



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101856435 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 23

(21) 申请号 200910068386. 9

G01N 21/31 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 04. 07

A61K 135/00 (2006. 01)

A61K 125/00 (2006. 01)

(73) 专利权人 天津药物研究院

地址 300193 天津市南开区鞍山西道 308 号

(56) 对比文件

CN 1883618 A, 2006. 12. 27, 说明书第 2 页最

后 1 段至第 4 页第 2 段及实施例 1、2.

(72) 发明人 马莉 韩峰 侯文彬 高静

张新鑫 申秀萍 王圣明 胡金芳

刘静

审查员 刘军政

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

有限公司 11280

代理人 曹津燕

(51) Int. Cl.

A61K 36/83 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

A61P 19/04 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

G01N 30/36 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页

(54) 发明名称

一种祖师麻总香豆素提取物的制备方法和含量测定方法

(57) 摘要

本发明提供一种祖师麻总香豆素提取物的制备方法和含量测定方法,该制备方法包括:以祖师麻药材为原料,水和 / 或 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液为溶剂进行提取,制得浸膏;将浸膏与固体稀释剂混合,加入有机溶剂进行提取,回收溶剂得到固体提取物,或者将浸膏加水悬浮,加入有机溶剂萃取,回收溶剂得到固体提取物;将固体提取物加水悬浮,采用大孔吸附树脂层析,首先以水或 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液为流动相淋洗除杂质,然后以含低级醇水溶液洗脱,收集洗脱液;前半部分洗脱液回收溶液得到固体,即一部分祖师麻总香豆素提取物;后半部分洗脱液回收溶剂得到的固体再加水混悬,用有机溶剂萃取,有机层回收溶剂得到固体,即另一部分祖师麻总香豆素提取物。

1. 一种祖师麻总香豆素提取物的制备方法,其中包括以下步骤:
 - (1) 以祖师麻药材为原料,水或 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液为溶剂进行提取,制得浸膏;
 - (2) 将浸膏与固体稀释剂混合,加入有机溶剂进行提取,回收溶剂得到固体提取物,或者将浸膏加水悬浮,加入有机溶剂萃取,回收溶剂得到固体提取物;
 - (3) 将固体提取物加水悬浮,采用大孔吸附树脂层析,首先以水或 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液为流动相淋洗除杂质,然后以 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液洗脱,收集洗脱液;
 - (4) 前半部分洗脱液回收溶剂得到固体,即一部分祖师麻总香豆素提取物;后半部分洗脱液回收溶剂得到的固体加水混悬,再用有机溶剂萃取,有机层回收溶剂得到固体,即另一部分祖师麻总香豆素提取物。
2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中提取的方法为回流或渗漉。
3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液的低级醇浓度为 $0 \sim 95\%$ (体积/体积)。
4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液的低级醇浓度为 $30 \sim 70\%$ (体积/体积)。
5. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中有机溶剂为醋酸乙酯、正丁醇和/或水饱和正丁醇。
6. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)为将浸膏与固体稀释剂混合,加入有机溶剂进行提取,回收溶剂得到固体提取物。
7. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中固体稀释剂选自淀粉、微粉硅胶、硅藻土、高岭土、活性炭和白陶土中的一种或多种。
8. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中大孔吸附树脂选自苯乙烯、苯乙烯-丙烯酸酯、二苯乙烯、丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯型树脂中的一种或多种。
9. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中大孔吸附树脂为苯乙烯型或苯乙烯-丙烯酸酯型大孔吸附树脂。
10. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中淋洗除杂质使用的低级醇水溶液的低级醇浓度为 $0 \sim 50\%$ (体积/体积)。
11. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中淋洗除杂质使用的低级醇水溶液的低级醇浓度为 $0 \sim 20\%$ (体积/体积)。
12. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中洗脱树脂使用的低级醇水溶液的低级醇浓度为 $20 \sim 90\%$ (体积/体积)。
13. 根据权利要求12所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中洗脱树脂使用的低级醇水溶液的低级醇浓度为 $20 \sim 50\%$ (体积/体积)。
14. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(4)后半部分洗脱液萃取采用的有机溶剂为醋酸乙酯和/或正丁醇。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的制备方法制备的祖师麻总香豆素提取物。
16. 根据权利要求15所述的祖师麻总香豆素提取物,其特征在于,按提取物总重量计,所述总香豆素的含量不低于 50% 。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的祖师麻总香豆素提取物,其特征在于,所述总香豆素提取物包含瑞香素、祖师麻乙素、瑞香素-8-O-葡萄糖苷和 7-OH-香豆素。

