



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113413632 B

(45) 授权公告日 2022. 06. 03

(21) 申请号 202110776032.0

C11B 1/10 (2006.01)

(22) 申请日 2021.07.08

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103408545 A, 2013.11.27

申请公布号 CN 113413632 A

CN 102329369 A, 2012.01.25

CN 104083556 A, 2014.10.08

(43) 申请公布日 2021.09.21

李振凯等. 银柴胡生物学、化学成分及药理作用研究进展.《南京中医药大学学报》.2020,

(73) 专利权人 宁夏大学

地址 750021 宁夏回族自治区银川市西夏区贺兰山西路489号

Lin Dong等.CHEMICAL CONSTITUENTS OF

Stellaria dichotoma var. lanceolata AND THEIR ANTI-INFLAMMATORY EFFECT ON

(72) 发明人 彭励 宋乐 王红 李振凯 吴薇

张桂杰 李乐 马科

LIPOPOLYSACCHARIDE-STIMULATED RAW 264.7

(74) 专利代理机构 北京卓爱普专利代理事务所

(特殊普通合伙) 11920

CELLS.《Chemistry of Natural Compounds》.2021,

专利代理师 王玉松 宋丹丹

敖亮等. 银柴胡化学成分及其抗炎活性.《中成药》.2018,

(51) Int. Cl.

B01D 11/02 (2006.01)

审查员 韩希玲

权利要求书2页 说明书14页 附图10页

(54) 发明名称

一种银柴胡脂类提取物及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种银柴胡脂类提取物及其制备方法。所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计,含有以下组分:甘油磷脂0.5%-0.6%、鞘脂0.02%-0.03%、甘油酯9%-11%、固醇类85%-90.5%、孕烯醇酮脂0.01%-0.02%、脂肪酰0.3%-0.4%、糖脂0.07%-0.09%;该银柴胡脂类提取物的制备方法包括以下步骤:(1)将银柴胡药材粉碎至40-60目;将粉碎后的银柴胡投入萃取釜中,设定萃取釜的萃取温度为40-50℃、萃取压力为25-35Mpa,分离釜I的压力为6MPa-10MPa,温度为50℃-60℃,萃取釜的分离釜II的压力为6MPa-10MPa,温度为30℃-40℃,萃取时间为1-3h,即得银柴胡脂类提取物。本发明对银柴胡中的脂质组分的构成进行了分析,发现了一系列脂质类成分,含有8种甘油磷脂、6种鞘脂、3种甘油酯、4种固醇类、1种孕烯醇酮脂、3种脂肪酰、4种糖脂共7类脂质物质,29种脂质成分。

CN 113413632 B

1. 一种银柴胡脂类提取物,其特征在于,所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计,含有以下组分:

甘油磷脂0.5%-0.6%、鞘脂0.02%-0.03%、甘油酯9%-11%、固醇类85%-90.5%、孕烯醇酮脂0.01%-0.02%、脂肪酰0.3%-0.4%、糖脂0.07%-0.09%;

所述银柴胡脂类提取物的制备方法包括以下步骤:

(1) 将银柴胡药材粉碎至40-60目;

(2) 将粉碎后的银柴胡投入超临界CO₂萃取釜中,设定超临界CO₂萃取釜的萃取温度为40-50℃、萃取压力为25-35Mpa,分离釜I的压力为6MPa-10MPa,温度为50℃-60℃,萃取釜的分离釜II的压力为6MPa-10MPa,温度为30℃-40℃,萃取时间为1-3h,即得银柴胡脂类提取物。

2. 如权利要求1所述的银柴胡脂类提取物,其特征在于,所述甘油磷脂包括溶血磷脂酰甘油、卵磷脂、脑磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、心磷脂、磷脂酸,所述鞘脂包括神经酰胺、磷酸神经酰胺、鞘糖脂、鞘磷脂、硫脂、神经节苷脂,甘油酯包括甘油二酯、单甘油酯、甘油三酯,固醇包括胆固醇酯、谷甾醇酯、豆甾醇酯、酵母甾醇,孕烯醇酮脂包括辅酶,脂肪酰包括酰基肉碱、

(*o*-酰基)-1-羟基脂肪酸和蜡,糖脂包括半乳糖二酰基丙三醇、二半乳糖二酰基丙三醇、半乳糖单酰基丙三醇和硫酸甘油单酯。

3. 一种从银柴胡中提取银柴胡脂类提取物的方法,其特征在于,所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计,含有以下组分:

甘油磷脂0.5%-0.6%、鞘脂0.02%-0.03%、甘油酯9%-11%、固醇类85%-90.5%、孕烯醇酮脂0.01%-0.02%、脂肪酰0.3%-0.4%、糖脂0.07%-0.09%;;

所述银柴胡脂类提取物的制备方法包括以下步骤:

(1) 将银柴胡药材粉碎至40-60目;

(2) 将粉碎后的银柴胡投入超临界CO₂萃取釜中,设定超临界CO₂萃取釜的萃取温度为40-50℃、萃取压力为25-35Mpa,分离釜I的压力为6MPa-10MPa,温度为50℃-60℃,萃取釜的分离釜II的压力为6MPa-10MPa,温度为30℃-40℃,萃取时间为1-3h,即得银柴胡脂类提取物。

4. 如权利要求1所述的银柴胡脂类提取物,其特征在于,所述步骤(2)中设定超临界CO₂萃取釜的萃取温度为47℃,萃取压力35Mpa,萃取时间为3h。

5. 如权利要求1所述的银柴胡脂类提取物,其特征在于,所述步骤(2)中设定超临界CO₂萃取釜的萃取温度为50℃,萃取压力30Mpa,萃取时间为3h。

6. 如权利要求1所述的银柴胡脂类提取物,其特征在于,所述步骤(2)中设定超临界CO₂萃取釜的萃取温度为45℃,萃取压力30Mpa,萃取时间为2h。

7. 如权利要求5所述的银柴胡脂类提取物,其特征在于,所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计:

固醇88.111%、甘油酯10.868%、脂肪酰0.362%、孕烯醇酮脂0.013%、甘油磷脂0.532%、糖脂0.085%、鞘脂0.029%。

8. 一种银柴胡脂类提取物在制备治疗炎症的药物中的应用,其特征在于,所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计,含有以下组分:

甘油磷脂0.5%-0.6%、鞘脂0.02%-0.03%、甘油酯9%-11%、固醇类85%-90.5%、孕烯醇酮脂0.01%-0.02%、脂肪酰0.3%-0.4%、糖脂0.07%-0.09%。

9. 一种从银柴胡中提取银柴胡脂类提取物的方法,其特征在于,所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计,含有以下组分:

甘油磷脂0.5%-0.6%、鞘脂0.02%-0.03%、甘油酯9%-11%、固醇类85%-90.5%、孕烯醇酮脂0.01%-0.02%、脂肪酰0.3%-0.4%、糖脂0.07%-0.09%;

所述制备方法包括以下步骤:

(1) 将银柴胡药材粉碎至40-60目;

(2) 将粉碎后的银柴胡投入超临界CO₂萃取釜中,设定超临界CO₂萃取釜的萃取温度为47℃、萃取压力为35Mpa,分离釜I的压力为6MPa-10MPa,温度为50℃-60℃,超临界CO₂萃取釜的分离釜II的压力为6MPa-10MPa,温度为30℃-40℃,萃取时间为2h,即得银柴胡脂类提取物。

一种银柴胡脂类提取物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于中草药化学成分的提取技术领域,具体涉及一种银柴胡脂类提取物及其制备方法。

背景技术

[0002] 神经酰胺又称神经鞘脂类,是存在于皮肤的一种脂类,在表皮角质层形成过程中发挥着重要作用,是(神经)鞘脂类共有的结构单位,脂肪酸在鞘氨醇的氨基上具有酸酰胺键的结构,在其上如果结合糖,就成为鞘糖脂类,如果结合磷酸胆碱,就成为(神经)鞘磷脂,神经酰胺是鞘脂类的中间代谢产物,尤其在生物合成上占有重要的位置,在血小板以外仅少量存在,患有遗传性脂类积蓄症(lipidosis)之一的Fabry病的病人在小脑、肾脏中积蓄着大量神经酰胺,近年研究表明,当皮肤出现干燥、脱屑、开裂现象,其屏障功能明显降低时,皮肤补充神经酰胺可迅速恢复保湿和屏障功能,鉴于环保考虑,如今护肤品中所添加的神经酰胺已由原来的动物脑组织提取改为植物提取,如大米、玉米等植物。

发明内容

[0003] 为了解决以上技术问题,本发明提供了一种银柴胡脂类提取物及其制备方法。

[0004] 所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计,含有以下组分:

[0005] 甘油磷脂0.5%-0.6%、鞘脂0.02%-0.03%、甘油酯9%-11%、固醇类85%-90.5%、孕烯醇酮脂0.01%-0.02%、脂肪酰0.3%-0.4%、糖脂0.07%-0.09%;

[0006] 该银柴胡脂类提取物的制备方法包括以下步骤:

[0007] (1) 将银柴胡药材粉碎至40-60目;

[0008] (2) 将粉碎后的银柴胡投入萃取釜中,设定萃取釜的萃取温度为40-50℃、萃取压力为25-35Mpa,分离釜I的压力为6MPa-10MPa,温度为50℃-60℃,萃取釜的分离釜II的压力为6MPa-10MPa,温度为30℃-40℃,萃取时间为1-3h,即得银柴胡脂类提取物。

