

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07D311/60

C07D311/30

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00808993.0

[43]公开日 2002 年 6 月 26 日

[11]公开号 CN 1355797A

[22]申请日 2000.6.6 [21]申请号 00808993.0

[30]优先权

[32]1999.6.16 [33]DE [31]19927425.8

[86]国际申请 PCT/EP00/05182 2000.6.6

[87]国际公布 WO00/76992 德 2000.12.21

[85]进入国家阶段日期 2001.12.14

[71]申请人 默克专利股份有限公司

地址 德国达姆施塔特

[72]发明人 H·布普尔兹 M·俊戈尼茨

M·戈伦德 R·罗斯克普

H·哈特尼尔

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 唐晓峰

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 从生物类黄酮中回收异槲皮素

[57]摘要

本发明涉及从生物类黄酮浆即从回收类黄酮的母液
残余物中回收 高纯度异槲皮素的方法,该方法通过用含
有乙酸甲酯和水的混合溶剂 进行提取。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1、从生物类黄酮浆(母液残余物)中回收异槲皮素的方法,其特征在于进行下列步骤:

a) 用含有体积比为 9:1 的乙酸甲酯和水的混合溶剂提取母液残余物(浆),其中混合溶剂的用量为母液残余物重量的 10 倍,提取温度为 35-50℃,提取时间至少 30 分钟,经离心从固体残液中分离,

b) 用水稀释上述提取物,

c) 通过常压蒸馏从提取物中除去乙酸甲酯,

d) 迅速把水蒸馏残余物冷却至 10℃,期间异槲皮素开始沉淀。

e) 迅速分离和干燥所述产品。

2、权利要求 1 的方法,其特征不在于:从由 *Dimorphandra gardneriana* 提取芦丁的制备中获得母液残余物,把该母液残余物用作生物类黄酮浆。

3、权利要求 1 或 2 的方法,其特征不在于:所述溶剂混合物用碳酸氢铵缓冲。

4、权利要求 1 或 3 的方法,其特征不在于:提取时间持续 30-60 分钟。

5、权利要求 1-4 任意一项的方法,其特征不在于:用基于提取物量约 60-80%体积的水进行稀释步骤 b)。

6、权利要求 1-5 任意一项的方法,其特征不在于:在蒸馏(步骤 c)期间还可以进行加水(步骤 b)。

7、权利要求 1-6 任意一项的方法,其特征不在于:在 2 小时内迅速冷却水蒸馏残余物。

8、权利要求 1 的方法,其特征不在于:其作为半连续方法进行。

9、权利要求 7 的方法,其特征不在于:把必须量的溶剂通过装有滤板的提取器,其中所述提取器含有母液残余物的高浓度悬浮液,

设置提取器体积和体积流速,这样维持提取器中的停留时间为至少 30 分钟,

同时使提取器的温度为 35-50℃,

并且把新鲜的控温混合溶剂加入到提取器中同时收回等量的提取物, 这样提取器的运转体积维持不变,

并立即浓缩收回的提取物得到水残余物,

如果需要, 在卸下提取残余物后, 随后的结晶步骤、随后用水沸腾和用甲基叔丁基醚搅拌的纯化步骤在同一容器中进行。

说明书

从生物类黄酮中回收异槲皮素

本发明涉及从生物类黄酮母液残余物中回收高纯度异槲皮素的方法，该方法通过用含有乙酸甲酯和水的混合溶剂提取所述残余物。

最近，异槲皮素和其它类黄酮化合物例如芦丁由于其作为抗氧化剂的特定性质而被进行的深入的研究。在人体老化和疾病发生方面，自由基和活性氧化合物具有重要作用。

抗氧化剂例如类黄酮以及维生素 C 能够清除这样的游离基和物质，因此其降低了这些物质对机体的影响。

类黄酮物质特别是异槲皮素联合应用维生素 C 时具有重要作用，因此其在药物制剂中，其常常被用作食品添加剂或者作为食品添加剂给药。

因此日益需要高纯度的类黄酮例如槲皮素、芦丁或特别是异槲皮素。其制备方法应该是廉价的，所述高纯度产品应该以尽可能少的步骤获得。

因此，本发明的目的是寻找从今可能廉价的起始原料中回收高纯度异槲皮素的有效方法，其中异槲皮素的纯度优选大于 90% (HPLC)。

令人意外地，业已发现：通过应用含有乙酸甲酯和水的混合溶剂提取生物类黄酮浆残余物，可以从其中回收得到高纯度的异槲皮素。

因此，本发明涉及从生物类黄酮浆（母液残余物，例如从 *Dimorphandra gardneriana* 中制备芦丁形成的母液残余物）中回收异槲皮素的方法，其特征在于进行下列步骤：

