



(21)申请号 201610544059.6

(22)申请日 2016.07.06

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106167493 A

(43)申请公布日 2016.11.30

(73)专利权人 河北大学

地址 071000 河北省保定市五四路180号

(72)发明人 朱华结 赵丹 曹飞 李婉

(51)Int.Cl.

C07D 491/22(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

审查员 李军勇

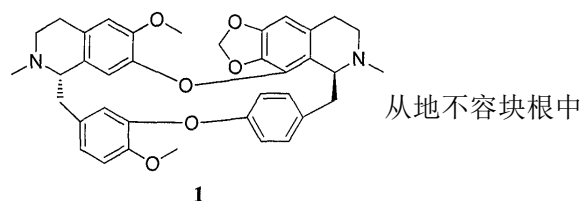
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

新型千金藤素的制备方法及其在药物上的应用

(57)摘要

本发明涉及一类化学结构式1所示的(1R,1'R)-千金藤素、其制备方法和用途：



提取(1R,1'R)-千金藤素。(1R,1'R)-千金藤素对人宫颈癌细胞(HeLa),人肺癌细胞(A549)和人乳腺癌细胞(MCF-7)具有良好的抑制活性,可用于制备抗肿瘤药物。本发明技术方案的第三方面是提供了第一方面所述的(1R,1'R)-千金藤素在制备抗肿瘤药物中的应用。

1. 一种 (1R,1'R)-千金藤素的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

- (1) 将5kg干燥的地不容块根粉碎后用80%的乙醇溶液加热条件下提取3次;
- (2) 在45°C下加压浓缩,得到粗浸膏80g;
- (3) 将粗浸膏溶于水中,用乙酸乙酯萃取5次,得浸膏50g;
- (4) 浸膏加入200-300目硅胶拌样,然后用石油醚/乙酸乙酯为4:1、3:2、2:3、1:4、纯乙酸乙酯洗脱,得到5个组分;
- (5) 将第3个组分反复经过硅胶色谱柱、Sephadex LH-20色谱柱和ODS反向色谱分离得到 (1R,1'R)-千金藤素。

新型千金藤素的制备方法及其在药物上的应用

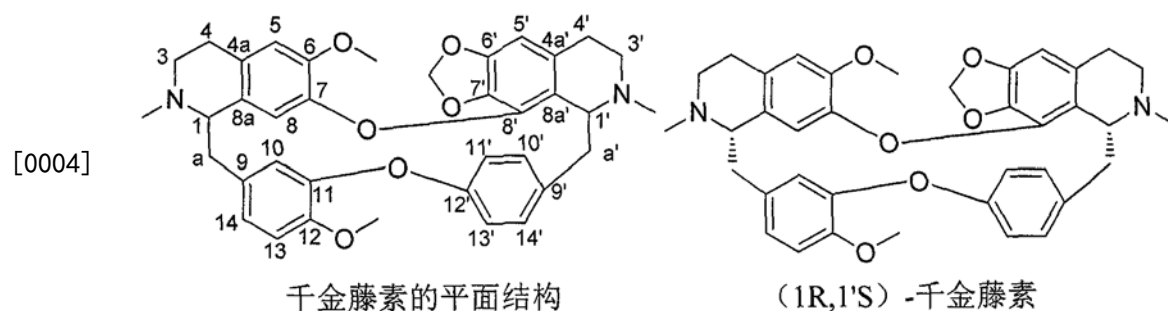
技术领域

[0001] 本发明涉及一类新化合物的制备及其用途,具体是千金藤素及其在制备抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

[0002] 1938年Kondoh和Keimatsu第一次确定千金藤素的结构为(1R,1'S)-千金藤素(Cepharanthine),双苄基喹啉类生物碱是防己科千金藤属植物中的主要成分,具有抗肿瘤,免疫调节、抑菌等作用,用于因放疗、化疗引起的粒细胞缺乏症或其他原因引起的白细胞减少症等[Moshe Rogosnitzky等,Pharmacological Reports,2011,63,337-347]。我们从地不容块根中提取得到新型千金藤素,其结构为(1R,1'R)-千金藤素,未见文献报道。

