



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106046187 B

(45)授权公告日 2018.06.19

(21)申请号 201610489504.3

A61K 31/715(2006.01)

(22)申请日 2016.06.28

A61P 37/04(2006.01)

A61K 36/185(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106046187 A

(56)对比文件

CN 102964466 A,2013.03.13,

CN 102526754 A,2012.07.04,

CN 103739732 A,2014.04.23,

CN 1616494 A,2005.05.18,

高素莲 等.黄蜀葵多糖的分析.《分析测试学报》.2002,第21卷(第6期),

审查员 余晓媛

(43)申请公布日 2016.10.26

(73)专利权人 南京中医药大学

地址 210023 江苏省南京市栖霞区仙林大道138号

(72)发明人 江曙 潘欣欣 段金廛 钱大玮 朱悦 严辉

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 杨海军

(51)Int.Cl.

C08B 37/00(2006.01)

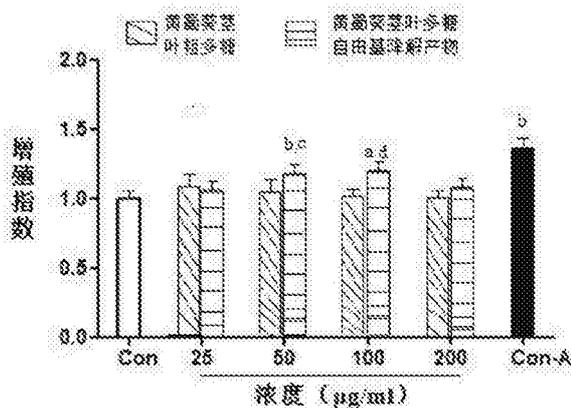
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

具有提高免疫活性的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物及其制备方法,黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物由摩尔比为0.34:18.56:1.0:0.36的甘露糖、葡萄糖、半乳糖以及阿拉伯糖组成;分子量为552.36kDa。本发明通过大量实验优选提取分离工艺,采用水提醇沉法得到粗多糖,再脱蛋白,然后采用DEAE-52纤维素树脂进行纯化,制得纯度高的黄蜀葵茎叶多糖,再采用H₂O₂-Vc体系进行降解,纯化,得到黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。本发明充分利用废弃的黄蜀葵茎叶资源,变废为宝,得到可提高免疫活性的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物,可实现中药资源的可持续化应用,具有很好的经济价值和生态环境保护意义。



1. 一种黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的溶液,其特征在于,黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物由摩尔比为0.34:18.56:1.0:0.36的甘露糖、葡萄糖、半乳糖以及阿拉伯糖组成;黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的分子量为552.36kDa;

黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的溶液的浓度为50~100 μ g/mL;

黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的制备方法包括以下步骤:

(1) 取黄蜀葵茎叶乙醇提取后的药渣,加入药渣重量10~30倍体积的水,回流提取2~3次,每次1~2小时,过滤,合并滤液,减压浓缩;Sevag法除蛋白,离心,取上清液,加入无水乙醇,醇沉过夜,抽滤,取沉淀,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,烘干,得黄蜀葵茎叶粗多糖;

(2) 黄蜀葵茎叶粗多糖的分级

称取步骤(1)制备得到的黄蜀葵茎叶粗多糖,加蒸馏水溶解,加样于DEAE-52层析柱中,用0.0、0.1、0.3、0.5mol/L NaCl溶液梯度洗脱,并采用苯酚-硫酸法检测多糖含量,分别收集不同的洗脱峰,减压浓缩,透析,最后将透析液真空冷冻干燥,获得黄蜀葵茎叶多糖;

(3) 黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解

取步骤(2)得到的黄蜀葵茎叶多糖,采用H₂O₂-维生素C体系进行降解,具体操作方法为:准确称取黄蜀葵茎叶多糖,溶于蒸馏水中,加入的H₂O₂和Vc,30~35 $^{\circ}$ C搅拌降解,反应结束后,调节pH至中性,流水透析,减压浓缩,冻干,得黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。

