



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109499096 B

(45)授权公告日 2020.02.11

(21)申请号 201811616487.0

C07C 49/255(2006.01)

(22)申请日 2018.12.27

C07C 45/78(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 李晶晶

申请公布号 CN 109499096 A

(43)申请公布日 2019.03.22

(73)专利权人 中国科学院地球化学研究所

地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号

(72)发明人 余德顺 马龙利 陈可可 叶菲菲
李岗 于海

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 孙海杰

(51)Int.Cl.

B01D 15/42(2006.01)

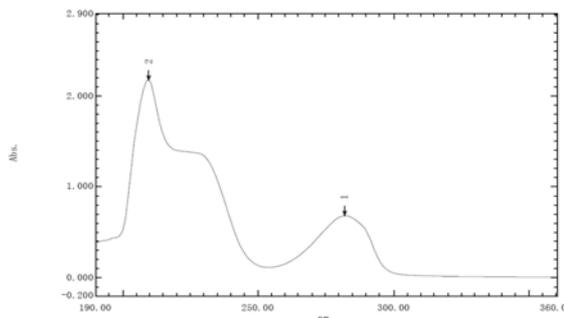
权利要求书1页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法以及6-姜酚的生产方法

(57)摘要

本发明涉及分离纯化领域,提供了一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法以及6-姜酚的生产方法。该减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其包括:将含有6-姜酚的原料经流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第一混合溶剂于第一减压柱内梯度洗脱,获得6-姜酚粗品;将6-姜酚粗品经流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第二混合溶剂于第二减压柱内梯度洗脱,获得6-姜酚纯化物。其利用两步减压梯度洗脱的方法对6-姜酚进行分离和纯化,减压操作使得操作更易控制,洗脱时间短,同时采用不同的比例混合的正己烷-乙酸乙酯作为流动相,流动相种类少,消耗量少,并且容易回收。



1. 一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其特征在于,其包括:

将含有6-姜酚的原料经流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第一混合溶剂于第一减压柱内梯度洗脱,获得6-姜酚粗品;

将所述6-姜酚粗品经流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第二混合溶剂于第二减压柱内梯度洗脱,获得6-姜酚纯化物;

其中,所述第一混合溶剂具有四个梯度,每个梯度的所述第一混合溶剂的密度分别为0.670-0.674 g/ml,0.675-0.679 g/ml,0.681-0.685 g/ml,0.686-0.690 g/ml;

所述第二混合溶剂具有五个梯度,每个梯度的所述第二混合溶剂的密度中,正己烷的密度为 $\rho_0=0.668\sim 0.672$ g/ml,用正己烷和乙酸乙酯配制成五个梯度的混合溶剂,其的密度分别为 $\rho_0+0.003\sim 0.007$ g/ml、 $\rho_0+0.008\sim 0.012$ g/ml、 $\rho_0+0.013\sim 0.017$ g/ml、 $\rho_0+0.018\sim 0.022$ g/ml、 $\rho_0+0.023\sim 0.027$ g/ml。

2. 根据权利要求1所述的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其特征在于,每个梯度的所述第一混合溶剂的密度分别为0.670 g/ml,0.677 g/ml,0.683 g/ml,0.688 g/ml。

3. 根据权利要求1所述的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其特征在于,每个梯度的所述第二混合溶剂的密度中,正己烷的密度为0.670 g/ml,混合溶剂五个梯度的密度分别为 $\rho_0+0.005$ g/ml、 $\rho_0+0.010$ g/ml、 $\rho_0+0.015$ g/ml、 $\rho_0+0.020$ g/ml、 $\rho_0+0.025$ g/ml。

4. 根据权利要求1所述的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其特征在于,在所述第一减压柱内,填充的硅胶的目数为300-400目,所述含有6-姜酚的原料与所述第一减压柱内硅胶的质量比为1:90-110。

5. 根据权利要求1所述的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其特征在于,在所述第二减压柱内,填充的硅胶的目数为300-400目,所述6-姜酚粗品与所述第二减压柱内的硅胶的质量比为1:190-210。

6. 根据权利要求1所述的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其特征在于,洗脱液以薄层色谱鉴别,用6-姜酚标准品对照,展开剂为体积比为2:1的正己烷和乙酸乙酯。

7. 根据权利要求1所述的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其特征在于,所述原料为6-姜酚含量为10-15%的姜油或姜油树脂。

8. 一种6-姜酚的生产方法,其特征在于,其包括6-姜酚的提取方法以及如权利要求1-7任一项所述的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法。

减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法以及6-姜酚的生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分离纯化领域,具体而言,涉及一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法以及6-姜酚的生产方法。

背景技术

[0002] 姜酚是天然存在于生姜中的一类辣味物质,为黄色油状液体,也是姜辣素的主要活性成分,是由含有 β -羟基酮结构的烷基链同系物组成的化合物。姜酚是一类化合物,主要包括4-姜酚、6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚和12-姜酚等十多种成分,其中属6-姜酚含量最高,占姜酚类物质的75%以上,鲜姜中占总姜辣素80%以上。6-姜酚在姜酚类物质中含量最高,且具有多种生物活性,如抗氧化、抗诱变、抗炎、抗风湿、抗肿瘤、驱寒、保肝利胆等作用。

[0003] 姜酚的提取方法有很多,如有压榨法、溶剂提取法、超声提取法、微波法、酶解法、超声复合酶解法和超临界流体萃取法等。姜酚的提取方法虽然有很多,但目前公认的从生姜中提取姜酚的最佳方法是超临界CO₂萃取法。用超临界二氧化碳萃取技术萃取、分离姜精油和姜辣素是目前生姜资源深度综合利用较为理想的关键技术。

[0004] 高纯度6-姜酚分离纯化方法主要有硅胶柱层析法、大孔吸附树脂法、聚酰胺柱分离法、分子蒸馏技术、制备型高效液相色谱法和高速逆流色谱法等。目前6-姜酚的分离方法中,运用最多、最成熟的是柱层析法。柱层析法可以得到丰富的组分信息,不破坏天然产物中原有成分,能分离结构和性质非常相似的化合物,分离出的组分纯度较高。

[0005] 6-姜酚巨大的药用价值和商业价值,使其备受关注,每年都会有相关的文章发表或者专利受理。而目前6-姜酚研究关键难点在于其分离提纯上,因为对其药理药效的有效评估需要很高纯度的6-姜酚。采用何种分离技术或者分离工艺,将低含量的提取物进一步分离纯化从而获得很高纯度的6-姜酚,一直是需要攻克难题。6-姜酚分离提出研究大都还停留在实验室的小规模阶段,一般是采用柱层析技术与其他分离手段或技术相结合,进行多次分离纯化,从而获得极高高纯度姜酚。而采用多种分离技术相结合,会增加分离工艺的复杂性,增加成本。为获得毫克级别的6-姜酚往往需要耗费大量原料,因而在众多姜酚的研究中极少提及分离纯化后6-姜酚的回收率。

[0006] 鉴于此,特提出本申请。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其在减压条件下操作,洗脱时间短,可获得高纯度的6-姜酚产品,效果显著。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种6-姜酚的生产方法,其能够实现提取、分离和纯化6-姜酚,获得高纯度的6-姜酚产品。

[0009] 本发明的实施例是这样实现的:

[0010] 一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其包括:将含有6-姜酚的原料经流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第一混合溶剂于第一减压柱内梯度洗脱,获得6-姜酚粗品;

