



(21) 出願番号: 201610402511.5
(22) 出願日: 2016.06.08
(65)同一出願のすでに公表された文献番号出願公開番号:

CN 105949257 A

(43) 出願公開日: 2016.09.21

(73) 特許権者: 沈陽薬科大学

住所: 110016 遼寧省沈陽市沈河区文化路103号

(72) 発明者: 于治国 赵云丽 白岩

(74) 特許代理機関: 沈陽ジェック知識産権代理有限公司 21207

代理人: 靳玲

(51) Int. Cl.

C07H 17/07(2006.01)

C07H 1/08(2006.01)

A61K 31/7048(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 17/18(2006.01)

(56) 対比文件

WO 2010/018199 A1, 2010.02.18,

CN 102016054 A, 2011.04.13,

CN 103804443 A, 2014.05.21,

CN 1449763 A, 2003.10.22,

E. A. Prokudina et al..Rapid UPLC-ESI-MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids.

《Journal of Food Composition and Analysis》.2012, 第26卷第36-42ページ.

徐春华 等. 大豆异黄酮の抗酸化と抗腫瘍活性に関する研究《大豆科学》.2010, 第29卷(第5号), 第870-873ページ.

岳爱琴 等. 大豆异黄酮の抽出と精製及び抗酸化性に関する研究《安徽农业科学》. 2014, 第42卷(第28号), 第9912-9915ページ.

Hor-Gil Hur et al..Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin 《. Arch Microbiol》.2000, 第174巻第422-428ページ.

Changhyun Roh et al..Hydroxylation of daidzein by CYP107H1 from Bacillus subtilis 168 《. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic》.2008, 第59巻第248253ページ.

審査官: 付丹

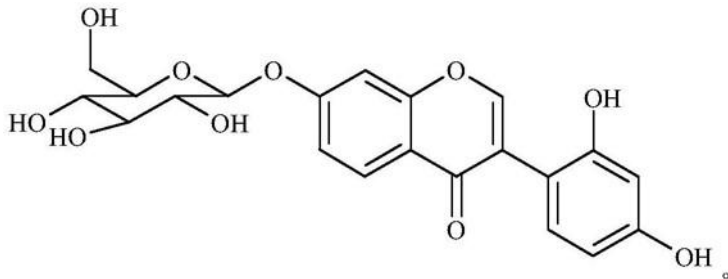
(54) 発明名称:

一種イソフラボングリコシド化合物の製造方法と用途

(57) 摘要

本発明は、医薬品および天然物化学の領域に属し、特に新しいイソフラボノイドグリコシド化合物、その製造方法および用途に関するものです。本発明のイソフラボノイドグリコシド化合物の構造は、以下の通りです。本発明では、まず正相（シリカゲル）カラムクロマトグラフィーを用い、次に逆相（ODS カラム）カラムクロマトグラフィーを用いて分離し、最後にメタノールで再結晶して化合物 2'-ヒドロキシ大豆イソフラボノイドを得る。本発明の化合物は、体内での過剰なフリーラジカルの産生またはフリーラジカルの除去能力の低下によって引き起こされるさまざまな疾患の予防および治療に使用することができる。

1. 以下は構造を持つ 2'-ヒドロキシイソフラボンの訳です:



2. 本発明は、第 1 の化合物の製造方法に関するものであり、以下の手順を含みます:

- (1) 緑豆植物の粗抽出物の製造: 適量の緑豆植物を取り、エタノールまたはメタノールで抽出し、ろ過してろ過液を結合し、アルコール抽出物を得る。アルコール抽出物を減圧回収し、アルコールの匂いなくなるまで減圧回収し、粗抽出物を得る。
 - (2) 緑豆植物の抽出物の製造: 緑豆植物の粗抽出物を取り、異なる極性の有機溶媒を順番に用いて抽出し、抽出液を廃棄し、次に正ブタノールで抽出し、正ブタノール抽出液を結合し、正ブタノールを減圧回収し、緑豆植物の抽出物を得る。
 - (3) 2'-ヒドロキシダイズオフラボンの製造: 得られた緑豆植物の抽出物に適量のメタノールを加えて分散させ、適量のシリカゲルを加えて均一に攪拌し、予め処理したシリカゲルカラムに詰め、2種類の有機溶媒を混合した混合有機溶媒 100:0~0:100 を使用して梯度洗浄を行い、混合有機溶媒 50:50~30:70 の洗浄液を収集し、濃縮して濃厚な液状にし、適量のメタノールを分散させる。オープン ODS カラムに上層液を流し込み、アルコール-水 0:100~100:0 で梯度洗浄を行い、アルコール-水 15:85~25:75 の洗浄液を収集し、濃縮して 2'-ヒドロキシダイズオフラボンを得る。
 - (4) 2'-ヒドロキシダイズオフラボンの精製: 得られた 2'-ヒドロキシダイズオフラボンをメタノールで重結晶させ、高純度の 2'-ヒドロキシダイズオフラボンを得る。
- (2) の手順では、まず 0.5~2 倍の体積の石油エーテルまたはシクロヘキサンで 1~5 回抽出し、次に 0.5~2 倍の体積のジクロロメタンまたはクロロホルムまたは酢酸エチルで 1~5 回抽出し、最後に 0.5~2 倍の体積の正ブタノールで 1~5 回抽出します。

