



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115010598 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202210376380.3

C07C 51/47 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.11

C07C 51/48 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 3/10 (2006.01)

申请公布号 CN 115010598 A

A61K 31/19 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

(43) 申请公布日 2022.09.06

审查员 柴雅静

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650201 云南省昆明市盘龙区蓝黑路  
132号

(72) 发明人 邱明华 洪德福 胡贵林 周琳

李忠荣 王彦兵

(74) 专利代理机构 昆明祥和知识产权代理有限公司

53114

专利代理师 马晓青

(51) Int. Cl.

C07C 62/32 (2006.01)

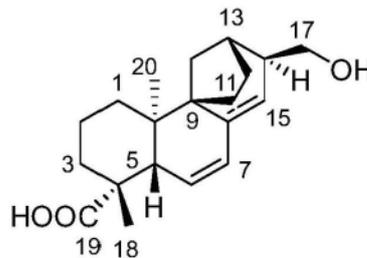
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

## (54) 发明名称

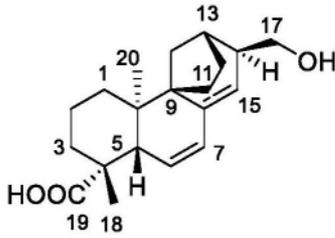
化合物Villanovane VI及其药物组合物与其制备方法和应用

## (57) 摘要

本发明提供一种对映-滨海孪生花烷型咖啡二萜(化合物Villanovane VI)及其药物组合物与其制备方法,与其在制备药物和食品中的应用。属于药物技术领域和食品技术领域。本发明的新化合物Villanovane VI对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性 $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) 为 $9.2 \pm 1.73$ , 化合物Villanovane VI对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性比一线临床 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制药物Acarbose更强。可作为药物用于治疗糖尿病相关的疾病。可用于降糖的健康产品。本发明的制备方法原料易得,易于操作,收率高,适于工业化生产。



1. 如下结构式所示的化合物Villanovane VI,



2. 权利要求1所述的化合物Villanovane VI的制备方法,其特征在于该方法包括下述步骤:取云南咖啡S288烘焙豆,粉碎,用3-5倍量甲醇加热回流提取二次,每次提取时间分别为10小时、3小时,合并提取液,减压回收溶剂得到浓缩浸膏MeOHE,将浸膏分散在水相中,依次用石油醚,乙酸乙酯进行萃取,分别得到两个部分浸膏PEE和AcOEtE;AcOEtE浸膏上正相硅胶柱,以体积比为15:1、10:1、2:1、1:1、1:4的石油醚/乙酸乙酯为流动相,和体积比为50:1、20:1、10:1、2:1、1:1、0:1的氯仿/甲醇为流动相,进行流份分段,得到八个组分段Fr.A→Fr.H;对Fr.B部分利用C18反相色谱柱,以体积比为70:30→0:100的水/甲醇进行流份分段,合并相同部分得到9个部分Fr.B-1→Fr.B-9,其中Fr.B-6部分利用正相硅胶柱色谱,以体积比为石油醚/乙酸乙酯4:1→0:1处理,分别得到6个部分Fr.B-6-1→Fr.B-6-6,Fr.B-6-4通过反相硅胶柱层析,乙腈/水45:55纯化,得单体化合物Villanovane VI。

