(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114702469 B
(45)授权公告日 2023.09.19

(21)申请号 202210410749.8

(22)申请日 2022.04.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114702469 A

(43)申请公布日 2022.07.05

(73)专利权人 聊城大学
地址 252000 山东省聊城市东昌府区湖南路1号

(72)发明人 李爱峰 宋雅倩 于琳琳 柳仁民 孙爱玲

(74)专利代理机构 青岛致嘉知识产权代理事务所(普通合伙) 37236
专利代理师 高维波

(51)Int.Cl.
C07D 307/88(2006.01)

(56)对比文件
CN 104003963 A,2014.08.27
CN 101015552 A,2007.08.15
US 2008152730 A1,2008.06.26
亢静静.“超临界流体色谱分离纯化蛇床子、补骨脂等重要有效成分的研究”.中国优秀硕士学位论文全文数据库(医药卫生科技辑).2017,(第3期),第E057-226页.
杨学东;伍勋;胡立翠;郭鹤男.不同溶剂对川芎药材中有效成分提取效果的影响.中国中药杂志.2012,(第13期),1942-1945.

审查员 梁艳辉

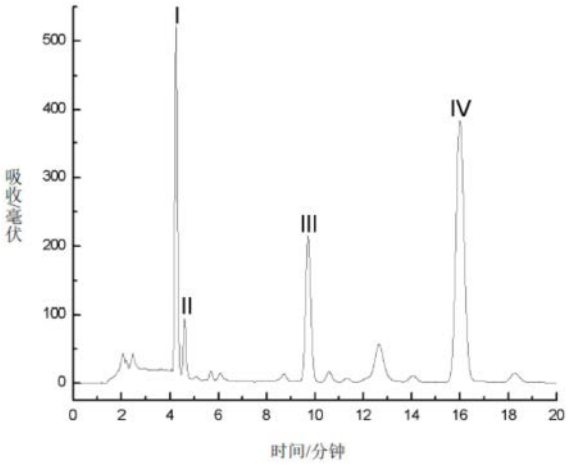
权利要求书1页 说明书6页 附图7页

(54)发明名称

一种从川芎中提取分离纯化4种苯酞内酯的方法

(57)摘要

本发明涉及一种从川芎中提取、分离纯化4种苯酞内酯的方法,是以川芎药材为原料,经过下述步骤:(1)川芎苯酞内酯的提取;(2)粗提物的组成分析;(3)超临界流体色谱分离分析川芎苯酞内酯的条件优化;(4)超临界流体色谱分离纯化川芎苯酞内酯;(5)化合物的纯度检测及结构鉴定。本发明使用半制备型超临界流体色谱对川芎苯酞内酯进行分离纯化,一次分离耗时20分钟,得到4种高纯度的成分,经鉴定分别是洋川芎内酯H、洋川芎内酯I、瑟丹酸内酯和Z-藁本内酯。本工艺过程高效快速,绿色环保,对环境无严重危害,有机溶剂的用量极低,产品的后处理简单,能耗低,产品中有机溶剂残留量极低,综合成本低。



CN 114702469 B

1.一种从川芎中提取、分离纯化4种苯酞内酯的方法,其特征在于,步骤为:

(1)川芎苯酞内酯的提取:将川芎药材粉碎,用10倍量80%乙醇加热回流提取3次,每次1.5小时,过滤,提取液经减压浓缩得粗提物;

(2)粗提物的组成分析:使用分析型高效液相色谱仪对川芎粗提物的组成进行了分离分析,条件如下:色谱柱为YMC-Pack ODS-AQ柱,250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm,流动相的组成为甲醇-0.1%甲酸,65:35,V/V,流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,检测波长为280 nm;

(3)超临界流体色谱分离分析川芎苯酞内酯的条件:使用分析型超临界流体色谱仪对川芎苯酞内酯的分离分析条件如下:色谱柱为YMC-Pack Diol-NP柱,流动相为超临界CO_2,改性剂为甲醇,改性剂在流动相中的体积比呈阶梯式上升,0-7 min,1.5%甲醇;7-13 min,6%甲醇,流动相的流速为3.5 mL/min,分离压力为13MPa,分离温度为50℃,检测波长为280 nm;

(4)超临界流体色谱分离纯化川芎苯酞内酯:用半制备型超临界流体色谱仪对粗提物中的成分进行分离纯化,最佳条件如下:YMC-Pack Diol-NP柱,250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm,流动相为超临界CO_2,改性剂为甲醇,甲醇在流动相中的体积比呈阶梯式上升,0-10 min,1.5%;10-20 min,6%,流动相的流速为15-25 mL/min,分离压力为13 MPa,分离温度为50℃,检测波长为280 nm;根据色谱图手动收集目标组分馏分,自然挥发除去溶剂;

(5)化合物的纯度检测及结构鉴定:将每一个目标组分馏分用甲醇溶解,其纯度用高效液相色谱法进行检测,色谱条件见步骤(2),经核磁共振波谱分析4种化合物分别是Z-藁本内酯、瑟丹酸内酯、洋川芎内酯I、洋川芎内酯H。

一种从川芎中提取分离纯化4种苯酞内酯的方法

技术领域

[0001] 本发明属于化工领域，具体是涉及一种从川芎中提取分离纯化4种苯酞内酯的方法。

背景技术

[0002] 川芎为伞形科藁本属植物川芎Ligusticum chuanxiong Hort.的干燥根茎，性温，味辛，归肝、胆、心包经，具有活血行气、祛风止痛的功效，用于胸痹心痛、胸胁刺痛、跌扑肿痛、月经不调、经闭痛经、腹痛、头痛、风湿痹痛等症的治疗，为中医常用的活血化瘀药。川芎含有苯酞内酯、萜烯、生物碱、多糖等多种类型的化学成分，其中以苯酞内酯的含量最高。苯酞内酯具有解痉、平喘、抗惊、镇痛、抗血小板凝聚、松弛子宫和气管平滑肌、抑制中枢神经、抗实验性脑缺血等多种生理活性。已报道的苯酞内酯有洋川芎内酯H、洋川芎内酯I、瑟丹酸内酯及Z-藁本内酯等。

