



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106421047 B

(45) 授权公告日 2020.09.22

(21) 申请号 201610971469.9

A61P 39/06 (2006.01)

(22) 申请日 2016.11.07

A61P 13/12 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106421047 A

(43) 申请公布日 2017.02.22

(73) 专利权人 华南理工大学

地址 511458 广东省广州市南沙区环市大道南路25号华工大广州产研院

(72) 发明人 任娇艳 史传超 郑亚美

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 何淑珍

(56) 对比文件

CN 103599123 A, 2014.02.26

陈建福等. 柚叶多酚的提取工艺优化.《中央民族大学学报》.2016,第25卷(第3期),第18-25页,1.1、1.2.2、2.2.3项下.

陈建福等. 柚叶多酚的提取工艺优化.《中央民族大学学报》.2016,第25卷(第3期),第18-25页,1.1、1.2.2、2.2.3项下.

审查员 王明

(51) Int. Cl.

A61K 36/752 (2006.01)

A61P 19/06 (2006.01)

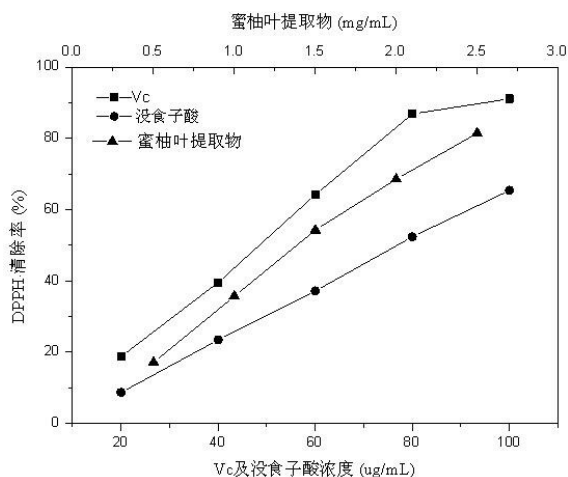
权利要求书1页 说明书6页 附图6页

(54) 发明名称

一种蜜柚叶提取物及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种蜜柚叶提取物及其制备方法与应用。制备方法包括如下步骤：(1)将蜜柚叶烘干去梗，粉碎后过筛；(2)过筛后的蜜柚叶粉末用乙醇进行热提取，得到蜜柚叶乙醇提取液；(3)将蜜柚叶乙醇提取液浓缩后冻干，得到蜜柚叶提取物。该蜜柚叶提取物中主要活性成分为黄酮和多酚。本发明采用简单的乙醇热提取方法得到蜜柚叶提取物。本发明提取的蜜柚叶提取物具有明显的抗氧化和降尿酸活性。



1. 一种蜜柚叶提取物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将蜜柚叶烘干去梗,粉碎后过60~80目筛;

(2) 过筛后的蜜柚叶粉末用乙醇进行热提取,得到蜜柚叶乙醇提取液,所述乙醇为体积分数50~80%的乙醇,蜜柚叶粉末与乙醇的料液比为1:15~1:30g/mL,所述热提取是:在40~80℃温度下提取6~10h,重复三次,合并滤液;步骤(3)中,所述浓缩是浓缩至相对于水的密度为1.15~1.30;

(3) 将蜜柚叶乙醇提取液浓缩后冻干,得到蜜柚叶提取物;所述蜜柚叶提取物的主要成分为黄酮和多酚;所述蜜柚叶提取物具有抗氧化性和降尿酸活性;所述抗氧化性体现为对DPPH·自由基、羟自由基、超氧阴离子和ABTS^{•+}的清除活性;所述对DPPH·自由基、羟自由基、超氧阴离子和ABTS^{•+}的清除活性的IC₅₀值分别为1.24 mg/mL、1.04 mg/mL、1.49 mg/mL和3.31 mg/mL;所述降尿酸活性体现为体外降尿酸活性,体外降尿酸活性的检测采用比色法;所述降尿酸活性体现为抑制黄嘌呤氧化酶的活性,对黄嘌呤氧化酶活性抑制的IC₅₀值为4.8 mg/mL。

2. 由权利要求1所述制备方法得到的蜜柚叶提取物,其特征在于,所述蜜柚叶提取物的主要成分为黄酮和多酚;所述蜜柚叶提取物具有抗氧化性和降尿酸活性;所述抗氧化性体现为对DPPH·自由基、羟自由基、超氧阴离子和ABTS^{•+}的清除活性;所述对DPPH·自由基、羟自由基、超氧阴离子和ABTS^{•+}的清除活性的IC₅₀值分别为1.24 mg/mL、1.04 mg/mL、1.49 mg/mL和3.31 mg/mL;所述降尿酸活性体现为体外降尿酸活性,体外降尿酸活性的检测采用比色法;所述降尿酸活性体现为抑制黄嘌呤氧化酶的活性,对黄嘌呤氧化酶活性抑制的IC₅₀值为4.8 mg/mL。

一种蜜柚叶提取物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及柚子叶的开发利用,具体涉及一种蜜柚叶提取物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 我国柚子资源丰富,分布广泛,主要分布于广东、广西、福建、云南等地,因其清爽的口感,独特的芳香而倍受人们青睐。目前,人们对柚子叶的研究主要集中于柚子叶精油的提取,对柚子叶多酚、黄酮的研究鲜有报道。多酚、黄酮是广泛存在于植物皮、根、叶、果实中的一类天然有机化合物,具有广泛的生物活性,如抗氧化、抗肿瘤、抑菌、调节免疫、抗炎抗过敏、止血镇痛等,已被列为保健食品的一类功能因子。

