

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016年9月22日 (22.09.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/145983 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/4375 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *A61P 5/50* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/074781
- (22) 国际申请日: 2016年2月28日 (28.02.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510118945.8 2015年3月17日 (17.03.2015) CN
201510118944.3 2015年3月17日 (17.03.2015) CN
201510118943.9 2015年3月17日 (17.03.2015) CN
201510118942.4 2015年3月17日 (17.03.2015) CN
201610064099.0 2016年1月27日 (27.01.2016) CN
- (71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市童家巷24号李萍, Jiangsu 210009 (CN)。
- (72) 发明人: 李萍 (LI, Ping); 中国江苏省南京市童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。 徐晓军 (XU, Xiaojun); 中国江苏省南京市童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。
- (74) 代理人: 北京科亿知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING KEYI INTELLECTUAL PROPERTY FIRM); 中国北京市北京海淀区蓟门里和景园1-2-502号汤东风, Beijing 100088 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于发明人身份(细则 4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: MEDICAL USE OF ISOQUINOLINE ALKALOID

(54) 发明名称: 异喹啉生物碱的医药用途

(57) Abstract: A use of an isoquinoline alkaloid in preparing a composition used to treat or prevent diabetes, diabetic nephropathy, hyperlipidemia, and non-alcoholic fatty liver. The isoquinoline alkaloid is phellodendrine or a pharmaceutical salt, hydrate, anhydrate, or polymorph thereof.

(57) 摘要: 异喹啉生物碱在制备用于治疗或预防糖尿病、糖尿病肾病、高脂血症、非酒精性脂肪肝的组合物中的用途。所述异喹啉生物碱为黄柏碱或其药用盐、水合物、无水物、晶型。



WO 2016/145983 A1

异喹啉生物碱的医药用途

技术领域

本发明涉及天然药物领域，涉及异喹啉生物碱的医药用途，具体涉及黄柏碱或其盐或其晶型的医药用途。

背景技术

糖尿病是一种由于胰岛素分泌缺陷及（或）其生物学作用障碍引起的以高血糖为特征的代谢疾病，是在遗传基础上，有环境因素参与的遗传易感性疾病，是一种慢性全身性代谢疾病，严重危害人类健康，积极开展糖尿病的防治工作已成为主要的社会公共卫生问题。

I 型糖尿病的发病原因主要是由于胰岛素分泌绝对缺少，II 型糖尿病是从胰岛素抵抗为主伴胰岛素相对不足到胰岛素分泌不足为主伴胰岛素抵抗的病理过程。目前公认 II 型糖尿病是一种在环境因素、生活方式的改变的作用下由多个基因分别或相互作用所导致的复杂遗传病，但是 II 型糖尿病的病因尚未完全阐明。

西医目前常采用饮食、运动疗法磺酰脲类、双胍类、噻唑烷二酮类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、瑞格列奈、胰岛素等来治疗 II 型糖尿病，仅噻唑烷二酮类可改善胰岛素抵抗。病人在用西药治疗的同时，又不断地出现动脉硬化、冠心病和高血压等并发症，II 型糖尿病的复杂机制及其导致的全身病变是西药治疗的薄弱环节。不论是磺脲类的促泌剂还是噻唑烷二酮类的增敏剂在实验和临床研究中都不具备明显的减肥功效，而肥胖是 II 型糖尿病乃至代谢综合征的重要病理基础。

II 型糖尿病不仅是糖代谢紊乱疾病，还是脂肪代谢紊乱疾病。肥胖引起的 II 型糖尿病患者通常都有高糖和高脂饮食，并常伴有高脂血症。有研究表明提示血糖“正常”的肥胖患者已有 β 细胞分泌功能的异常。但是，大部分的肥胖者并不发展为糖尿病，说明机体的自身状况起重要作用。在同样的毒性作用下，易感人群很容易发展成 II 型糖尿病，而不敏感人群可能终身不发病，或者延迟发病。现代医学并不能够改变机体的易感性，但可以通过改变生活方式，减肥等手段来尽可能地减少早期的诱因，尽量地延长代偿期，从而延迟 II 型糖尿病的发生，甚至避免发病。

通大学硕士研究生学位论文》，罗鸿，2012年）。

黄柏碱(Phellodendrine)是从芸香科植物黄柏(*Phellodendron chinensis* Schneid.)、威氏黄柏的茎皮中提取分离出来的一种异喹啉生物碱，其具有降血压、抗肾炎、抑制细胞免疫反应、中枢神经抑制等作用。

黄柏碱的药理作用主要有：降压作用，主要表现为静注于猫和鼠和犬均可引起降压，并能增强肾上腺素和去甲肾上腺素的升压反应，抑制人工窒息及刺激迷走神经向中端的升压反应，抑制刺激节前纤维而起的猫瞬膜收缩。随剂量增大，降压作用强度及持续时间也增加；植物神经阻断作用，表现为黄柏碱对中枢神经有抑制作用，能抑制小鼠的自发活动和各种反射；肌肉松弛作用；对细胞免疫应答期的诱导期有抑制作用。

《黄柏中几种生物碱的分离、鉴定及促胰岛素分泌活性筛选》（《中国医药指南》，2011年3月，第9卷，第7期，第54-55页，周明伟、范明松、季宇斌、唐意红）记载了：从黄柏的生物碱部分分离得到3个化合物，分别为小檗碱、药根碱、黄柏碱。研究发现，在葡萄糖浓度为5.6mmol/L时，黄柏总碱中的3种生物碱对胰岛素的分泌均无明显的促进作用；而当葡萄糖浓度为16.7mmol/L时，小檗碱能够明显的促进细胞的胰岛素分泌。阳性药格列美脲在低糖浓度和高糖浓度时，都能够促进胰岛素分泌。

未见有关黄柏碱、晶型及其盐对于糖尿病有预防或治疗作用的报道。

未见有关黄柏碱、晶型及其盐对于高脂血症有预防或治疗作用的报道。

未见有关黄柏碱、晶型及其盐对于非酒精性脂肪肝有预防或治疗作用的报道。

未见有关黄柏碱、晶型及其盐对于糖尿病肾病有预防或治疗作用的报道。

未见有关黄柏碱晶型的报道。

未见有关黄柏碱晶型及其盐的制备工艺的报道。

发明内容

异喹啉生物碱用于制备治疗或预防糖尿病的组合。

异喹啉生物碱用于制备保护胰岛细胞、或、修复受损胰岛细胞的组合，或，用于制备对抗胰岛素抵抗的组合。

异喹啉生物碱用于制备治疗或预防高脂血症的组合。

异喹啉生物碱用于制备治疗或预防非酒精性脂肪肝的组合物。

异喹啉生物碱用于制备治疗或预防糖尿病肾病的组合物。

异喹啉生物碱为黄柏碱。

异喹啉生物碱为市售或按已知方法制备的黄柏碱或其药用盐、水合物或无水物、或晶型。

黄柏碱药用盐包括：无机酸盐例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐和磷酸盐；有机酸盐例如乙酸盐，苯甲酸盐，马来酸盐，富马酸盐，苹果酸盐，柠檬酸盐，草酸盐，乳酸盐，琥珀酸盐，酒石酸盐，烷基磺酸盐或芳基磺酸盐，半胱氨酸盐或其它氨基酸盐；还包括碱式盐如钠盐、钾盐和钙盐；

黄柏碱药用盐包括，其晶型。

本发明的组合物，其特征为：药物、保健品、或功能性食品，赋形剂或载体为制药或食品领域中常用的赋形剂或载体，如稀释剂，崩解剂，润滑剂等。

本发明的组合物，其特征为：为通过口服或注射形式使用

本发明的组合物，其特征为：预防或治疗 I、或 II 型糖尿病。

在黄柏碱的药理活性研究中，本发明意外地发现黄柏碱具有显著的减低血糖作用。本发明通过(1)STZ 造模的糖尿病小鼠，通过(2)高脂诱导的 2 型糖尿病动物模型（DIO 小鼠），进行了禁食血糖检测（FBG）。

在黄柏碱的药理活性研究中，本发明意外地发现黄柏碱具有显著的减低血脂作用，意外地发现黄柏碱能降低胆固醇，甘油三酯和低密度脂蛋白的水平，出人意料地发现黄柏碱能提升高密度脂蛋白的水平，从而可用于预防和、或治疗与高血脂有关的疾病或症状。

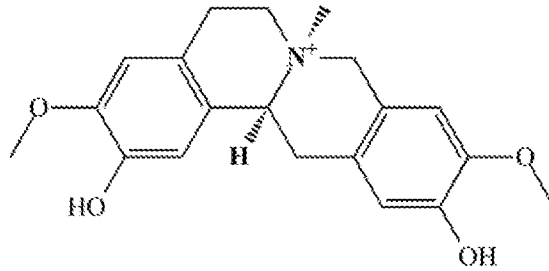
在黄柏碱的药理活性研究中，本发明意外地发现黄柏碱具有显著的治疗或预防非酒精性脂肪肝作用，意外地发现黄柏碱有效缓解高脂饲料引起的非酒精性脂肪肝变性，改善因脂肪变性而导致的肝功能损害。

黄柏碱药用盐按照本领域的常规技术制备、或、

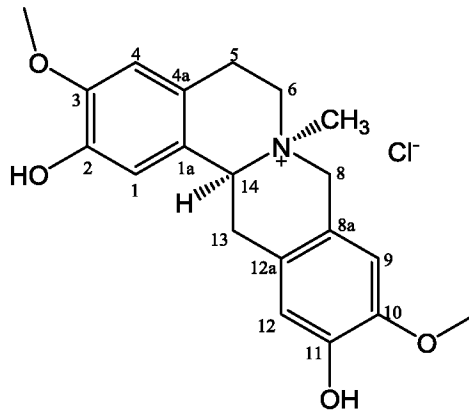
黄柏碱药用盐按照如下方式制备，取黄柏碱单体，用氯仿溶解，加入氯仿的酸溶液，析出沉淀，过滤干燥，得到黄柏碱的药用盐单体，用乙醇溶解，置冰箱放置，析晶，过滤干燥，得到黄柏碱的药用盐，纯度达到 98%以上；

本发明所述的黄柏碱（Phellodendrine），CAS 号为 6873-13-18，其分子式

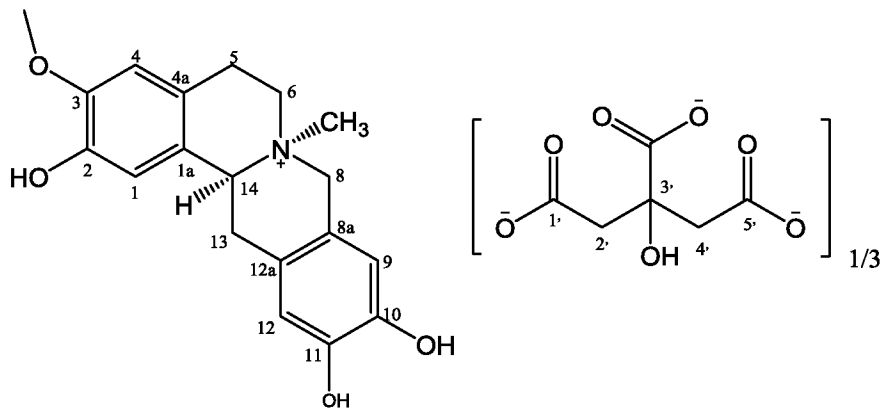
是 $C_{20}H_{24}NO_4$ ，相对分子质量 342，具有式如下的结构：



本发明所述的盐酸黄柏碱的结构式如下：



本发明所述的柠檬酸黄柏碱盐结构式如下：



黄柏碱的盐酸盐、柠檬酸盐的优选的制备方法

(1) 总生物碱的提取

配制质量分数为 3.0 % 的 NaCl 溶液，调其 PH 为 3.0；干燥黄柏药材用该溶液以料液比 1:8 浸泡提取 2 次，每次 48 h，合并提取液；

(2) 黄柏碱的粗分

将合并提取液通过 HPD100 型大孔吸附树脂柱层析吸附，干燥的黄柏药材

与大孔吸附树脂的质量比为 1:5，上样速度控制在 2.0 ml/min，上样完毕后静止吸附 2.0 h；吸附完毕后，先用 3.0 BV 的水洗脱除杂；再用 30 %乙醇洗脱 3.0 BV，收集洗脱液，于 50 °C 减压浓缩得浸膏；

(3) 黄柏碱的纯化精制

将浸膏通过 10 %氨水碱化的 200-300 目硅胶柱层析：浸膏与填料碱化硅胶的重量比为 1:30，先采用三氯甲烷-甲醇 30:1 洗脱 5.0 BV，再用 5.0 BV 甲醇洗脱，收集合并甲醇洗脱部分；将甲醇洗脱液于 45 °C 条件下减压浓缩干燥，得黄柏碱粗品；

(4) 盐酸黄柏碱结晶的制备

将黄柏碱粗品先用少量乙醇溶解，再滴加浓 HCl 调溶液 PH 至 3.0，置冰箱 4 °C 条件下放置 24 h，析晶，过滤干燥，上述方法反复重结晶得到纯度达到 98 %的盐酸黄柏碱。

(5) 柠檬酸黄柏碱盐结晶的制备

将黄柏碱粗品先用少量乙醇溶解，再滴加柠檬酸调溶液 PH 至 3.0，置冰箱 4 °C 条件下放置 24 h，析晶，过滤干燥，上述方法反复重结晶得到纯度达到 98 %的柠檬酸黄柏碱盐。

黄柏碱晶型鉴定报告

本品外观为白色粉末，为了鉴定晶型对其进行了如下表征：

由黄柏碱的拉曼谱图可知：黄柏碱该晶型的出峰位置在 3027.98, 2934.40, 1612.19, 1454.43, 1346.48, 803.70, 757.01, 710.76, 670.10, 594.22, 447.83, 418.96, 400.67, 283.32, 221.56, 176.72, 103.27, 83.85 cm^{-1} 。

由黄柏碱的 DSC 图谱可知：黄柏碱该晶型在升温到 250°C 左右开始熔化。

由黄柏碱的 TGA 图谱可知：黄柏碱该晶型的分解温度是 270.13°C。

黄柏碱的 XRD 图谱及数据

黄柏碱 X 射线衍射数据

Anode Cu, Wavelength 1 1.5406Å, Wavelength 2 1.54443Å

Generator 40 KV, Generator 40 mA

Step 0.02°, StepTime 0.3s, Start Angle 3.00°

End Angle 40.00°, Slit1.0/1.0/Ni/0.2, Date Mar-26-2015

NO.	Angle	d value	Intensity	Intensity %
-----	-------	---------	-----------	-------------

