated by 3-(4, 5)-dimethylthiazia20(-z-y1)-3, 5-di-phenylterazoliumromide (MTT) assay for the first time. **Result:** Lonicerin was synthesized and had the protective effect on L02 cell injured by triptolide *in vitro*. **Conclusion:** The synthetic route for lonicerin with high yield was simple, feasible, economic and convenient for industrial manufacture. Lonicerin had the protective effect on L02 cell injured by triptolide.

[Key words] lonicerin; synthesis; triptolide; protective effect on injured liver

忍冬苷(lonicerin, 木犀草素-7-O-新橙皮糖苷)是存在于忍冬科植物忍冬、华南忍冬、山银花、新疆雪莲、山茱萸及凤尾草等植物中的一种黄酮类成分,有抗菌、抗氧化、抗骨质疏松、抗焦虑和抗炎等生物活性^[1-5],具有广泛的医药用途。但是忍冬苷在以

上植物中的含量非常低,一般小于千分之一,从天然植物中分离纯化、大规模制备忍冬苷非常困难且成本很高。因此为解决天然忍冬苷来源困难问题,开发其合成方法,具有重要意义。目前报道的合成方法^[6]有:将根皮乙酰苯-4-β-新橙皮糖苷与原儿茶醛反应得圣草素-7-O-β-新橙皮糖苷,进一步脱氢得忍冬苷,该法生产成本较高。本文以价廉易得,大量存在于枳实、枳壳、陈皮等植物中的新橙皮苷为原料,通过脱氢和脱甲基等步骤合成忍冬苷。该方法操作方便、收率高、成本低廉、适合忍冬苷的工业化生产。

雷公藤是目前治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病最有效的中药之一。雷公藤甲素(triptolide,

[收稿日期] 20111017(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960495)

[第一作者] 刘芳, 硕士, 高级实验师, 从事有机化学研究, Tel: 0799-6682171, E-mail: shuhao122@163.com

[通讯作者] * 刘建群, 博士, 教授, 从事中药活性成分及质量评价研究, Tel: 0791-87118657, E-mail: liu5308@sina.com

TP)是雷公藤的主要有效成分之一,具有显著的免疫抑制、抗炎、抗肿瘤和抗生育等作用,在临床上主要用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮、皮肤病、肾炎和器官排斥反应等 50 多个病种^[7-8]。但它又属于毒性很强的药物,LD₅₀ 约为 0.8 mg·kg⁻¹ (小鼠口服),急性中毒主要表现为肝损伤、胃肠道毒性,长期毒性表现为抑制骨髓并损害心和肾脏等器官^[9-10]。TP 的有效剂量与中毒剂量极为相近,临床用药很不安全,这大大限制了它的临床应用。

课题组发现凤尾草对 TP 有很好的减毒作用,对其诱导的肝损伤具有较好的保护作用^[11-12],并从凤尾草中分离了忍冬苷等黄酮类化合物。报道了忍冬苷对 TP 诱导的人系 L02 肝细胞损伤的保护作用。

1 材料

Bruker-500 型核磁共振波谱仪 (Bruker 公司), Agilent 1100LC/MSD Trap 液相色谱-质谱联用仪 (安捷伦公司), NAPCO5410 型 CO₂ 细胞培养箱 (Precision Scient IF-IC), Model 550 型酶标仪 (BIO-RAD), TP 对照品 (中国药品生物制品检定所,批号 111567-200502,含量 ≥ 99%), DMEM 培养基 (GIB-

Cobrl), 噻唑蓝 (MTT, Fluka 公司), 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), 二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司), 胰蛋白酶 (trypsin, AM-Resco 公司), 人系 L02 正常肝细胞 (上海细胞所), 谷胱甘肽 (GSH, 重庆药友制药有限责任公司), 忍冬苷为自制品 (HPLC 纯度 99.18%), 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 忍冬苷的合成