将所述6-姜酚粗品经流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第二混合溶剂于第二减压柱内梯度洗脱,获得6-姜酚纯化物。

[0011] 一种6-姜酚的生产方法,其包括6-姜酚的提取方法以及上述减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法。

[0012] 本发明实施例的有益效果包括:

[0013] 本实施例提供的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法利用两步减压梯度洗脱的方法对6-姜酚进行分离和纯化,减压操作使得操作更易控制,洗脱时间短,同时采用不同的比例混合的正己烷-乙酸乙酯作为流动相,流动相种类少,消耗量少,并且容易回收。此外,本实施例提供的6-姜酚的生产方法,其能够实现提取、分离和纯化6-姜酚,获得高纯度的6-姜酚产品。

附图说明

[0014] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0015] 图1为本发明实验例提供的对照品紫外-可见光谱图;

[0016] 图2为本发明实验例提供的精制样品紫外-可见光吸收谱图;

[0017] 图3为本发明实验例提供的对照品红外谱图;

[0018] 图4为本发明实验例提供的精制样品红外谱图;

[0019] 图5为本发明实验例提供的对照品液质谱谱图;

[0020] 图6为本发明实验例提供的精制样品液质谱谱图;

[0021] 图7为本发明实验例提供的精制样品核磁共振碳谱图;

[0022] 图8为本发明实验例提供的精制样品核磁共振氢谱谱图。

具体实施方式

[0023] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0024] 下面对本发明实施例的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法以及6-姜酚的生产方法进行具体说明。

[0025] 一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其包括以下步骤:

[0026] S100、将含有6-姜酚的原料经流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第一混合溶剂于第一减压柱内梯度洗脱,获得6-姜酚粗品。

[0027] S101、前期准备:

[0028] 层析柱要洗干净特别是无油质,规格为100mm×1100mm;旋转蒸发仪,3%FeCl₃乙醇溶液;6-姜酚标准品溶液;其他材料包括拌样硅胶(40~80目)、填料硅胶(300-400目)、真空泵、抽滤瓶(1000ml及500ml)、升降铁架台、脱脂棉花、254薄层板、展缸、碘缸、毛细管(0.3

×100mm)、胶头滴管、烧杯、玻璃棒、量筒等。

[0029] S102、配制洗脱剂:

[0030] 洗脱剂为正己烷与乙酸乙酯系列第一混合溶液,第一混合溶剂具有四个梯度,每个梯度的第一混合溶剂的密度分别为0.670-0.674g/ml,0.675-0.679g/ml,0.681-0.685g/ml,0.686-0.690g/ml;优选地,每个梯度的第一混合溶剂的密度分别为0.670g/ml,0.677g/ml,0.683g/ml,0.688g/ml。整个冲柱过程中,以0.683g/ml的洗脱剂为主要冲柱梯度。当第一混合溶剂洗脱剂梯度密度范围不在上述梯度密度范围时,对6-姜酚纯度及收率的提高影响较大。

[0031] 制备样品:取适量的原料姜油树脂(自制,优选为6-姜酚含量为10-15%的姜油或姜油树脂),用电子分析天平精确称量。将姜油树脂置于搅拌皿内(避光),用乙酸乙酯完全溶解,搅拌均匀;按比例加入适量的拌样硅胶(60-80目),搅拌均匀,室温挥干。姜油树脂与拌样硅胶的添加质量比,一般1:2或1:3。

[0032] S103、填柱:

[0033] 取适量干燥的脱脂棉花,撕扯至蓬松且均匀,塞入玻璃层析柱底部,用细长的木棍使棉花塞得密实,表面平整,厚度约为3.0cm;按一定的姜油树脂与第一减压柱内硅胶的质量比(1:90-110,优选为1:100),根据姜油树脂的质量加入对应量的硅胶(300-400目或H),用真空泵缓慢抽实,且使硅胶层表面平整。

[0034] S104、上样:

[0035] 将拌好的样品均匀地平铺在硅胶上,铺样品时要缓慢少量,这样更容易使其表面平整;铺完样品后,继续平铺一层拌样硅胶,起保护样品层的作用,厚度约1.5cm;随后塞上蓬松的棉花,厚度约3.0cm,要完全覆盖硅胶层,倒入洗脱剂时起缓冲作用,从而保护样品层完整;继续在棉花层上面均匀放入适量玻璃珠,使棉花在倒入洗脱剂时不会浮起。

[0036] S105、冲柱:

[0037] a.首先缓慢倒入适量的正己烷,慢慢浸湿棉花和硅胶层表面约5.0cm处,同时用玻璃棒轻轻挤压棉花,使棉花内空气析出;待棉花层没有气泡冒出后,加大倒入正己烷的量,没过玻璃珠,之后添加正己烷速度可适当加快,直至加满层析柱。

[0038] b.待硅胶层被正己烷浸湿1/3后,采用下一个梯度的洗脱剂0.677g/ml,检查减压装置是否放置恰当,无误后打开真空泵抽真空,从而提高冲柱速率。此后,硅胶层色带开始缓慢出现分层,且时间越长每一层色带区分更加明显。下一个梯度的洗脱剂替换上一个梯度,要等层析柱内洗脱剂走到棉花层时为起点。

[0039] 硅胶层色带一般分为5层,深黄,白色,绿黄,浅黄,无色,每一层色带会随每一个梯度下的洗脱剂一起冲出。根据色带能大致判断6-姜酚所在的区段,但是仍要根据精确的点板情况如图,来准确确定样品中6-姜酚所处的硅胶层。

[0040] c.点板具体操作:将薄层析板切割成1.5cm×5.0cm的小板,点板时用铅笔在距离小板底部0.5cm处轻轻地画一条水平基准线,等距离点板,大小均匀合适,左边为样品点,右边为6-姜酚对照品点。配制展开剂,在展缸中加入正己烷20滴,乙酸乙酯10滴。将小板放入展缸,待展开剂跑到距离小板顶部0.3mm左右处时取出,用吹分风机吹干,放入碘缸中显色,随后浸入配制好3%FeCl₃的乙醇溶液中溶液几秒钟,取出,用电炉烘烤直至显色。烘烤时高度和温度要适当,不然显色效果差。

[0041] 整个冲柱过程点板频率是有要求的,前期正常情况下点板遵循间隔规律即可,每1000ml点板一次;需集中点板位置主要是色带处于过渡区或者交界处时,这时点板次数视情况相应增加,一般为300ml点板一次。

[0042] 在步骤b中,点板上样品点与6-姜酚对照品点位置开始时距离很远,且样品点较小且颜色很浅;随着冲柱的进行,两个点的距离缓慢靠近,且样品点变大且颜色加深。当样品点与6-姜酚对照品点靠近速率变得很缓慢,表明这个洗脱剂梯度下,相应极性组分已基本分离出,继续用下一个梯度的洗脱剂冲柱。

[0043] d.根据点板情况,当样品点与6-姜酚对照品点位置开始重合就开始收集组分溶液。两点前重叠或平行,完全重叠或平行,重叠或平行后情况下的组分溶液,分别对应地归类收集。

[0044] e.待基本收集完点板情况如样品圆点与6-姜酚对照品圆点位置一致的组分溶液后,继续用下一个梯度的洗脱剂继续冲柱。

[0045] S105、溶剂回收及6-姜酚粗品收集:

[0046] a.溶剂回收:将不好6-姜酚的滤液用旋转蒸发仪回收洗脱剂,旋转蒸发仪设定值:水浴温度50℃、转速40Rpm、真空度15mbar,用冷水冷凝。回收的洗脱剂放置2500ml锥形瓶内,根据对应梯度下洗脱剂的密度重新配制利用。配制洗脱剂过程用密度计控制,密度偏高加入正己烷,密度偏低加入乙酸乙酯。前期收集的滤液不含6-姜酚的组分,所以旋转蒸发仪的温度设定较高,可缩短回收时间,提高回收效率,同时浓缩液不需回收,直接舍弃。

[0047] b.6-姜酚粗品收集:将每一批次含6-姜酚的滤液单独收集,先用旋转蒸发仪旋蒸,旋转蒸发仪设定值:温度35-45℃、转速50-70Rpm、真空度30-40mbar(优选为,温度30℃、转速60Rpm、真空度35mbar)。回收洗脱剂,重新配制。待滤液浓缩后,每一批次立刻单独收集至100ml锥形瓶中,然后放入真空干燥箱中干燥,真空干燥箱设定值:于温度35-45℃、真空度0.7-1.2Mpa(优选为温度40℃、真空度0.9Mpa)。将制得的6-姜酚粗品置于锥形瓶内,密封冷藏。

[0048] S200、将6-姜酚粗品经流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第二混合溶剂于第二减压柱内梯度洗脱,获得6-姜酚纯化物。

[0049] S201、准备工作:

[0050] 层析柱或者硅胶柱(50×1200mm)预先洗净,无油质,晾干;预先配置好展开剂(正己烷:乙酸乙酯=2:1);3%FeCl₃乙醇溶液;6-姜酚标准品溶液;其他材料包括拌样硅胶(40~80目)、填料硅胶(300-400目)、真空泵、抽滤瓶(1000ml及500ml)、升降铁架台、脱脂棉花、254薄层板、展缸、碘缸、毛细管(0.3×100mm)、胶头滴管、烧杯、玻璃棒、量筒等。

[0051] 洗脱剂为按一定比例配制的正己烷及乙酸乙酯的第二混合溶液,配置过程如下:

a.用0.6~0.7g/ml密度计先测出实验室温度下正己烷的密度,计 ρ_0 (正己烷的密度为0.668-0.672g/ml)。b.向正己烷中加入乙酸乙酯,以0.003-0.007g/ml为混合液密度的单位增加量,配制获得的乙酸乙酯的浓度依次为: $\rho_0+0.003\sim 0.007\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.008\sim 0.012\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.013\sim 0.017\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.018\sim 0.022\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.023\sim 0.027\text{g/ml}$;优选地,正己烷的密度为 ρ_0 (0.670g/ml),以0.005g/ml为密度增量,配制五个梯度: $\rho_0+0.005\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.010\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.015\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.020\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.025\text{g/ml}$,配制五个不同密度的洗脱液各2000ml。此后冲柱回收的接液旋转蒸发后回收得溶剂,用密度计测量其密度,并配置成所需的洗脱剂。

当第二混合溶剂洗脱剂梯度密度范围不在上述梯度密度范围时,对6-姜酚纯度及收率的提高影响较大。

[0052] 减压过柱装置由真空泵,升降铁架台,抽滤瓶,橡胶塞,玻璃层析柱及橡胶导管组成,整个减压装置要求密封性良好,安全可靠,操作简便。

[0053] 准备好旋转蒸发仪,主要是洗净溶剂接收瓶,保证内部无杂质及其他溶剂,干燥除去瓶内壁的水分;检查仪器密封性,冷却水流通是否顺畅。

[0054] S202、装柱及上样(干法):

[0055] a.在柱子底部加入适量撕扯蓬松的干燥脱脂棉花,用长棍或细长自来水管将柱底棉花压密实,表面尽量平整,防止填料硅胶在装柱或冲柱过程中外漏。

[0056] b.用500ml烧瓶装上200g左右的填料硅胶,慢慢从顶部倒入柱中,装填料过程中用真空泵抽滤,并用手或是软皮塞拍打柱壁,以便填料下落装实。重复该操作直至填料到达柱2/3的位置,并拍打柱壁保证填料面平整,记下总填料质量M。

[0057] c.根据总的填料质量M,按一定填料比(第二减压柱内的硅胶与样品量的质量比190-210:1,优选为200:1),称取所需的粗分离物样品,记下质量m,填充的硅胶的目数为300-400目。

[0058] d.取适量原料样品,加入适量的乙酸乙酯进行溶解,可采用适当加热或超声等手段辅助溶解。乙酸乙酯加入体积量V为原料样品质量的1.5~2倍,即 $m:V=1.5\sim 2$ 。

[0059] e.向上述乙酸乙酯溶解液中加入适量的拌样硅胶(40~80目),加入质量为样品质量的2~3倍。充分搅拌、挥干,直至拌样硅胶分散均匀、颗粒粗细一致,并呈现黄色或金黄色。

[0060] f.将上述黄色拌样硅胶均匀地加入柱中,用手或软皮塞拍打柱壁使其表面平整。

[0061] g.加入适量40~80目硅胶覆盖在黄色拌样硅胶上,保护样品层,厚约2~3cm,拍打柱壁使其表面平整。

[0062] h.在加入松散的棉花,用木棍压平整,使其覆盖全部硅胶,起缓冲作用,棉花厚2cm左右。最后在棉花上压上的玻璃赛或石子,避免在加入洗脱剂过程中棉花浮起或被冲散开。

[0063] S203、洗脱及收集:

[0064] a.润柱:先用500~1000ml正己烷缓慢倒入柱中,用玻璃棒轻轻挤出棉花内的空气;待棉花层没有气泡冒出后,加大倒入正己烷,直至加满层析柱。

[0065] b.冲柱:检查减压装置是否放置恰当,无误后打开真空泵抽真空,进行减压过柱;待柱中硅胶层被正己烷浸湿超过填料高度的1/3,且正己烷液面低至上部棉花处时,用配好的洗脱剂 $\rho_0+(0.003\sim 0.007)g/ml$ 冲柱。此后,硅胶层色带开始缓慢出现分层,且时间越长每一层色带区分更加明显。下一个梯度的洗脱剂替换上一个梯度,要等层析柱内洗脱剂液面走到上部棉花层时为起点。

[0066] 硅胶层色带由下到上分为5层:小圈黄色带,一段无色带,一段黄色带,一段白色带,深黄色带。理论上是每一层色带用一个梯度的洗脱剂冲出,但往往为了节约时间、节省溶剂,可以根据色带大致判断6-姜酚所在的区段后,用一两个梯度的洗脱剂将6-姜酚前的杂质都冲出。当然,具体的冲柱梯度及更换梯度都要根据点板情况来决定。

[0067] c.点板:将254薄层析板切割成1~2cm×5.0cm的小板,用铅笔在距离小板底部0.5~1cm处轻画一条水平基准线,并在线上画两个点。左边为样品点,右边为6-姜酚对照品点。

点板好后用吹风机吹干或电烤炉烤干,冷却后将小板倾斜放入装有少量展开剂的展缸中跑板。待展开剂跑到距离小板顶部0.3mm左右处时取出,用吹分风机吹干或电烤炉烤干,放入碘缸中显色。若碘缸中显色后,与对照品点的水平位置附近有显色点,则需要浸入配制好的3%FeCl₃中几秒,取出,用电炉烘烤直至显色,观察是否与对照品点位置水平。

