



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103109812 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201310065910. 3

(22) 申请日 2013. 03. 01

(71) 申请人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650201 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 李顺林 李亚婷 郝小江 陈永队

张仲凯

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务

所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

A01N 43/16(2006. 01)

A01N 43/12(2006. 01)

A01P 1/00(2006. 01)

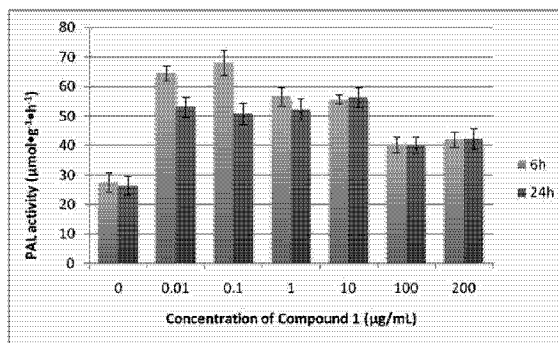
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

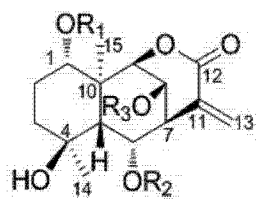
三裂蟛蜞菊中的倍半萜内酯在制备抗烟草花叶病毒药物中的应用

(57) 摘要

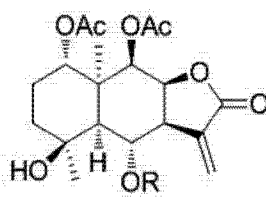
本发明提供三裂蟛蜞菊(Wedelia trilobata)中的倍半萜内酯在制备抗烟草花叶病毒药物中的应用。试验结果证明,此类化合物可以诱导烟草自身产生系统获得性抗性(SAR),显著抑制 TMV 对寄主的初侵染,从而减少病毒进入寄主细胞并进一步复制和增值的机会,起到对寄主保护的作用;对 TMV 侵染的抑制率优于市售抗病毒农药“宁南霉素”。



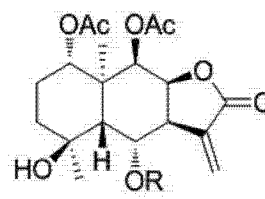
1. 下列结构式所示的倍半萜内酯在制备抗烟草花叶病毒药物中的应用，



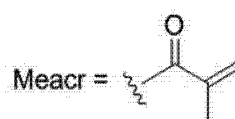
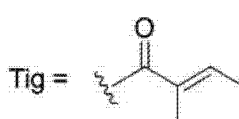
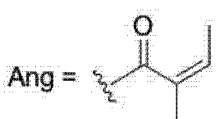
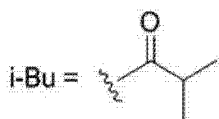
- 1 $R_1=Ac$, $R_2=i-Bu$, $R_3=Ang$
 2 $R_1=Ac$, $R_2=i-Bu$, $R_3=Tig$
 3 $R_1=H$, $R_2=i-Bu$, $R_3=Ang$
 4 $R_1=H$, $R_2=i-Bu$, $R_3=Tig$



- 5 $R=i-Bu$
 6 $R=Meacr$



- 7 $R=Meacr$
 8 $R=i-Bu$



2. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于所述的倍半萜内酯为从三裂蟛蜞菊中提取的倍半萜内酯。

3. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于所述的倍半萜内酯化合物由下述方法获得：将三裂蟛蜞菊干燥全草经 95% 甲醇回流提取 3 次，得到的浸膏在水中溶解后分别用石油醚，氯仿，乙酸乙酯和正丁醇进行萃取，得到石油醚，氯仿，乙酸乙酯和正丁醇四部分；将氯仿部分用硅胶 100-200 目，石油醚 / 乙酸乙酯体系进行柱层析分离，得到 5 个部分，其中石油醚 / 乙酸乙酯 6:4 部分经硅胶和 Sephadex LH-20 凝胶进行分离后得到化合物 1, 2, 5 和 6；其中石油醚 / 乙酸乙酯 1:1 部分经相同分离过程得到化合物 3 和 4；将石油醚部分用硅胶 100-200 目，石油醚 / 乙酸乙酯体系进行柱层析分离，得到 5 个部分，其中石油醚 / 乙酸乙酯 6:4 部分经硅胶，Sephadex LH-20 凝胶和高效液相色谱进行分离后得到化合物 7 和 8。

