



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105061212 B

(45)授权公告日 2018.03.09

(21)申请号 201510498084.0

C07C 67/48(2006.01)

(22)申请日 2015.08.13

C07C 67/56(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 张保集

申请公布号 CN 105061212 A

(43)申请公布日 2015.11.18

(73)专利权人 江苏康缘药业股份有限公司

地址 222047 江苏省连云港市连云港经济
技术开发区江宁工业城

(72)发明人 萧伟 倪付勇 刘露 宋亚玲

赵祎武 黄文哲 王振中 周习

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 赵青朵

(51)Int.Cl.

C07C 69/732(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

一种新绿原酸的制备方法

(57)摘要

本发明涉及化学领域,特别涉及一种新绿原酸的制备方法。该制备方法采用金银花用乙醇回流提取,过滤,浓缩,大孔吸附树脂分离,乙醇-水梯度洗脱。HPLC分析检测,收集新绿原酸洗脱部位。再利用中低压制备色谱仪进行快速制备达克级以上。同时对其进行结构鉴定及纯度检测,其纯度达98.86%。该方法制备的新绿原酸达到了含量测定用对照品的要求,为大量制备高纯度的新绿原酸提供了一种新方法。

1. 一种新绿原酸的制备方法,其特征在于,由如下步骤组成:

步骤a:获得金银花提取物;

步骤b:取所述金银花提取物经HPD200A型大孔吸附树脂柱分离,获得洗脱液;

步骤c:取所述洗脱液,用中低压制备液相色谱仪分离纯化,流动相为乙腈-0.5%甲酸水(v/v)梯度洗脱,获得新绿原酸;所述中低压制备色谱的检测波长为240~360nm;

步骤a中所述金银花提取物的提取方法为取金银花与乙醇回流提取,过滤,获得滤液;所述金银花与所述乙醇的质量体积比为1:(10~30);所述乙醇为乙醇的水溶液,所述乙醇的水溶液中乙醇的体积百分含量为50%~95%;

步骤b中所述经HPD200A型大孔吸附树脂柱分离具体为:按料液比1g:10~20mL,上大孔树脂柱,先用水洗脱,再用10~95%的乙醇梯度洗脱;收集含有新绿原酸粗品的水洗脱部位,流速2~4BV/h,洗脱5~10BV;

步骤c中所述中低压制备色谱的洗脱系统为乙腈-0.5%甲酸水(v/v)溶液,所述乙腈与0.5%甲酸水溶液的体积比为10:90。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤b中所述树脂柱分离的洗脱溶剂为水或乙醇。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,步骤c中所述中低压制备色谱的检测波长为326nm。

4. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,步骤a中所述金银花提取物的提取方法为:

步骤a1:取金银花与50%~95%的乙醇的水溶液回流提取,过滤,获得滤液,减压浓缩至25℃时的相对密度为1.05g·ml⁻¹;

步骤a2:再与乙醇混合至乙醇的体积分数为80%,静置,过滤,收集滤液减压浓缩至无醇味;

步骤a3:取步骤a2所述滤液与水按照体积比为1:1混合,静置过夜,过滤,获得滤液。

一种新绿原酸的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学领域,特别涉及一种新绿原酸的制备方法。

背景技术

[0002] 新绿原酸是从忍冬科植物忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.) 的干燥花蕾即金银花 (*Flos Lonicerae japonicae*) 中提取精制得到的产品,是单咖啡酰奎宁酸类化合物,是金银花中的主要有机酸类成分之一。咖啡酰奎宁酸类化合物是一类由奎宁酸和不同数目的咖啡酸通过酯化反应缩合而成的酚酸类天然化合物,这类化合物广泛存在于植物之中,具有显著的抗氧化活性、抗微生物作用、酶抑制作用、肝细胞保护作用、抑制血小板聚集等作用。咖啡酰奎宁酸类化合物在植物中分布广泛,并具体有多种药理活性,相信随着对咖啡酰奎宁酸类化合物研究的深入和发展将会成为新药开发的一个热点。因此,新绿原酸作为咖啡酰奎宁酸类化合物具有很大的开发应用前景,对新绿原酸的分离和纯化成为其深度开发的关键技术。

