

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101967174 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 201010504825.9

(22) 申请日 2008.06.02

(62) 分案原申请数据

200810114405.2 2008.06.02

(71) 申请人 北京世纪博康医药科技有限公司

地址 100070 北京市丰台区科技园区海鹰路  
9号金汤大厦3段203

(72) 发明人 郝守祝

(51) Int. Cl.

C07J 53/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

一种环木菠萝烯醇阿魏酸酯的组合物制剂和  
纯化工艺

(57) 摘要

本发明公开了环木菠萝烯醇阿魏酸酯提纯方法,通过反复重结晶的方法实现,采用本发明提纯方法所得环木菠萝烯醇阿魏酸酯纯度可达到80%以上。

1. 一种提纯环木菠萝烯醇阿魏酸酯的方法,其特征是包括将粗品用纯化溶液溶解,静置析出结晶的步骤,其中的纯化溶液选自乙酸乙酯、丙酮、甲醇、乙醇、正丁醇或者其混合物。
2. 根据权利要求1的方法,其中的纯化溶液选自乙酸乙酯、丙酮或其混合物。
3. 根据权利要求2的方法,其中的纯化溶液为乙酸乙酯。
4. 根据权利要求2的方法,其中的纯化溶液为丙酮。
5. 根据权利要求1的方法,其中包括将结晶过滤、干燥的步骤。
6. 根据权利要求5的方法,包括将权利要求9中的结晶、过滤、干燥的步骤重复1-20次。。
7. 根据权利要求6的方法,重复权利要求9的结晶、过滤、干燥的步骤1-10次。
8. 根据权利要求1-7中任一项的方法,纯化时溶液的加入量为溶质的1-50倍。
9. 根据权利要求8的方法,纯化溶液的加入量为溶质的5-30倍。
10. 根据权利要求8的方法,纯化溶液的加入量为溶质的5-15倍。

## 一种环木菠萝烯醇阿魏酸酯的组合物制剂和纯化工艺

[0001] 本申请是申请人于 2008 年 6 月 2 日提出的申请号为 2008101144052, 名称为一种环木菠萝烯醇阿魏酸酯的组合物制剂和纯化工艺的发明的专利的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明公开了一种环木菠萝烯醇阿魏酸酯的提纯工艺和制剂, 更进一步本发明公开了一种使用重结晶技术从谷维素原料中提纯环木菠萝烯醇阿魏酸酯的工艺。

### 背景技术

[0003] 随着现代社会生活和工作的节奏逐渐加快, 现代都市人的亚健康状态不容乐观。据统计患有植物神经失调症、更年期综合症、原发性痛经、经前紧张症等由于植物神经机能障碍, 导致交感神经与副交感神经失去平衡, 非器质性疾病的发病率呈逐年上升的趋势。

[0004] 植物神经失调症通常由精神创伤及长期紧张、疲劳引起, 导致大脑皮质的功能减弱、引起过渡兴奋与迅速疲惫而发病。更年期综合症多是指妇女绝经后体内雌、孕激素水平降低引起的心血管、神经、内分泌系统功能紊乱, 导致功能性子宫出血、阵发性潮热和出汗、外阴及阴道萎缩、骨质疏松等症状及性格变化。原发性痛经由于其高发病率而引起人们的关注, 在病情严重但仍然坚持工作的患者当中, 容易导致生产能力下降, 发生事故的可能性上升, 工作质量下降等。原发性痛经指生殖器官没有器质性病变, 在行经前后或在行经期间出现腹痛、腰酸、下腹坠胀或者其他不适, 影响生活和工作。好发于 15 ~ 25 岁及初潮后的 6 个月 ~ 2 年内其病因尚不清楚, 是青春期常见症状之一。经前紧张症是指妇女经前期产生烦躁、易怒、头痛、失眠、乳房胀痛、腹胀等一组以焦虑为主要临床表现的临床症候群。经前期紧张发生率高, 表现复杂, 直接影响广大妇女的身心健康。

