



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106317157 B

(45)授权公告日 2018.12.07

(21)申请号 201610701251.1

(22)申请日 2016.08.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106317157 A

(43)申请公布日 2017.01.11

(73)专利权人 吉首大学

地址 416000 湖南省湘西土家族苗族自治州吉首市人民南路120号

(72)发明人 魏华

(51)Int.Cl.

C07J 9/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 103665082 A, 2014.03.26, 说明书第3页第[0026]段、第5页第[0031]段.

Xu-Bing Chen et al..Cytotoxic cucurbitane triterpenoids isolated from the rhizomes of *Hemsleya amabilis*. 《Fitoterapia》.2014, 第94卷第91页图1, 第92页表3, 第89页.

Xu-Bing Chen et al..Cytotoxic cucurbitane triterpenoids isolated from the rhizomes of *Hemsleya amabilis*. 《Fitoterapia》.2014, 第94卷第91页图1, 第92页表3, 第89页.

审查员 王欢

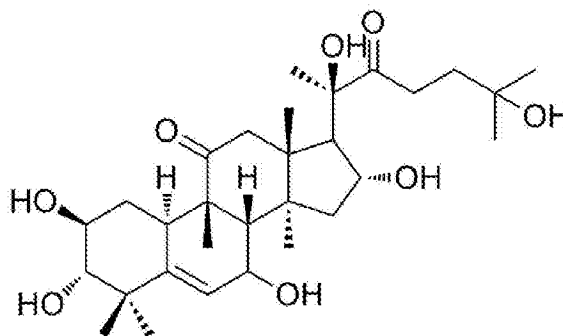
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

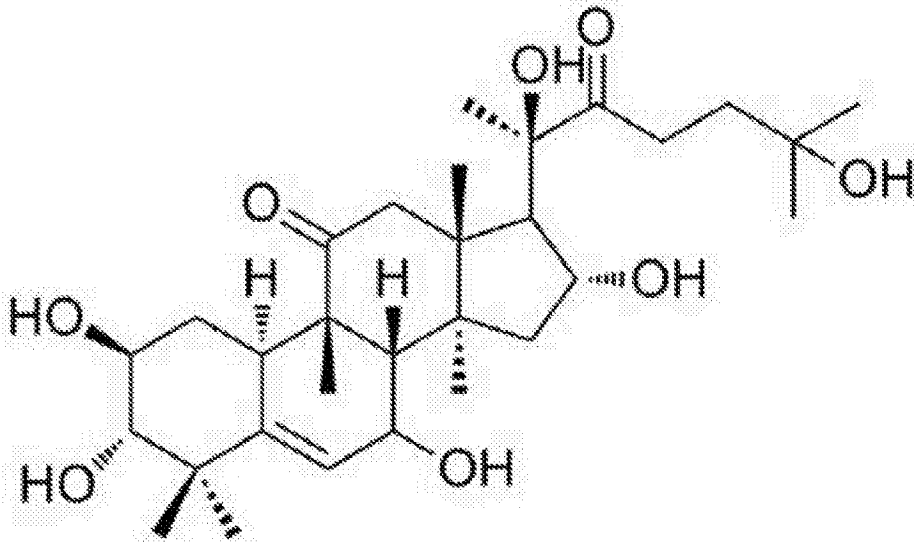
一种多羟基双酮类葫芦烷型三萜及其制法和用途

(57)摘要

本发明公开了一种从金佛山雪胆根茎中分离纯化得到的多羟基双酮类葫芦烷型三萜及其制法和用途,并利用现代分析手段确定了其化学结构和理化性质,根据有关化合物的命名规则命名为 $2\beta, 3\alpha, 7\beta, 16\alpha, 20\beta, 25$ -六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11,22-二酮,为无色粉末,易溶于氯仿、甲醇,该化合物为一新化合物。经功能性试验证明: $2\beta, 3\alpha, 7\beta, 16\alpha, 20\beta, 25$ -六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11,22-二酮对HeLa细胞和KB细胞等肿瘤细胞均具有较强的抑制作用,能够作为制备防治肿瘤药物的原料,具有较强的应用价值和市场前景。



