



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105131077 B

(45)授权公告日 2016.09.14

(21)申请号 201510512672.5

(22)申请日 2015.08.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105131077 A

(43)申请公布日 2015.12.09

(73)专利权人 广州普立森生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市高新技术产业

开发区科学城科丰路31号华南新材料

创新园G1栋226号

专利权人 广东粤微食用菌技术有限公司

(72)发明人 杨柏华 谢意珍 焦春伟 帅欧

李向敏

(74)专利代理机构 广州弘邦专利商标事务所有

限公司 44236

代理人 张钊斌

(51)Int.Cl.

C07J 71/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101012268 A, 2007.08.08, 全文.

CN 1134306 A, 1996.10.30, 全文.

CN 101412971 A, 2009.04.22, 全文.

CN 104694401 A, 2015.06.10, 全文.

审查员 王瑞

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇的方法

(57)摘要

本发明提供一种从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇的方法,包括制备过氧麦角甾醇粗提物、中压制备色谱纯化、模拟移动床纯化和重结晶步骤。本发明工艺简单稳定、适合工业化连续生产、产品收率较高、生产成本低。

1. 从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)制备过氧麦角甾醇粗提物:采用渗漉法或回流提取法对破壁灵芝孢子粉进行提取,所得提取液减压浓缩蒸至干,得到过氧麦角甾醇粗提物A;

(2)中压制备色谱纯化:将步骤(1)制得的过氧麦角甾醇粗提物A用60-95%甲醇水溶液溶解,制得中压制备色谱上样液,进行中压制备色谱纯化,收集含过氧麦角甾醇的流份,减压浓缩至干,得到过氧麦角甾醇浸膏B;

(3)模拟移动床纯化:将步骤(2)得到的过氧麦角甾醇浸膏B用60-95%甲醇水溶液溶解,制得进样液,注入模拟移动床色谱分离系统进一步纯化,过氧麦角甾醇在萃取液中,将萃取液减压浓缩至干,得到富含过氧麦角甾醇的干膏C;

(4)将步骤(3)中富含过氧麦角甾醇的干膏C用乙酸乙酯-环己烷混合溶液加热溶解,转入0-8℃环境中重结晶,过滤并洗涤沉淀得到高纯度过氧麦角甾醇,其中,

所述步骤(1)中,渗漉法或回流提取法所用的提取溶剂为乙酸乙酯、环己烷、石油醚中的一种或其任意比例混合物,所述渗漉法的浸渍时间为24-48h,浸渍温度为室温,近似等速收集5-10BV的渗滤液,所述回流提取法的液固比为6-10,微沸状态下提取1-2h,过滤,重复提取1-2次后合并滤液;

所述步骤(2)中,中压制备色谱柱采用30-50 μ m ODS硅胶自填,柱高45cm,上样液的固含量为0.05-0.2g/mL,上样流速为2-5mL/min,上样体积为0.1BV,采用60-95%甲醇水溶液以1.2-2.0BV/h的速度等度洗脱;

所述步骤(3)中,进样液的固含量为0.05-0.2g/mL,模拟移动床色谱分离系统中色谱柱填料为30-50 μ m粒度的ODS反向硅胶,系统采用8-16支色谱柱串联组成,分成四区,每区有2-4支相同的色谱柱串联,系统参数设置为室温,进样泵流速为3-6mL/min,洗脱泵流速为16-38mL/min,萃取液流速为10-23mL/min,萃余液流速为9-21mL/min,切换时间为10-24min;

所述步骤(4)中,乙酸乙酯-环己烷混合溶液的用量为干膏C的10-20倍,乙酸乙酯与环己烷的体积比为50:50-10:90,重结晶的时间为36-48h。

从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇的方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及一种提取过氧麦角甾醇的方法,具体涉及一种从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇的方法,属于提取分离技术领域。