[0003] 川芎中苯酞内酯的纯化方法主要有硅胶柱层析法及大孔吸附树脂法。硅胶柱层析法的操作过程繁琐，回收率较低，经常使用氯仿、苯等毒性较强的有机溶剂，所得产品中有机溶剂残留较为严重；大孔吸附树脂法的分离效率较低，通常用于样品的粗分离。

[0004] 因此，建立一种高效快速的提取、分离纯化川芎中苯酞内酯的方法对于深化川芎的药理作用研究及完善质量控制体系均具有重要的意义。

[0005] 超临界流体色谱是以超临界流体为流动相的色谱分离分析技术，它集合了气相色谱法和液相色谱法的优点，不仅能够分析气相色谱不宜分析的高沸点、低挥发性的组分，而且比液相色谱法具有更快的分析速率和更高的柱效。超临界流体色谱常用超临界CO_2为流动相，必要时添加少量的极性改性剂，CO_2无色、无味、无毒、价廉易得，CO_2经减压后可挥发除去，因此，用该方法纯化所得的产品有机溶剂残留量极低，产品的后处理操作简单，成本低。目前，超临界流体色谱已用于天然产物、药物、表面活性剂、农药等物质的分离和分析。但是，尚未见该技术用于纯化川芎苯酞内酯的报道。

[0006] 本发明使用超临界流体色谱对川芎苯酞内酯进行了半制备型分离和纯化，提供了一种高效、快速、简便、绿色环保的从川芎中提取、分离纯化4种苯酞内酯的新方法。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种高效、快速、简便、绿色环保的从川芎中提取、分离纯化 4种苯酞内酯的方法。

[0008] 本发明的方案如下：

[0009] 从川芎中提取、分离纯化4种苯酞内酯的方法，其步骤为：

[0010] (1)川芎苯酞内酯的提取：将川芎药材粉碎，用溶剂进行提取，过滤，提取液经减压浓缩得粗提物；

[0011] (2)粗提物的组成分析：使用分析型高效液相色谱仪对川芎粗提物的组成进行了分离分析，条件如下：色谱柱为YMC-Pack ODS-AQ柱(250mm×4.6mm I.D.,5μm)，流动相为甲

醇-水，乙腈-水，甲醇-0.1％甲酸或乙腈-0.1％甲酸，流速为1.0mL/min，柱温为 25℃，检测波长为280nm；

[0012] (3)超临界流体色谱分离分析川芎苯酞内酯的条件优化：使用分析型超临界流体色谱仪对川芎苯酞内酯的分离分析条件进行了优化，条件如下：色谱柱为YMC-Pack Diol-NP 柱、YMC-Pack ODS-AQ柱或YMC-Pack NH_2柱，流动相为超临界CO_2，改性剂为甲醇、乙醇、异丙醇或乙腈，改性剂在流动相中的体积比呈阶梯式上升，流动相的流速为2.5-4.5 mL/min，分离压力为11-15MPa，分离温度为35-55℃，检测波长为280nm；

[0013] (4)超临界流体色谱分离纯化川芎苯酞内酯：用半制备型超临界流体色谱仪对粗提物中的成分进行分离纯化，最佳条件如下：色谱柱为YMC-Pack Diol-NP柱(250mm×10 mm I.D.,5μm)，流动相为超临界CO_2，改性剂为甲醇，甲醇在流动相中的体积比呈阶梯式上升，流动相的流速为15-25mL/min(优选为20mL/min)，分离压力为13MPa，分离温度为50℃，检测波长为280nm；根据色谱图手动收集目标组分馏分，自然挥发除去溶剂；

[0014] (5)化合物的纯度检测及结构鉴定：将每一个目标组分馏分用甲醇溶解，其纯度用高效液相色谱法进行检测，色谱条件见步骤(2)，经核磁共振波谱分析4种化合物分别是Z-藁本内酯、瑟丹酸内酯、洋川芎内酯I、洋川芎内酯H。

[0015] 前述方法中，步骤(1)提取方法为冷浸、超声或加热回流(优选加热回流)，提取溶剂为水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯和石油醚(优选乙醇)。

[0016] 前述方法中，步骤(1)提取用乙醇-水溶液的浓度为30-95％(优选80％)，提取溶剂的用量为6倍量-15倍量(优选10倍量)。

[0017] 前述方法中，步骤(1)提取时间为1-2小时(优选1.5小时)，提取次数为2-5次(优选3次)。

[0018] 前述方法中，步骤(2)流动相的组成为甲醇-0.1％甲酸(65:35,V/V)。

[0019] 前述方法中，步骤(3)中色谱柱为YMC-Pack Diol-NP柱(250mm×4.6mm I.D.,5μm)，改性剂为甲醇。

[0020] 前述方法中，步骤(3)中，对于Z-藁本内酯和瑟丹酸内酯而言，甲醇在流动相中的体积比为0.5％-3.0％(优选1.5％)，对于洋川芎内酯I和洋川芎内酯H而言，甲醇在流动相中的体积比为4％-9％(优选6％)。