[0003] 目前,文献中没有关于新绿原酸的规模制备方法,有文献报道通过多次的高效制备液相分离从金银花中得到新绿原酸20.7mg;在忍冬叶提取物正丁醇部位通过MCI填料进行多次富集,再经过Sephadex LH-20凝胶色谱进一步分离,最后运用制备型高效液相从金银花中分离得到新绿原酸32mg;在肿节风提取物中通过运用反复硅胶柱层析及Sephadex LH-20凝胶色谱分离,再利用制备液相分离纯化得到新绿原酸5mg;在山牡荆树干心中通过运用反复硅胶、Sephadex LH-20凝胶色谱及反相C₁₈分离得到新绿原酸5mg。这些都是在实验室条件下利用反复常压硅胶柱、凝胶及半制备液相对新绿原酸进行分离纯化;另外,因其制备的新绿原酸的量都是毫克级,所以,其工序过程很难具备放大生产的可能性,即使可以获得克级的样品,也会因工序繁琐、制备时间长、消耗有机溶剂多而增加其生产成本。

[0004] 因此,为了更好的开发利用新绿原酸,在现有技术的基础之上,研究开发一种制备效率高,速度快,生产成本低,无需使用大量的有机溶剂,从金银花中快速进行新绿原酸的制备方法具有重要的现实意义。本方法首先采用大孔树脂富集新绿原酸粗品,然后利用中低压制备液相快速分离纯化获得高质量分数的新绿原酸单体。其优点在于:a,从过程上来讲,本实验由提取、富集、纯化三步完成,不涉及反复硅胶柱层析,避免了大量有机溶剂的使用,减少污染,降低成本,缩短时间;b,从制备量和纯度上来讲,30min内一次制备就可以达到克级,且制备的纯度高达98.86%,目前未见有从金银花中制备高质量分数的新绿原酸及短时间内一次制备达到克级的专利文献和非专利文献报道。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供一种新绿原酸的制备方法。该方法制得的新绿原酸的纯度达98.86%,达到了含量测定用对照品的要求;同时一次制备所得新绿原酸产品重量达到克级以上,为大量制备高纯度的新绿原酸提供了一种新方法。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种新绿原酸的制备方法,包括如下步骤:

[0008] 步骤a:获得金银花提取物;

[0009] 步骤b:取所述金银花提取物经树脂柱分离,获得洗脱液;

[0010] 步骤c:取所述洗脱液,用中低压制备液相分离纯化,流动相为乙腈-0.5%甲酸水(v/v)梯度洗脱,获得新绿原酸;所述中低压制备色谱的检测波长为240~360nm。

[0011] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤b中所述树脂柱分离的树脂为非极性树脂。

[0012] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤b中所述树脂柱分离的树脂为HPD200A型大孔吸附树脂。

[0013] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤b中所述树脂柱分离的洗脱溶剂为水或乙醇。

[0014] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤b中所述经树脂柱分离具体为:按料液比1g:10~20mL,上大孔树脂柱,先用水洗脱,再用10~95%的乙醇梯度洗脱。收集含有新绿原酸粗品的水洗脱部位,流速2~4BV/h,洗脱5~10BV。

[0015] 中低压制备色谱技术也被称为闪式制备色谱技术,分离速度快、效率高,可在短时间内制备毫克到数十甚至达百克的样品。不但可以应用于正相填料也可以应用于反相填料。与常压柱色谱相比,具有分辨率高、分离速度快的优势,与高效制备液相相比,具有制备量大、时间短的特点。同时可以自主填充分离柱的填料,增加分离选择性,节约生产成本。使其在天然产物分离纯化研究工作中发挥重要的作用。在本发明的一些具体实施方案中,步骤c中所述纯化为中低压制备色谱纯化,所述中低压制备色谱的检测波长为240~360nm。

[0016] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤c中所述中低压制备色谱的检测波长为326nm。

[0017] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤c中所述中低压制备色谱的洗脱系统为乙腈-0.5%甲酸水(v/v)溶液,所述乙腈与0.5%甲酸水溶液的体积比为10:90。

[0018] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤a中所述金银花提取物的提取方法为取金银花醇提,过滤,获得滤液。

[0019] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤a中所述金银花提取物的提取方法为取金银花与乙醇回流提取,过滤,获得滤液。

[0020] 在本发明的一些具体实施方案中,以g/mL计,步骤a中所述金银花与所述乙醇的质量体积比为1:(10~30);所述乙醇为乙醇的水溶液,所述乙醇的水溶液中乙醇的体积百分含量为50%~95%。

[0021] 在本发明的一些具体实施方案中,该制备方法采用金银花用10-30倍量50%-95%乙醇回流提取,过滤,浓缩,HPD200A大孔吸附树脂分离,乙醇-水梯度洗脱。HPLC分析检测,收集新绿原酸洗脱部位。再利用Reveleris中低压制备色谱仪(美国GRACE公司)进行快速制备达克级以上。同时对其进行结构鉴定及纯度检测,其纯度达98.86%。

[0022] 在本发明的一些具体实施方案中,步骤a中所述金银花提取物的提取方法为:

[0023] 步骤a1:取金银花与50~95%(体积分数)的乙醇回流提取,过滤,获得滤液,减压浓缩至25℃时的相对密度为1.05g·mL⁻¹;

[0024] 步骤a2:再与乙醇混合至乙醇的体积分数为80%,静置,过滤,收集滤液减压浓缩至无醇味;

[0025] 步骤a3:取步骤a2所述滤液与水按照体积比为1:1混合,静置过夜,过滤,获得滤液。

[0026] 具体的,取金银花用10倍量50~95%乙醇回流提取两次(2h/次),滤过,合并两次滤液浓缩至小体积,上HPD200A大孔树脂,依次用水、20%、40%、95%的乙醇洗脱。经HPLC分析,新绿原酸主要集中在水洗脱部位。然后利用Reveleris中低压制备色谱仪(美国GRACE公司)进行快速制备达克级以上。同时对其进行结构鉴定及纯度检测,其纯度达98.86%。

[0027] 具体的,本发明提供了一种新绿原酸的制备方法,包括如下步骤:步骤a:将金银花药材,按料液比1g:10~30mL加入浓度为50%~95%乙醇作为提取剂,加热回流提取两次(2h/次),过滤,取上清液浓缩干燥,获得富含新绿原酸的金银花乙醇浸膏(相对于金银花药材,转移率为90.5~95.6%);

[0028] 步骤b:将上述金银花乙醇浸膏充分分散于蒸馏水中,按料液比1g:10~20mL,上大孔树脂柱,先用水洗脱,再用10~95%的乙醇梯度洗脱。收集含有新绿原酸粗品的水洗脱部位,流速2~4BV/h,洗脱5~10BV。浓缩、干燥,获得新绿原酸粗品(纯度为30.6~38.9%);

[0029] 步骤c:取上述新绿原酸粗品,用中低压制备液相分离纯化,流动相为0.5%甲酸水溶液和乙腈,梯度洗脱,快速纯化,获得新绿原酸单体(纯度为98.0~99.0%)。

[0030] 本发明提供的新绿原酸的制备方法采用金银花用10倍量70%乙醇回流提取两次(2h/次),滤过,合并两次滤液浓缩至小体积,上HPD200A大孔树脂,依次用水、20%、40%、95%的乙醇洗脱。经HPLC分析,新绿原酸主要集中在水洗脱部位。然后利用Reveleris中低压制备色谱仪(美国GRACE公司)进行快速制备达克级以上。同时对其进行结构鉴定及纯度检测,其纯度达98.86%,色谱图见图4,ESI-MS图见图6。该方法制备的新绿原酸达到了含量测定用对照品的要求,为大量制备高纯度的新绿原酸提供了一种新方法。

附图说明

[0031] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0032] 图1示新绿原酸制备流程图;

[0033] 图2示金银花提取液HPLC色谱图;峰1为新绿原酸;

[0034] 图3示HPD200A纯化后的HPLC色谱图;峰1为新绿原酸;

[0035] 图4示中低压制备色谱纯化后新绿原酸HPLC色谱图;峰1为新绿原酸;

[0036] 图5示新绿原酸对照品图;峰1为新绿原酸;

[0037] 图6示新绿原酸ESI-MS;

[0038] 图7新绿原酸对照品紫外扫描色谱图;

[0039] 图8新绿原酸粗品紫外扫描色谱图;

[0040] 图9示新绿原酸制备HPLC图。

具体实施方式

[0041] 本发明公开了一种新绿原酸的制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进

行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0042] 本发明提供的新绿原酸的制备方法中所用原料及试剂均可由市场购得。其中,Reveleris中低压制备色谱仪(美国GRACE公司),适用于4g-330g中压制备色谱柱。

[0043] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0044] 实施例1

[0045] 1、提取工艺

[0046] 取金银花10.0kg,依次用10倍量70%乙醇回流提取两次(2h/次),滤过,滤液减压浓缩至相对密度 $1.05\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (25℃)。搅拌加入乙醇至乙醇体积分数为80%,静置过夜,滤过,滤液减压浓缩至无醇味,加水稀释至1:1,静置过夜,滤过,弃去不溶物,得滤液备用。

[0047] 2、树脂型号的筛选

[0048] 选取4种经预处理的树脂各5g(HPD200A、D101、HP20、AB-8)置100mL具塞锥形瓶中,取金银花提取浓缩液加入瓶中,于室温静置24h,吸附平衡后,滤去树脂,定量移取清液,测定新绿原酸的含量,计算吸附率。结果见表1。

[0049] 表1不同型号树脂的吸附率

[0050]

