



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113181254 B

(45) 授权公告日 2022.06.17

(21) 申请号 202110517632.5

(56) 对比文件

(22) 申请日 2021.05.12

CN 105708971 A, 2016.06.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 薛亚男

申请公布号 CN 113181254 A

(43) 申请公布日 2021.07.30

(73) 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 鲁群 喻美华 张星星 刘睿

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 赵琪

(51) Int. Cl.

C07C 231/24 (2006.01)

C07C 235/34 (2006.01)

A61K 36/736 (2006.01)

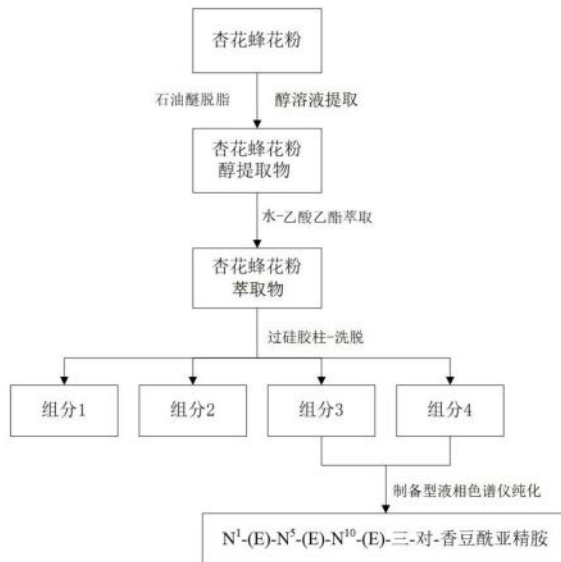
权利要求书3页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用、从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法

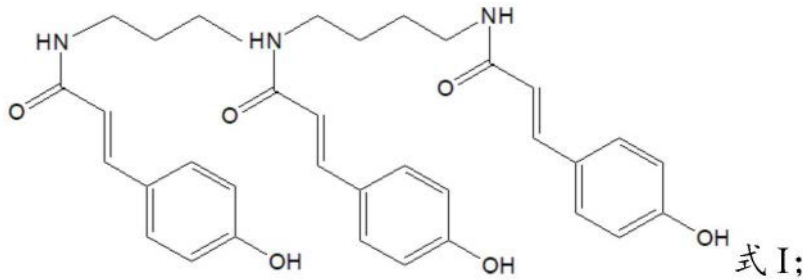
(57) 摘要

本发明属于物质提取技术领域,提供了一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用、从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法。本发明提供的从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法,通过石油醚将杏花蜂花粉中的脂类物质除去;然后采用醇溶液对脱脂后的杏花蜂花粉进行提取,将酚胺化合物释放到醇溶液中;采用萃取剂对杏花蜂花粉醇提取物进行萃取,除去溶于水的杂质;然后采用硅胶柱对杏花蜂花粉萃取物进行初步纯化分离;再采用制备型液相色谱仪进行进一步纯化,保证得到了酚胺化合物;同时,所得酚胺化合物的产量高、纯度高、杂质少;另外,所得酚胺化合物具有极强的酪氨酸酶抑制效果和抗氧化效果。



1. 一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用,所述酚胺化合物为 N^1 -(E)- N^5 -(E)- N^{10} -(E)-三-对-香豆酰亚精胺;

所述 N^1 -(E)- N^5 -(E)- N^{10} -(E)-三-对-香豆酰亚精胺具有式I所示结构:



从杏花蜂花粉中提取酚胺类化合物的方法,包括以下步骤:

将杏花蜂花粉和石油醚混合,进行脱脂处理,得到脱脂杏花蜂花粉;所述脱脂处理的条件包括:脱脂处理的次数为2次,每次脱脂处理的料液比为1:2g/mL,每次脱脂处理的时间为20~40min;脱脂处理的温度为25~40℃;

将所述脱脂杏花蜂花粉和醇溶液混合,进行提取,除去所得提取液中的残渣,得到上清液;所述醇溶液为醇的水溶液;所述醇溶液的体积浓度为70~90%;所述醇溶液中的醇为甲醇或乙醇;所述提取的条件包括:提取的次数为2次,每次提取的料液比独立地为1g:(10~40)mL,每次提取的时间为20~40min;提取的温度为25~40℃;

将所述上清液进行第一浓缩得到杏花蜂花粉醇提取物;

将所述杏花蜂花粉醇提取物和萃取剂混合,进行萃取,所得上层萃取相经第二浓缩后进行冷冻干燥,得到杏花蜂花粉萃取物;所述萃取剂为水和乙酸乙酯的混合溶液;所述萃取剂中水和乙酸乙酯体积比为1:1~1:3;

将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,依次采用第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂进行梯度洗脱,得到组分3和组分4;

所述硅胶柱为日本YMC公司型号SLG12S50、粒径50 μ m硅胶柱;

所述硅胶柱中硅胶的体积为杏花蜂花粉萃取物上样体积的60倍;

所述第一洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为95:5的混合液;

所述第二洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为90:10的混合液;

所述第三洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液;

所述第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂的用量为硅胶柱的柱体积的2倍;

将所述组分3和组分4分别利用制备型液相色谱仪进行纯化,得到酚胺化合物;所述酚胺化合物为 N^1 -(E)- N^5 -(E)- N^{10} -(E)-三-对-香豆酰亚精胺;

所述制备型液相色谱仪的参数包括:

色谱仪:伊利特制备色谱仪;

色谱柱:伊利特SinoChrom ODS-BP,300*20mm,10 μ m;

流动相:流动相A为体积浓度为0.1%的乙酸水溶液,流动相B为甲醇;

洗脱程序:0~30min,60%B;

进样量:1mL;

流速:8mL/min。

2. 一种从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法,包括以下步骤:

将杏花蜂花粉和石油醚混合,进行脱脂处理,得到脱脂杏花蜂花粉;所述脱脂处理的条件包括:脱脂处理的次数为2次,每次脱脂处理的料液比为1:2g/mL,每次脱脂处理的时间为20~40min;脱脂处理的温度为25~40℃;

将所述脱脂杏花蜂花粉和醇溶液混合,进行提取,除去所得提取液中的残渣,得到上清液;所述醇溶液为醇的水溶液;所述醇溶液的体积浓度为70~90%;所述醇溶液中的醇为甲醇或乙醇;所述提取的条件包括:提取的次数为2次,每次提取的料液比独立地为1g:(10~40)mL,每次提取的时间为20~40min;提取的温度为25~40℃;

将所述上清液进行第一浓缩得到杏花蜂花粉醇提取物;

将所述杏花蜂花粉醇提取物和萃取剂混合,进行萃取,所得上层萃取相经第二浓缩后进行冷冻干燥,得到杏花蜂花粉萃取物;所述萃取剂为水和乙酸乙酯的混合溶液;所述萃取剂中水和乙酸乙酯体积比为1:1~1:3;

将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,依次采用第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂进行梯度洗脱,得到组分3和组分4;

所述硅胶柱为日本YMC公司型号SLG12S50、粒径50 μ m硅胶柱;

所述硅胶柱中硅胶的体积为杏花蜂花粉萃取物上样体积的60倍;

所述第一洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为95:5的混合液;

所述第二洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为90:10的混合液;

所述第三洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液;

所述第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂的用量为硅胶柱的柱体积的2倍;

将所述组分3和组分4分别利用制备型液相色谱仪进行纯化,得到酚胺化合物;所述酚胺化合物为N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺;