[0005] 谷维素是目前用于治疗上述疾病的有效药物之一, 在本申请书中谷维素指用于获得任何类型的肉桂酸甾醇酯衍生物。现有谷维素药物多是从米糠等初步提纯获得, 组分中普遍含多种阿魏酸酯类物质。目前在米糠油中发现阿魏酸酯已达 15 种以上, Codber 等用一种可逆相高性能液体色谱方法能分离存在于米糠油谷维素中独立成分, 用这种方法能分离和收集到 10 种成分。当组分转变成三甲代甲硅烷基醚衍生物后, 用气质联用仪器, 并配合用一种电子冲击质谱就可鉴定。在化学上, 谷维素是三萜烯醇 (植物甾醇) 阿魏酸酯混合物。谷维素组成物鉴定为豆甾醇阿魏酸酯, 豆甾醇阿魏酸酯, 环木菠萝烯醇阿魏酸酯, 24-亚甲基环木菠萝醇阿魏酸酯, V7- 菜油甾醇阿魏酸酯, 菜油甾醇阿魏酸酯, V7- 谷甾醇阿魏酸酯, 谷甾醇阿魏酸酯, 菜油甾醇阿魏酸酯, 谷甾醇阿魏酸酯; 已有的研究证实重要的米糠阿魏酸酯是环木菠萝烯醇阿魏酸酯, 24-亚甲基环木菠萝醇阿魏酸酯, 菜油甾醇阿魏酸酯。

[0006] 因谷维素成分复杂, 包括有多种甾醇类阿魏酸酯和三萜醇类阿魏酸酯, 因此谷维素成分的提纯对谷维素相关药物生产, 药物品质控制有着重要的意义。市场上现有的谷维素药物大都是通过从米糠油中纯化制成药剂, 目前针对谷维素单一组分的纯化提取尚没有文献和研究公开报道。

[0007] 欧洲专利申请 EP503650 公开了一种通过水解  $\gamma$ -谷维素获得阿魏酸酯类物质的方法,但此法成本偏高,同时对谷维素的利用率偏低,得率仅在 22%左右。

[0008] 申请号为 971961328 的中国专利申请公开了一种从谷维素脂肪物质获取谷维素浓缩品的方法,利用该方法可以获得 60% -90%的浓缩物,但未涉及到高纯度的谷维素进一步分离纯化获得单一组分的问题。

[0009] 申请号为 02135610.6 中国专利申请公开了一种用溶剂萃取提纯得到 60-70%纯度谷维素的方法,所获得的谷维素用于药物纯度偏低,也没有进一步研究单独成分的提取。

[0010] 文献“米糠功能因子  $\gamma$ -谷维醇的研究”(中国粮油学报 2000,15(6):14-18)研究了利用单纯的高效液相色谱法提纯谷维素获得环木菠萝烯醇阿魏酸酯的方法,其不足之处是只能获得纯度为 90%左右的提纯效果,并且利用单纯的高效液相法成本较高,该方法可以用于实验室或者小批量样品生产分析环境,但是不适合进行规模工业化生产。

[0011] 文献“环木菠萝烯醇阿魏酸酯的结构研究”(云南大学学报,2003.25(6):531-533)研究构效关系时使用了硅胶柱层析的方法,分别用石油醚、乙醚、乙酸乙酯洗脱粗分,回收溶剂后得乙酸乙酯部分.该部分再次用硅胶柱层析,乙醚-乙酸乙酯梯度洗脱,薄层检测后甲醇重结晶后得纯化合物.使用该方法的不足之处为多次使用柱层析,增大了成本,不利于工业生产中实际使用。

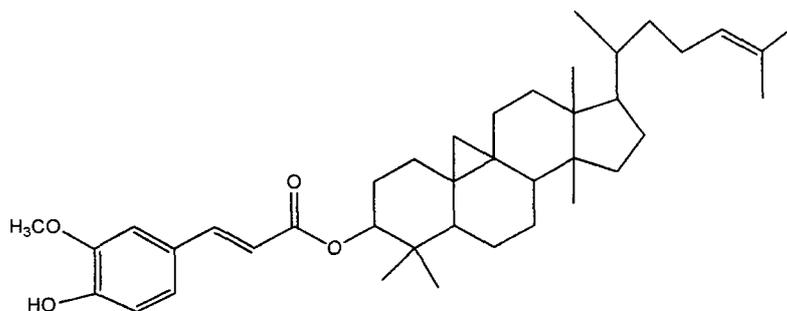
[0012] 文献“米糠谷维素提取纯化方法研究进展”(粮食与油脂,2007.11,1-5)综合分析了现在常用的从米糠等原料中生产谷维素的技术方案,但是没有进一步就谷维素单独组分的获得进行研究。

