

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07D 311/62 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310104759.6

[45] 授权公告日 2006年1月25日

[11] 授权公告号 CN 1238350C

[22] 申请日 2000.3.3

[21] 申请号 200310104759.6

分案原申请号 00808921.3

[30] 优先权

[32] 1999.4.23 [33] JP [31] 116380/99

[71] 专利权人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京都

共同专利权人 日加威士己株式会社

[72] 发明人 本多伸吉 高桥知也 神村彩子

松冈贵子 神田智正 柳田显郎

稗田一男

审查员 戴年珍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 孟凡宏

权利要求书1页 说明书18页 附图16页

[54] 发明名称

原花色素低聚物的提纯方法

[57] 摘要

本发明涉及一种二聚至五聚原花色素低聚物的纯化方法，它包括使用乙酸甲酯作为液相，通过固-液萃取方法从含有原花色素低聚物的原料或从原料中得到的粗纯化产品中萃取原花色素低聚物；一种二聚至五聚原花色素低聚物的纯化方法，它包含使用酶进行预处理，这种酶用于水解包含原花色素低聚物的原料、从原料中得到的粗纯化产品、或包含这些物质之一的溶液；以及一种具有均一聚合度的二聚至五聚原花色素低聚物的纯化方法，它包括使用选自酯溶剂、酮溶剂、烃溶剂、醚溶剂和醇溶剂的单一溶剂或两种或多种溶剂的混合溶剂作为流动相，通过正相硅胶液相色谱法，从含有原花色素低聚物的原料或从原料中得到的粗纯化产品中，按照聚合度分离和纯化原花色素低聚物。

1. 一种具有均一聚合度的二聚至五聚原花色素低聚物的纯化方法，它包括使用选自己烷/甲醇/乙酸乙酯、己烷/丙酮、己烷/甲醇/四氢呋喃/乙酸、己烷/甲醇/四氢呋喃/甲酸、己烷/甲醇/乙酸甲酯/乙酸、己烷/甲醇/乙酸甲酯、和己烷/乙酸甲酯/丙酮的混合溶剂作为流动相，根据恒溶剂洗脱通过正相硅胶液相色谱法，从含有二聚至五聚原花色素低聚物的原料或从原料中得到的粗纯化产品中，按照聚合度分离和纯化原花色素低聚物。
5
2. 权利要求 1 的纯化方法，其中含有二聚至五聚原花色素低聚物的原料或从原料中得到的粗纯化产品是从植物中得到的。
10
3. 一种具有均一聚合度的二聚至五聚原花色素低聚物的纯化方法，它包括使用选自烃溶剂/醇溶剂/酯溶剂和烃溶剂/酮溶剂的混合溶剂作为流动相，根据恒溶剂洗脱通过正相硅胶液相色谱法，从含有二聚至五聚原花色素低聚物的原料或从原料中得到的粗纯化产品中，
15 按照聚合度分离和纯化原花色素低聚物。
4. 一种具有均一聚合度的二聚至五聚原花色素低聚物的纯化方法，它包括使用选自己烷/甲醇/乙酸乙酯和己烷/丙酮的混合溶剂作为流动相，根据恒溶剂洗脱通过正相硅胶液相色谱法，从含有二聚至五聚原花色素低聚物的原料或从原料中得到的粗纯化产品中，按照聚
20 合度分离和纯化原花色素低聚物。
5. 一种二聚至五聚原花色素低聚物的纯化方法，它结合使用权利要求 1-4 任一项的纯化方法和一种二聚至五聚原花色素低聚物的纯化方法，后者包括使用酶进行预处理，这种酶用于水解包含原花色素低聚物的原料、从原料中得到的粗纯化产品、或包含这些物质之一的
25 溶液。

原花色素低聚物的提纯方法

5 本申请是基于申请日为 2000 年 3 月 3 日申请号为 00808921.3 的
申请所提交的分案申请。

技术领域

10 本发明涉及一种有效地纯化高纯度原花色素低聚物的方法。这种
低聚物具有不同的生物活性，包括抗肿瘤、消炎、抗老化、抗氧化、
抗过敏、抗菌性和生毛发活性等，并且可以有效应用于食品、化妆品、
药物等。

背景技术

通常，已知原花色素是一种高级植物的生物保护物质，是一类聚
合物的属名，这类聚合物以黄烷-7-醇作为结构单元，以 $4\beta \rightarrow 6$ 、 4β
 $\rightarrow 8$ 、 $4\beta \rightarrow 8 \cdot 2\beta \rightarrow 7$ 等成键方式聚合的二聚体或多聚体形式存在。
15 这些低聚物也称为凝缩单宁 ("E. Steinegger · R. Hänsel,
Pharmacognosy [第一卷], Approach to Chemistry and Pharmacology"
(Shuji Itokawa 等译, Hirokawa 出版公司), 204-208 (1977); Porter
L. J., Flavans and Proanthocyanidins, In: Harborne J. B. (编),
"the Flavonoids, Advances in Research Science 1986", Chapman &
20 Hall, 23-55 (1994))。这些低聚物通常被称为原花色素，原因是它
们经酸处理后生成花色素并变红。已知原花色素表现出各种各样的生
物活性。已见报道的生物活性包括抗肿瘤、消炎、抗老化、抗氧化、
抗过敏、抗菌性和生毛发活性等 [Bart Schwitters/Jack
Masquelier, "21st century Biophylaxis Substance OPC", Akira
25 Sasaki 译, Fragrance Journal, 50-135 (1997); Tomoya Takahashi
等, Journal of Investigative Dermatology, 112, 310-316 (1999)]。
结构和活性之间的所有关系，即这些生物活性和原花色素的聚合度之
间的关系，并非都不清楚。例如，对于生毛发活性，有人已报道，在
原花色素类物质中二聚至五聚的原花色素低聚物（特别是二聚体和三
30 聚体）具有最高的活性 (W096/00561)。

对于从植物体中分离和纯化原花色素，已经尝试过从几种植物体
中分离和纯化原花色素，包括葡萄种籽、松树皮、银杏叶、花生和可

可豆等。对这些原料进行工业萃取的例子包括从下列原料中进行的萃取：葡萄种子（日本公开未审查申请书 No. 3-200781, W097/39632, US5484594），松树皮（US4698360, W097/44407）等。在依据日本公开未审查申请书 No. 3-200781 的方法中，进行了如下的预处理，将白葡萄种子与低于 70℃ 的水相接触，然后用热水萃取。所得萃取液加入 Sephadex LH-20™ 柱，然后用 70% 乙醇洗脱，由此获得纯度约为 90% 的含有原花色素的粉末。在根据 US4698360 的方法中，1 吨松树皮在压力下进行热水萃取，然后重复进行乙酸乙酯洗脱和加入氯仿沉淀的步骤，由此获得含原花色素的粉末。然而，从上述方法得到的纯化产品，没有一种是仅含有 90% 或更多的二聚至五聚的原花色素的低聚物。这些纯化产品也都含有单体、六聚体或更高级聚合物、或其它有机酸。

使用逆流液-液分配法作为纯化原花色素的一种方法，例如，一种使用水和乙酸乙酯的方法，描述在 Andrew G. H. Lea, J. Sci. Fd. Agric., 29, 471-477(1978) 中，在日本公开未审查申请书 No. 61-16982 等文献中。

使用固-液分配法作为纯化原花色素的一种方法，例如，一种使用乙酸乙酯的方法，描述在日本公开未审查申请书 No. 8-176137 和 EP0707005 中。例如，100kg 的葡萄破碎后用水(1650L)、氯化钠(300kg)和丙酮(550L)的混合溶剂萃取。接着通过蒸馏除去丙酮获得剩余物。将剩余物用乙酸乙酯进行固-液萃取，然后加入二氯乙烷(45L)，由此获得 1.5kg 至 2.5kg 的原花色素沉淀(EP0707005)。

此外，使用色谱法提纯原花色素的方法包括使用上述 Sephadex LH-20™ 柱的方法（一种对葡萄种子进行萃取的方法，日本公开未审查申请书 No. 3-200781），和使用以聚苯乙烯基的吸附树脂的方法（一种对红豆萃取的方法，日本公开已审查申请书 No. 7-62014）。例如，将以聚苯乙烯基的吸附树脂“Sepabeads SP-850™”（MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION）加入到浸泡干燥的红豆的水中，然后搅拌混合物，由此使原花色素吸附在树脂上。然后，将树脂在低于 70℃ 的温度下干燥，用 80% (v/v) 的乙醇在 70℃ 洗脱，由此可以获得纯度约为 60% 的含原花色素的粗粉末。

然而，所有这些都是不按照聚合度提纯原花色素混合物。也就是说，这些方法不能有效地和有选择性地获得二聚至五聚的原花色

素低聚物。它们对二聚至五聚的原花色素低聚物的回收率低。

按聚合度分离原花色素，已知有一种使用正相硅胶液相色谱的方法（一种对可可豆萃取的方法：J. Rigaud 等，J. Chromatogr. A, 654, 255-260 (1993)，一种对葡萄种子萃取的方法：Corine Prieur 等，5 Phytochemistry, 36, 781-784 (1994)）。前一种方法包含如下步骤，将用甲醇从可可豆中萃取获得的包含原花色素类的样品溶液加入硅胶柱，然后用二氯甲烷：甲醇：甲酸：水[(41→5):(7→43):1:1]的混合溶剂作为流动相进行梯度洗脱。后一种方法包含以下步骤，将用甲醇从葡萄种子中萃取获得的包含原花色素类的样品溶液加入硅胶10 柱，然后用二氯甲烷：甲醇：水：三氟乙酸[(82→10):(18→86):2:0.05]的混合溶剂作为流动相进行梯度洗脱。

然而，这些方法涉及一些问题，如由于含氯溶剂的使用和溶剂混合物复杂引起的溶剂回收和重复使用困难。而且，需要使用高浓度梯度溶剂作为流动相进行梯度洗脱。因此，考虑到安全和经济因素，这些方法不适合用作面向大量提纯的工业分离方法。15

发明内容

本发明的目的是提供用于从含有原花色素的原料或其粗纯化产品中有效提纯高纯度二聚至五聚的原花色素低聚物的方法。

20 常规技术的结合不足以除去目的成分二聚至五聚原花色素以外的物质，例如构成原花色素的单体，如类黄酮、儿茶素或表儿茶素等，六聚或更高聚的原花色素聚合物，以及其它杂质。也就是说，难于有效地获得高纯度二聚至五聚的原花色素低聚物，即本发明的目的组分。另外，考虑到所用溶剂组合物的复杂性、经济、安全等因素，大多数已知的方法不适合用于工业处理。25

作为为解决这些问题所进行的充分研究的结果，我们已经完成了一种有效提纯高浓度二聚至五聚原花色素的方法。

第一个发明是一种纯化二聚至五聚原花色素低聚物的方法，包括使用乙酸甲酯作为液相，通过固-液萃取方法，从含有原花色素的原料30 或从其粗纯化产品中提纯原花色素低聚物。

作为上述液相的乙酸甲酯可以以单一溶剂或混合溶剂形式使用，这种混合溶剂是乙酸甲酯和一种可与乙酸甲酯混溶的有机溶剂的结

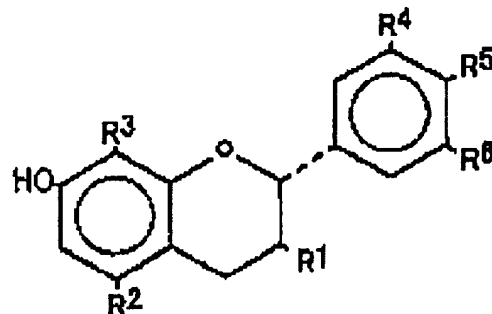
合，它是通过将这种有机溶剂加入乙酸甲酯中制备的。

第二个发明是一种纯化二聚至五聚原花色素低聚物的方法，包括使用一种水解酶对含有原花色素的原料、从原料中得到的粗纯化产品、或包含这些物质之一的溶液进行预处理。

- 5 第三个发明是一种纯化具有均一聚合度的二聚至五聚原花色素低聚物的方法，其中原花色素低聚物通过正相硅胶液相色谱法用溶剂作为流动相从含有原花色素的原料或从其粗纯化产品中依聚合度进行分离和纯化，这种溶剂可以是选自酯溶剂、酮溶剂、烃溶剂、醚溶剂和醇溶剂的单一溶剂或两种或多种溶剂的混合溶剂。优选使用两种或多
10 种溶剂的混合溶剂作为上述流动相。