[0009] A指得是以上提取方法制得的银柴胡提取物中的脂质成分,银柴胡为宁夏道地药材,为石竹科繁缕属植物银柴胡(*Stellaria dichotoma* L.var.*lanceolata* Bge.)的干燥根,性寒味甘,具有清虚热、除痞热等功效;目前发现的银柴胡活性成分主要有甾醇类、环肽类、生物碱类、黄酮类、酚酸类、挥发性物质等,其药理活性主要集中在解热抗炎、抗过敏、抗癌、促进血管舒张等方面,但对于脂质类物质的研究未见报道,目前研究银柴胡活性成分的提取方法主要为水蒸气蒸馏法或溶剂萃取法,这两种提取工艺简单,但其提取效率低,耗能高,安全性低,热稳定成分容易被破坏,如使用95%的乙醇提取,在依次用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,用层析法进行分离,可以得到10个化合物,分别为3-羟基-β-卡巴林、taraxacine A、1,2,3,4-四氢-1,2,3,4-三羟基-β-卡巴林、1-乙酰基-β-卡巴林、arenarine A、arenarine B、邻苯二甲酸二异丁酯、邻苯二甲酸二丁酯、亚麻酸甲酯、苜蓿素,不同的方法提取的脂溶性成分不同,现有的提取方法无法获知银柴胡中的其他脂溶性活性成分。

[0010] 本研究以银柴胡药材为原料,采用超临界CO₂萃取技术提取银柴胡活性成分,研究

萃取压力、萃取温度和萃取时间对银柴胡提取物得率的影响,通过响应面法优化银柴胡的提取工艺,并采用UHPLC-MS/MS技术对所得超临界提取物成分进行分析,为银柴胡的进一步开发利用提供理论依据。

[0011] 进一步地,本发明提供的银柴胡脂类提取物具体的成分列表见表1。

[0012] 表1. 银柴胡脂类提取物成分分布

脂质类型	中文名	英文名	简写	
甘油磷脂	溶血磷脂酰甘油	lysophosphatidy	LPG	
	卵磷脂	phosphatidylcholine	PC	
	脑磷脂	phosphatidylethanolamine	PE	
	磷脂酰甘油	phosphatidylglycerol	PG	
	磷脂酰丝氨酸	phosphatidylserine	PS	
	磷脂酰肌醇	phosphatidylinositol	PI	
	心磷脂	Cardiolipin	CL	
	磷脂酸	phosphatidic acid	PA	
	鞘脂	神经酰胺	Ceramides	Cer
		磷酸神经酰胺	Ceramides phosphate	CerP
鞘糖脂		Simple Glc series	CerG2G NAc1	
[0013]	鞘磷脂	sphingomyelin	SM	
	硫脂	Sulfatide	ST	
	神经节苷脂	Gangliosides	GM3	
	甘油酯	甘油二酯	diglyceride	DG
		单甘油酯	monoglyceride	MG
甘油三酯		triglyceride	TG	
固醇	胆固醇酯	Cholesterol Ester	ChE	
	谷甾醇酯	Sitosterol ester	SiE	
	豆甾醇酯	Stigmasterol ester	StE	
	酵母甾醇	zymosterol	ZyE	
孕烯醇酮	辅酶	Coenzyme	Co	

	脂			
	脂肪酰	酰基肉碱	Acyl Carnitine	AcCa
		(<i>o</i> -酰基)-1-羟基	(<i>O</i> -acyl)-1-hydroxy fatty	OAHFA
		脂肪酸	acid	
		蜡	wax exters	WE
[0014]	糖脂	半乳糖二酰基丙三醇	Monogalactosyldiacylglycerol	MGDG
		二半乳糖二酰基丙三醇	Digalactosyldiacylglycerol	DGDG
		半乳糖单酰基丙三醇	Monogalactosylmonoacylglycerol	MGMG
		硫酸甘油单酯	Sulfoquinovosylmonoacylglycerol	SQMG

[0015] 另一方面,本发明还提供了一种从银柴胡中提取银柴胡脂类提取物的方法,所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计,含有以下组分:

[0016] 甘油磷脂0.5%-0.6%、鞘脂0.02%-0.03%、甘油酯9%-11%、固醇类85%-90.5%、孕烯醇酮脂0.01%-0.02%、脂肪酰0.3%-0.4%、糖脂0.07%-0.09%;

[0017] 该银柴胡脂类提取物的制备方法包括以下步骤:

[0018] (1) 将银柴胡药材粉碎至40-60目;

[0019] (2) 将粉碎后的银柴胡投入萃取釜中,设定萃取釜的萃取温度为40-50℃、萃取压力为25-35Mpa,分离釜I的压力为6MPa-10MPa,温度为50℃-60℃,萃取釜的分离釜II的压力为6MPa-10MPa,温度为30℃-40℃,萃取时间为1-3h,即得银柴胡脂类提取物。

[0020] 另一方面,本发明还提供了一种从银柴胡中提取神经酰胺的方法,该方法包括以下步骤:

[0021] (1) 将银柴胡药材粉碎至40-60目;

[0022] (2) 将粉碎后的银柴胡投入萃取釜中,设定萃取釜的萃取温度为40-50℃、萃取压力为25-35Mpa,分离釜I的压力为6MPa-10MPa,温度为50℃-60℃,萃取釜的分离釜II的压力为6MPa-10MPa,温度为30℃-40℃,萃取时间为1-3h,即得银柴胡脂类提取物,所述银柴胡脂类提取物含有神经酰胺。

[0023] 进一步地,步骤(2)中设定萃取釜的萃取温度为47℃,萃取压力35MPa,萃取时间为3h。

[0024] 进一步地,使用以上参数制得的银柴胡脂类提取物含有以下组分:

[0025] 固醇88.111%、甘油酯10.868%、脂肪酰0.362%、孕烯醇酮脂0.013%、甘油磷脂0.532%、糖脂0.085%、鞘脂0.029%。

[0026] 进一步地,步骤(2)中设定萃取釜的萃取温度为50℃,萃取压力30MPa,萃取时间为3h。

[0027] 进一步地,步骤(2)中设定萃取釜的萃取温度为45℃,萃取压力30MPa,萃取时间为2h。

[0028] 本发明还提供了一种银柴胡脂类提取物在制备治疗验证的药物中的应用,所述银柴胡脂类提取物以重量百分比计,含有以下组分:

[0029] 甘油磷脂0.5%-0.6%、鞘脂0.02%-0.03%、甘油酯9%-11%、固醇类85%-90.5%、孕烯醇酮脂0.01%-0.02%、脂肪酰0.3%-0.4%、糖脂0.07%-0.09%。

[0030] 本发明还提供了一种银柴胡提取物的制备方法,该制备方法包括以下步骤:

[0031] (1) 将银柴胡药材粉碎至40-60目;

[0032] (2) 将粉碎后的银柴胡投入萃取釜中,设定萃取釜的萃取温度为40-50℃、萃取压力为25-35Mpa,分离釜I的压力为6MPa-10MPa,温度为50℃-60℃,萃取釜的分离釜II的压力为6MPa-10MPa,温度为30℃-40℃,萃取时间为1-3h,即得银柴胡脂类提取物。

[0033] 本发明通过对银柴胡进行提取得到了银柴胡脂类提取物,并在银柴胡脂类提取物中发现了一系列脂质类成分,包括8种甘油磷脂、6种鞘脂、3种甘油酯、4种固醇、1种孕烯醇酮脂、3种脂肪酰、4种糖脂共7类脂质物质,共29种脂质成分,对于银柴胡全面了解其脂质构成、挖掘功能性活性成分,开发银柴胡相关产品提供参考,为银柴胡中复杂、繁多的脂质组份分析、鉴定提供强有力的技术支持。

附图说明

[0034] 图1.为不同的萃取压力下银柴胡脂类提取物得率折线图;

[0035] 图2为不同的萃取温度下银柴胡脂类提取物得率折线图;

[0036] 图3.为不同的萃取时间下银柴胡脂类提取物得率折线图;

[0037] 图4.为萃取压力与萃取温度交互作用的响应面分析图;

[0038] 图5.为萃取压力与萃取时间的交互作用的响应面分析图;

[0039] 图6.为萃取温度与萃取时间的交互作用的响应面分析图;

[0040] 图7.为银柴胡脂类提取物中各成分含量占比饼图;

[0041] 图8.银柴胡提取物中脂质成分分布情况.a.脂质数量;b.不同类型脂质的质量百分比(%);c.甘油磷脂中LPG、PC、PE、PG、PS、PI、CL、PA的质量百分比(%);d.鞘脂中Cer、CerP、CerG2/3GNAc 1、SM、ST、GM3的质量百分比(%);e.甘油酯中DG、MG、TG的质量百分比(%);f.固醇类中ChE、SiE、StE、ZyE的质量百分比(%);g.脂肪酰中AcCa、OAHFA、WE的质量百分比(%);h.糖脂中MGDG、DGDG、MGMG、SQMG的质量百分比(%);

[0042] 图9.正离子模式下银柴胡提取物中的脂质成分分布情况,a脂质数量,b不同类型脂质的质量百分比($\mu\text{g/g}$);

[0043] 图10.负离子模式下银柴胡提取物脂质中的成分分布情况a脂质数量b不同类型脂质的质量百分比($\mu\text{g/g}$)。

具体实施方式

[0044] 1材料

[0045] 1.1仪器

[0046] HA120-50-05超临界萃取装置,江苏南通华安超临界萃取有限公司;高速万能粉碎机;AL204电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Q-Exactive Plus质谱仪(Thermo Scientific);UHPLC Nexera LC-30A超高效液相色谱仪;(SHIMADZU)低温高速离

心机。

[0047] 1.2药材与试剂

[0048] 干燥银柴胡药材购自宁夏同心预望镇,经宁夏大学彭励教授鉴定为石竹科繁缕属银柴胡柴胡(*Stellaria dichotoma* L.var.*lanceolata* Bge.)的干燥根。

[0049] 二氧化碳(CO₂含量为99.9%,食品级);乙腈(Thermo Fisher);异丙醇(Thermo Fisher);甲醇(Thermo Fisher)。

[0050] 2方法

[0051] 2.1超临界CO₂萃取银柴胡活性成分

[0052] 称取1500g预先粉碎好(粉碎至50目)的银柴胡药材粉末,投入5L萃取釜中,按照表3设定萃取釜的萃取温度、萃取压力和萃取时间,设定分离釜I的压力为6MPa,温度为60℃、分离釜II的压力为6MPa,温度为60℃,当温度达到实验要求时,开启二氧化碳气瓶,通过高压泵对萃取釜、分离釜进行加压,当压力达到实验所要求的数值时,进行萃取,记录时间,每隔30min,从分离釜I、II放料,即得银柴胡脂类提取物。

