



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104672191 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201510052946.7

(22)申请日 2015.02.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104672191 A

(43)申请公布日 2015.06.03

(73)专利权人 天津科技大学

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区十三大街29号

(72)发明人 郁彭 孙华 雷亚楠 李雅珊

彭小林 王浩猛 滕玉鸥

(74)专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司

12209

代理人 赵瑶瑶

(51)Int.Cl.

C07D 311/36(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

(56)对比文件

CN 102406694 A,2012.04.11,全文.

K.Ding,et al.Efficient synthesis of isoflavone analogues via a Suzuki

coupling reaction.《Tetrahedron Letters》.2005,第46卷第3707-3709页.

T. Miyase et al..Antioxidants from Lespedeza homoloba (II).《Phytochemistry》.1999,第52卷第311-319页.

T. Miyase et al..Antioxidants from Lespedeza homoloba (II).《Phytochemistry》.1999,第52卷第311-319页.

陈乃东等.春花胡枝子黄酮的提取及其抗氧化能力测定.《中国林副特产》.2006,(第5期),第1-4页.

Khalivulla, et al.A New C-geranylated Isoflavone from Dalbergia paniculate.《Natural Product Communications》.2007,第2卷(第11期),第1109-1111页.

张帆等.胡枝子中化学成分及黄酮类物质提取与分析的研究进展.《时珍国医国药》.2008,第19卷(第12期),第2884-2885页.

张帆等.胡枝子中化学成分及黄酮类物质提取与分析的研究进展.《时珍国医国药》.2008,第19卷(第12期),第2884-2885页.

审查员 童瑶

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

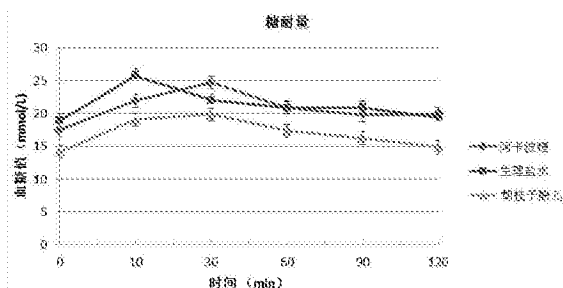
(54)发明名称

胡枝子酚E₁类化合物及制备方法和应用

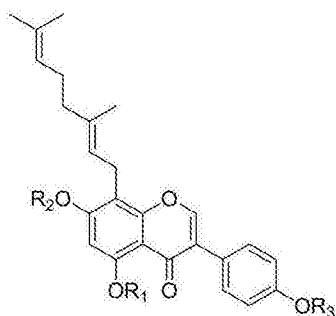
(57)摘要

本发明涉及一种胡枝子酚E₁类化合物及制备方法和应用,具体是胡枝子酚E₁类化合物的制备及其在抗肿瘤药物和治疗糖尿病药物中的应用.本发明首次合成出胡枝子酚E₁及其衍生物,并对所合成的化合物针对人白血病细胞(K562)、人结肠癌细胞(HT-29)、人胃癌细胞(MGC-803)进行了抗肿瘤活性测试,结果表明这类化合物的IC₅₀<100μM;同时进行了α-葡萄糖苷酶抑制活性测试,结果表明胡枝子酚E₁的IC₅₀<10μM.本发明提供的化合物原料易得,制备方法简单,在治疗肿瘤药物和治疗糖尿病药物中的有着良好的应

用前景。

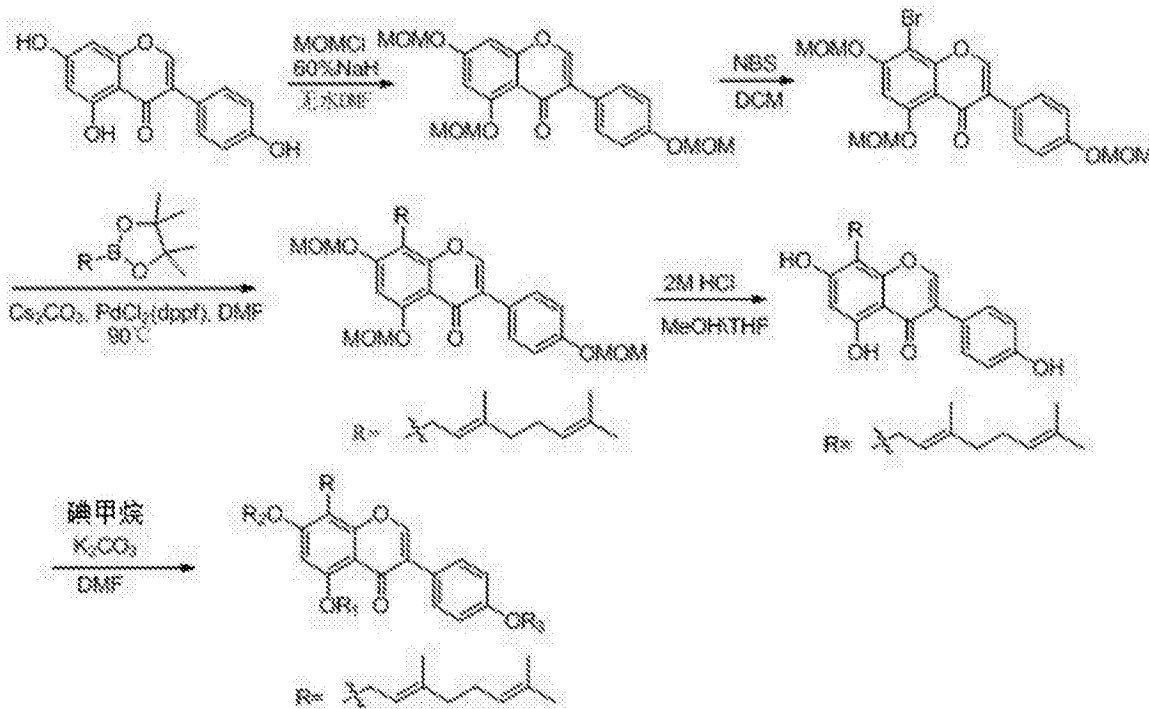


1. 一种胡枝子酚E1类化合物在制备治疗肿瘤药物中的应用,其特征在于:胡枝子酚E1类化合物具有以下结构通式:



