

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910038854.8

[51] Int. Cl.

C07D 493/18 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 23 日

[11] 公开号 CN 101538272A

[22] 申请日 2009.4.21

[21] 申请号 200910038854.8

[71] 申请人 中国科学院南海海洋研究所

地址 510301 广东省广州市新港西路 164 号

[72] 发明人 张 偲 高广春 尹 浩 漆淑华

罗雄明 肖志会 李庆欣

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 陈 卫

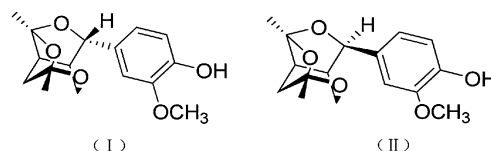
权利要求书 2 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

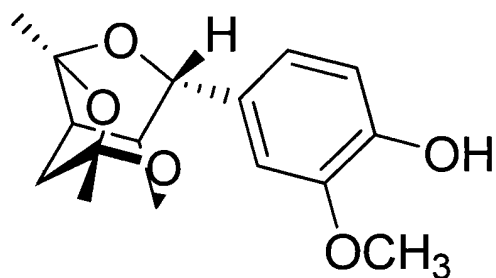
苯丙素衍生物及其制备方法和在制备抗乳腺癌药物中的应用

[57] 摘要

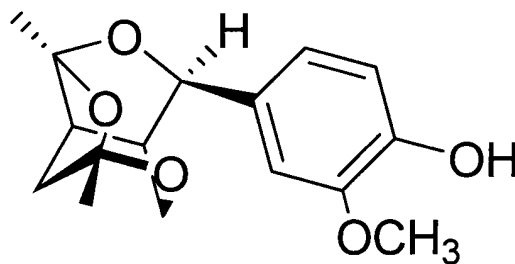
本发明公开一种苯丙素衍生物及其制备方法和在制备抗乳腺癌药物中的应用，该苯丙素衍生物为一对差向异构体，其结构式如式(I)和式(II)所示。本发明的苯丙素衍生物是采用 95% 工业酒精提取、柱层析和薄层层析相结合的方法从红树植物山石榴中制备而得。本发明的苯丙素衍生物具有不同于现有苯丙素类化合物的新骨架结构，且该苯丙素衍生物对咸水虾和人乳腺癌细胞具有毒杀作用，因此本发明的苯丙素衍生物可作为药物先导化合物用于医学、药学等领域，如可用于制备抗乳腺癌药物。



1、一种苯丙素衍生物，其结构式如式（I）或式（II）所示。



（I）



（II）

2、一种制备权利要求1所述苯丙素衍生物的方法，其特征在于该方法包括如下步骤：

（1）将红树植物山石榴用95%工业酒精浸泡提取，将提取液减压浓缩得粗提物，粗提物再用乙酸乙酯萃取，收集乙酸乙酯层；

（2）将上述乙酸乙酯层进行硅胶柱层析，梯度洗脱后再由薄层层析分析得到粗品，将粗品进行纯化后即可得到权利要求1所述苯丙素衍生物。

3、根据权利要求2所述制备方法，其特征在于，步骤（1）中所述粗提物用乙酸乙酯萃取前先用石油醚萃取。

4、根据权利要求2所述制备方法，其特征在于，步骤（2）中所述乙酸乙酯层进行硅胶柱层析，梯度洗脱后再由薄层层析分析得到粗品的具体步骤为：

（1）将乙酸乙酯层进行硅胶柱层析，用氯仿：甲醇的体积比为100：0~50：50的一系列氯仿-甲醇混合液为洗脱剂进行梯度洗脱；

（2）洗脱后，选择用氯仿和甲醇的体积比为98：2的氯仿-甲醇混合液洗脱时得到的组分，将该组分进行硅胶柱层析，用石油醚和丙酮的体积比为90：10~20：80的一系列石油醚-丙酮混合液为洗脱剂进行梯度洗脱；

（3）洗脱后，选择用石油醚：丙酮的体积比为4：1的石油醚-丙酮混合液

洗脱得到的组分,将该组分进行硅胶柱层析,用石油醚和乙酸乙酯的体积比为 3: 1 的石油醚-乙酸乙酯混合液为洗脱剂,洗脱后薄层层析,用石油醚: 乙酸乙酯的体积比为 3: 2 的石油醚-乙酸乙酯混合液作为展开剂,收集该薄层层析上 R_f 值为 0.4 和 0.6 的两点,即为粗品。