[0003] (+)-千金藤素(Cepharanthine)分子式为 $C_{37}H_{38}N_2O_6$,分子量为606.71,平面结构如下图。

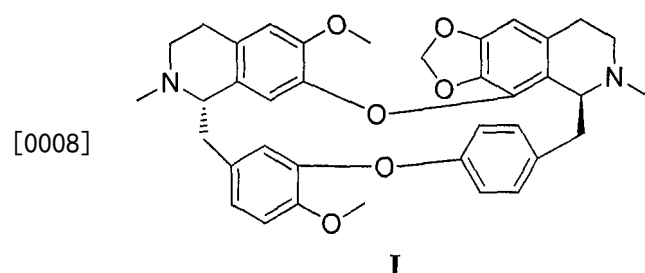


发明内容

[0005] 本发明解决的技术问题是提供一类(1R,1'R)-千金藤素、其制备方法和用途。

[0006] 为解决本发明的技术问题,本发明提供如下技术方案:

[0007] 本发明技术方案的第一方面是提供了一类如化学结构式I所示的(1R,1'R)-千金藤素:



[0009] 本发明技术方案的第二方面是提供了从地不容块根中提取(1R,1'R)-千金藤素的方法,

[0010] 本发明技术方案第三方面是提供了第一方面所述的(1R,1'R)-千金藤素在制备抗肿瘤药中的应用。

[0011] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0012] 本发明的(1R,1'R)-千金藤素是结构新颖的化合物,可用于制备抗肿瘤药物。

附图说明

[0013] 图1是A:(1R,1'S)-1构型的理论计算的ECD光谱与实测值比较图;B:(1S,1'S)-1构型的理论计算的ECD光谱与实测值比较图;

[0014] 图2是A:(1R,1'S)-1构型的理论计算的VCD光谱与实测值比较图;B:(1S,1'S)-1构型的理论计算的VCD光谱与实测值比较图;

[0015] 图3是A:(1R,1'S)-1构型的理论计算的¹³C-NMR与实测值比较图;B:(1S,1'S)-1构型的理论计算的¹³C-NMR与实测值比较图;

具体实施方式

[0016] 以下实施例旨在说明本发明而不是对本发明的进一步限定。

[0017] 实施例1

[0018] (1R,1'R)-千金藤素的提取制备:

[0019] 从安国中药市场购买地不容块根5kg,粉碎,使用适量80%酒精萃取3次,45℃下减压浓缩得到提取粗浸膏80g,将粗浸膏溶于水中,用适量乙酸乙酯萃取5次,得浸膏50g。浸膏加入200-300目硅胶拌样,然后用石油醚/乙酸乙酯(4:1、3:2、2:3、1:4、纯乙酸乙酯)洗脱,粗分得到Fr.1-5个组分,组分Fr.3反复经过硅胶色谱柱、Sephadex LH-20凝胶色谱柱、RP-C18反相填料色谱柱分离得到10mg目标化合物。

[0020] 实施例2

[0021] (1R,1'R)-千金藤素结构的鉴定:

[0022] 实施例1所制化合物定性分析数据和图谱:

[0023] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 2.38-2.44, 2.63-2.68 (2m, 2×2H, 2×NCH₂), 2.56 (s, 3H, N-Me), 2.64 (s, 3H, N-Me), 2.76-2.79, 2.84-2.87 (m, 2×2H, 2×CH₂), 3.60 (s, 1H, CH), 3.68 (s, 3H, OMe), 2.98-3.31 (m, 4H, 2×CH₂), 3.88 (s, 3H, OMe), 4.17 (s, 1H, CH), 5.59, 5.55 (ds, 2H, OCH₂O), 5.47 (s, 1H, C₆H₃), 6.32 (s, 1H, C₆H₂), 6.64 (s, 1H, C₆H₂), 6.77 (ds, 2H, C₆H₃), 6.35 (s, 1H, C₆H₁), 7.03 (s, 1H, C₆H₄), 6.36 (s, 1H, C₆H₄), 6.95 (s, 1H, C₆H₄), 7.37 (d, J=7.9Hz, 1H, C₆H₄);

