



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106967132 A

(43)申请公布日 2017.07.21

(21)申请号 201710207665.3

A61P 39/00(2006.01)

(22)申请日 2017.03.31

(71)申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 戚建华 王艳惠 向兰 林燕飞

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司 33200

代理人 赵杭丽

(51) Int. Cl.

C07H 13/04(2006.01)

C07H 15/10(2006.01)

C07H 1/08(2006.01)

A61K 31/7024(2006.01)

A61K 31/7032(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

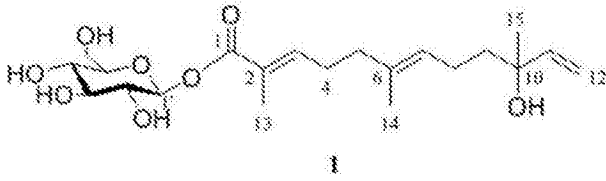
(54)发明名称

深州蜜桃中活性化合物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供深州蜜桃中活性化合物及其制备方法和应用。首先将深州蜜桃果实粉碎后,置于甲醇中浸提,过滤浓缩,并对浸提物进行分离纯化获得两个倍半萜类活性化合物,其中一个为新结构化合物,命名为SZMT01。本发明从深州蜜桃中提取出的两个化合物能够显著延长酵母细胞的复制性寿命,具有抗衰老功能。通过对SZMT01抗衰老机理的分析发现SZMT01是通过调节SOD基因的表达,提高酵母的抗氧化能力,从而达到延长酵母细胞复制性寿命的目的。氧化应激实验说明SZMT01在双氧水存在的条件下可以提高酵母的生存率。本发明针对深州蜜桃活性化合物在延缓衰老及治疗衰老性疾病方面进行了研究,对新药研发具有重要的现实意义。

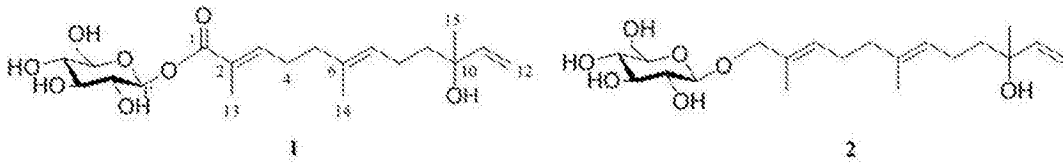
1. 一种深州蜜桃中活性化合物,其特征在于,所述深州蜜桃活性化合物称为化合物1,其结构式为:



2. 一种深州蜜桃中活性化合物的制备方法,其特征在于,所述化合物分别为化合物1和化合物2,通过以下步骤实现:

- (1) 取深州蜜桃果实,粉碎后,置于甲醇中震荡浸提,过滤浓缩,获得浸提物;
- (2) 对浸提物进行分离纯化,获得所述的深州蜜桃活性化合物;

化合物1和化合物2的结构式如下:



3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述浸提的温度为室温,时间为24h。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述分离纯化通过以下步骤实现:

- (a) 以甲醇:水溶剂系统作洗脱剂,对浸提物进行第一次分离,获得目标馏分I;
- (b) 以甲醇:水溶剂系统作洗脱剂,对所述目标馏分I进行第二次分离,获得活性馏分II和III;
- (c) 以甲醇水溶液为流动相,利用反相HPLC对活性馏分II和III进行第三次分离,分别获得所述深州蜜桃活性化合物1和化合物2。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(a)中,甲醇:水溶剂系统按体积比30:70,50:50,70:30,100:0依次洗脱,体积比70:30洗脱的馏分为目标馏分I。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(b)中,甲醇:水溶剂系统按照体积比50:50,55:45,60:40,65:35,70:30,80:20,100:0依次洗脱,体积比60:40和65:35洗脱的馏分为活性馏分II和活性馏分III。

7. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(c)中,所述流动相为63%甲醇水溶液;分离过程中,取保留时间为13.9分钟的馏分,得到深州蜜桃活性化合物1。

8. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(c)中,所述流动相为65%甲醇水溶液;分离过程中,取保留时间为14.5分钟的馏分,得到深州蜜桃活性化合物2。

