



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103524573 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310491651. 0

A61P 29/00(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 10. 18

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学第一  
附属医院

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街  
30 号

(72) 发明人 陈剑鸿 胡小刚 张宏伟 夏培元  
黄明春 蔡永青 戴青

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有  
限公司 11275

代理人 赵荣之

(51) Int. Cl.

C07H 15/18(2006. 01)

C07H 1/08(2006. 01)

A61K 31/7032(2006. 01)

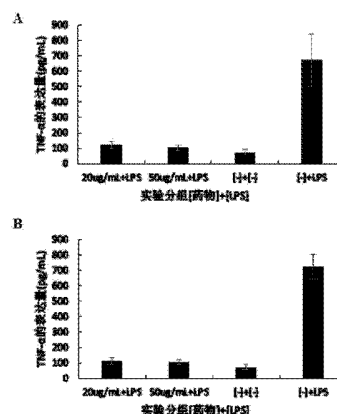
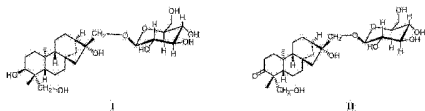
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

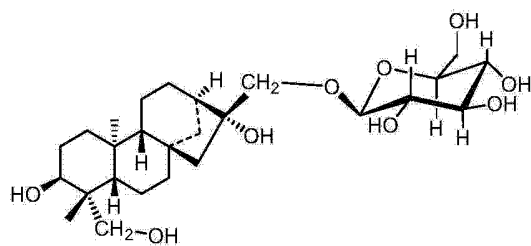
对映贝壳杉烷型糖苷化合物及其制备方法和  
用途

(57) 摘要

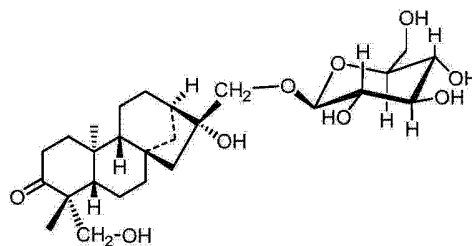
本发明公开了从茅莓茎和叶中分离得到的  
两个新型对映贝壳杉烷型糖苷化合物, 结构式分  
别如 I 和 II 所示, 体外抗炎活性研究表明, 这  
两个化合物对内毒素脂多糖(LPS) 诱导的炎症  
具有显著的保护作用, 可用于制备抗炎药物和抗  
炎保健品, 也可以作为化学合成中间体等应用。



1. 对映贝壳杉烷型糖苷化合物,其特征在于,结构式如 I 或 II 所示:



I



II

2. 权利要求 1 所述对映贝壳杉烷型糖苷化合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a. 提取:将茅莓茎和叶干燥、粉碎,分成两份,其中一份用体积百分浓度为 65% 的乙醇作溶剂回流提取,收集提取液;另一份用体积百分浓度为 65% 的乙醇作溶剂进行渗漉,收集渗漉液;合并提取液和渗漉液,减压回收乙醇,制备得到流浸膏;

b. 萃取:将步骤 a 所得流浸膏分散于水中,依次用石油醚、水饱和和乙酸乙酯、水饱和和正丁醇萃取,收集正丁醇萃取液,浓缩,干燥,制备得到正丁醇萃取物;

c. 分离:将步骤 b 所得正丁醇萃取物进行硅胶柱层析,以二氯甲烷、甲醇和水的混合液为洗脱剂按三者体积比为 40:1:0 至 2:1:0.1 进行梯度洗脱,收集洗脱液,薄层色谱法检查,合并相同组分的洗脱液,再分别进行反相 C18 柱层析,以甲醇和水的混合液为洗脱剂按二者体积比为 5:95 至 80:20 进行梯度洗脱,收集洗脱液,薄层色谱法检查,合并相同组分的洗脱液,分别浓缩、干燥,制备得到粗品;

d. 纯化:将步骤 c 所得粗品分别用制备型高效液相色谱纯化或重结晶,即得结构式如 I 或 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物。

3. 权利要求 1 所述对映贝壳杉烷型糖苷化合物在制备抗炎药物中的用途。

4. 权利要求 1 所述对映贝壳杉烷型糖苷化合物在制备抗炎保健品中的用途。

## 对映贝壳杉烷型糖苷化合物及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及从茅莓茎和叶中分离得到的两个新型对映贝壳杉烷型糖苷化合物,还涉及这两个化合物的提取分离方法,以及其在医药、保健方面的用途。

