



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102826982 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 19

(21) 申请号 201210282524. 5

(22) 申请日 2012. 08. 09

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市浙大路 38 号

(72) 发明人 程翼宇 王毅 张玉峰

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 张法高 赵杭丽

(51) Int. Cl.

C07C 49/743 (2006. 01)

C07C 45/78 (2006. 01)

C07D 303/32 (2006. 01)

A61K 31/336 (2006. 01)

A61K 31/122 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

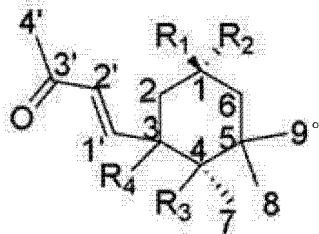
权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

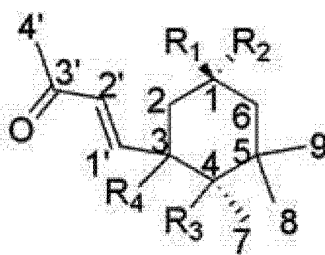
一种来自返魂草的单萜类化合物及其提取方
法和用途

(57) 摘要

本发明提供一种来自返魂草的单萜类化合物, 具体为是化合物 I 和化合物 II。将返魂草粉碎后加热提取、浓缩, 用正相硅胶柱行分离、洗脱, 浓缩干燥后经制备液相色谱分离得到。本发明单萜类化合物具有较好的抗炎活性, 可在制备抗炎药物中的应用, 单萜化合物的通式如下。



1. 一种来自返魂草的单萜类化合物,其特征在于,所述的单萜化合物的通式如下:



其中:

化合物 I : $R_1+R_2=0$, $R_3=OH$, $R_4=H$, $\Delta^{2,3}$,

化合物 II : $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=$ $R_4=0$ 。

2. 权利要求 1 所述的一种来自返魂草的单萜类化合物的制备方法,其特征在于,通过以下步骤实现:将返魂草药材粉碎后,加入 3-8 倍量水或 10%~90% 乙醇-水溶液,加热回流 1-2 小时,提取 1-3 次,合并提取液,将提取液浓缩成浸膏,并将其与硅胶进行拌样,用正相硅胶柱对其进行分离,首先用体积比为 5:1 的石油醚和乙酸乙酯洗脱,得洗脱液 E,弃之,再用体积比为 3:1 的石油醚和乙酸乙酯洗脱,得洗脱液 F,洗脱液 F 浓缩干燥后经制备液相色谱分离得到化合物 I 和化合物 II,制备色谱的分离条件:色谱柱为制备柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 250×21.2 mm, 7 μ m,流动相为水和甲醇,梯度洗脱程序如下:0 min, 10% 甲醇-水;60 min, 50% 甲醇-水;流速:10ml/min,柱温为室温,检测波长:254 nm,收集 31.0min 的色谱峰,减压回收溶剂,得化合物 I,收集 34.5min 的色谱峰,减压回收溶剂,得化合物 II。

3. 根据权利要求 1 所述的一种来自返魂草的单萜类化合物在制备抗炎药物中的应用,其特征在于,所述单萜类化合物为化合物 I 和化合物 II。

4. 根据权利要求 3 所述的应用,其特征在于,所述药物的制剂形式为固体制剂或液体制剂。

一种来自返魂草的单萜类化合物及其提取方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属中药领域,具体涉及中药有效成分的提取、分离与制备工艺领域,尤其涉及中药返魂草中提取分离具有抗炎活性的化合物及其应用。