[0024] ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ: 25.8 (C-4'), 28.9 (C-4), 37.9 (C-a), 40.3 (C-a'), 42.3 (N-Me), 43.9 (N-Me), 45.3 (C-3'), 51.2 (C-3), 55.0 (OMe), 56.0 (OMe), 61.9 (C-1'), 64.2 (C-1), 100.4 (O-CH₂-O), 102.2 (C-5'), 110.9 (C-13), 111.1 (C-5), 116.8 (C-10), 118.5 (C-8), 120.9 (C-11'), 122.2 (C-13'), 123.8 (C-14), 126.5 (C-8a'), 128.0 (C-8a, C-14'), 130.8 (C-4a), 131.7 (C-10'), 132.8 (C-9, C-4a'), 138.1 (C-9'), 138.2 (C-7'), 139.0 (C-8'), 141.9 (C-7), 147.0 (C-12, C-6'), 148.7 (C-6), 148.8 (C-11), 152.3 (C-12');

[0025] ESI-QTOFMS: [M+H]⁺607.2802。

[0026] 通过与参考文献[陈江弢等.天然产物研究与开发,2005,17(5):580-582.]比较,数据一致,确定其平面结构为6',12'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-6,7-(methylenebis(oxy))-oxyacanthan。

[0027] 绝对构型的确定:

[0028] (1) 旋光

[0029] 实验测得化合物 $[\alpha]_D^{20} = +230$ ($C = 0.005 \text{CHCl}_3$)

[0030] 利用量子化学理论(密度泛函), B3LYP/6-311+G(d)//PCM//B3LYP/6-311+G(d) 计算(1R,1'S)构型的旋光值为+60.1; (1S,1'S)构型的旋光值为-206.8,由此判断化合物1的绝对构型可能为(1S,1'S)的对映体(1R,1'R)。

[0031] (2) ECD

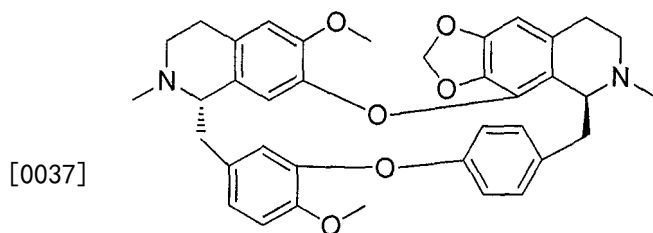
[0032] 利用量子化学理论(密度泛函), 在B3LYP/6-311+G(d)//B3LYP/6-311+G(d)上分别计算(1R,1'S)-1、(1S,1'S)-1构型的ECD,并与实验结果进行比较。如附图1所示,发现实验测试时化合物1在243nm、291nm处有正的Cotton效应,在263nm处为负的Cotton效应,而计算结果显示(1R,1'S)-1在241nm、253nm、297nm处有负Cotton效应,在246nm、275nm处有正Cotton效应,与实验结果比较即不一致也不成镜像关系,因此化合物1构型不是(1R,1'S)。(1S,1'S)-1构型的计算结果显示在238nm、289nm处为负的Cotton效应,264nm处为正的Cotton效应,与实验结果成镜像关系,因此化合物1的绝对构型有可能是(1S,1'S)的对映体(1R,1'R)。

