



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109534984 B

(45)授权公告日 2020.08.14

(21)申请号 201811566755.2 *C07C 51/47*(2006.01)
(22)申请日 2018.12.19 *C07C 51/48*(2006.01)
(65)同一申请的已公布的文献号 *C07C 59/52*(2006.01)
申请公布号 CN 109534984 A *A61P 19/06*(2006.01)
(43)申请公布日 2019.03.29 *A61P 3/10*(2006.01)
(73)专利权人 南京大学 *A61K 31/192*(2006.01)
地址 210023 江苏省南京市栖霞区仙林大 *A23L 33/105*(2016.01)
道163号 审查员 王影
(72)发明人 钦佩 张鹤云
(74)专利代理机构 南京艾普利德知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
32297
代理人 张铂
(51)Int.Cl.
C07C 51/42(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种利用互花米草制备对香豆酸的方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用互花米草制备对香豆酸的方法,将互花米草提取液经过乙酸乙酯萃取后取水相再使用正丁醇萃取,浓缩正丁醇相萃取液得到正丁醇相粗膏。将正丁醇相粗膏依次经过正相硅胶柱层析、ODS反相层析和凝胶柱层析,最后经过高效液相层析技术进行分离纯化,得到对香豆酸。本发明药理研究结果表明对香豆酸对高尿酸血症小鼠具有显著的降尿酸和降血糖效果。

1. 一种利用互花米草制备对香豆酸的方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 采集互花米草地上部分,用水浸提,浓缩,获取互花米草浓缩液,先经乙酸乙酯萃取后取水相再使用正丁醇萃取,浓缩正丁醇相萃取液得到正丁醇相粗膏;

(2) 将步骤(1)所得到正丁醇相粗膏采用正相硅胶柱层析进行分离,采用二氯甲烷/甲醇系统进行100:0~100梯度洗脱,收集二氯甲烷:甲醇体积比为 100 : 8 梯度下的洗脱液;

(3) 对步骤(2)的洗脱液采用 ODS 反相层析柱进行分离,流动相为体积比为 4:6的甲醇与水的混合溶液,收集洗脱液;

(4) 对步骤(3)的洗脱液采用凝胶柱层析进行分离,流动相为甲醇,收集洗脱液;

(5) 对步骤(4)的洗脱液采用反相高效液相进行分离,流动相为体积比为1:1的甲醇与水的混合溶液,等度洗脱,得到对香豆酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于步骤(2)将正丁醇相粗膏与硅胶填料拌样,干法上样,用二氯甲烷/甲醇体系进行洗脱,收集二氯甲烷:甲醇体积比为100 : 8 梯度下的洗脱液。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于步骤(2)将正丁醇相粗膏采用相同的层析条件进行两次正相硅胶柱层析。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于步骤(3)收集第 5个柱体积的洗脱液。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于步骤(4)采用葡聚糖凝胶柱层析。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤(5)采用 C18 反相高效液相制备柱,流速 2 ml/min,收集保留时间为 9.7 min 的产物即为对香豆酸。

7. 对香豆酸在制备降血尿酸功能产品中的用途,其特征在于所述对香豆酸采用如下方法制备而成:

(1) 采集互花米草地上部分,用水浸提,浓缩,获取互花米草浓缩液,先经过乙酸乙酯萃取后取水相再使用正丁醇萃取,浓缩正丁醇相萃取液得到正丁醇相粗膏;

(2) 将步骤(1)所得到正丁醇相粗膏采用正相硅胶柱层析进行分离,采用二氯甲烷/甲醇系统进行100:0~100梯度洗脱,收集二氯甲烷:甲醇体积比为 100 : 8 梯度下的洗脱液;

(3) 对步骤(2)的洗脱液采用 ODS 反相层析柱进行分离,流动相为甲醇与水的混合溶液,甲醇与水的体积比为 4:6,收集第 5 个柱体积的洗脱液;

(4) 对步骤(3)的洗脱液采用葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析进行分离,流动相为甲醇,收集洗脱液;

(5) 对步骤(4)的洗脱液采用反相高效液相进行分离,C18 反相高效液相制备柱,流动相为 50%的甲醇水溶液,流速2 ml/min,收集保留时间为 9.7 min 的产物即为对香豆酸。

8. 如权利要求7所述的用途,其特征在于所述功能产品为食品、保健品或者药物。

一种利用互花米草制备对香豆酸的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物源功能产品技术领域。具体涉及一种利用互花米草制备对香豆酸的方法以及该法制备得到的对香豆酸在制备降血尿酸功能产品中的用途。