[0068] 注意:铅笔线上的两个点彼此不能靠太近,更不能太靠近薄层小板的边缘。两点靠得太近,点板、跑板时容易彼此干扰;太靠近板边缘容易发生边缘效应,导致跑板跑偏、跑快或跑慢。点板时点要重复多次点板,点的位置要准确,点要小。

[0069] 点板频率:整个冲柱过程中,前期(未出现6-姜酚点以前)正常情况下点板一般为每接收1000~2000ml接液点板一次。需集中点板的位置主要是黄色带与无色带、无色带与深黄色带过渡区或者交界处时。因为此位置是6-姜酚开始冲出来和即将冲完时的过度区域,这时点板次数相应增加,一般为200~300ml点板一次。

[0070] 或者可以从接液颜色来进行点板,整个冲柱过程中,接液一般是由无色渐变为淡黄色,再由淡黄色渐变为无色,最后直到冲柱结束—6-姜酚完全冲出,这个阶段的接液都是无色。最开始的无色接液及淡黄色接液均不需要点板,因为这种情况的接液中均不存在6-姜酚。当接液由淡黄色渐变为无色后,6-姜酚开始冲出,此时要多点板,既每接收到200~300ml就点一次板。

[0071] 除杂:小薄板板上样品点与6-姜酚对照品点位置上方会出现两个点,这两个点开始时一上一下,距离很远。随着冲柱的进行,两个点的距离会逐渐缩短,上方的点会缓慢靠近下方的点。当两个点的距离接近,接近到上方点的下边缘基本与下方点的上边缘接触或同处一个水平线时,表明大部分杂质已冲出,6-姜酚即将冲出来。此种情况下的接液中均是杂质,可直接旋转蒸发回收溶剂后丢弃。

[0072] d.收集:当样品点与6-姜酚对照品点水平位置上开始有重叠部分时,开始收集组分溶液。共分三组接液:两点重叠或平行前为接液1,完全重叠或平行为接液2,重叠或平行后为接液3,分别归类收集。当样品点与6-姜酚对照品点的位置不再发生相对变化,点变小颜色变得很浅,且其下方位置出现模糊小点时,表明6-姜酚组分已基本全冲出,冲柱结束。

[0073] 注意:当样品点与6-姜酚对照品点开始有重叠或平行,是冲柱的关键时刻,因为此时代表6-姜酚已开始冲出,但还有较多杂质。所以这个时期要多点板,可以每接收得100ml左右就点一次板,以便更好判断杂质是否基本去除,接液中6-姜酚是否较纯。

[0074] 关于何时更换下一梯度洗脱液的问题:理论上来说,若该梯度冲洗下,还有组分被冲出,则应继续用该梯度洗脱剂冲洗,直至该梯度下冲不出组分,才可更换下一梯度洗脱剂。特别是在6-姜酚开始随杂质冲出及6-姜酚快要冲完时,这两个阶段不能更换或改变洗脱剂浓度。这是为了避免洗脱剂梯度跨越过大,导致6-姜酚与杂质不能很好的分开而被一起冲出,影响其含量。

[0075] 此外,减压梯度洗脱过程中,不同梯度下的洗脱剂对姜油树脂组分的吸附作用不同,即每一类极性相同或近似的组分在对应极性或大于该极性的洗脱剂冲柱时才能有效的被分离出。若该洗脱剂极性偏小,则对应组分不能被分离出且基本不会溶于洗脱剂而被冲出。因此实验过程中,洗脱剂流速不是主要影响分离效果的因素,从而抽真空减压时泵的真空度不是主要影响分离效果的因素,但是洗脱剂的流速应控制合理,使之便于操作,且整个实验的每个阶段尽量控制恒速。

[0076] S204、溶剂的回收：

[0077] a. 设置旋转蒸发仪的参数值：加热温度50℃（含6-姜酚的接液旋蒸时，水浴温度设置为35-45℃）、真空度30~40mbar，开自来水冷凝。

[0078] b. 将适量接液倒入旋转蒸发底瓶中，不能超过旋转蒸发底瓶的容积，一般加入体积最多为底瓶容积的2/3，避免减压蒸发时底瓶内溶液暴沸。

[0079] c. 将装有溶剂的底瓶连接到旋转蒸发仪转轴上，转紧固定旋钮，下调仪器直至底瓶部分浸没进水浴中，开转轴旋钮，转速为50~60Rpm，开真空泵开关。

[0080] d. 底瓶溶液旋蒸干了以后，先关掉真空泵，将转轴旋钮调到“0”，选松通气旋钮，通入空气。待真空泵真空度数值恢复常压数值后，取下回收瓶中的回收溶剂，倒出里面的溶剂，装好回收瓶。

[0081] 回收溶剂后底瓶中不含6-姜酚的物质，也可以直接丢弃；也可找一个干净的带盖的敞口瓶集中回收，以便日后另有用途时需要。含6-姜酚的物质，用少量分析纯乙酸乙酯或甲醇多次（3次以上）溶解，倒入预先洗净、干燥并称好质量的烧饼中。

[0082] 旋转蒸发仪回收的洗脱剂倒入固定的瓶内，而后根据所需配制洗脱剂，重复利用。用回收的溶剂重新配置洗脱剂的过程中，用密度计测量控制，密度偏高加入正己烷，密度偏低加入乙酸乙酯。或用两种不同密度的回收溶剂（密度一个高一个低），配置成所需洗脱剂（该洗脱剂密度介于两种回收的溶剂密度之间）。

[0083] S205、样品干燥：

[0084] 将装有样品的烧饼（用乙酸乙酯或甲醇溶解的含有6-姜酚的分离物）放入真空干燥箱中进行真空干燥，真空干燥箱参数设置：温度35-45℃、真空度0.7-1.2Mpa。如若没有真空干燥箱设备，也可将装有样品的烧饼放入鼓风式干燥箱中进行干燥，干燥箱温度设置为35-45℃。待干燥完全后，取出烧饼，称取质量，放入冰箱中冷藏保存。

[0085] 其中，第一减压柱和第二减压柱在冲柱过程中并无流速要求，只需尽量控制恒速，方便操作即可。也无控制温度的要求，室温即可。

[0086] 第一减压柱和第二减压柱在冲柱过程中由于使用真空泵进行抽真空，但无压力要求，只需通过真空度来调节洗脱剂流速，使洗脱剂顺利流经柱子。

[0087] 以下结合实施例对本发明的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法以及6-姜酚的生产方法进一步进行阐述。

[0088] 实施例1

[0089] 本实施例提供了一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法，其包括以下步骤：

[0090] S100、第一步减压梯度层析柱

[0091] 将含有6-姜酚的原料用乙酸乙酯完全溶解，加入拌样硅胶，挥发去除乙酸乙酯，采用300-400目层析硅胶干法装柱，含有6-姜酚的原料与第一减压柱内硅胶的质量比为1:100。用流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第一混合溶剂于第一减压柱内梯度洗脱，第一混合溶剂的密度分别为0.670g/ml, 0.676g/ml, 0.682g/ml, 0.687g/ml；洗脱液以薄层色谱法鉴别，用6-姜酚标准品对照，展开剂为体积比为2:1的正己烷和乙酸乙酯。将相同部位合并，减压浓缩回收乙酸乙酯，将经第一减压柱洗脱后收集的含有6-姜酚的收集液于温度35℃、转速40Rpm、真空度35mbar条件下干燥浓缩，将第一浓缩液经真空干燥获得6-姜酚含量为62.9%的6-姜酚粗品；

