



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102423324 A

(43) 申请公布日 2012.04.25

(21) 申请号 201110428612.7

(22) 申请日 2011.12.20

(66) 本国优先权数据

201010595839.6 2010.12.20 CN

(71) 申请人 成都中医药大学

地址 611137 四川省成都市温江区柳台大道  
1166 号

(72) 发明人 彭腾 邓赞 张旭 邱建平

李鸿翔 贺钢民

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务

所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡

(51) Int. Cl.

A61K 36/185(2006.01)

A61P 39/06(2006.01)

A61K 133/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

一种钟花报春花提取物及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明提供了一种钟花报春花提取物,该提取物中总黄酮的含量以芦丁计不得低于 50% w/w。本发明钟花报春花提取物对超氧阴离子自由基、羟自由基、DPPH 自由基均具有良好的清除能力,表明钟花报春花提取物具有良好的抗氧化作用,为抗氧化的保健品或 / 和药物提供了一种新的选择。

1. 一种钟花报春花提取物,其特征在于:该提取物中总黄酮的含量以芦丁计不得低于50% w/w。
2. 根据权利要求1所述的提取物,其特征在于:该提取物中总黄酮的含量以芦丁计为50-60% w/w。
3. 根据权利要求2所述的提取物,其特征在于:该提取物中总黄酮的含量以芦丁计为50-55% w/w。
4. 根据权利要求1-3任意一项所述的提取物,其特征在于:所述的钟花报春花提取物来源于报春花科报春花属植物钟花报春 *Primula sikkimensis* Hook 的花的提取物。
5. 一种制备权利要求1-4任意一项所述的提取物的方法,它包括如下步骤:
  - (1) 取钟花报春花,以50-95% V/V 乙醇提取,合并提取液备用;
  - (2) 将步骤(1)中的提取液回收乙醇后,用正丁醇萃取,将正丁醇层回收正丁醇后,上大孔吸附树脂,先用水洗脱至不发生三氯化铁反应和盐酸镁粉反应,再用30%-95%的乙醇洗脱,收集洗脱液,回收溶剂后,干燥,即得钟花报春花提取物。
6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:步骤(1)中采用50-70% V/V 乙醇提取;步骤(2)中选用30-40% V/V 乙醇进行洗脱。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:步骤(1)中采用60% V/V 乙醇提取;步骤(2)中选用30% V/V 乙醇进行洗脱。
8. 权利要求1-4任意一项所述的钟花报春花提取物在制备自由基清除剂中的用途。
9. 根据权利要求8所述的用途,其特征在于:所述自由基清除剂为超氧阴离子自由基清除剂、羟基自由基清除剂、DPPH 自由基清除剂。
10. 一种抗氧化的保健品或/和药物组合物,其特征在于:它是由权利要求1-4任意一项所述的钟花报春花提取物为活性成分,加上药学上常用的辅料或辅助性成分制备而成的制剂。

## 一种钟花报春花提取物及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种钟花报春花提取物,属药物领域。

### 背景技术

[0002] 自由基,是外层电子轨道上含有不配对电子的原子、原子团和分子的总称,包括:(1) 氧自由基,如超氧阴离子自由基、羟基自由基;(2) 脂性自由基,它是由氧自由基和多价不饱和脂肪酸作用后生成的中间代谢产物,如烷自由基、烷氧自由基和烷过氧自由基等;(3) 其他自由基,如氯自由基、甲基自由基和 NO。自由基具有强氧化性,可损害机体的组织和细胞,进而引起慢性疾病及衰老反应。研究表明,炎症、肿瘤、衰老、血液病、以及心、肝、肺、皮肤等各方面疑难疾病的发生机理与体内自由基产生过多或清除自由基能力下降有着密切的关系。因此,降低体内自由基的损害显得尤为重要。

[0003] 目前,多使用自由基清除剂(又称抗氧化剂)来降低体内自由基含量。自由基清除剂是具有清除自由基作用的物质,常见的有抗氧化酶 SOD、维生素 E、C、硒、辅酶 Q、谷胱甘肽等单体活性物质。同时,研究人员也发现,中药在清除自由基中也发挥着重要作用,如人参、三七、丹参、女贞子、黄精、首乌、灵芝、麦冬、虎杖等单味中药材,以及生脉饮等中药复方,均是优异的自由基清除剂。

