



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109985070 A

(43)申请公布日 2019.07.09

(21)申请号 201910328312.8

(22)申请日 2019.04.23

(71)申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路
301号

(72)发明人 欧阳臻 葛琦 万晶琼 朱益灵

(51)Int.Cl.

A61K 36/068(2006.01)

A61P 39/06(2006.01)

A61K 35/64(2015.01)

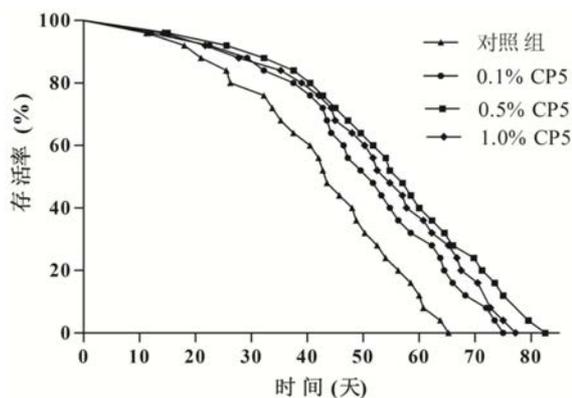
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种金蝉花提取物及其在制备抗氧化药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种金蝉花提取物及其在制备抗氧化药物中的应用,属于医药技术领域。利用金蝉花不同多糖组分对乙醇醇沉浓度不同的性质,使多糖分级分离纯化,提供了一种有效提取金蝉花多糖组分的方法,为寻找具有精准抗氧化活性的金蝉花活性成分提供来源。本发明从金蝉花水提物中分离出具有高效抗氧化活性的小分子多糖,并通过多次醇沉去除部分蛋白质等杂质,且不同分子结构的金蝉花多糖得到有效分离,使目标多糖纯度相对较高,为研究出针对抗氧化活性的金蝉花多糖,提高多糖利用率。



1. 一种金蝉花多糖提取物的制备方法,其特征在于按照下述步骤进行:

步骤1) 对金蝉花药材进行脱脂;

步骤2) 将脱脂后的金蝉花药材,加入蒸馏水回流提取,减压浓缩得到金蝉花多糖粗提液;

步骤3) 对步骤2) 中金蝉花多糖粗提液加入95%乙醇,使乙醇终浓度达到30-40% (体积浓度),于低温条件下静置醇沉数小时后,对所得沉淀去除残留乙醇后冷冻干燥,得到一级醇沉产物CP1和一级上清液CS1;

步骤4) 将步骤3) 所得一级上清液CS1中加入95%乙醇,使乙醇终浓度达到40-50% (体积浓度),重复步骤3) 操作,得到二级醇沉产物CP2和二级上清液CS2;

步骤5) 重复步骤4),依次使溶液乙醇终浓度达到50%-60% (体积浓度),60%-70% (体积浓度),70%-80% (体积浓度),分别得到金蝉花醇沉产物CP3,CP4,CP5。

2. 根据权利要求1所述的一种金蝉花多糖提取物的制备方法,其特征在于所述步骤1) 所述脱脂是:干燥金蝉花药材,粉碎过药典2号筛,石油醚浸提金蝉花粉末,进行脱脂处理,烘干备用;优选地,金蝉花与石油醚的料液比为1:(8~3)。

3. 根据权利要求1所述的一种金蝉花多糖提取物的制备方法,其特征在于所述步骤2) 中回流提取条件中金蝉花与蒸馏水的质量比为1:10~15,提取时间为2~3小时,提取温度为80~100℃,提取次数为2~4次,减压浓缩至原体积的1/10-1/5。

4. 根据权利要求1所述的一种金蝉花多糖提取物的制备方法,其特征在于所述步骤3) 中低温条件为0℃-10℃,静置醇沉时间为12~48小时。

5. 根据权利要求1所述的一种金蝉花多糖提取物的制备方法,其特征在于所述步骤3) 中沉淀去除残留乙醇的方法为将沉淀加水复溶,减压旋蒸去除乙醇溶剂,至溶液无明显乙醇气味。

6. 一种金蝉花多糖提取物的用途,用于制备抗氧化药物。

7. 金蝉花多糖提取物与药学上可接受的辅料组成的药物组合物;金蝉花活性部位可单独或几种部位组合,再进一步与辅料组合,剂型包括:片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂、混悬剂、滴丸、口服液体制剂。