3. 权利要求1所述的化合物Villanovane VI在制备治疗糖尿病药物中的应用。

4. 权利要求1所述的化合物Villanovane VI在制备降糖药物中的应用。

5. 含有权利要求1所述的化合物Villanovane VI及可药用载体的药物组合物。

6. 权利要求5所述的药物组合物的制备方法,其特征在于该方法包括下述步骤:取云南咖啡S288烘焙豆,粉碎,用3-5倍量甲醇加热回流提取二次,每次提取时间分别为10小时、3小时,合并提取液,减压回收溶剂得到浓缩浸膏MeOHE,将浸膏分散在水相中,依次用石油醚,乙酸乙酯进行萃取,分别得到两个部分浸膏PEE和AcOEtE;AcOEtE浸膏上正相硅胶柱,以体积比为15:1、10:1、2:1、1:1、1:4的石油醚/乙酸乙酯为流动相,和体积比为50:1、20:1、10:1、2:1、1:1、0:1的氯仿/甲醇为流动相,进行流份分段,得到八个组分段Fr.A→Fr.H;对Fr.B部分利用C18反相色谱柱,以体积比为70:30→0:100的水/甲醇进行流份分段,合并相同部分得到9个部分Fr.B-1→Fr.B-9,其中Fr.B-6部分利用正相硅胶柱色谱,以体积比为石油醚/乙酸乙酯4:1→0:1处理,分别得到6个部分Fr.B-6-1→Fr.B-6-6,Fr.B-6-4通过反相硅胶柱层析,乙腈/水45:55纯化,得单体化合物Villanovane VI,然后加入可药用载体。

7. 权利要求5所述的药物组合物在制备治疗糖尿病药物中的应用。

8. 权利要求5所述的药物组合物在制备降糖药物中的应用。

## 化合物Villanovane VI及其药物组合物与其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物技术领域,具体地,涉及一种对映-滨海孪生花烷型咖啡二萜(化合物Villanovane VI)及其药物组合物与其制备方法,与其在制备药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 咖啡二萜属于对映贝壳杉烷型的二萜,是咖啡中一类非常重要的次生代谢产物,两个主要成分为咖啡醇,咖啡豆醇,由于咖啡二萜类物质在咖啡中不可忽视的存在,一直有大量研究,包括新型咖啡二萜结构和活性功能。目前咖啡二萜类化合物抗肿瘤活性研究比较深,除了具有抗肿瘤活性外,还具有抗菌,抗病毒等活性。

[0003] 本发明人一直在咖啡二萜的新型结构及其活性上深度挖掘,将已经发表的咖啡二萜化合物和类似化合物的<sup>13</sup>C NMR,组建咖啡二萜数据库;再通过Python编写数据匹配语法(DATAAnalyte软件),进行粗提物的<sup>13</sup>C NMR与数据库对比,快速分析粗提物中主要的二萜化合物,对粗提物选择性纯化,快速发现并分离鉴定新活性二萜化合物。利用这一技术,从云南咖啡中发现了80多个新咖啡二萜类化合物,包括氧化型二萜、重排型二萜、呋喃型二萜、内酰胺型二萜、内酯型二萜、 $\Delta 4,18$ 型二萜、降解型二萜、维拉诺瓦型二萜和阿替生烷型二萜。最近邱明华研究团队从云南咖啡的烘焙豆中发现十个新颖的对映贝壳杉烷二萜衍生物。在活性研究中发现,其中四个对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶显示出中等抑制作用,在咖啡中含量最高的两类二萜Cafestol和Kahweol对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶不显示抑制作用,但十分有趣:咖啡二萜主成分对应Cafestol和Kahweol的脱水产物Dehydrocafestol和Dehydrokahweol显示出中等的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。该现象表明,在C-15和C-16之间的双键有利于发挥 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。通过分子对接实验深入研究了这些二萜衍生物发挥活性的可能机制。

[0004] 迄今为止,现有技术中未见有对新化合物Villanovane VI的报道,也未对其有活性和应用方面的报道。

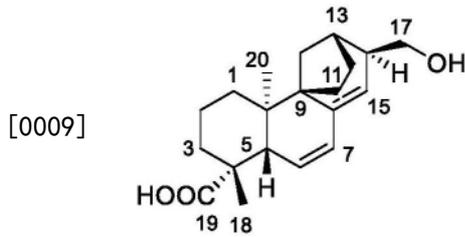
### 发明内容:

[0005] 本发明的目的在于提供一种新的对映-滨海孪生花烷型咖啡二萜及其药物组合物与其制备方法,与其在制备药物中的应用。

[0006] 本发明应用咖啡二萜NMR特征数据库的分析技术,从云南咖啡栽培品种S288熟豆中共分离鉴定了60个化合物,包括2种类型二萜新骨架,32个新化合物。对分离得到的咖啡二萜化学进行了 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性实验,结果表明:新化合物Villanovane VI,显示明显优于阿卡波糖中等的抑制活性。新化合物Villanovane VI结构属于对映-滨海孪生花烷型二萜,本发明还对分离鉴定的部分二萜的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,通过分子对接进行构型关系讨论。

