



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101899077 A

(43) 申请公布日 2010.12.01

(21) 申请号 201010206031.4

A61P 9/00(2006.01)

(22) 申请日 2010.06.23

A61P 9/10(2006.01)

(71) 申请人 吉林大学

地址 130000 吉林省长春市人民富锦路
1266 号

申请人 中国科学院长春应用化学研究所

(72) 发明人 刘忠英 刘志强 丁一迪

(74) 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任
公司 22001

代理人 马守忠

(51) Int. Cl.

C07H 17/07(2006.01)

C07H 1/08(2006.01)

A61K 31/7048(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 4 页

(54) 发明名称

朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法及
应用

(57) 摘要

本发明涉及朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的
提取方法及应用。所述的提取方法,不仅可以避免
因为色谱柱的不可逆吸附而导致产率低,而且
可以大量提取高纯度的淫羊藿次苷 I。所述的提
取方法,经高效液相色谱法进行含量测定,淫羊
藿次苷 I 的质量提取率在 60%以上,质量易控,方
法简便快速。本发明对淫羊藿次苷 I 进行了药
理方面的研究,证实淫羊藿次苷 I 具有对垂体
后叶素诱发大鼠心肌缺血的保护作用。其具体
表现在可以抑制 T 波的作用;可以抑制 J 点位
移变化的作用。淫羊藿次苷 I 对豚鼠离体心
脏有保护作用。其具体表现在可以增加豚鼠的
冠脉流量。本发明得到的淫羊藿次苷 I,其用
于制备治疗心脏病的药物。

1. 朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法,其特征在于,其步骤和条件如下:

a 将朝鲜淫羊藿叶用是其质量 15 倍的体积浓度为 70%乙醇回流 4 小时,滤出乙醇提取液,将回流过的药渣用是朝鲜淫羊藿叶质量 10 倍的体积浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液;

b 滤液在 50℃下减压蒸出溶剂,得到提取物,提取物中所含的水分不多于其质量的 5%;

c 用朝鲜淫羊藿叶质量 2 倍的无水乙醇溶解步骤 b 中所得到的提取物,加入浓盐酸,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸的体积 mL 为 1 : 0.05 ~ 0.15,在 50℃水浴加热 15 ~ 25 小时,室温放置过夜,过滤;

d 滤液在 50℃减压浓缩至其体积的 20%,加入朝鲜淫羊藿叶质量 2 倍的蒸馏水析出沉淀,沉淀在 50℃下用体积浓度为 20%的乙醇溶液洗涤,洗涤后的沉淀在 50℃下真空干燥,得到淫羊藿次苷 I 粉末。

2. 如权利要求 1 所述的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法,其特征在于,所述的步骤 c,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸的体积 mL 为 1 : 0.05,在 50℃水浴加热 15 小时,其余的同权利要求 1。

3. 如权利要求 1 所述的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法,其特征在于,所述的步骤 c,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸的体积 mL 为 1 : 0.15,在 50℃水浴加热 25 小时,其余的同权利要求 1。

4. 如权利要求 1 所述的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法,其特征在于,所述的步骤 c,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸的体积 mL 为 1 : 0.10,在 50℃水浴加热 20 小时,其余的同权利要求 1。

朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法及应用。

背景技术

[0002] 淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 (*Epimedium brevicornum* Maximl)、箭叶淫羊藿 [*E. sagittatum* (Sieblet Zuecl) Maximl]、柔毛淫羊藿 (*E. pubescens* Maximl)、巫山淫羊藿 (*E. wushanense* Tl Sl Ying) 或朝鲜淫羊藿 (*E. korcanam* Nakai) 的干燥地上部分, 具补肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿之功效, 常用于治疗阳痿不举、小便淋漓、腰膝无力以及冠心病、慢性气管炎、神经衰弱和小儿麻痹等症。

[0003] 现代化学成分研究显示, 淫羊藿的主要有效成份是淫羊藿总黄酮 (淫羊藿苷、淫羊藿次苷) 和淫羊藿多糖, 其总黄酮中的活性成分被认为是 8 位具有异戊烯基 (及其衍生基团) 的黄酮醇及其苷类。

[0004] 现代药理学研究表明, 淫羊藿黄酮具有调节机体免疫功能, 增强雄性生殖功能, 扩张血管, 改善血液流变学, 促进造血系统功能, 抗氧化辐射, 抗骨质疏松等多种功效。近年来, 对淫羊藿苷的口服代谢研究表明, 在肠道菌群的作用下, 淫羊藿苷主要代谢成次苷和苷元, 原型的生物利用度低。淫羊藿次苷 I 是淫羊藿苷的体内代谢产物之一, Lenoble 等报道了淫羊藿次苷 I 对 PDE-25 酶具有很好的抑制作用。

