



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101698634 B

(45) 授权公告日 2013.03.27

(21) 申请号 200910207395.1

(22) 申请日 2009.10.20

(66) 本国优先权数据

200910023124.0 2009.06.30 CN

(73) 专利权人 三原润禾植化有限公司

地址 713814 陕西省西安市三原县大程镇美乐街东段

(72) 发明人 王春德 高强 邓尚勇 焦珂

王芸珍

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限

公司 61211

代理人 徐平

(51) Int. Cl.

C07C 39/21 (2006.01)

C07C 37/70 (2006.01)

C07C 37/82 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1962592 A, 2007.05.16, 权利要求 1.

CN 101338327 A, 2009.01.07, 权利要求 1.

CN 1760166 A, 2006.04.19, 权利要求 1.

审查员 戴年珍

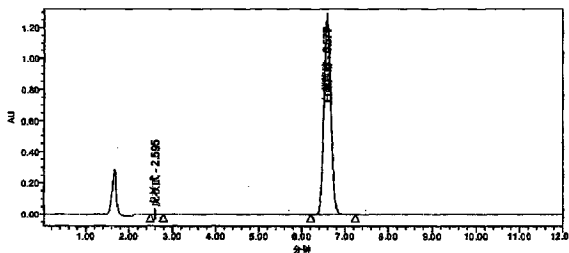
权利要求书 3 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,该方法包括粉碎、酶解、提取、离心、柱分离、重结晶或粉碎、提取、酶解、离心、柱分离、重结晶步骤。通过在酶解步骤中加入水解酶,再通过柱层析的分离,其中柱层析所用填料为聚丙烯酸树脂 CG71、聚丙烯酸树脂 RPC 40、聚苯乙烯树脂 CG161、聚苯乙烯树脂 CG300、葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 中的一种,解决了现有从虎杖中提取分离白藜芦醇方法成本高,产品收率低,不能将白藜芦醇进一步转化为白藜芦醇,工艺繁琐、周期长,不适用于工业化大生产的技术问题。该方法成本低、收率高、工艺简单、生产周期短,适用于工业化大生产。



1. 从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,包括以下步骤:

1) 粉碎

将虎杖原料粉碎;

2) 酶解

将步骤 1) 粉碎后的原料中加入原料重量 1 ~ 2 倍量的水和原料重量 1% ~ 10% 的水解酶,拌匀,在 35 ~ 40℃ 条件下酶解 12 ~ 48h,将酶解后的原料干燥;所述水解酶是纤维素酶、果胶酶或  $\beta$ -葡聚糖苷酶的一种、两种或两种以上的混合酶;

3) 提取

将步骤 2) 酶解后的干燥原料,用提取溶剂回流或冷浸提取,将提取液浓缩至比重为 1.10 ~ 1.30,该比重是在 60 ~ 70℃,常压下测定的,然后加入体积为浓缩液体积 1 ~ 3 倍量的水,放置沉降;

4) 离心

将步骤 3) 制得的加水浓缩液离心,过滤,得到沉淀;

5) 柱分离

5.1) 沉淀溶解拌样

取沉淀重量 1 倍量的体积浓度为 60 ~ 80% 的甲醇或乙醇加入步骤 4) 的沉淀中溶解,得到溶解液和沉淀,弃沉淀,将溶解液与柱填料拌样,烘干,得到拌样样品,所加柱填料与步骤 4) 得到的沉淀的质量比为 1:2;所述柱填料为聚丙烯酸树脂 CG71、聚苯乙烯树脂 CG161、或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 中的一种;

5.2) 上柱

取步骤 5.1) 制得的拌样样品与柱层析填料上柱,再用洗脱体系进行洗脱,通过薄层层析法检查各流份,收集含有白藜芦醇的流份,浓缩至原体积的 1/10 ~ 1/3,放置产生结晶;所述拌样样品与柱层析填料的质量比为 1:3 ~ 1:15,所述柱层析填料为聚丙烯酸树脂 CG71、聚苯乙烯树脂 CG161、或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20;

6) 重结晶

将步骤 5.2) 产生的结晶用离心机或板框过滤器过滤,得到粗结晶,将此粗结晶用粗结晶重量的 1 ~ 4 倍量的体积浓度为 80%~95% 的甲醇或乙醇重结晶,得到含量不低于 98% 的白藜芦醇。

2. 根据权利要求 1 所述的从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,其特征在于:所述步骤 2) 中加入的水解酶为  $\beta$ -葡聚糖苷酶和果胶酶的混合酶,用量为原料重量的 4%, $\beta$ -葡聚糖苷酶与果胶酶的质量比为 19:1,酶解温度为 37℃,酶解时间为 36h。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,其特征在于:所述提取溶剂是甲醇、乙醇、乙酸乙酯或丙酮。

4. 根据权利要求 3 所述的从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,其特征在于:所述洗脱体系为甲醇/水、乙醇/水、丙酮/水或石油醚/乙酸乙酯体系。

