



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103113433 B

(45) 授权公告日 2015.09.23

(21) 申请号 201310060675.0

(22) 申请日 2013.02.27

(73) 专利权人 河南科技大学

地址 471000 河南省洛阳市涧西区西苑路
48号

(72) 发明人 邓瑞雪 刘普 尹卫平 高嘉屿
王怡冉 牛亚琪 段文录 时清亮
柴元武

(74) 专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所
(普通合伙) 41120

代理人 罗民健

(51) Int. Cl.

C07H 17/04(2006.01)

C07H 1/08(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101780126 A, 2010.07.21, 权利要求
1-10, 说明书第 1-3 页.

EP 1795201 A1, 2007.06.13, 全文.

CN 102924542 A, 2013.02.13, 全文.

Jong Hwan Kwak, 等. Cytotoxic Phenolic
Compounds from Chionanthus retusus. 《Arch.

Pharm. Res.》. 2009, 第 32 卷 (第 12 期), 第
1681-1687 页.

Rui-Xue Deng, 等. Chemical constituents
from Syringa pubescens Turcz. 《Biochemical
Systematics and Ecology》. 2010, 第 38 卷 (第
4 期), 第 813-815 页.

李利英, 等. 新药材小叶丁香抗肝纤维化成分
提取工艺研究. 《中成药》. 2009, 第 31 卷 (第
11 期), 第 1781-1783 页.

刘普, 等. 小叶丁香萜类化学成分研究. 《中
国实验方剂学杂志》. 2011, 第 17 卷 (第 19 期),
第 127-131 页.

宋文青. 新型固相萃取填料的制备、评价及
应用研究. 《天津大学硕士学位论文》. 2011, 第
1-6, 31 页.

审查员 臧乐芸

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

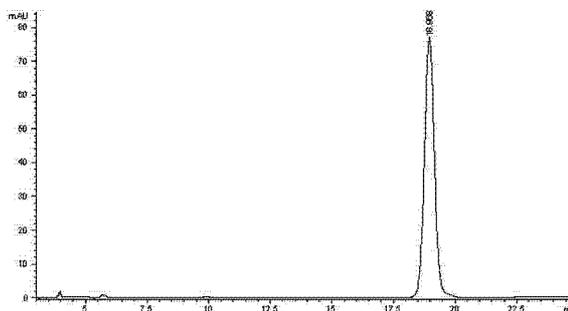
(54) 发明名称

一种从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法

(57) 摘要

本发明属于中药有效成分提取及分离技术领域, 具体涉及一种从巧玲花中提取高纯度橄榄苦苷的方法, 包括将粉碎过的干燥巧玲花用乙醇浸泡后超声提取, 并将提取液浓缩成浸膏的步骤, 以及将制得的浸膏提纯分离的步骤, 即通过采用超声辅助有机溶剂乙醇提取、溶解过滤、固相萃取、反相 flash 柱快速层析、活性炭吸附及重结晶等工艺制备高纯度的裂环烯醚萜苷类化合物-橄榄苦苷; 本发明提供的方法简便, 快捷, 所得到产品纯度高, 收率高, 为今后橄榄苦苷的开发研究奠定了基础。

CN 103113433 B



1. 一种从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,包括将粉碎过的干燥巧玲花用乙醇浸泡后超声提取,并将提取液浓缩成浸膏的步骤,以及将制得的浸膏提纯分离的步骤,其特征在于,所述提纯分离的步骤为:

步骤一:将制得的浸膏用甲醇或乙腈溶解后过滤,滤液与硅胶和硅藻土混合搅拌,其中硅胶与硅藻土的质量比为 2:1~1:2,混合均匀后置于常温下挥干溶剂,混合物依次用氯仿、氯仿-甲醇混合溶剂及甲醇分别萃取两次,每次用于萃取的溶剂均为混合物质量的 10-15 倍,其中氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为 4:1,萃取完成后收集甲醇萃取溶液,浓缩,浓缩物备用;

