



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108186790 A

(43)申请公布日 2018.06.22

(21)申请号 201810249713.X

(22)申请日 2018.03.26

(71)申请人 马海周

地址 410007 湖南省长沙市韶山中路113号
湖南中医药大学

(72)发明人 马海周

(74)专利代理机构 长沙新裕知识产权代理有限公司 43210

代理人 赵登高

(51)Int.Cl.

A61K 36/804(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

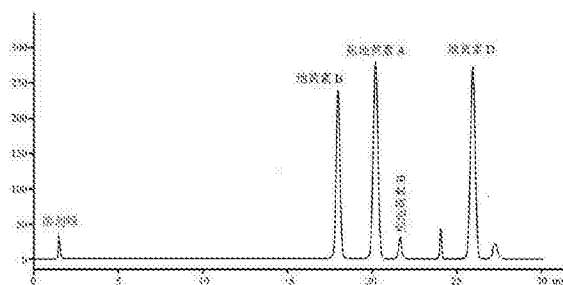
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

一种地黄提取物、制备方法及在促进CIK细胞体外增殖方面的应用

(57)摘要

本发明公开了一种地黄提取物、制备方法及在促进CIK细胞体外增殖方面的应用。该提取物中地黄素B、地黄素D和焦地黄素A总含量不低于90%，制备方法包括：步骤S1，将鲜地黄片用乙醇水溶液热回流提取，减压浓缩得浸膏；步骤S2，将浸膏用水溶解，先用石油醚萃取除杂，再用二氯甲烷萃取，合并二氯甲烷萃取液，浓缩干燥得二氯甲烷萃取物；步骤S3，将二氯甲烷萃取物上样于XDA-1B大孔吸附树脂柱，先用30%乙醇洗脱除杂，再用75%乙醇洗脱，收集8-10BV洗脱液，浓缩干燥得地黄提取物粗品；步骤S4，将地黄提取物粗品上样于正相硅胶柱，用体积比为10:1:0.2的二氯甲烷/甲醇/异丙醇混合溶剂洗脱，收集6-7BV洗脱液，浓缩干燥。该提取物可以促进CIK细胞体外增殖。



1. 一种地黄提取物,以地黄块根为原料制备而成,其特征在于:地黄素B、地黄素D和焦地黄素A在该地黄提取物中的总含量不低于90%。

2. 权利要求1所述地黄提取物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤S1,将鲜地黄洗净切片、干燥得到鲜地黄片;将鲜地黄片用乙醇水溶液热回流提取,合并提取液,减压浓缩得浸膏;

步骤S2,将浸膏用适量水溶解,先用石油醚萃取除杂,再用二氯甲烷萃取,合并二氯甲烷萃取液,浓缩干燥得二氯甲烷萃取物;

步骤S3,将二氯甲烷萃取物溶解拌树脂上样于XDA-1B大孔吸附树脂柱,先用30%乙醇洗脱除杂,再用75%乙醇洗脱,收集8-10BV洗脱液,浓缩干燥得到地黄提取物粗品;

步骤S4,将地黄提取物粗品上样于正相硅胶柱,用体积比为10:1:0.2的二氯甲烷/甲醇/异丙醇混合溶剂洗脱,收集6-7BV洗脱液,浓缩干燥得到富含地黄素B、地黄素D、焦地黄素A的地黄提取物。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:步骤S1将鲜地黄片用95%乙醇水溶液热回流提取3次,每次2h,固液比为1:20,合并提取液,减压浓缩得浸膏。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:步骤S2先用石油醚等体积萃取3次除杂,再用二氯甲烷萃取3次,合并二氯甲烷萃取液,浓缩干燥得二氯甲烷萃取物。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:步骤S2将二氯甲烷萃取物用30%乙醇水溶液溶解,拌树脂上样于XDA-1B大孔吸附树脂柱。

6. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:步骤S3中XDA-1B大孔吸附树脂柱的树脂径高比为1:10,拌样树脂占树脂总量的1/10。

7. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:步骤S3先用12BV的30%乙醇洗脱除杂,再用75%乙醇以10BV/h的流速洗脱,收集8-10BV洗脱液,浓缩干燥。

8. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:步骤S4中硅胶径高比为1:10,拌样硅胶占硅胶总量的1/10;用体积比为10:1:0.2的二氯甲烷/甲醇/异丙醇混合溶剂以10BV/h的速度洗脱,收集6-7BV洗脱液,浓缩干燥。

9. 权利要求1所述地黄提取物的HPLC分析方法,其特征在于,色谱参数如下:

色谱柱:Shim-packVP-ODS (4.6mm×250mm,5μm);

流动相A相:乙腈/水按照体积比1:9的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

流动相B相:乙腈/水按照体积比9:1的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

洗脱程序:0-5min,15%B相;5-15min,15%→55%B相;15-30min,55%→65%B相;

流速:1.0mL/min;

柱温:30℃;

检测波长:207nm。

10. 权利要求1所述地黄提取物在促进CIK细胞体外增殖方面的应用。

一种地黄提取物、制备方法及其在促进CIK细胞体外增殖方面的应用

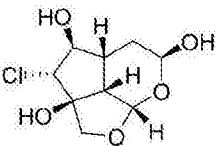
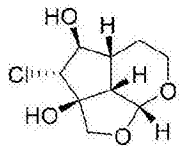
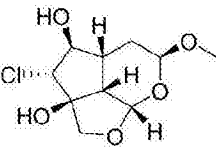
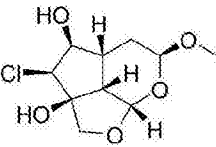
技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,具体涉及一种地黄提取物、制备方法及其在促进CIK细胞体外增殖方面的应用。