2. 权利要求1所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的溶液的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 取黄蜀葵茎叶乙醇提取后的药渣,加入药渣重量10~30倍体积的水,回流提取2~3次,每次1~2小时,过滤,合并滤液,减压浓缩;Sevag法除蛋白,离心,取上清液,加入无水乙醇,醇沉过夜,抽滤,取沉淀,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,烘干,得黄蜀葵茎叶粗多糖;

(2) 黄蜀葵茎叶粗多糖的分级

称取步骤(1)制备得到的黄蜀葵茎叶粗多糖,加蒸馏水溶解,加样于DEAE-52层析柱中,用0.0、0.1、0.3、0.5mol/L NaCl溶液梯度洗脱,并采用苯酚-硫酸法检测多糖含量,分别收集不同的洗脱峰,减压浓缩,透析,最后将透析液真空冷冻干燥,获得黄蜀葵茎叶多糖;

(3) 黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解

取步骤(2)得到的黄蜀葵茎叶多糖,采用H₂O₂-维生素C体系进行降解,具体操作方法为:准确称取黄蜀葵茎叶多糖,溶于蒸馏水中,加入的H₂O₂和Vc,30~35 $^{\circ}$ C搅拌降解,反应结束后,调节pH至中性,流水透析,减压浓缩,冻干,得黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。

3. 根据权利要求2所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的溶液的制备方法,其特征在于,步骤(3)准确称取黄蜀葵茎叶多糖40mg,溶于蒸馏水中,加入摩尔比为1:1的0.025mol/L的H₂O₂和Vc,35 $^{\circ}$ C搅拌降解4h,反应结束后,调节pH至中性,流水透析,取透析液,减压浓缩,冻干,得黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。

4. 权利要求1所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的溶液在制备提高免疫力的药物或保健品中的应用。

具有提高免疫活性的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物多糖,具体涉及一种具有提高免疫活性的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物及其制备方法。

背景技术

[0002] 中药资源是保障国民健康、发展民族医药的坚实基础。近年来中药及天然药用生物资源的生产面积已超过 $2.40 \times 10^6 \text{hm}^2$,药材产量可达 $5.40 \times 10^6 \text{t}$,而废弃的植物根系以及地上茎叶的生物量高达 $1.1 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^7 \text{t}$,是药材产量2~3倍,造成了严重的资源浪费和环境污染。因此,在中药资源产业化过程中提高药用生物资源的利用价值、尤其是提升其药用价值,对于中医药产业的健康发展以及发展资源节约型、环境友好型的经济具有重大意义。

[0003] 黄蜀葵(*Abelmoschus manihot* L.Medic)为锦葵科秋葵属植物,始载于《嘉祐本草》,《本草纲目》中记载:“其花气味甘、寒、滑、无毒,主治小便淋及催生,治诸恶疮脓水久不瘥者,作末敷之即愈,为疮家要药”等。其根、茎、叶均具有一定的药用价值。黄蜀葵花为主要用药部位,在采收过程中其茎叶部分多被丢弃或是焚烧,造成了黄蜀葵茎叶资源的极大浪费以及环境的污染。

[0004] 多糖是一类结构复杂的高分子物质,具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗突变、抗辐射和增强免疫等多种生物学功效。但一般情况下,天然提取的多糖生物活性较弱。在天然多糖分子中引入某种离子基团并且具有恰当的取代度时,不仅能够显著改善多糖在水中的溶解度,而且可以使多糖链的构象发生改变,从而使其具有某种特定的结构而提高生物活性。

[0005] 因此,对多糖进行部分降解,把大分子断裂成较小片段,使得某些活性基团暴露出来,改善多糖的活性,是分子修饰的重要方向。目前,国内外对黄蜀葵茎叶多糖的研究主要集中在理化性质以及单糖的分析,对其活性的研究较少。因此,应用羟自由基降解技术改变黄蜀葵茎叶多糖的结构、改善其理化性质,获得真正具有活性的多糖,对黄蜀葵茎叶资源的高效利用以及生态环境的保护意义重大。

发明内容

[0006] 发明目的:本发明的目的是为了解决现有技术的不足,以黄蜀葵茎叶废弃物为原料,通过优选方法制备得到黄蜀葵茎叶粗多糖,然后对黄蜀葵茎叶多糖进行自由基降解,得到具有提高免疫活性的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。

