



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109999065 A

(43)申请公布日 2019.07.12

(21)申请号 201811509370.2

(22)申请日 2018.12.11

(71)申请人 青海大学

地址 810000 青海省西宁市城北区宁大路
251号

(72)发明人 叶英 索有瑞 王树林 韩丽娟
院珍珍

(74)专利代理机构 北京国坤专利代理事务所
(普通合伙) 11491

代理人 郭伟红

(51)Int.Cl.

A61K 36/185(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

(54)发明名称

茶蔗子果实乙酸乙酯提取物抗菌用途

(57)摘要

茶蔗子果实乙酸乙酯提取物抗菌用途。本发明提供了如下所述茶蔗子果实提取物在制备抗菌产品中的用途;所述提取物中,有机酸含量为2.0~2.5%w/w,黄酮含量为1.8~2.5%w/w。本发明研究发现,上述提取物具有良好的抗菌活性。

1. 如下所述茶藨子果实提取物在制备抗菌产品中的用途;所述提取物中,有机酸含量为2.0~2.5%w/w,黄酮含量为1.8~2.5%w/w。
2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于:所述提取物中,有机酸含量为2.2~2.4%,黄酮含量为2.2~2.4%w/w。
3. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于:所述提取物为茶藨子果实的乙酸乙酯提取物。
4. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于:所述提取物的制备方法包括如下内容:
 - (1) 取除去乙醇后的茶藨子果实乙醇提取物;
 - (2) 茶藨子果实乙醇提取物用石油醚-水系统进行提取,水相备用;
 - (3) 水相用乙酸乙酯提取,取乙酸乙酯提取液,除去溶剂即得提取物。
5. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于:所述茶藨子果实乙醇提取物采用浓度为60~95%乙醇进行提取。
6. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于:茶藨子果实乙醇提取物为茶藨子果实85~95%v/v乙醇提取物和65~75%v/v乙醇提取物的混合物;进一步地,茶藨子果实乙醇提取物是由茶藨子果实为原料,依次用85~95%v/v乙醇、65~75%v/v乙醇提取后,合并乙醇提取物所得。
7. 根据权利要求1~6任意一项所述的用途,其特征在于:所述茶藨子果实为茶藨子属植物的果实;进一步地,所述茶藨子属植物选自狭果茶藨子。
8. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于:所述细菌选自大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、铜绿芽孢杆菌中的一种或多种;进一步选自金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、铜绿芽孢杆菌中的一种或多种。
9. 一种抗菌产品,其特征在于:它是由权利要求1-7中所述茶藨子果实提取物为活性成分。

茶藨子果实乙酸乙酯提取物抗菌用途

技术领域

[0001] 本发明属于涉及一种茶藨子果实乙酸乙酯提取物的抗菌用途。

技术背景

[0002] 茶藨子属植物形态变异较大,类型复杂,全世界约有160种,主要分布于欧洲和北美气候温暖地区,在亚洲、南美和北非也分布广泛,中国境内有59种30个变种,仅青海省就分布有11种1个变种。

[0003] 狭果茶藨子(*Ribes stenocarpum* Maxim.)属虎耳草科茶藨子属植物,为落叶灌木,生于海拔2800米以下的山坡灌丛、杂木林下或山沟中。《凉山州中草药资源普查名录》记载狭果茶藨子的茎和枝可用于肝炎的治疗,《晶珠本草》中记载茶藨子有敛毒、除黄水并能收敛各种脉管病的作用。狭果茶藨子的果实为多汁浆果,风味独特多样,从苦、酸到酸甜可口,老百姓通常将茶藨子的果实生食用于防治感冒。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于对茶藨子果实的进一步研究开发。

[0005] 具体地,本发明提供了如下所述茶藨子果实提取物在制备抗菌产品中的用途;所述提取物中,有机酸含量为2.0~2.5%w/w,黄酮含量为1.8~2.5%w/w。

