(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日:
2005年9月15日(15.09.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/085255 A1

(51) 国际分类号[7]: C07D 493/04, A61K 31/55, A61P 29/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000171

(22) 国际申请日: 2004年3月4日(04.03.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 日本大学 (NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 日本国东京都千代田区九段南四丁目8番24号, Tokyo 102-8275 (JP)。

(71)(72) 发明人/申请人: 王珏(WANG, Jue) [CN/JP]; 日本千叶县船桥市夏见6-1-18 403室, Chiba 273-0865 (JP)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 北中进(KITANAKA, Susumu) [JP/JP]; 日本国东京都千代田区九段南四丁目8番24号日本大学内, Tokyo 102-8275 (JP)。姚新生 (YAO, Xinsheng) [CN/CN]; 王乃利(WANG, Naili) [CN/CN]; 中国广东省深圳市高新技术产业园南区深圳清华大学研究院C区7楼710室深圳中药及天然药物研究中心, Guangdong 518057 (CN)。张家欣 (ZHANG, Jiaxin) [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市文化路103号沈阳药科大学, Liaoning 110016 (CN)。

(74) 代理人: 北京北新智诚知识产权代理有限公司 (BEIJING BEIXIN-ZHICHENG INTELLECTUAL PROPERTY AGENT CO., LTD); 中国北京市西直门南大街16号, Beijing 100035 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

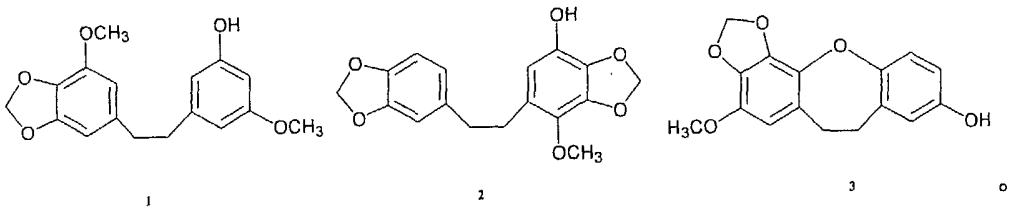
(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号，请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的"代码及缩写符号简要说明"。

(54) Title: THE EXTRACT OF *BULBOPHGLLUM RADIATUM LINDL* AND THE PREPARATION AND THE USE

(54) 发明名称: 石豆兰提取物及其制备方法和用途



1 2 3

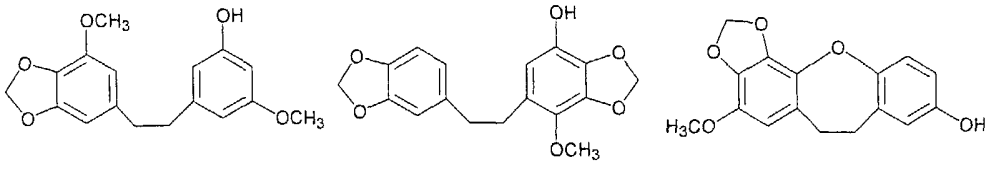
(57) **Abstract:** The present invention discloses a method of extracting and separating compounds which can inhibit NO production from medicinal plant *Bulbophgllum radiatum Lindl*, which including: preparing the extract of *Bulbophgllum radiatum Lindl*; separating the said extract with column chromatography and collecting the eluting components; concentrating the eluting components under reduced pressure to further the separation and refine; analyzing the physical and chemical characteristic of the refined compounds to determine the molecular structures; assaying the NO inhibiting effect and the toxicity effect. And it is found that the obtained compounds can inhibit NO production. Wherein the molecular structures of compound 1-3 are determined as.

WO 2005/085255 A1

[见续页]

(57) 摘要

本发明公开了一种从药用植物石豆兰中提取分离抑制 NO 生成活性的化合物的方法，包括步骤有：制备石豆兰的提取物；对上述提取物利用柱层析进行分离，收集洗脱组分；对收集到的洗脱馏分进行减压浓缩，进一步分离精制；对精制得到的化合物进行理化特性分析以确定其结构；并进行 NO 生成抑制活性和毒性测试。发现精制得到的化合物具有抑制 NO 生成的活性。其中化合物 1-3 的结构确定如下：



1 2 3

石豆兰提取物及其制备方法和用途

技术领域:

本发明涉及具有抑制NO生成活性的石豆兰提取物及其制备方法。

背景技术:

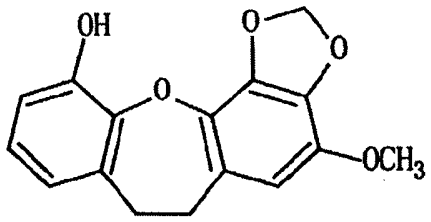
困扰人们的日常炎性疾病包括，关节炎症例如骨关节炎、类风湿性关节炎、类风湿性脊椎炎、痛风关节炎等；炎性皮肤病例如湿疹、牛皮癣、皮炎等；炎性眼疾例如眼色素层炎、结膜炎等；肺部疾病例如哮喘、支气管炎、急性呼吸窘迫综合症等；菌血症、那毒素血症、口疮溃疡、龈炎、胰腺炎等；胃肠道疾病例如节段性回肠炎、萎缩性胃炎、溃疡性结肠炎、腹腔炎、消化性溃疡、应激性肠道综合症例如由幽门螺旋杆菌感染而引起的粘膜炎症或者由非甾体类抗炎药引起的肠胃病等等。

有关各种炎症致病作用的机理是：已知体内一氧化氮（ＮＯ）是介导细胞免疫和炎症的毒性物质。其前体是左旋精氨酸(Ｌ-ａｒｇ),Ｌ-ａｒｇ末端胍基上的 2 个相同的氢原子之一在ＮＯ合成酶(ＮＯＳ)的作用下生成ＮＯ。目前已经分离出三种不同类型的 NOS,包括内皮 NO 合成酶(eNOS),神经元 NO 合成酶(nNOS)及诱导型 NO 合成酶(iNOS)。目前已知,巨噬细胞、肝细胞、平滑肌细胞、腺癌细胞以及上皮细胞均能表达 iNOS。某些炎性细胞因子和微生物产物如脂多糖（LPS）则可诱导 iNOS 表达。iNOS 一旦被诱导即可表达出高度活性,产生大量NO。

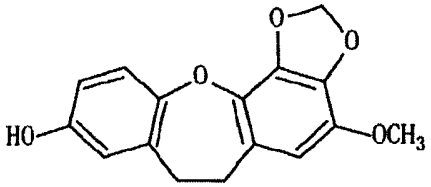
因此，长时间以来，人们致力于寻找NO合成酶的抑制剂来治疗与之相关的炎性疾病。但这些抑制剂大多局限于化学合成的物质，副作用较大。现有技术中未见从天然中草药植物中提取抗炎活性物质的报道。

石豆兰（Bulbophgllum radiatum Lindl），兰科植物，主要分布于中国长江以南的地区。在中国民间使用其新鲜植物（常用量8～20g），具有平喘、活血、消肿止痛、四肢麻痹等抗炎作用。

但迄今为止，对于石豆兰的化学成分及生物活性的研究报道较少。在中国专利公开号为：CN1458154A “一种新的抗肿瘤化合物石豆兰酚甲”中公开了一种化合物石豆兰酚甲(bulbophylol A)的结构式为：



在中国专利公开号为：CN1458155A “一种新的抗肿瘤化合物石豆兰酚乙”中公开了一种化合物石豆兰酚乙(bulbophylol B)的结构式为：



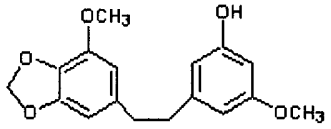
在以上两个专利申请说明书中通过核磁共振分析了所公开的化合物的基本数据，并以体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞为模型考察所公开的化合物的抗肿瘤活性。都没有涉及分离、确定石豆兰中的抗炎活性成分。

