(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106420871 B
(45)授权公告日 2020.06.19

(21)申请号 201610862430.3

(22)申请日 2016.09.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106420871 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(73)专利权人 澳门大学
地址 中国澳门氹仔大学大马路

(72)发明人 万建波 刘放 张庆文

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 任岩

(51)Int.Cl.
A61K 36/258(2006.01)
C07J 17/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 101884655 A,2010.11.17,说明书第1页第0013段,说明书第2页第0017段,权利要求4,.
CN 105816471 A,2016.08.03,权利要求1-10.
CN 104435034 A,2015.03.25,权利要求1-11.
CN 1732964 A,2006.02.15,权利要求1.
CN 101323635 A,2008.12.17,权利要求1-6.
CN 104817609 A,2015.08.05,权利要求1-7.
CN 101884655 A,2010.11.17,说明书第1页第0013段,说明书第2页第0017段,权利要求4,.
CN 101049331 A,2007.10.10,权利要求1-5.
CN 1869050 A,2006.11.29,全文.

审查员 焦士勇

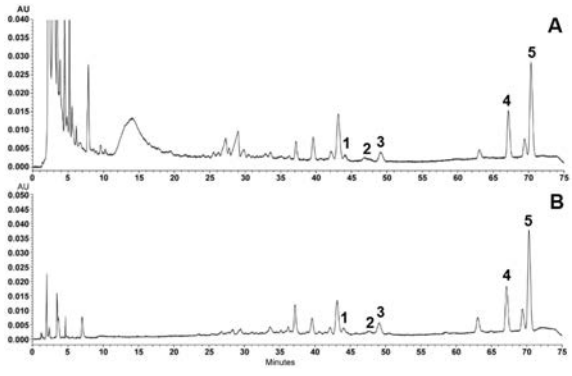
权利要求书2页 说明书4页 附图4页

(54)发明名称

富含Fe、Fd的三七总皂苷及其单体Fe和Fd的制备方法

(57)摘要

本发明提供一种富含Fe、Fd的三七总皂苷及其单体Fe和Fd的制备方法。所述制备方法包括步骤:(1)将三七药材加入温水中浸泡10～200min,然后加入乙醇水溶液或水进行提取,得到提取液,其中,所述三七药材包括三七叶和/或三七花;(2)将提取液上大孔吸附树脂柱,用乙醇水溶液洗脱,即得富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七总皂苷。本发明的制备方法能够大大提高稀有三七皂苷Fe和Fd在总皂苷中的含量,同时通过简单的分离纯化方法即可获得三七皂苷Fe和Fd单体。



CN 106420871 B

1.一种富含Fe、Fd的三七总皂苷的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1)将三七药材加入温水中浸泡10~200min，然后加入乙醇水溶液或水进行提取，得到提取液，其中，所述三七药材选自三七叶和/或三七花；所述温水的温度为40~50℃；

(2)将提取液上大孔吸附树脂柱，用乙醇水溶液洗脱，即得富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七总皂苷。

2.根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，步骤(1)中，所述三七药材为三七药材粉末。

3.根据权利要求2所述的制备方法，其特征在于，步骤(1)中，所述三七药材为20~60目的三七药材粉末。

4.根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，步骤(1)中，所述浸泡的时间为30~90min；

浸泡时，所述三七药材与温水的质量体积比为1:1~1:10。

5.根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，步骤(1)中，所述乙醇水溶液的浓度为70~90%，所述三七药材与所述乙醇水溶液的质量体积比为1:1~1:100。

6.根据权利要求5所述的制备方法，其特征在于，步骤(1)中，所述三七药材与所述乙醇水溶液的质量体积比为1:20~1:25。

7.根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，步骤(1)中，所述提取为渗漉提取、热回流提取和超声提取中的任一种；

所述提取的时间为1~6h。

8.根据权利要求7所述的制备方法，其特征在于，步骤(1)中，所述提取的时间为90~150min。

9.根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，步骤(2)中，在将提取液上大孔吸附树脂柱之前，还对所述提取液进行减压浓缩，之后将浓缩后的提取液上大孔吸附树脂柱；

若在步骤(1)中加入了乙醇水溶液进行提取，则对所述提取液进行减压浓缩至无醇味后，之后将浓缩后的提取液上大孔吸附树脂柱。

10.根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，步骤(2)中，所述大孔吸附树脂为X-5、AB-8、DM-301、NK-2、NKA-2、NK-9、D-101和WLD中的任一种。

11.根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，步骤(2)中，所述用乙醇水溶液洗脱是先以0~20%(v/v)乙醇水溶液洗涤，弃去洗液，再以40~100%(v/v)乙醇水溶液洗脱，收集洗脱液。

