



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110507670 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 201910902374.5	CN 110559303 A, 2019.12.13
(22) 申请日 2019.09.24	CN 110511261 A, 2019.11.29
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110507670 A	CN 108635375 A, 2018.10.12 CN 106265743 A, 2017.01.04 CN 107028954 A, 2017.08.11
(43) 申请公布日 2019.11.29	CN 103415286 A, 2013.11.27
(73) 专利权人 江西天元药业有限公司 地址 331200 江西省宜春市樟树市城北工 业园江西天元药业	US 2017370954 A1, 2017.12.28 CA 2842187 A1, 2013.01.24 Fei Cai等. Critical Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cognitive Impairment Induced by Microcystin-LR. 《Int. J. Mol. Sci.》. 2015, 王杰等. 不同来源引流熊胆粉的化学成分系 统分析. 《中国中药杂志》. 2018, 王永金等. 人工熊胆的化学研究. 《沈阳药学 院学报》. 1991,
(72) 发明人 傅金荣 付金洪	审查员 李欣欣
(51) Int. Cl. A61K 35/413 (2015.01) A61K 31/575 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)	权利要求书1页 说明书19页 附图1页
(56) 对比文件 CN 110507669 A, 2019.11.29 CN 110548037 A, 2019.12.10	

(54) 发明名称

精制熊胆粉及预防治疗肝病肝纤维化改善肝功能的用途

(57) 摘要

本发明涉及精制熊胆粉及预防治疗肝病肝纤维化改善肝功能的用途。具体的, 本发明一方面涉及式I所示化合物在制备用于预防或治疗肝病和肝纤维化以及用于改善肝功能: 该化合物, 其使用Cu-K $\alpha$  辐射, 在以2 $\theta$  角度表示的粉末X-射线衍射图谱中, 在 $8.53 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.96 \pm 0.20^\circ$ 、 $12.03 \pm 0.20^\circ$ 、 $13.14 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.82 \pm 0.20^\circ$ 、 $17.26 \pm 0.20^\circ$ 、 $22.53 \pm 0.20^\circ$ 、 $24.21 \pm 0.20^\circ$ 、 $26.68 \pm 0.20^\circ$ 、 $29.42 \pm 0.20^\circ$ 、 $31.24 \pm 0.20^\circ$ 处有衍射峰。该化合物呈现优异的生物性能例如具有优异的生物利用度, 并且可以发挥与熊胆粉或牛磺熊去氧胆酸一样的生理学活性。例如其可用于预防或治疗预防或治疗肝病和肝纤维化以及用于改善肝功能。

CN 110507670 B



## 精制熊胆粉及预防治疗肝病肝纤维化改善肝功能的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及一种熊胆粉制品,以及它们的制备方法。这种熊胆粉制品呈现优异的生物学效果,例如其可用于预防或治疗肝病和肝纤维化以及用于改善肝功能。

### 背景技术

[0002] 目前,单用熊胆粉制成的中成药以及含熊胆粉成分的复方中成药制剂有153种,涉及药品生产企业183家。其综合功效无法用其他药物代替。在从汉代到清代的660种中医药学典籍(含8万多个传统方剂)中,约有366部著作记载了熊胆的功效应用及方剂配伍。主要包括《药性论》、《普济方》、《唐本草》、《千金方》、《本草纲目》、《本草纲目拾遗》等。熊胆粉的性味归经可概括为味苦,性寒。归肝、胆、心、肺、脾、胃、大肠经。熊胆药性苦寒,主入肝、胆经,能清肝泻火,明目退翳,主治目赤翳障;清肝胆湿热,利胆退黄,主治黄疸尿赤。入心经,能清心通脉止痛,主治心痛;入心、肝二经,能清热开窍,息风止痉,主治时气热病,怔忡神昏,小儿惊风,癫痫抽搐。入脾胃经,能消积导滞,杀虫疗疳,主治食积腹痛,疳积发热。入大肠经,能清热燥湿,主治湿热泻痢,痔疮漏疮。“诸痛痒疮皆属于心”,入心经,又能清热凉血解毒,主治疗毒恶疮,蓄血,血淋。入肺经,能清肺利咽,化痰止咳,主治咽痛喉痹,痰热咳嗽。现代药理学研究证实,熊胆粉具有多种药理作用,总结归纳主要包括有保肝、利胆、溶解胆石、抗肝纤维化、镇静、解痉、抗惊厥、镇痛、强心、降压、抗血栓、抗动脉粥样硬化、降血脂、镇咳、祛痰、平喘、抗肿瘤、抗炎、解热、抑菌等作用。体现了熊胆粉多成分、多靶点的药效学作用特点,为熊胆粉临床治疗肝胆、心脑血管、感染性疾病及传染病等重大疾病提供了科学依据。目前学术界针对熊胆粉开展的药理研究主要从如下方面进行:肝胆系统,中枢神经系统,心脑血管系统,消化系统,呼吸系统,抗炎、抑菌、抗病毒等,眼科、耳鼻喉科等。

[0003] 多版《中国药典》均记载了以熊胆和/或其分泌的胆汁的药材或包含它的制剂。例如,2005年版《中国药典》一部附录24页中记载了药材熊胆为熊科动物黑熊*Selenarctos thibetanus* Cuvier或棕熊*Ursus arctos* Linnaeus的干燥胆囊。2010年版《中国药典》一部附录27页中记载了熊胆粉为熊科动物黑熊*Selenarctos thibetanus* Cuvier经胆囊手术引流胆汁而得的干燥品;该版药典一部还收收载了熊胆胶囊、熊胆救心丸/丹、熊胆痔灵膏等由包括熊胆粉为原料制成的制剂。2015年版《中国药典》一部记载了熊胆胶囊、熊胆救心丸、熊胆痔灵膏、熊胆痔灵栓等由包括熊胆粉为原料制成的制剂。

[0004] 目前,人工引流熊胆胆汁的干燥品已作为天然熊胆的替代品入药并审批上市,命名为熊胆粉,是国家卫生部批准的一类新药。熊胆粉为熊科动物黑熊经过胆囊手术引流胆汁而得的干燥品,性寒,味苦,入肝、胆、脾、胃、大肠经,具有清热,平肝,明目之功。现代研究发现,熊胆粉化学成分比较复杂,主要含结合型熊去氧胆酸(UDCA)、鹅去氧胆酸(CDCA)、胆酸(CA)、去氧胆酸(DCA)、牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)、牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)及胆固醇类、胆色素类、氨基酸类、蛋白质、肽、脂肪酸、微量元素等。其中熊去氧胆酸是重要的特征成分。目前临床上主要应用于胆结石、脂肪肝、胆囊炎、病毒性肝炎、慢性乙型肝炎等肝胆疾病,眼睑

带状疱疹, 痔疮等疾病。

[0005] 张赞华文献(张赞华, 等, HPLC指纹图谱法测定熊胆胶囊中的胆汁酸类成分, 华西药理学杂志, 2009, 24 (4): 402~403) 记载熊胆胶囊由黑熊引流胆汁的低温干燥品制成, 熊胆性寒、味苦, 具有清热、解毒、利胆、解痉和明目的功能, 熊胆胶囊活性成分主要为牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸。

[0006] CN1060337C (中国专利申请号93116933X, 发明名称熊胆粉肠溶胶囊及其制备工艺) 记载熊胆粉由三部分构成: 第一部分是占熊胆粉总量50%左右的结合型胆汁酸, 它包括牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸等等, 这其中牛磺熊去氧胆酸的含量最多, 占熊胆粉总量20%左右; 第二部分是水溶性蛋白质、氨基酸、无机盐等成分, 它们是产生吸潮的主要原因, 多无直接的生理活性, 通常仅起营养作用; 第三部分是脂溶性胆汁素例如胆红素、胆固醇、甾体类物质等成分, 其生理活性不强, 甚至例如胆固醇通常是需要尽量避免摄入的成分, 原因在于它们通常会引发一些心脑血管疾病。

[0007] 因此, 本领域技术人员已花费巨大精力, 致力于将熊胆粉进一步纯化以期去除不必要的甚至有害的成分。例如, CN103520210A (201310523280.X, 盛源堂) 公开了一种熊胆粉纯化方法, 包括如下顺序进行的步骤: (1) 在新鲜提取的熊胆汁中加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 和无菌水蒸馏水, 震荡混匀, 静置澄清, 获得上清液; (2) 在步骤(1) 中所得上清液中加入2倍体积的无水乙醇, 制得熊胆醇提物; (3) 将步骤(2) 所得熊胆提纯物加入大孔硅胶柱子, 利用2倍体积75%无水乙醇分3次对硅胶柱子进行洗涤, 收集洗涤液; (4) 用无菌蒸馏水对步骤(3) 中所得洗涤液进行稀释, 使得无水乙醇的浓度为16.5%; (5) 将步骤(4) 中所得含有16.5%无水乙醇的熊胆汁上清液加入到纤维素粉CF11柱子中, 涡旋振荡混匀, 进行熊胆汁分离, 5000rpm条件下, 离心5min, 离心结束后, 在纤维素粉CF11柱子中加入等体积的无菌蒸馏水, 5000rpm条件下, 离心5min; (6) 收集步骤(5) 中所得上清液, 加入1/10体积的3mol/L NaAc和等体积的异丙醇, 混匀, 20℃沉淀, 沉淀完成后, 4℃条件下, 12000rpm离心30min, 弃上清, 收集沉淀; (7) 加入75%无水乙醇对步骤(6) 中收集的沉淀进行洗涤, 洗涤结束后, 在4℃环境下, 12000rpm离心30min, 弃上清, 收集沉淀; (8) 将步骤(7) 中所得沉淀, 溶于蒸馏水中, 搅拌1至3小时, 制成熊胆溶液, 调节pH为2至8, 加热至50℃并保持该温度, 加入复合蛋白酶, 酶解结束后, 灭酶, 进行超滤膜过滤, 获得的上清液经喷雾干燥后即可获得熊胆粉成品。据信该发明技术所得熊胆粉, 有效含量高, 色素含量低, 无腥味, 药用价值提升。