背景技术

[0002] 地黄素B、地黄素D、焦地黄素A和焦地黄素B为从地黄中分离得到的天然产物,化学结构非常相似,化学信息如下表所示。

[0003]

名称	CAS 登录号	化学结构	来源
地黄素 B	103744-83-8		地黄块根
地黄素 D	103744-84-9		地黄块根
焦地黄素 A	124902-16-5		地黄块根
焦地黄素 B	124989-76-0		地黄块根

[0004] 目前尚未见上述四种地黄素及以该四种地黄素为主要成分的提取物在CIK细胞体外增殖方面的研究报道。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一种地黄提取物、制备方法及其在促进CIK细胞体外增殖方面的应用。

[0006] 上述目的通过如下技术方案实现:

[0007] 一种地黄提取物,以地黄块根为原料制备而成,地黄素B、地黄素D和焦地黄素A在该地黄提取物中的总含量不低于90%。

[0008] 上述地黄提取物的制备方法,包括如下步骤:

[0009] 步骤S1,将鲜地黄洗净切片、干燥得到鲜地黄片;将鲜地黄片用乙醇水溶液热回流提取,合并提取液,减压浓缩得浸膏;

[0010] 步骤S2,将浸膏用适量水溶解,先用石油醚萃取除杂,再用二氯甲烷萃取,合并二氯甲烷萃取液,浓缩干燥得二氯甲烷萃取物;

[0011] 步骤S3,将二氯甲烷萃取物溶解拌树脂上样于XDA-1B大孔吸附树脂柱,先用30%乙醇洗脱除杂,再用75%乙醇洗脱,收集8-10BV洗脱液,浓缩干燥得到地黄提取物粗品;

[0012] 步骤S4,将地黄提取物粗品上样于正相硅胶柱,用体积比为10:1:0.2的二氯甲烷/甲醇/异丙醇混合溶剂洗脱,收集6-7BV洗脱液,浓缩干燥得到富含地黄素B、地黄素D、焦地黄素A的地黄提取物。

[0013] 优选地,步骤S1将鲜地黄片用95%乙醇水溶液热回流提取3次,每次2h,固液比为1:20,合并提取液,减压浓缩得浸膏。

[0014] 优选地,步骤S2先用石油醚等体积萃取3次除杂,再用二氯甲烷萃取3次,合并二氯甲烷萃取液,浓缩干燥得二氯甲烷萃取物

[0015] 优选地,步骤S2将二氯甲烷萃取物用30%乙醇水溶液溶解,拌树脂上样于XDA-1B大孔吸附树脂柱。

[0016] 优选地,步骤S3中XDA-1B大孔吸附树脂柱的树脂径高比为1:10,拌样树脂占树脂总量的1/10。

[0017] 优选地,步骤S3先用12BV的30%乙醇洗脱除杂,再用75%乙醇以10BV/h的流速洗脱,收集8-10BV洗脱液,浓缩干燥。

[0018] 优选地,步骤S4中硅胶径高比为1:10,拌样硅胶占硅胶总量的1/10;用体积比为10:1:0.2的二氯甲烷/甲醇/异丙醇混合溶剂以10BV/h的速度洗脱,收集6-7BV洗脱液,浓缩干燥。

[0019] 上述地黄提取物的HPLC分析方法,色谱参数如下:

[0020] 色谱柱:Shim-packVP-ODS (4.6mm×250mm,5μm);

[0021] 流动相A相:乙腈/水按照体积比1:9的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0022] 流动相B相:乙腈/水按照体积比9:1的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0023] 洗脱程序:0-5min,15%B相;5-15min,15%→55%B相;15-30min,55%→65%B相;

[0024] 流速:1.0mL/min;

[0025] 柱温:30℃;

[0026] 检测波长:207nm。

[0027] 上述地黄提取物在促进CIK细胞体外增殖方面的应用。

[0028] 本发明技术优势:

[0029] 本发明提供了一种地黄提取物,该提取物可以促进CIK细胞体外增殖;本发明还提供了该提取物的制备方法和HPLC分析方法。

附图说明

[0030] 图1为实施例2制备的地黄提取物的HPLC图谱;

[0031] 图2为实施例2步骤S4硅胶柱层析洗脱剂不添加异丙醇所得提取物的HPLC图谱;

[0032] 图3为实施例3制备液相色谱图;

[0033] 图4-6分别为实施例3所得地黄素B、地黄素D、焦地黄素A的HPLC图谱;

[0034] 图7为实施例3中步骤S3若使用XDA-1大孔吸附树脂替代XDA-1B大孔吸附树脂,步

骤S4所得地黄提取物的HPLC图谱；

[0035] 图8为实施例4混标溶液的HPLC色谱图；

[0036] 图9为实施例4使用不添加N-十六碳酰-L-丝氨酸钠的流动相对混标溶液的分离图。

具体实施方式

[0037] 下面结合实施例具体介绍本发明的实质性内容，但本领域技术人员应当知道，不应将本发明的保护范围局限于这些具体实施例。

[0038] 实施例1：地黄素B、地黄素D、焦地黄素A和焦地黄素B对CIK细胞体外增殖的影响

[0039] 一、实验材料

[0040] 地黄素B、地黄素D、焦地黄素A和焦地黄素B自制，纯度在95%以上。

[0041] 二、实验方法

[0042] 1、分离单个细胞

[0043] 用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法从健康志愿者外周血分离出PBMC，加4mL PBS稀释4mL全血（比例为1:1），取出稀释血缓慢加入装有4mL Ficoll-Hypaque离心管中，注意不要打乱液面界面，2000r/min离心20min，轻轻吸取单个核细胞至另一支离心管中。加入生理盐水5mL，轻轻吹匀细胞，离心洗涤2次。

