



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113185560 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 12

(21) 申请号 202110484207.0

C07H 1/08 (2006.01)

(22) 申请日 2021.04.30

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 31/7034 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113185560 A

(56) 对比文件

CN 105503971 A, 2016.04.20

(43) 申请公布日 2021.07.30

李东东等. 星点设计-响应面法优化超声提取青竹标多酚.《中药材》.2011,第34卷(第1期),第129-133页.

(73) 专利权人 山东省分析测试中心

地址 250014 山东省济南市历下区科院路19号

Yongai Xiong, et al.. Isolation and identification of two new compounds from the seeds of Moringa oleifera and their antiviral and anti-inflammatory activities.《Natural Product Research》.2020,第1-10页.

(72) 发明人 于金倩 王晓 王岱杰 宋祥云

赵恒强

审查员 陆皞然

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司

37221

专利代理师 孙维傲

(51) Int. Cl.

C07H 15/203 (2006.01)

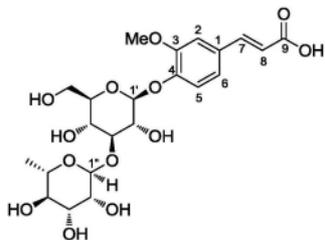
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种酚苷类化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

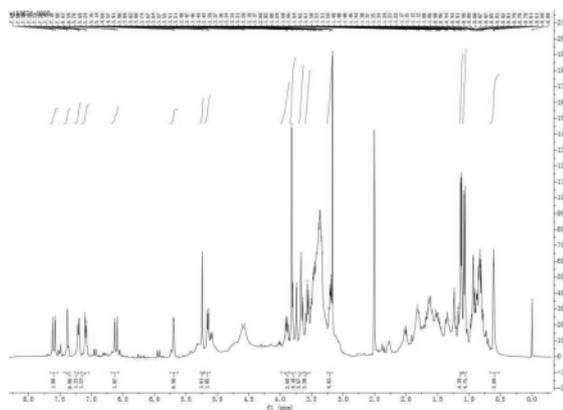
本申请提供一种酚苷类化合物及其制备方法和应用,所述酚苷类化合物具有式I所示结构:



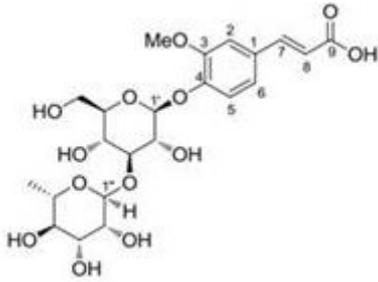
该化合物具有较

式 I。

好的抗炎效果,而且毒副作用低,具有良好的药用前景。



1. 一种酚苷类化合物,其结构如式I所示:



式I。

2. 权利要求 1 所述的酚苷类化合物的制备方法,其特征在于,所述方法包括:

(1) 取青竹标药材,粉碎,95%乙醇加热回流提取三次,固液比为

1:3,每次2h,将提取液合并过滤,浓缩至无醇味,得青竹标乙醇粗取物;

(2) 将步骤(1)中粗提物加入水超声打散,依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取3次,得到正丁醇萃取部位,回收正丁醇萃取溶剂得到正丁醇相粗提物;

(3) 将步骤(2)中所得的正丁醇相粗提物加水稀释,通过C18吸附树脂色谱,依次用  $5 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $12 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $30 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $60 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $80 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $100\% \text{MeOH}$  进行洗脱,每1500 ml 作为一个单位接收,每个梯度洗脱3个接收单位,将各洗脱部分减压浓缩至干;

(4) 将步骤(3)中  $60 \pm 1\% \text{MeOH}$  洗脱部分,进一步采用 C18 吸附树脂色谱,依次用  $50 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $60 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $70 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $80 \pm 1\% \text{MeOH}$ 、 $100\% \text{MeOH}$  进行洗脱,每 500 ml 作为一个单位接收,每个梯度洗脱3个接收单位,将各洗脱部分减压浓缩至干;

(5) 将步骤(4)中  $70 \pm 1\% \text{MeOH}$  洗脱部分,采用RP-C18高压制备柱色谱,用  $\text{CH}_3\text{CN}$  与  $\text{H}_2\text{O}$  的体积比为20:80的混合物进行制备,其中,流速: $10 \text{ mL min}^{-1}$ ;检测波长:250 nm,最终得到式I所示阿魏酸酚苷类化合物。

3. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述的酚苷类化合物。

4. 一种药物制剂,其包含权利要求1所述的酚苷类化合物和至少一种药学上可接受的辅料和/或载体。

5. 权利要求1所述的酚苷类化合物或权利要求3所述的药物组合物或权利要求4所述的药物制剂在制备治疗抗炎药物中的应用。

6. 权利要求1所述的酚苷类化合物或权利要求3所述的药物组合物或权利要求4所述的药物制剂在制备一氧化氮抑制剂药物或试剂中的应用。

## 一种酚苷类化合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本申请涉及天然药物化学领域,具体涉及一种酚苷类化合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本申请的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

