

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610038739.7

[51] Int. Cl.

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61K 129/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 100340251C

[22] 申请日 2006.3.9

[21] 申请号 200610038739.7

[73] 专利权人 中国林业科学研究院林产化学工业研究所

地址 210042 江苏省南京市锁金五村 16 号

[72] 发明人 陈笏鸿 汪咏梅 吴冬梅 吴在嵩

[56] 参考文献

CN1679795A 2005.10.12

FLAVONOLS FROM MYRICA ESCULENTA BARK Sun Dawang, 林产化学与工业, 第 11 卷第 4 期 1991

毛杨梅及油柑树皮单宁组分的研究 赵祖春等, 林产化学与工业, 第 7 卷第 3 期 1987

审查员 程 诚

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 陆志斌

权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法

[57] 摘要

一种从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法：将净化后的毛杨梅树皮原料用植物粉碎机粉碎，将粉碎好的树皮原料用水在 50 ~ 80℃ 温度条件下，提取 60 ~ 120min，提取液加入浓度为 0.5 ~ 1% 的壳聚糖乙酸溶液作为絮凝剂，搅拌静置，冷却至室温；降温至 1 ~ 7℃，静置 24 ~ 48h，将上述清液用水配成固含量为 4 ~ 5% w/v 的上柱液，采用填料为预先经净化处理的非极性或低极性大孔吸附树脂吸附分离，常压下从醇水洗脱液中蒸出乙醇，得到的产物水溶液经真空冷冻干燥，得粉状天然抗氧化活性物质。由本发明制得的目标产物具有更强的抗氧化、清除自由基的生物活性功能。

1. 一种从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法，其特征在于：

(1)粉碎：将净化后的毛杨梅树皮原料用植物粉碎机粉碎；

(2)提取：以水为溶剂，将粉碎好的树皮原料用水在 50~80℃温度条件下，提取 60~120 min，得提取液；

(3)絮凝沉降：提取液加入浓度为 0.5~1%的壳聚糖乙酸溶液作为絮凝剂，搅拌静置，冷却至室温；壳聚糖的用量为树皮原料量的 0.025~0.05%；

(4)冷冻分离：将加入絮凝剂的提取液降温至 1~7℃，静置 24~48 h，分离出清液，沉淀物弃去；

(5)树脂吸附分离：将上述清液用水配成固含量为 4~5%w/v 的上柱液，采用填料为预先经净化处理的非极性或低极性大孔吸附树脂，上柱液流速为 1.4~1.7 Bv/h，吸附后用纯净水洗柱，再用体积比为 60~70%v/v 的乙醇水溶液以 1.4~1.7 Bv/h 的流速洗脱，收集洗脱液；

(6)脱溶剂：在常压下从醇水洗脱液中蒸出乙醇，用纯净水稀释，得产物水溶液；

(7)真空冷冻干燥：产物水溶液经冷冻后在 0~0.01 Mpa 的真空低压下进行脱水干燥，即得粉状天然抗氧化活性物质。

2. 根据权利要求 1 所述的一种从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法，其特征在于：步骤(1)中粉碎机的筛孔  $\Phi=2\sim 4$  mm。

3. 根据权利要求 1 所述的一种从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法，其特征在于：步骤(2)用下列方式进行提取：

罐组逆流连续浸提法：每罐加入粉碎好的树皮原料和水，固液质量体积比为 1 : 5~10，置于浸提温度为 60~80℃恒温水槽内，单罐浸提时间为 60~120 min，罐数 4~6 个。

4. 根据权利要求 1 所述的一种从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法，其特征在于：步骤(2)还可以用下列方式进行提取：

超声强化提取法：粉碎好的树皮和水置于反应槽内，固液质量体积比为

1 : 5~10, 超声工作频率为 50~100 kHz, 超声功率为 100~200 W, 提取温度为 55~65°C, 时间为 60~90 min。

5. 根据权利要求 1 所述的一种从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法, 其特征在于: 步骤(3)絮凝沉降, 提取液可以先浓缩至 6~7 °Be'。

## 从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法

### 技术领域

本发明涉及一种从植物材料提取天然抗氧化活性物质的方法,尤其涉及一种从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法。