而且，本发明能够提供具有 90 (w/w) %或更高纯度的纯化二聚至五聚原花色素、纯度为 90 (w/w) %或更高的二聚原花色素、和 90 (w/w) %或更高纯度的三聚原花色素，这些物质可以通过上述纯化方法或其结合得到。

- 15 原花色素类物质是凝缩单宁，存在于不同的植物体内，并拥有一个基本结构，其中黄烷-7-醇通过 $4\beta \rightarrow 6$ 、 $4\beta \rightarrow 8$ 、 $4\beta \rightarrow 8 \cdot 2\beta O \rightarrow 7$ 等键合逐步凝缩或聚合。在分类中，将二聚至五聚的原花色素和六聚或更高聚合物的原花色素分别定义为原花色素低聚物和原花色素聚合物。而且，黄烷-7-醇单体定义为构成原花色素的单体。原花色素的低聚物的例子包括原花色素类，如原花青素、原翠雀素和原花葵素，
20 及其所有立体异构体。一种构成原花色素类化合物的单体如下列结构式 (I) 所示：



- 25 (其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 是相同或不同的基团，代表氢、羟基或 3, 4, 5-三羟苯甲酰基)。

本发明中使用的原料或从中得到的粗纯化产品的例子包括任何含有原花色素低聚物的物质，特别优选的例子具体包括植物原料，如水果、种皮、植物种子和树皮、从中得到的萃取物、和从中得到的粗纯化产品。例如，优选那些富含原花色素低聚物的物质，包括果汁、或从如葡萄、柿子、苹果、蓝莓、红莓等的种皮或种子中得到的萃取物、或从花生壳、栗子壳等、大麦糠或荞麦的外皮、柿子叶、松树皮、棕榈叶等物质中得到的萃取物。

此外，通过非酶法或酶法获得的粗产品或其粗纯化产品也可以用作原料。用于合成原花色素低聚物的合成方法的例子包括在 *Journal of Chemical Society Perkin Transaction I*, 1535-1543 (1983) 中描述的用于表儿茶素或儿茶素的二聚体的制造方法，以及在 *Phytochemistry*, 25, 1209-1215 (1986) 中描述的用于表儿茶素或儿茶素的三聚体的制造方法。根据这些方法或类似方法制得的粗产品或由此获得的粗纯化产品也可以用作本发明方法的原料。

挥发性的有机溶剂优选作为用于第一个发明的与乙酸甲酯可混溶的有机溶剂。这种有机溶剂的例子包括醇溶剂类，如甲醇、乙醇、丙醇和丁醇；酯溶剂类，如甲酸甲酯、甲酸乙酯和乙酸乙酯；酮溶剂类，如丙酮；腈溶剂类，如乙腈；醚溶剂类，如四氢呋喃和 1, 2-二甲氧基乙烷；烃溶剂类如己烷；及羧酸溶剂类如乙酸。当使用与乙酸甲酯可混溶的有机溶剂时，整个萃取溶剂优选含有乙酸甲酯 50 体积%或更多，更优选 70 体积%或更多，更加优选 90 体积%或更多。

在第二个发明中使用的用于水解的酶的例子包括糖苷酶和酯酶。

糖苷酶的例子包括选自下列物质的单一物质或两种或多种物质的混合物：淀粉酶、纤维素酶、葡聚糖酶、木聚糖酶、葡糖苷酶、右旋糖酐酶、壳多糖酶、半乳糖醛酶、溶菌酶、半乳糖苷酶、甘露糖苷酶、呋喃果糖苷酶、海藻糖酶、氨基葡糖苷酶、支链淀粉酶、神经酰胺酶、岩藻糖苷酶和琼脂酶。酯酶的例子包括选自下列物质的单一物质或两种或多种物质的混合物：羧酸酯酶、芳基酯酶、脂肪酶、乙酰酯酶、胆碱酯酶、果胶酯酶、胆甾醇酯酶、叶绿素酶、内酯酶、单宁酶和水解酶。

在第二个发明中，含有含二聚至五聚原花色素低聚物原料或从中获得的粗纯化产品的溶液的例子通常包括水溶液，或含有 10%或更少

如醇、酯或酮等有机溶剂的水溶液。

在第三个发明中，用作流动相的酯溶剂的例子包括甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、甲酸异丙酯、甲酸丁酯、甲酸异丁酯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、丙酸甲酯、丙酸乙酯、丙酸丙酯、丙酸异丙酯、丙酸丁酯、丙酸异丁酯、丁酸甲酯、丁酸乙酯、丁酸丙酯、丁酸异丙酯、丁酸丁酯和丁酸异丁酯。酮溶剂的例子包括丙酮、甲乙酮、甲丙酮、甲基异丙基酮、甲丁酮、甲基异丁基酮、甲基叔丁基酮、二乙基酮、二异丙基酮、甲基乙烯基酮、环丁酮、环戊酮和环己酮。烃溶剂的例子包括戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、十九烷、环己烷、二甲苯和甲苯。醚溶剂的例子包括四氢呋喃和 1, 2-二甲氧基乙烷。醇溶剂的例子包括甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇、仲丁醇、叔丁醇等。

从植物原料中的萃取和粗纯化可通过例如以下所述的已知方法进行。

包括植物果实、种皮、种子、外层、壳、叶子和树皮等的植物原料在经过如空气干燥的干燥处理后，用作萃取用的材料。完整的植物原料也可以用作萃取用的材料。

从上述待萃取的材料进行原花色素的粗萃取可以参考已知的方法 [Chem. Pharm. Bull., 38, 3218(1990), Chem. Pharm. Bull. 40, 889-898(1992)]。例如，将已经压碎或粉碎的植物原料用溶剂进行萃取。作为萃取用的溶剂，可以使用选自亲水性溶剂和亲油性溶剂的单一溶剂，或两种或多种溶剂的混合溶剂。这些溶剂包括水，醇溶剂如甲醇、乙醇和异丙醇，酮溶剂如丙酮和甲乙酮，以及酯溶剂如乙酸甲酯和乙酸乙酯。萃取的温度范围通常为 0-100℃，优选为 5-50℃。象种子等含油材料可以在不压碎的情况下进行萃取。如果需要的话，萃取可以重复 2 至 3 次。不溶的剩余物通过过滤或离心法从通过上述步骤获得的萃取液中除去，从而获得粗萃取液。植物原料，如植物汁、树汁等，可以直接用作萃取材料，或凝缩单宁的浓缩粗萃取液可以参考 Agric. Biol. Chem., 45, 1885-1887 (1981) 来制备。

对通过化学方法，如非酶法或酶法获得的粗产品的萃取和粗纯化，也可以用类似于上述的方法进行。

下面，将用实施例给出本发明纯化方法的详细描述。

在第一个发明中，二聚至五聚的原花色素低聚物通过以下步骤进行纯化：使用乙酸甲酯单一溶剂或乙酸甲酯和一种可与乙酸甲酯混溶的有机溶剂的混合溶剂作为液相，将含有原花色素低聚物的原料或从中获得的粗纯化产品进行固-液萃取。当原料或从中获得的粗纯化产品是液体时，优选通过喷雾干燥或冷冻干燥进行预固体化。通常，固体和乙酸甲酯、或固体和乙酸甲酯与一种可与乙酸甲酯混溶的有机溶剂的混合溶剂的混合比 (w/v) 约为 1: 1 至 1: 1000。在室温下萃取或在加热搅拌下进行短时间萃取。优选固体和乙酸甲酯、或固体和乙酸甲酯与一种可与乙酸甲酯混溶的有机溶剂的混合溶剂的混合比 (w/v) 为 1: 5 至 1: 100。萃取在室温下进行约 1 小时，并更优选在相同条件下将剩余物随后重复萃取（几次）。更细的粉末粒径对于有效的固-液萃取是优选的。当使用混合溶剂进行萃取时，优选通过将溶剂混合，使混合溶剂具有与乙酸甲酯的极性类似的溶剂极性。使用这些溶剂进行固-液萃取抑制了原花色素聚合物和其它杂质的洗脱，并能有效纯化二聚至五聚原花色素低聚物。在第一个发明中，浓缩所得乙酸甲酯萃取液，并将浓缩的剩余物重新溶解在水中或水溶剂如缓冲液中，然后，二聚至五聚原花色素低聚物可以通过冷冻干燥或喷雾干燥得到回收。

在第二个发明中，二聚至五聚的原花色素低聚物通过以下步骤进行纯化：使用可水解含有原花色素低聚物的原料、从原料中得到的粗纯化产品、或包含这些物质之一的溶液的酶进行预处理。原料或从中得到的粗纯化产品通常含有除原花色素低聚物之外的许多杂质。特别是当原料或从中得到的粗纯化产品是从植物得到的，则除去原花色素低聚物之外，多酚、苷、酯等都以高比例存在。用上述水解酶对这类苷或酯杂质进行预处理获得苷元，使在下一纯化步骤中有效去除这些杂质和提高原花色素低聚物的纯度成为可能。例如，芸香苷是在 Polygonaceae 家族的 *Fagopyrum esculentum* 的整个植物中大量存在的类黄酮葡萄糖苷酶，通过用 β -糖苷酶处理使其变成作为苷元的标精。绿原酸和 p-香豆酰奎尼酸是在 dicotyledons 的水果或叶子中大量存在的羟基肉桂酸酯，在用羟基肉桂酸酯水解酶对其处理时，它们的缩酚酸键（分子内酯键）被水解，分别生成咖啡酸和奎尼酸，及 p-香豆酸和奎尼酸。使用水解用的酶处理的反应条件依赖酶的类型等因素而

不同。通常，反应条件是 PH3-8、温度 25-55℃、时间 1-24 小时。用水解酶处理得到的上述苷元成分、单糖或羧酸，可以通过常规技术如降温、液-液或固-液萃取、或柱吸附、或这些方法相结合和正相色谱法易于除去。这些步骤允许有效去除在含有二聚至五聚原花色素低聚物的原料或从中得到的粗纯化产品中的杂质，并且提高了目的成分，即二聚至五聚原花色素低聚物的纯度。

在第三个发明中，具有均一聚合度的二聚至五聚原花色素低聚物可以通过如下方法获得：通过正相硅胶液相色谱法用溶剂作为流动相从含有原花色素的原料或从中得到的粗纯化产品依聚合度进行分离和纯化，这种溶剂可以是选自酯溶剂、酮溶剂、烃溶剂、醚溶剂和醇溶剂的单一溶剂或两种或多种溶剂的混合溶剂。对于上面的正相硅胶液相色谱法，可以使用毛细管柱色谱法或高效液相色谱法。先将含有二聚至五聚原花色素低聚物的溶液除溶剂或水，然后将剩余物溶解在流动相或与流动相相溶的有机溶剂中。当原料或从中得到的粗纯化产品是固体时，把它们直接溶解在流动相或在与流动相相溶的有机溶剂中。如果必要，将它们用膜过滤器等过滤然后装入色谱柱中。关于洗脱目的成分，考虑到操作的简单化，优选使用没有浓度梯度流动相的恒溶剂洗脱。在恒溶剂（isocratic）洗脱中优选的流动相的例子包括混合溶剂，如己烷/甲醇/乙酸乙酯、己烷/丙酮、己烷/甲醇/四氢呋喃/乙酸、己烷/甲醇/四氢呋喃/甲酸、己烷/甲醇/乙酸甲酯/乙酸、己烷/甲醇/乙酸甲酯、和己烷/乙酸甲酯/丙酮。

第三个发明的纯化方法使杂质，即构成原花色素类物质的单体如 (+)-儿茶素、(+)-鞣儿茶酸、(-)-表儿茶素、(-)-表鞣儿茶酸，和六聚或更高级原花色素聚合物的去除成为可能；并且使依照目的成分，即二聚至五聚原花色素低聚物的聚合度的分离和纯化成为可能。

根据作为萃取源的原料、目的纯度等，在本申请书中第一至第三个发明的纯化方法可以自由选用、重复使用或结合使用。

为了纯化二聚至五聚原花色素低聚物，结合使用两个或多个第一至第三个发明的纯化方法是优选的。为了纯化具有均一聚合度的二聚至五聚原花色素低聚物，结合使用第一个发明的纯化方法和/或第二个发明的纯化方法和/或第三个发明的纯化方法是优选的。而且，当结合使用纯化方法时，使用的步骤和顺序可以自由选择。