一种金蝉花提取物及其在制备抗氧化药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及从中药材金蝉花中制备具有抗氧化活性的部位及在制备抗氧化药物方面的应用。

背景技术

[0002] 抗氧化是抗氧化自由基的简称,研究表明,癌症、衰老或其它疾病大都与过量自由基的产生有关联,随着世界范围内人口老龄化问题的凸显,以及人们对健康长寿的日益追求,寻找天然、高效的抗氧化剂是现代医药和保健品的发展趋势。

[0003] 金蝉花(*Cordyceps cicadae*)是麦角菌科真菌大蝉草寄生在蝉若虫后形成的干燥复合体,是一种药食两用真菌,与冬虫夏草的无性型同属,是我国传统名贵中药材之一。蝉花之名最早见于《雷公炮炙论》,是第一个作为药用的虫草属真菌,《证类本草》首载蝉花具有“味甘、寒,无毒。主小儿天吊,惊痫,夜啼心悸……医工云入药最奇”之功效。现代研究表明,金蝉花具有免疫调节、抗氧化衰老、镇静安眠、缓解痛风、补肾强肾、抗肿瘤、抗疲劳及应激、调节脂质代谢等功效;临床上,金蝉花治疗慢性肾病效果显著。其活性成分主要包括多糖、核苷、甘露醇、麦角甾醇等,且研究表明,蝉花的虫草酸含量约为冬虫夏草的2.2倍,腺苷约是其4倍,虫草多糖的含量与之接近,总氨基酸含量是其2倍多,维生素E、叶酸、核黄素、B族维生素等均高于冬虫夏草,重金属含量远低于冬虫夏草。陈以平教授等对金蝉花的临床研究发现,其在保护肾功能、延缓慢性肾功能衰竭方面功效显著;宋捷民等发现蝉花可显著提高血清溶血素水平和巨噬细胞的吞噬活性,表明其具有促进免疫功能的作用;多项药理学研究表明金蝉花多糖是一种良好的自由基清除剂或自由基反应抑制剂,可通过提高生物的造血功能和免疫功能而达到其抗氧化和抗衰老作用。因此,通过对金蝉花活性部位的提取分析,有望开发出具有高效抗氧化活性的新型药物。

[0004] 现代技术对金蝉花活性物质的研究主要集中在金蝉花某一整体活性部位的提取,如专利CN201410046301.8及专利CN201410046249.6分别对金蝉花醇提物的石油醚部位、乙酸乙酯部位,专利CN201410046280.X对金蝉花水提取物的正丁醇部位,专利CN201410232441.4对金蝉花水提物的醇沉粗多糖等活性物质进行提取,并研究其神经保护和抗衰老活性,但以上发明对金蝉花活性部位分离精细化程度不够,多糖有效利用率不高。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的关键技术问题是利用金蝉花不同多糖组分对乙醇醇沉浓度不同的性质,使多糖分级分离纯化,提供了一种有效提取金蝉花多糖组分的方法,为寻找具有精准抗氧化活性的金蝉花活性成分提供来源。

[0006] 本发明的第一个方面涉及一种金蝉花多糖提取物及其制备方法,该提取物纯度较高且具有高效抗氧化活性。本发明的技术方案如下:一种金蝉花多糖提取物的制备方法,按照下述步骤进行:

[0007] 步骤1) 对金蝉花药材进行脱脂;

[0008] 步骤2) 将脱脂后的金蝉花药材,加入蒸馏水回流提取,减压浓缩得到金蝉花多糖粗提液。

[0009] 步骤3) 对步骤2) 中金蝉花多糖粗提液加入95%乙醇,使乙醇最终质量浓度达到30-40%于低温条件下静置醇沉数小时后,对所得沉淀去除残留乙醇后冷冻干燥,得到一级醇沉产物CP1和一级上清液CS1。

[0010] 步骤4) 将步骤3) 所得一级上清液CS1中加入95%乙醇,使乙醇最终质量达到40-50% (体积浓度),重复步骤3) 操作,得到二级醇沉产物CP2和二级上清液CS2。

[0011] 步骤5) 重复步骤4),依次使溶液乙醇最终质量浓度达到50%-60% (体积浓度),60%-70% (体积浓度),70%-80% (体积浓度),分别得到金蝉花醇沉产物CP3,CP4,CP5。

