(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日:
2005年11月10日(10.11.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/105824 A1

(51) 国际分类号[7]: C07J 71/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2005/000554

(22) 国际申请日: 2005年4月21日(21.04.2005)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200410037346.5 2004年4月29日(29.04.2004) CN
200510059467.4 2005年3月25日(25.03.2005) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所(INSTITUTE OF RADIATION MEDICINE, ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES, PLA) [CN/CN]; 中国北京市太平路27号, Beijing 100850 (CN)。

(72) 发明人;及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 马百平(MA, Baiping) [CN/CN]; 陈浩(CHEN, Hao) [CN/CN]; 熊呈琦(XIONG, Chengqi) [CN/CN]; 康利平(KANG, Liping) [CN/CN]; 张洁(ZHANG, Jie) [CN/CN]; 中国北京市太平路27号, Beijing 100850 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市阜成门外大街2号万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的"代码及缩写符号简要说明"。

(54) Title: A PROCESS FOR PREPARATION OF TIMOSAPONIN B II

(54) 发明名称: 知母皂苷 BII 的制备方法

(57) **Abstract:** A process for preparation of timosaponin B II, which uses Chinese traditional drug Anemarrhena Rhizome or newly collected rhizoma or fibrous root of *Anemarrhena Asphodeloides Bge.* as raw material, and comprises isolation of timosaponin B II by one or more steps selected from solvent extraction, resin adsorption, polyamide chromatography, inversed phase column chromatography, column chromatography on Sephadex LH-20 and so on in combination with conventional drying method such as vacuum drying, freeze drying, spray drying and so on. Timosaponin B II obtained by the present process is of over 90% purity, and the process is simple and applicable and suitable for industrial production.

(57) 摘要

本发明涉及一种知母皂苷 BII 的分离制备方法。该方法以中药知母或者新鲜采集的知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge.根茎或须根为原料，采用溶剂提取法、树脂吸附法、聚酰胺层析、反相柱层析法、Sephadex LH-20 柱层析法等工艺中的一种或者多种工艺，并结合减压干燥、冷冻干燥、喷雾干燥等常用干燥方法分离制备知母皂苷 BII。本方法制备的知母皂苷 BII 的纯度高于 90%，而且工艺简单实用，适宜于产业化生产。