9. 根据权利要求2所述方法制备获得的深州蜜桃活性化合物在制备抗衰老药物或保健品中的应用,所述化合物为化合物1和化合物2。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述药物或保健品由权利要求1所述的深州蜜桃两个活性化合物和药学上可接受的载体制成。

深州蜜桃中活性化合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,尤其涉及深州蜜桃中的两种活性化合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 根据最新统计数据,全世界60岁及以上老龄人口在2014年已经达到了9.01亿,预计到2050年这个数字将会超过20亿。世界已进入老龄化社会,随之而来的与衰老相关的疾病已成为日益显著的问题,包括阿尔茨海默病、帕金森在内的神经退行性疾病是世界性的医学难题之一。仅在中国,阿尔茨海默病的患者数量在2010年已增加至569万。在医药学领域,寻找防治老年性疾病的药物已经成为当务之急。

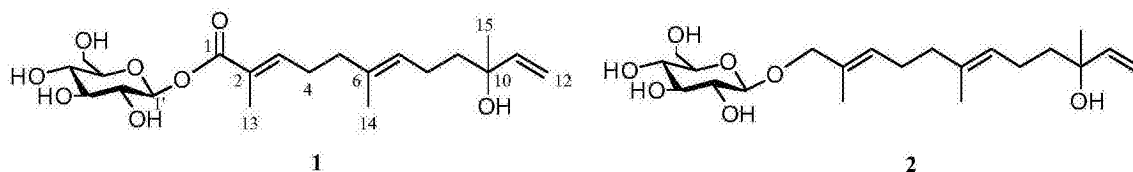
[0003] 经过对衰老机制的长期研究,本领域内已形成多种衰老学说,包括程序衰老说、体细胞突变说、错误成灾说,自由基说、神经内分泌说、免疫衰老说等等。由此可见,衰老是一个十分复杂的过程,即便是同一类抗衰老药物,其发挥药效的方式也不尽相同,彼此之间无必然联系。

[0004] 深州蜜桃来源于河北省深州市,此地具有独特的地理环境和土壤条件,盛产蜜桃,特色鲜明。深州市也被国家林业局命名为“中国蜜桃之乡”。深州蜜桃个头硕大、果型独特、色泽绚丽、果顶凸尖、缝合线深、皮薄肉细、汁甜如蜜、香味浓郁等独特的风味特色,被誉为桃中之王,又称魁桃。历经两千多年,一直作为皇室贡品,是独有的名贵品种,史称“贡桃”。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种深州蜜桃中的活性化合物1(化合物SZMT01)和化合物2,所述的深州蜜桃中的活性化合物为倍半萜苷类化合物,其中化合物1为倍半萜酯苷类新结构化合物,两种活性化合物具有较强的抗衰老能力。其结构式如下:

[0006]



[0007] 上述深州蜜桃活性化合物1的理化性质为:无色粉末; $[\alpha]_D^{28}$ -29.1 (c 0.16, MeOH); 分子式为 $C_{21}H_{34}O_8$;高分辨率质谱ESI-TOF-MS m/z 437.2151 $[M+Na]^+$,理论值: $C_{21}H_{34}O_8Na^+$ 437.2151; 1H 和 ^{13}C NMR如表1所示。

[0008] 活性化合物2的理化性质为:无色粉末; $[\alpha]_D^{28}$ -18.0 (c 0.2, MeOH); 分子式为 $C_{21}H_{36}O_7$;高分辨率质谱ESI-TOF-MS m/z 423.2368 $[M+Na]^+$,理论值: $C_{21}H_{36}O_7Na^+$ 423.2359; ^{13}C NMR (125MHz, CD_3CD_2) 数据如下: δ_c 14.1 (C-13), 16.0 (C-14), 23.7 (C-8), 27.4 (C-4), 27.6 (C-15), 40.3 (C-5), 43.4 (C-9), 62.8 (C-6'), 71.8 (C-4'), 73.9 (C-10), 75.1 (C-2'), 76.0 (C-1), 77.9 (C-5'), 78.2 (C-3'), 102.6 (C-1'), 112.0 (C-12), 126.0 (C-7), 129.9 (C-3), 132.9

