



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102451235 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201010523056. 7

A61P 11/00(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 10. 27

A61Q 19/00(2006. 01)

A61Q 19/08(2006. 01)

(71) 申请人 深圳劲创生物技术有限公司

A61Q 17/04(2006. 01)

地址 518057 广东省深圳市南山区科技园科
智西路 5 号 25 栋西一楼

A23L 1/30(2006. 01)

A61K 127/00(2006. 01)

(72) 发明人 左小峰 陈文良 陈利琼 周云

(74) 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理
有限公司 44217

代理人 郭伟刚

(51) Int. Cl.

A61K 36/63(2006. 01)

A61K 8/97(2006. 01)

C07H 17/04(2006. 01)

A61P 39/06(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

A61P 31/12(2006. 01)

A61P 33/02(2006. 01)

A61P 33/00(2006. 01)

A61P 33/12(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 4 页

(54) 发明名称

油橄榄叶提取物的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种油橄榄叶提取物的制备方法,包括:将油橄榄干叶投料到极性溶剂中进行提取;提取液回收溶剂后,加水和辅料,混匀、静置、压滤,合并滤液;滤液经大孔树脂吸附、乙醇水混合液解吸附后,收集解吸液;解吸液回收溶剂后真空浓缩,干燥,得到油橄榄叶提取物。本发明采用添加辅料和大孔树脂纯化的组合发明方法制备油橄榄叶提取物,工艺简单、成本低廉,得到的油橄榄叶提取物中,橄榄苦苷含量高,适于大规模生产。



1. 一种油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
步骤一:将油橄榄干叶投料到极性溶剂中进行提取;
步骤二:提取液回收溶剂后,加水和辅料水沉,混匀、静置、压滤,合并滤液;
步骤三:采用大孔树脂柱层析法纯化,步骤二的滤液经大孔树脂吸附、乙醇水混合液解吸附后,收集解吸液;
步骤四:解吸液回收溶剂后真空浓缩,干燥,得到油橄榄叶提取物。
2. 根据权利要求1所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述油橄榄干叶为新鲜的油橄榄叶经阴干得到,或者在70-110℃下干燥1-3h得到。
3. 根据权利要求2所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述油橄榄干叶中的含水量低于10%,橄榄苦苷含量不低于4%。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述油橄榄干叶还要经过除杂、破碎步骤。
5. 根据权利要求1所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述极性溶剂为醇度50-85%的乙醇水溶液,油橄榄干叶与极性溶剂的重量体积比为1:5-15。
6. 根据权利要求1所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述步骤一的提取方法为加热回流、浸渍或渗漉,所述加热回流的次数为二次或二次以上。
7. 根据权利要求1所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述步骤二中,水沉时使水与油橄榄干叶的重量体积比为5-12:1。
8. 根据权利要求1或7所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述步骤二的辅料为硅藻土。
9. 根据权利要求1所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述步骤三中的乙醇水混合液为醇度20-70%的乙醇水溶液。
10. 根据权利要求1所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其特征在于,所述步骤四中的干燥方法为真空干燥、喷雾干燥、鼓风干燥中的至少一种。

油橄榄叶提取物的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及天然物质的提取技术领域,更具体而言,涉及一种油橄榄叶提取物的制备方法,尤其涉及一种富含橄榄苦苷的油橄榄叶提取物的制备方法。

背景技术

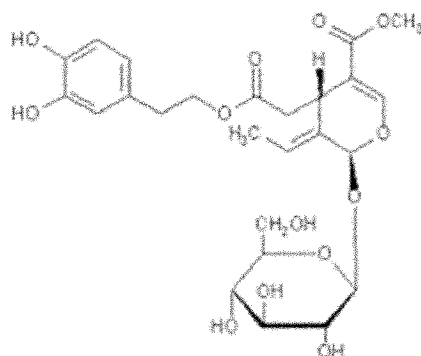
[0002] 油橄榄 (*Olea europaea* L.), 属木犀科 (*Oleaceae*) 木犀榄属 (*Olea*) 常绿乔木, 是世界著名的木本油料树种, 有 4000 多年的栽培历史。油橄榄主要分布在北纬 45° 到南纬 37° 之间, 中心分布区是地中海国家, 希腊、意大利、突尼斯、西班牙为集中产地, 现在世界各国均有引种栽培。我国传统中药所用的橄榄为橄榄科植物橄榄 (*Canarium album* Raeusch) 的果实, 也称野橄榄, 与油橄榄 (木犀科) 不是同一属植物, 二者的用途明显不同。

[0003] 我国于 1964 年引种油橄榄以来, 经过科研工作者多年的研究, 确定我国适于油橄榄生长和结实的最佳适生区为: 嘉陵江上游白龙江低山河谷区, 以甘肃省武都县为中心, 种植面积约 4 万公顷; 金沙江干热河谷区, 以四川省西昌为中心, 种植面积约 10 万公顷; 长江三峡低山河谷区, 包括四川省万县、巫山、奉节; 湖北省巴东、秭归、宜昌等, 油橄榄面积约 15 万公顷; 秦岭带以陕西汉中和四川广元为中心, 约有 15 万公顷。近十年来, 在西部开发政策支持下, 油橄榄的种植发展较快, 甘肃、四川二省的基地建设已初具规模, 并建立起橄榄油加工厂, 油橄榄果实得到充分利用, 但每年因修剪而废弃的油橄榄叶在数千吨以上, 而未得到很好利用。

[0004] 橄榄苦苷 (oleuropein) 是橄榄中的苦味素, 是一种苯酚类裂环烯醚萜苷, 广泛存在于木犀科木犀榄属植物油橄榄 (洋橄榄) (*Olea europaea* L.) 和卡岑属植物日本白蜡树 (*Fraxinus japonica* Blume) 等植物叶中, 以及女贞属植物女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait) 和日本女贞 (*Ligustrum japonica* Thunb) 等植物果实中。由于其在多种天然产物生物途径中的重要性, 裂环烯醚萜类化合物被认为是木犀榄科植物化学分类学上的标记化合物, 是多酚的主要成分之一。