[0003] 自由基导致的氧化损伤与许多疾病的发生有密切的关系,植物中安全有效的抗氧化剂是现阶段研究的热点,但柚子叶抗氧化性还鲜有报道。黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase,XOD)是体内核酸代谢中重要的酶,可催化黄嘌呤和次黄嘌呤氧化生成尿酸,同时产生过氧化物自由基,尿酸浓度过高会引起高尿酸血症,导致痛风发作,因此,抑制XOD的活性可有效减少体内尿酸的生成,阻止或延缓痛风的发作,减少机体损伤。

[0004] 随着人们生活方式的改变,大量高嘌呤食物被摄入,导致痛风发病率呈逐年上升趋势,已成为我国次于糖尿病的第二大代谢类疾病。但目前其治疗药物往往治标不治本,且伴有不良反应,因此天然安全有效的抗痛风药物越来越受到人们的关注。近年来,诸多研究关注中草药提取物对黄嘌呤氧化酶抑制的效果,但柚子叶提取物对黄嘌呤氧化酶活性方面的探究鲜有报道。本实验主要研究柚子叶活性成分多酚与黄酮的提取工艺,并首次研究提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制活性,探讨其作为降尿酸功能因子的可能性,同时为柚子叶的综合开发利用提供一定的参考依据。

发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于提供一种具有抗氧化和降尿酸功效的蜜柚叶提取物及其制备方法,该蜜柚叶提取物可用于开发具有预防或治疗痛风类疾病功效的保健品及药品。

[0006] 本发明通过如下技术方案实现。

[0007] 一种蜜柚叶提取物的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 将蜜柚叶烘干去梗,粉碎后过筛;

[0009] (2) 过筛后的蜜柚叶粉末用乙醇进行热提取,得到蜜柚叶乙醇提取液;

[0010] (3) 将蜜柚叶乙醇提取液浓缩后冻干,得到蜜柚叶提取物。

[0011] 进一步地,步骤(1)中,所述过筛为过60~80目筛。

[0012] 进一步地,步骤(2)中,所述乙醇为体积分数50~80%的乙醇。

[0013] 进一步地,步骤(2)中,蜜柚叶粉末与乙醇的料液比为1:15~1:30g/mL。

[0014] 进一步地,步骤(2)中,所述热提取是:在40~80℃温度下提取6~10h,重复三次,合并滤液。

- [0015] 进一步地,步骤(3)中,所述浓缩是浓缩至相对于水的密度为1.15~1.30。
- [0016] 由上述任一项所述制备方法得到的蜜柚叶提取物。
- [0017] 进一步地,所述蜜柚叶提取物的主要成分为黄酮和多酚。
- [0018] 进一步地,所述蜜柚叶提取物具有抗氧化性和降尿酸活性。
- [0019] 更进一步地,所述抗氧化性体现为对DPPH·自由基、羟自由基、超氧阴离子和ABTS·⁺的活性清除。
- [0020] 更进一步地,所述对DPPH·自由基、羟自由基、超氧阴离子和ABTS·⁺的活性清除的IC₅₀值分别为1.24mg/mL、1.04mg/mL、1.49mg/mL和3.31mg/mL。
- [0021] 更进一步地,所述降尿酸活性体现为体外降尿酸活性,体外降尿酸活性的检测采用比色法。
- [0022] 更进一步地,所述降尿酸活性体现为抑制黄嘌呤氧化酶的活性,对黄嘌呤氧化酶活性抑制的IC₅₀值为4.8mg/mL。
- [0023] 所述蜜柚提取物用作包括痛风疾病的辅助治疗药物或用于制备具有以降尿酸为功能因子的保健食品及药品。
- [0024] 所述蜜柚叶提取物用于制备降尿酸、促进尿酸肾排泄、修复肾损伤的药物;将蜜柚叶提取物与药学上可接受的载体制成保健食品。
- [0025] 与现有技术相比,本发明具有如下优点和有益效果;
- [0026] (1) 本发明提取方法简单,方便快捷;
- [0027] (2) 本发明通过乙醇热提取的方式获得蜜柚叶提取物,得到的蜜柚叶提取物有显著的降尿酸活性,可以进一步用于筛选制备和开发降尿酸药物和保健食品。

附图说明

- [0028] 图1为实施例1中蜜柚叶提取物对DPPH·自由基的活性清除作用曲线图;
- [0029] 图2为实施例2中蜜柚叶提取物对羟自由基的活性清除作用曲线图;
- [0030] 图3为实施例3中蜜柚叶提取物对超氧阴离子的活性清除作用曲线图;
- [0031] 图4为实施例4中蜜柚叶提取物对ABTS·⁺的活性清除作用曲线图;
- [0032] 图5为实施例1~4蜜柚叶提取物对各自由基离子活性清除的IC₅₀值的柱状图;
- [0033] 图6为实施例5中蜜柚叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制活性曲线图。

具体实施方式

[0034] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中,下列实施例中未注明具体条件的实验方法,均按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择,如下实施例中的原料均为市售。

[0035] 实施例1

[0036] 蜜柚叶提取物对DPPH·自由基的清除作用

[0037] 1、蜜柚叶提取物的提取

[0038] (1) 将蜜柚叶烘干去梗,粉碎后过60目筛;

[0039] (2) 过筛后的蜜柚叶粉末用体积分数为80%的乙醇在80℃下热提取6h,重复三次,合并滤液,得到蜜柚叶乙醇提取液;蜜柚叶粉末与乙醇的料液比为1:30g/mL;