5、根据权利要求 2 所述制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述将粗品进行纯化是采用葡聚糖凝胶柱对粗品进行纯化。

6、根据权利要求 2 所述制备方法,其特征在于,所述硅胶柱层析的填料为 200~300 目硅胶。

7、根据权利要求 2 所述制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,浸泡次数为 4 次,每次 7 天。

8、权利要求 1 所述苯丙素衍生物在制备抗乳腺癌药物中的应用。

苯丙素衍生物及其制备方法和在制备抗乳腺癌药物中的应用

技术领域

本发明涉及具有生物活性的有机化合物领域，具体涉及一种苯丙素衍生物及其制备方法和在制备抗乳腺癌药物中的应用。

背景技术

苯丙素类(phenylpropanoids)是一类含有一个或几个 C6—C3 单位的天然成分。这类成分有单独存在的，也有以 2 个、3 个、4 个甚至多个单位聚合存在的，包括苯丙稀、苯丙醇、苯丙酸及其缩酯、香豆素、木脂素、黄酮和木质素等。从生源合成途径来看，苯丙素类多数由莽草酸，通过苯丙氨酸和酪氨酸，再经脱氨、羟基化、偶合等反应形成最终产物。目前已经发现的苯丙素衍生物骨架结构以苯丙酸类、香豆素类、木脂素类和黄酮类为代表。

苯丙素类化合物很多具有很好的生物活性，如从日本蛇菰中得到的松柏苷和咖啡酸葡萄糖酸苷具有抗组胺释放的活性；中药秦皮治痢疾的有效成分是七叶内酯及其苷；小檗科鬼臼等多种植物中所含的鬼臼毒素及其衍生物具抗肿瘤的活性；五味子素能降低谷丙转氨酶而用于治疗肝炎；芦丁、槲皮素、葛根素等有明显的扩张冠状动脉的作用。厚朴酚具肌肉松弛作用；牛蒡子甙对风热感冒有效等。

红树植物是一种海洋高等植物，是海洋药物开发和新药研究的主要药源之一。目前进入临床及临床前研究的抗肿瘤海洋药物主要有膜海鞘素、海兔素肽、苔藓虫素等脂类、多肽或萜类化合物，这些抗肿瘤药物以往大多从海洋动物中提取，从红树植物中提取的鲜有报道。

但红树植物同样拥有良好的抗肿瘤的海洋先导化合物,如海莲树皮提取物能有效的抑制两种类型的肿瘤:肉瘤 180 和刘易斯肺癌 (Kokpol U. Chemistry of natural products from mangrove plants, UNDP/UNESCO, Training course on life history of selected species of flora and fauna in mangroce ecosystem[J]. Thailand, 1985, 159-169); 海漆中的二萜化合物具有抗艾滋病和抗肿瘤的作用 (Konoshima T, Konishi T, Takasaki M, et al. Antitumor-promoting activity of diterpenes from *Excoecaria agallocha* II [J]. Bio Pharm Bull, 2001, 24 (12): 1440-1442); 老鼠簕的乙醇提取物能有效抑制肿瘤的生长和致癌物诱导的老鼠皮层瘤的生产等 (Babu B H, Shylesh B S, Padikkala J, et al. Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthus ilicifolius* in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 79 (1): 27-33)。

近几年的研究发现,红树林资源是寻找生物活性物质尤其是新骨架结构的药物先导化合物的重要来源,如吴军等人从木果楝中分到了两个高度氧化的 8, 9, 30-phargmalin orthoester 化合物 Xyloccensins O 和 P (Wu J, et al. Xyloccensins O and P, Unique 8,9,30-phragmalin orthoesters from *Xylocarpus granatum* [J]. Organic Letters, 2004, 6 (11): 1841-1844); 郭跃伟等人从木榄中得到一个新骨架结构的大环聚二硫化合物 (Sun Y Q, Guo Y W. Gymnorrhizol, an unusual macrocyclic polydisulfide from the Chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. Tetrahedron letters, 2004, 45 (28): 5533-5535); 吴军等人还发现木果楝中的 Xylogranatins F, G and R 在 1mg/mL 的浓度下对 *Mythimna separata* 的幼虫有显著的拒食活性 (Wu J, Zhang S, Bruhn T, et al. Xylogranatins F-R: Antifeedants from the Chinese mangrove, *Xylocarpus granatum*, a new biogenetic

pathway to tetranorttriterpenoids [J]. Chemistry-A European Journal, 2008, 14 (4): 1129-1144)。

