

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510074805.1

[51] Int. Cl.

C07C 403/00 (2006.01)

C07C 49/403 (2006.01)

C07C 49/497 (2006.01)

A61K 31/557 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 12 月 6 日

[11] 公开号 CN 1872838A

[22] 申请日 2005.6.3

[21] 申请号 200510074805.1

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院毒物
药物研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 崔承彬 李长伟 蔡 兵 韩 冰

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 顾颂邈

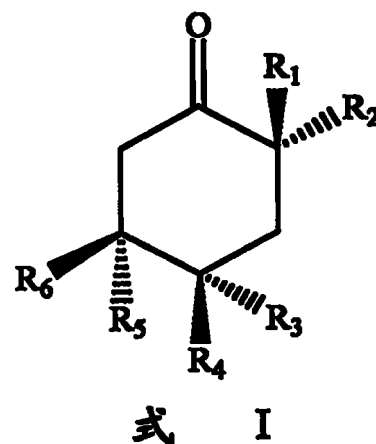
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 7 页

[54] 发明名称

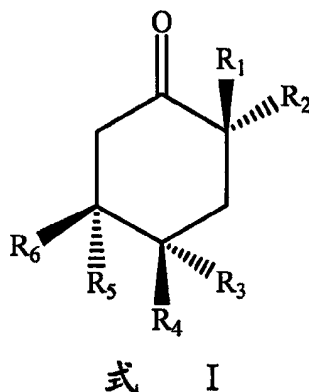
单环多取代饱和环己酮类化合物及其制备方法
和用途

[57] 摘要

本发明涉及式 I 含一个长链烃取代基的单环多取代饱和环己酮类化合物、含有该类化合物的提取物及所述化合物和提取物的制备方法和用途。本发明的单环多取代饱和环己酮类化合物可作为细胞周期抑制剂、细胞凋亡诱导剂、细胞增殖抑制剂和抗肿瘤剂用于抗肿瘤治疗。



1. 提取物,其特征在于其中含有至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐类:

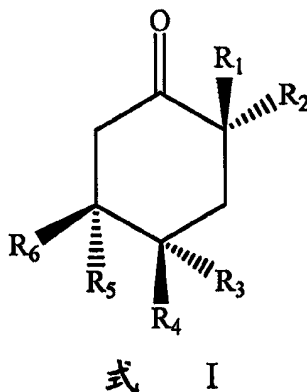


其中,

环己酮的六元环取 4C_1 椅式构型;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 为氢、羟基、氨基、甲氧基或任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基, 并且, R_1 - R_6 中至少一个为所述的任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基, 其余至少三个为选自羟基或甲氧基的含氧取代基。

2. 式 I 化合物或其药学上可接受的盐类:



其中,

环己酮的六元环取 4C_1 椅式构型;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 为氢、羟基、氨基、甲氧基或任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基, 并且, R_1 - R_6

中至少一个为所述的任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链C₁₅-C₂₀烷基,其余至少三个为选自羟基或甲氧基的含氧取代基。

3. 权利要求 2 所述的式 I 化合物, 其中, R₁ 和 R₂ 为羟基或 (Z)-14-烯十九烷基; R₃、R₄、R₅、R₆ 为羟基或氢。

4. 权利要求 2 或 3 所述式 I 化合物, 其中, R₁ 为 (Z)-14-烯十九烷基, R₂、R₄、R₆ 为羟基, R₃、R₅ 为氢。

5. 权利要求 2 或 3 所述式 I 化合物, 其中, R₂ 为 (Z)-14-烯十九烷基, R₁、R₃、R₆ 为羟基, R₄、R₅ 为氢。

6. 含有作为活性成分的权利要求 2-5 任一项所述化合物以及一种或多种药用载体或赋形剂的药物组合物。

7. 权利要求 1 所述提取物的制备方法, 该方法包括用醇或含水醇浸提有关植物原料例如南酸枣, 获得提取物。

8. 权利要求 2 所述的式 I 化合物的制备方法, 该方法包括用醇或含水醇浸提有关植物原料例如南酸枣获得粗浸膏后, 分离纯化得到式 I 化合物。

9. 权利要求 1 所述的提取物和/或权利要求 2 所述的式 I 化合物用于制备细胞周期抑制剂、细胞凋亡诱导剂、肿瘤细胞的增殖抑制剂或肿瘤细胞杀伤剂的用途。

10. 权利要求 1 所述的提取物和/或权利要求 2 所述的式 I 化合物用于制备抗肿瘤药物的用途。

单环多取代饱和环己酮类化合物及其制备方法和用途

技术领域:

本发明涉及单环多取代饱和环己酮类化合物及其制备方法和用途。具体涉及含一个长链烃取代基的单环多取代饱和环己酮类化合物、含有该类化合物的提取物、提取分离并纯化获取该类化合物的方法以及所述提取物和化合物用于制备细胞周期抑制剂、细胞凋亡诱导剂、细胞增殖抑制剂、癌细胞杀伤剂和抗肿瘤剂的用途。

背景技术:

单环饱和环己酮类化合物系指在环己烷酮的碳骨架上连有不同取代基的一系列化合物。该类化合物骨架结构单一, 主要因取代基种类和取代位置的不同而形成不同的化合物。其中, 含一个长链烃取代基的取代单环饱和环己酮类化合物有些已有文献报道。如文献 S. R. Johns, *et al.*, *Camptosperma* Exudates. The optically active long-chain 5-hydroxycyclohex-2-enones and long-chain bicycle[3.3.1]nonane-3,7-diones: *Aust. J. Chem.*, 40, 79-96, 1987 曾记载了几个含一个长链烃基(十七个碳或十九个碳)的取代单环饱和环己酮类化合物。但上述文献记载的化合物均为人工转化产物。迄今已知的该类化合物不仅数目少、取代类型有限, 而且有关该类化合物的抗肿瘤活性以及具有与本发明化合物相同取代类型的含一个长链烃取代基的单环多取代饱和环己酮类化合物至今未见报道。

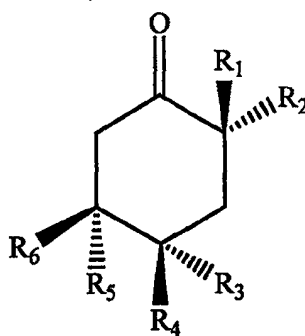
南酸枣 *Choerospondias axillaries* (Roxb.) Burtt et Hill 为漆树科南酸枣属植物, 其树皮和果实入药, 树皮主治疮疡、汤火伤、阴囊湿疹, 鲜果则消食滞, 治食滞腹痛, 果核醒酒解毒, 治风毒起疙瘩成疮或癆痈(江苏新医学院编, 中药大辞典, 上册, 上海, 上海人民出版社, 1977 年, 第 397-398 页和第 1564 页)。干燥果实已作为中药“广枣”

收入我国 2000 年版药典（国家药典委员会，中华人民共和国药典，一部，北京，化学工业出版社，2000 年，第 32 页）。南酸枣中的黄酮、酚酸、有机酸、氨基酸、甾体等多种类型的化学成分已有报道，南酸枣粗提物、总黄酮或单体化合物的抗菌、抑制血小板聚集等多种活性也已有研究报道（熊冬生等；南酸枣植物在药物方面的研究概况及其应用前景：广东药学，2000 年第 10 卷第 5 期，第 8-10 页）。但南酸枣的抗肿瘤活性及其活性成分尤其是本发明涉及的单环多取代饱和环己酮类活性成分至今未见研究报道。

发明内容：

本发明旨在提供一种具有细胞周期抑制、细胞凋亡诱导以及对癌细胞直接杀伤等抗肿瘤活性的含一个长链烃取代基的单环多取代饱和环己酮类化合物。

本发明人首次发现南酸枣的粗提物对癌细胞有很好的杀伤性细胞毒、细胞凋亡诱导、细胞周期抑制及对癌细胞增殖的抑制等抗肿瘤活性，遂对其活性成分进行了研究，并发现南酸枣粗提物中的下列式 I 所示单环多取代饱和环己酮类化合物具有上述的抗肿瘤活性：



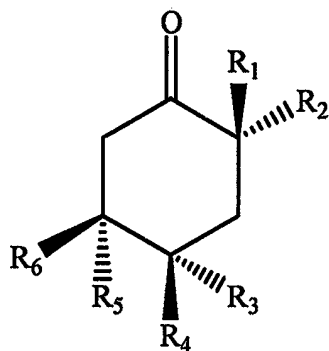
式 I

其中，

环己酮的六元环取 4C_1 椅式构型；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 为氢、羟基、氨基、甲氧基或任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基，并且， R_1 - R_6 中至少一个为所述的任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基，其余至少三个为选自羟基或甲氧基的含氧取代基。

因此，本发明的第一个方面涉及一种提取物，其特征在于其中包含至少一种式 I 所示的单环多取代饱和环己酮类化合物及其药学上可接受的盐：



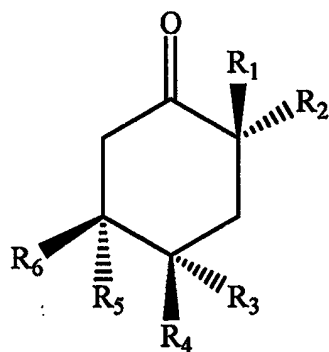
式 I

其中，

环己酮的六元环取 4C_1 椅式构型；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 为氢、羟基、氨基、甲氧基或任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基，并且， R_1 - R_6 中至少一个为所述的任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基，其余至少三个为选自羟基或甲氧基的含氧取代基。

本发明的第二个方面涉及式 I 所示单环多取代饱和环己酮类化合物及其药学上可接受的盐：



式 I

其中，

环己酮的六元环取 4C_1 椅式构型；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 为氢、羟基、氨基、甲氧基或任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基，并且， R_1 - R_6 中至少一个为所述的任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直

