



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103936698 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201410046542. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 06. 26

C07D 307/12 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07D 317/54 (2006. 01)

10-2009-0048065 2009. 06. 01 KR

A61K 31/341 (2006. 01)

A61K 31/36 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61P 3/04 (2006. 01)

200980160739. 6 2009. 06. 26

A61P 3/10 (2006. 01)

(71) 申请人 朝鲜大学校产学协力团

A61P 3/00 (2006. 01)

地址 韩国光州广域市

A23L 1/30 (2006. 01)

申请人 株式会社爱茉莉太平洋

(72) 发明人 吴元根 阮非红 黎氏文秋

姜厚远 申宜锡 崔镇圭 徐大方

李尚骏

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 何冲 万志香

权利要求书1页 说明书13页 附图4页

(54) 发明名称

用于预防或治疗肥胖或代谢综合征的组合物

(57) 摘要

本发明涉及 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物, 其可以激活从肉豆蔻获得的 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK), 还涉及一种组合物, 其包含作为活性成分的 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物, 用于预防或治疗例如肥胖的代谢综合征。更为具体地, 本发明涉及 AMPK 激活的化合物, 其包含 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物中的一种化合物, 所述化合物通过使用 30% 或更少的乙醇溶液提取肉豆蔻并通过色谱法分离和提纯而得, 如以下化学式 (1) 所示, 还涉及一种组合物, 其包含作为活性成分的 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物, 用于预防或治疗由 AMPK 酶的激活引起的代谢综合征, 如肥胖、糖尿病、高胆固醇血症和心肺疾病。

1. 用于预防或治疗肥胖或代谢综合征的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含作为活性成分的、选自甘密树脂素 B、甘密树脂素 A、肉豆蔻素 C-1、verrucosin、三白脂素和四氢呋喃愈创木素中的至少一种。

2. 根据权利要求 1 所述的用于预防或治疗肥胖或代谢综合征的药物组合物,其特征在于,所述组合物能提高 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 的活性。

3. 选自甘密树脂素 B、甘密树脂素 A、肉豆蔻素 C-1、verrucosin、三白脂素和四氢呋喃愈创木素中的至少一种物质在制备用于预防、改善或治疗肥胖或代谢综合征的组合物中的用途。

用于预防或治疗肥胖或代谢综合征的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种木脂素类化合物,其可以激活从豆蔻(肉豆蔻)中获得的 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK),而且涉及一种组合物,其包含作为活性成分的木脂素类化合物。更具体地,本发明涉及 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物,其可以通过 10-30% 乙醇水溶液从肉豆蔻中提取而得,它可以激活 AMPK 并能够有效地预防和/或治疗代谢综合征如肥胖、糖尿病、高血脂症及心血管疾病,而且本发明涉及一种用于治疗和预防由 AMPK 的激活介导的疾病的组合物,其包含作为活性成分的 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物。

背景技术

[0002] 由于近年来经济的发展和水平的提高,饮食生活得到改善,同时热量的摄入量在迅速增加。然而,通过运动无法消耗足够的热量,从而导致肥胖的增加。肥胖不仅对于更喜欢苗条身材的年轻人无魅力,而且据报道当肥胖继续下去时,将导致各种成人病,如高血压、糖尿病、高血脂症、冠状动脉疾病等,也会引发乳腺癌、子宫癌、结肠癌,因此如今将肥胖视为一种严重的疾病(*J. Biol. Chem.*, 273, 32487-32490 (1998); *Nature*, 404, 652-660 (2000))。

[0003] 目前,用于治疗肥胖的药物大致分为通过作用于中枢神经系统影响食欲的药物及通过作用于胃肠道抑制吸收的药物。作用于中枢神经系统的药物包括那些能抑制血清素 (5-HT) 神经系统的药物,如芬氟拉明、右芬氟拉明等;那些作用于去甲肾上腺素神经系统的药物,如麻黄素、咖啡因等;以及同时作用于血清素及去甲肾上腺素系统用于抑制肥胖的药物,如西布曲明等。另外,作为通过作用于胃肠道来抑制肥胖的药物,奥利斯特是典型的例子,其通过抑制在肠道中的脂肪酶来减少脂肪的吸收,并被批准用于治疗肥胖。然而,其中芬氟拉明等由于副作用如肺高血压或心脏瓣膜疾病已退出市场,其它药物由于引起血压降低、乳酸酸中毒等问题,对具有心力衰竭或肾脏疾病的患者是不适用的。

[0004] 因此,为了找到用于治疗肥胖的更好的方法,发明人被能量代谢的调节机制所吸引。由于预防和/或治疗代谢综合征的药剂会花费很长一段时间,而且药物靶标为参与能量调节的线粒体,因此相比指向其他药物靶标的药物,所述药物应该具有更高的安全性(如更低的毒性)。由此,发明人探索出一种药剂,其能够激活来自天然产品的酶 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK)。

AMPK 是一种激酶,其活性受如营养、运动、压力等的细胞能量状态 (AMP/ATP 的比值) 的调节。众所周知,酶通过调节参与细胞能量代谢的酶的磷酸化来影响各种生理过程,包括葡萄糖转换、脂肪酸合成、胆固醇合成等(*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 185-210, 2007)。

[0005] 据最近的报道,AMPK 参与由运动刺激的肌肉细胞的葡萄糖的摄取,而且众所周知,AMPK 起监控细胞的能量潜力的传感器作用。在运动时或在饥饿状态下,肌肉细胞、肝细胞和脂肪细胞停止合成脂肪和糖原,以便能够供应必要的能量,并且通过降解贮存的脂肪向

机体提供所需的能量。同时,这种酶被认为是从脂肪细胞分泌瘦素和脂联素的细胞内信号传感器。特别地,人们认为在肥胖者体内观察到的低含量的脂联素与由肥胖诱发的抗胰岛素性密切相关,因此,AMPK 激活剂成为有希望的肥胖的药物靶标 (*Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8(10), 774-785, 2007)。

[0006] 曾经在不了解机理的情况下,将二甲双胍用作口服抗糖尿病的药物。当了解所述药物可以激活 AMPK 后,很多企业开始研发 AMPK 的药物靶标。在 2008 年,澳大利亚的 Garban 等称从苦瓜中提取的 4 种成分可以激活以参与人体的代谢调节而著名的 AMPK 酶 (*Chem. Biol.*, 15(5), 263-273, 2007)。

[0007] 通常,在新药的开发方法中,从用于传统药学的天然药物的探索新的活性成分的方法要比通过实验改变现有药物的方法更有可能取得成功。由于所述活性成分已使用很久,所以在毒性问题上所得药物相对安全。

[0008] 豆蔻树(肉豆蔻)为肉豆蔻科的常绿树木,产于苏门答腊和爪哇。它是一种雌雄异株的、生长高度约 10-20m 的植物。果实为椭圆形,种子被红色果肉所覆盖,所述种子被称为肉豆蔻。肉豆蔻长期以来被用作食品中的调味料,如调味汁。在东方医学中,肉豆蔻被用作芳香健胃剂,以治疗腹泻、腹胀、呕吐、食欲不振等。

[0009] 本发明的发明人已从肉豆蔻中分离出 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物,而且发现这些化合物能够激活 AMPK 酶且向动物进行给药时表现出其活性。从而发现本发明的化合物可以用于包括肥胖的代谢综合征。

[0010] 然而,据报道称给药高剂量的肉豆蔻会引发急性毒性。所述肉豆蔻提取物中含有有毒的烷基苯衍生物,包括肉豆蔻醚、榄香素和黄樟油素。已知这些物质会在人体内转变为苯异丙胺衍生物,并且表现出与精神药物相似的有毒活性。传统上,将肉豆蔻在石灰水中浸泡一天左右并予以加热干燥,以减缓其毒性。

[0011] 在肉豆蔻中含量最多的有毒物质为肉豆蔻醚 (*Yagaku Zasshi*, 128(1), 129-133, 2008)。据报道,肉豆蔻的甲醇提取物中平均含有 2.1% 的肉豆蔻醚 (*Natural Toxins*, 5, 186-192, 1997; *Korean Journal of Pharmacognosy*, 38(1), 19-21, 2007)。

