



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110934899 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 23

(21) 申请号 201911322326.5

A61P 7/04 (2006.01)

(22) 申请日 2019.12.20

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 102247420 A, 2011.11.23

申请公布号 CN 110934899 A

CN 103951672 A, 2014.07.30

(43) 申请公布日 2020.03.31

陈锐等. 早莲草凝血和溶血活性成分的研究.《天然产物研究与开发》.2014,第26卷

(73) 专利权人 九江学院

过七根等. 薄层层析法分析早莲草的凝血活性成分.《江西师范大学学报(自然科学版)》

地址 332005 江西省九江市前进东路551号
九江学院

.2017,第41卷(第1期),

(72) 发明人 张炳火 刘怀 李汉全 过七根
杨建远 查代明

审查员 张娜

(74) 专利代理机构 长沙智德知识产权代理事务
所(普通合伙) 43207

专利代理师 卢钟廷

(51) Int. Cl.

A61K 36/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种早莲草凝血止血活性成分的提取方法
及应用

(57) 摘要

本发明提供了种早莲草凝血止血活性成分的提取方法,包括如下步骤:1)取植株洗净后干燥,粉碎过筛10-150目,取得早莲草粉;2)加入助溶剂并浸泡并过滤,以充分除去其中的有机溶剂,得提取液A;3)加入萃取剂,分离其中的极性小组份并除去,加入去离子水并充分搅拌后,得提取液B;4)进行固相萃取;5)完成固相萃取后在大孔树脂中首先采用水洗脱,之后用醇类溶液对所述大孔树脂反复洗脱2-5次,收集末次洗脱后的洗脱液C;6)将蒸发浓缩得到膏状物质并干燥,得早莲草活性成分提取物。本发明的提取物可占早莲草干重的1.0-6.5%,实现了凝血止血中药提取物较高产地制备;且过程中的各助剂等均为常见且成本较低的类型,适合工业化生产。

1. 一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法,包括以下步骤:

1) 取旱莲草地上部分或全株,洗净后干燥,粉碎过筛10-150目,取得旱莲草粉;

2) 将上述旱莲草粉中加入助溶剂并浸泡并过滤,将所得的浸提液浓缩,以充分除去其中的有机溶剂,得提取液A,并使每加入1kg的旱莲草粉可得提取液A为4-10升;

3) 将上述步骤所得提取液加入萃取剂,分离其中的极性小组分 并除去,萃余液减压蒸馏并充分除去其中的有机溶剂,加入去离子水并充分搅拌后,将其中的不溶性的沉淀物过滤后,得提取液B;

4) 采用填装大孔吸附树脂的固相萃取柱对所述提取液B进行固相萃取;

5) 完成固相萃取后在大孔树脂中首先采用水洗脱,之后用醇类溶液对所述大孔树脂反复洗脱2-5次,且历次洗脱加入的醇类水溶液浓度逐步提高,收集末次洗脱后的洗脱液C;

6) 将所述洗脱液C蒸发浓缩以除去醇类物质和大部分水,得到膏状物质,并干燥,得旱莲草活性成分提取物;

所述步骤2)中,助溶剂的成分及配比为:去离子水 : 甲醇 : 乙醇或丙酮: 乙酸乙酯=1-3 : 1-3 : 1-3 : 1-3,该助溶剂加入时液温为40-65℃;

所述步骤3)中,萃取剂为乙酸乙酯或二氯甲烷;

所述步骤4)中,大孔吸附树脂为罗门哈斯大孔吸附树脂或者三菱大孔吸附树脂,每千克所述提取液B需所述大孔吸附树脂0.8-2.6升;

所述步骤5)中,醇类水溶液为甲醇水溶液或乙醇水溶液,初次洗脱浓度为10%-25%的甲醇水溶液或2%-10%的乙醇水溶液,且历次洗脱加入的醇类水溶液用量不小于所述固相萃取柱体积的1.5倍。

2. 根据权利要求1所述的一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法,其特征在于,所述过滤为离心过滤或真空过滤。

3. 根据权利要求1所述的一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法,其特征在于,所述步骤4)中固相萃取柱的出口溶液流速为0.2-1.0倍柱体积/小时,萃取液面下降至树脂面时即关闭出口。

4. 根据权利要求1所述的一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法,其特征在于,所述步骤5)中,加入洗脱用水量不小于所述固相萃取柱体积的1.2倍。

