



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102319273 A

(43) 申请公布日 2012.01.18

(21) 申请号 201110262118.8

A61P 3/04 (2006.01)

(22) 申请日 2011.09.06

A61P 3/06 (2006.01)

(71) 申请人 江苏省中国科学院植物研究所

地址 210014 江苏省南京市中山门外前湖后村1号

(72) 发明人 冯煦 王奇志 王鸣 陈雨 单宇

印敏 管福琴 赵友谊 孙浩

(51) Int. Cl.

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

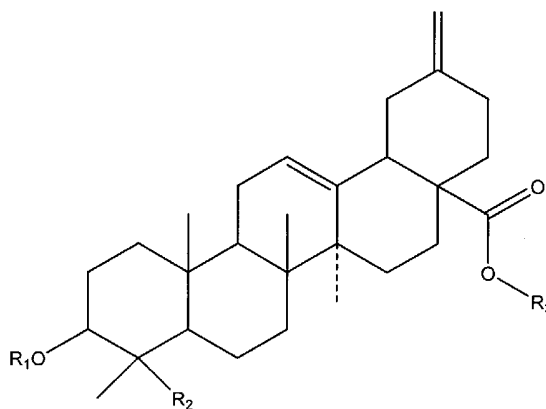
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 16 页

(54) 发明名称

北美盐角草活性总皂苷提取物及其制备方法和瘦身减肥的用途

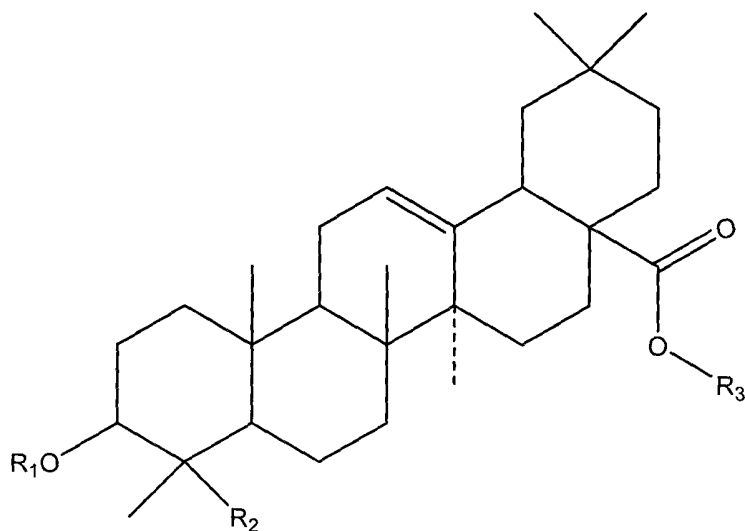
(57) 摘要

本发明涉及一种从北美盐角草 (*Salicornia biggelowii* Torr.) 植株中提取得到北美盐角草活性总皂苷 (精制品) 提取物及其制备方法和瘦身减肥药品或瘦身减肥保健食品的用途, 属于药用天然产物领域或保健食品制造业。提取物为北美盐角草活性总皂苷, 制备方法包括 50-95% 乙醇提取, 低极性溶剂萃取, 离心, 大孔树脂, 得到北美盐角草活性总皂苷。本发明的提取工艺及方法获得的有效成分得率及纯度高, 明确了北美盐角草活性总皂苷的药理、药效作用及其中的有效成分和它们的含量比例, 降三萜型皂苷化合物 (结构通式见右图) 含量不低于 20%, 易于掌握有效剂量。北美盐角草活性总皂苷瘦身减肥的作用机理是阻止内、外源性胆固醇在胃肠道中的吸收, 促进胆固醇降解成胆酸排出体外, 同时加速脂肪分解代谢, 降低血清中 TC、TG 和 LDL-C 含量并升高 HDL-C 水平含量, 使血浆脂蛋白在体内正常化, 减少人体脂肪存积而达到减肥的目的。

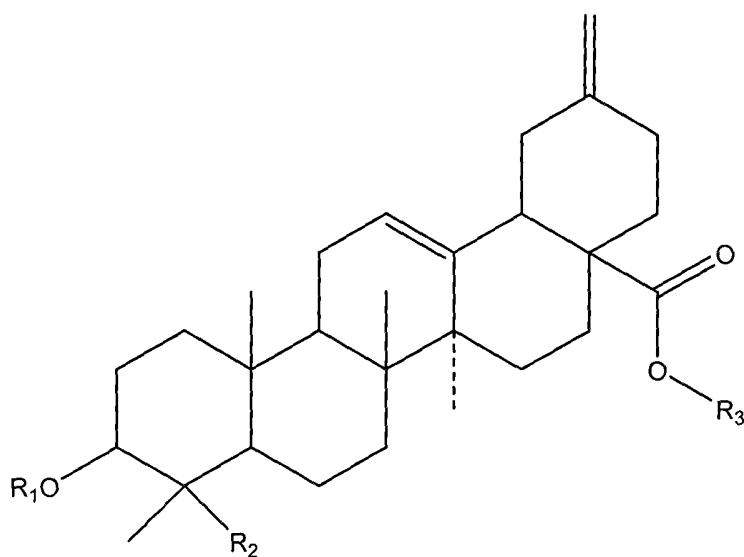


1. 一种北美盐角草活性总皂苷提取物的制备方法和瘦身减肥药品或瘦身减肥保健食品的用途。

2. 根据权利要求 1, 一种北美盐角草活性总皂苷提取物, 其特征是提取物中总皂苷含量为 60-90%, 所含的皂苷类成分符合以下通式 I 和通式 II, 其中主要活性成分降三萜型皂苷 (结构见通式 II) 含量不少于 20%。



通式 I



通式 II

$R_1 = \text{H}$, 糖链

$R_2 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{OH}$

$R_3 = \text{H}$, 糖链

3. 根据权利要求 1、2, 其中北美盐角草总皂苷是通过如下方法制备得到的:

(1) 将北美盐角草全草切碎置于提取釜中, 加入 3~10 倍生药体积的低级醇, 低级醇为 C1~C5 醇类, 其浓度为 50~95%, 提取温度为 30~70℃, 匀速搅拌 6~12h, 过滤得到滤液, 并反复提取 1~4 次, 合并滤液得到粗提取液;

(2) 提取液减压浓缩后, 溶于 30~70℃ 热水, 浸膏与水的体积比为 1:2~3, 按

1 : 1 ~ 3 体积加入石油醚萃取, 除去亲脂性杂质;

(3) 按 1 : 1 ~ 3 体积加入正丁醇进行萃取, 减压浓缩至无有机溶剂味的固体, 得到粗制总皂苷;

(4) 将粗制总皂苷加入少量甲醇至溶解, 然后一边搅拌一边加入少量乙酸乙酯, 混合均匀, 析出总皂苷, 反复处理 3 ~ 9 次, 干燥后即得到精制总皂苷, 该北美盐角草总皂苷得率为 0.5% ~ 2 重量%, 纯度为 60 ~ 70%。

4. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中北美盐角草总皂苷是通过如下方法制备得到的:

(1) 将北美盐角草全草切碎置于提取釜中, 加入 3 ~ 10 倍生药体积的低级醇, 低级醇为 C1 ~ C5 醇类, 其浓度为 50 ~ 95%, 提取温度为 30 ~ 70°C, 匀速搅拌 6 ~ 12h, 过滤得到滤液, 并反复提取 1 ~ 4 次, 合并滤液得到粗提取液;

(2) 粗提液浓缩至原来的 1/3 后, 利用大孔吸附树脂吸附, 用 1 倍柱体积的水洗去水溶性杂质, 例如糖等, 改用 30% ~ 80% 乙醇对其进行梯度洗脱, 收集洗脱液;

(3) 将洗脱液减压浓缩至无有机溶剂味固体, 得到粗制总皂苷;

(4) 将粗制总皂苷加入少量甲醇至溶解, 然后一边搅拌一边加入少量乙酸乙酯, 混合均匀, 析出总皂苷, 反复处理 3 ~ 9 次, 干燥后即得到精制总皂苷, 该北美盐角草总皂苷得率为 0.8 ~ 3 重量%, 纯度为 65 ~ 90%。

5. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中北美盐角草总皂苷是通过如下方法制备得到的:

(1) 将北美盐角草全草切碎置于提取釜中, 加入 3 ~ 10 倍生药体积的低级醇, 低级醇为 C1 ~ C5 醇类, 其浓度为 50 ~ 95%, 提取温度为 30 ~ 70°C, 匀速搅拌 6 ~ 12h, 过滤得到滤液, 并反复提取 1 ~ 4 次, 合并滤液得到粗提取液;

(2) 将粗提液浓缩, 加入 30°C ~ 70°C 热水, 浸膏与水的体积比为 1 : 2 ~ 3, 2000 ~ 3000rp 离心 20 ~ 30min 得到沉淀和上清液两部分;

(3) 将沉淀物加入 50 ~ 95% 乙醇进行回流提取, 将过滤液浓缩、干燥得到一部分总皂苷;

(4) 将上清液减压浓缩, 2000 ~ 3000rp 离心 20 ~ 30min, 用水洗沉淀物, 干燥得到另一部分总皂苷。

(5) 合并以上两个部分得到总皂苷, 该北美盐角草总皂苷得率为 1 ~ 4 重量%, 纯度为 65 ~ 75%。

6. 根据权利要求 1-5 所得到的提取物北美盐角草活性总皂苷, 用于制备降低血清中 TC、TG 和 LDL-C 含量并升高 HDL-C 水平含量的减肥药物或减肥保健品。

北美盐角草活性总皂苷提取物及其制备方法和瘦身减肥的用途

1、技术领域

[0001] 本发明涉及从北美盐角草 (*Salicornia biggelowii*) 植株中提取得到的北美盐角草活性总皂苷 (精制品) 提取物及其制备方法, 以及该活性总皂苷在制备瘦身减肥药品或瘦身减肥保健食品的用途, 属于药用天然产物领域或保健食品制造业。本发明制备的美盐角草活性皂苷降三萜型化合物含量明确, 易于掌握其有效剂量, 用于制备治疗肥胖症时更为安全、稳定。

2、背景技术

[0002] 肥胖本身就是一种威胁人类健康的慢性疾病, 是一种常见的病症, 同时也会伴随高血压、高血脂、心脑血管疾病、糖尿病等疾病的发生, 目前国际上通行的标准是人的体重超过 $[(\text{身高}-105) \times 2]$ 的 120% 谓之肥胖人群, 肥胖症已经成为全球关注的健康问题之一, 因此, 从年轻时就应注意自己身体的肥胖情况是每个家庭应该高度重视的问题。目前预防和治疗肥胖的方法很多, 可以分为药物治疗、保健食品疗法、运动疗法和行为疗法, 其中药物治疗又可分为: 食欲抑制剂法、消化吸收阻滞剂法和代谢刺激法三种, 而前两种方法副作用较明显, 而采用后一种方法比较安全可靠。因此研究开发出安全有效的肥胖降血脂药物具有极大的临床和社会意义。

[0003] 北美盐角草 (*Salicornia bigelovii* Torr.) 是藜科 (Chenopodiaceae) 盐角草属植物, 主要分布于海滨以及盐沼, 高度耐盐。迫于人口增长、资源短缺、粮食不足和环境恶化问题, 人们开始重视对盐渍土资源的开发利用, 盐生植物资源调查及利用因此成为国外研究的热点。在美国亚利桑那大学环境研究室的耐盐性测试中表现出高的生长活力、产量潜力和产品品质, 是具有开发潜力的一种盐生蔬菜作物, 不但充分利用了滨海盐碱地资源, 改善了环境, 还为人们带来经济收益。

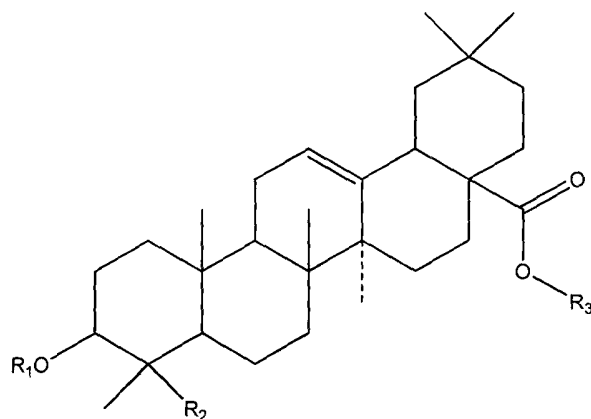
[0004] 皂苷具有广泛的生理活性, 在动物实验和体外模型中显示了降低胆固醇, 抗癌, 抗炎和抗氧化等活性。皂苷对心血管的作用在于降低胆固醇的肠道吸收, 从而降低血浆和肝中胆固醇的水平。这种作用的机制很可能在于皂苷能在肠道中与胆固醇结合, 从而抑制胆固醇的直接吸收, 也有可能是由于皂苷影响了胆汁酸循环而对胆固醇代谢起作用。北美盐角草富含皂苷, 尤其是结构新颖的降五环三萜皂苷含量很高。作为一种全海水灌溉的蔬菜作物, 北美盐角草可促进人体内的酸碱平衡, 对高血压、高血脂、高胆固醇具有明显的调节作用, 并可促进脂肪向肌肉细胞转化; 在欧美国家, 盐角草作为传统的保健蔬菜, 被誉为“减肥草”; 在韩国, 盐角草被用于治疗便秘、肥胖、糖尿病和癌症。目前, 北美盐角草已经在江苏省沿海滩涂大面积种植, 并开发出一系列的盐角草产品, 如饮料, 食品菜肴、面条、元宵、茶叶等, 保健品、食用油包括海蓬子共轭亚油酸等, 海蓬子秸秆板、海蓬子生物黄酮产品。本发明扩展了北美盐角草的药用和食品应用价值。

