

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810150537.0

C07J 71/00 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 31 日

[11] 公开号 CN 101333242A

[22] 申请日 2008.8.4

[21] 申请号 200810150537.0

[71] 申请人 中国人民解放军第四军医大学
地址 710032 陕西省西安市长乐西路 17 号

[72] 发明人 汤海峰 田 冶 张淑瑜 王晓娟
文爱东

[74] 专利代理机构 西安慈源有限责任专利事务所
代理人 鲍燕平

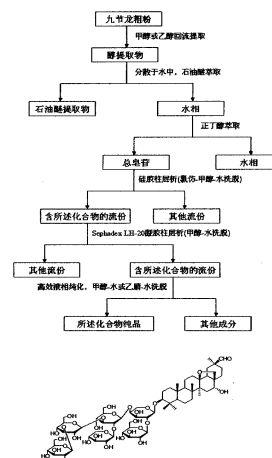
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

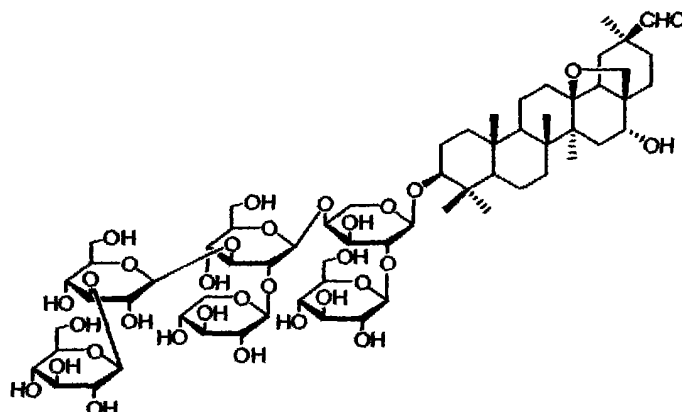
一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物

[57] 摘要

本发明公开了一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物，分子式 $C_{64}H_{104}O_{32}$ 。采用高分辨质谱和二维核磁共振谱等光谱技术，确定了该化合物的化学结构。体外抗肿瘤试验表明，该化合物对 HL-60 人白血病和 U251MG 人恶性胶质瘤等 8 种肿瘤细胞有明显的抑制作用。本发明可为研制新的抗肿瘤药物提供先导化合物，可望成为治疗癌症的药物。



1. 一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物，其特征在于化学结构式如下：



式 1

上述式 1 结构其化学名称为 3 β -O-{ β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)-{ β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 2)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4))- α -L-吡喃阿拉伯糖基}-16 α -羟基-13 β ,28-环氧-齐墩果烷-30-醛 (3 β -O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-{ β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4))- α -L-arabinopyranosyl}-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxy-oleanan-30-al), 以下简称其为 HEOA。

2. 权利要求 1 所述一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物，其制备方法是：

(1) 提取：以九节龙为原料，原料经粉碎后，按重量体积比加入 3~5 倍原料重的甲醇或乙醇，回流提取，共提取 3 次，每次 2~4 小时；合并提取液，回收溶剂，得甲醇或乙醇提取物，提取物分散于按重量体积比 5~10 倍的水中，分别用和水等体积的石油醚萃取 3 次，萃取后的水相再分别用与水等体积的正丁醇萃取 3 次，合并正丁醇萃取液，回收溶剂后得到总皂苷提取物；

(2) 分离：上述总皂苷应用硅胶柱层析，以体积比为 7:2:1~6.5:3.5:1 的氯仿-甲醇-水混合溶剂洗脱，薄层层析检测，收集式 1 化合物 HEOA 的流份，再用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析，以体积比为 2:3~1:1 的甲醇-水洗脱以除去多糖和其他杂质，合并含式 1 化合物 HEOA 的流份，再经高效液相色谱仪分离纯化，体积比为 2:8~3:7 的甲醇-水或体积比为 1.5:8.5~2.5:7.5 的乙腈-水混合溶剂为流动相洗脱，得到式 1 化合物 HEOA 的纯品。

3. 权利要求 1 所述一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物

技术领域

本发明涉及医药技术领域，是从植物中分离有生物活性的化合物，具体地说是从九节龙中提取分离到的一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物。