12.根据权利要求11所述的制备方法，其特征在于，步骤(2)中，在用乙醇水溶液洗脱之前，先用水洗至流出液为无色。

13.一种三七皂苷Fe和Fd单体的制备方法，其特征在于，还包括如下步骤：

(1)将三七药材加入温水中浸泡10~200min，然后加入乙醇水溶液或水进行提取，得到提取液，其中，所述三七药材选自三七叶和/或三七花；所述温水的温度为40~50℃；

(2)将提取液上大孔吸附树脂柱，用乙醇水溶液洗脱，即得富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七总皂苷；

(3)将步骤(2)所得的富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七总皂苷吸附于硅胶柱上，分别用氯仿-甲醇和乙酸乙酯-甲醇进行洗脱，分段收集合并三七皂苷Fe和Fd的流份，减压回收溶

剂至干,即得到三七皂苷Fe和Fd的单体。

14.根据权利要求13所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述氯仿-甲醇中,氯仿与甲醇的体积比为20:1~1:1;

所述乙酸乙酯-甲醇中,乙酸乙酯与甲醇的体积比为10:1~1:1。

富含Fe、Fd的三七总皂苷及其单体Fe和Fd的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于天然药物制备技术领域，具体涉及一种富含Fe、Fd的三七总皂苷及其单体Fe和Fd的制备方法。

背景技术

[0002] 三七为五加科植物三七[Panax notoginseng(Burk.)F.H.Chen]的干燥根，为我国名贵中药，其主要有效成分为皂苷类化合物，三七多以根或根茎入药。研究发现三七叶具有安神、降压、镇痛、消炎等功效，然而其利用率仅有5%，大部分可利用资源被丢弃。三七叶和三七花中含有大量达玛烷型原人参二醇型人参皂苷，以人参皂苷Rb_3、Rb_2和Rc为主要成分，而三七皂苷Fe和Fd的含量极低，因此其药理作用报道也很少。为了进一步开发三七叶/花及稀有人参皂苷，如何获得富含三七皂苷Fe和Fd的三七总皂苷、以及大量快速制备三七皂苷Fe和Fd化学单体是目前亟待解决的问题。

发明内容

[0003] 有鉴于此，本发明的目的是提供一种富含Fe、Fd的三七总皂苷及其单体Fe和Fd的制备方法。本发明的制备方法能够大大提高稀有三七皂苷Fe和Fd在总皂苷中的含量，同时通过简单的分离纯化方法即可获得高含量的三七皂苷Fe和Fd单体。

[0004] 为了实现上述目的，本发明提供一种富含Fe、Fd的三七总皂苷及其单体Fe和Fd的制备方法，包括如下步骤：

[0005] (1)将三七药材加入温水中浸泡10～200min，然后加入乙醇水溶液或水进行提取，得到提取液，其中，所述三七药材包括三七叶和/或三七花；

[0006] (2)将提取液上大孔吸附树脂柱，用乙醇水溶液洗脱，即得富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七总皂苷。

[0007] 其中，步骤(1)中，所述三七药材优选粉末状三七药材，即三七药材粉末，更优选规格为20～60目的三七药材粉末。

[0008] 所述温水的温度优选10～80℃，更优选40～70℃。

[0009] 所述浸泡的时间优选30～90min。

[0010] 浸泡时，所述三七药材与温水的质量体积比优选为1:1～1:10，此处，所述的质量体积比是本领域常规的含义，其单位可以是kg/L或g/mL，举例来说，1kg三七药材浸泡于1L温水的质量体积比即为1:1。

[0011] 步骤(1)中，所述乙醇水溶液的浓度为本领域常规所述，其浓度可以是0～100%(v/v)任意，优选70～90%，所述三七药材与所述乙醇水溶液的质量体积比优选为1:1～1:100，更优选1:20～1:25，此处，所述的质量体积比是本领域常规的含义，其单位可以是kg/L或g/mL，举例来说，1kg三七药材用1L乙醇水溶液提取的质量体积比即为1:1。

[0012] 步骤(1)中，所述提取为本领域常规的操作，优选渗漉提取、热回流提取和超声提取中的任一种；所述提取的时间优选1～6h，更优选90～150min。

[0013] 步骤(2)中，在将提取液上大孔吸附树脂柱之前，还优选对所述提取液进行减压浓缩，之后将浓缩后的提取液上大孔吸附树脂柱；若在步骤(1)中加入了乙醇水溶液进行提取，则优选对所述提取液进行减压浓缩至无醇味后，之后将浓缩后的提取液上大孔吸附树脂柱。