[0005] 目前, 对淫羊藿总黄酮的提取工艺及淫羊藿苷的分离提取、理化性质、结构确证等研究已有大量报道, 但对淫羊藿次苷 I 的提取方法研究甚少。

[0006] 国内常以水或乙醇为溶剂 (张琳, 张瑾, 现代中药研究与实践: Vol. 18(5)2004, 63-64) 提取淫羊藿中总黄酮; 采用柱色谱法 (郑训海等, 中草药: Vol. (11)2002, 964-967) 对淫羊藿中不同化学成分进行分离。国外也有采用柱色谱法分离提取淫羊藿次苷的报道 (Lenoble, et al. "Compositions comprising icariside I and anhydroicaritin and methods for making the same" Unit States Patent 2002(6399579))。柱色谱分离纯化黄酮类化合物存在由不可逆吸附导致产率低的缺点, 而且分离过程十分耗时、耗力, 不利于黄酮化合物的大量分离提取。因此, 虽然对淫羊藿中各类黄酮化合物的研究十分迫切, 但由于分离提取困难, 研究进展十分缓慢。

发明内容

[0007] 为了消除因为柱色谱分离纯化黄酮类化合物存在由不可逆吸附导致产率低, 而且分离过程十分耗时、耗力, 不利于黄酮化合物的大量分离提取的缺点, 本发明提供了朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法及应用, 不仅可以避免因为色谱柱的不可逆吸附而导致产率低, 而且可以大量提取高纯度的淫羊藿次苷 I, 从而更加推动了对其研究的进展。

[0008] 本发明的目的是提供朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法, 其步骤和条件如下:

[0009] a 将朝鲜淫羊藿叶用是其质量 15 倍的体积浓度为 70% 乙醇回流 4 小时, 滤出乙醇

提取液,将回流过的药渣用是朝鲜淫羊藿叶质量 10 倍的体积浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液;

[0010] b 滤液在 50℃下减压蒸出溶剂,得到提取物,提取物中所含的水分不多于其质量的 5%;

[0011] c 用朝鲜淫羊藿叶质量 2 倍的无水乙醇溶解步骤 b 中所得到的提取物,加入浓盐酸,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸的体积 mL 为 1:0.05~0.15,在 50℃水浴加热 15~25 小时,室温放置过夜,过滤;

[0012] d 滤液在 50℃减压浓缩至其体积的 20%,加入朝鲜淫羊藿叶质量 2 倍的蒸馏水析出沉淀,沉淀在 50℃下用体积浓度为 20%的乙醇溶液洗涤,洗涤后的沉淀在 50℃下真空干燥,得到淫羊藿次苷 I 粉末。

[0013] 本发明的淫羊藿次苷 I 具有对垂体后叶素诱发大鼠心肌缺血的保护作用。其具体表现在可以抑制 T 波的作用;可以抑制 J 点位移变化的作用。还证实淫羊藿次苷 I 对豚鼠离体心脏有保护作用。其具体表现在可以增加豚鼠的冠脉流量,具体见实施例 8-9。

[0014] 本发明的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的应用,其用于制备治疗心脏病的药物。

[0015] 有益效果:本发明提供了朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法,不仅可以避免因为色谱柱的不可逆吸附而导致产率低,而且可以大量提取高纯度的淫羊藿次苷 I,从而更加推动了对其研究的进展。

[0016] 本发明提供了朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的提取方法。经高效液相色谱法含量测定,淫羊藿次苷 I 的质量提取率在 60%以上,质量易控,方法简便快速。

[0017] 本发明对淫羊藿次苷 I 进行了药理方面的研究,证实淫羊藿次苷 I 具有对垂体后叶素诱发大鼠心肌缺血的保护作用。其具体表现在可以抑制 T 波的作用;可以抑制 J 点位移变化的作用。淫羊藿次苷 I 对豚鼠离体心脏有保护作用。其具体表现在可以增加豚鼠的冠脉流量。本发明的朝鲜淫羊藿叶中淫羊藿次苷 I 的应用,其用于制备治疗心脏病的药物。