[0053] 其中,得率(%)=(超临界提取物(g)/银柴胡粉末(g))×100%。

[0054] 2.2超临界CO₂萃取工艺优化

[0055] 2.2.1单因素实验

[0056] 单因素实验为固定其他实验因素,研究萃取温度、萃取压力及萃取时间对银柴胡脂类提取物得率的影响,各因素水平为:萃取压力为20Mpa,25Mpa,30Mpa,35Mpa,40Mpa;萃取温度为35℃,40℃,45℃,50℃,55℃;萃取时间1h,2h,3h,4h,5h。

[0057] 2.2.2超临界CO₂萃取条件的响应面优化

[0058] 通过前期单因素试验,根据Box-Behnken试验设计原理,选取萃取压力,萃取温度,萃取时间3个主要影响因素为研究对象,将萃取压力(A),萃取温度(B),萃取时间(C)设计3个水平,因素水平见表1。

[0059] 表2. 试验设计因素水平表

	因素			
	水平	A 萃取压力 (Mpa)	B 萃取温度 (℃)	C 萃取时间 (h)
[0060]	1	25	40	1
	2	30	45	2
	3	35	50	3

[0061] 2.3超临界提取物脂质类成分LC-MS/MS分析

[0062] 2.3.1样本预处理方法

[0063] 取适量样本(制得的银柴胡脂类提取物),加入200μL水和20μL internal lipid

standard mixture, MP涡旋, 加入800 μ L MTBE, 涡旋混合, 加入240 μ L预冷甲醇, 涡旋混合, 低温水浴中超声20min, 室温放置30min, 14000g、10 $^{\circ}$ C离心15min, 取上层有机相, 氮气吹干, 质谱分析时加入200 μ L90%异丙醇/乙腈溶液复溶, 充分涡旋, 取90 μ L复溶液, 14000g 10 $^{\circ}$ C离心15min, 取上清进样分析。

[0064] 2.3.2 色谱条件

[0065] 样品采用UHPLC Nexera LC-30A超高效液相色谱系统进行分离, C18色谱柱; 柱温45 $^{\circ}$ C; 流速300 μ L/min, 流动相组成A: 乙腈水溶液(乙腈: 水=6:4, v/v), B: 乙腈异丙醇溶液(乙腈: 异丙醇=1:9, v/v), 梯度洗脱程序如下: 0-2min, B维持在30%, A维持在70%; 2-25min, B从30%线性变化至100%, A维持在0%; 25-35min, B维持在30%, A维持在70%, 整个分析过程中样品置于10 $^{\circ}$ C自动进样器中, 为避免仪器检测信号波动而造成的影响, 采用随机顺序, 进行样本的连续分析。

[0066] 2.3.3 质谱条件:

[0067] 分别采用电喷雾电离(ESI)正离子和负离子模式进行检测, 样品经UHPLC分离后采用Q Exactive系列质谱仪(Thermo ScientificTM)进行质谱分析, ESI源条件如下: 温度300 $^{\circ}$ C, 鞘气流速45arb, 辅助气体流速15arb, 吹扫气体流速1arb, 喷雾电压3.0KV, 毛细管温度350 $^{\circ}$ C, S-Lens RF Level50%, MS₁的扫描范围: 200-1800, 脂质分子和脂质碎片的质量电荷比, 按照下列方法采集: 每次全扫描(fullscan)后采集10个碎片图谱(MS₂scan, HCD), MS₁在M/Z200时分辨率为70000, MS₂在M/Z200时分辨率为17500。

[0068] 2.4 数据处理

[0069] 利用Lipid Search4.2软件(Thermo ScientificTM)实现原始数据处理、峰提取、脂质鉴定、峰对齐和定量等一体化分析; 通过子离子、母离子和中性丢失扫描的鉴别算法, 实现脂质定性分析; 采用同位素内标法, 利用待测物与内标的响应丰度比值(峰面积比)以及内标的浓度, 计算待测物的绝对含量。

[0070] 3 结果

[0071] 3.1 超临界CO₂萃取银柴胡化学成分的单因素实验

[0072] 3.1.1 萃取压力对银柴胡脂类提取物得率的影响

[0073] 在萃取温度50 $^{\circ}$ C、萃取时间2h的条件下, 分别测定萃取压力为20MPa, 25MPa, 30MPa, 35MPa, 40MPa条件下银柴胡脂类提取物得率, 由图1可见, 随着萃取压力由20MPa升高到30MPa时, 超临界提取物得率随之增加, 当萃取压力大于30MPa时得率降低, 在温度、时间条件相同的情况下, 压力增大, 导致CO₂流量密度增大, 减少了溶剂与溶质的传质距离, 增加传质效率, 从而促使得率增加, 但当压力增加到一定程度后, 将降低CO₂扩散率, 致使得率下降, 同时过高压力对机器损耗大, 在设备使用时存在一定的安全隐患, 所以, 综合考虑, 选择30MPa为最佳萃取压力。

[0074] 3.1.2 萃取温度对银柴胡脂类提取物得率的影响

[0075] 在萃取压力30MPa、萃取时间2h的条件下, 分别测定萃取温度为35 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C条件下银柴胡脂类提取物得率, 由图2可见, 当温度从35 $^{\circ}$ C上升至45 $^{\circ}$ C时, 超临界提取物得率随之增加, 当萃取温度大于45 $^{\circ}$ C时得率降低, 萃取温度对提取物得率的影响主要有两方面, 一方面温度升高使CO₂密度降低, 使CO₂对提取物的溶解能力下降, 得率降低, 但另一方面温度升高会导致分子热运动加快, 促进提取物得率升高, 超临界状态下CO₂密度对

温度和压力的变化非常敏感,由于在30MPa时,压力较高,萃取温度升高使其CO₂密度降低减慢,分子热运动加快,提取物得率逐渐升高;但温度升高到一定程度后,CO₂密度降低成为主导因素,致使萃取得率不断降低,综合考虑,选择45℃为最佳萃取温度。

[0076] 3.1.3萃取时间对对银柴胡脂类提取物得率的影响

[0077] 在萃取压力30MPa、萃取温度50℃的条件下,分别测定萃取时间为1h,2h,3h,4h,5h条件下银柴胡脂类提取物得率,由图3可见,当时间处于1h到2h时间内提取物得率随时间延长而增加,当时间超过2h时,提取物得率增长幅度变小,综合实验结果和经济效益来考虑,选择2h为最佳萃取时间。

[0078] 3.2响应面试验结果

[0079] 3.2.1响应面试验设计

[0080] 在单因素实验基础上,运用Design Expert12.0软件设计响应面实验方案,试验采用了3因素3水平的响应面试验,按照表1进行响应面实验。试验方案及结果见表3。

[0081] 表3. 试验设计方案及结果

试验号	因素			得率 (%)
	A 萃取压力 (MPa)	B 萃取温度 (℃)	C 萃取时间 (min)	
1	25	40	2	0.24
2	35	40	2	0.258
[0082] 3	25	50	2	0.25
4	35	50	2	0.298
5	25	45	1	0.141
6	35	45	1	0.179
7	25	45	3	0.311

	8	35	45	3	0.329
	9	30	40	1	0.165
	10	30	50	1	0.185
	11	30	40	3	0.31
	12	30	50	3	0.345
[0083]	13	30	45	2	0.34
	14	30	45	2	0.331
	15	30	45	2	0.326
	16	30	45	2	0.336
	17	30	45	2	0.322

[0084] 3.2.2响应面方差分析结果

[0085] 为了检验回归方程的可靠性并确定各因素对银柴胡脂类提取物得率的影响程度，对回归方程进行了方差分析，结果见表4。回归方程：

[0086] $Y=0.33+0.015A+0.013B+(0.078C+7.500E-003)AB-(5.000E-003)AC+(3.750E-003)BC-0.040A^2-0.029B^2-0.051C^2$ 。

[0087] 表4. 方差分析结果

[0088]	方差的来	总和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
--------	------	----	-----	----	-----	-----	-----

源							
模型	0.076	9	8.445E-003	231.15	< 0.0001**	极显著	
A	1.861E-003	1	1.861E-003	50.92	0.0002*	显著	
B	1.378E-003	1	1.378E-003	37.72	0.0005*	显著	
C	0.049	1	0.049	1336.45	< 0.0001**	极显著	
AB	2.250E-004	1	2.250E-004	6.16	0.0421*	显著	
AC	1.000E-004	1	1.000E-004	2.74	0.1420	不显著	
[0089] BC	5.625E-005	1	5.625E-005	1.54	0.2546	不显著	
A ²	6.864E-003	1	6.864E-003	187.86	< 0.0001**	极显著	
B ²	3.572E-003	1	3.572E-003	97.76	< 0.0001**	极显著	
C ²	0.011	1	0.011	295.36	< 0.0001**	极显著	
残差	2.558E-004	7	3.654E-005				
失拟项	4.375E-005	3	1.458E-005	0.28	0.8413	不显著	
纯误差	2.120E-004	4	5.300E-005				
总误差	0.076	16					

[0090] 注:**表示 $P < 0.01$, 差异极显著;*表示 $P < 0.05$, 差异显著;

[0091] 表5. 回归方程误差统计分析

Std. Dev.	0.006	R-Squared	0.9966
C. V. %	2.20	Adj-Squared	0.9923
Mean	0.27	Pred-Squared	0.9865
PRESS	0.001	Adeq recision	44.139

[0093] 根据表4可以明显看出C, A², B², C²项对响应值有极显著影响 (P<0.01), A、B、AB项对响应值有显著影响 (P<0.05), 表5中多元相关系数R²越大, 说明相关性越好; Adj R-Squared和Pred R-Squared (RAdj²-RPred²<0.2) 这两个值高且接近, 则回归模型能充分说明工艺过程; 不高则说明对工艺解释不充分, 需考虑是否存在其他显著的影响因子, CV<10%, 表明实验的可信度和精确度高; 精密度 (Adeq Precision) 是有效信号与噪声的比值, 大于4视为合理, 从表5可以看出, 拟合的回归方程符合以上检验原则, 适应性较好, 因此, 可以利用此回归方程进行真实实验结果的预测与分析。