[0008] CN105147729A (201510650516.5, 甸川) 公开了一种熊胆粉的制备方法, 步骤包括: (A)、过滤: 取新鲜引流熊胆汁, 过滤, 得到滤液; (B)、灭菌: 在滤液中加入高浓度乙醇, 乙醇加入后药液中乙醇含量为75%~85%, 接着进行搅拌, 静置, 搅拌时间为20~40分钟, 静置时间为24~72小时; (C)、浓缩: 减压浓缩除去乙醇, 减压浓缩在35~45℃下进行, 减压浓缩后得到灭菌熊胆液; (D)、冷冻干燥: 灭菌熊胆液进行冷冻干燥, 所述的冷冻干燥的方法为: 将灭菌熊胆液以1~2℃/min的降温速率降温至35~40℃, 恒温0.5~3.5h, 抽真空至1~15Pa, 再以1~3℃/min的升温速率升温至室温。据信该发明利用新鲜熊胆汁为液体的特点, 采用乙醇与胆汁混溶, 利用乙醇对病毒、致病菌的杀灭作用, 通过控制乙醇在药液中含量和时间, 不破坏熊胆汁中的活性成分, 杀灭各种致病菌和病毒, 保证临床用药的安全性、有效性, 克服了传统上熊胆粉生产的缺陷, 所得熊胆粉外观为金黄色, 具透明光泽, 极大地提高了熊胆粉质量。

[0009] CN106386659A (201610755739.2, 天佑) 公开了熊胆粉工厂化生产的方法, 该方法包括黑熊良种的选择、饲养、取胆、喂服中草药、超低温冷冻干燥, 具体如下: (1) 黑熊良种的选择: 选择身体健壮、品种特征明显、采食力强、生产性能好、体质结实、肢蹄健壮、3 岁以上的黑熊做培养熊; (2) 饲养: 对培养熊采用复合饲料进行喂养, 所述复合饲料按质量比的配比为: 玉米 50~60 份、鱼粉 3~5 份、大麦 10~15 份、炒熟的大豆 10~15 份、肉类 3~5 份、蚕蛹 3~5 份; 喂养至黑熊体重达到 90kg 及以上时开始取胆; (3) 取胆: 采用动物自体造管无痛引流方法采胆, 具体做法是, 在黑熊的腹壁和胆囊之间, 利用黑熊自身的组织在腹壁端制造环形括约肌, 括约肌收缩时能关闭管腔, 舒张时使管腔开放, 括约肌受植物性神经的支配或激素调节, 利用这一特性, 采胆时给黑熊喂营养液, 使黑熊括约肌舒张, 管腔开放, 用酒精棉球消毒开放的管腔通道口, 把消毒后的不锈钢空心探针探入管腔通道, 胆汁即沿着空心探针自动流到接胆汁的杯子中, 取胆完成后拔出探针即可; (4) 喂服中草药: 取胆完成后, 给黑熊喂服加入糖浆水的中草药, 连续喂服 10 天; 所述中草药配方为: 厚朴 20~30 份、青皮 20~30 份、肉桂 20~30 份、菠菜 20~30 份; 何首乌 20~30 份、甘草 20~30 份、大青叶 20~30 份、板蓝根 20~30 份; 玉米蛋白粉 20~30 份、黄豆粉 20~30 份、核桃粕 20~30 份、花生粕 20~30 份; 女贞子 40~50 份、薏仁 40~50 份、陈皮 5~10 份、生姜 5~10 份; 将上述中草药粉碎并混合均匀后加入糖浆水喂服黑熊; (5) 超低温冷冻干燥: 将取出的熊胆汁预先在 -60℃ 温度及以下冻结, 然后置于真空状态下, 将其含有的水分升华, 获得干燥的熊胆粉。据信该发明方法制备得到的熊胆粉品质好、产量高、且对黑熊身体没有伤害。

[0010] CN102114044A (201010617773.6, 归真堂) 公开了一种熊胆汁的提取方法, 在熊的胆囊上切开创口, 并与肌肉组织形成瘻管, 扎紧; 痊愈后挤动瘻口采集胆汁。该方法可用于非连续、定时定量和长期采集, 而且不会对熊自身利用胆汁造成影响。本发明公开了一种优质熊胆粉及其制备方法, 该熊胆粉在 365nm 紫外灯下呈亮黄色荧光, 其在 198nm 下有 3 个色谱峰; 制备方法包括将胆汁静置、分离、干燥后粉碎过筛, 即得。据信该发明制备的熊胆粉外观色泽纯正, 熊胆粉中牛磺熊去氧胆酸含量高, 不吸潮, 利于储运和加工。

[0011] CN103040869A (201310027917.6, 康奥) 公开了一种人工熊胆粉, 它是由禽胆为原料, 加入牛磺熊去氧胆酸钠制备而成, 其中牛磺熊去氧胆酸钠与禽胆的重量配比为: 牛磺熊去氧胆酸钠 20-40 份、禽胆 80-60 份。本发明还提供了该人工熊胆粉的制备方法。发明不仅配方科学独特、原料易得、工艺简单、成本低廉、保证质量、确保疗效、保护野生动物, 而且内在质量和外观性状都与天然熊胆几乎相近, 提供一条简便、经济、安全、环保, 且质量和外观都与天然熊胆极为相近的人工熊胆粉, 为天然熊胆的理想替代品。

[0012] CN1311002A (00102073.0, 石丽霞) 公开了一种精制熊胆粉及其制作方法, 属药理学领域普通熊胆粉易吸潮结块, 有粘牙感、味极腥臭、极苦、杂质多、吸收缓慢, 性质不稳定易腐败, 有效成份含量低, 限制了熊胆粉的应用范围, 口服应用时常加入调味剂, 减轻腥臭味。该发明采用乙醇提取法、乙醇提取活性炭脱色法及醋酸乙酯分离法提纯精制熊胆粉, 精制后的熊胆粉色浅细腻、无粘牙感、无腥臭味、苦味轻、不易腐败、不易吸潮结块、性质稳定, 有效成份含量平均提高到 2 倍以上。延长贮存时间, 扩大应用范围, 提高了药物疗效。

[0013] CN106038601A (201610368003.X, 大易) 公开了一种高含量、高纯度、低腥味熊胆粉的制备方法, 具体方法是将熊胆粉、活性炭和助滤剂充分混合, 然后将混合物用乙醇溶液提取至提取液中胆烷酸为阴性, 收集乙醇提取液, 浓缩并回收乙醇, 收集浓缩液, 干燥而得; 所

述助滤剂为水和醇不溶的硅酸盐矿物质。据信该发明的方法简单,更具可操作性、可控性好,制得的熊胆粉以牛磺熊去氧胆酸计的的含量最高可达45%以上,回收率近100%,以重量计算回收率可达85%以上,该方法适合于工业化大规模生产,成本低,能够用于制备特殊制剂企业所需的高品质高含量、高纯度、低腥味熊胆粉。

[0014] 然而,本领域仍然期待有新的方法来制备具有优良性质的熊胆粉,尤其是以高收率获得含有高纯度结合型胆汁酸的熊胆粉的方法,以及此类熊胆粉的医疗和保健的用途,例如其可用于预防或治疗肝病和肝纤维化以及用于改善肝功能。

## 发明内容

[0015] 本发明的目的在于提供一种新的方法来制备具有优良性质的熊胆粉,尤其是提供一种以高收率获得含有高纯度结合型胆汁酸的熊胆粉的方法。本发明旨在通过如下方案实现的。

[0016] 本发明第一方面,本发明提供了制备精制熊胆粉的方法,其包括如下步骤:

[0017] (1) 将采集的熊胆汁加水稀释(例如加2~3倍体积水稀释,例如加2.5倍体积水稀释),用80目筛网过滤,(任选的,将80目筛网过滤所得滤液使用1M盐酸溶液调节其pH=3.0~3.5例如pH=3.3,接着向滤液中添加1.0~1.5%氯化钠例如添加1.2%氯化钠),得粗熊胆液(可以测定此工艺中间体中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量);

[0018] (2) 使用切向流超滤系统(例如仕必纯KR2i型切向流超滤系统),用超纯水冲洗管路,安装1kD的MidiKros过滤器,对步骤(1)所得粗熊胆液进行过滤,得到滤液和5~15倍(例如10倍)浓缩回流液(可以测定此工艺中间体中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量);

[0019] (3) 使用1M氢氧化钠溶液将上一步骤所得滤液调节其pH=6.5~7.0例如pH=6.8,接着向其中加入精氨酸(其量是滤液中牛磺熊去氧胆酸量的2~3摩尔倍例如2.5摩尔倍),在40~50℃例如44~46℃温度处搅拌2~3小时例如2.5小时,过滤弃沉淀物,然后向滤液中添加1~2倍例如1.5倍体积的乙酸乙酯,静置2~4小时例如3小时,析出沉淀,过滤,弃滤液,得到沉淀物;

[0020] (4) 向上一步骤所得沉淀物中添加乙醇(例如以沉淀物重量:乙醇体积比为1g:3~5ml例如1g:4ml的比例添加乙醇),在室温下搅拌0.5小时,静置2~4小时例如3小时,滤除沉淀,得到滤液;

[0021] (5) 向上一步骤所得滤液中添加1~2倍体积例如2倍体积的乙酸乙酯-乙醚(5:1)混合液,静置5~8小时例如6小时,析出沉淀,过滤,得到沉淀物,减压干燥除去溶剂,得到精制熊胆粉。

[0022] 根据本发明第一方面的方法,其中在步骤(1)中,将80目筛网过滤所得滤液使用1M盐酸溶液调节其pH=3.0~3.5。

[0023] 根据本发明第一方面的方法,其中在步骤(1)中,将所述滤液调节其pH=3.0~3.5后,还向滤液中添加1.0~1.5%氯化钠。已经出人意料的发现,通过将所述滤液调节其pH=3.0~3.5并且向其中添加规定量氯化钠,可以使得所述牛磺熊去氧胆酸在后续进行切向流超滤时进入滤液部分,而其它结合型胆酸绝大部分进入到浓缩回流液中。

