



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104817432 A

(43) 申请公布日 2015.08.05

(21) 申请号 201510133850.3

(22) 申请日 2015.03.25

(71) 申请人 青岛华仁技术孵化器有限公司

地址 266071 山东省青岛市市南区香港中路
32号五矿大厦 801-A 室

(72) 发明人 不公告发明人

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 苏雪雪

(51) Int. Cl.

C07C 35/44(2006.01)

C07C 29/76(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

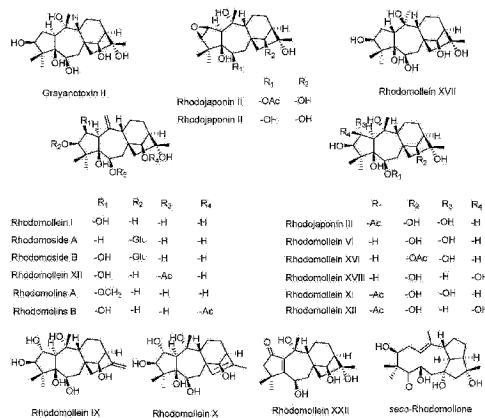
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种二萜类化合物的抗肿瘤药物及其方法用途

(57) 摘要

本发明公开了一种二萜类化合物,其制备方法包括:A.将闹羊花用二氯甲烷一次或多次脱脂,过滤,收集滤渣;B.将闹羊花用醇或醇溶液提取一次或多次,过滤,收集滤液,再减压浓缩干燥,获得醇提取物;C.将醇提取物加水,以石油醚萃取再次脱脂后,以乙酸乙酯萃取,获得的乙酸乙酯萃取液再以饱和碳酸氢钠水溶液萃取,取乙酸乙酯相蒸干,获得乙酸乙酯萃取物粗品;D.将获得的粗品进行柱色谱分离纯化,得到纯化后的二萜类化合物。本发明二萜类化合物对结肠癌细胞(HT-29、HCT-8)、肝癌细胞(Bcl-7402)、非小细胞肺癌(A549)和/或乳腺癌(MCF-7)具有很强的抑制作用。



1. 一种二萜类化合物,其特征在于,制备方法包括:

A. 将闹羊花用二氯甲烷一次或多次脱脂,过滤,收集滤渣;

B. 将闹羊花用醇或醇溶液提取一次或多次,过滤,收集滤液,再减压浓缩干燥,获得醇提取物;

C. 将醇提取物加水,以石油醚萃取再次脱脂后,以乙酸乙酯萃取,获得的乙酸乙酯萃取液再以饱和碳酸氢钠水溶液萃取,取乙酸乙酯相蒸干,获得乙酸乙酯萃取物粗品;

D. 将获得的粗品进行柱色谱分离纯化,得到纯化后的二萜类化合物。

2. 根据权利要求 1 所述的二萜类化合物,其特征在于,所述步骤 D 的详细步骤包括:

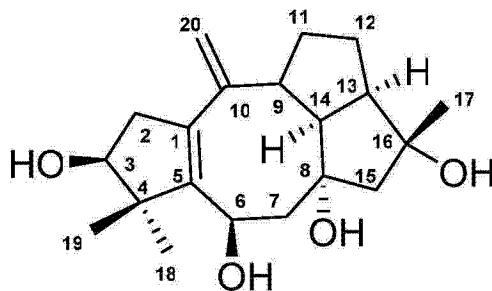
①将粗品在硅胶上进行柱层析,用乙酸乙酯-乙醇梯度洗脱,获得乙酸乙酯-乙醇洗脱物;

②取乙酸乙酯-乙醇洗脱物再进行硅胶柱层析,用二氯甲烷-甲醇等度洗脱,收集 6-8 柱体积洗脱部位,浓缩;

③取步骤②浓缩物进行反相硅胶柱层析,用水-甲醇等度洗脱,收集 4-5 柱体积洗脱部位,浓缩;

④取步骤③浓缩物用制备型高效液相色谱分离,水-甲醇梯度洗脱,从水-甲醇洗脱部位得到纯的化合物 I。

3. 一种二萜类化合物,其特征在于,所述二萜类化合物的化学结构式如下:



4. 一种如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述二萜类化合物的药理学活性测试方法,其特征在于,包括如下步骤:

A. 取对数生长期肿瘤细胞培养于 96 孔培养板内,每孔 100 μ L,含 1000-1200 个肿瘤细胞;次日,给药组加入含有不同浓度化合物,每药设 4 个剂量组,每组设 3 个平行板;

B. 对照组加入与所述二萜类化合物等体积的溶剂,置 5% CO_2 温箱中于 37 $^\circ\text{C}$ 培养,4d 后弃去培养液,每孔加入 200 μ L 0.2% MTT 溶液,37 $^\circ\text{C}$ 保温 4h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解甲管颗粒,轻度震荡后,用酶标仪,在参考波长 450nm,检测波长 570nm 条件下测定光密度 OD 值;