[0014] 步骤(2)中，所述大孔吸附树脂优选X-5、AB-8、DM-301、NK-2、NKA-2、NK-9、D-101和WLD中的任一种。

[0015] 步骤(2)中，所述用乙醇水溶液洗脱可为本领域常规，优选地，是先以0～20％(v/v)乙醇水溶液洗涤，弃去洗液，再以40～100％(v/v)乙醇水溶液洗脱，收集洗脱液。

[0016] 步骤(2)中，优选地，在用乙醇水溶液洗脱之前，先用水洗至流出液为无色。

[0017] 优选地，为了制得高含量的稀有三七皂苷Fe和Fd单体，所述富含Fe、Fd的三七总皂苷及其单体Fe和Fd的制备方法还包括如下步骤：

[0018] (3)将步骤(2)所得的富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七总皂苷吸附于硅胶柱上，分别用氯仿-甲醇和乙酸乙酯-甲醇进行洗脱，分段收集合并三七皂苷Fe和Fd的流份，减压回收溶剂至干，即得到三七皂苷Fe和Fd的单体。

[0019] 其中，所述氯仿-甲醇中，优选氯仿与甲醇的体积比为20:1～1:1；所述乙酸乙酯-甲醇中，优选乙酸乙酯与甲醇的体积比为10:1～1:1。

[0020] 本发明中，上述优选条件在符合本领域常识的基础上可任意组合，即得本发明各较佳实例。

[0021] 本发明所用的原料或试剂除特别说明之外，均市售可得。

[0022] 本发明取得了下述有益效果：

[0023] 采用本发明的制备方法获得的产品中总皂苷收率高，总皂苷含量可达84％(香草醛-高氯酸UV法)，主要含三七皂苷Fe和Fd等成分，且三七皂苷Fe和Fd的富集程度和含量较高，其中三七皂苷Fe含量可达5.1％(HPLC法)，三七皂苷Fd含量可达8.8％(HPLC法)，所分离得到的三七皂苷Fe和Fd单体纯度均在90％以上，由此可见本发明的工艺效率高、耗时少、低成本、高效率，利于产业化高质量生产。

附图说明

[0024] 图1是三七叶甲醇提取物(A)和水煎煮液(B)HPLC色谱图，其中1-3是人参皂苷Rc、Rb_2和Rb_3，4-5为三七皂苷Fe和Fd；

[0025] 图2A和图2B是水浸泡温度对转化效率的影响结果图；

[0026] 图3A和图3B是水浸泡时间对转化效率的影响结果图；

[0027] 图4是本发明实施例1中未经大孔吸附树脂处理的浓缩液(A)，及所制备得到富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七叶总皂苷组合物产品(B)的HPLC图，其中1-3为人参皂苷Rc、Rb_2和Rb_3，4-5为三七皂苷Fe和Fd；

[0028] 图5是本发明实施例1中分离得到的三七皂苷Fe(A)和三七皂苷Fd(B)单体HPLC色谱图。

具体实施方式

[0029] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白，以下结合具体实施例，并参照

附图，对本发明作进一步的详细说明。

[0030] 鉴于三七叶和三七花中含有大量达玛烷型原人参二醇型人参皂苷，以人参皂苷Rc、Rb_2和Rb_3为主要成分，而三七皂苷Fe和Fd的含量极低，因此其药理作用报道也很少。为了加强对于稀有三七皂苷Fe和Fd的研究，实有必要首先提高稀有三七皂苷Fe和Fd的含量并对其进行分离和富集。申请人在大量的实验探究过程中，惊喜地发现，若在对三七药材进行醇提(或不以醇进行提取)之前，先用温水对三七药材进行一定时间的浸泡，则有助于三七皂苷Fe和Fd的生成转化，提高稀有三七皂苷Fe和Fd的含量。进一步地，若将三七药材粉碎至一定目数的粉末，并优化温水的温度和浸泡时间，则Fe和Fd生成转化的效率能够进一步提高。申请人经过大量的探索实验并经反复的实验验证，终于得到本发明的实验条件，结果表明，在本发明的实验参数范围下，均能够取得理想的效果。

[0031] 申请人在前期研究中发现，三七叶甲醇或乙醇提取物中，三七皂苷Fe和Fd的含量极低，水煎煮液中三七皂苷Fe和Fd的含量有所提高，而人参皂苷Rc和Rb_3含量相应地减少，结果如图1所示。进一步的研究发现，在纯水的情况下，人参皂苷Rc和Rb_3在某种酶的作用下能够水解转化为三七皂苷Fe和Fd。申请人经过更进一步的研究发现，这种转化的效率跟温度有较大的相关性，经反复的实验验证发现50℃时的转化效率最高，而随着温度继续升高，则转化率开始慢慢下降，结果请见图2A和图2B。同时，申请人还对浸泡时间进行了考察，优化了浸泡时间，结果如图3A和图3B所示。

