

“君臣佐使”配伍规则指导下黄连解毒汤 药效分子的一体化组装及其抗老年痴呆作用*

王婵茜¹, 黄能能¹, 蒋真磊¹, 刘璐洁¹, 文志铭¹, 刘志军^{1,2}, 陈河如^{1,3}

1. 中药及天然药物研究所 / 中药现代化与创新药物研究国际合作联合实验室 / 暨南大学药学院, 广东 广州 510632
2. 广州药本君安医药科技股份有限公司, 广东 广州 510663
3. 广东省中药药效物质基础及创新药物研究重点实验室 / 生物活性分子与成药性优化全国重点实验室 / 暨南大学, 广东 广州 510632

摘要:依据文献甄别的黄连解毒汤“君臣佐使”功效分子群,本文设计合成了系列“君-臣”一体化分子,即阿魏酸-丁香酚一体化分子 **FE-n** ($n = 1\sim 5, 7$) 共 6 个,黄芩素-丁香酚一体化分子 **S3E-n** ($n = 1\sim 5, 7$) 和 **S5E-n** ($n = 1\sim 5, 7$) 两个系列化合物共 12 个。DPPH 法体外抗氧化活性检测结果揭示,**FE-n** 在屏蔽丁香酚酚羟基、保留阿魏酸酚羟基前提下,在 $n > 3$ 时,显示出高于单个单体的抗氧化活性,具有一定的“君-臣”协同效应;而 **S3E-n** 和 **S5E-n** 由于屏蔽了黄芩素 6-位酚羟基,均显示出弱的抗氧化活性。本研究同时建立谷氨酸诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型筛选目标化合物的抗阿尔茨海默病(AD)活性。结果揭示,**FE-n** 均具有抗 AD 活性,以 **FE-4** 的活性最佳;其抗 AD 活性大小与链长 n 的关系大致与其体外抗氧化活性与链长的关系相对应;而 **S3E-n** 和 **S5E-n** 两个系列化合物除 **S3E-5**、**S3E-7** 和 **S5E-5** 显示出弱的保护作用外,其他均没有显示抗 AD 活性。未来将探索更合适的连接子及其连接方式,进一步揭示内在的“君臣佐使”分子配伍规律。

关键词:黄连解毒汤;君臣佐使;药效分子一体化;抗氧化;抗阿尔茨海默病

中图分类号:R961 文献标志码:A 文章编号:2097-0137(2026)02-0109-15

Integrated assembly of pharmacodynamic molecules in Huanglian Detoxifying Decoction guided by “JCZS” compatibility law and their activities of anti-Alzheimer's disease

WANG Chanxi¹, HUANG Nengneng¹, JIANG Zhenlei¹,
LIU Lujie¹, WEN Zhiming¹, LIU Zhijun^{1,2}, CHEN Heru^{1,3}

1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products / International Cooperative Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization and Innovative Drug Development of Chinese Ministry of Education / College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China
2. Guangzhou PharmCherub Medical Science & Technology Incorporated Corporation, Guangzhou 510663, China
3. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research / State Key Laboratory of Bioactive Molecules and Druggability Assessment / Jinan University, Guangzhou 510632, China

* 收稿日期:2025-08-29 录用日期:2025-10-17 网络首发日期:2025-10-30
基金项目:广东省自然科学基金(2021A1515011238;2020A1515010857)
作者简介:王婵茜(2000年生),女;研究方向:药物化学;E-mail:wangchanxii@stu.jnu.edu.cn
通信作者:陈河如(1967年生),男;研究方向:药物化学、化学生物学;E-mail:thrchen@jnu.edu.cn

全文阅读



ZR20250176

Abstract: Based on the "emperor, minister, assistant and courier" pharmacodynamic molecular groups of Huanglian Detoxifying Decoction identified by literature, series of integrated "emperor-minister" molecules have been designed and synthesized, including 6 ferulic acid-eugenol integrated molecules **FE-*n*** ($n = 1-5, 7$), 12 scutellarin-eugenol integrated molecules of **S3E-*n*** ($n=1-5, 7$) and **S5E-*n*** ($n=1-5, 7$) series. Results of *in vitro* antioxidant activity detected by DPPH assay indicated that **FE-*n*** possesses higher antioxidant activity than either single monomer when $n > 3$ under the premise of shielding the phenolic hydroxyl group of eugenols and retaining the phenolic hydroxyl group of ferulic acid, showing a certain degree of "emperor-minister" synergistic effect; however, **S3E-*n*** and **S5E-*n*** showed weak antioxidant activity because the phenolic hydroxyl group at 6-position of scutellarin was blocked. In the meantime, a glutamate-induced SH-SY5Y cell damage model was established to screen the anti-Alzheimer's disease (AD) activity of target compounds. The results showed that all **FE-*n*** ($n = 1-5, 7$) had an anti-AD activity, and **FE-4** was the most active one; The relationship between the order of its anti-AD activity and chain length n corresponds to that between its *in vitro* antioxidant activity and chain length. Interestingly, except **S3E-5**, **S3E-7** and **S5E-5** showed a weak protective effect, the other compounds in **S3E-*n*** and **S5E-*n*** series showed no anti-AD activity. In the future, more appropriate linkers and connection modes need to be explored to reveal the inherent "emperor, minister, assistant and courier" molecular compatible law.

Key words: Huanglian Detoxifying Decoction; emperor minister assistant courier; integrated assemble of pharmacodynamic molecules; anti-oxidation; anti-Alzheimer's disease

阿尔茨海默病(AD, Alzheimer's disease)是一种起病隐匿、进行性发展的神经退行性疾病。临床表现为渐进性记忆丧失、语言功能、运动机能和物体识别等多方面障碍,常伴随人格与行为异常,最终发展为全面性痴呆并致死(Scheltens et al., 2021)。全球AD患病率正持续攀升。到2050年,全球确诊AD的患者总人数可能高达1.3亿,这将对患者的家庭以及社会造成巨大的负担(Twiss et al., 2025)。AD的核心病理特征为细胞外老年斑(SPs, senile plaques)和细胞内神经原纤维缠结(NFTs, neurofibrillary tangles)的形成。前者由淀粉样 β 蛋白($A\beta$, amyloid- β protein)异常聚集沉积所产生,后者则由Tau蛋白过度磷酸化所介导;这些病理变化会引发大脑神经元与突触的大量丧失,最终导致脑萎缩等严重后果(Hong et al., 2025; Nong et al., 2025; Granholm et al., 2024)。目前,获美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于AD的药物主要包括他克林、多奈哌齐、利斯的明、加兰他敏及美金刚(穆晓等, 2024; 刘志安等, 2022)。

中医立论认为,AD与心、脾、肾功能失调关系最为密切;心脾两虚则气血化生无源,肾精亏虚则脑髓失养,加之痰瘀等病理产物壅阻脑窍,共同导致AD的发生发展(黄洁茹等, 2013)。中医药防治AD的独特价值已引起医学界广泛重视,这得益于其疗效

确切、副作用少以及多靶点、多通路的整体调节优势(陈广田等, 2021)。在治疗AD过程,中医组方遵循“君臣佐使”的方剂配伍原则(王岩等, 2025)。比如,地黄饮子,出自《黄帝内经·素问·宣明论方》(韩冉等, 2018)。该方剂共有15味中药:肉苁蓉、巴戟天、熟地黄、山茱萸为君,主补肾填髓;附子、肉桂、麦冬、石斛、五味子为臣,司固本培元、滋阴敛液之职;佐以远志、石菖蒲、茯苓化痰开窍;使以薄荷、生姜、大枣调和营卫。研究揭示(余虹霓等, 2023),地黄饮子可以激活AD小鼠的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase)/蛋白激酶B(Akt, protein kinase B)信号通路,促使小鼠的Akt和糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β)磷酸化水平增加,同时还呈现出剂量依赖性提高AD小鼠体内各种抗氧化酶的活性,从而提高机体的抗氧化能力,减少氧化损伤和细胞凋亡,提高记忆力。

黄连解毒汤始载于《肘后备急方》(刘卫霞等, 2015),该方组成精简,黄连为君,其性善走,主入心经以泻火,兼入中焦;黄芩为臣,专入上焦肺经,以清泻肺火;黄柏为佐,尤擅清利下焦湿热之火;栀子为使,能泻上、中、下三焦之火,又能利尿而引热邪下行。方青等(2004)以黄连解毒汤干预 $A\beta_{1-40}$ 诱导的AD大鼠,发现黄连解毒汤不仅可以使大鼠的学习记忆水平明显提高,还可以降低TNF- α 、INF- γ 、

IL-2 三种炎症细胞因子的含量;李斌等(2013)以东莨菪碱腹腔注射的小鼠为模型,给黄连解毒汤后可以提高模型小鼠的学习记忆能力,生化指标显示黄连解毒汤是通过降低 AchE 活性而增强 ChAT 的活性,从而使 Ach 的含量增加,达到修复胆碱能神经,改善学习记忆功能的效果。

显然,中药复方的“君臣佐使论”是中药制方的重要原则之一,在宏观上对中药复方的制方指导已有几千年的实践论证。龙伟等(2008)借助计算机虚拟筛选技术对黄连解毒汤的 265 个化学成分进行功能分群研究,并建立了复方分子功能分群的标准,最终成功鉴定出 12 个君药分子、152 个臣药分子、48 个佐药分子及 53 个使药分子,为“君臣佐使论”必定存在其微观机制的观点提供了实证支持。该研究“君药”分子如小檗碱(berberine)、黄芩素(scutellarin)、阿魏酸(ferulic acid)作为治疗老年痴呆症的潜在药物已有相关文献报道(Li et al., 2023; Simunkova et al., 2019; Sgarbossa et al., 2015);臣药是处方中辅助君药起治疗作用的药物,所以“臣药”分子与“君药”分子应当具有相似的功能。研究

证实(Roy et al., 2024; Taheri et al., 2019; Zhu et al., 2015),“臣药”分子丁香酚(eugenol)、黄连碱(coptisine)、异汉黄芩素(isowogonin)具有治疗 AD 作用;佐药最重要的特征是缓和“君臣药”的毒副作用,“佐药”分子绿原酸(chlorogenic acid)、甘露醇(mannitol)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid)的解毒功能已经得到证实(Huang et al., 2024; Ho et al., 2019; Wang et al., 2008);“使药”的作用一般认为有两个方面,一是调和诸药;二是引经作用,即引导诸药达到患病脏腑、相关经络及病灶,或靶向类似作用。