步骤二:将步骤一所得浓缩物用甲醇溶解后过滤,滤液采用装有反相填料的 flash 柱吸附,然后用甲醇-水洗脱液进行洗脱分离,分段收集馏分,用 HPLC 检测,取橄榄苦苷含量大于 90% 的馏分段,减压蒸馏即得橄榄苦苷粗品;

步骤三:将步骤二所得橄榄苦苷粗品于 50-60℃ 条件下用甲醇溶剂溶解,配成饱和溶液,趁热用活性炭吸附过滤,滤液于 0-4℃ 条件下结晶,过滤干燥即得纯度大于 98% 橄榄苦苷。

2. 如权利要求 1 所述的从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,其特征在于:所述将巧玲花浸泡后超声提取并浓缩的方法为:将粉碎过的干燥巧玲花,用体积浓度为 60-90% 的乙醇浸泡 24-36 小时,然后在 50-60℃ 条件下超声提取 30-50 分钟,过滤,将所得滤渣再用乙醇重复超声提取 2-3 次,合并提取液,于 50-60℃ 条件下减压蒸馏浓缩得浸膏。

3. 如权利要求 2 所述的从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,其特征在于:超声提取时,乙醇的质量为干燥巧玲花质量的 10-12 倍。

4. 如权利要求 1 所述的从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,其特征在于:所述步骤一中用于溶解浸膏的甲醇或乙腈的质量为浸膏质量的 5-7 倍。

5. 如权利要求 1 所述的从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,其特征在于:所述步骤一中所用硅胶和硅藻土的总重量为浸膏重量的 2-4 倍。

6. 如权利要求 1 所述的从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,其特征在于:所述步骤二中的 flash 柱采用的反相填料为 RP-18 或 ODS-A。

7. 如权利要求 1 所述的从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,其特征在于:所述步骤三中活性炭的用量为橄榄苦苷粗品质量的 8-10 倍。

一种从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法

技术领域

[0001] 本发明属于中药有效成分提取及分离技术领域,具体涉及一种从巧玲花中提取高纯度橄榄苦苷的方法。

背景技术

[0002] 巧玲花(*Syringa pubescens* Turca)为木犀科丁香属植物,灌木,又名毛(叶)丁香、四季丁香,小叶丁香,产自河南、河北、陕西等地。经研究发现,巧玲花中含有三萜类、黄酮类和皂苷类化合物,其橄榄苦苷的含量相对较高,有较大的研究开发价值。

[0003] 橄榄苦苷是一种裂环烯醚萜苷类化合物,在至少 25 种木犀科植物中存在。橄榄苦苷又是一个具有较强生物活性的化合物,文献报道其具有显著的抗真菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗癌和降血糖等多种生物活性,另外,橄榄苦苷还具有抗心律失常和解痉作用,是一种作用效果较好的血管紧张素转化酶抑制剂;橄榄苦苷还能够激活胃蛋白酶并降低其他酶的活性;橄榄苦苷还能减少肝细胞中由离子诱导的脂质过氧化作用产生的丙醛酸;目前,橄榄苦苷正逐渐被应用于医药、保健食品、化妆品等领域。

[0004] 目前,橄榄苦苷主要是从油橄榄(*Olea europaea* L., *Olea africana*, *Olea capensis* L.)的叶、果实及树皮,紫丁香(*Syringa oblata* Lindl.),小叶丁香(*Syringa microphylla* Diels)等植物中得到。目前,有报道采用大孔吸附树脂从巧玲花中富集得到橄榄苦苷,但是得到的橄榄苦苷含量只有 40% 左右,尚未有高纯度的橄榄苦苷规模化制备工艺的研究报道。因此,研究开发新的橄榄苦苷制备工艺,从巧玲花中规模化制备高纯度的橄榄苦苷,对于该化合物的应用开发具有重要意义。