附图说明

[0018] 图 1 实施例 1 的总黄酮含量测定的 HPLC 谱图。

[0019] 图 2 为实施例 2 的 200-600nm 波长范围内的淫羊藿苷标准品的扫描图。

[0020] 图 3 为实施例 3 的标准品淫羊藿苷在 270nm 下的标准曲线。

[0021] 图 4 为实施例 4 所得到的淫羊藿次苷 I 单体 200-800nm 的紫外扫描图。

[0022] 图 5 为实施例 5 所得到的淫羊藿次苷 I 的 HPLC 谱图。

[0023] 图 6 为实施例 6 所得到的淫羊藿次苷 I 的 HPLC 谱图。

[0024] 图 7 为实施例 7 所得到的淫羊藿次苷 I 的 HPLC 谱图。

[0025] 上述图 1、图 5-图 7 中的液相条件如下:

[0026] 梯度洗脱:波长 272nm,流速:1ml/min,柱温:30℃,色谱柱:采用 ODS-C₁₈ 填料色谱柱(4.6×250mm,5μm)岛津公司

[0027]

时间 (min)	0	10	20	25	30	35	45	50	55	60
----------	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----

[0028]

比例 乙腈：水	15	30	40	60	100	85	60	40	30	15
------------	----	----	----	----	-----	----	----	----	----	----

具体实施方式

[0029] 实施例 1

[0030] 称取朝鲜淫羊藿叶 5 克,用 75mL 体积浓度为 70%乙醇回流 4 小时,滤出乙醇提取液,将回流过的药渣用 50mL 的体积浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液,将滤液定溶至 200mL。精密量取 0.2mL 滤液定溶至 25mL 的容量瓶中,在 270nm 下测定吸光度值为 0.730 ;取 10 μ L 该溶液测其 HPLC 色谱图,HPLC 色谱图结果见附图 1。

[0031] 实施例 2

[0032] 取 2.30mg 淫羊藿苷标准品于 25mL 容量瓶中,用甲醇定溶,其浓度为 0.092mg/mL 的淫羊藿苷标准溶液。在 200 ~ 600nm 下进行紫外扫描,270nm 为淫羊藿苷最大吸光度值。结果见附图 2。

[0033] 实施例 3

[0034] 根据实施例 2 制备浓度为 0.092mg/mL 的淫羊藿苷标准溶液。分别取此标准溶液 1.0mL、1.5mL、2.0mL、2.5mL、3.0mL 于 5mL 的容量瓶中,甲醇定溶,配置成浓度分别为 0.0184mg/mL、0.0276mg/mL、0.0368mg/mL、0.0460mg/mL、0.0552mg/mL 的溶液,测定其吸光度值。绘制淫羊藿苷浓度相对于吸光度的标准曲线。根据标准曲线可以得出,实施例 1 中朝鲜淫羊藿总黄酮的提取率可达 12%。结果见附图 3。

[0035] 实施例 4

[0036] 用质量含量为 99% 以上的淫羊藿次苷 I 单体配置浓度分别为 0.0404mg/mL、0.1212mg/mL、0.2020mg/mL、0.2828mg/mL、0.3636mg/mL 的淫羊藿次苷 I 标准溶液,分别取 10 μ L 进行高效液相考察。以峰面积对标准溶液浓度进行线性回归,得出工作曲线方程。结果见附图 4。

[0037] 质量含量为 99% 以上的淫羊藿次苷 I 单体的制备方法如下:

[0038] a 按体积比为 5 : 5 : 4.5 : 5.5 分别量取正己烷、乙酸乙酯、甲醇和水于 1000mL 的分液漏斗中,充分震荡,静置,放置过夜;

[0039] b 以澄清的上相为固定相,下相为流动相,以 10mL/min 的流速使固定相充满螺旋管柱,然后螺旋管柱以 1600rpm/min 的速度旋转,稳定 10min 后,以 1.0mL/min 的速度泵入流动相,使体系达到流体动力学平衡;

[0040] c 根据高速逆流色谱的进样系统选择进样体积,以 1.0mg/mL 的溶液浓度进样,下相溶解淫羊藿次苷 I 提取物样品,检测器波长为 272nm,温度为 10 $^{\circ}$ C。其中所述的体积不得少于 3mL;

[0041] d 第一个出现的大峰不是淫羊藿次苷 I,第二个出现的峰为朝鲜淫羊藿叶中提取的淫羊藿次苷 I 单体,溶液颜色呈荧黄色,经过冷冻干燥,得淫羊藿次苷 I 单体粉末。

[0042] 实施例 5

[0043] a 称取朝鲜淫羊藿叶 100 克,用 1500mL 体积浓度为 70%乙醇回流 4 小时,滤出乙醇提取液,将回流过的药渣用 1000mL 的质量浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液;

[0044] b 滤液在 50℃下减压蒸出溶剂,,提取物中所含的水分不能多于其质量的 5%;

