

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2008 年 4 月 17 日 (17.04.2008)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2008/043246 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/7048 (2006.01) **A61P 3/10** (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2007/002684
- (22) 国际申请日: 2007 年 9 月 11 日 (11.09.2007)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200610122125.7
2006 年 9 月 12 日 (12.09.2006) CN
- (71) 申请人及
(72) 发明人: 徐广爱(XU, Guang'ai) [CN/CN]; 中国海南省海口市秀英区滨海大道76号金城小区香堤阁, Hainan 570125 (CN)。
- (74) 代理人: 北京北新智诚知识产权代理有限公司 (BEIJING BEIXIN-ZHICHENG INTELLECTUAL PROPERTY AGENT CO.,LTD); 中国北京市西城区西直门南大街16号, Beijing 100035 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。

(54) Title: DRUG COMPOSITION FOR TREATING 2 TYPE DIABETES AND ITS CHRONICITY NEOPATHY

(54) 发明名称: 具有2型糖尿病及其慢性并发症治疗作用的药物组合物

(57) Abstract: A drug composition for treating 2 type diabetes and its chronicity neopathy is disclosed. The composition is composed of chimonin and berberine in a certain rate. The composition has a preferable effect in decreasing blood glucose and fat compared with chimonin and berberine which is used alone.

(57) 摘要:

本发明涉及一种具有治疗2型糖尿病及防治2型糖尿病慢性并发症作用的药物组合物, 该组合物由含一定比例的芒果苷与小檗碱组成。该组合物较芒果苷与小檗碱单一应用具有更好的降糖、降脂等效果。



WO 2008/043246 A1

具有 2 型糖尿病及其慢性并发症治疗作用的药物组合物

技术领域

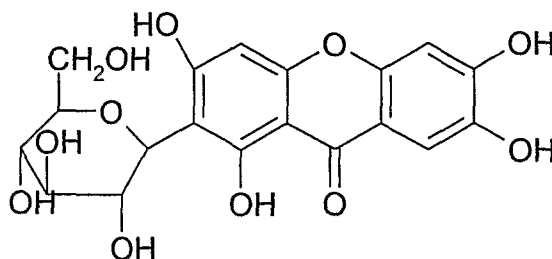
本发明涉及一种具有 2 型糖尿病及其慢性并发症治疗作用的药物组合物，其中的活性成分由芒果苷与小檗碱组成。

5 背景技术

近年来，2 型糖尿病及其众多的慢性并发症已成为威胁人类健康的“第三号杀手”。据统计，我国 2 型糖尿病的标化患病率，由 80 年代初期的 0.9% 迅猛增至目前的 5.21%，糖耐量减低的标化患病率为 4.76%。2 型糖尿病长期高血糖对机体许多组织和器官产生危害，导致多种 2 型糖尿病慢性并发症发生，如冠心病、
10 动脉粥样硬化、脑血管病等大血管病变；糖尿病肾病、糖尿病性视网膜病变等微血管病变；神经病变；糖尿病足；黄斑病、白内障、青光眼、屈光改变、虹膜睫状体病变等眼的其他病变等。

目前，已上市的口服降糖药大都价格昂贵或具有一定的不良反应而导致患者依从性较差。2 型糖尿病慢性并发症的发病机理尚不完全明了，临床亦没有较理想的治疗药物。因此开发价廉高效低毒的既具有降糖作用，又能防治 2 型糖尿病
15 慢性并发症的药物具有重要的临床意义与市场价值。

芒果苷(mangiferin)是从百合科植物知母等植物中提取的天然多酚类化合物，分子式： $C_{19}H_{18}O_{11}$ ，分子量：422。其化学结构如下：

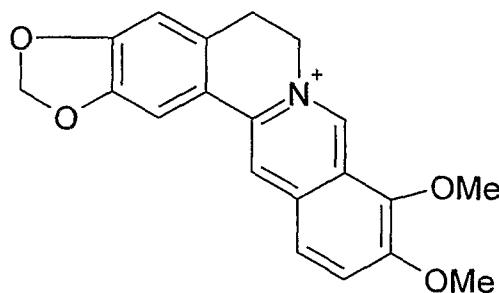


20 芒果苷是一种天然的清除自由基的抗氧化剂，芒果苷的药理研究表明其具有多种生物活性，如抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、降糖、抗炎、利胆、免疫调节、降脂等。其中芒果苷口服或腹腔注射皆可降低糖尿病鼠的血糖、血脂水平，其降糖的机制可能为通过增加胰岛素敏感性发挥其抗糖尿病活性【Miura T, Ichiki H, Hashimoto I, et al. Antidiabetic activity of a xanthone compound ,

mangiferin. *Phytomedicine*, 2001, 8(2): 85-87】。近年来, 越来越多的证据发现高糖、氧化应激和糖尿病慢性并发症之间密切相关。Muruganandan 等研究发现, 腹腔注射芒果苷控制了链脲霉素诱导糖尿病鼠产生的脂质过氧化反应, 降低糖尿病及其慢性并发症大鼠由于氧化性损伤引起的糖基化血红蛋白和血清肌酸磷酸激酶 (CPK) 的量, 并明显地保护动物免于心脏和肾脏的损伤【Muruganandan S, Gupta S, Kataria M, et al. mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology*, 2002, 176(3): 165-173】。大鼠一次性腹腔注射芒果苷的半数致死量 (LD₅₀) 为 365mg/kg【余胜民, 钟鸣. 芒果苷药理研究进展. *中国中医药科技*, 1999, 6(3): 199-200】。可见芒果苷的安全性极好。

