(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110452278 B
(45)授权公告日 2022.01.11

(21)申请号 201910084942.5

(22)申请日 2019.01.29

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110452278 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(73)专利权人 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 张颖君 朱宏涛 尚佳欢 王东 杨崇仁

(74)专利代理机构 昆明祥和知识产权代理有限公司 53114
代理人 马晓青

(51)Int.Cl.
C07J 7/00(2006.01)
C07J 9/00(2006.01)
C07D 307/16(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61K 31/575(2006.01)
A61K 31/57(2006.01)
A61K 31/341(2006.01)

审查员 蒋薇薇

权利要求书2页 说明书16页

(54)发明名称

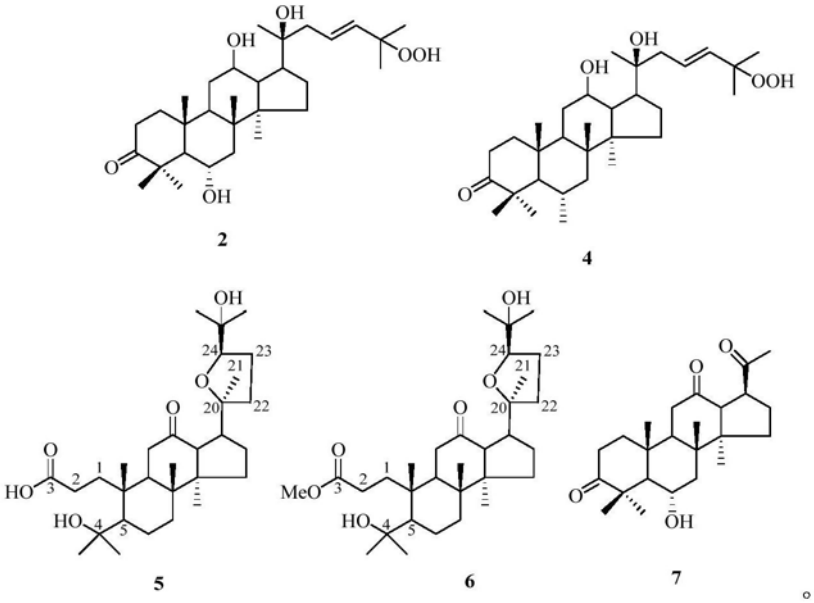
臭七次生代谢物及其制备方法与其在制药中的应用

(57)摘要

本发明提供臭七次生代谢物1-7及其制备方法，以其为活性成分的药物组合物，及其在制备预防炎症性病变的药物中的应用，以及其在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用。本发明主要是采用植物化学研究手段，从臭七中获得上述化合物1-7，并制成固体、液体或膏状体剂型。本发明所得抗炎化合物为天然产物，对人体细胞无毒无害。

CN 110452278 B

1.如下结构式所示的臭七次生代谢物2,4-7,



2.如权利要求1所述的臭七次生代谢物2,4-7,其特征在于该5个化合物来源于臭七的次生代谢物。

3.抗炎药物组合物,其含有权利要求1所述的臭七次生代谢物2,4-7单体或混合物作为有效成分,并至少包含一种药学上可接受的载体。

4.权利要求1所述的臭七次生代谢物2,4-7的制备方法,其特征在于该方法是将风干的臭七粉碎,60℃条件下甲醇回流提取3次,过滤,滤液经真空浓缩去除有机溶剂,上大孔树脂层析柱,以纯水洗脱去除多糖,再用甲醇洗脱得皂苷粗品,皂苷粗品上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱,得三个部分A,B和C;B部分继续上RP-18,用甲醇:水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱,得到8个部分B1-B8,将B1继续上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比10:1的溶剂洗脱得4个部分B1.1-B1.4,将B1.2上RP-18半制备柱层析,用甲醇:水体积比从1:1到9:1的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物2;B4部分上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比200:1的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物7;B5部分上硅胶层析柱,氯仿:甲醇体积比200:1到50:1的溶剂洗脱得5个部分B5.1-B5.5,B5.5部分经半制备高效液相色谱仪纯化,经乙腈:水体积比43:57的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物4;B7部分上硅胶柱层析,氯仿:甲醇体积比200:1到50:1的溶剂洗脱得5个部分B7.1-B7.5,B7.3部分上RP-18层析柱,甲醇:水体积比为50:50的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物6;并经半制备高效液相色谱仪纯化,用乙腈:水体积比43:57的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物5。

5.权利要求1所述的臭七次生代谢物2,4-7在制备预防炎症性病变的药物中的应用。

6.权利要求1所述的臭七次生代谢物2,4-7在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用。

7.权利要求3所述的药物组合物在制备预防炎症性病变的药物中的应用。

8.权利要求3所述的药物组合物在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用。

9.权利要求1所述的臭七次生代谢物2,4-7对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价方法,其特征在于该方法是将小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中,接种密度为1.5×10^5个细胞/孔,化合物2,4-7分别溶解于DMSO溶剂中,制备出浓度为50μM的溶液及其连续梯度稀释溶液,之后进行细胞处理,每个处理设3个重复,用浓度为1

μg/mL的肉毒素LPS进行刺激,18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行评价,于570nm处检测吸收值,采用Reed-Muench法计算各化合物的半抑制浓度IC_{50}值;同时,采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐,半抑制浓度IC_{50}=39.26±0.91μM作为阳性对照。

