



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102838485 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 26

(21) 申请号 201110171481. 9

(22) 申请日 2011. 06. 23

(71) 申请人 东莞市岭奥生物科技有限公司
地址 523711 广东省东莞市塘厦镇西湖工业
园二区 8 号

(72) 发明人 李素珍 王金堂

(51) Int. Cl.

C07C 69/732 (2006. 01)

C07C 67/48 (2006. 01)

A61K 31/216 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

A61P 31/20 (2006. 01)

A61P 3/06 (2006. 01)

A61P 39/06 (2006. 01)

A23L 1/29 (2006. 01)

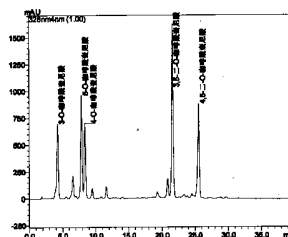
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

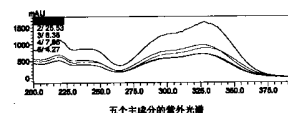
一种大叶冬青提取物

(57) 摘要

本发明涉及一种具药用价值的大叶冬青 (*Ilex latifolia* Thunb) 叶提取物及其制备方法, 该提取物的特征在于, 富含咖啡酰奎尼酸类有效成分, 具有抗氧化、降血脂、抗病毒等活性, 可用于制造防治心脑血管疾病、高脂血症、病毒性肝炎的药品或保健品。



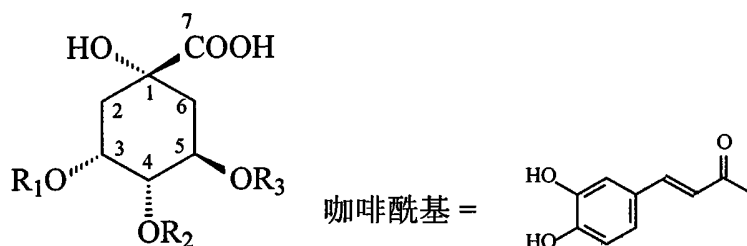
HPLC 色谱



五个主成分的紫外光谱

1. 一种具药用价值的大叶冬青 (*Ilex latifolia* Thunb) 叶提取物, 其特征在于, 含有以咖啡酰奎尼酸类或其钠盐为主的酚酸类成分。

2. 权利要求 1 所述咖啡酰奎尼酸具有如下结构通式:



其中, $R_1 \sim R_3$ 中 1 ~ 2 个取代基是咖啡酰基, 其余为氢; C-3 和 C-5 的绝对构型均为 R。

3. 权利要求 1 和 2 所述咖啡酰奎尼酸, 其中 3,5-二-O-咖啡酰奎尼酸和 4,5-二-O-咖啡酰奎尼酸的含量之和为 5% ~ 95% (重量)。

4. 权利要求 1 和 2 所述咖啡酰奎尼酸, 其中 3,5-二-O-咖啡酰奎尼酸和 4,5-二-O-咖啡酰奎尼酸的含量之和为 40% ~ 95% (重量)。

5. 一种权利要求 1 所述提取物的制备方法, 其特征在于, 包含以下部分或全部顺序操作步骤:

- a. 取大叶冬青叶, 用水、酒精或甲醇回流提取, 滤过, 浓缩, 得浸膏;
 - b. 取浸膏, 加水溶解, 用碱水调 pH 为 6.5 ~ 8.5, 滤过, 滤液再加酸水酸化至 pH 为 1 ~ 4, 过滤, 沉淀用水洗净酸水, 抽干, 得沉淀部分;
 - c. 滤液中溶解的酚性成分通过聚酰胺柱进行吸附, 先用水洗除杂质, 再用 20% ~ 95% (重量) 浓度的酒精将酚性成分洗下, 回收溶剂, 浓缩物并入沉淀部分;
 - d. 沉淀干燥后用烷烃类有机溶剂脱脂;
 - e. 沉淀用有机溶剂提取, 滤过, 浓缩, 得总酚酸精膏;
 - f. 精膏用碱水溶解, 滤过, 浓缩, 干燥, 得总酚酸钠盐。
6. 权利要求 5 中步骤 b 和 f 所述碱水为氢氧化钠、碳酸钠或碳酸氢钠水溶液; 步骤 b 所述酸水为盐酸或硫酸水溶液; 步骤 d 所述烷烃类为石油醚、己烷、环己烷、汽油之一或其混合液; 步骤 e 所用有机溶剂为丙酮、醋酸乙酯、正丁醇、乙醇之一或其混合液, 优选丙酮和醋酸乙酯。