[0092] S200、第二步减压梯度层析柱

[0093] 将上述步骤S100获得的6-姜酚粗品用为6-姜酚粗品质量1.5~2倍体积量的乙酸乙酯溶解,加入质量为样品质量的2倍的拌样硅胶,充分搅拌、挥干。采用300-400目层析硅胶干法装柱,6-姜酚粗品与第二减压柱内硅胶的质量比为1:200。用流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第二混合溶剂于第二减压柱内梯度洗脱,第二混合溶剂的五个梯度溶液中,正己烷的密度为 ρ_0 (0.670g/ml),以0.005g/ml为密度增量,配制五个梯度: $\rho_0+0.005\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.010\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.015\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.020\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.025\text{g/ml}$ 。洗脱液以薄层色谱法鉴别,用6-姜酚标准品对照,展开剂为体积比为2:1的正己烷和乙酸乙酯。将相同部位合并,减压浓缩回收乙酸乙酯;将第二减压柱洗脱后收集的含有6-姜酚的收集液于35℃,转速50Rpm,真空度30mbar下干燥浓缩;将第二浓缩物用乙酸乙酯或甲醇溶解,接着倒入烧饼中,将装有样品的烧瓶置于35℃、真空度0.7Mpa的条件下真空干燥,获得6-姜酚含量为97.89%的6-姜酚纯化物。

[0094] 实施例2

[0095] 本实施例提供了一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其包括以下步骤:

[0096] S100、第一步减压梯度层析柱

[0097] 将含有6-姜酚的原料用乙酸乙酯完全溶解,加入拌样硅胶,挥发去除乙酸乙酯,采用300-400目层析硅胶干法装柱,含有6-姜酚的原料与第一减压柱内硅胶的质量比为1:110。用流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第一混合溶剂于第一减压柱内梯度洗脱,第一混合溶剂的密度分别为0.673g/ml,0.678g/ml,0.684g/ml,0.689g/ml;洗脱液以薄层色谱法鉴别,用6-姜酚标准品对照,展开剂为体积比为2:1的正己烷和乙酸乙酯。将相同部位合并,减压浓缩回收乙酸乙酯,将经第一减压柱洗脱后收集的含有6-姜酚的收集液于温度40℃、转速50Rpm、真空度30mbar条件下干燥浓缩,将第一浓缩液经真空干燥获得6-姜酚含量为63.46%的6-姜酚粗品;

[0098] S200、第二步减压梯度层析柱

[0099] 将上述步骤S100获得的6-姜酚粗品用为6-姜酚粗品质量1.5~2倍体积量的乙酸乙酯溶解,加入质量为样品质量的3倍的拌样硅胶,充分搅拌、挥干。采用300-400目层析硅胶干法装柱,6-姜酚粗品与第二减压柱内硅胶的质量比为1:210。用流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第二混合溶剂于第二减压柱内梯度洗脱,第二混合溶剂的五个梯度溶液中,正己烷的密度为 ρ_0 (0.670g/ml),以0.005g/ml为密度增量,配制五个梯度: $\rho_0+0.005\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.010\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.015\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.020\text{g/ml}$ 、 $\rho_0+0.025\text{g/ml}$ 。洗脱液以薄层色谱法鉴别,用6-姜酚标准品对照,展开剂为体积比为2:1的正己烷和乙酸乙酯。将相同部位合并,减压浓缩回收乙酸乙酯;将第二减压柱洗脱后收集的含有6-姜酚的收集液于43℃,转速58Rpm,真空度38mbar下干燥浓缩;将第二浓缩物用乙酸乙酯或甲醇溶解,接着倒入烧饼中,将装有样品的烧瓶置于43℃、真空度0.9Mpa的条件下真空干燥,获得6-姜酚含量为98.09%的6-姜酚纯化物。

[0100] 实施例3

[0101] 本实施例提供了一种减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法,其包括以下步骤:

[0102] S100、第一步减压梯度层析柱

[0103] 将含有6-姜酚的原料用乙酸乙酯完全溶解,加入拌样硅胶,挥发去除乙酸乙酯,采

用300-400目层析硅胶干法装柱,含有6-姜酚的原料与第一减压柱内硅胶的质量比为1:100。用流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第一混合溶剂于第一减压柱内梯度洗脱,第一混合溶剂的密度和用量分别为0.670g/ml,0.677g/ml,0.683g/ml,0.688g/ml;洗脱液以薄层色谱法鉴别,用6-姜酚标准品对照,展开剂为体积比为2:1的正己烷和乙酸乙酯。将相同部位合并,减压浓缩回收乙酸乙酯,将经第一减压柱洗脱后收集的含有6-姜酚的收集液于温度30℃、转速60Rpm、真空度15mbar条件下干燥浓缩,将第一浓缩液经真空干燥获得6-姜酚含量为64.8%的6-姜酚粗品;

[0104] S200、第二步减压梯度层析柱

[0105] 将上述步骤S100获得的6-姜酚粗品用为6-姜酚粗品质量1.5~2倍体积量的乙酸乙酯溶解,加入质量为样品质量的2倍的拌样硅胶,充分搅拌、挥干。采用300-400目层析硅胶干法装柱,6-姜酚粗品与第二减压柱内硅胶的质量比为1:200。用流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例的第二混合溶剂于第二减压柱内梯度洗脱,第二混合溶剂的五个梯度溶液中,正己烷的密度为 ρ_0 (0.670g/ml),以0.005g/ml为密度增量,配制五个梯度: $\rho_0+0.005$ g/ml、 $\rho_0+0.010$ g/ml、 $\rho_0+0.015$ g/ml、 $\rho_0+0.020$ g/ml、 $\rho_0+0.025$ g/ml。洗脱液以薄层色谱法鉴别,用6-姜酚标准品对照,展开剂为体积比为2:1的正己烷和乙酸乙酯。将相同部位合并,减压浓缩回收乙酸乙酯;将第二减压柱洗脱后收集的含有6-姜酚的收集液于40℃,转速55Rpm,真空度35mbar下干燥浓缩;将第二浓缩物用乙酸乙酯或甲醇溶解,接着倒入烧瓶中,将装有样品的烧瓶置于40℃、真空度1.1Mpa的条件下真空干燥,获得6-姜酚含量为98.12%的6-姜酚纯化物。

[0106] 实验例

[0107] 一、6-姜酚的检测

[0108] 原料、第一步及第二步减压层析柱分离物中6-姜酚的含量采用的是高效液相色谱仪进行分析,具体参数如下:

[0109] 色谱条件:Agilent高效液相色谱仪,色谱柱:迪马Diamonsil C18 (4.6mm×250mm, 5 μ m);乙腈-水 (v/v=70:30) 为流动相;流速1.0mL/min;检测波长为280nm,柱温30℃,进样量:10 μ l。

序 号	姜油树脂中 6-姜酚含量/%	第一步减压 6-姜酚含量/%	第二步减压 6-姜酚含量/%
[0110] 1	11.99	62.9	97.89
2		63.46	98.09
3		64.8	98.12

