



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102533895 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201010584074. 6

(22) 申请日 2010. 12. 10

(71) 申请人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130000 吉林省长春市人民大街 5625
号

(72) 发明人 刘志强 韩天娇 宋凤瑞 郑重
邢俊鹏 刘淑莹

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 魏晓波 逯长明

(51) Int. Cl.
C12P 17/16 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种 3- 表酯蟾毒配基的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及微生物转化领域,公开了一种 3- 表酯蟾毒配基的制备方法,包括将含大鼠肠道菌群的悬浮液在 GAM 培养液中 37℃ 厌氧培养 22 ~ 25h,向所得培养液中加入酯蟾毒配基,37℃ 厌氧培养 40 ~ 80h,酯蟾毒配基的加入量为每 1mL 培养液加入 0. 1 ~ 0. 3mg 酯蟾毒配基,取培养液以非极性溶剂萃取,收集萃取液,得 3- 表酯蟾毒配基。本发明利用大鼠肠道菌群转化酯蟾毒配基制备 3- 表酯蟾毒配基,方法简单,制备过程中产生的副产物少,酯蟾毒配基转化率高,制备的 3- 表酯蟾毒配基纯度高,可用于 3- 表酯蟾毒配基的大量制备。

1. 一种 3- 表酯蟾毒配基的制备方法, 包括:
步骤 1: 将含大鼠肠道菌群的悬浮液在 GAM 培养液中 37°C 厌氧培养 22 ~ 25h;
步骤 2: 向步骤 1 所得培养液中加入酯蟾毒配基, 37°C 厌氧培养 40 ~ 80h, 所述酯蟾毒配基的加入量为每 1mL 培养液加入 0.1 ~ 0.3mg 酯蟾毒配基;
步骤 3: 取步骤 2 所得培养液以非极性溶剂萃取, 收集萃取液, 得 3- 表酯蟾毒配基。
2. 根据权利要求 1 所述制备方法, 其特征在于, 步骤 3 所述非极性溶剂为乙酸乙酯。
3. 根据权利要求 2 所述制备方法, 其特征在于, 步骤 2 所得培养液与乙酸乙酯的体积比为 1 : 100。
4. 根据权利要求 1 所述制备方法, 其特征在于, 还包括对萃取液进行纯化步骤。
5. 根据权利要求 4 所述制备方法, 其特征在于, 所述纯化为硅胶柱层析纯化或制备型高效液相色谱纯化。
6. 根据权利要求 5 所述制备方法, 其特征在于, 所述硅胶柱层析纯化以环己烷与丙酮体积比为 5.5 : 1 的溶液为流动相。

一种 3- 表酯蟾毒配基的制备方法

技术领域

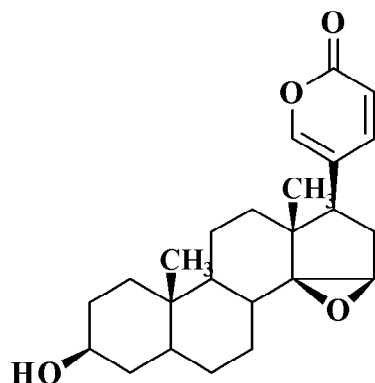
[0001] 本发明涉及微生物转化领域,具体的说是涉及一种 3- 表酯蟾毒配基的制备方法。

背景技术

[0002] 蟾酥为传统中药材,是由蟾蜍科两栖爬行动物的耳后腺及皮肤腺分泌物加工而成。蟾酥味甘、辛,性温,有毒,含甾体物、生物碱等生物活性物质,具有解毒、镇痛、开窍、抗肿瘤等多种功能。

[0003] 蟾酥为我国的传统药材,药源比较丰富。酯蟾毒配基 (resibufogenin) 是中药蟾酥中主要的活性成分,是在 C-17 位连有一个 α -吡喃酮环的甾体化合物,其分子式为 $C_{24}H_{32}O_4$, 分子量为 384. 51, 结构式如下式所示:

