



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101406649 B

(45) 授权公告日 2011.05.11

(21) 申请号 200710046888.2

大学学报》. 2005, 第 36 卷 (第 5 期), 408-410.

(22) 申请日 2007.10.10

审查员 封明艳

(73) 专利权人 中国科学院上海药物研究所

地址 200031 上海市太原路 294 号

专利权人 香港中文大学

(72) 发明人 叶阳 林鸽 林理根

约翰·安东尼·鲁德 李希强

唐春萍 柯昌强

(74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理

有限公司 11225

代理人 朱梅 徐志明

(51) Int. Cl.

A61K 31/55 (2006.01)

A61K 36/904 (2006.01)

A61P 11/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1931171 A, 2007.03.21, 说明书全文.

CN 1453279 A, 2003.11.05, 说明书全文.

吕丽华等. 直立百部的化学成分.《中国药科

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

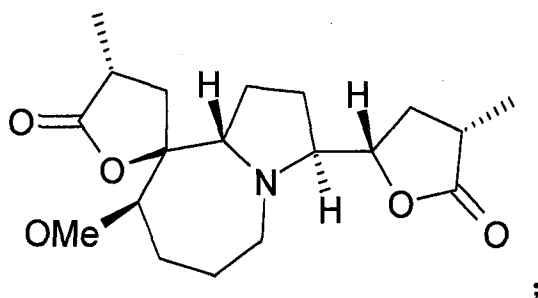
(54) 发明名称

总生物碱提取物及其提取方法和在制备治疗咳嗽药物中的用途

(57) 摘要

本发明属于药物化学领域,具体公开了一种百部科 (Stemonaceae) 百部属直立百部 (Stemona sessilifolia) 的有效总生物碱提取物及其提取方法和在制备治疗咳嗽药物中的应用。本发明的百部科百部属直立百部植物的有效总生物碱提取物具有减轻和 / 或抑制咳嗽的活性。

1. 一种具有镇咳活性的直立百部有效总生物碱提取物,其特征在於,其含有 74.0wt%~80.2wt%的结构式如下的百部定碱,



所述直立百部有效总生物碱提取物按如下方法得到:

(a) 用醇、水或其混合物浸渍百部科植物直立百部样品,过滤后得到提取液;所述醇为乙醇;

(b) 将提取液中的溶剂减压蒸发形成浆状物,得到直立百部总提取物;

(c) 将浆状物用稀盐酸水溶液溶解,并调节 pH 至 1~2,减压抽滤不溶物,所得滤液用乙醚萃取三次,萃取后的水相即为酸水;

(d) 将酸水用氨水碱化 pH 至 9~10,用氯仿、二氯甲烷或者其混合物反复萃取,至水相无生物碱反应,合并有机相,减压浓缩得到直立百部有效总生物碱提取物。

2. 根据权利要求 1 所述的直立百部有效总生物碱提取物,其特征在於,在所述的步骤 (c) 中,稀盐酸为 4wt% 的稀盐酸。

3. 权利要求 1 或 2 所述的直立百部有效总生物碱提取物在制备治疗咳嗽药物中的应用。

4. 一种具有镇咳活性的直立百部有效总生物碱提取物的制备方法,其特征在於,包括以下步骤:

(a) 用醇、水或其混合物浸渍百部科植物直立百部样品,过滤后得到提取液;所述醇为乙醇;

(b) 将提取液中的溶剂减压蒸发形成浆状物,得到直立百部总提取物;

(c) 将浆状物用稀盐酸水溶液溶解,并调节 pH 至 1~2,减压抽滤不溶物,所得滤液用乙醚萃取三次,萃取后的水相即为酸水;

(d) 将酸水用氨水碱化 pH 至 9~10,用氯仿、二氯甲烷或者其混合物反复萃取,至水相无生物碱反应,合并有机相,减压浓缩得到直立百部有效总生物碱提取物。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在於,在所述的步骤 (c) 中,稀盐酸为 4wt% 的稀盐酸。

