



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104398532 B

(45)授权公告日 2017.02.22

(21)申请号 201410662253.5

(22)申请日 2013.04.11

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104398532 A

(43)申请公布日 2015.03.11

(62)分案原申请数据  
201310124216.4 2013.04.11

(73)专利权人 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所  
地址 571737 海南省儋州市宝岛新村

(72)发明人 王茂媛 晏小霞 王祝年 王建荣  
王清隆 王鹏

(74)专利代理机构 广州市越秀区海心联合专利  
代理事务所(普通合伙)  
44295

代理人 王洪娟

(51)Int.Cl.

A61K 31/7048(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

C07J 71/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1711099 A,2005.12.21,

CN 101156865 A,2008.04.09,

Jun-zhu Li,等.Cytotoxicity of cardenolides and cardenolide glycosides from *Asclepias curassavica*.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2009,第19卷

审查员 陈振中

权利要求书2页 说明书6页

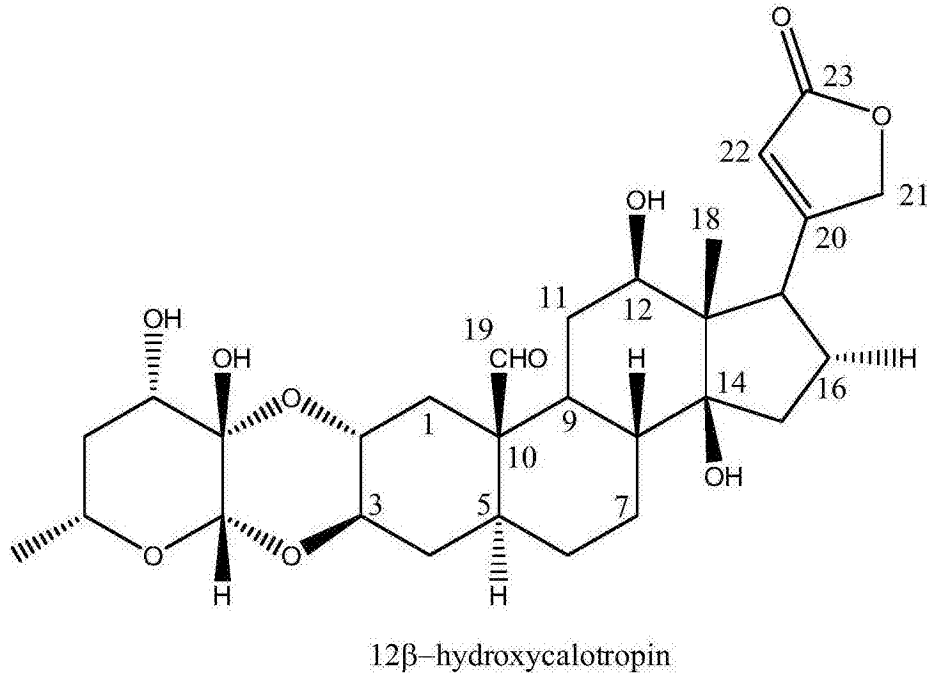
(54)发明名称

一种强心苷化合物的用途

(57)摘要

本发明公开了强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin在制备具有治疗和预防肿瘤作用的药物中的用途,该强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin具有显著的抗肿瘤活性,可作为治疗肿瘤的先导化合物;同时,本发明提供的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的提取分离方法简单易行,成本低,效率和得率高,提取物质量好。

1. 强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin在制备具有治疗肿瘤作用的药物中的用途, 所述强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的分子式为C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>10</sub>, 结构式如下:



所述的肿瘤为口腔癌、肺癌或人前列腺癌细胞LNCap。

2. 根据权利要求1所述的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin在制备具有治疗肿瘤作用的药物中的用途, 其特征是: 所述强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的制备方法如下:

A、选取牛角瓜茎, 粉碎后, 加入乙醇, 浸提3~4次, 每次6~8天, 合并浸提液, 减压浓缩至无醇味得到牛角瓜的乙醇提取物;

B、将牛角瓜的乙醇提取物分散于水中制成牛角瓜悬浊液, 分别按牛角瓜悬浊液与石油醚的体积比为1:3、1:2和1:1, 用石油醚对牛角瓜悬浊液重复萃取后, 保留石油醚萃取后的水相;

C、将石油醚萃取后的水相过滤, 将滤液用D-101大孔吸附树脂柱色谱分离, 并依次用水和甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 减压浓缩回收甲醇后, 得到甲醇浸膏;

