



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107007595 B

(45)授权公告日 2019.01.25

(21)申请号 201710354440.0

(22)申请日 2015.12.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107007595 A

(43)申请公布日 2017.08.04

(62)分案原申请数据
201510868700.7 2015.12.01

(73)专利权人 哈尔滨商业大学
地址 150076 黑龙江省哈尔滨市道里区通
达街138号

(72)发明人 陈宁

(51) Int. Cl.
A61K 31/395(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
C07D 498/04(2006.01)

(56)对比文件

CN 102716068 A,2012.10.10,
WO 2010012714 A1,2010.02.04,
LIN L-Z等.Lycorine Alkaloids from
Hymenocallis Littoralis.《Phytochemistry》
.1995,第40卷(第4期),1295-1298.
韩日等.水鬼蕉生物碱成分的研究进展.《黑
龙江医药》.2013,(第02期),209-211.

审查员 耿立冬

权利要求书1页 说明书7页 附图7页

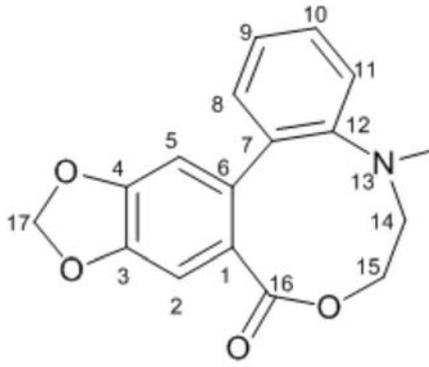
(54)发明名称

水鬼蕉新碱A在制备抗炎药物中的应用

(57)摘要

本发明属于医药技术领域,具体涉及一种从植物水鬼蕉鳞茎中分离得到新的生物碱类化合物的应用。本发明所涉及化合物的结构式如式(I)所示。所涉及的应用是关于上述化合物用于制备抗炎药物。该化合物具有明显的抑制炎症的作用;且制备该化合物的原料资源丰富,提取分离技术难度小,溶剂可回收使用,生产成本低。

1. 水鬼蕉新碱A在制备抗炎药物中的应用,水鬼蕉新碱A的结构式如式(I)所示:



(I)

。

水鬼蕉新碱A在制备抗炎药物中的应用

[0001] 本申请为申请号201510868700.7、申请日2015年12月01日、发明名称“一种新化合物及其应用”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于医药技术领域,具体涉及一种从植物水鬼蕉鳞茎中分离得到新的生物碱类化合物的应用。

背景技术

[0003] 水鬼蕉(*Hymenocallis littoralis*),又名美洲蜘蛛兰,为多年生鳞茎草本植物。有如螯蟹腿、蜘蛛脚,故有“螯蟹花”、“水鬼蕉”的名称。花为白色,有香气。花期夏秋,蒴果卵圆形或环形,肉质状,成熟时裂开。种子为海绵质状,绿色。水鬼蕉原产美洲热带地区,西印度群岛。中国福建、广东、广西、云南等地区引种栽培。在具备观赏价值的同时,也具备一定的药用价值,其鳞茎可以入药,临床用于舒筋活血,消肿止痛。用于风湿关节痛,甲沟炎,跌打肿痛,痈疽,痔疮等。研究发现,其鳞茎中含有丰富的生物碱类化合物。

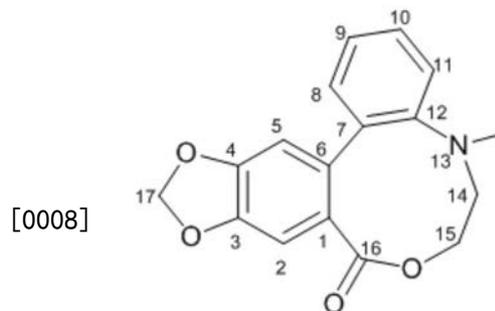
[0004] 根据报道,主要以水鬼蕉的鳞茎作为研究对象,水鬼蕉鳞茎中主要含有生物碱、黄酮类化合物,研究表明生物碱具有很好的抗肿瘤、抗炎活性。

[0005] 我们对采集自广西的水鬼蕉进行了系统的化学成分研究,以期明确其化学成分,为天然药物化学研究积累资料;发现具有良好活性的天然产物,为后续深入的研究开发提供物质基础。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种新的化合物及其在制备抗炎、抗肿瘤药物中的应用。

[0007] 本发明是从水鬼蕉(生长于中国广西贵港)鳞茎中提取分离得到的一种新的生物碱类化合物,命名为水鬼蕉新碱A其化学结构式(I)如下:



(I)

[0009] 本发明的化合物的制备原料资源丰富,提取分离技术难度小,溶剂可回收使用,生产成本低。

[0010] 上述化合物的制备方法如下:

[0011] (1) 提取:将水鬼蕉的鳞茎切碎,阴干,用浓度为1%的氢氧化钠浸泡碱化,碱化时间为1小时,然后取出水鬼蕉鳞茎晾干,用二氯甲烷温浸法提取3次,每次2小时;合并提取液,对提取液减压浓缩成浸膏。

[0012] (2) 分离:将上述浸膏应用硅胶柱层析,以体积比为15:1-3:1的氯仿-甲醇系统梯度洗脱,薄层层析检测,收集含有新化合物的流分,再经ODS反相柱层析,以体积比为3:7-5:5的甲醇-水进行洗脱,最后经C18反相柱层析制备液相制备,以体积比为4:6的甲醇-水进行洗脱,得到新化合物水鬼蕉新碱A。

[0013] 本发明的新化合物水鬼蕉新碱A,黄色无定形粉末,HR-ESI-MS在 m/z 298.1070处给出 $[M+H]^+$ 峰,在 m/z 617.1861处给出 $[2M+Na]^+$ 峰,推算其分子式为 $C_{17}H_{15}NO_4$, 1H 和 ^{13}C 核磁共振数据如表1所示。

