

水飞蓟宾 Mannich 碱衍生物的合成及保肝活性研究

王保军^{1,2,3}, 韩 民^{2,3}, 李志遥^{2,3}, 曹 晶^{2,3}, 王根辈^{2,3},
何 毅^{2,3*}, 段中余^{1*}

(1. 河北工业大学化工学院, 天津 300131; 2. 天士力控股集团有限公司研究院, 天津 300410;
3. 天士力制药集团股份有限公司创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410)

摘要: 本文分别以水飞蓟宾和脱氢水飞蓟宾为先导化合物, 首次合成两个水溶性水飞蓟宾 Mannich 碱衍生物 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP, 化学结构通过 ¹H NMR 和 HR-MS 进行确证。采用 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤模型考察两个水飞蓟宾 Mannich 碱衍生物的抗肝损伤作用, 测定肝脏指数变化和血清中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH) 活力及总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 水平, 观察肝组织病理组织学变化, 并进行大鼠药代动力学研究。研究表明, DHSLB-PIP 高剂量组 (40 mg·kg⁻¹) 可以显著降低小鼠 ALT、AST、LDH 和 TG 水平, 具有量效关系, 并且能够改善肝组织的病理学改变。同时 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 在大鼠体内的 C_{max} 和 AUC_{0-8 h} 相对于水飞蓟宾均显著增加, 相对生物利用度分别为 172.5% 和 259.8%。本研究设计合成的水飞蓟宾衍生物 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 具有良好的水溶性及抗肝损伤生物活性, 并且显著提高了水飞蓟宾在大鼠体内的生物利用度, 可作为新药候选物进一步研究其成药性。

关键词: 水飞蓟宾衍生物; 结构修饰; Mannich 反应; 生物活性; 相对生物利用度

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 05-0771-07

Synthesis and hepatoprotective activity of Mannich base derivatives of silybin

WANG Bao-jun^{1,2,3}, HAN Min^{2,3}, LI Zhi-yao^{2,3}, CAO Jing^{2,3}, WANG Gen-bei^{2,3},
HE Yi^{2,3*}, DUAN Zhong-yu^{1*}

(1. School of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300131, China;
2. TCM Research Center, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China; 3. State Key Laboratory of Critical
Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Group Co. Ltd, Tianjin 300410, China)

Abstract: Two novel Mannich base derivatives of silybin, SLB-DEA and DHSLB-PIP, were designed and synthesized. All the structures of new Mannich base derivatives of silybin were characterized by ¹H NMR and HR-MS. Their protective action against CCl₄-induced liver injury in mice were investigated. The changes of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were determined and the histopathological changes in liver tissues were examined. Pretreatment with a higher dosage of DHSLB-PIP (40 mg·kg⁻¹) prevented CCl₄-induced liver injury as indicated by the reduced levels of ALT, AST, LDH and TG. Meanwhile, liver histopathological improvement was observed in the model groups. The pharmacokinetics study in rats showed that the relative bioavailability of

收稿日期: 2017-12-04; 修回日期: 2018-01-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51473045); “重大新药创制” 国家科技重大专项资助项目 (2017ZX09301005).

*通讯作者 Tel: 13011324008, E-mail: zyduan@hebut.edu.cn;

Tel: 18102080996, E-mail: heyi@tasly.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1200

SLB-DEA and DHSLB-PIP were 172.5% and 259.8% compared with silybin. All the results suggest that SLB-DEA and DHSLB-PIP may protect liver against injury by CCl_4 and the relative bioavailability was significantly increased, which is worth of further investigation for their druggability.

Key words: silybin derivatives; structure modification; Mannich reaction; biological activity; relative bioavailability

水飞蓟宾用于肝脏疾病的治疗已有两千年的历史,是天然的保肝药物,其作用机制主要是抗氧化、抗脂质过氧化、清除自由基和稳定细胞膜^[1]。同时,水飞蓟宾还广泛用于非酒精性脂肪肝^[2]、抗抑郁、降血脂、保护心肌、抑制癌细胞增殖以及神经保护等多个新适应症的探索开发^[3–5]。但由于水飞蓟宾的脂溶性和水溶性均较差^[6],体内生物利用度低,个体对药物的吸收差异较大,从而降低了水飞蓟宾的临床疗效。为此,国内外学者采用各种制剂技术或化学方法对其进行理化性质优化和结构改造,并系统研究了水飞蓟宾衍生物和不同药理活性之间的构效关系^[7],以期提高生物利用度,发现新型水飞蓟宾候选药物。