3、发明内容

[0005] 本发明的目的在于从北美盐角草中提取具有生物活性的皂苷,将皂苷作为减肥降血脂药物,并寻找最适剂量,减少服用量且得到显著的治疗效果,以提供一种北美盐角草总皂苷制备瘦身减肥药品或瘦身减肥保健食品的方法和用途。

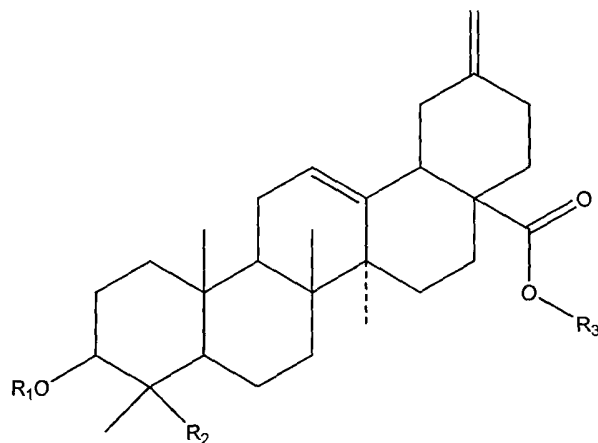
[0006] 北美盐角草中含有大量的皂苷,主要类型为降三萜型和齐墩果酸型皂苷。江苏省中国科学院植物研究所药用植物研究开发中心在对北美盐角草中主要皂苷类成分进行分离后,得到一系列具有减肥降血脂活性的降三萜型皂苷化合物,本发明明确了北美盐角草中主要皂苷类成分的组成和性质及用途,其特征是提取物中总皂苷含量为 60-90%,所含的皂苷类成分符合以下通式 I 和通式 II,其中主要活性成分降三萜型皂苷(结构见通式 II)的含量不少于 20%。

[0007]



[0008] 通式 I

[0009]



[0010] 通式 II

[0011] $R_1 = \text{H, 糖链, GlcA}$

[0012] $R_2 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{OH}$

[0013] $R_3 = \text{H, 糖链, GlcA}$

[0014] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0015] 从北美盐角草全草中提取到总皂苷,得率为 0.5 ~ 4 重量%,呈固态棕黄色,易溶于乙醇,易溶于热水。以高脂饲料饲养的营养性肥胖大鼠作为模型对北美盐角草总皂苷进行体内减肥降血脂活性检测;以大鼠前体脂肪细胞培养为模型对北美盐角草总皂苷进行体外减肥活性检测,除非另有说明,本发明中的%为重量百分比。

[0016] 本发明北美盐角草总皂苷的制备方法具体为：

[0017] 方法 1：

[0018] (1) 将北美盐角草全草切碎置于提取釜中，加入 3～10 倍生药体积的低级醇，低级醇为 C1～C5 醇类，其浓度为 50～95%，提取温度为 25～70℃，过滤得到滤液，并反复提取 2～4 次，合并滤液得到粗提取液；

[0019] (2) 提取液减压浓缩后，溶于 25～70℃水中，浸膏与水的体积比为 1：2～3，按 1：1～3 体积加入石油醚萃取，除去亲脂性杂质；

[0020] (3) 按 1：1～3 体积加入正丁醇进行萃取，减压浓缩至无有机溶剂味的固体，得到粗制总皂苷；

[0021] (4) 将粗制总皂苷加入少量甲醇至溶解，然后一边搅拌一边加入少量乙酸乙酯，混合均匀，析出总皂苷，反复处理 3～9 次，干燥后即得到精制总皂苷，该北美盐角草总皂苷得率为 0.2%～2 重量%，纯度为 60～70%。

[0022] 方法 2：

[0023] (1) 将北美盐角草全草切碎置于提取釜中，加入 3～10 倍生药体积的低级醇，低级醇为 C1～C5 醇类，其浓度为 50～95%，提取温度为 25～70℃，过滤得到滤液，并反复提取 2～4 次，合并滤液得到粗提取液；

[0024] (2) 粗提液浓缩至原来的 1/3 后，利用大孔吸附树脂吸附，用 1 倍柱体积的水洗去水溶性杂质，例如糖等，改用 30%～80%乙醇对其进行梯度洗脱，收集洗脱液；

[0025] (3) 将洗脱液减压浓缩至无有机溶剂味固体，得到粗制总皂苷；

[0026] (4) 将粗制总皂苷加入少量甲醇至溶解，然后一边搅拌一边加入少量乙酸乙酯，混合均匀，析出总皂苷，反复处理 3～9 次，干燥后即得到精制总皂苷，该北美盐角草总皂苷得率为 0.8～3 重量%，纯度为 65～90%。

[0027] 方法 3：

[0028] (1) 将北美盐角草全草切碎置于提取釜中，加入 3～10 倍生药体积的低级醇，低级醇为 C1～C5 醇类，其浓度为 50～95%，提取温度为 25～70℃，过滤得到滤液，并反复提取 2～4 次，合并滤液得到粗提取液；

[0029] (2) 将粗提液浓缩，加入 30℃～70℃热水，浸膏与水的体积比为 1：2～3，2000～3000rpm 离心 20～30min 得到沉淀和上清液两部分；

[0030] (3) 将沉淀物加入 50～95%乙醇进行回流提取，将过滤液浓缩、干燥得到一部分总皂苷；

[0031] (4) 将上清液减压浓缩，2000～3000rpm 离心 20～30min，用水洗沉淀物，干燥得到另一部分总皂苷。

[0032] (5) 合并以上两个部分得到总皂苷，该北美盐角草总皂苷得率为 0.3～4 重量%，纯度为 65～75%。

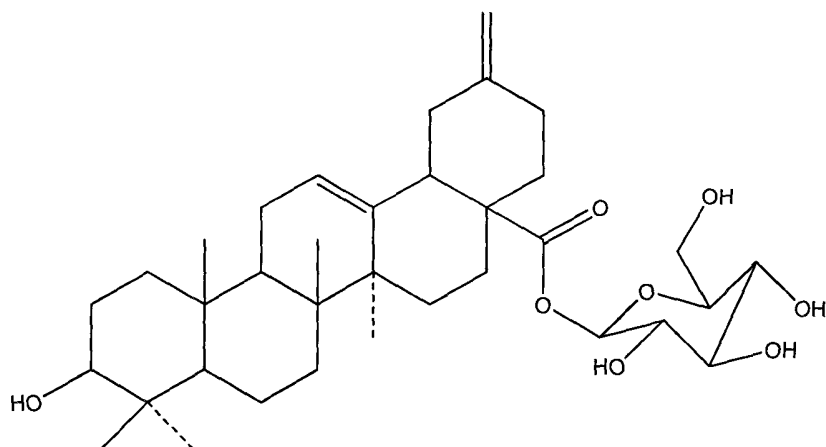
[0033] 所述制备方法中的北美盐角草原料均为北美盐角草的全草，剪刀剪成 5cm 左右小段。

[0034] 上述方法 2 中所用的大孔吸附树脂为 D101 或 SA-3 或 AB-8；上述方法 1、2 中所用的醇为无水或含水醇，所用石油醚、乙酸乙酯为分析纯。

[0035] 所述干燥方法为减压真空干燥、冷冻干燥或喷雾干燥。

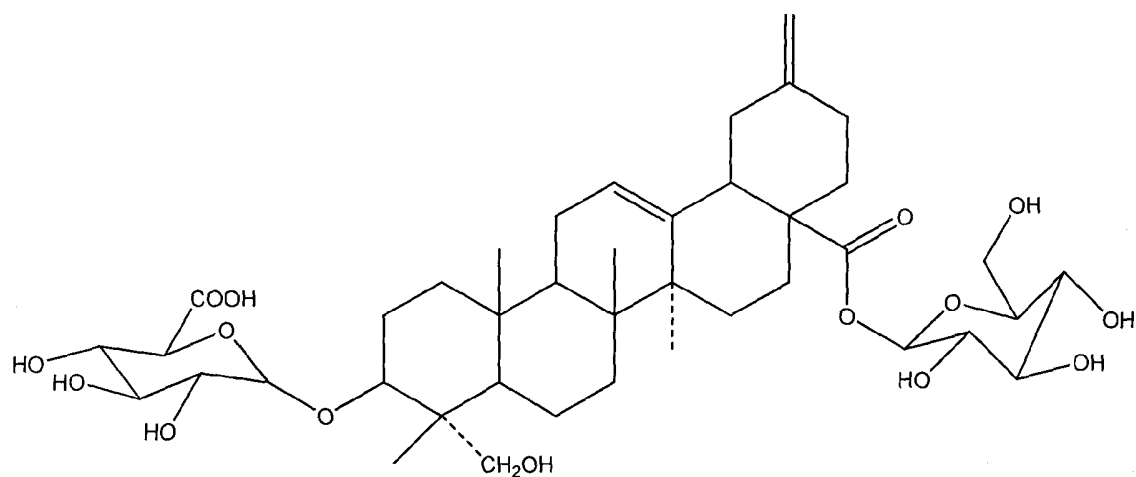
[0036] 三个降三萜型皂苷分别为：

[0037]



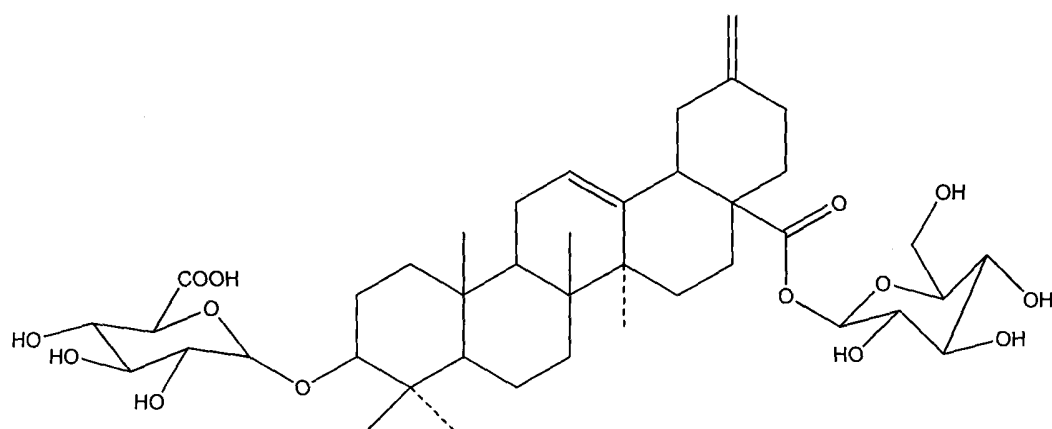
[0038] 化合物 1

[0039]



[0040] 化合物 2

[0041]



[0042] 化合物 3

[0043] 本发明用 Liebermann 反应检测所提的北美盐角草总皂苷, 反应中溶液呈黄→红→蓝→紫→绿色变化, 可以确定其为皂苷类化合物。总皂苷的定量测定是利用苷元与香兰素的硫酸试剂发生的显色反应, 产生有色物质, 以齐墩果酸为标准品绘制标准曲线, 利用紫

外分光光度法测定总皂苷纯度。

[0044] 降三萜型皂苷的定性定量测定是利用降三萜苷元与香兰素的硫酸试剂发生的显色反应,产生蓝色斑点,以化合物 1、化合物 2 和化合物 3 为标准品绘制标准曲线,利用 HPLC 法测定降三萜型皂苷的含量:

[0045] 1、仪器与试剂

[0046] 高效液相色谱仪 Aglient 1100 系列,四元泵,自动进样器,检测器:Alltech ELSD2000 (Alltech, Deerfield, IL, USA), 色谱柱:Aglient Zorbax SB-C₁₈ 柱 (150×4.6mm, 5.0 μm), 乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯。

[0047] 2、色谱条件

[0048] 流动相:0-10min, 乙腈:0.5%磷酸溶液维持比例 (30:70), 11-25min, 流动相比比例由 (30:70) 线形改变到 (45:55), 26-30min, 流动相维持比例 (45:55)。ELSD 管温度:106℃。氮气流速:2.6L/min。

[0049] 3、对照品溶液的制备

[0050] 分别精密称取经五氧化二磷干燥过夜的化合物 1、化合物 2 和化合物 3 对照品,各加甲醇制成每 1mL 分别含 0.05mg 的溶液,作为对照溶液。