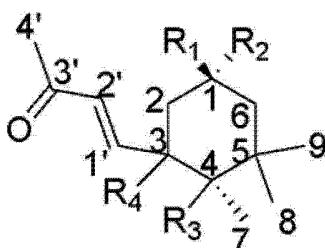
背景技术

[0002] 返魂草是菊科千里光属多年生草本植物麻叶千里光(*Senecio cannabifolius* Less.)的干燥地上部分,具有清热祛痰、止咳的功效。现代药理研究表明,返魂草有抗菌、抗炎及抗病毒等作用(杨秀东等,长春中医药大学学报,2006,22,70-71.);现已被开发的制剂有肺宁颗粒(返魂草颗粒)、肺宁口服液等。临床上常用于治疗慢性支气管炎咳嗽。有研究报道返魂草中的酚酸类成分具有抗菌活性(吴斌等. 中草药,2005,36(10):1447-1450;吴斌等. 中国药物化学杂志,2005,15(3):178~179;吴斌等,天然产物研究与开发,2005,17(4):440-443.),但返魂草中具有抗炎活性的化学成分尚不清楚。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种从返魂草中提取的单萜类化合物,所述的单萜化合物的通式如下:

[0004]



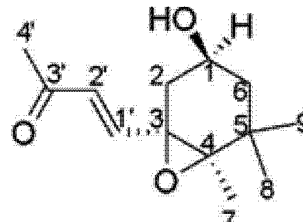
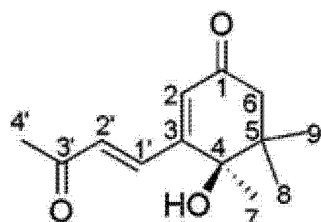
[0005] 其中:

[0006] 化合物 I : $R_1+R_2=0$, $R_3=OH$, $R_4=H$, $\Delta^{2,3}$,

[0007] 化合物 II : $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=R_4=0$ 。

[0008] 化合物 I 和化合物 II 的结构式如下:

[0009]



[0010] 化合物 I 化合物 II

[0011] 具体有化合物 I (E, 4R)-4-羟基-4,5,5-三甲基-3-(3-氧代丁烯)环己烯-2-酮 [(E, 4S)-4-hydroxy-4,5,5-trimethyl-3-(3-oxobut-1-enyl)cyclo-hex-2-enone] 和 化合物 II (E)-4-((1S, 3R, 4R)-1-羟基-4,5,5-三甲基-7-氧代桥环[4.1.0]庚烯)-1-丁

烯-3-酮 [(E, 3S)-4-(3-hydroxy-5, 5, 6-trimethyl-7-oxabicyclo[4. 1. 0]heptan-1-yl)but-3-en-2-one]。

[0012] 本发明的另一目的是从返魂草中提取的单萜类化合物的制备方法, 通过以下步骤实现: 将返魂草药材粉碎后加入提取溶剂, 加热提取得提取液, 将提取液浓缩成浸膏, 并将其与硅胶进行拌样, 用正相硅胶柱对其进行分离, 用石油醚和乙酸乙酯作为洗脱溶剂, 得洗脱液, 洗脱液经浓缩干燥后得到组分, 再经制备液相色谱分离得到化合物 I 和化合物 II。

[0013] 优选的化合物 I 和化合物 II 制备方法, 包括下列步骤: 将返魂草药材粉碎后, 加入 3-8 倍量水或 10%~90% 乙醇-水溶液, 加热回流 1-2 小时, 提取 1-3 次, 合并提取液, 将提取液浓缩成浸膏, 并将其与硅胶进行拌样, 用正相硅胶柱对其进行分离, 首先用体积比为 5:1 的石油醚 (60-90℃) 和乙酸乙酯作为洗脱溶剂洗脱, 得洗脱液 E, 弃之。再用体积比为 3:1 的石油醚 (60-90℃) 和乙酸乙酯作为洗脱溶剂洗脱, 得洗脱液 F。洗脱液 F 浓缩干燥后经制备液相色谱分离得到化合物 I 和 II 两个单萜类化合物。制备色谱的分离条件: 色谱柱为制备柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 250×21.2mm, 7 μm, 流动相为水和甲醇, 梯度洗脱程序如下: 0min, 10% 甲醇-水; 60min, 50% 甲醇-水; 流速: 10ml/min, 柱温为室温, 检测波长: 254nm。收集 31.0min 的色谱峰, 减压回收溶剂, 得化合物 I。收集 34.5min 的色谱峰, 减压回收溶剂, 得化合物 II。