5. 根据权利要求 4 所述的从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,其特征在于:所述步骤 3) 中提取溶剂是丙酮,冷浸提取,将提取液浓缩至比重为 1.21,该比重是在 65℃,常压下测定的,向浓缩液中加入体积为浓缩液体积 2 倍量的水;所述步骤 5.1) 中取沉淀重量 1 倍量的体积浓度为 70% 的甲醇,柱填料为聚苯乙烯树脂 CG161;所述步骤 5.2) 中上柱所用的拌

样样品与柱层析填料的质量比为 1 :8 ;柱层析填料为聚苯乙烯树脂 CG161 ;洗脱体系为石油醚 / 乙酸乙酯洗脱体系 ;所述步骤 6)中使用离心机过滤,得到粗结晶,将粗结晶用粗结晶重量的 2 倍量的体积浓度为 95% 的甲醇重结晶。

6. 从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,包括以下步骤:

1) 粉碎

将虎杖原料粉碎;

2) 提取

将步骤 1)粉碎后的原料,用提取溶剂回流或冷浸提取,将提取液浓缩至比重为 1.10 ~ 1.30,该比重是在 60 ~ 70°C,常压下测定的,加入体积为浓缩液体积 1 ~ 2 倍量的水;

3) 酶解

在步骤 2)的加水浓缩液中加入原料重量 1%~ 10%的水解酶,搅拌均匀,在 35 ~ 40°C 条件下酶解 6 ~ 36h,得到酶解液;所述水解酶是纤维素酶、果胶酶或  $\beta$ -葡聚糖苷酶的一种、两种或两种以上的混合酶;

4) 离心

将步骤 3)制得的酶解液离心,过滤,得到沉淀;

5) 柱分离

5.1) 沉淀溶解拌样

取沉淀重量 1 倍量的体积浓度为 60 ~ 80% 的甲醇或乙醇加入步骤 4)制得的沉淀中溶解,得到溶解液和沉淀,弃沉淀,将溶解液与柱填料拌样,烘干,得到拌样样品,所加柱填料与步骤 4)得到的沉淀的质量比为 1 :2 ;所述柱填料为聚丙烯酸树脂 CG71、聚苯乙烯树脂 CG161 或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 ;

5.2) 上柱

取步骤 5.1)制得的拌样样品与柱层析填料上柱,再用洗脱体系进行洗脱,通过薄层层析法检查各流份,收集含有白藜芦醇的流份,浓缩至原体积的 1/10 ~ 1/3,放置产生结晶;所述拌样样品与柱层析填料的质量比为 1:3 ~ 1:15 ;所述柱层析填料为聚丙烯酸树脂 CG71、聚苯乙烯树脂 CG161 或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 ;

6) 重结晶

将步骤 5.2)产生的结晶用离心机或板框过滤器过滤,得到粗结晶,将此粗结晶用粗结晶重量的 1 ~ 4 倍量的体积浓度为 80%-95% 的甲醇或乙醇重结晶,得到含量不低于 98% 的白藜芦醇。

7. 根据权利要求 6 所述的从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,其特征在于:所述提取溶剂是甲醇、乙醇、乙酸乙酯或丙酮。

8. 根据权利要求 7 所述的从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,其特征在于:所述洗脱体系为甲醇 / 水、乙醇 / 水、丙酮 / 水或石油醚 / 乙酸乙酯体系。

9. 根据权利要求 8 所述的从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,其特征在于:所述步骤 2)中提取溶剂是乙酸乙酯,回流提取,将提取液浓缩至比重为 1.10,该比重是在 60°C,常压下测定的,向浓缩液中加入浓缩液体积 1 倍量的水;所述步骤 5.1)中取沉淀重量 1 倍量的体积浓度为 80% 的甲醇,柱填料为葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 ;所述步骤 5.2)中上柱所用的拌样样品与柱层析填料的质量比为 1 :8 ;柱层析填料为葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 ;洗

脱体系为乙醇 / 水洗脱体系 ;所述步骤 6)中使用离心机过滤,得到粗结晶,将粗结晶用粗结晶重量的 1.5 倍量的体积浓度为 95% 的甲醇重结晶。

## 从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种黄酮类化合物的提取分离领域,具体涉及一种从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法。

### 背景技术

[0002] 白藜芦醇 (Resveratrol), 又叫三羟基芪, 分子式:  $C_{14}H_{12}O_3$ , 相对分子质量为 228.24。白藜芦醇是无味, 灰白色或白色粉末, 难溶于冷水, 能溶于热水、乙醚、乙醇、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等, 熔点为 256 ~ 257°C。白藜芦醇是从蓼科植物虎杖的根茎和根或者葡萄科植物葡萄的果皮中提取出来的一种黄酮类化合物。1940 年首次发现白藜芦醇, 20 世纪 70 年代首次发现葡萄中含有这种物质, 后来人们发现虎杖、花生、桑椹等植物中也含有这种成分。白藜芦醇是一种重要的植物抗毒素, 它能够阻止低密度脂蛋白的氧化, 因而具有潜在的防心血管疾病、防癌、抗病毒及免疫调节作用, 它被美国专著《抗衰老圣经》一书列为“100 种最热门有效抗衰老物质”之一, 成为全世界研究的热点。