在建立功效群分子的基础上,进行微观意义上的“君臣佐使”配伍,形成分子中药(见图1),这样的分子中药具有成分明确、作用机制清晰、质量标准容易控制的特点(Wang et al., 2025b; 王四旺, 2008)。本研究组提出药效分子的一体化组装,即通过合适的连接子(一)将不同的药效分子连接在一起,成为一个一体化的分子(图1),这样的分子将是多靶导向配体,对于治疗类似 AD 这样的多因性疾病具有更突出的优势(Manavi et al., 2025; Zhou et al., 2019)。

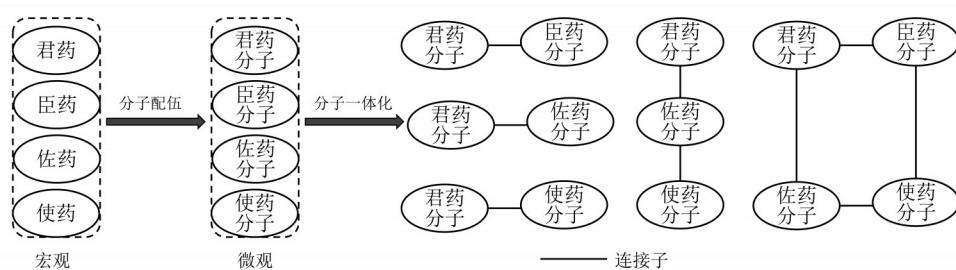


图1 黄连解毒汤药效分子的配伍及一体化组装

Fig. 1 Compatibility and integrated assembly of pharmacodynamic molecules in Huanglian Detoxifying Decoction

鉴于此,本研究将报道药效分子一体化组装的初步尝试,即对黄连解毒汤中的“君药分子-臣药分子”进行一体化组装,并对其抗氧化活性和对 AD 细胞模型的保护作用进行初步研究。

1 材料与方

1.1 仪器、试剂和材料

集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义予华仪器有限公司);EYELA 型旋转蒸发仪(东京理化器械独资工厂);FA2104 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);低温恒温搅拌反应浴(长城科工贸有限公司);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);DZF-150 型小型真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声

仪器有限公司);TU-1810S 紫外分光光度计(北京普析通仪器有限公司);LGJ-12 冷冻干燥机(巩义市英峪予华仪器有限公司);Bruker-AV 400 MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);LC-UV100 液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司);Cosmosil 5C18-MS-II 色谱柱(Nacalai Tesque Inc., 日本)。

BP211D 分析天平(德国 Sartorius 公司);生物安全柜(新加坡 Esco 公司);移液枪(德国 Eppendorf 公司);HVE-50 蒸汽压力灭菌锅(日本 Hirayama 公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);超纯水机(美国 Millipore 公司);酶标仪(美国 Bio Tek 公司);倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司)。

阿魏酸、黄芩素、1,3-二溴丙烷、1,8-二溴辛烷、碘甲烷均购自北京伊诺凯科技有限公司;1,2-二溴

乙烷、1,4-二溴丁烷、1,5-二溴戊烷、四氢呋喃(THF)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)购自萨恩化学技术(上海)有限公司;丁香酚、1,6-二溴己烷、乙酸钠、二氯亚砷、碘化钾、钨碳、Trolox、DPPH、谷氨酸、甲醇(色谱纯)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

DMEM培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国Millipore公司;支原体清除试剂购自碧云天生物技术有限公司。人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)购于中国科学院上海细胞库。

DMF和甲醇分别先经过量的无水硫酸钠预处理,进行过夜搅拌后静置,取上层清液加CaH₂回流6~8 h,减压蒸馏,加入分子筛保存备用;THF先经过量的无水硫酸钠预处理,充分搅拌后静置一段时间,取上层清液加入钠丝、二苯甲酮,回流直至溶液变成深紫色,收集66 °C左右馏分,并将活化后的分子筛加入馏分,保存备用。

1.2 黄连解毒汤中“君药分子-臣药分子”的一体化组装及合成

鉴于药效分子的一体化组装还未见文献报道依据,尚未有相关成熟的理论作为指导,本研究属于初始的、摸索性工作。依据从简单到复杂,由易到难的原则,考虑到阿魏酸、黄芩素和丁香酚都是黄连解毒汤中的药效分子,同时商业上也是价廉易得,本研究选择“君药”分子阿魏酸和黄芩素分别与“臣药”分子丁香酚通过简单的碳链(**E-*n***)进行一体化组装,碳链链长*n*为1到5以及7个碳。设计合成“阿魏酸-丁香酚”和“黄芩素-丁香酚”药效一体化化合物的合成路线,见图2。

1.2.1 1-*O*-溴烷基丁香酚(**E-*n***, *n* = 1~5, 7)的合成

取丁香酚(0.15 mL, 1.0 mmol)于干燥的100 mL单口瓶中,加入碳酸钾(690.0 mg, 5.0 mmol),以及相对应的1,*n*-二溴烷烃(1.6 mmol),加入适量丙酮溶解,氮气保护,60 °C回流24 h,TLC点板检测。待反应完毕后,过滤,滤液经减压浓缩,再经硅胶柱层析进行分离纯化(石油醚:乙酸乙酯 = 50:1, *V/V*)。

1-*O*-溴乙基丁香酚(**E-1**)依据上述实验步骤,投入1,2-二溴乙烷(300.6 mg, 1.6 mmol)。经硅胶柱层析分离后,得到黄色液体220.2 mg,收率81.2%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.84 (d, *J* = 8.3, 1H), 6.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 5.95 (ddt, *J* = 16.9, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.13~5.05 (m, 2H), 4.32 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.70~3.56 (m, 2H),

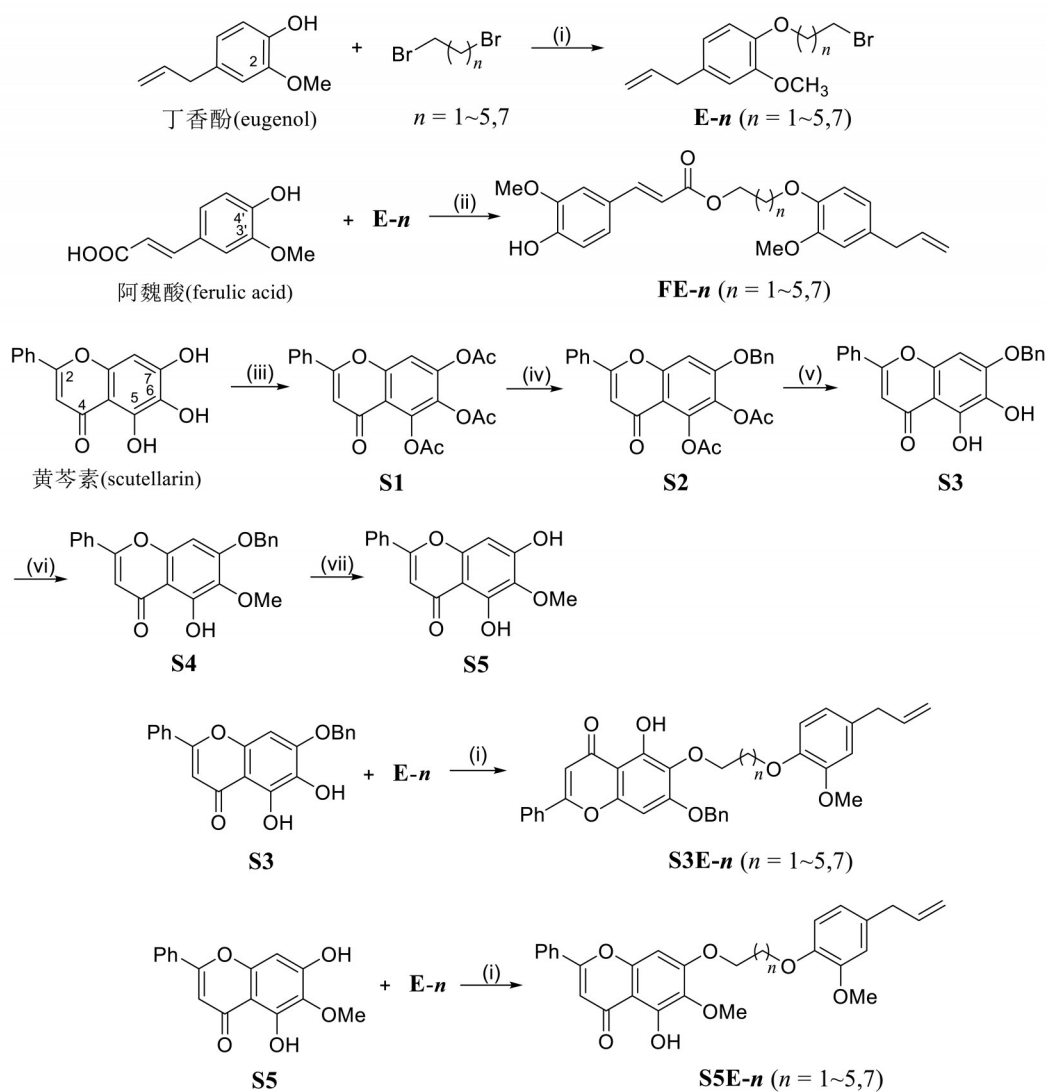
3.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.7, 147.5, 137.2, 133.2, 121.7, 115.8, 113.9, 112.5, 69.4, 56.1, 39.7, 29.1; HR-MS (ESI): calcd for C₁₂H₁₆BrO₂ [M+H]⁺ 271.033 4, found 271.033 1。以上数据与Rao et al. (2022)同。

1-*O*-溴丙基丁香酚(**E-2**)依据上述实验步骤,投入1,3-二溴丙烷(323.0 mg, 1.6 mmol)。经硅胶柱层析分离后,得黄色液体226.7 mg,收率79.5%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.85 (d, *J* = 8.4, 1H), 6.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.96 (ddt, *J* = 16.7, 10.1, 6.7 Hz, 1H), 5.12~5.05 (m, 2H), 4.32 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.65 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.31 (p, *J* = 6.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.7, 147.4, 137.6, 133.5, 121.1, 115.8, 114.0, 112.7, 69.3, 56.1, 39.8, 33.2, 29.9; HR-MS (ESI): calcd for C₁₃H₁₈BrO₂ [M+H]⁺ 285.049 0, found 285.049 3。以上数据与Wang et al. (2021)同。