臭七次生代谢物及其制备方法与其在制药中的应用

技术领域：

[0001] 本发明属于医药领域，具体地，涉及臭七次生代谢物及其制备方法与其在抗炎药物组合物中的应用及其在制药中的应用。

背景技术：

[0002] 三七(Panax notoginseng(Burk.)F.H.Chen)又名田七、血参、金不换等，为我国重要的传统中药，常用作滋补品或调节血液循环的药物。在心血管、脑血管、神经、免疫等系统具有多方面的药理活性，还具有对肝损伤的保护作用和抗肿瘤、抗炎等作用。因其具有很高的药用价值和经济价值，在我国已有400多年的栽培历史。三七自然分布区域狭窄，仅生长于海拔1500-1800米，北纬23.5°地区。适栽于我国西南地区的云南省文山州及文山州与广西省接壤的小部分地区。

[0003] 近几十年来，由于三七产业的不断发展，对三七原材料需求的持续增长，三七种植面积不断向外扩张。然而，三七属于典型的生态脆弱型植物，对环境中的光照、温度及空气湿度等因子十分敏感，适宜生长区外的扩大种植极易因病原微生物的侵染而导致三七根腐病的发生。染病后的三七根部腐烂，并伴有似鸡屎的臭味，又名臭七。每年因根腐病危害导致的臭七上万吨，严重影响了三七产业的发展。

[0004] 然而，三七因遭受病原微生物侵染向臭七转变过程中势必会启动防疫机制，改变自身的代谢方式，产生一系列有别于健康生长状态下的防疫性次生代谢物，这些防疫性次生代谢物可能对人体具有特殊的生理活性。研究者有必要探究臭七次生代谢物的分子结构及其生理活性，进一步研究臭七的开发利用，不仅有利于减小三七因病害带来的损失，还能丰富具有生理活性的三七天然小分子化合物库。

[0005] 然而，迄今为止，现有技术中未见有从臭七中分离得到 20(S)-dammar-25-ene-24(S)-hydroperoxyl-3β,6α,12β,20-tetrol (1)， 20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-6α,12β,20-triol (2)， 20(S)-dammar-12-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-3β,6α,20-triol (3)， 20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-12β,20-diol (4)， 20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid (5)， 20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid methyl ester (6),and 6α-hydroxy-22,23,24,25,26,27-hexanordammar-3,12,20-trione(7)等化合物及其制备方法的相关报导，未见其在抗炎相关药理活性方面的报道，也未见其在治疗抗炎药物及药物制剂中的报道。

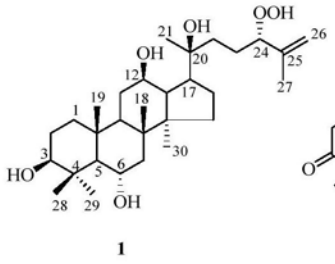
发明内容：

[0006] 本发明旨在提供一种臭七次生代谢物 20(S)-dammar-25-ene-24(S)-hydroperoxyl-3β,6α,12β,20-tetrol (1)， 20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-6α,12β,20-triol (2)， 20(S)-dammar-12-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-3β,6α,20-triol (3)， 20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-12β,20-

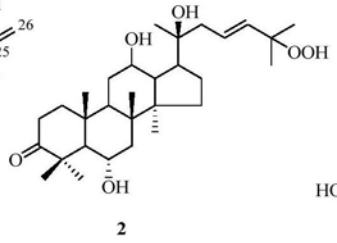
diol (4), 20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid (5), 20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid methyl ester (6),and 6α-hydroxy-22,23,24,25,26,27-hexanordammar-3,12,20-trione(7)的制备方法,以其为活性成分的药物组合物,及其在制备预防炎症性病变的药物中的应用,以及其在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用。

[0007] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

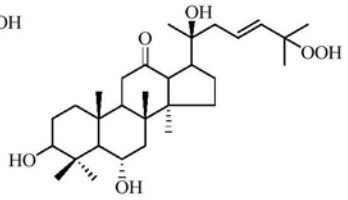
[0008] 如下结构式所示的臭七次生代谢物1-7,



1

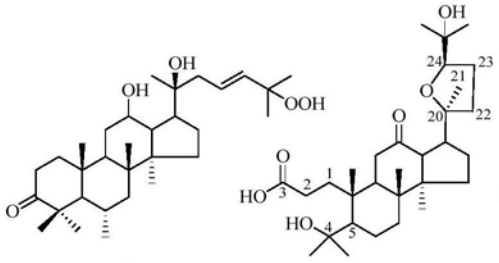


2



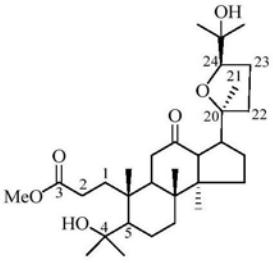
3

[0009]

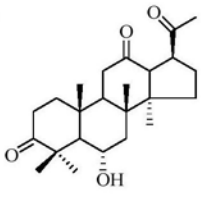


4

5



6



7

。

[0010] 臭七次生代谢物1-7来源于臭七即感染根腐病的腐根三七的次生代谢物。

[0011] 抗炎药物组合物,其含有臭七次生代谢物1-7,单体或混合物作为有效成分,并至少还包含一种药学上可接受的载体。

[0012] 本发明同时提供了臭七次生代谢物1-7的制备方法,该方法是将风干的臭七粉碎,60℃条件下甲醇回流提取3次,过滤。滤液经真空浓缩去除有机溶剂,上大孔树脂层析柱,以纯水洗脱去除多糖,再用甲醇洗脱得皂苷粗品。皂苷粗品上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱,得三个部分即A,B和C。B部分继续上RP-18,用甲醇:水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱,得到8个部分即B1-B8,将 B1继续上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比10:1的溶剂洗脱得4个部分即B1.1-B1.4,将B1.2上RP-18半制备柱层析,用甲醇:水体积比从1:1到9:1的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物2和3;B3部分上硅胶半制备层析柱,用乙腈:水体积比35:65的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物1;B4部分上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比200: 1的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物7;B5部分上硅胶层析柱,氯仿:甲醇体积比200:1到50:1的溶剂洗脱得5个部分即B5.1-B5.5,B5.5部分经半制备高效液相色谱仪纯化,经乙腈:水体积比43:57的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物4;B7部分上硅胶柱层析,氯仿:甲醇体积比200:1到50:1的溶剂洗脱得5个部分即B7.1-B7.5,B7.3 部分上RP-18层析柱,甲醇:水体积比为50:50的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物6;并经半制备高效液相色谱仪纯化,用乙腈:水体积比43:57的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物5。