[0003] 目前, 白藜芦醇的制备方法有化学合成法, 植物细胞培养法和天然产物提取法。

[0004] 现合成白藜芦醇需要通过 5 步以上的合成工艺才能达到 98% 的含量, 并且合成工艺条件苛刻, 试剂昂贵, 收率低, 很难实现工业化生产;

[0005] 植物细胞培养技术, 是指在不改变植物天然属性的基本特性的前提下, 把本来应在天然环境中生长的植物, 置于完全人工受控的反应环境中, 并利用优化的细胞繁殖条件促使植物细胞高速繁殖, 然后从细胞中提取对人类有用的天然的药用成分, 这一技术仅限于小实验的培养, 并且培养过程中人为控制严格, 操作复杂, 对于工业化大生产还需深入的研究和探讨。

[0006] 从天然产物中提取和分离白藜芦醇, 既充分利用了我国丰富的自然资源, 又具有经济可行的生产优势。

[0007] 中国专利 CN 1116264C “白藜芦醇和白藜芦醇甙分离方法及其应用”和中国专利 CN1724495A “从中草药植物虎杖中制备白藜芦醇的方法”主要采用将虎杖根茎用有机溶剂提取, 经乙酸乙酯萃取、浓缩、柱层析和重结晶, 得到纯度高达 97% 以上的白藜芦醇和白藜芦醇甙。但是, 该方法是用乙酸乙酯萃取, 乳化现象明显, 产品损失严重, 从而导致收率降低, 且该方法是从虎杖中将白藜芦醇和白藜芦醇甙提取分离出来, 没有将白藜芦醇甙转化为白藜芦醇, 这一步骤没有实施, 也会影响白藜芦醇的收率。

[0008] 中国专利 CN1269831C “虎杖甙和白藜芦醇的新制备方法”提出一种虎杖苷和白藜芦醇的新制备方法, 它是用聚酰胺层析法分离纯化虎杖苷和白藜芦醇。该专利中用聚酰胺树脂分离, 聚酰胺树脂目数比较细, 容易堵柱, 并且专利中没有将虎杖甙转化为白藜芦醇, 工艺不经济。

[0009] 中国专利 CN 1513822A “虎杖提取高纯白藜芦醇工艺”, 本发明简化了工艺和操作程序, 缩短了生产周期, 降低了生产成本, 提高了产品收率和纯度。此工艺利用微生物转化, 用 40% 乙醇与 4- 甲基 -2- 戊醇混合剂作为萃取溶剂, 利用较好的设备微波提取, 缩短生产

周期,但是将微波提取用于规模化生产现在仍旧有一定的难度,工艺不可行,仅局限于实验室的实验。

[0010] 中国专利 CN 1384088A “一种从虎杖植物中提取白藜芦醇的制备方法”和中国专利 CN 1926592A “一种从中药虎杖中分离纯化白藜芦醇苷和白藜芦醇的方法”分别采用专用的高压层析柱和高速逆流色谱法分离白藜芦醇,设备成本高,仅能达到公斤级生产,产率低,生产成本低,局限于实验室的分离,不适用大生产。

[0011] 中国专利 CN1090603C“一种从中药虎杖中提取白藜芦醇的工艺”,本发明涉及一种药用原料白藜芦醇的提取工艺。所述的提取工艺为:在粉末状虎杖原料中加入复合酶在恒温下进行酶解反应 48-72 小时获得酶解原料;再用溶解萃取、浓缩获得含白藜芦醇的半成品,再经精制即得。此专利工艺简单,但需要反复结晶才能得到白藜芦醇的精品,反复重结晶会造成产品收率低,损耗大,生产成本高的缺点。

## 发明内容

[0012] 为了解决背景技术中存在的从虎杖中提取分离白藜芦醇方法成本高,没有将白藜芦醇甙转化为白藜芦醇,白藜芦醇收率低,且工艺繁琐、周期长,不适用于工业化大生产的技术问题,本发明提供了一种成本低、白藜芦醇收率高、工艺简单、周期短,适用于工业化大生产的从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法。

[0013] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0014] 从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,包括以下步骤:

[0015] 1) 粉碎

[0016] 将虎杖原料粉碎;

[0017] 2) 酶解

[0018] 将步骤 1) 粉碎后的原料中加入原料重量 1 ~ 2 倍量的水和原料重量 1% ~ 10% 的水解酶,拌匀,在 35 ~ 40℃ 条件下酶解 12 ~ 48h,将酶解后的原料干燥;该水解酶可以是纤维素酶、植物提取复合酶、淀粉酶、果胶酶或  $\beta$ -葡聚糖苷酶的一种、两种或两种以上的混合酶;

[0019] 3) 提取

[0020] 将步骤 2) 酶解后的干燥原料,用提取溶剂回流或冷浸提取,将提取液浓缩至比重为 1.10 ~ 1.30,该比重是在 60 ~ 70℃,常压下测定的,然后加入体积为浓缩液体积 1 ~ 3 倍量的水,沉降;

[0021] 4) 离心

[0022] 将步骤 3) 制得的加水浓缩液离心,过滤,得到沉淀;