1	6.259	14.109	265	50
2	12.352	7.16	335	63
3	12.902	6.856	253	47.6
4	15.961	5.548	315	59.3
5	16.256	5.448	210	39.5
6	18.482	4.797	531	100
7	18.707	4.74	257	48.3
8	19.374	4.578	130	24.4
9	20.287	4.374	55.7	10.5
10	21.071	4.213	92.8	17.5
11	21.869	4.061	527	99.2
12	23.965	3.71	90.9	17.1
13	24.763	3.592	264	49.8
14	25.316	3.515	138	25.9
15	25.755	3.456	225	42.4
16	26.507	3.36	306	57.6
17	28.116	3.171	71.1	13.4
18	28.605	3.118	61.4	11.6
19	29.911	2.985	49.7	9.4
20	32.493	2.753	137	25.7
21	33.14	2.701	80.5	15.2
22	34.129	2.625	56.7	10.7
23	36.351	2.469	71.9	13.5
24	37.152	2.418	76	14.3

黄柏碱的红外图谱

由该谱图可知，其出峰位置为 3404.71, 3058.97, 2835.29, 2739.91, 1612.26, 1529.37, 1456.07, 1336.58, 1451.80, 1355.27, 1262.70, 1356.27, 1262.70, 1226.76, 1210.56, 1180.94, 1114.01, 1122.24, 1027.05, 1009.90, 878.82, 848.68, 837.53, 802.99, 733.58, 698.08cm⁻¹。

在 3404.71cm⁻¹ 位置出现一个强而且较宽的峰，此峰应该为黄柏碱酚羟基与结构中形成氢键的羟基伸缩振动，

3058.97cm⁻¹ 出现的则是其结构中苯环 C-H 的伸缩振动，

2835.29cm⁻¹ 和 2739.91cm⁻¹ 对应的则是其结构中烷基 C-H 的伸缩振动。

在 2500cm⁻¹ 到 2300cm⁻¹ 存在的峰有可能是叔胺盐 R₃NH⁺的 N-H 伸缩振动。

峰 1612.26cm⁻¹ 和 1529.37cm⁻¹ 极有可能是结构中苯环的 C=C 伸缩振动。

其余的峰对应的可能是烷基 C-H 弯曲振动、C-N 的伸缩振动以及苯环 C-H 的面外弯曲振动。

基于上述发现，本发明现已完成。为了便于理解，下面通过附图和具体实施例对本发明的黄柏碱在治疗糖尿病药物中的用途进行详细的描述。需要特别指出的是，具体实施例和附图仅是为了说明，显然本领域的技术人员可以根据本文说明，对本发明进行各种修正或改变，这些修正和改变也将纳入本发明范围之内。

附图说明

图 1.黄柏碱对 I 型糖尿病小鼠胰腺组织的影响

图 2.黄柏碱对 II 型糖尿病小鼠口服糖耐量的影响

图 3.黄柏碱对 II 型糖尿病小鼠胰岛素耐量的影响

图 4.黄柏碱对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏组织的影响

图 5: 肾脏 HE 染色

图 6: 肾脏 PAS 染色

图 7.黄柏碱的拉曼图谱

图 8.黄柏碱的 DSC 图谱

图 9.黄柏碱的 TGA 图谱

图 10. 黄柏碱的 XRD 图谱及数据

图 11. 黄柏碱的红外图谱

图 12. 黄柏碱的盐酸盐的 CNMR 图

图 13. 黄柏碱的盐酸盐的 HNMR 图

图 14. 黄柏碱的盐酸盐的 MS 图

图 15. 黄柏碱的柠檬酸盐的 CNMR 图

图 16 黄柏碱的柠檬酸盐的 HNMR 图

图 17 黄柏碱的柠檬酸盐的 MS 图

图 1 的详细说明

图 1 通过上中下三个部分展示黄柏碱对 I 型糖尿病小鼠胰腺组织的影响；

图 1 的上部展示正常组小鼠胰腺组织；

图 1 的中部展示 STZ 组小鼠胰腺组织；

图 1 的下部展示 STZ+黄柏碱组小鼠胰腺组织。

图 2 的详细说明

图 2 展示黄柏碱对 II 型糖尿病小鼠口服糖耐量的影响；

图 2 中，control 为正常饮食组，HFD 为高脂饮食组，HFD+Phellodendrine 为高脂+Phellodendrine 组。

图 3 的详细说明

图 3 展示黄柏碱对 II 型糖尿病小鼠胰岛素耐量的影响

图 3 中，control 为正常饮食组，HFD 为高脂饮食组，HFD+Phellodendrine 为高脂+Phellodendrine 组。

图 4 的详细说明

图 4 通过左上、右上、左下、右下四个部分展示黄柏碱对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏组织的影响；

图 4 的左上部展示正常组小鼠肝脏组织；

图 4 的右上部展示高脂组小鼠肝脏组织；

图 4 的左下部展示洛伐他汀组小鼠肝脏组织；

图 4 的右下部展示黄柏碱小鼠肝脏组织。

图 5 的详细说明

图 5 通过上中下三个部分展示肾脏 HE 染色；

图 5 的上部展示正常组小鼠肾脏组织；

图 5 的中部展示 STZ 组小鼠肾脏组织；

图 5 的下部展示 STZ+黄柏碱组小鼠肾脏组织。

图 6 的详细说明

图 6 通过上中下三个部分展示肾脏 PAS 染色；

图 6 的上部展示正常组小鼠肾脏组织；

图 6 的中部展示 STZ 组小鼠肾脏组织；

图 6 的下部展示 STZ+黄柏碱组小鼠肾脏组织。

图 8 的详细说明

样品是：phellodendrine,用量 2.0440mg

横坐标单位是温度 (°C) ;

图 9 的详细说明

样品是: phellodendrine,用量 6.3330mg

横坐标单位是温度 (°C) ;

图 10 的详细说明

横轴: 2THETA SCALE;

本发明涉及如下表格

表 1.黄柏碱对 STZ 造模的 I 型糖尿病小鼠的禁食血糖的影响。

表 2.黄柏碱对 STZ 造模的小鼠胰岛数目的影响

表 3.黄柏碱对高脂造模的 II 型糖尿病禁食血糖的影响

表 4.正常组小鼠糖耐量原始数据及相应线下面积

表 5.高脂组小鼠糖耐量原始数据及相应线下面积

表 6.黄柏碱治疗高脂饮食小鼠糖耐量原始数据及线下面积

表 7.黄柏碱对口服糖耐量线下面积数据分析

表 8.正常组小鼠糖胰岛素耐量原始数据及线下面积

表 9.高脂组小鼠糖胰岛素耐量原始数据及线下面积

表 10.黄柏碱治疗高脂饮食小鼠糖胰岛素耐量原始数据

表 11.黄柏碱对高脂饮食小鼠糖胰岛素耐量线下统计分析

表 12.各组小鼠血脂指标的变化

表 13.各组小鼠肝功能相关指标的变化

表 14.黄柏碱对 STZ 造模的糖尿病肾病的血糖的影响

表 15.黄柏碱对 STZ 造模的糖尿病肾病的尿量的影响

表 16.黄柏碱对 STZ 造模的糖尿病肾病的 UAE(24h 尿白蛋白排泄率)的影响.

表 17.黄柏碱对 STZ 造模的糖尿病肾病的 UACR(ug 尿白蛋白/mg 肌酐 比值)的影响.

具体实施方式

实施例 1

为了研究黄柏碱对 I 型糖尿病血糖影响，本实验采用经典的 I 型糖尿病模型，使用 C57BL 小鼠随机分为 3 组，正常对照组（10 只），STZ 组（20 只）。STZ 组连续腹腔注射 STZ（50mg/Kg）5 天，两周后测定禁食血糖，血糖大于等于 13.8mmol/L 为造模成功。然后将 STZ 组随机分为 STZ 组和黄柏碱治疗组，每组 10 只，黄柏碱治疗组采用口服灌胃（15mg/kg）10 周后，禁食 4h 后测定禁食血糖结果如图 1 所示，具有显著的统计学差异。

动物的一般情况:

胰岛组织病理学检查：石蜡切片、HE 染色，观察病理变化

表 1.黄柏碱对 STZ 造模的 I 型糖尿病血糖的影响.

组别	空腹血糖(mmol/L)	P 值
正常组	7.35±1.17***	1.70E-12
STZ 组	23.00±2.689	
STZ+黄柏碱	17.23±5.39**	0.00715105

注：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，与 STZ 组相比。

结果表明黄柏碱能够有效的降低 STZ 造成的 I 型糖尿病的血糖

表 2.黄柏碱对 STZ 造模的小鼠胰岛数目的影响

组别	对照	STZ	STZ+黄柏碱
	5	1	1
	6	1	2
	4	2	2
	6	1	1
	6	0	2
	3	1	1
	4	0	2
	6	0	1
	6	1	1
mean	5.1	0.78	1.4
sd	1.166666667	0.666667	0.87
p 值	4.3431E-08		0.032
	***		*

注：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，与 STZ 组相比。

随机选取胰腺病理切片 9 个视野进行统计。附图 1 的结果显示 STZ 造模后胰腺萎缩，组织结构坏死，通过黄柏碱治疗后胰岛组织形态结构恢复明显。

注：标尺为 20 μ m，放大倍数 400 倍。

实施例 2

为了研究黄柏碱对 II 型糖尿病的影响，本实验采用经典的 II 型糖尿病模型，使用 C57BL 小鼠随机分为 3 组，正常对照组（10 只），模型组（10 只），黄柏碱治疗组（10 只），其中模型组和黄柏碱治疗组采用高脂饮食（基础饲料加入 20%猪油）造模 8 周，黄柏碱治疗组在高脂饮食同时采用口服灌胃（50mg/kg）方式给药，给药结束后测定禁食过夜测定、空腹血糖、葡萄糖耐量和胰岛素耐量。实验数据进行方差分析，结果以 $x \pm s$ 表示。结果显示，黄柏碱治疗效果明显，具有显著统计学差异。

实验结果：

表 3.黄柏碱对高脂造模的 II 型糖尿病禁食血糖的影响

组别	空腹血糖(mM)	P 值
正常组	4.46 \pm 0.56***	0.0007
高脂饮食	6.82 \pm 1.75	
高脂饮食+黄柏碱	4.51 \pm 1.29**	0.0035

注：*** $P < 0.001$ ，与正常组相比；* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ ，与高脂组相比

糖耐量试验是一种口服葡萄糖负荷试验，用以了解机体对进食葡萄糖后的血糖调节能力。通过糖耐量试验，可以早期发现糖代谢异常，是目前公认的诊断糖尿病的金标准，在血糖增高但尚未达到糖尿病诊断标准时，为明确是否患糖尿病，可以采用 OGTT 进行鉴别诊断。正常情况下，机体有一套维持血糖的机制，口服葡萄糖，血糖短暂升高后迅速恢复正常，即糖耐量正常，相应的口服糖耐量曲线线下面积较小，糖尿病患者糖的利用障碍，口服葡萄糖后血糖迅速升高，血糖下降速度较慢，即糖耐量减退相应的线下面积较大，该实验中糖耐量减退，

如图 2 所示黄柏碱治疗组和正常组的糖耐量曲线均在模型组曲线下，相应的线下面积也均低于模型组，且具有统计意义。

糖耐量实验方法：小鼠禁食过夜，小鼠口服血糖 2g/kg 后分别在 0, 15, 30, 60, 90, 120 min 时，尾尖采血测定相应血糖，使用 GraphPad Prism 软件计算相应线下面积（AUC）

胰岛素耐受实验方法：小鼠禁食过夜，小鼠腹腔注射胰岛素 0.75IU/kg 后分别在 0, 30, 60, 90, 120, 150 min 时，尾尖采血测定相应血糖，使用 GraphPad Prism 软件计算相应线下面积（AUC）

糖耐量原始数据如下：

表 4.正常组小鼠糖耐量原始数据

OGTT-正常 组血糖 (mM)	0min	15min	30min	60min	90min	120min	线下面积 (AUC)
1	4.5	15.4	15	9	8.1	6.9	1219
2	4.1	16	17.1	12.2	11.9	5.9	1467
3	3.8	13.3	12.9	9.4	7.3	8.2	1142
4	3.9	10.9	14.2	7.7	8.8	7.7	1123
5	5.9	20.8	15	9.3	7.8	6.2	1300
6	4.7	19.3	17.8	9.5	7.9	5.3	1327
7	4.6	17.3	13	11.3	5.3	4.7	1155
8	4.6	15.8	10.9	8.5	6.3	4.9	1034
9	4.9	18	8.5	13.7	8	5.8	1236
10	5.9	16	10.5	7.2	7.3	4.2	1019
平均值	4.69	16.28	13.49	9.78	7.87	5.98	1202.2

表 5.高脂组小鼠糖耐量原始数及相应线下面积

OGTT-高 脂组血糖 (mM)	0min	15min	30min	60min	90min	120min	线下面积 (AUC)
1	4.5	23.2	32.6	14.7	10.2	6.9	1966
2	4.5	26.3	18.9	8.9	7.8	7.6	1469
3	5	20.6	15.5	8.8	7.5	7.3	1294
4	4	22.6	18.5	11.5	9.5	9.7	1561
5	5.2	27.9	29.6	25.1	15	29.5	2769
6	4.8	27.1	22.4	14	9.8	8.7	1791
7	6.2	21.5	11	8.9	8.4	8.8	1268
8	11	16	9.6	10.7	8.5	7.8	1232
9	4.9	26.5	23.1	10.9	9.8	10.2	1728
10	8.2	25.6	13.7	11	12.9	9.8	1618
平均值	5.83	23.73	19.49	12.45	9.94	10.63	1669.6

表 6.黄柏碱治疗高脂饮食小鼠糖耐量原始数及线下面积

OGTT-高脂+ 黄柏碱血糖 (mmol/L)	0min	15min	30min	60min	90min	120min	线下面积 (AUC)
1	3.5	19.8	7.6	7.3	5.4	4.4	941.3
2	3.3	17.9	9.1	4.9	6	4.8	897
3	4.3	17.1	10.2	7	5.3	4.6	956.3
4	3.7	9.5	6.9	4.9	4.6	4.4	676.5
5	3.9	14.5	8.6	6.2	5.8	5	875.3
6	3.9	14	9	6.5	4.8	4.8	852.8
7	3.2	14.8	11.5	5.3	3.8	3.7	833.3
8	4.9	15.8	13	6.5	4.9	4.9	981.8
9	3	12.3	9.4	5.5	4.5	4.4	784.5
10	5.2	17.1	13.2	6.7	7.2	5.9	1098
平均值	3.89	15.28	9.85	6.08	5.23	4.69	889.68