三裂蟛蜞菊中的倍半萜内酯在制备抗烟草花叶病毒药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物技术领域,具体地,涉及三裂蟛蜞菊(*Wedelia trilobata*)中的倍半萜内酯作为防控烟草花叶病的制剂,在制备抗烟草花叶病毒药物中的应用。

背景技术

[0002] 植物病毒是仅次于真菌和细菌的一类植物病害,危害大且很难防治,有“植物癌症”之称。烟草花叶病毒病是烤烟生产的主要病害之一。三裂蟛蜞菊(*Wedelia trilobata*)是中国南方的一种入侵植物,具有超强的繁殖能力,能够通过化感作用抑制其它植物的生长而发展成单优种群。民间主要用来治疗蛇伤、鱼伤、腹泻、肾结石和感冒等疾病,其主要成分倍半萜内酯具有抗癌和抗肝毒性等作用。迄今,未有三裂蟛蜞菊中的倍半萜内酯作为防控烟草花叶病的制剂,在制备抗烟草花叶病毒药物中的应用的报道。

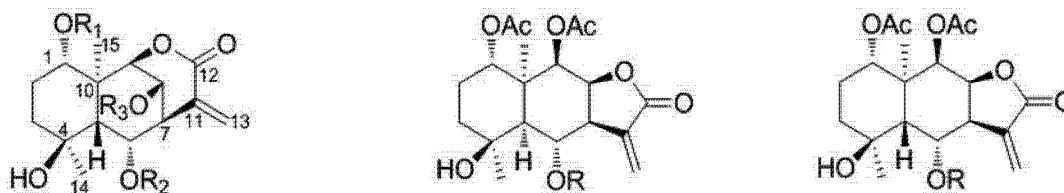
发明内容

[0003] 本发明的目的是提供三裂蟛蜞菊中的倍半萜内酯在制备抗烟草花叶病毒药物中的应用。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:

[0005] 下列结构式所示的倍半萜内酯在制备抗烟草花叶病毒药物中的应用,

[0006]



1 $R_1=Ac$, $R_2=i-Bu$, $R_3=Ang$

2 $R_1=Ac$, $R_2=i-Bu$, $R_3=Tig$

3 $R_1=H$, $R_2=i-Bu$, $R_3=Ang$

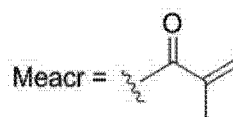
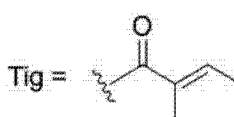
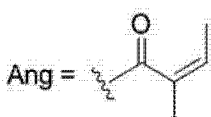
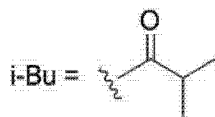
4 $R_1=H$, $R_2=i-Bu$, $R_3=Tig$

5 $R=i-Bu$

6 $R=Meacr$

7 $R=Meacr$

8 $R=i-Bu$



[0007] 所述的应用,其中倍半萜内酯为从三裂蟛蜞菊中提取的倍半萜内酯。

[0008] 所述的应用,其中倍半萜内酯化合物由下述方法获得:将三裂蟛蜞菊干燥全草经95% 甲醇回流提取3次,得到的浸膏在水中溶解后分别用石油醚,氯仿,乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,得到石油醚,氯仿,乙酸乙酯和正丁醇四部分;将氯仿部分用硅胶100-200目,石

油醚 / 乙酸乙酯体系进行柱层析分离,得到 5 个部分,其中石油醚 / 乙酸乙酯 6:4 部分经硅胶和 Sephadex LH-20 凝胶进行分离后得到化合物 1,2,5 和 6;其中石油醚 / 乙酸乙酯 1:1 部分经相同分离过程得到化合物 3 和 4;将石油醚部分用硅胶 100-200 目,石油醚 / 乙酸乙酯体系进行柱层析分离,得到 5 个部分,其中石油醚 / 乙酸乙酯 6:4 部分经硅胶, Sephadex LH-20 凝胶和高效液相色谱进行分离后得到化合物 7 和 8。

[0009] 本发明化合物用作药物时,可以直接使用,或者以药物组合物的形式使用。该药物组合物含有 0.1-99%,优选为 0.5-90% 的本发明化合物,其余为药物学上可接受的,对人和动物无毒和惰性的可药用载体和 / 或赋形剂。所述的药用载体或赋形剂是一种或多种固体、半固体和液体稀释剂、填料以及药物制品辅剂。将本发明的药物组合物以单位体重服用量的形式使用。采用制药和食品领域公认的方法制备成各种剂型,如液体制剂(注射剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂等)、固体制剂(片剂、胶囊剂、颗粒剂、冲剂等)、喷剂、气雾剂等。