[0023] 5) 柱分离

[0024] 5.1) 沉淀溶解拌样

[0025] 取沉淀重量 1 倍量的体积浓度为 60 ~ 80% 的甲醇或乙醇加入步骤 4) 的沉淀中溶解,得到溶解液和沉淀,弃沉淀,将溶解液与柱填料拌样,烘干,得到拌样样品;

[0026] 所加柱填料与步骤 4) 得到的沉淀的质量比为 1 : 2;

[0027] 柱填料可以是聚丙烯酸树脂 CG71、聚丙烯酸树脂 RPC40、聚苯乙烯树脂 CG161、聚苯乙烯树脂 CG300、葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 中的一种;

[0028] 5. 2) 上柱

[0029] 取步骤 5. 1) 制得的拌样样品与柱层析填料上柱,再用洗脱体系进行洗脱,通过薄层层析法检查各流份,收集含有白藜芦醇的流份,浓缩至原体积的 1/10 ~ 1/3,放置产生结晶;

[0030] 拌样样品与柱层析填料的质量比为 1 : 3 ~ 1 : 15 ;

[0031] 柱层析填料可以是聚丙烯酸树脂 CG71、聚丙烯酸树脂 RPC40、聚苯乙烯树脂 CG161、聚苯乙烯树脂 CG300、葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 ;

[0032] 6) 重结晶

[0033] 将步骤 5. 2) 产生的结晶用离心机或板框过滤器过滤,得到粗结晶,将此粗结晶用粗结晶重量的 1 ~ 4 倍量的体积浓度为 80% -95% 的甲醇或乙醇重结晶,得到含量不低于 98% 的白藜芦醇。

[0034] 上述步骤 2) 中加入的最佳水解酶为  $\beta$ -葡聚糖苷酶和果胶酶的混合酶,用量为原料重量的 4%,  $\beta$ -葡聚糖苷酶与果胶酶的质量比为 19 : 1,酶解温度为 37°C,酶解时间为 36h 时最佳 ;

[0035] 上述提取溶剂可以是甲醇、乙醇、乙酸乙酯或丙酮 ;

[0036] 上述洗脱体系可以是甲醇 / 水、乙醇 / 水、丙酮 / 水或石油醚 / 乙酸乙酯体系 ;

[0037] 上述步骤 3) 中提取溶剂是丙酮,冷浸提取,将提取液浓缩至比重为 1. 21,该比重是在 65°C,常压下测定的,向浓缩液中加入体积为浓缩液体积 2 倍量的水 ;步骤 5. 1) 中取沉淀重量 1 倍量的体积浓度为 70% 的甲醇,柱填料为聚苯乙烯树脂 CG161 ;步骤 5. 2) 中上柱所用的拌样样品与柱层析填料的质量比为 1 : 8 ;柱层析填料为聚苯乙烯树脂 CG161 ;洗脱体系为石油醚 / 乙酸乙酯洗脱体系 ;步骤 6) 中使用离心机过滤,得到粗结晶,将粗结晶用粗结晶重量的 2 倍量的体积浓度为 95% 的甲醇重结晶为最佳。

[0038] 本发明解决其技术问题所采用的另一技术方案是 :

[0039] 从虎杖中提取分离白藜芦醇的方法,包括以下步骤 :

[0040] 1) 粉碎

[0041] 将虎杖原料粉碎 ;

[0042] 2) 提取

[0043] 将步骤 1) 粉碎后的原料,用提取溶剂回流或冷浸提取,将提取液浓缩至比重为 1. 10 ~ 1. 30,该比重是在 60 ~ 70°C,常压下测定的,加入体积为浓缩液体积 1 ~ 2 倍量的水 ;

[0044] 3) 酶解

[0045] 在步骤 2) 的加水浓缩液中加入原料重量 1% ~ 10% 的水解酶,搅拌均匀,在 35 ~ 40°C 条件下酶解 6 ~ 36h,得到酶解液 ;该水解酶可以是纤维素酶、植物提取复合酶、淀粉酶、果胶酶或  $\beta$ -葡聚糖苷酶的一种、两种或两种以上的混合酶 ;

[0046] 4) 离心

[0047] 将步骤 3) 制得的酶解液离心,过滤,得到沉淀 ;

[0048] 5) 柱分离

[0049] 5. 1) 沉淀溶解拌样

[0050] 取沉淀重量 1 倍量的体积浓度为 60 ~ 80% 的甲醇或乙醇加入步骤 4) 制得的沉淀

中溶解,得到溶解液和沉淀,弃沉淀,将溶解液与柱填料拌样,烘干,得到拌样样品;

[0051] 所加柱填料与步骤 4) 得到的沉淀的质量比为 1 : 2;

[0052] 柱填料可以是聚丙烯酸树脂 CG71、聚丙烯酸树脂 RPC40、聚苯乙烯树脂 CG161、聚苯乙烯树脂 CG300、葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 中的一种;

[0053] 5. 2) 上柱

[0054] 取步骤 5. 1) 制得的拌样样品与柱层析填料上柱,再用洗脱体系进行洗脱,通过薄层层析法检查各流份,收集含有白藜芦醇的流份,浓缩至原体积的 1/10 ~ 1/3,放置产生结晶;

