

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610052223.8

[51] Int. Cl.

A61K 36/896 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)
A61K 125/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年6月17日

[11] 授权公告号 CN 100500196C

[22] 申请日 2006.6.30

[21] 申请号 200610052223.8

[73] 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38号

[72] 发明人 张琳 孙治国 田景奎 梁波
李凌军

[56] 参考文献

CN1212145C 2005.7.27

CN1490320A 2004.4.21

《重楼化学成分和药理作用研究进展》.
武姗姗等. 中草药, 第35卷第3期. 2004

大孔吸附树脂分离重楼中偏诺类皂苷的研
究. 万近福等. 昆明师范高等专科学校学报,
第27卷第4期. 2005

树脂技术用于重楼总皂苷醇化工艺的研究.
华四辉等. 云南中医中药杂志, 第27卷第1期.
2006

重楼抗肿瘤作用研究. 王艳霞等. 中草
药, 第36卷第4期. 2005

审查员 程诚

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司
代理人 张法高

权利要求书1页 说明书9页

[54] 发明名称

一种重楼总皂苷的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种重楼有效部位—总皂苷的制备方法及其用途。本发明改变了现有技术中膜过滤结合树脂吸附法中沉淀部分的处理方法,通过酒精提取、膜过滤、丙酮脱脂、树脂脱色等步骤实现、缩减为仅通过醇提水沉和去离子水洗涤沉淀完成,使得制备工艺显著简化。同时,生产过程中减少了乙醇用量,显著降低了生产成本,省去了丙酮的使用,进一步减少了成本和生产中的危险性;有效成分提取回收率高,含量高,质量稳定。本发明还提供了重楼总皂苷作为在制备抗炎、消肿、止痛的外用药物、抗病毒药物、抗肿瘤以及肿瘤辅助治疗药物中的应用。

1、一种重楼总皂苷的制备方法，其特征在于该方法是：重楼饮片或粗粉，加入体积重量比为 6~12 倍的 60%~95%的含水醇，回流提取 2~3 次，每次提取时间为 1~3 小时，合并提取液，合并后的提取液离心；分出沉淀和上清液，然后将上清液浓缩至 0.2~1.0g 生药/ml，静置过夜后离心，得上清液 A 及沉淀 A'；向沉淀 A'中加入相当于提取所用生药量体积重量比为 1~5 倍的去离子水进行搅拌、洗涤，然后再次离心，倾出上清液，得上清液 B 和沉淀 B'；合并上清液 A 和 B，将合并 A、B 后的上清液通过装有大孔吸附树脂的层析柱，上清液按重楼总皂苷的量计与干树脂的比例为 1:4~1:10，上柱流速 1~4BV/h，树脂径高比为 1:3~1:9；用水洗涤树脂 3~12BV，洗脱流速为 1-6BV/h，水洗脱液弃去；用含体积比为 65~95%含水乙醇洗脱 2~6 BV，流速为 1~6BV/h，收集乙醇洗脱液；乙醇洗脱液减压浓缩至相对密度为 1.1~1.25，与沉淀 B'合并，干燥，即得重楼总皂苷。

