



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105663673 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 15

(21) 申请号 201610051427. 3

*A23L 2/52*(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 01. 26

*A23L 33/10*(2016. 01)

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

*A61K 125/00*(2006. 01)

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 张文昕 李昭华 戴宇 董先智

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 单骁越

(51) Int. Cl.

*A61K 36/8969*(2006. 01)

*A61K 8/97*(2006. 01)

*A61P 31/04*(2006. 01)

*A61P 31/10*(2006. 01)

*A61P 31/12*(2006. 01)

*A61Q 19/10*(2006. 01)

*A61Q 17/00*(2006. 01)

*A61P 37/02*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

玉竹高异黄酮的制备方法及其在医药中的应用

(57) 摘要

本发明提供一种用于制备玉竹高异黄酮的方法,所述方法包括以下步骤:1) 对经粉碎的玉竹根茎进行超临界流体萃取脱脂,2) 对脱脂产物进行热回流提取以得到玉竹总黄酮,以及 3) 对步骤 2) 中获得的玉竹总黄酮进行柱层析纯化,其中在所述热回流提取步骤中向所述脱脂产物加入乙醇和  $MnCl_2$ ,并且在所述柱层析纯化步骤中使用甲基丙烯酸酯大孔树脂。本发明还提供根据本发明的方法制备的玉竹高异黄酮的用途。

1. 一种用于制备玉竹高异黄酮的方法,所述方法包括以下步骤:
  - 1)对经粉碎的玉竹根茎进行超临界流体萃取脱脂,
  - 2)对脱脂产物进行热回流提取以得到玉竹总黄酮,以及
  - 3)对步骤2)中获得的玉竹总黄酮进行柱层析纯化,其中在所述热回流提取步骤中向所述脱脂产物加入乙醇和 $MnCl_2$ ,并且在所述柱层析纯化步骤中使用甲基丙烯酸酯大孔树脂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述柱层析纯化步骤前,对所述树脂进行预处理。
3. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括以下步骤:

取玉竹根茎,粉碎后经不加改性剂的超临界流体萃取脱脂;

向脱脂所得的药渣加入乙醇和 $MnCl_2$ 以进行热回流提取,过滤热回流后的液体,将滤液合并并浓缩,得到玉竹总黄酮样品;

树脂预处理:取适量甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂,用乙醇浸泡,然后用乙醇洗涤,直到洗出液中加适量蒸馏水无白色浑浊现象,再用蒸馏水洗至无醇,然后依次用NaOH、HCl浸泡,分别用蒸馏水洗至中性,备用;

取所述玉竹总黄酮样品加水溶解,加于经所述预处理的甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂柱上,用蒸馏水洗脱至洗脱液近无色,弃去洗脱液,然后先用低浓度乙醇洗脱至洗脱液近无色,弃去洗脱液,再用高浓度乙醇洗脱至洗脱液近无色,收集洗脱液并减压回收,得到玉竹高异黄酮提取物。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中在所述热回流提取步骤中加入的 $MnCl_2$ 的量为0.1%~5%w/v。
5. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中在所述柱层析纯化步骤中使用HP-2MG型甲基丙烯酸酯大孔树脂。
6. 根据权利要求3所述的方法,其中所述低浓度乙醇的浓度为10-40%v/v并且所述高浓度乙醇的浓度为50-90%v/v。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法制备的玉竹高异黄酮在制备抗菌、防病毒制剂中的用途。
8. 一种抗菌、防病毒的皮肤保护洗液,其包含根据权利要求1-6中任一项所述的方法制备的玉竹高异黄酮。
9. 一种保健食品,其包含根据权利要求1-6中任一项所述的方法制备的玉竹高异黄酮。
10. 一种具有免疫调节功能的组合物,其包含根据权利要求1-6中任一项所述的方法制备的玉竹高异黄酮。

