



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102078356 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201010592705. 9

(22) 申请日 2010. 12. 17

(73) 专利权人 中国科学院新疆理化技术研究所
地址 830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市
北京南路 40 号附 1 号

(72) 发明人 阿吉艾克拜尔·艾萨 信学雷
赵海清 吴涛 杨伟俊 张尧

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐中科新兴专利事务
所 65106

代理人 张莉

(51) Int. Cl.

A61K 36/28 (2006. 01)

A23L 1/29 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

张冰等. 菊苣胶囊对糖尿病复合高脂兔血
糖血脂及血尿酸的影响. 《中药新药与临床药
理》. 1998, 第 9 卷 (第 04 期), 221 — 224.

何轶等. 菊苣根化学成分研究. 《中国中药

杂志》. 2002, 第 27 卷 (第 3 期), 209, 210.

王小芬等. 菊苣药理药效研究进展. 《新疆
中医药》. 2006, 第 24 卷 (第 03 期), 80 — 83.

朱金芳等. RP-HPLC 法测定菊苣提取物中秦
皮乙素的含量. 《新疆医科大学学报》. 2010, 第
33 卷 (第 8 期), 871 — 873.

审查员 沈丽鸽

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种菊苣降糖有效部位及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种菊苣降糖有效部位的制备方法及其用途, 该方法从毛菊苣中采用有机溶剂提取, 大孔树脂分离纯化获得降糖有效部位, 并阐明其医学用途, 经初步的活性筛选试验证明: 通过本发明所述的方法获得的有效部位具有蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制剂作用, 并通过动物实验证实具有降糖、降脂活性; 该有效部位可用于在制备治疗糖尿病的药物或保健品的应用及作为药物组合物的应用。

1. 一种菊苣降糖有效部位的制备方法,其特征在于按下列步骤进行:

a、先用极性溶剂 20-95%浓度的甲醇或乙醇水溶液或无水甲醇或无水乙醇,在温度 20℃-溶剂沸点的条件下提取菊苣地上部分;

b、将步骤 a 提取物浓缩,用水或浓度 1-20%甲醇或乙醇溶解分散,加入预先处理好的大孔树脂柱,以水,10%,30%,95%的甲醇或乙醇溶液梯度洗脱,收集 30-95%流出液浓缩后即可得到具有降血糖活性的有效部位,其中大孔树脂型号为 HPD600、HPD450、NKA-9、D201、D301、HPD300、AB-8。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 a 提取时固液比为 1:2-10。

3. 如权利要求 1 所述的方法获得的有效部位,其特征在于:对蛋白质酪氨酸磷酸酶 1B 具有抑制作用。

一种菊苣降糖有效部位及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种菊苣中降糖有效部位的制备及其用途,具体的说是从毛菊苣中提取的活性成分,作为治疗糖尿病药物及功能食品的用途。

背景技术

[0002] 菊苣按照中国药典,“菊苣”特指菊苣属植物毛菊苣 (*Cichorium glandulosum* Bioss. et Huet.) 和菊苣 (*Cichorium intybus* L.)。菊苣是一种用途广泛的植物,意大利居民用菊苣叶做蔬菜沙拉,味美可口,除此之外,菊苣更多是具有很高药用价值。

