(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107753542 B
(45)授权公告日 2021.05.07

(21)申请号 201711269669.0

(22)申请日 2017.12.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107753542 A

(43)申请公布日 2018.03.06

(73)专利权人 海南师范大学
地址 570000 海南省海口市琼山区龙昆南路99号

(72)发明人 陈文豪 惠阳 陈光英 宋小平 武晓雪 周秀悄

(74)专利代理机构 海口翔翔专利事务有限公司 46001
代理人 莫臻

(51)Int.Cl.
C07D 307/83(2006.01)
C07D 311/40(2006.01)
C07D 311/32(2006.01)
C07C 65/21(2006.01)
C07C 67/48(2006.01)
C07C 57/04(2006.01)
A61K 36/28(2006.01)
A61P 39/06(2006.01)
A23L 3/3472(2006.01)

(56)对比文件
CN 104610054 A,2015.05.13
林碧芬.蟛蜞菊活性成分分离及抑菌作用研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库》.2010,第1、11-12、18-20、23-26、28页.

审查员 田丽丽

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

南美蟛蜞菊花抗氧化提取物及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明公开了一种南美蟛蜞菊花抗氧化提取物及其制备方法和用途。该提取物是在南美蟛蜞菊花的干燥粉末中加入溶剂提取;提取液经过滤、减压浓缩得到总提取物,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,减压回收分别得到石油醚部分、乙酸乙酯部分和水溶解部分,所得乙酸乙酯部分和水溶解部分具有优良清除DPPH自由基和抗油脂氧化活性,其中乙酸乙酯部分包含9个黄酮和4个苯丙素类化合物。本发明制得的提取物得率高,工艺流程简单,适合较大规模的制备。所述提取物具有优良抗氧化活性,可以作为活性组分应用于抗氧化药物和食品保鲜中。

CN 107753542 B

1.一种南美蟛蜞菊花抗氧化提取物的制备方法,其特征在于,其步骤如下:

(1)将粉碎后的南美蟛蜞菊花药材过20～80目筛后加入85～95%的乙醇或甲醇水溶液,室温浸泡、加热或超声提取,提取时间为60分钟至7天,料液比为1:1～1:10;

(2)将南美蟛蜞菊花药材提取液过滤、减压回收得到总提取物,加水混悬,依次用石油醚和乙酸乙酯萃取,减压回收分别得到石油醚部分、乙酸乙酯部分和水溶解部分;

(3)其中,乙酸乙酯部分经硅胶柱色谱,首先采用氯仿:乙酸乙酯=1:0～10:1洗脱去除石油醚萃取残留物及小极性油脂成分,再经丙酮洗脱,真空浓缩即得富含酚类成分,具有优良抗氧化活性的南美蟛蜞菊花提取物;而水溶解部分真空冷冻干燥所得即是南美蟛蜞菊花另一抗氧化提取物;对乙酸乙酯部分所制得的抗氧化提取物进行反复柱层析:石油醚:丙酮=20:1硅胶柱层析、氯仿:丙酮=50:1硅胶柱层析、氯仿:甲醇体积比为1:1葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析分别得到化合物2、化合物5和化合物13;石油醚:丙酮=15:1硅胶柱层析,接着是氯仿:甲醇体积为1:1葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析,石油醚:乙酸乙酯=7:1硅胶柱层析以及氯仿:乙酸乙酯=15:1硅胶柱层析分离得到化合物12、化合物3和化合物6;氯仿:乙酸乙酯=10:1硅胶柱层析,接着是氯仿:甲醇体积比为1:1葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析分离得到化合物10、化合物11和化合物7;氯仿:乙酸乙酯=8:1硅胶柱层析、石油醚:丙酮=3:1硅胶柱层析和氯仿:丙酮=10:1硅胶柱层析分离得到化合物1、化合物4、化合物8和化合物9;