链或支链 C_{15} - C_{20} 烃基, 其余至少三个为选自羟基或甲氧基的含氧取代基。

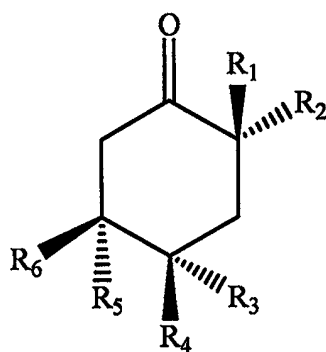
本发明的第三个方面涉及制备上述提取物的方法, 所述方法包括用醇或含水醇对有关植物原料、例如南酸枣进行提取, 得粗浸膏即提取物。

本发明的第四个方面涉及制备上述式 I 化合物的方法, 所述方法包括用醇或含水醇对有关植物原料、例如南酸枣进行提取得粗浸膏后, 再经分离纯化得到式 I 化合物。

本发明的第五个方面涉及含有作为活性成分的式 I 单环多取代饱和环己酮类化合物以及一种或多种药用载体或赋形剂的药物组合物。

本发明的第六个方面涉及式 I 单环多取代饱和环己酮类化合物用于制备细胞周期抑制剂、细胞凋亡诱导剂、细胞增殖抑制剂、癌细胞杀伤剂和抗肿瘤剂的用途。

在本发明的一个实施方式中, 本发明涉及下列式 I 单环多取代饱和环己酮类化合物及其药学上可接受的盐:



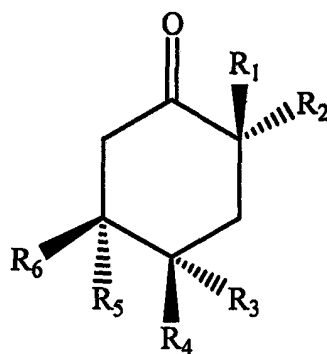
式 I

其中,

环己酮的六元环取 4C_1 椅式构型;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 为氢、羟基、氨基、甲氧基或任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15-20} 烃基, 并且, R_1 - R_6 中至少一个为所述的任选被羟基、氨基等取代基取代的饱和或不饱和直链或支链 C_{15} - C_{20} 烃基, 其余至少三个为选自羟基或甲氧基的含氧取代基。

在本发明的一个优选实施方案中, 本发明涉及下列式 I 单环多取代饱和环己酮类化合物及其药学上可接受的盐:



式 I

其中,

R_1 和 R_2 为羟基或(*Z*)-14-烯十九烷基, R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 为羟基或氢。

在本发明进一步的优选实施方案中, 式 I 中的 R_1 为(*Z*)-14-烯十九烷基, R_2 、 R_4 、 R_6 为羟基, R_3 、 R_5 为氢。

在本发明另一个进一步的优选实施方案中, 式 I 中的 R_2 为(*Z*)-14-烯十九烷基, R_1 、 R_3 、 R_6 为羟基, R_4 、 R_5 为氢。

含有上述式 I 化合物的提取物及纯的式 I 化合物可通过如下方法制备: 用醇或含水醇对有关植物材料、例如南酸枣进行提取, 得粗浸膏即提取物, 然后再从粗浸膏中分离纯化而得到式 I 化合物。

根据本发明, 上述方法中所采用的醇是乙醇; 所述含水醇是 60~95% 的含水乙醇; 所述分离纯化包括本领域技术人员熟知的天然产物分离纯化的常规方法和手段, 如液液萃取、柱层析、薄层层析、高效液相层析及重结晶等。其中柱层析、高效液相和重结晶精制可反复进行多次。

本发明采用丽丝胺罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB) 法和流式细胞术结合显微镜下检测细胞形态特征的方法, 测试了式 I 化合物对小鼠乳腺癌 tsFT210 细胞、人大肠癌 HCT-15 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人卵巢癌 A2780 细胞的细胞增殖抑制、细胞周期抑制和细胞凋亡诱导以及对癌细胞的直接杀伤等作用。经实验证实, 式 I 化合物通过抑制细胞周期周转、诱发癌细胞凋亡或直接的杀伤等方式显示出抑制肿瘤细胞增殖的生物学活性, 从而具有抗肿瘤作用。

本发明式 I 化合物与各种药物可接受的载体、赋形剂或辅料配伍, 可制成抗肿瘤药物, 用于肿瘤的治疗。

本发明中的术语“药学上可接受的盐”可以是药用无机或有机盐。

本发明式 I 中具有碱性基团的化合物可以与无机酸形成药用盐,例如硫酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐;也可与有机酸形成药用盐,例如乙酸盐、草酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、马来酸盐等。本发明式 I 中具有酸性基团的化合物可以与碱金属或碱土金属形成药用盐,优选但不限于钠盐、钾盐、镁盐或钙盐。

本发明化合物可以单独或以药物组合物的形式给药。给药途径可以是口服、非肠道或局部给药。药物组合物可根据给药途径配成各种适宜的剂型。

本发明化合物的药物组合物可以以下面的任意方式施用:口服,喷雾吸入,直肠用药,鼻腔用药,颊部用药,局部用药,非肠道用药,如皮下,静脉,肌内,腹膜内,鞘内,心室内,胸骨内和颅内注射或输入,或借助一种外植储器用药。其中优选口服、腹膜内或静脉内给药方式。

当口服用药时,本发明化合物可制成任意口服可接受的制剂形式,包括但不限于片剂、胶囊、水溶液或水悬浮液。其中,片剂使用的载体一般包括乳糖和玉米淀粉,另外也可加入润滑剂如硬脂酸镁。胶囊制剂使用的稀释剂一般包括乳糖和干燥玉米淀粉。水悬浮液制剂则通常是将活性成分与适宜的乳化剂和悬浮剂混合使用。任选地,以上口服制剂形式中还可加入一些甜味剂、芳香剂或着色剂。

当皮肤局部施用时,本发明化合物可制成适当的软膏、洗剂或霜剂制剂形式,其中将活性成分悬浮或溶解于一种或多种载体中。软膏制剂可使用的载体包括但不限于:矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧化乙烯、聚氧化丙烯、乳化蜡和水;洗剂或霜剂可使用的载体包括但不限于:矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、吐温 60、十六烷酯蜡、十六碳烯芳醇、2-辛基十二烷醇、苜醇和水。

本发明化合物还可以无菌注射制剂形式用药,包括无菌注射水或油悬浮液或无菌注射溶液。其中,可使用的载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,灭菌的非挥发油也可用作溶剂或悬浮介质,如单甘油酯或二甘油酯。

另外需要指出,本发明化合物使用剂量和使用方法取决于诸多因

素, 包括患者的年龄、体重、性别、自然健康状况、营养状况、化合物的活性强度、服用时间、代谢速率、病症的严重程度以及诊治医师的主观判断。优选的使用剂量介于 0.01-100mg/kg 体重/天。

本发明式 I 化合物还可作为抑制细胞周期或诱发细胞凋亡的低分子生物探针用于生命科学研究中。当把式 I 化合物作为细胞周期抑制剂或细胞凋亡诱导剂用于生命科学研究时, 可溶于甲醇或含水甲醇中, 也可溶于二甲基亚砷的含水溶液中加入应用。

附图说明:

图 1 是化合物 I 在甲醇溶液 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 中的紫外吸收光谱;

图 2 是化合物 I 的红外吸收光谱 (KBr);

图 3 是化合物 I 在氘代氯仿中的 ^1H 核磁共振谱;

图 4 是化合物 I 在氘代氯仿中的 ^{13}C 核磁共振谱;

图 5 是化合物 I 在甲醇溶液 (1.0 mg/ml) 中的圆二色散 (CD) 光谱;

图 6 是化合物 II 在甲醇溶液 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 中的紫外吸收光谱;

图 7 是化合物 II 的红外吸收光谱 (KBr);

图 8 是化合物 II 在氘代甲醇中的 ^1H 核磁共振谱;

图 9 是化合物 II 在氘代甲醇中的 ^{13}C 核磁共振谱;

图 10 是化合物 II 在甲醇溶液 (1.0 mg/ml) 中的圆二色散 (CD) 光谱;

图 11 是小鼠乳腺癌 tsFT210 细胞用化合物 I 处理 17 小时后测得的流式细胞直方图;

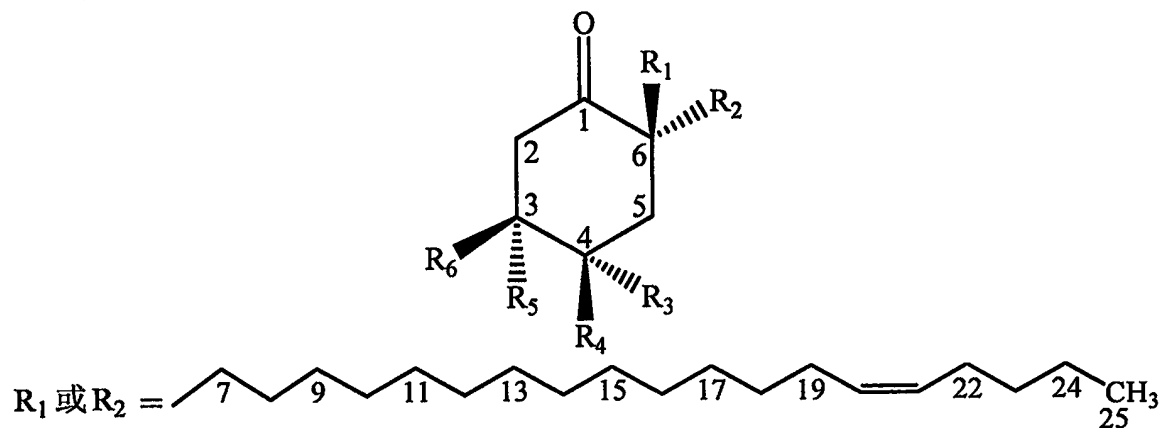
图 12 是小鼠乳腺癌 tsFT210 细胞用化合物 II 处理 17 小时后测得的流式细胞直方图。