(3)の手順では、混合有機溶媒は二塩化メチレン-メタノール、またはクロロホルム-メタノール、または二塩化メチレン-エタノール、またはクロロホルム-エタノールです。

3. 要求項2に記載の製造方法は、(1)の手順で5〜20倍量の30%〜100%のエタノールまたはメタノールを1〜3回抽出し、抽出液を結合します。

4. 要求項2に記載の製造方法は、(3)の手順でアルコール-水 15:85〜30:70の洗浄液を使用して洗浄を行います。

5. 要求項2または4に記載の製造方法は、(3)の手順でアルコール-水の梯度洗浄を行います。アルコール-水はメタノール-水またはエタノール-水です。

6. 医薬品の組成物であり、要求項1に記載の2'-ヒドロキシダイズオフラボン化合物と薬学的に許容されるキャリアを含むものです。

7. 一医薬品の製剤であり、要求項1に記載の2'-ヒドロキシダイズオフラボン化合物または要求項6に記載の医薬品の組成物を含むものであり、製剤は錠剤、カプセル、顆粒剤、経口溶液、注射剤である。

8. 要求項1に記載の2'-ヒドロキシダイズオフラボン化合物または要求項6に記載の医薬品の組成物は、体内の活性酸素の生成過剰または活性酸素の除去能力の低下によって引き起こされる様々な疾患の予防および治療に使用される薬剤の製造において応用されます。

9. 要求項8に記載の応用は、特徴として、体内での活性酸素の生成過剰または活性酸素の除去能力の低下によって引き起こされる様々な疾患には、心臓病、老年性認知症、腫瘍、または老化症状が含まれます。

一種イソフラボングリコシド化合物の製造方法と用途

技術領域

[0001] 本発明は医薬および天然物化学の分野に属し、具体的には新しいイソフラボングリコシド化合物及びその製造方法と用途に関するものである。

背景技術

[0002] 緑豆は豆科植物の緑豆 (*Vigna radiata* L.) の乾燥した成熟種子であり、清熱解毒、湿気を乾燥させる効果があります。嘔吐、発疹、疔瘡、疥癬などの症状の治療に使用されます。「本草汇言」には、緑豆を使用して疔毒、癩疹、金、石、丹、火および霍乱の治療が記載されています。現在、緑豆植物の薬理活性および活性成分に関する報告はありません。

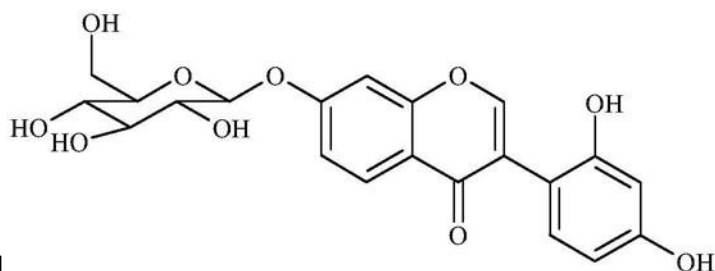
[0003] イソフラボングリコシド化合物は植物界に普遍的に存在し、現在、緑豆植物から新しいイソフラボングリコシド化合物である 2'-ヒドロキシダイゼインが発見され、これは未発見の新しい化合物です。