[0051] 4、样品测定

[0052] 精密称取北美盐角草活性总皂苷 10mg, 甲醇定容至 100mL, 各样品经 HPLC 检测, 计算化合物 1、化合物 2 和化合物 3 含量之和不得少于总皂苷的 20%。

[0053] 采用制备药物制剂的常规方法和助剂, 将北美盐角草活性总皂苷制备成各种制剂, 例如粉剂、片剂、胶囊、颗粒剂、缓释片、缓释胶囊、滴丸或液体制剂等。上述制剂应用于临床治疗肥胖症、高血脂症及制成含北美盐角草总皂苷减肥降脂保健品。

[0054] 通过上述方法制备的北美盐角草总皂苷在减肥降血脂方面有显著的效果。在营养性肥胖大鼠体内实验中, 当北美盐角草总皂苷的剂量 $\geq 0.8\text{g/kg} \cdot \text{d}$ 时, 大鼠体重、lee's 指数、睾丸周围脂肪系数及血脂指标均显示出显著减肥降血脂效果。在大鼠前体脂肪细胞培养实验中, 当北美盐角草总皂苷的剂量 $\geq 200 \mu\text{g/ml}$ 时, 北美盐角草总皂苷显示出显著的抑制大鼠前体脂肪细胞增殖与分化的作用。

[0055] 本发明方法得到的北美盐角草总皂苷原料易得, 方法简单, 生产成本低, 产品中总皂苷含量较高, 质量稳定、易于控制。

4、附图说明:

- | | |
|---|---|
| [0056] 图 1、降三萜型皂苷的通式 | 图 2、化合物 1、化合物 2 和化合物 3 的结构图 |
| [0057] 图 3、化合物 1 的 ¹ H-NMR 谱 | 图 4、化合物 1 的 ¹³ C-NMR 谱 |
| [0058] 图 5、化合物 2 的 ¹ H-NMR 谱 | 图 6、化合物 2 的 ¹³ C-NMR 谱 |
| [0059] 图 7、化合物 2 的 IR 谱 | 图 8、化合物 2 的 ¹ H- ¹ H COSY 谱 |
| [0060] 图 9、化合物 2 的 HMQS 谱 | 图 10、化合物 2 的 HMBC 谱 |
| [0061] 图 11、化合物 2 的 ROESY 谱 | 图 12、化合物 3 的 ¹ H-NMR 谱 |
| [0062] 图 13、化合物 3 的 ¹³ C-NMR 谱 | 图 14、化合物 3 的 ESI-MS 谱 |
| [0063] 图 15、化合物 3 的 HMQC 谱 | 图 16、化合物 3 的 HMBC 谱 |

5、具体实施方式：

[0064] 实施例 1

[0065] 采用方法 1, 将北美盐角草新鲜全草, 用剪刀剪成 5cm 左右小段, 加入 3 倍生药体积的 95% 乙醇, 室温下 (25℃) 提取 3 次, 每次 7 天, 粗提液抽滤合并。30℃ 减压旋转蒸发浓缩滤液, 将所得浸膏分散于水中, 浸膏体积 / 水体积为 1 : 2.5, 先按 1 : 1 体积加入石油醚对其进行萃取, 除去脂溶性杂质, 再按 1 : 1 体积加入乙酸乙酯萃取, 除去黄酮、香豆素等成分, 然后用正丁醇反复萃取 3 次, 减压回收正丁醇后得到粗总皂苷。将得到的粗总皂苷溶于少量无水乙醇, 然后滴入乙酸乙酯 (体积比为 1 : 0.5), 搅拌均匀, 有总皂苷析出。反复处理 5 次, 收集析出的总皂苷, 冷冻干燥。所得北美盐角草总皂苷为棕黄色, 得率为 0.21%, 紫外分光光度法测定纯度为 62%, HPLC 法测定降三萜皂苷含量 23%。

[0066] 实施例 2：

[0067] 采用方法 1, 将北美盐角草新鲜全草, 用剪刀剪成 3cm 左右小段, 加入 6 倍生药体积的 80% 乙醇, 在 70℃ 的水浴中回流提取 2 次, 每次 2h, 粗提液抽滤合并。70℃ 减压旋转蒸发浓缩滤液, 将所得浸膏溶于热水中, 浸膏体积 / 水体积为 1 : 2, 先按 1 : 2 体积加入石油醚对其进行萃取, 除去脂溶性杂质, 再按 1 : 2 体积加入乙酸乙酯萃取, 除去黄酮、香豆素等成分, 然后用正丁醇反复萃取 5 次, 减压回收正丁醇后得到粗总皂苷。将得到的粗总皂苷溶于少量无水乙醇, 然后滴入乙酸乙酯 (体积比为 1 : 0.8), 搅拌均匀, 有总皂苷析出。反复处理 5 次, 收集析出的总皂苷, 45℃ 减压真空干燥。所得北美盐角草总皂苷为棕黄色, 得率为 0.27%, 紫外分光光度法测定纯度为 65%, HPLC 法测定降三萜皂苷含量 25%。

[0068] 实施例 3

[0069] 采用方法 1, 取北美盐角草干燥全草, 用剪刀剪成 1cm 左右小段, 加入 10 倍生药体积的 50% 乙醇, 在 50℃ 的水浴中提取 2h 抽率得到粗提液, 反复提取 4 次, 合并滤液。50℃ 减压旋转蒸发浓缩滤液, 将浸膏溶于 50℃ 热水中, 浸膏体积 / 水体积为 1 : 2, 先按 1 : 1 体积加入石油醚对其进行萃取, 除去脂溶性杂质, 再按 1 : 1 体积加入乙酸乙酯萃取, 除去黄酮、香豆素等成分, 然后用正丁醇反复萃取 6 次, 减压回收正丁醇后得到粗总皂苷。将得到的粗总皂苷溶于少量无水乙醇, 然后滴入乙酸乙酯 (体积比为 1 : 0.5), 搅拌均匀, 有总皂苷析出。反复处理 5 次, 收集析出的总皂苷, 45℃ 减压真空干燥。所得北美盐角草总皂苷为棕黄色, 得率为 1.97%, 紫外分光光度法测定纯度为 67%, HPLC 法测定降三萜皂苷含量 27%。

[0070] 实施例 4

[0071] 采用方法 2, 取北美盐角草新鲜全草, 用剪刀剪碎成 1cm, 用 3 倍生药体积的 95% 乙醇, 室温 (25℃) 下, 浸泡 7 天, 过滤得到粗提取液, 反复浸泡 3 次, 合并滤液。在 40℃ 减压旋转蒸发浓缩滤液至原来体积的 1/3, 将浓缩液经过大孔吸附树脂 D101, 使液体中的皂苷吸附于树脂上, 弃去流出液, 再用 1 倍柱体积的蒸馏水冲洗树脂柱, 弃去流出液, 继而分别用 3 倍柱体积的 30%、50%、90% 乙醇进行梯度洗脱, 收集 30%、50% 乙醇洗脱液, 减压浓缩后得到粗总皂苷。将得到的粗制总皂苷溶于少量无水甲醇中, 然后滴入乙酸乙酯 (体积比 1 : 1), 搅拌均匀, 有总皂苷析出。反复处理 5 次, 收集析出的总皂苷, 40℃ 减压真空干燥。所得北美盐角草总皂苷为棕黄色, 得率为 0.39%, 紫外分光光度法测定纯度为 65%, HPLC 法测定降三萜皂苷含量 26%。

[0072] 实施例 5

[0073] 采用方法 2, 取北美盐角草干燥全草, 用剪刀剪碎成 3cm, 用 6 倍生药体积的 80% 乙醇, 在 70℃ 下加热回流提取 2h, 抽滤得到粗提取液, 反复提取 4 次, 合并滤液。在 70℃ 减压旋转蒸发浓缩滤液至原来体积的 1/3, 将浓缩液经过大孔吸附树脂 D101, 使液体中的皂苷吸附于树脂上, 弃去流出液, 再用 1 倍柱体积的蒸馏水冲洗树脂柱, 弃去流出液, 继而分别用 2 倍柱体积的 10%、30%、50%、70%、95% 乙醇进行梯度洗脱, 收集 30%、50%、70% 乙醇洗脱液, 减压浓缩后得到粗总皂苷。将得到的粗制总皂苷溶于少量无水甲醇中, 然后滴入乙酸乙酯 (体积比 1 : 0.7), 搅拌均匀, 有总皂苷析出。反复处理 5 次, 收集析出的总皂苷, 45℃ 减压真空干燥。所得北美盐角草总皂苷为棕黄色, 得率为 2.97%, 紫外分光光度法测定纯度为 69%, HPLC 法测定降三萜皂苷含量 28%。

[0074] 实施例 6

[0075] 采用方法 2, 取北美盐角草干燥全草, 用剪刀剪碎成 1cm, 用 10 倍生药体积的 50% 乙醇, 在 80℃ 下加热提取 2h, 抽滤得到粗提取液, 反复提取 2 次, 合并滤液。在 60℃ 减压旋转蒸发浓缩滤液至原来体积的 1/3, 将浓缩液经过大孔吸附树脂 AB-8, 使液体中的皂苷吸附于树脂上, 弃去流出液, 再用 1 倍柱体积的蒸馏水冲洗树脂柱, 弃去流出液, 继而分别用 2 倍柱体积的 10%、30%、50%、70%、80%、95% 乙醇进行梯度洗脱, 收集 30%、50%、70% 乙醇洗脱液, 减压浓缩后得到粗总皂苷。将得到的粗制总皂苷溶于少量无水甲醇中, 然后滴入乙酸乙酯 (体积比 1 : 0.5), 搅拌均匀, 有总皂苷析出。反复处理 5 次, 收集析出的总皂苷, 45℃ 减压真空干燥。所得北美盐角草总皂苷为棕黄色, 得率为 1.79%, 紫外分光光度法测定纯度为 75%, HPLC 法测定降三萜皂苷含量 31%。

[0076] 实施例 7

[0077] 采用方法 3, 取北美盐角草新鲜全草, 用剪刀剪碎成 1cm, 用 3 倍生药体积的 80% 乙醇, 在 70℃ 的水浴中热提 2h, 过滤得到粗提取液, 并反复提取 4 次, 合并滤液。滤液经减压浓缩得到浸膏, 溶于 70℃ 热水, 浸膏与水的体积比为 1 : 2.5, 以 3000rpm 离心 30min, 分离上清液和沉淀。将沉淀物用 3 倍生药体积的 60% 乙醇进行回流提取, 过滤浓缩, 40℃ 减压真空干燥得到一部分总皂苷; 将上清液减压浓缩, 3000rpm 离心 30min, 用水洗沉淀物, 45℃ 减压真空干燥得到另一部分总皂苷, 合并两个部分得到总皂苷, 所得北美盐角草总皂苷为棕黄色, 得率为 0.3%, 紫外分光光度法测定纯度为 61%, HPLC 法测定降三萜皂苷含量 21%。

[0078] 实施例 8

[0079] 采用方法 3, 取北美盐角草干燥全草, 用剪刀剪碎成 1cm, 用 6 倍生药体积的 75% 乙醇, 在 50℃ 的水浴中热提 2h, 过滤得到粗提取液, 并反复提取 2 次, 合并滤液。滤液经减压浓缩得到浸膏, 溶于 50℃ 热水, 浸膏与水的体积比为 1 : 2, 以 2500rpm 的速度离心 20min, 分离上清液和沉淀。将沉淀物用 3 倍生药体积的 95% 乙醇进行回流提取, 过滤浓缩, 45℃ 减压真空干燥得到一部分总皂苷; 将上清液减压浓缩, 2500rpm 离心 20min, 用水洗沉淀物, 45℃ 减压真空干燥得到另一部分总皂苷, 合并两个部分得到总皂苷, 所得北美盐角草总皂苷为棕黄色, 得率为 1.57%, 紫外分光光度法测定纯度为 64%, HPLC 法测定降三萜皂苷含量 26%。

[0080] 实施例 9

[0081] 采用方法 3, 取北美盐角草干燥全草, 用剪刀剪碎成 3cm, 用 10 倍生药体积的 70%

乙醇,在 70℃的水浴中热提 2h,过滤得到粗提取液,并反复提取 4 次,合并滤液。滤液经减压浓缩得到浸膏,溶于 70℃热水,浸膏与水的体积比为 1 : 2,以 3000rpm 离心 20min,分离上清液和沉淀。将沉淀物用 5 倍生药体积的 70%乙醇进行回流提取,过滤浓缩,40℃减压真空干燥得到一部分总皂苷;将上清液减压浓缩,3000rpm 离心 20min,用水洗沉淀物,45℃减压真空干燥得到另一部分总皂苷,合并两个部分得到总皂苷,所得北美盐角草总皂苷为棕黄色,得率为 2.93%,紫外分光光度法测定纯度为 70%,HPLC 法测定降三萜皂苷含量 30%。

[0082] 实施例 10

[0083] 片剂:取北美盐角草总皂苷 5g,加入 5g 可压淀粉和 4g 羧甲基淀粉钠,混合均匀,以 70%的乙醇为润湿剂,制软材,18 目筛制粒,烘干,16 目筛整粒,加入 0.3g 硬脂酸镁为润滑剂,混合均匀,压片、包衣,制成 100 片包衣片。

