



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102239838 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 16

(21) 申请号 201110127016. 5

A01P 3/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 11. 03

A01P 13/00 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61K 31/343 (2006. 01)

200910193619. 8 2009. 11. 03

A61P 35/00 (2006. 01)

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483 号

(72) 发明人 徐汉虹 唐文伟 魏孝义 曾东强
龙丽萍

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

A01N 43/12 (2006. 01)

A01P 7/02 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页

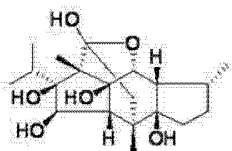
(54) 发明名称

萜类化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

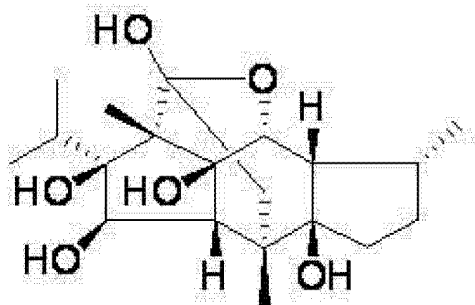
本发明公开了一种萜类化合物及其制备方法和应用。所述萜类化合物的化学结构式如式(II)所示,为伊桐素 A(itola)。所述化合物的制备方法包括将采集的植物伊桐种子或枝叶和树皮烘干粉碎后用有机溶剂提取、提取液减压浓缩制得膏状提取物、将膏状提取物分离纯化等步骤。所述化合物具有良好的活性,可应用于防治农业害虫、害螨、致病菌、杂草、人畜卫生害虫及制备治疗癌症

的药物方面的应用。



(II)

1. 一种萜类化合物的应用,其特征在于应用于制备杀螨剂、杀菌剂、除草剂或制备治疗癌症的药物方面;所述萜类化合物具有式(II)所示结构通式:



(II)。

2. 根据权利要求1所述萜类化合物的应用,其特征在于应用于制备抗肺癌(A-549)、鼻咽癌(SUNE1)、肝癌(BEL-7402)、结肠癌(HT-29)或乳腺癌(MCF-7)的药物方面。

萜类化合物及其制备方法和应用

[0001] 本申请是申请号为 200910193619.8 中国专利申请的分案申请，

原申请的申请日为 2009 年 11 月 3 日、申请号为 200910193619.8，发明名称为“萜类化合物及其制备方法和应用”。

技术领域

[0002] 本发明属于化学技术领域，具体涉及一种萜类化合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0003] 萜类化合物是广泛存在于植物中的天然有机化合物，具有很强生物活性。萜类化合物在植物与其生活环境的互作中发挥作用：(1) 植物对植食性昆虫的直接与间接防御反应，直接防御反应中可以作为毒素、取食或产卵干扰素；植物在受到植食性昆虫攻击后会释放一些挥发性萜类吸引天敌，从而形成其对攻击者的间接防御反应。(2) 增强植物抗病能力，植物倍半萜抗毒素如脱氧-6-甲氧基棉酚等对真菌有显著的抑制作用。(3) 化感作用，如植物释放某些物质抑制其他植物种子萌发及幼苗生长的异株克生现象，调节群体密度、影响种群格局和群落演替的自毒作用。(4) 与其他生物种群的互利关系，如诱导昆虫授粉、产卵、寄主定向等。

[0004] 萜类化合物已广泛应用于工农业生产和医药卫生中。如青蒿中的青蒿素对恶性疟疾有速效作用，短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 中的二萜类化合物紫杉醇具有良好的抗癌活性。许多萜类化合物还可以作为香料，如姜的根茎是常用的食品调味香料，其中含有姜烯、 β -麝子油烯、水芹烯等萜类化合物。

[0005] 伊桐 (*Itoa orientalis Hemsl*) 又名野厚朴，为大风子科伊桐属植物，常绿乔木，主要分布于我国西南和广西地区，在民间主要用于风湿痹痛，跌打损伤，肝炎及贫血等症状 (国家中药管理局中华本草编委会，中华本草，第 5 卷，上海科学技术出版社，1998:446)。群众用伊桐叶诱杀玉米黑毛虫 (广西地方志编委会编，广西通志，广西人民出版社，2000)。