具体实施方式:

下列实施例将进一步说明本发明, 但并不对本发明构成限制。

在以下实施例中, 以下称为化合物 I 的本发明化合物经核磁共振等鉴定具有如下结构: 式 I 化合物, 其中, 六元环取 $^4\text{C}_1$ 构型 (绝对构型为

3*S*4*R*6*R*), R_1 为 (*Z*)-14-烯十九烷基, R_2 、 R_4 、 R_6 为羟基, R_3 、 R_5 为氢; 以下称为化合物 II 的本发明化合物经核磁共振等鉴定具有如下结构: 式 I 化合物, 其中, 六元环取 4C_1 构型(绝对构型为 3*S*4*S*6*S*), 其中 R_2 为 (*Z*)-14-烯十九烷基, R_1 、 R_3 、 R_6 为羟基, R_4 、 R_5 为氢:



式 I

碳环及长链上的阿拉伯数字表示相应碳原子的标位。

在化合物的结构研究中, 熔点用北京天地宇科技有限责任公司 X-4 型精密显微熔点测定仪测定, 温度未校正。比旋光度用 JSASCO P-1020 型旋光仪测定。正负离子 TOF-MS 和 HR-TOF-MS 分别用美国 ABI 公司 API 3000 型液相色谱-质谱联用仪和英国 Micromass 公司 LCT 型质谱仪测定, 紫外光谱用 Shimadzu UV2501PC 型紫外分光光度仪测定, 红外光谱用 Nicolet Magna—IR™ 550 型红外光谱仪测定, 核磁共振谱用 JEOL Eclips-600 型超导核磁共振仪 (600 MHz ^1H -NMR, 150 MHz ^{13}C -NMR) 测定。圆二色散 (CD) 光谱用 JASCO J-810 Spectropolarimeter 测定。

实施例 1. 化合物 I 的提取与分离精制

第一步骤: 含有化合物 I 的提取物的制备

取南酸枣的干燥树皮 (3.2 kg) 粉碎后用乙醇 25 升室温浸提, 每次浸泡 7 天, 共提 4 次。合并提取液, 浓缩干燥, 得乙醇提取物 750 g。将乙醇提取物 750 g 悬浮于 3 升水中, 依次用氯仿 (3 升)、乙酸乙酯 (3 升)、正丁醇 (3 升) 各萃取 4 次, 分别得到氯仿提取物 60 g、乙酸乙酯提取物 310 g、正丁醇提取物 300 g 和水层残留物 80 g。其中, 氯仿

提取物为含化合物 I 的提取物。

第二步骤：含化合物 I 的层析粗组分的制备

氯仿提取物 (60 g) 干法上减压硅胶柱 (柱床 7.5 cm × 18.5 cm), 用石油醚 (P)-丙酮 (A)、甲醇溶剂系统进行洗脱。通过增加石油醚 (P) 中丙酮 (A) 的用量来梯度递增洗脱溶剂的极性或更换成甲醇来加大洗脱溶剂的极性。根据薄层检测及活性测试结果合并馏份, 得到 6 个组分 Fr-1 (3.2 g, $V_P: V_A=100:1$ 洗脱部分)、Fr-2 (2.3 g, $V_P: V_A=50:1$ 洗脱部分)、Fr-3 (2.0 g, $V_P: V_A=10:1$ 洗脱部分)、Fr-4 (10.8 g, $V_P: V_A=5:1$ 洗脱部分)、Fr-5 (13.6 g, $V_P: V_A=2:1$ 洗脱部分) 和 Fr-6 (25 g, 甲醇洗脱部分)。将 Fr-5 (13.6 g) 干法上减压硅胶柱 (5.0 cm × 22 cm), 用氯仿 (C)-乙酸乙酯 (Ac)、丙酮、甲醇系统洗脱, 根据薄层检测及活性测试结果合并馏份, 得到 6 个组分 Fr-5-1 (4.1 g, $V_C: V_{Ac}=8:1$ 洗脱部分)、Fr-5-2 (980 mg, $V_C: V_{Ac}=4:1$ 洗脱部分)、Fr-5-3 (3.7 g, $V_C: V_{Ac}=2:1$ 洗脱部分)、Fr-5-4 (1.1 g, 乙酸乙酯洗脱部分)、Fr-5-5 (1.8 g, 丙酮洗脱部分)、Fr-5-6 (0.8 g, 甲醇洗脱部分)。其中, Fr-5-3 为含化合物 I 的层析粗组分。

第三步骤：化合物 I 的纯化和精制

将 Fr-5-3 (3.7 g) 上 Sephadex LH-20 柱 (柱床 3.8 cm × 36 cm), 用氯仿-甲醇 (1:1) 洗脱, 得到主要含化合物 I 的层析组分。该组分在 RP-18 反相分析高效液相层析 (203 nm 检测) 中, 当用甲醇洗脱时, 在保留时间 8 分钟处给出含化合物 I 的洗脱组分。经相同条件 RP-18 反相制备高效液相层析 (203 nm 检测) 分离, 用甲醇洗脱并收集相应洗脱组分, 得到化合物 I 粗品。该化合物 I 粗品在用 80% 甲醇洗脱的 RP-18 反相分析高效液相 (203 nm 检测) 中, 在保留时间 72 分钟处给出化合物 I 的单一洗脱峰。经相同条件 RP-18 反相制备高效液相层析 (203 nm 检测) 分离, 用 80% 甲醇洗脱并收集的相应洗脱组分, 浓缩并经氯仿-甲醇中重结晶得化合物 I 纯品 104 mg。

化合物 I 白色结晶型粉末, 熔点 75.1–76.2 °C, $[\alpha]_D^{31} +37.7^\circ$ (c 1.0, CHCl_3), 分子式 $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_4$ 。正离子 TOF-MS m/z : 428 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 411

$[M+H]^+$, 393 $[M+H-H_2O]^+$, 375 $[M+H-2H_2O]^+$; 负离子 TOF-MS m/z : 455 $[M-H+HCOOH]^-$, 445 $[M+C1]^-$, 391 $[M-H-H_2O]^-$; 正离子 HR-TOF-MS m/z : 实测值 411.3475 $[M+H]^+$, 计算值 411.3474 ($[M+H]^+$)。UV λ_{\max} nm (log ϵ) in MeOH: 201 (3.64, 末端吸收)。IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3394, 3282 (OH), 2920, 2850 (CH_3 & CH_2), 1718 (CO), 1465, 1332, 1166 (C-O), 1070, 1004, 651。CD λ_{\max} nm (mdeg) in MeOH at 1.0 mg/ml: 317 (-21.3715), 283.7 (+58.3594), 206.6 (-30.5037), 202.6 (-1.16184)。 ^1H 及 ^{13}C NMR 数据见表 1。

表 1 化合物 I 在氘代氯仿中的 600 MHz ^1H 及 400 MHz ^{13}C 核磁共振数据^{a)}

标位	δ_{H} (J in Hz)	COSY ^{b)}	HMBC ^{c)}	δ_{C}
1	—			210.98 s
2	Ha 2.98 dd (12.8, 11.5)	He-2, H-3	C-1, C-3, C-4, C-6	41.81 t
	He 2.69 ddd (12.8, 4.5, 0.9)	Ha-2, H-3, H-4	C-1, C-3, C-4	
3	3.98 m	Ha-2, He-2, 3-OH, H-4		71.96 d
4	4.20 m	He-2, H-3, Ha-5, He-5	C-6	68.50 d
5	Ha 1.70 dd (14.9, 3.5)	H-4, He-5	C-6, C-7	40.45 t
	He 2.43 dd (14.9, 3.9)	H-4, Ha-5	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7	
6	—			77.40 s
7	Ha 2.07 ddd (14.2, 12.3, 4.5)	Hb-7, Ha-8, Hb-8	C-5, C-6, C-8, C-9	39.64 t
	Hb 1.77 ddd (14.2, 12.4, 4.6)	Ha-7, Ha-8, Hb-8	C-1, C-5, C-6, C-8, C-9	
8	Ha 1.39 m	Ha-7, Hb-7, Hb-8	C-9, C-10	23.09 t
	Hb 1.02 m	Ha-7, Hb-7, Ha-8	C-9, C-10	
9-17	1.22-1.30 ^{d)} m	Ha-8, Hb-8, H-18	C-8, 9~C-17, 18, 19	29.5-29.8 ^{d)} t
18	1.29-1.35 ^{d)} m	H-17, H-19	C-16, C-17, C-19, C-20	29.5-29.8 ^{d)} t
19	2.02 (2H) m	H-18, H-20	C-17, C-18, C-20, C-21	26.89 ^{d)} t
20	5.35 AB type	H-19, H-21	C-19, C-22	129.91 ^{d)} d
21	5.35 AB type	H-20, H-22	C-19, C-22	129.82 ^{d)} d
22	2.02 (2H) m	H-21, H-23	C-20, C-21, C-23, C-24	27.18 ^{d)} t
23	1.29-1.35 ^{d)} m	H-22, H-24	C-21, C-22, C-24, C-25	22.33 t
24	1.29-1.35 ^{d)} m	H-23, H-25	C-22, C-23	31.96 t
25	0.90 (3H) t (7.1)	H-24	C-23, C-24	14.00 q
3-OH	2.42 br s	H-3	C-3, C-4	—
4-OH	2.46 br s	H-4	C-3, C-4, C-5	—
6-OH	3.58 s		C-1, C-5, C-6, C-7	—

a): 表中信号根据 DEPT、PFG ^1H - ^1H COSY、PFG HMQC、PFG HMBC 及 NOE 差谱解析结果予以归属。b): 该栏中的代号分别表示在 PFG ^1H - ^1H COSY 谱中与同一行标位中的氢核给出耦合相关信号的氢核。c): 该栏中的代号分别表示在 PFG HMBC 谱 ($^1J_{\text{CH}}=8.3$ 或 4 Hz) 中与同一行标位中的氢核给出 HMBC 耦合相关信号的碳原子。d)、e)、f): 该信号因与其它信号相互重叠而未能予以确切归属。h)、i): 带有相同上标的两个信号之间信号归属可互换。