[0084] 实施例 11

[0085] 胶囊:取北美盐角草总皂苷 5g,加入 8g 可压淀粉和 2g 羧甲基纤维素钠,混合均匀,以 70%的乙醇为润湿剂,制软材,24 目筛制粒,烘干,20 目筛整粒,加入 0.3g 硬脂酸镁,混合均匀,装胶囊,制成 100 粒胶囊。

[0086] 实施例 12

[0087] 颗粒剂:取北美盐角草总皂苷 10g,加入 45g 蔗糖粉、10g 羧甲基纤维素钠、10g 微晶纤维素和 5g 柠檬酸,混合均匀,以 3% PVP 为润湿剂,制软材,20 目筛制粒,烘干,18 目筛整粒,分装,制成粒径为 830 ~ 880 μm 的 100 袋颗粒剂。每袋重 0.70 ~ 0.79g。

[0088] 实施例 13

[0089] 粉针剂:取北美盐角草总皂苷 1.2g,羟丙基- β -环糊精 13.5g,加注射用水 0.3L,搅成糊状,再加 70℃~85℃的注射用水 0.3L,溶解时温度控制在 70℃~85℃,加甘露醇 45g 溶解,再用 1mol/L 盐酸溶液调 pH 值至 5.6,加入针用炭后室温搅拌,过滤脱炭,精滤。滤液按每只 2ml 进行分装,采用速冻法干燥,将制品取出,进行封口,即得到性状为白色疏松块状物或粉末,即得粉针剂。

[0090] 实施例 14

[0091] 滴丸:将 15g 聚乙二醇 4000 在水浴上加热得熔融液,趁热加入北美盐角草总皂苷 5g,搅拌均匀,65℃保温 1 小时,用滴丸机滴制,滴速 120 滴 / 分钟,滴制温度 65℃~75℃,在 15℃左右的液体石蜡中冷却,制得丸重约 60mg,干燥,包衣,即得滴丸。

[0092] 实施例 15

[0093] 口服液:取蒸馏水适量,加入 2g 北美盐角草总皂苷、18g 蔗糖粉、2g 柠檬酸,搅拌溶解,过滤,滤液补充蒸馏水至 1000ml,加入香精适量,搅拌均匀,分装,每支 10ml,压盖,100℃消毒 1 小时,检查合格,即得口服液。

[0094] 实施例 16

[0095] 粉剂:取北美盐角草总皂苷 3g,粉碎成粒径为 20 μm 粉状物,加入 50g 蔗糖粉、10g 羧甲基纤维素钠、10g 微晶纤维素混合均匀,分装,制成 100 袋粉剂。每袋重 0.65 ~ 0.70g。添加量为食品或饲料的 0.01 ~ 1%。

[0096] 6、药效实验

[0097] 将上述实施例 5 制备所得的北美盐角草总皂苷进行如下效果实验:

[0098] 1、营养性肥胖大鼠检测北美盐角草总皂苷减肥降血脂活性实验

[0099] SD 大鼠 60 只 (80 ± 20 g) 随机分为 6 组,除空白组喂食基础饲料以外,每组均给予等量高脂饲料,每只每天 20g。4 周以后测得体重高于空白组 15%,开始灌胃。实验组每天分别灌胃 50mg/kg·d、200mg/kg·d、800mg/kg·d 北美盐角草总皂苷。空白组、高脂组灌以等量蒸馏水,阳性对照组灌以盐酸西布曲明 2.5mg/kg·d。给药 3 周之后检测大鼠体重、身长,计算 lee's 指数,眼眶静脉丛采血,用试剂盒测血清中总胆固醇 TC、甘油三酯 TG、高密度脂蛋白 HDL-c、低密度脂蛋白 LDL-c 值。处死后解剖检测大鼠睾丸脂肪湿重。结果见表 1、表 2、表 3、表 4。

[0100] 表 1. 北美盐角草总皂苷对大鼠体重、身长和 lee's 指数的影响

[0101]

	体重 g	身长 cm	lee's
空白组	213.3±20.2	20.1±0.5	289.1±13.6
高脂组	255.3±47.3	20.3±0.9	303.1±10.7
阳性对照	207.9±30.1	21.1±1.1	270.5±1.3**
50mg/kg·d	200.1±22.0	20.9±1.1	271.2±8.7**
200mg/kg·d	206.9±10.7	20.0±1.1	279.3±9.4**
800mg/kg·d	215.7±43.1	20.5±1.3	273.5±5.3**

[0102] * 表示与高脂组比较, $0.01 < p < 0.05$, ** 表示与高脂组比较 $p < 0.01$

[0103] 表 2. 北美盐角草总皂苷对大鼠睾丸周围脂肪湿重及其脂肪系数的影响

[0104]

	睾丸周围脂肪湿重 g	睾丸周围脂肪系数%
空白组	1.609±0.321**	0.739±0.167**
高脂组	2.703±0.609	0.978±0.089
阳性对照	1.679±0.590*	0.773±0.213
50mg/kg·d	1.476±0.477**	0.711±0.210**
200mg/kg·d	1.352±0.421**	0.655±0.378**
800mg/kg·d	1.593±0.576*	0.679±0.197**

[0105] * 表示与高脂组比较, $0.01 < p < 0.05$, ** 表示与高脂组比较 $p < 0.01$

[0106] 表 3. 大鼠血清总胆固醇 TC、甘油三酯 TG

[0107]

	TC mmol/l	TG mmol/l
空白组	2.198±0.239**	0.658±0.012**
高脂组	3.561±0.457	0.993±0.137
阳性对照	2.650±0.503**	0.947±0.176
50mg/kg·d	2.595±0.765	0.576±0.147**
200mg/kg·d	2.973±0.619	0.735±0.639*
800mg/kg·d	2.570±0.512**	0.609±0.238**

[0108] *表示与高脂组比较, $0.01 < p < 0.05$, **表示与高脂组比较 $p < 0.01$

[0109] 表 4. 大鼠血清高密度脂蛋白 HDL-c、低密度脂蛋白 LDL-c

[0110]

	HDL-c mmol/l	LDL-c mmol/l
空白组	0.613±0.040**	2.126±0.279*
高脂组	0.471±0.069	3.191±0.798
阳性对照	0.663±0.051**	2.306±0.359*
50mg/kg·d	0.685±0.017**	2.091±0.333*
200mg/kg·d	0.783±0.117**	2.170±0.170*
800mg/kg·d	0.788±0.109**	1.975±0.279*

[0111] *表示与高脂组比较, $0.01 < p < 0.05$, **表示与高脂组比较 $p < 0.01$

[0112] 2、大鼠前体脂肪细胞培养

[0113] 将体重为 80g 的幼年 SD 大鼠断颈处死, 无菌操作取出睾丸周围脂肪组织, 剪成 1mm^3 左右的碎块, 用 I 型胶原酶 37°C 消化 $1\text{h} \sim 2\text{h}$ 。用 200 目尼龙筛过滤后, $1000 \sim 1500\text{rpm}$ 离心 $10 \sim 20\text{min}$ 。弃去上清液, 加入红细胞裂解数, 室温放置 10min , 加入 10% 小牛血清的 αMEM , 按 5×10^4 个/ cm^2 密度接种于 2 个 96 孔培养板, 至于 37°C $50\text{ml}/1\text{CO}_2$ 培养箱培养。1 天后如下更换培养液: 空白组为不含样品的 10% 小牛血清的 αMEM ; 含北美盐角草总皂苷分别 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的三个剂量的 10% 小牛血清 αMEM 培养液, 每 2 天更换一次培养液, 8 天后用 MTT 法检测细胞增殖情况。另一块 96 孔板用基础培养液培养 4 天后更换为上述含样品培养液, 培养 72h , 用油红 O 染色法检测细胞分化情况。结果如表 5、表 6。

[0114] 表 5. MTT 法检测前体脂肪细胞增殖各组 $\text{OD}_{490\text{nm}}$

[0115]

	北美盐角草总皂苷	空白组
50 μ g/ml	0.295 \pm 0.019**	0.475 \pm 0.037
100 μ g/ml	0.157 \pm 0.027**	
200 μ g/ml	0.183 \pm 0.022**	

[0116] *表示与高脂组比较, $0.01 < p < 0.05$, **表示与高脂组比较 $p < 0.01$

[0117] 表 6. 油红 O 染色法检测前体脂肪细胞分化各组 OD_{500nm}

[0118]

	北美盐角草总皂苷	空白组
50 μ g/ml	0.196 \pm 0.017	0.230 \pm 0.019
100 μ g/ml	0.167 \pm 0.009*	
200 μ g/ml	0.169 \pm 0.002*	

[0119] *表示与高脂组比较, $0.01 < p < 0.05$, **表示与高脂组比较 $p < 0.01$

[0120] 上述实验结果表明,本发明的北美盐角草总皂苷在各剂量,均显示出显著的减肥降血脂活性。可利用北美盐角草总皂苷制备药物或者保健食品用于预防或者治疗肥胖症及高血脂症。本发明的北美盐角草总皂苷的制备方法和用途已经通过具体的实例进行了描述,本领域技术人员可借鉴本发明内容,适当改变原料、工艺条件等环节来实现相应的其它目的,其相关改变都没有脱离本发明的内容,所有类似的替换和改动对于本领域技术人员来说是显而易见的,都被视为包括本发明的范围之内。

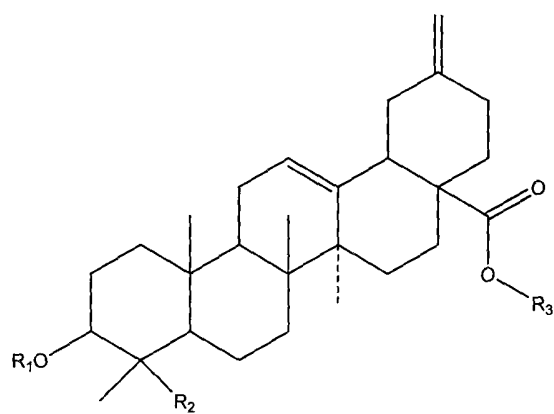
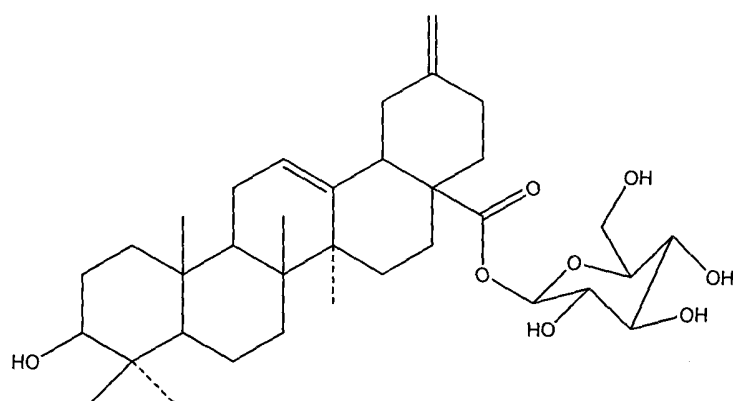
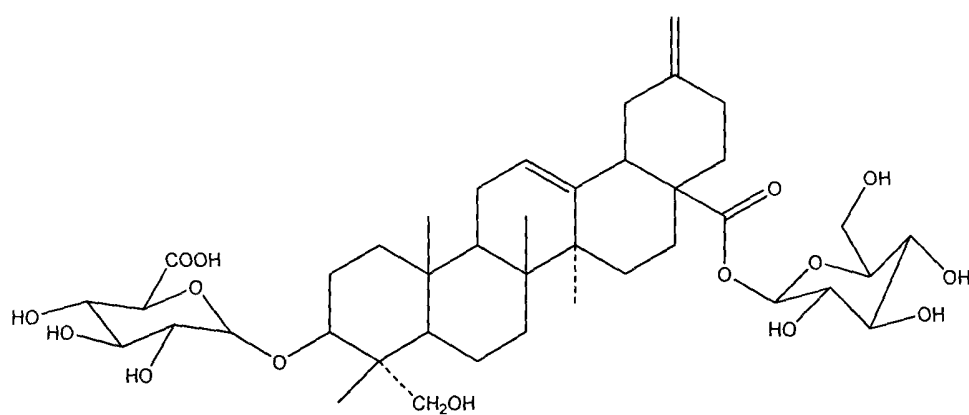