7. 权利要求 1 所述提取物, 单独或与其它药用许可的活性成分和 / 或辅料组合, 在制备防治心脑血管疾病药品或保健品中的应用。

8. 权利要求 1 所述提取物, 单独或与其它药用许可的活性成分和 / 或辅料组合, 在制备治疗肝炎药品或保健品中的应用。

9. 权利要求 1 所述提取物, 单独或与其它药用许可的活性成分和 / 或辅料组合, 在制备调节血脂和 / 或抗氧化类保健品中的应用。

一种大叶冬青提取物

技术领域

[0001] 本发明涉及药用植物提取物领域,具体为一种大叶冬青叶提取物的化学性质、制备方法及其在制备药品、保健品中的应用。

背景技术

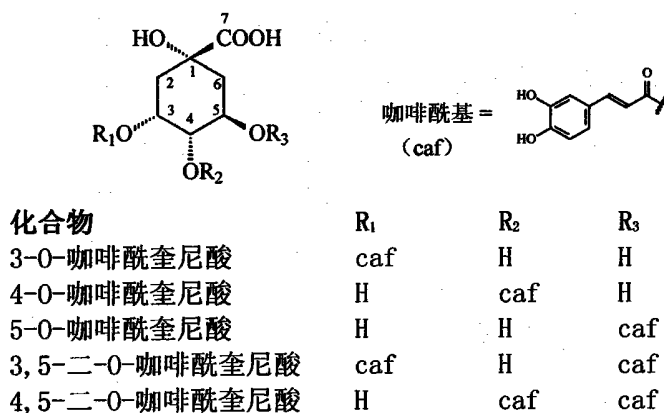
[0002] 大叶冬青 (*Ilex latifolia* Thunb) 为冬青科乔木植物,是我国南方常用的苦丁茶品种之一,古籍《本草拾遗》就有关于本品降脂的记载:“久食令人瘦,去人脂”。过去 30 年来,许多学者对该植物进行了研究(广州中医药大学学报,2008,25(3):277-280;时珍国医国药,2008,19(3):759-762)。药理实验证明,本品水提物具有抗氧化、扩张血管、降血压、降脂等活性。同时,动物实验也显示,本品在高剂量下对肝肾等脏器具有明显的毒性(茶叶科学,2004,24(1):49-52)。该植物成分复杂,已报道的就有皂苷、三萜、甾醇、黄酮、挥发油、脂肪酸、氨基酸、微量元素、维生素等多种类别,究竟哪种或哪些成分是大叶冬青的主要降脂药效物质,现有公开文献尚未给出明确答案。近年来三萜和皂苷类成分比较受重视,有一些发明专利与这些成分有关,如 CN101775061、CN101016328、CN1508149 等。有关该植物的酚性成分结构及其药理活性则鲜见报道。

发明内容

[0003] 本发明的目的之一是阐明大叶冬青的调节血脂活性成分,为合理开发利用该植物资源提供科学依据。发明人通过大量高通量筛选和实验研究,终于确定总酚酸为降血脂和抗氧化活性部位,经色谱分离纯化并应用现代波谱技术测定分子结构,阐明了一系列咖啡酰奎尼酸类成分,其含量高达 2% 以上,从而首次揭示出大叶冬青调节血脂的有效成分理化性质,为提取路线设计和质量控制奠定了坚实的基础。

[0004] 本发明提取物中的咖啡酰奎尼酸类都具有下列结构通式,其中 $R_1 \sim R_3$ 中有 1~2 个为咖啡酰基,其余为氢, C-3 和 C-5 的绝对构型均为 R。具体结构式如下所示。

[0005]



[0006] 这些咖啡酰奎尼酸类成分均为已知天然产物,它们在植物界广泛存在,但以如此高的含量和特定比例存在于大叶冬青,正是本发明意外和有益的重要发现之一。附图 1 为

本发明提取物的典型 HPLC 色谱及其紫外光谱图,反映了该总酚酸化学组成的基本概况,其主要成分都含有咖啡酰共轭基团,所以紫外光谱极为相似。

[0007] 本发明提取物中 3,5-二-O-咖啡酰奎尼酸和 4,5-二-O-咖啡酰奎尼酸是主要有效成分,二者含量因药材产地、品质、提取方法等因素而波动,含量之和一般为 5%~95% (重量)。本发明提取物的化学组成并不仅限于上述咖啡酰奎尼酸,发明人发现,天然的咖啡酰奎尼酸类 C-7 羧基都是游离的,但在提取分离过程中因接触醇类溶剂,如乙醇、甲醇,可导致少量酯化产物形成,这类次生产物在总酚酸提取物中通常很少,生物活性与酯化前也类似。发明人还发现,酚酸中含有微量黄酮类成分,为槲皮素及其苷类,如芦丁。另外,如附图所示,提取物中还有若干微量成分有待进一步阐明。