背景技术

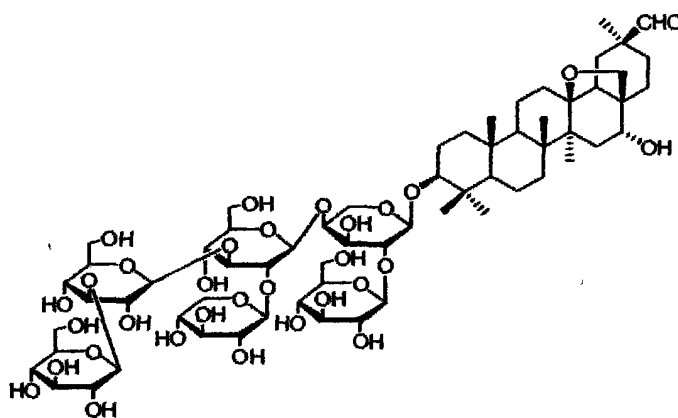
九节龙(*Ardisia pusilla* A. DC)为紫金牛科紫金牛属植物，分布于中国南部地区，具有清热解毒的功效，药用全草。紫金牛属植物主要含有三萜皂苷化合物，且被证明是其主要有效成分。已有人对九节龙中的三萜皂苷进行过研究，并报道分离鉴定了3种原生的三萜皂苷(指非经过酸水解等化学方法而获得的三萜皂苷)，即九节龙皂苷 I (ardipusilloside I)、九节龙皂苷 II (ardipusilloside II) 和一个未命名的四糖三萜皂苷，其中九节龙皂苷 II 作为新化合物被报道过2次(张清华，王晓娟，缪振春，等. 药学学报，1993, 28(9): 673-678 和缪振春，冯锐，周永新，等. 波谱学杂志，1999, 16(5): 395-402)，但从化学结构上看其实是同一个化合物。这3种化合物被证实对多种肿瘤显示较强的抑制作用。但相比于紫金牛属其他植物，对九节龙的三萜皂苷类化学成分的研究尚不充分。我们对九节龙中的三萜皂苷进行了系统分离，获得了一种新的三萜皂苷类化合物，其化学结构和抗肿瘤活性未见有过报道。

I 类创新药物(单体化合物药物)研制的大量实践和报道证实：化学结构决定药理作用，新的化学结构很可能预示着更强的生物活性、更低的毒副作用或更适于在临床使用。虽然1993年已报道了九节龙皂苷 I 和九节龙皂苷 II 的结构和提取分离，但与已从紫金牛属其他植物分离获得大量的三萜皂苷化学成分相比，对九节龙的三萜皂苷类成分的研究尚不充分，而且也未见到有将这3种三萜皂苷成分进行更深入的新药开发的报道，说明3种已知成分在抗肿瘤新药开发方面还是遇到了一些障碍。因此迫切需要对九节龙的化学成分进行更深入研究，从中获得更多新化合物特别是具有较强抗肿瘤作用的新化合物。

发明内容

本发明的旨在提供具有抗肿瘤作用的、提取分离自九节龙的一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物。

本发明的目的是这样实现的，一种新的三萜皂苷类抗肿瘤化合物，其特征是：式 I 所示化合物



式 I

上述结构其化学名称为 3 β -O-{ β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)-{ β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 2)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)}- α -L-吡喃阿拉伯糖基}-16 α -羟基-13 β ,28-环氧-齐墩果烷-30-醛 (3 β -O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)}- α -L-arabinopyranosyl}-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxy-oleanan-30-al), 是从九节龙中提取分离的新的三萜皂苷类化合物, 以下简称其为 HEOA。

所述的从九节龙中提取分离上述三萜皂苷类化合物的方法, 其步骤如下:

(1) 提取: 将九节龙原料粉碎后, 按重量体积比加入 3~5 倍原料重的甲醇或乙醇, 经回流提取, 共提取 3 次, 每次 2~4 小时, 合并提取液, 回收溶剂, 得甲醇或乙醇提取物, 提取物分散于按重量体积比 5~10 倍的水中, 分别用水等体积的石油醚萃取 3 次, 萃取后的水相再分别用水等体积的正丁醇萃取 3 次, 合并正丁醇萃取液, 回收溶剂后得到总皂苷提取物;

