

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 325**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/537** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61P 9/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2014 PCT/CN2014/080077**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14201994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2014 E 14813421 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3011965**

54 Título: **Extracto de *Salvia miltiorrhiza*, formulación de microgránulos del mismo, formulación de microgránulos encapsulada preparada a partir del mismo, métodos de preparación y usos de la misma**

30 Prioridad:

**17.06.2013 CN 201310237560**  
**17.06.2013 CN 201310237932**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.03.2021**

73 Titular/es:

**TASLY PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.**  
**(100.0%)**  
**Tasly Modern TCM Garden Pu Jihe East Road No.**  
**2 Beichen District**  
**Tianjin 300410, CN**

72 Inventor/es:

**YAN, XIJUN;**  
**ZHANG, SHUNNAN;**  
**YE, ZHENGLIANG;**  
**ZHOU, LIHONG;**  
**DONG, HAI'OU;**  
**ZHANG, WENSHENG;**  
**ZHANG, HONGBO;**  
**MA, CHANGYU;**  
**ZHENG, YONGFENG y**  
**FAN, LIJUN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 810 325 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Extracto de *Salvia miltiorrhiza*, formulación de microgránulos del mismo, formulación de microgránulos encapsulada preparada a partir del mismo, métodos de preparación y usos de la misma

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la medicina, más en particular a un nuevo extracto de *Salvia miltiorrhiza* y a su formulación de microgránulos, así como a una formulación de microgránulos encapsulada preparada a partir del mismo. Asimismo, la presente invención se refiere a una formulación que contiene el extracto de *Salvia miltiorrhiza* mencionado anteriormente, a métodos de preparación y usos del mismo.

10

**Antecedentes de la invención**

La raíz de *Salvia miltiorrhiza* (nombre en chino: Danshen) es una raíz seca, que proviene de la raíz de *Salvia miltiorrhiza Bunge*. Se ha utilizado para el tratamiento de la angina de pecho por cardiopatía coronaria (CHD, *coronary heart disease*) con casi miles de años de historia en China. El Danshen se registró por primera vez en *Classic of Shen Nong Materia Medica* of E. Han Dynasty y figura en el grado superior. Se confirmó que tenía efectos para detener el dolor haciendo circular la Qi (energía), tranquilizando la mente calmando el corazón, enfriando la sangre eliminando el calor y eliminando la estasis activando la sangre.

20

Desde el siglo pasado, con el desarrollo de métodos de separación química y el aumento de la fitoquímica moderna, los componentes químicos del Danshen se han estudiado más a fondo.

Como se muestra en estudios, en el Danshen existen principalmente dos grupos de componentes bioactivos: una categoría es el componente bioactivo liposoluble representado por la tanshinona y la otra es el componente bioactivo hidrosoluble representado por el ácido salvianólico. Entre los componentes bioactivos liposolubles, se demostró que la tanshinona tenía múltiples efectos antisépticos, antiinflamatorios, eliminando la estasis activando la sangre y promoviendo la cicatrización. En los últimos años, los estudios sugirieron que se creía que el componente bioactivo hidrosoluble era el que desempeñaba un papel en la eliminación de la estasis activando la sangre. Por ejemplo, el ácido salvianólico A tuvo un efecto notablemente protector sobre la lesión de células miocárdicas causada por I/R (isquemia/reperfusión), mientras que los ácidos salvianólicos totales mostraron un efecto más fuerte de arritmia anti I/R. Se confirmó que el ácido salvianólico A, el ácido salvianólico B y los ácidos salvianólicos totales tenían efectos protectores de la lesión cerebral en ratas causada por I/R, lo que podría reducir el contenido de MDA en el tejido cerebral. Los ácidos salvianólicos no solo tenían efectos antitrombóticos, sino también un efecto protector sobre el hígado y los riñones. Por otra parte, tenían un fuerte efecto antioxidante, lo que podría eliminar el anión superóxido y los radicales libres, inhibir la peroxidación lipídica etc. (Guanhua DU etc, *Basic Medical Science and Clinics*, 2000, 20(5): 10-14).

30

35

Ahora, el método de extracción de la fracción hidrosoluble del Danshen, se centró en los métodos de extracción con agua y después en la separación mediante una columna de resina o de poliamida. Por ejemplo, Takashi Tanaka, etc comunicó un método de extracción de salvianolato (*Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 1989, 37 (2), 340-344). Por otra parte, KojiHase etc (*PlantaMedica*, 1997, 63, 22-26), Yaming XU etc. (patente china CN1247855A, publicada en marzo de 2000), Ping LIU etc (patente china CN1270809A, publicada en octubre de 2000) y Lianniang LI etc (patente china 01142288.2, publicada en septiembre de 2001) revelaron métodos similares de extracción de ácidos salvianólicos de Danshen.

45

En la técnica anterior, los métodos de extracción de Danshen generalmente se dividieron en las siguientes categorías:

50

El Danshen se extrajo con agua para tener un líquido de extracción de agua, seguido de concentración y precipitación con etanol para dar el sobrenadante. El sobrenadante obtenido se concentró para obtener el extracto en bruto de Danshen con ácidos salvianólicos como componentes principales.

El Danshen se sometió a decocción con agua para tener líquido de extracción acuoso, seguido de concentración y precipitación con etanol para dar el sobrenadante. El sobrenadante obtenido se concentró hasta cierto grado y se hizo pasar a través de una columna de resina macroporosa o de una columna de poliamida. La columna se eluyó con agua y etanol para dar el eluyente, que se concentró y se secó para tener el extracto con ácidos salvianólicos como componentes principales.

60

El Danshen se extrajo con CO<sub>2</sub> mediante extracción con líquidos supercríticos para dar extracto de tanshinona y el residuo se sometió a decocción con agua y se precipitó con etanol para dar el sobrenadante. El sobrenadante obtenido anteriormente se hizo pasar a través de una columna de resina, que se eluyó con agua y etanol para tener el extracto hidrosoluble.

65

En los métodos anteriormente mencionados, se suele seleccionar una parte de las fracciones como componentes

bioactivos, por ejemplo, los ácidos salvianólicos o las tanshinonas. La utilización del Danshen es relativamente baja, debido a que la otra parte de los componentes bioactivos se desaprovecha y no se extraen todos los componentes del Danshen. Esto dará como resultado un desaprovechamiento de recursos medicinales.

- 5 El microgránulo virgen es un portador común en la preparación farmacéutica, que se usa en la mayoría de las cápsulas disponibles en el comercio. En primer lugar, el microgránulo virgen se carga con fármaco y se recubre para prepararse en el microgránulo diana que tiene una propiedad de liberación. Presenta buena fluidez, facilidad de carga en cápsula, pequeña diferencia cuantitativa de llenado y liberación estable, etc. El microgránulo es muy utilizado en el campo de la farmacia. Como portador, puede prensarse en un comprimido y cargarse en cápsulas.
- 10 El microgránulo no solo mejora la estabilidad del medicamento, sino que también ajusta eficazmente la tasa de liberación del mismo. Como sistema de suministro de fármacos, el microgránulo tiene sus propias ventajas terapéuticas, por ejemplo, menor estimulación intestinal, reducción del efecto de absorción rápida del fármaco y aumento de la seguridad del mismo.
- 15 La tecnología de carga de fármacos con el microgránulo virgen se ha utilizado durante muchos años, pero son muy pocos los productos de la medicina tradicional china (MTC) que intervienen. La tecnología de carga de fármacos de la MTC, presenta más o menos limitaciones, por ejemplo, una pequeña cantidad de carga de fármaco, inestabilidad y escasa presencia, etc. En la bibliografía de patente se proporcionan algunos ejemplos de composiciones de extracto de *Salvia miltiorrhiza* para su uso en la mejora de la microcirculación (CN 1 827 130 A), en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (CN 102 846 705 A) o en el tratamiento de afecciones isquémicas (CN 102 772 487 A). La extracción de *Salvia miltiorrhiza* puede realizarse con etanol y precipitación con agua (CN 102 846 705 A); o mediante la preparación adicional de ácido salvianólico por medio de resinas del agua (CN 102 772 487 A). En la bibliografía no de patente, tal como Cai et al. ("Study on Extraction And Refinement of *Salvia miltiorrhiza*", archivos chinos de medicina tradicional china, vol.11, no.30, 2012, págs. 2565-2570), se proporciona una comparación entre diferentes esquemas de extracción. Sin embargo, no se sugiere una combinación de extractos de etanol y agua. El contenido de CN 103 127 220 A y CN 101 773 546 A desvela un proceso de recubrimiento de lecho fluido para *Salvia miltiorrhiza*.

#### Contenido de la invención

- 30 Para utilizar mejor el medicamento en bruto de Danshen, aprovechando por completo el efecto farmacológico del Danshen, el objetivo de la presente invención es proporcionar un extracto de Danshen con una actividad farmacológica más fuerte. Después de la mejora tecnológica, se ha desarrollado una tecnología de carga de fármaco apropiada para el extracto de Danshen mencionado anteriormente, y se ha preparado adicionalmente en microgránulos de Danshen.

En la presente invención, el extracto de Danshen se define mediante uno cualquiera de los siguientes párrafos numerados.

- 40 1. Un extracto de Danshen (*Salvia miltiorrhiza*), caracterizado por que dicho extracto comprende los siguientes componentes por parte en peso: Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (0,5-16): (0,5-15): (0,5-15): (5-140): (0,5-25): (1-50): (150-600).
- 45 2. El extracto según el párrafo 1, caracterizado por que dicho extracto comprende los siguientes componentes por parte en peso: Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (1-8): (1-8): (1-8): (10-70): (1-10): (2-20): (250-500).
- 50 3. El extracto según el párrafo 2, caracterizado por que dicho extracto comprende los siguientes componentes por parte en peso: Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (2-5): (2-5): (2-5): (25-60): (2-6): (4-10): (300-450).
- 55 4. El extracto según el párrafo 3, caracterizado por que dicho extracto comprende los siguientes componentes por parte en peso: Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (2-4): (2-4): (2-4): (25-30): (2-5): (4-10): (330-400).
- 60 5. El extracto según el párrafo 4, caracterizado por que dicho extracto comprende los siguientes componentes por parte en peso: Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = 3: 3: 3: 28: 4: 7: 370.
- 65 6. Una formulación de microgránulos, que como principio activo (PA), comprende uno cualquiera de los extractos de Danshen mencionados anteriormente en los párrafos 1 ~ 5.
7. El microgránulo según el párrafo 6, caracterizado por que la densidad aparente de dicho microgránulo es de 0,6 ~ 1,3 g/ml, el área de superficie específica es de 0,005 ~ 0,05 m<sup>2</sup>/g y el tamaño de partícula es de 0,5 ~ 1,8 mm.

8. El microgránulo según el párrafo 6 o 7, caracterizado por que la densidad aparente de dicho microgránulo es de 0,8 ~ 1,1 g/ml, el área de superficie específica es de 0,01 ~ 0,03 m<sup>2</sup>/g y el tamaño de partícula es de 0,7 ~ 1,2 mm.

5 9. Un método de preparación de extracto de Danshen que comprende las siguientes etapas:

(1) extraer Danshen con alcohol y filtrarlo para dar líquido de extracción alcohólico y residuo A para su uso posterior;

10 (2) Extraer el residuo A con agua, filtrarlo para dar líquido de extracción acuoso y desechar el residuo B;

(3) Respectivamente, los líquidos de extracción alcohólicos y acuosos mencionados anteriormente, se enfrían y se dejan en reposo y ambos sobrenadantes se extraen para dar el sobrenadante alcohólico y acuoso respectivamente;

15 (4) El sobrenadante de agua mencionado anteriormente se concentra para tener un líquido de extracción de agua concentrado;

20 (5) Añadir gradualmente el sobrenadante alcohólico al líquido de extracción acuoso concentrado, combinar y concentrar para dar una solución concentrada mezclada;

(6) Añadir agua purificada a la solución concentrada mezclada, combinar bien para dar extracto de Danshen.

25 10. El método del párrafo 9, caracterizado por que en la etapa (1), el alcohol es etanol a una concentración de 50 ~ 100 % (v/v) en una cantidad de 2 ~ 7 veces el peso del medicamento en bruto y el tiempo de extracción es de 0,5 ~ 4 horas.

30 11. El método del párrafo 9 o 10, caracterizado por que en la etapa (2), la cantidad de agua añadida es de 3 ~ 7 veces el peso del residuo A y el tiempo de extracción es de 0,5 ~ 4 horas.

35 12. Los métodos de uno cualquiera de los párrafos 9 ~ 11, caracterizados por que en la etapa (3), dicho proceso de enfriamiento y reposo incluye las siguientes etapas: agitar el líquido de extracción durante 20 ~ 60 min y dejar en reposo durante 6 ~ 24 horas disminuyendo la temperatura a 15° C o a una temperatura inferior, antes de extraer el sobrenadante.

40 13. Los métodos de uno cualquiera de los párrafos 9 ~ 12, caracterizados por que en la etapa (4), el sobrenadante de agua se concentra a una densidad relativa de 1,10 ~ 1,35 para dar el líquido de extracción de agua concentrado.

