



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106905390 B

(45)授权公告日 2017.12.12

(21)申请号 201710125023.9

(22)申请日 2017.03.03

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106905390 A

(43)申请公布日 2017.06.30

(73)专利权人 甘肃中医药大学

地址 730000 甘肃省兰州市城关区定西路35号

(72)发明人 林丽 孙少伯 晋玲 崔治家
王振恒 马毅

(74)专利代理机构 北京高航知识产权代理有限公司 11530

代理人 赵永强

(51)Int.Cl.

C07H 17/06(2006.01)

C07H 1/08(2006.01)

A61K 31/7048(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

A61P 15/08(2006.01)

A61P 5/28(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/74(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/14(2006.01)

(56)对比文件

CN 104983915 A,2015.10.21,

CN 104789612 A,2015.07.22,

审查员 冯伟

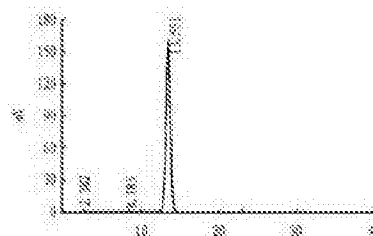
权利要求书3页 说明书16页 附图2页

(54)发明名称

一种黑果枸杞花青素的制备工艺及其检测方法
方法与用途

(57)摘要

本发明属于植物提取物领域,涉及一种黑果枸杞花青素的制备工艺及其检测方法与用途。该黑果枸杞花青素是采用超微粉碎、仿生提取、超声波辅助提取以及大孔吸附树脂进行柱层析分离纯化等步骤制成的。该方法制备的黑果枸杞花青素提取物不仅质量多,而且纯度高。本发明还提供了采用高效液相色谱法对该黑果枸杞花青素进行含量测定的方法。本发明还提供了该黑果枸杞花青素注射液以及该注射液的制备方法及其制药用途。



1. 一种黑果枸杞花青素提取物, 其特征在于, 该黑果枸杞花青素提取物是采用如下方法制备的:

(1) 将黑果枸杞置烘箱内 $40^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ 烘干 $3 \sim 5\text{h}$ 后, 取干燥的黑果枸杞, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为 $1000 \sim 1200\text{kPa}$, 进料速度为 $200 \sim 220\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 分级频率为 $20 \sim 30\text{Hz}$, 粉碎时间为 $30 \sim 40\text{min}$, 得黑果枸杞超微粉A;

(2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A, 加入 $40 \sim 60$ 倍量的仿生提取溶媒, $35 \sim 40^{\circ}\text{C}$ 水浴加热, 搅拌提取 $0.5 \sim 2\text{h}$, 离心 $10 \sim 30\text{min}$, 离心速度 $3200 \sim 4000\text{r}/\text{min}$, 分别收集上清液B和沉淀C; 上清液B浓缩, 得浸膏D, 备用, 沉淀C备用; 上述仿生提取溶媒是由 $0.2 \sim 0.4\%$ 氯化钠、 $0.3 \sim 0.5\%$ 胃蛋白酶、 $0.3 \sim 0.5\%$ 胰蛋白酶及 $0.02 \sim 0.04\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

(3) 取步骤(2)所得沉淀C, 进行超声波辅助提取, 提取温度 $40 \sim 50^{\circ}\text{C}$, 超声波频率 $40 \sim 60\text{kHz}$, 按 $1\text{g}:10 \sim 15\text{mL}$ 的料液比, 加入浓度为 $60 \sim 70\%$ 的乙醇作为提取液, 每次提取 $10 \sim 30\text{min}$, 共提取 $2 \sim 3$ 次, 合并提取液, 滤过, 滤液回收乙醇, 得浸膏E, 备用;

(4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并, 混匀, 进行柱层析分离; 选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离, 树脂柱径高比为 $1:7 \sim 9$, 上样体积 $6\text{BV} \sim 8\text{BV}$, 水洗 $4\text{BV} \sim 6\text{BV}$ 除杂, 以乙酸乙酯: $0.2\text{mol}/\text{L}$ 磷酸二氢钠溶液 $=1:1$ 的洗脱剂 $7\text{BV} \sim 9\text{BV}$ 洗脱, 流速为 $2\text{BV}/\text{h} \sim 4\text{BV}/\text{h}$, 收集洗脱液, 洗脱液浓缩, 干燥, 即得黑果枸杞花青素提取物。

2. 如权利要求1所述的黑果枸杞花青素, 其特征在于, 该黑果枸杞花青素是采用如下方法制备的:

(1) 将黑果枸杞置烘箱内 40°C 烘干 4h 后, 取干燥的黑果枸杞, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为 1100kPa , 进料速度为 $210\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 分级频率为 25Hz , 粉碎时间为 35min , 得黑果枸杞超微粉A;

(2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A, 加入 50 倍量的仿生提取溶媒, 37°C 水浴加热, 搅拌提取 1h , 离心 20min , 离心速度 $3600\text{r}/\text{min}$, 分别收集上清液B和沉淀C; 上清液B浓缩, 得浸膏D, 备用, 沉淀C备用; 上述仿生提取溶媒是由 0.3% 氯化钠、 0.4% 胃蛋白酶、 0.4% 胰蛋白酶及 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

(3) 取步骤(2)所得沉淀C, 进行超声波辅助提取, 提取温度 45°C , 超声波频率 50kHz , 按 $1\text{g}:12\text{mL}$ 的料液比, 加入浓度为 65% 的乙醇作为提取液, 每次提取 20min , 共提取三次, 合并提取液, 滤过, 滤液回收乙醇, 得浸膏E, 备用;

(4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并, 混匀, 进行柱层析分离; 选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离, 树脂柱径高比为 $1:8$, 上样体积 7BV , 水洗 5BV 除杂, 以乙酸乙酯: $0.2\text{mol}/\text{L}$ 磷酸二氢钠溶液 $=1:1$ 的洗脱剂 8BV 洗脱, 流速为 $3\text{BV}/\text{h}$, 收集洗脱液, 洗脱液浓缩, 干燥, 即得黑果枸杞花青素提取物。

3. 如权利要求1~2任意一项所述的黑果枸杞花青素提取物, 其特征在于, 该黑果枸杞花青素提取物采用药学中常规的制药方法制备成注射剂。

4. 一种黑果枸杞花青素提取物注射剂, 其特征在于, 该黑果枸杞花青素提取物注射剂的制备方法为:

(1) 将黑果枸杞置烘箱内 $40^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ 烘干 $3 \sim 5\text{h}$ 后, 取干燥的黑果枸杞, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为 $1000 \sim 1200\text{kPa}$, 进料速度为 $200 \sim 220\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 分级频率为 $20 \sim 30\text{Hz}$, 粉碎时间为 $30 \sim 40\text{min}$, 得黑果枸杞超微粉A;

(2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入40~60倍量的仿生提取溶媒,35~40℃水浴加热,搅拌提取0.5~2h,离心10~30min,离心速度3200~4000r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.2~0.4%氯化钠、0.3~0.5%胃蛋白酶、0.3~0.5%胰蛋白酶及0.02~0.04mol·L⁻¹盐酸配制成溶液;

(3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度40~50℃,超声波频率40~60kHz,按1g:10~15mL的料液比,加入浓度为60~70%的乙醇作为提取液,每次提取10~30min,共提取2~3次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

(4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:7~9,上样体积6BV~8BV,水洗4BV~6BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂7BV~9BV洗脱,流速为2BV/h~4BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物;

(5) 取注射用水,加热至60~80℃,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏36~60小时,滤过,取滤液,调pH为6~7,加入活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌封、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

5. 如权利要求4所述的黑果枸杞花青素注射剂,其特征在于,该黑果枸杞花青素注射剂的制备方法为:

(1) 将黑果枸杞置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

(2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及0.03mol·L⁻¹盐酸配制成溶液;

(3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

(4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物;

(5) 取注射用水,加热至70℃,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏48小时,滤过,取滤液,调pH为6.5,加入0.5%的活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌封、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

6. 一种黑果枸杞花青素提取物注射剂在制备多囊卵巢综合症药物中的应用,其特征在于,该黑果枸杞花青素提取物注射剂是采用如下方法制备的:

(1) 将黑果枸杞置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

(2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅

拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

(3)取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

(4)取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物;

(5)取注射用水,加热至70℃,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏48小时,滤过,取滤液,调pH为6.5,加入0.5%的活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌封、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

一种黑果枸杞花青素的制备工艺及其检测方法与用途

技术领域：

[0001] 本发明属于植物提取物领域，具体涉及一种黑果枸杞花青素提取物及其制备方法与检测方法。

技术背景：

[0002] 黑果枸杞，(*Lycium ruthenicum* Murr.) 又名黑枸杞，是茄科枸杞属多年生耐盐、抗旱植物，其食用和药用的部位为其干燥的果实。《中国植物志》记载：分布于我国陕西北部黄土高原、宁夏、甘肃、青海、内蒙古、新疆和西藏等地区，其中主要分布于甘肃省的盐碱沙化地区。黑果枸杞是一种有着独特营养价值及医药价值的药材，也是一种重要的经济及生态作物。作为一种著名的中药材，黑果枸杞用于治疗心脏病、月经不调、更年期疾病等。研究发现黑枸杞含有的主要化学成分为花青素，花青素是一种多酚黄酮类的花色苷，具有独特的药理活性。花青素具有多种生物活性，包括抗氧化性、神经保护、抗癌性、抗糖尿病、视力保护和皮肤保健等。因此，花青素的提取纯化制备工艺受到越来越多的研究者关注。传统提取花青素的方法是通过有机溶剂浸提，然而这种方法只适用于低浓度的花青素分离制备，此外该提取方法存在操作周期长、过程繁琐、有机溶剂消耗量大、成本高等不足。现在有一些新的技术可作为辅助手段用于花青素提取纯化，如微波辅助提取和超临界CO₂提取技术，这些新技术的确可以使花青素的纯度及生产效率有所改善，但改善的效果并不明显，而且成本也远远高于传统方法。

[0003] 本发明的发明人作为甘肃黑果枸杞研究的重要单位甘肃中医药大学的科研人员，对黑果枸杞已经进行了多年的研究，在对黑果枸杞多年的持续研究中意外发现了一种独特的提取分离黑果枸杞中花青素的方法，非常有效地提高了黑果枸杞花青素的提取率。

[0004] 本发明所用的黑果枸杞均为甘肃产黑果枸杞药材，由甘肃凯正黑果枸杞开发有限公司提供。

发明内容：

[0005] 本发明的目的是提供一种黑果枸杞花青素。

[0006] 本发明的另一目的是提供该黑果枸杞花青素提取物的制备方法。

[0007] 本发明的另一目的是提供该黑果枸杞花青素提取物含量测定方法。

[0008] 本发明还提供了该黑果枸杞花青素提取物的注射剂药物剂型及其制备方法。

[0009] 本发明还提供了该黑果枸杞花青素提取物注射液在制备治疗多囊卵巢综合症药物中的应用。

[0010] 本发明还提供了该黑果枸杞花青素提取物在制备治疗肿瘤药物中的应用。

[0011] 本发明的目的是通过以下方式实现的：

[0012] 一种黑果枸杞花青素提取物，是采用如下方法制备的：

[0013] (1) 将黑果枸杞置烘箱内40℃～50℃烘干3～5h后，取干燥的黑果枸杞，采用气流粉碎机进行超微粉碎，气流粉碎机的气流压力为1000～1200kPa，进料速度为200～220r·

min^{-1} , 分级频率为20~30Hz, 粉碎时间为30~40min, 得黑果枸杞超微粉A;

[0014] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A, 加入40~60倍量的仿生提取溶媒, 35~40℃水浴加热, 搅拌提取0.5~2h, 离心10~30min, 离心速度3200~4000r/min, 分别收集上清液B和沉淀C; 上清液B浓缩, 得浸膏D, 备用, 沉淀C备用; 上述仿生提取溶媒是由0.2~0.4%氯化钠、0.3~0.5%胃蛋白酶、0.3~0.5%胰蛋白酶及0.02~0.04 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0015] (3) 取步骤(2)所得沉淀C, 进行超声波辅助提取, 提取温度40~50℃, 超声波频率40~60kHz, 按1g:10~15mL的料液比, 加入浓度为60~70%的乙醇作为提取液, 每次提取10~30min, 共提取2~3次, 合并提取液, 滤过, 滤液回收乙醇, 得浸膏E, 备用;

[0016] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并, 混匀, 进行柱层析分离; 选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离, 树脂柱径高比为1:7~9, 上样体积6BV~8BV, 水洗4BV~6BV除杂, 以乙酸乙酯:0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂7BV~9BV洗脱, 流速为2BV/h~4BV/h, 收集洗脱液, 洗脱液浓缩, 干燥, 即得黑果枸杞花青素提取物。