附图说明

[0010] 图 1 接种 3 天后施药叶中病毒 CP 的积累;

[0011] 图 2 接种 7 天后新生叶中病毒 CP 的积累;

[0012] 图 3 不同浓度下化合物 1 对烟叶中 PAL 酶活性的促进作用。

具体实施方式:

[0013] 下面用本发明的实际例子来进一步说明本发明的实质性内容,但本发明的内容并不局限于此。

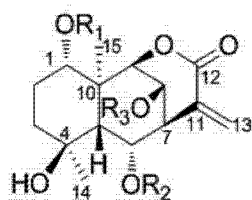
[0014] 实施例 1:

[0015] 化合物提取和分离:

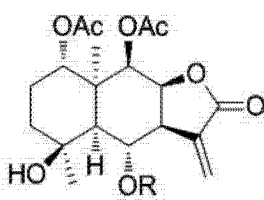
[0016] 三裂蟛蜞菊(*Wedelia trilobata*)干燥全草经 95% 甲醇回流提取 3 次(4h, 4h, 3h),得到的浸膏(11.3%)在水中溶解后分别用石油醚,氯仿,乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,得到石油醚,氯仿,乙酸乙酯和正丁醇四部分。将氯仿部分用硅胶(100-200 目),石油醚 / 乙酸乙酯体系进行柱层析分离,得到 5 个部分。其中石油醚 / 乙酸乙酯 6:4 部分经硅胶和 Sephadex LH-20 凝胶进行分离后可得到化合物 1 (0.00021%), 2 (0.000061%), 5 (0.0002%) 和 6 (0.000052%)。其中石油醚 / 乙酸乙酯 1:1 部分经相同分离过程可得到化合物 3 (0.0002%) 和 4 (0.000052%)。将石油醚部分用硅胶(100-200 目),石油醚 / 乙酸乙酯体系进行柱层析分离,也得到 5 个部分。其中石油醚 / 乙酸乙酯 6:4 部分经硅胶, Sephadex LH-20 凝胶和高效液相色谱进行分离后可得到化合物 7 (0.00015%) 和 8 (0.00034%)。

[0017] 用上述方法得到的化合物 1-8 的结构式为:

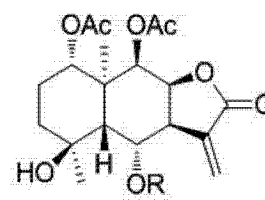
[0018]



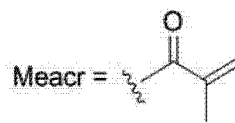
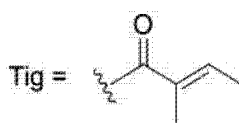
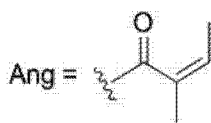
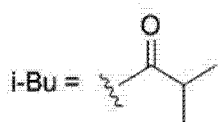
- 1 $R_1=Ac, R_2=i-Bu, R_3=Ang$
 2 $R_1=Ac, R_2=i-Bu, R_3=Tig$
 3 $R_1=H, R_2=i-Bu, R_3=Ang$
 4 $R_1=H, R_2=i-Bu, R_3=Tig$



- 5 $R=i-Bu$
 6 $R=Meacr$



- 7 $R=Meacr$
 8 $R=i-Bu$



[0019] 实施例 2 :

[0020] 1、实验方法

[0021] 心叶烟半叶枯斑法 : 挑选健康合适的心叶烟, 暗室放置一夜。每棵烟挑选大小相似的 3 片叶子, 供试化合物分离自三裂虻蜱菊, 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解成 10mg/ml 的母液于 4℃ 保存, 临用时用无菌水稀释为所需浓度, DMSO 的终浓度 25 μl/ml 对实验结果无影响。每片叶子的一半均匀施药 100 μl 作为处理, 另一半施以 25 μl/ml DMSO 溶液。3h 后每片叶子摩擦接种 50 μg/ml TMV 200 μl, 未施药的一半作为阳性对照, 未施药且摩擦接种 25 μl/ml DMSO 溶液的叶片作为空白。10min 后用无菌水将叶表面的金刚砂洗净。放入无虫温室中, 3-4 天后按公式计算 TMV 抑制率 : $1 - (\text{处理的平均枯斑数} / \text{阳性对照的平均枯斑数}) \times 100$ 。每个化合物重复三次。