(4)对纯化得到的单体化合物进行结构鉴定,分别为9个黄酮类化合物、4个苯丙素类化合物,化合物1为紫铆花素,化合物2为4,2′,4′-三羟基-3-甲氧基查尔酮,化合物3为7,4′-二羟基二氢黄酮,化合物4为7,3′,5′-二羟基二氢黄酮,化合物5为7,4′-二羟基-3′-甲氧基二氢黄酮,化合物6为5,7,3′,4′-二羟基-8-甲氧基二氢黄酮,化合物7为5,4′-二羟基-7-甲氧基黄酮,化合物8为3,5,7,8,3′-四羟基-4′-甲氧基黄酮,化合物9为7,3′,4′-三羟基橙酮,化合物10为E-对羟基桂皮酸,化合物11为Z-对羟基桂皮酸,化合物12为Z-3-(2′,4′-二羟基苯基)-2-丙烯酸和化合物13为咖啡酸乙酯。

南美蟛蜞菊花抗氧化提取物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于天然植物提取领域，特别涉及一种南美蟛蜞菊花抗氧化提取物及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 南美蟛蜞菊(Wedelia trilobata)又称三裂(叶)蟛蜞菊，为菊科(Compositae)蟛蜞菊属(Wedelia)多年生草本植物。其原产热带美洲中南部，植物的叶子或地上部分在加勒比海地区和中美洲的传统医药中用于治疗背痛、肌肉痉挛、风湿病、顽固伤口、溃疡、肿胀、关节痛使用。在19世纪70年代被首次引入香港用于替代传统中药蟛蜞菊，主要用于治疗白喉、百日咳、痢疾、痔疮、跌打损伤。如今，在我国广泛分布于广东、广西、福建和海南等地的路旁、田边、沟边或湿润草地上，常常过度成长成茂密地被，排挤且阻止其它植物的再生，破坏所处生态系统平衡，严重威胁我国南部地区物种的多样性，被列为“世界100种危害最大的外来入侵物种”之一。

[0003] 张玉虎等人在“三裂蟛蜞菊中的倍半萜内酯成分及其化感作用，热带亚热带植物学报，2004，12(6)：533-537”中报道从植物全株分离得到6个倍半萜内酯类化合物，并发现化合物1、2、混合物3a和3b，4a和4b对萝卜、小白菜和西红柿的幼苗生长具有很强抑制作用，混合物4a和4b对咸水虾有较强的毒性；朱慧等人在“三裂蟛蜞菊茎总黄酮含量的提取及其抗氧化性研究，食品科学，2009，30(6)：52-56”中报道，三裂蟛蜞菊茎中总黄酮含量为4.1％，具有较好的羟自由基、超氧阴离子自由基清除率，但未见进一步的黄酮化学成分的鉴定研究。武美兰等人在“三裂蟛蜞菊化学成分的研究，中草药，2010，41(5)：681-685”中报道，从南美蟛蜞菊地上部位中分离得到11个化合物，主要涉及倍半萜内酯和对映贝壳杉烷型二萜；该作者等人在对比研究“三裂蟛蜞菊花的化学成分研究，亚太传统医药，2009，5(8)：41-42”中报道，从南美蟛蜞菊花中分离得到5个化合物，均与从南美蟛蜞菊地上部位中分离得到的化合物一致，但两篇报道均未进行生物活性测试。

[0004] 在活性成分方面，公开号为CN104083348A的中国专利公开了来源于南美蟛蜞菊等植物材料的四种贝壳杉烷二萜化合物可用于制备糖苷酶抑制剂药物；公开号为CN103109812A的中国专利公开了来源于南美蟛蜞菊植物材料的8种倍半萜内酯类化合物可用于制备抗烟草花叶病毒药物；公开号为CN104610054A的中国专利公开了一种从南美蟛蜞菊植物中分离的咖啡酰对羟基苯酚酯p-hydroxyphenyl caffeate用于制备强效酪氨酸酶抑制剂。

[0005] 在提取物生物活性方面，公开号为CN106465714A、CN106342934A、CN106342936A的中国专利分别公开了利用南美蟛蜞菊挥发油与其他提取物组合用于防治荔枝泥蜂透翅蛾、荔枝蝽、荔枝叶螨；公开号为CN105767021A、CN105851070A的中国专利，分别公开了南美蟛蜞菊叶的水提取物用于杀灭人纹污灯蛾幼虫、斜纹夜蛾幼虫。

[0006] 现如今，自由基过量所引发的疾病越来越多，抗氧化剂的研究和开发已成为重点关注方向，而化学合成抗氧化剂的毒副作用使开发天然抗氧化剂的呼声越来越高。迄今为

