[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07H 17/04 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810182239.X

[43] 公开日 2009 年 7 月 15 日

[11] 公开号 CN 101481398A

[22] 申请日 2009.2.23
[21] 申请号 200810182239.X
[71] 申请人 扬子江药业集团有限公司
地址 225321 江苏省泰州市高港区扬子江南路 1 号扬子江药业集团有限公司
[72] 发明人 陆宏国 孙田江 金 波 李浩东 周 斌 何 达 陈国俊 玄振玉 黄孝春
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种从独一味中同时制备高纯度 5 - 羟基 - 独一味素 A 苷和独一味素 A 苷提取物的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种同时制备高纯度 sesamoside 和 phlorigidoside C 提取物的方法，该方法采用独一味为原料，以乙醇溶液进行温浸提取，浓缩后依次经聚酰柱纯化和大孔树脂纯化，最后再经液相色谱制备系统进行纯化，得高纯度 sesamoside 和 phlorigidosideC 提取物，二者的浓度分别达到了 98.85% 和 99.37%，符合国家含量测定用对照品的质量要求。 本发明生产环节省去了硅胶柱层析的步骤，操作简单，显著减少了 sesamoside 和 phlorigedoside C 的损失，适合工业化大生产。

1、一种从独一味中同时制备高纯度 sesamoside 和 phlorigidosideC 提取物的方法，包括以下步骤：

（1） 提取：独一味粗粉，加 6-12 倍 50-80%的乙醇，50-80℃温浸提取 3 次，每次 1-3 小时，合并提取液，减压浓缩，回收乙醇，得浓缩液；

（2） 聚酰胺纯化：将步骤（1）得到的浓缩液加入聚酰胺柱上，用 3-5BV 水洗脱，收集上柱流出液和水洗脱液，得混合液；

（3） 大孔树脂纯化：将步骤（2）得到的混合液加入大孔树脂柱上，先用 5-10BV 水洗脱，再用 3-5BV 30-80%的乙醇洗脱，收集醇洗脱液，减压浓缩至干，得粗品；

（4） 液相色谱制备系统纯化：将步骤（3）得到的粗品经液相色谱制备系统纯化，以 20-35%的甲醇-水进行梯度洗脱，检测波长 237nm，分别收集保留时间为 9-17min 和 11-19min 的流份，减压浓缩，冷冻干燥，即得。

2、如权利要求 1 所述的同时制备高纯度 sesamoside 和 phlorigidosideC 提取物的方法，其特征在于：其中的第（4）步采用的液相色谱制备系统包括中压或高压液相色谱制备系统。

3、如权利要求 2 所述的同时制备高纯度 sesamoside 和 phlorigidosideC 提取物的方法，其特征在于：所述的中压或高压液相色谱制备系统采用 RP-C18 柱。

4、如权利要求 1 所述的同时制备高纯度 sesamoside 和 phlorigidosideC 提取物的方法，其特征在于：制备所得的 sesamoside 和 phlorigidoside C 纯度分别达到了 98.85%和 99.37%，符合国家含量测定用对照品的质量要求。

一种从独一味中同时制备高纯度5-羟基-独一味素A苷和独一味素A苷提取物的方法

技术领域

本发明属医药技术领域，具体是涉及一种从植物独一味中同时分离纯化作为对照品的单体化合物sesamoside和phlorigidoside C的方法。

背景技术

独一味[lamiophlomis rotata (benth.) kudo]是藏、蒙、纳西等民族民间草药，具有止血、镇痛、活血化瘀、抗菌消炎、增强免疫力等作用。在我国一千多年前的藏医学名著《四部医典》和《晶珠本草》中就已有记载。独一味生长于海拔2700～4500m的高山草甸、河滩等处。主产于西藏、青海、云南、四川、甘肃等省区，藏医将其用于骨髓炎、关节黄水病、骨折、跌伤、枪伤等。

中国药典2005年版一部收录了独一味药材，但其中作为药材质量控制的关键指标的含量测定项，采用测定药材中木樨草素的含量。黄酮类成分具有多方面的生理活性，但独一味中的黄酮类是否是其止血、镇痛的主要药学成分还有待于进一步研究。有研究表明：独一味中的环烯醚萜类成分是其止血、镇痛作用主要药效成分，参见贾正平等人，解放军药学学报，Vol 21(2005)，272～274。独一味中的环烯醚萜苷包括至少26种结构类似的化合物，其中sesamoside及phlorigidoside C是独一味中含量较高的2个环烯醚萜苷类成分。

