



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102391328 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 28

(21) 申请号 201110259326. 2

(22) 申请日 2011. 09. 05

(71) 申请人 中国中医科学院中药研究所
地址 100700 北京市东直门内南小街 16 号

(72) 发明人 杨滨 晏仁义 余盛贤

(51) Int. Cl.

C07H 15/18 (2006. 01)

C07H 1/08 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 3 页

(54) 发明名称

同时制备 magnoloside A 和 magnoloside B
化学对照品的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种同时制备 magnoloside A 和 magnoloside B 化学对照品的制备工艺。厚朴药材经醇提取得粗提物, 经萃取、树脂柱分离、反相中压液相色谱制备和反相高效液相色谱制备四步高效纯化, 即可获得纯度大于 98% 的 magnoloside A 和 magnoloside B 两种化学对照品。本发明工艺步骤较简单、纯度高、色泽好, 并且适于规模化生产。

1. 同时制备 magnoloside A 和 magnoloside B 化学对照品的方法,其特征在于:厚朴药材经醇提取得粗提物,经萃取、树脂柱分离、反相中压液相制备及反相高效液相制备四步高效纯化,同时获取纯度大于 98% 的 magnoloside A 和 magnoloside B 两种化学对照品;具体步骤如下:

(1) 提取和萃取:厚朴药材用乙醇溶液提取得粗提物,回收乙醇并浓缩至一定体积,用氯仿萃取除掉脂溶性杂质。

(2) 树脂柱粗分:水层经树脂柱分离,先以水洗脱除去杂质,然后以体积分数在 20% -30% 之间的任一乙醇溶液洗脱,收集相应乙醇洗脱物,浓缩干燥得棕色浸膏。

(3) 反相中压液相色谱富集和高效液相制备色谱精制:棕色浸膏用水或低浓度甲醇溶液溶解,微孔滤膜过滤,反相中压液相色谱分离,以甲醇-醋酸水溶液为洗脱体系,紫外检测器 328nm 下监测,收集图谱中两个主要的色谱峰,蒸干,即可得到纯度大于 85% 的 magnoloside A 和 magnoloside B 粗品;再经反相高效液相制备色谱分离,甲醇-水溶液为洗脱体系,即可得到纯度大于 98% 的对照品,其外观为淡黄色粉末。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (1) 中提取溶剂可为 0-95% 乙醇。其用量是药材的 4-10 倍。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (1) 中加热回流提取的时间为 1-2 小时,提取次数为 2-4 次。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (1) 中浓缩至 1-2g 生药 /mL。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (1) 中氯仿的用量为被萃取溶液体积的 1-2 倍,萃取次数 2-3 次。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (2) 中粗分离中采用的树脂为 D101、HPD 100、Diaion HP-20 或 AB-8。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (2) 中各梯度洗脱的体积为 3-5 倍柱体积。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 样品用水或者为体积分数不高于 25% 的甲醇溶解,样品浓度为 100-1000mg/mL。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中反相中压液相制备柱的填充填料为 C18,制备柱长 30-100cm、直径 2-5cm。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中反相高压液相制备柱的填充填料为 C18,制备柱长 25-50cm、直径 2-5cm。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中反相中压液相采用的流动相为甲醇利含醋酸的水溶液两相体系,醋酸水的 PH 值为 3-4,两相溶剂以体积分数比为 11 : 89 ~ 35 : 65 进行梯度洗脱,流速为 30-100mL/min。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中反相高压制备液相进样体积为 1-50mL,流速控制在 10-200mL/min;采用的流动相为 30% 甲醇水溶液。

