



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115260032 B

(45) 授权公告日 2023.01.06

(21) 申请号 202211219023.2

CN 110250395 A, 2019.09.20

(22) 申请日 2022.10.08

CN 1683316 A, 2005.10.19

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103005438 A, 2013.04.03

申请公布号 CN 115260032 A

CN 111166842 A, 2020.05.19

(43) 申请公布日 2022.11.01

CN 101863758 A, 2010.10.20

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

IN 201611024962 A, 2018.03.02

地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

CN 113402574 A, 2021.09.17

(72) 发明人 董泽军 肖雪蓉 张凌 鞠鹏

Junwei Wu, 等. Combination of

瞿燕

supercritical fluid extraction with high-speed countercurrent chromatography for extraction and isolation of ethyl

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

pmethoxycinnamate and ethyl cinnamate

专利代理师 申素霞

from *Kaempferia galanga* L. 《Separation

(51) Int. Cl.

Science and Technology》. 2016, 第51卷(第10期),

C07C 67/56 (2006.01)

吴华东. 山柰化学成分的研究. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》. 2018, (第1期),

C07C 69/734 (2006.01)

C07C 69/618 (2006.01)

梁元昊等. HSCCC分离天然产物中化学成分研究进展. 《中成药》. 2020, (第08期),

(56) 对比文件

CN 108911985 A, 2018.11.30

CN 109303772 A, 2019.02.05

CN 105784914 A, 2016.07.20

CN 107205447 A, 2017.09.26

审查员 余琼

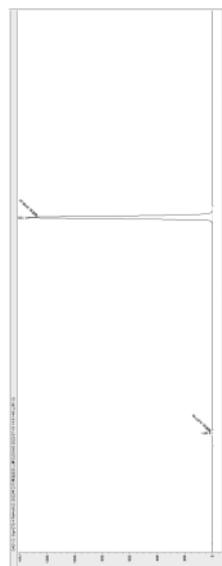
权利要求书1页 说明书5页 附图10页

(54) 发明名称

一种利用高速逆流色谱分离纯化对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种利用高速逆流色谱分离纯化对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的方法,属于天然产物技术领域。本发明采用高速逆流色谱分离法,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系作为两相溶剂体系,能够高效制备得到山柰提取物,山柰提取物的分离量大、无损耗、收率高、纯度高;而且,本发明提供的提取方法,具有操作简便、重现性好和分离环境缓和的特点。进一步地,本发明通过控制正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比能够得到高纯度的对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯。



CN 115260032 B

1. 一种利用高速逆流色谱分离纯化反式对甲氧基肉桂酸乙酯的方法,包括以下步骤:

将山奈根茎与乙醇溶液混合,进行醇提,得到山奈粗提物;所述乙醇溶液中乙醇的体积分数为50~95%;所述醇提的温度为50~80℃,醇提的次数为2~4次,单次醇提的时间为1~4h;

将所述山奈粗提物进行高速逆流色谱分离,得到反式对甲氧基肉桂酸乙酯;所述高速逆流色谱分离采用的两相溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系,所述两相溶剂体系的上相为固定相,下相为流动相;所述正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系中正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比为3.5:1.25:3.5:1.25;

所述正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系在使用前进行脱气处理;

所述高速逆流色谱分离条件包括:温度为20~30℃;主机的转速为500~1000r/min;流动相的流速为5~20mL/min。

一种利用高速逆流色谱分离纯化对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及天然产物技术领域,具体涉及一种利用高速逆流色谱分离纯化对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的方法。

背景技术

[0002] 山奈(*kaempferia galanga* L.),又名沙姜、三藨、三奈、三柰、山辣、土麝香、万烘、香奈子,为姜科植物山柰属,分布于中国台湾、广东、广西、云南等省区。山柰具有良好的临床药理作用和药效,其根茎是一味常用的中药,其具有行气温中、消食、止痛的功效,临床主要用于治疗胸膈胀满、腹冷痛、饮食不消。山奈挥发油含量高,且气味芳香浓郁,还可以作为食品中的调料和香料广泛用于食品工业。目前研究表明山奈提取物的生物活性成分,具有较好的抗氧化、抗炎、抗癌、抗菌、抗病毒等多种功效。

[0003] 现有技术“利毛才让等. 藏药山奈中对甲氧基肉桂酸乙酯提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(33): 14585-14586”对山奈药材中对甲氧基肉桂酸乙酯的提取工艺进行研究,首先采用索氏提取法、热回流法或超声法进行提取,然后进行高效液相色谱分离,得到对甲氧基肉桂酸乙酯。上述现有技术采用高效液相色谱分离过程中,对甲氧基肉桂酸乙酯进样量在0.1~0.8 μ g范围内呈良好的线性关系,对甲氧基肉桂酸乙酯的分离量小。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种利用高速逆流色谱分离纯化对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的方法,本发明提供的方法能够从山奈中高效、大批量地分离得到对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系在高速逆流色谱制备山奈提取物中的应用。

[0007] 优选地,所述正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系中正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比为(3~4):(1~1.5):(3~4):(1~1.5)。

[0008] 本发明提供了一种利用高速逆流色谱分离纯化对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的方法,包括以下步骤:

[0009] 将山奈根茎与乙醇溶液混合,进行醇提,得到山奈粗提物;

[0010] 将所述山奈粗提物进行高速逆流色谱分离,得到对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯;所述高速逆流色谱分离采用的两相溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系。

[0011] 优选地,所述正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系中正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比为(3~4):(1~1.5):(3~4):(1~1.5)。

[0012] 优选地,所述乙醇溶液中乙醇的体积分数为50~95%。

[0013] 优选地,所述醇提的温度为50~80 $^{\circ}$ C,醇提的次数为2~4次,单次醇提的时间为1~

4h。

[0014] 优选地,正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系在使用前进行脱气处理。

[0015] 优选地,所述高速逆流色谱分离条件包括:温度为20~30℃;主机的转速为500~1000r/min;流动相的流速为5~20mL/min。

[0016] 本发明提供了一种利用高速逆流色谱分离纯化对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的方法,包括以下步骤:将山奈根茎与乙醇溶液混合,进行醇提,得到山奈粗提物;将所述山奈粗提物进行高速逆流色谱分离,得到对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯;所述高速逆流色谱分离采用的两相溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系。本发明采用高速逆流色谱(HSCCC)法,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系作为两相溶剂体系,以上相为固定相,下相为流动相,能够实现从山奈中高效分离得到对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯,且本发明采用的高速逆流色谱法对于肉桂酸乙酯以及对甲氧基肉桂酸乙酯的分离量大、无损耗,对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的收率高。而且,本发明提供的提取方法,具有操作简便、重现性好和分离环境缓和的特点,适宜工业化生产。