[0021] 前述方法中，步骤(3)中流动相的流速为3.5mL/min，分离压力为13MPa，分离温度为50℃。

[0022] 本发明从川芎中提取、分离纯化4种苯酞内酯。首先，用80％乙醇加热回流提取使苯酞内酯类成分溶出，同时使强极性成分不被溶出；接下来，使用高效液相色谱法对粗提物的组成进行了分离分析，确定了4种目标化合物；然后，用分析型超临界流体色谱仪对分离条件进行了优化，包括色谱柱、改性剂的种类及在流动相中的体积比、流动相的流速、分离压力及分离温度，建立了最佳分离方法；紧接着，将分离从分析型规模放大到用半制备型规模，使用半制备型超临界流体色谱仪对提取物中的成分进行分离纯化，一次分离可以得到4种化合物；最后，用高效液相色谱法对化合物的纯度进行测定，根据核磁共振波谱分析对化合物的结构进行鉴定。该方法所得目标化合物纯度高，杂质含量极低，这一点可从图4至图7中看出。除此之外，还具有如下优势：

[0023] 1、用80％乙醇加热回流提取川芎中的苯酞内酯是利用了“相似相溶”的原理，苯酞

内酯的极性较弱，因此在80％乙醇中的溶解度最大，温度升高，溶解度增大。同时水溶性杂质（如阿魏酸等有机酸类成分及多糖类成分等）溶出较少，不仅提高了提取效率，而且可以使粗提物尽可能纯净，最大程度降低了制备型色谱柱被污染的程度，延长了色谱柱的使用寿命。

[0024] 2、使用分析型超临界流体色谱仪对川芎粗提物的分离条件进行了优化，使用YMC-Pack Diol-NP色谱柱，以超临界CO_2为流动相，甲醇为改性剂，通过调节甲醇在流动相中的体积比就可以在12分钟内使4种极性不同的目标化合物获得基线分离。

[0025] 3、从分析型规模放大到半制备型规模，使用与分析型色谱柱填料相同规格不同的半制备柱，在改性剂、分离压力和分离温度不变的情况下，对流动相的流速及流动相中改性剂的体积比进行优化，建立了半制备型超临界流体色谱分离纯化川芎苯酞内酯的方法。使用YMC-Pack Diol-NP色谱柱，以超临界CO_2为流动相，甲醇为改性剂，通过调节甲醇在流动相中的体积比使4种目标化合物在短时间内出峰，一次分离仅仅耗时20分钟，就可以得到4种高纯度单体化合物。该方法操作简单，分离效率高，工艺周期短，甲醇的用量极低，一次分离仅仅消耗15mL甲醇，大大节省了试剂，降低了生产成本。

[0026] 4、用高效液相色谱法对制备所得化合物的纯度进行测定，该方法准确、快速。

[0027] 5、提取、分离、纯化过程中仅用到乙醇、甲醇和水，不使用对环境和人体危害大的氯仿、苯等有机溶剂。产品的后处理简单且能耗低，流动相中的CO_2可减压挥发除去，极少量的甲醇可自然挥发除去，该方法绿色环保、综合成本低、产品中有机溶剂残留量极低。

[0028] 6、优化了层析方法的条件(洗脱液的组成和流速)，使化合物的纯度和纯化效率都大为提高。

附图说明

[0029] 图1是川芎粗提物的高效液相色谱图。

[0030] 图2是川芎粗提物的分析型超临界流体色谱图。

[0031] 图3是川芎粗提物的半制备型超临界流体色谱图。

[0032] 图4是洋川芎内酯H的高效液相色谱图及紫外光谱图。

[0033] 图5是洋川芎内酯I的高效液相色谱图及紫外光谱图。

[0034] 图6是瑟丹酸内酯的高效液相色谱图及紫外光谱图。

[0035] 图7是Z-藁本内酯的高效液相色谱图及紫外光谱图。

[0036] 在图1-7中，I:洋川芎内酯H;II:洋川芎内酯I;III:瑟丹酸内酯;IV:Z-藁本内酯。

具体实施方式

[0037] 下面结合实施例和附图详细说明本发明的技术方案，但保护范围不被此限制。实施例中所用设备或原料皆可从市场获得。所用试剂均购自天津市科密欧化学试剂有限公司，所用水为去离子水。

[0038] 实施例一:从川芎中提取、分离纯化4种苯酞内酯的方法，其步骤为：

[0039] (1)川芎中苯酞内酯的提取:将川芎药材粉碎，用10倍量80％乙醇加热回流提取3次，每次1.5小时，过滤，将乙醇提取液合并，减压浓缩得粗提物。

[0040] (2)粗提物的组成分析:使用分析型高效液相色谱仪对川芎粗提物的组成进行了

分离分析，色谱柱为YMC-Pack ODS-AQ柱(250mm×4.6mm I.D.,5μm)，流动相为甲醇-0.1%甲酸(65:35,V/V)，流速为1.0mL/min，柱温为25℃，检测波长为280nm。

[0041] (3)超临界流体色谱分离分析川芎苯酞内酯的条件优化：使用分析型超临界流体色谱仪对川芎苯酞内酯的分离分析条件进行了优化，最佳条件如下：色谱柱为YMC-Pack Diol-NP柱(250mm×4.6mm I.D.,5μm)，流动相为超临界CO_2，改性剂为甲醇，甲醇在流动相中的体积比呈阶梯式上升(0-7min，1.5%甲醇；7-13min，6%甲醇)，流动相的流速为3.5mL/min，分离压力为13MPa，分离温度为50℃，检测波长为280nm。

