



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103432183 B

(45) 授权公告日 2015.06.10

(21) 申请号 201310416653.3

(22) 申请日 2013.09.13

(73) 专利权人 沈阳药科大学

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路
103号

专利权人 赤峰民益天然花青素有限责任公
司

(72) 发明人 赵余庆 张晓书 毕秀丽 夏希纯

(74) 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限
公司 21207

代理人 靳玲

(51) Int. Cl.

A61K 36/28(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101167775 A, 2008.04.30, 说明书第2页

第2段及第10页第⑨部分.

CN 101095711 A, 2008.01.02, 说明书第2页
实施例1.

朱月等. 翠菊花叶多糖对羟自由基的清除
作用.《江苏农业科学》.2012, 第40卷(第3期),
第302-303页.

付艳丽等. 大孔吸附树脂分离杭白菊中总
黄酮的工艺优选.《中国实验方剂学杂志》.2012,
第18卷(第17期), 第53-55页.

审查员 刘军政

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

翠菊中多酚提取物及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及翠菊中多酚类成分的提取工艺及其在治疗糖尿病和抗癌活性中的应用。取翠菊原料加到提取罐中,加入酸性乙醇溶液,提取,每次提取液回收醇,所得浓缩液合并,上大孔吸附树脂,采用10倍量蒸馏水、10%~95%乙醇分别洗脱,10%~55%洗脱液浓缩即得。本发明通过Hpt-100大孔树脂富集翠菊花中的多酚类成分,对所得到的各个流分进行体内外活性筛选,发现其乙酸乙酯层抑制 α -葡萄糖苷酶与PTP1B酶活性最强。同时体外研究发现翠菊多酚类成分总提物及乙酸乙酯萃取得对肿瘤细胞也有明显的抑制作用,有效剂量为10 μ g/mL。本发明通过验证,翠菊原花青素富集物的乙酸乙酯层萃取得物降血糖及抗肿瘤作用均与所选的阳性药相接近甚至更好。

1. 翠菊中多酚提取物的制备方法,其特征在于,取翠菊原料加到提取罐中,加入酸性乙醇溶液进行回流提取,所得浓缩液合并后上大孔吸附树脂,分别用5~15倍蒸馏水和10~95%乙醇进行梯度洗脱,分别减压浓缩得洗脱液,把10%~55%洗脱液真空干燥得多酚提取物;所述的酸性乙醇溶液浓度为10%~95%;所述的大孔树脂选自D-101或AB-8。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述的提取温度为20~100℃,提取时间为0.5~3h,提取2~3次。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,浓缩后的洗脱液在50℃真空干燥。

4. 一种制剂,其特征在于,根据权利要求1所述的制备方法制备的多酚提取物和药学上可接受的载体结合制备临床上可接受的制剂。

5. 权利要求1-3任何一项所述的制备方法制备的多酚提取物或权利要求4所述的制剂在制备抗癌药中的应用。

6. 权利要求1-3任何一项所述的制备方法制备的多酚提取物或权利要求4所述的制剂在制备降糖药中的应用。

翠菊中多酚提取物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,主要涉及翠菊中多酚提取物的提取工艺及其治疗糖尿病与癌症药物中的应用。

背景技术

[0002] 糖尿病是由于胰腺的功能失调导致胰岛素相对或绝对不足,或靶细胞对胰岛素的敏感性降低而引起的一系列全身性代谢紊乱疾病。根据导致疾病的原因和在不同人群中的分布不同,临床常将糖尿病分为 I 型糖尿病、II 型糖尿病。全世界有 3.46 亿人患有糖尿病。如果不采取有效措施,随着病程的进展,糖尿病会出现多种并发症,可能损害心脏、血管、眼睛、肾脏和神经。糖尿病及其并发症给个人、家庭、国家带来巨大的负担。世卫组织估计,在 2006-2015 年期间,仅因糖尿病及其并发症,中国就将损失 5580 亿美元。