14. Los métodos de uno cualquiera de los párrafos 9 ~ 13, caracterizados por que en la etapa (6), a la solución concentrada mezclada se la añade agua purificada varias veces 10 l ~ 100 l, 5 l ~ 50 l cada vez, se combina y se concentra al vacío para dar el extracto con una densidad relativa de 1,25 ~ 1,35 a 82,5 ± 2,5° C.

45 15. Los métodos de uno cualquiera de los párrafos 9 ~ 14, caracterizado por que dicho método comprende las siguientes etapas: coger Danshen molido, añadir 400 ± 12 l de etanol (90 ± 0,5 %), someter a decocción durante 90 ± 5 min, filtrar a través de un tamiz de malla 200, combinar y poner en un tanque de separación. Para la 2ª decocción durante de 60 ± 3 min., al residuo resultante se le añaden 500 ± 15 l de agua, se filtra a través de un tamiz de malla 200 y el residuo se desecha. El líquido de extracción acuoso se combina y se coloca en diferentes tanques. El líquido de extracción alcohólico mezclado y el líquido de extracción acuoso mezclado se colocan en diferentes tanques de separación, por los que se hace pasar agua congelada para enfriar y se deja reposar. Después de 30 minutos de agitación, el líquido de extracción se enfría a 15° C o a una temperatura inferior durante 4 horas y se deja reposar durante 6 ~ 24 horas. El sobrenadante de agua y el sobrenadante de alcohol se transfieren a los tanques respectivos. En primer lugar, el sobrenadante acuoso se concentra en líquido de extracción de agua concentrado con una densidad relativa de 1,25 ~ 1,30 (82,5 ± 2,5° C), en el que gradualmente se añade el sobrenadante de alcohol y además se combina y se concentra. Durante el proceso de concentración, la densidad de la solución concentrada no es inferior a 1,15. Cuando la densidad de la solución concentrada mezclada es >1,34, se añaden dos veces 10 l de agua purificada, 5 l cada vez (45 ± 5° C), se combina, se concentra a una densidad relativa de 1,33 ~ 1,35 (82,5 ± 2,5° C), y se filtra inmediatamente a través de un tamiz de malla 40 para dar el extracto de Danshen.

60 16. Los métodos de uno cualquiera de los párrafos 9 ~ 15, caracterizados por que el extracto de Danshen preparado mediante dicho método comprende los siguientes componentes por parte en peso:  
 65 Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (0,5-16): (0,5-15): (0,5-15): (5-140): (0,5-25): (1-50): (150-600).

17. El método del párrafo 16, caracterizado por que el extracto de Danshen preparado comprende los siguientes componentes por parte en peso:

Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (1-8): (1-8): (1-8): (10-70): (1-10): (2-20): (250-500).

5

18. El método del párrafo 17, caracterizado por que el extracto de Danshen preparado comprende los siguientes componentes por parte en peso:

Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (2-5): (2-5): (2-5): (25-60): (2-6): (4-10): (300-450).

10

19. El método del párrafo 18, caracterizado por que el extracto de Danshen preparado comprende los siguientes componentes por parte en peso:

Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (2-4): (2-4): (2-4): (25-30): (2-5): (4-10): (330-400).

15

20. El método del párrafo 19, caracterizado por que el extracto de Danshen preparado comprende los siguientes componentes por parte en peso:

Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = 3: 3: 3: 28: 4: 7: 370.

20

21. Un método de preparación de microgránulos que contiene extracto de Danshen que comprende las siguientes etapas:

(1) Tomar el extracto de Danshen y el microgránulo virgen en una proporción en peso de 1: 5 ~ 5: 1 para su uso posterior;

25

(2) Suministro y fluidificación: el microgránulo virgen de la fórmula posológica, se absorbe en una máquina de recubrimiento de secado fluidificado para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado;

30

(3) Carga de fármaco en fase inicial: una vez que la temperatura del material alcanza los 40 ~ 60° C, se pulveriza un líquido y se extiende sobre la superficie del microgránulo a una tasa de 70 ~ 120 g/min. Dicho líquido pulverizado consiste en pequeñas gotitas preparadas atomizando el extracto de Danshen premezclado obtenido diluyendo con agua el extracto de Danshen;

35

(4) Fase de carga del fármaco: cuando el material está a 40 ~ 60° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo. El diámetro del microgránulo y la tasa de pulverización aumentan gradualmente para dar un gránulo con un diámetro de 0,5 ~ 1,8 mm.

40

22. El método del párrafo 21, caracterizado por que dicho método comprende adicionalmente la etapa (5): después de la pulverización, el microgránulo de carga de fármaco se recubre pulverizando líquido de recubrimiento. La temperatura del material de recubrimiento es de 40 ~ 60° C, la tasa de pulverización es de 40 ~ 300 g/min, el tiempo de recubrimiento de 1 ~ 4 horas y la concentración de líquido de recubrimiento de 5 ~ 25 %.

45

23. El método del párrafo 22, caracterizado por que dicho método comprende las siguientes etapas:

(1) Tomar el extracto de Danshen y el microgránulo virgen en una proporción en peso de 1: 3 ~ 3: 1, preferiblemente de 2: 1 ~ 1: 1, para su uso posterior;

50

(2) Suministro y fluidificación: a un volumen de aire de 600 ~ 1500 m<sup>3</sup>/h, el microgránulo virgen se absorbe en una máquina de recubrimiento de secado fluidificado para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado. Sin embargo, la fluidificación no puede ser demasiado fuerte, para impedir que el microgránulo virgen se desgaste y espolvoree. Debido a esto, el microgránulo virgen debe cubrirse con las gotitas atomizadas con la pistola pulverizadora;

55

(3) Carga de fármaco en fase inicial: la pistola pulverizadora y la presión de pulverización se ajustan para hacer que los líquidos se atomicen en pequeñas gotitas. El extracto se suministra a la pistola pulverizadora mediante una bomba dosificadora. Las presiones del chorro de aire superior e inferior se establecieron a 200 ~ 300 KPa (2,0 ~ 3,0 bares) y a 250 ~ 350 KPa (2,5 ~ 3,5 bares), respectivamente. La temperatura del material es de 50°C. Una vez que la temperatura alcanza los 45° C, la solución de suministro comienza a pulverizarse a una tasa de 120 g/min;

60

(4) Fase de carga del fármaco: cuando el material está a 45 ~ 55° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo, pero la velocidad máxima no supera los 400 g/min. El volumen de aire se ajusta de acuerdo con el estado fluidificado del microgránulo;

65

(5) Recubrimiento: después de la carga del fármaco, el líquido de recubrimiento se pulveriza directamente para realizar el recubrimiento. Inicialmente, la temperatura del material se establece a 50° C y la tasa de pulverización a 80 g/min. Después de 20 minutos de recubrimiento, la tasa de pulverización puede ajustarse a 80-150 g/min., la temperatura del material se regula a 40-55° C. La tasa de infusión, el volumen de aire y la temperatura del material se ajustan de acuerdo con la adhesión del microgránulo.

24. El método del párrafo 23, caracterizado por que la solución de extracto medicinal se prepara por dilución de extracto de Danshen con agua. La proporción en peso del extracto de Danshen con respecto al agua es de 100: 60-100, preferiblemente de 100: 70-90, más preferiblemente de 100: 75-85.

25. Los métodos de uno cualquiera de los párrafos 21 ~ 24, caracterizados porque dicho microgránulo es el microgránulo de uno cualquiera de los párrafos 6 ~ 8.

26. Los extractos de Danshen de uno cualquiera de los párrafos 1 - 5 o la formulación de microgránulos de uno cualquiera de los párrafos 6 - 8, para su uso en la mejora de la microcirculación o la reducción de lípidos en la sangre.

En la presente invención, el extracto de Danshen comprende componentes de Danshen tanto hidrosolubles como liposolubles. Mediante el ajuste del proceso, los componentes hidrosolubles y liposolubles se dispersan uniformemente en dicho extracto de Danshen. Por otro lado, la secuencia de concentración y la densidad relativa se establecen en el presente método, lo que efectivamente impedirá una concentración reducida de tanshinona causada por la concentración prolongada a alta temperatura. Los componentes liposolubles de Danshen se conservan eficazmente después de extraer Danshen con alcohol, lo que puede mejorar la estabilidad del extracto. La adición de agua en una fase posterior de concentración para concentrarse conjuntamente puede reducir los disolventes orgánicos residuales en el extracto.

En la presente invención, como se muestra en el resultado de la prueba de eficacia, el extracto de Danshen mostró sus efectos de mejorar significativamente la angiectasia de la microcirculación auricular capilar en ratones, mejorando aún más la microcirculación. Por otro lado, como se muestra en el resultado de la prueba de eficacia, el extracto de Danshen tiene el efecto de reducir los lípidos en la sangre.

En la presente invención, la formulación de microgránulos presenta menos portadores y una dosis única más pequeña, generalmente de 0,1 ~ 4 g cada vez. Morfológicamente, tiene forma regular de una partícula esférica o esferoidal con una superficie lisa. Dicha formulación de microgránulos tiene excelentes propiedades físicas, por ejemplo, buena fluidez, tamaño de partícula bien distribuido, textura compacta y resistencia a la compresión, resistencia a la abrasión, alta densidad (densidad aparente: 0,6-1,3 g/ml), pequeña área de superficie específica (0,005-0,05m<sup>2</sup>/g, preferiblemente 0,01-0,03m<sup>2</sup>/g) y corto límite de desintegración. Estas propiedades no solo pueden mejorar el cumplimiento de los pacientes, sino que también permiten promover el uso real de la tecnología de recubrimiento, resolviendo así los problemas de la fácil absorción de la humedad y la inestabilidad. Por otra parte, además de utilizarse como un gránulo normal, dicho microgránulo de la presente invención puede utilizarse para un producto inmediato, para gránulos de fórmula o para cargarse en cápsulas. Además, dicho microgránulo puede prepararse en varios tipos de formas de dosificación de recubrimiento, formulación de liberación sostenible o controlada y formulación de suministro de fármacos en sitios específicos, etc.

#### Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama comparativo de extractos de Danshen preparados mediante dos formas de concentración diferentes: (1) adhesión al matraz después de desechar el extracto de Danshen; (2) matraz de lavado con agua; (3) matraz de lavado con alcohol al 95 %. En donde, (a) se mostró que el líquido de extracción alcohólico se concentró primero y se añadió con el líquido de extracción acuoso; (b) se mostró que el líquido de extracción acuoso se concentró primero y se añadió gradualmente con líquido de extracción alcohólico.

La figura 2 es el diagrama de recubrimiento mediante dos formas de concentración diferentes.

La Fig. 3 es una curva de concentración y mortalidad del pez cebra con respecto al extracto de Danshen.

La Fig. 4 muestra la región cuantitativamente analítica de lípidos en sangre en el pez cebra, en el que el lípido en sangre se analizó cuantitativamente dentro de la región de la línea continua.

La figura 5 muestra la tinción de grasa vascular en la cola del pez cebra 48 horas después del tratamiento con diferentes concentraciones.

La figura 6 es un gráfico de barras de la reducción de lípidos en sangre en el pez cebra, causada por el extracto de Danshen preparado a diferentes concentraciones.

#### Realizaciones

En una realización de esta invención, en la etapa (3) del método preparativo del extracto de Danshen, enfriamiento y reposo significa que el extracto se agita durante 20 ~ 60 minutos disminuyendo su temperatura a 15° C o a una temperatura inferior, se deja que el extracto repose durante 6 ~ 24 horas y se extrae el sobrenadante. Al enfriar a temperatura ambiente o a una temperatura inferior, las impurezas se pueden eliminar rápidamente, por ejemplo, partículas contaminantes. La baja temperatura puede acortar el tiempo de reposo, que es aplicable a la industrialización, garantizando la estabilidad de la tanshinona y de los ácidos salvianólicos.

En una realización de esta invención, en la etapa (5) del método preparativo del extracto de Danshen, al líquido de extracción de agua concentrado se le añade gradualmente el sobrenadante de alcohol de la etapa (3), combinado y concentrado a presión reducida para dar el líquido concentrado mezclado con una densidad relativa  $\geq 1,20$ . Si el sobrenadante de alcohol se concentra primero solo, las tanshinonas serán propensas a la precipitación y aglomeración a medida que disminuya la concentración de alcohol en el líquido, finalmente adhiriéndose a la pared del dispositivo. En el presente método, al líquido de extracción de agua concentrado se le añade gradualmente el sobrenadante de alcohol, combinado y concentrado, lo que hará que las tanshinonas del sobrenadante de alcohol se dispersen bien en un líquido de extracción de agua concentrado. Debido a esto, se muestra que el extracto preparado mediante el modo de concentración de la presente invención, tiene un tamaño de partícula uniforme, que impide eficazmente la disminución de la concentración de las tanshinonas causada por la concentración a alta temperatura prolongada y conserva una recuperación relativamente alta de los componentes liposolubles preparados por extracción con alcohol. En la producción real, el extracto tiene un simple requisito para el equipo de limpieza, es fácil de operar y factible de industrializar. Lo que es más importante aún, será beneficioso para la formulación posterior. A continuación, los experimentos se proporcionan para elaborar los efectos de diferentes formas de concentración sobre las propiedades de los extractos de Danshen.