[0017] 所述的黑果枸杞花青素, 优选是采用如下方法制备的:

[0018] (1) 将黑果枸杞置烘箱内40℃烘干4h后, 取干燥的黑果枸杞, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为1100kPa, 进料速度为210 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 分级频率为25Hz, 粉碎时间为35min, 得黑果枸杞超微粉A;

[0019] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A, 加入50倍量的仿生提取溶媒, 37℃水浴加热, 搅拌提取1h, 离心20min, 离心速度3600r/min, 分别收集上清液B和沉淀C; 上清液B浓缩, 得浸膏D, 备用, 沉淀C备用; 上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及0.03 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0020] (3) 取步骤(2)所得沉淀C, 进行超声波辅助提取, 提取温度45℃, 超声波频率50kHz, 按1g:12mL的料液比, 加入浓度为65%的乙醇作为提取液, 每次提取20min, 共提取三次, 合并提取液, 滤过, 滤液回收乙醇, 得浸膏E, 备用;

[0021] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并, 混匀, 进行柱层析分离; 选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离, 树脂柱径高比为1:8, 上样体积7BV, 水洗5BV除杂, 以乙酸乙酯:0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱, 流速为3BV/h, 收集洗脱液, 洗脱液浓缩, 干燥, 即得黑果枸杞花青素提取物。

[0022] 所述的黑果枸杞花青素提取物的质量检测方法, 该黑果枸杞花青素提取物是采用如下方法制备的:

[0023] (1) 将黑果枸杞置烘箱内40℃烘干4h后, 取干燥的黑果枸杞, 采用气流粉碎机进行超微粉碎, 气流粉碎机的气流压力为1100kPa, 进料速度为210 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 分级频率为25Hz, 粉碎时间为35min, 得黑果枸杞超微粉A;

[0024] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A, 加入50倍量的仿生提取溶媒, 37℃水浴加热, 搅拌提取1h, 离心20min, 离心速度3600r/min, 分别收集上清液B和沉淀C; 上清液B浓缩, 得浸膏D, 备用, 沉淀C备用; 上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及0.03 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0025] (3) 取步骤(2)所得沉淀C, 进行超声波辅助提取, 提取温度45℃, 超声波频率50kHz, 按1g:12mL的料液比, 加入浓度为65%的乙醇作为提取液, 每次提取20min, 共提取三

次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0026] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物;

[0027] 采用高效液相色谱法测定黑果枸杞花青素提取物中的花青素含量:

[0028] (1) 色谱条件:色谱柱:采用C₁₈柱,流动相:体积比为90:10的4%磷酸-乙腈溶液,流速0.8mL/min;柱温30℃;检测波长520nm;

[0029] (2) 样品溶液制备:准确称取25.00mg的黑果枸杞青花素提取物溶于25.00mL的1%盐酸甲醇溶液中,超声20min,将溶液用0.22μm滤膜过滤,收集滤液,即得样品溶液;

[0030] (3) 标准品溶液制备:将矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品1.00mg溶于1.00mL 1%盐酸甲醇溶液中,配成1mg/mL的标准品溶液;

[0031] (4) 测定:精密吸取样品溶液、标准品溶液各5μL,注入高效液相色谱仪,进行测定。

[0032] 所述的黑果枸杞花青素提取物,采用药学中常规的制药方法制备成注射剂。

[0033] 一种黑果枸杞花青素提取物注射剂的制备方法为:

[0034] (1) 将黑果枸杞置烘箱内40℃~50℃烘干3~5h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1000~1200kPa,进料速度为200~220r·min⁻¹,分级频率为20~30Hz,粉碎时间为30~40min,得黑果枸杞超微粉A;

[0035] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入40~60倍量的仿生提取溶媒,35~40℃水浴加热,搅拌提取0.5~2h,离心10~30min,离心速度3200~4000r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.2~0.4%氯化钠、0.3~0.5%胃蛋白酶、0.3~0.5%胰蛋白酶及0.02~0.04mol·L⁻¹盐酸配制成溶液;

[0036] (3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度40~50℃,超声波频率40~60kHz,按1g:10~15mL的料液比,加入浓度为60~70%的乙醇作为提取液,每次提取10~30min,共提取2~3次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0037] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:7~9,上样体积6BV~8BV,水洗4BV~6BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂7BV~9BV洗脱,流速为2BV/h~4BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物;

[0038] (5) 取注射用水,加热至60~80℃,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏36~60小时,滤过,取滤液,调pH为6~7,加入活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌装、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

[0039] 所述的黑果枸杞花青素注射剂,优选的制备方法为:

[0040] (1) 将黑果枸杞置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

[0041] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰

蛋白酶及 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0042] (3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度 45°C ,超声波频率 50kHz ,按 $1\text{g}:12\text{mL}$ 的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取 20min ,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0043] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为 $1:8$,上样体积 7BV ,水洗 5BV 除杂,以乙酸乙酯: 0.2mol/L 磷酸二氢钠溶液 $=1:1$ 的洗脱剂 8BV 洗脱,流速为 3BV/h ,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物;

[0044] (5) 取注射用水,加热至 70°C ,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏 48h ,滤过,取滤液,调 pH 为 6.5 ,加入 0.5% 的活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌装、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

[0045] 所述的黑果枸杞花青素提取物注射剂在制备多囊卵巢综合症药物中的应用,该黑果枸杞花青素提取物注射剂是采用如下方法制备的:

[0046] (1) 将黑果枸杞置烘箱内 40°C 烘干 4h 后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为 1100kPa ,进料速度为 $210\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,分级频率为 25Hz ,粉碎时间为 35min ,得黑果枸杞超微粉A;

[0047] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒, 37°C 水浴加热,搅拌提取 1h ,离心 20min ,离心速度 3600r/min ,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由 0.3% 氯化钠、 0.4% 胃蛋白酶、 0.4% 胰蛋白酶及 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0048] (3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度 45°C ,超声波频率 50kHz ,按 $1\text{g}:12\text{mL}$ 的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取 20min ,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0049] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为 $1:8$,上样体积 7BV ,水洗 5BV 除杂,以乙酸乙酯: 0.2mol/L 磷酸二氢钠溶液 $=1:1$ 的洗脱剂 8BV 洗脱,流速为 3BV/h ,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物;