[0013] 本发明同时还提供了臭七次生代谢物1-7在制备预防炎症性病变的药物中的应用和在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用。

[0014] 本发明此外还提供了所述的药物组合物在制备预防炎症性病变的药物中的应用，以及所述的药物组合物在制备治疗炎症性疾病的药物中的应用。

[0015] 所述的上述臭七次生代谢物1-7的制备是采用天然产物系统分离方法从臭七中分离、纯化和结构鉴定。所述的臭七次生代谢物1-7的结构鉴定是指将分离得到的单体化合物进行红外光谱、紫外光谱、高分辨质谱和核磁共振图谱分析，确定结构。

[0016] 本发明另外还提供了臭七次生代谢物1-7对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价方法。该方法是指将从中科院上海细胞库获得的小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中，接种密度为1.5×10^5个细胞/孔。化合物1-7 分别溶解于DMSO溶剂中，制备出浓度为50μM的溶液及其连续梯度稀释溶液，之后进行细胞处理(每个处理设3个重复)。用浓度为1μg/mL的肉毒素LPS进行刺激，18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行评价，于570nm处检测吸收值，采用Reed-Muench法计算各化合物的半抑制浓度IC_{50}值。同时，采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐(半抑制浓度IC_{50}＝39.26±0.91μM)作为阳性对照。

[0017] 本发明的臭七次生代谢物1-7或其盐可经口或不经过口给药，给药量因药物不同而各有不同，对成人来说，每天1-20mg比较合适。

[0018] 经口服给药时，首先使化合物与常规的药用辅剂如赋形剂、崩解剂、黏合剂、润滑剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、芳香剂、表面活性剂等混合，将其制成颗粒剂、胶囊、片剂等形式给药；非经口给药时可以注射液、输液剂、栓剂或涂抹剂等形式给药。制备上述制剂时，可使用常规的制剂技术。

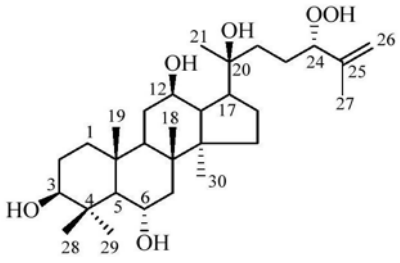
具体实施方式：

[0019] 下面以本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容，这些实例仅是对本发明优选方案的说明，而并不以任何方式限制本发明的保护范围。

[0020] 实施例1：

[0021] 20(S)-dammar-25-ene-24(S)-hydroperoxyl-3β,6α,12β,20-tetrol(1)的制备和其在医药中的应用。

[0022]



1

[0023] 步骤一：化合物20(S)-dammar-25-ene-24(S)-hydroperoxyl-3β,6α,12β,20-tetrol(1)的制备。

[0024] 将风干的臭七粉碎，60℃条件下甲醇回流提取3次，过滤。滤液经真空浓缩去除有机溶剂，上大孔树脂层析柱，以纯水洗脱去除多糖，再用甲醇洗脱得皂苷粗品。皂苷粗品上硅胶层析柱，用氯仿：甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱，得三个部分即A，B 和C。B部分继续上RP-18，用甲醇：水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱，得到8个部分即B1-B8，将B3部分

上硅胶半制备层析柱，用乙腈:水体积比35:65 的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物1。

[0025] 该化合物为一新化合物，经鉴定为20(S)-dammar-25-ene-24(S)-hydroperoxyl -3β,6α,12β,20-tetrol。

[0026] 其理化数据如下：白色无定形粉末；$[\alpha]_D^{25}$ +26.8 (c 0.12,MeOH)；UV(MeOH) λ_{max} (logε)203(0.16)nm；IR(KBr) ν_{max} 3416,2961,2932,2876,1648,1631,1465,1451, 1384cm^{-1}；HRESIMS m/z 531.3659$[M+Na]^+$(calcd 531.3662)，分子式$C_{30}H_{52}O_6$；^{1}H NMR(C_5D_5N, 600MHz)和^{13}C NMR(C_5D_5N,150MHz)数据见表1.

[0027] 表1.化合物1的^{1}H和^{13}CNMR

[0028]

No.	δ_C	δ_H (*J* in Hz)	No.	δ_C	δ_H (*J* in Hz)
1	39.8	1.07 m, 1.70 m	16	27.4	1.37 m, 1.86 m
2	28.6	1.88 m, 1.95 m	17	55.2	2.36 dt (18.0,7.2)
3	78.9	3.56 dt (11.8,5.1)	18	17.9	1.13 s
4	40.8		19	18.1	1.03 s
5	62.2	1.26 d (10.4)	20	73.3	
6	68.2	4.44 m	21	27.7	1.42 s
7	48.0	1.91 m， 1.99 m	22	32.4	1.75 td (13.0,4.9) 2.28 td (13.1,4.0)
8	41.6		23	26.8	2.48 m
9	50.6	1.62 m	24	90.6	4.81 t (6.8)
10	39.8		25	146.7	
11	32.6	1.60 m, 2.17 m	26	113.9	5.12 s, 5.29 s
12	71.5	3.95 m	27	17.8	1.94 s
13	48.7	2.08 t (10.6)	28	32.5	2.03 s
14	52.1		29	17.0	1.48 s
15	31.9	1.04 m, 1.57 m	30	17.5	0.97 s