1. 一种化合物在制备抗口腔表皮样癌KB细胞药物中的应用,其特征在于:该化合物为无色粉末,易溶于氯仿、甲醇,并具有如下所示结构



2. 一种权利要求1所述化合物的制备方法,其特征在于:金佛山雪胆根茎干燥后粉碎过筛,加95%乙醇加热回流提取3次,每次1-3小时,合并提取液,减压回收溶剂,浓缩后得总浸膏,总浸膏用水分散后,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,萃取液浓缩至干;取乙酸乙酯部位浸膏用硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇1:0-0:1梯度洗脱,得到12个馏分 Fr A-L, Fr.F部分经凝胶色谱洗脱后再用氯仿-甲醇作为洗脱液洗脱除去色素,然后样品经反相中压色谱柱经MeOH-H₂O 以60:40; 70:30; 80:20; 90:10进行梯度洗脱,得到四个部份Fr.F1-4,其中Fr.F3经高效液相色谱纯化分离,采用甲醇-水洗脱,收集16.7分钟的洗脱液结晶即得。

3. 根据权利要求2所述化合物的制备方法:其特征在于:所述加热回流提取中金佛山雪胆根茎与乙醇的质量体积比为1:8-1:12。

4. 根据权利要求2所述化合物的制备方法:其特征在于:所述凝胶色谱洗脱中,氯仿-甲醇洗脱液中氯仿与甲醇的体积比为45:55-60:40。

5. 根据权利要求2所述化合物的制备方法:其特征在于:所述高效液相色谱纯化分离中,甲醇-水洗脱液中甲醇与水的体积比为80:20。

一种多羟基双酮类葫芦烷型三萜及其制法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种多羟基双酮类葫芦烷型三萜衍生物及其制法和用途,具体指 2β , 3α , 7β , 16α , 20β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮及其制法和用途。

背景技术

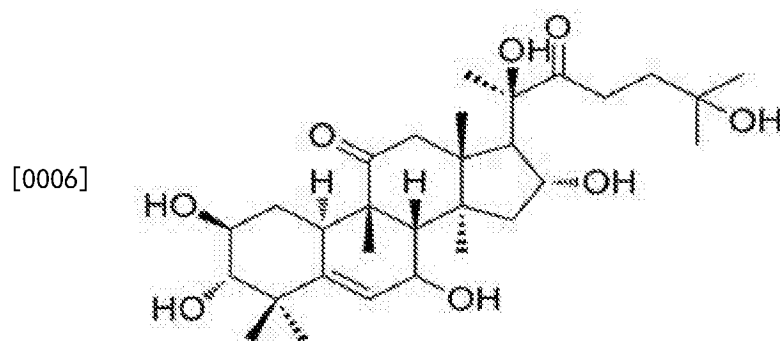
[0002] 金佛山雪胆(*Hemsleya pengxianensis* W. J. Chang var. *jinfushanensis* L. D. Shen & W. J. Chang)为葫芦科(Fabaceae)雪胆属植物,产于我国东南部地区,生于海拔2000米左右的林缘及山谷灌丛中。金佛山雪胆的果实呈卵形、长4-5厘米,直径2.5-3.5厘米,果皮表面有细小的疣状突起而与原变种相区别,主要活性成分分别为葫芦烷型四环三萜及其皂苷和齐墩果烷型五环三萜及其皂苷,具有清热解毒,抗菌消炎等多种功效,临床上主要用于治疗菌痢、各种炎症、溃疡、黄疸等多种疾病。

[0003] 金佛山雪胆的药效主要来源于其中的葫芦烷型三萜类化合物,因此,开发和利用雪胆中的葫芦烷型单体化合物,进一步挖掘其潜在的药用价值,并对其单体化合物的结构和理化性质进行确定和表征,对于开发利用金佛山雪胆资源具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明就是克服现有技术的不足,提供一种从金佛山雪胆根茎中分离得到的具有重要生物活性和产业化利用价值的多羟基双酮类葫芦烷型化合物。该单体化合物为从金佛山雪胆中首次分离得到,利用现代分析手段表征其结构并确认其生物活性后,根据有关化合物的命名规则命名为 2β , 3α , 7β , 16α , 20β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮,该化合物为一新化合物。

[0005] 一种从金佛山雪胆根茎中分离得到的 2β , 3α , 7β , 16α , 20β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮,具有如下式所示结构:



[0007] 上述从金佛山雪胆根茎中分离得到的 2β , 3α , 7β , 16α , 20β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮按下述方法得到:

[0008] 金佛山雪胆根茎干燥后粉碎过筛,加95%乙醇加热回流提取3次,每次1-3小时,合并提取液,减压回收溶剂,浓缩后得总浸膏,总浸膏用水分散后,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,萃取液浓缩至干;取乙酸乙酯部位浸膏用硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇(1:0-0:1)梯度洗脱,得到12个馏分 Fr A-L,Fr.F部分经凝胶色谱洗脱后再用氯仿-甲醇作

为洗脱液洗脱除去色素,然后样品经反相中压色谱柱经MeOH-H₂O (60:40; 70:30; 80:20; 90:10)梯度洗脱,得到四个部份Fr. F1-4,其中Fr. F3经高效液相色谱纯化分离,采用甲醇-水洗脱,收集16.7分钟的洗脱液结晶即得。

[0009] 所述加热回流提取中金佛山雪胆根茎与乙醇的质量体积比为1:8-1:12。

[0010] 所述氯仿-甲醇洗脱液中氯仿与甲醇的体积比为45:55-60:40。

[0011] 所述甲醇-水洗脱液中甲醇与水的体积比为80:20。

[0012] 2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮为无色粉末,易溶于氯仿,甲醇,将2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮进行体外抗肿瘤药效学实验,体外抗肿瘤药效学实验利用MTT比色法。

[0013] 以2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮为实验组,以Doxorubicin(多柔比星,抗肿瘤药物)为对照组,同时设立空白组,实验组、对照组和空白组选取HeLa(人宫颈癌)细胞和KB(人口腔表皮样癌)为实验对象,培养基稀释后,以6 \times 10⁴/ml的密度接种于96孔板,每孔100 μ l,培养箱中正常培养24小时后,各组加入相对应的药物,使各组药物的最终浓度分别为2.5 μ g/ml (1组),5 μ g/ml (2组),10 μ g/ml (3组),20 μ g/ml (四组),40 μ g/ml (5组),共设5个浓度,每个浓度3个复孔;培养48小时后,于每孔加MTT 10 μ l染色;继续培养四小时后,吸弃原培养液,每孔加入DMSO 100 μ l,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解,并于酶联免疫检测仪 570 nm 波长处检测光密度值,根据光密度值计算50%抑制浓度(IC₅₀, μ g/mL),光密度值计算IC₅₀的计算方法为现有公知技术。实验组、对照组对HeLa细胞和KB细胞的IC₅₀如表1所示。

[0014] 表1

组别	HeLa细胞	KB细胞
实验组	2.9 \pm 0.8	14.7 \pm 1.6
对照组	1.3 \pm 0.11	0.89 \pm 0.03

[0015] 通过上表的数据可以看出,本发明所述的2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮对HeLa细胞和KB细胞均具有一定的抑制作用,能够作为制备防治肿瘤药物的原料,具备较强的产业化应用价值。

[0016] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0017] 首次从金佛山雪胆根茎中分离得到了具有重要抗肿瘤活性的2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮,并利用现代分析手段确定了其化学结构和理化性质。经功能性试验证明:2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮对肿瘤细胞具有较强的抑制作用,能够作为制备防治肿瘤药物的原料,具有较强的应用价值和市场前景。

附图说明

[0018] 图1是2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮的分子结构示意图。

[0019] 图2是2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮的核磁共振氢谱(¹H-NMR)。

[0020] 图3是2 β , 3 α , 7 β , 16 α , 20 β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮的

核磁共振碳谱 (^{13}C -APT)。

具体实施方式

[0021] 下面将结合具体实施例对本发明作进一步的说明

[0022] 第一步:金佛山雪胆根茎(5.0 kg)干燥后粉碎过80目筛。第二步:药材粉末加10倍量乙醇加热回流提取3次,每次2小时,合并提取液,减压回收溶剂,浓缩后得总浸膏1033 g。第三步:金佛山雪胆根茎总浸膏加适量水进行分散处理后,分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,萃取至无色,将萃取液减压浓缩至干,称量得石油醚部位总浸膏56g、氯仿部位总浸膏302g、乙酸乙酯部位总浸膏151g、正丁醇部位总浸膏409 g。第四步:取乙酸乙酯层浸膏151 g经硅胶柱色谱(100~200目)分离,氯仿-甲醇(1:0-0:1)梯度洗脱,得到12个馏分 Fr A-L。第五步:Fr.F部分经凝胶色谱洗脱,氯仿-甲醇(45:55)作为洗脱液洗脱除去色素,然后样品经反相中压色谱柱经MeOH-H₂O(60:40; 70:30; 80:20; 90:10)梯度洗脱,得到四个部份Fr. F1-4。第六步:其中Fr. F3经高效液相色谱纯化分离,采用甲醇-水(80:20)洗脱,收集16.7分钟的洗脱液结晶即得到无色粉末,易溶于氯仿、甲醇。