10 因为芒果苷不溶于水, 故其在剂型的选择、机体的生物利用、吸收等受到极大限制。

小檗碱(berberine, Ber)又名黄连素, 系从毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Feranch 根和皮中提取的异喹啉类生物碱, 为黄连的主要成分。分子式: [C₂₀H₁₈NO₄]⁺, 分子量: 336.37。其化学结构如下:



15

小檗碱的药理研究表明其具有多种生物活性, 如抗菌、抗病毒、降糖、抗心率失常、降压、抗肿瘤、降脂等。

动物实验研究发现, Ber 可以降低正常小鼠、四氧嘧啶糖尿病及其慢性并发症小鼠和自发性糖尿病及其慢性并发症 KK 小鼠的血糖。作用较强、持续时间也较长, 同时 Ber 可以改善 KK 小鼠的葡萄糖耐量。近年来临床研究也证明, Ber 具有抗糖尿病及其慢性并发症作用, 尤其应用在 2 型糖尿病及其慢性并发症的治疗方面。其机制可能是通过抑制肝脏的糖异生和 / 或促进外周组织的葡萄糖酵解而产生降糖作用, 即非胰岛素依赖性。但小檗碱只有在中度高糖(11.1mmol/L) 条件下才有显著的降糖效应, 严重高糖(22.2mmol/L) 时作用消失, 从而主要适用于糖耐量低减、空腹血糖超常或糖尿病血糖尚稳定时【殷峻, 胡仁明, 陈名道. 二甲

25

双胍、曲格列酮和小檗碱对 Hep G2 细胞耗糖作用比较.中华内分泌代谢杂志,2002,18(6):488-489】。

近年研究表明,持续高血糖可使细胞内醛糖还原酶的活性增加,最终导致糖尿病神经、视网膜及各种血管病变的发生。抑制醛糖还原酶活性对治疗糖尿病慢性并发症具有重要意义。许多学者研究表明小檗碱对抑制醛糖还原酶具有一定作用【刘长山,董砚虎.中药黄芩苷与黄连素对糖尿病鼠醛糖还原酶活性作用的观察.中国 2 型糖尿病杂志,1996,4(3):163】。

小檗碱的治疗量相当安全,副作用也很少。长期服用未见任何障碍,一次口服 2.0g 未见任何副作用【季宇彬.中药有效成分药理与应用,哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2004,77】。

小檗碱生物利用度较低,发挥降糖效力需要一定的血糖范围,而使得小檗碱在糖尿病患者的临床使用范围大大受限。

发明内容

为了开发价廉高效低毒的既具有降糖作用,又能防治 2 型糖尿病慢性并发症的药物,本发明人通过大量的研究发现,将小檗碱与芒果苷以一定的比例组合,产生了以下几点意想不到的效果:

首先,小檗碱与芒果苷组合后,治疗 2 型糖尿病的效果显著增强,二者具有协同作用。具体表现在:

1、将小檗碱的非胰岛素依赖性降糖作用与芒果苷的胰岛素增敏作用有机地结合,产生更显著的降糖作用。

2、芒果苷的抗氧化作用及降脂作用与小檗碱的降脂、醛糖还原酶抑制等作用的有机结合,可有效地用于防治 2 型糖尿病慢性并发症。

其次,因为芒果苷不溶于水,而将二者组合后,芒果苷溶出性显著增加。

最后,因为芒果苷与小檗碱生物利用度皆较低,而将二者组合后,生物利用度显著提高。

鉴于该组合物所产生的有益效果,结合芒果苷与小檗碱两单体口服给药的高安全性与低原料成本,可知该组合物可以达到获得价廉高效低毒的既具有降糖作

用,又能防治2型糖尿病慢性并发症的药物的目的。

具体技术方案如下:

本发明提供一种用于制备2型糖尿病治疗药物的药物组合物,其特征在于:
该组合物作为药效组分的原料是由芒果苷与小檗碱组成,芒果苷和小檗碱以重量
5 比为1:0.1-1:20组成。