a) 用含有体积比为 9:1 的乙酸甲酯和水的混合溶剂提取母液残余物（浆），其中混合溶剂的用量为母液残余物重量的 10 倍，提取温度为 35-50℃，提取时间至少 30 分钟，经离心从固体残液中分离，

b) 用水稀释上述提取物，

c) 通过常压蒸馏从提取物中除去乙酸甲酯，

d) 迅速把水蒸馏残余物冷却至 10℃，期间异槲皮素开始沉淀。

e) 迅速分离和干燥所述产品。

所述生物类黄酮浆液为制备纯类黄酮后剩余的母液残余物，其常常含有相对大量的其它类黄酮。这些残余物为回收其它类黄酮的良好的起始原料。

例如，在 *Dimorphandra gardneriana* (fava d'anta) 中，异槲皮素是含量仅仅次于芦丁的另种类黄酮，在制备芦丁期间，母液中必然出现异槲皮素。提取这种母液残余物(浆)用于回收异槲皮素是本发明的主题物质。

所述异槲皮素是用含有乙酸甲酯和水的混合溶剂从母液残余物 (“pasta seca”) 中提取得到的，在混合溶剂中，乙酸甲酯与水的体积比为 9:1，混合溶剂的用量为所用母液残余物重量的 10 倍，即每千克母液残余物中应用 10 升提取溶剂，经离心从固体残液中分离。所述残液用新鲜母液残余物补充后，可以进行再提取。

此处的原料优选预先过筛的，并将其缓缓引入到反应器中。

为了尽可能不使异槲皮素水解，优选应用不含酸的乙酸甲酯。因此，应用缓冲液例如碳酸氢铵缓冲所述溶剂混合物。

提取温度为 35-50℃，因此明显低于乙酸甲酯的沸点(从 55-57℃)。在较高温度下，必然出现产率降低和提取溶剂的损失，并且出现过滤困难。

提取时间至少为 30 分钟。优选进行 30-60 分钟。虽然即使高达 6 小时的较长提取时间也不至于引起任何损害，但其对纯度的提高没有明显作用。

用水(去离子水)稀释提取物，水的用量优选为提取物体积的 60-80%、特别优选 60-70%。常压下蒸馏掉乙酸甲酯。优先选择最高 70℃ 的底温(bottom temperature)。

提取过程应该尽可能在 1 小时内进一步立即进行，否则由于不能控制的结晶过程使纯度降低。

任选地，可以分多次把水加入，并可以延迟至蒸馏期间为止。

馏出物中仍然含有约 5%重量的水(应用 Karl fischer 方法), 并可以在调整水含量后重新应用。通过这种途径可以回收约 85%重量的乙酸甲酯。

把水提取残余物迅速冷却至 10℃, 优选的进行时间为最长 2 小时, 期间异槲皮素开始沉淀。

在冷却期间, 约 80%总量的异槲皮素直接以非常细的高纯度晶体形式沉淀。HPLC 检测显示: 所述产品含有 94%的异槲皮素、1%的芦丁和 0.2%的槲皮素。因此达到了以 90%以上的纯度形式达到了回收异槲皮素的优选目的。

必须立即分离所述产品, 因为如果再进行搅动将会使晶体结构变得更粗, 含量也会下降, 尽管主要只有槲皮素沉淀。

然后干燥所得产品, 优选在干燥箱中进行真空干燥, 其中压力约 80-120mbar, 干燥温度最高为 45℃。

如果不能对提取物进一步立即进行处理, 或者沉淀产品由于差错而放置时间过长, 这样将出现纯度降低。然而, 可以通过进一步纯化步骤对所需异槲皮素的纯度进行进一步提高。

关于可能的进一步纯化步骤, 可以提到的有例如: 用甲基叔丁基醚搅拌以除去槲皮素杂质。

进一步纯化的另一种途径是在用水进行简单的沸腾后过滤。

如果大规模操作, 本发明方法还可以通过半连续方法进行。所述半连续方法也是本发明的主题。

该方法是: 用必需量的溶剂(其中溶剂混合物也是由体积比为 9:1 的乙酸甲酯和水组成)通过装有滤板的提取器, 所述提取器中含有母液残余物的高浓度悬浮液。

设置提取器的体积和体积流速从而维持提取器的停留时间为至少 30 分钟。经过一段试行期后(期间提取器循环操作), 新鲜的温度控制的溶剂混合物进入到提取器中, 同时等量的提取物被收回, 这样提取器的运转体积维持不变。此时提取器的温度选择范围是 35-55℃。

