



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103181930 B

(45) 授权公告日 2016.04.13

(21) 申请号 201310083521.3

(22) 申请日 2013.03.16

(73) 专利权人 西北大学

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号

专利权人 陕西蜂产品工程技术研究中心

(72) 发明人 曹炜 程妮 雷兴生 高慧  
邓建军

(74) 专利代理机构 西安西达专利代理有限责任  
公司 61202

代理人 谢钢

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048(2006.01)

A61K 31/352(2006.01)

A61K 31/192(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A23L 33/10(2016.01)

(56) 对比文件

CN 102119939 A, 2011.07.13,

CN 1430982 A, 2003.07.23,

CN 101869287 A, 2010.10.27,

CN 101999573 A, 2011.04.06,

审查员 陈红霞

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

五味子蜂花粉有效部位及其在预防肝脏损伤中的应用

(57) 摘要

本发明涉及五味子蜂花粉有效部位及其提取方法和在预防肝脏损伤中的应用。该有效部位通过乙醇提取五味子蜂花粉获得,其活性成份组成及含量为:没食子酸  $15.78 \pm 1.64$  mg/kg,原儿茶酸  $54.78 \pm 5.09$  mg/kg,香草酸  $64.21 \pm 5.13$  mg/kg, *p*-香豆酸  $57.32 \pm 5.25$  mg/kg,槲皮素  $273.63 \pm 20.84$  mg/kg,橙皮苷  $741.56 \pm 76.84$  mg/kg,堪菲醇  $387.34 \pm 35.65$  mg/kg,高良姜素  $487.35 \pm 47.24$  mg/kg。发明人研究发现,五味子蜂花粉抗氧化活性高于已知的所有商品化蜂花粉,可用于制备预防四氯化碳致肝脏损伤的药物或保健食品。

1. 一种具有预防四氯化碳致肝脏损伤的五味子蜂花粉有效部位,其特征在于该有效部位通过乙醇提取五味子蜂花粉获得,其活性成份组成及含量为:没食子酸 $15.78 \pm 1.64$  mg/kg,原儿茶酸 $54.78 \pm 5.09$  mg/kg,香草酸 $64.21 \pm 5.13$  mg/kg,p-香豆酸 $57.32 \pm 5.25$  mg/kg,槲皮素 $273.63 \pm 20.84$  mg/kg,橙皮苷 $741.56 \pm 76.84$  mg/kg,堪菲醇 $387.34 \pm 35.65$  mg/kg,高良姜素 $487.35 \pm 47.24$  mg/kg,

五味子蜂花粉有效部位采用如下方法提取得到:

(1)破壁五味子蜂花粉用8-15倍重量,体积比为50-95%的乙醇提取,合并提取液,过滤;

(2)将滤液减压浓缩到无醇味,溶于水,用AB-8型大孔树脂吸附,体积比为50-95%乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩到无醇味,溶于水,再用XAD-2型大孔树脂吸附,体积比为50-70%的乙醇洗脱,洗脱液浓缩至干即可。

2. 权利要求1所述的五味子蜂花粉有效部位在制备预防或治疗四氯化碳致肝脏损伤药物中的应用。

3. 权利要求1所述的五味子蜂花粉有效部位在制备预防或治疗四氯化碳致肝脏损伤保健食品中的应用。

## 五味子蜂花粉有效部位及其在预防肝脏损伤中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及五味子蜂花粉有效部位及其提取方法和在预防四氯化碳致肝脏损伤中的应用,属于医药和功能性食品技术领域。

### 背景技术

[0002] 肝脏是人体重要的物质代谢器官,在碳水化合物、蛋白质、脂肪、维生素等营养素的吸收、转化、贮存、分泌及排泄方面起着重要作用。肝脏也是人体重要的保护器官,具有解毒和吞噬功能,尤其对很多外来的化学性药物具有代谢和生物转化作用,通过新陈代谢将一些有毒的外源化合物代谢成无毒或毒性较小、易于排泄的物质。然而,一些药物经肝脏代谢后可能转化成毒性和蓄积性更大的物质,从而影响肝脏的功能,甚至会引起肝脏病变。大量研究表明,一些有机小分子对肝脏有一定损害作用,例如乙醇、甲醇、氯仿及四氯化碳等,特别是长期从事有机小分子生产和科研的人员,很容易通过呼吸吸入大量有机小分子,从而对肝脏造成化学性损伤。

