



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101074223 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200610081455. 6

A61P 3/10(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 05. 19

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院  
毒物药物研究所

JP 平 4-59788 A, 1992. 02. 26, 679 页实施例 2, 677 页下部左栏第四段至 678 页上部右栏第二段, 677 页上部右栏第二、三段.

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

全文.

(72) 发明人 单俊杰 任晋玮 赵毅民

杜树山 等. 天南星黄酮成分的研究. 中国药  
学杂志 40 19. 2005, 40(19), 1459 页化合物 6.

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038

Marc Estiarte et al. Free-air  
CO2 enrichment of wheat: leaf  
flavonoid concentration throughout  
the growth cycle. PHYSIOLOGIA  
PLANTARUM 105. 1998, 105426 及 433 页化合物 4.

代理人 顾颂迺

审查员 于保华

(51) Int. Cl.

C07D 311/30(2006. 01)

C07H 17/07(2006. 01)

C07D 311/40(2006. 01)

A61K 31/355(2006. 01)

A61K 31/7048(2006. 01)

A61K 9/20(2006. 01)

A61K 9/48(2006. 01)

A61K 9/70(2006. 01)

A61K 9/08(2006. 01)

A61P 3/06(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

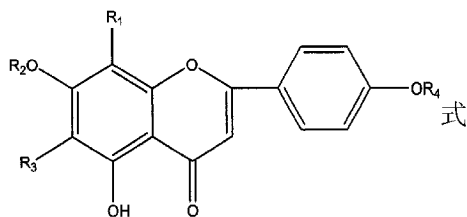
芹菜素衍生物及其治疗糖尿病及并发症的用途

(57) 摘要

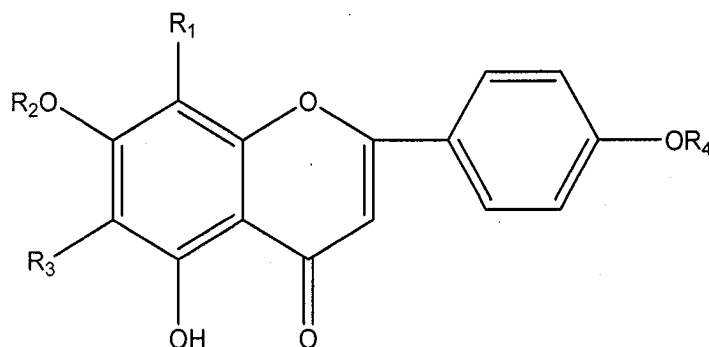
本发明涉及式 I 芹菜素衍生物、其制备方法, 其中, R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub>的定义如权利要求所述, 本发明还涉及含有所述芹菜素衍生物的药物组合物及其用于制备治疗糖尿病及并发症的药物、特别是降血糖、降血脂、降胆固醇和抑制醛糖还原酶活性的药物

的 5 用途。

I 的结构式。



1. 式 I 的芹菜素及其糖苷化衍生物,或其药学上可接受的盐在制备治疗糖尿病的药物或者在制备降血糖、降血脂、降胆固醇的药物中的用途:



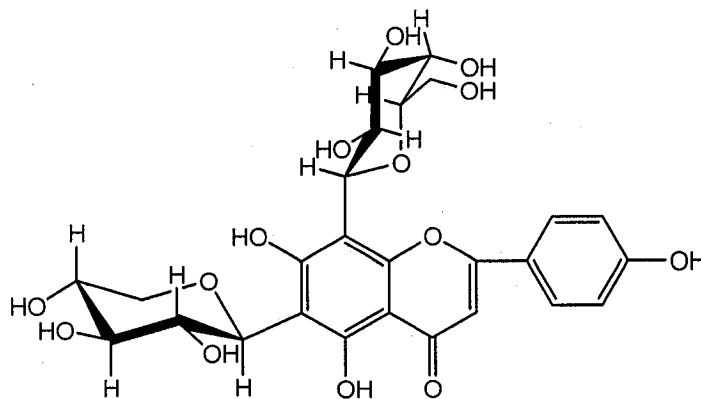
式 I 的结构式

其中,

$R_1, R_2, R_3$  和  $R_4$  各自独立地为氢或糖基,所述的糖基在其羟基上可任选地进一步被卤素、 $C_{1-4}$  低级烷基或  $C_{1-4}$  低级烷氧基取代。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述的式 I 的芹菜素及其糖苷化衍生物选自:

化合物 1:6-C-D- 木糖 -8-C-D- 半乳糖 - 芹菜素苷,结构如下:



化合物 2:6-C-D- 半乳糖 -8-C-D- 葡萄糖 - 芹菜素苷;

化合物 3:6-C-D- 阿拉伯糖 -8-C D- 半乳糖 - 芹菜素苷;和

化合物 4:6,8- 二 -D- 半乳糖 - 芹菜素苷,

或其药学上可接受的盐。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述式 I 的芹菜素及其糖苷化衍生物是由包括以下步骤的方法制备的:将胡芦巴种子 95% 的醇提取物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,得到的正丁醇萃取部位经硅胶柱、大孔树脂柱和聚酰胺柱层析分离,再经 ODS 制备色谱纯化。

4. 以下化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗糖尿病并发症或者抑制醛糖还原酶活性的药物中的用途:

化合物 2:6-C-D- 半乳糖 -8-C-D- 葡萄糖 - 芹菜素苷;

化合物 3:6-C-D- 阿拉伯糖 -8-C D- 半乳糖 - 芹菜素苷;和

化合物 4:6,8- 二 -D- 半乳糖 - 芹菜素苷。

## 芹菜素衍生物及其治疗糖尿病及并发症的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及芹菜素衍生物、其制备方法、含有芹菜素衍生物的药物组合物及其用于制备治疗糖尿病及并发症的药物、特别是降血糖、降血脂、降胆固醇和抑制醛糖还原酶活性的药物的用途。

[0002] 技术背景

[0003] 葫芦巴种子是一种传统的中药材，具有温肾、祛寒、止痛之功效。已有报道从葫芦巴中分离得到甾体皂甙、黄酮、生物碱等多种成分。有关葫芦巴用于治疗糖尿病在国内外也早已有研究报道 (G. Ribes, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1986, 182 :159-166 ;M. A. Riyad, Planta Med. , 1988, 54 :286 ;R. D. Sharma, Nutrition Res. , 1996, 16 (8) :1331 ;L. Ali, Planta Med. , 1995, 61 :358 ;朱镇海, 四川中医, 2000, 18 (11) :20 ;陈轶玉, 镇江医学院学报, 2001, 11 (2) :163), 但尚不清楚其中的有效成分。目前多认为葫芦巴中的皂苷类化合物可能是活性成分, 但是没有得到实验数据的证明。

[0004] 本发明人曾对葫芦巴种子提取物进行化学系统分离, 分别得到皂苷和黄酮类组分, 对它们进行了降血糖活性研究, 首次发现葫芦巴种子中皂苷类和黄酮苷类均有明显降血糖和降血脂作用 (CN200410071030. 8)。

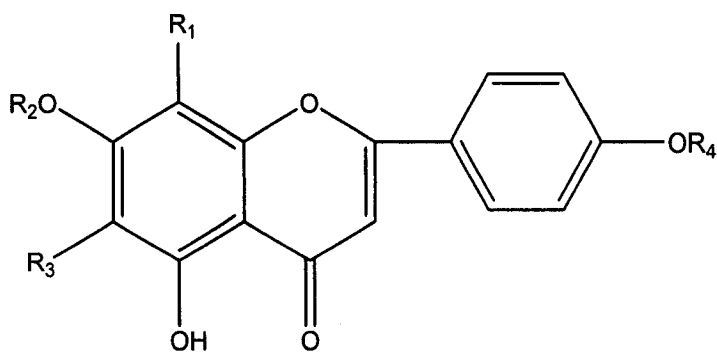
[0005] 芹菜素型黄酮广泛分布于唇形科、菊科、玄参科等植物中, 具有多种生物活性, 如抗肿瘤 (I. K. Wang, Eur J Cancer, 1999, 35 :1517)、抗炎 (王杰松, 第二医科大学学报, 1999, 20 :362)、抗动脉硬化 (张晶, 中药材 1999, 22 :131)、镇静催眠 (Viola H. , Planta Med. , 1995, 61 :213)、抗菌和抗病毒 (Adriana R. , Phytochemistry, 1999, 52 :1479) 和抗氧化作用 (Lin C. M. , Biochem. Biophys. Res. Comm, 2002, 294 :167)。迄今为止未见涉及芹菜素及其衍生物抗糖尿病及并发症的报导。