WO 2005/105824 A1

知母皂苷 BII 的制备方法

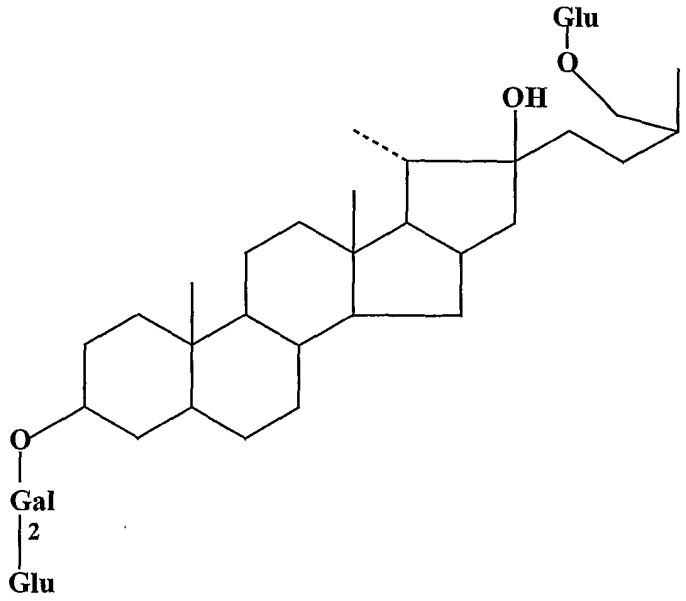
技术领域

本发明涉及知母皂苷 **BII** 的分离制备方法。

背景技术

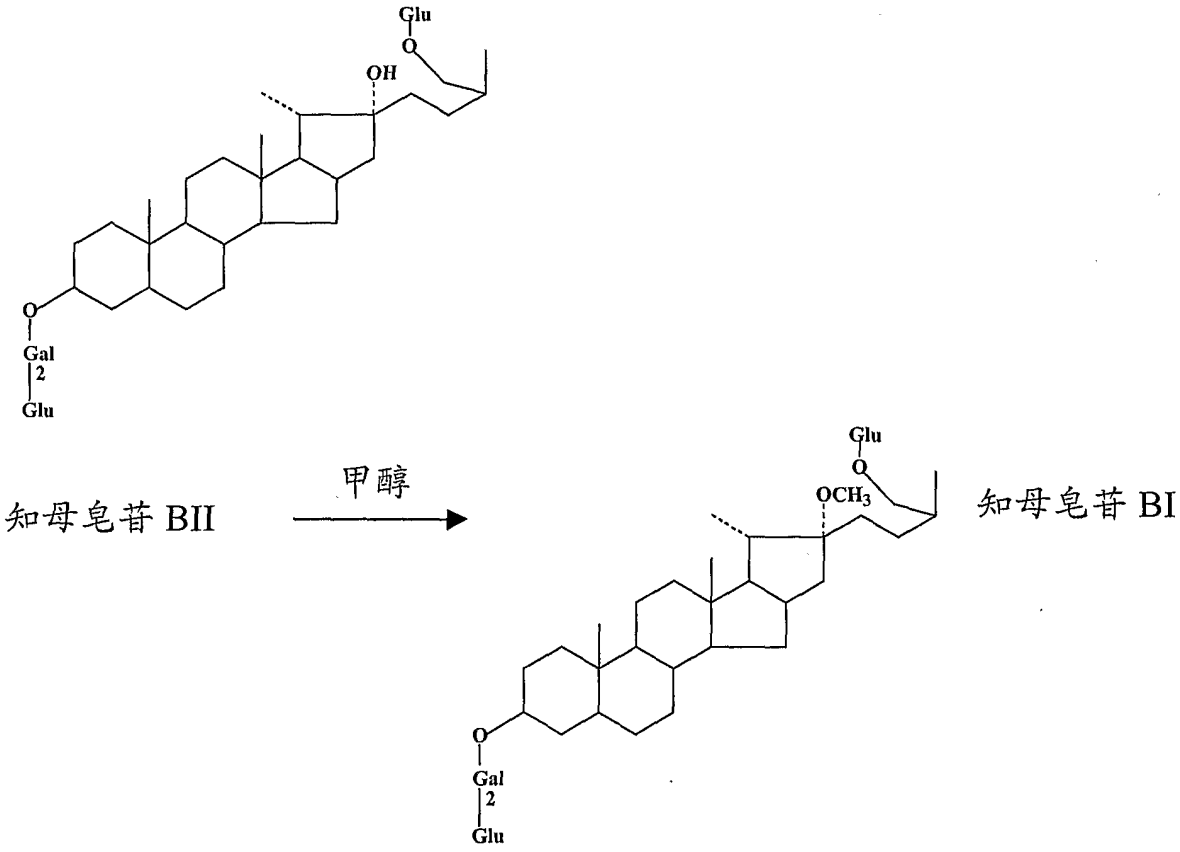
中药知母为百合科(Liliaceae)知母属多年生草本植物知母 ***Anemarrhena asphodeloides*** **Bge.** 的根茎，主产于河北、内蒙古、山西及东北等地，中医用作苦寒清热药，有清热泻火，滋阴润燥的功效，主要治疗外感热病、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴和肠燥便秘等。知母的主要成分是甾体皂苷(**steroidal saponin**)，其次还有黄酮、寡糖、多糖及脂肪酸等。药理研究表明知母主要有抗菌抗病毒、退热、降血糖、镇静、抑制血小板聚集、抗肿瘤以及辐射防护等作用。

知母皂苷 **BII**（**Timosaponin BII**），又名原知母皂苷 **AIII**（**Prototimosaponin AIII**）等，是知母中的主要成分，结构为（**25S**）－**26**－**O**－β－**D**－葡萄吡喃糖基－**22**－羟基－**5**β－呋甾－**3**β、**26**－二醇－**3**－**O**－β－**D**－葡萄吡喃糖基（**1**→**2**）－β－**D**－半乳吡喃糖苷 **[(25S)-26-0-β-D-glucopyranosyl- 22- hydroxy-5β-furostane-3β, 26-diol-3-0-β-D-glucopyranosyl(1 → 2)-β-D-galactopyranoside]**。结构如下：



1963 年川崎敏男等首次分出知母皂苷 BII，但并未阐明其结构。1991 年南云清二等首次阐明了知母皂苷 BII 的化学结构(Seiji NAGUMO et al, 药学杂志(日), 1991; 111(1): 306-310)。以后 Noboru Nakashima （NOBORU NAKASHIMA et al，Journal of Natural Products，1993; 56(3):345-350 ）、马百平（马百平等，药学学报, 1996; 31(4): 271－277)、Masayasu Kimula（Masayasu KIMURA et al, Biol.Pharm.Bull,1996; 19(7): 926-931)和 Jianying Zhang （Jianying ZHANG et al，Clinica Chimica Acta，1999; 289:79-88)等先后报道了知母皂苷 BII 的分离及活性。研究表明，知母皂苷 BⅡ具有降血糖、抑制血小板聚集、清除自由基、以及抗痴呆的活性。在知母皂苷 BⅡ的分离制备上，已有文献基本均应用正丁醇萃取、正相硅胶柱层析，同时结合大孔吸附树脂或高效液相色谱制备获得。正丁醇萃取皂苷乳化严重；硅胶柱层析上样量有限，硅胶填料不易再生利用，洗脱溶剂应用氯仿－甲醇－