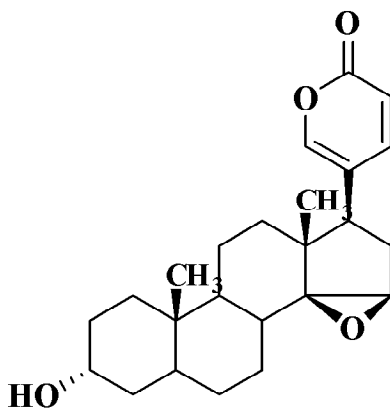
[0004]



[0005] 酯蟾毒配基具有强心、升压及兴奋呼吸中枢等作用,药理实验表明,酯蟾毒配基对手术期间的低血压、出血性休克和创伤性低血压的升压作用明显,持续时间长,并无血压过度升高的现象,升压显效率在 40%左右,总有效率 90%左右。酯蟾毒配基兴奋呼吸作用显著,对新生儿窒息、麻醉、镇痛、镇静药物等引起的中枢性呼吸抑制有较好的治疗效果,对肺心病、肺炎等引起的呼吸循环衰竭具有兼顾的治疗效果,是一种较好的呼吸循环兴奋剂。

[0006] 3- 表酯蟾毒配基,英文名为 3-epiresibufogenin,是酯蟾毒配基的 C-3 位羟基发生差向异构化作用后的产物,是酯蟾毒配基在体内的主要代谢产物之一,结构式为:

[0007]



[0008] 3-表酯蟾毒配基具有抗癌抗肿瘤活性,而且毒性较酯蟾毒配基小,在制药领域具有广泛的应用前景。然而目前3-表酯蟾毒配基的制备通常使用化学方法(GEORGER, PETTIT, Y. A. . J. Org. Chem 37(25) :4040-4044.),过程繁琐,产生大量副产物,并且制备过程大都使用苯等对人毒性较大的有机溶剂,限制了3-表酯蟾毒配基的生产与应用。

发明内容

[0009] 有鉴于此,本发明目的针对现有的3-表酯蟾毒配基制备方法副产物多的缺陷,提供一种副产物少的3-表酯蟾毒配基的制备方法。

[0010] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0011] 一种3-表酯蟾毒配基的制备方法,包括:

[0012] 步骤1:将含大鼠肠道菌群的悬浮液在GAM培养液中37℃厌氧培养22~25h;

[0013] 步骤2:向步骤1所得培养液中加入酯蟾毒配基,37℃厌氧培养40~80h,所述酯蟾毒配基的加入量为每1mL培养液加入0.1~0.3mg酯蟾毒配基;

[0014] 步骤3:取步骤2所得培养液以非极性溶剂萃取,收集萃取液,得3-表酯蟾毒配基。

[0015] 正常大鼠肠道中主要为厌氧菌,其中大肠杆菌、拟杆菌、肠球菌、双歧杆菌和乳杆菌为正常大鼠肠道内常见菌群。在正常大鼠肠道内的5种细菌中,拟杆菌最多,肠杆菌最少,其余介于二者之间。本发明利用大鼠肠道菌群将酯蟾毒配基转化为3-表酯蟾毒配基。

[0016] 本发明所述制备方法步骤1将含大鼠肠道菌群的悬浮液在GAM培养液中厌氧培养,使大鼠肠道菌群厌氧菌增殖。其中,所述含大鼠肠道菌群的悬浮液可以为新鲜的大鼠粪便悬浮液。

[0017] 本发明所述GAM培养液为用于厌氧菌培养的基础培养基,用于各类厌氧菌的增殖,具体配方为:胰蛋白胨10g/L、胨胨10g/L、大豆胨3g/L、牛肉膏2.2g/L、葡萄糖3g/L、磷酸二氢钾2.5g/L、氯化钠5g/L、淀粉5g/L、L-半胱氨酸0.5g/L、硫代乙醇酸钠0.3g/L、酵母浸膏5g/L、牛肝浸出粉1.2g/L。

[0018] 本发明所述制备方法步骤2为向步骤1所得培养液中加入酯蟾毒配基,37℃厌氧培养40~80h,利用大鼠肠道菌群将酯蟾毒配基转化为3-表酯蟾毒配基。其中,所述酯蟾毒配基的加入量为每1mL培养液中加入0.1~0.3mg酯蟾毒配基。