### 发明内容

[0006] 在上述研究的基础上, 本发明人对葫芦巴种子提取物中的降糖活性组分黄酮苷类进行了更为深入的化学分离和降糖活性追踪, 首次发现了具有抗糖尿病及并发症作用的芹菜素衍生物。

[0007] 因此, 本发明的第一个方面涉及具有式 I 的芹菜素及其糖苷化衍生物, 或其药学上可接受的盐:

[0008]



[0009] 式 I 的结构式

[0010] 其中,

[0011]  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  和  $R_4$  各自独立地为氢或糖基,所述的糖基在其羟基上可任选地进一步被卤素、 $C_{1-4}$  低级烷基或  $C_{1-4}$  低级烷氧基取代。

[0012] 本发明的第二个方面涉及上述式 I 化合物的制备方法,所述方法包括将葫芦巴种子 95% 的醇提取物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,得到的正丁醇萃取部位经硅胶柱、大孔树脂柱和聚酰胺柱层析分离,再经 ODS 制备色谱纯化。

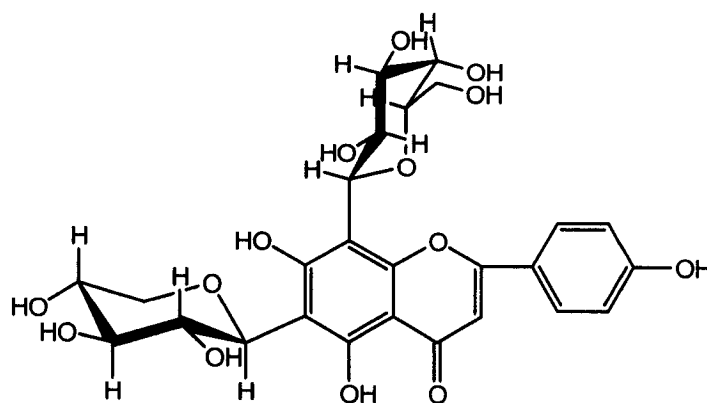
[0013] 本发明的第三个方面涉及含有至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物

[0014] 本发明的第四个方面涉及所述 I 化合物或其药学上可接受的盐用于制备治疗糖尿病及并发症的药物、特别是降血糖、降血脂、降胆固醇和抑制醛糖还原酶活性的药物的用途。

[0015] 根据本发明的一个优选的实施方式,本发明的式 I 化合物为如下化合物 1、化合物 2、化合物 3 或化合物 4,或它们药学上可接受的盐:

[0016] 化合物 1 :6-C-D- 木糖 -8-C-D- 半乳糖 - 芹菜素苷,其具有以下结构:

[0017]



[0018] 化合物 2 :6-C-D- 半乳糖 -8-C-D- 葡萄糖 - 芹菜素苷;

[0019] 化合物 3 :6-C-D- 阿拉伯糖 -8-C D- 半乳糖 - 芹菜素苷;或

[0020] 化合物 4 :6,8- 二 -D- 半乳糖 - 芹菜素苷。

[0021] 根据本发明,术语“糖基”包括自然界天然存在或人工合成的单糖或寡糖,例如葡萄糖、乳糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、果糖、麦芽糖等等。

[0022] 根据本发明,本发明的式 I 化合物可单独或以药物组合物的形式使用,给药方式可根据具体情况而定,并可根据需要按照药剂学领域的常规方法制成适合口服、直肠给药、

肌肉注射等给药方式的剂型,如:片剂、胶囊、膏剂、贴剂、悬浮液,注射液,滴注液等剂型。

[0023] 本发明药物组合中含有的载体或赋形剂包括药剂学常规应用的载体和赋形剂,例如填充剂、粘合剂、防腐剂、矫味剂、稀释剂、着色剂等。本发明药物组合可按本领域已知方法制备,例如将式 I 化合物与药用载体混合。