### 背景技术

毛杨梅(*Myrica esculenta*)在我国南方地区有广阔的资源分布。毛杨梅树皮富含植物多酚,其主要成分为局部酰化的聚原翠雀素(polymeric prodelpinidins),这种现象在植物界是不多见的,因为在植物体中原翠雀素多与原花青素(procyanidins)共存。原翠雀素与原花青素同属于原花色素(proanthocyanidins)类。研究表明,低聚原花色素(oligomeric proanthocyanidins, OPC)具有很强的抗氧化生物活性,能清除人体内有害的自由基,提高人体的免疫力,可作为防癌、抗突变、防治心血管疾病药物的主要有效成分和用作安全无毒的新型天然抗氧化剂和自由基清除剂等,已成为医药、保健品的重要原料及食品、化妆品的重要添加剂。

国外对原花色素(主要是原花青素)生物活性的研究已有几十年历史,特别是自80年代以来,德国、法国、意大利、奥地利、日本、印度、匈牙利、韩国等国家开展了大量的研究工作。我国从80年代起加入了世界研究开发原花色素的行列。

1951年法国 Jacques Masquelier 首次发现了原花青素的抗氧化性能,并成功地从海岸松皮中提取出原花青素。1967年美国 Joslyn 等从葡萄皮和葡萄籽中分离出原花色素多酚化合物。1976年 Bombardelli 发明了从葡萄籽中提取高含量原花青素混合物的方法,葡萄(籽和皮)作为原花青素的重要资源,日益受到人们的关注。1979年 Jacques Masquelier 进一步研究从葡萄籽中提取原花青素并实现了产业化。1983年法国 D. Cagnian 等成功地合成了儿茶素和表儿茶素的聚合物。国外文献同期还有从不同的天然产物中提取分离原花色素的报导。

国外关于提取原花色素的专利较为有代表性的有:法国 Jacques Masquellier 从海岸松树皮以沸水提取,乙酸乙酯萃取粗提液,三氯甲烷沉淀产物,1969年

申请专利。日本有贺敏明以 *Aesculus hippocastanum* 树皮为原料，用水提取，石油醚洗涤，树脂吸附产物。美国 Tochiaki Ariga 从松树皮以甲醇提取，石油醚洗涤，乙酸乙酯萃取，液相色谱柱分离得到产品，1989 年申请专利。波兰 Oszmianski Jan，以丙酮为溶剂，采用超声波从葡萄籽中提取原花青素，乙酸乙酯萃取，三氯甲烷沉淀产物，1996 年申请专利。美国 Henkel 公司从葡萄籽中提取原花青素，以沸水提取，乙酸乙酯萃取粗提物，三氯甲烷沉淀产品，1997 年申请专利。

当前已有多种原花青素作为天然抗氧化剂的研究报道，并已有保健产品问世，例如：从法国海岸松树皮和从其它松属树皮中提取的碧萝芷（pycnogenol）、从葡萄籽和皮中提取的原花青素等。

总体上我国原花色素的研究大都处于植物化学研究阶段。近些年来，国内对原花青素的提取纯化工艺及抗氧化功能作了初步的研究，也有厂家生产葡萄籽和松树皮提取物，作为天然强抗氧化剂进入市场。

综上所述，对原花色素提取分离技术及其抗氧化生物活性的研究已成为国内外天然化合物研究领域的热点，日益广泛和深入。但大部分的研究开发工作，主要集中在从葡萄籽（皮）和松树皮原料中提取分离的以原花青素为主体的天然抗氧化活性物质，而本发明是涉及从毛杨梅树皮提取以原翠雀素为主体的天然抗氧化活性物质。

## 发明内容

本发明提供了一种以毛杨梅树皮为原料提取天然抗氧化活性物质的方法。

具体方法如下：

(1)粉碎：将净化后的毛杨梅树皮原料用植物粉碎机粉碎，筛孔  $\Phi=2\sim 4$  mm；

(2)提取：以水为溶剂，将粉碎好的树皮原料用水在  $50\sim 80^{\circ}\text{C}$  温度条件下，提取  $60\sim 120$  min，得提取液；具体可以选择以下任一种方法提取：

罐组逆流连续浸提法：每罐加入粉碎好的树皮原料和水，固液质量体积比为  $1:5\sim 10$ ，置于浸提温度为  $60\sim 80^{\circ}\text{C}$  恒温水槽内，单罐浸提时间为  $60\sim 120$  min，罐数  $4\sim 6$  个。

超声强化提取法：粉碎好的树皮和水置于反应槽内，固液质量体积比为  $1:5\sim 10$ ，超声工作频率为  $50\sim 100$  kHz，超声功率为  $100\sim 200$  W，提取温度为