所述制备型液相色谱仪的参数包括:

色谱仪:伊利特制备色谱仪;

色谱柱:伊利特SinoChrom ODS-BP,300*20mm,10 μ m;

流动相:流动相A为体积浓度为0.1%的乙酸水溶液,流动相B为甲醇;

洗脱程序:0~30min,60%B;

进样量:1mL;

流速:8mL/min。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述梯度洗脱后,还包括:将所得洗脱液进行TLC检验,相同条带的洗脱液合并到一起,最终得到4个组分,分别为组分1、组分2、组分3和组分4;利用高效液相色谱法对4个组分进行检测,确定组分3和组分4含有N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述高效液相色谱法的参数包括:

色谱仪:美国Thermo-Fisher公司UltiMate 3000液相色谱仪;

色谱柱:Hypersil DOLD,250*4.6mm,5 μ m;

流动相:流动相A为体积浓度为0.13%的甲酸水溶液,流动相B为甲醇;

洗脱程序:0min,50%B;20min,63%B;

进样量:10 μ L;

流速:0.5mL/min。

5. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,组分3和组分4利用制备型液相色谱仪进行纯化之前,还包括:将组分3和组分4分别用色谱甲醇配制成2mg/mL的样品溶液。

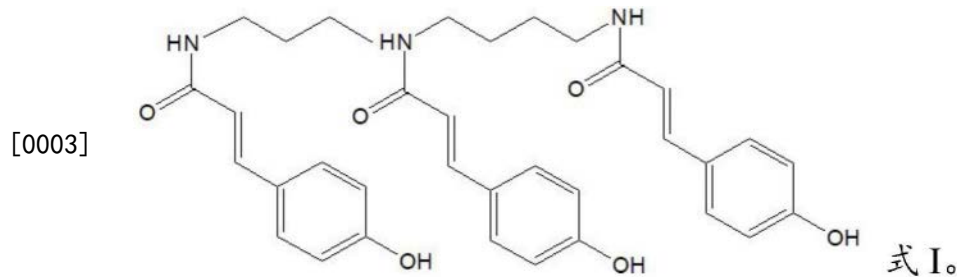
一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用、从杏花蜂花粉中 提取酚胺化合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及物质提取技术领域,尤其涉及一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用、从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法。

背景技术

[0002] N^1 - (E) - N^5 - (E) - N^{10} - (E) -三-对-香豆酰亚精胺具有式I所示结构,属于酚胺化合物。酚胺化合物可以调节植物生长、细胞增殖、诱导花的形成,在植物的发育和防御中有着特殊的功能。近年来研究表明,酚胺类化合物具有抗真菌、抗炎和抗氧化等多种功能活性。酚胺化合物作为新兴的功能活性因子,可应用于保健品、化妆品和药品等多领域。



[0004] 虽然现有技术已经公开了从莲藕等中提取 N^1 - (E) - N^5 - (E) - N^{10} - (E) -三-对-香豆酰亚精胺,但是获得的 N^1 - (E) - N^5 - (E) - N^{10} - (E) -三-对-香豆酰亚精胺的产量低、纯度低。

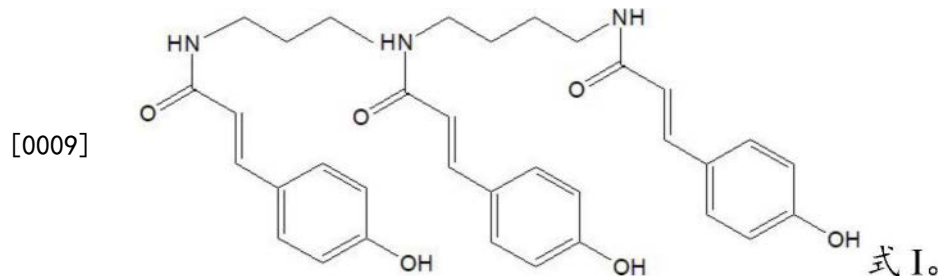
发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用、从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法。本发明从杏花蜂花粉提取酚胺化合物,所得酚胺化合物的产量高、纯度高。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用,所述酚胺化合物为 N^1 - (E) - N^5 - (E) - N^{10} - (E) -三-对-香豆酰亚精胺;

[0008] 所述 N^1 - (E) - N^5 - (E) - N^{10} - (E) -三-对-香豆酰亚精胺具有式I所示结构:



[0010] 本发明还提供了一种从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法,包括以下步骤:

[0011] 将杏花蜂花粉和石油醚混合,进行脱脂处理,得到脱脂杏花蜂花粉;

[0012] 将所述脱脂杏花蜂花粉和醇溶液混合,进行提取,除去所得提取液中的残渣,得到

上清液；

[0013] 将所述上清液进行第一浓缩得到杏花蜂花粉醇提取物；

[0014] 将所述杏花蜂花粉醇提取物和萃取剂混合，进行萃取，所得上层萃取相经第二浓缩后进行冷冻干燥，得到杏花蜂花粉萃取物；

[0015] 所述萃取剂为水和乙酸乙酯的混合溶液；

[0016] 将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后，依次采用第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂进行梯度洗脱，得到组分3和组分4；

[0017] 所述硅胶柱为日本YMC公司型号SLG12S50、粒径50 μ m硅胶柱；

[0018] 所述硅胶柱中硅胶的体积为杏花蜂花粉萃取物上样体积的60倍；

[0019] 所述第一洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为95:5的混合液；

[0020] 所述第二洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为90:10的混合液；

[0021] 所述第三洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液；

[0022] 将所述组分3和组分4分别利用制备型液相色谱仪进行纯化，得到酚胺化合物；所述酚胺化合物为N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺；

[0023] 所述制备型液相色谱仪的参数包括：

[0024] 色谱仪：伊利特制备色谱仪；

[0025] 色谱柱：伊利特SinoChrom ODS-BP, 300*20mm, 10 μ m；

[0026] 流动相：流动相A为体积浓度为0.1%的乙酸水溶液，流动相B为甲醇；

[0027] 洗脱程序：0~30min, 60%B；

[0028] 进样量：1mL；

[0029] 流速：8mL/min。

[0030] 优选地，所述脱脂处理的条件包括：脱脂处理的次数为2次，每次脱脂处理的料液比为1:2g/mL，每次脱脂处理的时间为20~40min；脱脂处理的温度为25~40℃。

[0031] 优选地，所述醇溶液为醇的水溶液；所述醇溶液的体积浓度为70~90%；所述醇溶液中的醇为甲醇或乙醇。

[0032] 优选地，所述提取的条件包括：提取的次数为2次，每次提取的料液比独立地为1g：(10~40)mL，每次提取的时间为20~40min；提取的温度为25~40℃。

[0033] 优选地，所述萃取剂中水和乙酸乙酯体积比为1:1~1:3。

[0034] 优选地，所述第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂的用量为硅胶柱的柱体积的2倍。

[0035] 优选地，所述梯度洗脱后，还包括：将所得洗脱液进行TLC检验，相同条带的洗脱液合并到一起，最终得到4个组分，分别为组分1、组分2、组分3和组分4；利用高效液相色谱法对4个组分进行检测，确定组分3和组分4含有N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺。