[0003] 目前,针对化学性肝脏损伤并无特效药,一些对脂肪肝有效的西药可能对肝脏也有一定的毒性,针对化学性肝脏损伤保护的功能性食品稀少,因此,从天然食品资源中寻找对化学性肝脏损伤有保护作用的产品迫在眉睫。

[0004] 蜂花粉是蜜蜂采集显花植物花蕊中的花药,然后加入自身腺体分泌物和花蜜,经混合而成的一种不规则扁圆形状物。蜂花粉被誉为“全能营养食品”,除了含有多种营养素外,还含有酚类化合物、氨基酸、生物酶、多糖及甾醇等生物活性化合物,具有抗氧化、增强免疫、调节血脂、预防和治疗前列腺炎及防辐射等作用。目前直接服用蜂花粉存在服用量大的不足。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种五味子蜂花粉有效部位。

[0006] 本发明另一目的是提供上述五味子蜂花粉有效部位的提取方法。

[0007] 本发明还有一个目的是提供上述五味子蜂花粉有效部位在制备预防四氯化碳致小鼠肝脏损伤药物或保健食品中的用途。

[0008] 本发明实现过程如下:

[0009] 五味子蜂花粉有效部位,该有效部位通过乙醇提取五味子蜂花粉获得,其活性成份组成及含量为:没食子酸 $15.78 \pm 1.64$  mg/kg,原儿茶酸 $54.78 \pm 5.09$  mg/kg,香草酸 $64.21 \pm 5.13$  mg/kg,p-香豆酸 $57.32 \pm 5.25$  mg/kg,槲皮素 $273.63 \pm 20.84$  mg/kg,橙皮苷 $741.56 \pm 76.84$  mg/kg,堪菲醇 $387.34 \pm 35.65$  mg/kg,高良姜素 $487.35 \pm 47.24$  mg/kg。

[0010] 上述五味子蜂花粉有效部位采用如下方法提取得到:

[0011] (1)破壁五味子蜂花粉用8-15倍重量,体积比为50-95%的乙醇提取2-3次,提取温度为50-80℃,每次提取5-15小时,合并提取液,过滤;

[0012] (2)将滤液减压浓缩到无醇味,溶于水,用AB-8型大孔树脂吸附,体积比为50-95%

乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩到无醇味,溶于水,再用XAD-2型大孔树脂吸附,体积比为50-70%的乙醇洗脱,洗脱液浓缩至干即可。

[0013] 上述五味子蜂花粉有效部位可用于制备预防或治疗四氯化碳致肝脏损伤药物或保健食品。

[0014] 发明人研究发现,五味子蜂花粉抗氧化活性高于已知的所有商品化蜂花粉,有望开发成一种具有竞争力的预防化学性肝脏损伤的功能性食品或护肝中药。五味子蜂花粉有效部位添加辅料可以制成各种可接受的剂型,包括但不限于硬胶囊剂、颗粒剂、片剂、软胶囊剂等剂型。

[0015] 本发明五味子蜂花粉有效部位经动物药效学实验证实,具有预防四氯化碳致肝脏损伤的作用,可用于制备预防四氯化碳致肝脏损伤的药物或保健食品。

#### 附图说明

[0016] 图1 空白对照组(正常组);

[0017] 图2 模型对照组;

[0018] 图3 蜂花粉组;

[0019] 图4 蜂花粉提取物小剂量组;

[0020] 图5 蜂花粉提取物大剂量组。

#### 具体实施方式

[0021] 实施例1:五味子蜂花粉有效部位的制备

[0022] 取破壁五味子蜂花粉1000g,加95%乙醇8000ml,60℃回流提取8小时,共提取2次,合并两次提取液、过滤,将滤液减压浓缩,浓缩温度为40℃,浓缩到无醇味,并呈一定体积,用水转移,加热溶解。将溶解物用AB-8树脂吸附,用体积比为50%乙醇洗脱,洗脱物减压回收乙醇至醇味,并呈一定体积,用水转移,加热溶解,再用XAD-2型树脂吸附,用体积比为50%的乙醇洗脱物浓缩至干,即为本发明有效部位。

[0023] 其活性成份组成及含量为:没食子酸 $15.78 \pm 1.64$  mg/kg,原儿茶酸 $54.78 \pm 5.09$  mg/kg,香草酸 $64.21 \pm 5.13$  mg/kg,p-香豆酸 $57.32 \pm 5.25$  mg/kg,槲皮素 $273.63 \pm 20.84$  mg/kg,橙皮苷 $741.56 \pm 76.84$  mg/kg,堪菲醇 $387.34 \pm 35.65$  mg/kg,高良姜素 $487.35 \pm 47.24$  mg/kg。

