



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104853762 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201380049180. 6

加巴日亚海·穆德·阿林

(22) 申请日 2013. 07. 26

(74) 专利代理机构 无锡市汇诚永信专利代理事

(30) 优先权数据

务所(普通合伙) 32260

PI2012700505 2012. 07. 27 MY

代理人 张欢勇

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2015. 03. 20

A61K 36/889(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/05(2006. 01)

PCT/MY2013/000135 2013. 07. 26

A61P 31/12(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/017900 EN 2014. 01. 30

(71) 申请人 马来西亚棕榈油协会

地址 马来西亚雪兰莪州加影班达尔巴班吉
机构 6 号

(72) 发明人 拉维加德维·沙姆巴沙穆提

谭友爱

赛义德·费罗斯·赛义德·阿布·贝
克

彻·阿尼莎斯·彻·艾德斯

利欧·宋·森

莫哈德·贾米勒·埃利亚斯

万·萨里德哈·万·奥马尔

莫哈德·索菲安·穆罕默德·埃德瑞
思

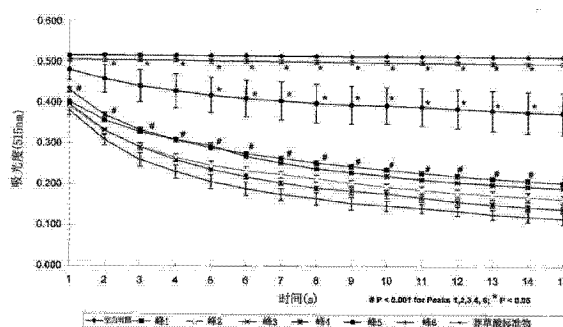
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

获取自油棕基材料的新型生物活性化合物

(57) 摘要

本公开涉及一种获取自油棕基材料的新型生物活性化合物和包含所述生物活性化合物的组合。根据本发明获得的生物活性化合物的分子质量为 482。所述生物活性化合物还具有强效的 HIV 逆转录酶活性和抗氧化活性。



1. 一种组合物,其包含获取自油棕基材料的生物活性化合物,其中所述化合物的分子量为 482。
2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述生物活性化合物是从棕榈油基废料提取。
3. 如权利要求 2 所述的组合物,其中所述生物活性化合物是从油棕榈植物液提取。
4. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述化合物是从棕榈油研磨废液提取。
5. 获取自油棕基材料的化合物的用途,所述化合物用作制备可用于提供生物活性性质的组合物的活性成分,由此所述化合物的分子量为 482。
6. 如权利要求 5 所述的用途,其中所述化合物获取自棕榈油基废料。
7. 如权利要求 5 所述的用途,其中所述化合物获取自油棕榈植物液。
8. 如权利要求 5 所述的用途,其中所述化合物获取自棕榈油研磨废液。

获取自油棕基材料的新型生物活性化合物

技术领域

[0001] 本发明整体涉及生物活性化合物,更具体地涉及获取自植物和植物基材料的酚类化合物,所述化合物表现出高度显著的生物活性性质。

背景技术

[0002] 预期对生物活性化合物的需求会随着世界人口的增加而急剧增加,因此对各种工业和医药用途的需求也会增加,例如在制备用于医疗药物,例如特别是针对流行病爆发情况的抗病毒药物的用途中。

[0003] 目前,绝大多数生物活性化合物通常以相当低的浓度存在。此外,提取工艺或方法的成本昂贵。另外,生物活性化合物的稀缺可获得性已妨碍了药物的生产潜力,并从而加剧了对其它丰富来源的需求。

