

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610104856.9

[51] Int. Cl.

A61K 36/296 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 6 月 6 日

[11] 公开号 CN 1973848A

[22] 申请日 2006.11.6

[21] 申请号 200610104856.9

[71] 申请人 西北大学

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号

[72] 发明人 孙文基 谢娟平

[74] 专利代理机构 西安西达专利代理有限责任公司
代理人 谢 钢

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称

巫山淫羊藿总酚酸在药物及保健食品中的应用

[57] 摘要

本发明公开了巫山淫羊藿总酚酸的提取方法，还公开了巫山淫羊藿总酚酸在制备抗氧化、抗菌和增强免疫的药物及保健食品中的应用。巫山淫羊藿总酚酸的制备工艺如下：取巫山淫羊藿，用 8~20 倍量水煎煮 3 次，每次 1 小时，合并煎煮液，离心取上清液；水煎煮液上 AB-8 大孔树脂柱，每克树脂上 2ml 药液，大孔树脂先用 2~5 倍的水洗脱，弃去水洗液，大孔树脂再用 2~3 倍的 30% 乙醇洗脱，弃去洗脱液，大孔树脂再用 3~8 倍的 70% 乙醇洗脱，回收洗脱液中的乙醇，减压抽干，得残留物，即巫山淫羊藿总酚酸（以朝藿定 C 计含量 50% 以上）。

- 1、巫山淫羊藿总酚酸，其特征在于：主要活性成分为朝藿定 C，以朝藿定 C 计总酚酸含量在 50%以上；

巫山淫羊藿总酚酸的制备方法如下：巫山淫羊藿用 8~20 倍量水煎煮，煎煮液上 AB-8 大孔树脂柱，先用 2~5 倍的水洗脱，再用 2~3 倍的 30%乙醇水溶液洗脱，最后用 3~8 倍的 70%乙醇洗脱，回收 70%乙醇洗脱液，减压抽干，得残留物即巫山淫羊藿总酚酸。

- 2、权利要求 1 所述的巫山淫羊藿总酚酸的制备方法，其特征在于，巫山淫羊藿用 8~20 倍量水煎煮，煎煮液上 AB-8 大孔树脂柱，先用 2~5 倍的水洗脱，再用 2~3 倍的 30%乙醇水溶液洗脱，最后用 3~8 倍的 70%乙醇洗脱，回收 70%乙醇洗脱液，减压抽干，得巫山淫羊藿总酚酸。
- 3、根据权利要求 2 所述的巫山淫羊藿总酚酸的制备方法，其特征在于，制备得到的巫山淫羊藿总酚酸粗品于 95%的乙醇中溶解后再上 AB-8 大孔树脂，70%乙醇洗脱，回收洗脱后的残留物溶于 2-5 倍的 95%乙醇中，过滤，回收乙醇并抽干，再用乙酸乙酯热溶，放置，析出结晶，得以朝藿定 C 计含量为 80% ~ 97%的巫山淫羊藿总酚酸。
- 4、权利要求 1 所述的巫山淫羊藿总酚酸在制备抗氧化药物和保健食品中的应用。
- 5、权利要求 1 所述的巫山淫羊藿总酚酸在制备抗菌药物和保健食品中的应用。
- 6、权利要求 1 所述的巫山淫羊藿总酚酸在制备增强免疫药物和保健食品中的应用。

巫山淫羊藿总酚酸在药物及保健食品中的应用

技术领域

本发明涉及巫山淫羊藿总酚酸及其提取方法，还涉及巫山淫羊藿总酚酸在药物及保健食品中的应用，特别是巫山淫羊藿总酚酸或朝藿定 C 计总酚酸含量在 50%以上的巫山淫羊藿总酚酸在抗氧化、抗菌和增强免疫的药物及保健食品中的应用，属于医药领域。

背景技术

对体弱的老年人和未成年人及久病的康复者常常需要增强免疫及抗菌抗氧化的药物及保健食品，要求毒副作用小，可长期服用。

淫羊藿是一种传统中药，包括淫羊藿 (*E.brevicornu* Maxim.)、心叶淫羊藿 (*E.parvifolium* s.z.et T.L.zhang)、箭叶淫羊藿 (*E.pime-dium sagittatum*(Sieb.etZucc.) Maxim.)、朝鲜淫羊藿 (*Epimedium ko-reanum* Nakai.) 和巫山淫羊藿 (*E.wushanense* T.S.Ying)。

