



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102093453 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201110042057. 4

魏均娴等. 三七花皂甙元的研究. 《中国中药杂志》. 1984, 第 09 卷 (第 05 期), 全文.

(22) 申请日 2006. 08. 07

审查员 严华

(62) 分案原申请数据

200610047404. 1 2006. 08. 07

(73) 专利权人 辽宁新中现代医药有限公司

地址 110043 辽宁省沈阳市大东区东塔街 1 号

(72) 发明人 赵余庆 关健 孙宝山

(74) 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司 21207

代理人 李宇彤

(51) Int. Cl.

C07J 9/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

史公良等. 人参稀有抗肿瘤皂苷制备方法的研究. 《中国现代中药》. 2006, 第 08 卷 (第 06 期), 全文.

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β , 12 β , 20-三醇的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种结构式为原人参二醇衍生物 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β , 12 β , 20-三醇 [简称 20(R)-25-OH-PPD] 的制备方法。人参总皂苷水解的方法获得了如上原人参二醇衍生物, 其中人参皂苷水解方法包括碱水解法、酸水解 I 法和酸水解 II 法。并经核磁共振光谱确定了其结构。该方法收率高、纯度高, 产品质量稳定, 可实现工业生产, 能满足用于新型抗肿瘤药物的开发需要。

1. 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇的制备方法,其特征在于:称取三七总皂苷 10g,溶于 1000ml 浓盐酸和 1000ml 乙醇混合溶液中超声,超声条件:频率:50kHz;功率:3KW;时间:10 分钟;在温度 40℃水解 12h,用 5mol/L 氢氧化钠中和反应液,减压回收甲醇,用乙醚萃取反应液,萃取液经水洗、无水硫酸钠干燥、蒸干收集残余物,经硅胶柱层析分离,氯仿:甲醇=30:1-5:1 梯度洗脱得 7 个流分,流分 4 经乙酸乙酯重结晶后,得 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇白色结晶,收率 1.6%。

2. 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇的制备方法,其特征在于:称取人参总皂苷 10g,溶于 1000ml 硫酸浓度为 3.0mol/L、浓度为 80%的乙醇水溶液中超声,超声条件:频率:50kHz;功率:3KW;时间:60 分钟;在温度 40℃水解 8h,然后加水沉淀,水洗至中性的沉淀经硅胶柱层析分离,氯仿:甲醇=30:1-5:1 梯度洗脱得 7 个流分,流分 4 经乙酸乙酯重结晶后,得 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇白色结晶,收率 1.8%。

3. 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇的制备方法,其特征在于:称取人参总皂苷 10g,溶于 1000ml 磷酸浓度为 8.5mol/L、浓度为 80%的甲醇水溶液中超声,超声条件:频率:50kHz;功率:3KW;时间:60 分钟;在温度 40℃ 24h,用 2.5mol/L 氢氧化钠中和反应液,减压回收甲醇,用氯仿萃取反应液,氯仿相经水洗、无水硫酸钠干燥、蒸干收集残余物,经硅胶柱层析分离、氯仿:甲醇=30:1-5:1 梯度洗脱、乙酸乙酯重结晶后,得 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇白色结晶,收率 1.6%。

20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇的制备方法

[0001] 本申请是辽宁新中现代医药有限公司 2006 年 8 月 7 日申请的申请号为 200610047404.1,发明名称为“20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇的制备方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及结构式一种原人参二醇衍生物 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇 [简称 20(R)-25-OH-PPD] 的制备方法。其制备方法包括 A:硅胶层析法;B:碱水解法,经过酸中和、有机溶剂萃取及硅胶柱层析分离后得到 20(R)-25-OH-PPD 白色结晶;C、酸水解 I 法,经过碱中和、有机溶剂萃取及硅胶柱层析分离后得到 20(R)-25-OH-PPD;D、酸水解 II 法,加水沉淀,水洗至中性的沉淀经硅胶柱层析分离后得到 20(R)-25-OH-PPD 白色结晶。

