(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112321663 A
(43)申请公布日 2021.02.05

(21)申请号 202011130975.8

(22)申请日 2020.10.21

(71)申请人 宋景华
地址 250131 山东省济南市历城区桑园路28号

(72)发明人 不公告发明人

(51)Int.Cl.
C07J 9/00(2006.01)
C07D 303/40(2006.01)
C07D 301/32(2006.01)
C07C 51/42(2006.01)
C07C 51/47(2006.01)
C07C 51/487(2006.01)
C07C 59/46(2006.01)
C07C 29/74(2006.01)
C07C 29/76(2006.01)
C07C 29/88(2006.01)
C07C 33/14(2006.01)
A61K 36/07(2006.01)
B01J 20/26(2006.01)
B01J 20/28(2006.01)
B01J 20/30(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 9/12(2006.01)
A61P 3/06(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法

(57)摘要

本发明公开了一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法，该方法采用复合酶酶解、多孔共价有机框架材料COF-701富集、多频超声辅助提取的工艺，通过优化上样液、洗脱液和超声频率等参数，实现了对桑黄中类固醇和总三萜的同时高效纯化富集。该方法具有稳定性好、选择性高、吸附量大、操作简便可控等优点，可用于各种复杂样品中类固醇和总三萜的纯化富集。

CN 112321663 A

1.一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法,其特征在于,步骤如下:

(1)将除杂后的桑黄在60℃下烘干后粉碎,过40目筛网,得到桑黄干粉;

(2)向桑黄干粉中加入磷酸氢二钠缓冲液,混合均匀,再按桑黄干粉质量的0.2～1.0%加入复合酶,在45～55℃下酶解30～90分钟,酶解液经离心分离得到上清液和沉淀物;

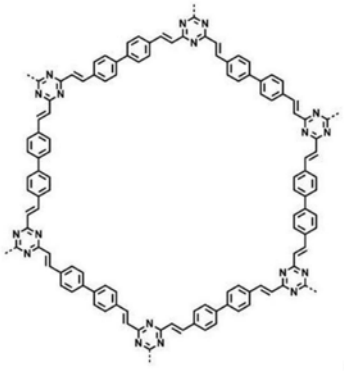
(3)在步骤(2)中上清液中加入共价有机框架材料COF-701,其添加量为桑黄干粉质量的1%,进行多频超声萃取,经离心分离得到COF-701富集材料;

(4)COF-701富集材料置于离心管中,加入洗脱液,超声振荡1分钟,经离心分离得到上清液和COF-701;上清液经旋转蒸发仪减压浓缩后得到类固醇和总三萜产品。

2.根据权利要求1所述的一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜方法,其特征在于:所述磷酸氢二钠缓冲液,成分为磷酸氢二钠和柠檬酸,pH为4.0～6.0,其添加量为桑黄干粉质量的5～10倍。

3.根据权利要求1所述的一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜方法,其特征在于:所述复合酶,由纤维素酶和葡萄糖氧化酶组成,其中,纤维素酶和葡萄糖氧化酶质量比为3:1～1:3。

4.根据权利要求1所述的一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜方法,其特征在于:所述共价有机框架材料COF-701,由2,4,6-三甲基-1,3,5-三嗪和4,4′-联苯二甲醛在三氟乙酸催化下于150℃聚合得到,比表面积是1715m^2g^{-1},孔径为1.1nm,在强酸性和碱性条件下可以保持其组成和结晶度,其结构式如下:



。

5.根据权利要求1所述的一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜方法,其特征在于:所述多频超声萃取,超声频率为20-80kHz,两两组合或三种同时组合,超声处理功率为100-1000W,萃取时间为30-300s。

6.根据权利要求1所述的一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜方法,其特征在于:所述离心分离,在700～2000rpm下离心10～30min。

7.根据权利要求1所述的一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜方法,其特征在于:所述洗脱液,由乙醇、甘油、碳酸二甲酯、柠檬烯、乙酸乙酯中的一种或二种及以上混合;洗脱液添加量为COF-701富集材料质量的2～5倍。

8.根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述超声振荡,超声频率为25kHz,超声处理功率为600W。

一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种同时纯化提取桑黄中类固醇和总三萜的方法，属于天然有机化学领域。