18. 根据权利要求 15 或 16 或 17 所述的祖师麻总香豆素提取物的含量测定方法,其中包括以下步骤:

(1) 瑞香素、祖师麻乙素、瑞香素-8-O-葡萄糖苷及 7-OH-香豆素的 HPLC 含量测定:

精密称取祖师麻总香豆素提取物 50mg,置于 50mL 量瓶中,加 50% (体积 / 体积) 甲醇水溶液适量使其溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 2mL 置于 10mL 量瓶中,加 50% (体积 / 体积) 甲醇水溶液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;分别以瑞香素、祖师麻乙素、瑞香素-8-O-葡萄糖苷及 7-OH-香豆素的甲醇溶液为对照品溶液;色谱柱用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,体积比为 25 : 75 的甲醇-0.5%醋酸水溶液为流动相;检测波长为 327nm;

(2) 祖师麻总香豆素的含量测定:

分别将上述供试品溶液及祖师麻乙素对照品溶液稀释至适当体积,按照紫外-可见分光光度法,在 310nm 波长处测定吸收度,计算。

一种祖师麻总香豆素提取物的制备方法和含量测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于天然药物化学领域,主要涉及一种祖师麻总香豆素提取物的制备方法和含量测定方法。

背景技术

[0002] 祖师麻为瑞香科(Thymelaeaceae)瑞香属植物黄瑞香(*Daphne giraldii*Nitsche)的根皮和茎皮,具有祛风通络、祛瘀止痛之功效,常用于治疗关节风湿痛等症。民间用于治疗头痛、牙痛、风湿性关节炎、跌打损伤、胃痛、肝区痛及支气管炎等症,俗称“打的满地上爬,离不开祖师麻”。现代药学研究表明:祖师麻含有多种化学成分,如香豆素类(瑞香素和瑞香苷等)、二萜类(瑞香毒素,12-羟基瑞香毒素,黄瑞香甲素,黄瑞香乙素、黄瑞香丙素等)、木质素类((±)-丁香树脂醇,(-)-松脂酚,(-)-二氢芝麻素,(-)-落叶松树脂醇等)、黄酮类、蒽醌类及甾醇类等化学成分。其中,香豆素类成分具有较好的镇痛、抗急性炎症和抗佐剂性关节炎作用,可广泛用于缓解和治疗各类疼痛、风湿类关节炎、关节扭伤挫伤等疾病。

[0003] 中国发明专利申请 CN1883618A 公开了一种祖师麻有效部位及其制备方法与应用,该祖师麻有效部位含有药物有效成分祖师麻甲素(即瑞香素)、西瑞香素和瑞香辛,总香豆素含量为 50%~90%。但该专利申请中制备的提取物中杂质含量高且多为黄酮类化合物,在单用分光光度法测定香豆素类化合物含量时,由于黄酮类化合物在总香豆素测定的波长下是有吸收的,导致香豆素类化合物的含量检测不准确,有效成分香豆素类化合物实际含量偏低。

发明内容

[0004] 因此,本发明的目的在于提供一种祖师麻总香豆素提取物的制备方法,该制备方法的提取工艺经过进一步优化,制得的祖师麻总香豆素提取物组成明确,杂质含量低,有效成分含量更高,药效更强,从而降低了服用剂量,减少了副作用。

[0005] 用于实现本发明上述目的的技术方案如下:

[0006] 一种祖师麻总香豆素提取物的制备方法,其中包括以下步骤:

[0007] (1) 以祖师麻药材为原料,水或 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液为溶剂进行提取,制得浸膏;

[0008] (2) 将浸膏与固体稀释剂混合,加入有机溶剂进行提取,回收溶剂得到固体提取物;或者将浸膏加水悬浮,加入有机溶剂进行萃取,回收溶剂得到固体提取物;

[0009] (3) 将固体提取物加水悬浮,采用大孔吸附树脂层析,首先以水或 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液为流动相淋洗除杂质,然后以 $C_1 \sim C_5$ 低级醇水溶液洗脱,收集洗脱液;

[0010] (4) 前半部分洗脱液回收溶剂得到固体,即一部分祖师麻总香豆素提取物;后半部分洗脱液回收溶剂得到的固体加水混悬,再用有机溶剂萃取,有机层回收溶剂得到固体,即另一部分祖师麻总香豆素提取物。