[0040] (3) 将蜜柚叶乙醇提取液浓缩至相对于水的密度为1.15后冻干,得到蜜柚叶提取物。

[0041] 2、实验样品及试剂制备

[0042] 蜜柚叶提取物溶液:准确称取20mg蜜柚叶提取物,用蒸馏水配成2.5mg/ml溶液,分别稀释成0.5、1.0、1.5、2.0mg/ml的蜜柚叶提取物溶液,备用。

[0043] 0.2mmol/L的DPPH·溶液:准确称取DPPH·0.00788g溶解于100ml 95%乙醇,避光保存。

[0044] 3、实验过程

[0045] 将2mLDPPH·溶液(0.2mmol/L)置于试管中,加入2mL蜜柚叶提取物溶液,震荡均匀,室温放置30min后在517nm处测定吸光值(A_i);

[0046] 以2mL95%乙醇加入2mL蒸馏水调零;

[0047] 对照为:2mL DPPH·溶液加上2mL95%乙醇在517nm处测定波长下的吸光值(A_c), 2mL蜜柚叶提取物溶液和2mL95%乙醇混合后在517nm处测定波长的吸光值(A_j)。

[0048] 提取物对DPPH·的清除能力用抑制率R表示: $R = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$ 。

[0049] 以不同浓度的Vc及没食子酸溶液为标准品,并以同样的实验方法测定不同浓度的Vc及没食子酸溶液对DPPH·自由基的活性清除。

[0050] 4、实验结果

[0051] 得到的对DPPH·自由基的清除作用的实验结果如图1,由图1可知,蜜柚叶提取物对DPPH·自由基的活性清除的IC₅₀值为1.24mg/mL。

[0052] 实施例2

[0053] 蜜柚叶提取物对羟自由基的清除作用

[0054] 1、蜜柚叶提取物的提取

[0055] (1) 将蜜柚叶烘干去梗,粉碎后过60目筛;

[0056] (2) 过筛后的蜜柚叶粉末用体积分数为70%的乙醇在80℃下热提取8h,重复三次,合并滤液,得到蜜柚叶乙醇提取液;蜜柚叶粉末与乙醇的料液比为1:15g/mL;

[0057] (3) 将蜜柚叶乙醇提取液浓缩至相对于水的密度1.15后冻干,得到蜜柚叶提取物。

[0058] 2、实验样品及试剂制备

[0059] 蜜柚叶提取物溶液:准确称取20mg蜜柚叶提取物,用蒸馏水配成2.5mg/ml溶液,分别稀释成0.5、1.0、1.5、2.0mg/ml的蜜柚叶提取物溶液,备用。

[0060] 5mmol/L邻二氮菲溶液:0.0991g邻二氮菲固体,加入2ml无水乙醇溶解后加入98ml去离子水。

[0061] pH 7.4磷酸盐缓冲液:3.12g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 定容到100ml,得溶液A;7.16g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 定容到100ml,得溶液B;取9.5ml溶液A及40.5ml溶液B混合于烧杯中,调节pH至7.4。

[0062] 15mmol/L EDTA溶液:1.0959g EDTA固体用去离子水定容到250ml容量瓶中,备用。

[0063] 5mmol/L硫酸亚铁溶液:0.1390g硫酸亚铁固体,加入100ml去离子水(现配现用)。

[0064] 0.1wt%过氧化氢溶液:0.335ml的30% H_2O_2 加入100ml去离子水(现配现用)。

[0065] 3、实验过程

[0066] 样品管3组(编号①②③):取1.2mL邻二氮菲溶液(5mmol/L)加入0.8mL磷酸盐缓冲

液(0.2M,pH 7.4)混匀后,加入1.2mL蜜柚叶提取物溶液和1.2mLEDTA(15mmol/L)溶液,再次混匀。

[0067] 损伤管、未损伤管(编号④⑤):取1.2mL邻二氮菲溶液(5mmol/L)加入0.8mL磷酸盐缓冲液(0.2M,pH 7.4)混匀后,加入1.2mL去离子水和1.2mL EDTA(15mmol/L)。

[0068] 试管①~⑤分别加入1.2ml 5mmol/L硫酸亚铁溶液,充分混匀后,试管①②③④分别加入1.6ml 0.1wt%过氧化氢溶液,试管⑤加入1.6ml去离子水;试管①~⑤置于37℃恒温水浴锅保温1h,测定536nm处吸光值,记录数据。

[0069] 以不同浓度的Vc及没食子酸溶液为标准品,并以同样的实验方法测定不同浓度的Vc及没食子酸溶液对羟自由基离子的活性清除。

[0070] 4、实验结果

[0071] 得到的蜜柚叶提取物对羟自由基的清除作用的实验结果如图2,由图2可知,蜜柚叶提取物对羟自由基的活性清除的IC₅₀值为1.04mg/mL。

[0072] 实施例3

[0073] 蜜柚叶提取物对超氧阴离子的清除活性

[0074] 1、蜜柚叶提取物的提取

[0075] (1)将蜜柚叶烘干去梗,粉碎后过70目筛;

[0076] (2)过筛后的蜜柚叶粉末用体积分数为60%的乙醇在40℃下热提取6h,重复三次,合并滤液,得到蜜柚叶乙醇提取液;蜜柚叶粉末与乙醇的料液比为1:25g/mL;

[0077] (3)将蜜柚叶乙醇提取液浓缩至相对于水的密度1.30后冻干,得到蜜柚叶提取物。

[0078] 2、实验样品及试剂制备

[0079] 蜜柚叶提取物溶液:准确称取20mg提取物,用蒸馏水配成2.5mg/ml溶液,分别稀释成0.5、1.0、1.5、2.0mg/ml的蜜柚叶提取物溶液,备用。

