



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102028754 B

(45) 授权公告日 2013.12.25

(21) 申请号 201010550340.3

(22) 申请日 2010.11.19

(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

(72) 发明人 赵余庆 刘延泽 唐云 曹家庆  
李巍

(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 李宇彤

(56) 对比文件

刘振洋,等. 绞股蓝总皂苷的闪式提取及纯化工艺研究. 《2008年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集》. 2008, 第349-353页.

刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践. 《中国天然药物》. 2007, 第5卷(第6期), 第401-401页.

史琳,等. 五味子藤茎化学成分的研究. 《中草药》. 2009, 第40卷(第11期), 第1707-1710页.

审查员 卢建伟

(51) Int. Cl.

A61K 31/704(2006.01)

A61K 31/7048(2006.01)

A61K 36/57(2006.01)

A61P 25/20(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

A23L 1/29(2006.01)

A61K 131/00(2006.01)

A61K 135/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种五味子总木脂素和总皂苷的快速制备方法

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,公开了一种五味子总木脂素和总皂苷的快速制备方法。该制备方法以中药五味子果实(果浆),五味子藤茎和果柄为原料,粉碎后加入倍量水和有机溶剂后在低温(室温)下和10分钟内进行多次闪式提取,经有机溶剂萃取后得到含量大于50%的五味子总木脂素;经树脂纯化后制成含量大于50%的五味子总皂苷。本发明具有以下优点:(1)有效成分含量高,且不被破坏;(2)提取的时间短,效率高;(3)能耗相对较低;(4)操作简便,易于推广使用。

CN 102028754 B

1. 一种五味子总木脂素和总皂苷的快速制备方法,是以木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* Bill 的果实、果浆、果柄及藤茎为原料,经破碎加入倍量各种溶剂后,在低温或室温下进行组织破碎、快速高效提取,其特征在于,应用闪式提取器提取,提取 1 分钟-10 分钟内完成,提取 1-5 次;加入溶剂量为药材重量的 1-15 倍,提取温度为 20-60℃,提取时“调速旋钮”旋转到“4-5”即提取时电压为 100-150V,所用的溶剂是水、甲醇、乙醇、丙酮、正丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、石油醚、正己烷及它们的任意比例的混合溶剂,其具体步骤为:

(1) 将五味子果实、果浆、藤茎和果柄干燥、粉碎,用 10-95% 的甲醇、乙醇、异丙醇或正丁醇的一种进行闪式提取,提取液经减压浓缩后用有机溶剂萃取,萃取液浓缩后得到的提取物,其五味子总木脂素和总皂苷的含量大于 50%;

或(2) 将五味子果实、果浆、藤茎和果柄干燥、粉碎,用 10-95% 的甲醇、乙醇、异丙醇或正丁醇的一种进行闪式提取,提取液经减压浓缩后,采用大孔树脂富集,用水洗脱后用 30%-90% 的乙醇洗脱,浓缩后得到的提取物,其五味子总皂苷的含量大于 50%。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,组织破碎应为 10-40 目。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,加入的溶剂量为药材的 1-10 倍。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述的低温或室温指温度为 20-50℃。

5. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述的快速高效提取指 10 分钟内完成多次提取,即通常在提取 1 分钟-3 分钟内完成,提取 2-3 次;有效成分含量提高 10-50%。

6. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:所述的有机溶剂为极性小于正丁醇的醚、醇、酯、酮;洗脱方式为单一或混合溶剂的梯度洗脱。

7. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:所述的大孔吸附树脂为苯乙烯、丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯、丙烯酸或氧化氮类大孔树脂中的一种或几种。

## 一种五味子总木脂素和总皂苷的快速制备方法

[0001] 技术领域

[0002] 本发明属于医药技术领域,涉及一种总木脂素和总皂苷的快速制备方法,根据该制备方法所得的提取物,其五味子总木脂素和总皂苷的含量大于 50%,用于防治失眠,提高免疫力。