[0050] (5) 取注射用水,加热至 70°C ,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏 48h ,滤过,取滤液,调 pH 为 6.5 ,加入 0.5% 的活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌装、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

[0051] 所述的黑果枸杞花青素提取物在制备治疗肿瘤药物中的应用,该黑果枸杞花青素是采用如下方法制备的:

[0052] (1) 将黑果枸杞置烘箱内 40°C 烘干 4h 后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为 1100kPa ,进料速度为 $210\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,分级频率为 25Hz ,粉碎时间为 35min ,得黑果枸杞超微粉A;

[0053] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒, 37°C 水浴加热,搅拌提取 1h ,离心 20min ,离心速度 3600r/min ,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由 0.3% 氯化钠、 0.4% 胃蛋白酶、 0.4% 胰蛋白酶及 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0054] (3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0055] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物。

[0056] 通过如下实验研究验证本发明的技术效果:

[0057] 实验一:HPLC法测定黑果枸杞花青素提取物中青花素的含量

[0058] 1材料与方法

[0059] 1.1材料与设备

[0060] 1.1.1材料与试剂

[0061] 黑果枸杞:由甘肃大禹黑枸生物科技有限公司生产,地产:甘肃;矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品:由大连美仑生物技术有限公司公司生产;甲醇、乙腈:由天津康科德科技有限公司生产,色谱纯;盐酸、磷酸、无水乙醇:由北京世纪拓鑫精细化工有限公司生产,分析纯。

[0062] 1.1.2设备

[0063] LC-20AT高效液相色谱仪(岛津);检测器SPD-20,VP-ODSC18柱(4.6mm×150.0mm),UV-1700分光光度计(岛津),电子天平,超纯水仪,真空泵,超声清洗器。

[0064] 1.2实验方法

[0065] 1.2.1黑果枸杞青花素提取物的制备

[0066] (1) 将黑果枸杞置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

[0067] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及0.03mol·L⁻¹盐酸配制成溶液;

[0068] (3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0069] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物。

[0070] 1.2.2黑果枸杞青花素提取物的紫外-可见光谱分析

[0071] 用移液管吸取花青素样品溶液0.2mL,移入10.00mL的容量瓶中,用体积比为1%盐酸甲醇稀释,用UV-1700进行紫外-可见吸收光谱分析。

[0072] 1.2.3样品溶液

[0073] 准确称取25.00mg的黑果枸杞青花素提取物溶于25.00mL的1%盐酸甲醇溶液中,

超声20min,将溶液用0.22μm滤膜过滤,取5μL上样。

[0074] 1.2.4标准品溶液

[0075] 将矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品1.00mg溶于1.00mL1%盐酸甲醇溶液中,配成1mg/mL的标准品溶液。

[0076] 1.2.5标准曲线的绘制

[0077] 从标准品溶液中吸取一定量,用1%盐酸甲醇稀释成2、10、20、50、100μg/mL标品待测液,用0.22μm滤膜过滤,取5μL上样。以矢车菊色素浓度为纵坐标,峰面积为横坐标进行线性回归分析,绘制标准品的标准曲线:

[0078] $f(X) = 1.9536 \times 10^{-5}X - 0.4568, r = 0.9998$ 。

[0079] 1.2.6样品中矢车菊素-3-葡萄糖苷含量的计算。

[0080]
$$X\% = \frac{A \cdot C \cdot V}{A_s \cdot m \cdot 100} \cdot f$$

[0081] 式中,X为矢车菊色素含量;A为样品中矢车菊色素峰面积;C为标准溶液中矢车菊色素的浓度(μg/mL);V为样品最终定容体积(mL);As为标准溶液中矢车菊色素峰面积;m为试样质量(g);f为稀释倍数。

[0082] 1.2.7色谱条件

[0083] 色谱柱:采用C₁₈柱,流动相:体积比为90:10的4%磷酸-乙腈溶液,流速0.8mL/min;柱温30℃;检测波长520nm。

[0084] 2结果与分析

[0085] 2.1光谱分析

[0086] 花青苷类化合物分别在265~275和465~560nm处有2个特征吸收峰。将黑果枸杞青花素提取物用1%盐酸甲醇溶解,进行紫外-可见光吸收光谱扫描,可以发现在紫外和可见光区各有1个较强的吸收峰,其波长分别为270和520nm,由此可推断黑果枸杞青花素提取物中的色素为花青苷类物质。

[0087] 2.2矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品色谱图

[0088] 由附图1可知,矢车菊色素保留时间为13.558min。

[0089] 2.3黑果枸杞青花素提取物中矢车菊色素的色谱图

[0090] 在附图1的实验条件下测定黑果枸杞青花素提取物4个批次产品得到的色谱图。在色谱图中,在13.558min附近均有峰检出,4个批次的保留时间分别为13.652、13.598、13.612、13.486min,平均保留时间为13.592min,与标品的保留时间比较吻合,可以断定此峰为矢车菊素-3-葡萄糖苷。将矢车菊色素的峰面积代入标准曲线,通过计算得出黑果枸杞青花素提取物中矢车菊色素的平均含量为92%。

[0091] 2.4回收率实验

[0092] 分别精密吸取一定量的矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品溶液,加入到已知量的矢车菊素-3-葡萄糖苷浓度的样品中,按测定样品含量的方法操作、测试,测得3个浓度的矢车菊素-3-葡萄糖苷的平均回收率为1.2.32%。

[0093] 2.5精密度实验

[0094] 取同一批次的花青素样品溶液,精密吸取10μL,连续进样5次,测定矢车菊素-3-葡萄糖苷的峰面积,结果其峰面积的RSD=1.12%(n=5)。

[0095] 3结论

[0096] 结果表明:本发明黑果枸杞花青素提取物的主要成分是矢车菊素-3-葡萄糖苷,平均含量为92%。

[0097] 实验二:不同提取纯化方法制备黑果枸杞花青素提取物提取的纯度与含量的比较研究

[0098] 1不同提取纯化方法制备的黑果枸杞提取物

[0099] 1.1本发明方法制备黑果枸杞青花素提取物

[0100] (1)将黑果枸杞1000g置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

[0101] (2)取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及0.03mol·L⁻¹盐酸配制溶液;

[0102] (3)取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0103] (4)取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物56.52g。