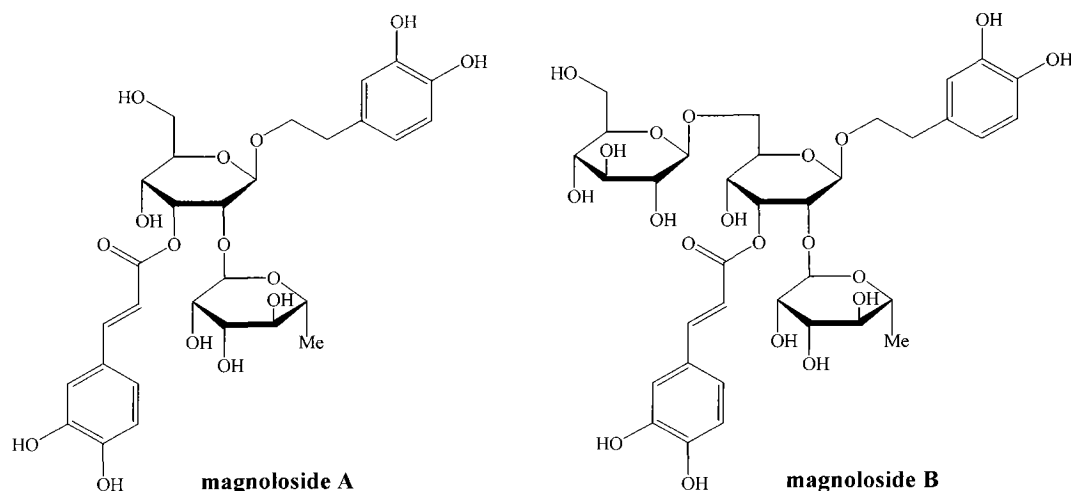
13. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (3) 中反相中压液相和反相高压制备液相上样量与填料之比为 1 : 30-1 : 10。

同时制备 magnololide A 和 magnololide B 化学对照品的方法

一、技术领域

[0001] 本发明涉及一种同时制备 magnololide A 和 magnololide B 化学对照品的制备工艺。主要包括提取、溶剂萃取、树脂柱分离及中压反相液相富集和高压反相液相制备四步高效纯化,收集流份、干燥即可同时获取两种对照品。其结构式如下:

[0002]



二、背景技术

[0003] 厚朴为大宗常用中药材之一,具有燥湿消痰、下气除满的功能,用于湿滞伤中、脱痞吐泻、食积气滞、腹胀便秘、痰饮喘咳。厚朴酚与和厚朴酚被认为是厚朴的活性成分,同时也是《中国药典》中厚朴药材含量测定的成分;余盛贤等报道了苯乙醇苷类化合物为厚朴水溶性部位的主要成分,指出苯乙醇苷-magnololide A在厚朴的产地加工过程中含量有较大变化(中国中药杂志,2010,35(14)1831-1835)。苯乙醇苷类化合物具有广泛的生物活性,而对中药厚朴中苯乙醇苷类化合物的化学成分研究少有报道,对苯乙醇苷类成分的定性定量研究更是未见报道。因此,制备 magnololide A、magnololide B 对照品对于厚朴药材及相关复方的多指标质量控制具有重要意义。目前,对照品市场上也未见 magnololide A 和 magnololide B 的供应,其分离制备方法也少有报道。Hasegawa takashi 首次报道了从日本厚朴 (*Magnolia obovata*) 中分离得到 magnololide A 和 magnololide B,并申请了新化合物专利(JP 63310899)。其制备步骤如下:日本厚朴用甲醇提取物,混悬于水中,经正丁醇萃取,正丁醇萃取部位反复经硅胶柱层析纯化,最后经 HW-40F 纯化得到纯品。该方法制备工艺较为复杂,制备周期较长,且没有进行纯度检验。

[0004] 本发明以厚朴为原料,经醇提取得到提取物,通过萃取、树脂柱分离、反相中压液相色谱制备和反相高效液相制备色谱四步高效纯化,收集相应流份,干燥,可批量同时获取两个个对照品。

三、发明内容

[0005] 本发明提供了一种工艺较简单、易规模化的制备新方法,从厚朴中同时制备纯度大于 98% 的 magnoloside A 和 magnoloside B 两种化学对照品,制备规模为克级。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案:

[0007] (1) 将厚朴药材粉碎,得到粗粉,用 70% 乙醇水加热回流提取。

[0008] (2) 将 (1) 乙醇水提取的提取液浓缩至 2g 生药 /mL,用等体积的氯仿萃取三次。

[0009] (3) 将 (2) 中萃取后的水溶液过大孔树脂柱,用 5 倍柱体积的蒸馏水洗脱除杂,再用 5 倍柱体积 20% 乙醇水洗脱。

[0010] (4) 将 (3) 中 20% 乙醇水洗脱液浓缩至干,用 0% -25% 的甲醇水溶解,配置成浓度为 100-1000mg/mL。

[0011] (5) 中压反相制备色谱柱的填充填料为 C18,制备柱长 30-100cm、直径 2-5cm;采用的流动相为 A:甲醇;B:pH 3-4 的醋酸水溶液,两相溶剂以按照体积分数比为 11 : 89 到 35 : 65 进行梯度洗脱;进样量与色谱填料的比为 1 : 30-1 : 100,流速控制在 15-100mL/min;收集两个主峰。