[0022] 2、实验结果

[0023] 由于心叶烟属于 TMV 的枯斑寄主, 可以通过比较只接种病毒的叶片和经化合物处理叶片的枯斑数量及枯斑大小来判断化合物是否抑制了病毒的初侵染。表 1 为化合物 1-8 在不同浓度下与对照药物“宁南霉素”在心叶烟上对 TMV 侵染抑制率的比较, 由结果可知, 化合物 1-8 可以显著抑制 TMV 对寄主的初侵染, 从而减少病毒进入寄主细胞并进一步复制和增值的机会, 起到对寄主保护的作用。在低浓度下化合物 1-8 对 TMV 侵染的抑制率由于市售抗病毒农药“宁南霉素”

[0024] 表 1 化合物 1-8 在不同浓度下与宁南霉素在心叶烟上对 TMV 侵染抑制率的比较

[0025]

三裂螳螂菊 倍半萜内酯	抑制率 (%)			
	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
1	65.8 $\pm$ 4.6	42.1 $\pm$ 5.5	39.9 $\pm$ 8.6	21.3 $\pm$ 7.5
2	46.7 $\pm$ 7.6	41.5 $\pm$ 3.6	32.1 $\pm$ 5.4	7.5 $\pm$ 3.4
3	55.4 $\pm$ 5.0	44.4 $\pm$ 4.1	30.2 $\pm$ 8.0	13.3 $\pm$ 4.7
4	66.6 $\pm$ 6.4	48.5 $\pm$ 6.8	37.4 $\pm$ 5.3	15.9 $\pm$ 6.4
5	65.8 $\pm$ 3.5	63.9 $\pm$ 3.9	46.6 $\pm$ 5.8	34.1 $\pm$ 6.2
6	55.3 $\pm$ 7.2	35.4 $\pm$ 9.0	31.9 $\pm$ 5.5	11.3 $\pm$ 5.1
7	59.6 $\pm$ 6.5	43.8 $\pm$ 6.4	34.3 $\pm$ 7.4	9.6 $\pm$ 2.8
8	76.5 $\pm$ 7.0	53.9 $\pm$ 6.5	35.2 $\pm$ 8.4	14.7 $\pm$ 3.4
宁南霉素	13.5 $\pm$ 3.2	55.3 $\pm$ 2.8	62.2 $\pm$ 5.6	81.2 $\pm$ 3.5

[0026] 实施例 2：

[0027] (1) 实验方法

[0028] 普通烟 K326 体内实验(叶圆片法)：挑选健康合适的普通烟，暗室放置一夜。每棵烟挑选大小相似的 2 片叶子，供试化合物用无菌水稀释为所需浓度，每片叶子均匀施药 200 μl 。24h 后，每片叶子摩擦接种 50 $\mu\text{g/mL}$ TMV 200 μl ；未施药的接种叶片作为阳性对照，未施药且摩擦接种 25 $\mu\text{l/mL}$ DMSO 溶液的叶片作为阴性对照。10min 后用无菌水将叶表面的金刚砂洗净。3 天后将叶片切成直径 1cm 的圆片，取 10 片进行 Western-blot 检测。接种 7 天后取施药叶的上位新叶，将叶片切成直径 1cm 的圆片，用于检测系统获得性抗性。每个化合物重复三次。

[0029] (2) 实验结果

[0030] 由于普通烟 K326 属于 TMV 的系统寄主，可以通过 Western-blot 方法比较烟草叶片中 TMV 外壳蛋白(CP)的积累量从而得知预施化合物是否抑制了病毒的积累和转移。由图 1 及图 2 可见，化合物 1 和 6 在施药叶和新生叶中均有良好的诱导活性，化合物 2, 7 和 8 在新生叶中具有良好的诱导活性。