[0004] 钟花报春 (*Primula sikkimensis* Hook) 是一种常见的藏药材,属于报春花科报春花属植物,以花入药,是藏药“相相直吾”其中的一种原植物。花黄色,钟状,聚生于花葶顶端,主产于西藏东部及南部、青海东南部、四川西部、云南西北部;生于海拔 3750-4500 米的林缘湿草地、水沟边;分布于尼泊尔、锡金、不丹、缅甸。具有清热解毒,泻肝胆火、止血等作用,还能用于心脉瘀阻、血脉不畅,疗效确切,在甘孜藏族地区广泛使用,资源十分丰富。

[0005] 邱建平利用正交试验研究了从钟花报春的花中提取总黄酮的优选工艺,指出以 60% 乙醇,20 倍溶媒用量,回流提取 3 次,每次 1 小时,提取得到的总黄酮含量较高,提取物中总黄酮含量可达 7% 左右。(邱建平,等,正交设计优化钟花报春花总黄酮提取工艺,成都医学院学报,2009 年 4 卷 4 期)。

[0006] 目前,还未见将钟花报春花总黄酮的用于清除自由基的报道。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种钟花报春花提取物。本发明的另一目的是提供该提取物的制备方法和用途。

[0008] 本发明提供了一种钟花报春花提取物,该提取物中总黄酮的含量以芦丁计不得低于 50% w/w。

[0009] 其中,所述的钟花报春花提取物来源于报春花科报春花属植物钟花报春 *Primula sikkimensis* Hook 的花的提取物。

[0010] 进一步地,该提取物中总黄酮的含量以芦丁计为 50-60% w/w。

[0011] 更进一步地,该提取物中总黄酮的含量以芦丁计为 50-55% w/w。

[0012] 本发明还提供了一种制备上述提取物的方法,它包括如下步骤:

[0013] (1) 取钟花报春花,以 50-95% V/V 乙醇提取,合并提取液备用;

[0014] (2) 将步骤 (1) 中的提取液回收乙醇后,用正丁醇萃取,将正丁醇层回收正丁醇后,上大孔吸附树脂,先用水洗脱至不发生三氯化铁反应和盐酸镁粉反应,再用 30% -95% 的乙醇洗脱,收集洗脱液,回收溶剂后,干燥,即得钟花报春花提取物。

[0015] 进一步地,步骤 (1) 中采用 50-70% V/V 乙醇提取;步骤 (2) 中选用 30-40% V/V 乙醇进行洗脱。

[0016] 进一步优选地,步骤 (1) 中采用 60% V/V 乙醇提取;步骤 (2) 中选用 30% V/V 乙醇进行洗脱。

[0017] 更进一步优选地,步骤 (1) 中采用 60% V/V 乙醇提取 3 次。步骤 (2) 中选用 30% V/V 乙醇进行洗脱,洗脱至不发生三氯化铁反应和盐酸镁粉反应。

[0018] 本发明还提供了上述钟花报春花提取物在制备自由基清除剂中的用途。

[0019] 进一步地,所述自由基清除剂为超氧阴离子自由基清除剂、羟基自由基清除剂、DPPH 自由基清除剂。

[0020] 本发明还提供了一种抗氧化的保健品或 / 和药物组合物,它是由上述的钟花报春花提取物为活性成分,加上药学上常用的辅料或辅助性成分制备而成的制剂。

[0021] 本发明钟花报春花提取物对超氧阴离子自由基、羟自由基、DPPH 自由基均具有良好的清除能力,表明钟花报春花提取物具有良好的抗氧化作用,为抗氧化的保健品或 / 和药物提供了一种新的选择。

## 具体实施方式

[0022] 实施例 1 本发明钟花报春花提取物的制备

[0023] 取干燥的钟花报春花粗粉,加入 20 倍量 60% 乙醇浸泡后,加热回流提取 3 次,每次 1h,趁热抽滤,合并滤液,减压回收至无醇味后,加入适量蒸馏水后,用正丁醇萃取,减压回收正丁醇溶液至无正丁醇味后,加入适量蒸馏水溶解,过滤后,滤液上经预处理的 D101 大孔吸附树脂,先用蒸馏水洗脱至不发生三氯化铁反应和盐酸镁粉反应,然后用 30% 乙醇洗脱,收集洗脱液,直至不发生三氯化铁反应和盐酸镁粉反应,合并洗脱液,回收溶剂后,干燥即得钟花报春花提取物,其中,总黄酮以芦丁计含量为 52.5%。

[0024] 本发明钟花报春花提取物的制备方法不限于实施例中所述的方式,现有的黄酮提取方法均能用于对钟花报春花提取物的提取,如碱水提取等;对总黄酮的精制也可采用其他型号的大孔吸附树脂进行精制,洗脱溶剂除采用乙醇以外,也可以采用弱碱溶液进行洗脱,也可提高黄酮含量。