En una realización de esta invención, en la etapa (6) del método preparativo del extracto de Danshen, A la solución concentrada mezclada, se la añaden dos veces 10 litros de agua purificada, 5 l cada vez, se combinan y se concentran a presión reducida a una densidad relativa de 1,25-1,35 a  $82,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$  y se filtra inmediatamente para dar extracto de Danshen. La adición de agua tiene como objetivo evaporar el alcohol, controlar los residuos de alcohol y mejorar la calidad del extracto de Danshen. A través del método de la invención el producto puede cumplir el requisito de la UE para el alcohol residual del extracto ( $\leq 0,5 \%$ ).

El extracto de Danshen de la presente invención se analizó mediante el método desvelado en la técnica anterior.

(1) Determinación de tanshinona IIA y criptotanshinona (en relación con elementos de la Raíz de *Salvia miltiorrhiza* en la *Farmacopea China* (2010))

Las condiciones cromatográficas y la idoneidad del sistema estuvieron presentes de la siguiente manera: como material de relleno se utilizó una columna  $C_{18}$ ; como fase móvil se utilizó metanol-agua (75:25); y la longitud de onda de detección era de 270 nm. El número teórico de placa calculado para el pico de tanshinona IIA no fue inferior a 2000.

Preparación de solución estándar: una cantidad apropiada de criptotanshinona y tanshinona IIA se pesó con precisión y se colocó en un matraz aforado marrón y se añadió metanol para dar la solución estándar que contenía 16  $\mu\text{g}$  por ml de criptotanshinona y tanshinona IIA.

Preparación de la solución de muestra: se tomaron aproximadamente 0,2 g de extracto de Danshen, se pesaron con precisión y se colocaron en un matraz aforado de 10 ml. Se añadió metanol para disolverlo mediante ultrasonido durante 30 minutos, se enfrió a temperatura ambiente, continuado por la adición de metanol al volumen, se agitó y se pasó a través de una membrana orgánica de 0,22  $\mu\text{m}$  para dar la solución de la muestra.

Método de ensayo: se extrajeron con precisión 5  $\mu\text{l}$  de solución estándar y solución de muestra, respectivamente, se inyectaron en HPLC y se midió para dar el resultado.

(2) Determinación de ácidos salvianólicos

Las condiciones cromatográficas y la idoneidad del sistema estuvieron presentes de la siguiente manera: como material de relleno se utilizó una columna  $C_{18}$  (2,1 x 100 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ); como fase móvil A se utilizó una solución acuosa de ácido sulfúrico al 0,05 % (ml/ml), como fase móvil B una solución de acetonitrilo por elución en gradiente de acuerdo con la Tabla 1; caudal a 0,4 ml/min; longitud de onda de detección a 280 nm, temperatura de la columna a 40° C y tiempo de grabación durante 12 min. El número teórico de placa calculado para el pico de Danshensu no fue inferior a 8000.

Tabla 1: gradiente de elución para la determinación de ácidos salvianólicos

Tiempo	A (solución de ácido fosfórico al 0,05 %) (%)	B (acetonitrilo) (%)
0-1,6	93→82	7→18
1,6-1,8	82→79,2	18→20,8
1,8-6,1	79,2→75	20,8→25
6,1-8,0	75→65	25→35
8,0-8,5	65→10	35→10
8,5-10,5	10	90
10,5-11,0	10→93	90→7
11,0-12,0	93	7

Preparación de solución estándar: una cantidad apropiada de Danshensu, ácido rosmarínico, ácido litospérmico y ácido salvianólico B, se pesó con precisión y se colocó en un matraz aforado de 100 ml. Se añadió metanol al 75 % para disolver hasta el volumen y se agitó hasta dar la solución estándar a una concentración de 0,03, 0,04, 0,04, 0,5 mg/ml.

Preparación de la solución de muestra: se pesaron con precisión aproximadamente 0,1 g de sustancia de muestra, se colocaron en un matraz aforado de 10 ml y se añadió agua purificada para disolverlo mediante ultrasonido durante 15 minutos. Se añadió agua hasta el volumen y se pasó a través de una membrana de agua de 0,22 µm para dar la solución de muestra.

Método de ensayo: se extrajeron con precisión 2 µl de solución estándar y solución de muestra respectivamente y se inyectaron en HPLC para determinar mediante un método estándar externo.

### (3) Determinación de estaquiosa

Condiciones cromatográficas e idoneidad del sistema

Condiciones cromatográficas de la columna de amino:

columna de amino Hypersil-NH2 (4,6 mmx250 mm, 5 µm), Dalian Elite, temperatura de la columna a 40° C; como fase móvil se utilizó acetonitrilo-agua (v:v=70:30); caudal a 1,0 ml/min.

Preparación de solución estándar: una cantidad apropiada de estaquiosa se pesó con precisión y se colocó en un matraz aforado de 10 ml. Se añadió agua para disolver hasta el volumen para dar la solución madre de estaquiosa a una concentración de 5 mg/ml.

Preparación de la solución de muestra: Se pesaron con precisión 0,1 g de sustancia de muestra, se colocaron en un matraz aforado de 10 ml y se añadió agua purificada para disolverlo mediante ultrasonido durante 15 minutos. Se añadió agua hasta el volumen y se pasó a través de una membrana de agua de 0,22 µm para dar la solución de muestra.

Método de ensayo: se extrajeron con precisión 2 µl de solución estándar y solución de muestra respectivamente y se inyectaron en HPLC para determinar mediante un método estándar externo.

En una realización de esta invención, el microgránulo virgen, también conocido como gránulo virgen o gránulo medicinal, como se conoce en la técnica anterior, está disponible en el comercio. Los núcleos de gránulos medicinales incluyen principalmente gránulos medicinales (tipo sacarosa), gránulos de celulosa microcristalina y gránulos de almidón, etc. Dicho microgránulo virgen de la presente invención es uno seleccionado de gránulo de almidón, gránulo de PEG-6000, gránulo de sacarosa o gránulo de celulosa microcristalina, preferiblemente gránulo de almidón o gránulo de PEG-6000. Este gránulo muestra una serie de ventajas, como la alta carga de fármaco, fácil de recubrir, fácil de controlar y factible de industrializar.

En una realización de esta invención, el microgránulo de carga de fármaco puede prepararse en cápsulas de gránulo después de un procesamiento adicional. Dicho microgránulo está recubierto, tamizado para dar microgránulos recubiertos, que se carga en cápsulas vacías para obtener la cápsula de gránulos de la MTC.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos experimentales se ofrecen solo con el fin de ilustrar adicionalmente la presente invención.

A menos que se indique otra cosa, en la presente invención, % y ‰, se refiere a relación en peso.

Experimento 1: efecto de diferentes formas de concentración sobre el extracto Danshen

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para investigar el efecto de las diferentes formas de concentración en una serie de propiedades del rasgo, la distribución de las partículas y la constitución del ácido salvianólico.

5 Se pesaron con precisión 450 g de Danshen, se extrajo 4 veces con etanol al 90 % durante 1,5 horas y se filtró para dar la solución de extracto; los residuos resultantes se sometieron a reflujo 5 veces con agua durante 1 hora, se filtraron, para tener líquido de extracción alcohólico y líquido de extracción acuoso. En cada experimento la extracción se repitió dos veces en paralelo.

10 1<sup>er</sup> esquema: en primer lugar, el líquido de extracción alcohólico se concentró, seguido de adición gradual de líquido de extracción acuoso concentrado, combinado y concentrado para dar el extracto con un grado de azúcar de  $86 \pm 2$  %.

15 2<sup>o</sup> esquema: en primer lugar, el líquido de extracción acuoso se concentró hasta un grado de azúcar de  $84 \pm 2$  %, seguido de adición del líquido de extracción alcohólico, combinado y concentrado para dar el extracto con un grado de azúcar de  $86 \pm 2$  %.

20 En primer lugar, después de desechar el extracto de Danshen, se investigó la adhesión al matraz (Fig. 1 (1)), del matraz lavado con agua (Fig. 1 (2)) y del matraz lavado con alcohol al 95 % (Fig. 1 (3)), para comparar las ventajas y desventajas entre los dos esquemas. Se obtuvieron los siguientes resultados:

20 Como se muestra en la Fig. 1 (1), en el 1<sup>er</sup> esquema una gran cantidad de escoria negra y la adhesión al matraz fueron importantes y en el 2<sup>o</sup> esquema la cantidad de escoria era pequeña y uniforme. El extracto mediante el modo de concentración del 2<sup>o</sup> esquema tenía mejor carácter.

25 Como se muestra en la Fig. 1 (2), en el 1<sup>er</sup> esquema una gran cantidad de escoria negra y la adhesión al matraz fueron importantes y en el 2<sup>o</sup> esquema había una menor adhesión sobre las paredes. El modo de concentración del 2<sup>o</sup> esquema tuvo un mejor efecto al lavarlo con agua sobre el equipo.

30 Como se muestra en la Fig. 1 (3), el líquido de lavado con etanol al 95 % tenía un color intenso en el 1<sup>er</sup> esquema y más claro en el 2<sup>o</sup> esquema.

35 En resumen, en cuanto a la propiedad de presencia del extracto de Danshen y el posterior lavado del equipo mecánico, el modo de concentración del 2<sup>o</sup> esquema es una mejor opción, concretamente, primero se concentró el líquido de extracción acuoso, seguido de adición gradual de líquido de extracción alcohólico, combinado y concentrado.

40 Como se muestra en la figura 2, visto desde las imágenes del recubrimiento del extracto de Danshen, se descubrió que la escoria negra grande precipitaba en el extracto de Danshen del 1<sup>er</sup> y que la escoria pequeña, que tuvo menos efecto sobre la formulación posterior, se distribuía uniformemente en el extracto de Danshen del 2<sup>o</sup> esquema.

40 Por otra parte, la distribución del tamaño de partícula en los extractos de Danshen obtenidos mediante los dos esquemas, se midió con un tamiz farmacopeico.

45 Se tomaron 50 g de extracto de Danshen de cada lote respectivo, a los que se añadió agua 5 veces para disolverlos y dar líquidos de extracto. Los líquidos resultantes se hicieron pasaron a través de tamices farmacopeicos n° 1-8 (tamices apilados secuencialmente), se lavaron con aproximadamente 500 ml de agua destilada y se observó la distribución del tamaño de partícula en cada tamiz. Después de esto, las partículas presentes en cada tamiz se lavaron, se recogieron, se filtraron con una bomba de aire y se pesaron en seco junto con el papel de filtro. Los resultados se observan en la Tabla 2.

50

Tabla 2: análisis del tamaño de partícula en extractos de Danshen mediante dos modos de concentración

Tamiz farmacopeico	1 <sup>er</sup> esquema (‰)	2 <sup>o</sup> esquema (‰)
n.º 1 (malla 10)	32,98	-
n.º 2 (malla 24)	7,58	-
n.º 3 (malla 50)	5,57	-
n.º 4 (malla 65)	1,09	-
n.º 5 (malla 80)	0,13	-
n.º 6 (malla 100)	0,49	0,05
n.º 7 (malla 120)	0,11	0,43
n.º 8 (malla 150)	0,28	6,32
n.º 8 % de fracción de tamaño inferior	95,18 %	99,32 %

Como se muestra en la Tabla 2, de acuerdo con el tamaño de partícula y el orden en el que aparecen las partículas más grandes, las propiedades del extracto de Danshen del 2º esquema eran mejores que las del 1º esquema. Por tanto, la forma de concentración del 2º esquema era una mejor opción. El líquido de extracción acuoso se concentró primero, seguido de adición gradual de líquido de extracción alcohólico, combinado y concentrado.

5

A continuación se presentan los ejemplos 1 ~ 6 que son ejemplos de preparación de extractos de Danshen.

#### **Ejemplo 1: preparación de extracto de Danshen**

10 El extracto de Danshen se preparó mediante un método que consistía en las siguiente etapas:

Durante 2 horas, el Danshen se sometió a reflujo 5 veces con etanol (75 %) y se filtró para dar líquido de extracción etanólico y se dejó el residuo A para su uso posterior;

15 El residuo A se extrajo 5 veces con agua durante 2 horas, se filtró para dar líquido de extracción acuoso y el residuo B se desechó;

20 Respectivamente, el líquido de extracción etanólico obtenido en la etapa (1) se agitó durante 30 minutos, se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 12 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante etanólico; el líquido de extracción acuoso obtenido en la etapa (2) se agitó durante 30 min., se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 12 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante acuoso;

25 El sobrenadante acuoso se concentró para tener líquido de extracción acuoso concentrado con una densidad relativa de 1,20 ~ 1,30;

30 Al líquido de extracción acuoso concentrado se le añadió gradualmente el sobrenadante etanólico obtenido en la etapa (3), se combinó y se concentró a presión reducida para dar una solución concentrada mezclada con una densidad relativa  $\geq 1,20$ , durante la concentración, la densidad relativa se mantuvo a no menos de 1,10;

35 A la solución concentrada mezclada se le añadió dos veces 50 litros de agua purificada, 25 l cada vez, se combinó bien, se concentró a presión reducida a una densidad relativa de 1,25-1,35 (82,5  $\pm$  2,5° C) y se filtró inmediatamente para dar extracto de Danshen.

