



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108516999 A

(43)申请公布日 2018.09.11

(21)申请号 201810549140.2

(22)申请日 2018.05.31

(71)申请人 浙江大学

地址 310013 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 陈卫 徐阳 谢佳宏

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 朱滕琪

(51) Int. Cl.

C07H 17/065(2006.01)

C07H 1/08(2006.01)

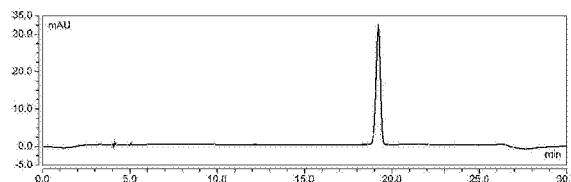
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法

(57)摘要

本发明一种分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,包括醇提浓缩、大孔树脂吸附、制备液相色谱纯化和高速逆流色谱分离,从花色苷组成复杂的蓝莓原料中分离制备高纯度矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体。本发明首次将制备液相色谱和高速逆流色谱技术结合,并通过对工艺参数的优化,从蓝莓中分离得到高纯度的矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体,其纯度最高可达99%。



1. 一种分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,包括:

(1) 醇提浓缩:以蓝莓为原料,经醇提浓缩得到蓝莓花色苷粗提液;

(2) 大孔树脂吸附:将所述蓝莓花色苷粗提液注入大孔树脂,经洗脱及后处理得到蓝莓花色苷提取物冻干粉;

(3) 制备液相色谱纯化:采用C18色谱柱,经流动相进行梯度洗脱,再经后处理得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉;

所述流动相:A相为纯甲醇或酸的体积百分浓度为0.1~1.5%的酸-甲醇体系,B相为甲酸体积百分浓度为1~5%的甲酸-水体系;

所述梯度洗脱的程序为:A相的体积百分浓度在0~5min内保持5%不变,在5~30min内从5%上升至60%,收集18~19min的洗脱物;

(4) 高速逆流色谱分离:以正丁醇-甲基叔丁基醚-甲醇-水-三氟乙酸为两相溶剂体系,经分离得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷;

所述正丁醇、甲基叔丁基醚、甲醇、水和三氟乙酸的体积比为2:2:1:5:0.01~0.1。

2. 根据权利要求1所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述醇提浓缩,具体为:

将洗净的蓝莓与酸性乙醇溶液混合,超声提取完全后过滤并收集滤液,滤液在40~50℃下真空旋转蒸发除去乙醇并浓缩,得到蓝莓花色苷粗提液;

所述酸性乙醇溶液为酸的体积百分浓度为0.1~1.5%的乙醇溶液;

所述蓝莓与酸性乙醇溶液的质量体积比为1:6~12g/mL。

3. 根据权利要求2所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,所述酸选自盐酸、甲酸、乙酸、草酸中的至少一种;

所述乙醇溶液的体积百分浓度为50~95%。

4. 根据权利要求1所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述大孔树脂吸附,具体为:

将所述蓝莓花色苷提取液注入大孔树脂中,先用去离子水冲洗大孔树脂,再用体积百分浓度为2~22%的酸性醇溶液进行梯度洗脱,收集体积百分浓度为14~18%的酸性醇溶液的洗脱液,40~50℃下真空旋转蒸发除醇后,真空冷冻干燥得到蓝莓花色苷提取物冻干粉;

所述大孔树脂的牌号选自AB-8、HPD-100、D101或DM-130;

所述酸性醇溶液选自酸的体积百分浓度为0.1~1.5%的醇溶液,醇溶液选自甲醇溶液或乙醇溶液,酸选自盐酸、甲酸、乙酸中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,步骤(3)中,先将所述蓝莓花色苷提取物冻干粉经去离子水复溶后,再注入制备液相色谱仪中进行纯化;

所述复溶后的浓度为20~120mg/mL,进样量为1~4mL;

所述C18色谱柱的规格为20mm×250mm,温度为30℃;

所述A相中的酸选自甲酸或三氟乙酸。

6. 根据权利要求5所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于:

所述复溶后的浓度为30~50mg/mL;

所述流动相:A相为纯甲醇或甲酸体积百分浓度为0.1%的甲酸-甲醇体系,B相为甲酸体积百分浓度为3~5%的甲酸-水体系,流动相的流速为5~10mL/min。

7.根据权利要求1所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述的后处理包括减压浓缩和真空冷冻干燥。

8.根据权利要求1所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,步骤(4)中,所述高速逆流色谱分离,具体为:

配制所述两相溶剂系统,上相为固定相,下相为流动相,以20~30mL/min的流速将所述固定相泵入高速逆流色谱仪中,在25~35℃、主机转速为700~1000r/min的条件下,以1~8mL/min的流速泵入所述流动相,待两相达到平衡后,将所述矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉用流动相溶解后进样,经液相检测后,收集仅包含目标产物的流出液,再经减压浓缩、冷冻干燥后得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体。

9.根据权利要求8所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,所述两相溶剂系统中,正丁醇、甲基叔丁基醚、甲醇、水和三氟乙酸的体积比为2:2:1:5:0.01;

以20~30mL/min的流速将所述固定相泵入高速逆流色谱仪中,在25~30℃、主机转速为850~1000r/min的条件下,以3mL/min的流速泵入所述流动相。

10.根据权利要求9所述的分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,其特征在于,所述矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉用流动相溶解后的浓度为15~35mg/mL,进样体积为1~15mL;

所述液相检测的波长为280nm。

一种分离制备矮牵牛素-3-O-半乳糖苷的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及天然产物的分离纯化领域,具体涉及一种分离制备矮牵牛素-3-O-半乳糖苷的方法。

