

抗肿瘤有效成分 20(R)-25-OCH₃-原人参二醇的结晶法分离

张赛楠¹, 赵余庆^{1,2*}

1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 从 25-OCH₃-原人参二醇 (25-OCH₃-PPD) 非消旋体混合物中分离得到抗肿瘤有效成分 20(R)-25-OCH₃-PPD (AD-1)。方法 采用结晶法拆分 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物中的 AD-1, 并对所用溶剂的种类、用量及结晶温度等分离条件进行了优化, 探讨溶剂的介电常数和 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物的 *S/R* 比例间的关系。结果 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物 (*R*: 59.34%; *S*: 38.35%), 在最优条件下, 丙酮 26 mL、4 °C 时, 可以获得 AD-1 的产率与纯度分别为 38.76%、97.83%。结论 溶剂的电解质范围在 20.7 左右, 低饱和度的溶剂以及低温有利于 AD-1 的分离。

关键词: 结晶; 非消旋体混合物; 25-OCH₃-原人参二醇; 20(R)-25-OCH₃-原人参二醇; 介电常数; 抗肿瘤

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2014)06 - 0770 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.005

Crystallization separation of antitumor constituent 20(R)-25-OCH₃-PPD

ZHANG Sai-nan¹, ZHAO Yu-qing^{1,2}

1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Key Laboratory of Structure-based Drug Design and Discovery, Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To separate antitumor constituent AD-1 [20(R)-25-OCH₃-protopanaxadiol (PPD)] from non-racemic enantiomeric mixture. **Methods** A crystallization method has been developed to separate AD-1 from 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture, the sorts and amount of solvent and crystallization temperature were optimized to obtain the best separative conditions, and the relationship between the *S/R* percentage of 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture and dielectric constant of the solvent was discussed. **Results** Under the optimized conditions (acetone 26 mL, 4 °C), the yield and purity of AD-1 crystals are 38.76% and 97.83% from 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture (*R*: 59.34%; *S*: 38.35%), respectively. **Conclusion** The ϵ values of solvents are about 20.7, and an unsaturated solution and low temperature are beneficial to the separation of AD-1 from 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture.

Key words: crystallization; non-racemic enantiomeric mixture; 25-OCH₃- protopanaxadiol; 20(R)-25-OCH₃- protopanaxadiol; dielectric constant; antitumor

25-OCH₃-原人参二醇 (25-OCH₃-PPD) 是从三七的茎叶与人参果实中分离得到一种新型的达玛烷型的三萜皂苷^[1-2]。25-OCH₃-PPD 同其他的人参皂苷相比具有显著的细胞毒性^[1]。在几种人癌细胞系中, 20(*S*)-25-OCH₃-PPD 的 IC₅₀ 值同人参皂苷 Rg₃ 相比增强了 10~100 倍, 同时 20(*R*)-25-OCH₃-PPD (AD-1) (结构见图 1) 在细胞系 Colon205、A549 中显示出比 20(*S*)-25-OCH₃-PPD 更强的细胞毒性^[1-2]。Zhang 等^[3]研究了 20(*S*)-25-OCH₃-PPD 药物动力学

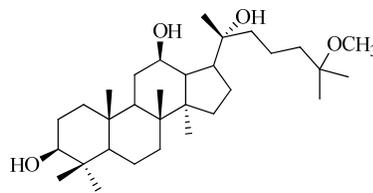


图 1 AD-1 的结构

Fig.1 Structure of AD-1

以及口服和静脉给药后在大鼠体内的活性代谢产物。然而, 在大量制备 AD-1 的过程中产生了非消旋体

收稿日期: 2013-12-16

基金项目: “十一五”国家重大新药创制项目 (2009ZX09102-114); 中药标准提取物的工业化色谱制备平台建设 (2009ZX09301-012-105B); 国家自然科学基金资助项目 (81273389)

作者简介: 张赛楠 (1987—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物分析。E-mail xmze2012@163.com

*通信作者 赵余庆 Tel: (024)23986521 E-mail: zyq4885@126.com

混合物 [AD-1、20(S)-25-OCH₃-PPD]。目前有关构型异构体的拆分文献报道有很多方法,例如经典结晶法、化学拆分法、动力学拆分法、生物拆分法、色谱拆分、手性液-液萃取拆分法、膜分离法^[4],通过高成本的制备高效液相色谱法可以将25-OCH₃-PPD非消旋混合物进行分离,但本实验采用具有低成本、操作简单和所得产物为固体的优势的结晶方法进行了分离。与此同时,结晶法作为一种相对经典且成熟的方法,已经被广泛的应用在精细化工、制药和食品等领域。Wang等^[5]利用直接结晶法联合色谱技术拆分了外消旋化合物心得安;李鹏等^[6]报道用乙醇溶液中溶解度的差异,并借助沉淀和结晶手段,从而实现人参皂苷 Rg₃ 构型异构体的分离。