通过这些方法，可以有效地获得具有高纯度（纯度为 90 (w/w) % 或更高）的二聚至五聚的原花色素低聚物、二聚原花色素、和三聚原花色素。

5 通过本发明的纯化方法纯化的二聚至五聚的原花色素低聚物、二聚原花色素、和三聚原花色素可以用作制造食品、化妆品、药物等的原料。

附图说明

图 1 显示反相液相色谱法的结果。图 1 中的符号表示下列物质：

- 10 1. PB1
2. (+)-儿茶素
3. PB2
4. 绿原酸
5. 咖啡酸
- 15 6. PC1
7. (-)-表儿茶素
8. p-香豆酸酯
9. p-香豆酸
10. 根皮苷
- 20 11. 根皮素

图 2 显示正相液相色谱法的结果。

图 3 显示正相液相色谱法的结果。

图 4 显示反相液相色谱法的结果。图 4 中的符号表示下列物质：

1. PB1
- 25 2. (+)-儿茶素
3. PB2
4. PC1
5. (-)-表儿茶素

[5]，[6] 相应于图 3 中馏分编号的单体馏分。

30 [7] - [11] 相应于图 3 中馏分编号的二聚体馏分。

[12] - [20] 相应于图 3 中馏分编号的三聚体馏分。

图 5 显示正相液相色谱法的结果。

图 6 显示反相液相色谱法的结果。图 6 中的符号表示下列物质：

1. PB1
2. (+)-儿茶素
3. PB2
- 5 4. PC1
5. (-)-表儿茶素

[2] - [4] 相应于图 5 中馏分编号的单体馏分。

[5] - [9] 相应于图 5 中馏分编号的二聚体馏分。

[10] - [15] 相应于图 5 中馏分编号的三聚体馏分。

- 10 图 7 显示原花色素低聚物聚合度分布的分析结果。

这个说明书包括在日本专利申请 No.11-116380 (本申请书的优先权文件) 中的说明书和/或图表中公开的全部或部分内容。

15 具体实施方式

下面, 本发明将用实施例进行进一步的说明, 但是它并不限于这些实施例的任一个或类似实例。

实施例 1 通过固-液萃取进行的纯化 (A)

- 20 将 300ml 乙酸甲酯加入 30g 在参考实施例 1 中获得的原花色素馏分中, 然后, 在室温下进行固-液萃取 1 小时。萃取总共进行两次, 将两次萃取所得的萃取液混合然后过滤。接着, 萃取的剩余物用少量乙酸甲酯洗涤。将乙酸甲酯萃取液和洗涤液合并并且在减压条件下浓缩。将少量的蒸馏水加入其中, 然后在减压条件下再次进行浓缩, 并将萃取组分溶解在水溶液中。将所得水溶液进行冷冻干燥获得 17.5g
- 25 粉末状乙酸甲酯萃取物。然后, 将萃取剩余物干燥获得 12.5g 由乙酸甲酯萃取后的粉末状非萃取物。在两种粉末产品中的二聚和三聚原花色素的含量用参考实施例 2 中所述的反相液相色谱法测量。测定的二聚原花色素组分是原花青素 B1 (表儿茶素-(4 β →8)-儿茶素; 以下缩写为 PB1) 和原花青素 B2 (表儿茶素-(4 β →8)-表儿茶素; 以下
- 30 缩写为 PB2)。测定的三聚原花色素组分是原花青素 C1 (表儿茶素-(4 β →8)-表儿茶素 4 β →8)-表儿茶素; 以下缩写为 PC1)。表 1 列出了用乙酸甲酯萃取的结果和固含量的收率%。

表 1

	产量 (g)	固含量 收率 (%)	PB1		PB2		PC1		PB1+PB2+PC1		
			含量 (g)	收率 (%)	含量 (g)	收率 (%)	含量 (g)	收率 (%)	含量 (g)	收率 (%)	纯度 (%)
萃取前样品	(30.0)		(1.22)		(4.34)		(1.96)		(7.52)		(25.1)
乙酸甲酯萃 取物	17.5	58.3	1.16	95.1	4.03	92.8	1.65	84.2	6.84	91.0	39.1
乙酸甲酯萃 取后的非萃 取物	12.5	41.7	0.06	4.9	0.31	7.2	0.31	15.8	0.68	9.0	5.4

如表 1 所示，用乙酸甲酯进行固-液萃取有效地达到了对以 PB1、PB2 和 PC1 为代表的原花色素低聚物成分的选择性萃取和纯度提高。

实施例 2 通过固-液萃取进行的纯化 (B)

乙酸甲酯和不同的溶剂以体积比 9: 1 (当用乙酸甲酯: 己烷混合时, 比例为 9: 5) 进行混合, 这样制得固-液萃取用的溶剂。在这些不同的溶剂中使用的可以与乙酸甲酯混溶的有机溶剂有: 甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、甲酸乙酯、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、四氢呋喃、己烷或乙酸。将 10ml 用于萃取的溶剂加入 1g 在参考实施例 1 中获得的每一种原花色素馏分中, 然后混合物在室温下进行固-液萃取 1 小时 (单一萃取)。通过离心过滤从萃取液中除去固体成分后, 一定量的萃取液用蒸馏水稀释 100 倍 (0.01→1ml)。然后 PB1、PB2 和 PC1 的含量用参考实施例 2 中所述的反相液相色谱法测量。同时, 每一种萃取液取 1ml 样品除去溶剂, 然后冷冻干燥, 由此测定固体萃取物的量。表 2 列出了用每一种萃取剂通过固-液萃取所得萃取液中 PB1、PB2 和 PC1 的萃取效率和固含量收率 (%)。并且, 作为对比实施例, 也以上述类似的方式 (除了将 20ml 乙酸乙酯用于 2g 原花色素馏分), 只用乙酸乙酯作萃取液进行固-液萃取。表 2 也列出了对比试验的结果。

表 2

萃取用的溶剂	固含量 收率 (%)	PB1 (mg)	PB2 (mg)	PC1 (mg)	PB1+PB2+PC1		
					萃取量 (mg)	收率 (%)	纯度 (%)
未用萃取溶剂处理	(100)	36.4	136.1	63.0	235.5	(100)	23.6
乙酸乙酯(对比实施例)	9.8	6.2	24.3	7.0	37.5	15.1	38.3
100%乙酸甲酯	39.9	25.9	87.7	31.1	144.7	61.5	36.3
乙酸甲酯/甲醇 (9/1)	82.8	39.5	137.1	62.7	239.3	101.6	28.9
乙酸甲酯/乙醇 (9/1)	80.5	39.8	140.1	64.6	244.4	103.8	30.4
乙酸甲酯/丙醇 (9/1)	77.2	38.9	134.0	62.4	235.3	99.9	30.5
乙酸甲酯/丁醇 (9/1)	79.0	38.4	136.6	62.7	237.7	100.9	30.1
乙酸甲酯/甲酸乙酯 (9/1)	40.0	26.3	89.9	31.1	147.3	62.5	36.8
乙酸甲酯/乙酸乙酯 (9/1)	39.6	25.4	86.6	30.1	142.1	60.3	35.9
乙酸甲酯/丙酮 (9/1)	56.1	33.5	120.7	50.2	204.4	86.8	36.5
乙酸甲酯/乙腈 (9/1)	59.3	35.8	123.2	51.3	210.4	89.3	35.5
乙酸甲酯/四氢呋喃 (9/1)	83.7	34.4	120.1	51.3	205.8	87.4	24.6
乙酸甲酯/乙酸 (9/1)	70.5	38.3	131.1	56.5	225.9	95.9	32.1
乙酸甲酯/己烷 (95/5)	15.7	10.7	41.0	9.9	61.6	24.8	39.2

实施例 3 通过固-液萃取进行的纯化 (C)

乙酸甲酯和乙酸乙酯以表 3 所列出的体积比进行混合, 然后进行固-液萃取。将 10ml 有不同体积比的用于萃取的溶剂加入到 1g 在参考实施例 1 中获得的每一种原花色素馏分中, 然后在 30℃ 下进行固-液萃取 1.5 小时。这个步骤重复三次。将这些萃取液合并, 在减压下浓缩, 并冷冻干燥, 由此获得粉末状产品(萃取液)。PB1、PB2 和 PC1 在粉末产品中的含量用参考实施例 2 中所述的反相液相色谱法测量。表 3 列出了用不同体积比的溶剂萃取的结果, 包括固含量收率(%)、PB1、PB2 和 PC1 各自的萃取物量和收率、PB1、PB2 和 PC1 的总收率(%)和纯度。

表 3

萃取用的溶剂	固含量收率 (%)	PB1 (mg) (%)	PB2 (mg) (%)	PC1 (mg) (%)	PB1+PB2+PC1		
					萃取量 (mg)	收率 (%)	纯度 (%)
未用萃取溶剂 处理	100	39.9 (100)	153.4 (100)	66.9 (100)	260.2	100	26
乙酸乙酯 (对比实施例)	34.9	23.0 (57.6)	90.4 (58.9)	28.7 (42.9)	142.1	54.6	40.7
乙酸乙酯/乙酸甲酯 (9/1)	39.2	25.8 (64.7)	100.9 (65.8)	32.3 (48.3)	159	61.1	40.6
乙酸乙酯/乙酸甲酯 (7/3)	42.5	28.6 (71.7)	110.2 (71.8)	35.5 (53.1)	174.3	67	41
乙酸乙酯/乙酸甲酯 (5/5)	46.5	31.0 (77.7)	121.0 (78.9)	39.9 (59.6)	191.9	73.8	41.3
乙酸乙酯/乙酸甲酯 (3/7)	51	33.8 (84.7)	130.1 (84.8)	44.5 (66.5)	208.4	80.1	40.9
乙酸乙酯/乙酸甲酯 (1/9)	51.6	33.0 (82.7)	127.7 (83.2)	45.4 (67.9)	206.1	79.2	39.9
乙酸乙酯/乙酸甲酯 (1/10)	52.4	33.3 (83.5)	128.9 (84.0)	47.1 (70.4)	209.3	80.4	39.9

5 如表 3 所示, 用包含乙酸甲酯的萃取溶剂进行固-液萃取有效地实现了对以 PB1、PB2 和 PC1 为代表的原花色素低聚物成分的选择性萃取和纯度提高。

实施例 4 结合使用酶解处理的纯化

10 将在参考实施例 1 中制得的多酚萃取液用商店出售的食品加工用酶制剂进行处理。这里使用的酶制剂是由曲霉衍生的脂肪酶制剂 (Lipase Sankyo™, SANKYO CO., LTD.) 和水解酶制剂 (羧基肉桂酸酯水解酶, Seishin Co., LTD.)。100ml 多酚萃取液先用 5mol/l 的 NaOH 调节 PH 至 5, 并用蒸馏水稀释 10 倍, 由此获得样品溶液。上述的脂肪酶制剂和上述的水解酶制剂各取 1g, 分别加入 1L 样品溶液 (最终
15 浓度: 0.1%) 中, 酶反应在 45℃ 下进行 16 小时。对反应前和反应后的样品溶液用在参考实施例 2 中描述的反相液相色谱法进行测试, 结果分别列在图 1-a 和图 1-b。如图中所示, 大部分主要杂质, 绿原酸和根皮苷消失了, 而代之以由上述酶反应产生的单体咖啡酸、p-香豆酸和根皮素的增加。下一步, 将反应后的溶液浓缩, 接着进行喷雾干

干燥，这样获得 20g 粉末产品。然后，将 200ml 乙酸甲酯加入其中，进行固-液萃取。乙酸甲酯萃取液的色谱图列于图 1-c。在图 1-a 和图 1-b 的基线上以峰形出现的原花色素聚合物通过固-液萃取除去了。再将少量的蒸馏水加入萃取液中，接着通过在减压条件下浓缩除去乙酸甲酯，这样提取后的成分溶解在水中。将乙酸乙酯/n-己烷 (8/2) (以与水溶液相等的用量) 加入到刚制备的水溶液 (50ml) 中进行液-液萃取。所得有机溶剂层 (上层) 和水层 (下层) 的色谱图分别为图 1-d 和图 1-e。这样，部分构成原花色素的单体 (儿茶素、表儿茶素) 和大部分由先前的酶处理得到的主要产品，单体咖啡酸、p-香豆酸和根皮素，被转移到有机溶剂层 (图 1-d)。大部分以 PB1、PB2 和 PC1 为代表的二聚至五聚原花色素低聚物在液-液萃取后仍留在水溶液层中 (图 1-e)。将最终获得的水层浓缩并冷冻干燥，由此获得 5.7g 粉末。经过这一系列步骤，总固含量中 PB1+PB2+PC1 的纯度提高了约 4 倍，从 11.5 增加到 40.3%。如上所述，通过对原料的提取液进行酶解处理，然后进行多种纯化方法的结合使用，目的成分，二聚至五聚原花色素低聚物的纯度可以有效地提高。

