

[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 01113191.8

[51] Int. Cl.

A61K 36/605 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 2 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1240407C

[22] 申请日 2001.6.29 [21] 申请号 01113191.8

[71] 专利权人 上海复旦张江生物医药股份有限公司

地址 201203 上海市浦东张江高科技园区蔡
伦路 308 号

[72] 发明人 蒋剑平 黄 哲 邵 玲 张燕群
张鹰峰

审查员 田洪旻

[74] 专利代理机构 上海浦东良风专利代理有限责
任公司

代理人 徐启伟

权利要求书 3 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

具有 α - 糖苷酶抑制剂活性的中药提取物、
其制备方法及用途

[57] 摘要

一种具有 α - 糖苷酶抑制剂活性的中药提取物、其制备方法及用途，系桑白皮、桑叶、桑枝或桑葚粉碎后用醇和/或水提取、絮凝、浓缩后，经色谱法纯化而得。获得的是上述各药材中所含之总生物碱。用于治疗糖尿病、肥胖症、艾滋病。

1、一种具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物，其特征是以桑白皮、桑叶或桑葚为原材料，通过以下制备方法获得的产品：原材料经过适当粉碎后，用水，甲醇或乙醇，或含水醇类在静态或动态下，室温或加热回流提取，提取溶剂量为原药重量的5-12倍，可重复提取1-3次，然后滤去药渣，滤液在常压或减压、动态状态下浓缩至一定浓度后，通过醇沉、絮凝方法，使杂质沉淀，再经离心或包括常压、减压、微滤、超滤的过滤除去不溶物，清液上阳离子交换树脂，阳离子交换树脂采用苯乙烯系树脂、大孔型树脂中的一种，以蒸馏水洗尽不吸附的杂质，再用洗脱液洗脱，洗脱液为氨水，浓度0.2~1N，洗脱液浓缩后，上阴离子交换树脂，阴离子交换树脂采用苯乙烯系树脂、大孔型树脂中的一种，收集液浓缩，制成干粉。

2、一种如权利要求1所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法，其特征在于制备工艺步骤如下：原材料经过适当粉碎后，用水，甲醇或乙醇，或含水醇类在静态或动态下，室温或加热回流提取，提取溶剂量为原药重量的5-12倍，重复提取1-3次，然后滤去药渣，滤液在常压或减压、动态状态下浓缩至一定浓度后，通过醇沉、絮凝方法，使杂质沉淀，再经离心或包括常压、减压、微滤、超滤的过滤除去不溶物，清液上阳离子交换树脂，阳离子交换树脂采用苯乙烯系树脂、大孔型树脂中的一种，以蒸馏水洗尽不吸附的杂质，再用洗脱液洗脱，洗脱液为氨水，浓度0.2~1N，洗脱液浓缩后，上阴离子交换树脂，阴离子交换树脂采用苯乙烯系树脂、大孔型树脂中的一种，收集液浓缩，制成干粉。

3、根据权利要求2所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物制备方

法,其特征是:提取溶剂为水,温度为 80~90℃,水用量为 10~12 倍药材重量。

4、根据权利要求 3 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物制备方法,其特征是:水温为 80℃,水用量为 10 倍药材重量。

5、根据权利要求 2 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法,其特征是:醇沉过程中加入乙醇使总浓度为 50%~80%。

6、根据权利要求 5 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法,其特征是:醇沉过程中加入乙醇使总浓度为 70%。

7、根据权利要求 2 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法,其特征是:阳离子交换树脂采用的苯乙烯系树脂为 001×4, 001×7, Amberlite IR120 中的一种,采用大孔型树脂为 Amberlite 252。

8、根据权利要求 2 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法,其特征是:洗脱液氨水浓度为 0.5N。

9、根据权利要求 2 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法,其特征是:阴离子交换树脂采用苯乙烯系树脂为 201×4, 201×7 中的一种,采用大孔树脂为 Ambersep 900。