[0014] 经实验研究表明,本发明的化合物对肿瘤有明显的抑制作用。因此,可以用于制备抗肿瘤药物。另外,该化合物对炎症也有明显的抑制作用,因此,可以用于制备抗炎药物。

[0015] 表1水鬼蕉新碱A的 1H 和 ^{13}C 核磁共振数据

Position	新化合物	
	δ_c	δ_H (J in Hz)
1	121.5	—
2	108.1	7.03 (1H, s)
3	148.2	—
4	148.8	—
5	104.5	7.67(1H, s)
6	123.3	—
7	127.3	—
[0016] 8	125.5	8.05 (1H, d, $J=8.0$ Hz)
9	129.0	7.53 (1H, t, $J=7.3$ Hz)
10	130.1	7.59 (1H, t, $J=7.3$ Hz)
11	120.6	7.82 (1H, d, $J=8.0$ Hz)
12	140.8	—
13N-CH ₃	49.9	3.65 (3H, s)
14	60.6	5.81 (1H, d, $J=14.3$ Hz) 4.68 (1H, d, $J=14.4$ Hz)
15	63.5	3.85 (2H, dd, $J=15.2, 25.2$ Hz)
16	163.0	—
17	101.8	6.15 (2H, s)

[0017] 新化合物水鬼蕉新碱A结构解析

[0018] 如图1-7所示,本发明新化合物的 1H NMR、 ^{13}C NMR、2D-NMR (COSY、HSQC、HMBC和ROSEY)谱,以及HR-ESI-MS谱得知化合物结构。具体地说:

[0019] 1H -NMR (400MHz, DMSO- d_6) 谱中, δ :8.05 (1H, d, $J=8.0$ Hz,) , 7.82 (1H, d, $J=8.0$ Hz) , 7.59 (1H, t, $J=7.3$ Hz) , 7.53 (1H, t, $J=7.3$ Hz) , 提示结构中可能存在一个1,2邻二取代的苯环片段; δ :7.67 (1H, s) , 7.03 (1H, s) , 提示结构中可能存在一个AA' BB' 取代的苯环片段; δ :5.81 (1H, d, $J=14.3$ Hz,) , 4.68 (1H, d, $J=14.4$ Hz) , 3.85 (2H, dd, $J=15.2, 25.2$ Hz) , 提示结构中可能存在2*-CH₂-片段; δ :3.65 (3H, s) , 提示结构中可能存在一个与吸电子基相连的甲基。

[0020] ^{13}C -NMR (100MHz, DMSO- d_6) 谱给出17个碳信号,其中 δ_c 163.0为羰基碳信号。 δ_c : 148.8、148.2、140.8、130.1、129.0、127.3、125.5、123.3、121.5、120.6、108.1、104.5提示结构中可能存在12个SP²杂化的碳原子; δ_c 63.5、60.6、49.9提示结构中可能存在与吸电子基连接的碳原子。

[0021] HSQC谱给出结构中所有氢碳直接相连的信息,如表1所示。 δ_H 6.15与 δ_c 101.8相关

提示结构中可能存在-O-CH₂-O-片段;δ_H3.65与δ_C49.9相关,提示结构中可能存在-N-CH₃-片段。

[0022] HMBC谱中,芳香质子信号δ_H7.67与δ_C 148.8、121.5相关,芳香质子信号δ_H7.03与δ_C 148.2、123.3相关,以及亚甲基质子信号δ_H6.15与δ_C 148.8、148.2相关,提示存在结构片段A1(如图8所示);芳香质子信号δ_H8.05与δ_C 140.8、130.1、123.3相关,芳香质子信号δ_H7.82与δ_C 130.1、129.0相关,芳香质子信号δ_H7.59与δ_C 129.0、127.3、120.6相关,芳香质子信号δ_H7.53与δ_C 140.8、125.5、104.5相关,氮甲基质子δ_H3.65与δ_C140.8、63.5、60.6相关,亚甲基质子信号δ_H3.85与δ_C163.0、60.6、49.9相关,亚甲基质子信号δ_H5.81与δ_C140.8、123.3、121.5相关,亚甲基质子信号δ_H4.68与δ_C140.8、123.3、121.5、63.5相关,提示存在结构片段A2(如图8所示)。将结构片段A1和A2部分连接在一起,最终确定了化合物A的平面结构。

[0023] NOESY谱中,H-11与H-15、13相关,H-2与H-14a、14b相关,H-14a与H-14b、13相关,确定了该化合物的相对构型。该化合物为未见文献报道的新生物碱类化合物,相关NMR数据归属如表1所示。

附图说明

- [0024] 图1新化合物的¹H NMR谱;
- [0025] 图2新化合物的¹³C NMR谱;
- [0026] 图3新化合物的COSY谱;
- [0027] 图4新化合物的HSQC谱;
- [0028] 图5新化合物的HMBC谱;
- [0029] 图6新化合物的ROSEY谱;
- [0030] 图7新化合物的HR-ESI-MS谱;
- [0031] 图8新化合物的结构片段;
- [0032] 图9新化合物对人体肿瘤细胞的体外增殖抑制作用影响。

具体实施方式

[0033] 下面通过实施例进一步描述本发明,使本专业技术更全面地理解本发明,但不以任何方式限制本发明。

[0034] 实施例1:水鬼蕉(*Hymenocallis littoralis*)鳞茎,切碎,阴干称重7.5kg,用浓度为1%的氢氧化钠浸泡碱化,碱化时间为1小时,然后取出水鬼蕉鳞茎晾干,用二氯甲烷温浸法提取3次,每次提取二氯甲烷的用量为30L,每次提取时间为2小时;合并提取液,对提取液减压浓缩成浸膏,得到浸膏78g;将上述浸膏与80g硅胶混合拌样,应用硅胶柱层析,以体积比为15:1-3:1的氯仿-甲醇系统梯度洗脱,薄层层析检测,收集体积比为15:1-3:1的流分,再经ODS反相柱层析,以体积比为3:7-5:5的甲醇-水进行洗脱,收集洗脱液,最后经C18反相柱层析制备液相制备,等度洗脱,流动相为甲醇-水(40:60),流速为3ml/min,检测波长210nm,柱温25℃,得到新化合物水鬼蕉新碱A纯品177mg。