[0012] 本发明的发明人已确立了一种提取条件,在该条件下从肉豆蔻中提取的活性成分的含量最高,而肉豆蔻醚的含量最低,进而开发用于预防和治疗包括肥胖的代谢综合征的组合物。

[0013] 关于相关肉豆蔻提取物馏分的在先专利,包括“用于抑制胆固醇酯酶的、含有草药提取物的组合物(韩国专利登记号 399529)”、“用于预防或治疗糖尿病的、含有作为活性成分的中草药提取物的药物组合物(韩国专利登记号 795976)”和“用于预防或治疗冠状动脉心脏病或动脉硬化的、含有作为活性成分的中草药提取物的药物组合物(韩国专利登记号 793204)”。然而,这些专利仅仅使用了肉豆蔻提取物本身,而没有阐明其活性成分,因此与基于包含于肉豆蔻提取物中的活性化合物的本发明不是很接近。

[0014] 与包含于肉豆蔻提取物中的活性化合物有关的在先专利包括“用于抑制由抗癌剂诱导的毒性的抑制剂及含有该抑制剂的抗癌组合物(韩国专利登记号 646574)”、“用于治疗或预防痤疮的、含有作为活性成分的木脂素类化合物的组合物(韩国专利登记号 567431)”、“用于保护肝脏、治疗肝脏疾病的药物组合物(韩国专利登记号 619498)”、“用于治疗或预防

炎症性疾病的含有木脂素类化合物的药物组合物(韩国专利登记号 579752)”、“用于治疗或预防 2 型糖尿病的药物组合物(韩国专利登记号 627643)”、“用于治疗或预防 PPAR α 介导的疾病的、含有其作为活性成分的肉豆蔻木酚素或医学上可接受的盐的药物组合物(韩国专利登记号 830192)”和“用于治疗或预防神经性脑血管疾病的、含有木脂素的药物组合物(韩国专利登记号 679306)”。这些专利公开了肉豆蔻木酚素的各种活性,但在结构和性质上都与本发明公开的活性化合物 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素的活性不同。

[0015] 虽然韩国专利公开号为 2008-112090 的公开了用于糖尿病或 PPAR γ 介导的疾病的作为活性成分的奥斯托百木酚素 7 (austobailignan 7),但在本发明公开的提取条件下没有发现所述化合物。韩国专利号 2008-112090 公开的药物作用机理是基于 PPAR γ 的激活,等同于作为抗糖尿病口服药物的格列酮(glitazone)基药物的作用机理。然而,众所周知所述药物在治疗时,增加脂肪细胞的数目,具有诱导肥胖的副作用。

[0016] 相比之下,本发明的 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物是以激活 AMPK 的机理为基础的且能够促进能量代谢,进而用于预防和治疗肥胖和代谢综合征,这不同于 PPAR γ 的激活,没有与 PPAR γ 的激活相关的副作用。

[0017] 发明人在相同的时间段给动物口服等同浓度的肉豆蔻木酚素或甘密树脂素 B 后,将本发明中所述的 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物之一的甘密树脂素 B 与韩国专利号 83192 (在肉豆蔻相关专利中,与本发明最接近)的肉豆蔻木酚素的活性进行比较。结果表明,他们证实甘密树脂素 B 具有更好的活性。

[0018] 与在先专利不同,为了从肉豆蔻中最大化地提取所述活性物质 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素,同时最小化地提取有毒物质肉豆蔻醚和榄香素,本发明使用 10-30% 乙醇水溶液作为提取溶剂,提供一种用于预防和治疗包括肥胖的代谢综合征的新型肉豆蔻提取物的组合物。同时,本发明的发明人通过离子交换树脂进一步去除包含在肉豆蔻提取物中的痕量的肉豆蔻醚。

[0019] 发明人已从肉豆蔻的 10-30% 乙醇提取物中提取 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物,并使用 C2C12 细胞株通过测量被激活的 AMPKs、p-AMPK 和 p-ACCs(ACC1 和 ACC2)研究它们的活性。作为代表性的化合物,他们为用于肥胖和代谢综合征的药物开发模型测量了甘密树脂素 B,并对所述化合物的活性予以确认。

发明内容

[0020] 本发明涉及提供一种包含肉豆蔻提取物的、有效地用于预防和治疗肥胖或代谢综合征的组合物,所述肉豆蔻提取物包括至少一种 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物,该化合物具有 AMP 激活的蛋白激酶(AMPK)的激活活性且其中含有最少量量的有毒物质——肉豆蔻醚。

[0021] 本发明又涉及提供一种有效地用于预防和治疗肥胖或代谢综合征的、含有作为活性成分的一种或多种 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物的组合物,所述 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物从肉豆蔻中分离、提纯而得,且具有 AMPK 激活的活性。

附图说明

[0022] 通过以下对某些典型实施例的描述,结合附图,本发明的上述及其它目的、特征和优势将变得明显:

图 1 展示了从肉豆蔻提取物的活性馏分中获得的各化合物的高效液相色谱分析谱图,其中所述肉豆蔻提取物经 30% 的乙醇提取、并吸附至 Diaion HP-20 上而获得;

图 2 展示了通过 30% 乙醇提取的肉豆蔻提取物的高效液相色谱(HPLC)分析谱图;

图 3 展示了通过 75% 乙醇提取的肉豆蔻提取物的高效液相色谱分析谱图;

图 4 展示了通过 75% 甲醇提取的肉豆蔻提取物的高效液相色谱分析谱图;

图 5 展示了肉豆蔻的 30% 乙醇提取物通过 Diaion HP-20 的吸附及 80% 乙醇的洗脱获得的高效液相色谱分析谱图;

图 6 展示了 30% 肉豆蔻乙醇提取物通过 Diaion HP-20 的吸附及 90% 乙醇的洗脱而获得的高效液相色谱分析谱图;

图 7 展示了在使用从最终浓度为 10 μ g/mL 的肉豆蔻中分离出的 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物处理不同的 C2C12 细胞株后,用于确定 AMPK 活性的 p-AMPK 和 p-ACC 的测量结果;和

图 8 比较了口服给药甘密树脂素 B、肉豆蔻木酚素(作为对照)、或肉豆蔻的 30% 乙醇提取物 8 周后,在高脂肪饮食诱导的肥胖模型中体重的增加。

附图说明

[0023] 通过以下对某些典型实施例的描述,结合附图,本发明的上述及其它目的、特征和优势将变得明显:

图 1 展示了从肉豆蔻提取物的活性馏分中获得的各化合物的高效液相色谱分析谱图,其中所述肉豆蔻提取物经 30% 的乙醇提取、并吸附至 Diaion HP-20 上而获得;

图 2 展示了通过 30% 乙醇提取的肉豆蔻提取物的高效液相色谱(HPLC)分析谱图;

图 3 展示了通过 75% 乙醇提取的肉豆蔻提取物的高效液相色谱分析谱图;

图 4 展示了通过 75% 甲醇提取的肉豆蔻提取物的高效液相色谱分析谱图;

图 5 展示了肉豆蔻的 30% 乙醇提取物通过 Diaion HP-20 的吸附及 80% 乙醇的洗脱获得的高效液相色谱分析谱图;

图 6 展示了 30% 肉豆蔻乙醇提取物通过 Diaion HP-20 的吸附及 90% 乙醇的洗脱而获得的高效液相色谱分析谱图;

图 7 展示了在使用从最终浓度为 10 μ g/mL 的肉豆蔻中分离出的 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物处理不同的 C2C12 细胞株后,用于确定 AMPK 活性的 p-AMPK 和 p-ACC 的测量结果;和

