



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103272408 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201310225370. 0

C07D 317/70(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 06. 07

C07D 493/04(2006. 01)

(73) 专利权人 江苏迪沃特仪器设备科技有限公司

审查员 司彦斌

地址 223300 江苏省淮安市淮阴区南昌北路
9 号(江苏淮阴科技产业园 A5 楼)

(72) 发明人 孟强 孙娟 戴士俊 张俊
张云海 范金豹 沈红艳 周亮亮

(74) 专利代理机构 淮安市科文知识产权事务所
32223

代理人 谢观素

(51) Int. Cl.

B01D 15/10(2006. 01)

C07C 43/21(2006. 01)

C07C 43/23(2006. 01)

C07C 41/36(2006. 01)

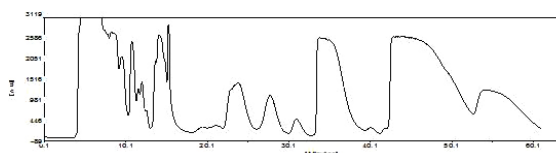
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法,包括以下步骤:流动相配制、溶解过滤、动态轴向压缩柱装填、系统平衡、洗脱分离、浓缩。本发明在一次分离纯化过程中,可以获得多种单体,且液相色谱法检测纯度在 98. 5% 以上,收率在 98% 以上;工艺简单,所用有机溶剂价格便宜,消耗量少,且均可以回收再用;紫外检测器在线监测,操作简单,效率高,产品质量容易控制;等度洗脱,对设备性能要求低,生产周期短,可以轻易实现从实验室到工业化五味子单体的高效分离纯化。



1. 用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法, 其特征在于包括以下步骤:

(1) 流动相配制: 用体积比例 60~95:2~30:3~10 的正己烷、乙酸乙酯、异丙醇配制流动相, 作为样品洗脱液;

(2) 溶解过滤: 将五味子粗品用溶剂溶解, 超声过滤后, 将滤液用步骤(1) 配制的流动相稀释作为样品;

(3) 动态轴向压缩柱装填: 将色谱填料用步骤(1) 配制的流动相匀浆得到匀浆液, 将匀浆液送入动态轴向压缩柱, 排出流动相后压实色谱填料, 完成动态轴向压缩柱的装填;

(4) 系统平衡: 用步骤(1) 配制的流动相冲洗步骤(3) 装填的动态轴向压缩柱, 持续 10~20min, 直到色谱仪检测的色谱基线平稳, 达到平衡状态;

(5) 洗脱分离: 将步骤(2) 所得样品注入步骤(4) 平衡后的动态轴向压缩柱, 用紫外检测器检测样品分离情况, 根据保留时间和峰高确定每种五味子单体开始收集和停止收集的时间点;

(6) 浓缩: 将步骤(5) 收集到的每种单体分别减压浓缩, 去除溶剂。

2. 如权利要求 1 所述的用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法, 其特征在于: 步骤(2) 采用 0.45 μm 有机滤膜对溶解有五味子粗品的溶剂进行过滤。

3. 如权利要求 1 所述的用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法, 其特征在于: 步骤(2) 的溶剂由正己烷、乙酸乙酯、异丙醇中的一种或两种或两种以上混合而成。

4. 如权利要求 1 所述的用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法, 其特征在于: 步骤(2) 的样品浓度为 0.28~0.5g/ml。

5. 如权利要求 1 所述的用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法, 其特征在于: 步骤(3) 的色谱填料为 200~800 目极性硅胶填料。

6. 如权利要求 1 所述的用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法, 其特征在于: 步骤(4) 动态轴向压缩柱的填料高度为 250mm。

7. 如权利要求 1 所述的用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法, 其特征在于: 步骤(5) 的紫外检测器的检测波长为 250nm。

用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学领域,具体涉及用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法。

