



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103012425 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201310014126. X

A01P 1/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 01. 15

(56) 对比文件

(73) 专利权人 云南民族大学

CN 102675076 A, 2012. 09. 19, 全文.

地址 650500 云南省昆明市呈贡大学城雨花校区

CN 102786530 A, 2012. 11. 21, 全文.

CN 102827118 A, 2012. 12. 19, 全文.

(72) 发明人 高雪梅 胡秋芬 李银科 李干鹏
黄相忠

审查员 宋增锋

(74) 专利代理机构 昆明知道专利事务所(特殊
普通合伙企业) 53116

代理人 姜开侠

(51) Int. Cl.

C07D 493/04 (2006. 01)

A01N 43/90 (2006. 01)

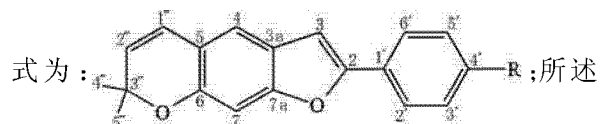
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

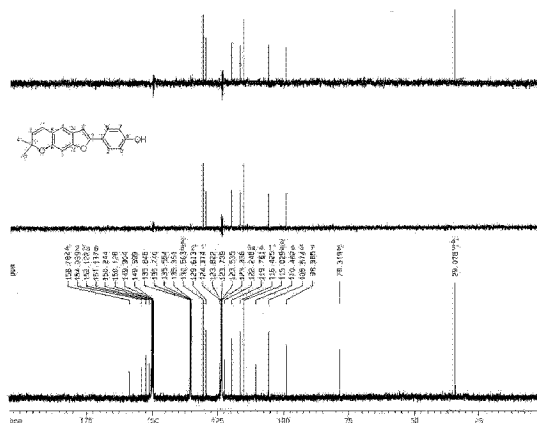
一种苯并呋喃类化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

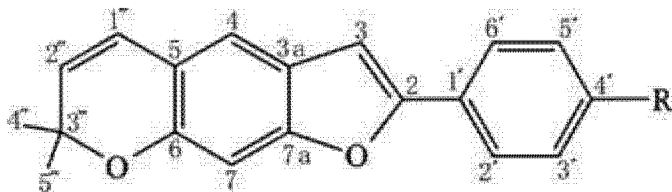
本发明公开了一种苯并呋喃类化合物及其制备方法和应用,所述的苯并呋喃类化合物其结构



的 R 为 -OH, 其分子式为 $C_{19}H_{16}O_3$, 该化合物命名为 gramniphenol F。所述的 R 为 -OMe。其分子式为 $C_{20}H_{18}O_3$, 该化合物命名为 gramniphenol G。制备方法, 是以干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实为原料, 经浸膏提取、有机溶剂萃取、硅胶柱层析、高压液相色谱分离步骤所述的苯并呋喃类化合物在制备抗烟草花叶病药物中的应用。经对抗烟草花叶病毒的实验, gramniphenol F、gramniphenol G 的抑制率分别达到 $35.8 \pm 3.6\%$ 和 $32.1 \pm 3.8\%$, 具有很好的抗烟草花叶病毒活性, 均比阳性对照品南宁霉素的抑制率 ($31.8 \pm 2.5\%$) 高。本发明化合物结构简、单活性好, 可作为抗烟草花叶病毒药物的先导性化合物, 有良好的应用前景。



1. 一种苯并呋喃类化合物,其特征是:所述的苯并呋喃类化合物是以干燥的竹叶兰枝条、叶或果实为原料,经浸膏提取、有机溶剂萃取、硅胶柱层析、高压液相色谱分离得到的,其结构式为:



;R 为 $-OH$, 其分子式为 $C_{19}H_{16}O_3$, 该化合物命名为 gramniphenol F; 或者 R 为 $-OMe$, 其分子式为 $C_{20}H_{18}O_3$, 该化合物命名为 gramniphenol G。

2. 一种权利要求 1 所述的苯并呋喃类化合物的制备方法,其特征是以干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实为原料,经浸膏提取、有机溶剂萃取、硅胶柱层析、高压液相色谱分离获得,具体为:

A、浸膏提取:将竹叶兰枝条、叶或果实粗粉碎到 20~40 目,用有机溶剂超声提取 2~4 次,每次 30~60min,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩提取液至 1/4~1/2 体积时,静置,滤除沉淀物,浓缩成浸膏 a;该步骤所述有机溶剂为 70~100% 的丙酮、乙醇或甲醇;

B、有机溶剂萃取:浸膏 a 中加入重量比 1~2 倍量的水,用与水等体积的有机溶剂萃取 3~5 次,合并有机溶剂萃取相,减压浓缩成浸膏 b;该步骤所述有机溶剂为乙酸乙酯、氯仿、乙醚、石油醚或苯;

C、硅胶柱层析:将浸膏 b 用重量比 1.5~3 倍量的丙酮溶解,然后用浸膏重 0.8~1.2 倍的 80~100 目硅胶拌样,然后上硅胶柱层析,装柱硅胶为 160~200 目,用量为浸膏 b 重量 6~8 倍量;用体积比为 1:0、20:1、9:1、8:2、3:2、1:1、1:2、0:1 的混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;该步骤所述混合有机溶剂为正己烷-丙酮、氯仿-丙酮、氯仿-甲醇、石油醚-丙酮或石油醚-乙酸乙酯;

D、反相柱层析:将以 9:1 配比的有机溶剂进行洗脱得到的洗脱液上反相柱层析,反相柱是用反相材料 C-18 装柱;用体积含量为 20~100% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集各部分洗脱液并浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;

E、高效液相色谱分离:将以体积含量 55~70% 甲醇水溶液洗脱得到的洗脱液经高效液相色谱分离纯化,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol F 和 gramniphenol G;

F、当 E 步骤所述的高效液相色谱分离纯化是以 50~70% 的甲醇为流动相,流速 10~14ml/min, 21.2×250mm, 5 μm 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254nm,每次进样 45~60 μL,收集 10~25min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol F;

G、当 E 步骤所述的高效液相色谱分离纯化是以 50~70% 的甲醇为流动相,流速 10~14ml/min, 21.2×250mm, 5 μm 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254nm,每次进样 45~60 μL,收集 25~40min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol G。

