



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102670764 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 201210137229. 0

A61K 131/00(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 05. 07

审查员 薛姣

(73) 专利权人 南京中医药大学

地址 210029 江苏省南京市汉中路 282 号

(72) 发明人 段金廛 郭盛 钱大玮

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

公司 32200

代理人 李纪昌

(51) Int. Cl.

A61K 36/725(2006. 01)

A23L 1/09(2006. 01)

A23L 2/60(2006. 01)

A23L 1/308(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 39/06(2006. 01)

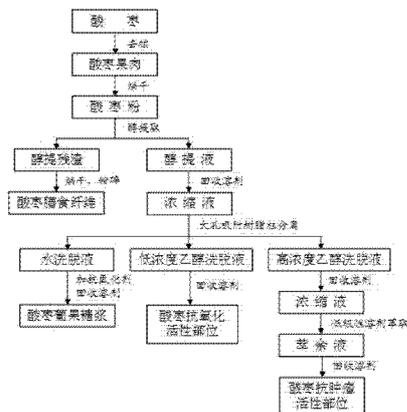
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

酸枣的活性部位及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种酸枣的葡果糖浆、膳食纤维、抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位及其制备方法和应用,本发明以酸枣果肉为原料,乙醇提取,残渣制成酸枣膳食纤维粉;醇提液经大孔树脂分离,依次用水、不同浓度乙醇洗脱,水洗脱液得酸枣葡果糖浆;低浓度乙醇洗脱液得抗氧化活性部位,高浓度乙醇洗脱液,加低极性有机溶剂萃取,得酸枣抗肿瘤活性部位。本发明利用废弃物酸枣果肉为原料,以现代提取分离手段和药理活性筛选相结合的方法提取其活性组分,变废为宝,抗氧化活性部位可清除多种自由基,有望开发成抗氧化及抗衰老药物;抗肿瘤有效部位,活性成分更清楚、含量高,对多种肿瘤细胞具有很好的抑制和杀灭作用,有望开发成新的抗肿瘤药物。



1. 酸枣抗肿瘤活性部位在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述的酸枣抗肿瘤活性部位是通过以下方法制备得到:

(1)将制备酸枣仁后的酸枣果肉,经干燥、粉碎后,用6至10倍量浓度为50%至100%乙醇回流法或渗漉法提取1至4次,得乙醇提取液和醇提残渣;

(2)取步骤(1)所得乙醇提取液先浓缩回收乙醇,然后采用D101、AB-8或HP-20型大孔吸附树脂分离,以水、浓度30%-70%的乙醇、浓度80%-100%的乙醇依次洗脱,分别收集洗脱液;

(3)取步骤(2)所得的浓度80%-100%的乙醇洗脱液,减压回收乙醇后加0.5至5倍量的低极性有机溶剂萃取2至4次,萃余液回收溶剂后得酸枣抗肿瘤活性部位;所述的低极性有机溶剂为石油醚、正己烷或环己烷;

所述的肿瘤为人胃癌、人结肠癌、人肺癌或人肝癌。

酸枣的活性部位及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物果实的有效成分及其提取技术,具体涉及一种酸枣果肉的葡果糖浆、膳食纤维、抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位及其制备方法与应用。

[0002] 背景技术:

[0003] 酸枣(*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*)系鼠李科(Rhamnaceae)枣属植物,广泛分布于我国北方广大地区,其成熟果实中含有多种生物活性成分,如葡萄糖、果糖、植物多糖、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸等,具有多重药理功效,为我国特有的生物资源。其干燥成熟种子酸枣仁为常用中药,具养心补肝,宁心安神,敛汗,生津之功效,广泛应用于中医临床配方以及中成药和保健食品生产原料。而其果肉作为生产中药酸枣仁的废弃物料,除少量经直接干燥粉碎制作酸枣粉用于食品饮料行业外,少有加工利用。据统计,目前我国年产销酸枣仁达 3 万吨,间接造成近 10 万吨酸枣果肉资源作为酸枣药用植物的废弃组织被丢弃,造成资源浪费。目前酸枣果肉加工产品主要有酸枣粉、酸枣汁等,但这些制品一般为粗加工产品,均以酸枣果肉为原料实施,缺乏产品的高附加值、深层次加工过程,资源的综合利用程度不高。

[0004] 发明内容:

[0005] 发明目的:本发明的目的是为了解决现有酸枣资源利用技术粗糙,资源浪费严重,酸枣果肉加工程度低下等不足,提供一种酸枣的葡果糖浆、膳食纤维以及抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位,本发明另一个目的是提供一种同时制备酸枣的葡果糖浆、膳食纤维以及抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位的技术方法及其应用,将酸枣果肉资源变废为宝,实现综合利用。