[0025] 实施例 2 钟花报春花提取物制备方法的筛选

[0026] 1. 总黄酮含量测定方法

[0027] 1.1 对照品溶液的制备

[0028] 取芦丁对照品 0.01006g,置于 50ml 容量瓶中,加 60% 乙醇定容至刻度,制得浓度为 0.2012mg/ml 的对照品溶液,备用。

[0029] 1.2 样品溶液的制备

[0030] 按照各制备方法制备得到的浸膏转移至 100ml 容量瓶中,并定容至刻度,从此溶

液中精密移取 10ml 于 100ml 容量瓶中,并用 60%乙醇定容至刻度,即制得样品溶液,备用。

### [0031] 1.3 测定波长的确定

[0032] 精密移取对照品溶液 7ml 和供试品溶液 2ml,分别置于 2 支 25ml 容量瓶中,均加入 60%乙醇稀释至 7ml,混匀,加 5%亚硝酸钠溶液 1ml,摇匀,放置 6min,再加 10%硝酸铝溶液 1ml,摇匀,放置 6min,加氢氧化钠溶液 10ml,再加 60%乙醇至刻度,摇匀,放置 15min,以相应试剂为空白,照紫外可见分光光度法(《药典》05 年版附录 VA),在 200-800nm 进行扫描,测得对照品溶液和样品溶液的最大吸收波长分别为 506.51nm 和 498.67nm。两者的最大吸收波长接近,因此确定 506nm 为测定波长。

### [0033] 1.4 标准曲线的制备

[0034] 精密量取对照品溶液(0.2012mg/ml)0.0ml,1.0ml,2.0ml,3.0ml,4.0ml,5.0ml,6.0ml,7.0ml,分别置于 25ml 容量瓶中,各加 60%乙醇至 7.0ml,加 5%亚硝酸钠溶液(0.050g/ml)1.0ml,摇匀,放置 6min,再加 10%硝酸铝溶液(0.09972g/ml)1.0ml,摇匀,放置 6min. 加氢氧化钠试液(0.04308g/ml)10ml,再加 60%乙醇至刻度,摇匀,放置 15min,以相应试剂为空白,按紫外可见分光光度法(《药典》05 版附录 VA),在 506nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。

[0035] 求得的标准曲线方程为  $Y = 12.785X - 0.001$   $R^2 = 0.9992$ 。

### [0036] 1.5 样品液的测定

[0037] 从供试品溶液中精密移取 4ml 于 1 支 25ml 容量瓶中,然后用 60%乙醇溶液稀释至 7.0ml,然后按照对照品溶液的显色方法显色。精密量取 60%乙醇 4ml,作为空白对照,后续显色处理同上述对照品。

[0038] 在 506nm 处测定吸光度 A,由标准曲线的回归方程计算总黄酮含量。

## [0039] 2、本发明钟花报春花提取物的提取方法考察

### [0040] 2.1 单因素方法考察

[0041] 本实验以不同乙醇浓度为考察因素,以钟花报春中总黄酮得率为考察指标,筛选钟花报春中总黄酮的最佳提取工艺条件。

#### [0042] 2.1.1 仪器与材料

##### [0043] (1) 仪器与试剂

[0044] UV-2500 型紫外-可见分光光度计 PerkinElmer Lambda 35UV/VIS Spectrometer; 热回流装置,超声仪,R-201 旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司),DZF-6021 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),瑞士 PAG-160A 电子天平,FA1104 电子天平(上海精天电子仪器厂),电子恒温不锈钢水浴锅(上海宏兴机械仪器实业制造公司),DGG-9140B 电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司),SHE-III 循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂),芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号为 10080-200707),95%乙醇,90%乙醇,80%乙醇,70%乙醇,60%乙醇,5%亚硝酸钠溶液;10%硝酸铝溶液;4.3%氢氧化钠溶液以上试剂均为分析纯。实验用水系重蒸水。