止，在抗氧化应用方面未见南美蟛蜞菊相关专利，也没有关于南美蟛蜞菊花抗氧化有效部位及其进一步化学成分的分离鉴定的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种有效地纯化制备南美蟛蜞菊花的抗氧化活性部位的方法，并经多次柱层析，阐明活性部位的化学成分。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种上述方法制备的南美蟛蜞菊花抗氧化提取物。

[0009] 本发明的再一目的在于提供一种上述南美蟛蜞菊花抗氧化提取物的用途。

[0010] 本发明的目的可通过下述技术路线得以实现，南美蟛蜞菊花抗氧化提取物的制备方法，其步骤如下：

[0011] (1)在南美蟛蜞菊花的干燥粉末中加入溶剂提取，溶剂为85～95％的乙醇或甲醇。

[0012] (2)将南美蟛蜞菊花提取液经过滤、减压浓缩得到总提取物，加水混悬均匀，依次用石油醚、乙酸乙酯萃取，减压回收分别得到对应石油醚、乙酸乙酯和水溶解部分。

[0013] (3)乙酸乙酯和水溶解部分，即是南美蟛蜞菊花抗氧化提取物。其中，乙酸乙酯溶解部分经柱色谱除去石油醚溶解残留物及小极性成分后，得总酚组分，该组份经反复柱层析得到9个黄酮类化合物、4个苯丙素类化合物。

[0014] 上述步骤(1)中，所述南美蟛蜞菊花干燥粉末是将南美蟛蜞菊的花经阴干后粉碎得到，所述溶剂为乙醇或甲醇与水(V/V)的混合溶液。

[0015] 上述步骤(1)中，所述提取方法包括室温浸泡、加热或超声提取。

[0016] 上述步骤(1)中，南美蟛蜞菊花药材与溶剂的体积比为1:1～1:10。

[0017] 上述步骤(2)中，所述石油醚、乙酸乙酯用量为水混悬液的1～2倍体积量。

[0018] 上述步骤(3)中，柱层析用填料为柱层析用硅胶或葡聚糖凝胶;所述硅胶柱层析用洗脱溶剂为石油醚、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯和丙酮中任意两种混合;所述葡聚糖凝胶柱层析用洗脱溶剂为氯仿、甲醇和水中任意两种混合。

[0019] 上述步骤(3)中13个酚类化合物，所包含的9个黄酮类化合物和4个苯丙素类化合物，分别为紫铆花素，4,2′,4′-三羟基-3-甲氧基查尔酮，7,4′-二羟基二氢黄酮(甘草素)，7,3′,5′-二羟基二氢黄酮，7,4′-二羟基-3′-甲氧基二氢黄酮，5,7,3′,4′-二羟基-8-甲氧基二氢黄酮，5,4′-二羟基-7-甲氧基黄酮，3,5,7,8,3′-四羟基-4′-甲氧基黄酮(4′-甲氧基棉花素)，7,3′,4′-三羟基橙酮(硫磺菊素)，E-对羟基桂皮酸，Z-对羟基桂皮酸，Z-3-(2′,4′-二羟基苯基)-2-丙烯酸和咖啡酸乙酯。

[0020] 本发明通过对提取物的生物活性研究，阐明其新用途，为此进行的抗氧化相关实验以清除DPPH自由基、抑制油脂氧化值为活性指标。实验结果表明，乙酸乙酯溶解和水溶解部分具有明显体外清除DPPH自由基和抑制油脂氧化值升高的能力，具有优良抗氧化活性，可以作为活性组份与药学、食品学上可接受的药物或辅料载体组合，制备用于抗氧化的药物和食品保鲜剂，包括各种口服及注射单方以及复方制剂，并以合适的剂型存在，这些制剂可以是片剂、胶囊剂、混悬剂、溶液剂、注射剂、粉针剂、喷雾剂等。如以淀粉等为辅料制成的片剂、以微晶纤维素为辅料的胶囊剂，等等。