组别	HPD200A	D101	HP20	AB-8
吸附率(%)	1.2%	15.3%	28.7%	23.5%

[0051] 说明HPD200A对新绿原酸几乎无吸附,因此其水洗部位新绿原酸含量较高,故选择HPD200A型大孔吸附树脂为应用树脂。

[0052] 3、洗脱溶剂的选择

[0053] 按照优选的HPD200A树脂平行取5份进行样品吸附后,分别用水、10%、20%、30%、40%乙醇溶液进行洗脱,HPLC跟踪检测,计算洗脱率,流出液减压浓缩并干燥,测定新绿原酸含量,结果见表2。

[0054] 表2不同浓度乙醇对新绿原酸的洗脱率和含量

[0055]

组别	水	10%	20%	30%	40%
洗脱率(%)	97.6%	98.1	98.5	98.8	98.8
含量(%)	75.6%	58.4	47.2	23.6	10.3

[0056] 由表2可知,水洗脱液的新绿原酸含量最高,10%、20%、30%和40%乙醇洗脱液可将新绿原酸几乎全洗下来,但同时洗脱下来的杂质也多,结合成本考虑,故选择水作为洗脱溶剂。

[0057] 4、树脂柱分离

[0058] 树脂预处理:选用HPD200A型大孔树脂用5%氢氧化钠溶液4倍量体积的浸泡24h,加4倍量体积的水洗至中性,加5%盐酸溶液4倍量体积的浸泡6h,水洗至中性,加95%乙醇浸泡12h后洗脱,至流出乙醇液与水混合不产生白色浑浊为止,用足量水洗至无醇味,获得金银花提取液备用。

[0059] 吸附洗脱:取预处理好的HPD200A型大孔树脂柱(600mm×80mm),精密量取金银花提取液上柱,吸附完成后用5倍量体积的水洗脱,收集含有新绿原酸粗品的水洗脱部位,流

速2~4BV/h,洗脱5~10BV。减压浓缩,真空干燥,研碎,得新绿原酸粗品145g,备用。

[0060] 5、中低压制备条件选择

[0061] 5.1检测波长的选择

[0062] 取新绿原酸粗品5.0mg,50%甲醇溶解,在紫外分光光度计190~600nm进行全波长扫描,以对照品扫描图作为对照,结果显示样品与对照品的图谱基本一致,在240nm、280nm、326nm处均有较大吸收,而在326nm处的吸光度值最大,故以326nm作为分离新绿原酸的检测波长,紫外扫描色谱图见图7-8。

[0063] 5.2洗脱剂的选择

[0064] 采用Agilent 1260型高效制备液相色谱仪,以甲醇-水、甲醇-0.5%甲酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.5%甲酸水溶液系统为流动相,考察各系统下不同配比的洗脱效果,最终确定以乙腈-0.5%甲酸水溶液(10:90)为洗脱系统,(0~30min),此系统条件下各色谱峰分离度较好,能够使新绿原酸得到有效的分离,制备色谱图见图9,故选择乙腈-0.5%甲酸水(v/v)溶液系统。

[0065] 5.3样品的制备

[0066] 利用Reveleris中低压制备色谱仪(美国GRACE公司),以自制C₁₈填料色谱柱(400mm×80mm,40μm)为分离柱,柱温为室温,流动相乙腈-0.5%甲酸水溶液(10:90),流速20mL/min,检测波长326nm。取新绿原酸粗品20g(新绿原酸的质量分数13.8%),用适量50%甲醇溶解,进样体积为20mL,进样量10.0g,时间20min/次,2次进样。减压浓缩收集液,冷冻干燥,得新绿原酸白色粉末2.36g,回收率为85.5%。

[0067] 新绿原酸分离流程图见图1,色谱图如图2-9,峰1为新绿原酸。

[0068] 6、结构鉴定

[0069] 制得的白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z :353[M-H]⁻。¹H-NMR(400MHz,CD₃OD) δ:2.09~2.18(1H,d,J=3.2Hz,H-2a),1.94~2.03(1H,d,J=6.6Hz,H-2b),4.12~4.14(1H,m,H-3),3.76(1H,dd,J=3.6,9.6Hz,H-4),5.33~5.40(1H,m,H-5),1.95~1.18(1H,m,H-6a),2.13~2.18(1H,m,H-6b),7.03(1H,d,J=2.0Hz,H-2'),6.77(1H,d,J=8.2Hz,H-5'),6.91(1H,dd,J=2.0,8.2Hz,H-6'),7.54(1H,d,J=15.6Hz,H-7'),6.26(1H,d,J=15.9Hz,H-8')。¹³C-NMR(100MHz,CD₃OD) δ:39.0(C-6),40.7(C-2),72.6(C-3),73.0(C-4),75.0(C-5),77.9(C-1),115.2(C-2'),115.5(C-8'),116.5(C-5'),122.9(C-6'),127.8(C-1'),146.8(C-3'),146.9(C-7'),149.5(C-4'),169.2(C-9'),181.0(COOH)。故鉴定该化合物为新绿原酸。