[0045] c 用 200mL 无水乙醇溶解 b 步骤中所得的提取物,用朝鲜淫羊藿叶质量 2 倍的水乙醇溶解步骤 b 中所得到的提取物,加入浓盐酸,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸的体积 mL 为 1 : 0.05,在 50℃水浴加热 15 小时,室温放置过夜,过滤;

[0046] d 滤液在 50℃减压浓缩至原体积的 20%,加入 200mL 蒸馏水析出沉淀,沉淀在 50℃下用浓度为 20%乙醇溶液洗涤四次,每次用 100mL,洗涤后的沉淀在 50℃下真空干燥,得到得到淫羊藿次苷 I 提取物。该提取物称重为 5.6760 克。其 HPLC 色谱图结果见附图 5。

[0047] 实施例 6

[0048] a 称取朝鲜淫羊藿叶 100 克,用 1500mL 质量浓度为 70%乙醇回流 4 小时,滤出乙醇提取液,将回流过的药渣用 1000mL 的质量浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液;

[0049] b 滤液在 50℃下减压蒸出溶剂,得到的提取物中所含的水分不能多于其质量的 5%;

[0050] c 用 200mL 无水乙醇溶解 b 步骤中所得的提取物,加入浓盐酸,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸的体积 mL 为 1 : 0.15,在 50℃水浴加热 25 小时,室温放置过夜,过滤;

[0051] d 滤液在 50℃减压浓缩至原体积的 20%,加入 200mL 蒸馏水析出沉淀,沉淀在 50℃下用浓度为 20%乙醇溶液洗涤四次,每次用 100mL,洗涤后的沉淀在 50℃下真空干燥,得到得到淫羊藿次苷 I 提取物。该提取物称重为 5.3560 克。其 HPLC 色谱图结果见附图 6。

[0052] 实施例 7

[0053] a 称取朝鲜淫羊藿叶 100 克,用 1500mL 体积浓度为 70%乙醇回流 4 小时,滤出乙醇提取液,将回流过的药渣用 1000mL 的体积浓度为 70%乙醇回流提取 2 小时,滤出乙醇提取液,合并两次滤液;

[0054] b 滤液在 50℃下减压蒸出溶剂,得到的提取物中所含的水分不能多于其质量的 5%;

[0055] c 用 200mL 无水乙醇溶解 b 步骤中所得的提取物,加入浓盐酸,朝鲜淫羊藿叶质量克:浓盐酸的体积 mL 为 1 : 0.1,在 50℃水浴加热 20 小时,室温放置过夜,过滤;

[0056] d 滤液在 50℃减压浓缩至原体积的 20%,加入 200mL 蒸馏水析出沉淀,沉淀在 50℃下用浓度为 20%乙醇溶液洗涤四次,每次用 100mL,洗涤后的沉淀在 50℃下真空干燥,得到得到淫羊藿次苷 I 提取物。该提取物称重 6560 克。其 HPLC 色谱图结果见附图 7。

[0057] 实施例 8

[0058] 淫羊藿次苷对垂体后叶素诱发大鼠心肌缺血的保护作用

[0059] 将雄性 Wistar 大鼠 (180g-220g) 40 只,随机分成 4 组,每组 10 只,分别为模型对照组淫羊藿次苷组、复方丹参滴丸组。复方丹参滴丸组和 1、2 号样品组以 200mg/kg 的剂量灌胃相应的药物,每天一次,共 7 天,模型对照组灌胃等体积的蒸馏水。

[0060] 第七天给药后 30min,将大鼠用 25%乌拉坦 (1.2g/kg) 腹腔注射麻醉,仰卧固定,

记录标准 II 导联心电图。5min 后舌下静脉注射垂体后叶素 0.5U/kg。在 10s 内推完。分别记录注射前 (0s) 及注射后第 15, 30s 及 1, 2, 5, 10min 的心电图, 观察 T 波和 J 波的变化。

[0061] 统计学处理: 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 F 检验和组间 t 检验。