[0003] 酚苷类化合物是一类分布广泛于多种科属中的活性物质,目前已有多种化合物被证实具有抗炎、抗骨质疏松、抗病毒、抗氧化、抗雌激素等作用。炎症反应是由多种介质参与、炎症因子与机体不断斗争直至达到一个平衡的复杂过程,而中药是通过多途径,多环节发挥抗炎作用的。随着“回归自然”、“崇尚自然”消费潮流的涌起,天然药物因其安全、有效、毒副作用小的优点而受到重视,有着非常重要的开发利用价值。

[0004] 青竹标(*Scindapsus officinalis* Schott)别名密腺崖角藤、水蜈蚣、爬树龙、金竹标,天南星科岩角藤的全株,主要分布于云南、贵州、广西,是一种在当地应用广泛的珍稀民族药。《云南中草药选》记载其具有祛瘀镇痛、润肺止咳的功效,可治跌打损伤、骨折、风湿麻木、支气管炎、百日咳;《广西药植名录》记载其“消肿,止痛,治跌打,风湿,痈疮”;《贵州药植目录》记载其“去瘀生新,镇痛”。为了充分发掘青竹标抗炎的药效物质基础,我们对其化学成分进行了研究,从中得到一种新的酚苷类化合物,且该化合物具有显著的抗炎活性。

[0005] 然而,青竹标中的化学成分种类多且复杂,为了进一步研究其活性成分,促进青竹标的开发应用并保证其临床疗效,对其进行提取分离,并探究其生理活性尤为必要。

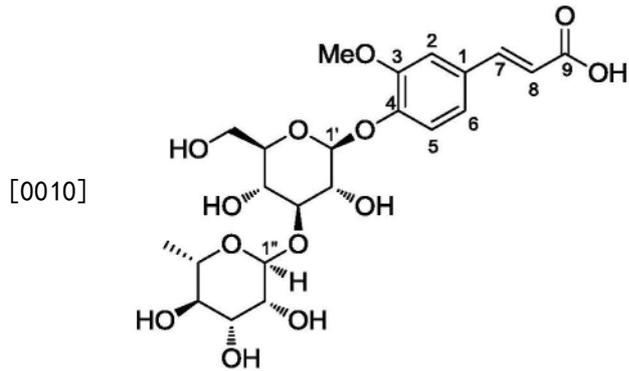
### 发明内容

[0006] 本发明提供了一种酚苷类化合物及其制备方法和应用。本发明所述酚苷类化合物提取分离自青竹标植物,该化合物具有良好的抗炎效果,尤其毒副作用低,具有良好的药用前景。

[0007] 具体地,本发明的技术方案如下所述:。

[0008] 在本发明的第一方面,本发明提供了一种阿魏酸酚苷类化合物,其化学名称为:

[0009] 4-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid,其具有式I所示结构:



[0011] 在本发明的第二方面,本发明提供了上述式I化合物的制备方法,在本发明的一些实施方式中,式I化合物提取自青竹标药材,包括:采用乙醇回流提取得到青竹标乙醇粗提取物,然后进行萃取以获取正丁醇部位,对正丁醇部位先后进行 $C_{18}$ 吸附树脂色谱和RP- $C_{18}$ 高压制备柱色谱,得到式I所示阿魏酸酚苷类化合物。

[0012] 在一些具体地实施方式中,所述方法包括:

[0013] (1) 取青竹标药材,粉碎,95%乙醇加热回流提取三次,固液比为1:3,每次2h,将提取液合并过滤,浓缩至无醇味,得青竹标乙醇粗提取物;

[0014] (2) 将步骤1中粗提取物加入水超声打散,依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取3次,得到正丁醇萃取部位,回收正丁醇萃取溶剂得到正丁醇相粗提取物(正丁醇部位);

[0015] (3) 将步骤2中所得的正丁醇相粗提取物(正丁醇部位)加水稀释,通过 $C_{18}$ 吸附树脂色谱,依次用 $5 \pm 1\%$  MeOH、 $12 \pm 1\%$  MeOH、 $30 \pm 1\%$  MeOH、 $60 \pm 1\%$  MeOH、 $80 \pm 1\%$  MeOH、 $100\%$  MeOH进行洗脱,每1500ml作为一个单位接收,每个梯度洗脱3个接收单位,将各洗脱部分减压浓缩至干;

[0016] (4) 将步骤3中 $60 \pm 1\%$  MeOH洗脱部分,进一步采用 $C_{18}$ 吸附树脂色谱,依次用 $50 \pm 1\%$  MeOH、 $60 \pm 1\%$  MeOH、 $70 \pm 1\%$  MeOH、 $80 \pm 1\%$  MeOH、 $100\%$  MeOH进行洗脱,每500ml作为一个单位接收,每个梯度洗脱3个接收单位,将各洗脱部分减压浓缩至干;