#### **Ejemplo 2: preparación de extracto de Danshen**

El extracto de Danshen se preparó mediante un método que consistía en las siguiente etapas:

40 (1) Durante 0,5 horas, el Danshen se sometió a reflujo 2 veces con etanol (50 %) y se filtró para dar líquido de extracción etanólico y se dejó el residuo A para su uso posterior;

(2) El residuo A se extrajo 2 veces con agua durante 0,5 horas, se filtró para dar líquido de extracción acuoso y el residuo B se desechó;

45 (3) Respectivamente, el líquido de extracción etanólico obtenido en la etapa (1) se agitó durante 20 minutos, se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 6 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante etanólico; el líquido de extracción acuoso obtenido en la etapa (2) se agitó durante 20 min., se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 6 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante acuoso;

50 (4) El sobrenadante acuoso se concentró para tener líquido de extracción acuoso concentrado con una densidad relativa de 1,20;

55 (5) Al líquido de extracción acuoso concentrado se le añadió gradualmente el sobrenadante etanólico obtenido en la etapa (3), se combinó y se concentró a presión reducida para dar una solución concentrada mezclada con una densidad relativa  $\geq 1,20$ , durante la concentración, la densidad relativa se mantuvo a no menos de 1,10;

60 (6) A la solución concentrada mezclada se le añadió dos veces 10 l de agua purificada, 5 l cada vez, se combinó bien, se concentró a presión reducida a una densidad relativa de 1,25 (82,5  $\pm$  2,5° C) y se filtró inmediatamente para dar extracto de Danshen.

#### **Ejemplo 3: preparación de extracto de Danshen**

El extracto de Danshen se preparó mediante un método que consistía en las siguiente etapas:

65

(1) Durante aproximadamente 4 horas, el Danshen se sometió a reflujo 7 veces con etanol (100 %) y se filtró

para dar líquido de extracción etanólico y se dejó el residuo A para su uso posterior;

(2) El residuo A se extrajo 7 veces con agua durante aproximadamente 4 horas, se filtró para dar líquido de extracción acuoso y el residuo B se desechó;

(3) Respectivamente, el líquido de extracción etanólico obtenido en la etapa (1) se agitó durante 60 minutos, se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 24 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante etanólico; el líquido de extracción acuoso obtenido en la etapa (2) se agitó durante 60 min., se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 24 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante acuoso;

(4) El sobrenadante acuoso se concentró para tener líquido de extracción acuoso concentrado con una densidad relativa de 1,30;

(5) Al líquido de extracción acuoso concentrado se le añadió gradualmente el sobrenadante etanólico obtenido en la etapa (3), se combinó y se concentró a presión reducida para dar una solución concentrada mezclada con una densidad relativa  $\geq 1,20$ , durante la concentración, la densidad relativa se mantuvo a no menos de 1,10;

(6) A la solución concentrada mezclada se añadieron 100 l de agua purificada, 50 l cada vez, se combinó bien, se concentró a presión reducida a una densidad relativa de 1,35 (82,5  $\pm$  2,5° C) y se filtró inmediatamente para dar extracto de Danshen.

#### **Ejemplo 4: preparación de extracto de Danshen**

El extracto de Danshen se preparó mediante un método que consistía en las siguiente etapas:

(1) Durante aproximadamente 2 horas, el Danshen se sometió a reflujo 5 veces con etanol (75 %) y se filtró para dar líquido de extracción etanólico y se dejó el residuo A para su uso posterior;

(2) El residuo A se extrajo 5 veces con agua durante aproximadamente 2 horas, se filtró para dar líquido de extracción acuoso y el residuo B se desechó;

(3) Respectivamente, el líquido de extracción etanólico obtenido en la etapa (1) se agitó durante 30 minutos, se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 12 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante etanólico; el líquido de extracción acuoso obtenido en la etapa (2) se agitó durante 30 min., se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 12 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante acuoso;

(4) El sobrenadante acuoso se concentró para tener líquido de extracción acuoso concentrado con una densidad relativa de 1,20 ~ 1,30;

(5) Al líquido de extracción acuoso concentrado se le añadió gradualmente el sobrenadante etanólico obtenido en la etapa (3), se combinó y se concentró a presión reducida para dar una solución concentrada mezclada con una densidad relativa  $\geq 1,20$ ;

(6) A la solución concentrada mezclada se la añadieron dos veces 50 l de agua purificada, 25 l cada vez, se combinó bien y se concentró a presión reducida a una densidad relativa de 1,25 ~ 1,35 (82,5  $\pm$  2,5° C) y se filtró inmediatamente para dar extracto de Danshen.

#### **Ejemplo 5: preparación de extracto de Danshen**

El extracto de Danshen se preparó mediante un método que consistía en las siguiente etapas:

(1) Durante aproximadamente 2 horas, el Danshen se sometió a reflujo 5 veces con etanol (75 %) y se filtró para dar líquido de extracción etanólico y se dejó el residuo A para su uso posterior;

(2) El residuo A se extrajo 5 veces con agua durante aproximadamente 2 horas, se filtró para dar líquido de extracción acuoso y el residuo B se desechó;

(3) Respectivamente, el líquido de extracción etanólico obtenido en la etapa (1) se agitó durante 30 minutos, se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 12 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante etanólico; el líquido de extracción acuoso obtenido en la etapa (2) se agitó durante 30 min., se enfrió a 15° C o a una temperatura inferior, se dejó reposar durante 12 horas y se extrajo el sobrenadante para dar el sobrenadante acuoso;

(4) El sobrenadante de agua se concentró para tener líquido de extracción acuoso concentrado con una

densidad relativa de 1,20 ~ 1,30;

(5) Al líquido de extracción acuoso concentrado se le añadió gradualmente el sobrenadante etanólico obtenido en la etapa (3), se combinó y se concentró a presión reducida para dar una solución concentrada mezclada con una densidad relativa  $\geq 1,20$ , durante la concentración, la densidad relativa se mantuvo a no menos de 1,10;

(6) A la solución concentrada mezclada se la añadieron dos veces 50 l de agua purificada, 25 l cada vez, se combinó bien y se concentró a presión reducida a una densidad relativa de 1,25 ~ 1,35 ( $82,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ ) y se filtró inmediatamente para dar extracto de Danshen.

**Ejemplo 6: preparación de extracto de Danshen**

Extracto de Danshen: el Danshen se cortó. La presencia del medicamento en bruto se revisó y se pesó para su uso posterior.

Secuencia de introducción de materiales: El Danshen se cortó, se introdujo y se sometió a decocción con etanol al  $90 \pm 0,5 \%$  por primera vez y con agua OI (de osmosis inversa) de primer paso por segunda vez, como disolvente de extracción.

Extracción:

Un lote de producto se incluyó en dos tanques de extracción. De acuerdo con la fórmula, se pesaron 100 kg de Danshen cortado y se colocaron respectivamente en cada uno de los tanques, se sometieron a decocción con  $400 \pm 12 \text{ l}$  de etanol ( $90 \pm 0,5 \%$ ) durante  $90 \pm 5 \text{ min}$  y se filtraron a través de un tamiz de malla 200 para proporcionar los líquidos de extracción. Los líquidos de los dos tanques se combinaron y se colocaron en un tanque de separación. El residuo resultante se extrajo con  $500 \pm 15 \text{ l}$  de agua durante  $60 \pm 3 \text{ minutos}$  por segunda vez, se filtró a través de un tamiz de malla 200 y el residuo se desechó. Los líquidos de extracción acuosos en dos tanques se combinaron y se colocaron en dos tanques de separación diferentes.

Enfriamiento y reposo:

Las soluciones mezcladas de etanol y agua de Danshen se colocaron en diferentes tanques de separación, que se enfriaron haciendo pasar agua congelada y se dejaron en reposo para dar el líquido de extracción. El líquido de extracción resultante se agitó durante 30 minutos, una vez que la temperatura disminuyó a  $15^\circ \text{C}$  o a una temperatura inferior, se dejó en reposo durante 6 ~ 24 horas. Los sobrenadantes de extracción etanólicos y acuosos de Danshen se colocaron respectivamente en diferentes tanques de separación.

Concentración:

el líquido de extracción acuoso de Danshen se concentró primero a una densidad relativa de 1,25 ~ 1,30 ( $82,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ ), en el que se añadió gradualmente sobrenadante etanólico de Danshen y se concentró. Durante la concentración, la densidad relativa no fue inferior a 1,15. Una vez que la densidad relativa del líquido de extracción mezclado de Danshen era de  $\geq 1,34$ , se añadieron dos veces 10 l de agua purificada, 5 l ( $45 \pm 5^\circ \text{C}$ ) cada vez, se combinó, se concentró a una densidad relativa de 1,33 ~ 1,35 ( $82,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ ) y se filtró a través de un tamiz de malla 40 inmediatamente para dar extracto de Danshen.

Los extractos de Danshen de los Ejemplos 1~6 se determinaron mediante el método de la presente invención y en la Tabla 3 se muestran los resultados.

Tabla 3: determinación de los extractos de Danshen

Ej.	Componentes (mg/g)						
	Danshensu	ácido rosmarínico	ácido litospérmico	ácido salviaanólico B	criptotanshinona	tanshinona IIA	estaquiosa
1	0,5	0,5	0,5	5,2	0,5	1,5	150,5
2	16,7	15,2	15,5	140,1	25,4	50,2	600,1
3	1,2	1,4	1,7	10,2	1,1	2,2	250,4
4	5,03	4,71	4,19	35,32	5,67	9,36	425,9
5	8,2	8,4	7,8	139,2	9,6	20,5	597,5
6	3,1	3,0	3,1	27,7	4,0	6,9	370,4

El extracto de Danshen del Ejemplo 6 se utilizó en los siguientes Ejemplos 7 ~ 11 para preparar el microgránulo de Danshen basándose en las siguientes condiciones:

Materias primas:

extracto de Danshen	32,5 kg
microgránulo virgen de almidón o PEG-6000	16,0 kg
Opadry 85G66817	1,5 kg

5 Preparación de líquido medicinal de extracto de Danshen: el extracto de Danshen se colocó en un tanque de premezclado, en el que se añadió 0,7 ~ 0,9 veces agua, se agitó durante 30 minutos o más para dar el líquido medicinal de extracto.

Carga de fármaco del microgránulo virgen de almidón: la presión de atomización y la pistola pulverizadora se ajustaron para hacer que el líquido medicinal se atomizara en gotitas finas.

10 **Ejemplo 7: preparación de microgránulo de carga de fármaco**

15 Suministro y fluidificación: el microgránulo virgen se absorbió en una máquina de recubrimiento de secado fluidificado con un volumen de aire a 600 m<sup>3</sup>/h para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado; sin embargo, la fluidización no fue demasiado fuerte, para impedir que el microgránulo virgen se desgaste y espolvoree.

20 Carga de fármaco en fase inicial: la pistola pulverizadora se ajustó para poder atomizar bien. El líquido de extracción se suministró con una bomba dosificadora a la pistola pulverizadora. Respectivamente, las presiones del chorro de aire superior e inferior se establecieron a 200 KPa y 250 KPa (2,0 bares y 2,5 bares). La temperatura del material fue de aproximadamente 50° C. Una vez que la temperatura alcanzó 45° C, la solución de suministro comenzó a pulverizarse a una tasa de pulverización de 70 g/min.

25 Fase de carga de fármaco: cuando el material estaba a 50° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo, pero la velocidad máxima no superó los 400 g/min. El volumen de aire se ajustó de acuerdo con el estado fluidificado del microgránulo.

30 Recubrimiento: después de la carga del fármaco, el líquido de recubrimiento se pulverizó directamente para realizar el recubrimiento. Inicialmente, la temperatura del material se ajustó a 50° C y la tasa de pulverización a 40 g/min. Después de 20 minutos de recubrimiento, la tasa de pulverización se ajustó a 80 g/min., la temperatura del material se regula a 40° C. La tasa de infusión, el volumen de aire y la temperatura del material se ajustaron de acuerdo con la adhesión del microgránulo.

35 En donde, el líquido de extracción medicinal se preparó con extracto de Danshen y agua en una proporción en peso de 100: 90.

**Ejemplo 8: preparación de microgránulo de carga de fármaco**

40 Suministro y fluidificación: el microgránulo virgen se absorbió en una máquina de recubrimiento de secado fluidificado con un volumen de aire a 1500 m<sup>3</sup>/h para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado;

45 Carga de fármaco en fase inicial: la pistola pulverizadora se ajustó para poder atomizar bien. El líquido de extracción se suministró con una bomba dosificadora a la pistola pulverizadora. Respectivamente, las presiones del chorro de aire superior e inferior se establecieron a 300 KPa y 350 KPa (3,0 bares y 3,5 bares). La temperatura del material fue de aproximadamente 50° C. Una vez que la temperatura alcanzó 45° C, la solución de suministro comenzó a pulverizarse a una tasa de pulverización de 120 g/min.

50 Fase de carga de fármaco: cuando el material estaba a 55° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo, pero la velocidad máxima no supera los 400 g/min. El volumen de aire se ajustó de acuerdo con el estado fluidificado del microgránulo.