巫山淫羊藿总酚酸的组成主要为双藿苷 A(diphyllloside A)、淫羊藿属苷 A(epimedoside A)、朝藿定 C(epimedin C)、淫羊藿苷(icariin)、淫羊藿属苷 C(epimedoside C)、意卡瑞苷 A(icarisoside A)、去多甲基羟基淫羊藿素(desmethylanhydroicaritin)和齐墩果酸。

发明内容

本发明的目的在于提供巫山淫羊藿总酚酸或含以朝藿定 C 计总酚酸含量在 50%以上的巫山淫羊藿总酚酸的用途，即在制药和保健食品中的应用。以朝藿定 C 计算的总酚酸含量可使用比色法或紫外分光光度法测定。

本发明涉及巫山淫羊藿总酚酸或含以朝藿定 C 计总酚酸含量在 50%以上的巫山淫羊藿总酚酸作为制备抗氧化药物及保健食品中的应用。

本发明涉及巫山淫羊藿总酚酸或含以朝藿定 C 计总酚酸含量在 50%以上的巫山淫羊藿总酚酸作为制备抗菌药物及保健食品中的应用，例如含以朝藿定 C 计 60%，70%，80%，90%等。

本发明涉及巫山淫羊藿总酚酸或含总酚酸以朝藿定 C 计含量在 50%以上的巫山淫羊藿总酚酸作为制备增强免疫药物及保健食品中的应用。

从巫山淫羊藿中可提取出总酚酸（以含总酚酸以朝藿定 C 计约 50%），也可再精制成朝藿定 C，两者均具有抗氧化、抗菌和增强免疫效果，可用于制备抗氧化、抗菌和增强免疫的药物和保健食品。

巫山淫羊藿总酚酸的制备工艺如下：

取巫山淫羊藿，用 8~20 倍量水煎煮 3 次，每次 1 小时，合并煎煮液，离心取上清液；水煎煮液上 AB-8 大孔树脂柱，每克树脂上 2mL 药液，大孔树脂先用 2~5 倍的水洗脱，弃去水洗液，大孔树脂再用 2~3 倍的 30%乙醇洗脱，弃去洗脱液，大孔树脂再用 3~8 倍的 70%乙醇洗脱，回收洗脱液中的乙醇，减压抽干，得残留物，即巫山淫羊藿总酚酸（以朝藿定 C 计含量 50%以上）。

将上述方法制备得到的巫山淫羊藿总酚酸粗品于 95%的乙醇中溶解后再上 AB-8 大孔树脂，70%乙醇洗脱，回收洗脱后的残留物溶于 2-5 倍的 95%乙醇中，过滤，回收乙醇并抽干，再用乙酸乙酯热溶，放置，析出结晶，过滤，得以朝藿定 C 计含量为 80% ~ 97%的巫山淫羊藿总酚酸。

有效成分巫山淫羊藿总酚酸制备抗氧化、抗菌和增强免疫的药物和保健食品以常规制剂的形式来使用；所述的常规制剂含作为活性成分在制剂中与药学和保健食品上可接受的载体如适宜于胃肠内和胃肠外给予的有机或无机的固体或液体赋形剂混合，该制剂可以是固体形式如片剂、胶囊剂、散剂、丸剂、颗粒剂，也可以是液体形式如注射剂、乳剂等。

上述制剂中可含有辅助物质、稳定剂、润湿剂和其它常用的添加剂，如乳糖、柠檬酸、酒石酸、硬脂酸镁、石膏粉、蔗糖、玉米淀粉、滑石粉、明胶、琼脂、果胶、花生油、橄榄油、可可脂、乙二酸、抗坏血酸、甘露醇等。

上述的制剂可按照各种制剂常规的制备工艺制成。

在药物和保健食品安全性方面，巫山淫羊藿的急毒 $LD_{50} > 23 \text{ g/Kg}$ (小鼠)。
所以巫山淫羊藿基本属于无毒物质，是一种比较安全物质。

为更好的理解本发明的实质，下面将用巫山淫羊藿总酚酸的药理实验及结果来说明其在制药和保健食品中的用途。

一、 受试提取物：巫山淫羊藿总酚酸提取物。

1.1 提供单位：陕西省生物医药重点实验室

1.2 性状：黄色至深黄色的固体粉末，味微苦。

1.3 规格：含总酚酸以朝藿定 C 计 $\geq 50\%$

1.5 溶剂：二次重蒸水或甲醇

1.5 储存条件：4℃，密闭保存

1.6 配制方法：水配制成

二、菌种选择：铜绿甲单孢细菌 (PAO)，革兰氏阳性菌，为医院中广泛存在的致病菌。对于烧伤病人，手术后恢复期病人和免疫力低下的未成年人和老年人常常构成致命的危害，并且此菌极易对普通抗生素产生抗药性，是目前较难解决的问题，选此菌种实验，具有代表性。