(C-2), 135.7 (C-6), 146.4 (C-11)。

[0009] 本发明的另一个目的是提供深州蜜桃中两个活性化合物1 (化合物SZMT01) 和化合物2的制备方法, 通过以下步骤实现:

[0010] (1) 取深州蜜桃果实, 粉碎后, 置于甲醇中浸提, 过滤浓缩, 获得浸提物;

[0011] (2) 对浸提物进行分离纯化, 获得所述深州蜜桃活性化合物1和化合物2。

[0012] 作为优选, 步骤(1)中, 所述浸提的温度为25~30℃, 时间为0.5~24h。更优选, 所述浸提的温度为25℃室温, 时间为24h。

[0013] 进一步地, 步骤(2)中, 所述分离纯化的过程包括:

[0014] (a) 以甲醇:水溶剂系统作洗脱剂, 对浸提物进行第一次分离, 获得目标馏分I;

[0015] (b) 以甲醇:水溶剂系统作洗脱剂, 对所述目标馏分I进行第二次分离, 获得活性馏分II和活性馏分III;

[0016] (c) 以甲醇水溶液为流动相, 利用反相HPLC对活性馏分II和活性馏分III进行第三次分离, 获得所述深州蜜桃活性化合物1和化合物2;

[0017] 其中: 步骤(a)中, 采用十八烷基键合硅胶开口柱进行分离; 甲醇:水溶剂系统按体积比30:70, 50:50, 70:30, 100:0依次洗脱, 体积比70:30洗脱的馏分为目标馏分I。

[0018] 步骤(b)中, 采用十八烷基键合硅胶开口柱进行分离; 甲醇:水溶剂系统按照体积比50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 80:20, 100:0依次洗脱, 体积比60:40和65:35洗脱的馏分为活性馏分II和活性馏分III。

[0019] 步骤(c)中, 所述流动相为63%甲醇水溶液; 分离过程中, 取保留时间为13.9分钟的馏分, 得到深州蜜桃活性化合物1。

[0020] 步骤(c)中, 所述流动相为65%甲醇水溶液; 分离过程中, 取保留时间为14.5分钟的馏分, 得到深州蜜桃活性化合物2。

[0021] 本发明的再一个目的是提供所述深州蜜桃活性化合物在制备抗衰老药物或保健品中的应用, 例如将深州蜜桃制成抗衰老蜜桃饮品等。由深州蜜桃活性化合物和药学上可接受的载体制成。研究表明, 化合物SZMT01和化合物2在抗衰老化合物的体外筛选模型中, 均可以显著延长酵母细胞的复制性寿命。

[0022] 所述药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体, 如填充剂、粘合剂、湿润剂、吸收促进剂、表面活性剂等。

[0023] 所述填充剂可采用淀粉、蔗糖或微晶纤维素; 所述粘合剂可采用淀粉浆、羟丙纤维素、明胶或聚乙二醇; 所述湿润剂可采用硬脂酸镁、微粉硅胶或聚乙二醇类; 所述吸收促进剂可采用聚山梨脂或卵磷脂; 所述表面活性剂可采用伯洛沙姆、脂肪酸山梨坦或聚山梨脂。另外还可以加入其它辅剂如香味剂、甜味剂等。

[0024] 所述抗衰老药物或保健品的剂型可以是片剂, 丸剂, 粉剂, 分散片, 小药囊剂, 酏剂, 混悬剂, 乳剂, 溶液剂, 糖浆剂, 气雾剂, 软胶囊, 硬胶囊, 无菌注射液, 搽剂或栓剂; 可制成常规、速释、缓释或延迟释放制剂。

[0025] 本发明的抗衰老药物可通过各种途径给予, 包括口服、鼻腔、肌肉注射、皮下注射、静脉注射等。

[0026] 为了进一步探究化合物SZMT01在抗衰老方面的作用机理, 我们通过氧化应激实验对化合物SZMT01进行了抗衰老机理初步研究, 发现该化合物SZMT01在双氧水存在的条件下