[0012] (6) 两个主峰收集液分别浓缩,经高压反相制备液相纯化,填充填料为 C18,制备柱长 25-50cm,直径 2-5cm;采用的流动相为 30% 甲醇水等度洗脱,流速为 10-100mL/min。

[0013] (7) 收集液 40℃ 低压回收有机溶剂,然后冻干。

[0014] 以本发明从厚朴中分离 magnoloside A 和 magnoloside B 化学对照品具有如下优点和进步:

[0015] (1) 本发明针对性强,工艺较简单。

[0016] 氯仿萃取除去厚朴中的脂溶性化合物,再经大孔树脂分离,最大程度地富集目标产物,有利于中压反相制备色谱中填料的保护和分离效果的提高;中压反相液相制备较文献反复硅胶柱层析,具有较好的重现性和快速等优点;高压制备液相中采用甲醇-水溶剂等度洗脱,不需平衡柱子,提高了效率、节约了试剂。

[0017] (2) 本发明中采用的技术手段适于放大进行规模化生产。

[0018] 大孔树脂具有价格便宜、可再生反复使用等特点,适于规模化生产;采用的中压反相色谱和高压反相色谱也具有规模生产的优点。

[0019] (3) 本发明得到的对照品具有纯度高(大于 99%),色泽较好(淡黄色)。

四、附图说明

[0020] 图 1 为 magnoloside A 的 HPLC 分析图谱 (328nm);

[0021] 图 2 为 magnoloside B 的 HPLC 分析图谱 (328nm);

[0022] 图 3 为 magnoloside A 的 ^1H -NMR 图谱;

[0023] 图 4 为 magnoloside A 的 ^{13}C -NMR 图谱;

[0024] 图 5 为 magnoloside B 的 ^1H -NMR 图谱;

[0025] 图 6 为 magnoloside B 的 ^{13}C -NMR 图谱;

[0026] 图 7 为厚朴中制备 magnoloside A 和 magnoloside B 对照品的工艺流程图。

五、具体实施方式

[0027] 现结合实施例对本发明做进一步详细说明,实施例仅限于说明本发明,而非对本

发明的限定。

[0028] 厚朴干燥树皮 8.0kg, 粉碎, 用 4 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2h, 提取 3 次, 浓缩至 4L, 用 4L 氯仿萃取 3 次。水部位经 4L 的 D101 大孔树脂分离, 5 倍柱体积蒸馏水洗脱除杂后, 再用 5 倍柱体积的 20% 乙醇洗脱, 收集 20% 乙醇洗脱部分, 浓缩干燥得棕色浸膏 250g。取浸膏 50g, 用 50mL 20% 甲醇溶解, 经微孔滤膜滤过, 注入反相中压色谱柱, 色谱柱直径 5cm, 长 50cm, 色谱柱的填充填料为 50 μ m C18 (YMC), 流速控制为 100mL/min, 检测波长为 328nm, 流动相梯度为 0-100min, 11% -35% 甲醇 - 醋酸水 (pH = 3)。收集两个主峰, 40℃ 减压旋转浓缩, 得到 magnoloside A 10.5g, magnoloside B 7g。

[0029] 反相高压液相制备: 取 magnoloside A 粗品 1.5g, 溶于 10mL 20% 甲醇水中, 经微孔滤膜滤过, 吸取 1mL 滤液经高压反相制备柱分离, 柱长度为 25cm, 内径 2cm, 流速 10mL/min, 合理收集主峰得到 100mg 的 magnoloside A, 纯度大于 98%。吸取 5mL 滤液经高压反相制备柱分离, 柱长度为 50cm, 内径 5cm, 流速 150mL/min, 合理收集主峰得到 480mg 的 magnoloside A, 纯度大于 98%。外观为淡黄色粉末。