5. 根据权利要求1所述的一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法,其特征在于,所述步骤5)洗脱流速为0.2-1.0倍固相萃取柱体积/小时。

6. 采用权利要求1至5中任一项所得的旱莲草凝血止血活性成分在制备止血、凝血药物和医疗、卫生材料中的应用。

一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体为一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法及应用。

背景技术

[0002] 旱莲草是一种重要的药用植物,是民间最常用的止血中草药,最早用于止血,常用来治疗阴虚血热、吐血、血衄、尿血、血痢、崩漏下血以及外伤出血等出血性病证,其止血功能在临床中药复方制剂方面已得到了一些应用,它是宁环片、功血宁冲剂和明目止血片等临床常用止血中药制剂的主要成分之一,但目前还没有纯粹利用旱莲草开发的凝血止血药物。

[0003] 旱莲草是一种亦药亦食的一年生植物,其凝血止血活性成分毒副作用小,效果好。虽然国内外有关于旱莲草各种溶剂浸泡提取的粗提物的凝血和止血活性、及可能凝血和止血机理的研究,但均未涉及具体凝血和止血化合物。我们研究发现,旱莲草中含有多种凝血和止血活性成分,既含有脂溶性化合物(如螳螂菊内酯类化合物),也含有水溶性化合物,其中一种黄色粉末状水溶性物质是旱莲草的主要凝血和止血活性成分之一,该化合物能够导致红细胞凝聚成团,并使毛细血管收缩,导致凝血和止血,但该化合物在纯化状态下很容易失去活性,限制了该单体化合物在止血药物方面的应用。然而,我们研究还发现,采用一定的提取和纯化技术,除去旱莲草中的蛋白质、多糖等极性特别大的水溶性物质,以及极性较小的色素等部分脂溶性物质后,再将该化合物与其他极性相近的凝血止血化合物、以及一部分脂溶性凝血止血化合物一起洗脱,得到的组分具有很强的凝血止血活性,且其凝血止血活性稳定期在3年以上,活性组分占旱莲草干重的1.5-6.5%,在水和乙醇中的溶解度高,便于吸收利用,发挥凝血止血活性;同时酸性条件下其凝血止血活性增强。这些研究结果说明旱莲草中的凝血止血活性成分在生产外伤止血药物、胃肠消化道出血治疗用药和止血创可贴等方面具有重要应用价值。

[0004] 同时,旱莲草在我国分布极为广泛,资源极为丰富,生长条件简单,种植和管理成本低廉,因此,利用旱莲草研制和生产相关止血药物,能够充分利用我国丰富的旱莲草资源。

发明内容

[0005] 本发明为进一步探索和利用旱莲草的凝血止血功效,实现凝血止血中药提取物,提出一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法。

[0006] 本发明所采用的技术方法为:

[0007] 一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法,包括以下步骤:

[0008] 1)取旱莲草地上部分或全株,洗净后干燥,粉碎过筛10-150目,取得旱莲草粉;

[0009] 2)将上述旱莲草粉中加入助溶剂并浸泡并过滤,将所得的浸提液浓缩,以充分除去其中的有机溶剂,得提取液A,并使每加入1kg的旱莲草粉可得提取液A为4-10升;

[0010] 3)将上述步骤所得提取液加入萃取剂,分离其中极性小的组份并除去,萃余液减压蒸馏并充分除去其中的有机溶剂,加入去离子水并充分搅拌后,将其中的不溶性的沉淀物过滤后,得提取液B;

[0011] 4)采用填装大孔吸附树脂的固相萃取柱对所述提取液B进行固相萃取;

[0012] 5)完成固相萃取后在大孔树脂中首先采用水洗脱,之后用醇类溶液对所述大孔树脂反复洗脱2-5次,且历次洗脱加入的醇类水溶液浓度逐步提高,收集末次洗脱后的洗脱液C;

[0013] 6)将所述洗脱液C蒸发浓缩以除去醇类物质和大部分水,得到膏状物质,并干燥,得旱莲草活性成分提取物。

[0014] 作为优选,所述步骤2)的助溶剂的成分及配比为:去离子水 : 甲醇 : 乙醇或丙酮: 乙酸乙酯=1~3 : 1~3 : 1~3 : 1~3,该助溶剂加入时液温为40-65℃。