三、 实验材料：

铜绿甲单孢细菌 黄烷基苯肼自由基 (DPPH)

昆明种健康小鼠

四、 实验方法与结果

4.1 巫山淫羊藿总酚酸抗菌作用

4.1.1 固体培养基实验：采用滤纸片法，淫羊藿总酚酸用甲醇配制成不同浓度 (2-20 $\mu\text{g/mL}$) 的溶液，点于滤纸片上，覆盖于带 PAO 菌的固体培养基上，同时以不含样品的甲醇液点于滤纸片上作为空白对照，于培养箱中培养 24 小时，取出，于 LAS-3000 荧光/化学发光成像分析仪中测定，发现带样滤纸片周边与不含样品的滤纸片有明显扩大的暗圈。

4.1.2 液体培养基实验:取巫山淫羊藿总酚酸,用水配制成不同浓度(1-50 μ g/mL)的溶液,分别加入液体培养基和 PAO 菌悬液,同时以水加入 PAO 菌悬液,作为对照,搅拌均匀,倾于 96 孔板,置于 VICTOR³_{TM} 1420 MULTILABEL COUNTER 多孔技术仪中培养 24 小时,培养过程中每半小时测定一次发光值(CPS)和 PAO 菌的细胞数(OD),以发光值对测定次数作图,得到巫山淫羊藿总酚酸对 PAO 菌毒性基因(rhLA)表达的抑制作用图,以 PAO 菌生长过程中的细胞数(OD)对测定次数作图,得到巫山淫羊藿总酚酸对 PAO 菌生长的抑制作用图,结果如图 1、图 2 所示。

液体菌悬液的发光值高,代表毒性基因的表达量高,从图 1 可以看出,加样菌悬液的发光曲线一直低于对照菌悬液,表明巫山淫羊藿总酚酸对 PAO 菌的表达有明显的抑制作用,而加样液体菌悬液的细胞生长曲线与对照液体菌悬液的生长曲线完全重合,表明巫山淫羊藿总酚酸对 PAO 菌的生长无抑制作用。这种抗菌机理表明巫山淫羊藿总酚酸抗菌作用是通过抑制毒性基因的表达而非毒性基因的生长。因为普通抗生素是通过抑制细菌的生长而抗菌的,这种机理细菌极易产生抗药性,尤其是医院中广泛存在的铜绿甲单孢细菌,抑制细菌的表达则不易产生抗药性,因此,巫山淫羊藿总酚酸抗菌作用优于普通抗生素,具有应用前景。

4.2 巫山淫羊藿总酚酸抗氧化作用

本实验以体外抗氧化体系为模型,巫山淫羊藿总酚酸成分对 DPPH 自由基的抗氧化活性,揭示了淫羊藿的保健功能。

巫山淫羊藿总酚酸以甲醇溶解,分别配制为浓度约为 0.5-5 mg/mL 的溶液,作为样品溶液。

分别吸取不同浓度的样品溶液于 5 mL 容量瓶中,各加入 4 mL 的 0.025 mg/mL DPPH 溶液,以甲醇定容至 5 mL,同法制备空白对照溶液,另取抗坏血酸(VC)配制为 0.5-5 mg/mL 的溶液,同法操作制备阳性对照,室温下避光静置 1 小时后于 516 nm 处测定吸光值。

DPPH· 的清除率通过下式计算:

$$\text{清除率}(\%) = [(\text{DPPH}\cdot)_{t=0} - (\text{DPPH}\cdot)_t] / (\text{DPPH}\cdot)_{t=0} \times 100\%$$

式中 $(\text{DPPH}\cdot)_{t=0}$ 为体系中 DPPH 自由基的初始浓度; $(\text{DPPH}\cdot)_t$ 为 t 时刻溶液中 DPPH 自由基的浓度。以样品 (mg) / DPPH· (mg) 对 DPPH 自由基清除率作图, 就可以得到清除 50%DPPH 自由基时所需样品的量, 即 EC_{50} 值。