(2) 分离: 上述总皂苷应用硅胶柱层析, 以体积比为 7:2:1~6.5:3.5:1 的氯仿-甲醇-水混合溶剂洗脱, 薄层层析检测, 收集含式 I 化合物 HEOA 的流份, 再用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 以体积比为 2:3~1:1 的甲醇-水洗脱以除去多糖和其他杂质, 合并含式 I 化合物 HEOA 的流份, 再经高效液相色谱仪分离纯化, 体积比为 2:8~3:7 的甲醇-水或体积比为 1.5:8.5~2.5:7.5 的乙腈-水混合溶剂为流动相洗脱, 得到式 I 化合物 HEOA 的纯品。

所述的式 I 化合物 HEOA 对 HL-60 人白血病、U251MG 人恶性胶质瘤等 8 种不同的肿瘤细胞株均显示显著的抑制作用, 半数有效抑制浓度(IC₅₀ 值)在 0.75~9.38 μ mol/L 之间。

本发明的特点是:

式 I 化合物 HEOA 与从九节龙中提取分离的 3 种已知三萜皂苷的化学结构均不相同, 也未见从天然界分离得到或通过合成的手段得到过。而式 I 化合物 HEOA 对多种不同肿瘤细胞株的显著抑制作用也表明其可以进一步作为新的抗肿瘤药物进行研究开发。对九节龙总皂苷的提取方法虽然是皂苷类成分的常用提取方法, 但并未见用于含式 I 化合物 HEOA 的总皂苷的提取。已报道的对九节龙单体皂苷成分的分离方法中, 未见采用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 而该层析方法的应用对于除去多糖和其他杂质有显著作用, 可以高度富集式 I 化合物 HEOA, 这也是本发明能够获得在九节龙中含量较少的式 I 化合物 HEOA 的重要原因。

本发明从九节龙中通过提取、分离纯化得到式 I 化合物 HEOA, 该化合物可用于制备治疗上述癌症的药物, 为研制新的抗肿瘤药物提供了先导化合物。

附图说明

下面结合实施例附图对本发明做进一步说明。

图 1 是化合物的提取和分离工艺流程图。

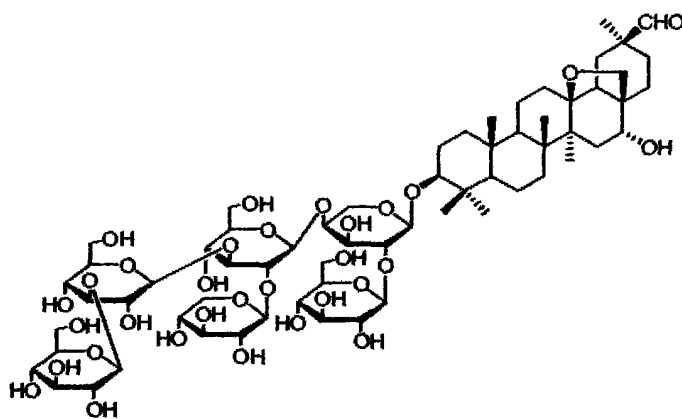
具体实施方式

下面结合具体实施例来说明本发明的实质。应理解, 这些实施例仅用于证实本发明而不适用于限制本发明的范围。下述实施例中未注明具体条件的试验方法, 通常按照常规条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

化合物的提取和分离

实施例 1:

实施例化合物的提取和分离工艺流程如图 1 所示, 实施例 1 采集四川夹江县的九节龙全草作为原料, 原料经粉碎成粗粉后, 取 3 公斤, 加入 10 升浓度为 95% 的乙醇进行回流提取, 共提取 3 次, 每次 2 小时。合并提取液, 减压回收溶剂(减压回收即本行业通常所采用的抽滤方法, 下同), 得乙醇提取物 120 克。提取物分散于 1 升水中, 用石油醚萃取 3 次, 每次 1 升。萃取后的水相再用正丁醇萃取 3 次, 每次 1 升, 合并正丁醇萃取液, 减压回收溶剂后得到总皂苷提取物 10 克。将总皂苷进行硅胶柱层析, 以氯仿-甲醇-水混合溶剂进行梯度洗脱, 洗脱液的体积比分别为 7:3:1 和 6.5:3.5:1(均取下层作为洗脱液), 按 100 mL 为一个流份接收, 并用硅胶薄层层析检测(薄层展开溶剂为氯仿-甲醇-水(6.5:3.5:1)的下层, 显色剂为体积比为 1:4 的硫酸-甲醇溶液, 喷显色剂后于 105 °C 加热显色), 收集含如下式 1 化合物 HEOA 的第 13~15 流份, 减压蒸干溶剂后得 0.9 克样品。样品进行 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(100 克)层析, 以体积比为 2:3 的甲醇-水混合溶剂洗脱, 薄层层析检测, 合并含如下式 1 化合物 HEOA 的流份(120 毫克), 再经高效液相色谱仪(岛津公司)分离纯化(HPLC 条件为: 大连依利特公司 Sino Chrom ODS-BP 色谱柱 10 × 250 mm, 25% 甲醇为流动相, 流速 2 mL/min, 室温, 206 nm 紫外检测), 得到如下式 1 化合物 HEOA 的纯品 63 毫克。