[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] 如下结构式所示的化合物Villanovane VI,



[0010] 本发明同时提供了化合物Villanovane VI的制备方法,该方法包括下述步骤:取云南咖啡烘焙豆,粉碎,用3-5倍量甲醇加热回流提取二次,每次提取时间分别为10小时、3小时,合并提取液,减压回收溶剂得到浓缩浸膏MeOHE,将浸膏分散在水相中,依次用石油醚,乙酸乙酯进行萃取,分别得到两个部分浸膏PEE和AcOEtE;AcOEtE浸膏上正相硅胶柱,以体积比为15:1、10:1、2:1、1:1、1:4的石油醚/乙酸乙酯为流动相,和体积比为50:1、20:1、10:1、2:1、1:1、0:1的氯仿/甲醇为流动相,进行流份分段得到八个组分段Fr.A→Fr.H;对Fr.B部分利用C18反相色谱柱,以70:30→0:100的水/甲醇进行流份分段,合并相同部分得到9个部分Fr.B-1→Fr.B-9,其中Fr.B-6部分利用正相硅胶柱色谱,石油醚/乙酸乙酯4:1→0:1处理,分别得到6个部分Fr.B-6-1→Fr.B-6-6,Fr.B-6-4通过反相硅胶柱层析,乙腈/水45:55纯化,得单体化合物Villanovane VI。

[0011] 本发明还提供了化合物Villanovane VI在制备治疗糖尿病药物中的应用。

[0012] 化合物Villanovane VI在制备降糖药物中的应用。

[0013] 此外,本发明还提供了含有化合物Villanovane VI及可药用载体的药物组合物。

[0014] 药物组合物的制备方法:取云南咖啡烘焙豆,粉碎,用3-5倍量甲醇加热回流提取二次,每次提取时间分别为10小时、3小时,合并提取液,减压回收溶剂得到浓缩浸膏MeOHE,将浸膏分散在水相中,依次用石油醚,乙酸乙酯进行萃取,分别得到两个部分浸膏PEE和AcOEtE;AcOEtE浸膏上正相硅胶柱,以体积比为15:1、10:1、2:1、1:1、1:4的石油醚/乙酸乙酯为流动相,和体积比为50:1、20:1、10:1、2:1、1:1、0:1的氯仿/甲醇为流动相,进行流份分段得到八个组分段Fr.A→Fr.H;对Fr.B部分利用C18反相色谱柱,以70:30→0:100的水/甲醇进行流份分段,合并相同部分得到9个部分Fr.B-1→Fr.B-9,其中Fr.B-6部分利用正相硅胶柱色谱,石油醚/乙酸乙酯4:1→0:1处理,分别得到6个部分Fr.B-6-1→Fr.B-6-6,Fr.B-6-4通过反相硅胶柱层析,乙腈/水45:55纯化,得单体化合物Villanovane VI,然后加入可药用载体。

[0015] 药物组合物在制备治疗糖尿病药物中的应用。

[0016] 药物组合物在制备降糖药物中的应用。

[0017] 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。

[0018] 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。本发明的药物可经多种形式(液体制剂、固体制剂、注射剂、外用制剂、喷剂、复方制剂)给药。

[0019] 与现有技术相比,本发明具备如下的优益性:

[0020] 1.本发明提供了新化合物Villanovane VI,填补了现有技术的空白。

[0021] 2.本发明提供了制备新化合物Villanovane VI的方法,该方法原料易得,易于操作,收率高,适于工业化生产。

[0022] 3.本发明提供了新化合物Villanovane VI作为有效成分的药物组合物,为新的抗肿瘤药物提供了具有较好药用作用的新的药物。

[0023] 4.本发明的新化合物Villanovane VI对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性 $IC_{50}$  ( $\mu$ M)为 $9.2 \pm 1.73$ ,化合物Villanovane VI对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性比一线临床 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制药物Acarbose更强。

[0024] 5.新化合物Villanovane VI可作为药物用于治疗糖尿病相关的疾病。

#### 附图说明:

[0025] 图1 Villanovane VI的制备工艺流程;