[0033] (3) VCD

[0034] 使用B3LYP/6-31+G(d,p)//PCM/B3LYP/6-31+G(d,p)对(1R,1'S)-1、(1S,1'S)-1进行VCD计算,采用全电子能进行VCD光谱处理,并与实验值进行比较。如附图2所示,计算的两个构型的IR图谱和实验值都比较吻合。图2中(1R,1'S)构型的VCD信号有的和实验方向一致,有的和实验方向相反。例如1'、2'、5'、6'、8'、9'、10'、14'与1、2、5、6、8、9、10、14方向相反,而3'、4'、7'、11'、12'和3、4、7、11、12的方向一致,同样说明化合物1不是(1R,1'S)构型。图2中,计算的是(1S,1'S)构型的VCD,其1'-14'的信号均和实验所得信号方向相反。因此可以推测出化合物1的绝对构型应可能为(1S,1'S)的对映体(1R,1'R)。

[0035] (4) ^{13}C -NMR

[0036] 采用B3LYP/6-311+G(d)//PCM/B3LYP/6-311+G(d)方法对(1R,1'S)-1、(1S,1'S)-1构型进行 ^{13}C -NMR计算,并与实验结果比较。从附图3中可以看出, ^{13}C -NMR计算中,(1R,1'S)构型的有7个芳香碳化学位移差值超过了4ppm,分别是C-8a、C-9、C-10、C-7'、C-9'、C-12'、C-13',相关系数为0.9965。而(1S,1'S)构型的计算结果中只有C-8与实验值相差4.7ppm,其余的都在4.0ppm范围内,其相关系数为0.9986,比(1R,1'S)构型更接近实验值。



(+)-(1R,1'R)-cepharanthine
[α] $_D^{20} +230$ (氯仿)

[0038] 因此综合OR、ECD、VCD、 ^{13}C -NMR的结果可以确定化合物1的绝对构型应为(1S,1'S)的对映体(1R,1'R)。

[0039] 实施例3

[0040] (1R,1'R)-千金藤素的抗肿瘤活性测定

[0041] 1. 抗肿瘤活性原理

[0042] MTT法,是一种检测细胞存活和生长的方法。以活细胞代谢物还原剂噻唑蓝[3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑,MTT]为基础。MTT是一种能接受氢原子的染料。活细胞线粒体中与NADP相关的脱氢酶在细胞内可将黄色的MTT转化成不溶性的蓝紫色的甲瓚(formazon),而死细胞则无此功能。用DMSO溶解formazon后,在一定波长下用酶标仪测定光密度值,既可定量测出细胞的存活率。根据光密度值的变化观察样品对肿瘤细胞的抑制作用。

[0043] 2. 抗肿瘤活性实验

[0044] 细胞系:人宫颈癌细胞(HeLa),人肺癌细胞(A549),人乳腺癌细胞(MCF-7)(以上细胞株均由中国科学药物研究所提供,有本实验室传代保存。)

[0045] 试剂:噻唑蓝(MTT美国AMRESCO公司)、RPMI 1640培养液(北京索莱宝生命科技有限公司)、新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司产品)、抗生素(美国英杰生命技术公司);胰酶(Trypsin 1:250:美国AMRESCO公司);96孔培养板(Costar);二甲基亚砷(北京索莱宝生命科技有限公司);注射用顺铂(齐鲁制药有限公司);DMEM(北京索莱宝生命科技有限公司)。

[0046] 仪器:SW-CJ-2FD洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、Heal Force 90型二氧化碳培养箱(上海力申科学仪器有限公司);CKX41SF型倒置显微镜(日本Olympus Corporation);Synergy HT型酶标仪(美国Bio-Tek公司);超纯水制备仪(湖南科尔顿水务有限公司制备)。

[0047] 实验操作:试样对于癌细胞的测试。一次实验过程中,每种试样设置5个浓度梯度(100 μ mol/mL、50 μ mol/mL、25 μ mol/mL、12.5 μ mol/mL和6.25 μ mol/mL),每个浓度四个平行试样,每组实验平行3次,并通过空白组对照得出结论。酶标仪检测各孔OD值,检测波长570nm。

