



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104127463 B

(45)授权公告日 2018.08.28

(21)申请号 201410310185.6

(22)申请日 2014.07.01

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104127463 A

(43)申请公布日 2014.11.05

(73)专利权人 青岛蔚蓝生物股份有限公司

地址 266061 山东省青岛市城阳区双元路

北首青大工业园青岛康地恩动物药业
有限公司

(72)发明人 钟英杰 蒋贻海 付海宁 张会梅

庞云露 贺倩倩

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

A61K 31/05(2006.01)

A61K 36/28(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 102716164 A,2012.10.10,

CN 101032541 A,2007.09.12,

CN 102060706 A,2011.05.18,

审查员 张忠会

权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

一种紫锥菊提取物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种紫锥菊提取物及其制备方法和应用,所述提取物含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚含量高于12%,紫锥菊多糖含量高于20%,菊苣酸的含量高于4%。本发明提供的提取物对小鼠溶血素抗体生成具有明显促进作用,说明该药可增强体液免疫,且效果优于现有技术。

1. 一种紫锥菊提取物,其提取物含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚含量高于12%,紫锥菊多糖含量高于20%,菊苣酸的含量高于4%;

制备所述紫锥菊提取物的方法包括如下步骤:

1) 紫锥菊粉碎,过筛,过10目-24目筛,备用;

2) 取步骤1) 中药材粉末,加紫锥菊粉重量7-10倍量体积的含0.1%-0.5%酸的60%-85%乙醇溶液,回流提取1.5-3.0小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.12的浸膏,备用;

3) 将步骤2) 得到的药渣,加紫锥菊粉重量5-7倍量体积的含0.05%-0.15%碱的水溶液,60-90℃温浸提取0.5-2.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.08的浸膏,备用;

4) 合并步骤2) 和步骤3) 中所得浸膏,进行离心处理,将清液干燥,得紫锥菊提取物。

2. 根据权利要求1所述的提取物,其特征在于,所述提取物含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚12.1-14.4%,紫锥菊多糖21.1-25.8%,菊苣酸4.11-5.12%。

3. 根据权利要求1所述的提取物,其特征在于,所述提取物中含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚12.1-12.8%,紫锥菊多糖21.5-25.8%,菊苣酸4.11-4.72%。

4. 根据权利要求1所述的提取物,其特征在于,所述提取物中含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚12.8%,紫锥菊多糖25.8%,菊苣酸4.11%。

5. 根据权利要求1所述的提取物,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 紫锥菊,粉碎,过15目筛,备用;

2) 取步骤1) 中药材粉末,加紫锥菊粉重量8倍量体积的含0.2%酸的70%乙醇溶液,回流提取2.0小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.12的浸膏,备用;

3) 将步骤2) 中所得药渣,加紫锥菊粉重量6倍量体积的0.1%碱溶液,75℃温浸提取1.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃时测定相对密度为1.06-1.08的浸膏,备用;

4) 合并步骤2) 和步骤3) 中所得浸膏,进行高速管式离心处理,得清液和沉淀,将所得清液喷雾干燥,得紫锥菊提取物。

6. 根据权利要求1或5所述的提取物,其特征在于,所述紫锥菊为紫锥菊的全草或茎、叶、花、根的一种或几种混合物。

7. 根据权利要求1或5所述的提取物,其特征在于,所述步骤2) 中的酸为浓盐酸、磷酸、冰醋酸、柠檬酸的一种或几种;

所述步骤3) 中的碱为碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、氢氧化钾、浓氨水的一种或几种。

8. 一种制备权利要求1-4任一项所述的提取物的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 紫锥菊,粉碎,过10目-24目筛,备用;

2) 取步骤1) 中药材粉末,加紫锥菊粉重量7-10倍量体积的含0.1%-0.5%酸的60%-85%乙醇溶液,回流提取1.5-3.0小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.12的浸膏,备用;

3) 将步骤2) 中所得药渣,加紫锥菊粉重量5-7倍量体积的含0.05%-0.15%碱的水溶

液,60-90℃温浸提取0.5-2.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.08的浸膏,备用;

4) 合并步骤2) 和步骤3) 中所得浸膏,进行离心处理,将清液干燥,得紫锥菊提取物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 紫锥菊,粉碎,过15目筛,备用;

2) 取步骤1) 中药材粉末,加紫锥菊粉重量8倍量体积的含0.2%酸的70%乙醇溶液,回流提取2.0小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.12的浸膏,备用;

3) 将步骤2) 中所得药渣,加紫锥菊粉重量6倍量体积的0.1%碱溶液,75℃温浸提取1.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃时测定相对密度为1.06-1.08的浸膏,备用;