背景技术

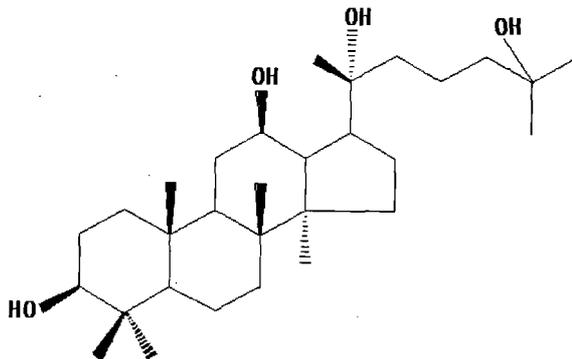
[0003] 1979 年,日本学者 Odashima 等人发现人参皂苷 Rh₂ 在体外能抑制肺癌细胞 3LL(小鼠)、莫里斯肝细胞(兔子)、B-16 恶性肿瘤(小鼠)和 HELA 细胞(人)的增殖,并证明人参皂苷能引起癌细胞向正常细胞转化。1991 年,日本学者 Kikuchi 等人报道,给裸鼠口服人参皂苷 Rh₂ 可明显抑制人类卵巢癌(HRA)的增生。小鼠的生存率显著上升(对照组 124 天,治疗组 198 天)1995-1996 年,日本学者 Kitagawa 等人报道,人参皂苷 Rg₃ 可以抑制由 bombesin 所致大鼠肠癌腹腔内转移的作用。Azuma 等报道了 20(S)、20(R) 人参皂苷 Rg₃ 和 Rb₂ 在体内体外对 B16-BL6 肿瘤细胞在肺部的转移有抑制作用。1998 年,日本学者 Nakata 等人报道,口服人参皂苷 Rh₂(0.4-1.6mg/kg/天)不仅可以抗 HRA 肿瘤,而且可延长裸鼠生存期(对照组 60 天,治疗组 85 天)。天然皂苷肠道菌群代谢转化的研究表明:由于肠道菌群对糖苷键的水解能力极强,大多数天然皂苷入血成分为其次级苷或苷元。多种天然二醇组人参皂苷均报道有抗肿瘤作用,包括:Rg₃, Rh₂, Rb₁ 等等。这些皂苷最终体内代谢产物均为 Compound K(以下简称 C-K)或原人参二醇(以下简称 PPD)。由此,人们联想:是否 C-K 或原人参二醇为二醇组人参皂苷抗肿瘤的活性代谢产物。换言之,Rg₃, Rh₂ 可能为抗肿瘤天然前体药物。因此,探讨 C-K 或原人参二醇的抗肿瘤作用有可能会较 Rg₃ 或 Rh₂ 具有更大的价值。但由于 C-K 和原人参二醇大量获取的困难,有关这两个化合物的临床前评价尚未见系统报道。2001 年 11 月份,在韩国召开人参皂苷抗肿瘤国际学术研究会,会上,日本著名学者柴田承二作了有关人参皂苷及三萜皂苷抗肿瘤活性的综述报告。二醇组皂苷和原人参二醇衍生物的抗肿瘤的临床价值已引起高度重视。

[0004] 综上所述,人参皂苷 Rg₃、Rh₂ 和原人参二醇衍生物,均有作为潜在抗肿瘤药物开发的可能性,但这些皂苷天然含量极低,例如:Rg₃ 在白参中的含量仅为 0.0003%,在红参中的含量约为 0.03%,而 Rh₂ 和 20(R)-羟基-3 β ,12 β ,20,25-三醇在天然人参中并不存在,仅在红参中含有 Rh₂ 约 0.001%。而原人参二醇和其衍生物的含量更为稀少。因此,采用化学

方法或生物学方法转化上述稀有人参皂苷将具有重要意义。

[0005] 20(R)-25-OH-PPD 化学结构式如下所示：

[0006]



发明内容

[0007] 本发明的目的是提供 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇的制备方法。

[0008] 本发明的目的是这样实现的：

[0009] A、硅胶层析法,用 70%乙醇提取、大孔吸附树脂纯化后的人参果总皂苷,经氯仿萃取、硅胶柱层析及反相硅胶柱层析分离后得到 20(R)-25-OH-PPD,收率 0.1-1.0%。

[0010] B、碱水解法,即将人参总皂苷溶解于碱性有机溶剂中进行碱水解,然后经过酸中和、有机溶剂萃取及硅胶柱层析分离后得到 20(R)-25-OH-PPD 白色针状结晶,收率 1-50%。

[0011] C、酸水解 I 法:人参总皂苷溶解于酸性水溶液中进行超声酸水解,然后经过碱中和、有机溶剂萃取及硅胶柱层析分离后得到 20(R)-25-OH-PPD 白色针状结晶,收率 1-50%。