[0014] 本发明的再一个目的是从返魂草中提取的单萜类化合物在制备抗炎药物中的应用。

[0015] 本发明的化合物 I 和化合物 II 可以作为活性成分, 加入药剂学上接受的药物赋形剂或载体, 按照药剂学上记载的方法制成制剂。所述药物的制剂形式包括颗粒剂、片剂、冲剂、散剂、口服液、糖衣片剂、薄膜衣片剂、肠溶衣片剂、胶囊剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、口含剂、颗粒剂、丸剂、膏剂、丹剂、喷雾剂、滴丸剂、崩解剂、口崩片、微丸等。

[0016] 本发明的有益效果为: (1) 本发明首次公开了中药返魂草中两种新化合物的结构并提供了该两种新化合物的提取制备方法。(2) 本发明提供了返魂草中两种新化合物在脂多糖刺激 RAW246.7 细胞株上的抗炎活性评价结果, 发现其均具有较好的抗炎活性, 可开发为抗炎药物。

具体实施方式

[0017] 本发明结合实施例进一步详细说明本发明的实质内容, 该实施例仅用于说明本发明而并非对本发明的限制。

[0018] 实施例一返魂草中化合物 I 和化合物 II 的提取制备

[0019] 将返魂草药材粉碎后, 加入 8 倍量水, 加热回流 2 小时, 提取 3 次, 合并提取液, 将提取液浓缩成浸膏, 并将其与硅胶进行拌样, 用正相硅胶柱对其进行分离, 首先用体积比为 5:1 的石油醚 (60-90℃) 和乙酸乙酯作为洗脱溶剂洗脱, 得洗脱液 E, 弃之, 再用体积比为 3:1 的石油醚 (60-90℃) 和乙酸乙酯作为洗脱溶剂洗脱, 得洗脱液 F。洗脱液 F 浓缩干燥后经制备液相色谱分离得到两个单萜类化合物。制备色谱的分离条件: 色谱柱为制备柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 250×21.2mm, 7 μm, 流动相为水和甲醇, 梯度洗脱程序如下: 0min, 10% 甲醇-水; 60min, 50% 甲醇-水; 流速: 10ml/min, 柱温为室温, 检测波长: 254nm。收集 31.0min 的色谱峰, 减压回收溶剂, 得化合物 I。收集 34.5min 的色谱峰, 减压回收溶

剂,得化合物 II。

[0020] 实施例二返魂草中化合物 I 和化合物 II 的提取制备

[0021] 将返魂草药材粉碎后,加入 3 倍量 70% 乙醇-水溶液,加热回流 1.5 小时,提取 1 次,合并提取液,将提取液浓缩成浸膏,并将其与硅胶进行拌样,用正相硅胶柱对其进行分离,首先用体积比为 5:1 的石油醚 (60-90℃) 和乙酸乙酯作为洗脱溶剂洗脱,得洗脱液 E,再用体积比为 3:1 的石油醚 (60-90℃) 和乙酸乙酯作为洗脱溶剂洗脱,得洗脱液 F,弃之。洗脱液 F 浓缩干燥后经制备液相色谱分离得到两个单萜类化合物。制备色谱的分离条件:色谱柱为制备柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 250×21.2mm, 7 μm, 流动相为水和甲醇,梯度洗脱程序如下:0min, 10% 甲醇-水;60min, 50% 甲醇-水;流速:10ml/min, 柱温为室温,检测波长:254nm。收集 31.0min 的色谱峰,减压回收溶剂,得化合物 I。收集 34.5min 的色谱峰,减压回收溶剂,得化合物 II。