[0024] 作为活性成分的本发明式 I 化合物的用量取决于使用对象的年龄、体重和疾病的类型及严重程度等因素。

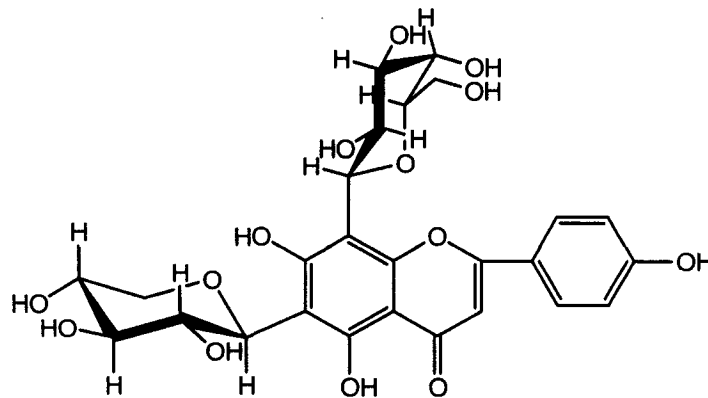
### 具体实施方式

[0025] 实施例 1. 芹菜素衍生物的提取和分离

[0026] 将葫芦巴种子 95% 醇提取物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,得到正丁醇萃取部位。该萃取部位首先经硅胶柱层析,再经过 AB-8 大孔树脂柱层析和聚酰胺柱层析分离,最后通过 ODS 制备色谱进行纯化,得到 4 个芹菜素衍生物,分别如下:

[0027] 化合物 1 :6-C-D- 木糖 -8-C-D- 半乳糖 - 芹菜素苷,其具有以下结构:

[0028]



[0029] 化合物 2 :6-C-D- 半乳糖 -8-C-D- 葡萄糖 - 芹菜素苷;

[0030] 化合物 3 :6-C-D- 阿拉伯糖 -8-C-D- 半乳糖 - 芹菜素苷;和

[0031] 化合物 4 :6,8- 二 -D- 半乳糖 - 芹菜素苷。

[0032] 化合物 1 为黄色粉末。HCl-Mg 反应呈阳性,苯酚-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 反应呈阳性。根据 <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 数据与文献数据对照,可确定其为 6-C-D- 木糖 -8-C-D- 半乳糖 - 芹菜素苷。

[0033] UV λ<sub>max</sub><sup>MeOH</sup> nm :271, 339。

[0034] 负离子 ESI-MS 给出 m/z 563 [M-H]<sup>-</sup>, 正离子 ESI-MS 给出 m/z :565 [M+H]<sup>+</sup>, 587 [M+Na]<sup>+</sup>, 603 [M+K]<sup>+</sup>, 1151 [2M+Na]<sup>+</sup>, 1167 [2M+K]<sup>+</sup>, 确定其分子量是 564。

[0035] <sup>1</sup>H-NMR δ ppm (DMSO-d<sub>6</sub>) :13.78 (1H, s, 5-OH, 重氢交换后消失), 7.96 (2H, d, J = 7.2Hz, 2', 6' -H), 6.93 (2H, d, J = 7.8Hz, 3', 5' -H), 6.79 (1H, s, 3-H), 4.98 (1H, d, J = 9.0Hz, gala 端基 H), 4.55 (1H, d, J = 9.6Hz, xyl 端基 H), 3.0 ~ 3.85 为糖环氢。

[0036] <sup>13</sup>C-NMR δ ppm (DMSO-d<sub>6</sub>) :182.29 (C-4), 163.58 (C-2), 161.79 (C-7), 161.16 (C-5, 4'), 153.41 (C-9), 128.72 (C-2', 6'), 121.33, (C-1'), 115.96 (C-3', 5'), 109.33 (C-6), 103.71 (C-8), 102.98 (C-10), 102.53 (C-3), 79.37 (gala-5, xyl-3), 74.93 (gala-3), 74.28 (gala-1), 73.72 (xyl-1), 70.28 (gala-2), 70.06 (xyl-2), 69.99 (xyl-4), 69.82 (xyl-5), 68.43 (gala-4), 60.82 (gala-6)。