【背景技术】

[0002] 过氧麦角甾醇,全称 $5\alpha,8\alpha$ -过氧麦角甾-6,22(E)-二烯-3 β -醇($5\alpha,8\alpha$ -Epidioxysterosta-6,22-dien-3 β -ol),为已知化合物,属于甾醇类化合物,广泛存在于食药菌及其他真菌中。关于其活性报道的很多,专利201410311586.3披露其在杀伤HeLa癌细胞方面与紫杉醇具有协同作用,可降低紫杉醇的用量,从而降低其化疗毒副作用和费用;专利200610126091.9公开其具有显著的抗肿瘤(人乳腺癌及肝癌)的药理活性,并且对免疫器官和体重没有不良影响;专利201210233192.1报道其对恶性乳腺癌细胞(MT-1)、淋巴瘤细胞(Jurkat)及脑瘤细胞(U87)均具有显著的抑制作用,特别是对脑瘤干细胞等耐药性的肿瘤干细胞具有杀灭作用;专利200810119948.3报道其具有显著的抑菌活性,可应用于天然抗生素领域;专利01817014.5披露了其具有很强的抑制黑色素生成作用,可应用于美白化妆品领域;专利200610052166.3披露其对农业害虫,如菜青虫、斜纹夜蛾、蚜虫等具有致毒作用,可应用于杀虫剂领域。另外,还有其他文献报道其具有抗氧化、抗结核、抗炎、抗动脉粥样硬化及抑制人T细胞增殖等广泛的药理作用。

[0003] 过氧麦角甾醇提取分离纯化技术现有文献报道较少,且多以先分离未知单体后鉴别为过氧麦角甾醇为主,极少量文献资料还存在作者误判的情况。专利201210233192.1利用酶法破壁孢子粉经超临界二氧化碳萃取,以肿瘤抑制率为活性追踪手段,先后以氯仿、乙酸乙酯、石油醚-乙酸乙酯混合溶剂、石油醚-丙酮混合溶剂等为洗脱剂,经3次正向硅胶柱分离,最终再采用制备色谱精制获得一活性最高的单体成分,鉴别为过氧麦角甾醇。专利200610126091.9以簇生沿丝伞子实体或菌丝体为原料,通过甲醇提取,石油醚萃取,上正向硅胶柱,环己烷-乙酸乙酯混合溶剂洗脱,合并相同流分,经多次重结晶获得两个单体,其中一个鉴别为过氧麦角甾醇。专利200810119948.3采用石油醚从真菌Ppf4发酵菌液中萃取,菌丝用丙酮提取后石油醚萃取,合并石油醚部位,上正向硅胶柱,环己烷-丙酮混合溶剂洗脱,合并目标流份,再经凝胶和反向硅胶精制,获得三个单体,其中一个鉴别为过氧麦角甾醇。程纯儒等(赤芝子实体化学成分研究和细胞毒性测试,沈阳药科大学学报,2014,31(2):102-106.)以赤芝子实体为原料,经95%乙醇提取,石油醚萃取,上正向硅胶柱,以石油醚-乙酸乙酯混合溶剂洗脱,在一个流份中先重结晶出另一单体,再将母液进行半制备分离,最终获得一单体,鉴别为过氧麦角甾醇。刘雅峰等(真菌竹黄中的过氧麦角甾醇的分离,天津中医学院学报,2004,23(1):15-16.)以真菌竹黄为原料,经乙酸乙酯提取,以正向硅胶柱反复柱层析获得一单体,鉴别为过氧麦角甾醇。章能胜等(玫烟色拟青霉中过氧麦角甾醇的高速逆流色谱法分离纯化及质谱分析,食品与发酵工业,2009,35(6):14-16.)采用较为先进的高速逆流色谱法对玫烟色拟青霉中过氧麦角甾醇进行分离纯化,但其获得的目标产物并非真正的过氧麦角甾醇,因为过氧麦角甾醇在240-400nm无紫外吸收,而文中分离过程的