[0035] 实施例2:新化合物水鬼蕉新碱A的细胞毒活性实验

[0036] 1、实验材料

[0037] 1.1、受试样品

[0038] 水鬼蕉新碱A用DMSO溶解,加入PBS配成1000 μ g/ml的溶液或均匀的混悬液,然后用含有DMSO的PBS稀释。

[0039] 1.2、细胞株

[0040] A549(人肺癌细胞)、LOVO(人肠癌细胞)、MCF-7(人乳腺癌细胞)、HL-60(人白血病细胞)、HepG-2(人肝癌细胞)。

[0041] 1.3、培养液

[0042] 包含RPMI1640、15%NBS、双抗。

[0043] 1.4、其他材料

[0044] 酶标仪、96孔培养板。

[0045] 2、试验方法

[0046] MTT法:96孔板每孔加入浓度为 1×10^5 个/ml的细胞悬液100 μ l,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内。24h后,加入样品液,10 μ l/孔,设6复孔,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内作用48h。每孔加入5mg/ml的MTT溶液20 μ l,作用4h后加入溶解液,100 μ l/孔,置培养箱内,溶解后用酶标仪测570nmOD值。

[0047] 3、试验结果

[0048] 结果见图9,结果显示,水鬼蕉新碱A对A549(人肺癌细胞)、LOVO(人肠癌细胞)、MCF-7(人乳腺癌细胞)、HL-60(人白血病细胞)和HepG-2(人肝癌细胞)均有较好的抑制活性,水鬼蕉新碱A有很好的抗肿瘤作用,具有良好的开发前景。

[0049] 实施例3:新化合物水鬼蕉新碱A对小鼠S180肉瘤(实体型)的疗效试验

[0050] 1、实验材料

[0051] 1.1、受试样品

[0052] 水鬼蕉新碱A用少量吐温-80助溶后用0.5%CMC配成溶液。

[0053] 1.2、动物

[0054] 品系:昆明种小鼠

[0055] 体重:20 \pm 2g

[0056] 1.3、移植性肿瘤

[0057] 小鼠S180肉瘤

[0058] 2、试验方法

[0059] 取生长良好的小鼠S180肉瘤腹水,用生理盐水以1:4稀释,每只小鼠腋皮下接种0.2ml,随机分组,分为对照组,环磷酰胺组(CTX组,20mg/kg,ip \times 7)、水鬼蕉新碱A(5mg/kg)组,接种后次日起给药,给药体积为0.5ml/20g体重,连续灌胃7天。接种后10日脱颈处死动物,称动物体重后解剖取瘤块,称瘤重。结果判定根据以下公式:

$$[0060] \quad \text{肿瘤抑制率}\% = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

[0061] 3、实验结果

[0062] 水鬼蕉新碱A有显著的肿瘤抑制作用,实验结果见表2。

[0063] 表2新化合物水鬼蕉新碱A对小鼠S180肉瘤的抑制作用

[0064]

组别	剂量	给药	动物数		动物体重 (g)	瘤重 (g)	抑制率
	(mg/kg)	方案	始	终	(去瘤后)	±SD	%
空白对照 (溶剂)		po×7	15	15	26.03±3.22	1.53±1.06	
CTX	20	ip×7	20	20	26.07±2.98	0.67±0.34	56.21
水鬼蕉新碱 A	5	po×7	20	20	27.16±2.09	0.72±0.38*	52.94

[0065] 与对照组比较:*P<0.05,**P<0.01。

[0066] 实施例4:新化合物水鬼蕉新碱A抗炎实验小鼠耳肿胀模型

[0067] 1、实验动物

[0068] Swiss种小鼠,体重20-24g

[0069] 2、实验模型和测试方法

[0070] 取小鼠50只,随机分成5组,按表3所示的剂量灌胃给药3d,于末次给药后1h,用0.05ml的二甲苯将小鼠左耳致炎,用直径为7mm的打孔器将双耳重叠打孔,将打孔的圆片在万分之一灵敏度天平上称量,用鼠耳两圆片的重量差表示其肿胀度。

[0071] 3、统计学分析:

[0072] 全部实验结果均以均数±标准误差表示。用student t-检验比较各组数据与空白组的显著性差异,P<0.05,表示差异有显著性意义。

[0073] 4、试验结果:

[0074] 表3新化合物水鬼蕉新碱A对小鼠耳肿胀实验的影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

[0075]

组别	剂量(mg/kg)	耳肿胀(mg)	抑制率(%)
空白		18.49±1.28	
氢化可的松	20	10.51±1.09	43.2
	5	13.52±1.86	26.9
水鬼蕉新碱 A	10	12.26±0.82	33.7
	20	10.01±2.11	45.9

[0076] 与对照组比较:*P<0.05,**P<0.01。

[0077] 结果表明,阳性对照药氢化可的松、新化合物水鬼蕉新碱A对小鼠耳肿胀模型引起的炎症有显著的抑制作用。

[0078] 实施例5:新化合物水鬼蕉新碱A抗炎实验大鼠角叉菜胶足肿胀模型

[0079] 1、实验动物

[0080] SD大鼠,雌雄各半,体重200±20g。

[0081] 2、试验模型和检测方法

[0082] 取大鼠50只,随机分成5组,按表4所示的剂量灌胃给药4d,与末次给药前测量致炎前容积;末次给药后30min,于大鼠右后肢足跖皮下注射1%角叉菜胶0.1ml致炎。分别于致