背景技术

[0002] 对香豆酸(p-coumalic acid)化学名称为对-羟基肉桂酸,是羟基肉桂酸类化合物中最主要的一种。研究表明对香豆酸具有多种生理功能,例如抗氧化、抗菌、抗心血管疾病、抗突变等活性。目前,生产对香豆酸的方法有化学合成法、天然提取法和生物转化法。化学合成法是通过将对羟基苯甲醛和二酸反应得到对香豆酸。天然提取法多是通过碱解植物细胞壁来获得对香豆酸。而生物转化法是对香豆酸通过微生物酶转化而成。有文献报道可以从薏仁麸皮、甘蔗渣、玉米芯等农作物废料中提取对香豆酸,然而这些农作物都是一年生植物,其产量受生长周期和生长速度以及播种规模影响,作为对香豆酸的植物提取来源非常有限。

[0003] 互花米草(*Spartina alterniflora*)是禾本科多年生高秆型草本植物,原产于北美洲大西洋海岸,分布于北起纽芬兰南至佛罗里达中部及墨西哥湾沿岸的潮间带滩地和沼泽地。1979年末由南京大学仲崇信教授等人引入我国,旨在弥补先前引进的大米草(*Spartina anglica*)植株较矮、产量低、不便收割利用等不足。20世纪80-90年代在我国江苏、浙江、福建等地沿海引种成功,并逐步发展成大面积盐沼植被(现在发展为55 468hm²),为我国沿海地区保滩护岸、促淤造陆做出巨大贡献。但随着互花米草的生长蔓延和过度扩张,其负面作用逐步显现,影响了部分沿海地区的生物多样性,特别是滩涂水产养殖。为了实现了互花米草的资源化利用,兴利除弊,既创造经济效益,又产生很好的生态效益,以南京大学盐生植物实验室为代表的科研人员做了大量的研究开发工作,如在国际上解决了互花米草提取物的食用问题,取得卫生部新资源食品的批文(卫新食准字94第06号)。

发明内容

[0004] 本发明为探索互花米草提取物中的功能化合物的降尿酸等生物功效,对互花米草提取物生物矿质液进行了分离、纯化和鉴定,获得18个单体化合物,并对这些单体化合物的降尿酸活性进行了研究,结果表明利用互花米草可以制备得到对香豆酸,该方法制备得到的对香豆酸具有降血尿酸活性。

[0005] 本发明具体技术方案如下:

[0006] 一种利用互花米草制备对香豆酸的方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 采集互花米草地上部分,用水浸提,浓缩,获取互花米草浓缩液,先经过乙酸乙酯萃取后取水相再使用正丁醇萃取,浓缩正丁醇相萃取液得到正丁醇相粗膏;

[0008] (2) 将步骤(1)所得正丁醇相粗膏采用正相硅胶柱层析进行分离,采用二氯甲烷/甲醇系统进行100:0~100梯度洗脱,收集二氯甲烷:甲醇体积比为100:8梯度下的洗脱液;

[0009] (3) 对步骤(2)的洗脱液采用ODS反相层析柱进行分离,流动相为甲醇与水的混合溶液,收集洗脱液;

[0010] (4) 对步骤(3)的洗脱液采用凝胶柱层析进行分离,流动相为甲醇,收集洗脱液;

[0011] (5) 对步骤(4)的洗脱液采用反相高效液相进行分离,流动相为甲醇与水的混合溶液,等度洗脱,得到对香豆酸。

[0012] 本发明所述方法,步骤(2)优选将正丁醇相粗膏与硅胶填料拌样,干法上样,用二氯甲烷/甲醇体系进行洗脱,收集二氯甲烷:甲醇体积比为100:8梯度下的洗脱液。更优选的,将正丁醇相粗膏采用相同的层析条件进行两次正相硅胶柱层析。

[0013] 本发明所述方法,步骤(3)优选甲醇与水的体积比为4:6,收集第5个柱体积的洗脱液。

[0014] 本发明所述方法,步骤(4)优选采用葡聚糖凝胶柱层析,优选Sephadex LH-20。

[0015] 本发明所述方法,步骤(5)优选采用C18反相高效液相制备柱,流动相为50%的甲醇水溶液,流速2ml/min,收集保留时间为9.7min的产物即为对香豆酸。

[0016] 本发明另一目的在于提供本发明所述方法制得的对香豆酸在制备降尿酸功能产品中的用途。所述功能产品为食品、保健品或者药物。

[0017] 本发明对高尿酸血症小鼠血尿酸水平的测定显示,对香豆酸降尿酸效果显著,阳性对照苯溴马隆效果不显著。对高尿酸血症小鼠血糖水平的测定显示,对香豆酸降血糖效果非常显著,阳性对照苯溴马隆效果不显著。对高尿酸血症小鼠血清肌酐水平的测定显示,对香豆酸组和米草精粉组降肌酐效果非常显著,其他各试验组和苯溴马隆组效果显著。对高尿酸血症小鼠血清总蛋白水平的测定显示,各试验组和苯溴马隆组血清总蛋白水平的恢复效果都非常显著,尤以对香豆酸和去糖米草精粉组血清总蛋白非常接近生理盐水组的正常水平。

[0018] 本发明优点:

[0019] (1) 互花米草为多年生草本,单株一年内可繁殖几十甚至上百株,相较于一年生农作物而言,不需要频繁播种,维护、种植成本低,产量高,作为对香豆酸的植物提取来源具有不可比拟的优势;

[0020] (2) 本发明所述方法制得的互花米草对香豆酸,HPLC液相纯度为95%,其中还含有其它活性成分,本发明药理研究结果表明本发明制得的对香豆酸相较于市售对香豆酸对高尿酸血症小鼠具有更显著的降尿酸和降血糖效果。

附图说明

[0021] 图1为互花米草活性成分分离流程图。

[0022] 图2为本发明方法制得对香豆酸的LC-MS图。

[0023] 图3为本发明方法制得对香豆酸的¹H NMR (400MHz) 图 (Acetone-d₆)。

[0024] 图4为本发明方法制得对香豆酸的¹³C NMR spectrum (400MHz) 图 (Methanol-d₄)。

具体实施方式

[0025] 以下通过实施例说明本发明的具体步骤,但不受实施例限制。

[0026] 在本发明中所使用的术语,除非另有说明,一般具有本领域普通技术人员通常理

解的含义。

[0027] 下面结合具体实施例并参照数据进一步详细描述本发明。应理解,这些实施例只是为了举例说明本发明,而非以任何方式限制本发明的范围。

[0028] 在以下实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。

[0029] 实施例1互花米草活性成分的研究

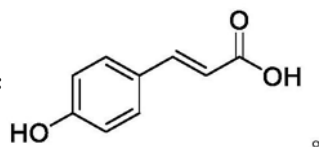
[0030] 采集互花米草地上部分100kg,晒干、切割成2~3cm长,加20倍热水浸提,浓缩提取液为深棕色液体(10kg左右)。

[0031] 也可参考专利申请号201510266409.2公开的技术方案制得互花米草精粉,溶于纯净水中,配置成1:10的样品母液(水溶液,其中总皂苷含量>6.0%)。本发明使用的米草精粉购自于江苏海力发生物科技有限公司。

[0032] 取互花米草浓缩液2500g,先用等体积乙酸乙酯萃取萃取3遍,取有机相减压旋蒸浓缩,得到乙酸乙酯相粗膏113.8g,合并水相再用等体积正丁醇萃取3遍,减压旋蒸浓缩,得到正丁醇相粗膏159.6g。

[0033] 对上述乙酸乙酯相粗膏和正丁醇相粗膏进行硅胶柱层析粗分,分别以石油醚/乙酸乙酯(v/v 100:0、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1,each 2500ml)和CH₂Cl₂/MeOH(v/v 100:0、100:1、100:2、100:4、100:8、100:16、100:32和1:1,each 2500ml)作为流动相梯度洗脱,根据TLC薄层层析结果合并相似组分,合并得到乙酸乙酯相的9个组分和正丁醇相的10个组分,再将各个组分再经过硅胶柱层析,ODS反相层析,凝胶柱层析进一步分离,最后经过高效液相层析技术进行分离纯化,最终得到18个单体化合物。具体分离流程见图1,图1中化合物12即为对香豆酸,根据高分辨质谱推测其分子量为164,分子式为C₉H₈O₃,计算可知其不饱和

度为6,结构为:



[0034] 对香豆酸具体制备过程如下:

[0035] 取53.2g正丁醇相粗膏与等质量的硅胶材料拌样。待样品与硅胶充分接触并挥发去除甲醇后,用干法上样。第一遍的粗分采用正相硅胶分离方法,称取拌样硅胶10倍质量的硅胶作为分离柱,选择的硅胶柱的内径r为6.5cm,计算的分离柱体积为4378ml。完成装柱后,用二氯甲烷/甲醇体系进行洗脱,依次使用二氯甲烷/甲醇(v/v)为100:0、100:1、100:2、100:4、100:8、100:16、100:32和1:1比例各洗脱2500ml,收集100:8梯度下的洗脱液,真空浓缩获得该段提取膏子3.9g。再对该段提取物进行细分,采用同样的正相分离。此次采用硅胶柱内径r为1.8cm,柱体积为264ml。用相同的洗脱体系收集二氯甲烷:甲醇=100:8比例下的洗脱液,膏子量为1.33g。该段膏子用ODS反相层析柱进行分离(柱内径1cm,柱体积110ml),用甲醇:水(v/v)为4:6的体系洗脱,收集第5个柱体积的洗脱液,膏子量为0.64g。接着使用葡聚糖凝胶柱层析法(Sephadex LH-20)对该化合物进行液相制备前的除杂(柱内径1cm,柱体积141.3ml),采用甲醇进行洗脱,最终获得膏子量为0.36g。该段膏子进行高效液相制备,采用碳十八的液相制备柱(Eclipse XDB-C18, 5μm, 9.4×250mm),用甲醇:水(v/v)1:1等度洗脱,流速2ml/min,收集保留时间9.7min的洗脱峰,制备获得对香豆酸(纯度95%以上),共得41.0mg。