Wang 等^[8]研究发现水飞蓟宾磷脂酰胆碱复合物对 CCl_4 诱导的小鼠肝脏保护作用明显。Zarrelli 等^[9]将水飞蓟宾 23 位羟基基团修饰为硫酸、磷酸二酯等基团,提高了水飞蓟宾的水溶性,抗氧化细胞模型实验显示该系列具有更高的抗氧化活性。Zhang 等^[10]采用高压匀质法制备水飞蓟宾纳米晶体自稳定 Pickering 乳液,从而提高水飞蓟宾的口服生物利用度。上述研究均改善了水飞蓟宾在体内的药代动力学行为,具有一定的应用前景。

在对水飞蓟宾进行的众多结构改造及构效关系研究中,尚没有文献报道水飞蓟宾 Mannich 碱衍生物的合成方法及生物活性。Mannich 胺甲基化反应^[11]可以在分子中引入 *N*-烷基官能团,提高母体化合物

的溶解度,增强化合物的生物活性。本文以水飞蓟宾 (SLB) 和 2,3-脱氢水飞蓟宾 (DHSLB) 为先导物,合成两个水飞蓟宾 Mannich 碱衍生物,通过 CCl_4 致小鼠急性肝损伤模型评价其保肝活性;并进一步考察两个衍生物在大鼠体内的药动学行为和相对生物利用度。水飞蓟宾 Mannich 碱衍生物的合成如合成路线 1 所示。

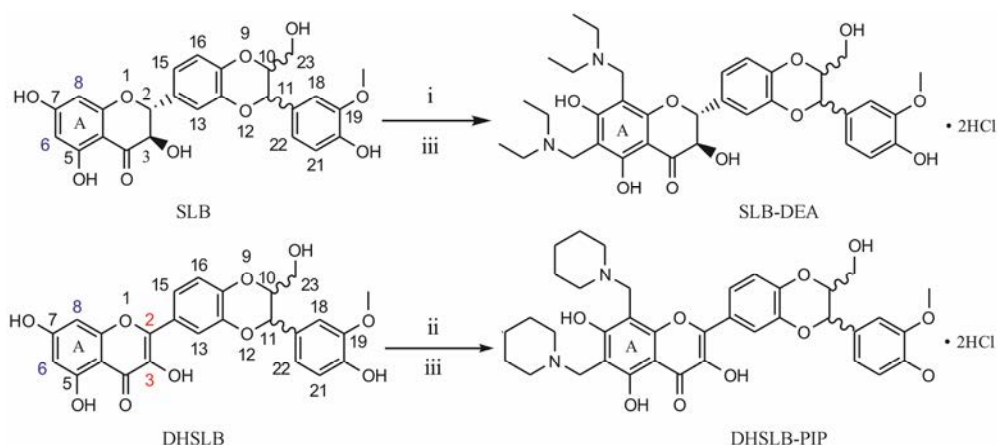
结果与讨论

1 目标化合物的合成

分别以水飞蓟宾和脱氢水飞蓟宾为原料,在甲醛的存在下分别与二乙胺、哌啶发生 Mannich 反应,得到水飞蓟宾 Mannich 碱衍生物 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP,产物经盐酸-甲醇水溶液处理制得其水溶性盐酸盐,化学结构经 $^1\text{H NMR}$ 和 HR-MS 确证。表征数据见表 1。经测定,SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 盐酸盐在纯水中的溶解度大于 $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,溶解性显著提高。

2 目标化合物的抗肝损伤活性评价

2.1 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠肝脏指数的影响 正常组、模型组、SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 高、低剂量组各组间小鼠体质量差异均无统计学意义;但模型组小鼠肝质量、肝脏指数与正常对照组比较显著增加 ($P < 0.05$),提示小鼠急性肝损伤模型成功建立;与模型组比较,SLB-DEA 和



Scheme 1 Synthesis of target compounds. Reagents and conditions: (i) Diethylamine, formaldehyde, methanol, rt. 40 h; (ii) Piperidine, formaldehyde, methanol, rt. 40 h; (iii) Hydrochloric acid, methanol, rt. 0.5 h