炎后2、4、6h测量右踝关节以下容积。

[0083] 3、统计学分析：

[0084] 全部实验结果均以均数±标准误差表示。用student t-检验比较各组数据与空白组的显著性差异， $P < 0.05$ ，表示差异有显著性意义。

[0085] 4实验结果：

[0086] 表4新化合物水鬼蕉新碱A对大鼠角叉菜胶足肿胀试验的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

[0087]

组别	剂量 (mg/kg)	足肿胀度 (ml)		
		2h	4h	6h
空白		1.21±0.07	1.02±0.11	0.95±0.15
地塞米松	300	0.31±0.12**	0.37±0.01**	0.27±0.09**
	10	1.23±0.11	0.92±0.12	0.98±0.25
水鬼蕉新碱 A	20	1.08±0.62	0.85±0.26*	0.79±0.37
	40	0.76±0.60	0.30±0.60**	0.29±0.16**

[0088] 与对照组比较：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

[0089] 结果表明，阳性对照药地塞米松、水鬼蕉新碱A对大鼠叉菜胶足肿胀模型所引起的炎症有显著的抑制作用。

[0090] 实施例6：新化合物水鬼蕉新碱A抗炎实验小鼠腹腔毛细血管通透性试验

[0091] 1、实验小鼠

[0092] NH系小鼠，雌雄兼用，体重 $20 \pm 2g$ 。

[0093] 2、实验模型和测试方法

[0094] 取大鼠50只，随机分组5组，按表5所示的剂量灌胃给药1h，尾静脉注射2%生理盐水溶液0.1ml/10g体重，随机腹腔注射0.8%醋酸生理盐水溶液0.2ml/只，20min后脱颈椎处死小鼠，用5ml生理盐水分数次洗涤腹腔，3000转/分，离心15min；取上清液用酶标仪于570nm比色测定其光密度(OD)值。

[0095] 3、统计学分析：

[0096] 全部实验结果均以均数±标准误差表示。用student t-检验比较各组数据与空白组的显著性差异， $P < 0.05$ ，表示差异有显著性意义。

[0097] 4、试验结果

[0098] 表5. 新化合物水鬼蕉新碱A对小鼠腹腔毛细血管通透性试验的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

[0099]

组别	剂量(mg/kg)	腹腔毛细血管渗透液 OD 值 ($\lambda = 570\text{nm}$)
空白	-	0.77 ± 0.33
地塞米松	1.5	$0.37 \pm 0.21^*$
	10	0.75 ± 0.13
水鬼蕉新碱 A	20	$0.44 \pm 0.25^*$
	40	$0.36 \pm 0.11^*$