[0048] 3. 抗肿瘤活性评价

[0049] 1) 细胞抑制率计算:

$$[0050] \quad \text{细胞抑制率}(\%) = \frac{\text{正常OD值} - \text{加药OD值}}{\text{正常OD值}} \times 100\%$$

[0051] 2) IC₅₀值计算

[0052] 试样浓度对数值与细胞抑制率线性回归,利用软件SPSS计算试样对细胞的半数抑制浓度IC₅₀值。(1R,1'R)-千金藤素对癌细胞的IC₅₀见表1。

[0053] 表1 (1R,1'R)-千金藤素对癌细胞的IC₅₀ (μ M)

[0054]

化合物	HELA	MCF-7	A549
(1R,1'R)-千金藤素	9.15	3.5	5.40
顺铂	5.98	5.49	1.45

[0055] 测试结果显示(1R,1'R)-千金藤素对人宫颈癌细胞(HeLa),人肺癌细胞(A549),人乳腺癌细胞(MCF-7)有较好的抑制活性,可作为制备抗癌药的应用。

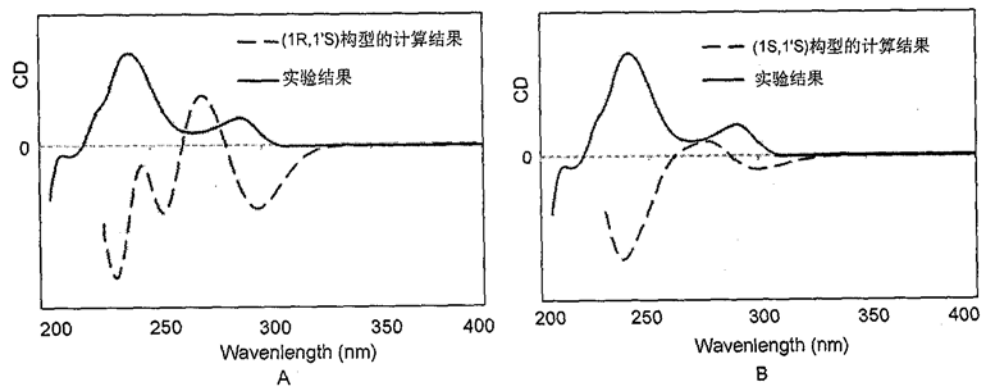


图1

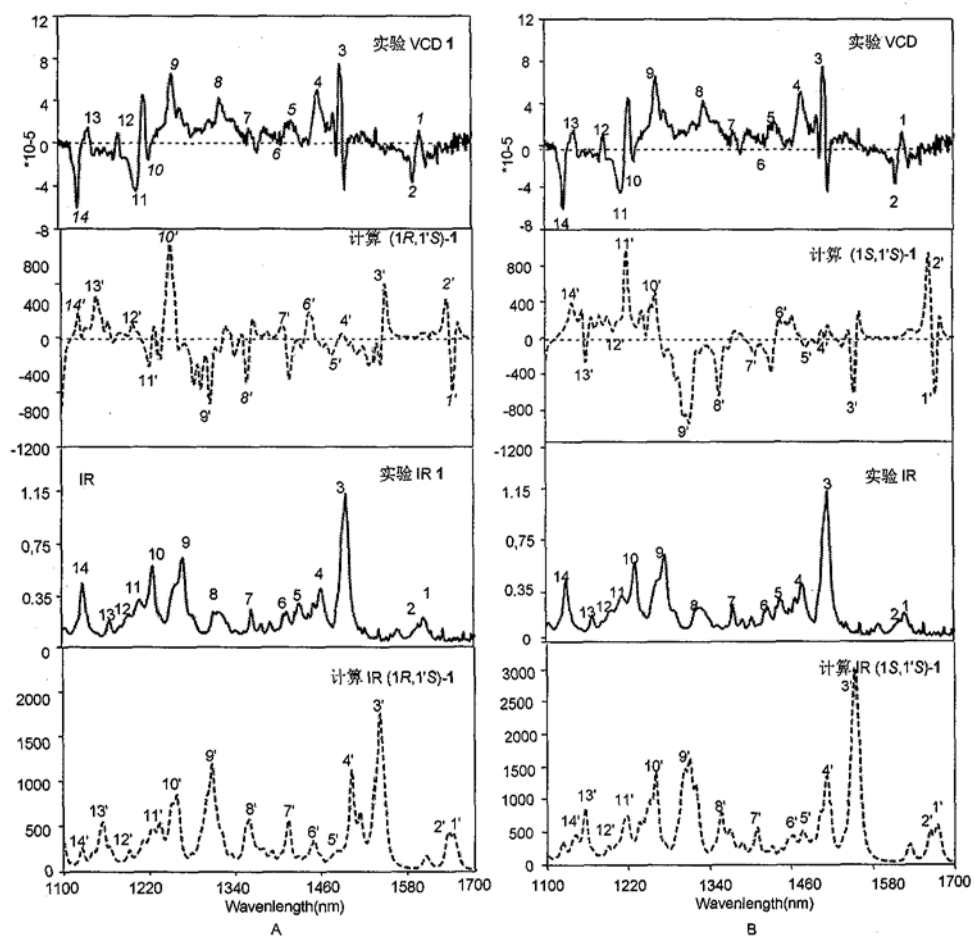


图2

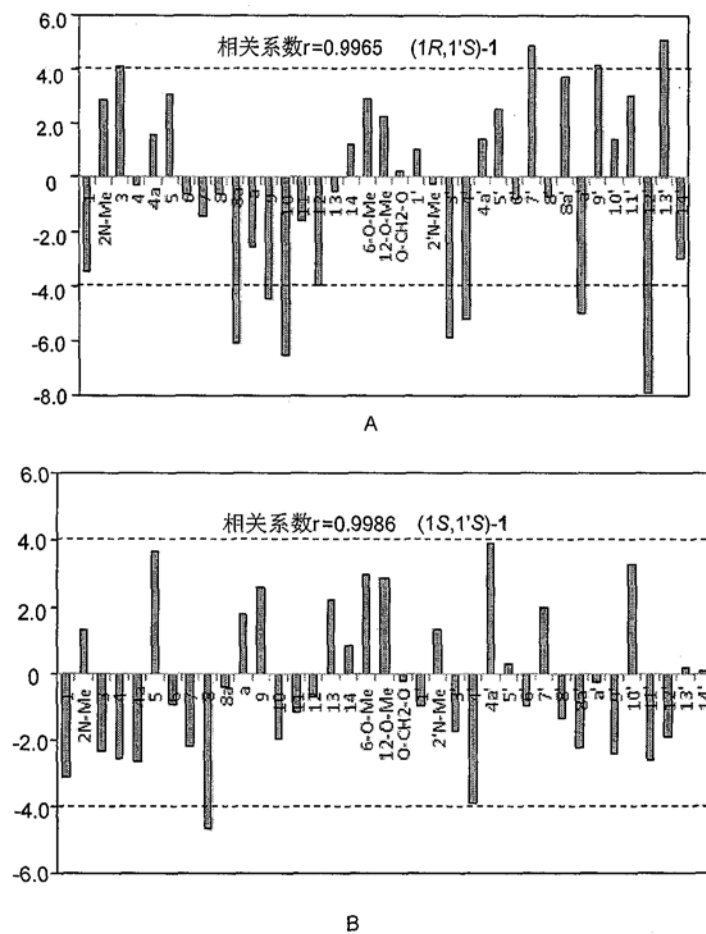


图3