



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107522680 B

(45) 授权公告日 2021.01.08

(21) 申请号 201710799789.5

(22) 申请日 2017.09.07

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107522680 A

(43) 申请公布日 2017.12.29

(73) 专利权人 海南师范大学

地址 570000 海南省海口市琼山区龙昆南路99号

(72) 发明人 惠阳 陈文豪 陈光英 宋小平

韩长日 戴春燕

(74) 专利代理机构 海口翔翔专利事务有限公司

46001

代理人 莫臻

(51) Int. Cl.

C07D 307/92 (2006.01)

C07C 69/732 (2006.01)

C07C 62/34 (2006.01)

C07C 62/38 (2006.01)

C07C 237/20 (2006.01)

C07C 62/32 (2006.01)

C07C 51/42 (2006.01)

C07C 67/48 (2006.01)

C07J 63/00 (2006.01)

C07J 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101259124 A, 2008.09.10

CN 103086879 A, 2013.05.08

任慧等. 南美蟛蜞菊化学成分研究.《中草药》.2015,第38卷(第7期),第1426-1429页.

H. Lage et al..Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells.

《Phytomedicine》.2010,第17卷第441-448页.

审查员 王馨悦

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

南美蟛蜞菊花抗肿瘤提取物及其制备方法和用途

(57) 摘要

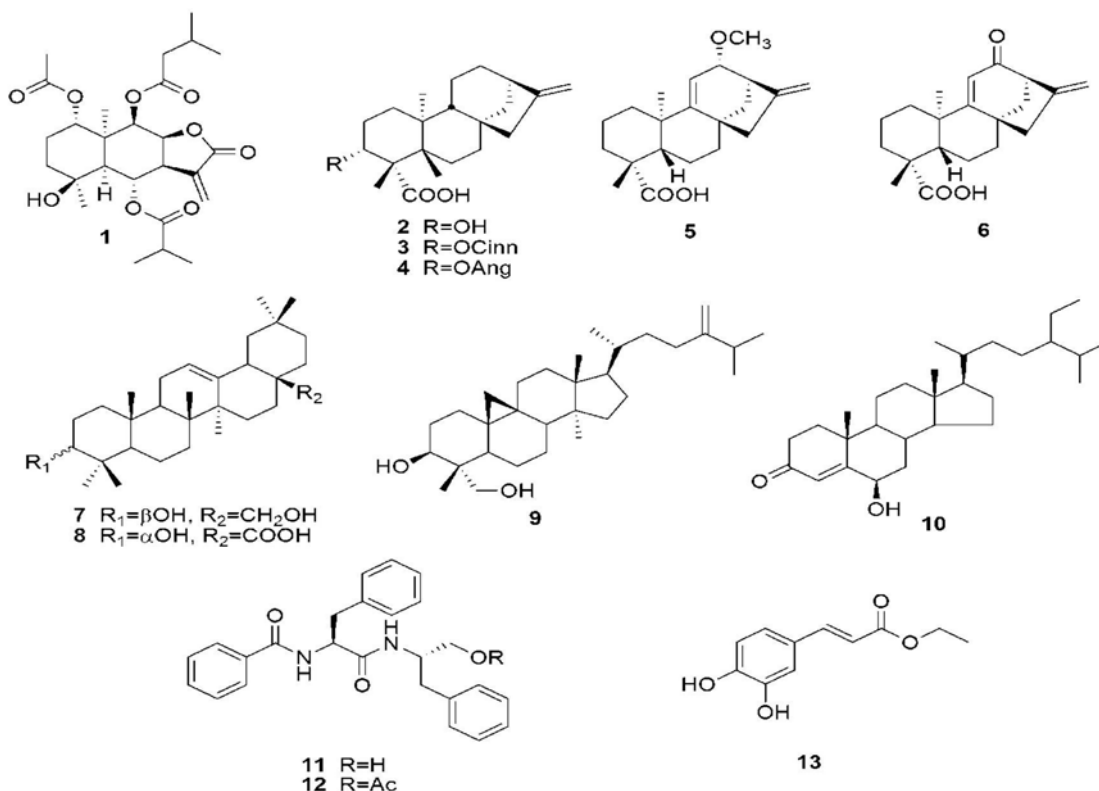
本发明公开了一种南美蟛蜞菊花抗肿瘤提取物及其制备方法和用途。该提取物是在南美蟛蜞菊花的干燥粉末中加入溶剂提取;提取液经过滤、减压浓缩得到总提取物,加水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,减压回收分别得到石油醚部分、乙酸乙酯部分和水溶解部分,所得石油醚部分包括1个桉烷型倍半萜内酯、5个对映贝壳杉烷型二萜类化合物、2个齐墩果烷型三萜、1个环阿尔廷烷型三萜、1个甾醇类化合物、2个二肽类化合物和1个咖啡酸酯类化合物。本发明制得的提取物得率高,工艺流程简单,成本低廉,适合较大规模的制备。提取物具有广谱抗肿瘤活性,可以作为活性组份应用于预防和治疗肿瘤的药物中。

