



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109091602 A

(43)申请公布日 2018.12.28

(21)申请号 201811354062.7

(22)申请日 2018.11.14

(71)申请人 河南大学

地址 475001 河南省开封市明伦街85号

(72)发明人 丛悦 郭敬功 刘习平 王书云

(74)专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通合伙) 41104

代理人 时立新 杨海霞

(51)Int.Cl.

A61K 36/8962(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A23L 33/105(2016.01)

A61K 131/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

韭菜子有效成分、提取方法及其在制备保护肝损伤药物方面的应用

(57)摘要

本发明涉及一种韭菜子有效成分的提取方法,包括如下步骤:1)将粉碎后的韭菜子、炒韭菜子或盐炙韭菜子用20—50%乙醇进行闪式提取,提取液浓缩得到提取物浸膏;将提取物浸膏分散在水中,然后用二氯甲烷进行萃取,萃取所得水层部位用大孔吸附树脂吸附,然后依次用水、30%乙醇、60%乙醇梯度洗脱,收集60%乙醇洗脱液;2)将60%乙醇洗脱液旋转蒸发,然后用水溶解,再经ODS开放柱纯化,甲醇与水按体积比1.8—2.5:1进行洗脱,薄层色谱检测,合并相同组分并经减压浓缩即得。经实验研究发现:韭菜子有效成分可以拮抗四氯化碳引起的小鼠肝组织损伤,且具有一定的保护作用。

1. 一种韭菜子有效成分的提取方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 将粉碎后的韭菜子、炒韭菜子或盐炙韭菜子用20—50%乙醇进行闪式提取,提取液浓缩得到提取物浸膏;将提取物浸膏分散在水中,然后用二氯甲烷进行萃取,萃取所得水层部位用大孔吸附树脂吸附,然后依次用水、30%乙醇、60%乙醇梯度洗脱,收集60%乙醇洗脱液;

2) 将60%乙醇洗脱液旋转蒸发,然后用水溶解,再经ODS开放柱纯化,甲醇与水按体积比1.8—2.5:1进行洗脱,薄层色谱检测,合并相同组分并经减压浓缩得粗品。

2. 如权利要求1所述韭菜子有效成分的提取方法,其特征在于,步骤1)中,闪式提取2—3次,闪式提取时每1 g 韭菜子、炒韭菜子或盐炙韭菜子添加8—15mL的20—50%乙醇。

3. 如权利要求2所述韭菜子有效成分的提取方法,其特征在于,步骤1)中,每次闪式提取的时间为3—10min。

4. 如权利要求1所述韭菜子有效成分的提取方法,其特征在于,步骤1)中,所述大孔吸附树脂的型号为HPD100,HPD600,HPD400,D101,AB-8,ADS-17或DM130。

5. 如权利要求1所述韭菜子有效成分的提取方法,其特征在于,步骤2)中,所得粗品溶于水后,用制备型高效液相色谱纯化;色谱条件:流速6—8ml/min、波长203nm,用22—27%的乙腈水溶液进行等度洗脱。

6. 采用权利要求1至5任一所述方法提取得到的韭菜子有效成分。

7. 权利要求6所述韭菜子有效成分在制备保护肝损伤药物、食品或保健品中的应用。

韭菜子有效成分、提取方法及其在制备保护肝损伤药物方面的应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物提取技术领域,具体涉及一种韭菜子有效成分、提取方法及其在制备保护肝损伤食品、保健品以及药物中的新应用。

背景技术

[0002] 肝脏是人体的重要器官,它是物质合成与代谢、能量产生和转换的重要枢纽。肝脏暴露于有害条件下如药物、化学试剂、辐射等均可引起急性肝损伤,长期作用可导致不可修复的损伤,并发生代偿性修复,即形成肝纤维化,进一步可发展成肝硬化或肝癌。由于山区和乡镇的卫生、饮食条件较差,所以山区和乡镇人口肝病发病率最高。因此,开发有效预防、治疗和价位低廉的保肝功能性食品、保健品或药物具有重要意义。