[0044] 2、CIK细胞的培养

[0045] 在生理盐水悬浮的PBMC中加CIK初始培养液，调整细胞浓度为 5×10^5 /mL，种植于24孔板中，每孔200 μ L，首先加入含1000U/mL IFN- γ 的RPMI1640培养液，置于5%CO₂、37℃恒温培养箱中培养；24h后加100ng/mL抗CD3、500U/mL IL-2；培养4d后调整细胞浓度为 1×10^6 /mL，每隔2d补加500U/mL IL-2。照此法扩增至第10天收获CIK细胞。

[0046] 3、CCK-8法检测地黄素B、地黄素D、焦地黄素A和焦地黄素B对CIK细胞增殖影响

[0047] 收集培养10d的CIK细胞， 1×10^5 /mL细胞数接种于96孔板，200 μ L/孔，分别加入20 μ M地黄素B、地黄素D、焦地黄素A或焦地黄素B（对照组添加等体积溶媒），孵育48h后，加入CCK8，孵育后，于酶标仪450nm处检测各孔吸光值（OD）。

[0048] 4、统计学方法

[0049] 采用SPSS 19.0统计软件。计量资料以均值 $\pm$ 标准差表示，组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0050] 三、实验结果

[0051] 与对照组相比，地黄素B组、地黄素D组、焦地黄素A组48h增殖率显著升高（ $P < 0.05$ ），焦地黄素B组增殖率无明显差异（ $P > 0.05$ ）。结果如下表。

[0052]

组别	干预 48h 增殖率 (%)
对照组	5.48±0.79
地黄素 B 组	21.21±0.82
地黄素 D 组	20.84±0.77
焦地黄素 A 组	23.75±0.92
焦地黄素 B 组	6.63±0.88

[0053] 上述结果表明,地黄素B、地黄素D和焦地黄素A可以显著提高CIK细胞体外增殖,而焦地黄素B不具有这种作用。焦地黄素B与焦地黄素A相比,仅C1连接的碳原子构型不同,地黄素B和地黄素D中该碳原子构型与焦地黄素A相同,证明该碳原子的构型对地黄素类化合物的促进CIK细胞增殖活性至关重要,这种构效关系首次发现。

[0054] 实施例2:以地黄素B、地黄素D、焦地黄素A为主要成分的地黄提取物的制备及活性

[0055] 制备方法包括如下步骤:

[0056] 步骤S1,将鲜地黄洗净切片,55℃干燥,得到鲜地黄片;将鲜地黄片用95%乙醇水溶液热回流提取3次,每次2h,固液比为1:20,合并提取液,减压浓缩得浸膏;

[0057] 步骤S2,将浸膏用适量水溶解,先用石油醚等体积萃取3次除杂,再用二氯甲烷萃取3次,合并二氯甲烷萃取液,浓缩干燥得二氯甲烷萃取物;

[0058] 步骤S3,将二氯甲烷萃取物用30%乙醇水溶液溶解,拌树脂上样于XDA-1B大孔吸附树脂柱,树脂径高比为1:10,拌样树脂占树脂总量的1/10,先用12BV的30%乙醇洗脱除杂,再用75%乙醇以10BV/h的流速洗脱,收集8-10BV洗脱液,浓缩干燥得到地黄提取物粗品;

[0059] 步骤S4,将地黄提取物粗品上样于正相硅胶柱,硅胶径高比为1:10,拌样硅胶占硅胶总量的1/10;用体积比为10:1:0.2的二氯甲烷/甲醇/异丙醇混合溶剂以10BV/h的速度洗脱,收集6-7BV洗脱液,浓缩干燥得到富含地黄素B、地黄素D、焦地黄素A的地黄提取物。

[0060] 富含地黄素B、地黄素D、焦地黄素A的地黄提取物的HPLC分析:

[0061] 色谱仪:岛津LC-20AT高效液相色谱仪;

[0062] 色谱柱:Shim-packVP-ODS (4.6mm×250mm,5μm);

[0063] 流动相A相:乙腈/水按照体积比1:9的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0064] 流动相B相:乙腈/水按照体积比9:1的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0065] 洗脱程序:0-5min,15%B相;5-15min,15%→55%B相;15-30min,55%→65%B相;

[0066] 流速:1.0mL/min;

[0067] 柱温:30℃;

[0068] 检测波长:207nm;

[0069] 进样量:10μL。

[0070] 图1为上述地黄提取物的HPLC图谱,主要成分为地黄素B、地黄素D和焦地黄素A,经外标法定量,地黄素B、地黄素D和焦地黄素A占提取物总重的90.2%。由于焦地黄素B不具有促进CIK细胞增殖的活性,而其与焦地黄素A结构非常接近,为了将焦地黄素B排除在上述提

取物之外,步骤S4硅胶柱层析的洗脱剂中增加了少量异丙醇。若流动相不添加异丙醇,其他操作不变,所得提取物的HPLC图谱如图2所示,含有较多焦地黄素B和其他杂质。

[0071] 按照实施例1的方法测试上述地黄提取物对CIK细胞体外增殖的促进活性,5 μ g/mL地黄提取物干预48h后的增殖率为(26.18 $\pm$ 1.07)%,显著优于对照组。

