

(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
2013 年 9 月 26 日 (26.09.2013)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2013/139111 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 36/185 (2006.01) A61K 133/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/080972
- (22) 国际申请日: 2012 年 9 月 4 日 (04.09.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210082553.7 2012 年 3 月 21 日 (21.03.2012) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 江苏苏中药业集团股份有限公司 (JIANGSU SUZHONG PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省姜堰市苏中路 1 号, Jiangsu 225500 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 唐仁茂 (TANG, Ren-mao) [CN/CN]; 中国江苏省姜堰市苏中路 1 号, Jiangsu 225500 (CN)。
- (74) 代理人: 北京汇智胜知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING IPWIN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY); 中国北京市西城区西直门外大街 135 号北展宾馆写字楼 5208, Beijing 100044 (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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(条约第 21 条(3))。

(54) Title: TOTAL FLAVONE EXTRACT OF ABELMOSCHUS MANIHOT AND PREPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 黄蜀葵花总黄酮提取物及其制备方法

(57) Abstract: Disclosed are a total flavone extract of Abelmoschus Manihot and the preparation method thereof. The weight ratio of Gossypetin-3'-glucoside : Quercetin-3'-glucoside : Isoquercetin is (11-16) : (2.5-6) : (4-6.5) in the extract.

(57) 摘要: 一种黄蜀葵花总黄酮提取物及其制备方法, 所述提取物中棉皮素-3'-葡萄糖苷: 槲皮素-3'-葡萄糖苷: 异槲皮苷的重量比为 (11-16) : (2.5-6) : (4-6.5)。

WO 2013/139111 A1

黄蜀葵花总黄酮提取物及其制备方法

本申请要求于 2012 年 03 月 21 日提交中国专利局，申请号为 201210082553.7，发明名称为“黄蜀葵花总黄酮提取物及其制备方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

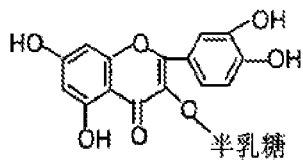
本发明技术属于中药制药领域，具体涉及一种黄蜀葵花提取物、制剂及其制备方法，该黄蜀葵花提取物可用于药品、保健品和食品。

背景技术

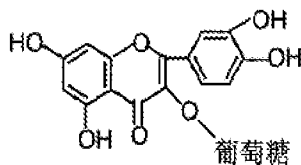
黄蜀葵花为锦葵科秋葵属植物黄蜀葵 *Abelmoschus Manihot* (L.) Medic 的干燥花，黄蜀葵花最早记载于《嘉佑本草》，分布广泛、资源丰富，《本草纲目》记载：其花气味甘、寒、滑、无毒，主治小便淋及催生，治诸恶疮脓水久不瘥者，作末敷之即愈，为疮家要药，消疽肿，浸油涂汤火伤等。现代医学中，黄蜀葵花的主要有效成分是黄酮类成分，目前对化学成分的研究也集中于黄蜀葵花总黄酮(Total flavone of A, TFA)及其单体。自 20 世纪 80 年代至今已有七个黄酮类单体分离鉴定。研究证明具有降低蛋白尿，减轻红细胞尿，减轻肾小管间质病变，消除氧自由基，提高红细胞免疫粘附力，促进人循环免疫复合物(CIC)的转运与清除，调节细胞免疫功能，抑制体液免疫反应程度，从而减轻人循环免疫复合物(CIC)介导性肾损伤，改善肾功能，达到治疗慢性肾炎(CKD)的目的。

药理研究表明，黄蜀葵花中黄酮类化合物是其主要生物活性成分。进

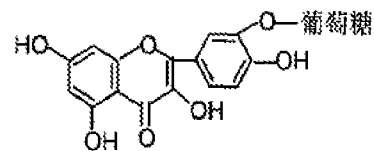
一步的化学研究表明，黄蜀葵花黄酮类化合物(或称为总黄酮)中以金丝桃苷，异槲皮苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷、棉皮素-3'-葡萄糖苷、杨梅素-3-葡萄糖苷、槲皮素-3-洋槐糖苷、棉皮素、杨梅素、槲皮素九种成分含量较多，该九种化合物有以下化学式：