[0024] 实施例2:五味子蜂花粉有效部位的制备

[0025] 取破壁五味子蜂花粉1000g,加75%乙醇10000ml,70℃回流提取6小时,共提取2次,合并两次提取液、过滤,将滤液减压浓缩,浓缩温度为40℃,浓缩到无醇味,并呈一定体积,用水转移,加热溶解。将溶解物用AB-8树脂吸附,用体积比为70%乙醇洗脱,洗脱物减压回收乙醇至醇味,并呈一定体积,用水转移,加热溶解,再用XAD-2型树脂吸附,用体积比为60%的乙醇洗脱物浓缩至干,即为本发明有效部位。

[0026] 其活性成份组成及含量为:没食子酸 $15.78 \pm 1.64$  mg/kg,原儿茶酸 $54.78 \pm 5.09$  mg/kg,香草酸 $64.21 \pm 5.13$  mg/kg,p-香豆酸 $57.32 \pm 5.25$  mg/kg,槲皮素 $273.63 \pm 20.84$  mg/kg,橙皮苷 $741.56 \pm 76.84$  mg/kg,堪菲醇 $387.34 \pm 35.65$  mg/kg,高良姜素 $487.35 \pm 47.24$  mg/kg。

[0027] 实施例3:五味子蜂花粉有效部位的制备

[0028] 取破壁五味子蜂花粉1000g,加55%乙醇12000ml,50℃回流提取12小时,共提取2次,合并两次提取液、过滤,将滤液减压浓缩,浓缩温度为40℃,浓缩到无醇味,并呈一定体积,用水转移,加热溶解。将溶解物用AB-8树脂吸附,用体积比为80%乙醇洗脱,洗脱物减压回收乙醇至醇味,并呈一定体积,用水转移,加热溶解,再用XAD-2型树脂吸附,用体积比为60%的乙醇洗脱物浓缩至干,即为本发明有效部位。

[0029] 其活性成份组成及含量为:没食子酸 $15.78 \pm 1.64$  mg/kg,原儿茶酸 $54.78 \pm 5.09$  mg/kg,香草酸 $64.21 \pm 5.13$  mg/kg,p-香豆酸 $57.32 \pm 5.25$  mg/kg,槲皮素 $273.63 \pm 20.84$  mg/kg,橙皮苷 $741.56 \pm 76.84$  mg/kg,堪菲醇 $387.34 \pm 35.65$  mg/kg,高良姜素 $487.35 \pm 47.24$  mg/kg。

[0030] 实施例4:五味子蜂花粉有效部位的制备

[0031] 破壁五味子蜂花粉加10倍重量积比50%的乙醇溶液,在50℃搅拌提取10小时,过滤,将滤渣再用相同重量和浓度的乙醇提取1次,合并两次提取液,40℃减压浓缩回收乙醇直至无醇味。将提取液转入水中,将溶解物用AB-8树脂吸附,用体积比为70%乙醇洗脱,洗脱物减压回收乙醇至醇味,并呈一定体积,用水转移,加热溶解,再用XAD-2型树脂吸附,用体积比为70%的乙醇洗脱,将洗脱物浓缩至干为五味子蜂花粉有效部位。

[0032] 其活性成份组成及含量为:没食子酸 $15.78 \pm 1.64$  mg/kg,原儿茶酸 $54.78 \pm 5.09$  mg/kg,香草酸 $64.21 \pm 5.13$  mg/kg,p-香豆酸 $57.32 \pm 5.25$  mg/kg,槲皮素 $273.63 \pm 20.84$  mg/kg,橙皮苷 $741.56 \pm 76.84$  mg/kg,堪菲醇 $387.34 \pm 35.65$  mg/kg,高良姜素 $487.35 \pm 47.24$  mg/kg。

[0033] 实施例5:药效学研究

[0034] (1)试验材料:

[0035] 受试物为上述提取物,实验动物为雄性昆明种小白鼠,体重18-22克。取小白鼠72只,随即分6组,每组12只,第一、二组为正常对照组和模型组,灌胃蒸馏水20 g/kg体重,第三组为五味子蜂花粉组,灌胃20g/kg;第四、五组为实验组,分别灌胃五味子蜂花粉提取物1g/kg和3 g/kg体重,在实验第42天,正常灌胃后2小时,对照组腹腔注射花生油0.1 mL/10 g 体重,模型组和实验组腹腔注射0.2%四氯化碳花生油溶液0.1 mL/10 g 体重。所有动物断粮不断水,16小时后摘眼球采血,颈部脱臼处死,取肝脏测定。