[0017] (5) 将步骤4中 $70 \pm 1\%$  MeOH洗脱部分,采用RP- $C_{18}$ 高压制备柱色谱,用 $CH_3CN/H_2O$  (20:80, v/v) 进行制备,其中,流速: $10 mL \cdot min^{-1}$ ;检测波长:250nm,最终得到式I所示阿魏酸酚苷类化合物。

[0018] 当然,基于本发明的结构,本领域技术人员也可设计路线对该化合物进行全合成。

[0019] 在本发明的第三方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含上述第一方面中所述的式I酚苷类化合物。

[0020] 本发明所述药物组合物是指包括有时治疗有效量的规定成分的药物产品如式I化合物,以及直接或间接地由规定量的规定成分的组合产生的任何产品。

[0021] 在本发明的第三方面,本发明提供了一种药物制剂,其包含上述第一方面中所述的式I酚苷类化合物和至少一种药学上可接受的辅料和/或载体。

[0022] 本发明所述辅料是指药学上可接受的药物组合物中除有效成分之外的成分,其对受试者无毒。药学上可接受的赋形剂包括但不限于赋形剂(如粘合剂、填充剂、崩解剂等)、缓冲剂、稳定剂或防腐剂等。

[0023] 本发明所述载体是指药学上可接受的溶剂,悬浮剂或载体,用于将药物活性成分比如本发明的式I化合物递送至动物或人体内。载体可以是液体或固体,并按照计划的给药

方式进行选择。蛋白和脂质体也是药物载体。

[0024] 本发明的一些实施方式中包括生产药物组合物或药物制剂的方法,所述方法包括将本发明的式I化合物与药用辅料和/或载体混合。通过任意合适的方法制备制剂,通常通过以所需比例均匀混合活性化合物与液体和/或微细粉碎的固体辅料制备,然后如果需要,使所得混合物形成所需的形状。

[0025] 本领域技术人员可根据其他其公知的技术将本发明的化合物配制成药物组合物或药物制剂。比如可根据由沈阳药科大学主编的现代药物制剂丛书进行药物制剂的制备。除本文提到以外,合适的药用辅料是本领域已知的,例如参见2005年版的药用辅料手册(原著第四版),作者(英)R.C.罗(RaymondCRowe)(美)P.J.舍斯基(PaulJSheskey)。

[0026] 在本发明的第四方面,本发明提供了上述第一方面中所述的式I酚苷类化合物或包含该化合物的药物组合物或药物制剂在制备治疗抗炎药物中的应用。

[0027] 在本发明的第五方面,本发明提供了上述第一方面中所述的式I酚苷类化合物或包含该化合物的药物组合物或药物制剂在制备一氧化氮抑制剂药物或试剂中的应用。

[0028] 在本发明的第六方面,本发明提供了一种治疗炎症的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的式I酚苷类化合物或包含该化合物的药物组合物或药物制剂。

[0029] 本发明所述受试者是指已经是治疗、观察或实验的对象的动物,优选指哺乳动物,最优选指人。

[0030] 本发明所述治疗有效量是指包括本发明化合物在内的活性化合物或药剂的量,该量可引起研究者、兽医、医生或其他医疗人员所追求的组织系统、动物或人的生物学或医学响应,这包括减轻或部分减轻受治疗的疾病、综合征、病症或障碍的症状。

[0031] 相较于现有技术,本发明的优势在于:

[0032] 本发明提供了一种从青竹标中分离纯化的新酚苷类化合物4-0-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid,以青竹标为原料,来源广泛,制备工艺简单,经济、安全,得率高,所得的酚苷类化合物4-0-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid(式I化合物)具有较好的抗炎活性,而且毒副作用低,具有良好的药用前景。

## 附图说明

[0033] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本申请的进一步理解,本申请的示意性实施例及其说明用于解释本申请,并不构成对本申请的不当限定。以下,结合附图来详细说明本申请的实施方案,其中:

[0034] 图1为式I化合物的 $^1\text{H}$  NMR图谱;

[0035] 图2为式I化合物的 $^{13}\text{C}$  NMR图谱;

[0036] 图3为式I化合物的HMQC图谱;

[0037] 图4为式I化合物的HMBC图谱;

[0038] 图5为式I化合物的HRESIMS图谱。

## 具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施例,进一步阐述本申请。应理解,这些实施例仅用于说明本申请而不适用于限制本申请的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0040] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。本申请所使用的试剂或原料均可通过常规途径购买获得,如无特殊说明,本申请所使用的试剂或原料均按照本领域常规方式使用或者按照产品说明书使用。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本申请方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0041] 实施例1 酚苷类化合物(式I化合物)的制备

[0042] 4-0- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1-3)-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}]$ - (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid即式I化合物的制备方法,步骤如下:

[0043] (1) 取青竹标药材,粉碎,95%乙醇加热回流提取三次,固液比为1:3,每次2h,将提取液合并过滤,浓缩至无醇味,得青竹标乙醇粗提物。

[0044] (2) 将步骤1中粗提物加入适量水超声打散,依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取3次,得到正丁醇萃取部位,回收正丁醇萃取溶剂得到正丁醇部位。

[0045] (3) 将步骤2中所得的正丁醇部位加水稀释,通过 $C_{18}$ 吸附树脂色谱,依次用 $5\pm 1\%$  MeOH、 $12\pm 1\%$  MeOH、 $30\pm 1\%$  MeOH、 $60\pm 1\%$  MeOH、 $80\pm 1\%$  MeOH、 $100\%$  MeOH进行洗脱,每1500ml作为一个单位接收,每个梯度洗脱3个接收单位,将各洗脱部分减压浓缩至干。

[0046] (4) 将步骤3中 $60\pm 1\%$  MeOH洗脱部分,进一步采用 $C_{18}$ 吸附树脂色谱,依次用 $50\pm 1\%$  MeOH、 $60\pm 1\%$  MeOH、 $70\pm 1\%$  MeOH、 $80\pm 1\%$  MeOH、 $100\%$  MeOH进行洗脱,每500ml作为一个单位接收,每个梯度洗脱3个接收单位,将各洗脱部分减压浓缩至干。

[0047] (5) 将步骤4中 $70\pm 1\%$  MeOH洗脱部分,采用RP- $C_{18}$ 高压制备柱色谱,用 $CH_3CN/H_2O$  (20:80, v/v) 进行制备(流速: $10\text{ mL min}^{-1}$ ;检测波长:250nm),最终得到新的阿魏酸酚苷类化合物。

[0048] 结构鉴定:对分离得到的单体成分应用Bruker Impact II质谱仪和Burker400MHz核磁共振波谱仪分别进行MS,NMR谱的测定,所得核磁数据见表1,鉴定该新阿魏酸酚苷类化合物的结构。

[0049] 4-0- $[\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1-3)-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}]$ - (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid:棕色无定型粉末。HR ESI-MS质谱分析分子量为 $m/z$  525.2903  $[M+Na]^+$ ,结合 $^1\text{H-NMR}$ 与 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据确定该化合物分子式为 $C_{22}H_{30}O_{13}Na$  ( $C_{22}H_{30}O_{13}Na$ ,计算值525.1579)。红外光谱中 $1664\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰表明化合物结构中含有共轭羰基, $1626,1588$ 和 $1502\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰表明化合物结构中含有苯环。 $^1\text{H-NMR}$ 谱显示反式阿魏酸苷元的特征信号,包括2个反式烯氢信号: $\delta_{\text{H}}$  7.60 (1H, d,  $J=15.8\text{ Hz}$ , H-7), 6.60 (1H, d,  $J=15.8\text{ Hz}$ , H-8); ABX耦合的苯环信号: $\delta_{\text{H}}$  7.38 (1H, s, H-2), 7.09 (1H, d,  $J=8.8\text{ Hz}$ , H-5), 7.21 (1H, dd,  $J=7.8, 0.8\text{ Hz}$ , H-6); 1个甲氧基信号: $\delta_{\text{H}}$  3.82 (3H, s, OMe-4)。此外, $^1\text{H-NMR}$ 谱还给出了2个糖的端基氢信号: $\delta_{\text{H}}$  5.15 (1H, d,  $J=7.6\text{ Hz}$ , H-1'), 5.24 (1H, s, H-1''),表明该化合物为阿魏酸酚苷类化合物。

[0050]  $^{13}\text{C-NMR}$ 和DEPT谱显示该化合物共有22个碳原子,分别为2个甲基,1个亚甲基,15个

次甲基,3个季碳以及1个共轭羰基碳信号( $\delta_c$  166.4),其中10个碳为苷元信号,12个碳为糖信号。将该化合物进行酸水解,经HPLC检测出含有2种单糖基团,分别为D-glucoses,D-galactose和L-rhamnose,比例为1:1,经糖端基氢信号的耦合常数进一步确定其相对构型,最终确定糖结构为 $\beta$ -D-glucopyranose和 $\alpha$ -L-rhamnopyranose。糖链的连接位置由HMBC谱中远程相关关系确定: $\delta_H$  5.15(H-1')与 $\delta_c$  148.6(C-4)相关, $\delta_H$  3.57(H-3')与 $\delta_c$  98.0(C-1')和100.3(C-1'')相关, $\delta_H$  5.24(H-1'')与 $\delta_c$  75.9(C-3')相关。综上所述,该化合物的结构确定为4-0-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (E)-3-(4-hydroxy-3-met hoxyphenyl) acrylic acid。表1示出了该化合物的 $^1H$  NMR(400MHz,DMSO)和 $^{13}C$  NMR数据(100MHz,DMSO)