本发明提供的芒果苷和小檗碱的优选比例范围为重量比为1:1-1:10。

本发明提供的芒果苷和小檗碱的更优选比例范围为重量比为1:3-1:6。

本发明提供的上述药物组合物,其特征在于所述小檗碱也可以是盐酸小檗碱、硫酸小檗碱、鞣酸小檗碱或小檗碱其他医学上可接受的盐。

10 本发明另一目的是提供上述药物组合物在制备2型糖尿病治疗药物中的应用。

本发明提供的上述药物组合物在制备2型糖尿病治疗药物中的应用,其特征在于,所述2型糖尿病治疗药物为降糖药物。

15 本发明提供的上述药物组合物在制备2型糖尿病治疗药物中的应用,其特征在于,所述2型糖尿病治疗药物为2型糖尿病慢性并发症防治药物。

本发明提供的上述药物组合物在制备2型糖尿病治疗药物中的应用,其特征在于所述的2型糖尿病慢性并发症,具体指2型糖尿病并发大血管病变、微血管病变、神经病变、糖尿病足、黄斑病、白内障、青光眼、屈光改变、虹膜睫状体病变中的一种或几种。

20 本发明还提供一种具有2型糖尿病治疗作用的药物,其特征在于该药物是由上述药物组合物与药用辅料组成。

本发明提供的上述药物为口服剂型,具体为片剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、颗粒剂、散剂、丸剂、滴丸剂、糖浆剂、口服溶液剂、口服混悬剂。

25 本发明提供的组合物大鼠有效剂量范围为20-350mg/日,按照不同种类动物间剂量换算公式折到人体为200-3500mg/日/人。给药途径为口服,每日3-4次。因动物与人体之间的差异,故允许实际临床应用剂量有所调整。

下面给出具体实施方式对本发明作进一步说明,但不限于此。

具体实施方式:

本发明所采用的小檗碱、盐酸小檗碱、硫酸小檗碱、鞣酸小檗碱、芒果苷皆可以通过购买市售品获得（价格在每公斤 1000 元人民币左右），亦可自行按照常规提取分离等方法获得。

制备例 1 小檗碱的制备

- 5 取盐酸小檗碱（纯度大于 98%）用热水溶解，向溶液中氨水调 pH10-12,静置过夜，析出沉淀，过滤，干燥，即得小檗碱,高效液相(HPLC)测定含量 98.5%。

制备例 2 芒果苷的制备

- 知母饮片加 75%乙醇回流提取两次，每次 1 小时，减压回收乙醇，大孔树脂吸附，水洗后，用 20%乙醇洗脱，洗脱液减压浓缩得粗品新芒果苷；再用 40%
10 乙醇洗脱，洗脱液减压浓缩得粗芒果苷。粗品新芒果苷和粗品芒果苷经重结晶精制获得新芒果苷和芒果苷纯品，纯度经 HPLC 测定大于 95%。

制备例 3 芒果苷片剂的制备

- 称取芒果苷 100g，过 80 目筛，加入微晶纤维素 100g、淀粉 100g 作为稀释剂组成制剂配方，混匀，加入粘合剂制软材，用 24 目筛制粒，干燥后整粒，加
15 入适量润滑剂，压片，制成 1000 片，包薄膜衣，即得，含药量为 100mg/片。

制备例 4 芒果苷小檗碱片剂的制备

称取芒果苷 90.9g，小檗碱 9.1g，混匀，过 80 目筛，加入羧甲基纤维素 80g、预胶化淀粉 120g 作为稀释剂组成制剂配方，混匀，加入粘合剂制软材，用 24 目筛制粒，干燥后整粒，加入适量润滑剂，压片，制成 1000 片，包薄膜衣，即得。

20 制备例 5 芒果苷小檗碱片剂的制备

称取芒果苷 50g，小檗碱 50g，混匀，过 80 目筛，加入微晶纤维素 60g、预胶化淀粉 140g 作为稀释剂组成制剂配方，混匀，加入粘合剂制软材，用 24 目筛制粒，干燥后整粒，加入适量润滑剂，压片，制成 1000 片，包薄膜衣，即得。

制备例 6 芒果苷小檗碱片剂的制备

- 25 称取芒果苷 25g，小檗碱 75g，混匀，过 80 目筛，加入微晶纤维素 40g、预

胶化淀粉 160g 作为稀释剂组成制剂配方,混匀,加入粘合剂制软材,用 24 目筛制粒,干燥后整粒,加入适量润滑剂,压片,制成 1000 片,包薄膜衣,即得。

制备例 7 芒果苷小檗碱片剂的制备

称取芒果苷 14g,小檗碱 86g,混匀,过 80 目筛,加入微晶纤维素 60g、预
5 胶化淀粉 140g 作为稀释剂组成制剂配方,混匀,加入粘合剂制软材,用 24 目筛制粒,干燥后整粒,加入适量润滑剂,压片,制成 1000 片,包薄膜衣,即得。

制备例 8 芒果苷小檗碱片剂的制备

称取芒果苷 9g,小檗碱 91g,混匀,过 80 目筛,加入微晶纤维素 30g、淀粉 170g 作为稀释剂组成制剂配方,混匀,加入粘合剂制软材,用 24 目筛制粒,
10 干燥后整粒,加入适量润滑剂,压片,制成 1000 片,包薄膜衣,即得。