[0007] 本发明另一个目的是提供黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的制备方法和其应用。本发明充分利用废弃的黄蜀葵茎叶资源,变废为宝,得到可提高免疫活性的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物,可实现中药资源的可持续化应用,具有很好的经济价值和生态环境的保护意义。

[0008] 技术方案:为了实现以上目的,本发明采用的技术方案为:

[0009] 一种黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物,黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物由摩尔比为0.34:18.56:1.0:0.36的甘露糖、葡萄糖、半乳糖以及阿拉伯糖组成;黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的分子量为552.36kDa。

[0010] 本发明所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 取黄蜀葵茎叶乙醇提取后的药渣,加入药渣重量10~30倍体积的水,回流提取2~3次,每次1~2小时,过滤,合并滤液,减压浓缩;Sevag法除蛋白,离心,取上清液,加入无水乙醇,醇沉过夜,抽滤,取沉淀,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,烘干,得黄蜀葵茎叶粗多糖;

[0012] (2) 黄蜀葵茎叶粗多糖的分级

[0013] 称取步骤(1)制备得到的黄蜀葵茎叶粗多糖,加蒸馏水溶解,加样于DEAE-52层析柱中,用0.0、0.1、0.3、0.5mol/L NaCl溶液梯度洗脱,并采用苯酚-硫酸法检测多糖含量,分别收集不同的洗脱峰,减压浓缩,透析,最后将透析液真空冷冻干燥,获得黄蜀葵茎叶多糖;

[0014] (3) 黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解

[0015] 取步骤(2)得到的黄蜀葵茎叶多糖,采用H₂O₂-维生素C(Vc)体系进行降解,具体操作为:准确称取黄蜀葵茎叶多糖,溶于蒸馏水中,加入的H₂O₂和Vc,30~35℃搅拌降解,反应结束后,调节pH至中性,流水透析,减压浓缩,冻干,得黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。

[0016] 作为优选方案,以上所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的制备方法,步骤(3)准确称取黄蜀葵茎叶多糖40mg,溶于蒸馏水中,加入摩尔比为1:1的0.025mol/L的H₂O₂和Vc,35℃搅拌降解4h,反应结束后,调节pH至中性,流水透析,取透析液,浓缩,冻干,得黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。

[0017] 本发明所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物在制备提高免疫力的药物或保健品中的应用。

[0018] 作为优选方案,以上所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物在制备提高免疫力的药物或保健品中的应用,把黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物和药学上可接受的载体制成片剂、胶囊剂、颗粒剂或微囊剂型的药物。

[0019] 本发明通过实验研究表明,本发明制备得到的黄蜀葵茎叶多糖,经过自由基降解的产物具有显著的促进脾淋巴细胞增殖的作用,可用于制备提高免疫力的药物或保健品。

[0020] 本发明所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物在制备提高免疫力的药物或保健品中的应用,可将黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物和药学上可接受的载体制成片剂、胶囊剂、颗粒剂或微囊剂型的药物。

[0021] 本发明在制成片剂时,在黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物中添加载体乳糖或玉米淀粉,需要时加入润滑剂硬脂酸镁,混合均匀,然后压片制成片剂。

[0022] 在制成胶囊剂时,将黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物和载体乳糖或玉米淀粉混合均匀,整粒,然后装胶囊制成胶囊剂。

[0023] 本发明在制成颗粒剂时,把黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物和稀释剂乳糖或玉米淀粉混合均匀,整粒,干燥,制成颗粒剂。

[0024] 有益效果:本发明提供的具有提高免疫活性的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物和现有技术相比具有以下优点:

[0025] 1、本发明通过大量实验优选提取分离工艺,首先采用水提醇沉法得到粗多糖,再脱除蛋白,然后采用DEAE-52纤维素树脂进行纯化,制得纯度高的黄蜀葵茎叶多糖,然后再采用 H_2O_2 -Vc体系进行降解,纯化,得到黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。

[0026] 本发明充分利用废弃的黄蜀葵茎叶资源,变废为宝,制备得到可提高免疫活性的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物,可实现中药资源的可持续化应用,具有很好的经济价值和生态环境的保护意义。