背景技术

[0002] 桑黄是我国一类传统珍稀药用真菌的俗称，具有多种药理作用，如抗肿瘤、抗氧化、提升免疫力等。桑黄的天然子实体内含有丰富的高分子类多糖体，三萜类、蛋白质、矿物质、氨基酸和固醇类等化合物。三萜类化合物具有调节免疫力、抑制癌细胞，调整血压、保护肝脏，降低血脂肪、抗过敏与发炎等多种作用，其药理作用与临床效果深受肯定。固醇类化合物是由胆固醇衍生而来，具有抗发炎，调节体内的钠、钾比例，使其保持恒定，调节血糖含量，避免过高或不足以及调节性功能，同样促进第二性征成熟的作用。目前，对于桑黄多糖的提取、分离纯化研究较多，而类固醇和三萜类化合物的研究较少。

发明内容

[0003] 本发明的技术任务是为了弥补现有技术的不足，提供一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法，该方法耗时短、成本低、操作简单，具有很好的工业前景。

[0004] 为实现上述目的，本发明采用的技术方案如下：

[0005] (1)将除杂后的桑黄在60℃下烘干后粉碎，过40目筛网，得到桑黄干粉；

[0006] (2)向桑黄干粉中加入磷酸氢二钠缓冲液，混合均匀，再按桑黄干粉质量的0.2～1.0％加入复合酶，在45～55℃下酶解30～90分钟，酶解液经离心分离得到上清液和沉淀物；

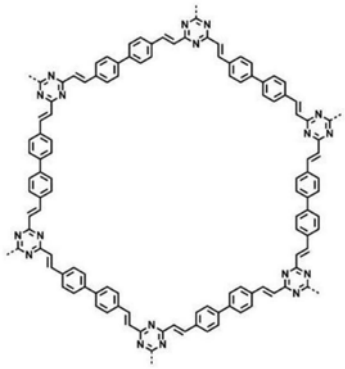
[0007] (3)在步骤(2)中上清液中加入共价有机框架材料COF-701，其添加量为桑黄干粉质量的1％，进行多频超声萃取，经离心分离得到COF-701富集材料；

[0008] (4)COF-701富集材料置于离心管中，加入洗脱液，超声振荡1分钟，经离心分离得到上清液和COF-701；上清液经旋转蒸发仪减压浓缩后得到类固醇和总三萜产品。

[0009] 所述磷酸氢二钠缓冲液，成分为磷酸氢二钠和柠檬酸，pH为4.0～6.0，其添加量为桑黄干粉质量的5～10倍。

[0010] 所述复合酶，由纤维素酶和葡萄糖氧化酶组成，其中，纤维素酶和葡萄糖氧化酶质量比为3:1～1:3。

[0011] 所述共价有机框架材料COF-701，由2,4,6-三甲基-1,3,5-三嗪和4,4′-联苯二甲醛在三氟乙酸催化下于150℃聚合得到，比表面积是1715m^2g^{-1}，孔径为1.1nm，在强酸性和碱性条件下可以保持其组成和结晶度，其结构式如下：

[0012] 。

[0013] 所述多频超声萃取，超声频率为20-80kHz，两两组合或三种同时组合，超声处理功率为100-1000W，萃取时间为30-300s。

[0014] 所述离心分离，在700～2000rpm下离心10～30min。

[0015] 所述洗脱液，由乙醇、甘油、碳酸二甲酯、柠檬烯、乙酸乙酯中的一种或二种及以上混合；洗脱液添加量为COF-701富集材料质量的2～5倍。

[0016] 所述超声振荡，超声频率为25kHz，超声处理功率为600W。

[0017] 所述类固醇和总三萜产品为含有Phellilane L(图1所示1)、Phellidene E(图1所示 2)、Phellinulin D(图1所示3)、Phellinulin I(图1所示4)、Phellinulin K(图1 所示5)、啤酒甾醇(图1所示6)、β-谷甾醇(图1所示7)和齿孔醇(图1所示8)的混合物，提取率为60％-80％。

[0018] 相对于现有技术，本发明所述的从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法具有以下优势：

[0019] (1)本发明在桑黄的类固醇和总三萜提取中加入了多频超声协同提取方法，显著缩短提取时间，减少溶剂用量，提高提取率；且得到的类固醇和总三萜提取物纯度高，无需后续分离处理，提取物具有广阔的药用和食用的应用前景。