式 1

上述结构其化学名称为 3 β -O-{ β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)-{ β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 2)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)}- α -L-吡喃阿拉伯糖基}-16 α -羟基-13 β ,28-环氧-齐墩果烷-30-醛 (3 β -O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-{ β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)}- α -L-arabinopyranosyl}-16 α -hydroxy-13 β ,28-epoxy-oleanan-30-al), 是从九节龙中提取分离的新的三萜皂苷类化合物, 简称其为 HEOA。

实施例 2:

采集四川夹江县的九节龙全草作为原料, 原料经粉碎成粗粉后, 取 1 公斤, 加入 4 升甲醇进行回流提取, 共提取 3 次, 每次 3 小时。合并提取液, 减压回收溶剂, 得甲醇提取物 30 克。提取物分散于 200 毫升水中, 用石油醚萃取 3 次, 每次 200 毫升。萃取后的水相再用正丁醇萃取 3 次, 每次 200 毫升, 合并正丁醇萃取液, 减压回收溶剂后得到总皂苷提取物

3 克。将总皂苷进行硅胶柱层析,以氯仿-甲醇-水混合溶剂进行梯度洗脱,洗脱液的体积比分别为 7:2:1, 7:3:1 和 6.5:3.5:1(均取下层作为洗脱液),按 50 mL 为一个流份接收,并用硅胶薄层层析检测(薄层展开溶剂为氯仿-甲醇-水(6.5:3.5:1)的下层,显色剂为体积比为 1:4 的硫酸-甲醇溶液,喷显色剂后于 105 °C 加热显色),收集含实施例 1 式 I 化合物 HEOA 的第 12~14 流份,减压蒸干溶剂后得 0.3 克样品。样品进行 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(50 克)层析,以体积比为 1:1 的甲醇-水混合溶剂洗脱,薄层层析检测,合并含实施例 1 式 I 化合物 HEOA 的流份(30 毫克),再经高效液相色谱仪(岛津公司)分离纯化(HPLC 条件为:大连依利特公司 Sino Chrom ODS-BP 色谱柱 10 × 250 mm, 20% 乙腈为流动相,流速 2 mL/min, 室温, 206 nm 紫外检测),得到实施例 1 式 I 化合物 HEOA 的纯品 27 毫克。

实施例 3:

采集四川夹江县的九节龙全草作为原料,原料经粉碎成粗粉后,取 1 公斤,加入 5 升浓度为 95% 的乙醇进行回流提取,共提取 3 次,每次 4 小时。合并提取液,减压回收溶剂,得乙醇提取物 32 克。提取物分散于 160 毫升水中,用石油醚萃取 3 次,每次 160 毫升。萃取后的水相再用正丁醇萃取 3 次,每次 160 毫升,合并正丁醇萃取液,减压回收溶剂后得到总皂苷提取物 3.5 克。将总皂苷进行硅胶柱层析,以氯仿-甲醇-水混合溶剂进行梯度洗脱,洗脱液的体积比分别为 7:3:1 和 6.5:3.5:1(均取下层作为洗脱液),按 35 mL 为一个流份接收,并用硅胶薄层层析检测(薄层展开溶剂为氯仿-甲醇-水(6.5:3.5:1)的下层,显色剂为体积比为 1:4 的硫酸-甲醇溶液,喷显色剂后于 105 °C 加热显色),收集含实施例 1 式 I 化合物 HEOA 的第 13~15 流份,减压蒸干溶剂后得 0.32 克样品。样品进行 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(50 克)层析,以体积比为 2:3 的甲醇-水混合溶剂洗脱,薄层层析检测,合并含实施例 1 式 I 化合物 HEOA 的流份(43 毫克),再经高效液相色谱仪(岛津公司)分离纯化(HPLC 条件为:大连依利特公司 Sino Chrom ODS-BP 色谱柱 10 × 250 mm, 30% 甲醇为流动相,流速 2 mL/min, 室温, 206 nm 紫外检测),得到实施例 1 式 I 化合物 HEOA 的纯品 22 毫克。