图 2.黄柏碱对 II 型糖尿病小鼠口服糖耐量的影响

注: control 为正常饮食组, HFD 为高脂饮食组, HFD+Phellodendrine 组为高脂

表 7.黄柏碱对口服糖耐量线下面积数据分析

糖耐量 AUC	对照组	高脂组	高脂饮食+黄柏碱
	1219	1966	941.3
	1467	1469	897
	1142	1294	956.3
	1123	1561	676.5
	1300	2769	875.3
	1327	1791	852.8
	1155	1268	833.3
	1034	1232	981.8
	1236	1728	784.5
	1019	1618	1098
mean	1202.2	1669.6	889.68
SD	137.7	455	115.61
P 值	0.0061		5.38E-05
	**		***

胰岛素耐量试验是反映机体对胰岛素敏感性的实验, II 型糖尿病的主要特征为胰岛素抵抗, 对胰岛素敏感性降低, 即注射相同胰岛素相同时间内血糖高于正常机体, 如图 3 所示, 高脂造模后对胰岛素敏感性降低, 注射相同量的胰岛素

后各个点的血糖值均高于正常组，其相应的线下面积也高于正常组，给予黄柏碱治疗后各个时间点的血糖数值低于模型组，相应线下面积低于高脂诱导的模型组。结果表明黄柏碱能够有效的增加胰岛素敏感性改善糖尿病。

表 8. 正常组小鼠糖胰岛素耐量原始数据

ITT-对照组 (mM)	0min	30min	60min	90min	120min	150min	线下面积 (AUC)
1	4.9	2.8	3	2.2	2.6	4.1	453
2	4.7	3.6	2.9	1.8	2.7	3.7	456
3	3.9	4.7	2.2	2.4	2.8	3.18	469.2
4	4.9	2.3	2.2	3	2.7	2.6	418.5
5	4.6	2.8	1.7	2	2.4	2.8	378
6	5.1	2.3	1.7	2.4	2.5	3.3	393
7	3.8	3.8	2	1.9	2.7	3.3	418.5
8	5.8	3.2	2.39	2.12	3.7	3.3	478.8
9	5.7	3	2.1	1.3	2.2	2.2	376.5
10	4.1	2.4	1.8	2.4	3.4	3.1	408
mean	4.73	3.12	2.11	2.15	2.79	3.05	421.83

表 9. 高脂组小鼠糖胰岛素耐量原始数据

ITT-高脂 (mM)	0min	30min	60min	90min	120min	150min	AUC
1	5.7	3.9	2.5	2.6	2.9	3.1	489.0
2	5.6	4.6	3.1	2.9	3.6	4.2	573.0
3	5.2	3.7	2.8	2.5	3.3	3.5	499.5
4	4.6	3.4	2.6	2.7	2.8	3.1	460.5
5	4.7	3.3	2.5	1.8	2.2	2.7	405.0
6	5.9	4.1	2.9	2.6	3.1	3.3	519.0
7	5.4	3.6	2.8	3.2	3.5	3.9	532.5
8	6.1	3.8	3.1	3.1	3.3	3.6	544.5
9	5.8	3.2	2.7	2.8	3.1	3.6	495.0
10	6.4	4.3	3.4	3.5	3.2	3.7	583.5
mean	5.54	3.79	2.84	2.77	3.1	3.47	510.2

表 10.黄柏碱治疗组小鼠糖胰岛素耐量原始数据

ITT-高脂+							
黄柏碱 (mM)	0min	30min	60min	90min	120min	150min	AUC
1	4.5	2.7	1.9	2.1	2.7	2.7	390.0
2	5.6	3.2	2.7	1.7	2.3	3.3	430.5
3	5.3	2.3	1.6	1.9	2.3	3.1	369.0
4	4.7	4.3	2.4	2.8	2.9	3	487.5
5	4.6	2.6	2.7	2.1	2.8	3.1	421.5
6	4.3	3.2	2.3	2.8	2.9	3.3	450.0
7	4.2	2.6	3.1	2.9	2.7	2.8	444.0
9	4.9	3.4	2.1	2.7	2.7	3.1	447.0
10	3.9	3.2	2.6	2.3	2.8	2.3	420.0
8	4.6	3.3	3.1	2.7	3.6	3.3	499.5
mean	4.66	3.08	2.45	2.4	2.77	3	435.9

图 3.黄柏碱对 II 型糖尿病小鼠胰岛素耐量的影响

表 11.黄柏碱对 II 型糖尿病小鼠糖胰岛素耐量线下统计分析

组别	对照组	高脂饮食组	高脂饮食+黄柏碱
1	453	489	390.0
2	456	573	430.5
3	469.2	499.5	369.0
4	418.5	460.5	487.5
5	378	405	421.5
6	393	519	450.0
7	418.5	532.5	444.0
8	478.8	544.5	447.0
9	376.5	495	420.0
10	408	583.5	499.5
mean	424.95	510.15	435.9
SD	37.34	53.12	39.8
P 值	0.0006		0.0023
	***		**

注： * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与高脂组比较

可见：与正常组相比，模型组小鼠空腹血糖值显著升高，说明 II 型糖尿病模型造模成功。同时，与模型组相比，黄柏碱有显著的降低空腹血糖的作用和增加葡萄糖耐受、增强胰岛素敏感性。

实施例 3

黄柏碱对高脂血症和非酒精性脂肪肝的治疗作用，

1、实验动物及方法：

C57BL 小鼠，SPF 级，雄性，体重(20±2)g，随机分成两组，第一组 12 只，为正常组，给与正常饲料，其余小鼠(44 只)分为第二组，给与高脂饲料（基础饲料加入 20%猪油，1.25%胆固醇，0.5%的胆酸钠）自由摄食、饮水。连续喂养 8 周后，从正常对照组和脂肪肝模型组分别处死 4 只小鼠，比较两组小鼠的血清和肝脏生化指标，以及肝脏组织病理切片，判断非酒精性脂肪肝模型小鼠是否建立成功。

将造模成功小鼠 32 只随机分为 4 组，分别为正常对照组（8 只），模型组（8 只），黄柏碱治疗组（8 只），阳性对照组（洛伐他汀组 8 只），连续灌胃给药 8 周。给药期间，除正常对照组标准饲料饲养外，其余各组继续给予高脂饮食，直到实验结束。黄柏碱治疗组在高脂饮食同时采用口服灌胃(50mg/kg)方式给药，阳性对照组在高脂饮食同时采用口服灌胃洛伐他汀(60mg/kg)方式给药)

2、观察指标：

a 动物的一般情况

实验动物在 SPF 动物房中饲养，12h 光照 12h 黑夜，自由饮食饮水，实验期间动物状态正常。

b 肝功能相关指标：血清 ALT、AST，

c 血脂相关指标：TC、TG、HDL、LDL

d 病理学检查：HE 染色

3、实验结果：

结果表明：黄柏碱均可明显降低血浆中的总胆固醇（TC）和甘油三酯(TG)，升高高密度脂蛋白（HDL），降低低密度脂蛋白（LDL），降低血浆中天门冬氨酸转氨酶（AST），丙氨酸转氨酶（ALT），病理切片结果显示有效缓解高脂饲料引起的非酒精性脂肪肝变性，改善因脂肪变性而导致的肝功能损害。

给药结束后测定小鼠、血脂水平。实验数据进行方差分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果显示，黄柏碱对降低高脂效果明显，具有显著统计学差异。

表 12.各组小鼠血脂指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	总胆固醇 (mmol/L)	总甘油三酯 (mmol/L)	高密度脂蛋白 (mmol/L)	低密度脂蛋白 (mmol/L)
空白组	3.425±0.2869 ***	1.111±0.2057 **	2.990±0.2790 **	0.40± 0.1484***
模型组	4.775±0.3924	1.555±0.3171	1.961±0.6469	0.89±0.1309
洛伐他汀组	3.838±0.2669 ***	1.0917± 0.2049 **	2.300±0.2113	0.52± 0.2291**
黄柏碱组	3.5825±0.2669 **	1.001±0.1580 ***	2.630±0.3066 *	0.75±0.3380

表 13 各组小鼠肝功能相关指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	丙氨酸转氨酶 (U/L)	天门冬氨酸转氨酶 (U/L)
空白组	22.14±2.233 ***	92.35±14.345**
模型组	35.60±1.749	126.59±19.040
洛伐他汀组	25.95±3.135 ***	110.8±38.840
黄柏碱组	21.96±2.981 ***	97.75±27.959 *

实施例 4

为了研究黄柏碱对糖尿病肾病血糖影响，使用 C57BL 小鼠随机分为 3 组，正常对照组（10 只），STZ 组（20 只）。STZ 组连续腹腔注射 STZ（50mg/Kg）5 天，两周后测定禁食血糖，血糖大于等于 13.8mM 为糖尿病造模成功。然后将 STZ 组随机分为 STZ 组和黄柏碱治疗组，STZ 组仅正常饲养，黄柏碱治疗组采用口服灌胃（15mg/kg），12 周后，将小鼠放入小鼠代谢笼中，自由饮食饮水，将尿液用于分析，所测指标均为临床上糖尿病肾病的检测的经典指标，如表 14-16 所示 STZ 组相比空白对照组，显著升高均在 10 倍以上，说明糖尿病小鼠肾功能出现严重损伤，如图 1、2 所示 STZ 组相比正常组器官损伤明显。综合以上表图可以得出糖尿病肾病造模成功。

表 14.结果表明黄柏碱能够有效的降低 STZ 造成的血糖升高，逆转由糖尿病肾病引起的尿量增加（表 15），有效的降低糖尿病肾病引起的 24h 蛋白排泄率升高（表 16）。临床上常用尿液中白蛋白和肌酐的比值评估肾功能，黄柏碱的有效的降低糖尿肾病引起的白蛋白和肌酐的比值升高（表 17）。尿量、24h 蛋白排泄率白蛋白和肌酐的比值的结果表明黄柏碱治疗很好的改善了肾功能。

为了更进一步的评估肾脏器官性损伤的改变，本发明对肾脏进行 PAS 染色

和 HE 染色。图 5, 6 显示: 黄柏碱能够有效的修复糖尿病肾病的器官性损伤逆转, 如图所示 STZ 组肾小球系膜区增宽, 基质增加, 肾小球基膜增厚, 肾小管基膜增厚及分裂, 呈现出极为典型的糖尿病肾病特征, 显示造模良好, 而黄柏碱在一定程度上修复, 系膜区相对缩小, 改善了基质增生以及肾小管基膜增厚, 说明治疗作用明显效果显著。

表 14.黄柏碱对 STZ 造模的糖尿病肾病的血糖的影响 (单位: mM) .

组别	对照组	STZ	STZ+黄柏碱
	7.9	20.9	12
	7.5	20.8	14.1
	9.9	28.6	23.3
	6.3	27.1	15.4
	8.4	24.9	26.6
	9.9	20.7	15.3
	9.7	23.4	13.2
	12.3	20.3	14.5
	6.8	19.7	12.9
	11.3	30.9	31.7
平均值	9	23.73	17.9
SD	1.95	3.97	6.80
p 值 (vs STZ)	4.0E-09		0.031
	***		*

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 STZ 组相比。

表 15.黄柏碱对 STZ 造模的糖尿病肾病的尿量的影响 (单位: g) .

组别	对照组	STZ	STZ+黄柏碱
	0	5.13	0.44
	0.58	6.69	3.24
	0.37	20.27	4.49
	0.37	10.41	2.55
	1.69	19.08	1.38
	0	3.35	0.1
	0.28	9.91	1.37
	0.28	8.02	3.55
	0.29	9.91	0.32
	0	5.75	5.81
平均值	0.386	9.852	2.33
SD	0.496	5.664	1.931
p 值 (vs STZ)	5.26E-05		0.001
	***		***

表 16.黄柏碱对 STZ 造模的糖尿病肾病的 UAE(24h 尿白蛋白排泄率, 单位: μ g)的影响.

组别	对照组	STZ	STZ+黄柏碱
	0.00	113.34	5.42
	6.69	163.57	73.35
	2.70	438.84	117.76
	3.06	260.21	64.35
	14.65	427.41	30.35
	0.00	83.62	2.24
	2.03	196.95	21.66
	2.11	157.74	69.10
	1.37	242.64	5.91
	0.00	120.56	47.40
平均值	3.26	220.49	43.75
SD	4.48	124.94	37.60
p 值 (vs STZ)	0.000032		0.00045
	***		***

表 17.黄柏碱对 STZ 造模的糖尿病肾病的 UACR(μ g 尿白蛋白/mg 肌酐 比值)的影响.

组别	对照	STZ	STZ+黄柏碱
	0.00	216.46	84.29
	29.29	365.17	317.99
	14.45	574.10	215.31
	16.12	604.66	264.00
	54.39	514.78	53.69
	0.00	685.98	94.48
	14.51	219.74	93.71
	30.58	249.62	57.87
	15.44	416.09	94.16
	0.00	167.65	115.86
平均值	17.48	401.43	139.13
SD	17.04	186.01	92.45
p 值 (vs STZ)	0.0000041		0.00085
	***		***

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 STZ 组相比。

实施例 5

黄柏碱的制剂

黄柏碱片剂

黄柏碱 10mg, 淀粉 88g, 硬脂酸镁 3g

制备工艺：取黄柏碱过 100 目筛，加淀粉、硬脂酸镁混合均匀，制成颗粒，干燥，压片，即得。

黄柏碱胶囊

黄柏碱 10mg, 淀粉 88g, 硬脂酸镁 3g

制备工艺：取黄柏碱过 100 目筛，加淀粉、硬脂酸镁混合均匀，制成颗粒，干燥，装胶囊，即得。

黄柏碱注射液

黄柏碱 47mg, 注射用氯化钠 7mg

制备工艺：取黄柏碱过 100 目筛，加 1.9mL 注射用水溶解，加入注射用氯化钠至等渗，调节 pH 值至 7~7.1，滤过，冷藏 24 小时，加注射用水至规定量，滤过，灌封，灭菌，即得。

实施例 6

黄柏碱的食品制剂

干酵母 5g、温水 90ml、水少许、面粉 150g、黄柏碱 5mg, 植物油 10g、低钠盐少许

饼干做法：把酵母撒在温水里搅拌溶解，加入黄柏碱。加入面粉搅拌，再加入植物油，揉成光滑的面团；面团制成 0.2cm 厚的薄片；压出造型，刺洞，表面撒上水，撒上一点低钠盐，室温发酵 10 分钟；烤箱预热 120 度，放在上层，烤约 10 分钟，得到含黄柏碱的食品。

实施例 7

黄柏碱单体(纯度在 91%~92%) 100mg, 先用 10ml 氯仿溶解，加入 10mL 0.1 M HCL 氯仿溶液，析出沉淀，过滤干燥，得到盐酸黄柏碱单体，用 1ml 乙醇溶解，置冰箱 4°C 条件下放置 24h, 析晶，过滤干燥，得到盐酸黄柏碱单体，纯度达到 98%以上。