[0006] 技术方案:为了实现以上目的,本发明采用的技术方案为:

[0007] 一种酸枣的葡果糖浆、膳食纤维和抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位,其通过以下方法制备得到:

[0008] (1)将制备酸枣仁后的酸枣果肉在热风循环烘箱中干燥,粉碎,用 6 至 10 倍量乙醇提取 1 至 4 次,得乙醇提取液和醇提残渣;

[0009] (2)取步骤(1)所得醇提残渣,烘干后粉碎制成酸枣膳食纤维粉,经过筛、压片或灌装胶囊,制成酸枣膳食纤维片或胶囊;检测结果表明酸枣膳食纤维粉中含可溶性酸枣多糖(30%)、纤维素(40%)、粗蛋白(15%);

[0010] (3)取步骤(1)所得乙醇提液先浓缩回收乙醇,采用大孔吸附树脂分离,以水、低浓度乙醇、高浓度乙醇依次洗脱,分别收集洗脱液;

[0011] (4)取步骤(3)所得的水洗脱液,加入 0.5%至 10%的抗氧化剂,经减压浓缩得酸枣葡果糖浆;含量检测结果表明酸枣葡果糖浆中葡萄糖 $\geq 30\%$ 、果糖 $\geq 30\%$;

[0012] (5)取步骤(3)所得的低浓度乙醇洗脱液,减压浓缩至干,得酸枣抗氧化活性部位;检测结果表明总酚类成分含量 $\geq 50\%$;

[0013] (6)取步骤(3)所得的高浓度乙醇洗脱液,减压回收乙醇后加 0.5 至 5 倍量的低极性有机溶剂萃取 2 至 4 次,萃余液回收溶剂后得酸枣抗肿瘤活性部位,检测结果表明总三萜

含量 \geq 50%。

[0014] 作为优选方案,以上所述的酸枣的葡果糖浆、膳食纤维和抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位,步骤(1)中提取溶剂乙醇的浓度为 50 至 100%,所述的提取方法为渗漉法、回流法或连续逆流提取法。作为更优选方案,其中步骤(1)中提取溶剂乙醇用量为药材重量的 10 倍,乙醇浓度为 80%,提取方式为加热回流提取,提取 3 次,该方法可保证提取溶液和药材之间达到足够大的浓度差,增加目标成分的溶出率,因为乙醇浓度太低,总三萜部位得率太低,乙醇浓度太高葡萄糖、果糖转移率变低,因此本发明根据活性成分的性质,确定乙醇的浓度和用量,得到的部位目标成分溶出率高,活性更强。

[0015] 作为优选方案,以上所述的酸枣的葡果糖浆、膳食纤维和抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位,步骤(4)中抗氧化剂为维生素 C、异维生素 C 钠或柠檬酸。

[0016] 作为优选方案,以上步骤(3)所得醇提液先浓缩回收乙醇,采用 D101、AB-8 或 HP-20 型大孔吸附树脂分离,分别以水、30-70% 乙醇、80-100% 乙醇依次洗脱。作为更优选方案,其中步骤(3)中所用大孔吸附树脂为 D101 型,步骤(5)收集浓度为 60% 乙醇洗脱液,得到的总酚类成分含量最高,可高达 58%,抗氧化活性最强,高于其它乙醇洗脱液;作为更优选方案,步骤(6)收集浓度为 95% 乙醇洗脱液,得到的总三萜含量最高,可高达 56%,抗肿瘤活性最强。本发明以现代提取分离手段和药理活性筛选相结合的方法确定酸枣最佳抗氧化和抗肿瘤有效部位,经大量实验研究表明,浓度为 60% 乙醇能将具抗氧化活性的总酚类成分洗脱出来,而不会将三萜类成分洗出,有利于具抗肿瘤活性的三萜类成分在柱上的富集。采用 95% 乙醇洗脱,可以最大程度地将三萜类成分从树脂柱上解离出来,并且萃取溶剂优选石油醚,用量为回收乙醇后母液的 1 倍量,且萃取 3 次,以保证脂肪酸类成分的去除,提高总三萜部位中三萜类成分的富集率,能够得到总三萜含量高,杂质少,活性更强的抗肿瘤活性部位,经 HPLC-ELSD 检测该总三萜部位中主要含有麦珠子酸、马斯里酸、美洲茶酸、3-氧代白桦脂酸、齐墩果酮酸、乌苏酮酸等三萜类成分,其总含量可达 56%。