[0080] 3、实验过程

[0081] 黄嘌呤氧化酶在有氧的条件下,可以催化黄嘌呤转化为尿酸,同时产生超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$), $\cdot O_2^-$ 与NBT结合后呈蓝色;蜜柚叶提取物清除能力越大,与NBT结合的 $\cdot O_2^-$ 越少,溶液颜色就会越浅。

[0082] 测定方法为:20 μ L 3mmol/L黄嘌呤加入180 μ L 0.6mmol/L NBT和20 μ L蜜柚叶提取物溶液,于37℃反应5min;之后加入20 μ L 0.1u/mL的黄嘌呤氧化酶于96孔板中37℃保温30min后,于560nm处测定吸光值,记为A_{sample}。

[0083] 以磷酸盐缓冲液(pH=7.5,浓度为0.2mol/L)代替蜜柚叶提取物溶液作为空白对照,560nm处测定吸光值,记为A_{control}。

[0084] 清除率(%) = (A_{control}-A_{sample})/A_{control}×100

[0085] 以不同浓度的Vc及没食子酸溶液为标准品,并以同样的实验方法测定不同浓度的Vc及没食子酸溶液对超氧阴离子自由基的活性清除。

[0086] 4、实验结果

[0087] 实验结果如图3所示,由图3可知,蜜柚叶提取物对超氧阴离子的活性清除的IC₅₀值为1.49mg/mL。

[0088] 实施例4

[0089] 蜜柚提取物对ABTS·+的清除活性

[0090] 1、蜜柚叶提取物的提取

[0091] (1) 将蜜柚叶烘干去梗,粉碎后过80目筛;

[0092] (2) 过筛后的蜜柚叶粉末用体积分数为80%的乙醇在60℃下热提取10h,重复三次,合并滤液,得到蜜柚叶乙醇提取液;蜜柚叶粉末与乙醇的料液比为1:30g/mL;

[0093] (3) 将蜜柚叶乙醇提取液浓缩至相对于水的密度1.20后冻干,得到蜜柚叶提取物。

[0094] 2、实验样品及试剂制备

[0095] ABTS储备液(7.4mmol/L,0.4mL):取ABTS 3mg,加蒸馏水0.735mL。(MW=548.7)

[0096] K₂S₂O₈储备液(2.6mmol/L,1.43mL):取K₂S₂O₈ 1mg,加蒸馏水1.43mL。(MW=270.32)

[0097] 蜜柚叶提取物溶液:准确称取20mg提取物,用蒸馏水配成2.5mg/ml溶液,分别稀释成0.5、1.0、1.5、2.0mg/ml的蜜柚叶提取物溶液,备用。

[0098] 3、实验过程

[0099] 配制ABTS+•储备液:以2.6mmol/L的过硫酸钾储备液溶解7.4mmol/L的ABTS储备液,配成7mmol/L的ABTS+•储备液,在室温、避光条件下静置12h。

[0100] 配制ABTS+•测定液:以磷酸盐缓冲液(10mmol/L,pH7.4)稀释ABTS+•储备液,使其吸光度在734nm波长处达到0.700±0.020。

[0101] 测定:取0.8mLABTS+•测定液,加入0.2ml蜜柚叶提取物溶液,准确振荡10s,静置6分钟,测定734nm波长处的吸光度A。

[0102] 空白:取0.8mLABTS+•测定液,加入0.2ml95%乙醇,准确振荡10s,静置6分钟,测定734nm波长处的吸光度A₁。

[0103] 清除率=(A₁-A)/A₁×100%

[0104] 以不同浓度的V_c及没食子酸溶液为标准品,并以同样的实验方法测定不同浓度的V_c及没食子酸溶液对ABTS+•的活性清除。

[0105] 4、测定结果

[0106] 蜜柚提取物对ABTS+•的清除活性结果如图4所示,由图4可知,蜜柚叶提取物对ABTS+•的活性清除的IC₅₀值为3.31mg/mL。

[0107] 图5为实施例1~4中,蜜柚叶提取物对各自由基离子清除活性的IC₅₀值的柱状图;由图5可知,蜜柚叶提取物对DPPH•自由基、羟自由基、超氧阴离子和ABTS+•的活性清除的IC₅₀值分别为1.24mg/mL、1.04mg/mL、1.49mg/mL和3.31mg/mL。

[0108] 实施例5

[0109] 蜜柚叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制活性

[0110] 1、蜜柚叶提取物的提取

[0111] (1) 将蜜柚叶烘干去梗,粉碎后过75目筛;

[0112] (2) 过筛后的蜜柚叶粉末用体积分数为75%的乙醇在50℃下热提取8h,重复三次,合并滤液,得到蜜柚叶乙醇提取液;蜜柚叶粉末与乙醇的料液比为1:20g/mL;

[0113] (3) 将蜜柚叶乙醇提取液浓缩至相对于水的密度1.18后冻干,得到蜜柚叶提取物。

[0114] 2、实验样品及试剂制备

[0115] 蜜柚叶提取物溶液:将蜜柚叶提取物配制成2、4、6、8、10mg/mL蜜柚叶提取物溶液。

[0116] 阳性对照品溶液:别嘌呤醇先用1mol/L的NaOH溶解配制成50μg/mL溶液,再用0.2mol/L磷酸缓冲液(pH=7.5)稀释成2.5、7.5、14、20、27.5μg/mL别嘌呤醇溶液,备用。

[0117] 3、实验过程

[0118] 将50μL浓度为0.1U/mL的黄嘌呤氧化酶溶液、50μL浓度为0.2mol/L (PH=7.5) 的磷酸盐缓冲液、蜜柚叶提取物溶液依次加入到96微孔版中,振摇30s后37℃保温15min(平衡时间对结果有影响,此时间保证操作可行性),采用多道移液器快速向96微孔板加入150μL浓度为0.2mM的黄嘌呤,在酶标仪中记录反应30min;后加入50μL浓度为1M的HCl终止反应,于290nm处测定吸光值。