[0062] 1. 淫羊藿次苷 I 对 T 波的影响。结果见表 1。

[0063] 结论: 淫羊藿次苷 I 组在注射 PIT 后的 T 波抬高均明显低于模型组, 淫羊藿次苷有抑制 T 波的作用。

[0064] 2. 淫羊藿次苷 I 对 J 波的影响。结果见表 2。

[0065] 结论: 淫羊藿次苷 I 在注射 PIT 后的 J 点位移变化均明显低于模型组, 结果显示淫羊藿次苷 I 具有抑制 J 点位移变化的作用。

[0066] 实施例 9

[0067] 淫羊藿次苷 I 对豚鼠离体心脏的保护作用

[0068] 健康雄性豚鼠 30 只, 体重为 350g-380g, 腹腔注射戊巴比妥钠 40mg/kg 麻醉后, 固定, 打开胸腔, 剪断腔静脉、主动脉及心脏周围组织, 迅速摘出心脏置于 4℃ Krebs-Henseleit 液 (K-H 液) 中轻轻挤出心脏余血并适当修剪后, 主动脉插管, 置于 Langendorf 灌注装置行经主动脉灌注, K-H 液灌流 (K-H 液成分如下 (g/L): NaCl 6.92, KCl 0.35, CaCl₂·2H₂O 0.38, KH₂PO₄ 0.16, MgSO₄ 0.29, NaHCO₃ 2.1, 葡萄糖 2.0, pH 7.4) 装入密闭灌流瓶中, 下放出一定量的灌流液, 上与氧气瓶相连充入相应量的氧气 (95% O₂, 5% CO₂), 用力摇匀。超级恒温器维持灌流液恒温 37℃, 排尽灌流管道内空气。灌流压力由一插入灌流瓶底与大气相通的玻璃管维持恒定 (灌流液面距心脏 70cm)。用蛙心夹夹住心尖, 经滑轮与弹簧装置连接到张力换能器, 用 BL-420 生物机能实验系统记录心率; 调节灌流液流速使心脏冠脉流量为 5-8ml/min, 心脏灌流适应 10min 后趋于稳定, 测量每分钟冠脉流量, 连续测 3min, 若相差不大, 则取其平均值作为给药前冠脉流量。然后分别给淫羊藿次苷 (6mg/ml) 和阳性药 (西地兰 0.8mg/ml), 给药体积 1mL, 给药结束后连续测量 10min 内每分钟冠脉流量并开始记录心跳, 以其平均值作为给药后的冠脉流量和心率。

[0069] 统计学处理: 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 F 检验和组间 t 检验。结果见表 3。

[0070] 结论: 淫羊藿次苷 I 可以使大鼠离体心脏冠脉流量比给药前明显增加, 具有显著性差异, 淫羊藿次苷 I 有增加大鼠心脏冠脉流量的作用。

表 1 受试药物对垂体后叶素所致心肌缺血大鼠 T 波的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	注射 PIT 前			注射 PIT 后				
	(u/mv)	15s	30s	1min	2min	5min	10min	
模型对照组	0.16±0.02	0.27±0.06	0.22±0.02	0.19±0.03	0.17±0.04	0.17±0.03	0.16±0.04	
淫羊藿次苷	0.14±0.05	0.19±0.04*	0.16±0.02*	0.15±0.04*	0.14±0.05	0.14±0.05	0.14±0.03	
复方丹参组	0.15±0.02	0.19±0.05*	0.16±0.03*	0.14±0.02*	0.13±0.04	0.13±0.03	0.13±0.04	

与模型组比较: * P<0.05。

表 2 受试药物对垂体后叶素所致心肌缺血大鼠 J 点的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	注射 PIT 前			注射 PIT 后				
	(u/mv)	15s	30s	1min	2min	5min	10min	
模型对照组	0.04±0.02	0.11±0.06	0.09±0.02	0.08±0.03	0.07±0.04	0.06±0.03	0.08±0.04	
淫羊藿次苷	0.04±0.05	0.07±0.04*	0.07±0.02*	0.06±0.04*	0.05±0.06	0.05±0.05	0.06±0.03	
复方丹参组	0.04±0.02	0.07±0.05*	0.07±0.03*	0.06±0.02*	0.05±0.07	0.05±0.06	0.06±0.04	

与模型组比较: * P<0.05。

[0071]

[0072] 表 3 受试药物对豚鼠离体心脏冠脉流量的影响($\bar{x} \pm s$)

[0073]

组别	数量 (只)	冠脉流量 (ml/min)		心率 (BPM)	
		给药前	给药后	给药前	给药后

淫羊藿次苷	10	6.64±0.67 7.72±0.71*	188.16±43.81 213.89±50.65
西地兰组	10	6.73±0.76 7.86±0.66*	186.56±37.66 218.18±46.28