[0021] 本发明与现有技术相比具有如下优点和效果：

[0022] 1)利用简单的提取分离方法，对南美蟛蜞菊花不同极性部位进行抗氧化活性筛

选,得到活性部位,并经多次柱层析,阐明活性部位的化学成分。

[0023] 2)本发明所得提取物具有优良抗氧化活性,且化学成分明确,主要为酚类成分。可以广泛用于抗氧化药物和食品保鲜剂中。

[0024] 4)本发明制得的提取物得率高,工艺流程简单,成本低廉,适合较大规模的制备。

具体实施方式

[0025] 下面结合实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0026] 南美蟛蜞菊花提取物的制备方法步骤如下:

[0027] 1)将粉碎后的南美蟛蜞菊花药材(过20～80目筛)中加入85～95%的乙醇或甲醇水溶液,室温浸泡、加热或超声提取,提取时间为60分钟至7天,料液比为1:1～1:10;

[0028] 2)将南美蟛蜞菊花药材提取液过滤、减压回收得到总提取物,加水混悬,依次用石油醚和乙酸乙酯萃取,减压回收分别得到石油醚部分、乙酸乙酯部分和水溶解部分;

[0029] 3)其中,乙酸乙酯部分经硅胶柱色谱,首先采用氯仿:乙酸乙酯(1:0～10:1)洗脱去除石油醚萃取残留物及小极性油脂成分,再经丙酮洗脱,真空浓缩即得富含酚类成分,具有优良抗氧化活性的南美蟛蜞菊花提取物;而水溶解部分真空冷冻干燥所得即是南美蟛蜞菊花另一抗氧化提取物。对乙酸乙酯部分所制得的抗氧化提取物进行反复柱层析:石油醚:丙酮(20:1)、氯仿:丙酮(50:1)硅胶柱层析、葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析(氯仿:甲醇=1:1,v/v)分别得到化合物(2)、(5)和(13);石油醚:丙酮(15:1)硅胶柱层析,接着是葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析(氯仿:甲醇=1:1,v/v)石油醚:乙酸乙酯(7:1)以及氯仿:乙酸乙酯(15:1)硅胶柱层析分离得到化合物(12)、(3)和(6);氯仿:乙酸乙酯(10:1)硅胶柱层析接着是葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析(氯仿:甲醇=1:1,v/v)分离得到(10)、(11)和(7);氯仿:乙酸乙酯(8:1)、石油醚:丙酮(3:1)和氯仿:丙酮(10:1)硅胶柱层析分离得到化合物(1)、(4)、(8)和(9)。

[0030] 4)综合应用多种光谱波谱技术(包括IR、UV、MS、1D/2D NMR和x-ray单晶衍射)结合相关文献参考,对纯化得到的单体化合物进行结构鉴定,分别为9个黄酮类化合物、4个苯丙素类化合物,具体结构为紫铆花素(1),4,2′,4′-三羟基-3-甲氧基查尔酮(2),7,4′-二羟基二氢黄酮(甘草素,3),7,3′,5′-二羟基二氢黄酮(4),7,4′-二羟基-3′-甲氧基二氢黄酮(5),5,7,3′,4′-二羟基-8-甲氧基二氢黄酮(6),5,4′-二羟基-7-甲氧基黄酮(7),3,5,7,8,3′-四羟基-4′-甲氧基黄酮(4′-甲氧基棉花素,8),7,3′,4′-三羟基橙酮(硫磺菊素,9),E-对羟基桂皮酸(10),Z-对羟基桂皮酸(11),Z-3-(2′,4′-二羟基苯基)-2-丙烯酸(12)和咖啡酸乙酯(13),测定结构可靠。

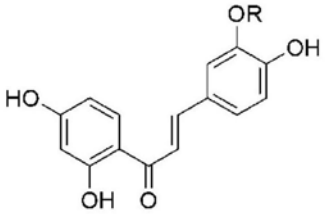
[0031] 下面结合实施例对本发明作详细说明。

[0032] 实例一南美蟛蜞菊花有效部位的制备

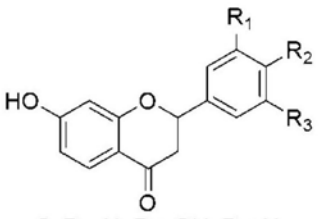
[0033] 南美蟛蜞菊花(10Kg),室温下采用95%乙醇室温浸泡3次,7天/次,合并提取液,减压浓缩得总提取物(1.2Kg),加水悬浮分散,分别用石油醚,氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得石油醚部分(200g),乙酸乙酯部分(380g)和水溶解部分(560g)。