[0023] 上述无色粉末的结构表征和确认如下:

[0024] 将上述所得无色粉末进行核磁共振氢谱(^1H -NMR)和核磁共振碳谱(^{13}C -APT)分析, ^1H -NMR谱图如图2所示, ^{13}C -APT谱图如图3所示。

[0025] 对图2和图3进行图谱解析,将图2和图3各峰进行归属,图2和图3的峰归属如表2所示,通过图2、图3以及表1的数据可知,无色粉末的化学结构式如图1所示,根据有关化合物的命名规则命名为 2β , 3α , 7β , 16α , 20β , 25-六羟基葫芦烷萜-5(E)-单烯-11, 22-二酮。

[0026] 英文名为 2β , 3α , 7β , 16α , 20β , 25-hexahydroxycucurbita-5(E)-ene-11, 22-dione。

1

位置	δ_c , type	δ_H (J, Hz)	位置	δ_c , type	δ_H (J, Hz)
1	35.1	3.28(1H, m) 3.47(1H, m)	16	70.8	4.88(1H, t, 13.2)
2	71.3	4.20(1H, m)	17	59.1	2.96(1H, d, 12.6)
3	81.7	3.50(1H, d, 6.0)	18	20.8	1.28(3H, s)
4	43.5		19	22.5	1.77(3H, s)
5	145.7		20	80.6	
6	122.8	6.24(1H, d, 4.2)	21	25.8	1.59(3H, s)
7	66.6	4.51(1H, d, 4.8)	22	216.5	
8	53.3	2.55(1H, m)	23	33.2	1.73(1H, m) 2.58(1H, m)
9	49.0		24	38.9	2.18(1H, m) 2.24(1H, m)
10	35.8	1.85(1H, m)	25	69.5	
11	214.0		26	30.5	1.37(3H, s)
12	49.8	2.83(1H, m) 3.24(1H, m)	27	30.3	1.37(3H, s)
13	48.3		28	20.0	1.50(3H, s)
14	50.8		29	23.4	1.36(3H, s)
15	46.9	1.86(1H, d, 13.2) 2.16(1H, m)	30	25.8	1.51(3H, s)

[0027]

[0028] 表2 化合物1的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (150MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 谱数据

[0029] 上述只是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何形式上的限制。任何熟悉本领域的技术人员,在不脱离本发明技术方案范围的情况下,都可利用上述揭示的技术内容对本发明技术方案做出许多可能的变动和修饰,或修改为等同变化的等效实施例。因此,凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同变化及修饰,均应落在本发明技术方案保护的范围内。