因此本发明从石豆兰中提取具有明确抗炎活性的组分，其安全无毒，并能有效地抑制 NO 的生成，达到抗炎作用。

发明公开：

本发明的发明目的是从药用植物石豆兰中提取具有明确抗炎活性的组分，其能有效地抑制 NO 的生成，达到抗炎作用。

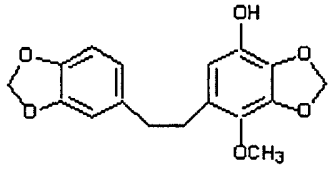
本发明提供了一种石豆兰提取物 1，其具有如下的结构式：



1

石豆兰提取物 1，其具有抑制 NO 生成的活性。

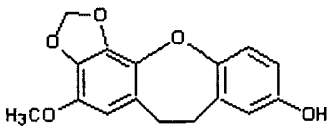
本发明还提供了一种石豆兰提取物 2，其具有如下的结构式：



2

石豆兰提取物 2，其具有抑制 NO 生成的活性。

本发明还提供了一种石豆兰提取物 3，其具有如下的结构式：



3

石豆兰提取物 3，其具有抑制 NO 生成的活性。

本发明涉及一种从药用植物石豆兰（Bulbophgllum radiatum Lindl）中分离活性化合物的方法，其特征在于包含如下的步骤：

1）制备石豆兰的乙醇提取物；经过乙醇浸泡提取重复 2 次，合并这些提取液，经减压浓缩得到褐色粉末提取物；

2）将该粉末提取物溶解在水中，依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇作为洗脱液分别提取；

3）对步骤 2）中的乙酸乙酯、石油醚洗脱液利用柱层析进行分离；

4）对步骤 3）中收集到的洗脱液进行减压浓缩，进一步分离精制；

对步骤 4）中分离得到化合物进行理化特性分析以确定其结构；

对石豆兰提取物进行 NO 生成抑制活性和毒性测试。

其中，优选石豆兰的乙醇提取液浓度是 60%；

其中，层析柱可以在硅胶柱或 Sephaden LH-20 柱中选择；而洗脱剂可以在氯仿：甲醇（体积比为 100：0，95：5，90：10， 85：15， 80：20， 70：30， 60：40， 50：50， 0：100）、或正己烷：乙酸乙酯（体积比为 100：0，95：5，90：10， 85：15， 80：20， 70：30， 60：40， 50：50， 0：100）、或正己烷：丙酮（体积比为 100：0，95：5，90：10， 85：15， 80：20， 70：30， 60：40， 50：50， 0：100）中选择。

其中，减压浓缩优选是在 40℃条件下进行的。

其中，精制的方法为使用 HPLC，流动相：甲醇—H_2O=1：1，流速 4ml/min，在室温下制备；或 HPLC(AQVSAIL SS 4251 Senshu Scientific Co、Ltd、10×250mm)，流动相：正己烷 ：丙酮=7：3，流速 4ml/min。室温下制备。

其中的理化特性分析技术包括核磁共振技术。

其中， NO 生成抑制活性测试是利用小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 通过 griess 法进行分析的。

其中的毒性作用是通过 MMT 细胞毒性试验进行分析的。

一种石豆兰提取物 6，其特征在它具有如下的理化参数：

		^{13}C-NMR	^{1}H-NMR
性状	无色油状	1 136.2 s	
EI-MS (m/z)	272	2 102.4 d	6.36 d (2.2)
HR-EI-MS(m/z)实测值	272,1054	3 148.7 s	
计算值	272.1049	4 133.3 s	
分子量	272.1	5 143.5 s	
分子式	$C_{16}H_{16}O_4$	6 107.6 d	6.37 d (2.2)
UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε)		1′ 143.3 s	
	202 (4.35)	2′ 115.4 d	6.64 m
	207 (3.40)	3′ 155.5 s	
	275 (3.27)	4′ 112.8 d	6.64 m
IR $v_{max}^{KBr}cm^{-1}$		5′ 129.5 d	7.15 t (7.6)
	3464, 2950,	6′ 121.0 d	6.78 d (7.6)
	2858, 2781,	a 37.9 t	2.81 brs
	1632, 1589	a’ 37.7 t	2.81 brs
	1350, 926	OCH_3 56.5 q	3.85 s
		OCH_2O 101.2 t	5.82 s

化合物 6 是从石豆兰中按照上述方法分离得到的

一种石豆兰提取物 7，其特征在它具有如下的理化参数：

		^{13}C-NMR	^{1}H-NMR
性状	白色结晶	1 125.5 s	
EI-MS (m/z)	318	2 134.5 s	
HR-EI-MS(m/z)实测值	318.1054	3 137.6 s	
计算值	318.1049	4 135.9 s	
分子量	318.1	5 138.2 s	
分子式	$C_{17}H_{18}O_6$	6 110.9 d	6.16 s
UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε)		1′ 135.2 s	
	202 (4.42)	2′ 113.4 d	6.68 d (1.8)
	209 (4.39)	3′ 148.6 s	
	275 (3.30)	4′ 145.5 d	6.67 d (8.0)
IR $v_{max}^{KBr}cm^{-1}$		5′ 116.0 s	
	3364, 2950	6′ 122.0 d	6.58dd (8.0, 1.9)
	2858, 1612	a 37.2 t	2.75 m
	1519, 1458	a’ 33.7 t	2.75 m
	1357, 926	OCH_3 57.9 q	3.78 s
		56.3 q	3.71 s
		OCH_2O 102.5t	3.79 s