总生物碱提取物及其提取方法和在制备治疗咳嗽药物中的用途

技术领域

[0001] 本发明属于药物化学领域,更具体而言,涉及从百部科百部属直立百部植物中提取的有效总生物碱提取物、及其提取方法和在制备治疗咳嗽药物中的应用。

背景技术

[0002] 咳嗽是为清除气道内物质(痰液)的一种突然爆发性呼气动作。

[0003] 咳嗽本身是一种保护性反射,能清除咽部和整个呼吸道的粘性分泌物、吸入的有害物或异物,因此咳嗽是人体的一种重要的防御机制,如果咳嗽减弱或消失是非常有害的,甚至是致命的。但是咳嗽对人们健康的影响是辩证的,长期频繁咳嗽可影响患者的呼吸、心脏和日常生活、工作,因此是有害的,也是人们经常就医的原因。据美国调查,咳嗽是该国患者就医的第一位原因,而不明原因的慢性咳嗽占呼吸科门诊的10%~38%。

[0004] 咳嗽的发生机理一般是咳嗽感受器接受刺激,通过舌咽神经、迷走神经传入通路进入咳嗽中枢,然后发出冲动,再沿迷走神经传至相应感受器而产生一系列的呼吸肌群收缩运动,引起咳嗽。

[0005] 咳嗽通常按时间分为3类:急性咳嗽、亚急性咳嗽和慢性咳嗽。急性咳嗽时间<3周,亚急性咳嗽3~8周,慢性咳嗽≥8周。1. 急性咳嗽:普通感冒是急性咳嗽最常见的病因,其他病因包括急性支气管炎、急性鼻窦炎、过敏性鼻炎、慢性支气管炎急性发作、支气管哮喘(简称哮喘)等。2. 亚急性咳嗽:最常见原因是感冒后咳嗽(又称感染后咳嗽)、细菌性鼻窦炎、哮喘等。3. 慢性咳嗽:慢性咳嗽原因较多,通常可分为两类:一类为初查X线胸片有明确病变者,如肺炎、肺结核、肺癌等。另一类为X线胸片无明显异常,以咳嗽为主或惟一症状者,即通常所说的不明原因慢性咳嗽(简称慢性咳嗽)。慢性咳嗽的常见原因有:咳嗽变异型哮喘(CVA)、鼻后滴流综合征(PNDs)、嗜酸粒细胞性支气管炎(EB)和胃食管反流性咳嗽(GERC),这些原因占了呼吸内科门诊慢性咳嗽比例的70%~95%。其他病因较少见,但涉及面广,如慢性支气管炎、支气管扩张、支气管内膜结核、变应性咳嗽(AC)、心理性咳嗽等。

[0006] 除了人身体病变会产生咳嗽外,机械刺激例如微粒物质的吸入或者刺激性气体(例如NH₃,Cl₂)的吸入也能引起剧烈咳嗽;此外,温度急剧变化的刺激例如特别冷或特别热的空气的吸入也能导致咳嗽。

[0007] 资料显示,每年全世界约有15%的成年人和大约10%的未成年人受到不同程度的咳嗽的干扰。因此,市场对止咳药物的需求巨大。

[0008] 治疗咳嗽的镇咳药物已发展有很多种,目前在临床上使用比较广的主要是两类:一类是中枢性镇咳药,以吗啡类化合物为代表,如可待因(codeine)、右美沙芬(dextromethorphan);一类是外周性镇咳药,如苯丙派林(benproperine)、莫吉司坦(moguisteine)等。然而,这些化合物都有不利的副作用。例如吗啡类化合物的使用会导致成瘾、呼吸抑制、抑制平滑肌的收缩(例如导致便秘)和出现幻觉。特别是可待因高度成瘾,右美沙芬能诱

发幻觉、妄想或其它精神病症状。此外，具有强镇咳活性的药物例如可待因和美沙芬对中枢神经系统有不利影响。

[0009] 由于目前临床上用于治疗咳嗽的药物或多或少都有一些严重不利的副作用，因此需要药学工作者研发无此类副作用并能有效减轻和 / 或抑制咳嗽的镇咳药物。

[0010] 百部作为一种传统中药，在我国已经使用了 2000 多年，《本草纲目》上记载，百部药用其根，甘苦微温，具有止咳平喘、杀虫止痒之功效。在临床上主治咳嗽上气、治肺热、润肺、治疳、杀虻虫、寸白虫及一切树木蛀虫、杀虱及蝇蠊、治疥癣、驱虫蚕咬毒。《中国药典》从 1985 版开始收载百部，规定药用百部为百部科百部属植物直立百部 [*Stemonasessilifolia*(Miq)Miq]、蔓生百部 [*S. japonica*(Blume)Miq] 和对叶百部 [*S. tuberosa* Lour.] 的地下部分。百部生长在海拔 370-2240 米的山坡丛林下、溪边、路旁以及山谷和阴湿岩石中，在秦岭、淮河以南各省区以及越南、缅甸、泰国和印度北部都有分布。