[0029] 步骤二：化合物20(S)-dammar-25-ene-24(S)-hydroperoxyl-3β,6α,12β,20-tetrol(1)的抗炎活性评价。

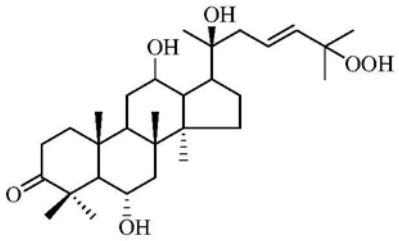
[0030] 所述的化合物1对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价。是指将从中科院上海细胞库购买的小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中，接种密度为1.5×10^{5}个细胞/孔。化合物1溶解于DMSO溶剂中，制备出终浓度从50 μM开始2倍稀释共设6个梯度的溶液。之后将细胞分为空白对照组(0.1％DMSO)、LPS应激模型组(1μg/mL LPS)及不同浓度化合物1预处理组(分别加入50μM、50/2μM、50/4μM、50/8μM、50/16μM、50/

32μM的化合物1预处理细胞1h)，之后再分别添加终浓度为1μg/mL的LPS进行刺激，培养18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行检测，于570nm处检测吸收值。

[0031] NO生成抑制率(%)＝(非药物处理组OD_{570nm}-样品组OD_{570nm})/非药物处理组OD_{570nm}×100%；其IC_{50}(50%concentration of inhibition)按Reed&Muench法计算。同时，采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐(半抑制浓度 IC_{50}＝39.26±0.91μM)作为阳性对照。结果显示，化合物1的IC_{50}＝35.26±0.88μM，其活性优于阳性对照。

[0032] 实施例2：

[0033] 20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-6α,12β,20-triol(2)的制备和其在医药中的应用。

[0034] 

2

[0035] 步骤一：化合物20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-6α,12β,20-triol(2)的制备。

[0036] 将风干的臭七粉碎，60℃条件下甲醇回流提取3次，过滤。滤液经真空浓缩去除有机溶剂，上大孔树脂层析柱，以纯水洗脱去除多糖，再用甲醇洗脱得皂苷粗品。皂苷粗品上硅胶层析柱，用氯仿:甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱，得三个部分即A,B 和C。B部分继续上RP-18，用甲醇:水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱，得到8个部分即B1-B8，将B1继续上硅胶层析柱，用氯仿:甲醇体积比10:1的溶剂洗脱得4个部分即B1.1-B1.4，将B1.2上RP-18半制备柱层析，用甲醇:水体积比从1:1到9:1的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物2。

[0037] 该化合物为一新化合物，经鉴定为20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl- 6α,12β,20-triol。

[0038] 其理化数据如下：白色无定形粉末；$[\alpha]_D^{25}$ +85.8(c 0.19,MeOH)；UV(MeOH) λ_{max}(logε)202(0.14)nm；IR(KBr)ν_{max} 3423,2966,2940,2875,1693,1631,1383； HRESIMS m/z 529.3500$[M+Na]^+$(calcd 529.3500)，分子式$C_{30}H_{50}O_6$；^1H NMR (C_5D_5N,600MHz)和^{13}C NMR (C_5D_5N,150MHz)数据见表2。

[0039] 表2.化合物2的^1H和^{13}CNMR

[0040]

No.	δ_C	δ_H (J in Hz)	No.	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	40.4	1.61 m, 1.76 m	16	27.2	1.48 m, 1.88 m
2	33.8	2.31 m, 2.84 m	17	54.5	2.40 dt (18.0,7.2)
3	219.2		18	17.4	1.00 s
4	48.2		19	18.4	0.88 s
5	59.5	1.96 d (10.6)	20	73.8	
6	67.3	4.25 m	21	28.2	1.45 s
7	45.9	1.92 m	22	40.8	2.47 dd (13.8,4.8) 2.81 m
8	41.0		23	127.7	6.28 m
9	49.3	1.71 m	24	138.1	6.09 d (16.0)
10	38.6		25	81.8	
11	33.3	1.61 m, 2.12 m	26	25.6	1.59 s
12	71.3	3.95 m	27	25.8	1.59 s
13	49.1	2.08 m	28	32.6	1.70 s
14	52.2		29	20.5	1.73 s
15	31.7	1.08 m, 1.63 m	30	16.6	1.34 s

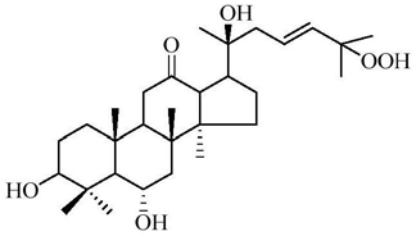
[0041] 步骤二:化合物20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-6α,12β,20-triol(2) 的抗炎活性评价。

[0042] 所述的化合物2对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价。是指将从中科院上海细胞库购买的小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中,接种密度为1.5×10^5个细胞/孔。化合物2溶解于DMSO溶剂中,制备出终浓度从50 μM开始2倍稀释共设6个梯度的溶液。之后将细胞分为空白对照组(0.1%DMSO)、LPS应激模型组(1μg/mL LPS)及不同浓度化合物2预处理组(分别加入50μM、 50/2μM、50/4μM、50/8μM、50/16μM、50/32μM的化合物2预处理细胞1h),之后再分别添加终浓度为1μg/mL的LPS进行刺激,培养18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行检测,于570nm处检测吸收值。

