



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106928376 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201710179626.7

(22)申请日 2017.03.23

(71)申请人 李春生

地址 100091 北京市海淀区西苑操场1号中
国中医科学院西苑医院

(72)发明人 李春生

(51)Int.Cl.

C08B 37/00(2006.01)

A61K 31/715(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

A61P 1/14(2006.01)

A61P 39/06(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

A61P 15/00(2006.01)

A61P 39/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

山茱萸多糖的分离方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及山茱萸多糖的分离方法及其应用。分离山茱萸多糖的方法包括如下步骤：①原料用水漂洗；用水于煎煮两次，过滤，合并滤液；②滤液用大孔吸附树脂动态吸附处理，吸附除去脂溶性成份和苦涩性物质，得到口味微甜的流出液，将流出液浓缩成流膏状浓缩物；③流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理，接着将所得沉淀用乙醇洗涤，干燥，得到山茱萸多糖。还涉及所述山茱萸多糖的生物学用途以及包含所述山茱萸多糖的组合物。本发明山茱萸多糖呈现如说明书所述诸多有益效果，例如其能够补肾阳，抗皮质激素副作用，抗氧化，抗肿瘤，提高免疫力，提高生命活力，改善性功能。可用来制成补益类口服液，或制作补益类保健饮料及保健酒等，应用前景广阔。

1. 测试山茱萸多糖中莫诺苷和马钱苷的含量的方法,该方法包括如下步骤:

照中华人民共和国药典2015年版四部通则0512所载高效液相色谱法的规范测定;

色谱条件与系统适用性试验:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈为流动相A,以0.3%磷酸溶液为流动相B,按以下规定进行梯度洗脱:0~20分钟期间流动相A为7%且流动相B为93%,20~50分钟期间流动相A从7%线性增加到20%且流动相B从93%线性减少到80%;检测波长为240nm;柱温为35℃;理论板数按马钱苷峰计算应不低于10000;

对照品溶液的制备:取莫诺苷对照品、马钱苷对照品适量,精密称定,加80%甲醇制成每1ml各含10μg的混合溶液,即得;

山茱萸药材供试品溶液的制备:取过三号筛的山茱萸药材粉末0.05g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇25ml,称定重量,加热回流1小时,放冷,再称定重量,用80%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得;

山茱萸多糖供试品溶液的制备:取山茱萸多糖0.5g,精密称定,置10ml量瓶中,加流动相A与流动相B以体积比20:80的混合液使溶解,定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得;

测定法:分别精密吸取对照品溶液、山茱萸药材供试品溶液与山茱萸多糖供试品溶液各10μl,注入液相色谱仪,记录色谱图,用外标法以峰面积计算药材和山茱萸多糖中的莫诺苷(C₁₇H₂₆O₁₁)和马钱苷(C₁₇H₂₆O₁₀)。

2. 分离山茱萸多糖的方法,该方法以山茱萸的成熟果肉为原料,包括如下步骤:

①将原料用水漂洗以除去灰尘;用3~4倍量的水于50~100℃煎煮两次,每次30~90分钟,过滤,果渣任选用3~4倍量的热水洗涤一次,合并两次滤液和洗液;

②滤液采用大孔吸附树脂动态吸附处理,吸附除去脂溶性成份和苦涩性物质,得到口味微甜的流出液,将流出液浓缩成流膏状浓缩物;

③流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理,醇沉时使用浓度为70-90%的乙醇,接着将所得沉淀用95%的乙醇洗2次,真空干燥,得到山茱萸多糖。

3. 根据权利要求1的方法,其中步骤①所述的水煮温度为80~100℃,时间为1小时。

4. 根据权利要求1的方法,其中步骤②所述大孔吸附树脂动态处理所用树脂是选自下列中的两种树脂的联用动态吸附:X-5、D101、AB-8、NKA-9、XAD-2、XAD-4、XAD-7、XAD-8。

5. 根据权利要求1的方法,其中步骤②所述大孔吸附树脂动态处理时,水煮滤液先经树脂NKA-9动态吸附,再经树脂X-5动态吸附,去除非多糖的物质。

6. 根据权利要求1的方法,其中步骤③所述流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理,醇沉使乙醇浓度达到80-85%。

7. 根据权利要求1的方法,其包括如下步骤:

①取山茱萸干果肉,用水漂洗两次,除去灰尘,以4倍量的水80~100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液,以3倍量的水80-100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液;再以3倍量热水洗渣一次;合并洗液和两次煎煮液,过滤,制成澄明滤液;

