(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105663150 B
(45)授权公告日 2018.09.25

(21)申请号 201610154708.1

(22)申请日 2016.03.17

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105663150 A

(43)申请公布日 2016.06.15

(73)专利权人 株洲千金药业股份有限公司
地址 412007 湖南省株洲市天元区株洲大道801号

(72)发明人 刘逆夫 龚云 夏博候 李亚梅 林丽美 伍实花 赵威

(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 任重 冯振宁

(51)Int.Cl.
A61K 31/7034(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61K 36/758(2006.01)

(56)对比文件
CN 101235059 A,2008.08.06,全文.
CN 104274578 A,2015.01.14,全文.
Er-Li Tian, et al..Phenolic glycosides from Glycosmis pentaphylla.《Journal of Asian Natural Products Research》.2014,第16卷(第12期),1119-1125.
李华 等.千斤拔化学成分研究.《中草药》.2009,第40卷(第4期),512-516.
孙琳 等.千斤拔化学成分研究.《中国药物化学杂志》.2009,第19卷(第5期),364-367.
陈一 等.千斤拔的镇痛和抗炎作用.《广西医学》.1993,第15卷(第2期),77-79.

审查员 郑茹

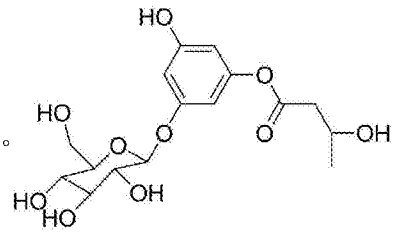
权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54)发明名称

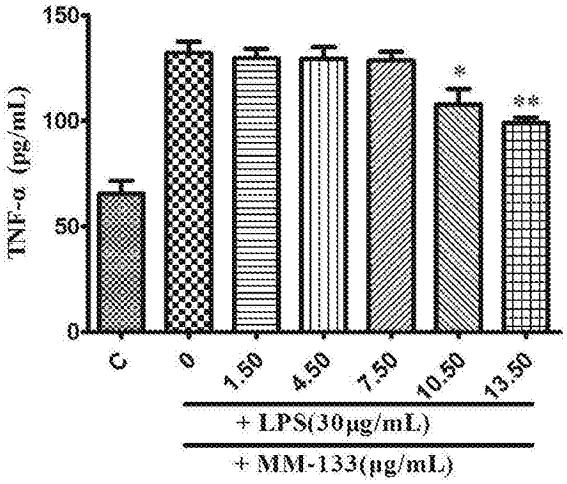
一种苯丙素类化合物及其药学上可接受的盐在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用

(57)摘要

本发明涉及医药技术领域,公开了一种苯丙素类化合物及其药学上可接受的盐在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用。该苯丙素类化合物显示出可以抑制细胞炎症因子TNF-α,IL-1β,IL-6的表达作用,具有对羟基自由基的(-OH)的抑制作用,进而具有抗炎及抗氧化活性,为炎症性疾病,如宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、乳腺炎、咽喉炎和/或关节炎等疾病的治疗药物的开发提供方向。

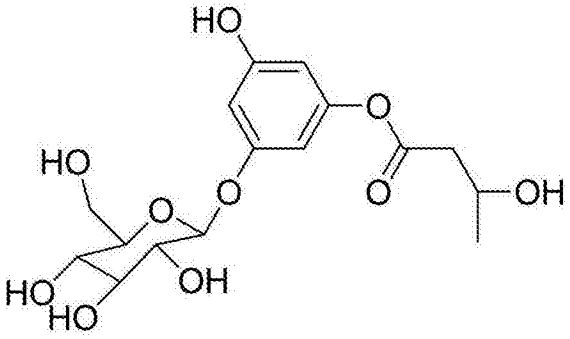


(I)。



CN 105663150 B

1.一种苯丙素类化合物及其药学上可接受的盐在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用,所述苯丙素类化合物的结构式如式(I)所示:



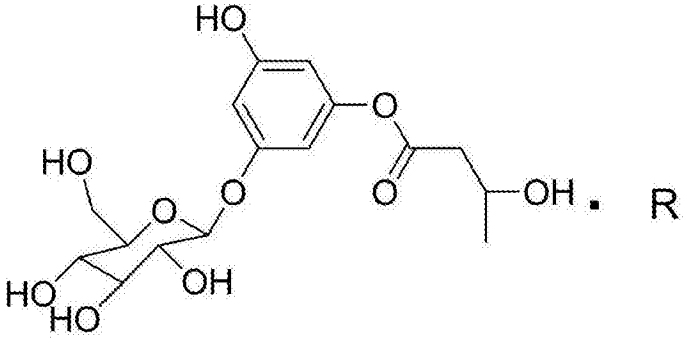
(Ⅰ)。

2.根据权利要求1所述应用,其特征在于,在制备抑制细胞炎症因子TNF-α,IL-1β,IL-6的表达或抑制羟基自由基的活性的药物中的应用。

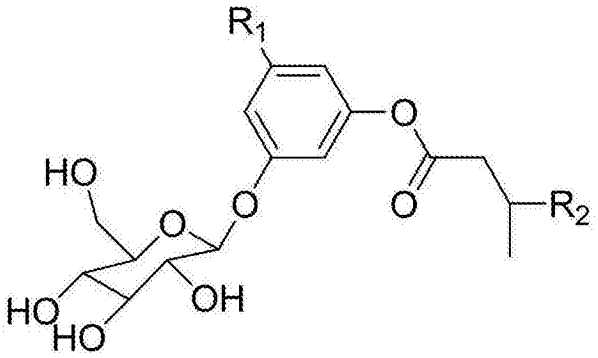
3.根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述炎症性疾病为宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、乳腺炎、咽喉炎和/或关节炎。

4.根据权利要求1至3任一项所述应用,其特征在于,所述药学上可接受的盐为式(I)所示苯丙素类化合物与酸或碱形成的药学上可接受的盐,

所述苯丙素类化合物药学上可接受的盐的结构如式(Ⅱ)或式(Ⅲ)所示:



(Ⅱ);



(Ⅲ);

其中,R为无机酸,R_1或R_2为磺酸根、连氧碱金属离子或铵根中的任意一种或任意两种。

5.根据权利要求4所述应用,其特征在于,所述无机酸为盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、磷酸;所述磺酸根为具有芳基的磺酸根;所述连氧碱金属离子为钾离子、钠离子

或锂离子。

6.根据权利要求1至3任一项所述应用，其特征在于，所述药学上可接受的盐为羧酸盐、乳酸盐、钙盐或镁盐。

7.根据权利要求5所述应用，其特征在于，所述具有芳基的磺酸根为苯磺酸根或对甲苯磺酸根。

8.根据权利要求1至3任一项所述应用，其特征在于，所述药物含有药学上允许的辅料和/或载体。

9.根据权利要求8所述应用，其特征在于，所述药物还含有金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参中的一种或几种。

10.根据权利要求8所述应用，其特征在于，所述药物还含有金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参中的一种或几种的提取物。

11.根据权利要求8所述应用，其特征在于，所述药物的剂型为片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、丸剂、溶液剂、混悬剂、注射剂、软膏剂、栓剂或喷雾剂。

12.根据权利要求8所述应用，其特征在于，所述药物的剂型为糖浆剂。

一种苯丙素类化合物及其药学上可接受的盐在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域，具体涉及一种苯丙素类化合物及其药学上可接受的盐在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用。

背景技术

[0002] 从天然药物中提取分离得到的成分结构多样、活性显著，对其进行分离纯化、结构修饰、改造和全合成，一直是新药研发的一个主要思路。

[0003] TNF-α：是一种能够直接杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性的细胞因子，是迄今为止所发现的直接杀伤肿瘤作用最强的生物活性因子之一，然而其毒副作用也非常严重。

