



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102250170 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201110129709. 8

A23L 1/29 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 05. 19

(71) 申请人 浙江农林大学

地址 311300 浙江省杭州市临安市环城北路
88 号

(72) 发明人 袁珂 廖海兵 殷明文 林晓春

(74) 专利代理机构 杭州浙科专利事务所 33213

代理人 吴秉中

(51) Int. Cl.

C07H 17/07 (2006. 01)

C07H 1/08 (2006. 01)

A61K 31/7048 (2006. 01)

A61P 39/06 (2006. 01)

A61P 31/00 (2006. 01)

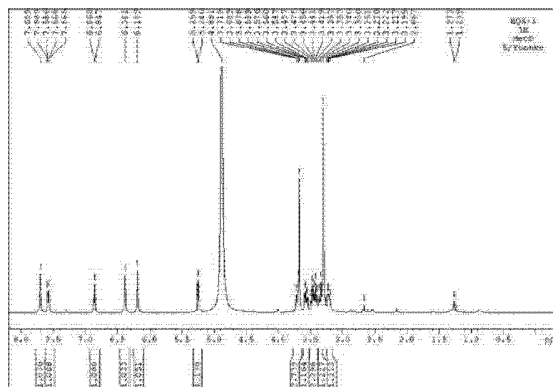
权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 6 页

(54) 发明名称

黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法及其用途

(57) 摘要

黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法及其用途, 属于提取分离技术领域。以黄秋葵果实为原料, 采用渗漉提取、闪蒸浓缩、萃取脱色、醇沉转移出多糖及果胶, 继续真空浓缩、通过大孔吸附树脂柱分离富集、再结合凝胶树脂柱色谱技术从中分离得到 5, 7, 3', 4' - 四羟基 - 4' - O- 甲基 - 3-O- β -D- 葡萄糖黄酮苷和 5, 7, 3', 4' - 四羟基 - 3-O- [β -D- 葡萄糖基 - (1 \rightarrow 2)] - β -D- 葡萄糖黄酮苷两个单体化合物, 提取率分别为 3. 62% ~ 8. 66% 和 8. 01% ~ 12. 98%, 纯度均达到 95% 以上。本发明工艺简单、生产成本低, 制得的两个黄酮苷具有很好抗氧化及抑菌活性。



1. 黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 原料的处理:取黄秋葵嫩果,以横段面切片后晒干或风干,备用;

2) 渗漉提取:将干燥的片状黄秋葵果实装入渗漉筒中,用折合黄秋葵干燥果实1~2倍量的40%~70%含水乙醇浸润4~6小时后装入渗漉桶中,用折合黄秋葵干燥果实10~18倍量的50%~70%含水乙醇进行渗漉提取,调节流速,以8~15 mL/min流速收集渗漉提取液;

3) 闪蒸浓缩:将渗漉提取液在水浴温度60~70℃,真空度为0.090 Mpa~0.095 Mpa的条件下采用真空薄膜浓缩装置进行闪蒸浓缩,调节待浓缩液的进液速度,以150~350 mL·min⁻¹的流量反复浓缩,得到折合每毫升浓缩液含0.5~1.0克原药材的浓缩液;

4) 脱色除杂处理:将浓缩液用石油醚萃取脱色除杂3~4次,每次用量为浓缩液与石油醚的体积比为1:1~1:3,将石油醚萃取液合并后进行真空浓缩,回收石油醚,萃取脱色后得到的浓缩液备用;

5) 醇沉转移出多糖与果胶:在上述浓缩液中加入95%的工业酒精调整至浓缩液中乙醇浓度达到70%~80%,放置过夜,析出多糖与果胶沉淀,将沉淀物转移出去另行利用,得到除糖后的浓缩液;

6) 继续真空浓缩:得到除糖后的浓缩液继续在50℃以下真空闪蒸浓缩,得到折合每毫升浓缩液含1.5~2.0克原药材的浓缩液;

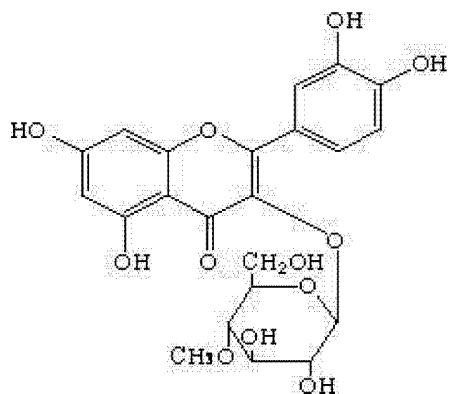
7) 大孔树脂分离富集:得到的浓缩液通过Diaion HP-20大孔吸附树脂柱色谱分离富集,然后先用H₂O洗脱,再依次用10%~70%含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱,最后用70%丙酮洗脱,分别收集3倍柱体积的各部位洗脱液,合并20%~60%含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液,将合并的洗脱液在50℃以下真空闪蒸浓缩,得到洗脱浓缩液;

8) 凝胶树脂分离纯化:将上述合并的洗脱浓缩液继续通过Toyopearl HW-40柱色谱,以H₂O、20%含水甲醇或含水乙醇、40%含水甲醇或含水乙醇、60%含水甲醇或含水乙醇、70%丙酮梯度洗脱;

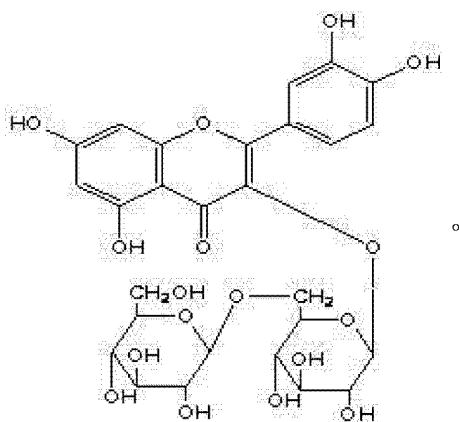
9) 步骤8)中20%含水甲醇或含水乙醇洗脱部位减压浓缩干燥后,溶于少量水后通过MCI gel CHP-20 P柱色谱,以H₂O及不同浓度的含水甲醇或含水乙醇梯度洗脱,TLC检识,相同流分合并,得化合物2的浅黄色结晶;

10) 步骤8)中40%含水甲醇或含水乙醇部位通过Sephadex LH-20柱色谱,以水及不同浓度的含水甲醇梯度洗脱,TLC检识,相同流分合并,得化合物1的浅黄色粗品。

2. 如权利要求1所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于所述的化合物1为5,7,3',4'-四羟基-4''-O-甲基-3-O-β-D-葡萄糖黄酮苷,其结构式为:



3. 如权利要求 1 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于所述的化合物 2 为 5, 7, 3', 4' - 四羟基 -3-O-[β -D-葡萄糖基-(1 \rightarrow 6)]- β -D-葡萄糖黄酮苷, 其结构式为:



4. 如权利要求 1 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤 2) 中:浸润所用的含水乙醇浓度为 45%~65%,优选 50%~60%;渗漉提取时所用的含水乙醇浓度为 55%~65%,优选 58%~60%;渗漉提取时流速为 10~14mL/min,优选 11~12 mL/min。

5. 如权利要求 1 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤 3) 中:进液速度为 200~300 mL \cdot min⁻¹, 220~260 mL \cdot min⁻¹。

6. 如权利要求 1 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤 4) 中:浓缩液与石油醚的体积比为 1:1~1:2。

7. 如权利要求 1 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤 7) 中:先用 H₂O 洗脱,再依次用 10% 含水甲醇或含水乙醇、20% 含水甲醇或含水乙醇、40% 含水甲醇或含水乙醇、60% 含水甲醇或含水乙醇、70% 含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱,最后用 70% 丙酮洗脱,分别收集 3 倍柱体积的各部位洗脱液,合并 20% 含水甲醇或含水乙醇、40% 含水甲醇或含水乙醇、60% 含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液。

8. 如权利要求 1 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤 7) 中:先用 H₂O 洗脱,再依次用 10% 含水甲醇或含水乙醇、25% 含水甲醇或含水乙醇、45% 含水甲醇或含水乙醇、65% 含水甲醇或含水乙醇、70% 含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱,最后用 70% 丙酮洗脱,分别收集 3 倍柱体积的各部位洗脱液,合并 25% 含水甲醇或含水乙醇、45% 含水甲醇或含水乙醇、65% 含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液。

9. 如权利要求 1 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤 7) 中:先用 H_2O 洗脱,再依次用 15% 含水甲醇或含水乙醇、30% 含水甲醇或含水乙醇、40% 含水甲醇或含水乙醇、55% 含水甲醇或含水乙醇、70% 含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱,最后用 70% 丙酮洗脱,分别收集 3 倍柱体积的各部位洗脱液,合并 15% 含水甲醇或含水乙醇、30% 含水甲醇或含水乙醇、40% 含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液。

10. 如权利要求 1 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷在制备防治抗氧化试验、抑菌制剂中的应用。

黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于提取分离技术领域,具体为黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法及其用途。

背景技术

[0002] 黄秋葵为锦葵科秋葵属植物,在我国南北方地区均有栽培。黄秋葵被许多国家定为运动员的首选蔬菜及老年人的保健食品,在美国和日本等国家被称为“植物伟哥”及“绿色人参”,是一种具有较高营养价值的优良的食疗保健蔬菜。

[0003] 黄秋葵中含有黄酮、多糖、果胶、微量元素、氨基酸等多种功效成分,具有抗疲劳、增强人体免疫力,保肝强肾,抗衰老、降低血糖、帮助消化、清火明目、健胃润肠等方面的作用。黄秋葵因其良好的功能和保健作用越来越受到人们的喜爱。对黄秋葵进行深加工可以提高其附加值。但黄秋葵果实的采收具有一定的季节性,嫩果作为保健蔬菜存在保质期短,不便长期保存的弊端。因此需要将黄秋葵嫩果进行精深加工、以提高其附加值及资源利用率。

[0004] 黄秋葵果实中含有大量的黄酮类成分,已知黄酮类化合物是一类存在于植物界的重要的生物活性物质,据研究报道,它不仅能作为防治心脑血管疾病的药物,而且有明显的抗脂质过氧化、抗衰老、清除自由基,降血脂、降低胆固醇、降血糖,抗癌防癌、免疫调节等生理活性,是一种在人类的营养、健康和防治疾病方面有着广阔应用前景的药物,也是应用广泛的天然抗氧化剂和防腐剂,可用于保健食品和化妆品,因此具有很好的开发应用价值。目前未见有对黄秋葵果实进行其黄酮苷类化合物的分离鉴定及生物活性研究的报道。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的上述问题,本发明的目的在于设计提供一种黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法及其用途的技术方案,具有工艺操作简单、生产成本低、收得率及纯度高,无污染、易于产业化生产等优点,制得的两个黄酮苷具有很好抗氧化及抑菌活性,适合用做中药化学对照品、医药原料,也可用做保健品、食品添加剂等。

[0006] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 原料的处理:取黄秋葵嫩果,以横段面切片后晒干或风干,备用;

2) 渗漉提取:将干燥的片状黄秋葵果实装入渗漉筒中,用折合黄秋葵干燥果实1~2倍量的40%~70%含水乙醇浸润4~6小时后装入渗漉桶中,用折合黄秋葵干燥果实10~18倍量的50%~70%含水乙醇进行渗漉提取,调节流速,以8~15 mL/min流速收集渗漉提取液;

3) 闪蒸浓缩:将渗漉提取液在水浴温度60~70℃,真空度为0.090 Mpa~0.095 Mpa的条件下采用真空薄膜浓缩装置进行闪蒸浓缩,调节待浓缩液的进液速度,以150~350 mL·min⁻¹的流量反复浓缩,得到折合每毫升浓缩液含0.5~1.0克原药材的浓缩液;

4) 脱色除杂处理:将浓缩液用石油醚萃取脱色除杂3~4次,每次用量为浓缩液与石

油醚的体积比为 1:1 ~ 1:3, 将石油醚萃取液合并后进行真空浓缩, 回收石油醚, 萃取脱色后得到的浓缩液备用;

5) 醇沉转移出多糖与果胶: 在上述浓缩液中加入 95% 的工业酒精调整至浓缩液中乙醇浓度达到 70% ~ 80%, 放置过夜, 析出多糖与果胶沉淀, 将沉淀物转移出去另行利用, 得到除糖后的浓缩液;

6) 继续真空浓缩: 得到除糖后的浓缩液继续在 50℃ 以下真空闪蒸浓缩, 得到折合每毫升浓缩液含 1.5 ~ 2.0 克原药材的浓缩液;

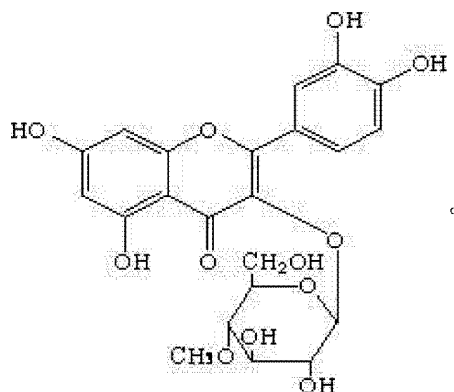
7) 大孔树脂分离富集: 得到的浓缩液通过 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱色谱分离富集, 然后先用 H₂O 洗脱, 再依次用 10% ~ 70% 含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱, 最后用 70% 丙酮洗脱, 分别收集 3 倍柱体积的各部位洗脱液, 合并 20% ~ 60% 含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液, 将合并的洗脱液在 50℃ 以下真空闪蒸浓缩, 得到洗脱浓缩液;

8) 凝胶树脂分离纯化: 将上述合并的洗脱浓缩液继续通过 Toyopearl HW-40 柱色谱, 以 H₂O、20% 含水甲醇或含水乙醇、40% 含水甲醇或含水乙醇、60% 含水甲醇或含水乙醇、70% 丙酮梯度洗脱;

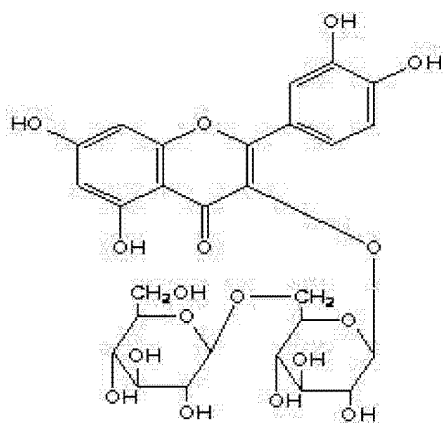
9) 步骤 8) 中 20% 含水甲醇或含水乙醇洗脱部位减压浓缩干燥后, 溶于少量水后通过 MCI gel CHP-20 P 柱色谱, 以 H₂O 及不同浓度的含水甲醇或含水乙醇梯度洗脱, TLC 检识, 相同流分合并, 得化合物 2 的浅黄色结晶;

10) 步骤 8) 中 40% 含水甲醇或含水乙醇部位通过 Sephadex LH-20 柱色谱, 以水及不同浓度的含水甲醇梯度洗脱, TLC 检识, 相同流分合并, 得化合物 1 的浅黄色粗品。

[0007] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法, 其特征在于所述的化合物 1 为 5, 7, 3', 4' - 四羟基 - 4'' - O - 甲基 - 3-O-β-D-葡萄糖黄酮苷, 其结构式为:



[0008] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法, 其特征在于所述的化合物 2 为 5, 7, 3', 4' - 四羟基 - 3-O-[β-D-葡萄糖基-(1 → 6)]-β-D-葡萄糖黄酮苷, 其结构式为:



[0009] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤2)中:浸润所用的含水乙醇浓度为45%~65%,优选50%~60%;渗漉提取时所用的含水乙醇浓度为55%~65%,优选58%~60%;渗漉提取时流速为10~14mL/min,优选11~12 mL/min。

[0010] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤3)中:进液速度为200~300 mL·min⁻¹,220~260 mL·min⁻¹。

[0011] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤4)中:浓缩液与石油醚的体积比为1:1~1:2。

[0012] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤7)中:先用H₂O洗脱,再依次用10%含水甲醇或含水乙醇、20%含水甲醇或含水乙醇、40%含水甲醇或含水乙醇、60%含水甲醇或含水乙醇、70%含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱,最后用70%丙酮洗脱,分别收集3倍柱体积的各部位洗脱液,合并20%含水甲醇或含水乙醇、40%含水甲醇或含水乙醇、60%含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液。

[0013] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤7)中:先用H₂O洗脱,再依次用10%含水甲醇或含水乙醇、25%含水甲醇或含水乙醇、45%含水甲醇或含水乙醇、65%含水甲醇或含水乙醇、70%含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱,最后用70%丙酮洗脱,分别收集3倍柱体积的各部位洗脱液,合并25%含水甲醇或含水乙醇、45%含水甲醇或含水乙醇、65%含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液。

[0014] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,其特征在于步骤7)中:先用H₂O洗脱,再依次用15%含水甲醇或含水乙醇、30%含水甲醇或含水乙醇、40%含水甲醇或含水乙醇、55%含水甲醇或含水乙醇、70%含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱,最后用70%丙酮洗脱,分别收集3倍柱体积的各部位洗脱液,合并15%含水甲醇或含水乙醇、30%含水甲醇或含水乙醇、40%含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液。