[0055] 所述拌样样品与柱层析填料的质量比为 1 : 3 ~ 1 : 15;

[0056] 柱层析填料可以是聚丙烯酸树脂 CG71、聚丙烯酸树脂 RPC40、聚苯乙烯树脂 CG161、聚苯乙烯树脂 CG300、葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 中的一种;

[0057] 6) 重结晶

[0058] 将步骤 5. 2) 产生的结晶用离心机或板框过滤器过滤,得到粗结晶,将此粗结晶用粗结晶重量的 1 ~ 4 倍量的体积浓度为 80% -95% 的甲醇或乙醇重结晶,得到含量不低于 98% 的白藜芦醇。

[0059] 上述步骤 3) 中加入的最佳水解酶为  $\beta$ -葡聚糖苷酶、植物提取复合酶和纤维素酶的混合酶,用量为原料重量的 2%,  $\beta$ -葡聚糖苷酶、植物提取复合酶与纤维素酶的质量比为 12 : 5 : 3,酶解温度为 40℃,酶解时间为 12h 时最佳;

[0060] 上述提取溶剂可以是甲醇、乙醇、乙酸乙酯或丙酮;

[0061] 上述洗脱体系可以是甲醇 / 水、乙醇 / 水、丙酮 / 水或石油醚 / 乙酸乙酯体系;

[0062] 上述步骤 2) 中提取溶剂是乙酸乙酯,回流提取,将提取液浓缩至比重为 1. 10,该比重是在 60℃,常压下测定的,加入体积为浓缩液体积 1 倍量的水;步骤 5. 1) 中取沉淀重量 1 倍量的体积浓度为 80% 的甲醇,柱填料为葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20;步骤 5. 2) 中上柱所用的拌样样品与柱层析填料的质量比为 1 : 8;柱层析填料为葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20;洗脱体系为乙醇 / 水洗脱体系;步骤 6) 中使用离心机过滤,得到粗结晶,将粗结晶用粗结晶重量的 1. 5 倍量的体积浓度为 95% 的甲醇重结晶为最佳。

[0063] 上述两种技术方案中柱分离用到的柱填料是聚丙烯酸树脂 CG71、聚丙烯酸树脂 RPC40、聚苯乙烯树脂 CG161、聚苯乙烯树脂 CG300、葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 或葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 中的一种,这些填料由于都是高分子填料,对目标分离物的死吸附少或者不产生死吸附,使得产品的收率提高。同时,传统的工艺方法是从虎杖中提取分离白藜芦醇和白藜芦醇甙,没有将白藜芦醇甙转化为白藜芦醇,上述两种方案通过在提取步骤前或提取步骤后加入水解酶,使白藜芦醇甙进一步转化为白藜芦醇,再经柱分离和重结晶技术中各个环节的控制,使得白藜芦醇的收率提高。

[0064] 本发明的优点:

[0065] 1、该方法采用有机溶剂提取,之后加水沉降,再用醇溶解样品,避免萃取带来的损失,提高产品收率,降低成本。

[0066] 2、该方法将白藜芦醇甙转化为白藜芦醇,提高了白藜芦醇的收率。

[0067] 3、该方法成本低。



[0068] 4、该方法工艺简捷、周期短,适用于工业化大生产。

#### 附图说明

[0069] 图 1 是实施例 1 得到的白藜芦醇含量测定结果的 HPLC 高效液相图谱。

[0070] 图 2 是实施例 2 得到的白藜芦醇含量测定结果的 HPLC 高效液相图谱。

[0071] 图 3 是实施例 3 得到的白藜芦醇含量测定结果的 HPLC 高效液相图谱。

[0072] 图 4 是实施例 4 得到的白藜芦醇含量测定结果的 HPLC 高效液相图谱。

#### 具体实施方式

[0073] 实施例 1

[0074] 取 1000kg 虎杖原料粉碎,加入 1000kg 水和 10kg 纤维素酶,拌匀,在 35℃ 条件下酶解 40h,将酶解后的原料以微波干燥方式进行干燥;取干燥后的原料,用体积浓度为 80% 的甲醇回流提取,将提取液浓缩至比重为 1.10(该比重是在 63℃,常压下测定的),加入体积为浓缩液体积 2 倍量的水,沉降,放置 12h;用离心机离心,过滤,得沉淀 70kg;取 70kg 体积浓度为 80% 的甲醇加入沉淀中溶解,得到溶解液和沉淀,弃沉淀,将溶解液与 35kg 聚丙烯酸树脂 CG71 拌样,烘箱烘干备用;取质量比为 1 : 3 的拌样样品与聚丙烯酸树脂 CG71 上柱,分离,用不同体积比的甲醇 / 水洗脱体系进行洗脱,先用甲醇 / 水体积比为 3 : 7 洗脱杂质,再用甲醇 / 水体积比为 5 : 5 洗脱有效成分,收集有效成分段,浓缩产生结晶,将结晶离心,得到粗结晶,将粗结晶用粗结晶重量的 1.5 倍量的体积浓度为 80% 的甲醇重结晶,即可得到含量为 98.767% 的白藜芦醇 12kg,白藜芦醇的收率为 1.2%,表 1 是该实施例的检测结果列表,图 1 是该实施例得到的白藜芦醇含量测定结果的 HPLC 高效液相图谱。