图 8 比较了口服给药甘密树脂素 B、肉豆蔻木酚素(作为对照)、或肉豆蔻的 30% 乙醇提取物 8 周后,在高脂肪饮食诱导的肥胖模型中体重的增加。

具体实施方式

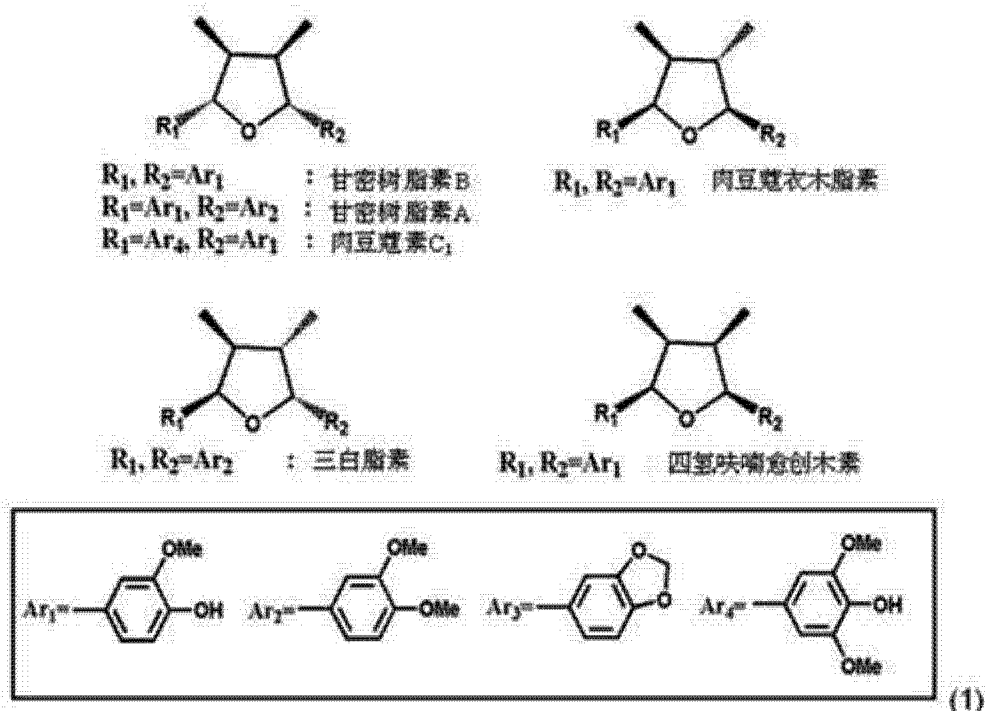
[0024] 本发明的发明人已检测各种野生植物和中草药中 AMP 激活的蛋白激酶(AMPK)激活的活性,并且选择肉豆蔻作为候选植物。

[0025] 他们已确立一种提取条件,在该条件下可以从肉豆蔻中提取高浓度的活性成分

2, 5-二芳基-3, 4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物,而使有毒物质肉豆蔻醚的浓度最小化,而且证实在此条件下提取的肉豆蔻提取物及2, 5-二芳基-3, 4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物具有高 AMPK 激活活性并能够抑制肥胖的诱因。

[0026] 同时,他们发现含有通过乙醇水溶液提取的肉豆蔻提取物的组合物,通过激活 AMPK 用于预防或治疗肥胖或代谢综合征,其中所述肉豆蔻提取物含有至少一种 2, 5-二芳基-3, 4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物(见化学式(1))。

[0027] 所述化合物可以用作治疗肥胖或糖尿病的制剂、预防肥胖或糖尿病的制剂、或激活 AMPK 的制剂。



[0028] 根据本发明的激活 AMPK 的药物组合物包含至少一种作为活性成分的上述化合物。

[0029] 可通过以下方式获得 AMPK 激活剂——包含于肉豆蔻中的 2, 5-二芳基-3, 4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物:将肉豆蔻磨碎并用乙醇水溶液萃取;用色谱法分离并提纯 AMPK 激活的 2, 5-二芳基-3, 4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物;研究获得的 2, 5-二芳基-3, 4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物的化学结构以及物理和化学性质;使用高效液相色谱法(HPLC)分析所述化合物;研究所述化合物的 AMPK 激活活性;和通过口服给药所述化合物的馏分进行动物实验。

[0030] 通过离子交换树脂可以进一步去除肉豆蔻的乙醇提取物中的痕量肉豆蔻醚,然后将 2, 5-二芳基-3, 4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物进行浓缩。更为具体地,所述用于去除肉豆蔻醚的离子交换树脂可以为未被取代的芳香基的合成吸附树脂,如 Diaion HP-20、SP825、AXT204、XAD1600T 或 MN200 (三菱化学 Mitsubishi Chemical)。

[0031] 本发明的发明人已通过物理和化学性质及核磁共振谱鉴别出,本发明的化合物为甘密树脂素 B (nectandrin B)、甘密树脂素 A (nectandrin A)、肉豆蔻素 C₁ (fragransin C₁)、肉豆蔻衣木脂素(verrucosin)、三白脂素(saucernetin) 和四氢呋喃愈创木素(tetrahydrofuroguaiacin),而且通过将所述化合物或含有所述化合物的馏分口服给药,

说明了在动物体内 AMPK 激活的活性。

[0032] 可通过有机溶剂(如乙醇、乙醚、丙酮等)提取法、使用正己烷和水的分馏法、柱色谱法、用于提取植物组分的已知方法、或上述方法的组合容易地从肉豆蔻中提取本发明的所述 AMPK 激活的化合物。如有需要,可以通过普遍采用的方法进一步提纯粗提物。

[0033] 本发明中采用的色谱法可以为硅胶柱色谱法、LH-20 柱色谱法、离子交换树脂色谱法、薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法等。

[0034] 由于本发明的所述 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物可以激活 AMPK,其可有效地用于预防和治疗肥胖或糖尿病。可以将具有良好的生物利用度的所述化合物用于有利地使用。由于所述 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物可以容易地从肉豆蔻中分离且具有良好的稳定性,其还可以用作食品或药品的添加剂。

[0035] 根据常用的方法可将本发明的含有肉豆蔻提取物的药物组合物制成口服剂型如粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、悬浮剂、乳剂、糖浆剂、喷剂等,或制成肠外剂型如栓剂或无菌注射液。含有所述提取物的组合物包括载体、赋形剂或稀释剂,如乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、皂荚胶、海藻酸钠、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、甲基对羟基苯、丙基羟基苯、滑石粉、硬脂酸镁或矿物油。制备时可以使用稀释剂或赋形剂,如填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等。用于口服给药的固体剂型包括片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂等,而且制备时可在其中混合一种或多种的赋形剂,例如淀粉、碳酸钙、蔗糖或乳糖、明胶等。而且,除使用简单的赋形剂之外,还可以使用润滑剂如硬脂酸镁或滑石粉。用于口服给药的液体剂型包括悬浮剂、内溶液、乳剂,糖浆等。除例如水和液体石蜡简单的稀释剂外,还可以包含各种赋形剂,例如润湿剂、甜味剂、芳香剂,防腐剂等。用于肠外给药的剂型包括无菌水溶液、非水溶液、悬浮剂、乳剂、冻干制剂、或栓剂。丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,注射用酯如油酸乙酯等,可用作非水溶液或悬浮剂。Witepsol、聚乙二醇、吐温 61、可可脂、劳林黄油、甘油明胶等可以用作栓剂基质。

[0036] 所述活性成分的给药剂量将根据对象的年龄、性别、体重,待治疗的具体疾病或生理状态,疾病或生理状态的严重程度、给药途径、和诊断而有所不同。基于这些因素确定给药剂量在本领域普通技术人员知识范围内。本发明的所述化合物的给药剂量为 0.01-2000 mg/kg/天,特别为 1-500 mg/kg/天。一天可以给药一次或几次。然而,上述剂量不会以任何方式限制本发明的范围。可通过各种途径将本发明的提取物给药至哺乳动物,包括小鼠、圈养动物和人类。所有可能的给药途径包括,例如口服给药、直肠给药、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、子宫内给药或侧脑室内给药。由于本发明的所述提取物几乎没有毒性和副作用,因此可以长期安全的给药,用于预防目的。

[0037] 本发明还提供用于预防肥胖的具有保健功能的食品,该食品含有肉豆蔻提取物及营养学上可接受的食品添加剂。本发明的具有保健功能的食品可以为片剂、胶囊剂、丸剂、液体等的剂型。可将本发明的化合物添加入,如各种食品、饮料、口香糖、茶、维生素复合物、功能性保健食品等之中。更为具体地,本发明提供具有保健功能的食品,其可用于预防和治疗肥胖或代谢综合征,且包含作为活性成分的肉豆蔻提取物及营养学上可接受的食品添加剂。