实施例 5 用正相液相色谱法的纯化 (A)

将 100ml 乙酸甲酯加入到 10g 在参考实施例 1 中获得的原花色素馏分中，进行固-液萃取。萃取液在减压条件下浓缩至恒定体积，得到 20ml 浓缩液。然后进行用硅胶作为填充剂的正相液相色谱分离组分。色谱条件如下：

色谱柱：Inertsil SIL™ (4.6mm 内径 × 150mm, GL Science)

用于恒溶剂分离的流动相：己烷/甲醇/乙酸乙酯 (70/30/10)

进样量：0.01ml

流量：1.8ml/min

检测：UV280nm

所得的色谱图见图 2。在这些条件下，原花色素低聚物组分按聚合度从二聚体至更高聚合物依次分离，然后从柱上洗脱。也就是说，它证实了具有均匀聚合度的低聚物成分 (二聚体、三聚体等)，依照各自的目的通过用硅胶作填料的正相液相色谱达到了选择性分离。

而且使用相同的浓缩液体样品，可在制备规模上进行正相液相色谱的分级。分级条件如下：

硅胶填料：球型多孔硅胶（75 μm ，120A）

柱尺寸：6mm 内径 \times 500mm \times 2 的柱子

5 用于恒溶剂分离的流动相：己烷/甲醇/乙酸乙酯（70/30/10）

进样量：0.5ml

流量：3ml/min

分级：15ml/5min./1 馏分

检测：UV280nm

10

如图 3 所示，样品中的原花色素低聚物即使在制备规模上也能依聚合度分离。

15 随后，在色谱图中相应于单体、二聚体和三聚体的洗脱馏分进行取样。然后，在每一种洗脱馏分中低聚物组分的组成用参考实施例 2 中描述的反相液相色谱法进行检测。如图 4-[5]和图 4-[6]所示，单体馏分主要由儿茶素和表儿茶素组成，如图 4-[7]至图 4-[11]所示，二聚体馏分主要由 PB1 和 PB2 组成，如图 4-[12]至图 4-[20]所示，三聚体馏分主要由 PC1 组成。分离后的馏分各由具有相同聚合度的低聚物组分构成。

20 以上所得纯化的二聚和三聚原花色素产品的纯度分别是 93 和 92（w/w）%。

实施例 6 用正相液相色谱法的纯化（B）

25 使用在实施例 5 中浓缩的液体样品进行正相液相色谱分级。分级条件如下：

硅胶填料：球型多孔硅胶（75 μm ，120A）

柱尺寸：6mm 内径 \times 500mm \times 2 的柱子

用于恒溶剂分离的流动相：己烷/丙酮（40/60）

进样量：0.05ml

30 流量：3ml/min

分级：15ml/5min./1 馏分

检测：UV280nm

图 5 是所得色谱图。对在色谱图中相应于单体峰、二聚体峰和三聚体峰的洗脱馏分进行取样。然后,对每一种洗脱馏分中低聚物组分的组成用参考实施例 2 中描述的反相液相色谱法进行研究。如图 6-[2] 至图 6-[4] 所示,单体馏分主要由儿茶素和表儿茶素组成,如图 6-[5] 至图 6-[9] 所示,二聚体馏分主要由 PB1 和 PB2 组成,如图 6-[10] 至图 6-[15] 所示,三聚体馏分主要由 PC1 组成。与实施例 5 相似,分离后的馏分都由具有相同聚合度的低聚物组分构成。

上述获得的纯化后的二聚和三聚原花色素产品的纯度分别是 95 和 93 (w/w) %。

(参考实施例 1) 从苹果中制备原花色素成分

根据在 Rapid Communication of Mass Spectrometry, 11, 31-36 (1997) 中描述的方法,从苹果制备多酚萃取液和原花色素馏分。主要品种为“Fuji”的生苹果(3kg)作为原料。将水果压碎同时向其中加入偏亚硫酸氢钾,并榨汁获得果汁。果汁进行离心和过滤以使其澄清,这样获得 1.8L 清澈的果汁。接着,将果汁加入一个 Sepabeads SP-850™ (Nippon Rensui)-填充柱(25mm 内径×285mm)中,使果汁中的多酚成分吸附在其中。在果汁中存在的糖和有机酸通过用 300ml 蒸馏水洗涤除去后,多酚成分用 200ml 的 80%乙醇水溶液洗脱。然后,收集的洗脱液在减压条件下浓缩至 65ml,这样获得多酚萃取液。将多酚萃取液(25ml)进一步加入一个 TSK-GEL toyopearl HW-40EC™ (TOSOH)-填充柱(25mm 内径×285mm)中,然后用 200ml 蒸馏水洗涤柱子,这样大多数杂质、酚、羧酸被除去了。然后,把 250ml 的 40%乙醇水溶液加入柱中,使其他低分子量多酚洗脱。随后,将 100ml 的 60%丙酮水溶液加入柱子中,这样洗脱和回收大多数原花色素。这里,部分二聚到五聚的原花色素低聚物混合在用 40%乙醇水溶液洗脱的洗脱液中。这样,将洗脱液在减压条件下浓缩脱去乙醇,浓缩液进一步加入 Sep-pak C18ENV™柱中(Waters),这样仅仅重新纯化和回收混合在浓缩液中的原花色素组分。回收后的溶液和用 60%丙酮水溶液洗脱的洗脱液进行混合,在减压条件下浓缩,并冷冻干燥,由此获得原花色素馏分(清澈果汁 1.8L→8g)。质谱分析表明这个馏分由单体至

15 聚的原花色素类化合物构成。根据需求, 这个步骤可以以更大的规模进行, 以使制备的多酚萃取液或原花色素馏分的产量满足每一个实施例的需要。

5 (参考实施例 2) 多酚分析

在实施例中描述的不同样品中的多酚组分的组成的分析, 可通过反相液相色谱根据需求在下列条件下进行。

色谱柱: Inertsil ODS-3™ (4.6 × 15mm, GL Science)

10 洗脱液: A) 0.1mol/l 磷酸盐缓冲剂 (PH2) / 甲醇 (8/2) B) 0.1mol/l 磷酸盐缓冲剂 (PH2) / 甲醇 (5/5) 梯度洗脱条件: 0 → 10min. (100%A), 10min → 50min. (100%A → 100%B), 50min → 65min. (100%B)

进样量: 10 μl

流量: 1ml/min

检测: UV280nm

15

(参考实施例 3) 原花色素低聚物聚合度分布的分析

从在实施例 1 中用乙酸甲酯萃取获得的萃取液或非萃取液中制得的粉末产品中的原花色素低聚物的聚合度分布用凝胶渗透色谱法进行分析。分析条件如下:

20 色谱柱: TSK-GEK toyopearl HW-40F™ (2.5 × 95cm, TOSOH)

洗脱液: 丙酮/8mol/l 脲 (6/4)

流量: 1.0ml/min

分级: 3ml/3min./1 馏分 (最初的 80ml 倒掉)

检测: 加入酚试剂用比色法 (在可见光区 760nm 处检测)

25 接着, 将标准儿茶素类化合物 (表儿茶素、PB2 和 PC1 各 2mg)、原花色素混合物 (10mg)、用乙酸甲酯从原花色素混合物中萃取获得的粉末产品 (5.83mg) 和用乙酸甲酯从同一混合物中未萃取出的粉末产品 (4.17mg) 分别溶解在 0.5ml 洗脱液中并进行分析。图 7 列出了分析结果。

30 如图 7 所示, 在上述分析条件下, 样品中的原花色素低聚物基于填料的分子筛效应, 按照聚合度从大到小的顺序被洗脱出来。具体来说, 三聚体、二聚体和单体组分在色谱图上以单峰出现。如图 7 中所

示，用乙酸甲酯萃取液制得的粉末产品主要由单体、二聚和三聚的原花色素低聚物成分组成。另一方面，乙酸甲酯从同一混合物未萃取出的粉末产品主要由具有大分子量的原花色素聚合物成分构成。

5 在这里引用的所有出版物、专利和专利申请书整体在此引入作为参考。

工业可行性

10 根据本发明，二聚至五聚的原花色素低聚物，以及具有均一聚合度的二聚和三聚原花色素化合物从含有原花色素类化合物的原料或从原料中获得的粗纯化产品中有效地进行高纯度提纯。由本发明制得的原花色素低聚物具有各种各样的生物活性，包括抗肿瘤、消炎、抗老化、抗氧化、抗过敏、抗菌性和生发活性等，因此它们在包括食品、化妆品、和药物等在内的应用方面有用途。