水混合溶剂系统，回收利用较难。所以现有文献报道的知母皂苷BⅡ的制备方法往往过程复杂，制备量小，纯度不高，不适于工业化制备。即使使用大孔吸附树脂及反相液相色谱，也往往使用甲醇－水洗脱剂，知母皂苷BⅡ的C-22羟基在含甲醇的溶剂中可以甲氧基化，生成一定比例的甲氧基化物（知母皂苷BⅠ）（**Seiji NAGUMO et al, 药学杂志(日), 1991; 111(1): 306-310**），这样在制备中就会损失一部分样品，同时回收溶剂得到的也是知母皂苷BⅡ和知母皂苷BⅠ的混合物，很难得到知母皂苷BⅡ的单体化合物。



因此，改进知母皂苷BⅡ的制备方法是十分必要的。

发明内容

本发明的目的是提供一种改进的知母皂苷 BII 的制备方法，该方法避免在提取纯化中使用正丁醇、应用硅胶柱层析，以及避免在洗脱中使用甲醇，从而保证了知母皂苷 BII 的纯度和收率。

因此，本发明涉及一种改进的知母皂苷 BII 的制备方法，其包括:

a）将市售的中药知母饮片或者新鲜采集的知母（*Anemarrhena asphodeloides* Bge.）根茎或须根为原料，用选自水、丙酮、乙醇、丙醇或它们的至少两种混合物溶剂提取，

b）将 a）中提取物通过选自树脂吸附、聚酰胺层析、反相柱层析法或 Sephadex LH-20 柱层析法的一种或者多种方式分离，用水、丙酮、乙腈、乙醇、丙醇或它们的至少两种混合物作洗脱剂洗脱，

c）合并 b）中洗脱液，然后干燥得知母皂苷 BII。

根据本发明，在步骤 a）中，可选用水、丙酮、乙醇、丙醇中的一种溶剂，也可选用其中的任意两种或多种溶剂以任意比例所组成的混合溶剂，在室温下浸润提取或者超声波振荡仪超声振荡提取，或者在加热状态下浸润提取或回流提取，提取次数可以是一次，也可以是多次。其中，优选:

水煎煮；或 10－95％的乙醇水溶液回流、渗漉或超声提取；或 10－80％的丙酮水溶液回流、渗漉或超声提取。

根据本发明，在步骤 b）中，针对树脂吸附法，树脂可选用 D-101 型吸附树脂、AB-8 型吸附树脂、XAD-2 型吸附树脂、HP20 型吸附树脂、SP825 型吸附树脂、SP700 型吸附树脂、CHP-20P 型吸附树脂或者 SP70 型吸附树脂以及其他型号的聚苯乙烯型大

孔吸附树脂，洗脱溶剂用水、丙酮、乙醇、丙醇中的一种或多种，洗脱时可以等浓度洗脱，也可以梯度洗脱。

进一步讲，提取液的离心上清液或过滤液通过大孔树脂吸附，用水或低浓度的丙酮或低级醇的水溶液淋洗除去杂质，低级醇为乙醇或丙醇，其浓度为 5－30％，用量为柱体积的 2－7 倍（2－7BV）；再用较高浓度的丙酮或低级醇的水溶液洗脱，低级醇为乙醇、丙醇，其浓度为 20－70％，用量为柱体积的 2－7 倍（2－7BV），根据检测情况，收集此部分洗脱液或其中部分洗脱液，回收溶剂，浓缩，得到粗知母皂苷 BII。

在本发明步骤 b）选用的聚酰胺层析法中，可选柱层析法或静态吸附过滤法，洗脱剂用水、丙酮、乙腈、乙醇、丙醇中的一种或多种，洗脱时可以等浓度洗脱，也可以梯度洗脱。

进一步讲，含知母皂苷 BII 的水溶液通过聚酰胺柱，用水或低浓度的丙酮或低级醇的水溶液洗脱，低级醇为乙醇或丙醇，其浓度为 0－15％，用量为柱体积的 2－5 倍（2－5BV），根据检测情况，收集此部分洗脱液或其中部分洗脱液，回收溶剂，浓缩，得到知母皂苷 BII。或含知母皂苷 BII 的水溶液中加入聚酰胺，充分搅拌、放置，布氏漏斗过滤，用水或低浓度的丙酮或低级醇的水溶液进一步洗脱，根据检测情况，收集此部分洗脱液或其中部分洗脱液，回收溶剂，浓缩，得到知母皂苷 BII。再用高浓度的丙酮、乙醇或丙醇的水溶液，或酸、碱再生。