D、将甲醇浸膏经减压硅胶柱层析, 以氯仿与甲醇的体积比分别为100:1、50:1、25:1、10:1、5:1、2:1和0:100作为洗脱剂, 对减压硅胶柱进行梯度洗脱, 分别得粗提物Fr.1~Fr.7;

E、将步骤D所得粗提物Fr.4经硅胶柱层析, 以氯仿与甲醇的体积比分别为10:1、8:1、6:1、4:1、2:1、0:1作为洗脱剂, 对硅胶柱进行梯度洗脱, 得到6个部分Fr.4-1~Fr.4-6;

F、将E步骤的Fr.4-2经硅胶柱层析, 采用氯仿和丙酮作为洗脱剂进行洗脱, 洗脱时采用TLC薄层色谱收集相同的成分, 得到6个部分Fr.4-2-1~Fr.4-2-6; 将Fr.4-2-3依次进行Sephadex LH-20凝胶柱层析、反相柱层析、以及再次硅胶柱层析, 最终得到强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin。

3. 根据权利要求2所述的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin在制备具有治疗肿瘤作用的药物中的用途, 其特征是: 步骤A中牛角瓜茎与乙醇的质量体积比为1kg:1~3L; 所述

乙醇的体积百分含量为92~98%。

4. 根据权利要求2所述的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin在制备具有治疗肿瘤作用的药物中的用途,其特征是:步骤B中用石油醚对牛角瓜悬浊液重复萃取3次后,保留石油醚萃取后的水相。

5. 根据权利要求2所述的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin在制备具有治疗肿瘤作用的药物中的用途,其特征是:步骤F中氯仿和丙酮的体积比为4:5;凝胶柱层析时采用的凝胶柱为Sephadex LH-20凝胶柱,凝胶柱层析时洗脱溶剂采用体积百分含量为95%的乙醇;再次硅胶柱层析时采用的洗脱溶剂为体积比为11:1:1的氯仿、甲醇和丙酮混合溶剂。

## 一种强心苷化合物的用途

[0001] 本申请是“一种强心苷化合物的新用途”的分案申请,原申请的申请日为2013年4月11日,申请号为:201310124216.4。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及强心苷化合物,具体涉及一种强心苷12 $\beta$ -hydroxycalotropin及其用途。

### 背景技术

[0003] 肿瘤对人类健康和生命的威胁很大,它和心血管疾患已成为医学上的两大难关,在全世界构成死亡原因的头两位。全世界52亿人口中,每年约有700万人新患肿瘤,每年约有500多万人死于肿瘤,几乎每6秒钟就有一名肿瘤患者死亡。我国目前每年平均约有150万人新患肿瘤,每年约有80万人死于肿瘤。现有的抗肿瘤药物都不能彻底有效地治愈。同时由于新型肿瘤的不断发现,迫使人们努力寻找新的抗肿瘤药物。长期以来,从药用植物尤其是热带药用植物中寻找抗肿瘤药物成为各国医学、药学、化学及生物学家们的一个共同愿望。研究表明,抗肿瘤药物70%来源于热带或亚热带植物。继长春花新碱之后,紫杉醇及其衍生物Epothilones的发现,使此项工作取得了突破性的进展。然而,由于有些抗肿瘤成分在植物体内含量极低,有些植物还是濒危珍稀物种,且植物生长缓慢,过度采挖可能导致该物种的灭绝,这些因素限制了抗肿瘤植物药的发展。

[0004] 牛角瓜[*Calotropis gigantea*(L.)Dryand ex Ait.f.]为萝藦科(Asclepiadaceae)牛角瓜属(*Calotropis*)植物。在我国主要分布于海南、广东、四川和云南等地。牛角瓜全株有毒,其根、茎、叶、花、果及各部位的白色汁液均可药用,具有抗菌、消炎、驱虫、化痰、解毒等功效,是一种民间常用药。国内外研究表明牛角瓜主要含强心苷类化合物,为其毒性成分。但是关于牛角瓜中的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin是否具有抗肿瘤作用目前还是未知的。