[0012] 所述步骤1) 所述脱脂是:干燥金蝉花药材,粉碎过药典2号筛,石油醚浸提金蝉花粉末,进行脱脂处理,烘干备用。优选地,金蝉花与石油醚的料液比为1:(8~3)。

[0013] 所述步骤2) 中回流提取条件中金蝉花与蒸馏水的质量比为1:10~15,提取时间为2~3小时,提取温度为80~100℃,提取次数为2~4次,减压浓缩至原体积的1/10-1/5。

[0014] 所述步骤3) 中低温条件为0℃-10℃,静置醇沉时间为12~48小时。

[0015] 所述步骤3) 中沉淀去除残留乙醇的方法为将沉淀加水复溶,减压旋蒸去除乙醇溶剂,至溶液无明显乙醇气味。

[0016] 2、本发明第二个方面涉及对所述分级醇沉金蝉花多糖的用途,用于制备抗氧化药物。

[0017] 为了检测发明所得的醇沉金蝉花多糖产物的抗氧化活性,将本发明所得的各分级多糖按照1% (w/v) 的比例添加到果蝇基础培养基中,饲喂生理性衰老果蝇和双氧水氧化应激果蝇,分别观察样品在不同剂量下对果蝇寿命的影响,并分析样品饲养生理性衰老果蝇30天后,体内丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)等过氧化指标测定,结果表明65%-75%分级醇沉金蝉花多糖在体外模型中具有显著的抗氧化活性,且具有一定的剂量依赖性,表明醇沉金蝉花多糖在制备抗氧化衰老药物方面具有良好的潜力。

[0018] 3、本发明第三个方面涉及金蝉花多糖提取物与药学上可接受的辅料组成的药物组合物。

[0019] 金蝉花活性部位可单独或几种部位组合,再进一步与辅料组合,剂型包括:片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂、混悬剂、滴丸、口服液体制剂等。

[0020] 本发明所述的载体或赋形剂包括药剂学常规应用的载体和赋形剂,例如溶剂、崩解剂、矫味剂、防腐剂、着色剂、粘合剂等。

[0021] 下面的实施例和药理活性实验是对本发明的进一步详细说明,以下所列举的实施例不以任何方式构成限制。

[0022] 本发明从金蝉花水提物中分离出具有高效抗氧化活性的小分子多糖,并通过多次醇沉去除部分蛋白质等杂质,且不同分子结构的金蝉花多糖得到有效分离,使目标多糖纯度相对较高,为研究出针对抗氧化活性的金蝉花多糖,提高多糖利用率。

附图说明

[0023] 图1金蝉花多糖CP5延长了生理性衰老果蝇的寿命(n=100)。随机分为4组:空白对

照组、金蝉花多糖高1%、中0.5%、低0.1%剂量组,每组100只。每日观察并记录果蝇的存活情况,每3天更换一次培养基,直至果蝇全部死亡。数据用Log-rank检验进行分析。

[0024] 图2金蝉花CP4多糖能抑制果蝇双氧水氧化应激引起的损伤(n=100)。随机分为4组:空白对照组、金蝉花多糖高1%、中0.5%、低0.1%剂量组,每组100只。每日观察并记录果蝇的存活情况,每3天更换一次培养基,直至果蝇全部死亡。数据用Log-rank检验进行分析。

[0025] 图3金蝉花多糖CP4对果蝇中抗氧化酶活性的影响。随机分为4组:空白对照组、金蝉花多糖高1%、中0.5%、低0.1%剂量组,每组100只。每3天更换一次培养基,饲喂第30天后测定果蝇体内MDA、GSH-PX含量和CAT酶活力。数据以平均值±SD表示。数据通过ANOVA分析,然后进行Dunnett's t-检验。与空白对照组相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。(A) CP4处理降低了果蝇中丙二醛(MDA)的含量。(B) CP70-60处理显著增加了果蝇中过氧化氢酶(CAT)的含量。(C) CP4处理增强了果蝇中谷胱甘肽过氧化酶(GSH-px)的活性,雌果蝇均呈剂量依赖性,而(B)和(C)中雄果蝇的中剂量最为明显。

具体实施方式

[0026] 实施例1 70%乙醇一分级醇沉多糖部位对生理性衰老果蝇的影响:

[0027] (1) 金蝉花70%乙醇一分级醇沉多糖部位(CP5)的制备:

[0028] 干燥金蝉花药材,粉碎过药典2号筛,按液料比5:1的石油醚浸提金蝉花粉末,进行脱脂处理,脱脂后的粉末于40℃烘干备用,石油醚在30℃下进行回收。称取金蝉花粉末50g,用500mL蒸馏水在90℃条件下,回流提取两次,每次2小时,提取液经减压浓缩后,加入3/7倍体积的95%乙醇,使乙醇终浓度达到30%,于4℃条件下,静置12小时。离心沉淀后的多糖加水复溶后,减压浓缩至无醇味,冷冻干燥,得到金蝉花粗多糖CP1组分。根据上清液剩余体积,继续加入1/6倍体积的无水乙醇,使乙醇终浓度达到40%,方法相同,冷冻干燥,得到40%乙醇一分级醇沉多糖部位(CP2)。依次使乙醇终浓度达到50%、60%、70%和80%,得到各个分级金蝉花多糖(CP3、CP4、CP5和CP6)和剩余水部位。其中多糖CP5组分即为金蝉花70%乙醇沉淀的多糖部位。

[0029] (2) 果蝇的培养:

[0030] 果蝇,为野生型Oregon K黑腹果蝇,由江苏大学药学院提供。将果蝇安置在含有5mL培养基的50mL培养瓶中,在25℃,60±5%湿度,24h昼夜交替的生化培养箱(邦西仪器科技(上海)有限公司)中。果蝇培养基,为标准玉米粉琼脂培养基,由青岛海博生物科技有限公司(Qingdao,China;<http://www.hopebiol.com/>)购得,在室温、避光和干燥条件下保存。

[0031] (3) CP5对生理性衰老果蝇的影响:

[0032] 收集8h内羽化的雄性果蝇400只。随机分为4组:0%对照组和1%、0.5%、0.1%CP5处理的剂量组,每组各100只,分为4管,每管25只。对照组的果蝇饲喂基础培养基,CP5剂量组的果蝇分别以混有70%乙醇一分级醇沉多糖的培养基喂养。正常给药,每3天更换一次培养基。每两日观察并记录果蝇的存活情况,直至果蝇全部死亡,观察生存时间。绘制寿命曲线,并计算果蝇的平均寿命、半数死亡时间和最高寿命。最长寿命的计算方法是最长幸存10%的果蝇种群的平均寿命(图1)。

[0033] 表1用金蝉花多糖CP5饲喂生理性衰老果蝇的寿命参数

	组别 (g/100mL)	半数死亡时间 (d)	平均寿命 (d)	最高寿命 (d)
	Control	43.50±1.73	42.93±1.04	64.50±2.27
[0034]	0.1	51.75±1.50***	50.70±0.25***	74.25±1.39***
	0.5	57.00±2.45***	55.80±0.42***	81.00±2.27***
	1.0	54.75±3.77***	55.76±1.24***	76.13±1.55***

[0035] 注:最高寿命计算为每组中最长幸存的果蝇10%的平均寿命(与空白对照组相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001)。

[0036] 果蝇生理性衰老模型,可以直观地得出金蝉花多糖CP5各剂量延长果蝇的半数死亡时间、平均寿命和最高寿命。其中,中等剂量组效果最为显著,与对照组相比,可将果蝇半数死亡时间延长31.03%,平均寿命延长29.98%,最高寿命延长25.58%。说明CP5具有延缓果蝇寿命的功效(表1)。

[0037] 实施例2金蝉花65%乙醇一分级醇沉多糖部位对H₂O₂氧化应激衰老果蝇的影响:

[0038] (1) 金蝉花65%乙醇一分级醇沉多糖部位的制备:

[0039] 干燥金蝉花药材,粉碎过药典2号筛,按液料比8:1的石油醚浸提金蝉花粉末,进行脱脂处理,脱脂后的粉末于40℃烘干备用,石油醚在30℃下进行回收。称取金蝉花粉末50g,用600mL蒸馏水在80℃条件下,回流提取两次,每次3小时,提取液经减压浓缩后,加入95%乙醇,使乙醇终浓度达到35%,于0℃条件下,静置24小时。离心沉淀后的多糖加水复溶后,减压浓缩至无醇味,冷冻干燥,得到金蝉花粗多糖CP1组分。根据上清液剩余体积,继续加入1/6倍体积的95%乙醇,使乙醇终浓度达到45%,方法相同,冷冻干燥,得到45%乙醇沉淀金蝉花多糖组分(CP2)。重复以上操作,依次使乙醇终浓度达到55%、65%、75%,得到各个分级金蝉花多糖(CP2、CP3、CP4、CP5)和剩余水部位。其中多糖CP4组分即为金蝉花65%乙醇一分级醇沉多糖部位。