2、如权利要求 1 所述的一种重楼总皂苷的制备方法，其特征在于所述的大孔树脂为非极性和弱极性大孔树脂中的一种。

一种重楼总皂苷的制备方法

技术领域

本发明属于制药领域，特别是公开了一种重楼有效部位-总皂苷的制备方法及其用途。

背景技术

重楼为百合科植物滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. M. azz. 和七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎。在我国，重楼是多种著名中成药，如云南白药、季德胜蛇药片、宫血宁胶囊等的主要组成药物。但这些药物基本上仍是将重楼与其它药物配伍之后，采用水或乙醇的提取物直接制剂而成，保留着传统中药的制备方式。重楼总皂苷为重楼多重药理作用的主要有效成分，重楼有效部位就是应用现代科学技术将其中的总皂苷类成分富集到 50% 以上含量。由重楼总皂苷制成的药物具有服用量少、制剂性能好等多种优点，克服了传统中药用量大，工艺粗的诸多缺点。目前，由重楼总皂苷制成的药物主要用于治疗子宫出血。已有的制备技术中，有两种方法可以达到使重楼提取物中总皂苷的含量超过 50% 的要求。这两种方法分别是单纯的树脂吸附法和膜过滤结合树脂吸附法。单纯的树脂法是将重楼的提取液浓缩，离心，所得到的上清液通过大孔树脂柱制备重楼总皂苷，这种方法的缺陷在于：由于重楼总皂苷水溶性差，大量重楼总皂苷在提取液浓缩时沉淀出来，从而导致浓缩液离心后的上清液中仅保留了部分总皂苷，使得通过该方法制备重楼总皂苷，有效成分的提取回收率只有不到 50%。膜过滤结合树脂吸附法改进了单纯树脂法有效成分回收率低的不足，但是工艺步骤繁琐，生产过程中乙醇用量多，随着能源价格的飞涨，工艺的繁复、乙醇用量过大都使得大工业生产的成本显著提高。此外，该工艺中在脱色时，使用丙酮等有机溶剂，一定程度上也增加了生产的成本和危险性。

发明内容

本发明的目的就是克服现有重楼总皂苷生产工艺中的不足，提供了一种重楼有效部位-总皂苷的制备方法，同时提供重楼总皂苷在制药中的新用途。

本发明是这样实现的：将重楼饮片或粗粉，加入 6~12 倍 60%~95% 的含水醇 (V/W)，回流提取 2~3 次，每次提取时间为 1~3 小时，合并提取液，合并后的提取液离心；分出沉淀和上清液，然后将上清液浓缩至 0.2~1.0g 生药/ml，静置过夜后离心，得上清液 A 及沉淀 A'。向沉淀 A' 中加入相当于提取所用生药量 1~5 倍 (V/W) 的去离子水进行搅拌、洗涤，然后再次离心，倾出上清液，得上清液 B 和沉淀 B'；合并上清液 A 和 B，将合并 A、B 后的上清液通过装有大孔吸附树脂的层析柱，上清液按重楼总皂苷的量计与干树脂的比例为 1:4~1:10，上柱流速 1~4BV/h，树脂径高比为 1:3~1:9；用水洗涤树脂 3~12BV，洗脱流速为 1~6BV/h，水洗脱液弃去；用含 65~95% 含水乙醇 (V/V) 洗脱 2~6 BV，流速为 1~6BV/h，收集乙醇洗脱液；乙醇洗脱液减压浓缩至相对密度为 1.1~1.25，与沉淀 B' 合并，干燥，即得重楼有效部位-总皂苷。

所述的大孔树脂为非极性或弱极性大孔树脂。

用上述方法制得的重楼总皂苷含量为 50%~90%，其中重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的量合计为 10%~20%，重楼总皂苷的回收率大于 85%。

本发明改变了现有技术中膜过滤结合树脂吸附法中沉淀部分的处理方法，通过酒精提取、膜过滤、丙酮脱脂、树脂脱色等步骤实现、缩减为仅通过醇提水沉和去离子水洗涤沉淀完成，使得制备工艺显著简化。同时，生产过程中减少了乙醇用量，显著降低了生产成本，省去了丙酮的使用，进一步减少了成本和生产中的危险性；有效成分提取回收率高，含量高，质量稳定。

本发明的另一发明点是重楼总皂苷作为在制备抗炎、消肿、止痛的外用药物、抗病毒药物、抗肿瘤以及肿瘤辅助治疗药物中的应用。

本发明以重楼总皂苷为原料，可将其作为活性成分与制药学上可接受的载体或药用辅料开发成相宜的抗炎、消肿、止痛、抗病毒、抗肿瘤以及肿瘤辅助的制剂，如胶囊剂（软胶囊、硬胶囊）、凝胶剂、软膏剂、滴丸剂、片剂、颗粒剂、散剂、口服液等。