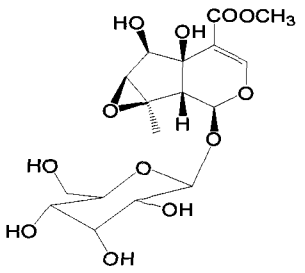
独一味地上部分用乙醇回流提取，所得乙醇流浸膏用丙酮提取，丙酮提取物经聚酰胺层析，水洗脱部分再经反复硅胶柱层析，分离得到了sesamoside，参见张承忠等人，中草药,Vol 23（1992）,509-510。该方法使用常规的硅胶柱层析的方法分离纯化大极性环烯醚萜苷类成分sesamoside，分离效果不佳，产品纯度低，而且往往会存在较大的损失；独一味根依次用95%乙醇和50%乙醇超声提取，50%乙醇提取物用D-1400大孔树脂纯化，10%乙醇洗脱部分经硅胶柱层析纯化，再经ODS-A反相填料纯化，制备得到了sesamoside以及phlorigidoside C，参见Jun-Jie Tan等人，Helv. Chim. Acta, Vol 90 (2007)，143-148。该方法存在以下局限性：环烯醚萜苷类成分极性较大，具有良好的水溶性，它们在乙醇-水组成混合溶剂里也具有很大溶解度。研究表明：95%的乙醇对独一味环烯醚萜苷的提取效果也较好，其干膏收率可达到13%，干膏中环烯醚萜苷类成分sesamoside及phlorigidoside C的含量分别可达到4.7%和3.1%。因此先用95%乙醇提取独一味药材，会造成sesamoside及phlorigidoside C的较大损失。

中国专利CN 1660163A公开了一种从独一味中提取总环烯醚萜苷的方法，该方法采用独一味为原料，以0-95%乙醇溶液在20-70℃温浸提取，提取液浓缩至浸膏状，加10-15倍30-90℃水溶解，放冷，滤过，除去脂溶性成分得提取液，提取液加入聚酰胺柱，合并流出液和水洗液上大孔树脂柱，10-95%的乙醇洗脱大孔树脂柱，得到总环烯醚萜苷。该方法得到的总环烯醚萜苷类为组成复杂的混合物体系，未报道是否含有sesamoside及phlorigidoside C。

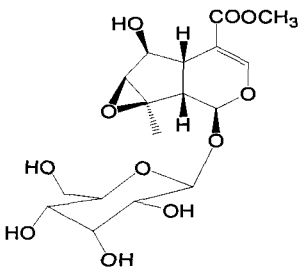
Sesamoside在其它植物中也有发现：螃蟹甲全草，粉碎后用95%乙醇提取，减压蒸馏回收提取液，得粗提物。粗提物经处理后分别以石油醚、氯仿、乙酸乙酯及正丁醇萃取，正丁醇萃取部分通过硅胶柱层析则分别得到了化合物sesamoside，参见高咏莉等人，中药材，Vol 30（2007），1239-1242；取自然干燥的糙苏根，粉碎后用95%的乙醇加热回流提取3次，每次6h。提取液减压浓缩，得浸膏，浸膏加水混悬后，分别用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇进行萃取，醋酸乙酯萃取物经硅胶柱，凝胶渗透色谱反复分离，制备高压液相色谱纯化，得到化合物sesamoside，参见刘普等人，药学学报，Vol 42（2007），401-404；萝卜秦艽根粗粉，用95%乙醇回流提取，每次2h，合并提取液，减压浓缩得浸膏。浸膏用水溶解并稀释后，经D101型大孔吸附树脂吸附，分别用10%，40%，95%乙醇洗脱。40%乙醇洗脱物浸膏经减压硅胶柱色谱，氯仿/甲醇梯度洗脱，所得各部分再经过反复硅胶柱色谱和制备高效液相色谱分离，分得到化合物sesamoside，参见余振喜等人，中国中药杂志，Vol 31（2006），656-658；糙苏地下部分药粉，先用95%的乙醇在微沸状态下浸提4次，减压浓缩后将浸提物悬浮于水中依次用乙酸乙酯和正丁醇分别进行萃取，正丁醇萃取物经硅胶柱层析，用氯仿/甲醇 梯度洗脱，TCL检测合并为9个流分(Fr1-9)。Fr-3经硅胶柱层析，氯仿/甲醇梯度洗脱，得到sesamoside，参见杨永利等人，兰州大学学报，Vol 40（2004），67-71。

以上制备工艺采用植物化学的研究方法，对sesamoside和phlorigidoside C的提取及纯化工艺均未做深入研究，研究水平也局限于实验室规模，不适合工业化生产。重复上述方法，分离得到的sesamoside和phlorigidoside C的纯度经检查，不能达到国家标准。同时，市场上没有符合国家标准的sesamoside及phlorigidoside C对照品在销售。