4) 合并步骤2) 和步骤3) 中所得浸膏,进行高速管式离心处理,得清液和沉淀,将所得清液喷雾干燥,得紫锥菊提取物。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,其特征在于,所述紫锥菊为紫锥菊的全草或茎、叶、花、根的一种或几种混合物。

11. 根据权利要求8或9所述的方法,其特征在于,所述步骤2) 中的酸为浓盐酸、磷酸、冰醋酸、柠檬酸的一种或几种;

所述步骤3) 中的碱为碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、氢氧化钾、浓氨水的一种或几种。

12. 权利要求1-7任一项所述的提取物或权利要求8-11任一项所述方法所制备得到的提取物在制备增强免疫系统功能的药物中的应用。

一种紫锥菊提取物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及中药提取物,具体涉及一种紫锥菊提取物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 紫锥菊(Echinacea),是原产于北美和加拿大南部的一种松果菊数植物,该属植物共有8个种和数个变种,目前作为药物开发的主要有三个品种,紫松果菊(Echinacea purpurea,即通常所说的紫锥菊)、狭叶紫锥菊(Echinacea augustifolia)和白色紫锥菊(Echinacea pallida)。

[0003] 紫锥菊,是目前受到国际普遍重视的一种免疫促进剂和免疫调节剂,是闻名世界的“免疫”草药,具有突出的抗感染与促免疫的作用,它的提取物及制剂销售额居美国草药市场销售排名前5名,受到国内外的极大关注。

[0004] 而目前,紫锥菊的提取有下列方法,如:

[0005] CN03134457.7(公开号为CN1473602)包括乙醇回流提取、除杂、浓缩、真空干燥,上柱等步骤。其存在以下不足之处:①提取液直接进行微滤处理,容易造成微滤膜堵塞,且生产效率低,不适宜大生产。②浓缩所得浸膏,进行减压干燥,由于菊苣酸等多酚类成分耐热性不好,长时间的受热造成菊苣酸损失较多,导致最终得到的提取物中菊苣酸含量不高。

[0006] CN200610031845.2(公开号为CN1957961A)紫锥菊提取物的制备方法,原料采用的是新鲜状态的紫锥菊全草,经提取,浓缩得紫锥菊提取物。该方法存在以下不足之处:①制备工艺以紫锥菊鲜药材为研究对象,虽然紫锥菊鲜品菊苣酸含量较高,但紫锥菊提取物的生产受季节限制,紫锥菊提取物的药源问题限制了其工业化生产。②其工艺生产的主要是以菊苣酸含量为指标,而药材中发挥免疫作用的多糖成分其未考虑,一定程度造成了药材资源的浪费。③制备工艺中药材用高浓度乙醇提取2次,药渣中吸附有大量乙醇,而未见处理,其生产的紫锥菊提取物成本较高。

[0007] CN200610061847.6(公开号为CN101032541A)公开了一种紫锥菊提取物及其制备方法和含量测定方法,该方法存在以下不足之处:①提取用乙醇量较大,乙醇消耗量大,成本较高。经试验研究其工艺菊苣酸转移率较低,在40-50%左右。②其工艺制备的紫锥菊提取物中菊苣酸含量较低,且指标单一,未体现总多酚和总多糖类成分含量转移情况。

[0008] CN201210216720.2(公开号为CN102716164A)提供的紫锥菊提取物,是采用碱性乙醇溶液及溶菌酶对紫锥菊药材进行两次提取获得;产品中:多糖含量 $\geq 21.50\%$,多酚含量 $\geq 8.10\%$,菊苣酸含量 $\geq 5.00\%$ 。其存在以下不足之处:用pH=12氢氧化钙乙醇溶液提取容易造成钙离子与菊苣酸等多酚成分整合,形成沉淀不溶物,且在高温碱性环境中易造成菊苣酸所含酯键的断裂,造成菊苣酸等成分的破坏,而实际上通过该文献的碱醇提方法,其内容物达不到该文献限定的含量。

[0009] 目前,一般认为紫锥菊的活性成分主要是咖啡酸类衍生物和酚酸类化合物、多糖及糖蛋白、烷基酰胺类成分、类黄酮等。多酚类成分是一直以来被公认的具有免疫增强、抗炎、抗病毒作用的物质,其中菊苣酸作为一种指标性成分用于评价紫锥菊药材的质量。而

紫锥菊多糖和糖蛋白复合物亦能刺激巨噬细胞的吞噬功能,刺激T淋巴细胞增殖,溶血空斑试验表明能明显增加空斑数目,因而能显著增强体液免疫功能,功用可与黄芪多糖、香菇多糖等多种多糖类成分相媲美。