[0011] 在上述制备方法的步骤(1)中,提取的方法优选为回流或渗漉; $C_1 \sim C_5$ 低级醇水

溶液的低级醇浓度可以为 0 ~ 95% (体积 / 体积), 优选为 30 ~ 70% (体积 / 体积)。

[0012] 在上述制备方法的步骤 (2) 中, 有机溶剂优选为醋酸乙酯、正丁醇和 / 或水饱和正丁醇。优选地, 上述制备方法的步骤 (2) 为将浸膏与固体稀释剂混合, 加入有机溶剂进行提取, 回收溶剂得到固体提取物; 其中, 固体稀释剂可以选自淀粉、微粉硅胶、硅藻土、高岭土、活性炭和白陶土中的一种或多种。

[0013] 在上述制备方法的步骤 (3) 中, 大孔吸附树脂可以选自苯乙烯、苯乙烯 - 丙烯酸酯、二苯乙烯、丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯型树脂中的一种或多种, 例如 D101、D201、DA201、HPD300、HPD400、HPD800、FL-1、FL-2 和 / 或 AB-8 树脂, 优选为苯乙烯型或苯乙烯 - 丙烯酸酯型大孔吸附树脂; 淋洗除杂质使用的低级醇水溶液的低级醇浓度可以为 0 ~ 50% (体积 / 体积), 优选为 0 ~ 20% (体积 / 体积); 洗脱树脂使用的低级醇水溶液的低级醇浓度可以为 20 ~ 90% (体积 / 体积), 优选为 20 ~ 50% (体积 / 体积)。

[0014] 在上述制备方法的步骤 (4) 中, 后半部分洗脱液萃取采用的有机溶剂优选为醋酸乙酯和 / 或正丁醇。

[0015] 本发明还提供了上述制备方法制备的祖师麻总香豆素提取物。其中, 按提取物总重量计, 所述总香豆素的含量不低于 50% (重量), 例如 50% ~ 90% (重量)。具体来说, 所述总香豆素提取物包含瑞香素、祖师麻乙素、瑞香素 -8-O- 葡萄糖苷和 7-OH- 香豆素中的一种或多种。优选地, 按提取物总重量计, 所述总香豆素提取物包含瑞香素 0% ~ 50% (重量), 祖师麻乙素 0% ~ 50% (重量), 瑞香素 -8-O- 葡萄糖苷 0% ~ 50% (重量), 7-OH- 香豆素 0% ~ 30% (重量)。

[0016] 本发明还提供了上述祖师麻总香豆素提取物的含量测定方法, 其中包括以下步骤:

[0017] (1) 瑞香素、祖师麻乙素、瑞香素 -8-O- 葡萄糖苷及 7-OH- 香豆素的 HPLC 含量测定:

[0018] 精密称取祖师麻总香豆素提取物 50mg, 置于 50mL 量瓶中, 加 50% (体积 / 体积) 甲醇水溶液适量使其溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 2mL 置于 10mL 量瓶中, 加 50% (体积 / 体积) 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 分别以瑞香素、祖师麻乙素、瑞香素 -8-O- 葡萄糖苷及 7-OH- 香豆素的甲醇溶液为对照品溶液; 色谱柱用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 体积比为 25 : 75 的甲醇 -0.5% 醋酸水溶液为流动相; 检测波长为 327nm;

[0019] (2) 祖师麻总香豆素的含量测定:

[0020] 分别将上述供试品溶液及祖师麻乙素对照品溶液稀释至适当体积, 按照紫外 - 可见分光光度法, 在 310nm 波长处测定吸收度, 计算。

[0021] 在本发明的祖师麻总香豆素提取物的制备方法中, 除采用一些常规方法外, 还采用了一些较为重要的先进工艺步骤来降低杂质黄酮类化合物的含量, 以提高总香豆素的含量。其中包括: (1) 采用固液萃取法或液液萃取法可以极大地富集有效成分 (即香豆素类成分), 同时提高提取率和有效成分的含量, 同时更加具有针对性地去除了二萜类毒性成分。其中, 固液萃取法中使用的固体稀释剂具有多孔性, 对杂质的吸附力较强, 同时还能吸附色素; 增加了提取物与有机溶剂的接触面, 可以同时采用加热或渗漉的方法进行提取, 从而有效避免了萃取过程中的乳化和沉淀阻塞出液口等问题, 进一步提高了提取效率。(2) 通过树

脂吸附工艺不仅进一步去除了二萜类等毒性成分,同时极大地提高了总香豆素类成分的含量;特别是对树脂处理后的不同洗脱液采用不同的处理方法,在进一步提高了总香豆素的含量同时,有效地降低了黄酮类化合物杂质的含量。(3)相应地,本发明的祖师麻总香豆素提取物的含量测定方法将 HPLC 法与分光光度法结合,克服了原来仅使用分光光度法特异性差、准确性低、杂质干扰严重的缺陷。(4)与此同时,从药理作用的整体作用强度来看,本发明制备的提取物的药效明显更强,给药剂量明显降低。