在前人研究的基础上，发明人针对目前该技术存在的不足，经反复研究探索，终于发明了一种工艺简单，工业上可行的从独一味地上部分同时分离纯化sesamoside和phlorigidoside C的方法。sesamoside和phlorigidoside C的化学结构式如下：



Sesamoside



Phlorigidoside C

发明内容

本发明的目的是提供一种从独一味中同时提取纯化可以作为对照品的 sesamoside 和 phlorigidoside C 的方法。

本发明是通过如下技术方案实现的：

（1）提取：独一味粗粉，加 6-12 倍，50-80%的乙醇，50-80℃温浸，提取 3 次，每次 1-3 小时，合并提取液，减压浓缩，回收乙醇，得浓缩液。

（2）聚酰胺纯化：将步骤（1）得到的浓缩液加入聚酰胺柱上，用 3-5BV 水洗脱，收集上柱流出液和水洗脱液，得混合液。

（3）大孔树脂纯化：将步骤（2）得到的混合液加入大孔树脂柱上，先用 5-10BV 水洗脱，再用 3-5BV 30-80%的乙醇洗脱，收集醇洗脱液，减压浓缩至干，得粗品。

（4）液相色谱制备系统纯化：将步骤（3）得到的粗品经液相色谱制备系统 RP-C18 柱纯化，甲醇-水（20-35%）洗脱，检测波长 237nm，分别收集保留时间为 9-17min 和 11-19min 的流份，减压浓缩，冷冻干燥，即得。

本发明所述的液相色谱制备系统纯化包括中压或高压液相色谱制备系统。

本发明所述的中压或高压液相色谱制备系统采用 RP-C18 柱。

本发明的优点在于：

（1）该方法制备得到的 sesamoside 和 phlorigidoside C，纯度分别达到了 98.85%和 99.37%。该方法是首次被提出，使用该方法所得产物首次达到国家含量测定用对照品的质量要求；

（2）该方法采用中压或高压液相色谱制备系统，省去了硅胶柱层析的步骤，操作简单，显著减少了 sesamoside 和 phlorigedoside C 的损失；

（3）该方法能够从独一味中同时分离纯化得到 sesamoside 和 phlorigidoside C 两种物质，这一工艺大大节约了成本，适合工业化大生产。

附：sesamoside 和 plorigidoside C 的碳谱、氢谱数据如下表：

sesamoside 和 plorigidoside C 的碳谱数据

C	Sesamoside	plorigidoside C
1	94.9	95.6
3	155.3	153.4
4	110.7	106.8
5	74.3	36.1
6	74.3	77.6
7	65.7	64.6
8	64.0	63.3
9	52.2	43.0
10	15.9	16.5
11	168.4	170.3
Glc-1	98.6	98.6
2	72.4	72.8
3	75.4	75.7
4	69.5	69.5
5	76.3	76.3
6	60.6	60.6
$COOCH_3$	52.0	52.0

sesamoside 和 plorigidoside C的氢谱数据

H	Sesamoside	phlorigidoside C
1	5.61（1H，d，J＝5.8 Hz，H-1）	5.23（1H，d，J＝9.6 Hz，H-1）
3	7.60（1H，s，H-3）	7.51（1H，s，H-3）
6	4.30(1H，d，J＝2.1 Hz，H-6)	3.84(1H，dd，J＝1.7,10.8 Hz，H-6)
7	3.53(1H，d，J＝2.1 Hz，H-7)	
9	2.55(1H，d，J＝5.8 Hz，H-9)	
10	1.39(3H, s,H-10)	1.50(3H, s,H-10)
Glc-1	4.73（1H，d，J=8.0 Hz，H-1’）	4.84（1H，d，J=8.0 Hz，H-1’）
$COOCH_3$	3.66(3H, s,OMe)	3.66(3H, s,OMe)

附图说明

图 1 是本发明 Sesamoside 的高效液相纯度检查图，经高效液相检测，Sesamoside 纯度达到 99.85%。

图 2 是本发明 Phlorigidoside C 的高效液相纯度检查图，经高效液相检测，Phlorigidoside 纯度达到 99.37%。

具体实施方式

实施例一

（1）提取：独一味粗粉 100g，加 6 倍量，50%的乙醇，50℃温浸，提取 3 次，每次 1 小时，合并提取液，减压浓缩，回收乙醇，浓缩液，滤过，得相对密度为 1.05 的浓缩液 300ml。