[0017] 进一步地,本发明通过控制正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系中正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比能够得到高纯度的对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯。

附图说明

[0018] 图1为实施例1制备得到的山奈粗提物的高效液相色谱图;

[0019] 图2为实施例1制备得到的山奈粗提物的高速逆流色谱(HSCCC)图;

[0020] 图3为实施例1制备得到的化合物a的高效液相色谱图;

[0021] 图4为实施例1制备得到的化合物b的高效液相色谱图;

[0022] 图5为实施例1制备得到的化合物a的¹³C-NMR谱图;

[0023] 图6为实施例1制备得到的化合物a的¹H-NMR谱图;

[0024] 图7为实施例1制备得到的化合物a的质谱图;

[0025] 图8为实施例1制备得到的化合物b的¹³C-NMR谱图;

[0026] 图9为实施例1制备得到的化合物b的¹H-NMR谱图;

[0027] 图10为实施例1制备得到的化合物b的质谱图。

具体实施方式

[0028] 本发明提供了一种利用高速逆流色谱分离纯化对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯的方法,包括以下步骤:

[0029] 将山奈根茎与乙醇溶液混合,进行醇提,得到山奈粗提物;

[0030] 将所述山奈粗提物进行高速逆流色谱分离,得到对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯;所述高速逆流色谱分离采用的两相溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系。

[0031] 在本发明中,若无特殊说明,所有的原料组分均为本领域技术人员熟知的市售商品。

[0032] 本发明将山奈根茎与乙醇溶液混合,进行醇提,得到山奈粗提物。

[0033] 在本发明中,所述山奈根茎优选为干燥山奈根茎,所述山奈根茎在使用前优选先进行粉碎,本发明对于所述粉碎没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的粉碎方式粉碎

至粒径 $\leq 0.5\text{cm}$ 即可。

[0034] 在本发明中,所述乙醇溶液中乙醇的体积分数优选为50~95%,更优选为60~80%,进一步优选为70~75%。在本发明中,所述山奈根茎(干重)的质量与乙醇溶液的体积之比优选为1g:(1~4)mL,更优选为1g:(2~3)mL。

[0035] 在本发明中,所述醇提的温度优选为50~80 $^{\circ}\text{C}$,更优选为60~70 $^{\circ}\text{C}$;所述醇提的次数优选为2~4次,更优选为3次;单次醇提的时间优选为1~4h,更优选为2~3h。

[0036] 完成所述醇提后,本发明优选还包括将所得醇提液进行浓缩,得到山奈粗提物。本发明对于所述浓缩没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的浓缩方式浓缩至恒重即可。

[0037] 得到山奈粗提物后,本发明将所述山奈粗提物进行高速逆流色谱分离,得到对甲氧基肉桂酸乙酯和/或肉桂酸乙酯;所述高速逆流色谱分离采用的两相溶剂体系为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系。

[0038] 在本发明中,所述正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系中正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系中正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比优选为(3~4):(1~1.5):(3~4):(1~1.5),更优选为(3.1~4):(1~1.4):(3.1~3.9):(1.1~1.4),进一步优选为(3.2~4):(1.2~1.4):(3.2~3.8):(1.2~1.5)。在本发明中,所述正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系在使用前优选进行脱气处理。在本发明中,所述脱气处理优选为超声脱气处理,所述超声脱气处理的温度优选为10~30 $^{\circ}\text{C}$,更优选为20~25 $^{\circ}\text{C}$;所述超声脱气处理的时间优选为10~30min,更优选15~20min。在本发明中,所述正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系优选在储液罐中配制得到,所述正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系的上相为固定相,下相为流动相。

[0039] 在本发明中,所述高速逆流色谱分离前优选还包括对所述高效逆流色谱的色谱柱进行平衡,所述平衡优选为:利用固定相将高效逆流色谱的色谱柱填充满,注入流动相至两相溶剂体系在色谱柱中达到平衡状态(上下分层)。在本发明中,所述平衡参数优选包括:温度优选为20~30 $^{\circ}\text{C}$,更优选为25 $^{\circ}\text{C}$;主机优选采用正转方式,所述主机的转速优选为500~1000r/min,更优选为700~800r/min;流动相的流速优选为5~20mL/min,更优选为10~15mL/min。

[0040] 在本发明中,将所述山奈粗提物进行高速逆流色谱分离优选为:例如固定相将山奈粗提物溶解,将所得山奈粗提物溶液进样,注入流动相进行高速逆流色谱分离。本发明对于所述溶解用固定相的用量没有特殊限定,能够将山奈粗提物溶解即可。

[0041] 在本发明中,所述高速逆流色谱分离条件优选包括:温度优选为20~30 $^{\circ}\text{C}$,更优选为25 $^{\circ}\text{C}$;主机优选采用正转方式,所述主机的转速优选为500~1000r/min,更优选为700~800r/min;流动相(即正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系的下相)的流速优选为5~20mL/min,更优选为10~15mL/min;检测波长优选为270nm。

[0042] 在本发明中,所述对甲氧基肉桂酸乙酯的高速逆流色谱分离的出峰位置优选为30~41min;所述肉桂酸乙酯的出峰位置优选为43~54min。

[0043] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0044] 实施例1

[0045] (1)将干燥山柰根茎粉碎至粒径 $\leq 0.5\text{cm}$,将1000g干燥山柰根茎粉与3000mL体积分数为95%的乙醇水溶液回流醇提3次,每次醇提时间为2h,将所得醇提液浓缩至恒重,得到山柰粗提物(88g)。

[0046] (2)将正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水(3.5:1.25:3.5:1.25, v/v/v/v)置于储液罐中,充分振摇,然后在25℃条件下超声脱气20min,分相,所得上相为固定相,所得下相为流动相。取1g山柰粗提物,超声完全溶解于20mL固定相,得到山柰粗提物溶液。

