

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07D307/84



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02117923.9

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1202103C

[22] 申请日 2002.5.23 [21] 申请号 02117923.9

[71] 专利权人 天津天士力制药股份有限公司

地址 300402 天津市北辰区新宜白大道辽河
东路 1 号

[72] 发明人 魏 峰 岳洪水 李德坤 孙江晓

叶正良 李 旭

审查员 彭 斌

[74] 专利代理机构 北京华科联合专利事务所

代理人 王 为

权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 丹参总酚酸的制备方法

[57] 摘要

本发明公开一种丹参总酚酸的制备方法和它的制备品的用途。其制备方法为：丹参用水热提，提取液经聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱分离与精制后，冷冻干燥，即得丹参总酚酸。其成品收率为生药量的 4% 以上，总酚酸含量在 80% 以上。所得的丹参总酚酸可作为防治心脑血管疾病等的药物而应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种丹参总酚酸的制备方法，其特征在于，包括如下步骤，
 - (a) 丹参用水提取，
 - (b) 提取液用聚酰胺层析柱分离，
 - (c) 洗脱液用大孔吸附树脂层析柱分离。
2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 (a) 中还包括，提取液调 pH 至酸性后，过滤；步骤 (b) 中还包括，滤液通过聚酰胺层析柱，用水冲洗至 pH 值为中性，再用弱碱性水溶液洗脱，收集碱洗脱液；步骤 (c) 中还包括，步骤 (b) 中的碱洗脱液，调 PH 值到酸性后，通过大孔吸附树脂层析柱，先用水冲洗至 pH 值为中性，再用含水或无水低级醇洗脱，收集洗脱液，洗脱液减压浓缩至无醇，干燥。
3. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(a)中用水加热提取 2~4 次，每次 0.5 小时~2 小时。
4. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(a)中水提取的温度为 60~100℃。
5. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(a)中水提取的温度为 90~100℃。
6. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(a)中提取液用酸调 pH 值至 4 以下，步骤(c)中的碱洗脱液用酸调 pH 值至 4 以下。
7. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(a)中提取液用酸调 pH 值至 2 以下，步骤(c)中碱洗脱液用盐酸或硫酸调 pH 值至 2 以下。
8. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(b)中用 0.01%~2%弱碱水溶液洗脱。
9. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(b)中用 0.08%~0.5%碳酸氢钠水溶液洗脱。
10. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(c)中所述大孔吸附树脂为苯乙烯型。
11. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(c)中用含水 C₁~C₅ 低级醇洗脱。
12. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤(c)中用含水乙醇洗脱。

-
13. 根据权利要求 11 或 12 所述的制备方法, 其特征在于, 含水 $C_1 \sim C_5$ 低级醇或乙醇的洗脱液浓度为 40%~95%。
 14. 根据权利要求 11 或 12 所述的制备方法, 其特征在于, 含水 $C_1 \sim C_5$ 低级醇或乙醇的洗脱液浓度为 60%~95%。
 15. 根据权利要求 11 所述的制备方法, 其特征在于, 洗脱液乙醇的浓度为 95%。
 16. 根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(c)中用无水 $C_1 \sim C_5$ 低级醇洗脱。
 17. 根据权利要求 16 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(c)中用无水乙醇洗脱。

丹参总酚酸的制备方法

技术领域

本发明涉及中药提取物，更具体地说，涉及从中药丹参中提取精制而成的丹参总酚酸。

背景技术

丹参是我国传统医学中常用药物之一，有悠久的临床应用历史。丹参的化学成分主要可分为水溶性成分和脂溶性成分两大部分。20世纪早期的研究主要集中在以丹参酮为代表的脂溶性成分方面，经几十年努力，取得巨大成就。从20世纪80年代初，我国药物研究人员对丹参水溶性成分进行了研究，首先报道了丹参水溶性成分丹参素的结构，此后陆续发现了数十种水溶性成分，并明确其化学结构，证明丹参水溶性有效成分主要是酚酸类化合物。从丹参酚酸类化合物药理研究来看，丹酚酸具有多方面的作用，例如，丹酚酸A对缺血再灌注引起的心肌细胞损伤有明显的保护作用，总丹酚酸表现出较强的抗缺血再灌注性心律失常作用；丹酚酸A、丹酚酸B以及总丹酚酸对小鼠脑缺血再灌注引起的脑损伤有保护作用，可以减少脑组织中MDA含量；丹酚酸抗血栓作用；丹酚酸对肝、肾的保护作用；丹酚酸具有很强的抗氧化作用，可以清除超氧阴离子和释基自由基，抑制脂质过氧化反应，等等。（杜冠华等，基础医学与临床，2000，20（5）：10~14）