[0072] 实施例3:地黄素B、地黄素D、焦地黄素A单体的分离制备

[0073] 分离制备方法包括如下步骤:

[0074] 步骤S1,将鲜地黄洗净切片,55 $^{\circ}$ C干燥,得到鲜地黄片;将鲜地黄片用95%乙醇水溶液热回流提取3次,每次2h,固液比为1:20,合并提取液,减压浓缩得浸膏;

[0075] 步骤S2,将浸膏用适量水溶解,先用石油醚等体积萃取3次除杂,再用二氯甲烷萃取3次,合并二氯甲烷萃取液,浓缩干燥得二氯甲烷萃取物;

[0076] 步骤S3,将二氯甲烷萃取物用30%乙醇水溶液溶解,拌树脂上样于XDA-1B大孔吸附树脂柱,树脂径高比为1:10,拌样树脂占树脂总量的1/10,先用12BV的30%乙醇洗脱除杂,再用75%乙醇以10BV/h的流速洗脱,收集8-10BV洗脱液,浓缩干燥得到地黄提取物粗品;

[0077] 步骤S4,将地黄提取物粗品上样于正相硅胶柱,硅胶径高比为1:10,拌样硅胶占硅胶总量的1/10;用体积比为10:1:0.2的二氯甲烷/甲醇/异丙醇混合溶剂以10BV/h的速度洗脱,收集6-7BV洗脱液,浓缩干燥得到富含地黄素B、地黄素D、焦地黄素A的地黄提取物;

[0078] 步骤S5,制备液相分离:制备液相色谱参数如下,根据色谱图(如图3所示)收集地黄素B、地黄素D、焦地黄素A对应的流份;

[0079] 制备液相色谱参数:

[0080] 色谱系统:Waters Prep 150制备液相色谱系统

[0081] 色谱柱:XBridge Prep C18柱(19mm $\times$ 250mm,5 μ m)

[0082] 流动相A相:乙腈/水按照体积比1:9的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0083] 流动相B相:乙腈/水按照体积比9:1的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0084] 洗脱程序:0-5min,15%B相;5-15min,15% $\rightarrow$ 55%B相;15-30min,55% $\rightarrow$ 65%B相;

[0085] 流速:16.0mL/min;

[0086] 柱温:30 $^{\circ}$ C;

[0087] 检测波长:207nm;

[0088] 进样量:100 μ L;

[0089] 步骤S6,脱盐:将地黄素B、地黄素D、焦地黄素A对应的流份分别浓缩至干后用甲醇超声,N-十六碳酰-L-丝氨酸钠不溶于甲醇,过滤收集滤液浓缩干燥即得地黄素B、地黄素D、焦地黄素A单体。

[0090] 地黄素B、地黄素D、焦地黄素A单体的HPLC分析:

[0091] 色谱仪:岛津LC-20AT高效液相色谱仪;

[0092] 色谱柱:Shim-packVP-ODS(4.6mm $\times$ 250mm,5 μ m);

[0093] 流动相A相:乙腈/水按照体积比1:9的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0094] 流动相B相:乙腈/水按照体积比9:1的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0095] 洗脱程序:0-5min,15%B相;5-15min,15% $\rightarrow$ 55%B相;15-30min,55% $\rightarrow$ 65%B相;

[0096] 流速:1.0mL/min;

[0097] 柱温:30℃;

[0098] 检测波长:207nm;

[0099] 进样量:10μL。

[0100] 图4-6分别为制备得到的地黄素B、地黄素D、焦地黄素A的HPLC图谱,可见其纯度均较高,经外标法定量均在95%以上。

[0101] 上述制备方法中,步骤S3若使用XDA-1大孔吸附树脂替代XDA-1B大孔吸附树脂,步骤S4所得地黄提取物中杂质成分明显较多(如图7所示),尤其是地黄素B和焦地黄素A之间的杂质对于地黄素B和焦地黄素A单体的分离纯化影响很大。

[0102] 实施例4:检测焦地黄素A中焦地黄素B的方法

[0103] HPLC分析参数:

[0104] 色谱仪:岛津LC-20AT高效液相色谱仪;

[0105] 色谱柱:Shim-packVP-ODS (4.6mm×250mm,5μm);

[0106] 流动相A相:乙腈/水按照体积比1:9的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0107] 流动相B相:乙腈/水按照体积比9:1的混合液,含5ppm的N-十六碳酰-L-丝氨酸钠;

[0108] 洗脱程序:0-5min,15%B相;5-15min,15%→55%B相;15-30min,55%→65%B相;

[0109] 流速:1.0mL/min;

[0110] 柱温:30℃;

[0111] 检测波长:207nm;

[0112] 进样量:10μL。

[0113] 单标溶液:分别配置浓度为0.1mg/mL的焦地黄素A、焦地黄素B甲醇溶液。

[0114] 混标溶液:配置焦地黄素A、焦地黄素B浓度分别为0.1mg/mL的甲醇溶液。

[0115] 图8为混标溶液的HPLC色谱图。可见焦地黄素A、焦地黄素B在上述色谱条件下可以有效分离,实现基线分离,分离度大于2.0。

[0116] 若使用常规的乙腈/水作为流动相(流动相不添加N-十六碳酰-L-丝氨酸钠,其他参数不变),混标溶液的HPLC色谱图如图9所示,焦地黄素A、焦地黄素B分离难度大。这表明,流动相中添加N-十六碳酰-L-丝氨酸钠有助于增加焦地黄素A、焦地黄素B这对手性异构体在反相色谱柱上的区分度。