[0003] 韭菜子(*Semen Allii Tuberosae*)是百合科葱属多年生植物韭菜(*Allium tuberosum* Rottl. Ex Spreng.)的干燥成熟种子,为药食同源的中药,具有益肾、健脾提神、行气理血、润肠通便、壮阳固精等功效,用于肾亏虚,腰膝酸痛,阳痿遗精等,收载于《中国药典》。研究表明韭菜子化学成分主要有甾体皂苷类、生物碱类、硫化物、黄酮类等化合物。现代药理研究证明韭菜子具有温肾壮阳、加强免疫、抗氧化、抗衰老、抑菌等作用。韭菜子为韭菜生产的附属产品,韭菜种植面积变得更为广泛、货源充足,使价格一直保持在平稳、合理阶段。对于开发高效、低价的保肝药,解决“看病难,看病贵”具有重要意义。目前,并未有韭菜子在保肝护肝方面应用文献的相关报道。

发明内容

[0004] 本发明目的在于克服现有技术缺陷,提供一种价格低廉、制备简单的韭菜子有效成分。

[0005] 本发明还提供了上述韭菜子有效成分的提取方法及其在制备保护肝损伤食品、保健品以及药物中的新应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种韭菜子有效成分的提取方法,其具体包括如下步骤:

1) 将粉碎后的韭菜子、炒韭菜子或盐炙韭菜子用20—50%乙醇进行闪式提取,提取液浓缩得到提取物浸膏;将提取物浸膏分散在水中,然后用二氯甲烷进行萃取,萃取所得水层部位用大孔吸附树脂吸附,然后依次用水、30%乙醇、60%乙醇梯度洗脱,收集60%乙醇洗脱液;

2) 将60%乙醇洗脱液旋转蒸发以回收溶剂,然后洗脱物用水溶解,再经ODS开放柱纯化(可按重量比1:10—20装柱),甲醇与水按体积比1.8—2.5:1进行洗脱,薄层色谱检测,合并相同组分并经减压浓缩得粗品。

[0007] 上述韭菜子有效成分的提取方法,步骤1)中,闪式提取2—3次,闪式提取时每1 g 韭菜子、炒韭菜子或盐炙韭菜子添加8—15mL的20—50%乙醇。

[0008] 上述韭菜子有效成分的提取方法,步骤1)中,每次闪式提取的时间以3—10min为

宜。二氯甲烷萃取次数以2—3次为宜。

[0009] 具体的,上述韭菜子有效成分的提取方法,步骤1)中,所述大孔吸附树脂的型号为HPD100,HPD600,HPD400,D101,AB-8,ADS-17或DM130等。

[0010] 上述韭菜子有效成分的提取方法,步骤2)中,所得粗品溶于水后,用制备型高效液相色谱纯化即得韭菜子有效成分;色谱条件:流速6—8ml/min、波长203nm,用22—27%的乙腈水溶液进行等度洗脱。

[0011] 本发明提供了采用上述方法提取得到的韭菜子有效成分。

[0012] 本发明还提供了上述韭菜子有效成分在制备保护肝损伤药物、食品或保健品中的应用。

[0013] 和现有技术相比,本发明的有益效果如下:

本发明从韭菜子中提取得到韭菜子有效成分,并采用腹腔注射四氯化碳诱导急性肝损伤小鼠模型。经实验研究发现:韭菜子有效成分可以拮抗四氯化碳引起的小鼠肝组织损伤,且具有一定的保护作用,表现为减轻肝细胞炎症和纤维化,促进肝细胞再生和降低血清中天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶的作用。此外,本发明韭菜子有效成分的提取工艺简单,溶剂可回收利用,提取量大,提取物纯度高,适合工业化生产,并且韭菜子来源广泛,取材便利,同时开拓了韭菜子有效成分作为保护肝损伤的保健品、食品或药物用途。

附图说明

[0014] 图1为本发明韭菜子有效成分对四氯化碳引起的小鼠肝损伤组织病理变化的影响。

具体实施方式

[0015] 为了使本发明的技术目的、技术方案和有益效果更加清楚,下面结合具体实施例,对本发明的技术方案作出进一步的说明,但所述实施例旨在解释本发明,而不能理解为对本发明的限制,实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。