[0006] 进一步地,进一步地,所述提取物中有机酸含量为2.2~2.4%,黄酮含量为2.2~2.4%w/w;或者,机酸含量为2.0~2.2%,黄酮含量为1.9~2.1%w/w。实验表明,在上述范围内,该提取物都有良好的抗菌活性。

[0007] 其中,所述提取物为茶藨子果实的乙酸乙酯提取物。

[0008] 其中,所述提取物的制备方法包括如下内容:

[0009] (1) 取除去乙醇后的茶藨子果实乙醇提取物;

[0010] (2) 茶藨子果实乙醇提取物用石油醚-水系统进行提取,水相备用;

[0011] (3) 水相用乙酸乙酯提取,取乙酸乙酯提取液,除去溶剂即得提取物。

[0012] 可以根据需求,制备出干燥提取物或者含水提取物。

[0013] 其中,所述茶藨子果实乙醇提取物采用浓度为60~95%乙醇进行提取。

[0014] 其中,茶藨子果实乙醇提取物为茶藨子果实85~95%v/v乙醇提取物和65~75%v/v乙醇提取物的混合物。

[0015] 进一步地,茶藨子果实乙醇提取物是由茶藨子果实为原料,依次用85~95%v/v乙醇、65~75%v/v乙醇提取后,合并乙醇提取物所得。

[0016] 本发明还提供了一种茶藨子果实提取物的制备方法,包括如下内容:

[0017] (1) 取除去乙醇后的茶藨子果实乙醇提取物;

[0018] (2) 茶藨子果实乙醇提取物用石油醚-水系统进行提取,水相备用;

[0019] (3) 水相用乙酸乙酯提取,取乙酸乙酯提取液,除去溶剂即得提取物。

[0020] 前述茶藨子果实为茶藨子属植物的果实;本发明一个具体实施方式中,所述茶藨

子属植物选自狭果茶藨子。

[0021] 所述细菌选自大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、铜绿芽孢杆菌中的一种或多种;进一步发现,本发明提取物尤其对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、铜绿芽孢杆菌中的一种或多种的抗菌活性显著。

[0022] 本发明提供了一种抗菌产品,它是由上述茶藨子果实提取物为活性成分。

[0023] 本发明所述“w/w”为质量比,可以是g/g,也可以是kg/kg、mg/mg等。

[0024] 本发明研究发现,上述提取物具有良好的抗菌活性,同时还具备良好的抗疲劳作用。

[0025] 本发明中,乙醇提取物的制备方法,采用常规的方法即可,例如加热提取、常温提取、加压提取、常压提取,具体表现可以是回流提取、浸渍提取、渗漉提取、微波辅助提取、超声提取、闪式提取等等。

[0026] 本发明中,有机溶剂提取,主要是使用有机溶剂从水相中提取分离物质,利用了相似相容原理,通过溶解度差异、有机溶剂和水的不同性质,将不同的成分分离。

[0027] 本发明中所述“石油醚-水系统”,是指通过石油醚和水同时存在的条件下,使用石油醚从水相中提取分离物质,与前述“有机溶剂提取”相似。

[0028] 本发明中“除去乙醇”是指,尽量将提取液中的乙醇除去。当然,在本领域常用的操作方法中,乙醇往往难以尽去,可能会出现有乙醇残留的情况,但少量的乙醇残留也属于本发明的保护范畴。常用的方法多为减压回收,当然也可以常压加热挥发乙醇。

[0029] 本发明中“除去溶剂”,与“除去乙醇”相似。

[0030] 本发明中所述“产品”,包括但不限于用在药品、保健品、食品添加剂等各个方面。在实际生产中,其使用应当符合相关行政法规的要求。

具体实施方式

[0031] 本发明具体实施方式中使用的各种材料信息如下。

[0032] 狭果茶藨子果实于2017年9月采自青海省互助县,由青海大学农牧学院孙海群教授鉴定为狭果茶藨子(*Ribes stenocarpum* Maxim.)果实,烘干粉碎备用。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Monilia albican*)、铜绿芽孢杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)购自杭州百思生物技术有限公司。