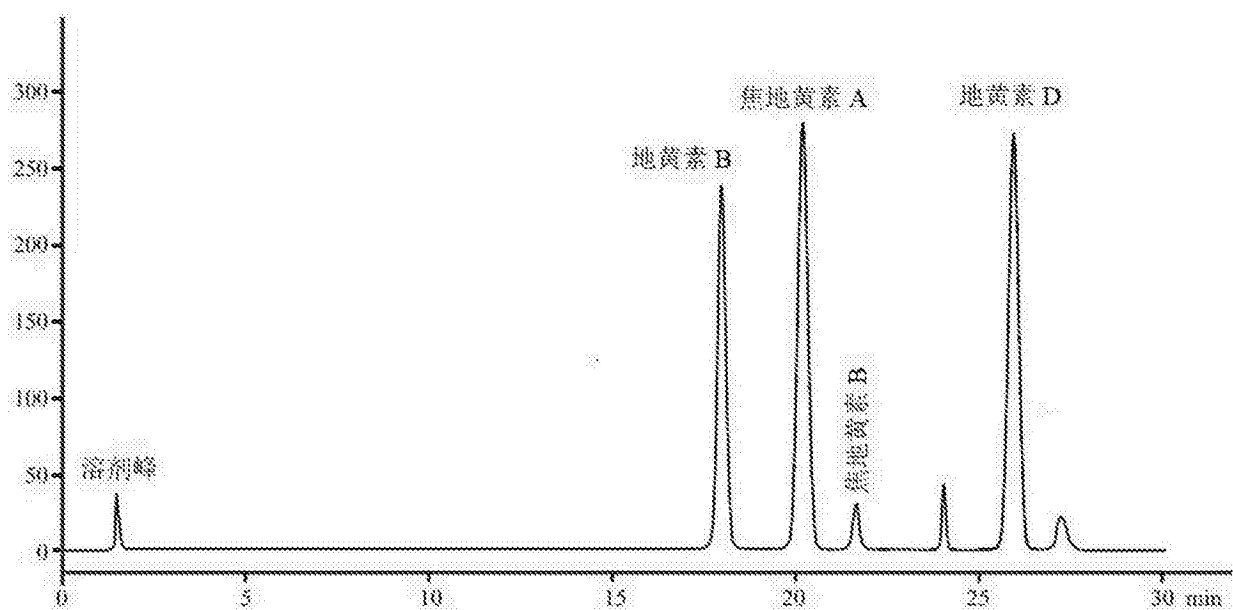


图1

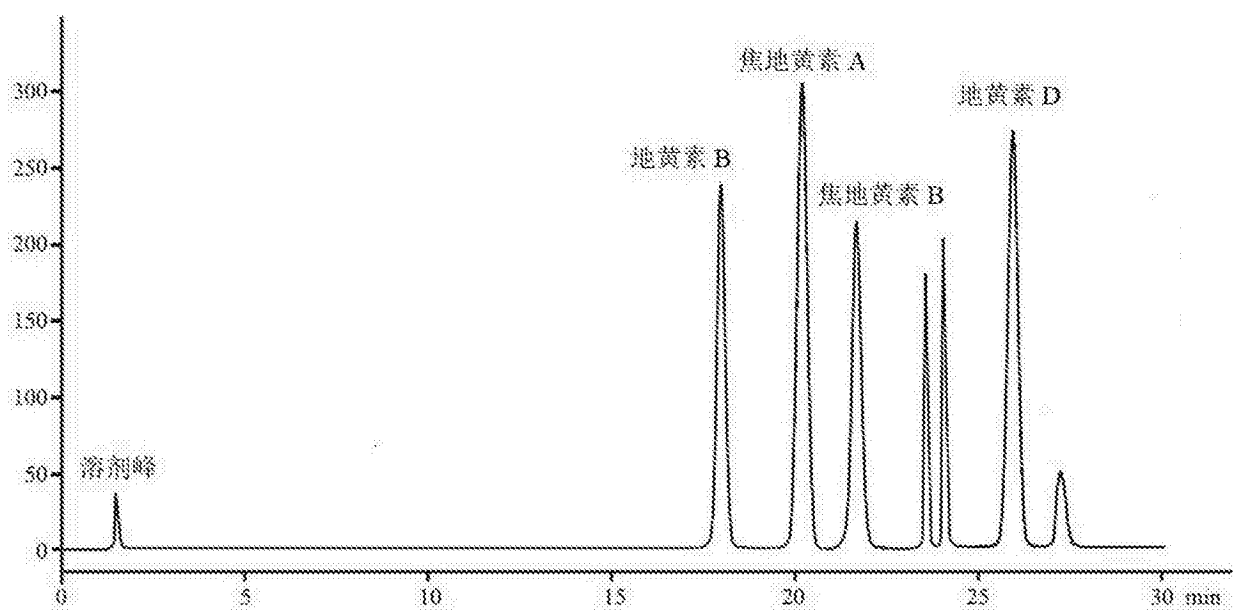


图2