背景技术

[0002] 花色苷是广泛存在于植物中的一种水溶性色素,是由花青素与一个或多个糖基,如葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等,通过糖苷键结合形成的多酚类化合物。自然界中常见的花青素主要有6种,分别是天竺葵素(Pelargonidin)、矢车菊素(Cyanidin)、飞燕草素(Delphinidin),芍药素(Peonidin),矮牵牛素(Petunidin)和锦葵色素(Malvidin)。近年来,大量的研究证实天然来源的花色苷具有抗氧化、抗肿瘤、预防心血管疾病、缓解糖尿病及控制肥胖等生物活性。随着人们生活水平的不断提高,人们对天然来源且无毒副作用的功能组分的呼声也越来越高,花色苷作为天然来源最具代表性的功能因子,因其良好的着色功能及优良的生物活性受到广大研究者及食品医药企业的青睐。

[0003] 但由于花色苷类化合物结构相似,极性差异较小,导致高纯度花色苷单体的分离纯化极其困难。但目前,已经有报道分离纯化得到高纯度花色苷单体。

[0004] 如公开号为CN 106366141 A的中国专利文献公开了一种分离制备天竺葵素-3-O-葡萄糖苷单体的方法,以草莓为原料,通过冷冻干燥、醇提浓缩、分级萃取、AB-8大孔树脂纯化制备得到。又如公开号为CN 106831911 A的中国专利文献公开了一种从蓬蘽中分离纯化天竺葵素-3-O-葡萄糖苷单体的方法,包括醇提浓缩、乙酸乙酯萃取、AB-8大孔树脂及高速逆流色谱。

[0005] 上述技术方案中虽然均制备得到了高纯度的花色苷单体,但主要原因在于草莓和蓬蘽中花色苷组成简单,仅含矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-葡萄糖苷和天竺葵素-3-O-芸香糖苷的3种花色苷化合物,其中天竺葵素-3-O-葡萄糖苷占总花色苷含量的80%以上。但对于花色苷组成复杂的原料,上述的技术方案则难以实现高纯度花色苷单体的纯化与制备。

[0006] 蓝莓,又称越橘、蓝浆果,属杜鹃花科,越橘属植物,不仅富含人体所需的基础营养成分,而且还富含多种不同种类的花色苷,具有活化视网膜、降血糖、抗炎和抗肿瘤作用。我国的蓝莓栽培起步较晚,目前主要以直接鲜食消费为主,或加工成果酱、果汁、果酒等初级产品,有关高附加值的蓝莓产品在国内外市场上却寥寥无几。由于蓝莓中的花色苷组成复杂,含有至少12种结构相似的花色苷化合物,导致目前通过单一的柱层析或色谱技术制备得到的高纯度花色苷均为花色苷混合物,而非高纯度花色苷单体。

[0007] 如公开号为CN 106905391 A的中国专利文献中公开了一种蓝莓花色苷提取、分离纯化方法,将蓝莓榨汁与提取剂混合,在常温、压力为100~160MPa的条件下均质提取1~4次,过滤、合并滤液,得到蓝莓花色苷粗提物,再经HPD600大孔树脂进行分离纯化。该技术方案以pH=1~2的80%乙醇溶液为提取剂,利用高压将蓝莓功效成分从生物细胞中释放,解决了蓝莓有效成分在保持高提取率的前提下,有效成分不被高温破坏的问题,但获得的提

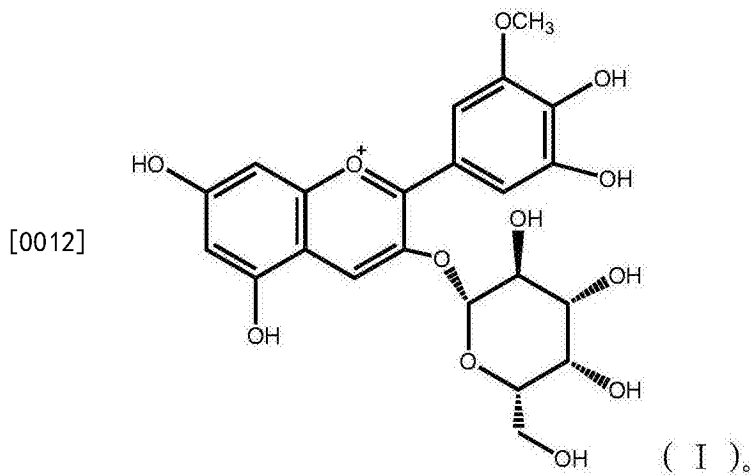
取物为花色苷混合物,而花色苷的含量仅为46.45%。

[0008] 又如公开号为CN 104109403 A的中国专利文献中公开了一种野生蓝莓花青素提取、纯化新方法,制备工艺包括:生物酶解、微波回流提取、收集、粗过滤、微孔过滤、超滤、真空冷冻干燥、分相、高速逆流色谱纯化。该技术方案采用非热力高效提取分离技术,提高了萃取速度,但提取、纯化工艺过于复杂,难以实现大规模的工业化生产,且获得的提取物仍为花色苷混合物,花色苷的纯度最高仅为42.7%。