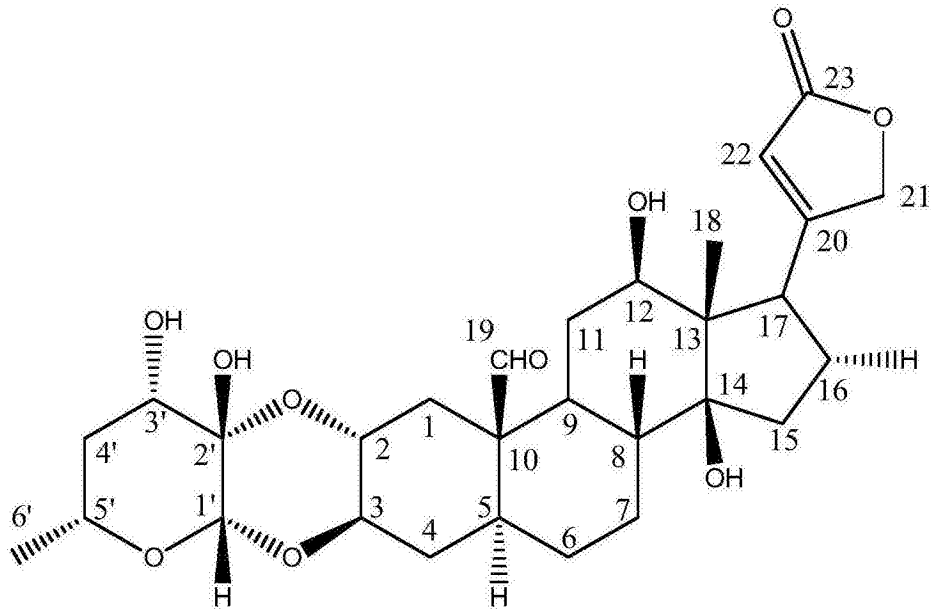
### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin在制备具有治疗和预防肿瘤作用的药物中的用途。

[0006] 本申请发明人对牛角瓜中的强心苷类化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin进行了提取、分离、纯化和抗肿瘤活性测试发现,该牛角瓜中的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin具有抗肿瘤的新用途。

[0007] 本发明的上述目的是通过如下技术方案来实现的:强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin在制备具有治疗和预防肿瘤作用的药物中的用途,所述强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的分子式为C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>10</sub>,结构式如下:

[0008]

12 $\beta$ -hydroxycalotropin

[0009] 本发明所述肿瘤主要是为胆管癌、肾癌、胰腺癌、结肠直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、大肠癌、肝癌、胆癌、胆道癌、急性白血病、恶性淋巴瘤、脑瘤、骨肿瘤、黑素瘤、神经胶质瘤、口腔癌、鼻咽癌、肺癌或胃癌等。

[0010] 本发明强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin可以从牛角瓜中利用包括吸附树脂柱层析、硅胶柱层析、反相硅胶柱层析、凝胶柱层析、减压柱层析等多种分离手段获得,或者通过合成以及半合成手段获得。与适宜的赋形剂相结合,按照常规方法制成各种剂型。

[0011] 本发明所述强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin优选的制备方法如下:

[0012] A、选取牛角瓜茎,粉碎后,加入乙醇,浸提3~4次,每次6~8天,合并浸提液,减压浓缩至无醇味得到牛角瓜的乙醇提取物;

[0013] B、将牛角瓜的乙醇提取物分散于水中制成牛角瓜悬浊液,分别按牛角瓜悬浊液与石油醚的体积比为1:3、1:2和1:1,用石油醚对牛角瓜悬浊液重复萃取后,保留石油醚萃取后的水相;

[0014] C、将石油醚萃取后的水相过滤,将滤液用D-101大孔吸附树脂柱色谱分离,并依次用水和甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,减压浓缩回收甲醇后,得到甲醇浸膏;

[0015] D、将甲醇浸膏经减压硅胶柱层析,以氯仿与甲醇的体积比分别为100:1、50:1、25:1、10:1、5:1、2:1和0:100作为洗脱剂,对减压硅胶柱进行梯度洗脱,分别得粗提物Fr.1~Fr.7;

[0016] E、将步骤D所得粗提物Fr.4经硅胶柱层析,以氯仿与甲醇的体积比分别为10:1、8:1、6:1、4:1、2:1、0:1作为洗脱剂,对硅胶柱进行梯度洗脱,得到6个部分Fr.4-1~Fr.4-6;

[0017] F、将E步骤的Fr.4-2经硅胶柱层析,采用氯仿和丙酮作为洗脱剂进行洗脱,洗脱时采用TLC薄层色谱收集相同的成分,得到6个部分Fr.4-2-1~Fr.4-2-6;将Fr.4-2-3依次进行Sephadex LH-20凝胶柱层析、反相柱层析、以及再次硅胶柱层析,最终得到强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin。