[0070] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

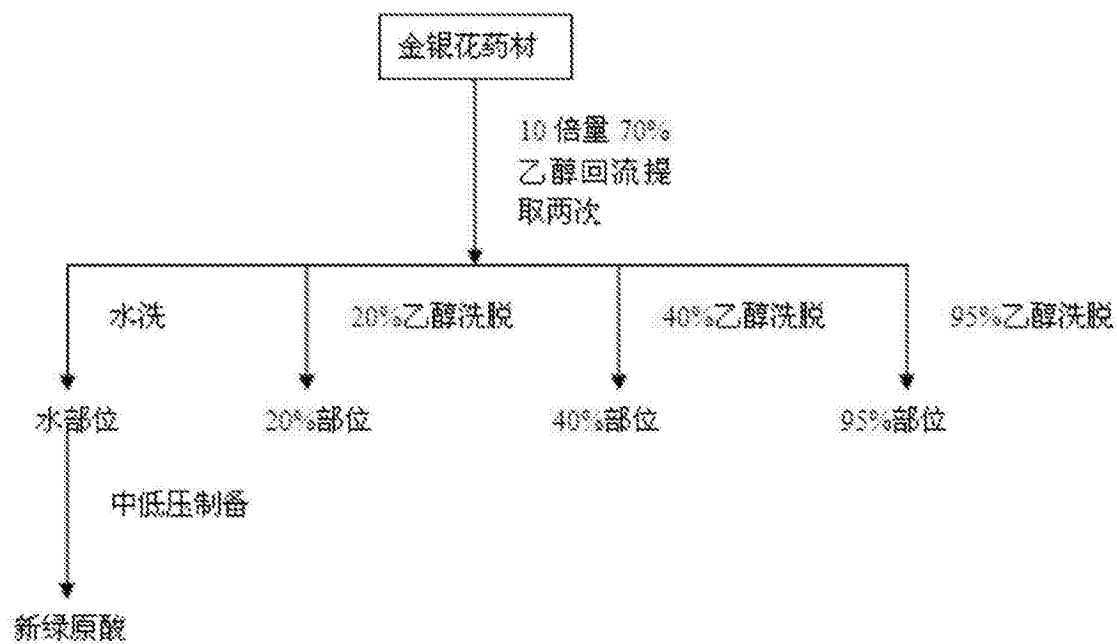


图1