[0042] (4)超临界流体色谱分离纯化川芎苯酞内酯：用半制备型超临界流体色谱仪对粗提物中的成分进行分离纯化，色谱柱为YMC-Pack Diol-NP柱(250mm×10mm I.D.,5μm)，流动相为超临界CO_2，改性剂为甲醇，甲醇在流动相中的体积比呈阶梯式上升(0-10min，1.5%甲醇；10-20min，6%甲醇)，流动相的流速为20mL/min，分离压力为13MPa，分离温度为50℃，检测波长为280nm。根据色谱图手动收集目标组分馏分，自然挥发除去溶剂。

[0043] (5)化合物的纯度检测及结构鉴定：将每一个目标组分馏分减压浓缩后用甲醇溶解，其纯度用高效液相色谱法进行检测，色谱条件见步骤(2)，分析结果表明4种化合物的纯度都达到了98%以上。经核磁共振波谱分析4种化合物分别是洋川芎内酯H、洋川芎内酯I、瑟丹酸内酯及藁本内酯。

[0044] 发明人通过调节流动相中甲醇的体积比，采用不同的洗脱方式，控制流动相的流速为 15-25mL/min(优选20mL/min)，优选出了实现本发明目的的纯化条件，有关实验结果如下：

[0045] 表一：川芎粗提物的半制备型超临界流体色谱分离条件

[0046]

	流动相中甲醇的体积比
实施例 1	0-30 min，0-10%
实施例 2	0-15 min，1.5%；15-30 min，6%

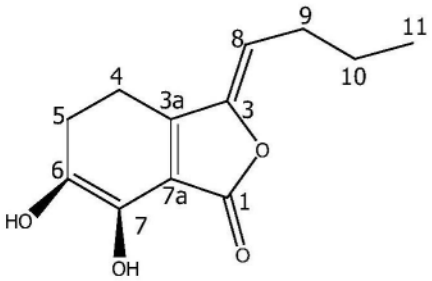
[0047]

实施例 3	0-10 min，1.5%；10-20 min，6%

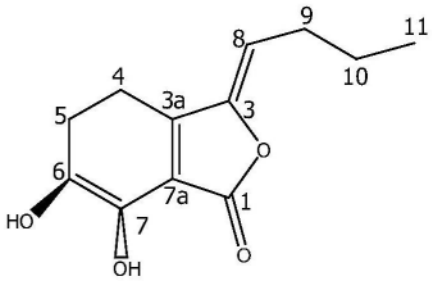
[0048] 在实施例1中，Z-藁本内酯与瑟丹酸内酯不能获得较好的分离，所得化合物的纯度较低。在实施例2中，Z-藁本内酯与瑟丹酸内酯，洋川芎内酯I与洋川芎内酯H均可以获得较好的分离，但是瑟丹酸内酯与洋川芎内酯I间隔时间较长。在实施例3中，各组分之间分离效果良好，分离时间也较为适宜。

[0049] 图3是当选用实施例3体系时川芎粗提物的半制备型高效液相色谱图，由图可见，各成分分离良好，分离时间也较为适宜。根据色谱图手动收集各峰组分，回收溶剂后，即可得到相应的高纯度化合物。经高效液相色谱面积归一化法分析测试，纯度高于98%，这一点可从图4至图7中看出。

[0050] 经核磁共振波谱分析证实所提取纯化得到的4个化合物的化学结构式如下：

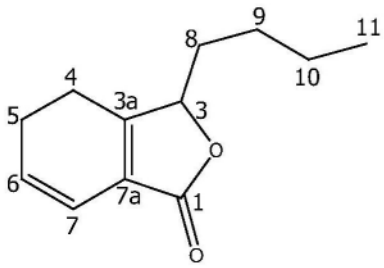


洋川芎内酯H

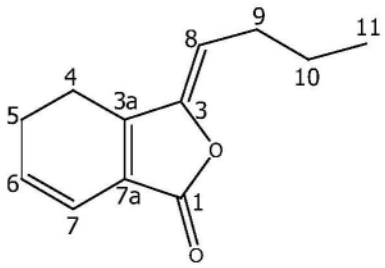


洋川芎内酯I

[0051]



瑟丹酸内酯



Z-藁本内酯

[0052] 4个化合物的鉴定结果如下：

[0053] 洋川芎内酯H：^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm:5.31(1H,t,J＝8.0Hz,8-H),4.61(1H,d,J＝2.8Hz,7-OH),4.04(1H,m,6-OH),2.67-2.38(2H,m,4-H),2.36(2H,m,9-H),2.16-1.89(2H,m,5-H),1.50(2H,m,10-H),0.96(3H,t,J＝7.4Hz,11-H).^{13}C-NMR(100MHz,$CDCl_3$)δppm:169.3(1-C),153.2(3a-C),148.2(3-C),125.3(7a-C),114.4(8-C),67.2(6-C),63.5(7-C),28.1(9-C),25.7(5-C),22.3(10-C),18.3(4-C),13.8(11-C)。

[0054] 洋川芎内酯I：^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm:5.29(1H,t,J＝7.8Hz,8-H),4.50(1H,d, J＝5.6Hz,7-OH),3.96(1H,brs,6-OH),2.54(2H,m,4-H),2.36(2H,q,J＝7.2Hz,9-H),2.05-1.88(2H,m,5-H),1.49(2H,m,10-H),0.95(3H,t,J＝7.4Hz,11-H).^{13}C-NMR(100MHz,$CDCl_3$)δppm:168.9(1-C),152.6(3-C),147.9(3a-C),125.8(7a-C),114.5(8-C),71.8(6-C), 68.1(7-C),28.1(9-C),26.7(5-C),22.3(10-C),19.3(4-C),13.5(11-C)。