制备例 9 芒果苷小檗碱片剂的制备

称取芒果苷 4.8g,小檗碱 95.2g,过 80 目筛,加入微晶纤维素 40g、预胶化淀粉 160g 作为稀释剂组成制剂配方,混匀,加入粘合剂制软材,用 24 目筛制粒,干燥后整粒,加入适量润滑剂,压片,制成 1000 片,包薄膜衣,即得。

15 制备例 10 小檗碱片剂的制备

称取小檗碱 100g,过 80 目筛,加入适量淀粉作为稀释剂组成制剂配方,混匀,加入粘合剂制软材,用 24 目筛制粒,干燥后整粒,加入适量润滑剂,压片,包衣,即得,含药量为 100mg/片。

制备例 11 芒果苷盐酸小檗碱片剂的制备

20 称取芒果苷 25g,盐酸小檗碱 75g,混匀,过 80 目筛,加入适量甲基纤维素 20g、预胶化淀粉 180g 作为稀释剂组成制剂配方,混匀,加入粘合剂制软材,用 24 目筛制粒,干燥后整粒,加入适量润滑剂,压片,制成 1000 片,包薄膜衣,即得。

制备例 12 芒果苷鞣酸小檗碱颗粒剂的制备

25 称取芒果苷 28g,鞣酸小檗碱 172g,混匀,过 80 目筛,加入矫味剂蔗糖 600g、

羧甲基纤维素 200g 组成制剂配方，混匀，加入粘合剂制软材，用 24 目筛制粒，干燥后整粒，制得 1000g，包装，即得。

制备例 13 芒果苷盐酸小檗碱胶囊的制备

称取芒果苷 14.3g，盐酸小檗碱 85.7g，混匀，混匀过 80 目筛，加入适量微晶纤维素 20g、预胶化淀粉 80g 作为稀释剂组成制剂配方，混匀，加入粘合剂制软材，用 24 目筛制粒，干燥后整粒，装胶囊，制成 1000 粒，即得。

制备例 14 芒果苷小檗碱滴丸的制备

称取芒果苷、小檗碱适量，按 1: 4 混合均匀，将 400g 聚乙二醇 4000，置水浴中加热熔融后加入芒果苷小檗碱组合物 100g，75℃保温下搅拌使分散均匀，药液转移至滴丸机 75℃恒温储料罐中，在滴头口径为 3.0/4.0mm，滴速 60 滴/分钟，冷却剂为二甲基硅油，冷却液温度 20℃±2℃条件下，调节丸重为 40mg，滴制成丸，除去滴丸表面上的冷却液，分装，即得。

实验例 1：芒果苷与小檗碱组合物溶出度试验

分别取制备例 3、6、10 样品各 6 片，分别标记为 MAG、MB、BER，置于转篮中，于 900ml pH6.8 的磷酸缓冲溶液中，按中国药典二部附录溶出度项下，采用转篮法，转速 100r/min。于 5、10、20、30、60、120、240、360、480min 取样，每次 2ml，并立即补充同温介质 2ml，取出液以 0.45μm 滤膜过滤后，分别测芒果苷和小檗碱浓度，计算平均溶出率。结果见表 1。

表 1 芒果苷与小檗碱组合物溶出度试验结果

样品	溶出成分	不同时间平均溶出率%(n=6)								
		5	10	20	30	60	120	240	360	480
MAG	芒果苷	8.62	11.69	16.62	21.69	26.13	30.73	36.24	38.55	41.14
MB	芒果苷	21.99	37.03	48.54	73.61	84.67	90.14	92.28	95.46	96.58
	小檗碱	30.26	42.77	55.61	72.88	86.37	90.87	93.03	96.43	97.24
BER	小檗碱	31.18	43.93	56.11	74.62	87.71	91.16	94.64	96.36	97.37

结论：芒果苷小檗碱组合物中芒果苷溶出率较单体制剂有显著提高。

试验例 2 芒果苷小檗碱组合物与芒果苷、小檗碱口服生物利用度比较。

1. 药液配制

- 5 称取芒果苷适量，加 1%羧甲基纤维素钠溶液混悬，制成 25mg/mL 混悬液，为样 A；称取盐酸小檗碱适量，加 1%羧甲基纤维素钠溶液，配成浓度为 25mg/mL 混悬液，为样 B；称取芒果苷、盐酸小檗碱适量，按 1：4 混合，加 1%羧甲基纤维素钠溶液，配成浓度为 50mg/mL 混悬液，为样 C。

2. 灌胃给药方案

- 10 大鼠禁食 16h，自由饮水，分别灌胃给药，样 A 剂量为 40 mg/kg、样 B 剂量为 160 mg/kg、样 C 剂量为 200mg/kg。分别于给药前 5min 和给药后 0、1、2、3、4、5、6、8、10、12、15、24h 取血 0.4ml，立即加入含肝素的离心管中，3000r.min⁻¹ 离心 10min，得血清。