[0012] D、酸水解 II 法:即人参总皂苷溶解于酸性有机溶液中进行超声酸水解,然后加水沉淀,水洗至中性的沉淀经硅胶柱层析分离后得到 20(R)-25-OH-PPD,收率 1-80%。

[0013] E、微生物水解法:利用微生物菌株在水溶液中水解人参总皂苷,反应产物去除微生物后,经大孔吸附树脂柱纯化、硅胶柱层析后得到 20(R)-25-OH-PPD,收率 1-80%；

[0014] F、采用核磁共振光谱法对所得 20(R)-25-OH-PPD 进行结构鉴定。

[0015] 上述白色针状晶体,熔点 252-254 $^{\circ}$ C (EtOAc), EI-MS(m/z):478,分子式为 C₃₀H₅₄O₄; ¹³C-NMR 给出 4 个羟基碳的化学位移分别为 79.5(C-3),71.9(C-12),74.7(C-20),71.5(C-25)。C-17(51.3),C-21(22.4),C-22(44.0) 化学位移表明化合物 1 的 C-20 构型为 R。¹³C-NMR 中其它碳的化学位移为:40.3(C-1),28.0(C-2),40.0(C-4),57.3(C-5),18.9(C-6),35.9(C-7),40.9(C-8),50.9(C-9),38.2(C-10),32.0(C-11),49.5(C-13),52.6(C-14),32.0(C-15),27.1(C-16),16.3(C-18-CH₃),6.8(C-19-CH₃),19.4(C-23),45.4(C-24),29.4(C-26-CH₃),29.1(C-27-CH₃),28.6(C-28-CH₃),16.2(C-29-CH₃),17.4(C-30-CH₃)。由此鉴定化合物的结构为 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇 [20(R)-25-OH-PPD]。

[0016] 我们利用硅胶层析法和人参总皂苷水解的方法获得了一种原人参二醇衍生物,并采用核磁共振光谱法确定它的化学结构为 20(R)-25-羟基-达玛烷型-3 β ,12 β ,20-三醇 [20(R)-25-OH-PPD]。20(R)-25-OH-PPD。经药效学试验体内 3 种人肿瘤细胞的抗癌试验结

构证明 20(R)-25-OH-PPD 具有较强的抗肿瘤活性。与人参皂苷 Rg_3 对比它们的抑制肿瘤细胞的作用优于人参皂苷 $-Rg_3$ 。该制备 20(R)-25-OH-PPD 的方法收率、纯度高,产品质量稳定,可实现工业生产,能满足用于新型抗肿瘤药物的开发需要。

具体实施方式

[0017] 下面结合实施例对本发明做进一步说明。

[0018] 实施例 1:硅胶层析法制备得到 20(R)-25-OH-PPD

[0019] 5kg 干燥的五加科人参属植物新鲜人参果用 70%乙醇提取后,通过 D101 大孔吸附树脂柱后(由天津化学有限公司提供),水洗后用 70%乙醇从柱中洗脱将其分离纯化、干燥后获得人参果总皂苷。取人参果总皂苷 10g,用氯仿萃取,氯仿萃取物进行硅胶柱层析分离,氯仿:甲醇(30:1-5:1)梯度洗脱得 7 个流分,流分 5 经反相硅胶柱层析分离、乙腈:水(80:20)洗脱、乙酸乙酯重结晶后得到 20(R)-25-OH-PPD,收率 0.18%。

[0020] 实施例 2:碱解法制备得到 20(R)-25-OH-PPD

[0021] 称取人参总皂苷 10g,溶解于 1000ml 95%乙醇溶液中,滤过,除去不溶物,得到滤液。将配制好的 0.5% (W/V) 氢氧化钠乙醇溶液在搅拌下加入到上述滤液中,静止,滤过,水洗沉淀至中性。干燥后的沉淀经硅胶柱层析分离,石油:乙酸乙酯(30:1-1:1)梯度洗脱得 8 个流分,流分 5 经乙酸乙酯重结晶后,得 20(R)-25-OH-PPD 白色结晶,收率 1.2%。

[0022] 实施例 3:氢氧化钠水解法制备 20(R)-25-OH-PPD

[0023] 称取人参果总皂苷 10g,溶于 1000ml 氢氧化钠浓度为 2.5mol/L、浓度为 80%的甲醇水溶液中水解 24h,用 2.5mol/L 盐酸中和反应液,减压回收甲醇,用氯仿萃取反应液,氯仿相经水洗、无水硫酸钠干燥、蒸干收集残余物,经硅胶柱层析分离、石油:乙酸乙酯(50:1-2:1)梯度洗脱得 8 个流分,流分 5 经乙酸乙酯重结晶后,得 20(R)-25-OH-PPD 白色结晶,收率 1.4%。

