

灯盏乙素酯类前药的合成、理化性质及降解研究

操 锋, 郭健新, 平其能*, 邵 云, 梁 静

(中国药科大学 药剂教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 对口服难吸收中药活性成分灯盏乙素进行结构改造, 为寻找和设计合理前药及其剂型提供依据。方法 通过先成盐后酯化的方法合成灯盏乙素乙酯、苄酯并改进文献方法合成羟乙酰胺酯, 用质谱和氢谱确证结构。研究 3 种前药在不同 pH 水溶液中的稳定性、溶解度、分配系数和在入血浆中的降解。制备灯盏乙素羟乙酰胺酯环糊精包合物和乳剂, 比较包合物和乳剂在肠液中对前药的保护作用, 考察该前药在不同肠段黏膜匀浆中的降解情况。结果 合成的 3 种前药经确证为目标物, 灯盏乙素羟乙酰胺酯在缓冲液 (pH 4.2) 和水中的溶解度比灯盏乙素分别提高近 10 倍和 35 倍, 分配系数也由原来的 -2.56 提高到 1.48; 该酯水溶液的稳定性较好 ($t_{1/2} \approx 16$ d, pH 4.2), 在入血浆的半衰期最短 ($t_{1/2} \approx 7$ min), 但在肠黏膜匀浆中的降解可能影响酯的吸收, 不同肠段黏膜匀浆降解羟乙酰胺酯的次序为: 十二指肠 > 回肠 > 空肠 > 结肠。乳剂在肠黏膜匀浆中对前药有显著的保护作用, 包合物次之。结论 与灯盏乙素乙酯和苄酯比较, 羟乙酰胺酯的理化性质较好, 但其在肠道中的稳定性有待提高, 可以选择乳剂或结肠定位给药减少前药的降解。

关键词: 灯盏乙素; 前药; 合成; 羟乙酰胺酯; 理化性质; 小肠降解; 乳剂; 包合物

中图分类号: R916; R943 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)07 - 0595 - 08

Ester prodrug of scutellarin: synthesis, physicochemical property and degradation

CAO Feng, GUO Jian-xin, PING Qi-neng*, SHAO Yun, LIANG Jing

(Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

Abstract: Aim To establish the fundamentals for the design of scutellarin prodrug and formulation with feasible physicochemical and biopharmaceutical properties by esterifying scutellarin, an active component with poor absorption extracted from *Erigeron breviscapus* of Chinese medicine. **Methods** With the method of salifying followed by esterifying, ethyl and benzyl ester of scutellarin were synthesized. Glycolamide ester of scutellarin was also synthesized with an improved method. Their structures were confirmed by MS and ^1H NMR. The solubility and partition coefficient of the prodrugs were determined and their degradations were investigated in various buffers and in human plasma. The emulsion and cyclodextrin complex of glycolamide ester were prepared and the protection of the ester from degradation was compared in the intestinal tract contents. Furthermore, the degradation of glycolamide ester in the homogenates of various intestinal segments was studied. **Results** Three prodrugs were synthesized successfully and their structures were confirmed. Glycolamide ester of scutellarin showed better stability in the aqueous solution ($t_{1/2} \approx 16$ d, pH 4.2) and the shortest half life in the human serum ($t_{1/2} \approx 7$ min). Compared with scutellarin, the solubility of glycolamide ester was increased about ten times in pH 4.0 buffer, and about thirty five times in water. Partition coefficient of the glycolamide ester increased significantly from -2.56 to 1.48. However, the ester degradation in the homogenates of intestinal mucus would be an obstacle for its absorption. The degradation rates were in the order duodenum > ileum >

收稿日期: 2005-10-17.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (30300440).

* 通讯作者 Tel: 86 - 25 - 3271299, Fax: 86 - 25 - 3301606, E-mail: pingqn@cpu.edu.cn

jejunum > colon. The emulsion showed a better protection of glycolamide ester from the degradation than cyclodextrin complex. **Conclusion** Glycolamide ester of scutellarin shows better physicochemical properties than ethyl and benzyl ester of scutellarin, but its stability in intestinal tract needs to be improved. The emulsion or / and colon-targeted delivery may be selected as one of strategies to decrease the presystemic degradation.

Key words: scutellarin; prodrug; synthesis; glycolamide ester; physicochemical property; intestinal degradation; emulsion; cyclodextrin complex

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国内外药物化学家研究的热点。灯盏乙素 (scutellarin) 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、降低外周阻力、减少血小板计数和抑制血小板凝集等作用^[1-3]。但由于其溶解性和渗透性差, 犬口服绝对生物利用度只有 0.4%^[4], 严重影响了其口服应用的效果^[5]。