Table 1 Physical properties and ^1H NMR and HR-MS data of target compounds

Compd	Appearance	Yield/%	^1H NMR and HR-MS
SLB-DEA	White solid	60.6	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.02–6.80 (6H, m, Ar-H), 5.01 (1H, d, J = 8.2 Hz, 2-H), 4.92 (1H, d, J = 7.6 Hz, 11-H), 4.43 (1H, d, J = 7.5 Hz, 3-H), 4.18–4.16 (1H, m, 10-H), 3.78 (3H, s, -OCH ₃), 3.52 (1H, d, J = 10.2 Hz, 23a-H), 3.33 (1H, d, J = 7.5 Hz, 23b-H), 2.87–2.81 (4H, m, -NCH ₂ -), 1.09–1.01 (6H, m, -CH ₃); HR-MS (ESI) C ₃₅ H ₄₄ N ₂ O ₁₀ [M+H] ⁺ Calcd. 653.307 4, Found: 653.308 5
DHSLB-PIP	Yellow solid	52.9	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.81–6.82 (6H, m, Ar-H), 4.98 (1H, d, J = 8.0 Hz, 11-H), 4.26–4.24 (1H, m, 10-H), 3.78 (3H, s, -OCH ₃), 3.75 (2H, s, -CH ₂ -), 3.67 (2H, s, -CH ₂ -), 3.59 (1H, d, J = 10.1 Hz, 23a-H), 3.39 (1H, d, J = 7.8 Hz, 23b-H), 2.55 (4H, m, -NCH ₂ -), 2.45 (4H, m, -NCH ₂ -), 1.55–1.45 (12H, m, -CH ₂ -); HR-MS (ESI) C ₃₇ H ₄₂ N ₂ O ₁₀ [M+H] ⁺ Calcd. 675.291 8, Found: 675.290 7

DHSLB-PIP 高、低剂量组小鼠肝质量和肝脏指数明显降低 ($P < 0.05$); 初步说明 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 对 CCl₄ 致小鼠肝损伤具有保护作用。各组小鼠肝脏指数测定结果见表 2。

2.2 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST、LDH、TC 及 TG 活性的影响

各剂量组小鼠血清指标测定结果见表 3。测定结果显示, 模型组小鼠腹腔注射 CCl₄ 后与正常组比较, 血清中 ALT、AST、LDH 活性均显著升高 ($P < 0.05$), 表明肝细胞已受到破坏, 原位于细胞内的转氨酶大量入血, 提示造模成功。阳性药水林佳对照组与模型组相比较 ALT、AST、LDH 均显著降低 ($P < 0.05$), 表现出良好的肝保护能力; SLB-DEA 高、低剂量组与模型组相比较 AST、ALT 值均降低, 但差异无统计学意义; DHSLB-PIP 高、低剂量组 ALT、AST、LDH 值较模型组均显著降低 ($P < 0.05$), 其中高剂量组降低幅度最为明显, 已趋于正常组水平, 说明其对 CCl₄

致肝损伤具有较好的保护作用, 并且存在量效关系。

各给药组与正常组相比, 血清中 TC 含量无明显变化。与正常组相比, 模型组血清中 TG 含量明显升高 ($P < 0.05$), 说明 CCl₄ 可诱导小鼠肝脏脂质化。SLB-DEA 组与模型组相比, TC、TG 的含量均无显著差异, 但 DHSLB-PIP 高剂量组 TG 含量显著降低 ($P < 0.05$), 表明 DHSLB-PIP 高剂量对小鼠的血脂升高具有明显的抑制作用。上述研究结果充分证明, DHSLB-PIP 能够增强肝细胞抗损伤能力, 改善肝损伤小鼠的脂类代谢异常, 具有显著的抗肝损伤活性。

2.3 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响

病理切片结果图 1 显示: 正常组 (A) 小鼠肝脏肝组织结构清晰, 肝小叶完整, 肝细胞结构及形态正常, 细胞核大而圆且排列有序, 无炎症出现。模型组 (B) 肝细胞明显损伤, 肝组织结构紊乱, 肝细胞肿胀并出现坏死, 细胞膜不清晰, 细胞核分布杂乱, 并伴有

Table 2 Effects of different dose groups on liver index in mice. $n=8$, $\bar{x} \pm s$. $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

Group	Dose/mg·kg ⁻¹	Body mass/g	Liver mass/g	Liver index/%
Normal control	–	26.27 ± 0.90	1.18 ± 0.31	4.65 ± 0.20
CCl ₄ model	–	25.45 ± 1.47	1.44 ± 0.06 $\Delta\Delta$	5.00 ± 0.32 $\Delta\Delta$
Positive control	40	26.18 ± 1.28	1.29 ± 0.07*	4.62 ± 0.25**
SLB-DEA	20	26.23 ± 0.93	1.23 ± 0.13**	4.67 ± 0.40*
SLB-DEA	40	25.76 ± 1.24	1.18 ± 0.11**	4.57 ± 0.344**
DHSLB-PIP	20	26.05 ± 0.78	1.23 ± 0.08**	4.72 ± 0.27*
DHSLB-PIP	40	26.34 ± 1.40	1.17 ± 0.07**	4.44 ± 0.12**