3. 样品处理

- 15 血浆样品的处理：精密吸取血清样品 100μL，精密加入乙腈—乙酸（9：1）400μL，涡旋 1.5min，3000r/min 离心 10min，吸取上清液至干净的试管内，氮气吹干，残留物加入 100μL 流动相，涡旋 1.5min，3000r/min 离心 10min，吸取上清液，尖底进样瓶中，HPLC 进样 20μL。

4 样品的测定

- 20 4.1 仪 器

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司):包括 G1312A 二元泵,G1313A

自动进样器。

4.2 血浆样品测定的色谱条件色谱柱: discover ODS 柱(250mm×6mm, 5μm); 流动相、甲醇 -0.1%H₃PO₄ 水溶液梯度洗脱; 流速 1.0ml/min 检测波长: 264nm, 柱温:40℃。

5 4.3 结果

表 2 芒果苷、盐酸小檗碱与其组合物的生物利用度比较

参数	芒果苷	盐酸小檗碱	芒果苷盐酸小檗碱组合物
C _{max} (μg/ml)	18.6±1.5	54.1±2.6	芒果苷
			34.2±2.6
			小檗碱
			87.4±3.1
T _{1/2β} (hr)	4.3±0.4	3.5±0.3	芒果苷
			6.2±0.5
			小檗碱
			4.4±0.4
AUC _{0-∞} /μg.h/ml	1198.6±390.7	3439.5±249.8	芒果苷
			2158.5±215.6
			小檗碱
			4641.5±380.4

上述结果显示:口服芒果苷盐酸小檗碱组合物较各自单独服用生物利用度有显著提高,组合物组中芒果苷和小檗碱的血药浓度(C_{max})和 AUC 值远高于二者单独服用的 C_{max} 和 AUC 值,表明芒果苷小檗碱组合物具有互相促进吸收的作用。

下面实验例中以肾组织与眼晶状体作为 2 型糖尿病慢性并发症的代表器官。

因 GK (Goto-Kakizaki) 大鼠是一种自发性的糖尿病模型,其发病机理又与临床 II 型糖尿病的发病机理极为相似,在糖尿病症发作后,快速出现高血糖、胰岛素分泌减弱等,后期并发视网膜病、微血管病、神经病、肾病。因此被广泛应用于 2 型糖尿病研究,故以下实验以 GK 大鼠为糖尿病模型。

实验例 3 不同剂量芒果苷、小檗碱、组合物对 2 型糖尿病大鼠的影响

1 材料

1.1 药物:

按制备例 1、2 制备芒果苷与小檗碱,然后按照给药剂量与配比混合或稀释即可。

1.2 试剂:

还原型辅酶 II (NADPH)、还原型辅酶 I (NADH): 分析纯, Sigma 公司产品; DL-甘油醛: 分析纯, 意大利 Roth 公司产品。

1.3 动物:

- 5 正常 SPF 级 Wistar 大鼠及 4 月龄 GK 大鼠, 雌雄各半, 均购自上海斯莱克实验动物有限公司。

除正常对照外, 其余大鼠喂饲高脂饲料(饲料中蛋白含量为 20%, 胆固醇含量为 3.5%)。

2 实验分组

- 10 将大鼠适应性饲养 1 周后, 随机选取血糖值在 11.1mmol/L 以上的 GK 大鼠, 分为模型组及芒果苷小剂量组(10mg/kg)、芒果苷中剂量组(30mg/kg)、芒果苷大剂量组(200mg/kg); 小檗碱小剂量组(10mg/kg)、小檗碱中剂量组(20mg/kg)、小檗碱大剂量组(150mg/kg); 组合物小剂量组[芒果苷(10mg/kg) + 小檗碱(10mg/kg)]、组合物大剂量组[芒果苷(200mg/kg) + 小檗碱(150mg/kg)]。Wistar 大鼠做为正常对照组。每组大鼠 10 只。每日固定时间以灌胃给药的方式进行。对照组给予等量的生理盐水。共给药 12 周。

3 观察指标

3.1 血糖与血脂: 试验结束时收集血标本, 血糖、血脂(甘油三酯、胆固醇)采用 HITACHI7080 自动生化分析仪检测。

- 20 3.2 醛糖还原酶(AR)活性: 试验结束时取左侧晶体加甘油置-80℃冰箱保存, 供测定 AR 活性用。晶体 AR 活性测定参照 Maragoudakis 等的方法, 略作变动: 即记录 NADPH 在 340nm 处吸光值下降 10U 来表示酶活性。本研究使用两种反应体系, 第一种反应体系包括 67mmol/L、pH6.2 的 Na^+ - K^+ 磷酸缓冲液, 10mmol/L 的 DL-甘油醛、5mmol/L 的 2-巯基乙醇、0.1mmol/L 的 NADPH 和酶适量; 实验杯包括全部试剂, 对照杯以双蒸水代替底物 DL-甘油醛。第二种反应体系以 0.1mmol/L 的 NADH 代替 NADPH, 其余试剂同第一种反应体系。测
- 25