目前世界医学人员致力于“艾滋病、癌症和老年病”等疑难病症的研究，海洋药物在这方面发挥了独特的作用。而我国的药物研究极少有来源于海洋生物活性先导化合物的原创性研究和专利，开发海洋药物，对红树植物等海洋生物的化学成分和生物活性进行研究，寻找新药的先导化合物已迫在眉睫。

发明内容

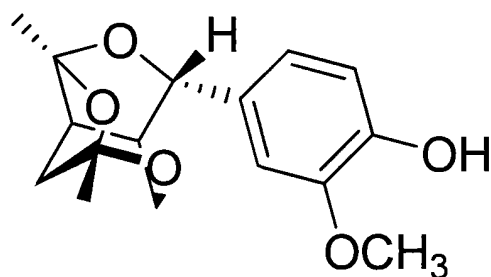
本发明的目的在于针对现有技术的不足，提供一种从红树植物中提取出的，具有细胞毒活性的且具有新骨架结构的苯丙素衍生物。

本发明的另一个目的在于提供上述苯丙素衍生物的制备方法。

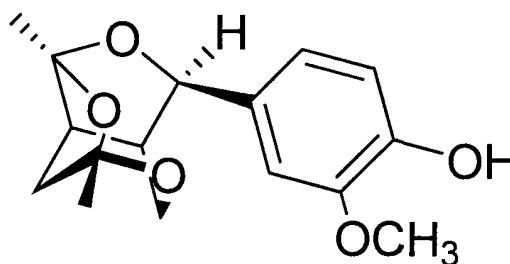
本发明的另一个目的在于提供上述苯丙素衍生物在制备抗乳腺癌药物中的应用。

本发明的上述目的是通过如下方案予以实现的：

本发明的苯丙素衍生物是从红树植物山石榴中分离得到的，其结构式如式（I）或式（II）所示。



(I)



(II)

通过对上述两种化合物进行质谱、核磁共振谱包括二维相关谱等分析发现，式（I）和式（II）所示化合物为一对差向异构体，且和现有的苯丙素类化合物相比，式（I）和式（II）所示化合物具有3个相互耦合的氧环结构，

其中包括两个缩醛结构片断，是天然产物中的一类新骨架结构的苯丙素衍生物。本发明人将式（I）所示化合物命名为 Catunaregin，将式（II）所示化合物命名为 Epicatunaregin。

本发明的苯丙素衍生物，采用本领域技术人员从植物中分离获得某活性成分时常用的提取、萃取和柱层析及薄层层析相结合进行分离的方法，其制备方法包括如下步骤：

（1）将红树植物山石榴用 95%工业酒精浸泡提取，将提取液减压浓缩得粗提物，粗提物再用乙酸乙酯萃取，收集乙酸乙酯层；

（2）将上述乙酸乙酯层进行硅胶柱层析，梯度洗脱后再由薄层层析分析得到粗品，将粗品进行纯化后即可得到本发明的苯丙素衍生物。

上述步骤（1）中，用 95 体积%工业酒精浸泡提取山石榴，其浸泡提取的次数以及时间优选浸泡 4 次，每次 7 天。

上述步骤（1）中，乙酸乙酯萃取前，还可以先用石油醚萃取一下粗提物，从而除去粗提物中的油脂性物质，减少乙酸乙酯层的杂质。

上述步骤（2）中，对乙酸乙酯层进行硅胶柱层析梯度洗脱，通过薄层层析分析后硅胶柱和凝胶柱纯化得到目的产物，其原理和操作均为本领域技术人员所共知的，具体操作时可优选如下方案：

a.将步骤（1）得到的乙酸乙酯层进行硅胶柱层析梯度洗脱，洗脱剂可选择氯仿-甲醇混合液，该混合液浓度采用氯仿：甲醇=100：0~50：50 的一系列体积比，洗脱后采用薄层层析（TLC）进行追踪，合并相同的组分；所述硅胶柱层析以及 TLC 的操作均参考教科书上的常规操作；