[0036] 血清中谷丙、谷草转氨酶的测定:采集全血,3000转每分钟离心,分离血清,用试剂盒测定谷丙(ALT)、谷草转氨酶(AST)。肝脏中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的测定:取右叶肝脏制备10%肝匀浆,4℃ 2500转离心20分钟,上清液用于测定丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶。

[0037] 肝脏组织切片:取左叶肝脏约3克,于10%福尔马林溶液中浸泡24小时以上,修整后石蜡包埋,切出约5微米厚度的薄片,脱蜡,脱水,HE染色,观察肝脏组织的坏死情况,包括总细胞坏死,炎细胞浸润等,肝窦充血,脂肪变性,气球样变。

[0038] 如图1所示,肝小叶结构纹理清晰,细胞索排列整齐,肝窦正常。图2模型对照组显示,炎细胞大量浸润,肝细胞广泛坏死,坏死灶分布于肝小叶中央静脉周围和肝被膜下,肝窦增加,肝细胞呈气球样变。图3 蜂花粉组显示,肝组织损伤没有明显减轻,出现多灶性肝细胞坏死伴有炎症。图4 蜂花粉提取物小剂量组显示,肝小叶结构清晰,肝窦比模型组缩

小,细胞索排列较整齐,大多数细胞结构清晰。图5 蜂花粉提取物大剂量组显示,肝小叶结构清晰,接近正常状态,多数肝细胞结构清晰。

[0039] (2)结果:

表1 五味子蜂花粉提取物对四氯化碳致小鼠肝脏损伤血液生化指标的影响 ( $\bar{X} \pm SD$ )

组别	剂量 $g \cdot kg^{-1}$	ALT U/L	AST U/L
空白对照组	-	12.6±2.3	28.7±3.7
模型对照组	-	248.3±13.5	146.3±9.4
蜂花粉组	20	236.2±12.5	143.6±5.3
蜂花粉提取物 小剂量组	1	121.5±6.2**	79.3±4.6**
蜂花粉提取物 大剂量组	3	68.5±4.7**	41.3±3.8**

[0040]

注:与空白对照组比较 ※ $P < 0.05$ ; ※※ $P < 0.01$ 。

与模型对照组比较 \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

表2 五味子蜂花粉提取物对四氯化碳致小鼠肝脏损伤肝脏生化指标的影响 ( $\bar{X} \pm SD$ )

组别	剂量 $g \cdot kg^{-1}$	GSH-Px U/g 蛋白	SOD U/mg 蛋白	MDA nmol/mg 蛋白
空白对照组	-	935.8±24.7	372.4±14.5	5.6±0.95
模型对照组	-	435.7±18.5	236.7±12.4	8.3±1.1
蜂花粉组	20	440.5±16.3	241.9±10.1	8.2±0.83
蜂花粉提取物 小剂量组	1	553.6±21.7**	326.8±15.6**	7.1±0.34*
蜂花粉提取物 大剂量组	3	648.4±34.5**	390.4±18.4**	6.4±0.45**

[0041]

注:与空白对照组比较 ※ $P < 0.05$ ; ※※ $P < 0.01$ 。

与模型对照组比较 \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

[0042] 表1和表2结果表明,与模型对照组相比较,五味子蜂花粉提取物能够显著降低小鼠血清ALT和AST的活性,同时能够降低小鼠肝脏氧化产物MDA的含量,提高肝脏GSH-Px和SOD的活性,为预防四氯化碳肝脏损伤的有效部位。