化合物 I 的 NOE 差谱测试分析结果:当照射 Ha-2 时,在 He-2、Ha-7、Hb-7 上分别观测到 NOE 信号;当照射 H-3 时,在 He-2、H-4、Ha-5、He-5、3-OH 上分别观测到 NOE 信号;当照射 Ha-5 时,在 H-3、H-4、He-5 上分别观测到 NOE 信号;当照射 Ha-7 时,在 Ha-2、He-5、Hb-7、Hb-8、H-9 上分别观测到 NOE 信号;当照射 He-7 时,在 Ha-7 上观测到 NOE 信号。

实施例 2. 化合物 II 的提取与分离精制

第一步骤: 含有化合物 II 的提取物的制备

参照实施例 1 中的第一步骤,同法操作,由 6 公斤南酸枣原料获得了含化合物 II 的主要提取物即氯仿提取物 110 克。

第二步骤: 含化合物 II 的层析粗组分的制备

取含化合物 II 的氯仿提取物 60 克,干法上减压硅胶柱(柱床 7.5 cm × 18.5 cm),用石油醚(P)-丙酮(A)、甲醇溶剂系统进行洗脱。通过增加石油醚(P)中丙酮(A)的用量来梯度递增洗脱溶剂的极性或更换成甲醇来加大洗脱溶剂的极性。根据薄层检测及活性测试结果合并馏分,得到 6 个组分 Fr-1 (3.3 g, $V_F: V_A=100:1$ 洗脱部分)、Fr-2 (2.1 g, $V_F: V_A=50:1$ 洗脱部分)、Fr-3 (2.2 g, $V_F: V_A=10:1$ 洗脱部分)、Fr-4 (11.0 g, $V_F: V_A=5:1$ 洗脱部分)、Fr-5 (14.0 g, $V_F: V_A=2:1$ 洗脱部分)和 Fr-6 (24.5 g, 甲醇洗脱部分)。将 Fr-5 (14.0 g) 干法上减压硅胶柱(柱床 5.0 cm × 22 cm),用氯仿(C)-乙酸乙酯(Ac)、丙酮、甲醇系统洗脱,根据薄层检测及活性测试结果合并馏分,得到 6 个组分 Fr-5-1 (4.3 g, $V_C: V_{Ac}=8:1$ 洗脱部分)、Fr-5-2 (1.0 g, $V_C: V_{Ac}=4:1$ 洗脱部分)、Fr-5-3 (3.8 g, $V_C: V_{Ac}=2:1$ 洗脱部分)、Fr-5-4 (1.0 g, 乙酸乙酯洗脱部分)、Fr-5-5 (1.9 g, 丙酮洗脱部分)、Fr-5-6 (0.9 g, 甲醇洗脱部分)。其中,Fr-5-5 为含化合物 II 的层析粗组分。

第三步骤: 化合物 II 的纯化和精制

将 Fr-5-5 (1.9 g) 用适量氯仿-甲醇(1:1)溶解,上 Sephadex LH-20 柱(柱床 3.8 cm × 36 cm),用氯仿-甲醇(1:1)洗脱,按洗脱

顺序依次得到组分 Fr-5-5-1 (0.8 g)、Fr-5-5-2 (0.4 g) 和 Fr-5-5-3 (0.7 g)。化合物 II 主要集中在 Fr-5-5-2 中, 因此, 将 Fr-5-5-2 通过制备硅胶薄层层析(氯仿-甲醇 7:1 展开)分离, 得到化合物 II 的粗品(230 mg)。该化合物 II 粗品在 RP-18 反相分析高效液相层析(203 nm 检测)中, 当用 83% 甲醇洗脱时, 在保留时间 59 分钟处给出化合物 II 的单一洗脱峰, 遂进行相同条件放大实验分离精制, 经 RP-18 反相制备高效液相层析(203 nm 检测)分离, 收集相应洗脱组分, 浓缩并经甲醇中重结晶操作得到化合物 II 纯品 135 mg。

化合物 II 白色结晶型粉末, 熔点 92-94°C, $[\alpha]_D^{31} +31.4^\circ$ (c 1.0, CHCl_3), 分子式 $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_4$ 。正离子 TOF-MS m/z : 428 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 411 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 393 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 375 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$; 负离子 TOF-MS m/z : 469 $[\text{M}-\text{H}+\text{CH}_3\text{COOH}]^-$, 455 $[\text{M}-\text{H}+\text{HCOOH}]^-$, 445 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 391 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$; 正离子 HR-TOF-MS m/z : 实测值 411.3487 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 411.3474 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。UV λ_{\max} nm ($\log \varepsilon$) in MeOH: 200 (3.69, 末端吸收)。IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3383 (OH), 2922, 2850 (CH_3 & CH_2), 1726 (CO), 1465, 1457, 1366, 1080 (C-O), 699, 644, 621。CD λ_{\max} nm (mdeg) in MeOH at 1.0 mg/ml: 319.5 (-16.6417), 284.4 (+107.044), 210.6 (+9.10091), 204.8 (+30.7266)。 ^1H 及 ^{13}C NMR 数据见表 2。

表2 化合物II在氘代甲醇中的600 MHz ^1H 及400 MHz ^{13}C 核磁共振数据^{a)}

标位	δ_{H} (J in Hz)	COSY ^{b)}	HMBC ^{c)}	δ_{C}
1	—			212.24 s
2	Ha 2.64 dd (13.5, 7.1)	He-2, H-3	C-1, C-3, C-4, C-6	43.70 t
	He 2.77 dd (13.5, 3.9)	Ha-2, H-3	C-1, C-3, C-4	
3	3.84 m	Ha-2, He-2, H-4	C-1, C-4, C-5	75.08 d
4	3.95 m	H-3, Ha-5, He-5	C-2, C-3, C-6	70.96 d
5	Ha 1.79 dd (14.2, 6.4)	H-4, He-5	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7	42.02 t
	He 2.11 dd (14.2, 4.1)	H-4, Ha-5	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7	
6	—			78.76 s
7	Ha 1.89 ddd (13.5, 12.7, 4.2)	Hb-7, Ha-8, Hb-8	C-5, C-6, C-8	39.22 t
	Hb 1.62 ddd (13.5, 12.7, 4.1)	Ha-7, Ha-8, Hb-8	C-1, C-5, C-6, C-8	
8	Ha 1.37 m	Ha-7, Hb-7, Hb-8	C-7, C-9, C-10	24.17 t
	Hb 1.17 m	Ha-7, Hb-7, Ha-8	C-7, C-9, C-10	
9	1.25-1.30 ^{d)} m	Ha-8, Hb-8	C-7, C-10, C-11	30.62 ^{e)} t
10	1.25-1.30 ^{d)} m	H-9, H-11	C-9, C-11, C-12	30.32 ^{e)} t
11-16	1.25-1.30 ^{d)} m	H-10, H-12	C-8, C9~C-17, 18	30.6-30.8 ^{d)} t
17	1.25-1.30 ^{d)} m	H-16, H-18	C-15, 16, C-18, C-19	31.20 t
18	1.30-1.36 ^{d)} m	H-17, H-19	C-16, C-17, C-19, C-20	30.6-30.8 ^{d)} t
19	2.02 (2H) m	H-18, H-20	C-17, C-18, C-20, C-21	27.89 ^{g)} t
20	5.33 AB type	H-19, H-21	C-19, C-22	130.80 d
21	5.33 AB type	H-20, H-22	C-19, C-22	130.80 d
22	2.02 (2H) m	H-21, H-23	C-20, C-21, C-23, C-24	28.11 ^{h)} t
23	1.30-1.36 ^{d)} m	H-22, H-24	C-21, C-22, C-24	23.37 t
24	1.30-1.36 ^{d)} m	H-23, H-25	C-22, C-23	33.14 t
25	0.90 (3H) t (6.9)	H-24	C-23, C-24	14.31 q

a): 表中信号根据 DEPT、PFG ^1H - ^1H COSY、PFG HMQC、PFG HMBC 及 NOE 差谱解析结果予以归属。b): 该栏中的代号分别表示在 PFG ^1H - ^1H COSY 谱中与同一行标位中的氢核给出偶合相关信号的氢核。c): 该栏中的代号分别表示在 PFG HMBC 谱($^1J_{\text{CH}}=8.3$ 或 4 Hz) 中与同一行标位中的氢核给出 HMBC 偶合相关信号的碳原子。d)、f)、g): 该信号因与其它信号相互重叠而未能予以确切归属。e)、i): 带有相同上标的两个信号之间信号归属可互换。

化合物 II 的 NOE 差谱测试分析结果: 当照射 He-2 时, 在 Ha-2 和 H-3 上分别观测到 NOE 信号; 当照射 H-3 时, 在 He-2 和 Ha-5 上分别观测到 NOE 信号; 当照射 H-4 时, 在 Ha-2 和 He-5 上分别观测到 NOE; 当

照射 Ha-5 时, 在 H-3、He-5、Ha-7、Hb-7 上分别观测到 NOE 信号; 当照射 He-5 时, 在 H-4、Ha-5、Ha-7 上分别观测到 NOE 信号; 当照射 Ha-7 时, 在 He-5、Hb-7、Ha-8、H-9 上分别观测到 NOE 信号; 当照射 He-7 时, 在 Ha-5、Ha-7、Ha-8、H-9 上观测到 NOE 信号。