C. 以溶剂对照处理的细胞株为对照组,以紫杉醇作为阳性对照药品,测量结果用以下公式计算药物对肿瘤细胞和正常细胞的抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均 OD 值} - \text{给药组平均 OD 值}}{\text{对照组平均 OD 值}} \times 100\%$$

D. 由所得细胞抑制率使用 LOGIT 法计算化合物 IC_{50} 数值。

5. 一种如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述二萜类化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

6. 根据权利要求 5 所述二萜类化合物制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述的

肿瘤为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bc1-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

7. 一种如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述二萜类化合物在检测抗肿瘤药物的活性中的应用。

8. 根据权利要求 7 所述二萜类化合物在检测抗肿瘤药物活性中的应用, 其特征在于, 所述的肿瘤为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bc1-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

9. 一种如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述二萜类化合物在筛选抗肿瘤药物中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述二萜类化合物在筛选抗肿瘤药物中的应用, 其特征在于, 所述的肿瘤为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bc1-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

一种二萜类化合物的抗肿瘤药物及其方法用途

技术领域

[0001] 本发明涉及天然提取物药物化学技术领域,特别涉及一种二萜类化合物的抗肿瘤药物及其方法用途。

背景技术

[0002] 羊躑躅 (*Rhododendron molle* G. Don) 为杜鹃花科植物,分布于我国长江流域至南部各地,生长于山坡、灌丛或草丛中。羊躑躅的花、果实和根等均可供药用。花一般称闹羊花,味辛,温,有大毒,入肝经;具有定痛、驱风和除湿等功效,用于风湿顽痹,伤折疼痛,皮肤顽痹。果实一般称六轴子或八里麻,味苦,温,有大毒,入肺、脾经;具有搜风止痛、止咳平喘等功效,用于风寒湿痹,跌打损伤,咳喘。根味辛,温,有毒,入脾经;具有祛风、止咳、散瘀和止痛等功效,用于风寒湿痹,跌打损伤,痔漏,癰疮。化学研究表明,二萜和黄酮类化合物是羊躑躅花、果实和根等的主要成分,其中二萜类成分既是主要有效成分,也是其毒性成分。

[0003] 目前从羊躑躅的花、果实和根中分离得到并经结构确证的二萜类成分根据母核主要分为两大类:grayanane 型和 kalmanol 型。Grayanane 型代表性化合物包括: rhodomollein XVI、rhodomollein XVII、rhodomollein XVIII、rhodojaponin III、rhodojaponin VI (Diterpenoids from the Fruits of *Rhododendron molle*, J. Nat. Prod. 2000, 63, 1214-1217); rhodomoside A 和 rhodomoside B (Diterpenoid and Phenolic Glycosides from the roots of *Rhododendron molle*); rhodomollein IX、rhodomollein X、rhodomollein XI、rhodomollein XII 和 rhodomollein XIII (Diterpenoids from the Flowers of *Rhododendron molle*, J. Nat. Prod. 2004, 67, 1903-1906); rhodomolin A 和 rhodomolin B (Grayanane Diterpenoids from the Flowers of *Rhododendron molle* with Cytotoxic Activity against a *Spodoptera frugiperda* Cell Line, J. Nat. Prod. 2005, 68, 924-926); seco-rhodomollone (Diterpenoids from the Flowers of *Rhododendron molle*, J. Nat. Prod. 2014, 77, 1185-1192)。Kalmanol 型代表性化合物包括: rhodomollein XV、kalmanol (Diterpenoids from the Fruits of *Rhododendron molle*, J. Nat. Prod. 2000, 63, 1214-1217) 和 rhodomollein XIV (Diterpenoids from the Flowers of *Rhododendron molle*, J. Nat. Prod. 2004, 67, 1903-1906)。代表性 Grayanane 型和 kalmanol 型二萜化合物结构如图 1 所示。

[0004] 闹羊花为羊躑躅的干燥花,具有祛风除湿、散瘀定痛之功效,可用于风湿痹痛、偏正头痛、跌扑肿痛、顽痹 [中华人民共和国药典 (一部) [S], 2010 版]。其化学成分研究始于二十世纪八十年代,研究内容主要集中于其二萜类化学成分。Grayanane 型和 kalmanol 型二萜类化合物主要通过液液萃取和不同类型填料的柱色谱法分离纯化得到。典型的方法为:第一步,不同浓度的醇溶液提取;第二步,提取物分散于水中,分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,分成不同极性段;第三步,取二萜类化合物集中的乙酸乙酯萃取物用正相硅胶柱色谱、反相硅胶柱色谱、MCI 微孔树脂柱色谱或者凝胶柱色谱细分纯化。