重楼总皂苷的药效学试验

药物：重楼软膏，含药量分别为 5%、10%、15%；凝胶剂：含药量分别为 5%、10%、15%；重楼总皂苷：含量 60%

动物：新西兰大白兔、Wister种大鼠、昆明种小鼠

菌株及病毒株、细胞株：

人食道癌细胞Eca-109、胃癌细胞SGC-7901、白血病细胞HL-60、柯萨奇病毒株（CVB₂）、甲₁型（A₁）和甲₃型（A₃）流感病毒、Hela细胞株

（一）外用消炎、止痛的药效学数据

1. 抗炎试验

1.1 小鼠耳廓肿胀法

取 18—22 g 昆明种雌性小鼠 50 只,随机分为 5 组,分别为重楼软膏组（高、中、低剂量组）、皮炎平霜和赋形剂对照组。将药物涂于小鼠右耳两面 100mg/只,给药 30 min 后,再于小鼠右耳两面涂二甲苯 0.1ml/只,致肿,左耳不涂为正常耳。1h 后脱颈椎处死小鼠,用直径 6mm 打孔器冲下双耳同一相应部分的圆片,称重,以左、右耳重量之差为肿胀度,比较药物的抗炎作用。结果见表 1。

表 1 重楼软膏对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的影响

编号	动物数（只）	肿胀度（mg）
赋形剂组	10	5.0± 2.7
皮炎平霜	10	1.3± 0.65
重楼软膏 5%	10	1.4±0.7
重楼软膏 10%	10	1.1 ± 0.7*
重楼软膏 15%	10	1.0 ± 0.6**

与赋形剂对照组比较：*：P < 0.05，**：P < 0.01

1.2 重楼软膏对角叉菜胶诱导大鼠足肿胀的试验

取大鼠 50 只,按体重, 性别随机分为 5 组。将大鼠右后肢用于固定, 在其踝关节处用圆珠笔作一标志, 动物的右后肢浸入足容积测量装置内, 浸入深度以标志处为界。读取动物右后肢的正常体积(ml), 给各组动物分别涂药物于右后肢,均给药 300mg, 30min 后在每只鼠右后肢足掌心向踝关节方向进行皮下注射 1%角叉菜胶液 0.1ml/只。其后每 30 min 测定鼠后肢的容积, 连续 3 次, 结果见表 2:

表 2 重楼软膏对角叉菜胶诱导大鼠足肿胀的影响

组 别	动物数 (只)	右足容积/ ml		
		正常	30min	60min
赋形剂对照组	10	2.10	2.30±0.16	2.35 ± 0.12
皮炎平霜	10	2.16	2.48 ± 0.11	2.59 ± 0.09*
重楼软膏 5%	10	2.09	2.50 ± 0.12	2.54±0.11
重楼软膏 10%	10	2.12	2.46± 0.10	2.50± 0.09
重楼软膏 15%	10	2.17	2.40± 0.13	2.47 ± 0.10**

与赋形剂对照组比较: *P < 0.05, **P < 0.01

1.3 对大鼠棉球肉芽肿试验 取大鼠50只,随机分5组。腹腔注射巴比妥钠30mg.kg⁻¹麻醉, 在每只鼠的左右蹊部用碘酊消毒, 75%酒精棉球脱碘后, 各1cm 长的小口, 用眼科镊子将20mg 的高压灭菌棉球(青霉素和链霉素混合液0.2ml)浸泡, 烘干, 从切口处植入皮下, 随机缝合皮肤。从手术当日分别涂以重楼凝胶、赋形剂及皮炎平霜, 剂量均为300mg/只, 涂药于肉芽肿处, 连续给药8 d, 第9天打开原切口将棉球连同周围结缔组织一起取出, 剔除脂肪组织, 放烘箱中70℃恒温烘干, 称重。将称的重量减去棉球原重量即得肉芽肿重量。比较各组的差异, 结果见表3。

表3 重楼凝胶对大鼠棉球肉芽的影响

编号	动物数 (只)	棉球肉芽干重 (mg)
赋形剂组	10	69.2± 5.8*
皮炎平霜	10	86± 4.9
重楼凝胶 5%	10	75±7.2**
重楼凝胶 10%	10	68± 6.5**
重楼凝胶 15%	10	63 ± 3.6**

与赋形剂对照组比较: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

2. 止痛作用药效学试验

对小鼠的镇痛试验(热板法) 将热板预热 10min, 调节恒温水浴装置, 使水温控制在 $(75 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。取 18-22g 小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每次 1 只放在热板上, 小鼠自放在热板上至出现舔后足所需时间(s) 作为该鼠的痛阈值。舔后足时间小于 5 s 或大于 30 s 或跳跃者弃之不用。将合格的小鼠随机分为 5 组, 测其常痛阈值(即用药前痛阈值)。重楼凝胶和赋形剂组动物脊部脱毛涂药 100mg, 哌替啶组小鼠腹腔注射 $0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药后 30、60s, 分别测定小鼠痛阈值。如 60 s 仍无反应, 将小鼠取出, 以免烫伤, 其痛阈值以 60s 计算, 结果见表 4。