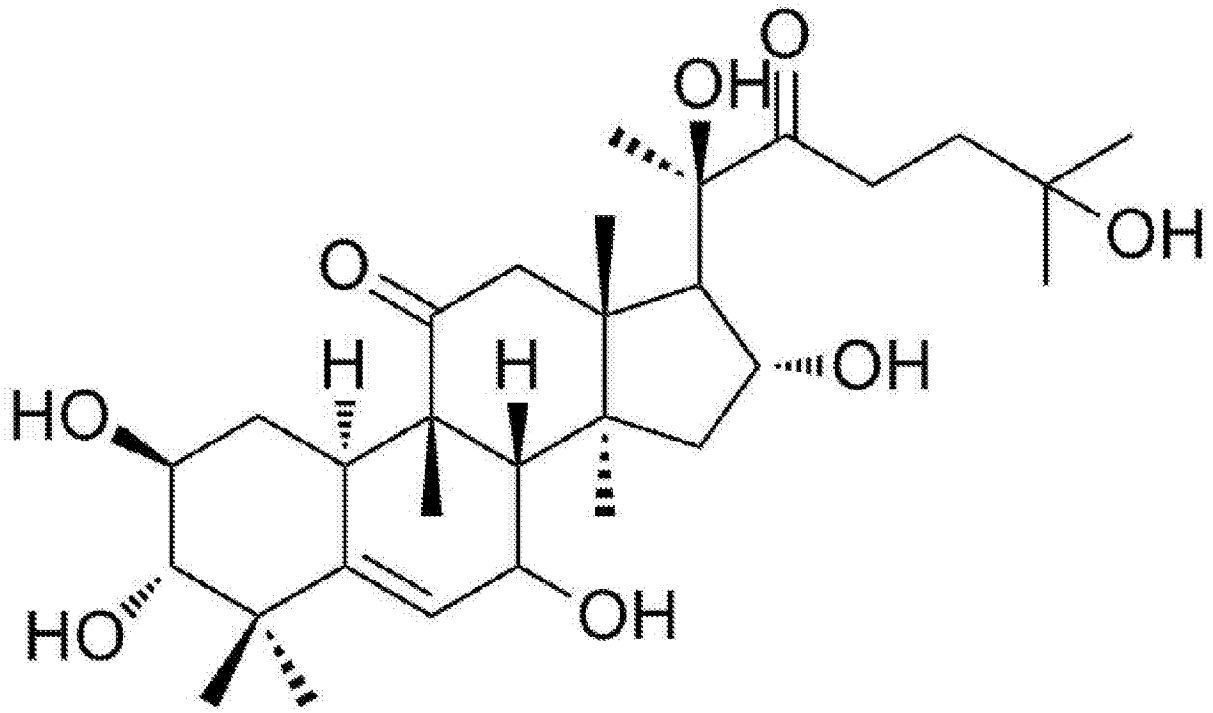


图1

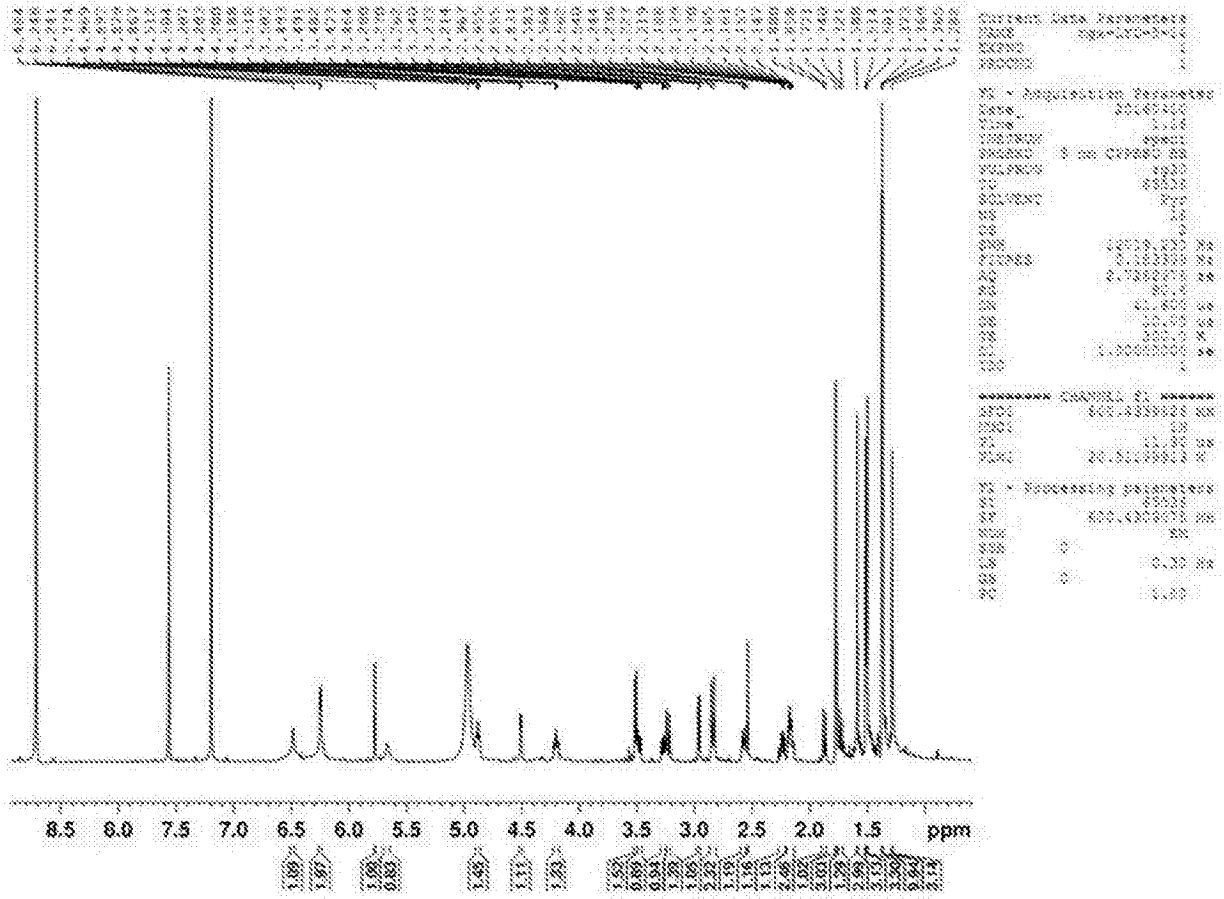