[0038] 通过乙醇水溶液提取的本发明的肉豆蔻提取物中含有低含量的有毒物质肉豆蔻

醚和高浓度的 AMPK 激活的 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物。由于肉豆蔻提取物是在根据本发明的提取条件下提取而得, 而且从中分离出的 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物可激活 AMPK, 进而可以预计其能够预防和治疗肥胖或代谢综合征。

[0039] 同时, 由于可以去除存在于肉豆蔻提取物中的有毒物质, 本发明能够有益地应用于医药、美容、食品等领域。

具体实施方式

[0040] 下面将说明实施例。以下实施例仅以说明为目的, 不用于限制本发明的范围。相反, 提供的实施例能使本发明变得更为清楚、完整, 并且使本领域的技术人员充分理解本发明。

[0041] < 实施例 1: 从肉豆蔻中提取含有低含量的肉豆蔻醚和高含量的甘密树脂素 B 的乙醇提取物的制备 >

将磨成粉末的肉豆蔻 (100g) 溶解于各溶液 (500mL, 见表 1) 中, 然后利用超声提取器在 2 小时内提取 3 次活性物质。使用相同的浓度的被分离的提取物的活性成分。利用 Sigma (Cat. No. M9237) 获取肉豆蔻醚。使用每种溶液提取所述肉豆蔻提取物, 并用高效液相色谱法 (Optima Pak C18 柱 4.6x250mm, 粒径 5 μ m, 流速 1mL/分, 紫外线检测: 260 nm) 通过 MeOH/H₂O (0-32 分: 63% MeOH, 32-37 分: 63 $\rightarrow$ 100% MeOH) 分析肉豆蔻醚。表 1 展示了使用不同的溶液提取的肉豆蔻提取物中肉豆蔻醚和甘密树脂素 B 的含量。

[0042] 表 1

提取溶液	含量	
	肉豆蔻醚	甘密树脂素B
水	0.19%	0.62%
10% 乙醇水溶液	0.31%	1.24%
20%乙醇水溶液	0.33%	2.98%
30%乙醇水溶液	0.45%	7.48%
40%乙醇水溶液	1.34%	2.79%
50%乙醇水溶液	1.48%	2.77%
75%乙醇水溶液	1.27%	2.95%
75%甲醇水溶液	1.85%	7.47%

如表 1 所示, 30% 乙醇提取物中含有平均 0.45% 的肉豆蔻醚, 大约是 75% 乙醇提取物的 1.27% 的三分之一, 而且在同等条件下 75% 甲醇提取物为 1.85%。而且, 使用 MeOH/H₂O (0-35 分: 60% MeOH, 35-60 分: 60 $\rightarrow$ 100% MeOH) 的高效液相色谱法 (Optima Pak C18 柱 4.6x250mm, 粒径 5 μ m, 流速 1mL/分, 紫外线检测: 260 nm) 的结果表明, 在 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物中甘密树脂素 B 的含量最高 (见图 1)。使用甘密树脂素 B 作为参考, 来比较肉豆蔻提取物中 2, 5- 二芳基 -3, 4- 二甲基四氢呋喃木脂素类化合物的含量。30% 或更少的乙醇提取物中含有更高含量的甘密树脂素 B, 如图 2-4 所示。

[0043] 因此,鉴于在最小化有毒物质的含量时使活性物质的含量最大化,使用 30% 或更少的乙醇从肉豆蔻中提取所述活性物质是最有效的。

[0044] < 实施例 2: 进一步从肉豆蔻乙醇提取物中去除肉豆蔻醚 >

使用 30% 的乙醇 (1,000 mL) 水溶液提取肉豆蔻 (500g), 并使其穿过离子交换树脂 Diaion HP-20 而吸附至树脂上 (500g)。然后, 分别使用 1 升的 50% 乙醇、60% 的乙醇、70% 的乙醇、80% 的乙醇、90% 的乙醇、100% 的乙醇和 100% 丙酮洗脱所述提取物。表 2 展示了经乙醇溶液和丙酮洗脱吸附于 Diaion HP-20 的甘密树脂素 B 和肉豆蔻醚的洗脱程度。

[0045] 表 2

洗脱液	洗脱液中的含量	
	肉豆蔻醚	甘密树脂素B
30%乙醇水溶液	0.04%	0.01%
50%乙醇水溶液	0.04%	0.1%
70%乙醇水溶液	0.04%	24.2%
80%乙醇水溶液	0.04%	61.0%
90%乙醇水溶液	0.66%	13.9%
100%乙醇	20.77%	1.0%
100%丙酮	13.71%	3.0%

如表 2 所示,用 80% 或更少的乙醇洗脱吸附于 Diaion HP-20 上的物质时,几乎检测不到肉豆蔻醚。

[0046] 使用相同的溶剂来监测作为 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物之一的甘密树脂素 B 的洗脱。如表 2、图 5 及图 6 所示,当使用 80% 乙醇作为洗脱液时,被洗脱的甘密树脂素 B 的浓度最高。

[0047] < 实施例 3: 从肉豆蔻中提取的化合物的辨别 >

在实施例 1 中,使用 ^1H -和 ^{13}C -NMR 分析通过高效液相色谱法从 30% 的乙醇肉豆蔻提取物中分离的 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物。从本发明的肉豆蔻中提取的 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物 (化合物 1-6) 的物理和化学性质如下。

[0048] 3-1. 四氢呋喃愈创木素 (化合物 1)

无色粉末; ^1H -NMR :ppm (500 MHz, CDCl_3) : δ 0.61 (6H, d, $J = 6.0$ Hz, 3- 和 4-Me)、2.67 (2H, m, 3- 和 4-H)、3.91 (6H, 3'- and 3''-OMe)、5.12 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, 2- 和 5-H)、5.59 (2H, s, 4'- 和 4''-OH)、6.90-6.99 (6H, m, 2'-, 5'-, 6'-, 2''-, 5''- 和 6''-H); ^{13}C -NMR :ppm (125 MHz, CDCl_3) : δ 11.7 (3- 和 4-Me)、41.5 (C-3 和 C-4)、55.8 (2 $\times$ OMe)、82.7 (C-2 和 C-5)、109.0 (C-2' 和 C-2'')、113.9 (C-5' 和 C-5'')、119.3 (C-6' 和 C-6'')、132.5 (C-1' 和 C-1'')、144.3 (C-4' 和 C-4'')、146.2 (C-3' 和 C-3'')。

[0049] 3-2. 三白脂素 (化合物 2)

无色油; ^1H -NMR :ppm (500 MHz, CDCl_3) : δ 0.63 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 4-Me)、1.01

(3H, d, $J = 6.5$ Hz, 3-Me)、2.33 (2H, m, 3- 和 4-H)、3.90-3.92 (6H, 3'- 和 3''-OMe)、4.65 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, 2-H)、5.46 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, 5-H)、5.58 (2H, s, 4'- 和 4''-OH)、6.77-6.99 (6H, m, 2'-, 5'-, 6'-, 2''-, 5''- 和 6''-H); $^{13}\text{C-NMR}$: ppm (125 MHz, CDCl_3): δ 9.42 (3-Me)、11.83 (4-Me)、43.4 (C-3)、47.6 (C-4)、55.8 (2 $\times$ OMe)、84.8 (C-2)、85.7 (C-5)、108.3 (C-2')、108.7 (C-2'')、113.9 (C-5')、114.0 (C-5'')、118.8 (C-6')、119.3 (C-6'')、132.6 (C-1')、135.0 (C-1'')、144.3 (C-4')、145.0 (C-4'')、146.3 (C-3'')、146.6 (C-3')。

[0050] 3-3. 肉豆蔻衣木脂素(化合物 3)