### 背景技术

[0003] 五味子的主要活性成分为木脂素类化合物和三萜化合物,早期的研究表明五味子具有保肝、抗衰老等作用(汤臣康. 五味子的化学和药理研究的新进展 [J]. 西北药学杂志, 1994, 9(6):278-282),最近研究报道五味子的粗提物有抗肿瘤作用(刘耕陶. 肿瘤抗药性研究新进展 [J]. 医学研究杂志, 2008, 37 (3)),禹洁等在提取分离五味子总木脂素的基础上,对纯化后的总木脂素的体外抗肿瘤活性进行了研究,发现五味子总木脂素对乳腺癌及肝癌细胞表现出极强的抑制作用,  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的抑制率已高于 50%,其中 MCF-7 的抑制率有较明显的剂量效应依赖关系, HepG<sub>2</sub> 的剂量效应依赖关系不太明显,而对食管癌的抑制作用稍弱。(禹洁,刘培勋,龙伟等. 五味子总木脂素的分离纯化与体外抗肿瘤活性的研究 [J]. 中国药师, 2009, 12 (12));

[0004] 五味子三萜类化合物的生物活性主要有抗 HIV,对肿瘤细胞的抑制作用,从 *S. lancifolia*. 的茎叶中分离得到结构新颖的双降三萜化合物显示有微弱的抗 HIV 活性 (R. T. L, S. H. Li, Q. S. Zhao, Z. W. Lin, H. D. Sun, Y. Lu, C. Wang and Q. T. Zheng, *Tetrahedron Lett.*, 2003, 44, 3531.);从 *Schinensis* 中分离得到降三萜 Schintrilactone A 具有很强的活性,其 EC<sub>50</sub> 为  $17.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Schintrilactone B 的 EC<sub>50</sub> 为  $36.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Micrandilactone B 表现出很弱的抗 HIV-1 活性, EC<sub>50</sub> >  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Huang SX, Yang J, Huang H, *et al.* Structural Characterization of Schintrilactone, a New Class of Nortriterpenoids from *Schisandra chinensis Org Lett*, 2007, 9 (21): 4175 ~ 4178); Pre-schisanartanin 具有很强的活性, EC<sub>50</sub> 为  $13.81 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Huang SX, Li RT, Liu J P, *et al* Isolation and Characterization of Biogenetically Related Highly Oxygenated Nortriterpenoids from *Schisandra chinensis Org Lett*, 2007, 9 (11):2079 ~ 2082);从 *Smicrantha* 藤茎中分离得到的降三萜 Micrandilactone C 也显示出较强的抗 HIV - 1 活性, EC<sub>50</sub> 值为  $7.71 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (SI > 29.54) (Li RT, Han QB, Zheng YT, *et al* Structure and anti - HIV activity of micrandilactones B and C, new nortriterpenoids possessing a unique skeleton from *Schisandra micrantha Chem Commun (Camb)*, 2005, 23:2936 ~ 2938);从 *Srubri f- lora* 藤茎中分得的 Rubriflodilactone B 显示出抗 HIV - 1 活性, EC<sub>50</sub> 为  $9.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 选择性系数 (SI) 为 12.39 (Xiao WL, Yang LM, Gong NB, *et al* Rubriflodilactones A and B, Two Novel Bisnortriterpenoids from *Schisandra rubriflora* and Their Biological Activities *Org Lett*, 2006, 8(5): 991 ~ 994); Rubriflorin A, Rubriflorin B, Rubriflorin C 表现出完全不同的抗 HIV 活性。(Xiao