其中R₁、R₂、R₃选甲基,所述肿瘤为人白血病、人结肠癌、人胃癌。

2. 一种胡枝子酚E₁类化合物的制备方法,其特征在于:合成路线如下:



其中R₁、R₂、R₃选甲基。

胡枝子酚E₁类化合物及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于新化合物制备方法及药物领域,尤其是胡枝子酚E₁类衍生物的制备治疗肿瘤药物和治疗糖尿病药物中的应用。

技术背景

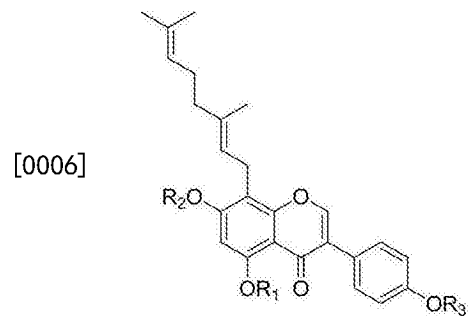
[0002] 胡枝子酚E₁又名8-香叶基异黄酮,主要存在于天然豆科植物同裂胡枝子的根茎中。研究表明,胡枝子酚E₁具有抗氧化活性和抑制BACE1活性。在已知文献报道中,具有香叶基的异黄酮类化合物的生物活性有明显提高,如抗肿瘤、抗氧化、抗炎等生物活性。本发明首次合成了胡枝子酚E₁及其衍生物对该类化合物的生物活性的进一步研究提供一定的帮助。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种胡枝子酚E₁类化合物及制备方法和应用,胡枝子酚E₁类化合物在治疗肿瘤药物和治疗糖尿病药物中的应用。

[0004] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0005] 胡枝子酚E₁类化合物,结构通式如下:



[0007] 其中R₁、R₂、R₃为氢、甲基。

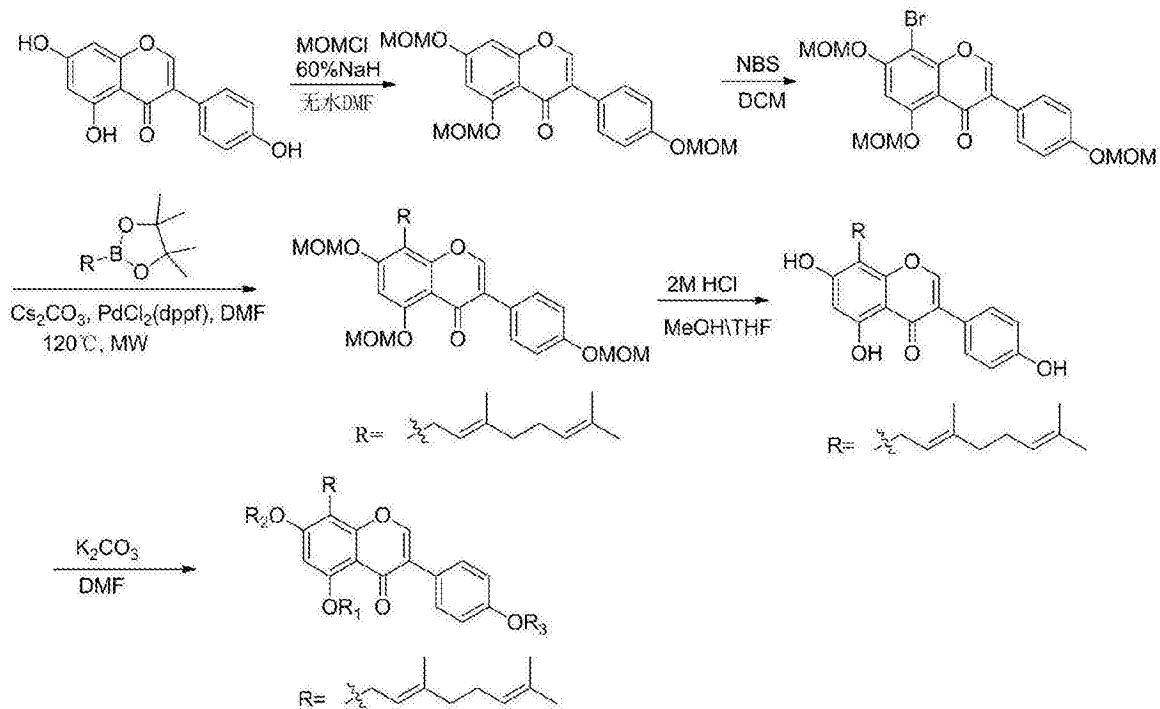
[0008] 所述的胡枝子酚E₁类化合物的制备及其在抗肿瘤药物和治疗糖尿病药物中的应用,其特征在于:所述的R₁为氢、R₂为氢、R₃为氢,即胡枝子酚E₁。