[0075] 表 1

[0076]

名称	保留时间 (min)	面积 (微伏 * 秒)	高度 (微伏)	含量%
白藜芦醇	6.485	13398429	1313560	98.767

[0077] 实施例 2

[0078] 取 1000kg 虎杖原料粉碎,加入 1500kg 的水和 7kg 的植物提取复合酶和 1kg 纤维素酶,拌匀,在 38℃ 条件下酶解 38h;将酶解后的原料以鼓风干燥方式进行干燥;取干燥后的原料,用体积浓度为 80% 的乙醇回流提取,将提取液浓缩至比重为 1.15(该比重是在 62℃,常压下测定的),加入体积为浓缩液体积 1 倍量的水,沉降,放置 12h;用离心机离心,过滤,得沉淀 68kg;取 68kg 体积浓度为 70% 的甲醇将沉淀溶解,得到溶解液和沉淀,弃沉淀,将溶解液与 34kg 聚丙烯酸树脂 RPC40 拌样,烘箱烘干备用;取质量比为 1 : 5 的拌样样品与聚丙烯酸树脂 RPC40 上柱,分离,用不同体积比的丙酮 / 水洗脱体系进行洗脱,先用丙酮 / 水体积比为 9 : 1 洗脱杂质,再用丙酮 / 水体积比为 8 : 1 洗脱有效成分,收集有效成分段,浓缩产生结晶,将结晶用离心机过滤,得到粗结晶,用粗结晶重量的 2 倍量的体积浓度为 95% 的甲醇重结晶,即可得到含量为 98.591% 的白藜芦醇 11kg,白藜芦醇的收率为 1.1%,表 2 是该实施例的检测结果列表,图 2 是该实施例得到的白藜芦醇含量测定结果的 HPLC 高效液相图谱。

[0079] 表 2

[0080]

名称	保留时间 (min)	面积 (微伏 * 秒)	高度 (微伏)	含量%
白藜芦醇	6.481	13564213	1210271	98.591

[0081] 实施例 3

[0082] 取虎杖 1000kg 原料粉碎,加入 1500kg 水和 3.8kg  $\beta$ -葡聚糖苷酶和 0.2kg 果胶酶,拌匀,在 37℃ 条件下酶解 36h,将酶解后的原料自然干燥;取干燥后的原料,用丙酮冷浸提取,将提取液浓缩至比重为 1.21(该比重是在 65℃,常压下测定的),加入浓缩液体积 2 倍量的水,放置 12h;用离心机离心加水浓缩液,过滤,得沉淀 72kg;取 72kg 体积浓度为 70%的甲醇加入沉淀中溶解,得到溶解液和沉淀,弃沉淀,将溶解液与 36kg 聚苯乙烯树脂 CG161 拌样,烘箱烘干备用;取质量比为 1 : 8 的拌样样品和聚苯乙烯树脂 CG161 上柱,分离,用不同体积比的石油醚 / 乙酸乙酯洗脱体系进行洗脱,先用石油醚 / 乙酸乙酯体积比为 9 : 1 洗脱杂质,再用石油醚 / 乙酸乙酯体积比为 5 : 1 洗脱有效成分,收集有效成分段,浓缩产生结晶,用离心机过滤,得到粗结晶,用粗结晶重量 2 倍量的体积浓度为 95%的甲醇重结晶,即可得到含量为 99.258%的白藜芦醇 13kg,白藜芦醇的收率为 1.3%,表 3 是该实施例的检测结果显示列表,图 3 是该实施例得到的白藜芦醇含量测定结果的 HPLC 高效液相图谱。

[0083] 表 3

[0084]

名称	保留时间 (min)	面积 (微伏 * 秒)	高度 (微伏)	含量%
白藜芦醇	6.577	14207919	1259849	99.258

[0085] 实施例 4

[0086] 取 1000kg 虎杖原料粉碎,用乙酸乙酯回流提取,将提取液浓缩至比重为 1.10(该比重是在 60℃,常压下测定的),加入浓缩液体积 1 倍量的水,加入 1.2kg  $\beta$ -葡聚糖苷酶、0.5kg 植物提取复合酶和 0.3kg 纤维素酶,搅拌均匀,在 40℃ 的条件下酶解 12h,得到酶解液,将酶解液用离心机离心,过滤,得沉淀 73kg。取 73kg 体积浓度为 80%的甲醇加入沉淀中溶解,得到溶解液和沉淀,弃沉淀,将溶解液与 36.5kg 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 拌样,烘箱烘干备用;取质量比为 1 : 8 的拌样样品与葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 上柱,分离,用不同体积比的乙醇 / 水洗脱体系进行洗脱,先用乙醇 / 水体积比为 1 : 4 洗脱杂质,再用乙醇 / 水体积比为 2 : 1 洗脱有效成分,收集有效成分段,浓缩产生结晶,将结晶用离心机过滤,得到粗结晶,用粗结晶重量的 1.5 倍量的体积浓度为 95%的甲醇重结晶,即可得到含量为 98.826%的白藜芦醇 12kg,白藜芦醇的收率为 1.2%,表 4 是该实施例的检测结果显示列表,图 4 是该实施例得到的白藜芦醇含量测定结果的 HPLC 高效液相图谱。