[0004] 近年、シリカゲルや ODS などの充填材が天然薬物の化学成分の抽出、分離精製、製剤工程の改革、製剤の品質分析などに広く使用されており、その独特の機能が明らかになっています。シリカゲルと ODS の相反する吸着機能と物質の相似性と相容性の原理を利用して、漢方薬の抽出液から有効成分や有効部位を分離精製し、最大限に粗取精を行い、漢方薬の現代化研究の発展を促進しています。

[0005] フリーラジカルはシグナル伝達および免疫などに重要な役割を果たしていますが、過剰な活性酸素フリーラジカルは細胞内や体液中の生体分子 (DNA、リピッド、プロテインなど) に対して連鎖反応を起こし、正常な細胞や組織を損傷させ、さまざまな疾患 (がん、老化、さまざまな心血管疾患など) を引き起こします。同時に、フリーラジカル除去活性を持つ合成抗酸化剤または天然抗酸化剤の研究は、国内外の様々な学問分野で研究の焦点となっており、その中でもイソフラボン類化合物の研究はフリーラジカル除去剤の研究のホットな分野です。

発明内容

[0006] 本発明の一つの目的は、新しいイソフラボングリコシド化合物およびその化学構造と名称、すなわち 2'-ヒドロキシダイゼイン (英語名: 2'-hydroxydaidzin) を提供することです。その具体的な構造式は以下の通りです:



[0007]

[0008] この化合物は以下の分光学的特徴を持っています：¹H-NMR、¹³C-NMR、および HMBC スペクトルは表 1 に示す通りです。

[0009] 表 1. 化合物 2'-羟基大豆昔的 ¹H-NMR、¹³C-NMR および HMBC スペクトルのデータ。

[0010]

Position	¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	HMBC
2	154.8	8.22 (1H, s)	C-3, 4, 9, 1'
3	122.0		
4	175.1		
5	126.9	8.00 (1H, d, 8.8)	C-4, 7
6	115.5	7.12 (1H, dd, 8.8, 2.2)	C-8, 10
7	161.3		
8	103.4	7.22 (1H, d, 2.2)	C-6, 7, 9, 10
9	157.1		
10	118.5		
1'	109.9		
2'	156.4		
3'	102.8	6.35 (1H, d, 2.2)	C-1', 2', 4', 5'
4'	158.4		
5'	106.3	6.26 (1H, dd, 8.3, 2.2)	C-1', 3', 4'
6'	132.2	6.98 (1H, d, 8.3)	C-3, 4'
1''	100.0	5.10 (1H, d, 7.0)	C-7, 5''
2''	73.2	3.29 (1H, m)	C-4''
3''	76.5	3.29 (1H, m)	C-2''
4''	69.6	3.17 (1H, m)	C-6''
5''	77.2	3.46 (1H, m)	C-4''
6''	60.7	3.70 (1H, m), 3.46 (1H, m)	C-5''

[0011] HR-ESIMS データ：この化合物の高分解能質量スペクトルは、マイナスイオンモードで分子イオンピーク (negative ion mode)： $m/z=455.0929[M+Na]^+$ (calcd. for $C_{21}H_{20}O_{10}Na$, 455.0949), 分子式： $C_{21}H_{20}O_{10}$ 。

[0012] 本発明のもう一つの目的は、上記の異黄酮苷化合物の製造方法を提供することです。具体的な手順は以下の通りです：

[0013] (1) 緑豆の乾燥茎枝を取り、乙醇またはメタノールで抽出し、ろ過して合併ろ液を得る。得られたろ液を減圧回収してアルコールの風味を除去し、粗抽出液を得る。

[0014] (2) 得られた粗抽出液を、順次異なる極性の有機溶媒で抽出し、抽出液を廃棄し、次に正ブタノールで抽出し、正ブタノール抽出液を合併し、減圧回収して正ブタノールを得る。これにより緑豆の植物体抽出物を得る。

[0015] (3) 得られた緑豆の植物体抽出物に適量のメタノールを分散させ、適量のシリカゲルを加えてよくかき混ぜ、事前に処理したシリカゲルカラムに装填し、2種類の有機溶媒を混合した混合有機溶媒 (100:0~0:100) で勾配洗脱を行い、混合有機溶媒 (50:50~30:70) の洗脱液を回収し、濃縮して濃厚な状態にする。次に ODS カラムに装填し、アルコール-水 (0:100~100:0) で勾配洗脱を行う。アルコール-水 (15:85~30:70) が選択され、洗脱液アルコール-水 (15:85~25:75) を回収し、濃縮して異黄酮苷化合物を得る。