[0005] 闹羊花中二萜类成分药理活性筛选的报道较少,细胞毒活性研究更少。2005 年,

Zhong 等报道了闹羊花中两个 Grayanane 型化合物 rhodomolins A 和 rhodomolins B 对斜纹夜蛾细胞系 Sf-9 的细胞毒作用, IC₅₀ 值在 12-80 μg/mL (Grayanane Diterpenoids from the Flowers of *Rhododendron molle* with Cytotoxic Activity against a *Spodoptera frugiperda* Cell Line, *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 924-926)。目前尚未见闹羊花中 kalmanol 型二萜成分的活性报道。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于, 在针对闹羊花有效成分研究中, 从乙酸乙酯萃取物中分离鉴定了一个新的 kalmanol 型二萜化合物, 化学结构上为 rhodomollein XXIV 5 位羟基和 1 位氢脱水产物, 为首次报道, 命名为 kalmanene。细胞毒试验表明, 该化合物对肿瘤细胞具有显著的细胞毒作用, 对正常细胞细胞毒作用相对较弱, 可以作为制备抗肿瘤药物的活性成分。

[0007] 为解决上述技术问题, 本发明提供了一种二萜类化合物, 其制备方法包括:

[0008] A. 将闹羊花用二氯甲烷一次或多次脱脂, 过滤, 收集滤渣;

[0009] B. 将闹羊花用醇或醇溶液提取一次或多次, 过滤, 收集滤液, 再减压浓缩干燥, 获得醇提取物;

[0010] C. 将醇提取物加水, 以石油醚萃取再次脱脂后, 以乙酸乙酯萃取, 获得的乙酸乙酯萃取液再以饱和碳酸氢钠水溶液萃取, 取乙酸乙酯相蒸干, 获得乙酸乙酯萃取物粗品;

[0011] D. 将获得的粗品进行柱色谱分离纯化, 得到纯化后的二萜类化合物。

[0012] 所述步骤 D 的详细步骤可以包括:

[0013] ①将粗品在硅胶上进行柱层析, 用乙酸乙酯-乙醇梯度洗脱, 获得乙酸乙酯-乙醇洗脱物;

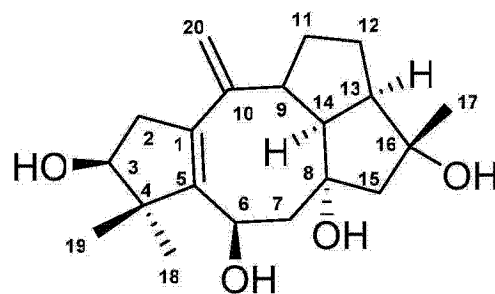
[0014] ②取乙酸乙酯-乙醇洗脱物再进行硅胶柱层析, 用二氯甲烷-甲醇等度洗脱, 收集 6-8 柱体积洗脱部位, 浓缩;

[0015] ③取步骤②浓缩物进行反相硅胶柱层析, 用水-甲醇等度洗脱, 收集 4-5 柱体积洗脱部位, 浓缩;

[0016] ④取步骤③浓缩物用制备型高效液相色谱分离, 水-甲醇梯度洗脱, 从水-甲醇洗脱部位得到纯的化合物 I。

[0017] 为解决上述技术问题, 本发明还提供了一种二萜类化合物, 所述二萜类化合物的化学结构式如下:

[0018]



[0019] 为解决上述技术问题, 本发明又提供了一种如前述任一项所述二萜类化合物的药理学活性测试方法, 包括如下步骤:

[0020] A. 取对数生长期肿瘤细胞培养于 96 孔培养板内, 每孔 100 μ L, 含 1000-1200 个肿瘤细胞; 次日, 给药组加入含有不同浓度化合物, 每药设 4 个剂量组, 每组设 3 个平行板;

[0021] B. 对照组加入与所述二萜类化合物等体积的溶剂, 置 5% CO₂ 温箱中于 37°C 培养, 4d 后弃去培养液, 每孔加入 200 μ L 0.2% MTT 溶液, 37°C 保温 4h, 弃去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解甲簪颗粒, 轻度震荡后, 用酶标仪, 在参考波长 450nm, 检测波长 570nm 条件下测定光密度 OD 值;

[0022] C. 以溶剂对照处理的细胞株为对照组, 以紫杉醇作为阳性对照药品, 测量结果用以下公式计算药物对肿瘤细胞和正常细胞的抑制率:

[0023]

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均 OD 值} - \text{给药组平均 OD 值}}{\text{对照组平均 OD 值}} \times 100\%$$

[0024] D. 由所得细胞抑制率使用 LOGIT 法计算化合物 IC₅₀ 数值。

[0025] 为解决上述问题, 本发明再提供了一种如前述任一项所述二萜类化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0026] 所述二萜类化合物制备抗肿瘤药物中的应用中所述的肿瘤为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bcl-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

[0027] 为解决上述技术问题, 本发明另提供了一种如前述任一项所述二萜类化合物在检测抗肿瘤药物的活性中的应用。

[0028] 所述的肿瘤优选为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bcl-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

[0029] 为解决上述技术问题, 本发明再提供了一种如前述任一项所述二萜类化合物在筛选抗肿瘤药物中的应用。

[0030] 所述的肿瘤优选为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bcl-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