[0015] 所述的黄秋葵果实中两个活性黄酮苷在制备防治抗氧化试验、抑菌制剂中的应用。

[0016] 上述黄秋葵果实中两个活性黄酮苷的制备方法,具有如下有益效果:黄秋葵果实原料来源丰富、价廉易得,制备工艺简单,加工制备的成本低、收得率及纯度高;制备工艺中用不到有毒溶剂、无环境污染,具有经济安全、绿色环保、易于产业化生产的特点;提取后采用石油醚萃取脱色处理,排除了色素对后续分离纯化的干扰,采用醇沉法处理,避免了提取物中大量多糖和果胶的干扰;得到的单体化合物收率较高,化合物5,7,3',4'-四羟基-4'-O-甲基-3-O-β-D-葡萄糖黄酮苷的提取率为3.62%~8.66%,化合物

5, 7, 3', 4' - 四羟基 -3-O-[β -D-葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)]- β -D-葡萄糖黄酮苷的提取率为 8.01%~12.98%, 纯度均达到 95% 以上; 制备的单体化合物具有显著的抗氧化及抑菌活性, 具有很好的开发应用前景, 可用作中药化学对照品、医药原料、保健品、食品添加剂等。

[0017] 本申请文件中涉及的百分含量除另有说明外, 均指重量百分含量。

附图说明

[0018] 图 1 为化合物 1 的 ^1H NMR(400 MHz) 图谱;

图 2 为化合物 1 的 ^{13}C NMR(100 MHz) 图谱;

图 3 为化合物 1 的 DEPT 图谱;

图 4 为化合物 1 的 HSQC 图谱;

图 5 为化合物 1 的 HMBC 图谱;

图 6 为化合物 2 的 ^1H NMR(400 MHz) 图谱;

图 7 为化合物 2 的 ^{13}C NMR(100 MHz) 图谱;

图 8 为化合物 2 的 DEPT 图谱;

图 9 为化合物 2 的 ^1H - ^1H COSY 图谱;

图 10 为化合物 2 的 HSQC 图谱;

图 11 为化合物 2 的 HMBC 图谱。

具体实施方式

[0019] 现结合本发明的实施例和相关试验, 对本发明作进一步说明。

[0020] 实施例 1

1) 原料的处理: 取黄秋葵嫩果, 以横段面切片后晒干或风干, 备用;

2) 渗漉提取: 将干燥的片状黄秋葵果实装入渗漉筒中, 用折合黄秋葵干燥果实 1~2 倍量的 70% 含水乙醇浸润 5 小时后装入渗漉桶中, 用折合黄秋葵干燥果实 14 倍量的 70% 含水乙醇进行渗漉提取, 调节流速, 以 10 mL/min 流速收集渗漉提取液;

3) 闪蒸浓缩: 将渗漉提取液在水浴温度 65 $^{\circ}\text{C}$, 真空度为 0.095 Mpa 的条件下采用真空薄膜浓缩装置进行闪蒸浓缩, 调节待浓缩液的进液速度, 以 250 mL \cdot min $^{-1}$ 的流量反复浓缩, 得到折合每毫升浓缩液含 0.5~1.0 克原药材的浓缩液;

4) 脱色除杂处理: 将浓缩液用石油醚萃取脱色除杂 3 次, 每次用量为浓缩液与石油醚的体积比为 1:2, 将石油醚萃取液合并后进行真空浓缩, 回收石油醚, 萃取脱色后得到的浓缩液备用;

5) 醇沉转移出多糖与果胶: 在上述浓缩液中加入 95% 的工业酒精调整至浓缩液中乙醇浓度达到 75%, 放置过夜, 析出多糖与果胶沉淀, 将沉淀物转移出去另行利用, 得到除糖后的浓缩液;

6) 继续真空浓缩: 得到除糖后的浓缩液继续在 50 $^{\circ}\text{C}$ 以下真空闪蒸浓缩, 得到折合每毫升浓缩液含 2.0 克原药材的浓缩液;

7) 大孔树脂分离富集: 得到的浓缩液通过 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱色谱分离富集, 然后先用 H_2O 洗脱, 再依次用 10% 含水甲醇或含水乙醇、20% 含水甲醇或含水乙醇、40% 含水甲醇或含水乙醇、60% 含水甲醇或含水乙醇、70% 含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱, 最

后用 70% 丙酮洗脱, 分别收集 3 倍柱体积的各部位洗脱液, 合并 20% 含水甲醇或含水乙醇、40% 含水甲醇或含水乙醇、60% 含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液, 将合并的洗脱液在 50℃ 以下真空闪蒸浓缩, 得到洗脱浓缩液; 其中用 H₂O 洗脱继续除去水溶性杂质; 最后用 70% 丙酮洗脱除掉全部杂质, 再生大孔吸附树脂;

8) 凝胶树脂分离纯化: 将上述合并的洗脱浓缩液继续通过 Toyopearl HW-40 柱色谱, 以 H₂O、20% 含水甲醇或含水乙醇、40% 含水甲醇或含水乙醇、60% 含水甲醇或含水乙醇、70% 丙酮梯度洗脱;

9) 步骤 8) 中 20% 含水甲醇或含水乙醇洗脱部位减压浓缩干燥后, 溶于少量水后通过 MCI gel CHP-20 P 柱色谱, 以 H₂O 及不同浓度的含水甲醇或含水乙醇梯度洗脱, TLC 检识, 相同流分合并, 得化合物 2 的浅黄色结晶;

10) 步骤 8) 中 40% 含水甲醇或含水乙醇部位通过 Sephadex LH-20 柱色谱, 以水及不同浓度的含水甲醇梯度洗脱, TLC 检识, 相同流分合并, 得化合物 1 的浅黄色粗品。

[0021] 上述步骤 2) 中: 浸润 4 小时、6 小时, 浸润所用的含水乙醇浓度为 45%、65%、50%、60%; 渗漉提取时所用的含水乙醇浓度为 55%、65%、58%、60%; 渗漉提取时流速为 8 mL/min、14 mL/min、11 mL/min、12 mL/min。用折合黄秋葵干燥果实 10、11、13、15、16、18 倍量含水乙醇进行渗漉提取。步骤 3) 中: 水浴温度 60℃、70℃, 真空度为 0.090 Mpa, 进液速度为 200 mL/min、300 mL · min⁻¹、220 mL/min、260 mL · min⁻¹、350 mL · min⁻¹。步骤 4) 中: 浓缩液与石油醚的体积比为 1:1、1:3。步骤 5) 中在上述浓缩液中加入 95% 的工业酒精调整至浓缩液中乙醇浓度达到 70%、80%。步骤 7) 中: 先用 H₂O 洗脱, 再依次用 15% 含水甲醇或含水乙醇、25% 含水甲醇或含水乙醇、45% 含水甲醇或含水乙醇、65% 含水甲醇或含水乙醇、70% 含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱, 最后用 70% 丙酮洗脱, 分别收集 3 倍柱体积的各部位洗脱液, 合并 25% 含水甲醇或含水乙醇、45% 含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液。步骤 7) 中: 先用 H₂O 洗脱, 再依次用 15% 含水甲醇或含水乙醇、25% 含水甲醇或含水乙醇、45% 含水甲醇或含水乙醇、65% 含水甲醇或含水乙醇、70% 含水甲醇或含水乙醇进行梯度洗脱, 最后用 70% 丙酮洗脱, 分别收集 3 倍柱体积的各部位洗脱液, 合并 25% 含水甲醇或含水乙醇、45% 含水甲醇或含水乙醇、65% 含水甲醇或含水乙醇部位的洗脱液。步骤同实施例 1, 也可以取得本发明所述的有益效果。

[0022] 所述的“用折合黄秋葵干燥果实 1 ~ 2 倍量的 40% ~ 70% 含水乙醇”意思是指: 若黄秋葵干燥果实重量为 1kg 则 40% ~ 70% 含水乙醇的用量为 1 ~ 2 升; 所述的“用折合黄秋葵干燥果实 10 ~ 18 倍量的 50% ~ 70% 含水乙醇”意思是指: 若黄秋葵干燥果实重量为 1kg 则 50% ~ 70% 含水乙醇的用量为 10 ~ 18 升。

[0023] 所述的真空薄膜浓缩装置为自行设计组装, 所有部件均可从市场上直接购得, 具体的组装结构也已经公开过。所述的 Diaion HP-20 大孔吸附树脂由日本三菱公司生产, 可直接购得。所述的 Toyopearl HW-40、MCI gel CHP-20 P 柱色谱填料由日本三菱公司生产, 可直接购得。所述的 Sephadex LH-20 (葡聚糖凝胶) 柱色谱填料为 Pharmacia Biotech 产品, 可直接购得。

[0024] 本发明进行 TLC 检识的条件: 薄层板为 0.5% CMC-Na - 硅胶 GF₂₅₄ 板, 展开剂为乙酸乙酯-乙醇-水, 显色剂 a: 紫外灯 (254 nm) 下观察荧光; 显色剂 b: 2% FeCl₃-2% K₃Fe(CN)₆ 喷洒, 105℃ 烘烤至显色, 显色剂 c: 自然光观察, 黄酮类化合物自身显淡黄色。

[0025] 结构鉴定：主要利用光谱技术，包括核磁共振谱 (^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT、 ^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC) 和质谱分析 (ESI-MS) 鉴定化合物 1 和 2 的结构。