发明内容

[0005] 针对现有技术中从巧玲花中富集得到的橄榄苦苷含量不高的问题,本发明提供一种从巧玲花中提取高纯度橄榄苦苷的方法。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:

[0007] 一种从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,包括将粉碎过的干燥巧玲花用乙醇浸泡后超声提取,并将提取液浓缩成浸膏的步骤,以及将制得的浸膏提纯分离的步骤,所述提纯分离的步骤为:

[0008] 步骤一:将制得的浸膏用甲醇或乙腈溶解后过滤,滤液与硅胶和硅藻土混合搅拌,其中硅胶与硅藻土的质量比为 2:1~1:2,混合均匀后置于常温下挥干溶剂,混合物依次用氯仿、氯仿-甲醇混合溶剂及甲醇分别萃取两次,每次用于萃取的溶剂均为混合物质量的 10-15 倍,其中氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为 4:1,萃取完成后收集甲醇萃取溶液,浓缩,浓缩物备用;

[0009] 步骤二:将步骤一所得浓缩物用甲醇溶解后过滤,滤液采用装有反相填料的 flash 柱吸附、然后用甲醇-水洗脱液进行洗脱分离,分段收集馏分,用 HPLC 检测,取橄榄苦苷含量大于 90% 的馏分段,减压蒸馏即得橄榄苦苷粗品;

[0010] 步骤三：将步骤二所得橄榄苦苷粗品于 50-60℃ 条件下用甲醇溶剂溶解，配成饱和溶液，趁热用活性炭吸附过滤，滤液于 0-4℃ 条件下结晶，过滤干燥即得纯度大于 98% 橄榄苦苷；

[0011] 所述将巧玲花浸泡后超声提取并浓缩的方法为：将粉碎过的干燥巧玲花，用体积浓度为 60-90% 的乙醇浸泡 24-36 小时，然后在 50-60℃ 条件下超声提取 30-50 分钟，过滤，将所得滤渣再用乙醇重复超声提取 2-3 次，合并提取液，于 50-60℃ 条件下减压蒸馏浓缩得浸膏；

[0012] 超声提取时，乙醇的质量为干燥巧玲花质量的 10-12 倍；

[0013] 所述步骤一中用于溶解浸膏的甲醇或乙腈的质量为浸膏质量的 5-7 倍；

[0014] 所述步骤一中所用硅胶和硅藻土的总重量为浸膏重量的 2-4 倍；

[0015] 所述步骤二中的 flash 柱采用的反相填料为 RP-18 或 ODS-A；

[0016] 所述步骤三中活性炭的用量为橄榄苦苷粗品质量的 8-10 倍。

[0017] 本发明的有益效果：

[0018] 本发明采用硅胶和硅藻土混合搅拌固相萃取，提高了分离提纯效率，且萃取溶剂用量少，成本低，工业化操作方便；

[0019] 本发明采用超声提取效率高，温度较低，避免了在煮沸条件下对某些成分糖苷类成分含量的影响；

[0020] 本发明采用反相填料洗脱，适合于橄榄苦苷的分离，且采用 flash 柱分离具有分离速度快，上样量大等优点；

[0021] 本发明提供一种新的规模化制备高纯度橄榄苦苷的来源，通过采用超声辅助有机溶剂乙醇提取、溶解过滤、固相萃取、反相 flash 柱快速层析、活性炭吸附及重结晶等工艺制备高纯度的裂环烯醚萜苷类化合物 - 橄榄苦苷，可以单独或与适宜的赋形剂等结合，按照常规方法制成口服或非口服剂型用于制备治疗药物；

[0022] 本发明提供的方法简便，快捷，所得到产品纯度高，收率高，为今后橄榄苦苷的开发研究奠定了基础。

附图说明

[0023] 图 1 为所得到橄榄苦苷 HPLC 分析图谱；

[0024] 图 2 为采用本发明方法制得的橄榄苦苷的 ¹H NMR 图谱；

[0025] 图 3 为采用本发明方法制得的橄榄苦苷的 ¹³C NMR 图谱。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施方式对本发明做进一步的阐述。