3. 一种权利要求 1 所述的苯并呋喃类化合物在制备抗烟草花叶病药物中的应用。

一种苯并呋喃类化合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物有效成分提取技术领域,具体涉及一种苯并呋喃类化合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 兰科(Orchidaceae)为单子叶植物,竹叶兰属(*Arundina*)是兰科的一个属,为陆生兰。该属共有约5种,分布于亚洲热带至大洋洲的一些岛屿。其中竹叶兰 *A. graminifolia* 与狭叶竹叶兰 *A. stenopetala* 等2种亦产我国南部。竹叶兰,植株高40~80cm,有时可达1m以上;地下根状茎常在连接茎基部处呈卵球形膨大,貌似假鳞茎,茎直立,常数个丛生或成片生长,产浙江、江西、福建、台湾、湖南南部、广东、海南、广西、四川南部(米易)、贵州(榕江、兴义)、云南(邓川、凤庆、景洪、西畴、屏边等)和西藏东南部(墨脱)。生于草坡、溪谷旁、灌丛下或林中,海拔400~2800米。在尼泊尔、锡金、不丹、印度、斯里兰卡、缅甸、越南、老挝、柬埔寨、泰国、马来西亚、印度尼西亚、琉球群岛和塔希提岛等地也有分布。竹叶兰药用部位为根茎和茎叶,其性苦,平。清热解毒,祛风除湿,止痛,利尿。用于治疗黄疸,热淋,脚气水肿,疝气腹痛,风湿痹痛,胃痛,尿路感染,毒蛇咬伤,疮痈肿毒,跌打损伤等。竹叶兰是西双版纳地区傣族人民常用的植物药,当地的傣族同胞把开着美丽花朵的竹叶兰叫做“农尚嗨”,是一种尽人皆知的解毒良药。

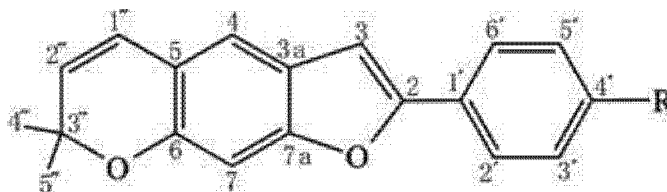
[0003] 苯并呋喃,也称为香豆酮、氧茛、 β -苯并呋喃,是一个杂环芳香有机化合物。苯并呋喃可通过氯乙酸对水杨醛发生O-烷基化,而后失水得到。由于植物苯并呋喃成分结构类型多,立体化学复杂,具有多种生物活性,国内外对该领域的研究十分活跃,无论是天然存在的,还是人工合成得到的苯并呋喃类化合物,都引起了化学家的广泛关注。因此对该属植物的继续深入研究显得尤为重要。

发明内容

[0004] 本发明的第一目的是提供一种苯并呋喃类化合物;第二目的在于提供所述苯并呋喃类化合物的制备方法;第三目的在于提供所述苯并呋喃类化合物在制备抗烟草花叶病药物中的应用。

[0005] 本发明的第一目的是这样实现的,所述的苯并呋喃类化合物是以干燥的竹叶兰枝条、叶或果实为原料,经浸膏提取、有机溶剂萃取、硅胶柱层析、高压液相色谱分离得到的,其结构式为:

[0006]



[0007] 所述的R为-OH,其分子式为 $C_{19}H_{16}O_3$,该化合物命名为gramniphénol F。

[0008] 所述的 R 为 -OMe。其分子式为 $C_{20}H_{18}O_3$ ，该化合物命名为 grammiphenol G。

[0009] 本发明的第二目的是这样实现的，所述的苯并呋喃类化合物的制备方法，是以干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实为原料，经浸膏提取、有机溶剂萃取、硅胶柱层析、高压液相色谱分离获得，具体为：

[0010] A、浸膏提取：将竹叶兰枝条、叶或果实粗粉碎到 20~40 目，用有机溶剂超声提取 2~4 次，每次 30~60min，提取液合并；提取液过滤，减压浓缩提取液至 1/4 ~ 1/2 体积时，静置，滤除沉淀物，浓缩成浸膏 a；

[0011] B、有机溶剂萃取：浸膏 a 中加入重量比 1~2 倍量的水，用与水等体积的有机溶剂萃取 3~5 次，合并有机溶剂萃取相，减压浓缩成浸膏 b；

[0012] C、硅胶柱层析：将浸膏 b 用重量比 1.5~3 倍量的丙酮溶解，然后用浸膏重 0.8~1.2 倍的 80~100 目硅胶拌样，然后上硅胶柱层析，装柱硅胶为 160~200 目，用量为浸膏 b 重量 6~8 倍量；用体积比为 1:0~0:1 的混合有机溶剂梯度洗脱，收集梯度洗脱液、浓缩，经 TLC 监测，合并相同的部分；

[0013] D、反相柱层析：将以 9:1 配比的有机溶剂进行洗脱得到的洗脱液上反相柱层析，反相柱是用反相材料 C-18 装柱；用体积含量为 20~100% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱，收集各部分洗脱液并浓缩，经 TLC 监测，合并相同的部分；

[0014] E、高效液相色谱分离：将以体积含量 55~65% 甲醇水溶液洗脱得到的洗脱液经高效液相色谱分离纯化，即得所述的苯并呋喃类化合物；

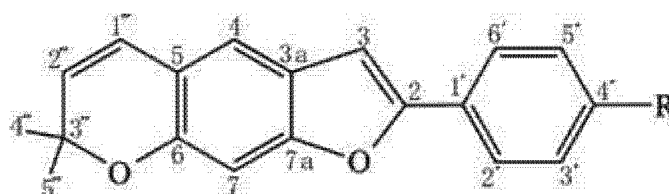
[0015] F、E 步骤所述的高效液相色谱分离纯化是以 50~70% 的甲醇为流动相，流速 10~14ml/min，21.2 X 250 mm，5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相，紫外检测器检测波长为 254 nm，每次进样 45~60 μ L，收集 10~25min 的色谱峰，多次累加后蒸干。即得所述的苯并呋喃类化合物 grammiphenol F；

[0016] G、E 步骤所述的高效液相色谱分离纯化是以 50~70% 的甲醇为流动相，流速 10~14ml/min，21.2 X 250 mm，5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相，紫外检测器检测波长为 254 nm，每次进样 45~60 μ L，收集 25~40min 的色谱峰，多次累加后蒸干。即得所述的苯并呋喃类化合物 grammiphenol G。