2.1.1 路线 见图 1。

2.1.2 方法

2.1.2.1 碘取代及脱碘化氢反应 将 6.10 g 新橙皮苷加入 60 mL 无水吡啶中,加热溶解,再加入 3.56 g 碘,于 110 °C 搅拌加热回流 6 h,减压回收吡啶,析出物加入大量水洗涤,得到淡黄色固体碘代新橙皮苷。将得到的碘代新橙皮苷溶解于 60 mL 5% NaOH 溶液中,于 50 °C 加热 20 min,过滤,滤得清液加入 60 mL 甲醇,用 5% HCl 调节 pH 5,析出黄色固体后抽滤,并用水洗至中性,干燥得香叶木素-7-O-新橙皮糖苷。

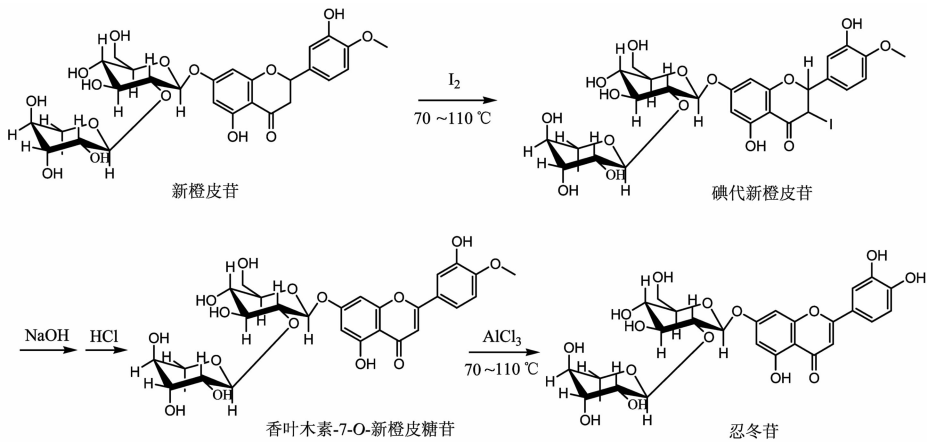


图 1 忍冬苷的合成路线

2.1.2.2 AlCl₃ 脱甲基 将上述得到的香叶木素-7-O-新橙皮糖苷加入 60 mL 无水吡啶中,加热溶解,再加入 13.30 g 无水 AlCl₃,于 70 °C 搅拌加热回流 9 h,减压回收吡啶,将固体依次用 5% HCl 和水洗涤,过滤,得黄色粉末,进一步用聚酰胺柱纯化,依次用水,40% 乙醇洗脱,将 40% 乙醇洗脱部分收集,减压回收溶剂得忍冬苷 4.91 g (HPLC 纯度 99.18%),收率 82.6%。

2.2 忍冬苷对 TP 诱导的肝细胞损伤的保护作用

取处于对数生长期的人系 L02 肝细胞,用胰酶消化后,调整细胞悬液密度为 1 × 10⁶/mL,以 10% 小牛

血清的 DMEM 培养基均匀接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL (边缘孔用无菌 PBS 填充)。5% CO₂, 37 °C 孵育培养 24 h 后,弃去培养液,分别加入 40 mg·L⁻¹ TP,正常对照组除外,继续培养 24 h 后,弃去培养液,再分别加入 75,150,300 mg·L⁻¹ 的忍冬苷及 150,300 mg·L⁻¹ 的阳性对照药 GSH。每组设 6 个复孔,另设正常对照孔和调零孔。5% CO₂, 37 °C 孵育 24 h 后各孔加入 20 μL 0.5% 的 MTT,37 °C 避光培养 4 h。终止培养,小心弃上清液,各孔加入 100 μL DMSO,混匀,振荡器振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪在波长 490 nm 处测定其吸光度

(A)值,以 A 间接反映 L02 肝细胞在培养孔中的增殖密度。以正常组细胞存活率为 100%, $A_{\text{其余组}}$ 与 $A_{\text{正常组}}$ 相除计算细胞存活率。