[0036] 优选地，所述高效液相色谱法的参数包括：

[0037] 色谱仪：美国Thermo-Fisher公司UltiMate 3000液相色谱仪；

[0038] 色谱柱：Hypersil DOLD, 250*4.6mm, 5 μ m；

[0039] 流动相：流动相A为体积浓度为0.13%的甲酸水溶液，流动相B为甲醇；

[0040] 洗脱程序：0min, 50%B；20min, 63%B；

[0041] 进样量:10 μ L;

[0042] 流速:0.5mL/min。

[0043] 优选地,组分3和组分4利用制备型液相色谱仪进行纯化之前,还包括:将组分3和组分4分别用色谱甲醇配制成2mg/mL的样品溶液。

[0044] 本发明提供了一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用,所述酚胺化合物为N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺。本发明从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物,所得酚胺化合物的产量高、纯度高。

[0045] 本发明还提供了一种从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法,包括以下步骤:将杏花蜂花粉和石油醚混合,进行脱脂处理,得到脱脂杏花蜂花粉;将所述脱脂杏花蜂花粉和醇溶液混合,进行提取,除去所得提取液中的残渣,得到上清液;将所述上清液进行第一浓缩得到杏花蜂花粉醇提取物;将所述杏花蜂花粉醇提取物和萃取剂混合,进行萃取,所得上层萃取相经第二浓缩后进行冷冻干燥,得到杏花蜂花粉萃取物;将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,依次采用第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂进行梯度洗脱,得到组分3和组分4;所述硅胶柱为日本YMC公司型号SLG12S50、粒径50 μ m硅胶柱;所述硅胶柱中硅胶的体积为杏花蜂花粉萃取物上样体积的60倍;所述第一洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为95:5的混合液;所述第二洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为90:10的混合液;所述第三洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液;将所述组分3和组分4分别利用制备型液相色谱仪进行纯化,得到酚胺化合物;所述酚胺化合物为N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺;所述制备型液相色谱仪的参数包括:色谱仪:伊利特制备色谱仪;色谱柱:伊利特SinoChrom ODS-BP, 300*20mm, 10 μ m;流动相:流动相A为体积浓度为0.1%的乙酸水溶液,流动相B为甲醇;洗脱程序:0~30min, 60%B;进样量:1mL;流速:8mL/min。

[0046] 本发明提供的方法,通过石油醚将杏花蜂花粉中的脂类物质除去;然后采用醇溶液对脱脂杏花蜂花粉进行提取,将杏花蜂花粉中的酚胺化合物释放到醇溶液中;采用萃取剂对杏花蜂花粉醇提取物进行萃取,除去溶于水的杂质;然后采用硅胶柱对杏花蜂花粉萃取物进行初步纯化分离;再采用制备型液相色谱仪进行进一步纯化,保证得到了酚胺化合物;同时,所得酚胺化合物的产量高、纯度高、杂质少;另外,所得酚胺化合物具有极强的酪氨酸酶抑制效果和抗氧化效果。

[0047] 进一步地,本发明通过合理控制提取的条件,使酚胺化合物被大量提取出来,最终使所得酚胺化合物的收率高。

[0048] 进一步地,本发明的提取方法中所有提取步骤均在较低温度下进行,对酚胺化合物的破坏小,保留率高。

附图说明

[0049] 图1为本发明提供的从杏花蜂花粉中提取N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺的方法流程图;

[0050] 图2为实施例1所得杏花蜂花粉萃取物(a)、组分1(b)、组分2(c)、组分3(d)、组分4(e)和最终所得酚胺化合物(f)的色谱图;

[0051] 图3为实施例1所得酚胺化合物的一级(a)和二级(b)质谱图。

具体实施方式

[0052] 本发明提供了一种杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用,所述酚胺化合物为 $N^1-(E)-N^5-(E)-N^{10}-(E)-三-对-香豆酰亚精胺$ 。

[0053] 本发明从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物,所得酚胺化合物的产量高、纯度高、杂质少。

[0054] 本发明还提供了一种从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法,包括以下步骤:

[0055] 将杏花蜂花粉和石油醚混合,进行脱脂处理,得到脱脂杏花蜂花粉;

[0056] 将所述脱脂杏花蜂花粉和醇溶液混合,进行提取,除去所得提取液中的残渣,得到上清液;

[0057] 将所述上清液进行第一浓缩得到杏花蜂花粉醇提取物;

[0058] 将所述杏花蜂花粉醇提取物和萃取剂混合,进行萃取,所得上层萃取相经第二浓缩后进行冷冻干燥,得到杏花蜂花粉萃取物;

[0059] 将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,依次采用第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂进行梯度洗脱,得到组分3和组分4;

[0060] 将所述组分3和组分4分别利用制备型液相色谱仪进行纯化,得到酚胺化合物;所述酚胺化合物为 $N^1-(E)-N^5-(E)-N^{10}-(E)-三-对-香豆酰亚精胺$ 。

[0061] 在本发明中,如无特殊说明,本发明所用原料均优选为市售产品。

[0062] 本发明将杏花蜂花粉和石油醚混合,进行脱脂处理,得到脱脂杏花蜂花粉。

[0063] 在本发明中,所述杏花蜂花粉在和石油醚混合之前,优选进行机械破碎;所述机械破碎优选在粉碎机中进行;本发明对所述机械破碎的参数不做具体限定,只要能够使杏花蜂花粉的粒径为80目即可。

[0064] 在本发明中,所述脱脂处理的条件优选包括:脱脂处理的次数优选为2次,每次脱脂处理的料液比优选为1:2g/mL,每次脱脂处理的时间优选为20~40min;脱脂处理的温度优选为25~40℃。在本发明中,所述脱脂处理优选在超声的条件下进行,所述超声的功率优选为500~600W。

[0065] 本发明中,脱脂处理能够将杏花蜂花粉中的脂类除去。

[0066] 得到脱脂杏花蜂花粉后,本发明将所述脱脂杏花蜂花粉和醇溶液混合,进行提取,除去所得提取液中的残渣,得到上清液。

[0067] 在本发明中,所述醇溶液优选为醇的水溶液;所述醇溶液的体积浓度优选为70~90%,进一步优选为80%;所述醇溶液中的醇优选为甲醇或乙醇,进一步优选为乙醇。在本发明的具体实施例中,所述醇溶液具体优选为体积浓度为80%的乙醇水溶液。

[0068] 在本发明中,所述提取的条件优选包括:提取的次数优选为2次,每次提取的料液比独立地优选为1g:(10~40)mL,进一步优选为1g:30mL;每次提取的时间优选为20~40min,进一步优选为30min;提取的温度优选为25~40℃。在本发明中,所述提取优选在超声的条件下进行,所述超声的功率优选为500~600W。

[0069] 本发明中,提取能够将脱脂杏花蜂花粉中的酚胺化合物较大程度提取出来,以保证酚胺化合物的收率高。

[0070] 在本发明中,所述除去所得提取液中的残渣的方式优选为抽滤,本发明对所述抽滤的参数不做具体限定,采用本领域技术人员熟知的抽滤方式即可。

[0071] 得到上清液后,本发明将所述上清液进行第一浓缩得到杏花蜂花粉醇提取物。

[0072] 在本发明中,所述第一浓缩优选在旋转蒸发仪上进行,所述第一浓缩的温度优选为30~40℃。本发明对所述第一浓缩的时间不做具体限定,只要能够将上清液中的提取剂充分除去即可。