## 发明内容

[0013] 本发明解决了目前技术领域没有从谷维素获得环木菠萝烯醇阿魏酸酯方案的问题,所公开的工艺以现行标准的谷维素药物为原料,通过现代分离精制手段,去除大部分谷维素原料中的非环木菠萝烯醇类阿魏酸酯的成分,从而获得纯度 80%以上(含 80%)环木菠萝烯醇阿魏酸酯。本发明公布的提纯方法步骤少,单元操作少,避免了制备液相色谱仪器的使用,降低了提纯的技术难度和成本开支,可以应用于规模化生产,批量制造高纯度的纯环木菠萝烯醇阿魏酸酯。采用本发明的制备方法,产率高(约 1%),成本低,具有极广阔的应用前景。

[0014] 环木菠萝烯醇阿魏酸酯的化学结构式如下所示:

[0015]



[0016] 本发明提供了一种环木菠萝烯醇阿魏酸酯的制备方法,包括以下步骤:取谷维素,用纯化溶液溶解,静置析出结晶。

[0017] 进一步的,本发明的制备方法包括以下步骤:取谷维素,用纯化溶液溶解,静置析

出结晶,过滤,干燥。重复以上重结晶过程 1-20 次。其中,纯化溶液选自乙酸乙酯、丙酮、甲醇、乙醇、正丁醇或其中两种或两种以上的混合物,优选乙酸乙酯、丙酮或其混合物;最优选乙酸乙酯或丙酮;重结晶过程的重复次数优选 2-10 次。

[0018] 优选地,纯化溶液的加入量是溶质的 1-50 倍,优选 5-30 倍,最优选 5-15 倍。

[0019] 采用以上制备方法制备的环木菠萝烯醇阿魏酸酯,其纯度大于 80%,优选大于 90%,最优选大于 95%。

[0020] 通过色谱法对市售谷维素药物原料和本发明获得的环木菠萝烯醇阿魏酸酯的百分含量进行了对比。

[0021] 表 1 市售谷维素药物原料和本发明获得的环木菠萝烯醇阿魏酸酯的百分含量对照

[0022]

组分	市售谷维素 药物原料含量 (%)	本发明含量 (%)
甾醇类阿魏酸酯		
其中: $\beta$ -谷甾醇阿魏酸酯	6~8	0~0.5
菜油甾醇阿魏酸酯	10~12	0~0.5
豆甾醇阿魏酸酯	1~2	0~0.2
三萜醇类阿魏酸酯		
其中: 环木菠萝醇阿魏酸酯	8~10	0~1
环木菠萝烯醇酯阿魏酸酯	25~30	80~99.9
24-亚甲基环木菠萝醇阿魏酸酯	35~40	0~20
24-甲基环木菠萝醇阿魏酸酯	0.2~0.5	0~0.2

[0023] 由上述试验数据表明,本发明工艺使谷维素原料中的主要成分环木菠萝烯醇阿魏酸酯的含量可以被精确的控制,对未来的药理研究、制剂研究以及质量研究奠定良好的基础。

[0024] 研究表明,通过本发明的提纯工艺获得的高纯度环木菠萝烯醇阿魏酸酯,其在活性方面比多种成分混杂的谷维素更具有优势。

[0025] 大量试验研究表明,本发明由于含有高纯度的环木菠萝烯醇阿魏酸酯,其在活性方面比多种成分混杂的谷维素更具有优势。

[0026] 另一方面,本发明还提供了一种药物制剂,含有环木菠萝烯醇阿魏酸酯和药学上可接受的载体,其中环木菠萝烯醇阿魏酸酯的纯度为 80% 以上,优选 90% 以上,更优选 95% 以上。本发明的药物制剂可以是片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、丸剂等口服制剂或注射剂,特别是非油溶媒的供静脉注射用的制剂。