[0033] 实验动物:健康昆明小鼠50只,体重(20±2g),SPF级,由中国农业科学院兰州兽医研究所提供。

[0034] KC-130小型粉碎机北京开创同和科技发展有限公司;DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器河南予华仪器有限公司;HH-4数显恒温水浴锅国华电器有限公司;RE-52A旋转蒸发器上海亚荣生化仪器厂;250B生化培养箱常州国华电器有限公司;YM-75立式压力蒸汽灭菌器上海申安医疗器械厂;UV-2600紫外可见分光光度计岛津企业管理有限公司;SC2201匀浆机上海小岩工贸发展有限公司;XW-80A旋涡混匀器上海驰唐电子有限公司;H/T16MM-台式高速离心机湖南赫西装备仪器有限公司;SM600酶标仪上海永创医疗器械有限公司;DHG-9240A电热鼓风干燥箱上海一恒科学仪器有限公司;14-0807超声波清洗机宁波新芝生物科技股份有限公司;ESJ110-4B电子天平沈阳龙腾电子有限公司。

[0035] MH琼脂培养基、MH肉汤培养基等生物试剂购自杭州百思生物技术有限公司；肌糖原(MG)试剂盒、肝糖原(LG)试剂盒、血清尿素氮(BUN)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所，无水乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、石油醚、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝等均为分析纯。

[0036] 实施例1本发明提取物的制备(即乙酸乙酯提取物II)

[0037] 称取一定量的狭果茶藨子果实样品，90%乙醇加热回流提取三次，收集滤液，滤渣再用70%乙醇提取三次，过滤合并所有滤液，浓缩后用石油醚萃取，弃去石油醚层，用乙酸乙酯萃取水相，合并有机相，制备得到乙酸乙酯提取物II。

[0038] 实施例2本发明提取物的制备(即乙酸乙酯提取物II)

[0039] 称取一定量的狭果茶藨子果实样品，85%乙醇加热回流提取2次，收集滤液，滤渣再用75%乙醇提取三次，过滤合并所有滤液，浓缩后用石油醚萃取，弃去石油醚层，用乙酸乙酯萃取水相，合并有机相，除去溶剂干燥后，得乙酸乙酯提取物II。

[0040] 实施例3本发明提取物的制备(即乙酸乙酯提取物II)

[0041] 称取一定量的狭果茶藨子果实样品，95%乙醇加热回流提取2次，收集滤液，滤渣再用75%乙醇提取2次，过滤合并所有滤液，浓缩后用石油醚萃取，弃去石油醚层，用乙酸乙酯萃取水相，浓缩有机相，得乙酸乙酯提取物II。

[0042] 本发明后续试验中，将提取物制备成干浸膏，便于计算。

[0043] 总有机酸含量测定 分别称取狭果茶藨子果实不同提取物0.5g，50%乙醇溶解并定容至50mL，吸取10mL于250mL锥形瓶中，加1%酚酞指示剂2滴，用0.1mol/L的氢氧化钠标准液滴定至中性，记录氢氧化钠溶液用量，根据下列公式计算总有机酸含量，重复三次取平均值。

[0044] 总有机酸含量(%) = $(C \times V \times 40 \times K) / (m \times 10 / 50) \times 100\%$ (公式1)

[0045] 式中：V-滴定消耗氢氧化钠溶液体积(mL)；C-氢氧化钠标准液浓度(mol/L)；m-样品质量(g)；K-换算成主要酸的系数(即1毫摩尔氢氧化钠相当于主要酸的系数，核果类采用酒石酸，茶藨子为核果，K=0.075)。

[0046] 总有机酸含量的测定结果

[0047] 表1不同提取物的有机酸含量测定结果

[0048]