[0036] 实施例2互花米草提取物及对香豆酸降尿酸的动物试验

[0037] 一、实验材料

[0038] 1、动物:20-25克雄性昆明种小白鼠,60只

[0039] 2、造模剂:次黄嘌呤

[0040] 3、阳性药:苯溴马隆

[0041] 4、拟阳性药:米草精粉、去糖米草精粉

[0042] 5、阴性药剂:生理盐水

[0043] 6、试验药剂:米草提取物中分离鉴定的对香豆酸

[0044] 7、溶剂:羧甲基纤维素钠-CMC-Na

[0045] 8、注射器:1ml、5ml

[0046] 9、离心管:1.5ml、2ml、5ml

[0047] 10、采血用毛细血管

[0048] 11、饲喂器:平头9#针头

[0049] 二、测试仪器

[0050] 贝克曼LX20全自动生化分析仪

[0051] 三、实验方案

[0052] 1、试剂配制:

[0053] (1) 0.8% CMC-Na (羧甲基纤维素钠) 的配制:称取2.4克CMC-Na,先用少量纯净水调成湖状,再用纯净水定容至300ml,倒入烧杯中煮沸使其完全溶解,然后再倒进容量瓶,用纯净水补足至300ml。

[0054] (2) 50mg/ml次黄嘌呤的配制:称取1g次黄嘌呤,溶于20ml CMC-Na溶液中。

[0055] (3) 0.5mg/ml苯溴马隆配制:称取20mg苯溴马隆,溶于40ml CMC-Na溶液中,使之浓度为0.5mg/ml。

[0056] (4) 拟阳性药米草精粉配制:

[0057] 准确称取米草精粉1g,用上述CMC-Na溶液将米草精粉(按总皂苷含量5.7%计)配制成4.5mg/ml剂量试液。

[0058] (5) 拟阳性药去糖米草精粉配制:

[0059] 称取米草精粉2g,用20ml70%乙醇沉淀并过滤去除米草精粉的多糖,浓缩制成去糖米草精粉浸膏,再用上述CMC-Na溶液将去糖米草精粉浸膏按总皂苷含量5.7%计,配制成4.5mg/ml的剂量试液。

[0060] (6) 试验药剂配制:20mg对香豆酸,溶于40ml CMC-Na溶液中,浓度为0.5mg/ml。

[0061] 2、模型动物试验组别设计:

[0062] (1) 空白对照组(生理盐水)10只动物

[0063] (2) 模型组(CMC-Na)10只动物

[0064] (3) 米草精粉组(4.5mg/ml)10只动物

[0065] (4) 去糖米草精粉组(4.5mg/ml)10只动物

[0066] (5) 对香豆酸组(0.5mg/ml)10只动物

[0067] (6) 苯溴马隆组(0.5mg/ml)10只动物

[0068] 四、实验方法:

[0069] 对各组受试动物每天给药一次(每天给药前称体重),连续给药7天,各动物组实验

方法:对1、3、4、5、6组动物分别进行胃内给药(i.g.),模型组胃内(ig)给CMC-Na;具体情况如下:

- | | | |
|--------|-----------------|----------------|
| | (1) 空白对照组(生理盐水) | i.g 0.1ml/10g |
| | (2) 模型组(CMC-Na) | i.g 0.1ml/10g |
| [0070] | (3) 米草精粉组 | i.g. 0.1ml/10g |
| | (4) 去糖米草精粉组 | i.g. 0.1ml/10g |
| | (5) 对香豆酸组 | i.g. 0.1ml/10g |
| | (6) 苯溴马隆组 | i.g. 0.1ml/10g |

[0071] 第8天最后一次给药30min后,除生理盐水组,其他各组,腹腔(i.p.)注射已配制的50mg/ml次黄嘌呤,按剂量1000mg/kg体重给药,在给药后30-40min,立刻摘除眼球采血,置离心管中,在室温下,待血清渗出,取出离心(15000rpm,4min),吸取上层血清置带盖的样品管中,根据所得血清体积,全部用生理盐水配制到所需体积,在贝克曼LX20全自动生化分析仪上测定血尿酸、血糖、尿素氮、肌酐、总胆固醇、甘油三酯、总蛋白、谷丙转氨酶等指标。

[0072] 所有数据经Spss11.5软件包处理,采用单因素方差分析,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

[0073] 五、实验结果

[0074] 5.1实验鼠血尿酸测定结果

[0075] 经测试,试验样品及两个米草精粉组(包括去糖米草精粉组)都有不同程度的对高尿酸血症小鼠血清尿酸水平降低的影响,而且在本实验设计范围内,对香豆酸组效果显著,阳性对照苯溴马隆组效果不显著(表1)。

[0076] 表1试验样品对实验小鼠血尿酸的影响(μM)