[0003] II 型糖尿病,也称非胰岛素依赖型糖尿病,其胰岛素分泌正常或者增高,但肝脏、脂肪组织和骨骼肌对胰岛素敏感性降低,即胰岛素抵抗,患者多为成年。II 型糖尿病发病机理主要有:(1)大多数 II 型糖尿病的发病原因是因位于胰岛素靶细胞的细胞膜上受体缺陷导致胰岛素与受体结合敏感性降低,使细胞外葡萄糖不能被人体充分摄取利用导致血糖升高。(2)胰岛素受体底物缺陷。胰岛素受体底物属于细胞质中的适配蛋白,主要连接胰岛素受体等多种效应分子,介导细胞对胰岛素等的反应。(3)胰岛素信号转导缺陷。在胰岛素分泌和传递信号的过程中,胰岛素信号传递是一系列过程,涉及多种信号蛋白。在我国 II 型糖尿病患者占糖尿病患者约 95%。因此开发治疗糖尿病的药物是本领域不断研发的方向。

[0004] 癌症,亦称恶性肿瘤,为由控制细胞生长增殖机制失常而引起的疾病。癌细胞除了生长失控外,还会局部侵入周遭正常组织甚至经由体内循环系统或淋巴系统转移到身体其他部分。癌症是一大类恶性肿瘤的统称。癌细胞的特点是无限制、无止境地增生,使患者体内的营养物质被大量消耗;癌细胞释放出多种毒素,使人体产生一系列症状;癌细胞还可转移到全身各处生长繁殖,导致人体消瘦、无力、贫血、食欲不振、发热以及严重的脏器功能受损等等。与之相对的有良性肿瘤,良性肿瘤则容易清除干净,一般不转移、不复发,对器官、组织只有挤压和阻塞作用,但癌症(恶性肿瘤)还可破坏组织、器官的结构和功能,引起坏死出血合并感染,患者最终由于器官功能衰竭而死亡。到了科学高速发展的今天,我们有理由相信癌症并非不治之症。

[0005] 翠菊为一种治目赤肿痛,昏花不明的中药,其主要活性成分为多酚类化合物,现有技术中还没有提取翠菊中多酚类成分的相关报道。

发明内容

[0006] 本发明所解决的技术问题是,提供了一种高效、无污染的从翠菊中提取多酚类成分的提取工艺。

[0007] 为了实现本发明的上述目的,本发明的工艺步骤为:取翠菊原料加到提取罐中,加入酸性乙醇溶液,提取,每次提取液回收醇,所得浓缩液合并,上大孔吸附树脂,采用 10 倍

量蒸馏水、10~95% 乙醇进行梯度洗脱, 分别减压浓缩洗脱液。

[0008] 所述的酸性乙醇溶液浓度为 10%~95% ;

[0009] 所述的大孔吸附树脂选自 Hpt-100、D-101 或 AB-8 ;

[0010] 提取中温度为 20~100℃, 提取时间为 0.5~3 h, 提取 2-3 次。

[0011] 所述的洗脱液在 50℃ 真空条件下浓缩。

[0012] 本发明的有益效果 :

[0013] 1. 本发明首次选用翠菊作为研究对象, 对其中多酚类成分进行提取、制备。所用原料翠菊已实现大规模种植, 原料易得、来源广泛、价格低廉, 生产成本较低 ;

[0014] 2. 本发明首次对翠菊中多酚类成分的提取工艺进行了优选, 筛选出了最佳提取条件。在该优选工艺条件下, 多酚的提取率可以达到 1.38%, 适合工业放大和生产 ;

[0015] 3. 本发明采用活性追踪法, 对翠菊多酚提取物按不同极性进行分段萃取, 并首次分别对它们进行体内、外降血糖和抗肿瘤活性评价 ;

[0016] 4. 本发明对翠菊提取物各萃取层进行体内、外降糖和抗肿瘤活性评价, 首次发现乙酸乙酯萃取层的体内、外降血糖活性与三种阳性对照药相比, 活性接近或者优于阳性药, 同时该层也显示了较好的抗肿瘤活性。

[0017] 5. 本发明涉及的结果不仅扩展了具有降糖和抗肿瘤活性天然药物的来源, 其显示的活性结果也为进一步开发糖尿病及抗癌药物提供科学参考。

[0018] 具体实施方法 :