[0006] 关于伊桐中萜类化合物及其制备方法和应用，目前未见相关技术报道。

发明内容

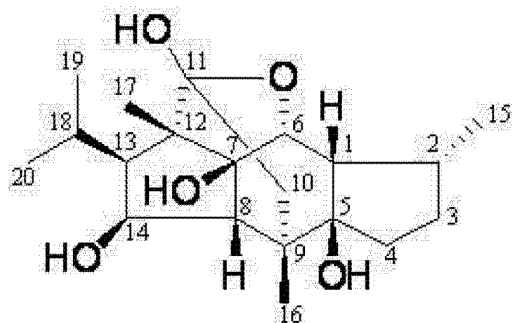
[0007] 本发明的目的是弥补现有技术不足，提供一种新的萜类化合物，来源于植物伊桐。

[0008] 本发明的另一个目的是提供所述萜类的化合物的制备方法。

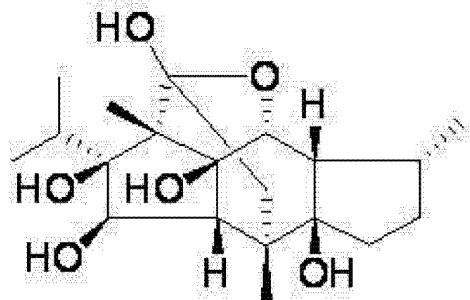
[0009] 本发明还有一个目的是提供所述萜类化合物的应用。

[0010] 本发明的目的通过以下技术方案来予以实现：

提供一种萜类化合物的，其结构式如式 (I) 或式 (II) 所示：



(I)



(II)

其中式(I)所示化合物命名为 13-脱羟基伊桐素 A (13-Deoxyitol A), 式(II)所示化合物命名为伊桐素 A (itol A)。

[0011] 本发明同时提供了所述萜类化合物的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 将伊桐(*Itoa orientalis*)的种子或者枝叶和树皮 60℃烘干粉碎后用有机溶剂提取, 提取液减压浓缩得到膏状提取物;

(2) 将膏状提取物分离纯化得到产物;

步骤(1)所述提取采用有机溶剂冷浸提取或用有机溶剂超声波振荡提取; 所述有机溶剂为甲醇或乙醇。

[0012] 步骤(2)所述分离纯化是采用常规的高效液相制备层析、萃取、硅胶柱层析、凝胶柱层析或反相柱层析方法。

[0013] 本发明同时提供了所述萜类化合物的应用:

通过实验证实, 本发明所述萜类化合物对农业害虫、害螨、致病菌、杂草或人畜卫生害虫具有生物活性, 可以应用作为杀虫剂、杀螨剂、杀菌剂、除草剂的活性成分。

[0014] 本发明所述萜类化合物可以和农药学上通用的任何农药助剂混合制成粉剂、粒剂、水剂等剂型, 可以按农药上常规方法制备。

[0015] 通过实验证实,本发明所述萜类化合物对癌细胞有抑制作用,可以应用作为治疗癌症的活性成分。尤其是可应用于制备抗肺癌(A-549)、鼻咽癌(SUNE1)、肝癌(BEL-7402)、结肠癌(HT-29)或乳腺癌(MCF-7)的药物方面。

[0016] 本发明所述萜类化合物可以和药学上所能接受的或通用的辅料混合制成口服、外用、注射等剂型,其中口服制剂包括片剂、胶囊剂、颗粒剂、滴丸剂等;外用包括栓剂、搽剂、洗剂、膏剂、透皮贴剂等;注射剂包括注射液、混悬液、冻干粉末等,均可以按照制药领域的常规方法制备。

[0017] 本发明的有益效果是:

(1) 本发明提供了一组具有生物活性的萜类化合物,对农药、医药领域具有重要的意义。

[0018] (2) 本发明从植物伊桐中制备得到一组具有农药和医学活性的萜类化合物,为有效开发利用植物伊桐提供了广阔的前景;

(3) 本发明制备方法简单,成本较低。

具体实施方式

[0019] 下面结合具体实施例来进一步详细说明本发明。

[0020] 实施例1:13-脱羟基伊桐素A的制备

(1) 采集植物伊桐(*Itoa orientalis* Hems1)种子,取20Kg种子以60℃温度烘干后粉碎,用150L甲醇室温下浸提三次,采用常规方法将甲醇提取液浓缩至膏状,得固体浸膏500g;