[0004] 因此,期望探究生物活性化合物的其它低成本的丰富来源以有助于实现高涨的全球需求。

[0005] 本申请着重于实现来自棕榈油研磨的植物液和油棕基材料以及棕榈油研磨废液(POME)作为生物活性化合物来源的价值和潜力。

[0006] 本发明公开了作为生物活性化合物丰富来源的包含棕榈油研磨植物液的油棕基材料。

发明内容

[0007] 在一个方面,提供一种组合物,其包含获取自油棕基材料的生物活性化合物,其中所述酚类化合物的分子量为 482。

[0008] 在另一方面,提供了获取自油棕基材料的化合物的用途,所述化合物用作制备可用于提供生物活性性质的组合物的活性成分,由此所述化合物的分子量为 482。

附图说明

[0009] 一些附图中包含颜色标示或实体以说明用于本发明的目的的实验的结果。

[0010] 图 1 示出关于根据要求保护的本发明的优选实施方式的化合物的基于 DPPH 清除测定所获得的结果;以及

[0011] 图 2 示出关于根据要求保护的本发明的优选实施方式的化合物的基于逆转录酶测定所获得的结果。

具体实施方式

[0012] 本发明所公开的描述和实施例涉及一种生物活性化合物、组合物及其方法,由此从油棕基材料提取分子量为 482 的生物活性化合物。

[0013] 可用于本发明中的棕榈植物液的生物活性提取物为根据各种常规的合适方法和工艺获取自棕榈油研磨过程的植物液的那些提取物。

[0014] 尽管出于标准化的目的,提取物可包含包括酚类化合物、果酸、果糖和甘油、淀粉、纤维素和半纤维素在内的多种化合物,但所用提取物的浓度是根据酚含量(即没食子酸当量)来进行测量。

[0015] 本发明的实施方式涉及一种组合物,其包含获取自油棕的任意部分、油棕基材料(包括棕榈油加工的植物液和棕榈油研磨废液)的生物活性化合物和其它主要酚类化合物。本发明的组合物可基于可用的或标准的方法来制备。预期所述制备是安全的并且所述组合物适用于但不限于包括饮食补充剂、营养制品和促进健康目的在内的日常消耗。还应注意的是,基于本发明的优选实施方式获得的生物活性化合物及其衍生物被认为表现出抗病毒和抗微生物效果。

[0016] 对本领域的技术人员而言显而易见的是,获取自油棕的任意部分或油棕基材料(包括来自棕榈油研磨的植物液和棕榈油研磨废液)的粗提取物除了包含新型主要标志生物活性化合物之外还包含多种其它酚类化合物。

[0017] 已经发现获取自油棕基材料(对于本公开而言更具体地为获取自来自棕榈油研磨的植物液和棕榈油研磨废液)的提取物在经受根据本发明的方法的分离和纯化阶段时包含新型生物活性化合物或其衍生物。

[0018] 本发明因此扩及新型生物活性化合物;及其方法,由此所述方法的主要步骤为对获取自油棕的任意部分、来自棕榈油研磨的植物液和棕榈油研磨废液的粗提取物进行预处理。此实施方式包括分离分子量为 482 的基本上纯化的生物活性化合物。应该指出的是,“分离的或纯化的”生物活性化合物或其生物活性部分基本上不含其它多孔材料或其它组分或基本上不含化学前体或其它化学物质。

[0019] 下列实施例仅用于阐述制备生物活性化合物和有关化合物的不同方法,而不应理解为限制权力要求的范围。根据优选实施方式,获取自油棕基材料的提取物可经受预处理工艺。此类工艺可根据以下实施例 1 所述进行。

[0020] 实施例 1

[0021] 提取物的预处理

[0022] 制备包含生物活性化合物的组合物的方法的第一步骤是对粗提取物进行预处理以获得预浓缩的或部分纯化的提取物。这可用下述低严苛性条件进行:使提取物经受快速色谱法或类似方法,或可选地,使所述提取物经受乙醇沉淀,然后进行高效液相色谱法。此类方法的一个实例在下文以引用的方式给出并且不应理解为限制权力要求的范围。

[0023] 第一途径涉及的主要步骤为:加载“sep-pak”型柱,移除杂质,用甲醇或乙醇洗脱所述提取物以及使所述提取物在旋转蒸发仪中经历浓缩阶段。第二途径包括以下步骤:向三种体积的冷乙醇(EtoH)中添加一定量的萃取物,将所述混合物在-20℃的优选温度下储存过夜,以 1500Xg 离心至少 15 分钟,用适量的蒸馏水溶解获取自前一步骤的沉淀物,以及通过旋转蒸发仪在 50℃下浓缩以获得 3ml 的优选终值。应提及的是,用于两种途径的这些步骤可用本领域中已知的标准工序的替代步骤来代替以实现类似的目标。