[0031] 本发明有益的技术效果在于, 本发明二萜类化合物对结肠癌细胞 (HT-29、HCT-8)、肝癌细胞 (Bcl-7402)、非小细胞肺癌 (A549) 和 / 或乳腺癌 (MCF-7) 具有很强的抑制作用, 其中对结肠癌细胞 (HT-29、HCT-8)、肝癌细胞 (Bcl-7402) 和乳腺癌 (MCF-7) 的抑制作用强于阳性药对照; 另一方面, 化合物 I 对正常细胞 (人脐静脉内皮细胞 VEC) 的抑制作用要弱于阳性药, 表明本发明化合物 I 具有抗肿瘤作用, 且具有一定的选择性。

附图说明

[0032] 图 1 为现有技术中代表性 Grayanane 型二萜化合物结构图;

[0033] 图 2 为现有技术中代表性 kalmanol 型二萜化合物结构图;

[0034] 图 3 为本发明实施例所述化合物 1 的化学结构式。

具体实施方式

[0035] 以下将结合实施例来详细说明本发明的实施方式, 借此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题, 并达成技术效果的实现过程能充分理解并据以实施。

[0036] 本发明一实施例提供了一种二萜类化合物,其制备方法包括:

[0037] A. 将闹羊花用二氯甲烷一次或多次脱脂,过滤,收集滤渣;

[0038] B. 将闹羊花用醇或醇溶液提取一次或多次,过滤,收集滤液,再减压浓缩干燥,获得醇提取物;

[0039] C. 将醇提取物加水,以石油醚萃取再次脱脂后,以乙酸乙酯萃取,获得的乙酸乙酯萃取液再以饱和碳酸氢钠水溶液萃取,取乙酸乙酯相蒸干,获得乙酸乙酯萃取物粗品;

[0040] D. 将获得的粗品进行柱色谱分离纯化,得到纯化后的二萜类化合物。

[0041] 所述步骤 D 的详细步骤可以包括:

[0042] ①将粗品在硅胶上进行柱层析,用乙酸乙酯-乙醇梯度洗脱,获得乙酸乙酯-乙醇洗脱物;

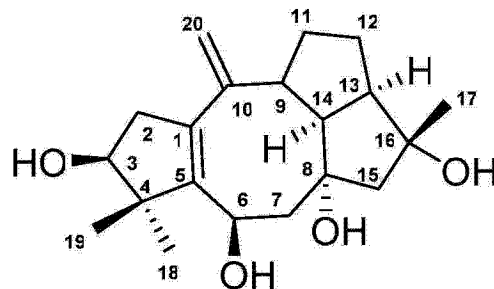
[0043] ②取乙酸乙酯-乙醇洗脱物再进行硅胶柱层析,用二氯甲烷-甲醇等度洗脱,收集 6-8 柱体积洗脱部位,浓缩;

[0044] ③取步骤②浓缩物进行反相硅胶柱层析,用水-甲醇等度洗脱,收集 4-5 柱体积洗脱部位,浓缩;

[0045] ④取步骤③浓缩物用制备型高效液相色谱分离,水-甲醇梯度洗脱,从水-甲醇洗脱部位得到纯的化合物 I。

[0046] 本发明另一实施例提供了一种二萜类化合物,所述二萜类化合物的化学结构式如下:

[0047]



[0048] 本发明又一实施例提供了一种如前述任一项所述二萜类化合物的药理学活性测试方法,包括如下步骤:

[0049] A. 取对数生长期肿瘤细胞培养于 96 孔培养板内,每孔 100 μ L,含 1000-1200 个肿瘤细胞;次日,给药组加入含有不同浓度化合物,每药设 4 个剂量组,每组设 3 个平行板;

[0050] B. 对照组加入与所述二萜类化合物等体积的溶剂,置 5% CO_2 温箱中于 37 $^\circ\text{C}$ 培养,4d 后弃去培养液,每孔加入 200 μ L 0.2% MTT 溶液,37 $^\circ\text{C}$ 保温 4h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解甲簪颗粒,轻度震荡后,用酶标仪,在参考波长 450nm,检测波长 570nm 条件下测定光密度 OD 值;

[0051] C. 以溶剂对照处理的细胞株为对照组,以紫杉醇作为阳性对照药品,测量结果用以下公式计算药物对肿瘤细胞和正常细胞的抑制率:

[0052]

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均 OD 值} - \text{给药组平均 OD 值}}{\text{对照组平均 OD 值}} \times 100\%$$

[0053] D. 由所得细胞抑制率使用 LOGIT 法计算化合物 IC_{50} 数值。

[0054] 为解决上述问题,本发明再提供了一种如前述任一项所述二萜类化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0055] 所述二萜类化合物制备抗肿瘤药物中的应用中所述的肿瘤为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bcl-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

[0056] 本发明另一实施例提供了一种如前述任一项所述二萜类化合物在检测抗肿瘤药物的活性中的应用。

[0057] 所述的肿瘤优选为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bcl-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