[0011] 中国专利 ZL03122472.5 公开了一种具有镇咳活性的百部植物提取物和生物碱。但是其中的具体实施例只对对叶百部进行了相关研究，而没有对其他百部属植物进行相关研究。所公开的提取方法只是生物碱类化合物普遍适用的提取方法。

[0012] 直立百部与对叶百部所含生物碱化合物的种类、含量及其性质均有很大的差异。因此，有必要对直立百部进行更深入的研究。

发明内容

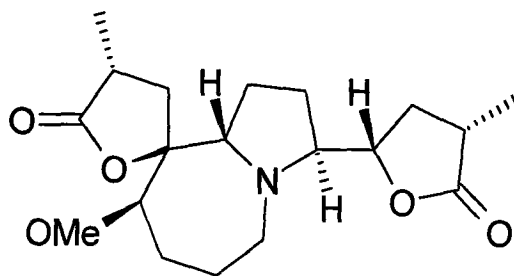
[0013] 针对以上现有技术的不足，本发明的目的是提供一种具有镇咳活性的从百部科百部属直立百部植物中提取的有效总生物碱提取物。

[0014] 本发明的又一目的是提供上述直立百部有效总生物碱提取物的提取方法。

[0015] 本发明的再一目的是提供上述直立百部有效总生物碱提取物在制备治疗咳嗽药物中的用途。

[0016] 本发明提供的具有镇咳活性的百部科植物直立百部有效总生物碱提取物，其含有 74.0wt%~80.2wt% 的结构式如下的百部定碱 (stemospironine)：

[0017]



[0018] 本发明提供的上述直立百部有效总生物碱提取物，按如下方法提取得到：

[0019] (a) 用醇、水或其混合物浸渍百部科植物直立百部样本，过滤后得到提取液；所述醇为乙醇；

[0020] (b) 将提取液中的溶剂减压蒸发形成浆状物，即为直立百部总提取物；

[0021] (c) 将浆状物用稀盐酸（优选 4wt%）水溶液溶解，并调节 pH 至 1~2，减压抽滤不溶物，所得滤液用乙醚萃取三次，萃取后的水相即为酸水；

[0022] (d) 将酸水用氨水碱化 pH 至 9 ~ 10, 用氯仿、二氯甲烷或者其混合物反复萃取, 至水相无生物碱反应, 合并有机相, 减压浓缩得到直立百部有效总生物碱提取物。

[0023] 本发明提供的从百部科植物中提取的有效直立百部总生物碱提取物和直立百部总提取物, 具有减轻或者抑制咳嗽的活性, 可用于制备治疗咳嗽药物。

[0024] 本发明的有益效果在于: 与 ZL03122472.5 相比, 本发明具有以下几个方面的特点:

[0025] (1)、所用的原植物不同。本发明所用的原植物是百部科百部属植物直立百部 (*Stemona sessilifolia*), 而 ZL03122472.5 在实施例中仅仅涉及的原植物是百部科百部属植物对叶百部 (*Stemona tubrosa*)。

[0026] (2)、所得到的总生物碱提取物中的主要活性成分不同。本发明所涉及的活性成分主要是百部定碱 (Stemospironine), 而 ZL03122472.5 中所涉及到的活性成分包括 Neotuberostemonine、Tuberostemonine J、Tuberostemonine H、Neostenine 和 Epibisdehydro-tuberostemonine J。两种提取物中的活性成分在结构类型与性质上均有着很大的差异。

[0027] (3)、本发明的提取分离方法是针对直立百部所含有的活性成分的性质通过大量的实验得到的。比起 ZL03122472.5 中的普遍适用的方法, 对于直立百部中活性成分的提取更加合理、更具有可行性。ZL03122472.5 提取用的方法是加热回流, 而百部中所含生物碱性质不稳定, 在加热的情况下结构容易发生变化, 所以在本发明中采用了常温渗漉的方法来进行提取, 保证百部生物碱结构的稳定性; ZL03122472.5 在步骤 C 中提取物水液调节 pH1 ~ 2 后是直接离心过滤然后碱化, 这种方法仅仅除掉了一部分杂质, 但是与本发明的直立百部总生物碱提取物中的主要活性成分性质比较相近的一些杂质却没有除掉, 这样就为后续处理带来不必要的麻烦, 而本发明在直立百部活性成分的提取过程中在过滤后加入乙醚进行萃取把这部分杂质去除, 从而简化了后续处理, 节省了时间。