[0073] 得到杏花蜂花粉醇提取物后,本发明将所述杏花蜂花粉醇提取物和萃取剂混合,进行萃取,所得上层萃取相经第二浓缩后进行冷冻干燥,得到杏花蜂花粉萃取物。

[0074] 在本发明中,所述萃取剂为水和乙酸乙酯的混合溶液;所述萃取剂中水和乙酸乙酯的体积比优选为1:1~1:3,具体优选为1:1。在本发明中,所述萃取剂与杏花蜂花粉醇提取物的体积比优选为6:1。

[0075] 在本发明中,所述萃取优选包括以下步骤:将所述杏花蜂花粉醇提取物与萃取剂中的水混合,然后与乙酸乙酯混合进行萃取。

[0076] 在本发明中,所述第二浓缩优选在旋转蒸发仪上进行,所述第二浓缩的温度优选为30~40℃。本发明对所述第二浓缩的时间不做具体限定,只要能够将上层萃取相中的乙酸乙酯充分去除即可。

[0077] 在本发明中,所述冷冻干燥优选包括:先在-50~-60℃常压预冻2h,60~70Pa、-50~-60℃的条件下真空冷冻干燥48h。

[0078] 本发明中,萃取能够将溶于水的杂质,比如低聚糖和多肽等极性相对较大的物质充分去除,以保证最终酚胺化合物的高纯度。

[0079] 得到杏花蜂花粉萃取物后,本发明将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,依次采用第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂进行梯度洗脱,得到组分3和组分4。

[0080] 在本发明中,所述硅胶柱为日本YMC公司型号SLG12S50、粒径50μm硅胶柱;所述硅胶柱中硅胶的体积为杏花蜂花粉萃取物上样体积的60倍。

[0081] 在本发明中,所述第一洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为95:5的混合液;所述第二洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为90:10的混合液;所述第三洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液。在本发明中,所述第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂的用量为硅胶柱的柱体积的2倍。

[0082] 所述梯度洗脱后,本发明优选还包括:将所得洗脱液进行TLC检验,相同条带的洗脱液合并到一起,最终得到4个组分,分别为组分1、组分2、组分3和组分4;利用高效液相色谱法对4个组分进行检测,确定组分3和组分4含有N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺。

[0083] 本发明对所述TLC检验的参数不做具体限定,采用本领域技术人员熟知的TLC检验操作及参数即可。

[0084] 在本发明中,所述高效液相色谱法的参数优选包括:色谱仪:美国Thermo-Fisher公司UltiMate 3000液相色谱仪;色谱柱:Hypersil DOLD,250*4.6mm,5μm;流动相:流动相A为体积浓度为0.13%的甲酸水溶液,流动相B为甲醇;洗脱程序:0min,50%B;20min,63%B;进样量:10μL;流速:0.5mL/min。

[0085] 本发明中,硅胶柱的主要作用是根据不同物质在硅胶上的吸附力不同而得到分离,将不同极性的物质按照极性的大小顺序分别洗脱下来,以实现纯化目标物质的目的。

[0086] 得到组分3和组分4后,本发明将所述组分3和组分4分别利用制备型液相色谱仪进

行纯化,得到酚胺化合物;所述酚胺化合物为 $N^1-(E)-N^5-(E)-N^{10}-(E)-三-对-香豆酰亚精胺$ 。

[0087] 在本发明中,组分3和组分4利用制备型液相色谱仪进行纯化之前,优选还包括:将组分3和组分4分别用色谱甲醇配制成2mg/mL的样品溶液。

[0088] 在本发明中,所述制备型液相色谱仪的参数包括:

[0089] 色谱仪:伊利特制备色谱仪;

[0090] 色谱柱:伊利特SinoChrom ODS-BP,300*20mm,10 μ m;

[0091] 流动相:流动相A为体积浓度为0.1%的乙酸水溶液,流动相B为甲醇;

[0092] 洗脱程序:0~30min,60%B;

[0093] 进样量:1mL;

[0094] 流速:8mL/min。

[0095] 所述纯化后,本发明优选还包括将所得纯化物进行冷冻干燥。在本发明中,所述冷冻干燥优选包括:先在-50~-60 $^{\circ}$ C常压预冻2h,然后在60~70Pa、-50~-60 $^{\circ}$ C真空冷冻干燥48h。

[0096] 本发明中,所述组分3和组分4经制备型液相色谱仪纯化,能够提高酚胺化合物的纯度,减少杂质的含量。

[0097] 图1为本发明提供的从杏花蜂花粉中提取 $N^1-(E)-N^5-(E)-N^{10}-(E)-三-对-香豆酰亚精胺$ 的方法流程图;具体为:杏花蜂花粉经石油醚脱脂、醇溶液提取,得到杏花蜂花粉醇提取物;所述杏花蜂花粉醇提取物经水-乙酸乙酯萃取,得到杏花蜂花粉萃取物;所述杏花蜂花粉萃取物经过硅胶柱和洗脱,得到组分1、组分2、组分3和组分4;分别对所述组分3和组分4利用制备型液相色谱仪纯化,得到酚胺化合物 $N^1-(E)-N^5-(E)-N^{10}-(E)-三-对-香豆酰亚精胺$ 。

[0098] 下面结合实施例对本发明提供的杏花蜂花粉在提取酚胺化合物中的应用、从杏花蜂花粉中提取酚胺化合物的方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0099] 实施例1

[0100] 称取100g杏花蜂花粉原料于粉碎机中进行机械粉碎后,将得到的80目的机械粉碎后杏花蜂花粉用石油醚超声(超声的功率为600W)脱脂处理;所述脱脂处理的条件包括:脱脂处理的次数为2次,每次脱脂处理的料液比为1:2g/mL,每次脱脂处理的时间为30min,脱脂处理的温度为30 $^{\circ}$ C,得到脱脂杏花蜂花粉。

[0101] 将脱脂杏花蜂花粉用体积浓度为80%的乙醇水溶液在超声(超声的功率为600W)的条件下进行提取;提取条件包括:提取的次数为2次,每次提取的料液比1:30g/mL,每次提取的时间为30min;提取的温度为30 $^{\circ}$ C;将所得提取液进行抽滤除去残渣,得到上清液;用旋转蒸发器对上清液进行第一浓缩,得到杏花蜂花粉醇提取物;将150mL杏花蜂花粉醇提取物悬浮于375mL蒸馏水后与525mL乙酸乙酯混合进行萃取,将上层萃取相经第二浓缩后,先于-58 $^{\circ}$ C常压预冻2h,然后于66Pa、-58 $^{\circ}$ C真空冷冻干燥48h,得到杏花蜂花粉萃取物。

[0102] 将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,依次采用第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂进行梯度洗脱,得到组分3和组分4。

[0103] 硅胶柱为日本YMC公司型号SLG12S50、粒径50 μ m硅胶柱;硅胶柱中硅胶的体积为杏

花蜂花粉萃取物上样体积的60倍；第一洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为95:5的混合液；第二洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为90:10的混合液；第三洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液；所述第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂的用量均为硅胶柱的柱体积的2倍。

[0104] 得到洗脱液后，将洗脱液通过TLC检测合并，具有相同条带的洗脱液合并到一起，最终合并得到4个组分，分别命名为组分1、组分2、组分3、组分4。将组分1、组分2、组分3和组分4分别通过高效液相色谱分析，结果发现：组分3和组分4里含有目标化合物，因此对组分3和组分4进行进一步纯化。