[0005] 橄榄苦苷分子式 $C_{25}H_{32}O_{13}$, 分子量 540.52, 熔点 87 ~ 89°C, 易吸湿, 易溶于乙醇、丙酮、吡啶等, 可溶于水、丁醇、乙酸乙酯等, 几乎不溶于乙醚、石油醚、氯仿等, 其结构式如下所示:

[0006]



[0007] 橄榄苦苷是一种生物活性物质, 具有极强的抗氧化能力, 用于护肤品可以促进肌

肤胶原蛋白再生,纠正老化痕迹,自然抵御由氧化而导致的肌肤破坏,免受紫外线伤害,有效维持肌肤柔嫩与弹性,国外许多知名品牌的高档化妆品中均有添加。其抗氧化活性已经被众多学者所证实,同时橄榄苦苷具有强力的抗细菌和抗病毒特性,可用于制造治疗病毒、细菌、原生动物类、寄生虫和吸血虫等所引起的疾病和治疗感冒的新药。油橄榄叶提取物已在美洲和欧洲用作膳食补充剂以增强免疫功能。

[0008] 中国专利 CN101003557 公开了一种富含高纯度橄榄苦苷的油橄榄叶提取物的制备方法,通过橄榄叶极性溶剂提取、碱性离心沉降、离心清液、膜耦合分离等步骤得到通过纳滤膜的浓缩液,然后介质吸附、解吸附得到洗脱液,真空浓缩后干燥,获得橄榄苦苷含量大于 50% 的富含高纯度橄榄苦苷的油橄榄叶提取物。该方法采用碱性沉降、膜分离和介质吸附相结合的方法获得了纯度为大于 50% 橄榄苦苷的油橄榄叶提取物,但实际操作步骤过多,不利于工业化大生产,而且膜分离设备首期投资大,提高了产品成本。中国专利申请 CN101084945 同样采用膜设备微滤、超滤、纳滤进行纯化,其获得有效成分橄榄苦苷的含量达到 40% 以上,但其收率较低,单位生产成本低。

[0009] 中国专利 CN1583052 公开一种橄榄叶提取物提取制备方法,将橄榄叶二氧化氯消毒漂洗,干燥后醇提,真空浓缩,在浓缩液中加入茶多酚抗氧化,经干燥获得橄榄叶提取物,其制备的橄榄叶提取物有效成分含量低,且收率低。美国专利 US5714150 中采用醇水溶液热提二次以上,提取液真空浓缩后喷雾干燥或者真空干燥,其制备得到含橄榄苦苷 30-40% 的橄榄叶提取物。日本特开 2002128678 用含水溶剂提取,合成树脂处理后,干燥得到含橄榄苦苷 25% 以上的提取物。这些提取物中橄榄苦苷的含量太低,均不能满足市场要求。

[0010] 另外,还有中国专利申请 CN101781344 公开了一种橄榄叶提取物的制备方法,橄榄叶极性溶剂提取;水沉,离心;离心液分别用石油醚、乙酸乙酯萃取;乙酸乙酯相回收溶剂后,加水或醇水稀释,0.45 μ m 纳滤膜滤过,制备型高效液相色谱柱分离,干燥后得到含橄榄苦苷 > 90% 的橄榄叶提取物。欧洲专利 EP1795201 中将橄榄叶磨成直径 0.05 到 1 毫米的细粉, pH8.0 碱水提取;水提液经有机溶剂萃取,萃取液真空低温干燥得到含橄榄苦苷 40-45% 的粗提物;此粗提物再经快速硅胶色谱柱纯化,收集含橄榄苦苷部分的解吸液,回收溶剂后得到含 95-98% 橄榄苦苷的非晶质固体。虽然这两种方法中橄榄苦苷含量较高,但它们均更适合于科学研究,成本偏高,难以实现规模化生产。

发明内容

[0011] 本发明要解决的技术问题在于,针对现有技术中提取步骤复杂、成本高、橄榄苦苷含量低的缺陷,提供一种工艺简单、成本低的油橄榄叶提取物的制备方法,利用该方法得到的油橄榄叶提取物中的橄榄苦苷含量较高。

[0012] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:一种油橄榄叶提取物的制备方法,包括以下步骤:

[0013] 步骤一:将油橄榄干叶投料到极性溶剂中进行提取;

[0014] 步骤二:提取液回收溶剂后,加水和辅料水沉,混匀、静置、压滤,合并滤液;

[0015] 步骤三:采用大孔树脂柱层析法纯化,步骤二的滤液经大孔树脂吸附、乙醇水混合液解吸附后,收集解吸液;

[0016] 步骤四:解吸液回收溶剂后真空浓缩,干燥,得到油橄榄叶提取物。

[0017] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述油橄榄干叶为新鲜的油橄榄叶经阴干得到,或者在 70-110℃ 下干燥 1-3h 得到。

[0018] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述油橄榄干叶中的含水量低于 10%,橄榄苦苷含量不低于 4%。

[0019] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述油橄榄干叶还要经过除杂、破碎步骤。

[0020] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述极性溶剂为醇度 50-85% 的乙醇水溶液,油橄榄干叶与极性溶剂的重量体积比为 1 : 5-15。

[0021] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述步骤一的提取方法为加热回流、浸渍或渗漉,所述加热回流的次数为二次或二次以上。

[0022] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述步骤二中,水沉时使水与油橄榄干叶的重量体积比为 5-12 : 1。

[0023] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述步骤二的辅料为硅藻土。

[0024] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述步骤三中的乙醇水混合液为醇度 20-70% 的乙醇水溶液。

[0025] 本发明所述的油橄榄叶提取物的制备方法,其中,所述步骤四中的干燥方法为真空干燥、喷雾干燥、鼓风干燥中的至少一种。

[0026] 本发明的油橄榄叶提取物的制备方法,采用极性溶剂提取油橄榄叶中的橄榄苦苷,并通过醇提水沉法进行预处理,然后采用大孔树脂吸附橄榄苦苷,最后浓缩、干燥,得到油橄榄叶提取物。