[0016] 本发明中,炒韭菜子或盐炙韭菜子采用本领域常规技术制作即可,因其制作过程并非本申请的创新之所在,故此不再详述。下述实施例中,如无特殊说明,乙醇、甲醇、乙腈浓度均为体积浓度。

[0017] 实施例1

一种韭菜子有效成分的提取方法,包括以下步骤:

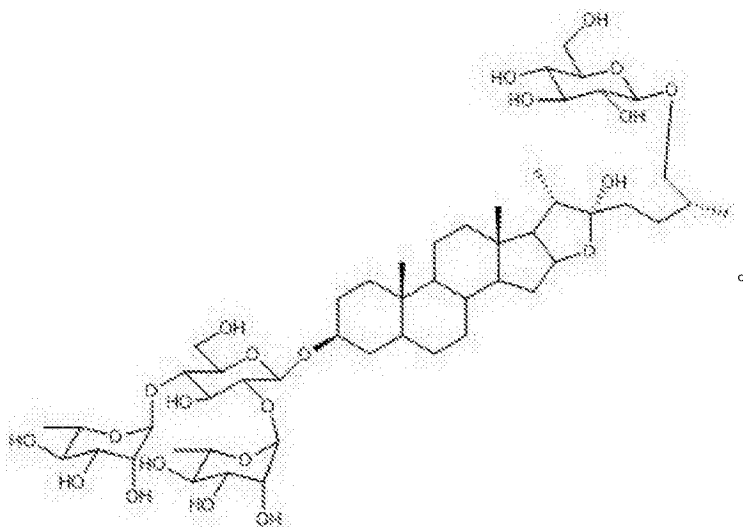
1)将5kg干燥的韭菜子粉碎后,分别用50L 50%乙醇闪式提取3次(第一次闪式提取3 min,第二次闪式提取5 min,第三次闪式提取5 min),闪式提取结束后过滤,合并三次滤液,减压浓缩得到提取物浸膏。将提取物浸膏分散在水中,用同体积二氯甲烷萃取3次,萃取所得水层部位经HPD100大孔吸附树脂吸附,然后依次用水、30%乙醇、60%乙醇梯度洗脱,收集60%乙醇洗脱液;

2)将60%乙醇洗脱液旋转蒸发以回收溶剂,然后洗脱物用水溶解,再经ODS开放柱纯化(可按重量比1:15装柱),甲醇与水按照体积比1.8:1洗脱,薄层色谱检测,合并相同组分并经减压回收溶剂,得粗品;

3) 将所得粗品溶于水后,用制备型高效液相色谱纯化即得韭菜子有效成分;色谱条件:流速8ml/min、波长203nm,用22%的乙腈水溶液进行等度洗脱。

[0018] 上述提取所得的韭菜子有效成分纯品,性状呈白色粉末,收率为0.038%。对上述制得的韭菜子有效成分纯品运用多种谱学技术进行鉴定,发现其主要成分为 Neoprotodioscin(化学名:26-O-β-D-吡喃葡萄糖基-25(R)-5α-呋甾烷-3β, 22α, 26-三羟基-3-O-[α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→4)]-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,5,6-二氢原薯蓣皂苷,新原薯蓣皂苷:5,6-dihydroprotodioscin),具体鉴定结果如下。

[0019] Neoprotodioscin,结构式如下所示:



仪器材料: ^1H , ^{13}C NMR 图谱由 Bruker am400 MHz 核磁共振仪测定,TMS为内标;质谱由VG.AUTO Spec-3000 型质谱仪测定。