②澄明滤液采用大孔吸附树脂进行动态吸附处理,先以15:1比例大孔吸附树脂NKA-9动态吸附处理,再以30:1比例的大孔吸附树脂X-5动态吸附处理;

③流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理;醇沉时将95%的乙醇往浓缩水溶物里加,边加边搅动,使乙醇浓度达到80~85%,静置后过滤,收集沉淀,再以95%乙醇洗涤沉淀两次;真空干燥,得到山茱萸多糖。

8. 根据权利要求7的方法,其中动态吸附处理时以 α -萘酚试剂检测。

9. 权利要求2-8任一项所述方法制得的山茱萸多糖在制备用于产生下列生理功能的产品中的用途:补肾阳、抗皮质激素副作用;抗自由基;抗肿瘤;提高免疫;壮阳,改善性功能;增强生命活力;在一个实施方案中,所述产品是呈口服液或保健饮料或保健酒的形式。

10. 一种组合物,其是呈口服液或保健饮料或保健酒的形式,该组合物中包括权利要求2-8任一项所述方法制备得到的山茱萸多糖,以及任选的生理学可接受的载体。

山茱萸多糖的分离方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于中药化学领域,涉及一种中药有效部位,特别是涉及一种山茱萸的有效部位,更特别的是涉及山茱萸多糖的分离、纯化及其应用。

背景技术

[0002] 山茱萸是山茱萸科灯台树属植物山茱萸(*Cornus Officinalis* Sieb.et Zucc)的成熟干燥果肉。味苦涩,性温。功能补肝益肾、涩肠固脱,是中医临床常用的四十种骨干药物之一。本品的记载首见于公元前3—4世纪成书的中药典籍《神农本草经》,列为中品,云其“主心下邪气,寒热,温中,主风寒湿痹,去三虫,久服轻身。”山茱萸的应用,除广泛作为饮片入药,更作为六味丸类的成分之一而入丸剂。其中水溶性多糖这一有效部位,则因苦涩味的存在使应用受到阻碍,成为进一步开发的瓶颈。

[0003] 山茱萸的主产区在河南省伏牛山南麓至陕西省秦岭一带,浙江省天目山亦有出产。全国丰年产量达到1千万公斤,仅河南西峡县产量即突破100万公斤。它是我国重要的天然资源,药用价值相当可观。但因供过于求,开发的瓶颈问题没有解决,导致产品长期大量积压。本发明人曾统计了国家商务部电子商务平台—《中药材诚实通》2016年12月24日发布的112条山茱萸商品信息,全国尚未售出的山茱萸饮片达18554630公斤,相当于积压接近两年的山茱萸产量。山茱萸价格由二十世纪九十年代每公斤250元,降至现在的每公斤27元,四川省泸州市出售的最低价是每公斤17.5元。以上现状,大大挫伤了山茱萸药农栽培药树,脱贫致富的积极性,也不利于山茱萸药用价值的进一步推广。为此,山茱萸有效部位的研究和口味改良任务,仍是本领域技术人员迫切期待有相关技术进展。

发明内容

[0004] 本发明的目的:是对山茱萸果肉中水溶性多糖进行提取分离,同时对它的应用价值进行考查。建立一种简单可行、易于操作、易于实现产业化的方法,达到山茱萸脂溶性、水溶性两有效部位的分离,去除苦涩味,为山茱萸水溶性多糖的深入开发应用奠定基础。

[0005] 本发明所用的材料,是山茱萸的干燥成熟果肉(饮片)。这种饮片是通过如下方式获得的:山茱萸科灯台树属植物的山茱萸(*Cornus Officinalis* Sieb.et Zucc),于每年9—11月果实呈红色时成熟,分别采摘;接着可照如下水煮法进行加工:将红色鲜果置80℃水中煮10~15分钟,趁热及时捞出,挤出种子,晒干制成干燥果肉,为山茱萸饮片。我们所用山茱萸饮片,来源为河南产。

[0006] 山茱萸有效成分的纯化研究,报道较多的脂溶性提取物有:总皂苷、马前苷、环烯醚萜苷、熊果酸、鞣酸等,多为苦涩味成分;而水溶性多糖及其报导较少涉及。文献报道的山茱萸多糖的提取方法有:水提醇沉、超声法、热水浸泡在碱性条件下提取等,以上处理方法均未解决去掉山茱萸苦涩味的问题。本发明采用大孔吸附树脂双树脂联用动态吸附法,一举分离多糖与脂溶性成分,并去掉了苦涩味,为进行山茱萸水溶性成分开发应用奠定了基础。