[0094] 3.2.3 响应面交互作用分析

[0095] 由方差分析结果可知, 每个因素对银柴胡提取物得率的影响程度不同并且具有相互作用, 并不是纯粹的线性关系, 响应面法优化所得三者的3D图及等高线图见图4-图6, 等高线的形状为椭圆形表示因素的交互作用显著, 圆形则表示交互作用不显著, 其中A和B的交互作用显著, 其他两个因素两两交互作用不显著, 此结果与表3分析结果相同, 由其中的3D图可以看出, 萃取时间的坡面相比于萃取时间与萃取压力的坡面陡峭, 说明萃取时间比萃取压力及萃取温度对得率的影响大; 萃取压力的坡面相比于萃取时间的坡面弧度更大, 说明萃取压力对得率的影响高于萃取温度, 由响应面结果得到各个因素对银柴胡提取物得率的影响大小依次为萃取时间>萃取压力>萃取温度。

[0096] 3.2.4 优化工艺验证试验

[0097] 通过Design-Expert10.0.7软件求解回归方程, 得到银柴胡脂类提取物最佳提取工艺条件为温度47.007℃, 压力35MPa, 提取2.737h, 理论得率为0.337%, 根据萃取设备的实际可操作性, 将工艺条件改为萃取压力35Mpa, 萃取温度47℃, 萃取时间为3h, 根据上述试验条件进行验证试验, 并进行3次重复验证, 得到银柴胡脂类提取物得率为0.341%, 误差为0.85%, 实际值与理论值基本相符, 说明响应面优化得到的工艺参数较好, 具有实用价值。

[0098] 3.3 超临界CO₂萃取银柴胡脂类提取物的分布情况

[0099] 如表1所示, 在最佳提取工艺条件 (即萃取压力35Mpa, 萃取温度47℃, 萃取时间为3h) 下的银柴胡脂类提取物中检测到8种甘油磷脂、6种鞘脂、3种甘油酯、4种固醇、1种孕烯醇酮脂、3种脂肪酸、4种糖脂共7类脂质物质, 29种脂质成分, 如图7所示, 含量最高的成分为固醇及甘油酯成分, 分别为88.111%, 10.868%。

[0100] 由于测出各脂质成分的含量的数据过多, 此处以Cer (神经酰胺) 为例, 如表6所示,

示出了银柴胡脂类提取物中的亚类为神经酰胺的活性成分的含量(在正离子模式下检测)。

[0101] 表6. 银柴胡脂类提取物中的亚类为神经酰胺的活性成分的含量表。

分子式	含量 ($\mu\text{g/g}$)	分子式	含量 ($\mu\text{g/ml}$)	分子式	含量 ($\mu\text{g/ml}$)
C34 H70 O3 N1	1.423 ± 0.033	C34 H64 O3 N1	0.669 ± 0.074	C34 H67 O3 N1 Na1	0.623 \pm 0.217
C34 H68 O3 N1	2.572 ± 0.161	C31 H67 O5 N2	4.572 ± 2.782	C34 H67 O4 N1 Na1	0.53 \pm 0.195
C34 H68 O4 N1	27.269 ± 1.624	C35 H66 O3 N1	1.76 ± 2.098	C36 H72 O3 N1	0.474 \pm 0.067
C34 H66 O3 N1	1.431 ± 0.051	C34 H66 O4 N1	0.468 ± 0.108	C36 H66 O3 N1	0.507 \pm 0.031
C36 H69 O3 N1 Na1	12.317 ± 0.319	C35 H72 O4 N1	0.606 ± 0.245	C38 H66 O4 N1	1.23 \pm 0.168
C36 H70 O3 N1	5.162 ± 0.203	C33 H71 O5 N2	2.416 ± 0.192	C29 H58 O3 N1	0.183 \pm 0.016
C36 H67 O3 N1 Na1	1.097 ± 0.091	C36 H68 O4 N1	0.531 ± 0.027	C34 H66 O5 N1	0.685 \pm 0.049
C36 H67 O3 N1 Na1	0.716 ± 0.025	C38 H66 O3 N1	2.183 ± 0.524	C35 H70 O4 N1	0.294 \pm 0.071
C36 H68 O3 N1	8.406 ± 0.088	C38 H70 O3 N1	7.856 ± 0.123	C36 H72 O4 N1	0.718 \pm 0.118
C40 H70 O3 N1	0.792 ± 0.075	C38 H72 O3 N1	2.933 ± 0.09	C36 H67 O4 N1 Na1	1.189 \pm 0.212
C40 H70 O3 N1	1.095 ± 0.454	C35 H67 O6 N1 Na1	4.038 ± 0.387	C38 H70 O4 N1	0.857 \pm 0.021
C38 H68 O4 N1	1.099 ± 0.22	C39 H71 O3 N1 Na1	0.498 ± 0.142	C41 H73 O3 N1 Na1	2.968 \pm 1.226
C32 H56 O3 N1	0.673 ± 0.087	C40 H68 O4 N1	0.932 ± 0.077	C46 H84 O3 N1	44.174 \pm 3.989
C32 H66 O3 N1	1.925 ± 0.176	C40 H73 O3 N1 Na1	0.423 ± 0.128	C45 H85 O4 N1 Na1	4.979 \pm 0.322
C32 H69 O2 N2	8.107 ± 0.937	C42 H72 O3 N1	3.614 ± 0.542		
C33 H66 O3 N1	0.417 ± 0.016	C46 H82 O3 N1	1.024 ± 0.073		
C35 H60 O2 N1	2.349 ± 0.406	C47 H87 O3 N1 Na1	9.598 ± 0.372		
C33 H68 O3 N1	0.329 ± 0.078	C48 H87 O3 N1 Na1	1.027 ± 0.172		

[0104] 银柴胡脂类提取物中脂质的分布情况如下：

[0105] 采用UHPLC-Q Exact ive MS对银柴胡中脂质组分进行分析,在ES I正离子和负离

子模式进行检测,如表7所示,在银柴胡中检测到甘油磷脂、鞘脂、甘油酯、固醇类、孕烯醇酮脂、脂肪酰、糖脂共7类脂质物质,甘油磷脂包含LPG、PC、PE、PG、PS、PI、CL、PA 8种脂质,鞘脂包含Cer、CerP、CerG2/3GNAc1、SM、ST、GM3 6种脂质,甘油酯包含DG、MG、TG 3种脂质,固醇类包括ChE、SiE、StE、ZyE 4种脂质,孕烯醇酮脂包括Co1种脂质,脂肪酰包括AcCa、OAHFA、WE3种脂质。糖脂包括MGDG、DGDG、MGMG、SQMG 4种脂质,总共29种脂质成分。如图8a所示,银柴胡超临界提取物中总共检测到2542个脂质成分,其中甘油磷脂、鞘脂、甘油酯、固醇类、孕烯醇酮脂、脂肪酰、糖脂脂质成分数量分别为246、196、1630、212、3、120、138(图8a),质量百分比分别为0.53%,0.03%,10.69%,88.29%,0.38%,0.09%(图8b)。甘油磷脂中LPG、PC、PE、PG、PS、PI、CL、PA,其中含量最高的为磷脂酰肌醇0.36%(图8c);鞘脂中Cer、CerP、CerG2/3GNAc 1、SM、ST、GM3脂质成分种类分别168、11、2、1、13、1,其中含量最高的为Cer质量百分比为0.02%(图8d);甘油酯中DG、MG、TG脂质成分种类分别为395、38、1197,含量最高的为DG质量百分比为9.39%(图8e);固醇类中ChE、SiE、StE、ZyE脂质成分种类分别为16、48、86、62,其中含量最高的为酵母甾醇质量百分比61.66%(图8f)。孕烯醇酮脂Co脂质成分种类为3,质量百分比0.02%,脂肪酰中AcCa、OAHFA、WE脂质成分种类分别为1、37、79,含量最多的为WE质量百分比0.28%(图8g)。糖脂中MGDG、DGDG、MGMG、SQMG脂质成分种类分别为125、7、5、1,其中含量最多的为MGDG质量百分比为0.08%(图8h)。

[0106] 表7. 银柴胡提取物中脂质成分构成

脂质类型	中文名	英文名	简写	含量
甘油磷脂	溶血磷脂酰甘油	lysophosphatidy	LPG	0.01%

	卵磷脂	phosphatidylcholine	PC	0.01%
	脑磷脂	phosphatidylethanolamine	PE	0.10%
	磷脂酰甘油	phosphatidylglycerol	PG	0.04%
	磷脂酰丝氨酸	phosphatidylserine	PS	0.02%
	磷脂酰肌醇	phosphatidylinositol	PI	0.36%
	心磷脂	Cardiolipin	CL	0.01%
	磷脂酸	phosphatidic acid	PA	0.00%
鞘脂	神经酰胺	Ceramides	Cer	0.02%
	磷酸神经酰胺	Ceramides phosphate	CerP	0.01%
			CerG2	
	鞘糖脂	Simple Glc series	/3GNA	0.00%
			c1	
	鞘磷脂	sphingomyelin	SM	0.00%
	硫脂	Sulfatide	ST	0.00%
	神经节苷脂	Gangliosides	GM3	0.00%
甘油酯	甘油二酯	diglyceride	DG	9.39%
[0108]	单甘油酯	monoglyceride	MG	0.75%
	甘油三酯	triglyceride	TG	0.55%
固醇类	胆固醇	Cholesterol Ester	ChE	26.22%
	谷甾醇	Sitosterol ester	SiE	0.16%
	豆甾醇	Stigmasterol ester	StE	0.25%
	酵母甾醇	zymosterol	ZyE	61.66%
孕烯醇酮脂	辅酶	Coenzyme	Co	0.01%
脂肪酰	酰基肉碱	Acyl Carnitine	AcCa	0.00%
	(o-酰基)-1-羟基脂肪酸	(O-acyl)-1-hydroxy fatty acid	OAHA	0.08%
	蜡	wax esters	WE	0.28%
糖脂	半乳糖二酰基丙三醇	Monogalactosyldiacylglycerol	MGDG	0.08%
	二半乳糖二酰基丙三醇	Digalactosyldiacylglycerol	DGDG	0.00%
	半乳糖单酰基丙三醇	Monogalactosylmonoacylglycerol	MGMG	0.01%
	硫酸甘油单酯	Sulfoquinovosylmonoacylglycerol	SQMG	0.00%