[0040] (2) 金蝉花65%乙醇一分级醇沉多糖部位对H₂O₂氧化应激衰老果蝇的影响:

[0041] 收集8h内羽化的雄性果蝇400只。随机分为4组:对照组和1%、0.5%、0.1%CP4处理的剂量组,每组各100只,分为4管,每管25只。对照组的果蝇饲喂基础培养基,CP4剂量组的果蝇分别以补充有65%乙醇一分级醇沉多糖部位的培养基喂养。在正常给药第30天,移出果蝇,饥饿适应2h后,将果蝇转移至干净已灭菌的培养管中,管底部放一片圆形的滤纸,该纸片由含有6%葡萄糖的30%H₂O₂溶液浸润。

[0042] 记录每3h果蝇死亡数,直至所有果蝇死亡。绘制寿命曲线,并计算果蝇的平均寿命、半数死亡时间和最高寿命(图2)。

[0043] 表2金蝉花CP4多糖对H₂O₂急性损伤果蝇寿命的影响(n=100)

	组别 (g/100mL)	半数死亡时间 (h)	平均寿命 (h)	最高寿命 (h)
	Control	12.00±0.00	11.76±0.69	17.5±1.41
[0044]	0.1	13.50±1.00*	13.12±0.56**	19.25±1.04*
	0.5	15.50±1.00***	15.16±0.42***	21.00±1.07***
	1.0	15.50±1.00***	15.12±0.13***	19.88±0.83**

[0045] 注:最大寿命计算为每组中最长幸存的果蝇10%的平均寿命(与空白对照组相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001)。

[0046] 由表2和图2可知,在H₂O₂急性氧化损伤中,给药组与模型组相比果蝇存活时间差异

显著。金蝉花多糖CP4各剂量均可延长果蝇的半数死亡时间、平均寿命和最高寿命。其中中等剂量组效果最为显著,与对照组相比,可将果蝇半数死亡时间延长29.17%,平均寿命延长28.91%,最高寿命延长20.0%。

[0047] 实施例3 75%乙醇一分级醇沉多糖对果蝇体内抗氧化指标的影响:

[0048] (1) 75%乙醇一分级醇沉多糖 (CP4) 的制备:

[0049] 干燥金蝉花药材,粉碎过药典2号筛,按液料比3:1的石油醚浸提金蝉花粉末,进行脱脂处理,脱脂后的粉末于40℃烘干备用,石油醚在30℃下进行回收。称取金蝉花粉末50g,用750mL蒸馏水在100℃条件下,回流提取三次,每次2小时,提取液经减压浓缩后,加入1/5倍体积的无水乙醇,使乙醇终浓度达到40%,于10℃条件下,静置48h。离心沉淀后的多糖加水复溶后,减压浓缩至无醇味,冷冻干燥,得到金蝉花粗多糖CP1组分。根据上清液剩余体积,继续加入1/6倍体积的无水乙醇,使乙醇终浓度达到50%,方法相同,冷冻干燥,得到50%乙醇沉淀金蝉花多糖组分 (CP2)。重复以上操作,依次使乙醇终浓度达到65%、75%和85%,得到各个分级金蝉花多糖 (CP3、CP4和CP5) 和剩余水部位。其中多糖CP4组分即为金蝉花75%乙醇一分级醇沉多糖。

[0050] (2) CP4对果蝇体内抗氧化指标的影响:

[0051] 收集8h内羽化的雌雄果蝇720只。随机分为4组:对照组和1%、0.5%、0.1%CP4处理的剂量组,每组雌、雄果蝇各90只,每组分为3管,每管30只,每3天更换一次培养基。对照组的果蝇饲喂基础培养基,CP4剂量组的果蝇分别以补充有金蝉花75%乙醇一分级醇沉多糖的培养基喂养。分别在第10天、20天和30天,取每组雌、雄果蝇各1管。饥饿适应2h后,加生理盐水冰浴研磨,离心得果蝇组织匀浆。按照试剂盒说明操作,测定组织匀浆中蛋白含量、MDA含量、CAT活性和GSH-px的含量 (图3)。

[0052] 表3金蝉花多糖CP4对果蝇抗氧化能力的影响

[0053]