55 Recubrimiento: después de la carga del fármaco, el líquido de recubrimiento se pulverizó directamente para realizar el recubrimiento. Inicialmente, la temperatura del material se ajustó a 50° C y la tasa de pulverización a 80 g/min. Después de 20 minutos de recubrimiento, la tasa de pulverización se ajustó a 150 g/min., la temperatura del material se regula a 55° C. La tasa de infusión, el volumen de aire y la temperatura del material se ajustaron de acuerdo con la adhesión del microgránulo.

En donde, el líquido de extracción medicinal se preparó con extracto de Danshen y agua en una proporción en peso de 100: 70.

60 **Ejemplo 9: preparación de microgránulo de carga de fármaco**

Suministro y fluidificación: el microgránulo virgen se absorbió en una máquina de recubrimiento de secado fluidificado con un volumen de aire a 1500 m<sup>3</sup>/h para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado;

5 Carga de fármaco en fase inicial: la pistola pulverizadora se ajustó para poder atomizar bien. El líquido de extracción se suministró con una bomba dosificadora a la pistola pulverizadora. Respectivamente, las presiones del chorro de aire superior e inferior se establecieron a 300 KPa y 350 KPa (3,0 bares y 3,5 bares). La temperatura del material fue de aproximadamente 50° C. Una vez que la temperatura alcanzó 45° C, la solución de suministro comenzó a pulverizarse a una tasa de pulverización de 120 g/min.

15 Fase de carga de fármaco: cuando el material estaba a 55° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo, pero la velocidad máxima no supera los 400 g/min. El volumen de aire se ajustó de acuerdo con el estado fluidificado del microgránulo.

20 Recubrimiento: después de la carga del fármaco, el líquido de recubrimiento se pulverizó directamente para realizar el recubrimiento. Inicialmente, la temperatura del material se ajustó a 50° C y la tasa de pulverización a 80 g/min. Después de 20 minutos de recubrimiento, la tasa de pulverización se ajustó a 150 g/min., la temperatura del material se regula a 55° C. La tasa de infusión, el volumen de aire y la temperatura del material se ajustaron de acuerdo con la adhesión del microgránulo.

25 En donde, el extracto de Danshen, como extracto, y el microgránulo de almidón, como microgránulo virgen, estaban en una proporción en peso de 2:1; el líquido medicinal se preparó con extracto de Danshen y agua en una proporción en peso de 100:82.

#### **Ejemplo 10: preparación de microgránulo de carga de fármaco**

30 Suministro y fluidificación: el microgránulo virgen se absorbió en una máquina de recubrimiento de secado fluidificado con un volumen de aire a 1500 m<sup>3</sup>/h para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado; sin embargo, la fluidización no fue demasiado fuerte, para impedir que el microgránulo virgen se desgaste y espolvoree.

35 Carga de fármaco en fase inicial: se utilizó un separador de 0,2 mm en la pistola pulverizadora que se ajustó para poder atomizar bien. El líquido de extracción se suministró con una bomba dosificadora a la pistola pulverizadora. Respectivamente, las presiones del chorro de aire superior e inferior se establecieron a 300 KPa y 350 KPa (3,0 bares y 3,5 bares). La temperatura del material fue de aproximadamente 50° C. Una vez que la temperatura alcanzó 45° C, la solución de suministro comenzó a pulverizarse a una tasa de pulverización de 120 g/min.

40 Fase de carga de fármaco: cuando el material estaba a 55° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo, pero la velocidad máxima no supera los 400 g/min. El volumen de aire se ajustó de acuerdo con el estado fluidificado del microgránulo.

45 Recubrimiento: después de la carga del fármaco, el líquido de recubrimiento se pulverizó directamente para realizar el recubrimiento. Inicialmente, la temperatura del material se ajustó a 50° C y la tasa de pulverización a 80 g/min. Después de 30 minutos de recubrimiento, la tasa de pulverización se ajustó a 150 g/min., la temperatura del material se regula a 55° C. La tasa de infusión, el volumen de aire y la temperatura del material se ajustaron de acuerdo con la adhesión del microgránulo.

50 En donde, El extracto de Danshen, como extracto, y el microgránulo de sacarosa, como microgránulo virgen, estaban en una proporción en peso de 1: 1; el líquido medicinal se preparó con extracto de Danshen y agua en una proporción en peso de 100:90.

#### **Ejemplo 11: preparación de la cápsula de microgránulo de Danshen**

55 Preparación de líquido medicinal de extracto de Danshen: el extracto de Danshen se colocó en un tanque de premezclado, en el que se añadió agua purificada 0,82 veces, se agitó durante 30 minutos o más para dar el líquido medicinal;

Carga de fármaco del microgránulo virgen de almidón: la pistola pulverizadora se ajustó para poder atomizar bien;

60 Suministro y fluidificación: el microgránulo virgen de almidón se absorbió en una máquina de recubrimiento de secado fluidificado con un volumen de aire a 1000 m<sup>3</sup>/h para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado; sin embargo, la fluidización no fue demasiado fuerte, para impedir que el microgránulo virgen se desgaste y espolvoree. El líquido de extracción premezclado se suministró con una bomba dosificadora a la pistola pulverizadora. Respectivamente, las presiones del chorro de aire superior e inferior se establecieron a 250 KPa y 300 KPa (2,5 bares y 3 bares). En la fase inicial de carga de fármaco, la temperatura del material fue de aproximadamente 50° C. Una vez que la temperatura alcanzó 45° C, la solución de suministro comenzó a

65

pulverizarse a una tasa de pulverización de 120 g/min.

5 Fase de carga de fármaco: cuando el material estaba a 50° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo, pero la velocidad máxima no supera los 400 g/min. El volumen de aire se ajustó de acuerdo con el estado fluidificado del microgránulo. Durante el proceso de carga de fármaco, las muestras deben tomarse desde el puerto de muestreo, si fuera necesario, para observar la adhesión y el espolvoreado del microgránulo. Dependiendo de la observación, se ajustó la tasa de infusión, el volumen de aire y la temperatura del material.

10 Recubrimiento: el opadry 85G66817 y el agua purificada se agitaron uniformemente durante un tiempo no inferior a 45 minutos para dar un líquido de recubrimiento al 18 % para su uso posterior. Después de la carga del fármaco, el líquido de recubrimiento se pulverizó directamente para realizar el recubrimiento. Inicialmente, la temperatura del material se ajustó a 50° C y la tasa de pulverización a 80 g/min. Después de 20 minutos de recubrimiento, la tasa de pulverización se ajustó a 100 g/min., la temperatura del material se regula a 50° C. La tasa de infusión, el volumen de aire y la temperatura del material se ajustaron de acuerdo con la adhesión del microgránulo. Después del recubrimiento, la temperatura disminuyó a 35° C para descargar el material.

20 Exploración de microgránulos recubiertos: los microgránulos recubiertos intermedios se exploraron, el diámetro de malla interno era de 1,8 mm. El microgránulo de Danshen tenía un tamaño inferior, representando un tamaño no inferior a 90 %.

Cápsula de carga: el microgránulo de Danshen explorado se cargó en una cápsula con una cargadora de cápsulas para dar la cápsula.

25 La densidad aparente, el área de superficie específica y el tamaño de partícula del microgránulo obtenido en los Ejemplos 7-11 se habían determinado mediante el siguiente método:

30 El tamaño de partícula se analizó mediante un método convencional, por ejemplo, el tamiz farmacopeico n.º 7 provisto según el artículo de medición en la leyenda de la farmacopea China (I). Para analizar el tamaño de las partículas, se utilizó el método de tamizado.

35 La densidad aparente se analizó mediante el método convencional de medición de la viscosidad, por ejemplo, el instrumento de ensayo de características de polvo BT-1000 integral (desarrollado conjuntamente por Dandong Better Apparatus Inc. y la Universidad de Qinghua). La densidad aparente de las partículas se analizó según los requisitos del instrumento.

40 El área de superficie específica se analizó mediante un método convencional, por ejemplo, el analizador del área de superficie específica SSA-3600 (Beijing Biaode Electronic Technology Inc.). El área de superficie específica del microgránulo se analizó según los requisitos del instrumento.

En la Tabla 4 se observan los resultados obtenidos.

Tabla 4: densidad aparente, área de superficie específica y tamaño de partícula del microgránulo

Ejemplo	Densidad aparente (g/ml)	Área de superficie específica (m <sup>2</sup> /g)	Tamaño de partícula (mm)
7	1,02	0,02	1,01
8	0,62	0,005	1,83
9	1,25	0,05	0,48
10	0,81	0,01	1,22
11	1,09	0,03	0,69

45 El efecto del extracto de Danshen en la presente invención se demostró en el siguiente ensayo de eficacia.

Ejemplo de ensayo 1: efecto del extracto de Danshen sobre la microcirculación auricular en ratones

50 Para evaluar el efecto del extracto de Danshen sobre la microcirculación, el ensayo se realizó comparando ratones del modelo de trastorno de microcirculación auricular causado por NA y ratones normales, para evaluar el efecto del extracto de Danshen sobre la microcirculación. El fármaco de ensayo se dividió en tres grupos de dosis de 7, 14, 28 g de medicamento en bruto/kg (2, 4, 8 g de extracto/kg), que se administraron por vía intragástrica durante 7 días. Después de la última administración, el calibre y el caudal vascular de la microcirculación auricular en los ratones se analizaron con un instrumento de medición de microcirculación.

55 1. Materiales

1.1 Fármaco de ensayo

Extracto de Danshen preparado mediante el método del Ejemplo 6, extracto de color marrón oscuro (1 g de extracto corresponde a 3,5 g de medicamento en bruto)

5

1.2 Fármaco positivo

Compuesto de pastilla de suero Danshen (CDDP, siglas del inglés *Compound Danshen Dripping Pill*), 27 mg/pastilla, proporcionada por Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd.

10

1.3 Animales

1.3.1 Especie, especificación y fuente

15 Ratones ICR (*Institute of Cancer Research*) puros, con un peso de 18 ~ 22 g, mitad macho y mitad hembra, se adquirieron en el centro de medicina comparativa de la Universidad de Yangzhou con el n.º de certificación SCXK 2012-0004.

1.3.2 Condiciones de alimentación

20

Los ratones se criaron en jaulas de ventilación independiente (IVC, *Independent Ventilation Cage*) con aire de una pureza de 10000. La temperatura del laboratorio era de  $24 \pm 2^\circ \text{C}$ , la humedad del 60 % - 80 % y el aire se cambiaba unas 10 ~ 15 veces/hora. Periodo de iluminación: 12 horas de luz (L)/12 horas de oscuridad (O). Los ratones macho y hembra se criaron por separado, con no más de 5 en cada jaula.

25

Alimentación: Se adquirió pienso nutritivo de valor completo para ratones en Jiangsu Xietong Medical Bio-engineering Inc. La calidad estaba en línea con el estándar GB14924.1-2001 (estándar de calidad general para piensos de fórmula de animales de laboratorio).

30 Almohadillado: el almohadillado de partículas esterilizadas se adquirió en Jiangsu Xietong Medical Bio-engineering Inc.

Agua: agua potable purificada

35 1.4 Reactivo

Inyección de clorhidrato de adrenalina, 1 ml:1 mg, lote N.º: 120915 Shanghai Hefeng Pharmaceutical Inc.

Uretano, 500 g/frasco, analíticamente puro, adquirido en Shanghai Qingxi Chemical Technology Inc.

40

1.5 Instrumental

Balanza de precisión electrónica BSA124S (0,1 mg-120 g), escala electrónica KD-160 de Sartorius, Alemania, Dongguan Bailida Health Equipment Inc.

45

Indicador de circulación multisitio WXT-4 a color, Xuzhou Hengda Optical Electronic Inc.

2 Método

50 2.1 Ajuste de dosis

De acuerdo con la investigación anterior, basándose en experimentos preliminares, se establecieron tres grupos de dosis en los fármacos de ensayo: medicamento en bruto 7, 14, 28/kg (2, 4, 8 g de extracto/kg). La dosis clínica del extracto de Danshen fue de 10 g de medicamento en bruto/persona/día, la dosis equivalente calculada para los ratones fue de 2 g de medicamento en bruto/kg. Por tanto, en este estudio, tres dosis eran 3,5, 7 y 14 veces respectivamente la dosis clínica equivalente.

55

Según bibliografía relacionada y resultados relevantes, como fármaco positivo (CDDP), se estableció un grupo de dosis: 270 mg (10 pastillas)/kg.

60

2.2 Efecto sobre la microcirculación auricular en ratones normales

50 ratones se dividieron al azar en 5 grupos, 10 ratones en cada grupo: grupo de control testigo, grupo tratado con extracto de Danshen (2, 4, 8 g de extracto/kg) y grupo tratado con CDDP (270 mg/kg). Una vez al día, cada grupo recibía, respectivamente, administración intragástrica y el grupo de control testigo recibía el mismo volumen de agua destilada. El 6º día después de la administración, todos los ratones ayunaron durante la noche con libre acceso al

65

agua. Después de 7 días de administración, se inyectó uretano (20 %, 0,1 ml/10 g) por vía intraperitoneal para proporcionar anestesia. Con esparadrapo adhesivo médico, se arrancó cilio auricular y los ratones se colocaron en una posición lateral en la mesa de observación. Después de añadir gota a gota parafina líquida utilizando una pequeña varilla de vidrio, la oreja se aplastó hacia atrás sobre el soporteorejas. Se seleccionaron venas y capilares auriculares del mismo sitio para observar el cambio del calibre y el caudal vascular de la microcirculación auricular de los ratones con un instrumento de medición de microcirculación respectivamente antes de la administración y a las 0,5, 2 y 4 horas después de la administración.