[0032] 实施例1

[0033] 将20g三七叶粉碎成40目粉末，加80mL的水在50℃下浸润0.5小时，然后加入400mL的70％乙醇回流提取60分钟，收集提取液，过滤，滤渣回收，继续加入400mL的70％乙醇回流提取60分钟，合并提取液，减压浓缩至相对密度为1.11；将浓缩液上D-101型大孔吸附树脂柱，其中大孔吸附树脂与浓缩液的体积比为2:1，柱径与柱高比为1:15，先用水洗至流出液为无色，再用15倍柱体积的20％乙醇冲洗，弃去冲洗液，最后用体积分数为60％的乙醇全部洗脱，收集洗脱液，回收溶剂至干即得富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七叶总皂苷组合物2.5g，经香草醛-高氯酸UV法检查，总皂苷纯度为84％。经HPLC法检查，其中三七皂苷Fe含量5.1％，三七皂苷Fd含量为8.8％。本实施例中，未经大孔吸附树脂处理的浓缩液(A)，及经过大孔吸附树脂处理制得的富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七叶总皂苷组合物产品(B)的HPLC色谱图如图4所示，其中1-3为人参皂苷Rc，Rb_2和Rb_3，4-5为三七皂苷Fe和Fd。

[0034] 将制得的总皂苷吸附于2倍量的硅胶上，挥发至干，备用；装柱，将总皂苷10倍量的柱层析硅胶，用氯仿湿法装柱，反复用洗脱剂洗脱，使硅胶充分下沉紧密；上样及洗脱，将样品慢慢加入层析柱中，用氯仿-甲醇(体积比5:1)等度洗脱，分段收集，每流份收集量为4倍柱体积，经薄层色谱检测后合并含有三七皂苷Fe和Fd的流份，减压回收溶剂至干，再用硅胶柱层析法，用乙酸乙酯-甲醇(体积比5:1)等度洗脱，分段收集，每流份收集量为3倍柱体积，经薄层色谱检测后分别合并三七皂苷Fe和Fd流份，减压回收溶剂至干，得到三七皂苷Fe 54.6mg和Fd 56.7mg。HPLC检测纯度各为90.6％和90.8％，分离得到的三七皂苷Fe(A)和三七皂苷Fd(B)单体的HPLC色谱图如图5所示。

[0035] 实施例2

[0036] 将10g三七花粉碎成50目粉末，加100mL水在40℃下浸润1.5小时，然后加入150mL 90％乙醇超声提取60分钟，收集提取液，过滤，减压浓缩至相对密度为1.15；将浓缩液上X-5

型大孔吸附树脂柱，其中大孔吸附树脂与浓缩液的体积比为1.5:1，柱径与柱高比为1:10，先用水洗至流出液为无色，再用10倍柱体积的20％乙醇冲洗，弃去冲洗液，最后用体积分数为70％的乙醇全部洗脱，收集洗脱液，回收溶剂至干即得富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七花总皂苷2.02g，经香草醛-高氯酸UV法检查，总皂苷纯度为64.7％。经HPLC法检查，其中三七皂苷Fe含量为4.23％，三七皂苷Fd含量为7.16％。

[0037] 将制得的总皂苷吸附于3倍量的硅胶上，挥发至干，备用；装柱，将总皂苷5倍量的柱层析硅胶，用氯仿湿法装柱，反复用洗脱剂洗脱，使硅胶充分下沉紧密；上样及洗脱，将样品慢慢加入层析柱中，用氯仿-甲醇(体积比20:1)等度洗脱，分段收集，每流份收集量为4倍柱体积，经薄层色谱检测后合并含有三七皂苷Fe和Fd的流份，减压回收溶剂至干，再用硅胶柱层析法，用乙酸乙酯-甲醇(体积比3:1)等度洗脱，分段收集，每流份收集量为3倍柱体积，经薄层色谱检测后分别合并三七皂苷Fe和Fd流份，减压回收溶剂至干得三七皂苷Fe 21.0mg和Fd 23.4mg。HPLC检测纯度各为82.1％和73.5％。

[0038] 实施例3

[0039] 将15g三七叶粉碎成60目粉末，加90mL水在70℃下浸润0.5小时，然后加入150mL 80％乙醇超声提取30分钟，收集提取液，过滤，滤渣回收，减压浓缩至相对密度为1.08；将浓缩液上DM-301型大孔吸附树脂柱，其中大孔吸附树脂与浓缩液的体积比为1:2，柱径与柱高比为1:12，先用水洗至流出液为无色，再用10倍柱体积的10％乙醇冲洗，弃去冲洗液，最后用体积分数为80％的乙醇全部洗脱，收集洗脱液，回收溶剂至干，即得富含稀有三七皂苷Fe和Fd的三七叶总皂苷3.10g，经香草醛-高氯酸UV法检查，总皂苷纯度为41.0％。经HPLC法检查，其中三七皂苷Fe含量4.24％，三七皂苷Fd含量8.24％。