WL, Li XL, Wang RR, *et al* Triterpenoids from *Schisandra rubriflora* *J Nat Prod*, 2007, 70 (6):1056 ~ 1059);从 *S. sp henanthera* 中分离得到的 Sphenalactone A, Sphenalactone B, Sphenalactone C, Sphenalactone D 具有较弱的抗 HIV-1 活性,  $EC_{50}$  分别为 89.1, 74.1, 52.5, 35.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Xiao WL, Yang LM, Li M, *et al* Sphenalactones A-D, a new class of highly oxygenated trinortriterpenoids from *Schisandra sphenanthera* *Tetrahedron Lett*, 2007, 48(31): 5543 ~ 5546), Sphenadilactone C, 其  $EC_{50}$  为 29.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 选择参数 ( $CC_{50} / EC_{50}$ ) 为 6.68 (Xiao WL, Huang SX, Wang RR, *et al* Nortriterpenoids and lignans from *Schisandra sphenanthera* *Phytochemistry*. 2008, 69(16): 2862 ~ 2866);从 *S. lancifolia* 中得到的化合物 lancifodilactone H, lancifoic acid A, 表现出具有一定潜在的抗 HIV 活性,  $EC_{50}$  分别为 16.6, 16.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Xiao WL, Tian RR, Pu J X, *et al* Triterpenoids from *Schisandra lancifolia* with Anti-HIV-1 Activity *J Nat Prod*, 2006, 69(2): 277 ~ 279);从 *Ssphenanthera* 中分离得到的 Sphenalactone A, Sphenalactone B (Xiao WL, Yang LM, Li M, *et al*. Sphenalactones A-D, a new class of highly oxygenated trinortriterpenoids from *Schisandra sphenanthera*. *Tetrahedron Lett*, 2007, 48 (31): 5543 ~ 5546), Sphenadilactone C (Xiao WL, Huang SX, Wang RR, *et al*. Nortriterpenoids and lignans from *Schisandra sphenanthera*. *Phytochemistry*, 2008, 69(16): 2862 ~ 2866), 对 HeLa、HepG<sub>2</sub> 毒株没有明显的抑制活性,  $IC_{50}$  均大于 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 在 *K. coccinea* 中分离得到的 Kadlongilactone A, Kadlongilactone B 对人体肿瘤细胞 K562, Bel-7402 和 A549 具有很强的抑制活性,  $IC_{50}$  分别低于 0.1, 0.1, 和 1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Xiao WL, Li RT, Li SH, *et al*. Lancifodilactone F: A Novel Nortriterpenoids Possessing a Unique Skeleton from *Schisandra lancifolia* and It's Anti-HIV Activity. *Org Lett*, 2005, 7 (7): 1263 ~ 1266), 但 Kadcoccolactones A ~ J 并没有表现出抑制活性 ( $IC_{50} > 5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (Gao XM, Pu JX, Huang SX, *et al*. Kadcoccolactones A-J, Triterpenoids from *Kadsura coccinea*. *J Nat Prod*, 2008, 71 (7): 1182 ~ 1188)。从 *K1 heteroclita* 藤茎中分离得到新的三萜内酯 heteroclitilactones A - F、schisanlactone B、E 对人类肿瘤细胞 Bel - 7402, BGC - 823, MCF - 7 和 HL - 60 显示中等细胞毒性 (Wang W, Liu J, Han J, *et al*. New triterpenoids from *Kadsura heteroclita* and their cytotoxic activity. *Planta Med*, 2006, 72 (5): 450 ~ 457)。

[0005] 五味子果实、藤茎及五味子果柄是木兰科五味子属植物北五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的果实、干燥藤茎及果柄, 五味子果浆为五味子果实除掉种子后的鲜果浆。

[0006] 本研究小组已从五味子藤茎和果柄中分离到了和五味子果实中相同的木脂素, 如五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素和 gomisin N 等 (中药材 2009 年 7 月第 32 卷第 7 期和中草药 2009 年 11 月第 40 卷第 11 期)。

[0007] 常见的有关五味子木脂素的提取方法如下:

[0008] 溶剂提取

[0009] 浸提: 常用水、乙醇、丙酮、石油醚、氯仿及苯等作为提取溶剂, 浸提耗时, 费溶

剂、工艺繁琐，易存在溶剂残留。

[0010] 回流提取与索氏提取：提取温度高，时间长，由于提取过程中常伴随分解、醇解、水解、沉淀等反应的发生，对光、热不稳定的物质易被破坏，难以稳定产品质量。

[0011] 超声波提取

[0012] 超声波作为一种新型提取技术，因其具有强烈振动和空化效应，可以加速有效成分的溶出，提取温度不高，克服了传统有机溶剂提取中有效成分因高温劣变的可能，使得物质活性不易被破坏，提取时间短，产率高，操作简单，已在天然产物提取方面得到了广泛的应用。

[0013] 孟广森采用超声波提取养肝胶囊中的五味子醇甲，以甲醇为溶剂，料液比1: 40，超声功率250W，超声20 min作为提取条件，结果表明此方法线形良好，平均加样回收率为96. 9%。

[0014] 微波萃取

[0015] 微波萃取或称微波辅助萃取，是一种具有良好发展前景的萃取分离方法。其选择性好、萃取时间短、溶剂用量少、污染低，并且回收率高，已在环境分析、食品、化工、农业等领域受到了极为广泛的重视。

[0016] 黄惠华等利用微波萃取五味子果实中的五味子醇甲，考察了萃取溶剂的优化，选择水和乙醇作为萃取溶剂。探讨了萃取时间、萃取功率、料液比对五味子醇甲提取率的影响，结果表明微波350W，5~8 min，液固比12: 1最好，明显优于传统索氏提取，结合HPLC测定了五味子醇甲含量。

[0017] 超临界CO<sub>2</sub>提取

[0018] 超临界CO<sub>2</sub>萃取以其无需溶剂、对环境无污染的“绿色”提取优势，不仅在五味子活性成分提取中站稳了一席之地，而且一直是分离技术中一个最活跃的领域。超临界CO<sub>2</sub>临界温度低，提取原料中的有效成分能被有效保存而不被破坏，特别适合用来提取对热敏感、易氧化分解的成分。另外，超临界CO<sub>2</sub>萃取能力强，产率高。现已广泛应用于食品工程、化学工程、生物工程、环境保护等领域。杨苏蓓利用超临界CO<sub>2</sub>萃取技术，以华中五味子为研究材料，五味子甲素、乙素、酯甲和醇甲为研究目标。通过对萃取压力、温度、CO<sub>2</sub>流量为三因素正交设计，得出的最佳工艺为21 MPa, 37°C, CO<sub>2</sub>流量5 L/min。

[0019] 鉴于以上提取方法有提取时间长，有效成分提取不完全，提取温度高，有效成分易被破坏，成本高等缺点，本实验采用新型的闪式提取器进行提取，以提高提取效率，降低实验成本。

[0020] 闪式提取技术是一种利用闪式提取器对于植物软、硬材料快速提取的新型提取技术。由于完成一次提取一般在1-3分钟左右，比传统方法更快速、简便，故被称之为闪式提取。其原理是依靠机械剪切力和超动分子渗滤技术，在室温及溶剂存在下数秒钟内将植物的根、茎、叶、花、果实等物料破碎至细微颗粒，并使有效成分迅速达到组织内外平衡，通过过滤达到提取的目的。闪式提取技术能够避免植物有效成分受热破坏，具有溶剂用量小，提取时间短，效率高等特点，是一种新兴的中药现代化提取关键技术。

[0021] 目前，随着人们保健意识的增强，国内外对于五味子的需求量越来越大，辽宁产五味子藤茎资源丰富，在人工种植过程中每年有大量的藤茎被修剪下来，而果柄也被当成废弃物扔掉。如应用本发明专利技术——闪式提取技术对五味子果浆、藤茎和果柄中的功效