[0047] (3)开启循环水浴并将温度设定为25℃,用30mL/min流速将固定相泵入主机并充满分离螺旋管,开启主机电源以800r/min正向旋转,待转速稳定后,以10mL/min流速泵入流动相,待流动相从分离螺旋管出口流出且基线稳定并调零后,将步骤(2)所得山柰粗提物溶液由进样器注入进样环,分离螺旋管出口处流出液在270nm下连续检测,根据逆流色谱图手动收集各色谱组分;接收出峰时间为30~41min的目标成分记为化合物a(140mg),接收出峰时间为43~54min的目标成分记为化合物b(15mg)。

[0048] 山柰粗提物的高效液相色谱图如图1所示,其部分峰数据如表1所示,由表1和图1可知,两个主峰的保留时间分别为11.13min和11.26min。

[0049] 表1 山柰粗提物的高效液相色谱的部分峰的数据

| # | 时间 | 峰面积 | 峰高 | 峰宽 | 对称因子 | 峰面积 % |
|---|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| 1 | 1.187 | 435.8 | 82 | 0.076 | 1.342 | 3.545 |
| 2 | 1.733 | 94 | 21.1 | 0.066 | 0.859 | 0.764 |
| 3 | 1.89 | 168.3 | 27.1 | 0.0905 | 1.622 | 1.369 |
| 4 | 2.835 | 562.6 | 80.2 | 0.1118 | 1.608 | 4.575 |
| 5 | 3.549 | 222.7 | 41.3 | 0.0749 | 0.457 | 1.811 |
| 6 | 4.273 | 84.9 | 15.8 | 0.0767 | 1.127 | 0.690 |
| 7 | 11.13 | 9157.9 | 1942.9 | 0.075 | 0.885 | 74.481 |
| 8 | 11.259 | 1569.5 | 340.2 | 0.0698 | 0.813 | 12.765 |

[0051] 图2为山柰粗提物的高速逆流色谱(HSCCC)图。

[0052] 使用高效液相色谱仪对得到的化合物a和化合物b的纯度进行检测。HPLC分析条件为:Agilent1260 ZORBAX SB-C18柱(5 μm , 4.6mm \times 150, I.D.), DAD检测器270nm,流动相流速为1.0mL/min,流动相为乙腈-水(0~100, v/v)。

[0053] 化合物a的高效液相色谱图如图3所示,其峰数据如表2所示:

[0054] 表2 化合物a的高效液相色谱数据

| # | 时间 | 峰面积 | 峰高 | 峰宽 | 对称因子 | 峰面积 % |
|---|-------|------|------|--------|-------|--------|
| 1 | 3.951 | 10 | 1.9 | 0.0884 | 1.023 | 0.113 |
| 2 | 11.12 | 8799 | 1349 | 0.1087 | 0.848 | 99.887 |

[0056] 由图3和表2可知,化合物a的纯度为99.89%,其保留时间为11.12min。

[0057] 化合物b的高效液相色谱图如图4所示,其峰数据如表3所示:

[0058] 表3 化合物b的高效液相色谱数据

| # | 时间 | 峰面积 | 峰高 | 峰宽 | 对称因子 | 峰面积 % |
|---|--------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 1 | 3.883 | 12.6 | 2.7 | 0.0768 | 0.889 | 0.533 |
| 2 | 11.264 | 2356.2 | 363.6 | 0.108 | 0.795 | 99.467 |

[0060] 由图4和表3可知,化合物b的纯度为99.47%,其保留时间为11.26min。

[0061] 目标化成分的结构鉴定:对化合物a和化合物b进行 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和质谱分析。化合物a的碳谱图如图5所示,氢谱图如图6所示,质谱图如图7所示,化合物a的结构表征数据

如下：¹H-NMR (CD₃OD)：7.62 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.54 (2H, d, J = 7.6 Hz, H-2 and H-6), 6.94 (2H, d, J = 7.6 Hz, H-3 and H-5), 6.36 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 4.22 (2H, q, J = 7.1 Hz, H-10), 1.31 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-11); ¹³C-NMR (CD₃OD)：169.1 (s, C-9), 163.2 (s, C-4), 145.9 (d, C-7), 130.9 (d, C-2 and C-6), 128.3 (s, C-1), 116.3 (d, C-8), 115.4 (d, C-3 and C-5), 61.5 (t, C-10), 55.9 (q, OCH₃), 14.6 (q, C-11)。

[0062] 由图5~图7以及上述结构表征数据可知,化合物a为对甲氧基肉桂酸乙酯(*E*)-1-(4-Methoxyphenyl)pent-1-en-3-one)。

[0063] 化合物b的碳谱图如图8所示,氢谱图如图9所示,质谱图如图10所示,化合物b的结构表征数据如下：¹H-NMR (CDCl₃)：7.69 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.52 (2H, m, H-2 and H-6), 7.38 (3H, m, H-3, H-4 and H-5), 6.44 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8), 4.27 (2H, q, J = 7.1 Hz, H-10), 1.34 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-11); ¹³C-NMR (CDCl₃)：167.0 (s, C-9), 144.6 (d, C-7), 130.2 (d, C-4), 134.4 (s, C-1), 128.8 (d, C-3 and C-5), 128.0 (d, C-2 and C-6), 118.2 (d, C-8), 60.5 (t, C-10), 14.3 (q, C-11)。由图8~图10以及上述结构表征数据可知,化合物b为肉桂酸乙酯(*E*)-1-Phenylpent-1-en-3-one)。

[0064] 实施例2

[0065] 按照实施例1的方法制备对甲氧基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯,与实施例1的区别仅在于:正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比=3.5:1.25:3.5:1.25;对甲氧基肉桂酸乙酯的纯度为97.25%,肉桂酸乙酯的纯度为97.28%。

[0066] 实施例3

[0067] 按照实施例1的方法制备对甲氧基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯,与实施例1的区别仅在于:正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比=4:1:3.5:1.5;对甲氧基肉桂酸乙酯的纯度为97.32%,肉桂酸乙酯的纯度为97.27%。

[0068] 对比例1

[0069] 按照实施例1的方法制备对甲氧基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯,与实施例1的区别仅在于:正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比=4.5:1:4:1;管柱出口处流出液在270nm下连续检测,结果未检测到对甲氧基肉桂酸乙酯以及肉桂酸乙酯。

[0070] 对比例2

[0071] 按照实施例1的方法制备对甲氧基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯,与实施例1的区别仅在于:正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水的体积比=4.2:1:4:1;对甲氧基肉桂酸乙酯的纯度为78.2%,肉桂酸乙酯的纯度为75.8%。