[0024] 根据本发明第一方面的方法,其中步骤(2)中,经历切向流超滤所得的滤液中,牛

磺鹅去氧胆酸是牛磺熊去氧胆酸重量的0~5%，优选是0~3%，优选是0~2%。即，在所得滤液中，基本上没有牛磺鹅去氧胆酸。

[0025] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(2)中，经历切向流超滤所得的回流液中，牛磺熊去氧胆酸是牛磺鹅去氧胆酸重量的0~8%，优选是1~5%，优选是1~3%。即，在所得回流液中，基本上没有牛磺熊去氧胆酸的残留。经历上述步骤(2)的切向流超滤，可以将牛磺鹅去氧胆酸和牛磺熊去氧胆酸分离开来。

[0026] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(5)所得精制熊胆粉中，牛磺熊去氧胆酸含量大于70%例如70~74%，特别是大于71%例如71~74%，特别是大于72%例如72~74%。

[0027] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(5)所得精制熊胆粉中，牛磺熊去氧胆酸与精氨酸的摩尔比为1:0.98~1.02，尤其是1:0.99~1.01。

[0028] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(5)所得精制熊胆粉中，牛磺熊去氧胆酸与精氨酸总量点该精制熊胆粉总量的百分比大于95%例如95~100%，特别是大于96%例如96~100%，特别是大于97%例如97~100%，特别是大于98%例如98~100%。

[0029] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(5)所得精制熊胆粉的熔点为187~189℃。根据上述结果，可以确定本发明所得精制熊胆粉是一种具有187~189℃熔点的牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐。

[0030] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(5)所得精制熊胆粉，其使用Cu-K $\alpha$ 辐射，在以2 $\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱中，在约8.53°、约10.96°、约12.03°、约13.14°、约14.82°、约17.26°、约22.53°、约24.21°、约26.68°、约29.42°、约31.24°处有衍射峰。

[0031] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(5)所得精制熊胆粉，其使用Cu-K $\alpha$ 辐射，在以2 $\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱中，在8.53 $\pm$ 0.20°、10.96 $\pm$ 0.20°、12.03 $\pm$ 0.20°、13.14 $\pm$ 0.20°、14.82 $\pm$ 0.20°、17.26 $\pm$ 0.20°、22.53 $\pm$ 0.20°、24.21 $\pm$ 0.20°、26.68 $\pm$ 0.20°、29.42 $\pm$ 0.20°、31.24 $\pm$ 0.20°处有衍射峰。

[0032] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(5)所得精制熊胆粉，其使用Cu-K $\alpha$ 辐射，在以2 $\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱中，在8.53 $\pm$ 0.10°、10.96 $\pm$ 0.10°、12.03 $\pm$ 0.10°、13.14 $\pm$ 0.10°、14.82 $\pm$ 0.10°、17.26 $\pm$ 0.10°、22.53 $\pm$ 0.10°、24.21 $\pm$ 0.10°、26.68 $\pm$ 0.10°、29.42 $\pm$ 0.10°、31.24 $\pm$ 0.10°处有衍射峰。

[0033] 根据本发明第一方面的方法，其中步骤(5)所得精制熊胆粉，其使用Cu-K $\alpha$ 辐射，具有图1所示的粉末X-射线衍射图谱。

[0034] 进一步的，本发明第二方面提供了一种精制熊胆粉，其是一种具有187~189℃熔点的牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐。

[0035] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉，其中牛磺熊去氧胆酸含量大于70%例如70~74%，特别是大于71%例如71~74%，特别是大于72%例如72~74%。

[0036] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉，其中牛磺熊去氧胆酸与精氨酸的摩尔比为1:0.98~1.02，尤其是1:0.99~1.01。

[0037] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉，其中牛磺熊去氧胆酸与精氨酸总量点该精制熊胆粉总量的百分比大于95%例如95~100%，特别是大于96%例如96~100%，特别是大于97%例如97~100%，特别是大于98%例如98~100%。

[0038] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉，其使用Cu-K $\alpha$ 辐射，在以2 $\theta$ 角度表示的粉末X-

射线衍射图谱中,在约 $8.53^{\circ}$ 、约 $10.96^{\circ}$ 、约 $12.03^{\circ}$ 、约 $13.14^{\circ}$ 、约 $14.82^{\circ}$ 、约 $17.26^{\circ}$ 、约 $22.53^{\circ}$ 、约 $24.21^{\circ}$ 、约 $26.68^{\circ}$ 、约 $29.42^{\circ}$ 、约 $31.24^{\circ}$ 处有衍射峰。

[0039] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉,其使用Cu-K $\alpha$ 辐射,在以 $2\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱中,在 $8.53\pm 0.20^{\circ}$ 、 $10.96\pm 0.20^{\circ}$ 、 $12.03\pm 0.20^{\circ}$ 、 $13.14\pm 0.20^{\circ}$ 、 $14.82\pm 0.20^{\circ}$ 、 $17.26\pm 0.20^{\circ}$ 、 $22.53\pm 0.20^{\circ}$ 、 $24.21\pm 0.20^{\circ}$ 、 $26.68\pm 0.20^{\circ}$ 、 $29.42\pm 0.20^{\circ}$ 、 $31.24\pm 0.20^{\circ}$ 处有衍射峰。

[0040] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉,其使用Cu-K $\alpha$ 辐射,在以 $2\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱中,在 $8.53\pm 0.10^{\circ}$ 、 $10.96\pm 0.10^{\circ}$ 、 $12.03\pm 0.10^{\circ}$ 、 $13.14\pm 0.10^{\circ}$ 、 $14.82\pm 0.10^{\circ}$ 、 $17.26\pm 0.10^{\circ}$ 、 $22.53\pm 0.10^{\circ}$ 、 $24.21\pm 0.10^{\circ}$ 、 $26.68\pm 0.10^{\circ}$ 、 $29.42\pm 0.10^{\circ}$ 、 $31.24\pm 0.10^{\circ}$ 处有衍射峰。

[0041] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉,其使用Cu-K $\alpha$ 辐射,具有图1所示的粉末X-射线衍射图谱。

[0042] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉,其是照包括如下步骤的方法制备得到的:

[0043] (1) 将采集的熊胆汁加水稀释(例如加2~3倍体积水稀释,例如加2.5倍体积水稀释),用80目筛网过滤,(任选的,将80目筛网过滤所得滤液使用1M盐酸溶液调节其pH=3.0~3.5例如pH=3.3,接着向滤液中添加1.0~1.5%氯化钠例如添加1.2%氯化钠),得粗熊胆液(可以测定此工艺中间体中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量);

[0044] (2) 使用切向流超滤系统(例如仕必纯KR2i型切向流超滤系统),用超纯水冲洗管路,安装1kD的MidiKros过滤器,对步骤(1)所得粗熊胆液进行过滤,得到滤液和5~15倍(例如10倍)浓缩回流液(可以测定此工艺中间体中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量);

[0045] (3) 使用1M氢氧化钠溶液将上一步骤所得滤液调节其pH=6.5~7.0例如pH=6.8,接着向其中加入精氨酸(其量是滤液中牛磺熊去氧胆酸量的2~3摩尔倍例如2.5摩尔倍),在40~50°C例如44~46°C温度处搅拌2~3小时例如2.5小时,过滤弃沉淀物,然后向滤液中添加1~2倍例如1.5倍体积的乙酸乙酯,静置2~4小时例如3小时,析出沉淀,过滤,弃滤液,得到沉淀物;

[0046] (4) 向上一步骤所得沉淀物中添加乙醇(例如以沉淀物重量:乙醇体积比为1g:3~5ml例如1g:4ml的比例添加乙醇),在室温下搅拌0.5小时,静置2~4小时例如3小时,滤除沉淀,得到滤液;

[0047] (5) 向上一步骤所得滤液中添加1~2倍体积例如2倍体积的乙酸乙酯-乙醚(5:1)混合液,静置5~8小时例如6小时,析出沉淀,过滤,得到沉淀物,减压干燥除去溶剂,得到精制熊胆粉。

[0048] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉,其中在步骤(1)中,将80目筛网过滤所得滤液使用1M盐酸溶液调节其pH=3.0~3.5。

[0049] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉,其中在步骤(1)中,将所述滤液调节其pH=3.0~3.5后,还向滤液中添加1.0~1.5%氯化钠。已经出人意料的发现,通过将所述滤液调节其pH=3.0~3.5并且向其中添加规定量氯化钠,可以使得所述牛磺熊去氧胆酸在后续进行切向流超滤时进入滤液部分,而其它结合型胆酸绝大部分进入到浓缩回流液中。

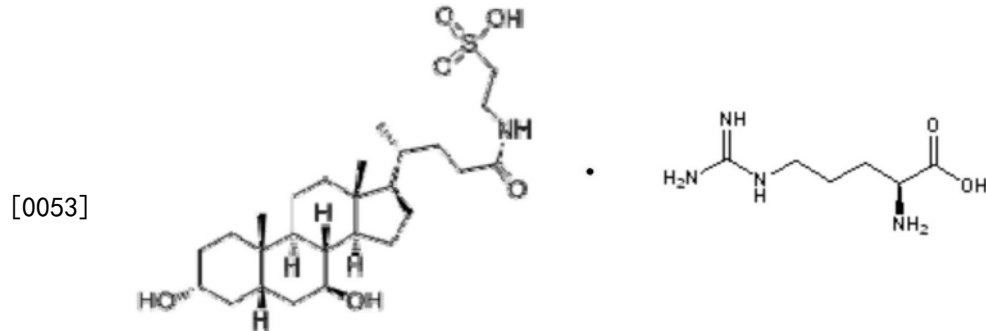
[0050] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉,其中步骤(2)中,经历切向流超滤所得的滤液



中,牛磺鹅去氧胆酸是牛磺熊去氧胆酸重量的0~5%,优选是0~3%,优选是0~2%。即,在所得滤液中,基本上没有牛磺鹅去氧胆酸。

[0051] 根据本发明第二方面的精制熊胆粉,其中步骤(2)中,经历切向流超滤所得的回流液中,牛磺熊去氧胆酸是牛磺鹅去氧胆酸重量的0~8%,优选是1~5%,优选是1~3%。即,在所得回流液中,基本上没有牛磺熊去氧胆酸的残留。经历上述步骤(2)的切向流超滤,可以将牛磺鹅去氧胆酸和牛磺熊去氧胆酸分离开来。