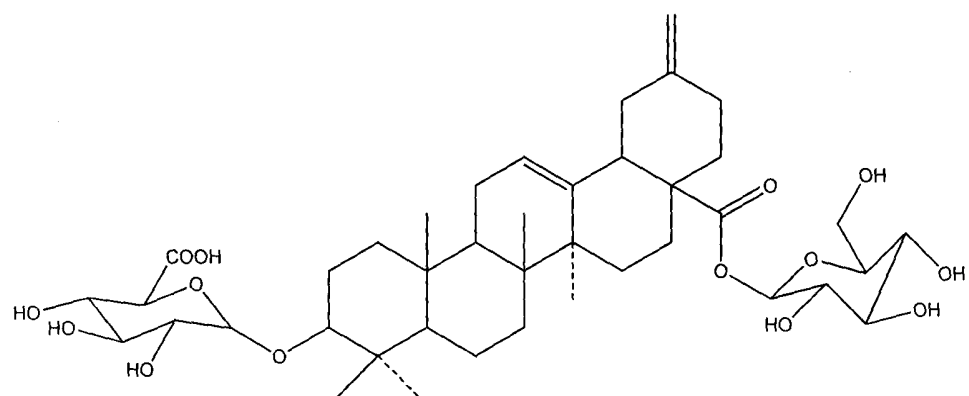
图 1



化合物 1



化合物 2



化合物 3

图 2

SL-9 H1-NMR C5D5N 303K AV-500

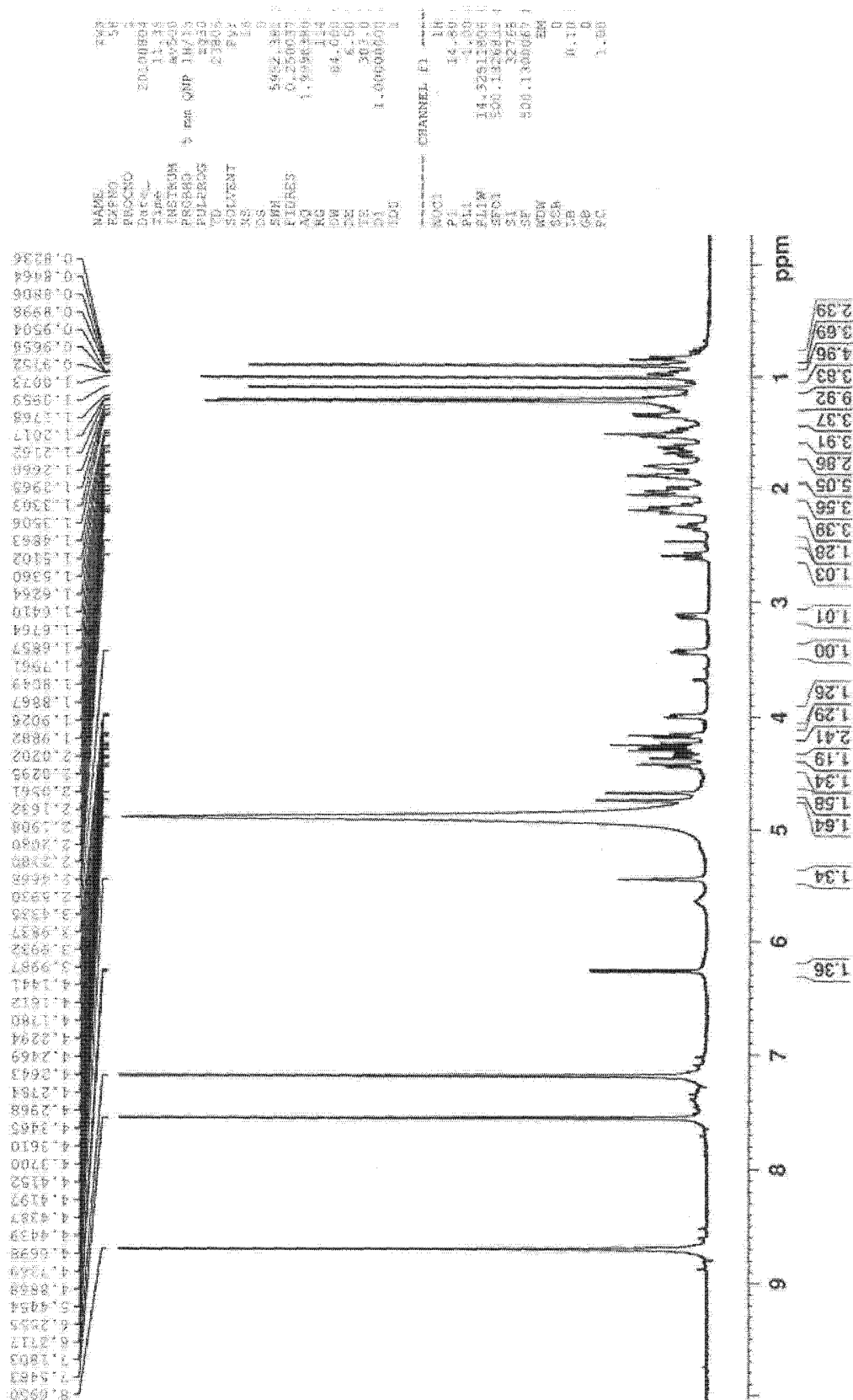


图 3

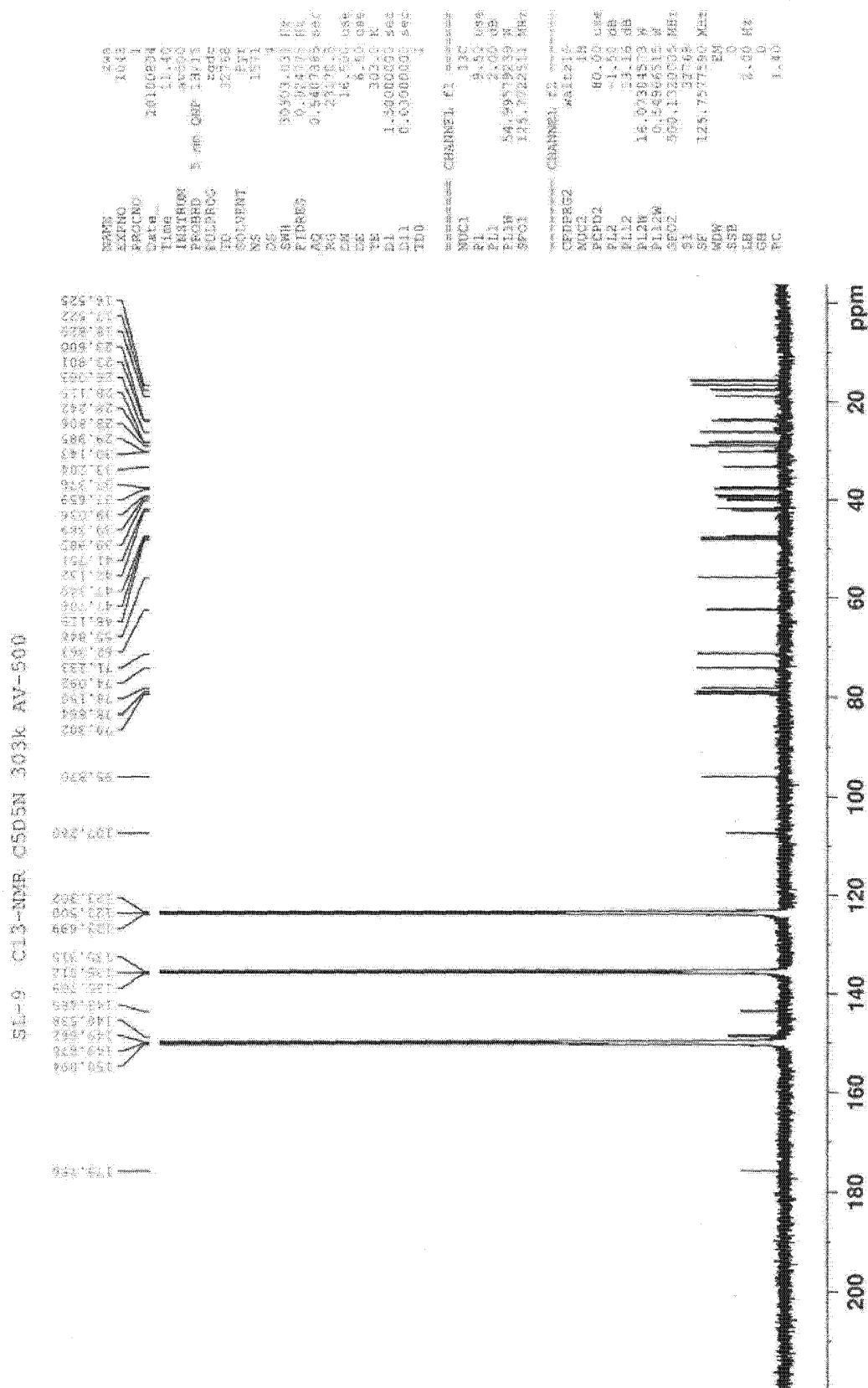


图 4

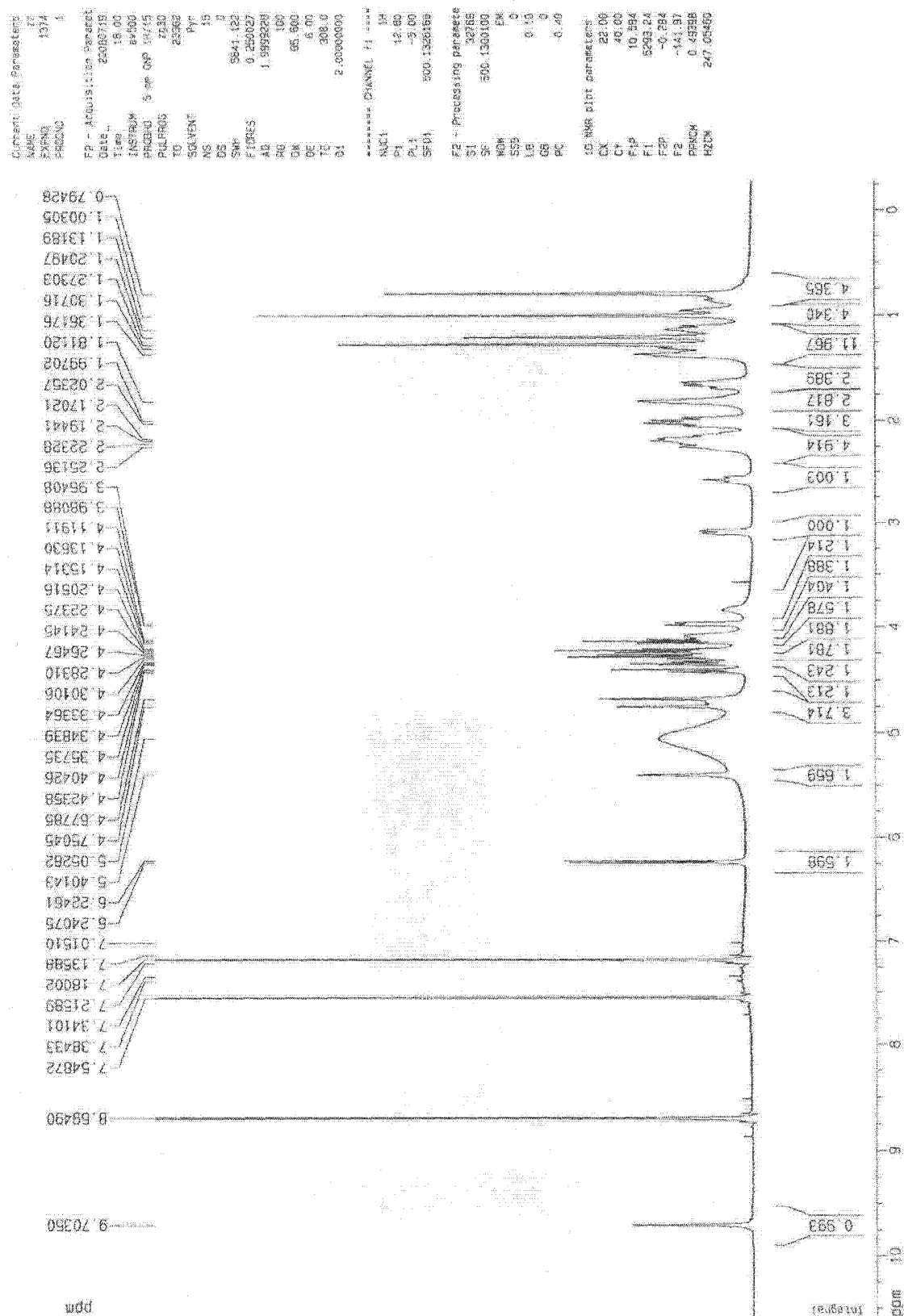


图 5