[0026] 图2 Villanovane VI与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶蛋白分子对接结果;

[0027] 图3化合物Villanovane VI的化学结构示意图。

#### 具体实施方式:

[0028] 下面结合附图,用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来既定本发明。

[0029] 实施例1

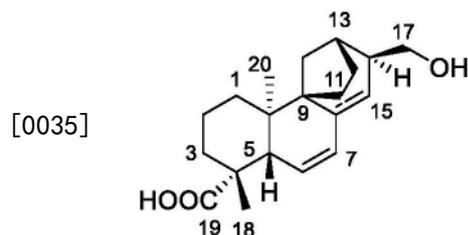
[0030] 一种对映-滨海孪生花烷型咖啡二萜(化合物Villanovane VI)的制备:

[0031] 取云南咖啡S288烘焙豆定量,将烘焙豆粉碎之后用3-5倍量甲醇加热回流提取二次,每次提取时间分别为10小时、3小时,合并提取液,减压回收溶剂得到浓缩浸膏MeOHE(得率20%-25%),将浸膏分散在水相中,依次用石油醚,乙酸乙酯进行萃取,分别得到两个部分浸膏PEE和AcOEtE(得率6%-8%)。

[0032] AcOEtE浸膏上正相硅胶柱,以石油醚/乙酸乙酯为流动相(15:1、10:1、2:1、1:1、1:4, v/v)和氯仿/甲醇为流动相(50:1、20:1、10:1、2:1、1:1、0:1, v/v)进行流份分段得到八个组分段(Fr.A $\rightarrow$ Fr.H)。对Fr.B(得率0.2%-0.3%)部分利用C18反相色谱柱,以水/甲醇(70:30 $\rightarrow$ 0:100, v/v)进行流份分段合并相同部分得到9个部分(Fr.B-1 $\rightarrow$ Fr.B-9)。其中Fr.B-6部分(得率0.1%-0.15%)利用正相硅胶柱色谱(石油醚/乙酸乙酯,4:1 $\rightarrow$ 0:1, v/v)处理,分别得到6个部分(Fr.B-6-1 $\rightarrow$ Fr.B-6-6)。Fr.B-6-4通过反相硅胶柱层析(乙腈/水,45:55)纯化即得到单体化合物Villanovane VI(得率0.02%-0.04%)。

[0033] 化合物Villanovane VI制备工艺流程:根据实验总结,目标活性分子Villanovane VI的制备工艺流程归纳如图1。目标活性分子Villanovane VI的结构表征:

[0034] 1)化合物Villanovane VI的化学结构:



[0036] 2)化合物Villanovane VI的结构表征。

[0037] Villanovane VI: 白色无定形粉末。[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>28</sup> 96.54 (c 0.26, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ): 243.0(4.01), 196.0(4.02); HRESIMS m/z 339.1931 [M+Na]<sup>+</sup> 给出分子式 C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> (计算值: C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 339.1931);。

[0038] <sup>1</sup>H NMR (CH<sub>3</sub>OD, 600MHz, J in Hz)  $\delta_{\text{H}}$ : 1.50 (1H, m, H-1a), 1.56 (1H, m, H-1b), 1.54 (1H, m, H-2a), 1.93 (1H, m, H-2b), 1.09 (1H, m, H-3a), 2.21 (1H, m, H-3b), 2.11 (1H, d, J=10.2Hz, H-5), 6.11 (1H, d, J=10.2Hz, H-6), 5.88 (1H, dd, d, J=3, 10.2Hz, H-7), 1.33 (1H, m, H-11a), 1.85 (1H, m, H-11b), 1.66 (2H, m, H-12), 2.39 (1H, m, H-13), 1.58 (1H, m, H-14a), 1.76 (1H, m, H-14b), 5.17 (1H, brs, H-15), 2.63 (1H, m, H-16), 3.50 (2H, d, J=8.4Hz, H-17), 1.30 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-20), xx (1H, s, COOH)。