(2) 将固体浸膏悬浮于水中,依次用等体积比的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取3次,将乙酸乙酯部分通过硅胶柱层析,使用 CHCl_3 -MeOH(体积比100:1到40:60)作为梯度洗脱,收集 CHCl_3 -MeOH体积比为100:10时的洗脱组分,该组分再经丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)纯化,以甲醇洗脱,得到13-脱羟基伊桐素A(13-Deoxyitol A) 15mg。

[0021] 实施例2 13-脱羟基伊桐素A的制备

(1) 采集植物伊桐(*Itoa orientalis* Hems1)枝叶和树皮,取15Kg以60℃温度烘干后粉碎,粉碎物中加入3倍粉碎物质量的甲醇溶剂后用超声波提取器超声振荡提取10分钟,然后过滤,将滤液浓缩至膏状;

(2) 将膏状物用少量甲醇溶解,通过高效制备液相色谱分离纯

化得到13-脱羟基伊桐素A 10mg。

[0022] 实施例1和实施例2制备得到的13-脱羟基伊桐素A为无色不定型粉末,熔点为:198~199℃,结构式如式(I)所示;波谱数据如下:

ESI-MS m/z : 388[M+Cl]⁻, 351[M-H]⁻;

HR-EI-MS m/z : 352.2246 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$ 352.2244);

¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 0.99 (3H, d, J = 6Hz, 20-Me), 0.99 (3H, s, 16-Me), 1.08 (3H, d, J = 7.2Hz, 15-Me), 1.10 (3H, d, J = 6.6Hz, 19-Me), 1.17 (3H, s, 17-Me), 1.55 (1H, m, 4 β -H), 2.18 (1H, br. dd, J = 13.8, 7.8Hz, 4 α -H), 1.59 (1H, dd, J = 10.2, 5.4Hz, 13-H), 1.61 (1H, d, J = 15.0Hz, 10 β -H), 1.70 (1H, d, J = 15.0Hz, 10 α -H), 1.70 (1H, m, 3 α -H), 1.75 (1H, m, 3 β -H), 1.87

(1H, m, 18-H), 1.96 (1H, dd, $J = 8.4, 2.6\text{Hz}$, 1-H), 2.25 (1H, br. s, 8-H), 2.43 (1H, m, 2-H), 3.76 (1H, d, $J = 2.6\text{Hz}$, 6-H), 4.32 (1H, d, $J = 5.4\text{Hz}$, 14-H);

^{13}C NMR (150 MHz, MeOD) δ 10.3 (C-17), 15.2 (C-15), 22.1 (C-20), 23.4 (C-19), 24.3 (C-16), 27.6 (C-18), 35.9 (C-3), 37.0 (C-2), 37.3 (C-4), 40.7 (C-9), 43.5 (C-10), 54.6 (C-13), 55.0 (C-1), 55.6 (C-8), 57.3 (C-12), 76.0 (C-6), 79.2 (C-14), 88.5 (C-5), 92.6 (C-7), 108.1 (C-11).

所有波谱数据是通过 ^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H COSY 和 HMBC 等二维核磁共振谱归属,表明所得化合物结构正确。

[0023] 实施例 3 伊桐素 A 的制备:

(1) 采集植物伊桐(*Itoa orientalis* Hemsl)种子,取 20Kg 种子以 60℃ 温度烘干后粉碎,每次用 50L 甲醇浸提,共浸提三次,合并甲醇提取液浓缩至膏状,得固体浸膏 500g;

(2) 将固体浸膏悬浮于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁

醇萃取多次。将乙酸乙酯部分通过硅胶柱层析,使用 CHCl_3 - MeOH (体积比 100 :1 到 40 :60) 作为梯度洗脱,收集 CHCl_3 - MeOH 体积比为 100 :10 时的洗脱组分,该组分再经羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)纯化,以甲醇洗脱,得到伊桐素 A (itol A) 15g。

[0024] 制备得到的伊桐素 A 为无色块状结晶,熔点为 :249 ~ 250℃,结构式如式(II)所示;波谱数据如下:

ESIMS m/z : 391 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 403 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$, 367 $[\text{M} - \text{H}]^-$;

HR-EI-MS m/z 368.2173: ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_6$, calc. for 368.2193).