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
	生理盐水组		127.68±21.63		
	CMC 模型组	0.8%	695.25±64.37		
[0077]	对香豆酸组	0.5mg/ml	505.2±20.93	0.038*	与 CMC 组比
	米草精粉组	4.5mg/ml	531.04±74.93	0.065	与 CMC 组比
	米草去糖组	4.5mg/ml	537.31±67.92	0.074	与 CMC 组比
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	602.80±87.8	0.171	与 CMC 组比

[0078] 注:* $P < 0.05$,表示差异显著。

[0079] 5.2实验鼠血糖测定结果

[0080] 经测试,试验样品及两个米草精粉组(包括去糖米草精粉组)都有不同程度的对高尿酸血症小鼠血糖水平降低的影响,而且在本实验设计范围内,对香豆酸组效果非常显著,阳性对照苯溴马隆组效果不显著(表2)。

[0081] 表2试验样品对实验小鼠血糖的影响(mM)

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
[0082]	生理盐水组		7.66±1.32		
	CMC 模型组	0.8%	10.18±2.4		
	香豆素组	0.5mg/ml	7.39±1.22	0.011**	与 CMC 组比
	米草精粉组	4.5mg/ml	9.18±1.73	0.23	与 CMC 组比
	米草去糖组	4.5mg/ml	8.83±1.78	0.17	与 CMC 组比
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	9.03±1.18	0.19	与 CMC 组比

[0083] 5.3实验鼠尿素氮测定结果

[0084] 经测试,试验样品及两个米草精粉组(包括去糖米草精粉组)都有不同程度的对高尿酸血症小鼠血清尿素氮水平降低的影响,而且在本实验设计范围内,对香豆酸组效果显著,阳性对照苯溴马隆组效果非常显著,两个米草精粉组效果极其显著(表3)。

[0085] 表3试验样品对实验小鼠尿素氮的影响(mM)

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
[0086]	生理盐水组		5.59±0.89		
	CMC 模型组	0.8%	8.74±0.60		
	香豆素组	0.5mg/ml	7.72±0.84	0.031*	与 CMC 组比
	米草精粉组	4.5mg/ml	5.83±0.49	5.11E-07***	与 CMC 组比
	米草去糖组	4.5mg/ml	6.46±0.65	5.51E-05***	与 CMC 组比
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	7.33±0.65	0.003**	与 CMC 组比

[0087] 注:*P<0.05,表示差异显著,**P<0.01,表示差异非常显著,***P<0.001,表示差异极其显著,以下各表同此。

[0088] 5.4实验鼠肌酐测定结果

[0089] 经测试,试验样品及两个米草精粉组(包括去糖米草精粉组)都有不同程度的对高尿酸血症小鼠血清肌酐水平降低的影响,而且在本实验设计范围内,对香豆酸组和米草精粉组效果非常显著,苯溴马隆组效果显著,各试验组血清肌酐都接近生理盐水组的正常水平(表4)。

[0090] 表4试验样品对实验小鼠肌酐的影响(mM)

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
[0091]	生理盐水组		19.65±3.29		
	CMC 模型组	0.8%	25.3±4.43		
	对香豆酸组	0.5mg/ml	19.06±1.41	0.004**	与 CMC 组比
	米草精粉组	4.5mg/ml	19.38±5.03	0.044**	与 CMC 组比
	米草去糖组	4.5mg/ml	19.53±5.24	0.037*	与 CMC 组比
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	20.51±3.77	0.043*	与 CMC 组比

[0092] 5.5实验鼠总胆固醇测定结果

[0093] 经测试,试验样品及两个米草精粉组(包括去糖米草精粉组)都有不同程度的对高尿酸血症小鼠血清总胆固醇水平降低的影响,而且在本实验设计范围内,对香豆酸组效果非常显著,苯溴马隆组效果显著(表5)。

[0094] 表5试验样品对实验小鼠总胆固醇的影响(mM)

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
[0095]	生理盐水组		4.12±0.52		
	CMC 模型组	0.8%	4.14±0.17		
	香豆素组	0.5mg/ml	3.68±0.43	0.009**	与 CMC 组比
	米草精粉组	4.5mg/ml	3.71±0.53	0.04*	与 CMC 组比
	米草去糖组	4.5mg/ml	3.74±0.44	0.035*	与 CMC 组比
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	3.79±0.43	0.038*	与 CMC 组比

[0096] 5.6实验鼠甘油三酯测定结果

[0097] 经测试,试验样品各组都有不同程度的对高尿酸血症小鼠血清甘油三酯水平降低的影响(表6)。

[0098] 表6试验样品对实验小鼠甘油三酯的影响(mM)

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
[0099]	生理盐水组		2.15±0.38		
	CMC 模型组	0.8%	2.34±0.48		
	对香豆酸组	0.5mg/ml	1.84±0.24	0.015*	与 CMC 组比
	米草精粉组	4.5mg/ml	1.57±0.24	0.0009***	与 CMC 组比
	米草去糖组	4.5mg/ml	1.98±0.16	0.05*	与 CMC 组比
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	1.72±0.23	0.007**	与 CMC 组比