[0007] 为此,本发明第一方面提供了一种山茱萸多糖的分离方法,该方法以山茱萸的成熟果肉为原料,包括如下步骤:

[0008] ①将原料用水漂洗以除去灰尘;用3~4倍量的水于50~100℃煎煮两次,每次30~90分钟,过滤,果渣任选用水3~4倍量的热水洗涤一次,合并两次滤液和洗液(得混合液);

[0009] ②滤液(即步骤①所得混合液)采用大孔吸附树脂动态吸附处理,吸附除去脂溶性成份和苦涩性物质,得到口味微甜的流出液,将流出液浓缩成流膏状浓缩物;

[0010] ③流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理,醇沉时使用浓度为70~90%的乙醇,接着将所得沉淀用95%的乙醇洗2次,真空干燥,得到山茱萸多糖。

[0011] 根据本发明第一方面任一实施方案的方法,其中步骤①所述的水煮温度最优的为80~100℃,时间为1小时。

[0012] 根据本发明第一方面任一实施方案的方法,其中步骤②所述大孔吸附树脂动态处理所用树脂包括非极性的、低极性的、中等极性的。但优选的是非极性的和中等极性的,如国产的X-5、D101、AB-8、NKA-9,进口的Amberlite XAD系列的XAD-2、XAD-4、XAD-7、XAD-8等,进一步优选的是双树脂联用动态吸附。

[0013] 根据本发明第一方面任一实施方案的方法,其中步骤②所述大孔吸附树脂动态处理时,水煮滤液先经中等极性树脂(例如树脂NKA-9)动态吸附,再经非极性树脂(例如树脂X-5)动态吸附,去除非多糖的物质。凡属于非极性到中等极性的大孔吸附树脂,都在本发明的保护之列。

[0014] 根据本发明第一方面任一实施方案的方法,其中步骤③所述流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理,醇沉使乙醇浓度达到80~85%。

[0015] 根据本发明第一方面任一实施方案的方法,其包括如下步骤:

[0016] ①取山茱萸干果肉,用水漂洗两次,除去灰尘,以4倍量的水80~100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液,以3倍量的水80~100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液。再以3倍量热水洗渣一次。合并洗液和两次煎煮液,过滤,制成澄明滤液。

[0017] ②澄明滤液采用大孔吸附树脂进行动态吸附处理,先以15:1比例大孔吸附树脂NKA-9动态吸附处理,再以30:1比例的大孔吸附树脂X-5动态吸附处理(以 α -萘酚试剂检测)。经两次动态吸附处理得到的流出液,其口味微微酸甜,浓缩成流膏状。

[0018] ③流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理。醇沉时将95%的乙醇往浓缩水溶液里加,边加边搅动,使乙醇浓度达到80~85%,静置后过滤,收集沉淀,再以95%乙醇洗涤沉淀两次。真空干燥,得到山茱萸多糖。其收率以干燥山茱萸果肉计,可达25~30%。

[0019] 进一步的,本发明第一方面提供了本发明第一方面任一实施方案所述山茱萸多糖在制备用于产生下列生理功能的产品中的用途:补肾阳、抗皮质激素副作用;抗自由基;抗肿瘤;提高免疫;壮阳,改善性功能;增强生命活力。

[0020] 根据本发明第二方面的用途,其中所述产品是呈口服液或保健饮料或保健酒的形式。

[0021] 进一步的,本发明第三方面提供了一种组合物,其是呈口服液或保健饮料或保健酒的形式,该组合物中包括本发明第一方面任一实施方案所述方法制备得到的山茱萸多糖,以及任选的生理学可接受的载体。

[0022] 本发明任一方面或该任一方面的任一实施方案所具有的任一技术特征同样适用

其它任一实施方案或其它任一方面的任一实施方案,只要它们不会相互矛盾,当然在相互之间适用时,必要的话可对相应特征作适当修饰。下面对本发明的各个方面和特点作进一步的描述。

[0023] 本发明所引述的所有文献,它们的全部内容通过引用并入本文,并且如果这些文献所表达的含义与本发明不一致时,以本发明的表述为准。此外,本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义,即便如此,本发明仍然希望在此对这些术语和短语作更详尽的说明和解释,提及的术语和短语如有与公知含义不一致的,以本发明所表述的含义为准。