1-*O*-溴丁基丁香酚(**E-3**)依据上述实验步骤,投入1,4-二溴丁烷(345.5 mg, 1.6 mmol)。经硅胶柱层析分离后,得黄色液体226.2 mg,收率75.6%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.83 (d, *J* = 8.2, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.97 (ddt, *J* = 16.8, 10.1, 6.8 Hz, 1H), 5.11~5.04 (m, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.54 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.33 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.12~2.07 (m, 2H), 2.03~1.96 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.6, 147.2, 137.6, 133.2, 120.7, 115.6, 113.8, 112.5, 68.3, 56.0, 39.8, 30.9, 29.7, 28.1; HR-MS (ESI): calcd for C₁₄H₂₀BrO₂ [M+H]⁺ 299.064 7, found 299.064 5。以上数据与Wu et al. (2024)同。

1-*O*-溴戊基丁香酚(**E-4**)依据上述实验步骤,投入1,5-二溴戊烷(367.9 mg, 1.6 mmol)。经硅胶柱层析分离后,得黄色液体240.6 mg,收率76.8%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.85 (d, *J* = 8.2, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 5.95 (ddt, *J* = 16.8, 10.1, 6.8 Hz, 1H), 5.12~5.05 (m, 2H), 4.11 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.53 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.34 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.91~1.85 (m, 2H), 1.79~1.73 (m, 2H), 1.36~1.28 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.7, 147.5, 137.3, 132.7, 121.7, 115.7, 113.9, 112.6, 69.2, 56.3, 39.9, 33.8, 32.7, 28.8, 24.5; HR-MS (ESI): calcd for C₁₅H₂₂BrO₂ [M+H]⁺ 313.080 3, found 313.080 7。以上数据与Wu et al. (2024)同。

1-*O*-溴己基丁香酚(**E-5**)依据上述实验步骤,投



(i) K₂CO₃, 丙酮, 60 °C, 24 h; (ii) 三乙胺, 丙酮, 60 °C, 24 h; (iii) Ac₂O, NaOAc, 80 °C, 8 h; (iv) KI, K₂CO₃, BnBr, 丙酮, 60 °C, 24 h; (v) w=5% NaOH, 丙酮, 60 °C, 6 h; (vi) KI, MeI, K₂CO₃, 丙酮, 60 °C, 24 h; (vii) Pd/C, H₂, 四氢呋喃, 室温, 12 h。

图2 黄连解毒汤中“君药分子-臣药分子”的一体化组装

Fig. 2 Integrated assembly of "emperor-minister pharmacodynamic molecules" in Huanglian Detoxifying Decoction

入1,6-二溴己烷(390.4 mg, 1.6 mmol)。经硅胶柱层析分离后,得黄色液体258.2 mg,收率78.9%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.84 (d, *J* = 8.3, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.93 (ddt, *J* = 16.7, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.13~5.07 (m, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.52 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.35 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.89~1.81 (m, 2H), 1.78~1.72 (m, 2H), 1.46~1.42 (m, 2H), 1.33~1.25 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.8, 147.7, 136.6, 132.7, 121.8, 116.1, 113.8, 112.5, 69.1, 56.2, 39.7, 33.9, 32.6, 29.8, 25.5, 24.8; HR-MS (ESI): calcd for C₁₆H₂₄BrO₂ [M+H]⁺ 327.096 0, found 327.095 8。以上数据与Wu et al. (2024)同。

1-*O*-溴辛基丁香酚(E-7)依据上述实验步骤,投入1,8-二溴辛烷(435.2 mg, 1.6 mmol)。经硅胶柱层析分离后,得黄色液体252.3 mg,收率70.8%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.87 (d, *J* = 8.3, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 5.94 (ddt, *J* = 16.8, 10.3, 6.8 Hz, 1H), 5.11~5.04 (m, 2H), 4.10 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.53 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.34 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.85~1.79 (m, 2H), 1.78~1.73 (m, 2H), 1.45~1.41 (m, 2H), 1.33~1.28 (m, 4H), 1.27~1.25 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.9, 147.8, 136.7, 132.6, 121.9, 116.2, 113.7, 112.6, 69.0, 56.1, 39.8, 33.7, 32.5, 29.7(2), 28.6, 28.1, 25.9; HR-MS (ESI): calcd for C₁₈H₂₈BrO₂

$[M+H]^+$ 355.127 3, found 355.127 8。以上数据与 Wu et al. (2024) 同。

1.2.2 丁香酚氧烷基阿魏酸酯(FE-*n*, *n* = 1~5, 7)的合成 取阿魏酸(388.0 mg, 2.0 mmol)于干燥的 100 mL 单口瓶中,加入三乙胺(0.84 mL, 6.0 mmol), 以及相对应的 E-*n* (*n* = 1~5, 7)系列化合物(1.0 mmol), 加入适量丙酮溶解, 60 °C 搅拌反应 24 h, TLC 点板监测。待反应完全后, 反应液经减压蒸馏浓缩, 加入蒸馏水 150 mL, 用乙酸乙酯连续萃取水相 3 次, 将有机相合并, 无水硫酸钠干燥, 然后过滤, 除去无水硫酸钠, 经减压蒸馏除去乙酸乙酯, 硅胶柱层析(石油醚: 乙酸乙酯 = 5:1, *V/V*)分离纯化。得到黄色黏稠液体, 收率 45.3%~76.2%。

丁香酚氧乙基阿魏酸酯(FE-1)依据上述实验步骤, 投入 E-1(272.2 mg, 1.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 174.1 mg, 收率 45.3%, 纯度 98.2%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.05~6.99 (m, 2H), 6.91~6.84 (m, 2H), 6.70 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.31 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.00~5.86 (m, 2H), 5.10~5.01 (m, 2H), 4.56~4.48 (m, 2H), 4.29~4.24 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.4, 150.0, 148.2, 145.0, 146.5, 145.5, 137.7, 134.2, 127.1, 123.4, 120.8, 115.9, 115.3, 115.1, 114.9, 112.8, 109.5, 68.0, 63.1, 56.1, 40.0; HR-MS (ESI): calcd for C₂₂H₂₅O₆ ($[M+H]^+$) 385.165 1, found 385.164 2。

丁香酚氧丙基阿魏酸酯(FE-2)依据上述实验步骤, 投入 E-2(285.2 mg, 1.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 253.4 mg, 收率 63.6%, 纯度 98.5%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.05~6.97 (m, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.26 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 6.00~5.86 (m, 1H), 5.10~5.01 (m, 2H), 4.39 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.11 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.20 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.4, 149.6, 148.2, 147.0, 146.7, 145.1, 137.8, 133.4, 127.0, 123.2, 120.6, 115.8, 115.4, 114.9, 113.8, 112.6, 109.6, 66.0, 61.5, 56.0, 39.9, 28.9; HR-MS (ESI): calcd for C₂₃H₂₇O₆ ($[M+H]^+$) 399.180 8, found 399.180 9。

丁香酚氧丁基阿魏酸酯(FE-3)依据上述实验步骤, 投入 E-3(299.2 mg, 1.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 308.5 mg, 收率 74.8%, 纯度

98.6%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.05~6.99 (m, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.26 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.00~5.85 (m, 1H), 5.09~5.01 (m, 2H), 4.25 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.02 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.30 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.97~1.84 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.4, 149.5, 148.1, 147.0, 146.8, 145.0, 137.8, 133.1, 127.0, 123.1, 120.6, 115.7, 115.5, 114.9, 113.5, 112.5, 109.5, 68.8, 64.2, 56.0(2), 39.9, 26.2, 25.6; HR-MS (ESI): calcd for C₂₄H₂₉O₆ ($[M+H]^+$) 413.196 3, found 413.196 7。

丁香酚氧戊基阿魏酸酯(FE-4)依据上述实验步骤, 投入 E-4(313.2 mg, 1.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 300.3 mg, 收率 70.4%, 纯度 97.8%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.93 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 2H), 5.15~4.95 (m, 2H), 4.20 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.99 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.31 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.92~1.82 (m, 2H), 1.80~1.70 (m, 2H), 1.58 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.5, 149.5, 148.1, 147.0, 146.9, 144.9, 137.8, 133.0, 127.0, 123.1, 120.6, 115.7, 115.6, 114.9, 113.4, 112.5, 109.5, 69.0, 64.5, 56.0, 56.0, 39.9, 29.1, 28.7, 22.7; HR-MS (ESI): calcd for C₂₅H₃₁O₆ ($[M+H]^+$) 427.212 2, found 427.211 3。

丁香酚氧己基阿魏酸酯(FE-5)依据上述实验步骤, 投入 E-5(327.3 mg, 1.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 335.7 mg, 收率 76.2%, 纯度 97.6%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.05~6.97 (m, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.36~6.15 (m, 2H), 6.04~5.81 (m, 1H), 5.10~4.99 (m, 2H), 4.17 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.96 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.29 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.85~1.77 (m, 2H), 1.75~1.64 (m, 2H), 1.53~1.40 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.5, 149.4, 148.1, 147.0, 146.9, 144.8, 137.7, 132.8, 126.9, 123.0, 120.5, 115.6, 115.5, 114.9, 113.3, 112.4, 109.5, 69.0, 64.5, 55.9, 55.9, 39.8, 29.2, 28.7, 25.9, 25.8; HR-MS (ESI): calcd for C₂₆H₃₃O₆ ($[M+H]^+$)

441.227 7, found 441.227 4。

丁香酚氧辛基阿魏酸酯(**FE-7**)依据上述实验步骤,投入**E-7**(355.3 mg, 1.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体339.3 mg,收率72.4%,纯度96.9%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.06~6.99 (m, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 6.00~5.86 (m, 1H), 5.09~5.00 (m, 2H), 4.17 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.96 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.30 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.85~1.74 (m, 2H), 1.72~1.61 (m, 2H), 1.42~1.36 (m, 8H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.6, 149.4, 148.1, 147.0(2), 144.8, 137.8, 132.8, 127.1, 123.1, 120.6, 115.7, 115.6, 114.9, 113.3, 112.5, 109.5, 69.2, 64.7, 56.0(2), 39.9, 29.4, 29.3, 28.9, 26.0; HR-MS (ESI): calcd for C₂₈H₃₇O₆ ([M+H]⁺) 469.259 0, found 469.258 6。