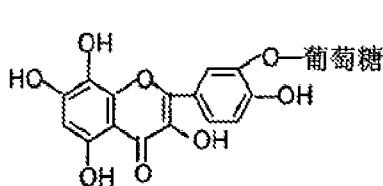
金丝桃苷



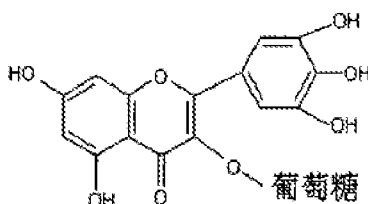
异槲皮苷



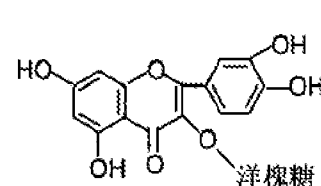
槲皮素-3'-葡萄糖苷



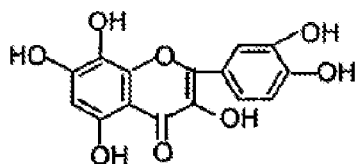
棉皮素-3'-葡萄糖苷



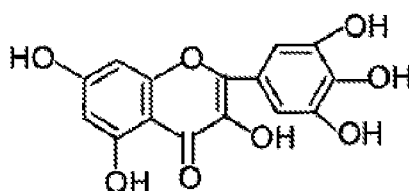
杨梅素-3-葡萄糖苷



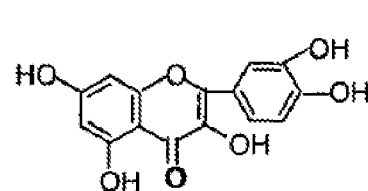
槲皮素-3-洋槐糖苷



棉皮素



杨梅素



槲皮素。

目前黄蜀葵花总黄酮提取物的制备方法归纳为三种：

1、先用水或醇提取，将回收溶剂后得到的提取物混悬于水中，分别用氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取，分成几个提取部分，再用硅胶柱或葡聚糖凝胶柱层析、分离成单组物质。

2、用乙醇提取，合并提取液，滤过，滤液浓缩，浓缩液加适量水稀释，

通过大孔树脂柱或通过聚酰胺柱，用醇水溶液梯度洗脱，洗脱液浓缩，干燥，粉碎后得总黄酮提取物，如申请号 200410035741.X 发明专利文件中所述的黄蜀葵花总黄酮提取物的制备方法。

3、用乙醇提取，合并提取液，提取液减压浓缩至 60℃ 时比重为 1.13-1.16 的浸膏，加入沸水分次溶解，静置，过滤，滤液通过大孔吸附树脂柱或聚酰胺柱层析，用甲醇洗脱，收集洗脱液；洗脱液减压浓缩，真空干燥得黄蜀葵花总黄酮提取物粗品；总黄酮提取物粗品精制，用醋酸乙酯-乙醇提取，回收溶剂，减压干燥或真空干燥得到黄蜀葵花总黄酮提取物，如申请号 200610097615.6 发明专利文件中所述的黄蜀葵花总黄酮提取物的制备方法。

不同方法提取得到的提取物中所含黄酮类化合物的种类及其含量均不相同，或者说组成及其重量比例不同的总黄酮，导致其药理活性、药性的差异也很大，这就意味着每一种提取方法得到的都是一种新的物质(组合物)。尽管目前认为黄酮类化合物是活性成分，但是现有技术仍未确定这些黄酮类化合物中哪些化合物为主要活性成分，本发明通过大量的实验基本确定了主要的黄酮化合物。本发明进一步优化主要活性成分之间的重量比例，目前的黄蜀葵花总黄酮提取物中黄酮化合物的含量棉皮素-3'-葡萄糖苷 < 槲皮素-3'-葡萄糖苷 ≤ 异槲皮苷，且棉皮素-3'-葡萄糖苷的含量通常为异槲皮苷或者槲皮素-3'-葡萄糖苷的一半，本发明的黄蜀葵花总黄酮提取物棉皮素-3'-葡萄糖苷的含量基本为异槲皮苷或者槲皮素-3'-葡萄糖苷的 2 倍以上，同时本发明的提取物在治疗肾炎疾病中也获得了更好的效果。