[0022] 实施例三返魂草中化合物 I 和化合物 II 的提取制备

[0023] 将返魂草药材粉碎后,加入 6 倍量 20% 乙醇-水溶液,加热回流 1 小时,提取 2 次,合并提取液,将提取液浓缩成浸膏,并将其与硅胶进行拌样,用正相硅胶柱对其进行分离,首先用体积比为 5:1 的石油醚 (60-90℃) 和乙酸乙酯作为洗脱溶剂洗脱,得洗脱液 E,弃之,再用体积比为 3:1 的石油醚 (60-90℃) 和乙酸乙酯作为洗脱溶剂洗脱,得洗脱液 F。洗脱液 F 浓缩干燥后经制备液相色谱分离得到两个单萜类化合物。制备色谱的分离条件:色谱柱为制备柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 250×21.2mm, 7 μm, 流动相为水和甲醇,梯度洗脱程序如下:0min, 10% 甲醇-水;60min, 50% 甲醇-水;流速:10ml/min, 柱温为室温,检测波长:254nm。收集 31.0min 的色谱峰,减压回收溶剂,得化合物 I。收集 34.5min 的色谱峰,减压回收溶剂,得化合物 II。

[0024] 实施例四返魂草中化合物 I 和化合物 II 结构鉴定

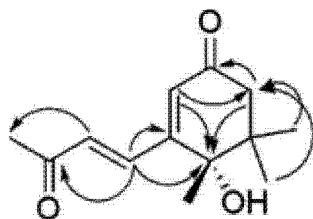
[0025] 化合物 I 为红色油状物, $[\alpha]_D^{20}=+10.8$ (c=0.1, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3447, 1659, 1188, 1122, 1027, 987 cm⁻¹; ¹H 谱 (DMSO, 500MHz) 和 ¹³C 谱 (DMSO, 125MHz), 其 NMR 数据见下表 1; HR-ESI-MS m/z: 分子离子峰 221.1180 [M-H]⁻ (C₁₃H₁₇O₃, 计算值 221.1183)。

[0026] 表 1

	化合物 I	
	δ (C)	δ (H)
1	197.4	—
2	127.0	5.86
3	162.1	—
4	78.6	—
5	41.6	—
[0027] 6	49.7	2.68, 2.17
7	19.0	1.80(s)
8	23.6	0.96(s)
9	24.6	0.91 (s)
1'	147.5	6.99(d, 16.0)
2'	131.0	6.28(d, 16.0)
3'	198.6	—
4'	27.7	2.29(s)

[0028] 化合物 I 的核磁 C-H 远程相关如下：

[0029]



[0030] H-2 与 C-4、C-6, H-6 与 C-1、C-4, H-7 与 C-3、C-4, H-8、H-9 与 C-6 之间存在着远程相关信号,这说明化合物 I 分子中存在 4-羟基-4,5,5-三甲基环己基-2-烯酮环。 δ 6.28(d, J=16.0Hz, H-2'), 6.99(d, J=16.0Hz, H-1'), 2.29(d, H-4') 这三个氢信号说明化合物分子存在 (E)-酮丁烯基。H-1' 和 C-3, C-4 之间的远程相关信号说明 (E)-酮丁烯基连接在 4-羟基-4,5,5-三甲基环己基-2-烯酮环的 3 位碳上。

[0031] 通过 ^1H 谱、 ^{13}C 谱、二维谱鉴定得到化合物 I 结构为 (E, 4R)-4-羟基-4,5,5-三甲基-3-(3-氧代丁烯)环己烯-2-酮。

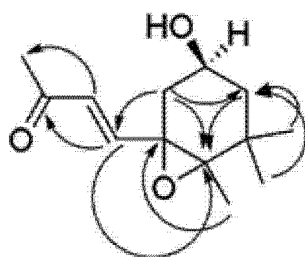
[0032] 本发明化合物 II 为红色油状物, $[\alpha]_D^{20} = -4.1$ (c=0.1, MeOH); IR(KBr): ν_{\max} 3432, 1676, 1258, 1177, 1042, 989 cm^{-1} ; ^1H 谱 (DMSO, 500MHz) 和 ^{13}C 谱 (DMSO, 125MHz) 核磁共振数据见下表 2; HR-ESI-MS m/z: 分子离子峰 223.1341 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值 $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_3$, 223.1340)。