具体实施方式

[0022] 以下通过实施例对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明,而不适用于限定本发明的范围。

[0023] 实施例 1

[0024] 取祖师麻药材 1.0kg,以 20% (体积 / 体积) 乙醇水溶液回流提取 3 次,滤过,合并滤液回收乙醇,拌入淀粉中,用水饱和正丁醇回流提取,回收溶剂,固体物质加水吸附于 D201 树脂,以水洗去杂质,再用 20% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,前半部分回收乙醇,固体备用;后半部分回收乙醇,固体物质加水悬浮,用醋酸乙酯萃取,有机层回收溶剂得到固体,合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质,干燥,得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0025] 按照高效液相色谱法进行测定:

[0026] 精密称取祖师麻总香豆素有效部位提取物 50mg,置于 50mL 量瓶中,加 50% (体积 / 体积) 甲醇水溶液适量使之溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 2mL 置于 10mL 量瓶中,加 50% (体积 / 体积) 甲醇水溶液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;分别以祖师麻甲素、祖师麻乙素、瑞香素-8-O-葡萄糖苷及 7-OH-香豆素的甲醇溶液为对照品溶液;色谱柱用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,25 : 75 (体积 / 体积) 的甲醇-0.5% 醋酸水溶液为流动相;检测波长为 327nm。

[0027] 按提取物总重量计,祖师麻甲素 3.8% (重量),祖师麻乙素 40.6% (重量),瑞香素-8-O-葡萄糖苷 18.4% (重量) 及 7-OH-香豆素 2.4% (重量)。

[0028] 按照紫外分光光度法进行测定:

[0029] 分别将上述供试品溶液及祖师麻乙素对照品溶液稀释至适当体积,按照紫外-可见分光光度法,在 310nm 波长处测定吸收度,计算。

[0030] 按提取物总重量计,祖师麻总香豆素的含量为 73.6% (重量)。

[0031] 实施例 2

[0032] 取祖师麻药材 1.0kg,以 30% (体积 / 体积) 乙醇水溶液渗漉提取,渗漉液减压回收乙醇,拌入微粉硅胶中,用乙酸乙酯渗漉提取,回收溶剂,固体物质加水吸附于 D201 树脂,以 10% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗去杂质,再用 30% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,前半部分 60℃ 减压回收乙醇,固体物质备用;后半部分 60℃ 减压回收乙醇,固体物质加水悬浮,用正丁醇萃取,有机层回收溶剂得到固体,合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质,真空干燥,得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0033] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0034] 按提取物总重量计,祖师麻甲素 5.2% (重量),祖师麻乙素 28.6% (重量),瑞香

素-8-O-葡萄糖苷 20.4%（重量）及 7-OH-香豆素 3.0%（重量）。

[0035] 按照上述紫外分光光度法进行测定：

[0036] 按提取物总重量计，祖师麻总香豆素的含量为 65.5%（重量）。

[0037] 实施例 3

[0038] 取祖师麻药材 1.0kg，以 40%（体积 / 体积）乙醇水溶液回流提取，提取液减压回收乙醇，拌入硅藻土中，用正丁醇渗漉提取，回收溶剂，固体物质加水吸附于 D101 树脂，以 20%（体积 / 体积）乙醇水溶液洗去杂质，再用 40%（体积 / 体积）乙醇水溶液洗脱，收集洗脱液，前半部分回收乙醇，固体物质备用；后半部分回收乙醇，固体物质加水悬浮，用醋酸乙酯萃取，有机层回收溶剂得到固体，合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质，真空干燥，得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0039] 按照上述高效液相色谱法进行测定：

[0040] 按提取物总重量计，祖师麻甲素 10.5%（重量），祖师麻乙素 14.6%（重量），瑞香素-8-O-葡萄糖苷 48.6%（重量）及 7-OH-香豆素 4.4%（重量）。

[0041] 按照上述紫外分光光度法进行测定：

[0042] 按提取物总重量计，祖师麻总香豆素的含量为 87.4%（重量）。

[0043] 实施例 4

[0044] 取祖师麻药材 1.0kg，以 50%（体积 / 体积）乙醇水溶液渗漉提取，渗漉液减压回收乙醇，拌入活性炭中，用醋酸乙酯回流提取，回收溶剂，固体物质加水吸附于 FL-2 树脂，以 30%（体积 / 体积）乙醇水溶液洗去杂质，再用 50%（体积 / 体积）乙醇水溶液洗脱，收集洗脱液，前半部分 60℃减压回收乙醇，固体物质备用；后半部分 60℃减压回收乙醇，固体物质加水悬浮，用正丁醇萃取，有机层回收溶剂得到固体，合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质，真空干燥，得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0045] 按照上述高效液相色谱法进行测定：