3 结果与讨论

3.1 忍冬苷的表征 黄色粉末, AlCl_3 和盐酸镁粉反应阳性, Molish 反应阳性, 提示为黄酮苷类化合物。用盐酸加热水解后薄层色谱检测有木犀草素、鼠李糖和葡萄糖。ESI-MS m/z : 595 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 593 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。根据 MS 和 NMR 信息确定化合物分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 6.75 (s, 1H, H-3), 6.38 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.74 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H-8), 7.42 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.92 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 7.45 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, 8.2, H-6'), 13.00 (s, 1H, OH-5), 9.62 (s, 2H, OH-3', 4'), 5.25 (d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 5.14 (s, 1H, H-1'''), 1.20 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz, H-6'''), 3.10 ~ 3.80 (m, sugar)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 164.4 (C-2), 103.2 (C-3), 181.8 (C-4), 161.1 (C-5), 97.7 (C-6), 162.4 (C-7), 94.4 (C-8), 156.9 (C-9), 105.4 (C-10), 121.3 (C-1'), 113.5 (C-2'), 145.8 (C-3'), 149.9 (C-4'), 116.0 (C-5'), 119.1 (C-6'), 99.2 (C-1''), 77.1 (C-2''), 76.9 (C-3''), 69.6 (C-4''), 76.3 (C-5''), 60.5 (C-6''), 100.4 (C-1'''), 70.3 (C-2'''), 70.5 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 18.0 (C-6''')。

3.2 忍冬苷的合成反应条件优化 采用三因素三水平正交试验考察了碘与新橙皮苷的摩尔比、反应温度、反应时间对碘取代反应步骤产率的影响, 结果见表 1。

由表 1 数据和极差比较可见, 影响碘取代反应收率的因素顺序为 B (反应温度) $> A$ (碘与新橙皮苷的摩尔比) $> C$ (反应时间), 反应温度对产物收率影响显著。根据产物收率确定较佳的碘取代反应条件为碘与新橙皮苷的摩尔比为 1.4:1, 反应温度 110 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间 6 h。

采用三因素三水平正交试验考察了 NaOH 浓度、反应时间、反应温度对消除反应产率的影响, 结果见表 2。

由表 2 数据和极差比较可见, 影响消除反应收率的因素顺序为 C (反应温度) $> A$ (NaOH 浓度) $> B$ (反应时间), 反应温度对产物收率影响显著, 反应时间对产物收率影响较小。根据产物收率确定较佳的消除反应条件为 NaOH 浓度为 5%, 反应时间为

表 1 碘取代反应正交试验结果

No.	A $M_{\text{碘}}/M_{\text{新橙皮苷}}$	B 反应温度 / $^{\circ}\text{C}$	C 反应时间 /h	碘代新橙皮苷 产量(以 HPLC 峰面积表示)
1	1.2:1	70	6	826
2	1.2:1	90	9	1 438
3	1.2:1	110	12	1 658
4	1.4:1	70	9	1 255
5	1.4:1	90	12	1 706
6	1.4:1	110	6	1 824
7	1.6:1	70	12	1 486
8	1.6:1	90	6	1 589
9	1.6:1	110	9	1 725
$K_1/3$	1 307	1 189	1 413	
$K_2/3$	1 595	1 578	1 473	
$K_3/3$	1 600	1 736	1 617	
R	293	547	204	

表 2 消除反应正交试验结果

No.	A NaOH 浓度/%	B 反应 时间/min	C 反应 温度/ $^{\circ}\text{C}$	香叶木素-7-O-新橙 皮糖苷产量(以 HPLC 峰面积表示)
1	5	20	30	1 958
2	5	40	50	2 785
3	5	60	100	2 583
4	10	20	50	2 736
5	10	40	100	2 290
6	10	60	30	1 986
7	15	20	100	2 249
8	15	40	30	2 098
9	15	60	50	2 382
$K_1/3$	2 442	2 314	2 014	
$K_2/3$	2 337	2 391	2 634	
$K_3/3$	2 243	2 317	2 374	
R	199	77	620	

40 min, 反应温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

采用三因素三水平正交试验考察了 AlCl_3 与新橙皮苷的摩尔比、脱甲基反应温度、脱甲基反应时间对脱甲基反应产率的影响, 结果见表 3。

表 3 数据和极差比较可见, 影响脱甲基反应收率的因素顺序为 C (脱甲基反应时间) $> B$ (脱甲基反应温度) $> A$ (AlCl_3 与新橙皮苷的摩尔比), 脱甲