[0015] 作为优选,所述过滤为离心过滤或真空过滤。

[0016] 作为优选,所述步骤3)的萃取剂为乙酸乙酯或二氯甲烷。

[0017] 作为优选,所述大孔吸附树脂为罗门哈斯大孔吸附树脂或者三菱大孔吸附树脂,每千克所述提取液B需所述大孔吸附树脂0.8-2.6升。

[0018] 作为优选,所述步骤4)中固相萃取柱的出口溶液流速为0.2-1.0倍柱体积/小时,萃取液面下降至树脂面时即关闭出口。

[0019] 作为优选,所述步骤5)中,加入洗脱用水量不小于所述固相萃取柱体积的1.2倍。

[0020] 作为优选,所述步骤5)中,醇类水溶液为甲醇水溶液或乙醇水溶液,初次洗脱浓度为10%-25%的甲醇水溶液或2%-10%的乙醇水溶液,且历次洗脱加入的醇类水溶液用量不小于所述固相萃取柱体积的1.5倍。

[0021] 作为优选,所述步骤5)洗脱流速为0.2-1.0倍固相萃取柱体积/小时。

[0022] 旱莲草提取物在止血、凝血药物和医疗、卫生材料中的应用。

[0023] 本发明的提取方法和应用具有如下技术效果:

[0024] 1、本发明的提取方法以旱莲草地上部分或全草为原料,所提取物可占旱莲草干重的1.0-6.5%,实现了凝血止血中药提取物较高产地制备;

[0025] 2、提取过程中的各助剂等均为常见且成本较低的类型,有效提取物含量可达旱莲草全株干重的1.0-6.5%,适合工业化生产;

[0026] 3、本发明方法的提取物具有凝聚红细胞、导致纤维蛋白原转变为纤维蛋白和收缩毛细血管等多种止血机制,应用该提取物为主要成分的相关药物将具有良好的凝血止血效果。

具体实施方式

[0027] 下面通过实施例等,对本发明作进一步详述。

[0028] 一种旱莲草凝血止血活性成分的提取方法,具体包括以下步骤。

[0029] 步骤1,旱莲草样品采集和成粉:在旱莲草植株大量种子成熟后,采集全植株或地上部分,去除枯枝,洗净泥土,先置于荫处通风摊开晾1-3天后切碎,于太阳下晒干或置于40-50℃烘箱中烘干,并粉碎成10-150目旱莲草粉,并称量重量。

[0030] 步骤2,化学成分提取:通过加入去离子水 : 甲醇 : 乙醇(或丙酮): 乙酸乙酯=1

~3 : 1~3 : 1~3 : 1~3调配而成的助溶剂浸泡旱莲草粉,且浸泡时助溶剂液温为40-60℃。采用离心过滤或真空过滤,并减压蒸馏回收初始浸提溶剂,回收的浸提溶剂可补充适量的去离子水后再重新加入其余的旱莲草粉中,进一步浸提,循环上述步骤,直至提取液颜色很淡为止,得浸提液。浓缩该浸提液,以充分除去其中的有机溶剂,并使每千克旱莲草粉的提取液A的终体积为4-10升。

[0031] 步骤3,无活性小极性物质的去除:用乙酸乙酯或二氯甲烷充分萃取上述提取液A,以分离出其中极性较小的组分,同时减压蒸馏萃余液充分除去其中残余的有机溶剂,再进行离心过滤或真空过滤,除去不溶性的沉淀后得提取液B。

[0032] 步骤4,活性成分的固相萃取:采用罗门哈斯大孔吸附树脂Amberlite™ XAD16或者三菱大孔吸附树脂SP70等相关树脂对上述提取液B进行固相萃取,每千克所述旱莲草粉的提取物要树脂0.8-2.6升。具体为,将填装在固相萃取柱中的大孔吸附树脂进行活化,并使填装的树脂柱中无气泡,再将上述提取液B加入大孔吸附树脂柱中,打开萃取柱出口,使样品溶液流经树脂柱,对活性成分进行固相萃取,出口溶液流速为0.2-1.0倍柱体积/小时,流出溶液可再次加入树脂柱中,对其中少量未吸附的活性成分再次吸附,待活性成分完全吸附后,溶液的液面下降至树脂面时即关闭出口,以完成固相萃取。