[0017] 作为优选方案,以上所述的酸枣的葡果糖浆、膳食纤维和抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位的制备方法,其中步骤(1)酸枣果肉在 50℃ 热风循环烘箱中干燥,此操作步骤中烘干温度不可太高,本发明实验结果表明酸枣果肉中的糖类成分在高温下易与氨基酸、蛋白等发生美拉德反应而发生聚合、褐变,而使有效成分丧失活性,因此本发明在干燥处理时优选在 50℃ 热风循环烘箱中干燥。

[0018] 本发明提供的酸枣的葡果糖浆、膳食纤维和抗肿瘤活性部位的制备方法,其包括以下步骤:

[0019] (1) 将制备酸枣仁后的酸枣果肉干燥,粉碎,用 6 至 10 倍量乙醇提取 1 至 4 次,得乙醇提取液和醇提残渣;

[0020] (2) 取步骤(1)所得醇提残渣,烘干后粉碎制成酸枣膳食纤维粉,经过筛、压片或填充胶囊,制成酸枣膳食纤维片或胶囊;

[0021] (3) 取步骤(1)所得乙醇提液先浓缩回收乙醇,采用大孔吸附树脂分离,以水、低浓度乙醇、高浓度乙醇依次洗脱,分别收集洗脱液;

[0022] (4) 取步骤(3)所得的水洗脱液,加入 0.5% 至 10% 的抗氧化剂,经减压浓缩得酸枣葡果糖浆;

[0023] (5) 取步骤(3)所得的低浓度乙醇洗脱液,减压浓缩至干,得酸枣抗氧化活性部

位；

[0024] (6)取步骤(3)所得的高浓度乙醇洗脱液,减压回收乙醇后加 0.5 至 5 倍量的低极性有机溶剂萃取 2 至 4 次,萃余液回收溶剂后得酸枣抗肿瘤活性部位。

[0025] 作为优选方案,以上所述的酸枣的葡果糖浆、膳食纤维、抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位的制备方法,步骤(1)中提取溶剂乙醇的浓度为 50 至 100%,所述的提取方法为回流法、渗漉法或连续逆流提取法。

[0026] 作为优选方案,以上所述的酸枣的葡果糖浆、膳食纤维、抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位的制备方法,步骤(3)中的大孔吸附树脂为 D101、AB-8 或 HP-20 型大孔吸附树脂,洗脱溶剂分别为水、低浓度乙醇为 30%-70% 乙醇、高浓度乙醇为 80%-100% 乙醇依次洗脱。本发明根据酸枣中总酚类成分和总三萜活性部位的极性大小,采用优选浓度的乙醇梯度洗脱的方式可以将总酚类成分和具有抗肿瘤活性的总三萜最大程度洗脱出来,而不会出现成分相互交叉,纯度最高。

[0027] 作为优选方案,以上所述的酸枣的葡果糖浆、膳食纤维、抗肿瘤活性部位的制备方法,步骤(4)中抗氧化剂为维生素 C、异维生素 C 钠或柠檬酸,步骤(6)中所述的低极性有机溶剂为石油醚、正己烷或环己烷。

[0028] 本发明提供的酸枣葡果糖浆可用于饮料、甜味剂加工等食品工业,也可以作为中间原料用来制备结晶果糖或葡萄糖及高果糖糖浆。

[0029] 本发明提供的具有抗氧化活性酸枣有效部位可以用于抗衰老、抗氧化药物的制备。

[0030] 本发明提供的具有抗肿瘤作用的酸枣有效部位在制备抗肿瘤药物中的应用。作为优选,所述的具有抗肿瘤作用的酸枣有效部位在制备防治人胃癌、人结肠癌、人肺癌或人肝癌药物中的应用。

[0031] 作为优选方案,把酸枣抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位和药学上可接受的载体制成片剂、胶囊剂、颗粒剂、栓剂、微囊或透皮控释贴剂剂型的药物。

[0032] 本发明提供的具有抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位在制成片剂时分别把酸枣有效部位和载体乳糖或玉米淀粉,需要时加入润滑剂硬脂酸镁,混合均匀,然后压片制成片剂。本发明提供的具有抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位在制成胶囊剂时把酸枣有效部位和载体乳糖或玉米淀粉混合均匀,整粒,然后装胶囊制成胶囊剂。本发明提供的具有抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位在制成颗粒剂时,把酸枣有效部位和稀释剂乳糖或玉米淀粉混合均匀,整粒,干燥,制成颗粒剂。

[0033] 有益效果:本发明从酸枣果肉中提取葡果糖浆、膳食纤维和抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位和现有技术相比具有以下优点:

[0034] (1) 本发明主要以制备酸枣仁过程中产生的废弃物料酸枣果肉为原料,提取其活性部位,实现变废为宝,提升了酸枣的可利用价值,实现了酸枣资源的综合利用,具有很好的经济效应。