[0026] 化合物 1：分子式为： $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ ，ESI-MS m/z 479 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，浅黄色结晶，遇三氯化铁-铁氰化钾试剂显蓝色，与盐酸-镁粉试剂反应显粉红色，Molish 反应显阳性。通过光谱技术确定化合物 1 为 5, 7, 3', 4' - 四羟基 -4' -O - 甲基 -3-O- β -D- 葡萄糖黄酮苷。其 ^1H NMR (400 MHz)、 ^{13}C NMR (100 MHz) 数据见表 1。

[0027] 化合物 2：分子式为： $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$ ，ESI-MS m/z 625 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，浅黄色无定型粉末，遇三氯化铁-铁氰化钾试剂显蓝色，与盐酸-镁粉试剂反应显粉红色，Molish 反应显阳性。通过光谱技术，并与文献数据对照，确定化合物 2 为 5, 7, 3', 4' - 四羟基 -3-O- $[\beta$ -D- 葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)]- β -D- 葡萄糖黄酮苷。其 ^1H NMR (400 MHz)、 ^{13}C NMR (100 MHz) 数据见表 1。

[0028]

表 1 化合物 1 和 2 的 ^{13}C -NMR 与 ^1H -NMR 光谱数据 (MeOH- d_4 , TMS, δ ppm, J , Hz)

化合物 1			化合物 2		
序号	δ_{H} (化学位移)	δ_{C} (化学位移)	序号	δ_{H} (化学位移)	δ_{C} (化学位移)
2		159.03	2		158.88
3		135.63	3		135.59
4		179.50	4		179.40
5		163.06	5		163.01
6	6.19(1H, s)	99.89	6	6.19(1H, d, 2.0 Hz)	99.89
7		166.02	7		165.99
8	6.38(1H, s)	94.71	8	6.39(1H, d, 2.0 Hz)	94.82
9		158.47	9		158.47
10		105.70	10		105.76
1'		123.08	1'		123.09
2'	7.70(1H, d, 1.2 Hz)	117.56	2'	7.67(1H, d, 2.4 Hz)	117.52
3'		149.86	3'		149.84
4'		145.92	4'		145.91
5'	6.86(1H, d, 8.4 Hz)	116.01	5'	6.86(1H, d, 8.4 Hz)	116.08
6'	7.58(1H, dd, 8.4, 1.2 Hz)	123.20	6'	7.66(1H, dd, 8.4, 2.4 Hz)	123.53
1''	5.25(1H, d, 7.6 Hz)	104.31	1''	5.23(1H, d, 7.6 Hz)	104.58
2''	3.46(1H, brs)	75.73	2''	3.63(1H, brs)	75.75
3''	3.42(1H, m)	78.12	3''	3.43(1H, m)	77.99
4''	3.34(1H, m)	71.22	4''	3.08(1H, m)	75.08
5''	3.22(1H, brs)	78.40	5''	3.48(1H, brs)	77.87
6''	3.57(1H, m) 3.72(1H, brs)	62.55	6''	3.225(1H, m) 3.326(1H, brs)	62.51
4''-O CH ₃	3.68(3H, s)	55.11	1'''	4.14(1H, d, 7.6 Hz)	103.98
			2'''	3.39(1H, m)	71.28
			3'''	3.76(1H, m)	77.60
			4'''	3.53(1H, brs)	77.77
			5'''	3.97(1H, m)	75.08
			6'''	3.23(1H, m) 3.35(1H, brs)	69.57

经过高效液相色谱峰面积归一化法标定纯度，两种单体化合物的含量均在 95% 以上，经含量测定，原料中化合物 5, 7, 3', 4' - 四羟基 -4' -O - 甲基 -3-O- β -D- 葡萄糖黄酮苷的提取率为 3.62% ~ 8.66%，化合物 5, 7, 3', 4' - 四羟基 -3-O- $[\beta$ -D- 葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)]- β -D- 葡萄糖黄酮苷的提取率为 8.01% ~ 12.98%。

[0029] 图 1-11 中符号说明如下：ESI-MS 为电喷雾电离质谱； ^1H -NMR 为核磁共振氢谱； ^{13}C -NMR 为核磁共振碳谱；DEPT 为无畸变极化转移增强法； ^1H - ^1H COSY 为二维氢氢相关谱，HSQC 为二维碳氢直接相关谱；HMBC 为二维碳氢远程相关谱； δ 为化学位移，单位为 ppm； J

为偶合常数,单位为 Hz ;TMS 为内标物 ;MeOH-d₄ 为氘代甲醇 ;Molish 试剂为浓硫酸 -2% 的 α - 萘酚的乙醇溶液。

[0030] 为进一步说明本发明在医药及食品领域中的作用,下面通过部分抗氧化及抑菌试验来加以说明。

[0031] 1、抗氧化试验

1, 1- 二苯基苦基苯肼 (DPPH) 是一种稳定的有机自由基, 通过检测生物试剂对 DPPH 自由基的清除能力可以体现其抗氧化性的强弱。近年来,国内外学者利用 DPPH 溶液的吸光度变化作为清除自由基能力的分光光度测定,并被证明是一种灵敏、简单易行的有效方法。本试验采用 DPPH 分光光度法用以评价本发明得到的两个黄酮苷单体的抗氧化能力。

[0032] DPPH • 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,在溶液中可生成具有典型紫色的稳定溶液,其孤对电子在 517 nm 附近有强吸收 (显深紫色)。当有机清除剂存在时, 由于清除剂与 DPPH 孤对电子配对而使其在 517nm 处的吸光度减小,使溶液的典型紫色变浅,其吸光度的变化与其所接受的电子成定量关系。即吸光度越小,自由基清除剂清除自由基的能力越强,通过测定吸收减弱的程度,可评价自由基清除剂的活性,因而可用分光光度法进行定量分析。在 200 μ L 不同浓度的样品溶液中分别加入 100 μ L 的 DPPH 乙醇溶液,24 $^{\circ}$ C 混匀放置 20 分钟后,用酶标仪测定 517nm 处的吸光度,用下面的公式计算 DPPH 自由基清除率: Scavenging % = $1 - (A_p - A_c) / A_{max} \times 100\%$ 。式中, A_p 为 200 μ L 的 DPPH 溶液和 100 μ L 待测液的吸光度, A_c 为 200 μ L 待测液和 100 μ L 70% 乙醇的吸光度, A_{max} 为 100 μ L DPPH 溶液和 200 μ L 70% 乙醇的吸光度。

[0033] 供试样品测定过程中用 Trolox 作阳性对照,并以此换算出被测供试样品总的抗氧化能力。测定结果表示为达到一定浓度测试物质相当的抗氧化能力所需要的 Trolox 浓度。IC₅₀ 值是一个常用于评价抗氧化能力的参数,它是指抗氧化剂清除 50% 的 DPPH 自由基时所需的浓度。其值越小,表示达到 50% 清除率时,所用的自由基清除剂的浓度剂量越小,其自由基清除效果也就越好,对应的参试样品抗氧化活性越强。

[0034] (1) 实验条件 :Tecan Infinite M200 酶标仪 ;UV-2102 PCS 紫外可见分光光度计 ;101-3 电热鼓风恒温干燥箱 ;KQ-250B 型超声波清洗器 ;旋转蒸发仪 ;DPPH (1, 1- 二苯基 -2- 苦肼基自由基) ;酶标板为 96 微孔板,其他试剂均为分析纯。

[0035] (2) DPPH 溶液、Trolox 阳性对照溶液及供试品溶液的配制 :DPPH 溶液的配制 :准确称取 DPPH 试剂 11.83 mg,用 70% 乙醇溶解,并定量转入 100 mL 容量瓶中,用 70 % 乙醇定容,摇匀得质量浓度为 118.3 μ g \cdot mL⁻¹ 的 DPPH 贮备液,置于冰箱中冷藏备用,实验前适当稀释 DPPH • 溶液。

[0036] 称取 Trolox 对照品 21.45 mg,用 70% 乙醇溶解于 100 mL 的量瓶中,定容至刻度后得到浓度为 0.1056 mg \cdot mL⁻¹ 的 Trolox 阳性对照溶液。取适量 Trolox 阳性对照溶液,逐级稀释成浓度为 0.00212、0.006336、0.01056、0.014784、0.019008 mg \cdot mL⁻¹ 的梯度溶液。

[0037] 供试品溶液的制备 :分别精确称取通过本发明方法提取纯化得到的两个黄酮苷单体 136 mg,用 70% 乙醇溶解并定容至 100 mL 量瓶中。然后分别取 1 mL,2 mL,3 mL,4 mL 用 70% 乙醇定容于 5 mL 量瓶中,配置成不同浓度的供试品溶液,将得到的供试品溶液置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待用。