##### [0045] (2) 实验药材

[0046] 钟花报春花:由重庆中药研究所涂永勤博士鉴定为钟花报春 *Primula sikkimensis* Hook 的干燥花。

#### [0047] 2.1.2 方法与结果

## [0048] (1) 总黄酮的提取

[0049] 取 I 号内钟花报春花适量于托盘内铺开,同时取 II 号内钟花报春花适量于另一托盘内铺开,一起放入烘箱中,30℃干燥过夜。将烘干的药材快速地用打粉机打成粗粉,然后平铺于托盘中,置于烘箱中 30℃干燥一定时间(约 2 小时)然后用袋子封装好置于干燥器中保存备用。分别精密称取 I 号药材粉末 5.000g,4.998g,4.998g,4.996g,4.997g,置于 5 支 250ml 洁净的圆底烧瓶中,分别加入 100ml 的 95%,90%,80%,70%,60%乙醇浸泡药材 30 分钟。分别精密称取 II 号药材粉末 4.997g,5.000g,4.998g,4.999g,5.002g,置于 5 支 250ml 洁净的圆底烧瓶中,然后同 I 号药材粉末一样处理。将 I 号和 II 号中每两个所用乙醇浓度相同的样品置于同一水浴锅中回流提取 2 小时,60%,70%,80%,90%,95%乙醇的水浴温度分别为 86℃,85℃,84.5℃,83.5℃,82.5℃,然后分别趁热抽滤,滤渣再加 100ml 同第一次提取的溶剂回流提取 2 次,每次 1 小时,然后合并滤液备用。(配制不同浓度乙醇温度为 18℃)。洗 10 个大小基本一致的蒸发皿,置减压干燥箱中减压 60℃干燥过夜备用。蒸发皿减压干燥后分别精密称重,重量如下所示:

[0050] 表 1 不同乙浓度干燥后的重量

[0051]

	I 95%	I 90%	I 80%	I 70%	I 60%	II 95%	II 90%	II 80%	II 70%	II 60%
蒸发皿重(g)	41.991	38.164	45.574	43.516	41.417	40.902	45.957	43.518	45.933	45.178

[0052] 将各自合并的滤液分别减压浓缩(旋转蒸发器浓缩是的水浴温度为 50℃)到一定程度,然后转移至相应的蒸发皿中,60℃水浴挥干,然后将含浸膏的蒸发皿置减压干燥器中 60℃减压干燥过夜。含浸膏的蒸发皿经压干燥后,精密称定各含膏蒸发皿总重,结果如下表所示:

[0053] 表 2

[0054]

	I 95%	I 90%	I 80%	I 70%	I 60%	II 95%	II 90%	II 80%	II 90%	II 60%
蒸发皿重(g)	41.991	38.164	45.574	43.516	41.147	40.902	45.957	43.518	45.933	45.178
含膏蒸发皿重(g)	43.242	39.607	47.229	45.204	43.058	42.458	47.701	45.462	48.017	47.302
浸膏重(g)	1.251	1.443	1.655	1.688	1.641	1.556	1.744	1.944	2.084	2.124

[0055] 由上表数据经处理得“不同浓度乙醇提取浸膏情况”,结果表明 60%乙醇提取的浸膏量最多。

[0056] 各浸膏用各自的提取溶剂溶解并定容于 100ml 容量瓶中,并超声处理,使其全部溶解,放冷至室温,备用。

[0057] 2.1.3 样品液的测定

[0058] 分别从供试品溶液 I 95%,90%,80%,70%,60%,II 95%,90%,80%,70%,60%中精密移取 7ml,5ml,4ml,4ml,7ml,5ml,5ml,4ml,4ml 于 10 支 25ml 容量瓶中,然后分别用各自相应浓度的乙醇溶液稀释至 7ml,然后按照对照品溶液的显色方法显色。然后以各自试

剂为空白对照,分别在 500nm 和 506nm 处测定吸光度 A,结果如下表所示:

[0059] 表 3 各样品吸光度情况

样品号	取供试品 V (ml)	A (506nm)
I 95	7	0.609
I 90	5	0.590
I 80	5	0.559
I 70	4	0.522
[0060] I 60	4	0.536
II 95	7	0.592
II 90	5	0.573
II 80	5	0.620
II 70	4	0.649
II 60	4	0.660

[0061] 由上表数据还得到“不同浓度醇提后总黄酮占浸膏比例”和“不同浓度乙醇提取黄酮的能力”

[0062] 表 4 不同浓度醇提后总黄酮占浸膏比例

样品号	1-醇浓度	浸膏中总黄酮比例 (%)
I 95	0.05	13.62114956
[0063] I 90	0.1	13.29875215
I 80	0.2	13.23303012
I 70	0.3	15.14636895
I 60	0.4	15.99723739

[0064] 表 5 不同浓度醇提后总黄酮占浸膏比例

样品号	1-醇浓度	浸膏中总黄酮比例 (%)
II 95	0.05	10.64599694
[0065] II 90	0.1	12.87166368
II 80	0.2	12.49293877
II 70	0.3	15.24736957
II 60	0.4	15.21339818