目前，丹参酚酸类化合物的提取方法多为水提后过树脂柱，例如，Takashi Tanaka等报道的丹参多酚酸盐的提取方法（*Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 1989, 37（2），340~344），另外，Koji Hase等（*Planta Medica*, 1997, 63, 22~26）、徐亚明等（中国专利 CN1247855A, 2000年3月公开）、刘平等（中国专利 CN1270809A, 2000年10月公开）、黎莲娘等（中国专利，申请号 01142288.2, 申请日 2001年9月）亦采用类似的方法从丹参中提取酚酸类化合物。但以上方法都存在一个不易产业化的问题——需要大量浓缩水。由于丹参总酚酸不稳定，其水提液必须在50~60℃浓缩，其工艺难度大，成本高。长时间的加热，即使在50~60℃，也导致丹参总酚酸不稳定，影响产品的质量及疗效，使该产品很难产业化。另一缺陷是产率较低，一般为2~3%，低的产率亦限制

了这些方法在工业上的应用。

发明内容

本发明的目的是克服现有技术中的不足，提供一种产率高、成本低、质量好、易于产业化的丹参总酚酸的提取方法。

本发明的丹参总酚酸的制备方法，基本上是由丹参用水热提，聚酰胺柱分离，大孔吸附树脂柱分离几个步骤组成。

本发明通过下述技术方案予以实施：

- (a) 丹参去杂质、切成小块或粉碎成粗粉，用水热提，提取液调 pH 至酸性后，滤过；
- (b) 滤液上聚酰胺柱，用水冲洗至 pH 值为中性，再用弱碱性水溶液洗脱，收集碱洗脱液；
- (c) 碱洗脱液调 PH 值到酸性后，上大孔吸附树脂柱，先用水冲洗至 pH 值为中性，再用含水或无水低级醇洗脱，收集洗脱液；
- (d) 洗脱液减压浓缩至无醇，干燥，即得丹参总酚酸。

其中：步骤(a)中，用水加热提取 2~4 次，每次 0.5 小时~2 小时，提取的温度为 60~100℃（最佳为 90~100℃）；提取液用酸调 pH 值至 4 以下（最佳为 2 以下）。

步骤(b)中，洗脱液弱碱性水溶液的浓度优选范围为 0.01%~2%（最佳范围为 0.08%~0.5%）；聚酰胺材料为聚己内酰胺（尼龙-6）。

步骤(c)中，大孔吸附树脂为苯乙烯型；碱洗脱液用酸调 pH 值到 4 以下（最佳为 2 以下）；低级醇的碳原子范围为 C₁~C₅，如甲醇、乙醇等，其洗脱浓度为 40%~95%（最佳为 60%~95%），从工业化生产的安全、低成本和工艺简化上考虑，采用 95%乙醇进行洗脱，实际效果也令人满意。

依本发明的方法制成的丹参总酚酸，可制成任何一种药剂学上所说的剂型，也可配合其他药物或组分一起制成制剂使用。

本发明与现有技术相比有如下优势：

1. 易于产业化。本发明克服了现有技术中需要大量浓缩水即不易产业化的难点，在不加热、不减压的情况下就可以祛除大量水，优化了工艺步骤和条件，不消耗能源，不

污染环境，无论从技术条件还是从绿色环保来看，均使产业化易于实现。

2. 有效成分损失少。本发明避免了现有技术中因醇沉而造成有效成分的部分损失；也避免了现有技术中因水溶液浓缩而对丹参酚酸化合物稳定性的影响，减少了有效成分的分解、损失，保证了产品的稳定性。

3. 产率高。现有技术的成品(丹参总酚酸干粉)收率一般为生药量的2~3%；而本发明的成品收率一般在4%以上，明显高于现有技术所采用的方法，且成品中的总酚酸百分含量80%以上，杂质少，质量高。

4. 成本低。本发明不需要在加热、减压的情况下浓缩大量的水，有效降低了能耗，降低了生产成本；本发明的丹参总酚酸产率高，且丹参总酚酸含量与现有技术的含量相近或高于现有技术的含量，即同样的生药量可生产出更多质量相同或质量更高的产品。成本的降低，不仅使产业化更加容易，而且能为患者带来更多的利益，从而产生巨大的社会效益。