[0009] 而且R₁为甲基、R₂为甲基、R₃为甲基,即三甲基胡枝子酚E₁。

[0010] 而且R₁为氢、R₂为甲基、R₃为甲基,即7,4'-二甲基胡枝子酚E₁。

[0011] 胡枝子酚E₁类衍生物的制备,合成路线如下:

[0012]



[0013] 其中R₁、R₂、R₃为氢、甲基。

[0014] 本发明首次合成出胡枝子酚E₁及其衍生物,并进行了体外细胞抗肿瘤活性的测定,所测定的3种肿瘤细胞分别为人白血病细胞(K562)、人结肠癌细胞(HT-29)和人胃癌细胞(MGC-803),结果显示这类衍生物具有较好的抗肿瘤生物活性(IC₅₀<100μM);进行了体外α-葡萄糖苷酶抑制活性测试,结果表明:胡枝子酚E₁具有较好的α-葡萄糖苷酶抑制活性(IC₅₀<10μM)。本发明具有操作简单、反应条件温和、合成工艺和纯化方法简单、收率高、测定方法简单等优点,并且对肿瘤细胞和α-葡萄糖苷酶有很好的抑制作用,可应用于制备抗肿瘤和治疗糖尿病药物。

附图说明

[0015] 图1为胡枝子酚E₁核磁共振氢谱。

[0016] 图2为三甲基胡枝子酚E₁核磁共振氢谱。

[0017] 图3为7,4'-二甲基胡枝子酚E₁核磁共振氢谱。

[0018] 图4降糖活性动物实验测试血糖值。

[0019] 具体的实施方式

[0020] 为了理解本发明,下面结合实施例对本发明作进一步说明:下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0021] 下面通过实施例具体说明制备方法。

[0022] 第一部分:胡枝子酚E₁类化合物的制备

[0023] 1、制备3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-4H-苯丙吡喃-4-酮

[0024] 将金雀异黄素(2.0g,7.40mmol)溶于无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF,20mL)中,在0°C条件下先分批加入60%NaH(0.8g,33.30mmol),再缓慢滴加氯甲基甲醚(2.68g,33.30mmol),反应体系用氩气保护。继续低温反应1h后,升至室温反应,经TLC检测反应完

全后,将反应液缓慢倒入冰水(100mL)中淬灭。用二氯甲烷萃取(50mL×3),合并有机相,有机相用饱和氯化钠溶液洗涤,再用无水硫酸钠干燥,蒸干,硅胶柱层析纯化(石油醚:乙酸乙酯=15:1,v/v),得3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-4H-苯丙吡喃-4-酮2.2g,白色固体,收率87%。

[0025] 化合物结构确证数据为:¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ3.48(s,3H),3.51(s,3H),3.54(s,3H),5.19(s,2H),5.24(s,2H),5.31(s,2H),6.74(s,1H),6.75(s,1H),7.07(d,J=8.8Hz,2H),7.46(d,J=8.8Hz,2H),7.78(s,1H);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):δ55.9,56.4,56.6,94.3,94.4,95.5,97.0,102.0,111.3,116.0,125.4,125.8,130.4,150.3,157.1,158.6,159.4,161.1,175.2;LRMS(ESI)m/z:403.1[M+H]⁺。

[0026] 2、制备3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-8-溴-4H-苯丙吡喃-4-酮

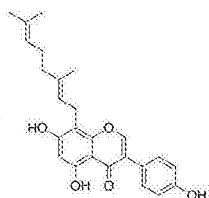
[0027] 将步骤1中获得的3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-4H-苯丙吡喃-4-酮(2.0g,5.86mmol)溶于二氯甲烷(20mL)中,在搅拌下加入N-溴代丁二酰亚胺(1.15g,6.45mmol),室温反应2h。经TLC检测反应完全后,将反应液缓慢倒入冰水(100mL)中搅拌,有白色固体析出,抽滤,得3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-8-溴-4H-苯丙吡喃-4-酮2.3g,白色固体,产率为93%。

[0028] 化合物结构确证数据为:¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ3.48(s,3H),3.54(s,3H),3.55(s,3H),5.20(s,2H),5.32(s,2H),5.35(s,2H),6.99(s,1H),7.08(d,J=8.8Hz,2H),7.46(d,J=8.4Hz,2H),7.90(s,1H);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):δ55.9,56.7,56.8,93.5,94.3,95.1,95.9,100.4,112.2,116.1,124.9,125.8,130.4,150.4,155.3,157.3,157.9,158.0,175.0;LRMS(ESI)m/z:481.3[M+H]⁺。

[0029] 3、制备3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-8-香叶基-4H-苯丙吡喃-4-酮

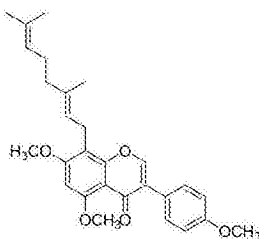
[0030] 将步骤2获得的3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-8-溴-4H-苯丙吡喃-4-酮(240mg,0.50mmol)溶于无水DMF(2mL)中,再分别加入香叶基硼酸酯(198mg,0.75mmol),无水碳酸铯(227mg,0.70mmol),催化剂[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钪(18.2mg,0.025mmol),反应体系用氩气保护。90℃条件下反应8h,经TLC检测反应完全后,加入乙酸乙酯(20mL)稀释,再用水(10mL)洗三次。有机相用饱和氯化钠溶液洗涤,再用无水硫酸钠干燥,蒸干,硅胶柱层析纯化(石油醚:乙酸乙酯=10:1,v/v),得3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-8-香叶基-4H-苯丙吡喃-4-酮190mg,黄色油状物,产率71%。