### 2.3 Efecto sobre la alteración de la microcirculación causada por NA

60 ratones se dividieron al azar en 6 grupos, 10 ratones en cada grupo: grupo de control testigo, grupo modelo, grupos tratados con extracto de Danshen (2, 4, 8 g de extracto/kg) y grupo tratado con CDDP (270 mg/kg). Una vez al día, el grupo de control testigo y el grupo modelo recibieron el mismo volumen de agua destilada. El 6º día después de la administración, todos los ratones ayunaron durante la noche con libre acceso al agua.

Después de 7 días de administración, se inyectó uretano (20 %, 0,1 ml/10 g) por vía intraperitoneal para proporcionar anestesia. Con esparadrapo adhesivo médico, se arrancó cilio auricular y los ratones se colocaron en una posición lateral en la mesa de observación. Después de añadir gota a gota parafina líquida utilizando una pequeña varilla de vidrio, la oreja se aplastó hacia atrás sobre el soporteorejas. Se seleccionaron venas y capilares auriculares del mismo sitio y se analizaron con un instrumento de medición de microcirculación. 30 minutos después de la última administración intragástrica, 5 grupos, excepto el grupo de control testigo, recibieron inmediatamente una inyección de NA (100 µg/kg) a través de la vena de la cola. El cambio del calibre y el caudal vascular de la microcirculación auricular de los ratones se observaron respectivamente antes de la administración y a los 5, 30 y 120 minutos después de la administración.

### 2.4 Método estadístico

Los datos se expresaron como "M±DE (desviación estándar)" y se utilizó la prueba F para comparar entre los grupos.

## 3. Resultados

### 3.1 Efecto sobre la microcirculación auricular en ratones normales

En comparación con el grupo de control testigo en el mismo punto temporal, el diámetro de la parte de entrada y de la parte de salida en cada punto temporal en el grupo tratado con una dosis alta de extracto de Danshen, aumentó significativamente (P <0,05, P<0,01). En el grupo tratado con una dosis media de extracto de Danshen, el diámetro de la parte de entrada y de la parte de salida en cada punto temporal aumentó significativamente (P<0,05, P<0,01) 2 horas después de la administración. En el grupo tratado con una dosis baja de extracto de Danshen, el diámetro de la parte de entrada y de la parte de salida en cada punto temporal aumentó notablemente, lo cual tiene un significado estadístico, en comparación con el grupo de control testigo (Tablas 5 y 6).

Al mismo tiempo, en comparación con el grupo de control testigo, el caudal sanguíneo de la microcirculación auricular aumentó significativamente 0,5 horas después de la administración en cada grupo tratado con la dosis de extracto de Danshen, lo cual tiene un significado estadístico (Tabla 7).

Tabla 5: efecto del extracto de Danshen sobre el diámetro de la parte de entrada de la microcirculación auricular en ratones normales (N = 10, M±DE)

Grupos	dosis (g/kg)	Diámetro de la parte de entrada (µm)			
		0h	0,5h	2h	4h
Grupo de control testigo		21,3 ± 6,9	23,1 ± 3,4	26,4 ± 5,8	26,8 ± 8,0
Grupo tratado con CDDP	0,27	23,5 ± 5,3	30,9 ± 9,5*	31,6 ± 7,7*	27,8 ± 9,8
Dosis baja de extracto de Danshen	2	21,3 ± 9,1	27,1 ± 5,2*	29,9 ± 5,8	29,5 ± 7,1
Dosis media de extracto de Danshen	4	22,0 ± 8,1	29,2 ± 7,3*	30,2 ± 7,4*	29,1 ± 5,6
Dosis alta de extracto de Danshen	8	22,0 ± 4,1	33,7 ± 11,0*	35,4 ± 9,4*	27,4 ± 4,0

\*P<0,05, \*\*P<0,01, en comparación con el grupo de control testigo.

Tabla 6: efecto del extracto de Danshen sobre el diámetro de la parte de salida de la microcirculación auricular en ratones normales (N = 10, M±DE)

Grupos	Dosis (g/kg)	Diámetro de la parte de salida (µm)			
		0h	0,5h	2h	4h
Grupo de control testigo		40,1 ± 14,9	50,2 ± 22,3	51,4 ± 14,8	49,8 ± 20,6
Grupo tratado con CDDP	0,27	58,7 ± 14,6*	88,9 ± 20,5**	74,2 ± 17,5**	56,5 ± 17,8
Dosis baja de extracto de Danshen	2	49,0 ± 16,1	66,4 ± 18,5*	60,8 ± 20,9	56,9 ± 13,3
Dosis media de extracto de Danshen	4	55,8 ± 20,0	74,8 ± 21,0*	73,7 ± 21,6*	62,0 ± 21,9
Dosis alta de extracto de Danshen	8	76,0 ± 28,4**	99,6 ± 32,8**	87,9 ± 29,9**	81,3 ± 21,4**

\*P<0,05, \*\*P<0,01, en comparación con el grupo de control testigo.

Tabla 7: efecto del extracto de Danshen sobre el caudal sanguíneo de la microcirculación auricular en ratones normales (N = 10, M±DE)

Grupos	Dosis (g/kg)	Caudal (µm/s)			
		0h	0,5h	2h	4h
Grupo de control testigo		588,0 ± 43,6	573,6 ± 33,5	552,6 ± 45,1	588,4 ± 31,3
Grupo tratado con CDDP	0,27	590,6 ± 44,0	619,7 ± 32,3*	609,1 ± 45,2	604,1 ± 38,3
Dosis baja de extracto de Danshen	2	580,0 ± 33,6	613,6 ± 39,5*	562,6 ± 75,1	588,4 ± 51,3
Dosis media de extracto de Danshen	4	590,0 ± 24,4	637,3 ± 52,2*	570,8 ± 76,5	596,8 ± 71,8
Dosis alta de extracto de Danshen	8	583,1 ± 36,7	639,0 ± 48,5*	611,8 ± 55,5*	599,1 ± 52,4

5 3.2 Efecto sobre la alteración de la microcirculación causada por NA

En comparación con el grupo de control testigo, 30 minutos después de preparar el modelo con NA, los diámetros de la parte de entrada y de la parte de salida de la microcirculación auricular en ratones disminuyeron significativamente (P<0,05, P<0,01) y el caudal sanguíneo se redujo parcialmente. Al cabo de 120 min de preparar el modelo, los cambios microvasculares habían desaparecido gradualmente.

En cada grupo de dosis, el extracto de Danshen tuvo un efecto mejorado sobre el diámetro inferior causado por NA en la parte de entrada y en la parte de salida en diferentes niveles (P<0,05, P<0,01) y un cierto efecto sobre el aumento del caudal sanguíneo (Tablas 8, 9, 10).

Tabla 8: efecto del extracto de Danshen sobre el diámetro de la parte de entrada de la microcirculación auricular en ratones causado por NA (N = 10, M±DE)

Grupos	Dosis (g/kg)	Diámetro de la parte de entrada (µm)			
		0 min	5 min	30 min	120 min
Grupo de control testigo		27,6 ± 7,5	28,4 ± 4,7	27,4 ± 7,0	27,9 ± 5,5
Grupo modelo		30,1 ± 7,9	20,0 ± 5,1*	19,3 ± 3,6**	24,8 ± 5,1
Grupo tratado con CDDP	0,27	31,4 ± 7,4	28,0 ± 6,5#	29,3 ± 10,3 #	28,6 ± 7,2
Dosis baja de extracto de Danshen	2	29,3 ± 5,6	28,6 ± 5,4 #	23,1 ± 4,1	24,0 ± 10,2
Dosis media de extracto de Danshen	4	35,4 ± 9,8	28,5 ± 7,3#	24,9 ± 5,3 #	24,0 ± 6,3
Dosis alta de extracto de Danshen	8	31,8 ± 10,7	27,0 ± 8,2 #	27,7 ± 5,9###	26,9 ± 4,9

\*P<0,05, \*\*P<0,01, en comparación con el grupo de control testigo; #P<0,05, ###P<0,01, en comparación con el grupo de control modelo.

Tabla 9: efecto del extracto de Danshen sobre el diámetro de la parte de salida de la microcirculación auricular en ratones causado por NA (N = 10, M±DE)

Grupos	Dosis (g/kg)	Diámetro de la parte de salida (µm)			
		0 min	5 min	30 min	120 min
Grupo de control testigo		52,0 ± 20,9	52,3 ± 13,5	51,6 ± 11,8	47,9 ± 14,9
Grupo modelo		53,7 ± 13,2	40,4 ± 8,3**	38,0 ± 11,9*	46,8 ± 11,8
Grupo tratado con CDDP	0,27	56,5 ± 20,9	50,9 ± 15,8 #	51,7 ± 15,0 #	50,1 ± 8,6
Dosis baja de extracto de Danshen	2	58,4 ± 17,1	50,1 ± 14,7 #	47,1 ± 10,9 #	49,6 ± 19,2
Dosis media de extracto de Danshen	4	56,8 ± 11,1	54,5 ± 10,9 #	54,9 ± 12,2 #	52,9 ± 21,9
Dosis alta de extracto de Danshen	8	59,8 ± 19,5	61,9 ± 23,5 #	55,5 ± 15,0 #	51,1 ± 12,6

\*P<0,05, \*\*P<0,01, en comparación con el grupo de control testigo; #P<0,05, en comparación con el grupo de control modelo.

Tabla 10: efecto del extracto de Danshen sobre el flujo sanguíneo de la microcirculación auricular en ratones causado por NA (N = 10, M±DE)

Grupos	Dosis (g/kg)	Caudal (µm/s)			
		0 min	5 min	30 min	120 min
Grupo de control testigo		389,3 ± 147,5	390,6 ± 135,7	399,4 ± 108,4	379,2 ± 111,5
Grupo modelo		397,5 ± 81,1	312,8 ± 90,8	354,3 ± 178,9	390,9 ± 183,2
Grupo tratado con CDDP	0,27	367,1 ± 143,2	420,2 ± 131,9#	402,4 ± 132,0	400,9 ± 176,0
Dosis baja de extracto de Danshen	2	354,4 ± 38,3	378,8 ± 42,4	367,6 ± 17,7	388,9 ± 48,5
Dosis media de extracto de Danshen	4	350,8 ± 81,8	387,7 ± 91,6	369,0 ± 160,8	439,6 ± 104,9 #
Dosis alta de extracto de Danshen	8	408,5 ± 145,3	420,1 ± 134,4 #	397,9 ± 193,7	399,9 ± 113,7

#P<0,05, en comparación con el grupo modelo.

5 Como se muestra en este ejemplo de ensayo, se confirmó que el extracto de Danshen tenía un efecto obviamente aumentado sobre el diámetro en la parte de entrada y la parte de salida en ratones normales, y un cierto efecto en el aumento del caudal sanguíneo de la microcirculación microvascular de la aurícula.

10 En comparación con los ratones normales, 30 minutos después de preparar el modelo con NA, el diámetro en la parte de entrada y en la parte de salida de la microcirculación auricular en ratones disminuyó significativamente (P<0,05, P<0,01), el caudal sanguíneo disminuyó parcialmente. Al cabo de 120 min de preparar el modelo, los cambios microvasculares habían desaparecido gradualmente. En cada grupo de dosis, el extracto de Danshen tuvo un efecto mejorado sobre el diámetro inferior causado por NA en la parte de entrada y en la parte de salida en diferentes niveles (P<0,05, P<0,01) y escaso efecto sobre el caudal sanguíneo.

15 En resumen, el extracto de Danshen de la presente invención obviamente podría mejorar la angiectasia de los capilares de la microcirculación auricular y mejorar aún más la microcirculación.

20 Ejemplo de ensayo 2: efecto del extracto de Danshen sobre la reducción de lípidos en sangre en el modelo de pez cebra

### 1. Reactivos e instrumental

25 Fármaco de ensayo: Para preparar la solución madre, el extracto de Danshen preparado mediante el método del Ejemplo 6, se diluyó con agua ultrapura y se conservó a -20° C.

30 Instrumental y reactivos: microscopio de disección (SZX7, Olympus Inc), placa de 6 orificios (Nest Biotech), MESAB (Sigma), Metilcelulosa (Sigma), lovastatina (Meilun Bio-tech Inc, Dalian, N.º de lote: 20111002, pureza>99 %, en polvo), alimento con alto contenido en grasa (Huante Inc, Hangzhou), Aceite rojo (Sigma, N.º de lote: 20120411).