[0024] 用于制备如本文所述的组合物的方法的下一必要步骤包括从部分纯化的或预处理的提取物中分离酚类化合物并对其进行纯化。这可通过基于低严苛性条件或参数的常规高效液相色谱法(HPLC)来进行。此类方法的一个实例在下文以引用的方式给出并且不应理解为限制权力要求的范围。

[0025] 实施例 2

[0026] 酚类化合物从油棕基材料的分离和纯化

[0027] 准备 econosil C185 μm 粒度, 优选柱长 $25\text{cm} \times 10\text{mm id}$, 流速 3ml/分钟 。优选的流动相梯度可包括两种溶剂, 一种溶剂由 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 和一定量的水组成, 另一种溶剂由 $10/90$ 的 $0-1\%$ TFA/ 乙腈 (ACN) v/v 组成。在此研究中, 注射柱为 1ml 并且取 280nm 处的读数。通过 HPLC 使混合物经受分离, 并且观察到存在若干个峰, 至少一个峰指示 30 至 35 分钟内的化合物洗脱。峰的其它细节将在下一实施例 (峰分离章节) 中进行描述。

[0028] 然而应理解, HPLC 的柱和参数的选择可变化以获得所述洗脱时间的类似结果。可将洗脱馏分适当收集并以粉末或液体形式提供以用于进一步的分析。

[0029] 实施例 3

[0030] 峰分离

[0031] 观察获取自浓缩样品注射的 HPLC 色谱图。峰馏分的鉴定基于保持时间。从该色谱图观察到存在若干个峰, 其中使每个峰馏分分别经受结构和化学鉴定。

[0032] 实施例 4

[0033] 峰的分子量

[0034] 使用标准液相色谱-质谱法 (LC-MS) 获得所收集的六个主峰的分子量。从结果中观察到峰 6 的分子质量为 482 。

[0035] 实施例 5

[0036] 概述 - 自由基清除

[0037] 进一步分析馏分 1 至 6 在自由基清除中的性质。DPPH 的自由基形式为紫色并且在 515nm 的波长处吸收度最高。诸如某些酚类化合物的抗氧化剂能够清除 DPPH 的自由基, 从而导致紫色强度降低, 这可通过分光光度法测量。

[0038] 自由基清除测定

[0039] 将 DPPH 的储液用水稀释至 0.025mg/ml , 得到在 50% 甲醇中的最终溶液。制备浓度为 300ppm ($300\mu\text{g/ml}$) 的没食子酸。在水中制备待测试物质以得到 300ppm GAE 的浓度。

[0040] 向透明小容器中的 $975\mu\text{l}$ DPPH 溶液中添加 $25\mu\text{l}$ 样品。 515nm 波长处的吸光度通过分光光度法以 0.1 分钟的间隔监测 2 分钟。将对照以相同的方式进行处理, 不同的是将样品替代成水。空白对照包含替代 DPPH 的 50% 的甲醇以及替代样品的水。从测试值中扣除空白对照的值。

[0041] 任何特定吸光度下的 DPPH 浓度根据 DPPH 标准曲线使用式 $y = aX + b$ 进行计算

[0042] 其中 Y = 吸光度 (515nm 处)

[0043] X = DPPH 的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)

[0044] a = 线性回归系数

[0045] b = y 截距

[0046] 由于标准曲线穿过原点, 因此 $b = 0$

[0047] 对该式进行重新整理,

[0048]
$$X = \frac{Y}{a} \dots \dots \dots (3)$$

[0049] 剩余 DPPH 的百分比 (% DPPHrem) 使用下式来计算

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet}_{\text{rem}} = \frac{[\text{DPPH}]_0 - [\text{DPPH}^{\bullet}]_t}{[\text{DPPH}]_0} \times 100\% \quad (4)$$

[0051] 其中,

[0052] $[\text{DPPH}]_t$ = DPPH 在 t 时间的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)

[0053] $[\text{DPPH}]_0$ = DPPH 的初始浓度 ($\mu\text{g/ml}$)

[0054] 根据剩余 DPPH 的百分比相对于时间的关系来作图,所得到的图如图 1 所示。根据所得结果,峰 6 表现出最强的 DPPH 自由基清除活性,这是由于其与其它峰相比具有吸收性最低的化合物。