[0024] 本发明目的在于制备山茱萸多糖,这是一种水易溶性物质,其它水不溶性物质例如皂苷类(例如莫诺苷和马钱苷)虽然会存在其它生理活性,但是其混杂在本发明山茱萸多糖显然是不适宜的,从这个方面讲,本发明制备的山茱萸多糖期望这些皂苷类尽可能的少,以免影响本发明山茱萸多糖的生物学活性;山茱萸或者本发明制得的各种山茱萸多糖中的典型皂苷莫诺苷和马钱苷的含量可照高效液相色谱法进行;通过该高效液相色谱法测定一单位药材中莫诺苷和马钱苷两者(此二者在本发明中可称为总皂苷)的总量(记为第一总量),以及一单位药材经本发明方法制得的山茱萸多糖中莫诺苷和马钱苷两者的总量(记为第二总量),以第二总量除以第一总量再乘以百分之一百所得百分数即为总皂苷残余率;经计算,本发明下文实施例1-3方法制备的山茱萸多糖其总皂苷残余率均在百分之六点七至百分之八点三范围内,呈现较高的残余率;在本发明的补充实施例中,即在补充实施例1a、补充实施例2a、补充实施例3a、分别参照本文实施例1-3的方法,不同的仅是在步骤②用树脂进行吸附处理前的滤液中添加重量/体积百分数为百分之零点一五的氯化钠和重量/体积百分数为百分之零点零二的冰乙酸,最终得到三批山茱萸多糖,经测定,这三批山茱萸多糖其总皂苷残余率均在百分之零点六三至百分之零点九四范围内,显示总皂苷基本无残余;但是令人遗憾的是,在上述三个补充实施例中如果仅添加氯化钠和冰乙酸之一时,所得山茱萸多糖其总皂苷残余率均大于百分之五点八七,表明要有效降低多糖中的总皂苷含量时需要氯化钠和冰乙酸二者同时使用;另外经测定这三批补充实施例制得的山茱萸多糖中氯化钠和冰乙酸均无残余,均未检测到它们在山茱萸多糖中的存在;另外这三批补充实施例制得的山茱萸多糖在其它方面与实施例1-3所得山茱萸多糖无差异,例如收率均在百分之二十五至三十范围内;在下面试验例和制剂例中,如未特别说明所用的山茱萸多糖是补充实施例3a中制得的;因此,根据本发明任一方面的任一实施方案,其中在步骤②用树脂进行吸附处理前的滤液(即步骤①所得混合液)中添加重量/体积百分数为百分之零点一五的氯化钠和重量/体积百分数为百分之零点零二的冰乙酸。本发明用于测定山茱萸或者本发明所得各种山茱萸多糖中的典型皂苷莫诺苷和马钱苷的含量的高效液相色谱法如下:照中华人民共和国药典2015年版四部通则0512所载高效液相色谱法的规范测定;色谱条件与系统适用性试验:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈为流动相A,以0.3%磷酸溶液(且该酸溶液中还包含0.01%酒石酸)为流动相B,按以下规定进行梯度洗脱:0~20分钟期间流动相A为7%且流动相B为93%,20~50分钟期间流动相A从7%线性增加到20%且流动相B从93%线性减少到80%;检测波长为240nm;柱温为35℃;理论板数按马钱苷峰计算应不低于10000;对照品溶液的制备:取莫诺苷对照品、马钱苷对照品适量,精密称定,加80%甲醇制成每1ml各含10μg的混合溶液,即得;山茱萸药材供试品溶液的制备:取过三号筛的山