[0035] (2) 本发明提供了一种全新的天然糖浆,该糖浆的糖成分主要由葡萄糖和果糖组成,葡萄糖和果糖总量干基含量大于 80%,与目前食品加工中使用的葡果糖浆相比,由于加工过程中不产生化学作用,与自然界中的存在形式(例如立体构象等)完全相同,作为甜味剂,食用安全,口感佳,是真正意义的天然糖浆。

[0036] (3) 本发明从酸枣果肉中分离提取出具有整肠降脂功效的新型保健功能的酸枣膳食纤维,产品具有高蛋白,低热量、整肠作用明显等特点,可应用于减肥排毒、调节血脂等产品开发。

[0037] (4) 本发明提供的酸枣抗氧化活性部位,实验结果表明对多种氧自由基均具有很好的清除作用,且长期使用无不良反应,可以方便和药学上可接受的载体制备成各种剂型的药物,方便服用。

[0038] (5) 本发明提供的酸枣抗肿瘤活性部位,实验结果表明对多种肿瘤细胞均具有很好的抑制作用,且长期使用无不良反应,抗肿瘤疗效确切,安全无毒,且可以方便和药学上可接受的载体制备成各种剂型的药物,方便服用。

[0039] (6) 本发明的制备方法根据酸枣果肉活性成分的理化性质,经大量实验优选制备工艺,实现了同时制备酸枣葡果糖浆、膳食纤维、抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位,有效避免了单一制备所带来的资源浪费,提高了酸枣的综合利用率,降低了成本,并且制备方法适宜工业化大生产。

附图说明

[0040] 图 1 为酸枣的葡果糖浆、膳食纤维、抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位的制备工艺流程图。

具体实施方式

[0041] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的具体的物料配比、工艺条件及其结果仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0042] 实施例 1

[0043] 如图 1 工艺流程所示,酸枣的葡果糖浆、膳食纤维和抗氧化活性部位及抗肿瘤活性部位,其通过以下方法制备得到:

[0044] (1) 将制备酸枣仁后的酸枣果肉在 50℃热风循环烘箱中干燥,干燥后的酸枣果肉冷却后粉碎,取粉碎后的酸枣果肉粉 10 kg 加 100 kg 浓度 80% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 小时,提取液合并,过滤后得乙醇提取液和醇提残渣。

[0045] (2) 取步骤(1)所得醇提残渣,离心分离出残留溶剂,热风烘箱中烘干,粉碎过 60 目筛,得酸枣膳食纤维粉约 3 kg,经过筛、压制成 1 g 重的酸枣膳食纤维素片,其主要成分为:可溶性酸枣多糖(32%)、纤维素(41%)、粗蛋白(14%)。

[0046] (3) 取步骤(1)所得醇提液先浓缩回收乙醇,得浓缩液 10 L,加入经活化的直径为 50 厘米,高 1.5 米的 D101 大孔吸附树脂层析柱中,预吸附 12 小时后,分别以水、60% 乙醇和 95% 乙醇按 2 BV/h 的速度洗脱,分别收集洗脱液 50 L。

[0047] (4) 取步骤(3)中水洗脱液 50 L,加入维生素 C 250 g,减压浓缩到可溶性固形物为 70% 为止,得到酸枣葡果糖浆 5 kg,其中按干基计葡萄糖含量为 40%、果糖含量为 43%,其中真空浓缩温度控制在 60℃以下,真空度为 0.1 MPa。

[0048] (5) 取步骤(3)中 60% 乙醇洗脱液 50 L,减压浓缩至干,得酸枣抗氧化活性部位 45 g,总酚类成分含量为 58%。

[0049] (6)取步骤(3)所得的 95% 乙醇洗脱液 50 L,减压回收乙醇后得浓缩液 4 L,加 4 L 石油醚分两次萃取,萃余液回收溶剂后得酸枣抗肿瘤活性部位 159 g,其总三萜含量为 56%。

[0050] 实施例 2

[0051] 酸枣葡果糖浆、膳食纤维、抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位的制备方法,具体包括以下步骤:

[0052] (1)将制备酸枣仁后的酸枣果肉在 50℃热风循环烘箱中干燥,干燥后的酸枣果肉冷却后粉碎,取粉碎后的酸枣果肉粉 10 kg 加 60% 乙醇渗漉,收集渗漉液 240 kg 和渗漉后残渣。