[0046] 按提取物总重量计，祖师麻甲素 14.2%（重量），祖师麻乙素 32.3%（重量），瑞香素-8-O-葡萄糖苷 20.1%（重量）及 7-OH-香豆素 8.5%（重量）。

[0047] 按照上述紫外分光光度法进行测定：

[0048] 按提取物总重量计，祖师麻总香豆素的含量为 90.6%（重量）。

[0049] 实施例 5

[0050] 取祖师麻药材 1.0kg，以 60%（体积 / 体积）乙醇水溶液回流提取，提取液减压回收乙醇，拌入高岭土中，用正丁醇回流提取，回收溶剂，固体物质加水吸附于 AB-8 树脂，以 40%（体积 / 体积）乙醇水溶液洗去杂质，再用 60%（体积 / 体积）乙醇水溶液洗脱，收集洗脱液，前半部分回收乙醇，固体物质备用；后半部分回收乙醇，固体物质加水悬浮，用乙酸乙酯萃取，有机层回收溶剂得到固体，合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质，真空干燥，得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0051] 按照上述高效液相色谱法进行测定：

[0052] 按提取物总重量计，祖师麻甲素 41.7%（重量），祖师麻乙素 5.6%（重量），瑞香素-8-O-葡萄糖苷 5.1%（重量）及 7-OH-香豆素 20.5%（重量）。

[0053] 按照上述紫外分光光度法进行测定：

[0054] 按提取物总重量计，祖师麻总香豆素的含量为 85.4%（重量）。

[0055] 实施例 6

[0056] 取祖师麻药材 1.0kg, 以 70% (体积 / 体积) 乙醇水溶液渗漉提取, 渗漉液减压回收乙醇, 拌入白陶土中, 用醋酸乙酯回流提取, 回收溶剂, 固体物质加水吸附于 AB-8 和 D101 复合树脂, 以 50% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗去杂质, 再用 70% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗脱, 收集洗脱液, 前半部分 60℃ 减压回收乙醇, 固体物质备用; 后半部分 60℃ 减压回收乙醇, 固体物质加水悬浮, 用正丁醇萃取, 有机层回收溶剂得到固体, 合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质, 真空干燥, 得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0057] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0058] 按提取物总重量计, 祖师麻甲素 47.8% (重量), 祖师麻乙素 3.5% (重量), 瑞香素 -8-O- 葡萄糖苷 3.8% (重量) 及 7-OH- 香豆素 28.5% (重量)。

[0059] 按照上述紫外分光光度法进行测定:

[0060] 按提取物总重量计, 祖师麻总香豆素的含量为 93.5% (重量)。

[0061] 实施例 7

[0062] 取祖师麻药材 1.0kg, 以 80% (体积 / 体积) 乙醇水溶液回流提取, 提取液减压回收乙醇, 拌入硅藻土: 白陶土 (重量比 = 1 : 1) 中, 用正丁醇回流提取, 回收溶剂, 固体物质加水吸附于 D101 和 D201 复合树脂, 以 20% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗去杂质, 再用 90% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗脱, 收集洗脱液, 前半部分回收乙醇, 固体物质备用; 后半部分回收乙醇, 固体物质加水悬浮, 用乙酸乙酯萃取, 有机层回收溶剂得到固体, 合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质, 真空干燥, 得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0063] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0064] 按提取物总重量计, 祖师麻甲素 15.2% (重量), 祖师麻乙素 10.1% (重量), 瑞香素 -8-O- 葡萄糖苷 8.6% (重量) 及 7-OH- 香豆素 10.6% (重量)。

[0065] 按照上述紫外分光光度法进行测定:

[0066] 按提取物总重量计, 祖师麻总香豆素的含量为 67.6% (重量)。

[0067] 实施例 8

[0068] 取祖师麻药材 1.0kg, 以 40% (体积 / 体积) 乙醇水溶液渗漉提取, 提取液减压回收乙醇, 拌入高岭土中, 用醋酸乙酯渗漉提取, 回收溶剂, 固体物质加水吸附于 AB-8 和 D201 复合树脂, 以 20% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗去杂质, 再用 40% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗脱, 收集洗脱液, 前半部分回收乙醇, 固体物质备用; 后半部分回收乙醇, 固体物质加水悬浮, 用正丁醇萃取, 有机层回收溶剂得到固体, 合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质, 真空干燥, 得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0069] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0070] 按提取物总重量计, 祖师麻甲素 6.8% (重量), 祖师麻乙素 25.2% (重量), 瑞香素 -8-O- 葡萄糖苷 38.5% (重量) 及 7-OH- 香豆素 5.6% (重量)。