[0109] 其中,正离子模式下银柴胡超提取物脂质构成如下:

[0110] 在正离子模式下检测到银柴胡提取物中7类(甘油磷脂、鞘脂、甘油酯、固醇、孕烯

醇酮脂、脂肪酰、糖脂)、21种(LPG、PC、PE、PG、PS、PI、Cer、CerP、SM、ST、DG、MG、TG、ChE、SiE、StE、ZyE、Co、AcCa、WE、MGDG)、2188个脂质组分,如图9a所示其中甘油磷脂、鞘脂、甘油酯、固醇类、孕烯醇酮脂、脂肪酰脂质成分数量分别为184、75、1630、212、3、80,质量百分比分别为0.51%、0.02%、10.71%、88.45%、0.01%、0.28%、(图9b),糖脂的脂质成分数量为4,其含量为痕量。其中只在正离子模式下检测到的成分为甘油酯、固醇、孕烯醇酮脂、脂肪酰及糖脂。其中甘油磷脂在正离子模式下检测到6种(LPG、PC、PE、PG、PS、PI),其脂质成分数量分别为1、23、90、35、5、30。其中含量最高的为PI质量百分比为0.36%;鞘脂在正离子模式下检测到4种(Cer、CerP、SM、ST),其脂质成分种类分别50、11、1、13,其中含量最高的为Cer质量百分比为0.02%。

[0111] 负离子模式下银柴胡超提取物脂质构成如下:

[0112] 在负离子模式下只检测到2类(甘油磷脂、鞘脂),7种(PG、PI、CL、PA、Cer、CerG2/3GNAc 1、GM3)、183个脂质组分,如图10a所示,其中,甘油磷脂、鞘脂脂质成分数量分别为62、121,如图10b所示,质量百分比为73.79%、26.21%。甘油磷脂在负离子模式下检测到4种(PG、PI、CL、PA)其脂质成分数量分别为38、9、10、5,其中含量最高的为CL质量百分比为30.87%;鞘脂在负离子模式下检测到3种(Cer、CerG2/3GNAc1、GM3)其脂质成分数量分别为118、2、1,其中含量最高的为Cer,质量百分比为24.40%。

[0113] 本研究利用超临界萃取法提取到的物质中植物甾醇(固醇)含量占总脂质含量的88.29%;不同种类的脂质成分活性不同,因此不同的脂质类成分对银柴胡的药理功能的贡献不同,其中质量百分比>0.1%的主要为甘油磷脂、甘油酯、固醇类、孕烯醇酮脂、脂肪酰。甘油磷脂被认为是抗结肠癌、胃肠道病原体、阿尔茨海默氏病、抑郁和压力的功能成分。甘油酯是植物油的主要组分,主要功能是供给与储存能源、固定和保护内脏,参与妊娠期母体和腹中胎儿生长发育等多个环节的能量供应,且在脂质代谢中发挥关键作用。植物中所含的固醇类成分是一类广泛存在于植物内的一种具有生物学活性成分,只能通过外源性摄入,而不能在人体内合成物质。植物固醇具有良好的降脂、抗炎、抗氧化、调节免疫活性、抗肿瘤、延缓衰老等生物学功能,目前有研究表明对于未来用于阿尔茨海默氏病(alzheimer's disease, AD)心血管疾病的治疗具有重要作用。孕烯醇酮脂(pregnenolone),孕烯醇酮是一种自然产生的荷尔蒙和类固醇。孕烯醇酮是合成黄体酮、非那留胺等的重要中间体,用于留体类药物中间体和甾体类药物的合成。孕烯醇酮脂加强脑功能和记忆能力等。目前涉及孕烯醇酮应用方面的研究较少。脂肪酰中含量最多的为蜡,植物蜡主要存在于银柴胡根的角质层中可防止水分流失。鞘脂与糖脂成分在银柴胡中含量较少,这两种成分在植物中的含量普遍较低,但也具有重要的生物活性,糖脂在抗肿瘤、抗HIV、抗炎症、抗菌和增强机体免疫等方面具有生物活性;鞘脂具有抗癌、抑菌和低胆固醇等生物特性。因此,本研究对银柴胡脂质类成分的全面定性定量分析,对于银柴胡药用功能挖掘以及开发利用可能有重要帮助。

[0114] 综上,仅为本发明之较佳实施例,不以此限定本发明的保护范围,凡依本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰,皆为本发明专利涵盖的范围之内。