鉴于上述情况，急需一种有效成分明确、疗效更好更稳定并且安全可靠

靠、工艺合理可行、质量稳定的黄蜀葵花总黄酮提取物及其制备方法，适合企业大生产要求，更解决了黄蜀葵花制剂服用剂量大的问题，方便患者、造福患者。

发明内容

本发明的目的在于：提供一种有效成分明确、质量更加稳定，有效成分更完全，疗效更好更稳定并且安全可靠，制备工艺简单、成本低廉，适合工业化大生产的黄蜀葵花总黄酮提取物、制剂及其制备方法。通过本发明所述的黄蜀葵花总黄酮制备方法，解决了黄蜀葵花总黄酮提取物的有效成分含量、质量低的问题，特别是本发明制备方法适合工业化大生产，操作简便、易于控制，产业化生产中运用本发明制备方法，黄蜀葵花提取物的有效成分比例更优、含量高、质量高，解决了黄蜀葵花服用剂量大的问题。

为实现本发明，本发明提供如下技术方案。

一种黄蜀葵花的总黄酮提取物，含有棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷和异槲皮苷，其重量比例为棉皮素-3'-葡萄糖苷：槲皮素-3'-葡萄糖苷：异槲皮苷=（11-16）：（2.5-6）：（4-6.5）。

优选地，棉皮素-3'-葡萄糖苷：槲皮素-3'-葡萄糖苷：异槲皮苷的重量比例可以为（12-15）：（3-5）：（4-6）或（13-14）：（4-5）：（4-5）或（11-16）：（4-5）：（4-5）或（12-15）：（2.5-6）：（4-6.5）或（12-15）：（4-5）：（4-6.5）。

优选地，以提取物总重量为基准，按重量百分比，上述提取物中总黄酮含量大于 50%。

优选地，上述提取物还含有槲皮素、槲皮素-3-洋槐糖苷；上述提取物

还含有金丝桃苷、棉皮素；上述提取物还含有杨梅素、杨梅素-3-葡萄糖苷。

本发明还提供一种药物组合物，所述药物组合物含有上述黄蜀葵花的总黄酮提取物和药用可接受载体。

所述药用可接受载体，包括或可以是用于固体制剂的各种赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、稳定剂、发泡剂、包衣剂等，或用于半固体制剂、液体制剂的溶剂、增溶剂、悬浮剂、等渗剂、缓冲剂、润肤剂、乳化剂等，此外，也可以根据需要使用其它药用添加剂诸如防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂和调味剂等。

具体的，上述药用可接受载体辅料的例子包括但不限于淀粉、糊精、乳糖、微晶纤维素、羟丙甲基纤维素、聚乙二醇、硬脂酸镁、滑石粉、硫酸钙、微粉硅胶、木糖醇、乳糖醇、葡萄糖、甘氨酸、甘露醇、羟丙基- β -环糊精等的一种或一种以上。

优选地，上述的药物组合物为胶囊剂、片剂、注射剂、溶液剂、糖浆剂、颗粒剂、丸剂、粉剂、膏剂、贴剂、软胶囊、硬胶囊、或滴丸。

本发明的技术方案还包括上述黄蜀葵花的总黄酮提取物在制备治疗肾炎疾病的药物中的用途。

本发明的技术方案还包括上述药物组合物在制备治疗肾炎疾病的药物中的用途。

本发明的技术方案还包括上述黄蜀葵花的总黄酮提取物在制备食品、饮料及保健品中的应用。黄蜀葵花的总黄酮提取物，通过添加普通添加剂作为组成成分，可以制成液体的、固体的、粉末状等各种形态的食品、饮料及保健品。