5. 动物实验研究也说明了依本发明的方法制备的丹参总酚酸的有益效果。

实验例

丹酚酸对大脑中动脉凝闭大鼠脑缺血的保护作用

1. 试验材料

1) 动物：Wistar大鼠，购自北京医科大学动物所，雄性，体重200~220克，许可证编号SCXK(京)2002-003。

2) 试剂：水合三氯乙醛，中国辽宁沈阳试剂厂生产，批号，920401。红四氮唑(TTC)，北京化工厂生产，批号，810911。

3) 仪器：高频电刀，北京医用电子仪器厂。SXP-1B手术显微镜，上海医用光学仪器厂。

4) 被测药物：总丹酚酸(天士力)，按本发明方法制备；

总丹酚酸(药物所)，中国医学科学院药物所提供，按中国专利(申请号01142288.2，申请日2001年9月)的方法制备；

香丹注射液，雅安三九药业有限公司生产，批号，010901，作为对照药品。

5) 被测药物配制方法及给药途径：总丹酚酸，香丹注射液均用灭菌生理盐水稀释，配成所需浓度，总丹酚酸10mg/kg和20mg/kg舌下静脉给药，香丹注射液1ml/kg(相当

于 1g/kg), 舌下静脉给药。以上药物均于缺血后 30 分钟舌下静脉给予。

6) 试验组的设置: 假手术对照组, 缺血对照组, 总丹酚酸(药物所)10mg/kg 和 20mg/kg 组, 总丹酚酸(天力士)10mg/kg 和 20mg/kg 组,

2. 实验方法

1) 大鼠大脑中动脉阻断(电凝闭)脑缺血法: 进入试验的雄性大鼠腹腔注射三氯乙醛 350mg/kg 麻醉, 左侧位固定在鼠板上, 在手术显微镜下沿外耳道与眼眦连线中点切开皮肤, 暴露出颞弓, 用咬骨钳咬去颞弓, 并沿颅骨剪断筋膜, 暴露出颞前窝, 用小牵张器将磷状骨和下颌骨间距撑开, 于颅骨底开颅窗, 暴露出大脑中动脉, 用高频电刀烧断, 以阻断血流, 造成局部脑缺血。30 分钟后进行舌下静脉给药后回笼饲养。室温严格控制在 24~25℃。

2) 脑梗塞体积测定: 大鼠中脑动脉阻断 24 小时后断头取脑。将剥离完整的大脑放入 4℃冰箱内盛有生理盐水的小杯中 10 分钟后去嗅球、小脑及低位脑干, 沿冠状面切为五片, 立即放入含有 1.5ml 4%红四氮唑(TTC)及 0.1ml 1mol/L 磷酸氢二钾的 5ml 染色液中, 避光在 37℃水浴中温孵 30 分钟。取出脑片放入 10%福尔马林中固定。正常组织为玫瑰红色; 缺血组织呈白色。用重量求积法测量梗塞面积, 计算梗塞区域占大脑半球面积的百分比。

3) 脑水份含量的测定: 大鼠中脑动脉阻断后 24 小时, 处死动物, 取出全脑, 将剥离完整的大脑去嗅球、小脑及低位脑干后称重(此为脑湿重)再放于烤箱中 105℃烤至恒重(约 48 小时), 再称重(此为脑干重)脑水含量=(脑湿重-脑干重)/脑湿重×100%

4. 实验结果

丹酚酸对大脑中动脉凝闭大鼠脑缺血的保护作用

组别	剂量 mg / kg	动物数 N	梗塞体积(%)	含水量(%)
假手术对照		12	0	79.4586±0.3402**
缺血对照		10	7.0194±4.389	80.4487±0.8614
香丹注射液	1ml/kg	12	0.7553±2.2188**	79.4364±0.5061**
丹酚酸(药物所)	10	12	3.2919±3.205#	79.4723±0.5475**
丹酚酸(药物所)	20	12	1.5156±2.7602*	79.4806±0.6819*
丹酚酸(天力士)	10	10	2.8170±3.2621#	79.4529±0.7693*
丹酚酸(天力士)	20	10	1.5328±3.2575*	79.5914±0.5843*

注: (1) **P<0.01, *P<0.05, 双侧检验, 与缺血对照比较。

#P<0.05, 单侧检验, 与缺血对照比较。

(2) 对照药品香丹注射液 1ml/kg 相当于含生药量 1g/kg;