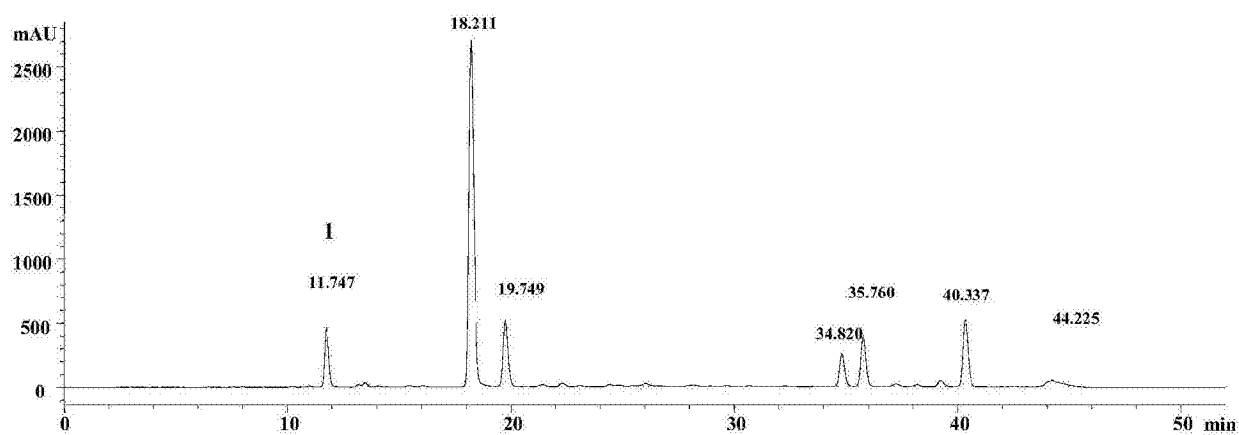


图2

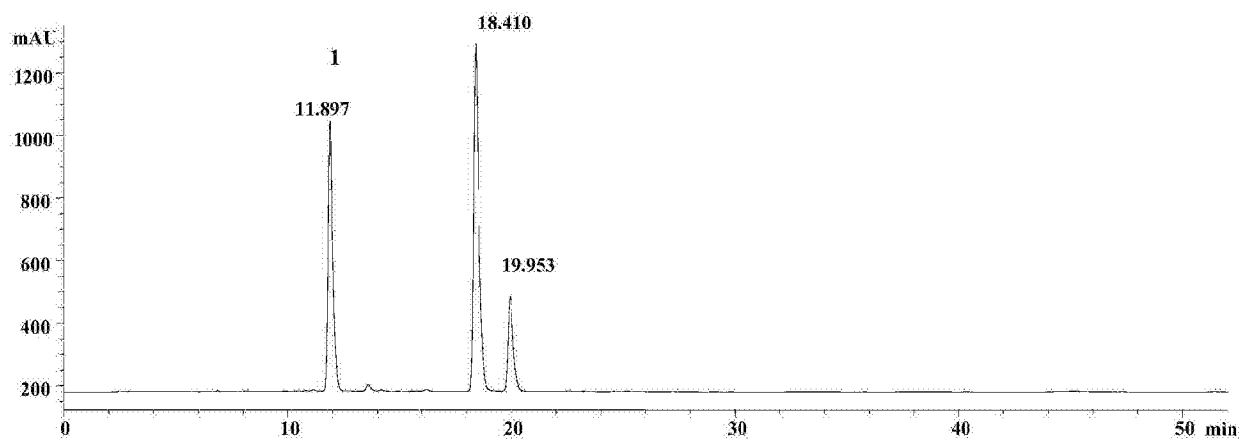


图3

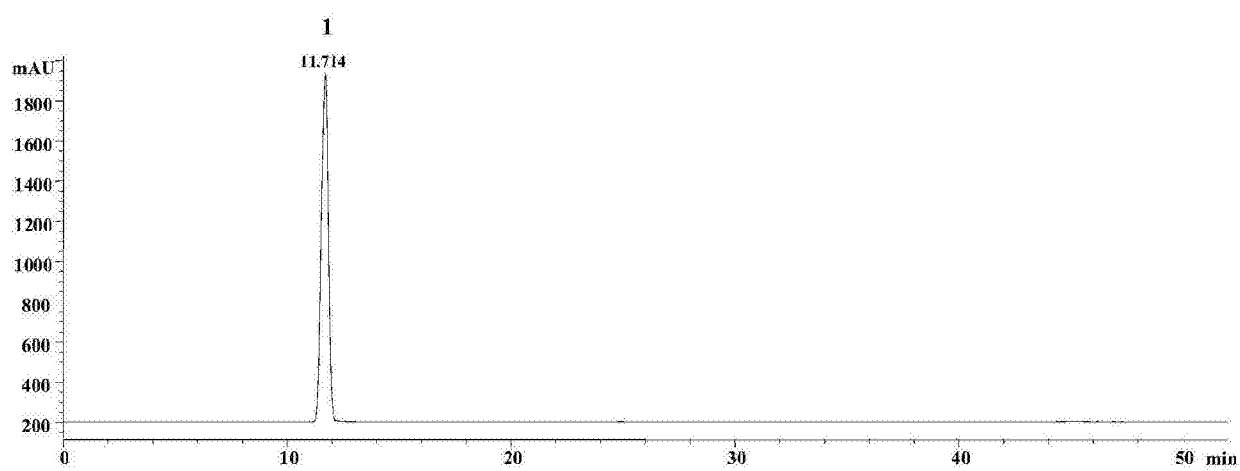