[0027] 本发明的油橄榄叶提取物的制备方法,在醇提水沉法的水沉时,添加辅料硅藻土(diatomite),利用物理方法代替化学方法吸附油脂,避免了化学方法带来的溶剂污染,有效地防止了油脂污染大孔树脂和影响大孔树脂的纯化与再生。

[0028] 本发明的油橄榄叶提取物的制备方法中,通过利用硅藻土吸附油脂和采用大孔树脂富集目标产物橄榄苦苷的结合,有效地提高了最终得到的油橄榄叶提取物中橄榄苦苷的含量,橄榄苦苷在提取物中的质量百分数可达到 55% 以上。

[0029] 本发明的油橄榄叶提取物的制备方法,不仅得到的油橄榄叶提取物可满足市场需求,而且工艺步骤少,工艺简单,整个流程易操作,降低了成本。另外,本发明的油橄榄叶提取物的制备方法耗能少、基本无环境污染,得到的产品收率及纯度高,适于规模化生产。

附图说明

[0030] 下面将结合附图及实施例对本发明作进一步说明,附图中 :

[0031] 图 1 是本发明的油橄榄叶提取物的制备方法的流程图 ;

[0032] 图 2 是橄榄苦苷对照品的 HPLC 图谱 ;

[0033] 图 3 是流率 2BV/h 流出液的 HPLC 图谱 ;

[0034] 图 4 是上样浓度 6mg/mL 流出液的 HPLC 图谱 ;

[0035] 图 5 是 70% 乙醇解吸液的 HPLC 图谱 ;

[0036] 图 6 是本发明实施例 1 的油橄榄叶提取物的 HPLC 图谱。

[0037] 图 7 是本发明实施例 2 的油橄榄叶提取物的 HPLC 图谱。

[0038] 图 8 是本发明实施例 3 的油橄榄叶提取物的 HPLC 图谱。

[0039] 图 9 是本发明实施例 4 的油橄榄叶提取物的 HPLC 图谱。

具体实施方式

[0040] 在此,为了避免混淆,申请人认为有必要指出的是,本说明书中所述的油橄榄叶或油橄榄干叶为木犀科木犀榄属油橄榄的叶子,而非我国传统中药所用的橄榄科植物橄榄的叶子。

[0041] 另外,有必要指出的是,本说明书中使用的百分比,如无特别说明,一般是指质量分数。在此,短语“重量体积比”是指以 kg 为计量单位的固体物质与以 L 为计量单位的液体物质之间的比例,或者是指以 L 为计量单位的液体物质与以 kg 为计量单位的固体物质之间的比例。应当理解的是,不管固体物质在前或是液体物质在前,“重量体积比”中,“重量”是指固体物质以 kg 为计量单位的重量,“体积”是指液体物质以 L 为计量单位的体积。而且,若固体物质在前,“重量体积比”是固体物质的重量与液体物质的体积间的比值;反之,若液体物质在前,“重量体积比”是液体物质的体积与固体物质的重量间的比值。为了更清楚地表达该意思,例如油橄榄干叶与极性溶剂的重量体积比为 1 : 5 或极性溶剂与油橄榄干叶的重量体积比为 5 : 1,均是指 1kg 油橄榄干叶和 5L 极性溶剂、2kg 油橄榄干叶和 10L 极性溶剂、5kg 油橄榄干叶和 25L 极性溶剂或 100kg 油橄榄干叶和 500L 极性溶剂或 200kg 油橄榄干叶和 1000L 极性溶剂,以及其它存在类似关系的油橄榄干叶和极性溶剂。

[0042] 在利用油橄榄叶提取物的制备方法生产富含橄榄苦苷的油橄榄叶提取物之前,通常要对油橄榄叶进行选择 and 一定的预处理。

[0043] 一般地,受生长周期的影响,4 月和 11 月采摘的油橄榄叶中橄榄苦苷的含量最低,因此,依据本发明,为了不使最终提取物中橄榄苦苷含量受到过大影响,所使用的油橄榄叶不在这两个月份中进行采集。另外,在一年的其它时间中,虽然因生长周期影响,油橄榄叶中橄榄苦苷含量会有波动,但是对得到的油橄榄叶提取物中的橄榄苦苷的最低含量无太大影响。为了在油橄榄叶提取物中得到含量较高的的橄榄苦苷,也可根据中国专利 CN101003557 中的建议,在 2 月或 5 月份采集油橄榄叶。

[0044] 从油橄榄树上采集的新鲜的油橄榄叶,需要经过干燥,然后方用于油橄榄叶提取物的制备。应当理解,此处所述的“新鲜的油橄榄叶”是指油橄榄叶从树上采下之后不超过 48h 的油橄榄叶,因为采下的油橄榄叶一旦经过较长时间未经处理,其中含有的橄榄苦苷将会大量分解,导致提取物中含量显著降低,达不到市场需求的含量水平。为此,建议从油橄榄树上采下的新鲜的油橄榄叶立刻用于油橄榄叶提取物的制备,以尽可能地减少橄榄苦苷的降解。

[0045] 另外,对新鲜的油橄榄叶进行的干燥处理,是为了除去油橄榄叶中的水分,使橄榄苦苷在油橄榄叶中所占比重提升。一般地,经过依据本发明的方法对油橄榄叶干燥后,得到的油橄榄干叶中,水分含量低于 10%,橄榄苦苷含量不低于 4%。优选地,油橄榄干叶中水分含量低于 6%。虽然现有技术中已有许多油橄榄叶的干燥方法,但是,在此优选地,该处采用的方法为:将新鲜的油橄榄叶阴干,或者在 70-110℃ 下干燥 1-3h 得到油橄榄干叶。阴干时间无特别限定,通过下面所述的烘干测定法测定油橄榄叶中的水分含量,当其低于 10% 时即表示阴干处理结束。在高温快速干燥处理中,例如在温度为 70℃、75℃、80℃、85℃、