[0027] 2、本发明经过体外小鼠脾淋巴细胞的增殖活性试验表明,黄蜀葵茎叶多糖并无明显的免疫调节活性,但是黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物具有显著的促进脾淋巴细胞增殖的作用。在 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量时具有最强的增殖作用,增值率为1.219,而修饰前的增殖指数仅为1.078,取得了非常好的预料不到的技术效果。

附图说明

[0028] 图1为黄蜀葵茎叶多糖及其自由基降解产物的脾细胞增殖活性柱状图。

具体实施方式

[0029] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的具体的物料配比、工艺条件及其结果仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0030] 实施例1

[0031] 本发明所述的黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物的制备方法,包括以下步骤:

[0032] (1) 黄蜀葵茎叶粗多糖的制备

[0033] 黄蜀葵茎叶粗粉100g,加入30倍量水,100℃水浴回流提取3次,每次1h。过滤,合并滤液,减压浓缩。Sevag法除蛋白,离心(4000r/min,10min),取上清液,加入四倍体积的无水乙醇,醇沉过夜,抽滤,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤三次,50℃烘干,即得黄蜀葵茎叶粗多糖。

[0034] (2) 黄蜀葵茎叶粗多糖的分级

[0035] 称取粗多糖3g,加适量蒸馏水溶解,配制质量浓度为30mg/mL的多糖溶液,加样于DEAE-52层析柱中。用0.0、0.1、0.3、0.5mol/L NaCl溶液梯度洗脱,流速1.0mL/min(10min/管),采用苯酚-硫酸法检测多糖含量,分别收集不同的洗脱峰,减压浓缩,透析,最后将透析液真空冷冻干燥,获得黄蜀葵茎叶多糖。

[0036] (3) 黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解

[0037] 取步骤(2)得到的黄蜀葵茎叶多糖采用 H_2O_2 -Vc体系进行降解,准确称取黄蜀葵茎叶多糖40mg,溶于20mL蒸馏水中,加入0.025mol/L的 H_2O_2 和Vc(H_2O_2 与Vc的摩尔比为1:1),35℃搅拌降解4h,反应结束后,调节pH至中性,流水透析3天,减压浓缩,冻干,得降黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物。

[0038] 实施例2 黄蜀葵茎叶多糖的自由基降解产物总糖以及糖醛酸含量的测定

[0039] 1、实验方法:以D-无水葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法测定硫酸化修饰前后黄蜀葵茎叶多糖的总糖含量;采用间羟联苯法测定糖醛酸含量,以D-葡萄糖醛酸为标准品。

[0040] 2、实验结果:实施例1制备得到黄蜀葵茎叶多糖的总糖含量99.76%,黄蜀葵茎叶

多糖的自由基降解产物的总糖含量有所下降,为95.53%;黄蜀葵茎叶多糖在降解前不含糖醛酸,降解后亦不含糖醛酸,这与单糖组成的结果是一致的。

[0041] 实施例3 黄蜀葵茎叶多糖及其自由基降解产物的单糖组成分析

[0042] 1、实验方法采用三氟乙酸水解多糖样品,以混合单糖为标准品,PMP衍生多糖样品以及混标,利用高效液相色谱法根据出峰时间确定单糖的组成,根据峰面积绘制各单糖的标准曲线测定样品的单糖含量。

[0043] 2、实验结果:单糖组成分析

[0044] 实施例1制备得到的黄蜀葵茎叶多糖及降解产物的单糖组成的摩尔比如表1所示,黄蜀葵茎叶多糖由甘露糖、葡萄糖、半乳糖以及阿拉伯糖组成,其中葡萄糖的含量最多,其它三种糖的含量较少。自由基降解后,降解产物主要是葡萄糖的比例有所降低,降解成功。

[0045] 表1黄蜀葵茎叶多糖及其自由基降解产物的单糖组成摩尔比

	甘露糖	葡萄糖	半乳糖	阿拉伯糖
[0046] 黄蜀葵茎叶多糖	0.40	21.93	1.00	0.40
[0047] 黄蜀葵茎叶多糖自由基降解产物	0.34	18.56	1.00	0.36