[0019] 一、翠菊多酚类成分提取工艺

[0020] 本发明的工艺步骤为 : 取翠菊原料加到提取罐中, 加入 10%~95% 的酸性乙醇溶液, 提取温度为 20~100° ℃, 提取时间为 0.5~3 h, 提取 2-3 次, 每次提取液回收乙醇溶液, 所得浓缩液合并, 上大孔吸附树脂, 采用 10 倍量蒸馏水、10~55% 和 55%~95% 乙醇分别洗脱, 10%~55% 洗脱液在 50° ℃ 真空浓缩得多酚提取物。

[0021] 作为一种优选方案, 工艺参数为 : 乙醇浓度为 50%, 提取温度为 50° , 提取时间为 2.5 h。

[0022] 乙醇浓度、提取温度和提取时间对多酚类的提取效果影响, 可见下表。

[0023]

试验号	提取温度 (°C)	提取时间 (h)	乙醇浓度 (%)	多酚浓度(mg/mL)
1	40	2	10	0.284
2	40	2	95	0.213
3	60	2.5	45	0.306
4	60	3	10	0.294
5	50	2.5	45	0.347
6	50	3	95	0.312
7	50	2.5	50	0.352

[0024] 同时,将提取液合并后,过大孔树脂,本发明采用上述提取的优选条件 7 考察了三种型号的大孔吸附树脂及不同乙醇浓度梯度洗脱对对多酚类成分富集的影响,结果可见下表。

[0025]

大孔树脂型号	洗脱时乙醇浓度 (%)	产率 (%)
Hpt-100	10	1.35
	30	1.36
	55	1.37
D-101	10	1.28
	30	1.30
	55	1.31
AB-8	10	1.31
	30	1.33
	55	1.30

[0026] 结果显示,采用如上三种大孔树脂,在 10-55% 乙醇洗脱浓度下,其多酚类成分的产率均可达 1.25% 以上,同时,对翠菊多酚提取物的大孔树脂富集效果最好的是 45% 乙醇洗脱, Hpt-100 型号的大孔树脂。

[0027] 二、 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

[0028] 本发明对 50°C 提取 2.5h 的提取物过 Hpt-100 大孔树脂 45% 乙醇洗脱流分,进行分层萃取(萃取比例 1:5),得到石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等流分,同时对这几个流分进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选,发现乙酸乙酯层活性与阳性药阿卡波糖活性相近。

[0029] 1、磷酸缓冲液的配制:250 mL (0.2 mol/L) 磷酸二氢钾与 118 mL (0.2 mol/L) NaOH 混合得到 pH 值为 6.8 的磷酸缓冲液,备用。

[0030] 2、 α -葡萄糖苷酶溶液的配制:适量称取,用双重蒸馏水溶解,保证酶溶液的活力单位为 0.02 U/ μ L。配制好后将其在 -4°C 下冷冻、避光保存。本次实验取 30 μ L 后加 270 μ L 缓冲液(稀释 10 倍)。

[0031] 3、底物对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)溶液的配制:称取 30 mg 固体 PNPG,溶于 5 mL 磷酸缓冲液中(6 μ g/ μ L),因底物较难溶解,故用超声波将其振荡 20 min,溶解后用黑色塑料袋将其包裹,严密避光,冷藏保存。

[0032] 4、 Na_2CO_3 终止液的配制:取 21.2 g Na_2CO_3 溶于蒸馏水中,配成 0.2 mol/L 的溶液。

[0033] 操作步骤:

[0034] 第一组(对照组):将 30 μ L 的 α 葡萄糖苷酶溶液加入试管中 \rightarrow 加入 20 μ L 的双重蒸馏水 \rightarrow 37°C 温浴 5 min \rightarrow 加入 150 μ L 的 PNPG \rightarrow 用 800 μ L 磷酸缓冲液补齐,保证最后体积为 1 mL \rightarrow 所有的溶液加齐后,密封,放入水浴锅中 37°C 温浴 30 min \rightarrow 然后将每个瓶中加入 2 mL 的碳酸钠做为终止剂,停止反应。

[0035] 第二组~第三组为加药组,分别加入抑制剂 10 mg/mL、3 mg/mL、1 mg/mL 共 3 个浓度梯度。与对照组不同的是用抑制剂代替双重蒸馏水,其它组份保持一致。最后,测出每个瓶中的 OD 值。所有的反应体系做三个平行。

[0036] 酶活性抑制率 = $[\text{A 空白} - (\text{A 样品} - \text{A 背景})] / \text{A 空白} \times 100\%$