[0053] (2)取步骤(1)所得渗漉后残渣,离心分离出残留溶剂,热风烘箱中烘干,粉碎过 60 目筛,得酸枣膳食纤维粉约 2.9 kg,经过筛、压制成 1 g 重的酸枣膳食纤维素片,其主要成分为:可溶性酸枣多糖(34%)、纤维素(40%)、粗蛋白(15%)。

[0054] (3)取步骤(1)所得醇提液先减压浓缩回收乙醇,得浓缩液 10 L,加入经活化的直径为 50 厘米,高 1.5 米的 AB-8 大孔吸附树脂层析柱中,预吸附 12 小时后,分别以水、50% 乙醇和 90% 乙醇按 2 BV/h 的速度洗脱,分别收集洗脱液 50 L。

[0055] (4)取步骤(3)中水洗脱液 50 L,加入维生素 C 100 g、柠檬酸 20 g 减压浓缩到可溶性固形物为 70% 为止,得到酸枣葡果糖浆 4.9 kg,其中按干基计葡萄糖含量为 42%、果糖含量为 44%。真空浓缩温度应小于 60℃。真空度为 0.1 MPa。

[0056] (5)取步骤(3)中 50% 乙醇洗脱液 50 L,减压浓缩至干,得酸枣抗氧化活性部位 40 g,总酚类成分含量为 54%。

[0057] (6)取步骤(3)所得的 90% 乙醇洗脱液 50 L,减压回收乙醇后得浓缩液 4 L,加 4 L 环己烷分两次萃取,萃余液回收溶剂后得酸枣抗肿瘤活性部位 152 g,其总三萜含量为 51%。

[0058] 实施例 3

[0059] 酸枣葡果糖浆、膳食纤维、抗氧化活性部位和抗肿瘤活性部位的制备方法,具体包括以下步骤:

[0060] (1)将制备酸枣仁后的酸枣果肉在 50℃热风循环烘箱中干燥,干燥后的酸枣果肉冷却后粉碎,取粉碎后的酸枣果肉粉 10 kg 加 70% 乙醇在 50℃条件下连续逆流提取,收集提取液 260 kg 和提取后残渣。

[0061] (2)取步骤(1)所得残渣,加压过滤分离出残留溶剂,残渣热风烘箱中烘干,粉碎过 60 目筛,得酸枣膳食纤维粉约 3.3 kg,经过筛、压制成 1 g 重的酸枣膳食纤维素片,其主要成分为:可溶性酸枣多糖(30%)、纤维素(41%)、粗蛋白(12%)。

[0062] (3)取步骤(1)所得醇提液先减压浓缩回收乙醇,得浓缩液 10 L,加入经活化的直径为 50 厘米,高 1.5 米的 HP-20 大孔吸附树脂层析柱中,预吸附 12 小时后,分别以水、55% 乙醇和 95% 乙醇按 2 BV/h 的速度洗脱,分别收集洗脱液 50 L。

[0063] (4)取步骤(3)中水洗脱液 50 L,加入异维生素 C 300 g 减压浓缩到可溶性固形物为 65% 为止,得到酸枣葡果糖浆 5.2 kg,其中按干基计葡萄糖含量为 41%、果糖含量为 40%。真空浓缩温度应小于 60℃,真空度为 0.1 MPa。

[0064] (5)取步骤(3)中 55% 乙醇洗脱液 50 L,减压浓缩至干,得酸枣抗氧化活性部位 35 g,总酚类成分含量为 51%。

[0065] (6)取步骤(3)所得的 95% 乙醇洗脱液 50 L,减压回收乙醇后得浓缩液 4 L,加 6 L

正己烷分三次萃取,萃余液回收溶剂后得酸枣抗肿瘤活性部位 142 g,其总三萜含量为 55%。

[0066] 实施例 4

[0067] 酸枣抗氧化活性部位抗氧化实验研究

[0068] 一、实验材料与药物

[0069] 1. 仪器与材料:酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek 公司); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、水杨酸、过氧化氢(H_2O_2) 购于无锡市亚盛化工有限公司; DPPH 购于 ALDRICH Chemistry, 96 孔板 (Costar 公司)。其余试剂均购于上海国药化学试剂公司。

[0070] 2. 受试药物及处理方法:实施例 1、实施例 2 和实施例 3 制备得到的酸枣抗氧化活性部位,采用乙醇溶解制得所需浓度。

[0071] 二、测定方法

[0072] 1. DPPH 清除率的测定

[0073] 在 96 孔板中分别加入终浓度为 50, 100, 200, 400 mg/L 的各受试药物 100 μL ,。再加入等体积含 0.05 g/L DPPH 的无水乙醇溶液,避光反应 30 min 后在 517 nm 波长下测定其吸光度为 A_0 。同时作空白对照,在 517 nm 波长下测定其吸光度为 A_1 。为扣除药物本底颜色对实验的影响,在加入终浓度分别为 50, 100, 200, 400 mg/L 的药物后加入等体积无水乙醇在 517 nm 波长下测定其吸光度 A_2 。按照下式进行计算各受试药物对 DPPH 清除率: $A_1 - (A_0 - A_2) / A_1 \times 100\%$, 计算 IC_{50} 。