[0033] 表 2

化合物 II		
	δ (C)	δ (H)
1	62.2	3.60(m)
2	40.8	2.16, 1.57
3	67.4	—
4	69.3	—
5	35.0	—
[0034]	6	1.46, 1.24
	7	1.10(s)
	8	1.11(s)
	9	0.89(s)
	1'	7.09(d, 15.5)
	2'	6.02(d, 15.5)
	3'	—
	4'	2.24(s)

[0035] 化合物 II 的核磁 C-H 远程相关如下：

[0036]



[0037] 与化合物 I 不同的是, $\delta_c 194.7$ 的酮基碳与 $\delta_c 127.0$ 和 162.1 的烯碳信号消失了, 取而代之的是两个氧代碳原子 ($\delta_c 62.2$ 和 67.4) 及一个 $\delta_c 40.8$ 的碳原子。H-2 与 C-4、C-6, H-6 与 C-4, H-7 与 C-3, H-8、H-9 与 C-6 之间存在着远程相关信号, 这说明化合物 II 分子中存在环己烷骨架。 $\delta 6.02$ (d, $J=15.5\text{Hz}$, H-2'), 7.09 (d, $J=15.5\text{Hz}$, H-1'), 2.24 (d, H-4') 这三个氢信号说明化合物分子存在 (E)-酮丁烯基。H-1' 与 C-4, H-2 与 C-1' 之间存在远程相关信号说明 (E)-酮丁烯基连接在环己烷骨架的 3 位。

[0038] 通过 ^1H 谱、 ^{13}C 谱、二维谱鉴定得到化合物 II 结构为 (E)-4-((1S, 3R, 4R)-1-羟基-4, 5, 5-三甲基-7-氧代桥环[4.1.0]庚烯)-1-丁烯-3-酮。

[0039] 实施例五返魂草中化合物 I 和化合物 II 的抗炎活性评价

[0040] 抗炎活性评价实验中设定正常细胞组、脂多糖 (LPS) 刺激对照组和加药组。

[0041] 使用 200ng/ml 的脂多糖刺激 RAW264.7 巨噬细胞, 分别加入 $0, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50\ \mu\text{mol/L}$ 浓度的化合物 I 和化合物 II 进行孵育, 正常细胞组不加入脂多糖刺激。孵育 24 小时后采用一氧化氮检测试剂盒检测细胞培养液中一氧化氮的分泌量。测定方法采用试剂盒提供方法, 具体为取 $100\ \mu\text{l}$ 正常组、对照组及加药组细胞培养液及一系列浓度亚硝酸钠标准品溶液加入 96 孔板中, 分别加入 Griess 试剂 I 和试剂 II, 振荡混匀后置于酶标仪中, 选择 550nm 测定各孔吸光度值, 计算抗炎活性。

[0042] 测得化合物 I 具有显著的抗炎活性, 在 $50\ \mu\text{mol/L}$ 浓度下抑制 LPS 诱导的 NO 生成作用的抑制率为 77.5% , 其抑制 NO 分泌的 IC_{50} 值为 $30.65\ \mu\text{M}$ 。

[0043] 测得化合物 II 具有一定的抗炎活性, 在 $50\ \mu\text{mol/L}$ 浓度下抑制 LPS 诱导的 NO 生成作用的抑制率为 47.3% 。

[0044] 实施例六滴丸制剂的制备

[0045] 取具有抗炎活性的化合物 I 或化合物 II 0.05g 与 10.5g 聚乙二醇-20000 混合均匀, 加热熔融, 化料后移至滴丸滴灌中, 药液滴至 $6\sim 8^\circ\text{C}$ 液体石蜡中, 除油, 制得滴丸 400 粒。

[0046] 实施例七口服液的制备

[0047] 取具有抗炎活性的化合物 I 或化合物 II 0.1g 、蔗糖 200g 和蒸馏水 1000ml , 上述组分混合均匀后, 分装 100 支, 灭菌后即得。