[0072] 对比例3

[0073] 按照CN 111166842 A实施例1的方法制备山奈提取物。但是乙腈-甲醇-磷酸氢二钠溶液(pH=6.5)组成的溶剂系统不分层,无法实现高速逆流色谱分离,也不能分离得到对甲氧基肉桂酸乙酯和肉桂酸乙酯。

[0074] 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。

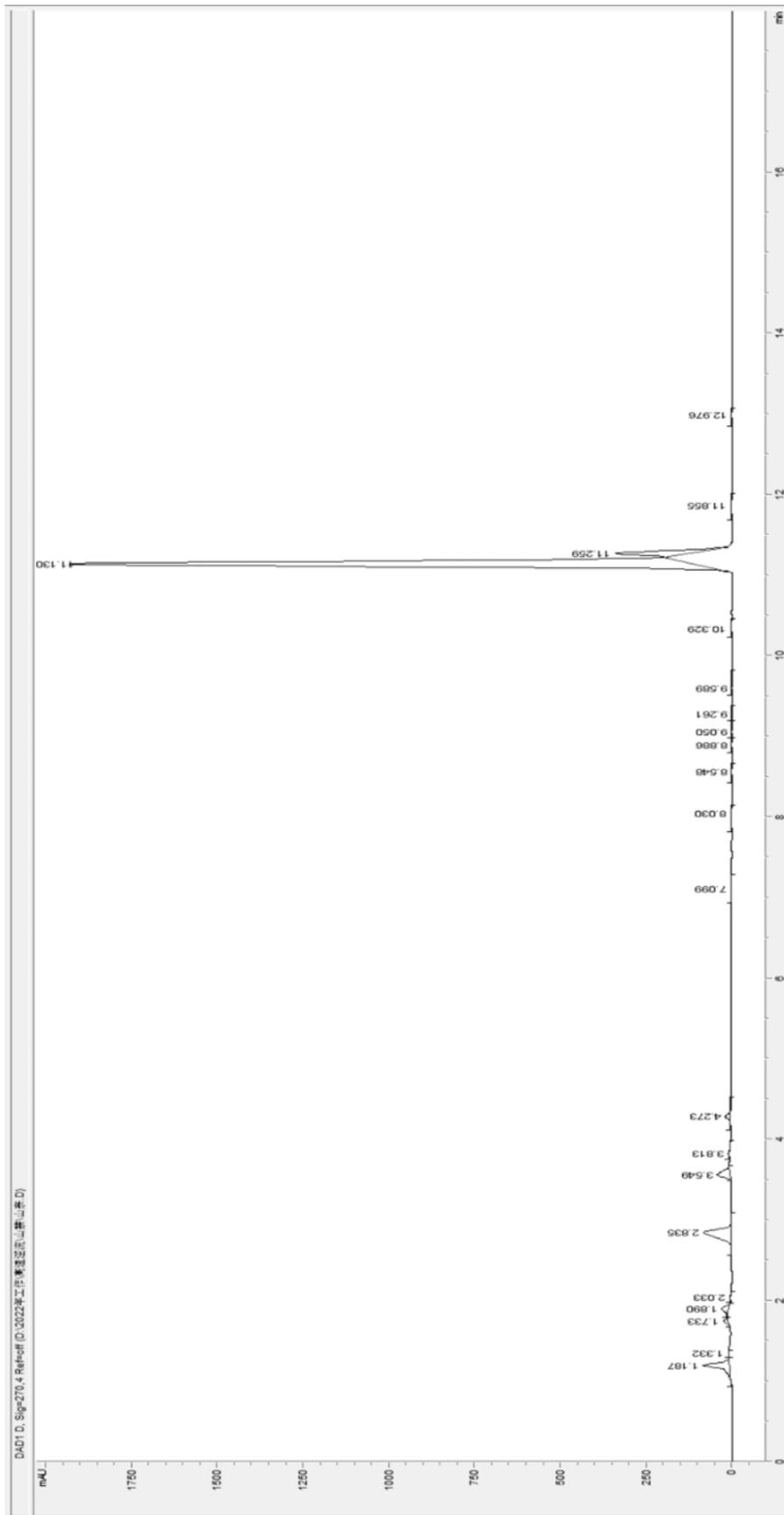


图1

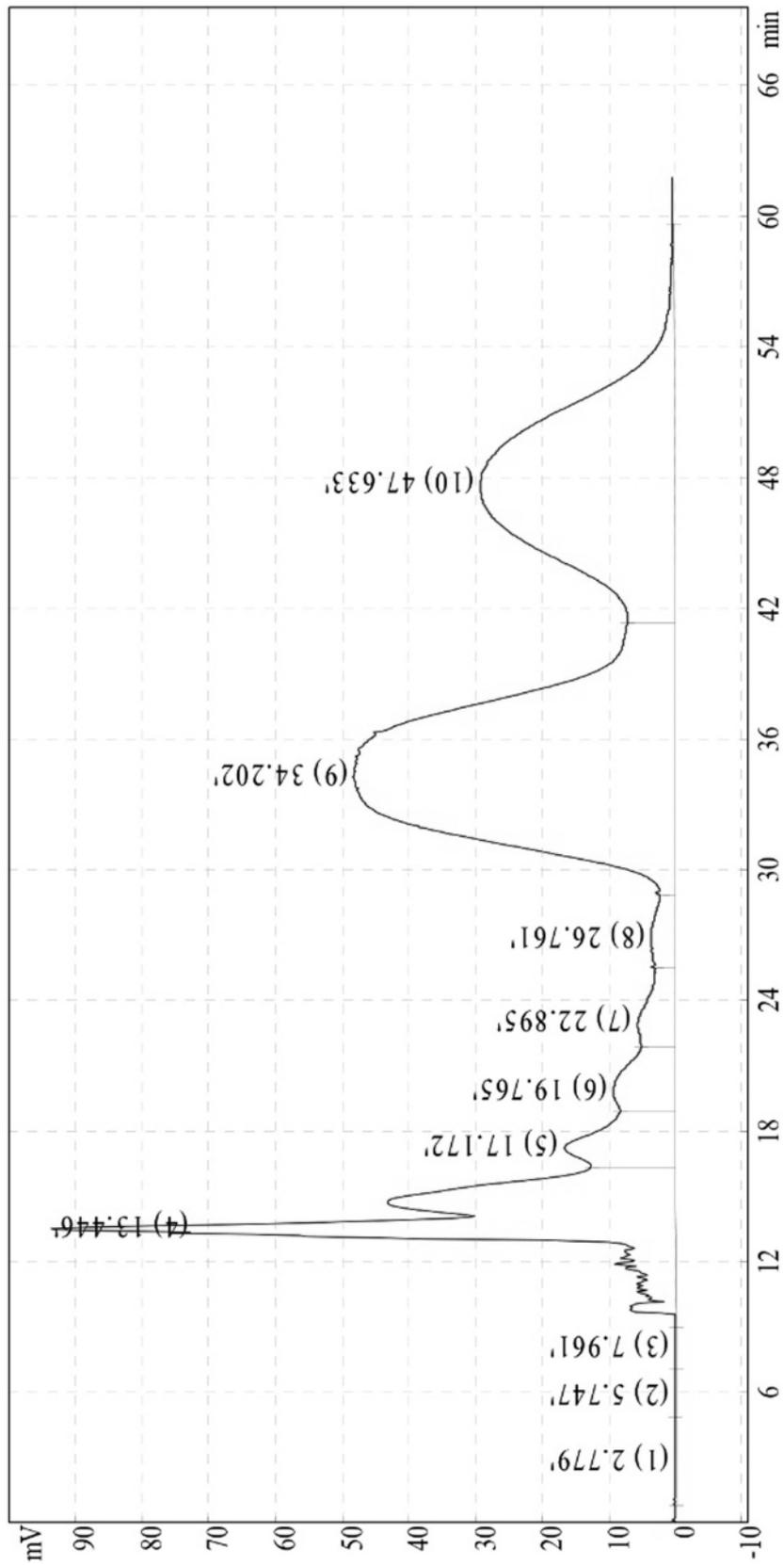