[0031] 实施例 3：

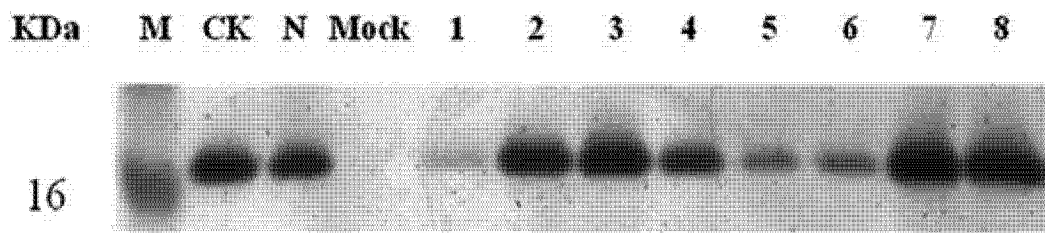
[0032] 1、实验方法

[0033] 烟叶中苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定：将不同浓度的化合物 1 喷洒于普通烟 K326 的叶片上，分别于 6 小时和 24 小时取烟叶样品。相同浓度 DMSO 处理的烟叶为阴性对照。取鲜叶 0.5g，加 10% 聚乙烯吡咯烷酮(0.05mol/L, pH 8.8 硼酸缓冲液配制)0.5mL 加 2mL 含 5mmol/L 巯基乙醇的硼酸缓冲液(pH 8.0)，4℃下研磨，10000r/min 离心 15min，取上清液 1mL (或稀释为适合浓度)，加 1mL 0.02mol/L 苯丙氨酸(0.05mol/L, pH 8.8 硼酸缓冲液配制)，加 2mL 重蒸馏水，对照不加苯丙氨酸，多加 1mL 重蒸水，总体积为 4mL，2min 时，290nm 波长下测 OD 值。或置于恒温水浴 30℃保温 30min 后 290nm 波长下测 OD 值，以光密度变化 0.01 所需的酶量为一个活性单位(相当于每毫升反应混合物形成 1 μg 肉桂酸)。结果以每

小时每克鲜重产生的肉桂酸量表示,即 $\mu\text{mol/g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

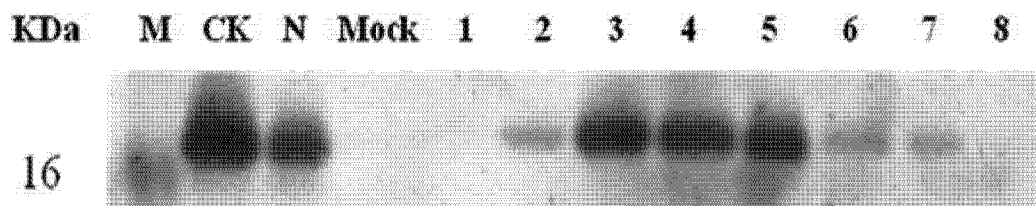
[0034] 2、实验结果

[0035] PAL 酶是水杨酸合成途径上的关键酶,而水杨酸是系统获得性抗性(SAR)信号通路上的关键信号分子。实验结果表明,在较低浓度下,化合物 1 在处理烟叶 6 小时和 24 小时后均可以使烟叶中的 PAL 酶活性升高,从而促进水杨酸的合成,激活 SAR 信号通路,使烟草进行自我保护(图 3 所示)。说明三裂蟛蜞菊中的此类化合物是可以诱导植物系统获得性抗性的一类小分子化合物。



(M: Marker, CK: 只接种未施药的阴性对照, N: 宁南霉素, Mock: 健康叶)

图 1



(M: Marker, CK: 只接种未施药的阴性对照, N: 宁南霉素, Mock: 健康叶)

图 2

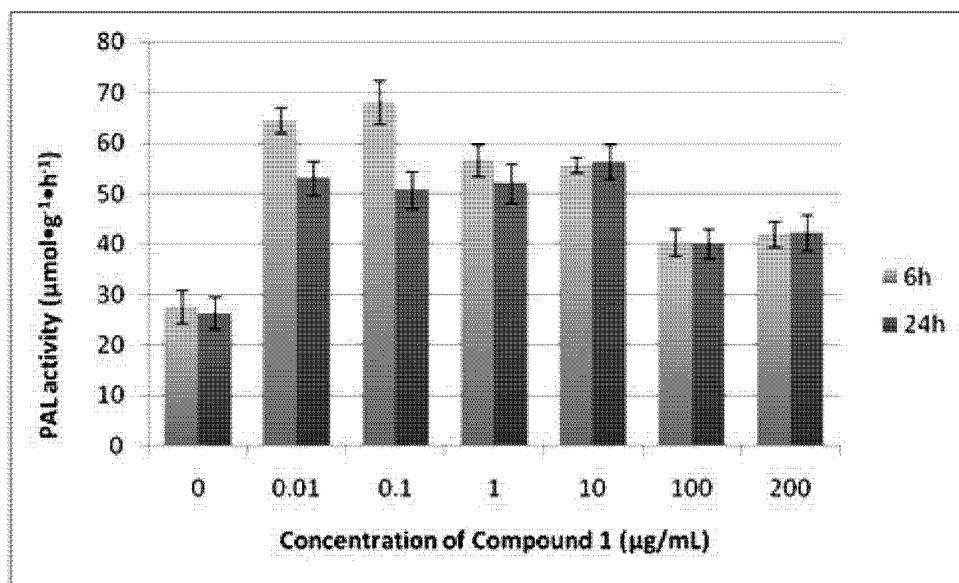


图 3