[0004] IL-1β：在局部低浓度时协同刺激APC和T细胞活化，促进B细胞增殖和分泌抗体，进行免疫调节。大量产生时有内分泌效应：诱导肝脏急性期蛋白合成，引起发热和恶病质。

[0005] IL-6：人类IL-6基因位于第7号染色体上；IL-6分子量在21～30KD之间。主要由单核巨噬细胞、Th2细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞产生。能够刺激活化B细胞增殖，分泌抗体；刺激T细胞增殖及CTL活化；刺激肝细胞合成急性期蛋白，参与炎症反应；促进血细胞发育。

[0006] IL-6可由多种细胞合成，包括活化的T细胞和B细胞、单核－巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞以及成纤维细胞等。IL-6作用的靶细胞很多，包括巨噬细胞、肝细胞、静止的T细胞、活化的B细胞和浆细胞等；其生物效应也十分复杂。

[0007] OH为生物系统中最具活性的活性氧物质，能导致细胞及生物体内DNA，蛋白质和脂质氧化损伤。

[0008] 因此，寻求新的化合物，能抑制细胞炎症因子TNF-α，IL-1β，IL-6的表达作用，抑制羟基自由基(-OH)的活性，应用于炎症性疾病的治疗，是非常有必要的。

[0009] 千斤拔药材为豆科(Leguminosae)千斤拔属(Flemingl.Roxb.或Moghania)植物大叶千斤拔(Moghaniamacrophylla(Willd.)O.Kuntze)的干燥根，在我国主要分布于东南部地区。该植物在中国植物志(1995，41:313)、台湾植物志(1977，3:258)、海南植物志(1965，2:311)、《中国高等植物图鉴》(1972，2:510)、中国主要植物图说(1955，pp707)和广州植物志(1956，pp361)中均有收录。千斤拔药材为广西地区的道地药材，史载于《植物名实图考》，有着广泛的民间用药基础。其性味甘，微涩，平，具有清热除湿等功效，主要用于治疗风湿骨痛、跌打损伤、慢性肾炎、痛经和白带多等妇科疾病。该药材目前已收载入2005年版《中国药典》附录。

[0010] 大叶千斤拔已报道的成分主要有黄酮类、甾类、萜类、蒽醌类、挥发油类成分，均具有一定的药理活性，其药理活性多样，报道较多的有神经保护作用，抗炎、抗氧化作用，对病原微生物的驱虫作用、类激素作用、细胞毒作用，抗菌作用以及免疫增强作用、抗疲劳作用。

[0011] 千斤拔目前广泛应用于妇科、风湿痹痛等类型的中成药生产，如妇科千金片、妇科

千金胶囊、金鸡冲剂、金鸡胶囊等，此类中成药主要用于妇科病(痛经、子宫寒冷不孕、子宫下垂、盆腔炎、乳腺炎、白带多、产后血虚、关节痛、产后腰膝痛、缺乳和乳疮等)，虚弱贫血(妇女贫血，气血虚弱和病后气虚等)。近年来，临床报道较多的是妇科千金片在治疗妇科炎症方面的作用。

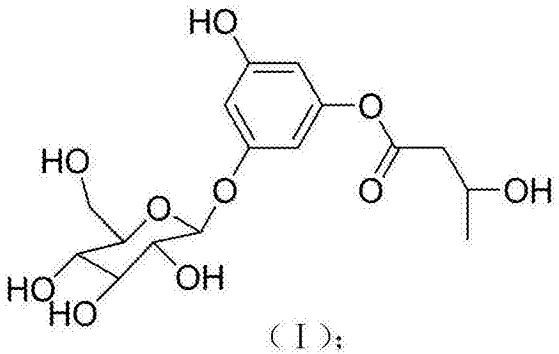
[0012] 目前，在千斤拔的文献中，报道苯丙素类化合物的文献极少，寻找有效的苯丙素类新化合物，对其进行分离纯化、结构修饰和合成，开发新药，应用于炎症性疾病的治疗，意义重大。

发明内容

[0013] 本发明要解决的技术问题是，寻找一种有效成分，其能抑制细胞炎症因子TNF-α，IL-1β，IL-6的表达作用，并对羟基自由基(-OH)具有抑制作用，能应用于制备治疗炎症性疾病的药物中。本发明提供一种苯丙素类化合物，其可以抑制细胞炎症因子TNF-α，IL-1β，IL-6的表达作用，具有对羟基自由基(-OH)的抑制作用，进而具有抗炎及抗氧化活性，为抗炎药物的开发提供方向，用于治疗相关炎症性疾病，如宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、乳腺炎、咽喉炎和/或关节炎等。

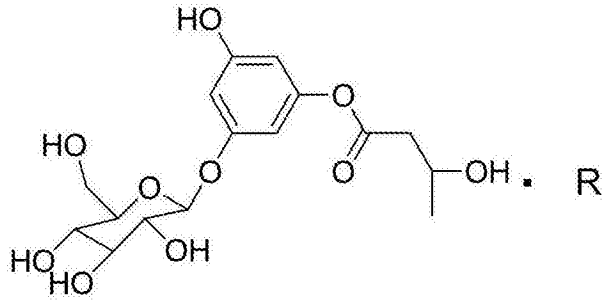
[0014] 本发明的目的是提供一种苯丙素类化合物的医药应用。

[0015] 提供一种苯丙素类化合物及其药学上可接受的盐作为制备治疗炎症性疾病的药物中的应用，所述苯丙素类化合物的结构式如式(I)所示：

[0016] 

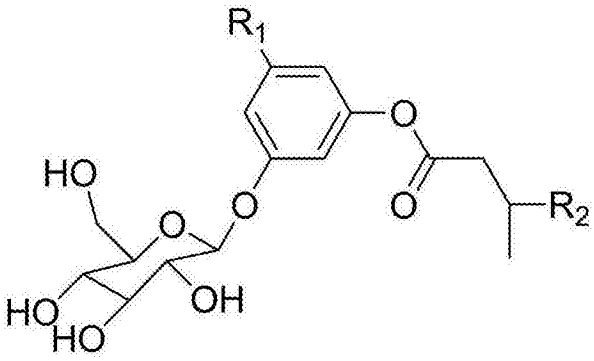
(Ⅰ)；

[0017] 所述苯丙素类化合物药学上可接受的盐的结构如式(Ⅱ)或式(Ⅲ)所示：



(Ⅱ);

[0018]



(Ⅲ);

[0019] 其中,R为无机酸,R_1或R_2为磺酸根、碱金属离子或铵根中的任意一种或任意两种。

[0020] 优选地,所述苯丙素类化合物及其药学上可接受的盐在制备抑制细胞炎症因子TNF-α,IL-1β,IL-6的表达或抑制羟基自由基(-OH)的活性的药物中的应用,应用于治疗炎症性疾病的药物中。

[0021] 优选地,所述炎症性疾病为宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、乳腺炎、咽喉炎和/或关节炎。

[0022] 所述药学上可接受的盐为式(I)所示苯丙素类化合物与酸或碱形成的药学上可接受的盐,其中,式(Ⅱ)中,R为无机酸,式(Ⅲ)中,R_1或R_2为磺酸根、碱金属离子或铵根中的任意一种或任意两种。

[0023] 所述无机酸为盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、羧酸、磷酸或乳酸;所述磺酸根为具有芳基的磺酸根;所述碱金属离子为钾离子、钠离子、钙离子、镁离子或锂离子。

[0024] 所述具有芳基的磺酸根为苯磺酸根或对甲苯磺酸根。

[0025] 所述苯丙素类化合物药学上可接受的盐为铵盐。

[0026] 所述药物含有药学上允许的辅料和/或载体。

[0027] 优选地,所述药物还含有其他药效成分。

[0028] 优选地,所述药物还含有金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参中的一种或几种。