[0043] NO生成抑制率(%)=(非药物处理组OD_{570nm}-样品组OD_{570nm})/非药物处理组 OD_{570nm} ×100%;其IC_{50}(50%concentration of inhibition)按Reed&Muench法计算。同时,采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐(半抑制浓度IC_{50}=39.26±0.91μM)作为阳性对照。结果显示,化合物2的IC_{50}=17.23±0.81μM,其活性显著优于阳性对照。

[0044] 实施例3:

[0045] 20(S)-dammar-12-oxo-23-ene-25-hydro-peroxyl-3β,6α,20-triol(3)的制备和其在医药中的应用。

[0046] 

3

[0047] 步骤一:化合物20(S)-dammar-12-oxo-23-ene-25-hydro-peroxyl-3β,6α,20-triol(3)的制备。

[0048] 将风干的臭七粉碎,60℃条件下甲醇回流提取3次,过滤。滤液经真空浓缩去除有机溶剂,上大孔树脂层析柱,以纯水洗脱去除多糖,再用甲醇洗脱得皂苷粗品。皂苷粗品上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱,得三个部分即A,B 和C。B部分继续上RP-18,用甲醇:水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱,得到8个部分即B1-B8,将B1继续上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比10:1的溶剂洗脱得4个部分即B1.1-B1.4,将B1.2上RP-18半制备柱层析,用甲醇:水体积比从1:1到9:1的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物3。

[0049] 该化合物为一新化合物,经鉴定为 20(S)-dammar-12-oxo-23-ene-25-hydro-peroxyl-3β,6α,20-triol。

[0050] 其理化数据如下:白色无定形粉末;$[\alpha]_D^{25}$ +41.1(c 0.34,MeOH);UV(MeOH)λ_{max}(log ε)202(0.17)nm;IR(KBr)ν_{max} 3431,2971,2932,1698,1630,1425cm^{-1};HRESIMS m/z 529.3502$[M+Na]^+$(calcd 529.3505),分子式$C_{30}H_{50}O_6$;^1H NMR(C_5D_5N,600MHz)和^{13}C NMR(C_5D_5N,150MHz)数据见表3。

[0051] 表3.化合物3的^1H和^{13}CNMR

No.	δ_C	δ_H (*J* in Hz)	No.	δ_C	δ_H (*J* in Hz)
1	39.4	0.96 m, 1.44 m	16	25.0	1.90 m, 2.09 m
2	28.4	1.87 m	17	44.8	2.74 m
3	78.6	3.51 dt (11.5,4.6)	18	17.9	1.32 s
4	40.8		19	17.8	0.91 s
5	62.0	1.25 d (10.5)	20	74.0	
6	68.1	4.47 m	21	27.6	1.46 s
7	47.2	1.97 m	22	46.0	2.48 dd (13.2,4.8)
					2.59 dd (13.5,5.9)
8	42.1		23	127.2	6.16 m
9	54.4	1.91 m	24	138.7	6.06 d (15.8)
10	40.0		25	81.7	1.55 s
11	40.5	2.37 m, 2.40 m	26	25.5	
12	212.3		27	25.7	1.55 s
13	56.7	3.37 d (9.7)	28	32.3	2.00 s
14	56.0		29	16.9	1.46 s
15	32.3	1.18 m, 1.91 m	30	17.7	1.02 s

[0052]

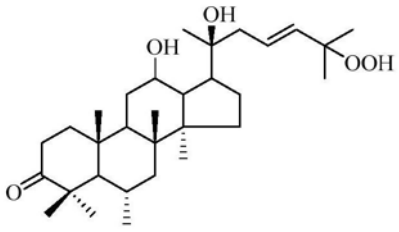
[0053] 步骤二:化合物20(S)-dammar-12-oxo-23-ene-25-hydro-peroxyl-3β,6α,-20-triol(3) 的抗炎活性评价。

[0054] 所述的化合物3对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价。是指将从中科院上海细胞库购买的小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中,接种密度为1.5×10^5个细胞/孔。化合物3溶解于DMSO溶剂中,制备出终浓度从50 μM开始2倍稀释共设6个梯度的溶液。之后将细胞分为空白对照组(0.1%DMSO)、LPS应激模型组(1μg/mL LPS)及不同浓度化合物3预处理组(分别加入50μM、50/2μM、50/4μM、50/8μM、50/16μM、50/32μM的化合物3预处理细胞1h),之后再分别添加终浓度为1μg/mL的LPS进行刺激,培养18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行检测,于570nm处检测吸收值。

[0055] NO生成抑制率(%)=(非药物处理组OD_{570nm}-样品组OD_{570nm})/非药物处理组 OD_{570nm} ×100%;其IC_{50}(50%concentration of inhibition)按Reed&Muench法计算。同时,采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐(半抑制浓度 IC_{50}=39.26±0.91μM)作为阳性对照。结果显示,化合物3的IC_{50}=27.21±0.67μM,其活性显著优于阳性对照。

[0056] 实施例4:

[0057] 20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-12β,20-diol(4)的制备和其在医药中的应用。

[0058] 

4

[0059] 步骤一:化合物20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-12β,20-diol(4)的制备。

[0060] 将风干的臭七粉碎,60℃条件下甲醇回流提取3次,过滤。滤液经真空浓缩去除有机溶剂,上大孔树脂层析柱,以纯水洗脱去除多糖,再用甲醇洗脱得皂苷粗品。皂苷粗品上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱,得三个部分即A,B 和C。B部分继续上RP-18,用甲醇:水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱,得到8个部分即B1-B8,B5部分上硅胶层析柱,氯仿:甲醇体积比200:1到50:1 的溶剂洗脱得5个部分即B5.1-B5.5,B5.5部分经半制备高效液相色谱仪纯化,经乙腈:水体积比43:57的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物4。