[0003] 菊苣系维吾尔族习用药材,具有清肝利胆,健胃消食,利尿消肿的功效。用于湿热黄疸,胃痛食少,水肿尿少。

[0004] II 型糖尿病是我国中老年人的常见慢性病。我国肥胖者中有 30% 患有 2 型糖尿病。由于 II 型糖尿病和肥胖均属于与生活方式密切相关的多基因遗传性疾病,其发病机制尚不十分明确。近来的研究表明,蛋白质酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 可减弱胰岛素及瘦素信号转导,引起脂代谢异常,是导致胰岛素抵抗和肥胖的关键环节;同时,实验证明,PTP1B 小鼠即使在致肥胖饮食条件下也未出现胰岛素抵抗和肥胖。由此引起人们对 PTP1B 抑制剂的广泛兴趣,PTP1B 基因成为越来越引人注目的靶基因之一。蛋白质酪氨酸磷酸化是细胞代谢、信号传导及细胞周期调控的重要调节步骤。PTP1B 属于蛋白质酪氨酸磷酸酶家族,该家族 40 余种磷酸酶都具有一个约 240 个氨基酸组成的同源序列,位于酶催化活性部位,以跨膜受体样蛋白和胞内酶形式存在,催化蛋白质酪氨酸去磷酸化反应。PTP1B 通过对胰岛素受体激酶 (insulin receptor kinase, IRK) 或 IRK 活性片段的磷酸化酪氨酸残基去磷酸化作用对胰岛素信号传导进行负调节。国外正在筛选 PTP1B 抑制剂主要有两类:一类是 PTP1B 的底物类似物-磷酸酪氨酸多肽;另一类是芳基磷酸盐类小分子物质,但其还正在研发中,还没有用于 II 型糖尿病的临床治疗。钒酸钠虽为蛋白酪氨酸酶 (PTP) 的有效抑制剂,但其不具有选择性,也只能用于体外研究。因此,非肽类、非磷酸盐类 PTP1B 抑制剂的研究成为这一领域的热门。目前筛选 PTP1B 抑制剂最有效的策略就是以 PTP 的活性部位为靶点,该研究用 PTP1B 的催化结构域进行抑制剂的筛选,以期获得可用于临床的、有效的、特异性的抑制剂。本发明直接针对 PTP1B 靶点进行筛选。

[0005] 在国内外研究的已相当多的研究证实菊苣具有降血糖功能。北京中医药大学中药学院研制了菊苣胶囊,张冰等发现菊苣胶囊对糖尿病复合高脂兔血糖血脂及血尿酸有一定影响,作者采用四氧嘧啶静脉注射复合高脂食饵的复合兔模型,观察菊苣胶囊对高血糖、高血脂模型兔血糖、血脂及血尿酸的影响。结果发现,菊苣胶囊在连续口服给药时,可降低模型动物第 2 周、第 4 周、第 8 周时空腹血糖、甘油三酯、总胆固醇水平,表明菊苣经化学提取后制成的胶囊剂可降低复合动物模型的血糖、血脂、血尿酸水平,具有改善代谢紊乱的多方面作用。

[0006] 随后张冰又发现菊苣醇提取物对实验性高脂家兔的血液流变性有一定影响,作者采用复合高血糖高血脂兔模型,观察菊苣醇提取物对血液流变性的影响,结果发现,菊苣醇

提物能降低全血、血浆粘稠度 ;降低模型动物红细胞沉降速率及血沉方程 K 值。

[0007] 张冰还发现菊苣提取物对 α 香树脂醇对高糖高脂环境中家兔主动脉平滑肌细胞膜微粘度及过氧化脂质有一定影响力,能明显降低高脂高糖模型细胞膜粘度、改善细胞流动性,降低培养液中 LPO 含量,两者之间作用强度无明显差异。

[0008] 高云艳等采用四氧嘧啶高血糖模型大鼠、观察菊苣不同提取物对模型动物血糖、血总胆固醇 (TC) 及总甘油三酯 (TG) 的影响。结果得出菊苣醇提物对模型降低血糖、血 TC 及 TG 方面疗效优于水煮醇沉提取物。

[0009] 郑红梅等将菊苣降血糖和降血脂的有效部位进一步缩小,通过对大鼠药理实验,发现菊苣正己烷提取物能降低四氧嘧啶大鼠血糖,对其胰岛素水平无显著影响,能降低高脂大鼠血清总胆固醇、总甘油三脂、低密度脂蛋白含量,并能显著降低其全血粘度、血浆粘度、血浆纤维蛋白原含量。

[0010] 在菊苣胶囊的对血糖影响的机理方面,张冰初步探讨了菊苣胶囊防治糖尿病的作用机理,他采用体内方法,通过对不同高血糖模型小鼠给药,实验结果发现,菊苣胶囊可显著降低四氧嘧啶及肾上腺素模型小鼠血糖含量,同时升高肾上腺素模型小鼠肝糖原含量。初步表明,菊苣胶囊降糖作用与胰外途径有关,尤其是与增加肝糖原含量、减少肝糖原分解作用有关。