附图说明

[0028] 图 1 是用本发明所用方法提取得到的直立百部有效总生物碱提取物 HPLC 测定的谱图。

[0029] 图 2 是用 ZL03122472.5 所用方法提取得到的直立百部有效总生物碱提取物 HPLC 测定的谱图。

[0030] 图 3 是直立百部 (*Stemona sessilifolia*) 不同提取物口服给药的镇咳活性测定结果。

具体实施方式

[0031] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步详细描述, 但不作为对本发明的限定。

[0032] I. 概要

[0033] 本发明提供治疗咳嗽的直立百部有效总生物碱提取物, 及其提取方法和应用。该有效总生物碱提取物能用于治疗咳嗽。在此, 词语“治疗咳嗽”是指能够减轻和 / 或降低咳嗽发生的强度和频率。

[0034] II. 百部科植物有效提取物

[0035] 本发明提供具有镇咳活性的百部科植物总提取物,本发明还提供了具有镇咳嗽活性的百部科直立百部植物活性部位有效总生物碱提取物。属于百部科的属为 *Stemona*、*Croomia* 或 *Stichoneuron*,本发明的提取物来自 *Stemona* 属的 *Stemona sessilifolia*(直立百部)。

[0036] 本发明提供的具有镇咳活性的百部科直立百部植物有效总生物碱提取物的提取方法如上所述。

[0037] 具体实施例

[0038] 实验中所用的 *Stemona sessilifolia* 干根茎采自于中国海南省,经中国科学院上海药物所沈金贵副教授鉴定是 *Stemona sessilifolia*。此种植物材料的证据样本保藏在中国科学院上海药物研究所;实验中所用的百部定碱对照品由本申请发明人分离得到。

[0039] 本实验使用雄性成年 Dunkin-Hartley 豚鼠(体重 300-500g),由香港中文大学实验动物中心提供。豚鼠置于实验室内(温度 $21 \pm 1^\circ\text{C}$;湿度 60%),自然昼/夜循环,给以标准的食物和水。

[0040] 在本文中,除非特别说明,涉及溶剂比例均为体积比。

[0041] 实施例 1

[0042] 直立百部总提取物的提取

[0043] 将 *Stemona sessilifolia* 干的根茎(10kg)切碎,95%乙醇室温浸泡三次,每次用量 10L,时间 72 小时,合并三次提取液,减压浓缩得到浆状液,即为直立百部总提取物(350g)。

[0044] 实施例 2

[0045] 直立百部有效总生物碱提取物的提取

[0046] 向实施例 1 中得到的浆状液中加入稀盐酸溶液(4%)进行酸化,并调节最终 pH 为 1~2,减压抽滤出不溶物,所得滤液用乙醚萃取三次,每次用乙醚 200ml,萃取后的水相即为酸水。酸水用氨水碱化至 pH 9~10,用氯仿反复萃取,每次用氯仿 200ml,至水相无生物碱反应,合并有机相,减压浓缩氯仿得到直立百部有效总生物碱提取物(42g)。

[0047] 实施例 3

[0048] 对照品百部定碱的分离

[0049] 将实施例 2 中得到的直立百部有效总生物碱提取物进行硅胶(100~200目)柱层析分离(硅胶用量为 1.5kg),以石油醚:乙酸乙酯(6:1)、(5:1)、(4:1)、(3:1)、(2:1)、(1:1)和(1:2)为洗脱液,每个梯度的洗脱液体积均为 10L,每 500mL 浓集为一馏分。每一个梯度的洗脱液合并并浓缩,得到 1~7 共 7 个部位。

[0050] 部位 4,即流动相为石油醚:乙酸乙酯(3:1)洗下部位(12.0g)浓缩溶剂后放于室温静置,析出结晶,将结晶过滤出来,然后经乙酸乙酯重结晶,得到化合物百部定碱(3.8g)。

[0051] 实施例 4

[0052] 直立百部有效总生物碱提取物中百部定碱(stemospironine)的含量测定

[0053] 分别称取 5 份样品,每份含直立百部各 50g,按照上述实施例 1 和 2 中所述方法平行进行处理分别得到 5 份直立百部总生物碱提取物,然后利用 HPLC 归一化法对得到的直立