[0039] <sup>13</sup>C NMR (CH<sub>3</sub>OD, 150MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 32.2 (CH<sub>2</sub>, C-1), 20.5 (CH<sub>2</sub>, C-2), 38.7 (CH<sub>2</sub>, C-3), 44.5 (C, C-4), 52.2 (CH, C-5), 128.4 (CH, C-6), 126.7 (CH, C-7), 144.7 (C, C-8), 53.8 (C, C-9), 39.1 (C, C-10), 32.9 (CH<sub>2</sub>, C-11), 24.2 (CH<sub>2</sub>, C-12), 35.9 (CH, C-13), 36.6 (CH<sub>2</sub>, C-14), 123.2 (CH, C-15), 47.9 (CH, C-16), 64.4 (CH<sub>2</sub>, C-17), 30.0 (CH<sub>3</sub>, C-18), 181.2 (C, C-19), 17.5 (CH<sub>3</sub>, C-20)。

[0040] 实施例2

[0041] 化合物Villanovane VI与对照的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性试验:

[0042] 1) 实验原理

[0043]  $\alpha$ -葡萄糖苷酶能催化 $\alpha$ -1,4-糖苷键水解,使小肠内麦芽糖、蔗糖等寡糖水解。抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性,可使葡萄糖的生成及吸收减缓,降低餐后血糖峰值,调整血糖水平。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂已成为近年来药物化学的研究热点。4-硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside,PNPG)是 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的特异性底物,PNPG能被 $\alpha$ -葡萄糖苷酶水解产生对硝基苯酚(黄色),该产物在405nm有特征吸收。通过对比本发明化合物Villanovane VI加入前后体系中对硝基苯酚的生成量,即可测定化合物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。实验选用阿卡波糖(Acarbose)为阳性对照。

[0044] 2) 实验方法

[0045] i) 溶液配制

[0046] a) 磷酸盐缓冲液PBS (pH=6.86): 混合磷酸盐粉末加入500mL容量瓶中,加入无CO<sub>2</sub>蒸馏水至刻度,溶解摇匀后4℃保存备用。

[0047] b) 底物溶液PNPG (2.5mM): 精密称取PNPG共37.6mg,用上述PBS定容到50mL,溶解摇匀后4℃保存备用。

[0048] c)  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液 (1U/mL): 精密称取2.3mg (26U/mg) 葡萄糖苷酶粉末,用上述PBS溶解配制到10U/mL,10U/mL管分装,于-20℃下保存备用。每次使用时再用PBS稀释10倍。

[0049] d) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液 (0.2M): 称取无水Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末2.12g置于100mL容量瓶中,用上述PPBS定容到100mL,溶解摇匀后4℃保存备用。

[0050] e) 样品溶液: 单体化合物母液配制浓度20 $\mu$ mol/mL,阳性药母液配制浓度20 $\mu$ mol/mL。测定时将母液稀释到相应的倍数。

[0051] ii)  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

[0052] 样品组: 96孔板中依次添加40 $\mu$ L PBS缓冲液,10 $\mu$ L样品溶液,10 $\mu$ L $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液,于37℃预孵育10min,后加入50 $\mu$ L PNPG溶液,于37℃孵育60min,最后加入80 $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶

液。

[0053] 背景组:96孔板中依次添加50μL PBS缓冲液,10μL样品溶液,于37℃预孵育10min,后加入40μL PNPG溶液,于37℃孵育60min,最后加入80μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液。

[0054] 对照组:96孔板中依次添加40μL PBS缓冲液,10μL阿卡泼糖溶液,于37℃预孵育10min,后加入40μL PNPG溶液,于37℃孵育60min,最后加入80μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液。

[0055] 每组实验平行做三次,在酶标仪中检测405nm处的吸光度,根据以下公式计算出样品的酶抑制率: $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率% =  $(OD_{背景} - OD_{样品}) / OD_{背景} \times 100\%$ 。

[0056] 结果:

[0057] 化合物Villanovane VI对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的IC<sub>50</sub>

[0058] Villanovane VI IC<sub>50</sub> (μM) 9.2±1.73

[0059] 同实验中Acarbose IC<sub>50</sub> (μM) 60.71±16.45

[0060] 实验结果表明:化合物Villanovane VI对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性比一线临床 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制药物Acarbose更强。

[0061] 活性化合物分子对接结果:

[0062] 化合物Villanovane VI与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶蛋白分子对接结果(图2),发现Villanovane VI的C-19上的羰基分别与TRP81(3.1 Å, 3.3 Å,)和ASP64(2.8 Å)形成氢键。

[0063] 制剂实施例:

[0064] 1.取化合物Villanovane VI,按其与赋形剂重量比1:1的比例加入赋形剂,制粒压片。

[0065] 2.取化合物Villanovane VI,按其与赋形剂重量比1:2的比例加入赋形剂,制粒压片。

[0066] 3.取化合物Villanovane VI,按常规胶囊制剂方法制成胶囊。

[0067] 4.取化合物Villanovane VI,再按下述方法制成片剂:

片剂: 化合物 100 mg

淀粉 适量

[0068] 玉米浆 适量

硬脂酸镁 适量

[0069] 5.胶囊剂:取化合物Villanovane VI 100mg,淀粉适量,硬脂酸模适量,制备方法:将化合物与助剂混合,过筛,在合适的容器中均匀混合,把得到的混合物装入硬明胶胶囊。

[0070] 6.取化合物Villanovane VI 1份,10份植脂末,混匀,按照常规方法制成固体饮料。

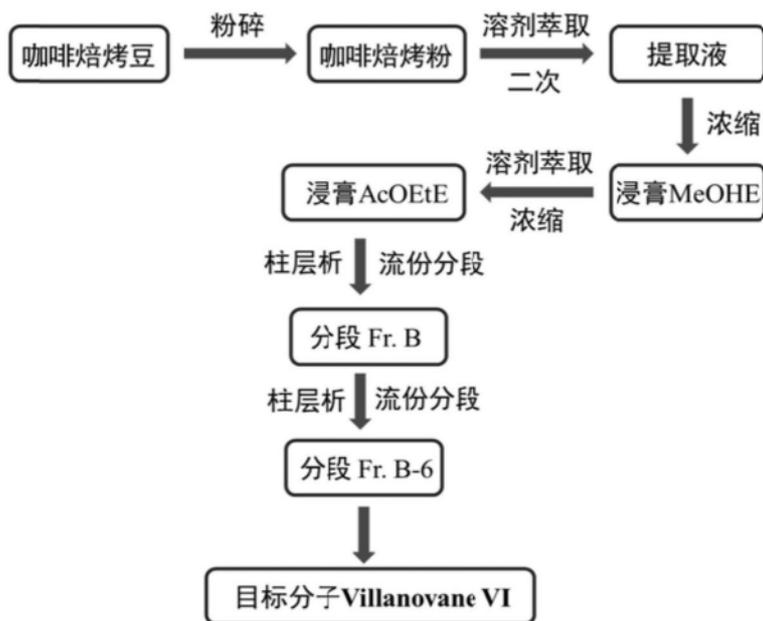


图1

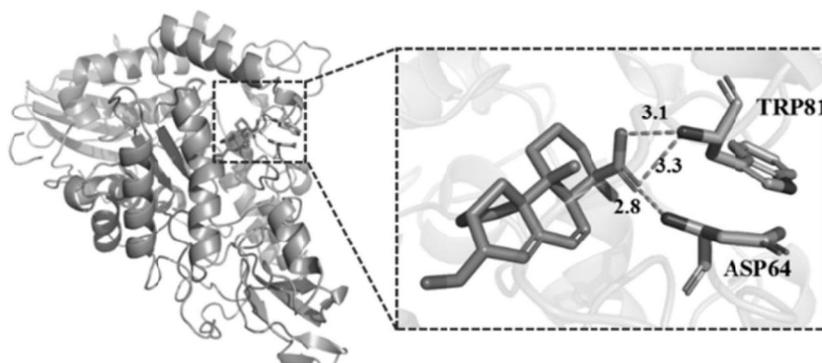


图2

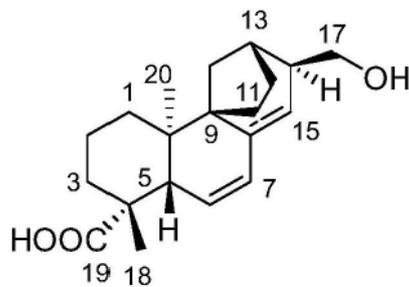


图3