（2）聚酰胺纯化：将浓缩液加入聚酰胺柱上，用 3BV 水洗脱，收集上柱流出液和水洗脱液，得混合液 600ml。

（3）大孔树脂纯化：混合液加入 AB-8 大孔树脂柱上，先用 5BV 水洗脱，再用 3BV 30%的乙醇洗脱，收集醇洗脱液，减压浓缩至干，得粗提物 10.3g。

（4）液相色谱制备系统纯化：粗提物经中压液相色谱制备系统 RP-C18 柱纯化，甲醇-水（25%）洗脱，检测波长 237nm，分别收集保留时间为 14min 和 16min 的流份，减压浓缩，冷冻干燥，即得 sesamoside，312mg 和 phlorigidoside C，285mg。

实施例二

（1）提取：独一味粗粉 100g，加 8 倍量，60%的乙醇，70℃温浸，提取 3 次，每次 1 小时，合并提取液，减压浓缩，回收乙醇，得相对密度为 1.05 的浓缩液 300ml。

（2）聚酰胺纯化：将浓缩液加入聚酰胺柱上，用 5BV 水洗脱，收集上柱流出液和水洗脱液，得混合液 800ml。

（3）大孔树脂纯化：混合液加入 XAD-1600 大孔树脂柱上，先用 8BV 水洗脱，再用 5BV 70%的乙醇洗脱，收集醇洗脱液，减压浓缩至干，得粗提物 11.9g。

（4）液相色谱制备系统纯化：粗提物经中压液相色谱制备系统 RP-C18 柱纯化，甲醇-水（20%）洗脱，检测波长 237nm，分别收集保留时间为 11min 和 13min 的流份，减压浓缩，冷冻干燥，即得 sesamoside，345mg 和 phlorigidoside C，296mg。

实施例三

（1）提取：独一味粗粉 100g，加 10 倍量，80%的乙醇，80℃温浸，提取 3 次，每次 2 小时，合并提取液，减压浓缩，回收乙醇，得相对密度为 1.10 的浓缩液 140ml。

（2）聚酰胺纯化：将粗提液 1 加入聚酰胺柱上，用 5BV 水洗脱，收集上柱流出液和水洗脱液，得混合液 640ml。

（3）大孔树脂纯化：浓缩液加入 XAD-16 大孔树脂柱上，先用 10BV 水洗脱，再用 4BV 80%的乙醇洗脱，收集醇洗脱液，减压浓缩至干，得粗提物 11.9g。

（4）液相色谱制备系统纯化：粗提物经中压液相色谱制备系统 RP-C18 柱纯化，甲醇-水（35%）洗脱，检测波长 237nm，分别收集保留时间为 6min 和 9min 的流份，

减压浓缩，冷冻干燥，即得 sesamoside，345mg 和 phlorigidoside C，296mg。

实施例四

（1）提取：独一味粗粉 100g，加 8 倍量，60%的乙醇，70℃温浸，提取 3 次，每次 1 小时，合并提取液，减压浓缩，回收乙醇，得相对密度为 1.05 的浓缩液 300ml。

（2）聚酰胺纯化：将浓缩液加入聚酰胺柱上，用 5BV 水洗脱，收集上柱流出液和水洗脱液，得混合液 800ml。

（3）大孔树脂纯化：混合液加入 D101 大孔树脂柱上，先用 5BV 水洗脱，再用 4BV 70%的乙醇洗脱，收集醇洗脱液，减压浓缩至干，得粗提物 10.8g。

（4）液相色谱制备系统纯化：粗提物经高压液相色谱制备系统 RP-C18 柱纯化，甲醇-水（20%）洗脱，检测波长 237nm，分别收集保留时间为 6min 和 9min 的流份，减压浓缩，冷冻干燥，即得 sesamoside，365mg 和 phlorigidoside C，294mg。