[0008] 本发明的目的之二是提供一种大叶冬青总酚酸有效部位的制备方法。发明人基于对该植物化学成分的全面认识,利用咖啡酰奎尼酸类与皂苷、糖类、色素、三萜等其它成分的理化性质差异,摸索出一条独特的制备路线,如附图 2 所示,简单易行,适于工业生产,其特征在于部分或全部含有以下顺序操作步骤:

[0009] a. 取大叶冬青叶,粉碎,用水、酒精或甲醇回流提取,滤过,浓缩,得浸膏;

[0010] b. 取浸膏,加水溶解,用碱水调 pH6.5~8.5,滤过,滤液再加酸水酸化至 pH1~4,过滤,沉淀用水洗净酸水,抽干,得沉淀部分;

[0011] c. 滤液中溶解的酚性成分通过聚酰胺柱进行吸附,先用水洗除杂质,再用 20%~95% (重量) 浓度的酒精将酚性成分洗下,回收溶剂,浓缩物并入沉淀部分;

[0012] d. 沉淀干燥后用烷烃类有机溶剂脱脂;

[0013] e. 沉淀用有机溶剂提取,滤过,浓缩,得精膏(游离总酚酸);

[0014] f. 精膏用碱水溶解,滤过,浓缩,干燥,得总酚酸钠盐。

[0015] 步骤 a 所用溶剂,优选浓度为 20%~95% (重量) 的酒精;步骤 b 和 f 所用碱水为无机碱的水溶液,优选含钠离子的碱,如氢氧化钠、碳酸钠或碳酸氢钠水溶液;所用酸水为无机酸水溶液,如硫酸或盐酸的水溶液;脱脂所用烷烃类溶剂为石油醚、汽油、己烷、环己烷之一或混合物,优选石油醚。步骤 e 所用有机溶剂为醋酸乙酯、丙酮、正丁醇、乙醇之一或其混合溶剂,优选丙酮和醋酸乙酯,再优选丙酮。

[0016] 上述步骤 b~f 可选择性重复操作,以达到进一步精制纯化的目的。步骤 c 所述之聚酰胺柱吸附,可重复用于总酚酸的纯化,特别是富集二咖啡酰奎尼酸类。非酚性成分和单咖啡酰奎尼酸类通常用水或浓度在 10% 以下的稀酒精可优先洗脱下来,而二咖啡酰奎尼酸被聚酰胺吸附得更牢,一般使用浓度在 20% 以上的酒精洗脱。所得酚酸不含溶血性的皂苷,二咖啡酰奎尼酸含量高,3,5-和 4,5-二-O-咖啡酰奎尼酸含量之和可达 40%~95% (重量),质量易于控制,安全性好,适于作为注射剂原料药。

[0017] 本发明目的之三是提供上述提取物的医药用途。在确定总酚酸是大叶冬青的降血脂有效部位后,发明人尝试对其进行了更多的药效试验,惊奇地发现,该提取物对缺血性心脑血管疾病显示出优异的治疗效果,具有高效低毒的明显特征,并且在治疗病毒性肝炎和清除自由基、抗氧化方面也有不凡表现。下面提供本发明提取物的部分药理实验结果。

[0018] 1. 对局灶性脑缺血的影响

[0019] 大鼠静脉输注提取物(总酚酸盐),观察本品对三氯化铁所致脑缺血大鼠的行为及梗塞面积的影响,结果显示,大鼠输注提取物 2、4、8mg/kg 后,动物行为变化及梗塞范围

与生理盐水对照组比较有明显改善,24h后行为评分分别降低了46.2% ($p < 0.01$)、60.1% ($p < 0.001$)、50.8% ($p < 0.001$);脑梗塞面积平均缩小了20.2% ($p > 0.05$)、50.5% ($p < 0.001$)、41.4% ($p < 0.01$)。

[0020] 2. 对微循环障碍大鼠软脑膜局部血流量的影响

[0021] 静脉输注提取物(总酚酸盐),观察本品对高分子右旋糖苷所致大鼠微循环障碍的影响。结果表明,假手术大鼠软脑膜局部流量60min内无明显改变;静脉推注高分子右旋糖苷后大鼠脑软膜局部流量明显减少,60min内最大下降 23.5 ± 6.2 PU;静注提取物2、4、8mg/kg组于给药后10min,大鼠脑软膜流量降低值即明显少于溶剂对照组,作用持续60min以上,60min内最大下降分别为 18.1 ± 7.5 、 18.1 ± 5.5 、 13.4 ± 5.5 PU,与溶剂对照组最大下降值比较, p 分别 > 0.05 、 < 0.05 、 < 0.001 ,说明给予提取物可缓解静注高分子右旋糖苷导致微循环流量的减少。