[0031] 化合物结构确证数据为:¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ1.56(s,3H),1.63(s,3H),1.81(s,3H),1.97(t,J=8.0Hz,2H),2.03-2.08(m,J=14.8Hz,2H),3.48(s,3H),3.50(s,3H),3.51(s,2H),3.54(s,3H),5.05(t,J=8.8Hz,1H),5.19(m,3H),5.28(s,2H),5.29(s,2H),6.90(s,1H),7.07(d,J=8.4Hz,2H),7.47(d,J=8.4Hz,2H),7.85(s,1H);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):δ16.1,17.6,21.9,25.6,26.6,39.7,55.9,56.3,56.6,94.3,96.2,100.5,111.4,112.6,112.7,116.0,121.6,124.1,125.2,125.6,130.3,131.3,135.6,150.5,156.4,156.5,157.0,158.3,175.7;LRMS(ESI)m/z:539.1[M+H]⁺。

[0032] 4、制备胡枝子酚E₁

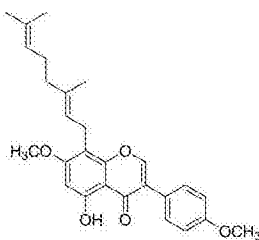
[0033] 将步骤3获得的3-((4'-甲氧甲氧基)苯基)-5,7-二甲氧甲氧基-8-香叶基-4H-苯丙吡喃-4-酮(100mg,0.1mmol)溶于甲醇(5mL)和四氢呋喃(1mL)中,在0℃条件下滴加2M盐酸溶液(2mL),继续低温反应1h后,升温至60℃回流反应。用TLC检测反应完全后,加入乙酸乙酯(20mL)稀释,再用水(10mL)洗三次,有机相用饱和氯化钠溶液洗涤,再用无水硫酸钠干燥,蒸干,硅胶柱层析纯化(石油醚:乙酸乙酯=10:1,v/v),得胡枝子酚E₁61mg,黄色固体,产率81%。

[0034] 化合物结构确证数据为:¹H NMR(400MHz,MeOD): δ 1.52(s,3H),1.57(s,3H),1.79(s,3H),1.97(t,J=7.2Hz,2H),2.05(m,J=7.6Hz,2H),3.41(d,J=7.2Hz,2H),5.01(t,J=6.8Hz,1H),5.20(t,J=6.8Hz,1H),6.27(s,1H),6.84(d,J=8.8Hz,2H),7.37(d,J=8.4Hz,2H),8.12(s,1H);¹³C NMR(100MHz,MeOD): δ 14.8,16.2,20.7,24.4,26.1,39.3,98.1,104.8,106.5,114.8,122.0,122.1,122.9,123.9,130.0,130.6,134.5,153.4,155.4,157.3,160.0,161.8,181.2;LRMS(ESI)m/z:407.1[M+H]⁺。

[0035] 5、制备三甲基胡枝子酚E₁

[0036] 将步骤4获得的胡枝子酚E₁(20mg,0.05mmol)溶于DMF(1mL)中,在搅拌下分别加入碳酸钾(21.8mg,0.15mmol)和碘甲烷(22.4mg,0.15mmol),反应体系用氩气保护。室温条件下反应1h,经TLC检测反应完全后,将反应液倒入冰水(10mL)中淬灭,用二氯甲烷萃取(5mL×3),合并有机相,有机相用饱和氯化钠溶液洗涤,再用无水硫酸钠干燥,蒸干,硅胶柱层析纯化(石油醚:乙酸乙酯=15:1,v/v),得三甲基胡枝子酚E₁20mg,白色固体,收率91%。

[0037] 化合物结构确证数据为:¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ 1.56(s,3H),1.62(s,3H),1.79(s,3H),1.97(t,J=8.8Hz,2H),2.14(m,2H),3.45(d,J=7.2Hz,2H),3.82(s,3H),3.94(s,3H),3.96(s,3H),5.05(t,J=6.8Hz,1H),5.17(t,J=6.8Hz,1H),6.42(s,1H),6.93(d,J=8.8Hz,2H),7.49(d,J=8.8Hz,2H),7.82(s,1H);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃): δ 16.1,17.6,21.6,25.6,26.6,19.7,55.3,55.8,56.4,91.9,109.6,109.9,113.6,121.8,124.2,124.5,125.1,130.3,131.3,135.4,150.2,156.5,159.3,159.8,160.8,176.0;HRMS(ESI)m/z:Calcd.for C₂₈H₃₂O₅[M+H]⁺449.2323.Found 449.2323

[0038] 6、制备7,4'-二甲基胡枝子酚E₁

[0039] 将步骤4获得的胡枝子酚E₁ (20mg, 0.05mmol) 溶于DMF (1mL) 中, 在搅拌下分别加入碳酸钾 (13.6mg, 0.1mmol) 和碘甲烷 (13.9mg, 0.1mmol), 反应体系用氩气保护。室温条件下反应1h, 经TLC检测反应完全后, 将反应液倒入冰水 (10mL) 中淬灭, 用二氯甲烷萃取 (5mL × 3), 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗涤, 再用无水硫酸钠干燥, 蒸干, 硅胶柱层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯 = 15:1, v/v), 得三甲基胡枝子酚E₁ 19mg, 白色固体, 收率89%。