图4

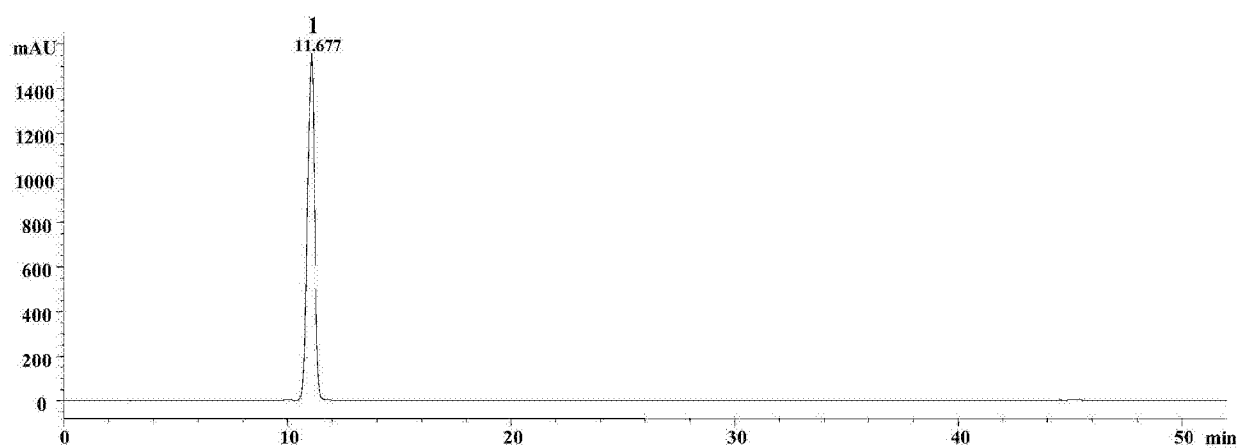


图5

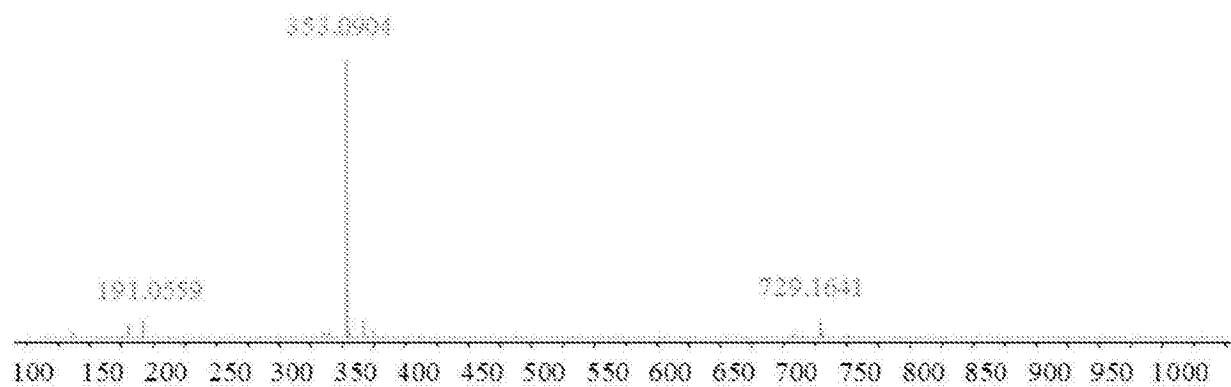


图6