[0022] 3. 对微循环障碍大鼠血粘度的影响

[0023] 前一实验结束后,从大鼠腹主动脉取血,按体积1:9比例将3.8%枸橼酸钠加入全血中抗凝,用锥板型血液粘度计在不同切速下($7.5 \sim 150s^{-1}$)测定大鼠全血粘度。结果表明,与假手术组比较,造型组大鼠在静脉推注高分子右旋糖苷后在不同切速下血粘度均明显高于正常大鼠。给予提取物(总酚酸盐)2mg/kg后在各切速下大鼠血粘度与模型对照组无明显差别;给予4mg/kg后在低切速($7.5s^{-1}$)时血粘度明显低于模型对照组($p < 0.05$);给予8mg/kg后在各切速下大鼠血粘度均明显低于模型对照组。

[0024] 4. 对大鼠实验性动脉血栓形成的影响

[0025] 取Wistar大鼠,按体重随机分组,每组10只。对照组大鼠静脉注射生理盐水;给药组静注提取物(总酚酸盐)2、4、8mg/kg,给药体积均为0.1ml/100g。实验时腹腔注射20%乌拉坦1g/kg麻醉,仰卧位固定,分离颈总动脉,将实验性体内血栓形成仪的刺激电极和温度探头挂于颈总动脉上,给药后10min开始刺激,刺激强度为2mA,刺激5min后关闭刺激开关,取下电极,3min后调节温控表至零位,记录动脉血栓形成时间。结果表明,大鼠静注提取物2、4、8mg/kg后,与对照组比较,动脉血栓形成时间分别推迟9% ($p > 0.05$)、63% ($p < 0.001$)、108% ($p < 0.001$),表明提取物中、高剂量能明显推迟大鼠实验性动脉血栓形成时间。

[0026] 5. 抗血小板聚集作用

[0027] 取Wistar大鼠,按体重随机分组,每组10只。对照组大鼠静注生理盐水,给药组分别静注提取物(总酚酸盐)2、4、8mg/kg,给药体积均为0.1ml/100g。实验时腹腔注射20%乌拉坦1g/kg麻醉,仰卧位固定,腹主动脉取血,3.8%枸橼酸钠与全血按1:9混合抗凝,1000rpm离心7min制备富血小板血浆,3000rpm离心10min制备贫血小板血浆,应用PPP自动平衡血小板聚集仪,将各诱导剂诱导的生理盐水组血小板聚集百分数调至60%左右,诱导剂ADP、花生四烯酸(AA)、胶原终浓度分别为 $4\mu mol/L$ 、 $2mmol/L$ 、 $20mg/ml$ 。观察对给药组大鼠血小板聚集作用的影响。结果见表1。

[0028] 表1 本发明提取物对大鼠血小板聚集功能的影响($\bar{X} \pm SD$, $n = 10$)

[0029]

药物	剂量 (mg/kg)	鼠数 (只)	血小板聚集百分率 (%)		
			ADP	花生四烯酸	胶原
溶剂对照	—	10	55.1±18.1	72.8±10.0	49.7±20.0
提取物	2	10	39.3±17.7	69.4±7.6	41.8±16.6
提取物	4	10	37.2±14.5*	62.1±18.8	39.4±18.8
提取物	8	10	36.1±20.0**	51.9±17.7*	26.2±18.0*

[0030] 注：与对照组比较，*p < 0.05；**p < 0.01

[0031] 6. 急性毒性试验

[0032] 取体重 18 ~ 22g 昆明种小鼠雌、雄各 50 只，按性别、体重分别随机分成各 5 组，每组 10 只，静脉推注提取物（总酚酸盐）2070、1863、1677、1509、1358mg/kg，相邻两剂量组剂距为 0.9，静注体积均为 0.1ml/10g 体重，观察给药后一周内小鼠的毒性反应、死亡分布和死亡动物数，并按 Bliss 法计算 LD₅₀ 及其 95% 可信限。结果表明，高剂量静脉注射提取物后小鼠 1min 左右出现自主活动减少，静卧，呼吸急促，继而出现行为失调，惊厥，5 ~ 20min 左右死亡。未死动物在 30min 后呼吸逐渐恢复正常，1h 后行为等均恢复正常，以后 6 日内均不再出现死亡。死亡小鼠肉眼尸检心、肺、肝等主要脏器未见异常。雌性小鼠 LD₅₀ 为 1676.75(1566.02 ~ 1795.30)mg/kg；雄性小鼠 LD₅₀ 为 1740.76(1617.87 ~ 1872.99)mg/kg，雌雄动物 LD₅₀ 近似，无明显差异。

[0033] 7. 对犬心肌缺血的治疗作用及血流动力学影响

[0034] 静脉输注提取物（总酚酸盐）2、4mg/kg，明显改善结扎犬冠状动脉前降支所致实验性急性心肌缺血程度，缩小心肌梗塞范围。麻醉开胸犬心脏血流动力学试验结果表明，输注组合物 1、2mg/kg 对血流动力学各指标无明显影响；4mg/kg 可降低血压、左室内压最大变化速率、左室做功及冠脉阻力，对心率、左室舒张末期压、总外周阻力、心脏泵血功能等其它血流动力学参数无影响，表明提取物通过减轻心脏后负荷，扩张冠脉及外周血管，减少回心血量及心脏做功发挥抗心肌缺血作用。