Table 3 Effects of SLB-DEA and DHSLB-PIP on the activity of ALT, AST, LDH, TC and TG induced by CCl₄ in mice serum. $n=8$, $\bar{x} \pm s$. $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

Group	Dose/mg·kg ⁻¹	ALT/IU·L ⁻¹	AST/IU·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹
Normal control	–	19.94 ± 3.54	72.58 ± 13.09	538.50 ± 121.50	4.15 ± 0.35	0.65 ± 0.13
CCl ₄ model	–	107.74 ± 35.22 $\Delta\Delta$	144.26 ± 29.60 Δ	1 016.13 ± 120.7 $\Delta\Delta$	4.11 ± 0.47	1.71 ± 0.68 Δ
Positive control	40	43.99 ± 16.07*	85.29 ± 12.79**	875.86 ± 142.92*	4.29 ± 0.28	1.45 ± 0.32
SLB-DEA	20	57.63 ± 23.34	118.41 ± 15.59	861.75 ± 111.64**	4.59 ± 0.62	1.85 ± 0.40
SLB-DEA	40	50.10 ± 23.07	102.96 ± 16.40	778.63 ± 120.00*	4.48 ± 0.63	1.90 ± 0.46
DHSLB-PIP	20	52.96 ± 18.72	95.78 ± 18.02*	630.00 ± 88.72**	4.06 ± 0.33	1.04 ± 0.29
DHSLB-PIP	40	36.10 ± 14.98*	83.73 ± 10.53**	671.25 ± 151.11**	4.25 ± 0.46	0.53 ± 0.17*

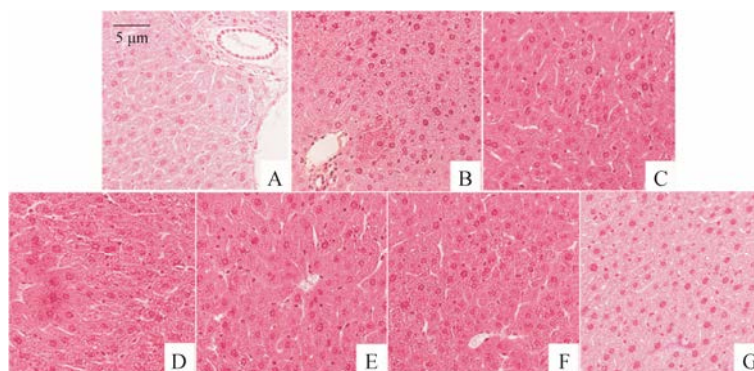


Figure 1 Liver histological evaluation of SLB-DEA and DHSLB-PIP treated mice. A: Normal control; B: CCl₄ group; C: Positive control; D: SLB-DEA (20 mg·kg⁻¹); E: SLB-DEA (40 mg·kg⁻¹); F: DHSLB-PIP (20 mg·kg⁻¹); G: DHSLB-PIP (40 mg·kg⁻¹)

弥漫性炎症细胞浸润现象。水林佳组 (C) 小鼠肝脏较红润, 肝组织结构相对清晰, 细胞膜基本清楚, 细胞核排列正常, 炎症细胞浸润现象得到明显改善。与模型组相比, SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 高、低剂量组 (D、E、F、G) 小鼠肝细胞病理损伤程度均减轻, 肝细胞结构比较完整, 肝细胞排列相对整齐, 高剂量组较低剂量组中央静脉周围的炎症细胞浸润情况得到明显改善; 其中 DHSLB-PIP 高剂量组改善程度与水林佳对照组相似。以上结果表明, SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 均能减轻 CCl₄ 对小鼠肝组织的损伤程度。