图2

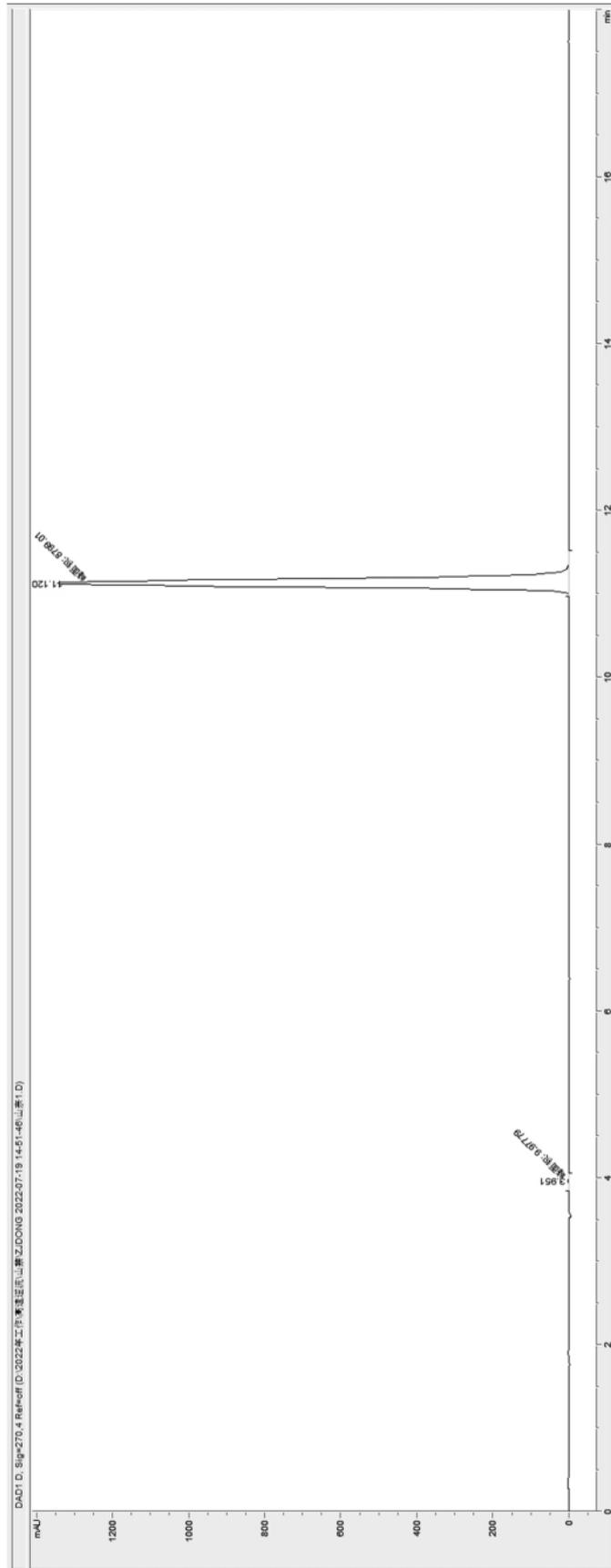


图3

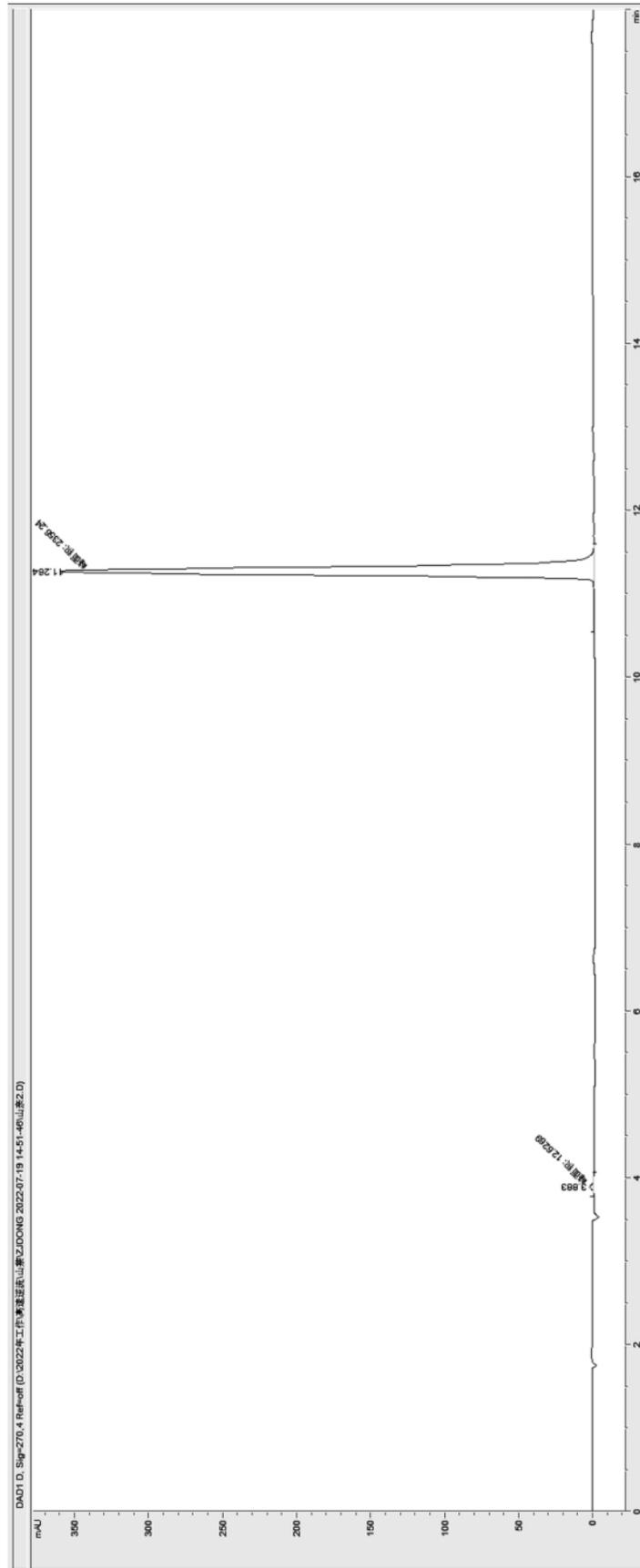


图4