90℃、95℃、100℃、105℃或110℃的高温下加热干燥,干燥时间例如为1h、1.5h、2h、2.5h、3h等。经过干燥步骤后,油橄榄干叶中的水分及橄榄苦苷的含量均可达到上述的标准。

[0046] 另外,为了进一步去除杂质并便于橄榄苦苷的溶剂提取,还对油橄榄干叶进行除杂和破碎步骤。一方面,除杂步骤减少了杂质含量,有助于提升提取物成品的品质,另一方面,破碎步骤将油橄榄干叶破碎成粗粉或较小的颗粒,便于其与提取溶剂的接触表面积,使橄榄苦苷更容易提取到溶剂中去。由于在后续的过滤步骤中,粗粉或颗粒可能会堵塞滤网上的孔,故也可以不将全部油橄榄叶破碎,留出一少部分置于滤网或滤膜上,以防止滤网或滤膜孔眼的堵塞,影响放液、回流、渗漉效率。

[0047] 图1是本发明的油橄榄叶提取物的制备方法的流程图。本说明书中,油橄榄叶提取物的制备方法,包括以下步骤:

[0048] a) 将油橄榄干叶投料到极性溶剂中进行提取。

[0049] 该步骤中,极性溶剂是指甲醇、乙醇、水、丙酮、丙醇、丁醇等极性溶剂中的一种或几种,此处优选的是,极性溶剂是醇度为50-85%的乙醇水溶液,油橄榄干叶与极性溶剂的重量体积比为1:5-15。例如,极性溶液是醇度50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%的乙醇水溶液,油橄榄干叶与极性溶剂的重量体积比为1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15。另外,发明人发现,极性溶剂若采用甲醇,提取效果较之其它溶剂会好,但是考虑到甲醇对人体具有较强的毒性,并且油橄榄叶提取物中甲醇的完全去除在操作上有一定的难度,为进一步降低成本以及可能存在的健康风险,故本申请的发明人优选地使用乙醇和水的混合液作为极性溶剂使用。

[0050] 另外,提取方法优选的,为加热回流、浸渍、渗漉中的一种。在加热回流方法中,提取温度优选为70-90℃,提取时间为4-8h,并提取至少两次。在浸渍或渗漉方法中,时间为24-48h。该处提到的加热回流、浸渍或渗漉均为公知的方法,本领域的技术人员在查阅相关工具书或科技文献后即可容易地得到这些方法的具体操作步骤及其它细节。因此,本说明书不再对其进行详细说明,上术方法均可参考例如中国中医药出版社2003年出版的《中药药剂学》第一版。此处给出的例子是为了更容易地理解本发明而给出的,如无特别说明,并不对本发明构成任何限制。

[0051] b) 将上一步得到的提取液回收溶剂后,加水 and 辅料水沉,混匀、静置、压滤,合并滤液。

[0052] 该步中首先将提取液中的极性溶剂回收,然后进行水沉,加水的目的即为了在水沉时使水与油橄榄干叶的重量体积比为5-12:1,例如,重量体积比为5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1。另外,还要添加辅料,水沉时间优选为4-20h,水沉液全部过滤。该处所指的混匀,是本领域的技术人员公知的意思,即使混合液中各组成成分的分布均一,形成匀质的溶液或混合液。此处,辅料是指硅藻土,其用于通过物理方法吸附油脂,避免化学法导致的溶剂污染问题,有效地防止提取液中的油脂污染大孔树脂。

[0053] c) 采用大孔树脂柱层析法纯化,即上一步骤中的滤液经大孔树脂吸附、乙醇水混合液解吸附后,收集解吸附液。

[0054] 在大孔树脂吸附过程中,优选地,大孔树脂与油橄榄干叶的重量比为1-3:1,吸附流速为0.5-3倍柱体积每小时。另外,优选地,解吸附溶剂为20-70%的乙醇水溶液,其与柱体积的体积比为3-5:1。

[0055] d) 解吸液回收溶剂后真空浓缩,干燥,得到油橄榄叶提取物。

[0056] 该步骤中,真空浓缩一般浓缩至波梅度(波美度)为 10-15° Bé,然后干燥,干燥采用真空干燥、喷雾干燥、鼓风干燥中的至少一种。

[0057] 大孔树脂的筛选

[0058] 大孔树脂,也称为大孔吸附树脂,其分离技术的主要原理为,大孔树脂对溶液中的不同有机物质成分具有选择性的吸附作用。通过选择合适的解吸附溶剂和条件,即可达到分离纯化的目的。大孔树脂的极性和空间结构是影响吸附的主要因素。由于理化性质稳定、可反复使用、单位成本低等特点,大孔树脂很适于工业生产。但是,大孔树脂分离技术的一个主要问题在于,大孔树脂的吸附、分离作用的专属性较高。通常,一个型号的吸附树脂只对某一种(类)的有机物质具有良好的分离提纯效果,甚至换了型号,分离提纯效果就大打折扣。为此,本申请的发明人在已有的葡萄籽、朝鲜蓟等大孔树脂技术的基础上,对适于橄榄苦苷提取的大孔树脂进行了筛选。

[0059] 1. 色谱条件确定

[0060] 色谱条件如下所示。

[0061] 色谱柱:YMC ODS C₁₈ 柱,规格 150*4.6mm,5 μ m;温度:室温;检测波长:230nm;流动相:乙腈:0.2%乙酸水(v:v=24:76);流速:1mL/min。

[0062] 另外,色谱中使用的橄榄苦苷对照品的 HPLC 图谱如图 2 所示。

[0063] 2. 树脂筛选

[0064] 本申请的发明人采用动态吸附法,比较了 HPD-100、AB-8、D101、LSA-8、LSA-21、LS-300B 等几种不同树脂的吸附效果。根据各树脂的吸附特征参数比上柱量(S)和比吸附量(A),D101、LSA-21、LS-300B 三种树脂的吸附效果较好。结果如表 1 所示。