[0074] 与给药前比较 : *P < 0.05。

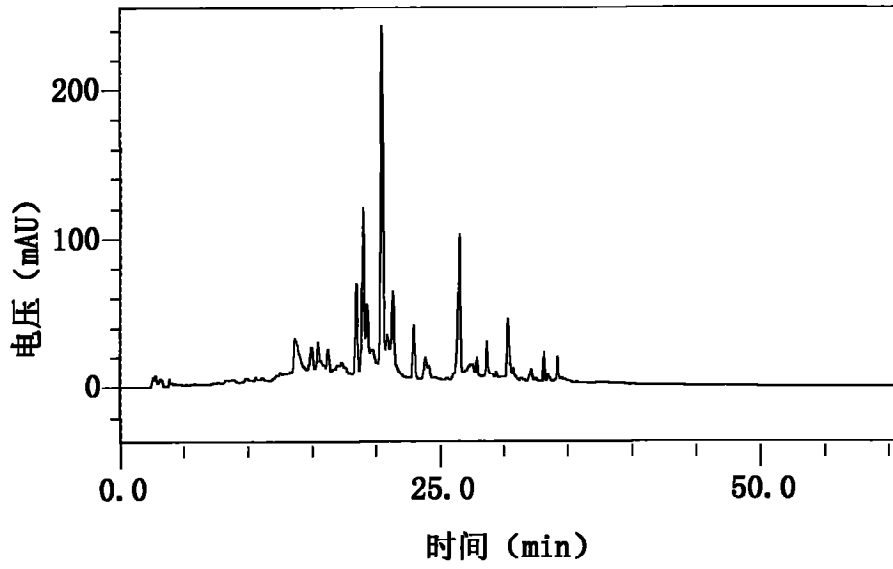


图 1

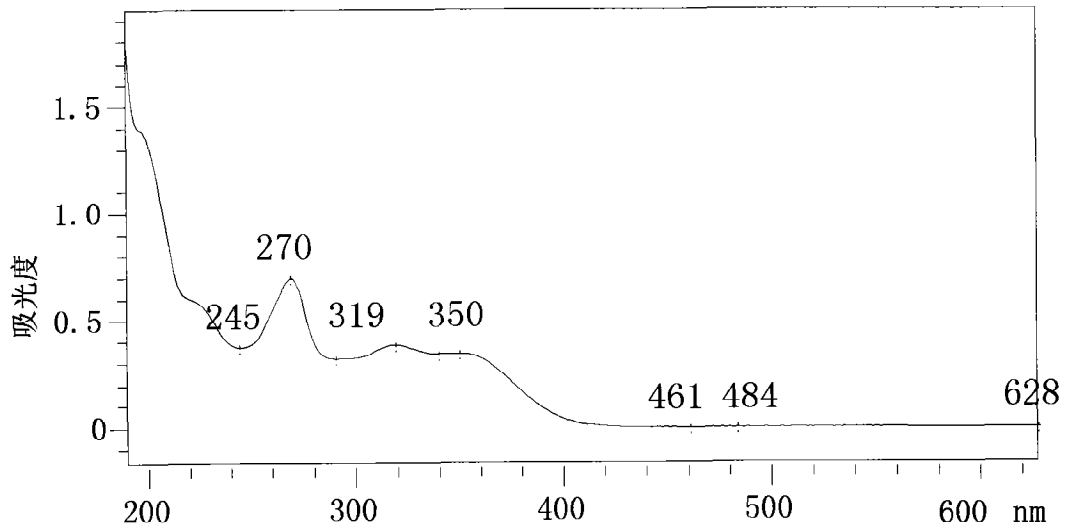