[0052] 进一步的,本发明第三方面提供了一种如下式I所示化合物:



I

[0054] 根据本发明第三方面的化合物,其具有187~189℃的熔点。

[0055] 根据本发明第三方面的化合物,其中牛磺熊去氧胆酸含量大于70%例如70~74%,特别是大于71%例如71~74%,特别是大于72%例如72~74%。

[0056] 根据本发明第三方面的化合物,其中牛磺熊去氧胆酸与精氨酸的摩尔比为1:0.98~1.02,尤其是1:0.99~1.01。

[0057] 根据本发明第三方面的化合物,其使用Cu-K $\alpha$ 辐射,在以2 $\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱中,在约8.53°、约10.96°、约12.03°、约13.14°、约14.82°、约17.26°、约22.53°、约24.21°、约26.68°、约29.42°、约31.24°处有衍射峰。

[0058] 根据本发明第三方面的化合物,其使用Cu-K $\alpha$ 辐射,在以2 $\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱中,在8.53 $\pm$ 0.20°、10.96 $\pm$ 0.20°、12.03 $\pm$ 0.20°、13.14 $\pm$ 0.20°、14.82 $\pm$ 0.20°、17.26 $\pm$ 0.20°、22.53 $\pm$ 0.20°、24.21 $\pm$ 0.20°、26.68 $\pm$ 0.20°、29.42 $\pm$ 0.20°、31.24 $\pm$ 0.20°处有衍射峰。

[0059] 根据本发明第三方面的化合物,其使用Cu-K $\alpha$ 辐射,在以2 $\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱中,在8.53 $\pm$ 0.10°、10.96 $\pm$ 0.10°、12.03 $\pm$ 0.10°、13.14 $\pm$ 0.10°、14.82 $\pm$ 0.10°、17.26 $\pm$ 0.10°、22.53 $\pm$ 0.10°、24.21 $\pm$ 0.10°、26.68 $\pm$ 0.10°、29.42 $\pm$ 0.10°、31.24 $\pm$ 0.10°处有衍射峰。

[0060] 根据本发明第三方面的化合物,其使用Cu-K $\alpha$ 辐射,具有图1所示的粉末X-射线衍射图谱。

[0061] 根据本发明第三方面的化合物,其是照包括如下步骤的方法制备得到的:

[0062] (1) 将采集的熊胆汁加水稀释(例如加2~3倍体积水稀释,例如加2.5倍体积水稀释),用80目筛网过滤,(任选的,将80目筛网过滤所得滤液使用1M盐酸溶液调节其pH=3.0~3.5例如pH=3.3,接着向滤液中添加1.0~1.5%氯化钠例如添加1.2%氯化钠),得粗熊胆液(可以测定此工艺中间体中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量);

[0063] (2) 使用切向流超滤系统(例如仕必纯KR2i型切向流超滤系统),用超纯水冲洗管路,安装1kD的MidiKros过滤器,对步骤(1)所得粗熊胆液进行过滤,得到滤液和5~15倍(例如10倍)浓缩回流液(可以测定此工艺中间体中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量);

[0064] (3) 使用1M氢氧化钠溶液将上一步骤所得滤液调节其pH=6.5~7.0例如pH=6.8,接着向其中加入精氨酸(其量是滤液中牛磺熊去氧胆酸量的2~3摩尔倍例如2.5摩尔倍),在40~50℃例如44~46℃温度处搅拌2~3小时例如2.5小时,过滤弃沉淀物,然后向滤液中添加1~2倍例如1.5倍体积的乙酸乙酯,静置2~4小时例如3小时,析出沉淀,过滤,弃滤液,得到沉淀物;

[0065] (4) 向上一步骤所得沉淀物中添加乙醇(例如以沉淀物重量:乙醇体积比为1g:3~5ml例如1g:4ml的比例添加乙醇),在室温下搅拌0.5小时,静置2~4小时例如3小时,滤除沉淀,得到滤液;

[0066] (5) 向上一步骤所得滤液中添加1~2倍体积例如2倍体积的乙酸乙酯-乙醚(5:1)混合液,静置5~8小时例如6小时,析出沉淀,过滤,得到沉淀物,减压干燥除去溶剂,得到式I化合物。

[0067] 根据本发明第三方面的化合物,其中在步骤(1)中,将80目筛网过滤所得滤液使用1M盐酸溶液调节其pH=3.0~3.5。

[0068] 根据本发明第三方面的化合物,其中在步骤(1)中,将所述滤液调节其pH=3.0~3.5后,还向滤液中添加1.0~1.5%氯化钠。已经出人意料地发现,通过将所述滤液调节其pH=3.0~3.5并且向其中添加规定量氯化钠,可以使得所述牛磺熊去氧胆酸在后续进行切向流超滤时进入滤液部分,而其它结合型胆酸绝大部分进入到浓缩回流液中。

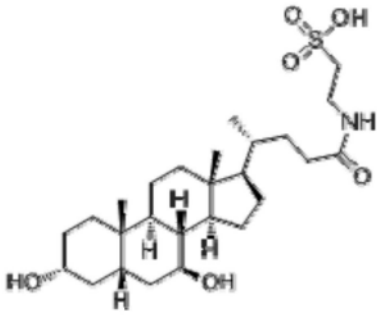
[0069] 根据本发明第三方面的化合物,其中步骤(2)中,经历切向流超滤所得的滤液中,牛磺鹅去氧胆酸是牛磺熊去氧胆酸重量的0~5%,优选是0~3%,优选是0~2%。即,在所得滤液中,基本上没有牛磺鹅去氧胆酸。

[0070] 根据本发明第三方面的化合物,其中步骤(2)中,经历切向流超滤所得的回流液中,牛磺熊去氧胆酸是牛磺鹅去氧胆酸重量的0~8%,优选是1~5%,优选是1~3%。即,在所得回流液中,基本上没有牛磺熊去氧胆酸的残留。经历上述步骤(2)的切向流超滤,可以将牛磺鹅去氧胆酸和牛磺熊去氧胆酸分离开来。

[0071] 进一步的,本发明第四方面提供了本发明第二方面任一项所述精制熊胆粉或者第三方面所述化合物在制备用于预防或治疗肝病和肝纤维化以及用于改善肝功能的产品中的用途。

[0072] 牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA),化学名为2-[[ (3 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 7 $\beta$ ) -3, 7-二羟基-24-氧代胆甾烷-24-基]氨基]乙烷磺酸二水合物,亦可表述为3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -二羟基胆甾烷酰-N-牛磺酸, CAS No: 14605-22-2。牛磺熊去氧胆酸的化学结构式如下:

[0073]

分子式: C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>N<sub>0</sub>S, 分子量: 499.7

[0074] 1902年自熊胆中发现TUDCA,其为熊胆中主要胆汁酸,具有解痉、抗惊厥、抗炎及溶胆石等作用。牛磺熊去氧胆酸是熊胆汁的有效成分,由意大利贝思迪大药厂研制,1991年首次在意大利上市,2007年以商品名滔罗特(taurolite)获准在中国销售,临床主要用于治疗胆囊胆固醇结石、原发性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化和慢性丙型肝炎等。临床研究表明,牛磺熊去氧胆酸与熊去氧胆酸相比,溶石速度加快、全溶率提高,且无明显的不良反应。

[0075] 本发明通过对熊胆粉进行精加工处理,得到的精制熊胆粉呈现一种或多种优良性能。

#### 附图说明

[0076] 图1为本发明精制熊胆粉的典型粉末X射线衍射图。

#### 具体实施方式

[0077] 通过下面的实施例可以对本发明进行进一步的描述,然而,本发明的范围并不限于下述实施例。本领域的专业人员能够理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可以对本发明进行各种变化和修饰。本发明对试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性和/或具体的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。以下实施例进一步说明本发明,而不是限制本发明。

[0078] 在本发明中,如果使用到A)本发明实施例1精制熊胆粉(即T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、B)实施例2组精制熊胆粉(牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、C)滔罗特三者为研究试药时,当描述它们的剂量时,如未另外说明,三者剂量均折算成牛磺熊去氧胆酸的量;若为口服给药,如未另外说明,在给药前均研磨成能够通过80目筛的细粉,给药前均将其以2%牛磺熊去氧胆酸浓度混悬于2%羧甲基纤维素钠中。

[0079] 测定各种物料中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量的方法:参照张赞华文献(张赞华,等,HPLC指纹图谱法测定熊胆胶囊中的胆汁酸类成分,华西药学杂志,2009,24(4):402~403)之“实验部分”记载的HPLC法,采用牛磺熊去氧胆酸对照品和牛磺鹅去氧胆酸对照品(均购自中国食品药品检定研究院)的外标法以峰面积计算。在测定牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐时,牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐在流动相中解离出游离牛磺熊去氧胆酸并且与其对照品保留时间一致,经测定,精氨酸在此HPLC法中不会影响其它物质的测定。

[0080] 测定各种物料中精氨酸的含量的方法:参照刘瑞文献(刘瑞,等,HPLC法测定布洛芬注射液中精氨酸的含量,西北药学杂志,2013,28(4):361)之2.1.4节至2.1.10节方法进

行,并且专属性、线性、精密度、重复性、稳定性、回收率符合一般的分析方法要求,牛磺熊去氧胆酸不影响精氨酸的测定。

[0081] 实施例1:制备精制熊胆粉

[0082] (1) 将(无管引流法)采集的熊胆汁(当将其减压干燥得到粉末时,测定该粉末中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量,分别为22.63%和16.31%,此数据为两种物质在熊胆汁固形物中的百分含量)加水稀释(加2.5倍体积水稀释),用80目筛网过滤,将80目筛网过滤所得滤液使用1M盐酸溶液调节其pH=3.3,接着向滤液中添加1.2%氯化钠,得粗熊胆液(将此粗熊胆液减压干燥得到粉末,测定此粉末中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量,分别为28.47%和20.33%,这显示二者比例与过滤前基本不变,但是由于过滤去除了杂质而得以浓缩;另外,可以根据上述百分数结果和熊胆汁、粗熊胆液的体积计算出这些物料中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的质量;从上述熊胆汁和粗熊胆液中两种物质质量的质量回收率讲,即粗熊胆液中牛磺熊去氧胆酸质量除以熊胆汁中牛磺熊去氧胆酸的质量再乘以100%所得百分数,牛磺熊去氧胆酸回收率99.78%、牛磺鹅去氧胆酸回收率99.43%);