1. 一种南美蟛蜞菊抗肿瘤提取物的分离方法,其特征在于,通过以下步骤制备:

(1) 将南美蟛蜞菊的花经阴干后粉碎得到南美蟛蜞菊花干燥粉末,在南美蟛蜞菊花干燥粉末中加入溶剂提取,溶剂为85~95%的乙醇或甲醇,南美蟛蜞菊花干燥粉末与溶剂的体积比为1:1~1:10,提取方法包括室温浸泡、加热或超声提取;

(2) 将南美蟛蜞菊花提取液经过滤、减压浓缩得到总提取物,加水混悬均匀,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,减压回收分别得到石油醚部分、乙酸乙酯部分和水溶解部分;所述石油醚、乙酸乙酯用量为水混悬液的1~2倍体积量;

(3) 石油醚部分经柱色谱脱油脂后,得南美蟛蜞菊花抗肿瘤提取物,该提取物经反复柱层析得到13个单体化合物,包括1个桉烷型倍半萜内酯、5个对映贝壳杉烷型二萜类化合物、2个齐墩果烷型三萜、1个环阿尔廷烷型三萜、1个甾醇类化合物、2个二肽类化合物和1个咖啡酸酯类化合物,其化学结构式分别为:



所述柱层析用填料为柱层析用硅胶或葡聚糖凝胶;所述硅胶柱层析用洗脱溶剂为石油醚、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯和丙酮中任意两种混合;所述葡聚糖凝胶柱层析用洗脱溶剂为氯仿、甲醇和水中任意两种混合。

南美蟛蜞菊抗肿瘤提取物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于天然植物药领域,特别涉及一种南美蟛蜞菊抗肿瘤提取物及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 南美蟛蜞菊(*Wedelia trilobata*) 又称三裂(叶) 蟛蜞菊,为菊科(Compositae) 蟛蜞菊属(*Wedelia*) 多年生草本植物。其原产热带美洲中南部,植物的叶子或地上部分在加勒比海地区和中美洲的传统医药中用于治疗背痛、肌肉痉挛、风湿病、顽固伤口、溃疡、肿胀、关节痛使用。在19世纪70年代被首次引入香港用于替代传统中药蟛蜞菊,主要用于治疗白喉、百日咳、痢疾、痔疮、跌打损伤。如今,在我国广泛分布于广东、广西、福建和海南等地的路旁、田边、沟边或湿润草地上,常常过度成长成茂密地被,排挤且阻止其它植物的再生,破坏所处生态系统平衡,严重威胁我国南部地区物种的多样性,被列为“世界 100种危害最大的外来入侵物种”之一。