组别 (g/100mL)	MDA 含量(U/mg pro)		CAT 酶活力(U/mg pro)		GSH-PX 含量(U/mg pro)	
	雄蝇	雌蝇	雄蝇	雌蝇	雄蝇	雌蝇
Control	0.59±0.04	0.7±0.08	8.17±0.47	6.03±0.71	0.23±0.01	0.17±0.06
0.1	0.23±0.01***	0.23±0.05***	10.09±0.59**	11.73±0.77***	0.36±0.09	0.47±0.06**
0.5	0.07±0.01***	0.1±0.00***	34.53±0.11***	16.28±1.75***	0.80±0.06***	0.55±0.02***
1	0.06±0.00***	0.09±0.01***	30.98±0.06***	29.09±0.33***	0.51±0.01***	0.88±0.11***

[0054] 注:与空白对照组相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[0055] 由表可知,喂饲30天金蝉花多糖CP4后,各剂量组果蝇体内的MDA含量与对照组比较明显下降(P<0.0001);随着多糖浓度的增加,各剂量组果蝇体内的,CAT酶活力和GSH-PX含量逐渐升高,且雌果蝇尤为突出,各剂量组与对照组比较差异有统计学意义(P<0.01或P<0.01)。

[0056] 实施例4金蝉花滴丸的制备

[0057] 分别称取400g聚乙二醇4000,在水浴上融化,再加入金蝉花70%乙醇一分级醇沉多糖450g冻干粉末,搅拌均匀,倾入保温管中,调节恒温装置,使药液在80~90℃下滴入冷却过的液体石蜡中(温度±4℃),滴完后,将药丸倾入滤纸上吸干石蜡油,再加入少量滑石粉,混匀,得金蝉花70%乙醇一分级醇沉多糖滴丸1000粒。