[0020] 测试结果:ESI-MS: m/z 1050.0 $[\text{M}-\text{H}]^-$,根据 ^{13}C -NMR和 ^1H -NMR的核磁数据,确定分子式为: $\text{C}_{51}\text{H}_{86}\text{O}_{22}$,分子量:1050.7。 ^1H -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ ppm谱显示有六个甲基质子信号 δ 0.84 (3H, s, H-18), δ 1.01 (3H, s, H-19), δ 1.00 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$, H-27), δ 1.26 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, H-21), δ 1.73 (3H, d, $J=6.2\text{Hz}$, H-Rha-6), δ 1.60 (3H, d, $J=6.2\text{Hz}$, H-Rha'-6);3位葡萄糖的端基氢信号 δ 4.91 (1H, d, $J=6.7\text{Hz}$, H-Glc-1), 26位葡萄糖的端基氢信号 δ 4.78 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$, H-Glc'-1),与葡萄糖2位相连的鼠李糖的端基氢信号 δ 6.32 (1H, s, H-Rha-1),以及与葡萄糖4位相连的鼠李糖的端基氢信号 δ 5.81 (1H, s, H-Rha'-1)。 ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ ppm显示:低场区有四个糖的端基碳信号 δ 99.6 (C-Glc-1), δ 104.8 (C-Glc'-1), δ 101.9 (C-Rha-1), δ 102.6 (C-Rha'-1); δ 110.4 (C-22)是呋甾烷22位的特征碳信号。与参考文献对照,该化合物为 Neoprotodioscin。碳谱核磁数据见表1。

[0021] 表1 Neoprotodioscin的碳谱数据

位置编号	1	位置编号	1
1	37.0	葡萄糖-1	89.6
2	29.7	2	72.7
3	78.9	3	77.9
4	39.9	4	78.5
5	44.4	5	76.7
6	28.7	6	61.2
7	32.1	葡萄糖-1	104.8
8	35.0	2	75.1
9	54.3	3	78.2
10	35.6	4	71.4
11	21.1	5	78.3
12	40.4	6	62.5
13	40.9	鼠李糖-1	101.9
14	56.2	2	72.3
15	32.2	3	72.5
16	50.9	4	73.8
17	63.7	5	69.2
18	16.5	6	18.3
19	12.2	鼠李糖-1	102.6
20	40.6	2	72.2
21	16.2	3	72.4
22	110.4	4	73.6
23	36.9	5	70.2
24	28.1	6	18.4
25	34.2		
26	74.9		
27	17.2		

检查:利用TLC,硫酸显色剂显色,110℃下5分钟,呈现绿色。

[0022] 含量测定:利用分析型HPLC,色谱条件:SHIMADZU C18色谱柱;流动相:乙腈、水体积比为33:67;流速:0.8mL/min,检测波长203nm,保留时间值22.4 min。经检测,纯度≥98%。

[0023] 实施例2

一种韭菜子有效成分的提取方法,包括以下步骤:

1)将1 kg干燥的盐炙韭菜子粉碎后,分别用12L 40%乙醇闪式提取3次(第一次闪式提取8 min,第二次闪式提取5 min,第三次闪式提取7min),闪式提取结束后过滤,合并三次滤液,减压浓缩得到提取物浸膏。将提取物浸膏分散在水中,用同体积二氯甲烷萃取2次,萃取所得水层部位经D101大孔吸附树脂吸附,然后依次用水、30%乙醇、60%乙醇梯度洗脱,收集60%乙醇洗脱液;

2) 将60%乙醇洗脱液旋转蒸发,回收洗脱液,然后洗脱物用水溶解,再经ODS开放柱纯化(可按重量比1:10装柱),甲醇与水按照体积比2.0:1洗脱,薄层色谱检测,合并相同组分并经减压回收溶剂,得粗品;

3) 将所得粗品溶于水后,用制备型高效液相色谱纯化即得韭菜子有效成分;色谱条件:流速7ml/min、波长203nm,用24%的乙腈水溶液进行等度洗脱。

[0024] 上述提取所得的韭菜子有效成分纯品,性状呈白色颗粒状粉末,收率为0.036%,纯度 $\geq 98\%$ 。

[0025] 实施例3

一种韭菜子有效成分的提取方法,包括以下步骤:

1) 将500g干燥的盐炙韭菜子粉碎后,分别用7 L 30%乙醇闪式提取2次(第一次闪式提取8 min,第二次闪式提取9 min),闪式提取结束后过滤,合并二次滤液,减压浓缩得到提取物浸膏。将提取物浸膏分散在水中,用同体积二氯甲烷萃取3次,萃取所得水层部位经D101大孔吸附树脂吸附,然后依次用水、30%乙醇、60%乙醇梯度洗脱,收集60%乙醇洗脱液;

2) 将60%乙醇洗脱液旋转蒸发回收溶剂,洗脱物用水溶解,再经ODS开放柱纯化(可按重量比1:20装柱),甲醇与水按照体积比2.3:1洗脱,薄层色谱检测,合并相同组分并经减压回收溶剂,得粗品;