图 2

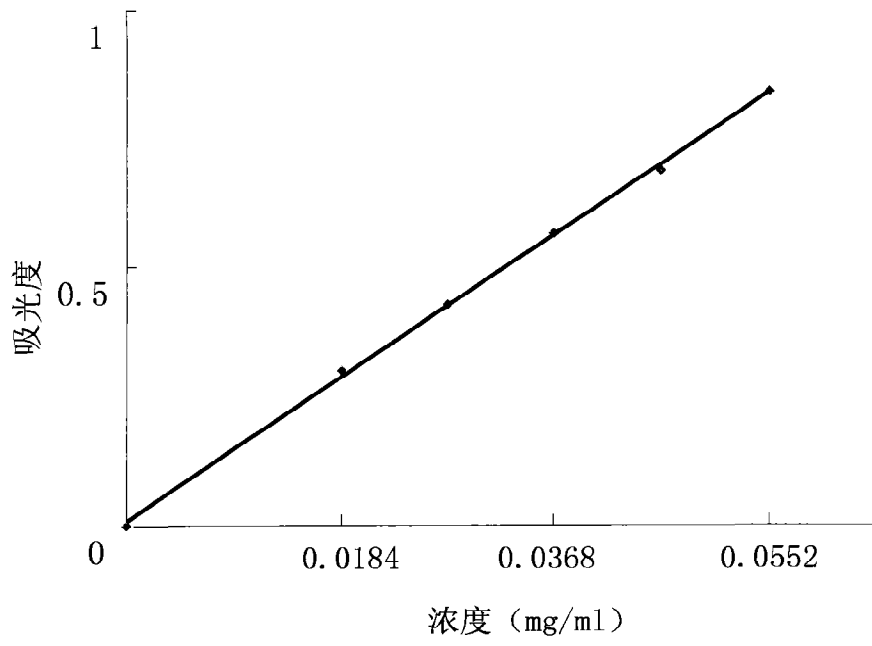


图 3

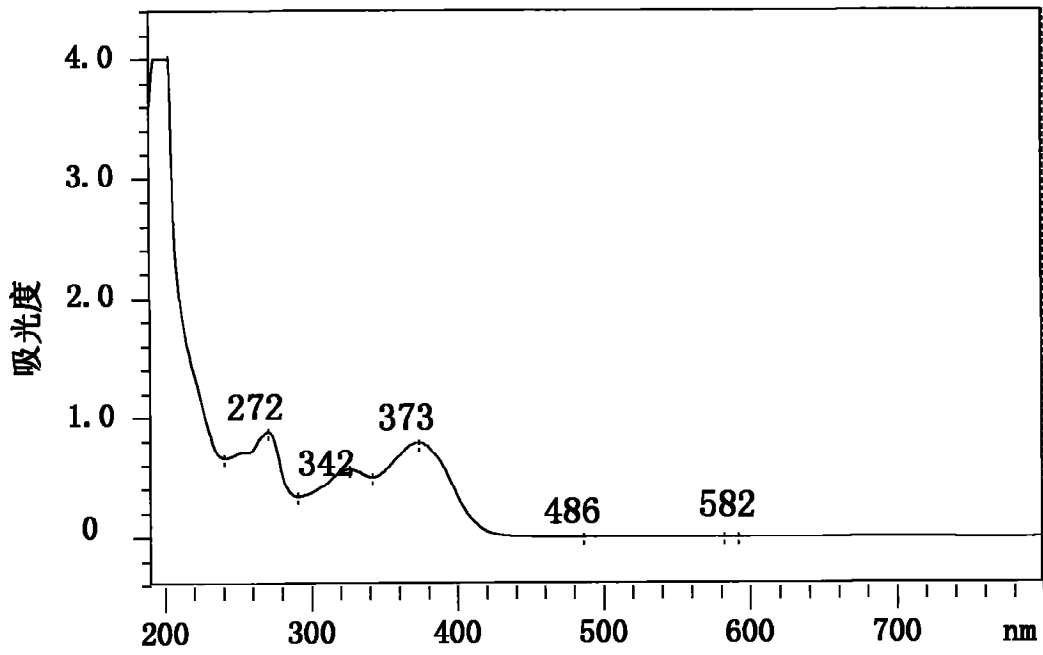


图 4

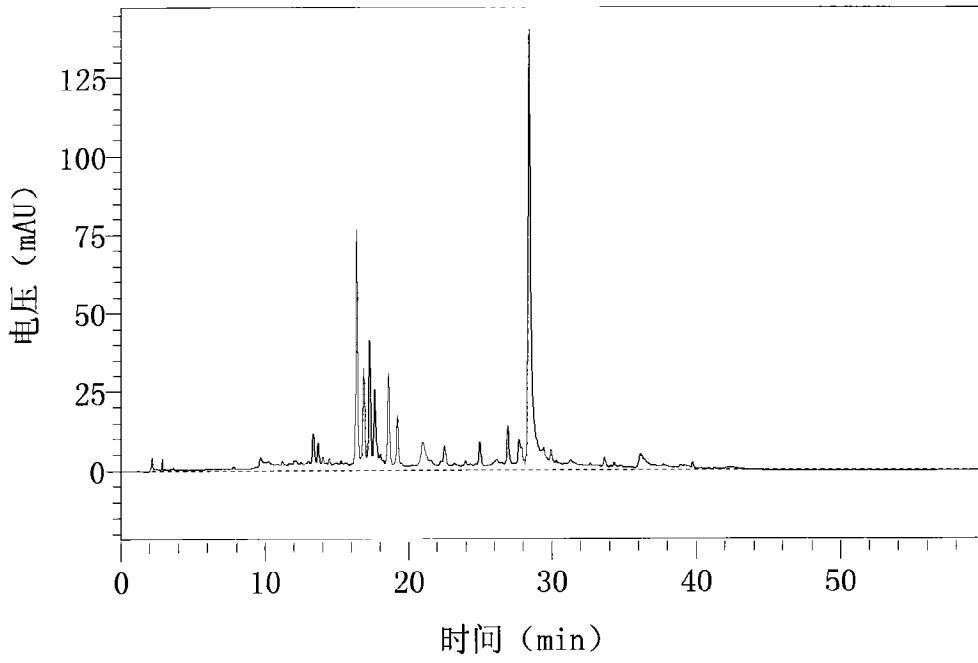