[0034] 乙酸乙酯部分脱油脂后的活性部位经过反复硅胶、葡聚糖凝胶(Sephdex LH-20)

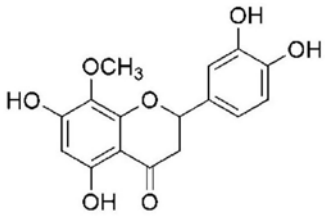
柱层析，得到9个黄酮类化合物、4个苯丙素类化合物，分别为石油醚：丙酮(20:1)、氯仿：丙酮(50:1)硅胶柱层析、葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析(氯仿：甲醇＝1:1，v/v)分别得到化合物4,2′,4′-三羟基-3-甲氧基查尔酮(2)7mg、7,4′-二羟基-3′-甲氧基二氢黄酮(5)16mg和咖啡酸乙酯(13)0.6g；石油醚：丙酮(15:1)硅胶柱层析，接着是葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析(氯仿：甲醇＝1:1，v/v)石油醚：乙酸乙酯(7:1)以及氯仿：乙酸乙酯(15:1)硅胶柱层析分离得到化合物Z-3-(2′,4′-二羟基苯基)-2-丙烯酸(12)12mg、7,4′-二羟基二氢黄酮(甘草素，3)17mg和5,7,3′,4′-二羟基-8-甲氧基二氢黄酮(6)8mg；氯仿：乙酸乙酯(10:1)硅胶柱层析接着是葡聚糖凝胶Sephadex LH-20柱层析(氯仿：甲醇＝1:1，v/v)分离得到E-对羟基桂皮酸(10)5mg，Z-对羟基桂皮酸(11)7mg和5,4′-二羟基-7-甲氧基黄酮(7)11mg；氯仿：乙酸乙酯(8:1)、石油醚：丙酮(3:1)和氯仿：丙酮(10:1)硅胶柱层析分离得到紫铆花素(1)1.2g、7,3′,5′-二羟基二氢黄酮(4)0.5g、3,5,7,8,3′-四羟基-4′-甲氧基黄酮(4′-甲氧基棉花素，8)1.4g和7,3′,4′-三羟基橙酮(硫磺菊素，9)3.4g，化学结构式如下：



1 R=H
2 R=CH_3

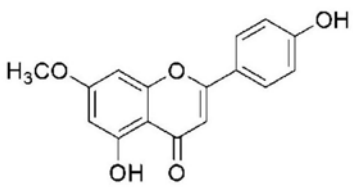


3 R_1=H, R_2=OH, R_3=H
4 R_1=R_3=OH, R_2=H
5 R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H

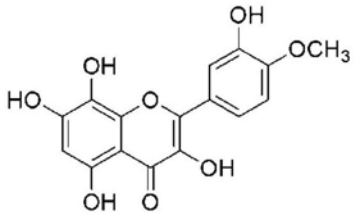


6

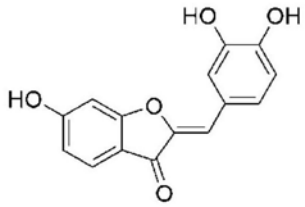
[0035]



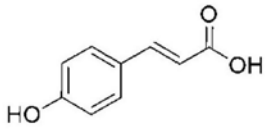
7



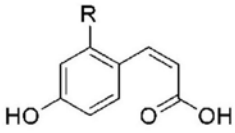
8



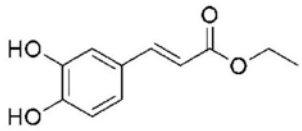
9



10



11 R=H
12 R=OH



13

[0036] 实施例二南美蟛蜞菊花提取物抗氧化活性研究

[0037] 1.南美蟛蜞菊花提取物清除DPPH自由基活性

[0038] 1.1实验方法：将1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)配制成65μM无水乙醇溶液。精密称取供试样品分别溶解于无水乙醇当中备用。

[0039] 移取50μL供试样品加入到3mL 65μM DPPH溶液中，空白对照用等量无水乙醇，混匀，室温下放置30min后于比色皿中，测定样品和DPPH的混合溶液在517nm处吸光值。每一吸光度平行测3次，取其平均值，计算系列浓度的清除率，得出IC_{50}值。清除率(Y)按下式计算：