[0065] 表 1 树脂筛选 S、A 值

	树脂品种	极性	平均孔径 nm	比表面积	S*100		脱附率
					A*100		
[0066]	HPD-100	非极性	8.5-9	650-700	5.34	5.17	85.2%
	AB-8	弱极性	13-14	480-520	6.16	6.09	83.6%
	D101	非极性	10-12	400-600	6.85	6.81	85.6%
	LSA-8	弱极性	10-12	480-520	6.34	6.25	86.7%
	LSA-21	中极性	20-30	560-600	6.78	6.76	86.1%
	LS-300B	弱极性	20-30	700-800	6.88	6.81	91.5%

[0067] 吸附特征参数有比上柱量(S, saturationratio)和比吸附量(A, absorptionratio)。比上柱量为达吸附终点时,单位质量干树脂吸附夹带成分的总和,表示树脂吸附、承载的总体能力,S 越大,承载能力越强,是确定树脂用量的关键参数。比吸附量为单位质量干树脂吸附成分的总和,表示树脂真实吸附能力,A 越大吸附能力越强,是选择树脂种类与评价树脂再生效果的重要参数。计算公式如下:

[0068] $S = (M_{上} - M_{残}) / M$

[0069] $A = (M_{上} - M_{残} - M_{水洗}) / M$

[0070] 其中, M :干树脂质量,即为市售树脂干燥至恒重测得的质量;

[0071] $M_{\text{上}}$:上柱液中橄榄苦苷的质量,为上柱体积与橄榄苦苷浓度的乘积;

[0072] $M_{\text{残}}$:过柱流出液中橄榄苦苷的质量,为流出液体积与橄榄苦苷浓度的乘积;

[0073] $M_{\text{水洗}}$:上柱毕,最初用水洗脱下来橄榄苦苷的质量,为水洗液体积与橄榄苦苷浓度的乘积。

[0074] 3. 上样浓度及流率的确定

[0075] 3.1 流率

[0076] 取预处理的树脂,湿法装柱(柱体积 100mL)。加入油橄榄叶水沉滤过液,控制流率 0.5BV/h(柱体积/小时)、1BV/h、2BV/h、3BV/h,每 1BV 收集 1 瓶,经 HPLC 检测,计算流出液中橄榄苦苷的量。结果表明 2BV/h 以下基本无流出,3BV/h 有少量流出,流率以 2BV/h 为好。图 3 为流率 2BV/h 流出液的 HPLC 图谱。

[0077] 3.2 上样浓度

[0078] 预处理树脂,高浓度水沉滤过液分别稀释成 10mg/mL、8mg/mL、6mg/mL、4mg/mL、2mg/mL,以 2BV/h 的流率上柱,HPLC 检测流出液中橄榄苦苷含量,6mg/mL 以下基本无流出,10mg/mL 有部分流出,故确定上样浓度 6mg/mL 或以下。如图 4 所示,为上样浓度 6mg/mL 流出液的 HPLC 图谱。

[0079] 4. 洗脱剂浓度及用量

[0080] 上样水洗之后分别用醇度 30%、40%、50%、60%、70%的乙醇各 500mL(相当于 5 个柱体积)洗脱,每 50mL 收集 1 瓶,经 HPLC 检测,计算每个流分中橄榄苦苷的量。50%乙醇即可很好解吸,但用量大;60%乙醇及 70%乙醇 3BV 即可完全解吸。再增加醇的浓度,80%的乙醇没有增加产品的回收率及提高含量。如图 5 所示,为 70%乙醇解吸液的 HPLC 图谱。

[0081] 表 2 不同浓度乙醇洗脱效果

	溶剂浓度	橄榄苦苷回收率(%)	橄榄苦苷含量(%)
	30%	51.2	67.8
[0082]	40%	63.6	65.7
	50%	81.2	66.0
	60%	93.4	61.5
[0083]	70%	95.1	62.5
	80%	94.8	58.9

[0084] 5. 结论

[0085] 橄榄苦苷具有一定的极性,根据“相似相溶”原理,弱极性的几个树脂柱均具有较强的吸附能力,其中 LS-300B 树脂的吸附效果最好,洗脱比较完全,适于在工业化生产中应用。中极性 LSA-21 树脂也有较好的吸附和洗脱效果。另外,非极性的 D101 树脂也表现出了良好的吸附作用,可能与其较大的比表面积有关。

[0086] 通过对以上多个树脂产品的反复试验研究,我们得到了较高收率的、含量高的油

橄榄叶提取物,其中橄榄苦苷所占比例达到 55% 以上。在生产放大的柱设备(高 3.5 米,内径 0.5 米)中得到一致的结果,因此,这验证了本发明的油橄榄叶提取物的制备方法在大规模生产中应用的可行性。

[0087] 测量方法

[0088] 1. 水分含量的测量

[0089] 新鲜的油橄榄叶经干燥后,需测定得到的油橄榄干叶中水分的含量,使其低于 10%。水分含量一般通过《中国药典》2005 年版一部附录 IX H 水分测定法第一法(烘干法)测量得出。

[0090] 2. 醇度的测量

[0091] 乙醇水溶液中醇度通过酒精计测量。

[0092] 3. 橄榄苦苷含量的测量

[0093] 橄榄苦苷在油橄榄叶或油橄榄叶提取物中的含量测量,采用高效液相色谱法(HPLC)完成。色谱条件为:

[0094] 色谱柱:YMC ODS C_{18} 柱,规格 150*4.6mm,5 μ m;

[0095] 检测温度:室温;

[0096] 检测波长:230nm;

[0097] 流动相:乙腈:0.2%乙酸水($v:v=24:76$);

[0098] 流速:1mL/min。

[0099] 4. 收率及橄榄苦苷含量的计算

[0100] 油橄榄叶提取物的收率及其中橄榄苦苷含量的计算,根据如下公式进行计算。

[0101] 油橄榄叶提取物的收率 = $M_{\text{提取物}}/M_{\text{干叶}} \times 100\%$;

[0102] 其中, $M_{\text{提取物}}$:油橄榄叶提取物干燥后的重量(kg), $M_{\text{干叶}}$:油橄榄干叶投料重量(kg)。

[0103] 橄榄苦苷含量 = $\{(A_{\text{样品}}/A_{\text{对照品}}) \times (V_{\text{对照品进}}/V_{\text{样品进}}) \times C_{\text{对照品}} \times V_{\text{样品}}\} / M_{\text{取样量}} \times 100\%$