[0024] 实施例 4:氢氧化钾水解法制备 20(R)-25-OH-PPD

[0025] 称取西洋参果总皂苷 10g,溶解于 1000ml 甲醇溶液中,滤过,除去不溶物,得到滤液。将配制好的 0.45% (W/V) 氢氧化钾乙醇溶液在搅拌下加入到上述滤液中,静止,滤过,收集沉淀。水洗沉淀至中性。干燥后的沉淀经硅胶柱层析分离、石油:丙酮(10:1-1:1)梯度洗脱得到 7 个流分,流分 4 经乙酸乙酯重结晶后,得 20(R)-25-OH-PPD 白色结晶,收率 1.5%。

[0026] 实施例 5:盐酸水解法制备得到 20(R)-25-OH-PPD

[0027] 称取西洋参叶总皂苷 10g,溶于 1000ml 盐酸浓度为 2.5mol/L、浓度为 80%的乙醇水溶液中超声,超声条件:频率:50kHz;功率:3KW;时间:30 分钟;在温度 40℃水解 12h,用 2.5mol/L 氢氧化钠中和反应液,减压回收甲醇,用氯仿萃取反应液,氯仿相经水洗、无水硫酸钠干燥、蒸干收集残余物,经硅胶柱层析分离、石油:丙酮(10:1-1:1)梯度洗脱得 7 个流分,流分 4 经乙酸乙酯重结晶后,得 20(R)-25-OH-PPD 白色结晶,收率 1.7%。

[0028] 实施例 6:酸解法制备得到 20(R)-25-OH-PPD

[0029] 称取三七叶总皂苷 10g,溶于 1000ml 浓盐酸和 1000ml 乙醇混合溶液中超声,超声条件:频率:50kHz;功率:3KW;时间:10 分钟;在温度 40℃水解 12h,用 5mol/L 氢氧化钠中和反应液,减压回收甲醇,用乙醚萃取反应液,萃取液经水洗、无水硫酸钠干燥、蒸干收集残

余物,经硅胶柱层析分离,氯仿:甲醇(30:1-5:1)梯度洗脱得7个流分,流分4经乙酸乙酯重结晶后,得20(R)-25-OH-PPD白色结晶,收率1.6%。

[0030] 实施例7:硫酸水解法制备20(R)-25-OH-PPD

[0031] 称取人参总皂苷10g,溶于1000ml硫酸浓度为3.0mol/L、浓度为80%的乙醇水溶液中超声,超声条件:频率:50kHz;功率:3KW;时间:60分钟;在温度40℃水解8h,然后加水沉淀,水洗至中性的沉淀经硅胶柱层析分离,氯仿:甲醇(30:1-5:1)梯度洗脱得7个流分,流分4经乙酸乙酯重结晶后,得20(R)-25-OH-PPD白色结晶,收率1.8%。

[0032] 实施例8:磷酸水解法制备20(R)-25-OH-PPD

[0033] 称取人参总皂苷10g,溶于1000ml磷酸浓度为8.5mol/L、浓度为80%的甲醇水溶液中超声,超声条件:频率:50kHz;功率:3KW;时间:60分钟;在温度40℃24h,用2.5mol/L氢氧化钠中和反应液,减压回收甲醇,用氯仿萃取反应液,氯仿相经水洗、无水硫酸钠干燥、蒸干收集残余物,经硅胶柱层析分离、氯仿:甲醇(30:1-5:1)梯度洗脱、乙酸乙酯重结晶后,得20(R)-25-OH-PPD白色结晶,收率1.6%。

[0034] 实施例9:微生物水解法制备20(R)-25-OH-PPD

[0035] 将纯化后的微生物菌株头孢霉菌G0405(*Cephalosporium* sp.)[由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为CGMCC1703],接种到含有10g三七总皂苷(含量大于80%)的水溶液中,在温度30℃,摇床转速160r·min⁻¹,自然pH值条件下转化3d。反应产物去除微生物后,经大孔吸附树脂柱纯化、硅胶柱层析分离、氯仿:甲醇(30:1-5:1)梯度洗脱、乙酸乙酯重结晶后,得20(R)-25-OH-PPD白色结晶,收率1.0%。