## 玉竹高异黄酮的制备方法及其在医药中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体地涉及一种玉竹高异黄酮的制备方法及其在医药中的应用。

### 背景技术

[0002] 玉竹是百合科黄精属多年生草本植物。分布较广,在国内很多省份均可生长,是我国出口创汇的主要中药材品种之一。玉竹主要作为滋补、保健品食用,是药食两用植物,已越来越受到人们的欢迎。玉竹性微寒、味甘,有养阴润燥、生津止渴的功效。玉竹的药用价值很高,在《神农本草经》、《本草纲目》等均有记载。迄今为止,从玉竹中分离鉴定了二氢高异黄酮(Wang Dongmei等Natural Product Research 2009 23(6)580)、甾体皂苷(林厚文等,药学学报1994 29(3)215)、二肽(秦海林等,中国中药杂志2004 29(1)42)等类型化合物。玉竹二氢高异黄酮类化合物有促进乳腺癌细胞凋亡(Rafi Mohamed M等Food Chemistry 2007 104 332)和抗菌作用(Wang Dongmei等Natural Product Research 2009 23(6)580)。高异黄酮类化合物是化合物中特殊的一类,这类化合物在植物中较少见,主要分布于百合科植物中。从百合科玉竹中分离得到了多个该类化合物,活性评价显示所得的高异黄酮对多种肿瘤细胞增殖具有明显的抑制作用,同时具有很强的抗炎作用。

[0003] 随着现代生活水平的提高,人们不仅关注疾病的治疗,更关注疾病的预防。具有提高免疫力、美容和抗衰老等功效的天然提取物得到人们普遍的非常关注。玉竹富含甾体皂苷、粘液质、黄酮、生物碱、多糖、多醇、鞣质和强心苷等成分,其中玉竹高异黄酮是一种重要的新型功能成分。玉竹高异黄酮添加到食品和饮料中,可以得到健康食品和保健饮料;玉竹高异黄酮与酞丁安、醋酸氯己定配伍,可以得到抗菌、防病毒的皮肤保护洗液;玉竹高异黄酮加入片剂中,可以得到具有免疫调节功能的药品。

### 发明内容

[0004] 传统“回流提取+聚酰胺树脂分离”技术所得高异黄酮纯度低,得率也较低。本发明的发明人发现,在热回流提取步骤中加入 $MnCl_2$ (0.1%~5%w/v)进行提取,可以显著提高高异黄酮的回收率;同时,在柱层析步骤中使用甲基丙烯酸酯大孔树脂,可以显著提高高异黄酮的纯度。经过上述改进后,高异黄酮的回收率由原来的30~60%提高到70%以上,终产品中高异黄酮的含量由原来的~20%提高到60%。

[0005] 本发明的目的在于提供一种玉竹高异黄酮的制备方法。包括如下步骤:

[0006] (1)选取玉竹根茎(例如,辽宁丹东产玉竹根茎),粉碎后经不加改性剂的超临界流体萃取脱脂。于圆底烧瓶中加入脱脂所得药渣、乙醇及 $MnCl_2$ 热回流,过滤除去残渣,合并滤液,浓缩得到玉竹总黄酮样品待用。

[0007] (2)树脂的预处理:取一定量甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂,用乙醇浸泡,然后用乙醇洗涤,直到洗出液中加适量蒸馏水无白色浑浊现象,再用蒸馏水洗至无醇;然后依次用NaOH、HCl浸泡,分别用蒸馏水洗至中性,备用。

[0008] (3)取(1)中得到的玉竹总黄酮样品加水溶解,加于经步骤(2)预处理的甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂柱上,用蒸馏水洗脱至洗脱液近无色,弃去洗脱液,然后先用低浓度乙醇洗脱至洗脱液近无色,弃去洗脱液,再用高浓度乙醇洗脱至洗脱液近无色,收集洗脱液,减压回收得玉竹高异黄酮提取物。