[0051] 表1

Positions	<b>3</b>	
1		128.4
2	7.38 s	111.1
3		149.8
4		148.6
5	7.09 d(8.8)	115.2
6	7.21 dd(7.8,0.8)	122.9
7	7.60 d(15.8)	145.1
8	6.60 d(15.8)	116.8
9		166.4
[0052] OMe	3.82 s	56.0
1'	5.15 d(7.6)	98.0
2'	3.36 ov	77.3
3'	3.57 t(8.0)	75.9
4'	3.20 m	70.2
5'	3.48 m	78.2
6'	3.66 d(11.2)	61.0
	3.46 ov	
1''	5.24 s	100.3
2''	3.67 ov	71.0

[0053]	3"	3.36 ov	70.9
	4"	3.19 ov	72.4
	5"	3.90 m	68.8
	6"	1.13 d(6.4)	18.5

## [0054] 实施例2药理学实验

[0055] 对实施例1制备得到的酚苷类化合物4-0-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid进行药理活性测定。

## [0056] 1、抗炎活性测定

[0057] 取RAW264.7小鼠巨噬细胞,计数,按 $3 \times 10^4$ /孔接种于96孔细胞培养板。采用含有10%牛胎血清、100U/mL青霉素和100 $\mu$ g/mL链霉素的DMEM培养基,将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中贴壁12h。实验分为空白对照组,LPS组,给药组和地塞米松组,对照组中只加入培养基,LPS组中只加入1 $\mu$ g/mL的LPS,地塞米松组中加入1 $\mu$ g/mL的LPS和10 $\mu$ M的地塞米松,给药组中加入1 $\mu$ g/mL的LPS和10 $\mu$ M的待测样品,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养24h。取出上清液60 $\mu$ L,加入Griess试剂10分钟后,用酶标仪570nm测定OD(光密度)值,根据NO标准曲线计算NO生成量。

## [0058] 2、细胞毒性测定

[0059] 用MTT法进行评价,将上述96孔板弃去培养液,每孔加入新鲜配置的含0.50mg/mL MTT的无血清培养基,37 $^{\circ}$ C下继续培养30min后,除去上清液。每孔加入100 $\mu$ L DMSO溶解formazan沉淀。在Perkin Elmer EnSpire型酶标仪上测定570nm处的光密度值。

## [0060] 3、实验结果

[0061] 4-0-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid的抗炎活性结果见表2。

[0062] 表2.新化合物对RAW264.7小鼠巨噬细胞NO释放的抑制作用

[0063]	化合物	浓度	筛选模型	NO生成	筛选模型	对细胞生
	编号	( $\mu$ mol/L)		量抑制率		长的抑制
				(%)		率 (%)
[0064]	空白	/	NO	/	MTT	/
	LPS	/	NO	/	MTT	/
	地塞米松	10 <sup>-5</sup>	NO	64.3	MTT	3.1
	新化合物	10 <sup>-5</sup>	NO	36.4	MTT	-9.1

[0065] 结论:采用Griess试剂测定4-0-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (E)-3-(4

[0066] -hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid对细胞NO释放的抑制作用,结果表明新化合物对LPS诱导的RAW264.7小鼠巨噬细胞的NO释放表现出一定程度的抑制作用,且通

过细胞毒性测定结果显示新化合物对RAW264.7小鼠巨噬细胞的增殖无抑制作用,表明4-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylic acid具有一定的抗炎活性。

[0067] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,尽管参照前述实施例对本申请进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