[0027] 一种从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法，包括将粉碎过的干燥巧玲花用乙醇浸泡后超声提取，并将提取液浓缩成浸膏的步骤，以及将制得的浸膏提纯分离的步骤，所述提纯分离的步骤为：

[0028] 步骤一：将制得的浸膏用甲醇或乙腈溶解后过滤，滤液与硅胶和硅藻土混合搅拌，其中硅胶与硅藻土的质量比为 2:1~1:2，混合均匀后置于常温下挥干溶剂，混合物依次用氯仿、氯仿 - 甲醇混合溶剂及甲醇分别萃取两次，每次用于萃取的溶剂均为混合物质量的

10-15 倍,其中氯仿-甲醇混合溶剂中氯仿和甲醇的体积比为 4:1,萃取完成后收集甲醇萃取溶液,浓缩,浓缩物备用;

[0029] 步骤二:将步骤一所得浓缩物用甲醇溶解后过滤,滤液采用装有反相填料的 flash 柱吸附、然后用甲醇-水洗脱液进行洗脱分离,分段收集馏分,用 HPLC 检测,取橄榄苦苷含量大于 90% 的馏分段,减压蒸馏即得橄榄苦苷粗品;

[0030] 步骤三:将步骤二所得橄榄苦苷粗品于 50-60℃ 条件下用甲醇溶剂溶解,配成饱和溶液,趁热用活性炭吸附过滤,滤液于 0-4℃ 条件下结晶,过滤干燥即得纯度大于 98% 橄榄苦苷;

[0031] 所述将巧玲花浸泡后超声提取并浓缩的方法为:将粉碎过的干燥巧玲花,用体积浓度为 60-90% 的乙醇浸泡 24-36 小时,然后在 50-60℃ 条件下超声提取 30-50 分钟,过滤,将所得滤渣再用乙醇重复超声提取 2-3 次,合并提取液,于 50-60℃ 条件下减压蒸馏浓缩得浸膏;

[0032] 超声提取时,乙醇的质量为干燥巧玲花质量的 10-12 倍;

[0033] 所述步骤一中用于溶解浸膏的甲醇或乙腈的质量为浸膏质量的 5-7 倍;

[0034] 所述步骤一中所用硅胶和硅藻土的总重量为浸膏重量的 2-4 倍;

[0035] 所述步骤二中的 flash 柱采用的反相填料为 RP-18 或 ODS-A;

[0036] 所述步骤三中活性炭的用量为橄榄苦苷粗品质量的 8-10 倍。

[0037] 橄榄苦苷含量的测定方法:按照文献“高效液相色谱法同时测定巧玲花不同部位中 5 种活性成分的含量”(刘普,张创峰,邓瑞雪,等,中国实验方剂学杂志,2011,46(24):1935-1938)的方法进行:采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-pH2.5 磷酸二氢钾缓冲盐(20:80)等度洗脱;流速 1ml·min⁻¹;检测波长 334nm;柱温 30℃。

[0038] 实施例 1

[0039] 一种从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,包括将粉碎过的干燥巧玲花用乙醇浸泡后超声提取,并将提取液浓缩成浸膏的步骤,以及将制得的浸膏提纯分离的步骤;

[0040] 所述将巧玲花浸泡后超声提取并浓缩的方法为:将粉碎过的干燥巧玲花 1 公斤,用质量为 12 公斤,体积浓度 90% 的乙醇浸泡 36 小时,然后在 60℃ 条件下超声提取 50 分钟,过滤,将滤渣重复提取 3 次,合并提取液,在 50-60℃ 下减压蒸馏浓缩,得浸膏 210g;

[0041] 所述提纯分离的步骤为:

[0042] 步骤一:将制得的 200g 浸膏用 7 倍质量甲醇溶解,过滤,滤液用质量倍数为 4 倍质量的硅胶-硅藻土(质量比 1:1)混合拌样,挥干溶剂后依次用 15 倍样品质量的氯仿、氯仿-甲醇(体积比 4:1)及甲醇分别萃取两次,收集甲醇萃取所得溶液,浓缩,称重,得样品 51 克,备用;

[0043] 步骤二:将步骤一所得样品用 5 倍质量的甲醇溶解,过滤,滤液采用装有 RP-18 反相填料的 flash 柱吸附,然后用甲醇-水洗脱液进行洗脱分离,分段收集馏分,用 HPLC 检测,取橄榄苦苷含量大于 90% 的馏分段,减压蒸馏即得橄榄苦苷粗品;

[0044] 步骤三:将步骤二所得橄榄苦苷粗品于 60℃ 条件下用甲醇溶剂溶解,配成饱和溶液,趁热用质量为橄榄苦苷粗品 10 倍的活性炭吸附过滤,滤液于 0-4℃ 条件下结晶,过滤干燥得橄榄苦苷样品 12.5g,采用前述橄榄苦苷含量的测定方法,得橄榄苦苷样品的纯度为

98.6%。

[0045] 实施例 2

[0046] 一种从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,包括将粉碎过的干燥巧玲花用乙醇浸泡后超声提取,并将提取液浓缩成浸膏的步骤,以及将制得的浸膏提纯分离的步骤;

[0047] 所述将巧玲花浸泡后超声提取并浓缩的方法为:将粉碎过的干燥巧玲花 1 公斤,用质量为 10 公斤、体积浓度 90% 的乙醇浸泡 24 小时,然后在 50℃ 条件下超声提取 30 分钟,过滤,将滤渣重复提取 2 次,合并提取液,在 50-60℃ 下减压蒸馏浓缩,得浸膏 205 g;

[0048] 所述提纯分离的步骤为:

[0049] 步骤一:将制得的 200g 浸膏用 7 倍质量乙腈溶解,过滤,滤液用质量倍数为 4 倍质量的硅胶-硅藻土(质量比 2:1) 混合拌样,挥干溶剂后依次用 15 倍样品质量的氯仿、氯仿-甲醇(体积比 4:1) 及甲醇分别萃取两次,收集甲醇萃取所得溶液,浓缩,得样品 51 克,备用;

[0050] 步骤二:将步骤一所得样品用 5 倍质量的甲醇溶解,过滤,滤液采用装有 ODS-A 反相填料的 flash 柱、用甲醇-水洗脱液进行洗脱分离,分段收集馏分,用 HPLC 检测,取橄榄苦苷含量大于 90% 的馏分段,减压蒸馏即得橄榄苦苷粗品;

[0051] 步骤三:将步骤二所得橄榄苦苷粗品于 50℃ 条件下用甲醇溶剂溶解,配成饱和溶液,趁热用质量为橄榄苦苷粗品 8 倍的活性炭吸附过滤,滤液于 0-4℃ 条件下结晶,过滤干燥得橄榄苦苷样品 10.9g,采用前述橄榄苦苷含量的测定方法,得橄榄苦苷样品的纯度为 98.8%。

[0052] 实施例 3

[0053] 一种从巧玲花中提取橄榄苦苷的方法,包括将粉碎过的干燥巧玲花用乙醇浸泡后超声提取,并将提取液浓缩成浸膏的步骤,以及将制得的浸膏提纯分离的步骤;

[0054] 所述将巧玲花浸泡后超声提取并浓缩的方法为:将粉碎过的干燥巧玲花 3 公斤,用质量为 30 公斤,体积浓度 90% 的乙醇浸泡 24 小时,然后在 60℃ 条件下超声提取 30 分钟,过滤,将滤渣重复提取 3 次,合并提取液,在 50-60℃ 下减压蒸馏浓缩,得浸膏 708g;

[0055] 所述提纯分离的步骤为:

[0056] 步骤一:将制得的 700g 浸膏用 5 倍质量甲醇溶解,过滤,滤液用质量倍数为 4 倍质量的硅胶-硅藻土(质量比 1:2) 混合拌样,挥干溶剂后依次用 10 倍样品质量的氯仿、氯仿-甲醇(体积比 4:1) 及甲醇分别萃取两次,收集甲醇萃取所得溶液,浓缩,称重,得样品 172g,备用;

[0057] 步骤二:将步骤一所得样品用 3 倍质量的甲醇溶解,过滤,滤液采用装有 RP-18 反相填料的 flash 柱、用甲醇-水洗脱液进行洗脱分离,分段收集馏分,用 HPLC 检测,取橄榄苦苷含量大于 90% 的馏分段,减压蒸馏即得橄榄苦苷粗品;

[0058] 步骤三:将步骤二所得橄榄苦苷粗品于 50℃ 条件下用甲醇溶剂溶解,配成饱和溶液,趁热用质量为橄榄苦苷粗品 8 倍的活性炭吸附过滤,滤液于 0-4℃ 条件下结晶,过滤干燥得橄榄苦苷样品 41.3g,采用前述橄榄苦苷含量的测定方法,得橄榄苦苷样品的纯度为 98.2%。

[0059] 所得的橄榄苦苷纯品经 HPLC、NMR (MeOD, 400MHz)、HR-MS (MeOD, 100MHz) 测定化合物的结构,波谱数据见下表,图谱结果见图 1 至 3。

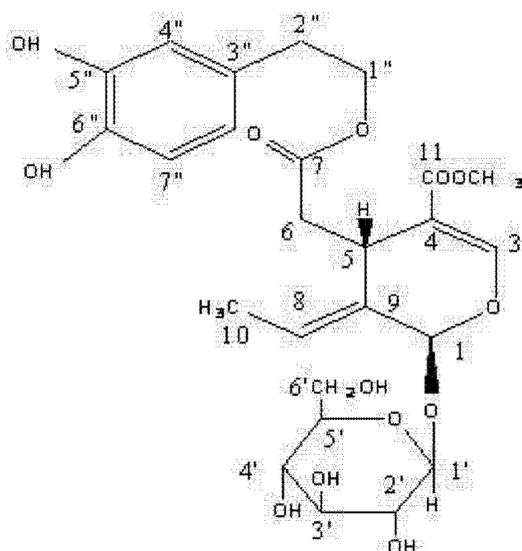
[0060] 表 1 橄榄苦苷 ^1H NMR 和 ^{13}C -NMR 数据

[0061]

	δ H	$J(\text{Hz})$	δ C
1	5.91		95.1
3	7.50		155.2
4			109.4
5	4.00	9.2, 4.3	31.8
6a	2.44	14, 8.8	41.3
6b	2.70	14, 4.4	
7			173.2
8	6.08	6.8	124.9
9			130.7
10	1.65	7.0	13.6
11			167.2
OMe	3.70		51.9
1'	4.80	8.0	100.9
2'	3.28-3.4		74.7
4'			71.4
5'			78.4
3'	3.79	8.8	77.9
6' a	3.66	12, 5.6	62.7
6' b	3.88	11.6	
1'' a	4.09	7.4	66.9
1'' b	4.19		
2''	2.75	7.2	35.4
3''			130.5
4''	6.65	2.0	117.0
5''			146.2
6''			144.9
7''	6.68	8.0	116.4
8''	6.54	8.0, 2.0	121.3

[0062] 经分析可得, 橄榄苦苷结构式为:

[0063]