茱萸药材粉末0.05g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇25ml,称定重量,加热回流1小时,放冷,再称定重量,用80%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得;山茱萸多糖供试品溶液的制备:取山茱萸多糖0.5g,精密称定,置10 ml量瓶中,加流动相A与流动相B以体积比20:80的混合液使溶解,定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得;测定法:分别精密吸取对照品溶液、山茱萸药材供试品溶液与山茱萸多糖供试品溶液各10 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图,用外标法以峰面积计算药材和山茱萸多糖中的莫诺苷(C₁₇H₂₆O₁₁)和马钱苷(C₁₇H₂₆O₁₀)。上述HPLC法的各项方法学指标均符合本领域通常需要达到的范围,例如对于各种测试液(包括针对山茱萸药材,还包括针对本文实施例1-3方法所得山茱萸多糖以及本文补充实施例1a-3a方法所得山茱萸多糖的这些样品),其重复进样6次后计算此重复测试次数中马钱苷测试结果的变异性,以6次测定结果的峰面积之间的相对标准偏差RSD表示,各种试样测试马钱苷的RSD均小于0.3%,符合本领域对于此测定结果一般要求小于1%的要求。另外,当流动相B中不添加酒石酸时,对各种山茱萸药材和山茱萸多糖样品进行测试时,除马钱苷外,其它各项方法学指标均符合本领域通常需要达到的范围。然而,已经出人意料的发现,当流动相B中不添加酒石酸时,对各种山茱萸多糖样品(包括本文实施例1-3方法所得山茱萸多糖以及本文补充实施例1a-3a方法所得山茱萸多糖)测试时马钱苷的RSD均在1.7~2.2%范围内,表明流动相B中不添加酒石酸的HPLC法测试山茱萸多糖时马钱苷的方法学不能满足一般性要求,但在测试山茱萸药材时却未发现此缺陷;即,上述流动相B不添加酒石酸的HPLC法在测试山茱萸药材中的马钱苷时能满足一般测试要求,但是在测试山茱萸多糖中的马钱苷时却不能满足测试要求,这是完全出人意料的,表明在用HPLC法测试山茱萸多糖中的马钱苷时在流动相B中添加少量酒石酸能够使测定结果达到符合要求的精密度。因此,在本发明的一个方面,提供了一种测试山茱萸多糖中莫诺苷和马钱苷的含量的方法,该方法包括上文所述HPLC法。本发明使用的山茱萸干燥果肉来源于农业第一线。本发明人采取了首先将干果漂洗两次,尽量去除灰尘和无关杂物。由于干果在挤出种子时已被挤破,所以不可以浸泡,更不可以用热水浸泡或洗涤,以免水溶性多糖进一步损失。接着以4倍量的水,在80~100℃煮60分钟过滤,收集滤液,再以3倍量的水80~100℃煮60分钟,并用2倍量的热水把渣子再洗一次,这样可以保证将山茱萸果肉中的水溶性部分充分浸煮出来。然后得到的水溶性成份,包括洗渣液,两次热煮滤液合并,冷却静置,再过滤,得到澄明的粗提液,其味苦涩。此粗提液中含有所有能用热水80~100℃可溶出的物质。其中除了多糖,也含有包括各式各样的低极性、中等极性、强极性的有机、无机的杂质,而且口味极其苦涩。除去这些除多糖以外的全部杂质,特别是从其中除去苦涩味的杂质,是本项发明的核心技术。我们采用了大孔吸附树脂双树脂联用动态吸附法,一举去除了全部脂溶性物质和苦涩味的物质,这是所有山茱萸研究文献中,甚至许多植物药多糖研究中不曾用过的。大孔吸附树脂双树脂联用动态吸附所用的树脂,包括非极性的、低极性、中等极性的大孔吸附树脂。这些树脂有国产的,也有进口的。例如国产的非极性的有X-5、D101、AB-8,中等极性的Amberlite-XAD7等。具体作法是,澄明的粗提取液以15:1的比例,首先用中等极性的大孔吸附树脂NKA-9动态吸附流出液收集(α -萘酚试剂检测),将此流出液再以30:1比例的大孔吸附树脂X-5动态吸附,流出液收集经两次动态吸附,得到的流出液。其口味微微酸甜,浓缩成流膏状。经此处理,所有在山茱萸果肉中原有的脂溶性成份和苦涩物质也全部去除。我们采用的这种大孔吸附树脂双树脂联用动态吸附法的优点,是把极性

最低的物质首先吸附在中等极性的树脂上,有利于树脂的再生利用;把极性相对较强的非多糖物质吸附在非极性的树脂上,同样有利于树脂的再生利用,并能更好地保证多糖的质量。解决了多糖的分离和去除苦涩味的问题,为山茱萸的进一步开发铺平了道路。山茱萸分离出水溶性多糖之后,其他水溶性成分,经分析有:葡萄糖、蔗糖、果糖、苹果酸、酒石酸、氨基酸、维生素、少量苷类及无机盐等。这些已知和常见物质,没有特殊的生理活性。经多糖常用的纯化方法,进行两次水溶、醇沉处理即可去除。我们采用的处理过程是:经大孔吸附树脂双树脂联用动态吸附处理,得到的流膏状浓缩物,再进行水溶,适当稀释,使能搅动。然后往其中加入95%的乙醇,边加边搅拌,直到乙醇的浓度达到80~85%,静置使充分沉淀、过滤。沉淀物适当水溶,重复醇沉操作,得到再沉淀后,用95%乙醇洗两次,真空干燥,获得山茱萸多糖。经分析为杂多糖,其收率以干燥山茱萸果肉计,可达25~30%。