百部总生物碱提取物中百部定碱 (stemospironine) 的含量进行测定, 根据相同色谱条件下百部定碱对照品的保留时间来确定样品中百部定碱的位置。

[0054] 分析条件为: 分析柱: XTerra, RP-18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm。流动相: 0.5% NH_4OH 水溶液 (I) 与含有 0.5% NH_4OH 的乙腈 (II) 的混合溶剂梯度洗脱, 具体洗脱条件为: 0 ~ 16min, I : II (75 : 25 ~ 64 : 36); 16 ~ 30min, I : II (64 : 36); 30 ~ 31min, I : II (64 : 36 ~ 5 : 95); 31 ~ 41min, I : II (5 : 95); 41 ~ 45min, I : II (5 : 95 ~ 75 : 25)。流速: 1ml/min。检测器: 蒸发光散射检测器 (ELSD)。百部定碱 (stemospironine) 在第 12.633min 出峰 (见图 1)。

[0055] 测定结果: 5 份直立百部总生物碱提取物中百部定碱的重量百分含量分别为: 76.0wt%、74.0wt%、78.0wt%、80.2wt%、75.6wt%。

[0056] 结果表明: 百部定碱在直立百部总生物碱提取物中的重量百分含量在 74.0 ~ 80.2 wt%, 为该直立百部总生物碱提取物中的主要生物碱。

[0057] 比较例 1

[0058] 分别称取 5 份样品, 每份含直立百部各 50g, 按照 ZL03122472.5 中实施例 3 中方法平行进行处理分别得到 5 份提取物, 然后利用上述的 HPLC 法对 5 份提取物中的百部定碱进行测定。色谱条件同上。百部定碱 (stemospironine) 在第 12.708min 出峰 (见图 2)。

[0059] 测定结果: 5 份提取物中百部定碱的重量百分含量分别为: 28.6wt%、31.2wt%、29.8wt%、29.7wt%、30.6wt%。

[0060] 通过上述实施例 4 和比较例 1 的测定结果可以看出: 本发明提取方法得到的直立百部总生物碱提取物中的活性成分百部定碱的重量百分含量在 74.0 ~ 80.2%, 明显高于 ZL03122472.5 中的提取方法得到的提取物中百部定碱的重量百分含量 (28.6 ~ 31.2%)。说明, ZL03122472.5 中的提取方法对活性成分百部定碱的破坏比较大, 而本发明的提取方法对于直立百部中的活性成分的提取来说更加科学, 更加合理, 也更加实用。

[0061] 试验实施例

[0062] 本发明直立百部有效总生物碱提取物和总提取物镇咳活性测试 (图 3)

[0063] 采用柠檬酸诱导的豚鼠咳嗽模型 (Gallico et al., 1994; Chung et al., 2003)。豚鼠随机分成不同的组, 每组 5 只豚鼠, 置于单个密封透明的有机玻璃室 (25 \times cm \times 12cm \times 12cm) 内, 使用超声波喷雾器 (OMRONNE-U12, 东京, 日本) 通入雾化的 0.5M 的柠檬酸水溶液 8 分钟, 每分钟约 0.5 毫升粒子平均直径 1-5 微米的气溶胶。监测 8 分钟内的阵发性咳嗽, 咳嗽的声音由室内放置的麦克风记录和放大。声波经 Cool Edit2000 软件 (Syntrillium, Phenix, USA) 的微机分析, 再经电脑软件 (CoughCount-CUHK-2003-Copyright) 处理声音数据计数咳嗽次数。每组豚鼠在柠檬酸刺激前 30 分钟口服单剂量给药。给药量为: 总提取物 500mg/kg 和 1000mg/kg; 总生物碱提取物为: 50mg/kg 和 150mg/kg。镇咳活性以给药组动物的咳嗽次数与空白对照组 (给予相应体积的生理盐水) 相比的咳嗽次数的减少计数。此外, 本发明亦用常用镇咳药可待因为阳性对照来验证此豚鼠咳嗽模型, 腹腔给药 30mg/kg 可待因咳嗽抑制率为 86%, 证明本模型的可行性。

[0064] 图 3 中: Ext1: 总提取物; Ext2: 总生物碱提取物。给药剂量单位为 mg/kg。与空白对照相比 **p < 0.01 具有显著性差异, 采用方差分析单向变量分析 (ANOVA) 的 Dunnett's