3) 将所得粗品溶于水后,用制备型高效液相色谱纯化即得韭菜子有效成分;色谱条件:流速7ml/min、波长203nm,用24%的乙腈水溶液进行等度洗脱。

[0026] 上述提取所得的韭菜子有效成分纯品,性状呈白色颗粒状粉末,收率为0.039%,纯度 $\geq 98\%$ 。

[0027] 效果实验:韭菜子有效成分对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤影响。

[0028] 实验原料:实施例1制得的韭菜子有效成分作为实验原料。

[0029] 实验动物:昆明种小鼠,体重 23 ± 2 g,SPF级,由河南省实验动物中心提供,生产批号:SCXK(豫)2017-0001。

[0030] 实验试剂:见下表2。

[0031] 实验仪器:见下表3。

[0032] 表2. 实验试剂。

实验试剂	规格	厂家
丙氨酸转氨酶 (ALT) 检测试剂盒	C010-2	南京建成生物工程研究所
天冬氨酸转氨酶 (AST) 检测试剂盒	C009-2	南京建成生物工程研究所
护肝片	161003	通化爱心药业股份有限公司
四氯化碳	AR	天津大茂化学试剂厂
食用橄榄油		益海嘉里食品营销有限公司
多聚甲醛	AE	天津市科密欧化学试剂有限公司
无水乙醇	100092683	国药集团化学试剂有限公司
二甲苯	10023418	国药集团化学试剂有限公司
苏木素染液套装	G1005	国药集团化学试剂有限公司
盐酸	10011008	武汉谷歌生物科技有限公司
氨水	10002118	国药集团化学试剂有限公司
中性树脂	10004160	国药集团化学试剂有限公司
哇哈哈纯净水		新乡娃哈哈昌盛饮料有限公司

[0033] 表3. 实验仪器

实验仪器	型号	厂家
梅特勒-托利多B-S天平	AB135-S型B-S系列	美国梅特勒-托利多
低温离心机	Thermo	美国
酶标仪	Thermo	美国
正置光学显微镜	NIKON ECLIPSE CI	日本尼康
成像系统	NIKON DS-U3	日本尼康
恒温培养振荡器	ZWY-100D	上海智诚分析仪器制造有限公司
恒温水浴锅	WB-2000	江阴市医疗器械有限公司
载玻片、盖玻片	10127105P-G	郑州长城科工贸有限公司
病理切片机	RM2016	江苏海门帆一实验器材厂
组织摊片机	KD-P	上海徕卡仪器有限公司
脱水机	JJ-12J	浙江省金华市科迪仪器公司
包埋机	JB-P5	武汉俊杰电子有限公司
冻台	JB-L5	武汉俊杰电子有限公司
烤箱	GFL-230	武汉俊杰电子有限公司
酶标仪	Multiskan Go1510	Thermo Scientific

实验方法:将40只雄性昆明小鼠随机分成5组,每组8只,五组分别为:空白组(给药组等体积的娃哈哈水)、四氯化碳模型组(给药组等体积的娃哈哈水)、护肝片阳性组(60mg/kg)、

韭菜子提取物低剂量组(5mg/kg)、韭菜子提取物高剂量组(15mg/kg)。各组分别按上述剂量灌胃给药,连续灌胃3天。第三天灌胃结束2h后,进行腹腔注射,注射体积以10ml/kg计算。模型组、阳性组、给药组腹腔注射含0.5% CCl_4 的橄榄油,空白组腹腔注射与模型组等体积的橄榄油,腹腔注射后小鼠禁食不禁水,24h后摘取小鼠眼球取血,将全血室温放置30-60min后进行离心($8000 \times g$, 10 min, 4°C)分离收集血清,血清在使用之前应放于 -80°C 冰箱中保存,然后测定血清中AST(天冬氨酸转氨酶)、ALT(丙氨酸转氨酶)水平,按照试剂盒说明书的方法进行测定。采用Graphpad Prism 6统计学软件进行处理分析,结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较采用One-way ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