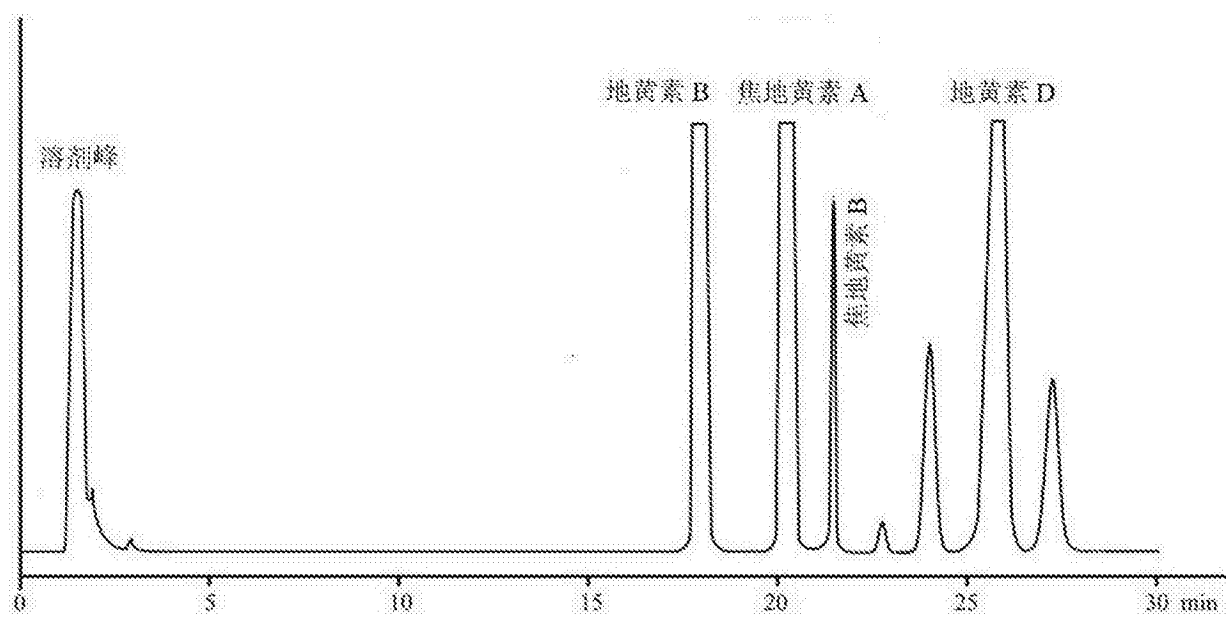


图3

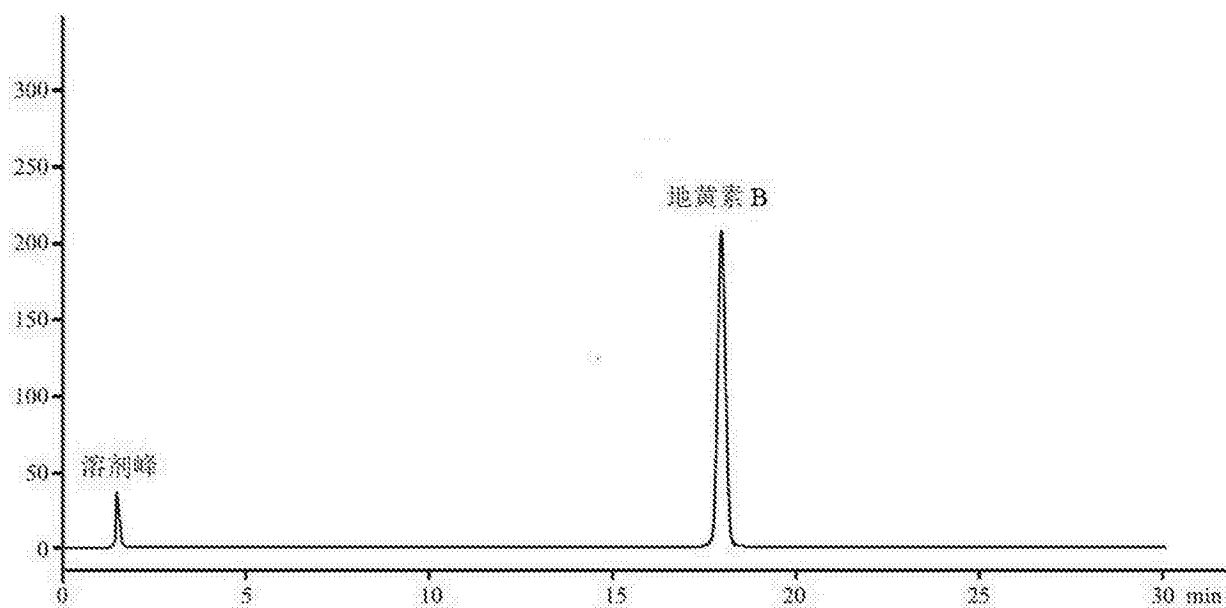


图4

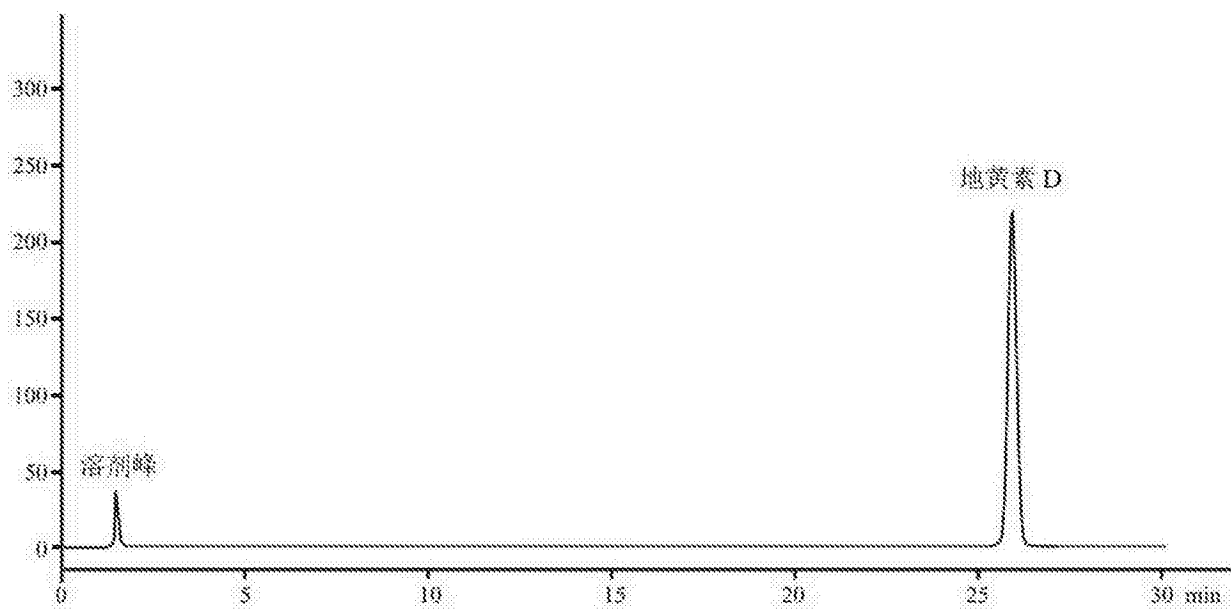