b.根据薄层层析的分析结果，选择用氯仿：甲醇的体积比为 98：2 的氯仿

-甲醇混合液洗脱得到的组分，对该组分再进行硅胶柱层析，洗脱剂采用石油醚：丙酮的体积比=90：10~20：80的一系列石油醚-丙酮混合液进行梯度洗脱，洗脱后采用薄层层析进行追踪合并相同的组分；所述硅胶柱层析以及 TLC 的操作均参考教科书上的常规操作；

c.根据薄层层析分析结果，选择用石油醚：丙酮的体积比为 4：1 的石油醚-丙酮混合液洗脱时得到的组分，并对该组分再次进行硅胶柱层析，层析后可选择石油醚-乙酸乙酯混合液（石油醚：乙酸乙酯= 3：1，体积比）进行洗脱，洗脱液进行薄层层析分析，收集用石油醚：乙酸乙酯的体积比=3：2 的石油醚-乙酸乙酯混合液作为展开剂时薄层层析上得到的 R_f 值为 0.4 和 0.6 两点，即为粗品。

将上述得到的两份粗品分别进行纯化处理，所述纯化处理可选择葡聚糖凝胶柱层析纯化（纯化时凝胶柱可选择 LH-20 填料，甲醇洗脱），最后分别纯化得到两份无色透明固体，对这两份无色透明固体均通过光谱信号（红外光谱，紫外光谱，质谱和核磁共振光谱）进行鉴定，结果发现为两种新物质：Catunaregin[其结构式如式（I）所示]和 Epicatunaregin[其结构式如式（II）所示]。

上述步骤（2）中，所用硅胶为本领域进行硅胶柱层析时常用的硅胶填料，优选高温（105℃干燥 30min）活化的 200~300 目硅胶。

本发明的 Catunaregin 和 Epicatunaregin 具有细胞毒活性，对咸水虾具有明显的致死作用，还能诱导人乳腺癌细胞株的凋亡，可用于制备抗乳腺癌的药物。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

1.本发明的苯丙素衍生物与现有苯丙素类化合物相比，具有 3 个相互联合

的氧环结构其中包括两个缩醛结构片断的新骨架结构,新骨架结构会赋予物质不同于现有物质的新的性质特点,因此对本发明苯丙素衍生物的研究将极大地扩充苯丙素的研究领域,目前本发明人已经发现该苯丙素衍生物对咸水虾和人乳腺癌细胞株具有毒杀作用,可将本发明苯丙素衍生物应用于抗肿瘤领域;

2.本发明的苯丙素衍生物是来源于海洋生物山石榴的一对差向异构体,它们作为一种新的药物先导化合物,不但自身在医学、药学等领域具有广阔的应用前景,而且它们的衍生物也将极大地丰富抗肿瘤药物种类;

3.本发明苯丙素衍生物的制备方法采用 95%工业酒精浸泡提取、乙酸乙酯萃取、柱层析和薄层层析相结合的方法,步步结合富集并且定位苯丙素衍生物,不但结果准确而且纯度高。

具体实施方式

下面结合具体实施例,对本发明做进一步地描述,但具体实施例并不对本发明做任何限定。

实施例 1 式(I)和式(II)所示化合物的制备

本实施例采用本领域技术人员从植物中分离获得某活性成分常用的提取、萃取以及柱层析和薄层层析相结合的分离方法,从红树植物山石榴的茎枝中得到两种新物质,并对它们进行光谱信号分析鉴定,发现这两种物质的结构式如式(I)和式(II)所示,这两个化合物为一对差向异构体,属于苯丙素类化合物,但是具有不同于现有苯丙素类化合物的新骨架结构。

本实施例的制备方法,其具体步骤如下:

(1) 将红树植物山石榴的茎枝自然凉干粉碎,取粉碎后的材料 4.9 Kg,用 95 体积%的工业酒精室温浸泡提取 4 次,每次 7 天,合并提取液减压浓缩后

得粗提取物，将该粗提取物加水混悬后得到混合液，先向该混合液中加入等体积的石油醚，石油醚将混合液中的油脂性杂质萃取出来，弃去石油醚萃取层，重复萃取3次后，向已经除去部分油脂性杂质的混合液中加入等体积的乙酸乙酯，取乙酸乙酯层保留，重复萃取3次后收集合并乙酸乙酯层，并减压浓缩；