[0003] 张玉虎等人在“三裂蟛蜞菊中的倍半萜内酯成分及其化感作用,热带亚热带植物学报,2004,12(6):533-537”中报道从植物全株分离得到6个倍半萜内酯类化合物,并发现化合物1、2、混合物3a和3b,4a和4b对萝卜、小白菜和西红柿的幼苗生长具有很强抑制作用,混合物4a和4b对咸水虾有较强的毒性;朱慧等人在“三裂蟛蜞菊茎总黄酮含量的提取及其抗氧化性研究,食品科学,2009,30(6):52-56”中报道,三裂蟛蜞菊茎中总黄酮含量为4.1%,具有较好的羟自由基、超氧阴离子自由基清除率。武美兰等人在“三裂蟛蜞菊化学成分的研究,中草药,2010,41(5):681-685”中报道,从南美蟛蜞菊地上部位中分离得到11个化合物,主要涉及倍半萜内酯和对映贝壳杉烷型二萜;该作者等人在对比研究“三裂蟛蜞菊花的化学成分研究,亚太传统医药,2009,5(8):41-42”中报道,从南美蟛蜞菊花中分离得到5个化合物,均与从南美蟛蜞菊地上部位中分离得到的化合物一致,两篇报道均未进行生物活性测试。

[0004] 在活性成分方面,公开号为CN104083348A的中国专利公开了来源于南美蟛蜞菊等植物材料的四种贝壳杉烷二萜化合物可用于制备糖苷酶抑制剂药物;公开号为CN104610054A的中国专利公开了一种从南美蟛蜞菊植物中分离的咖啡酰对羟基苯酚酯p-hydroxyphenyl caffeate用于制备强效酪氨酸酶抑制剂。

[0005] 在提取物生物活性方面,公开号为CN106465714A、CN106342934A、CN106342936A的中国专利分别公开了利用南美蟛蜞菊挥发油与其他提取物组合用于防治荔枝泥蜂透翅蛾、荔枝蝽、荔枝叶螨;公开号为CN105767021A、CN105851070A的中国专利,分别公开了南美蟛蜞菊叶的水提取物用于杀灭人纹污灯蛾幼虫、斜纹夜蛾幼虫。

[0006] 迄今为止,在肿瘤治疗应用方面未见南美蟛蜞菊相关专利,也没有关于南美蟛蜞菊花抗肿瘤有效部位及其进一步化学成分的分离的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种有效地纯化制备南美蟛蜞菊花的抗肿瘤活性部位,并经多次柱层析,阐明活性部位的化学成分。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种上述方法制备的南美蟛蜞菊花抗肿瘤提取物。

[0009] 本发明的再一目的在于提供一种上述南美蟛蜞菊花抗肿瘤提取物的用途。

[0010] 本发明的目的可通过下述技术路线得以实现,南美蟛蜞菊花抗肿瘤提取物的制备方法,其步骤如下:

[0011] (1) 在南美蟛蜞菊花的干燥粉末中加入溶剂提取,溶剂为85~95%的乙醇或甲醇。

[0012] (2) 将南美蟛蜞菊花提取液经过滤、减压浓缩得到总提取物,加水混悬均匀,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,减压回收分别得到石油醚部分、乙酸乙酯部分和水溶解部分。

[0013] (3) 石油醚部分经柱色谱脱油脂后,得南美蟛蜞菊花抗肿瘤提取物,该提取物经反复柱层析得到13个单体化合物,包括1个桉烷型倍半萜内酯、5个对映贝壳杉烷型二萜类化合物、2个齐墩果烷型三萜、1个环阿尔廷烷型三萜、1个甾醇类化合物、2个二肽类化合物和1个咖啡酸酯类化合物。