Animales: Los embriones del pez cebra se propagaron mediante apareamiento natural. En cada apareamiento, se prepararon 4 ~ 5 pares de adultos, y en promedio, cada par de peces cebra produjo 200 ~ 300 embriones. Seis horas después de la fecundación (6hdf) y 24hdf, los embriones se limpiaron (eliminando los embriones muertos) y se

seleccionaron los embriones calificados según la fase de desarrollo embrionario (Kimmel et al. 1995). Los embriones se incubaron en agua de piscifactoría a 28° C, que contenía 200 mg de sal marina soluble instantánea en 1 l de agua de ósmosis inversa con una conductividad de 480 ~ 510 µS/cm, un pH de 6,9-7,2, una dureza de 53,7 ~ 71,6 mg/l de CaCO<sub>3</sub>. Se requería alimentación 9 días después de la fecundación (9ddf) porque los embriones podían obtener nutrientes de su propio saco vitelino. Después del estudio, se utilizó metanosulfonato de triclaína (TMS) para sobreexponer a los embriones a varias etapas de desarrollo y se anestesió y sacrificó a los peces cebra. El procedimiento del sacrificio se realizó teniendo en cuenta la normativa reglamentaria de la AVMA (America Veterinary Medical Association) del sacrificio con anestesia.

## 10 2. Método

### A. Determinación de la concentración máxima no letal (CMNL) del extracto de Danshen

15 Para inducir el modelo de alto contenido de lípidos en sangre en el pez cebra, se utilizó alimento con alto contenido en grasa para alimentar a peces juveniles de pez cebra de la cepa ALBINO.

Después de la alimentación, el modelo de alto contenido de lípidos en sangre del pez cebra se trató con extracto de Danshen. Se establecieron varias concentraciones y se trataron 30 peces cebra en cada concentración.

20 Las cinco concentraciones iniciales de extracto de Danshen fueron respectivamente de 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml, 1200 µg/ml y 2000 µg/ml (preparadas con agua purificada).

25 Cuarenta y ocho (48) horas después del tratamiento, se contó el número de peces cebra muertos y para calcular la CMNL, se dibujó la curva de concentración óptima - efecto con el programa informático estadístico GraPhPad Prism 5.0.

### B. Evaluación cuantitativa del efecto hipolipemiante en sangre del extracto de Danshen

30 Según los resultados de la parte A, se evaluó el efecto hipolipemiante en sangre del extracto de Danshen a tres concentraciones (generalmente a CMNL, 1/3CMNL y 1/10CMNL), y se trataron 30 peces cebra con cada concentración.

35 Para inducir el modelo de alto contenido de lípidos en sangre en el pez cebra, se utilizó alimento con alto contenido en grasa para alimentar a peces juveniles de pez cebra de la cepa ALBINO.

Después de la alimentación, el modelo de alto contenido de lípidos en sangre en el pez cebra, se trató con el fármaco de ensayo durante 48 horas.

40 Fármaco positivo: lovastatina a 0,08 µg/ml.

Después de tratarse con los fármacos de ensayo, la grasa del pez cebra se tiñó con colorante específico de grasa.

45 Se seleccionaron al azar quince peces cebra a cada concentración para observar la intensidad de la tinción de grasa en la sangre de la cola de los peces cebra, se fotografiaron y se guardaron.

Para analizar las imágenes, se utilizó el programa informático analítico de imágenes Image -Pro Plus 6.0. La fuerza de la señal de la tinción (T) de grasa en la sangre de la cola del pez cebra se calculó y analizó cuantitativamente. Los resultados estadísticos se expresaron como  $X \pm EE$  (Error Estándar).

50 La fórmula de cálculo de la eficacia reductora de lípidos (hipolipemiante) en sangre del extracto de Danshen es la siguiente:

$$\text{Tasa hipolipemiante en sangre (\%)} = \left[ 1 - \frac{S(\text{medicamento})}{S(\text{control})} \right] \times 100 \quad (1)$$

55 Para el análisis estadístico, se utilizó un análisis de varianza y la prueba t de Dunnett,  $P < 0,05$  mostró una diferencia significativa.

## 3. Resultados

### 3.1 Determinación de la CMNL del extracto de Danshen

60

En la Tabla 11 se observa la tasa de mortalidad del pez cebra inducida con extracto de Danshen.

Como se muestra en la Tabla 11, para ajustar la curva de concentración y mortalidad (Fig. 3) se utilizó GraPhPad

5.0. Después de ajustar, se calculó que la CMNL del extracto de Danshen era de 540 µg/ml (extracto) correspondiente a 1890 µg/ml (medicamento en bruto).

Tabla 11: tasa de mortalidad del pez cebra inducida con el extracto de Danshen (n = 30)

Concentración de extracto (µg/ml)	Concentración correspondiente de medicina en bruto (µg/ml)	Tasa de mortalidad (%)
0	0	0
200	700	0
400	1400	0
600	2100	3,3
800	2800	33,3
1200	4200	100
2000	7000	100

5

### 3.2 Evaluación cuantitativa o efecto hipolipemiente en sangre del extracto de Danshen

Según el experimento de mortalidad, el efecto hipolipemiente en sangre del extracto de Danshen se evaluó a tres concentraciones (calculadas como medicamento en bruto): 1890 µg/ml (CMNL), 630 µg/ml (1/3CMNL) y 189 µg/ml (1/10CMNL).

10

Después de tratarse con extracto de Danshen, la grasa del pez cebra se tiñó de manera específica y se observó al microscopio, se fotografió y se conservó (Fig. 4). Como se muestra en la Fig. 4, como zona diana se observó una zona circular de línea continua. La fuerza de la tinción de grasa se analizó cuantitativamente con un programa informático analítico de imágenes para calcular la DOI (densidad óptica integral) del pez cebra (véase la Tabla 12). Según la DOI, para evaluar la eficacia del extracto de Danshen sobre la reducción de lípidos en sangre, la tasa hipolipemiente en sangre del pez cebra se calculó con la Fórmula (1) (véase la Tabla 12 y la Figura 5). La fuerza de la tinción de grasa en la cola de pez cebra en el grupo positivo (lovastatina 0,08 µg/ml) fue mucho más débil que la del grupo modelo, tasa de reducción 26,3 % (P<0,01). A 189 µg/ml, 630 µg/ml y 1890 µg/ml, el extracto de Danshen redujo significativamente la fuerza de la tinción de grasa vascular en la cola del pez cebra (P<0,001, P<0,001, P<0,001), tasa de reducción de 32,7 %, 35,2 % y 36,2 %, respectivamente.

15

20

Tabla 12: efecto sobre la reducción de lípidos en sangre 48 horas después del tratamiento con extracto de Danshen (Media ± EE)

Grupos	Concentración de medicina en bruto (µg/ml)	DOI de lípidos en sangre en la cola	% de tasa de reducción de lípidos en sangre
Grupo modelo	-	2906 ± 131	-
Grupo tratado con lovastatina	0,081	2142 ± 109*	26,3*
extracto de Danshen	189	1955 ± 149**	32,7**
	630	1884 ± 158**	35,2**
	1890	1854 ± 211**	36,2**

En comparación con el grupo modelo, \*: P<0,01, \*\*: P<0,001

25 Como se muestra en este ejemplo de ensayo, a 189 µg/ml, 630 µg/ml y 1890 µg/ml, el extracto de Danshen redujo significativamente la fuerza de la tinción de grasa vascular de la cola, tasa de reducción de lípidos en sangre 32,7 % (P<0,001), 35,2 % (P<0,001) y 36,2 % (P<0,001), respectivamente. Se indicó que el extracto de Danshen tenía el efecto de reducir los lípidos (efecto hipolipemiente) en sangre, y la eficacia se acercó a una fase de meseta a 1/3 CMNL.

## REIVINDICACIONES

1. Un extracto de Danshen (*Salvia miltiorrhiza*), **caracterizado por que** dicho extracto comprende los siguientes componentes por parte en peso: Danshensu: ácido rosmarínico: ácido litospérmico: ácido salvianólico B: 5  
criptotanshinona: tanshinona IIA: estaquiosa = (0,5-16): (0,5-15): (0,5-15): (5-140): (0,5-25): (1-50): (150-600); preferiblemente dichos componentes por parte en peso: (1-8): (1-8): (1-8): (10-70): (1-10): (2-20): (250-500); más preferiblemente dichos componentes por parte en peso: (2-5): (2-5): (2-5): (25-60): (2-6): (4-10): (300-450); adicionalmente más preferiblemente dichos componentes por parte en peso: (2-4) : (2-4) : (2-4) : (25-30) : (2-5) : (4-10) : (330-400); lo más preferiblemente dichos componentes por parte en peso: 3 : 3 : 3 : 28 : 4 : 7 : 370.
- 10 2. Una formulación de microgránulos que, como principio activo, comprende dicho extracto de Danshen de la reivindicación 1; siendo preferiblemente la densidad aparente de dicho microgránulo de 0,6 ~ 1,3 g/ml, el área de superficie específica de 0,005-0,05 m<sup>2</sup>/g y el tamaño de partícula de 0,5-1,8 mm; más preferiblemente, la densidad aparente de dicho microgránulo es de 0,8 ~ 1,1 g/ml, el área de superficie específica de 0,01-0,03 m<sup>2</sup>/g y el tamaño de partícula de 0,7-1,2 mm.
- 15 3. Una formulación de microgránulos encapsulada preparada a partir de la formulación de microgránulos de la reivindicación 2.
- 20 4. Un método de preparación de extracto de Danshen como se define en la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- (1) extraer Danshen con alcohol y filtrarlo para dar líquido de extracción alcohólico y residuo A para su uso posterior; siendo preferiblemente dicho alcohol etanol a una concentración de 50 ~ 100 % (v/v) en una cantidad de 2 ~ 7 veces el peso del medicamento en bruto y el tiempo de extracción de 0,5 ~ 4 horas;
- 25 (2) extraer el residuo A con agua, filtrarlo para dar líquido de extracción acuoso y desechar el residuo B; siendo preferiblemente la cantidad de agua añadida 3 ~ 7 veces el peso del residuo A y el tiempo de extracción de 0,5 ~ 4 horas;
- (3) respectivamente, los líquidos de extracción alcohólicos y acuosos se enfrían y se dejan en reposo y ambos sobrenadantes se extraen para dar el sobrenadante alcohólico y acuoso respectivamente; incluyendo, preferiblemente, dicho enfriamiento y reposo incluye las siguientes etapas: agitar el líquido de extracción durante 20 ~ 60 min y dejar en reposo durante 6 ~ 24 horas disminuyendo la temperatura a 15° C o a una temperatura inferior, antes de extraer el sobrenadante;
- 30 (4) concentrar el sobrenadante acuoso para tener líquido de extracción acuoso concentrado; preferiblemente concentrar el sobrenadante acuoso a una densidad relativa de 1,10 ~ 1,35 para dar el líquido de extracción acuoso concentrado;
- (5) añadir gradualmente el sobrenadante alcohólico al líquido de extracción acuoso concentrado, combinado y concentrado para dar una solución concentrada mezclada;
- 35 (6) añadir agua purificada a la solución concentrada mezclada, bien mezclada para dar extracto de Danshen; preferiblemente, añadir agua purificada varias veces a la solución concentrada mezclada 10 l ~ 100 l, 5 l ~ 50 l cada vez, mezclada y concentrada a presión reducida para dar el extracto con una densidad relativa de 1,25 ~ 1,35 a 82,5 ± 2,5° C.
- 40 5. El método de la reivindicación 4, **caracterizado por que** dicho método comprende las siguientes etapas:
- 45 coger Danshen molido, añadir 400 ± 12 l de etanol (90 ± 0,5 %), someter a decocción durante 90 ± 5 min, filtrar a través de un tamiz de malla 200, combinar y poner en el tanque de separación; para la 2ª decocción de 60 ± 3 min., al residuo resultante se le añaden 500 ± 15 l de agua, se filtra a través de un tamiz de malla 200 y el residuo se desecha; el líquido de extracción acuoso se combina y se coloca en diferentes tanques; el líquido de extracción alcohólico mezclado y el líquido de extracción acuoso mezclado se colocan en diferentes tanques de separación, por los que se hace pasar agua congelada para enfriar y se deja reposar; después de 30 minutos de agitación, el líquido de extracción se enfría a 15° C o a una temperatura inferior durante 4 horas y se deja reposar durante 6 ~ 24 horas; el sobrenadante acuoso y el sobrenadante alcohólico se transfieren a los tanques respectivos; en primer lugar, el sobrenadante acuoso se concentra en líquido de extracción de agua concentrado con una densidad relativa de 1,25 ~ 1,30 (82,5 ± 2,5° C), en el que gradualmente se añade el sobrenadante alcohólico y se combina y se concentra adicionalmente; durante el proceso de concentración, la densidad de la solución concentrada no es inferior a 1,15; cuando la densidad de la solución concentrada mezclada es ≥ 1,34, se añaden dos veces 10 l de agua purificada, 5 l cada vez (45 ± 5° C), se mezcla, se concentra a una densidad relativa de 1,33 ~ 1,35 (82,5 ± 2,5° C), y se filtra inmediatamente a través de un tamiz de malla 40 para dar el extracto de Danshen.
- 50 60 6. Un método de preparación de microgránulo que contiene extracto de Danshen como se define en la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:
- (1) Tomar el extracto de Danshen y el microgránulo virgen en una proporción en peso de 1: 5 ~ 5: 1 para su uso posterior;
- 65 (2) suministro y fluidificación: el microgránulo virgen de la fórmula posológica, se absorbe en una máquina de

recubrimiento de secado fluidificado para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado;

(3) carga de fármaco en fase inicial: una vez que la temperatura del material alcance 40-60° C, se pulveriza un líquido y se extiende sobre la superficie del microgránulo a una tasa de 70-120 g/min; dicho líquido pulverizado consiste en pequeñas gotitas preparadas atomizando el extracto de Danshen premezclado obtenido diluyendo con agua el extracto de Danshen;

(4) fase de carga de fármaco: cuando el material está a 40 ~ 60° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo; el diámetro del microgránulo y la tasa de pulverización aumentan gradualmente para dar un gránulo con un diámetro de 0,5 ~ 1,8 mm.