### 背景技术

[0002] 茅莓 *Rubus parvifolius* L. 为蔷薇科悬钩子属落叶小灌木,生长于海拔 400 ~ 2600 米的山坡杂木林下、向阳山谷、路旁或荒野,广泛分布于黑龙江、吉林、辽宁、河北、山西、陕西、甘肃、山东、江苏、安徽、浙江、江西、福建、台湾、河南、湖北、湖南、广东、广西、四川、贵州等地,野生资源十分丰富。其以根或茎、叶入药,药用名通常为薊田蔗,功效主要包括散瘀止痛、解毒、杀虫等。现代研究表明,茅莓具有败毒抗癌、抗炎止痛、缺血保护、保肝、抗氧化等多种药理学效应。但到目前为止,有关茅莓活性化学成分的研究报道并不多。而且,既往研究中,研究者通常习惯于以茅莓的根作为研究原料,对茅莓茎和叶等地上部分的考察研究则少见报道。

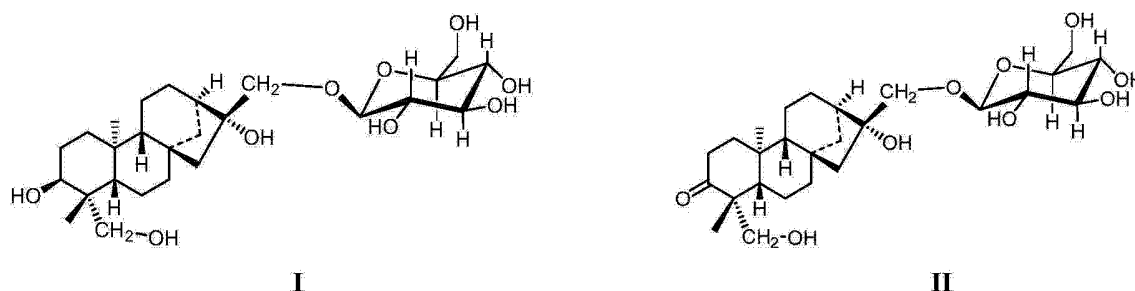
### 发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的之一是对茅莓的茎和叶进行化学成分提取分离与药理活性研究,鉴定其具有药理活性的化学成分;目的之二在于提供所得活性化学成分的制备方法;目的之三在于提供所得活性化学成分在医药、保健方面的用途。

[0004] 经研究,本发明提供如下技术方案:

[0005] 1. 对映贝壳杉烷型糖苷化合物,结构式如 I 或 II 所示:

[0006]



[0007] 2. 所述对映贝壳杉烷型糖苷化合物的制备方法,包括以下步骤:

[0008] a. 提取:将茅莓茎和叶干燥、粉碎,分成两份,其中一份用体积百分浓度为 65% 的乙醇作溶剂回流提取,收集提取液;另一份用体积百分浓度为 65% 的乙醇作溶剂进行渗漉,收集渗漉液;合并提取液和渗漉液,减压回收乙醇,制备得到流浸膏;

[0009] b. 萃取:将步骤 a 所得流浸膏分散于水中,依次用石油醚、水饱和乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取,收集正丁醇萃取液,浓缩,干燥,制备得到正丁醇萃取物;

[0010] c. 分离:将步骤 b 所得正丁醇萃取物进行硅胶柱层析,以二氯甲烷、甲醇和水的混合液为洗脱剂按三者体积比为 40:1:0 至 2:1:0.1 进行梯度洗脱,收集洗脱液,薄层色谱法检查,合并相同组分的洗脱液,再分别进行反相 C18 柱层析,以甲醇和水的混合液为洗脱剂

按二者体积比为 5:95 至 80:20 进行梯度洗脱,收集洗脱液,薄层色谱法检查,合并相同组分的洗脱液,分别浓缩、干燥,制备得到粗品;

[0011] d. 纯化:将步骤 c 所得粗品分别用制备型高效液相色谱纯化或重结晶,即得结构式如 I 或 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物。