具体实施方式

[0025] 通过下面的实施例可以对本发明进行进一步的描述,然而,本发明的范围并不限于下述实施例。本领域的专业人员能够理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可以对本发明进行各种变化和修饰。本发明对试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性和/或具体的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。以下实施例进一步说明本发明,而不是限制本发明。

[0026] 实施例1:制备山茱萸多糖

[0027] ①取山茱萸干果肉100克,用水漂洗两次,除去灰尘,以4倍量的水80~100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液,以3倍量的水80~100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液。再以3倍量热水洗渣一次。合并洗液和两次煎煮液,过滤,制成澄明滤液。

[0028] ②澄明滤液采用大孔吸附树脂进行动态吸附处理,先以15:1比例(药液与树脂重量比,下同)大孔吸附树脂NKA-9动态吸附处理,再以30:1比例的大孔吸附树脂X-5动态吸附处理(以 α -萘酚试剂检测)。经两次动态吸附处理得到的流出液,其口味微微酸甜,浓缩成流膏状。

[0029] ③流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理。醇沉时将95%的乙醇往浓缩水溶物里加,边加边搅动,使乙醇浓度达到80~85%,静置后过滤,收集沉淀,再以95%乙醇洗涤沉淀两次。真空干燥,得到山茱萸多糖。其收率以干燥山茱萸果肉计,可达25~30%。

[0030] 实施例2:制备山茱萸多糖

[0031] ①取山茱萸干果肉500克,用水漂洗两次,除去灰尘,以4倍量的水80~100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液,再以3倍量水80~100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液。再以4倍量的热水洗渣一次,合并洗液和两次滤液,过滤,制成澄明滤液。

[0032] ②澄明滤液采用大孔吸附树脂进行动态吸附处理,先以15:1比例大孔吸附树脂NKA9动态吸附处理,再以30:1比例的大孔吸附树脂X-5动态吸附处理(以 α -萘酚试剂检测)。经两次动态吸附处理得到的流出液,其口味微微酸甜,浓缩成流膏状。

[0033] ③流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理。醇沉时将95%的乙醇往浓缩水溶物里加,边加边搅拌,使乙醇浓度达到80~85%。静置后过滤,收集沉淀,再以95%乙醇洗涤沉淀两次。真空干燥,得到山茱萸多糖。其收率以干燥山茱萸果肉计,可达25~30%。

[0034] 实施例3:制备山茱萸多糖

[0035] ①取山茱萸干果肉1000克,用水漂洗两次,除去灰尘,以4倍量的水80~100℃煎煮60分钟,过滤,收集滤液。再以3倍量水80~100℃煎煮60分钟过滤,收集滤液。再以3倍量的热水洗渣一次,合并洗液和两次滤液,过滤,制成澄明滤液。

[0036] ②澄明滤液采用大孔吸附树脂进行动态吸附处理,先以15:1比例的大孔吸附树脂NKA9动态吸附处理,再以30:1比例的大孔吸附树脂X-5动态吸附处理(以 α -萘酚试剂检测)。经两次动态吸附处理得到的流出液,其口味微微酸甜,浓缩成流膏状。

[0037] ③流膏状浓缩物进行两次水溶、醇沉处理。醇沉时将95%的乙醇往浓缩水溶物里加,边加边搅拌,使乙醇浓度达到80~85%。静置后过滤,收集沉淀,再以95%乙醇洗涤沉淀两次。真空干燥,得到山茱萸多糖。其收率以干燥山茱萸果肉计,可达25~30%。

[0038] 试验例1:山茱萸多糖的毒性研究(山茱萸多糖的急性毒性试验)

[0039] 1.半数致死量(LD₅₀)测定:选用健康活泼昆明种小鼠30只,雌雄各半,分为3组。分别按0.045g/0.2ml/10g、0.056g/0.2ml/10g、0.07g/0.2ml/10g给予山茱萸多糖水溶液,相当于成人一日量的50、64、80倍,口服灌胃,观察7日。结果小鼠全部存活,未见毒副反应。于7日后拉颈处死动物,解剖胸腹腔,观察心、肝、脾、肺、肾、胃、肠等主要脏器,未见明显病理性改变,提示该药服用是安全的。

[0040] 2.最大耐受量测定(安全限度试验):选用健康活泼昆明种小鼠30只,雌雄各半,分为3组,按0.18g/0.5ml/20g山茱萸多糖量,在1日内各组分别口服灌胃1、2、3次,相当于成人量的100、200、300倍,连续7天。最后1天给第3组增加药量至最大药量、最大容积,然后拉颈处死动物,解剖观察各脏器有无病理改变。结果表明,对昆明种小鼠灌胃最大浓度、最大容积的山茱萸多糖量,相当于成人全日药量的315倍,药粉量为27g/kg,折算生药量为54g/kg,未见明显毒副反应及脏器病理改变,提示该药服用是安全的。