表3 脱甲基反应正交试验结果

No.	A M_{AlCl_3} / $M_{\text{新橙皮苷}}$	B 脱甲基反 应温度/ $^{\circ}\text{C}$	C 脱甲基反 应时间/h	忍冬苷产量 (以 HPLC 峰面积表示)
1	5:1	70	6	562.7
2	5:1	90	9	851.4
3	5:1	110	12	919.7
4	10:1	70	9	1 127
5	10:1	90	12	566.3
6	10:1	110	6	657.8
7	20:1	70	12	625.8
8	20:1	90	6	710.9
9	20:1	110	9	810
$K_1/3$	777.9	771.8	643.8	
$K_2/3$	783.7	709.5	929.5	
$K_3/3$	715.6	795.8	703.9	
R	68.1	86.3	285.7	

基反应时间对产物收率影响显著。根据产物收率确定较佳的脱甲基反应条件为 AlCl_3 /新橙皮苷的摩尔比为 10:1,脱甲基反应温度为 70°C ,脱甲基反应时间为 9 h。

3.3 忍冬苷对 TP 诱导的肝细胞损伤的保护作用

由表 4 可见,TP 对 L02 肝细胞生长具有很强的抑制作用,与文献报道的 TP 的急性毒性主要表现为肝损伤相一致。体外试验结果表明,忍冬苷对 TP 诱导的人系 L02 肝细胞损伤有极显著的保护作用,效果大大优于阳性对照药 GSH,但其确切的保肝作用及机制有待进一步通过动物试验验证。忍冬苷是凤尾草中主要黄酮成分之一,本试验结果表明忍冬苷可能是凤尾草降低 TP 毒性的活性成分之一。

表4 样品对 TP 诱导的人正常肝细胞
(L02) 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	细胞存 活率/%
正常	-	1.615 0 \pm 0.034 2	100.00
TP 模型	-	0.140 2 \pm 0.018 2	8.68
忍冬苷	75	2.588 0 \pm 0.246 9	160.24 ¹⁾
	150	2.610 5 \pm 0.297 0	161.66 ¹⁾
	300	3.219 8 \pm 0.181 5	199.39 ¹⁾
GSH 阳性对照	150	0.392 8 \pm 0.016 0	24.33 ¹⁾
	300	0.431 8 \pm 0.015 2	26.74 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

[参考文献]

- [1] 田冶,汤海峰,王晓娟,等. 假麦包叶抗菌活性成分的研究(2) [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(11): 1377.
- [2] LI C H, DU H, WANG L S, et al. Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia section moutan*) yellow flowers [J]. J Agr Food Chem, 2009, 57(18): 8496.
- [3] WANG X L, WANG N L, ZHANG Y, et al. Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. SM. on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell line [J]. Chem Pharm Bulletin, 2008, 56(1): 46.
- [4] Coleta Miguel, Batista Maria Teresa, Campos Maria Graca, et al. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents [J]. Phytotherapy Research, 2006, 20(12): 1067.
- [5] Han Chang Kyun, Park Byung Uk, Kwak Eui Jong, et al. A method for extracting ligustilide from *Lonicerae folium* and its use [P]. Korea, 1998, KR 163813 B1 19981201.
- [6] Inouye Hiroyuki, Aoki Yasuhiko, Wagner Hildebert, et al. Flavone glycosides of *Veronicastrum sibiricum* var *japonicum* and the synthesis of luteolin 7-neohesperidoside (veronicastroside) [J]. Chemische Berichte, 1969, 102(9): 3009.
- [7] Brinker A M, Ma J, Lipsky P E, et al. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae) [J]. Phytochemistry, 2007, 68(13): 1819.
- [8] 秦卫松. 雷公藤甲素及其作用机制[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2007, 16(2): 158.
- [9] 丁虹, 吴建元, 童静, 等. 雷公藤甲素急性毒性及其机制研究[J]. 中药材, 2004, 27(2): 115.
- [10] 刘明星, 董静, 杨亚江, 等. 雷公藤甲素的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 170.
- [11] 刘建群, 洪沁, 张维, 等. 凤尾草对雷公藤甲素的减毒作用[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(6): 443.
- [12] 刘建群, 张维, 高书亮, 等. 凤尾草对雷公藤甲素致小鼠肝损伤的保护作用研究[J]. 中国药房, 2010, 43(21): 4033.

[责任编辑 邹晓翠]