化合物 7 是从石豆兰中按照上述方法分离得到的。

本发明还涉及上述石豆兰提取物 1、2、3 在制备治疗与 NO 生成相关的炎症的药物中的应用。

本发明所取得的有益技术效果是首次从石豆兰中分离得到具有明确抗炎活性的提取物，其作为天然的 NO 生成抑制剂，克服了化学合成物质的毒副作用。

最佳实施方式：

实施例 1：提取物的制备与结构的确定

1、石豆兰的提取物制备：将 9.5 kg 的石豆兰全草粉碎，加入 60% 乙醇（乙醇:水＝6:4）至 55 升，室温浸泡 12 小时，然后再加热回流 1 小时，得浸出液。其滤渣再一次用 60%乙醇 55 升如上法提取，与上次提取液合并，在 40℃减压浓缩，得到 260.3g 褐色粉末。把全部的粉末萃取物溶解于 2 升水中，依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各 2 升分 3 次萃取，这些萃取液中的乙酸乙酯萃取物 40℃下减压浓缩，得到 32.6 克的褐色粉末。

将乙酸乙酯提取物 32.6g 上硅胶柱进行分离，洗脱剂分别为：氯仿：甲醇体积比（下同）=100：0，95：5，90：10，85：15，80：20，70：30，60：40，50：50，0：100，分别收集 2 升的洗脱液。

收集氯仿：甲醇=100：0 的洗脱馏份，在 40℃下减压浓缩得到浓缩物 4.7314g。将所得浓缩物进行硅胶柱层析，收集氯仿：甲醇=90：10 的馏份，40℃减压浓缩，用正乙烷：乙酸乙酯=90：10 重结晶，得无色针状结晶化合物式（1）（490mg），未见文献记载。

收集氯仿：甲醇=90：10 的洗脱馏分，40℃减压浓缩。利用 Sephaden LH-20 对浓缩物 8.1625g 进行分离，以氯仿：甲醇=7：3 为洗脱剂，每 40ml 为一馏份，收集第 18 至 25 馏份，40℃减压浓缩，得 0.9056g 浓缩物，然后上制备 HPLC，流动相：甲醇：H_2O=1：1，流速 4ml/min，在室温下制备。紫外检测波长 254nm。收集保留时间分别为 16 分 42 秒与 23 分 11 秒

的峰，每瓶 5ml40℃减压浓缩收集的馏份，分别得无色针状结晶化合物 2（21.8mg）以及化合物 3（22.1mg）。两个化合物均未见文献报道。

收集乙酸乙酯萃取物的氯仿：甲醇=90：10 的洗脱液，在 40℃减压浓缩，得到浓缩物 8.1625g 上 Sephaden LH-20（Pharmacia Biochem，7×15cm）进行柱层析，以氯仿：甲醇=1：1 作为洗脱剂，每 40ml 为一个馏分。收集第 21 至 42 的馏分，40℃减压浓缩。将所得的 1.0832g 浓缩物上 HPLC(AQVSAIL SS 4251 Senshu Scientific Co、Ltd、10×250mm)，流动相：正己烷 ：丙酮=7：3，流速 4ml/min；室温下制备；紫外检测波长 254nm,收集保留时间分别为 8 分 15 秒、13 分 24 秒、18 分 14 秒的流分。40℃减压浓缩收集液，得白色固体化合物 4（11.6mg）。无色油状化合物 5（12.1mg）以及无色油状化合物 6（18.5mg），化合物 4（Majumder,P.L and Basak.M., Two bibenzyl derivatives from the orchid *Cirrhopetalum andersonii*, Phytochemistry, 30 (1), 321-324 (1991)）及化合物 5（Asahina, Hiroshi; Yoshikawa, Hiromichi; Shuto, Yoshihiro. Effects of batatasin III and its analogs on gibberellic acid-dependent α-amylase induction in embryoless barley seeds and on cress growth, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62 (8), 1619-1620, (1998).）为已知化合物，化合物 6 未见文献报道。