无色油; $^1\text{H-NMR}$: ppm (500 MHz, CDCl_3): δ 0.67 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 4-Me)、1.06 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 3-Me)、1.79 (1H, m, 3-H)、2.25 (1H, m, 4-H)、3.87-3.89 (6H, 3'- 和 3''-OMe)、4.36 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, 2-H)、5.10 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, 5-H)、6.80-6.96 (6H, m, 2'-, 5'-, 6'-, 2''-, 5''- 和 6''-H); $^{13}\text{C-NMR}$: ppm (125 MHz, CDCl_3): δ 14.8 (3-Me)、15.2 (4-Me)、45.9 (C-4)、46.8 (C-3)、56.4 (2 $\times$ OMe)、84.6 (C-2)、89.0 (C-5)、111.6 (C-2')、111.9 (C-2'')、115.7 (C-5')、116.1 (C-5'')、120.7 (C-6')、120.9 (C-6'')、133.0 (C-1')、133.8 (C-1'')、147.5 (C-4')、146.8 (C-4'')、148.6 (C-3'')、149.0 (C-3')。

[0051] 3-4. 甘密树脂素 B (化合物 4)

无色油; $^1\text{H-NMR}$: ppm (600 MHz, CDCl_3): δ 1.05 (6H, d, $J = 6.0$ Hz, 3- 和 4-Me)、2.35 (2H, m, 3- 和 4-H)、3.85 (6H, 3'- 和 3''-OMe)、4.53 (2H, d, $J = 5.4$ Hz, 2- 和 5-H)、5.74 (2H, brs, 4'- 和 4''-OH)、6.91 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, 5'- 和 5''-H)、6.93 (2H, dd, $J = 1.8, 7.8$ Hz, 6'- 和 6''-H)、6.99 (2H, d, $J = 1.8$ Hz, 2'- 和 2''-H); $^{13}\text{C-NMR}$: ppm (200 MHz, CDCl_3): δ 133.9 (C-1' 和 C-1'')、114.1 (C-2' 和 C-2'')、146.4 (C-3' 和 C-3'')、144.9 (C-4' 和 C-4'')、109.2 (C-5' 和 C-5'')、119.1 (C-6' 和 C-6'')、87.2 (C-2 和 C-5)、44.1 (C-3 和 C-4)、12.7 (3-Me 和 4-Me)、55.7 (-OMe $\times$ 2)。

[0052] 3-5. 甘密树脂素 A (化合物 5)

白色晶体; $^1\text{H-NMR}$: ppm (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.00 (3H, d, $J = 3.5$ Hz, 4-Me)、1.02 (3H, d, $J = 3.5$ Hz, 3-Me)、2.27 (2H, m, 3- 和 4-H)、3.80-3.86 (9H, s, 3 $\times$ OMe)、4.43 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, 2-H)、4.44 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, 5-H)、6.81-7.09 (6H, m, Ar-H); $^{13}\text{C-NMR}$: ppm (125 MHz, CDCl_3) δ : 13.1 (3-Me)、13.2 (4-Me)、45.6 (C-4)、45.5 (C-3)、56.1-56.3 (3 $\times$ OMe)、88.0 (C-5)、88.2 (C-2)、110.9 (C-2')、111.3 (C-2'')、112.7 (C-5')、115.5 (C-5'')、119.5 (C-6')、120.0 (C-6'')、135.1 (C-1')、136.4 (C-1'')、146.9 (C-4')、148.3 (C-4'')、149.9 (C-3'')、150.4 (C-3')。

[0053] 3-6. 肉豆蔻素 C-1 (化合物 6)

无色油; $^1\text{H-NMR}$: ppm (500 MHz, CDCl_3): δ 1.04 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 3-Me)、1.06 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 4-H)、2.32 (1H, m, 3-H)、2.34 (1H, m, 4-H)、3.88 (9H, 3'-, 5'- 和 3''-OMe)、4.50 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, 2-H)、4.52 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, 5-H)、5.47-5.58 (2H, br, s, 4'- 和 4''-OH)、6.67 (2H, br, s, 2'- 和 6'-H)、6.91-6.97 (3H, m, 2''-, 5''- 和 6''-H); $^{13}\text{C-NMR}$: ppm (125 MHz, CDCl_3): δ 12.9 (3-Me)、13.1 (4-Me)、44.0 (C-3)、44.5 (C-4)、56.3-55.8 (3 $\times$ OMe)、87.2 (C-2)、87.5 (C-5)、103.1 (C-2' 和 C-6')、102.9 (C-2'')、114.1 (C-5'')、119.3 (C-6'')、134.0 (C-1')、133.5 (C-1'')、145.1 (C-4')、146.4 (C-4'')、146.9 (C-3', C-5' 和 C-3'')。

[0054] < 测试实施例 1: 木脂素类化合物 1-6 的 AMPK 激活的活性的测量 >

通过 C2C12 成肌细胞株测量从实施例 3 的肉豆蔻提取物中分离且提纯的化合物 1-6 的激活活性。将 C2C12 细胞接种于 6 孔板内并用含有 10% 牛血清的 DMEM 培养基进行培养。然后,将所述培养基重新置于含有 1% 牛血清的 DMEM 培养基内,以诱导分化。将分化的细胞在无血清的 DMEM 下放置 16 小时,待使用样品处理后再培养 2 小时。之后,利用 SDS 样品缓冲液处理所述细胞并使其超声裂解。将所述细胞裂解液经受 10% SDS-PAGE 电泳分离,且通过半干转印系统将蛋白质固定于 PVDF 转印膜上。在室温下利用 5% 脱脂牛奶使所述转印膜反应 1 小时,且使用 AMPK 和磷酸化的 AMPK (磷酸 AMPK, Thr172) 抗体进行免疫印迹。同时,由于在能量代谢中提高的 AMPK 活性会增加 ACCs 的磷酸化(乙酰辅酶 A 羧化酶 1 和 2),在细胞裂解液中可以观察到磷酸化的 ACCs (磷酸 ACCs)。

[0055] 图 7 展示了从肉豆蔻提取物中分离的木脂素类化合物 1-6 的 AMPK 激活的活性。如图 7 所示,从肉豆蔻提取物中分离的木脂素类化合物 1-6 显示高水平的 AMPK 和 ACC 的活性。如图 7 所见,由于甘密树脂素 B 在 2,5-二芳基-3,4-二甲基四氢呋喃木脂素类化合物中展现高含量和高 AMPK 活性,在下面实施例中使用甘密树脂素 B。

[0056] < 测试实施例 2: 在饮食诱导的肥胖模型中抗肥胖的效果 >

[步骤 1] 样品的制备

每天将浓度为 100 mg/kg 的甘密树脂素 B、肉豆蔻木酚素和浓度为 100 mg/kg 的肉豆蔻的 30% 乙醇提取物进行口服给药。为了进行口服给药,将所述物质溶解于 5% 的甲基纤维素水溶液中 (*Sigma Co., USA*)。

[0057] [步骤 2] 测试组和体重减轻的效果

为进行测试准备 7 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠,每组各 10 只。在一周的适应期之后,将小鼠置于单独的笼子中并维持 12/12 小时的明暗周期 (从早上 7 点到下午 5 点进行照明)。测试组为:1) 高脂肪饮食组,2) 高脂肪饮食 +100 mg/kg/ 天的甘密树脂素 B 组,3) 高脂肪饮食 +100 mg/kg/ 天的肉豆蔻木酚素组和 4) 高脂肪饮食 +100 mg/kg/ 天的 30% 肉豆蔻提取物组。连续 8 周每天在规定的时间内(上午 10 时)口服给药一次相应的物质。每周量一次体重(上午 11 时)。经给药 8 周之后,分析测试组和对照组的体重。表 3 展示了经口服给药所述物质后的体重变化。

[0058] 表 3

	经口服给药后的体重变化(g)						
	14 天	21天	28天	35天	42天	49天	56天
高脂肪饮食	4.40 ± 0.63	6.68 ± 0.70	8.04 ± 0.88	10.13 ±0.87	11.49 ±0.88	12.50 ±0.87	13.40 ±0.92
甘密树脂素B +高脂肪饮食	2.73 ± 0.49	3.68 ± 0.63	4.39 ± 0.60	6.61 ± 0.62	7.44 ± 0.67	8.51 ± 0.80	8.89 ± 0.82
肉豆蔻木酚素+高脂肪饮食	4.00 ± 0.38	5.31 ± 0.54	6.52 ± 0.59	8.91 ± 0.72	9.70 ± 0.85	10.63 ±0.84	11.48 ±0.89
肉豆蔻30%乙醇提取物+高脂肪饮食	3.22 ± 0.28	4.33 ± 0.39	5.20 ± 0.49	7.13 ± 0.48	8.39 ± 0.39	9.12 ± 0.51	9.55 ± 0.50