[0019] 由于3-表酯蟾毒配基极性很小,因此本发明所述制备方法以非极性溶剂萃取步骤2所得培养液,以提取大鼠肠道菌群转化的3-表酯蟾毒配基。所述非极性溶剂包括:氯仿、乙酸乙酯、二氯甲烷、苯、液状石蜡、植物油和乙醚等。

[0020] 优选的,本发明所述非极性溶剂为乙酸乙酯。

[0021] 更优选的是,所述步骤2所得培养液与乙酸乙酯的体积比为1:100。

[0022] 在一个具体实施方式中,本发明利用乙酸乙酯萃取步骤2所得培养液中的3-表酯蟾毒配基,然后以高效液相色谱和质谱检测萃取液组分,结果显示,萃取液的组分主要为酯蟾毒配基和3-表酯蟾毒配基,其他副产物含量极低,表明本发明所述利用大鼠肠道菌群转化酯蟾毒配基制备3-表酯蟾毒配基的方法副产物少。

[0023] 本发明所述制备方法在萃取制备3-表酯蟾毒配基后还包括对萃取液进行纯化步骤。

[0024] 优选的,所述纯化为硅胶柱层析纯化或制备型高效液相色谱纯化。

[0025] 硅胶柱层析法是根据物质在硅胶上的吸附力不同而得到分离,一般情况下极性较大的物质易被硅胶吸附,极性较弱的物质不易被硅胶吸附,整个层析过程即是吸附、解吸、再吸附、再解吸过程。本发明所述 3- 表酯蟾毒配基极性很小,容易被洗脱下来。

[0026] 制备型高效液相色谱是一种基于组分在固定相和流动相中的分配系数的微小差异,当固定相和流动相作相对运动时,样品中的各组分将形成不同的迁移速度的谱带而实现分离的技术。

[0027] 更优选的是,本发明所述硅胶柱层析纯化以环己烷与丙酮体积比为 5.5 : 1 的溶液为流动相。

[0028] 在一个具体实施方式中,本发明以环己烷与丙酮体积比为 5.5 : 1 的溶液为流动相,采用硅胶柱层析纯化制备纯品。高效液相色谱检测纯化后制备的 3- 表酯蟾毒配基纯品纯度大于 95%。

[0029] 本发明还利用核磁共振谱技术对本发明所述制备方法制备的 3- 表酯蟾毒配基进行了鉴定,核磁共振碳谱、氢谱和 DEPT 谱结果与 3- 表酯蟾毒配基对照品相符。其中,DEPT 为无畸变极化转移增强技术 (Distortionless Enhancement by polarization Transfer),可以克服其它种极化转移技术由于参数设置不当等而导致图谱的强度及相位等畸变失真的缺点,而方便地得到 CH, CH₂, CH₃ 彼此分离的偶合谱,使 CH_n 的各种类型的子谱更加一目了然,解析起来也就更加方便,是目前最理想的鉴别碳上连氢数目的常规技术。

[0030] 本发明所述制备方法利用大鼠肠道菌群转化酯蟾毒配基制备 3- 表酯蟾毒配基,制备方法简单,制备过程中产生的副产物少,酯蟾毒配基转化率高,制备的 3- 表酯蟾毒配基纯度高,可用于 3- 表酯蟾毒配基的大量制备。

附图说明

[0031] 图 1 示实施例 1 乙酸乙酯萃取液及酯蟾毒配基和 3- 表酯蟾毒配基标准品的高效液相色谱图,其中,(a) 乙酸乙酯萃取液高效液相色谱图;(b) 酯蟾毒配基纯品高效液相色谱图;(c) 3- 表酯蟾毒配基纯品高效液相色谱图;(d) 新鲜的大鼠粪便在 GAM 培养液中,厌氧培养后所得溶液的高效液相色谱图;

[0032] 图 2 示实施例 1 乙酸乙酯萃取液高效液相色谱图中峰 1 的质谱图;

[0033] 图 3 示实施例 1 乙酸乙酯萃取液高效液相色谱图中峰 2 的质谱图;

[0034] 图 4 示实施例 1 制备的 3- 表酯蟾毒配基纯品的 600 兆核磁共振碳谱图;