[0111] 注:第一步减压层析柱分离纯化获得的分离物收率在85~90%之间,第二步减压层析柱分离纯化获得的纯化物收率在10%左右。

[0112] 二、高纯度6-姜酚的谱图表征及分析

[0113] 除高效液相色谱的测定比对外,还对6-姜酚精制样品和对照品进行了其它一系列图谱的比对。紫外、红外、液质检测在贵州医科大学分析测试中心进行,核磁共振谱在贵州省中科院天然产物化学重点实验室进行。

[0114] (1) 紫外吸收图谱

[0115] 取适量对照品及自制的精制样品溶于甲醇中,置于紫外可见分光光度计中扫描,

以甲醇为空白对照,从190nm到360nm进行扫描,所得结果请参阅图1和图2。

[0116] 从图1和图2可以看出,6-姜酚对照品与精制样品紫外可见吸收光谱基本一致,均在230nm及280nm处出现吸收峰。6-姜酚230nm处的峰由 $\pi-\pi^*$ 跃迁产生,说明6-姜酚结构中存在着共轭体系。6-姜酚280nm处的峰由 $n-\pi^*$ 跃迁产生,是羰基化合物的特征谱带,这说明6-姜酚结构中存在着羰基。6-姜酚的最大吸收峰在230nm处,第二大吸收峰位于280nm处,由于对紫外波长稳定性因素等的考虑,一般将230nm,280nm作为6-姜酚的测定波长。

[0117] (2) 红外图谱

[0118] 取适量6-姜酚对照品及自制的精制样品,并以KBr压片法制备,然后置于傅立叶红外光谱仪中进行红外光谱的扫描,分辨率为 2cm^{-1} ,扫描范围为 $4000-500\text{cm}^{-1}$ 。所得结果请参阅图3和图4。

[0119] 由图3和图4可知,6-姜酚的红外图谱 1701.36cm^{-1} 处的峰为C=O伸缩振动吸收峰。 1601.02cm^{-1} 和 1513.08cm^{-1} 处的峰为苯环的骨架伸缩振动吸收峰, 852.24cm^{-1} 和 815.22cm^{-1} 处的峰为O-H伸缩振动吸收峰。 1275.99cm^{-1} 处的峰为烷基芳基醚的不对称=C-O伸缩振动吸收峰。 2932.93cm^{-1} 和 2857.33cm^{-1} 处的峰为 $-\text{CH}_2-$ 的特征吸收峰, 726cm^{-1} 处的峰是 $-\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}-$ 上的C-H面内摇摆振动($n \leq 4$),这些峰的存在说明6-姜酚结构不仅有亚甲基,而且有至少4个亚甲基是相连的。 1376.42cm^{-1} 处的峰为孤立甲基($-\text{CH}_3$)的特征吸收峰,由C-H对称弯曲振动引起。由图中也容易看出,6-姜酚对照品与精制样品的红外图谱匹配度高。

[0120] (3) 液相色谱-质谱谱图

[0121] 分别取6-对照品和自制的精制品适量,甲醇定溶,进样量 $1\mu\text{l}$,梯度洗脱,紫外及正、负离子模式检测。所得结果请参阅图5和图6。

[0122] 图5和图6中,从上往下分别为:6-姜酚标准品和精制样品的—UV、ES+、ES-图谱。由图中可以看出,6-姜酚标准品和精制样品的UV、ES+和ES-图谱匹配程度较高。

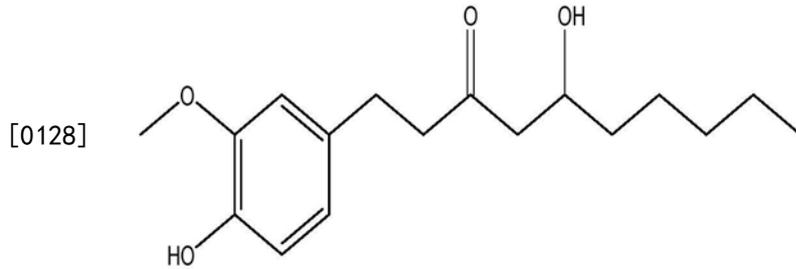
[0123] (4) 核磁共振NMR谱图

[0124] 图7为精制样品核磁共振碳谱图,图8为精制样品核磁共振氢谱谱图。

[0125] 从图7可知,图谱中18条谱线代表有18个碳,由于是用甲醇溶解后检测,所以除去甲醇中的1个碳后,检测的精制样品中有17个碳。图中 14×10^{-6} 、 $22 \times 10^{-6} \sim 49 \times 10^{-6}$ 、 68×10^{-6} 、 $111 \times 10^{-6} \sim 146 \times 10^{-6}$ 和 212×10^{-6} 处的化学位移说明检测的精制样品结构中分别存在甲基($-\text{CH}_3$)、亚甲基($-\text{CH}_2-$)、甲氧基($-\text{O}-\text{CH}_3$)、苯环和羰基($-\text{C}=\text{O}$),数目分别是1、4、1和1。

[0126] 从图8可知,检测的精制样品中有 $26n$ 个氢,其中 $n \geq 1$,为整数。图中 $0.9 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-6}$ 内的3个峰说明检测的精制样品中有甲基($-\text{CH}_3$), $1.2 \times 10^{-6} \sim 1.5 \times 10^{-6}$ 内的峰说明有多个相邻亚甲基($-\text{CH}_2-$), $2.4 \times 10^{-6} \sim 3.0 \times 10^{-6}$ 内的峰说明有羰基($=\text{C}=\text{O}$), 3.8×10^{-6} 处的峰说明有甲氧基($-\text{O}-\text{CH}_3$), 4.0×10^{-6} 附近有峰说明有醇羟基($-\text{OH}$), 4.9×10^{-6} 处的峰说明有酚羟基($-\text{OH}$), $6.5 \times 10^{-6} \sim 6.9 \times 10^{-6}$ 内的峰说明有苯环。

[0127] 综合图7和图8,得到检测的精制样品中物质的分子式,6-姜酚结构示意图如下所示:



[0129] 综合以上说明精制样品为6-姜酚。

[0130] 三、分离纯化工艺对产品的影响

[0131] 对比例1:将实施例3中的减压冲柱替换为加压冲柱;

[0132] 对比例2:将实施例3中的硅胶粒径由300-400目改变为100-200目;

[0133] 对比例3:一步柱层析法,采用石油醚、正己烷和乙酸乙酯的三元混合溶剂进行减压梯度洗脱,硅胶目数300-400目;

[0134] 对比例4:三步柱层析分离纯化,工艺路线如下:12.83%姜油树脂→常压柱→加压柱→减压柱→98%6-姜酚;粗分离采用常压柱,样品和硅胶比例为1:100,流动相为乙酸乙酯和石油醚混合溶剂(v/v,1:5);加压柱和减压柱样品与硅胶比例为1:200~1:300,填料目数为均为300-400目,加压柱流动相为乙酸乙酯和石油醚混合溶剂(v/v,1:3),减压柱流动相为正己烷-乙酸乙酯不同比例混合溶剂梯度洗脱;整个分离工艺周期为3-4周,从最初姜油树脂原料30克最后可得到1.64克纯度为98%的6-姜酚。从整个工艺过程可知:流程长周期长、流动相有机溶剂种类多且用量大、填料目数较细影响流出速度且价格更贵成本高,加压柱层析对柱子承压能力有要求。