[0040] 将制得的总皂苷吸附于5倍量的硅胶上，挥发至干，备用；装柱，将总皂苷15倍量的柱层析硅胶，用氯仿湿法装柱，反复用洗脱剂洗脱，使硅胶充分下沉紧密；上样及洗脱，将样品慢慢加入层析柱中，用氯仿-甲醇(体积比15:1)等度洗脱，分段收集，每流份收集量为4倍柱体积，经薄层色谱检测后合并含有三七皂苷Fe和Fd的流份，减压回收溶剂至干，再用硅胶柱层析法，用乙酸乙酯-甲醇(体积比10:1)等度洗脱，分段收集，每流份收集量为3倍柱体积，经薄层色谱检测后分别合并三七皂苷Fd和Fe流份，减压回收溶剂至干，得三七皂苷Fe 18.3mg和Fd 20.1mg。HPLC检测纯度各为81.3％和70.6％。

[0041] 上述实施例仅列举了部分适用于本发明技术方案的条件，如温水的温度、浸泡时间等，实际上，在本发明所附权利要求保护的范围内，皆能够取得理想的效果，即相比现有技术大幅度提高三七总皂苷中Fe和Fd的含量，在此不一一细举。

[0042] 以上所述的具体实施例，对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明，应理解的是，以上所述仅为本发明的具体实施例而已，并不用于限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