[0009] 经测定,在热回流提取步骤中加入 $\text{MnCl}_2$ (0.1%~5%w/v)提取玉竹高异黄酮,回收率由原来的30~60%提高到70%以上;在柱层析步骤中使用甲基丙烯酸酯大孔树脂,终产品中高异黄酮的含量由原来的20%提高到60%。

[0010] 本发明的另一个目的在于提供玉竹高异黄酮在医药中的应用。

[0011] 本发明的玉竹高异黄酮提取方法效果好,所提取的高异黄酮可用于制药或食品行业。

[0012] 根据本发明的方法制备的玉竹高异黄酮可与酞丁安、醋酸氯己定配伍,得到抗菌、防病毒的皮肤保护洗液;玉竹高异黄酮添加到食品和饮料中,得到健康食品和保健饮料;玉竹高异黄酮加入片剂中,得到具有免疫调节功能的药品,制剂具有与玉竹高异黄酮全部相同或相近的药理活性和用途。

[0013] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0014] 1.一种用于制备玉竹高异黄酮的方法,所述方法包括以下步骤:

[0015] 1)对经粉碎的玉竹根茎进行超临界流体萃取脱脂,

[0016] 2)对脱脂产物进行热回流提取以得到玉竹总黄酮,以及

[0017] 3)对步骤2)中获得的玉竹总黄酮进行柱层析纯化,

[0018] 其中在所述热回流提取步骤中向所述脱脂产物加入乙醇和 $\text{MnCl}_2$ ,并且在所述柱层析纯化步骤中使用甲基丙烯酸酯大孔树脂。

[0019] 2.根据第1项所述的方法,其中在所述柱层析纯化步骤前,对所述树脂进行预处理。

[0020] 3.根据第1项所述的方法,所述方法包括以下步骤:

[0021] 取玉竹根茎,粉碎后经不加改性剂的超临界流体萃取脱脂;

[0022] 向脱脂所得的药渣加入乙醇和 $\text{MnCl}_2$ 以进行热回流提取,过滤热回流后的液体,将滤液合并并浓缩,得到玉竹总黄酮样品;

[0023] 树脂预处理:取适量甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂,用乙醇浸泡,然后用乙醇洗涤,直到洗出液中加适量蒸馏水无白色浑浊现象,再用蒸馏水洗至无醇,然后依次用 $\text{NaOH}$ 、 $\text{HCl}$ 浸泡,分别用蒸馏水洗至中性,备用;

[0024] 取所述玉竹总黄酮样品加水溶解,加于经所述预处理的甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂柱上,用蒸馏水洗脱至洗脱液近无色,弃去洗脱液,然后先用低浓度乙醇洗脱至洗脱液近无色,弃去洗脱液,再用高浓度乙醇洗脱至洗脱液近无色,收集洗脱液并减压回收,得到玉竹高异黄酮提取物。