[0083] (2) 使用切向流超滤系统(仕必纯KR2i型切向流超滤系统),用超纯水冲洗管路,安装1kD的MidiKros过滤器,对步骤(1)所得粗熊胆液进行过滤,得到滤液和10倍浓缩回流液(测定此工艺中间体或经减压干燥所得粉末中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量);

[0084] (3) 使用1M氢氧化钠溶液将上一步骤所得滤液调节其pH=6.8,接着向其中加入精氨酸(其量是滤液中牛磺熊去氧胆酸量的2.5摩尔倍),在44~46℃温度处搅拌2.5小时,过滤弃沉淀物,然后向滤液中添加1.5倍体积的乙酸乙酯,静置3小时,析出沉淀,过滤,弃滤液,得到沉淀物;

[0085] (4) 向上一步骤所得沉淀物中添加乙醇(例如以沉淀物重量:乙醇体积比为1g:4ml的比例添加乙醇),在室温下搅拌0.5小时,静置3小时,滤除沉淀,得到滤液;(本领域技术人员公知,提到乙醇时,若未注明浓度,均是指98%乙醇)

[0086] (5) 向上一步骤所得滤液中添加2倍体积的乙酸乙酯-乙醚(5:1)混合液,静置6小时,析出沉淀,过滤,得到沉淀物,减压干燥除去溶剂,得到精制熊胆粉。

[0087] 上述工艺中,经测定:

[0088] 步骤(2)中,经历切向流超滤所得的滤液中,牛磺鹅去氧胆酸是牛磺熊去氧胆酸重量的0.76%,表明在所得滤液中,基本上没有牛磺鹅去氧胆酸;

[0089] 步骤(2)中,经历切向流超滤所得的滤液,测定其中牛磺熊去氧胆酸的含量,结合滤液体积计算牛磺熊去氧胆酸质量,与步骤(1)投料的熊胆汁中牛磺熊去氧胆酸质量相比,其回收率为98.26%,表明经历切向流超滤后牛磺熊去氧胆酸具有极高的回收率;

[0090] 步骤(2)中,经历切向流超滤所得的滤液,取其一部分减压干燥除溶剂得到粉末固形物,经测定,该固形物中,牛磺熊去氧胆酸占该固形物重量的83.68%,表明通过切向流超滤能够使得牛磺熊去氧胆酸显著富集于滤液中;

[0091] 步骤(2)中,经历切向流超滤所得的回流液中,牛磺熊去氧胆酸是牛磺鹅去氧胆酸重量的1.14%,表明在所得回流液中,基本上没有牛磺熊去氧胆酸的残留;经历上述步骤(2)的切向流超滤,可以将牛磺鹅去氧胆酸和牛磺熊去氧胆酸分离开来;

[0092] 步骤(5)所得精制熊胆粉中,牛磺熊去氧胆酸含量为73.62%;

[0093] 步骤(5)所得精制熊胆粉中,牛磺熊去氧胆酸与精氨酸的摩尔比为1:1.004;

[0094] 步骤(5)所得精制熊胆粉中,牛磺熊去氧胆酸与精氨酸总量占该精制熊胆粉总量的百分比为99.27%;

[0095] 步骤(5)所得精制熊胆粉与步骤(1)投料的熊胆汁中牛磺熊去氧胆酸质量相比,牛磺熊去氧胆酸在从步骤(1)至步骤(5)的整个过程中回收率为94.51%,表明本发明方法对于牛磺熊去氧胆酸具有非常高的回收率;

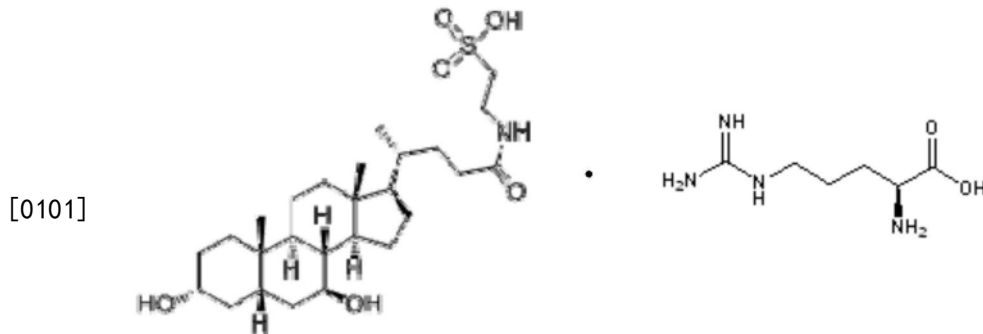
[0096] 步骤(5)所得精制熊胆粉的熔点为187~189℃。

[0097] 根据上述结果,可以确定本发明所得精制熊胆粉是一种具有187~189℃熔点的牛磺熊去氧胆酸精氨酸(1:1)盐。

[0098] 使用如下粉末X射线衍射分析方法测定结晶的衍射图:Rigaku Dmax/2400型粉末X衍射仪;Cu-K $\alpha$ 辐射,石墨单色器,40kV/40mA,2 $\theta$ 扫描范围为5-40°,扫描速度4°/分,步长0.01°;扫描方式为连续扫描;狭缝设置:出射slit DS:1/2°防散射slit:SS 1/2°;RS:0.3mm。

[0099] 本实施例1步骤(5)所得精制熊胆粉的粉末X射线衍射图如图1所示,图1的部分典型衍射角数据如下:以2 $\theta$ 角度表示的粉末X-射线衍射图谱,在8.53°(22.0%,相对丰度,下同)、10.96°(100.0%)、12.03°(39.5%)、13.14°(19.7%)、14.82°(45.3%)、17.26°(33.3%)、22.53°(69.3%)、24.21°(24.6%)、26.68°(46.8%)、29.42°(61.2%)、31.24°(49.5%)处有衍射峰。这表明本实施例1步骤(5)所得精制熊胆粉呈现一种典型的结晶形式,其在本发明中可称为T晶型或者可称为(即T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐等称谓)。

[0100] 本实施例1步骤(5)所得精制熊胆粉(即T晶型),其本质上是如下式I所示化合物,即牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐(1:1):



I

[0102] 实施例2:制备精制熊胆粉

[0103] 步骤(1)~步骤(4)照实施例1进行;步骤(5)中将所用乙酸乙酯-乙醚(5:1)混合液改为乙酸乙酯,沉淀物减压干燥除去溶剂,得到精制熊胆粉。经测定,此精制熊胆粉的熔点为162~163℃,熔点差异表明其与实施例1精制熊胆粉具有不同的晶型。

[0104] 实施例3:制备精制熊胆粉

[0105] 步骤(1)~步骤(4)照实施例1进行;步骤(5)中将所用乙酸乙酯-乙醚(5:1)混合液改为乙醚,沉淀物减压干燥除去溶剂,得到精制熊胆粉。经测定,此精制熊胆粉的熔点为173~175℃,熔点差异表明其与实施例1精制熊胆粉具有不同的晶型。

[0106] 以上实施例2和实施例3的结果表明,在步骤(5)中用乙酸乙酯-乙醚(5:1)混合液

结果能够获得熔点为187~189℃的T晶型,而不用此混合液时获得的结晶不同。

[0107] 对实施例1~3所得三种精制熊胆粉在45℃温度处放置3个月,然后测定它们的熔点,结果三批精制熊胆粉的熔点分别为188~189℃、168~174℃、180~185℃,结果显示实施例1产品是稳定的,而实施例2~3产品熔点呈现较大变化且熔程大,表明其稳定性存在缺陷。

#### [0108] 实施例4:制备精制熊胆粉

[0109] (1) 将(无管引流法)采集的熊胆汁(其固形物中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量分别为22.17%和17.15%)加水稀释(加2.5倍体积水稀释),用80目筛网过滤,向滤液中添加1.2%氯化钠,得粗熊胆液(其固形物中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量分别为28.23%和20.07%);

[0110] (2) 使用切向流超滤系统(仕必纯KR2i型切向流超滤系统),用超纯水冲洗管路,安装1kD的MidiKros过滤器,对步骤(1)所得粗熊胆液进行过滤,得到滤液和10倍浓缩回流液。

[0111] 经测定,步骤(2)经历切向流超滤所得的滤液与步骤(1)投料的熊胆汁中牛磺熊去氧胆酸质量相比的回收率为42.53%,表明经历切向流超滤后牛磺熊去氧胆酸回收率相当低。由于此非常低的回收率,本实施例未继续后续操作。

#### [0112] 实施例5:制备精制熊胆粉

[0113] (1) 将(无管引流法)采集的熊胆汁(其固形物中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量分别为22.43%和16.84%)加水稀释(加2.5倍体积水稀释),用80目筛网过滤,将80目筛网过滤所得滤液使用1M盐酸溶液调节其pH=3.3,得粗熊胆液(其固形物中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量分别为28.72%和20.65%);

[0114] (2) 使用切向流超滤系统(仕必纯KR2i型切向流超滤系统),用超纯水冲洗管路,安装1kD的MidiKros过滤器,对步骤(1)所得粗熊胆液进行过滤,得到滤液和10倍浓缩回流液。

[0115] 经测定,步骤(2)经历切向流超滤所得的滤液与步骤(1)投料的熊胆汁中牛磺熊去氧胆酸质量相比的回收率为56.14%,表明经历切向流超滤后牛磺熊去氧胆酸回收率相当低。由于此非常低的回收率,本实施例未继续后续操作。

[0116] 另外经测定,实施例4和实施例5的步骤(2)经历切向流超滤所得的滤液中,牛磺鹅去氧胆酸分别是牛磺熊去氧胆酸重量的34.52%和41.17%,表明有较大比例的牛磺鹅去氧胆酸进入滤液中。