前药是母体药物的衍生物, 在体内经过化学或酶降解释放出母体药物发挥药效。酯类前药是羧酸型母体药物的经典设计目标之一, 目前已有简单的脂肪族和芳香族的烷基酯类前药上市, 如依拉普利 (enalapril)^[6]、莫西普利 (moexipril)^[7]、奥司他伟 (oseltamivir)^[8] 及头孢呋新酯 (cefuroxime axetil)^[9] 等。羟乙酰胺酯类前药由于理化性质好, 血浆半衰期短受到关注, 目前上市的有卡莫他特 (camostat mesylate)^[10]。一些酯类前药改善了原药的理化性质和渗透性但仍不能显著提高口服吸收。这是因为这些药物或前药可能是 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance protein 2, MRP2) 等外排泵的底物^[11], 另外也可能是肠道和肠黏膜存在的大量代谢酶, 如酯酶、细胞色素 P450 酶和葡萄糖醛酸转化酶等^[12], 前药在到达血液循环前发生降解, 阻止了前药发挥作用。国外有报道^[13] 采用乳剂避免酯类前药的肠道降解, 对酯类前药在肠道和肠黏膜降解也有一些研究报道^[14,15]。

本文根据灯盏乙素的结构特点, 合成了 3 个分属不同类别的酯类前药: 灯盏乙素乙酯 (D1)、灯盏乙素苄酯 (D2) 和灯盏乙素羟乙酰胺酯 (D3)。对 3 种前药在不同 pH 条件下水溶液中的降解、人血浆中的降解、溶解性及油水分配系数等理化性质进行了研究。选择了理化性质较适宜的 D3 进行了肠道和肠黏膜的降解考察, 并比较了乳剂和包合物对 D3 在肠黏膜匀浆中降解的保护作用, 同时考察了 D3 在不同肠段黏膜的降解, 为灯盏乙素前药及其剂型的设计提供依据和参考。

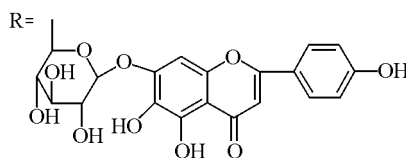
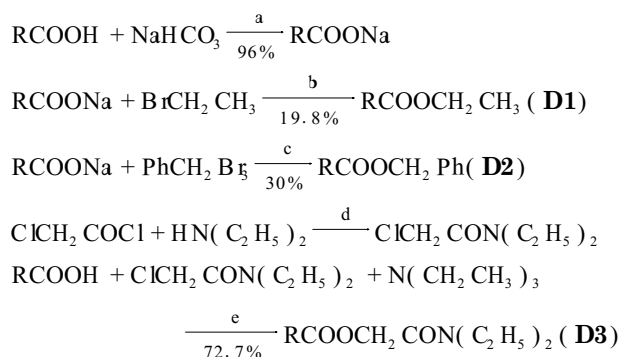
材料和方法

仪器 岛津高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu), LC-10AT 高压泵, SPD-10A 紫外可见检测器, CTO-10AS 型柱温控制箱, SIL-10AD 自动进样器; SCL-10A 色谱工作站; JY92-II 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝科器研究所); Sigma 3K3D 冷冻离心机 (Sigma, USA); Buchi 190 小型喷雾干燥机 (瑞士 Buchi 公司)。

药品与试剂 灯盏乙素 (云南玉溪万方天然药物有限公司, 纯度为含灯盏乙素 90.28%, 批号: 20031203); 大豆磷脂 (上海太伟药业有限公司, PC% > 92%); 2-羟丙基-β-环糊精 (江苏泰兴一鸣精细化工有限公司); Labrafac[®] CC 和 Labrasol (法国佳法赛公司); HBSS 转运液为含有 25 mmol·L⁻¹ 葡萄糖和 10 mmol·L⁻¹ HEPES 的 HBSS 缓冲液 (pH 7.0); 考马斯亮蓝总蛋白定量试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

动物 SD 雄性大鼠, 体重 (250 ± 20) g, 中国药科大学动物中心提供。

前药的合成 3 种前药的合成见路线图 1。



a: H₂O, 50 °C, 1 h; b: DMF, KI, 120 °C, 3 h; c: DMF, 120 °C, 1.5 h; d: benzene, 0 °C, 0.5 h; e: TEA, KI, 120 °C, 3 h

Scheme 1 Synthesis of the prodrugs

灯盏乙素钠盐的合成 灯盏乙素 5 g (0.011 mol) 加入 100 mL 烧杯中,加水 50 mL,机械搅拌,0.5 h 内分批加入 NaHCO_3 0.89 g (0.011 mol),室温搅拌 0.5 h 后在 50 °C 反应 0.5 h,降至室温,减压过滤浓缩后烘箱干燥得钠盐 5.12 g。

灯盏乙素乙酯 (D1) 的合成 将钠盐 (0.015 mol) 7.26 g 混悬于 DMF 30 mL 中,加入溴乙烷 (0.045 mol) 3.37 mL 和催化量的 KI 0.1 g (6×10^{-4} mol),磁力搅拌,升温到 120 °C, TLC 检测反应 (甲醇-水 = 15:1),约 3 h 后停止反应。倒入 100 mL 的冰水混合物中,乙酸乙酯提取 (4 × 50 mL),合并酯层,依次用 2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 30 mL,饱和的 NaCl 溶液洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥过夜,浓缩得油状物,加乙酸乙酯少量碾磨后置于冰箱中冷藏过夜,过滤得黄色固体,烘干,甲醇重结晶得淡黄色固体 1.4 g。