项目	有机酸提取物 I	乙酸乙酯提取物 II	乙酸乙酯提取物 III	正丁醇提取物 IV
总有机酸含量(%)	4.18	2.30	2.18	0.66

[0049] 由表1可知，狭果茶藨子果实不同极性部位中总有机酸的含量有差异，有机酸提取物I中有机酸含量最高，为4.18%，正丁醇提取物IV的有机酸含量最少，为0.66%，两种乙酸乙酯提取物中有机酸含量差异不大，说明乙酸乙酯提取物II在大孔吸附树脂柱层析过程中有机酸主要吸附于聚酰胺大孔吸附树脂，且后期通过碱水洗脱可有效回收大部分有机酸，达到有机酸初步富集纯化的目的。

[0050] 总黄酮含量测定绘制芦丁标准曲线：用80%乙醇溶解芦丁对照品10mg，定容至25ml，准确吸取对照品0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5mL分别置于10mL容量瓶中，采用亚硝酸钠-硝酸铝分光光度法测定各溶液的吸光度值，以芦丁标准液浓度为横坐标，吸

光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

[0051] 样品中总黄酮含量测定:分别称取狭果茶藨子果实不同提取物0.1g,80%乙醇溶解后定容至50mL,吸取0.5mL样品于10mL容量瓶中,加入5%亚硝酸钠溶液0.3mL静置6min,加入10%硝酸铝溶液0.3mL静置6min,再加入4%氢氧化钠溶液4mL,待充分反应后蒸馏水定容,于356nm处测定样品溶液的吸光值,根据标准曲线方程及下列公式计算样品的总黄酮含量。

[0052] 总黄酮含量(%) = $(C \times K \times V) / M \times 100\%$ (公式2)

[0053] 式中:C-测定的不同吸光度值所对应的样品总黄酮浓度(mg/mL);K-稀释倍数;V-移取稀释后的样品溶液体积(mL);M-称取的样品质量(g)。

[0054] 标准曲线及总黄酮化合物含量测定

[0055] 芦丁标准曲线与回归方程

[0056] 芦丁标准曲线回归方程: $y = 30.421x + 0.1623$, $R^2 = 0.9952$,符合线性关系。

[0057] 总黄酮化合物含量测定结果

[0058] 表2不同提取物中总黄酮化合物含量测定结果

[0059]

项目	有机酸提取物 I	乙酸乙酯提取物 II	乙酸乙酯提取物 III	正丁醇提取物 IV
总有机酸含量 (%)	—	2.28	2.00	2.20

[0060] 由表2可知,黄酮化合物主要存在于乙酸乙酯提取物 II、乙酸乙酯提取物 III 和正丁醇提取物 IV 中,且三种提取物中总黄酮化合物含量较为接近,说明分布于狭果茶藨子果实中的黄酮化合物极性差异较大。

[0061] 其他不同提取物的制备方法如下:

[0062] 有机酸提取物的制备 称取100g狭果茶藨子果实样品,加入75%乙醇浸泡1h,于索氏提取器中加热回流提取两次,每次2-3h,冷却后抽滤,收集滤液并浓缩至无醇味后加入5%氢氧化钠溶液调PH至11,用乙酸乙酯反复萃取溶液至无色,收集碱水层,5%盐酸调PH至2,再用乙酸乙酯反复萃取至无色,合并萃取液,减压回收溶剂,得有机酸提取物 I 乙酸乙酯提取物 III 和正丁醇提取物的制备称取一定量的狭果茶藨子果实样品,90%乙醇加热回流提取三次,收集滤液,滤渣再用70%乙醇提取三次,过滤合并所有滤液,浓缩后用石油醚萃取,弃去石油醚层,用乙酸乙酯萃取水相,浓缩有机相,得乙酸乙酯提取物 II,水相再用正丁醇萃取,浓缩正丁醇层,得正丁醇提取物 IV。乙酸乙酯提取物 II 过聚酰胺大孔吸附树脂,依次用2倍柱体积的蒸馏水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇和无水乙醇洗脱,然后将树脂倒出,用2%盐酸浸泡树脂2h,蒸馏水洗至中性,再加入2%氢氧化钠溶液浸泡2h,过滤收集滤液,浓缩得到乙酸乙酯提取物 III。