[0011] 郑红梅等从组织形态学上阐述了菊苣双降胶囊药理作用机理,她认为菊苣双降胶囊能降糖作用与修复胰岛 β 细胞和胰外途径特别是促进肝糖原合成,抑制糖异性有关,另外还推测,菊苣双降胶囊可能直接影响糖代谢,且其降糖作用与抑制肠道对葡萄糖的吸收有关。

[0012] 张冰等在已证明菊苣提取物在降糖降脂和改善血液流变性以及对兔动脉平滑肌细胞膜有良好的保护作用的基础上,又对模型动物血浆相关因子做了测试,他们得出结论认为菊苣提取物能改善血浆多种细胞因子水平,减少高糖高脂等不良因素对血管壁的刺激,对抗由高脂高糖导致的内皮素 (ET)、血管性假血友病因子 (Vwf) 水平升高,调节前列环素 (PGI₂) 和血栓素 (TXA₂) 的比值,维持正常舒缩状态,减少兔动脉平滑肌细胞异常增殖的刺激,减少斑块的形成,起到抗动脉粥样硬化的综合作用,进一步阐述了菊苣提取物药理作用机理。

[0013] 刘小青等用小鼠高脂血症模型证明不同剂量的菊苣提取物能明显降低高脂血症小鼠的血清总胆固醇、总甘油三脂、一氧化氮和过氧化脂质水平,增强超氧化物歧化酶活性,结论菊苣提取物能改善高脂饮食引起的高脂血症。萨翼等发现菊苣提取物 N2 还能降低该模型小鼠血清中的黄嘌呤氧化酶。刘小青等又用与人类代谢类似的鹌鹑高尿酸血症模型证明小剂量菊苣提取物能明显降低模型动物的血尿酸水平,菊苣提取物有明显的降尿酸作用,但药理作用机制并未提及。而孔悦等初步探讨了其作用机理,他们通过用大、中、小不同剂量菊苣提取物给药于高尿酸高甘油三酯血症的鹌鹑,相对于对照组,三个不同剂量组的菊苣提取物能明显降低鹌鹑血清中的尿酸和甘油三脂含量,而对肾功能没有影响,证明菊苣提取物对这种交互紊乱具有良好的调节作用,其药理作用具有多方面、多靶点的优势。

[0014] 最近又报道治疗 2 型糖尿病复方草药专利,这其中就包括菊苣提取物, R. Petlevski 用该复方草药的用两种不同的工艺路线得到粗提物,同样的药材用 60% 醇水冷浸 28 天,过滤,分成两份,一份冻干,得提取物 1 ;另一份低压回收醇水,同样冻干,得提取

物 2,将提取物 1 和提取物 2 对四氧嘧啶诱导的非肥胖糖尿病小鼠进行实验,结果提取物 2 相对于提取物 1 更能降低小鼠血清葡萄糖和果糖胺水平。

[0015] 以上主要阐述了菊苣提取物在降血脂降血糖及免疫调节生理活性,在国外,Zahra Amirghofran 对菊苣的免疫调节生理活性也做了评价:他的实验证明菊苣提取物在植物血球凝集素 (PHA) 存在下能明显抑制淋巴细胞增殖。

发明内容

[0016] 本发明目的在于,提供一种菊苣降糖有效部位的制备方法及其用途,该方法从菊苣中采用有机溶剂提取,大孔树脂分离纯化获得降糖有效部位,并阐明其医学用途,经初步的活性筛选试验证明:通过本发明所述的方法获得的有效部位具有蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制剂作用,并通过动物实验证实具有降糖、降脂活性;该有效部位可用于在制备治疗糖尿病的药物或保健品的应用及作为药物组合物的应用。

[0017] 本发明所述的菊苣降糖有效部位的制备方法,按下列步骤进行:

[0018] a、先用极性溶剂 20-95%浓度的甲醇或乙醇水溶液或无水甲醇或无水乙醇,在温度 20℃-溶剂沸点的条件下提取菊苣地上部分;

[0019] b、将步骤 a 提取物浓缩,用水或浓度 1-20%甲醇或乙醇溶解分散,加入预先处理好的大孔树脂柱,以水,10%,30%,95%的甲醇或乙醇溶液梯度洗脱,收集 30-95%流出液浓缩后即可得到具有降血糖活性的有效部位。