黄柏碱单体(纯度在 91%~92%) 100mg, 先用 10ml 氯仿溶解，加入 10mL 0.1 M H₂SO₄ 氯仿溶液，析出沉淀，过滤干燥，得到硫酸黄柏碱单体，用 1ml 乙醇溶解，过滤，滤液置冰箱 4°C 条件下放置 24h, 析晶，过滤干燥，得到硫酸黄柏碱单体，纯度达到 98%以上。

黄柏碱单体(纯度在 91%~92%) 100mg, 先用 10ml 氯仿溶解, 加入 10mL 0.1 M 磷酸氯仿溶液, 析出沉淀, 过滤干燥, 得到磷酸黄柏碱单体, 用 1ml 乙醇溶解, 过滤, 滤液置冰箱 4°C 条件下放置 24h, 析晶, 过滤干燥, 得到磷酸黄柏碱单体, 纯度达到 98%以上。

黄柏碱单体(纯度在 91%~92%) 100mg, 先用 10ml 氯仿溶解, 加入 10mL 0.1 M 果酸氯仿溶液, 析出沉淀, 过滤干燥, 得到果酸黄柏碱单体, 用 1ml 乙醇溶解, 过滤, 滤液置冰箱 4°C 条件下放置 24h, 析晶, 过滤干燥, 得到果酸黄柏碱单体, 纯度达到 98%以上。

黄柏碱单体(纯度在 91%~92%) 100mg, 先用 10ml 氯仿溶解, 加入 10mL 0.1 M 草酸氯仿溶液, 析出沉淀, 过滤干燥, 得到草酸黄柏碱单体, 用 1ml 乙醇溶解, 过滤, 滤液置冰箱 4°C 条件下放置 24 h, 析晶, 过滤干燥, 得到草酸黄柏碱单体, 纯度达到 98%以上。

黄柏碱单体(纯度在 91%~92%) 100mg, 先用 10ml 氯仿溶解, 加入 10mL 0.1 M 琥珀酸氯仿溶液, 析出沉淀, 过滤干燥, 得到琥珀酸黄柏碱单体, 用 1ml 乙醇溶解, 过滤, 滤液置冰箱 4°C 条件下放置 24 h, 析晶, 过滤干燥, 得到琥珀酸黄柏碱单体, 纯度达到 98%以上。

黄柏碱单体(纯度在 91%~92%) 100mg, 先用 10ml 氯仿溶解, 加入 10mL 0.1 M 醋酸氯仿溶液, 析出沉淀, 过滤干燥, 得到醋酸黄柏碱单体, 用 1ml 乙醇溶解, 过滤, 滤液置冰箱 4°C 条件下放置 24 h, 析晶, 过滤干燥, 得到醋酸黄柏碱单体, 纯度达到 98%以上。

黄柏碱单体(纯度在 91%~92%) 100mg, 先用 10ml 氯仿溶解, 加入 10mL 0.1 M 丙酸氯仿溶液, 析出沉淀, 过滤干燥, 得到丙酸黄柏碱单体, 用 1ml 乙醇溶解, 过滤, 滤液置冰箱 4°C 条件下放置 24 h, 析晶, 过滤干燥, 得到丙酸黄柏碱单体, 纯度达到 98%以上。

实施例 8

盐酸黄柏碱的制备方法

(1) 总生物碱的提取

配制质量分数为 3.0 % 的 NaCl 溶液, 调其 PH 为 3.0; 干燥黄柏药材用该溶液以料液比 1:8 浸泡提取 2 次, 每次 48 h, 合并提取液;

(2) 黄柏碱的粗分

将合并提取液通过 HPD100 型大孔吸附树脂柱层析吸附，干燥的黄柏药材与大孔吸附树脂的质量比为 1:5，上样速度控制在 2.0 ml/min，上样完毕后静止吸附 2.0 h；吸附完毕后，先用 3.0 BV 的水洗脱除杂；再用 30 %乙醇洗脱 3.0 BV，收集洗脱液，于 50 °C 减压浓缩得浸膏；

(3) 黄柏碱的纯化精制

将浸膏通过 10 %氨水碱化的 200-300 目硅胶柱层析：浸膏与填料碱化硅胶的重量比为 1:30，先采用三氯甲烷-甲醇 30:1 洗脱 5.0 BV，再用 5.0 BV 甲醇洗脱，收集合并甲醇洗脱部分；将甲醇洗脱液于 45 °C 条件下减压浓缩干燥，得黄柏碱粗品；

(6) 盐酸黄柏碱结晶的制备

将黄柏碱粗品先用少量乙醇溶解，再滴加浓 HCl 调溶液 PH 至 3.0，置冰箱 4 °C 条件下放置 24 h，析晶，过滤干燥，上述方法反复重结晶得到纯度达到 98 % 的盐酸黄柏碱。

(5) 盐酸黄柏碱的结构鉴定

测试仪器及条件：核磁共振谱测试采用 Bruker Avance 400 型核磁共振仪（瑞士），按超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱方法通则。溶剂采用氘代二甲基亚砷(DMSO- d_6)，TMS 为内标。对 ^1H 核，观察频率为 400.1 MHz，对 ^{13}C 核，观察频率为 100.6 MHz。质谱测试采用 Bruker Amazon SL 型离子阱质谱仪（瑞士），

样品用水溶解，直接进样分析。

Positive ESI-MS: m/z 342.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，推断本品的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$ 。 ^1H -NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.85, 6.73, 6.72, 6.66(4H,s,C-2, 3, 10, 11), 4.77 (1H,d, J = 10.0 Hz, H-8b), 4.70 (1H,m,H-14), 4.58 (1H, d, J = 15.2 Hz, H-8a), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.75 (3H, s, OCH₃), 3.66 (1H, m, H-6), 3.60(1H, m, H-6), 3.28 (1H, dd, J = 5.6, 18.4 Hz, H-13a), 3.16 (3H, N-CH₃), 3.14(2H, m, H-5), 2.96(1H, dd, J = 10, 18.6 Hz, H-13b)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 22.6(C-5), 33.0(C-13), 49.2(N-CH₃), 51.6(C-6), 55.7 (OCH₃ at C-3), 55.7(OCH₃ at C-10), 62.0(C-8), 64.3(C-14), 109.9(C-1), 112.5(C-9), 113.4(C-

4), 114.7(C-12), 116.4(C-13), 118.8(C-4a), 121.8(C-12a), 124.1(C-8a), 145.5(C-11), 146.8(C-2), 147.1(C-3), 147.9(C-10)。综合 ^1H , ^{13}C -NMR 及 ESI-MS 等波谱数据, 与文献对照, 确定本品为盐酸黄柏碱。

实施例 9 柠檬酸黄柏碱盐的制备方法

(1) 总生物碱的提取

配制质量分数为 3.0 % 的 NaCl 溶液, 调其 PH 为 3.0; 干燥黄柏药材用该溶液以料液比 1:8 浸泡提取 2 次, 每次 48 h, 合并提取液;

(2) 黄柏碱的粗分

将合并提取液通过 HPD100 型大孔吸附树脂柱层析吸附, 干燥的黄柏药材与大孔吸附树脂的质量比为 1:5, 上样速度控制在 2.0 ml/min, 上样完毕后静止吸附 2.0 h; 吸附完毕后, 先用 3.0 BV 的水洗脱除杂; 再用 30 % 乙醇洗脱 3.0 BV, 收集洗脱液, 于 50 °C 减压浓缩得浸膏;

(3) 黄柏碱的纯化精制

将浸膏通过 10 % 氨水碱化的 200-300 目硅胶柱层析: 浸膏与填料碱化硅胶的重量比为 1:30, 先采用二氯甲烷-甲醇 30:1 洗脱 5.0 BV, 再用 5.0 BV 甲醇洗脱, 收集合并甲醇洗脱部分; 将甲醇洗脱液于 45 °C 条件下减压浓缩干燥, 得黄柏碱粗品;

(7) 盐酸黄柏碱结晶的制备

将黄柏碱粗品先用少量乙醇溶解, 再滴加柠檬酸调溶液 PH 至 3.0, 置冰箱 4 °C 条件下放置 24 h, 析晶, 过滤干燥, 上述方法反复重结晶得到纯度达到 98 % 的柠檬酸黄柏碱盐。

(6) 柠檬酸黄柏碱盐的结构鉴定

测试仪器及条件: 核磁共振谱测试采用 Bruker Avance 400 型核磁共振仪 (瑞士), 按超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱方法通则。溶剂采用氘代二甲基亚砷 ($\text{DMSO-}d_6$), TMS 为内标。对 ^1H 核, 观察频率为 400.1 MHz, 对 ^{13}C 核, 观察频率为 100.6 MHz。质谱测试采用 Bruker Amazon SL 型离子阱质谱仪 (瑞士),

样品用水溶解, 直接进样分析。

Positive ESI-MS: m/z 342.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, Negative ESI-MS: 190.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 推断

本品的分子式为 $C_{20}H_{24}NO_4 \cdot C_6H_8O_7$; 1H -NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.85, 6.73, 6.71, 6.65(4H, s, H-2, 3, 10, 11), 4.74(1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-8b), 4.71 (1H, m, H-14), 4.57(1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-8a), 3.77(3H, s, OCH₃), 3.75(3H, s, OCH₃), 3.66 (1H, m, H-6), 3.60 (1H, m, H-6), 3.29(1H, dd, $J = 4.8, 18.0$ Hz, H-13a), 3.14 (3H, N-CH₃, C-5), 2.95 (1H, dd, $J = 9.6, 18.0$ Hz, H-13b), 2.51 (0.5H, s, H-2', 4'); ^{13}C -NMR(100 MHz, DMSO- d_6), δ : 22.7 (C-5), 33.0(C-13), 49.3(N-CH₃), 51.6 (C-6), 55.7(OCH₃ at C-3), 55.7(OCH₃ at C-10), 62.0 (C-8), 64.4(C-13a), 109.9(C-1), 112.5(C-9), 113.4(C-4), 114.7(C-12), 116.4(C-13), 118.9(C-4a), 121.8(C-12a), 124.1(C-8a), 145.5(C-11), 146.8(C-2), 147.1(C-3), 147.9(C-10), 44.6(C-2', 4'), 71.1(C-3'), 171.4 (C-1', 5'), 177.2(C-6')。综合 1H , ^{13}C -NMR 及 ESI-MS 等波谱数据, 与文献对照, 确定本品为柠檬酸黄柏碱盐。

权 利 要 求 书

1. 异喹啉生物碱用于制备治疗或预防糖尿病的组合。
2. 异喹啉生物碱用于制备治疗或预防糖尿病肾病的组合。
3. 异喹啉生物碱用于制备治疗或预防高脂血症的组合。
4. 异喹啉生物碱用于制备治疗或预防非酒精性脂肪肝的组合。
5. 根据权利要求 1-2 中的组合，其特征为：用于制备预防或治疗 I 型糖尿病、或、用于制备保护胰岛细胞、修复受损的胰岛细胞的组合；或、用于制备预防或治疗 II 型糖尿病、或、制备对抗胰岛素抵抗的组合。
6. 根据权利要求 1-4 中的组合，其特征为：异喹啉生物碱用于制备保护糖尿病肾病患者的肾脏组织、或、修复糖尿病肾病患者的受损的肾脏组织的组合。
7. 根据权利要求 1-4 中的组合，其特征为：异喹啉生物碱为黄柏碱或其药用盐、水合物或无水物。
8. 根据权利要求 1-4 中的组合，其特征为：

其中黄柏碱药用盐包括：无机酸盐例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐和磷酸盐；有机酸盐例如乙酸盐，苯甲酸盐，马来酸盐，富马酸盐，苹果酸盐，柠檬酸盐，草酸盐，乳酸盐，琥珀酸盐，酒石酸盐，烷基磺酸盐或芳基磺酸盐，半胱氨酸盐或其它氨基酸盐。还包括碱式盐如钠盐、钾盐和钙盐。

9. 根据权利要求 1-4 中的组合，其特征为：

黄柏碱晶型以下列的 X 射线衍射图表征，其以 2θ 角、晶面间距 d (Å)、相对强度 (Intensity %) 来表示：

NO.	2θ	d (Å)	相对强度 (Intensity %)
1	6.259	14.109	50
2	12.352	7.16	63
3	12.902	6.856	47.6
4	15.961	5.548	59.3
5	16.256	5.448	39.5
6	18.482	4.797	100
7	18.707	4.74	48.3
8	19.374	4.578	24.4
9	20.287	4.374	10.5
10	21.071	4.213	17.5
11	21.869	4.061	99.2
12	23.965	3.71	17.1
13	24.763	3.592	49.8

权 利 要 求 书

14	25.316	3.515	25.9
15	25.755	3.456	42.4
16	26.507	3.36	57.6
17	28.116	3.171	13.4
18	28.605	3.118	11.6
19	29.911	2.985	9.4
20	32.493	2.753	25.7
21	33.14	2.701	15.2
22	34.129	2.625	10.7
23	36.351	2.469	13.5
24	37.152	2.418	14.3。

10. 根据权利要求 1-8 中的组合物，其特征为：

黄柏碱药用盐按照如下方式制备：

取黄柏碱单体，用氯仿溶解，加入氯仿的酸溶液，析出沉淀，过滤干燥，得到黄柏碱的药用盐单体，用乙醇溶解，置冰箱放置，析晶，过滤干燥，得到黄柏碱的药用盐，纯度达到 98%以上；

或；

黄柏碱的盐酸盐、柠檬酸盐的优选的制备方法

(1) 总生物碱的提取

配制质量分数为 3.0 % 的 NaCl 溶液，调其 PH 为 3.0；干燥黄柏药材用该溶液以料液比 1:8 浸泡提取 2 次，每次 48 h，合并提取液；

(2) 黄柏碱的粗分

将合并提取液通过 HPD100 型大孔吸附树脂柱层析吸附，干燥的黄柏药材与大孔吸附树脂的质量比为 1:5，上样速度控制在 2.0 ml/min，上样完毕后静止吸附 2.0 h；吸附完毕后，先用 3.0 BV 的水洗脱除杂；再用 30 %乙醇洗脱 3.0 BV，收集洗脱液，于 50 °C 减压浓缩得浸膏；

(3) 黄柏碱的纯化精制

将浸膏通过 10 %氨水碱化的 200-300 目硅胶柱层析：浸膏与填料碱化硅胶的重量比为 1:30，先采用三氯甲烷-甲醇 30:1 洗脱 5.0 BV，再用 5.0 BV 甲醇洗脱，收集合并甲醇洗脱部分；将甲醇洗脱液于 45 °C 条件下减压浓缩干燥，得黄柏碱粗品；