[0030] 取 magnoloside B 粗品 1.5g, 溶于 10mL 20% 甲醇水中, 经微孔滤膜滤过, 吸取 1mL 滤液经高压反相制备柱分离, 柱长度为 25cm, 内径 2cm, 流速 10mL/min, 合理收集主峰得到 90mg 的 magnoloside B, 纯度大于 98%。吸取 5mL 滤液经高压反相制备柱分离, 柱长度为 50cm, 内径 5cm, 流速 150mL/min, 合理收集主峰得到 400mg 的 magnoloside B, 纯度大于 98%。外观为淡黄色粉末。

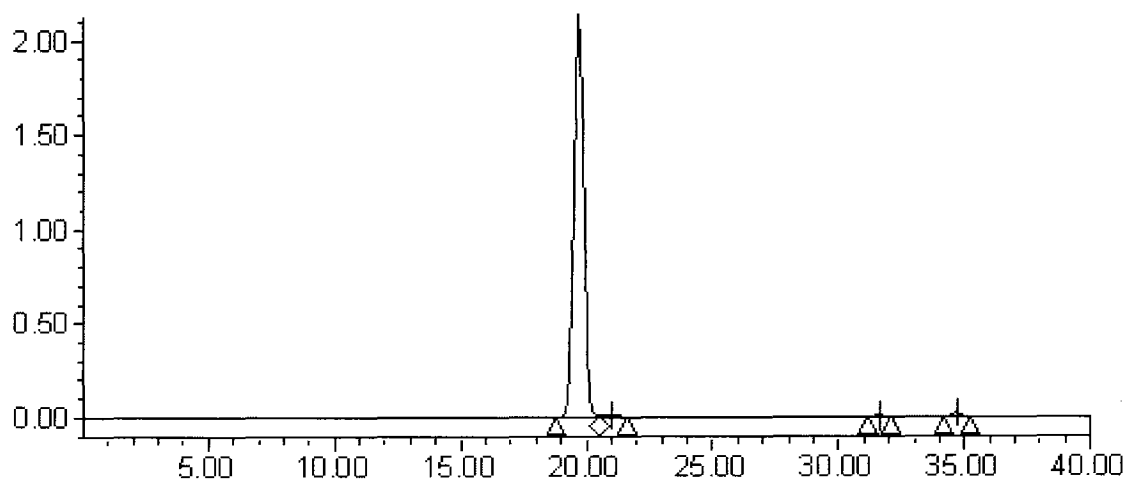


图 1

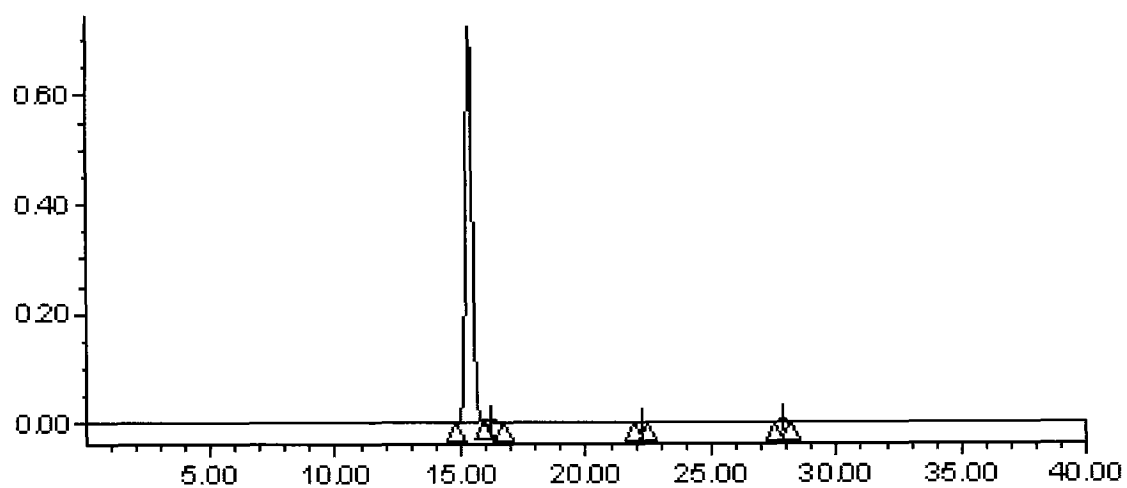


图 2

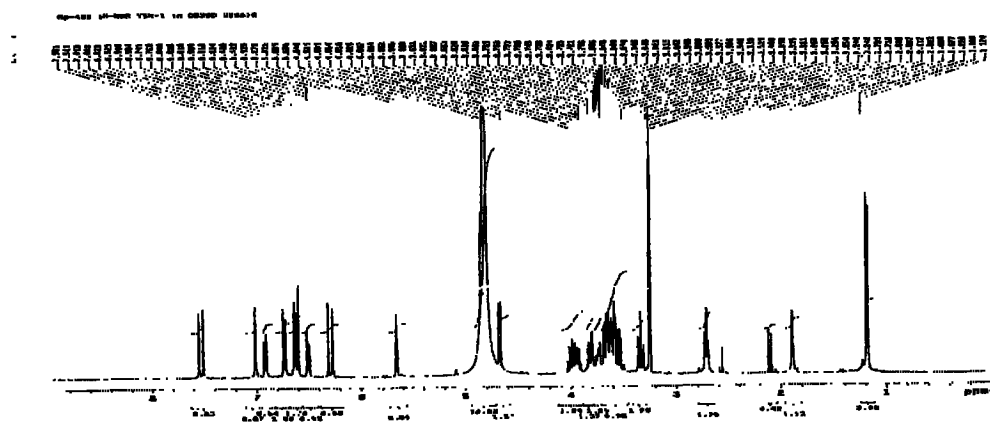