石油醚洗脱液浓缩得 29.3g 褐色粉末，进行硅胶柱（青岛海洋化工厂）层析，洗脱剂为正己烷：乙酸乙酯= 100：0，95：5，90：10， 85：15， 80：20， 70：30， 60：40， 50：50， 0：100，分别收集 2 升。40℃减压浓缩 95：5 的洗脱液。将浓缩物 1.2411g 进行硅胶（青岛海洋化工厂）柱层析，洗脱剂为正己烷：丙酮=100：0，95：5，90：10，85：15，80：20，70：30，60：40，50：50，0：100，各收集 300ml，40℃减压浓缩 90：10 洗脱部分的第 23 至 29 馏分。将 0.2101g 浓缩物在正己烷与丙酮的混合溶剂中重结晶，得白色结晶化合物 7（21.4mg）。化合物 7 未见文献报道。

2、确定结构式：化合物 1—7 的性状见表 1，^{13}C-NMR 与 ^{1}H-NMR 的数据见表 2。并由以上数据最终确定了化合物的结构式。

表 1 化合物 1 — 3 的性状

	化合物 1	化合物 2	化合物 3

性状	无色针状结晶	无色针状结晶	无色针状结晶
FAB-MS (m/z)	316	286	316
HR-FAB-MS(m/z)实测值	316.0947	286.0815	316.0996
计算值	316.0966	286.0841	316.0947
分子量	286.1	286.1	316.1
分子式	$C_{17}H_{16}O_6$	$C_{16}H_{14}O_5$	$C_{17}H_{16}O_6$
UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε)			
	203 (4.43)	203 (4.37)	203 (4.43)
	270 (3.11)	275 (3.19)	270 (3.11)
IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$	286 (3.40)	281 (3.26)	286 (3.40)
	3229, 2950, 2858	3464, 2950, 2858	3229, 2950, 2858
	2781, 1623, 1523	2785, 1620, 1497	2781, 1624, 1523
	1350, 926	1350, 926	1350, 926

表1续 化合物4－7的性状

	化合物4	化合物5	化合物6	化合物7
性状	白色结晶	无色油状	无色油状	白色结晶
EI-MS (m/z)	258	258	272	318
HR-EI-MS(m/z)实测值	258.3021	258.1234	272,1054	318.1054
计算值	258.3048	258.1256	272.1049	318.1049
分子量	318.3	258.1	272.1	318.1
分子式	$C_{15}H_{14}O_4$	$C_{16}H_{18}O_3$	$C_{16}H_{16}O_4$	$C_{17}H_{18}O_6$
UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε)				
	202 (4.41)	203 (4.43)	202 (4.35)	202 (4.42)
	276 (3.32)	270 (3.11)	207 (3.40)	209 (4.39)
		286 (3.40)	275 (3.27)	275 (3.30)
IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$				
	3279, 2924	3245, 2950,	3464, 2950,	3364, 2950
	2858, 1600	2858, 2781,	2858, 2781,	2858, 1612
	1520, 1458	1624, 1580	1632, 1589	1519, 1458
	1358, 934	1350, 926	1350, 926	1357, 926

表2 化合物1-7的NMR数据(ppm、$CDCl_3$、500MHz)

1		2	
^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR

1	123.1 s		1	126.7 s	
2	132.1 s		2	136.0 s	
3	135.7 s		3	139.2 s	
4	134.3 s		4	134.6 s	
5	108.8 s		5	139.7 s	
6	137.5 d	6.20 s	6	107.7 d	6.24 s
1′	135.7 s		1′	132.9 s	
2′	109.0 d	6.67 d (1.6)	2′	109.0 s	
3′	147.5 s		3′	151.0 d	7.04 d (9.6)
4′	145.7 s		4′	121.8 d	6.59 m
5′	108.1 d	6.71 d (7.8)	5′	113.7 s	
6′	121.2 d	6.61 dd (7.8, 1.6)	6′	116.5 d	6.59 m
a	36.4 t	2.78 brs	a	31.0 t	3.03 brs
a’	32.4 t	2.78 brs	a’	30.6 t	3.03 brs
OCH_3	57.1 q	3.79 s	OCH_3	56.9 q	3.83 s
OCH_2O	101.8 t	5.98 s	OCH_2O	102.1 t	5.98 s
	100.7 t				
		4.32 s (OH)			4.67 s (OH)