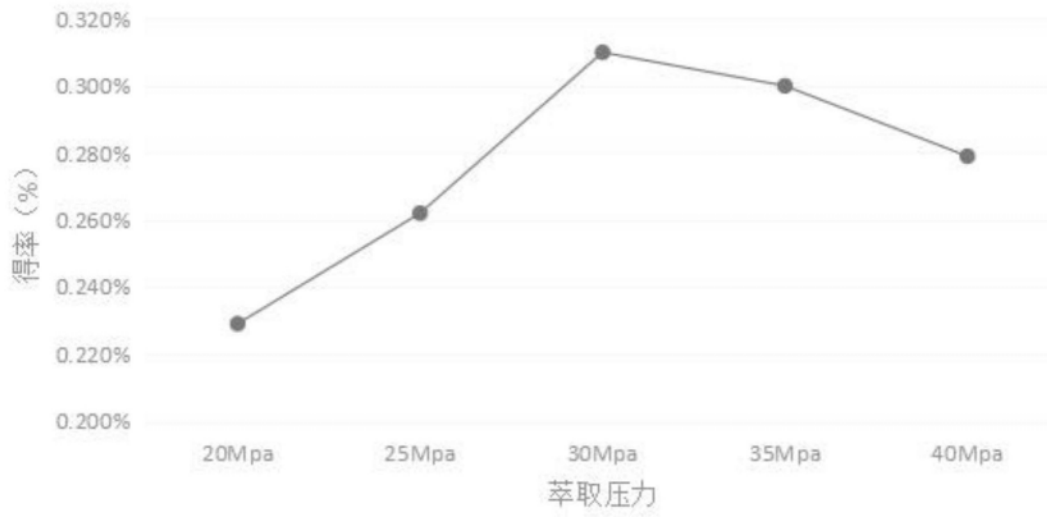


图1

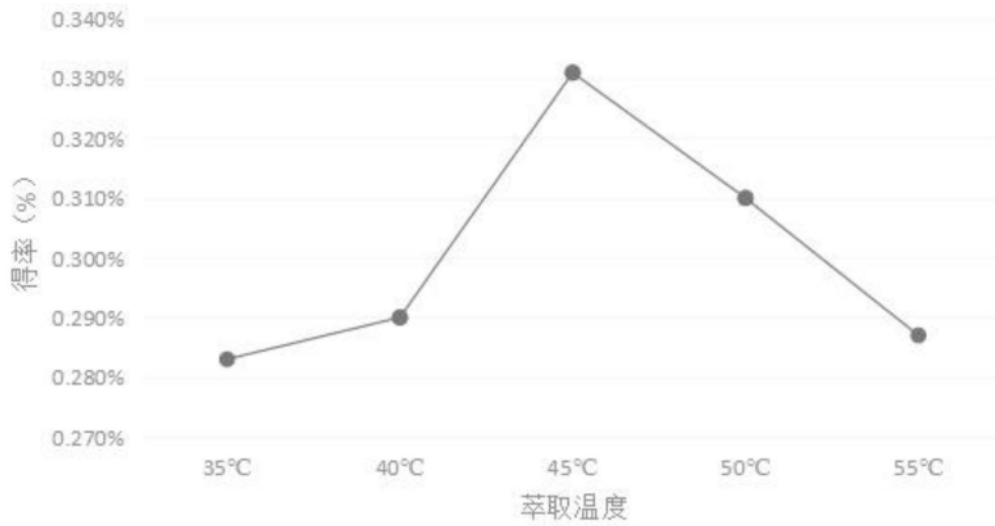


图2

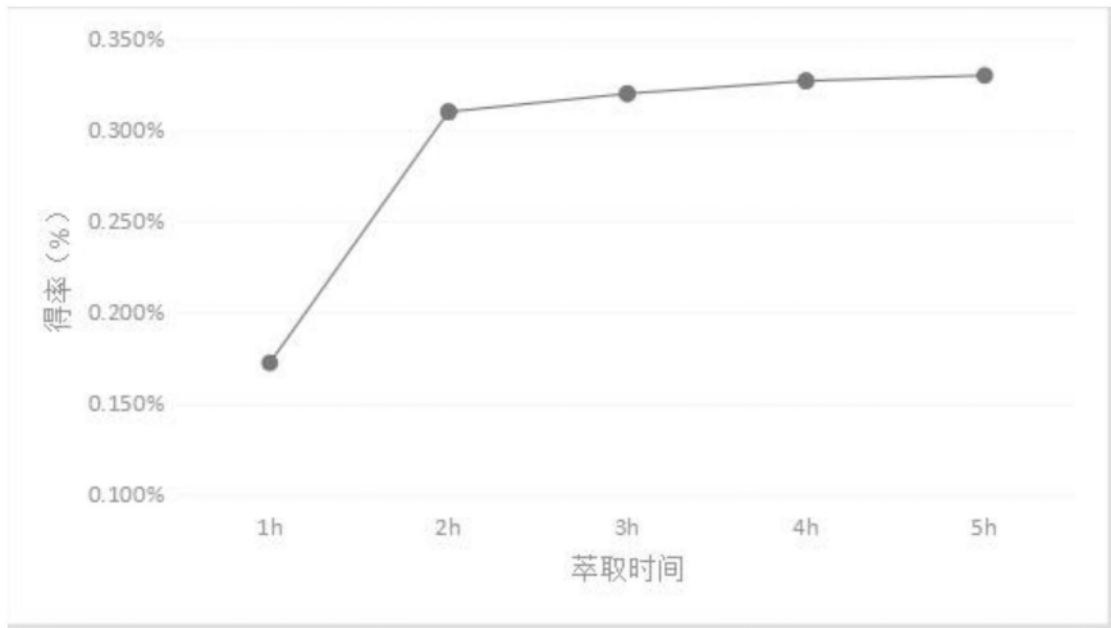


图3

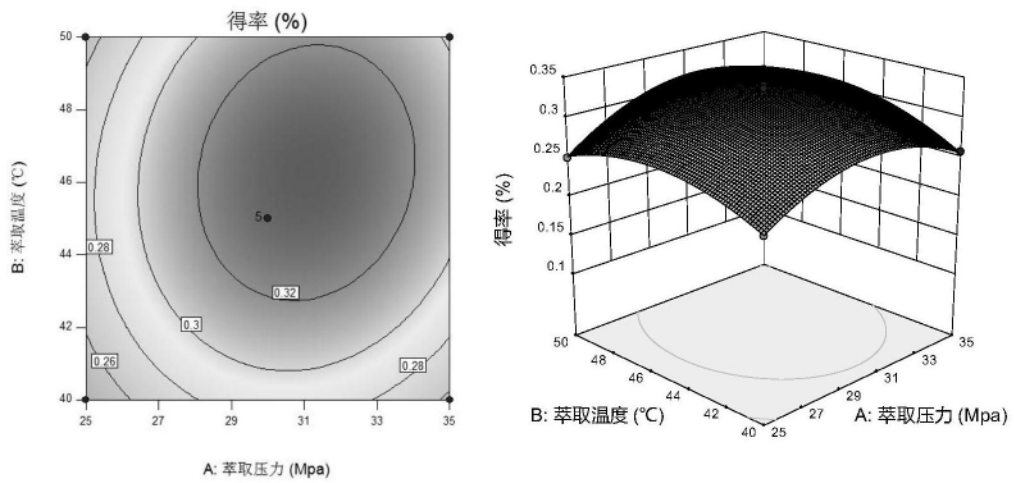


图4

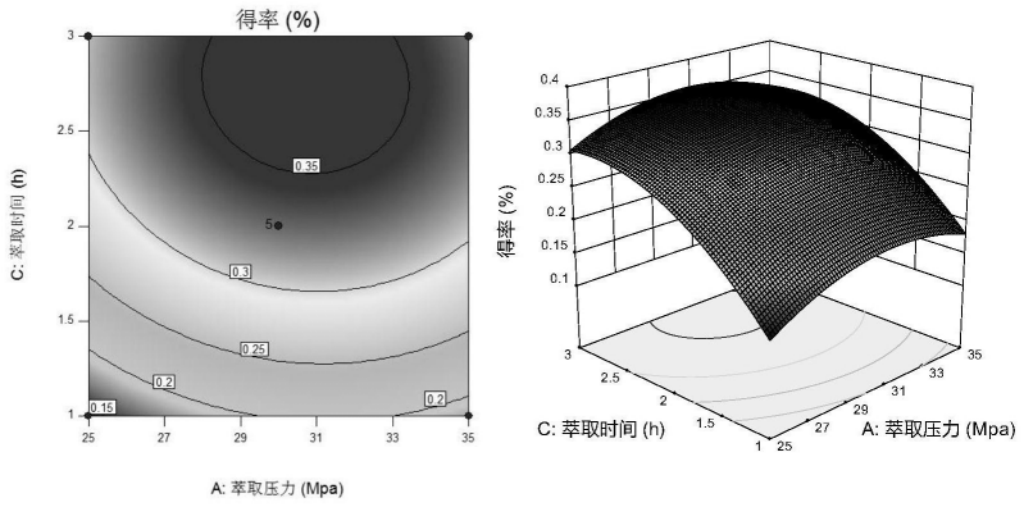


图5

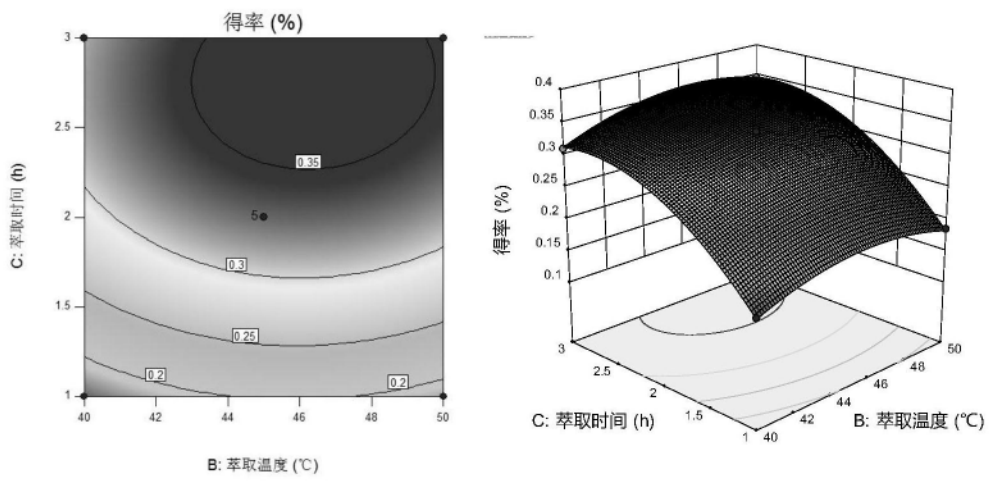


图6