实验结果表明 (从图 3 可见), 巫山淫羊藿总酚酸的 EC_{50} 值为 0.723, 抗坏血酸 (VC) 的 EC_{50} 值为 0.182, 其抗氧化能力显著高于同类植物, 与抗氧化的代表物质抗坏血酸相差不远。

4.3 巫山淫羊藿总酚酸增强免疫功能作用

4.3.1 巫山淫羊藿总酚酸用生理盐水分别配成 13 g/L, 26 g/L 和 52g/L 3 个浓度, 4℃ 冰箱保存备用。N-羟基脲(N-hydroxy-urea)由中国科学院上海生物化学研究所提供。昆明种健康小鼠雌雄各半, 体重(20±2)g, 在实验条件下适应 1 周后, 随机分为 5 组, 进行试验, 以羟基脲 320mg/(kg·d)ig 小鼠, 正常组每日 ig 生理盐水 0.5mL, 治疗组参照成人每千克体重用量(乘 10~20 倍), 分别以巫山淫羊藿总酚酸 300, 600 和 1200mg/(kg·g)ig 小鼠, 连续 10d, 实验第 11 天称体重和脾脏湿重、检测各组小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性。

4.3.2 脾细胞悬液制备: 无菌取出小鼠脾脏后, 用 100 目钢网研磨脾脏制备细胞悬液, 吸入离心管后静置 10min, 弃去沉淀的团块, Hanks 液洗 2 遍, 用完全 RPMI-1640 培养基调至所需浓度作为小鼠 NK 活性的效应细胞及小鼠 IL-2 的产生细胞。

IL-2 活性测定方法: 取前述方法制备的实验小鼠脾细胞, 加 ConA 刺激 48h, 再用指示细胞(小鼠胸腺细胞)共同培育, 同时作指示细胞加 IL-2 对照, 培养 60h, 加 $^3\text{H-TdR}$ 12h 后收集测 cpm 值, 根据标准曲线求得标本 IL-2 活性(U/mL)。

NK 细胞活性测定方法: 制备小鼠 NK 活性的效应细胞, 每孔 100μL 标记靶细胞 1×10^5 (YAC-1)与标记同位素 ^{37}kBq 混匀, 37℃ 培养 20~24h, 弃上清, 加入 DNA 酶和胰酶各 100μL(分别含 10μgDNA 和 0.6mg 胰酶), 充分混匀, 放置 1h 后收获每管上清 0.5mL 置另外的试管中。对照管以 FCS-1640 代替效应细胞。

用 γ 计数器分别测每管上清和细胞部分的 cpm 值。NK 细胞活性(%)=实验管 3H-TdR 释放率-对照管 3H-TdR 自然释放率。

统计学处理：采用 t 检验。

4.3.3 结果

实验小鼠一般状态：模型对照组第 6 天起表现活动迟缓、弓背蜷缩、毛枯不荣，肢尾冷等体征并伴有体重减轻，显著低于对照组($P<0.05$)，巫山淫羊藿总酚酸治疗组上述体征出现较迟(6~8d)，程度较轻，且无体重下降(略有增加)，与对照组相比，无显著性差异($P<0.05$)。见表 1。

TFE 对抗羟基脲鼠 IL-2、NK 细胞活性和脾脏指数的影响：巫山淫羊藿总酚酸治疗组与模型对照组相比 IL-2、NK 细胞活性、脾脏指数明显升高，有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，而与正常组相比则差异无显著性，表明巫山淫羊藿总酚酸可拮抗羟基脲对小鼠的免疫抑制作用，见表 1。

表 1 各实验组体重、IL-2，NK 细胞活性

剂 量 组 别 (mg/kg·d)	n	体重(g) (第 11 天)	IL-2 (U/mL)	NK (%)	脾脏指数 (脾重 mg/体重 g)
对照组 -	13	22.1±1.96**	24.16±9.21***	80.93±6.752**	49.8±4.22
模型组 -	11	19.0±2.10	10.87±1.89	69.27±13.810	46.9±5.34
巫山淫羊藿 300	12	21.3±2.04*	14.53±3.21*	81.62±6.592**	52.6±5.81*
总酚酸 600	12	21.9±1.98**	26.98±15.72**	82.34±10.662**	53.4±6.02*
1200	12	21.4±2.16*	18.28±16.04*	82.78±12.402**	51.3±4.74*