10、根据权利要求 2 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法,其特征是:干粉的制备采用真空干燥、冷冻干燥、收集液直接喷雾干燥成型中的一种,制备的干粉其中所含生物碱约为总重量的 50%~60%,制备的干粉加入相关辅料,制成片剂、胶囊剂型。

11、根据权利要求 10 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法,其特征是:所述片剂为普通片、薄膜片、肠溶片,片剂的制作:用上述总生物碱干粉,加入适量稀释剂选自淀粉、糊精、甘露醇、微晶纤维,适量的粘合剂选自水、乙醇、淀粉浆、明胶、纤维素,适量的崩解剂选自干淀粉、羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素、海藻酸钠,以及适量的润滑剂选自硬脂

酸镁、滑石粉、聚乙二醇，加入适量甜味剂，选自 D-木糖、木糖醇、麦芽糖醇、甜叶菊素、天冬甜母，按常规湿法制粒，干燥后整粒或干法制粒后压片，如是包薄膜衣片，用成膜材料选自纤维素类、聚乙二醇类，按常规包衣，分装入密闭瓶或铝塑板中。

12、根据权利要求 10 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物的制备方法，其特征是：所述胶囊为普通胶囊剂、肠溶胶囊剂，胶囊剂的制作：将上述总生物碱干粉加入适量辅料选自碳酸钙、甘露醇、氧化镁、微粉硅胶，适量润滑剂选自滑石粉、硬脂酸镁、乙二醇酯，聚硅酮类，以及适量的黏合剂选自矿物油、食油，并加入适量甜味剂，选自 D-木糖、木糖醇、麦芽糖醇、甜叶菊素、天冬甜母，混合成干粉或制成颗粒，填充入胶囊，分装在密闭铝塑包装中。

13、一种如权利要求 1 所述的具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物在制备治疗糖尿病的药物中的应用。

具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物、其制备方法及应用

本发明涉及一种中药提取物、其制备方法及应用，特别涉及一种具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物、其制备方法及应用。

随着社会经济的发展，人类生活方式的改变和饮食结构的改变，糖尿病患者（主要是II型糖尿病）的数量迅速增加，其发病率在全球范围内呈逐渐增高趋势，其死亡率已居肿瘤和心血管疾病之后的第3位。糖尿病(Diabetes Mellitus)是一类由遗传、环境、免疫等因素引起的、具有明显异质性的慢性高血糖及并发症所组成的综合症，主要分为I型和II型两种。I型即胰岛 β 细胞破坏而导致的胰岛素绝对缺乏，也称胰岛素依赖型(IDDM)。II型系由于胰岛素抵抗并胰岛素分泌不足所致，亦称非胰岛素依赖型(NIDDM)。目前，糖尿病的治疗主要分饮食疗法、运动疗法、胰岛素疗法、口服降糖药及中医药治疗等。在II型糖尿病的治疗中口服降糖药占主要地位，主要分为三类：磺脲类、双胍类和 α -糖苷酶抑制剂等。 α -糖苷酶抑制剂的作用机理是竞争性地抑制小肠刷状缘的近腔上皮细胞内的 α -糖苷酶，延缓碳水化合物的消化吸收，延迟双糖、低聚糖和多糖的吸收，延迟并减轻餐后血糖的升高。 α -糖苷酶包括胰淀粉酶、麦芽糖酶和蔗糖酶等，在体内承担将多糖转化为单糖的功能。其抑制剂的研究始于60年代，当时从链球菌的发酵培养液中发现了2-羟甲基-3,4,5,6-四羟基吡啶，命名为Nojirimycin（野尻霉素）。其后又不断有新的抑制剂被发现，大多为生物碱类。各类 α -糖苷酶抑制剂结构上共同的特点是存在拟单糖结构，亦即有一个多羟基的六元环或五元环结构。以六元环为例，其可为环己烷、环己烯、吡喃或吡啶等。若环中带有氮原子则为生物碱类，这是一类最主要的 α -糖苷酶抑