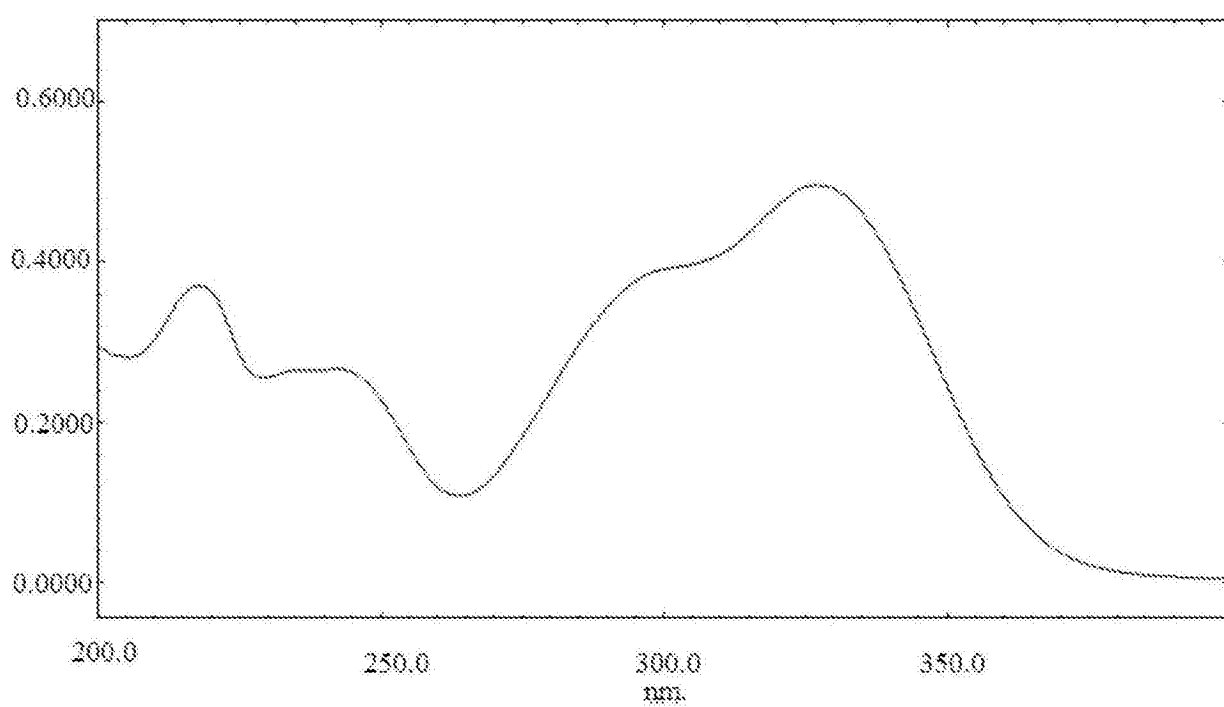


图7

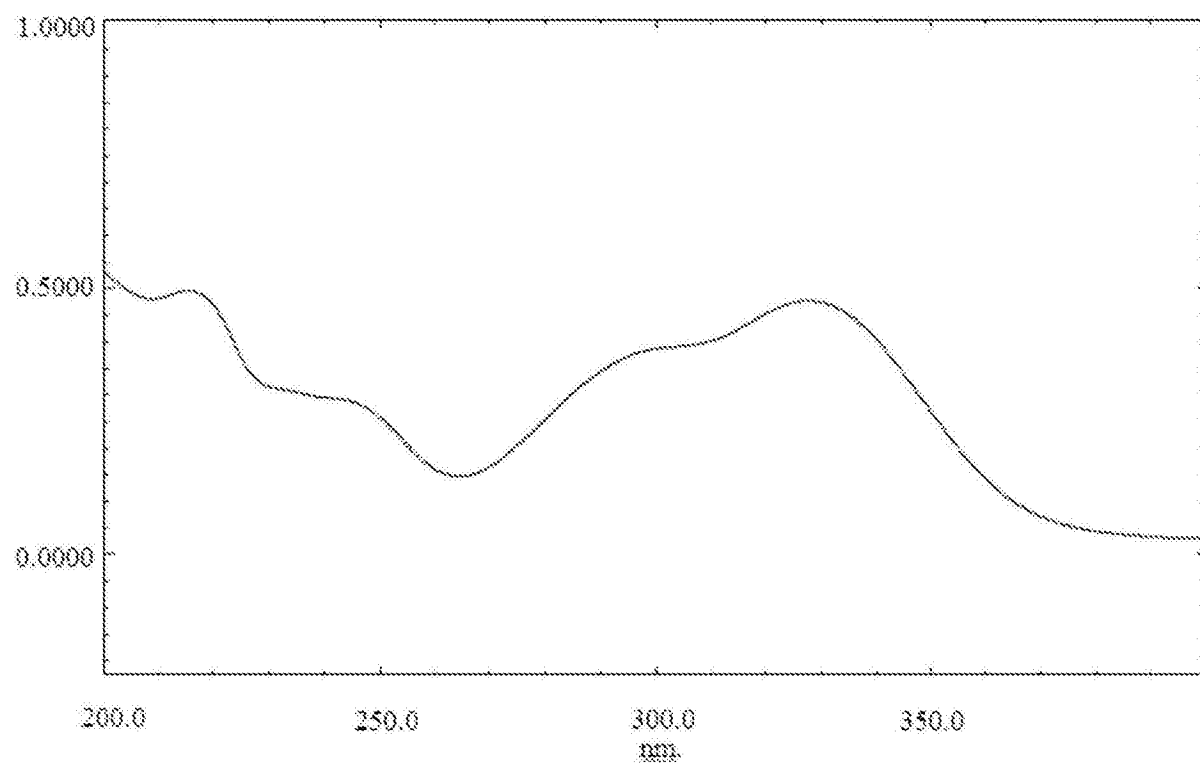


图8

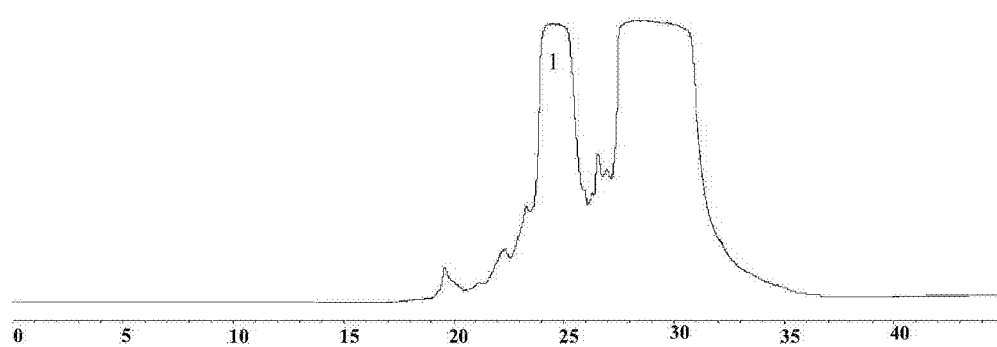


图9