与模型组相比：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

模型对照组小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性明显降低，与正常组相比有显著性差异，显示用羟基脲建立免疫功能低下小鼠模型是成功的。而且模型对照组小鼠还出现了明显的类似中医“阳虚”的体征，淫羊藿为临床常用的补阳药物，用其主要有效成分巫山淫羊藿总酚酸进行治疗，符合“因证论治”、“虚则补之”的中医理论，本实验中巫山淫羊藿总酚酸治疗组小鼠“阳虚”体征均明显减轻，正常组和治疗组体重略有增加，而模型对照组小鼠体重反而减少，表明巫山淫羊藿总酚酸对改善羟基脲所致小鼠整体机能状态有明显的作用。

IL-2 主要由 CD+4 和 CD+8T 细胞产生，此外 NK 细胞、LAK 细胞亦可产

生, IL-2 分布于 T 细胞、B 细胞、NK 细胞及 MΦ 表面。IL-2 通过与上述细胞膜表面的 IL-2R 结合, 而引起广泛的生物学效应, 是参与免疫应答的重要细胞因子。IL-2 活性在很大程度上决定 T 细胞依赖性免疫应答的强度。NK 细胞通过直接接触和 ADCC 效应对多种肿瘤细胞和病毒感染细胞有较强的杀伤作用。此外还有重要的免疫调节和对造血系统的调节作用。而静止的 NK 细胞必须经活化后才能发挥其杀伤作用。NK 细胞膜表面表达中等亲和力的 IL-2R, IL-2 可正反馈上调 NK 细胞活性。巫山淫羊藿总酚酸对模型小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性及升高脾脏指数的增强作用, 显示巫山淫羊藿总酚酸对免疫功能低下小鼠具有良好的免疫促进作用。

在巫山淫羊藿总酚酸 300 和 600mg/(kg·d)实验组间 IL-2 活性呈一定程度的剂量依赖关系(见表 1), 而巫山淫羊藿总酚酸 1200mg/(kg·d)剂量组未明显随剂量增加的 IL-2 和 NK 细胞活性增加, 提示在此基础上再加大 TFE 给药量, 可能治疗组小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性没有进一步促进作用, 反而有可能出现巫山淫羊藿总酚酸的毒副作用。

羟基脲的作用环节主要在于抑制核苷酸还原酶的活性, 从而抑制 DNA 合成。淋巴细胞是分裂增殖旺盛的细胞, 对羟基脲抑制 DNA 合成的影响, 会远较一般细胞敏感, 故细胞活性也易受到抑制。巫山淫羊藿总酚酸很可能是通过拮抗羟基脲对核苷酸还原酶的抑制, 从而促进核酸合成而达到增强免疫功能的作用。

可以看出巫山淫羊藿总酚酸有拮抗羟基脲抑制模型小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性的作用, 尤以 600mg/(kg·d)剂量组效果最为显著。

五、制剂形式

可以巫山淫羊藿总酚酸为原料, 制成各种常用制剂类型如胶囊剂、片剂等。

附图说明

图 1 液体菌悬液发光(毒性基因表达)曲线

图 2 液体菌悬液细胞生长(毒性基因生长)曲线

图 3 巫山淫羊藿总酚酸自由基清除率试验

具体实施方式

实施例 1:

取 200 g 巫山淫羊藿，用 3000 ml 水煎煮 3 次，每次 1 小时，合并煎煮液，离心取上清液；水煎煮液上 AB-8 大孔树脂柱，每克树脂上 2mL 药液，大孔树脂先用 3 倍的水洗脱，弃去水洗液，大孔树脂再用 2 倍的 30%乙醇洗脱，弃去洗脱液，大孔树脂再用 5 倍的 70%乙醇洗脱，回收洗脱液中的乙醇，减压抽干，得残留物，即巫山淫羊藿总酚酸（以朝藿定 C 计含量 53%）。

实施例 2:

将实施例 1 制备得到的巫山淫羊藿总酚酸于 95%的乙醇中溶解后上 AB-8 大孔树脂，70%乙醇洗脱，回收洗脱后的残留物与 2 倍的 95%乙醇中，过滤，回收乙醇并抽干，再用乙酸乙酯热溶，放置，析出结晶，过滤，得纯化后的巫山淫羊藿总酚酸（以朝藿定 C 计含量 70%）。

实施例 3

取巫山淫羊藿总酚酸 50 克（以朝藿定 C 计总酚酸含量为 55%），粉碎过 100 目筛，加入淀粉 3 克混合均匀，再加入 10%淀粉浆适量制成软材，20 目筛网制粒，60-70℃干燥，过 30 目筛整粒，加入羟丙基纤维素 3 克和硬脂酸镁 1 克充分混匀，压片，薄膜包衣，即得片剂 1000 片。每片含巫山淫羊藿总酚酸 50mg。