[0027] 本发明的静脉用注射剂含有环木菠萝烯醇阿魏酸酯和表面活性剂,所述的表面活性剂可以是阴离子、阳离子或非离子表面活性剂,包括但不限于聚氧乙烯山梨醇酯类,例如,聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸锂、鹅去氧胆酸、脱氧胆酸钠、甘脱氧胆酸钠, N-月桂基肌氨酸、氯化十六烷基吡啶、磷脂。优选的表面活性剂为吐温、聚乙二醇或其混合物。其中的吐温可以是吐温 20、40、60、80;聚乙二醇可以是聚乙二醇 200、400、600、800、1000、2000、4000、8000 或其混合物,优选聚乙二醇 200、400、800 或其混合物;最优选是吐温 80、聚乙二醇 400 或其混合物。

[0028] 本发明的注射剂还可任选地进一步包括赋形剂、抗氧化剂、PH 调节剂、防腐剂、等渗剂及其它药学上可接受的辅料。其中赋型剂可选自但不限于是甘露醇、乳糖、葡萄糖、山梨醇、氯化钠、水解明胶、右旋糖酐、蔗糖、甘氨酸、聚乙烯吡咯烷酮等中的一种或几种；优选为甘露醇或葡萄糖。防腐剂可以选自但不限于是苯酚、甲酚、三叔丁醇、苯甲醇、尼泊金中的一种或几种。稳定剂可以选自但不限于亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、硫脲、维生素 C、叔丁基对羟基茴香醚、二丁基苯酚、没食子酸丙酯、生育酚、抗坏血酸棕榈酸酯、乙二胺四乙酸、乙二胺四乙酸二钠中的一种或几种。PH 调节剂 PH 调节剂可以是药学可接受的有机酸、有机碱、无机酸、无机碱，包括但不限于盐酸、枸橼酸、酒石酸、磷酸、偏磷酸、聚偏磷酸、碳酸、硫酸、硝酸、醋酸、氢氧化钠、氢氧化钾、枸橼酸钠、枸橼酸钾、碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸胺、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、1,2- 己二胺、碳酸钠、酒石酸钠钾、偏磷酸钾、聚偏磷酸钾、偏磷酸钠中的一种或几种。

[0029] 本发明的提供的注射剂可以是水溶性注射液、输液、冻干粉针剂，优选水溶性注射液和冻干粉针剂，最优选冻干粉针剂。

[0030] 本发明的注射剂可以采用本领域常规的注射剂的制备方法制备得到。

[0031] 根据最终利用用途的不同，本发明所获得的晶体可用于制备治疗疾病的药物，或者用于功能食品添加剂，用量依据具体用途而定。

[0032] 实施例 1

[0033] 取含环木菠萝烯醇阿魏酸酯 40% 左右的谷维素 1kg，用 15kg 的乙酸乙酯加热溶解，室温静置至析出结晶，过滤，干燥。再将干燥的结晶重复以上的过程 10 次，可得环木菠萝烯醇阿魏酸酯的含量为 99% 以上的对照品。

[0034] 实施例 2

[0035] 1. 色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；甲醇—乙腈（40：60）为流动相；流速为 1.5ml/min；检测波长为 327nm；灵敏度为 0.005AUFS。理论塔板数按计算，应不低于 2000。

[0036] 2. 供试品溶液制备：精密称取市售谷维素原料、本发明各 10mg，至 10ml 量瓶中，加水溶解并定容，摇匀，即为供试品溶液。

[0037] 3. 测定：精密吸取供试品溶液 10  $\mu$  l，注入液相色谱仪，记录色谱图，以面积归一化法检查各个组分的百分含量。

[0038] 4. 测定结果

[0039] 表 2 测定结果

	供试品	环木菠萝烯醇阿魏酸酯含量 (%)
[0040]	市售谷维素原料	32
	本发明提纯品	98.2

[0041] 说明本发明工艺非常有效的提高了环木菠萝烯醇阿魏酸酯含量

[0042] 实施例 3

[0043] 处方

[0044] 注射用本发明冻干粉针 1000 瓶（含本发明 18mg/ 瓶）：

[0045]	本发明提纯品	18g
[0046]	聚乙二醇 400	250g
[0047]	吐温 80	250g
[0048]	10%甘露醇	6000g
[0049]	注射用水加至	5000ml
	共冻干成	1000支