(4) 盐酸黄柏碱结晶的制备

将黄柏碱粗品先用少量乙醇溶解，再滴加浓 HCl 调溶液 PH 至 3.0，置冰箱 4 °C 条件下放置 24 h，析晶，过滤干燥，上述方法反复重结晶得到纯度达到 98 % 的盐酸黄柏碱；

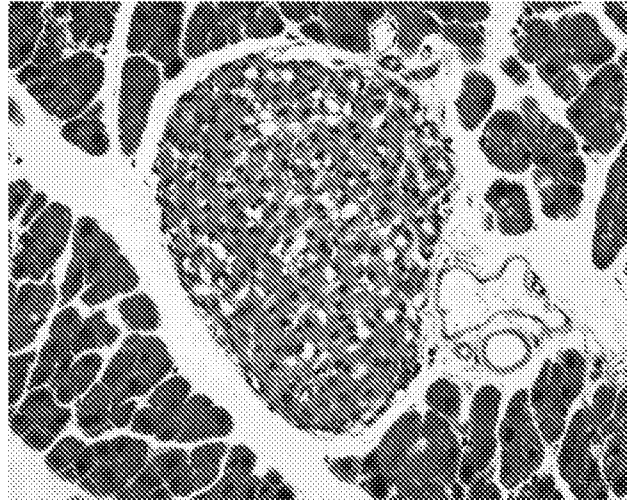
权 利 要 求 书

(5) 柠檬酸黄柏碱盐结晶的制备

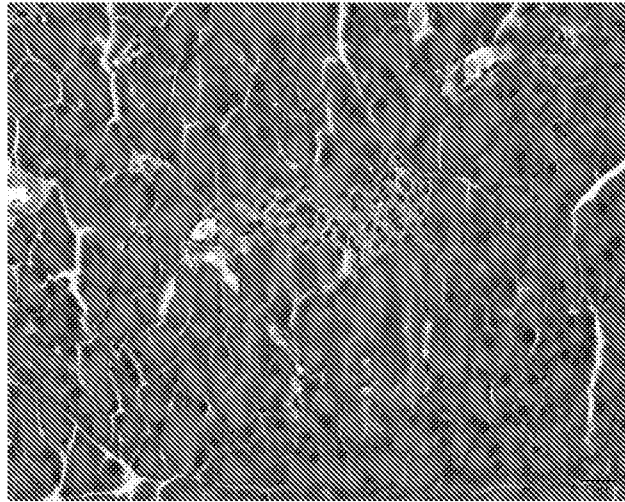
将黄柏碱粗品先用少量乙醇溶解，再滴加柠檬酸调溶液 PH 至 3.0，置冰箱 4 °C 条件下放置 24 h，析晶，过滤干燥，上述方法反复重结晶得到纯度达到 98 % 的柠檬酸黄柏碱盐。