[0104] 其中, $A_{\text{样品}}$:样品峰面积, $A_{\text{对照品}}$:对照品峰面积, $V_{\text{对照品进}}$:对照品进样量(μ l), $V_{\text{样品进}}$:样品进样量(μ l), $C_{\text{对照品}}$:对照品浓度(mg/ml), $V_{\text{样品}}$:样品体积(ml), $M_{\text{取样量}}$:样品的取样重量(mg)。

[0105] 另外,新购买的树脂通常需要用 95% 的乙醇浸泡,并用水洗净,然后才正常使用。

[0106] 实施例 1

[0107] 经干燥的油橄榄叶 200kg,经检测,水分含量小于 6%,橄榄苦苷含量大于 5%。将橄榄叶破碎成粗粉,用 1400L 的醇度 75% 乙醇水溶液加热回流提取两次,每次 4 小时,提取液回收乙醇后浓缩,浓缩液加水 2000L 水沉,同时添加辅料硅藻土,混匀,静置 12 小时,过滤,滤液上 400kg D101 大孔树脂柱,流速 0.5BV/h,醇度 70% 乙醇水溶液解吸,解吸液回收乙醇后真空浓缩,浓缩至 10° Bé,喷雾干燥,获得油橄榄叶提取物 10.3kg,收率 5.15%,橄榄苦苷含量 61%。该实施例中,检测油橄榄叶提取物的橄榄苦苷含量的 HPLC 图谱如图 6 所示。

[0108] 实施例 2

[0109] 经干燥的油橄榄叶 200kg,经检测,水分含量小于 6%,橄榄苦苷含量大于 5%。将部分油橄榄叶破碎成粗粉,少量不粉碎,先用适量醇度 70% 乙醇水溶液润湿,使之充分膨

胀,装筒,均匀压平,打开渗漉液出口的活塞,从上部添加醇度 70%乙醇水溶液至渗漉液从出口流出,溶剂浸没表面数厘米。浸渍 24 小时后用 2000L70%乙醇开始渗漉,流速 100L/h,合并渗漉液,渗漉液回收乙醇,浓缩液加水 1600L 水沉,同时添加辅料硅藻土,混匀,静置 8 小时,压滤,滤液上 400kg D101 大孔树脂柱,流速 0.5BV/h,醇度 70%乙醇-水溶液解吸,解吸液回收乙醇后真空浓缩,浓缩至 15° Bé,真空干燥,获得油橄榄叶提取物 9.4kg,收率 4.7%,橄榄苦苷含量 64%。该实施例中,检测油橄榄叶提取物的橄榄苦苷含量的 HPLC 图谱如图 7 所示。

[0110] 实施例 3

[0111] 经干燥的油橄榄叶 200kg,经检测,水分含量小于 10%,橄榄苦苷含量大于 5%。将部分橄榄叶破碎成粗粉,留少量不粉碎,用 2000L 的醇度 70%乙醇水溶液浸渍 48 小时,每隔两小时搅拌一次,回收乙醇,浓缩液加水 2000L 水沉,同时添加辅料硅藻土,混匀,静置 12 小时,压滤,滤液上 400kg D101 大孔树脂柱,流速 2BV/h,醇度 70%乙醇水溶液解吸,解吸液回收乙醇后真空浓缩,浓缩至 15° Bé,真空干燥,获得油橄榄叶提取物 6.6kg,收率 3.3%,橄榄苦苷含量 59%。该实施例中,检测油橄榄叶提取物的橄榄苦苷含量的 HPLC 图谱如图 8 所示。

[0112] 实施例 4

[0113] 经干燥的油橄榄叶 200kg,经检测,水分含量小于 4%,橄榄苦苷含量大于 4%。将橄榄叶破碎成粗粉,用 1400L 醇度 75%乙醇加热回流提取两次,每次 4 小时,提取液回收乙醇后浓缩,浓缩液加水 2000L 水沉,同时添加辅料硅藻土,混匀,静置 12 小时,压滤,滤液上 400kg LSA-21 大孔树脂柱,流速 1BV/h,醇度 70%乙醇水溶液解吸,解吸液回收乙醇后真空浓缩,浓缩至 10° Bé,喷雾干燥,获得油橄榄叶提取物 10.7kg,收率 5.35%,橄榄苦苷含量 60%。该实施例中,检测油橄榄叶提取物的橄榄苦苷含量的 HPLC 图谱如图 9 所示。

[0114] 以上所述仅为本发明的具有代表性的实施例,不以任何方式限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换或改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