[0010] 因此,对于紫锥菊提取物应该保留多酚和多糖两大类活性成分,合理利用药材资源,充分发挥紫锥菊抗炎、促免疫的功效。

[0011] 目前市售紫锥菊提取物多以总酚和菊苣酸含量为指标,多为黄绿色粉末,价格较高,经测定其所含多糖类成分较低,低于5%,同时市售未见标示紫锥菊多糖含量的紫锥菊提取物。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供一种紫锥菊提取物。

[0013] 本发明提供的一种紫锥菊提取物,其提取物含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚含量高于12%,紫锥菊多糖含量高于20%,菊苣酸的含量高于4%。

[0014] 具体的,所述提取物含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚12.1-14.4%,紫锥菊多糖21.1-25.8%,菊苣酸4.11-5.12%。

[0015] 优选地,所述提取物中含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚12.1-12.8%,紫锥菊多糖21.5-25.8%,菊苣酸4.11-4.72%。

[0016] 进一步优选,所述提取物中含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚12.8%,紫锥菊多糖25.8%,菊苣酸4.11%。

[0017] 本发明还提供了上述紫锥菊提取物的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0018] 1) 紫锥菊粉碎,过筛,备用;

[0019] 2) 将步骤1)得到的紫锥菊粉用含酸的乙醇溶液回流提取,其中乙醇浓度为60-95%,滤过,收集药渣和滤液,滤液浓缩得到浸膏,备用;

[0020] 3) 将步骤2)得到的药渣用含碱的水溶液温浸提取,滤过,得滤液和药渣,滤液浓缩得到浸膏,备用;

[0021] 4) 合并步骤2)和步骤3)浓缩的浸膏,分离,收取清液,干燥,得紫锥菊提取物。

[0022] 优选地,所述方法包括以下步骤:

[0023] 1) 紫锥菊,粉碎,过10目-24目筛,备用;

[0024] 2) 取步骤1)中药材粉末,加紫锥菊粉重量7-10倍量体积的含0.1%-0.5%酸的60%-85%乙醇溶液,回流提取1.5-3.0小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.12的浸膏,备用;

[0025] 3) 将步骤2)中所得药渣,加紫锥菊粉重量5-7倍量体积的含0.05%-0.15%碱的水溶液,60-90℃温浸提取0.5-2.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.08的浸膏,备用;

[0026] 4) 合并步骤2)和步骤3)中所得浸膏,进行离心处理,将清液干燥,得紫锥菊提取物。

[0027] 进一步优选,所述方法包括以下步骤:

[0028] 1) 紫锥菊,粉碎,过15目筛,备用;

[0029] 2) 取步骤1)中药材粉末,加紫锥菊粉重量8倍量体积的含0.2%柠檬酸的70%乙醇

溶液,回流提取2.0小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.06-1.12的浸膏,备用;

[0030] 3) 将步骤2) 中所得药渣,加紫锥菊粉重量6倍量体积的0.1%碳酸钠溶液,75℃温浸提取1.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃时测定相对密度为1.06-1.08的浸膏,备用;

[0031] 4) 合并步骤2) 和步骤3) 中所得浸膏,进行高速管式离心处理,得清液和沉淀,将所得清液喷雾干燥,得紫锥菊提取物。

[0032] 上述方法中:

[0033] 所述紫锥菊为紫锥菊的全草或茎、叶、花、根的一种或几种混合物。

[0034] 所述步骤2) 中的酸为浓盐酸、磷酸、冰醋酸、柠檬酸的一种或几种;

[0035] 所述步骤3) 中的碱为碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、氢氧化钾、浓氨水的一种或几种;

[0036] 所述含酸0.1-0.5%的60-85%的乙醇,是将0.1-0.5g的酸溶于100ml浓度为60-85%的乙醇中。

[0037] 本发明还提供了含上述提取物的制剂,由上述提取物单独制成或由提取物与药学上可接受的载体制成。

[0038] 所述制剂为微丸剂、散剂、糖浆剂、口服液、酞剂、片剂、颗粒剂、胶囊剂或软膏剂。

[0039] 所述辅料选自蔗糖、糊精、乙醇、微晶纤维素、淀粉、微粉硅胶、山梨酸钾、亚硫酸氢钠、硬脂酸镁、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、碳酸钾、三乙醇胺或甘油中的一种或多种的混合物。

[0040] 本发明还提供了上述提取物或其制剂在制备用于普通感染或创伤、感冒、扁桃体发炎、上呼吸道感染、咽喉肿痛等以及增强免疫系统功能的药物中的应用。

[0041] 本发明提供的紫锥菊提取物具有以下优点:

[0042] 1、与现有技术相比,本发明将紫锥菊药材粉碎后首先加适量浓度的酸性乙醇进行提取,主要是针对药材中所含的多酚类成分,原药材中多酚类成分一般是以其盐类存在,加入适量酸后,多酚类成分呈游离态,亲脂性增强,易溶于高浓度乙醇中,比单独用一定浓度乙醇提取提取率要高,滤过后,药渣加适量浓度的碱水温浸提取,主要是针对药材中所含的多糖类成分,水液中添加一定浓度的碱,可以使植物细胞壁破壁,多糖类成分更易浸出,提取效果更好,同时控制提取温度,可以保证在提取过程中避免温度过高造成多糖糖链的断裂,保证了多糖类成分的空间结构,进而保证了提取物的有效性,同时第二煎加碱水提取,能把第一煎药材吸附的乙醇溶液套洗出,进而回收乙醇,节约了成本。总结优点为:

[0043] ①工艺合理,有效成分转移率高,便于质量控制。紫锥菊药材粉碎后,第一煎加酸性乙醇溶液提取多酚类成分,提取率高,第二煎加碱温浸提取多糖类成分,细胞破壁,多糖成分浸出完全。

[0044] ②提取物中多酚、多糖及菊苣酸含量高,成本低,药效好。本发明提取物中多酚含量高于12%,多糖含量高于20%,菊苣酸的含量高于4%。

[0045] 2、与现有技术相比,本发明提供的方法中:

[0046] 1) 乙醇溶液的pH值:含酸0.1-0.5%的乙醇溶液,其pH值不明确,因为不同种类酸、不同浓度其0.1-.05%的乙醇溶液其pH值不同,现有技术中pH值为小于等于3,经试验验证

pH=3的乙醇溶液提取紫锥菊中菊苣酸含量最高。

[0047] 2) 乙醇浓度的区别:现有技术中乙醇的浓度为50%,本发明中乙醇的浓度为60-85%,乙醇浓度过低提取所得的极性大的杂质过多不利于后期纯化;

[0048] 3) 乙醇提取液浓缩:现有技术中采用两次醇提,然后将滤液浓缩,本发明中先将醇提的滤液浓缩,而本发明先用含酸醇溶液提取,后用碱水溶液提取,因此,两次不能合并提取液再浓缩,必须先进行浓缩再合并;

[0049] 4) 药渣的处理:现有技术将药渣再次用pH值为3的乙醇溶液提取,而本发明则是将药渣用碱水浸提,其原因是:在药材中,菊苣酸是以钠盐的形式存在,水溶性良好,采用酸提先是菊苣酸游离提取出来,第二次换碱水提取,使未提取完全的菊苣酸成盐在水中被提取出来以及多糖类成分也能在此步骤中被提取出来;

[0050] 5) 萃取:现有技术还对浓缩后的醇提液进行萃取,脱水,本发明没有,其原因是:本发明直接采用喷雾干燥得到提取物,不需要进行脱水处理。脱水处理是在实验室小试应用时常用;萃取过程在大生产中不切实际并不适用。

[0051] 最终得到的提取物中,现有技术提供的提取物中紫锥菊多酚、紫锥菊多糖和菊苣酸的含量均少于本发明。

[0052] 3、本发明提供的提取物对小鼠溶血素抗体生成具有明显促进作用,说明该药可增强体液免疫,且效果优于现有技术。

具体实施方式

[0053] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0054] 所述含百分之几的酸的乙醇溶液,是重量体积比,如以含0.2%柠檬酸的70%的乙醇溶液是将0.2g柠檬酸溶于100ml浓度为70%的乙醇中。

[0055] 所述浓度为0.05%-0.15%的碱溶液,是将0.05-0.15g碱溶于100ml水中。

[0056] 实施例1:紫锥菊的提取方法

[0057] 1、紫锥菊,粉碎,过15目筛,备用;

[0058] 2、取步骤1中药材粉末,加紫锥菊粉重量8倍量体积的含0.2%柠檬酸的70%乙醇溶液,回流提取2.0小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.12的浸膏,备用;

[0059] 3、将步骤2所得药渣,加紫锥菊粉重量6倍量体积的0.1%碳酸钠溶液,75℃温浸提取1.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃时测定相对密度为1.08的浸膏,备用;

[0060] 4、合并步骤2和步骤3中所得浸膏,进行高速管式离心处理,得清液和沉淀,将所得清液喷雾干燥,得紫锥菊提取物。

[0061] 实施例2:紫锥菊的提取方法

[0062] 1、取紫锥菊根10kg,粉碎,过15目筛,备用;