[0048] 实施例4 黄蜀葵茎叶多糖及其自由基降解产物的分子量测定

[0049] 1、试验方法:采用HPGPC-ELSD法测定自由基降解前后的分子量,以葡聚糖T系列为标准分子量制作标准曲线。

[0050] 2、实验结果

[0051] 实施例1制备得到的黄蜀葵茎叶多糖在自由基降解前的分子量为760.24kDa,降解后的分子量为552.36kDa,分子量大幅降低,进一步表明降解成功。

[0052] 实施例5 黄蜀葵茎叶多糖及其自由基降解产物小鼠脾淋巴细胞增殖试验

[0053] 1、实验方法:无菌取脾,制备小鼠脾淋巴细胞悬液,调整细胞浓度为 6×10^6 个/mL,于96孔板接种100 μ L/孔,再分别加入培养液(空白对照)、10 μ g/mL ConA(刀豆球蛋白A,阳性对照)及不同浓度的实施例1制备得到的黄蜀葵茎叶多糖及其自由基降解产物溶液各100 μ L/孔,每个浓度均设4个复孔,混合均匀后置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养24h。培养结束前4h,每孔加入MTT(5mg/mL)10 μ L,于上述条件中继续培养4h,离心弃上清,加入100 μ L DMSO,充分震荡后用酶标仪测定波长570nm的吸光值。

[0054] 淋巴细胞增殖指数=样品组吸光值/空白对照组吸光值

[0055] 2、实验结果:脾细胞增殖活性分析结果如图1所示,图中a表示与对照组相比,增强作用差异显著($p < 0.05$);b表示与对照组相比,增强作用差异极显著($p < 0.01$);c表示与黄蜀葵茎叶多糖组相比,增强作用差异显著($p < 0.05$);d表示与黄蜀葵茎叶多糖组相比,增强作用差异极显著($p < 0.01$)。对照组的增殖指数为1.002,阳性组为1.357。

[0056] 由图1可知,与对照组相比,黄蜀葵茎叶多糖在实验剂量范围内不能刺激脾淋巴细胞的增殖,而黄蜀葵茎叶多糖降解产物具有显著的促进脾淋巴细胞增殖的作用。黄蜀葵茎叶多糖降解产物在50 μ g/mL剂量时具有最强的增殖作用,增值率为1.219,而修饰前的增殖指数仅为1.078。取得了非常好的技术效果。

[0057] 本发明通过对黄蜀葵茎叶多糖降解前后的总糖、单糖组成的分析以及分子量的测

定,表明降解成功。黄蜀葵茎叶多糖与黄蜀葵茎叶多糖降解产物的体外小鼠脾淋巴细胞的增殖活性试验表明,黄蜀葵茎叶多糖并无免疫调节活性,但是经自由基降解后在50~100 μ g/mL剂量范围内表现出显著的免疫调节活性。本发明制备得到的黄蜀葵茎叶多糖降解产物,水溶性增加,暴露相关活性基团,使其具备免疫调节活性,为黄蜀葵茎叶资源的有效利用提供技术支持以及应用方向。

[0058] 以上实施方式只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人了解本发明内容并加以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所做的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围内。

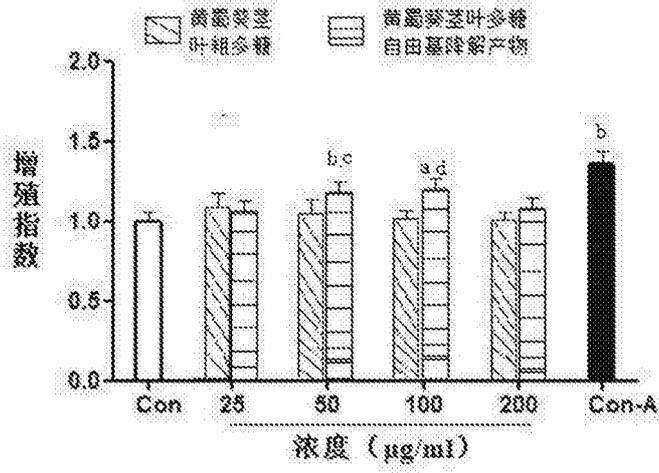


图1