3 大鼠体内药代动力学研究

取待测血浆样品, 按血浆处理方法处理后, 按照前期确定的色谱和质谱条件进行测定。3 组供试品在大鼠体内的药-时曲线见图 2。

采用 DAS 3.2.6 软件, 以非房室模型拟合处理平均血药浓度数据, 计算各个成分的药动学参数; 采用 SPSS 17.0 计算各成分组间的显著性差异。结果见表 4; 结果表明, SLB-DEA 在大鼠血浆中的 t_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0-8 h}$ 分别是水飞蓟宾的 11%、5.64 倍和 1.72 倍; DHSLB-PIP 在大鼠血浆中的 t_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0-8 h}$ 分别是水飞蓟宾的 7.4%、4.11 倍和 2.60 倍, SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 在大鼠体内的达峰时间明显缩短, 药物暴露量显著增加。利用公式 (相对生物利用度 =

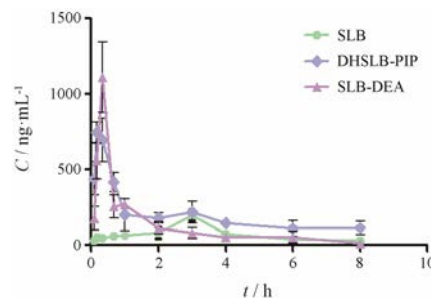


Figure 2 Plasma concentration-time curves of three components in rats *in vivo* in three groups. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

$AUC_{0-8 h \text{ 衍生物}}/AUC_{0-8 h \text{ 原型药物}} \times 100\%$) 计算相对生物利用度, SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 的相对生物利用度分别为 172.5% 和 259.8%; 计算结果表明, 与水溶性 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 在大鼠体内的吸收明显增加, 口服生物利用度显著提高。

4 小结

水飞蓟宾和脱氢水飞蓟宾均为黄酮木质素类化合物, 其中 A 环 C-6 和 C-8 为亲核反应中心^[12]。本文通过 A 环 C-6 和 C-8 位 H 原子与二级胺在甲醛水溶液中进行 Mannich 反应, 将氨基引入母体结构中, 并通过酸化成盐得到两个水溶性的水飞蓟宾 Mannich 碱衍生物 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP。¹HNMR 和 HR-MS 等数据证明二者均为 6,8-双取代衍生物。氨基基

Table 4 Pharmacokinetic parameters of three groups of rats. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SLB group

PK parameter	SLB	SLB-DEA	DHSLB-PIP
$AUC_{0-8 h} / \mu\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	588.792 ± 45.805	1 015.639 ± 136.986**	1 530.818 ± 145.907**
$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	737.526 ± 253.826	1 069.023 ± 211.746*	1 863.966 ± 140.540**
$MRT_{0-8 h} / \text{h}$	3.395 ± 0.343	1.791 ± 0.460**	2.912 ± 0.214**
$MRT_{0-\infty} / \text{h}$	5.235 ± 3.071	2.185 ± 0.985**	4.809 ± 1.829
$t_{1/2} / \text{h}$	2.788 ± 2.713	1.646 ± 0.813*	3.245 ± 1.758
t_{max} / h	3.000 ± 0.235	0.333 ± 0.012**	0.222 ± 0.032**
$CL_z / F L \cdot (\text{h} \cdot \text{kg})^{-1}$	72.612 ± 21.032	71.965 ± 13.004	41.627 ± 3.109**
$C_{max} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	197.333 ± 35.698	1 112.000 ± 229.678**	811.333 ± 53.003**

基团的引入可以提高水飞蓟宾母体的水溶性,从而提高生物利用度,同时与各类靶点蛋白结合能力更强的 N 原子可以大大改善化合物的生物活性。

本文采用经典的 CCl_4 致小鼠急性肝损伤模型评价目标化合物的抗肝损伤活性,此模型广泛用于肝损伤研究,能准确稳定地反映肝细胞的功能、代谢和形态学变化^[13,14]。其作用机制是 CCl_4 进入体内经肝药酶 P-450 激活,产生 CCl_3 自由基和 Cl 自由基^[15],与肝细胞生物膜上的脂质发生过氧化反应,生成脂质过氧化物,同时引起 Ca^{2+} 的内流,增加细胞膜的通透性,使肝细胞内的转氨酶外流入血,因此血清转氨酶水平的升高在一定程度上能够反映肝细胞损伤程度^[16,17]。而血清中转氨酶的浓度升高,尤以 AST 和 ALT 变化最为显著^[18],因此 ALT 和 AST 是衡量肝脏损伤程度的重要指标^[19,20]。