[0029] 优选地,所述药物还含有金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参中的一种或几种的提取物。

[0030] 所述提取物为按专利公告号CN1078079C、CN1170549C、CN1158087C、CN1330335C、CN1296071C、CN1321631C、CN1296072C、CN1296073C的任意一件或几件专利文件中所述的提

取方法制备得到。

[0031] 所述药物的剂型为片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、丸剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂、注射剂、软膏剂、栓剂或喷雾剂。

[0032] 本发明的目的是从传统的中药处方中，通过从妇科千金片及妇科千金胶囊的处方中，通过溶剂提取、柱层析分离、制备液相分离、纯化制得一种新苯丙素类化合物，并通过实验证实，其可以应用于炎症性疾病，如宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、乳腺炎、咽喉炎和/或关节炎等疾病的治疗。

[0033] 具体地，发明人通过从妇科千金片、妇科千金胶囊的处方中，选取大叶千斤拔的干燥根，通过溶剂提取、柱层析分离、制备液相分离、纯化，得到本发明所述苯丙素类化合物，然后对该苯丙素类化合物进行细胞试验，测定其对细胞炎症因子TNF-α,IL-1β,IL-6的抑制程度，实验表明，该化合物在浓度(10.50-13.50μg/mL)范围内对LPS刺激引起的Raw 264.7细胞炎症因子TNF-α含量有明显的抑制作用($p<0.05$)，并且表现出明显的剂量依赖关系；在浓度(4.50-13.50μg/mL)范围内对炎症因子IL-1β含量有明显的抑制作用($p<0.05$)，表现出明显的剂量依赖关系；在浓度(7.50-13.50μg/mL)范围内对炎症因子IL-6含量有明显的抑制作用($p<0.05$)，表现出明显的剂量依赖关系。

[0034] 本发明的有益效果：

[0035] 本发明从传统中药处方角度出发，从传统中药妇科千金片、妇科千金胶囊中提取、分离、纯化得到一种苯丙素类化合物，经实验证明，该苯丙素类化合物显示出可以抑制细胞炎症因子TNF-α,IL-1β,IL-6的表达作用，具有对羟基自由基(-OH)的抑制作用，为炎症性疾病，如宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、乳腺炎、咽喉炎和/或关节炎等疾病的治疗药物的开发提供了方向。

[0036] 本发明提供的新的苯丙素类化合物结构简单、纯度高，且提取分离方法简便、易于合成，可适应新药的产业化应用。

附图说明

[0037] 图1为本发明所述苯丙素类化合物的核磁共振氢谱图。

[0038] 图2为本发明所述苯丙素类化合物的核磁共振碳谱图。

[0039] 图3为本发明所述苯丙素类化合物对细胞活性的影响图。

[0040] 图4为本发明所述苯丙素类化合物对NO的抑制作用图。

[0041] 图5为本发明所述苯丙素类化合物对TNF-α的抑制作用图。

[0042] 图6为本发明所述苯丙素类化合物对IL-1β的抑制作用图。

[0043] 图7为本发明所述苯丙素类化合物对IL-6的抑制作用图。

[0044] 图8为本发明所述苯丙素类化合物对OH的抑制作用图。

具体实施方式

[0045] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明，但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明，本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。除非特别说明，本实施例所用的原料和设备均为本技术领域常规市购的原料和设备。

[0046] 本发明的化合物是所述式(I)所示的苯丙素类化合物及式(II)或式(III)所示该化合物药学上可接受的盐。该化合物可以采用本发明提供的以大叶千斤拔为原料提取的方法制备得到，也可以根据本发明提供的结构式结合采用本领域的化学合成等方法制备得到。

[0047] 作为本发明所述苯丙素类化合物的盐，只要是药学上可接受的盐即可，可列举为与盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、羧酸、磷酸、乳酸等无机酸形成的无机酸盐；与磺酸形成的磺酸盐；与钾、钠、钙、镁、锂等碱金属的氢氧化物形成的碱金属盐，与铵形成的铵盐等。

[0048] 本发明苯丙素类化合物可用作如宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、乳腺炎、咽喉炎和/或关节炎等炎症性疾病的治疗药物。

[0049] 本发明化合物可以与药学上允许的辅料和/或载体一起用作药物组合物，也可以在加入药学上允许的辅料和/或载体的情况下与金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参中的一种或几种中药材或提取物的组合用作药物组合物，本发明化合物还可以与其他药学上可接受的药效成分一起用作药物组合物。

[0050] 作为药物组合物，可以是片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、丸剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂、注射剂、软膏剂、栓剂、喷雾剂等。

[0051] 进一步地，片剂可以是在添加药学上允许的辅料和/或载体的情况下制成的糖衣片、薄膜衣片、肠溶性包衣片或双层片、多层片。

[0052] 本发明的辅料和/或载体可以如下：

[0053] 制成固体制剂，可以使用添加剂，例如蔗糖、乳糖、纤维素糖、麦芽糖醇、葡萄糖、淀粉类、琼脂、海藻酸盐类、甲壳素、壳聚糖类、果胶类、阿拉伯树胶类、明胶类、胶原类、酪蛋白、白蛋白、磷酸钙、山梨糖醇、甘氨酸、甘油、聚乙二醇、碳酸氢钠、滑石等。

[0054] 制成半固体制剂，可以使用动植物性油脂(橄榄油、玉米油、蓖麻油等)、矿物性油脂(凡士林、白凡士林、固态石蜡等)、蜡类(霍霍巴油、巴西棕榈蜡、蜂蜡等)、部分合成或全合成的甘油脂肪酸酯(月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸等)等。

[0055] 制成液体制剂，可使用添加剂，例如氯化钠、葡萄糖、山梨糖醇、甘油、橄榄油、丙二醇、乙醇等。尤其制成注射剂的情况下，可以使用无菌水溶液，例如生理盐水、等渗液、油性液，如麻油、大豆油。另外，还可以根据需要，并用适当的助悬剂，如羧甲基纤维素钠，非离子表面活性剂、助溶剂，如苯甲酸苄酯、苯甲醇等。

[0056] 这些制剂的有效成分的量为制剂的0.01～80重量%，适宜为1～50重量%，给药量根据患者的症状、体重、年龄等不同而变化。

[0057] 实施例1苯丙素类化合物的制备

[0058] 本实施例提供式(I)所示苯丙素类化合物的一种制备方法，包括如下步骤：

[0059] S1.取大叶千斤拔50kg，以根部为原料，干燥，切成小块。经8倍量60%的乙醇回流提取3次，每次2小时，将提取液合并，浓缩至无醇味，得浸膏备用；

[0060] S2.将步骤S1中浓缩后的浸膏溶于10L水中，采用D101大孔吸附树脂柱对其进行洗脱，洗脱剂为水，洗脱3个柱体积，收集洗脱液，命名为MM-1，备用；

[0061] S3.将步骤S2中收集到的流分MM-1用反相ODS柱层析进行洗脱，洗脱剂为甲醇-水系统，其体积比为25:75，洗脱18个柱体积，按每3个柱体积收集一个流分的洗脱液，按顺序收集6个流分，分别命名为:MM-11，MM-12，MM-13，MM-14，MM-15，MM-16备用；

[0062] S4.将步骤S3中的收集到的流分MM-13用制备液相分离，制备液相色谱柱为：YMC，20mm*250mm，流速：5ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇：水：乙酸的体积比为25:75:0.01，按出峰顺序收集洗脱液，共收集4个流分，分别命名为MM-131，MM-132，MM-133，MM-134，备用；