[0033] 步骤5,活性成分的洗脱:在完成固相萃取的树脂柱中加入1.2-2.5倍树脂柱体积的去离子水洗脱,除去树脂上残余的多糖等大极性物质;当去离子水液面下降至树脂面时加入2倍柱体积的10%-25%的甲醇水溶液或2%-10%的乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,减压蒸馏除去溶剂,得到10%-25%的甲醇水溶液或2%-10%的乙醇水溶液洗脱物;当10%-25%的甲醇水溶液或2%-10%的乙醇水溶液液面下降至树脂面后,加入3-10倍柱体积的30%-80%的甲醇水溶液或15%-60%的乙醇水溶液洗脱,得到洗脱液C。以上洗脱流速均为0.2-1.0倍柱体积/小时。

[0034] 步骤6,活性成分的干燥制备:采用减压蒸馏等蒸发浓缩方法,除去上述洗脱液C中的有机溶剂和大部分水后得到棕褐色膏状物,将膏状物进行真空冷冻干燥,即得到一种棕黄或褐色的粉末物质,即为本发明所述的旱莲草活性成分提取物,其含量占所述旱莲草粉干重的1.0-6.5%。

[0035] 实施例1

[0036] 活性成分不同极性的物质的凝血活性验证:取2 g制备的棕黄褐色粉末物质,用40%的甲醇水溶液溶解,采用反相色谱C18柱进行分离,洗脱溶剂为去离子水/甲醇溶液(10/0→8/2→6/4→4/6→2/8→0/1),按照洗脱时间分为6个组分,编号分别为1(7.75%)、2(14.9%)、3(35.65%)、4(4.88%)、5(2.68%)和6(34.14%)。采用加了抗凝剂柠檬酸钠的真空采血管采集人静脉血,作2种处理,(1)将血液用0.9%的无菌生理盐水稀释50倍,作为全血试验组;(2)将血液以2000 r/min离心10 min,去除血浆,收集血细胞,并用血液等体积的0.9%的无菌生理盐水洗涤2次,洗涤时先用生理盐水重新悬浮血细胞,然后以2000 r/min离心10 min,去除上清,收集血细胞,洗涤完后再用血样50倍体积的0.9%的无菌生理盐水重悬血细胞作为去除血浆的血细胞试验组。将各组分用相应溶剂配成5 mg/mL的浓度,取3 μL样品溶液,涂于洁净的载玻片上,涂布面积为1 cm²,待样品溶液完全干后,取3 μL红细胞生理盐水重悬液或全血稀释液,均匀涂布于样品处,并立即置于光学显微镜下拍照,计数游离和凝集的红细胞数目,每个浓度做3次重复,每次重复随机拍10个视野。除了去离子水洗脱的组分1

需要加酸性辅料物质后显示有较好的凝集红细胞活性外,其它组分均能够直接使红细胞凝集,对全血的红细胞凝集作用更强(表1)。

[0037] 表1 提取物中不同极性的组分凝血活性

凝血条件	不同组分及其凝血活性					
	1	2	3	4	5	6
[0038] 去除血浆的红细胞	-	+++	+++++	+++	+++	+++
全血中的红细胞	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

[0039] 注:-表示红细胞没有凝集成团,+表示红细胞凝集成团,+越多红细胞凝集越多,5个+接近100%。

[0040] 实施例2

[0041] 有效成分溶解度对比:取1 g制备的棕黄褐色粉末物质、1 g云南白药(产品

样品名称	样品溶解的质量		
	去离子水	乙醇	50%乙醇水溶液
旱莲草提取物	0.77±0.06 g	0.79±0.05 g	1.0±0 g
云南白药	0.16±0.02 g	0.045±0.008 g	0.24±0.03 g

[0042] 批号ZFA1615),分别加入4 mL去离子水、乙醇和50%乙醇水溶液,于30℃条件下充分振荡溶解,4500 rpm离心20 min,弃上清,沉淀干燥后称重,计算本发明制备的棕黄褐色粉末物质和云南白药粉剂的溶解情况,对比数据如下表所示。

[0043] 表2 溶解度对比表

[0044] 上述结果表明,本发明实施例制备的旱莲草提取物在不同溶剂中的溶解度远优于云南白药,可更有利于伤口组织吸收利用,发挥止血作用。

[0045] 实施例3

[0046] 静脉注射对皮下毛细血管的影响:用注射用水1 mL充分溶解130 mg本发明提取物后,12000 rpm离心5 min,取上清溶液,根据溶解度试验可知上清液样品浓度约为100 mg/mL。采用小鼠尾静脉注射0.1 mL上清液,30 min后对小鼠进行解剖,观察小鼠内表皮和毛细血管颜色等变化,判断样品是否导致毛细血管收缩;以等量的酚磺乙胺和注射用水作为对照。结果显示,在试验剂量下,注射旱莲草和酚磺乙胺的小鼠与注射注射用水的小鼠的活动无明显差异,但其内表皮的毛细血管颜色变暗,甚至旱莲草试验组颜色更暗些,此试验表明旱莲草提取物可能导致小鼠内表皮毛细血管收缩,从而减少了小鼠毛细血管内的血流量,能够促进止血。