本实验考察溶剂的种类、用量以及结晶温度等因素对从25-OCH₃-PPD非消旋体混合物中分离AD-1的影响,探讨了溶剂的介电常数和25-OCH₃-PPD非消旋体混合物的S/R的比例间的关系,从而优化分离AD-1的条件,实现实验室条件下的AD-1分离。

1 仪器与材料

BS124S Sartorius 分析天平; BCD-139AC 冰箱

(中国美的公司); K501 KNAUER 高效液相色谱仪(德国诺尔); 蒸发光散射检测器(上海通微分析技术有限公司)。

25-OCH₃-PPD非消旋体混合物(R: 59.34%; S: 38.35%)、AD-1对照品(经HPLC检测质量分数>98%,本实验室自制)。甲醇(色谱纯、分析纯),纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agela Venusil MP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(87:13); 体积流量为1.0 mL/min; 柱温35℃; 进样量10 μL。

2.2 溶剂类型的影响

分别精密量取各溶剂5 mL,置于锥形瓶中,加入25-OCH₃-PPD非消旋体混合物,在45℃下溶解,直至其形成近饱和溶液,放冷,静置15 d。结晶所得产物在50℃挥干,称定质量,基于25-OCH₃-PPD非消旋体混合物计算产率。后经0.45 μm滤膜滤过后,用HPLC分析其S/R比例。结果表明(表1、图2)^[7],采用丙酮为溶剂时目标物的量较高。

表1 25-OCH₃-PPD非消旋体混合物在不同溶剂中的分离

Table 1 Resolution of 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture in different solvents

编号	溶剂	介电常数	样品量 ^a /g	产率 ^b /%	S/R比例
1	醋酸乙酯	6.0	0.134 1	60.28	36.89/61.25
2	二氯甲烷	8.9	10.397 0	98.54	40.17/58.74
3	异丙醇	18.3	0.279 7	—	—
4	丙酮	20.7	0.132 4	42.22	20.41/77.57
5	95%乙醇	26.7	1.009 6	17.28	28.39/70.28
6	甲醇	33.0	1.042 8	86.78	39.26/59.04

^a在45℃的条件下达到近饱和溶液时所需的最小样品量; ^b产率是基于25-OCH₃-PPD非消旋体混合物进行计算

^aSample amount is minimum amount to obtain a nearly saturated solution at 45℃; ^bYield is calculated based on 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture

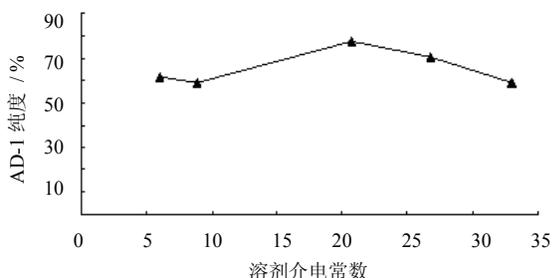


图2 溶剂的介电常数与AD-1纯度的关系

Fig. 2 Relationship between purity of AD-1 and dielectric constant of solvent used in resolution

2.3 溶剂用量的影响

基于“2.2”项下溶剂的选择,精密称取25-OCH₃-PPD非消旋体混合物0.5 g,置于锥形瓶中,向其中分别加入丙酮24、26、29、31 mL,超声溶解,室温下放置15 d,母液中析出产物,50℃挥干,称定质量,基于25-OCH₃-PPD非消旋体混合物中的AD-1的量计算产率。后经0.45 μm滤膜滤过后,用HPLC分析其S/R比例。结果见表2。

2.4 结晶温度的影响

基于“2.2”和“2.3”项下溶剂类型与溶剂用量的选择,精密称取25-OCH₃-PPD非消旋体混合物

0.5 g, 置于锥形瓶中, 向其中分别加入丙酮 26 mL, 超声溶解, 为使得利用结晶分离非消旋体混合物可以应用于大量制备, 本实验在常用的温度 4、25 °C 条件下进行, 放置 15 d, 母液中得产物, 在 50 °C 挥干, 称定质量, 基于 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物中的 AD-1 计算产率。后经 0.45 μm 滤膜滤过后, 用 HPLC 分析其 *S/R* 比例。结果见表 3。

表 2 溶剂用量的影响

Table 2 Effect of solvent amount

丙酮用量 / mL	产率 ^a / %	<i>S/R</i> 比例
24	77.91	20.80/76.66
26	48.84	2.624/87.09
29	20.63	3.015/95.80
31	5.34	1.391/97.42

^a产率是基于 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物中的 AD-1 的量进行计算

^aYield is calculated based on AD-1 of 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture

表 3 结晶温度的影响

Table 3 Effect of crystallization temperature

温度 / °C	产率 ^a / %	<i>S/R</i> 比例
25	28.62	23.01/75.52
4	38.76	0.959 7/97.83

^a产率是基于 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物中的 AD-1 的量进行计算

^aYield is calculated based on AD-1 of 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture

3 分析与讨论

表 1 显示了介电常数在 6~33 的溶剂的分离实验的结果, 由表 1 可知, 在介电常数 20.7 附近, 可以获得 AD-1。且在丙酮溶剂, 介电常数为 20.7 时得到了纯度相对较高的 AD-1。由图 2 可以看出, 虽然 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物只在 5 种溶剂中显示出了 *S/R* 比例的差异性, 但可以看出介电常数与 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物之间有一定的关系。目前对此现象可能的解释为由于分子间的氢键网络的缔合发生改变引起的, 而氢键网络是由溶剂的介电常数决定的^[8]。

表 2 显示了丙酮用量对 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物分离的结果。由表 2 可以看出, 随着丙酮用量的增加, 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物中的 *S/R* 比例以及产率降低, 在最优的溶剂用量 26 mL 的条件下, 可以获得产率为 48.84% 和 *S/R*=2.624/87.09 的 AD-1。

表 3 显示了结晶温度对分离的影响。在结晶温度为 4 °C 时, 最终的产品结晶产率为 38.76%, *S/R*=0.959 7/97.83, 在 25 °C 时, 产率为 28.62%, *S/R*=23.01/75.52。结果提示, 低温的条件有利于 AD-1 晶核的形成, 而使异构体得到分离。图 3 显示了 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物在分离前以及在优化条件下分离后的色谱图。

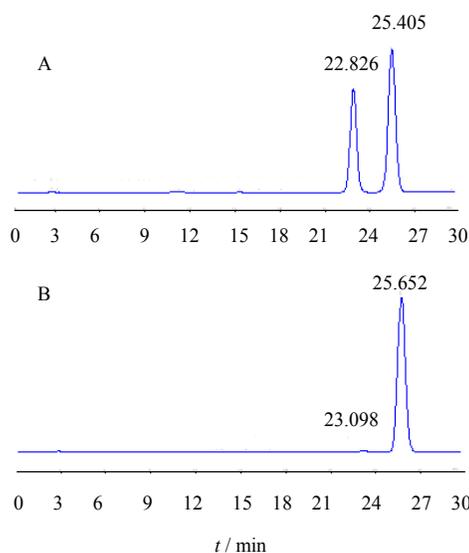


图 3 色谱图 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物 (A) 和 AD-1 结晶 (B) 在 26 mL 丙酮、4 °C 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC of 25-OCH₃-PPD non-racemic enantiomeric mixture (A) and AD-1 crystallized (B) in 26 mL of acetone at 4 °C

4 结论

本实验考察了不同溶剂、溶剂的用量、结晶温度对 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物分离的影响, 同时揭示了溶剂的介电常数与 25-OCH₃-PPD 非消旋体混合物的 *S/R* 比例的关系。结果显示, 溶剂的介电常数在 20.7 附近, 不饱和溶液以及低温的条件有利于 AD-1 的分离。

参考文献

- [1] Zhao Y, Wang W, Han L, *et al.* Isolation, structural determination, and evaluation of the biological activity of 20(*S*)-25-methoxyl-dammarane-3 β , 12 β , 20-triol [20(*S*)-25-OCH₃-PPD]. A novel natural product from *Panax notoginseng* [J]. *Med Chem*, 2007, 3(1): 51-60.
- [2] Zhao J M, Li N, Zhang H, *et al.* Novel dammarane-type sapogenins from *Panax ginseng* berry and their biological activities [J]. *Bioorganic Med Chem Lett*, 2011, 21: 1027-1031.

- [3] Zhang X, Xu J, Zhang D, *et al.* Pharmacokinetics of 20(*S*)-25-methoxyl-dammarane-3 β , 12 β , 20-triol and its active metabolite after oral and intravenous administration in rat [J]. *Xenobiotica*, 2009, 39(6): 457-464.
- [4] 卢定强, 李衍亮, 凌岫泉, 等. 手性药物拆分技术的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1731-1734.
- [5] Wang X J, Lu J, Ching C B. Application of direct crystallization for racemic compound propranolol hydrochloride [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(10): 2735-2745.
- [6] 李 鹏, 何克江, 杨 凌. 人参皂苷 Rg₃ 异构体的简易分离制备 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(9): 816-818.
- [7] Kato Y, Kitamoto Y, Morohashi N, *et al.* Crystallization-based optical resolution of 1, 1'-binaphthalene-2, 2'-dicarboxylic acid via 1-phenylethylamides: control by the molecular structure and dielectric property of solvent [J]. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50: 1998-2002.
- [8] 孙贤祥, 高晓新, 孙凌志. 非对映体结晶拆分中的溶剂效应 [J]. 常州大学学报: 自然科学版, 2010, 22(4): 69-74.