[0017] 本发明的第三目的是这样实现的，所述的苯并呋喃类化合物在制备抗烟草花叶病药物中的应用。

[0018] 本发明苯并呋喃类化合物是首次被分离出来的，通过核磁共振和质谱测定方法确定为苯并呋喃类化合物，并表征其具体结构为：

[0019]



[0020] 其异构体化合物 grammiphenol F、grammiphenol G 能通过本发明的方法分离出来。以 grammiphenol F、grammiphenol G 为原料，经对抗烟草花叶病毒的实验，其抑制率分别达到 $35.8 \pm 3.6\%$ 和 $32.1 \pm 3.8\%$ ，具有很好的抗烟草花叶病毒活性，均比阳性对照品南宁霉素的抑制率 ($31.8 \pm 2.5\%$) 高。以上结果揭示本发明化合物结构简单活性好，可作为抗烟

草花叶病毒药物的先导性化合物,在制备抗烟草花叶病毒药物中有良好的应用前景。

附图说明

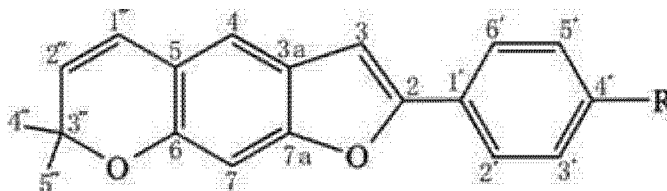
- [0021] 图 1 为化合物 Gramniphénol F 的核磁共振碳谱 (^{13}C NMR);
 [0022] 图 2 为化合物 Gramniphénol F 的核磁共振氢谱 (^1H NMR);
 [0023] 图 3 为化合物 Gramniphénol G 的核磁共振碳谱 (^{13}C NMR);
 [0024] 图 4 为化合物 Gramniphénol G 的核磁共振氢谱 (^1H NMR);
 [0025] 图 5 化合物 Gramniphénol F 的主要 HMBC ($\rightarrow$) 和 ^1H - ^1H COSY ($-$) 相关。

具体实施方式

[0026] 下面结合附图对本发明作进一步的说明,但不以任何方式对本发明加以限制,基于本发明教导所作的任何变换或改进,均落入本发明的保护范围。

[0027] 本发明所述的苯并呋喃类化合物是以干燥的竹叶兰枝条、叶或果实为原料,经浸膏提取、有机溶剂萃取、硅胶柱层析、高压液相色谱分离得到的,其结构式为:

[0028]



[0029] 所述的 R 为 $-\text{OH}$, 其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_3$, 该化合物命名为 gramniphénol F。

[0030] 所述的 R 为 $-\text{OMe}$, 其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_3$, 该化合物命名为 gramniphénol G。

[0031] 本发明所述的苯并呋喃类化合物制备方法,是以干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实为原料,经浸膏提取、有机溶剂萃取、硅胶柱层析、高压液相色谱分离获得,具体为:

[0032] A、浸膏提取:将竹叶兰枝条、叶或果实粗粉碎到 20~40 目,用有机溶剂超声提取 2~4 次,每次 30~60min,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩提取液至 1/4 ~ 1/2 体积时,静置,滤除沉淀物,浓缩成浸膏 a;

[0033] B、有机溶剂萃取:浸膏 a 中加入重量比 1~2 倍量的水,用与水等体积的有机溶剂萃取 3~5 次,合并有机溶剂萃取相,减压浓缩成浸膏 b;

[0034] C、硅胶柱层析:将浸膏 b 用重量比 1.5~3 倍量的丙酮溶解,然后用浸膏重 0.8~1.2 倍的 80~100 目硅胶拌样,然后上硅胶柱层析,装柱硅胶为 160~200 目,用量为浸膏 b 重量 6~8 倍量;用体积比为 1:0~0:1 的混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;

[0035] D、反相柱层析:将以 9:1 配比的有机溶剂进行洗脱得到的洗脱液上反相柱层析,反相柱是用反相材料 C-18 装柱;用体积含量为 20~100% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集各部分洗脱液并浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;

[0036] E、高效液相色谱分离:将以体积含量 55~65% 甲醇水溶液洗脱得到的洗脱液经高效液相色谱分离纯化,即得所述的苯并呋喃类化合物;

[0037] F、E 步骤所述的高效液相色谱分离纯化是以 50~70% 的甲醇为流动相,流速 10~14ml/min, 21.2 X 250 mm, 5 μm 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检

测波长为 254 nm,每次进样 45~60 μ L,收集 10~25min 的色谱峰,多次累加后蒸干。即得所述的苯并呋喃类化合物 grammiphenol F;

[0038] G、E 步骤所述的高效液相色谱分离纯化是以 50~70% 的甲醇为流动相,流速 10~14ml/min,21.2 X 250 mm,5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254 nm,每次进样 45~60 μ L,收集 25~40min 的色谱峰,多次累加后蒸干。即得所述的苯并呋喃类化合物 grammiphenol G。

[0039] A 步骤所述的有机溶剂为 70~100% 的丙酮、乙醇或甲醇。

[0040] B 步骤所述的有机溶剂为乙酸乙酯、氯仿、乙醚、石油醚或苯。

[0041] C 步骤所述的混合有机溶剂为正己烷-丙酮、氯仿-丙酮、氯仿-甲醇、石油醚-丙酮或石油醚-乙酸乙酯。

[0042] C 步骤所述的混合有机溶剂的体积配比为 1:0、20:1、9:1、8:2、3:2、1:1、1:2、0:1。

[0043] E 步骤所述的高效液相色谱分离纯化是以 50~70% 的甲醇为流动相,流速 10~14ml/min,21.2 X 250 mm,5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254 nm,每次进样 45~60 μ L,收集 10~40min 的色谱峰,多次累加后蒸干。