[0047] 实施例4

[0048] 提取物对红细胞凝集效率:将本发明制备的旱莲草提取物用50%甲醇水溶液配制成1 mg、2 mg、3 mg、4 mg和5 mg/mL的样品溶液。以相同浓度的云南白药作为对照组。取3 μL样品溶液,涂于洁净的载玻片上,涂布面积为1 cm²,待样品溶液完全干后,取3 μL红细胞生理盐水重悬液或全血稀释液,均匀涂布于样品处,并立即置于光学显微镜下拍照,计数游离和凝集的红细胞数目,每个浓度做3次重复,每次重复随机拍10个视野。试验结果(表3)显示,旱莲草样提取物对去除血浆的红细胞和全血中的红细胞均具有凝集作用,且对全血中的红细胞凝集作用更强;而云南白药试验组红细胞没有出现凝集现象,但溶血现象明显,红

细胞接触云南白药后几秒钟内即全部破裂消失。

[0049] 表3 旱莲草提取物对血细胞的凝集活性

样品浓度 (mg/mL)	红细胞凝集率 (%)			
	除去血浆的血细胞		全血中的血细胞	
	旱莲草提取物	云南白药	旱莲草提取物	云南白药
1	32.4±1.3	0	74.9±3.9	0
2	42.3±2.1	0	93.2±2.5	0
3	71.2±0.9	0	98.1±0.2	0
4	87.3±3.0	0	99.1±0.4	0
5	95.1±1.8	0	99.8±0.2	0

[0051] 以上结果说明,旱莲草可以直接凝集红细胞,进而发挥凝血止血作用。

[0052] 实施例5

[0053] 旱莲草提取物对血浆的影响:分别取浓度为1 mg、2 mg、3 mg、4 mg和5 mg/mL的样品溶液1.5 μL涂于洁净的载玻片上,涂布面积为1 cm²,待样品溶液完全干后,取3 μL血浆涂于样品处(即样品浓度分别为0.5 mg、1 mg、1.5 mg、2.0 mg、2.5 mg/mL),立即置于显微镜下观察。以同浓度的云南白药为对照组。结果发现,旱莲草提取物试验组在0.5 mg/mL时即出现大量小片絮状物,随着浓度的增加,絮状物大小逐渐增加,当浓度达到2.0 mg/mL以上时,几乎所有絮状物均彼此相连,形成巨大的网状物;而云南白药试验组没有出现任何变化,即使将浓度增加到50 mg/mL,血浆中依然没有出现絮状物。

[0054] 表4 旱莲草对血浆的影响

样品名称	样品浓度 (mg/mL)				
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
旱莲草提取物	+	++	++++	+++++	+++++
云南白药	-	-	-	-	-

[0056] 注:-表示没有絮状物出现,+表示有絮状物出现,+越多絮状物越大,且彼此相互连接。

[0057] 以上结果说明,旱莲草提取物还能够导致血浆中纤维蛋白原变为不溶的纤维蛋白,从而发挥凝血止血活性。

[0058] 实施例6

[0059] 凝血止血活性物质的有效期:采用以下2种保存方式保存样品,定期检测保存的样品凝血止血活性:(1)将提取制备的旱莲草凝血止血活性物质干燥粉末直接保存于室温(10-32℃)、未密封条件下,1-3年后检测其凝血止血活性;(2)在提取制备的旱莲草凝血止血活性物质干燥粉末中,加入2-6倍质量的50%乙醇水溶液溶解,用无菌纱布充分吸附样品溶液,再将纱布置于无菌容器中自然干燥后,于室温(10-32℃)、未密封条件下存放1-3年后检测纱布上吸附样品的凝血止血活性。经检测,2种保存方式保存的样品的凝血止血活性均未下降,这说明无论是将该活性提取物制成粉末状止血药物,还是将其制成止血创可贴,均具有至少3年的有效期。

[0060] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和润饰,这些改

进和润饰也应是为本发明的保护范围。