[0037] 氢谱、碳谱数据的归属建立在 HMBC 基础上。

[0038] 该化合物的紫外光谱、质谱和核磁共振图谱分别见附图 1、2、3 和 4。

[0039] 实施例 2. 生物活性实验

[0040] 化合物 1 对糖尿病小鼠血糖的影响

[0041] 将 50 只昆明小鼠随机分为正常对照组 (10 只) 和待造模组 (40 只)。待造模组小鼠禁食 24 小时后 (不禁水), 尾静脉快速注射四氧嘧啶生理盐水溶液, 剂量为 60mg/kg。72h 后尾尖取血测定小鼠血糖, 血糖值 >20.0mmol/L 的小鼠被选为糖尿病小鼠, 分成模型组 (10 只), 化合物 I 组 (50mg/kg, 10 只), 格列齐特 (gliclazide) 阳性药组 (80mg/kg, 10 只) 连续灌胃给药 18 天, 分别于第 7 天和第 18 天测定血糖。数据以  $X \pm SD$  表示, 二组均数间差异用 t 检验, 结果见表 1。

[0042] 表 1. 化合物 1 对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的影响

[0043]

组别	血糖 (mmol/L)		
	0 天	7 天	18 天
正常对照组	7.51 ± 0.65	8.24 ± 0.73	7.85 ± 1.05
模型组	22.82 ± 2.27	26.22 ± 2.08	23.11 ± 2.40
化合物 1 组	21.26 ± 2.42	21.93 ± 4.17*	16.58 ± 4.22***
格列齐特组	22.19 ± 2.04	23.27 ± 4.40	18.03 ± 6.59*

[0044] 注:数值为平均值 ± 标准差 ( $X \pm S. D.$ )。与模型组比较, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

[0045] 实验结果表明, 本发明化合物 1 对四氧嘧啶糖尿病小鼠具有明显的降血糖作用。

[0046] 化合物 1 对糖尿病小鼠血浆总胆固醇、甘油三脂和糖基化白蛋白水平的影响

[0047] 给予上述糖尿病小鼠本发明化合物 I 18 天后, 测定血糖, 眼眶取血, 处死。测定小鼠血浆中总胆固醇、甘油三脂和糖基化白蛋白水平。数据以平均值 ± 标准差表示, 二组均数间差异用 t 检验, 结果见表 2。

[0048] 表 2. 化合物 1 对四氧嘧啶糖尿病小鼠血浆中总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 和糖基化白蛋白 (FruC) 水平的影响

[0049]

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	FruC (umol/L)
正常对照组	2.30 ± 0.29	2.03 ± 0.48	174.1 ± 43
模型组	2.87 ± 0.51	2.64 ± 0.16	305.7 ± 31.1
化合物 1 组	2.55 ± 0.65	1.71 ± 0.41*	256.7 ± 44.4**
格列齐特组	2.93 ± 0.63	2.09 ± 0.50	272.4 ± 35.7

[0050] 注:数值为平均值 ± 标准差 ( $X \pm S. D.$ )。与模型组比较, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

[0051] 实验结果表明, 本发明化合物 1 具有显著降低血浆中甘油三酯和糖基化白蛋白的

作用。

[0052] 化合物 1 对醛糖还原酶的抑制作用

[0053] 醛糖还原酶的制备

[0054] 取新鲜牛眼晶状体 100g, 加入 300ml 冷蒸馏水匀浆。离心, 除去不溶物。加入饱和硫酸铵溶液, 使之浓度为 40%。搅拌 15min, 离心。弃去沉淀, 继续加入硫酸铵, 使之浓度为 75%。搅拌 15min, 离心, 获得沉淀物 (醛糖还原酶)。

[0055] 化合物 1 对醛糖还原酶活性的影响

[0056] 反应体系: 0.1M 磷酸缓冲液 (pH = 6.2); NADPH:  $2.5 \times 10^{-4}$ M; DL-甘油醛:  $1.5 \times 10^{-3}$ M; 醛糖还原酶适量; 不同浓度的化合物 I, 总反应体积为 3ml。