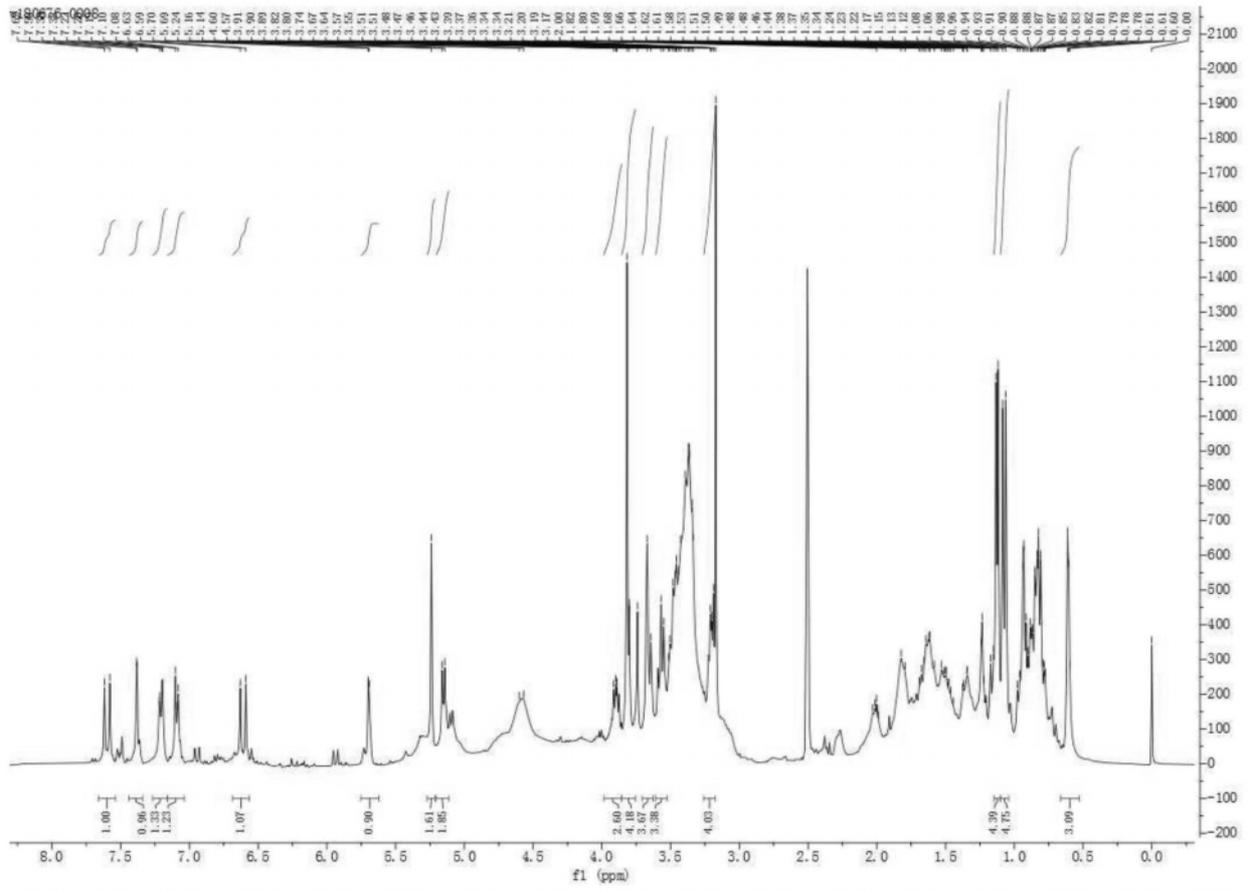


图1

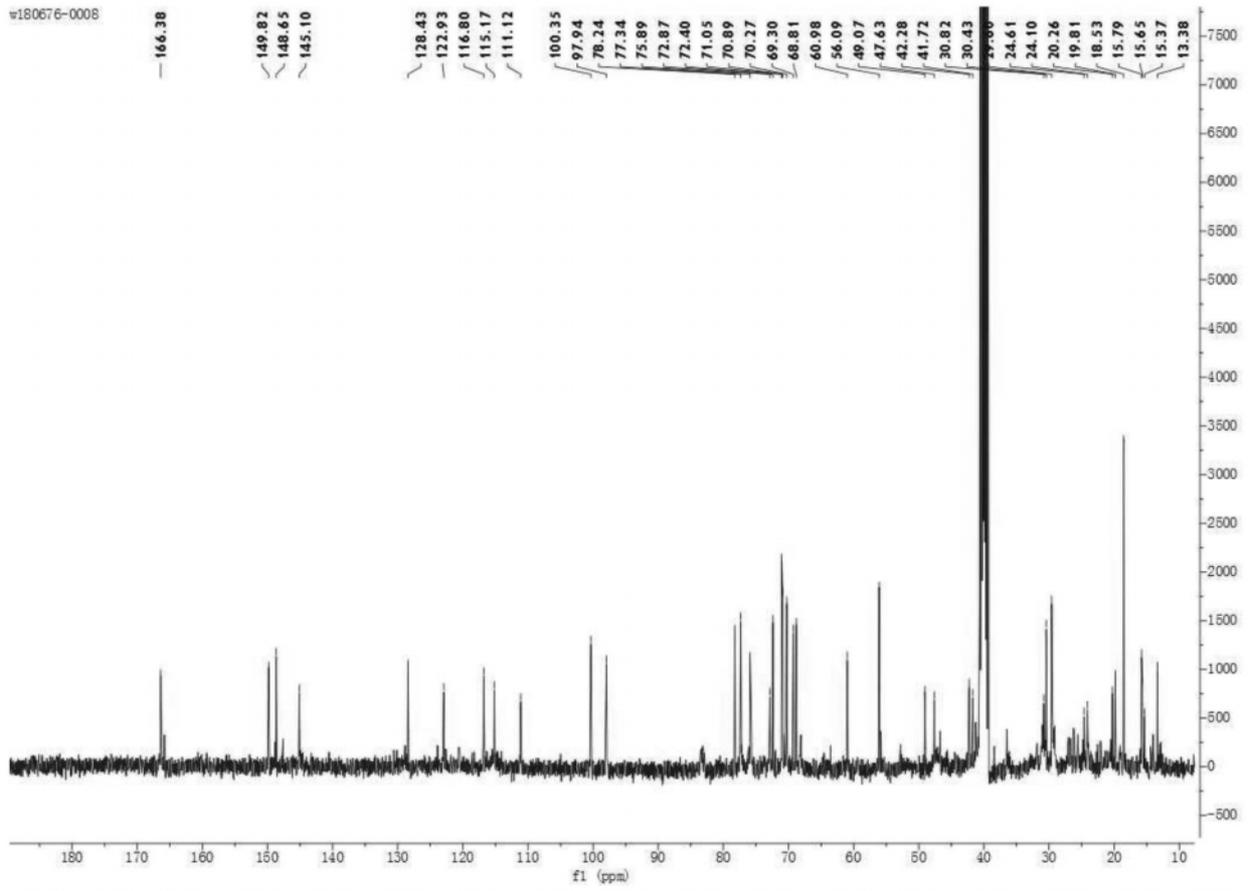