经 56 天的给药后,肉豆蔻提取物 + 高脂肪饮食组和甘密树脂素 B + 高脂肪饮食组与高脂肪饮食组和肉豆蔻木酚素 + 高脂肪饮食组相比,显示出较少的体重增加,如表 3 和图 8 所示。高脂肪饮食组的体重增加为 13.40 g 时,甘密树脂素 B 组的体重增加为 8.89g。与高脂肪饮食组相比,在 95% 的置信度内其对体重增加的抑制是统计学上显著的。相比之下,肉豆蔻木酚素组显示体重增加为 11.48 克,与高脂肪饮食组相比对体重增加的抑制在统计学上不显著的。30% 肉豆蔻提取物组显示体重增加为 9.55g,与高脂肪食物组相比,在 95% 的置信度内,其对体重增加的抑制是统计学上显著的(见表 3)。

[0059] < 测试实施例 4: 毒性测试 >

4-1. 急性毒性

待大量给药从肉豆蔻中提取的活性物质后,测量其急性毒性(24 小时内)和死亡率。将 20 只 ICR 小鼠分成对照组(10)和测试组(10)。对对照组的小鼠只用聚乙二醇 400/ 吐温 80/ 乙醇 (8/1/1, 体积 / 体积 / 体积) 进行口服给药,而对测试组的小鼠用实施例 3 中从肉豆蔻中提取的活性馏分分 50 次,给药剂量为 100 mg/kg (例如 5g/kg) 进行口服给药。表 4 中列出口服给药 5g/kg 的肉豆蔻提取物或甘密树脂素 B 的结果。

[0060] 表 4

口服给药的物质	给药之后经过的时间 (小时)						
	3	6	9	12	15	18	24
对照组(30%乙醇水溶液)	存活	存活	存活	存活	存活	存活	存活
肉豆蔻的30%乙醇提取物	存活	存活	存活	存活	存活	存活	存活
甘密树脂素B	存活	存活	存活	存活	存活	存活	存活

如表 4 所示,经给药 24 小时后,对照组和肉豆蔻提取物及甘密树脂素 B 的测试组中的所有的小鼠都存活了下来。

[0061] 4-2. 器官和组织的毒性

对用于测试抗肥胖效果的 C57BL/6J 小鼠进行器官毒性测试。经对测试组给药甘密树脂素 B 或 30% 乙醇提取物,对对照组只进行溶剂给药 8 周之后,采血样并通过 Select E (Vital Scientific NV, the Netherlands) 进行谷氨酸丙酮酸转移酶 (GPT) 和血液尿素氮 (BUN) 水平的检测,以研究对个别器官 (组织) 的作用。表 5 中列出口服给药肉豆蔻的 30% 乙醇提取物或甘密树脂素 B 8 周之后的 GPT 和 BUN 的水平。

[0062] 表 5

口服给药的物质	经8周后的水平	
	GTP	BUN
对照组(30%乙醇)	1.9 mg/dL	2.1 mg/dL
肉豆蔻的30%乙醇提取物	2.3 mg/dL	2.2 mg/dL
甘密树脂素B	2.1 mg/dL	1.8 mg/dL

结果表明,没有观察到对照组与测试组的 GPT 和 BUN 水平的显著区别,已知 GPT 与肝中毒相关, BUN 与肾毒性相关 (见表 5)。而且,当准备动物肝脏和肾脏组织的切片,在光学显微镜下进行组织学观察时,也没有观察到特别的异常之处。

[0063] < 剂型实施例 1: 药物剂型 >

1-1. 片剂的制备

将本发明的肉豆蔻提取物或从中分离的化合物 (200g) 与乳糖 (175.9 g)、马铃薯淀粉 (180 g) 和胶体硅酸 (32 g) 混合。在其中加入 10% 明胶溶液后,粉碎混合物并使其通过 14 目筛。干燥之后加入马铃薯淀粉 (160 g)、滑石粉 (50 g) 和硬脂酸镁 (5 g),并将所得混合物制备成片剂。

[0064] 2-2. 注射液的制备

将本发明分离的化合物 (1g)、氯化钠 (0.6g) 和抗坏血酸 (0.1g) 溶解于蒸馏水中,并且制成 100 mL 的容积。将所得溶液置于瓶中并在 20 °C 下加热 30 分钟进行消毒。