(2) 将上述减压浓缩后的乙酸乙酯层进行硅胶柱层析(200~300目，800g 硅胶)，用氯仿：甲醇的体积比为100：0~50：50的一系列氯仿-甲醇混合液为洗脱剂进行梯度洗脱，然后薄层层析分析合并相似组分，最后得到7个组分；所述硅胶柱层析以及薄层层析的操作均按照本领域的常规操作；

(3) 根据薄层层析结果，在上述7个组分中，选择用氯仿：甲醇的体积比为98：2的氯仿-甲醇混合液洗脱得到的组分，可命名为组分F3，将该F3组分再次进行硅胶柱层析(200~300目，300g 硅胶)，洗脱剂采用石油醚：丙酮的体积比=90：10~20：80的一系列石油醚-丙酮混合液进行梯度洗脱，然后薄层层析分析合并相似组分，最后得到10个组分；所述硅胶柱层析以及薄层层析的操作均按照本领域的常规操作；

(4) 根据薄层层析结果，在上述10个组分中，选择用石油醚：丙酮的体积比为4：1的石油醚-丙酮混合液洗脱时得到的组分，可命名为组分F8，对该组分F8再次进行硅胶柱层析(200~300目，50g 硅胶)，层析后选择石油醚-乙酸乙酯混合液(石油醚：乙酸乙酯=3：1，体积比)进行洗脱，洗脱液进行薄层层析分析，收集用石油醚：乙酸乙酯的体积比=3：2的石油醚-乙酸乙酯混合液作为展开剂时薄层层析上 R_f 值为0.4和0.6的两点，即得到两份粗品。

将上述两份粗品分别通过葡聚糖凝胶柱(甲醇为洗脱剂，填料型号为LH-20)层析纯化，最终分别得到9mg和1.7mg的两份无色透明固体，对所得

到的两份无色透明固体进行红外光谱、紫外光谱、质谱和核磁共振光谱等光谱信号分析鉴定。

鉴定结果:

1、9mg 无色透明固体

该化合物是无色的无定型固体, 根据高分辨质谱 HRESIMS 推导它的分子式为 $C_{16}H_{20}O_5$; 它的 IR 谱显示羟基(3411 cm^{-1}), 苯环($1606, 1518$ 和 1454 cm^{-1}); ^1H NMR 谱显示一个羟基氢 [$\delta_{\text{H}} 5.59$ (1H, s)], 一套 ABX 系统的氢 [$\delta_{\text{H}} 6.82$ (1H, d, $J = 1.7\text{ Hz}$), 6.89 (1H, d, $J = 8.1\text{ Hz}$), 6.81 (1H, dd, $J = 8.1, 1.7\text{ Hz}$)], 两个甲基氢 [$\delta_{\text{H}} 1.50, 1.61$ (3H, s)], 一个亚甲基氢 [$\delta_{\text{H}} 1.89$ (1H, dd, $J = 3.9, 12.5\text{ Hz}$) 和 2.28 (1H, d, $J = 12.5\text{ Hz}$)], 两个次甲基氢 [$\delta_{\text{H}} 2.50$ (1H, ddt, $J = 10.2, 4.0, 2.1\text{ Hz}$), 2.72 (1H, dd, $J = 10.2, 3.8\text{ Hz}$)], 一个氧次甲基氢 [$\delta_{\text{H}} 4.96$ (1H, d, $J = 4.0\text{ Hz}$)], 一个氧亚甲基氢 [$\delta_{\text{H}} 3.77$ (2H, d, $J = 2.0\text{ Hz}$)], 一个甲氧基氢 [$\delta_{\text{H}} 3.90$ (3H, s)]; ^{13}C (DEPT) NMR 谱显示 16 个碳信号: 除了两个季碳 ($\delta_{\text{C}} 106.0, 115.3$) 外, 其它信号 (一个苯环结构 $\delta_{\text{C}} 146.6, 145.2, 134.5, 118.9, 114.5, 108.7$, 一个甲氧基 $\delta_{\text{C}} 56.0$, 两个甲基 $\delta_{\text{C}} 22.6, 24.8$, 一个亚甲基 $\delta_{\text{C}} 33.3$, 一个氧亚甲基 $\delta_{\text{C}} 63.0$, 两个次甲基 $\delta_{\text{C}} 45.8, 47.9$, 一个氧次甲基 $\delta_{\text{C}} 85.3$) 均与氢谱显示信息相一致, 根据化学位移推断两个季碳可能是烯碳或是缩酮的碳。从以上信息可推断该化合物有 3 个环或者是 2 个环与一个双键。