在本发明 b）中选用的反相柱层析中，可选用常压或加压反相柱层析，所用柱填料可选十八烷基键合相（ODS）或八烷基键合相，洗脱剂用含水乙腈、含水丙酮或者含水乙醇、丙醇中的一种或多种，洗脱时可以等浓度洗脱，也可以梯度洗脱。

进一步讲，用洗脱剂溶解含知母皂苷 BII 的样品，样品溶液

通入反相层析柱，用含水乙腈、含水丙酮或者含水乙醇、丙醇中的一种或多种洗脱，有机溶剂浓度为 15－60％，分步收集，根据检测情况，合并其中部分洗脱液，回收溶剂，浓缩，得到知母皂苷 BII。

在本发明 b）中选用的 Sephadex LH-20 柱层析中，可选用常压或加压柱层析，洗脱剂用含水乙腈、含水丙酮或者含水乙醇、含水丙醇中的一种或多种，洗脱时可以等浓度洗脱，也可以梯度洗脱。

进一步讲，用洗脱剂溶解含知母皂苷 BII 的样品，样品溶液通入 Sephadex LH-20 层析柱，用含水乙腈、含水丙酮或者含水乙醇、含水丙醇等 C2－C5 醇类中的一种或多种洗脱，有机溶剂浓度为 5－60％，分步收集，根据检测情况，合并其中部分洗脱液，回收溶剂，浓缩，得到知母皂苷 BII。

根据本发明，步骤 c）中所述干燥为本领域中已知的干燥方法，举例讲，如减压干燥，冷冻干燥或喷雾干燥。

本发明主要解决了已有工艺中方法复杂的问题，特别是解决了由于工艺中使用正丁醇、硅胶柱层析及甲醇，致使知母皂苷 BII 纯度不高，收率损失的问题，本发明方法制备的知母皂苷 BII 的纯度高于 90%，而且工艺简单实用，适宜于产业化生产。

具体实施方式

下面的实施例用于进一步说明本发明，但其不意味着对本发明的任何限制。

实施例 1

知母皂苷 BII 的制备

中药知母饮片 8Kg，适当粉碎，加 50％乙醇 48L，浸泡 1 小

时，回流提取 1 小时，过滤；药渣再同样回流提取 2 次。合并醇提液，回收乙醇，减压浓缩至 40L。将预先处理好的大孔吸附树脂 SP825（日本三菱公司）装柱（18L），水平衡。提取浓缩液过滤，滤液上样，用水洗除去杂质。之后依次用 3 倍柱体积（3BV）的 35%乙醇、3BV 的 50%乙醇和 3BV 的 95%乙醇洗脱，经检测知母皂苷 BII 主要集中于 50%乙醇部分，此部分洗脱液回收乙醇，浓缩至小体积，加乙醇至 35%备用。再生后的大孔吸附树脂 SP825 柱（18L）用 35%乙醇平衡，通入上述备用样品，用 45%乙醇 6BV 洗脱，分步收集，每份 2000mL，HPLC 检测各份纯度。将 18－30 份合并，回收乙醇，浓缩至小体积备用。此样品通入处理好的聚酰胺柱中(6L, 30-60 目,临江试剂化工厂)，水洗脱 5BV，色带部分舍去，分步收集，每份 600mL，HPLC 检测，合并第 6－23 份，浓缩，喷雾干燥，得知母皂苷 BII 56.5g，产品收率为药材的 0.71%，HPLC 检测纯度为 90.8%。

实施例 2

知母皂苷 BII 的制备

中药知母饮片 5Kg，适当粉碎，加 30%丙酮 30L，浸泡 2 小时，用超声波振荡器超声提取 0.5 小时，过滤；药渣再同样超声提取 2 次。合并提取液，回收丙酮，减压浓缩至 30L。将预先处理好的大孔吸附树脂 AB－8（天津南开化工厂）装柱（18L），水平衡。提取浓缩液过滤，滤液上样，用水洗杂质。之后依次用 3 倍柱体积（3BV）的 20%乙醇、3BV 的 50%乙醇和 3BV 的 95%乙醇洗脱，经检测知母皂苷 BII 主要集中于 50%乙醇部分，此部分洗脱液回收乙醇，浓缩至小体积，真空干燥得知母皂苷 BII 粗样品 286g。将粗样品 80g 溶解于 1000ml 25%丙酮溶液，通入