[0061] 该化合物为一新化合物,经鉴定为 20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-12β,20-diol。

[0062] 其理化数据如下:白色无定形粉末;$[\alpha]_D^{25}$ +19.2(c 0.16,MeOH);UV(MeOH) λ_{max} (logε)203(0.27)nm;IR(KBr)ν_{max} 3416,2960,2934,2873,1705,1630,1384cm^{-1}; HRESIMS m/z 513.3552$[M+Na]^+$(calcd 513.3550),分子式$C_{30}H_{50}O_5$;^{1}H NMR (C_5D_5N,800MHz)和^{13}C NMR (C_5D_5N,200MHz)数据见表4。

[0063] 表4.化合物4的^{1}H和^{13}CNMR

No.	δ_C	δ_H (J in Hz)	No.	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	40.2	1.33 m, 1.79 m	16	27.2	1.49 m, 1.91 m
2	34.7	1.51 m, 2.46 m	17	54.6	2.39 dt (18.0,7.2)
3	216.9		18	16.0	1.09 s
4	47.9		19	17.4	0.94 s
5	55.7	1.38 m	20	73.8	
6	20.4	1.42 m, 1.50 m	21	28.2	1.47 s
7	34.9	1.28 m, 2.51 m	22	40.8	2.49 m
[0064]					2.82 dd (13.6,5.5)
8	40.4		23	127.7	6.29 m
9	50.1	1.55 m	24	138.1	6.09 d (15.9)
10	37.4		25	81.8	
11	32.9	1.62 m, 2.07 m	26	25.8	1.60 s
12	71.3	3.93 m	27	25.6	1.60 s
13	49.5	2.08 m	28	27.3	1.17 s
14	52.2		29	21.6	1.08 s
15	31.7	1.08 m, 1.64 m	30	16.5	0.95 s

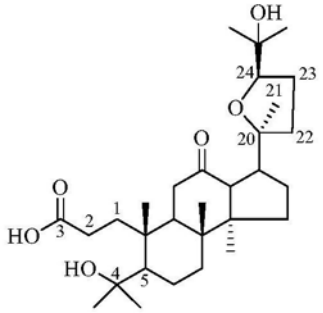
[0065] 步骤二:化合物20(S)-dammar-3-oxo-23-ene-25-hydroperoxyl-12β,20-diol(4)的抗炎活性评价。

[0066] 所述的化合物4对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价。是指将从中科院上海细胞库购买的小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中,接种密度为1.5×10^5个细胞/孔。化合物4溶解于DMSO溶剂中,制备出终浓度从50 μM开始2倍稀释共设6个梯度的溶液。之后将细胞分为空白对照组(0.1%DMSO)、LPS应激模型组(1μg/mL LPS)及不同浓度化合物4预处理组(分别加入50μM、50/2μM、50/4μM、50/8μM、50/16μM、50/32μM的化合物4预处理细胞1h),之后再分别添加终浓度为1μg/mL的LPS进行刺激,培养18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行检测,于570nm处检测吸收值。

[0067] NO生成抑制率(%)=(非药物处理组OD_{570nm}-样品组OD_{570nm})/非药物处理组OD_{570nm}×100%;其IC_{50}(50%concentration of inhibition)按Reed&Muench法计算。同时,采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐(半抑制浓度 IC_{50}=39.26±0.91μM)作为阳性对照。结果显示,化合物4的IC_{50}=41.21±0.33μM,其活性趋于阳性对照。

[0068] 实施例5:

[0069] 20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid(5)的制备和其在医药中的应用。

[0070] 

5

[0071] 步骤一:化合物20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid (5)的制备。

[0072] 风干的臭七粉碎,60℃条件下甲醇回流提取3次,过滤。滤液经真空浓缩去除有机溶剂,上大孔树脂层析柱,以纯水洗脱去除多糖,再用甲醇洗脱得皂苷粗品。皂苷粗品上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱,得三个部分即A,B 和C。B部分继续上RP-18,用甲醇:水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱,得到8个部分即B1-B8,将B7部分上硅胶柱层析,氯仿:甲醇体积比200:1到50: 1的溶剂洗脱得5个部分即B7.1-B7.5,B7.3部分上RP-18层析柱,甲醇:水体积比为50:50的溶剂洗脱、浓缩干燥,再经半制备高效液相色谱仪纯化,用乙腈:水体积比43:57的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物5。

[0073] 该化合物为一新化合物,经鉴定为20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid。

[0074] 其理化数据如下:无色柱状结晶;$[\alpha]_D^{25}$ +46.5 (c0.16,MeOH);UV(MeOH)λ_{max}(logε)202(0.20)nm;IR(KBr)ν_{max} 3439,2879,1707,1634,1384cm^{-1};HRESIMS m/z 529.3504 [M+Na]$^+$(calcd 529.3500),分子式$C_{30}H_{50}O_6$;^{1}H NMR(C_5D_5N,600MHz)和^{13}C NMR (C_5D_5N,150MHz)数据见表5。

[0075] 表5.化合物5的^{1}H和^{13}CNMR

[0076]

No.	δ_C	δ_H (*J* in Hz)	No.	δ_C	δ_H (*J* in Hz)
1	36.0	1.95 m, 3.20 m	16	25.7	1.82 m
2	30.0	2.56 m, 3.02 m	17	43.6	2.78 dd (16.2,7.2)
3	177.4		18	15.9	1.26 s
4	75.2		19	21.4	1.19 s
5	52.8	1.69 m	20	85.9	
6	23.4	1.68 m	21	25.8	1.25 s
7	34.3	1.30 m, 1.48 m	22	36.0	1.59 m, 1.95 m
8	40.9		23	27.4	1.98 m, 2.05 m
9	47.5	2.20 m	24	85.1	3.97 t (7.1)
10	42.3		25	71.6	
11	40.3	2.42 m, 2.59 m	26	27.0	1.45 s
12	210.9		27	27.6	1.40 s
13	57.8	3.24 d (9.0)	28	34.6	1.50 s
14	56.7		29	28.7	1.46 s
15	32.9	1.16 m, 1.79 m	30	17.2	0.85 s