[0063] 2、取步骤1中药材粉末,加紫锥菊粉重量7倍量体积的含0.3%盐酸的75%乙醇溶液,回流提取1.5小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.07的浸膏,备用;

[0064] 3、将步骤2中所得药渣,加紫锥菊粉重量6倍量体积的0.15%碳酸氢钠溶液,80℃

温浸提取40分钟,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.08的浸膏,备用;

[0065] 4、合并步骤2和步骤3中所得浸膏,进行高速管式离心处理,得清液和沉淀,沉淀弃去,清液另器收存,备用;

[0066] 5、将离心所得清液喷雾干燥,得紫锥菊提取物1.95kg(收率为19.5%)。

[0067] 实施例3:紫锥菊的提取方法

[0068] 1、取紫锥菊全草10kg,粉碎,过24目筛,备用;

[0069] 2、取步骤1中药材粉末,加8倍量含0.3%醋酸的60%乙醇溶液,回流提取2.0小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.08的浸膏,备用;

[0070] 3、将步骤2中所得药渣,加7倍量0.05%氢氧化钠溶液,70℃温浸提取1.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.08的浸膏,备用;

[0071] 4、合并步骤2和步骤3中所得浸膏,进行高速管式离心处理,得清液和沉淀,沉淀弃去,清液另器收存,备用;

[0072] 5、将离心所得清液喷雾干燥,得紫锥菊提取物2.2kg(收率为22%)。

[0073] 实施例4:紫锥菊的提取方法

[0074] 1、取紫锥菊叶、花混合物10kg,粉碎,过15目筛,备用;

[0075] 2、取步骤1中药材粉末,加8倍量含0.2%盐酸的70%乙醇溶液,回流提取1.5小时,滤过,得滤液和药渣,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.08的浸膏,备用;

[0076] 3、将步骤2中所得药渣,加7倍量0.05%氢氧化钠溶液,70℃温浸提取1.0小时,滤过,得滤液和药渣,药渣弃去,滤液减压浓缩至60℃测定相对密度为1.08的浸膏,备用;

[0077] 4、合并步骤2和步骤3中所得浸膏,进行高速管式离心处理,得清液和沉淀,沉淀弃去,清液另器收存,备用;

[0078] 5、将离心所得清液喷雾干燥,得紫锥菊提取物1.75kg(收率为17.5%)。

[0079] 对比例1:菊苣酸粉末的制备

[0080] 参考CN201210470455.0(公开号为CN102911056A)专利的实施例1的方法,具体方法为:

[0081] 1)将紫锥菊捣碎过20目筛,用HCl溶液调节质量浓度为50%的乙醇溶液的pH为3,首先将调配好的溶液与紫锥菊粉末按照质量比为8:1的比例在温度为100℃下煮沸提取1.5h,过滤后再将调配好的溶液与紫锥菊粉末按照质量比为6:1的比例在温度为100℃下煮沸1.5小时,过滤后与第一次滤液混合浓缩密度为1.1g/cm³的溶液;

[0082] 2)将密度为1.1g/cm³的浓缩液与乙酸乙酯按照质量比为1:1.2混合萃取,乙酸乙酯分三次加入分别提取萃取液后合并,合并后的萃取液用盐酸调节的pH为3的去离子水洗涤一次;

[0083] 3)将洗涤后的溶液与无水硫酸钠按照质量比为1:1.2的比例混合脱水8h,浓缩回收溶液即得到菊苣酸粉末。

[0084] 实验例1:提取物中有效成分的检测

[0085] 对实施例1-4和对比例1提供的提取物进行检测,具体检测方法为:

[0086] 1、菊苣酸含量测定

[0087] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈为流动相

A, 0.1%磷酸溶液为流动相B, 按表1进行梯度洗脱; 检测波长330nm。理论板数按菊苣酸峰计算应不低于1500。

[0088] 表1: 菊苣酸含量测定梯度洗脱

[0089]

时间(分钟)	流动相A(%)	流动相B(%)
0-20	15	85
20-22	15→40	85→60
22-25	40→15	60→85

[0090] 对照品溶液的制备精密称取菊苣酸对照品适量, 加70%甲醇制成每1ml含40 μ g的溶液, 即得。

[0091] 供试品溶液的制备取提取物细粉约0.1g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入70%甲醇50ml, 称定重量, 超声(功率250W, 频率35kHz)处理30分钟, 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得。

[0092] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μ l, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