[0035] 图 5 示实施例 1 制备的 3- 表酯蟾毒配基纯品的 600 兆核磁共振氢谱图;

[0036] 图 6 示实施例 1 制备的 3- 表酯蟾毒配基纯品的 600 兆 DEPT 谱图。

具体实施方式

[0037] 本发明实施例公开了一种 3- 表酯蟾毒配基的制备方法。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0038] 为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明进行详细说明。

[0039] 实施例 1 :GAM 培养液配制

[0040] 胰蛋白胨 10g、胨 10g、大豆胨 3g、牛肉膏 2.2g、葡萄糖 3g、磷酸二氢钾 2.5g、氯化钠 5g、淀粉 5g、L-半胱氨酸 0.5g、硫代乙醇酸钠 0.3g、酵母浸膏 5g、牛肝浸出粉 1.2g,溶于 800mL 蒸馏水中,调 pH 值至 7.1-7.2,定容至 1L,120℃ 高温灭菌 20min。

[0041] 实施例 2 :正常大鼠喂养

[0042] 选取 10 只体重为 220 ~ 250g 的 Wistar 大鼠,雌雄各半,在温度为 18 ~ 26℃、湿度为 40 ~ 70%、光照为 12 ~ 14h/ 天的条件下,以粒状或丸状商品化啮齿类饲料和自来水喂食。

[0043] 实施例 3 :3- 表酯蟾毒配基的制备与纯化

[0044] 取 0.2 克新鲜的大鼠粪便加入到 10mLGAM 培养液中,37℃ 厌氧培养 24h。然后加入 1.6mg 酯蟾毒配基,37℃ 厌氧培养 43h,得到培养液。培养液以 100 倍体积的乙酸乙酯萃取,微孔滤膜过滤萃取液,以 3- 表酯蟾毒配基标准品为对照,高效液相色谱和质谱联用分析。

[0045] 高效液相色谱检测条件为 Waters 2695 色谱仪;Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6mm×150mm,Agilent);流动相 A 为乙腈,B 为含 0.3% 醋酸的水溶液;流速:0.3ml/min;柱温:35℃;梯度:0 ~ 25min A 为 20% ~ 80%,25 ~ 35min A 保持 80% 不变。结果如图 1 所示。

[0046] 质谱检测条件为 Finnigan LCQ TM 离子阱质谱仪 (Thermo Finnigan, USA);APCI 离子源,正离子模式;蒸发管温度,450℃;壳气 (N₂),15.5L/min;辅助气 (N₂),1.65L/min;去聚集电流,5 μ A;金属毛细管温度,100min;毛细管电压,17V;管透镜电压,5V。结果如图 2 和图 3 所示。

[0047] 由图 1 可见,萃取液的主要组分为峰 1 和峰 2,与酯蟾毒配基和 3- 表酯蟾毒配基的标准品比较发现,峰 1 与酯蟾毒配基的色谱峰相似,峰 2 与 3- 表酯蟾毒配基的色谱峰相似,表明本发明所述萃取液组分主要为酯蟾毒配基和 3- 表酯蟾毒配基,其他副产物含量极低。经计算,3- 表酯蟾毒配基的转化率为 37.9%。

[0048] 将得到的乙酸乙酯萃取液上硅胶柱,以环己烷:丙酮体积比为 5.5 : 1 的溶液为流动相洗脱,收集洗脱液得到 3- 表酯蟾毒配基纯品。高效液相色谱检测 3- 表酯蟾毒配基纯品纯度为 96%。核磁共振谱技术鉴定制备的 3- 表酯蟾毒配基纯品,与 3- 表酯蟾毒配基对照品相符。核磁共振谱如图 4 ~ 6 所示。

[0049] 实施例 4 :3- 表酯蟾毒配基的制备与纯化

[0050] 取 0.3 克新鲜的大鼠粪便加入到 10mLGAM 培养液中,37℃ 厌氧培养 22h。然后加入 1.0mg 酯蟾毒配基,37℃ 厌氧培养 67h,得到培养液。培养液以氯仿萃取,微孔滤膜过滤萃取液,以 3- 表酯蟾毒配基标准品为对照,高效液相色谱和质谱联用分析,检测图同实施例 3,萃取液组分主要为酯蟾毒配基和 3- 表酯蟾毒配基,其他副产物含量极低。经计算,3- 表酯蟾毒配基的转化率为 55.2%。