1.2.3 5,6,7-O-三乙酰基黄芩素(S1)的合成 取黄芩素(270.0 mg, 1.0 mmol)于干燥的100 mL单口瓶中,加入乙酸钠113.0 mg(1.4 mmol),加入乙酸酐4 mL,80 °C反应8 h,TLC点板监测。待反应完全后,冷却至室温,将反应体系倒入150 mL冰水中,搅拌,乙酸乙酯萃取3次,蒸馏水洗涤,减压浓缩。残留物经硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 3:1, *V/V*)分离纯化,得无色黏稠液体330 mg,收率83.4%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 10.0 Hz, 4H), 6.62 (s, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.32 (s, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.4, 168.5, 167.4, 167.2, 162.9, 154.4, 147.1, 142.3, 132.9, 132.0, 131.1, 129.3, 126.4, 115.8, 110.5, 108.4, 21.0(2), 20.3; HR-MS (ESI): calcd for C₂₁H₁₇O₈ ([M+H]⁺) 397.092 3, found 397.092 8。以上数据与Li et al. (2015)同。

1.2.4 5,6-O-二乙酰-7-O-苜基黄芩素(S2)的合成 取化合物**S1**(396.4 mg, 1.0 mmol)于干燥的100 mL单口瓶中,加入碳酸钾(560.0 mg, 4.0 mmol),催化量的碘化钾(16.6 mg, 0.1 mmol),苜溴(0.36 mL, 3.0 mmol),加入35 mL丙酮溶解,60 °C搅拌反应24 h,TLC点板监测。待反应完全后,过滤,滤液经减压蒸馏浓缩,经硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 10:1, *V/V*)分离纯化。得无色黏稠液体329.7 mg,收率74.2%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 7.37 (s, 5H), 6.97 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.16 (s, 2H), 2.44 (s, 3H),

2.27 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.4, 168.9, 168.2, 162.3, 155.8, 155.4, 142.0, 135.2, 131.7, 131.4, 131.1, 129.2, 128.9, 128.6, 127.4, 126.3, 111.6, 108.4, 99.5, 71.4, 21.1, 20.3; HR-MS (ESI): calcd for C₂₆H₂₁O₇ ([M+H]⁺) 445.128 7, found 445.128 6。以上数据与Li et al. (2015)同。

1.2.5 7-O-苜基黄芩素(S3)的合成 取化合物**S2**(444.4 mg, 1.0 mmol)于干燥的100 mL单口瓶中,加入丙酮20 mL溶解化合物后,再加入 $w=5\%$ 氢氧化钠水溶液3.7 mL,60 °C搅拌反应6 h,TLC点板监测。待反应完全后,旋蒸除去丙酮,浓缩液加入蒸馏水溶解,用稀盐酸调节pH至中性,用乙酸乙酯连续萃取3次,将有机相合并,无水硫酸钠进行干燥,过滤除去无水硫酸钠,经减压蒸馏除去乙酸乙酯,柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 1:1, *V/V*)分离纯化。得黄色黏稠液体255.1 mg,收率70.8%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.55 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.59~7.51 (m, 5H), 7.44~7.34 (m, 3H), 7.02 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 5.28 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 182.3, 163.2, 153.6, 149.7, 146.5, 136.3, 132.0, 130.8, 130.5, 129.1, 128.5, 128.1, 127.8, 126.3, 105.4, 104.7, 92.5, 70.2; HR-MS (ESI): calcd for C₂₂H₁₇O₅ ([M+H]⁺) 361.107 6, found 361.107 7。以上数据与Jiang et al. (2018)同。

1.2.6 6-O-甲基-7-O-苜基黄芩素(S4)的合成 取化合物**S3**(360.4 mg, 1.0 mmol)于干燥的100 mL单口瓶中,加入碘甲烷0.1 mL(1.5 mmol)、碳酸钾414 mg(3.0 mmol)、催化量碘化钾(16.6 mg, 0.1 mmol),加入丙酮35 mL溶解,60 °C搅拌反应24 h,TLC点板监测。待反应完全后,过滤,滤液经减压蒸馏浓缩,经硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 10:1, *V/V*)分离纯化。得淡黄色黏稠液体364.4 mg,收率72.5%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.69 (s, 1H), 7.84 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 2H), 7.52~7.33 (m, 8H), 6.64 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.93 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.9, 164.2, 158.2, 153.5, 153.4, 136.0, 133.4, 132.0, 131.5, 129.3, 129.0, 128.5, 127.4, 126.5, 106.7, 105.8, 92.4, 71.1, 61.1; HR-MS (ESI): calcd for C₂₃H₁₉O₅ ([M+H]⁺) 375.123 2, found 375.122 8。以上数据与Panhekar et al. (2015)同。

1.2.7 6-O-甲基黄芩素(S5)的合成 取化合物**S4**(374.4 mg, 1.0 mmol)于干燥的100 mL单口瓶中,加入重蒸四氢呋喃溶解固体后,再加入 $w=10\%$ 钡

碳 15 mg, 通过气球加入氢气, 室温下搅拌 12 h。待反应完全后, 过滤, 滤液经减压蒸馏浓缩, 经硅胶柱层析(石油醚: 乙酸乙酯 = 3:1, V/V)分离纯化。得淡黄色黏稠液体 259.8 mg, 收率 91.4%。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 12.97 (s, 1H), 7.86 (dd, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 6.63 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 6.59 (s, 1H), 4.02 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 183.3, 164.3, 155.4, 153.5, 152.3, 132.1, 131.5, 130.6, 129.3, 126.5, 106.1, 105.5, 93.7, 61.1; HR-MS (ESI): calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 285.076 3, found 285.076 7。以上数据与 Huang et al. (2003)同。

1.2.8 6-*O*-丁香酚氧烷基-7-*O*-苜基黄芩素(S3E- n , $n = 1\sim 5, 7$)的合成 取化合物 S3 (360.4 mg, 1.0 mmol) 于干燥的 100 mL 单口瓶中, 加入碳酸钾 414 mg (3.0 mmol), 以及相对应的 E- n ($n = 1\sim 5, 7$) 系列化合物 (2.0 mmol), 加入适量丙酮溶解, 60 °C 搅拌反应 24 h, TLC 点板监测。待反应完全后, 过滤, 滤液经减压蒸馏浓缩, 经硅胶柱层析(石油醚: 乙酸乙酯 = 2:1, V/V) 分离纯化。得到淡黄色黏稠液体, 收率 44.2%~53.7%。

6-*O*-丁香酚氧乙基-7-*O*-苜基黄芩素(S3E-1) 依据上述实验步骤, 投入 E-1 (544.4 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 243.4 mg, 收率 44.2%, 纯度 98.3%。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 12.68 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 7.41 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 6.57 (s, 1H), 5.94 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 5.09~5.01 (m, 2H), 4.47 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.34 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.30 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 182.9, 164.2, 158.3, 153.5, 153.4, 149.7, 146.8, 137.9, 136.0, 133.4, 132.4, 132.0, 131.5, 129.3, 128.9, 128.4, 127.4, 126.5, 120.7, 115.8, 114.3, 112.7, 106.6, 105.8, 92.4, 71.5, 71.2, 68.7, 56.0, 40.0; HR-MS (ESI): calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{O}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 551.207 0, found 551.206 4。

6-*O*-丁香酚氧丙基-7-*O*-苜基黄芩素(S3E-2) 依据上述实验步骤, 投入 E-2 (570.4 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得淡黄色黏稠液体 272.2 mg, 收率 48.2%, 纯度 98.6%。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 12.65 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 7.41 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 6.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 9.2$ Hz, 3H), 6.56 (s, 1H), 6.01~5.87 (m, 1H), 5.14 (s, 2H),

5.09~5.01 (m, 2H), 4.26 (dt, $J = 15.4, 6.2$ Hz, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.30 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.30~2.21 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 182.9, 164.1, 158.3, 153.7, 153.3, 149.5, 147.2, 138.0, 135.9, 132.8, 132.3, 132.0, 131.5, 129.3, 128.9, 128.5, 127.4, 126.5, 120.8, 115.7, 113.7, 112.6, 106.6, 105.8, 92.2, 71.1, 70.4, 66.5, 56.1, 40.0, 29.9; HR-MS (ESI): calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{O}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 565.222 6, found 565.223 1。

6-*O*-丁香酚氧丁基-7-*O*-苜基黄芩素(S3E-3) 依据上述实验步骤, 投入 E-3 (598.4 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得淡黄色黏稠液体 311.3 mg, 收率 53.7%, 纯度 97.5%。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 12.65 (s, 1H), 7.84 (dd, $J = 7.8, 1.9$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 7.46~7.42 (m, 2H), 7.40~7.31 (m, 3H), 6.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 6.63 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.01~5.87 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.10~5.05 (m, 1H), 5.03 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 4.12 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.00 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.31 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.98 (dt, $J = 9.1, 4.1$ Hz, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 182.9, 164.1, 158.4, 153.7, 153.3, 149.6, 147.1, 137.9, 136.0, 132.8, 132.4, 132.0, 131.5, 129.3, 128.9, 128.5, 127.5, 126.4, 120.7, 115.7, 113.5, 112.6, 106.6, 105.8, 92.2, 73.1, 71.1, 68.9, 56.1, 40.0, 26.9, 26.0; HR-MS (ESI): calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{O}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 579.238 3, found 579.238 7。

6-*O*-丁香酚氧戊基-7-*O*-苜基黄芩素(S3E-4) 依据上述实验步骤, 投入 E-4 (626.4 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得淡黄色黏稠液体 310.6 mg, 收率 52.4%, 纯度 97.3%。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 12.66 (s, 1H), 7.87~7.81 (m, 2H), 7.52~7.41 (m, 5H), 7.35 (dt, $J = 13.2, 6.9$ Hz, 3H), 6.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.03~5.88 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.11~5.02 (m, 2H), 4.08 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.92 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.31 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.89~1.78 (m, 4H), 1.67~1.57 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 182.8, 164.1, 158.4, 153.6, 153.2, 149.5, 147.0, 137.9, 136.0, 132.8, 132.4, 132.0, 131.5, 129.2, 128.9, 128.5, 127.5, 126.4, 120.6, 115.7, 113.3, 112.5, 106.6, 105.7, 92.2, 73.4, 71.1, 69.1, 56.1, 40.0, 30.1, 29.2, 22.6; HR-MS (ESI): calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{O}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 593.253 9, found 593.254 2。