[0093] 2、提取物中多酚的含量测定方法

[0094] 对照品溶液的制备精密称取绿原酸对照品10mg, 加入40%乙醇溶液稀释至100ml。

[0095] 供试品溶液的制备精密称取提取物250mg, 加入40%乙醇溶液水浴超声溶解(水浴温度控制在15 $^{\circ}$ C以下), 室温下用40%乙醇溶液稀释定容至100ml。

[0096] 测定法分别精密量取1ml对照品及供试品溶液至50ml容量瓶中, 分别加入15ml F-D试液和7ml 30%Na₂CO₃试液于该容量瓶中, 边加边振摇, 加水定容混匀, 放置90min后, 照紫外-可见分光光度法, 以空白样品溶液作空白, 在700nm波长处测定吸光度。采用标准对照法, 计算多酚含量。

[0097] 3、提取物中多糖的含量测定方法:

[0098] 供试品溶液的制备取提取物细粉约20.0mg, 精密称定, 加水50ml加热使溶解, 放冷后定容至100ml量瓶中, 混匀, 即得。

[0099] 标准品溶液的配制取葡萄糖对照品, 精密称定, 加水配制成0.1mg/ml的溶液, 即得。

[0100] 标准曲线的建立精密量取0、0.05、0.1、0.15、0.20、0.25、0.30ml的标准葡萄糖溶液(0.1mg/ml), 加水补至0.5ml, 加6%苯酚0.3ml, 再加浓硫酸1.5ml, 摇匀, 沸水浴加热10分钟, 冷却, 490nm检测吸光度, 以葡萄糖质量为横坐标, 相应的吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线方程。

[0101] 测定法精密量取供试品溶液0.15ml, 加水补足0.5ml, 与标准品平行加入6%苯酚0.3ml, 浓硫酸1.5ml, 摇匀, 沸水浴加热10分钟, 冷却, 490nm检测吸光度。将样品的吸光度数值代入标准曲线方程, 计算多糖含量。

[0102] 4、检测结果: 见表2

[0103] 表2: 实施例1-3提取物中的成分(重量百分比%)

[0104]

	紫锥菊多酚	紫锥菊多糖	菊苣酸

实施例1	12.8	25.8	4.11
实施例2	14.4	21.1	4.89
实施例3	12.1	21.5	4.72
实施例4	14.4	22.7	5.12
对比例	10.5	2.58	3.46

[0105] 表2结果显示:本发明最终制得的紫锥菊提取物中,紫锥菊多酚含量高于12%,紫锥菊多糖含量高于21%,菊苣酸的含量高于4%;优选地,提取物中含有以下重量百分比的成分:紫锥菊多酚12.1-14.4%,紫锥菊多糖21.1-25.8%,菊苣酸4.72-5.12%。

[0106] 实施例5:紫锥菊颗粒剂

[0107] 取实施例1得到的紫锥菊提取物400g,加入蔗糖1200g,糊精400g,混匀,用85%乙醇为润湿剂,制软材,湿法制粒,烘干,整粒,得紫锥菊颗粒1890g。

[0108] 实施例6:紫锥菊微丸

[0109] 取实施例3得到的紫锥菊提取物300g,加入微晶纤维素100g,淀粉300g,糊精200g,蔗糖100g,混匀,用85%乙醇为润湿剂,制软材,挤出-滚圆法制丸,烘干,选丸,得紫锥菊微丸920g。

[0110] 实施例7:紫锥菊散剂

[0111] 取实施例2得到的紫锥菊提取物800g,加入微晶纤维素100g,微粉硅胶100g,混匀,得紫锥菊散剂980g。

[0112] 实施例8:紫锥菊糖浆

[0113] 取蔗糖650g,加水800ml加热使溶解,加入实施例1得到的紫锥菊提取物200g,山梨酸钾3g,搅拌均匀,静置24小时,滤过,滤液加水至1000ml,即得紫锥菊糖浆。

[0114] 实施例9:紫锥菊口服液

[0115] 取实施例2得到的紫锥菊提取物200g,加水800ml,加热使溶解,加入山梨酸钾3g,亚硫酸氢钠1g,搅拌均匀,静置24小时,滤过,滤液加水至1000ml混匀,得紫锥菊口服液。

[0116] 实施例10:紫锥菊酊剂

[0117] 取实施例1、2或3得到的紫锥菊提取物100g,加50%乙醇溶液800ml,搅拌均匀,静置24小时,滤过,滤液加50%乙醇溶液至1000ml,得紫锥菊酊剂。