[0066] 表 6 不同浓度乙醇提取黄酮的能力

样品号	1-醇浓度	C 原总黄酮 (mg/ml)
I 95	0.05	1.70400581
[0067] I 90	0.1	1.98756987
I 80	0.2	2.190066484
I 70	0.3	2.556707079
I 60	0.4	2.625146656

[0068] 表 7 不同浓度提取总黄酮含量

样品号	1-醇浓度	C 原总黄酮 (mg/ml)
[0069] II 95	0.05	1.656517124
II 90	0.1	2.244818146
II 80	0.2	2.428627298
II 70	0.3	3.177551819
II 60	0.4	3.231325772

[0070] 表 8 以上显色剂的配制

	亚硝酸钠	硝酸铝	氢氧化钠
[0071] 质量(g)	2.497	5.000	8.594
蒸馏水体积(ml)	50	50	200

[0072] 结果表明：以 60%乙醇为溶剂提取，提取钟花报春中总黄酮含量最高。

[0073] 2.2 正交实验方法考察

[0074] 前面的实验中，对钟花报春花提取采用了单因素的方法，为进一步考察提取方法对总黄酮和总浸膏量的影响，运用正交实验法进行了系统研究。

[0075] 2.2.1 仪器与材料

[0076] 实验药材：钟花报春花：由重庆中药研究所涂永勤博士鉴定为钟花报春 *Primula sikkimensis* Hook 的干燥花。

[0077] 2.1.2 方法与结果

[0078] 由于乙醇作为提取溶剂具有选择性好，渗透性强，浸出率较高的优点，因此本实验选择一定浓度的乙醇溶液作为提取剂。根据预实验结果，选择溶剂浓度、溶剂用量、提取次数 3 个因素进行正交设计，选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表，因素水平表见下表。

[0079] 表 9 正交设计因素水平表

水平	因素 A 溶剂浓度	因素 B 溶剂用量	因素 C 提取次数
[0080] 1	30	15 倍	1
2	60	20 倍	2
3	90	25 倍	3

[0081] 按下表所列各工艺组合制备样品：

[0082] 表 10 正交实验方案 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

实验号	A	B	C	D (空白)
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
[0083] 5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

[0084] 表 11 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验设计及结果



实验号	A	B	C	D	总黄酮含量 (mg/100g)
1	1	1	1	1	3497.394
2	1	2	2	2	6572.198
3	1	3	3	3	7340.597
4	2	1	2	3	6170.684
5	2	2	3	1	6908.556
[0085] 6	2	3	1	2	5550.778
7	3	1	3	2	4846.954
8	3	2	1	3	4710.324
9	3	3	2	1	3924.301
K1	17410.189	14515.032	13758.496	14330.251	
K2	18630.018	18191.078	16667.183	16969.93	
K3	13481.579	16815.676	19096.107	18221.605	
R	1716.146333	1225.348667	1779.203667	1297.118	

[0086] 表 12 方差分析结果

变异来源	平方和 S	自由度 f	均方 MS	F 值	P
A	48253759.4	2	24126879.7	18.34	>0.05
[0087] B	22997786.3	2	11498893.15	8.74	>0.05
C	50944154.07	2	25472077.03	19.36	<0.05
误差	2630803.498	2	1315401.749		

[0088]  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 

[0089] 从正交试验各组测得的总黄酮的含量来看,影响提取效果的主要因素为 A(乙醇浓度)和 C(提取次数),综合考虑后确定最佳提取条件为  $A_2B_2C_3$ ,即 20 倍量 60% 的乙醇回流提取 3 次,每次 60min。

[0090] 3. 本发明钟花报春花提取物的纯化方法考察

[0091] 3.1 同一大孔吸附柱上用不同浓度的乙醇洗脱对总黄酮含量的考察

[0092] 3.1.1 试药与仪器

[0093] 由“2”项下最佳方法提取得到的钟花报春花粗提物;芦丁标准品(中国药品生物制品鉴定所,含量测定用,批号 10080-200707)。

[0094] 3.1.2 方法与结果

[0095] (1) 样品液的制备

[0096] 将小 60% 最初定容余下的 90ml 减压浓缩(50℃)干(无水无醇味),然后用 200ml 蒸馏水超声溶解,用正丁醇萃取 3 次,每次 200ml. 减压回收正丁醇溶液至干(无正丁醇气味),用 300ml 蒸馏水超声溶解,然后抽滤制得的上 D101 型大孔树脂柱的样品,备用。