背景技术

[0002] 五味子,俗称山花椒、秤砣子、药五味子、面藤、五梅子等,古医书称它荃蓂、玄及、会及,最早列于神农本草经上品,五味子的作用有:1. 五味子提取物和醇甲能减少小鼠自主活动,尚有镇痛作用、肌肉松弛作用;2. 五味子醇提物及五味子甲素、乙素、丙素、醇甲、醇乙、酯甲、酯乙等对化学毒物引起的动物肝细胞损伤有明显保护作用;3. 五味子素、五味子丙素、去氧五味子素等对于离体狗肠系膜动脉收缩均有抑制作用,能增加豚鼠离体心脏及麻醉狗冠脉血流量;4. 五味子乙素、五味子酚均具有抗氧化作用,能清除自由基、抑制过氧化脂质形成;5. 五味子能增强小鼠慢性支气管炎支气管上皮细胞功能;6. 五味子能促进肝糖原的合成,使糖代谢加强,又能增加肝细胞蛋白质的合成;7. 五味子能抑制应激性溃疡的发生,使溃疡指数减少,并能抑制胃液分泌;8. 五味子具有很好的安神作用。

[0003] 公开号为 CN101428062A 的中国发明专利公开了一种五味子分离纯化方法,是先过色谱柱层析,再采用乙腈与水梯度洗脱过反相色谱柱,收集 48-52min 物质;此方法需要通过两次色谱柱,产生大量溶剂,能耗大、时间长;乙腈洗脱时,其毒性大,溶剂残留影响大;梯度洗脱对设备性能要求高,不适合工业化生产放大。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法,可以解决现有技术先过色谱柱层析,再采用乙腈与水梯度洗脱过反相色谱柱,需要通过两次色谱柱,产生大量溶剂,能耗大、时间长;而且乙腈其毒性大,溶剂残留影响大;梯度洗脱对设备性能要求高的问题。

[0005] 本发明通过以下技术方案实现:

[0006] 用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 流动相配制:用弱极性溶剂配制流动相,作为样品洗脱液;

[0008] (2) 溶解过滤:将五味子粗品用溶剂溶解,超声过滤后,将滤液用步骤(1)配制的流动相稀释作为样品;

[0009] (3) 动态轴向压缩柱装填:将色谱填料用步骤(1)配制的流动相匀浆得到匀浆液,将匀浆液送入动态轴向压缩柱,排出流动相后压实色谱填料,完成动态轴向压缩柱的装填;

[0010] (4) 系统平衡:用步骤(1)配制的流动相冲洗步骤(3)装填的动态轴向压缩柱,持续 10-20min,直到色谱仪检测的色谱基线平稳,达到平衡状态;

[0011] (5) 洗脱分离:将步骤(2)所得样品注入步骤(4)平衡后的动态轴向压缩柱,用紫外检测器检测样品分离情况,根据保留时间和峰高确定每种五味子单体开始收集和停止收