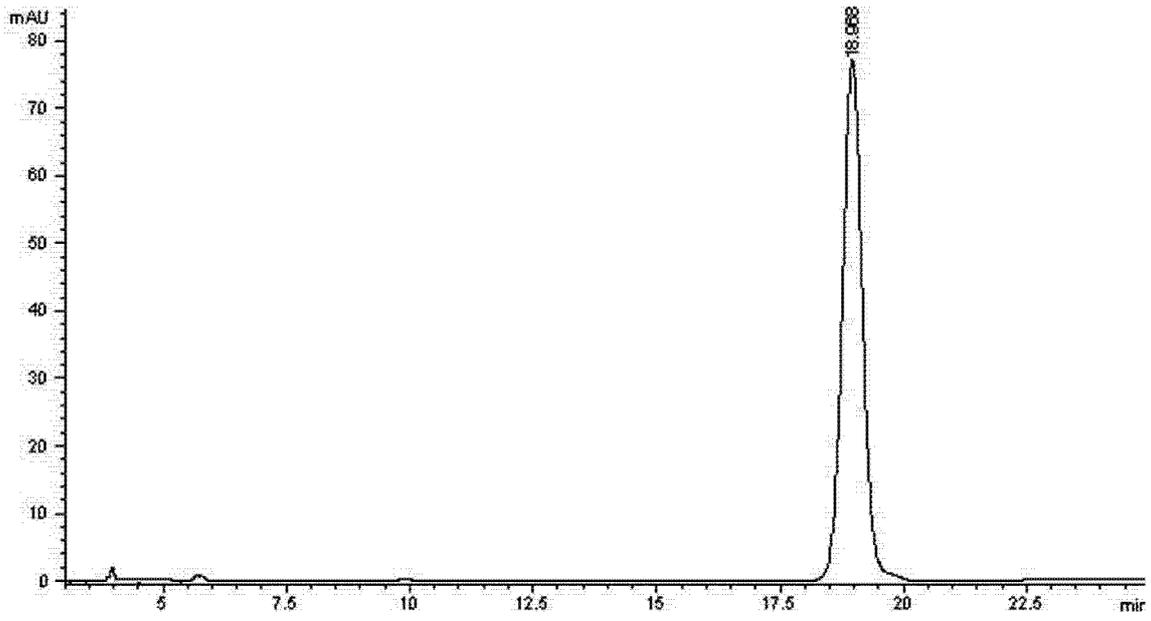


图 1

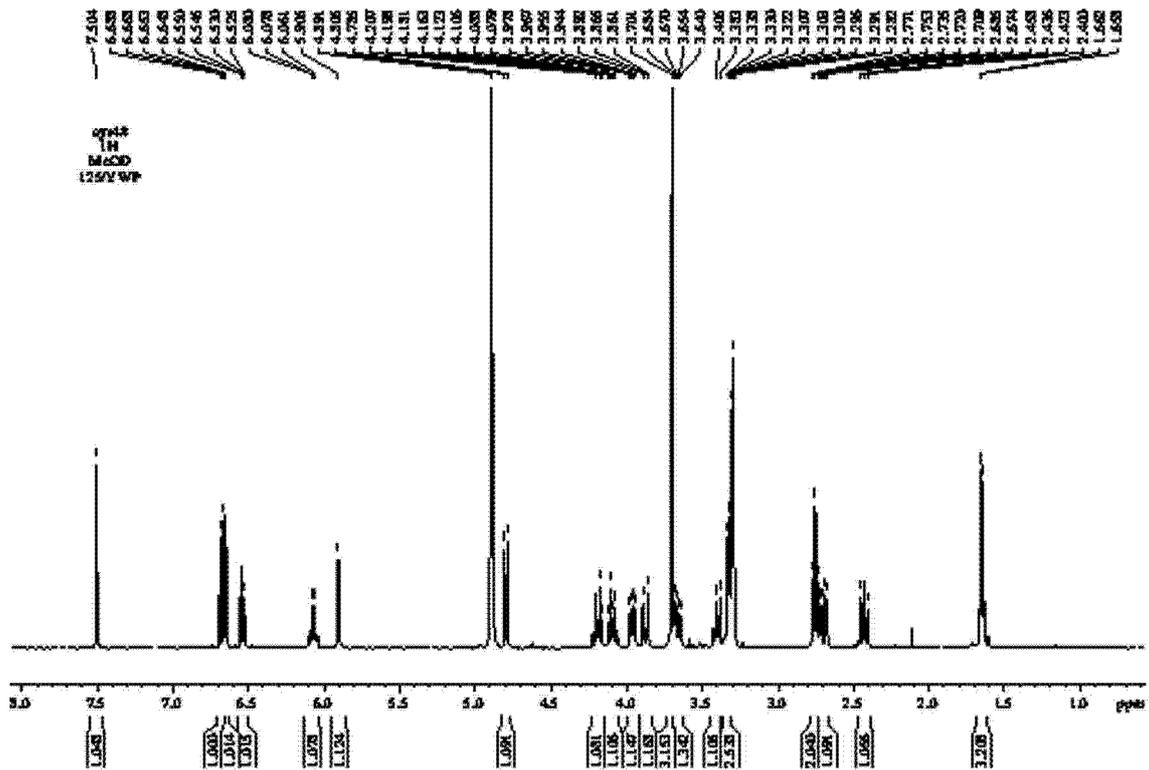