[0035] 8. 对高脂血症大鼠血清脂质水平的影响

[0036] 选用 SD 大鼠（180 ~ 200g）80 只，雌雄各半，喂养基础饲料 5d，测血清总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）正常值，然后随机分成五组，即高脂血症模型组，氯贝丁酯组（阳性对照组）和提取物高、中、低剂量组，给予高脂饲料喂养。高脂饲料配方：79% 基础饲料，1% 胆固醇，10% 蛋黄粉，10% 猪油。连续高脂饲料喂养 10d，取血测定 TC 值，证明均已形成高脂血症，各组选择 10 只继续高脂饲料喂养，并分别给予相应药物（NS 混悬液，10ml/kg），模型组给予等容积 NS，均灌胃给予。每日 1 次，于 14d 及 28d 分别从眼眶静脉丛取血，按酶试剂终点法测 TC、TG，所得实验数据用 POMS-05（随机方差分析）软件统计处理，用 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果见表 2。

[0037] 表 2. 本发明提取物对高血脂大鼠 TC 和 TG 的影响（ $\bar{x} \pm s$, n = 10）

[0038]

组别	药物剂量 mg/kg	TC 值 (mg/dl)		TG 值 (mg/dl)	
		14d	28d	14d	28d
高血脂模型组	NS(10ml/kg)	163±42	186±2	191±54	168±35
氯贝丁酯组	30	155±32**	151±25**	147±25**	148±18**
提取物组（低）	20	158±42*	155±65*	160±23**	156±35**
提取物组（中）	40	144±21**	142±14**	145±32**	140±12**
提取物组（高）	60	135±24**	132±23**	136±33**	133±11**

[0039] 注：与高血脂模型组比较，*p < 0.05，**p < 0.01。

[0040] 数据表明，提取物高、中、低剂量均可明显降低高血脂大鼠血清 TC 及 TG 水平，呈量效关系，且在中、高剂量条件下，作用明显强于阳性药对照组。

[0041] 9. 腹腔注射及口服给药在鸭体内对鸭乙型肝炎病毒感染的治疗效果

[0042] 实验采用一日龄北京鸭，经腿胫静脉注射鸭乙型肝炎病毒，7 天后开始给鸭腹腔注射及口服提取物 3 个剂量组，腹腔注射为 10、20、30mg/kg，口服给药为 30、60、120mg/kg，1 天 2 次，给药 10 天，观察药物对鸭的毒性和鸭血清鸭乙型肝炎病毒 DNA 的影响，并与阿昔洛韦比较。实验表明：口服大剂量组 120mg/kg，1 天 2 次 10 天，无毒性。腹腔注射给药 30mg/kg 组，按配对统计，给药后第 10 天和停药后 3 天治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著下降和显著下降 (P < 0.01-0.05)；按成组统计与各自对照组比较，给药后第 10 天和停药后 3 天，能非常显著和显著地降低 DHBV 感染鸭血清 DHBV-DNA 水平 (P < 0.01-0.05)。口服给药 60mg/kg，按配对统计，停药后 3 天治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有显著效果 (P < 0.05)；成组统计，给药后第 10 天和停药后 3 天治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有显著下降 (P < 0.05)。口服 120mg/kg 给药后第 5 天、第 10 天和停药后 3 天按配对统计，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有显著和非常显著下降 (P < 0.05-0.01)；成组统计处理，给药后第 5 天、第 10 天和停药后 3 天治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著和显著下降 (P < 0.01-0.05)。阿昔洛韦对照有显著效果，说明实验可信。结论：提取物腹腔注射给药 30mg/kg；口服给药 60-120mg/kg 对鸭乙型肝炎病毒感染有效。

[0043] 10. 对大鼠血清 MDA 含量和 SOD 活性的影响

[0044] 取雄性 20 月龄 Wistar 大鼠 40 只，体重 400 ~ 500g，随机分成四组：对照组（喂基础饲料），提取物大、中、小剂量组（喂基础饲料加提取物 60、40、20mg · kg⁻¹ · d⁻¹）。连续喂养 4w，于实验第 29 天，禁食 12h，股动脉采血测血清丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 值。用 SPSS10.0 软件分析，组间比较用 t 检验，结果见表 3。

[0045] 表 3. 本发明提取物对大鼠血清 MDA 含量和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

[0046]