[0063] S5.将步骤S4中收集到的流分MM-133用制备液相纯化，制备液相色谱柱为：YMC，20mm*250mm，流速：5ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇：水：乙酸的体积比为15:85:0.01，收集洗脱液，重结晶后得到所述苯丙素类化合物。

[0064] 实施例2苯丙素类化合物的制备

[0065] 本实施例提供式(I)所示苯丙素类化合物的一种制备方法，包括如下步骤：

[0066] S1.取大叶千斤拔40kg，以根部为原料，干燥，切成小块。经6倍量50％的乙醇回流提取2次，每次1小时，将提取液合并，浓缩至无醇味，得浸膏备用；

[0067] S2.将步骤S1中浓缩后的浸膏溶于5L水中，采用D101大孔吸附树脂柱对其进行洗脱，洗脱剂为乙醇与水的体积比为15:85，洗脱3个柱体积，收集洗脱液，命名为MM-1，备用；

[0068] S3.将步骤S2中收集到的流分MM-1用反相ODS柱层析进行洗脱，洗脱剂为甲醇-水系统，其体积比为20:80，洗脱18个柱体积，按每3个柱体积收集一个流分的洗脱液，按顺序收集6个流分，分别命名为：MM-11，MM-12，MM-13，MM-14，MM-15，MM-16备用；

[0069] S4.将步骤S3中的收集到的流分MM-13用制备液相分离，制备液相色谱柱为：YMC，20mm*250mm，流速：10ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇：水：乙酸的体积比为35:65:0.01，按出峰顺序收集洗脱液，共收集4个流分，分别命名为MM-131，MM-132，MM-133，MM-134，备用；

[0070] S5.将步骤S4中收集到的流分MM-133用制备液相纯化，制备液相色谱柱为：YMC，20mm*250mm，流速：5ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇：水：乙酸的体积比为15:85:0.01，收集洗脱液，重结晶后得到所述苯丙素类化合物。

[0071] 实施例3苯丙素类化合物的制备

[0072] 本实施例提供式(I)所示苯丙素类化合物的一种制备方法，包括如下步骤：

[0073] S1.取大叶千斤拔60kg，以根部为原料，干燥，切成小块。7倍量70％的乙醇回流提取4次，每次3小时，将提取液合并，浓缩至无醇味，得浸膏备用；

[0074] S2.将步骤S1中浓缩后的浸膏溶于8L水中，采用D101大孔吸附树脂柱对其进行洗脱，洗脱剂为乙醇与水的体积比为10:90，洗脱3个柱体积，收集洗脱液，命名为MM-1，备用；

[0075] S3.将步骤S2中收集到的流分MM-1用反相ODS柱层析进行洗脱，洗脱剂为甲醇-水系统，其体积比为30:70，洗脱18个柱体积，按每3个柱体积收集一个流分的洗脱液，按顺序收集6个流分，分别命名为：MM-11，MM-12，MM-13，MM-14，MM-15，MM-16备用；

[0076] S4.将步骤S3中的收集到的流分MM-13用制备液相分离，制备液相色谱柱为：YMC，20mm*250mm，流速：10ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇：水：乙酸的体积比为30:70:0.01，按出峰顺序收集洗脱液，共收集4个流分，分别命名为MM-131，MM-132，MM-133，MM-134，备用；

[0077] S5.将步骤S4中收集到的流分MM-133用制备液相纯化，制备液相色谱柱为：YMC，20mm*250mm，流速：5ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇：水：乙酸的体积比为15:85:0.01，收集洗脱液，重结晶后得到所述苯丙素类化合物。

[0078] 实施例4苯丙素类化合物的制备

[0079] 本实施例提供式(I)所示苯丙素类化合物的一种制备方法，包括如下步骤：

[0080] S1.取大叶千斤拔50kg，以根部为原料，干燥，切成小块。8倍量60％的乙醇回流提取2次，每次1.5小时，将提取液合并，浓缩至无醇味，得浸膏备用；

[0081] S2.将步骤S1中浓缩后的浸膏溶于6L水中，采用D101大孔吸附树脂柱对其进行洗脱，洗脱剂为乙醇与水的体积比为5:95，洗脱3个柱体积，收集洗脱液，命名为MM-1，备用；

[0082] S3.将步骤S2中收集到的流分MM-1用反相ODS柱层析进行洗脱，洗脱剂为甲醇-水系统，其体积比为25:75，洗脱18个柱体积，按每3个柱体积收集一个流分的洗脱液，按顺序收集6个流分，分别命名为:MM-11，MM-12，MM-13，MM-14，MM-15，MM-16备用；

[0083] S4.将步骤S3中的收集到的流分MM-13用制备液相分离，制备液相色谱柱为:YMC，20mm*250mm，流速:10ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇:水:乙酸的体积比为25:75:0.01，按出峰顺序收集洗脱液，共收集4个流分，分别命名为MM-131，MM-132，MM-133，MM-134，备用；

[0084] S5.将步骤S4中收集到的流分MM-133用制备液相纯化，制备液相色谱柱为:YMC，20mm*250mm，流速:5ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇:水:乙酸的体积比为15:85:0.01，收集洗脱液，重结晶后得到所述苯丙素类化合物。

[0085] 实施例5苯丙素类化合物的制备

[0086] 本实施例提供式(I)所示苯丙素类化合物的一种制备方法，包括如下步骤：

[0087] S1.取大叶千斤拔50kg，以根部为原料，干燥，切成小块。8倍量80％的乙醇回流提取2次，每次1.5小时，将提取液合并，浓缩至无醇味，得浸膏备用；

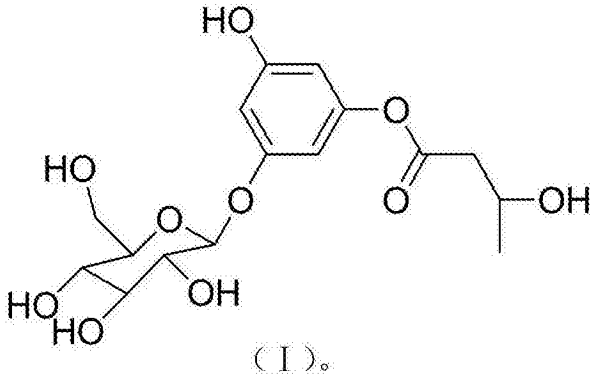
[0088] S2.将步骤S1中浓缩后的浸膏溶于6L水中，采用D101大孔吸附树脂柱对其进行洗脱，洗脱剂为乙醇与水的体积比为10:90，洗脱3个柱体积，收集洗脱液，命名为MM-1，备用；

[0089] S3.将步骤S2中收集到的流分MM-1用反相ODS柱层析进行洗脱，洗脱剂为甲醇-水系统，其体积比为28:72，洗脱18个柱体积，按每3个柱体积收集一个流分的洗脱液，按顺序收集6个流分，分别命名为:MM-11，MM-12，MM-13，MM-14，MM-15，MM-16备用；

[0090] S4.将步骤S3中的收集到的流分MM-13用制备液相分离，制备液相色谱柱为:YMC，20mm*250mm，流速:10ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇:水:乙酸的体积比为10:90:0.01，按出峰顺序收集洗脱液，共收集4个流分，分别命名为MM-131，MM-132，MM-133，MM-134，备用；

[0091] S5.将步骤S4中收集到的流分MM-133用制备液相纯化，制备液相色谱柱为:YMC，20mm*250mm，流速:5ml/min，流动相为甲醇-水-乙酸系统，甲醇:水:乙酸的体积比为15:85:0.01，收集洗脱液，重结晶后得到所述苯丙素类化合物。

[0092] 将实施例1至实施例5制备得到的化合物进行质谱、核磁共振氢谱、核磁共振碳谱的检测，结果证明所得化合物为:3’-羟基-4’葡萄糖基-3-羟基丁酸甲酯。其结构式如式(I)所示：