[0087] 表 4

[0088]

名称	保留时间 (min)	面积 (微伏 * 秒)	高度 (微伏)	含量%
白藜芦醇	6.525	11871085	1108212	98.826

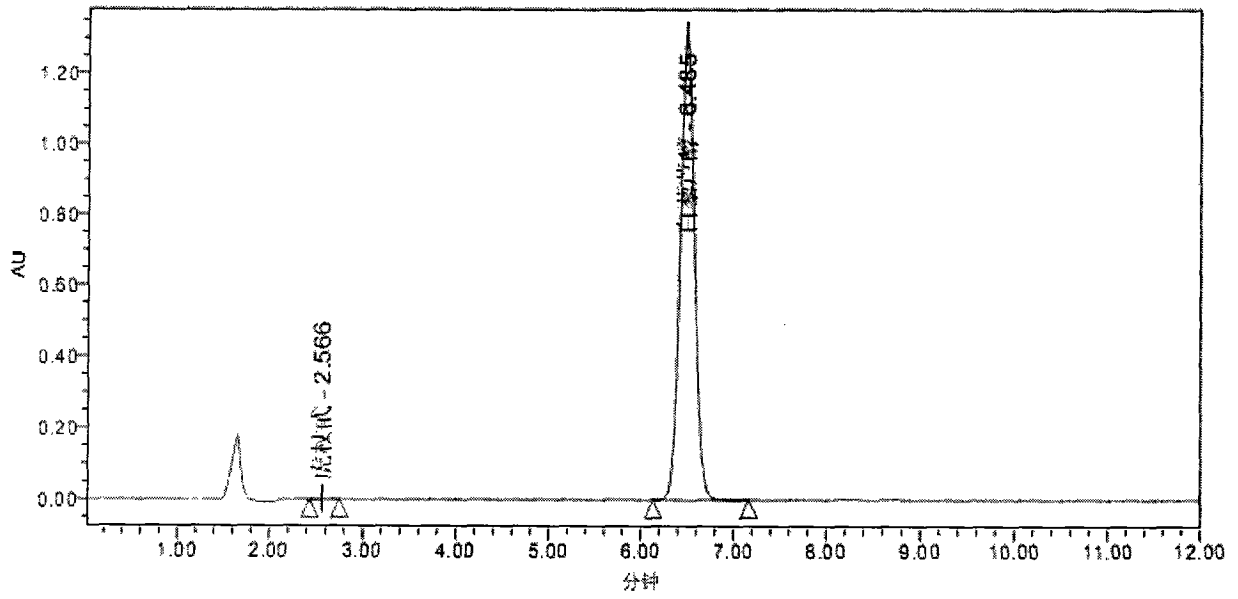


图 1