[0016] (4) 得られた異黄酮苷化合物をメタノールで再結晶し、2'-羟基大豆苷を得る。

[0017] 本発明では、手順(1)で述べたエタノールまたはメタノールの濃度は 30%~100% です。

[0018] 本発明では、手順(1)で述べた抽出は、5~20 倍量の 30%~100% エタノールまたはメタノールで 1~3 回のフラッシュ抽出を行い、抽出液を合併します。

[0019] 本発明では、手順(2)で述べた異なる極性の有機溶媒には、以下のようなものが含まれますが、これに限定されません：石油醚、シクロヘキサン、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル。

[0020] 本発明では、手順(2)で述べた異なる極性の有機溶媒および正ブタノールの用量は 0.5~2 倍体積であり、抽出回数は 1~5 回です。

[0021] 本発明では、手順(3)で述べた混合有機溶媒はジクロロメタン-メタノール、またはクロロホルム-メタノール、またはジクロロメタン-エタノール、またはクロロホルム-エタノールです。

[0022] 本発明では、手順(3)で述べた醇-水はメタノール-水またはエタノール-水です。

[0023] 本発明では、最初に正相 (シリカゲル) 柱クロマトグラフィーで分離し、次に逆相 (開いた ODS) 柱クロマトグラフィーで分離し、最後にメタノールで再結晶して化合物 2'-羟基大豆苷を得ます。

[0024] 本発明では、シリカゲル柱クロマトグラフィーで、ドライロード法を採用します。開いた ODS 柱クロマトグラフィーで湿法ロード法を採用します。

[0025] 本発明のもう一つの目的は、該化合物の製薬用途を提供することです。体内の過剰なフリーラジカルの生成またはフリーラジカル除去能力の低下によって引き起こされる様々な疾患、例えば心臓病、老年性認知症、腫瘍および老化の予防と治療に用いる薬剤の製造において用途を提供します。

附図説明

[0026] 図1は2'-羟基大豆苷の¹H-NMRスペクトル図です。

[0027] 図2は2'-羟基大豆苷の¹³C-NMRスペクトル図です。

[0028] 図3は2'-羟基大豆苷のHMBCスペクトル図です。

[0029] 図4は本発明の実施例である2'-羟基大豆苷の抽出分離の流れ図です。

具体的実施方法

[0030] 実施例1、2'-羟基大豆苷の分離製造

[0031] 1. 植物材料: 豆科植物の緑豆(*Vigna radiate* L.)の乾燥茎枝。

[0032] 2. 分離製造方法: 緑豆の乾燥茎枝25kgを、10倍量の95%エタノールを使用して2回フラッシュ抽出し、ろ過してろ過液を合併し、エタノールを無味になるまで減圧回収し、濃縮液約5Lを得る。それぞれ石油エーテル5L、二塩化メチレン5L、正ブタノール5Lを3回ずつ抽出し、正ブタノールの抽出液を合併し、正ブタノールを減圧回収し、緑豆の植物エキスを得る。緑豆の植物エキスを適量のメタノールで分散させ、適量のシリカゲルを加え、よく混合し、予め処理したシリカゲルカラムに詰める。二塩化メチレン-メタノール(100:0~0:100)のグラデーションで洗浄し、6つのフローフラクションを得る。フローフラクション6(二塩化メチレン-メタノール(20:80~0:100))は開放型ODSカラムで、メタノール-水(15:85~30:70)のグラデーションで洗浄し、4つのフローフラクションを得る。フローフラクション2(メタノール-水(20:80))はメタノール中で析出結晶を得て、2'-羟基大豆苷を得る。

[0033] 実施例2、2'-羟基大豆苷の体外抗酸化活性試験

[0034] 1. 装置: U-1900型分光光度計(Hitachi)、AB135-S型電子天秤(Mettler Toledo)、エンザイムマーカー(BIO-RAD)、pH-2TC(0.01レベル)精密デジタル酸度計(上海之信儀器有限公司)。

[0035] 2. 試薬: 塩化ナトリウム(NaCl)、塩化カリウム(KCl)、リン酸二水素カリウム(KH₂PO₄)、リン酸水素二カリウム(K₂HPO₄)、過硫酸カリウム(K₂S₂O₈)、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)二アンモニウム塩(ABTS)、アスコルビン酸。