结合 HMBC 谱和 ^1H - ^1H COSY 谱可以推出化合物的结构片断: HMBC 谱显示 $\delta_{\text{H}} 4.96$ ($\delta_{\text{C}} 85.3$) 与 $\delta_{\text{C}} 47.9, 63.0, 108.7, 118.9, 134.5$ 相关, 推出 phenyl-CH ($\delta_{\text{C}} 85.3$)-CH ($\delta_{\text{C}} 47.9$)-CH₂- ($\delta_{\text{C}} 63.0$)-片断的存在。在 HMBC 谱中 $\delta_{\text{C}} 106.0$ 与 $\delta_{\text{H}} 1.89$ (1H, dd, $J = 3.9, 12.5\text{ Hz}$), 2.28 (1H, d, $J = 12.5\text{ Hz}$), 1.50 (3H, s)

相关, ^1H - ^1H COSY 中 δ_{H} 1.89 (1H, dd, $J=3.9, 12.5$ Hz) 与 δ_{H} 2.72 (1H, dd, $J=10.2, 3.8$ Hz) 相关, 推出 CH_3 (δ_{C} 24.8) -C (δ_{C} 106.0) - CH_2 (δ_{C} 33.3) -CH (δ_{C} 45.8) -片断的存在。HMBC 谱 δ_{H} 1.61 (3H, s) 与 δ_{C} 115.3, 45.8 相关推出 CH_3 (δ_{C} 22.6) -C (δ_{C} 115.3) -CH (δ_{C} 45.8) -片断的存在。 ^1H - ^1H COSY 谱中 δ_{H} 2.72 (1H, dd, $J=10.2, 3.8$ Hz) 与 δ_{H} 2.50 (1H, ddt, $J=10.2, 4.0, 2.1$ Hz) 相关推出 δ_{C} 45.8 与 δ_{C} 47.9 相连。除此之外, HMBC 谱中 δ_{H} 3.77 (2H, d, $J=2.0$ Hz) 和 δ_{C} 106.0 的相关信号说明了醚键的存在。结合以上信息和分子式可推出该化合物的平面结构。

根据 ^1H NMR 的耦合常数和 NOESY 可推出化合物的相对构型如式 (I) 所示。H-8 和 H-10 之间的耦合常数 ($J=10.2$ Hz) 说明结构中的吡喃环呈船式构型, H-7 和 H-8 之间的耦合常数 ($J=4.0$ Hz) 说明 H-7 和 H-8 处于反式位置, 所以 H-7 处于 β 位。在 NOESY 中, H-7 和 H-8 有弱的相关信号, H-7 和 H-10 没有相关信号, 证明了该化合物的相对构型。经 CA 检索式 (I) 所示化合物为新化合物, 属于苯丙素衍生物, 命名为 Catunaregin。

其物理常数为: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 1.4^\circ$ (c 0.8, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 198 (3.16), 218 (3.54), 227 (3.72) 279 (3.19) nm; IR (KBr) ν_{max} 3411, 2985, 2937, 1606, 1518, 1454, 1386, 1272, 1238 cm^{-1} ; ESIMS: m/z 293 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 315 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 331 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 607 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 623 $[2\text{M} + \text{K}]^+$; HRESIMS: m/z 315.1202 ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 315.1203)。

2、1.7mg 无色透明固体

该化合物也是无色的无定型固体, 在 TLC 板上经 5% 硫酸显色剂显色与 Catunaregin 同为紫红色。经高分辨质谱 HRESIMS 推出分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5$ 。通

过比较光谱数据可以看出, 该化合物和 Catunaregin 的 IR 谱和 UV 谱的相似, ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱中除几个氢和碳的信号[如 H-7 (δ_{H} 5.63) 向低场位移了 0.67ppm; H-13a 和 H-13b 在 δ_{H} 2.04 处重叠; C-10(δ_{C} 38.0)和 C-13(δ_{C} 26.9) 分别向高场位移了 7.8 ppm 和 7.3 ppm]外其它信号与 Catunaregin 信号基本一致。