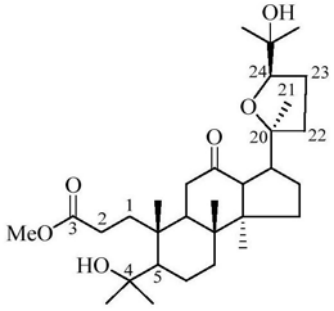
[0077] 步骤二:化合物20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid (5)的抗炎活性评价。

[0078] 所述的化合物5对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价。是指将从中科院上海细胞库购买的小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中,接种密度为1.5×10^5个细胞/孔。化合物5溶解于DMSO溶剂中,制备出终浓度从50 μM开始2倍稀释共设6个梯度的溶液。之后将细胞分为空白对照组(0.1%DMSO)、LPS应激模型组(1μg/mL LPS)及不同浓度化合物5预处理组(分别加入50μM、50/2μM、50/4μM、50/8μM、50/16μM、50/32μM的化合物5预处理细胞1h),之后再分别添加终浓度为1μg/mL的LPS进行刺激,培养18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行检测,于570nm处检测吸收值。

[0079] NO生成抑制率(%)=(非药物处理组OD_{570nm}-样品组OD_{570nm})/非药物处理组OD_{570nm}×100%;其IC_{50}(50%concentration of inhibition)按Reed&Muench法计算。同时,采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐(半抑制浓度 IC_{50}=39.26±0.91μM)作为阳性对照。结果显示,化合物5的IC_{50}=23.21±0.73μM,其活性显著优于阳性对照。

[0080] 实施例6:

[0081] 20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid methyl ester(6)的制备和其在医药中的应用。

[0082] 

6

[0083] 步骤一:化合物20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid methyl ester(6)的制备。

[0084] 风干的臭七粉碎,60℃条件下甲醇回流提取3次,过滤。滤液经真空浓缩去除有机溶剂,上大孔树脂层析柱,以纯水洗脱去除多糖,再用甲醇洗脱得皂苷粗品。皂苷粗品上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱,得三个部分即A,B 和C。B部分继续上RP-18,用甲醇:水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱,得到8个部分即B1-B8,将B7部分上硅胶柱层析,氯仿:甲醇体积比200:1到50: 1的溶剂洗脱得5个部分即B7.1-B7.5,B7.3部分上RP-18层析柱,甲醇:水体积比为50:50的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物6。

[0085] 该化合物为一新化合物,经鉴定为 20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid methyl ester。

[0086] 其理化数据如下:白色无定形粉末;$[\alpha]_D^{25}$ +38.8(c 0.17,MeOH);UV(MeOH)λ_{max}(log ε)202(0.20)nm;IR(KBr)ν_{max} 3440,2969,1733,1708,1630,1383cm^{-1};HRESIMS m/z 543.3667$[M+Na]^+$(calcd,543.3662),分子式$C_{31}H_{52}O_6$;^1H NMR(C_5D_5N,600MHz)和^{13}C NMR(C_5D_5N,150MHz)数据见表6。

[0087] 表6.化合物6的^1H和^{13}CNMR

[0088]

No.	δ_C	δ_H (J in Hz)	No.	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	35.6	1.82 m, 3.11 m	16	25.7	1.82 m
2	29.5	2.40 m, 2.88 m	17	43.6	2.78 m
3	175.2		18	15.9	1.24 s
4	75.1		19	21.3	1.15 s
5	52.8	1.62 m	20	85.8	
6	23.2	1.62 m	21	25.8	1.25 s
7	34.3	1.29 m, 1.46 m	22	36.0	1.58 m, 1.94 m
8	40.9		23	27.4	1.95 m, 2.04 m
9	47.4	2.13 m	24	85.1	3.98 t (7.3)
10	42.2		25	71.6	
11	40.2	2.40 m, 2.47 m	26	27.0	1.45 s
12	210.9		27	27.5	1.40 s
13	57.8	3.23 d (9.4)	28	34.8	1.48 s
14	56.7		29	28.5	1.42 s
15	32.8	1.16 m, 1.80 m	30	17.1	0.85 s
			31	51.7	3.54 s

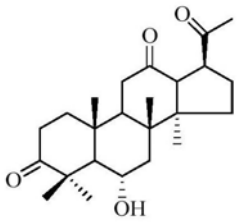
[0089] 步骤二:化合物20(S),24(R)-epoxy-3,4-seco-dammar-25-hydroxy-12-one-3-oic acid methyl ester(6)的抗炎活性评价。

[0090] 所述的化合物6对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价。是指将从中科院上海细胞库购买的小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中,接种密度为1.5×10^5个细胞/孔。化合物6溶解于DMSO溶剂中,制备出终浓度从50 μM开始2倍稀释共设6个梯度的溶液。之后将细胞分为空白对照组(0.1%DMSO)、LPS应激模型组(1μg/mLLPS)及不同浓度化合物6预处理组(分别加入50μM、50/2μM、50/4μM、50/8μM、50/16μM、50/32μM的化合物6预处理细胞1h),之后再分别添加终浓度为1μg/mL的LPS进行刺激,培养18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行检测,于570nm处检测吸收值。