7. El método de la reivindicación 6, **caracterizado por que** dicho método comprende adicionalmente la etapa (5): después de la pulverización, el microgránulo de carga de fármaco se recubre pulverizando líquido de recubrimiento; la temperatura del material de recubrimiento es de 40-60° C, la tasa de pulverización de 40-300 g/min, el tiempo de recubrimiento de 1 ~ 4 horas y la concentración del líquido de recubrimiento de 5 ~ 25 %.

8. El método de la reivindicación 7, **caracterizado por que** dicho método comprende las siguientes etapas:

(1) Tomar el extracto de Danshen y el microgránulo virgen en una proporción en peso de 1: 3 ~ 3: 1, preferiblemente de 2: 1 ~ 1: 1, para su uso posterior;

(2) suministro y fluidificación: a un volumen de aire de 600-1500 m<sup>3</sup>/h, el microgránulo virgen se absorbe en una máquina de recubrimiento de secado por fluidificación para que el microgránulo virgen se fluidifique completamente en el lecho fluidificado; sin embargo, la fluidificación no puede ser demasiado fuerte, para evitar que el microgránulo virgen se desgaste y espolvoree; debido a esto, el microgránulo virgen debe cubrirse con las gotitas atomizadas con la pistola pulverizadora;

(3) carga de fármaco en fase inicial: la pistola pulverizadora y la presión de pulverización se ajustan para hacer que los líquidos se atomicen en pequeñas gotitas; el extracto se suministra a la pistola pulverizadora con una bomba dosificadora; las presiones del chorro de aire superior e inferior se establecieron a 200 ~ 300 KPa (2,0 ~ 3,0 bares) y a 250 ~ 350 KPa (2,5 ~ 3,5 bares), respectivamente; la temperatura del material es de 50° C; una vez que la temperatura alcance 45° C, la solución de suministro comienza a pulverizarse a una tasa de 120 g/min;

(4) fase de carga del fármaco: cuando el material está a 45 ~ 55° C, el volumen de pulverización aumenta gradualmente con el aumento del diámetro del microgránulo, pero la velocidad máxima no supera los 400 g/min; el volumen de aire se ajusta de acuerdo con el estado fluidificado del microgránulo;

(5) recubrimiento: después de la carga del fármaco, el líquido de recubrimiento se pulveriza directamente para realizar el recubrimiento; inicialmente, la temperatura del material se establece a 50° C y la tasa de pulverización a 80 g/min; después de 20 minutos de recubrimiento, la tasa de pulverización puede ajustarse a 80-150 g/min., temperatura del material se regula a 40-55° C; la tasa de infusión, el volumen de aire y la temperatura del material se ajustan de acuerdo con la adhesión de microgránulo;

preferiblemente, la solución de extracto medicinal se prepara por dilución de extracto de Danshen con agua; la proporción en peso del extracto de Danshen con respecto al agua es de 100: 60-100, preferiblemente de 100: 70-90, más preferiblemente de 100: 75-85.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 ~ 8, **caracterizado por que** dicha formulación de microgránulos es la formulación de microgránulos de la reivindicación 2.

10. Los extractos de Danshen de la reivindicación 1 o la formulación de microgránulos de la reivindicación 2 o la formulación de microgránulos encapsulada de la reivindicación 3, para su uso en la mejora de la microcirculación o la reducción de lípidos en sangre.

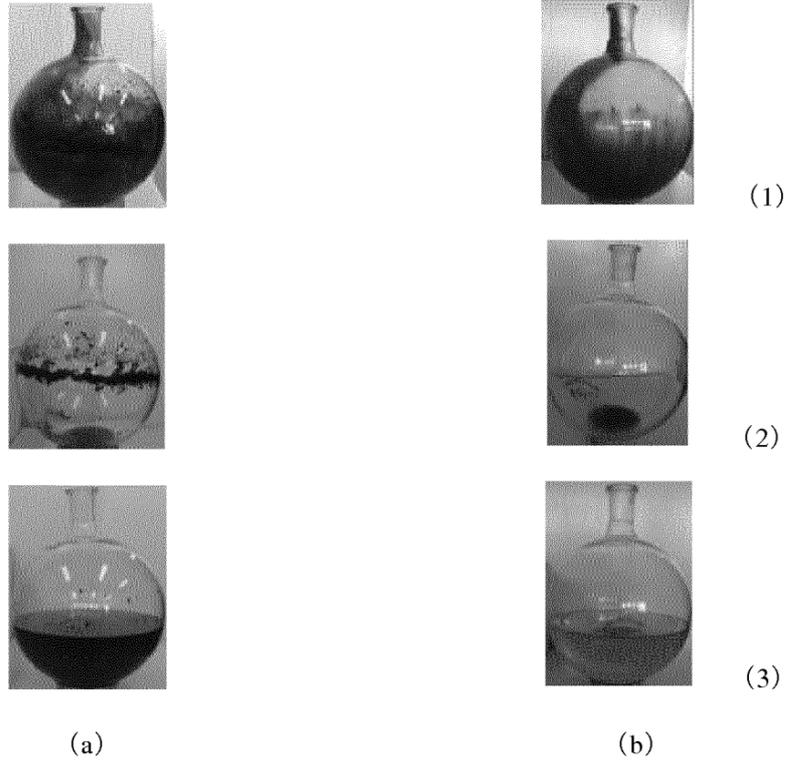


Fig. 1



Fig. 2

Curva de concentración y mortalidad del extracto de Danshen E01

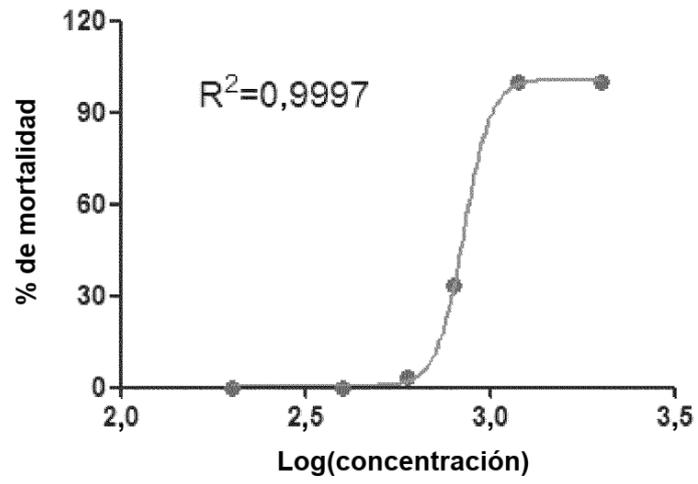


Fig. 3



Fig. 4

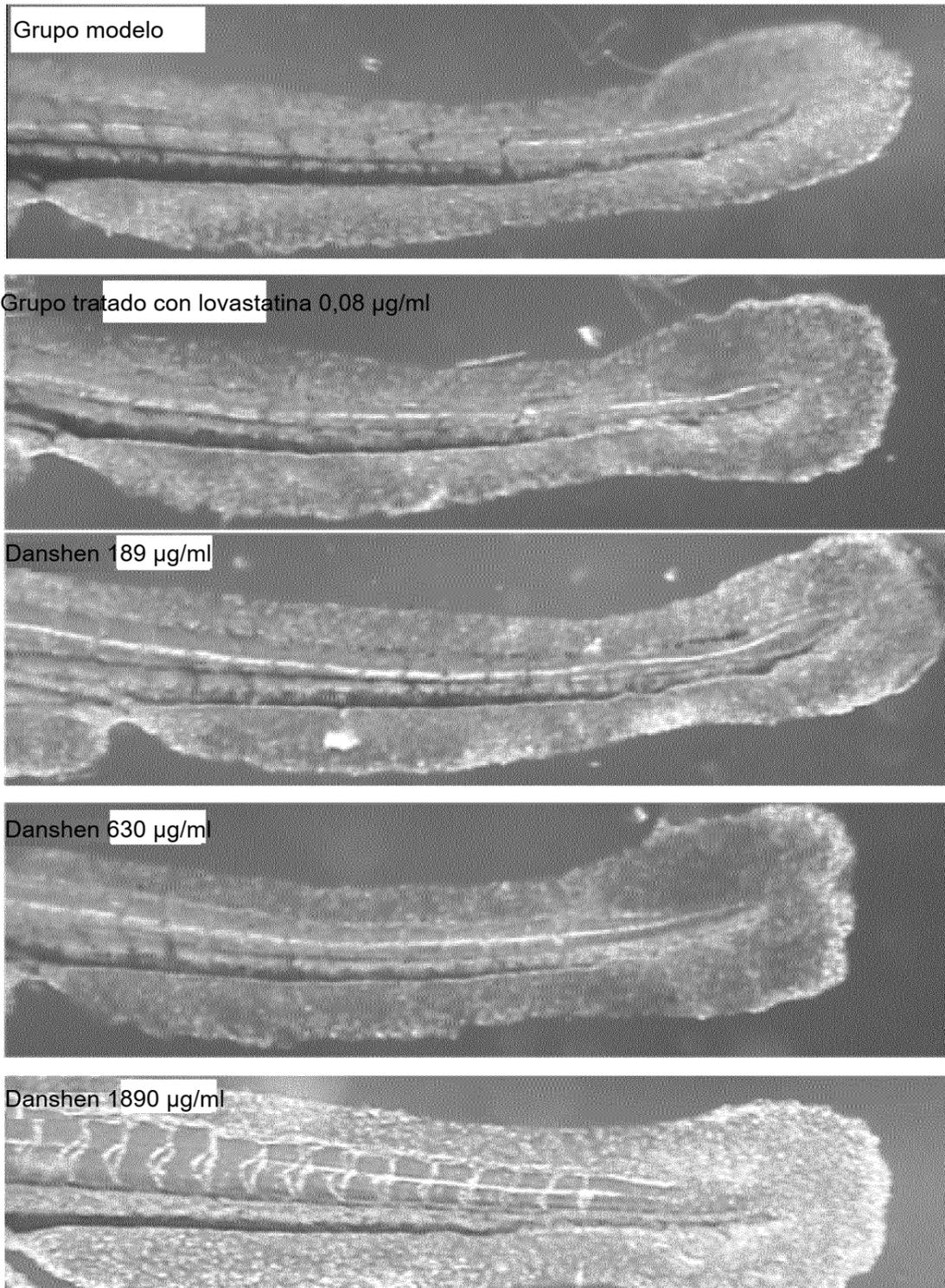


Fig. 5

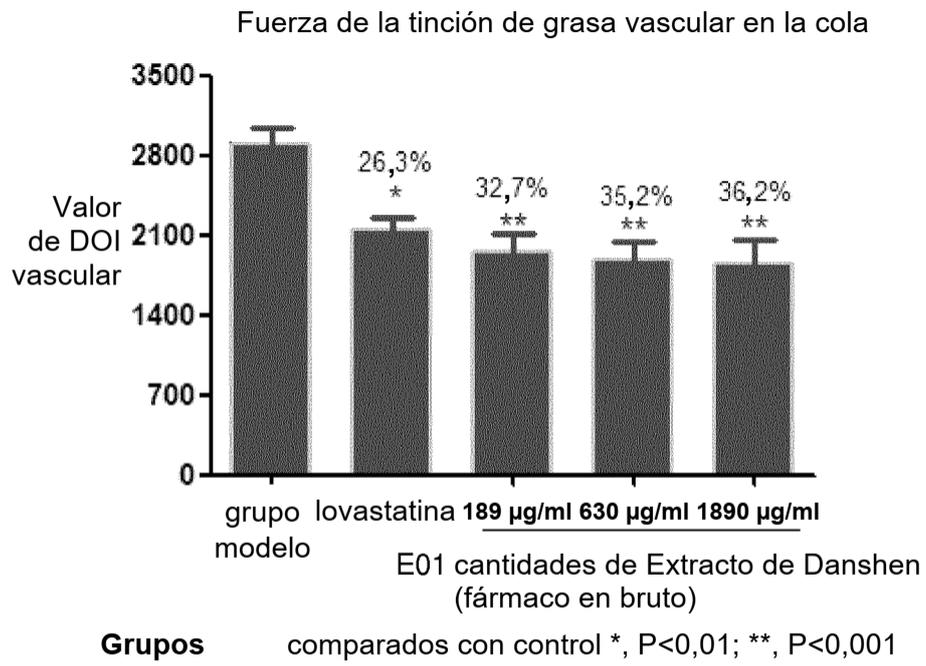


Fig. 6