组别	MDA (nmol/ml)	SOD (NU/ml)
对照组	8.92±0.56	181.45±7.15
提取物（大）	3.44±0.40*	194.58±8.55*
提取物（中）	4.26±0.24*	190.36±8.82*
提取物（小）	4.63±0.48*	187.76±9.04**

[0047] 与对照组比较： $*p < 0.01$ ； $**p < 0.05$ 。

[0048] 结果表明，本发明提取物能降低老龄大鼠血清MDA含量，升高老龄大鼠血清SOD活性，与对照组比较有显著差异。

[0049] 11. 抗氧化活性测定

[0050] 采用DPPH·氧化法，向3ml 25ug/mL的1,1-二苯-2-苦味酰基(DPPH·)溶液中加入150ul试样(空白对照用等量甲醇代替)，总体积3.15ml，混匀，于37℃放置30分钟后，用E-722型可见分光光度计在520nm处测其吸光值。提取物试样为1mg/ml、2mg/ml、4mg/ml、6mg/ml和8mg/ml甲醇溶液，以2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)为阳性对照。样品对DPPH·的清除率 = $[\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}] / \text{OD}_{\text{blank}} \times 100\%$ 。式中， OD_{blank} : DPPH·与溶剂混合液的吸光度， $\text{OD}_{\text{sample}}$: DPPH·与样品反应后的吸光度。结果显示，提取物试样对DPPH·有极强的清除能力，其 IC_{50} 为2.3mg/ml，比BHT(IC_{50} 4.2mg/ml)活性更强。

[0051] 本发明另一目的是提供大叶冬青提取物在制备药物、保健品、化妆品中的应用，包括单独或与其它药用许可的活性成分组合，配以适当的药用辅料或药学上许可的载体，应用当前公知的制剂工艺方法，制成各种口服或非肠道给药剂型，如片剂、硬胶囊、滴丸、口服液、颗粒剂、注射液、冻干粉针等。

附图说明

[0052] 图1本发明提取物的典型HPLC色谱和紫外光谱图，色谱条件：色谱柱VP-ODS，150L×4.6mm；流动相MeOH-0.1%TFA梯度洗脱(时间：0min→40min；MeOH：20%→60%，0.1%TFA：80%→40%)；波长328nm；流速1ml/min。

[0053] 图2本发明提取物的制备方法流程图

具体实施方式

[0054] 下面以更具体的实施例对本发明提取物制备方法及其在制备各类制剂中的应用加以说明，但本发明内容不局限于此。

[0055] 实施例1：大叶冬青总酚酸的制备

[0056] 取大叶冬青叶1kg，粉碎成粗粉，加入95%酒精回流提取3次，合并提取液，减压浓缩，得醇浸膏210g。浸膏用1.5L纯化水搅拌溶解，滴加稀氢氧化钠调pH值7左右，离心，滤过，滤液用5%盐酸酸化至pH2，静置2小时，过滤，沉淀用水洗至流出液pH5左右，抽干，得沉淀约98g。将滤液加至聚酰胺(30～60目)吸附柱内，先用水洗脱，至流出液颜色变浅且酸性降至pH5左右时，改用80%酒精洗脱，收集酒精洗脱液，减压浓缩，得膏状物约8g，并入沉淀部分。沉淀干燥后用石油醚回流脱脂3次，过滤，挥干，再用丙酮回流提取4次，合并提取液，回收溶剂，得总酚酸62g。其3,5-和4,5-二-O-咖啡酰奎尼酸含量之和为40%(重量)，味淡不苦，可作为各种口服和外用制剂的原料。

[0057] 实施例2：大叶冬青总酚酸的制备

[0058] 取大叶冬青叶1kg，粉碎成粗粉，加水煎煮3次，合并提取液，减压浓缩，得浸膏220g。浸膏用1.5L水搅拌溶解，加5%碳酸钠调pH值7左右，离心，滤过，滤液用5%硫酸酸化至pH2，静置2小时，过滤，沉淀用水洗至流出液pH5左右，抽干，得沉淀约88g。将滤液加至聚酰胺(30～60目)吸附柱内，先用水洗脱，至流出液颜色变浅且酸性降至pH5左右

时,改用 60%酒精洗脱,收集酒精洗脱液,减压浓缩,得膏状物约 8g,并入沉淀部分。沉淀干燥后用己烷回流脱脂 3 次,过滤,挥干,再用醋酸乙酯回流提取 4 次,合并提取液,回收溶剂,得总酚酸 55g。其 3,5- 和 4,5- 二 -O- 咖啡酰奎尼酸含量之和约为 41%,可作为各种口服和外用制剂的原料。

[0059] 实施例 3:大叶冬青总酚酸盐的制备

[0060] 取实施例 1 或 2 所得总酚酸 20g,缓慢分次加入 5%氢氧化钠适量,搅拌下使充分溶解,控制溶液 pH7 ~ 8,滤过,喷雾干燥,得总酚酸盐 18g。本品水溶性好,可作为各种固体和液体制剂的原料。

