



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104710501 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 17

(21) 申请号 201310691196. 9

(22) 申请日 2013. 12. 13

(71) 申请人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市中山路 457 号

(72) 发明人 肖红斌 洪志来 高明哲 卓荣杰

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 刘阳

(51) Int. Cl.

C07J 63/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种从雷公藤提取物中快速制备雷公藤红素
化学对照品的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种从雷公藤中快速制备高纯雷公藤红素化学对照品的新工艺。雷公藤药材经乙醇提取, 乙酸乙酯萃取、硅胶柱层析、高效制备色谱分离和凝胶纯化之后, 即可获得纯度大于 98% 的雷公藤红素化学对照品。本发明工艺步骤简单、易规模化生产, 并且纯度高。

1. 高效制备高纯的雷公藤红素化学对照品的方法,其特征在于:雷公藤药材经乙醇提取,乙酸乙酯萃取、硅胶柱层析、高效制备色谱分离和凝胶纯化,可获得纯度大于98%的雷公藤红素化学对照品。本发明步骤为:

1) 提取与萃取:

雷公藤药材,经乙醇提取,浓缩干燥后得到的总浸膏用水分散,得到总悬浮液;再将总悬浮液用乙酸乙酯萃取,浓缩干燥得乙酸乙酯萃取部位;

2) 硅胶柱层析分离:

将步骤1)中所得的乙酸乙酯萃取部位进行硅胶柱层析分离,石油醚-乙酸乙酯混合溶剂洗脱,洗脱液浓缩干燥得雷公藤红素组分;

3) 制备高效液相色谱纯化:

将步骤2)中所得的雷公藤红素组分用甲醇溶解,微孔滤膜过滤,即为供试品;将供试品用反相高效制备色谱分离,以甲醇-水溶液为洗脱体系,紫外检测器监测,收集雷公藤红素的色谱峰,流份浓缩干燥后得到雷公藤红素粗产物;

4) 凝胶纯化

将步骤3)中所得的雷公藤红素粗产物用甲醇溶解,经甲醇凝胶柱纯化,得到纯度大于98%雷公藤红素对照品。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤1)中提取时乙醇溶液的体积浓度为80%-100%。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤1)中分散时用的水的体积为总浸膏的4-5倍,萃取用的乙酸乙酯与总悬浮液的体积相同。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤2)中石油醚和乙酸乙酯的体积比例为4:1-1:1。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤2)中采用薄层色谱做指导收集流份,展开剂为石油醚-乙酸乙酯,石油醚-乙酸乙酯体积比为2:1,收集Rf值为0.4-0.6的洗脱物。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤3)中供试品溶液配置中,雷公藤红素组分浓度为50-150mg/mL。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤3)中反相高效液相制备色谱的流动相中,甲醇的体积分数为80%-90%,用甲酸调节至pH=4。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤3)反相高效液相制备中进样体积为5-10mL,流速控制在80-180mL/min。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤3)反相高效液相制备中采用275-425nm监测。

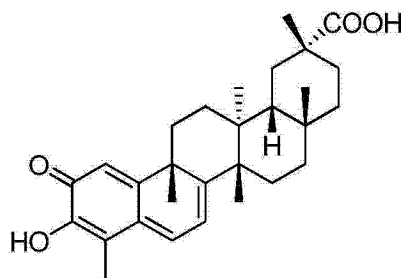
10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤4)纯化用的凝胶为Sephadex LH-20。

一种从雷公藤提取物中快速制备雷公藤红素化学对照品的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从雷公藤中快速制备雷公藤红素化学对照品的制备新工艺。主要包括提取与萃取、硅胶柱分离、快速的高效液相制备以及凝胶精制。雷公藤红素的结构式如下：

[0002]



雷公藤红素

背景技术

[0003] 在传统医学中,雷公藤为雷公藤属常用的药用植物,常用于治疗类风湿性关节炎、皮肤发痒、腰带疮和麻风反应。现代药理实验表明雷公藤有抗炎、抗氧化、免疫抑制、抗生育、抗菌、止痛、抗肿瘤等作用。雷公藤红素 (tripterine), 又称南蛇藤素 (celastrol), 红色针状晶体, 为一降碳五环三萜, 广泛分布于卫矛科雷公藤属和南蛇藤属药用植物的根部中。雷公藤红素是雷公藤中的主要药效成分之一, 药理活性丰富、主要有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抑制血管生成、诱导细胞凋亡等活性, 尤其是抗肿瘤活性引起了极大的研究兴趣, 具有广泛的开发应用前景。同时雷公藤红素又是雷公藤中一种的毒性成分, 因此制备高纯度雷公藤红素对于更深入研究其药理活性及相关药材或中成药的质量控制具有重要意义。