[0012] 3. 所述对映贝壳杉烷型糖苷化合物在制备抗炎药物中的用途。

[0013] 4. 所述对映贝壳杉烷型糖苷化合物在制备抗炎保健品中的用途。

[0014] 本发明的有益效果在于:本发明从茅莓茎和叶的含水乙醇提取物中分离得到两个全新的对映贝壳杉烷型糖苷化合物。体外抗炎活性研究表明,这两个化合物对内毒素脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 细胞的炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$  的表达具有明显的抑制作用。因此,这两个化合物可用于制备具有抗炎作用的药物或保健品。本发明不仅有助于探索中药茅莓防治疾病的机理及其物质基础,利于中药茅莓及其制剂的质量控制,而且有助于开发新的药物和保健品。在制备抗炎药物或抗炎保健品时,这两个化合物既可以单用、也可以联合应用作为活性成分;还能以这两个化合物为先导化合物,通过结构修饰或改造进一步提高其活性。此外,这两个化合物还可以作为化学合成中间体等,应用前景十分广阔。

## 附图说明

[0015] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供以下附图进行说明:

[0016] 图 1 为结构式如 I 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物的 NOESY 谱关键信息。

[0017] 图 2 为结构式如 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物的 NOESY 谱关键信息。

[0018] 图 3 为结构式分别如 I 和 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$  的抑制作用,其中 A 为结构式如 I 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物,B 为结构式如 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物。

## 具体实施方式

[0019] 下面将结合附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件进行。

[0020] 实施例 1、对映贝壳杉烷型糖苷化合物的提取分离与鉴定

[0021] 一、提取分离

[0022] a. 提取:将茅莓茎和叶干燥、粉碎,平均分成两份,其中一份用体积百分浓度为 65% 的乙醇作溶剂,回流提取 3 次,每次加入相当于茅莓茎和叶总重量 17 倍的溶剂提取 1 小时,收集提取液;另一份用体积百分浓度为 65% 的乙醇作溶剂进行渗漉,收集渗漉液;合并提取液和渗漉液,减压回收乙醇,制备得到流浸膏;

[0023] b. 萃取:将步骤 a 所得流浸膏分散于水中,依次用石油醚、水饱和乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取,收集正丁醇萃取液,浓缩,干燥,制备得到正丁醇萃取物;

[0024] c. 分离:将步骤 b 所得正丁醇萃取物进行硅胶柱层析,以二氯甲烷、甲醇和水的混合液为洗脱剂按三者体积比为 40:1:0 至 2:1:0.1(分别为 40:1:0、30:1:0、25:1:0、20:1:0、15:1:0、10:1:0.1、9:1:0.1、8:1:0.1、7:1:0.1、6:1:0.1、5:1:0.1、4:1:0.1、3:1:0.1、2:1:0.1)进行梯度洗脱,分段收集洗脱液,薄层色谱法检查,合并相同组分的洗脱液,最终

将洗脱液分为 14 个洗脱部分；取第 4 洗脱部分进行反相 C18 柱层析，以甲醇和水的混合液为洗脱剂按二者体积比为 5:95 至 80:20（分别为 5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:45、70:30、75:25、80:20）进行梯度洗脱，分段收集洗脱液，薄层色谱法检查，合并相同组分的洗脱液，最终将洗脱液分为 A、B、C、D 共 4 个洗脱部分；将 A 洗脱部分浓缩、干燥，制备得到化合物 I 粗品；将 B 洗脱部分浓缩、干燥，制备得到化合物 II 粗品；

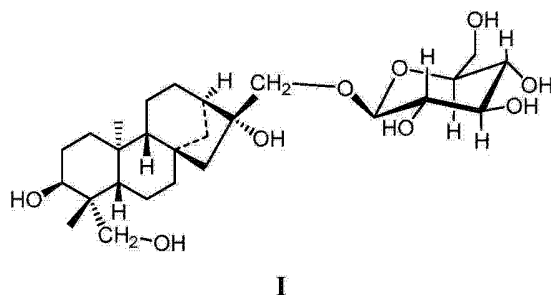
[0025] d. 纯化：将步骤 c 所得化合物 I、化合物 II 粗品分别用制备型高效液相色谱纯化或甲醇水溶液重结晶，即得化合物 I、化合物 II 纯品。

[0026] 进一步研究发现，按照步骤 c 所述方法，将硅胶柱层析分离得到的其余 13 个洗脱部分分别进行反相 C18 柱层析，从第 3、5、6、7 洗脱部分中也能分离获得化合物 I 和化合物 II。