[0037] A 空白:不加样品反应后的吸收值;

[0038] A 样品:加入样品反应后的吸收值;

[0039] A 背景:只加样品的吸收值。

[0040] 结果如下:

[0041]

成分	IC ₅₀ ^a (μg/mL)
混合物	8.14
石油醚层	84.33
二氯甲烷层	54.54
乙酸乙酯层	2.97
正丁醇层	77.89
阿卡波糖 ^a	2.24

^a 阿卡波糖为阳性对照

[0042] 三、PTP1B 酶抑制活性实验

[0043] 1. 储存液的配制:储存液由 250 mM Tris 与 10 mM EDTA 组成,分别称取 0.6055 g Tris 与 0.0584 g EDTA 溶于 10 mL 水中,加浓 HCl 调节 pH 值至 7.5,定溶至 20 mL,4 °C 保存。终浓度 Tris-HCl 为 250 mM,EDTA 为 10 mM。

[0044] 保存条件:4 °C 可长期保存。

[0045] 2. 缓冲液的配制:1 mL 存储液加入 0.0015 g DTT,0.72 μL β-巯基乙醇,定溶至 10 mL 备用。

[0046] 3. 原始包装为 50 μg/50 μL,含 25 mM Tris-HCl (pH 7.5),2 mM β-mercaptoethanol, 1mM EDTA, 1 mM DTT 和 20% Glycerol。

[0047] 保存条件:4 °C 冻存 2-4 周,-20 °C 冻存时间更长,若长时间冻存可添加 0.1% 牛血清白蛋白或人血清白蛋白。避免反复冻融。

[0048] 使用时取 35.4 μL 酶溶液加缓冲液稀释至 8.3 mL,可供 96 孔使用。可根据每次实验新化合物数量、浓度梯度、平行数量按比例配置 PTP1B 酶溶液。

[0049] 4. 底物的配制:0.1856 g pNPP 用缓冲液定溶至 1 mL 即可,锡箔纸包裹 -20° C 保存。

[0050] 5. 钒酸钠阳性药的配制:取 0.816 g 十二水钒酸钠,加 100 mL 蒸馏水,将溶液加热沸腾至半透明,并调节 pH 至 10 左右,用移液枪取 1 mL 溶液至 100 mL 烧杯中,用玻璃棒搅拌混匀,再次加热至沸腾至半透明,确保钒酸钠为单体形式,待冷却后分装于 1.5 mL EP 管中,-20°C 冷冻保存。

[0051] 6. 终止液的配制:2 M NaOH。

[0052] 操作步骤：

[0053] 第一组(对照组)把 83 μ L 缓冲液加入 96 孔板中→加入 0.4 μ L 的 PTP1B 酶→再加入 10 μ L 1% DMSO 溶液→最后加入 4 μ L 底物→恒温 37°C 反应 30 min →然后每孔加入终止液 5 μ L NaOH。

[0054] 第二组~第三组为加药组,分别加入抑制剂 100 μ M、30 μ M、10 μ M 共 3 个浓度梯度。与对照组不同的是用抑制剂代替 1%DMSO,其它组份保持一致。最后,测出每个孔的 OD 值。所有的反应体系做三个平行。

[0055] 酶活性抑制率=[A 空白 - (A 样品 - A 背景)]/A 空白 \times 100%

[0056] A 空白：不加样品反应后的吸收值；

[0057] A 样品：加入样品反应后的吸收值；

[0058] A 背景：只加样品的吸收值。

[0059]

成分	IC ₅₀ ^a (μ g/mL)
混合物	28.34
石油醚层	104.37
二氯甲烷层	72.14
乙酸乙酯层	25.82
正丁醇层	87.24
Na ₃ VO ₄ ^a	20.39

^a Na₃VO₄ 为阳性对照药

[0060] 四、体外抗肿瘤活性研究

[0061] 体外抗肿瘤活性实验采用 MTT 法,MTT 法又称 MTT 比色法,是一种检测细胞存活和生长的方法,该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。

[0062] 操作步骤如下：

[0063] 1、接种细胞：用含 10% 胎小牛血清得培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1000-10000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 100 μ L。