[0104] 1.2超声波辅助提取法制备黑果枸杞青花素提取物

[0105] 取干燥黑果枸杞1000g,粉碎,过60目筛,得黑果枸杞粉,按1:15(g/mL)料液比加入浓度为60%的乙醇作为提取液,提取温度50℃,超声波辅助提取,每次25min,共三次,收集提取液,滤过,滤液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物72.55g。

[0106] 1.3醇提色谱柱法制备黑果枸杞青花素提取物

[0107] 取干燥黑果枸杞1000g,按1:40(g/mL)料液比加入以pH为3.0的75%的乙醇溶液为提取液,提取温度40℃,选用AB-8型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积6BV~8BV,水洗4BV~6BV除杂,以95%洗脱剂50BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物18.20g。

[0108] 2.测定

[0109] 采用本发明实验一所提供的HPLC法测定黑果枸杞花青素提取物中青花素的含量的方法进行测定。

[0110] 3.测定结果

[0111] 测定结果见表1。

[0112] 表1不同提取方法提取得到的黑果枸杞青花素提取物的质量与花青素含量

[0113]	样品	提取物质量(g)	花青素质量(g)	提取物中花青素含量
	本发明方法制备黑果枸杞花青素提取物	56.52	52.09	92.17%
	超声波辅助提取法制备黑果枸杞花青素提取物	72.55	29.12	40.14%
	醇提色谱柱法制备黑果枸杞花青素提取物	18.20	10.95	60.17%

[0114] 4. 结论

[0115] 由表1实验结果可见,采用本发明提供的制备方法提取纯化得到的黑果枸杞花青素提取物,不仅提取得到花青素多,而且提取物的纯度高。

[0116] 实验三:本发明花青素注射液治疗多囊卵巢综合症的药物筛选实验研究

[0117] 1材料与方法

[0118] 1.1动物及药品

[0119] 1.1.1清洁级SD大鼠60只,体重180~220g,甘肃中医药大学医学实验中心提供,动物合格证号:SCXK(甘)2011-0001-0001011;实验设施合格证号:SYXK(甘)2011-0001-0000314;饲养于甘肃中医药大学医学实验中心,动物饲养于标准条件下,12h明暗交替,(22±2)℃,自由摄食饮水。动物在上述环境中适应性饲养1周后开始实验。

[0120] 1.1.2本发明花青素注射液:

[0121] (1)将黑果枸杞1000g置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

[0122] (2)取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及0.03mol·L⁻¹盐酸配制成溶液;

[0123] (3)取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0124] (4)取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物57.32;

[0125] (5)取注射用水1000mL,加热至70℃,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏48小时,滤过,取滤液,调pH为6.5,加入0.5%的活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌封、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

[0126] 1.1.3本发明花青素口服药物:

[0127] (1)将黑果枸1000g杞置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为

25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

[0128] (2)取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0129] (3)取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0130] (4)取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:7~9,上样体积6BV~8BV,水洗4BV~6BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂7BV~9BV洗脱,流速为2BV/h~4BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素52.14g。

[0131] 1.1.4注射用人绒毛膜促性腺激素:由丽珠集团丽珠制药厂公司生产,规格:1000单位,国药准字H44020674;

[0132] 1.1.5胰岛素注射液诺和灵N:由江苏万邦生化医药股份有限公司生产,规格:10mL:400单位,国药准字H32020614;

[0133] 1.1.6盐酸二甲双胍片,由华润双鹤药业股份有限公司生产,国药准字H11020541;

[0134] 1.1.7FSH、LH放射免疫试剂盒:由北京福瑞生物工程公司生产;E2、P、T化学发光免疫试剂盒:由北京福瑞生物工程公司生产。

[0135] 1.2多囊卵巢综合症动物模型复制

[0136] 参照PoretskyL介绍的胰岛素联合HCG造模法(PoretskyL,ClemonsJ,BogovichK.Hyperinsulinemia and human chorionic gonadotropin synergistically promote the growth of ovarian follicular cysts in rats[J].Metabolism,1992,41(8):903-910)。选择连续2个以上规律动情周期的大鼠,随机分为空白对照组(n=10)和模型组(n=50)。

[0137] 空白对照组以基础饲料喂养,自由饮食饮水;模型组予高脂饮食(基础饲料40%+化猪油25%+蔗糖25%+鸡蛋10%),处理期间为5%葡萄糖水,第1~10天给予诺和灵N(低精蛋白锌胰岛素NPH-Humu-lin),股内侧皮下注射,每日一次,由0.5IU递增至5.0IU;第11~22天持续5.0IU剂量,同时给予人绒毛膜促性腺激素皮下注射1.5IU溶于生理盐水共0.2mL,每日2次。22d后对照组继续普食喂养,模型组继续高脂饮食。持续至第六周,每周测体重一次。在第六周末晚8时开始禁食,次日上午8时随机选取10只断颈处死,评价造模效果。观测大鼠体重、卵巢重量、最大横截面积、病理组织学改变、血清LH、T、E2、P、FSH水平。

[0138] 造模成功后的大鼠随机分为4组,分别为:模型组、本发明花青素注射液组、本发明花青素口服药物组,阳性药物二甲双胍组,每组10只。实验大鼠以基础饲料适应性喂养1周后,模型组、本发明花青素注射液组、本发明花青素口服药物组,阳性药物二甲双胍组的大鼠改喂高糖高脂饲料,空白对照组继续以基础饲料喂养,模型组和空白组并给予生理盐水注射,本发明花青素注射液组大鼠给予本发明花青素注射液注射液 $25\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,腹腔注射,连续4周;本发明花青素口服药物组大鼠给予本发明花青素口服药物 $50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,灌胃,连续4周;阳性药物二甲双胍组大鼠给予阳性药物二甲双胍 $25\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,灌胃,

连续4周。

[0139] 1.3标本的收集及检测

[0140] 大鼠断颈取血, 双侧卵巢称重后浸入10%甲醛溶液固定。放射免疫法测定血清FSH、LH水平, 化学发光法测定血清中E2、T、P水平。

[0141] 卵巢组织HE染色。光镜下用目镜测微仪检测卵巢切片最大横轴和纵轴, 计算最大横轴和纵轴的1/2, 即(r_1 和 r_2), 根据公式 $\pi \times r_1 \times r_2$ 得到每卵巢标本的最大横截面积, 并观察卵巢形态学变化及闭锁卵、囊状卵泡、黄体等各类型卵泡。