[0058] 本发明再一实施例提供了一种如前述任一项所述二萜类化合物在筛选抗肿瘤药物中的应用。

[0059] 所述的肿瘤优选为结肠癌细胞株 HT-29、结肠癌细胞株 HCT-8、肝癌细胞株 Bcl-7402、非小细胞肺癌细胞株 A549 和 / 或乳腺癌细胞株 MCF-7。

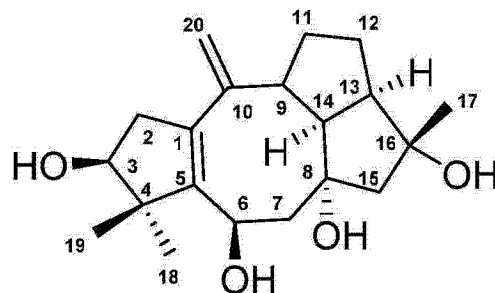
[0060] 本发明的又一个实施例提供一种从闹羊花中分离纯化出的具有抗肿瘤作用的新化合物 I。

[0061] 本发明的另一实施例提供了一种从闹羊花中分离纯化化合物 I 的制备方法。

[0062] 本发明的再一实施例提供了化合物 I 在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0063] 根据本发明的一实施例,提供具有下列化学结构式 I 的化合物:

[0064]



[0065] 根据本发明的另一实施例提供一种从闹羊花中分离纯化化合物 I 的制备方法,其制备步骤包括:

[0066] A. 将闹羊花用二氯甲烷提取一次或多次脱脂,过滤,收集滤渣;

[0067] B. 将闹羊花用醇或醇溶液提取一次或多次,过滤,收集滤液,再减压浓缩干燥,获得醇提取物;

[0068] C. 将醇提取物加水,以石油醚萃取再次脱脂后,以乙酸乙酯萃取,获得的乙酸乙酯萃取液再以饱和碳酸氢钠水溶液萃取,取乙酸乙酯相蒸干,获得乙酸乙酯萃取物(粗品);

[0069] D. 将获得的粗品进行柱色谱分离纯化,得到纯的化合物 I。

[0070] 上述步骤 D 的详细步骤包括如下:①将粗品在硅胶上进行柱层析,用乙酸乙酯-乙醇梯度洗脱,获得乙酸乙酯-乙醇(体积比 30 : 1)洗脱物;②取乙酸乙酯-乙醇(体积比 30 : 1)洗脱物再进行硅胶柱层析,用二氯甲烷-甲醇(15 : 1)等度洗脱,收集 6-8 柱体积洗脱部位,浓缩;③取步骤②浓缩物进行反相硅胶柱层析,用水-甲醇(55 : 45)等度洗脱,收集 4-5 柱体积洗脱部位,浓缩;④取步骤③浓缩物用制备型高效液相色谱分离,水-甲醇

梯度洗脱,从水-甲醇(体积比 60 : 40)洗脱部位得到纯的化合物 I。

[0071] 上述步骤D的详细步骤包括如下:①将粗品在硅胶上进行柱层析,用乙酸乙酯-乙醇梯度洗脱,获得乙酸乙酯-乙醇(体积比 30 : 1)洗脱物;②取乙酸乙酯-乙醇(体积比 30 : 1)洗脱物再进行硅胶柱层析,用二氯甲烷-甲醇(15 : 1)等度洗脱,收集 6-8 柱体积洗脱部位,浓缩;③取步骤②浓缩物进行反相硅胶柱层析,用水-甲醇(55 : 45)等度洗脱,收集 4-5 柱体积洗脱部位,浓缩;④取步骤③浓缩物用制备型高效液相色谱分离,水-甲醇梯度洗脱,从水-甲醇(体积比 60 : 40)洗脱部位得到纯的化合物 I。

[0072] 根据本发明的再一实施例,提供本发明化合物 I 在制备抗肿瘤药物中的应用。本发明化合物 I 活性以标准药理学检验规程进行评价,结果表明本发明化合物 I 对肿瘤细胞具有显著细胞毒作用,对多数肿瘤细胞的抑制效果强于阳性药或与阳性药相当;对正常细胞细胞毒作用较弱,抑制效果低于阳性药。基于所述标准药理学检验程序评价中所显示的活性,本发明化合物 I 因而可以用于抗肿瘤领域,优选结肠癌、肝癌和乳腺癌。

[0073] 下面是本发明化合物 I 的药理学试验方法及活性数据。

[0074] 体外抗人结肠癌细胞 (HT-29、HCT-8)、肝癌细胞 (Bcl-7402)、非小细胞肺癌 (A549)、乳腺癌细胞 (MCF-7) 和人脐静脉内皮细胞 (VEC) 的活性测定:

[0075] 平板打孔法测定 KB 和细胞株抑制活性,试验方法如下:取对数生长期细胞培养于 96 孔培养板内,每孔 100 μ L (含 1000-1200 个肿瘤细胞),次日,给药组加入含有不同浓度化合物,每药设 4 个剂量组,每组设 3 个平行板。对照组加入与化合物等体积的溶剂,置 5% CO₂ 温箱中于 37°C 培养,4d 后弃去培养液,每孔加入 200 μ L 0.2% MTT 溶液,37°C 保温 4h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解甲簪颗粒,轻度震荡后,用酶标仪,在参考波长 450nm,检测波长 570nm 条件下测定光密度 (OD)。以溶剂对照处理的细胞株为对照组,以紫杉醇作为阳性对照药品。测量结果用以下公式计算药物对肿瘤细胞和正常细胞的抑制率:

[0076]

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均 OD 值} - \text{给药组平均 OD 值}}{\text{对照组平均 OD 值}} \times 100\%$$

[0077] 由所得细胞抑制率使用 LOGIT 法进而计算化合物 IC₅₀ 数值。

[0078] 试验结果表明,本发明化合物 I 对结肠癌细胞 (HT-29、HCT-8)、肝癌细胞 (Bcl-7402)、非小细胞肺癌 (A549) 和乳腺癌 (MCF-7) 具有很强的抑制作用,其中对结肠癌细胞 (HT-29、HCT-8)、肝癌细胞 (Bcl-7402) 和乳腺癌 (MCF-7) 的抑制作用强于阳性药对照;另一方面,化合物 I 对正常细胞 (人脐静脉内皮细胞 VEC) 的抑制作用要弱于阳性药,表明本发明化合物 I 具有抗肿瘤作用,且具有一定的选择性。试验结果见表 1。

[0079] 表 1 本发明化合物 I 对肿瘤细胞和正常细胞的抑制作用 (IC₅₀ (μ M))

[0080]

细胞株	IC ₅₀ (μ M)	
	化合物 I	阳性药对照 (紫杉)
结肠癌细胞(HT-29)	8.77	12.54
结肠癌细胞(HCT-8)	7.36	13.41
肝癌细胞(Bcl-7402)	10.12	10.88
非小细胞肺癌(A549)	22.52	16.62
乳腺癌(MCF-7)	8.37	10.34
人脐静脉内皮细胞 (VEC)	55.33	38.95

[0081] 实施例 1

[0082] 取闹羊花 (产地湖北), 用二氯甲烷提取三次脱脂, 过滤, 收集滤渣。将滤渣用 95% 乙醇溶液提取三次, 过滤, 收集滤液, 减压浓缩得乙醇提取物。将乙醇提取物加水制成提取物水悬液, 以石油醚萃取三次再次脱脂后, 以乙酸乙酯萃取三次, 获得的乙酸乙酯萃取液浓缩, 再以饱和碳酸氢钠水溶液萃取三次, 取乙酸乙酯相蒸干, 获得乙酸乙酯萃取物粗品。

[0083] 将粗品在硅胶上进行柱层析, 用乙酸乙酯 - 乙醇梯度洗脱, 获得乙酸乙酯 - 乙醇 (体积比 30 : 1) 洗脱物, 浓缩得浸膏 E1。取浸膏 E1 再次进行硅胶柱层析, 用二氯甲烷 - 甲醇 (15 : 1) 等度洗脱, 收集 6-8 柱体积洗脱部位, 浓缩得浸膏 E2。取浸膏 E2 进行反相硅胶柱层析, 用水 - 甲醇 (55 : 45) 等度洗脱, 收集 4-5 柱体积洗脱部位, 浓缩得浸膏 E3。取浸膏 E3 用制备型高效液相色谱分离, 水 - 甲醇梯度洗脱, 从水 - 甲醇 (体积比 60 : 40) 洗脱部位得到纯的化合物 I。

[0084] 实施例 2

[0085] 取闹羊花 20Kg (产地湖北), 用二氯甲烷提取三次脱脂 (60L \times 3), 过滤, 收集滤渣。将滤渣用 95% 乙醇溶液提取三次 (60L \times 3), 过滤, 收集滤液, 减压浓缩得乙醇提取物 (1.2Kg)。将乙醇提取物加水 10L 制成提取物水悬液, 以石油醚萃取三次再次脱脂后 (10L \times 3), 以乙酸乙酯萃取三次 (10L \times 3), 获得的乙酸乙酯萃取液浓缩至约 10L 再以饱和碳酸氢钠水溶液萃取三次 (10L \times 3), 取乙酸乙酯相蒸干, 获得乙酸乙酯萃取物 (粗品, 约 200g)。

[0086] 将粗品 (约 200g) 在硅胶 (600g) 上进行柱层析, 用乙酸乙酯 - 乙醇梯度洗脱, 获得乙酸乙酯 - 乙醇 (体积比 30 : 1) 洗脱物, 浓缩得浸膏 E1。取浸膏 E1 再次进行硅胶柱层析, 用二氯甲烷 - 甲醇 (15 : 1) 等度洗脱, 收集 6-8 柱体积洗脱部位, 浓缩得浸膏 E2。取浸膏 E2 进行反相硅胶柱层析, 用水 - 甲醇 (55 : 45) 等度洗脱, 收集 4-5 柱体积洗脱部位, 浓缩得浸膏 E3。取浸膏 E3 用制备型高效液相色谱分离, 水 - 甲醇梯度洗脱, 从水 - 甲醇 (体积比 60 : 40) 洗脱部位得到纯的化合物 I (110mg)。