[0093] 

（Ⅰ）。

[0094] 其质谱、核磁共振氢谱、核磁共振碳谱的谱图数据如下：

[0095] HR-ESIMS显示[M+Na]+为m/z 397.1267，结合核磁特征，可得分子式为$C_{16}H_{22}O_{10}$，不饱和度为6。

[0096] ^{1}H-NMR(600MHz，CD_3OD)：7.43(dd，1H)，7.12(dd，1H)，6.81(dd，1H)，4.84(d，1H)，4.12(t，2H)，3.56(m，1H)，1.14(s，3H)。

[0097] ^{13}C-NMR(150MHz，CD_3OD)：179.3(C-1)，168.8(C-5')，150.1(C-1')，144.7(C-3')，129.9(C-2')，116.4(C-4')，114.8(C-6')，103.6(C-1")，76.6-61.4(C2"-6")，42.9(C-2)，21.8(C-3)，17.0(-CH_3)。

[0098] 实施例6苯丙素类化合物盐的制备

[0099] 苯丙素类化合物盐酸盐的制备：

[0100] 搅拌下将该苯丙素类化合物甲醇溶液中滴加饱和盐酸至pH值2-3，搅拌下滴加乙腈，抽滤，干燥得到白色粉末固体，即为苯丙素类化合物的盐酸盐。

[0101] 苯丙素类化合物磺酸盐的制备：

[0102] 在含有该苯丙素类化合物、溶剂、磺酸、中性油和促进剂的反应体系中加入碱金属的氢氧化物，加入溶剂、低级醇和助促进剂，通入二氧化碳，分离得到白色粉末固体，即为化合物的磺酸盐。

[0103] 苯丙素类化合物钾盐或钠盐的制备：

[0104] 将溶于乙醇中的KOH或NaOH加入该苯丙素类化合物中，搅拌下加热回流反应，冷制室温，搅拌下滴加乙腈，抽滤，干燥得白色固体，即为该苯丙素类化合物的钾盐或钠盐。

[0105] 苯丙素类化合物铵盐的制备：

[0106] 搅拌下将该苯丙素类化合物甲醇溶液中滴加饱和氨水至pH值9-11，搅拌下滴加乙腈，抽滤，干燥得到白色固体，即为苯丙素类化合物的铵盐。

[0107] 上述化合物盐的谱图数据：

[0108] 苯丙素类化合物盐酸盐：ESIMS显示m/z 410.62，核磁特征^{1}H-NMR(600MHz，CD3OD)：7.40(dd，1H)，7.07(dd，1H)，6.77(dd，1H)，4.64(d，1H)，4.02(t，2H)，3.46(m，1H)，1.11(s，3H)。

[0109] 苯丙素类化合物磺酸盐：ESIMS显示为m/z 438.22，核磁特征^{1}H-NMR(600MHz，CD3OD)：7.54(dd，1H)，7.13(dd，1H)，6.80(dd，1H)，4.83(d，1H)，4.10(t，2H)，3.54(m，1H)，1.13(s，3H)。

[0110] 苯丙素类化合物钾盐或钠盐：

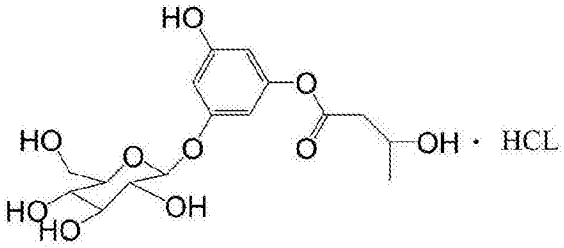
[0111] 钾盐：ESIMS显示m/z 412.42，核磁特征^{1}H-NMR(600MHz，CD3OD)：7.55(dd，1H)，

7.11(dd,1H),6.86(dd,1H),4.83(d,1H),4.11(t,2H),3.56(m,1H),1.14(s,3H)。

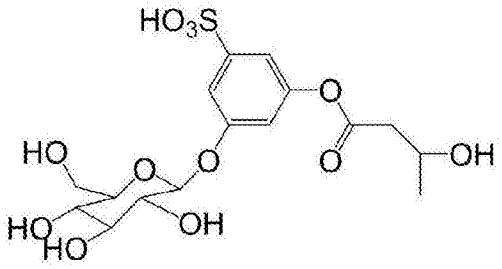
[0112] 钠盐:ESIMS显示m/z 396.54,7.51(dd,1H),7.10(dd,1H),6.87(dd,1H),4.85(d,1H),4.12(t,2H),3.57(m,1H),1.14(s,3H)。

[0113] 苯丙素类化合物铵盐:ESIMS显示m/z 389.26,核磁特征^{1}H-NMR(600MHz,CD3OD):7.46(dd,1H),7.17(dd,1H),6.80(dd,1H),4.84(d,1H),4.13(t,2H),3.51(m,1H),1.11(s,3H)。

[0114] 上述苯丙素类化合物盐的结构式如式(Ⅳ)～式(Ⅷ)所示。

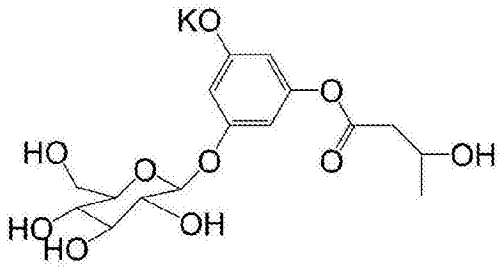


(Ⅳ);

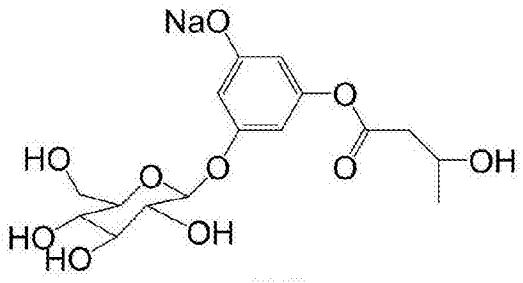


(Ⅴ);

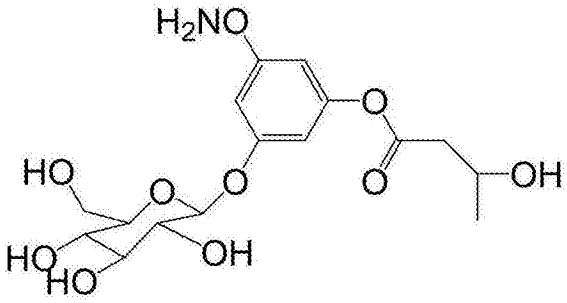
[0115]



(Ⅵ);



(Ⅶ);

[0116] 

(Ⅷ)。

[0117] 其中,式(Ⅳ)为制备得到的苯丙素类化合物盐酸盐,式(Ⅴ)为制备得到的苯丙素类化合物的其中一种磺酸盐,式(Ⅵ)为制备得到的苯丙素类化合物的其中一种钾盐,式(Ⅶ)为制备得到的苯丙素类化合物的其中一种钠盐,式(Ⅷ)为制备得到的苯丙素类化合物的其中一种铵盐。

[0118] 实验例7应用试验

[0119] 本发明所述化合物以及盐对LPS诱导的RAW 264.7巨噬细胞氧化应激与炎症的影响。(为了实验过程中记录方便,以下将本发明所述的苯丙素类化合物标号为:药物MM-133,即本发明中所述的药物MM-133即是指本发明式(I)所示苯丙素类化合物或其药学上可接受的盐。)

[0120] 1材料与方法

[0121] 1.1药品及仪器

[0122] 脂多糖(lipopolysaccharide,LPS),MTT购自Sigma公司;小鼠巨噬细胞Raw264.7购自湘雅细胞库;PBS;DMEM高糖培养基、胎牛血清、青霉素与链霉素;全自动酶标仪;恒温CO2培养箱。