[0142] 1.4统计学方法

[0143] 用SPSS13.0统计软件包进行统计学分析, 计量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0144] 2实验结果

[0145] 2.1大鼠体重变化

[0146] 干预前, 本发明花青素注射液组、本发明花青素口服药物组、阳性药物二甲双胍组与模型对照组比较, 体重无明显差异($P > 0.05$);

[0147] 干预后, 本发明花青素注射液组、阳性药物二甲双胍组的大鼠的食欲下降, 饮食明显减少, 体重下降程度与模型对照组相比, 具有显著差异($P < 0.01$), 与空白对照组相比无明显差异($P > 0.05$); 而本发明花青素口服药物组大鼠的食欲没有明显变化, 饮食明显并未见减少, 体重略有下降, 与模型对照组相比, 不具有显著差异($P > 0.05$), 与空白对照组相比, 差异显著($P < 0.05$); 实验结果见表2。

[0148] 表2各组大鼠体重变化比较($\bar{x} \pm s, g, n=10$)

组别	干预前	干预后
空白对照组	246.89±6.20	236.78±6.47
模型对照组	303.26±6.14※	306.51±7.42※
本发明花青素注射液组	305.24±7.97※	262.35±5.42***
本发明花青素口服药物组	304.35±7.64※	295.42±6.28※
阳性药物二甲双胍组	307.52±7.54※	268.68±8.67***

[0150] 注: 与空白对照组比较, # $P > 0.05$, ※ $P < 0.05$; 与模型对照组比较** $P < 0.01$

[0151] 2.2大鼠卵巢重量及最大横截面积比较

[0152] 本发明花青素注射液组、阳性药物二甲双胍组的大鼠的双侧卵巢平均重量和平均最大横截面积与模型对照组比较, 均显著低于模型对照组($P < 0.05$), 与空白对照组相比, 无统计学意义($P > 0.05$); 而本发明花青素口服药物组的大鼠的双侧卵巢平均重量和平均最大横截面积与模型对照组比较, 略低于模型对照组, 但不具有显著差异($P > 0.05$), 与空白对照组相比, 差异显著($P < 0.05$); 实验结果见表3。

[0153] 表3各组大鼠卵巢质量及最大横截面积的变化比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

[0154]

组别	双侧卵巢质量 (mg)	平均最大横截面积 (mm)
空白对照组	92.45±4.26	24.13±3.25
模型对照组	160.41±8.48※	35.16±8.26※
本发明花青素注射液组	95.28±4.22***	25.48±4.06***
本发明花青素口服药物组	154.64±9.54※	33.74±7.82※
阳性药物二甲双胍组	98.44±4.67***	24.25±5.28***

[0155] 注:与空白对照组比较, #P>0.05, ※P<0.05; 与模型对照组比较**P<0.01

[0156] 2.3大鼠血清激素水平

[0157] 各组大鼠血清E₂、P浓度相比均无差异性;本发明花青素注射液组、阳性药物二甲双胍组血清T浓度显著低于模型对照组 (P<0.01), 与空白对照组相比无差异性 (P>0.05), 血清LH、FSH浓度与模型对照组比较有显著差异 (P<0.05), 与空白对照组相比无明显变化 (P>0.05);本发明花青素口服药物组血清T浓度略低于模型对照组, 但无显著性差异, 血清LH、FSH浓度与模型对照组比较, 也没有显著性差异;实验结果见表4。

[0158] 表4各组大鼠血清激素水平比较 (n=10)

[0159]

组别	E ₂ (pg/mL)	P (ng/mL)	T (ng/mL)	LH (mIU/mL)	FSH (mIU/mL)
空白对照组	21.41±12.54	36.24±12.14	1.12±0.23	5.65±0.95	1.34±1.25
模型对照组	22.62±18.29	36.83±11.48	2.25±0.31	15.36±6.21※	0.88±0.58
本发明花青素注射液组	21.14±14.36	36.57±14.62	1.14±0.32***	6.22±0.98**	1.45±1.26**
本发明花青素口服药物组	22.52±15.24	36.25±13.16	2.02±0.36	14.47±5.28	0.95±1.12
阳性药物二甲双胍组	21.45±14.38	35.74±12.82	1.17±0.42***	6.85±0.92**	1.38±1.32

[0160] 注:与空白对照组比较, #P>0.05; 与模型对照组比较*P<0.05, **P<0.01

[0161] 2.5大鼠卵巢形态学改变

[0162] 本发明花青素注射液组大鼠卵巢体积较模型对照组小、色淡红、可见成熟卵泡。模型对照组外观苍白, 体积大, 可见较多囊状扩张卵泡。卵巢病理学改变:空白对照组卵巢见多个黄体及不同发育阶段的卵泡, 卵泡内颗粒细胞呈多层, 多为9~10层, 见附图2;模型对照组卵巢仍见多个囊性扩张的卵泡, 黄体及各种发育阶段卵泡较少, 其卵泡内卵母细胞或放射冠消失, 颗粒细胞层数少, 为2~3层, 见附图3;本发明花青素注射液组镜下可见多个黄体及各级卵泡, 卵泡囊性扩张减少或消失, 颗粒细胞层数增多, 为8~9层, 见附图4;本发明花青素口服药物组卵巢镜下可见少许黄体及卵泡, 卵泡囊性扩张略有减少, 颗粒细胞层数略有增加, 但不明显, 为3~4层, 见附图5;阳性药物二甲双胍组卵巢镜下可见多个黄体及各级卵泡, 卵泡囊性扩张减少或消失, 颗粒细胞层数增多, 为7~8层, 见附图6。

[0163] 3结论

[0164] 本发明花青素注射液可以改变多囊卵巢综合症血清异常激素水平, 对多囊卵巢综合症模型大鼠内分泌紊乱有明显的改善作用, 其效果明显优于本发明花青素口服药物, 说明花青素只有在特定的药物剂型下对多囊卵巢综合症才具有治疗效果。

[0165] 实验四:本发明注射液安全性实验报告

[0166] 为探讨本发明注射液临床用药的安全性, 本研究进行了安全性实验。

[0167] 1受试药物:

[0168] 本发明注射液药物:

[0169] (1) 将黑果枸杞1000g置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为 $210\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

[0170] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0171] (3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0172] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物57.32;

[0173] (5) 取注射用水1000mL,加热至70℃,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏48小时,滤过,取滤液,调pH为6.5,加入0.5%的活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌封、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