[0105] 组分3和组分4分别用制备型液相色谱仪进行纯化：将组分3和组分4样品溶于色谱甲醇，配置成2mg/mL的样品溶液，用0.45 μ m的滤膜过滤，色谱条件：采用伊利特制备色谱仪，以伊利特SinoChrom ODS-BP (300*20mm, 10 μ m)为色谱柱，流动相：体积浓度为0.1%的乙酸水溶液为流动相A，甲醇为流动相B，洗脱条件为0~30min, 60%B；进样量为1mL，流速8mL/min。收集目标色谱峰，然后先于-58 $^{\circ}$ C常压预冻2h，然后于66Pa、-58 $^{\circ}$ C真空冷冻干燥48h，得到酚胺化合物62.5mg。

[0106] 采用高效液相色谱法对所得杏花蜂花粉萃取物(a)、组分1(b)、组分2(c)、组分3(d)、组分4(e)和最终所得酚胺化合物(f)进行分析，所得色谱图如图2所示。从图2可以看出：硅胶柱层析对杏花蜂花粉萃取物中的酚胺化合物有很好的分离和富集效果，杏花蜂花粉萃取物(a)经硅胶柱层析后得到组分1(b)、组分2(c)、组分3(d)和组分4(e)，其中酚胺化合物主要富集在组分3(d)和组分4(e)中，故采用制备型液相色谱仪进一步纯化得到酚胺化合物(f)，得到的酚胺化合物纯度高、杂质少。

[0107] 对所得酚胺化合物进行结构鉴定，图3为酚胺化合物的一级(a)和二级(b)质谱图；表1为实施例1所得酚胺化合物的核磁结果。

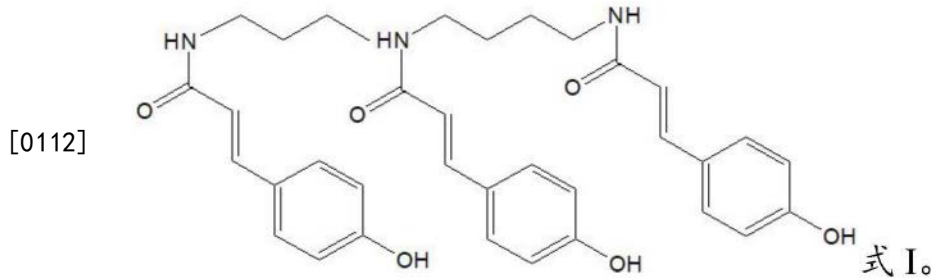
[0108] 表1实施例1所得酚胺化合物的核磁结果

[0109]

2	2H, 3.33 (m)	36.5/36.8
3	2H, 1.85/1.92 (quin)	27.5/29.2
4	2H, 3.52 (m)	44.3/45.6
6	2H, 3.52 (m)	47.2/48.0
7	2H, 1.68 (m)	25.0/26.5
8	2H, 1.60 (m)	26.5/26.6
9	2H, 3.33 (m)	38.5/38.8
1'	-	126.3
2'	7.35/7.36, (d, 6.0)	129.2
3'	6.77/6.79, overlapped	115.4
4'	-	159.1/159.3
5'	6.77/6.79, overlapped	115.4
6'	7.35/7.36, (d, 6.0)	129.2

	7'	7.43/7.44, overlapped	140.4/140.5/140.6/140.8
	8'	6.36/6.40, (d, 24.0)	116.8/116.9
	9'	-	168.1
	1"	-	126.5
	2"	7.43, overlapped/7.48, (d, 30.0)	129.6
	3"	6.71/6.76, (d, 30.0) overlapped	115.4
	4"	-	159.1/159.3
	5"	6.71/6.76, (d, 30.0) overlapped	115.4
	6"	7.43, overlapped/7.48, (d, 30.0)	129.6
	7"	7.50/7.53, (d, 18.0)	143.1
[0110]	8"	6.82/6.86, (d, 24.0)	113.5
	9"	-	167.9/168.0
	1'''	-	126.3
	2'''	7.39/7.40, (d, 6.0)	129.2
	3'''	6.80, overlapped	115.4
	4'''	-	159.1/159.3
	5'''	6.80, overlapped	115.4
	6'''	7.39/7.40, (d, 6.0)	129.2
	7'''	7.47/7.48, (d, 6.0)	140.4/140.5/140.6/140.8
	8'''	6.42, (d, 18.0)	117.1
	9'''	-	168.1

[0111] 结合表1的核磁信息和图3的质谱信息,可以得到:本实施例提取得到的酰胺化合物具有式I所示结构,为 N^1 -(E)- N^5 -(E)- N^{10} -(E)-三-对-香豆酰亚精胺,584.2756m/z [M+H]⁺,分子式为 $C_{34}H_{37}N_3O_6$,纯度为99.70%,纯度高。



[0113] 所得酚胺化合物的产量根据公式1计算得到：

[0114]
$$\text{产量} = \frac{\text{最终得到的酚胺化合物质量}/\mu\text{g}}{\text{初始杏花蜂花粉质量}/\text{g}} \quad \text{公式 1。}$$

[0115] 在本实施例中，100g杏花蜂花粉经过提取得到62.5mg酚胺化合物，所以产量为625 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，表示每克原料能提取得到625微克酚胺化合物。

[0116] 所得酚胺化合物的抑制酪氨酸酶效果测试

[0117] 方法：将提取得到的酚胺化合物配制成浓度为1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的样品溶液；在50 μL 各浓度样品溶液中分别加入50 μL 浓度为27.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酪氨酸酶溶液，在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2min后，加入150 μL 浓度为0.5 mmol/L 的L-多巴溶液，在475nm处测定吸光度，每10s测一次，共测5min。

[0118] 用50 μL PBS缓冲液代替样品溶液，其他步骤相同，作为空白对照。

[0119] 将酚胺化合物替换为曲酸作为阳性对照。

[0120] 酪氨酸酶的抑制率按照公式2进行计算：

[0121]
$$\text{酶抑制率}(\%) = [1 - (\text{样品组斜率}/\text{空白组斜率})] \times 100\% \quad \text{公式 2。}$$

[0122] 根据不同浓度样品溶液对酪氨酸酶的抑制率进行曲线拟合，并计算抑制率为50%时对应的样品浓度，得到样品的半抑制浓度 (IC_{50})， IC_{50} 值越低说明抑制酪氨酸酶的效果越好。

[0123] 实施例1所得酚胺化合物和曲酸的 IC_{50} 结果如表2所示

[0124] 表2实施例1所得酚胺化合物和曲酸的 IC_{50} 值

	名称	IC_{50} ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
[0125]	N^1 -(E)- N^5 -(E)- N^{10} -(E)-三-对-香豆酰亚精胺	8.57 \pm 0.79
	曲酸 (阳性对照)	19.89 \pm 1.82

[0126] 从表2可以看出：实施例1所得 N^1 -(E)- N^5 -(E)- N^{10} -(E)-三-对-香豆酰亚精胺的 IC_{50} 值为8.57 \pm 0.79 μM ，曲酸的 IC_{50} 值为19.89 \pm 1.82 μM ， IC_{50} 值越小效果越好， N^1 -(E)- N^5 -(E)- N^{10} -(E)-三-对-香豆酰亚精胺抑制酪氨酸酶效果强于阳性对照曲酸，说明本发明提取的 N^1 -(E)- N^5 -(E)- N^{10} -(E)-三-对-香豆酰亚精胺具有极强的酪氨酸酶抑制效果。