[0058] 实施例5金蝉花胶囊剂的制备

[0059] 金蝉花70%乙醇一分级醇沉多糖冻干粉末1000g,与药用淀粉500g混合均匀,烘干,按每粒0.45g制成胶囊。

[0060] 实施例6金蝉花片剂的制备

[0061] 金蝉花70%乙醇一分级醇沉多糖冻干粉末1000g,淀粉500g,混合均匀,用适量乙醇制粒,经整粒机整粒,压片,每片0.35g。

[0062] 实施例7金蝉花颗粒剂的制备

[0063] 金蝉花70%乙醇一分级醇沉多糖冻干粉末1500g,淀粉1000g,糖粉400g,混合均匀,用适量乙醇制粒,干燥、整粒、分装即得。

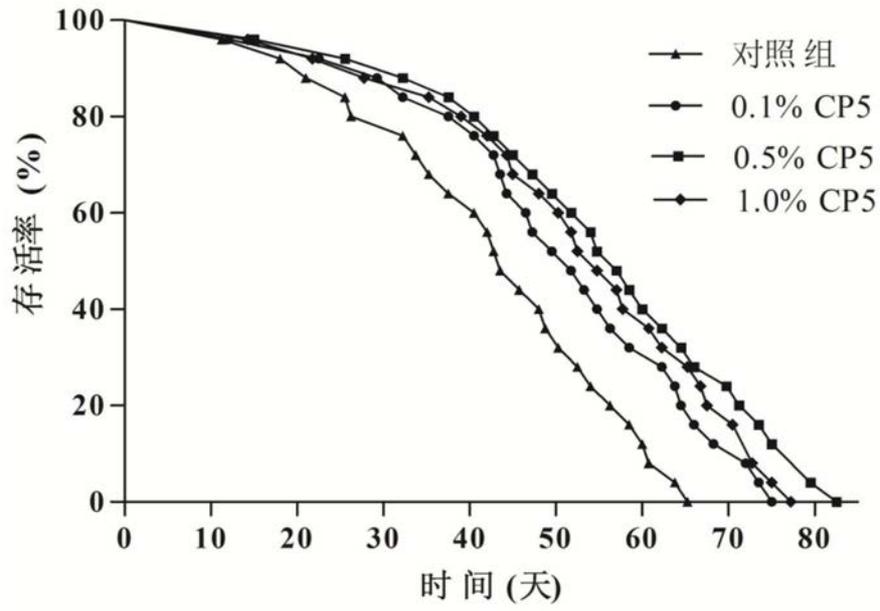


图1

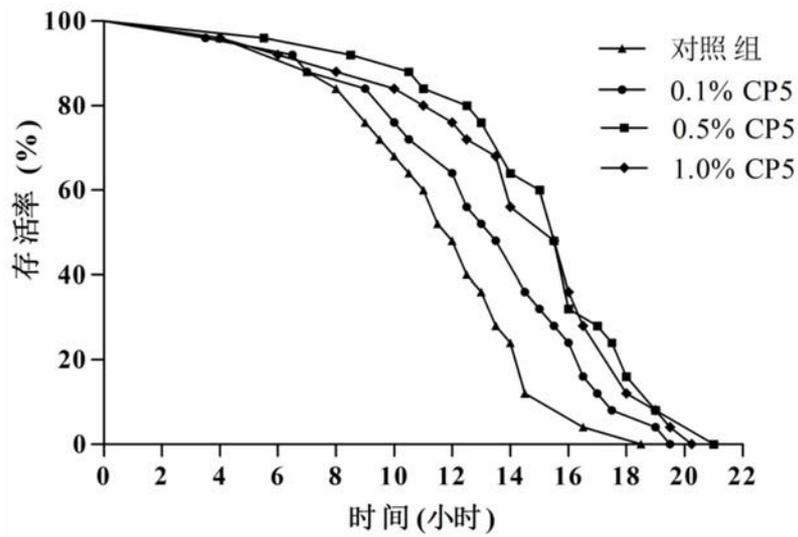


图2

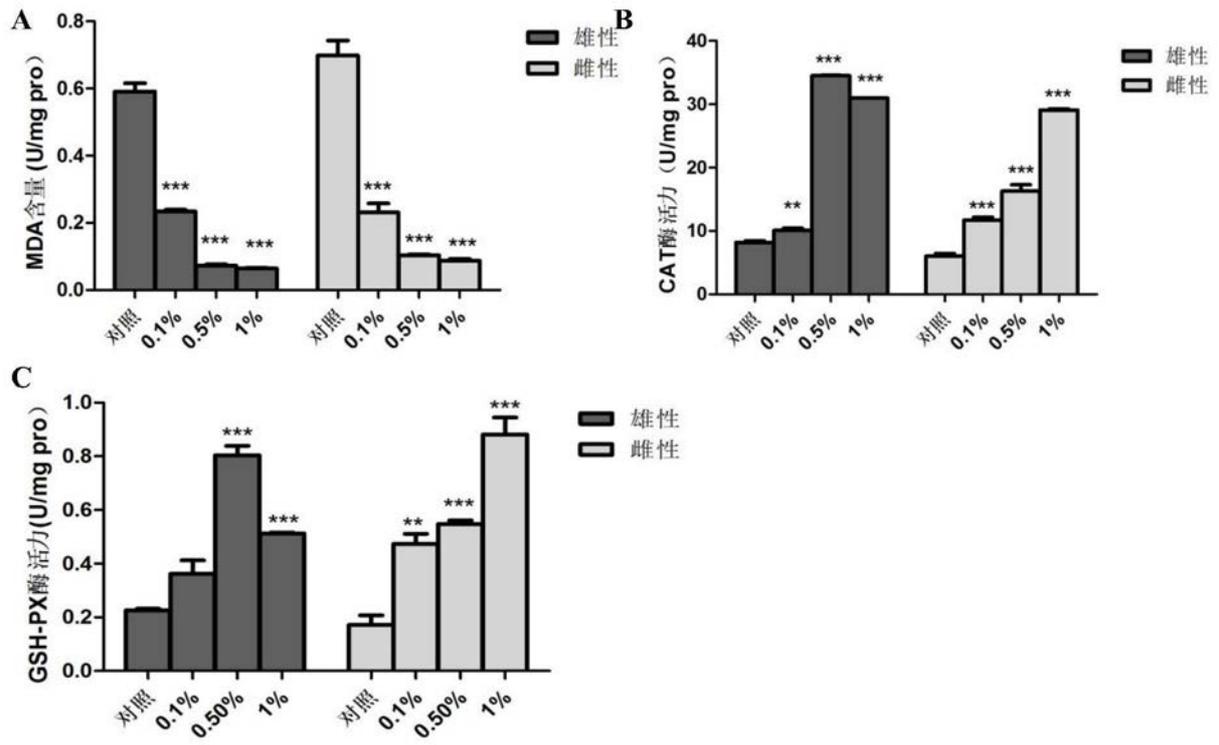


图3