[0071] 按照上述紫外分光光度法进行测定:

[0072] 按提取物总重量计, 祖师麻总香豆素的含量为 85.2% (重量)。

[0073] 实施例 9

[0074] 取祖师麻药材 1.0kg, 以 50% (体积 / 体积) 乙醇水溶液回流提取, 提取液减压回收乙醇, 拌入硅藻土中, 用水饱和正丁醇回流提取, 回收溶剂, 固体物质加水吸附于 FL-1 树

脂,以水洗去杂质,再用 30% (体积/体积) 乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,前半部分 60℃ 减压回收乙醇,固体物质备用;后半部分 60℃ 减压回收乙醇,固体物质加水悬浮,用正丁醇萃取,有机层回收溶剂得到固体,合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质,真空干燥,得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0075] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0076] 按提取物总重量计,祖师麻甲素 3.6% (重量),祖师麻乙素 48.2% (重量),瑞香素-8-O-葡萄糖苷 20.4% (重量) 及 7-OH-香豆素 2.8% (重量)。

[0077] 按照上述紫外分光光度法进行测定:

[0078] 按提取物总重量计,祖师麻总香豆素的含量为 82.6% (重量)。

[0079] 实施例 10

[0080] 取祖师麻药材 1.0kg,以 60% (体积/体积) 乙醇水溶液渗漉提取,提取液减压回收乙醇,拌入高岭土中,用醋酸乙酯渗漉提取,回收溶剂,固体物质加水吸附于 AB-8 树脂,以 10% (体积/体积) 乙醇水溶液洗去杂质,再用 50% (体积/体积) 乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,前半部分回收乙醇,固体物质备用;后半部分回收乙醇,固体物质加水悬浮,用正丁醇萃取,有机层回收溶剂得到固体,合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质,真空干燥,得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0081] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0082] 按提取物总重量计,祖师麻甲素 14.3% (重量),祖师麻乙素 20.6% (重量),瑞香素-8-O-葡萄糖苷 25.2% (重量) 及 7-OH-香豆素 5.7% (重量)。

[0083] 按照上述紫外分光光度法进行测定:

[0084] 按提取物总重量计,祖师麻总香豆素的含量为 90.2% (重量)。

[0085] 实施例 11

[0086] 取祖师麻药材 1.0kg,以 20% (体积/体积) 乙醇水溶液回流提取 3 次,滤过,合并滤液回收乙醇,用水饱和正丁醇萃取,回收溶剂,固体物质加水吸附于 AB-8 与 D201 复合树脂,以水洗去杂质,再用 30% (体积/体积) 乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,前半部分回收乙醇,固体备用;后半部分回收乙醇,固体物质加水悬浮,用醋酸乙酯萃取,有机层回收溶剂得到固体,合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质,干燥,得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0087] 按照高效液相色谱法进行测定:

[0088] 按提取物总重量计,祖师麻甲素 10.8% (重量),祖师麻乙素 30.5% (重量),瑞香素-8-O-葡萄糖苷 25.2% (重量) 及 7-OH-香豆素 1.5% (重量)。

[0089] 按照紫外分光光度法进行测定:

[0090] 按提取物总重量计,祖师麻总香豆素的含量为 75.5% (重量)。

[0091] 实施例 12

[0092] 取祖师麻药材 1.0kg,以 30% (体积/体积) 乙醇水溶液渗漉提取,渗漉液减压回收乙醇,用乙酸乙酯萃取,回收溶剂,固体物质加水吸附于 HPD-300 树脂,以 10% (体积/体积) 乙醇水溶液洗去杂质,再用 40% (体积/体积) 乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,前半部分 60℃ 减压回收乙醇,固体物质备用;后半部分 60℃ 减压回收乙醇,固体物质加水悬浮,用正丁醇萃取,有机层回收溶剂得到固体,合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质,真空干

燥,得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0093] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0094] 按提取物总重量计,祖师麻甲素 8.5% (重量),祖师麻乙素 28.2% (重量),瑞香素 -8-0- 葡萄糖苷 22.1% (重量) 及 7-OH- 香豆素 4.3% (重量)。

[0095] 按照上述紫外分光光度法进行测定:

[0096] 按提取物总重量计,祖师麻总香豆素的含量为 76.5% (重量)。

[0097] 实施例 13

[0098] 取祖师麻药材 1.0kg,以 70% (体积 / 体积) 乙醇水溶液渗漉提取,渗漉液减压回收乙醇,用醋酸乙酯萃取,回收溶剂,固体物质加水吸附于 HPD-400 树脂,以 20% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗去杂质,再用 50% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,前半部分 60℃减压回收乙醇,固体物质备用;后半部分 60℃减压回收乙醇,固体物质加水悬浮,用正丁醇萃取,有机层回收溶剂得到固体,合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质,真空干燥,得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0099] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0100] 按提取物总重量计,祖师麻甲素 25.2% (重量),祖师麻乙素 10.1% (重量),瑞香素 -8-0- 葡萄糖苷 8.6% (重量) 及 7-OH- 香豆素 10.6% (重量)。

[0101] 按照上述紫外分光光度法进行测定:

[0102] 按提取物总重量计,祖师麻总香豆素的含量为 68.6% (重量)。

[0103] 实施例 14

[0104] 取祖师麻药材 1.0kg,以 80% (体积 / 体积) 乙醇水溶液回流提取,提取液减压回收乙醇,用水饱和正丁醇萃取,回收溶剂,固体物质加水吸附于 HPD-800 树脂,以 30% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗去杂质,再用 60% (体积 / 体积) 乙醇水溶液洗脱,收集洗脱液,前半部分回收乙醇,固体物质备用;后半部分回收乙醇,固体物质加水悬浮,用乙酸乙酯萃取,有机层回收溶剂得到固体,合并两部分洗脱液处理后得到的固体物质,真空干燥,得到祖师麻总香豆素有效部位。

[0105] 按照上述高效液相色谱法进行测定:

[0106] 按提取物总重量计,祖师麻甲素 30.8% (重量),祖师麻乙素 10.2% (重量),瑞香素 -8-0- 葡萄糖苷 10.5% (重量) 及 7-OH- 香豆素 15.3% (重量)。

[0107] 按照上述紫外分光光度法进行测定:

[0108] 按提取物总重量计,祖师麻总香豆素的含量为 78.2% (重量)。

[0109] 表 1 祖师麻总香豆素提取物中的成分

[0110]

实 施 例	高效液相色谱法测定的香豆素含量(%)					紫外分光光度 法测定的总香 豆素含量(%)	未知成分 含量(%)
	祖师麻 甲素	祖师麻 乙素	瑞香素-8-O- 葡萄糖苷	7-OH- 香豆素	4种香豆素 总含量(%)		
1	3.8	40.6	18.4	2.4	65.2	73.6	8.4
2	5.2	28.6	20.4	3	57.2	65.5	8.3
3	10.5	14.6	48.6	4.4	78.1	87.4	9.3
4	14.2	32.3	20.1	8.5	75.1	90.6	15.5
5	41.7	5.6	5.1	20.5	72.9	85.4	12.5
6	47.8	3.5	3.8	28.5	83.6	93.5	9.9
7	15.2	10.1	8.6	10.6	44.5	67.6	23.1
8	6.8	25.2	38.5	5.6	76.1	75.2	9.1
9	3.6	48.2	20.4	2.8	75	82.6	7.6
10	14.3	20.6	25.2	5.7	65.8	90.2	24.4
11	10.8	30.5	25.2	1.5	68.1	75.5	7.4
12	8.5	28.2	22.1	4.3	63.1	76.5	13.4
13	25.2	10.1	8.6	10.6	54.5	68.6	14.1
14	30.8	10.2	10.5	15.3	66.8	78.2	11.4

[0111] 由上表可见,紫外分光光度法测得的总香豆素含量与 HPLC 法测得的 4 个已知成分含量之和只相差 7.4 ~ 24.4% (重量 / 重量),这部分包括了未知的香豆素类成分、黄酮类成分和其它在这一波长下有吸收的杂质。这一结果说明,本发明制备的提取物中黄酮类及其他杂质的含量大大降低。

[0112] 药效学试验:

[0113] 本发明对所得到的祖师麻总香豆素提取物进行了如下的药效学试验:

[0114] (1) 对小鼠水浴甩尾的影响

[0115]

分组	剂量 (mg/kg)	甩尾试验潜伏期 (X ± SD 秒)			
		给药前	1 小时	2 小时	3 小时
对照组	0	1.43 ± 0.26	1.31 ± 0.21	1.39 ± 0.37	1.38 ± 0.29
消炎痛	5	1.42 ± 0.42	1.79 ± 0.49*	1.73 ± 0.55	1.21 ± 0.33
口服高	20	1.46 ± 0.31	2.04 ± 0.56**	1.85 ± 0.55*	1.76 ± 0.58
口服低	5	1.45 ± 0.36	2.02 ± 0.75*	1.68 ± 0.56	2.03 ± 0.81
外用高	20	1.55 ± 0.35	1.97 ± 0.45**	1.71 ± 0.24*	1.88 ± 0.52*
外用低	5	1.44 ± 0.47	1.88 ± 0.52**	1.69 ± 0.48	1.92 ± 0.81