图2

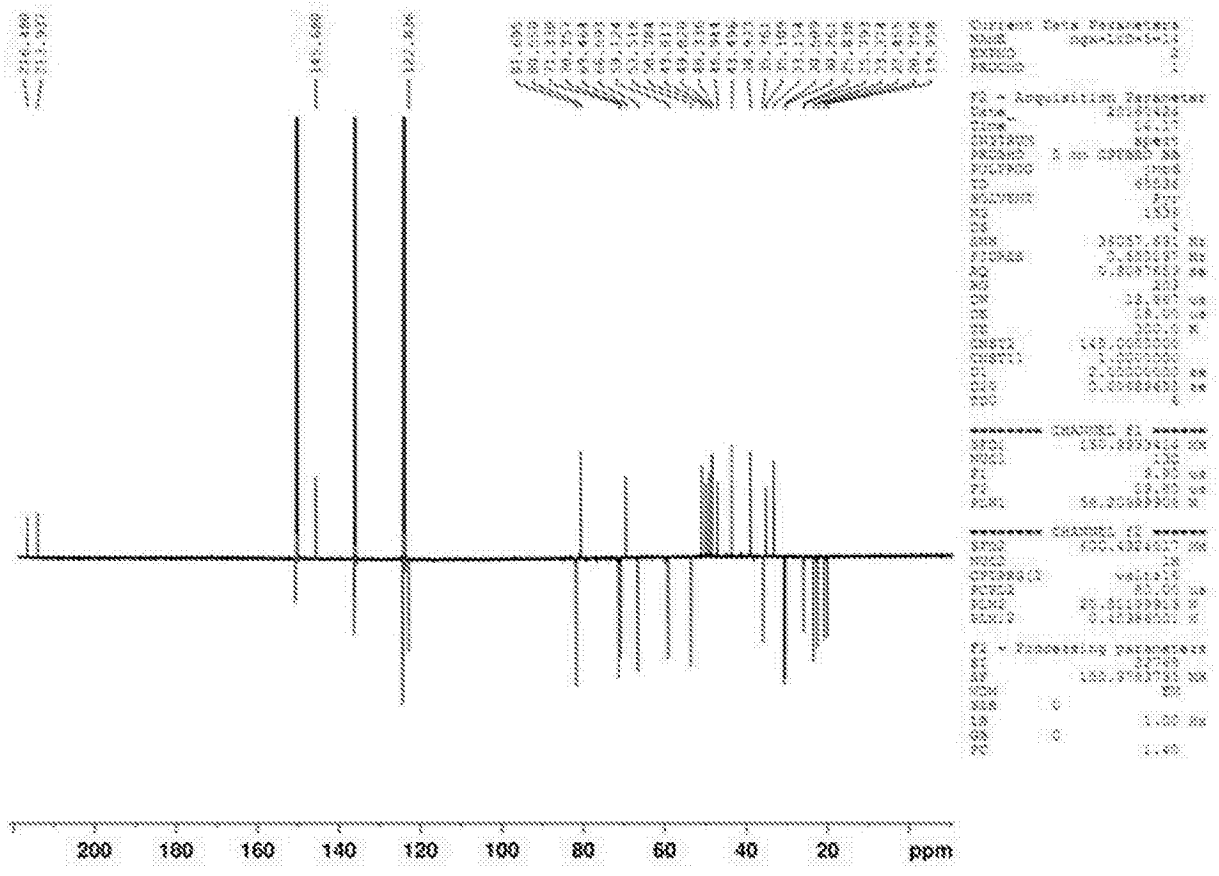


图3