制剂，结构上大致可分为七类：多羟哌啶类、四氢吡咯类、二氢吡咯类、吲哚拉西啶类、吡咯双烷类和托烷类等。除生物碱类外，某些黄酮类、环烷类等也具有抑制 α -糖苷酶活性的效应。中国专利 ZL98107147 介绍了“用噻唑烷二酮、促胰岛素分泌剂和 α -葡萄糖苷酶抑制剂治疗糖尿病”，但该专利没有涉及到如何从中药中提取和制造 α -葡萄糖苷酶抑制剂。中国有丰富的中药资源，如何利用这个资源与西医相结合，采用中药提取而不是化工合成的方法制造药品是一个非常好的中西医结合的方向。桑白皮为桑科植物桑(*Morus L.*)的除去栓皮的根皮。性味甘，寒。入肺、脾经。功用主治为泻肺平喘，行水消肿。治肺热咳喘，吐血，水肿，脚气，小便不利。近年来对其植物化学研究亦十分深入，其所含黄酮类成分已得到揭示，其甙类成分也逐渐受到重视。成分含有如含伞形内酯、东莨菪素和黄酮成分的桑根皮素 (Morusin)、桑素 (Mulberrin)、桑色烯 (Mulberrechromene)、环桑素 (Cyclomulberrin)、环桑色烯 (Cyclomulberrochromene) 等，并含有鞣质和粘液素。药理作用有利尿作用、降压作用和其他如镇静作用。但其中生物碱类成分研究较少。盖因其脂溶性生物碱成分含量极少，以氯仿萃取几乎得不到东西，因其所含的是极性较大亲水性强的多羟基吡啶类。七十年代日本学者发现桑白皮中生物碱主要含 1-羟甲基-2, 3, 4-三羟基吡啶，此即 1-脱氧野尻霉素 (1-deoxy-nojirimycin)，又称 moranoline。后又进一步发现了 moranoline 的系列衍生物。至于桑白皮治疗糖尿病的记载和研究较少。《上海常用中草药》中记载：治糖尿病：桑白皮四钱、枸杞子五钱。煎汤服。桑叶为桑科植物桑 *Morus alba L.* 的干燥叶。性味甘，苦，寒。归肺、肝经。具有疏散风热，清肺润燥，清肝明目。用于风热感冒，头晕头痛，目赤昏花。成分主要含有甾体及三萜类化合物；黄酮化合物；香豆精化合物挥发油；生物碱；氨基酸；有机酸和其他化合物等。药理作用主要抗菌作用、降血糖作用、抑制肠肌等作用。桑椹为桑科植物桑 *Morus alba L.* 的干燥果

穗。性味甘、酸、寒，归心、肝、肾经。具有补血滋阴，生津润燥。用于眩晕耳鸣，心悸失眠，须发早白，津伤口渴，内热消渴，血虚便秘。成分含有芦丁、维生素、蛋白质、氨基酸、生物碱等。药理作用具有激发淋巴细胞转化作用。

本发明的目的就在于提供一种具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物，就是一种由桑白皮、桑叶和桑葚制备的总生物碱，其制备方法是从中药中提取，该中药提取物作为 α -糖苷酶抑制剂应用于治疗糖尿病、肥胖症及爱滋等疾病。