^1H (acetone- d_6 , 500 MHz): δ 1.93 (1H, br d, $J = 9.2\text{ Hz}$, H-1), 2.45 (1H, m, H-2), 1.65 (1H, m, H-3 α), 1.74 (1H, m, H-3 β), 2.15 (1H, m, H-4 α), 1.59 (1H, m, H-4 β), 3.70 (1H, d, $J = 3.0\text{ Hz}$, H-6), 2.18 (1H, br d, $J = 2.0\text{ Hz}$, H-8), 1.84 (1H, d, $J = 14.6\text{ Hz}$, H-10 α), 1.53 (1H, d, $J = 14.6\text{ Hz}$, H-10 β), 4.01 (1H, s, H-14), 1.01 (3H, d, $J = 6.8\text{ Hz}$, H-15), 1.11 (3H, s, H-16), 1.31 (3H, s, H-17), 1.96 (1H, m, H-18), 1.09 (3H, d, $J=6.5\text{ Hz}$, H-19), 0.94 (3H, d, $J = 6.8\text{ Hz}$, H-20);

^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz): δ 54.8 (C-1), 37.4 (C-2), 36.0 (C-3), 38.4 (C-4), 88.2 (C-5), 76.5 (C-6), 91.1 (C-7), 58.9 (C-8), 42.7 (C-9), 46.3 (C-10), 106.2 (C-11), 63.1 (C-12), 84.0 (C-13), 79.9 (C-14), 16.6 (C-15), 23.1 (C-16), 11.4 (C-17), 35.5 (C-18), 19.8 (C-19), 19.3 (C-20).

所有波谱数据是通过 ^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H COSY 和 HMBC 等二维核磁共振谱归属,表明所得化合物结构正确。

[0025] 实施例 4 本发明所述化合物的杀虫活性实验

对稻飞虱长翅型成虫的触杀毒力测定方法:采用毛细管微量点滴法。先用丙酮或甲醇将萜类化合物溶解,再用丙酮或甲醇配成系列浓度,从网室中采回 2 ~ 5 日龄的稻飞虱长翅成虫,用 CO_2 气体麻醉后,用毛细管将 0.09239 μL 或 0.1164 μL 药液(对照用相应溶剂)点滴在虫体的前胸背板上。每种药剂共点滴 90 头虫左右,重复 3 次。处理过的试虫待苏醒后放入自制的养虫笼中,每个养虫笼放虫约 30 头。养虫笼是用聚酯薄膜制成的高 14cm、直径 7cm 的圆筒,圆筒下部用海绵塞堵住,上部用纱布封口,笼中放 2 支 TN1 稻茎,稻茎穿过

海绵塞剪口浸入罐头瓶的水中。将养虫笼连同盛水的罐头瓶放进温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 75% ~ 85%, 每日光照 16h 的光照培养箱中, 48h 检查死虫数。计算死亡率。

$$\text{死亡率(\%)} = \frac{\text{死虫数}}{\text{处理虫数}} \times 100$$

[0026] 用最小二乘法计算毒力回归方程、致死中浓度 (LD_{50})、 LD_{50} 的 95% 置信限等。

[0027] 实验证明, 本发明提供的化合物对农业害虫有良好的杀虫活性, 以伊桐素 A 和 13- 脱羟基伊桐素 A 为例, 对稻飞虱长翅型成虫的触杀毒力见表 1。

[0028] 表 1 伊桐素 A 和 13- 脱羟基伊桐素 A 对稻飞虱长翅型成虫的触杀毒力

药剂	毒力回归方程	LD_{50} ($\mu\text{g}/\text{头}$)	95% 置信限($\mu\text{g}/\text{头}$)	相关系数 (r)
A	$y=6.6703+2.5394x$	0.2205	0.1912-0.2587	0.9758
B	$y=7.3078+3.3062x$	0.2011	0.1846-0.2237	0.9833
C	$y=6.6343+2.4080x$	0.2118	0.1819-0.2457	0.9654