[0097] (2) 大孔树脂的预处理

[0098] 量取 D101 型大孔树脂约 62ml(使用前用 95% 乙醇浸泡),装于直径约 1.75cm 的玻璃柱中,用 95% 乙醇洗柱,洗至洗脱液与水混合(1 : 3) 不得浑浊为止,然后用蒸馏水洗至洗脱液无醇味为止,备用。

[0099] (3) 样品液的上样洗脱

[0100] 将上面制得的样品缓缓上于 D101 型大孔树脂柱上(上样速度为 1d/s),然后用

240ml 的蒸馏水洗脱,洗脱液与上样时流出的水溶液(300ml)合并,得水部位,然后依次分别用 360ml 30%,65%,95%乙醇溶液洗脱,得到不同的洗脱部位。将洗脱下来的水部位,30%乙醇部位,65%乙醇部位,95%乙醇部位分别于 50℃减压回收溶剂,然后水浴挥干(60℃),然后将装有浸膏的蒸发皿置于减压干燥箱中 60℃减压干燥过夜。精密称定,求得各部位的浸膏重。然后用各自的洗脱溶剂按下表所示定容:

[0101] 表 13

[0102]

	洗脱体积 (ml)	蒸发皿 (g)	含膏蒸发皿重 (g)	浸膏重 (g)	定容体积 (ml)
水部位	540	45.178	45.354	0.176	100
30%乙醇部位	360	43.518	43.783	0.265	100
65%乙醇部位	360	40.902	41.054	0.152	100
95%乙醇部位	360	43.516	43.602	0.086	50

[0103] 按照对照品的显色方法和测定条件,照下表对各洗脱部位进行总黄酮含量测定:

[0104] 表 14

	取供试品体积 (ml)	乙醇体积 (ml)	吸光度 A (506nm)
95%乙醇洗脱部位	7	0	0.0927
65%乙醇洗脱部位	3	4	0.5887
30%乙醇洗脱部位	1	6	0.7117
水洗脱部位	7	0	0.3980

[0106] 由上表数据求得各部位得到的浸膏中总黄酮的百分含量为:

[0107] 表 15

	总黄酮含量 (%)
95%乙醇洗脱部位	1.52178
65%乙醇洗脱部位	25.2875
30%乙醇洗脱部位	52.52066
水洗脱部位	6.33287

[0109] 结果表明;在同一柱子上用不同浓度的乙醇洗脱,30%乙醇洗脱部位的总黄酮含量最高,为 52.52066%。

[0110] 3.2 不同大孔吸附树脂柱上不同的乙醇浓度洗脱对总黄酮含量的考察

[0111] 3.2.1 方法与结果

[0112] (1) 样品液的制备

[0113] 取之前打粉干燥好的 II 号(采自阿坝)钟花报春花粉末 19.998g,置于 1000ml 圆底烧瓶中,加 26℃配制的 60%乙醇溶液 400ml 浸泡半小时,然后于 85℃水浴回流 2h,然后趁热抽滤,残渣再加 400ml 60%乙醇溶液,同第一次一样加热回流 1h,趁热抽滤,残渣同上一次一样处理,抽滤得滤液。将 3 次的滤液合并准备减压回收溶剂。将以上所得滤液减压

浓缩(50℃)至小体积,然后转移至预先在60℃减压干燥过夜的蒸发皿中,60℃水浴挥干。然后置减压干燥箱中60℃减压干燥过夜。

[0114] 精密称定含浸膏的蒸发皿总重为85.924g,根据蒸发皿的自重为76.839g,求得用60%乙醇从19.998g药材中提取得到的浸膏量为9.085g。用约800ml蒸馏水经超声处理将所得的9.085g浸膏溶解,然后用800ml正丁醇萃取。在50℃下减压回收正丁醇萃取液至小体积后,转移至一个60℃减压干燥过夜的蒸发皿(77.182g)中,水浴60℃挥干,然后置减压干燥箱中60℃减压干燥过夜。精密称定含正丁醇部位浸膏的蒸发皿总重(81.395g)求得正丁醇部位浸膏的重量为4.213g。

[0115] (2) 大孔树脂的预处理

[0116] 分别量取D101型大孔吸附树脂4份,每份均约为110±10ml,然后分别装于4根大小一致的直径为2cm的玻璃柱子中,用95%乙醇洗至洗脱液与水1:3混合不混浊为止,然后改用蒸馏水流至洗脱液基本上无醇味。