[0100] 与对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

[0101] 结果表明,阳性对照药地塞米松、水鬼蕉新碱A对小鼠腹腔毛细血管通透性试验引起的炎症有显著的抑制作用。

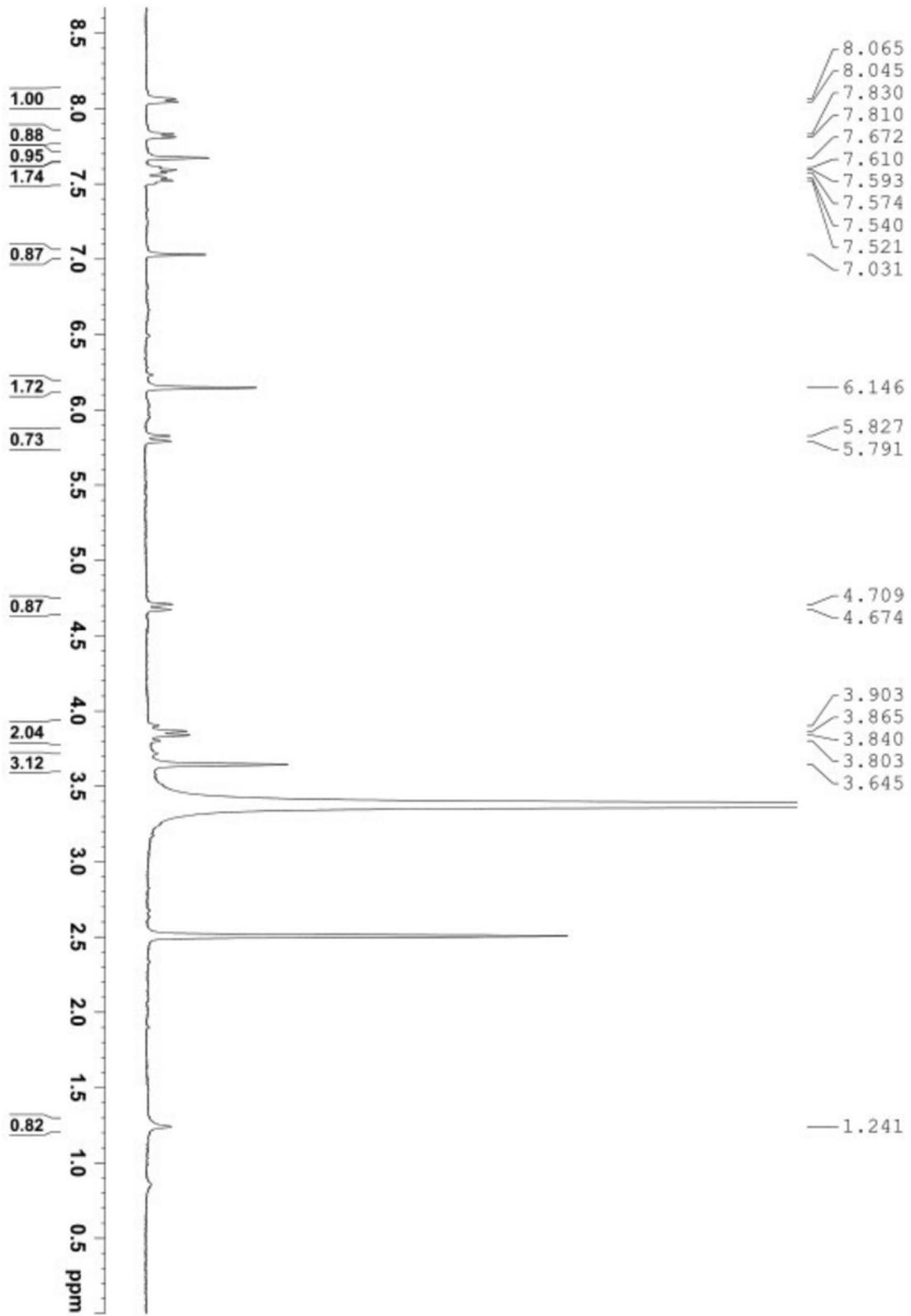


图1

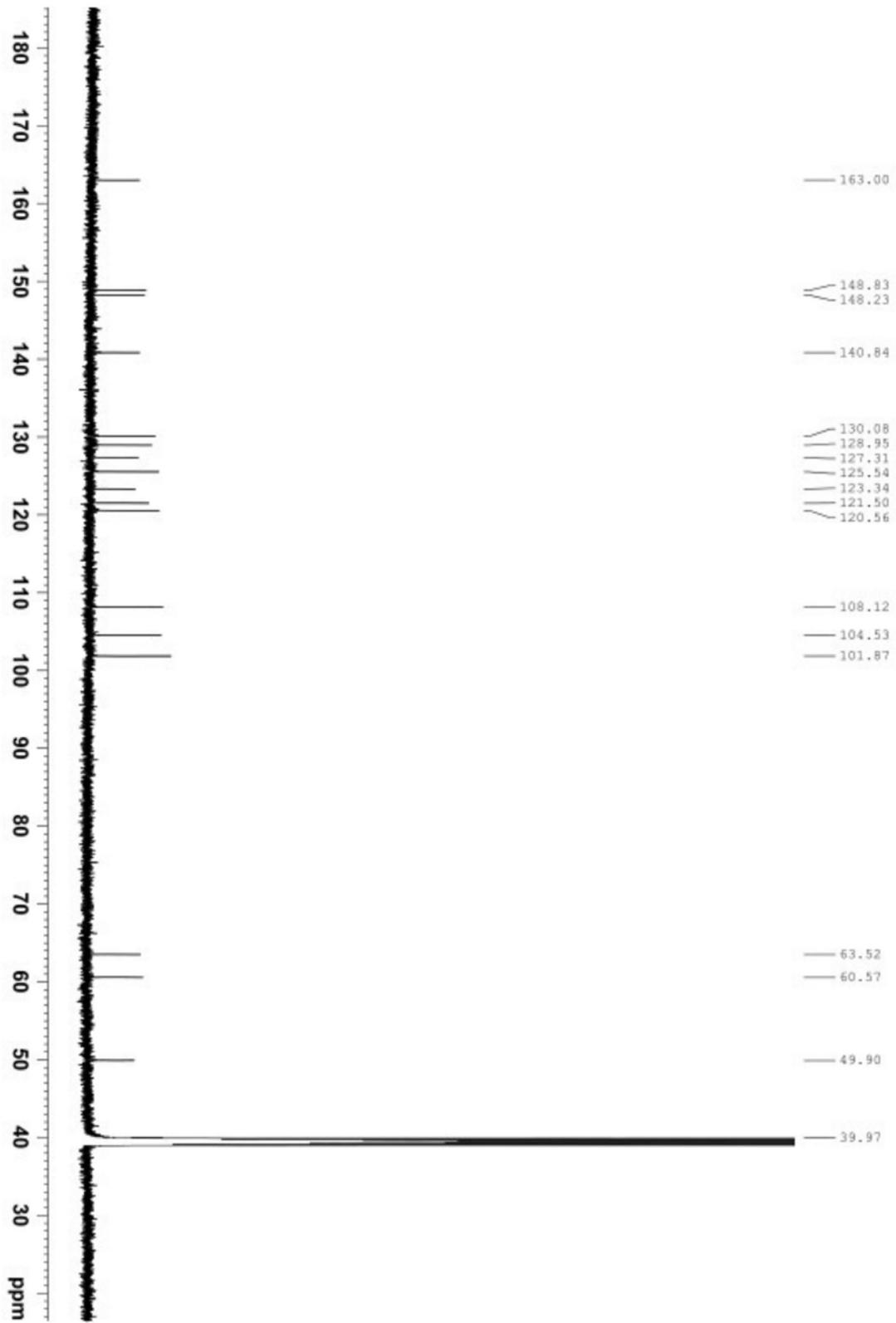


图2

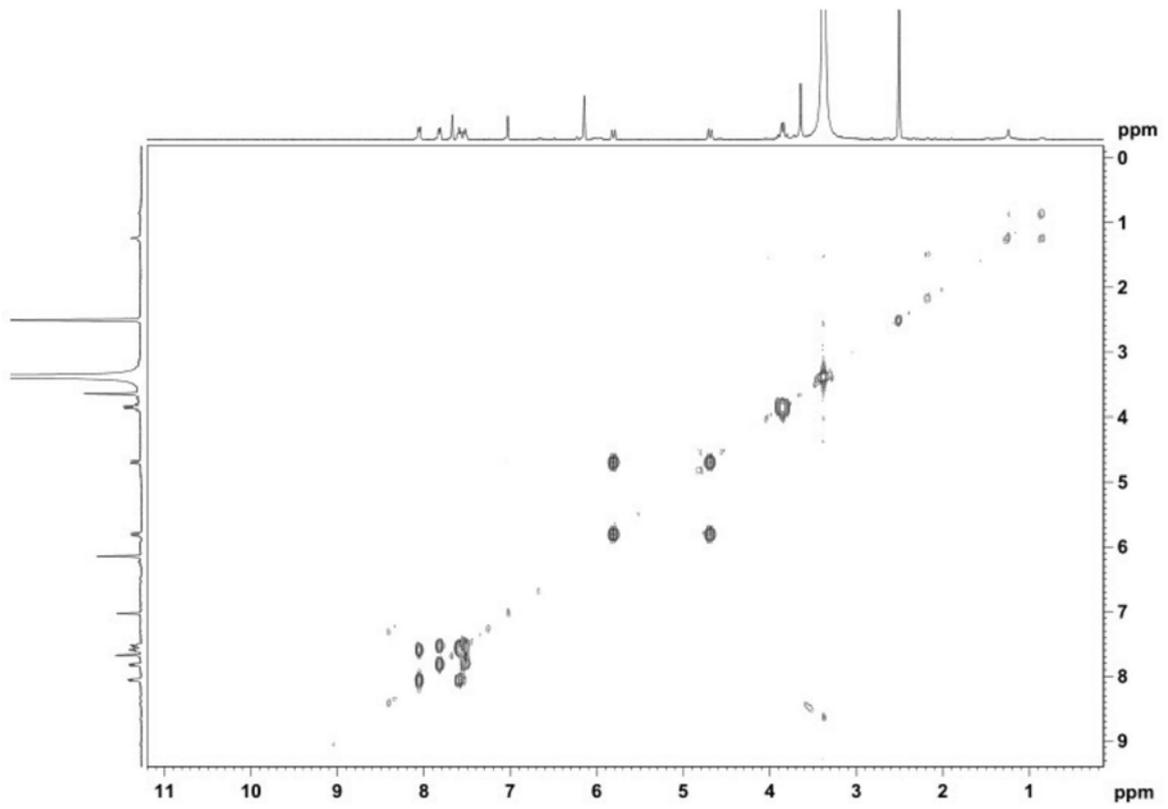


图3