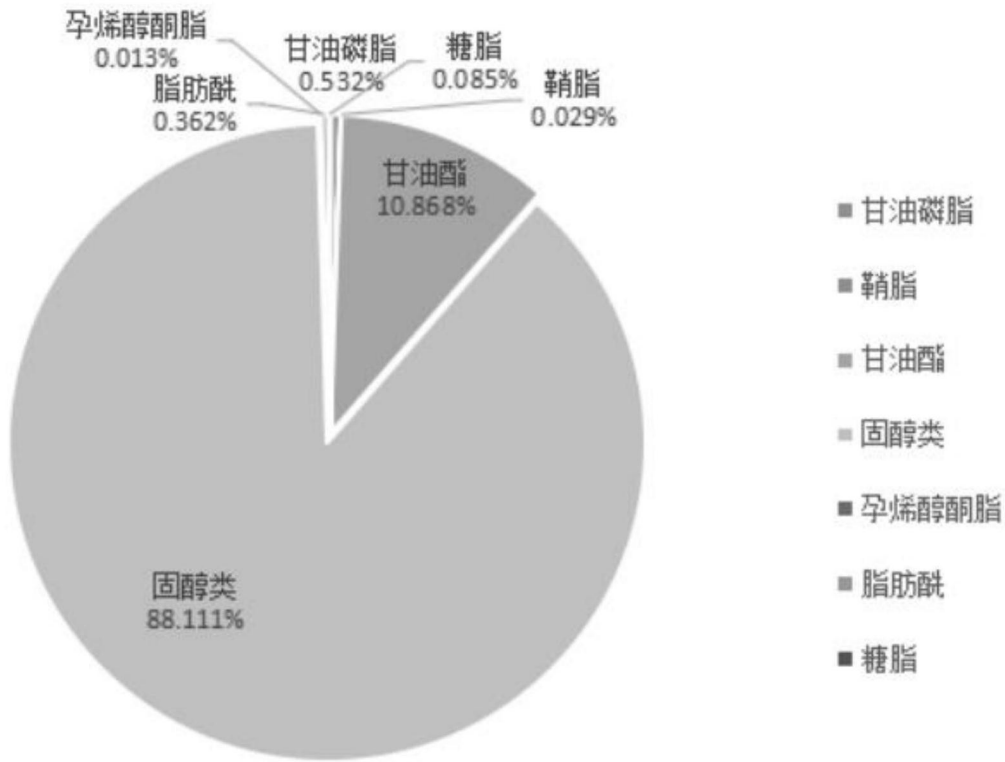


图7

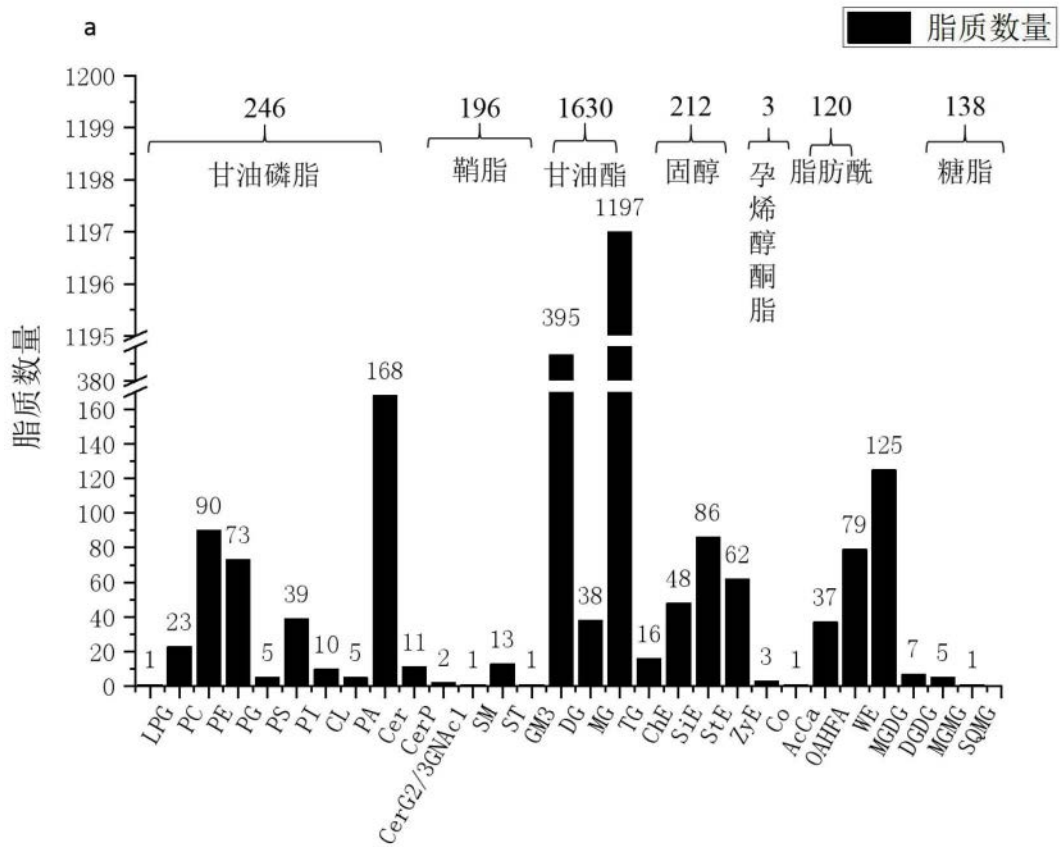


图8a

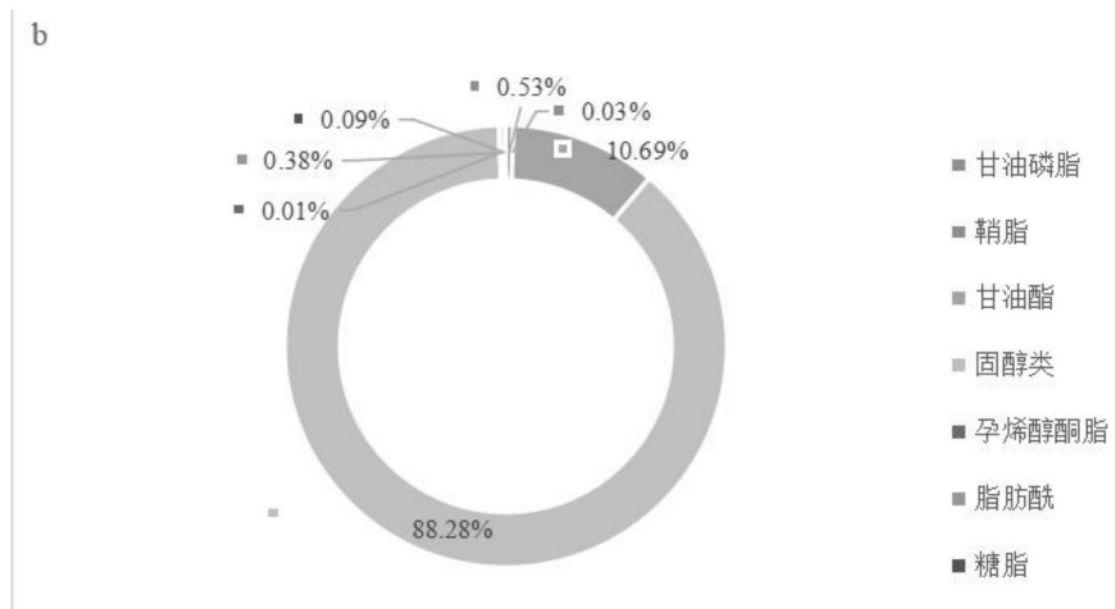


图8b

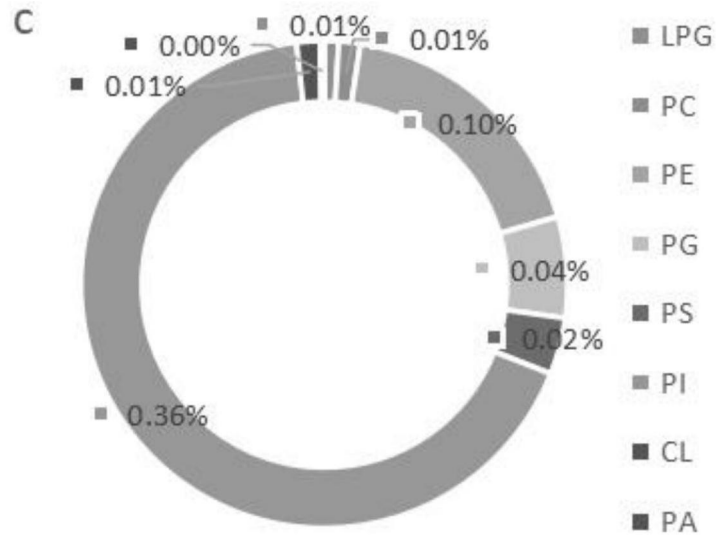


图8c

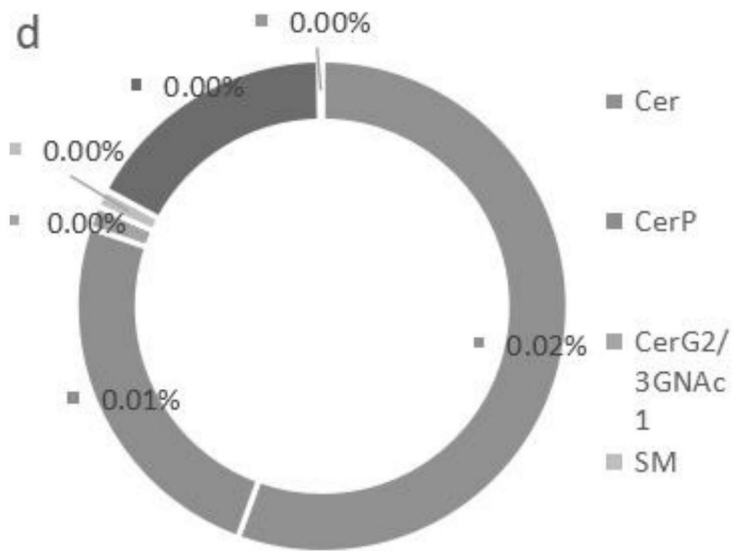


图8d

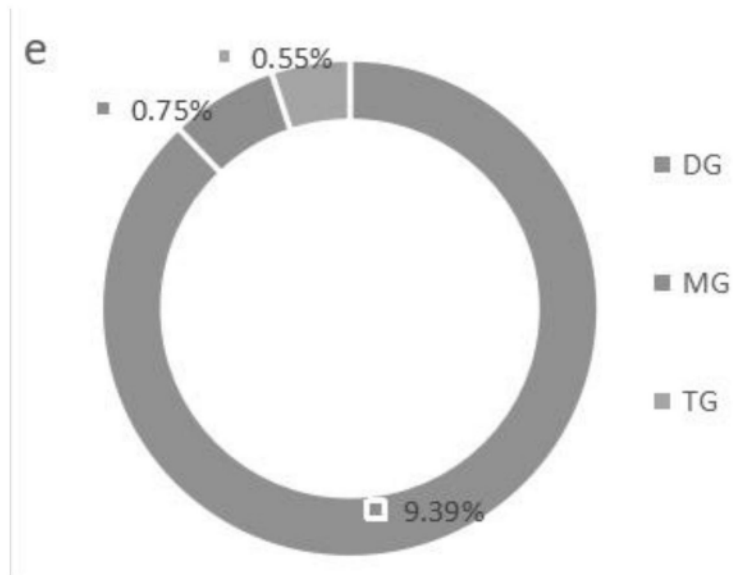


图8e

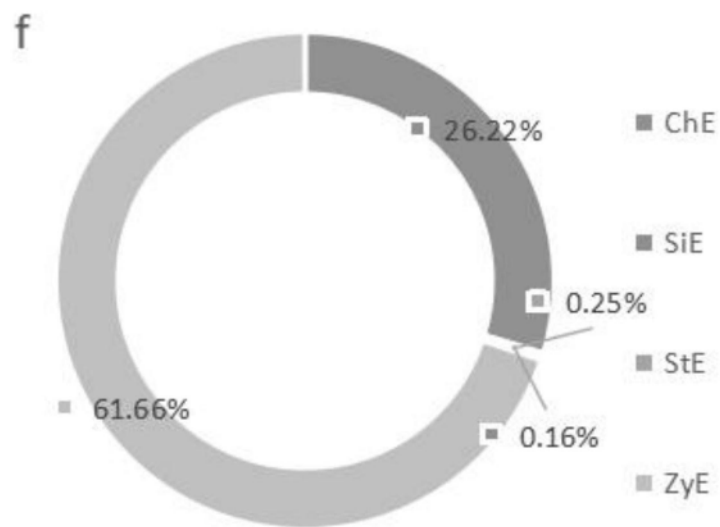