图5

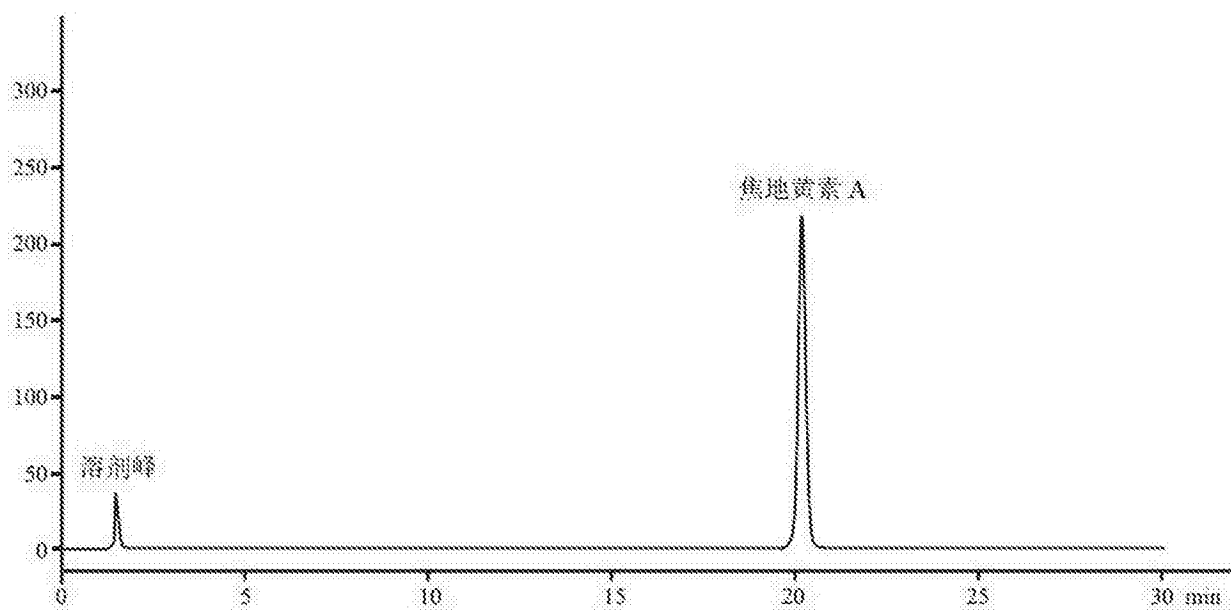


图6

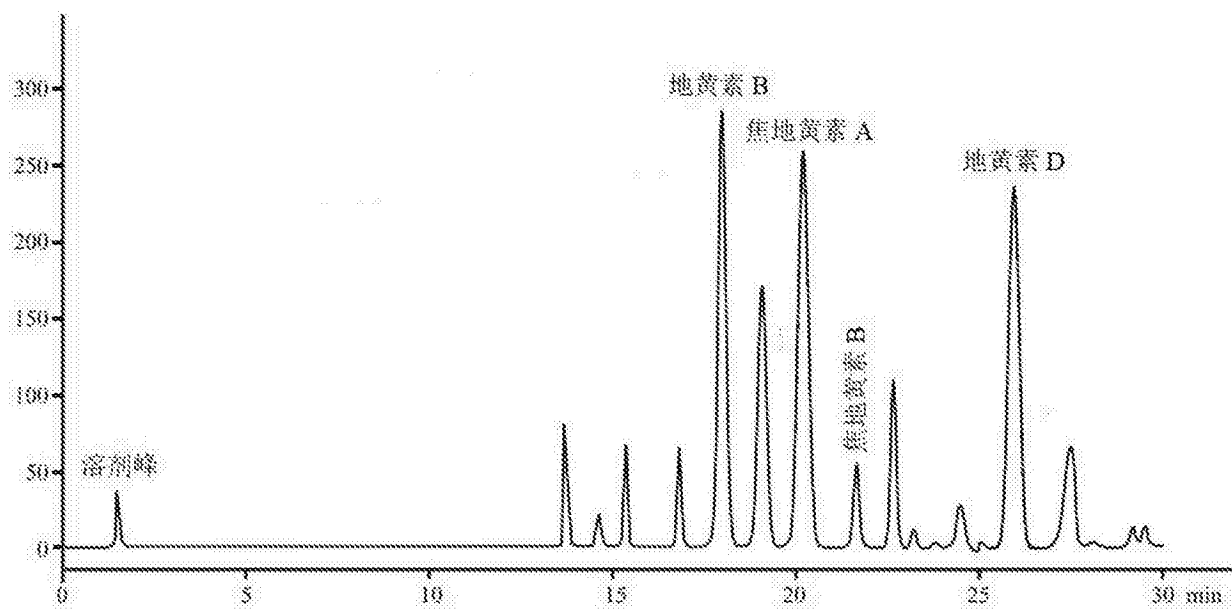