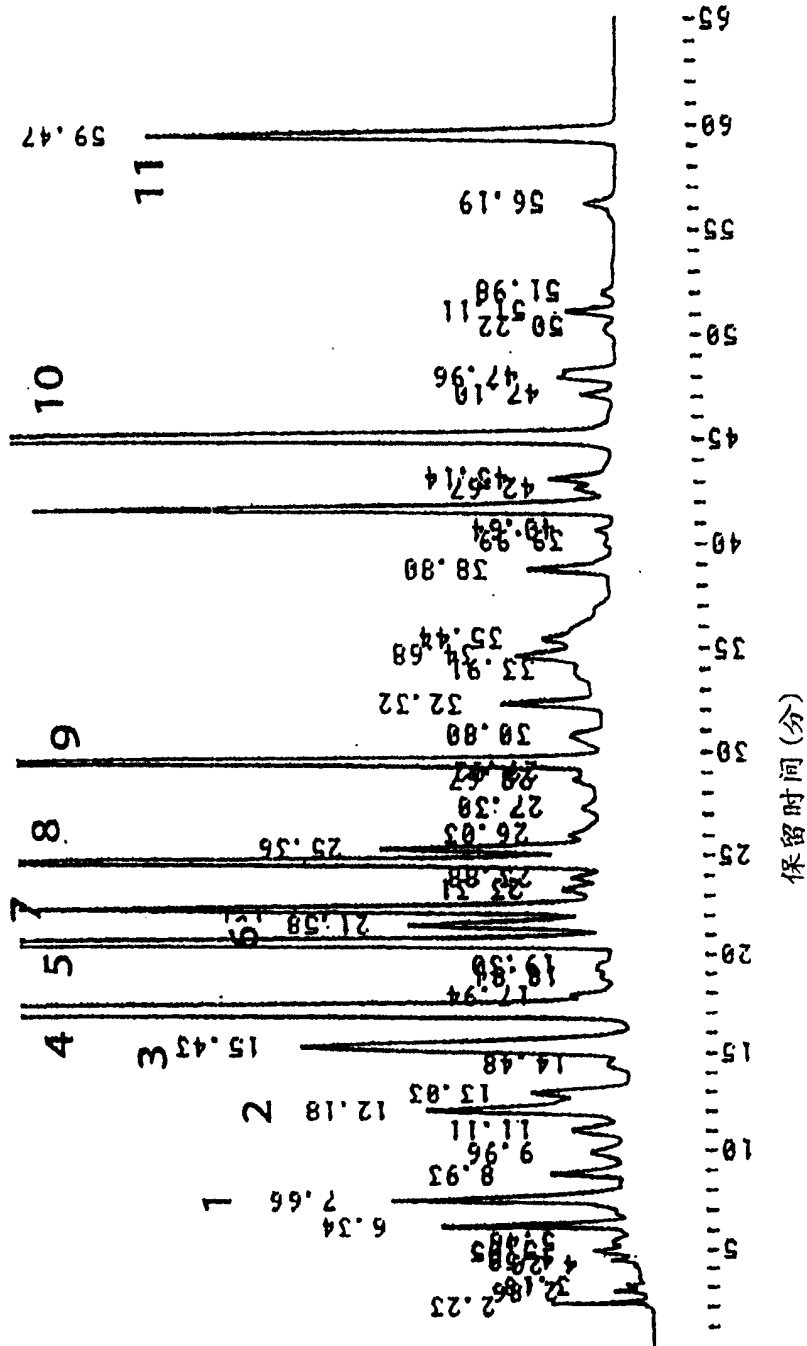
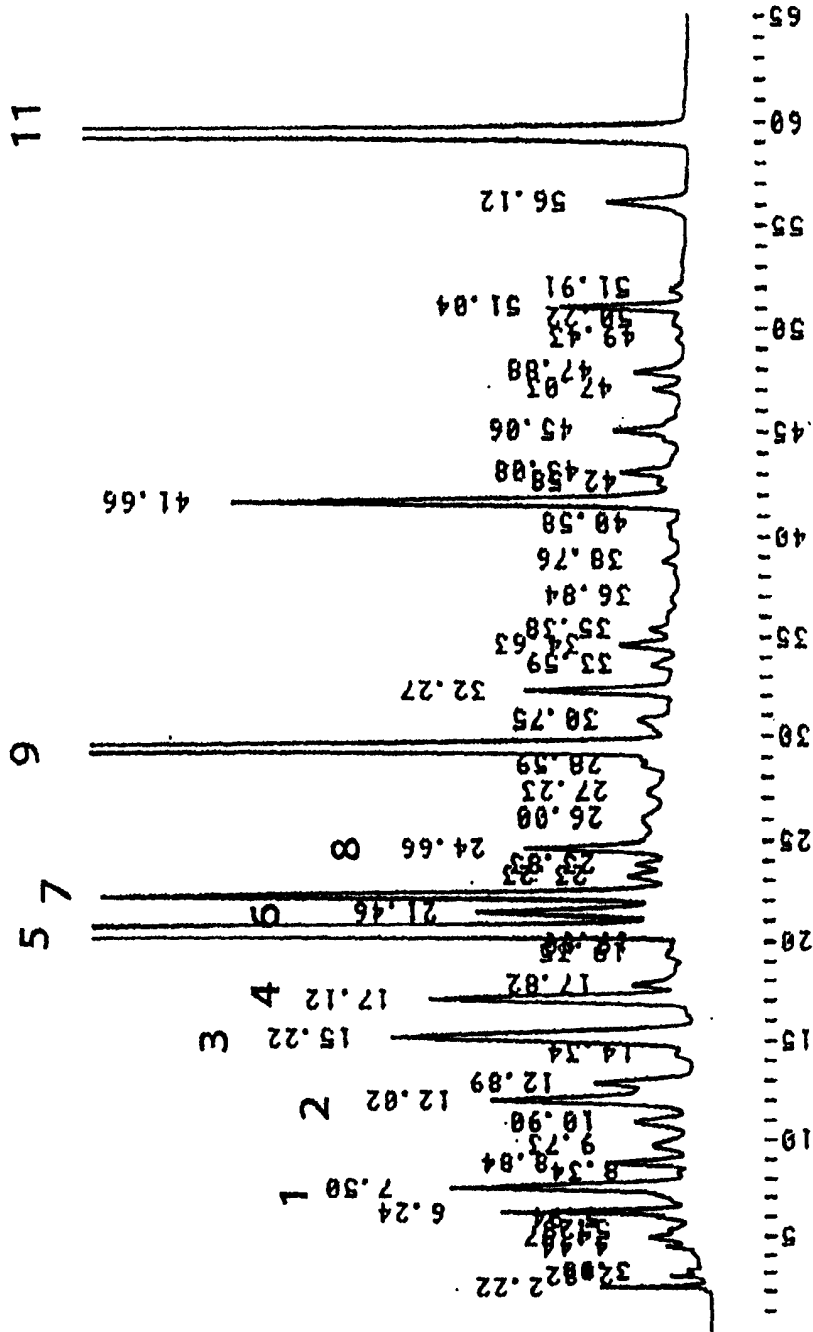


图 1a



保留时间(分)