成分进行纯化并加以充分的研究和利用,将扩大五味子的药食两用资源,也具有重要的社会意义。

### 发明内容

[0022] 本发明的目的是针对五味子果实资源紧缺,提供五味子果浆、藤茎和果柄提取物的制备方法,作为五味子资源的补充,替代五味子果实提取物入药或功能食品。

[0023] 本发明是通过如下技术方案完成的 | :

[0024] 一种五味子总木脂素和总皂苷的快速制备方法,是以木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* Bill 的果实、果浆、果柄及藤茎为原料,经破碎加入倍量各种溶剂后,在低温或室温下进行组织破碎、快速高效提取,应用闪式提取器提取,提取 1 分钟-10 分钟内完成,提取 1-5 次;加入溶剂量为药材重量的 1-15 倍,提取温度为 20-60℃,提取时“调速旋钮”旋转到“4-5”即提取时电压为 100-150V。

[0025] 所用的溶剂可以是水、甲醇、乙醇、丙酮、正丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、石油醚、正己烷等及它们的任意比例的混合溶剂。

[0026] 组织破碎应为 10-40 目,加入的溶剂量为药材的 1-10 倍。

[0027] 所述的低温或室温指温度为 20-50℃ (室温)。

[0028] 所述的快速高效提取指 10 分钟内完成多次提取,即通常在提取 1 分钟-3 分钟内完成,提取 2-3 次;有效成分含量提高 10-50%。

[0029] 所用的提取器为河南金鼎公司生产的各类型号的快速提取装置——闪式提取器。

[0030] 其具体步骤如下:

[0031] (1) 将五味子果实、果浆、藤茎和果柄干燥、粉碎,用 10-95% 的甲醇、乙醇、异丙醇或正丁醇的一种进行闪式提取,提取液经减压浓缩后用有机溶剂萃取,萃取液浓缩后得到的提取物,其五味子总木脂素的含量均大于 50%;

[0032] (2) 将五味子果实、果浆、藤茎和果柄干燥、粉碎,用 10-95% 的甲醇、乙醇、异丙醇或正丁醇的一种进行闪式提取,提取液经减压浓缩后,采用大孔树脂富集,用水、30%-70% 的乙醇、90% 乙醇洗脱,分别收集 70% 和 90% 乙醇洗脱液,浓缩后得到的提取物,其五味子总皂苷的含量均大于 50%。

[0033] (3) 将五味子果实、果浆、藤茎和果柄干燥、粉碎,分别用石油醚和正丁醇进行闪式提取,提取液减压浓缩得提取物,石油醚提取部分其五味子总木脂素的含量均大于 50%;正丁醇提取部分其五味子总皂苷的含量均大于 50%。

[0034] 所述的有机溶剂为极性小于正丁醇的醚、醇、酯、酮;洗脱方式为单一或混合溶剂的梯度洗脱。

[0035] 所述的大孔吸附树脂为苯乙烯、丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯、丙烯酸或氧化氮类大孔树脂中的一种或几种。

[0036] 依据以上工艺制备而得的提取物可以和药学上可以接受的载体混合,制成各种临床可用的剂型。

[0037] 本发明的有益效果

[0038] 本发明针对替代五味子果实提取物入药或功能食品,充分利用五味子资源,缓解五味子果实供不应求的状况。

## 具体实施方式

[0039] 下面的实施例可进一步说明本发明,但不以任何方式限制本发明。

[0040] 实施例 1:

[0041] 北五味子果实 100g,粉碎,12 倍量 85% 乙醇,闪式连续提取 3 次,2min/ 次,合并提取液,抽滤,减压浓缩至无醇味,用大孔树脂柱富集,分别用水、70% 乙醇洗脱、90% 乙醇洗脱,分别收集和减压回收乙醇。加入适量水后 90% 乙醇洗脱部分用石油醚萃取,除去溶剂后得到含量大于 50% 的五味子总木脂素;70% 乙醇洗脱部分用正丁醇萃取,减压除去溶剂后得到含量大于 50% 的五味子总皂苷。