本研究发现小鼠给予 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 后均能有效抑制血清中 AST、ALT 水平的升高,尤其以 DHSLB-PIP 高剂量保护作用最为显著 ($P < 0.01$),与阳性对照药物水林佳效果相当。说明 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 能增强肝细胞抗损伤能力,增加膜的稳定性,对肝脏有一定的保护作用。同时, CCl_4 造成的肝损伤模型中会产生大量的过氧化物自由基,这些自由基可造成机体的损害,诱导小鼠肝细胞发生不同程度的脂肪性变。模型组小鼠血清所含 TG 显著升高,而高剂量 DHSLB-PIP 可改善肝损伤小鼠的脂类代谢异常, TG 含量显著降低,恢复至正常组水平,其作用机制可能有:降低肝内脂质过氧化反应,改善细胞免疫功能等。

大鼠体内的药代动力学研究表明, SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 相对于 SLB 的相对生物利用度分别为 172.5% 和 259.8%, C_{\max} 显著增加, T_{\max} 明显缩短,说明 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 体内吸收迅速,生物利用度显著提高。这可能是因为 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 盐酸盐的溶解度得到显著改善,增加了药物透过胃肠上皮细胞的能力,从而增加药物的转运、促进药物吸收,使生物利用度得到明显提升^[21-23]。

本研究设计合成的水飞蓟宾衍生物 SLB-DEA 和 DHSLB-PIP 具有良好的水溶性及抗肝损伤生物活性,且生物利用度相较于水飞蓟宾均显著提高,因此,可作为新药候选物进一步研究其成药性。

实验部分

AB Sciex 三重四极杆 5500TM LC/MS/MS; SHIMADZU UPLC (日本岛津); 超高效液相色谱

(Waters ACQUITY UPLC); Waters Q-TOF Premier 质谱仪; Varian INOVA 400 MHz 核磁共振仪; 全自动生化仪 (7020 型, 日立公司生产); Milli-Q 超纯水系统 (Millipore 公司); 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。赛多利斯 BT25S 型分析天平; HGC24A 24 孔氮吹仪 (天津市恒奥科技发展有限公司); XW-80A 微型漩涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司); TG 16W 微量高速离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司)。

水飞蓟宾胶囊 (水林佳, 规格: 每粒 35 mg, 天津天士力圣特制药有限公司); SLB-DEA, 纯度 98%, DHSLB-PIP, 纯度 97%, 自行制备。二乙胺、哌啶, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 37% 甲醛水溶液, 分析纯, 阿拉丁试剂有限公司; 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 测定试剂均购于和光试剂; 其他试剂均为分析纯, 天津康科德科技有限公司。

SPF 级雄性 ICR 小鼠 70 只, 体重 20~22 g, 动物合格证号: SCXK (京) 2017-0001; Wistar 大鼠 (6 周龄) 9 只, 体质量 300~330 g, 许可证: SCXK (京) 2018-0001, 均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1 化学合成

1.1 水飞蓟宾二乙胺 Mannich 碱 (SLB-DEA) 的合成 将水飞蓟宾 (5.0 g, 10.4 mmol)、37% 甲醛水溶液 (3.37 g, 41.5 mmol)、二乙胺 (3.03 g, 41.5 mmol) 置于 25 mL 甲醇中, 室温搅拌。TLC (二氯甲烷-甲醇=10:1) 跟踪反应, 40 h 反应完全, 终止反应。减压旋干得粗品 5.7 g, 加入乙酸乙酯 100 mL 打浆 2 h, 减压过滤后, 经硅胶柱色谱 (CH_2Cl_2 - CH_3OH = 10:1~8:1) 分离得 SLB-DEA 4.1 g (收率 60.6%)。将制得的 SLB-DEA 溶于甲醇-盐酸溶液 (100 mL) 中, 搅拌 0.5 h, 经浓缩干燥得到 SLB-DEA 盐酸盐 4.3 g。

1.2 脱氢水飞蓟宾哌啶 Mannich 碱 (DHSLB-PIP) 的合成 将脱氢水飞蓟宾 (5.0 g, 10.4 mmol)、37% 甲醛水溶液 (3.38 g, 41.7 mmol)、哌啶 (3.55 g, 41.7 mmol) 置于 25 mL 甲醇中, 室温搅拌, TLC (二氯甲烷-甲醇=10:1) 跟踪反应, 40 h 反应完全, 终止反应。减压旋干得粗品 6.5 g, 加入乙酸乙酯 100 mL 打浆 2 h, 减压过滤后, 经硅胶柱色谱 (CH_2Cl_2 - CH_3OH = 10:1~7:1) 分离得 DHSLB-PIP 3.7 g (收率 52.9%)。将制得的 DHSLB-PIP 溶于甲醇-盐酸溶液 (100 mL) 中, 搅拌 0.5 h, 经浓缩干燥得 DHSLB-PIP 盐酸盐 3.9 g。