[0091] NO生成抑制率(%)=(非药物处理组OD_{570nm}-样品组OD_{570nm})/非药物处理组OD_{570nm}×100%;其IC_{50}(50%concentration of inhibition)按Reed&Muench法计算。同时,采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐(半抑制浓度 IC_{50}=39.26±0.91μM)作为阳性对照。结果显示,化合物6的IC_{50}=35.18±0.67μM,其活性优于阳性对照。

[0092] 实施例7:

[0093] 6α-hydroxy-22,23,24,25,26,27-hexanordammar-3,12,20-trione(7)的制备和其在医药中的应用。

[0094] 

7

[0095] 步骤一:化合物6α-hydroxy-22,23,24,25,26,27-hexanordammar-3,12,20-trione(7)的制备。

[0096] 将风干的臭七粉碎,60℃条件下甲醇回流提取3次,过滤。滤液经真空浓缩去除有机溶剂,上大孔树脂层析柱,以纯水洗脱去除多糖,再用甲醇洗脱得皂苷粗品。皂苷粗品上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比为7:3的溶剂洗脱,得三个部分即A, B和C。B部分继续上RP-18,用甲醇:水体积比从1:9到9:1的溶剂进行梯度洗脱,得到8个部分即B1-B8,B4部分上硅胶层析柱,用氯仿:甲醇体积比200:1的溶剂洗脱、浓缩干燥得化合物7。

[0097] 该化合物为一新化合物,经鉴定为 6α-hydroxy-22,23,24,25,26,27-hexanordammar-3,12,20-trione。

[0098] 其理化数据如下:无色针状结晶;$[\alpha]_D^{25}$ +183.2(c 0.11,MeOH);UV(MeOH) λ_{max}(log ε)203(0.18),224(0.14)nm;IR(KBr)ν_{max} 3516,3436,2974,2957,2876,1701, 1355cm^{-1};HRESIMS m/z 411.2503$[M+Na]^+$(calcd 411.2506),分子式$C_{24}H_{36}O_4$;^{1}H NMR(C_5D_5N,500MHz)和^{13}C NMR(C_5D_5N,125MHz)数据见表7。

[0099] 表7.化合物7的^{1}H和^{13}CNMR

[0100]

No.	δ_C	δ_H (*J* in Hz)	No.	δ_C	δ_H (*J* in Hz)
1	39.2	1.48 m, 2.25 m	13	57.5	3.27 d (12.0)
2	33.1	2.27 m, 2.77 m	14	54.4	
3	218.2		15	31.5	1.13 m, 1.72 m
4	47.7		16	25.5	1.71 m, 1.97 m
5	58.5	1.91 m	17	47.5	3.37 m
6	66.6	4.25 m	18	15.7	1.13 s
7	44.4	1.86 m	19	17.3	0.78 s
8	40.8		20	209.9	
9	52.0	1.90 m	21	29.9	2.22 s
10	38.1		22	19.9	1.68 s
11	39.1	1.89 m, 2.24 m	23	32.0	1.64 s
12	209.0		34	16.8	0.82 s

[0101] 步骤二:化合物6α-hydroxy-22,23,24,25,26,27-hexanordammar-3,12,20-trione(7)的抗炎活性评价。

[0102] 所述的化合物7对抑制小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7一氧化氮产生的影响评价。

是指将从中科院上海细胞库购买的小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7接种于96空板中，接种密度为1.5×10^5个细胞/孔。化合物7溶解于DMSO溶剂中，制备出终浓度从50 μM开始2倍稀释共设6个梯度的溶液。之后将细胞分为空白对照组(0.1％DMSO)、LPS应激模型组(1μg/mLLPS)及不同浓度化合物7预处理组(分别加入50μM、50/2μM、50/4μM、50/8μM、50/16μM、50/32μM的化合物7预处理细胞1h)，之后再分别添加终浓度为1μg/mL的LPS进行刺激，培养18小时后采用Griess试剂对上清液中的一氧化氮生成进行检测，于570nm处检测吸收值。

[0103] NO生成抑制率(％)＝(非药物处理组OD_{570nm}-样品组OD_{570nm})/非药物处理组OD_{570nm}×100％；其IC_{50}(50％concentration of inhibition)按Reed&Muench法计算。同时，采用一氧化氮合成酶抑制剂NG-Methyl-l-arginine醋酸盐(半抑制浓度 IC_{50}＝39.26±0.91μM)作为阳性对照。结果显示，化合物7的IC_{50}＝15.23±0.43μM，其活性极显著的优于阳性对照。

[0104] 制剂实施例1：

[0105] 按实施例1-7的方法，制备得化合物1-7，按常规方法加注射用水，精滤，灌封灭菌制成注射液。

[0106] 制剂实施例2：

[0107] 按实施例1-7的方法，制备得化合物1-7，将其溶于无菌注射用水中，搅拌使其充分溶解，用无菌抽滤漏斗过滤，再无菌精滤，分装于2安瓿中，低温冷冻干燥后无菌熔封得粉针剂。

[0108] 制剂实施例3：

[0109] 按实施例1-7的方法，制备得化合物1-7，与赋形剂重量比为9:1的比例加入赋形剂，制成粉剂。

[0110] 制剂实施例4：

[0111] 按实施例1-7的方法，制备得化合物1-7，按其与赋形剂重量比为1:5-1:10的比例加入赋形剂，制粒压片。

[0112] 制剂实施例5：

[0113] 按实施例1-7的方法，制备得化合物1-7，或按常规口服液制法制成口服液。

[0114] 制剂实施例6：

[0115] 按实施例1-7的方法，制备得化合物1-7，按其与赋形剂重量比为5:1的比例加入赋形剂，涂抹剂或清洗剂。

[0116] 制剂实施例7：

[0117] 按实施例1-7的方法，制备得化合1-7，按其与赋形剂重量比为3:1的比例加入赋形剂，制成涂抹剂或清洗剂。