[0063] 狭果茶藨子果实提取物的抑菌活性研究

[0064] 1菌悬液的制备选取大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、铜绿芽孢杆菌作为受试菌种,斜面活化后接种至肉汤培养基制备菌悬液,37℃恒温培养4h,灭菌生理盐水稀释培养液,用麦氏比浊管比浊至0.5麦氏单位。

[0065] 2药敏片的制备称取5g提取物,50%乙醇水浴加热使溶解,调整药液浓度分别为100mg/mL、200mg/mL、300mg/mL,将灭菌空白药敏片浸入不同浓度药液中,浸泡12h后烘干备

用。

[0066] 3K-B纸片扩散法测定不同提取物的抑菌作用将融化并灭菌的琼脂培养基冷却至50℃倒平板备用,棉签蘸取菌悬液均匀涂布培养基,反复几次,每次将平板旋转60度。用镊子将浸有不同浓度提取物的药敏片分别贴于培养基表面,用镊尖压平,以50%乙醇浸泡过的药敏片作为空白对照,以氨苄西林(10IU/片)、庆大霉素(10IU/片)、青霉素(10IU/片)药敏片为阳性对照,37℃恒温培养24h,游标卡尺测量菌落直径,十字交叉测量,取平均值。

[0067] 4二倍稀释法测定最小抑菌浓度和最低杀菌浓度配制200mg/mL的狭果茶藨子果实提取物,分别取1体积的不同提取物和已灭菌的液体培养基于试管中,混合均匀,以对倍稀释法逐管稀释药液,再加入等体积的稀释级菌液至各抑菌管,摇匀,使不同提取物终浓度为50、25、12.5、6.25、3.13、1.56mg/mL,并设置空白对照,将各试管置于37℃培养箱中培养24h。

[0068] 最低抑菌浓度(MIC)的判定:观察培养后各试管的浑浊情况,试管澄清且摇匀后仍澄清者,认为该管无菌生长,若试管内呈浑浊状态则表明有菌生长,从无菌生长试管中找出最低浓度试管,其所对应的药液浓度即为最低抑菌浓度。

[0069] 最低杀菌浓度(MBC)的判定:依次将未见细菌生长的各管移取适量液体均匀涂布于固体培养基平板上,37℃培养24h,以平板上菌落数少于5个的最小药液浓度作为最低杀菌浓度(MBC)。

[0070] 5提取物的抑菌活性结果

[0071] 5.1K-B纸片扩散法实验结果与分析

[0072] 表3提取物浓度为100mg/mL时抑菌圈直径

[0073]

抑菌圈直径 (mm)	有机酸 提取物 I	乙酸乙酯 提取物 II	乙酸乙酯 提取物 III	正丁醇 提取物 IV	氨苄西林 (阳性对照)
大肠杆菌 (<i>E.coli</i>)	7.3	11	9.2	6.5	22
沙门氏菌 (<i>S.typhi</i>)	6.2	7	10	6.9	25
枯草杆菌 (<i>B.subtilis</i>)	13	9	11	7	24
金黄色葡萄球菌 (<i>S.aureus</i>)	7	18	16.5	6.5	15
白色念珠菌 (<i>C.albicans</i>)	18	20	18	14	18
铜绿假单胞菌 (<i>P.aeruginosa</i>)	16	18.5	17.5	11	12

[0074] 注:抑菌圈直径大于20mm为极敏;15-20mm为高敏;10-15mm为中敏;7-9mm为低敏;小于6mm为不敏感。

[0075] 表4提取物浓度为200mg/mL时的抑菌圈大小

[0076]