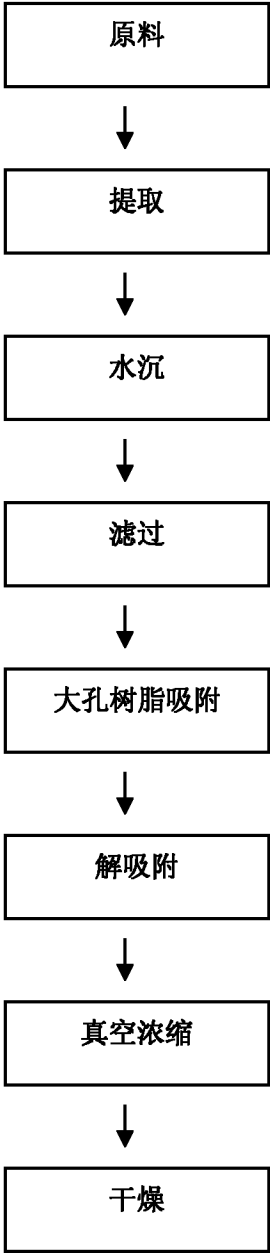


图 1

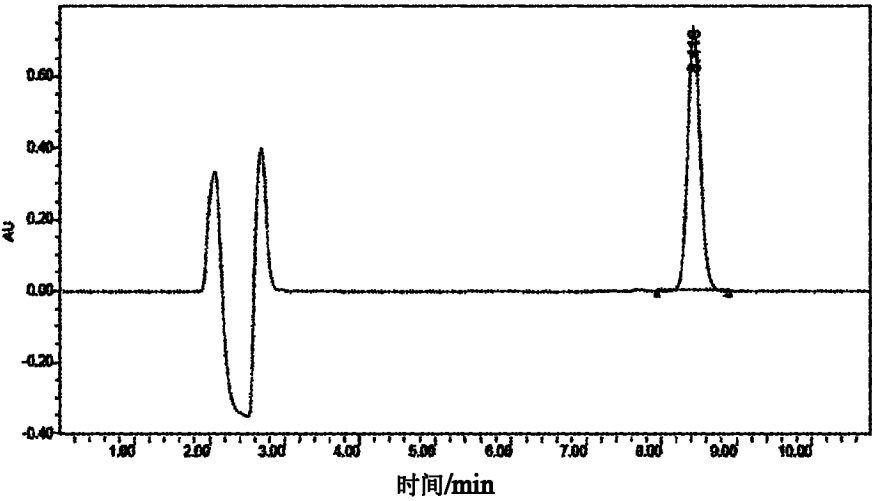


图 2

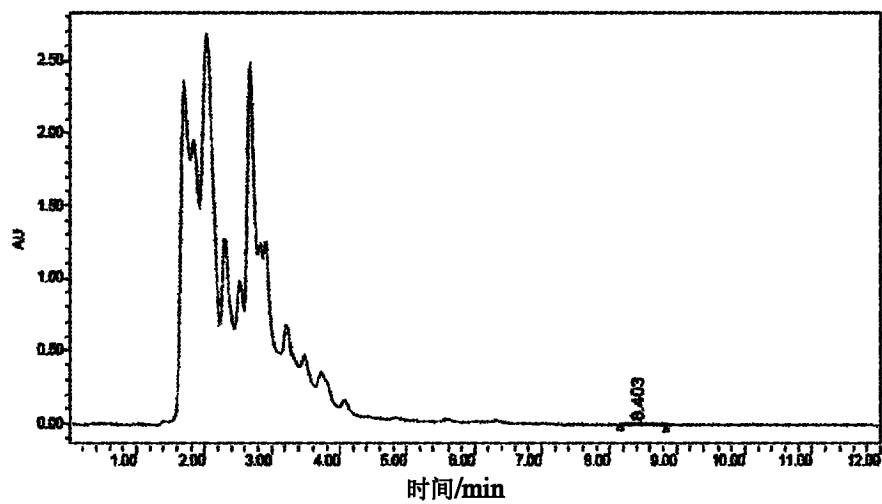


图 3

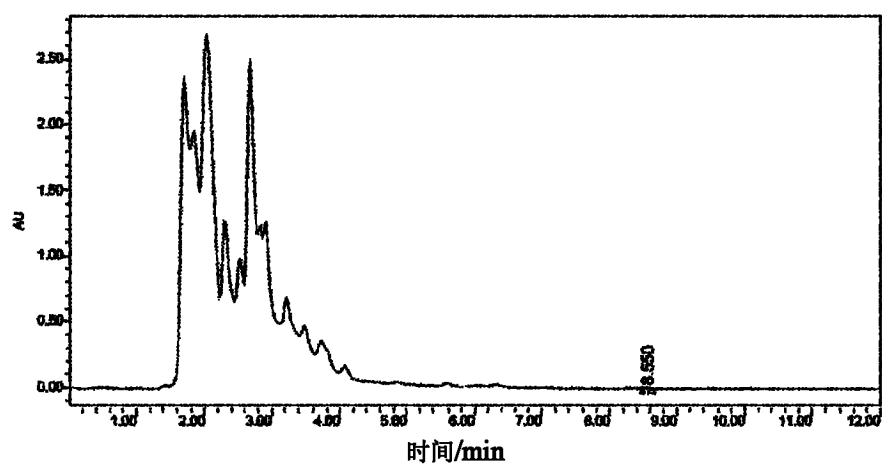


图 4

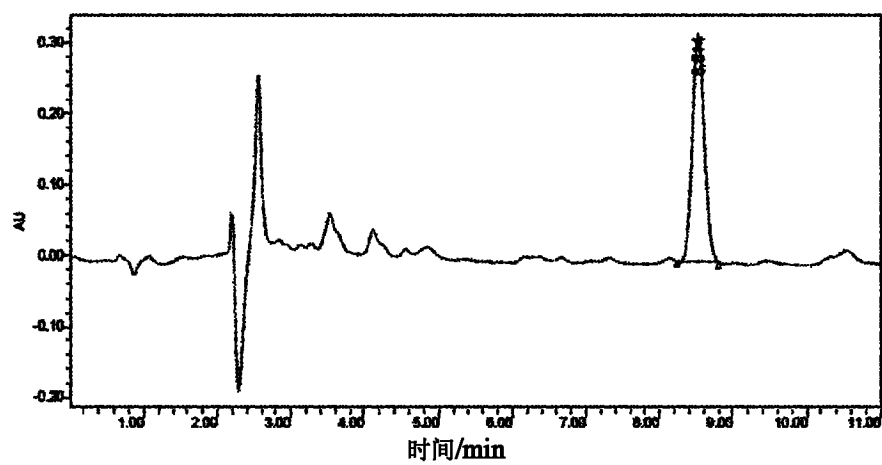