[0118] 实施例11:紫锥菊片

[0119] 取实施例4制得的紫锥菊颗粒350g,加入硬脂酸镁1g,混匀,压片,得紫锥菊片957片。

[0120] 实施例12:紫锥菊胶囊

[0121] 取实施例5制得的紫锥菊颗粒330g,装胶囊,得紫锥菊胶囊982粒。

[0122] 实施例13:紫锥菊胶囊

[0123] 取实施例6制得的紫锥菊散剂330g,装胶囊,得紫锥菊胶囊974粒。

[0124] 实施例14:紫锥菊胶囊

[0125] 取实施例7制得的紫锥菊微丸330g,装胶囊,得紫锥菊胶囊989粒。

[0126] 实施例15:紫锥菊软膏

[0127] 取硬脂酸120g,单硬脂酸甘油酯25g,碳酸钾9g置容器内,水浴加热至熔化,继续加热至70-80℃;另取三乙醇胺3ml,甘油100g,蒸馏水550ml置另一容器内,加热至70-80℃,缓

慢导入硬脂酸等油相中,边加边搅拌,至乳化完全;取取实施例1得到的紫锥菊提取物200g,加入上述制备的基质中,搅拌均匀,即得紫锥菊软膏。

[0128] 实验例2:提取方法的比较

[0129] 对比试验1、水提:将紫锥菊粉碎成粗粉,过15目筛,分别称取两份,各约500g,标记为A、B组,分别加水5000g、4000g,回流提取2次,每次1.5小时,将提取液合并,减压浓缩至60℃测定相对密度为1.08的浸膏,浸膏喷雾干燥,得紫锥菊提取物。测定提取物中菊苣酸、多酚及多糖的含量。

[0130] 对比试验2、70%乙醇提取

[0131] 将紫锥菊粉碎成粗粉,过15目筛,分别称取两份,各约500g,标记为A、B组,分别加70%乙醇5000g、4000g,回流提取2次,每次1.5小时,将提取液合并,减压浓缩至60℃测定相对密度为1.08的浸膏,浸膏喷雾干燥,得紫锥菊提取物。测定提取物中菊苣酸、多酚及多糖的含量。

[0132] 对比试验3、0.2%柠檬酸的70%乙醇和0.1%碳酸钠溶液提取试验

[0133] 将紫锥菊粉碎成粗粉,过15目筛,分别称取两份,各约500g,标记为A、B组,第一煎加0.2%柠檬酸的70%乙醇溶液5000g,回流提取1.5小时,滤过,药渣加0.1%碳酸钠溶液4000g80℃温浸提取1.5小时,滤过,滤液与一煎提取液合并,减压浓缩至60℃测定相对密度为1.08的浸膏,浸膏喷雾干燥,得紫锥菊提取物。测定提取物中菊苣酸、多酚及多糖的含量。

[0134] 对比试验4、50%乙醇(用氢氧化钙调节pH=12)和1%溶菌酶溶液提取试验(参考CN201210216720.2(公开号为CN102716164A)的方法)

[0135] 将紫锥菊粉碎成粗粉,过15目筛,分别称取两份,各约500g,标记为A、B组,第一煎加用氢氧化钙pH=12的50%乙醇溶液5000g,回流提取1.5小时,滤过,药渣加1%溶菌酶溶液4000g回流提取1.5小时,滤过,滤液与一煎提取液合并,减压浓缩至60℃测定相对密度为1.07的浸膏,浸膏喷雾干燥,得紫锥菊提取物。

[0136] 按照实验例1提供的方法测定提取物中菊苣酸、多酚及多糖的含量,结果见表3。

[0137] 表3:不同制备工艺紫锥菊提取物中菊苣酸、多酚及多糖成分含量结果

不同提取工艺		指标成分含量		
		菊苣酸含量 (%)	多酚含量 (%)	多糖含量 (%)
对比试验 1	A 组	1.37	4.41	17.30
	B 组	1.25	4.90	16.47
对比试验 2	A 组	3.22	8.51	8.07
	B 组	3.41	8.79	7.92
对比试验 3	A 组	5.25	14.79	25.15
	B 组	5.33	15.10	24.27
对比试验 4	A 组	5.05	8.36	17.77
	B 组	5.13	8.01	18.19

[0139] 表3结果显示:对比试验1-4中,只有采用0.2%柠檬酸的70%乙醇和0.1%碳酸钠溶液进行提取得到的提取物中各活性成分含量最高。

[0140] 实验例3:小鼠溶血素实验

[0141] 为进一步验证本发明制备的紫锥菊提取物的免疫促进作用,发明人考察了其对小

鼠溶血素的影响。

[0142] 1、材料与方法

[0143] 1.1实验药物

[0144] 受试药物:紫锥菊提取物,按照实施例1-4及对比例1制备,青岛康地恩药业有限公司提供。

[0145] 对照药物:盐酸左旋咪唑-黄芪多糖可溶性粉,批号20121013,广州市和生堂动物药业有限公司产品生产。

[0146] 1.2实验仪器:UV-1100型紫外分光光度计(日本岛津)。

[0147] 1.3实验动物

[0148] 昆明种小鼠,雄性,体重18-20g,由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供。合格证号:SCXK(沪)2007-0005