图 1b

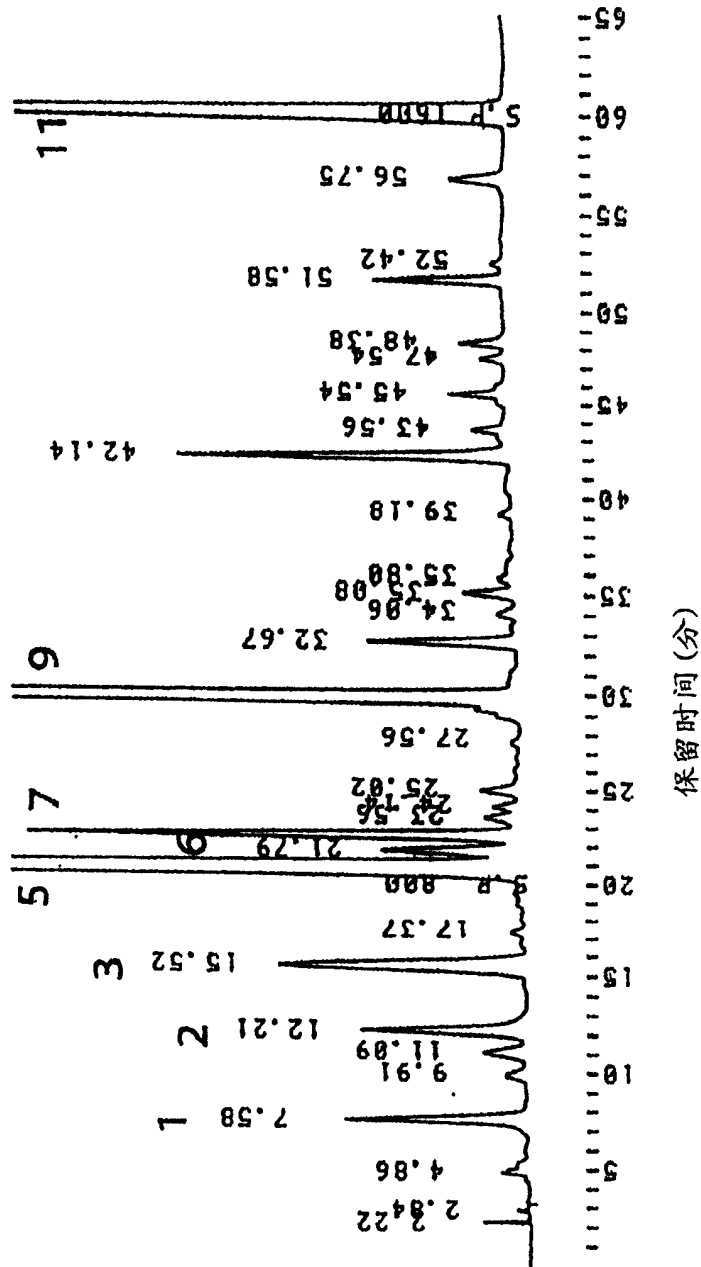


图 1c

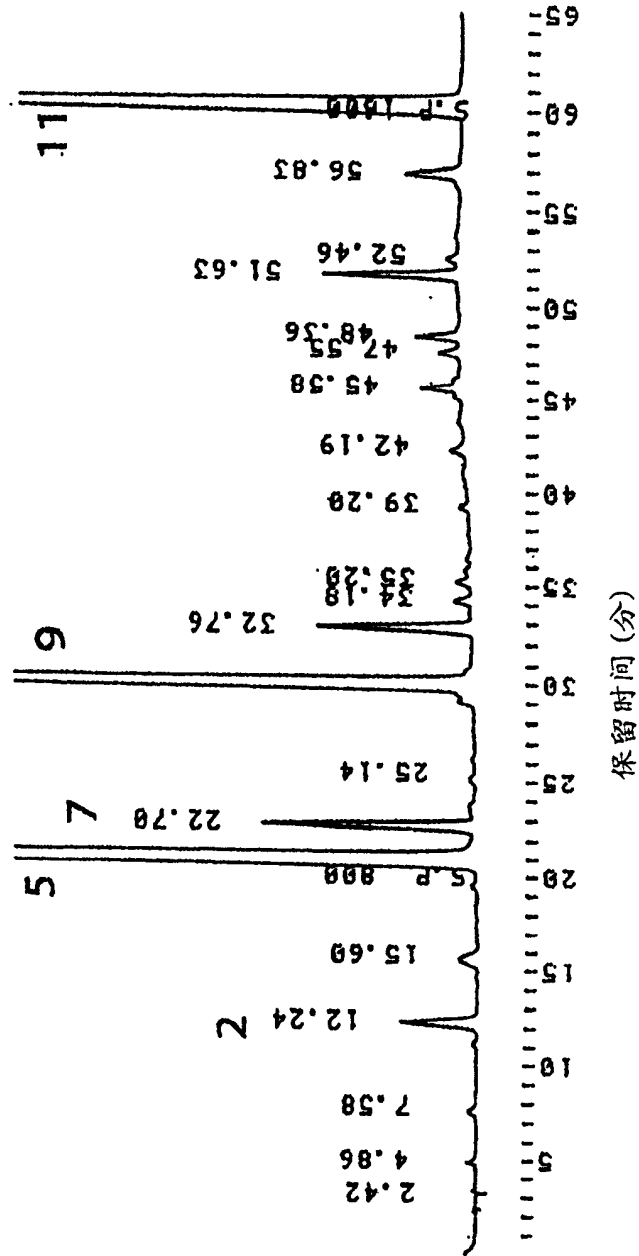


图 1d

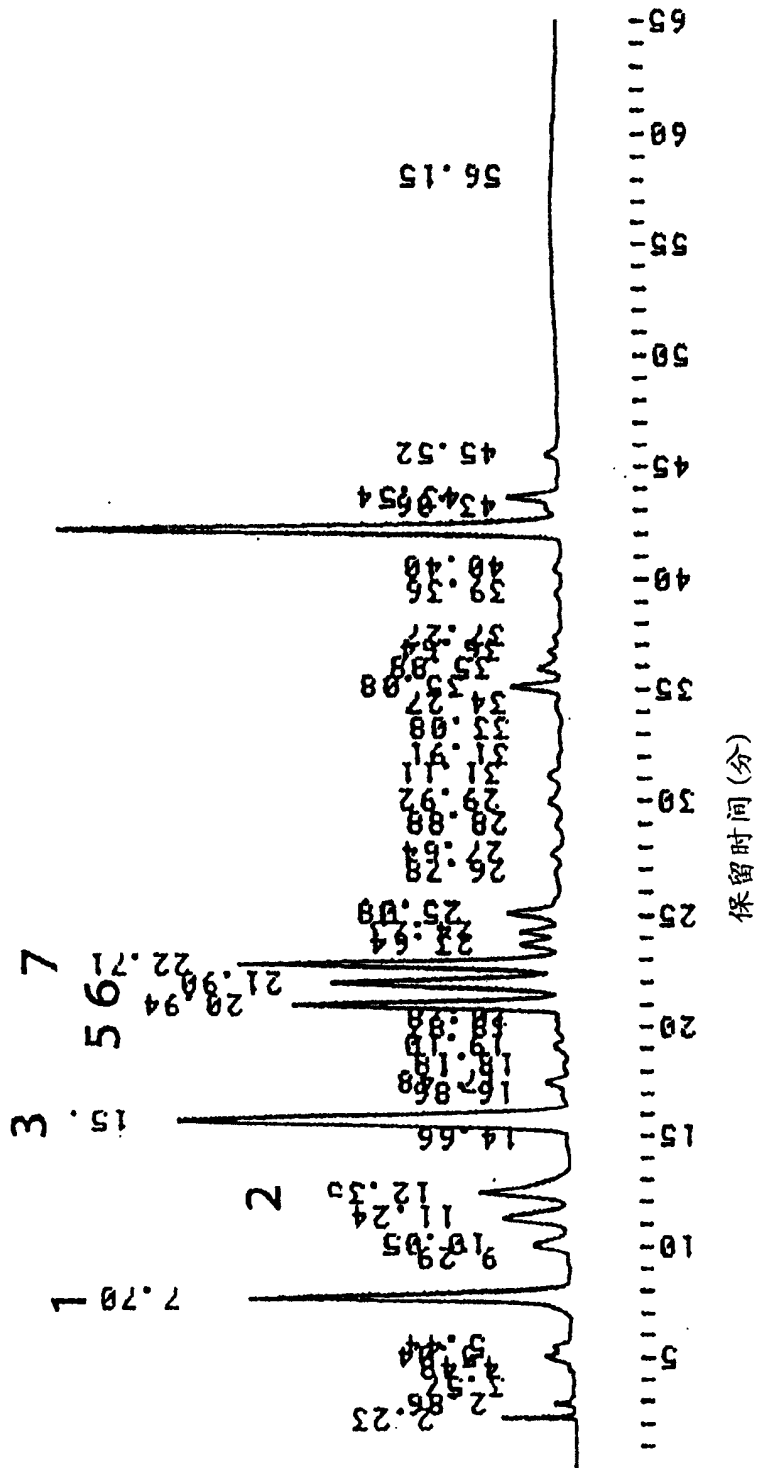


图 1e

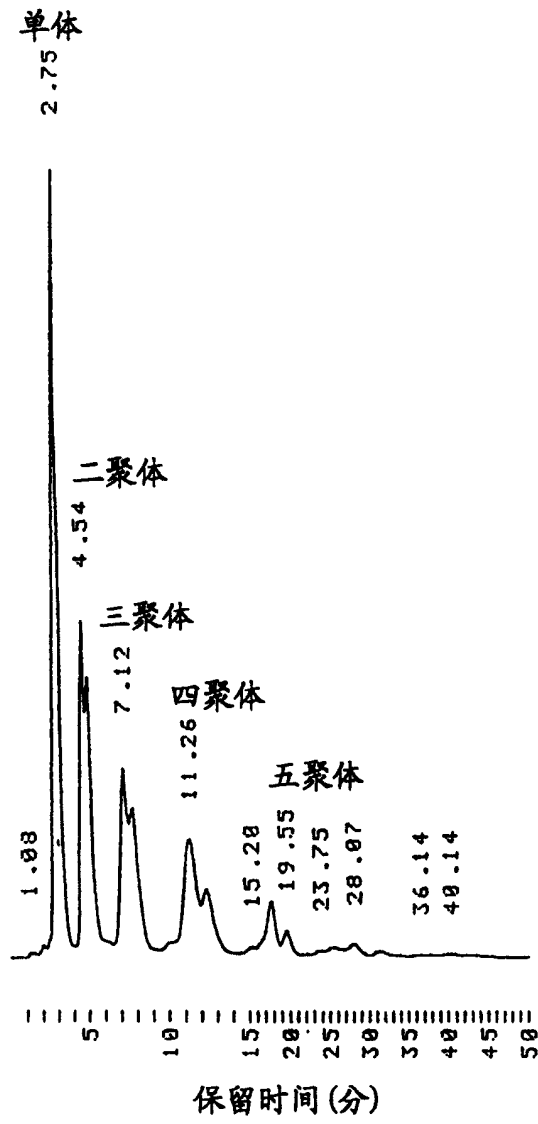


图 2

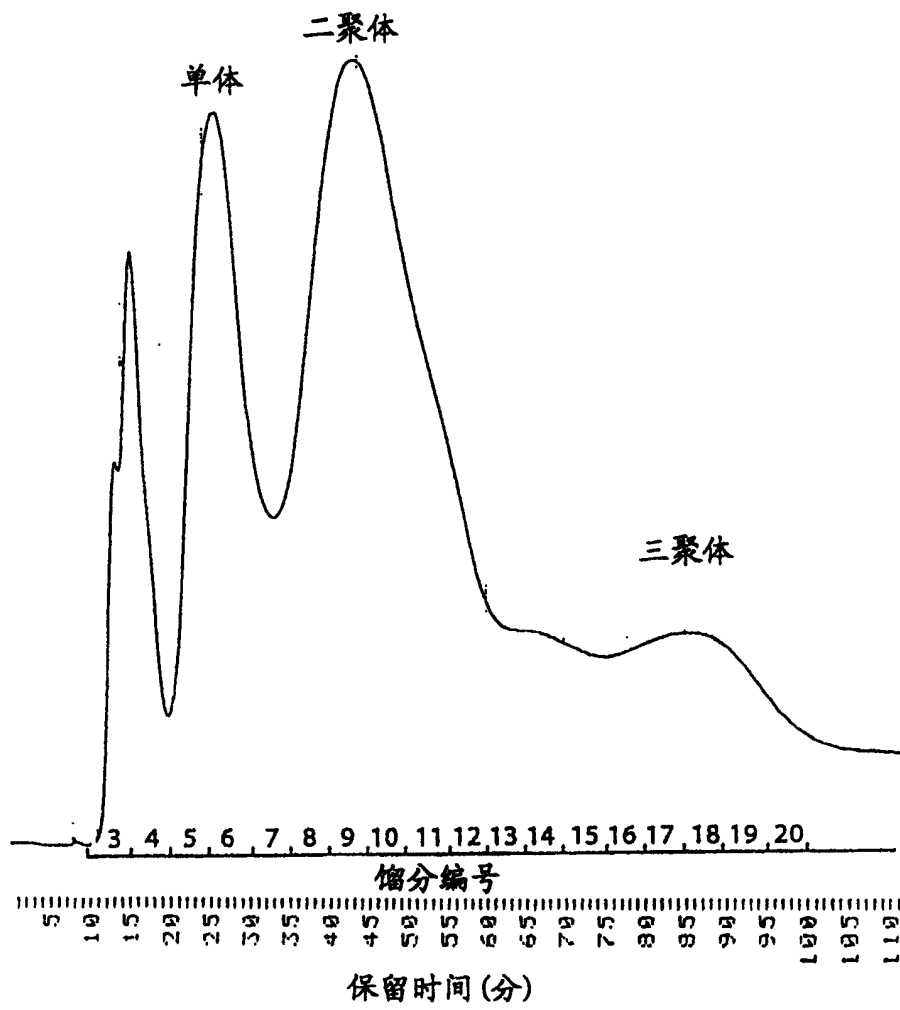