图 5

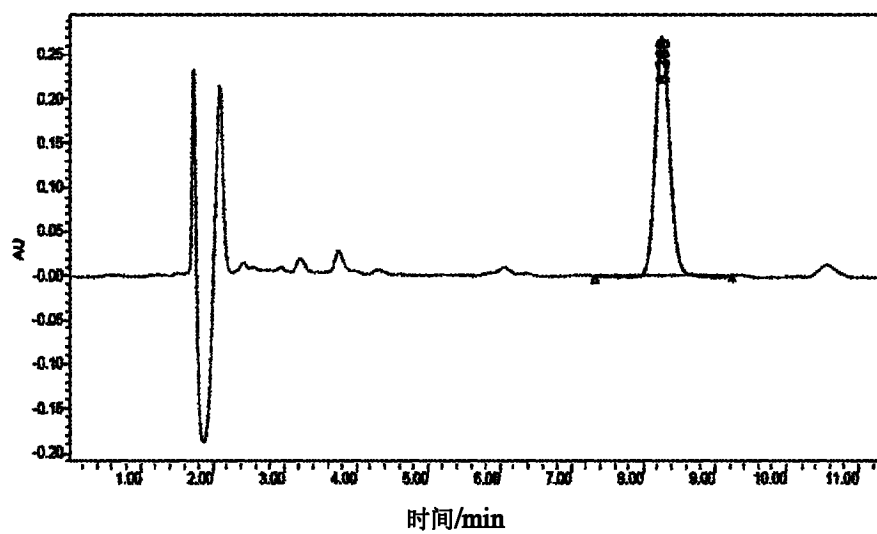


图 6

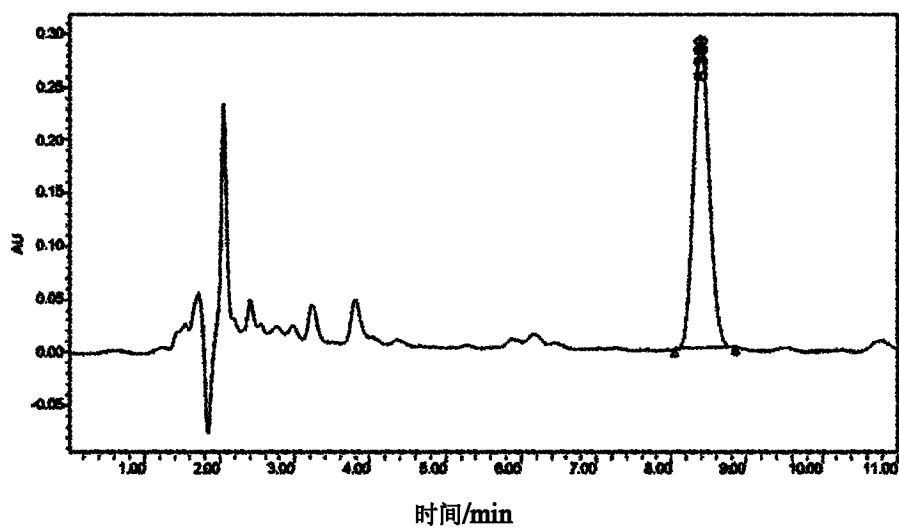


图 7

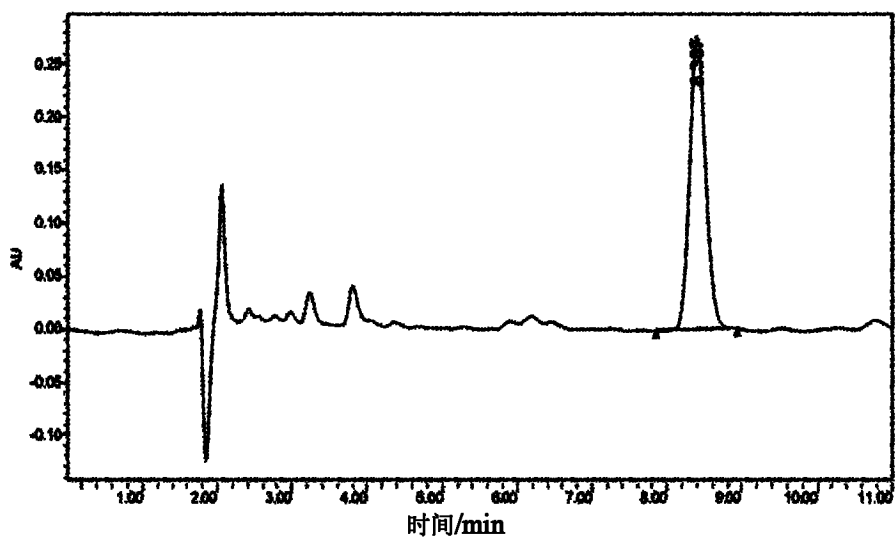


图 8

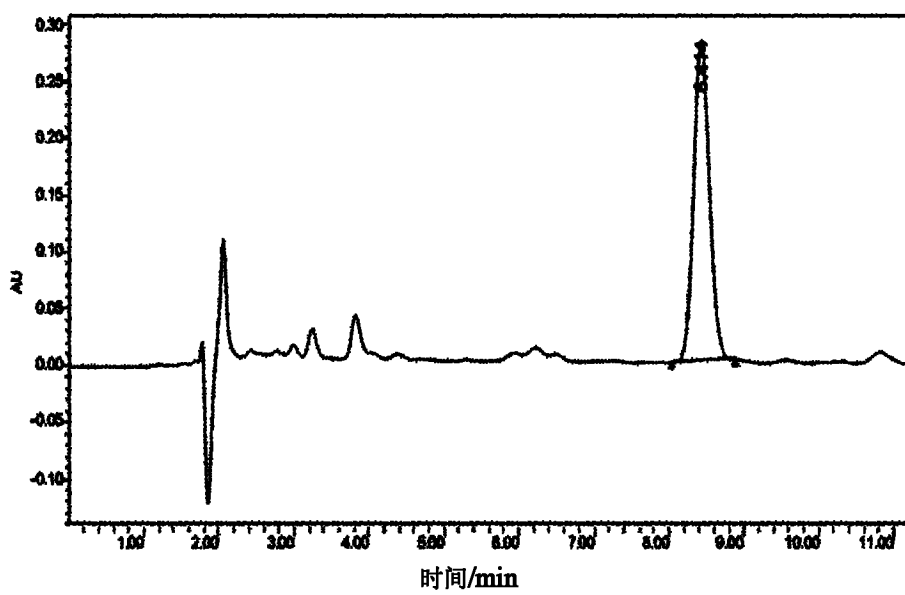


图 9