灯盏乙素苄酯 (D2) 的合成 将钠盐 (0.01 mol) 4.84 g 混悬于 DMF 20 mL 中,加入溴苄 (0.01 mol) 1.2 mL,磁力搅拌升温到 120 °C, TLC 检测反应 (石油醚-丙酮 = 3:1),1.5 h 后停止反应。倒入 70 mL 的冷水混合物中,乙酸乙酯提取 (4 × 50 mL),合并酯层,饱和 NaCl 溶液洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥过夜,浓缩得油状物,加乙酸乙酯少量碾磨后置于冰箱中冷藏过夜,过滤烘干得淡黄色固体 1.6 g。

N,N-二乙基-2-氯乙酰胺的合成 将二乙胺 11.9 mL (0.11 mol) 和苯 20 mL 加入二口烧瓶中,加干燥管,磁力搅拌,冰盐浴冷至 0 °C,从恒压滴液漏斗中缓慢滴加氯乙酰胺 (0.11 mol) 7.9 mL,维持反应在 10 ~ 15 °C,约 1 h 滴加完毕,撤除冰浴自然升温搅拌 0.5 h,回流 1 h,水 15 mL 洗两次,合并有机层,无水 Na_2SO_4 干燥过夜,常压过滤后浓缩得浅红色油状物,直接用于下一步合成。

灯盏乙素-(N,N-二乙基)-2-羟乙酰胺酯 (D3) 的合成 灯盏乙素 (0.11 mol) 5 g 加入 50 mL 二口圆底烧瓶中,依次加入 N,N-二乙基-2-氯乙酰胺 (0.012 mol) 1.79 g,三乙胺 1.2 g, DMF 20 mL 和 KI 0.15 g,120 °C 反应, TLC 检测反应 (甲醇-水 = 20:1),约 3 h 后停止反应。倒入 50 mL 的冰水混合物中,乙酸乙酯提取 (4 × 50 mL),合并有机层,依次用 2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 30 mL, 2% Na_2HCO_3 30 mL,饱和 NaCl 溶液洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥过夜,常压过滤后浓缩得油状物,加乙酸乙酯少量碾磨后置于冰箱中冷藏过夜,过滤得淡黄色固体 4.52 g。

前药在不同 pH 水溶液中的降解动力学研究 根据文献^[16],前药的降解研究是在 37 °C 下 pH 1.2

和 2.6 的溶液及 pH 4.2, 5.6, 7.4 和 9.0 的缓冲液 ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\mu = 0.5$) 中进行的。3 种前药的降解符合假一级动力学。

前药在人血浆中的降解动力学研究 根据文献^[17],将新鲜人血浆用 pH 7.4 等渗磷酸盐缓冲液 (IPBS) 稀释成 80% 后进行 D3 的降解研究。D1 和 D2 的 $t_{1/2}$ 直接由斜率求得。D3 的 $t_{1/2}$ 直接由图中降解曲线获得。

溶解度的测定 直接在 pH 4.2 的邻苯二甲酸钾的缓冲液 (由不同 pH 水溶液的降解动力学研究结果可知, pH 4.2 时 3 种前药较稳定) 和去离子水中进行。过量的前药加入 2 mL 的介质中,超声 10 min 后恒温 37 °C 下, $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌 24 h, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,滤液用 HPLC 测定含量。每组实验 3 份,同时平行测定了灯盏乙素在两种介质中的溶解度。

油水分配系数的研究 根据文献^[16],3 种前药和灯盏花素的分配系数在正辛醇和 pH 7.4 的 IPBS 中研究。

D3 羟丙环糊精包合物的制备 根据 Sinha 等^[18] 的制备包合物方法并加以改进。将摩尔比为 2:1 的 2-羟丙基-β-环糊精 1.30 g 和前药 D3 0.25 g 溶于 50% 的乙醇中,室温磁力搅拌 0.5 h 后喷雾干燥得到包合物。

D3 乳剂的制备 根据 Nicolaos 等^[19] 的报道加以改善制备 D3 的乳剂。将 D3 10 mg 于 80 °C 在氮气保护下溶于含有 Labrafac® CC 0.8 g, Labrasol 0.2 g 和大豆磷脂 0.16 g 的混合油相中,水相为 Tween 20 0.04 g 和水 5.5 g 的混合液。将水相于 80 °C 时加入等温的油相,高速搅拌得到初乳。冰浴下细胞破碎机探头式超声 (200 W, 120 s) 得乳剂,调节至 pH 4.5 后冲氮气保存。

大鼠小肠液和肠黏膜的制备及蛋白测定

肠液的制备 SD 雄性大鼠禁食 12 h,麻醉,固定于恒温板上。沿大鼠腹中线切开腹腔,自幽门下 3 cm 处开始结扎 50 cm 长的小肠囊,加入 HBSS 转运液 5 mL,静置 5 min 后排出, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 -23 °C 冷冻保存备用 (pH 6.8),测其蛋白浓度。