[0100] 5.7实验鼠总蛋白测定结果

[0101] 经测试,高尿酸血症小鼠血清总蛋白显著下降,试验样品及两个米草精粉组(包括去糖米草精粉组)都有不同程度的对高尿酸血症小鼠血清总蛋白水平升高的影响,而且在本实验设计范围内,各试验组和苯溴马隆组效果都非常显著,尤以对香豆酸组和去糖米草精粉组血清总蛋白非常接近生理盐水组的正常水平(表7)。

[0102] 表7试验样品对实验小鼠总蛋白的影响(g/L)

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
[0103]	生理盐水组		50.57±1.95		
	CMC 模型组	0.8%	38.84±8.84		
	对香豆酸组	0.5mg/ml	50.11±3.58	0.003**	与 CMC 组比
	米草精粉组	4.5mg/ml	48.57±2.53	0.002**	与 CMC 组比
	米草去糖组	4.5mg/ml	50.11±2.37	0.002**	与 CMC 组比
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	48.60±4.30	0.009**	与 CMC 组比

[0104] 5.8实验鼠谷丙转氨酶测定结果

[0105] 经测试,试验样品及两个米草精粉组(包括去糖米草精粉组)都有不同程度的对高尿酸血症小鼠血清谷丙转氨酶水平降低的影响,而且在本实验设计范围内,两个米草精粉组效果显著,其谷丙转氨酶非常接近生理盐水组的正常水平(表8)。

[0106] 表8试验样品对实验小鼠谷丙转氨酶的影响(U/L)

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
[0107]	生理盐水组		39.3±7.69		
	CMC 模型组	0.8%	54.27±15.09		
	对香豆酸组	0.5mg/ml	50.71±11.32	0.36	与 CMC 组比
	米草精粉组	4.5mg/ml	37.51±4.36	0.026*	与 CMC 组比
	米草去糖组	4.5mg/ml	39.47±8.01	0.050*	与 CMC 组比
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	40.58±6.38	0.069	与 CMC 组比

[0108] 5.9实验鼠体重测定结果

[0109] 经测试,试验各组(包括生理盐水组、CMC组和苯溴马隆组)喂养7天后体重均有增加,而且在本实验设计范围内,各组动物增重的水平差异不大(表8)。

[0110] 表9试验药剂对实验鼠体重的影响(g)

	组别	剂量	第 1 天体重	第 8 天体重	增重
[0111]	生理盐水组		25.5±0.9	30.8±1.9	5.3
	CMC 模型组	0.8%	25.6±1.4	30.8±1.3	5.2
	对香豆酸组	0.5mg/ml	24.1±1.2	29.5±1.7	5.4
	米草精粉组	4.5mg/ml	25.8±0.9	30.2±1.3	4.4
	米草去糖组	4.5mg/ml	25.1±0.9	29.7±1.5	4.6
	苯溴马隆组	0.5mg/ml	23.9±1.0	29.6±1.4	5.7

[0112] 注:各组增重比较,没有显著差异。

[0113] 实施例3本发明所述方法制备的对香豆酸与市售品降血尿酸效果的对比试验

[0114] 参照实施例2的方法考察本发明所述方法制备的对香豆酸与市售对香豆酸(购自于上海源叶生物科技有限公司)降血尿酸效果,结果如表10所示。

[0115] 本发明制得的对香豆酸0.5mg/ml剂量组和市售对香豆酸组0.75mg/ml剂量组都能够降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平,而市售对香豆酸组相同剂量0.5mg/ml组不能够降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平(表10)。这表明本发明对香豆酸降高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的活性高于市售对香豆酸。

[0116] 表10试验样品对实验小鼠血尿酸(UA)的影响

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
[0117]	生理盐水组		103.71±14.86		
	CMC 模型组	0.8%	770.07±186.57	4.29E-07***	与生理盐水组比
	本发明对香豆酸组	0.5mg/ml	542.42±102.07	0.032*	与 CMC 组比
	市售对香豆酸组	0.5mg/ml	600.36±164.49	0.106	与 CMC 组比
	市售对香豆酸组	0.75mg/ml	539.92±123.24	0.022*	与 CMC 组比
	市售对香豆酸组	1mg/ml	569.66±131.05	0.069	与 CMC 组比
	别嘌醇组	0.5mg/ml	29.33±14.71	1.21E-07***	

[0118] 注:*P<0.05表示明显差异;**P<0.01表示显著性差异;***P<0.001表示非常显著性差异

[0119] 本发明制得的对香豆酸0.5mg/ml剂量组和市售对香豆酸组0.75mg/ml和1mg/ml剂量组都能够降低高尿酸血症小鼠血清肌酐水平,而市售对香豆酸组相同剂量0.5mg/ml组不能够降低高尿酸血症小鼠血清肌酐水平(表11)。这表明本发明对香豆酸降高尿酸血症小鼠血清肌酐水平的活性高于市售对香豆酸。