[0009] 郭丹妮等(“葡聚糖凝胶色谱结合高速逆流色谱提取蓝莓中花青素”,郭丹妮,向灿辉,陈阳et.al,食品工业,2016年第2期)试验结合葡聚糖凝胶色谱及高速逆流色谱对野生蓝莓中的花青素进行了分离纯化,蓝莓粗提物先经过葡聚糖凝胶色谱初步分离,得到花青素含量高的组份,再经高速逆流色谱分离,以MTBE-正丁醇-乙腈-水(体积比1:3:1:5)为两相溶剂体系,流速0.5m L/min、主机转速1 860r/min以及检测波长280nm的条件下进行分离,从蓝莓的葡聚糖凝胶色谱柱分离产物中一次性分离得到两种花青素,纯度分别为65.0%和90.0%。该技术方案虽然公开其分离得到两种花青素,但从其图2的UPLC分析色谱图中,仅可推断样品1和样品2可能是花青素,而无法确认无误的得出两种样品即为花青素的结论,更无法进一步确认两种样品的化学成分。

[0010] 因此,研究开发一种纯化复杂花色苷原料如蓝莓的工艺对推动花色苷标准品市场及开发蓝莓深加工产品具有重要意义。

[0011] 矮牵牛素-3-0-半乳糖苷(Petunidin-3-0-galactoside),结构式如下,是蓝莓中主要的花色苷之一,也是蓝莓花色苷发挥生物活性的重要组成成分。



[0013] 但目前还未发现从蓝莓中分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体的研究和报道。

发明内容

[0014] 本发明为解决上述技术问题,提供了一种分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,将制备液相色谱和高速逆流色谱技术结合,再通过对工艺参数的优化,从花色苷组成复杂的蓝莓原料中分离制备得到高纯度的矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体。

[0015] 具体技术方案如下:

[0016] 一种分离制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的方法,包括:

[0017] (1) 醇提浓缩:以蓝莓为原料,经醇提浓缩得到蓝莓花色苷粗提液;

[0018] (2) 大孔树脂吸附:将所述蓝莓花色苷粗提液注入大孔树脂,经洗脱及后处理得到

蓝莓花色苷提取物冻干粉；

[0019] (3) 制备液相色谱纯化：采用C18色谱柱，经流动相进行梯度洗脱，再经后处理得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉；

[0020] 所述流动相：A相为纯甲醇或酸的体积百分浓度为0.1~1.5%的酸-甲醇体系，B相为甲酸体积百分浓度为1~5%的甲酸-水体系；

[0021] 所述梯度洗脱的程序为：A相的体积百分浓度在0~5min内保持5%不变，在5~30min内从5%上升至60%，收集18~19min的洗脱物；

[0022] (4) 高速逆流色谱分离：以正丁醇-甲基叔丁基醚-甲醇-水-三氟乙酸为两相溶剂体系，经分离得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷；

[0023] 所述正丁醇、甲基叔丁基醚、甲醇、水和三氟乙酸的体积比为2:2:1:5:0.01~0.1。

[0024] 如无特别说明，本发明中出现的所有原料的百分比均为体积百分浓度。

[0025] 本发明中出现的各种溶液，如无特别说明，均以水作为溶剂。

[0026] 步骤(1)中，所述醇提浓缩，具体为：

[0027] 将洗净的蓝莓与酸性乙醇溶液混合，超声提取完全后过滤并收集滤液，滤液在40~50℃下真空旋转蒸发除去乙醇并浓缩，得到蓝莓花色苷粗提液；

[0028] 所述酸性乙醇溶液为酸的体积百分浓度为0.1~1.5%的乙醇溶液；

[0029] 所述酸选自盐酸、甲酸、乙酸、草酸中的至少一种；

[0030] 所述乙醇溶液的体积百分浓度为50~95%；

[0031] 所述蓝莓与酸性乙醇的质量体积比(即料液比)为1:6~12g/mL。

[0032] 优选地，所述超声提取时间为60~240min，该过程在25~49℃下、避光条件下进行。

[0033] 为保证花色苷提取完全，将首次提取后得到的滤渣再按照相同条件重复提取若干次。

[0034] 进一步优选，所述乙醇溶液的体积百分浓度为70~90%，蓝莓与酸性乙醇的质量体积比为1:7~9g/mL。

[0035] 步骤(2)中，所述大孔树脂吸附，具体为：

[0036] 将所述蓝莓花色苷提取液注入大孔树脂中，先用去离子水冲洗大孔树脂，再用体积百分浓度为2~22%的酸性醇溶液进行梯度洗脱，收集体积百分浓度为14~18%的酸性醇溶液的洗脱液，40~50℃下真空旋转蒸发除醇后，真空冷冻干燥得到蓝莓花色苷提取物冻干粉；

[0037] 优选地，所述大孔树脂的牌号选自AB-8、HPD-100、D101或DM-130；进一步优选为AB-8大孔树脂。

[0038] 优选地，所述酸性醇溶液选自酸的体积百分浓度为0.1~1.5%的醇溶液；

[0039] 醇溶液选自甲醇溶液或乙醇溶液，体积百分浓度为2~22%；

[0040] 酸选自盐酸、甲酸、乙酸中的至少一种。

[0041] 进一步优选，分别采用含0.5% (v/v, 下同) 盐酸的2%、6%、10%、14%、18%、22%的乙醇溶液以2倍柱体积(2BV)进行梯度洗脱，收集体积百分浓度为14~18%的盐酸-乙醇溶液的洗脱液。

[0042] 所述酸性醇溶液的浓度，以含0.5%盐酸的2%的乙醇溶液为例，乙醇溶液的体积

百分浓度为2%，而盐酸与乙醇溶液的体积比为0.5:99.5。

[0043] 步骤(3)中,先将所述蓝莓花色苷提取物冻干粉经去离子水复溶后,再注入制备液相色谱仪中进行纯化;纯化后,所述的后处理包括减压浓缩和真空冷冻干燥。

[0044] 优选地:

[0045] 所述复溶后的浓度为20~120mg/mL,进样量为1~4mL;