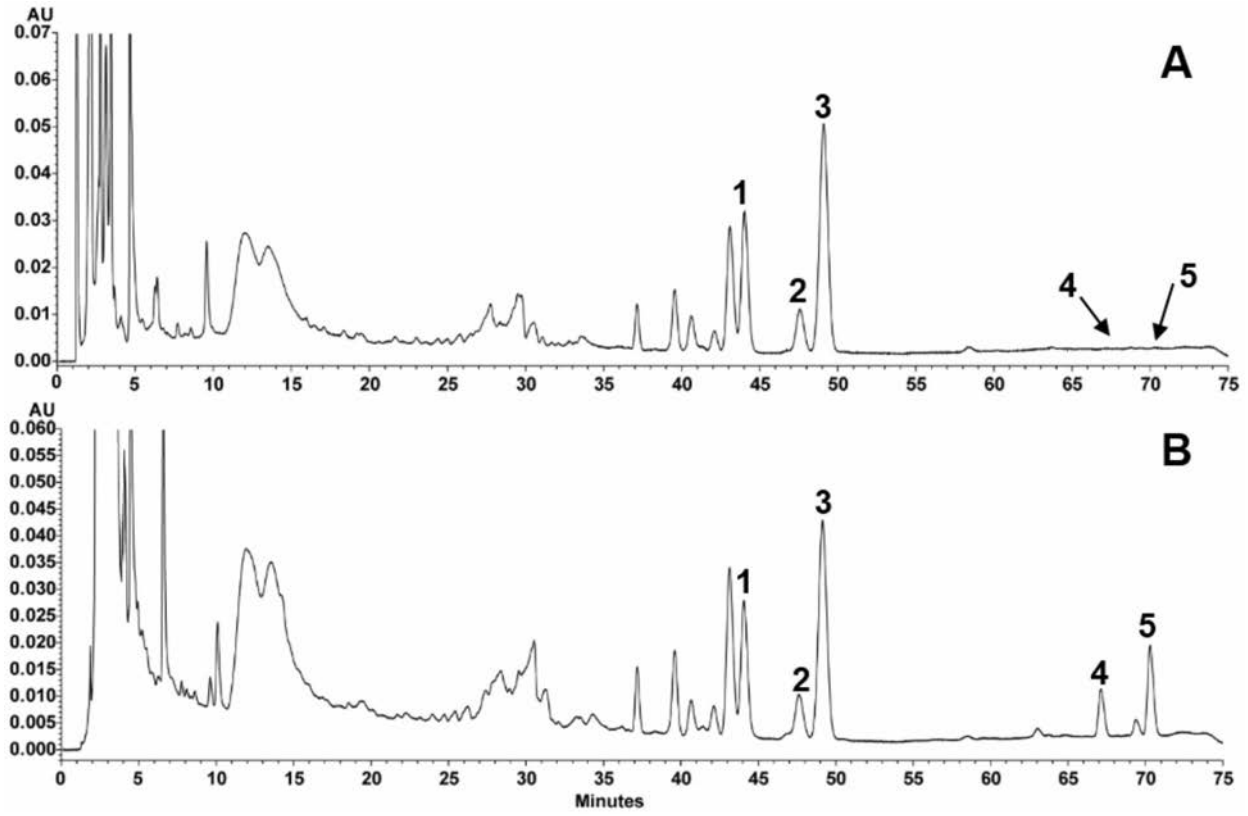


图1

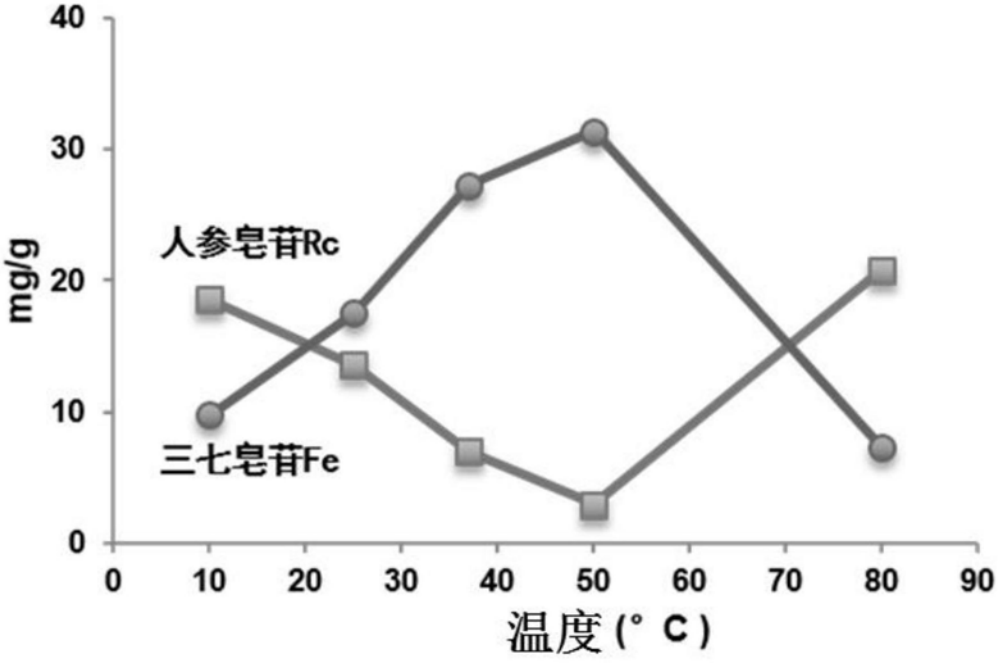


图2A

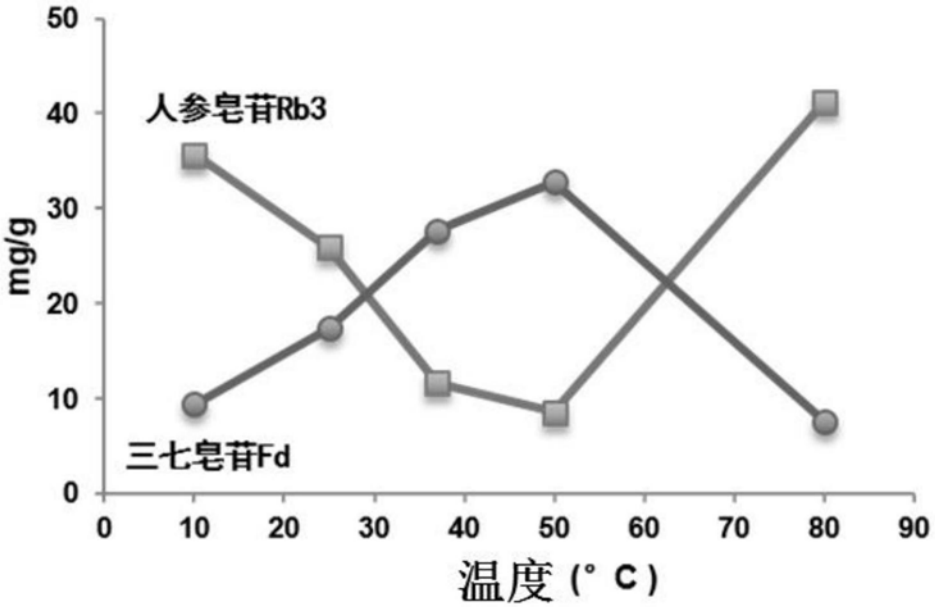

50
40
30
20
10
0
mg/g
人参皂苷Rb3
三七皂苷Fd
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
温度(°C)