[0042] 实施例 2:

[0043] 北五味子藤茎 100g,粉碎,12 倍量 85% 乙醇,闪式连续提取 3 次,2min/ 次,合并提取液,抽滤,减压浓缩至无醇味,用大孔树脂柱富集,分别用水、70% 乙醇洗脱、90% 乙醇洗脱,分别收集和减压回收乙醇。加入适量水后 90% 乙醇洗脱部分用石油醚萃取,除去溶剂后得到含量大于 50% 的五味子总木脂素;70% 乙醇洗脱部分用正丁醇萃取,减压除去溶剂后得到含量大于 50% 的五味子总皂苷。

[0044] 实施例 3:

[0045] 北五味子果柄 100g,粉碎,12 倍量 85% 乙醇,闪式连续提取 3 次,2min/ 次,合并提取液,抽滤,减压浓缩至无醇味,用大孔树脂柱富集,分别用水、70% 乙醇洗脱、90% 乙醇洗脱,分别收集和减压回收乙醇。加入适量水后 90% 乙醇洗脱部分用石油醚萃取,除去溶剂后得到含量大于 50% 的五味子总木脂素;70% 乙醇洗脱部分用正丁醇萃取,减压除去溶剂后得到含量大于 50% 的五味子总皂苷。

[0046] 实施例 4:

[0047] 北五味子果浆 100g,粉碎,12 倍量 85% 乙醇,闪式连续提取 3 次,2min/ 次,合并提取液,抽滤,减压浓缩至无醇味,用大孔树脂柱富集,分别用水、70% 乙醇洗脱、90% 乙醇洗脱,分别收集和减压回收乙醇。加入适量水后 90% 乙醇洗脱部分用石油醚萃取,除去溶剂后得到含量大于 50% 的五味子总木脂素;70% 乙醇洗脱部分用正丁醇萃取,减压除去溶剂后得到含量大于 50% 的五味子总皂苷。

[0048] 实施例 5:

[0049] 北五味子果实 100g,粉碎,12 倍量甲醇,闪式连续提取 3 次,2min/ 次,合并提取液,滤过,除去溶剂后依次用二氯甲烷和正丁醇萃取 3 次。除去二氯甲烷后得到含量大于 50% 的五味子总木脂素;正丁醇层萃取部分经减压除去溶剂,在通过树脂纯化后得到含量大于 50% 的五味子总皂苷。

[0050] 实施例 6:

[0051] 北五味子藤茎 100g,粉碎,12 倍量甲醇,闪式连续提取 3 次,2min/ 次,合并提取液,滤过,除去溶剂后依次用二氯甲烷和正丁醇萃取 3 次。除去二氯甲烷后得到含量大于 50% 的五味子总木脂素;正丁醇层萃取部分经减压除去溶剂,在通过树脂纯化、70% 乙醇洗脱后得到含量大于 50% 的五味子总皂苷。

[0052] 实施例 7:

[0053] 北五味子果柄 100g,粉碎,12 倍量甲醇,闪式连续提取 3 次,2min/ 次,合并提取液,

滤过,除去溶剂后依次用二氯甲烷和正丁醇萃取 3 次。除去二氯甲烷后得到含量大于 50% 的五味子总木脂素;正丁醇层萃取部分经减压除去溶剂,在通过树脂纯化、70% 乙醇洗脱后得到含量大于 50% 的五味子总皂苷。

[0054] 实施例 8:

[0055] 北五味子果浆 100g,粉碎,12 倍量甲醇,闪式连续提取 3 次,2min/次,合并提取液,滤过,除去溶剂后依次用二氯甲烷和正丁醇萃取 3 次。除去二氯甲烷后得到含量大于 50% 的五味子总木脂素;正丁醇层萃取部分经减压除去溶剂,在通过树脂纯化、70% 乙醇洗脱后得到含量大于 50% 的五味子总皂苷。