55~65℃, 时间为 60~90 min, 过滤除渣, 得提取液。

(3)絮凝沉降: 提取液加入浓度为 0.5~1%的壳聚糖乙酸溶液作为絮凝剂, 搅拌静置, 冷却至室温; 壳聚糖的用量为树皮原料量的 0.025~0.05% (提取液可以先浓缩至 6~7°Be');

(4)冷冻分离: 将加入絮凝剂的提取液降温至 1~7℃, 静置 24~48 h, 分离出清液, 沉淀物弃去;

(5)树脂吸附分离: 将上述清液用水配成固含量为 4~5%w/v 的上柱液, 采用填料为预先经净化处理的非极性或低极性大孔吸附树脂, 上柱液流速为 1.4~1.7 Bv/h, 吸附后用纯净水洗柱, 再用体积比为 60~70%v/v 的乙醇水溶液以 1.4~1.7 Bv/h 的流速洗脱, 收集洗脱液;

(6)脱溶剂: 在常压 ( $1.01 \times 10^5$  Pa) 下从醇水洗脱液中蒸出乙醇, 用纯净水稀释, 得产物水溶液;

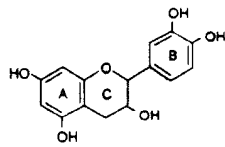
(7)真空冷冻干燥: 产物水溶液经冷冻后在 0~0.01 Mpa 的真空低压下进行脱水干燥, 即得粉状天然抗氧化活性物质。

与现有的从植物资源提取原花色素的文献报道相比, 本发明具有如下优点:

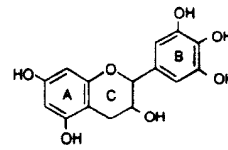
1. 当前国内外与原花色素相关的研究主要集中在从葡萄籽、皮和松树皮原料中提取分离以原花青素为主体的天然抗氧化活性物质, 而本发明是从毛杨梅树皮提取以原翠雀素为主体的天然抗氧化活性物质。毛杨梅在我国南方地区有广阔的资源分布, 树皮中富含原翠雀素, 因此本发明的目标产物原料来源丰富。

2. 由原翠雀素和原花青素的化学结构特征的异同可以分析推断, 本发明从毛杨梅树皮提取的以原翠雀素为主的多酚化合物与从松树皮和葡萄籽提取的以原花青素为主的多酚化合物相比, 具有更强的抗氧化、清除自由基的生物活性功能。

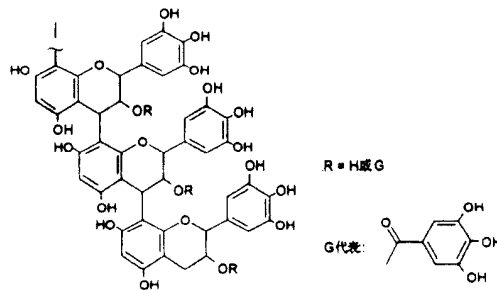
原花色素是指在植物体内形成的、经热酸-醇处理能产生花色素的一类植物多酚。原花色素按分子中羟基取代的不同类型, 可分为原花青素、原翠雀素、原刺槐素 (prorobinetinidins)、原菲瑟素 (profisetinidins) 等多种。原花青素与原翠雀素的化学结构区别在于: 前者的分子结构组成单元为儿茶素 (1), 而后的分子结构组成单元为棓儿茶素 (2)。



(1) 原花青素的结构组成单元



(2) 原翠雀素的分子结构组成单元



(3) 聚原翠雀素

从毛杨梅树皮提取的聚原翠雀素(3)的组成单元黄烷-3-醇结构中, B环上3, 4, 5位共有3个性能非常活跃的邻位羟基; 其另一特征是局部糖酰化: 底端单元为表儿茶素-3-O-糖酰脂, 糖酰化度约40%。

原花青素、原翠雀素虽然同属于原花色素类, 但分子结构上的差异必然会导致其抗氧化及清除自由基活性强弱的区别。酚类化合物是否具有捕获自由基的能力, 取决于其酚羟基能否作为H原子供体, 从而与自由基结合生成共轭稳定的化合物, 阻断自由基链式反应, 其清除自由基的能力与其分子结构(PheO-H键的离解能、PheO·共轭离域作用、空间位阻等)及其分子量有关。亦即在原花青素和原翠雀素的分子结构中羟基数和相互位置对其生物活性起重要作用, 相邻的酚羟基多则生物活性强。