本发明的目的是这样实现的：一种具有 α -糖苷酶抑制剂活性的中药提取物，涉及一种具有降血糖活性的中药有效部位，是由桑白皮、桑叶和桑葚制备的总生物碱，主要包括多羟基生物碱。制备方法包括以下步骤：原药材经过适当粉碎后，用水，甲醇或乙醇，或含水醇类在静态或动态下，室温或加热（包括回流）提取，提取溶剂量为原药重量的 5-12 倍，可重复提取 1-3 次，然后滤去药渣，滤液在常压或减压、动态状态下浓缩至一定浓度后，通过醇沉、絮凝等方法，使杂质沉淀，再离心或过滤（包括常压、减压、微滤、超滤等）除去不溶物。清液上阳离子交换树脂，以蒸馏水洗尽不吸附的杂质，再用 0.2~1N 的氨水溶液洗脱，洗脱液浓缩后，上阴离子交换树脂，收集液浓缩，经真空干燥或冷冻干燥成干粉，或将收集液直接喷雾干燥成型。提取溶剂以水最好，温度为 80~90℃，以 80℃ 为佳，水用量为 10~12 倍药材重量，以 10 倍最好。醇沉能有效去处提取液所含鞣质、多糖等杂质，可加入乙醇使总浓度为 50%~80%，以 70% 为好。絮凝效果更好，能更好降低有效成分的丢失。阳离子交换树脂可采用苯乙烯系树脂，如 001×4，001×7，Amberlite IR120 等，也可使用大孔型树脂，如 Amberlite 252 等。洗脱液以氨水最好，可用浓度 0.2~1N，以 0.5N 最好。阴离子交换树脂也可采用苯乙烯系树脂，如 201×4，201×7 等，或大孔树脂，如 Ambersep 900 等。以上制备的干粉，为浅黄色固体物质，易吸潮，味甘。其中所含生物碱约为总重量的 50%~60%。以上制备的总生物碱干粉，加入相关辅料，

可制成片剂、胶囊等剂型。1) 片剂：包括普通片、薄膜片、肠溶片等。用上述总生物碱干粉，加入适量稀释剂如淀粉、糊精、甘露醇、微晶纤维等，适量的粘合剂如水、乙醇、淀粉浆、明胶、纤维素等，适量的崩解剂如干淀粉、羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素、海藻酸钠等，以及适量的润滑剂如硬脂酸镁、滑石粉、聚乙二醇等，按常规湿法制粒，干燥后整粒或干法制粒后压片。如是包薄膜衣片，可用成膜材料如纤维素类、聚乙二醇类等，按常规包衣，分装入密闭瓶或铝塑板中。2) 胶囊剂：包括普通胶囊剂、肠溶胶囊剂等。将上述总生物碱干粉加入适量辅料如碳酸钙、甘露醇、氧化镁、微粉硅胶等，适量润滑剂如滑石粉、硬脂酸镁、乙二醇酯，聚硅酮类等，以及适量的黏合剂如矿物油、食油等，混合成干粉或制成颗粒，填充入胶囊，分装如密闭铝塑包装中。以上各剂型可加入适量甜味剂，如 D-木糖、木糖醇、麦芽糖醇、甜叶菊素、天冬甜母等。

本发明的有益效果是：由于桑具有良好的降血糖作用，其物质基础和机理多样，但其中主要的一种物质即其所含的总生物碱（多羟基生物碱），机理为抑制 α -糖苷酶活性。本发明所得之总生物碱，作为 α -糖苷酶抑制剂，具有疗效好、成本低等特点。可用于治疗糖尿病、肥胖症、爱滋病。

实例 1：桑白皮总生物碱提取实例：桑白皮 1000g，加水 8L，微沸状态下保温 2 小时，过滤。滤渣再加 6L 水，微沸状态下保温 2 小时，过滤。合并两次滤液，浓缩，絮凝，离心。离心后清液过 Amberjet 1200C 阳离子交换柱，0.5N 氨水溶液洗脱，收集硅钨酸反应阳性部分，收集液浓缩，再上 201×4 阴离子交换柱，收集不吸附部分，浓缩，干燥，得 5g 总生物碱。片剂的制作：包括普通片、薄膜片、肠溶片等。用上述总生物碱干粉，加入适量稀释剂如淀粉、糊精、甘露醇、微晶纤维等，适量的粘合剂如水、乙醇、淀粉浆、明胶、纤维素等，适量的崩解剂如干淀粉、羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素、海藻酸钠等，

以及适量的润滑剂如硬脂酸镁、滑石粉、聚乙二醇等，可加入适量甜味剂，如 D-木糖、木糖醇、麦芽糖醇、甜叶菊素、天冬甜母等。按常规湿法制粒，干燥后整粒或干法制粒后压片。如是包薄膜衣片，可用成膜材料如纤维素类、聚乙二醇类等，按常规包衣，分装入密闭瓶或铝塑板中。