25％丙酮平衡好的 C18 柱（6.5L）。依次用 28％丙酮（20000ml）、30％丙酮（20000ml）洗脱，80％丙酮（13000ml）再生柱子。28％和 30％丙酮部分分步收集，每份 600mL，HPLC 检测各份纯度。将 6－21 份合并，回收丙酮，浓缩至小体积，冰干，得知母皂苷 BII12.9g，产品收率为药材的 0.92%，HPLC 检测纯度为 94.3％。

实施例 3

知母皂苷 BII 的制备

中药知母饮片 5Kg，适当粉碎，加 30％丙酮 30L，浸泡 2 小时，用超声波振荡器超声提取 0.5 小时，过滤；药渣再同样超声提取 2 次。合并提取液，回收丙酮，减压浓缩至 30L。将预先处理好的大孔吸附树脂 AB－8（天津南开化工厂）装柱（18L），水平衡。提取浓缩液过滤，滤液上样，用水洗除去杂质。之后依次用 3 倍柱体积（3BV）的 20%乙醇、3BV 的 50%乙醇和 3BV 的 95％乙醇洗脱，经检测知母皂苷 BII 主要集中于 50%乙醇部分，此部分洗脱液回收乙醇，浓缩至小体积，真空干燥得知母皂苷 BII 粗样品 290g。将粗样品 80g 溶解于 1000ml 25％丙酮溶液，通入 32％甲醇平衡好的 C18 柱（6.5L）。依次用 32％甲醇（20000ml）、34％甲醇（20000ml）洗脱，90％甲醇（15000ml）再生柱子。32％和 34％甲醇部分分步收集，每份 600mL，HPLC 检测各份纯度。将 8－19 份合并，回收甲醇，浓缩至小体积，冰干，得知母皂苷 BII 样品 9.7g，HPLC 检测纯度为 73.1%；此样品溶解于 30％丙酮中，95℃回流 5 小时，回收丙酮，浓缩至小体积，冰干，得知母皂苷 BII 9.7g，产品收率为药材的 0.70%，HPLC 检测纯度为 93.9％。

实施例 4

知母皂苷 BII 的制备

知母新鲜根茎 4Kg，切薄片，加入 10L 水，煎煮 1 小时，过滤；药渣再加入 8L 水，煎煮 1 小时，过滤。合并滤液，减压浓缩至 10L，加乙醇至 25%，静置备用。将预先处理好的大孔吸附树脂 D101（天津农药厂）装柱（6L），25% 乙醇平衡。上述备用提取液过滤，滤液上样，依次用 3 倍柱体积（3BV）的 25%乙醇、3BV 的 35%乙醇和 3BV 的 90% 乙醇洗脱，经检测知母皂苷 BII 主要集中于 35%乙醇部分，此部分洗脱液回收乙醇，浓缩至小体积备用。此样品通入处理好的聚酰胺柱中（6L, 30-60 目,临江试剂化工厂），5BV 水洗脱，舍去有色部分，分步收集，每份 600ml，HPLC 检测，合并第 8－24 份，浓缩，喷雾干燥，得知母皂苷 BII 脱色粗样品 51g。取其中粗样品约 40g 样品溶解于 200ml 35% 乙醇溶液，通入 35% 乙醇平衡好的 Sephadex LH-20 柱（8.5L），用 35% 乙醇（50000ml）洗脱，95% 乙醇（20000ml）再生柱子。35% 乙醇部分分步收集，每份 800mL，HPLC 检测各份纯度。将 16－35 份合并，回收乙醇，浓缩至小体积，冰干，得知母皂苷 BII 11.2g，产品收率为新鲜根茎的 0.36%（相当干药材的 1.07%），HPLC 检测纯度为 92.3%。

实施例 5

知母皂苷 BII 的制备

知母须根 2Kg，切咀，加入 16L 水，煎煮 1 小时，过滤；药渣再加入 12L 水，煎煮 1 小时，过滤。合并滤液，减压浓缩至 12L，加丙酮至 15%，静置备用。将预先处理好的大孔吸附树脂 SP700（日本三菱公司）装柱（6L），15% 丙酮平衡。上述备用提取液