[0120] 表11试验样品对实验小鼠肌酐 (CREA) 的影响

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
	生理盐水组		18.27±1.93		
[0121]	CMC 模型组	0.8%	21.96±0.91	0.0005***	与盐水比
	本发明对香豆酸组	0.5mg/ml	20.73±1.32	0.045*	与 CMC 比
	市售对香豆酸组	0.5mg/ml	23.33±2.16	0.085	与 CMC 比
	市售对香豆酸组	0.75mg/ml	19.59±2.38	0.027*	与 CMC 比
	市售对香豆酸组	1mg/ml	19.68±1.00	0.001**	与 CMCM 比
	别嘌醇组	0.5mg/ml	22.66±3.65	0.325	与 CMC 比

[0122] 注：*P<0.05表示明显差异；**P<0.01表示显著性差异；***P<0.001表示非常显著性差异

[0123] 经测试，本发明制得的对香豆酸0.5mg/ml剂量组和市售对香豆酸组0.75mg/ml和1mg/ml剂量组都能够降低高尿酸血症小鼠血清总胆固醇水平，而市售对香豆酸组相同剂量0.5mg/ml组不能够降低高尿酸血症小鼠血清总胆固醇水平(表12)。这表明本发明对香豆酸降高尿酸血症小鼠血清总胆固醇水平的活性高于市售对香豆酸。

[0124] 表12试验样品对实验小鼠总胆固醇 (CHOL) 的影响

	组别	剂量	平均值±标准差	P 值	备注
	生理盐水组		3.77±0.53		
[0125]	CMC 模型组	0.8%	3.43±0.27	0.106	与盐水比
	本发明对香豆酸组	0.5mg/ml	3.19±0.18	0.017*	与盐水比
	市售对香豆酸组	0.5mg/ml	3.72±0.31	0.429	与盐水比
	市售对香豆酸组	0.75mg/ml	3.24±0.19	0.034*	与盐水比
	市售对香豆酸组	1mg/ml	3.29±0.34	0.035*	与盐水比
	别嘌醇组	0.5mg/ml	3.21±0.19	0.014*	与盐水比