[0044] 本发明所述的苯并呋喃类化合物在制备抗烟草花叶病药物中的应用。

[0045] 本发明所述的竹叶兰不受地区和品种限制,均可以实现本发明。

[0046] 实施例 1

[0047] 取干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实 4.5kg,粗粉碎至 40 目,用 70% 的丙酮超声提取 4 次,每次 60min,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩至体积的 1/4;静置,滤除沉淀物,浓缩成 523g 浸膏 a;在浸膏 a 中加入 784.5g 水,用与水等体积的乙酸乙酯萃取 5 次,合并萃取相,减压浓缩成 385g 浸膏 b;用 200 目硅胶 2310g 装柱,在浸膏 b 中加入 577.5g 的丙酮溶解,然后加入 100 目硅胶 385g 拌样,拌样后上柱;用体积比分别为 1:0、20:1、9:1、8:2、3:2、1:1、1:2、0:1 的氯仿-甲醇混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分,得到 6 个部分,体积比 9:1 的氯仿-甲醇混合有机溶剂的洗脱液 c 为 63g;用反相材料 C-18 装柱,洗脱液 c 上反相柱,以体积含量为 20~100% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集各部分洗脱液并浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;取以体积含量 55~70% 甲醇水溶液洗脱得到的洗脱液,再以 62% 的甲醇为流动相,流速 10ml/min,21.2 X 250mm,5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254 nm,每次进样 48 μ L,收集 19min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 grammiphenol F;收集 33min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 grammiphenol G。

[0048] 实施例 2

[0049] 取干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实 5kg,粗粉碎至 20 目,用 100% 的乙醇超声提取 2 次,每次 50min,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩至体积的 1/3;静置,滤除沉淀物,浓缩成 590g 浸膏 a;在浸膏 a 中加入 590 的水,用与水等体积的氯仿萃取 3 次,合并萃取相,减压浓缩成 438g 浸膏 b;用 160 目硅胶 3504g 装柱,在浸膏 b 中加入 1314g 的丙酮溶解,然后加入 80 目硅胶 350.4g 拌样,拌样后上柱;用体积比分别为 1:0、20:1、9:1、8:2、3:2、1:1、1:2、0:1 的正己烷-丙酮混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;用反相材料 C-18 装柱,洗脱液 c 上反相柱,以体积含量为 20~100% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集各部分洗脱液并浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;取以体积含量 55~70% 甲

醇水溶液洗脱得到的洗脱液,再以 50% 的甲醇为流动相,流速 14ml/min,21.2X250mm,5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254 nm,每次进样 45 μ L,收集 25min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol F;收集 40min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol G。

[0050] 实施例 3

[0051] 取干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实 6kg,粗粉碎至 30 目,用 80% 的甲醇超声提取 4 次,每次 30min,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩至体积的 1/2;静置,滤除沉淀物,浓缩成 700g 浸膏 a;在浸膏 a 中加入 1400g 的水,用与水等体积的乙醚萃取 4 次,合并萃取相,减压浓缩成 520g 浸膏 b;用 180 目硅胶 3638g 装柱,在浸膏 b 中加入 1040g 的丙酮溶解,然后加入 90 目硅胶 624g 拌样,拌样后上柱;用体积比分别为 1:0、20:1、9:1、8:2、3:2、1:1、1:2、0:1 的氯仿-丙酮混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;用反相材料 C-18 装柱,洗脱液 c 上反相柱,以体积含量为 20~100% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集各部分洗脱液并浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;取以体积含量 55~70% 甲醇水溶液洗脱得到的洗脱液,再以 60% 的甲醇为流动相,流速 12ml/min,21.2X250mm,5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254nm,每次进样 50 μ L,收集 21min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol F;收集 36min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol G。

[0052] 实施例 4

[0053] 取干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实 5.5kg,粗粉碎至 40 目,用 90% 的乙醇超声提取 3 次,每次 45min,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩至体积的 1/4;静置,滤除沉淀物,浓缩成 640g 浸膏 a;在浸膏 a 中加入 960g 的水,用与水等体积的石油醚萃取 4 次,合并萃取相,减压浓缩成 475g 浸膏 b;用 160 目硅胶 2850g 装柱,在浸膏 b 中加入 712.5g 的丙酮溶解,然后加入 80 目硅胶 475g 拌样,拌样后上柱;用体积比分别为 1:0、20:1、9:1、8:2、3:2、1:1、1:2、0:1 的石油醚-丙酮混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;用反相材料 C-18 装柱,洗脱液 c 上反相柱,以体积含量为 20~100% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集各部分洗脱液并浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;取以体积含量 55~70% 甲醇水溶液洗脱得到的洗脱液,再以 65% 的甲醇为流动相,流速 10ml/min,21.2X250mm,5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254nm,收集 17min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol F;收集 30min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol G。

[0054] 实施例 5

[0055] 取干燥的竹叶兰枝条、叶和 / 或果实 5kg,粗粉碎至 20 目,用 70% 的甲醇超声提取 4 次,每次 35min,提取液合并;提取液过滤,减压浓缩至体积的 1/2;静置,滤除沉淀物,浓缩成 580g 浸膏 a;在浸膏 a 中加入 1160g 的水,用与水等体积的苯萃取 5 次,合并萃取相,减压浓缩成 430g 浸膏 b;用 200 目硅胶 3010g 装柱,在浸膏 b 中加入 1290g 的丙酮溶解,然后加入 100 目硅胶 344g 拌样,拌样后上柱;用体积比分别为 1:0、20:1、9:1、8:2、3:2、1:1、1:2、0:1 的石油醚-乙酸乙酯混合有机溶剂梯度洗脱,收集梯度洗脱液、浓缩,

经 TLC 监测,合并相同的部分;用反相材料 C-18 装柱,洗脱液 c 上反相柱,以体积含量为 20~100% 的甲醇水溶液进行梯度洗脱,收集各部分洗脱液并浓缩,经 TLC 监测,合并相同的部分;取以体积含量 55~70% 甲醇水溶液洗脱得到的洗脱液,再以 70% 的甲醇为流动相,流速 12ml/min,21.2X250mm,5 μ m 的 Zorbax PrepHT GF 反相制备柱为固定相,紫外检测器检测波长为 254nm,收集 10min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol F;收集 26min 的色谱峰,多次累加后蒸干,即得所述的苯并呋喃类化合物 gramniphenol G。

[0056] 实施例 6

[0057] 取实施例 1 制备的化合物 gramniphenol F,为橙色胶状物;测定方法为:用核磁共振,结合其它波谱技术鉴定结构。

[0058] (1) 紫外光谱(溶剂为甲醇), $\lambda_{\max}(\log \varepsilon)$: 210 (4.28), 295 (4.06), 342 (3.85) nm;