s:一重线、d: 二重线、t : 三重线、m: 多重线

表2 续

3			4		
	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR		^{13}C-NMR	^{1}H-NMR
1	123.1 s		1	137.6 s	
2	132.1 s		2	102.0 d	6.22 s
3	135.7 s		3	141.6 s	
4	134.3 s		4	133.7 s	
5	108.8 s		5	150.2 s	
6	135.7 d	6.20 s	6	112.0 d	6.22 s
1′	135.7 s		1′	144.6 s	
2′	109.0 d	6.67 d (1.6)	2′	116.3 d	6.57 m
3′	147.5 s		3′	158.3 s	
4′	145.7 s		4′	113.8 d	6.57 m
5′	108.1 d	6.71 d (7.8)	5′	130.2 d	7.04 td (6.7, 0.8)
6′	121.2 d	6.61 dd (7.8, 6.1)	6′	120.8 d	6.61 dd (6.7, 0.8)
a	36.4 t	2.78 brs	a	39.2 t	2.73 m
a’	32.4 t	2.78 brs	a’	38.8 t	2.73 m
OCH_3	57.1 q	3.79 s			
OCH_2O	101.8 t	5.94 s	OCH_2O	102.0 t	5.82 s
	100.7 t	5.90 s			
		4.32 s (OH)			

表2 续

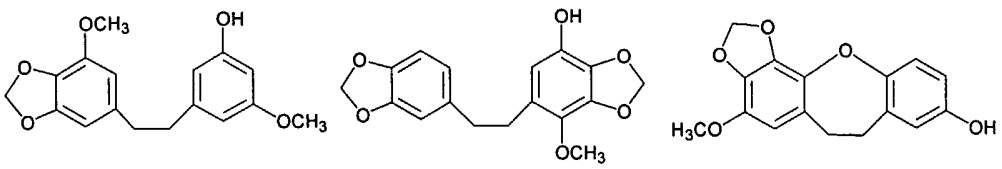
5			6		
	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR		^{13}C-NMR	^{1}H-NMR

1	144.1 s		1	136.2 s	
2	106.5 d	6.32 d (2.2)	2	102.4 d	6.36 d (2.2)
3	160.7 s		3	148.7 s	
4	97.4 d	6.30 d (2.2)	4	133.3 s	
5	160.7 s		5	143.5 s	
6	106.5 s		6	107.6 d	6.37 d (2.2)
1′	143.6 s		1′	143.3 s	
2′	115.4 d	6.68 m	2′	115.4 d	6.64 m
3′	155.5 s		3′	155.5 s	
4′	112.8 d	6.68 m	4′	112.8 d	6.64 m
5′	129.5 d	7.15 t (7.6)	5′	129.5 d	7.15 t (7.6)
6′	120.9 d	6.68 t (7.6)	6′	121.0 d	6.78 d (7.6)
a	37.5 t	2.86 brs	a	37.9 t	2.81 brs
a’	38.0 t	2.86 brs	a’	37.7 t	2.81 brs
OCH_3	55.2 q	3.77 s	OCH_3	56.5 q	3.85 s
	55.2 q	3.77 s	OCH_2O	101.2 t	5.82 s

表 2 续

	7	
	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR
1	125.5 s	
2	134.5 s	
3	137.6 s	
4	135.9 s	
5	138.2 s	
6	110.9 d	6.16 s
1′	135.2 s	
2′	113.4 d	6.68 d (1.8)
3′	148.6 s	
4′	145.5 d	6.67 d (8.0)
5′	116.0 s	
6′	122.0 d	6.58 dd (8.0, 1.9)
a	37.2 t	2.75 m
a’	33.7 t	2.75 m
OCH_3	57.9 q	3.78 s
	56.3 q	3.71 s
OCH_2O	102.5t	3.79 s

其中化合物 1-3 的结构确定如下：



1 2 3

实施例 2 抑制 NO 生成的活性

由于干扰素 r 以及脂多糖刺激而产生的巨石噬细胞对 NO 生成的阻碍效果（抑制 NO 生成的效果）通过下面的实验方法求得。并且根据阻碍效果的 IC50(um)来评价 NO 生成的抑制效果。

所用材料：

RAW 264.7 细胞（大日本制药）

N-1-盐酸萘乙二胺（1g 和光纯药）

磺胺（500g 和光纯药）

Ham’s F12 培养基（SIGMA N488 500mL）

IFN-γ（Geneyme/Techne 100μg）

脂多糖（LPS， 055：B5 10mg，Sigma）

磷酸（500ml 和光纯药）

DMSO（500ml 和光纯药）

96 孔微滴定板（50/盒 住友电木,商品名〔8096R〕）

微滴定板记数器（BIO-RAD 3550）

NO 生成抑制活性的试验方法：

调整 RAW264.7 细胞的浓度至 1-5×10^5个/ml ，分注于 96 孔板,每孔 200ul，置于 CO_2孵箱中，传代 1 个小时。加入检体后，加入脂多糖 2 ul 。在 CO 孵箱中培养 16 小时。调整最终浓度至干扰素 r（IFN-r）0.33ng/ml，LPS 100ng/ml。将检体溶解于 DMSO，调整含量至 0.2%。在显微镜下观察细胞并进行 MTT 实验。