[0174] 2方法

[0175] 2.1局部刺激性实验

[0176] 2.1.1实验动物

[0177] 日本大耳白家兔,雌雄兼用,体重2.0~2.5Kg,由甘肃中医药大学医学实验中心提供,动物合格证号:SCXK(甘)2011-0001-0001011;实验设施合格证号:SYXK(甘)2011-0001-0000314;饲养于甘肃中医药大学医学实验中心,动物饲养于标准条件下,12h明暗交替,(22 ± 2)℃,自由摄食饮水。动物在上述环境中适应性饲养1周后开始实验。

[0178] 2.1.2实验方法

[0179] 取健康无损伤的家兔2只,以无菌操作法分别在其左右两腿股四头肌内各注入供试品1.0mL/只,注射后48h处死动物,解剖取出股四头肌,纵向切开,观察注射部位局部刺激反应,按表5换算成相应的反应级。

[0180] 表5注射肌肉刺激反应评级标准

反应级	刺激反应
0	无明显变化
1	轻度充血,其范围在0.5cm×1.0cm以下
2	中度充血,其范围在0.5cm×1.0cm以下
3	重度充血,伴有肌肉变性
4	出现坏死,有褐色变性
5	出现广泛性坏死

[0182] 2.1.3实验结果

[0183] 实验结果表明:两只家兔,经肌肉注射后,家兔健康正常,腿部活动正常。家兔处死

取出股四头肌后,肉眼观察给药部位,给予本发明注射液的2例股四头肌刺激反应级数各为0级。提示本品对家兔股四头肌无刺激作用。

[0184] 2.2血管刺激性实验

[0185] 2.2.1实验动物

[0186] 日本大耳白家兔,雌雄兼用,体重2.0~2.5Kg,由甘肃中医药大学医学实验中心提供,动物合格证号:SCXK(甘)2011-0001-0001011;实验设施合格证号:SYXK(甘)2011-0001-0000314;饲养于甘肃中医药大学医学实验中心,动物饲养于标准条件下,12h明暗交替,(22±2)℃,自由摄食饮水。动物在上述环境中适应性饲养1周后开始实验。

[0187] 2.2.2实验方法

[0188] 取健康、两耳无损伤的家兔2只。用无菌操作方法于左耳耳缘静脉注射灭菌生理盐水2.0mL/Kg,于右耳耳缘静脉注射本发明注射液的浓缩液2.0mL/Kg,1次/d,连续3d。于末次注射24h后将动物放血处死,分别距注射部位进针点2cm处向心端剪下耳缘约2cm作为标本,标本用福尔马林固定,常规组织切片,观察血管周围变化、血管壁是否损伤、内皮细胞有无脱落、有无血栓形成以及其他病理变化。

[0189] 2.2.3实验结果

[0190] 实验结果表明:家兔左右耳肉眼观察注射部位均无异常,血管无充血,周围组织无水肿现象。病理切片观察结果表明,给予生理盐水的2例耳缘和给予本发明注射液的2例耳缘均未见血管扩张和炎细胞浸润,提示本品对家兔血管无刺激作用。

[0191] 2.3过敏实验

[0192] 2.3.1实验动物

[0193] 健康无伤雄性豚鼠,由甘肃中医药大学医学实验中心提供,动物合格证号:SCXK(甘)2011-0001-0001011;实验设施合格证号:SYXK(甘)2011-0001-0000314;饲养于甘肃中医药大学医学实验中心,动物饲养于标准条件下,12h明暗交替,(22±2)℃,自由摄食饮水。动物在上述环境中适应性饲养1周后开始实验。

[0194] 2.3.2实验方法

[0195] 取健康无伤豚鼠8只,体重250~350g,间日腹腔注射供试品0.5mL,连续3次,然后分为两组,每组4只,分别在第1次注射后14d及21d静脉注射本品1mL进行攻击,在注射后15min内观察动物反应。如有竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕或咳嗽3声等现象中的两种或两种以上者,或有啰音、抽搐、虚脱或死亡现象之一者为阳性。

[0196] 2.3.3实验结果

[0197] 实验结果表明:本发明注射液于第1次腹腔注射后第10天和第15天进行攻击,均未发生过敏反应,表明在本次实验条件下,本发明注射液对豚鼠无全身性致敏作用结果见表6。

[0198] 表6不同时间过敏实验观察结果

攻击时间 /d	动物数	结 果
10	4	---
15	4	---

[0200] “-”表示为阴性结果;“+”表示为阳性结果

[0201] 2.4溶血性实验

[0202] 2.4.1实验动物

[0203] 日本大耳白家兔,雄性,体重2.3Kg,由甘肃中医药大学医学实验中心提供,动物合格证号:SCXK(甘)2011-0001-0001011;实验设施合格证号:SYXK(甘)2011-0001-0000314;饲养于甘肃中医药大学医学实验中心,动物饲养于标准条件下,12h明暗交替,(22±2)℃,自由摄食饮水。动物在上述环境中适应性饲养1周后开始实验。

[0204] 2.4.2实验方法

[0205] 取健康家兔1只,从颈总动脉取血约10mL,放置于200mL三角瓶中,用玻璃棒搅动血液10min,除去纤维蛋白原,使成脱纤血液,加约10倍量的生理盐水,摇匀,离心(2000r/min,5min)除去上清液,沉淀的红血球再用生理盐水如下法洗涤2~3次,至上清液不显红色为止。取沉淀的红细胞1mL,加生理盐水50mL,制得2%的兔红细胞混悬液。取试管7支,按表3配比量依次加入2%兔红细胞混悬液和生理盐水,混匀后,置于37℃恒温水浴箱30min,然后分别加入不同量的药液(第6管为阴性对照管,第7管为阳性对照管),摇匀,置37℃恒温水浴箱中。开始每隔15min观察1次,1h后,每隔1h观察1次,共4次。见表7。

[0206] 表7溶血实验配比量表mL

试管	2%红细胞混悬液	生理盐水	本发明注射液	蒸馏水
1	2.5	2.1	0.4	-
2	2.5	2.2	0.3	-
3	2.5	2.1	0.2	-
4	2.5	2.2	0.1	-
5	2.5	2.2	0.2	-
阴性	2.5	2.2	-	-
阳性	2.5	-	-	2.5