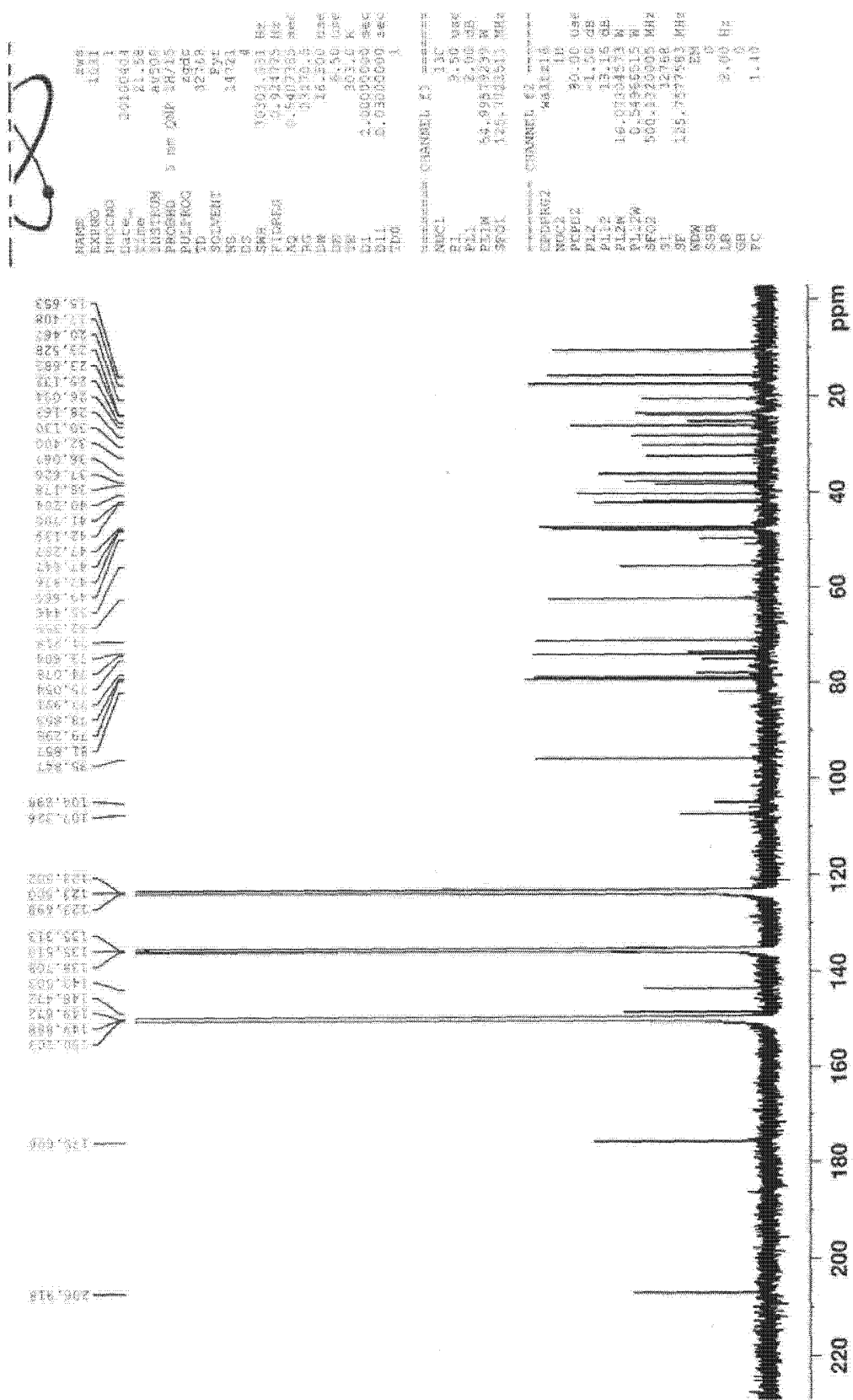


图 6

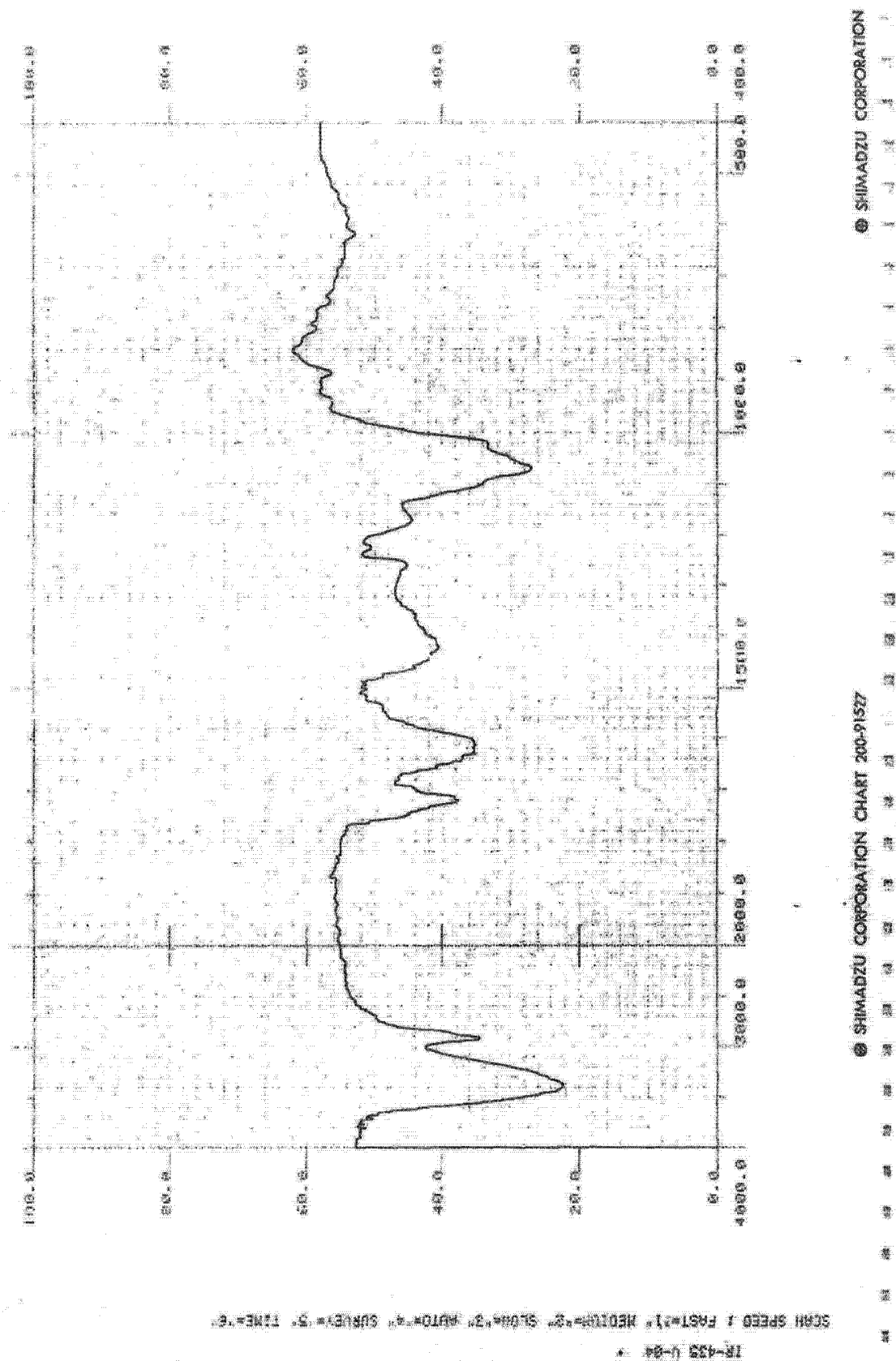


图 7

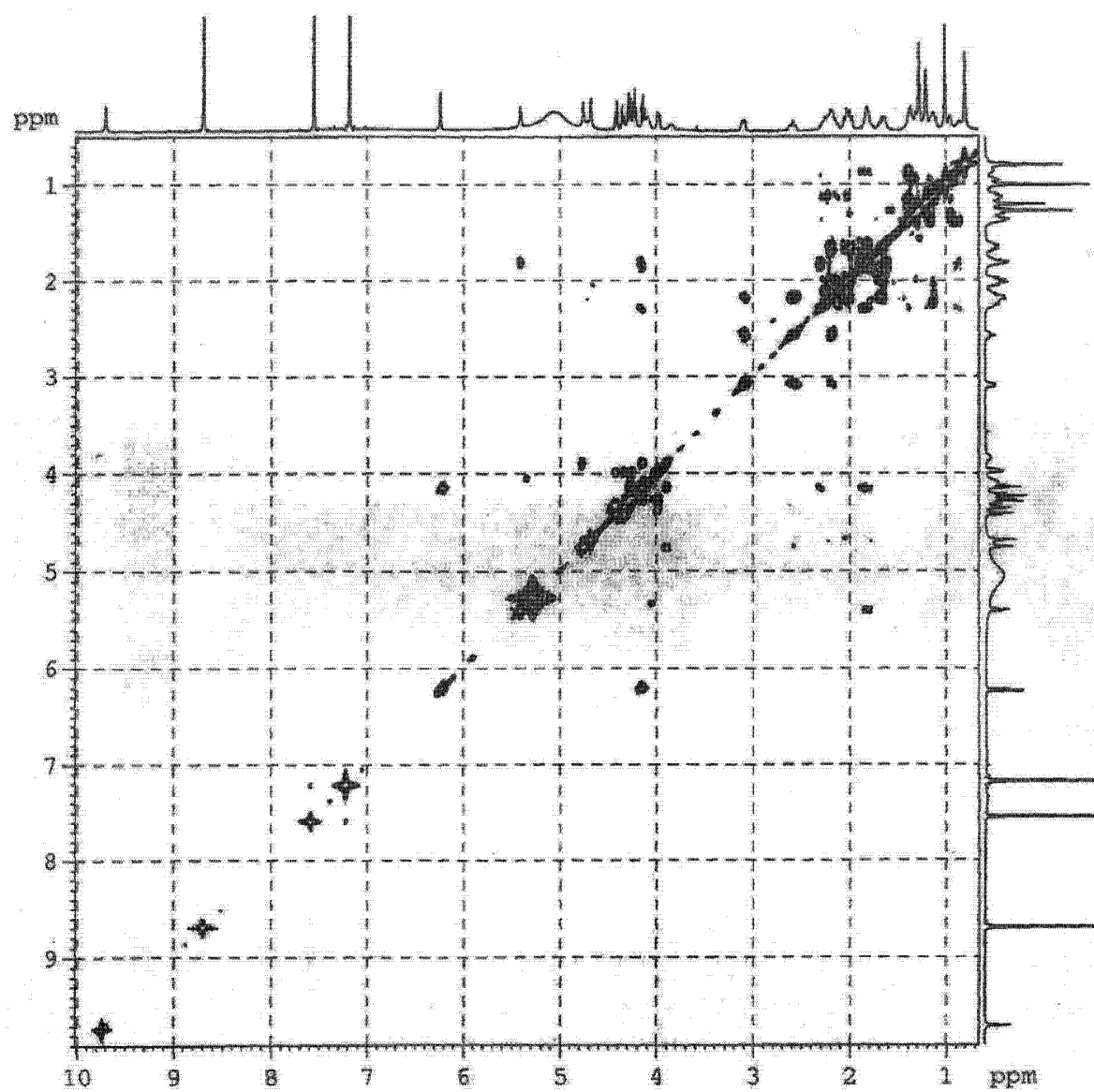


图 8

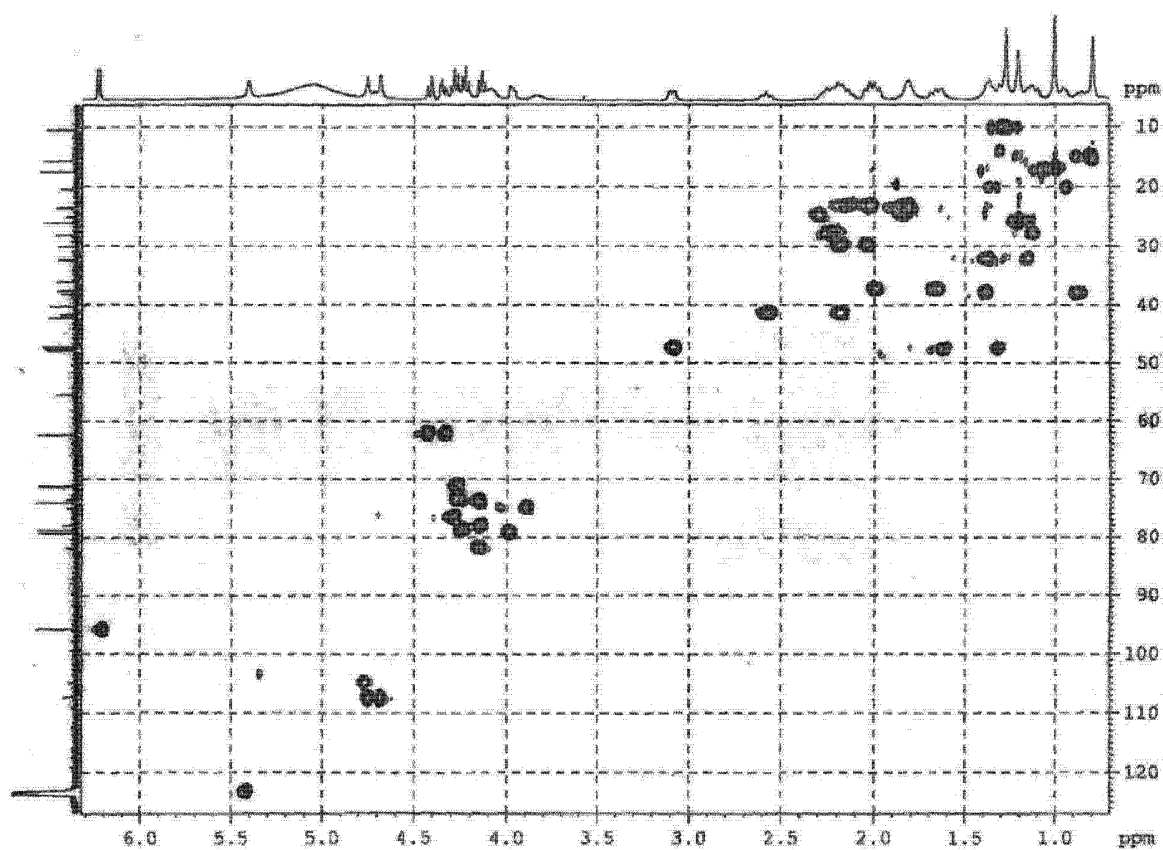


图 9

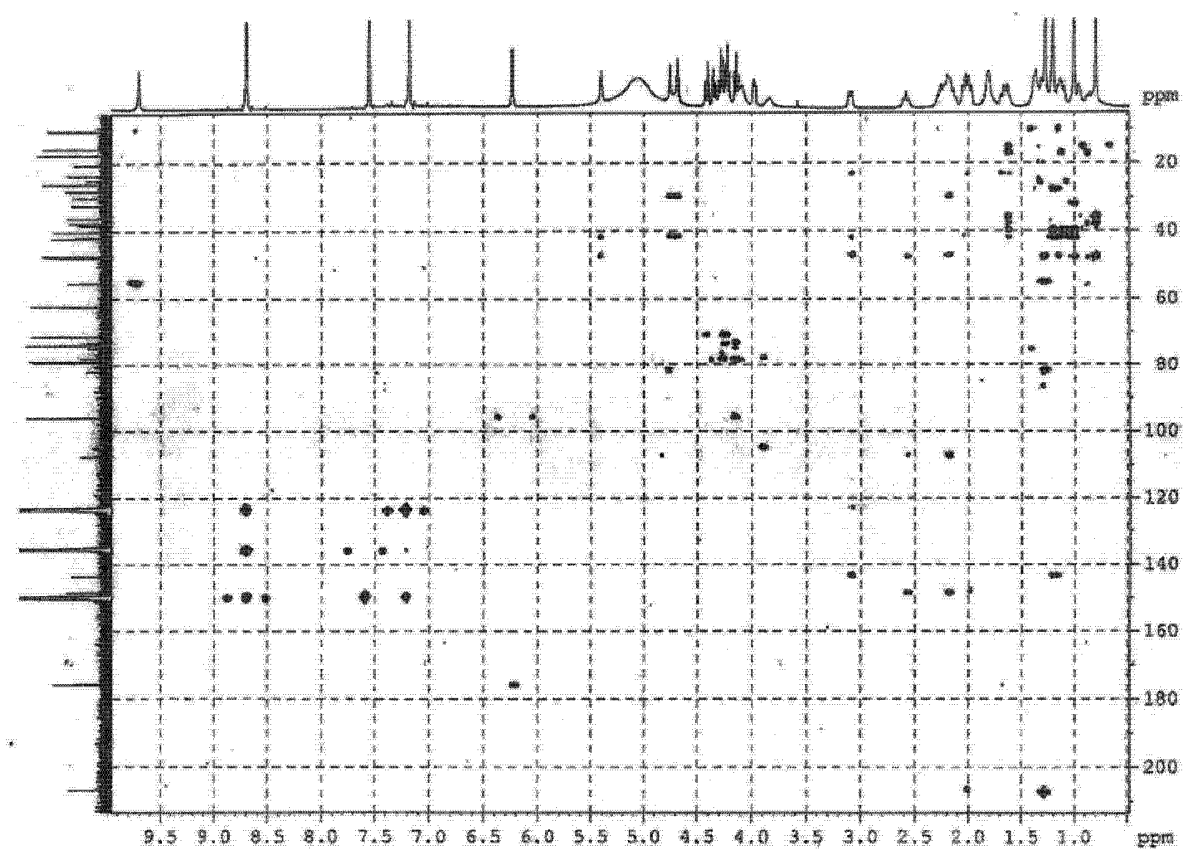


图 10