监视和目标物的纯度检测均采用280nm紫外吸收波长,且在色谱图中均显示出较大的吸光度,可能是作者误判。

[0004] 上述过氧麦角甾醇的分离纯化技术均存在一定的共同点:即多先用中强极性有机溶剂提取,弱极性有机溶剂多次萃取除杂后,反复多次经正向硅胶柱以一定比例的弱极性有机溶剂洗脱分离,收集目标流份,再经凝胶、制备色谱、重结晶等精制步骤获得过氧麦角甾醇的单体;其产量多为毫克级,其制备过程多是从未知出发,即先获得单体,再鉴定出是过氧麦角甾醇,制备目的多是为了阐明天然植物、真菌的化学成分组成,制备流程属于摸索式分离,工艺过程复杂多变,欠缺对生产成本和得率的考量,整个制备过程中均使用有毒、易挥发试剂,未考虑环境安全。终上所述,其工艺不适合直接应用于工业化生产。

[0005] 模拟移动床色谱分离系统是模拟移动床技术与色谱分离技术的有机结合,它采用系列色谱柱串联,并通过电磁阀来实现进料口和出料口的定期连续切换,以模拟出固定相连续逆流循环的移动床效果。模拟移动床技术与色谱结合使色谱分离从间歇变为连续,具有产量大、收率高、纯度高的特点,近年来该技术已被应用于石油化工、食品、发酵、医药等行业,主要是石油化工产品、糖、发酵产物、中药活性成分、手性化合物的纯化。但对于使用模拟移动床技术纯化过氧麦角甾醇的方法仍未见公开报道。

【发明内容】

[0006] 针对现有技术存在的技术缺陷,本发明的目的是提供一种工艺简单稳定、适合工业化连续生产、产品收率较高、生产成本低的从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇的方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇的方法,包括以下步骤:

[0009] (1)制备过氧麦角甾醇粗提物:采用渗漉法或回流提取法对破壁灵芝孢子粉进行提取,所得提取液减压浓缩蒸至干,得到过氧麦角甾醇粗提物A;

[0010] (2)中压制备色谱纯化:将步骤(1)制得的过氧麦角甾醇粗提物A用60-95%甲醇水溶液溶解,制得中压制备色谱上样液,进行中压制备色谱纯化,收集含过氧麦角甾醇的流份,减压浓缩至干,得到过氧麦角甾醇浸膏B;

[0011] (3)模拟移动床纯化:将步骤(2)得到的过氧麦角甾醇浸膏B用60-95%甲醇水溶液溶解,制得进样液,注入模拟移动床色谱分离系统进一步纯化,过氧麦角甾醇在萃取液中,将萃取液减压浓缩至干,得到富含过氧麦角甾醇的干膏C;

[0012] (4)将步骤(3)中富含过氧麦角甾醇的干膏C用乙酸乙酯-环己烷混合溶液加热溶解,转入0-8℃环境中重结晶,过滤并洗涤沉淀得到高纯度过氧麦角甾醇。

[0013] 所述步骤(1)中,渗漉法或回流提取法所用提取溶剂为乙酸乙酯、环己烷、石油醚中的一种或其任意比例混合物。

[0014] 所述步骤(1)中,渗漉法的浸渍时间为24-48h,浸渍温度为室温,近似等速收集5-10BV的渗滤液。

[0015] 所述步骤(1)中,回流提取法的液固比为6-10,微沸状态下提取1-2h,过滤,重复提取1-2次后合并滤液。

[0016] 所述步骤(2)中,中压制备色谱柱采用30-50μm ODS硅胶自填,柱高45cm,上样液的

固含量为0.05-0.2g/mL,上样流速为2-5mL/min,上样体积为0.1BV,采用60-95%甲醇水溶液以1.2-2.0BV/h的速度等度洗脱。

[0017] 所述步骤(3)中,进样液的固含量为0.05-0.2g/mL,模拟移动床色谱分离系统中色谱柱填料为30-50 μ m粒度的ODS反向硅胶,系统采用8-16支色谱柱串联组成,分成四区,每区有2-4支相同的色谱柱串联,系统参数设置为室温,进样泵流速为3-6mL/min,洗脱泵流速为16-38mL/min,萃取液流速为10-23mL/min,萃余液流速为9-21mL/min,切换时间为10-24min。