[0051] 将得到的萃取液上硅胶柱,以环己烷:丙酮体积比为 5.5 : 1 的溶液为流动相洗脱,收集洗脱液得到 3- 表酯蟾毒配基纯品。高效液相色谱检测 3- 表酯蟾毒配基纯品纯度为 95.7%。核磁共振谱技术鉴定制备的 3- 表酯蟾毒配基纯品,与 3- 表酯蟾毒配基对照品相符。

[0052] 实施例 5 :3- 表酯蟾毒配基的制备与纯化

[0053] 取 0.1 克新鲜的大鼠粪便加入到 10mLGAM 培养液中,37°C 厌氧培养 25h。然后加入 3.0mg 酯蟾毒配基,37°C 厌氧培养 71h,得到培养液。培养液以二氯甲烷萃取,微孔滤膜过滤萃取液,以 3- 表酯蟾毒配基标准品为对照,高效液相色谱和质谱联用分析,检测图同实施例 3,萃取液组分主要为酯蟾毒配基和 3- 表酯蟾毒配基,其他副产物含量极低。经计算,3- 表酯蟾毒配基的转化率为 38.6%。

[0054] 将得到的萃取液以制备型高效液相色谱纯化收集 3- 表酯蟾毒配基峰对应的洗脱液,得到 3- 表酯蟾毒配基纯品。高效液相色谱检测 3- 表酯蟾毒配基纯品纯度为 95.7%。核磁共振谱技术鉴定制备的 3- 表酯蟾毒配基纯品,与 3- 表酯蟾毒配基对照品相符。