[0055] 有关基于根据本发明的方法所得到的峰来确定酚类化合物的性质的进一步化学分析可基于本领域中已知的常规或标准工序来进行。

[0056] 实施例 6

[0057] 逆转录酶测定:进一步分析 1 至 6 的抑制剂测定馏分的蛋白酶和 HIV 逆转录酶抑制性质。根据本发明的一个实施方式,本发明所公开的峰 6 的纯化馏分已显示出对 HIV 蛋白酶和逆转录酶两者的强效抑制作用。分子量为 482 的化合物对应于峰 6。

[0058] 根据本发明用于分析相关人免疫缺陷病毒 (HIV) 复制活性的优选测定系统为逆转录酶系统。根据相关领域的研究,病毒活性可通过逆转录酶测定来测定。因此逆转录酶的抑制预示抗病毒活性,更具体而言,当在该测定中使用 HIV 逆转录酶时则预示抗 HIV 活性。

[0059] 使用商用逆转录酶测定试剂盒来确认馏分的抗 HIV 性质。

[0060] Calometric Roche™ 逆转录酶测定

[0061] 这是通过将地高辛 (dioxigenein) 和生物素标记的 dUTP 整合到 DNA 中来定量测定逆转录病毒的逆转录酶活性的比色酶免疫测定。

[0062] Calometric Roche™ 逆转录酶测定利用逆转录酶从模板 / 引物杂交聚 (A)_x 寡聚 (dT)₁₅ 开始合成 DNA 的能力。优化比率的地高辛和生物素标记的核苷酸整合到一个或同一个由 RT 新合成的 DNA 分子中。合成 DNA 的检测和定量作为 RT 活性的参数遵循夹心 ELISA 方案:生物素标记的 DNA 结合到预包被有链亲和素的微量滴定板 (MTP) 模块的表面。在下一个步骤中,结合过氧化物酶的地高辛的抗体 (抗 -DIG-POD) 结合到地高辛标记的 DNA。在最后一个步骤中,加入过氧化物酶底物 ABTS。过氧化物酶对底物的裂解进行酶催化,从而产生有色的反应产物。样品的吸光度可使用微量滴定板 (ELISA) 读取仪测定并且与样品中的 RT 活性水平直接相关。

[0063] 因此,馏分被制备成多种浓度的干湿两种形式。来自快速色谱的四种馏分也被制备成多种浓度。观察到峰 6 表现出显著且最高的抑制作用如,如从图 2 可见。

[0064] 要求保护的本发明的新型化合物可制备成以药理学有效量或营养学有效量单独使用或结合本领域的技术人员认为合适的其它药剂或化合物使用。另外,组合物可以按照常规实践的方式和形式 / 量来制备。

[0065] 本领域的技术人员将理解本文所描述的发明是容易进行变型和修改的,除了明确说明的那些之外。应当理解的是本发明包括所有此类变型和修改。本发明还包括在本说明书中逐个地或共同地提及或指出的所有这些步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或