[0055] 瑟丹酸内酯：^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$)δppm:6.20(1H,dt,J＝9.6Hz,7-H),5.90(1H,dt,J＝9.6Hz,6-H),4.92(2H,t,J＝3.6Hz,8-H),2.51(2H,m,4-H),1.86(2H,t,J＝2.4Hz,5-H),1.53(2H,q,J＝7.6Hz,9-H),1.35(2H,m,10-H),0.90(3H,t,J＝7.2Hz,11-H).^{13}C-NMR(100 MHz,$CDCl_3$)δppm:170.0(1-C),135.1(7a-C),131.1(7-C),85.3(3-C),43(6-C),34.2(8-C), 27.4(3a-C),25.3(9-C),24.9(5-C),22.4(4-C),20.7(10-C),13.8(11-C)。

[0056] Z-藁本内酯：1H-NMR(400MHz,CDCl3)δppm:6.28(1H,d,J＝9.6Hz,7-H),6.01(1H,d, J＝9.6Hz,6-H),5.23(1H,t,J＝7.8Hz,H-8),2.60(2H,m,H-4),2.46(2H,t,J＝13.5Hz,H-5),2.38(2H,q,J＝7.6Hz,H-9),1.50(2H,m,H-10),0.96(3H,t,J＝7.6Hz,H-11).13C-NMR(100 MHz,CDCl3)δppm:167.6(1-C),148.6(3a-C),147.0(3a-C),129.9(C-6),124.0(7a-

C),117.1(C-7),112.8(C-8),28.1(C-9),22.4(C-10),18.5(C-4),18.4(C-5),13.7(C-11)。

[0057] 应当指出的是,具体实施方式只是本发明比较有代表性的例子,显然本发明的技术方案不限于上述实施例。还可以有很多变形。本领域的普通技术人员,从此文件中所公开提到或是联想到的,均应认为是本专利所要保护的范围。