图2B

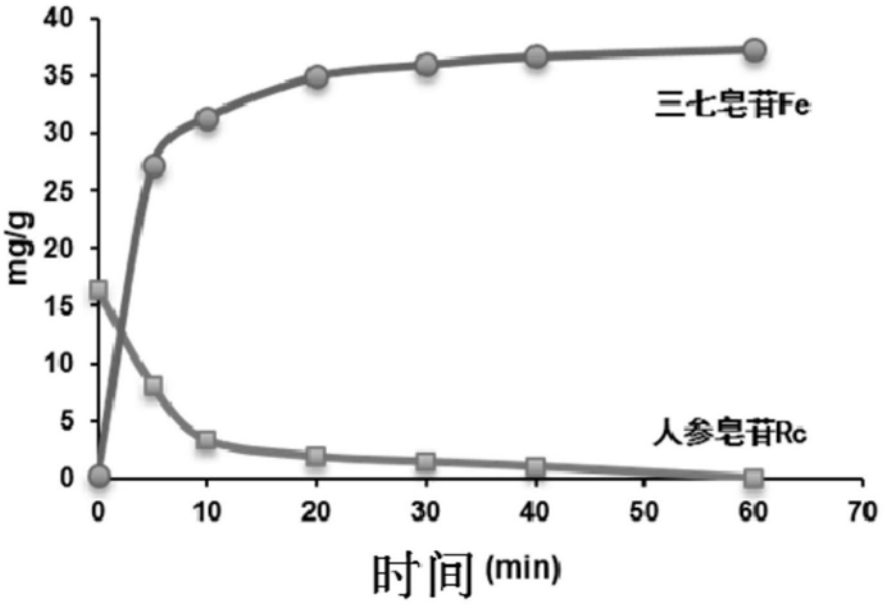

40
35
30
25
20
15
10
5
0
mg/g
三七皂苷Fe
人参皂苷Rc
0
10
20
30
40
50
60
70
时间(min)