[0041] 试验例2:山茱萸多糖的毒性研究(山茱萸多糖的长期毒性试验)

[0042] 选用健康活泼Wistar大鼠80只,随机分为4组,每组20只,雌雄各半。给药3个组,分别按0.9g/kg、2.3g/kg、4.5g/kg给予山茱萸多糖水溶液,相当于成人量的10、25、50倍灌胃;对照组按10ml/kg,给予等量自来水灌胃。给药各组雌雄大鼠,1、3、5、7、9号,喂药78天停药,其余动物90天停药。在称重、检查血常规、肝肾功能、心电图后,处死全部动物,解剖胸腹腔,做心、肝、脾、肺、肾、胃、大小肠、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢等脏器的重量及病理检查。结果表明,山茱萸多糖服用后,动物生活质量提高,未见明显生理、生化、心电图和病理性改变。提示该药安全无毒,适合于长期口服给药。

[0043] 试验例3:山茱萸多糖的药理活性研究:

[0044] (1) 山茱萸多糖补肾阳,抗皮质激素副作用的研究

[0045] 实验应用氢化考的松复制的肾阳虚大鼠模型,对山茱萸多糖的溶液,进行了补肾阳作用的整体器官、细胞、分子生物学水平研究。结果表明:(1)山茱萸多糖能够提高肾阳虚大鼠的存活率,其中大、中剂量组的存活率分别为73.30%,46.67%,明显高于小剂量组、模型阳性药(西洋参蜂王浆)组和模型空白对照组,统计差异显著($P<0.05\sim0.01$)。提示较大剂量给予山茱萸水溶性多糖,有明显对抗皮质激素氢化考的松副作用,延长肾阳虚动物存活时间的功效。(2)服用山茱萸多糖的肾阳虚动物,精神状态改善,毛色浓密光泽,腹胀明显好转,提示生命质量提高。(3)使用氢化考的松后,动物肝脏重量增加,肝细胞呈现肿胀、变

性、坏死等病理改变,肝糖元含量下降,丙二醛(MDA)含量升高,表明肝脏受到损伤。服用山茱萸多糖后,肝脏重量接近正常,肝细胞病理改变减轻,肝糖元含量升高,丙二醛含量下降,表明山茱萸多糖能够抗肾阳虚所致肝脏损害。(4)肝细胞RNA含量的多少与细胞的功能状态及细胞修复能力有密切关系。药物在大、中剂量组动物肝脏RNA含量明显高于模型、空白对照组,证明山茱萸多糖有改善肾阳虚动物肝细胞功能,促进肝细胞损伤修复的作用。(5)药物有升高大鼠睾丸间质细胞RNA含量的作用,与模型空白对照组、正常空白对照组相比,差异有显著性($P<0.005$)。提示山茱萸多糖能够补肾添精。(6)氢化考的松能使肾上腺皮质细胞产生肿胀、变性、坏死等病理改变,服用药物大、中剂量,可以保护肾上腺皮质细胞,使其损伤程度减至最低限度,提示山茱萸多糖有对抗肾阳虚所致肾上腺皮质病理损伤的作用。以上结果证实,山茱萸多糖对于阴虚及阳的动物,确有补益肾阳,抗皮质激素副作用,从整体、器官、细胞、分子水平改善生命质量的功效。

[0046] (2) 山茱萸多糖抗肿瘤作用的研究

[0047] 实验采用山茱萸多糖与HL—60白血病细胞共同培养,MTT法测定,观察山茱萸多糖对HL—60细胞增殖的抑制作用,用Hoethst 33258染色,在荧光显微镜下观察细胞核的形态变化;琼脂糖凝胶电泳法和流式细胞仪测定法,定量检测细胞凋亡。结果:山茱萸多糖 $25\sim 1000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 呈剂量依赖性抑制HL—60细胞增殖。山茱萸多糖作用48h后,荧光显微镜下HL—60细胞固缩、凝聚和断裂,DNA琼脂糖凝胶电泳可见明显的DNA梯带,流式细胞分析图上出现凋亡峰。结论:山茱萸多糖可诱导HL—60细胞凋亡,具有抗肿瘤作用,且呈药物浓度依赖性。