[0034] 取血后将小鼠断颈处死,剖取肝脏,用生理盐水冲洗,最后将肝脏组织放在4%的多聚甲醛溶液中保存20-24h,在无菌实验环境下用刀片将组织修剪成厚约5mm的组织,将组织依次放入脱水盒内,然后进行脱水、包埋、切片、烤片、HE染色,显微镜镜检,图像采集分析。结果见表4和图1。

[0035] 表4. 韭菜子有效成分抗四氯化碳引起的小鼠肝损伤活性($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	空白组	模型组	阳性组	5mg/kg	15mg/kg
AST	37.06 $\pm$ 3.81	166.24 $\pm$ 5.78 [#]	99.62 $\pm$ 12.66 ^{**}	108.76 $\pm$ 1.20 ^{**}	104.00 $\pm$ 3.45 ^{**}
ALT	34.58 $\pm$ 3.11	223.28 $\pm$ 6.40 [#]	96.76 $\pm$ 10.72 ^{**}	108.82 $\pm$ 10.41 ^{**}	105.93 $\pm$ 1.19 ^{**}

与空白组比较:[#] $P < 0.01$

与模型组比较:^{**} $P < 0.01$

表4的结果表明:与空白组相比,模型组的AST和ALT活力明显提高($^{\#}P < 0.01$);与模型组比较,韭菜子有效成分高、低剂量组的AST和ALT活力显著降低($^{**}P < 0.01$)。以上结果说明:本发明韭菜子有效成分高、低剂量组均具有显著拮抗四氯化碳引起的小鼠肝损伤。

[0036] 图1为本发明韭菜子有效成分对四氯化碳引起的小鼠肝损伤组织病理变化的影响。图1的结果表明:空白组肝小叶结构完整,肝细胞结构清楚,未出现肝细胞坏死、细胞核变性及炎症细胞浸润等病理特征,细胞质均匀,中央静脉清晰可见,细胞形态整体正常;四氯化碳模型组肝脏细胞结构遭到损坏,可以明显看到细胞核出现破裂变性现象,且有炎症细胞浸润中央静脉,肝小叶结构不完整;护肝片阳性组和本发明韭菜子有效成分高、低剂量组总体上肝细胞正常,细胞核结构正常,中央静脉清晰可见,无或较少炎症细胞浸润,细胞质均匀。

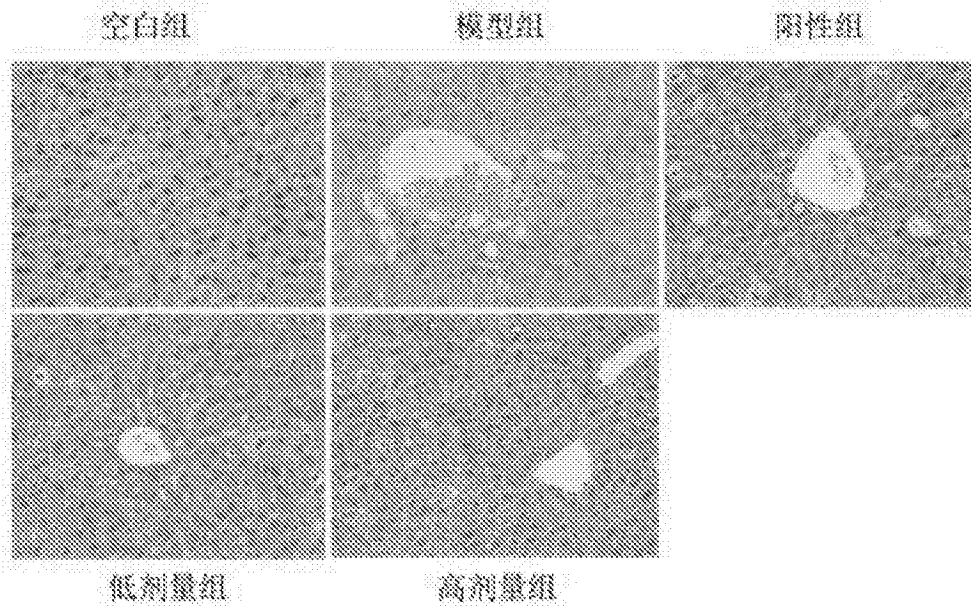


图1