肠黏膜的制备 将制备好肠液的大鼠立即取出十二指肠约 10 cm,空肠 15 cm,回肠 15 cm,结肠 10 cm,用冰 HBSS 转运液 4 mL 冲洗,将肠段剖开,用显微玻片于冰冷玻璃板上刮去黏膜,立即冷冻,称量后以 $5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 计算加入 HBSS 转运液,组织匀浆后在冷冻离心机上 4 °C $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取

上清液 (pH 7.0) 冷冻保存备用, 测其蛋白浓度。

根据考马斯亮蓝总蛋白定量试剂盒测定肠液和肠黏膜的蛋白浓度。

包合物和乳剂在小肠液中对前药保护作用的比较 根据蛋白活性的线性范围和前药的检测要求, 先进行预实验确定蛋白的浓度。将肠液用 HBSS 转运液稀释至 2 mL, 调节蛋白浓度至 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C 水浴加热 5 min, 分别加入 D3 的 DMSO 储液 15 μL , 乳剂及包合物水溶液, 使 D3 的浓度约为 $1.3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 立即涡旋, 于 0, 10, 30, 50, 70 及 90 min 取样 100 μL , 加入 -23°C 的乙腈 200 μL , 涡旋均匀后 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 取上清液进样 60 μL 。由标准曲线方程求得各浓度, 计算各时间点的剩余百分率, 以剩余百分率 (C_t/C_0) 对时间 (T) 作图, 考察在肠液中乳剂和包合物对 D3 的保护作用。对照组为 D3 的 DMSO 储液 15 μL 直接加入 HBSS 转运液 2 mL。

不同肠段肠黏膜匀浆对前药降解的比较研究 调节黏膜匀浆蛋白浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加入 D3 的 DMSO 储液, 使其浓度约为 $2.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 十二指肠匀浆的取样时间为 0, 5, 10, 20 及 30 min, 空肠, 回肠和结肠匀浆的取样时间为 0, 5, 10, 20, 30, 40 及 60 min, 其他操作同上, 考察 D3 在各肠段黏膜匀浆中的降解情况。

分析方法 (1) 色谱条件 色谱柱为 Shimadzu ODS 柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-醋酸-三乙胺 (53: 47: 0.1: 0.1), 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 334 nm, 柱温 30°C 。(2) 标准溶液的配制 精密称取自制前药配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甲醇溶液, 定量吸取该溶液分别用流动相稀释配成系列标准溶液, 取 20 μL 进样分析, 绘制峰面积 (A) 对浓度 (C) 的 3 个标准曲线分别用于 3 种前药的理化性质研究的分析。(3) 肠液和黏膜样品的处理 精密移取肠液或黏膜液 100 μL , 加入 -23°C 的乙腈 200 μL , 涡旋均匀后 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 取上清液 60 μL 进样。(4) D3 肠液和黏膜样品中的标准曲线 精密移取稀释好的空白肠液和混合黏膜液 2 mL 加入一定浓度的 D3 的标准溶液使其浓度依次为 0.5, 1, 4, 8, 10 和 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按照肠液和黏膜样品的处理方法测定标准曲线。(5) 方法回收率实验 精密移取稀释好的空白肠液和黏膜液 2 mL 加入一定浓度的 D3 的标准溶液配制成含 D3 1, 4 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 3 种浓度, 按肠液和黏膜样品的处理方法操作, 测定回收率。(6) 方法精密度试

验 同上配制低、中、高相同浓度的 D3 样品, 分别测定日内与日间 (5 d) 精密度。

结果

1 前药 D1, D2 和 D3 的熔点、质谱及氢谱

1.1 灯盏乙素乙酯 (D1) 收率 19.8%; mp $257 \sim 259^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.73 (1H, s, 5-OH), 10.38 (1H, s, 6-OH), 8.60 (1H, s, 4'-OH), 7.92 ~ 7.96 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.00 (1H, s, 8-H), 6.86 ~ 6.95 (2H, d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 3'-H, 5'-H), 6.82 (1H, s, 3-H), 5.47 ~ 5.53 (2H, m, 1''-H, 5''-H), 5.28 (2H, m, -CH₂-), 4.12 ~ 4.18 (3H, m, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 2.50 ~ 3.46 (3H, m, other sugar protons), 1.21 (3H, t, $J = 4.4 \text{ Hz}$, -CH₃-); ESI(-)-MS (m/z): 489.1 [M - H]⁻; 液相分析结果表明含量大于 98%。