[0074] 2. $\text{OH} \cdot$ 清除率的测定

[0075] 在 96 孔板中加入终浓度为 2.25 mol/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液和终浓度为 2.25 mol/L 的水杨酸各 50 μL , 加入终浓度分别为 50, 100, 200, 400 mg/L 各受试药物 50 μL 后, 加入终浓度为 2.2 mmol/L H_2O_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅加热 30 min 在 536nm 波长下测定其吸光度为 A_0 。同时作空白对照,在 536 nm 波长下测定其吸光度为 A_1 。为扣除药物本底颜色对实验的影响,在同法加入 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 水杨酸和各受试药物各 50 μL 后, 加入 50 μL 蒸馏水, 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅加热 30min 后在 536 nm 波长下测定其吸光度为 A_2 。按下式进行计算各受试药物对 $\text{OH} \cdot$ 清除率: $A_1 - (A_0 - A_2) / A_1 \times 100\%$, 计算 IC_{50} 。

[0076] 三、实验结果

[0077] 具体实验结果如表 1 所示,由下表 1 可看出酸枣抗氧化活性部位可有效清除 DPPH 及 $\text{OH} \cdot$ 自由基。通过抗氧化实验结果表明,本发明通过优选工艺提取得到的酸枣抗氧化活性部位,有望开发成为新一代抗氧化及抗衰老药物、功能食品或保健品。

[0078] 表 1 酸枣抗氧化活性部位清除 DPPH 和 $\text{OH} \cdot$ 自由基实验结果

[0079]

受试药物	DPPH IC_{50} (mg/mL)	$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ IC_{50} (mg/mL)
酸枣抗氧化活性部位(实施例 1)	0.11	0.32
酸枣抗氧化活性部位(实施例 2)	0.15	0.41
酸枣抗氧化活性部位(实施例 3)	0.14	0.45

[0080] 实施例 5

[0081] 酸枣抗肿瘤活性部位抗肿瘤实验研究

[0082] 一、实验材料和药物

[0083] 1. 实验材料:RMP1640 培养基(Gibco 公司), 新生牛血清(杭州四季青公司), 噻唑蓝(MTT, Amresco 公司), DMSO (Amresco 公司), 紫杉醇注射液(海口市制药厂有限公司)。

[0084] 2. 实验仪器:超净工作台(SW-CJ-1FD,苏州净化),CO₂培养箱(XD-101,SANYO),酶标仪(BIO-RAD Model NO. 550),96孔板(Costar公司)。

[0085] 3. 受试药物及处理方法:实施例1和实施例3制备得到的酸枣抗肿瘤有效部位,采用DMSO溶解,给药前用完全培养基配制成所需浓度。阳性对照药物紫杉醇注射液。

[0086] 4. 肿瘤细胞株:人胃癌细胞MGC-803、人结肠癌细胞HT-29、人肺癌细胞NCI-H460、人肝癌细胞HepG-2购自南京凯基生物公司。

[0087] 二、实验方法

[0088] 实验步骤为:细胞消化、计数、制成浓度为 5×10^4 个/mL的单细胞悬液,96孔板中每孔加入100 μ L单细胞悬液(每孔 5×10^3 个细胞);将96孔板置于37 $^{\circ}$ C,体积分数为5%的CO₂培养箱中培养24小时;用完全培养基稀释实施例1和实施例3制备得到的酸枣抗肿瘤有效部位至所需浓度,每孔加入100 μ L相应的含药培养基,同时设立阴性对照组,溶媒对照组(终浓度为0.1%DMSO),阳性对照组(终浓度为10 μ g/mL);置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养72小时后每孔加入20 μ L MTT (5mg/mL),在培养箱继续培养4小时;弃去培养基,每孔加入150 μ L DMSO溶解,摇床10分钟轻轻混匀;酶标仪在 $\lambda = 490\text{nm}$,测量OD值,计算细胞增殖抑制率。

[0089] 三、实验结果

[0090] 1. 酸枣抗肿瘤活性部位对人胃癌细胞MGC-803的抑制率及IC₅₀值

[0091] 具体实验结果如表2所示,由下表2可看出酸枣有效部位能显著抑制人胃癌细胞MGC-803的增殖,在浓度为50 μ g/mL的剂量下,对人胃癌细胞MGC-803的抑制率达到87.69%~90.86%,其IC₅₀为15 μ g/mL左右。说明该有效部位具有潜很好的抗人胃癌的活性,且具有较好的量效关系。