可以提高酵母的生存率,同时也发现该化合物是通过调节SOD基因的表达,提高酵母的抗氧化能力,从而实现酵母细胞复制性寿命的延长的。

[0027] 根据氧化自由基学说,氧化压力是导致衰老的主要原因。即使在正常条件下线粒体也会产生有害的代谢产物—活性氧 (ROS),这些物质会破坏细胞膜和生物大分子,例如蛋白和核酸,进而破坏细胞的功能,引起衰老和死亡。

[0028] SOD是一个与抗氧化应激相关的基因。化合物SZMT01不能延长SOD敲除后的酵母的复制性寿命,进而证明SZMT01是通过调节SOD基因的表达,从而实现酵母细胞复制性寿命的延长的。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0030] (1) 在酵母衰老模型K6001酿酒酵母细胞中,本发明从深州蜜桃中提取出的化合物SZMT01和2能够显著延长酵母细胞的复制性寿命,具有很强的抗衰老能力。

[0031] (2) 本发明深州蜜桃活性化合物对延缓衰老及治疗衰老性疾病方面的新药研发进行基础性研究,具有重要的现实意义。

附图说明

[0032] 图1为实施例2中制备获得的深州蜜桃活性化合物1 (A) 和化合物2 (B) 对酵母K6001复制性寿命的影响结果;其中,Control表示阴性对照;Res (Resveratrol) 为阳性对照白藜芦醇 (10 μ M);1 7.5 μ M表示浓度为7.5 μ M的化合物1,1 25 μ M表示浓度为25 μ M的化合物1;2 7.5 μ M表示浓度为7.5 μ M的化合物2,2 25 μ M表示浓度为25 μ M的化合物2。

[0033] 图2为实施例3中活性化合物1对酵母突变菌株 Δ sod1 (A) 和 Δ sod2 (B) 复制性寿命的影响结果;其中,Control (K6001) 表示未添加活性化合物1的K6001酵母;Control (Δ sod1) 和Control (Δ sod2) 分别表示未添加活性化合物1的K6001酵母突变菌株 Δ sod1和 Δ sod2;1 7.5 μ M (Δ sod1) 和1 7.5 μ M (Δ sod2) 分别表示添加7.5 μ M活性化合物1的K6001酵母突变菌株 Δ sod1和 Δ sod2。

[0034] 图3为实施例3中活性化合物1氧化应激实验结果;其中,Control (K6001) 表示未添加活性化合物1的K6001酵母;Control表示阴性对照;Res (Resveratrol) 为阳性对照白藜芦醇 (10 μ M);1 7.5 μ M表示浓度为7.5 μ M的化合物1,1 25 μ M表示浓度为25 μ M的化合物1。

具体实施方式

[0035] 本发明结合附图和实施例做进一步的说明。

[0036] 实施例1

[0037] 1、深州蜜桃中活性化合物1和化合物2的制备,具体步骤如下:

[0038] (1) 将3.0kg深州蜜桃置于甲醇(工业级)中,室温下浸提24小时(震荡);经抽滤浓缩后,得到甲醇浸提物100.0g。

[0039] (2) 将甲醇浸提物用十八烷基键合硅胶开口柱进行分离,以甲醇:水溶剂系统作洗脱剂,按甲醇:水的体积比=30:70,50:50,70:30,100:0,依次洗脱,取体积比70:30洗脱的馏分0.7g。

[0040] (3) 将步骤(2)所取馏分用十八烷基键合硅胶开口柱进行纯化,以甲醇:水溶剂系统作洗脱剂,按甲醇:水的体积比=50:50,55:45,60:40,65:35,70:30,80:20,100:0依次洗

脱,取体积比60:40和65:35分别洗脱的馏分3.7mg和2.3mg。

[0041] (4) 取步骤(3)所取馏分,用反向HPLC纯化,色谱条件:色谱柱ODS-HG-5 (10/250mm),流速3ml/min,检测波长210nm,流动相为63%甲醇水溶液,得到活性化合物1 1.1mg (保留时间为13.9min);流动相为65%甲醇水溶液,得到活性化合物2 1.8mg (保留时间为14.5min)。2、活性化合物1和化合物2的理化特征及化学结构分析