[0050] 处方中以本发明原料为主药,吐温 80 为增溶剂,聚乙二醇 400 为助溶剂,甘露醇为支撑剂,注射用水为冻干溶剂。

[0051] 制剂过程

[0052] 称取处方量的本发明提纯品、吐温 -80、PEG-400、甘露醇和 80% 处方量的注射用水,搅拌使之溶解至溶液澄清,室温搅拌 20 分钟,用 0.45 μm 微孔滤膜粗滤,滤液加注射用水至全量,再用 0.22 μm 微孔滤膜除菌过滤。对所得滤液进行可见异物、pH 及含量检验。

[0053] 将洗净、灭菌后的西林瓶、胶塞及精滤液传入灌装间,根据含量确定分装体积进行灌装同时半加塞。

[0054] 将分装好样品的西林瓶装入冻干盘,放入冻干箱中,冻干,冻干完毕,将胶塞完全压入西林瓶中,最后通大气,取出冻干的样品。即得本发明的注射用冻干粉针。

[0055] 实施例 4

[0056] 药物:谷维素油溶注射液,淡黄色油剂,;谷维素片,;本发明的注射用冻干粉针动物:ICR 小鼠 84 只,初始体重 18-22g,雌雄各半,随机分为 4 组,每组 12 只,1. 空白对照组;2. 谷维素片组 (50mg/kg);3. 本发明注射用冻干粉针组 (100mg/kg);4. 谷维素油溶注射液组 (200mg/kg)。

[0057] 实验方法:小鼠连续灌胃给药 3 天,空白组给予等体积溶酶。第 4 天末次给药后 1h 进行试验。参照 PorsoIt 方法,将单个小鼠放入水深 10cm 的烧杯(直径 13cm,高 19.5cm)中,水温 (25±2)℃。观察 6min,记录后 4min 内小鼠游泳的不动时间(指小鼠在水中停止挣扎,或显漂浮状态,仅有微小的肢体运动以保持头部浮在水面)。试验完将小鼠放在取暖设备下烘干,放回笼内。

[0058] 实验结果:

[0059] 小鼠强迫游泳试验结果( $\bar{X} \pm SD$ )

[0060]

分组	剂量	不动时间 (s)
空白对照组	—	126.2±56.0
谷维素油溶注射液组	200mg/kg/d	65.2±43.0*
本发明注射用冻干粉针组	100mg/kg/d	58.0±60.0***
谷维素片组	50mg/kg/d	99.0±41.7

[0061] 与空白组相比较:\*P < 0.05,\*\*P < 0.01,\*\*\*P < 0.001

[0062] 结论:受试药能显著缩短小鼠的不动时间,其中本发明注射用冻干粉针组达到统

计学意义 ( $P < 0.001$ ), 优于片组和油溶注射。

[0063] 实施例 5

[0064] 药物: 谷维素油溶注射液, 淡黄色油剂; 谷维素片; 本发明的注射用冻干粉针

[0065] 动物: 小鼠 70 只, 初始体重 18-22g, 雌雄各半, 随机分为 4 组, 每组 10 只, 1. 空白对照组; 2. 谷维素片组 (50mg/kg); 3. 本发明注射用冻干粉针组 (100mg/kg); 4. 谷维素油溶注射液组 (200mg/kg)。

[0066] 实验方法: 小鼠连续灌胃给药 3 天, 空白组给予等体积溶酶。第 4 天末次给药后 1h 进行试验。将小鼠面向闭臂放在中央区, 记录 5min 内进入开臂的次数、开臂内滞留时间及闭臂滞留时间。

[0067] 实验结果

[0068] 小鼠高架十字迷宫试验结果( $\bar{X} \pm SD$ )

[0069]

分组	剂量	开臂滞留时间 (%)	闭臂滞留时间 (%)
空白对照组	—	12.0 ± 4.50	82.0 ± 6.00
谷维素油溶注射液组	200mg/kg/d	20.15 ± 9.20*	71.5 ± 13.40*
本发明注射用冻干粉针组	100mg/kg/d	16.30 ± 5.00*	77.60 ± 5.00**
谷维素片组	50mg/kg/d	16.20 ± 7.50	73.00 ± 12.14*