[0020] 步骤 a 提取时固液比为 1:2-10。

[0021] 步骤 b 所用的大孔树脂型号为 HPD600、HPD450、NKA-9、D201、D301、HPD300、AB-8。

[0022] 通过该方法获得的有效部位对蛋白质酪氨酸磷酸酶具有抑制作用。

[0023] 通过该方法获得的有效部位在制备治疗降血糖的药物的用途。

[0024] 通过该方法获得的有效部位作为制备治疗降血糖的保健品或者其他功能性食品的用途。

具体实施方式

[0025] 实施例 1

[0026] 取菊苣地上部分 10Kg,粉碎,置于 50L 提取罐,以浓度 70%乙醇水溶液在室温下冷浸提取 6 次,每次时间为 24 小时,固液比为 1:2,合并提取液;

[0027] 将提取液放置旋转蒸发仪内减压浓缩,加入浓度 1%的乙醇水溶液溶解分散,加入预先处理好的大孔树脂 AB-8 柱中吸附,再用水,浓度为 10%,30%,95%的甲醇溶液梯度洗脱,收集 30-95%的流出液,浓缩后即可得到 110g 具有降血糖活性的有效部位。

[0028] 实施例 2

[0029] 取菊苣地上部分 4Kg,粉碎,置于 50L 提取罐,以浓度 95%乙醇水溶液在温度 20℃下冷浸提取 3 次,每次时间为 24 小时,固液比为 1:10,合并提取液;

[0030] 将提取液放置旋转蒸发仪内减压浓缩,加入水溶液溶解分散,加入预先处理好的大孔树脂 HPD600 柱中吸附,再用水,浓度为 10%,30%,95%的乙醇溶液洗脱,收集 30-95%的流出液,浓缩后即可得到具有 35g 降血糖活性的有效部位。

[0031] 实施例 3

[0032] 取菊苣地上部分 10Kg, 粉碎, 置于 50L 提取罐, 用无水乙醇提取, 加热至溶剂沸点提取 3 次, 每次 4h, 固液比为 1 : 4, 合并提取液;

[0033] 将提取液放置旋转蒸发仪内减压浓缩, 加入浓度 10% 的乙醇水溶液溶解分散, 加入预先处理好的大孔树脂 D301 柱中吸附, 用水, 浓度为 10%, 30%, 95% 的乙醇溶液梯度洗脱, 收集 30-95% 的流出液, 浓缩后即可得到 130g 具有降血糖活性的有效部位。

[0034] 实施例 4

[0035] 取菊苣地上部分 5Kg, 粉碎, 置于 50L 提取罐, 用无水甲醇提取, 加热至溶剂沸点提取 4 次, 每次 5h, 固液比为 1 : 7, 合并提取液;

[0036] 将提取液放置旋转蒸发仪内减压浓缩, 加入浓度 5% 的乙醇水溶液溶解分散, 加入预先处理好的大孔树脂柱 NKA-9 中吸附, 用水, 浓度为 10%, 30%, 95% 的乙醇溶液梯度洗脱, 收集 30-95% 的流出液, 浓缩后即可得到 60g 具有降血糖活性的有效部位。

[0037] 实施例 5

[0038] 取菊苣地上部分 3Kg, 粉碎, 置于 50L 提取罐, 用浓度 40% 的乙醇的水溶液温度 70℃ 保温浸泡提取 3 次, 每次 8h, 固液比为 1 : 5, 合并提取液;

[0039] 将提取液放置旋转蒸发仪内减压浓缩, 加入浓度 20% 的乙醇水溶液溶解分散, 加入预先处理好的大孔树脂 HPD300 柱中吸附, 再用水, 浓度为 10%, 30%, 95% 的乙醇溶液洗脱, 收集 30-95% 流出液, 浓缩后即可得到 40g 具有降血糖活性的有效部位。

[0040] 实施例 6

[0041] 取菊苣地上部分 3Kg, 粉碎, 置于 50L 提取罐, 用浓度 70% 的乙醇水溶液温度 40℃ 保温浸泡提取 3 次, 每次 8h, 固液比为 1 : 8, 合并提取液;

[0042] 将提取液放置旋转蒸发仪内减压浓缩, 加入浓度 15% 的乙醇水溶液溶解分散, 加入预先处理好的大孔树脂柱 HPD450 中吸附, 再用水, 浓度为 10%, 30%, 95% 的乙醇溶液梯度洗脱, 收集 30-95% 的流出液, 浓缩后即可得到约 43g 具有降血糖活性的有效部位。