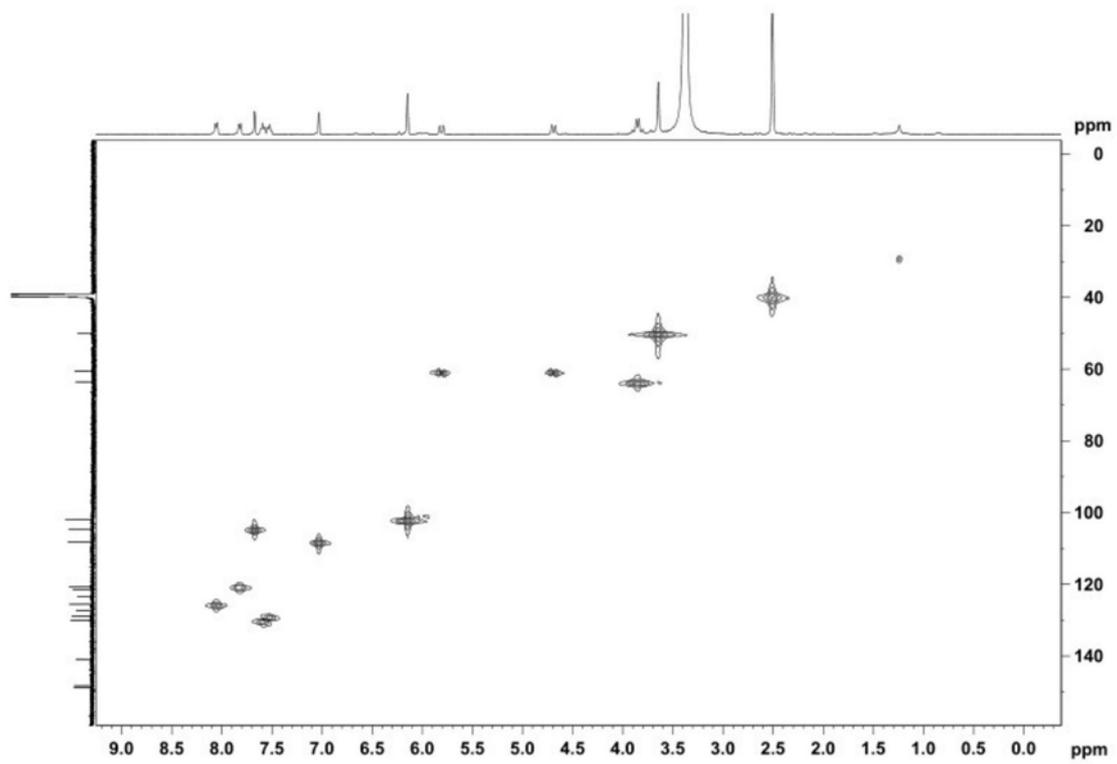


图4

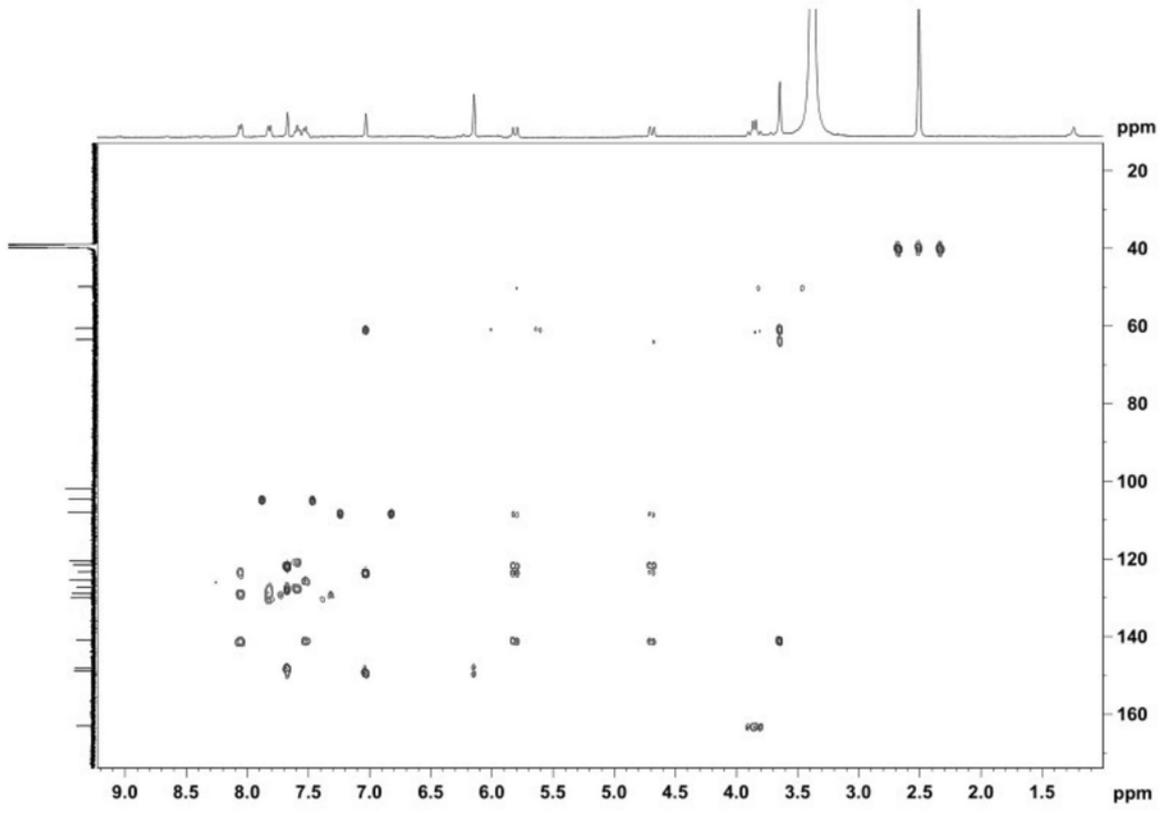


图5

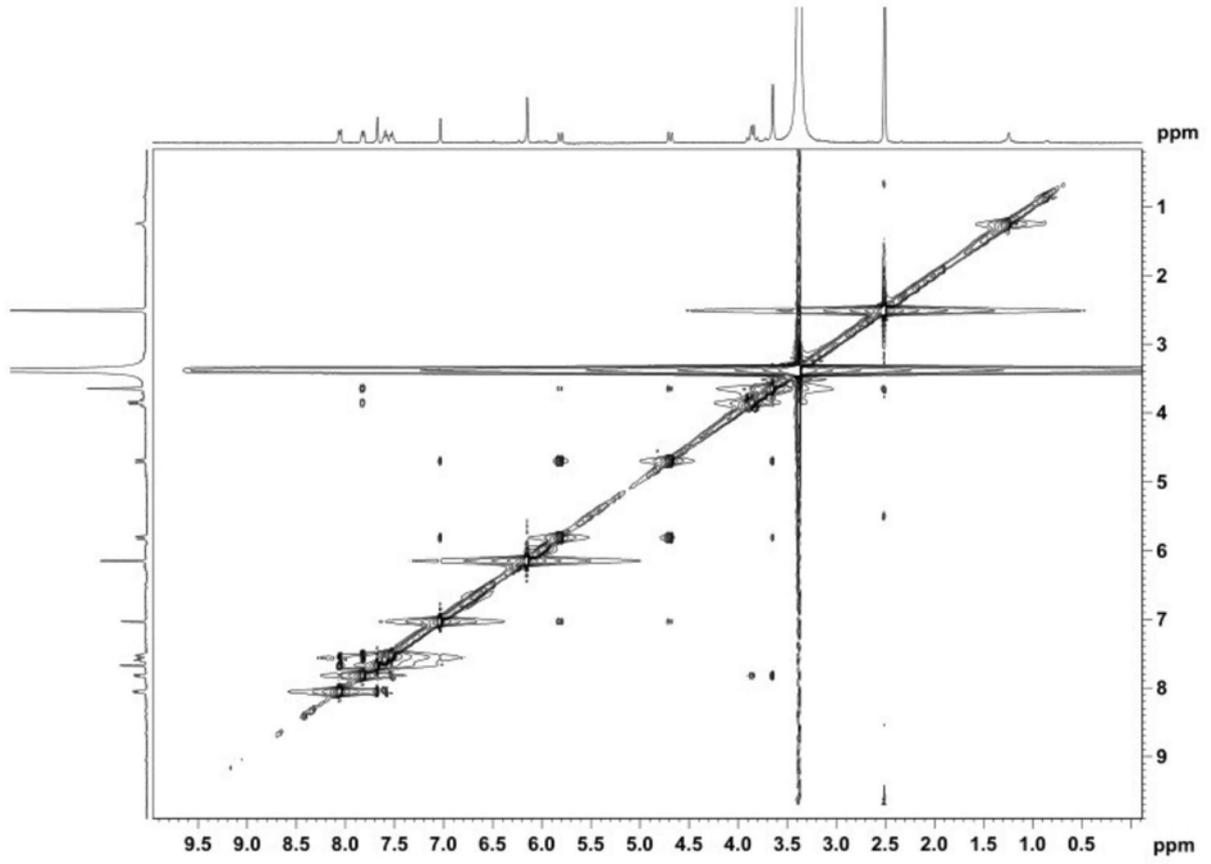


图6