[0061] 实施例 4:注射用大叶冬青总酚酸盐的制备

[0062] 取实施例 1 或 2 所得总酚酸 30g,加入 100ml 95%酒精使溶解,拌入适量聚酰胺,晾干,加至聚酰胺柱内,先用水洗,然后用 5%酒精洗,再用 80%酒精洗,收集 80%酒精洗脱液,减压浓缩,得膏状物 18g;继续用丙酮回流提取 4 次,合并提取液,回收溶剂,所得膏状物用适量 5%碳酸钠溶解,控制溶液 pH7 ~ 8,超滤,减压浓缩,喷雾干燥,得棕黄色粉末 15g。其 3,5- 和 4,5- 二 -O- 咖啡酰奎尼酸含量之和约为 83% (重量),不含皂苷,水溶性好,可作为注射剂原料。

[0063] 实施例 5:片剂制备

[0064] 取本发明总酚酸提取物 20g,与淀粉 100g、糊精 5g 混匀,加入 10%淀粉浆制软材,用 14 目尼龙筛网制粒,60 ~ 70℃通风干燥,16 目筛整粒,加硬脂酸镁 1.5g、羧甲基纤维素钠 5g,混匀,压制成 1000 片,包衣,即得,每片含提取物 20mg。给药剂量和次数根据临床有效性而定。

[0065] 实施例 6:胶囊制备

[0066] 取本发明总酚酸提取物 20g,与淀粉 120g、硬脂酸镁 2g 混匀,直接用全自动胶囊填充机填充成 1000 粒,抛光,即得,每粒含提取物 20mg。给药剂量和次数根据临床有效性而定。

[0067] 实施例 7:滴丸制备

[0068] 取本发明总酚酸提取物 12g,投入 32g 加热熔融的聚乙二醇 6000 中,搅拌至溶解,转移至贮液瓶中,密闭并保温在 80 ~ 90℃,调节滴丸机液滴定量阀门,由上往下滴入 10 ~ 15℃的液状石蜡中,共制 1000 粒,将形成的滴丸沥干并擦除液状石蜡,干燥即得,每粒含提取物 12mg。给药剂量和次数根据临床有效性而定。

[0069] 实施例 8:口服液制备

[0070] 取本发明总酚酸盐提取物 20g,与蜂蜜 400g、蔗糖 100g、苯甲酸钠 6g 及蒸馏水 2000ml 混合,加热至 85 ~ 90℃,搅拌使溶解,保温 30min,滤过,滤液加水稀释至 10000ml,搅匀,灌封 (每支 10ml),灭菌,即得。

[0071] 实施例 9:颗粒剂制备

[0072] 取本发明总酚酸提取物 4g、糊精 16g、蔗糖粉 230g 及乙醇适量,混匀,过 10 目筛制成颗粒,于 60 ~ 70℃干燥,整粒,分装,即得,每包重 2.5g。

[0073] 实施例 10:注射液制备

[0074] 取本发明总酚酸盐 50g,加注射用水适量使溶解,加配制量的 0.02%活性炭搅拌 5 ~ 10 分钟,滤过,滤液稀释至 10L 左右,加氯化钠调节渗透压至等渗,调 pH 7.5 ~ 8.0,滤

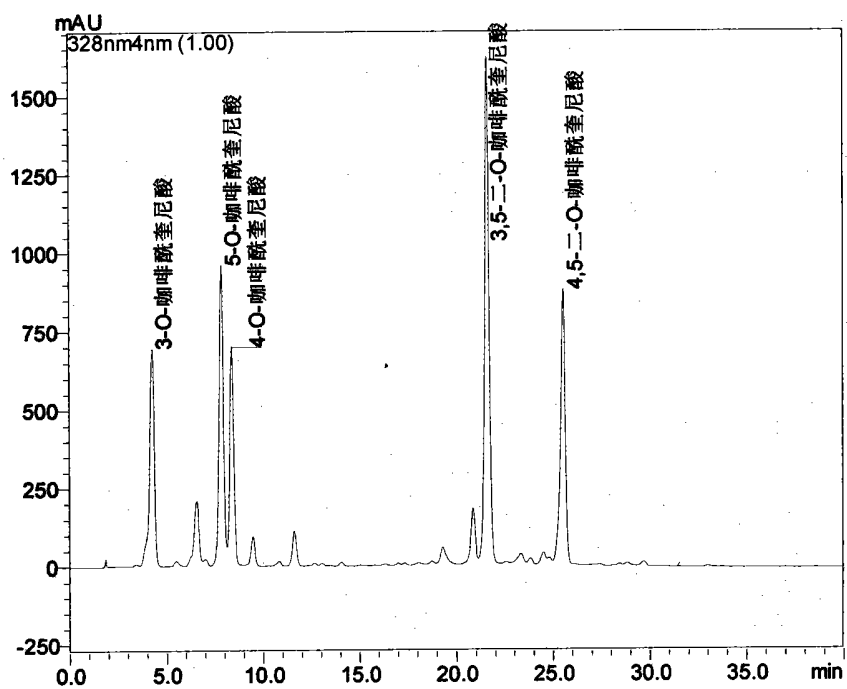
过,灌封成 1000 支 (10ml/ 支),灭菌,即得。可供静脉注射给药。给药剂量和次数根据临床有效性而定。