[0040] 化合物结构确证数据为: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.57 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.97 (t, J = 7.2Hz, 2H), 2.06 (m, 2H), 3.42 (d, J = 6.8Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 5.05 (t, J = 7.2Hz, 1H), 5.16 (t, J = 6.2Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.98 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.47 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.92 (s, 1H), 12.94 (s, 1H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 16.0, 17.6, 21.3, 25.6, 26.6, 39.7, 55.3, 56.0, 95.2, 105.7, 107.9, 114.1, 121.8, 123.0, 123.1, 124.2, 130.1, 131.3, 135.5, 152.8, 154.6, 159.7, 161.0, 162.9, 181.3; LRMS (ESI) m/z: 435.2 [M+H]⁺。

[0041] 第二部分: MTT法细胞增殖抑制活性筛选

[0042] 一、本发明抗肿瘤活性测定所用3肿瘤细胞: 人白血病细胞 (K562)、人结肠癌细胞 (HT-29) 和人胃癌细胞 (MGC-803)。

[0043] 1、抗肿瘤活性测定的具体步骤:

[0044] 溶液的配制:

[0045] PRMI1640培养液的配制: 购买HyClone PRMI1640培养基, 每瓶500mL, 加入10%的胎牛血清和1%的青链霉素溶液, 即每瓶培养基加入50mL的胎牛血清和5mL的青链霉素, 培养基的配置在超净工作台中进行, 后放置冰箱4℃保存。

[0046] DMEM/F-12培养液的配制: 购买HyClone DMEM/F-12培养基, 每瓶500mL, 加入10%的胎牛血清和1%的青链霉素溶液, 即每瓶培养基加入50mL的胎牛血清和5mL的青链霉素, 培养基的配置在超净工作台中进行, 后放置冰箱4℃保存。

[0047] PBS缓冲液的配制: 在1000mL锥形瓶中, 称取氯化钠8g, 氯化钾0.2g, 十二水合磷酸氢二钠2.9g, 磷酸二氢钾0.2g, 加入800mL纯净水充分搅拌溶解后定容至1000mL, 高压灭菌后放置冰箱4℃保存。

[0048] MTT溶液的配制: 称取MTT干粉0.5g, 溶于100mL PBS缓冲液中, 用0.22μm滤膜过滤除菌后, 放置冰箱-12℃保存。

[0049] 2、利用利用人白血病细胞K562活性测试

[0050] K562细胞使用的培养液为含1%的青霉素-链霉素溶液, 10%的胎牛血清的PRMI1640细胞培养液, 培养条件为37℃、含5%CO₂的恒温培养箱。具体步骤:

[0051] (1) 用血球计数板对细胞进行计数后, 用RPMI培养液将其稀释至5 × 10⁴个/mL;

[0052] (2) 在96孔板的每个孔里加入100μL细胞悬液, 培养箱37℃温育2h;

[0053] (3) 将所要测试化合物稀释至5种浓度: 2mM, 0.2mM, 20μM, 2μM, 0.2μM, 按照浓度依次加药0.5μL/孔, 培养箱37℃温育48h;

[0054] (4) 加入浓度为5mg/mL的MTT, 培养箱37℃温育4小时;

[0055] (5) 加异丙醇与盐酸裂解液, 酶标仪测570nm和630nm下的OD值;

[0056] (6) 处理数据, 根据OD值计算IC₅₀值。

[0057] 3、利用利用人结肠癌细胞HT-29活性测试

[0058] HT-29细胞使用的培养液为含1%的青霉素-链霉素溶液,10%的胎牛血清的DMEM/F-12细胞培养液,培养条件为37℃、含5%CO₂的恒温培养箱。具体步骤:

[0059] (1) 用血球计数板对细胞进行计数后,用DMEM/F-12培养液将其稀释至 5×10^4 个/mL;

[0060] (2) 在96孔板的每个孔里加入100 μ L细胞悬液吹打混匀,培养箱37℃温育24h;

[0061] (3) 将所要测试化合物稀释至5种浓度:2mM,0.2mM,20 μ M,2 μ M,0.2 μ M,按照浓度依次加药0.5 μ L/孔,培养箱37℃温育48h;

[0062] (4) 加入浓度为5mg/mL的MTT,培养箱37℃温育4h;

[0063] (5) 加DMSO将细胞溶解,酶标仪测490nm和630nm下的OD值;

[0064] (6) 处理数据,根据OD值计算IC₅₀值。

[0065] 4、利用人胃癌细胞MGC-803活性测试

[0066] MGC-803细胞使用的培养液为含1%的青霉素-链霉素溶液,10%的胎牛血清的DMEM细胞培养液,培养条件为37℃、含5%CO₂的恒温培养箱。具体步骤:

[0067] (1) 用血球计数板对细胞进行计数后,用DMEM low glucose培养液将其稀释至 5×10^4 个/mL;

[0068] (2) 在96孔板的每个孔里加入100 μ L细胞悬液吹打混匀,培养箱37℃温育24h;

[0069] (3) 将所要测试化合物稀释至5种浓度:2mM,0.2mM,20 μ M,2 μ M,0.2 μ M,按照浓度依次加药0.5 μ L/孔,培养箱37℃温育48h;

[0070] (4) 加入浓度为5mg/mL的MTT,培养箱37℃温育4h;

[0071] (5) 加DMSO将细胞溶解,酶标仪测490nm和630nm下的OD值;

[0072] (6) 处理数据,根据OD值计算IC₅₀值。

[0073] 抗肿瘤活性测定实验结果见表1。

[0074] 表1合成的胡枝子酚E₁类化合物的体外细胞增殖抑制活性

化合物	IC ₅₀ (μ M)		
	肿瘤细胞		
	K562	HT-29	MGC-803
胡枝子酚 E ₁	3.14 \pm 0.52	4.45 \pm 1.87	8.30 \pm 4.50
[0075] 三甲基胡枝子酚 E ₁	7.78 \pm 2.16	25.21 \pm 2.16	16.72 \pm 4.27
7, 4'-二甲基胡枝子酚 E ₁	47.25 \pm 6.78	>100	>100
金雀异黄素	59.64 \pm 6.14	>100	48.88 \pm 9.17
喜树碱	0.13 \pm 0.04	0.38 \pm 0.03	0.58 \pm 0.02