说明书附图

正常组



STZ 组



STZ+黄柏碱

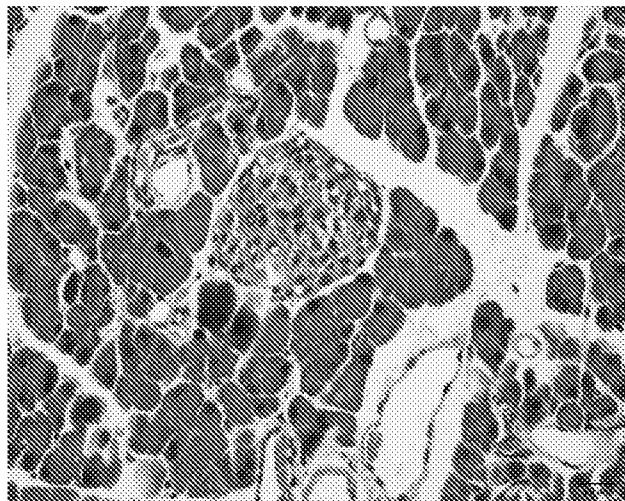


图 1

说明书附图

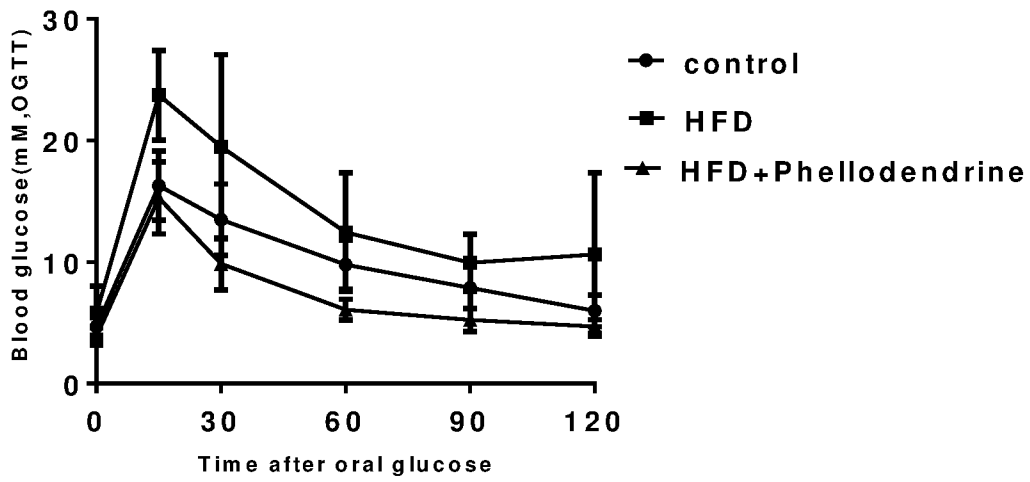


图 2

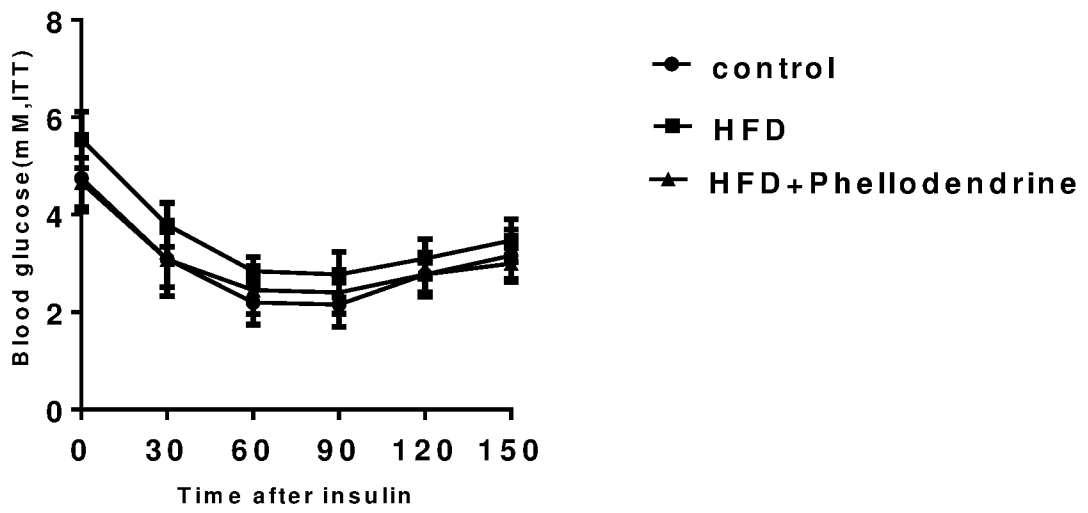


图 3

说明书附图

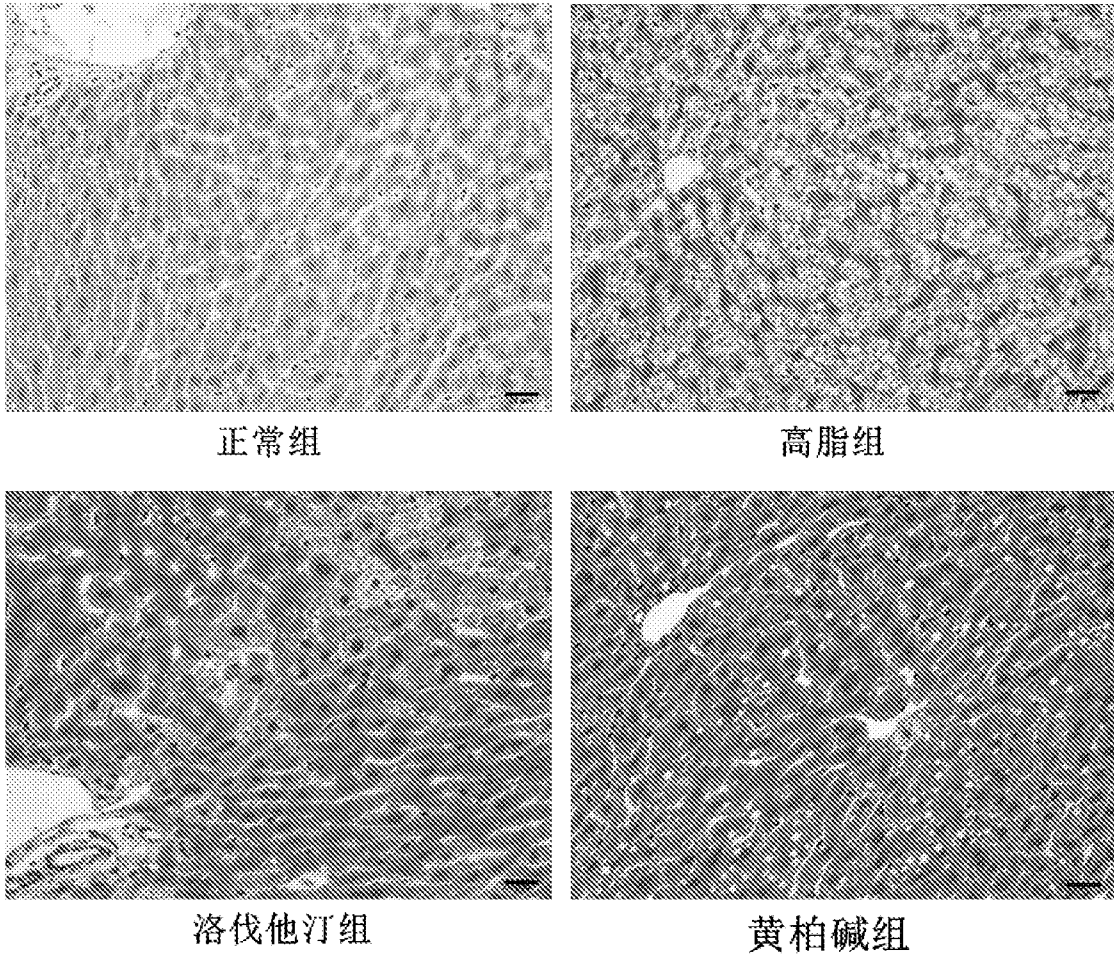


图 4

说明书附图

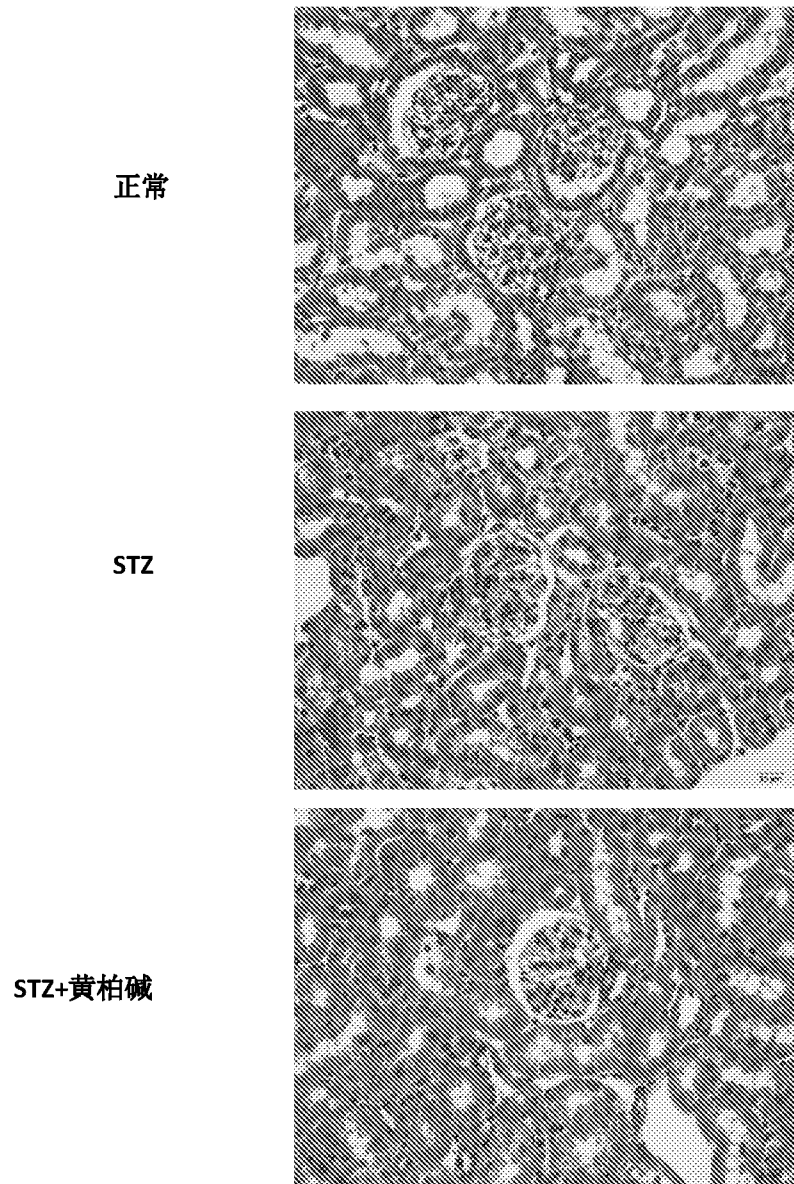


图 5

说明书附图

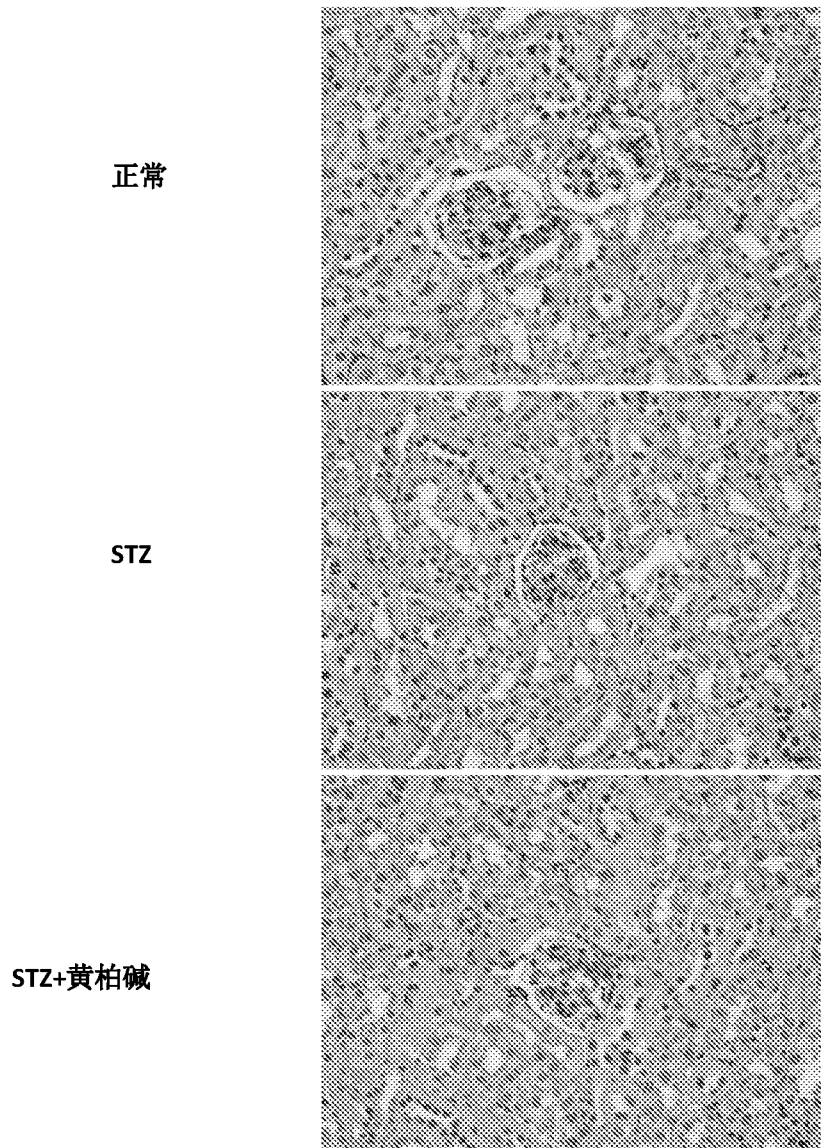


图 6

说明书附图

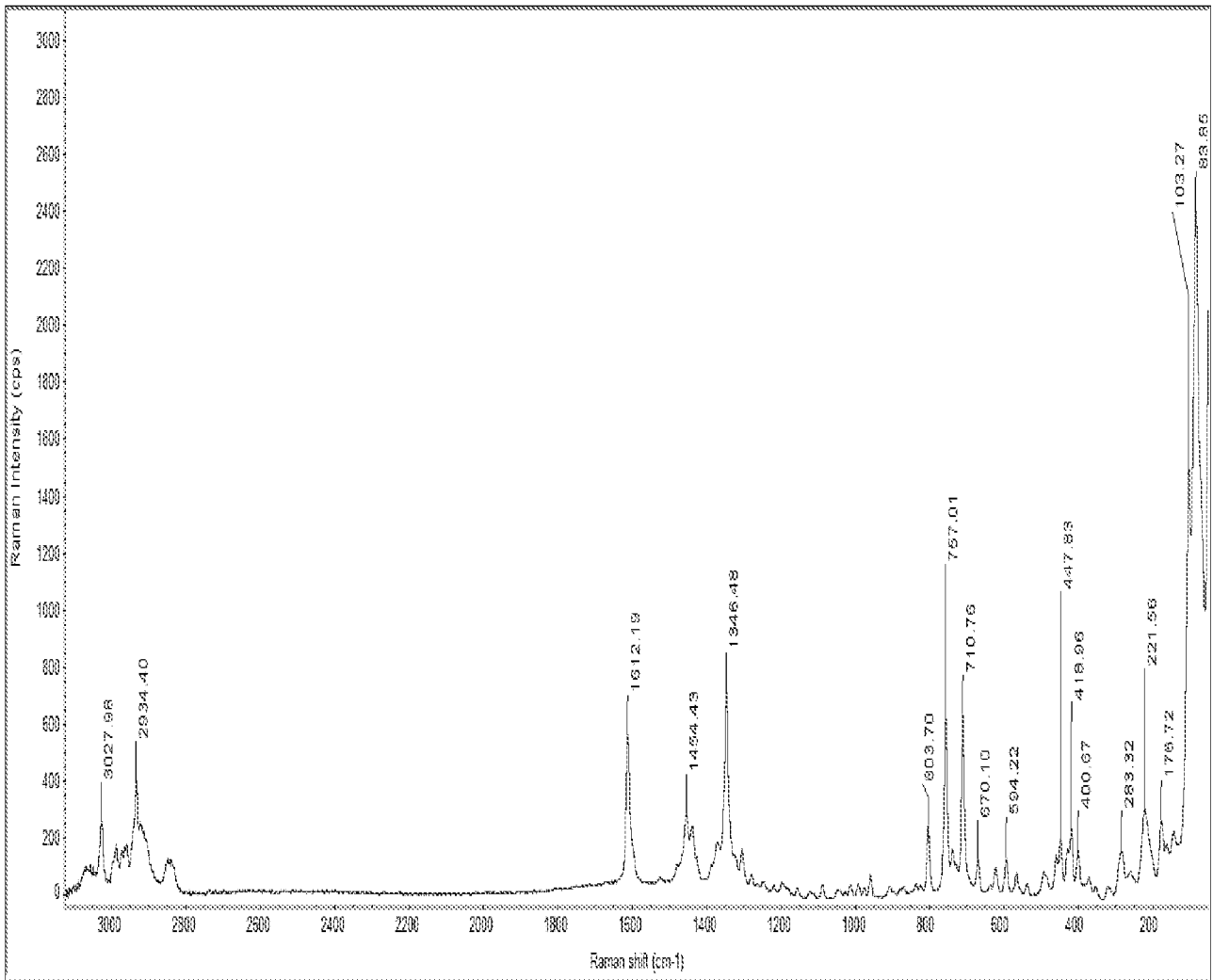


图 7

说明书附图

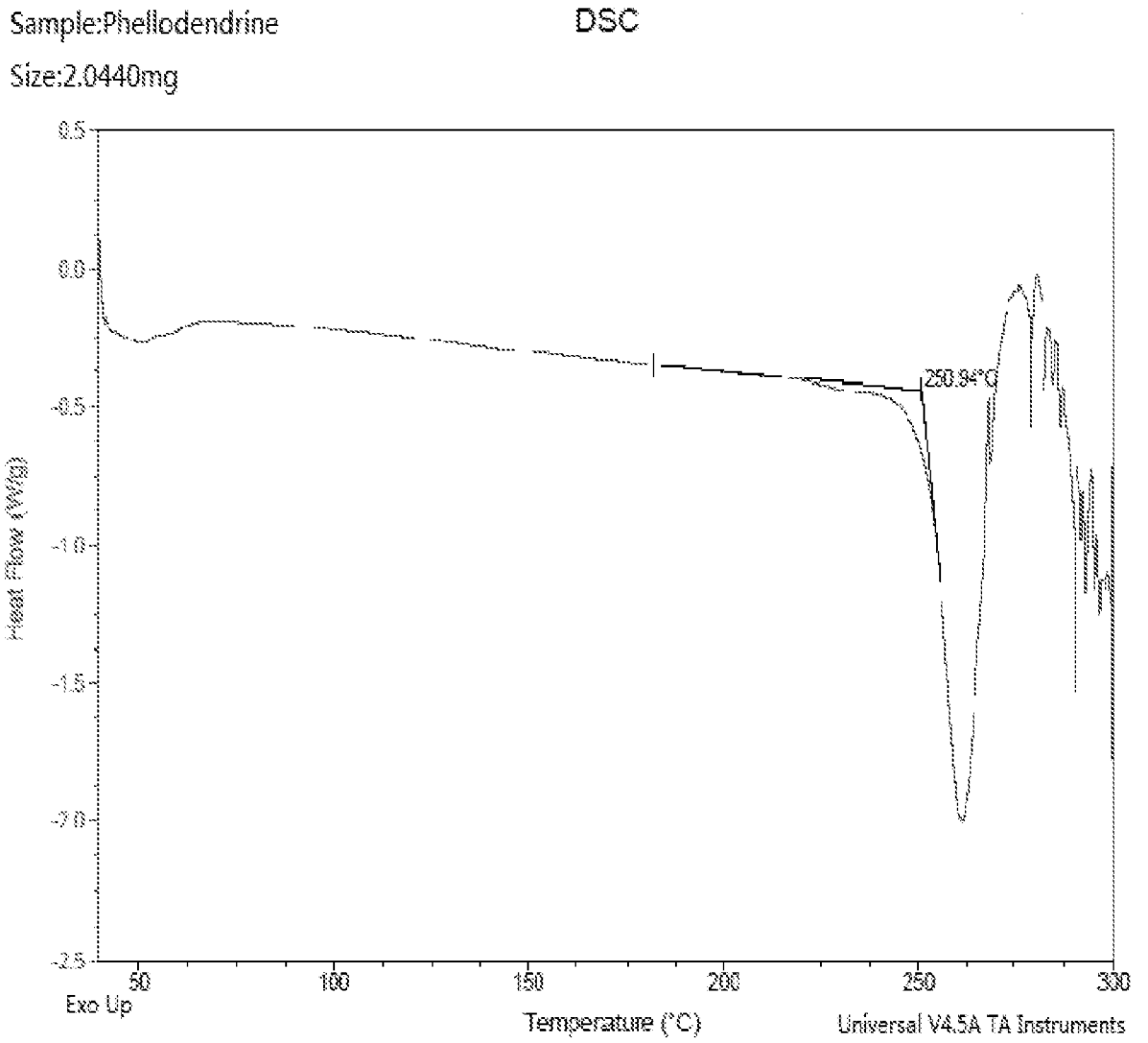


图 8

说明书附图

Sample: Phellodendrine

TGA

Size: 6.3330mg

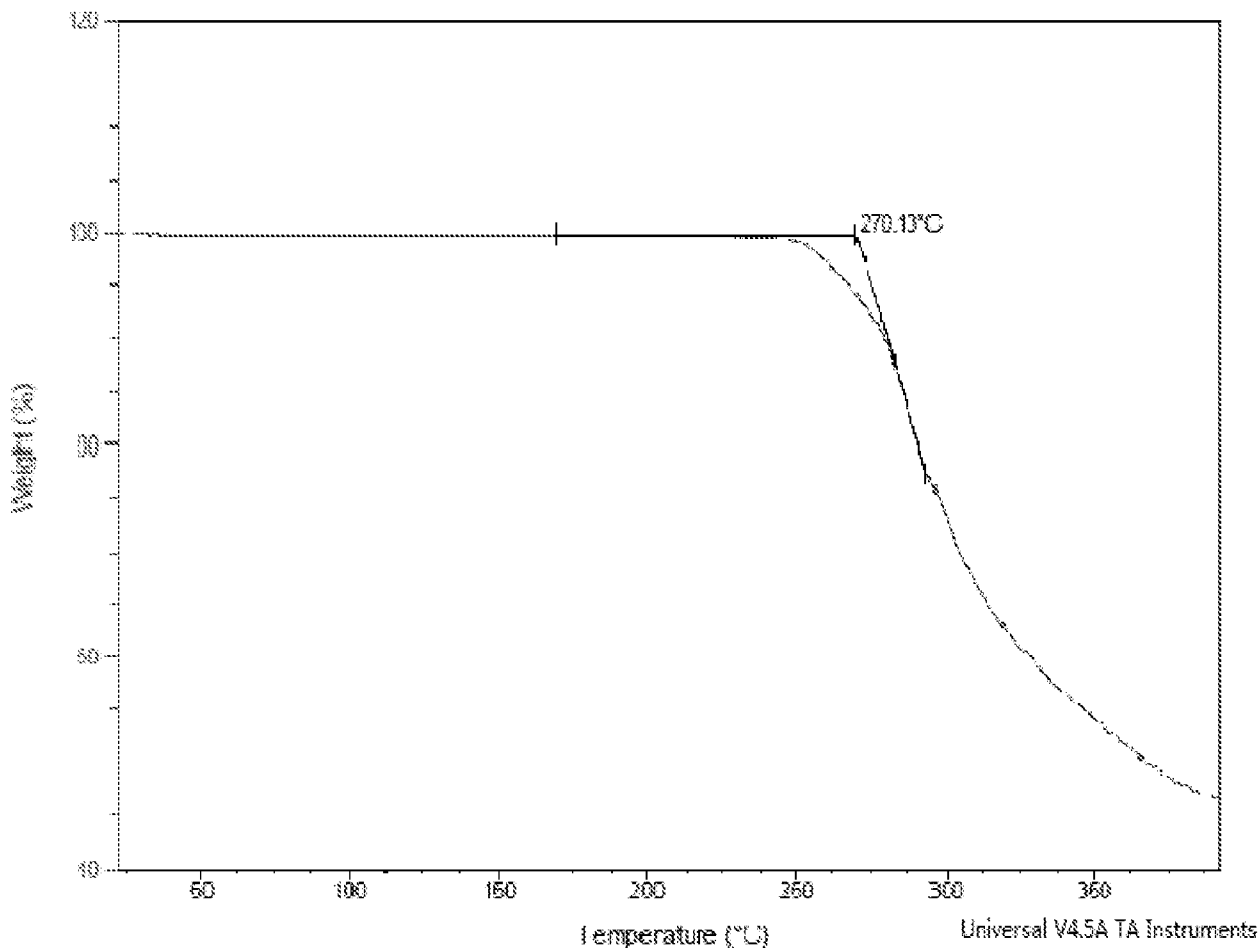


图 9

说明书附图

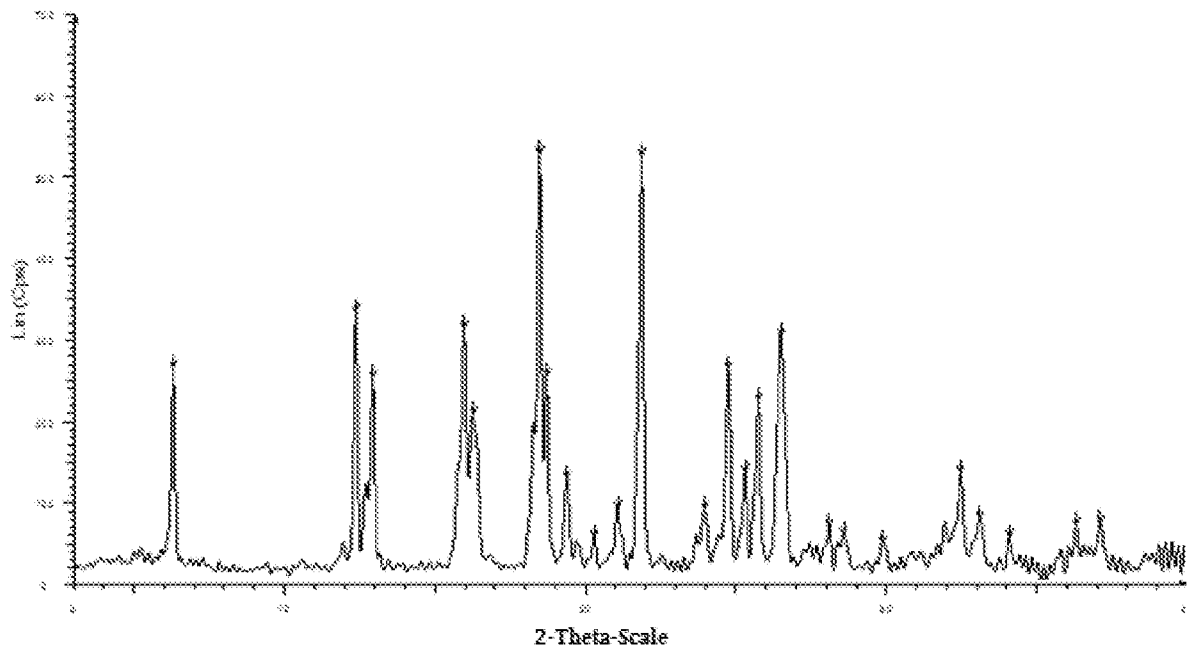


图 10

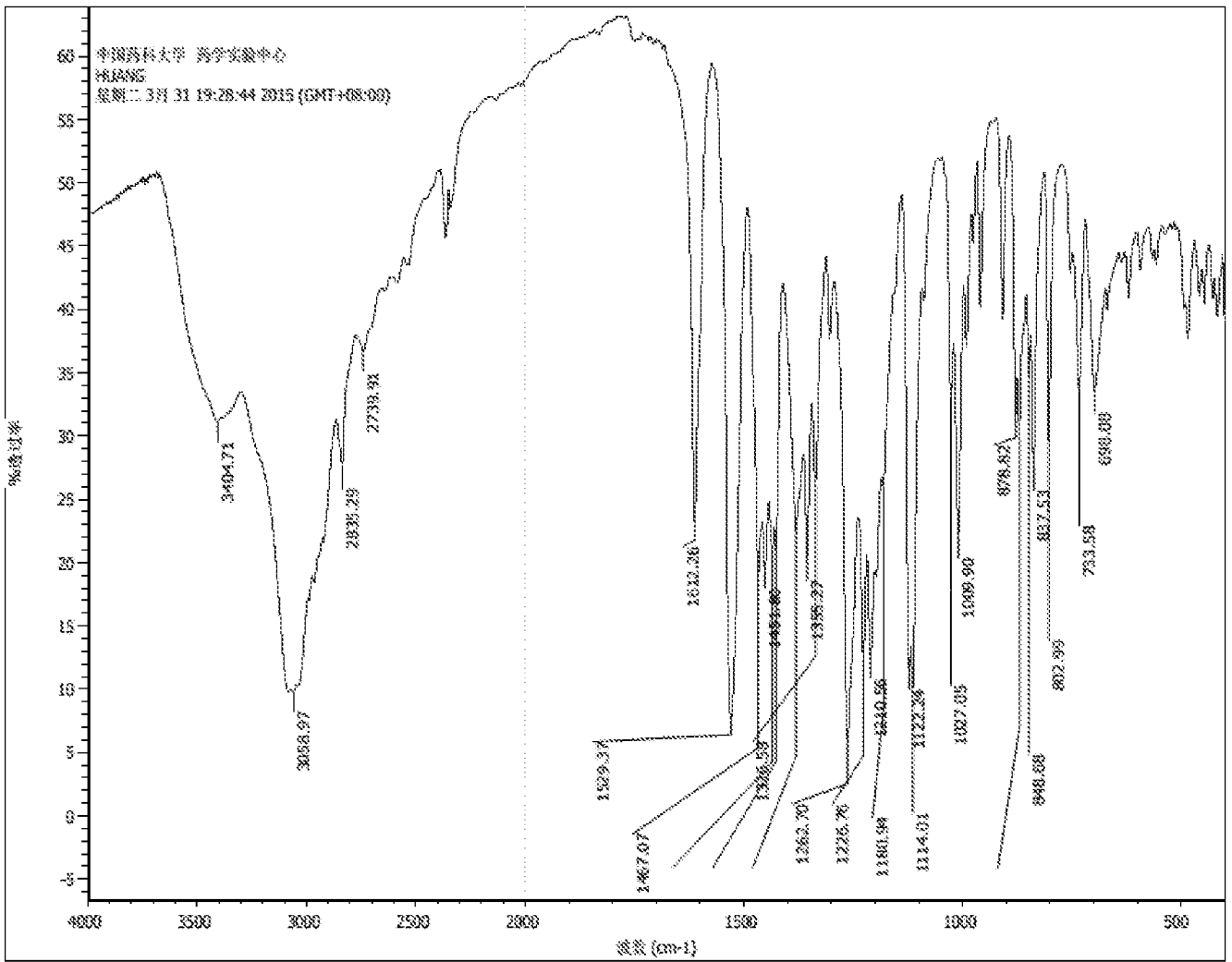


图 11

说明书附图

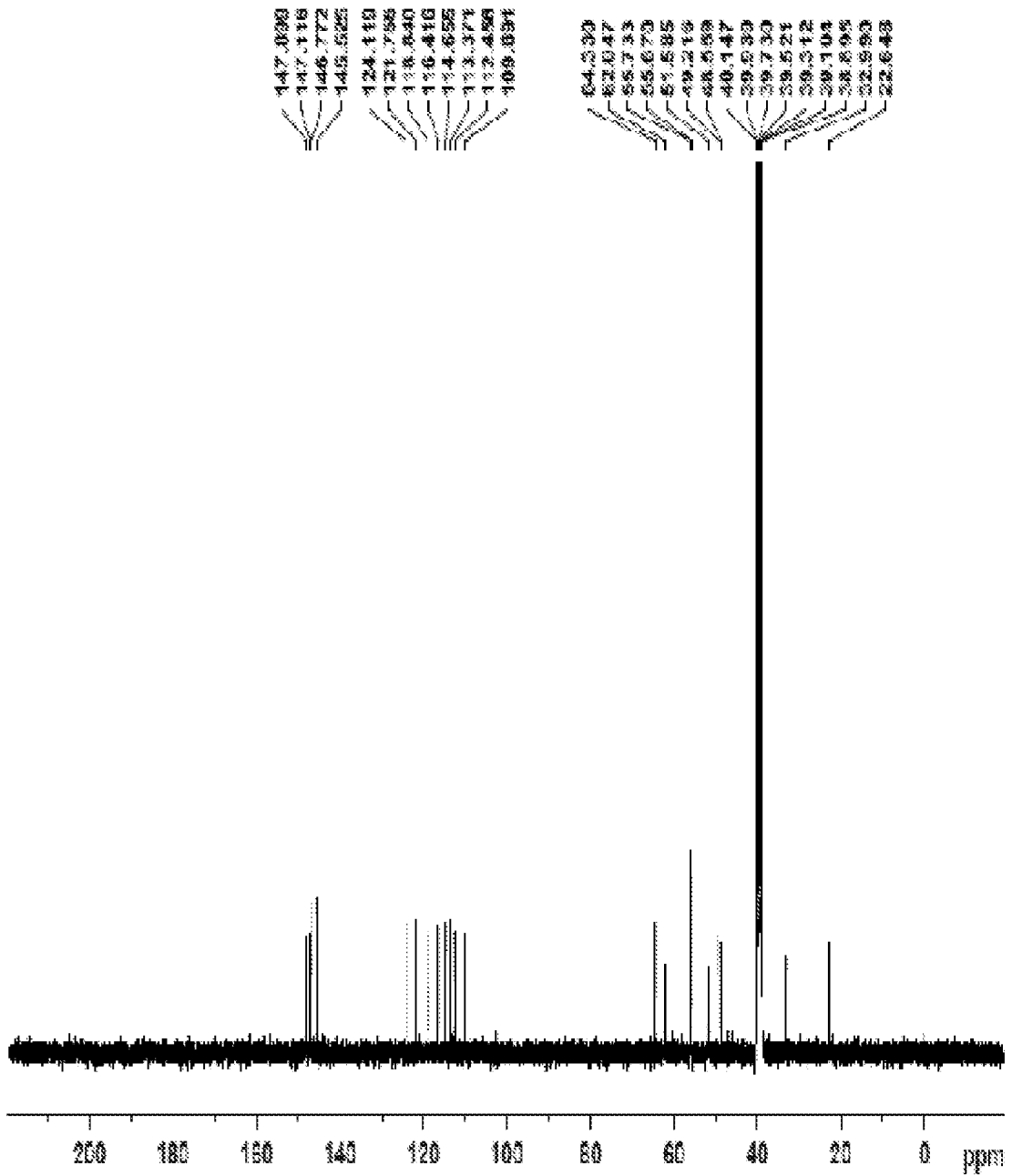


图 12

说明书附图

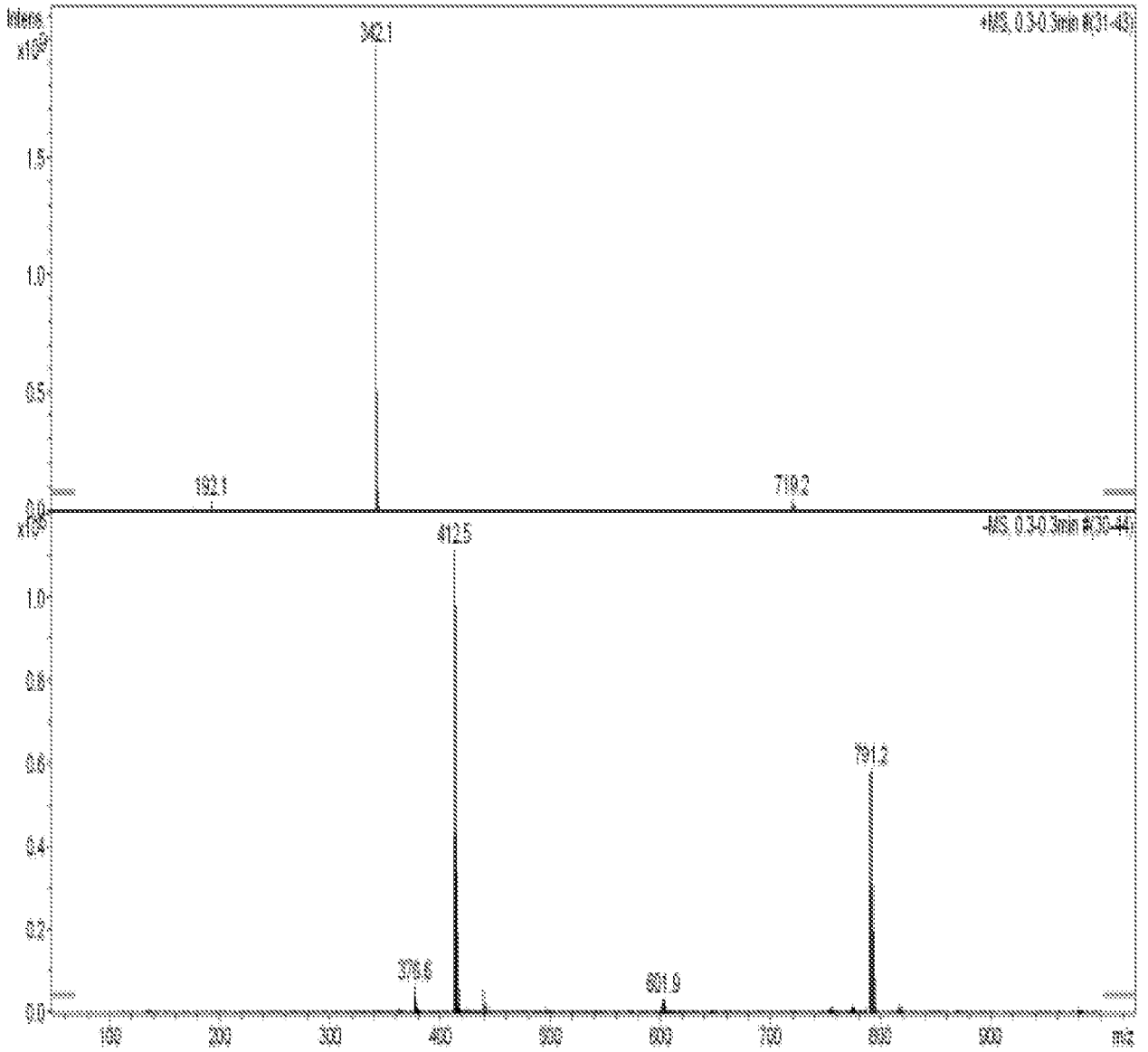


图 14

说明书附图

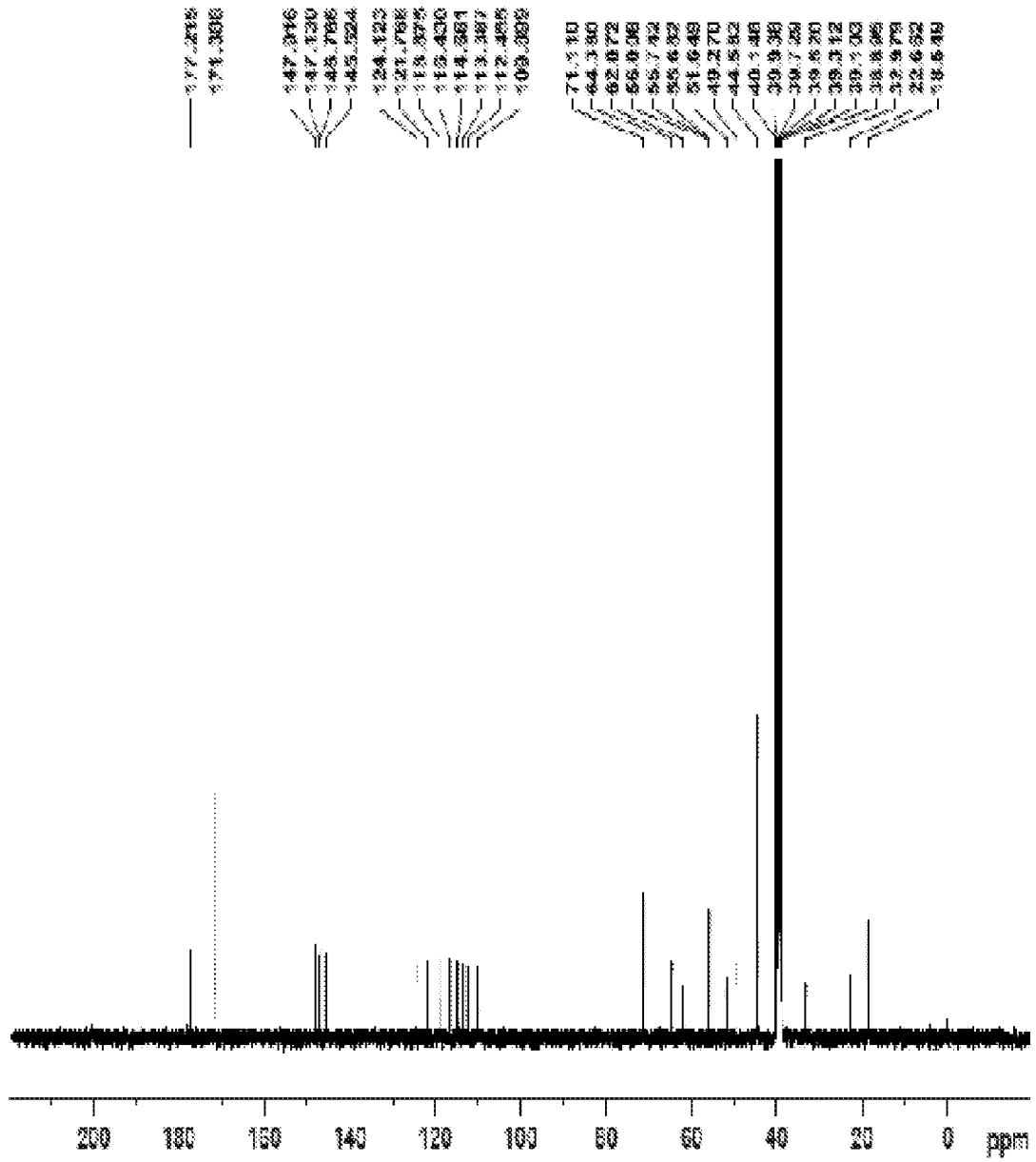


图 15

说明书附图

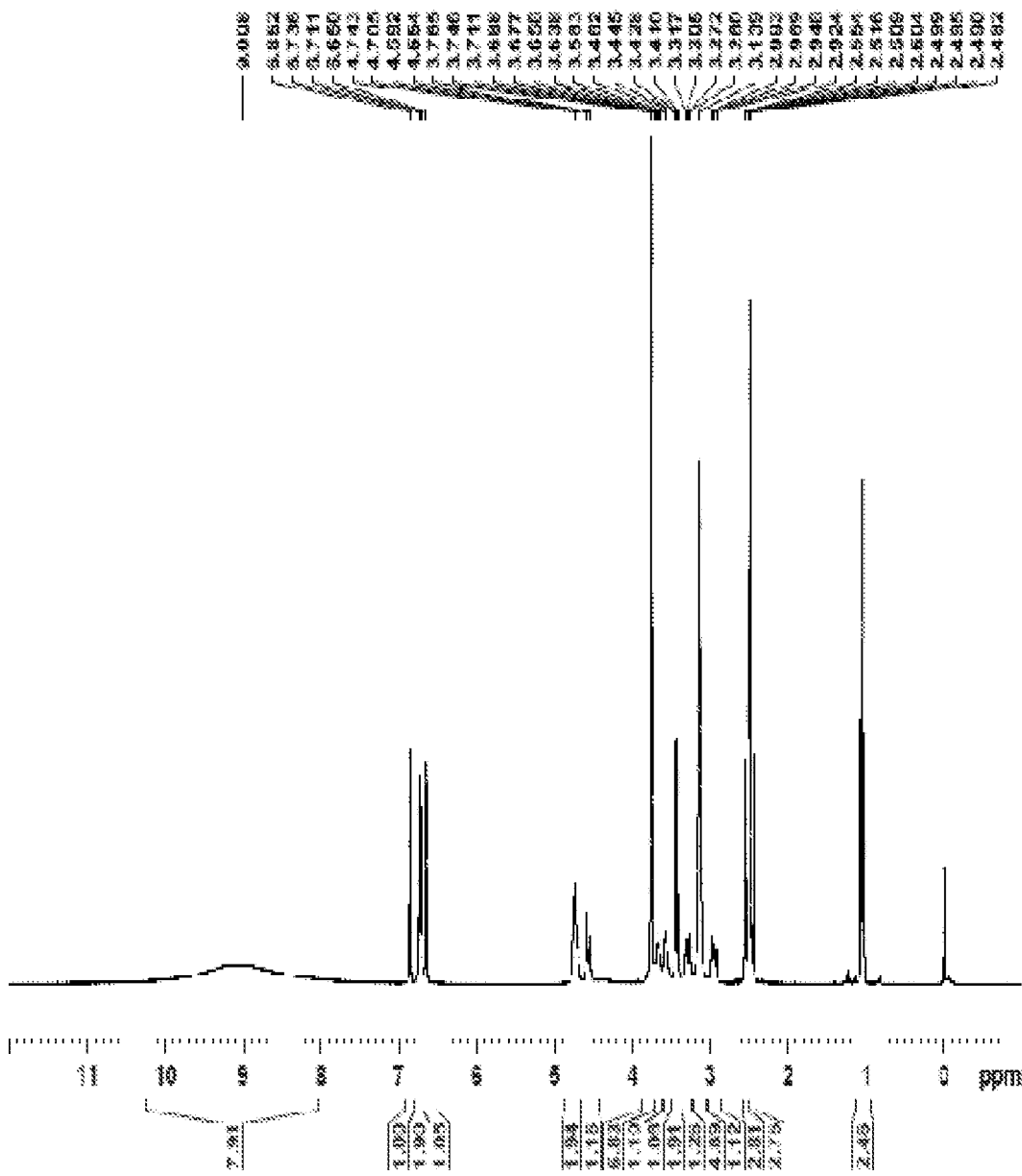


图 16

说明书附图

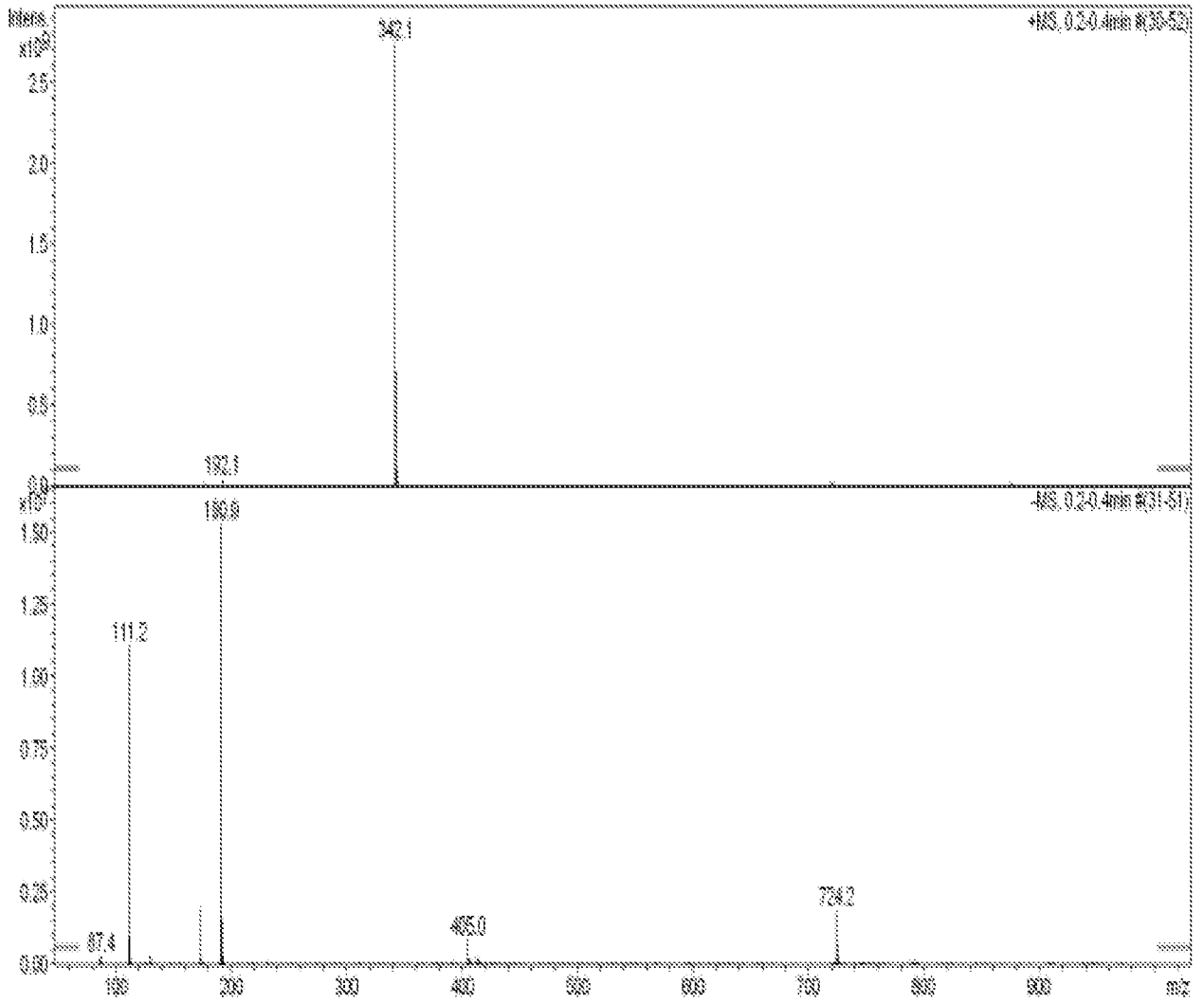


图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/074781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/4375 (2006.01) i; A61P 1/16 (2006.01) i; A61P 3/06 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i; A61P 13/12 (2006.01) i; A61P 5/50 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, REGISTRY, CAPLUS, EMBASE: isoquinoline, phellodendrine, diabetes, diabetic nephropathy, hyperlipoidemia, fatty liver etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101153039 A (CHINESE ACAD SCI SHANGHAI INST MATERIA et al.) 02 April 2008 (02.04.2008) the whole document, especially the abstract, claims 1-5, description pages 5-8, the experimental embodiment 2.	1-10
X	CN 102107006 A (CHIFCON MEDICINE R&D CO., LTD.) 29 June 2011 (29.06.2011) claims 1 and 3.	1, 5, 7-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 23 May 2016	Date of mailing of the international search report 01 June 2016
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer XIAO, Ying Telephone No. (86-10) 62089320