过滤，滤液上样，依次用 3 倍柱体积（3BV）的 25%丙酮、3BV 的 35%丙酮和 3BV 的 80％丙酮洗脱，经检测知母皂苷 BII 主要集中于 35%丙酮部分，此部分洗脱液回收丙酮，浓缩，喷雾干燥，得知母皂苷 BII 粗样品 45.0g。取其中粗样品约 40g 样品溶解于 200ml 10％丙酮溶液，通入 10％丙酮平衡好的 Sephadex LH-20 柱（8.5L），用 10％丙酮（40000ml）洗脱，80％丙酮（20000ml）再生柱子。10％丙酮部分分步收集，每份 800mL，HPLC 检测各份纯度。将 20－36 份合并，回收丙酮，浓缩至小体积，冰干，得知母皂苷 BII 9.2g，产品收率为须根原料的 0.52%，HPLC 检测纯度为 91.7％。

实施例 6

知母皂苷 BII 的制备

知母新鲜根茎 4Kg，切薄片，加入 50％乙醇 8L，浸泡 2 小时，用超声波振荡器超声提取 0.5 小时，过滤；药渣再同样超声提取 2 次。合并提取液，回收乙醇，减压浓缩至 10L。将预先处理好的大孔吸附树脂 AB－8（天津南开化工厂）装柱（6L），水平衡。提取浓缩液过滤，滤液上样，水洗除去杂质。之后依次用 3 倍柱体积（3BV）的 20%乙醇、3BV 的 50%乙醇和 3BV 的 95％乙醇洗脱，经检测知母皂苷 BII 主要集中于 50%乙醇部分，此部分洗脱液回收乙醇，浓缩至小体积，真空干燥得知母皂苷 BII 粗样品 59.3g。取粗样品其中 50g 溶解于 200ml 25％丙酮溶液，通入 25％丙酮平衡好的 C18 柱（6.5L）。依次用 28％丙酮（20000ml）、30％丙酮（20000ml）洗脱，80％丙酮（15000ml）再生柱子。28％和 30％丙酮部分分步收集，每份 600mL，HPLC 检测各份纯度。将 6－25 份合并，回收丙酮，浓缩至小体积，冰干得知母皂苷

BII15.6g。取其中 14.1g 样品再溶解于 70ml 25％的丙酮中，通入 25％丙酮平衡好的 C18 柱（6.5L）。用 28％丙酮（40000ml）洗脱，80％丙酮（1200ml）再生柱子。分步收集，每份 600mL，HPLC 检测各份纯度。将 8－19 份合并，回收丙酮，浓缩至小体积，冰干得知母皂苷 BII 4.5g，产品收率为新鲜根茎的 0.15%（相当干药材的 0.44%），HPLC 检测纯度为 98.6％。

样品为白色无定形粉末，mp>243 ℃ (dec)。Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应呈阳性，对 Ehrlich 试剂亦呈阳性反应。

知母皂苷 BII 的结构鉴定：利用红外、质谱和核磁等手段进行了结构鉴定，结果如下。

IR(漫反射)cm^{-1} :3348(OH), 2930, 2850, 1075, 1044(苷键 C-O)。

FAB-MS m/z 943$(M+Na)^+$, 903$(M+H-H_2O)^+$, 741$(M+H-H_2O-Glc)^+$, 579$(M+H-H_2O-Glc \times 2)^+$, 417$(M+H-H_2O-Glc \times 2-Gal)^+$, 399(苷元$+H-H_2O \times 2)^+$, 255, 185, 145。

EI-MS m/z 740$(M-H_2O-Glc)^+$, 578$(M-H_2O-Glc \times 2)^+$, 416(苷元$-H_2O)^+$, 415(苷元$-H-H_2O)^+$, 357, 273, 217, 181, 139。

^{1}H-NMR(C_5 D_5 N) δ :0.85(3H, S, 18-CH_3), 0.96(3H, S, 19-CH_3), 1.00(3H, d, J=6.4Hz, 27-CH_3), 1.30(3H, d, J=6.8Hz, 21-CH_3), 4.79(1H, d, J=7.8Hz, Glc 1-H), 4.90(1H, d, J=7.8Hz, Gal 1-H), 5.27(1H, d, J=7.8Hz, Glc 1-H)。

^{13}C-NMR 谱数据见表 1 。此化合物为 (25S)-26-0-β-D-葡萄吡喃糖基-22-羟基-5β-呋甾-3β、26-二醇-3-0-β-D-葡萄吡喃糖基(1→2)-β-D-半乳吡喃糖苷。