[0065] < 剂型实施例 2: 食品剂型 >

2-1. 调味品的制备

使用 0.2-10 质量份的本发明的肉豆蔻提取物或用从中分离的化合物制备用于改善健康的调味品。

[0066] 2-2. 小麦食品的制备

将 0.1-5.0 质量份的本发明的肉豆蔻提取物或从中分离的化合物添加到小麦粉中。使用所得混合物制备用于改善健康的面包、蛋糕、曲奇饼干、薄脆饼干及面条。

[0067] 2-3. 汤和肉汁的制备

将 0.1-1.0 质量份的本发明的肉豆蔻提取物或从中分离的化合物添加到汤和肉汁中,以制备用于加工改善健康的肉制品或面条的汤或肉汁。

[0068] 2-4. 乳制品的制备

将 0.1-1.0 质量份的本发明的肉豆蔻提取物或从中分离的化合物添加到牛奶中。使用所述牛奶可以制备各种奶产品,包括黄油和冰淇淋。

[0069] 2-5. 蔬菜汁的制备

将本发明的肉豆蔻提取物或从中分离的化合物 (0.5g) 添加到西红柿汁或胡萝卜汁 (1,000mL) 中,以制备用于改善健康的蔬菜汁。

[0070] 2-6. 果汁的制备

将本发明的肉豆蔻提取物或从中分离出的化合物 (0.1g) 添加到苹果汁或葡萄汁 (1,000mL) 中,以制备用于改善健康的果汁。