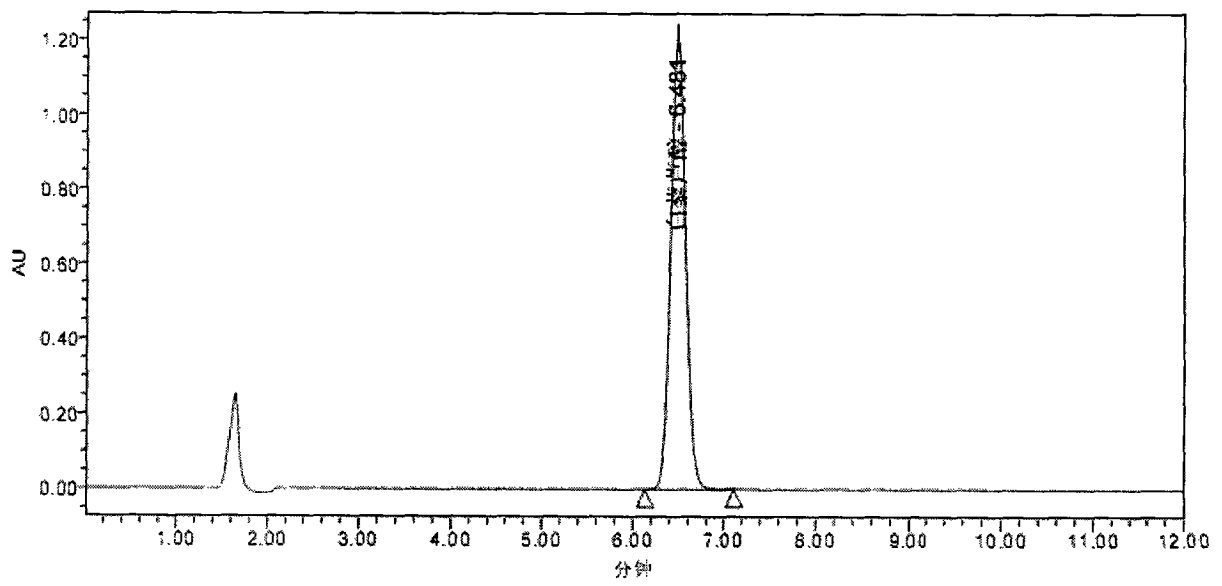


图 2

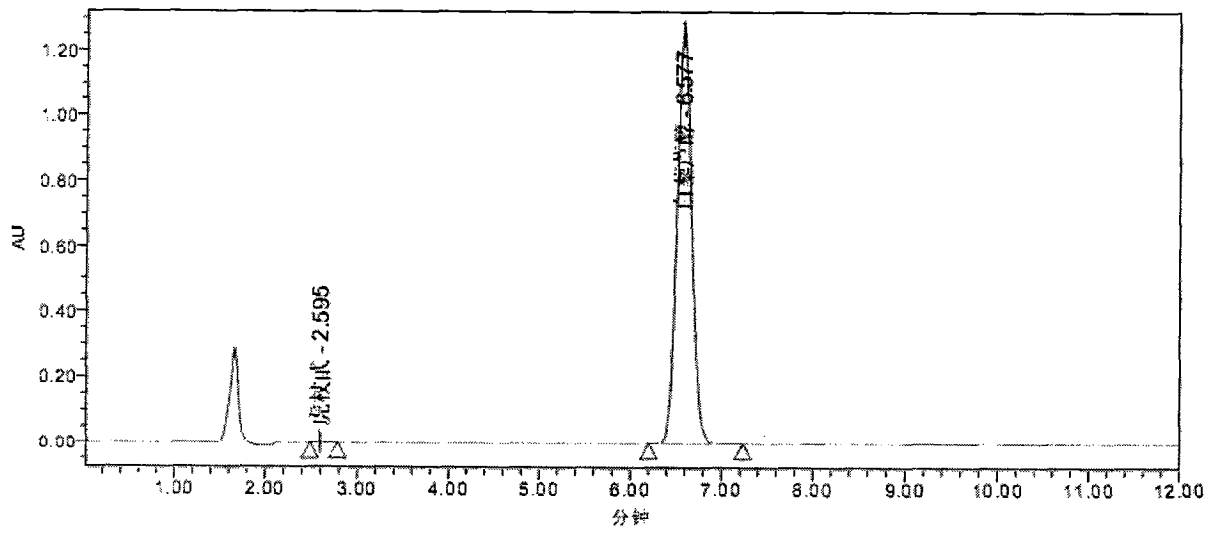


图 3

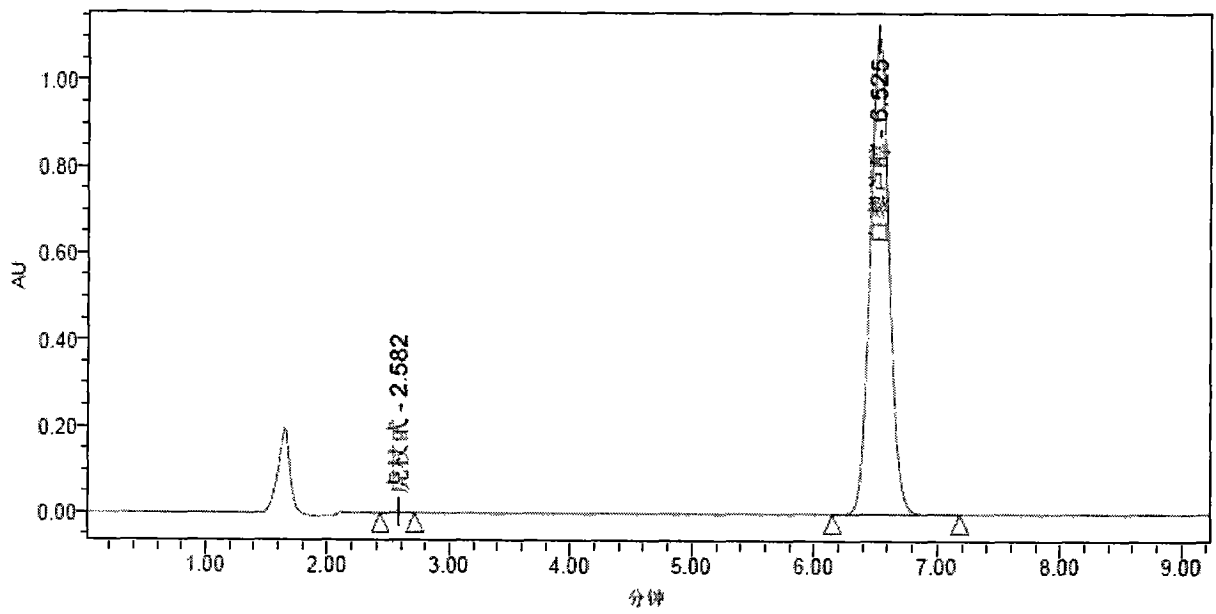


图 4