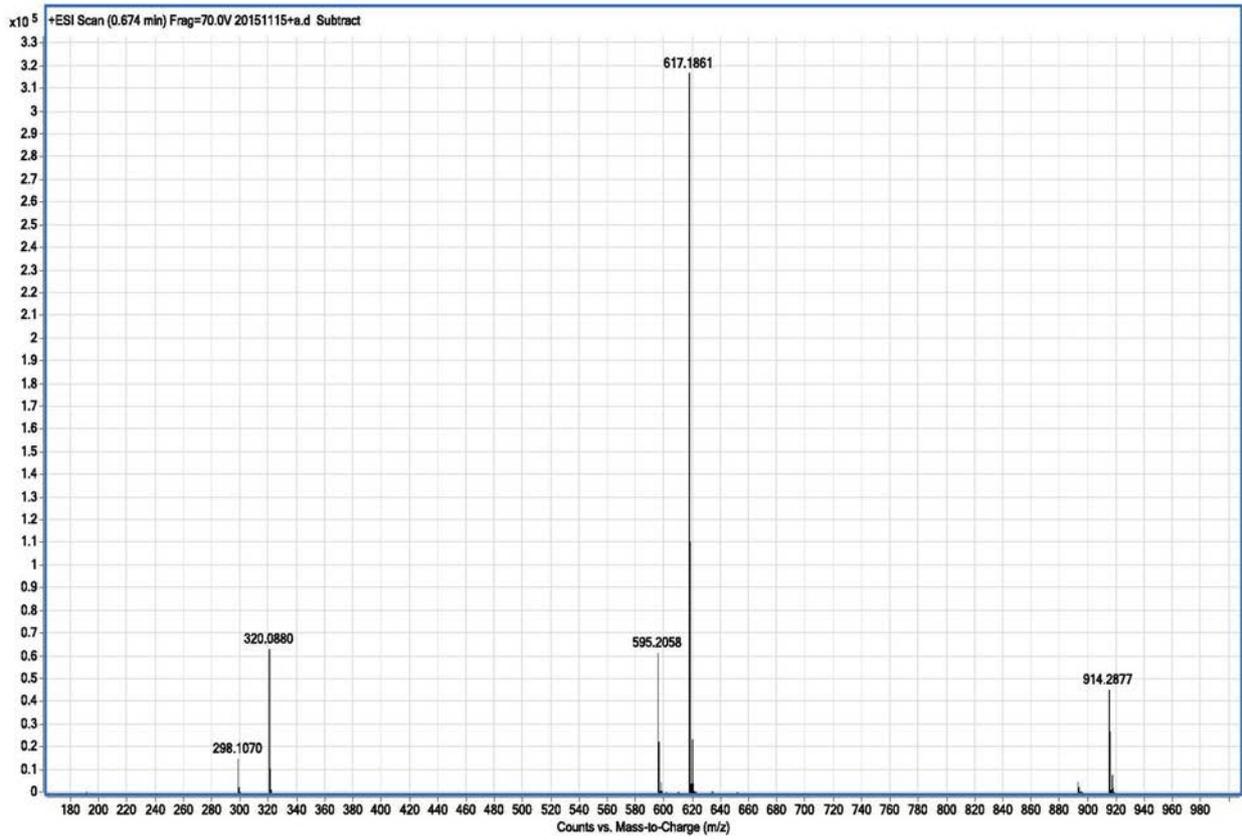


图7

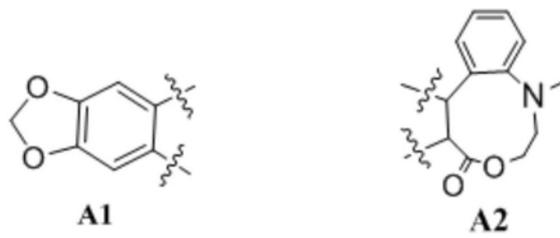


图8

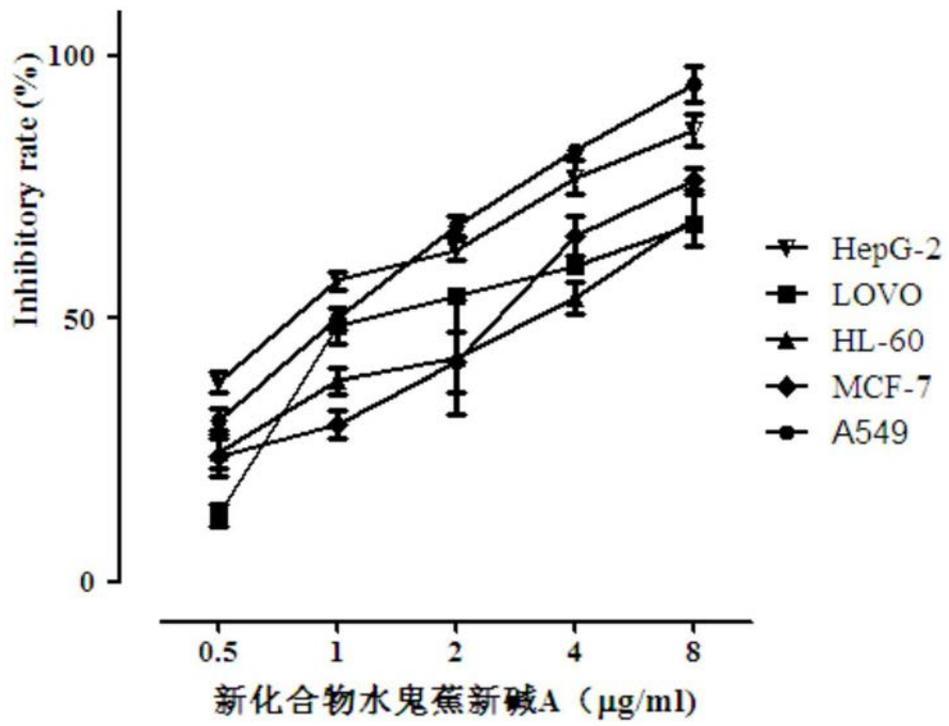


图9