图 5

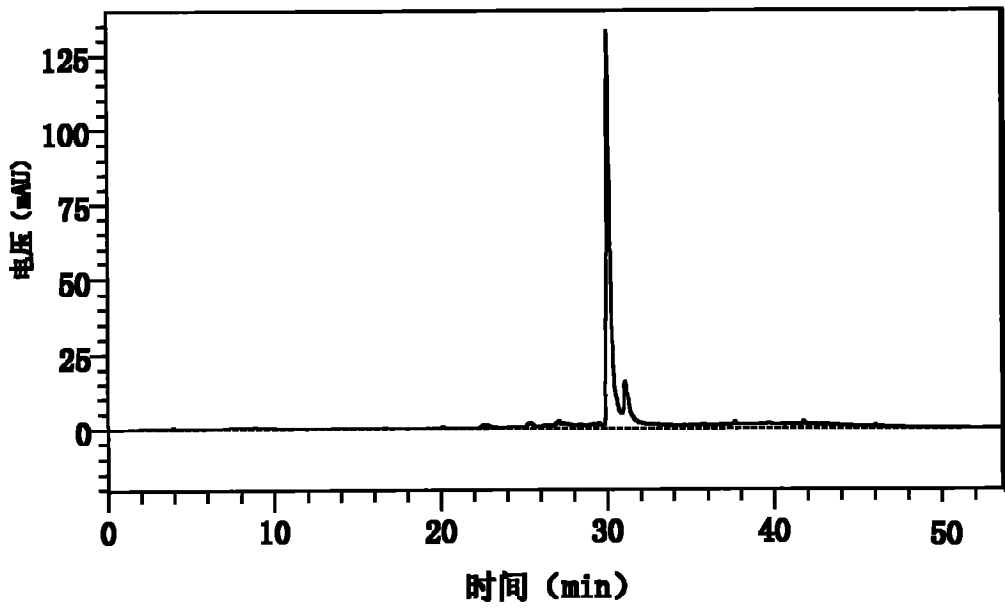


图 6

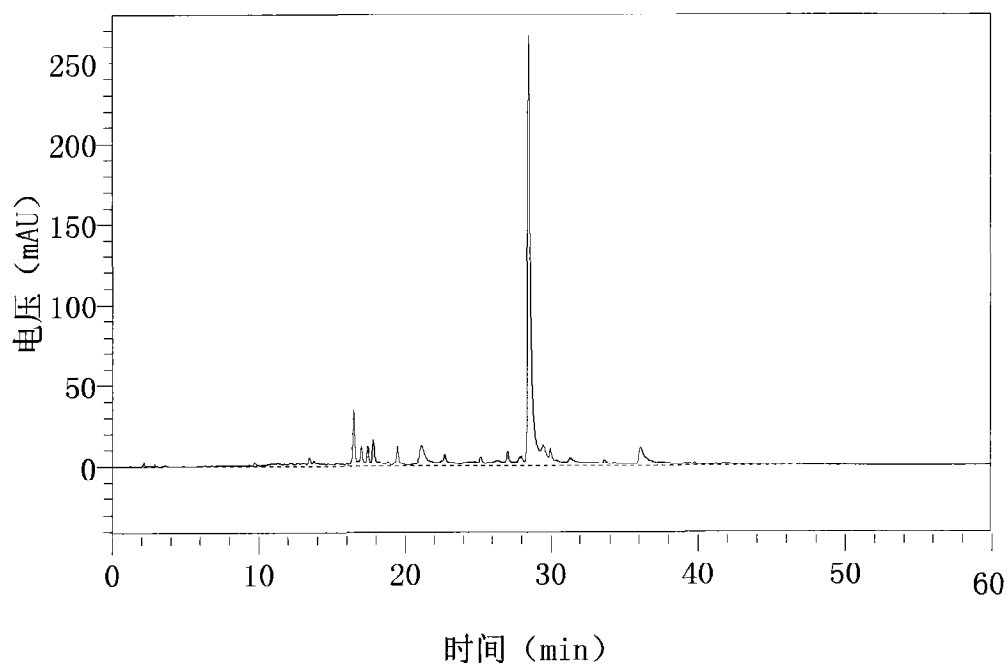


图 7