3. 此外, 从毛杨梅树皮提取的多酚化合物中还含有少量其它多酚化合物如栗木鞣花素、没食子酸、表儿茶素-3-O-糖酰酯、表儿茶素-3-O-糖酰-表儿茶素等, 都具有良好的抗氧化、清除自由基的生物活性, 对主要成分原翠雀素也能起到协同作用。

## 具体实施方式

### 实施例1:

一种从毛杨梅树皮提取天然抗氧化活性物质的方法:

- (1)粉碎, 将净化后的毛杨梅树皮原料用植物粉碎机粉碎 ( $\Phi 2\sim 4$  mm 筛孔);
- (2)提取, 以水为溶剂, 将粉碎好的树皮原料用水在  $50\sim 80^{\circ}\text{C}$  恒温条件下, 提取  $60\sim 120$  min, 得提取液; 其中温度可以是:  $55^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$ 、 $65^{\circ}\text{C}$ 、 $70^{\circ}\text{C}$ 、 $80^{\circ}\text{C}$ 。
- (3)絮凝沉降, 提取液加入浓度为  $0.5\sim 1\%$  的壳聚糖乙酸溶液作为絮凝剂, 搅拌静置, 冷却至室温; 壳聚糖的用量为树皮原料量的  $0.025\sim 0.05\%$ ; 其中壳聚糖乙酸溶液的浓度可以是:  $0.5\%$ 、 $0.6\%$ 、 $0.7\%$ 、 $0.8\%$ 、 $0.9\%$ 、 $1\%$ 。
- (4)冷冻分离, 将加入絮凝剂的提取液降温至  $1\sim 7^{\circ}\text{C}$ , 静置  $24\sim 48$  h, 分离出清液, 沉淀物弃去;
- (5)树脂吸附分离, 将上述清液用水配成固含量为  $4\sim 5\%$  w/v 的上柱液, 采用填料为预先经净化处理的非极性或低极性大孔吸附树脂, 上柱液流速为  $1.4\sim 1.7$  Bv/h, 吸附后用纯净水洗柱, 再用体积比为  $60\sim 70\%$  v/v 的乙醇水溶液以  $1.4\sim 1.7$  Bv/h 的流速洗脱, 收集洗脱液;
- (6)脱溶剂, 在常压下 ( $1.01\times 10^5$  Pa) 从醇水洗脱液中蒸出乙醇, 用纯净水稀释, 得产物水溶液;
- (7)真空冷冻干燥, 产物水溶液经冷冻后在  $0\sim 0.01$  Mpa 的真空低压下进行脱水干燥, 即得粉状天然抗氧化活性物质。

## 实施例 2:

1. 将经净化、风干和粉碎 (用植物粉碎机, 通过  $\Phi 2$  mm 筛板) 的毛杨梅树皮装于浸提罐内, 共 6 罐, 每罐装原料 50 g 和水 500 mL, 置于  $80^{\circ}\text{C}$  恒温水槽内, 按逆流浸提法, 每罐浸提时间为 60 min, 共用原料 300 g, 出液 2500 mL;
2. 将提取液浓缩至 550 mL (实测比重为  $4.9^{\circ}\text{Be}'$ ), 加入浓度为  $1\%$  的壳聚糖乙酸溶液 15 mL, 趁热强搅拌后静置, 冷至室温后将其置于  $7^{\circ}\text{C}$  冰箱中静置 48 h, 分出清液 534 mL ( $5.2^{\circ}\text{Be}'$ );
3. 将上述清液用纯净水稀释至浓度为  $5\%$  (w/v), 作为上柱液将其分为 2 份, 以  $1.4$  Bv/h 的流速分别加至两根已经过预处理的 AB-8 型大孔吸附树脂柱 (Bv =  $250\text{ cm}^3$ ), 而后分别用  $2.4$  Bv/h 的纯净水洗柱, 再分别用  $70\%$  的乙醇水溶液 430 mL 以  $1.7$  Bv/h 的流速洗脱, 合并洗脱液;



4. 在常压下 ( $1.01 \times 10^5$  Pa) 蒸出乙醇水洗脱液中的乙醇 (回用), 用纯净水稀释, 得产物水溶液;

5. 将产物水溶液在低温下真空冷冻干燥, 获得天然抗氧化活性物质粉状产品 35 g, 得率为 14.3% (树皮原料按绝干计)。

### 实施例 3:

1. 将按实施例 2 方法预处理的毛杨梅树皮 350 g 和浸提水 2500 mL 置于 KH-200 DB 型数控超声发生器槽内, 在超声强化作用下进行提取, 超声频率为 50 kHz, 超声功率为 200 W, 控制温度在  $60 \pm 5^\circ\text{C}$ , 提取时间为 60 min, 到后取出, 过滤去渣, 得提取液 2150 mL;