[0059] (2) 红外光谱(溴化钾压片) $\nu_{\max}$ 3342, 2981, 2879, 1602 1534, 1438, 1126, 1058 cm^{-1} ;

[0060] (3) HRESIMS 显示本发明化合物准分子离子峰 m/z 291.1015 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值为 291.1021), 结合 ^{13}C 和 ^1H NMR 谱(图 1 和图 2, 碳谱氢谱数据归属见表 1) 给出其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 。 ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) 和 ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) 数据, 见表 1。

[0061] Gramniphenol F 的红外光谱显示羟基(3342 cm^{-1}) 和芳环(1602, 1534, and 1438 cm^{-1}) 的存在。在 295 和 342 nm 处的紫外吸收也证实了该化合物结构中存在芳环。 ^1H , ^{13}C , 和 DEPT NMR 谱显示存在 19 个碳原子和 16 个氢。表明存在 1 个 2-arylbenzofuran 结构 [δ_{C} 154.0, 105.6, 119.8, 110.5, 151.1, 99.0, 122.2, 152.1, 124.4, 130.5 (2C), 115.0 (2C), 158.8] 上有 7 个芳香质子(δ_{H} 7.00s, 1H; 7.40s, 1H; 7.09s, 1H; 7.95d, $J=8.6$ Hz, 2H; and 6.84 d, $J=8.6$ Hz, 2H), 1 个 gem-dimethylchromene 基团 [δ_{C} 116.4, 129.6, 78.3, 29.1 (2C) and δ_{H} 6.60 d, $J=10.0$ Hz; 5.61 d, $J=10.0$ Hz; and 1.50s (6H)], 还有 1 个酚羟基(δ_{H} 10.83)。HMBC 谱中 H-1'' (δ_{H} 6.60) 与 C-4 (δ_{C} 119.8), C-5 (δ_{C} 110.5) 和 C-6 (δ_{C} 151.1) 相关, H-2'' (δ_{H} 5.61) 与 C-5 (δ_{C} 110.5) 相关, 说明 1 个 angularly fused gem-dimethylchromene 在 C-5 和 C-6 位。羟基信号(δ_{H} 10.83) 与 C-4' (δ_{C} 158.8) 和 C-3' /5' (δ_{C} 115.0) 的相关, 将两个酚羟基质子定位于 C-4'。至此该化合物的结构得到确定。

[0062] 实施例 7

[0063] 取实施例 1 制备的化合物 gramniphenol G, 为橙色胶状物;测定方法为:用核磁共振,结合其它波谱技术鉴定结构。

[0064] (1) 紫外光谱(溶剂为甲醇), $\lambda_{\max}(\log \varepsilon)$: 210 (4.32), 292 (4.11), 340 (3.89) nm;

[0065] (2) 红外光谱(溴化钾压片), $\nu_{\max}$ 3344, 2983, 2876, 1598, 1537, 1435, 1121, 1062 cm^{-1} ;

[0066] (3) HRESIMS 显示本发明化合物准分子离子峰 m/z 329.1150 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值为 329.1154), 结合 ^{13}C 和 ^1H NMR 谱(图 3 和图 4, 碳谱数据归属见表 1) 给出其分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 。 ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) 数据, 见表 1。

[0067] Gramniphénol G 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱和 gramniphénol F 的非常相似。通过对比发现这两个化合物的区别在于苯并呋喃环上的取代不同。Gramniphénol G 的 HMBC 谱中甲氧基信号 (δ_{H} 3.80) 与 C-4' (δ_{C} 161.0) 相关说明 1 个甲氧基取代在 C-4', 而 gramniphénol F 的 C-4' 取代是羟基。这说明 gramniphénol G 是 gramniphénol F 的 4'-*O*-methyl 衍生物。至此该化合物的结构得到确定。

[0068] 表 1 化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (溶剂为 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

[0069]

No.	Gramniphénol F		Gramniphénol G	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
2	154.0 s		154.5 s	
3	105.6 d	7.00 s	105.8 d	7.01 s
4	119.8 d	7.40 s	119.7 d	7.36 s
5	110.5 s		110.7 s	
6	151.1 s		151.4 s	
7	99.0 d	7.09 s	99.2 d	7.09 s
3a	122.2 s		122.2 s	
7a	152.1 s		153.0 s	
1'	124.4 s		124.9 s	
2', 6'	130.5 d	7.95 d (8.6)	131.1 d	7.91 d (8.6)
3', 5'	115.0 d	6.84 d (8.6)	114.9 d	6.98 d (8.6)
4'	158.8 s		161.0, s	
1''	116.4 d	6.60 d (10.0)	116.8 d	6.57 d (10.0)
2''	129.6 d	5.61 d (10.0)	130.0 d	5.56 d (10.0)
3''	78.3 s		79.0 s	
4'', 5''	29.1 q	1.50 s	29.8 q	1.50 s
-OMe-4'			55.6 q	3.80 s
Ar-OH-4'		10.83 s		

[0070] 实施例 8

[0071] 取实施例 2 制备的化合物 gramniphénol F、gramniphénol G 分别按实施例 6、7 中的方法进行结构测定, 结果为: 其结构同实施例 6、7, 分子式分别为 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 和 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 。

[0072] 实施例 9

[0073] 取实施例 3 制备的化合物 gramniphénol F、gramniphénol G 分别按实施例 6、7 中的方法进行结构测定, 结果为: 其结构同实施例 6、7, 分子式分别为 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 和 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 。

[0074] 实施例 10

[0075] 取实施例 4 制备的化合物 gramniphénol F、gramniphénol G 分别按实施例 6、7 中的方法进行结构测定, 结果为: 其结构同实施例 6、7, 分子式分别为 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 和 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 。

[0076] 实施例 11

[0077] 取实施例 5 制备的化合物 gramniphénol F、gramniphénol G 分别按实施例 6、7 中的方法进行结构测定, 结果为: 其结构同实施例 6、7, 分子式分别为 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 和 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 。

[0078] 实施例 12

[0079] 取实施例 1 制备的苯并呋喃类化合物 (gramniphénol F) 进行抗烟草花叶病毒活性

试验,如下:

[0080] 供试寄主:TMV 枯斑寄主心叶烟 *Nicotiana glutinosa* L., TMV 系统侵染寄主普通烟 *Nicotiana tabacum* L. K326, 防虫温室内培育。

[0081] 供试毒源:烟草花叶病毒(TMV, U1 strain), 由云南省烟草研究院烟草化学重点实验室保存于普通烟 K326 上。

[0082] 病毒提纯:参照 Gooding 等的方法, 略加修改。典型症状病叶经差速离心、PEG 沉淀及 10~40% 蔗糖不连续密度梯度离心后提纯病毒。提纯的病毒经紫外扫描确定质量浓度为 20mg/mL [virus concentration = (A260 × dilution ratio) / $E_{1\text{cm}}^{0.1\%, 260\text{nm}}$]。提纯的病毒保存于 -20℃, 使用前用 0.01 M PBS 稀释至 32 μg/mL。

[0083] 抑制侵染作用测定:采用局部枯斑法。将供试化合物溶解于 DMSO 并用蒸馏水稀释至所需浓度, 宁南霉素用作阳性对照。选择健康、生长旺盛的 5~6 叶期心叶烟, 左半叶接种化合物与病毒等体积混合液, 右半叶接种蒸馏水(含少量 DMSO)与病毒等体积混合液作阴性对照。接种后用水冲洗。每处理接种 4~5 个叶片, 重复 3 次, 3~4 天后统计枯斑数目, 计算抑制率。

[0084] 抑制率 = (对照枯斑数 - 处理枯斑数) / 对照枯斑数 × 100%。

[0085] 试验结果:本发明苯并呋喃类化合物是(gramniphénol F), 对抗烟草花叶病毒的抑制率达到 35.8 ± 3.6% (见表 2), 具有很好的抗烟草花叶病毒活性, 比阳性对照品南宁霉素的抑制率(31.8 ± 2.5%)高。以上结果揭示了本发明化合物结构简单活性好, 可作为抗烟草花叶病毒药物的先导性化合物, 在制备抗烟草花叶病毒药物中有良好的应用前景。

[0086] 实施例 13

[0087] 取实施例 1 制备的苯并呋喃类化合物(gramniphénol G), 按实施例 13 的方法进行抗烟草花叶病毒活性试验, 试验结果为:本发明苯并呋喃类化合物是(gramniphénol G), 对抗烟草花叶病毒的抑制率达到 32.1 ± 3.8% (见表 2), 具有很好的抗烟草花叶病毒活性, 比阳性对照品南宁霉素的抑制率(31.8 ± 2.5%)高。以上结果揭示了本发明化合物结构简单活性好, 可作为抗烟草花叶病毒药物的先导性化合物, 在制备抗烟草花叶病毒药物中有良好的应用前景。

[0088] 表 2 化合物的抗烟草花叶病毒活性

[0089]

Compound	%Inhibition at 20 μM	IC ₅₀ (μM)
Gramniphénol F	35.8 ± 3.6	40.8
Gramniphénol G	32.1 ± 3.8	57.7
Ningnamycin	31.8 ± 2.5	42.2