细胞毒性通过 MTT 法、由镜检确定。MTT 法是已知的常规方法。即，于 96 孔微滴定板,每孔 200μl 细胞浓度为 1.0×10^5细胞/ml，添加不同浓度的提取物或单体组分，将细胞培养 16 小时，加入 MTT 试剂，再培养 4 小时。弃上清，添加 150μLDMSO，将生成的甲臜（formazane）完全溶解，测定 570nm 下的吸光度。

利用 griess 法进行 NO 生成评价。

取上清 100ul，加入 0.1% N-1-盐酸萘乙二胺

（N-1-Naphthyethylene-diamine Dihyrochloride）溶液 50ul，对胺基苯磺酰胺溶液 50ul，室温放置 10 分钟。用分光光度计测 570nm 的 O.D.值。在 STD 中，用亚硝酸钠溶液（100，50，20，10，5，2，1，0 um）。供试药用注射用水溶解。

活性评价

计算出 NO_2^-的量，代入下面的公式求出抑制效果

抑制效果（%）={1-（X-Y）/（Z-Y）}X 100

X：在实验化合物存在下，由 IFN-γ 和 LPS 诱导产生的 NO_2^-的量，

Y；在实验化合物、IFN-γ 和 LPS 均不存在的情况下，诱导产生的 NO_2^-的量，

Z：IFN-γ 和 LPS 诱导产生的 NO_2^-的量。

NO 生成抑制效果的 IC_{50}如下所示：

表 3 石豆兰浸膏及萃取物的 NO 生成抑制试验的结果

	抑制率（IC_{50} uL）
石豆兰 60%浸膏	54.9
正己烷层浸膏	87.6
乙酸乙酯层浸膏	15.9
正丁醇层浸膏	38.8
水层浸膏	—

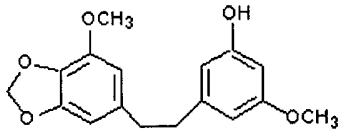
—：IC_{50} >100uL，水层浸膏 100ug/mL 时抑制率 40.3%