图7

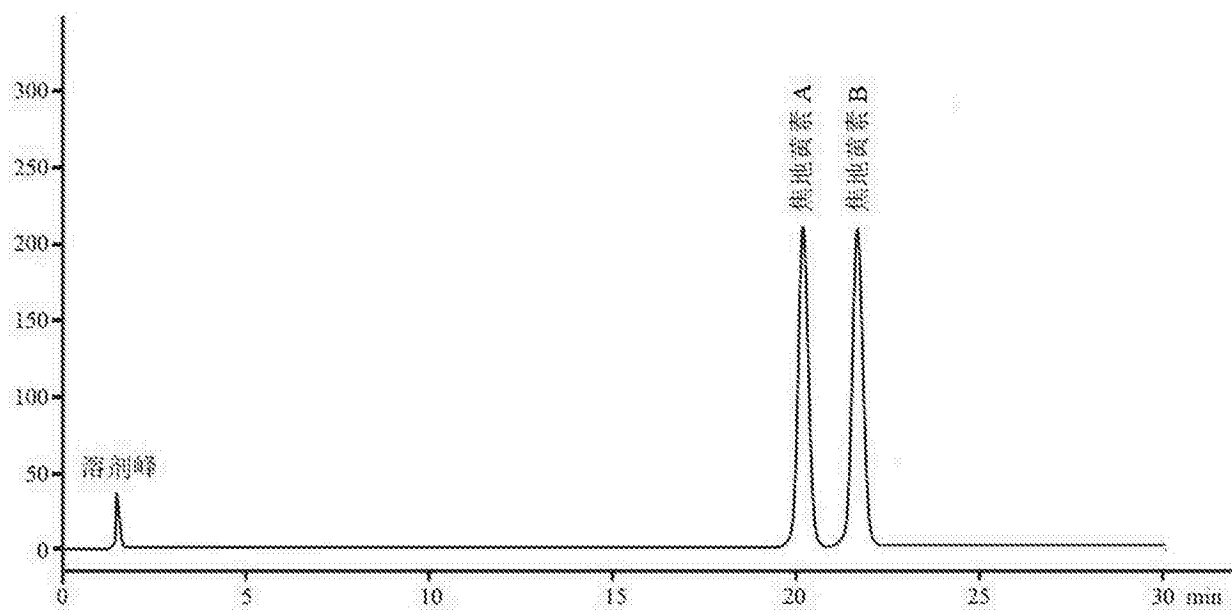


图8

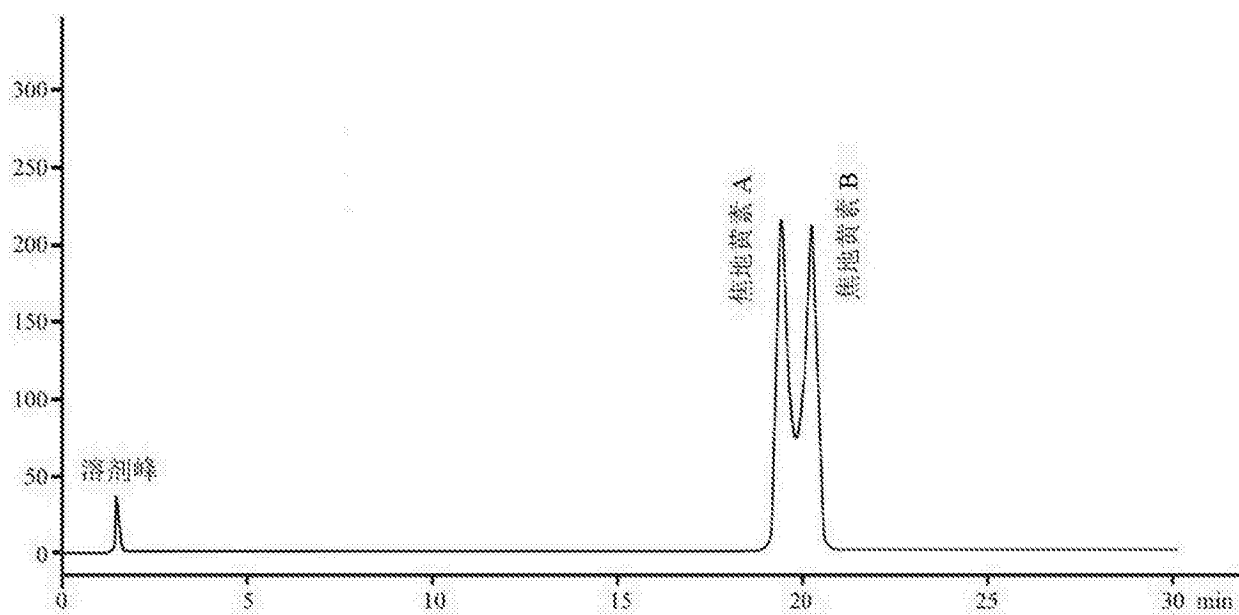


图9