[0090] 所有结果均为三次测试的平均值 All results are expressed as mean ± SD; n = 3。

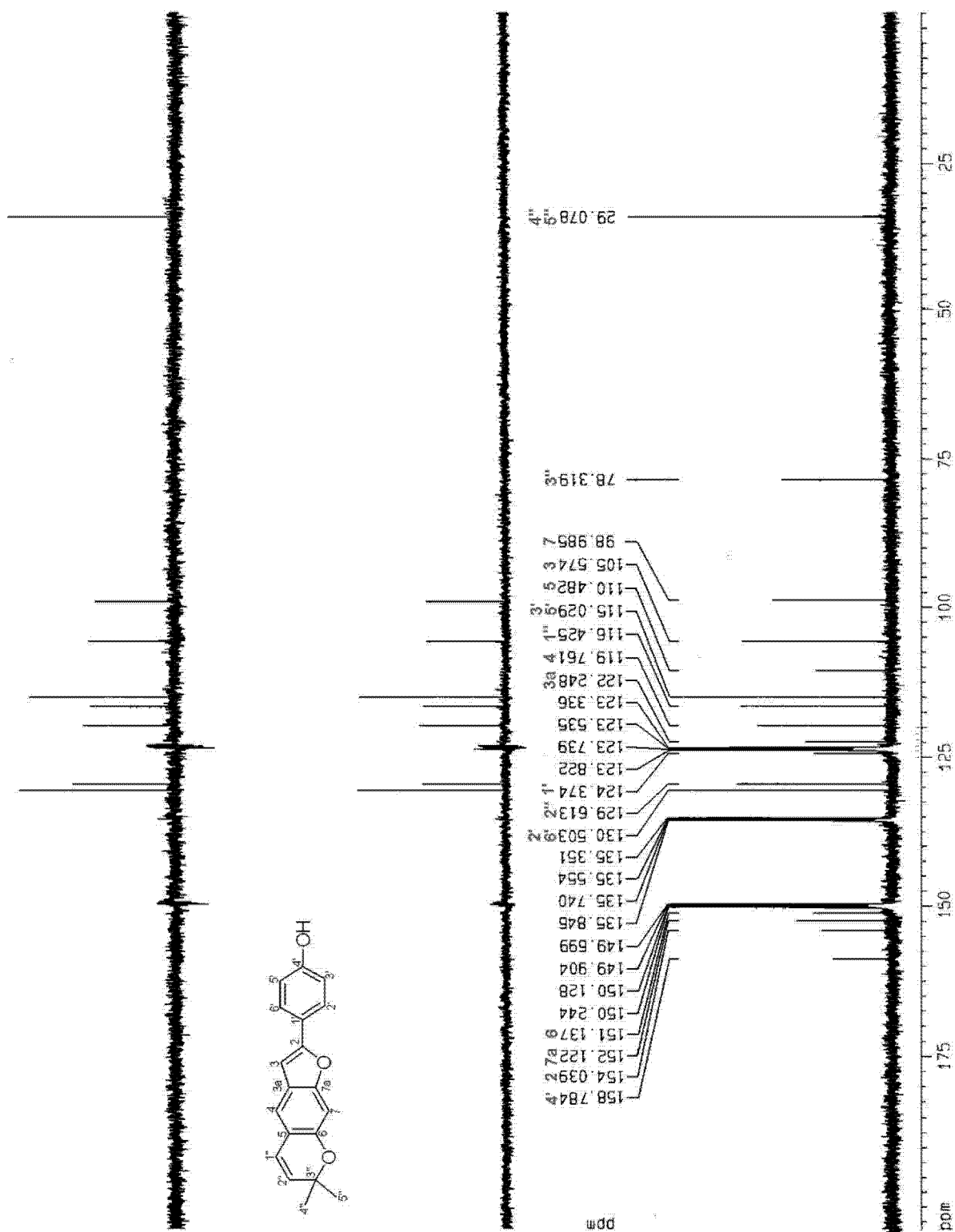


图 1

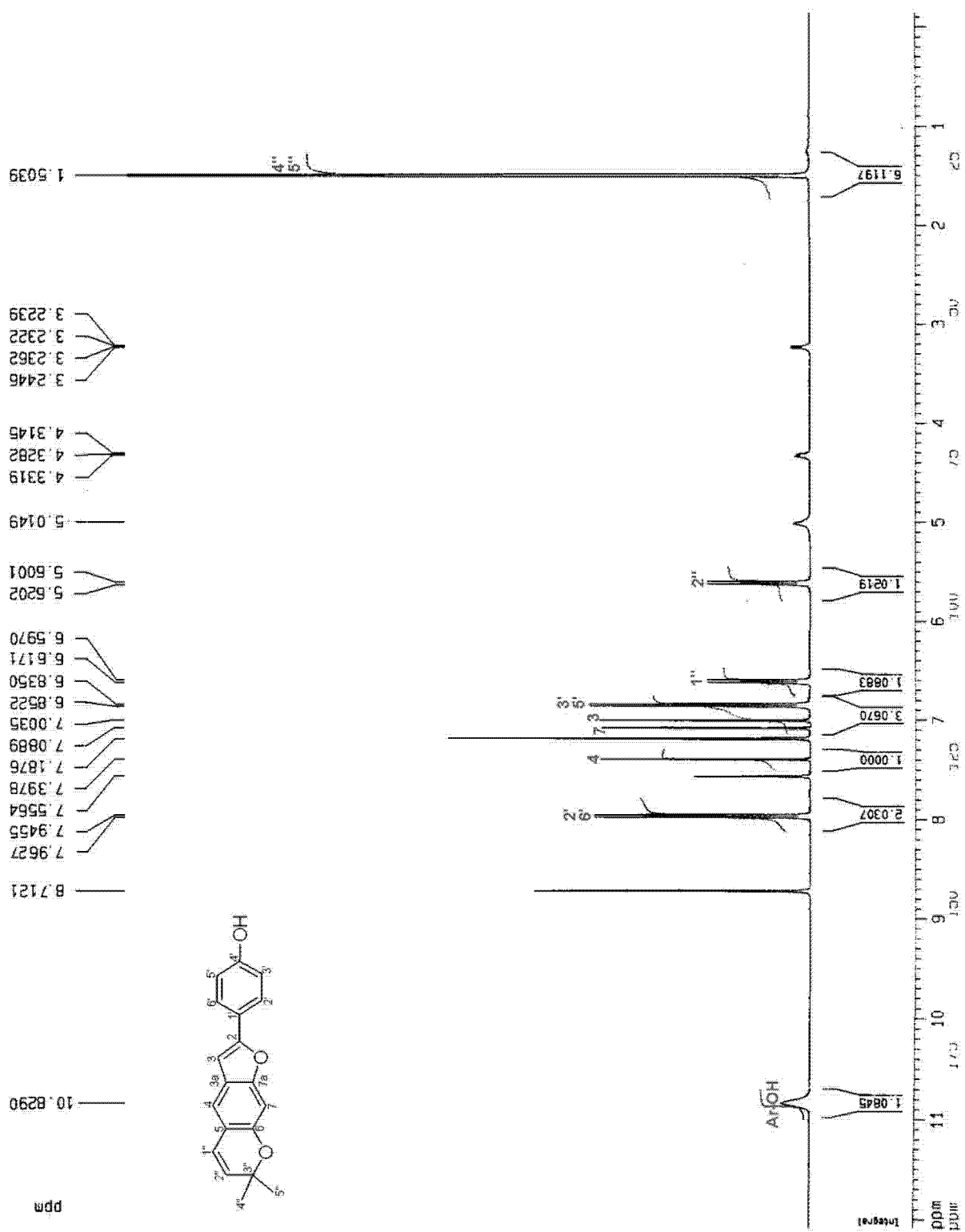