[0055] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

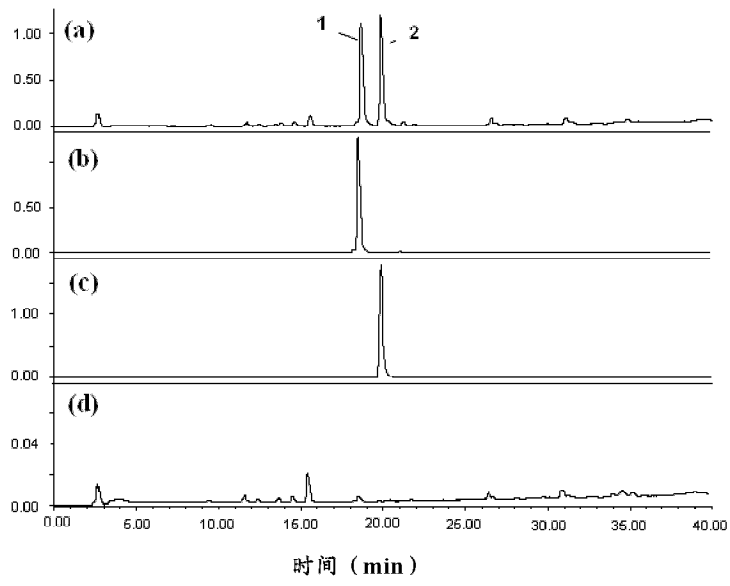


图 1