实施例 4

取巫山淫羊藿总酚酸 50 克（以朝藿定 C 计总酚酸含量为 70%），粉碎过 100 目筛，加入淀粉 3 克，微晶纤维适量，用稀乙醇制粒，20 目筛网制粒，60-70℃干燥，整粒，加入硬脂酸镁适量，充分混匀，填入胶囊即得。

每日服用 100-300mg 巫山淫羊藿总酚酸。

实施例 5

取巫山淫羊藿总酚酸（以朝藿定 C 计总酚酸含量为 58%）30 克，粉碎过 100 目筛，加入淀粉 300 克，加入 10%淀粉浆适量制成颗粒，60-70℃干燥，分装 200 袋。

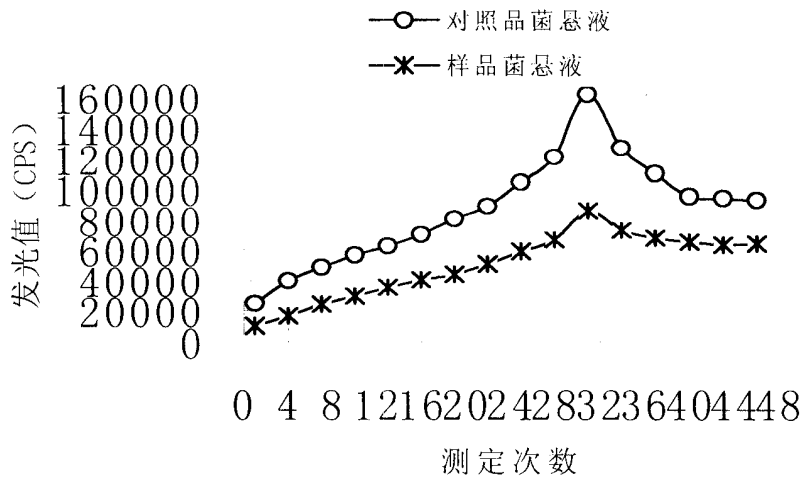


图 1

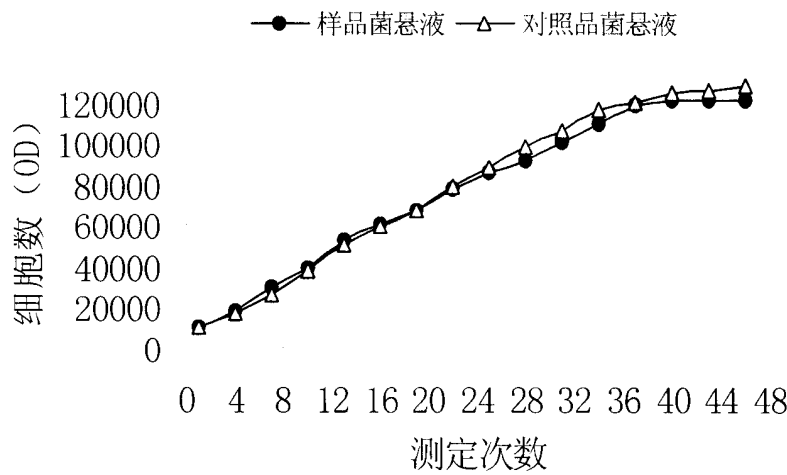


图 2

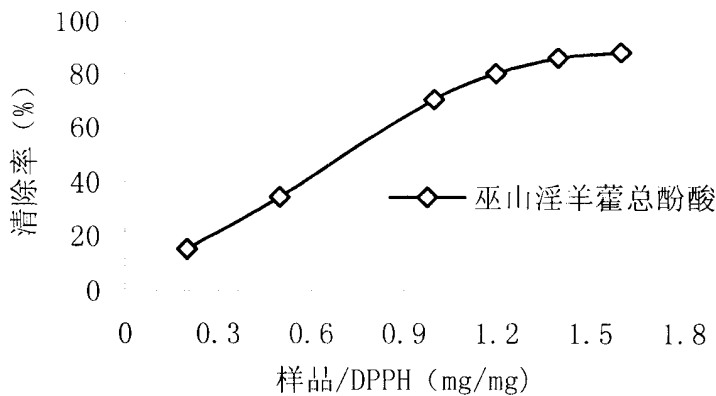


图 3