实施例 3. 生物活性测试

实验样品及实验方法

被测样品溶液的配制: 分别取上述实施例 1 中分离精制的化合物 I 和实施例 2 中分离精制的化合物 II, 精密称取适量, 用甲醇配制成所需浓度的溶液, 供测活性。

细胞系及细胞培养: 活性测试采用小鼠乳腺癌 tsFT210 细胞系、人大肠癌 HCT-15 细胞系、人宫颈癌 HeLa 细胞系、人乳腺癌 MCF-7 细胞系、人卵巢癌 A2780 细胞系。

细胞用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基, 在 32°C (tsFT210 细胞) 或 37°C (HCT-15、HeLa、MCF-7 和 A2780 细胞) 于通入 5%二氧化碳的培养箱中继代培养。

细胞增殖抑制活性测试方法 (丽丝胺罗丹明 B 法即 SRB 法): 取对数生长期的人大肠癌 HCT-15 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人卵巢癌 A2780 细胞, 用新鲜的 RPMI-1640 培养基配制成密度为每毫升 2×10^5 个细胞的细胞悬液, 按每孔 200 微升接种于 96 孔板中, 每孔加入 2 微升不同浓度的样品或空白溶液, 37°C 下培养 24 小时。取药物作用下培养后的细胞, 首先在光学显微镜下观察药物处理引起的形态学变化, 判断有无细胞周期抑制, 细胞凋亡或细胞坏死的形态学特征。继而吸去上清液并往每孔细胞中加入 20%三氯醋酸 50 微升, 置于 4°C 固定 1 小时, 用水冲洗 5 次并空气干燥。每孔加入 0.4% SRB 的醋酸溶液 50 微升并在室温静置 30 分钟。用 1%醋酸水清洗 4 次, 除去未结合的游离 SRB 染料。每孔加入 150 微升 Tris 缓冲液 (10 mmol/L, pH 10.5) 溶解蛋白结合染料并利用 MD 公司产 SPECTRA MAX Plus 型酶标仪测定每孔

在 520 nm 处的光密度 (OD) 值。在同一块 96 孔板中样品的每个浓度均设置三孔, 另设三孔空白对照, 取三孔平均 OD 值按 $IR\% = (OD_{\text{空白对照}} - OD_{\text{样品}}) / OD_{\text{空白对照}} \times 100\%$ 式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率 (IR%)。

流式细胞术测试方法: 取对数生长期的 tsFT210 细胞, 用新鲜的 RPMI-1640 培养基配制成密度为每毫升 2×10^5 个细胞的细胞悬液, 按每孔 0.5 毫升接种于 24 孔板中, 每孔加入 5 微升不同浓度的样品溶液, 32°C 下培养 17 小时。取药物作用下培养后的细胞, 首先在光学显微镜下观察药物处理引起的形态学变化, 判断有无细胞周期抑制, 细胞凋亡或细胞坏死的形态学特征, 必要时进行拍照。继而将细胞分别从 24 孔板转移至 1.5 毫升 Eppendorf 离心管中, 4°C 下 3000 转/分离心 3 分钟, 吸去上清液, 加 0.5 毫升磷酸缓冲溶液 (PBS) 震荡洗涤一次, 相同条件下离心收集细胞, 加 150 微升碘化丙啶 (PI) 水溶液 (在 100 毫升水中含 5 毫克 PI、100 毫克柠檬酸钠和 200 毫克 NP-40), 4°C 下染色 30 分钟后, 加入 150 微升 PBS 稀释, 用流式细胞仪分析测定细胞中 DNA 的含量分布。

实验结果

化合物 I 和化合物 II 对人癌细胞增殖的抑制活性

在 SRB 法测试中, 化合物 I 和化合物 II 对人大肠癌 HCT-15 细胞的细胞增殖均显示了一定的抑制活性, 不同浓度的化合物 I 和化合物 II 对人大肠癌 HCT-15 细胞增殖的抑制活性测试结果见表 3。

表 3 化合物 I 和化合物 II 抑制人大肠癌 HCT-15 细胞增殖的 SRB 法测试结果

化合物	不同浓度的化合物 I 和 II 对 HCT-15 细胞增殖的抑制率 (%)						IC ₅₀ (μM)
	200 μM	100 μM	10 μM	1 μM	0.1 μM	0.01 μM	
化合物 I	78.1%	76.5%	33.3%	9.6%	4.9%	4.3%	18.3
化合物 II	85.3%	84.0%	46.7%	43.9%	45.3%	47.7%	16.4

在 SRB 法测试中, 化合物 I 对人宫颈癌 HeLa 细胞、人卵巢癌 A2780 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖也显示出不同程度的抑制活性, 不同

浓度的化合物 I 对这些人癌细胞增殖的抑制活性测试结果见表 4。

表 4 化合物 I 抑制人癌细胞增殖的 SRB 法测试结果

细胞株	不同浓度的化合物 I 对人癌细胞增殖的抑制率 (%)					IC ₅₀ (μM)
	200 μM	100 μM	10 μM	1 μM	0.1 μM	
HeLa	85.7%	95.5%	55.6%	40.3%	26.7%	9.4
A2780	71.2%	64.4%	8.8%	2.3%	2.0%	51.1
MCF-7	87.7%	86.6%	27.5%	28.1%	21.6%	19.1

表 3 和表 4 结果表明, 在 SRB 法测试中, 化合物 I 和化合物 II 对所测试的癌细胞均显示了不同程度的抑制癌细胞增殖的抗癌活性。

流式细胞术结果

流式细胞术检测分析结果: 将 tsFT210 细胞用不同浓度的化合物 I 和化合物 II 处理后用流式细胞术进行了检测分析。结果表明: 化合物 I 在每毫升 3.1 微克至每毫升 12.5 微克的浓度范围内主要表现出细胞周期抑制活性, 将 tsFT210 细胞的细胞周期抑制在 G0/G1 期; 而当浓度超过每毫升 12.5 微克以上时, 主要呈现细胞凋亡诱导活性, 在 sub-G0/G1 区均检测到明显的凋亡峰, 且随浓度增高, 凋亡峰愈加显著; 当浓度在每毫升 50 微克以上时, 开始检测到一定的坏死性细胞毒活性。化合物 II 则在每毫升 6.2 微克至每毫升 25 微克的浓度范围内主要将 tsFT210 细胞的细胞周期抑制在 G0/G1 期, 在每毫升 25 微克以上时同时还显示较弱的 G2/M 期抑制活性, 当浓度在每毫升 50 微克以上时开始呈现一定的 S 期抑制活性, 当浓度在每毫升 100 微克或在该浓度以上时出现坏死性细胞毒活性。上述流式细胞术分析检测结果与下述显微镜下观测的形态学检测结果基本吻合。

形态学检测结果: 在光学倒置显微镜下观察到, tsFT210 细胞当用每毫升 12.5 微克的化合物 I 和 25 微克的化合物 II 处理时较少数量的细胞开始出现凋亡细胞的形态特征, 当用每毫升 25 微克以上的化合物 I 处理时, 视野中绝大多数呈现典型的凋亡细胞的形态即雪花瓣状细胞或膜裹着细胞碎片; 而用 50 微克以上的化合物 II 处理时, 视野中凋亡细

胞的数目也有所增加，但化合物 II 诱导癌细胞凋亡的活性比化合物 I 明显地弱很多。当用每毫升 50 微克以上的化合物 I 和化合物 II 处理时，有一部分癌细胞开始呈不同程度的典型的坏死性细胞的形态学特征，且随着化合物 I 和 II 的浓度增加，坏死性细胞毒活性也增强，表明化合物 I 在高浓度时对哺乳动物癌细胞具有一定的直接杀伤性细胞毒活性。

结论

上述实验结果表明，化合物 I 和化合物 II 可通过抑制细胞周期、诱发癌细胞发生凋亡或对癌细胞的直接杀伤性细胞毒活性来发挥其抑制癌细胞增殖的抗肿瘤作用。因此，本发明的化合物可作为抗肿瘤剂用于肿瘤的治疗，也可作为诱发细胞凋亡或抑制细胞周期的低分子探针用于探索生命现象本质的生命科学研究中。