[0014] 上述步骤(1)中,所述南美蟛蜞菊花干燥粉末是将南美蟛蜞菊花的花经阴干后粉碎得到,所述溶剂为乙醇或甲醇与水(V/V)的混合溶液。

[0015] 上述步骤(1)中,所述提取方法包括室温浸泡、加热或超声提取。

[0016] 上述步骤(1)中,南美蟛蜞菊花药材与溶剂的体积比为1:1~1:10。

[0017] 上述步骤(2)中,所述石油醚、乙酸乙酯用量为水混悬液的1~2倍体积量。

[0018] 上述步骤(3)中,柱层析用填料为柱层析用硅胶或葡聚糖凝胶;所述硅胶柱层析用洗脱溶剂为石油醚、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯和丙酮中任意两种混合;所述葡聚糖凝胶柱层析用洗脱溶剂为氯仿、甲醇和水中任意两种混合。

[0019] 上述步骤(3)中,1个桉烷型倍半萜内酯、5个对映贝壳杉烷型二萜类化合物、2个齐墩果烷型三萜、1个环阿尔廷烷型三萜、1个甾醇类化合物、2个二肽类化合物和1个咖啡酸酯类化合物,分别为1 α -乙酰氧基-4 β -羟基-6 α -异丁酰氧基-9 β -异戊酰氧基卤地菊内酯、对映3 α -羟基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸、对映3 α -肉桂酰氧基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸、对映3 α -当归酰氧基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸、12 α -甲氧基-9,11-脱氢-对映贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸、对映-12-羰基-9(11),16-贝壳杉烷二烯-19-羧酸、高根二醇、3-表齐墩果酸、24-亚甲基环阿尔廷-3,28-二醇、6 β -羟基豆甾-4,22-二烯-3-酮、金色酰胺醇、金色酰胺醇乙酯和咖啡酸乙酯。

[0020] 本发明的提取物具有广谱抗肿瘤活性,可以作为活性成分与可接受的药物载体制成治疗各种口服及注射单方以及复方制剂,如以淀粉等为辅料制成的片剂、以微晶纤维素为辅料的胶囊剂、以甘露醇为支架制成的注射剂,广泛应用于预防和治疗肿瘤药物中。

[0021] 本发明与现有技术相比具有如下优点和效果:

[0022] 1) 利用简单的提取分离方法,对南美蟛蜞菊花不同极性部位进行抗肿瘤活性筛选,得到活性部位,经多次柱层析,阐明活性部位的化学成分。

[0023] 2) 本发明所得提取物具有较好的抗肿瘤活性,且化学成分明确。可以广泛用于预防和治疗肿瘤药物中。

[0024] 4) 本发明制得的提取物得率高,工艺流程简单,成本低廉,适合较大规模的制备。

具体实施方式

[0025] 下面结合实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0026] 南美蟛蜞菊提取物的制备方法步骤如下:

[0027] 1) 将粉碎后的南美蟛蜞菊花药材(过20~80目筛)中加入85~95%的乙醇或甲醇水溶液,室温浸泡、加热或超声提取,提取时间为60分钟至7天,料液比为1:1~1:10;

[0028] 2) 将南美蟛蜞菊花药材提取液过滤、减压回收得到总提取物,加水混悬,加水混悬,依次用石油醚和乙酸乙酯萃取,减压回收分别得到石油醚部分、乙酸乙酯部分和水溶解部分;

[0029] 3) 石油醚部分经硅胶柱色谱,先石油醚或正己烷洗脱去除油脂,再经乙酸乙酯洗脱,真空浓缩即得具有广泛抗肿瘤活性的南美蟛蜞菊花提取物。对该活性部位进行反复柱层析:石油醚:丙酮(15:1)、石油醚:乙酸乙酯(20:1) 硅胶柱层析分别得到化合物(3)、(4)和(7);石油醚:丙酮(10:1) 硅胶柱层析,接着是葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析(氯仿:甲醇=1:1,v/v) 以及石油醚:乙酸乙酯(7:1) 硅胶柱层析分离得到化合物(9)、(2)、(10)、(8)和(6);氯仿:乙酸乙酯(10:1) 硅胶柱层析接着是葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析(氯仿:甲醇=1:1,v/v) 分离得到(11)、(12)和(1);石油醚:乙酸乙酯(5:1)和石油醚:丙酮(3:1) 硅胶柱层析分离得到化合物(5)和(13)。