[0038] (3)测定方法与测定结果:用点样用移液枪在 96 孔酶标板中分别加入不同浓度的供试品溶液 200 μL 和 DPPH 试液 100 μL 。样品加入后震荡 30s, 28℃保温 20 min 后, 用 Infinite M 200 酶标仪在 517 nm 波长下测定其吸光值 (A_p), 同时测定不加 DPPH 的样品空白吸光值 (A_c) 和加 DPPH 但不加样品的吸光值 (A_{\max})。用 Trolox 作阳性对照, 以 Trolox (X) 浓度为横坐标, 以测得的自由基清除率 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线, 结果表明 Trolox 溶液浓度在 0.002112 ~ 0.019008 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与其对 DPPH \cdot 的清除率呈良好的线性关系, $y=0.1023x+0.0845$, $r=0.9939$ 。样品抗氧化能力用 TEAC 表示。TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), 即每克抗氧化物质的自由基清除能力相当于 Trolox 的自由基清除能力的微摩尔数, 依此来评价被测物质的总抗氧化能力。

[0039] 取适量待测供试品溶液, 按标准曲线制备项下操作, 测定供试品溶液在 510 nm 下的吸光度, 计算供试品溶液对 DPPH \cdot 自由基的清除率及 TEAC 值。

[0040] 计算结果供试样品化合物 1 对 DPPH 清除率的 TEAC 值为 207.5318 mg Trolox /g DW ; 供试样品化合物 2 对 DPPH 清除率的 TEAC 值为 234.7465 mg Trolox /g DW

实验结果表明, 供试样品化合物 1 和 2 对 DPPH 自由基具有一定的清除率, 且清除率随供试样品溶液浓度的增大而提高。表明本发明制备的两个黄酮苷单体对 DPPH 自由基的清除率均较高, 即两者均具有较强的抗氧化活性, 且在配制浓度范围内随浓度升高抗氧化能力增强。

[0041] 2、抑菌试验

抑菌活性的测定采用琼脂扩散滤纸片法, 根据抑菌环直径判断抑菌能力。滤纸片直径 6.0 mm, 灭菌干燥后备用。每个样品做 3 次重复实验, 数据采用 SPSS1010 进行分析, 组间比较采用 t 检验。

[0042] (1)供试样品溶液的配制:分别称取一定量由本发明制备的黄酮苷单体, 平行称取 3 份, 加蒸馏水定容至容量瓶中, 然后依次稀释为不同浓度的水溶液, 并以消毒蒸馏水做空白对照。

[0043] (2)菌种活化与灭菌处理:将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌冷藏菌种分别接入 2 支营养琼脂斜面培养基活化, 28℃培养 24 h。培养基、其他实验所用器材和试剂均在 120℃下湿热高压灭菌 2 h。

[0044] (3)供试菌株悬液与含菌平板的制备:将盛有无菌水的试管排在试管架上, 将预先进行过斜面活化的 2 个菌种各挑出两环, 分别溶解在无菌水试管中, 制成菌株悬液, 稀释菌液, 使含菌体为 10^7 – 10^8 $\text{cfu} \cdot \text{L}^{-1}$, 即得菌株悬液。再将融化的灭菌培养基倾入无菌培养皿中, 待凝固后滴入 0.1 ml 菌悬液, 用无菌涂布环将菌悬液涂布均匀即成含菌平板, 待用。

[0045] (4)抑菌实验及抑菌圈的测定:抑菌圈测量是利用抑菌物质在涂布特定试验菌的琼脂培养基内成球形立体状扩散, 抑制试验菌的繁殖, 在抑菌物质的周围形成的透明圈。将无菌小滤纸片高温蒸汽灭菌干燥后备用。用无菌移液管吸取各种菌悬液加入无菌培养皿中, 用镊子夹取浸透样品溶液的滤纸片, 将其放在培养基表面。将放好滤纸片的含菌培养皿分别在恒温箱中培养, 到时取出, 测量并记录形成的抑菌环的直径。每组实验重复 3 次, 实验结果取平均值。

[0046] (4)最小抑菌浓度 (MIC) 测定结果:MIC 的测定采用二倍稀释法。将不同浓度的样品溶液分别用移液管移入各个平皿内, 倒入已经高温灭菌的培养基中充分混匀, 冷却凝固

后,每皿中加入菌悬液,用无菌涂布器涂布均匀进行培养。取出,观察结果,以不长菌的溶液浓度做为最低抑菌浓度 MIC,结果见下表。

[0047] 样品的抑菌试验结果

实验菌种	化合物 1		化合物 2	
	抑菌环直径 (mm)	抑菌试验结果 MIC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑菌环直径(mm)	抑菌试验结果 MIC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
金黄色葡萄球菌	30.19	26.61	30.83	25.65
大肠杆菌	21.68	41.27	20.35	41.42

该试验结果表明,供试样品的水溶液对供试菌种金黄色葡萄球菌、大肠杆菌均具有较强的抑制作用,且随浓度的增加抑菌效果增强。在相同浓度条件下供试样品对金黄色葡萄球菌的抑制作用明显大于大肠杆菌,该试验结果表明本发明制备的两个黄酮苷单体均具有一定的抑菌活性。

[0048] 以上试验结果表明,由黄秋葵果实中分离得到的 2 个黄酮苷单体具有一定的抗氧化及抑菌作用,因此在医药及食品行业可用作中药化学对照品、医药原料,也可用做保健品、食品添加剂等。