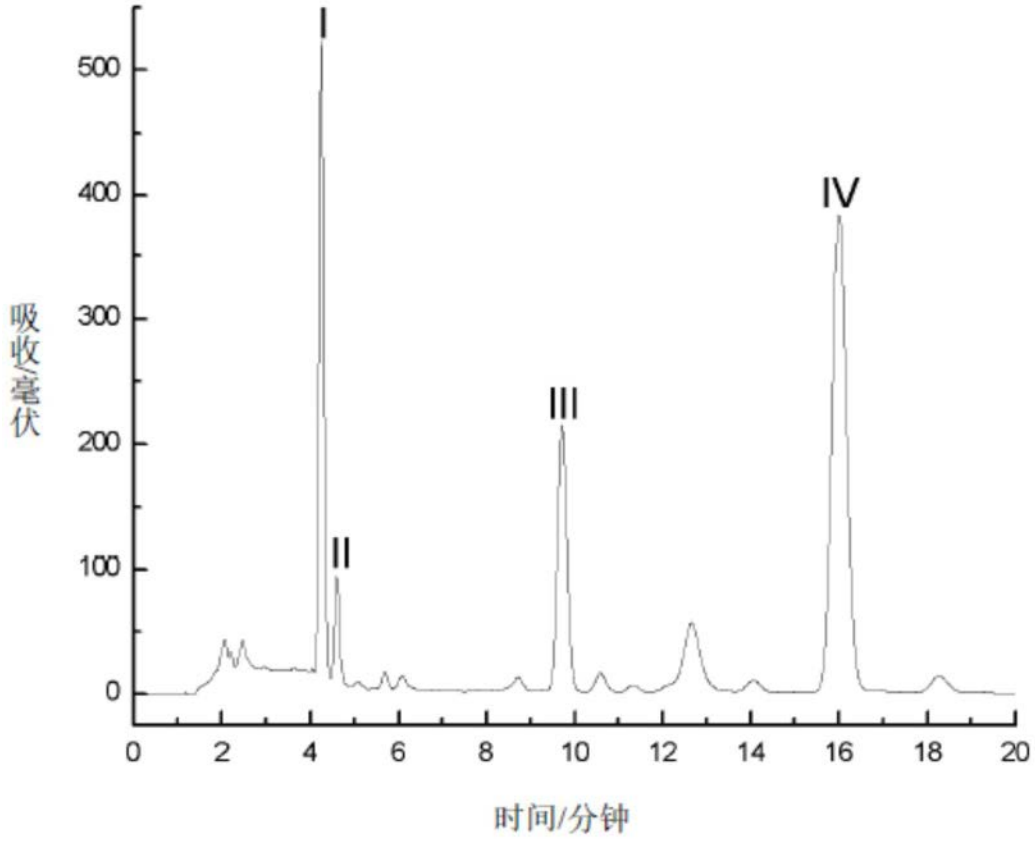


图1

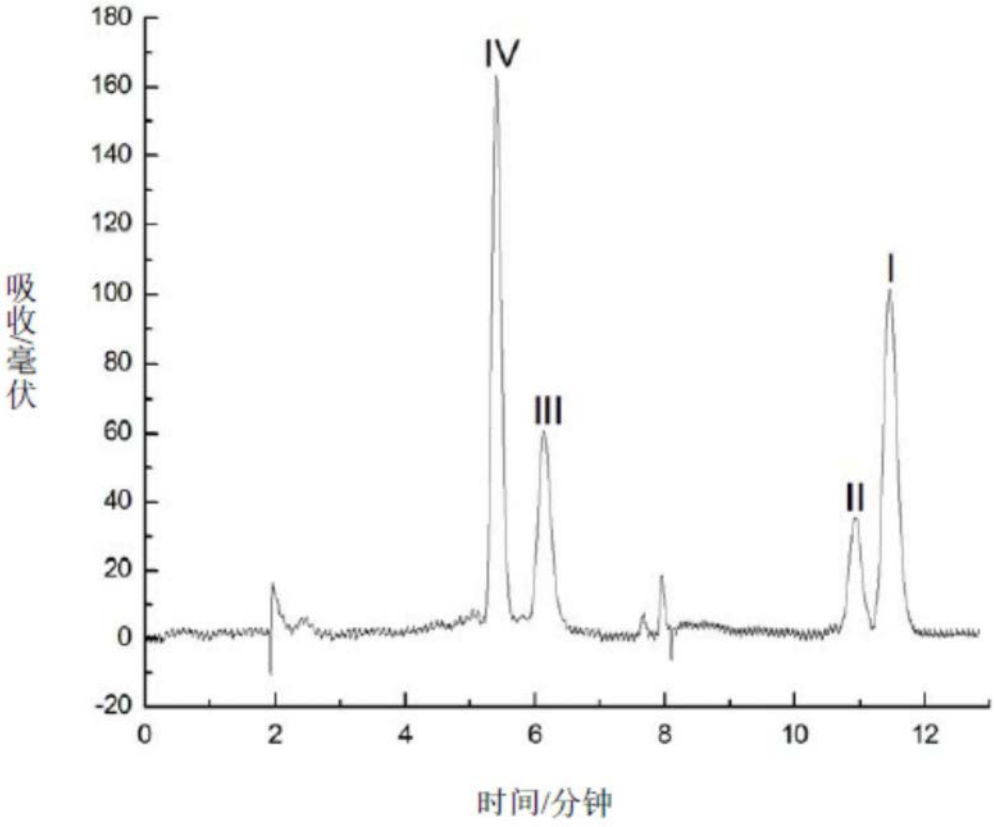

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
吸收毫伏
0
2
4
6
8
10
12
时间/分钟
IV
III
II
I