表 1. 知母皂苷 BII 的 ^{13}C - NMR 化学位移（C_5D_5N）

碳	化学位移	碳	化学位移
苷元		糖	
1	30.9	gal - 1	102.5
2	27.0	2	81.8
3	75.0	3	76.9
4	30.9	4	69.8
5	36.9	5	76.5
6	26.7	6	62.1
7	26.7	glc - 1	106.1
8	35.4	2	75.5
9	40.2	3	78.0
10	35.2	4	71.4
11	21.1	5	78.4
12	40.4	6	62.7
13	41.2	26glc - 1	105.1
14	56.4	2	75.2
15	32.4	3	78.5
16	81.2	4	71.6
17	64.0	5	78.4
18	16.7	6	62.7
19	24.0		
20	40.6		

21	16.4
22	110.6
23	37.1
24	28.3
25	34.4
26	75.3
27	17.4

对比实施例 1

知母皂苷 BII 的制备

中药知母饮片 1Kg，适当粉碎，加 60％乙醇 6L 浸泡 1 小时，加热回流提取 1 小时，过滤；药渣再同样回流提取 2 次。合并乙醇提取液，回收乙醇，减压浓缩至 4L。浓缩液中加入 4L 水饱和正丁醇振摇混匀后静置分层，取上层正丁醇液；下层水液再加入水饱和正丁醇同样萃取 4 次，合并 5 次萃取的正丁醇液浓缩至干，得到总皂苷 33.1g。总皂苷用甲醇溶解，拌入硅胶 60g，加热挥干溶剂。将拌好的样品上样到干法装好的硅胶层析柱（3L）中，氯仿－甲醇－水梯度洗脱，收集氯仿－甲醇－水（60：40：10 下相）洗脱含知母皂苷 BII 的部分浓缩至干，得粗品 2.3g；再经硅胶柱层析（500mL），氯仿－甲醇－水洗脱，收集氯仿－甲醇－水（65：35：10 下相）洗脱部分，每份 50ml，第 15－23 份浓缩干得样品 0.67g。此样品用 32％甲醇溶解，进行 C18 反相柱层析（600ml），依次用 32％甲醇（1800ml）、34％甲醇（1800ml）洗脱，90％甲醇（1200ml）再生柱子。32％和 34％甲醇部分分步收集，每份 50mL。HPLC 检测各份纯度，第 13－21 份合并，回收甲醇，浓缩至小体积，冰干，得知母皂苷 BII 样品 0.34g，HPLC 检测纯

度为 75.5%；此样品溶解于 30％的丙酮中，95℃水浴回流加热 5 小时，回收丙酮，浓缩，冰干得知母皂苷 BII 0.33g，产品收率为药材的 0.033%，纯度为 93.4％。

权 利 要 求

1. 一种改进的知母皂苷 BII 的制备方法，其包括:

a）将市售的中药知母饮片或者新鲜采集的知母（*Anemarrhena asphodeloides* Bge.）根茎或须根为原料，用选自水、丙酮、乙醇、丙醇或它们的至少两种混合物溶剂提取，

b）将 a）中提取物通过选自树脂吸附、聚酰胺层析、反相柱层析法或 Sephadex LH-20 柱层析法的一种或者多种方式分离，用水、丙酮、乙腈、乙醇、丙醇或它们的至少两种混合物作洗脱剂洗脱，

c）合并 b）中洗脱液，然后干燥得到知母皂苷 BII。

2. 如权利要求 1 所述方法，其特征在于 a）中提取是在室温或加热状态下提取、超声波振荡仪超声振荡提取，提取次数可以是一次，也可以是多次。

3. 如权利要求 1 所述方法，其特征在于 a）中所述溶剂提取是在水煎煮原料后，用下述方法之一提取:

10－95％的乙醇水溶液回流、渗漉或超声提取;

10－80％的丙酮水溶液回流、渗漉或超声提取。

4. 如权利要求 1 所述方法，其特征在于 b）中所述树脂吸附法中所用的树脂为聚苯乙烯型大孔吸附树脂，洗脱溶剂选自：由水、丙酮、乙醇和丙醇组成的溶剂，洗脱时可以等浓度洗脱，也可以梯度洗脱。

5. 如权利要求 4 所述方法，其特征在于 b）中所述树脂为 D-101 型吸附树脂、AB-8 型吸附树脂、XAD-2 型吸附树脂、HP20 型吸附树脂、SP825 型吸附树脂、SP700 型吸附树脂、CHP-20P

型吸附树脂或者 SP70 型吸附树脂。

6. 如权利要求 5 所述方法，其特征在于所述树脂吸附法为：使溶剂提取液的离心上清液或过滤液通过大孔树脂吸附，用水或 5－30％的丙酮、乙醇或丙醇的水溶液淋洗除去杂质，用量为柱体积的 2－7 倍，再用 20－70％的丙酮或乙醇或丙醇的水溶液洗脱，用量为柱体积的 2－7 倍。