[0018] 本发明步骤A中牛角瓜茎与乙醇的质量体积比为1kg:1~3L;所述乙醇的体积百分

含量为92~98%。

[0019] 本发明步骤B中用石油醚对牛角瓜悬浊液重复萃取3次后,保留石油醚萃取后的水相。

[0020] 本发明步骤F中氯仿和丙酮的体积比为4:5;凝胶柱层析时采用的凝胶柱为Sephadex LH-20凝胶柱,凝胶柱层析时洗脱溶剂采用体积百分含量为95%的乙醇;再次硅胶柱层析时采用的洗脱溶剂为体积比为11:1:1的氯仿、甲醇和丙酮混合溶剂。

[0021] 上述步骤A、B、C、D、E、F中采用的溶剂如石油醚、氯仿、甲醇、乙醇等均为工业级溶剂,重蒸后使用。

[0022] 上述D、E、F步骤中使用的硅胶柱、凝胶柱以及反相柱等均为现有技术中的常规设备。

[0023] 本发明具有如下优点:本发明提供的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin具有显著的抗肿瘤活性,可作为治疗肿瘤的先导化合物;同时,本发明提供的提取分离方法简单易行,成本低,效率高,得率高,提取物质量好。

### 具体实施方式

[0024] 下面结合具体实例对本发明作进一步阐述,但不限制本发明。

[0025] 实施例1

[0026] A、将牛角瓜(*Calotropis gigantea*)茎25.4kg自然风干粉碎后,按牛角瓜样品:乙醇水溶液约为1:2的质量/体积比(kg/L),将50L体积分数为95%的乙醇水溶液与25.4kg牛角瓜样品进行充分混合,密封,于室温浸提3次,每次7天,过滤合并浸提液,减压浓缩至无醇味得到乙醇提取物;

[0027] B、在室温下,将乙醇提取物分散于水中制成悬浊液,按乙醇提取液:石油醚=1:3、1:2、1:1的体积比,用石油醚对乙醇提取液重复萃取3次,减压浓缩回收石油醚后,得到石油醚浸膏(254.1g);

[0028] C、将石油醚萃取后的水液过滤,将过滤液用D-101大孔吸附树脂柱色谱分离,依次用水和甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,减压浓缩回收甲醇后,得到甲醇浸膏(255.7g);

[0029] D、将甲醇浸膏经减压硅胶柱层析,以氯仿:甲醇=100:1,50:1,25:1,10:1,5:1,2:1,0:100体积比的洗脱剂,进行梯度洗脱,分别得到7个部分Fr.1~Fr.7;

[0030] E、将D步骤用氯仿:甲醇=10:1洗脱得到的Fr.4(38.4g)经硅胶柱层析,用氯仿:甲醇=10:1,8:1,6:1,4:1,2:1体积比的洗脱剂进行梯度洗脱,最后用甲醇洗脱,得到6个部分Fr.4-1~Fr.4-6;

[0031] F、将E步骤的Fr.4-2(16.7g)经硅胶柱层析,用氯仿:丙酮=4:5体积比的洗脱剂进行洗脱,然后采用TLC薄层色谱收集相同的成分,得到6个部分,在这6个部分中的第3部分,也就是Fr.4-2-3,将Fr.4-2-3(2.0g)依次进行Sephadex LH-20凝胶柱层析(体积分数为95%的乙醇洗脱)、反相柱层析、以及硅胶柱层析(氯仿:甲醇:丙酮=11:1:1洗脱),最终得到强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin(98.2mg)。

[0032] 实施例2

[0033] 将实施例1中E步骤的Fr.4-1(3.2g)经柱层析后,用氯仿:甲醇=25:1体积比的洗脱剂进行洗脱,采用TLC薄层色谱收集相同的成分,得到7个部分Fr.4-1-1~Fr.4-1-7;将

Fr.4-1-4(869.5mg)经硅胶柱层析,依次用氯仿:甲醇=40:1、氯仿:丙酮=6:2体积比的洗脱剂进行洗脱,最终得到强心苷化合物calotropin(109.9mg)。研究发现,该化合物与本发明的目的化合物结构上的区别在于12位的碳上没有羟基,而本发明的目的化合物12位的碳上有羟基取代。在进一步的体外抗肿瘤活性测试中发现这两个化合物的抗IC<sub>50</sub>值差异显著(见表2)。