化合物的结构鉴定

实施例 1 式 I 化合物 HEOA 为白色无定形粉末,分子式为 $C_{64}H_{104}O_{32}$, 熔点为 265~266 °C; $[\alpha]_D^{22} -23.2^\circ$ (c 0.15, MeOH), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均为阳性。对化合物进行酸水解和糖衍生物的分析,具体方法为:采用 2 mol/L 三氟乙酸进行酸水解并常法制备水解产物(糖部分)的三甲基硅醚化衍生物,以 L-Chirasil-Val 气相色谱柱(25 m × 0.32 mm.) 进行 GC 分析,标准糖制备的相应衍生物作对照。标准糖衍生物的色谱保留时间分别为 8.68, 9.60 min (D-阿拉伯糖), 8.76, 9.64 min (L-阿拉伯糖), 10.84, 11.86 min (D-木糖), 10.87, 11.91 min (L-木糖), 14.56 min (D-葡萄糖), 14.50 min (L-葡萄糖)。可以看到,采用上述条件能够分辨不同绝对构型的糖。分析表明:本发明化合物的寡糖链由 3 种糖基组成,即 L-阿拉伯糖, D-木糖和 D-葡萄糖,组成比约为 1:1:4。通过高分辨质谱和核磁共振谱特别是二维核磁共振谱的综合解析,确定了该化合物的结构。其波谱数据如下:

ESI-MS (正离子模式) m/z : 1407 $[M+Na]^+$; ESI-MS (负离子模式) m/z : 1383 $[M-H]^-$; MS/MS (负离子模式, 母离子为 m/z 1383) m/z : 1251 $[1383-Xyl]^-$, 1221 $[1383-Glc]^-$, 1089 $[1221-Xyl]^-$, 1059 $[1221-Glc]^-$, 927 $[1089-Glc]^-$, 765 $[927-Glc]^-$, 603 $[765-Glc]^-$, 471 $[603-Ara]^-$ ($[aglycone-H]^-$); HR-ESI-MS (正离子模式) m/z : 1407.6410 $[M+Na]^+$ (计算值

C₄₄H₁₀₄NaO₃₂: 1407.6408)。其 ¹H 和 ¹³C 核磁共振数据见表 1。

表 1 实施例 1 式 I 化合物 HEOA 的 ¹H 和 ¹³C 核磁共振数据(测试溶剂: 氘代吡啶)

No.	¹ H (J)	¹³ C	No.	¹ H (J)	¹³ C
1	1.60 br d (12.0), 0.78 m	39.1	Glc I		
2	1.93 m, 1.75 m	26.4	1	5.36 d (7.8)	104.9
3	3.10 dd (11.4, 4.2)	89.0	2	4.03 m	76.0
4	—	39.6	3	4.00 m	78.3
5	0.63 d (11.4)	55.6	4	4.20 m	71.5
6	1.34 m	17.9	5	4.12 m	77.8
7	1.48 m, 1.16 m	34.3	6	4.52 m, 4.37 m	62.8
8	—	42.5	Glc II		
9	1.22 br d (12.6)	50.3	1	4.89 d (6.6)	103.8
10	—	36.8	2	4.02 m	80.8
11	1.69 m, 1.39 m	19.1	3	4.03 m	86.7
12	2.06 m, 1.40 m	32.6	4	4.01 m	69.3
13	—	86.3	5	3.67 m	77.8
14	—	44.5	6	4.49 m, 4.14 br d (9.6)	62.1
15	2.16 dd (14.4, 4.8), 1.44 m	36.7	Glc III		
16	4.17 m	76.8	1	5.17 d (7.8)	104.6
17	—	43.9	2	3.99 m	74.4
18	1.35 m	53.2	3	4.04 m	87.8
19	2.82 t (13.2), 2.07 m	33.3	4	4.02 m	69.6
20	—	48.2	5	3.98 m	78.5
21	2.51 td (13.2, 4.8), 2.04 m	30.4	6	4.31 br d (12.0), 4.16 br d (11.2)	62.4
22	1.92 m, 1.55 dd (13.2, 4.8)	32.3	Glc IV		
23	1.15 s	28.0	1	5.13 d (7.8)	105.0
24	1.01 s	16.5	2	3.97 m	75.2
25	0.79 s	16.3	3	4.23 m	77.8
26	1.25 s	18.4	4	4.09 m	71.7
27	1.50 s	19.7	5	3.84 m	78.1
28	3.51 d (7.8), 3.13 d (7.8)	77.6	6	4.42 br d (10.2), 4.18 m	62.3
29	0.98 s	24.0	Xyl		
30	9.60 s	207.5	1	5.15 d (6.6)	105.1
Ara			2	4.02 m	75.5
1	4.81 d (4.2)	104.3	3	4.21 m	78.3
2	4.49 m	79.4	4	4.08 m	71.5
3	4.30 m	72.6	5	4.37 m, 3.56 t (10.8)	66.6
4	4.24 m	77.9			
5	4.50 m, 3.66 d (10.2)	63.3			