检测指标	示例				
	实施例 3	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
原料中 6-姜酚含量/%	11.99	11.99	11.99	11.9-	12.83
6-姜酚粗品含量/%	64.8	62.4	59.6	61.4	常压柱: 71.4 加压柱: 85.7
6-姜酚纯化物含量/%	98.12	97.4	93.2	96.1	98.2
分离时间	16d	20d	14d	16d	27d
溶剂消耗量	/	/	/	/	/
溶剂回收难易程度	容易	容易	容易	容易	容易
收率	10	9	12	9	2.5

[0135] 综上所述,本实施例提供的减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法利用两步减压梯度洗脱的方法对6-姜酚进行分离和纯化,减压操作使得操作更易控制,洗脱时间短,同时采用不同的比例混合的正己烷-乙酸乙酯作为流动相,流动相种类少,消耗量少,并且容易回收。此外,本实施例提供的6-姜酚的生产方法,其包括6-姜酚的提取方法以及上述减压柱层析分离纯化6-姜酚的方法。其能够实现提取、分离和纯化6-姜酚,获得高纯度的6-姜酚产品。

[0137] 以上仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

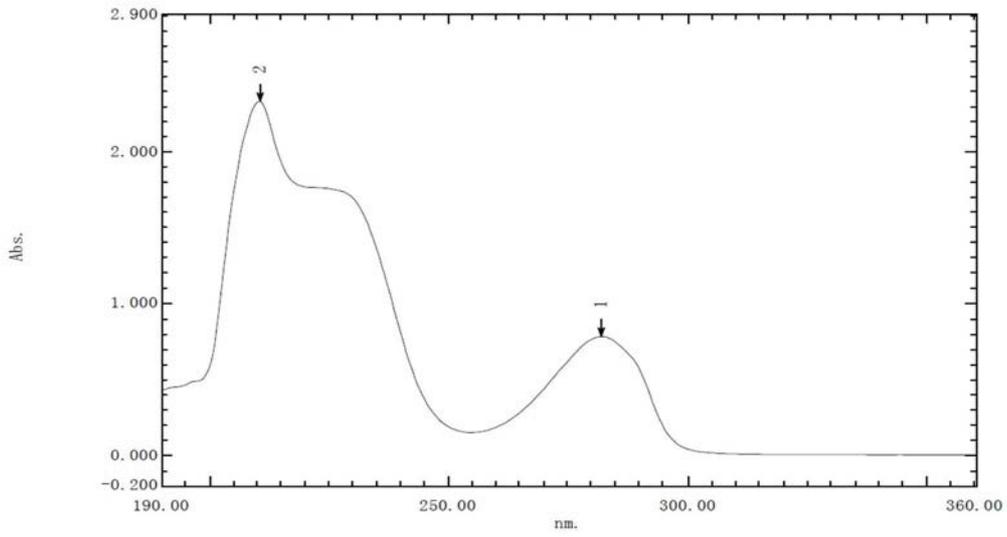


图1

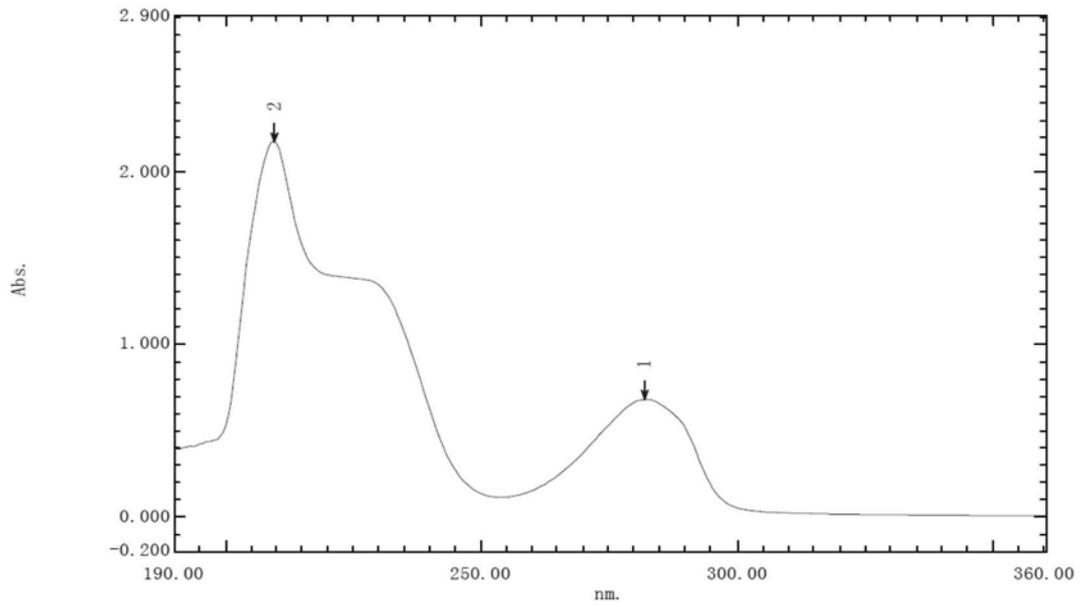


图2

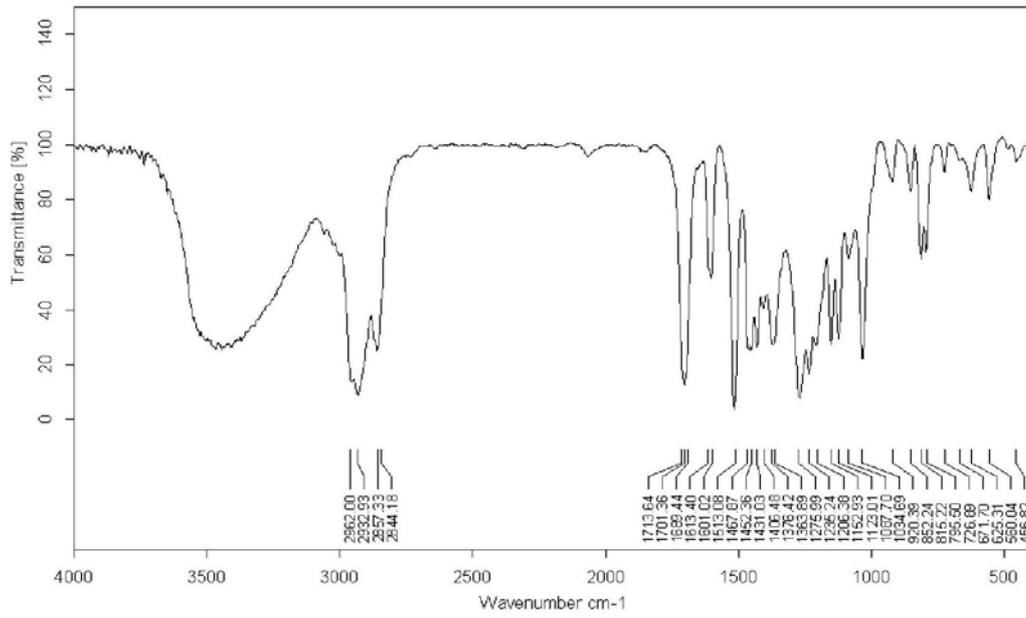


图3

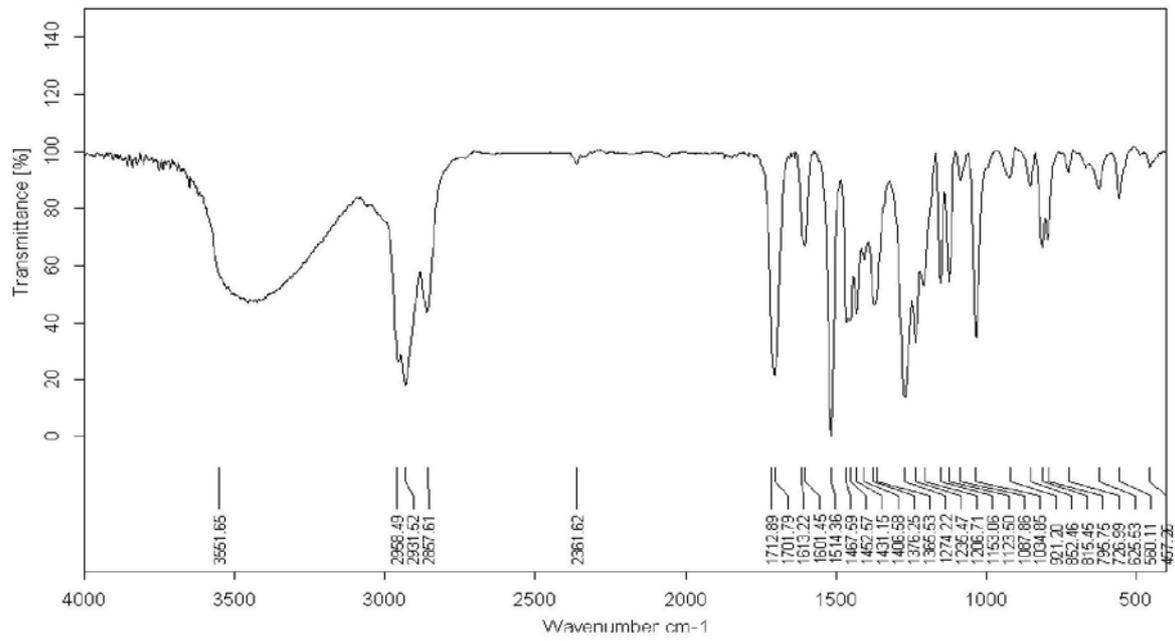


图4

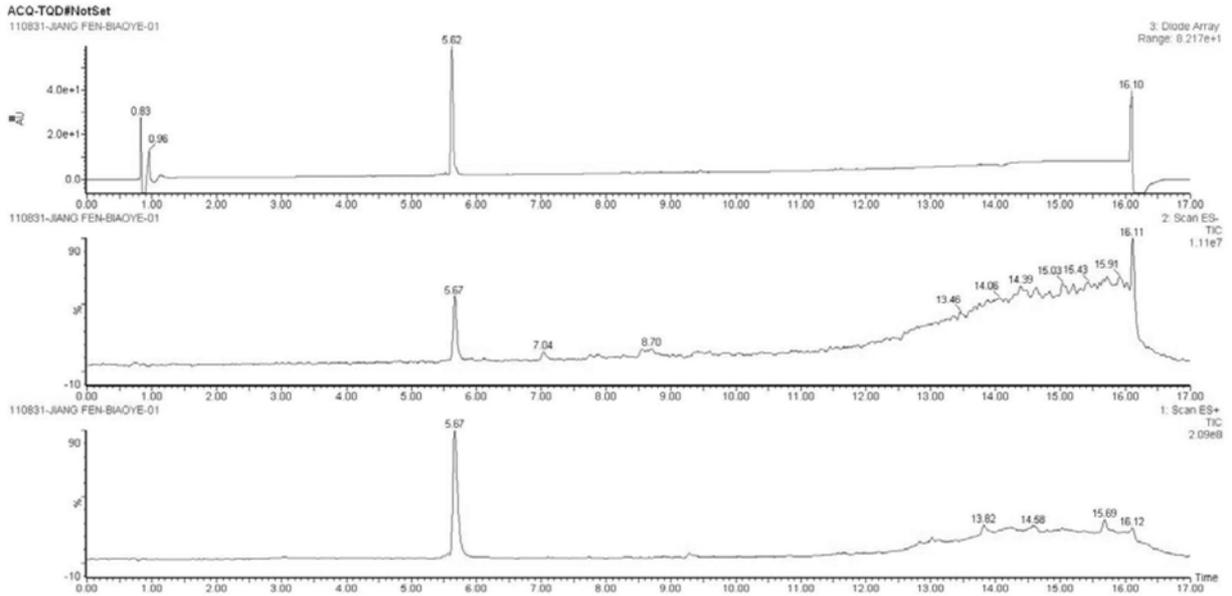


图5

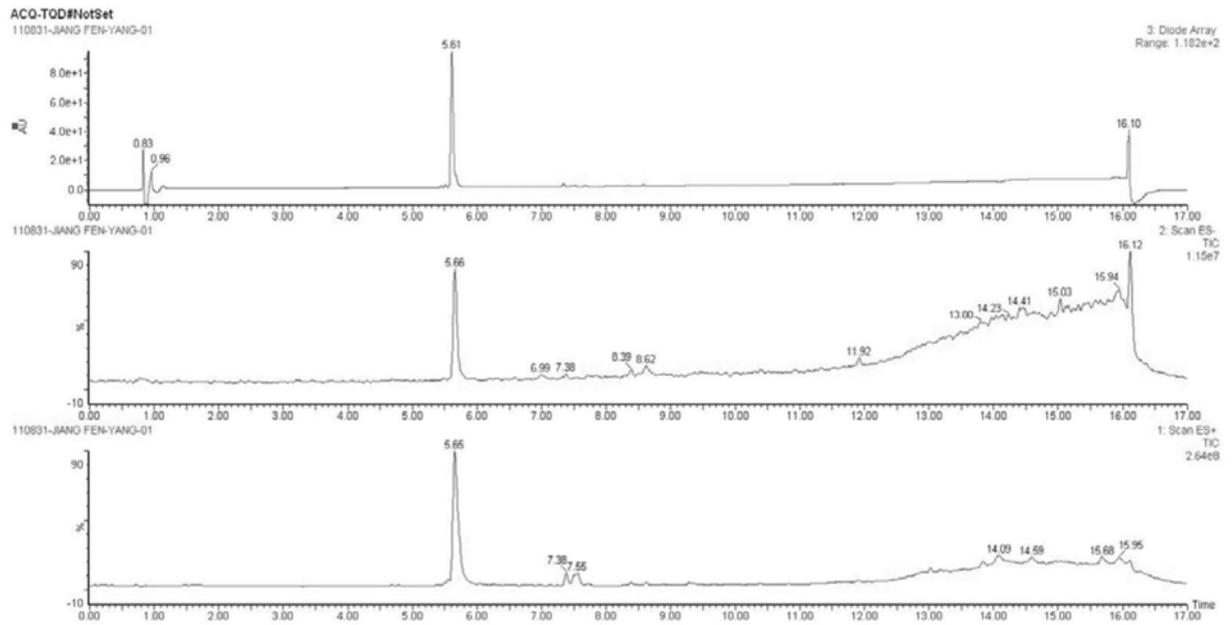


图6