[0092] 表2 酸枣抗肿瘤活性部位对人胃癌细胞MGC-803的抑制作用

[0093]

组别	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	OD值	SD值	抑制率 (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
阴性对照组		1.007	0.034		
DMSO 溶媒对照组	0.1%	0.998	0.067	0.89	
Taxol 阳性对照组	10.00	0.116	0.008	88.48	
酸枣抗肿瘤活性 部位(实施例1)	50.00	0.092	0.006	90.86	15.32
	25.00	0.198	0.022	80.34	
	12.50	0.550	0.034	45.38	
	6.25	0.938	0.026	6.85	
	3.13	1.005	0.015	0.20	
酸枣抗肿瘤活性 部位(实施例3)	50.00	0.124	0.007	87.69	15.97
	25.00	0.224	0.026	77.76	
	12.50	0.567	0.034	43.69	
	6.25	0.941	0.023	6.55	
	3.13	1.008	0.019	-0.10	

[0094] 2. 酸枣抗肿瘤活性部位对人结肠癌细胞 HT-29 的抑制率及 IC_{50} 值

[0095] 具体实验结果如表 3 所示,由下表 3 可看出酸枣有效部位能显著抑制人结肠癌细胞 HT-29 的增殖,在浓度为 50 μ g/mL 的剂量下,对人结肠癌细胞 HT-29 的抑制率达到 78.49%~84.01%,其 IC_{50} 为 16.50~21.65 μ g/mL。说明该有效部位对人结肠癌具有很好的抑制活性,且具有较好的量效关系。

[0096] 表 3 酸枣抗肿瘤活性部位对人结肠癌细胞 HT-29 的抑制作用

[0097]

组别	浓度 (μ g/mL)	OD 值	SD 值	抑制率 (%)	IC_{50} (μ g/mL)
阴性对照组		1.176	0.14		
DMSO 溶液对照组	0.1%	1.099	0.061	6.55	
Taxol 阳性对照组	10.00	0.34	0.047	71.09	
酸枣抗肿瘤活性部位 (实施例 1)	50.00	0.188	0.016	84.01	16.50
	25.00	0.425	0.052	63.86	
	12.50	0.785	0.094	33.25	
	6.25	0.932	0.07	20.75	
	3.13	1.012	0.111	13.95	
酸枣抗肿瘤活性部位 (实施例 3)	50.00	0.253	0.022	78.49	21.65
	25.00	0.553	0.038	52.98	
	12.50	0.864	0.127	26.53	
	6.25	0.944	0.090	19.73	
	3.13	1.116	0.032	5.10	

[0098] 3. 酸枣抗肿瘤活性部位对人肺癌细胞 NCI-H460 的抑制率及 IC_{50} 值

[0099] 具体实验结果如表 4 所示,由下表 4 可看出酸枣有效部位能显著抑制人肺癌细胞 NCI-H460 的增殖,在浓度为 50 μ g/mL 的剂量下,对人肺癌细胞 NCI-H460 的抑制率达到 86.30~89.55%,其 IC_{50} 为 22.42~23.24 μ g/mL。

[0100] 表 4 酸枣抗肿瘤活性部位对人肺癌细胞 NCI-H460 的抑制作用

[0101]

组别	浓度($\mu\text{g/mL}$)	OD 值	SD 值	抑制率 (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
阴性对照组		1.234	0.09		
DMSO 溶解对照组	0.1%	1.188	0.12	3.73	
Taxol 阳性对照组	10.00	0.219	0.015	82.25	
酸枣抗肿瘤活性部位 (实施例 1)	50.00	0.129	0.036	89.55	22.42
	25.00	0.745	0.073	39.63	
	12.50	0.859	0.041	30.39	
	6.25	1.144	0.042	7.29	
	3.13	1.199	0.089	2.84	
酸枣抗肿瘤活性部位 (实施例 3)	50.00	0.169	0.028	86.30	23.24
	25.00	0.785	0.021	36.39	
	12.50	0.845	0.101	31.52	
	6.25	1.098	0.048	11.02	
	3.13	1.191	0.078	3.48	

[0102] 4. 酸枣抗肿瘤活性部位对人肝癌细胞 HepG-2 的抑制率及 IC_{50} 值

[0103] 具体实验结果如表 5 所示,由下表 5 可看出酸枣有效部位能显著抑制人肝癌细胞 HepG-2 的增殖,在浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的剂量下,对人肝癌细胞 HepG-2 的抑制率达到 87.76 ~ 91.84%,其 IC_{50} 为 14.29 ~ 14.65 $\mu\text{g/mL}$ 。说明该有效部位具有潜在的抗人肝癌的活性,且具有较好的量效关系。