Ara: 阿拉伯糖, Glc: 葡萄糖(其中, Glc I 连接于 Ara 的 2 位, Glc II 连接于 Ara 的 4 位, Glc III 连接于 Glc II 的 3 位, Glc IV 连接于 Glc III 的 3 位), Xyl: 木糖, J: 偶合常数。

化合物体外抗肿瘤作用的研究

对实施例 1 式 I 化合物 HEOA 进行了体外抗肿瘤试验, 试验所采用的细胞株分别为: HL-60 人白血病、A-549 人肺癌、MKN-28 人胃癌、HCT-116 人结肠癌、BEL-7402 人肝癌、MDA-MB-435 人乳腺癌、K-562 人白血病、U251MG 人恶性胶质瘤细胞。其中, 对前 6 种肿瘤细胞采用 SRB 法, 对后 2 种肿瘤细胞采用 MTT 法测试。

(1) SRB 法测试：根据肿瘤细胞生长速率，将处于对数生长期的细胞以 90 μL/孔接种于 96 孔培养板，贴壁生长 24 小时，加不同浓度的本发明化合物 10 μL/孔，每个浓度设 3 个复孔，并设生理盐水对照和无细胞调零孔。肿瘤细胞在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 72 小时，然后倾去培养液，用 10%冷 TCA 固定细胞，4 ℃放置 1 小时后用蒸馏水洗涤 5 次，空气中自然干燥。然后加入由 1%冰醋酸配制的浓度为 4 mg/mL 的 SRB (Sigma 公司)溶液 100 μL/孔，室温中染色 15 分钟，去上清液，用 1%醋酸洗涤 5 次，空气中干燥，加入 150 μL/孔的 Tris 溶液。将 96 孔板置酶标仪上测定各孔在 520 nm 处的吸光度(OD)值。按下式计算被测物对肿瘤细胞生长的抑制率：

肿瘤抑制率=(1-治疗组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

半数有效抑制浓度 IC₅₀ 值采用 Logit 法计算。试验结果见表 2。

(2) MTT 法测试：根据肿瘤细胞生长速率，将处于对数生长期的肿瘤细胞以 4000 个细胞/孔接种于 96 孔培养板，贴壁生长 24 小时后，弃去原培养液，加入用 DMEM 培养液配制好的含不同浓度本发明化合物的溶液 200 μL，每个浓度设 3 个复孔，并设生理盐水对照和无细胞调零孔。肿瘤细胞在 37 ℃、5% CO₂-95% O₂ 条件下培养 48 小时，然后加入 PBS 溶解的浓度为 10 mg/mL 的 MTT (Sigma 公司) 20 μL，在同样条件下孵育 4 小时。最后，每孔加入 200 μL 的二甲基亚砜，混匀。将 96 孔板置酶标仪上测定各孔在 490 nm 处的吸光度(OD)值。按下式计算被测物对肿瘤细胞生长的抑制率：