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/074781

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group 1: claims 1, 2, 5, 6 and claims 7-10 (partly) set forth the use of isoquinoline alkaloids in the manufacture of a composition for treating or preventing diabetes, diabetic nephropathy.

Group 2: claims 3, 4 and claims 7-10 (partly) set forth the use of isoquinoline alkaloids in the manufacture of a composition for treating or preventing hyperlipidemia, fatty liver.

The two groups mentioned-above respectively relate to the use of isoquinoline alkaloids in the manufacture of a composition for treating or preventing different diseases. Isoquinoline alkaloid, for example phellodendrine, is a known compound. Therefore the two groups of claims do not have the same or corresponding special technical feature, and are not so linked as to form a single general inventive concept. They lack unity and do not meet the requirements of PCT Rule 13.1, 13.2 and 13.3.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/074781

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101153039 A	02 April 2008	EP 2070926 B1	07 September 2011
		CN 101153039 B	01 December 2010
		WO 2008040192 A1	10 April 2008
		EP 2070926 A4	14 April 2010
		JP 2010504919 A	18 February 2010
		US 2010113494 A1	06 May 2010
		AT 523509 T	15 September 2011
		EP 2070926 A1	17 June 2009
CN 102107006 A	29 June 2011	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/074781

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 31/4375(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; A61P 5/50(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>											
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, REGISTRY, CAPLUS, EMBASE: 异喹啉、黄柏碱、糖尿病、糖尿病肾病、高脂血、脂肪肝、isoquinoline, phellodendrine, diabetes, diabetic nephropathy, hyperlipoidemia, fatty liver等</p>											