[0123] 小鼠白介素1-β(IL-1-β)ELISA检测试剂盒,批号:2014/06(96T);小鼠白介素6(IL-6)ELISA检测试剂盒,批号:2014/06(96T);小鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)ELISA检测试剂盒,批号:2014/06(96T);小鼠一氧化氮(NO)ELISA检测试剂盒,批号:2014/10(96T);小鼠羟基自由基(OH)ELISA检测试剂盒,批号:2014/10(96T)。

[0124] 1.2药物制备

[0125] 首先用少量DMSO溶解,然后用DMEM稀释至一定的浓度,使终浓度中DMSO含量少于1‰。

[0126] 1.3细胞培养

[0127] 小鼠巨噬细胞Raw 264.7培养于含10%热灭活(56℃,30min)的胎牛血清(FBS)、10U/mL青霉素钠、100μg/mL链霉素的DMEM培养基中,37℃、5%CO_2恒温培养箱中孵育生长。

[0128] 1.4细胞活力测定

[0129] 细胞活力通过MTT法来测定。将细胞制成细胞悬液接种于96孔板(1×104个/孔)孵育24h,再同步化24h,然后将不同浓度的药物作用于细胞2h,然后再加入LPS(30μg/mL)刺激24h,吸弃原培养基,每孔加入100μL的MTT(0.5mg/mL)继续孵育4h,吸弃培养基,每孔加入150μL的DMSO,摇床振摇10min,在490nm处测定吸光度。

[0130] 1.5 NO含量测定

[0131] Raw 264.7细胞接种于96孔板24h,再同步化24h,然后将不同浓度的药物作用于细

胞2h，然后再加入LPS(30μg/mL)刺激24h，最后收集上清液，并于10000rpm离心5min，分装上清并置于-80℃保存备用。通过小鼠NO试剂盒测定NO含量。

[0132] 1.6炎症因子TNF-α，IL-1β，IL-6测量

[0133] 样品取1.5制备好的样品用于后续炎症因子测定。细胞产生TNF-α，IL-1β，IL-6的量通过小鼠TNF-α，IL-1β，IL-6试剂盒来测定。

[0134] 1.7 OH含量测定

[0135] 样品取1.5制备好的样品用于OH因子测定。通过OH试剂盒测定含量。

[0136] 1.8统计分析

[0137] 采用SPSS17.0软件，实验数据以(x±s表示；所得数据通过用单因素方差分析，方差齐性用LSD检验，方差不齐用Dunnett T3检验。

[0138] 2实验结果

[0139] 2.1细胞活力

[0140] 药物对细胞活力的影响通过MTT法来评价。如图3所示，药物MM-133在1.50-13.50μg/mL浓度范围内对Raw 264.7细胞活力没有显著影响；因此在此范围浓度下的药物浓度对于后续实验是合适的。

[0141] 2.2药物抑制NO的产生

[0142] 如图4所示，通过LPS刺激Raw 264.7细胞，其产生NO(65.81±2.93IU/mL)含量与正常组NO(33.61±2.19IU/mL)相比明显升高($p<0.01$)。药物MM-133在该浓度下对LPS引起的NO含量升高没有明显的抑制作用。

[0143] 2.3药物抑制TNF-α，IL-1β，IL-6的产生

[0144] 如图5至图7所示，通过LPS刺激Raw 264.7细胞，Raw 264.7细胞炎症因子TNF-α(132.16±5.28pg/mL)，IL-1β(358.80±24.64pg/mL)，IL-6(198.39±5.97pg/mL)含量与正常组TNF-α(65.41±6.29pg/mL)，IL-1β(172.67±10.06pg/mL)，IL-6(103.34±2.88pg/mL)相比含量明显升高($p<0.01$)；说明LPS能够刺激Raw264.7细胞产生大量炎症因子。

[0145] 药物MM-133在浓度(10.50-13.50μg/mL)范围内对LPS刺激引起的Raw 264.7细胞炎症因子TNF-α含量有明显的抑制作用($p<0.05$)，并且表现出明显的剂量依赖关系；在浓度(4.50-13.50μg/mL)范围内对炎症因子IL-1β含量有明显的抑制作用($p<0.05$)，表现出明显的剂量依赖关系；在浓度(7.50-13.50μg/mL)范围内对炎症因子IL-6含量有明显的抑制作用($p<0.05$)，表现出明显的剂量依赖关系。

[0146] 2.4药物抑制OH的产生

[0147] 如图8所示，通过LPS刺激Raw 264.7细胞，其产生OH(113.58±6.03ng/mL)含量与正常组OH(63.40±1.19ng/mL)相比明显升高($p<0.01$)。

[0148] 药物MM-133在(7.50-13.50μg/mL)浓度范围内对LPS引起的OH含量变化有明显的抑制作用($p<0.05$)，并表现出剂量依赖关系。

[0149] 本实验经体外培养，研究了药物MM-133对小鼠巨噬细胞NO，TNF-α，IL-1β，IL-6，OH生成的影响。

[0150] 药物MM-133对因子NO无抑制活性，在较高浓度对细胞炎症因子TNF-α有明显的抑制活性，对IL-1β，IL-6抑制活性较强，说明其通过抑制TNF-α的产生后，对IL-1β，IL-6的含量产生了影响，说明其抗炎活性较好，其在中高浓度时表现出一定的抗氧化活性。

[0151] 实施例8

[0152] 片剂的制备：按实施例1方法先制得式(I)所示的苯丙素类化合物，以及利用该化合物与无机酸(如盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、羧酸、磷酸、乳酸)或磺酸或碱金属的氢氧化物(如氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化锂)或铵制成的盐，按该化合物或其任意一种盐与赋形剂重量比为1:10的比例加入赋形剂，制粒压片。

[0153] 实施例9

[0154] 散剂的制备：按实施例1方法先制得式(I)所示的苯丙素类化合物，以及利用该化合物与无机酸(如盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、羧酸、磷酸、乳酸)或磺酸或碱金属的氢氧化物(如氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化锂)或铵制成的盐，按常规散剂制法制成散剂。

[0155] 实施例10

[0156] 胶囊剂或颗粒剂的制备：按实施例1方法先制得式(I)所示的苯丙素类化合物，以及利用该化合物与无机酸(如盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、羧酸、磷酸、乳酸)或磺酸或碱金属的氢氧化物(如氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化锂)或铵制成的盐，按该化合物或其任意一种盐与赋形剂重量比为1:10的比例加入赋形剂，制成胶囊剂或颗粒剂。

[0157] 实施例11

[0158] 注射剂的制备：按实施例1方法先制得式(I)所示的苯丙素类化合物，以及利用该化合物与无机酸(如盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、羧酸、磷酸、乳酸)或磺酸或碱金属的氢氧化物(如氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化锂)或铵制成的盐，按常规注射用水，精滤，灌封灭菌制成注射剂。

[0159] 实施例12

[0160] 一种药物组合物，含有实施例1方法制得式(I)所示的苯丙素类化合物，以及利用该化合物与无机酸(如盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、羧酸、磷酸、乳酸)或磺酸或碱金属的氢氧化物(如氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化锂)或铵制成的盐，以及金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参制成的粉末，和辅料。

[0161] 实施例13

[0162] 一种药物组合物，含有实施例1方法制得式(I)所示的苯丙素类化合物，以及金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参制成的粉末，和辅料。

[0163] 实施例14

[0164] 一种药物组合物，含有实施例1方法制得式(I)所示的苯丙素类化合物，以及金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参的提取物，和辅料。提取物是按专利公告号CN1078079C、CN1170549C、CN1158087C、CN1330335C、CN1296071C、CN1321631C、CN1296072C、CN1296073C的任意一件或几件专利文件中提取方法制备得到。