[0046] 所述C18色谱柱的规格为20mm×250mm,温度为30℃;

[0047] 所述A相中的酸选自甲酸或三氟乙酸。

[0048] 进一步优选:

[0049] 所述复溶后的浓度为30~50mg/mL,进样量为2mL;

[0050] 所述流动相:A相为纯甲醇或甲酸体积百分浓度为0.1%的甲酸-甲醇体系,B相为甲酸体积百分浓度为3~5%的甲酸-水体系,流动相的流速为5~10mL/min。

[0051] 所述A相为甲酸体积百分浓度为0.1%的甲酸-甲醇体系,具体是指甲酸与甲醇的体积比为0.1:99.9。

[0052] 步骤(4)中,所述高速逆流色谱分离,具体为:

[0053] 配制所述两相溶剂系统,上相为固定相,下相为流动相,以20~30mL/min的流速将所述固定相泵入高速逆流色谱仪中,在25~35℃、主机转速为700~1000r/min的条件下,以1~8mL/min的流速泵入所述流动相,待两相达到平衡后,将所述矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉用流动相溶解后进样,经液相检测后,收集仅包含目标产物的流出液,再经减压浓缩、冷冻干燥后得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体。

[0054] 优选地,所述矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉用流动相溶解后的浓度为15~35mg/mL;

[0055] 所述检测的波长为280nm。

[0056] 进一步优选,所述两相溶剂系统中,正丁醇-甲基叔丁基醚-甲醇-水-三氟乙酸的体积比为2:2:1:5:0.01;

[0057] 以20~30mL/min的流速将所述固定相泵入高速逆流色谱仪中,在25~30℃、主机转速为850~1000r/min的条件下,以3mL/min的流速泵入所述流动相。

[0058] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0059] 本发明首次将制备液相色谱和高速逆流色谱技术结合,并通过优化工艺参数的优化,从花色苷组成复杂的蓝莓中分离得到高纯度的矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体,其纯度最高可达99%。该分离方法具有样品处理量大、重复性好等优点,可大量制备得到高纯度的矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体,使之能够实现工业化生产,对于开发利用我国蓝莓资源提供了新的思路。

附图说明

[0060] 图1为实施例1中蓝莓花色苷冻干粉的高效液相色谱图;

[0061] 图2为实施例1中蓝莓花色苷冻干粉经制备液相色谱纯化后产物的高效液相色谱图;

[0062] 图3为实施例1中最终产物的高效液相色谱图;

[0063] 图4为对比例1中最终产物的高效液相色谱图;

- [0064] 图5为对比例2中最终产物的高效液相色谱图；
[0065] 图6为对比例5中最终产物的高效液相色谱图；
[0066] 图7为对比例6中最终产物的高效液相色谱图。

具体实施方式

[0067] 下面结合具体实施例对本发明作进一步描述,以下列举的仅是本发明的具体实施例,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0068] 实施例1

[0069] (1) 将1000g新鲜蓝莓洗净,按照料液比1:7(w/v,g/mL)的比例加入含0.1%(v/v)盐酸的70%的乙醇水溶液(乙醇与水的体积比为70:30)充分混合,超声提取90min,(45℃,避光),真空过滤,滤渣按上述条件重复提取2次,合并滤液,在48℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷粗提液;

[0070] (2) 将乙醇浸泡24h后的AB-8大孔树脂装入层析柱中,用去离子水洗至无醇味后,用4%的盐酸溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水洗至流出液为中性;用4%的氢氧化钠溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水冲洗至中性。将花色苷粗提液以0.5BV/h的流速注入AB-8大孔树脂中。先用去离子水以2BV/h的流速冲洗树脂,再分别用含0.5%(v/v)盐酸的2%,6%,10%,14%,18%,22%的乙醇水溶液以2BV/h的流速冲洗1h,并收集14~18%洗脱部分。在48℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷浸膏,将所述浸膏用少量的去离子水溶解,之后冷冻干燥得到蓝莓花色苷冻干粉;

[0071] (3) 制备液相色谱纯化:使用Unitary C18 20mm×250mm色谱柱,将花色苷冻干粉用去离子水溶解至浓度为50mg/mL,注入制备型液相色谱中,进样量2mL,所用流动相为A相:99.9%甲醇+0.1%甲酸;B相:97%水+3%甲酸;柱温为30℃,流速为10mL/min,梯度为:5%的A相0~5min,5%~60%A相5~30min。并在280nm下检测,收集18~19min的洗脱物,合并减压浓缩,真空冷冻干燥,得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉。

[0072] (4) 高速逆流色谱制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷:

[0073] 将正丁醇:甲基叔丁基醚:甲醇:水:三氟乙酸按2:2:1:5:0.01的体积比置于分液漏斗中,充分摇匀,静置30min后,将上下相分开,超声脱气35min。将上相作为固定相,下相作为流动相。将高速逆流色谱仪启动预热30min后,循环水浴设置为25℃,将固定相以30mL/min的流速泵入仪器,主机正转,启动仪器,使主机转速至850r/min。转速稳定后,以2mL/min的流速泵入流动相,两相在管路中达到平衡后,将200mg冻干粉溶于10mL流动相中,进样,每9mL收集一管,经液相检测(检测波长280nm)后,将只含目标产物-矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的管液收集合并,再经减压浓缩,得到花色苷浓缩液,冻干即得到15mg最终产物。经图3的高效液相色谱图可以明确,该最终产物为矮牵牛素-3-0-半乳糖苷,纯度为98.25%。