集的时间点；

[0012] (6) 浓缩：将步骤(5)收集到的每种单体分别减压浓缩，去除溶剂。

[0013] 本发明的进一步改进方案是，步骤(1)配制流动相的弱极性溶剂为正己烷、乙酸乙酯、异丙醇，体积比例 60~95 : 2~30 : 3~10。

[0014] 本发明的进一步改进方案是，步骤(2)采用 0.45 μm 有机滤膜对溶解有五味子粗品的溶剂进行过滤。

[0015] 本发明的进一步改进方案是，步骤(2)的溶剂由正己烷、乙酸乙酯、异丙醇中的一种或两种或两种以上混合而成。

[0016] 本发明的进一步改进方案是，步骤(2)的样品浓度为 0.28~0.5g/ml。

[0017] 本发明的进一步改进方案是，步骤(3)的色谱填料为 200~800 目极性硅胶填料。

[0018] 本发明的进一步改进方案是，步骤(4)动态轴向压缩柱的填料高度为 250mm。

[0019] 本发明的进一步改进方案是，步骤(5)的紫外检测器的检测波长为 250nm。

[0020] 本发明的与现有技术相比的优点在于：

[0021] 一、在一次分离纯化过程中，可以获得多种单体，且液相色谱法检测纯度在 98.5% 以上，收率在 98% 以上；

[0022] 二、工艺简单，所用有机溶剂价格便宜，消耗量少，且均可以回收再用；

[0023] 三、紫外检测器在线监测，操作简单，效率高，产品质量容易控制；

[0024] 四、等度洗脱，对设备性能要求低，生产周期短，可以轻易实现从实验室到工业化五味子单体的高效分离纯化。

附图说明

[0025] 图 1 为五味子粗品的反相梯度检测图谱。

[0026] 图 2 为步骤(5)检测样品分离情况的 HPLC 图谱。

[0027] 图 3 为收集的五味子甲素的反相梯度检测图谱。

[0028] 图 4 为收集的五味子乙素的反相梯度检测图谱。

[0029] 图 5 为动态轴向压缩柱结构示意图。

具体实施方式

[0030] 实施例 1

[0031] 用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法，包括以下步骤：

[0032] (1) 流动相配制：用正己烷、乙酸乙酯、异丙醇按照体积比例 95:2:3 配制流动相，作为样品洗脱液；

[0033] (2) 溶解过滤：将 10g 五味子粗品用体积比例为 3:1:6 的正己烷、乙酸乙酯、异丙醇混合溶液溶解，超声后用 0.45 μm 有机滤膜过滤，将滤液用步骤(1)配制的流动相稀释成浓度为 0.5g/ml 的样品；其中五味子粗品由五味子药材经水煮、过滤，将得到的药渣用浓度为 80% 的乙醇提纯、过滤，得到滤液，待滤液中的乙醇全部挥发后，将剩余物质用水沉淀，将所得沉淀物质用有机溶剂萃取(例如用汽油与浓度为 80% 的乙醇混合物萃取)，再浓缩去除溶剂得到五味子粗品；

[0034] (3) 动态轴向压缩柱装填：将 240g 的 200~800 目极性硅胶填料用步骤(1)配制的

流动相匀浆得到匀浆液,将匀浆液送入直径为 50mm 的动态轴向压缩柱,排出流动相后压实色谱填料,完成动态轴向压缩柱的装填;

[0035] (4) 系统平衡:用步骤(1)配制的流动相冲洗步骤(3)装填的动态轴向压缩柱,持续 10~20min,直到色谱仪检测的色谱基线平稳,达到平衡状态;

[0036] (5) 洗脱分离:设定紫外检测器的检测波长为 250nm,输液泵的流速为 100ml/min,将步骤(2)所得样品注入步骤(4)平衡后的动态轴向压缩柱,用紫外检测器检测样品分离情况,当有物质通过时,检测器将色谱信号传递到电脑上的色谱工作站,实时检测物质分离情况,从 10min 后的色谱峰逐个收集五味子单体,根据保留时间和峰高确定每种五味子单体开始收集和停止收集的时间点,所收集到的五味子单体包括:五味子醇甲、甲素、乙素、酯甲、丙素;

[0037] (6) 浓缩:将步骤(5)收集到的每种单体分别减压浓缩,去除溶剂,取每种单体 0.05g,分别溶解后定容到 100ml,再分别从中取 20 μ l,分别采用液相色谱法检测,纯度均达 99.5% 以上。

[0038] 如图 5 所示的动态轴向压缩柱,包括柱管 9,所述柱管 9 上、下两端分别通过 A 法兰 4 和 B 法兰 11 连接有上盖板 3、下盖板 10,所述上盖板 3 上设有孔 5,所述下盖板 10 上设有出料口 12,还包括活塞 7 和活塞 7 的驱动装置,所述活塞 7 设置于柱管 9 内腔,所述活塞 7 上设有 A 流体分配装置 15,所述 A 流体分配装置 15 的流动相入口 8 通过弹簧形盘管与孔 5 连通,所述 A 流体分配装置 15 的分配口位于活塞 7 的下端面;所述活塞 7 与上盖板 3 之间设有限位柱 13,所述限位柱 13 的一端垂直连接于活塞 7,另一端朝向上盖板 3;所述柱管 9 在活塞 7 与下盖板 10 之间的壁上设有连通内腔的进料口 14;所述下盖板 10 上设有 B 流体分配装置 16,所述 B 流体分配装置 16 的分配口设于下盖板 10 朝向活塞 7 的一端,所述 B 流体分配装置 16 的流动相出口连通于出料口 12。