[0025] 4.根据第1-3项中任一项所述的方法,其中在所述热回流提取步骤中加入的 $\text{MnCl}_2$ 的量为0.1%~5%w/v。

[0026] 5.根据第1-3项中任一项所述的方法,其中在所述柱层析纯化步骤中使用HP-2MG型甲基丙烯酸酯大孔树脂。

[0027] 6.根据第3项所述的方法,其中所述低浓度乙醇的浓度为10-40%v/v并且所述高

浓度乙醇的浓度为50-90%v/v。

[0028] 7. 根据第1-6项中任一项所述的方法制备的玉竹高异黄酮在制备抗菌、防病毒制剂中的用途。

[0029] 8. 一种抗菌、防病毒的皮肤保护洗液,其包含根据第1-6项中任一项所述的方法制备的玉竹高异黄酮。

[0030] 9. 一种保健食品,其包含根据第1-6项中任一项所述的方法制备的玉竹高异黄酮。

[0031] 10. 一种具有免疫调节功能的组合物,其包含根据第1-6项中任一项所述的方法制备的玉竹高异黄酮。

### 具体实施方式

[0032] 下面结合实施例对本发明作进一步说明,但本发明的实施方式不限于此。

[0033] 实施例1:高异黄酮的含量检测。

[0034] 精密称取玉竹高异黄酮提取物样品3份,每份约30mg,置25mL量瓶中,加70%乙醇适量,超声处理5分钟,用75%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液10.0mL于25mL量瓶,加70%乙醇至刻度,摇匀,作为样品溶液;分别精密吸取上述样品溶液1.0mL置加有镁粉300mg的具塞刻度试管中,再分别精密吸取芦丁对照品溶液2.0、4.0mL,置加有镁粉300mg的具塞刻度试管中,将试管置15℃左右的冷水浴中,缓慢滴加浓HCl 3mL,并不时振摇试管;最后加70%乙醇补足至10mL,摇匀,置沸水浴中加热60min,取出,迅速冷却至室温,于525nm处测定吸光度;外标两点法计算含量即得。

[0035] 实施例2:玉竹高异黄酮回收率的测定。

[0036] 实施例中回收率计算公式如下:

$$[0037] \quad S = \frac{W_2 \times X_2}{W_1 \times X_1} \times 100\%$$

[0038] 其中S代表回收率, $W_1$ 为玉竹根茎的重量, $X_1$ 为玉竹根茎中高异黄酮的质量百分比含量, $W_2$ 为提纯后的高异黄酮的质量, $X_2$ 为提纯后的高异黄酮的纯度。

[0039] 取新鲜玉竹根茎充分破碎后,用70%的乙醇充分回流提取24h,用实施例1中所述方法测定提取液中高异黄酮的含量W,则: $X_1 = W/W_1$ 。

[0040] 标准曲线的测定:准确称取预先在120度干燥至恒重的芦丁标准品,配制浓度为0.218mg/mL的标准液,定量移取该标准液进行比色分析,绘制标准曲线。

[0041]

样品	样品1	样品2	样品3	对比例
分光光度值	0.273	0.307	0.266	0.139
纯度	48.3%	59.2%	49.2%	18.9%

[0042] 实施例3:玉竹高异黄酮的提取方法

[0043] 通过以下方法提取玉竹高异黄酮:

[0044] (1) 辽宁丹东产玉竹根茎1000g经捣碎或粉碎后,用压力为35MPa萃取釜,温度为65℃的超临界流体萃取4h脱脂。

[0045] (2) 在热回流提取器中用70%的乙醇及0.1%的MnCl<sub>2</sub>将上步中萃取后所得残渣热

回流3次,每次2h,过滤热回流后的液体,合并以上3次的滤液,浓缩得到玉竹总黄酮样品。

[0046] (3)树脂的预处理:取一定量的甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂,用95%的乙醇浸泡24h,然后用乙醇洗涤,直到洗出液中加适量蒸馏水无白色浑浊现象,再用蒸馏水洗至无醇;然后依次用4%NaOH、5%HCl浸泡2-4h,分别用蒸馏水洗至中性,备用。

[0047] (4)取(2)中得到的玉竹总黄酮样品,加水溶解使其浓度为0.5%(w/v),加于甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂柱上,用水洗脱至洗脱液近无色,弃去洗脱液,用40%乙醇洗脱至洗脱液近无色,弃去洗脱液,用90%乙醇洗脱至洗脱液近无色,收集洗脱液,减压回收得玉竹高异黄酮提取物8.95g。

[0048] 根据实施例1的方法对上述步骤(2)中玉竹提取液进行含量测定,结果表明使用MnCl<sub>2</sub>能将提取液中高异黄酮含量提升~35%;以(回收液体积×高异黄酮浓度)比较回收率变化,结果表明高异黄酮回收率提升21.1%。

[0049]

提取条件	回收液体积	高异黄酮浓度检测值
------	-------	-----------

[0050]

70%乙醇热回流提取液	4.35L	0.712% w/v
70%的乙醇及 0.1%的 MnCl <sub>2</sub> 热回流提取液	3.91L	0.961% w/v