实例 2：桑叶总生物碱提取实例：桑叶 1000g，加水 10L，浸泡过夜，煮沸后 95℃保温 2 小时，过滤。滤渣再加 8L 水，煮沸后 95℃保温 2 小时，过滤。合并两次滤液，浓缩，絮凝，离心。离心后清液过 Amberlite IR120C 阳离子交换柱，以 0.5N 氨水溶液洗脱，收集液浓缩后再上 201×7 阴离子交换柱，收集不吸附部分，浓缩，干燥，得 3g 总生物碱。胶囊剂的制作：包括普通胶囊剂、肠溶胶囊剂等。将上述总生物碱干粉加入适量辅料如碳酸钙、甘露醇、氧化镁、微粉硅胶等，适量润滑剂如滑石粉、硬脂酸镁、乙二醇酯，聚硅酮类等，以及适量的黏合剂如矿物油、食油等，并可加入适量甜味剂，如 D-木糖、木糖醇、麦芽糖醇、甜叶菊素、天冬甜母等。混合成干粉或制成颗粒，填充入胶囊，分装如密闭铝塑包装中。

实例 3：体外糖苷酶抑制实验：大鼠 α -1, 4 糖苷酶提自大鼠小肠上段黏膜：正常雄性大鼠，禁食 12 小时，断头处死后取小肠上段（自十二指肠 10cm），用预冷的生理盐水冲洗两次，取粘膜层，按 1 : 10 用 0.5mmol/l NaCl-KCl 缓冲液稀释后匀浆，20000g 离心 30 分钟（4℃），沉淀用预冷的生理盐水稀释，500g 离心 10 分钟（4℃），上清分装供实验。以 pNP（p-硝基苯酚）法测定其活性，在 405nm 波长处测定反应中生成的硝基苯酚，硝基苯酚的形成速率与酶的活性成正比，以不加酶上清液及受试药物的反应体系为空白管调零，以不加受试药物反应体系管为 100%，并设拜唐平（Acarbose）为阳性对照管，加入实例 1、实例 2 所得总生物碱（以相应缓冲液溶解），计算该总生物碱对酶的抑制百分率。结果得到当酶活性抑制率为 20%—80%时，上述总生物碱的浓度为 20—1000 μ

g/ml，结果见图 1，其中，红点和黑点分别表示不同酶浓度。

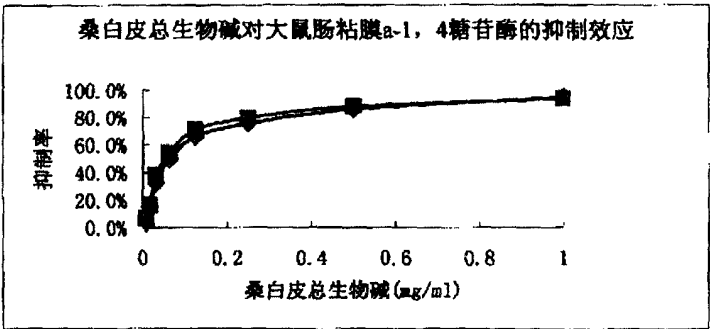


图 1. 桑白皮总生物碱体外抑制糖苷酶活性的效应

实例 4: STZ 诱导的糖尿病大鼠糖耐量实验: Wistar 大鼠体重为 180~200g, 禁食后尾静脉注射 STZ 50mg/kg, 72 小时后测血糖值 11.1mmol/L 以上者进行实验, 分组时各组动物平均血糖值相差不大于 6mmol/L, 大鼠共分为 6 组, 即空腹组、对照组、拜糖平组、小剂量组、中剂量组、大剂量组, 均禁食过夜, 除了空腹组灌生理盐水外, 其他各组均灌胃淀粉 5g/kg, 同时对照组灌胃生理盐水、拜糖平组灌胃拜糖平 50mg/kg、小剂量组灌胃桑白皮总生物碱 100mg/kg、中剂量组灌胃 200mg/kg、大剂量组灌胃 400mg/kg。给药后 60min 测血糖水平, 结果见表 1。