抑菌圈直径 (mm)	有机酸 提取物 I	乙酸乙酯 提取物 II	乙酸乙酯 提取物 III	正丁醇 提取物 IV	庆大霉素 (阳性对照)
大肠杆菌 (<i>E.coli</i>)	12.5	11	14	6.4	18
沙门氏菌 (<i>S.typhi</i>)	11	11.5	11	7	18
枯草杆菌 (<i>B.subtilis</i>)	15	11	12	7.5	24
金黄色葡萄球菌 (<i>S.aureus</i>)	9	22.5	18	6.5	16
白色念珠菌 (<i>C.albicans</i>)	20	22.5	20	15	19
铜绿假单胞菌 (<i>P.aeruginosa</i>)	21	20	20	11	18

[0077] 注:抑菌圈直径大于20mm为极敏;15-20mm为高敏;10-15mm为中敏;7-9mm为低敏;小于6mm为不敏感。

[0078] 表5提取物浓度为300mg/mL时的抑菌圈大小

[0079]

抑菌圈直径 (mm)	有机酸 提取物 I	乙酸乙酯 提取物 II	乙酸乙酯 提取物 III	正丁醇 提取物 IV	青霉素 (阳性对照)
大肠杆菌 (<i>E.coli</i>)	13.2	11	16.5	6.4	10
沙门氏菌 (<i>S.typhi</i>)	12.5	12.5	13	7.5	16
枯草杆菌 (<i>B.subtilis</i>)	18	13.5	13.5	8	12
金黄色葡萄球菌 (<i>S.aureus</i>)	12	23	22	6.5	9
白色念珠菌 (<i>C.albicans</i>)	22	23	21	15.5	13
铜绿假单胞菌 (<i>P.aeruginosa</i>)	22	21	22	11.5	13

[0080] 注:抑菌圈直径大于20mm为极敏;15-20mm为高敏;10-15mm为中敏;7-9mm为低敏;小于6mm为不敏感。

[0081] 由表3、表4、表5可知,狭果茶藨子果实中不同提取物对受试菌种抗菌活性具有较大差异,其中乙酸乙酯提取物 II 和乙酸乙酯提取物 III 对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌及铜绿假单胞菌抗菌活性较为突出,当提取物浓度为100mg/mL时,抑菌圈直径均大于15mm,表现为高敏,抑菌效果优于阳性对照药氨苄西林(10IU/片),且抑菌活性随药液浓度的增大而增强,当提取物浓度达到300mg/mL时,对上述三种菌的抑菌圈直径均大于20mm,表现为极敏,且抑菌效果优于阳性对照药青霉素(10IU/片)。此外,有机酸提取物 I 对白色念珠菌和铜绿假单胞菌抑制效果也不错,浓度为300mg/mL时优于阳性对照药青霉素(10IU/片),浓度为100mg/mL、200mg/mL时分别与氨苄西林(10IU/片)和庆大霉素(10IU/片)相当。

[0082] 5.2最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)

[0083] 表6不同提取物对白色念珠菌MIC和MBC值测定结果

[0084]

	最低抑菌浓度(MIC) / (mg/mL)	最低杀菌浓度(MBC) / (mg/mL)
有机酸提取物 I	1.56	3.13
乙酸乙酯提取物 II	1.56	3.13
乙酸乙酯提取物 III	3.13	6.25
正丁醇提取物 IV	3.13	6.25

[0085] 表7不同提取物对铜绿假单胞菌MIC和MBC值测定结果

[0086]

	最低抑菌浓度(MIC) / (mg/mL)	最低杀菌浓度(MBC) / (mg/mL)
有机酸提取物 I	1.56	3.13
乙酸乙酯提取物 II	1.56	3.13
乙酸乙酯提取物 III	3.13	6.25
正丁醇提取物 IV	6.25	12.5

[0087] 由表6、表7可知,狭果茶藨子果实中不同提取物对不同菌种的MIC和MBC值有差异,其中有机酸提取物 I 和乙酸乙酯提取物 II 对白色念珠菌和铜绿假单胞菌抗菌活性最好,且MIC值均为1.56mg/mL, MBC值均为3.13mg/mL。