2. 在提取液中加入 17.5 mL 浓度为 1% 的壳聚糖乙酸溶液, 强搅拌后静置冷至室温, 放入  $5^\circ\text{C}$  冰箱中静置 24 h 后分出清液 2020 mL, 实测其固含量为 53.7 g;

3. 将上述清液浓缩至 1080 mL, 实测其浓度为 5% (w/v);

4. 将上述溶液分成 3 份上大孔树脂吸附柱, 每根柱的上柱液为 360 mL;

5. 按实施例 2 中 (3)、(4)、(5) 的操作, 获得天然抗氧化活性物质粉状产品 36.8 g, 得率为 12.9% (树皮原料按绝干计)。

本发明中目标产物的抗氧化活性通过试验获得验证 (见附 1、附 2、附 3): 对不饱和油脂有抗氧化的作用; 对催化油脂过氧化反应的金属离子有络合能力; 有清除自由基的能力。

### 附 1: 本发明中目标产物对不饱和油脂的抗氧化性能测定

采用 Schaal 烘箱法测定目标产物对植物油脂热氧化的抑制能力。按 1 kg 底物油加入 0.4 g 抗氧化剂的比例, 称取实施例 2 中制备的目标产物试样 12 mg, 在容器中溶于 3 mL 的 60% 乙醇, 然后加入 30 g 底物亚麻油, 再加入 1 滴 Span 80, 振荡混合使其充分乳化, 置于  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  烘箱内, 每隔一定时间取油样 3 g, 用碘量法 (GB/T 5538-1995《油脂过氧化值测定法》) 测定其过氧化值 POV (meq/kg)。同行空白。结果如下:

油样	POV, meq/kg	时间, h	0	24	48	72
			空白油样	0.9	9.9	19.0
试样+油样	—	3.6	14.0	28.0		

结果数据表明, 目标产物具有对不饱和油脂的抗氧化作用。

### 附 2: 本发明中目标产物对金属离子的络合性能测定

目标产物能与  $\text{Fe}^{2+}$  离子生成有色络合物, 用分光光度计在波长 584 nm 处有特征吸收峰, 其吸光度与络合物的浓度成正比。

称取实施例 2 中制备的目标产物试样 0.2 g (精确至 0.1 mg), 溶于 200 mL 蒸馏水中, 其浓度为 1 mg/mL, 称取 0.1 g (精确至 0.1 mg)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 溶于 100 mL 蒸馏水中,  $\text{Fe}^{2+}$  浓度为 0.2 mg/mL。

在 5 mL 的试样溶液中, 分别加入 0、1、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mL 的  $\text{Fe}^{2+}$  溶液, 再分别用蒸馏水定容至 10 mL, 用分光光度计在 584 nm 处分别测定吸光度, 当  $\text{Fe}^{2+}$  溶液加入量增加至吸光度保持恒定时, 表明试样溶液对  $\text{Fe}^{2+}$  离子的络合已经饱和。

由此计算目标产物对  $\text{Fe}^{2+}$  离子的络合能力为 181 mg/g。

结果数据表明, 目标产物具有对金属离子的络合能力。

### 附 3: 本发明中目标产物对自由基的清除能力测定

以二苯基-苦基-肼基自由基 (DPPH, 美国 Sigma 公司) 为标准物, 用分光光度法测定本发明目标产物对 DPPH 的清除率。

配制工作溶液:

DPPH 的乙醇溶液, 浓度为 0.025 mg/mL; 目标产物试样的乙醇溶液, 浓度为 0.07 mg/mL。

分光光度计测定 ( $\lambda=517\text{ nm}$ ; 1 cm 比色皿):

DPPH 溶液原始吸光度: DPPH 溶液 5 mL 加乙醇 1 mL, 吸光度 0.485。

加入目标产物试样的 DPPH 溶液的吸光度变化情况: DPPH 溶液 5 mL 加试

样溶液 1mL，混合后即开始测定吸光度，随后每间隔 1 min 测定 1 次，吸光度持续下降，直至保持恒定不变为止，计时并进行计算。

测定结果：

吸光度下降至恒定值的时间：7 min；

DPPH 清除率：92.0%；

DPPH 清除速率：0.046 mg/min。

结果数据表明，目标产物具有对自由基（DPPH）的清除能力。