[0057] 反应自加入甘油醛开始, 在 340nm 处记录 5min 内吸光度的变化值。以芦丁为对照品, 结果见表 3。

[0058] 表 3 化合物 1 对醛糖还原酶活性的抑制作用

[0059]

抑制物	不同浓度化合物 I 的抑制百分率 (%)		
	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M
化合物 1	85	27	0
芦丁	96	34	10

[0060] 实验结果表明, 本发明化合物 1 对醛糖还原酶活性具有抑制作用。

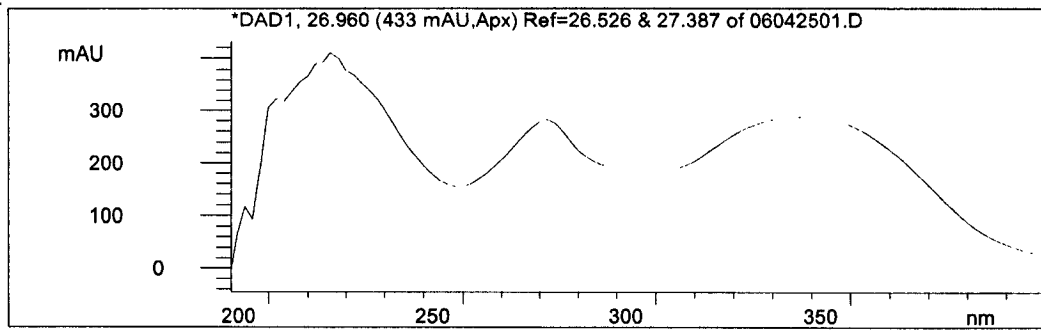


图 1 化合物 1 的紫外光谱

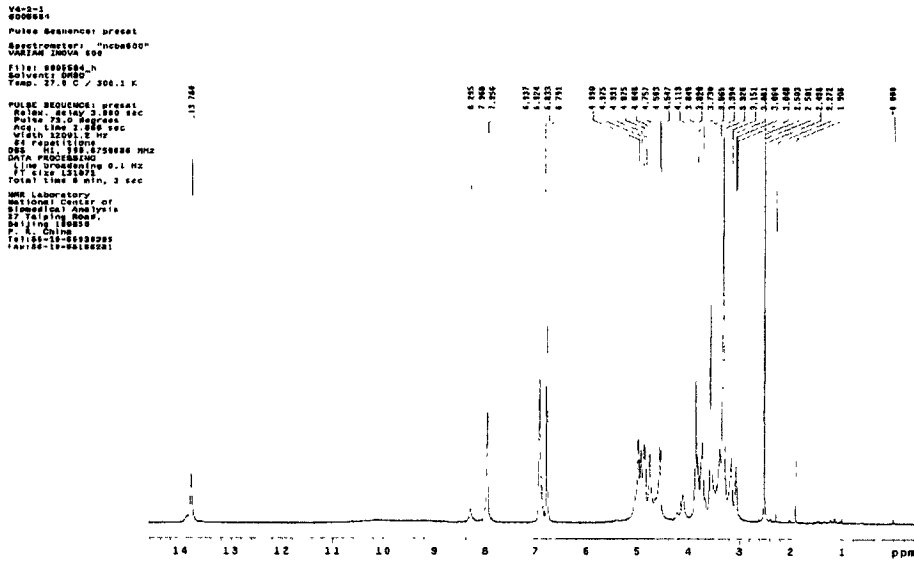


图 2 化合物 1 的 <sup>1</sup>H-NMR 图谱



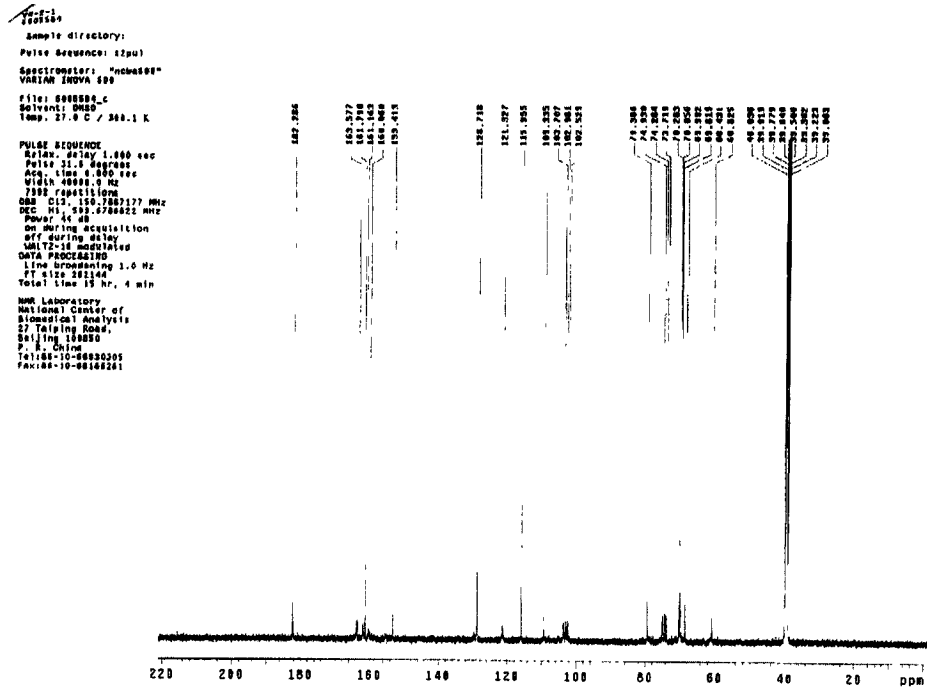


图 3 化合物 1 的 <sup>13</sup>C-NMR 图谱

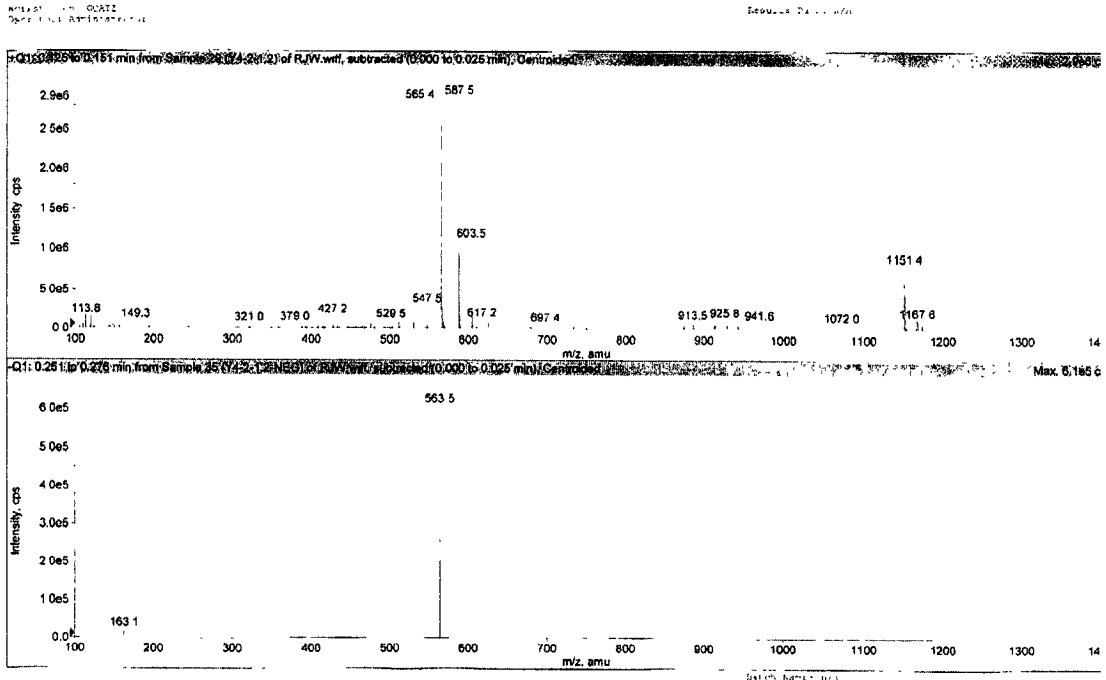


图 4 化合物 1 的质谱图