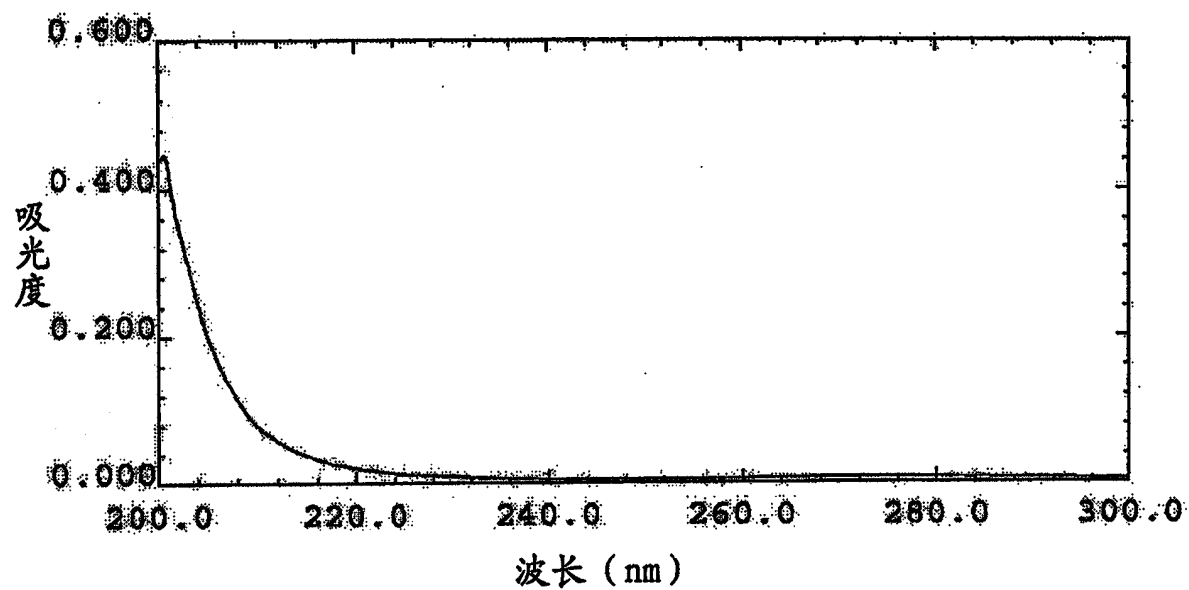


图 1

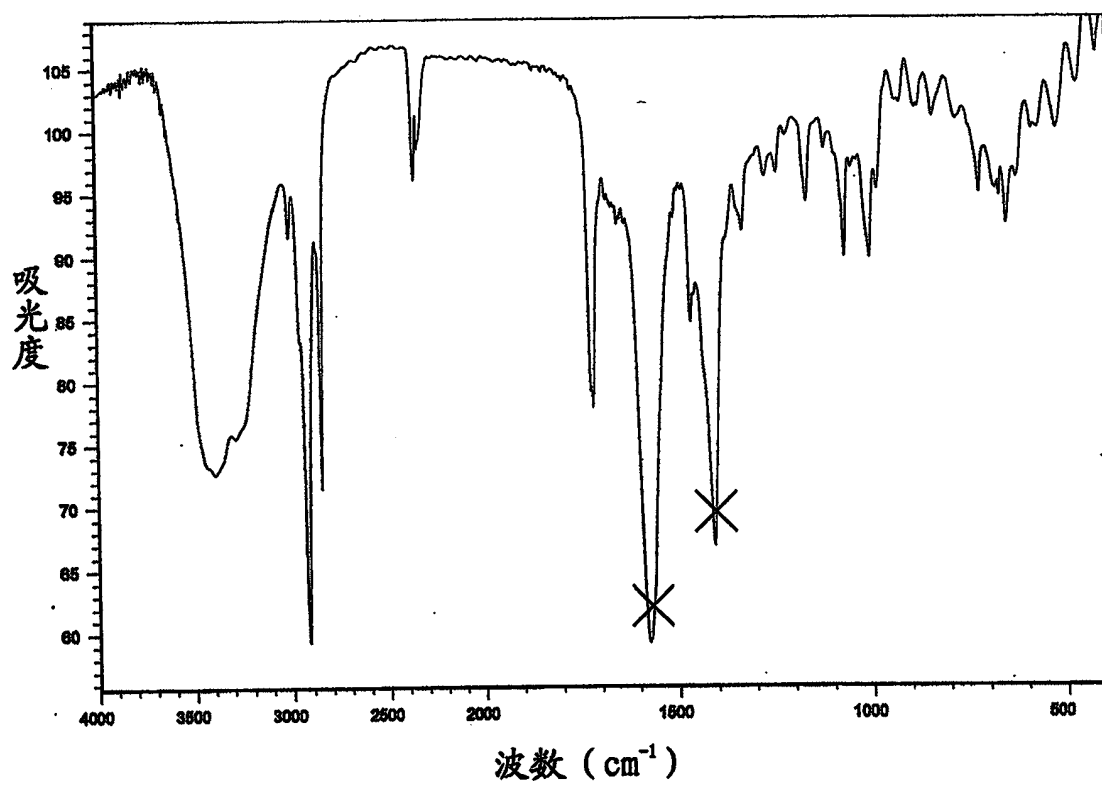


图 2

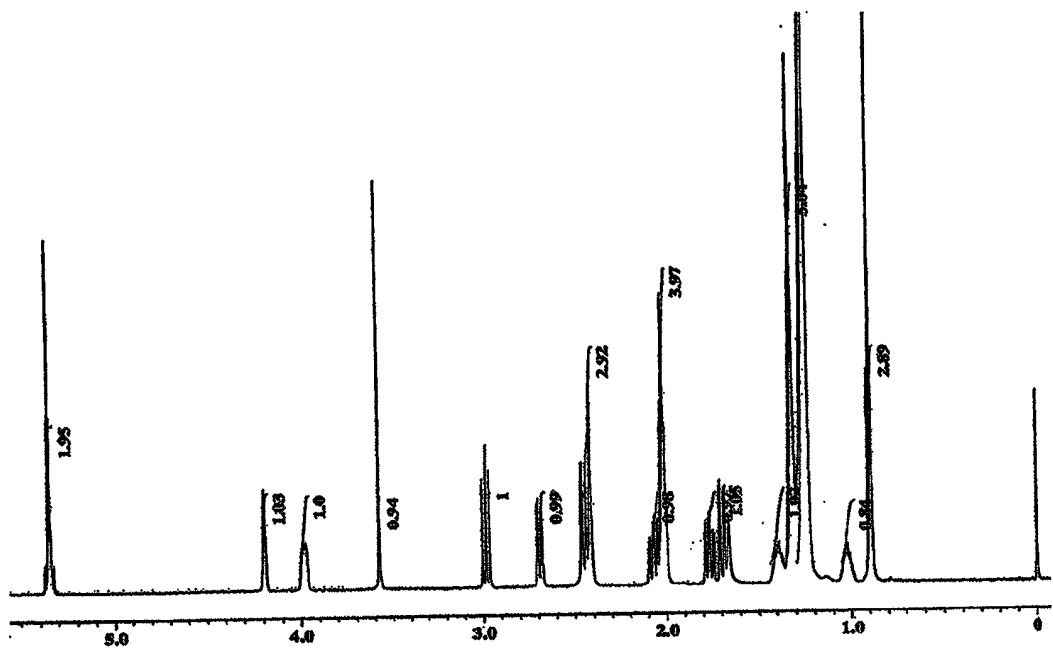


图 3

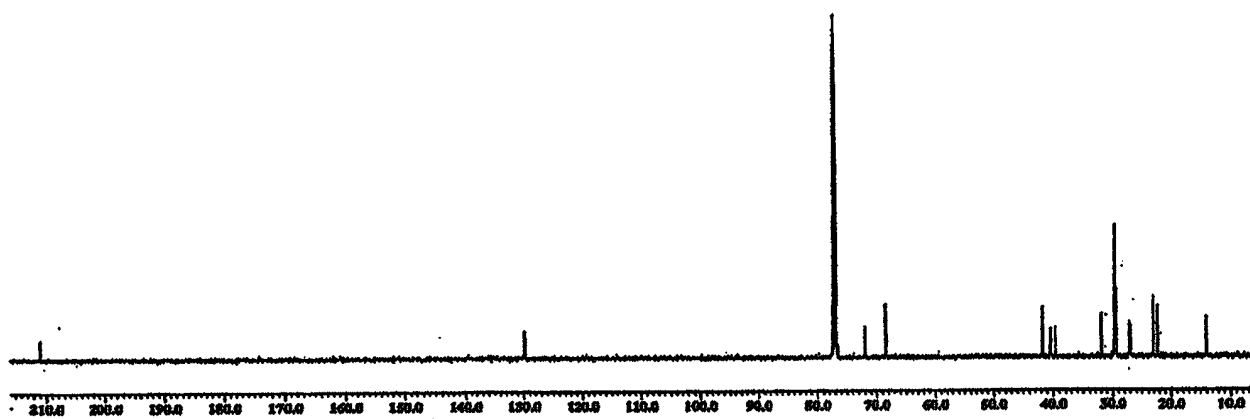


图 4