[0076] 注:IC₅₀表示半数抑制浓度。

[0077] 从表1可以看出合成的胡枝子酚E₁类化合物的体外细胞增殖抑制活性比金雀异黄素有很大提高。胡枝子酚E₁对人白血病细胞(K562)、人结肠癌细胞(HT-29)和人胃癌细胞(MGC-803)均有很好的生长抑制活性。

[0078] 二、采用微孔板筛选模型,以对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖为底物,测试化合物不同浓度梯度下的 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,并计算IC₅₀值。实验分为空白组、不加抑制剂的对照组和待测样品组。临床使用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖作为阳性对照药物。抑制剂和阿卡波糖溶于DMSO,DMSO在酶测试体系中含量为5%;缓冲液为磷酸盐缓冲液(pH=6.8,0.05M),对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖溶于磷酸盐缓冲液。

- [0079] (1) 空白组:加缓冲液和不同浓度的抑制剂,总体积200 μ L。
- [0080] (2) 对照组:加缓冲液(180 μ L)和 α -葡萄糖苷酶(0.04U,20 μ L),不加抑制剂。
- [0081] (3) 阳性对照组:加入缓冲液(150 μ L)、 α -葡萄糖苷酶(0.04U,20 μ L),抑制剂阿卡波糖的DMSO溶液和底物对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖(0.5M,30 μ L)的水溶液。
- [0082] (4) 待测样品组:加入缓冲液(140 μ L)、 α -葡萄糖苷酶(0.04U,20 μ L),待测样品的DMSO溶液(10 μ L)和底物对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖(0.5M,30 μ L),。
- [0083] 在96孔板中,依次加入上述的各种试剂,于37 $^{\circ}$ C温敷5min,再加入底物对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖,温敷30min,在酶标仪405nm波长处测定吸光度,根据下列公式计算该抑制剂对 α -葡萄糖苷酶的抑制率,当抑制率为50%时,所得抑制剂的浓度,即为该抑制剂对底物的IC₅₀值。实验结果见表2。

[0084] 表2合成的胡枝子酚E₁类化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性测试结果

化合物	IC ₅₀ (μ M)
胡枝子酚 E ₁	6.26 \pm 0.58
三甲基胡枝子酚 E ₁	>100
7, 4'-二甲基胡枝子酚 E ₁	>100
金雀异黄素	50.05 \pm 6.61
阿卡波糖	50.45 \pm 1.25

[0086] 注:IC₅₀表示半数抑制浓度。

[0087] 从表2可以看出只有胡枝子酚E₁具有很好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。甲基化的胡枝子酚E₁类化合物没有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,说明羟基是活性必须基团。

[0088] 三、降糖活性动物实验测试

[0089] 1材料与仪器

[0090] 实验小鼠

[0091] 102只清洁级雄性小鼠,体重20-24g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,每笼5只,隔日换一次垫料以保持笼内干净。实验室保持安静通风,室温22-24 $^{\circ}$ C,湿度20-50%,光暗周期(12h/12h)。随意取72只小鼠给予高脂饲料(粗蛋白 \geq 20%,粗脂肪 \geq 4.0%,粗纤维 \geq 5.0%,水分 \leq 10.0%,灰分 \leq 8.0%,钙1.0-1.8%,磷0.6-1.2%),其他空白组和急性毒性实验组给予普通食料,所用饲料为中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,饮用水为自来水。

[0092] 试剂及仪器

[0093] 安准型血糖仪及检测试纸条、SF-400C型天平、METTLER ROLEDO实验室pH计、FA1204B电子天平、链脲佐菌素(STZ)、生理盐水0.9%、0.1mol/L柠檬酸缓冲液pH4.4。

[0094] 2方法

[0095] (1) 模型建立

[0096] 取72只成年健康雄性ICR小鼠(20-24g),对给予高脂食料喂养第21天晚禁食过夜,第22天上午采尾血测定血糖,血糖值无 $>$ 11.1mmol/L。随意取25只小鼠给予一次性腹腔注射STZ 100mg/kg,另取20只小鼠腹腔注射STZ 80mg/kg,隔48h后再次给予腹腔注射STZ 60mg/kg。剩余小鼠高脂食料继续喂养一周后,禁食6h给予一次性腹腔注射STZ 100mg/kg。在七天后取尾血测血糖,以血糖 $>$ 11.1mmol/L为糖尿病。

[0097] 溶液的配制

[0098] ①柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液:准确称取柠檬酸2.10g,用无菌去离子水配制成0.1mol/L的柠檬酸溶液100mL;准确称取柠檬酸钠2.94g,用无菌去离子水配制成0.1mol/L柠檬酸钠溶液100mL,分别量取57.0mL柠檬酸溶液和43.0mL柠檬酸钠溶液,混匀,用pH计配成pH4.4的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,现配现用。

[0099] ②链脉佐菌素 (STZ) 溶液:将STZ粉末 (-20℃保存) 溶于柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中,配制100mg/mL的STZ溶液,现配现用,冰浴、避光保存。