[0087] 实施例 3

[0088] 取闹羊花 20Kg (产地湖北), 用二氯甲烷提取三次脱脂 (60L \times 3), 过滤, 收集滤渣。将滤渣用 95% 乙醇溶液提取三次 (60L \times 3), 过滤, 收集滤液, 减压浓缩得乙醇提取物 (1.0 ~ 1.4Kg)。将乙醇提取物加水 10L 制成提取物水悬液, 以石油醚萃取三次再次脱脂后 (10L \times 3), 以乙酸乙酯萃取三次 (10L \times 3), 获得的乙酸乙酯萃取液浓缩至约 10L 再以饱和碳酸氢钠水溶液萃取三次 (10L \times 3), 取乙酸乙酯相蒸干, 获得乙酸乙酯萃取物 (粗品,

180 ~ 220g)。

[0089] 将粗品 (180 ~ 220g) 在硅胶 (600g) 上进行柱层析,用乙酸乙酯-乙醇梯度洗脱,获得乙酸乙酯-乙醇 (体积比 30 : 1) 洗脱物,浓缩得浸膏 E1。取浸膏 E1 再次进行硅胶柱层析,用二氯甲烷-甲醇 (15 : 1) 等度洗脱,收集 6-8 柱体积洗脱部位,浓缩得浸膏 E2。取浸膏 E2 进行反相硅胶柱层析,用水-甲醇 (55 : 45) 等度洗脱,收集 4-5 柱体积洗脱部位,浓缩得浸膏 E3。取浸膏 E3 用制备型高效液相色谱分离,水-甲醇梯度洗脱,从水-甲醇 (体积比 60 : 40) 洗脱部位得到纯的化合物 I (105 ~ 115mg)。

[0090] 上述 3 个实施例制备的化合物 I 结构鉴定:

[0091] 无定形粉末,易溶于甲醇。HRESIMS 显示 $[M+Na]^+$ 为 m/z 357.2044,结合 ^{13}C -NMR 谱可确定该化合物分子式为 $C_{20}H_{30}O_4$,不饱和度为 6。红外 (IR) 提示羟基存在 ($3417cm^{-1}$)。 1H -NMR 谱提示有三个甲基存在 (δH 1.22, 1.12, 1.12),与季碳相连;两个连氧次甲基 (δH 3.85, 4.21);两个烯氢 (δH 5.08, 5.11)。 ^{13}C -NMR 谱和 DEPT 谱提示 20 个碳由 3 个甲基、6 个亚甲基 (1 个烯碳, δC 103.8)、5 个次甲基 (2 个连氧, δC 84.8, 64.9) 和 6 个季碳 (3 个烯碳, δC 126.9, 157.3, 154.6;两个连氧, δC 86.9, 81.9) 组成。四个烯碳证明存在两个双键,去掉两个不饱和度,还剩 4 个不饱和度。比较化合物 I 与 rhodomollein XXIV 1H -NMR 谱和 ^{13}C -NMR 谱,并结合以上分析可推测化合物 I 为 rhodomollein XXIV 进一步脱水结构。根据 HMBC 谱可知,脱水位置在 C1 和 C5 间。通过 ROESY 谱确定了化合物 I 的空间构型,最终确证化合物 I 为 rhodomollein XXIV 5 位羟基和 1 位氢脱水产物。

[0092] 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 谱图数据见表 2。

[0093] 表 2 核磁共振信号归属数据

[0094]

¹ H-NMR (Methanol- <i>d</i> ₄)		¹³ C-NMR (Methanol- <i>d</i> ₄)	
位置	δ _H	位置	δ _C
2a	2.34 (dd)	1	126.9 C
2b	2.61 (m)	2	39.9 CH ₂
3	3.85 (dd)	3	84.8 CH
6	4.21 (d)	4	42.7 C
7a	1.45 (d)	5	157.3 C
7b	1.71 (m)	6	64.9 CH
9	2.13 (m)	7	46.5 CH ₂
11a	1.35 (m)	8	86.9 C
11b	1.59 (m)	9	37.8 CH
12a	1.70 (m)	10	154.6 C
12b	1.93 (m)	11	37.5 CH ₂
13	1.24 (dd)	12	25.8 CH ₂
14	1.28 (d)	13	58.4 CH
15a	1.63 (d)	14	45.7 CH
15b	1.88 (d)	15	53.9 CH ₂
17	1.22 (s)	16	81.9 C
18	1.12 (s)	17	26.2 CH ₃
19	1.12 (s)	18	26.2 CH ₃
20a	5.08 (s)	19	25.7 CH ₃
20b	5.11 (s)	20	103.8 CH ₂