[0119] 4、按照公式计算提取物样品对XOD的抑制活性

[0120] 抑制率(%) = $[(A-B) - (C-D)] / (A-B) \times 100\%$

[0121] A: 50μL 0.1U/mL黄嘌呤氧化酶+50μL 0.2mol/L (PH=7.5) 的磷酸盐缓冲液+150μL 0.2mM的黄嘌呤

[0122] B: 50μL 0.2mol/L (PH=7.5) 的磷酸盐缓冲液+50μL 0.2mol/L (PH=7.5) 的磷酸盐缓冲液+150μL 0.2mM的黄嘌呤

[0123] C: 50μL 0.1U/mL黄嘌呤氧化酶+50μL蜜柚叶提取物溶液+150μL 0.2mM的黄嘌呤

[0124] D: 50μL 0.2mol/L (PH=7.5) 的磷酸盐缓冲液+50μL蜜柚叶提取物溶液+150μL 0.2mM的黄嘌呤

[0125] 以不同浓度的别嘌呤醇溶液为标准品,并以同样的实验方法测定不同浓度的别嘌呤醇溶液对黄嘌呤氧化酶活性抑制。

[0126] 5、测定结果

[0127] 对黄嘌呤氧化酶的抑制活性结果如图6所示,由图6可知,蜜柚叶提取物具有较好的黄嘌呤氧化酶抑制活性,对黄嘌呤氧化酶活性抑制的IC₅₀值为4.8mg/mL。