[0088] 狭果茶藨子果实中乙酸乙酯提取物 II 抗疲劳活性试验

[0089] 狭果茶藨子果实抗疲劳活性研究

[0090] 1动物分组与给药小鼠一周适应性饲养后分为空白对照组(双蒸水)、红景天阳性对照组(100mg/kg)、乙酸乙酯提取物 II 高剂量组(200mg/kg)、乙酸乙酯提取物 II 中剂量组

(100mg/kg)、乙酸乙酯提取物Ⅱ低剂量组(50mg/kg)共五组,每组10只,每天定时、定量灌胃一次,连续灌胃28天,灌胃饲养期间小鼠自由饮水、进食。

[0091] 2小鼠负重游泳试验参照Wei Tan等人的研究进行小鼠负重游泳试验。小鼠喂养4周并未次灌胃给药30min后,在小鼠尾部缠绕质量约为其体重5%的铅皮进行负重游泳,水的温度保持在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。记录小鼠自游泳开始至小鼠头部全部浸入水中且8S不能重新浮出水面的时间,作为小鼠的负重游泳时间。

[0092] 3小鼠脏器湿重及各生化指标的测定小鼠负重游泳离水休息30min,眼球采血后脱颈椎处死,解剖取出心、肝、脾、肾,用生理盐水漂洗,称取重量后记录湿重数据。采集的血液分离血清,分别按试剂盒说明书测定血清尿素氮、乳酸脱氢酶含量。解剖取出肝脏和后腿肌肉,按试剂盒说明处理样品并测定肝糖原,肌糖原含量。

[0093] 4统计分析所有数据均用SPSS 22.0软件对数据进行方差分析和LSD比较,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示(\bar{x} 表示平均数;s表示方差), $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

[0094] 实验结果:

[0095] 1乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠负重游泳时间的影响

[0096] 表8乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠负重游泳时间的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

[0097]

组别	动物数/只	剂量 (mg/kg)	负重游泳时间 (min)
空白对照组	8	—	139.43±26.09
阳性对照组 (红景天)	8	100	196.00±15.83*
提取物低剂量组	8	50	196.55±4.19*
提取物中剂量组	8	100	162.55±3.38*
提取物高剂量组	8	200	158.70±6.69*

[0098] 注:*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$

[0099] 如表8所示,与空白对照组相比,灌服狭果茶藨子果实乙酸乙酯提取物Ⅱ不同剂量组小鼠的负重游泳时间均显著延长($p < 0.05$),其中低剂量组的小鼠游泳时间最长($196.55 \pm 4.19\text{min}$),与红景天阳性对照组相当,说明狭果茶藨子果实乙酸乙酯提取物Ⅱ能延长小鼠负重游泳时间,减少疲劳状态。

[0100] 2乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠体重的影响

[0101] 表9乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠体重的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

[0102]

组别	1周	2周	3周	4周
空白对照组	22.16±0.62	32.89±1.01	34.23±0.74	34.19±1.41
阳性对照组 (红景天)	22.60±0.52	32.66±0.85	35.79±1.03	35.38±1.62
提取物低剂量组	21.89±1.02	33.51±1.12	34.86±0.56	35.02±0.85
提取物中剂量组	21.66±0.97	32.43±1.36	34.08±1.28	34.76±2.04
提取物高剂量组	21.35±0.47	32.89±0.57	33.54±0.87	34.59±1.79

[0103] 注:*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$

[0104] 表9所示为饲喂过程中各组小鼠的体重变化,结果显示:灌服狭果茶藨子果实乙酸乙酯提取物Ⅱ不同剂量组小鼠体重与空白对照组相比均无明显变化,给药28天后,各剂量组小鼠体重变化与空白对照组无差异($p > 0.05$),说明狭果茶藨子果实乙酸乙酯提取物Ⅱ