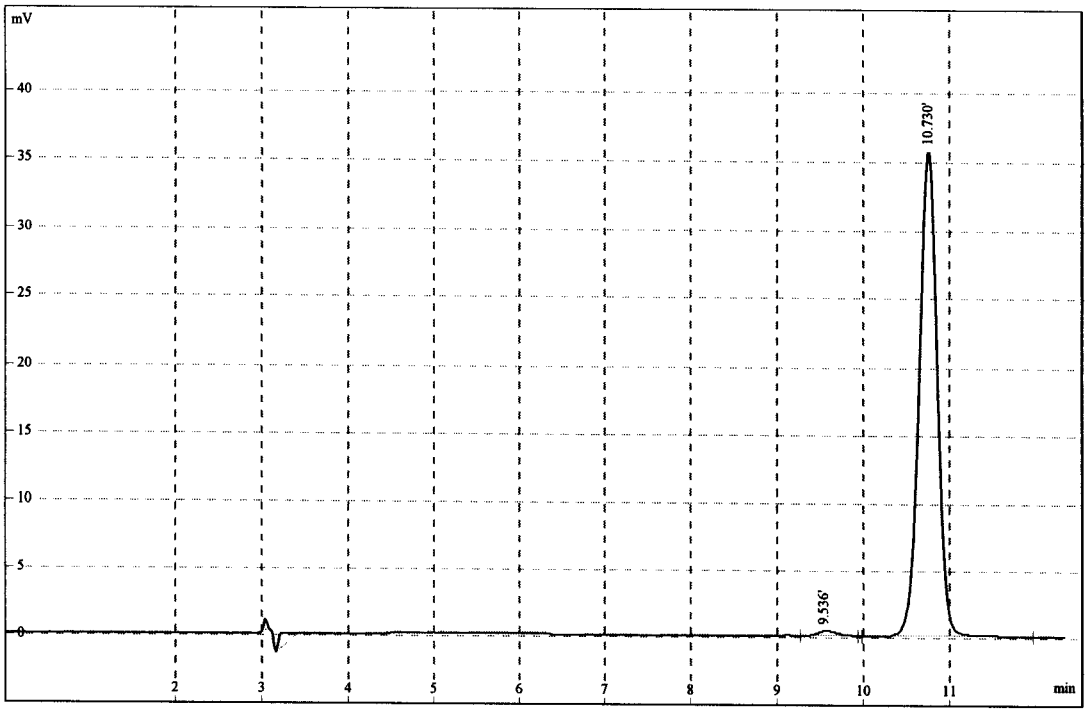

mV
40
35
30
25
20
15
10
5
0
9.536'
10.730'
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
min

图 1

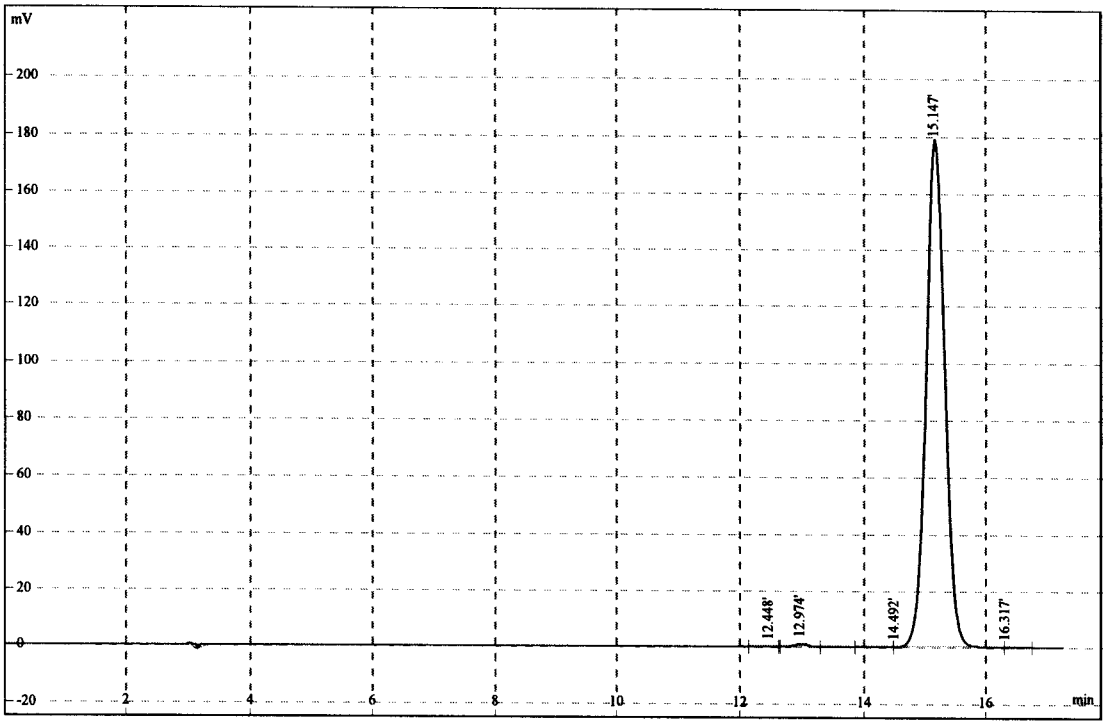

mV
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
12.448'
12.974'
14.492'
15.147'
16.317'
2
4
6
8
10
12
14
16
min

图 2