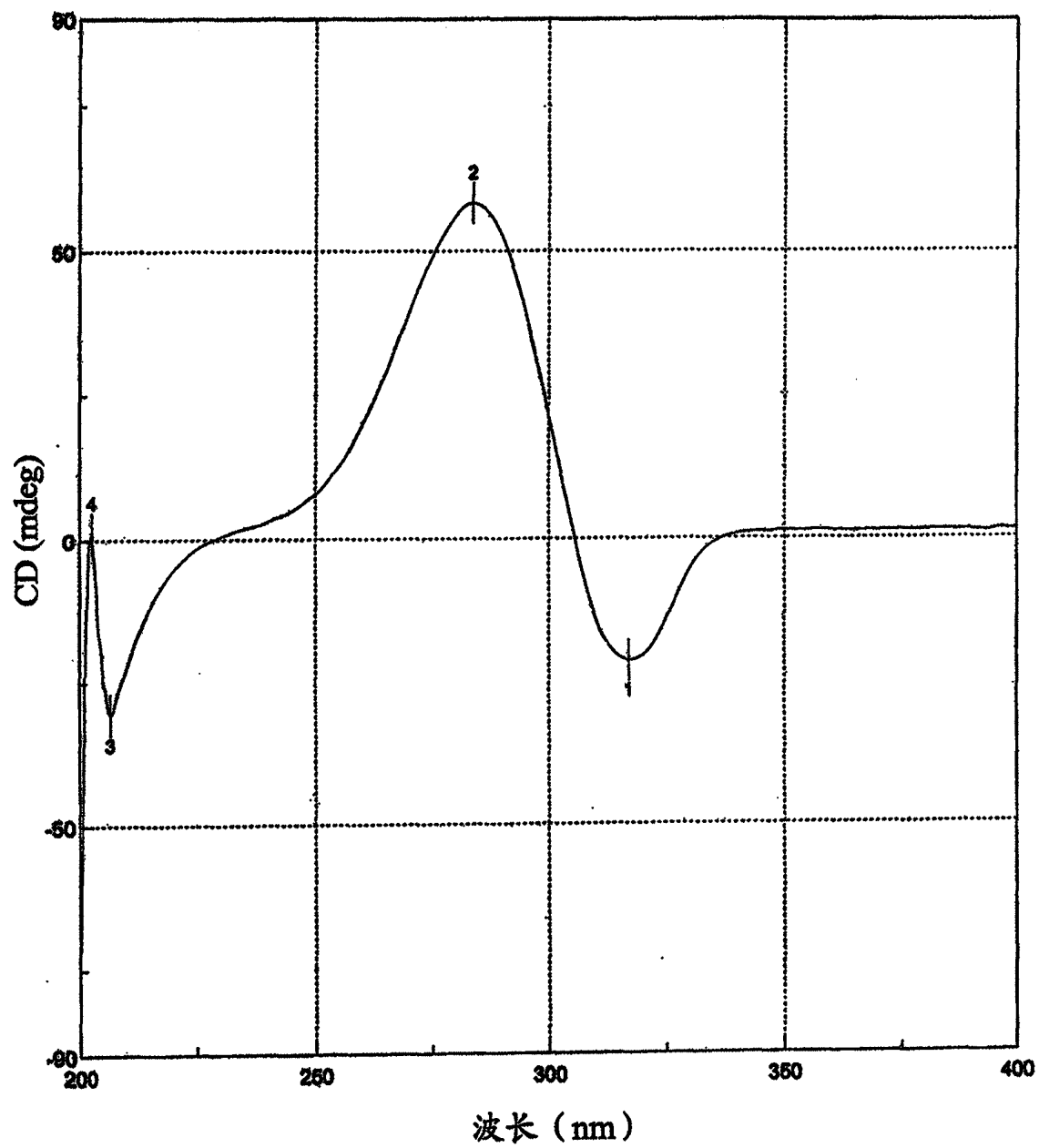


图 5

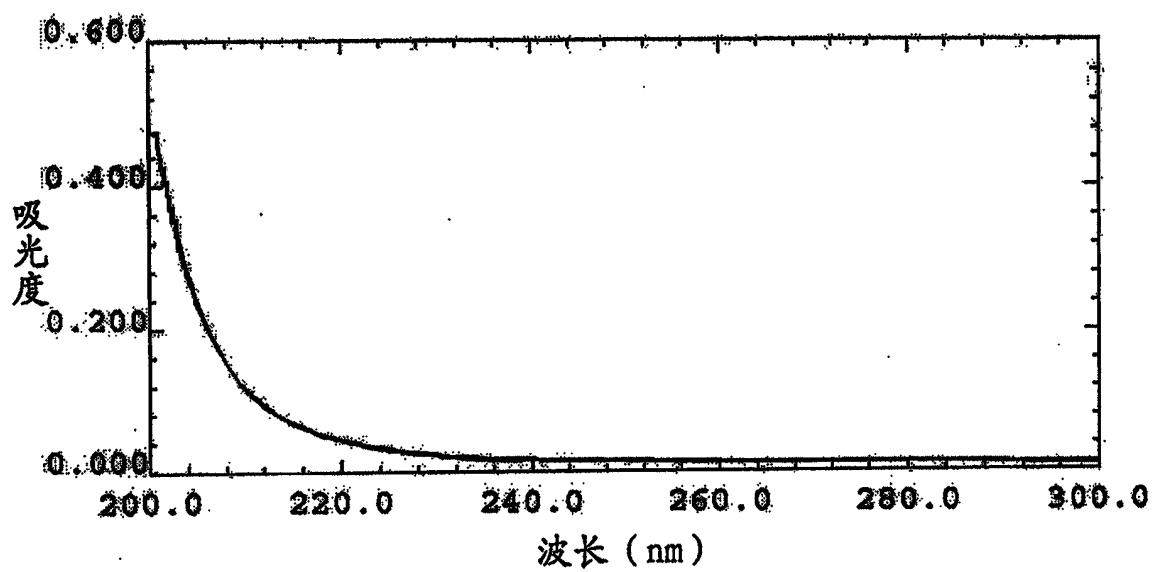


图 6

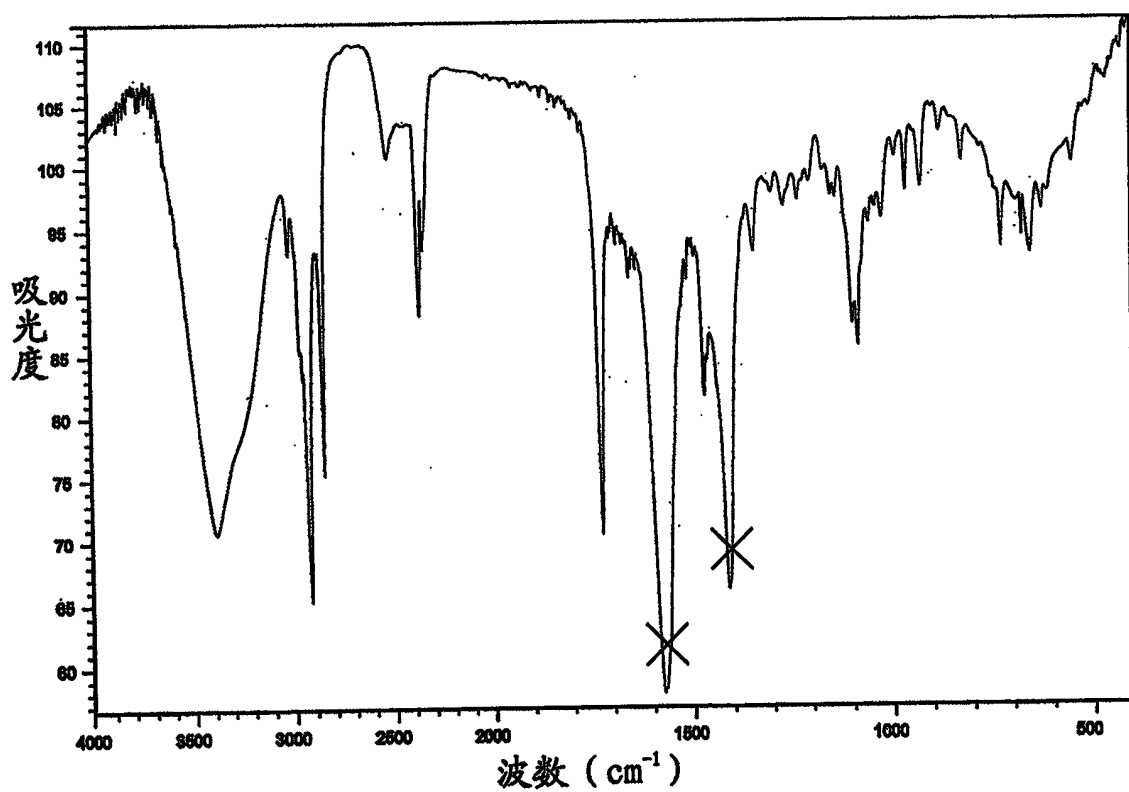


图 7

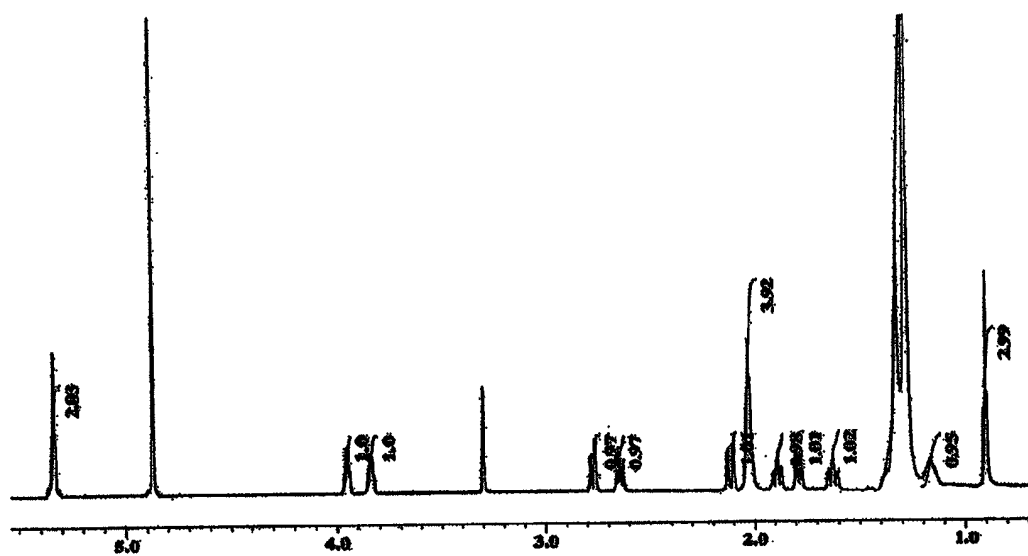


图 8