[0018] 所述步骤(4)中,乙酸乙酯-环己烷混合溶液的用量为干膏C的10-20倍,乙酸乙酯与环己烷的体积比为50:50-10:90,重结晶的时间为36-48h。

[0019] 和现有技术中过氧麦角甾醇的提取方法相比,本发明具有以下有益效果:

[0020] (1)本发明方法中的中压制备色谱主要起到初步除杂、富集的作用,与现有工艺(低级性有机试剂多次萃取或正向硅胶开放色谱初步切段)相比,不会带入新的杂质和有毒有害物质,能很好的保证过氧麦角甾醇的天然品质,环境更加安全友好,同时初步去杂效果更好,所获浸膏中过氧麦角甾醇的得率和含量相对较高,杂质切割更充分彻底,能基本去除比过氧麦角甾醇极性低的杂质成分,更适合作为模拟移动床色谱富集工艺的前处理工艺。

[0021] (2)本发明所采用模拟移动床色谱分离技术进一步纯化,模拟移动床技术与色谱结合使色谱分离从间歇变为连续,而色谱的高分离率、低能耗、低物耗、常温运行等优点继续保留。由于模拟了逆流,固定相和流动相能反复利用,从而大大提高了效率,降低了成本;模拟移动床色谱是在谱带首尾切取流分,使提纯过程更易控制;由于引进了精馏、回流机制,使分离能力增加,产品收率提高;又由于引进了连续机制,大大提高了产率,提高了生产的自动化水平和效率,溶剂耗损量显著降低,生产环境得到极大改善。

[0022] (3)本发明通过初提取、中压制备色谱纯化和模拟移动床色谱纯化富集得到的过氧麦角甾醇的纯度为50-80%,含量较高。

【具体实施方式】

[0023] 以下结合实施例来进一步解释本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。在未作说明的情况下,本发明中所涉及到的方法均为常规方法,所涉及到的原料均为市售产品。

[0024] 实施例1:

[0025] 采用以下步骤从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇:

[0026] (1)制备过氧麦角甾醇粗提物:采用渗漉法对破壁灵芝孢子粉进行提取,提取溶剂为乙酸乙酯,在室温条件下浸渍40h,近似等速收集8BV渗滤液;渗滤液采用旋转蒸发仪在水浴温度65 $^{\circ}$ C,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到过氧麦角甾醇粗提物A,检测结果显示粗提物A中过氧麦角甾醇的含量为0.62%。

[0027] (2)中压制备色谱纯化:将步骤(1)制得的过氧麦角甾醇粗提物A用60%甲醇水溶液加热超声溶解并通过0.45 μ m微孔滤膜,制得固含量为0.05g/mL的中压制备上样液,进行中压制备色谱纯化,色谱柱采用50 μ m ODS硅胶自填,柱高45cm,上样流速为2mL/min,上样体积为0.1BV,采用60%甲醇水溶液以1.2BV/h的速度等度洗脱,收集含过氧麦角甾醇的流份,采用旋转蒸发仪在水浴温度70 $^{\circ}$ C,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到过氧麦角甾醇浸