[0004] 目前, 制备雷公藤红素的方法报道较多, 提取的方法主要为有机溶剂、超声提取, 超临界 CO₂ 萃取, 纯化的方式基本采用有机溶剂萃取、传统硅胶或氧化铝柱层析, 再用混合有机溶剂重结晶 (中国发明专利 CN101311186A、CN101830960A); 还有用植物组织培养的方法来制备雷公藤红素 (美国专利 US4328309A); 少量使用反相 C18 或 C8 硅胶柱色谱纯化的文献 (中国发明专利 CN101638425A); 少量使用反相高效制备液相色谱对雷公藤红素提取和纯化的探讨 (中南大学硕士论文, 陈兰, 2010)。在已有的这些方法中, 采用重结晶制备的都使用了大量的卤代烃, 且纯度不能保证, 而采用反相 C18 或 C8 硅胶纯化和反相高效制备液相色谱一般为分析规模及半制备规模, 制备通量很小。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供一种快速获得高纯雷公藤红素对照品的高效制备工艺, 其制备规模达到克级。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:雷公藤药材用乙醇提取,经乙酸乙酯萃取、硅胶柱层析分离及制备高效液相色谱和凝胶纯化之后,可快速获得纯度大于 98% 的雷公藤红素化学对照品,其具体步骤如下:

[0007] 1) 提取与萃取:

[0008] 雷公藤药材,粉碎,用乙醇溶液提取,减压浓缩干燥后得到总浸膏,将总浸膏用水分散,得到的总悬浮液再用乙酸乙酯萃取,浓缩干燥后得乙酸乙酯萃取部位。

[0009] 2) 硅胶柱层析分离:

[0010] 乙酸乙酯萃取部位进行硅胶柱层析分离,石油醚-乙酸乙酯混合溶剂洗脱,薄层色谱检测,收集 Rf 值在 0.4-0.6 的洗脱液,洗脱液浓缩干燥得雷公藤红素组分。

[0011] 3) 制备高效液相色谱纯化:

[0012] 雷公藤红素组分用甲醇溶解,微孔滤膜过滤,反相高效制备色谱分离,以甲醇-水溶液为洗脱体系,紫外检测器监测,收集雷公藤红素的色谱峰,流份浓缩干燥后得到雷公藤红素粗产物。

[0013] 4) 凝胶纯化

[0014] 雷公藤红素粗产物用甲醇溶解,经甲醇凝胶柱纯化之后,得到纯度大于 98% 雷公藤红素对照品。

[0015] 所述步骤 1) 的具体过程为:雷公藤根部,粉碎后用体积分数为 80%-100% 的乙醇溶液常温下提取,提取 1-3 次,合并提取液,减压浓缩干燥后得到总浸膏。将总浸膏用水分散,分散时用的水的体积为总浸膏体积的 4-5 倍,萃取用的乙酸乙酯与总悬浮液的体积相当,萃取 1-3 次。合并萃取液,减压浓缩干燥后得到乙酸乙酯萃取部位。

[0016] 所述步骤 2) 的具体过程为:硅胶柱层析采用的洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯的混合溶剂,其体积比例为 4:1-1:1;薄层色谱采用的薄层板为 GF254 荧光板,展开剂为石油醚和乙酸乙酯的混合溶液,其体积比例为 2:1-1:1,紫外灯 254nm 处检视暗斑点,收集 Rf 值在 0.4-0.6 的洗脱液,洗脱液浓缩干燥得雷公藤红素组分。

[0017] 所述步骤 3) 的具体过程为:雷公藤红素组分用甲醇溶解,配置样品浓度为 50-150mg/mL;制备色谱柱的填充填料为 C18,制备柱长 20-22cm、直径 5-7.5cm;采用的流动相为体积分数为 80%-90% 的甲醇水溶液,用甲酸调节至 pH=4;进样体积为 5-10mL,流速控制在 80-180mL/min。

[0018] 所述步骤 4) 的具体过程为:凝胶的型号为 Sephadex LH-20,根据颜色来收集流分,浓缩干燥得到雷公藤红素纯品。

[0019] 为确证本发明所制备的对照品的结构,雷公藤红素测试了 UV、MS、MS/MS、HR-MS、¹H NMR、¹³C NMR 等。

[0020] 本发明从雷公藤乙醇提取物中分离雷公藤红素化学对照品具有如下优点和进步:

[0021] 1. 在以往的工艺中,提取或者萃取或者分离的过程中都使用了大量的卤代烃,而在本发明中仅使用甲醇、乙醇、石油醚和乙酸乙酯等安全且简单易得的有机溶剂。

[0022] 2. 本发明工艺非常适宜规模化工业生产。反相高效液相制备方法为快速制备方法,一次进样分离时间在 16 分钟,适合大批量化学对照品的制备;高效制备之后再使用凝胶纯化,通过几种不同的纯化手段相结合,进一步提高了化学对照品的纯度;所用流动相甲

醇含量较高,可实现制备溶剂的快速回收利用,降低批量制备的成本。

附图说明

[0023] 图 1 为制备高效液相的制备色谱图 (275nm) ;

[0024] 图 2 为雷公藤红素的 HPLC 分析图谱 (425nm) ;

[0025] 图 3 为雷公藤红素的 ^1H NMR 图谱 ;

[0026] 图 4 为雷公藤红素的 ^{13}C NMR 图谱。

具体实施方式

[0027] 现结合实施例和附图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] 实施例 1

[0029] 1) 乙酸乙酯萃取

[0030] 雷公藤根部 500g,用 1500mL 的无水乙醇提取 3 次,每次 3 小时,合并三次提取液,减压回收得到总浸膏约 31g,用约 120mL 的水分散,再用乙酸乙酯萃取 3 次,每次约用 150mL。合并萃取液,减压回收得到乙酸乙酯部位约 15g。

[0031] 2) 硅胶柱层析分离

[0032] 乙酸乙酯部位浸膏 15g,加入约 15g 硅胶拌匀,减压干燥,硅胶减压层析 (40cm*5cm) 分离,分别用 5 倍柱体积的石油醚:乙酸乙酯 (体积比 4:1)、石油醚:乙酸乙酯 (体积比 2:1)、石油醚:乙酸乙酯 (体积比 1:1) 台阶梯度洗脱,薄层色谱检测,以石油醚:乙酸乙酯 (体积比 2:1) 为展开剂,GF254 荧光板,紫外灯 254nm 处检视暗斑点,收集 Rf 值为 0.4 的洗脱液,浓缩干燥得到雷公藤红素组分约 5g。

[0033] 3) 反相高效制备液相色谱纯化

[0034] 雷公藤红素组分用纯甲醇溶解,配置成 50mg/mL 的供试品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤;制备型高效液相柱填料品牌为 Chromatorex C18 键合相填料;粒径为 9 μm ,柱长 20cm、直径 5cm;进样体积为 5mL,以 pH=4(加入甲酸调节)、体积浓度 90% 甲醇-水溶液为洗脱体系,流速控制在 80mL/min,紫外检测器 275nm 检测,收集保留时间为 11.2-12.3min 的流份,干燥得到雷公藤红素粗产品约 1.3g。制备色谱图见图 1。

[0035] 4) 凝胶纯化

[0036] 将雷公藤红素粗产品用甲醇溶解,使用 Sephadex LH-20 凝胶柱 (120cm*3cm) 纯化,洗脱溶剂为纯甲醇,流速控制为 30mL/h,根据洗脱液的颜色收集流分。减压干燥得到纯度大于 98% 的雷公藤红素标准品 1.1g。雷公藤红素对照品纯度分析图谱见图 2, ^1H NMR 见图 3, ^{13}C NMR 见图 4。

[0037] 实施例 2

[0038] 1) 乙酸乙酯萃取

[0039] 雷公藤根部 1000g,用 3000mL 的 80% 乙醇/水提取 1 次,提取时间为 3 小时,减压回收得到总浸膏约 52g,用约 250mL 的水分散,再用乙酸乙酯萃取 1 次,约用 300mL。减压回收得到乙酸乙酯部位约 26g。

[0040] 2) 硅胶柱层析分离

[0041] 乙酸乙酯部位浸膏 26g, 加入约 26g 硅胶拌匀, 减压干燥, 硅胶减压层析 (45cm*6cm) 分离, 分别用 5 倍柱体积的石油醚: 乙酸乙酯 (体积比 4:1)、石油醚: 乙酸乙酯 (体积比 2:1)、石油醚: 乙酸乙酯 (体积比 1:1) 台阶梯度洗脱, 薄层色谱检测, 以石油醚: 乙酸乙酯 (体积比 2:1) 为展开剂, GF254 荧光板, 紫外灯 254nm 处检视暗斑点, 收集 Rf 值为 0.4 的洗脱液, 浓缩干燥得到雷公藤红素组分约 8g。