丹酚酸(天力士)10mg/kg 相当于含生药量 0.25g/kg(以收率为 4%计算);
丹酚酸(天力士)20mg/kg 相当于含生药量 0.5g/kg(以收率为 4%计算)

5. 结论

采用大脑中动脉凝闭的方法造成大鼠脑缺血损伤,观察中国医学科学院药物研究所生产的丹酚酸与天津天士力制药股份有限公司生产的丹酚酸对脑缺血损伤的保护作用。结果显示,脑缺血后 30 分钟静脉给药,10mg/kg 和 20mg/kg,两种丹酚酸均可以明显改善缺血引起的脑水肿和脑梗塞、并且在相同剂量下两种药物作用相同。表明两种丹酚酸具有相同的抗脑缺血损伤作用。

用本发明方法所制备的丹参总酚酸,可制成任何一种药剂学上所说的药物剂型,这些药物剂型可以是,片剂、胶囊、颗粒剂、口服液、缓释制剂、控释制剂、凝胶剂、软膏剂、油膏剂、霜剂、栓剂、注射剂、粉针剂、贴剂、滴丸、混悬剂等。

用本发明方法所制备的丹参总酚酸,可应用于制备治疗心脑血管疾病、肾病、肝病、肺炎、肺心病、胰腺炎、糖尿病、颈椎病、眼底血管性疾病、眼底神经性疾病、偏头痛、慢性胃炎、眩晕、骨伤科疾病、高原疾病、老年痴呆症等的药剂中。

具体实施方式

下面结合对比例和实施例对本发明做进一步说明,下述各实施例仅用于说明本发明而并非对本发明的限制。

对比例

按专利申请文献(中国专利,申请号 01142288.2,申请日 2001 年 9 月)的方法制备丹参总酚酸

丹参 5kg 粉碎成粗粉,加去离子水在 100℃加热提取 3 次。第一次加 30L 水,加热 1 小时;第二、三次各加 15L 水分别加热 1/2 小时。提取液在 50℃减压浓缩至 5L,冷却后加 95%乙醇 14L,静置过夜,过滤。滤液在 50℃减压回收乙醇,所得浓缩液通过 RA 型大孔吸附树脂(以苯乙烯,二苯乙烯为主体,干树脂量 2kg),用去离子水洗至流出液无 α -萘酚反应,继续用 50%乙醇洗脱至洗脱液加三氯化铁铁氰化钾试剂无明显的酚羟基反应。洗脱液在 50℃减压浓缩后置于冰箱过夜,滤过即得丹参总酚酸提取液,以 2%

氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.5 后冷冻干燥, 即得丹参总酚酸干粉 114g。成品收率为生药量的 2.3%, 经检测其成品含总酚酸 83.72%, 丹酚酸 B 为 54.41%。

丹参总酚酸和丹酚酸 B 的检测方法: 按专利申请文献(中国专利, 申请号 01142288.2, 申请日 2001 年 9 月)的方法进行测定。

(1) 丹酚酸 B: 用 HPLC 法测定, 检测波长 288nm, 标准品丹酚酸 B 由天津天士力集团现代中药研究所提供, 纯度 98.0%。

(2) 丹参总酚酸: 含量 = $F(A-B) + B$

其中: A 为分光光度法测定以丹酚酸 B 为对照计算的总酚酸含量

B 为高效液相色谱法测定的丹酚酸 B 含量

F 为校正因子 0.626

实施例一

丹参 5kg 粉碎成粗粉, 加去离子水在 100℃ 微沸状态下加热提取 3 次。第一次 5.5 倍水, 加热 1 小时; 第二、三次各加 3 倍量水分别加热 0.5 小时。提取液用 10% 盐酸调 PH 值为 2 后, 滤过, 滤液上聚酰胺柱 (干树脂量为生药量 2/3)。用 5 倍量去离子水洗, 继续用 0.1% 碳酸氢钠水溶液洗脱, 用量为柱体积的 5 倍。收集洗脱液, 用 10% 盐酸调 PH 到 2 后上 D₁₀₁ 大孔吸附树脂, 用去离子水冲洗至中性, 继续用 95% 乙醇洗脱, 待色带下来即收集此色带。减压浓缩收集液至尽干, 用适量水溶解后冰箱冷藏过夜, 通过 0.3μm 混合纤维素微孔滤膜过滤即得丹参总酚酸提取液, 以 2% 氢氧化钠调节 PH 值到 6.0 后立即冷冻干燥, 得丹参总酚酸原料冻干粉 221g, 成品收率为生药量的 4.4%。按专利申请文献(中国专利, 申请号 01142288.2, 申请日 2001 年 9 月)的方法进行测定, 成品含总酚酸 83.94%, 丹酚酸 B 为 53.73%。