图 3

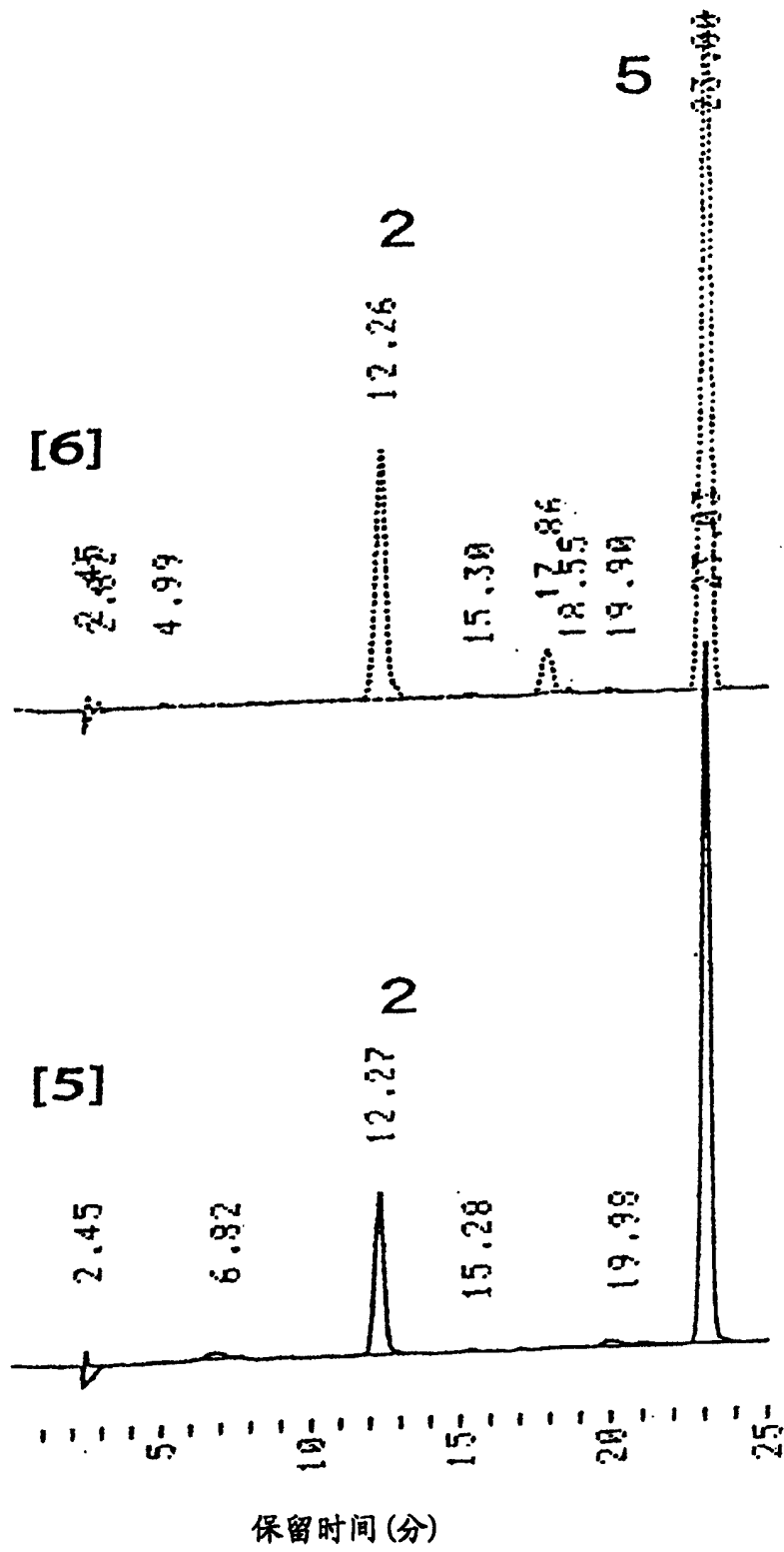


图 4

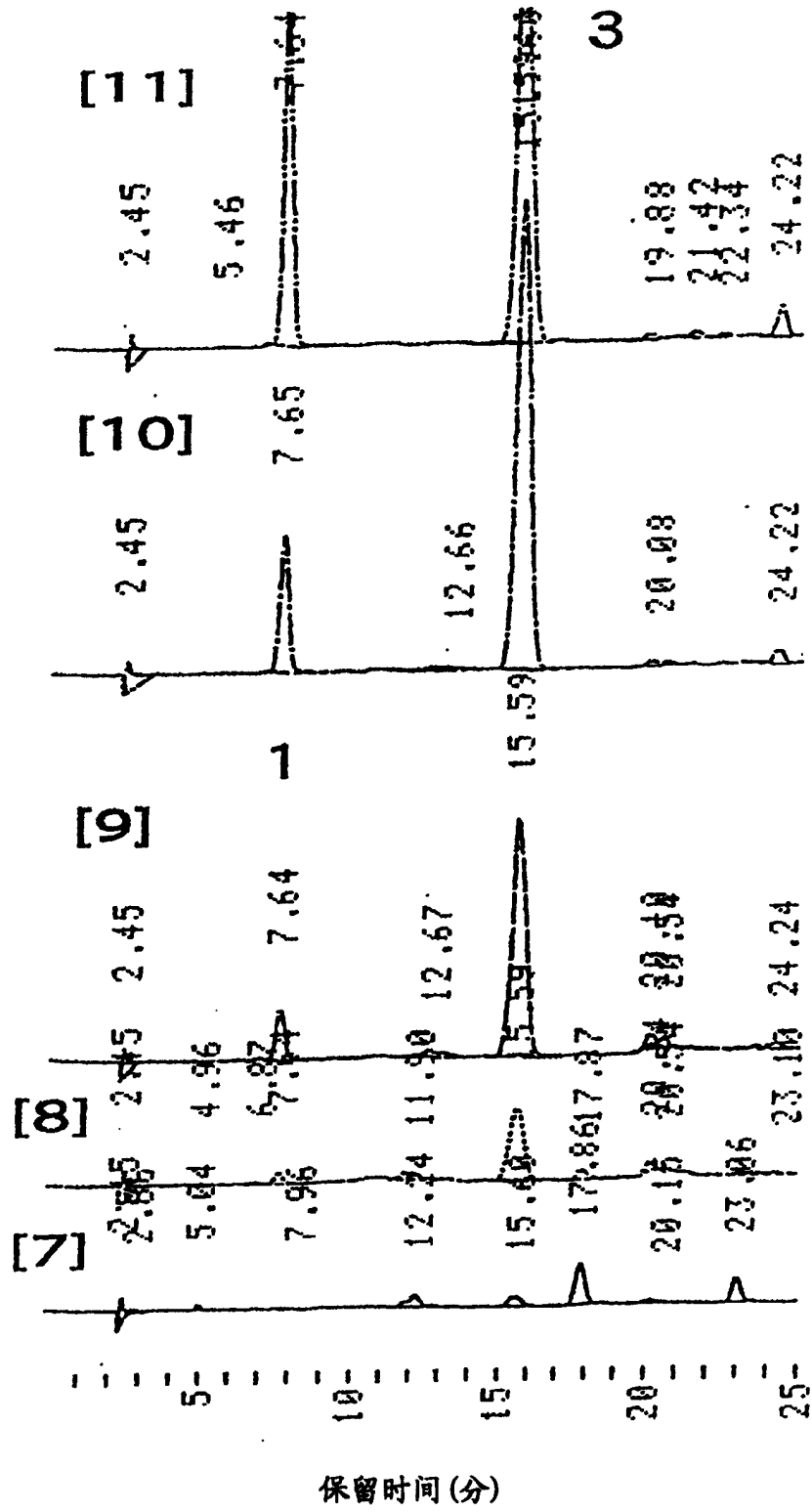


图 4

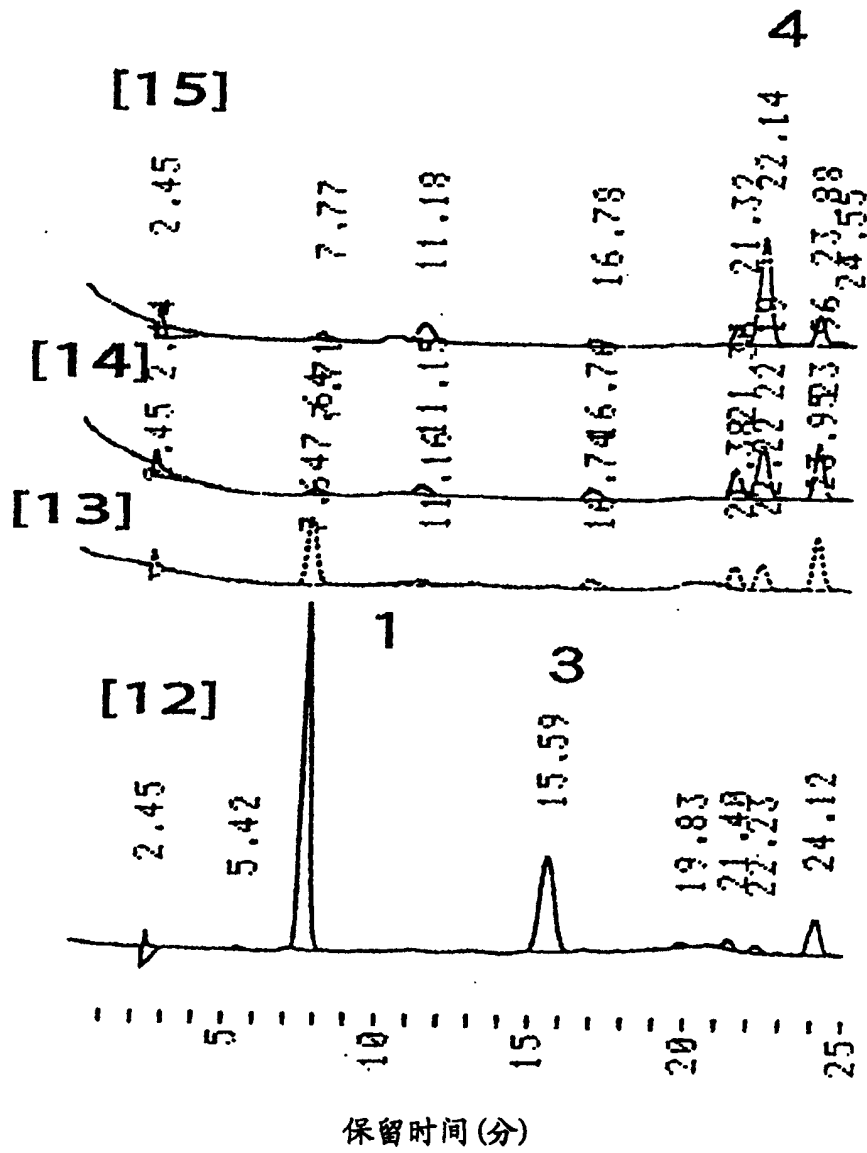


图 4

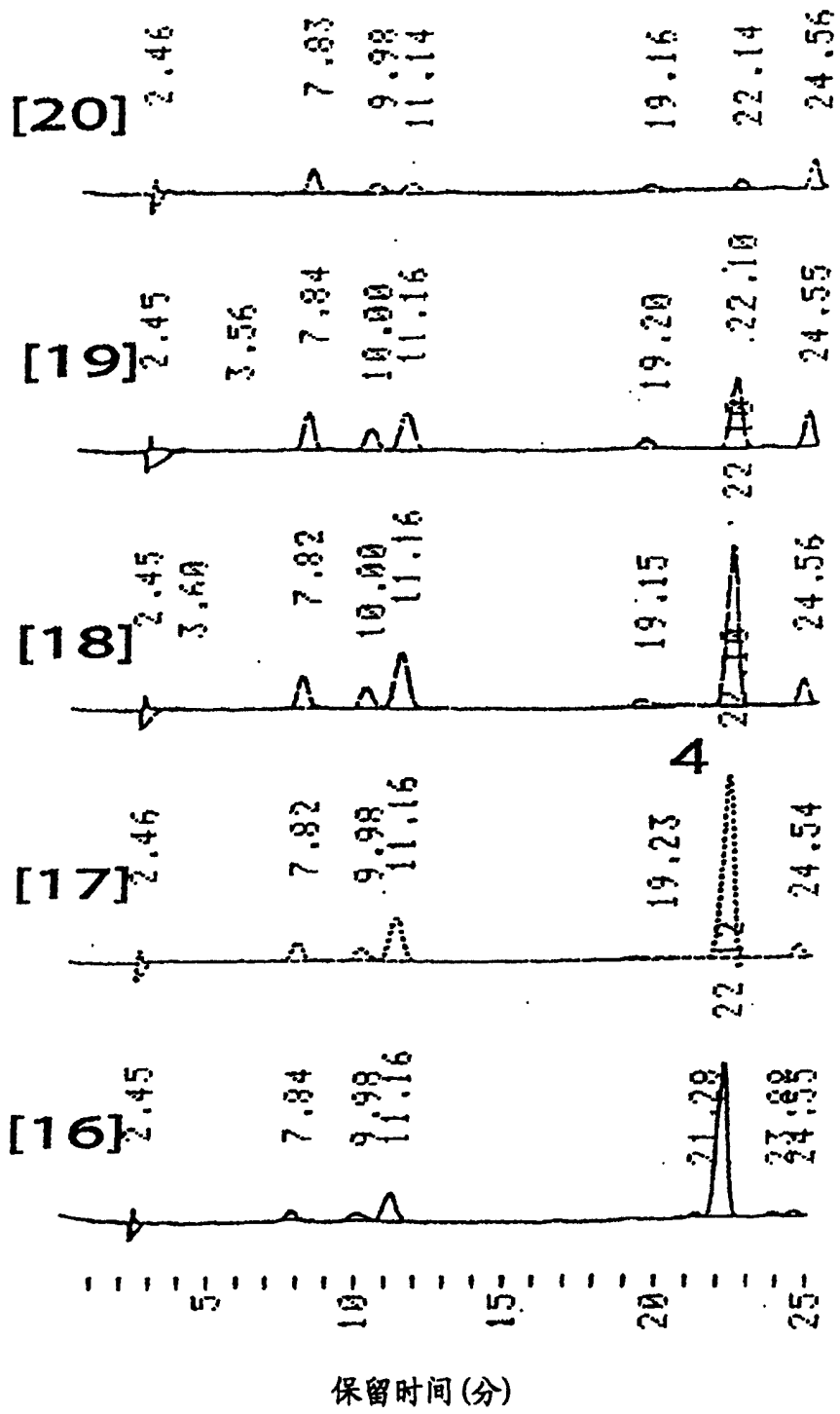


图 4