[0116] 与对照组比较 **p < 0.01 **p < 0.01

[0117] (2) 对小鼠光热甩尾的影响

[0118]

分组	剂量 (mg/kg)	药后甩尾试验潜伏期 (X ± SD 秒)		
		1 小时	2 小时	3 小时
对照组	0	4.93 ± 1.09	5.06 ± 0.62	5.44 ± 1.36
消炎痛	5	8.10 ± 1.62***	7.18 ± 2.38*	7.28 ± 1.34**
口服高	20	8.58 ± 2.07***	6.68 ± 1.24**	7.5 ± 2.49*
口服低	5	7.04 ± 2.55*	6.11 ± 1.58*	7.94 ± 1.58**
外用高	20	8.81 ± 1.35***	7.79 ± 2.21**	7.18 ± 2.03**
外用低	5	6.63 ± 1.72*	7.38 ± 2.93*	7.13 ± 1.96*

[0119] 与对照组比较 **p < 0.01 ***p < 0.001

[0120] (3) 对小鼠醋酸扭体的影响

分组	剂量 (mg/kg)	小鼠平均扭体次数 (次)
对照组	0	24 ± 10
消炎痛	5	2 ± 3***
口服高	20	6 ± 6***
口服低	5	11 ± 7**
外用高	20	7 ± 4***
外用低	5	13 ± 7*

[0122] 与对照组比较 **p < 0.01 ***p < 0.001

[0123] (4) 对小鼠耳肿的影响

	分组	剂量	鼠耳平均肿胀重量 (mg)
		(mg/kg)	
[0124]	对照组	0	8.0 ± 5.8
	消炎痛	5	3.5 ± 1.9*
	口服高	40	3.8 ± 2.3*
	口服低	10	3.8 ± 2.0*
	外用高	40	3.0 ± 2.0*
	外用低	10	10.7 ± 5.4

[0125] 与对照组比较 *p < 0.05 ***p < 0.001

[0126] (5) 祖师麻总香豆素对大鼠棉球肉芽肿的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

[0127]

分 组	给药剂量 (mg/Kg)	动物数 (只)	肉芽肿物平均重量(mg)	
			湿 重	干 重
对照组	0	10	160.6 ± 35.5	25.9 ± 7.7
氢化可的松	20	10	125.8 ± 30.0**	18.7 ± 7.4**
外用高	40	10	129.4 ± 48.7*	19.3 ± 8.3*
外用低	20	10	135.0 ± 22.9*	20.3 ± 4.5**
口服高	40	10	130.9 ± 20.7**	18.5 ± 3.9***
口服低	20	10	135.7 ± 24.5*	20.1 ± 6.6*

[0128] 与对照组比较 *P < 0.05 **P < 0.01 ***p < 0.001

[0129] (6) 祖师麻总香豆素对大鼠角叉菜胶足肿的影响

[0130]

组别	给药剂				
	量 (mg /Kg)	1 小时	2 小时	4 小时	6 小时
对照组	0	1.48 ± 0.33	2.11 ± 0.20	2.12 ± 0.20	2.04 ± 0.26
氢化可的松	20	$0.56 \pm 0.20^{***}$	$1.31 \pm 0.33^{***}$	$1.53 \pm 0.40^{**}$	$1.39 \pm 0.49^{**}$
外用高	40	$0.88 \pm 0.37^{**}$	$1.66 \pm 0.36^{**}$	$1.45 \pm 0.36^{***}$	$1.13 \pm 0.37^{***}$
外用低	20	$1.09 \pm 0.36^{**}$	$1.68 \pm 0.43^{**}$	$1.87 \pm 0.21^{**}$	$1.46 \pm 0.36^{***}$
口服高	40	$0.95 \pm 0.43^{**}$	$1.78 \pm 0.29^{**}$	$1.79 \pm 0.28^{**}$	$1.54 \pm 0.36^{**}$
口服低	20	1.56 ± 0.24	$1.75 \pm 0.28^{**}$	$1.49 \pm 0.33^{***}$	$1.03 \pm 0.36^{***}$

[0131] 以上实验表明祖师麻总香豆素有效部位具有更加显著的抗炎、镇痛作用。