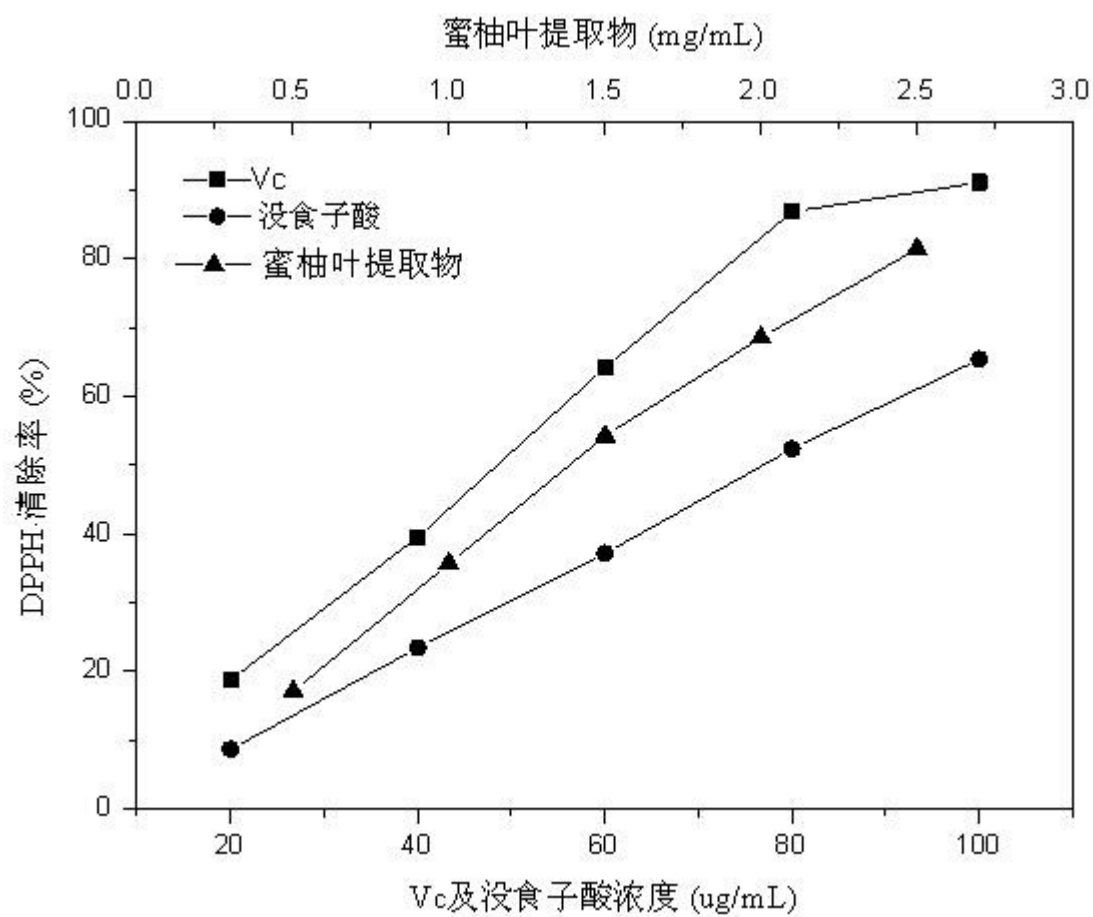


图1

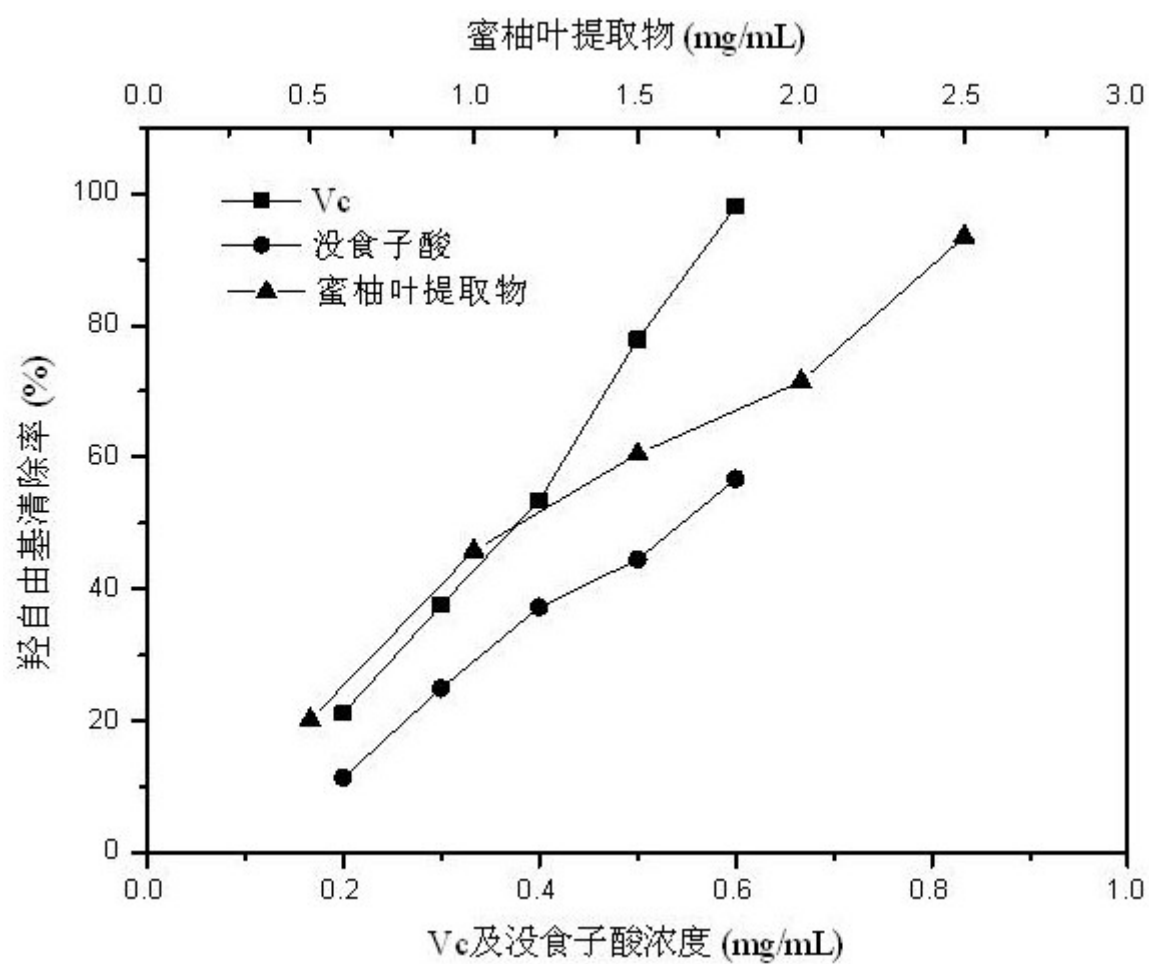


图2