[0117] 根据实施例4和实施例5的结果可见,在进行切向流超滤时,溶液调节pH=3.3同时向其中添加氯化钠对于提高牛磺熊去氧胆酸的回收率是有益的。另外,局限于现有技术,本发明人尚无法解释的是,尽管牛磺鹅去氧胆酸与牛磺熊去氧胆酸等结合型胆汁酸在化学结构或性能方面可能具有相似性,然而它们在切向流超滤工艺中呈现显著不同的过滤行为,并且似乎这种过滤行为差异与pH=3.3和氯化钠的处置有一定关联性,尽管这些结果并不影响本发明对于现有技术的贡献,然而本发明人仍然期待随着技术的进步在不久的将来能够解释上述现象。

#### [0118] 实验例1:精制熊胆粉的口服生物利用度

[0119] 供试品:实施例1所得精制熊胆粉、实施例2所得精制熊胆粉、市售牛磺熊去氧胆酸胶囊(滔罗特,H20150398,250mg/粒)。滔罗特经测定其每粒胶囊中的粉末重量约为250mg,表明其未添加辅料或者仅添加极微量辅料。实施例1和2精制熊胆粉以及滔罗特三者给药

前均研磨成能够通过80目筛的细粉,给药前均将其以2%浓度混悬于2%羧甲基纤维素钠中。

[0120] 动物:雄性日本大耳白家兔(江西中医药大学实验动物科技中心供)24只,体重2.0~2.5kg,随机均分为三组,A组给予实施例1精制熊胆粉,B组给予实施例2精制熊胆粉,C组给予滔罗特。

[0121] 给药及取血及血样处理:于给药前取血(耳缘静脉)1ml,作为0时血样;给药剂量以牛磺熊去氧胆酸形式计,以50mg牛磺熊去氧胆酸/kg体重的剂量灌胃给药,分别于0.5h、1h、2h、4h、6h、10h、15h、21h、30h同法取血;将血样离心出血浆0.5mL,然后用甲醇振摇提取、离心弃沉淀,重复此甲醇提取三次,合并甲醇液后挥干甲醇,待测。

[0122] 参考杨欣欣文献(杨欣欣,等,熊胆缓释滴眼凝胶兔眼内药代动力学研究,时珍国医国药,2017,28(7):1634)的HPLC方法,HPLC色谱条件:色谱柱为迪马C18(5 $\mu$ m,4.6mm $\times$ 250mm),流动相为磷酸二氢钠缓冲盐溶液(0.03mol/L,pH值4.4):甲醇=62:38,流速1.0ml/min,检测波长210nm,柱温30 $^{\circ}$ C,进样量20 $\mu$ l。牛磺熊去氧胆酸对照品购自Sigma-Aldrich公司,对照品和血样处理品用甲醇溶解后加流动相稀释,用于HPLC测定。HPLC方法的专属性、线性、精密度、稳定性、检测限、定量限、回收率均满足一般的生物样品分析要求。

[0123] 测定各时间点血样中,根据各时间点的血药浓度,用3P87软件、开放型二室模型处理血药浓时曲线数据,得曲线峰下面积AUC(0— $\infty$ )以及最大血药浓度C<sub>max</sub>和拟合的达峰时间T<sub>max</sub>,以AUC计算各样品相对于市售品的相对生物利用度,结果如下表(以均值 $\pm$ sd表示):

样品	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/mL)	AUC ( $\mu$ g/mL/h)	相对生物利用度 (%)
实施例1	2.83 $\pm$ 0.38	934.26 $\pm$ 56.81	126 937.63	151.7
实施例2	3.11 $\pm$ 0.62	742.63 $\pm$ 47.52	79 348.57	94.9
滔罗特	3.28 $\pm$ 0.33	717.59 $\pm$ 67.28	83 648.93	100

[0125] 根据上述结果可见,实施例1产品的生物利用度远远高于市售产品以及具有不同晶型的实施例2产品。

[0126] 鉴于本发明牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐在吸收进入血液循环后会呈解离的状态,即呈游离的牛磺熊去氧胆酸,将与滔罗特一样发挥其活性成分的应有生物学作用。例如,本发明产品牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐可以用于溶解胆固醇结石等疾病。

[0127] 实施例2:精制熊胆粉的降血脂作用

[0128] 1.材料

[0129] 供试品:实施例1所得精制熊胆粉、实施例2所得精制熊胆粉、市售牛磺熊去氧胆酸胶囊(滔罗特,H20150398,250mg/粒)。实施例1和2精制熊胆粉以及滔罗特三者给药前均研磨成能够通过80目筛的细粉,给药前均将其以2%浓度混悬于2%羧甲基纤维素钠中。

[0130] 胆固醇购自Sigma-Aldrich公司,产品号C8667,纯度 $\geq$ 99%;胆酸购自Sigma-Aldrich公司,产品号C1129,纯度 $\geq$ 98%;甲基硫氧嘧啶(市售片剂,H32022717)。

[0131] 动物:体重18~22g的昆明种雄性小鼠,体重180~220g的Wistar雄性大鼠,江西中医药大学实验动物科技中心供。

[0132] 2.对正常大鼠血脂的影响

[0133] 取大鼠40只,随机分为5组,每组8只。

- [0134] 空白对照组:2%羧甲基纤维素钠(体积与实施例1精制熊胆粉体积相同),
- [0135] 阳性对照组:药物为复方三维亚油酸胶丸I(临床上使用的降血脂药)0.6粒/kg(相当于临床常用量的10倍),
- [0136] 实施例1组:实施例1精制熊胆粉(即T晶型)50mg/kg(相当于临床常用量的10倍,下同),
- [0137] 实施例2组:实施例2精制熊胆粉50mg/kg,
- [0138] 滔罗特组:滔罗特50mg/kg。
- [0139] 以上各组,每日给药1次,均为14d。末次给药后4h采血,用酶比色法测定血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、及高密度脂蛋白(HDL)等参数,由此计算低密度脂蛋白(LDL,  $LDL = TC - (HDL + TG) / 5$ ),和动脉硬化指数(AI,  $AI = (Tc - HDL) / HDL$ ),进行组间比较。精制熊胆粉对正常大鼠血脂影响结果中,能够准确地反映血脂水平与AS、CHD之间的关系的参数HDL/TC比值、动脉硬化指数(AI)等部分数据列于下表(均值±S)。

[0140]

组别	TC(mmol/L)	HDL/TC(%)	AI(Tc—HDL)/HDL
空白对照	0.671±0.036	63.72±15.33	0.569±0.143
阳性对照	0.614±0.025*(-8.5%)	85.26±20.24***	0.173±0.086***
滔罗特	0.583±0.041**(-13.1%)	81.03±14.73**	0.234±0.077**
实施例2	0.576±0.032**(-14.2%)	77.24±13.28**	0.294±0.092**
实施例1	0.528±0.038***(-21.3%)	88.53±16.52***	0.130±0.084***

[0141] 与空白对照组比较,\*<0.05、\*\*<0.01、\*\*\*<0.001;TC栏中括号内的百分数是相比于空白对照组TC值的降低百分数。

### [0142] 3. 对高脂血症小鼠血脂的影响

[0143] 取小鼠60只,随机分为5组,每组12只。各组用4%胆固醇、1%胆酸、5%猪油、0.2%甲基硫氧嘧啶及93.3%普通饲料组成的高脂饲料饲养7d。各组药物剂量、给药方法、给药天数、测定及数据计算同上面针对正常大鼠的试验。末次给药4h后取出眼球采血,测上述各种指标,进行组间比较。精制熊胆粉对高脂血症小鼠血脂影响结果中,能够准确地反映血脂水平与AS、CHD之间的关系的参数HDL/TC比值、动脉硬化指数(AI)等部分数据列于下表(均值±S)。

组别	TC(mmol/L)	HDL/TC(%)	AI(Tc—HDL)/HDL
[0144] 空白对照	2.987±0.317	29.28±9.37	2.415±0.238
阳性对照	2.324±0.183**(-22.2%)	44.80±11.62**	1.232±0.194**
滔罗特	2.274±0.206**(-23.9%)	48.36±13.21***	1.068±0.146***
[0145] 实施例2	2.353±0.264**(-21.2%)	41.37±9.83**	1.417±0.171**
实施例1	2.026±0.238***##(-32.2%)	70.77±10.71***###	0.413±0.163***###

[0146] 与空白对照组比较,\*<0.05、\*\*<0.01、\*\*\*<0.001;与阳性对照组比较,#<0.05、##<0.01、###<0.001;TC栏中括号内的百分数是相比于空白对照组TC值的降低百分数。

[0147] 高脂血症是一种常见病、多发病。血清胆固醇(TC)升高是诱发动脉粥样硬化(AS)



及冠心病(CHD)的重要因素。CHD是西方国家人口中死亡的主要原因之一。近年来,我国的CHD发病率也有增长的趋势。我国35岁以上人群的CHD发病率为3%~5%,在人口死因顺位中,心血管病已从过去的3~7位上升到1~2位。HDL与发病率呈负相关。HDL可抑制细胞对LDL的摄取,阻碍胆固醇在细胞内堆积,把过多的胆固醇以酯的形式转运出来,从而阻止动脉硬化的发生。因此HDL/TC比值、动脉硬化指数(AI)更能准确地反映血脂水平与AS、CHD之间的关系,通常来讲,HDL/TC比值越大、动脉硬化指数(AI)越小,则表示药物的降血脂作用更好(郭虹,中国循环杂志,1992,7(1):86)。正常动物的血脂对药物的敏感性较低,如果用药后能使正常大鼠血清总胆固醇下降20%,则可认为药物有降胆固醇作用(李义奎,等,中药药理实验方法学,上海科技出版社,1991,397),根据药物对正常动物的降血脂结果可见,本发明牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐具有降血脂作用。上文结果显示,比之于阳性药物和其它牛磺熊去氧胆酸,本发明T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐在正常大鼠和高脂血症模型小鼠中均能够更加明显地降低大鼠血清胆固醇,其降血脂作用比阳性药物及其它牛磺熊去氧胆酸更强,T晶型能显示地增加HDL/TC比值、降低动脉硬化指数(AI)。这些结果提示,本发明T晶型的牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐具有明显的降血脂、抗动脉硬化作用。