7. 如权利要求 1 所述知母皂苷 BⅡ的分离制备方法，其特征在于 b）所述聚酰胺层析为柱层析法或静态吸附过滤法，洗脱剂选自由水、丙酮、乙腈、乙醇或丙醇组成的溶剂，洗脱时可以等浓度洗脱，也可以梯度洗脱。

8. 如权利要求 1 所述方法，其特征在于 b）中所述聚酰胺层析为：使含知母皂苷 BII 的水溶液通过聚酰胺柱，用水或 0－15％的丙酮、乙醇或丙醇的水溶液洗脱，用量为柱体积的 2－5 倍。

9. 如权利要求 1 所述方法，其特征在于所述反相柱层析法为常压或加压反相柱层析，所用柱填料为十八烷基键合相（ODS）或八烷基键合相，洗脱剂选自由含水乙腈、含水丙酮、含水乙醇和含水丙醇组成的洗脱剂，洗脱时可以等浓度洗脱，也可以梯度洗脱。

10. 如权利要求 1 所述知母皂苷 BⅡ的分离制备方法，其特征在于所述 Sephadex LH-20 柱层析法为常压或加压柱层析，洗脱剂选自由含水乙腈、含水丙酮、含水乙醇和含水丙醇组成的洗脱剂，洗脱时可以等浓度洗脱，也可以梯度洗脱。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2005/000554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C07J71/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07J71/00, A61K31/58, C07J, A61K31/56:A61K31/585

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNPAT, WPI, PAJ, EPODOC, CAPLUS

136656-07-0(CAS RN) et al.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ma, Baiping; et al. "Studies on the furostanol saponins from Anemarrhena asphodeloides Bunge", Yaoxue Xuebao, Vol.31, No.4, 1996, p 271~277, The whole document.	1-10
A	Jianying Zhang; et al. "Effect of six steroidal saponins isolated from anemarrhenae rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood", Clinica Chimica Acta, Vol.289, No.1-2, 1999, p 79—88, The whole document.	1-10
A	Noboru Nakashima; et al. "Isolation of pseudoprototimosaponin AIII from rhizomes of Anemarrhena asphodeloides and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice", J. Nat. Prod., Vol. 56,No.3, Mar. 1993, p 345—350, The whole document.	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 Jul. 2005 (04.07.2005)	04 · AUG 2005 (04 · 08 · 2005)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer Telephone No. (86-10)62085593

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2005/000554

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP2000-204043 A(OTSUKA PHARMA FACTORY INC.). 25 Jul.2000 (25.07.2000) The whole document.	1-10
A	JP4-54194 A(WAKUNAGA PHARMA .CO. LTD.). 21 Feb.1992(21.02.1992) The whole document.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2005/000554

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP2000-204043 A	25 Jul. 2000	None	
JP4-54194 A	21 Feb. 1992	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2005/000554

A. 主题的分类

IPC7: C07J71/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07J71/00, A61K31/58, C07J, A61K31/56:A61K31/585

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNKI, CNPAT, WPI, PAJ, EPODOC, CAPLUS

136656-07-0(CAS RN) 等。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	马百平等，“知母中呋甾皂甙的研究”，药学学报，Vol. 31，No.4，1996年，P 271～277。 全文。	1-10
A	Jianying Zhang 等，“Effect of six steroidal saponins isolated from anemarrhenae rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood”，Clinica Chimica Acta， Vol. 289, No. 1-2, 1999 年， p 79－88，全文。	1-10
A	Noboru Nakashima 等，“Isolation of pseudoprototimosaponin AIII from rhizomes of Anemarrhena asphodeloides and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice”，J. Nat. Prod. , Vol. 56,No.3, 1993 年 3 月， p 345－350。全文。	1-10

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
04. 7 月 2005（04.07.2005）	04 · 8月 2005 (04 · 08 · 2005)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号： (86-10)62019451	受权官员 印送 电话号码：(86-10)62085593

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2005/000554

C(续). 相关文件

类 型	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	JP2000-204043 A (株式会社大塚製薬工場)，2000 年 7 月 25 日（25.07.2000）,全文。	1-10
A	JP4-54194 A（湧永製薬株式会社）1992 年 2 月 21 日（21.02.1992），全文。	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2005/000554

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
JP2000-204043 A	2000 年 7 月 25 日	无	
JP4-54194 A	1992 年 2 月 21 日	无	