[0040] Y＝[1－(Ai－Aj)/Ao]×100％

[0041] 式中：Ao DPPH乙醇溶液在517nm处吸光值；

[0042] Ai DPPH乙醇溶液与试样混合液在517nm处吸光值；

[0043] Aj乙醇与试样混合液在517nm处吸光值。

[0044] 统计学处理:所有数据均以均数±标准差(±s)表示,使用SPSS 12.0统计软件对实验数据进行单因素方差分析,P＜0.05为有统计学意义。

[0045] 1.2.实验结果

[0046] 由实施例1得到的南美蟛蜞菊花提取物具有与抗坏血酸(维生素C)相当的清除DPPH自由基活性(见表1)。

[0047] 表1南美蟛蜞菊花不同溶剂提取物清除DPPH自由基活性

[0048]

样品	IC_{50}（μg/mL）
	DPPH
乙酸乙酯溶解部分	13.4
水溶解部分	10.2
抗坏血酸	8.5

[0049] 2南美蟛蜞菊花提取物抗油脂氧化活性

[0050] 本实验选用市售压榨花生油为抗氧化实验研究对象,以商品化抗氧化剂特丁基对苯二酚(TBHQ)为阳性对照,研究南美蟛蜞菊花提取物抗油脂氧化活性。

[0051] 2.1实验方法：

[0052] 2.1.1过氧化值(POV)测定方法参照GB/T5538－2005方法,进行适当调整。油样用30mL冰乙酸－异辛烷(3:2)溶解于锥形瓶中,加入0.5mL饱和碘化钾溶液反应1min(其间不断摇匀),立即加入30mL蒸馏水,用0.01mol/L硫代硫酸钠滴定该溶液至淡黄色时,加入0.5mL淀粉溶液继续滴定至蓝色消失,记录消耗硫代硫酸钠溶液的体积,同时做空白实验。POV值以每千克中活性氧的毫克当量(meq/kg)表示,每份样品重复测定三次。

[0053] 2.1.2抗油脂氧化实验——Schaal烘箱法将不同量(0.02%、0.06%)的样品(南美蟛蜞菊花提取物、TBHQ)以及适当添加少许蓖麻油助溶,分别添加到50.0g油脂中,不断搅拌使其均匀分散在油样中。并将加有抗氧化剂的油样和空白油样置于200mL烧杯中,放入空气对流良好的(60±1)℃电热鼓风干燥箱内,每隔一定时间充分搅拌一次并交换油样在烘箱中的位置,每2h定时取样测定POV值。用于评价南美蟛蜞菊花提取物抗油脂氧化效果。

[0054] 2.2.测定结果的计算与分析

[0055] POV＝[(V-V0)*c*1000]/m

[0056] POV—样品的过氧化值,%

[0057] V—样品消耗硫代硫酸钠溶液的体积,mL

[0058] V0—空白消耗硫代硫酸钠溶液的体积,mL

[0059] c—硫代硫酸钠标准溶液的摩尔浓度,mol/L

[0060] m—试样的质量,g

[0061] 由实施例1得到的南美蟛蜞菊花提取物具有比特丁基对苯二酚(TBHQ)更好的抗油脂氧化活性(见表2),不管是乙酸乙酯部分(二乙)还是水溶解部分(水提),均比阳性对照TBHQ具有更好的抑制油脂氧化值升高活性。

[0062] 表2南美蟛蜞菊花不同溶剂提取物抑制油脂活性

[0063]

样品添加量 氧化值	POV(meq/kg)				
	2h	4h	6h	12h	18h
空白	4.21	4.98	5.78	5.89	7.72
水提（0.02%）	3.62	3.91	4.05	4.08	4.69
水提（0.06%）	3.96	3.86	4.13	3.69	4.64
二乙（0.02%）	3.75	3.60	4.19	4.34	5.21
二乙（0.06%）	4.51	3.98	3.85	4.03	4.96

[0064]

TBHQ（0.02%）	4.46	4.16	4.50	4.09	6.53
TBHQ（0.06%）	4.16	4.25	4.42	3.86	6.18

[0065] 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，在不脱离本发明技术原理的前提下，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。