[0048] (3) 山茱萸多糖对老化小鼠脾淋巴细胞产生白细胞介素—2(IL—2)及其基因表达影响的研究

[0049] 实验选用C57BL/6J小鼠,2月龄为青年对照组,24月龄分二组(老年对照组和老年给药组),山茱萸多糖 $200\text{mg}/\text{kg}$ 灌胃,每日1次,连续两个月,对照组灌胃蒸馏水。结果表明:(1)3H—TdR和3H缬氨酸掺入,可显著增加老化小鼠脾淋巴细胞蛋白和DNA合成,与同龄对照组相比,其蛋白合成率增加 27.2% ($P<0.01$),DNA增殖率增加 18.2% ($P<0.05$)。提示该药对老化动物脾淋巴细胞蛋白及核酸合成有促进作用,(2)用IL—2依赖细胞株CTLL—20测定,与同龄组相比,IL—2活性提高了 14.9% ($P<0.05$)。(3)用K562细胞系测定NK细胞活性,与对照组相比,其活性提高了 52.6% 。(4)对老年小鼠脾淋巴细胞IL—2基因表达的影响:用缺口翻译试验,将 ^{32}P —dCTP标记IL—2 C DNA探针,与细胞总RNA印迹杂交,测定IL—2mRNA水平,证明了山茱萸多糖提高老年小鼠IL—2水平,主要是控制了IL—2的基因表达。

[0050] (4) 山茱萸多糖对小鼠造血生长因子—集落刺激因子(CSFs)影响的研究

[0051] 使用常规动物模型进行,结果表明,山茱萸多糖能使混合淋巴细胞反应(LPS)激活的小鼠腹腔巨噬细胞产生CSFs的作用增强,在 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,增强作用最大。

[0052] (5) 山茱萸多糖对外周血超氧化物歧化酶(SOD)水平影响的研究

[0053] 使用常规动物模型进行,结果表明,C57BL/6J小鼠每日口服 200 、 $100\text{mg}/\text{kg}$ 山茱萸多糖,连续两周,外周血SOD含量明显提高,达 $79.7\%\sim 93\%$,高于维生素E对照组的 28.1% ($P<0.01$),提示该药有抗氧化作用。

[0054] (6) 山茱萸多糖对小鼠常压缺氧耐力影响的研究

[0055] 使用常规动物模型进行,结果表明,口服中剂量药物($0.9\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$),能够延长小

鼠大气常压状态下的耐缺氧存活时间,优于阳性药(人参蜂王浆)对照组和空白对照组 ($P < 0.05$).提示药物可提高机体血氧利用率,降低机体耗氧量,改善机体缺氧状态。

[0056] (7) 山茱萸多糖对大鼠交配功能影响的研究

[0057] 使用常规动物模型进行,结果表明,服药后Wistar雄性大鼠对雌鼠的捕捉次数增加,尤以大剂量组为明显。与自来水空白对照组之间有显著性差异 ($P < 0.05$),西洋参蜂王浆阳性药对照组作用不显著。提示山茱萸多糖大剂量有一定壮阳作用。

[0058] (8) 山茱萸多糖对雄性大鼠阴茎勃起时间影响的研究

[0059] 使用常规动物模型进行,结果表明,Wistar雄性大鼠服用山茱萸多糖大、中小剂量后,电刺激引起的阴茎勃起所需时间明显缩短,与空白对照组相比统计学差异非常显著 ($P < 0.01$),提示该药有较强的改善性功能作用。

[0060] 试验例4:山茱萸多糖的初步临床研究:

[0061] 将山茱萸多糖制成的口服液(每瓶10ml,含山茱萸多糖3克),用于治疗正在内服强的松的肾病综合征患者6例,每次10ml,1日3次给药,疗程1月。结果与未服口服液的6例肾病综合征患者相比,山茱萸多糖组满月脸、向心性肥胖、痤疮、疲乏四项症状明显改善。

[0062] 制剂例1:山茱萸多糖口服液

[0063] 将山茱萸多糖加水溶解制成每10ml含山茱萸多糖3克的口服液。额外的试验证明,该口服液在用于治疗因服用皮质激素而致的柯兴氏综合征,肿瘤放、化疗后免疫功能低下症,男性性功能障碍等方面具有优异的效果。

[0064] 制剂例2:山茱萸多糖保健酒

[0065] 将山茱萸多糖加38度白酒溶解制成每10ml含山茱萸多糖2克的保健酒。额外的试验证明,该保健酒在用于提高中老年人的生命质量,改善肾阳虚症状,减少慢性疾病的发生等方面具有优异的效果。