1.2 灯盏乙素苄酯 (D2) 收率 30.0%; mp $223 \sim 226^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.73 (1H, s, 5-OH), 10.36 (1H, s, 6-OH), 8.59 (1H, s, 4'-OH), 7.88 ~ 7.59 (2H, m, 2'-H, 6'-H), 7.27 ~ 7.38 (5H, m, -ph), 6.99 (1H, s, 8-H), 6.91 ~ 6.94 (2H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 3'-H, 5'-H), 6.81 (1H, s, 3-H), 5.52 ~ 5.54 (2H, m, 1''-H, 5''-H), 5.21 ~ 5.30 (3H, m, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 4.25 ~ 5.17 (2H, d, $J = 9.6 \text{ Hz}$, -CH₂-), 3.33 ~ 3.46 (3H, m, other sugar protons); ESI(-)-MS (m/z): 551.2 [M - H]⁻; 液相分析结果表明含量大于 98%。

1.3 灯盏乙素-(*N,N*-二乙基)-2-羟乙酰胺酯 (D3) 收率 72.7%; mp $145 \sim 147^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.73 (1H, s, 5-OH), 10.34 (1H, s, 6-OH), 8.58 (1H, s, 4'-OH), 7.93 ~ 7.98 (2H, m, 2'-H, 6'-H), 7.02 (1H, s, 8-H), 6.86 ~ 6.96 (2H, d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 3'-H, 5'-H), 6.81 (1H, s, 3-H), 5.54 (2H, s, O-CH₂-CO), 5.27 ~ 5.30 (2H, m, 1''-H, 5''-H), 4.33 ~ 5.02 (3H, m, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 3.43 (3H, m, other sugar protons), 3.25 ~ 3.30 (4H, m, -CH₂-, -CH₂-), 0.98 ~ 1.14 (6H, t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, -CH₃-, -CH₃-); ESI(+)-MS (m/z): 576.1 [M + H]⁺; 液相分析结果表明含量大于 98%。

2 前药在不同 pH 水溶液的降解动力学

图 1 列出了 3 个前药在不同 pH 水溶液中的降解曲线。前药的降解图为 U 型, 说明存在酸催化、碱催化和水催化的过程。其表观速率常数可由下式表示:

$$K_{obs} = k_H \alpha_H + k_0 + k_{OH} \alpha_{OH}$$

其中 α_H 和 α_{OH} 分别为氢离子和氢氧根离子的浓度, k_H 和 k_{OH} 分别为酸催化和碱催化的速率常数, k_0 是水的催化速率常数。表 1 列出了 3 种前药的催化速率常数。

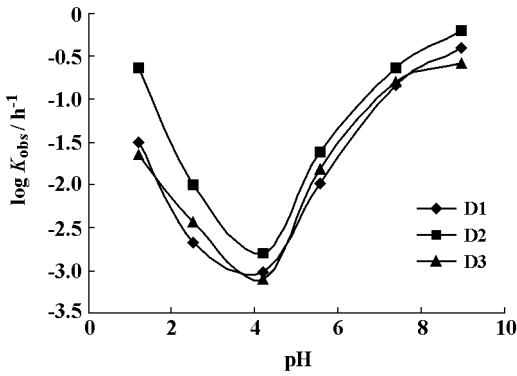


Figure 1 pH-Degradation rate profiles of the prodrugs at 37 °C ($n = 3$). **D1**: Ethyl of scutellarin; **D2**: Benzyl ester of scutellarin; **D3**: Glycolamide ester of scutellarin

Table 1 Degradation rate constants of prodrugs at 37 °C, 0.02 mol·L⁻¹ buffer and $\mu = 0.5$

Prodrug	k_H / mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹	K_0 / h ⁻¹	k_{OH} / mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹
D1	0.49	0.006 1	5.87×10^5
D2	0.12	0.24	2.90×10^4
D3	1.42	0.023	5.42×10^5

k_H and k_{OH} : The rate constants for specific acid- and base-catalyzed hydrolysis; k_0 : The rate constant for water-catalyzed hydrolysis

3 人血浆降解动力学研究

D1和 **D2**在人血浆中的降解方程分别为 $\log C = -0.001 1t + 0.518 9$ ($R^2 = 0.973 2$), $\log C = -0.003 6t + 0.995 7$ ($R^2 = 0.903 0$), 其 $t_{1/2}$ 分别为 273 min 和 83 min。 **D3**的降解如图 2 所示。由图可得 **D3**的人血浆 $t_{1/2}$ 约为 7 min。

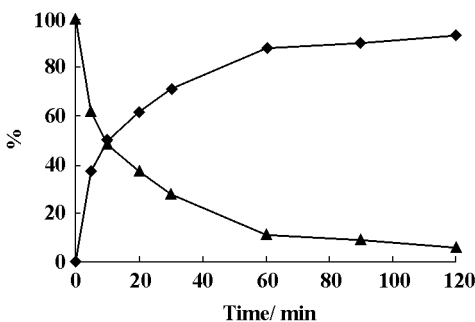


Figure 2 Hydrolysis of **D3** in 80% human plasma at 37 °C ($n = 3$). Disappearance of the prodrug (\blacktriangle) and appearance of scutellarin (\blacklozenge)