[0127] 所得酚胺化合物的抗氧化效果测试

[0128] 方法：用75 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液依次配制一系列浓度的水溶性维生素E (Trolox) 标准溶液 (6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。分别加入不同浓度Trolox标准溶液或者样品溶液25 μL 及8.16 $\times 10^{-8}$ mol/L 荧光素钠 (FL) 溶液150 μL ，在37 $^{\circ}\text{C}$ 下预温10min后，加入153 mmol/L 偶氮类化合物 (AAPH) 50 μL ，在37 $^{\circ}\text{C}$ 下以激发波长485nm，发射波长528nm进行

连续测定,每1min测定1次各孔荧光强度,测定2h。以相对荧光强度采用近似积分法计算荧光衰退曲线下面积(AUC)。以Trolox浓度为横坐标,净面积netAUC (netAUC=AUC样品-AUC空白)为纵坐标,绘制氧自由基吸收能力(ORAC)标准曲线。将样品用75mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制成5 μ g/mL,进行上述实验并计算样品的Trolox当量。

[0129] 实施例1所得酚胺化合物和Trolox的ORAC结果如表3所示

[0130] 表3实施例1所得酚胺化合物和Trolox的ORAC值

	名称	ORAC (μ mol Trolox/mg)
[0131]	N ¹ -(E)-N ⁵ -(E)-N ¹⁰ -(E)-三-对-香豆酰亚精胺	28.96 \pm 1.40
	Trolox (阳性对照)	3.995

[0132] 从表3可以看出:实施例1所得N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺的ORAC值大于Trolox,ORAC值越大则抗氧化效果越好,说明本发明提取的N¹-(E)-N⁵-(E)-N¹⁰-(E)-三-对-香豆酰亚精胺具有极强的抗氧化效果。

[0133] 对比例1

[0134] 与实施例1类似,区别仅在于,将杏花蜂花粉替换为玫瑰蜂花粉、茶花蜂花粉、玉米蜂花粉、荷花蜂花粉和荞麦蜂花粉,其他条件与实施例1相同。

[0135] 不同蜂花粉所得酚胺化合物的纯度和产量如表4所示。

[0136] 表4不同蜂花粉得到的酚胺化合物的纯度和产量结果

	名称	纯度	产量(μ g/g)
[0137]	杏花蜂花粉	99.70	625
	玫瑰蜂花粉	92.84	298
	茶花蜂花粉	88.16	166
[0138]	玉米蜂花粉	87.21	140
	荷花蜂花粉	-	-
	荞麦蜂花粉	-	-

[0139] 注:“-”表示该蜂花粉中酚胺化合物含量太低、提取不到。

[0140] 从表4可以看出:相比玫瑰蜂花粉、茶花蜂花粉、玉米蜂花粉、荷花蜂花粉和荞麦蜂花粉,本发明从杏花蜂花粉中得到的酚胺化合物的纯度高、产量高。

[0141] 对比例2

[0142] 称取100g杏花蜂花粉原料于粉碎机中进行机械粉碎后,将得到的80目的机械粉碎后杏花蜂花粉用石油醚超声(超声的功率为100W)脱脂处理;所述脱脂处理的条件包括:脱脂处理的次数为2次,每次脱脂处理的料液比为1:1g/mL,每次脱脂处理的时间为10min,脱脂处理的温度为50 $^{\circ}$ C,得到脱脂杏花蜂花粉。

[0143] 将脱脂杏花蜂花粉用体积浓度为50%的乙醇水溶液在超声(超声的功率为100W)

的条件下进行提取;提取条件包括:提取的次数为2次,每次提取的料液比1:5g/mL,每次提取的时间为10min;提取的温度为50℃;将所得提取液进行抽滤除去残渣,得到上清液;用旋转蒸发仪对上清液进行第一浓缩,得到杏花蜂花粉醇提取物;将60mL杏花蜂花粉醇提取物悬浮于140mL蒸馏水后与190mL乙酸乙酯混合进行萃取,将上层萃取相经第二浓缩后,并于-58℃常压预冻2h,然后于66Pa、-58℃真空冷冻干燥48h,得到杏花蜂花粉萃取物。

[0144] 将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,依次采用第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂进行梯度洗脱,得到组分3和组分4。

[0145] 硅胶柱为日本YMC公司型号SLG12S50、粒径50μm硅胶柱;硅胶柱中硅胶的体积为杏花蜂花粉萃取物上样体积的60倍;第一洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为95:5的混合液;第二洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为90:10的混合液;第三洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液;所述第一洗脱剂、第二洗脱剂和第三洗脱剂的用量均为硅胶柱的柱体积的2倍。

[0146] 得到洗脱液后,将洗脱液通过TLC检测合并,具有相同条带的洗脱液合并到一起,最终合并得到4个组分,分别命名为组分1、组分2、组分3、组分4。将组分1、组分2、组分3和组分4分别通过高效液相色谱分析,结果发现:组分3和组分4里含有目标化合物,因此对组分3和组分4进行进一步纯化。

[0147] 组分3和组分4分别用制备型液相色谱仪进行纯化:将组分3和组分4样品溶于色谱甲醇,配置成2mg/mL的样品溶液,用0.45μm的滤膜过滤,色谱条件:采用伊利特制备色谱仪,以伊利特SinoChrom ODS-BP (300*20mm,10μm)为色谱柱,流动相:体积浓度为0.1%的乙酸水溶液为流动相A,甲醇为流动相B,洗脱条件为0~30min,60%B;进样量为1mL,流速8mL/min。收集目标色谱峰,于-58℃常压预冻2h,然后于66Pa、-58℃真空冷冻干燥48h,得到酚胺化合物。纯度为95.2%,产量329μg/g。

[0148] 对比例3

[0149] 称取100g杏花蜂花粉原料于粉碎机中进行机械粉碎后,将得到的80目的机械粉碎后杏花蜂花粉用石油醚超声(超声的功率为500W)脱脂处理;所述脱脂处理的条件包括:脱脂处理的次数为2次,每次脱脂处理的料液比为1:2g/mL,每次脱脂处理的时间为20min,脱脂处理的温度为40℃,得到脱脂杏花蜂花粉。

[0150] 将脱脂杏花蜂花粉用体积浓度为80%的乙醇水溶液在超声(超声的功率为500W)的条件下进行提取;提取条件包括:提取的次数为2次,每次提取的料液比1:30g/mL,每次提取的时间为20min;提取的温度为40℃;将所得提取液进行抽滤除去残渣,得到上清液;用旋转蒸发仪对上清液进行第一浓缩,得到杏花蜂花粉醇提取物;将150mL杏花蜂花粉醇提取物悬浮于375mL蒸馏水后与525mL乙酸乙酯混合进行萃取,将上层萃取相经第二浓缩后,并于-58℃常压预冻2h,然后于66Pa、-58℃真空冷冻干燥48h,得到杏花蜂花粉萃取物。

[0151] 将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,用洗脱剂进行等度洗脱,得到3个组分。

[0152] 硅胶柱为日本YMC公司型号SL12SA150、粒径150μm硅胶柱;硅胶柱中硅胶的体积为杏花蜂花粉萃取物上样体积的20倍;洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液。

[0153] 得到洗脱液后,将洗脱液通过TLC检测合并,具有相同条带的洗脱液合并到一起,最终合并得到3个组分,分别命名为组分1、组分2、组分3。将组分1、组分2和组分3分别通过高效液相色谱分析,结果发现:组分2和组分3里含有目标化合物,因此对组分2和组分3进行进一步纯化。