[0208] 2.4.4溶血判定标准

[0209] 全溶血:溶液澄明红色,管底无细胞残留;部分溶血:溶液澄明红色或棕色,管底有少量红细胞残留;无溶血:红细胞全部下沉,上层液体无色澄明;凝集:虽无溶血,但出现红细胞凝集,振摇后不分散。

[0210] 2.4.5实验结果

[0211] 本发明注射液无溶血和凝集反应结果见表8。

[0212] 表8各种时段溶血实验结果

试管	15 min	30 min	45 min	1h	2h	3h	4h
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
阴性	-	-	-	-	-	-	-
阳性	+	+	+	+	+	+	+

[0214] “-”表示无溶血或凝集反应,“+”表示有溶血或凝集反应

[0215] 3结论

[0216] 本发明注射液经动物实验结果表明其安全性好,可供临床使用。

附图说明:

- [0217] 图1:矢车菊素-3-葡萄糖苷标品色谱图
[0218] 图2:空白对照组卵巢形态图
[0219] 图3:模型对照组卵巢形态图
[0220] 图4:本发明花青素注射液组卵巢形态图
[0221] 图5:本发明花青素口服药物组卵巢形态图
[0222] 图6:阳性药物二甲双胍组卵巢形态图

具体实施方式:

[0223] 实施例1:黑果枸杞青花素提取物及其制备

[0224] 1、黑果枸杞青花素提取物及其制备

[0225] (1) 将黑果枸杞1000g置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

[0226] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及0.03mol·L⁻¹盐酸配制成溶液;

[0227] (3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度45℃,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0228] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物57.26g。

[0229] 2、黑果枸杞青花素提取物的含量测定

[0230] 采用高效液相色谱法测定黑果枸杞花青素提取物中的花青素含量:

[0231] (1) 色谱条件:色谱柱:采用C₁₈柱,流动相:体积比为90:10的4%磷酸-乙腈溶液,流速0.8mL/min;柱温30℃;检测波长520nm;

[0232] (2) 样品溶液制备:准确称取25.00mg的黑果枸杞青花素提取物溶于25.00mL的1%盐酸甲醇溶液中,超声20min,将溶液用0.22μm滤膜过滤,收集滤液,即得样品溶液;

[0233] (3) 标准品溶液制备:将矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品1.00mg溶于1.00mL1%盐酸甲醇溶液中,配成1mg/mL的标准品溶液;

[0234] (4) 测定:精密吸取样品溶液、标准品溶液各5μL,注入高效液相色谱仪,进行测定;

[0235] (5) 测定结果:黑果枸杞花青素提取物含花青素52.7g。

[0236] 实施例2:黑果枸杞青花素提取物注射液及其制备

[0237] (1) 将黑果枸杞1000g置烘箱内40℃烘干4h后,取干燥的黑果枸杞,采用气流粉碎机进行超微粉碎,气流粉碎机的气流压力为1100kPa,进料速度为210r·min⁻¹,分级频率为25Hz,粉碎时间为35min,得黑果枸杞超微粉A;

[0238] (2) 取步骤(1)所得黑果枸杞超微粉A,加入50倍量的仿生提取溶媒,37℃水浴加

热,搅拌提取1h,离心20min,离心速度3600r/min,分别收集上清液B和沉淀C;上清液B浓缩,得浸膏D,备用,沉淀C备用;上述仿生提取溶媒是由0.3%氯化钠、0.4%胃蛋白酶、0.4%胰蛋白酶及 $0.03\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸配制成溶液;

[0239] (3) 取步骤(2)所得沉淀C,进行超声波辅助提取,提取温度 45°C ,超声波频率50kHz,按1g:12mL的料液比,加入浓度为65%的乙醇作为提取液,每次提取20min,共提取三次,合并提取液,滤过,滤液回收乙醇,得浸膏E,备用;

[0240] (4) 取步骤(2)所得浸膏D和步骤(3)所得浸膏E合并,混匀,进行柱层析分离;选用D101B型大孔吸附树脂进行柱层析分离,树脂柱径高比为1:8,上样体积7BV,水洗5BV除杂,以乙酸乙酯:0.2mol/L磷酸二氢钠溶液=1:1的洗脱剂8BV洗脱,流速为3BV/h,收集洗脱液,洗脱液浓缩,干燥,即得黑果枸杞花青素提取物57.32;

[0241] (5) 取注射用水1000mL,加热至 70°C ,加入步骤(4)所得花青素提取物,溶解,冷藏48小时,滤过,取滤液,调pH为6.5,加入0.5%的活性炭,充分搅拌,吸附后,滤过,取滤液,冷至室温,超滤,分装、灌封、灭菌、灯检,即得黑果枸杞花青素提取物注射液。

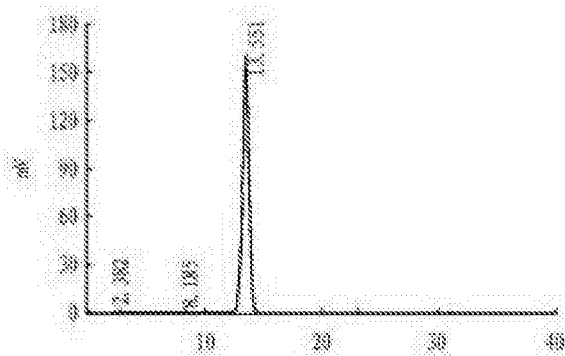


图1

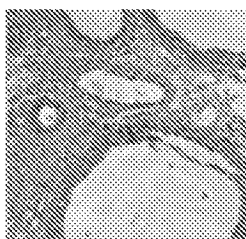


图2

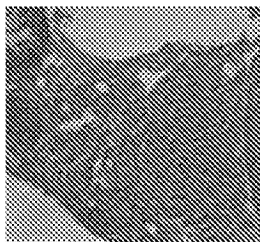


图3

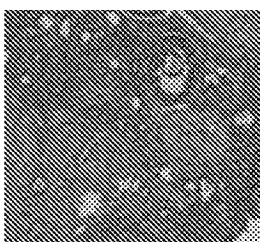


图4

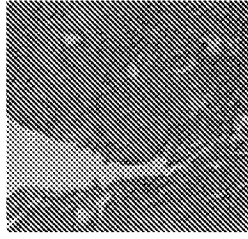


图5

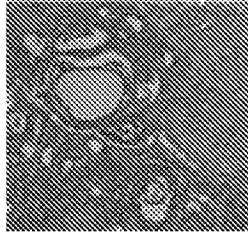


图6