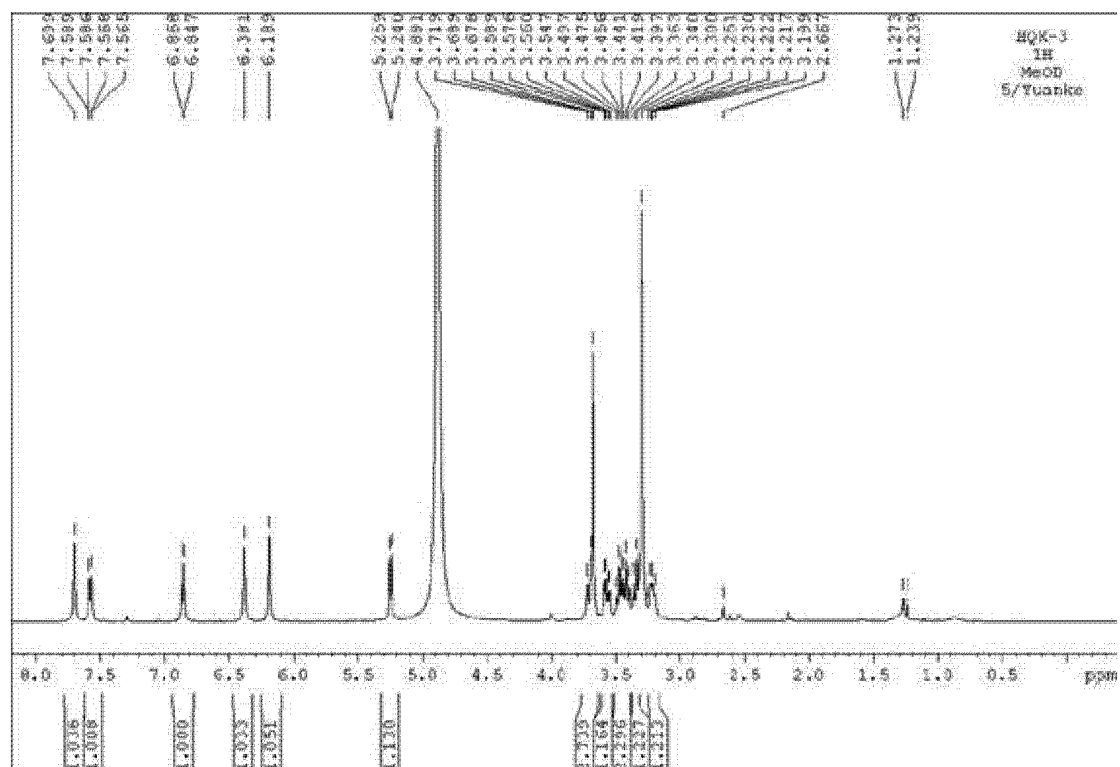


图 1

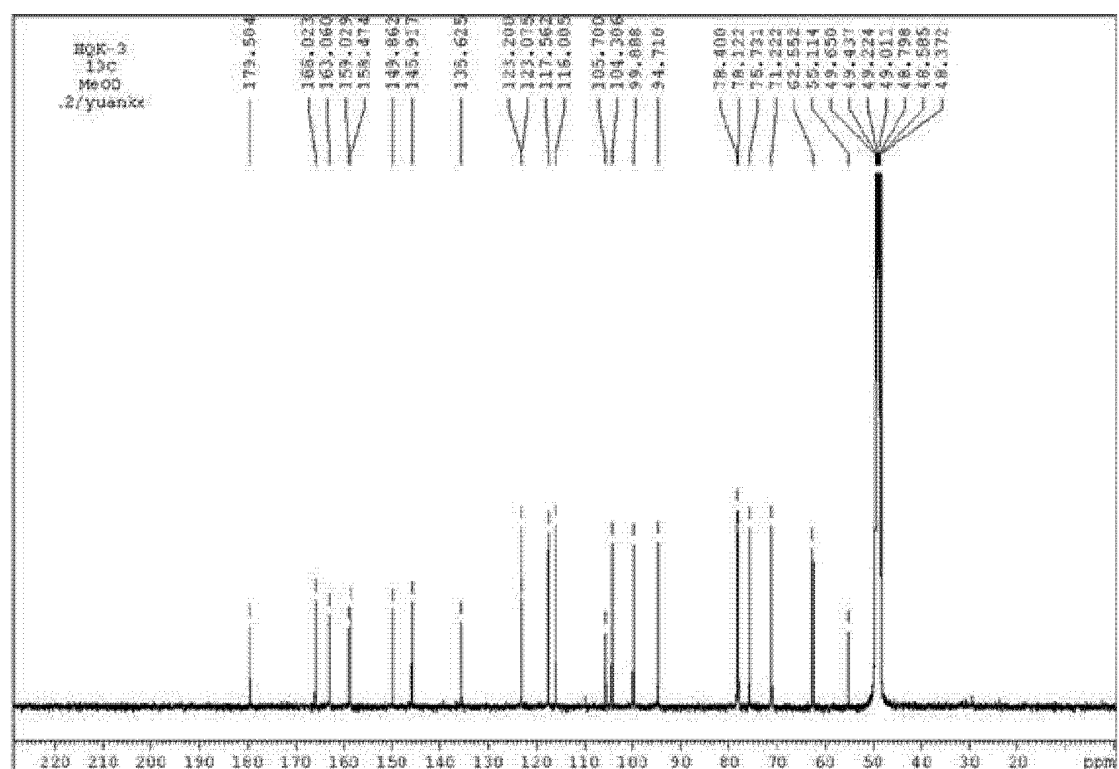


图 2

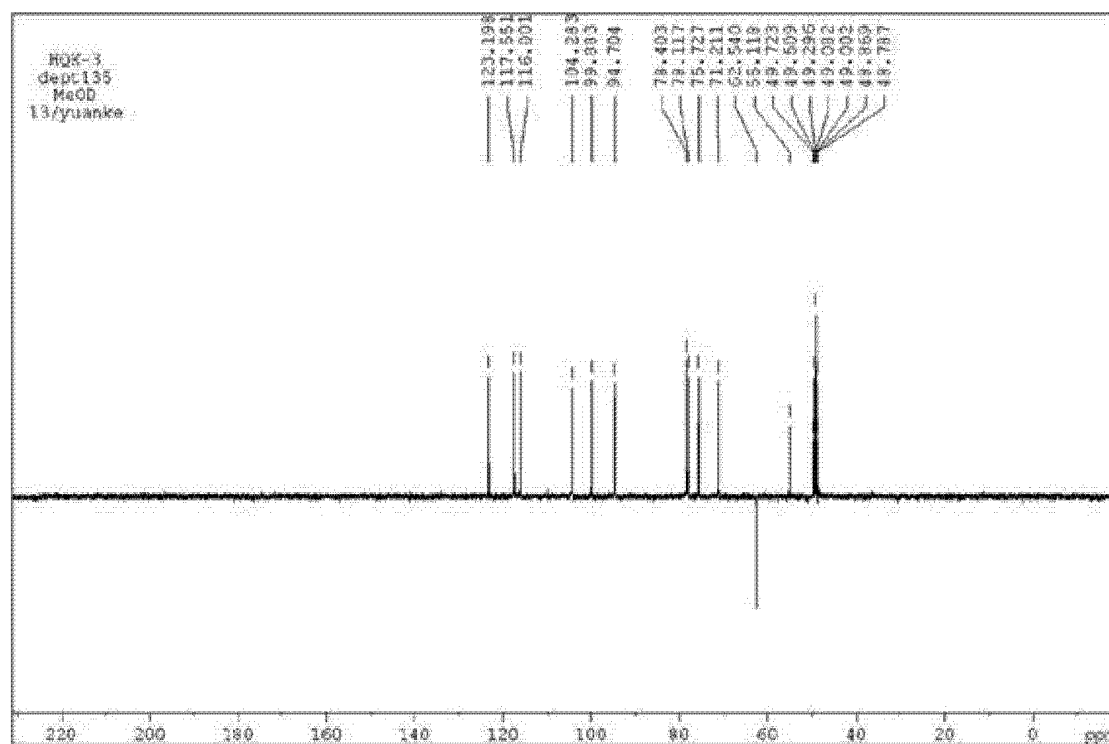


图 3

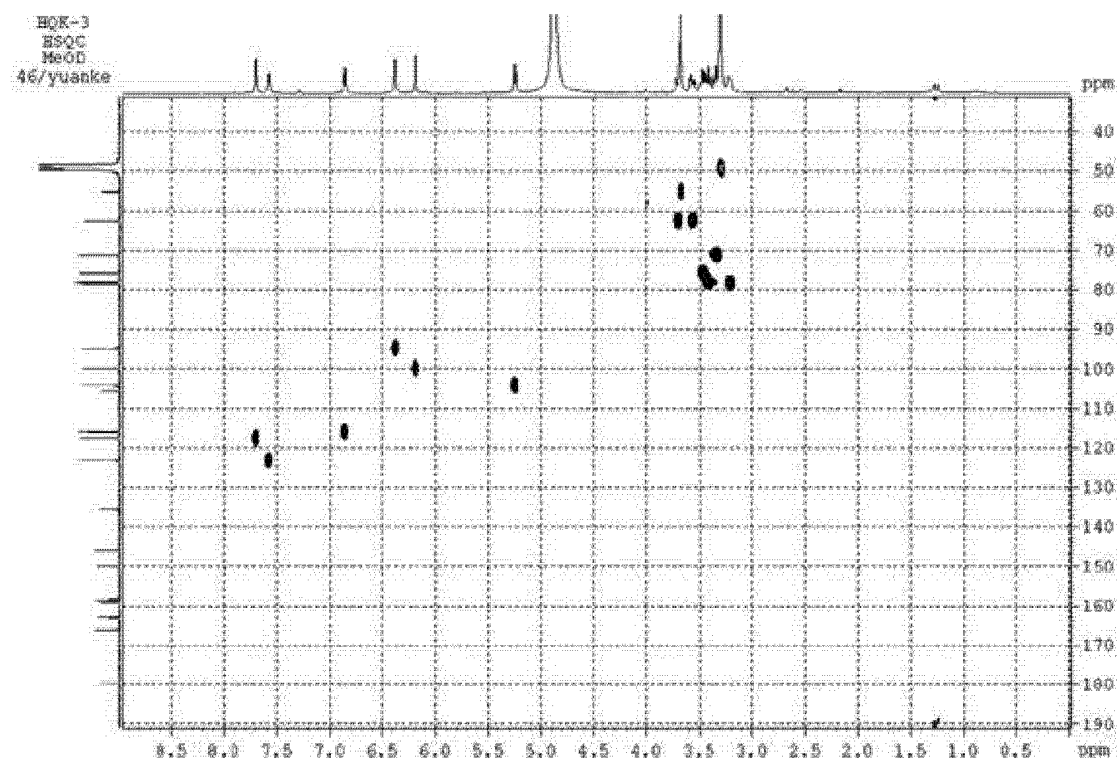