[0117] (3) 样品液的上样洗脱

[0118] 将正丁醇萃取得到的浸膏用1200ml蒸馏水溶解,超声,滤去沉淀,滤液均分为4份,每份为300ml,即制得上柱所需的4个样品。将4个样品分别缓缓上于已洗好的4根大孔树脂柱,然后均用200ml蒸馏水洗脱至几乎不发生三氯化铁反应和盐酸镁粉反应,然后4根柱子分别选用30%,40%,50%,60%乙醇中的其中一种单一洗脱至几乎不发生三氯化铁反应和盐酸镁粉反应。30%,40%,50%,60%乙醇洗脱的体积依次为1129ml,500ml,452ml,322ml。将30%,40%,50%,60%乙醇洗脱的溶液分别减压浓缩(50℃)至小体积,然后转移至小蒸发皿中(已于60℃减压干燥过夜),在60℃水浴上挥干,然后置于减压干燥箱中60℃减压干燥约10小时,然后置于干燥器中。精密称定各含浸膏的各蒸发皿中,取得各部位浸膏的重量。数据如下表所示:

[0119] 表16 不同浓度制备的浸膏量

蒸发皿编号	无膏蒸发皿重(g)	含膏蒸发皿重(g)	浸膏重(g)
[0120] 30%乙醇	43.525	43.938	0.413
40%乙醇	40.909	43.973	0.416
50%乙醇	43.523	43.973	0.450
60%乙醇	45.189	45.653	0.464

[0121] 将各部位的浸膏用各自洗脱用的乙醇溶液定容于100ml容量瓶中,备用。按照对照品的显色方法和测定条件,照下表对各洗脱部位进行总黄酮含量测定:

[0122] 表17 各洗脱部位进行总黄酮含量测定

[0123]

	取供试品 体积 (ml)	吸光度 y(A) (506nm)	X(C 显)mg/ml	C 定容 (mg/ml)	M 膏 (mg)	C 膏 (mg/ml)	总黄酮含 量 (%)
30% 乙 醇洗脱 部位	0.5	0.6528	0.0371451	1.857255	413	4.13	52.52066
40% 乙 醇洗脱 部位	0.5	0.4633	0.036316	1.8158	416	4.16	43.64904
50% 乙 醇洗脱 部位	0.5	0.5019	0.0393352	1.96676	450	4.50	43.70578
60% 乙 醇洗脱 部位	0.5	0.5041	0.0395072	1.97536	464	4.64	42.57241

[0124] 结果表明;在不同柱上,用各自单一的乙醇浓度平行洗脱,30%浓度的乙醇洗脱下来的总黄酮含量最高,为 52.52066%。

[0125] 3.2.2 结论

[0126] D101 型大孔树脂富集后钟花报春花中总黄酮的纯度:经 D101 型大孔吸附树脂处理后的总黄酮得到了有效富集,总黄酮纯度最高可达 52%。

[0127] 以下通过试验例进一步证明本发明的有益效果。

[0128] 试验例 1 清除超氧阴离子自由基 ( $O_2^-$ ) 的活性

[0129] 取 6 支具塞试管,依次加入 pH 值 8.2 的 Tris-HCl 2.25ml,三蒸水、钟花报春花提取物(实施例 1 制备),在 25℃ 水浴保温 20min,加入在 25℃ 水浴保温的邻苯三酚(用  $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 配置,浓度为  $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 后,准确反应 3min,加入  $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl 0.25ml 终止反应,终体积为 5ml。用相应空白试剂作对照,在 322nm 处测吸光度值 A。钟花报春花提取物的终浓度分别为 5,10,20,40,60  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,每管平行 5 次。以维生素 C 做阳性对照组,分别计算抑制率。

[0130]  $O_2^-$  清除率 / % =  $(A_0 - A_i) / A_0$ , 结果见表 18。

[0131] 表 18 钟花报春花提取物清除超氧阴离子的测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

[0132]

编号	吸光度值 A	浓度 C / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	抑制率 (%)
空白	0.052 ± 0.002	0	0
1	0.039 ± 0.001*	5	25
2	0.034 ± 0.003*	10	34.6
3	0.030 ± 0.001*	20	42.3
4	0.025 ± 0.002*	40	51.9
5	0.018 ± 0.003*	60	65.3

[0133] 注:样品组与空白对照组比较, \*p < 0.01。

[0134] 求得总黄酮  $IC_{50} = 35.0 \mu g \cdot mL^{-1}$ , 维生素  $CIC_{50} = 4.20 \mu g \cdot mL^{-1}$ 。表明, 本发明钟花报春花提取物对超氧阴离子自由基有良好的抑制、清除能力。