把收回的提取物立即进行浓缩得到水残余物, 有可能经调整水的量

后直接重新应用馏出液(含水量 4.2%)。

如果合适,当卸下提取残余物后,随后的结晶步骤、用水沸腾的纯化步骤和用甲基叔丁基醚的搅拌步骤在同一容器中进行,持续的固体产品相在整个期间持续存留于所述容器中,因此某些过滤步骤是多余的,从而尽可能地降低了产品和操作原料的损失。

在异槲皮素的粗品的纯化期间,用 MTBE 醚除去槲皮素和用水沸腾进行纯化可能是优选的除去槲皮素的方法,尽管应用水性母液也可以除去一些槲皮素。

图 1 通过实施例方式显示这种半连续作业工厂的图表

然而,在批量生产(当在相应大的提取容器例如瓷釉(enamel)容器中进行时)中,本发明的方法可能非常适合于以高纯度状态分离大量异槲皮素,而不需要进行另外的纯化步骤。

通过此处描述的方法,已经可以得到一种以非常经济的方式相对大规模地获得高纯度异槲皮素的方法。

即使不再进行评述,可以想像:本领域技术人员能够以相对宽的范围应用上述描述的方法。因此,优选的实施方案仅仅作为描述性公开,绝不能以任何方式对本发明构成限制。

所有上述和下面将记载的申请和出版物所公开的全部内容在此引入,作为参考。

下列实施例将更详细地解释本发明。

实施例 1

在悬浮的容器(suspension vessel)中,把 0.625kg 碳酸氢铵完全溶解于 5L 去离子水中。往该反应容器(enamel apparatus)中加入 45g 去离子水。通过 Alexander 筛把 50kg 母液残余物(pasta seca)过筛至中间储罐中。

把 418kg 乙酸甲酯转移至上述反应容器中,然后在搅拌下缓缓加入过筛的母液残余物。

在 45℃ 的内部温度下提取反应混合物约 45 分钟,然后转移(氮气保护)至离心管中,以 300rpm 的速度离心除去残液。再以 500-800rpm

的速度旋转干燥所得残余物(Diolen 旋转干燥布)。所得残液用母液残余物补充后可以用于再提取。

然后把提取物与 20 千克水混合。常压下蒸馏掉乙酸甲酯，其中最高低温为 65℃。馏出液仍然含有约 5% 重量的水(用 Karl Fisher 方法)，用水含量调整后循环应用。用此方法可以回收约 85% 重量的所用乙酸甲酯。

在 12 小时期间把水蒸馏物冷却至 10℃，期间异槲皮素开始沉淀。在冷却期间，约 80% 总量的沉淀的异槲皮素以非常细晶体形式高纯度地沉淀出来(HPLC: 约 94% 的异槲皮素、1% 的芦丁、0.2% 的槲皮素)。必须立即分离出所述产品(离心)，因为继续搅拌会使晶体结构变粗糙，含量也会下降，尽管主要只有槲皮素沉淀。

用水洗涤滤饼，然后旋转干燥。

产品的干燥温度最高为 45℃，真空箱的压力约 100mbar±20mbar。以此方式得到 3.49kg 干燥产品。

实施例 2

在此实施例中，记载了实验室规模的半连续方法：

起始原料：500g 母液残余物(pasta)、8370g 乙酸甲酯、去离子水。

把乙酸甲酯(约 9000ml)在储罐中与 1000g 去离子混合得到提取液。把 2 升这种溶剂混合物引入到提取器中，加热至 45℃。

在搅拌下把 500g 母液残余物加入到提取器中。以 4l/h 的体积流速经筛板抽出提取物，并对提取器进行补充，此过程进行 30 分钟。

30 分钟后，把提取物连续加入到蒸馏容器中；以连续补充剩余的温控提取物补充损失的提取物，这样提取器中维持 2 升恒定的运转体积。

约 2 小时后，起初加入的提取物被用完，然后把剩余的残余物抽干。

在提取期间，在常压下蒸馏把所有乙酸甲酯从提取物中蒸馏掉。馏出物中仍然含有 4.2% 的水(经 Karl Fischer 方法)，经调节含水量后

可以将其作为提取溶剂循环应用。

搅拌下，把剩下的水提取残余物冷却至室温，抽干，用少量提取溶剂洗涤。得到异槲皮素粗品 135.4g，HPLC：异槲皮素 70%，芦丁 25%，槲皮素 1%，其余 4%。

把 100g 异槲皮素粗品悬浮于 1000g 去离子水中，使其沸腾 1 分钟，然后立即过滤。经此方法，得到纯异槲皮素 (HPLC : 90%) 44g。

异槲皮素从提取物中结晶出来，其可以在与异槲皮素粗品的纯化中再次利用。

说明书附图