[0148] 实施例3:精制熊胆粉对胆结石、胆囊炎、胆囊功能的作用

[0149] 1、体外溶解胆结石的试验

[0150] 试药:A)采用本发明实施例1精制熊胆粉(即T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、B)实施例2组精制熊胆粉(牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、C)滔罗特三者为研究试药、D)重蒸水。

[0151] 结石:得自南昌大学一附医的3种人体结石分别为胆色素结石、胆固醇结石和混合型结石,其经醋酸酐法定性分析结石类型、分类后洗净并干燥至恒重。

[0152] 试药配制:用重蒸水分别配制三种试药(A组、B组、C组)的试药液,均折算成牛磺熊去氧胆酸计高浓度为0.5%。然后称取一定重量(1~1.2g)结石浸泡于10ml不同浓度的上述试药液中,每隔2天新换试药液1次,同时设对照组(用重蒸水代替试药液,D组)进行比较观察。分别于第15天和第45天取出结石洗净干燥恒重,记录余石重量,用下式计算溶石率:溶石率(%)=(结石初始重量-溶解后重量)÷结石初始重量×100%。结果如下:

时间	结石类型	A组	B组	C组	D组
[0153] 第15天	胆色素结石	31.34±3.15%**	17.82±3.32%	21.37±4.85%	0.02%
	胆固醇结石	23.37±2.83%**	14.83±2.18%	12.26±2.43%	-0.03%
	混合型结石	25.73±1.75%**	13.84±3.83%	15.36±3.64%	0.04%
第45天	胆色素结石	73.45±5.33%**	27.86±4.28%	29.44±2.33%	-0.04%
	胆固醇结石	54.72±4.76%**	26.92±3.84%	25.76±1.86%	0.03%
	混合型结石	57.38±6.47%**	22.63±5.37%	28.93±3.27%	0.06%

[0154] 注:同一结石的A组与C组比较,\*\*P<0.01。

[0155] 从上表可见,A组(T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)对三种结石的溶石效果显著优于市售品,P<0.01;而实施例2精氨酸盐与市售品基本无差异。表明本发明T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐具有优良的体外溶石作用。

[0156] 2、体内防结石试验

[0157] 本试验通过抑制家兔食饵性胆固醇结石形成试验考察本发明T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐在体内防结石的效果。

[0158] 取66只健康新西兰雄性大白兔(江西中医药大学实验动物科技中心供),随机分为5组,其中A组采用本发明实施例1精制熊胆粉(即T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、B组采用实施例2组精制熊胆粉(牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、C组滔罗特、D组空白对照组、E组模型组;D组10只动物,其余各组每组14只动物。实施例1和2精制熊胆粉以及滔罗特三者在给药前均研磨成能够通过80目筛的细粉,给药前均将其以2%牛磺熊去氧胆酸浓度混悬于2%羧甲基纤维素钠中。

[0159] 除空白对照组D组给予正常饲料喂养外,其余各组每天用含1%胆固醇的成石饲料喂养,同时每2天灌胃给药一次,每次给药剂量:A、B、C三组剂量均相当于含牛磺熊去氧胆酸50mg/kg,E组模型组给予等容积2%羧甲基纤维素钠。观察45d后剖杀,测定成石率,进行组间比较,结果见下表。

组别	动物数	成石动物数	成石率	结石总重*
A组	14	2	14.3%	4.57mg
B组	14	6	42.9%	15.84mg
C组	14	5	35.7%	13.51mg
D组	10	0	0	0
E组	14	11	78.6%	34.07mg

[0161] 注:\*结石总重是指从该组各只已形成结石的动物体内取出的结石的总重量。

[0162] 各组动物观察结果:D组全部动物试验间活泼健康、食欲旺盛、皮毛光泽;E组全部家兔在喂养过程中逐渐出现摄食减少、精神不振、皮毛不洁、体重不增、先后死亡3只,剖腹发现胆道中均有结石发生(它们均计入成石动物);其余三组家兔状态均优于E组,且三组均未见死亡。45d剖杀肉眼观察,只有空白对照组胆囊正常,其它给予成石饲料的各组家兔胆囊均有不用程度增生,以模型组病变最为严重,形状多不规则,囊壁炎性增厚明显。剖杀后检查发现,模型组14只家兔中有11只形成结石,其中7只结石在胆囊,2只结石在肝总管,2只结石在肝总管和胆囊兼有,成石率高达78.6%;空白对照组全部动物均未成石,模型组与空白对照组成石情况比较表明经45d的成石饲料喂养后造模成功;与E组相比,A、B、C组成石率明显更低,而A组比之于B组和C组亦有明显更低的成石率;结石总重数据与成石率呈现组间相同的差异趋势。上述结果表明,本发明T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐具有抑制胆结石发生的作用,进而具有体内防石作用。

[0163] 3、改善成石胆汁成分的作用

[0164] 众所周知,胆囊炎、胆结石患者的胆汁成分(即成石胆汁成分)与正常人的胆汁成分有显著差异,主要表面在患者的胆固醇含量高、呈饱和状态,由于胆道系统炎症改变(即胆囊炎)胆汁酸重吸收增多,胆汁酸浓度下降;患者胆囊粘液(糖蛋白)分泌亢进,粘液是促核形成因子,不仅增加胆汁的粘稠度而且使饱和状态的胆固醇易形成结晶,对胆固醇结石的形成具有重要的影响。本试验考察本发明T晶型的精氨酸盐在改善成石胆汁成分方面的效果。

[0165] 取66只健康新西兰雄性大白兔,随机分为5组,其中A组采用本发明实施例1精制熊胆粉(即T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、B组采用实施例2组精制熊胆粉(牛磺熊去氧胆酸

精氨酸盐)、C组滔罗特、D组空白对照组、E组模型组;D组10只动物,其余各组每组14只动物。实施例1和2精制熊胆粉以及滔罗特三者 in 给药前均研磨成能够通过80目筛的细粉,给药前均将其以2%牛磺熊去氧胆酸浓度混悬于2%羧甲基纤维素钠中。

[0166] 除D组给予正常饲料喂养外,其余各组用含1%胆固醇的成石饲料喂养,同时每天灌胃给药一次,每次给药剂量:A、B、C三组剂量均相当于含牛磺熊去氧胆酸50mg/kg,E组模型组给予等容积2%羧甲基纤维素钠。

[0167] 45d后进行试验,将家兔用戊巴比妥钠1g/kg耳缘静脉注射麻醉,麻醉后固定,剖腹,沿十二指肠第一段,暴露胆总管,向肝侧和肠侧分别插管,结扎固定后将导管引出体外缝合腹壁。接取胆汁分别进行下述测定:立即用偶氮法测定胆红素、用高铁硫酸显色法测定胆固醇、用荧光分光光度法测胆汁酸、用Alcian Blue法测定粘液含量,结果见下表。

[0168]	组别	胆红素(mg/dl)	胆固醇(mg/ml)	总胆汁酸(mg/ml)	黏液(mg/ml)
	A组	1.51±0.46**	0.26±0.10***	0.43±0.11***	1.63±0.42**
	B组	1.94±0.58*	0.45±0.14*	0.31±0.07**	2.18±0.36*
[0169]	C组	2.07±0.73	0.41±0.11*	0.29±0.09**	2.43±0.62
	D组	1.21±0.69	0.19±0.07	0.23±0.12	0.62±0.34
	E组	2.37±0.71##	0.61±0.23###	0.14±0.07#	3.06±0.87###

[0170] 注:各用药组与E组比较\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;E组与D组比较# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

[0171] 模型组与空白对照组比较,胆红素、胆固醇、粘液的含量均明显增加 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ ,总胆汁酸含量减小且有显著意义 $P < 0.05$ ,表明造模成功。与模型组相比,三种试药在胆红素、胆固醇、黏液方面均有不同程度的降低,尤其是A组明显比另外两种试药降低效果明显;三种试药还能够不同程度地提高总胆汁酸浓度,尤其是T晶型组效果最为显著。众所周知,牛磺熊去氧胆酸等胆汁酸具有溶解结石的作用,并能抑制羟甲基戊二酰辅酶A还原酶活性(此酶为肝脏合成胆固醇的限速酶,使内源性胆固醇合成减少),从而降低胆固醇的含量,能抑制胆固醇7 $\alpha$ -脱氢酶,从而抑制其它胆汁酸的合成,并且能够有效抑制胆固醇在肠道的吸收,促进胆汁中的胆固醇含量降低,而且还能使呈饱和状态的胆固醇胆汁成为不饱和状态,胆汁中胆固醇浓度的降低不仅能阻止胆固醇结石形成,还可促进其重新溶解。本发明上述结果表明,本发明T晶型精氨酸盐有降低胆汁中胆红素、胆固醇、粘液含量,增加总胆汁酸含量的作用,这些指标表明本发明T晶型精氨酸盐能够明显地改善成石胆汁成分,进而能够用于预防或治疗胆结石疾病、预防或治疗胆囊炎、以及改善胆囊功能。

[0172] 实施例4:精制熊胆粉抑制肝纤维化的作用

[0173] 1、材料

[0174] 实验动物为雄性SD大鼠(江西中医药大学实验动物科技中心供),体重170-195g。

[0175] 试剂:二甲基亚硝胺购自Sigma-Aldrich公司,直接红(Direct Red-80)购自Sigma-Aldrich公司,免疫组化单克隆抗体ED1购自美国Santa Cruz公司, $\alpha$ -SMA购自丹麦Dako公司。试药:A)采用本发明实施例1精制熊胆粉(即T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、B)实施例2组精制熊胆粉(牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐)、C)滔罗特三者为研究试药,三者 in 给药