图2

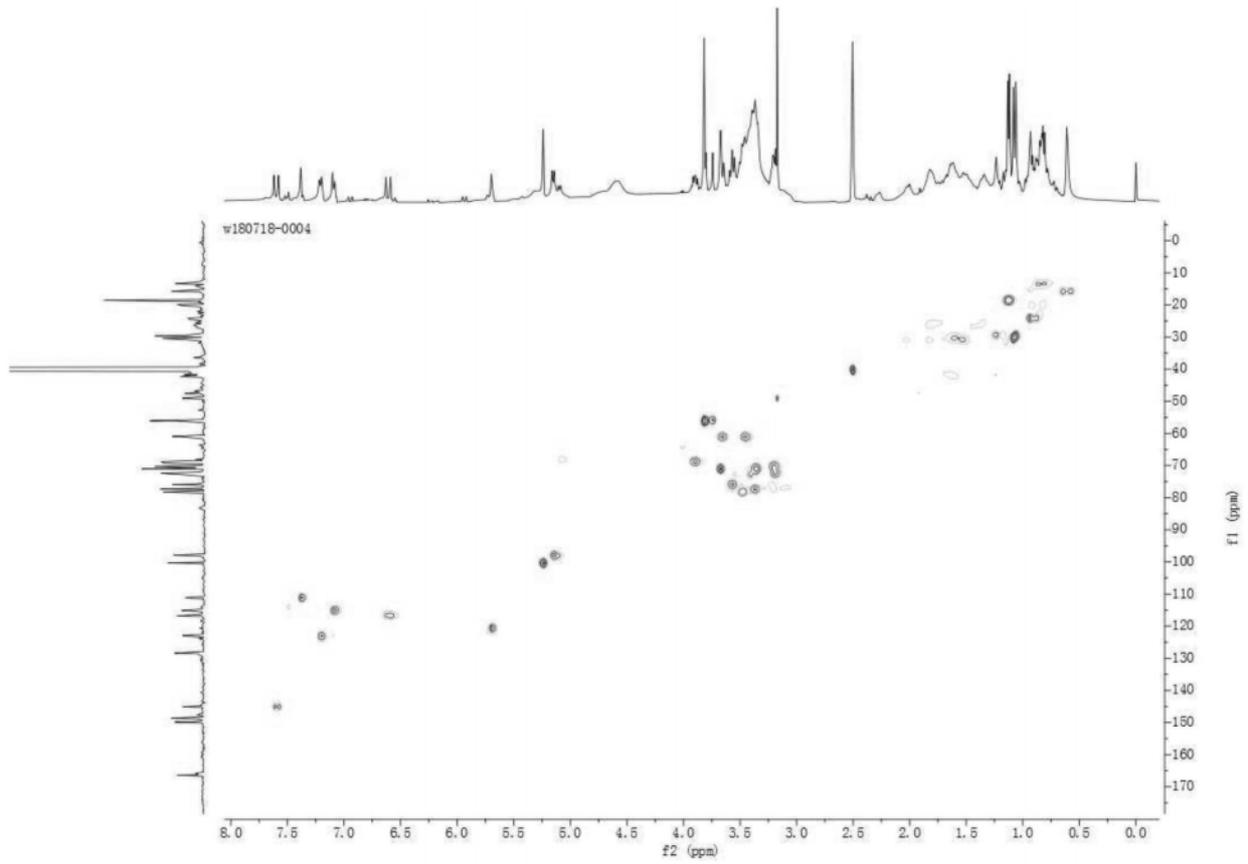


图3