[0104] 表 5 酸枣抗肿瘤活性部位对人肝癌细胞 HepG-2 的抑制作用

[0105]

组别	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	OD 值	SD 值	抑制率 (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
阴性对照组		0.980	0.033		
DMSO 溶解对照组	0.1%	0.981	0.045	-0.10	
Taxol 阳性对照组	10.00	0.148	0.005	84.90	
酸枣抗肿瘤活性部位 (实施例 1)	50.00	0.08	0.007	91.84	14.65
	25.00	0.099	0.014	89.90	
	12.50	0.648	0.059	33.88	
	6.25	0.854	0.041	12.86	
	3.13	0.979	0.089	0.10	
酸枣抗肿瘤活性部位 (实施例 3)	50.00	0.12	0.044	87.76	14.29
	25.00	0.114	0.031	88.37	
	12.50	0.539	0.089	45.00	
	6.25	0.885	0.077	9.69	
	3.13	0.982	0.041	-0.20	

[0106] 通过以上表 2 至表 5 的抗肿瘤实验结果表明,本发明通过优选工艺提取得到的酸枣抗肿瘤活性部位对人胃癌、人结肠癌、人肺癌和人肝癌等多种肿瘤具有很好的抑制作用,

有望开发成为新一代抗肿瘤药物。

[0107] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

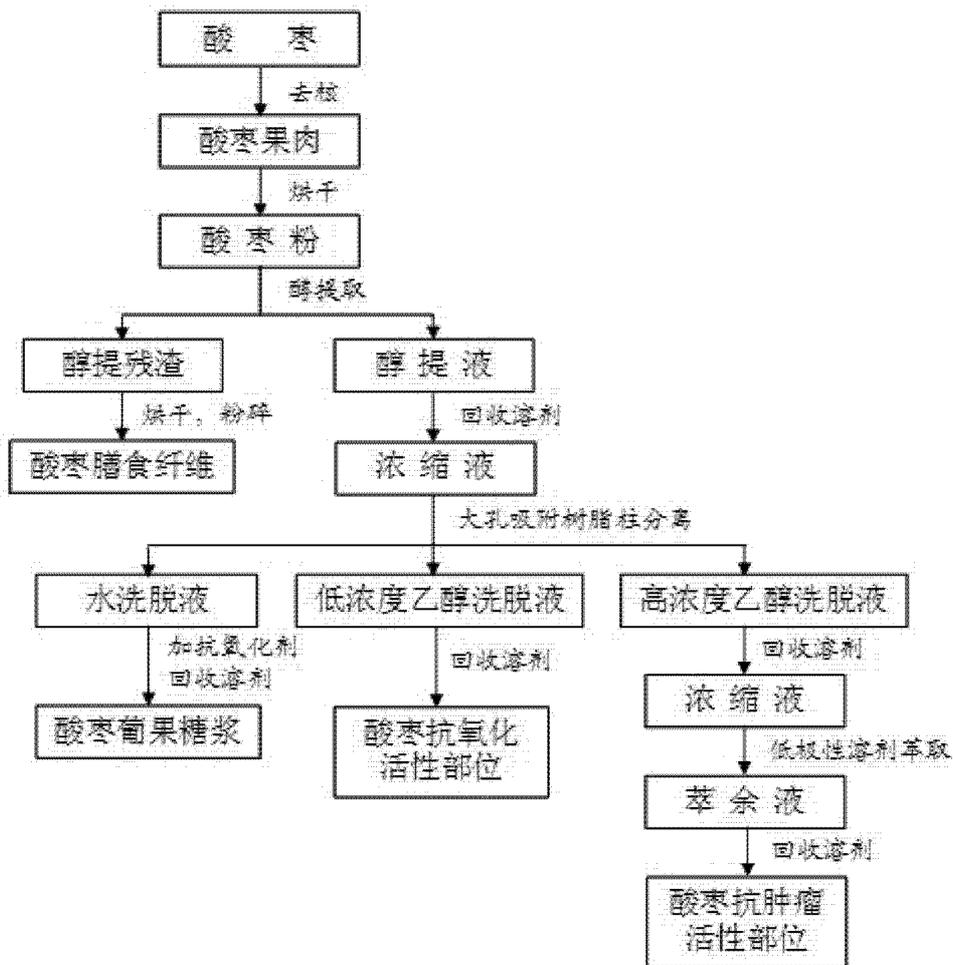


图 1