注 :A 为伊桐素 A, B 为 13- 脱羟基伊桐素 A, C 为对照药剂马拉硫磷

实施例 5 本发明所述化合物对农业害螨的杀螨活性

对截形叶螨的杀螨毒力采用玻片浸渍法。把双面胶的一面粘于载玻片的一端, 另一面轻轻地粘雌成螨 30 头左右, 螨体腹面朝上, 不粘住螨的口器、足和须, 使螨能自由活动, 4h 后在双目镜下观察, 挑去死螨。然后把粘有雌成螨的载玻片的一端分别放在 5 个系列浓度的药剂溶液、对照药剂三氯杀螨醇及清水对照中浸泡 3s, 用滤纸吸去多余的药液, 再把处理过的载玻片放在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、RH80% 的培养箱中, 24h 后检查雌成螨的死亡情况。

$$\text{死亡率(\%)} = \frac{\text{死螨数}}{\text{处理螨数}} \times 100$$

[0029] 用最小二乘法计算毒力回归方程、致死中浓度 (LD_{50})、 LD_{50} 的 95% 置信限等。

[0030] 实验证明, 本发明提供的化合物对农业害螨有良好的杀螨活性, 本实施例以伊桐素 A 和 13- 脱羟基伊桐素 A 为例进行实验, 伊桐素 A 和 13- 脱羟基伊桐素 A 对截形叶螨的触杀毒力见表 2。

[0031] 表 2 伊桐素 A 和 13- 脱羟基伊桐素 A 对截形叶螨雌螨的触杀毒力

药剂	毒力回归方程	LD ₅₀ (mg/L)	95%置信限 (mg/L)	相关系数 (r)
A	y=4.3198+2.1247x	2.29	2.06-2.53	0.9731
B	y=4.5433+1.5281x	1.99	1.33-2.83	0.9104
C	y=4.5875+1.5306x	1.86	1.10-3.05	0.9829

注:A为伊桐素A,B为13-脱羟基伊桐素A,C为对照药剂三氯杀螨醇

实施例6 本发明化合物的杀菌活性

对荔枝霜疫霉病菌孢子萌发的测定方法按照如下:(1)供试药液的配制:用适量有机溶剂溶解待测的化合物,然后用灭菌处理的双蒸水稀释,配成不同浓度的药液。(2)孢子悬浮液的制备:荔枝霜疫霉菌在PDA培养基和自制菜豆培养基平板上,于 $25\pm1^{\circ}\text{C}$,RH 95%条件下培养5~7 d后,用无菌水洗下孢子(囊),配制成孢子(囊)悬浮液,浓度为 10×40 倍显微镜下观察每个视野30~40个孢子(囊)。(3)孢子囊悬浮液和不同浓度的化合物溶液按照体积比1:1混合,得到不同浓度的含药孢子(囊)悬浮液,同时以溶解提取物或化合物相同体积的对应溶剂加入孢子悬浮液中为空白对照,在 $25\pm1^{\circ}\text{C}$,RH 98%条件下培养5~7 h。(4)取培养后的含药菌液与空白对照,在 10×40 倍显微镜下观察并统计孢子萌发结果。

$$[0032] \quad \text{孢子萌发率}(\%) = \frac{\text{孢子萌发数}}{\text{统计孢子总数}} \times 100$$

在自然状态下植物病原菌的孢子存在一部分就是不萌发的,所以孢子萌发抑制率在计算时需要加以校正,一般采用Abbott氏公式进行校正。

$$\text{校正萌发抑制率}(\%) = \frac{\text{对照萌发率}(\%) - \text{处理萌发率}(\%)}{\text{对照萌发率}(\%)} \times 100$$

[0033] 用最小二乘法计算孢子萌发抑制率毒力回归方程、抑制中浓度(EC_{50})、 EC_{50} 的95%置信限等。

[0034] 实验证明,本发明提供的化合物对农业病菌有良好的抑菌活性,以伊桐素A和13-脱羟基伊桐素A为例,所述萜类化合物对荔枝霜疫霉病菌孢子萌发的毒力见表3。

[0035] 表3 伊桐素A和13-脱羟基伊桐素A对荔枝霜疫霉病菌的萌发的毒力

药剂	毒力回归方程	EC ₅₀ (μg/mL)	95% 置信限 (μg/mL)	相关系数 (r)
A	y=1.388+1.870x	85.44	67.12-108.77	0.9489
B	y=0.875+1.987x	73.22	54.99-93.62	0.9885
C	y=2.573+1.440x	48.46	35.42-66.30	0.9896