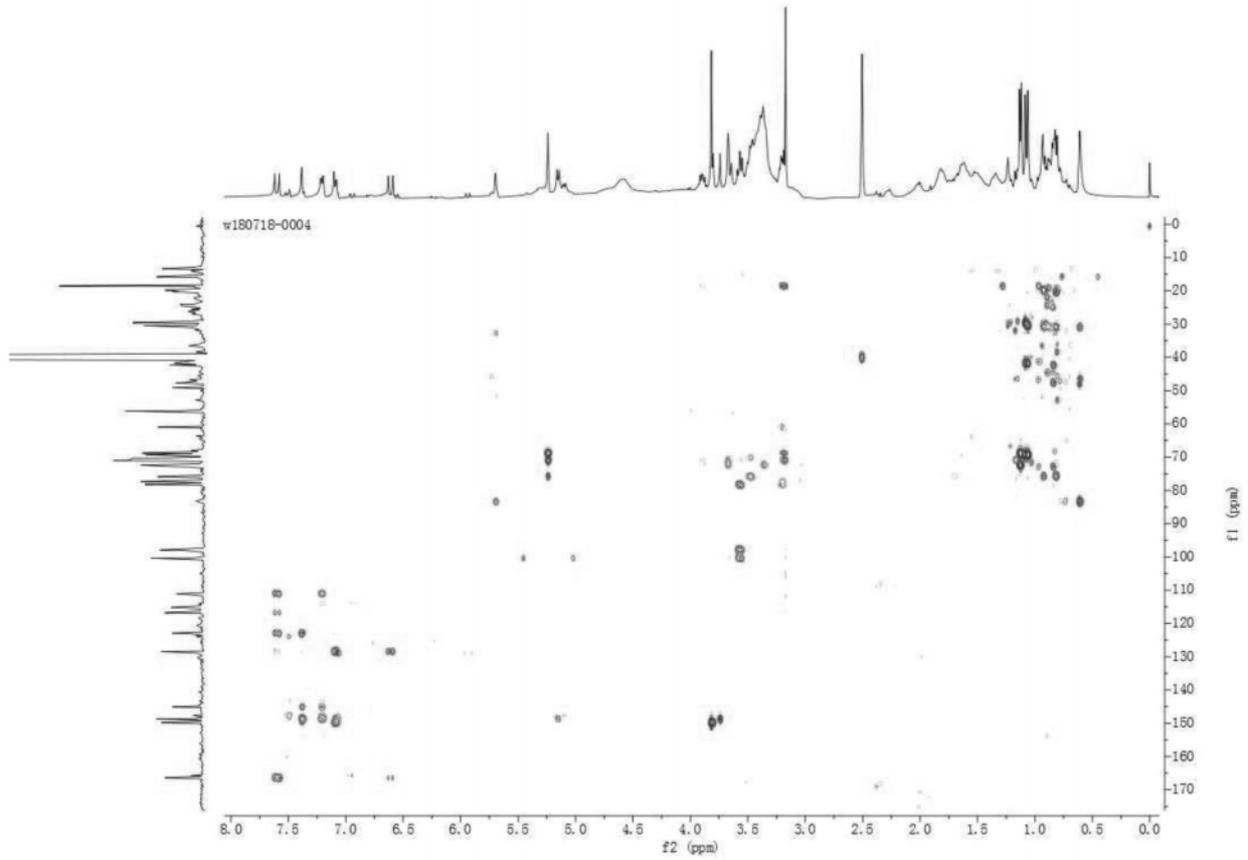


图4

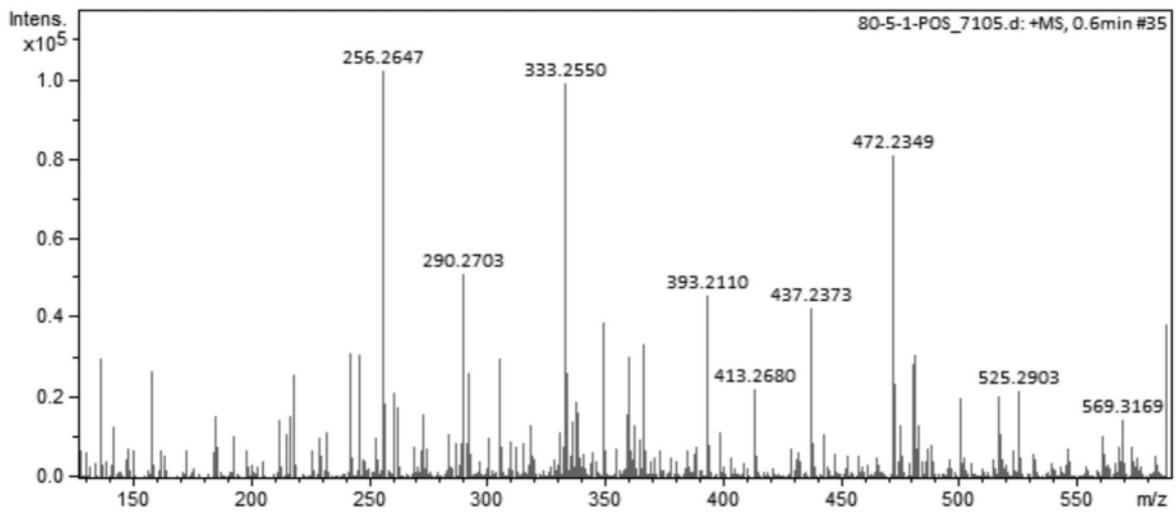


图5