图3A

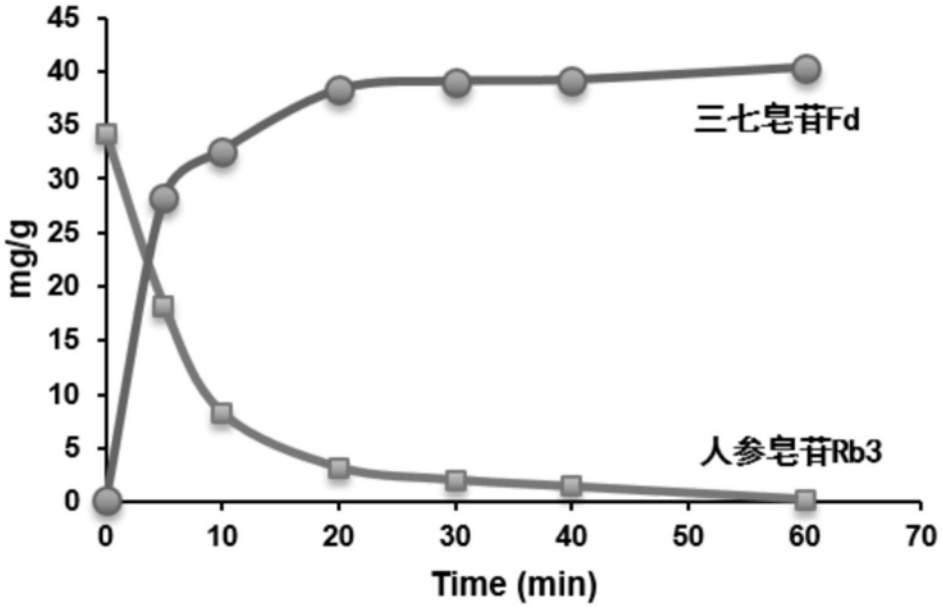


图3B

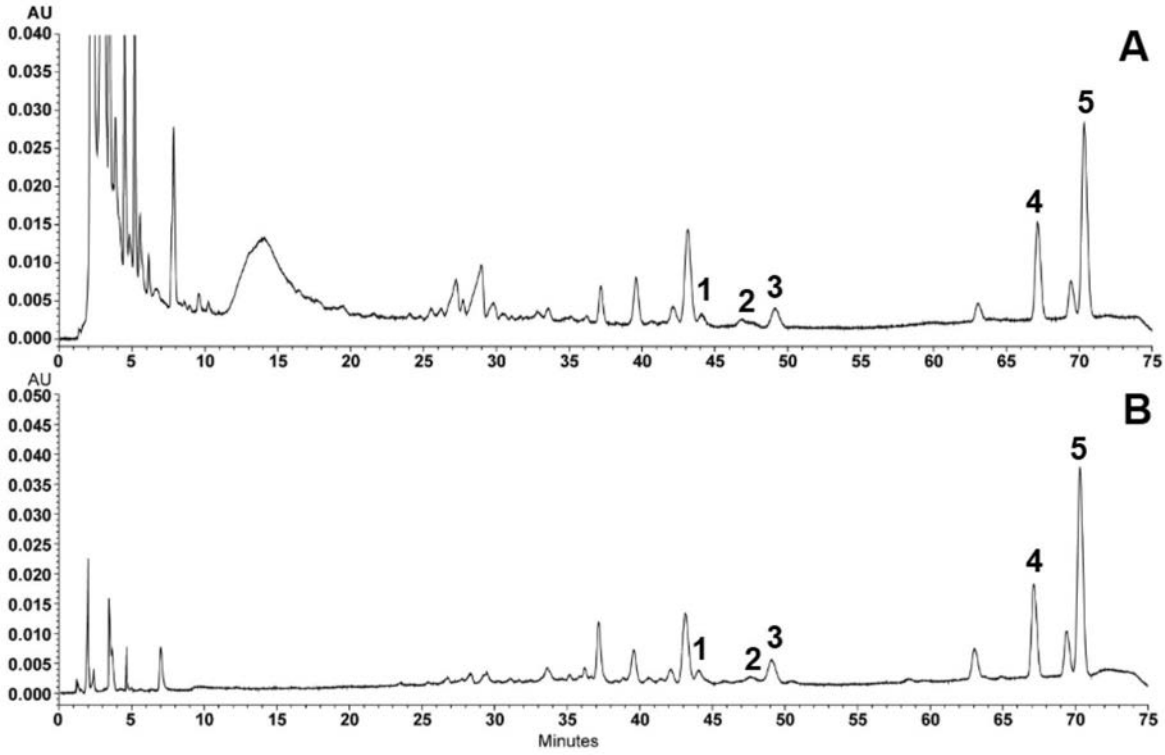


图4

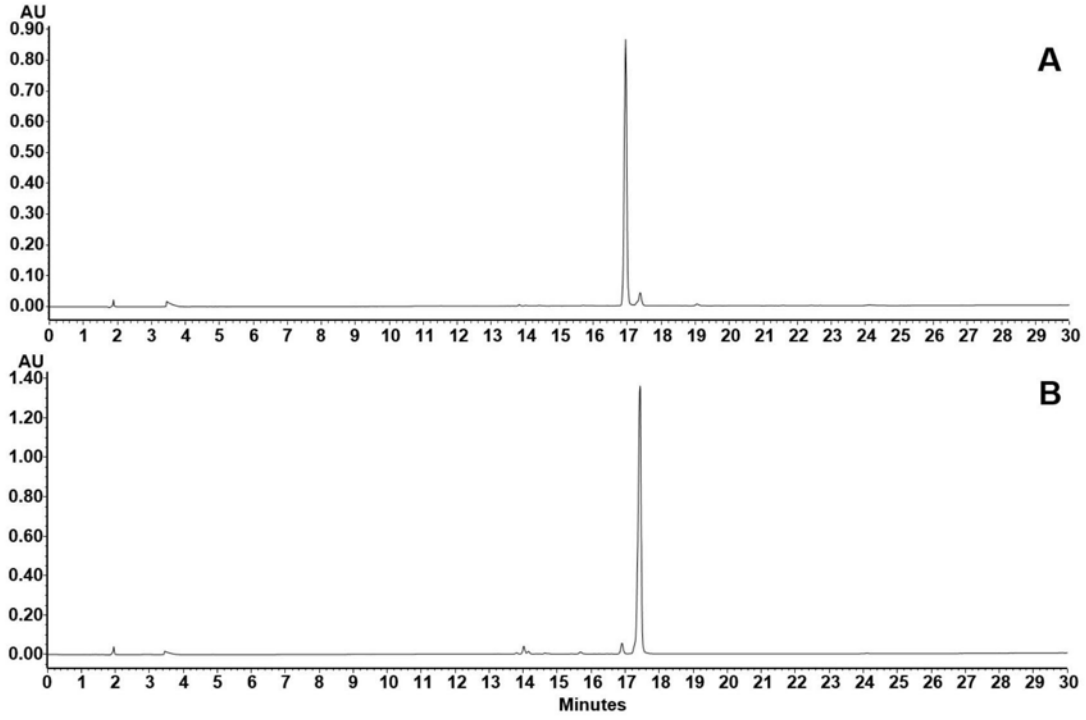

AU
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
A
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
AU
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
B
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Minutes

图5