6-*O*-丁香酚氧己基-7-*O*-苜基黄芩素(S3E-5) 依据上述实验步骤, 投入 E-5 (654.6 mg, 2.0 mmol)。

硅胶柱层析分离后得淡黄色黏稠液体 320.3 mg, 收率 52.8%, 纯度 97.8%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.65 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.42 (ddd, *J* = 29.2, 13.5, 6.8 Hz, 8H), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 6.60 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H), 5.95 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.11~5.01 (m, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.31 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.83~1.74 (m, 4H), 1.57~1.43 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.9, 164.1, 158.4, 153.6, 153.2, 149.5, 147.1, 137.9, 136.0, 132.8, 132.5, 131.9, 131.5, 129.2, 128.9, 128.4, 127.4, 126.4, 120.6, 115.7, 113.4, 112.6, 106.6, 105.7, 92.2, 73.5, 71.1, 69.2, 56.1, 30.0, 30.3, 29.3, 26.0, 25.9; HR-MS (ESI): calcd for C₃₈H₃₉O₇ ([M+H]⁺) 607.269 6, found 607.269 9。

6-*O*-丁香酚氧辛基-7-*O*-苄基黄芩素(**S3E-7**)依据上述实验步骤,投入 **E-7**(710.6 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 337.7 mg, 收率 53.2%, 纯度 97.2%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.66 (s, 1H), 7.83 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 2H), 7.51~7.42 (m, 5H), 7.42~7.32 (m, 3H), 6.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.02~5.87 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.10~5.02 (m, 2H), 4.06 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.96 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.79 (dd, *J* = 12.8, 5.0 Hz, 4H), 1.50~1.38 (m, 4H), 1.32 (dd, *J* = 6.5, 3.5 Hz, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.8, 164.0, 158.4, 153.6, 153.1, 149.5, 147.1, 137.9, 136.0, 132.7, 132.5, 131.9, 131.4, 129.2, 128.8, 128.4, 127.4, 126.4, 120.6, 115.7, 113.3, 112.5, 106.6, 105.7, 92.2, 73.6, 71.0, 69.3, 56.1, 39.9, 30.3, 29.5, 29.5, 29.4, 26.1, 26.0; HR-MS (ESI): calcd for C₄₀H₄₃O₇ ([M+H]⁺) 635.309 9, found 635.309 3。

1.2.9 6-*O*-甲基-7-*O*-丁香酚氧烷基黄芩素(S5E-*n***, *n* = 1~5, 7)的合成** 取化合物 **S5**(284.3 mg, 1.0 mmol)于干燥的 100 mL 单口瓶中,加入碳酸钾 414 mg (3.0 mmol),以及相对应的 **E-*n*** (*n* = 1~5, 7)系列化合物(2.0 mmol),加入适量丙酮溶解,60 °C 搅拌反应 24 h, TLC 点板监测。待反应完全后,过滤,滤液经减压蒸馏浓缩,经硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯 = 1:1, *V/V*)分离纯化。得到黄色黏稠液体,收率 41.8%~54.7%。

6-*O*-甲基-7-*O*-丁香酚氧乙基黄芩素(**S5E-1**)依据上述实验步骤,投入 **E-1**(544.4 mg, 2.0 mmol)。

硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 198.3 mg, 收率 41.8%, 纯度 95.8%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.65 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 6.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.73~6.69 (m, 2H), 6.64 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 5.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 5.09~5.02 (m, 2H), 4.45 (q, *J* = 2.4 Hz, 4H), 3.88 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.32 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.9, 164.2, 158.3, 153.5, 153.3, 145.0, 146.5, 137.7, 134.3, 133.3, 132.0, 131.5, 129.3, 126.5, 120.8, 115.9, 115.0, 112.9, 106.7, 105.8, 92.2, 68.1, 68.0, 61.1, 56.1, 40.0; HR-MS (ESI): calcd for C₂₈H₂₇O₇ ([M+H]⁺) 475.175 7, found 475.175 6。

6-*O*-甲基-7-*O*-丁香酚氧丙基黄芩素(**S5E-2**)依据上述实验步骤,投入 **E-2**(570.4 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得淡黄色黏稠液体 223.3 mg, 收率 45.7%, 纯度 98.2%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.64 (s, 1H), 7.86 (dd, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.63 (d, *J* = 14.5 Hz, 2H), 5.98~5.86 (m, 1H), 5.08~5.01 (m, 2H), 4.32 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.22 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.30 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.42~2.34 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.9, 164.2, 158.6, 153.5, 153.4, 149.8, 146.7, 137.8, 133.7, 133.1, 132.0, 131.6, 129.3, 126.5, 120.8, 115.9, 114.1, 112.6, 106.5, 105.8, 91.8, 66.1, 65.9, 61.0, 56.1, 40.0, 29.4; HR-MS (ESI): calcd for C₂₉H₂₉O₇ ([M+H]⁺) 489.191 3, found 489.191 5。

6-*O*-甲基-7-*O*-丁香酚氧丁基黄芩素(**S5E-3**)依据上述实验步骤,投入 **E-3**(598.4 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得淡黄色黏稠液体 272.9 mg, 收率 54.3%, 纯度 98.1%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.63 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 6.65 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.98~5.89 (m, 1H), 5.05 (dd, *J* = 9.1, 7.9 Hz, 2H), 4.19 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.11~2.02 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.9, 164.1, 158.7, 153.5, 153.4, 149.6, 146.9, 137.9, 133.3, 133.1, 132.0, 131.6, 129.3, 126.5, 120.7, 115.9, 113.6, 112.6, 106.4, 105.8, 91.7, 69.2, 68.9, 61.1, 56.1, 40.0, 26.2, 26.1; HR-MS (ESI): calcd for C₃₀H₃₁O₇ ([M+H]⁺) 503.207 0, found 503.207 5。

6-*O*-甲基-7-*O*-丁香酚氧戊基黄芩素(**S5E-4**)依据上述实验步骤,投入 **E-4**(626.4 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得淡黄色黏稠液体 277.4 mg, 收率 53.7%, 纯度 97.5%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.63 (s, 1H), 7.86 (dd, *J*=7.7, 1.9 Hz, 2H), 7.54~7.47 (m, 3H), 6.80 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 6.68 (d, *J*=6.6 Hz, 2H), 6.64 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.00~5.87 (m, 1H), 5.09~5.01 (m, 2H), 4.11 (t, *J*=6.5 Hz, 2H), 4.02 (t, *J*=6.5 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.30 (d, *J*=6.7 Hz, 2H), 1.94 (dt, *J*=14.5, 7.5 Hz, 4H), 1.70 (d, *J*=7.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.9, 164.1, 158.7, 153.5, 153.3, 149.6, 146.9, 137.8, 133.1, 133.1, 132.0, 131.5, 129.3, 126.4, 120.6, 115.8, 113.5, 112.5, 106.3, 105.8, 91.6, 69.2, 69.0, 61.0, 56.0, 40.0, 29.1, 28.9, 22.8; HR-MS (ESI): calcd for C₃₁H₃₃O₇ ([M+H]⁺) 517.222 6, found 517.223 1。

6-*O*-甲基-7-*O*-丁香酚氧己基黄芩素(**S5E-5**)依据上述实验步骤,投入 **E-5**(654.6 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得淡黄色黏稠液体 282.8 mg, 收率 53.3%, 纯度 96.5%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.63 (s, 1H), 7.86 (dd, *J*=7.6, 1.8 Hz, 2H), 7.50 (d, *J*=7.1 Hz, 3H), 6.79 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 6.69 (s, 2H), 6.64 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.00~5.86 (m, 1H), 5.09~5.01 (m, 2H), 4.09 (t, *J*=6.5 Hz, 2H), 3.99 (t, *J*=6.6 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.30 (d, *J*=6.7 Hz, 2H), 1.89 (dt, *J*=13.7, 6.7 Hz, 4H), 1.61~1.52 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.9, 164.1, 158.7, 153.5, 153.3, 149.6, 147.0, 137.9, 133.1, 133.0, 132.0, 131.5, 129.3, 126.4, 120.6, 115.8, 113.4, 112.6, 106.3, 105.8, 91.6, 69.3, 69.2, 61.0, 56.1, 40.0, 29.4, 29.0, 26.0, 25.9; HR-MS (ESI): calcd for C₃₂H₃₅O₇ ([M+H]⁺) 531.238 3, found 531.238 5。

6-*O*-甲基-7-*O*-丁香酚氧辛基黄芩素(**S5E-7**)依据上述实验步骤,投入 **E-7**(710.6 mg, 2.0 mmol)。硅胶柱层析分离后得黄色黏稠液体 305.6 mg, 收率 54.7%, 纯度 97.6%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.63 (s, 1H), 7.89~7.84 (m, 2H), 7.53~7.47 (m, 3H), 6.78 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 6.68 (d, *J*=6.7 Hz, 2H), 6.64 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.99~5.88 (m, 1H), 5.06 (d, *J*=6.9 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.07 (t, *J*=6.6 Hz, 2H), 3.97 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.30 (d, *J*=6.7 Hz, 2H), 1.90~1.79 (m, 4H), 1.51~1.37 (m, 8H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)

δ 182.9, 164.1, 158.8, 153.5, 153.3, 149.6, 147.1, 137.9, 133.1, 132.9, 132.0, 131.6, 129.3, 126.4, 120.6, 115.8, 113.4, 112.6, 106.3, 105.8, 91.6, 69.4, 69.3, 61.0, 56.1, 40.0, 29.5, 29.4, 29.4, 29.1, 26.1 (2); HR-MS (ESI): calcd for C₃₄H₃₉O₇ ([M+H]⁺) 559.269 6, found 559.269 5。

1.3 DPPH法检测体外抗氧化活性

精密称取 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 3.94 mg(0.01 mmol),将其溶解于 5 mL 的色谱纯甲醇中配制成 2 mmol/L 的母液,低温、避光保存。实验时取母液 100 μL 稀释至 2 mL,配制成 100 μmol/L 的溶液,现配现用。本实验以 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox)阳性对照品。

实验共设置 3 个组,每组有 3 个孔,分别是空白组(160 μL 甲醇 + 40 μL 供试品)、对照组(160 μL DPPH + 40 μL 甲醇)、样品组(160 μL DPPH + 40 μL 供试品)。所有溶液加入 96 孔板后,在摇床上震荡 1 min,使孔内溶液充分混合。将 96 孔板避光静置反应 30 min,然后快速将 96 孔板置于检测波长为 517 nm 的酶标仪中,记录所测化合物的吸光度(*A*)值,每个样品平行检测 3 次,取 3 次试验的平均值,并计算均方差。

$$C = [A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})] / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

式中 *C* 为自由基清除率;*A*_{对照} 为没有加入测试样品反应液的吸光度;*A*_{样品} 为加入测试样品后反应液的吸光度;*A*_{空白} 为空白组的吸光度。

1.4 抗衰老痴呆症活性评价(MTT法)