2 抗 CCl_4 致急性肝损伤活性研究

将动物称重, 编号, 随机分组。实验分为 7 组, 分

别为正常组、模型组、阳性药组 (水林佳, $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、SLB-DEA 低剂量组 ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、SLB-DEA 高剂量组 ($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、DHSLB-PIP 低剂量组 ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、DHSLB-PIP 高剂量组 ($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, 适应性饲养 3 天, 除正常组和模型组分别给予相同体积的纯水和溶媒 (2% 吐温水溶液) 灌胃外, 其余各组给予相应剂量灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 8 天。于第 8 天末次给药 2 h 后立即采用 0.08% CCl_4 花生油溶液按 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射。随即禁食不禁水, 造模后 16 h 摘眼球取血约 1 mL, $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取血清 -40°C 冻存待测。采用全自动生化仪测定血清中 ALT、AST、LDH、TC 及 TG 水平; 同时取肝脏, 用生理盐水冲洗组织样品以除去血液, 滤纸吸干并称重, 计算肝脏指数: 肝脏指数 = 肝质量 (g)/ 体质量 (g) $\times 100\%$ 。待称重完成后取肝左叶, 固定于组织固定液中, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 在光学显微镜下观察肝组织病理学变化。采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行统计学处理, 小鼠血清中 ALT、AST、LDH、TG 及 TC 的活性及小鼠的肝体比指数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 大鼠体内药代动力学研究

3.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18 $1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, 流动相: 甲醇 (A): 0.1% 甲酸水 (B); 流速: $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 梯度洗脱程序: 0~1.5 min 为 10% (v/v) A, 1.5~2.5 min 为 10% A~100% A, 2.5~2.9 min 为 100% A, 2.9~3.3 min 为 100% A~10% A, 3.3~4.5 min 为 10% A; 进样量: $10 \mu\text{L}$; 柱温: 40°C 。

3.2 质谱条件 检测模式为 MRM 模式, 质谱扫描方式进行样品分析, 0.1 min 前经旁路排出不进质谱。SLB-DEA、DHSLB-PIP 和内标艾司唑仑采用正离子模式分析, 电喷雾电压为 4800 V , 离子化温度为 480°C ; 水飞蓟宾和内标地高辛采用负离子模式检测, 电喷雾电压为 -4500 V ; 离子化温度为 550°C ; 雾化气与加热气均为氮气, 45 psi (1 psi $\approx 6.9 \text{ kPa}$); 气帘气压 20 psi; 用于定量分析的离子反应分别是 m/z 481.1 $\rightarrow m/z$ 300.1 (水飞蓟宾)、 m/z 653.0 $\rightarrow m/z$ 580.3 (SLB-DEA)、 m/z 675.2 $\rightarrow m/z$ 575.1 (DHSLB-PIP)、 m/z 779.3 $\rightarrow m/z$ 649.2 (内标地高辛)、 m/z 321.5 $\rightarrow m/z$ 152.1 (内标艾司唑仑), 碰撞能分别是 -27 、 36 、 42 、 -53 和 47 eV 。使用 Analyst® 1.6.2 软件采集并处理数据。

3.3 血浆样品采集 将 9 只 Wistar 大鼠随机分为 3 组, 每组 3 只, 实验前 12 h 禁食不禁水。3 组大鼠分别等摩尔灌胃给药 SLB ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、SLB-DEA ($75.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、SLB-PIP ($77.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。分别于给药前及给药 0.083、0.333、0.667、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 h 后于眼眶静脉丛取血 $300 \mu\text{L}$, 置于肝素离心管中, 血浆 $4500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层血浆 $150 \mu\text{L}$, 置于 -20°C 保存, 待测。

3.4 血浆样品处理方法 取 $50 \mu\text{L}$ 血浆, 正、负谱分别加入内标 (艾司唑仑 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、地高辛 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $100 \mu\text{L}$, 加乙酸乙酯 3 mL , 涡旋 3 min, 于 $4500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层有机相, 30°C 氮气吹干, 加入初始比例流动相 $100 \mu\text{L}$ 复溶, 取 $10 \mu\text{L}$ 进样。采用 DAS 3.2.6 软件, 以非房室模型拟合处理平均血药浓度数据, 计算各个成分的药动学参数; 采用 SPSS 17.0 计算各成分组间的显著性差异。