4 溶解度和分配系数的测定

表 2 列出了 3 种前药和原药在两种介质中的溶解度和在正辛醇和磷酸盐缓冲液中的分配系数。

Table 2 Solubility and log*P* of scutellarin and its prodrugs ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Comp. d.	Solubility / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		log <i>P</i>
	pH 4.2 Buffer	Dwater	
Scutellarin	42.7 ± 0.8	14.4 ± 0.7	-2.56 ± 0.04
D1	12.4 ± 0.6	13.1 ± 0.7	2.37 ± 0.10
D2	10.3 ± 0.4	nd	nd
D3	420 ± 30	500 ± 20	1.48 ± 0.09

nd: Not determined. *P* (Partition coefficient values) were carried out in *n*-octanol/phosphate buffer (pH 7.4) at 37 °C

5 包合物和乳剂在小肠液中对前药的保护作用

包合物和乳剂在肠液中对 **D3**的保护作用见图 3。

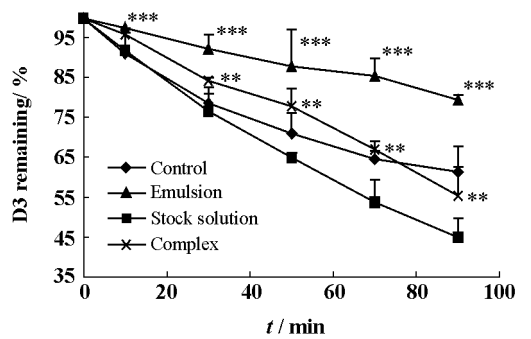


Figure 3 Time-dependent degradation of the **D3** remaining (at an initial concentration of 1.3×10^{-5} mol·L⁻¹) in the rat intestinal lumen, represented as percentage of intact **D3** remaining ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$). The amount of protein in the reaction mixture was 0.6 mg·mL⁻¹. ** $P < 0.01$ vs stock solution; *** $P < 0.001$ vs stock solution and control

6 不同肠段肠黏膜对前药的降解

大鼠不同肠段黏膜对前药 **D3**的降解如图 4 所示。

7 分析方法

D1的标准曲线为: $A = 42 073C - 1 798.9$, $r = 0.999 6$, 线性范围 0.1 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; **D2**为: $A = 8 315.2C + 706.9$, $r = 0.999 3$, 线性范围 0.1 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; **D3**为: $A = 31 127C - 1 087.6$, $r = 0.999 8$, 线性范围 0.1 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。 **D3**在黏膜中的标准曲线为: $A = 26 424C - 6 387.4$, $r = 0.999 8$, 线性范围 0.5 ~ 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 高中低 3 个浓度的方法回收率为 97.94%, 99.22% 和 100.45%, 日内精密

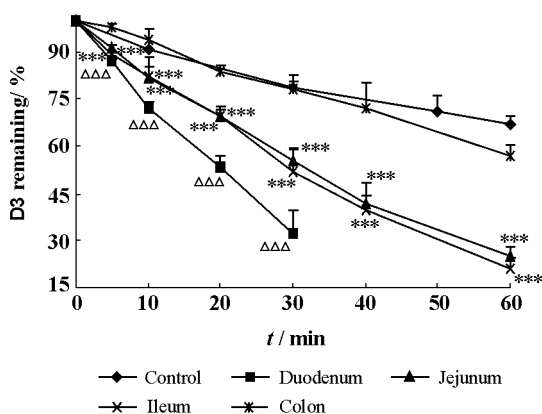


Figure 4 Time-dependent degradation of D3 in mucus homogenates from several segments of rat intestinal, represented as percentage of initial concentration of $2.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n = 3, \bar{x} \pm s$). The amount of protein in the reaction mixture was $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. *** $P < 0.001$ vs colon and control; $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.001$ vs jejunum, ileum, colon and control

RSD分别为 1.12%, 2.06%和 2.28%, 日间精密密度 RSD分别为 2.89%, 3.31%和 3.67%; D3在肠液中的标准曲线为: $A = 28\ 424C - 5\ 891.3, r = 0.999\ 9$, 线性范围 $0.5 \sim 15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 高中低 3个浓度的方法回收率为 99.04%, 99.72%和 98.45%, 日内精密密度 RSD分别为 0.98%, 1.04%和 1.56%, 日间精密密度 RSD分别为 2.09%, 2.31%和 3.16%。

讨论

本文首次合成出灯盏乙素的 3个前药灯盏乙素乙酯, 苄酯和羟乙酰胺酯, 其结构经质谱和氢谱得到确证。羧酸成酯的方法有很多种^[20, 21], 开始尝试使用酰氯法, DCC-DMAP法和 CDI法均未获成功。由于灯盏乙素含有 γ 吡喃酮环、酚羟基和糖苷键等较为敏感的基团, 选用较为温和的合成条件是关键。先成盐后与卤代物反应可在较温和的条件下得到产物 D1和 D2。D3的合成根据文献^[22]方法将其中间体不经蒸馏直接用于下一步的反应, 改进后顺利得到产物。