[0020] (2)COF-701是由轻质元素C和N连接而成的高度有序多孔晶态材料，具有低的密度和高的比表面积(1715m^2g^{-1})，在强酸性和碱性条件下也可以稳定存在，其作为富集材料可反复循环利用；孔径为1.1nm，孔道内含有π电子共轭体系，对类固醇和总三萜化合物具有高的选择性吸附性能；与其他多孔性吸附材料相比，具有无法比拟的优势。

附图说明

[0021] 图1是提取的类固醇和总三萜产品种类，图1所示1为Phellilane L、图1所示2 为Phellidene E、图1所示3为Phellinulin D、图1所示4为Phellinulin I、图1 所示5为Phellinulin K、图1所示6为啤酒甾醇、图1所示7为β-谷甾醇、图1所示 8为齿孔醇。

具体实施方式

[0022] 除有定义外，以下实施例中所用的技术术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的相同含义，所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

[0023] 下面结合实施例来详细说明本发明。

[0024] 实施例1一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法

[0025] (1)将除杂后的桑黄在60℃下烘干后粉碎，过40目筛网，得到桑黄干粉；

[0026] (2)向桑黄干粉中加入磷酸氢二钠缓冲液,混合均匀,再按桑黄干粉质量的0.2%加入复合酶,在55℃下酶解90分钟,酶解液经离心分离得到上清液和沉淀物;

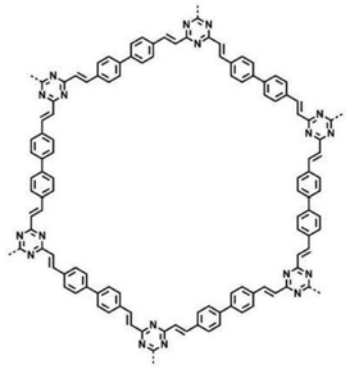
[0027] (3)在步骤(2)中上清液中加入共价有机框架材料COF-701,其添加量为桑黄干粉质量的1%,进行多频超声萃取,经离心分离得到COF-701富集材料;

[0028] (4)COF-701富集材料置于离心管中,加入洗脱液,超声振荡1分钟,经离心分离得到上清液和COF-701;上清液经旋转蒸发仪减压浓缩后得到类固醇和总三萜产品。

[0029] 所述磷酸氢二钠缓冲液,成分为磷酸氢二钠和柠檬酸,pH为4.0,其添加量为桑黄干粉质量的5倍;

[0030] 所述复合酶,由纤维素酶和葡萄糖氧化酶组成,其中,纤维素酶和葡萄糖氧化酶质量比为3:1;

[0031] 所述共价有机框架材料COF-701,由2,4,6-三甲基-1,3,5-三嗪和4,4′-联苯二甲醛在三氟乙酸催化下于150℃聚合得到,比表面积是1715m^2g^{-1},孔径为1.1nm,在强酸性和碱性条件下可以保持其组成和结晶度,其结构式如下:

[0032] ;

[0033] 所述多频超声萃取,超声频率为20kHz和80kHz,超声处理功率为1000W,萃取时间为300s;

[0034] 所述离心分离,在2000rpm下离心10min;

[0035] 所述洗脱液,由乙醇和柠檬烯混合,洗脱液添加量为COF-701富集材料质量的2倍;所述超声振荡,超声频率为25kHz,超声处理功率为600W。

[0036] 实施例2一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法

[0037] (1)将除杂后的桑黄在60℃下烘干后粉碎,过40目筛网,得到桑黄干粉;

[0038] (2)向桑黄干粉中加入磷酸氢二钠缓冲液,混合均匀,再按桑黄干粉质量的0.6%加入复合酶,在50℃下酶解60分钟,酶解液经离心分离得到上清液和沉淀物;

[0039] (3)在步骤(2)中上清液中加入共价有机框架材料COF-701,其添加量为桑黄干粉质量的1%,进行多频超声萃取,经离心分离得到COF-701富集材料;