[0039] 实施例 2

[0040] 用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法,包括以下步骤:

[0041] (1) 流动相配制:用正己烷、乙酸乙酯、异丙醇按照体积比例 70:23:7 配制流动相,作为样品洗脱液;

[0042] (2) 溶解过滤:将 100g 五味子粗品用体积比例为 1:1 的乙酸乙酯、异丙醇混合溶液溶解,超声后用 0.45 μ m 有机滤膜过滤,将滤液用步骤(1)配制的流动相稀释成浓度为 0.4g/ml 的样品;

[0043] (3) 动态轴向压缩柱装填:将 2000g 的 200~800 目极性硅胶填料用步骤(1)配制的流动相匀浆得到匀浆液,将匀浆液送入直径为 150mm 的动态轴向压缩柱,排出流动相后压实色谱填料,完成动态轴向压缩柱的装填;

[0044] (4) 系统平衡:用步骤(1)配制的流动相冲洗步骤(3)装填的动态轴向压缩柱,持续 10~20min,直到色谱仪检测的色谱基线平稳,达到平衡状态;

[0045] (5) 洗脱分离:设定紫外检测器的检测波长为 250nm,输液泵的流速为 800ml/min,将步骤(2)所得样品注入步骤(4)平衡后的动态轴向压缩柱,用紫外检测器检测样品分离情况,当有物质通过时,检测器将色谱信号传递到电脑上的色谱工作站,实时检测物质分离情况,从 10min 后的色谱峰逐个收集五味子单体,根据保留时间和峰高确定每种五味子单体开始收集和停止收集的时间点;

[0046] (6) 浓缩 : 将步骤(5) 收集到的每种单体分别减压浓缩, 去除溶剂, 取每种单体 0.05g, 溶解后定容到 100ml, 再从中取 20 μ l, 采用液相色谱法检测纯度可达 99.3% 以上。

[0047] 其余实施如实施例 1。

[0048] 实施例 3

[0049] 用动态轴向压缩柱分离纯化五味子单体的方法, 包括以下步骤:

[0050] (1) 流动相配制 : 用正己烷、乙酸乙酯、异丙醇按照体积比例 60:30:10 配制流动相, 作为样品洗脱液;

[0051] (2) 溶解过滤 : 将 500g 五味子粗品用正己烷溶液溶解, 超声后用 0.45 μ m 有机滤膜过滤, 将滤液用步骤(1) 配制的流动相稀释成浓度为 0.28g/ml 的样品;

[0052] (3) 动态轴向压缩柱装填 : 将 8000g 的 200~800 目极性硅胶填料用步骤(1) 配制的流动相匀浆得到匀浆液, 将匀浆液送入直径为 300mm 的动态轴向压缩柱, 排出流动相后压实色谱填料, 完成动态轴向压缩柱的装填;

[0053] (4) 系统平衡 : 用步骤(1) 配制的流动相冲洗步骤(3) 装填的动态轴向压缩柱, 持续 10~20min, 直到色谱仪检测的色谱基线平稳, 达到平衡状态;

[0054] (5) 洗脱分离 : 设定紫外检测器的检测波长为 250nm, 输液泵的流速为 3500ml/min, 将步骤(2) 所得样品注入步骤(4) 平衡后的动态轴向压缩柱, 用紫外检测器检测样品分离情况, 当有物质通过时, 检测器将色谱信号传递到电脑上的色谱工作站, 实时检测物质分离情况, 从 13min 后的色谱峰逐个收集五味子单体, 根据保留时间和峰高确定每种五味子单体开始收集和停止收集的时间点;

[0055] (6) 浓缩 : 将步骤(5) 收集到的每种单体分别减压浓缩, 去除溶剂, 取每种单体 0.05g, 溶解后定容到 100ml, 再从中取 20 μ l, 采用液相色谱法检测纯度可达 98.8% 以上。