表4 重楼凝胶对小鼠热板出现痛反应时间的影响

组别	剂量 (mg/只)	动物 (只)	出现痛反应时间 (秒)
赋形剂组	0	10	14 ± 3.7
皮炎平霜	100	10	32.0 ± 7.0***
重楼凝胶 5%	100	10	15.0 ± 3.7
重楼凝胶 10%	100	10	19.0 ± 8.7*
重楼凝胶 15%	100	10	19.2 ± 5.2**

与赋形剂对照组比较: **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$

(二) 重楼总皂苷体外抗病毒试验

1. 重楼总皂苷对感染了CVB₃病毒的细胞发生病变的抑制作用

在96孔培养板的Hela单层细胞内，每孔感染CVB₃100TCID₅₀，2h后倾去病毒液，分别加入高、中、低浓度的重楼总皂苷，培养96h后观察细胞病变。在另一组试验中，每孔先加入CVB₃100TCID₅₀，培养96h后观察病变（“-”表示无细胞病变；“+”表示有25%细胞病变；“++”表示有50%细胞发生病变，“+++”表示75%细胞发生病变；“++++”表示有100%细胞发生病变）。结果见表5。

表5 重楼总皂苷对感染了CVB₃病毒的细胞发生病变的抑制作用

组别	浓度 (mg/mL)	细胞病变			
		1号孔	2号孔	3号孔	4号孔
赋形剂对照组	-	-	-	-	-
CVB ₃	-	++++	++++	++++	++++
重楼总皂苷	20	-	-	-	-
	10	+	++	++	+
	5	+++	++	++	++

2. 重楼总皂苷对流感病毒的抑制作用

将重楼总皂苷配成高、中、低（20mg/mL、10mg/mL、5mg/mL）三个浓度，取人“O”型血配成0.75%浓度，将细胞培养（病毒液）25 μ L，加入微量V型血凝板上进行2倍稀释，最终稀释度1:256，加入0.75%的红细胞悬液50 μ L，37 $^{\circ}$ C 1h，观察红细胞凝集，以++为终点，以血凝滴度表示。结果显示重楼总皂苷在以上三个浓度下，对A₁型流感病毒的血凝滴度分别为1:4、1:8、1:16，对A₃型流感病毒的血凝滴度为1:4、1:4、1:8，表明重楼总皂苷对A₁和A₃型流感病毒具有很好的抑制作用。

(三) 重楼总皂苷抗肿瘤细胞试验

将重楼总皂苷（60%含量）配成高、中、低三个浓度，以人食道癌细胞Eca-109、胃癌细胞SGC-7901、白血病细胞HL-60为对象，进行体外细胞生长抑制试验（MTT法），结果见表6-8。

表 6 抑制食道癌细胞 Eca-109 生长试验结果

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	抑制率 (%)	是否有效
10	27.13	
100	74.16	*
300	86.82	**

表 7 抑制胃癌细胞 SGC-7901 生长试验结果

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	抑制率 (%)	是否有效
10	12.18	
100	53.88	*
300	76.90	**

表 8 抑制白血病细胞 HL-60 生长试验结果

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	抑制率 (%)	是否有效
10	15.04	
100	77.40	*
300	85.39	**