[0154] 组分2和组分3分别用制备型液相色谱仪进行纯化:将组分2和组分3样品溶于色谱甲醇,配置成2mg/mL的样品溶液,用0.45 μ m的滤膜过滤,色谱条件:采用伊利特制备色谱仪,以伊利特SinoChrom ODS-BP (300*20mm,10 μ m)为色谱柱,流动相:体积浓度为0.1%的乙酸水溶液为流动相A,甲醇为流动相B,洗脱条件为0~30min,60%B;进样量为1mL,流速8mL/min。收集目标色谱峰,于-58 $^{\circ}$ C常压预冻2h,然后于66Pa、-58 $^{\circ}$ C真空冷冻干燥48h,得到酰胺化合物。纯度为95.6%,产量345 μ g/g。

[0155] 对比例4

[0156] 称取100g杏花蜂花粉原料于粉碎机中进行机械粉碎后,将得到的80目的机械粉碎后杏花蜂花粉用石油醚超声(超声的功率为600W)脱脂处理;所述脱脂处理的条件包括:脱脂处理的次数为2次,每次脱脂处理的料液比为1:2g/mL,每次脱脂处理的时间为20min,脱脂处理的温度为30 $^{\circ}$ C,得到脱脂杏花蜂花粉。

[0157] 将脱脂杏花蜂花粉用体积浓度为80%的乙醇水溶液在超声(超声的功率为600W)的条件下进行提取;提取条件包括:提取的次数为2次,每次提取的料液比1:30g/mL,每次提取的时间为20min;提取的温度为50 $^{\circ}$ C;将所得提取液进行抽滤除去残渣,得到上清液;用旋转蒸发器对上清液进行第一浓缩,得到杏花蜂花粉醇提取物;将150mL杏花蜂花粉醇提取物悬浮于230mL蒸馏水后与330mL乙酸乙酯混合进行萃取,将上层萃取相经第二浓缩后,并于-58 $^{\circ}$ C常压预冻2h,然后于66Pa、-58 $^{\circ}$ C真空冷冻干燥48h,得到杏花蜂花粉萃取物。

[0158] 将所述杏花蜂花粉萃取物过硅胶柱后,用洗脱剂进行等度洗脱,得到3个组分;

[0159] 硅胶柱为日本YMC公司型号SLG12S50、粒径50 μ m硅胶柱;硅胶柱中硅胶的体积为杏花蜂花粉萃取物上样体积的50倍;洗脱剂为氯仿和甲醇体积比为85:15的混合液。

[0160] 得到洗脱液后,将洗脱液通过TLC检测合并,具有相同条带的洗脱液合并到一起,最终合并得到3个组分,分别命名为组分1、组分2、组分3。将组分1、组分2和组分3分别通过高效液相色谱分析,结果发现:组分2和组分3里含有目标化合物,因此对组分2和组分3进行进一步纯化。

[0161] 组分2和组分3分别用制备型液相色谱仪进行纯化:将组分2和组分3样品溶于色谱甲醇,配置成2mg/mL的样品溶液,用0.45 μ m的滤膜过滤,色谱条件:采用伊利特制备色谱仪,以伊利特SinoChrom ODS-BP (250*10mm,5 μ m)为色谱柱,流动相:体积浓度为0.13%的甲酸水溶液为流动相A,乙腈为流动相B,洗脱条件为0~30min,55%B;进样量为1mL,流速3mL/min。收集目标色谱峰,于-58 $^{\circ}$ C常压预冻2h,然后于66Pa、-58 $^{\circ}$ C真空冷冻干燥48h,得到酰胺化合物。纯度为82.3%,产量259 μ g/g。