[0070] 与空白组相比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

[0071] 实验结论: 在小鼠高架十字迷宫试验中, 受试药能增加小鼠进入开臂的时间 ( $P < 0.05$ ), 并缩短闭臂滞留时间 ( $P < 0.01$ ), 注射用冻干粉针组作用明显。

[0072] 实施例 6

[0073] 药物: 谷维素油溶注射液, 淡黄色油剂; 谷维素片; 本发明的注射用冻干粉针

[0074] 动物: 雌性 ICR 小鼠 80 只, 初始体重 18-22g, 随机分为 8 组, 每组 10 只:

[0075] 1. 空白对照组; 2. 谷维素片组 (50mg/kg); 3. 本发明注射用冻干粉针组 (100mg/kg); 4. 谷维素油溶注射液组 (200mg/kg)。

[0076] 实验方法: 除空白对照组外, 小鼠皮下注射己烯雌酚 0.1mg/只, 每日一次, 共 10 天, 首日及末日剂量加倍。十天后开始灌胃给药, 连续 3 天, 第 4 天末次给药后 1h, 腹腔注射催产素 0.5u/只, 随即进行扭体试验, 观察 20min 内动物首次扭体时间、扭体次数并计算平均扭体次数; 注射催产素后 1h, 摘眼球取血, 然后断颈处死并分离子宫及卵巢, 精确称重, 计算器官系数;

[0077] (3) 将子宫按试剂盒要求将其剪为数块, 分别用于测定前列腺素  $E_2$  ( $PGE_2$ ), 以冰盐水 (含 20mM EDTA) 洗净后, 再以冰盐水在冰浴下制成 10% 的子宫组织匀浆, 以 3000r/min 低温离心 15min, 取上清液 -70℃ 保存直至测定相应指标。

[0078] 实验结果:

[0079] 对痛经小鼠扭体的影响

[0080]

分组	剂量	扭体次数	潜伏期	抑制率 (%)
空白对照组	—	18.20±9.25	5.40±1.30	-
谷维素油溶注射液组	200mg/kg/d	10.6±5.25*	5.24±1.60	49.2
本发明注射用冻干粉针组	100mg/kg/d	11.18±4.50*	7.51±1.75	41.17
谷维素片组	50mg/kg/d	13.21±5.00*	8.00±3.00*	36.78

[0081] 结论：本试验选用催产素造模的痛经小鼠模型，考察受试药的止痛作用，结果如表所示。本发明注射用冻干粉针组，能显著减少痛经小鼠的扭体次数，延长潜伏期，提高扭体抑制率。

[0082] 实施例 4,5,6 采用小鼠强迫游泳及高架十字迷宫两项经典抑郁焦虑模型对受试药的抗抑郁焦虑作用进行检测，试验结果证实本发明的注射用冻干粉针通过精炼出纯度更高的有效成分，以及改变给药方式，提高了生物利用度，可以有效改善谷维素油溶注射液以及谷维素片由于代谢过程和首过效应带来的血药浓度的降低。因此本发明的注射用冻干粉针具有更好的治疗效果。

[0083] 实施例 7

[0084] 取市售的谷维素油溶注射液进行刺激性试验，结果表明注射部位及其周围组织轻微红肿、出现硬结，组织切片检查可见血管扩张明显，管周有炎性渗出物，表明在实验条件下谷维素油溶注射液对肌肉注射部位产生明显的刺激作用。

[0085] 实施例 2 制得的冻干粉针进行动物血管的刺激性。取健康、耳缘无损伤家兔 6 只，按体重随机分为两组，即试验组和氯化钠注射液对照组。以临床成人用谷维素油溶注射液剂量为依据设计家兔给药剂量，从家兔左侧耳缘静脉缓慢推注给药，对照组给予等容积氯化钠注射液，连续给予 5 天。试验结果表明，与氯化钠注射液组相比，静脉推注给予用本发明原料制备的冻干粉针，给药期间及末次给药 24 小时后，肉眼观察未见血管及周围组织红肿，组织切片检查可见兔耳静脉结构清晰，个别血管扩张明显，管壁厚薄均匀，内壁平滑，管周无炎性渗出物。表明实验条件下用本发明原料制备的冻干粉针对家兔耳缘静脉无明显刺激作用。