实施例二

丹参 5kg 粉碎成粗粉, 加去离子水在 80℃ 加热提取 3 次。第一次 5.5 倍水, 加热 2 小时; 第二、三次各加 3 倍量水分别加热 1 小时。提取液用 5% 硫酸调 PH 值为 1 后, 滤过, 滤液上聚酰胺柱 (干树脂量为生药量 2/3)。用 5 倍量去离子水洗, 继续用 0.2% 碳酸氢钠水溶液洗脱, 用量为柱体积的 4 倍。收集洗脱液, 用 5% 硫酸调 PH 到 1 后上 AB-8 大孔吸附树脂, 用去离子水冲洗至中性, 继续用 60% 乙醇洗脱, 待色带下来即收集此色

带。减压浓缩收集液至无醇味，冰箱冷藏过夜，通过 0.3 μ m 混合纤维素微孔滤膜过滤即得丹参总酚酸提取液，以 2%氢氧化钠调节 PH 值到 6.0 后立即冷冻干燥，得丹参总酚酸原料冻干粉 227g，成品收率为生药量的 4.5%。按专利申请文献(中国专利，申请号 01142288.2，申请日 2001 年 9 月)的方法进行测定，成品含总酚酸 83.15%，丹酚酸 B 为 54.03%。

实施例三

丹参 5kg 粉碎成粗粉，加去离子水在 100 $^{\circ}$ C 微沸状态下加热提取 3 次。第一次 5.5 倍水，加热 1 小时；第二、三次各加 3 倍量水分别加热 0.5 小时。提取液用 10%盐酸调 PH 值为 2 后，滤过，滤液上聚酰胺柱（干树脂量为生药量 2/3）。用 5 倍量去离子水洗，继续用 0.1%碳酸氢钠水溶液洗脱，用量为柱体积的 5 倍。收集洗脱液，用 10%盐酸调 PH 到 2 后上 RA 大孔吸附树脂，用去离子水冲洗至中性，继续用 60%甲醇洗脱，待色带下来即收集此色带。减压浓缩收集液至无醇味，冰箱冷藏过夜，通过 0.3 μ m 混合纤维素微孔滤膜过滤即得丹参总酚酸提取液，以 2%氢氧化钠调节 PH 值到 6.0 后立即冷冻干燥，得丹参总酚酸原料冻干粉 224g，成品收率为生药量的 4.5%。按专利申请文献(中国专利，申请号 01142288.2，申请日 2001 年 9 月)的方法进行测定，成品含总酚酸 84.02%，丹酚酸 B 为 54.17%。

实施例四

丹参总酚酸 胶囊剂 处方

丹参总酚酸 240g

微晶纤维素 40g

滑石粉 1.4%

3%聚维酮乙醇溶液 适量

共制成 1000 粒

取丹参总酚酸与微晶纤维素混合均匀，加 3%聚维酮乙醇溶液制软材，过 18 目筛制颗粒，60 $^{\circ}$ C 干燥 30-45 分钟，整粒，加入滑石粉，混匀，充于 1 号胶囊中，即得每粒含 240mg 胶囊。

实施例五

丹参总酚酸片剂 处方

丹参总酚酸	240g
微晶纤维素	40g
滑石粉	1.4%
3%聚维酮乙醇溶液	适量
共制成	1000 粒

取丹参总酚酸与微晶纤维素混合均匀，加 3%聚维酮乙醇溶液制软材，过 18 目筛制颗粒，60°C 干燥 30-45 分钟，整粒，加入滑石粉，混匀，压片。

实施例六

丹参总酚酸颗粒剂 处方

丹参总酚酸	240g
微晶纤维素	40g
滑石粉	1.4%
3%聚维酮乙醇溶液	适量
共制成	500 袋

取丹参总酚酸与微晶纤维素混合均匀，加 3%聚维酮乙醇溶液制软材，过 18 目筛制颗粒，60°C 干燥 30-45 分钟，整粒，装袋。

实施例七

丹参总酚酸粉针剂 处方

丹参总酚酸	100g
甘露醇	30g
依地酸钙钠	5g
蒸馏水	5ml

上述组分混匀后，冷冻干燥，分装 1000 支。