定组织匀浆酶活性，同时测定蛋白含量，一单位酶活性规定为 1min 产生 $1\mu\text{molNADP}^+$ （或 NDA^+ ）的酶量，各组织酶活性用比活性进行比较，比活性 = 酶单位/mg 蛋白。

3.3 氧化指标：

- 5 3.3.1 组织匀浆制备：大鼠给药 12 周后，股动脉放血处死，取肾组织，用 4°C 预冷生理盐水洗净血液，滤纸吸干水分后称重，每克肾组织加 10ml 生理盐水，置匀浆机上 10000 转 / 分，10 秒，3 次，制备 10% 匀浆，4000 转/分离心 10 分钟，取上清液， -20°C 保存待测。

3.3.2 生化指标测定：

- 10 1) 超氧化物歧化酶 (SOD)：黄嘌呤氧化酶法测定，试剂盒购自南京建成生物工程研究所；
- 2) 丙二醛 (MDA)：硫代巴比妥酸法测定，试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

- 15 3.4 统计学分析：计量资料值以均数标准差 ($\bar{x}\pm\text{SD}$) 表示。两组间比较采用 t 检验。

4 结果

10mg/kg 芒果苷与 10mg/kg 小檗碱组未能改善 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂、AR、MDA、SOD；30mg/kg 芒果苷与 20mg/kg 小檗碱组均在一定程度上改善 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂、AR、MDA、SOD。

- 20 组合物小剂量组 [芒果苷 (10mg/kg) + 小檗碱 (10mg/kg)] 非常显著地改善 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂、AR、MDA、SOD，与模型组比较 $p<0.01$ ，而且与 30mg/kg 芒果苷与 20mg/kg 小檗碱组比较亦有显著性差异 ($P<0.05$)。提示组合物中芒果苷和小檗碱具有协同作用。

- 25 组合物大剂量组 [芒果苷 (200mg/kg) + 小檗碱 (150mg/kg)] 极其显著地改善 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂、AR、MDA、SOD，与模型组比较 $P<0.001$ 。详见表 4。

5 结论

综上所述, 芒果苷与小檗碱组合物较芒果苷、小檗碱各单体具有更强的降糖活性, 且通过其具有的降脂、改善肾氧化指标与晶状体的 AR 活性, 表明其具有防治糖尿病慢性并发症的作用。

实验例 4 不同配比组合物对 2 型糖尿病大鼠的影响

5 1 药物与动物

1.1 药物: 按制备例 1、2 制备芒果苷与小檗碱, 然后按照表 3 所列给药剂量与配比混合即可。

1.2 动物: 正常 SPF 级 Wistar 大鼠及 GK 大鼠, 均购自上海斯莱克实验动物有限公司。

10 除正常对照外, 其余大鼠喂饲高脂饲料(饲料中蛋白含量为 20%, 胆固醇含量为 3.5%)。

2 实验分组

将大鼠适应性饲养 1 周后, 随机选取血糖值在 11.1mmol/L 以上的 GK 大鼠, 分为模型组及组合物各组(如表 3 所示)。Wistar 大鼠做为正常对照组。每组大鼠 15 鼠 10 只。每日固定时间以灌胃给药的方式进行。对照组给予等量的生理盐水。共给药 12 周。

表 3 组合物配比情况表

	芒果苷 (mg/kg)	小檗碱 (mg/kg)	芒果苷:小檗碱
组合物 A	20	0	
组合物 B	18.2	1.8	1:0.1
组合物 C	10	10	1:1
组合物 D	5	15	1:3
组合物 E	2.8	17.2	1:6
组合物 F	1.8	18.2	1:10
组合物 G	0.95	19.05	1:20
组合物 H	0	20	