[0056] 其余实施如实施例 1。

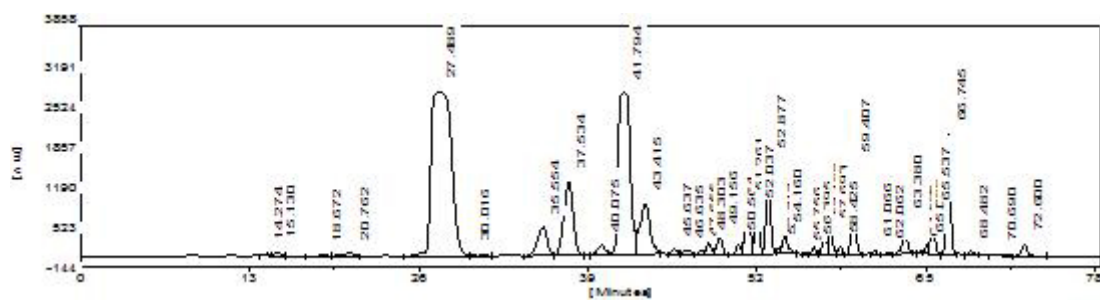


图 1

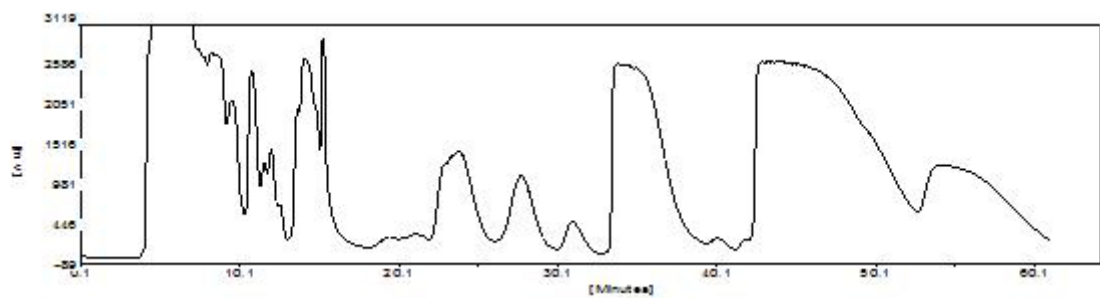


图 2