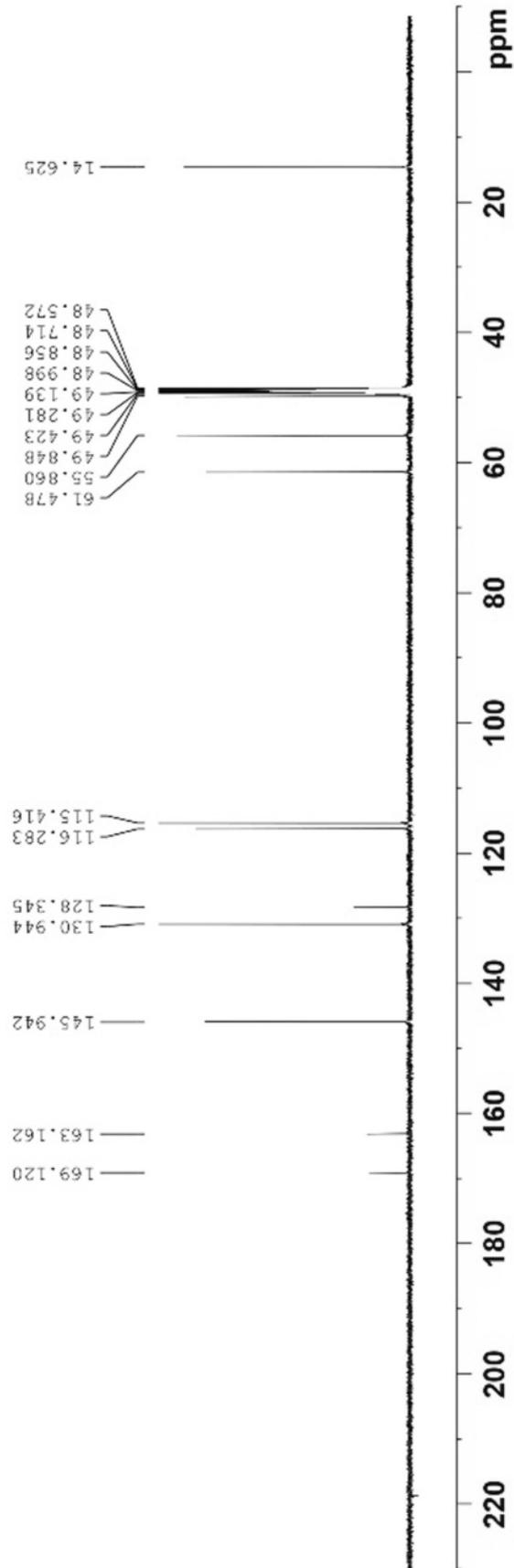


图5

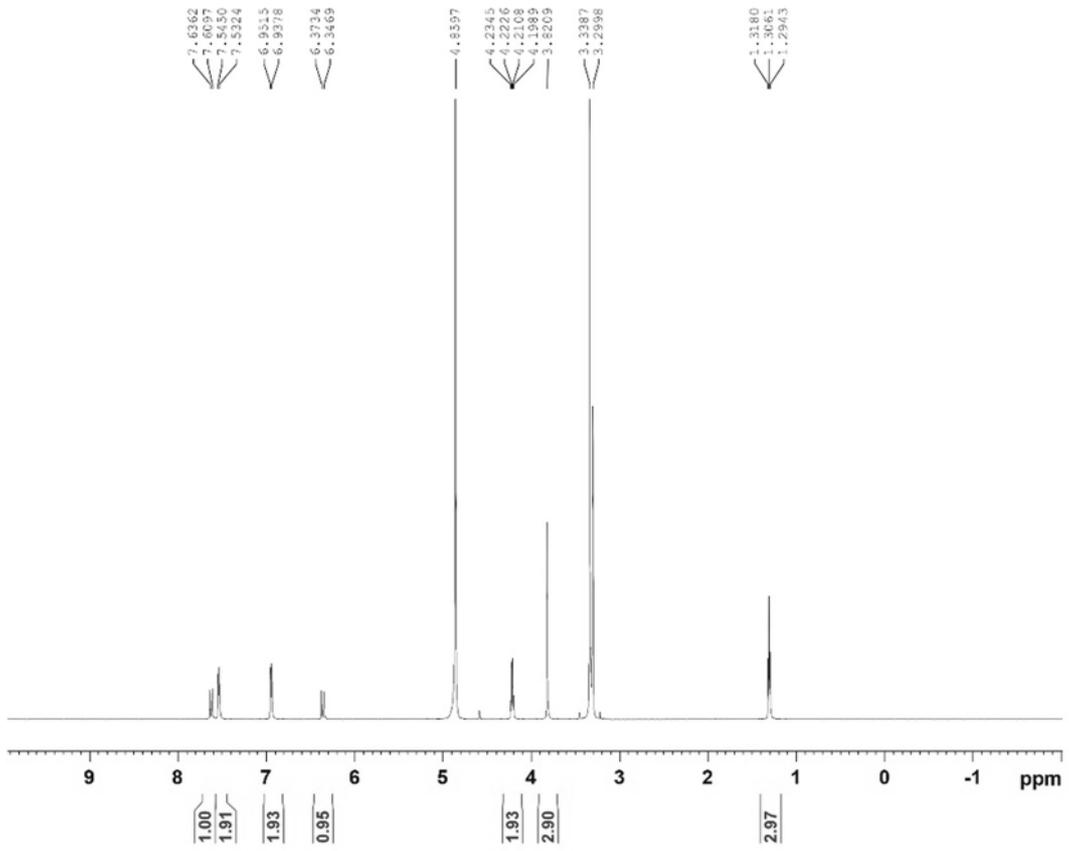


图6

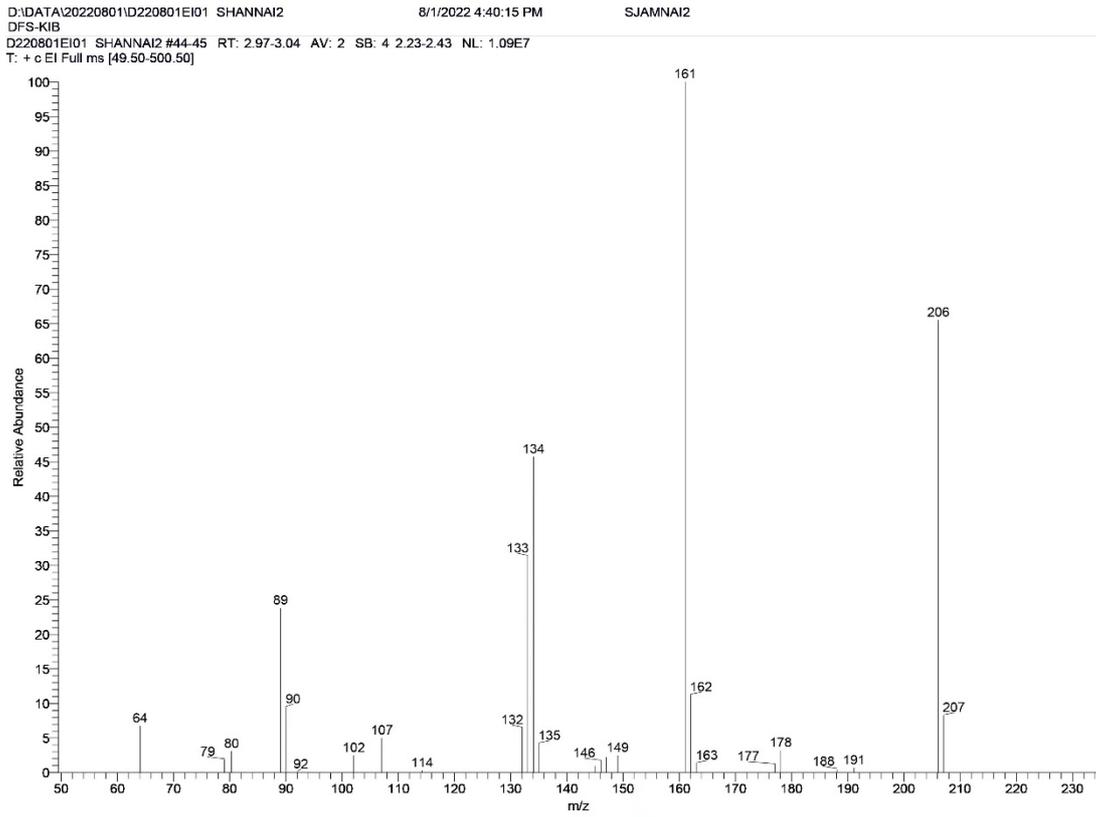


图7