肿瘤抑制率=(1-治疗组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

半数有效抑制浓度 IC₅₀ 值采用 Logit 法计算。试验结果见表 2。

表 2 实施例 1 式 I 化合物 HEOA 对肿瘤细胞的抑制作用

肿瘤 细胞株	HL-60	A-549	MKN-28	HCT-116	BEL-7402	MDA-MB-435	K-562	U251MG
IC ₅₀ 值 (μmol/L)	0.75 ± 0.20	1.33 ± 0.41	9.38 ± 2.29	1.97 ± 0.56	2.85 ± 0.38	8.15 ± 1.73	0.88 ± 0.14	2.57 ± 0.21

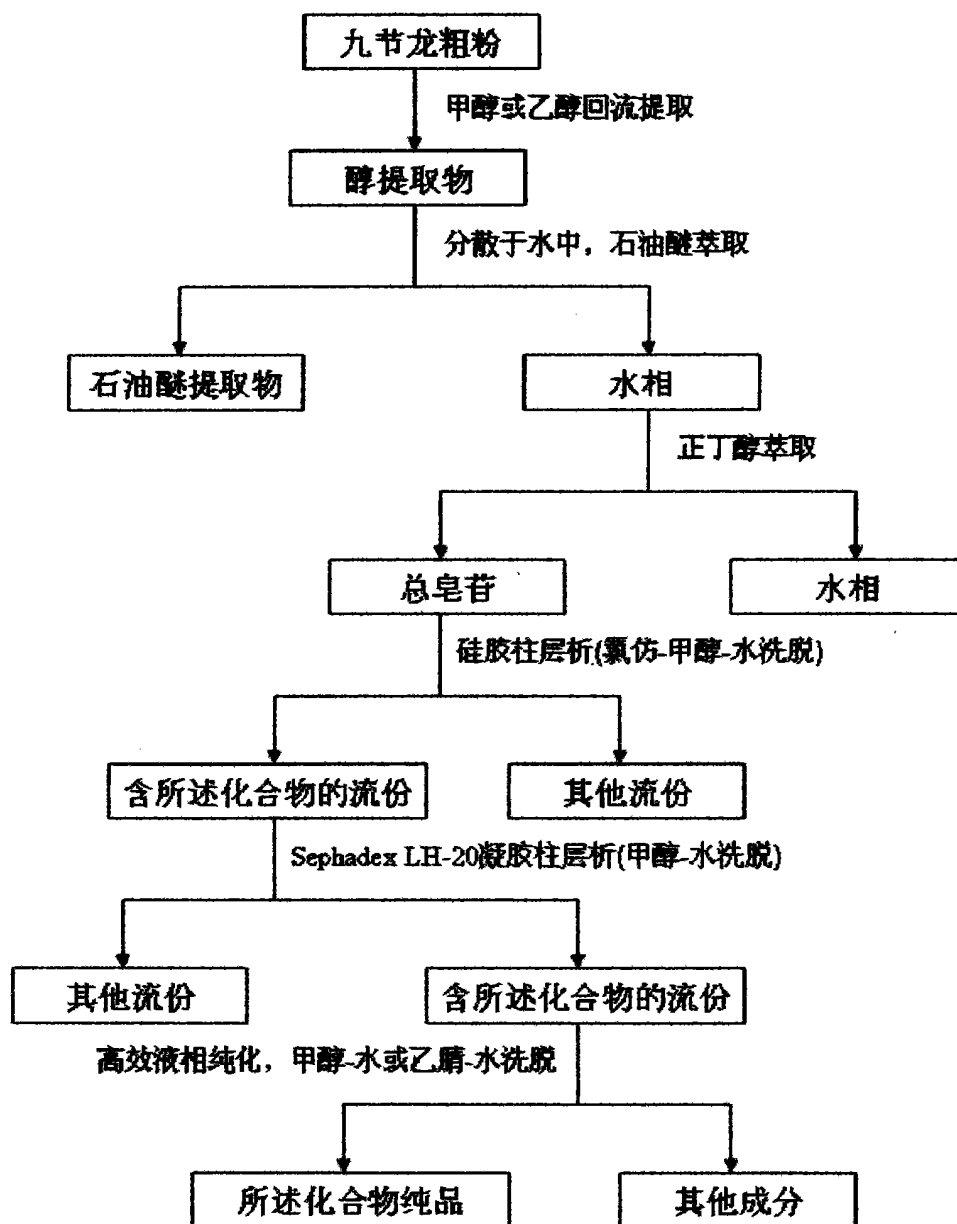


图1