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 101153039 A (中国科学院上海药物研究所 等) 2008年 4月 2日 (2008 - 04 - 02) 见全文, 尤其是摘要, 权利要求1-5, 说明书第5-8页, 试验实施例2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102107006 A (奇复康药物研发苏州有限公司) 2011年 6月 29日 (2011 - 06 - 29) 权利要求1、3</td> <td>1、5和7-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 101153039 A (中国科学院上海药物研究所 等) 2008年 4月 2日 (2008 - 04 - 02) 见全文, 尤其是摘要, 权利要求1-5, 说明书第5-8页, 试验实施例2	1-10	X	CN 102107006 A (奇复康药物研发苏州有限公司) 2011年 6月 29日 (2011 - 06 - 29) 权利要求1、3	1、5和7-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
X	CN 101153039 A (中国科学院上海药物研究所 等) 2008年 4月 2日 (2008 - 04 - 02) 见全文, 尤其是摘要, 权利要求1-5, 说明书第5-8页, 试验实施例2	1-10									
X	CN 102107006 A (奇复康药物研发苏州有限公司) 2011年 6月 29日 (2011 - 06 - 29) 权利要求1、3	1、5和7-10									
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>											
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>											
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 5月 23日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 6月 1日</p>										
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>肖瑛</p> <p>电话号码 (86-10)62089320</p>										

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 第1组: 权利要求1、2、5、6和权利要求7-10(部分)请求保护异喹啉生物碱用于制备治疗或预防糖尿病、糖尿病肾病的组合物;
- [2] 第2组: 权利要求3、4和权利要求7-10(部分)请求保护异喹啉生物碱用于制备治疗或预防高脂血症、非酒精性脂肪肝的组合物。
- [3] 以上2组分别涉及异喹啉生物碱用于制备治疗或预防不同疾病的组合物。异喹啉生物碱如黄柏碱是已知化合物。因此, 这2组权利要求之间不具有相同或相应的特定技术特征, 不属于一个总的发明构思, 因而不具备单一性, 不符合专利合作条约实施细则13.1、13.2和13.3的规定。

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求, 具体地说, 是权利要求:
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/074781

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101153039	A	2008年 4月 2日	EP	2070926	B1	2011年 9月 7日
				CN	101153039	B	2010年 12月 1日
				WO	2008040192	A1	2008年 4月 10日
				EP	2070926	A4	2010年 4月 14日
				JP	2010504919	A	2010年 2月 18日
				US	2010113494	A1	2010年 5月 6日
				AT	523509	T	2011年 9月 15日
				EP	2070926	A1	2009年 6月 17日
<hr/>							
CN	102107006	A	2011年 6月 29日	无			
<hr/>							