[0030] 4) 综合应用多种光谱波谱技术(包括IR、UV、MS、1D/2D NMR和x-ray 单晶衍射)结合相关文献参考,对纯化得到的单体化合物进行结构鉴定,分别为1个桉烷型倍半萜内酯、5个对映贝壳杉烷型二萜类化合物、2个齐墩果烷型三萜、1个环阿尔廷烷型三萜、1个甾醇类化合物、2个二肽类化合物和1个咖啡酸酯类化合物,具体结构为1 α -乙酰氧基-4 β -羟基-6 α -异丁酰氧基-9 β -异戊酰氧基卤地菊内酯(1)、对映3 α -羟基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸(2)、对映3 α -肉桂酰氧基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸(3)、对映3 α -当归酰氧基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸(4)、12 α -甲氧基-9,11-脱氢对映贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸(5)、对映-12-羧基-9(11),16-贝壳杉烷二烯-19-羧酸(6)、高根二醇(7)、3-表齐墩果酸(8)、24-亚甲基环阿尔廷-3,28-二醇(9)、6 β -羟基豆甾-4,22-二烯-3-酮(10)、金色酰胺醇(11)、金色酰胺醇乙酯(12)和咖啡酸乙酯(13),测定结构可靠。

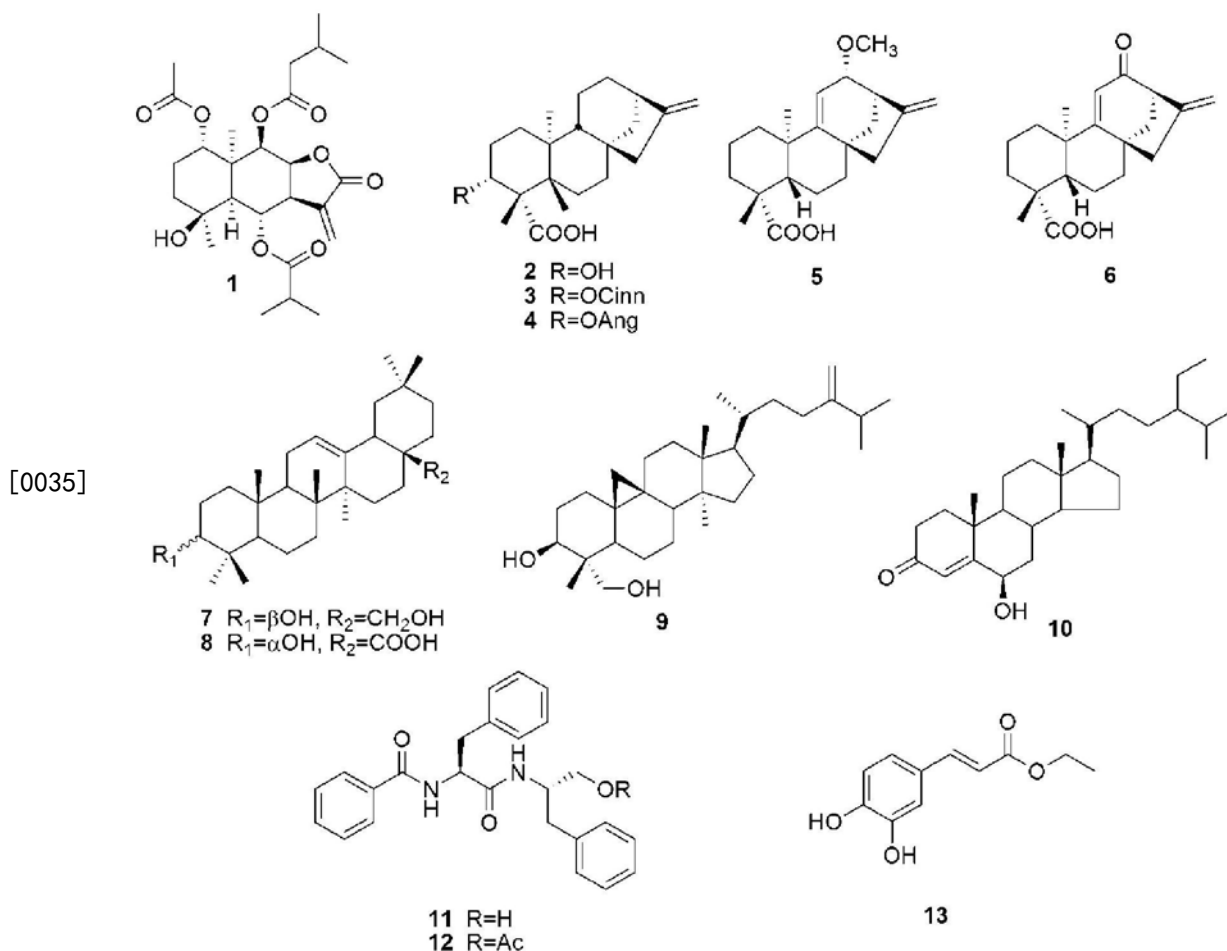