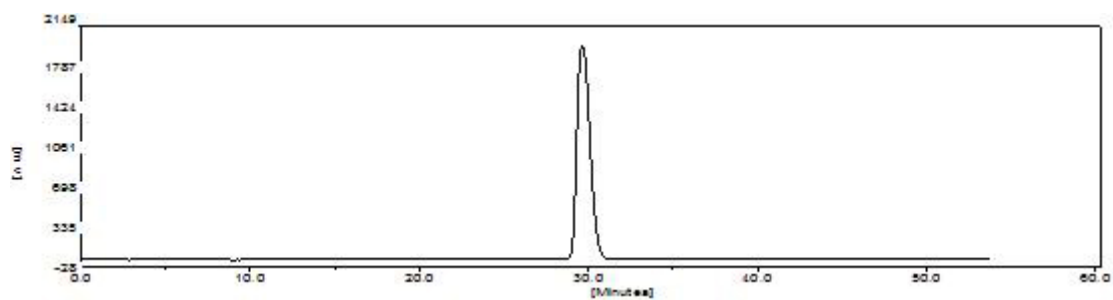


图 3

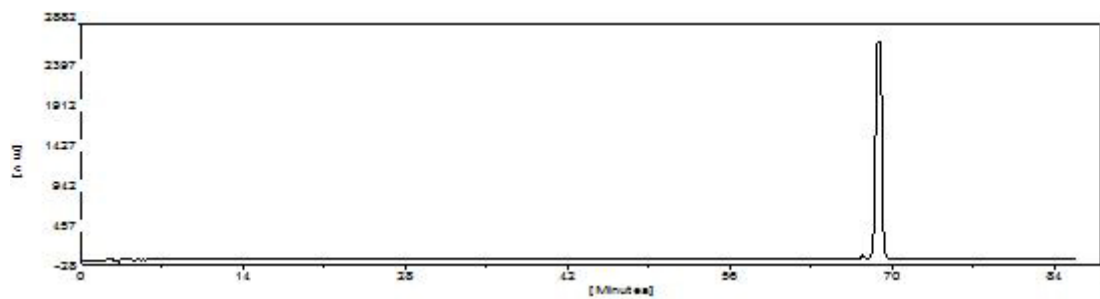


图 4

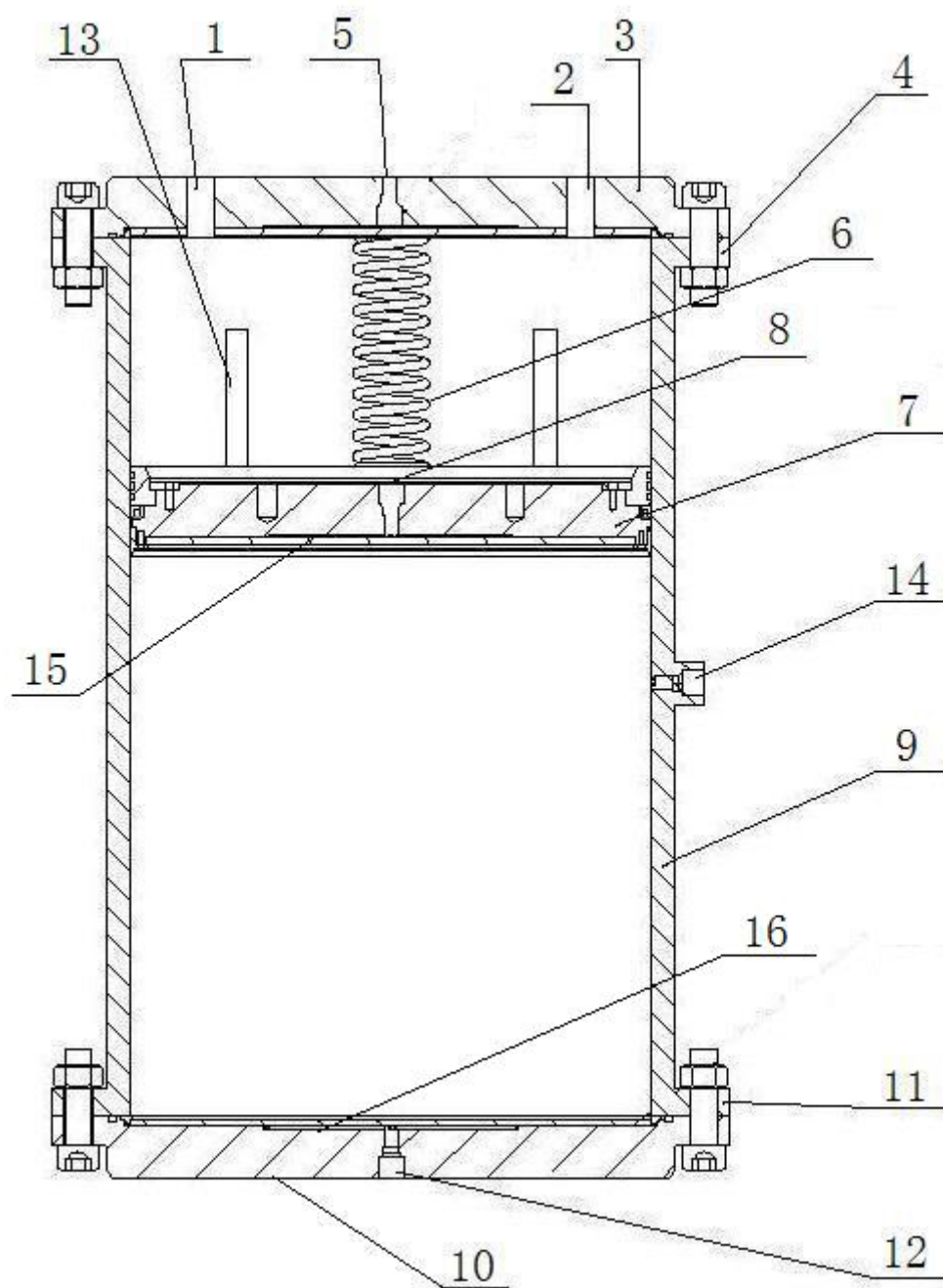


图 5