[0074] 通过对比图1~3的高效液相色谱图可知,蓝莓经过提取浓缩、大孔树脂梯度洗脱后,得到的蓝莓花色苷冻干粉主要是含有9个花色苷单体的混合物,进一步经过制备液相色谱纯化,收集18~19min的洗脱物,可以得到含有矮牵牛素-3-0-半乳糖苷及其他2个花色苷的混合物,最后通过高速逆流色谱分离,即可得到仅含矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的单体花色苷,且纯度为98.25%。

[0075] 实施例2

[0076] (1) 将3kg新鲜蓝莓洗净,按照料液比1:9(w/v)的比例加入含1.0%(v/v)盐酸的80%的乙醇水溶液充分混合,超声提取120min,(45℃以下,避光),减压过滤,滤渣按上述条件重复提取3次,合并滤液,在46℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷粗提液;

[0077] (2) 将乙醇浸泡24h后的AB-8大孔树脂装入层析柱中,用去离子水洗至无醇味后,用4%的盐酸溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水洗至流出液为中性;用4%的氢氧化钠溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水冲洗至中性。将花色苷粗提液以0.5BV/h的流速注入AB-8大孔树脂中。先用去离子水以2BV/h的流速冲洗树脂,再分别用含0.5%(v/v)盐酸的2%,6%,10%,14%,18%,22%的乙醇水溶液以2BV/h的流速冲洗1h,并收集14~18%洗脱部分。在48℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷浸膏,将所述浸膏用少量的去离子水溶解,之后冷冻干燥得到蓝莓花色苷冻干粉;

[0078] (3) 制备液相色谱纯化:使用Unitary C18 20mm×250mm色谱柱,将花色苷冻干粉用去离子水溶解至浓度为30mg/mL,注入制备型液相色谱中,进样量3mL,所用流动相为A相:99.9%甲醇+0.1%甲酸;B相:96%水+4%甲酸;溶剂梯度为:5%的A相0~5min,5%~60%A相5~30min,流速为10mL/min,进行梯度洗脱,并在280nm下检测,收集18~19min的洗脱物,合并减压浓缩,真空冷冻干燥,得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉。

[0079] (4) 高速逆流色谱制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷

[0080] 将正丁醇:甲基叔丁基醚:甲醇:水:三氟乙酸按2:2:1:5:0.01的体积比置于分液漏斗中,充分摇匀,静置30min后,将上下相分开,超声脱气45min。将上相作为固定相,下相作为流动相。将高速逆流色谱仪启动预热30min后,循环水浴设置为30℃,将固定相以25mL/min的流速泵入仪器,主机正转,启动仪器,使主机转速至950r/min。转速稳定后,以3mL/min的流速泵入流动相,两相在管路中达到平衡后,将350mg冻干粉溶于12mL流动相中,进样并在紫外检测器下检测,收集目标峰组分并减压浓缩,冻干即得到40mg矮牵牛素-3-0-半乳糖苷,纯度为98.79%。

[0081] 实施例3

[0082] (1) 将5kg新鲜蓝莓洗净,按照料液比1:8(w/v)的比例加入含1.5%(v/v)盐酸的90%的乙醇水溶液充分混合,超声提取200min,(45℃以下,避光),减压过滤,滤渣按上述条件重复提取4次,合并滤液,在47℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷粗提液;

[0083] (2) 将乙醇浸泡24h后的AB-8大孔树脂装入层析柱中,用去离子水洗至无醇味后,用4%的盐酸溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水洗至流出液为中性;用4%的氢氧化钠溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水冲洗至中性。将花色苷粗提液以0.5BV/h的流速注入AB-8大孔树脂中。先用去离子水以2BV/h的流速冲洗树脂,再分别用含0.5%(v/v)盐酸的2%,6%,10%,14%,18%,22%的乙醇水溶液以2BV/h的流速冲洗1h,并收集14~18%洗脱部分。在48℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷浸膏,将所述浸膏用少量的去离子水溶解,之后冷冻干燥得到蓝莓花色苷冻干粉;

[0084] (3) 制备液相色谱纯化:使用Unitary C18 20mm×250mm色谱柱,将花色苷冻干粉用去离子水溶解浓度30mg/mL,注入制备型液相色谱中,进样量3mL,所用流动相为A相:纯甲醇;B相:95%水+5%甲酸;溶剂梯度为:5%的A相0~5min,5%~60%A相5~30min,进行梯度洗脱,并在280nm下检测,收集18~19min的洗脱物,流速为10mL/min,真空冷冻干燥,得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉。

[0085] (4) 高速逆流色谱制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷

[0086] 将正丁醇:甲基叔丁基醚:甲醇:水:三氟乙酸按2:2:1:5:0.01的体积比置于分液漏斗中,充分摇匀,静置30min后,将上下相分开,超声脱气45min。将上相作为固定相,下相作为流动相。将高速逆流色谱仪启动预热30min后,循环水浴设置为28℃,将固定相以20mL/min的流速泵入仪器,主机正转,启动仪器,使主机转速至1000r/min。转速稳定后,以3mL/min的流速泵入流动相,两相在管路中达到平衡后,将500mg冻干粉溶于15mL流动相中,进样并在紫外检测器下检测,收集目标峰组分并减压浓缩,冻干即得到60mg矮牵牛素-3-0-半乳糖苷,纯度为99.12%。

[0087] 实施例4

[0088] (1) 将5kg新鲜蓝莓洗净,按照料液比1:8(w/v)的比例加入含1.5%(v/v)盐酸的90%的乙醇溶液充分混合,超声提取200min,(45℃以下,避光),减压过滤,滤渣按上述条件重复提取4次,合并滤液,在47℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷粗提液;