图 3

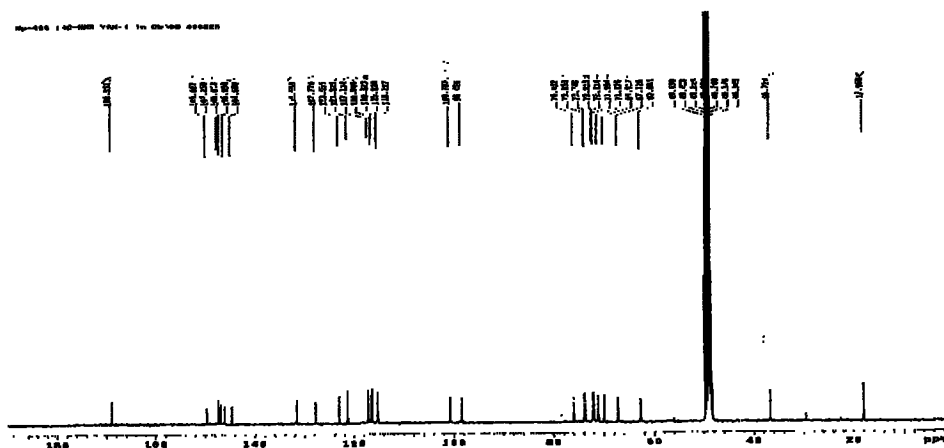


图 4

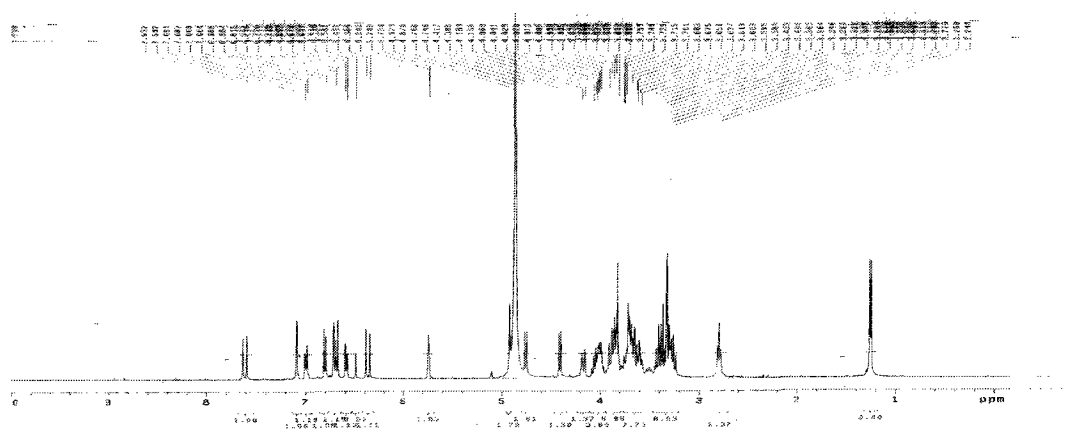


图 5

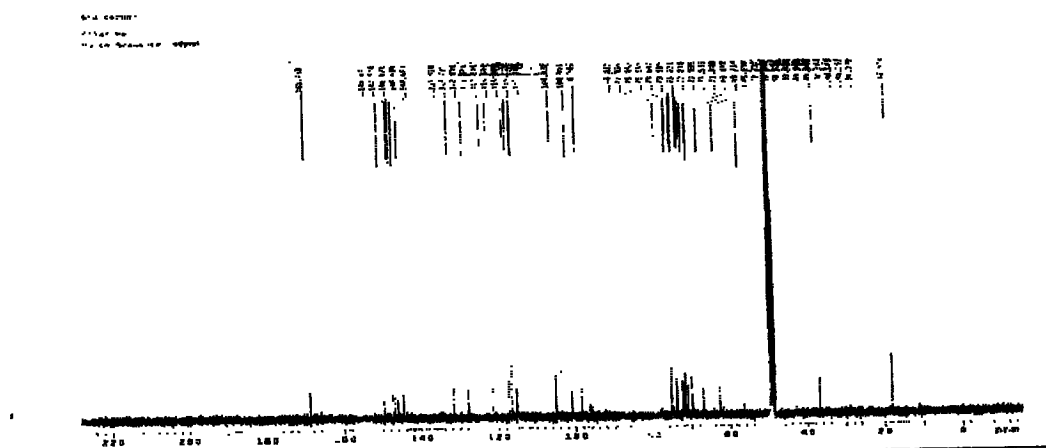


图 6

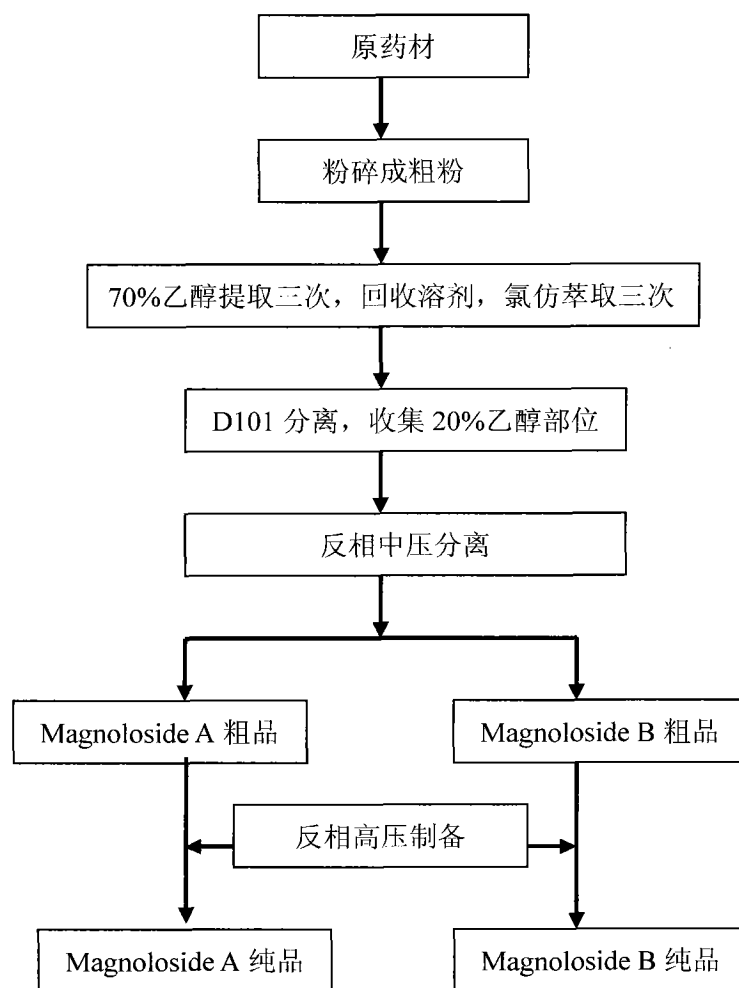


图 7