特征的任何和所有的组合或其中的任何两种或更多种。

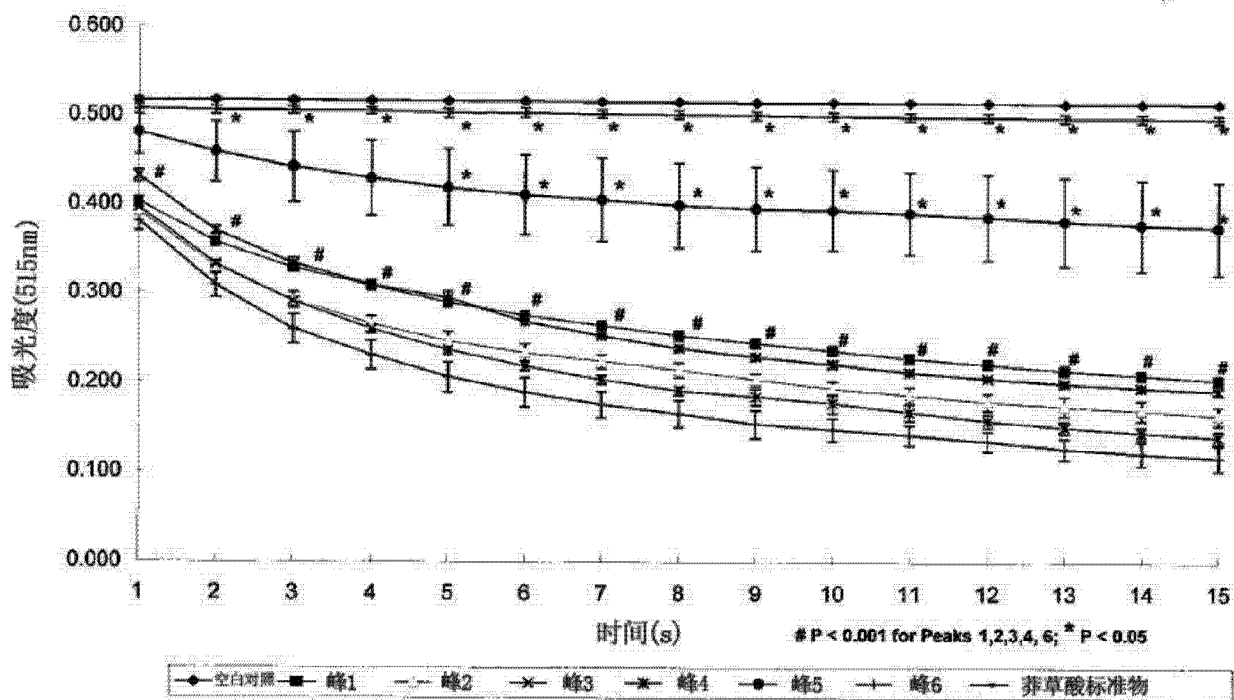


图 1

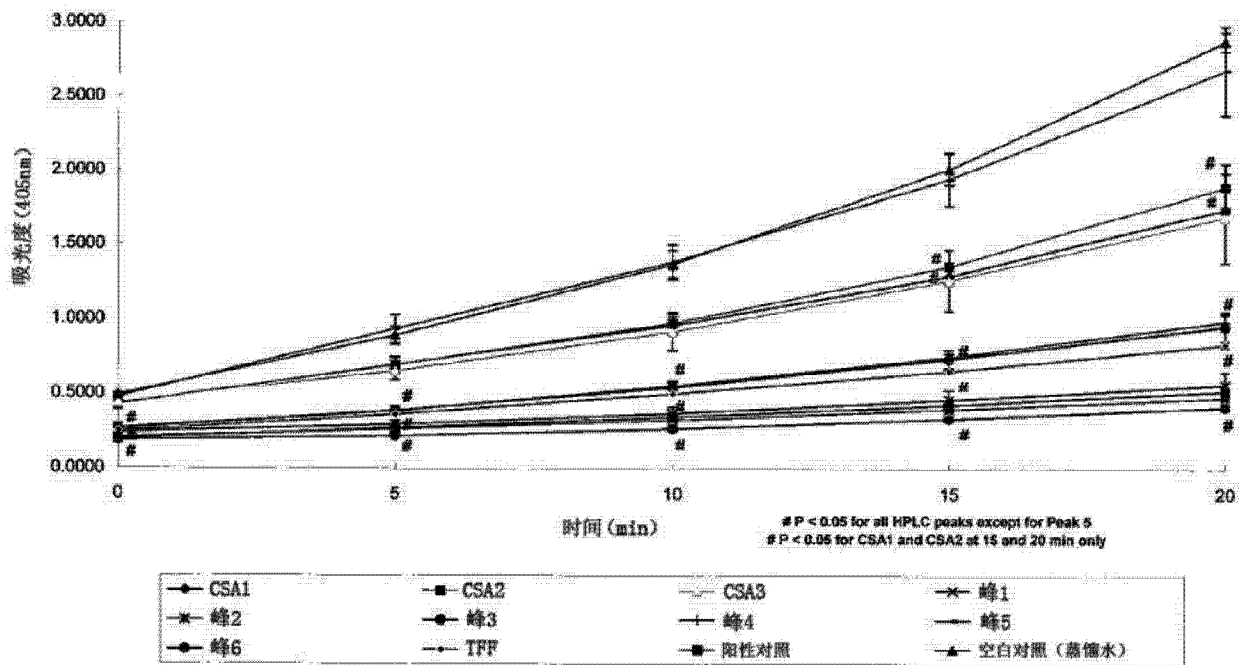


图 2