注:A为伊桐素A,B为13-脱羟基伊桐素A,C为对照药剂95%甲霜灵

实施例7 本发明化合物的除草活性

实验证明,本发明提供的化合物对农业害虫有良好的杀虫活性,伊桐素A和13-脱羟基伊桐素A对稗草生物活性见表4。

[0036] 对稗草活性测定采用滤纸法,将稗草种子催芽3~4d,待稗草种子露白后备用。把各个待测药剂用水稀释成不同浓度的药液,在铺有一张圆滤纸,直径为9cm的培养皿中加入各个浓度的待测药液5.00ml,精选整齐刚露白的稗草种子20粒于培养皿中,盖好保鲜膜,将培养皿放入LRH-250-G型光照培养箱,在(27±1)℃,24h光照条件下培养,另设清水作空白对照。每个处理重复3次,处理2~5d后测定芽长,求出抑制率。

[0037] 用最小二乘法计算毒力回归方程、致死中浓度(EC₅₀)、EC₅₀的95%置信限等。

[0038] 表4伊桐素A和13-脱羟基伊桐素A对稗草的敏感性

药剂	毒力回归方程	EC ₅₀ (mg/L)	95% 置信限 (mg/L)	相关系数 (r)
A	y=5.0492+0.4919x	0.9944	0.1746-3.3850	0.9562
B	y=5.0787+0.9267x	0.8225	0.5663-1.2030	0.9933
CK	y=5.1231+1.1628x	0.7837	0.5832-1.0430	0.9938

注:A为伊桐素A,B为13-脱羟基伊桐素A,CK为对照药剂扑草净

实施例8 对癌细胞的抑制活性测定

离体细胞毒性试验方法:所用人类癌细胞株有肺癌(A-549)、鼻咽癌(SUNE1)、肝癌(BEL-7402)、结肠癌(HT-29)和乳腺癌(MCF-7)。采用MTT法,设阴性对照组、溶剂对照组、阳性对照组及不同浓度本发明化合物剂量组,本发明药物用10% DMSO溶解并稀释成不同浓度梯度,溶剂对照组为10% DMSO,阳性对照组为紫杉醇(Taxol),重复3次,处理24h后观测结果。

[0039] 本发明提供伊桐素A、13-脱羟基伊桐素A对肺癌(A-549)、鼻咽癌(SUNE1)、肝癌(BEL-7402)、结肠癌(HT-29)和乳腺癌(MCF-7)等5种人癌细胞均有细胞毒性,具体

结果见表 5。

[0040] 表 5 伊桐素 A 和 13-脱羟基伊桐素 A 对几种人体外癌细胞的细胞毒性

细胞株	伊桐素 A IC ₅₀ (μg/mL)	13-脱羟基伊桐素 A IC ₅₀ (μg/mL)	对照药物 Taxol IC ₅₀ (μg/mL)
A-549	6.089×10^{-3}	1.263×10^{-3}	3.324×10^{-2}
SUNE1	1.138×10^{-2}	9.412×10^{-3}	6.402×10^{-3}
BEL-7402	4.683×10^{-2}	9.386×10^{-3}	6.865×10^{-3}
HT-29	3.765×10^{-1}	1.006×10^{-1}	2.204×10^{-1}
MCF-7	3.126×10^{-3}	3.745×10^{-3}	5.053×10^{-3}

实验证明,本发明制备得到的伊桐素 A 和 13-脱羟基伊桐素 A 对肺癌(A-549)、鼻咽癌(SUNE1)、肝癌(BEL-7402)、结肠癌(HT-29)和乳腺癌(MCF-7)等人癌细胞均有细胞毒性。上述癌细胞涉及常见的人癌细胞,伊桐素 A 和 13-脱羟基伊桐素 A 对其均具有良好的细胞毒活性,说明本发明化合物对癌细胞的抑制活性强且具有广泛的应用前景。