检验。

[0065] 结果表明,直立百部总生物碱提取物和总提取物均有镇咳活性并具量效关系。总提取物给药量 1000mg/kg 咳嗽抑制率为 52.75%,而总生物碱提取物给药量 150mg/kg 咳嗽抑制率达 37.36%,显示总生物碱提取物的镇咳活性较总提取物为高,进而说明以百部定碱为主的生物碱类化合物为镇咳的主要活性成分。

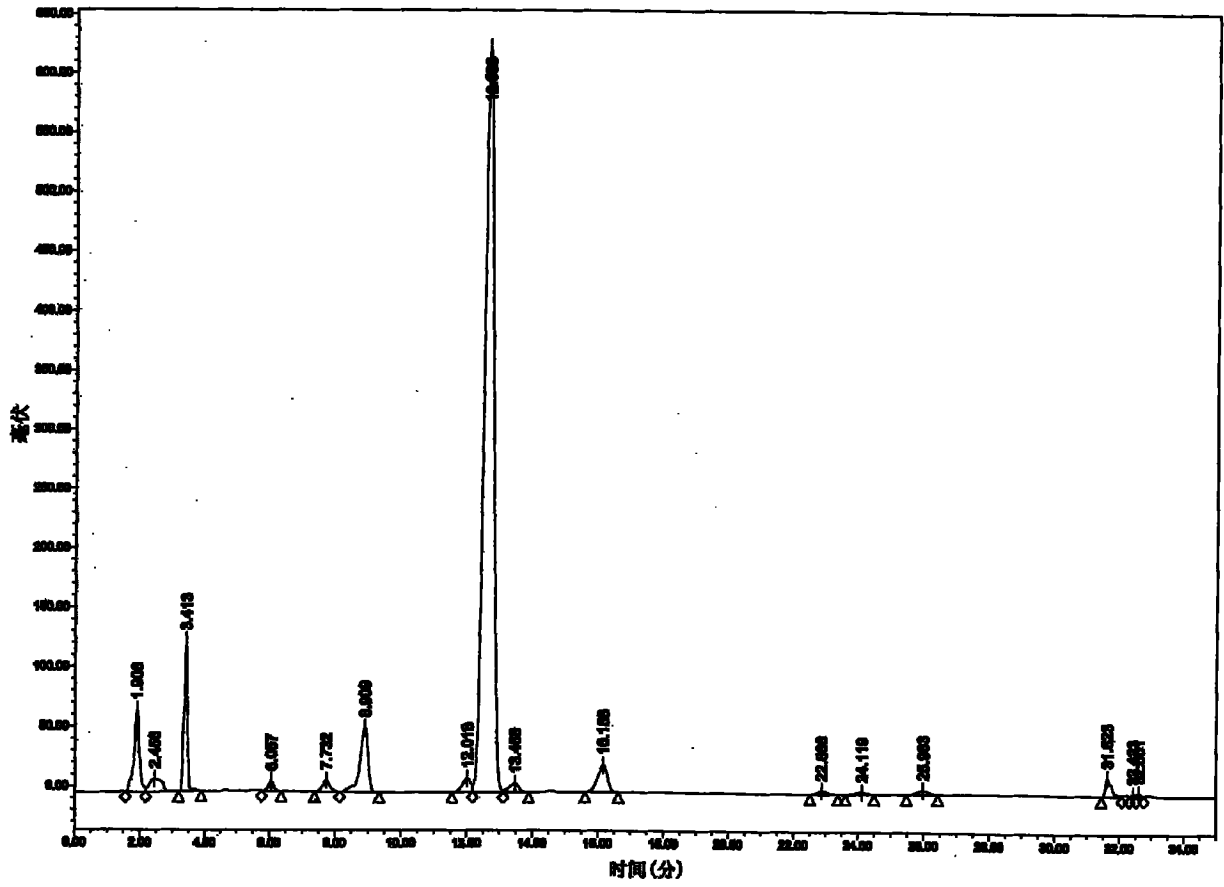


图 1

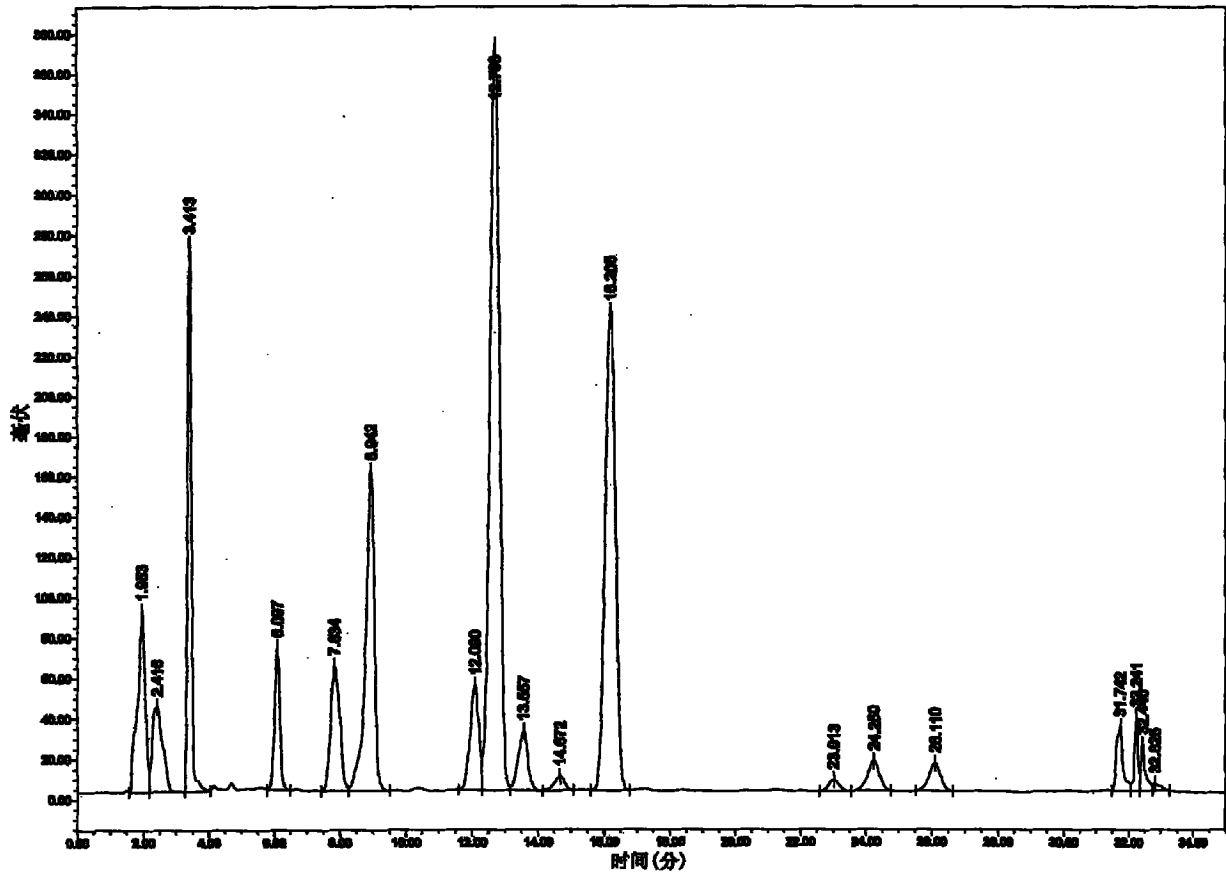


图 2

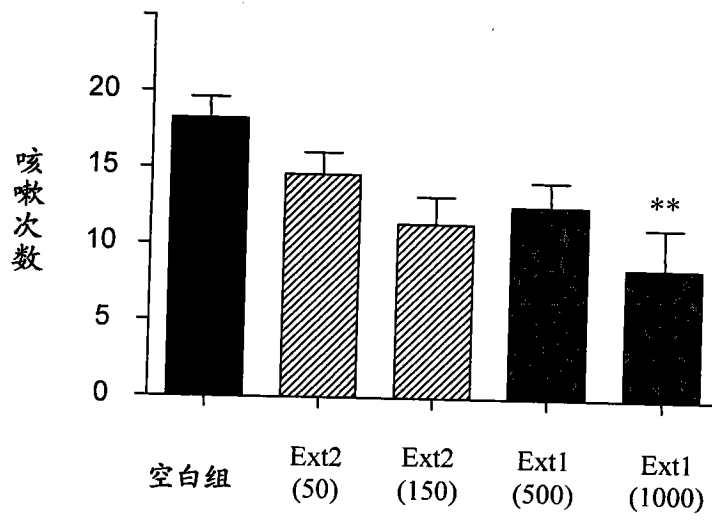


图 3