图2

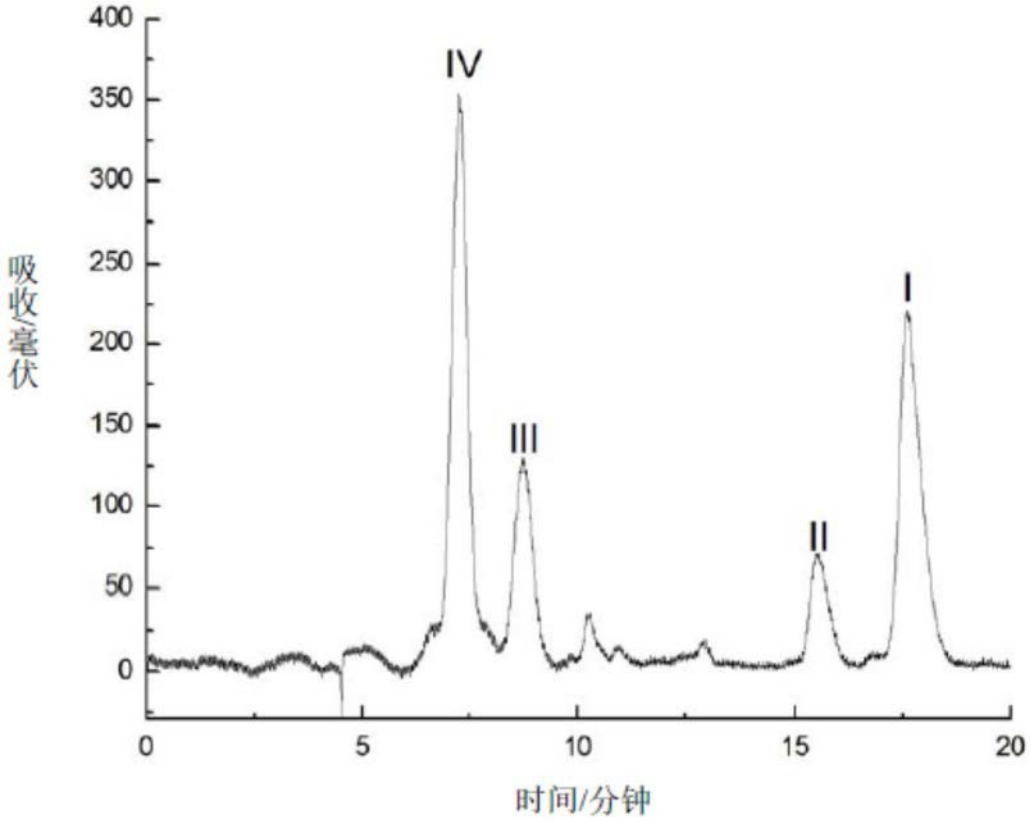


图3

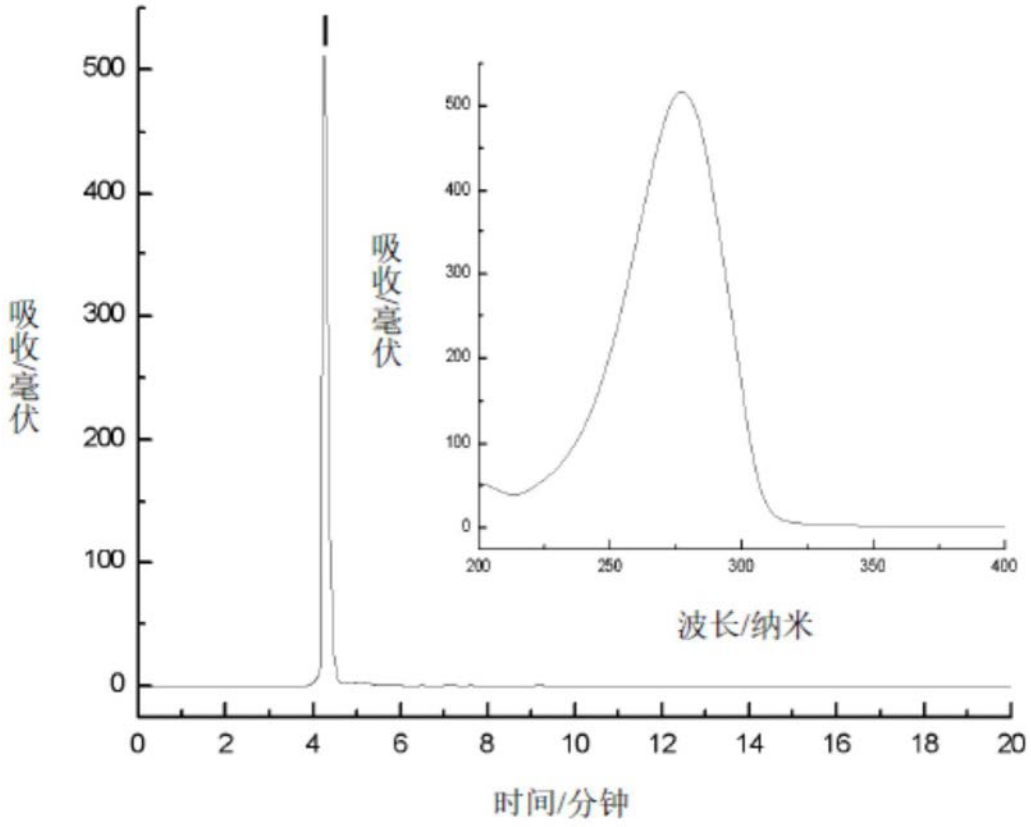

吸收毫伏
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
时间/分钟
吸收毫伏
500
400
300
200
100
0
200
250
300
350
400
波长/纳米

图4

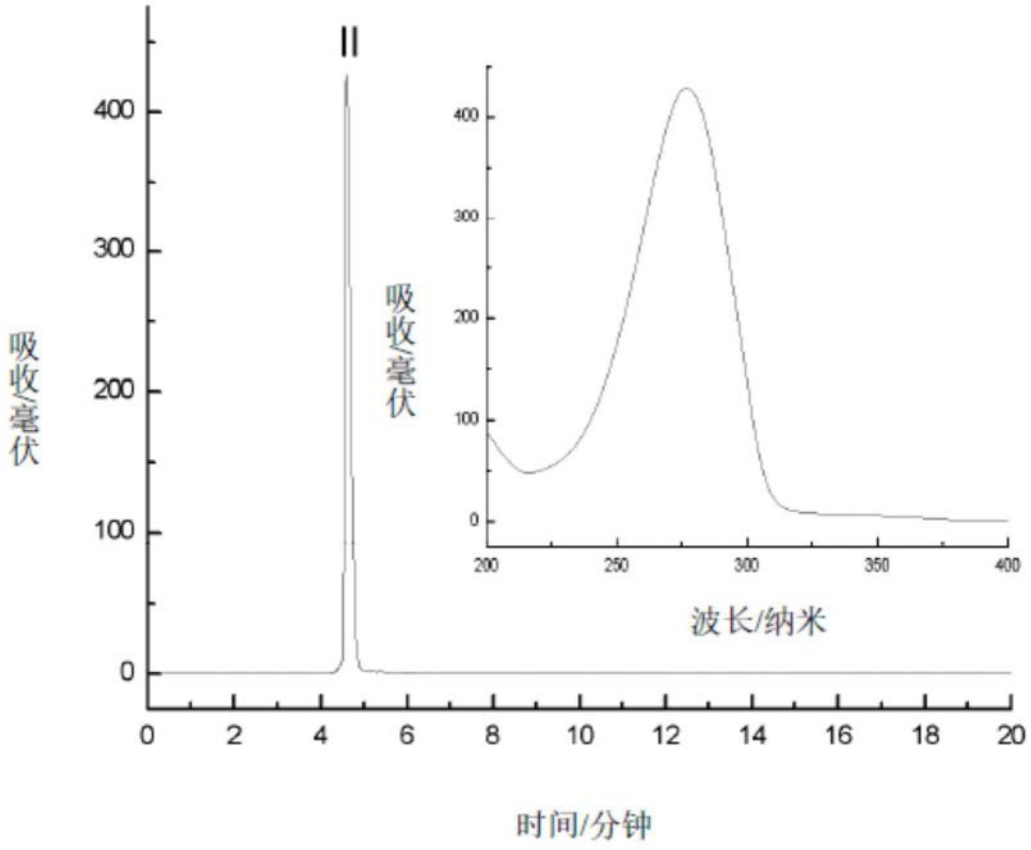

II
吸收毫伏
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
时间/分钟
吸收毫伏
400
300
200
100
0
200
250
300
350
400
波长/纳米