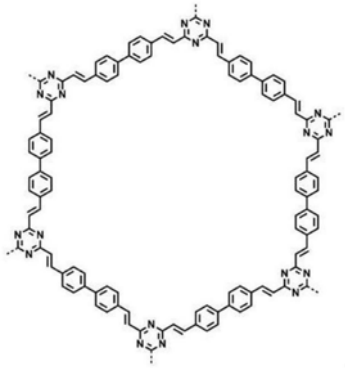
[0040] (4)COF-701富集材料置于离心管中,加入洗脱液,超声振荡1分钟,经离心分离得到上清液和COF-701;上清液经旋转蒸发仪减压浓缩后得到类固醇和总三萜产品。

[0041] 所述磷酸氢二钠缓冲液,成分为磷酸氢二钠和柠檬酸,pH为5.0,其添加量为桑黄干粉质量的7.5倍;

[0042] 所述复合酶,由纤维素酶和葡萄糖氧化酶组成,其中,纤维素酶和葡萄糖氧化酶质量比为1:1;

[0043] 所述共价有机框架材料COF-701,由2,4,6-三甲基-1,3,5-三嗪和4,4′-联苯二甲

醛在三氟乙酸催化下于150℃聚合得到,比表面积是1715m^2g^{-1},孔径为1.1nm,在强酸性和碱性条件下可以保持其组成和结晶度,其结构式如下:

[0044] ;

[0045] 所述多频超声萃取,超声频率为30kHz和70kHz,超声处理功率为550W,萃取时间为135s;

[0046] 所述离心分离,在1400rpm下离心20min;

[0047] 所述洗脱液,由乙醇、甘油和乙酸乙酯混合,洗脱液添加量为COF-701富集材料质量的3.5倍;

[0048] 所述超声振荡,超声频率为25kHz,超声处理功率为600W。

[0049] 实施例3一种从桑黄中同时纯化提取类固醇和总三萜的方法

[0050] (1)将除杂后的桑黄在60℃下烘干后粉碎,过40目筛网,得到桑黄干粉;

[0051] (2)向桑黄干粉中加入磷酸氢二钠缓冲液,混合均匀,再按桑黄干粉质量的1.0%加入复合酶,在45℃下酶解30分钟,酶解液经离心分离得到上清液和沉淀物;

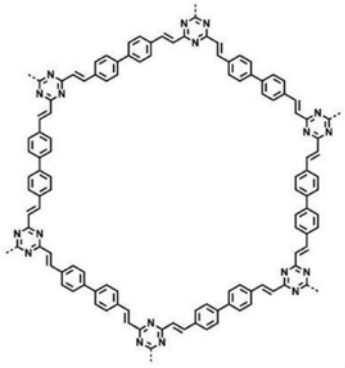
[0052] (3)在步骤(2)中上清液中加入共价有机框架材料COF-701,其添加量为桑黄干粉质量的1%,进行多频超声萃取,经离心分离得到COF-701富集材料;

[0053] (4)COF-701富集材料置于离心管中,加入洗脱液,超声振荡1分钟,经离心分离得到上清液和COF-701;上清液经旋转蒸发仪减压浓缩后得到类固醇和总三萜产品。

[0054] 所述磷酸氢二钠缓冲液,成分为磷酸氢二钠和柠檬酸,pH为6.0,其添加量为桑黄干粉质量的10倍;

[0055] 所述复合酶,由纤维素酶和葡萄糖氧化酶组成,其中,纤维素酶和葡萄糖氧化酶质量比为1:3;

[0056] 所述共价有机框架材料COF-701,由2,4,6-三甲基-1,3,5-三嗪和4,4′-联苯二甲醛在三氟乙酸催化下于150℃聚合得到,比表面积是1715m^2g^{-1},孔径为1.1nm,在强酸性和碱性条件下可以保持其组成和结晶度,其结构式如下:

[0057] 
;

[0058] 所述多频超声萃取,超声频率为20kHz,50kHz和80kHz,超声处理功率为100W,萃取时间为30s;

[0059] 所述离心分离,在700rpm下离心30min;

[0060] 所述洗脱液,由乙醇、甘油、碳酸二甲酯混合;洗脱液添加量为COF-701富集材料质量的5倍;

[0061] 所述超声振荡,超声频率为25kHz,超声处理功率为600W。

[0062] 实施例4共价有机框架材料COF-701的制备方法

[0063] (1)0.06g 2,4,6-三甲基-1,3,5-三嗪和0.154g 4,4'-联苯二醛溶解在4.5mL三甲基苯,4.5mL1,4-二恶烷,2mL三氟乙酸和0.25mL乙腈中;