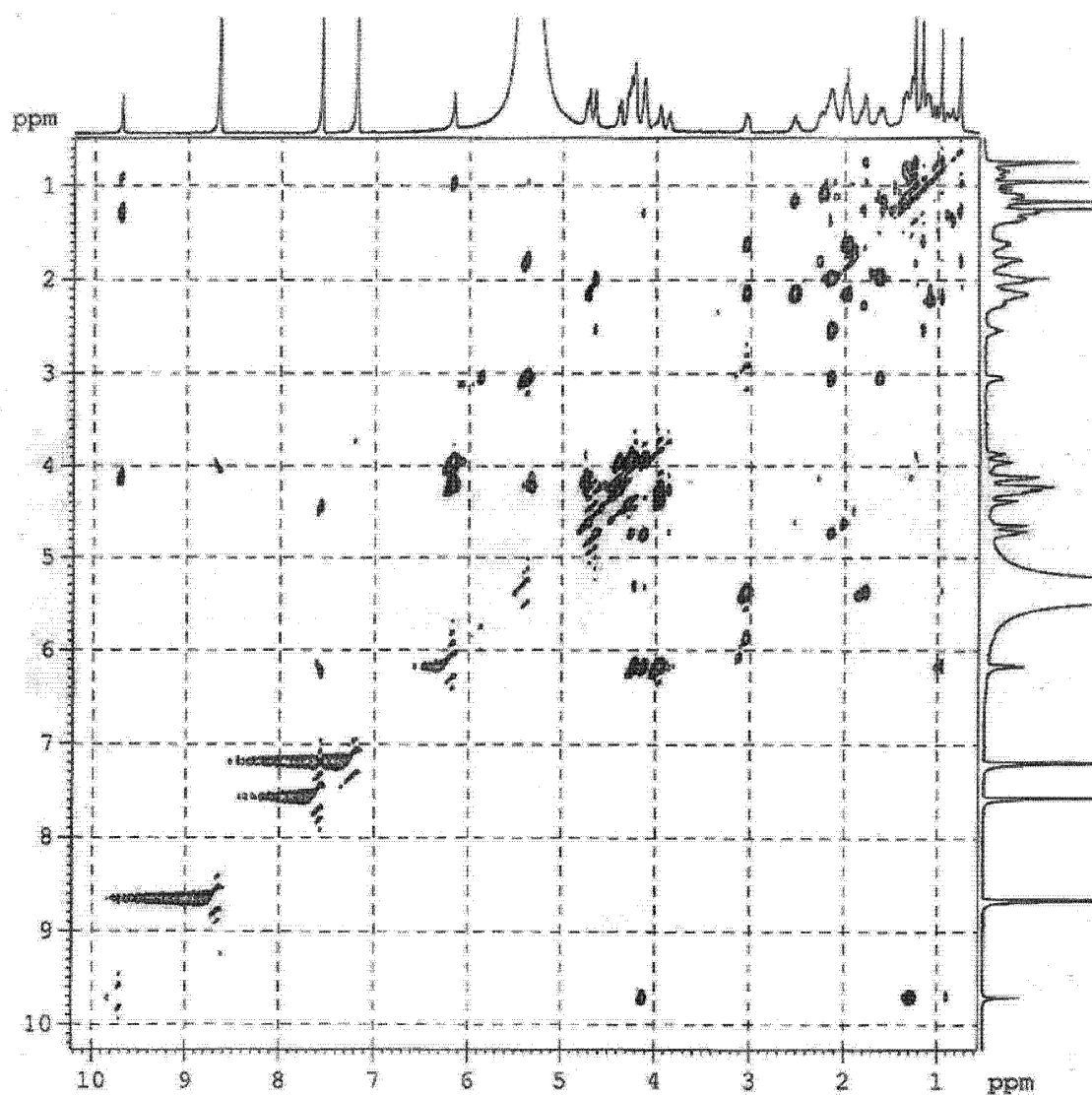


图 11

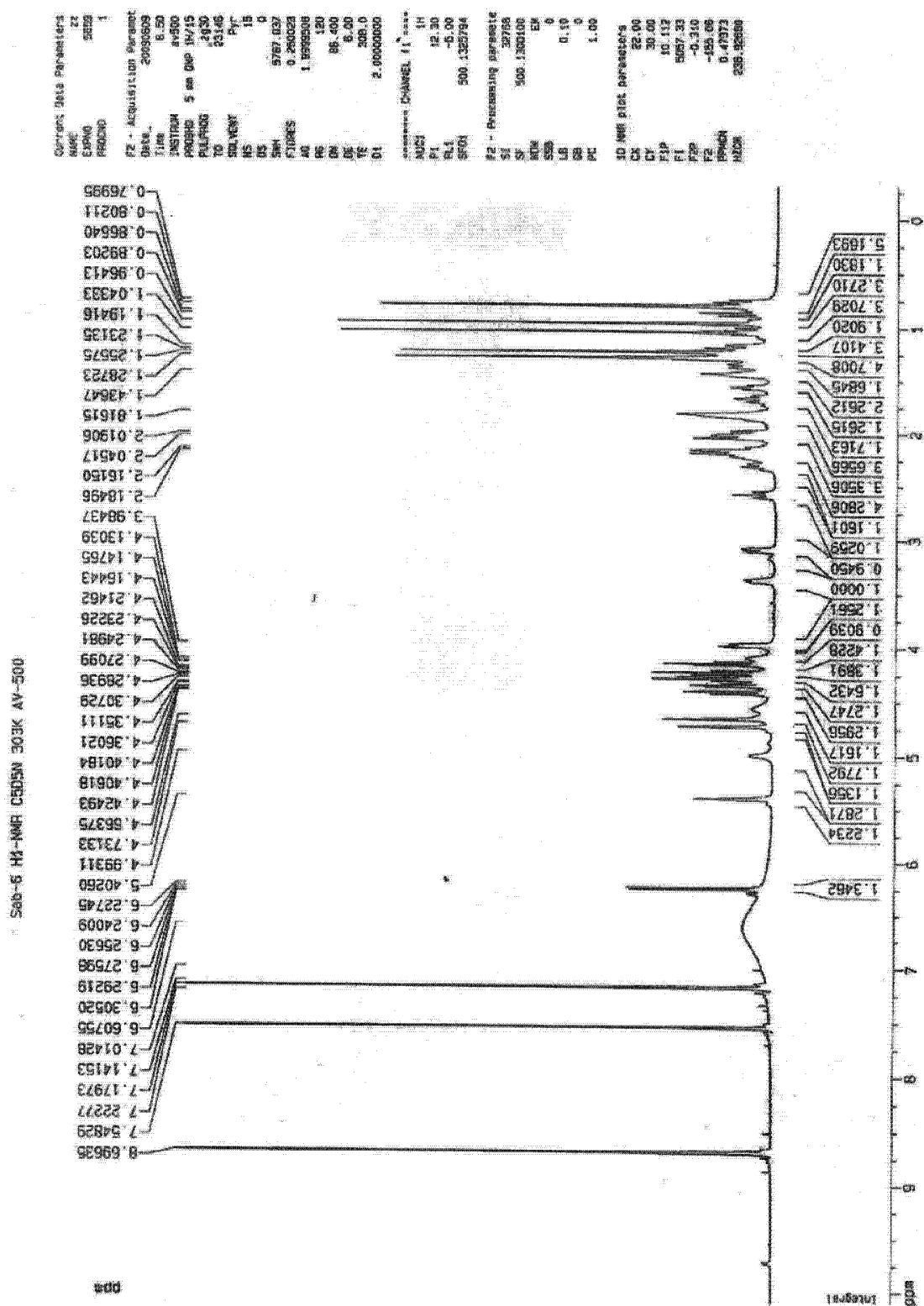


图 12

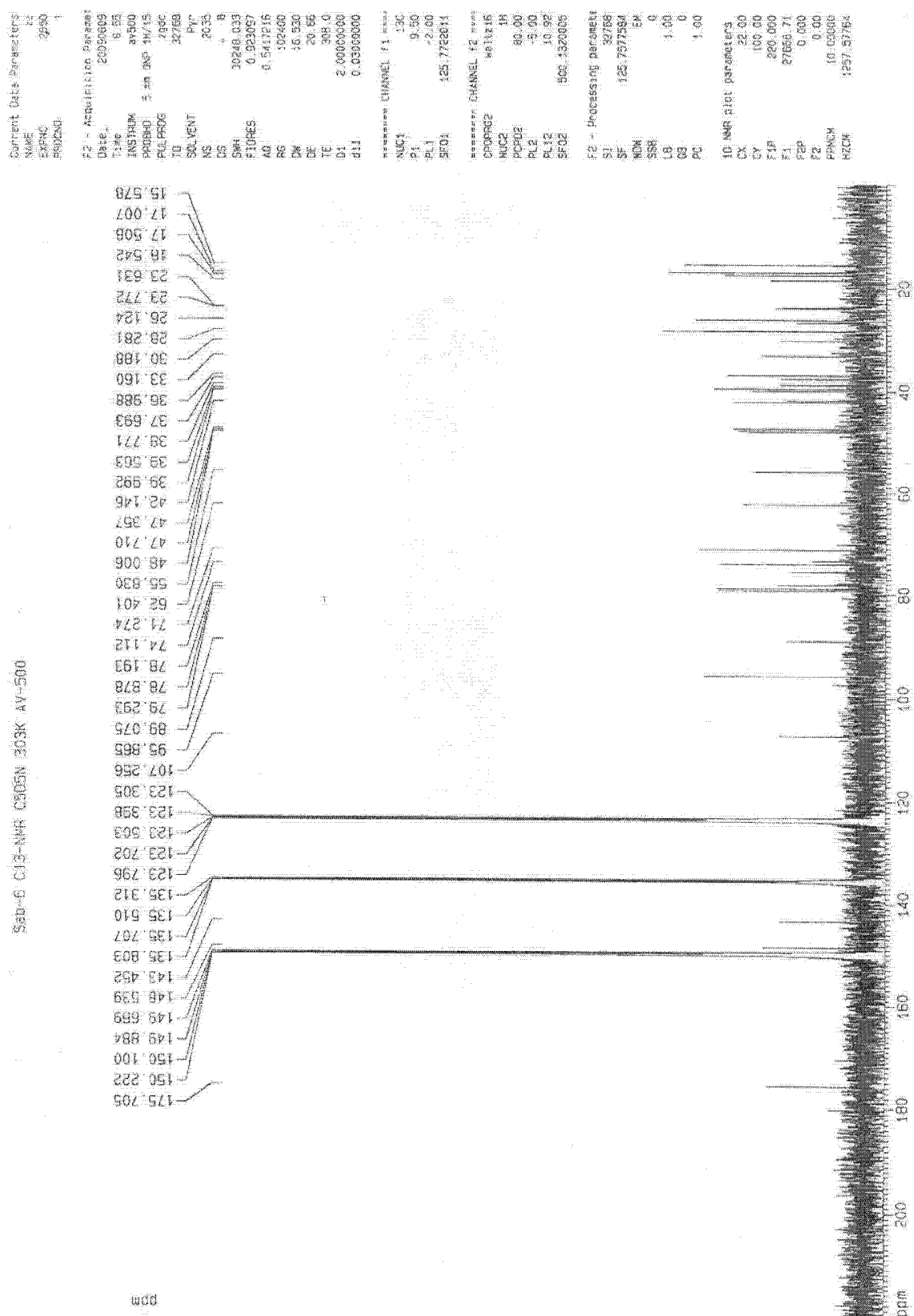


图 13

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: Sab--6.d
Method: Copy of Xu.MS
Sample Name: Default
Analysis Info:

Instrument: LC-MSD-Trip-SL
Operator: Administrator

Print Date: 10/14/08 14:13:37
Acq. Date: 10/14/08 14:04:47

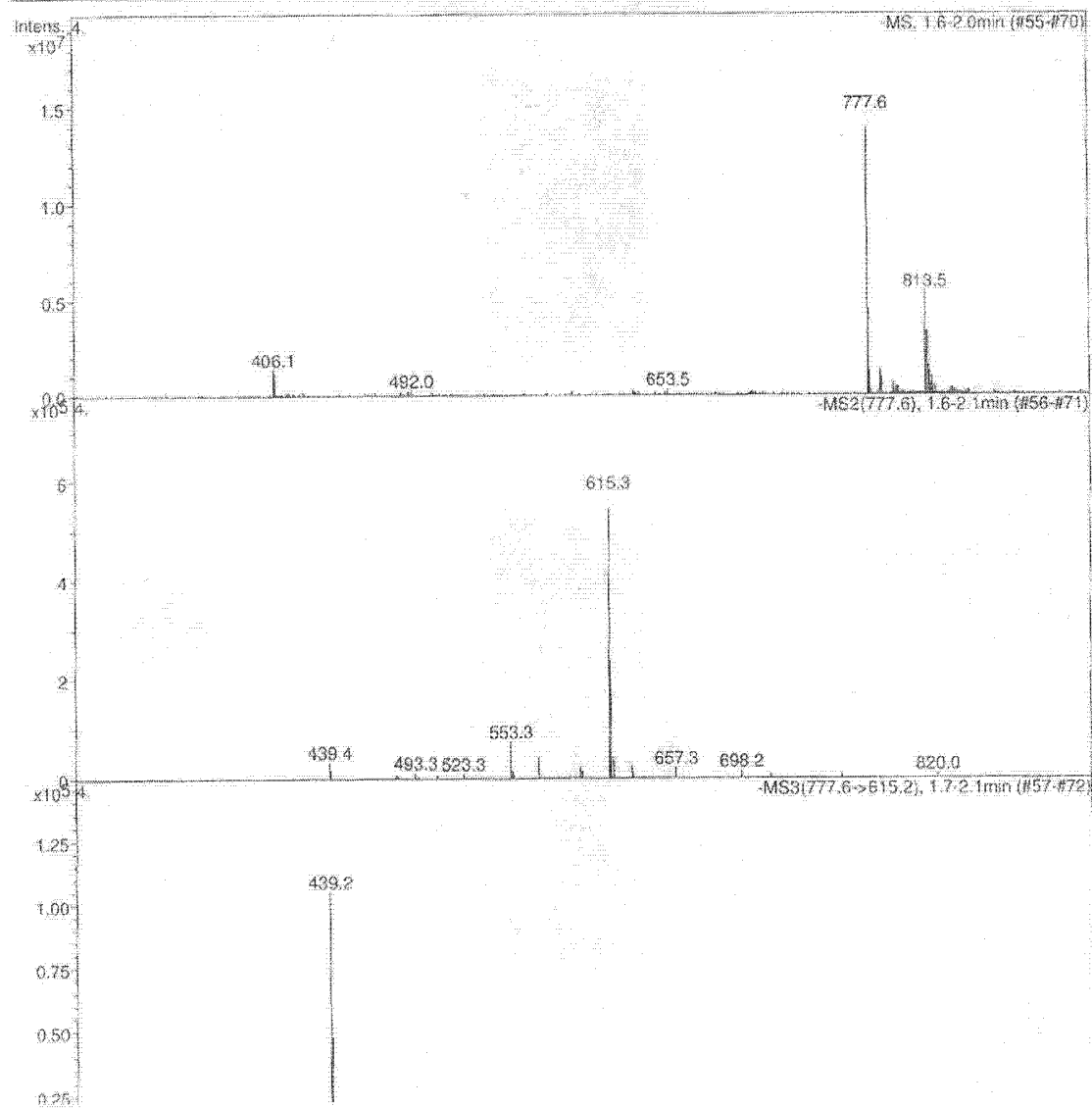


图 14

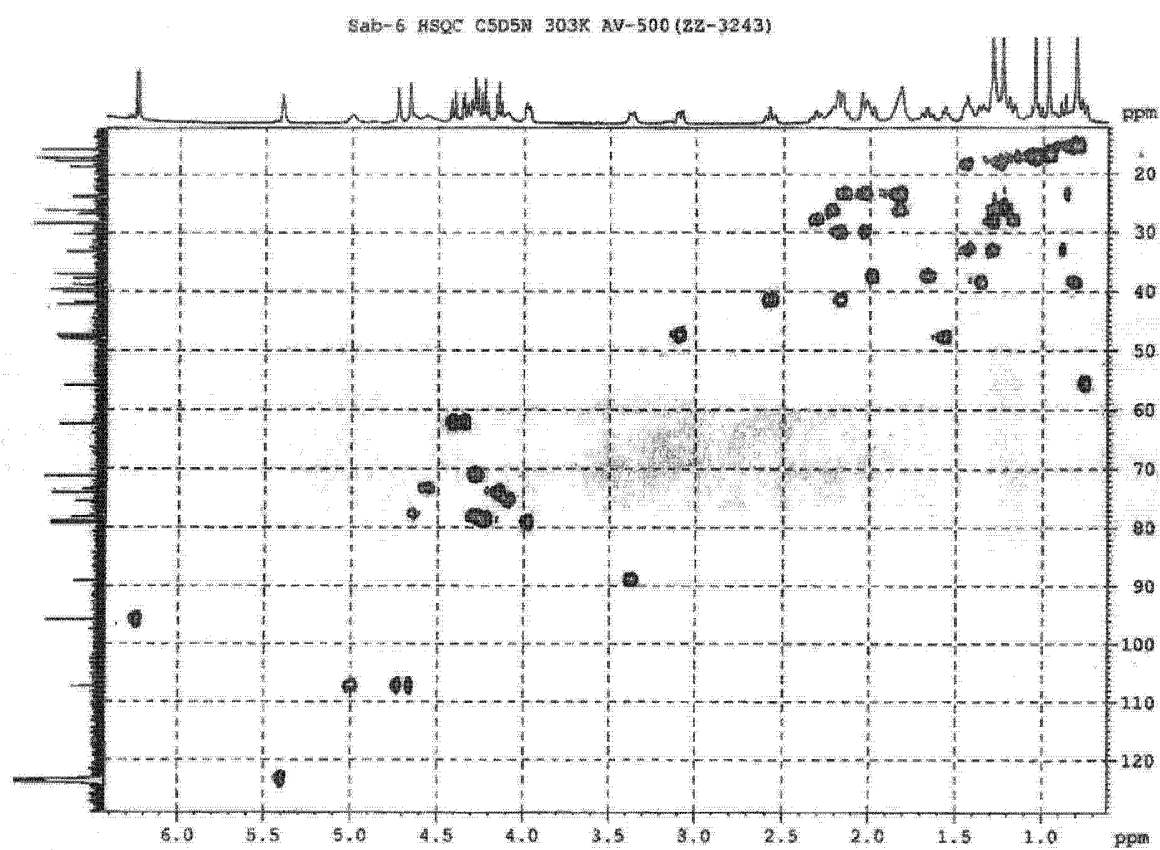


图 15

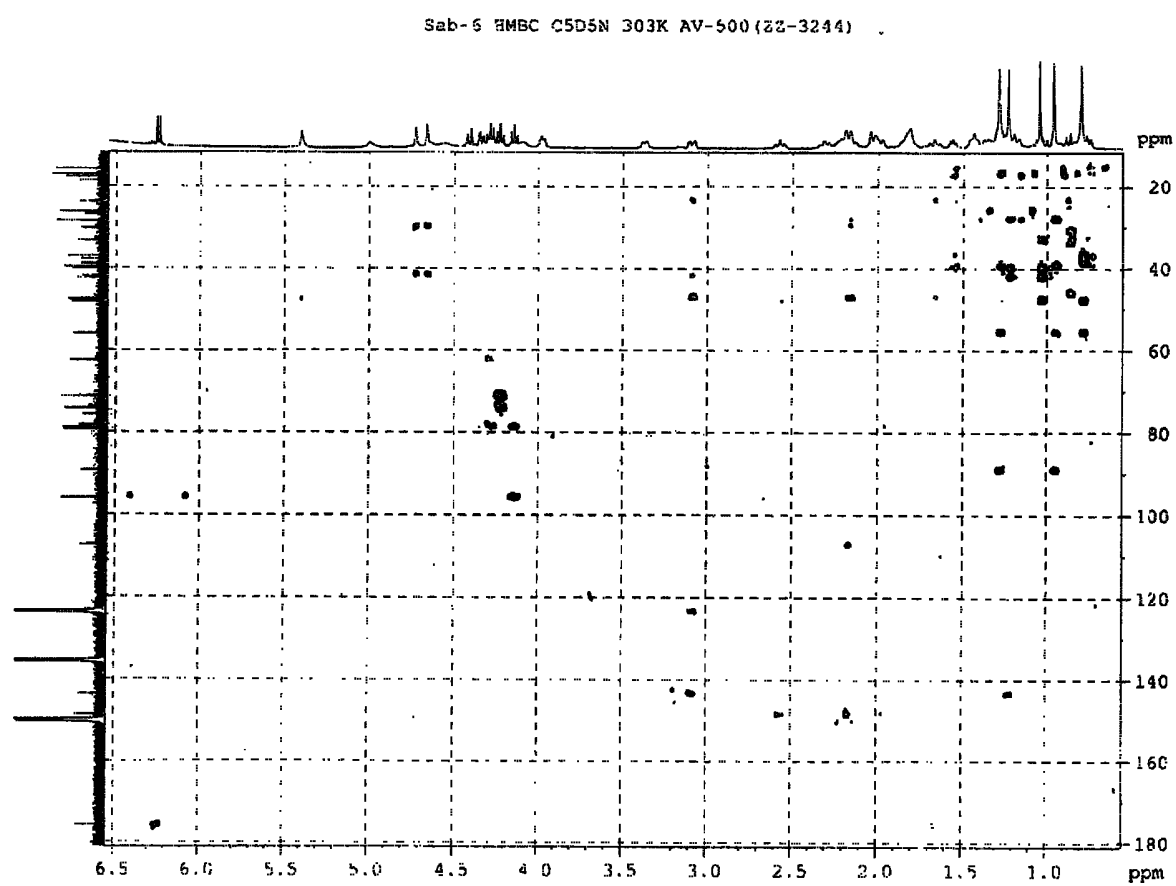


图 16