## [0027] 二、结构鉴定

[0028] 化合物 I：白色结晶性粉末；正离子质谱 ESI-MS<sup>+</sup> 中显示两个典型的离子峰 m/z：523.3 [M+Na]<sup>+</sup>，1023.6 [2M+Na]<sup>+</sup>；核磁共振碳谱 (<sup>13</sup>C NMR)、核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>H NMR) 数据及多键碳氢关系 (HMBC) 见表 1（溶剂为氘代吡啶，600MHz）；进一步结合 NOESY 结果（图 1），得出化合物 I 的结构式如 I 所示，分子式为 C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub>。经检索，该化合物尚未见报道，是一全新化合物。

[0029]



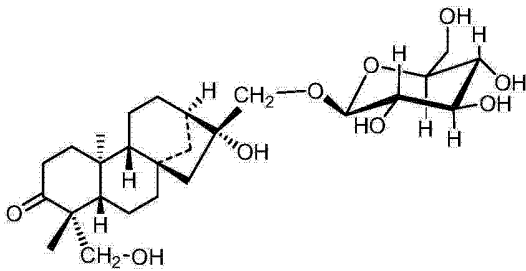
[0030] 表 1 化合物 I 的核磁共振波谱数据

[0031]

No.	$\delta_c$	$\delta_H$ (J/in Hz)	HMBC	No.	$\delta_c$	$\delta_H$ (J/in HZ)	HMBC
1	35.04	1.56(1H,m) 1.70(1H,m)	C-5,9,20	14	38.32	1.94(2H,m)	
2	27.73	1.53(1H,m) 1.86(1H,m)		15	54.23	1.58(1H,br.s) 1.75(1H,br.s)	
3	70.93	4.43(1H,br.s)	C-19	16	81.73		C-14,15,17
4	45.00		C-19	17	76.60	3.89(1H,d,10.7) 4.46(1H,d,10.7)	C-16, 1'
5	50.64	1.79(1H,m)	C-19,20	18	24.49	1.54(3H,s)	C-3,4,5,19
6	21.81	1.45(1H,m) 1.65(1H,m)		19	66.46	3.79(1H,m) 4.07(1H,m)	C-18
7	43.87	1.52(1H,m) 1.68(1H,m)		20	19.44	1.06(3H,s)	C-1,5,9,10
8	45.77			Glc			
9	57.89	1.16(1H,br.d)	C-15,20	1'	107.60	5.01(1H,d,7.9)	C-17
10	40.41		C-20	2'	76.43	4.07(1H,m)	
11	19.54	1.53(2H,m)		3'	79.50	4.25(1H,m)	
12	27.41	1.86(1H,m) 2.15(1H,m)		4'	72.58	4.19(1H,m)	
13	47.41	2.40(1H,br.s)	C-17	5'	79.62	3.99(1H,m))	
				6'	63.71	4.57(1H,d,11.3) 4.37(1H,m)	

[0032] 化合物 II :白色结晶性粉末 ;正离子质谱 ESI-MS<sup>+</sup> 中显示两个典型的离子峰 m/z :521. 3[M+Na]<sup>+</sup>, 1019. 6[2M+Na]<sup>+</sup> ;<sup>13</sup>C NMR、<sup>1</sup>H NMR 数据及 HMBC 见表 2 (溶剂为氘代吡啶, 600MHz) ;进一步结合 NOESY 结果 (图 2), 得出化合物 II 的结构式如 II 所示, 分子式为 C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>9</sub>。经检索, 该化合物尚未见报道, 是一全新化合物。

[0033]



II

[0034] 表 2 化合物 II 的核磁共振波谱数据

[0035]

No.	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC	No.	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC
1	39.89	1.21(1H,m) 1.91(1H,m)		14	37.09	1.91(2H,m)	
2	35.25	2.41(1H,m) 2.76(1H,m)		15	52.76	1.59(1H,m) 1.75(1H,d,14.3)	C-7,9,16,17
3	214.80			16	80.51		
4	54.39			17	75.38	3.92(1H,d,10.7) 4.47(1H,d,10.7)	C-16, 1'
5	56.70	1.32(1H,m)		18	21.21	1.41(3H,s)	C-3,4,5,19
6	21.67	1.34(1H,m) 1.55(1H,m)		19	64.69	3.80(1H,m) 4.25(1H,m)	
7	41.99	1.40(1H,m) 1.63(1H,m)		20	17.73	1.15(3H,s)	C-9,10
8	44.29			Glc			
9	55.75	0.94(1H,brd)		1'	106.46	5.03(1H,d,7.9)	C-17
10	38.71			2'	75.28	4.08(1H,m)	C-1'
11	18.68	1.41(1H,m) 1.49(1H,m)		3'	78.41	4.23(1H,m)	
12	26.35	1.49(1H,m) 1.85(1H,m)		4'	71.46	4.23(1H,m)	
13	46.12	2.42(1H,br,s)	C-17	5'	78.54	3.99(1H,m)	
				6'	62.59	4.41(1H,br.d,11.8) 4.58(1H,m)	