取对数生长期的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y),分别加入 DMEM 培养基(含 φ=10% 胎牛血清 FBS, w=1% 青霉素-链霉素双抗)适量,调整细胞浓度为 5 × 10⁵ 个/mL,接种于 96 孔培养板,每孔接种 SH-SY5Y 细胞悬液 100 μL,使每孔的细胞数为 3 000~5 000 个,边缘用无菌 PBS 填充 96 孔板。将 96 孔板置于 φ=5% CO₂ 培养箱中,37 °C 培养 24 h 后,将不同浓度的待测样品或 w=1% DMSO 加入 96 孔板中,每组设置 8 个复孔,预处理 3 h 后,弃去旧药液,PBS 洗涤 1 次,再加入浓度为 36.5 mmol/L 的造模药物谷氨酸溶液 100 μL 培养 24 h。随后弃去谷氨酸药液,加入 DMEM 完全培养基 100 μL、质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 10 μL 至样品组和对照组,培养 2~4 h。小心吸取上层清液,避免吸取甲臜结晶,加入 DMSO 100 μL/孔,震荡 10 min,溶解底部紫色结晶。应用酶标仪(Thermo 产品)于 570 nm 处测 *A* 值,每次实验重复 3 次。细胞生长抑制率 *I* 为

$$I = [1 - (A_{\text{加药组}} / A_{\text{对照组, DMSO}})] \times 100\%$$

式中 $A_{\text{加药组}}$ 为加入不同浓度的待测样品组的吸光度; $A_{\text{对照组, DMSO}}$ 为加入 $w=1\%$ DMSO 组的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 黄连解毒汤中“君药分子-臣药分子”的一体化组装

本研究将黄连解毒汤中的“君药”分子阿魏酸和黄芩素分别与“臣药”分子丁香酚通过简单的碳链进行一体化组装(图2~3)。保留大部分丁香酚结

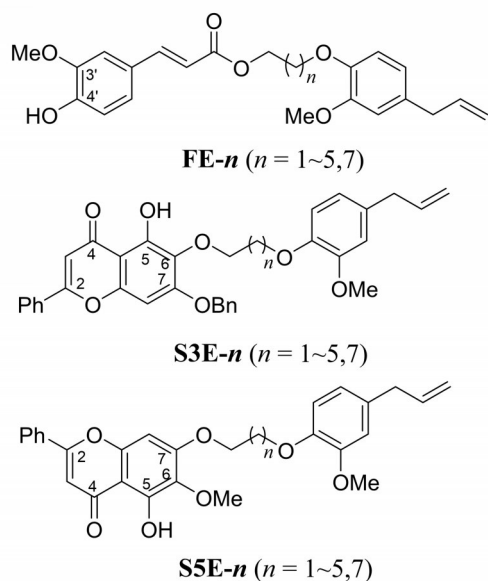


图3 “阿魏酸-丁香酚”和“黄芩素-丁香酚”的一体化分子的设计合成

Fig. 3 Design and synthesis of the "ferulic acid-eugenol" and "scutellarin-eugenol" hybrid molecules

构特征以及发生反应的难易程度两方面看,在酚羟基上烷基化是可取的。烷基化反应在 K_2CO_3 /丙酮溶液中、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行,生成化合物 $E-n$ ($n = 1\sim 5, 7$), 收率 $70.8\%\sim 81.2\%$ 。结果揭示,短链 1,2-二溴乙烷与丁香酚的反应收率最高,为 81.2% ;长链 1,8-二溴辛烷的反应收率最低,为 70.8% 。长链 1,8-二溴辛烷反应收率较低的原因可能跟长链的柔软度有关,柔性分子减少了有效碰撞的概率。

阿魏酸有 2 个部位可以与 $E-n$ 的 C-Br 键反应,即羧基和 4'-位酚羟基。本研究通过控制酸碱度,即利用有机碱三乙胺,使反应选择性地阿魏酸的羧基上进行,得到化合物 $FE-n$ ($n = 1\sim 5, 7$), 反应收率 $45.3\%\sim 76.2\%$ 。实验结果显示, C-Br 键在短链上其反应收率低,比如 $E-1$, 其反应收率为 45.3% 。这可能跟羧基进攻 $E-1$ 时其空间位阻较大有关。

黄芩素的 5,6,7-位有 3 个酚羟基,需要探索合适的选择性保护策略。本研究发现,利用 Ac_2O /NaOAc 先把 3 个酚羟基乙酰化,7-位酚酯在 K_2CO_3 /丙酮溶液中容易皂化形成酚氧负离子,与 BnBr 反应得到 7-位氧苄基化产物 $S2$; 化合物 $S2$ 中,5,6-位酚酯在 $w=5\%$ NaOH 的丙酮溶液作用下全部皂化,随后酸化成酚羟基,得到化合物 $S3$; 由于 5-位酚羟基与 4-位羰基之间存在分子内氢键,使得 6-位酚羟基更活泼,可以选择性甲基化得化合物 $S4$; $S4$ 催化氢化脱苄基得化合物 $S5$ 。利用 $S3$ 和 $S5$ 分别于 $E-n$ ($n = 1\sim 5, 7$) 得到 $S3E-n$ ($n = 1\sim 5, 7$) 和 $S5E-n$ ($n = 1\sim 5, 7$)。化合物 $S3E-n$ ($n = 1\sim 5, 7$) 中,7-位苄氧基没有脱除,主要是脱除苄基将有可能影响结构中的其他官能团;同样的道理,化合物 $S3E-n$ ($n = 1\sim 5, 7$) 中的 6-位甲氧基也没有脱除。若要使化合物 $S3E-n$ ($n = 1\sim 5, 7$) 中的 7-位和 6-位都转化为酚羟基,需要考虑其他保护策略。

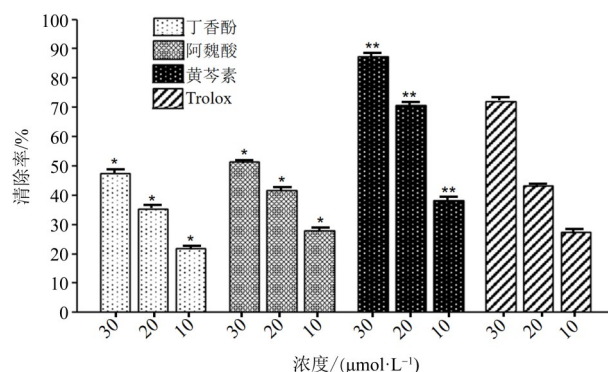
以碳链作为连接子只是初始的探索,未来还将考虑其他的连接方式,比如酯键、酰胺键等

2.2 一体化分子的体外抗氧化活性

氧化应激在阿尔茨海默病发病机理中扮演核心角色,它引发 $A\beta$ 蛋白异常沉积和 tau 蛋白过度磷酸化,导致神经元损伤、突触功能紊乱及认知衰退,抗氧化剂可以通过多种机制缓解这一过程(Wang et al., 2025a; Hu et al., 2018)。因此,有必要考察相关化合物的抗氧化活性。本研究利用 DPPH 法(Qin et al., 2015)检测了 Trolox、黄芩素、阿魏酸、丁香酚以及所合成的“君药分子-臣药分子”一体化分子体外抗氧化活性。其中, Trolox 是水溶性维生素 E, 在本研究中作为阳性对照药。

Trolox、黄芩素、阿魏酸、丁香酚在终浓度分别为 $30, 20, 10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时都具有良好的自由基清除活性(图4),其自由基清除率分别为: Trolox [$(70.9\pm 1.8)\%$ 、 $(42.3\pm 1.4)\%$ 、 $(26.0\pm 2.3)\%$]; 黄芩素 [$(86.2\pm 0.1)\%$ 、 $(69.6\pm 0.7)\%$ 、 $(37.5\pm 0.2)\%$]; 阿魏酸 [$(50.4\pm 1.7)\%$ 、 $(40.2\pm 3.2)\%$ 、 $(27.2\pm 1.6)\%$]; 丁香酚 [$(46.9\pm 0.45)\%$ 、 $(34.1\pm 1.7)\%$ 、 $(20.5\pm 1.8)\%$]。这些化合物清除率随浓度增加而增加,在浓度为 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$, 所有化合物均显示出较高的清除率。其中,黄芩素比阳性药 Trolox、阿魏酸和丁香酚的清除率都高;阿魏酸与丁香酚的清除率相当,但都比 Trolox 低。

为了比较所有化合物的体外抗氧化活性,本研究检测所有化合物在 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 DPPH 的自由基清除率,结果见表 1。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Trolox。

图4 丁香酚、阿魏酸、黄芩素、Trolox在不同浓度下的自由基清除率

Fig. 4 Clearance rates of eugenol, ferulic acid, scutellarin, Trolox at different concentration

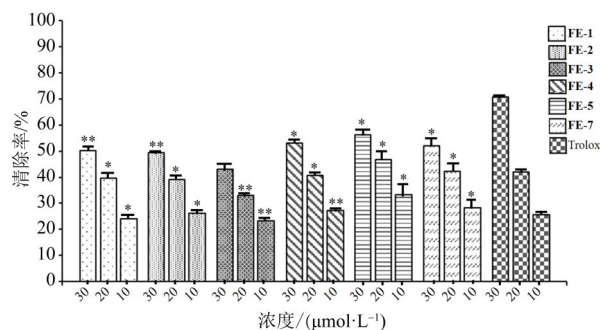
表1 30 $\mu\text{mol/L}$ 的目标化合物对DPPH的清除率

Table 1 Clearance rate to DPPH of the target compounds at the concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$

化合物编号	清除率/%	化合物编号	清除率/%
FE-1	50.3 \pm 3.1	S3E-1	12.2 \pm 1.1
FE-2	49.2 \pm 1.1	S3E-2	10.8 \pm 0.7
FE-3	42.3 \pm 3.9	S3E-3	13.2 \pm 2.0
FE-4	52.4 \pm 1.5	S3E-4	10.5 \pm 0.5
FE-5	55.8 \pm 4.4	S3E-5	12.2 \pm 0.8
FE-7	52.1 \pm 4.6	S3E-7	12.2 \pm 1.9
S5E-1	12.2 \pm 2.1	S3	87.2 \pm 1.0
S5E-2	12.3 \pm 2.1	S5	22.3 \pm 0.7
S5E-3	10.9 \pm 0.7	丁香酚+阿魏酸 ¹⁾	72.6 \pm 1.5
S5E-4	11.7 \pm 0.8	丁香酚+黄芩素 ¹⁾	89.2 \pm 0.1
S5E-5	11.9 \pm 1.2	阿魏酸+黄芩素 ¹⁾	88.8 \pm 0.8
S5E-7	11.8 \pm 1.1		