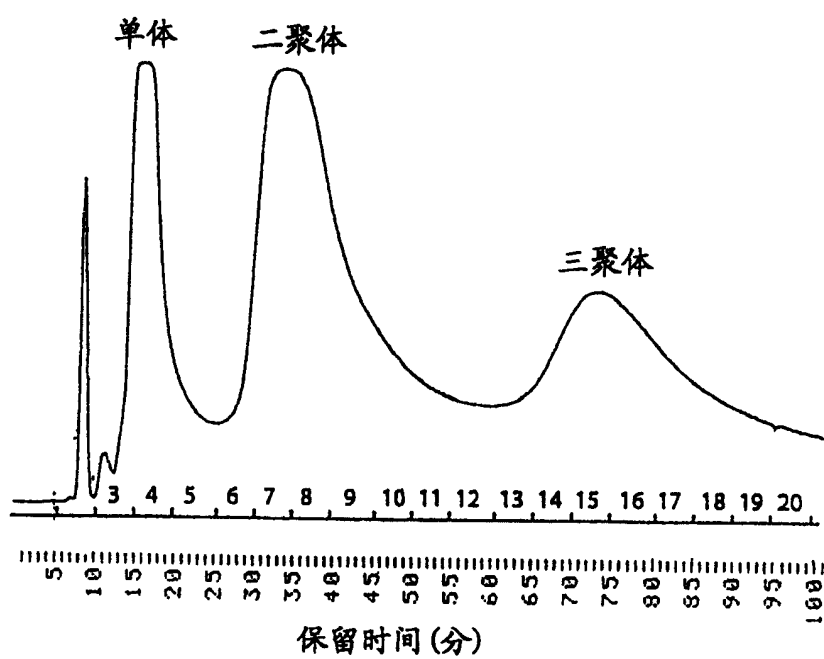


图 5

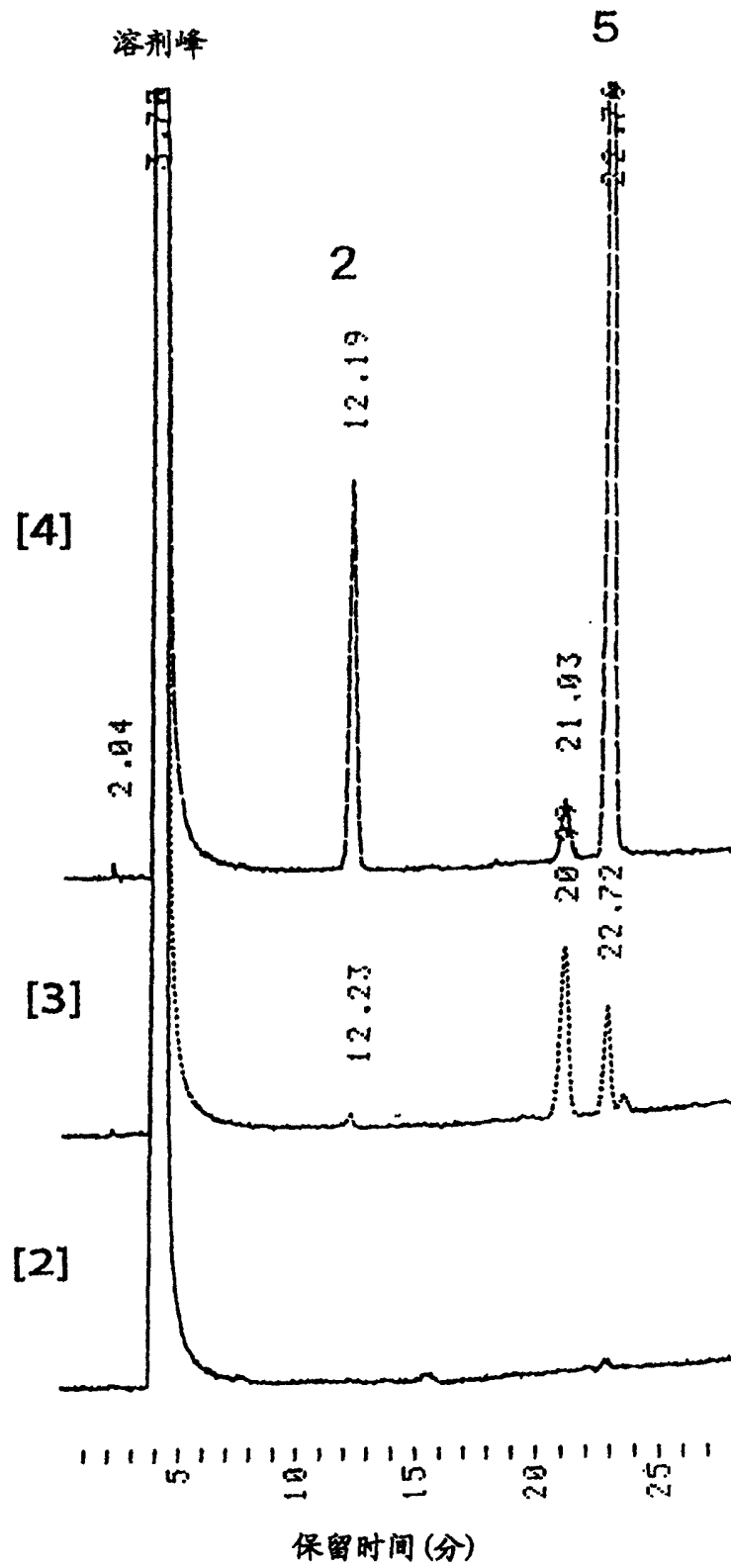


图 6

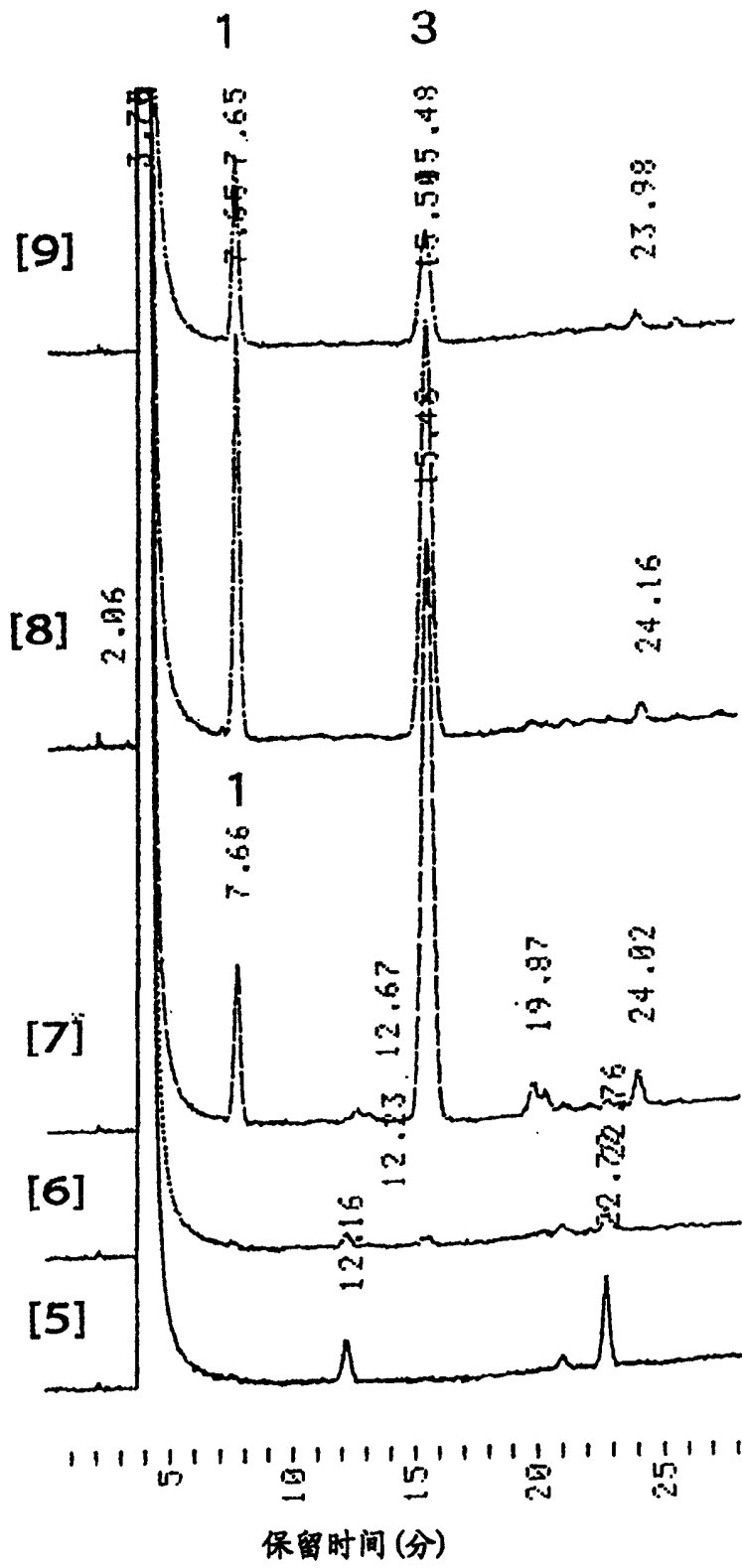


图 6

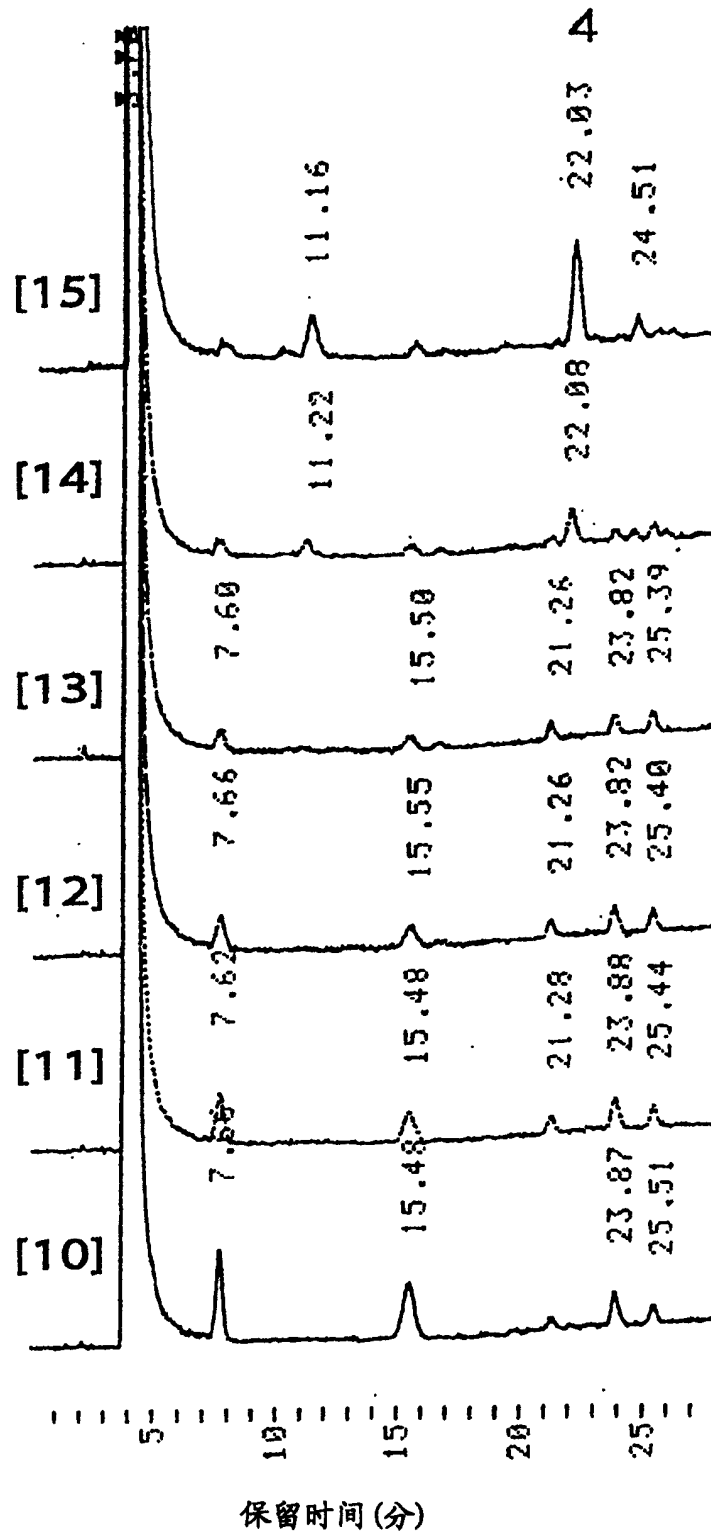


图 6

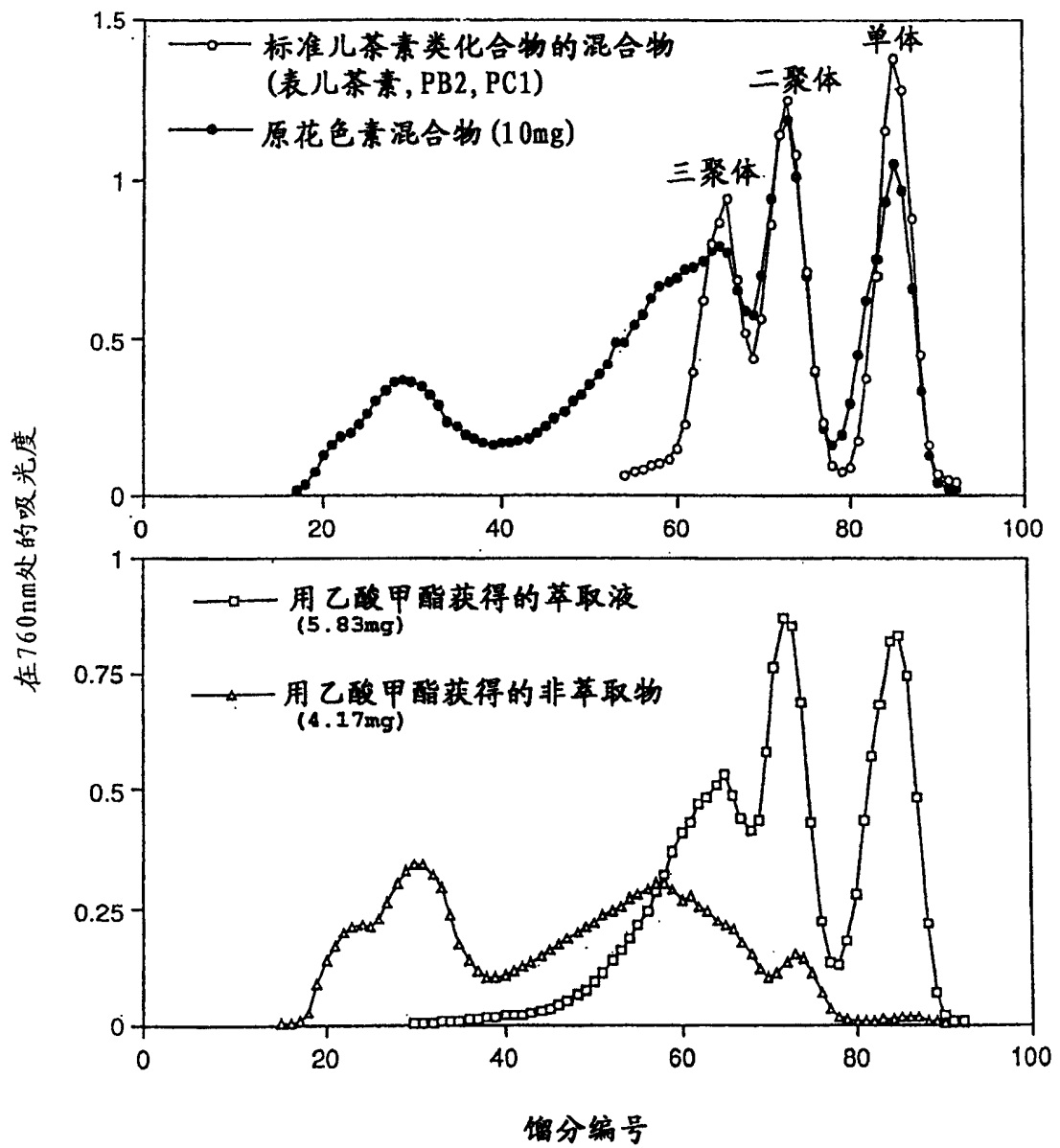


图 7