[0036] 実験で使用される2'-羟基大豆苷は発明者によって自家製であり、その化学構造は¹H-NMR、¹³C-NMR、HR-ESIMSによって確認されており、HPLC純度は98%以上です。

[0037] 3. 実験方法: pH7.4のリン酸緩衝溶液(PBS)を使用して7mmol/LのABTS溶液と2.45mmol/Lの過硫酸カリウム溶液を調製し、両者を等しい体積で混合し、室温で暗所で12時間反応させ、自由基正イオン(ABTS^{•+})溶液を得る。次に、pH7.4のPBS溶液を40倍に希釈し、希釈した後は避光のまま30分間放置し、734nmで吸光度0.71を測定する(抗酸化活性試験に使用可能)。メタノールを使用して2'-羟基大豆苷とアスコルビン酸の一連の濃度溶液を調製し、濃度はそれぞれ6mmol/L、3mmol/L、1.5mmol/L、0.3mmol/L、0.15mmol/Lとする。各濃度の供試品100μLを3mLのABTS^{•+}と室温で避光のまま6分間放置し、酵素免疫測定装置を使用して734nmで吸光度値ASを測定する。陰性対照にはメタノールを使用し、734nmで吸光度値ACを測定する。ABTS^{•+}除去率(%)の計算式は以下の通りです:

[0038] $ABTS \cdot +$ 除去率(%) = $(1 - A_s/A_0) \times 100\%$

[0039] SPSS 17.0 ソフトウェアを使用して半数抑制濃度(IC50)を計算しました。

[0040] 4. 実験結果: 表 2 を参照してください。

[0041] 表 2 . 化合物 2'-羟基大豆昔の体外 $ABTS \cdot +$ 除去結果

样品	IC ₅₀
2'-羟基大豆昔	8.27 ± 0.47
L-Ascorbic acid	18.81 ± 3.39

[0042]

[0043] 本発明のテスト結果により、化合物 2'-羟基大豆昔は $ABTS \cdot +$ 抑制活性を持ち、ビタミンCよりも強力な活性を示しました。したがって、この化合物は体外での強力な抗酸化活性を持っています。特に心血管系の疾患の予防と治療に適しており、その製造原料は広範でコストが低く、応用と開発の見通しも良好です。