[0064] (2)混合溶液置于高压釜中在150℃下进行72小时,得到红色固体;

[0065] (3)红色固体用0.05mol/L氨水溶液中和,并用乙醇清洗3次;

[0066] (4)在120℃真空条件下干燥48h,得到黄色粉末COF-701,产率为85%;

[0067] 循环利用的共价有机框架材料COF-701需要在120℃真空条件下活化24h。

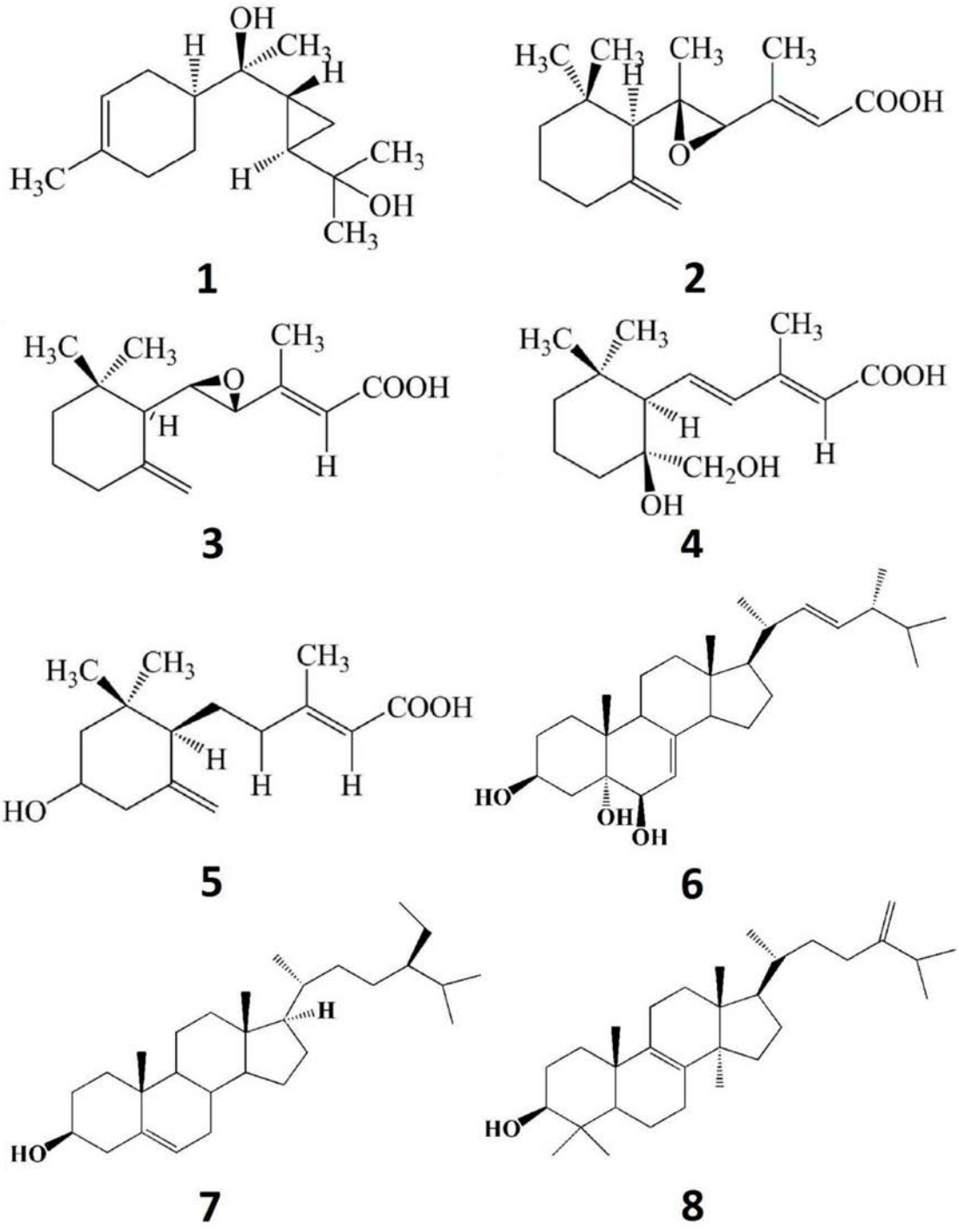


图1