[0126] 注：*P<0.05表示明显差异；**P<0.01表示显著性差异；***P<0.001表示非常显著性差异。

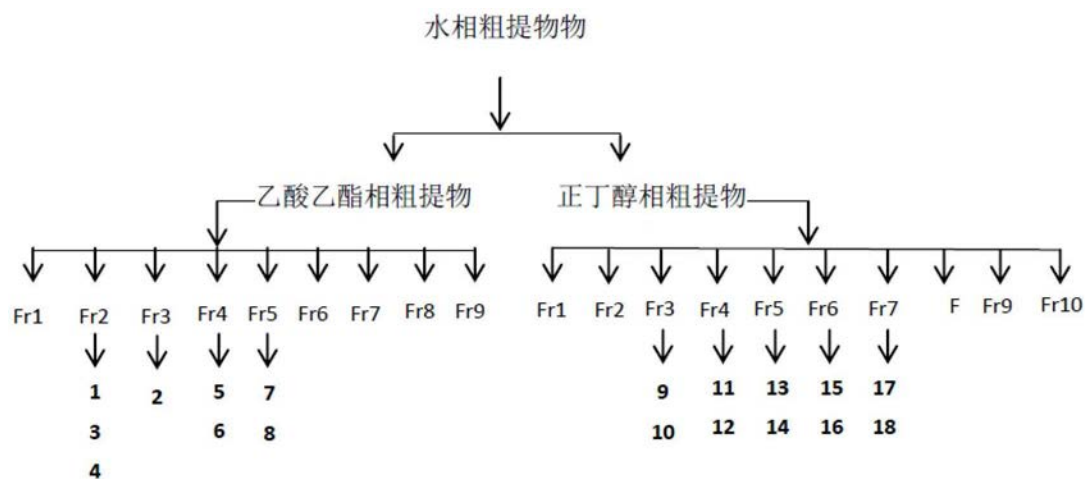


图1

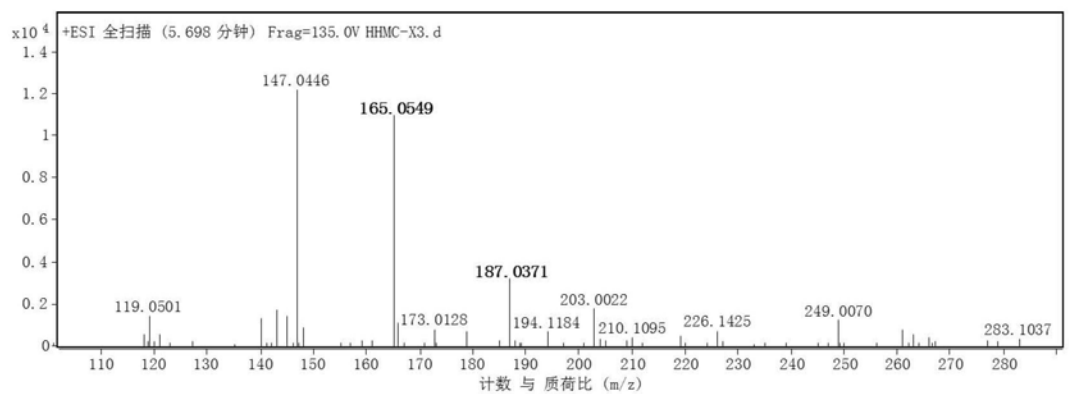


图2

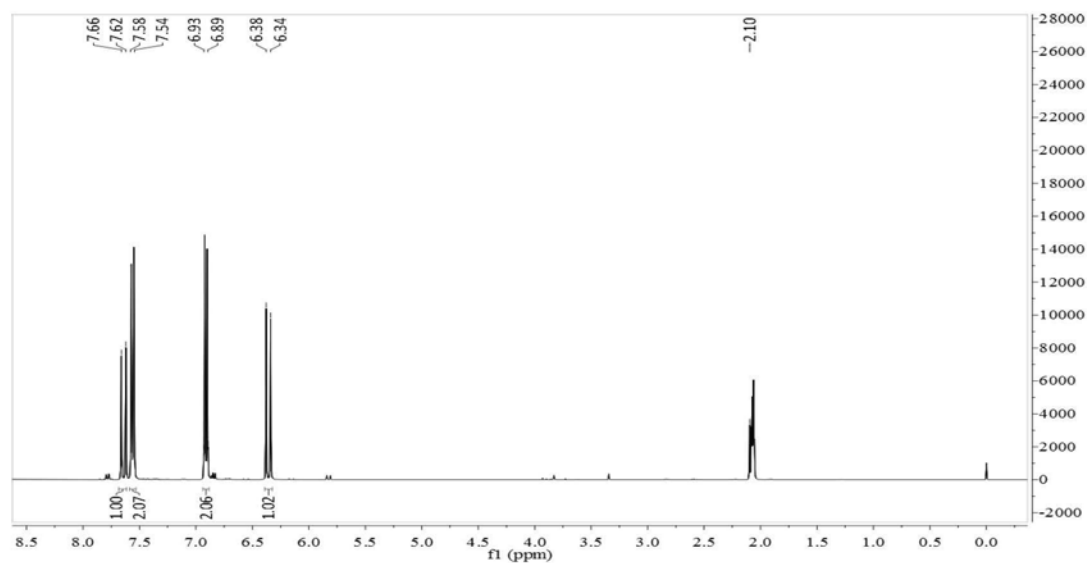


图3

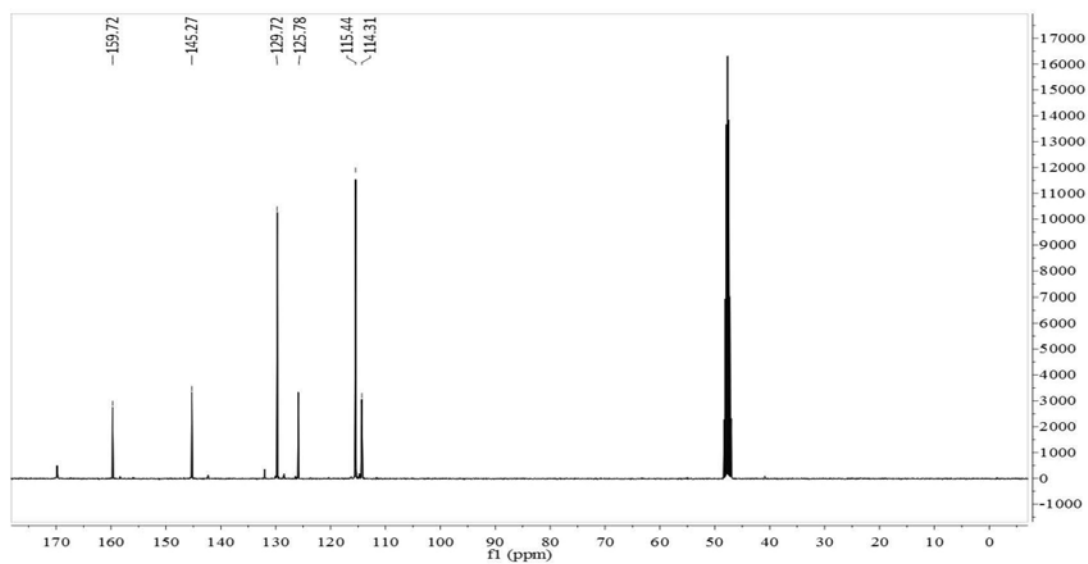


图4