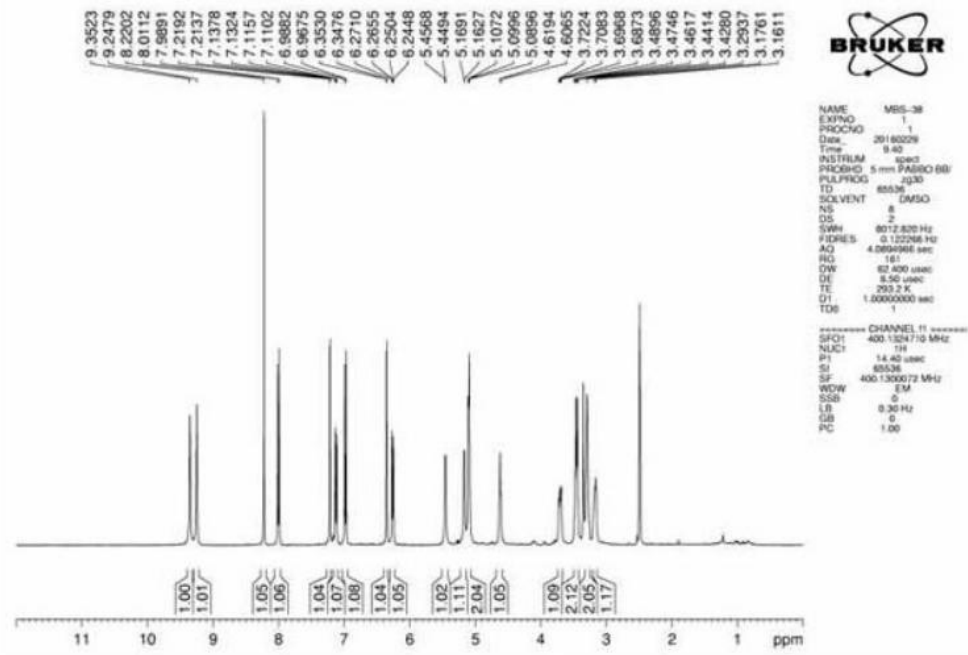


图1

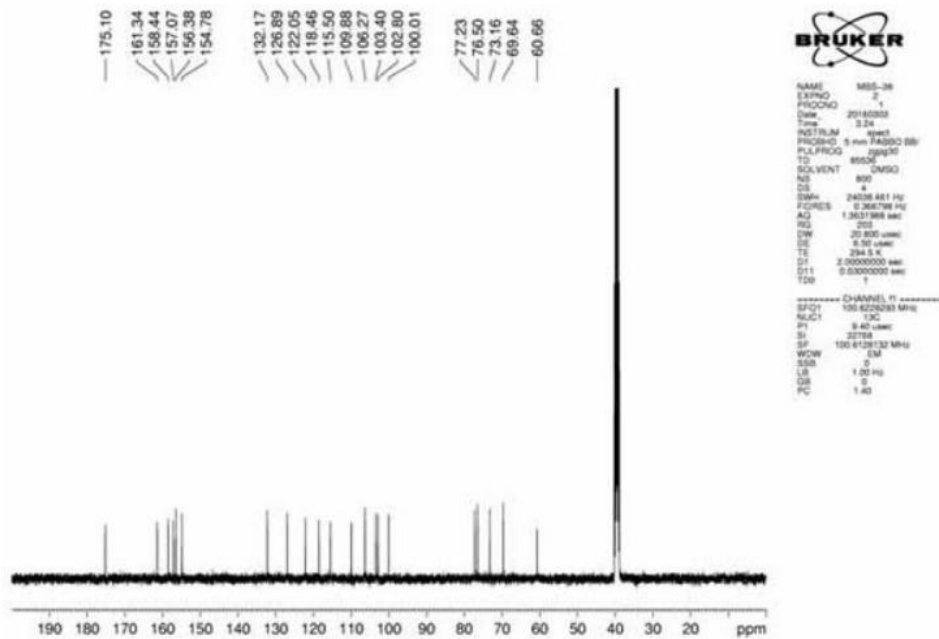


图2

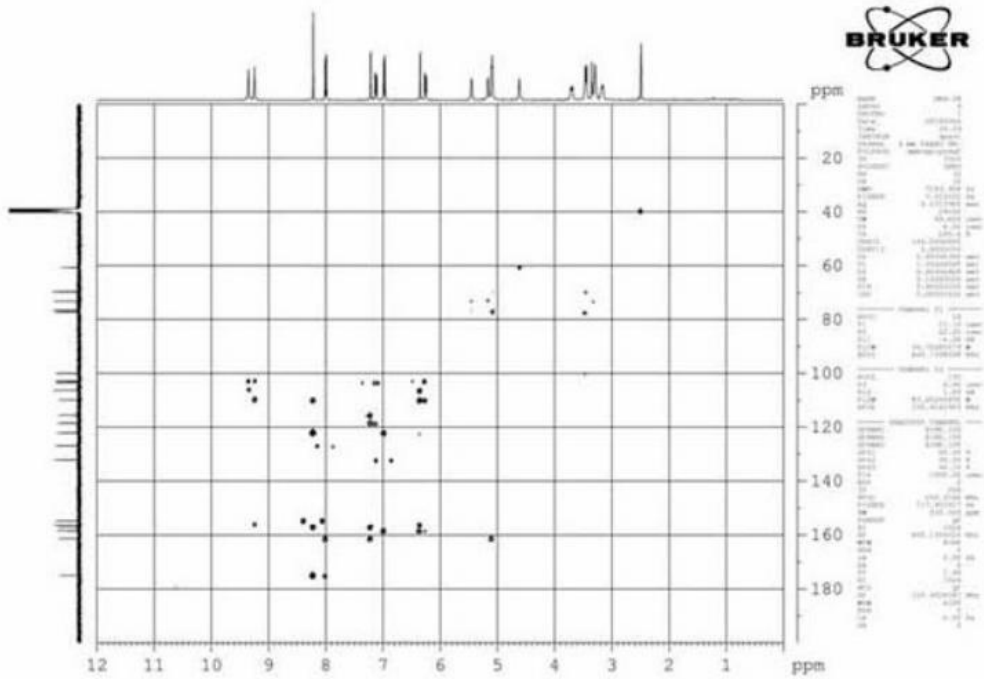


图3



图4