前均研磨成能够通过80目筛的细粉,给药前均将其以2%牛磺熊去氧胆酸浓度混悬于2%羧甲基纤维素钠中。

## [0176] 2、方法

[0177] 参照Matsuda文献[Matsuda Y, et al. Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology*, 1997; 26: 81-89]的方法制备动物模型并参考此模型给予各种试药。各种注射用的试药使用注射用生理盐水配制成为以1mL/kg量注射的浓度。将50只动物随机分为5组, A组(10只): 10g/L二甲基亚硝胺(生理盐水配制) 1mL/kg连续3天/周, 腹腔内注射共4周, 同时用T晶型牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐50mg/kg/d灌胃共4周; B组(10只): 10g/L二甲基亚硝胺(生理盐水配制) 1mL/kg连续3天/周, 腹腔内注射共4周, 同时用实施例2牛磺熊去氧胆酸精氨酸盐50mg/kg/d灌胃共4周; C组(10只): 10g/L二甲基亚硝胺(生理盐水配制) 1mL/kg连续3天/周, 腹腔内注射共4周, 同时用滔罗特50mg/kg/d灌胃共4周; D组即正常对照组(10只): 注射用生理盐水1mL/kg连续3天/周, 腹腔内注射共4周, 同时用2%羧甲基纤维素钠如A组灌胃那样等体积灌胃共4周; E组即模型组(10只): 10g/L二甲基亚硝胺(生理盐水配制) 1mL/kg连续3天/周, 腹腔内注射共4周, 同时用2%羧甲基纤维素钠如A组灌胃那样等体积灌胃共4周。实验结束后, 对动物称重, 用乙醚麻醉, 心脏采血离心处理。

[0178] 血清生化指标的检测: 血清ALT、AST活性检测采用Reiman氏方法, 总蛋白含量采用Biuret法, 全部试剂盒购自日本荣研化学公司, 严格按试剂盒说明书进行操作, 利用分光光度计测定吸光度, 对照标准曲线计算AST、ALT值和总蛋白含量。

[0179] 病理学检查: 采血后立即取肝脏称质量, 计算肝脏/体重百分比。病理学检查: 取肝组织二块, 经40g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片行HE和直接红染色(1g/L直接红苦味酸饱和液), 光镜下观察肝组织的病理变化及纤维组织增生程度。直接红染色的切片使用Aperio数字病理扫描仪与分析系统(Aperio AT2型, 徕卡显微系统公司)进行胶原纤维的定量分析, 观察条件: 物镜10倍, 每张切片随机选5个视野, 图像采集、分割处理, 参数统计分析, 得出目标总面积/统计场总面积之比值。免疫组织化学染色: 切片厚4~5 $\mu$ m, 常规脱蜡至水, 用SP法进行免疫组化染色, ED1工作浓度为1:500,  $\alpha$ -SMA工作浓度为1:50; 观察肝组织内KC和HSC数量及分布。统计学处理采用SPSS 13.0软件进行统计学分析。

## [0180] 3、结果

[0181] 试药组(例如A组)与模型组相比: 血清ALT活性下降、AST活性下降、总蛋白含量升高、肝脏/体重比升高、胶原纤维面密度下降, 这些参数的变化趋势均表明T晶型精氨酸盐有抑制肝纤维化的生物学效果。实验第4周末各项指标的检测结果如下表。5个参数的结果经统计学比较, E组与D组相比均为 $p < 0.001$ 或 $p < 0.01$ , 表明造模成功。

[0182]

组别	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	TP(g/L)	肝脏/体重比(%)	面密度(%)
A组	727.3 $\pm$ 91.3***	2636.9 $\pm$ 231.7***	64.2 $\pm$ 4.2**	2.86 $\pm$ 0.28**	3.43 $\pm$ 0.73***
B组	1038.6 $\pm$ 88.7*##	3748.2 $\pm$ 313.6***	55.8 $\pm$ 6.6*#	2.44 $\pm$ 0.34*#	7.27 $\pm$ 1.27*##
C组	974.0 $\pm$ 102.7**#	4132.7 $\pm$ 636.4*##	57.4 $\pm$ 4.2*#	2.35 $\pm$ 0.41*#	7.61 $\pm$ 1.06*##
D组	346.2 $\pm$ 82.6	1483.5 $\pm$ 248.3	73.3 $\pm$ 5.7	3.13 $\pm$ 0.24	1.41 $\pm$ 0.47

[0183]	E 组	1317.2±134.2	6241.3±732.3	48.6±5.1	2.07±0.33	10.36±1.35
--------	-----	--------------	--------------	----------	-----------	------------

[0184] 与E组比较,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。与A组比较,# $p < 0.05$ ,## $p < 0.01$ 。

[0185] 从上述数据可见,A、B、C各组均与模型组呈现统计学差异;A组差异明显比B、C两组更显著,并且A组与B、C两组显著更优。病理学观察结果显示:D组肝小叶结构正常,肝细胞无变性、坏死,肝小叶中央静脉壁和汇管区有少量胶原纤维;E组肝小叶结构紊乱,肝细胞变性、灶状或片状坏死,汇管区大量纤维组织增生,并形成较粗的纤维间隔伸入肝组织内,大部分形成弥漫性肝硬化;A组肝细胞变性、坏死较模型组轻,汇管区纤维组织减少,纤维间隔变细或消失,少量纤细的纤维间隔伸入肝组织内,只有小部分形成弥漫性肝硬化;B、C两组观察结果显示其优于E组但是不如A组。免疫组化染色结果:D组 $\alpha$ -SMA在肝小叶中央静脉壁有少量阳性表达,汇管区的各种血管壁阳性表达,肝细胞间无阳性细胞,ED1在肝小叶中央静脉周围、汇管区和肝实质内有少量阳性细胞分布;E组大量肝KC(ED1+)和HSC( $\alpha$ -SMA+)在增生的纤维组织及间隔内弥漫分布,肝实质内散在分布;A组肝KC和HSC的分布与模型组相似,但两种细胞的数量明显减少;B、C两组观察结果显示其优于E组但是不如A组。

[0186] 有些文献报道牛磺熊去氧胆酸能够对抗四氯化碳CC14引起的小鼠血清谷丙转氨酶升高,对CC14所致的肝病理组织改变有一定保护作用,能够缓解高脂高热量饮食引起的肝脂肪变性,对急慢性、黄疸型肝炎和肝硬化有效。本实验血清检测结果表明,本发明T晶型精氨酸盐有较好的降酶作用,其中AST活性下降较明显,血清总蛋白含量和肝/体质量比升高,肝组织胶原纤维面密度明显减少,表明该T晶型具有较好的抑制DMN诱发大鼠肝纤维化的作用,进而具有保肝护肝的效果。

[0187] 本说明书引用的所有参考文献,包括而但不限于所有的论文、出版物、专利、专利申请、简报、教科书、报告、底稿、小册子、书籍、互联网文章、杂志文章、期刊等,通过引用以其整体结合到本说明书中。本文的参考文献的讨论仅仅意在概括其作者所做出的断言,并非承认任何参考文献构成现有技术。申请人保留对所引用的参考文献的准确性和相关性提出异议的权利。

[0188] 虽然使用特定术语、装置和方法描述了本公开的实施方案,但是这类描述只用于说明目的。所用词汇是描述词汇而不是限制词汇。应当理解在不偏离随附权利要求书中阐述的本公开的精神和范围的情况下,本领域普通技术人员可进行变动和改变。另外,应当理解各种实施方案的方面可全部或部分互换。因此,随附权利要求书的精神和范围不应限于其中所含优选形式的描述。

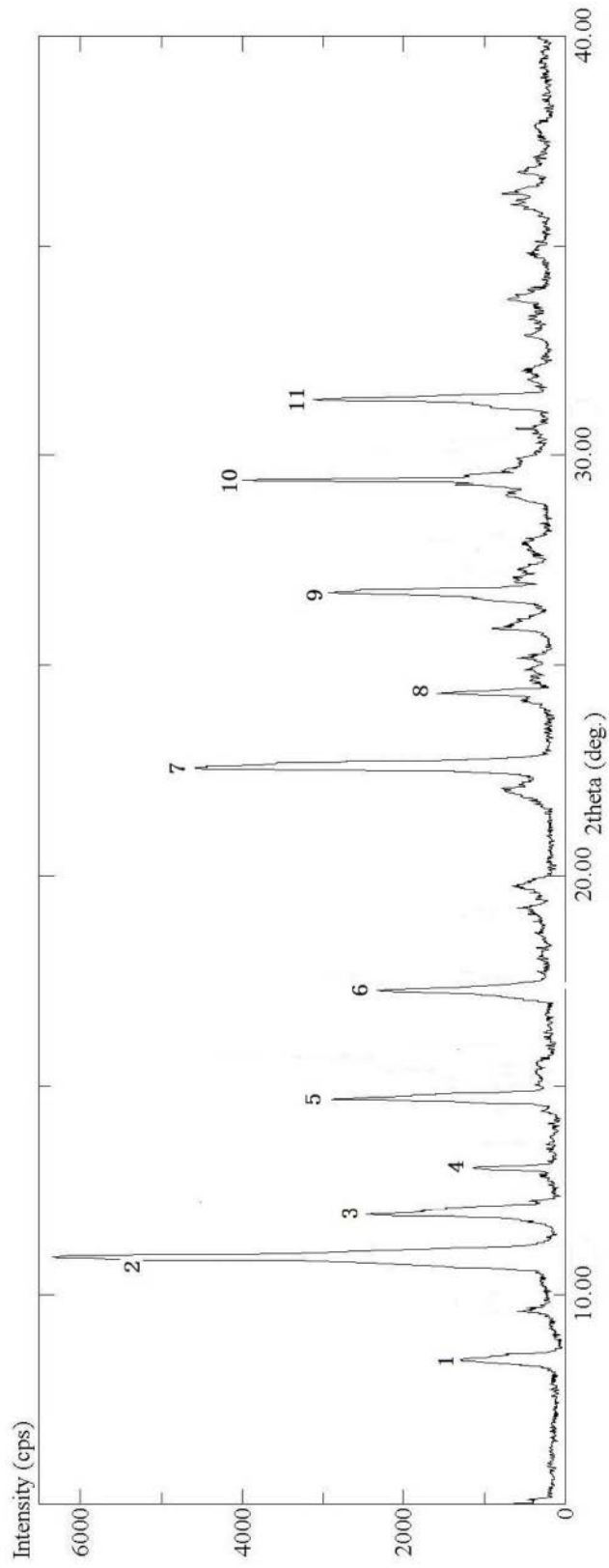


图1