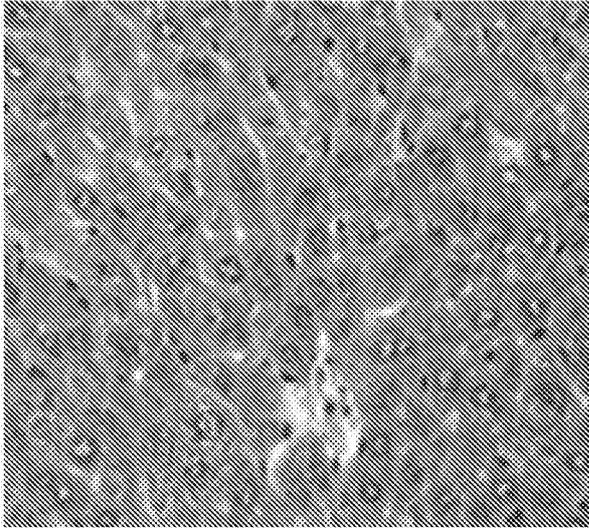


图1

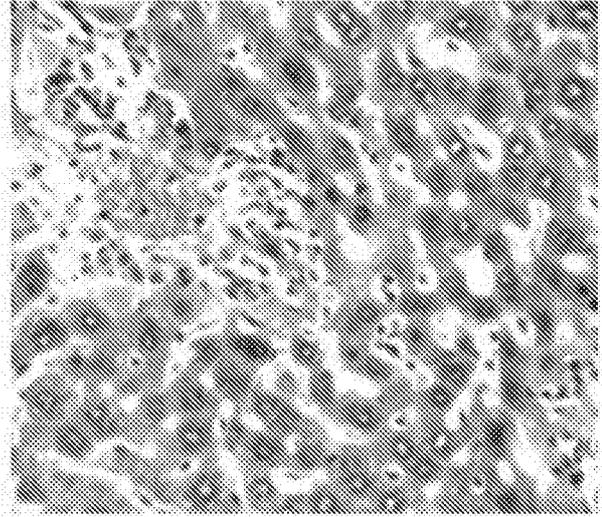


图2

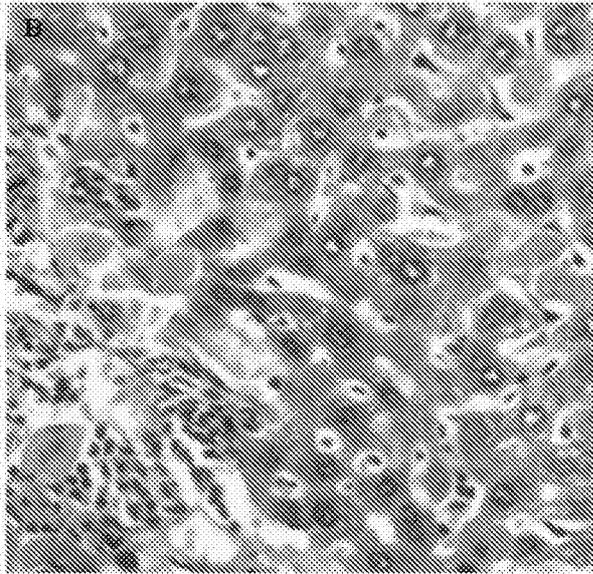


图3

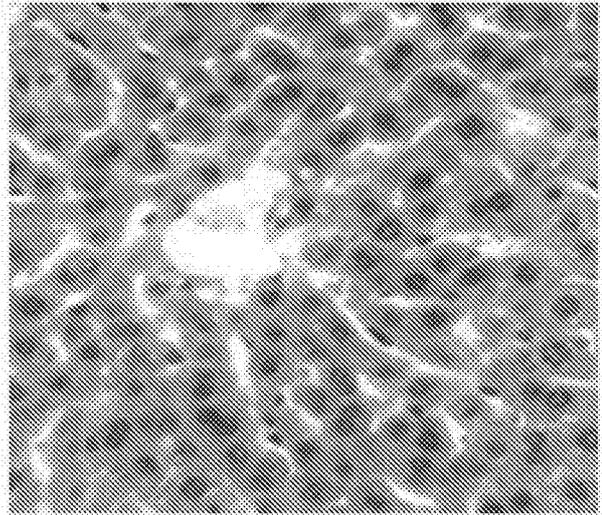


图4

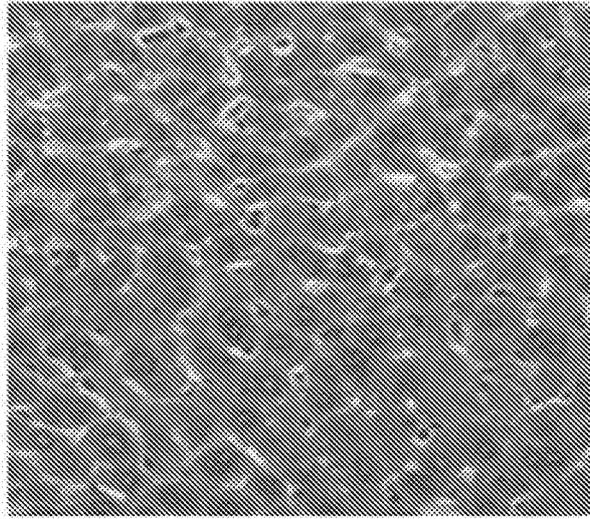


图5