References

- [1] Yuan X, Hao HP, Wang H, et al. Reversing effects of silybin on TAA-induced hepatic CYP3A dysfunction through PXR regulation [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11: 645–652.
- [2] Salamone F, Galvano F, Cappello F, et al. Silibinin modulates lipid homeostasis and inhibits nuclear factor kappa B activation in experimental nonalcoholic steatohepatitis [J]. Transl Res, 2012, 159: 477–486.
- [3] Shao S, Liu CY, Gao YH. Research advances in silybin in treatment of drug-induced liver injury [J]. J Clin Hepatol (临床肝胆病杂志), 2017, 33: 1179–1182.
- [4] Wang HJ, Jiang YY, Lu P, et al. An updated review at molecular pharmacological level for the mechanism of anti-tumor, antioxidant and immunoregulatory action of silybin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 413–421.
- [5] Antoszczak M, Klejborowska G, Kruszyk M, et al. Synthesis and antiproliferative activity of silybin conjugates with salinomycin and monensin [J]. Chem Biol Drug Design, 2015, 86: 1378–1386.
- [6] Ferreira LP, Cunha BPD, Kuster RM, et al. Synthesis and chemical modification of poly(butylene succinate) with rutin useful to the release of silybin [J]. Ind Crops Prod, 2017, 97: 599–611.
- [7] Kim NC, Graf TN, Sparacino CM, et al. Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*) [J]. Org Biomol Chem, 2003, 1: 1684–1689.
- [8] Wang Y, Zhang AY, Zhang X, et al. Comparison of the protective effect of silibinin phosphatidylcholine complex and

- silibinin on mice liver injury by CCl_4 [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2015, 35: 71–73.
- [9] Zarrelli A, Sgambato A, Petito V, et al. New C-23 modified of silybin and 2,3-dehydrosilybin: synthesis and preliminary evaluation of antioxidant properties [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 4389–4392.
- [10] Zhang JF, Liu C, Zhang J, et al. Preparation and evaluation of silybin nanocrystallines self-stabilizing Pickering emulsion [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2016, 51: 813–820.
- [11] Saadatjoo N, Golshekan M, Shariati S, et al. Ultrasound-assisted synthesis of β -amino ketones *via* a Mannich reaction catalyzed by Fe_3O_4 magnetite nanoparticles as an efficient, recyclable and heterogeneous catalyst [J]. *Arab J Chem*, 2017, 10: 735–741.
- [12] Wu XM, Liu GM, Feng YB, et al. Silybin-derived flavonolignans and their structure-activity relationships: research advances [J]. *J Int Pharm Res*, 2010, 37: 187–197.
- [13] Alrazuqi RAM, Aljawad FH, Hussaini JAA, et al. Hepatoprotective effect of glycyrrhiza glabra in carbon tetrachloride-induced model of acute liver injury [J]. *J Physiol Pharmacol Adv*, 2012, 2: 259–263.
- [14] Akihara R, Homma T, Lee J, et al. Ablation of aldehyde reductase aggravates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury involving oxidative stress and endoplasmic reticulum stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478: 765–771.
- [15] Makni M, Chtourou Y, Fetoui H, et al. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668: 133–139.
- [16] Beek JH, Moor MH, Geus EJ, et al. The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST [J]. *Behav Genet*, 2013, 43: 329–340.
- [17] Costa MM, França RT, Silva AS, et al. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs [J]. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2012, 21: 243–248.
- [18] He LY, Guo YX, Li C, et al. Progress in the biomarker discovery for drug-induced liver injury [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2015, 50: 959–965.
- [19] Yang J, Zhu D, Ju B, et al. Hepatoprotective effects of *Gentianella turkestanerum* extracts on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9: 569–579.
- [20] Milic N, Milosevic N, Suvajdzic L, et al. New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*) [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8: 1801–1810.
- [21] Wu W, Wang Y, Que L. Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 63: 288–294.
- [22] Wang Y, Wang S, Firempong CK, et al. Enhanced solubility and bioavailability of naringenin *via* liposomal nanoformulation: preparation and *in vitro*, and *in vivo*, evaluations [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2016, 18: 586–594.
- [23] Xie Y, Yi Y, Hu X, et al. Synchronous microencapsulation of multiple components in silymarin into PLGA nanoparticles by an emulsification/solvent evaporation method [J]. *Pharm Dev Technol*, 2016, 21: 672–679.