[0031] 下面结合实施例对本发明作详细说明。

[0032] 实例一 南美蟛蜞菊花有效部位的制备

[0033] 南美蟛蜞菊花(10Kg),室温下采用95%乙醇室温浸泡3次,7天/次,合并提取液,减压浓缩得总提取物(1.2Kg),加水悬浮分散,分别用石油醚,氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得石油醚部分(200g),乙酸乙酯部分(380g)和水溶解部分。

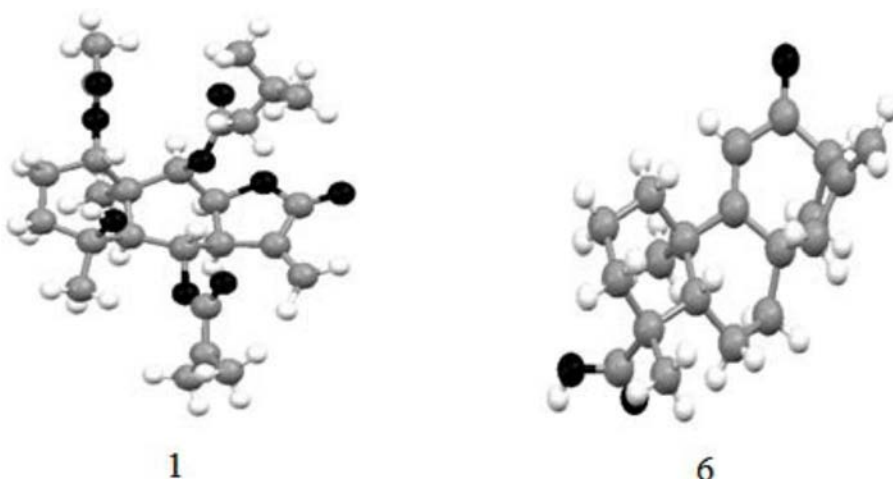
[0034] 石油醚部分脱油脂后的活性部位经过反复硅胶、葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)柱层析,得到1个桉烷型倍半萜内酯、5个对映贝壳杉烷型二萜类化合物、2个齐墩果烷型三萜、1个环阿尔廷烷型三萜、1个甾醇类化合物、2个二肽类化合物和1个咖啡酸酯类化合物,分别为石油醚:丙酮(15:1)、石油醚:乙酸乙酯(20:1) 硅胶柱层析分别得到对映3 α -肉桂酰氧基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸(3) 7mg、对映3 α -当归酰氧基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸(4) 16mg,和高根二醇(7) 26mg;石油醚:丙酮(10:1) 硅胶柱层析,接着是Sephadex LH-20 柱层析(氯