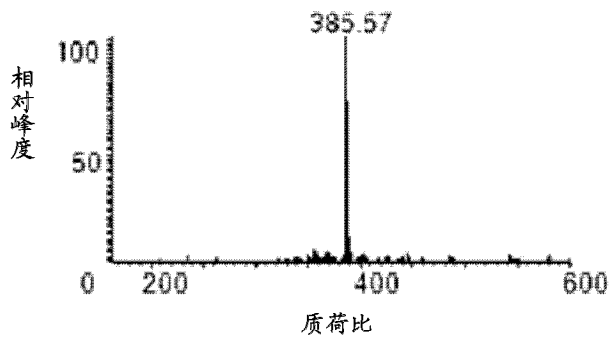


图 2

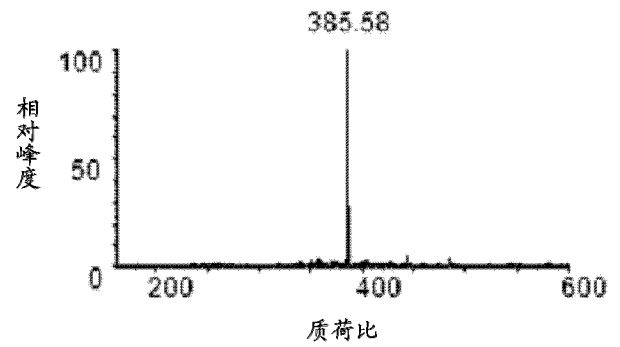


图 3

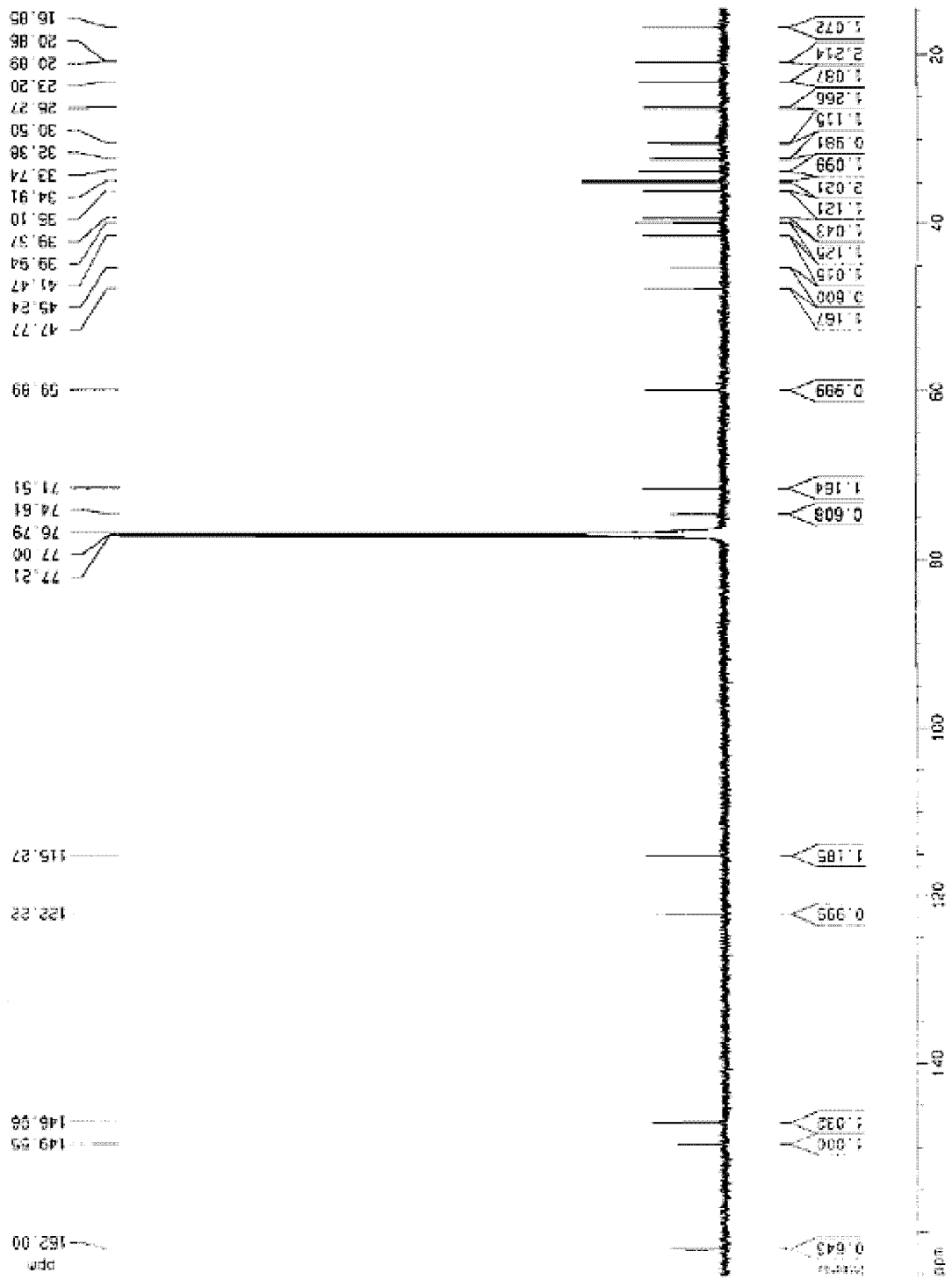