[0043] 实施例 7

[0044] 取菊苣地上部分 3Kg, 粉碎, 置于 50L 提取罐, 用浓度 20% 的甲醇水溶液温度 60℃ 保温浸泡提取 3 次, 每次 8h, 固液比为 1 : 8, 合并提取液;

[0045] 将提取液放置旋转蒸发仪内减压浓缩, 加入浓度 15% 的乙醇水溶液溶解分散, 加入预先处理好的大孔树脂柱 HPD450 中吸附, 再用水, 浓度为 10%, 30%, 95% 的乙醇溶液梯度洗脱, 收集 30-95% 的流出液, 浓缩后即可得到约 26g 具有降血糖活性的有效部位。

[0046] 实施例 8: 筛选实验:

[0047] 筛选方法: 用对 - 硝基苯基磷酸二钠 (pNPP) 作为底物, 以在阳性药物钒酸钠为对照, 利用酶标仪进行 PTP1B 酶抑制剂的高通量筛选, 根据 PTP1B 水解 pNPP 的磷酸基团而产生颜色反应来测定 PTP1B 的活性; 酶反应体系组成如下: 缓冲液 (50mM HEPES, pH 7.3, 100mM 氯化钠, 0.1% 牛血清白蛋白, 和 1mM 二硫代苏糖醇), PTP1B 融合蛋白, pNPP, PTP1B 特异抑制剂钒酸钠 (100 μ g/mL); 反应体系混匀后在 37℃ 放置 30min, 加入 1M 氢氧化钠终止反应, 置比色仪上测定 405 波长条件下的吸收值 (A), 测定结果减去本底值后计算酶活性。

[0048]

	浓度 1	浓度 2	阳性 对照
A_0	0.6877	0.6877	0.6877
A_{30min}	0.0553	0.209	0.0033
抑制(%)	91.96%	69.6%	99.52

[0049] 结论：

[0050] 从实验结果表明，菊苣活性部位具有蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 抑制剂对功效。

[0051] 实施例 9：动物实验：

[0052] wistar 雄性大鼠，(200±20)g，室温 18-20℃，湿度 50-60%，明暗周期 12/12h，自由摄食、饮水；给予标准大鼠饲料，适应性饲养一周后：空白组给予普通标准饲料，模型组及治疗组给予高糖高脂饲料喂养 4 周后，禁食 8-10 小时，于第 29 天测量空腹血糖、血脂，并静脉注 STZ45mg·kg⁻¹，72h 后，取禁食后 8-10h 大鼠尾静脉血，测空腹血糖；选择血糖值高于 11.1mmol·L⁻¹ 者视为血糖造模成功；

[0053] 给药方案

[0054] 分组：空白对照组 10 只，动物模型随机分为 6 组，每组 10 只，给药：造模成功后，各组每日 8:00-9:00 给予相应的药物，连续给药 4 周；空白对照组：基础饲料加相应体积蒸馏水；模型对照组：高脂饲料加相应体积蒸馏水；二甲双胍对照组：高脂饲料加二甲双胍片 100mg·kg⁻¹ 体重灌胃；毛菊苣提取物 100mg·kg⁻¹ 组：高脂饲料加毛菊苣提取物 100mg·kg⁻¹ 体重灌胃；毛菊苣提取物 300mg·kg⁻¹ 组：高脂饲料加毛菊苣提取物 300mg·kg⁻¹ 体重灌胃。经过四周灌胃，大鼠血糖变化如下：

[0055]

组别	空腹血糖 (mmol/L)
正常对照组	4.58±0.28
模型组	29.93±5.79 [#]
二甲双胍组	13.28±8.96 ^{**}
毛菊苣低剂量组	13.27±5.25 ^{**}
毛菊苣高剂量组	25.49±9.22

[0056] 注：与正常对照组相比，[#]P < 0.05，^{##}P < 0.01；与模型组相比，^{*}P < 0.05，^{**}P < 0.01。

[0057] 与模型组相比，毛菊苣低剂量组明显降低 2 型糖尿病大鼠的血糖，差异有统计学意义 (P < 0.01)。