3 观察指标

同实验例 1。

4 结果

结果如表 5 所示，不同配比的药物组合物对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂、

5 AR、SOD、MDA 均有显著的改善作用。

表 4 各试验药物对 2 型糖尿病大鼠的影响

实验分组	血糖 (mmol/L)	血脂		晶体 AR 活性		抗氧化指标	
		甘油三酯 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)	NADPH (0.1mmol/L)	NADH (0.1mmol/L)	SOD (U/mg pro)	MDA (nmol/mg pro)
空白组	6.45±0.37 ^{**}	1.40±0.15 ^{**}	1.25±0.13 ^{**}	0.56±0.35 ^{**}	0.30±0.15 ^{**}	210.43±30.32 ^{**}	2.59±0.58 ^{**}
模型组	20.63±3.24	3.51±0.37	4.50±1.36	5.40±2.15	2.90±0.75	132.56±23.50	4.37±0.92
芒果苷小剂量组	20.75±3.39	3.62±0.41	4.48±1.53	5.36±2.17	2.89±0.69	130.74±23.47	4.41±0.87
芒果苷中剂量组	13.05±2.23 [*]	2.82±0.22 [*]	3.16±0.32 [*]	3.05±0.59 [*]	1.64±0.42 [*]	168.23±13.46 [*]	3.48±0.47 [*]
芒果苷大剂量组	9.05±2.04 ^{**}	1.82±0.32 [*]	3.06±0.29 [*]	1.87±0.51 ^{**}	0.94±0.45 ^{**}	194.15±13.55 ^{**}	2.75±0.48 ^{**}
小檗碱小剂量组	21.24±3.13	3.49±0.68	4.53±1.28	5.64±2.19	2.98±0.60	131.56±23.49	4.39±0.90
小檗碱中剂量组	12.29±2.76 [*]	2.79±0.24 [*]	3.27±0.24 [*]	2.28±0.51 [*]	1.32±0.37 [*]	170.04±13.49 [*]	3.51±0.46 [*]
小檗碱大剂量组	9.11±2.08 ^{**}	1.80±0.19 [*]	3.01±0.28 [*]	1.87±0.51 ^{**}	0.94±0.45 ^{**}	195.10±13.71 ^{**}	2.76±0.40 ^{**}
组合物低剂量组	8.35±2.09 ^{**v#}	1.87±0.56 ^{**v#}	2.96±0.46 ^{**v#}	1.74±0.47 ^{**v#}	0.91±0.15 ^{**v#}	200.51±33.25 ^{**v#}	2.03±0.41 ^{**v#}
组合物高剂量组	6.11±2.02 ^{***}	1.51±0.20 ^{***}	1.37±0.29 ^{***}	1.60±0.55 ^{***}	0.65±0.11 ^{***}	218.51±33.15 ^{***}	2.57±0.33 ^{***}

注：与模型组比较：^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001；与芒果苷中剂量组比较：^vp<0.05, ^{vv}p<0.01；与小檗碱中剂量组比较：[#]p<0.05, ^{##}p<0.01。

表 5 不同配比组合物对 2 型糖尿病大鼠的影响

实验分组	血脂				晶体 AR 活性			抗氧化指标	
	血糖 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)	NADPH (0.1mmol/L)	NADH (0.1mmol/L)	SOD (U/mg pro)	MDA (nmol/mg pro)		
空白组	6.23±0.29 ^{**}	1.39±0.15 ^{**}	1.15±0.16 ^{**}	0.65±0.41 ^{**}	0.29±0.15 ^{**}	220.56±30.33 ^{**}	2.56±0.54 ^{**}		
模型组	21.45±3.25	3.56±0.38	4.62±1.36	5.68±2.23	2.99±0.65	135.57±23.06	4.33±0.90		
组合物 A	14.11±2.03 [*]	2.79±0.30 [*]	3.26±0.26 [*]	3.11±0.56 ^{**}	1.97±0.46 ^{**}	168.26±13.50 ^{**}	3.43±0.89 [*]		
组合物 B	10.25±2.31 ^{***v}	1.91±0.02 ^{***v}	3.17±0.22 ^{***v}	2.81±0.61 ^{***v}	1.64±0.45 ^{***v}	178.23±13.63 ^{***v}	2.97±0.40 ^{***v}		
组合物 C	9.27±2.06 ^{***vv}	1.92±0.24 ^{***v}	3.07±0.28 ^{***v}	1.79±0.59 ^{***v}	0.99±0.41 ^{***v}	195.17±13.47 ^{***v}	2.87±0.46 ^{***v}		
组合物 D	6.47±2.08 ^{***vv}	1.67±0.55 ^{***v}	2.68±0.38 ^{***v}	1.44±0.49 ^{***v}	0.71±0.14 ^{***v}	208.14±33.05 ^{***vv}	2.61±0.45 ^{***v}		
组合物 E	6.30±2.09 ^{***vv}	1.48±0.21 ^{***v}	1.48±0.28 ^{***v}	1.58±0.56 ^{***v}	0.58±0.21 ^{***v}	218.59±32.16 ^{***vv}	2.67±0.44 ^{***v}		
组合物 F	9.29±2.09 ^{***vv}	1.79±0.21 ^{***v}	3.19±0.28 ^{***v}	1.99±0.54 ^{***v}	0.97±0.66 ^{***v}	195.67±13.70 ^{***v}	2.89±0.42 ^{***v}		
组合物 G	10.95±3.23 ^{***v}	1.90±0.34 ^{***v}	3.24±0.56 ^{***v}	2.28±0.51 ^{***v}	0.68±0.42 ^{***v}	179.14±13.47 ^{***v}	2.92±0.41 ^{***v}		
组合物 H	12.34±2.09 [*]	2.91±0.09 [*]	3.33±0.26 [*]	2.48±0.58 ^{**}	1.39±0.53 [*]	171.10±13.81 [*]	3.52±0.77 [*]		

注：与模型组比较：^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001; ^v组合物 A 组比较：^vp<0.05, ^{vv}p<0.01; 与组合物 H 组比较：[#]p<0.05, ^{##}p<0.01。