[0051] 对上述步骤(2)所得玉竹总黄酮提取物用不同树脂进行柱层析分离,制备固体提取物样品。根据实施实例1所述方法测定其中高异黄酮含量:

分离条件	高异黄酮含量
[0052] 甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂 (HP-2MG 型)	60.25% w/w
聚酰胺树脂	29.97% w/w

[0053] 结果表明,使用甲基丙烯酸酯大孔吸附树脂比传统聚酰胺树脂方法提高高异黄酮含量30%左右。

[0054] 实施例4

[0055] 一种抗菌、防病毒的皮肤保护洗液,将实施例3得到的玉竹高异黄酮与酞丁安、醋酸氯己定配伍,得到抗菌、防病毒的皮肤保护洗液。平板抑菌实验证明对大肠杆菌、葡萄球菌、霉菌等具有较好的抑制作用。抗病毒实验证明对流感病毒、HPV病毒具有抑制作用。CAC02细胞实验证明对肿瘤细胞具有抑制作用。

[0056] 以下通过药效学试验和对比试验来进一步阐述本发明所述玉竹高异黄酮的有益效果。

[0057] 试验例1)

[0058] 将根据实施例3制备的玉竹高异黄酮与酞丁安、醋酸氯己定配伍,对得到的抗菌、防病毒的皮肤保护洗液进行体外抗菌活性试验。

[0059] 在不同的培养基上分别接种金黄色葡萄球菌(编号CICC 10001、大肠杆菌(编号CMCC44102,)、白色念珠菌(编号ATCC 10231),以上菌株均由其编号对应的微生物保藏中心提供。在37℃,培养24h后缓慢向培养基上滴加5%护肤洗液(由玉竹高异黄酮与酞丁安、醋酸氯己定以50:1:10的比例配伍得到)各5ml,阳性对照组滴加5ml生理盐水。经2分钟、4分钟、6分钟、8分钟观察抑菌情况,结果见表1。

[0060] 表1 该洗液体外抗菌活性实验

[0061]

试验菌种	作用不同时间(min)抑菌率(%)				阳性对照菌数
	2	4	6	8	
大肠杆菌	100	100	100	100	$3.71 \times 10^4$ CTU/mL
金黄色葡萄球菌	100	100	100	100	$2.56 \times 10^4$ CTU/mL
白色念珠菌	100	100	100	100	$2.72 \times 10^4$ CTU/mL

[0062] 表1所示结果表明:玉竹高异黄酮与酞丁安、醋酸氯己定配伍,得到的抗菌、防病毒的皮肤保护洗液有广谱的抗菌活性,2分钟几乎能杀灭女性阴道常见病原菌。

[0063] 试验例2)

[0064] 将根据实施例3制备的玉竹高异黄酮与酞丁安、醋酸氯己定配伍,对得到的抗菌、防病毒的皮肤保护洗液进行抗病毒试验。

[0065] 断颈处死雄性新西兰大耳白兔((北京实验动物研究中心提供,4月~5月龄,10只,体重2.4kg~3kg),无菌条件下迅速切取阴茎,剥离表皮组织,RPMI1640完全培养液反复冲洗,剪碎置无菌培养瓶备用。无菌条件下局麻切取门诊确诊的男性CA病人阴茎包皮较大疣体(0.5cm~1.0cm),RPMI1640完全培养液反复冲洗,置匀浆器研磨制成HPV疣体组织悬液,置无菌培养瓶加RPMI1640完全培养液培养备用。

[0066] 培养兔阴茎表皮细胞至细胞长满培养孔底部时,将不同剂量“洗液”分别加入各细胞培养孔,同时留2孔不加“洗液”作为对照组,继续培养,与对照组相比,相同培养时间内,未致细胞死亡的最大剂量作为“洗液”杀伤抑制病毒活性实验时用药的上限剂量。细胞病变的记录:“-”表示细胞正常生长,“+”表示1%~25%细胞病变,“++”表示26%~50%细胞病变,“+++”表示51%~75%细胞病变,“++++”表示76%~100%细胞病变。