[0165] 实施例15

[0166] 一种药物组合物，含有实施例1方法制得式(I)所示的苯丙素类化合物，以及利用该化合物与无机酸(如盐酸、氢溴酸、氢氟酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、羧酸、磷酸、乳酸)或磺酸或碱金属的氢氧化物(如氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化锂)或铵制成的盐，以及金樱根、单面针、鸡血藤、功劳木、穿心莲、当归、党参的提取物，和辅料。提取物是按

专利公告号CN1078079C、CN1170549C、CN1158087C、CN1330335C、CN1296071C、CN1321631C、CN1296072C、CN1296073C的任意一件或几件专利文件中提取方法制备得到。

[0167] 以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征和本发明的优势。本领域的技术人员应该了解，本发明不受上述实施例的限制，上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理，在不脱离本发明精神和范围的前提下，本发明还会有各种变化和改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的，这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

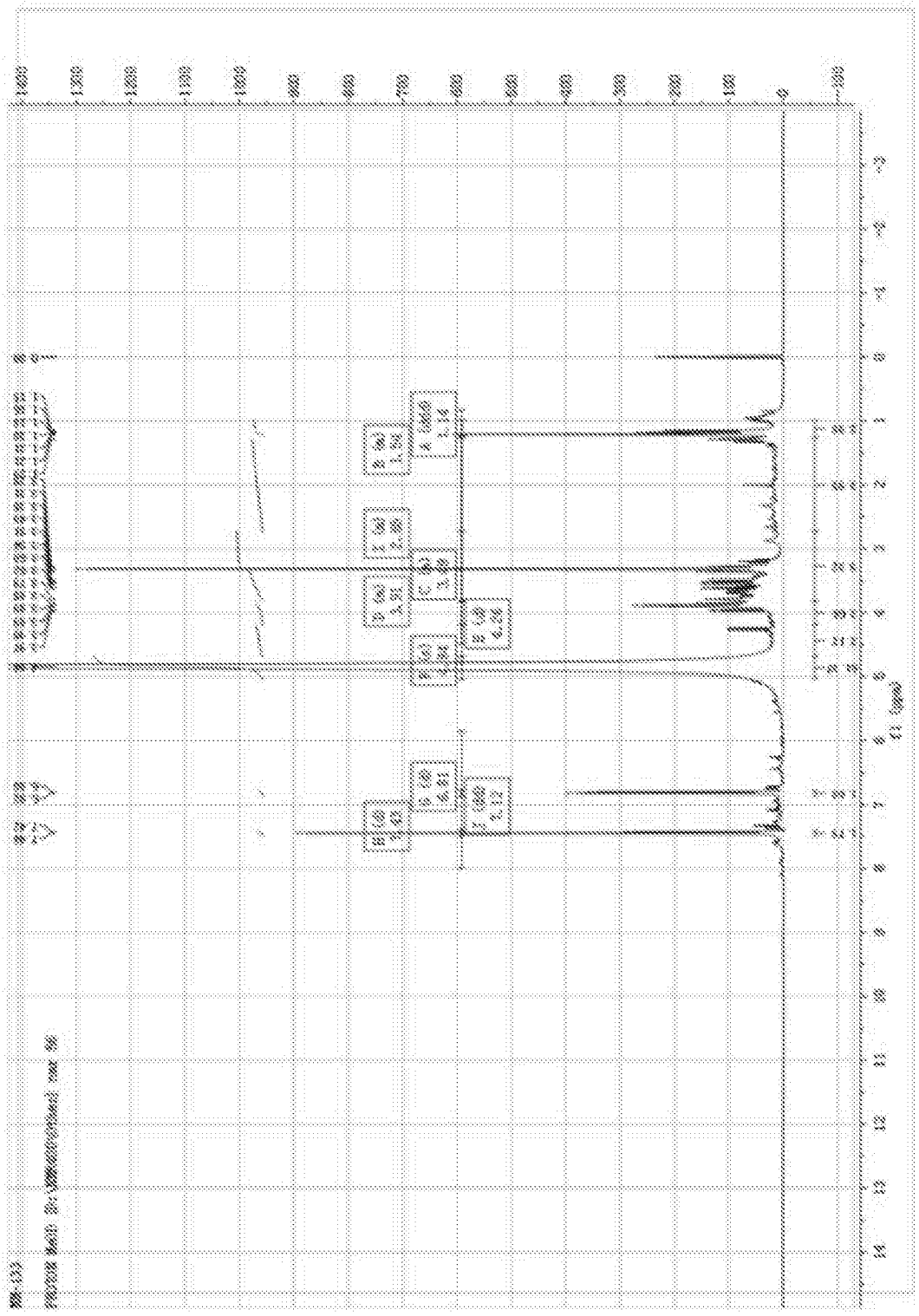


图1

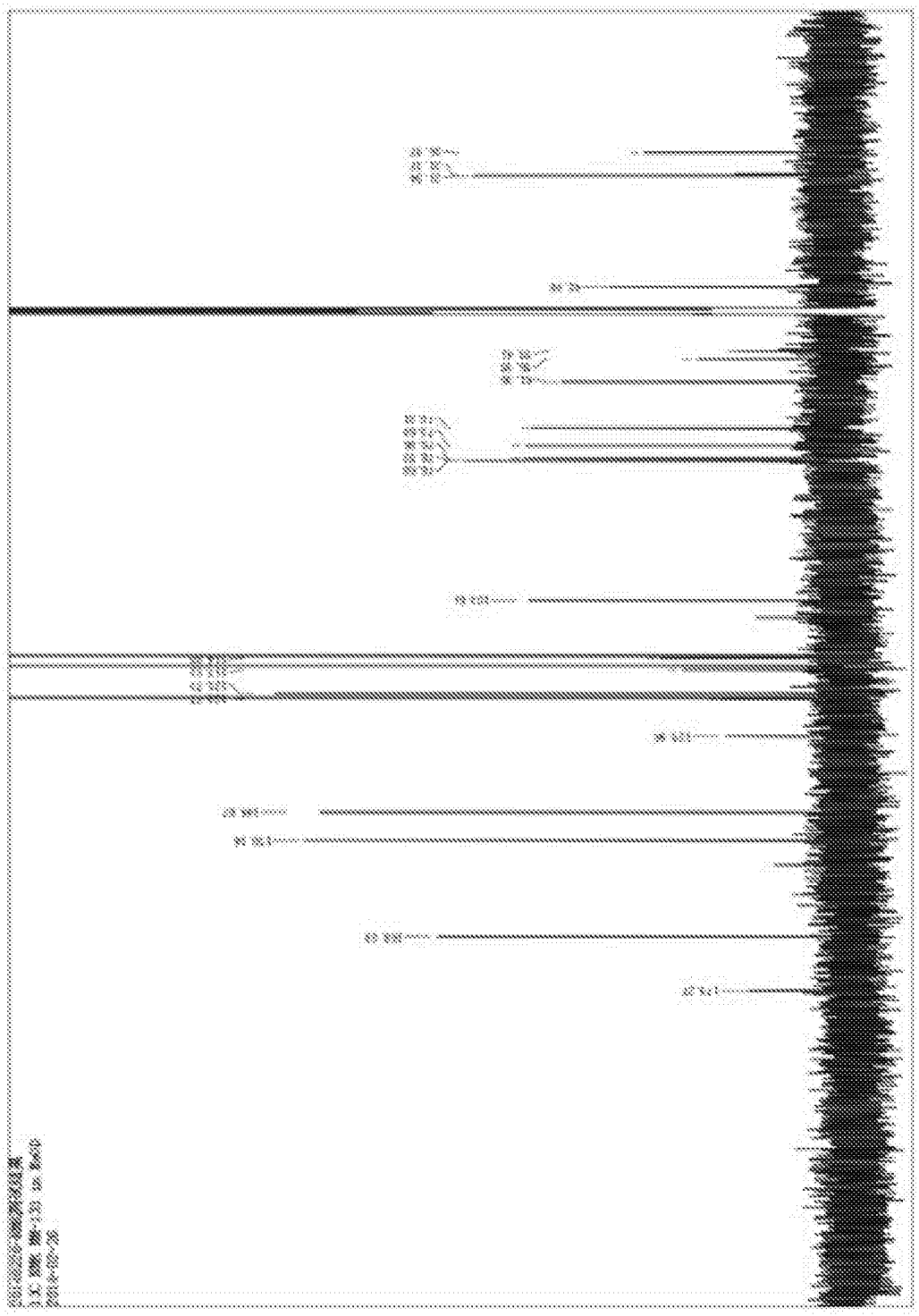


图2

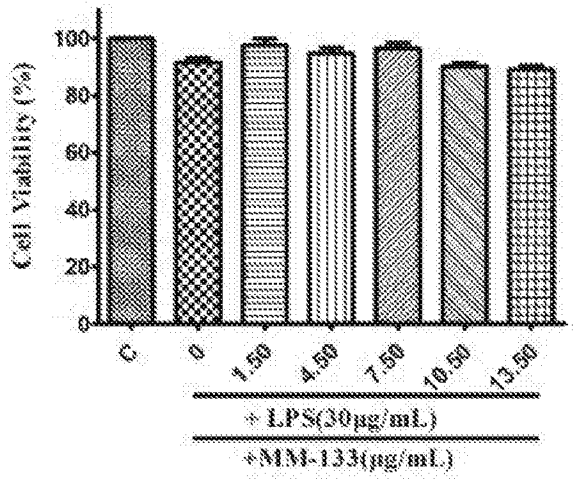