图 4

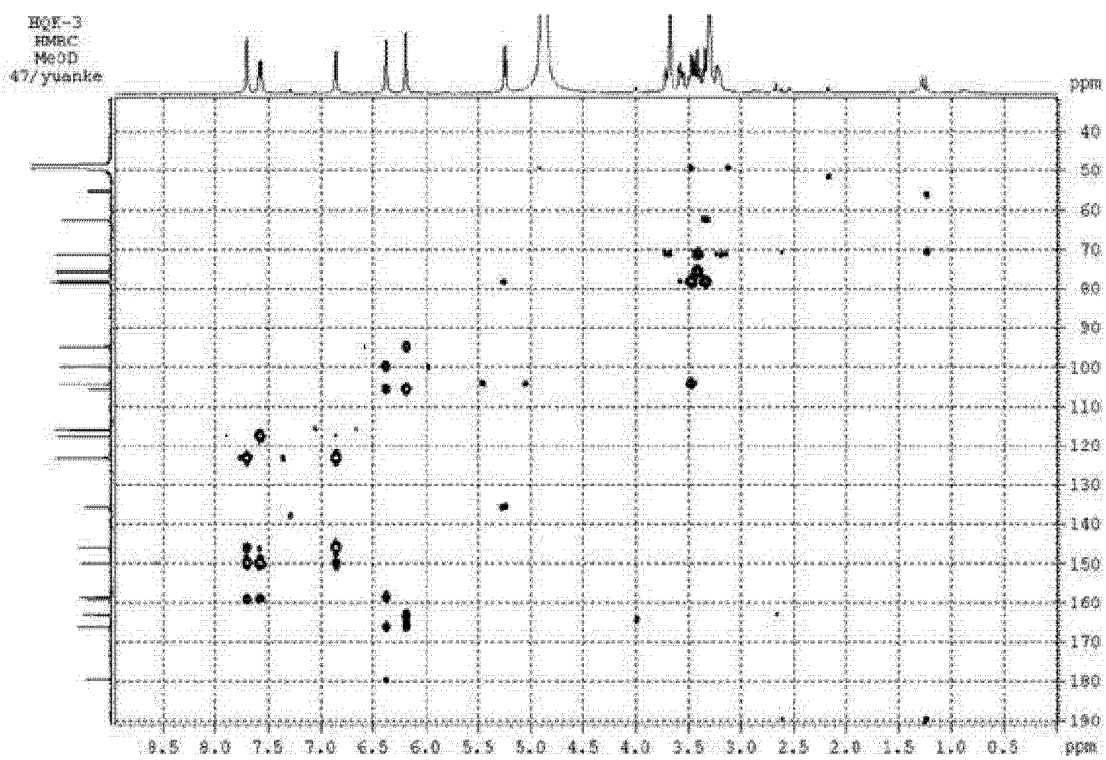


图 5

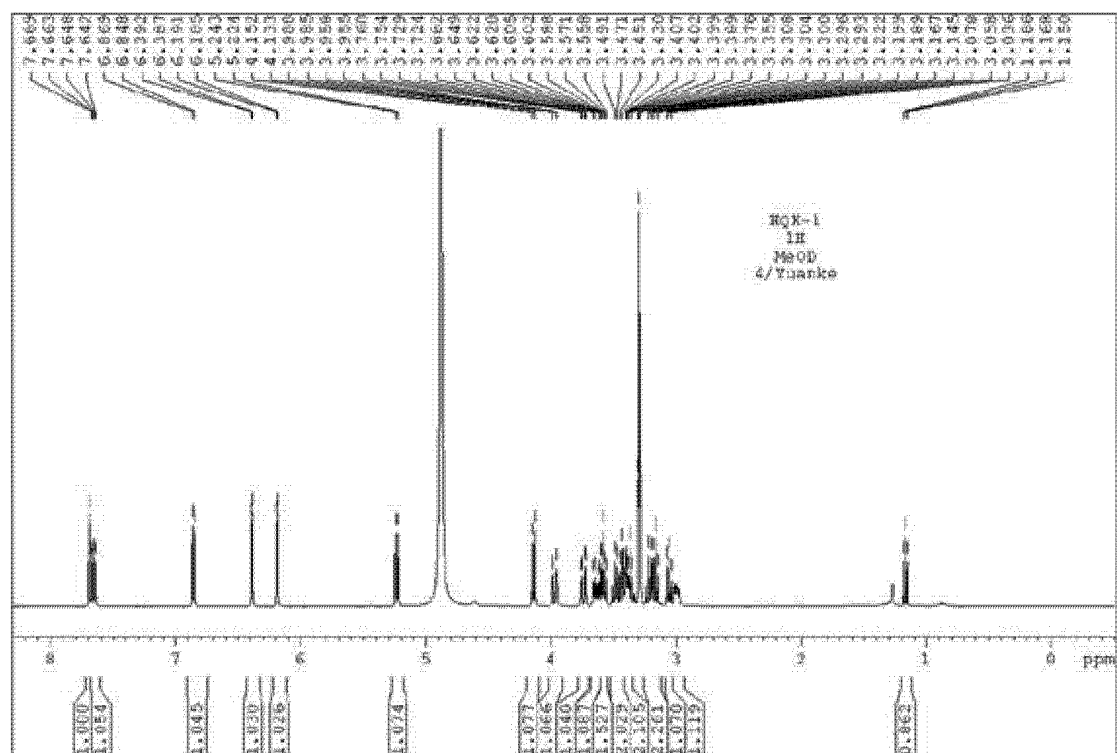


图 6

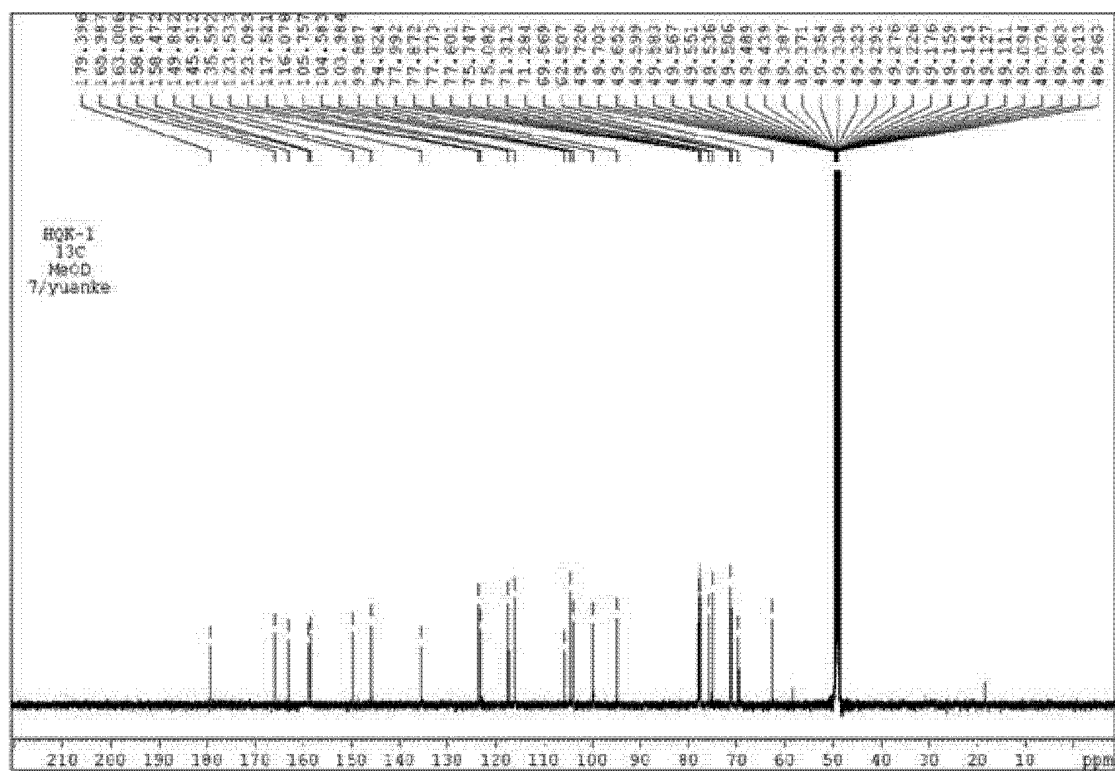


图 7