[0042] 3) 反相高效制备液相色谱纯化

[0043] 红色浸膏用纯甲醇溶解, 配置成 150mg/mL 的供试品溶液, 经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤; 制备型高效液相柱填料品牌为 Chromatorex C18 键合相填料; 粒径为 9 μ m, 柱长 22cm、直径 7.5cm; 进样体积为 10mL, 以 pH=4 (加入甲酸调节)、体积浓度为 80% 甲醇-水溶液为洗脱体系, 流速控制在 180mL/min, 紫外检测器 425nm 检测, 收集保留时间为 15.0-16.0min 的流份, 干燥得到雷公藤红素粗产品 2.3g。

[0044] 4) 凝胶纯化

[0045] 将雷公藤红素粗产品用甲醇溶解, 使用 Sephadex LH-20 凝胶柱 (120cm*3cm) 纯化, 洗脱溶剂为纯甲醇, 流速控制为 30mL/h, 根据洗脱液的颜色收集流分。减压干燥得到纯度大于 98% 的雷公藤红素标准品约 1.7g。

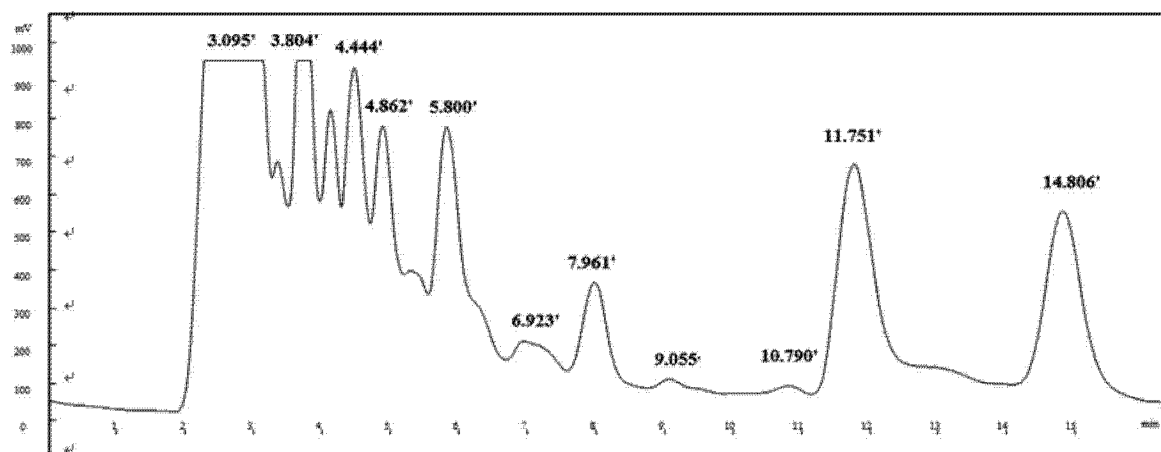


图 1

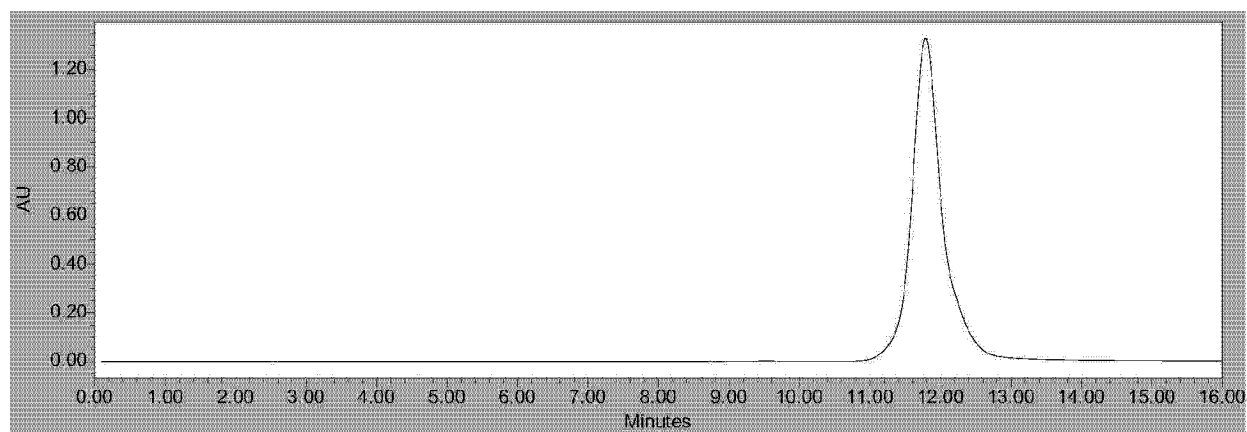


图 2