不会对小鼠体重造成影响。

[0105] 3乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠脏器湿重的影响

[0106] 表10乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠脏器湿重的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

[0107]

组别	心 (g)	肝 (g)	脾 (g)	肾 (g)
空白对照组	0.18±0.01	1.58±0.07	0.12±0.01	0.45±0.04
阳性对照组 (红景天)	0.18±0.01	1.57±0.10	0.11±0.01	0.46±0.04
提取物低剂量组	0.19±0.01	1.59±0.15	0.12±0.01	0.45±0.05
提取物中剂量组	0.19±0.01	1.58±0.08	0.11±0.02	0.44±0.02
提取物高剂量组	0.18±0.03	1.58±0.07	0.11±0.01	0.45±0.02

[0108] 注:*表示P<0.05;**表示P<0.01

[0109] 表10所示,灌服不同浓度的狭果茶藨子乙酸乙酯提取物Ⅱ28d后,解剖称量各组小鼠脏器湿重,经统计学分析后发现,各剂量组小鼠脏器湿重与空白对照组均无明显差异 (p>0.05),表明灌服不同剂量的狭果茶藨子乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠脏器重量无明显影响。

[0110] 4乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠糖原指标的影响

[0111] 表11乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠糖原的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

[0112]

组别	剂量 (mg/kg)	肝糖原 (mg/g)	肌糖原 (mg/g)
空白对照组	—	34.39±2.42	14.86±4.30
阳性对照组 (红景天)	100	36.19±6.72	18.96±4.35
提取物低剂量组	50	44.11±20.95*	20.64±1.73*
提取物中剂量组	100	40.60±23.66*	20.20±1.93*
提取物高剂量组	200	36.38±86.35	18.86±1.93

[0113] 注:*表示P<0.05;**表示P<0.01

[0114] 表11所示,实验组的小鼠运动后肝糖原、肌糖原水平显著高于空白组 (P<0.05),且低剂量组、中剂量组糖原水平均高于红景天阳性对照组,说明狭果茶藨子果实乙酸乙酯提取物Ⅱ能明显提高小鼠的糖原储备能力,提高运动过程中糖代谢能力,改善运动耐力进而增强小鼠的抗疲劳活性。

[0115] 5乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠血清指标的影响

[0116] 表12乙酸乙酯提取物Ⅱ对小鼠血清指标的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

[0117]

组别	剂量 (mg/kg)	BUN (mmol/L)	LDH 活力 (U/L)
空白对照组	—	10.91±1.71	275.00±45.56
阳性对照组	100	7.14±0.96**	388.22±77.94*
提取物低剂量组	50	4.65±1.36**	400.72±97.35**
提取物中剂量组	100	8.50±1.56**	389.74±34.91*
提取物高剂量组	200	6.61±1.72**	368.97±95.85*

[0118] 注:*表示P<0.05;**表示P<0.01

[0119] 表12所示,与空白对照组相比,给药28天后狭果茶藨子果实乙酸乙酯提取物Ⅱ不

同剂量组的小鼠血清尿素氮均极显著降低 ($P < 0.01$), 低剂量组BUN含量仅为 $4.65 \pm 1.36 \text{ mmol/L}$, 其含量降低到空白对照组的一半以下, 且远远低于红景天阳性对照组, 运动过程中血清尿素氮水平的降低表明小鼠蛋白质和氨基酸代谢减少, 显示出良好的运动适应性。此外, 不同剂量给药组与空白对照组相比, 小鼠乳酸脱氢酶水平均明显提高, 其中低剂量组差异极显著 ($P < 0.01$), 含量为 $400.72 \pm 97.35 \text{ U/L}$, 高于红景天阳性对照组, 说明狭果茶藨子果实中乙酸乙酯提取物 II 可提高运动后小鼠乳酸脱氢酶活性, 将乳酸转化为丙酮酸, 加速乳酸清除, 从而延缓小鼠运动性疲劳。