[0064] 2、培养细胞：同一般培养条件,在 CO₂ 恒温培养箱中培养 12 h。

- [0065] 3、呈色 :培养 12 h 之后,进行加药,每孔加入 10 μ L。
- [0066] 4、加 MTT :MTT 溶液(5 mg/mL 用 PBS 配制, pH=7.4) 20 μ L,继续孵育 4 h, 终止培养,小心吸取孔内培养上清液,对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液。
- [0067] 5、加入 DMSO 溶液 100 μ L。
- [0068] 6、比色 :选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。
- [0069] 体外细胞活性抑制率=[A 空白 - (A 样品 - A 背景)]/A 空白 \times 100%
- [0070] A 空白 :不加样品反应后的吸收值 ;
- [0071] A 样品 :加入样品反应后的吸收值 ;
- [0072] A 背景 :只加样品的吸收值。
- [0073] 数据结果如下 :(IC_{50} 值大于 50 的均无法证明其活性,其应该为具体值或是小于某个值)
- [0074]

成分	IC_{50}^a (μ g/mL)			
	MCF-7	Hale	A549	SW480
混合物	22.4	3.11	72.4	91.5
石油醚层	75.8	86.9	82.1	85.6
二氯甲烷层	24.13	28.27	44.87	42.65
乙酸乙酯层	18.97	12.26	42.28	37.54
正丁醇层	65.4	68.9	74.8	90.2
顺铂 ^a	11.87	7.02	16.02	12.36
卡铂 ^a	103.16	53.21	234.53	135.29

^a顺铂卡铂为阳性对照药

- [0075] 从体外降血糖及抗癌活性研究中可以看出,翠菊的多酚类物质对 α -葡萄糖苷酶和肿瘤细胞都有较强的抑制作用。
- [0076] 五、翠菊提取物对四氧嘧啶引起小鼠糖尿病模型的降糖试验
- [0077] 取雄性小鼠 150 只,体重 22-24 g,测正常血糖值。禁食 32 小时,以 220 mg/kg 剂量腹腔注射四氧嘧啶生理盐水溶液,72 小时后测定血糖值,选高血糖造型成功者 84 只分组,另设空白对照组,共计 7 组 :1、空白对照组 ;2、模型组 ;3、降糖灵(市购降糖药)组 80 mg/kg ;

4、糖尿灵片(市购降糖药)组 800 mg/kg ;5、翠菊提取物高剂量组 60 mg/kg ;6、翠菊提取物中剂量组 30 mg/kg ;7、翠菊提取物低剂量组 15 mg/kg。每天灌胃给药 1 次,连续给药 7 天,禁食后测血糖值。结果见下表。

[0078]

组别	剂量 (mg/kg)	血糖 (mmol/L)		降糖率 (%)
		给药前	给药 7 天以后	
空白组	-	6.37±0.97	5.8±1.13	-
模型组	-	17.84±1.03**	20.01±1.25*	-
阳性对照(降糖灵)	80	16.32±1.36	8.58±1.36	50.52
阳性对照(糖尿灵)	800	16.13±0.82	10.25±1.02	29.87
高剂量组	60	17.80±1.67	9.01±1.47	48.79
中剂量组	30	17.41±1.46	12.32±0.91	43.21
低剂量组	15	16.33±0.69▲▲	14.87±0.48▲▲	13.4

与空白对照组比较, ▲▲ $p < 0.01$;与模型组比较,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$

[0079] 结果表明,翠菊提取物可明显降低四氧嘧啶至糖尿病模型小鼠的血糖值 ($p < 0.05$, 0.01),具有明显的降糖作用,其作用优于糖尿灵片。

[0080] 通过上述实例可见,翠菊提取物具有抑制肿瘤细胞生长的作用,同时具有抑制胰岛素受体信号通路负性调节子 PTP1B 酶活力,改善四氧嘧啶高血糖家兔的血糖水平和胰岛素水平,具有明显的降糖作用。并且对于链脲霉素引起小鼠与家兔糖尿病血糖值具有明显的降低作用。

[0081] 本发明首次从翠菊花中通过大孔树脂富集得到高含量的原花青素类成分,并首次对其乙酸乙酯层流分进行体内外活性研究,通过验证,表明翠菊原花青素富集物的乙酸乙酯层萃提取物降血糖及抗肿瘤作用均与所选的阳性药相接近甚至更好。