[0089] (2) 将乙醇浸泡24h后的AB-8大孔树脂装入层析柱中,用去离子水洗至无醇味后,用4%的盐酸溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水洗至流出液为中性;用4%的氢氧化钠溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水冲洗至中性。将花色苷粗提液以0.5BV/h的流速注入AB-8大孔树脂中。先用去离子水以2BV/h的流速冲洗树脂,再分别用含0.5%(v/v)盐酸的2%,6%,10%,14%,18%,22%的乙醇以2BV/h的流速冲洗1h,并收集14-18%洗脱部分。在48℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷浸膏,将所述浸膏用少量的去离子水溶解,之后冷冻干燥得到蓝莓花色苷冻干粉;

[0090] (3) 制备液相色谱纯化:使用Unitary C18 20mm×250mm色谱柱,将花色苷冻干粉用去离子水溶解浓度30mg/mL,注入制备型液相色谱中,进样量3mL,所用流动相为A相:纯甲醇;B相:99%水+1%甲酸;溶剂梯度为:5%的A相0~5min,5%~60%A相5~30min,流速为10mL/min,进行梯度洗脱,并在280nm下检测,收集18~19min的洗脱物,真空冷冻干燥,得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉。

[0091] (4) 高速逆流色谱制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷

[0092] 将正丁醇:甲基叔丁基醚:甲醇:水:三氟乙酸按2:2:1:5:0.1的体积比置于分液漏斗中,充分摇匀,静置30min后,将上下相分开,超声脱气45min。将上相作为固定相,下相作为流动相。将高速逆流色谱仪启动预热30min后,循环水浴设置为28℃,将固定相以20mL/min的流速泵入仪器,主机正转,启动仪器,使主机转速至1000r/min。转速稳定后,以3mL/min的流速泵入流动相,两相在管路中达到平衡后,将500mg冻干粉溶于15mL流动相中,进样并在紫外检测器下检测,收集目标峰组分并减压浓缩,冻干即得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷,纯度为94.08%。

[0093] 对比例1

[0094] (1) 将5kg新鲜蓝莓洗净,按照料液比1:8(w/v)的比例加入含1.5%(v/v)盐酸的90%的乙醇溶液充分混合,超声提取200min,(45℃以下,避光),减压过滤,滤渣按上述条件重复提取4次,合并滤液,在47℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷粗提液;

[0095] (2) 将乙醇浸泡24h后的AB-8大孔树脂装入层析柱中,用去离子水洗至无醇味后,用4%的盐酸溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水洗至流出液为中性;用4%的氢氧化钠溶液以2BV/h的流速冲洗1h,再用去离子水冲洗至中性。将花色苷粗提液以0.5BV/h的流

速注入AB-8大孔树脂中。先用去离子水以2BV/h的流速冲洗树脂,再分别用含0.5% (v/v) 盐酸的2%,6%,10%,14%,18%,22%的乙醇以2BV/h的流速冲洗1h,并收集14~18%洗脱部分。在48℃下真空旋转蒸发除去乙醇,得到花色苷浸膏,将所述浸膏用少量的去离子水溶解,之后冷冻干燥得到蓝莓花色苷冻干粉;

[0096] (3) 制备液相色谱纯化:使用Unitary C18 20mm×250mm色谱柱,将花色苷冻干粉用去离子水溶解浓度30mg/mL,注入制备型液相色谱中,进样量3mL,所用流动相为A相:纯甲醇;B相:99.9%水+0.1%甲酸;溶剂梯度为:5%的A相0~5min,5%~60%A相5~30min,流速为10mL/min,进行梯度洗脱,并在280nm下检测,收集18~19min的洗脱物,真空冷冻干燥,得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷粗品冻干粉。

[0097] (4) 高速逆流色谱制备矮牵牛素-3-0-半乳糖苷:将正丁醇:甲基叔丁基醚:甲醇:水:三氟乙酸按2:2:1:5:0.5的体积比置于分液漏斗中,充分摇匀,静置30min后,将上下相分开,超声脱气45min。将上相作为固定相,下相作为流动相。将高速逆流色谱仪启动预热30min后,循环水浴设置为28℃,将固定相以20mL/min的流速泵入仪器,主机正转,启动仪器,使主机转速至1000r/min。转速稳定后,以3mL/min的流速泵入流动相,两相在管路中达到平衡后,将500mg冻干粉溶于15mL流动相中,进样并在紫外检测器下检测,收集目标峰组分并减压浓缩,冻干即得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷,纯度为87.56%。

[0098] 通过对比图3和4中的高效液相色谱图可知,当高速逆流色谱分离用两相溶剂体系的成分发生微调后,即可导致最终分离得到的矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体的纯度发生显著变化。

[0099] 对比例2

[0100] 对比于实施例3,去掉制备液相色谱纯化的步骤,其他步骤不变,所得最终产物的高效液相色谱图如图5所示,可知,该分离工艺只能得到含有矮牵牛素-3-0-半乳糖苷的混合物,无法得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体。

[0101] 对比例3

[0102] 制备工艺与实施例3的相同,区别仅在于将高速逆流色谱分离的溶剂体系替换为:正丁醇:甲基叔丁基醚:甲醇:水:三氟乙酸按1:3:1:5:0.01的体积比混合。经测试,由于逆流体系保留率过低,导致无法得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体。

[0103] 对比例4

[0104] 制备工艺与实施例3的相同,区别仅在于将高速逆流色谱分离的溶剂体系替换为:正丁醇:甲基叔丁基醚:乙腈:水:三氟乙酸按2:2:1:5:0.01的体积比混合。经测试,虽然可以得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体,但其纯度仅为90.15%,远低于实施例3制备得到的矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体的纯度(99.12%)。