[0075] 实施例 11 :冻干粉针制备

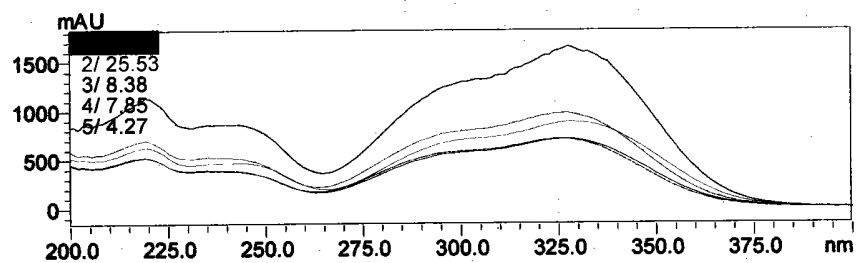
[0076] 无菌条件下取本发明总酚酸盐 50g,置于无菌容器内,加注射用水约 900ml,搅拌使溶解,调节 pH 值至 7.0 ~ 7.5,加注射用水至 1000ml,然后加配制量的 0.02%活性炭搅拌 5 ~ 10min,用无菌抽滤漏斗过滤,超滤,滤液检验合格后分装于安瓿中,低温冷冻干燥,无菌熔封即得,每支 50mg,临用前加注射用水适量使溶解,用氯化钠输液 250 ~ 500ml 稀释后缓慢静脉滴注。给药剂量和次数根据临床有效性而定。

[0077] 实施例 12 :复方胶囊制备

[0078] 取本发明总酚酸提取物 20g,与三七皂苷 20g、淀粉 150g 及适量乙醇混匀,过 10 目筛,干燥,整粒,加入硬脂酸镁 2g,混匀,用全自动胶囊填充机填充成 1000 粒,抛光,即得。每粒含提取物及三七皂苷各 20mg。可口服用于各种缺血性心脑血管疾病的防治。给药剂量和次数根据临床有效性而定。



HPLC 色谱



五个主成分的紫外光谱

图 1

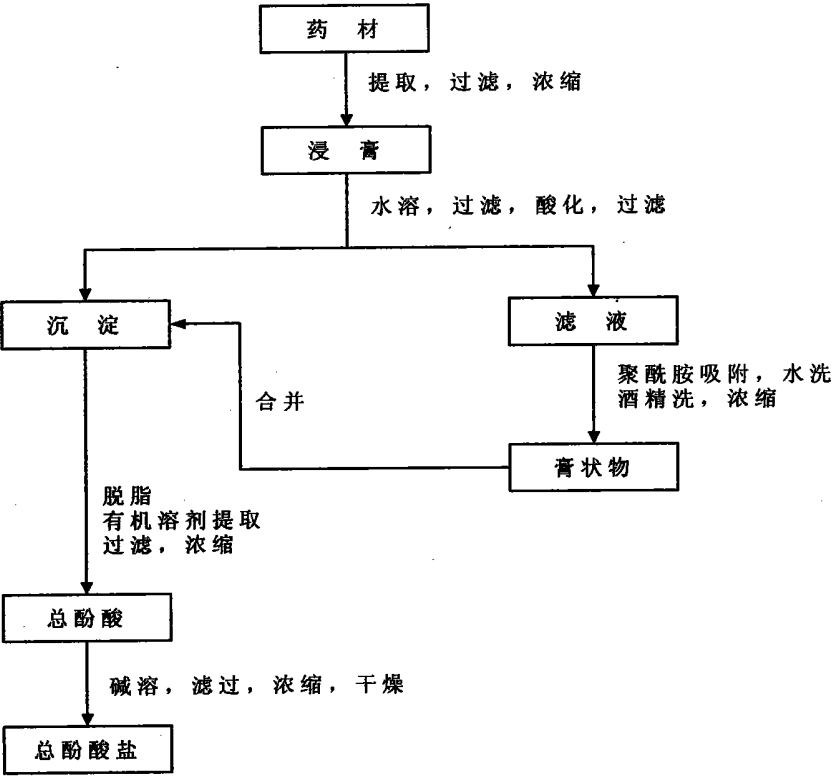


图 2