表 4 单体的 NO 生成抑制试验结果

化合物	抑制率（IC_{50} uM）
1	4.8
2	29.0
3	15.2
4	18.5
5	6.5
6	13.2
7	22.6

权利要求

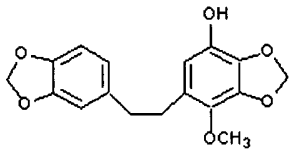
1. 一种石豆兰提取物 1，其特征在于具有如下的结构式：



1 。

2. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于其具有抑制 NO 生成的活性。

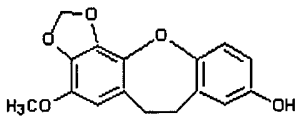
3. 一种石豆兰提取物 2，其特征在于具有如下的结构式：



2 。

4. 如权利要求 3 所述的化合物，其特征在于其具有抑制 NO 生成的活性。

5. 一种石豆兰提取物 3，其特征在于具有如下的结构式：



3 。

6. 如权利要求 5 所述的化合物，其特征在于其具有抑制 NO 生成的活性。

7．一种从药用植物石豆兰中分离活性化合物的方法，其特征在于包括如下的步骤：

1）制备石豆兰的乙醇提取物；经过乙醇浸泡提取重复 2 次，合并这些提取液，经减压浓缩得到粉末提取物；

2）将该粉末提取物溶解在水中，依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇作为洗脱液分别提取；

3）对步骤 2）中的乙酸乙酯、石油醚洗脱液利用柱层析进行分离；

4）对步骤 3）中收集到的洗脱液进行减压浓缩，进一步使用 HPLC 分离精制。

8．如权利要求 7 所述的方法，其特征在于所述的石豆兰的乙醇提取液优选浓度是 60%。

9．如权利要求 7 所述的方法，其特征在于所述的层析柱选自在硅胶柱或 Sephaden LH-20 柱中选择。

10．如权利要求 7 所述的方法，其特征在于所述的洗脱剂选自氯仿：甲醇、或正己烷：乙酸乙酯、或正己烷：丙酮。

11．如权利要求 10 所述的方法，其特征在于所述的洗脱剂比例为氯仿：甲醇（体积比为 100：0，95：5，90：10， 85：15， 80：20， 70：30， 60：40， 50：50， 0：100）、正己烷：乙酸乙酯（体积比为 100：0，95：5，90：10， 85：15， 80：20， 70：30， 60：40， 50：50， 0：100）、正己烷：丙酮（体积比为 100：0，95：5，90：10， 85：15， 80：20， 70：30， 60：40， 50：50， 0：100）。

12．如权利要求 7 所述的方法，其特征在于其中减压浓缩优选是在 40℃条件下进行的。

13．如权利要求 7 所述的方法，其特征在于其中精制的方法为使用 HPLC，流动相：甲醇—H_2O=1：1，流速 4ml/min，在室温下制备；或 HPLC，流动相：正己烷 ：丙酮=7：3，流速 4ml/min。

14. 一种石豆兰提取物 6，其特征在它具有如下的理化参数：

		^{13}C-NMR	^{1}H-NMR
性状	无色油状	1 136.2 s	
EI-MS (m/z)	272	2 102.4 d	6.36 d (2.2)
HR-EI-MS(m/z)实测值	272,1054	3 148.7 s	
计算值	272.1049	4 133.3 s	
分子量	272.1	5 143.5 s	
分子式	$C_{16}H_{16}O_4$	6 107.6 d	6.37 d (2.2)
UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε)		1′ 143.3 s	
	202 (4.35)	2′ 115.4 d	6.64 m
	207 (3.40)	3′ 155.5 s	
	275 (3.27)	4′ 112.8 d	6.64 m
IR $v_{max}^{KBr}cm^{-1}$		5′ 129.5 d	7.15 t (7.6)
	3464, 2950,	6′ 121.0 d	6.78 d (7.6)
	2858, 2781,	a 37.9 t	2.81 brs
	1632, 1589	a’ 37.7 t	2.81 brs
	1350, 926	OCH_3 56.5 q	3.85 s
		OCH_2O 101.2 t	5.82 s

15. 一种石豆兰提取物 7，其特征在它具有如下的理化参数：

		^{13}C-NMR	^{1}H-NMR

性状	白色结晶	1	125.5 s	
EI-MS (m/z)	318	2	134.5 s	
HR-EI-MS(m/z)实测值	318.1054	3	137.6 s	
计算值	318.1049	4	135.9 s	
分子量	318.1	5	138.2 s	
分子式	$C_{17}H_{18}O_6$	6	110.9 d	6.16 s
UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε)		1′	135.2 s	
	202 (4.42)	2′	113.4 d	6.68 d (1.8)
	209 (4.39)	3′	148.6 s	
	275 (3.30)	4′	145.5 d	6.67 d (8.0)
IR $v_{max}^{KBr}cm^{-1}$		5′	116.0 s	
	3364, 2950	6′	122.0 d	6.58dd(8.0, 1.9)
	2858, 1612	a	37.2 t	2.75 m
	1519, 1458	a’	33.7 t	2.75 m
	1357, 926	OCH_3	57.9 q	3.78 s
			56.3 q	3.71 s
		OCH_2O	102.5t	3.79 s

16. 如权利要求 1、3、5 中任一项所述石豆兰提取物，其特征在于在制备治疗与 NO 生成相关的炎症的药物中的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D493/04, A61K31/55, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C07D493, A61K31, A61P29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, PAJ, CNPAT, CNKI, CA, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1458155A	5
A		1-4, 6-16
A	CN1458154A	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 Oct. 2004 (14.10.2004)	11 [illegible] 2004
Name and mailing address of the ISA/CN 6, Xitucheng Rd. Jimen Bridge, Hidian District, 100088, Beijing, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer Li Yantao Telephone No. 82803216

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (January 2004)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/000171

A. 主题的分类

C07D493/04, A61K31/55, A61P29/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC7: C07D493, A61K31, A61P29/00

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

EPODOC, WPI, PAJ, CNPAT, CNKI, CA, STN

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN1458155A	5
A		1－4，6－16
A	CN1458154A	1－16

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
14　10 月 2004（14. 10. 2004）	21 10 2004
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 李彦涛 电话号码：(86-10)82803216