膏B。此时,过氧麦角甾醇浸膏B中过氧麦角甾醇的含量为16.8%,极性低的杂质成分已基本去除,极性大的杂质成分部分去除。

[0028] (3)模拟移动床纯化:模拟移动床色谱分离系统包括洗脱泵、进样泵、萃取泵、色谱柱、电磁阀、单向阀、信号采集器、系统控制器等,洗脱泵、萃取泵流速均为0-250mL/min,进样泵流速为0-50mL/min,3个泵工作压力均为0-10MPa,工作温度15-35℃,色谱柱填料为30μm粒度的ODS反向硅胶,系统采用16支色谱柱串联组成,分成四区,每区色谱柱4支,每隔一定时间经电磁阀切换有序改变进料口和出料口的位置,以实现分离床的模拟移动。将步骤(2)得到的过氧麦角甾醇浸膏B用95%甲醇水溶液加热超声溶解并通过0.45μm微孔滤膜,制得固含量为0.2g/mL的进样液,注入模拟移动床色谱分离系统进一步纯化,系统参数设置为室温,进样泵流速为3mL/min,洗脱泵流速为16mL/min,萃取液流速为10mL/min,萃余液流速为9mL/min,切换时间为24min,过氧麦角甾醇在萃取液中,萃取液采用旋转蒸发仪在水浴温度70℃,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到富含过氧麦角甾醇的干膏C。

[0029] (4)将步骤(3)中富含过氧麦角甾醇的干膏C用20倍的乙酸乙酯-环己烷混合溶液(10:90)加热溶解,转入0℃环境中重结晶40h,过滤并洗涤沉淀得到含量为53.7%的过氧麦角甾醇。

[0030] 本实施例采用HPLC-ESLD法检测过氧麦角甾醇的含量:安捷伦1200型高效液相色谱仪系统,美国ESA公司Chromachem蒸发光散射检测器,Waters Symmetry Shield RP18色谱柱(4.6*250mm,5μm),流动相为90%乙腈水溶液,等度洗脱,流速0.8mL/min,柱温30℃,漂移管温度80℃,雾化器温度60℃,氮气压力为25psi,增益为3,进样量20μL,以外标一点法计算纯度。

[0031] 实施例2:

[0032] 采用以下步骤从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇:

[0033] (1)制备过氧麦角甾醇粗提物:采用回流提取法对破壁灵芝孢子粉进行提取,提取溶剂为环己烷:石油醚(1:1),液固比为10,微沸状态下提取2h,过滤,重复提取1次,合并滤液,滤液采用旋转蒸发仪在水浴温度60℃,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到过氧麦角甾醇粗提物A,检测结果显示粗提物A中过氧麦角甾醇的含量为0.98%。

[0034] (2)中压制备色谱纯化:将步骤(1)制得的过氧麦角甾醇粗提物A用95%甲醇水溶液加热超声溶解并通过0.45μm微孔滤膜,制得固含量为0.2g/mL的中压制备上样液,进行中压制备色谱纯化,色谱柱采用30μm ODS硅胶自填,柱高45cm,上样流速为5mL/min,上样体积为0.1BV,采用80%甲醇水溶液以2.0BV/h的速度等度洗脱,收集含过氧麦角甾醇的流份,采用旋转蒸发仪在水浴温度65℃,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到过氧麦角甾醇浸膏B。此时,过氧麦角甾醇浸膏B中过氧麦角甾醇的含量为10.2%,极性低的杂质成分已基本去除,极性大的杂质成分部分去除。

[0035] (3)模拟移动床纯化:模拟移动床色谱分离系统包括洗脱泵、进样泵、萃取泵、色谱柱、电磁阀、单向阀、信号采集器、系统控制器等,洗脱泵、萃取泵流速均为0-250mL/min,进样泵流速为0-50mL/min,3个泵工作压力均为0-10MPa,工作温度15-35℃,色谱柱填料为50μm粒度的ODS反向硅胶,系统采用8支色谱柱串联组成,分成四区,每区色谱柱2支,每隔一定时间经电磁阀切换有序改变进料口和出料口的位置,以实现分离床的模拟移动。将步骤(2)得到的过氧麦角甾醇浸膏B用60%甲醇水溶液加热超声溶解并通过0.45μm微孔滤膜,制得