具体实施方式

实施例1

它重楼饮片 1kg，加入 6 倍量 60%的乙醇，回流提取 2 次，每次提取时间为 1 小时，合并乙醇提取液，合并后的乙醇提取液离心（转速 4000

转/分钟，时间 30 分钟），分出沉淀和上清液，将上清液浓缩至 0.25g 生药/ml，静置过夜后离心，得上清液 A 及沉淀 A'。向沉淀 A' 中加入相当于提取所用生药量 1 倍 (V/W) 的去离子水进行搅拌、洗涤，然后再次离心(转速 4000 转/分钟，时间 30 分钟)，倾出上清液，得上清液 B 和沉淀 B'；合并上清液 A 和 B，将合并 A、B 后的上清液通过装有 D101 型大孔吸附树脂（非极性）的层析柱，上清液按重楼总皂苷的量计与干树脂的比例为 1:4，上柱流速 1BV/h，树脂径高比为 1:3；用水洗涤树脂 3BV，洗脱流速为 1BV/h，水洗脱液弃去；用含 65% 的乙醇洗脱 2 BV，流速为 1BV/h，收集乙醇洗脱液；乙醇洗脱液减压浓缩至相对密度为 1.1，与沉淀 B' 合并，真空干燥（75℃，6h），即得。所制得的重楼样品中总皂苷的含量为 50%，重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的量合计为 10%。

实施例2

取重楼饮粗粉 1kg，加入 12 倍量 95% 的乙醇，回流提取 3 次，每次提取时间为 3 小时，合并乙醇提取液，合并后的乙醇提取液离心（转速 10000 转/分钟，时间 90 分钟）；分出沉淀和上清液，将上清液浓缩至 1.0g 生药/ml，静置过夜后离心，得上清液 A 及沉淀 A'，向沉淀 A' 中加入相当于提取所用生药量 5 倍 (V/W) 的去离子水进行搅拌、洗涤，然后再次离心（转速 10000 转/分钟，时间 90 分钟），倾出上清液。得上清液 B 和沉淀 B'；合并上清液 A 和 B，将合并 A、B 后的上清液通过装有 AB-8 型大孔吸附树脂（弱极性）的层析柱，上清液按重楼总皂苷的量计与干树脂的比例为 1:10，上柱流速 4BV/h，树脂径高比为 1:9；用水洗涤树脂 12BV，洗脱流速为 6BV/h，水洗脱液弃去；用含 95% 的乙醇洗脱 6 BV，流速为 6BV/h，收集乙醇洗脱液；乙醇洗脱液减压浓缩至相对密度为 1.25，与沉淀 B' 合并，真空干燥（75℃，6h），即得。所制得样品中总皂苷的含量为 90%，重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的量合计为 20%。

实施例3

取重楼饮片 1kg，加入 8 倍量 70% 的含水醇，回流提取 2 次，每次提

取时间为 2 小时，合并乙醇提取液，过滤；将过滤后的乙醇提取液浓缩至 0.5g 生药/ml，静置过夜，过滤，得上清液 A 及沉淀 A'，向沉淀 A' 中加入相当于提取所用生药量 2 倍量 (V/W) 的去离子水进行搅拌、洗涤，离心，倾出上清液，得上清液 B 和沉淀 B'；合并上清液 A 和 B，将合并 A、B 后的上清液通过装有 D101 型大孔吸附树脂（非极性）层析柱，上清液按重楼总皂苷的量计与干树脂的比例为 1:7，上柱流速 2BV/h，树脂径高比为 1:5；用水洗涤树脂 5BV，洗脱流速为 3BV/h，水洗脱液弃去；用含 70% 的乙醇洗脱 4 BV，流速为 3BV/h，收集乙醇洗脱液；乙醇洗脱液减压浓缩至相对密度为 1.15，与沉淀 B' 合并，真空干燥（75℃，6h），即得。所制得样品中总皂苷的含量为 65%，重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的量合计为 17%。

实施例4

重楼总皂苷50g，加入卡波姆940 10g、三乙醇胺6 g、甘油50 g、乙醇50g、氮酮50g、对羟基苯甲酸乙酯1g，蒸馏水加至1000ml，高速搅拌均匀后制成凝胶剂。

实施例5

重楼总皂苷50g，加入羟丙基甲基纤维素50g、氮酮20g、丙二醇50g、苯酚1g、甘油50g、蒸馏水加至100ml，由乳均机混匀后制成凝胶剂。

实施例6

重楼总皂苷50g，加入羊毛脂50 g、对羟基苯甲酸乙酯0.3g、凡士林加至1000 g，制成软膏剂。

实施例7

重楼总皂苷50g，加入硬脂酸300 g、三乙醇胺40 g、甘油80 g、羊毛脂40 g、液状石蜡250ml、蒸馏水1000ml，制成软膏剂。