1) 2种化合物按摩尔比1:1混合。

从表1可以看到,所考察的系列化合物的体外抗氧化活性,与其是否具有游离的酚羟基、结构中游离羟基的数量及其所处的位置有关。丁香酚和阿魏酸都有一个游离酚羟基,所接的侧链分别为烯丙基和羧乙烯基,它们表现出大致相当的清除率;一体化化合物FE- n ($n = 1\sim 5, 7$)也都有一个游离酚羟基,表现出来的清除率与丁香酚和阿魏酸大致相当,但随链长的变化,其清除率也有所变化(图5);当 $n=2$ 时,清除率最低,为(42.3 \pm 3.9)%;当 $n=5$ 时,清除率最高,为(55.8 \pm 4.4)%,体现出一定的协同效应。有趣的是,当丁香酚和阿魏酸等比例混合时,其清除率为(72.6 \pm 1.5)%,远高于丁香酚和阿魏酸自



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Trolox。

图5 一体化化合物FE- n ($n = 1\sim 5, 7$)在不同浓度下的自由基清除率

Fig. 5 Clearance rates of the integrated assemblies FE- n ($n = 1\sim 5, 7$) at different concentration

身,有更高的协同效应。所以未来需要对丁香酚和阿魏酸的一体化方式进行更进一步的探索。估计丁香酚和阿魏酸的一体化要在丁香酚的2-位甲氧基和阿魏酸的3'-位甲氧基之间才比较合适。

黄芩素的5,6,7-位有3个酚羟基,因此显示出比Trolox、阿魏酸和丁香酚高的抗氧化活性。当6-位酚羟基甲基化,黄芩素转变为化合物S5时,其清除率急降为(22.3 \pm 0.7)%,可见5-位游离羟基对黄芩素的抗氧化活性至关重要;相反,当6-位酚羟基苄基化,黄芩素转变为化合物S3时,其清除率为(87.2 \pm 1.0)%,比黄芩素的清除率略高,说明7-位酚羟基的烷基化对黄芩素的抗氧化活性不会带来负面影响。一体化化合物S3E- n ($n = 1\sim 5, 7$)和S5E- n ($n = 1\sim 5, 7$)都同时对6-位酚羟基进行了屏蔽,因此,它们所显示出来的抗氧化活性都很低,在30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的清除率均低于14%。同样有趣的是,当丁香酚和阿魏酸分别与黄芩素等比例混合时,其混合物清除率分别为(89.2 \pm 0.1)%和(88.8 \pm 0.8)%,略高于黄芩素自身。所以,未来丁香酚与黄芩素的一体化,连接子要在黄芩素7-位酚羟基和丁香酚2-位甲氧基之间。

2.3 一体化分子的抗AD活性

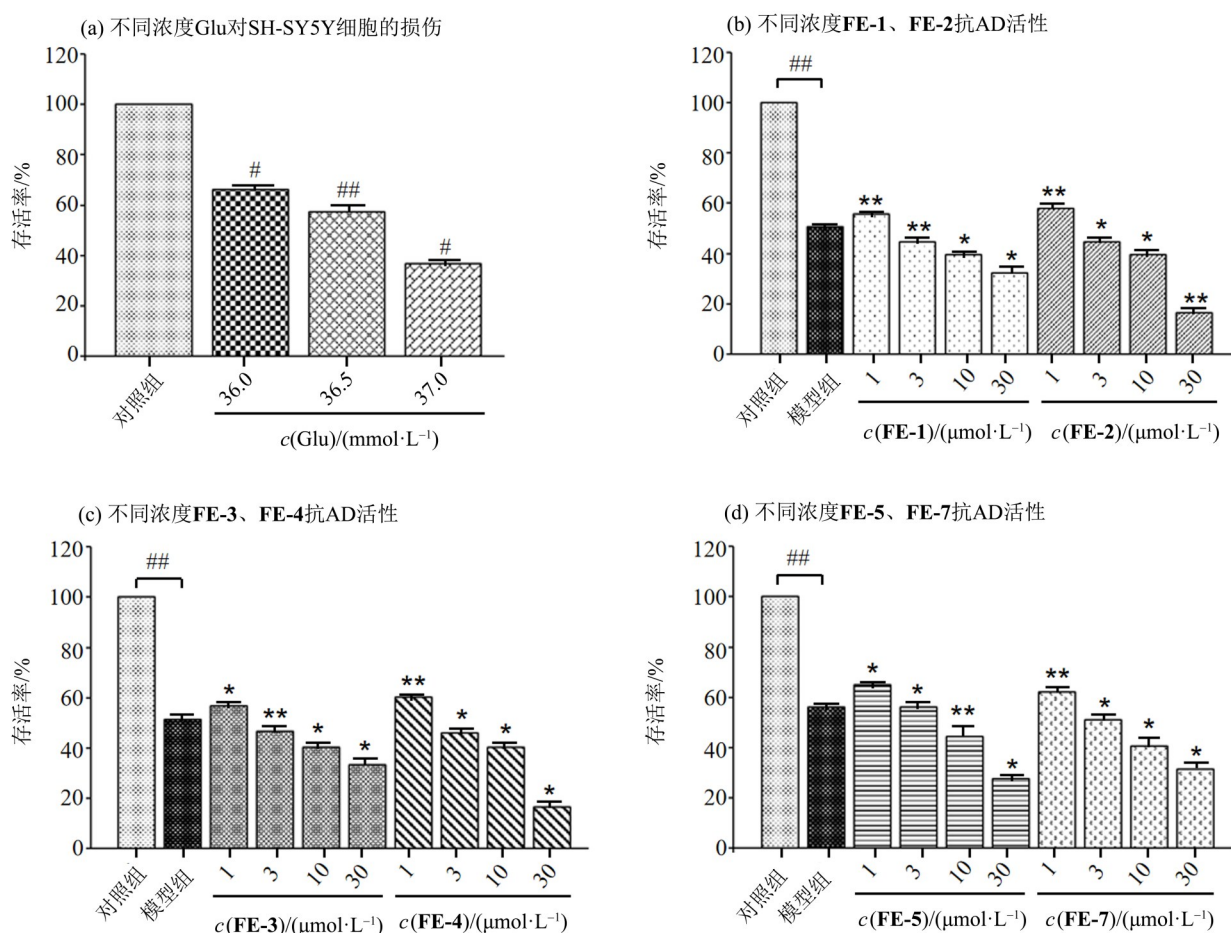
SH-SY5Y细胞系是源自人骨髓的神经母细胞瘤亚克隆细胞,具有与人体神经元相似的形态和生物学特性,被广泛用于阿尔茨海默病等神经退行性疾病的发病机制研究(Bell et al., 2021)。谷氨酸诱导的损伤SH-SY5Y细胞常用于筛选化合物的抗AD活性(Chen et al., 2024)。本研究利用该损伤模型检测一体化化合物的抗AD活性,结果见图6~7。

图6a显示,浓度为36.5 mmol/L的谷氨酸溶液与SH-SY5Y细胞孵育24 h,将对细胞造成损伤,细胞存活率在57%左右,而浓度为37 mmol/L的谷氨

酸浓度将使细胞存活率骤然下降,存活率仅有37%左右。因此,选用谷氨酸浓度为36.5 mmol/L作为细胞损伤造模浓度。

图6b~d揭示,一体化化合物FE-n (n = 1~5, 7)在浓度为1 μmol/L时均对谷氨酸诱导的SH-SY5Y细胞损伤具有保护作用。当SH-SY5Y细胞与浓度为36.5 mmol/L的谷氨酸孵育后分别加入

浓度为1 μmol/L的FE-1、FE-2、FE-3、FE-4、FE-5、FE-7,再孵育24 h,利用MTT法检测细胞存活率,发现细胞生存率分别提高11.2、19.3、12.0、20.0、13.5、9.0%;其中,化合物FE-4的活性最佳。一体化化合物FE-n (n = 1~5, 7)的抗AD活性大小与链长的关系大致与其体外抗氧化活性与链长的关系相对应。



存活率是指与对照组相比; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs 对照组; *P < 0.05, **P < 0.01 vs 模型组。

图6 FE-n (n = 1~5, 7)系列化合物的抗AD活性

Fig. 6 Anti-AD activities of FE-n (n = 1-5, 7) series compounds

当孵育的FE-n (n = 1~5, 7)一体化化合物浓度大于3 μmol/L时,这些化合物开始显示细胞毒性。当孵育浓度为30 μmol/L时,一体化化合物FE-n显示明显的细胞毒性,以FE-2和FE-4的细胞毒性最为突出,它们将细胞存活率分别降至10.6%和18.6%。

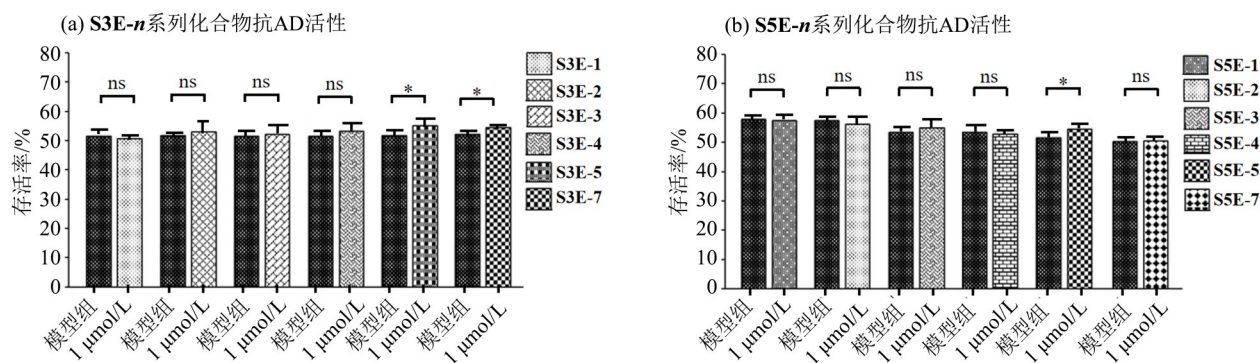
从图7可以看出,S3E-n (n = 1~5, 7)和S5E-n (n = 1~5, 7)系列化合物为1 μmol/L时,只有S3E-5、S3E-7和S5E-5显示出弱的保护作用,它们使细胞存活率分别增加8.4%、6.0%和6.3%;其他化合物没有显示出保护作用。可见,当6-位酚羟基被屏蔽时,一体化系列化合物S3E-n (n = 1~5, 7)和S5E-n (n =