图8f

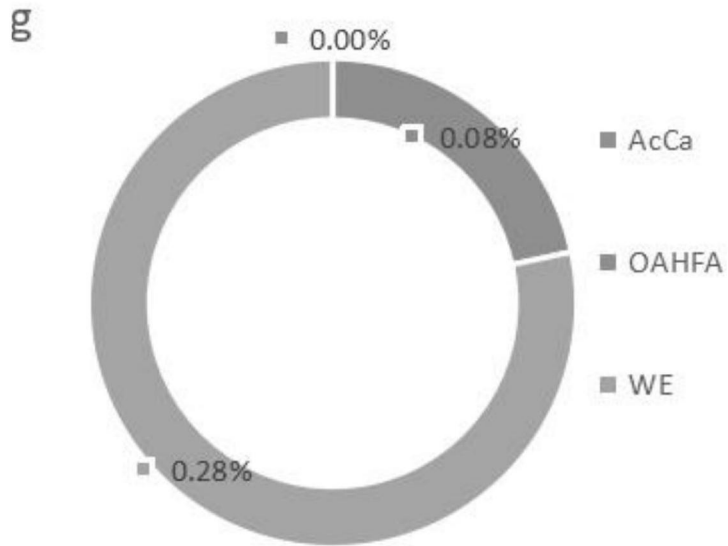


图8g

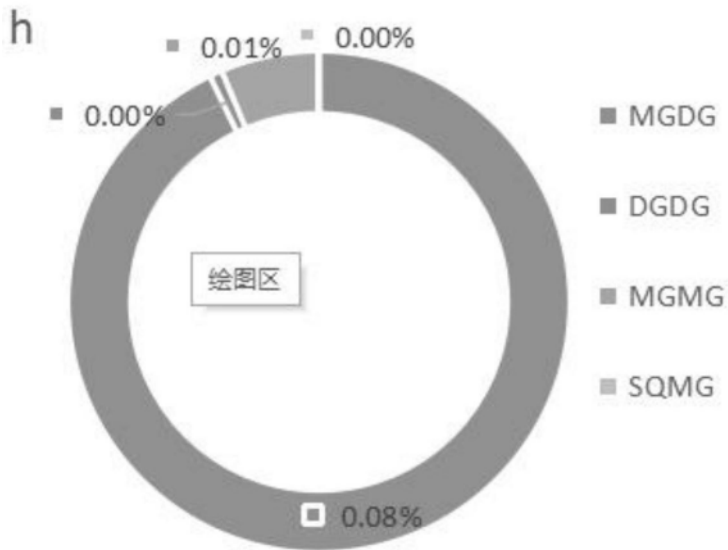


图8h

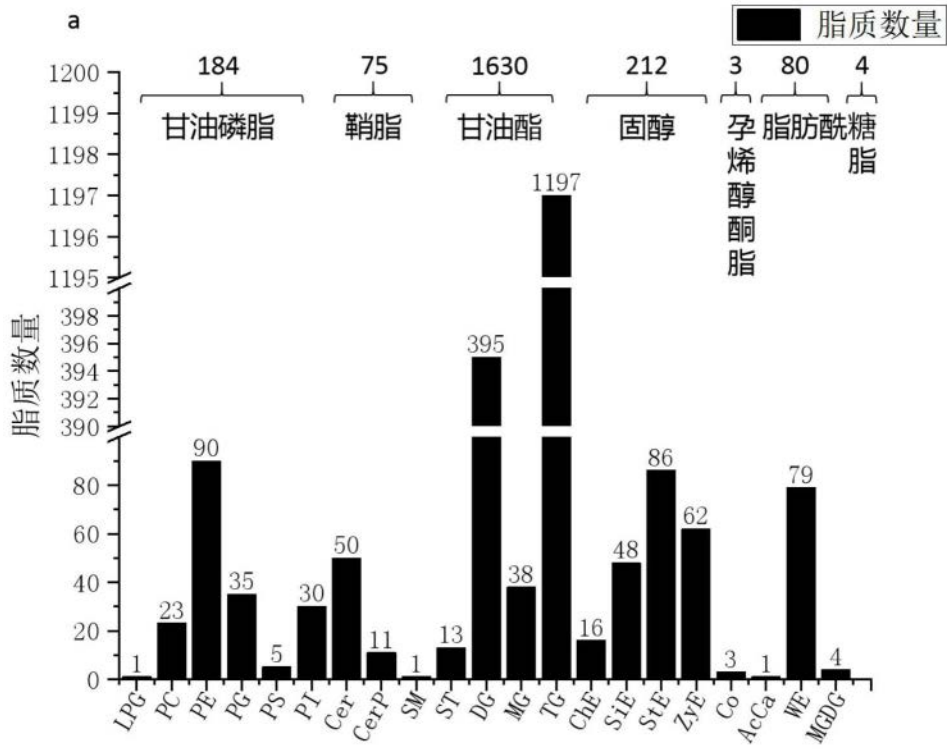


图9a

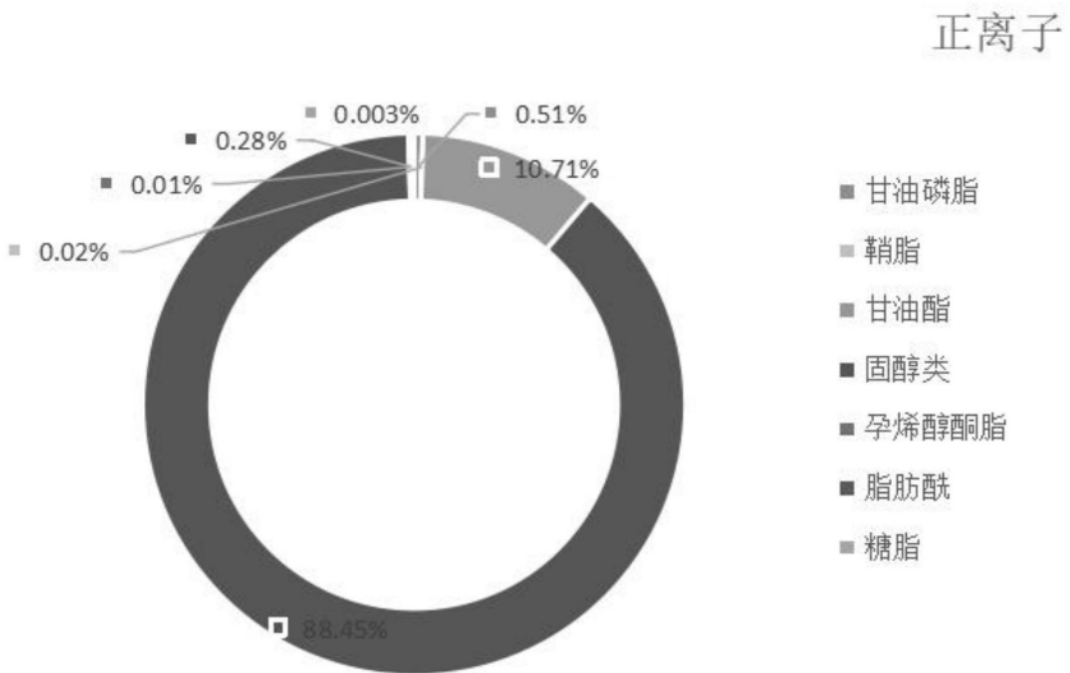


图9b

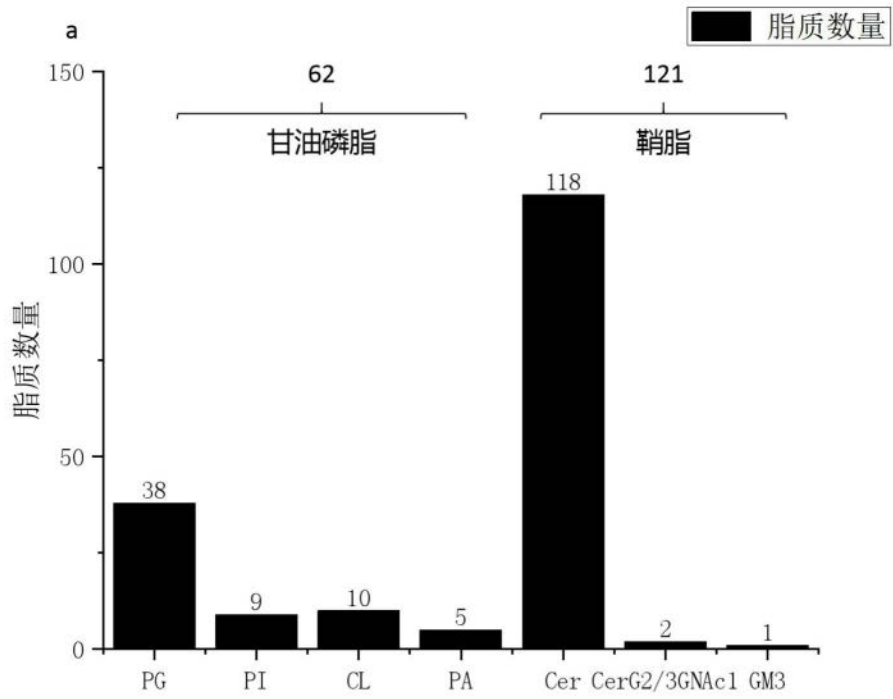


图10a

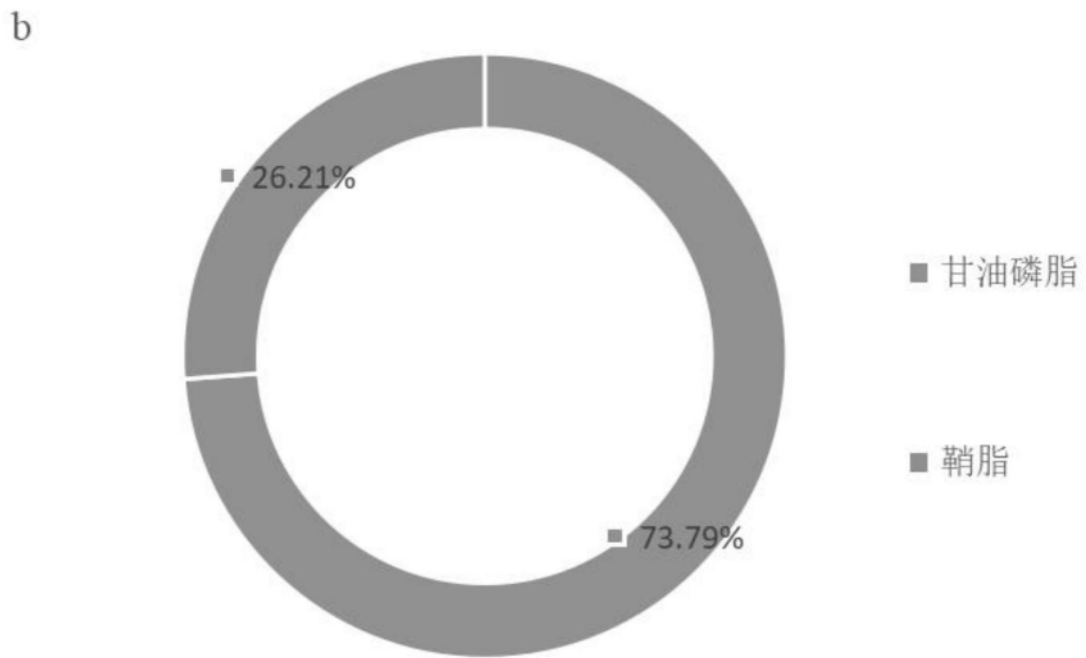


图10b