图 4

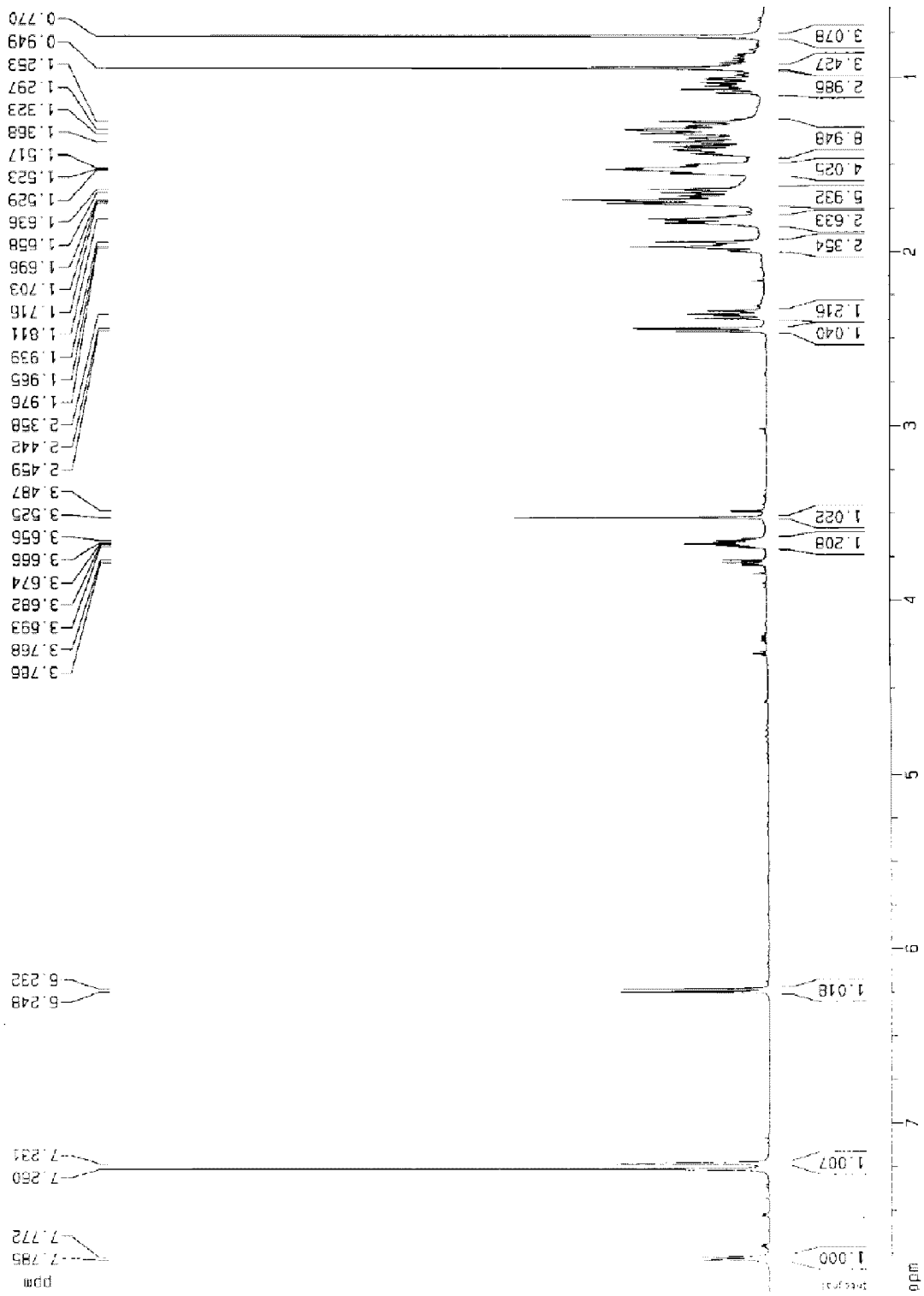


图 5

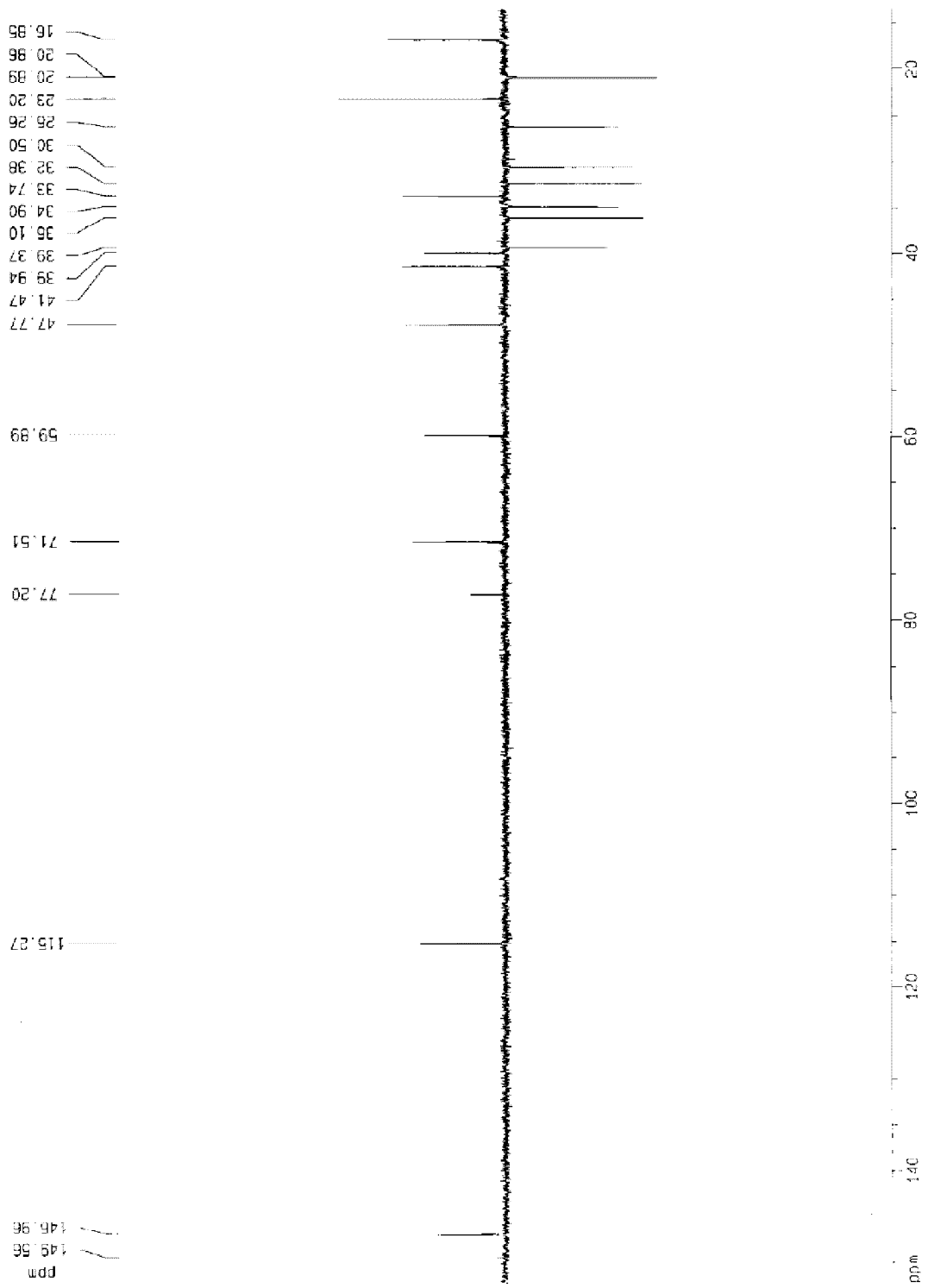


图 6