1~5, 7)不仅丧失抗氧化活性,同时丧失抗AD活性。

3 结论

依据文献甄别的黄连解毒汤中的“君臣佐使”功效分子群,本文设计合成了阿魏酸-丁香酚一体化分子FE-n (n = 1~5, 7)共6个,黄芩素-丁香酚一体化分子S3E-n (n = 1~5, 7)和S5E-n (n = 1~5, 7)两个系列化合物共12个。

利用DPPH法检测了所有化合物的体外抗氧化活性。实验结果显示,FE-n (n = 1~5, 7)在屏蔽丁香酚酚羟基、保留阿魏酸酚羟基前提下,在n > 3时,



存活率是指与对照组相比; * $P < 0.05$ vs 模型组; ns: 差异无统计学意义。

图7 S3E- n ($n = 1\sim 5, 7$)和S5E- n ($n = 1\sim 5, 7$)系列化合物的抗AD活性

Fig. 7 Anti-AD activities of S3E- n ($n = 1\sim 5, 7$) and S5E- n ($n = 1\sim 5, 7$) series compounds

显示出高于单个单体的抗氧化活性,具有一定的“君-臣”协同效应;而S3E- n ($n = 1\sim 5, 7$)和S5E- n ($n = 1\sim 5, 7$)由于屏蔽了黄芩素6-位酚羟基,显示出弱的抗氧化活性。未来需要探索更合适的连接子连接方式。

利用谷氨酸诱导的SH-SY5Y细胞损伤模型筛选了一体化化合物的抗AD活性。结果揭示,FE- n ($n = 1\sim 5, 7$)均具有抗AD活性,化合物FE-4的活性

最佳。一体化化合物FE- n ($n = 1\sim 5, 7$)的抗AD活性大小与链长的关系大致与其体外抗氧化活性与链长的关系相对应;S3E- n ($n = 1\sim 5, 7$)和S5E- n ($n = 1\sim 5, 7$)两个系列化合物除S3E-5、S3E-7和S5E-5显示出弱的保护作用外,其他都没有显示抗AD活性。

综上所述,通过合适的连接子和连接方式将药效分子按“君臣佐使”规则构建一体化分子,是未来中药复方实现现代化的有效途径。

参考文献:

- 陈广田, 曹兰秀, 2021. 中医临床治疗阿尔兹海默病研究进展[J]. 新乡医学院学报, 38(6): 593-596.
- 方青, 詹小萍, 莫剑翎, 等, 2004. 黄连解毒汤对AD大鼠的治疗作用及对细胞因子含量的影响[J]. 中国中药杂志, 29(6): 575-578.
- 韩冉, 马涛, 张志辰, 等, 2018. 地黄饮子治疗阿尔兹海默病的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 24(21): 124-130.
- 黄洁茹, 傅雷, 刘涛, 2013. 改良三甲散治疗老年痴呆病研究述评[J]. 中医学报, 28(4): 589-590.
- 李斌, 谢淑玲, 彭丽燕, 等, 2013. 黄连解毒汤对记忆获得性障碍小鼠学习记忆能力和中枢胆碱能系统的影响[J]. 中药药理与临床, 29(5): 1-3.
- 刘卫霞, 尤凯, 孙燕, 2015. 黄连解毒汤化学成分及临床应用的研究进展[J]. 沈阳医学院学报, 17(2): 121-124.
- 刘志安, 林燕玲, 韩爱东, 2022. A β 寡聚体与阿尔兹海默病[J]. 中山大学学报(自然科学版)(中英文), 61(3): 1-10.
- 龙伟, 刘培勋, 高静, 2008. 计算机虚拟筛选技术对黄连解毒汤药效物质功能分群的研究[J]. 医药导报, 27(1): 23-25.
- 穆晓, 赵慧敏, 刘昊晨, 等, 2024. 阿尔兹海默病药物研发最

- 新进展[J]. 中国药科大学学报, 55(6): 816-825.
- 王四旺, 2008. “中药分子”与“分子中药”[J]. 第四军医大学学报, (18): 1633-1636.
- 王岩, 金锐, 2025. 253种中成药组方君臣佐使与药品说明书成分书写顺序的关联性分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 25(5): 555-557+562.
- 余虹霓, 孙梦捷, 王凤丽, 等, 2023. 地黄饮子调节PI3K/Akt信号通路保护AD小鼠脑组织星形胶质细胞损伤及糖酵解的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 29(8): 10-18.
- BELL M, ZEMPEL H, 2021. SH-SY5Y-derived neurons: A human neuronal model system for investigating TAU sorting and neuronal subtype-specific TAU vulnerability [J]. Rev Neurosci, 33(1): 1-15.
- CHEN X F, LI S S, BAI Y J, et al, 2024. Design and synthesis of ligustrazine derivatives as potential anti-Alzheimer's agents[J]. Nat Prod Res, 38(16): 2825-2835.
- GRANHOLM A C, HAMLETT E D, 2024. The role of tau pathology in Alzheimer's disease and down syndrome [J]. J Clin Med, 13(5): 1338.
- HO A, SINICK J, ESKO T, et al, 2019. Circulating glucuronic acid predicts healthspan and longevity in

- humans and mice[J]. *Aging*, 11(18): 7694–7706.
- HONG X, HUANG L, LEI F, et al, 2025. The role and pathogenesis of tau protein in Alzheimer's disease [J]. *Biomolecules*, 15(6): 824.
- HU X Y, TENG S S, HE J W, et al, 2018. Pharmacological basis for application of scutellarin in Alzheimer's disease: Antioxidation and antiapoptosis[J]. *Mol Med Rep*, 18(5): 4289–4296.
- HUANG W H, CHIEN P Y, YANG C H, et al, 2003. Novel synthesis of flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *ChemInform*, 34(33): 339–340.
- HUANG Z, WU Z, GU X, et al, 2024. Diagnosis, toxicological mechanism, and detoxification for hepatotoxicity induced by pyrrolizidine alkaloids from herbal medicines or other plants[J]. *Crit Rev Toxicol*, 54(2): 123–133.
- JIANG X Y, ZHOU J T, LIN Q H, et al, 2018. Anti-angiogenic and anticancer effects of baicalein derivatives based on transgenic zebrafish model[J]. *Bioorg Med Chem*, 26(15): 4481–4492.
- LI X, CHEN J, FENG W, et al, 2023. Berberine ameliorates iron levels and ferroptosis in the brain of 3 × Tg-AD mice [J]. *Phytomedicine*, 118: 154962.
- LI Y F, YU B, SUN J S, et al, 2015. Efficient synthesis of baicalin and its analogs[J]. *Tetrahedron Lett*, 56(24): 3816–3819.
- MANAVI M A, NOURHASHEMI M, EMAMI S, et al, 2025. Lipoic acid scaffold applications in the design of multitarget-directed ligands against Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Chem*, 157: 108241.
- NONG Y H, KIM J S, JIA L T, et al, 2025. The interaction between neurotransmitter receptor activity and amyloid- β pathology in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 106(2): 391–409.
- PANHEKAR D, MAHALE G D, RENALSON K S, et al, 2015. Resolving structural ambiguity of Oroxylin synthesized by different approaches[J]. *J Chem Pharm Res*, 7(6): 174–180.
- QIN X Y, HAO X, HAN H, et al, 2015. Design and synthesis of potent and multifunctional aldose reductase inhibitors based on quinoxalinones[J]. *J Med Chem*, 58(3): 1254–1267.
- RAO J X, ZHAO J L, ZHU X, et al, 2022. Rhodium-catalyzed reaction of diazoquinones with allylboronates to synthesize allylphenols [J]. *Org Chem Front*, 9(14): 3677–3683.
- ROY A, ROY R, MEENA B S, et al, 2024. Coptisine reverses Alzheimer's disease by targeting cholinergic and amyloidogenic pathways[J]. *Med Hypotheses*, 189: 111407.
- SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al, 2021. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 397(10284): 1577–1590.
- SGARBOSSA A, GIACOMAZZA D, DI CARLO M, 2015. Ferulic acid: A hope for Alzheimer's disease therapy from plants[J]. *Nutrients*, 7(7): 5764–5782.
- SIMUNKOVA M, ALWASEL S H, ALHAZZA I M, et al, 2019. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease [J]. *Arch Toxicol*, 93(9): 2491–2513.
- TAHERI P, YAGHMAEI P, TEHRANI H S, et al, 2019. Effects of eugenol on Alzheimer's disease-like manifestations in insulin- and $\alpha\beta$ -induced rat models [J]. *Neurophysiology*, 51(2): 114–119.
- TWISS E, McPHERSON C, WEAVER D F, 2025. Global diseases deserve global solutions: Alzheimer's disease [J]. *Neurol Int*, 17(6): 92.
- WANG K X, CHEN X M, 2025a. Protective effect of flavonoids on oxidative stress injury in Alzheimer's disease [J]. *Nat Prod Res*, 39(5): 1272–1299.
- WANG Q, TAO Q, DONG H, et al, 2021. Fluorination triggers fluoroalkylation: Nucleophilic perfluoro-tert-butylation with 1, 1-dibromo-2, 2-bis(trifluoromethyl) ethylene (DBBF) and CsF [J]. *Angew Chem Int Ed*, 60(52): 27318–27323.
- WANG Q, WANG X, MORRIS M E, 2008. Effects of *L*-lactate and *D*-mannitol on gamma-hydroxybutyrate toxicokinetics and toxicodynamics in rats[J]. *Drug Metab Dispos*, 36(11): 2244–2251.
- WANG T T, ZHU B J, ZHAO J, et al, 2025b. Research progress in methods of acquisition, structure elucidation, and quality control of Chinese herbal polysaccharides[J]. *Chin J Nat Med*, 23(2): 143–157.
- WU K, WANG T Z, ZHANG C P, et al, 2024. *N*-alkoxyphthalimides as nitrogen electrophiles to construct C–N bonds via reductive cross-coupling [J]. *J Org Chem*, 89(14): 10004–10011.
- ZHOU J T, JIANG X Y, HE S Y, et al, 2019. Rational design of multitarget-directed ligands: Strategies and emerging paradigms [J]. *J Med Chem*, 62(20): 8881–8914.
- ZHU Y, WANG J, 2015. Wogonin increases β -amyloid clearance and inhibits tau phosphorylation *via* inhibition of mammalian target of rapamycin: Potential drug to treat Alzheimer's disease[J]. *Neurol Sci*, 36(7): 1181–1188.