表 1. 桑白皮总生物碱对 STZ 诱导的糖尿病大鼠糖耐量的影响

组别	剂量 (mg/kg)	N	血糖值 (mmol/L)
空腹组	-	5	3.56 ± 1.06
对照组	-	7	26.96 ± 4.01#
拜唐平组	50	8	16.42 ± 6.77*
小剂量组	100	7	19.90 ± 3.36*
中剂量组	200	7	18.76 ± 3.64*
大剂量组	400	7	18.32 ± 3.51*

P<0.01 v.s. 空腹组, * P<0.01 v.s. 对照组

实例 5: 正常小鼠糖耐量实验: 昆明种雄性小鼠体重为 22~25g, 共分为 6 组, 即空腹组、对照组、拜糖平组、小剂量组、中剂量组、大剂量组, 均禁食过夜, 除了空腹组灌生理盐水外, 其他各组均灌胃淀粉 10g/kg, 同时对照组灌胃生理盐水、拜糖平组灌胃拜糖平 50mg/kg、小剂量组灌胃桑白皮总生物碱

100mg/kg、中剂量组灌胃 200mg/kg、大剂量组灌胃 400mg/kg。给药后 60min 测血糖水平，结果见表 2。

表 2. 桑白皮总生物碱对正常小鼠糖耐量的影响

组别	剂量 (mg/kg)	N	血糖值 (mmol/L)
空腹组	-	6	5.25 ± 0.69
对照组	-	10	12.3 ± 3.97#
拜唐平组	50	9	6.94 ± 0.89*
小剂量组	100	9	7.94 ± 1.77*
中剂量组	200	9	6.52 ± 0.98*
大剂量组	400	9	6.06 ± 1.36*

P<0.01 v.s. 空腹组, * P<0.01 v.s. 对照组

实例 6: 正常小鼠餐后血糖时间曲线: 昆明种雄性小鼠体重为 22~25g, 禁食过夜, 灌胃淀粉 10g/kg 同时灌胃桑白皮总生物碱 200mg/kg, 给药后 0min、30min、60min、90min、120min 测血糖水平, 结果见图 2。

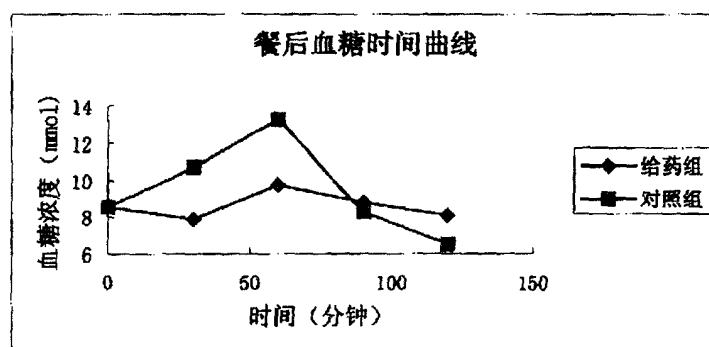


图 2. 桑白皮总生物碱对小鼠餐后不同时间血糖的影响

按以下方法控制其质量: 1) 生物碱鉴别反应: 取干粉少量, 于适量水中溶解, 加入数滴 6N HCl, 滴加硅钨酸试液, 有灰白色至黄色沉淀生成; 或滴加碘化铋钾试液, 有棕黄色沉淀生成。2) 酸碱滴定: 取上述干粉 0.5 克, 溶于 20ml 冰乙酸中, 以 0.1N 高氯酸为滴定液, 测得其中 N 原子当量数。再取上述干粉 0.5 克, 溶于 20ml 水中, 以 0.1N NaOH 为滴定液, 测得其中羧酸根当量数。N 原子当量数减去羧酸根当量数应为生物碱的摩尔数, 生物碱分子量以 180 计, 所算得的生物碱重量应不低于总重量的 30%。