[0162] 对比实施例1和对比例2~4可以看出:对比例2~4所述提取方法得到酰胺化合物的纯度和产量均低于实施例1,说明本发明的提取方法最佳。

[0163] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

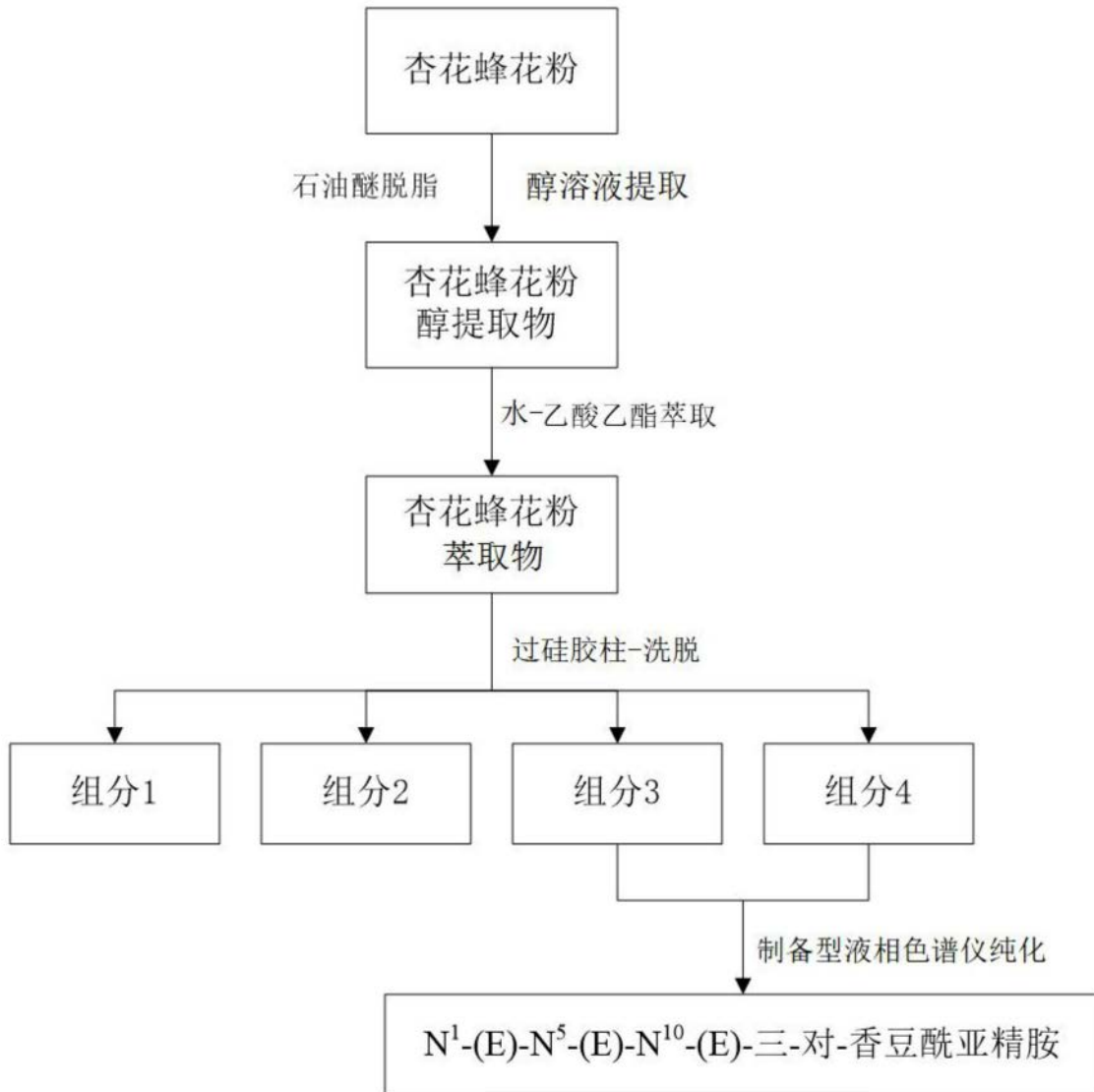


图1

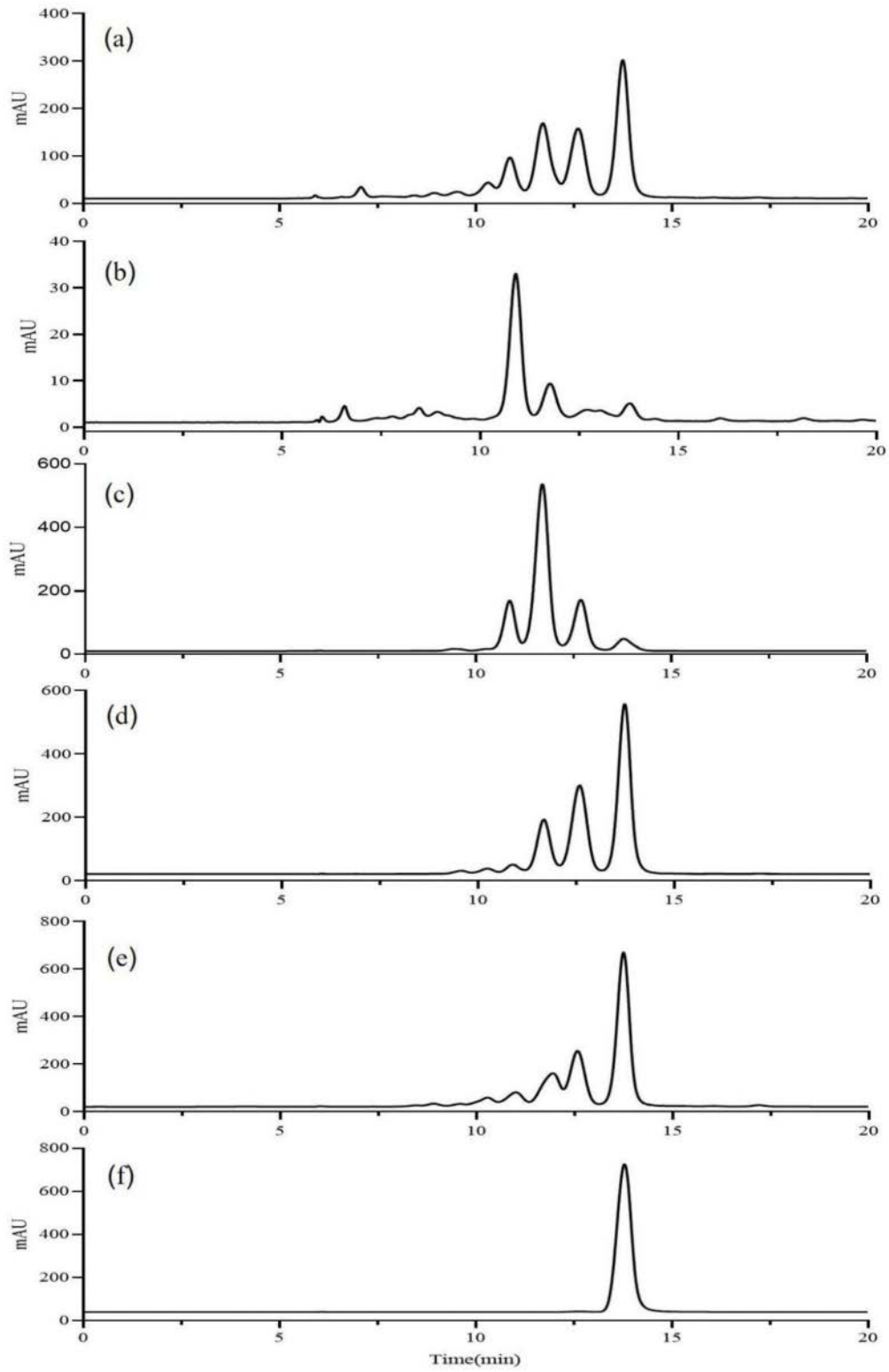


图2

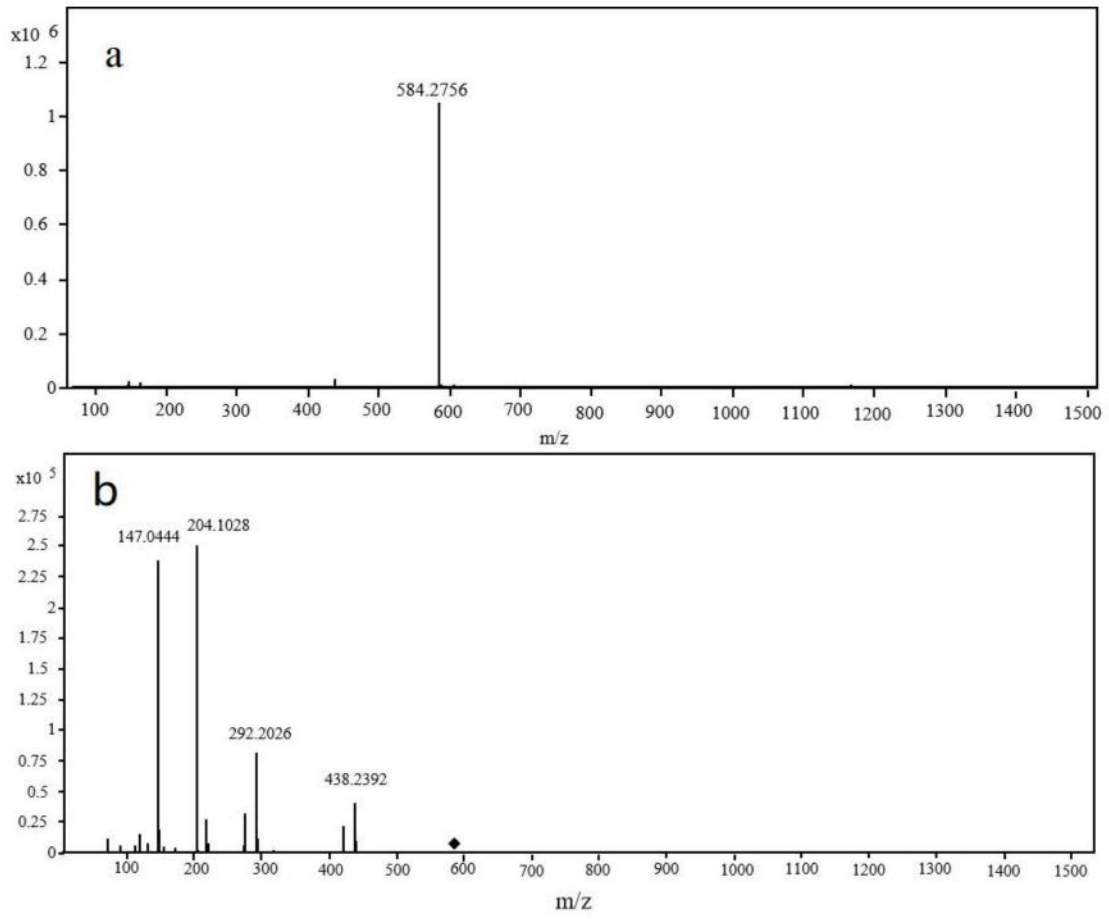


图3