[0042] 经 ^{13}C NMR、 ^1H NMR、HRMS、HSQC、HMBC、NOESY分析,结果如下:

[0043] 化合物1的理化性质:无色粉末,分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_8$,高分辨率质谱ESI-TOF-MS m/z 437.2151 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 ^1H NMR和 ^{13}C NMR的数据见下表1。

[0044] 表1 ^1H NMR和 ^{13}C NMR数据 (CD_3OD ; δ/ppm , J/Hz)。

Position	δ_{H}	δ_{C}
1		168.2
2		128.3
3	6.68 t (7.4)	145.3
4	2.32 m	28.4
5	2.11 t (7.4)	39.2
6		134.9
7	5.16 t (7.7)	126.7
8	2.02 m	23.7
9	1.51 m	43.3
10		73.8
11	5.90 dd (17.4, 10.8)	146.3
12	5.18 dd (17.4, 1.4) 5.02 dd (10.8, 1.4)	112.0
13	1.84 s	12.4
14	1.62 s	15.9
15	1.24 s	27.6
1'	5.52 d (7.8)	96.0
2'	3.38 m	74.1
3'	3.36 m	78.8
4'	3.36 m	71.2
5'	3.43 m	78.2
6'	3.82 dd (11.7, 1.6) 3.67 dd (11.7, 4.7)	62.4

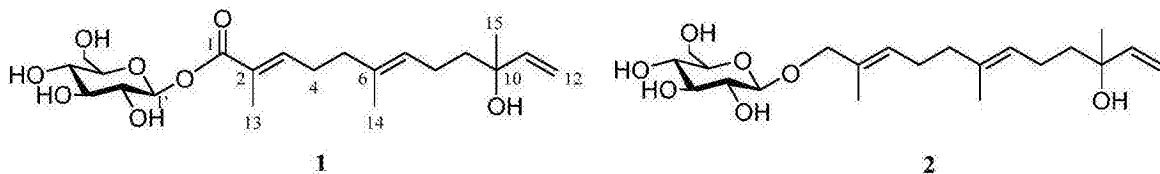
[0046] a 500MHz, b 125MHz

[0047] 化合物2的理化性质:无色粉末,分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_7$;高分辨率质谱ESI-TOF-MS m/z 423.2368 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 ^{13}C NMR (125MHz, CD_3CD) 数据如下: δ_{C} 14.1 (C-13), 16.0 (C-14), 23.7 (C-8), 27.4 (C-4), 27.6 (C-15), 40.3 (C-5), 43.4 (C-9), 62.8 (C-6'), 71.8 (C-4'), 73.9 (C-10),

75.1 (C-2'), 76.0 (C-1), 77.9 (C-5'), 78.2 (C-3'), 102.6 (C-1'), 112.0 (C-12), 126.0 (C-7), 129.9 (C-3), 132.9 (C-2), 135.7 (C-6), 146.4 (C-11)。

[0048] 化合物1和化合物2的结构式如下;

[0049]



[0050] 实施例2深州蜜桃中活性化合物1 (SZMT01) 和化合物2的抗衰老活性分析

[0051] 目前,用于抗衰老研究的生物模型主要有老鼠,线虫,果蝇和酵母。本实施例选择酿酒酵母作为抗衰老研究的活性系统;因为酵母是单细胞的真核生物,生命周期短,已获其完整的基因组数据,是目前常用的衰老模型生物。

[0052] 与此同时,以白藜芦醇作为阳性对照,白藜芦醇是目前众所周知的、在多种动物模型上显示抗衰老作用的小分子化合物。

[0053] 分析方法的步骤如下:

[0054] (1) 从-30℃冰箱取出K6001酵母菌株,用PBS洗涤三次,每次5ml,除去其中的甘油;再加入1ml PBS,吹打,使其悬浮后加入到5ml液体培养基(1%的酵母粉,2%的蛋白胨,3%的半乳糖)中;28℃振摇(160r/min)培养24小时。