图 2

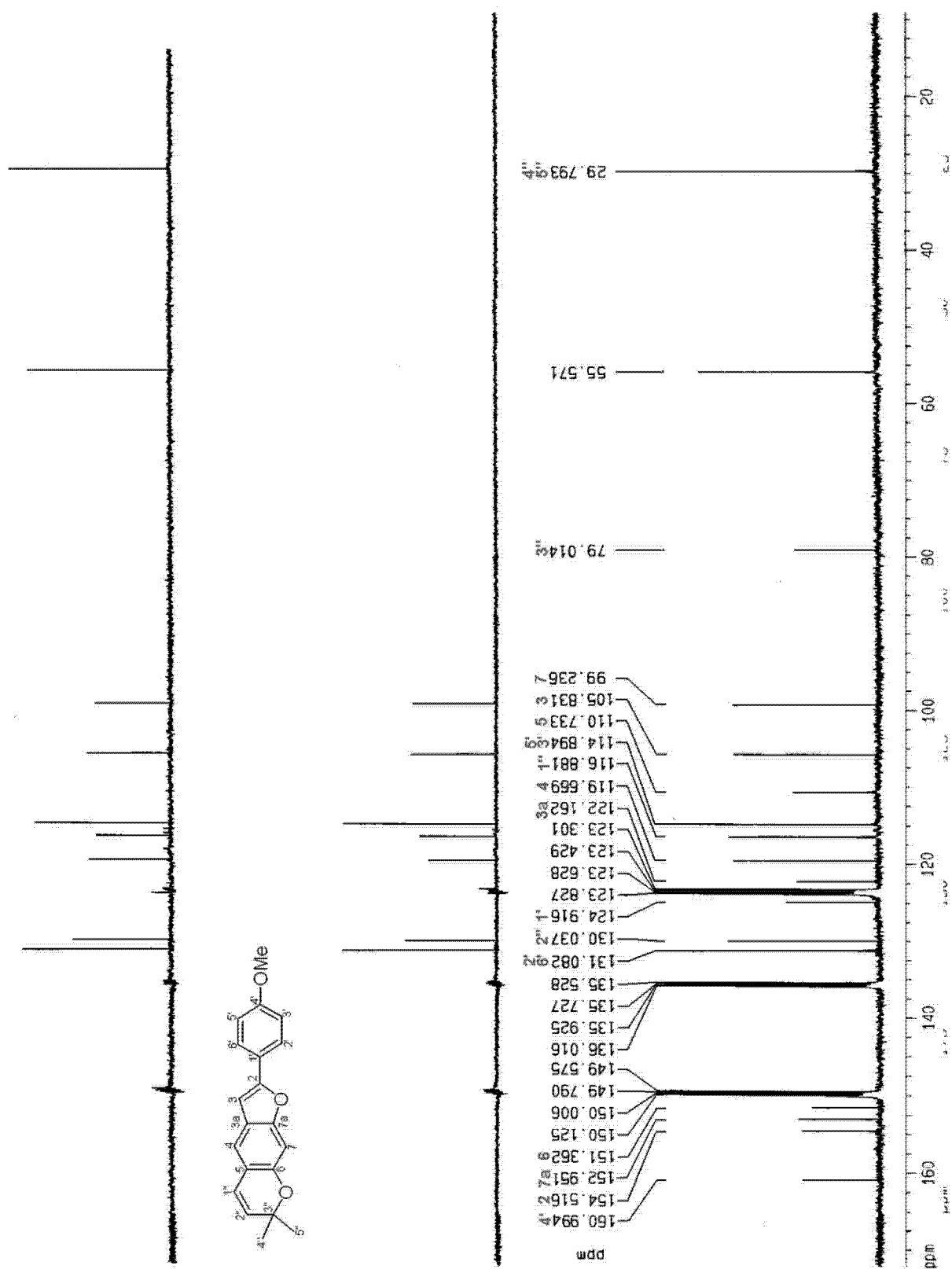


图 3

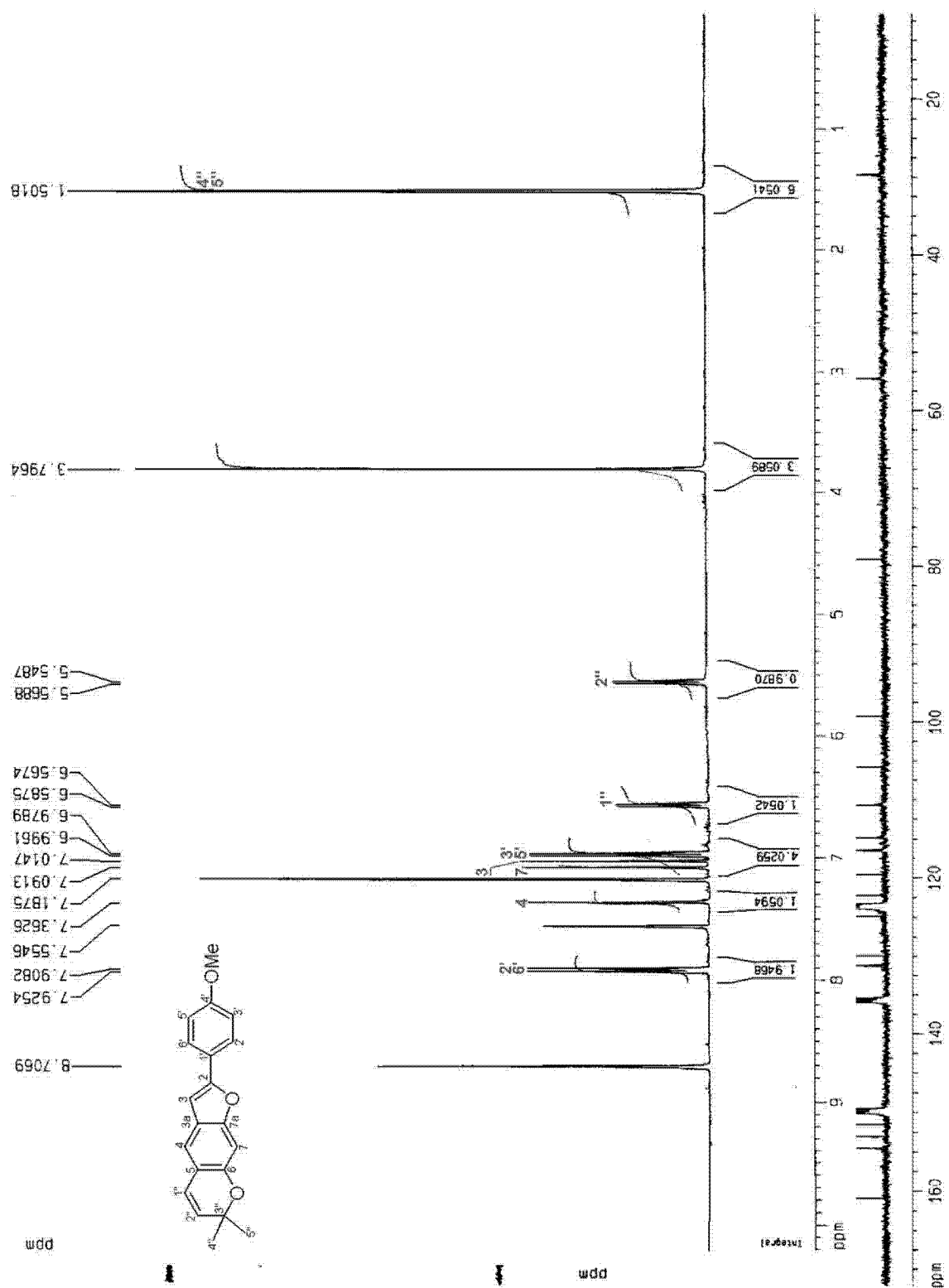


图 4

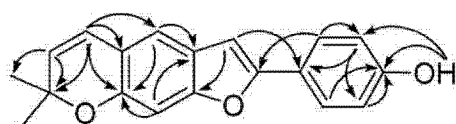


图 5