3个前药在不同 pH 介质中的降解动力学研究表明 D2最不稳定, 这一结果与 3种前药在水溶解性的测定中表现出的稳定性相一致, D2无法准确测定其水溶性。D1和 D3表现出较高的稳定性。可能原因是 3种酯类前药的降解机制不同, D2降解过程中可能由于苄基碳正离子较为稳定使其降解速度加快。

3个前药在人血浆中的降解结果表明简单脂肪族乙酯的半衰期最长, 芳香族苄酯的次之, 羟乙酰胺酯的最短, 这一降解顺序可能与酯酶的多样性和分布特征有关^[23]。乙酯 D1和苄酯 D2的降解酶可能分别是羧酸酯酶 hCE-1和 hCE-2, 而羟乙酰胺酯 D3的降解酶是胆碱酯酶^[22], 一般人血浆中胆碱酯酶的含量大于羧酸酯酶的含量^[24]。这也是血浆中前药 D3降解半衰期明显比在肠液中短的可能原因之一, 其二, D3在不同 pH 缓冲液的降解研究可知, D3在血浆 (pH 7.4) 中的化学降解比在肠液 (pH 6.8) 中快。羟乙酰胺酯 D3表现出最短的半衰期 (约 7 min), 与 Bundgaard^[25]报道的一致。实验结果还表明 D3能在人血浆中顺利释放出原药, 符合前药设计的基本要求。

溶解性的测定结果表明, 灯盏乙素经过简单修饰成乙酯和苄酯后溶解度均有下降, 而羟乙酰胺酯在缓冲液和水中的溶解度比灯盏乙素分别提高近 10倍和 35倍, 分配系数也由原来的 - 2.56提高到 1.48。

以上前药的理化性质研究结果显示, 相比其他两种前药, D3水溶液稳定性较好, 血浆半衰期短, 溶解性和油水分配系数得到显著改善具有较为适宜的理化性质, 提示前药 D3可能容易透过肠细胞膜, 有助于改善灯盏乙素的吸收。

Chen等^[26]的研究结果表明小肠的代谢是黄酮类难吸收药物的主要屏障, 口服前药也首先必须克服小肠处吸收时的降解^[11], 所以研究黄酮类酯类前药的关键之一是要考察其小肠的代谢。国外已有使用乳剂来保护酯类前药的口服降解报道^[13, 27], 其基本原理是胆碱酯酶不降解三甘油酸酯类油相和乳化剂, 从而使得处于油相中的前药免受肠道酶的降解并得到有效保护。鉴于大量文献报道环糊精包合物能显著提高药物的稳定性, 设想 D3与环糊精形成包合物后可能由于包合后立体位阻较大酯酶难以发挥降解作用。本文制备了乳剂和包合物并比较了两者在肠液中对前药的保护作用。比较储液和对照组看出, 储液比缓冲液的降解更明显, 说明肠液的蛋白活性是存在的。90 min时乳剂, 包合物, 储液和对照组的 D3剩余百分率分别为 $(79.35 \pm 1.2)\%$, $(55.53 \pm 7.1)\%$, $(44.96 \pm 4.9)\%$ 和 $(61.44 \pm 6.5)\%$ 。乳剂的每一时间点的剩余百分率与储液相比均有非常显著性差异 ($P < 0.001$), 表明乳剂对前药的保护作用很明显。包合物与储液的每个时间点的结果相比也存在显著性差异 ($P < 0.01$), 表明包合物也存在一

定的保护作用,但其作用不及乳剂。可能原因是包合反应在溶液中本身存在平衡,随着游离的前药不断被降解后,这一平衡向脱包合方向移动从而更多的前药会被降解。

鉴于肠壁细胞膜含有大量代谢酶^[12],找出酯酶活性较低的肠段可以为酯类前药的给药提供依据。实验结果显示十二指肠黏膜降解的每个时间均与其他肠段有极显著性差异 ($P < 0.001$),表明十二指肠黏膜的降解最快。空肠和回肠降解的每个时间均与结肠和对照组有极显著性差异 ($P < 0.001$),结肠的降解最慢。不同肠段黏膜降解 D3 的顺序为:十二指肠 > 回肠 > 空肠 > 结肠,与 Gelder等^[28]和 Cook等^[29]报道的一致。此结果可能与肠道黏膜的不同脂质表现出细胞反应和酶活性的差异有关^[30]。不同肠段降解结果提示选择酯酶活性较低的结肠靶向给药系统有望提高前药 D3 的口服吸收。

较为理想的前药应该吸收时较少被降解,吸收后顺利释放出原药发挥作用^[11]。肠液和肠黏膜的降解结果表明灯盏花素经过修饰形成前药 D3 后理化性质得到显著改善,但其吸收前(肠道)和吸收中(肠黏膜)的降解较快阻止了前药的作用。通过乳剂等制剂手段可以减少前药 D3 在肠道内的降解,D3 的吸收研究正在进行中。