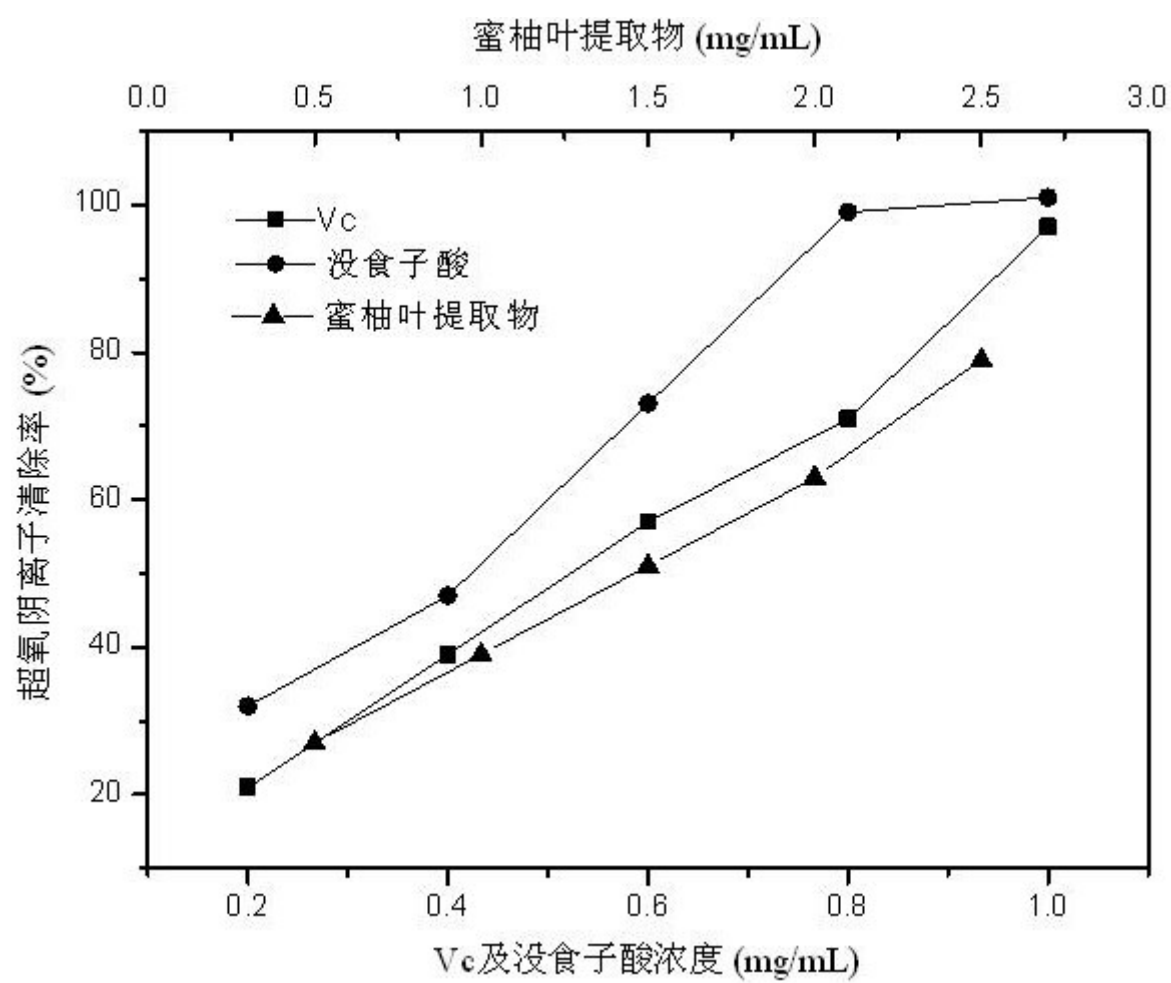


图3

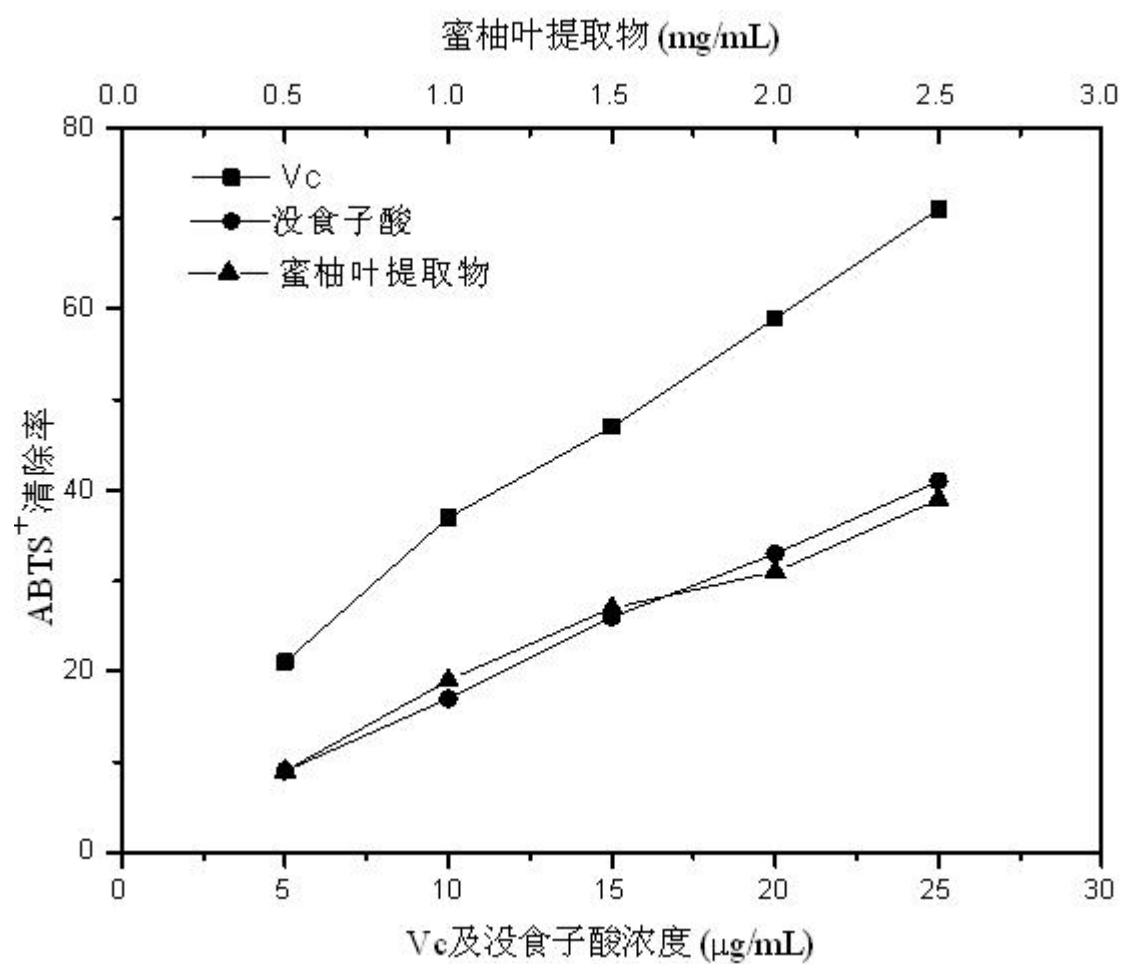


图4