[0036] 实施例 2、对映贝壳杉烷型糖苷化合物的抗炎活性研究

[0037] 收集对数生长期的小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264. 7, 以  $1 \times 10^5$  个 /mL 的浓度接种于 96 孔细胞培养板, 分为四个实验组 : 单纯内毒素脂多糖 (LPS) 刺激组、低浓度化合物处理组 (20  $\mu$  g/mL)、高浓度化合物处理组 (50  $\mu$  g/mL) 和空白对照组, 每组设置三个复孔。待细胞贴壁后, 低浓度和高浓度化合物处理组分别加入对应浓度的结构式如 I 或 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物, 孵育 2h, 然后, 单纯内毒素 LPS 刺激组、低浓度和高浓度化合物处理组分别加入终浓度为 10pg/mL 的 LPS, 37℃ 培养 24h, 最后, 采用 Rat TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司) 测定各组 TNF- $\alpha$  含量。

[0038] 结果见图 3, 可见结构式分别如 I 和 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物对 LPS 诱导的 RAW264. 7 细胞的炎症因子 TNF- $\alpha$  的产生均具有明显的抑制作用。因此, 结构式分别如 I 和 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物可以用于制备具有抗炎作用的药物或保健品。在制备抗炎药物或抗炎保健品时, 这两个化合物既可以单用、也可以联合应用作为活性成分, 可以按照药物或保健品的常规制备方法制成适合临床应用或人们日常服用的各种剂型。以这两个化合物为先导化合物, 还可以通过结构修饰或改造进一步提高其活性。

[0039] 此外, 结构式分别如 I 和 II 所示的对映贝壳杉烷型糖苷化合物还可以作为化学合成中间体等应用。

[0040] 最后说明的是, 以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制, 尽管通

过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出诸多改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。





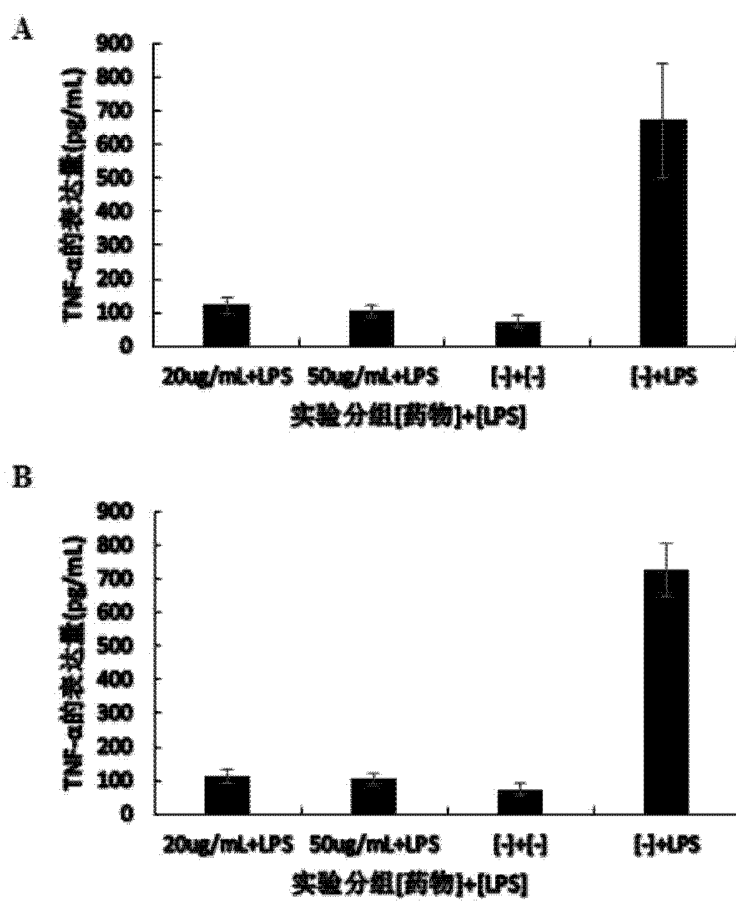


图 3