[0067] 培养兔阴茎表皮细胞至细胞长满培养孔底部时,将HPV疣体组织悬液1ml与不同浓度的“洗液”1ml.充分混合,37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下过夜处理后加入细胞培养孔内,用细胞维持液补足培养孔,同时设3个对照组,其中1组两孔只加细胞维持液1ml/孔;1组2孔只加HPV疣体组织悬液,用细胞维持液补足1ml/孔;1组2孔只加“洗液”(50mg/ml),用细胞维持液补足1ml/孔;37℃、5%CO<sub>2</sub>继续培养,每日镜下观察细胞生长情况。

[0068] 培养兔阴茎表皮细胞至细胞长满培养孔底部时,加入HPV疣体组织悬液,留4孔不加疣体组织悬液作为对照组,37℃、5%CO<sub>2</sub>继续培养24h后,将多余的疣体组织悬液吸去后

各孔加入不同浓度“洗液”并用细胞维持液补足1ml/孔.同时设3个对照组,实验方法同上,37℃、5%CO<sub>2</sub>继续培养,每日镜下观察细胞生长情况。

[0069] 培养兔阴茎表皮细胞至细胞长满培养孔底部时,1d后将HPV疣体组织悬液加入细胞培养孔,并用细胞维持液补足1ml/孔,同时设3个对照组,实验方法同上,37℃、5%CO<sub>2</sub>继续培养,每日镜下观察细胞生长情况。

[0070] 试验结果:

[0071] 表2 洗液对于兔包皮细胞增殖生长的影响

[0072]

浓 度 (mg/ml)	兔阴茎表皮细胞						
	1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)
0	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-

[0073] 表3 洗液对于HPV的直接杀伤

[0074]

浓 度 (mg/ml)	兔阴茎表皮细胞						
	1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)
无 HPV 感	-	-	-	-	-	-	-

[0075]

染							
0	+	+	+	++	++	+++	++++
15	+	+	+	+	+	++	+++
35	-	-	-	-	-	+	+
55	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	+	+

[0076] 表4 洗液对于HPV感染兔阴茎表皮细胞的阻断作用



[0077]

浓 度 (mg/ml)	兔阴茎表皮细胞						
	1(d)	2(d)	3(d)	4(d)	5(d)	6(d)	7(d)
无 HPV 感 染	-	-	-	-	-	-	-
0	+	+	+	++	++	+++	++++
15	+	+	+	+	++	+++	+++
35	+	+	+	+	+	++	++
55	+	+	+	+	+	+	+
75	+	+	+	+	+	+	+
95	+	+	+	+	+	++	++

[0078] 由表2可知,“洗液”浓度小于或等于95mg/ml时对细胞的增殖无影响,说明“洗液”对正常机体组织细胞损害作用小,提示临床应用安全。

[0079] 由表3可知,随着药物浓度的增大,“洗液”对HPV的杀伤作用增强。当“洗液”浓度在35mg/ml~95mg/ml时具有显著的抑制或杀灭作用。

[0080] 由表4可知,随着药物浓度的增大,“洗液”对HPV感染并造成细胞病变的阻断作用不断增强,特别在55mg/ml~75mg/ml时作用最强。

[0081] 综上说明该洗液对HPV病毒具有一定抑制作用,且对正常机体组织细胞损害作用小。

[0082] 实施例5

[0083] 一种保健食品,将实施例3得到的玉竹高异黄酮添加到食品和饮料中,得到健康食品和保健饮料。

[0084] 实施例6

[0085] 一种免疫调节功能的药品,将实施例3得到的玉竹高异黄酮加入片剂中,得到具有免疫调节功能的药品,制剂具有与玉竹高异黄酮全部相同或相近的药理活性和用途。