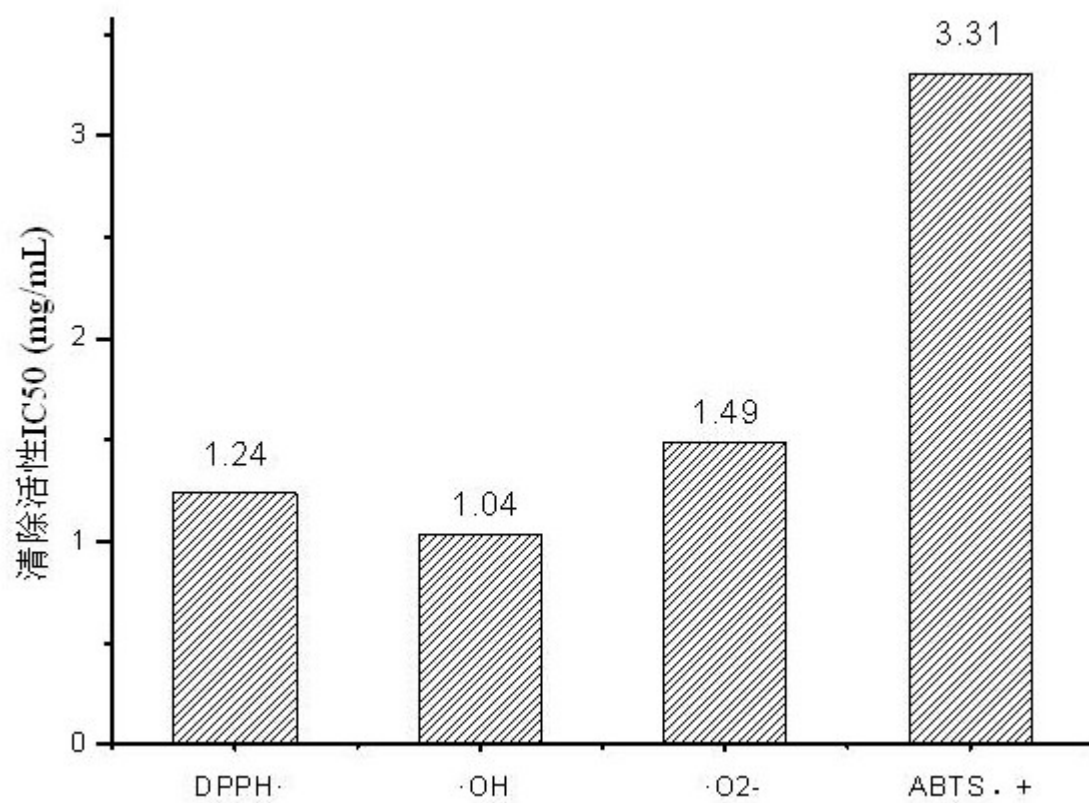


图5

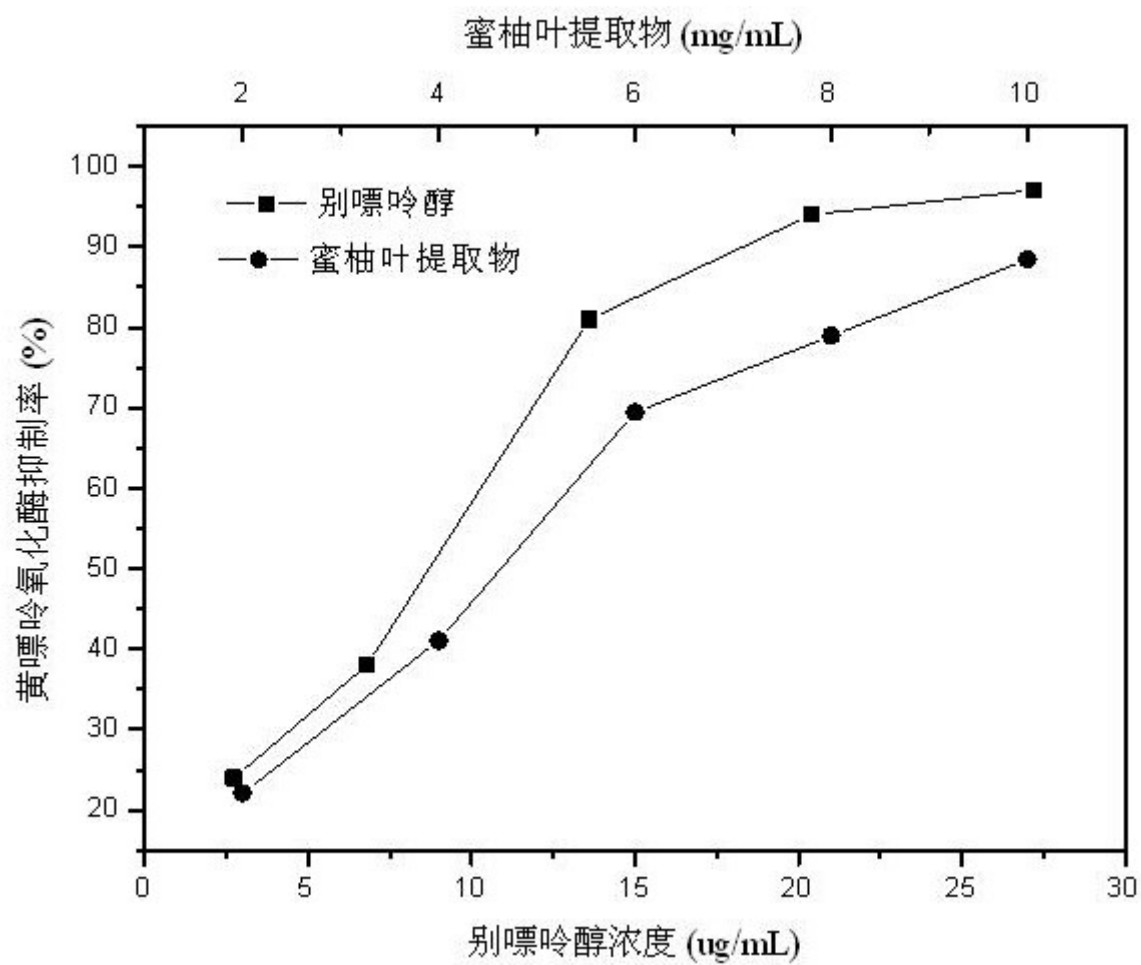


图6