固含量为0.05g/mL的进样液,注入模拟移动床色谱分离系统进一步纯化,系统参数设置为室温,进样泵流速为6mL/min,洗脱泵流速为38mL/min,萃取液流速为23mL/min,萃余液流速为21mL/min,切换时间为10min,过氧麦角甾醇在萃取液中,萃取液采用旋转蒸发仪在水浴温度65℃,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到富含过氧麦角甾醇的干膏C。

[0036] (4)将步骤(3)中富含过氧麦角甾醇的干膏C用10倍的乙酸乙酯-环己烷混合溶液(50:50)加热溶解,转入8℃环境中重结晶48h,过滤并洗涤沉淀得到含量为66.3%的过氧麦角甾醇。

[0037] 过氧麦角甾醇含量的检测方法同实施例1。

[0038] 实施例3:

[0039] 采用以下步骤从破壁灵芝孢子粉中提取过氧麦角甾醇:

[0040] (1)制备过氧麦角甾醇粗提物:采用回流提取法对破壁灵芝孢子粉进行提取,提取溶剂为乙酸乙酯:环己烷(1:1),液固比为6,微沸状态下提取1h,过滤,重复提取2次,合并滤液,滤液采用旋转蒸发仪在水浴温度70℃,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到过氧麦角甾醇粗提物A,检测结果显示粗提物A中过氧麦角甾醇的含量为1.23%。

[0041] (2)中压制备色谱纯化:将步骤(1)制得的过氧麦角甾醇粗提物A用80%甲醇水溶液加热超声溶解并通过0.45μm微孔滤膜,制得固含量为0.15g/mL的中压制备上样液,进行中压制备色谱纯化,色谱柱采用40μm ODS硅胶自填,柱高45cm,上样流速为4mL/min,上样体积为0.1BV,采用80%甲醇水溶液以1.8BV/h的速度等度洗脱,收集含过氧麦角甾醇的流份,采用旋转蒸发仪在水浴温度为60℃,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到过氧麦角甾醇浸膏B。此时,过氧麦角甾醇浸膏B中过氧麦角甾醇的含量为20.4%,极性低的杂质成分已基本去除,极性大的杂质成分部分去除。

[0042] (3)模拟移动床纯化:模拟移动床色谱分离系统包括洗脱泵、进样泵、萃取泵、色谱柱、电磁阀、单向阀、信号采集器、系统控制器等,洗脱泵、萃取泵流速均为0-250mL/min,进样泵流速为0-50mL/min,3个泵工作压力均为0-10MPa,工作温度15-35℃,色谱柱填料为40μm粒度的ODS反向硅胶,系统采用12支色谱柱串联组成,分成四区,每区色谱柱3支,每隔一定时间经电磁阀切换有序改变进料口和出料口的位置,以实现分离床的模拟移动。将步骤(2)得到的过氧麦角甾醇浸膏B用85%甲醇水溶液加热超声溶解并通过0.45μm微孔滤膜,制得固含量为0.15g/mL的进样液,注入模拟移动床色谱分离系统进一步纯化,系统参数设置为室温,进样泵流速为5mL/min,洗脱泵流速为33mL/min,萃取液流速为20mL/min,萃余液流速为18mL/min,切换时间为15min,过氧麦角甾醇在萃取液中,萃取液采用旋转蒸发仪在水浴温度60℃,真空度-0.085以下减压浓缩至干,得到富含过氧麦角甾醇的干膏C。

[0043] (4)将步骤(3)中富含过氧麦角甾醇的干膏C用15倍的乙酸乙酯-环己烷混合溶液(30:70)加热溶解,转入4℃环境中重结晶36h,过滤并洗涤沉淀得到含量为79.63%的过氧麦角甾醇。

[0044] 过氧麦角甾醇含量的检测方法同实施例1。

[0045] 以上实施例只是对本发明的描述,不应理解为对本发明范围的限制。在不偏离本发明精神的前提下,相关技术人员对本发明的技术方案所作出的各种变换或改进,均应落入本发明的权利要求书所确定的保护范围内。