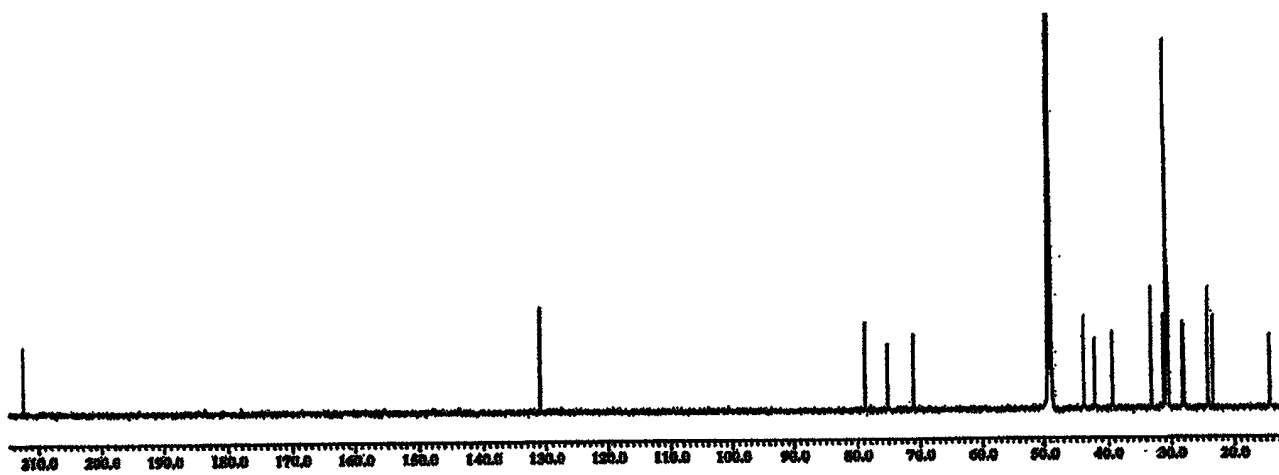


图 9

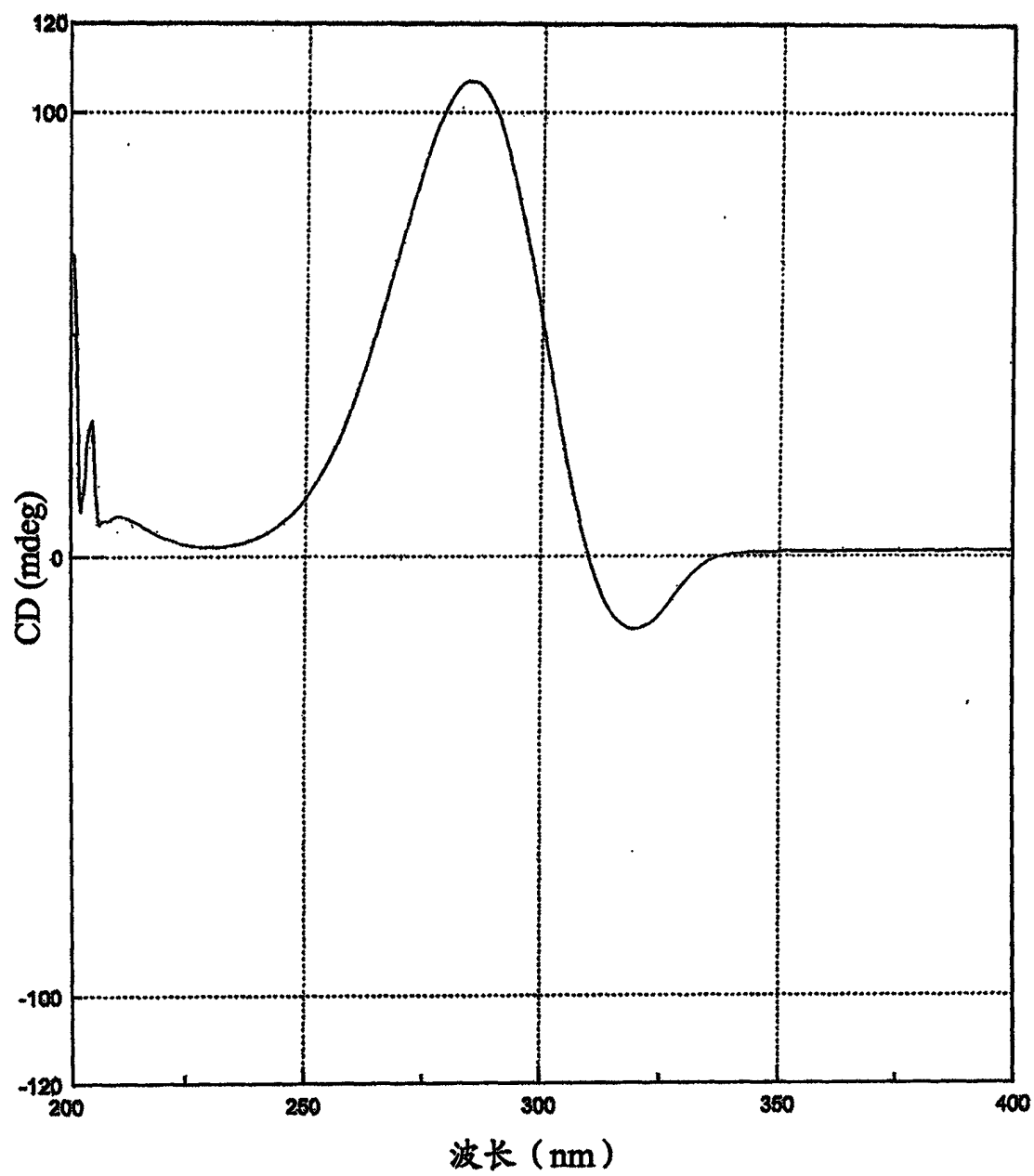


图 10

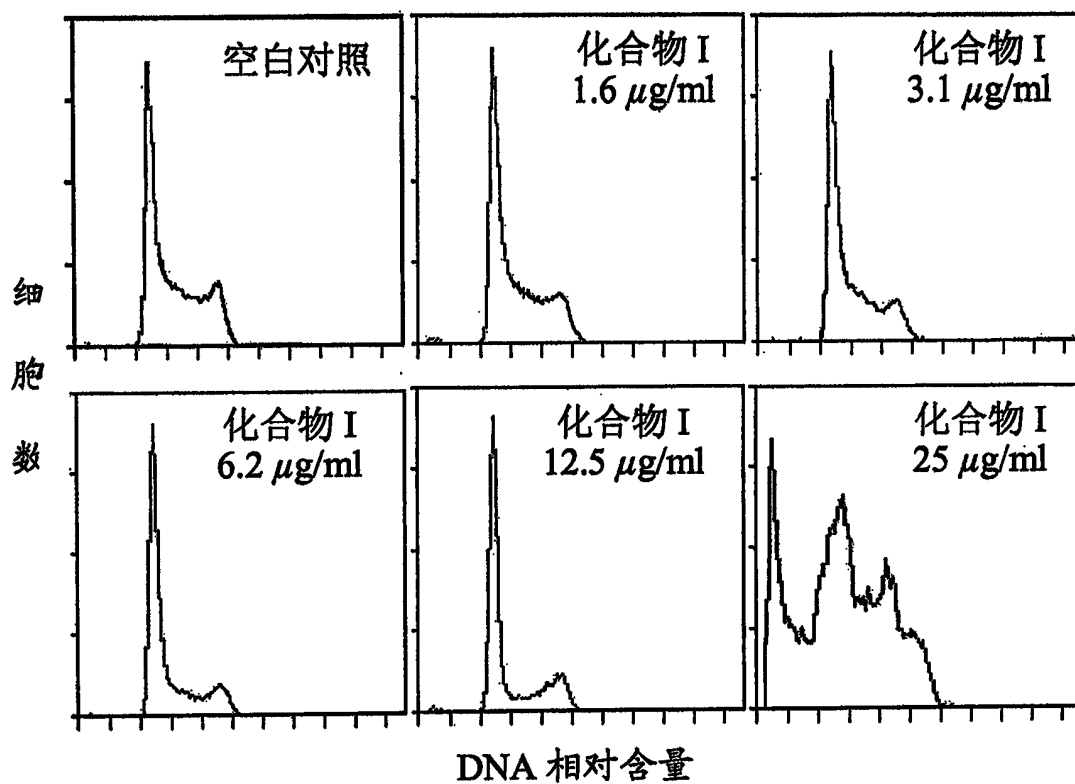


图 11

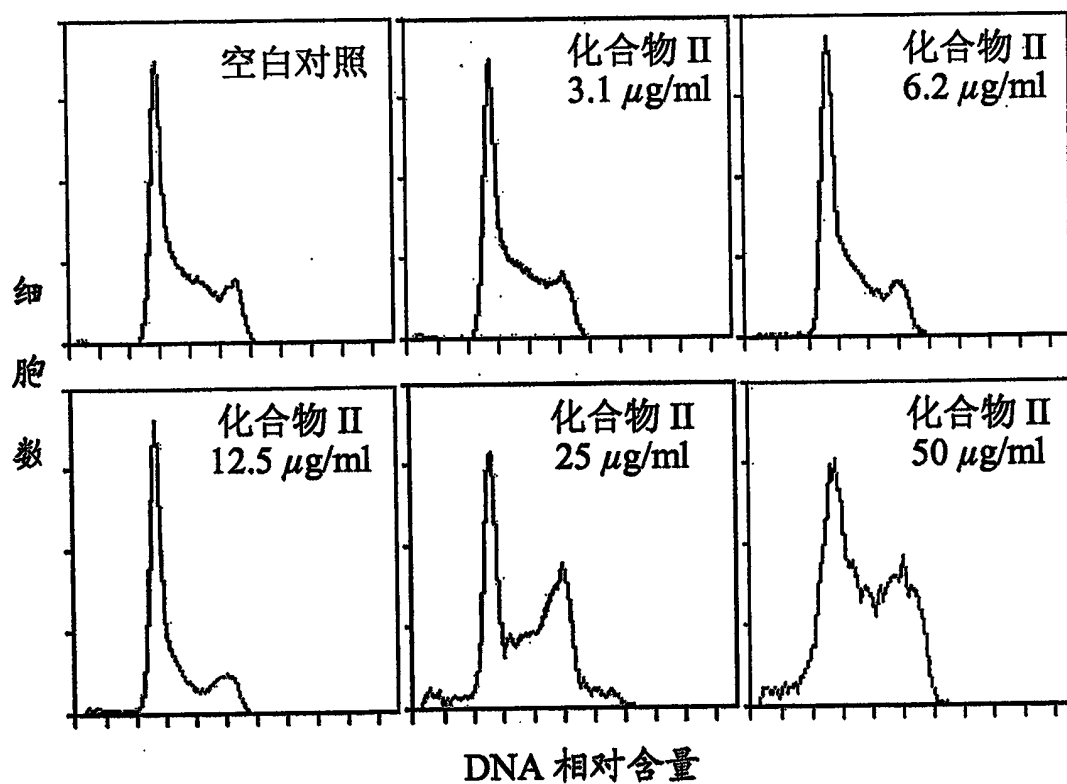


图 12