[0135] 试验例 2 钟花报春花提取物清除 DPPH 自由基的能力

[0136] 取 7 支试管, 依次加入  $0.13 mmol \cdot L^{-1}$  的 DPPH 2mL, 将钟花报春花提取物 (实施例 1 制备, 并配制成不同浓度), 用无水乙醇补足体积至 5mL, 混匀避光, 暗室下反应 20min, 取出后于 517nm 处测吸光度值 A, 用相应空白试剂作对照。总黄酮的终浓度分别为 1, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu g \cdot mL^{-1}$ , 每管平行 5 次。以维生素 C 做阳性对照组, 分别计算清除率。

[0137]  $DPPH \text{ 自由基清除率 } / \% = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100$

[0138] 式中:  $A_0$  为 2mL DPPH 溶液 + 2mL 样品溶剂 + 1mL 无水乙醇的吸光度;  $A_i$  为 2mL DPPH 溶液 + 2mL 样品溶液 (或对照品溶液) + 1mL 无水乙醇的吸光度;  $A_j$  为 2mL 无水乙醇 + 2mL 样品溶液 (或对照品溶液) + 1mL 无水乙醇的吸光度。

[0139] 表 19 钟花报春花提取物清除 DPPH 自由基的测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

[0140]

编号	吸光度值 A	浓度 C/ $\mu g \cdot mL^{-1}$	清除率 (%)
空白	0.565 ± 0.002	0	0.00
1	0.511 ± 0.001	1	9.01
2	0.484 ± 0.003*	2	17.30
3	0.364 ± 0.001*	4	34.87
4	0.261 ± 0.002*	6	51.25
5	0.172 ± 0.003*	8	68.85
6	0.105 ± 0.002*	10	79.38

[0141] 注:样品组与空白对照组比较, \*p < 0.01。

[0142] 求得总黄酮  $IC_{50} = 4.97 \mu g \cdot mL^{-1}$ , 维生素 C  $IC_{50} = 2.35 \mu g \cdot mL^{-1}$ 。表明, 本发明钟花报春花提取物对 DPPH 自由基有良好的清除能力。

[0143] 试验例 3 钟花报春花提取物对羟基自由基 ( $\cdot OH$ ) 的作用

[0144] 移取 25mL 2mmol/L  $FeSO_4$  溶液, 25mL 6mmol/L  $H_2O_2$  溶液于 150mL 的锥形瓶中, 混合均匀后加入 75mL 6mmol/L 水杨酸溶液, 在 37°C 的水浴中反应 15min, 然后在波长 510nm 处测吸光度, 从以上的测定体系中取 24mL 于 25mL 的比色管中, 再加入 1mL 50, 60, 70, 80, 90  $\mu g \cdot mL^{-1}$  不同质量浓度的钟花报春花提取物溶液 (钟花报春花提取物由实施例 1 制备), 37°C 的水浴中反应 15min 后, 于波长 510nm 处测其吸光度, 以 VC 和 BHT 作为阳性对照。每个实验组需重复 3 次, 求其平均值。

[0145]  $\cdot OH$  清除率 / % =  $(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})$ , 结果见下表。

[0146] 式中,  $A_{\text{sample}}$  为样品溶液的吸光度,  $A_{\text{blank}}$  为样品测定空白溶液的吸光度,  $A_{\text{control}}$  为

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准管的吸光度, A<sub>blank</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准空白管的吸光度

[0147] 表 19 钟花报春花提取物清除 ·OH 的测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

[0148]

编号	吸光度值 A	浓度 C/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	抑制率 (%)
空白	0.740±0.002	0	0.00
模型	0.543±0.001	0	0.00
1	0.561±0.001*	50	9.65
2	0.608±0.003*	60	33.60
3	0.638±0.001*	70	47.51
4	0.658±0.002*	80	58.60
5	0.667±0.003*	90	63.71

[0149] 注:样品组与空白对照组比较,\*p < 0.01。

[0150] 求得总黄酮 IC<sub>50</sub> = 70.31  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 维生素 C IC<sub>50</sub> = 7.32  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。表明,本发明钟花报春花提取物对羟基自由基有良好的抑制、清除能力。

[0151] 本发明钟花报春花提取物对超氧阴离子自由基、羟自由基、DPPH 自由基均具有良好的清除能力,表明钟花报春花提取物具有良好的抗氧化作用,为抗氧化的保健品或 / 和药物提供了一种新的选择。