权 利 要 求

- 1、一种用于制备 2 型糖尿病治疗药物的药物组合物，其特征在于：该组合物作为药效组分的原料是由芒果苷与小檗碱组成，芒果苷和小檗碱以重量比为 1:0.1-1:20 组成。
- 5 2、权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于芒果苷和小檗碱以重量比为 1:1-1:10 组成。
- 3、权利要求 2 所述的药物组合物，其特征在于芒果苷和小檗碱以重量比为 1:3-1:6 组成。
- 4、权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于所述小檗碱也可以是盐酸小檗碱、
10 硫酸小檗碱、鞣酸小檗碱或小檗碱其他医学上可接受的盐。
- 5、权利要求 1 所述的药物组合物在制备 2 型糖尿病治疗药物中的应用。
- 6、权利要求 5 所述药物组合物在制备 2 型糖尿病治疗药物中的应用，其特征在于，所述 2 型糖尿病治疗药物为降糖药物。
- 7、权利要求 5 所述药物组合物在制备 2 型糖尿病治疗药物中的应用，其特征在
15 于，所述 2 型糖尿病治疗药物为 2 型糖尿病慢性并发症防治药物。
- 8、权利要求 7 所述药物组合物在制备 2 型糖尿病治疗药物中的应用，其特征在于所述的 2 型糖尿病慢性并发症，具体指 2 型糖尿病并发大血管病变、微血管病变、神经病变、糖尿病足、黄斑病、白内障、青光眼、屈光改变、虹膜睫状体病变中的一种或几种。
- 20 9、一种具有 2 型糖尿病治疗作用的药物，其特征在于该药物是由权利要求 1 所述的药物组合物与药用辅料组成。
- 10、 权利要求 9 所述的药物为口服剂型，具体为片剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、颗粒剂、散剂、丸剂、滴丸剂、糖浆剂、口服溶液剂、口服混悬剂。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/002684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI,EPODOC,PAJ,CPRS, CNKI; CA, EMBASE;Chinese Medicine Abstract; chimonin; mangiferin; Mangifera indica; mango; berberine; berberinum; tmbellatine; diabetes; mellitus; urophthisis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAI, Ronghua et al., Measurement for chimonin and berberine in Pill for Nourishing Kidney-Yin by reversed-phase HPLC, Sep.2002 (09.2002) Journal of Shenyang Pharmaceutical University Vol.19, No.5, pages 332-334; ISSN: 1006-2858	1-10
A	YANG, Huaijin, et al., Research for active components in Traditional Chinese Medicine for Diabetes, Feb.2005 (02.2005) Chinese Journal of Information on TCM, vol.12 No.2, pages 92-93, ISSN: 1005-5304	1-10
PX	CN1903236A (ZHU, Haiyun, et al.) 31 Jan.2007(31.01.2007), claims 1-4, 10	1-10
E	CN101066275A (Guang Xi, Traditional Chinese Medical College) 7 Nov.2007 (07.11.2007), Abstract, claims	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
4 Dec.2007(04.12.2007)

Date of mailing of the international search report
13 Dec. 2007 (13.12.2007)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

LI, Gang

Telephone No. (86-10)62085256

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2007/002684

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1903236A	31.01.2007	None	
CN101066275A	07.11.2007	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/002684

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

A61K31/7048 (2006.01) i

A61K31/4375 (2006.01) i

A61P3/10 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2007/002684

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPI,EPODOC,PAJ,CPRS, 中国药学文摘库; CNKI; CA, EMBASE; 芒果苷, 芒果甙, 芒果素, 芒果甙, 知母宁; 小檗碱, 黄连素; 糖尿病; chimonin; mangiferin; Mangifera indica; mango; berberine; berberinum; tmbellatine; diabetes; mellitus; urophthisis

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	戴荣华等, 反相高效液相色谱法测定滋肾丸中芒果苷、盐酸小檗碱含量 9 月 2002(09.2002) 沈阳药科大学学报第 19 卷第 5 期, 332-334 页, ISSN:1006-2858	1-10
A	杨怀瑾等, 抗糖尿病中药活性成分研究进展 2 月 2005(02.2005) 中国中医药信息杂志第 12 卷第 2 期 92-93 页, ISSN: 1005-5304	1-10
PX	CN1903236A (朱海芸等) 31.1 月 2007(31.01.2007), 权利要求 1-4, 10	1-10
E	CN101066275A (广西中医学院) 7.11 月 2007(07.11.2007), 摘要, 权利要求书	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
04.12 月 2007 (04.12.2007)

国际检索报告邮寄日期
13.12 月 2007 (13.12.2007)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员

李钢

电话号码: (86-10) **62085256**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2007/002684

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1903236A	31.01.2007	无	
CN101066275A	07.11.2007	无	

主题的分类:

A61K31/7048 (2006.01) i

A61K31/4375 (2006.01) i

A61P3/10 (2006.01) i