图5

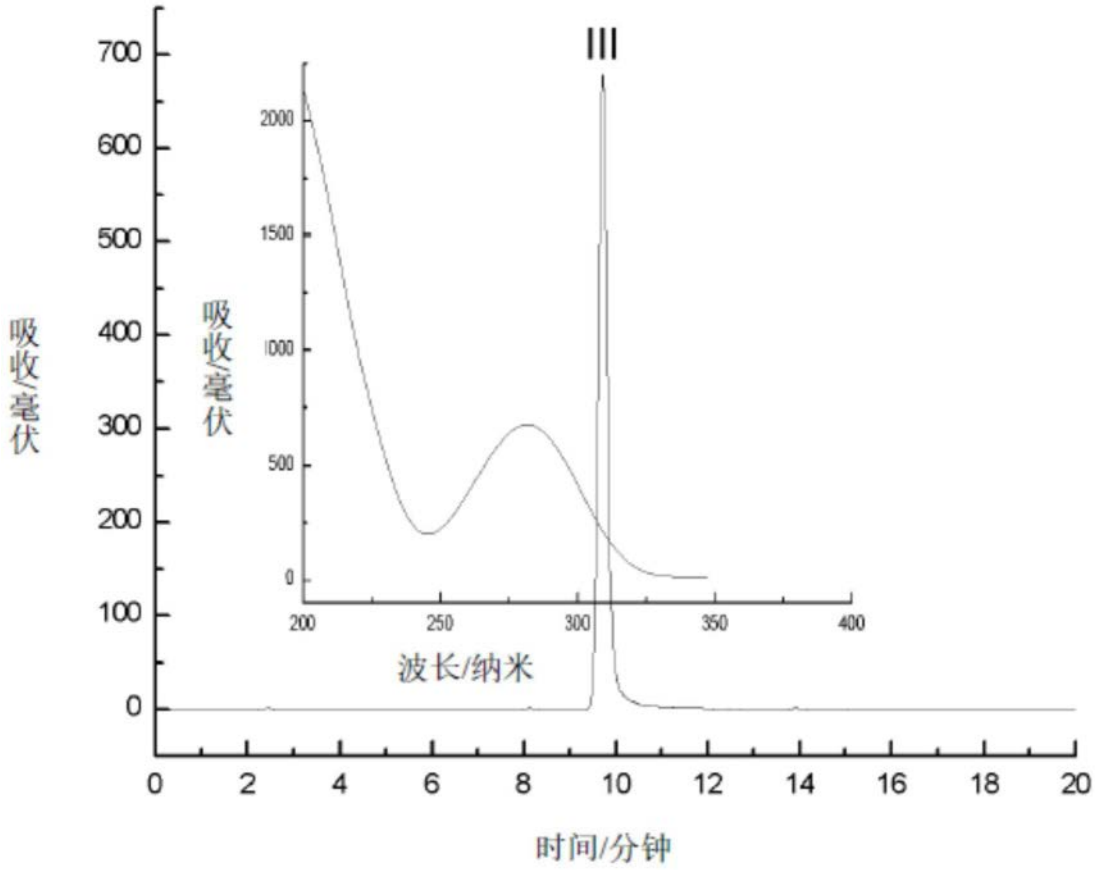

III
吸收/毫伏
吸收/毫伏
700
600
500
400
300
200
100
0
2000
1500
1000
500
0
200
250
300
350
400
波长/纳米
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
时间/分钟

图6

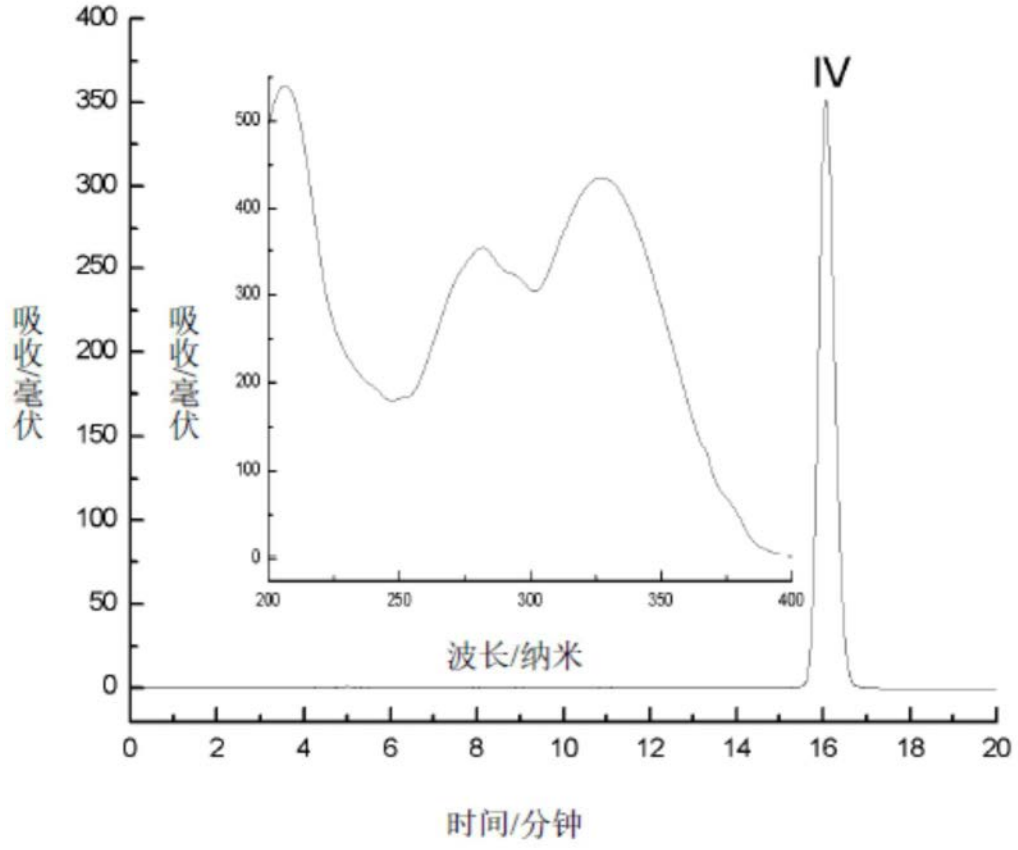


图7