[0034] 实施例3

[0035] 强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的结构鉴定:

[0036] 利用光谱技术,包括紫外、红外、核磁共振及高分辨质谱分析,鉴定了实施例1中的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的结构。运用2D-NMR技术对牛角瓜茎中首次发现的强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的<sup>13</sup>C-NMR,<sup>1</sup>H-NMR数据进行了归属(见下表1)。

[0037] 以下为强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的理化常数:

[0038] 12 $\beta$ -hydroxycalotropin:C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>10</sub>,白色无定形粉末(甲醇),10%硫酸乙醇溶液显棕色。m.p.214-216°C;[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>+6.4°(c=0.045,MeOH);HR-ESI-MS:m/z[M+Na]<sup>+</sup>583.2318(calcd.For C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>10</sub>Cl,583.2310);IR $\lambda_{max}$ (cm<sup>-1</sup>):3433cm<sup>-1</sup>,2957cm<sup>-1</sup>,2923cm<sup>-1</sup>,2852cm<sup>-1</sup>,1712cm<sup>-1</sup>,1655cm<sup>-1</sup>,1648cm<sup>-1</sup>,1638cm<sup>-1</sup>,1630cm<sup>-1</sup>,1459cm<sup>-1</sup>,1262cm<sup>-1</sup>,1105cm<sup>-1</sup>,1025cm<sup>-1</sup>;UV $\lambda_{max}$  nm(MeOH):218nm.<sup>13</sup>C-NMR和<sup>1</sup>H-NMR见下表1。

[0039] 表1强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin的碳谱和氢谱数据

Position	$\delta_H$ (CD <sub>3</sub> OD)	$\delta_C$ (CD <sub>3</sub> OD)	HMBC (H-C) (CD <sub>3</sub> OD)
1	$\alpha$ 1.17 (1H, m)	36.9	C-2, 3, 9, 10, 19
	$\beta$ 2.47 (1H,dd, $J=4.5, 11.3$ )		
2	3.84 (1H, td, $J=4.3, 11.8$ )	70.2	C-1, 3, 2'
3	3.93 (1H, td, $J=4.2, 10.8$ )	73.2	C-1', 2, 4, 5
4	1.54 (1H, d, $J=2.4$ )	34.4	C-2, 3, 10
[0040] 5	2.13 (1H, $J=8.1$ )	44.5	C-3, 4, 6, 7, 10
6	2.02 (1H, m)	28.8	C-4, 7, 8
7	1.99 (1H, m)	28.7	C-6, 8
8	1.74 (1H, m)	43.0	C-6, 7, 9, 10, 13, 14
9	1.64 (1H, m)	46.4	
10		53.6	
11	1.29 (1H, d, $J=3.6$ )	31.3	C-10, 12
12	3.34 (1H, d, $J=4.2$ )	74.9	C-11, 13, 14, 17, 18

	13		57.0	
	14		86.0	
	15	2.20 (1H, dd, $J=2.7, 13.3$ )	33.0	C-14, 16, 17, 20
	16	1.34 (1H, m); 1.29 (1H, m)	28.2	C-15, 17
	17	3.31 (1H, d, $J=4.2$ )	46.9	C-12, 13, 16, 18, 20
	18	0.72 (3H, s)	9.8	C-12, 13, 14, 17
	19	10.03 (1H, s)	209.1	C-1, 5, 10
	20		178.3	
[0041]	21	4.96 (1H, dd, $J=1.5, 18.5$ ) 4.90 (1H, dd, $J=1.5, 18.5$ )	75.4	C-23
	22	5.90 (1H, s)	117.9	C-17, 21, 23
	23		177.3	
	1 <sup>r</sup>	4.45 (1H, s)	97.3	C-2', 3
	2 <sup>r</sup>		92.7	
	3 <sup>r</sup>	3.59 (1H, dd, $J=4.5, 11.8$ )	74.0	C-2', 4', 5'
	4 <sup>r</sup>	1.69 (1H, m); 1.56 (1H, m)	40.0	
	5 <sup>r</sup>	3.66 (1H, m)	69.4	C-1', 4', 6'
	6 <sup>r</sup>	1.23 (3H, d, $J=6.2$ )	21.4	C-3', 4', 5'

[0042] 实施例4

[0043] 强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin和calotropin体外抗肿瘤活性测试的对比实验:

[0044] 采用MTT法测试了强心苷化合物12 $\beta$ -hydroxycalotropin和calotropin,对人胃癌细胞(SGC-7901)、人胃腺癌细胞(KKLS、MKN-28、MKN-45)、人慢性骨髓性白血病细胞(K562)、人口腔表皮癌细胞(KB)、人乳腺癌细胞(MCF7)、人肺癌细胞(NCI-H187)、人骨纤维肉瘤细胞(HT-1080)、人骨肉瘤细胞(G-292)、人骨肉瘤细胞(KHOS/NP)、人前列腺癌细胞(LNCap)等细胞株的体外抗肿瘤活性(结果见表2)。

[0045] 活性测试方法如下:

[0046] 实验设阴性对照组(水)、DMSO溶剂对照组、阳性对照组(丝裂霉素C)和8个不同浓度(0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、24.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的待测样品,IC<sub>50</sub>值 $<0.1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的待测样品继续往下稀释,再设6个不同浓度(0.0003、0.001、0.004、0.011、0.033和0.100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),每个浓度设3个平行。收集对数生长期细胞,血球计数板计数,按每孔4500个癌细胞量接种于96孔平底细胞培养板中,置于5%CO<sub>2</sub>、湿度90%以上、37℃温箱中培养。24h后取出加入一定量的待测样品,继续培养72h后取出置于显微镜下观察每孔细胞形态,记录细胞形态变化情况,接着每孔加入5mg/mL的MTT溶液(溶于平衡盐溶液PBS)15 $\mu\text{L}$ ,37℃反应4h后,将细胞培养液吸出,每孔加入100 $\mu\text{L}$  DMSO将Formazane充分溶解,将细胞培养板置于MK3酶标仪上,用570nm波长测各孔的吸光度(A),按下列公式求生长抑制率。

$$[0047] \quad \text{生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{用药组平均A值}}{\text{阴性对照组平均A值}}\right) \times 100\%$$

[0048] 以样品浓度为横坐标,以抑制率为纵坐标,根据浓度梯度利用origin软件拟合出抑制率曲线图,当抑制率为50%时的样品浓度即是细胞毒活性的IC<sub>50</sub>值,样品活性结果即以半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)表示。

[0049] 从表2可看出,强心苷化合物12β-hydroxycalotropin和calotropin结构上的差异进而抗肿瘤活性上也存在着显著差异。本发明的强心苷化合物抗肿瘤活性明显比calotropin强。

[0050] 表2强心苷化合物12β-hydroxycalotropin的体外抑瘤结果

细胞株	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	12β-hydroxycalotropin	calotropin
人胃癌细胞 (SGC-7901)	0.088	14.175
人胃腺癌细胞(KKLS)	0.182	10.44
人胃腺癌细胞(MKN-28)	0.388	7.541
人胃腺癌细胞 (MKN-45)	0.324	9.256
[0051] 人慢性髓原白血病细胞 (K562)	0.14	6.772
人口腔表皮癌细胞 (KB)	0.064	8.36
人乳腺癌细胞 (MCF 7)	3.578	15.75
人肺癌细胞 (NCL-H187)	0.079	12.82
人骨纤维肉瘤细胞 (HT-1080)	0.18	7.641
人骨肉瘤细胞 (G-292)	0.054	9.571
人骨肉瘤细胞 (KHOS/NP)	0.061	12.86
[0052] 人前列腺癌细胞 (LNCap)	0.68	14.693

[0053] 实施例5

[0054] 将实施例1制备的强心苷化合物12β-hydroxycalotropin 8g与微晶纤维素75g及硬脂酸镁7g混合,混合物用单冲压片机打成直径5mm,重量100mg的片剂。本片剂中每片含12β-hydroxycalotropin 8mg。结合病症,每次1-2片,每日服用2-3次。

[0055] 实施例6

[0056] 将实施例1制备的强心苷化合物12β-hydroxycalotropin 20g与乳糖95g及硬脂酸镁6g混合,以每300mg填充胶囊。本胶囊剂中,每个胶囊含12β-hydroxycalotropin 25mg。结合病症,每次1-2个,每日服用3-4次。

[0057] 以上列举的具体实施例是对本发明进行的说明。需要指出的是,以上实施例只用于对本发明作进一步说明,不代表本发明的保护范围,其他人根据本发明的提示做出的非本质的修改和调整,仍属于本发明的保护范围。