[0055] (2) 培养结束后,用5ml PBS洗涤三次,除去其中的液体培养基,用血球计数板计数,计算酵母的浓度。

[0056] (3) 采用无水乙醇作溶剂,配制7.5μM,25μM的1和2,10μM的白藜芦醇,备用。

[0057] (4) 在灭菌的培养皿中加入5ml的固体培养基(1%的酵母粉,2%的蛋白胨,2%的葡萄糖,2%的琼脂粉),待培养基凝固后,向其中分别加入步骤(3)中配制好的样品,溶剂挥发后加入4000个酵母,用涂布器涂抹均匀,28℃恒温培养48小时。

[0058] (5) 显微镜下每皿随机数出40个母细胞分别产生的子细胞个数,并记录、作图分析,结果见图1。

[0059] 由图1可知,阴性对照(未添加样品,Control)的平均寿命为 7.10 ± 0.34 ,阳性对照(添加10μM的白藜芦醇,Resverstrol)是 $8.40 \pm 0.47^*$;7.5μM,25μM浓度的1分别是 $8.87 \pm 0.53^{**}$, $8.37 \pm 0.51^*$;7.5μM,25μM浓度的2分别是 $8.40 \pm 0.54^*$, $8.20 \pm 0.41^*$ 。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

[0060] 因此,化合物1和化合物2能延长酵母的复制性寿命。

[0061] 实施例3深州蜜桃中活性化合物1抗衰老机制分析

[0062] 1、测试1在7.5μM的活性浓度下是否能够延长敲除了SOD基因的K6001酵母突变菌株 Δ sod1和 Δ sod2的复制性寿命。

[0063] 分析方法的步骤如下:

[0064] (1) 从-30℃冰箱取出K6001酵母菌株和K6001酵母突变菌株 Δ sod1和 Δ sod2,用PBS洗涤三次,每次5ml,除去其中的甘油;再加入1ml PBS,吹打,使其悬浮后加入到5ml液体培养基(1%的酵母粉,2%的蛋白胨,3%的半乳糖)中;28℃振摇(160r/min)培养24小时。

[0065] (2) 培养结束后,用5ml PBS洗涤三次,除去其中的液体培养基,用血球计数板计

数,计算酵母的浓度。

[0066] (3) 采用无水乙醇作溶剂,配制7.5 μ M的1,备用。

[0067] (4) 在灭菌的培养皿中加入5ml的固体培养基(1%的酵母粉,2%的蛋白胨,2%的葡萄糖,2%的琼脂粉),待培养基凝固后,向其中分别加入步骤(3)中配制好的样品,溶剂挥发后。加入4000个酵母(K6001酵母菌株或者K6001酵母突变菌株 Δ sod1和 Δ sod2,用涂布器涂抹均匀,28 $^{\circ}$ C恒温培养48小时。

[0068] (5) 显微镜下每皿随机数出40个母细胞分别产生的子细胞个数,并记录、作图分析,结果见图2。

[0069] 由图2可知,K6001菌株上阴性对照(未添加样品,Control)的平均寿命为6.85 \pm 0.42,阳性对照(添加10 μ M的白藜芦醇,Resverstrol)是8.70 \pm 0.48**,7.5 μ M浓度的1是8.40 \pm 0.48*;K6001酵母突变菌株 Δ sod1上阴性对照(未添加样品,Control)的平均寿命为6.55 \pm 0.33,阳性对照(添加10 μ M的白藜芦醇,Resverstrol)是6.95 \pm 0.32,7.5 μ M浓度的1是7.05 \pm 0.37;K6001酵母突变菌株 Δ sod2上阴性对照(未添加样品,Control)的平均寿命为6.65 \pm 0.36,阳性对照(添加10 μ M的白藜芦醇,Resverstrol)是7.17 \pm 0.46,7.5 μ M浓度的1是7.25 \pm 0.32。(* p <0.05,** p <0.01)

[0070] 因此,化合物1在7.5 μ M的活性浓度下不能够延长敲除了SOD基因的K6001酵母突变菌株 Δ sod1和 Δ sod2的复制性寿命。

[0071] 实施例5SZMT01提高酵母生存率的活性分析

[0072] 测试SZMT01能否提高酵母的生存率,测试方法如下:

[0073] (1) 将-30 $^{\circ}$ C保存的野生型酵母BY4741用5ml PBS洗涤三次,除去其中的甘油;加入1ml无菌水,吹打使其悬浮,加入到5ml葡萄糖培养基(1%的酵母粉,2%的蛋白胨,2%的葡萄糖)中;将其放入摇床,28 $^{\circ}$ C振摇(160r/min)培养24小时,使其恢复生长能力。

[0074] (2) 将BY4741接种到25ml新的葡萄糖培养基,调整OD₆₀₀值为0.1,然后分别与7.5 μ M、25 μ M的胆固醇和阳性对照品(10 μ M的白藜芦醇,Resverstrol)孵育12小时。

[0075] (3) 取各组含有相同酵母细胞的培养液5 μ L滴在含有9mM H₂O₂的葡萄糖固体培养基(1%的酵母粉,2%的蛋白胨,2%的葡萄糖,2%琼脂)上;28 $^{\circ}$ C培养3天后观察酵母的生长状况并照相,观察结果见图3。

[0076] 由图3可见,与阴性对照相比,在含有9mM H₂O₂的葡萄糖固体培养基上,7.5 μ M、25 μ M的SZMT01明显提高了酵母的生存率。

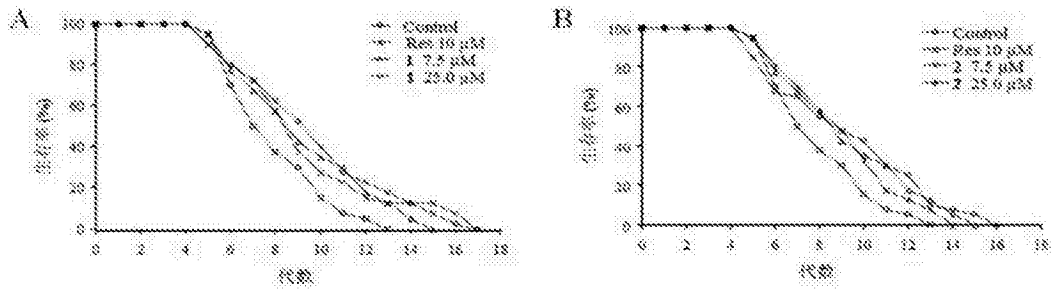


图1

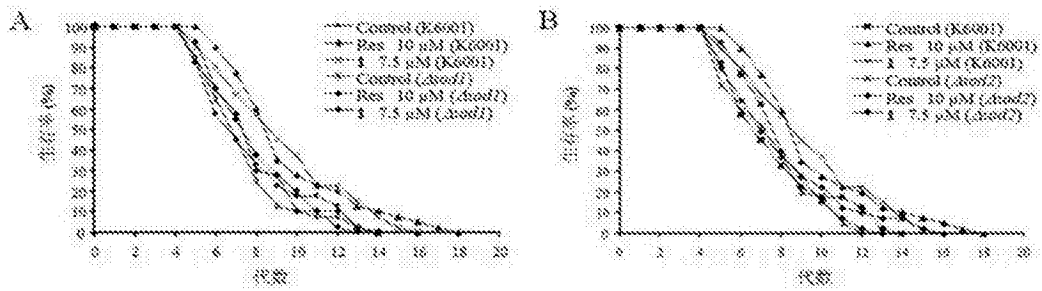


图2

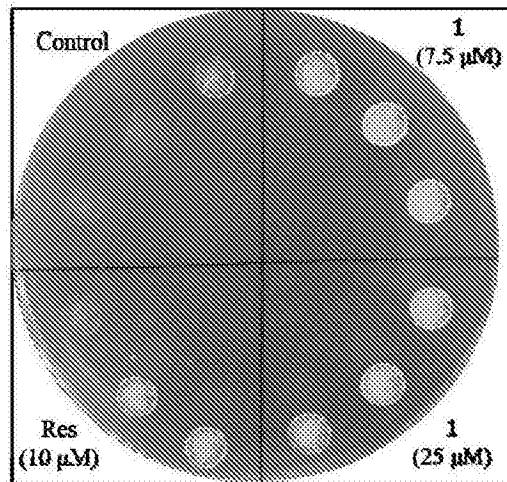


图3