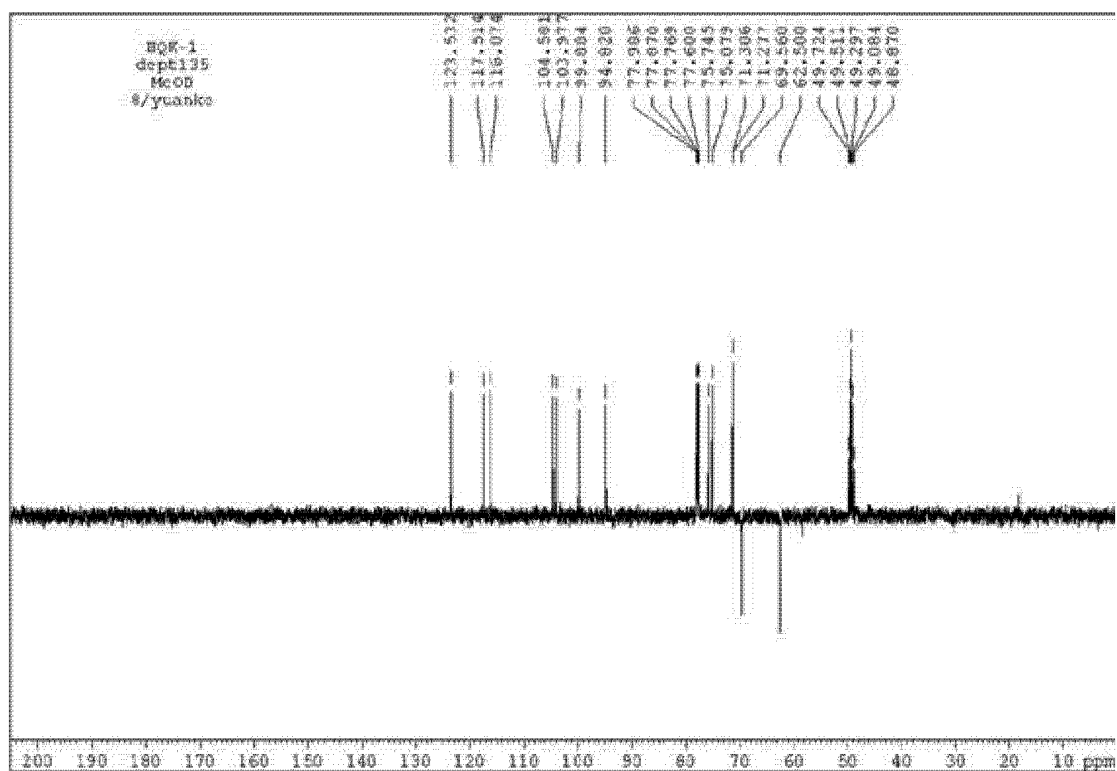


图 8

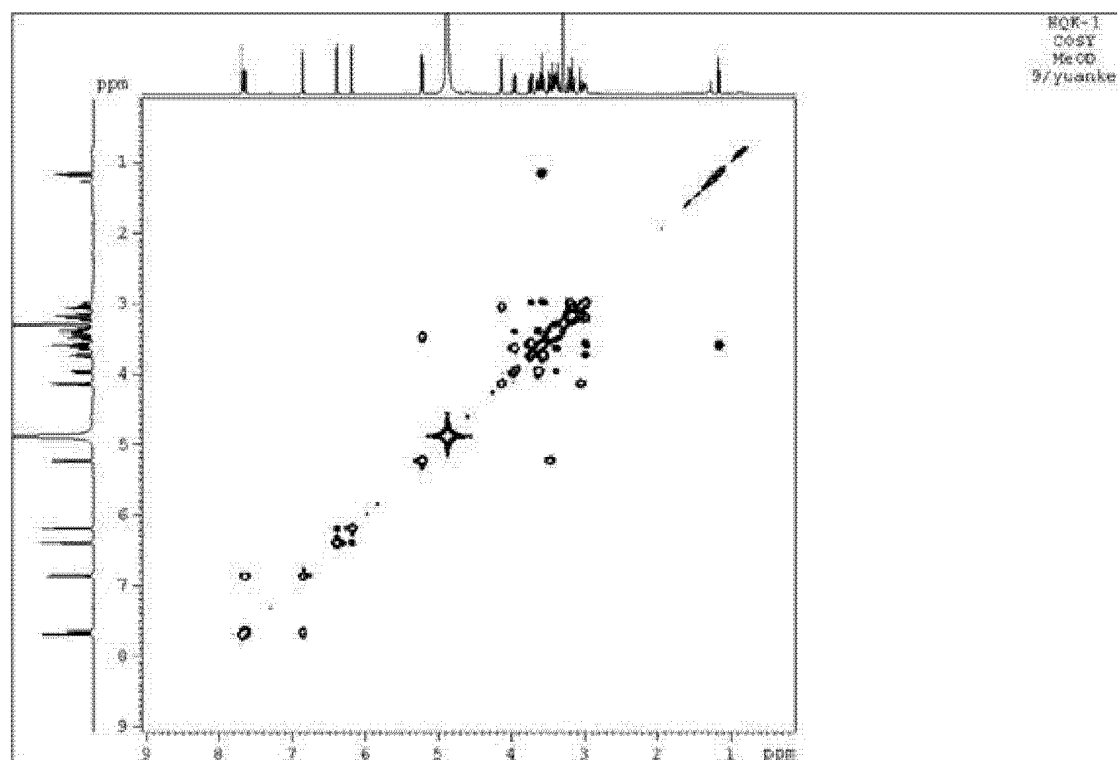


图 9

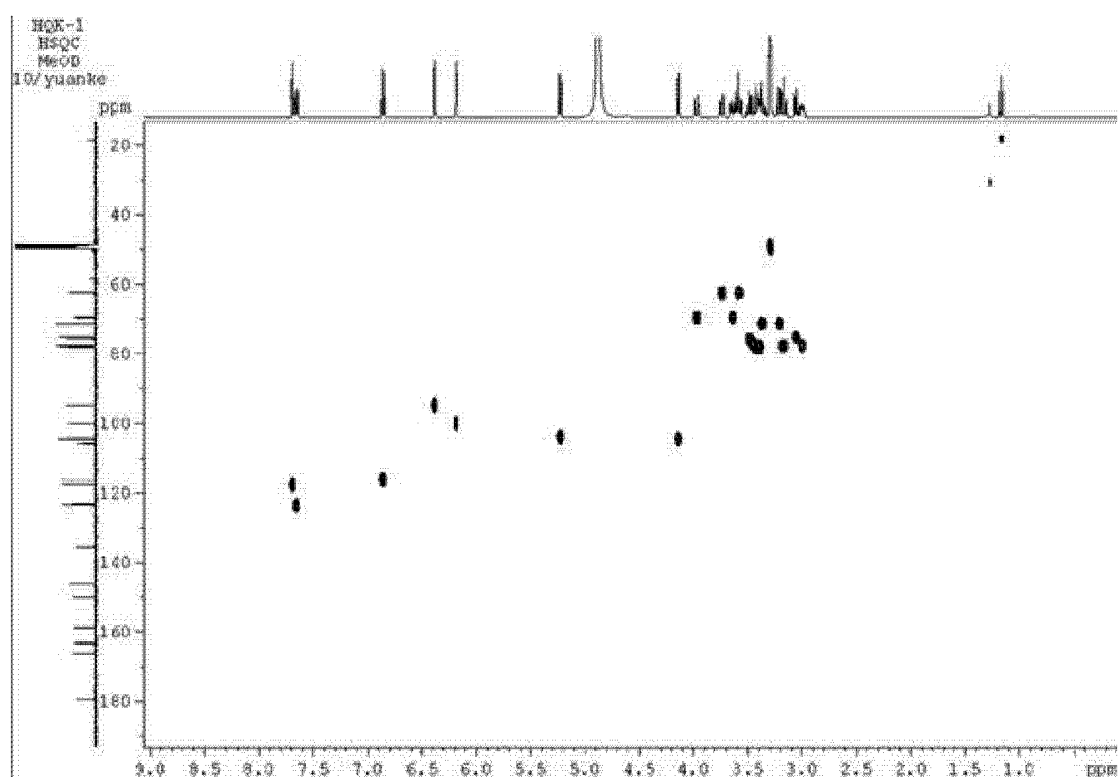


图 10

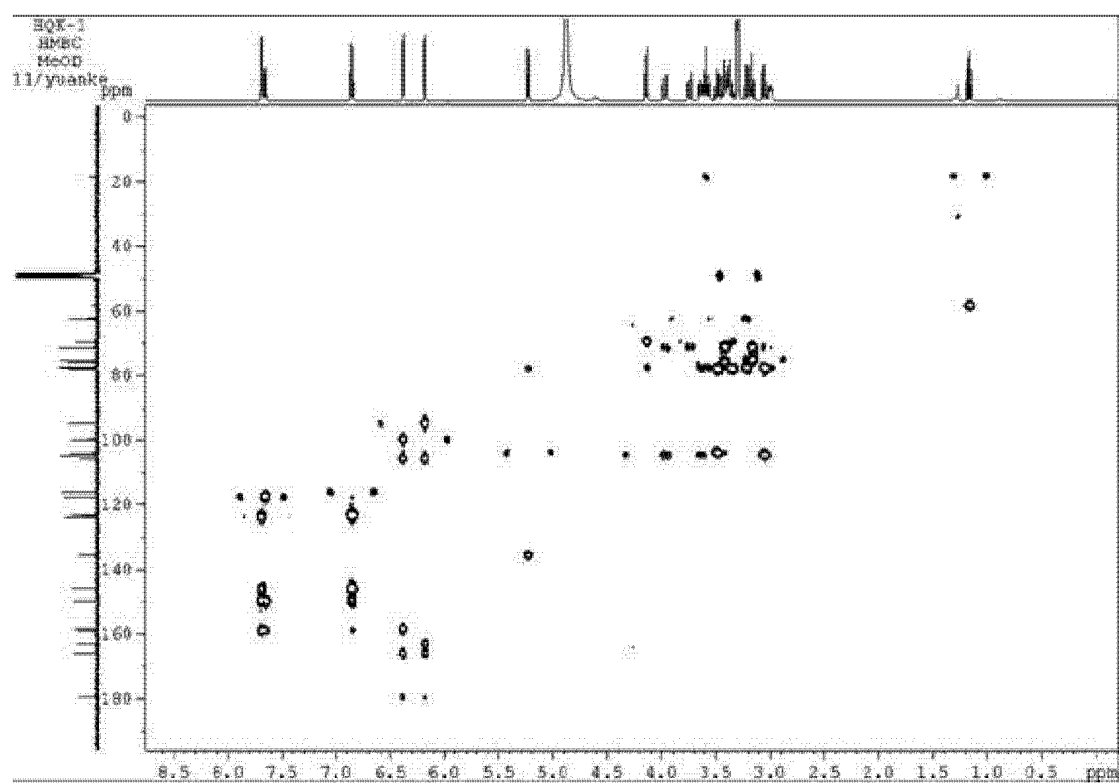


图 11