图 2

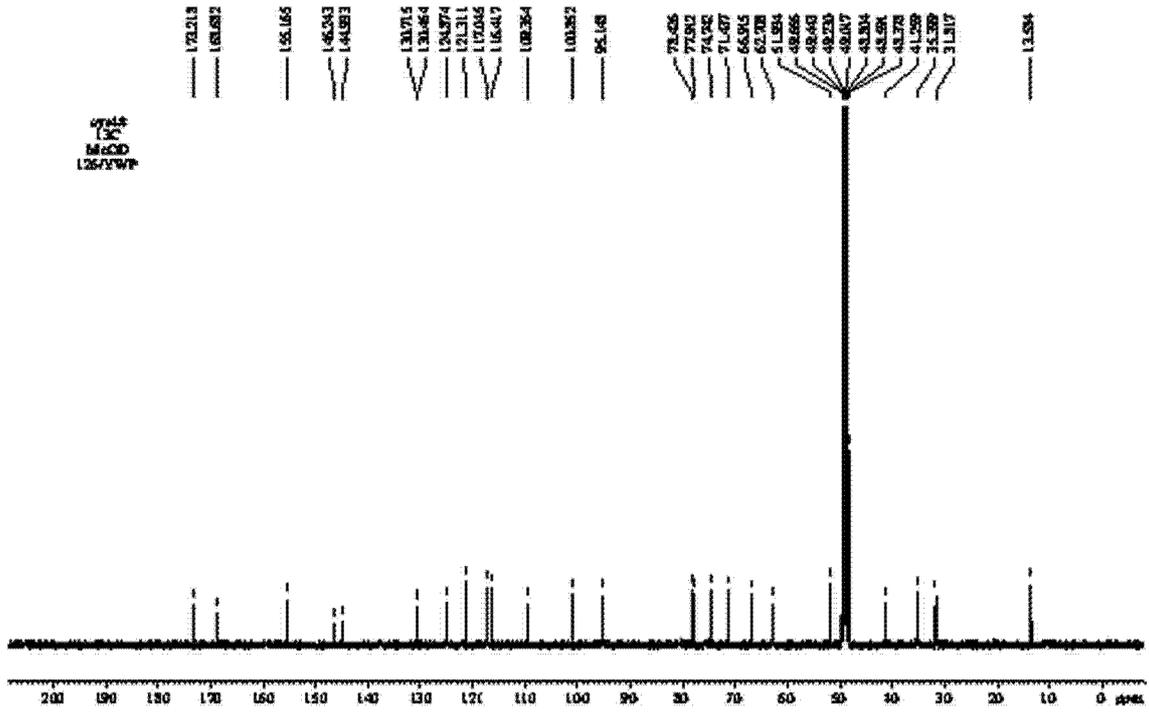


图 3