Cell Viability (%)
100
80
60
40
20
0
C
0
1.50
4.50
7.50
10.50
13.50
+ LPS(30μg/mL)
+MM-133(μg/mL)

图3

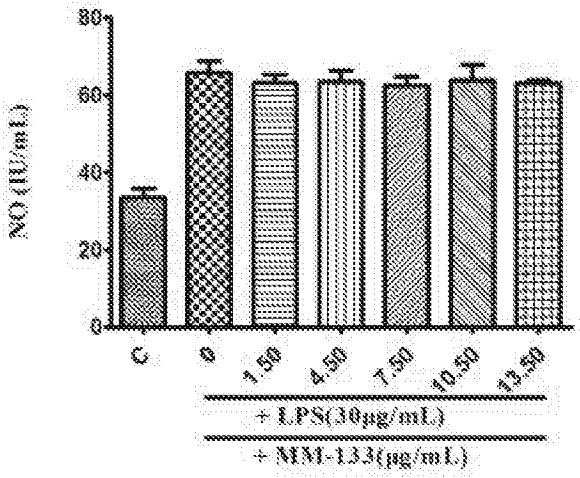

NO (IU/mL)
80
60
40
20
0
C
0
1.50
4.50
7.50
10.50
13.50
+ LPS(30μg/mL)
+ MM-133(μg/mL)

图4

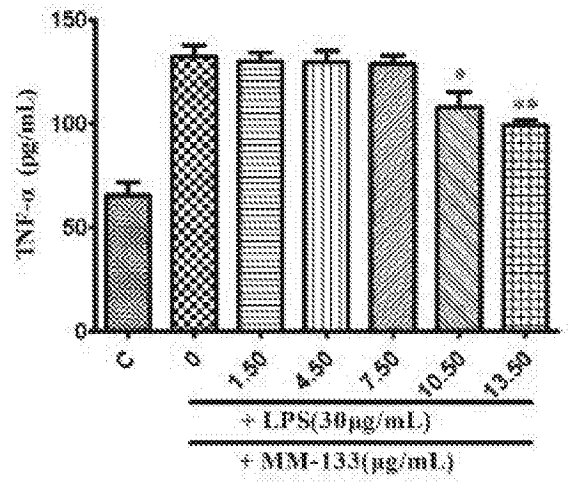

TNF-α (pg/mL)
150
100
50
0
*
**
C
0
1.50
4.50
7.50
10.50
13.50
+ LPS(30μg/mL)
+ MM-133(μg/mL)

图5

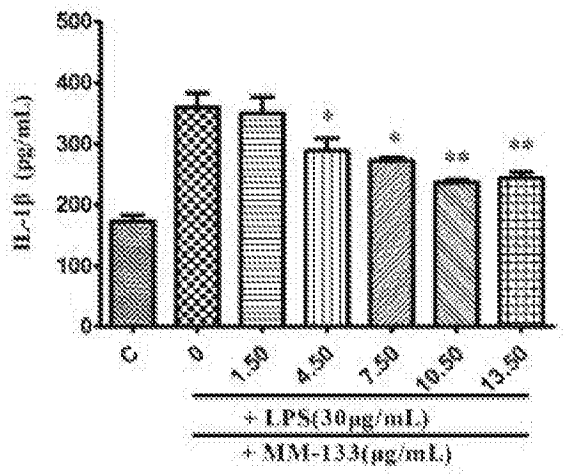

IL-1β (pg/mL)
500
400
300
200
100
0
C
0
1.50
4.50
7.50
10.50
13.50
+ LPS(30μg/mL)
+ MM-133(μg/mL)

图6

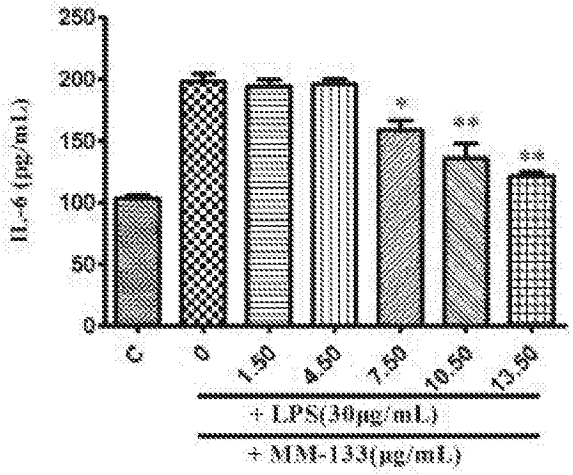

IL-6 (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
C
0
1.50
4.50
7.50
10.50
13.50
+ LPS(30μg/mL)
+ MM-133(μg/mL)

图7

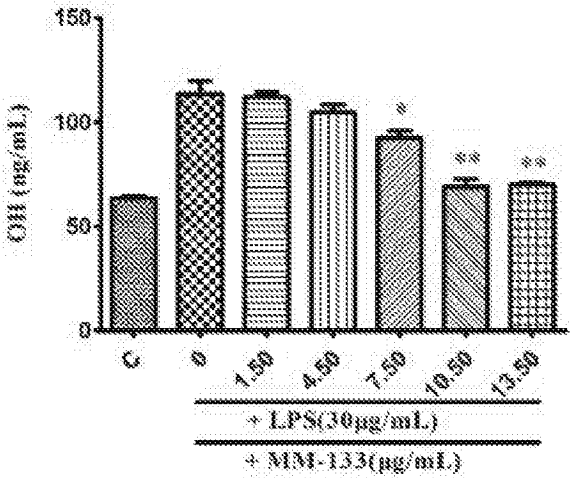

GH (ng/mL)
150
100
50
0
C
0
1.50
4.50
7.50
10.50
13.50
+ LPS(30μg/mL)
+ MM-133(μg/mL)

图8