[0100] ③化合物20悬浮液:分别准确称取制备的0.040g加入生理盐水至4.0mL溶解(给予小鼠100mg/kg剂量)。

[0101] ④麦芽糖溶液:准确称取麦芽糖2.4g,加入生理盐水至8.0mL溶解。

[0102] ⑤阿卡波糖溶液:准确称取阿卡波糖(拜糖平) 22mg,加入生理盐水至4.0mL溶解。

[0103] 糖耐量的测定

[0104] 末次给药前禁食不禁水6h,测量血糖值,给药1h后按2g/kg的剂量灌服麦芽糖溶液,之后分别于10min、30min、60min、90min、120min尾尖采血,用血糖仪测定血糖。

[0105] 血糖值见图4,胡枝子酚E1能够明显降低餐后血糖,并且血糖峰值由10min延迟至30min,降糖方式与阳性对照药阿卡波糖具有一定相似性,但降糖活性胡枝子酚E1比阿卡波糖强。

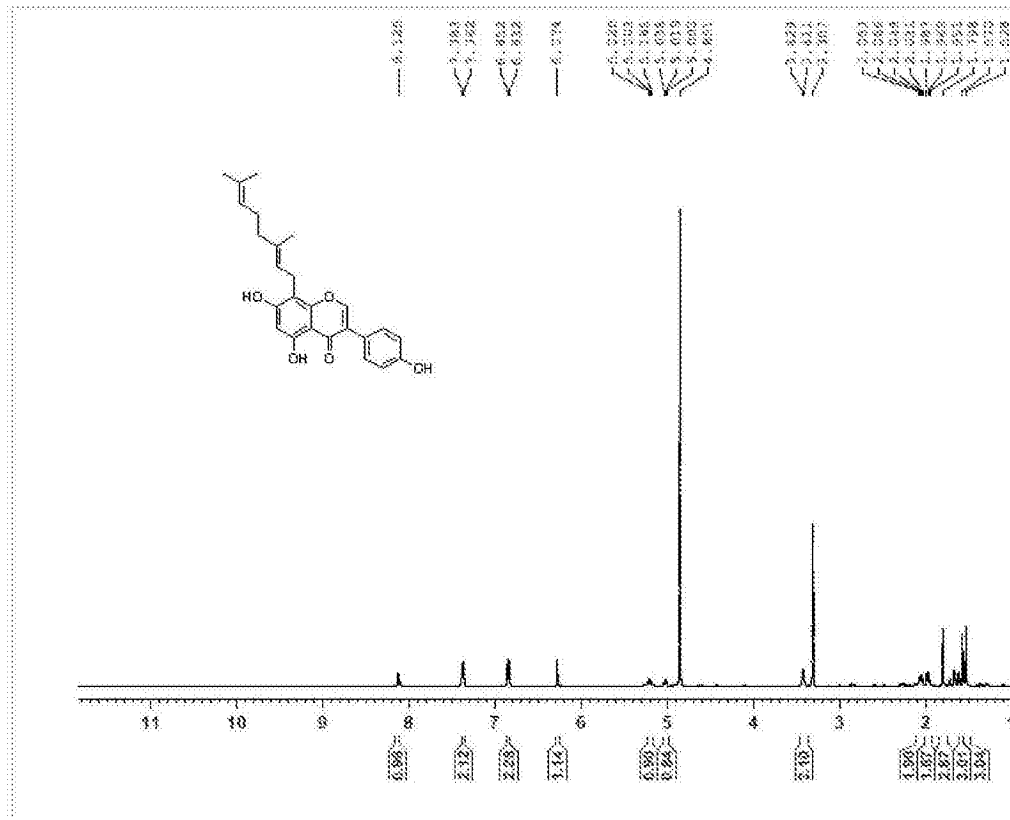


图1

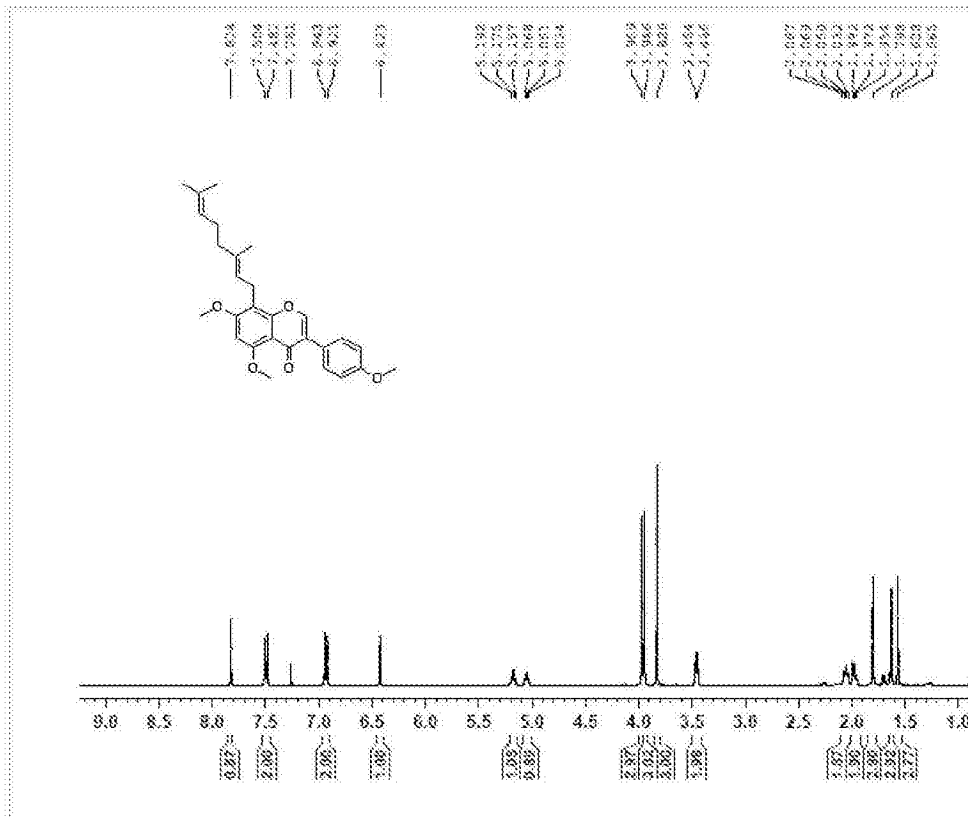


图2

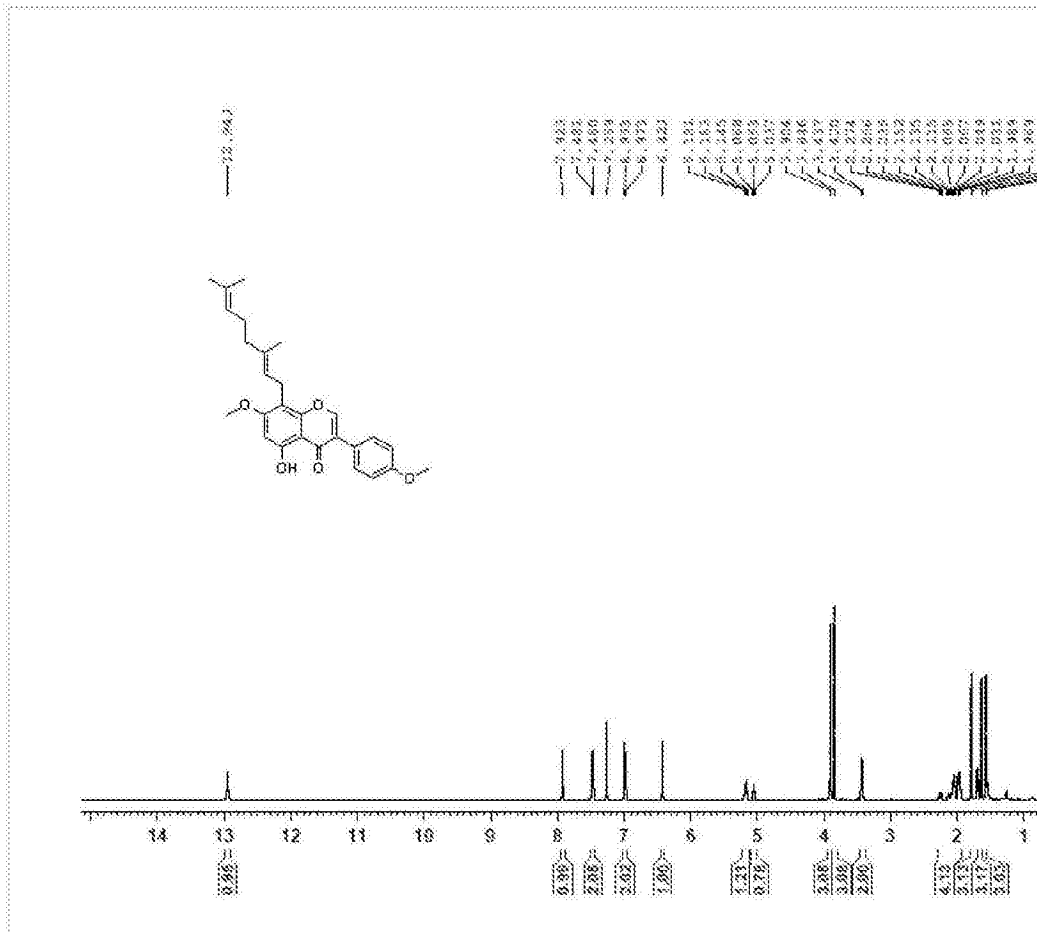


图3

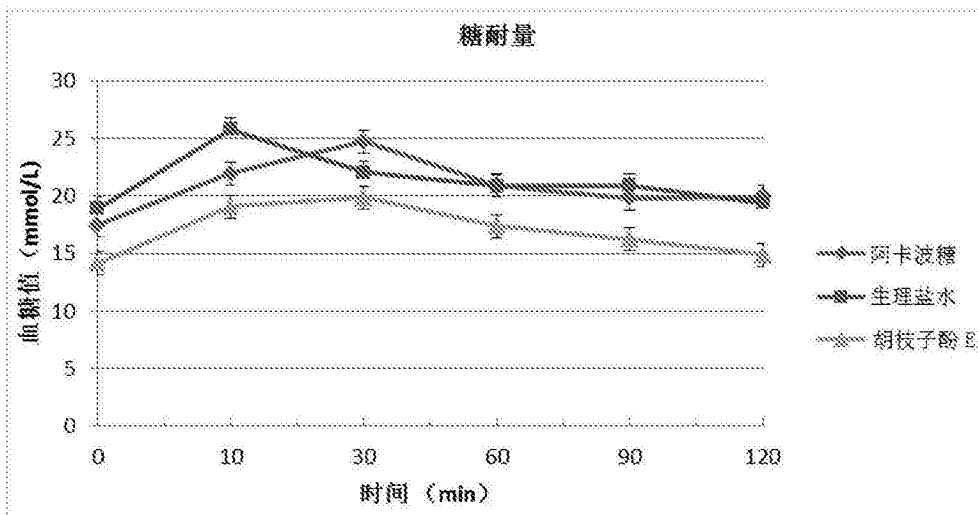


图4