[0105] 对比例5

[0106] 制备工艺与实施例3的相同,区别仅在于:制备液相色谱纯化工艺中的流动相B中,将甲酸-水溶液体系替换为水溶液,即不加甲酸,其他步骤不变,最终产物的高效液相色谱图如图6所示,得到的为矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体,但纯度低于90%。

[0107] 对比例6

[0108] 制备工艺与实施例3的相同,区别仅在于改变制备液相色谱纯化过程中组分收集时间,若组分收集时间不处在18~19min的范围,则无法得到矮牵牛素-3-0-半乳糖苷单体,

若组分收集时间包含且宽于18~19min范围,则纯度低于98%,最终产物的高效液相色谱图如图7所示。

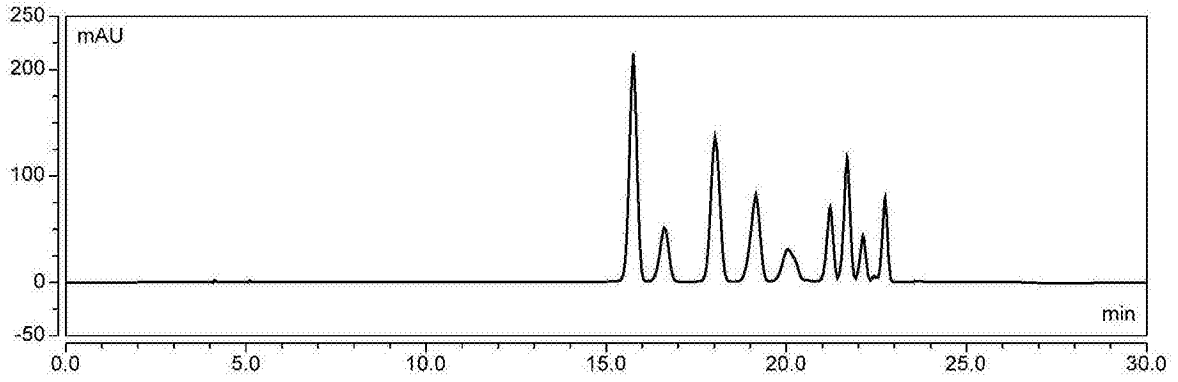


图1

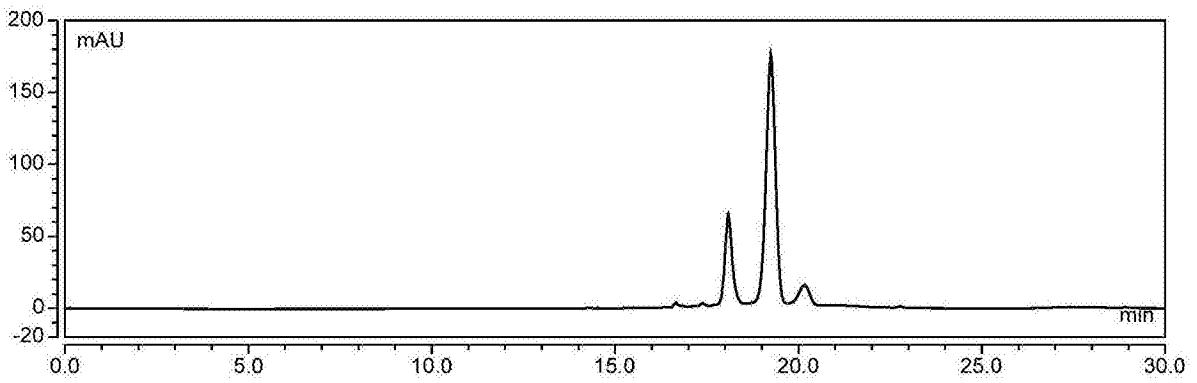


图2

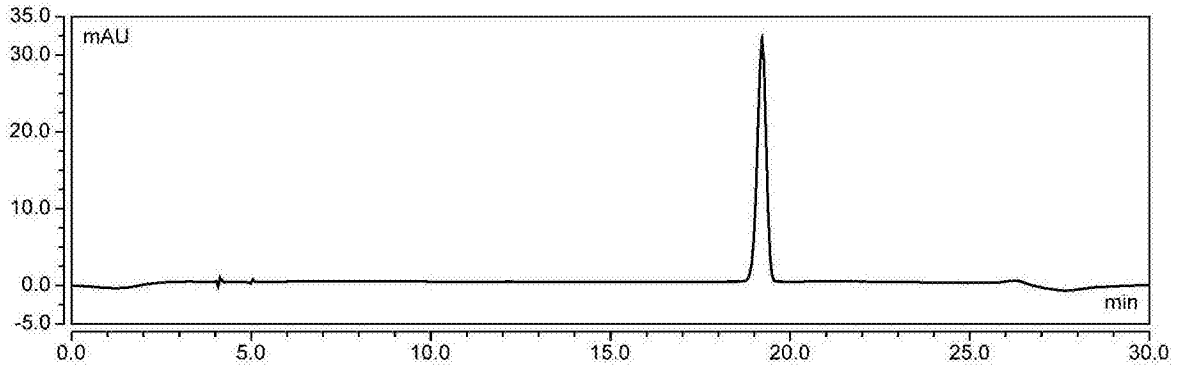


图3

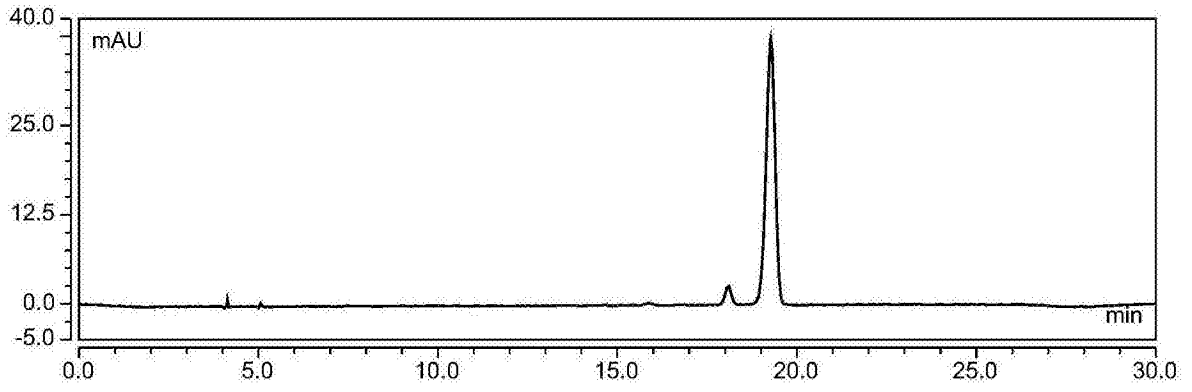


图4

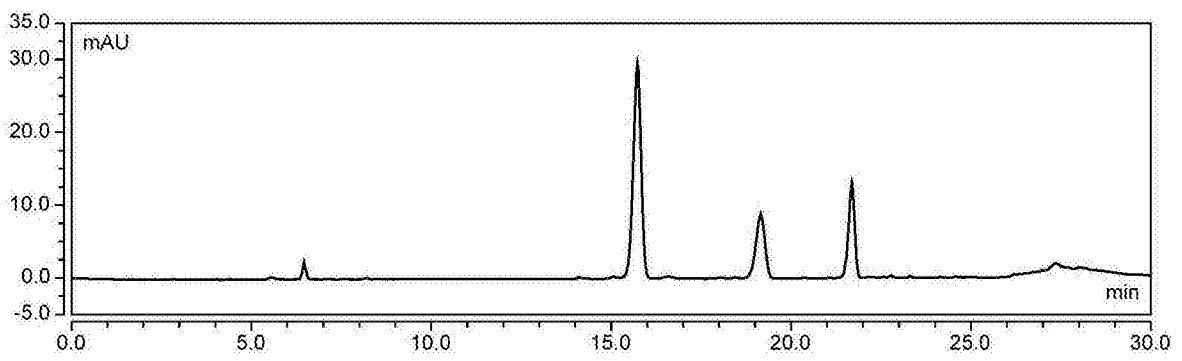


图5

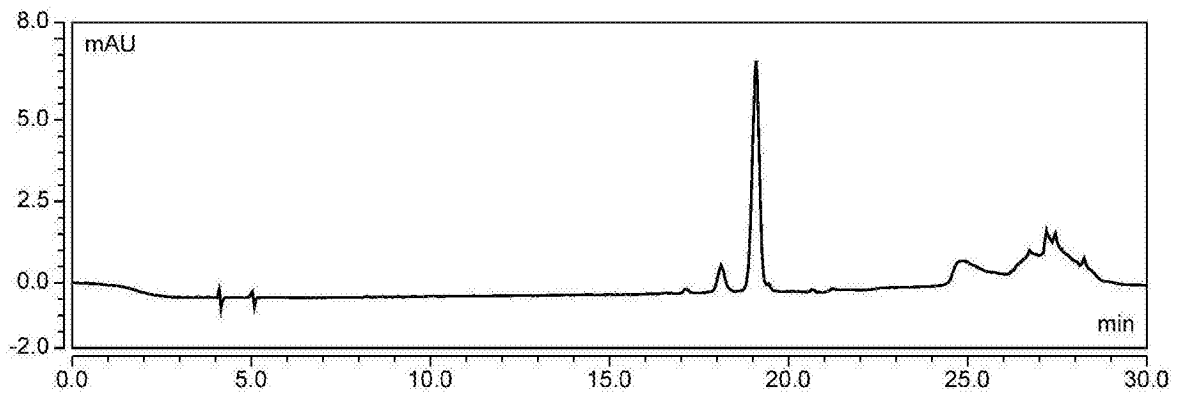


图6

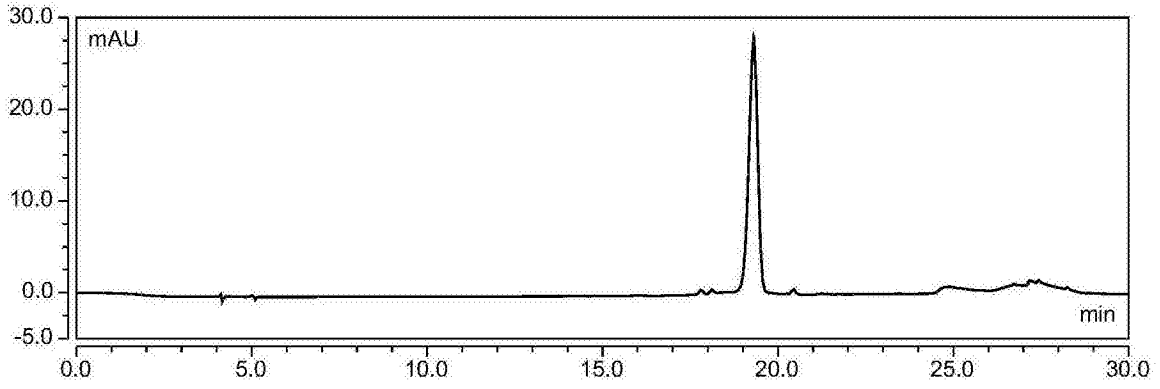


图7