[0095] 所有上述的首要实施这一知识产权,并没有设定限制其他形式的实施这种新产品和/或新方法。本领域技术人员将利用这一重要信息,上述内容修改,以实现类似的执行情况。但是,所有修改或改造基于本发明新产品属于保留的权利。

PT1505LB0223

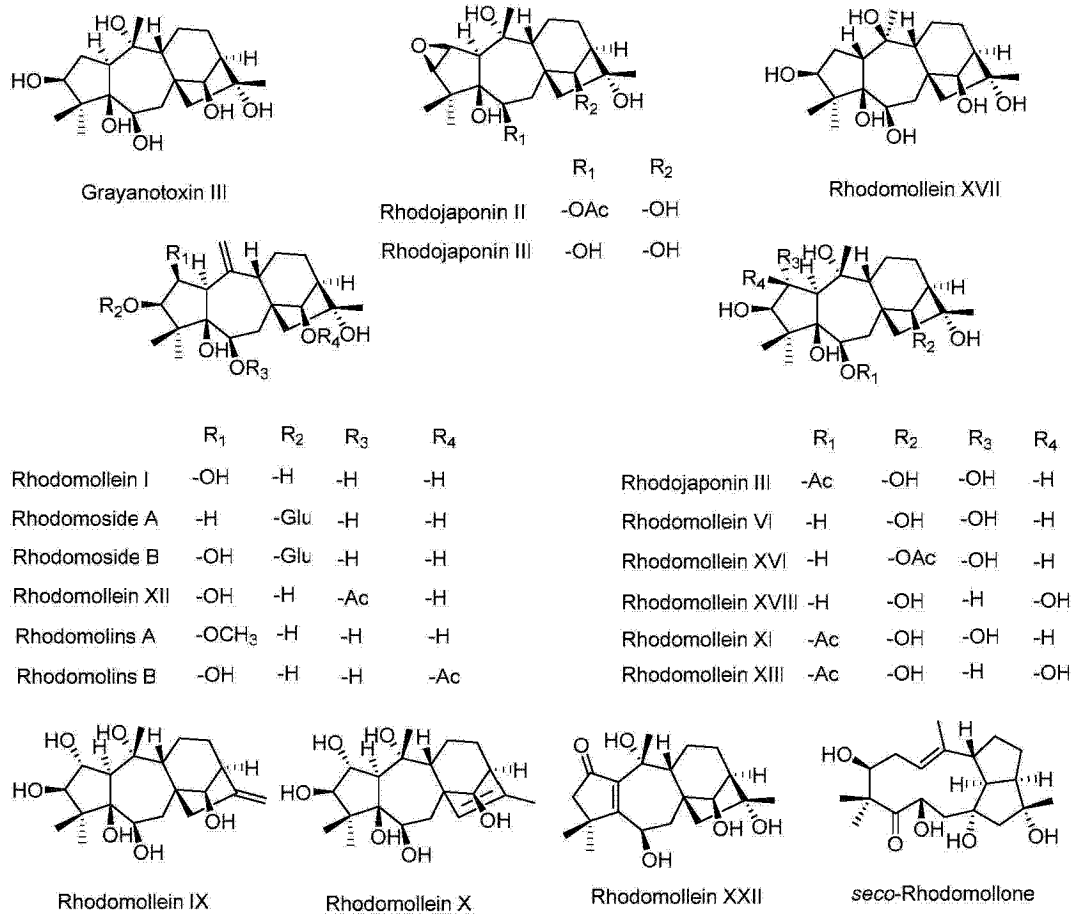


图 1

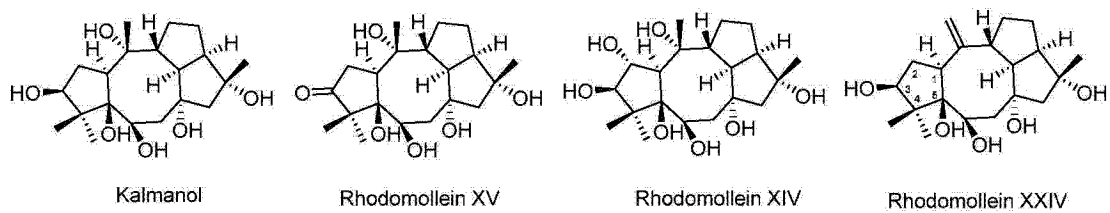


图 2

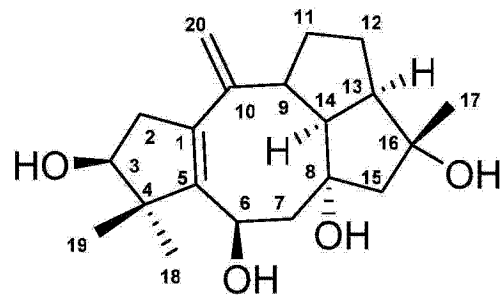


图 3