仿:甲醇=1:1,v/v)以及石油醚:乙酸乙酯(7:1)硅胶柱层析分离得到24-亚甲基环阿尔廷-3,28-二醇(9) 27mg、对映3 α -羟基贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸(2) 34mg、6 β -羟基豆甾-4,22-二烯-3-酮(10) 21mg、3-表齐墩果酸(8) 11mg和、对映-12-羧基-9(11),16-贝壳杉烷二烯-19-羧酸(6) 26mg;氯仿:乙酸乙酯(10:1)硅胶柱层析接着是Sephadex LH-20柱层析(氯仿:甲醇=1:1,v/v)分离得到金色酰胺醇(11) 15mg、金色酰胺醇乙酯(12) 23mg 和1 α -乙酰氧基-4 β -羟基-6 α -异丁酰氧基-9 β -异戊酰氧基卤地菊内酯(1) 21mg;石油醚:乙酸乙酯(5:1)和石油醚:丙酮(3:1)硅胶柱层析分离得到12 α -甲氧基-9,11-脱氢-对映贝壳杉烷-16-烯-19-羧酸(5) 10mg和咖啡酸乙酯(13) 34mg。化学结构式如下:



[0036] 化合物(1)和(6)的晶体结构如下所示:

[0037]



[0038] 实施例二 南美蟛蜞菊提取物抗肿瘤活性研究

[0039] 1. 实验方法: 将四种肿瘤细胞株SPCA-1、SGC-7901、K562、BEL-7402, 用含10%小牛血清的RPMI-1640培养基, 在37℃、5%CO₂培养箱中培养。采用MTT法进行细胞增殖抑制试验, 主要操作为取对数生长期的肿瘤细胞株, 用0.25%的胰蛋白酶消化, 10%新生小牛血清的RPMI-1640培养液调制成 5×10^4 个/mL的细胞悬液, 接种于96孔板中, 每孔接种180μL。在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养8-10h, 待其贴壁, 每个孔加入用PBS配制的样品液, 使得样品终浓度分别为1, 10, 和100μg/mL。每个浓度平行3孔, 继续培养44h后, 每孔加入50μLMTT (1mg/mL⁻¹, PBS配制), 在37℃、5%CO₂条件下继续温育4h, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加入150μLDMSO, 在微型振荡器上摇匀15min, 结晶溶解后, 在酶联免疫检测仪上选择570nm, 测定各孔的吸光值, 同时设置空白组 (仅加入含细胞的培养液) 和对照组 (以培养液替代药物), 计算细胞增殖抑制率。抑制率 (%) = (1 - 实验组3孔OD值平均值 / 对照组3孔OD值平均值) × 100%。

[0040] IC₅₀值的测定: 根据MTT实验初步筛选结果, 选择浓度为100μg/mL时抑制率>50%的样品, 进一步测定其半数抑制浓度IC₅₀。以同一样品浓度对数值为横坐标, 以抑制率作纵坐标, 作回归曲线, 计算出样品IC₅₀值。采用SPSS13.0 统计软件包进行数据处理及统计分析。

[0041] 2. 实验结果 (见表1)

[0042] 由实施例1得到的南美蟛蜞菊提取物对所选肿瘤细胞株SPCA-1、SGC-7901、K562、BEL-7402均显示不同程度的增殖抑制活性, IC₅₀值分别为60.2、57.5、81.6和65.3μg/mL; 乙酸乙酯萃取部位对四种测试肿瘤细胞显示无增殖抑制活性, IC₅₀值均大于100μg/mL。

[0043] 表1南美蟛蜞菊不同溶剂提取物的抗肿瘤活性

样品	IC ₅₀ (μg/mL)			
	SPCA-1	SGC-7901	K562	BEL-7402
石油醚部分	60.2	57.5	81.6	65.3
乙酸乙酯部分	N	N	N	N

[0044] 注: N为样品浓度为100μg/mL时, 肿瘤细胞增殖抑制率<50%。

[0047] 以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明技术原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰

也应视为本发明的保护范围。