[0149] 1.4实验方法

[0150] 1.4.1绵羊红细胞悬液的制备

[0151] 取绵羊抗凝血30ml,放入离心管中,用生理盐水洗涤3次,每次2000rpm离心沉淀,前2次离心5min,最后1次离心10min,10弃去上清液。分别取绵羊红细胞3ml两份,用生理盐水分别配制成20%、10%的绵羊红细胞混悬液。

[0152] 1.4.2补体制备

[0153] 取自豚鼠心脏血所制得的血清,按血清:20%羊红细胞=1:0.2混合,于4℃冰箱中放置30min,2000rpm离心10min,吸取上清液备用。

[0154] 1.4.3实验动物分组及处理

[0155] 昆明种小鼠共90只,随机分为9组,每组10只。分别为实施例1高、中、低3个剂量组,实施例2、3、4组、对比例1组、阳性对照组和空白组。

[0156] 分组后第2天开始给药,实施例1高、中、低剂量组分别以2.7g/kg、0.9g/kg、0.3g/kg的剂量、将紫锥菊提取物用生理盐水溶解,配制含0.012g/ml、0.036g/ml、0.108g/ml的溶液,每只小鼠给药体积为250ul/10g,给药方式为灌胃给药;实施例2-4组和对比例1组均按照0.9g/kg的剂量给药,将紫锥菊提取物用生理盐水溶解,配制含0.036g/ml的溶液,每只小鼠给药体积为250ul/10g,给药方式为灌胃给药;阳性对照药物给药剂量为0.1g/kg,方法同上,每日定时给药一次,所有给药组均连续给药2周。

[0157] 1.4.4血清的制备及溶血素抗体的测定

[0158] 于小鼠给药结束前4天,将浓度为20%的绵羊红细胞悬液,以0.2ml/只的剂量对所有组别小鼠腹腔注射。

[0159] 4天后眼球取血,离心分离血清,将所得血清按500倍稀释,在1ml稀释血清中加入10%0.5ml绵羊红细胞,再加入1ml经预处理的1:10豚鼠血清,37℃水浴10min后置入冰水终止反应。2000r/min离心10min取上清液1ml加3ml都氏试剂,放置10min后在722s分光光度计540nm波长处测定OD值。

[0160] 绵羊红细胞半数溶血OD值测定:取10%绵羊红细胞0.25ml加3ml都氏试剂,放置10分钟后测定OD值。按下列公式计算每个样品的溶血素值(HC₅₀)。

[0161] $HC_{50} = (\text{样品OD值} / \text{羊红细胞半数溶血时OD值}) \times \text{稀释倍数}$

[0162] 2、实验结果与分析:见表4

[0163] 表4:紫锥菊对小鼠溶血素的影响($\bar{X} \pm SD$) (n=10)

[0164]

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)	OD值	HC ₅₀
实施例1低剂量组	0.3	10	0.17±0.07	108.9±47.4
实施例1中剂量组	0.9	10	0.22±0.10*	139.0±58.3*
实施例1高剂量组	2.7	10	0.24±0.04**	149.2±29.1**
实施例2组	0.9	10	0.21±0.04	101.2±31.7
实施例3组	0.9	10	0.17±0.05**	158.3±10.9**
实施例4组	0.9	10	0.15±0.01*	121.8±20.6*
对比例1组	0.9	10	0.12±0.02	109.2±42.4*
阳性对照组	0.1	10	0.26±0.09**	148.2±46.4**
空白对照组	-	10	0.14±0.06	91.6±24.3

[0165] 注:各组与空白对照组比较:*表示显著差异(P<0.05);**表示极显著差异(P<0.01)。

[0166] 表4结果显示:

[0167] 与空白对照组相比,实施例1中、高剂量组具有提高小鼠的溶血素值的效果,具有显著或极显著性的差异;

[0168] 与对比例1组相比,实施例1中、高即两组、实施例2-4各组也提高了小鼠的溶血素值,具有显著差异;

[0169] 结果表明:本发明提供的提取物对小鼠溶血素抗体生成具有明显促进作用,说明该药可增强体液免疫,且效果优于现有技术。

[0170] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的