结合 HSQC、HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 谱可以推出该化合物的平面结构与 Catunaregin 相同。不同的是 ^1H NMR 谱中耦合常数 ($J_{7,8} = 7.0 \text{ Hz}$) 证明了 H-7 和 H-8 是顺式的, 因此 H-7 是 α 位。NOESY 谱中 H-7 和 H-8 之间的强相关信号也证明了这一推断, 因此该化合物和 Catunaregin 是一对差向异构体, 其结构式如式 (II) 所示, 经 CA 检索式 (II) 所示化合物为新化合物, 属于苯丙素衍生物, 命名为 Epicatunaregin。

其物理常数为: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 220 (3.90), 223 (3.97), 278 (3.39) nm; IR (KBr) ν_{max} 3426, 2984, 2937, 1603, 1516, 1463, 1382, 1274, 1237 cm^{-1} ; ESIMS: m/z 293 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 315 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 331 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 623 $[2\text{M} + \text{K}]^+$; HRESIMS: m/z 315.1205 ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 315.1203).

实施例 2 Catunaregin 和 Epicatunaregin 对咸水虾的致死活性实验

取 96 孔细胞培养板, 每孔加 200 μl 含 10~15 个海虾幼虫的人工海水液, 制成测试培养板。

本实施例设空白对照组和样品组: 空白对照组是向上述测试培养板中加入 5 μl 溶剂二甲基亚砜 (DMSO); 样品组是将实施例 1 制备所得 Catunaregin 用溶剂 DMSO 溶解后制备得到 Catunaregin 含量为 500 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度的样品液, 样品组分三个组, 1 组是向上述测试培养板中加入 5 μl 浓

度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液, 2 组是向上述测试培养板中加入 5 μl 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液, 3 组是向上述测试培养板中加入 5 μl 浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液。

空白对照组和三个样品组均各设 3 个平行实验。

将空白对照组和样品组均在室温培养 24h 后, 在双目解剖镜下检测计数海虾死亡个体数目。

海虾生物致死活性用校正死亡率表示, 按下列公式计算:

校正死亡率 = (对照组存活率 - 处理组存活率) / 对照组存活率 $\times 100\%$ 。

将 500 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度及其对应的校正死亡率输入计算机, 计算半数致死浓度 LC_{50} 及其 95% 置信区间, Catunaregin 的 LC_{50} 为 15.15 $\mu\text{g/mL}$ 。

按照上述方法对 Epicatunaregin 进行同样的试验, Epicatunaregin 的 LC_{50} 为 45.98 $\mu\text{g/mL}$ 。

由上述试验结果可以看出, Catunaregin 和 Epicatunaregin 具有明显的咸水虾致死活性。

实施例 3 MTT 法测定 Catunaregin 和 Epicatunaregin 的抗肿瘤活性

本实施例选择肿瘤细胞——人乳腺癌 F10 (市售) 为研究对象, 采用本领域技术人员检测细胞存活和生长常规使用的 MTT 比色法, 对 Catunaregin 和 Epicatunaregin 进行肿瘤细胞生长抑制实验。

样品组: 将实施例 1 制备所得 Catunaregin 以 DMSO 溶解后制备 Catunaregin 含量为 0.01、0.1、1、10 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 五个浓度的样品组。

阳性对照组: 5-氟脲嘧啶。

阴性对照组: 0.5 体积%DMSO 的细胞完全培养液 (市售)。

收集对数生长期的 F10 细胞，接种于 96 孔培养板，每孔细胞数为 $1.0 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ ，置于 5 体积% CO_2 培养箱培养，次日去掉培养基，分别加入五个浓度样品组、阳性对照组和阴性对照组；48 小时后，每孔加入 MTT $10 \mu\text{l}$ ，继续培养 4 小时，再每孔加入 DMSO $100 \mu\text{l}$ 终止反应，常温放置 1 小时，用酶标仪检测各孔在 570nm 处的吸光度 A 值，计算细胞生长抑制率，计算式如下：

$$\text{生长抑制率}(\%) = [(A_{\text{阴性}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

Catunaregin 对 F10 细胞生长的半数抑制率 IC_{50} 为 $5.33 \mu\text{g/mL}$ 。

按照上述方法对 Epicatunaregin 进行同样的试验，Epicatunaregin 对 F10 细胞生长的半数抑制率 IC_{50} 为 $12.76 \mu\text{g/mL}$ 。

由上述实验结果可以看出，Catunaregin 和 Epicatunaregin 对人乳腺癌细胞具有很好的毒杀作用，说明本发明的 Catunaregin 和 Epicatunaregin 具有抗肿瘤活性，可用于制备抗乳腺癌的药物。