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] Ge QH, Zhou Z, Zhi XJ, et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of breviscapine in beagle dogs [J]. *Chi J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2003, 34: 618 - 620.
- [5] Zhang HY, Ping QN, Guo JX, et al. Study on the pharmacokinetics of breviscapine and its β -cyclodextrin complex in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2005, 40: 563 - 567.
- [6] Todd PA, Heel RC, Enalapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and the therapeutic use in hypertension and congestive heart failure [J]. *Drugs*, 1986, 31: 198 - 248.
- [7] Stimpel M, Bonn R, Koch B, et al. Pharmacology and clinical use of the new ACE-inhibitor moexipril [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 1995, 13: 211 - 229.
- [8] He G, Massarella J, Ward P. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802 [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1999, 37: 471 - 484.
- [9] Ginsburg CM, McCracken GH, Petruska M, et al. Pharmacokinetics and bactericidal activity of cefuroxime axetil [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985, 28: 504-507.
- [10] Midgley I, Hood AJ, Proctor P, et al. Metabolic fate of ¹⁴C-camostat mesylate in man, rat and dog after intravenous administration [J]. *Xenobiotica*, 1994, 24: 79 - 92.
- [11] Beaumont K, Webster R, Gardner I, et al. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist [J]. *Current Drug Metabolism*, 2003, 4: 461 - 485.
- [12] Pueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, et al. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells [J]. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24: 634 - 642.
- [13] Crauste-Manciet S, Brossard D, Decroix MO, et al. Cefpodoxime-proxetil protection from intestinal lumen hydrolysis by oil-in water submicron emulsions [J]. *Int J Pharm*, 1998, 165: 97 - 106.
- [14] Hirayama F, Ogata T, Yano H. Release characteristics of a short-chain fatty acid, *n*-butyric acid, from its β -cyclodextrin ester conjugate in rat biological media [J]. *J Pharm Sci*, 2000, 89: 1487 - 1494.
- [15] Chan HO, Schmid HL, Stilgenbauer LA, et al. Evaluation of a targeted prodrug strategy to enhance oral absorption of poorly water-soluble compounds [J]. *Pharm Res*, 1998, 15: 1012 - 1018.
- [16] Dias CS, Anand BS, Mitra Ak. Effect of mono- and diacylation on the ocular disposition of ganciclovir: physicochemical properties, ocular bioavailability, and antiviral activity of short chain ester prodrugs [J]. *J Pharm Sci*, 2001, 91: 660 - 668.
- [17] Bundgaard H, Nielsen NM. Glycolamide ester as a novel biolabile prodrug type for non-steroidal anti-inflammatory carboxylic acid drugs [J]. *Int J Pharm*, 1988, 43: 101 - 110.
- [18] Sinha VR, Anitha R, Ghosh S, et al. Complexation of celecoxib with β -cyclodextrin: characterization of the interaction in solution and in solid state [J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94: 676 - 687.
- [19] Nicolaos G, Crauste-Manciet S, Farinotti R, et al. Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by oil-in water submicron emulsion [J]. *Int J Pharm*, 2003, 263: 165 - 171.
- [20] Yano H, Hirayama F, Kamada M, et al. Colon-specific delivery of prednisolone-appended α -cyclodextrin conjugate: alleviation of systemic side effect after oral administration [J]. *J Control Release*, 2002, 79: 103 -

- 112.
- [21] Leisen C, Langguth P, Herbert B, et al. Lipophilicities of baclofen ester prodrugs correlate with affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein: relevance for their permeation across the blood-brain barrier? [J]. Pharm Res, 2003, 20: 772 - 778.
- [22] Nielsen NM, Bundgaard H. Glycolamide ester as biolabile prodrugs of carboxylic acid agents: synthesis, stability, bioconversion and physicochemical properties [J]. J Pharm Sci, 1988, 77: 285 - 298.
- [23] Satuo T, Taylor P, Bosron WF, et al. Current progress on esterases: from molecular structure to function [J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30: 488 - 493.
- [24] McCracken NW, Blain PG, Williams FM. Human xenobiotic metabolizing esterases in liver and blood [J]. Biochem Pharmacol, 1993, 46: 1125 - 1129.
- [25] Bundgaard H. Novel chemical approaches in prodrug design [J]. Drugs Fut, 1991, 16: 443 - 458.
- [26] Chen J, Lin HM, Hu M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition [J]. J Pharmcol Exp Ther, 2003, 304: 1228 - 1235.
- [27] La Du BN, Snady H. Handbook of Experimental Pharmacology — Concepts in Biochemical Pharmacology [M]. 2nd ed. Berlin: Brodie BB and Gillette JR, 1971: 477 - 499.
- [28] Gelder JV, Shafiee M, Clercq ED, et al. Species-dependent and site-specific intestinal metabolism of ester prodrugs [J]. Int J Pharm, 2000, 205: 93 - 100.
- [29] Cook CS, Karabatsos PJ, Schoenhard GL, et al. Species dependent esterase activities for hydrolysis of anti-HIV prodrug glycovir and bioavailability of active sc-48334 [J]. Pharm Res, 1995, 12: 1158 - 1164.
- [30] Ungell AL, Bergstrand SB, Sjoberg A, et al. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat [J]. J Pharm Sci, 1998, 87: 360 - 366.