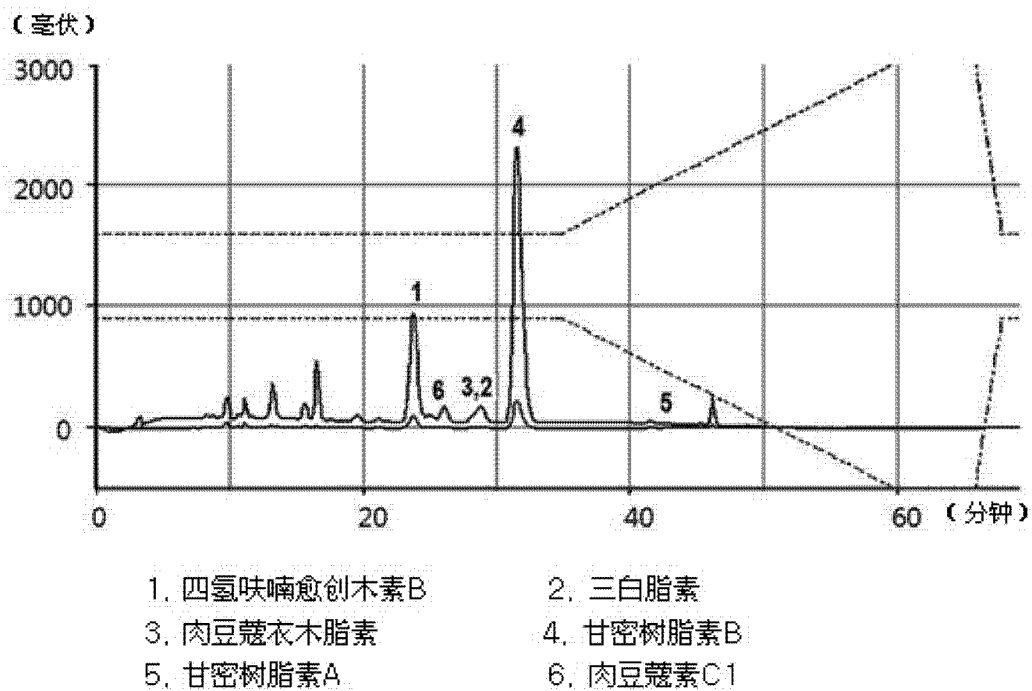


图 1

肉豆蔻的30%乙醇提取物的HPLC谱图

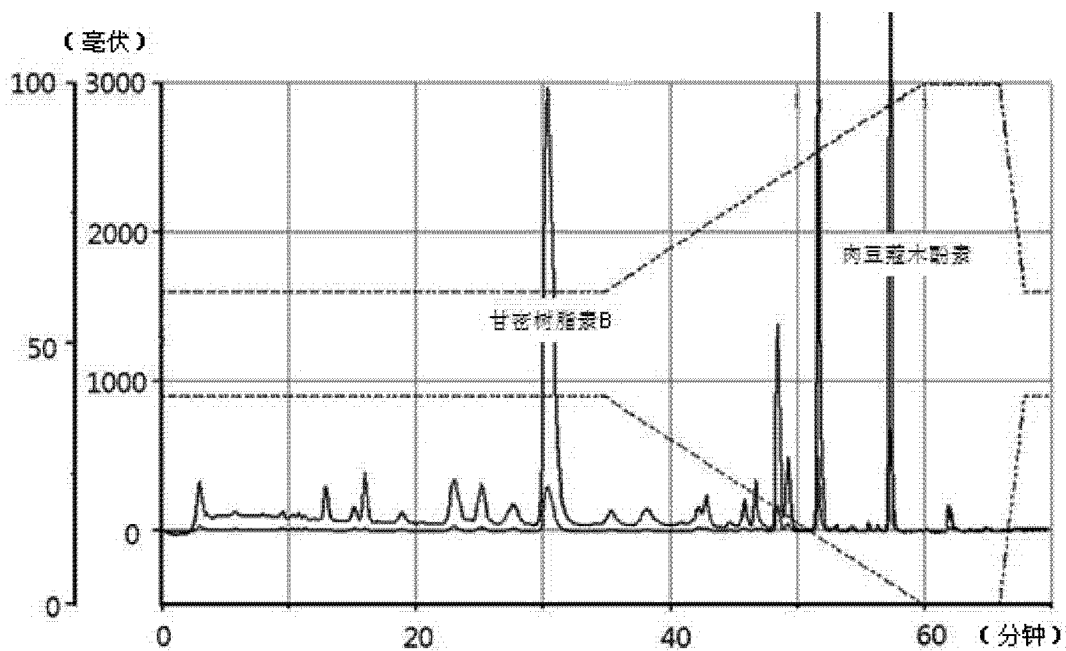


图 2

肉豆蔻的75%乙醇提取物的HPLC谱图

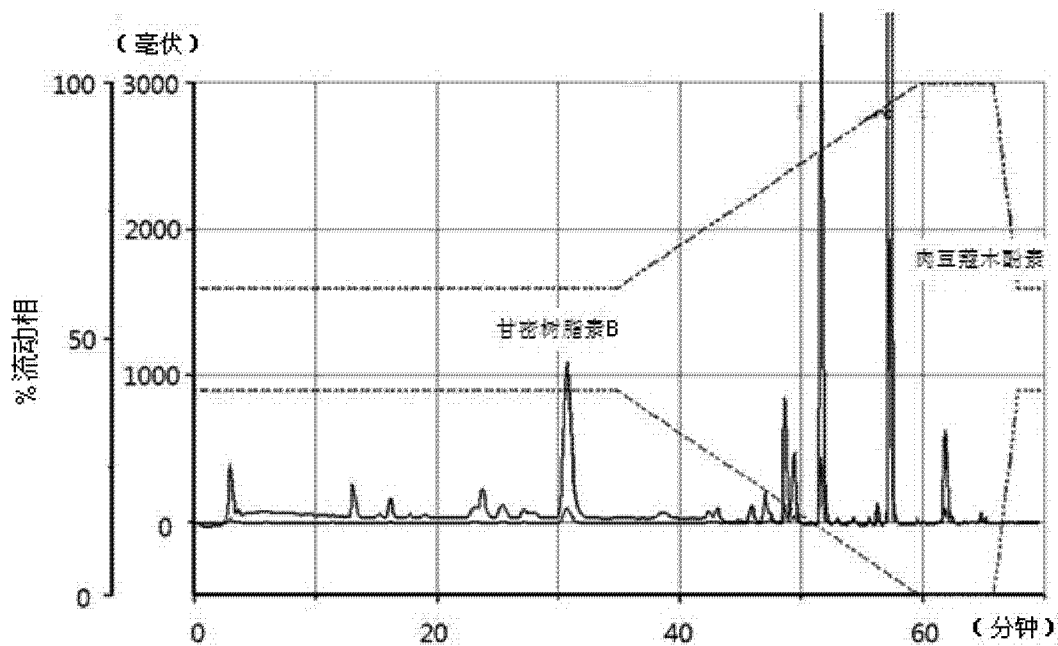


图 3

肉豆蔻的75%甲醇提取物的HPLC谱图

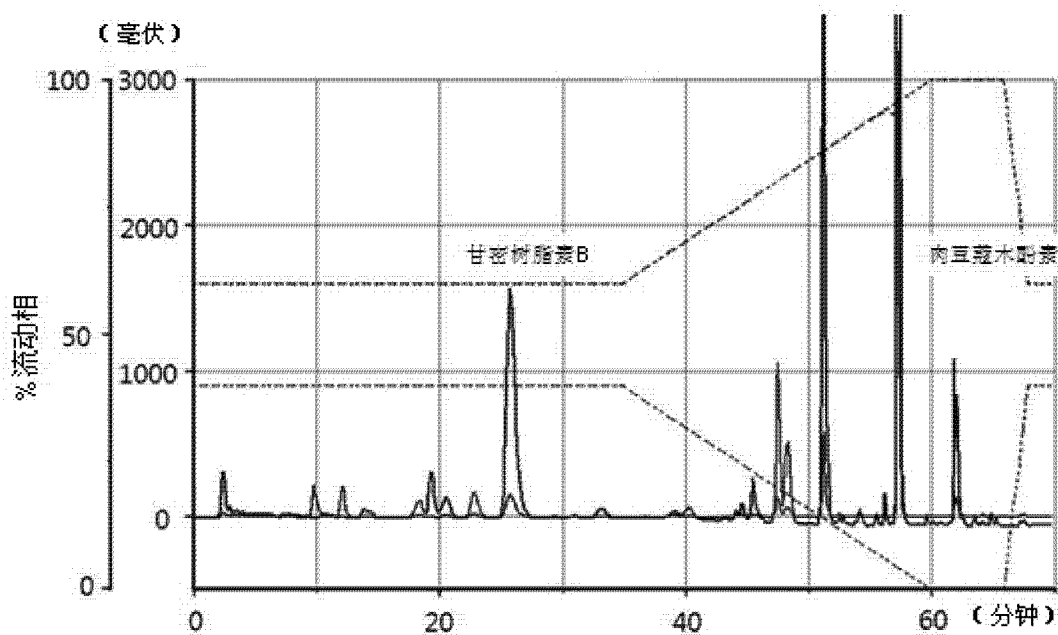


图 4

肉豆蔻的80%乙醇提取物的HPLC谱图

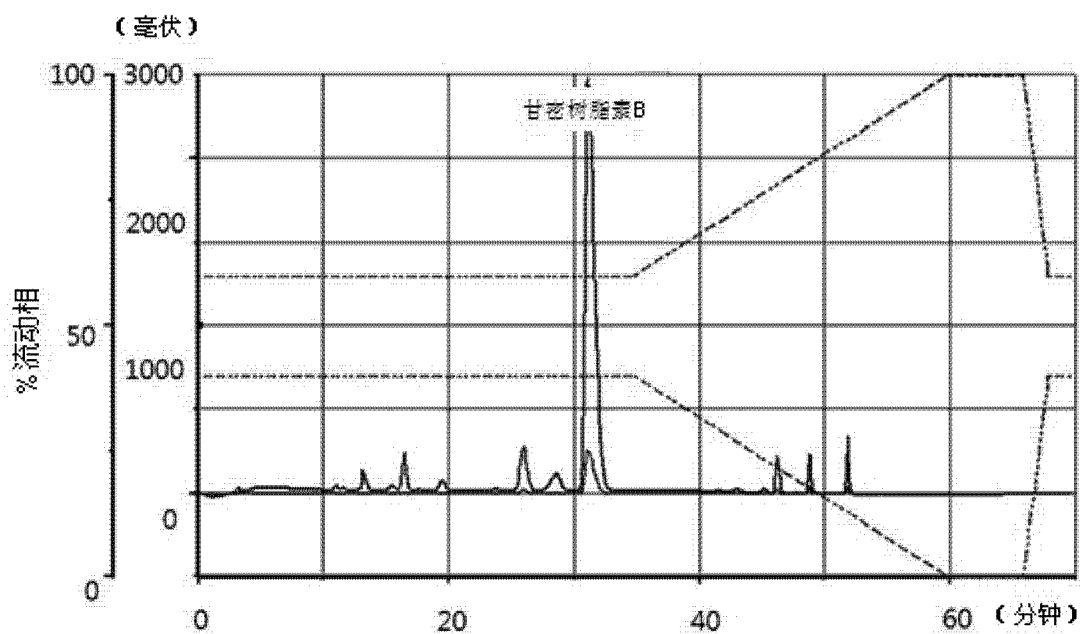


图 5

肉豆蔻的90%乙醇提取物的HPLC谱图

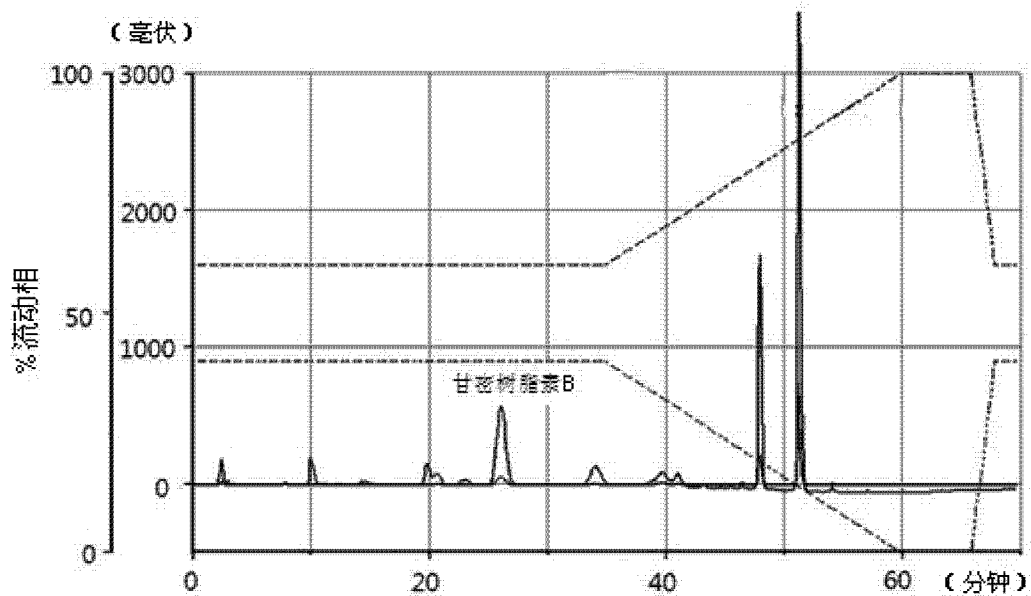


图 6

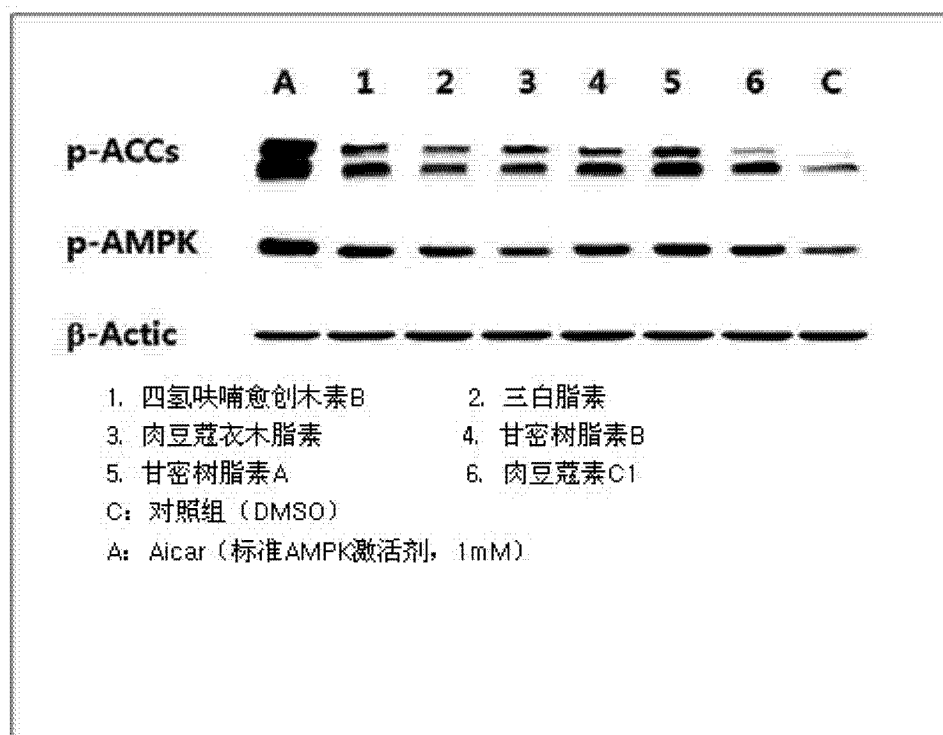


图 7

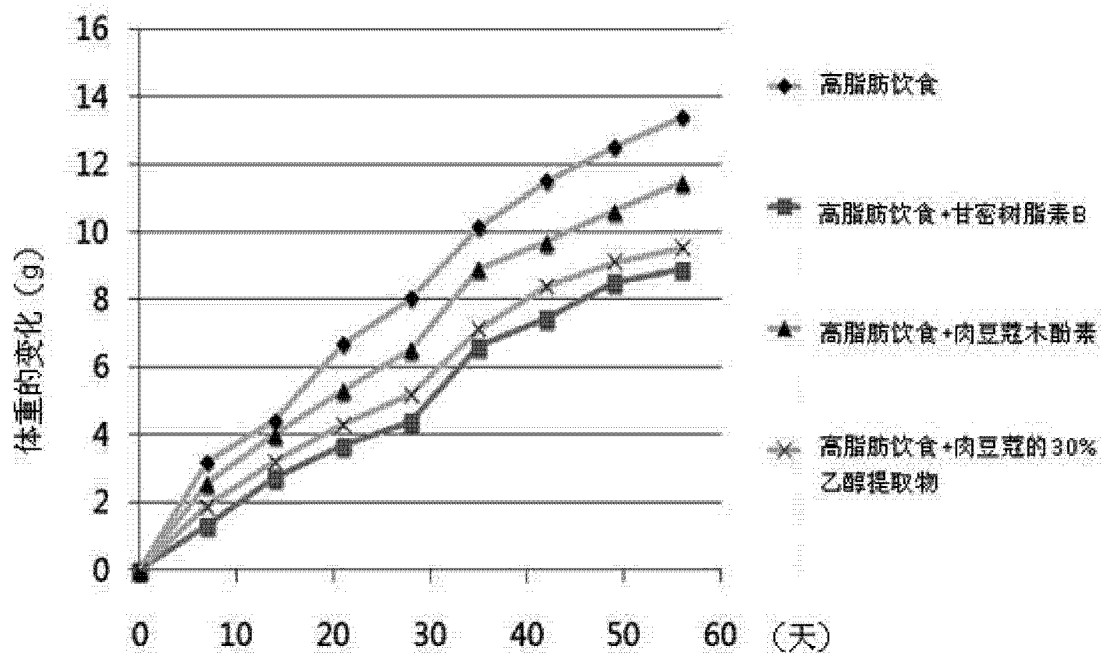


图 8