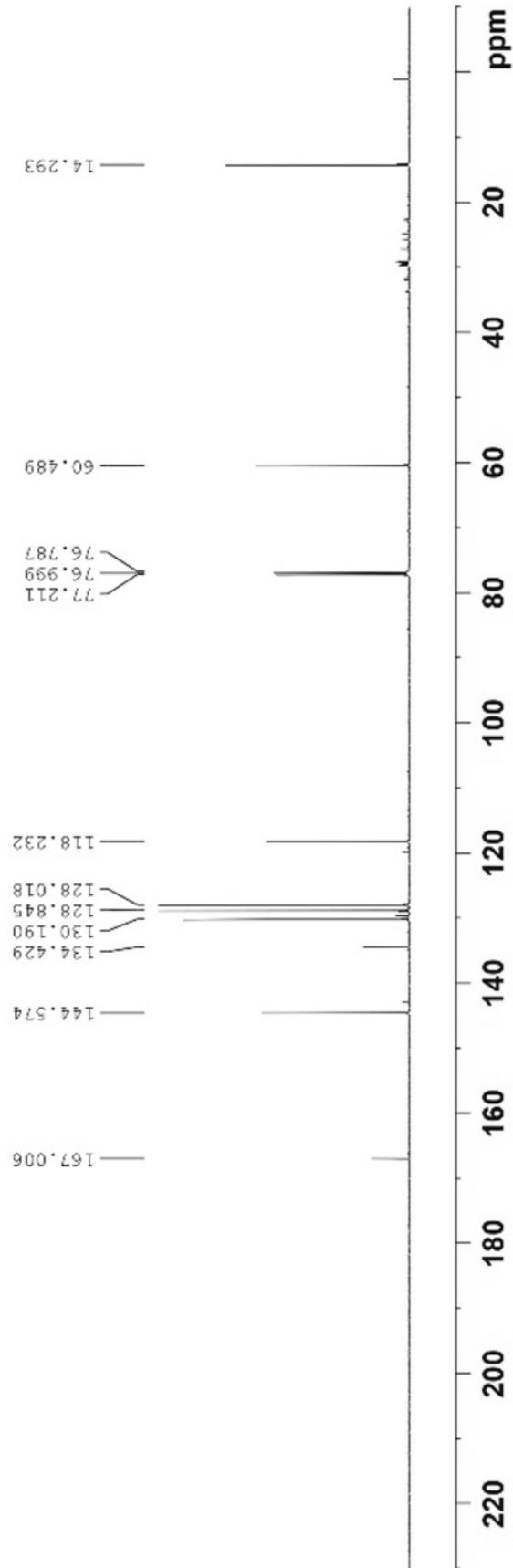


图8

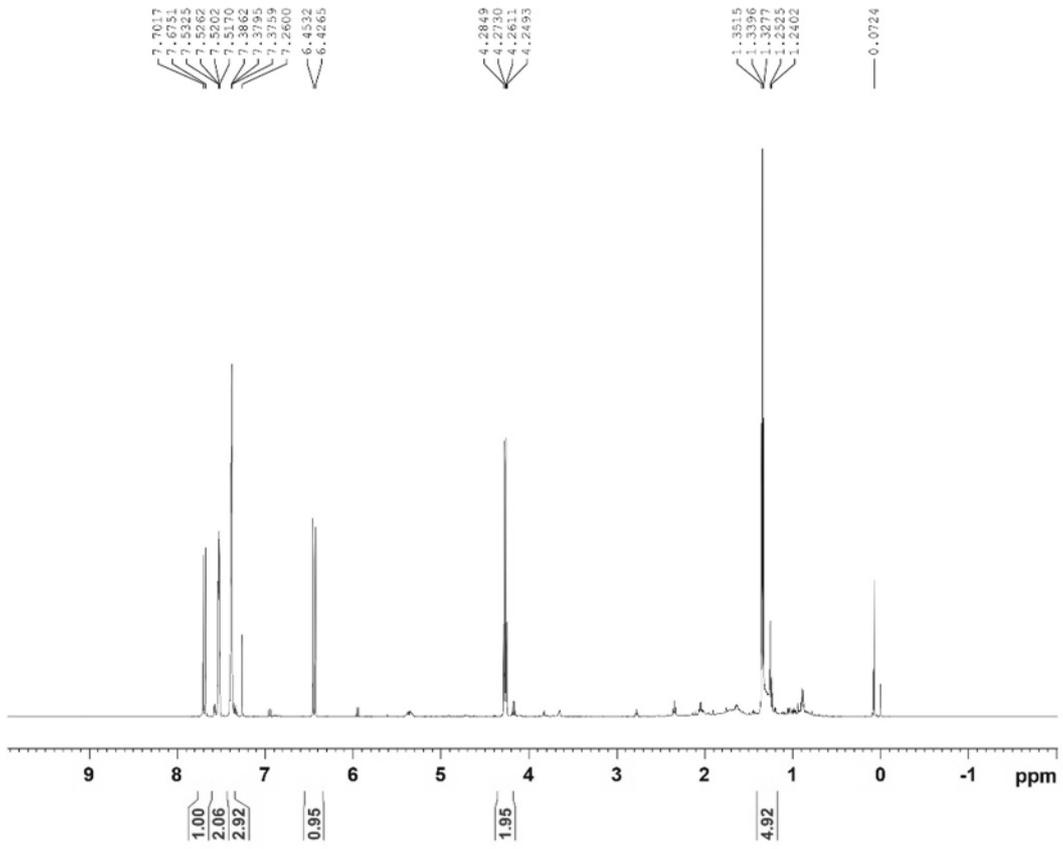


图9

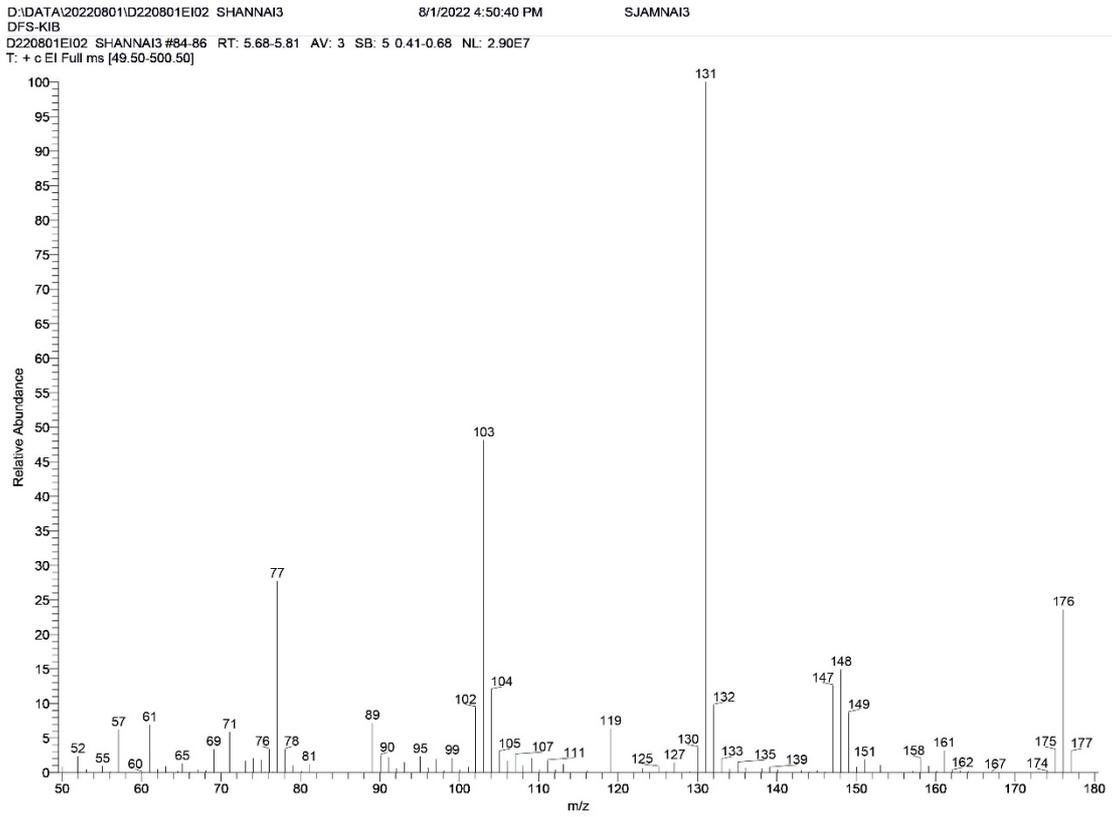


图10