上述黄蜀葵花的总黄酮提取物可以下述方法制备：

1、将黄蜀葵花用 6-18 倍量（即液固比为 6-18ml/g）的 40%-95%乙醇溶液提取 1-3 次，每次 1-4 小时，醇提液回收乙醇后浓缩至相对密度在 1.10-1.35 之间，得浓缩液，根据浓缩液中棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷和异槲皮苷的含量，通过向上述浓缩液加入棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷或异槲皮苷的单体化合物来调整三者的重量比例至（11-16）：（2.5-6）：（4-6.5）得到本发明的黄蜀葵花的总黄酮提取物。

其中棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷或异槲皮苷的单体化合物的制备可依据现有技术制备，如“黄蜀葵花黄酮成分的研究”，王先荣，周正华等，中国天然药物，第 2 卷第 2 期，第 91-93 页，2004 年 3 月中记载的“提取分离”方法部分。

该方法中的醇提工艺优选为加入 12 倍量的 60%乙醇，提取 2 次，每次 2 小时，浓缩液相对密度为 1.15；或加入 10 倍量的 80%乙醇，提取 2 次，每次 1.5 小时，浓缩液相对密度为 1.20；或加入 8 倍量的 90%乙醇，提取 2 次，每次 1 小时，浓缩液相对密度为 1.18。

2、将黄蜀葵花用 6-18 倍量（即液固比为 6-18ml/g）的 40%-95%乙醇溶液提取 1-3 次，每次 1-4 小时，醇提液回收乙醇后浓缩至相对密度在 1.10-1.35 之间，得浓缩液，将浓缩液通过硅胶柱，采用氯仿-甲醇梯度洗脱，根据各部分洗脱液中棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷和异槲皮苷的含量，选择不同的洗脱液进行混合来达到棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷或异槲皮苷三者的重量比例至（11-16）：（2.5-6）：（4-6.5），收集洗脱液浓缩、干燥、粉碎后得到本发明黄蜀葵花总黄酮提取物。氯仿-甲醇的体积比可依次按 20：80、30：70、40：60、50：

50、60：40、70：30、80：20 进行梯度洗脱，收集氯仿-甲醇的体积比为（30：70）、（50：50）和（80：20）的洗脱液。氯仿-甲醇的体积比也可依次按 10：90、25：75、44：66、55：45、67：33、85：15 进行梯度洗脱，收集氯仿-甲醇的体积比为（25：75）和（67：33）的洗脱液。根据各部分洗脱液中棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷和异槲皮苷的含量，选择不同的洗脱液进行混合来达到棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷或异槲皮苷三者的重量比例至（11-16）：（2.5-6）：（4-6.5）即可。

该方法中的醇提工艺优选为加入 12 倍量的 60%乙醇，提取 2 次，每次 2 小时，浓缩液相对密度为 1.15；或加入 10 倍量的 80%乙醇，提取 2 次，每次 1.5 小时，浓缩液相对密度为 1.20；或加入 8 倍量的 90%乙醇，提取 2 次，每次 1 小时，浓缩液相对密度为 1.18。

3、将黄蜀葵花用 6-18 倍量（即液固比为 6-18ml/g）的 40%-95%乙醇溶液提取 1-3 次，每次 1-4 小时，醇提液回收乙醇后浓缩至相对密度在 1.10-1.35 之间，得浓缩液，将浓缩液大孔吸附树脂或聚酰胺树脂，先用水洗脱 1-5 倍柱体积，再用 10%-20%乙醇或甲醇溶液洗脱 1-4 倍柱体积，再用 60-80%乙醇或甲醇溶液洗脱 1-4 倍柱体积，收集 60-80%乙醇或甲醇溶液的洗脱液，浓缩干燥后得到粗提取物，粗提取物用不同比例的醋酸乙酯-乙醇混合液或醋酸乙酯-甲醇混合液依次梯度萃取后，合并部分萃取液后浓缩干燥。醋酸乙酯-乙醇混合液或醋酸乙酯-甲醇混合液按体积比可依次按 18：82，38：62，52：48，68：32 进行梯度萃取，合并体积比（18：82）和（68：32）的萃取液。上述混合液还可以按照不同的体积比进行梯度萃取，根据各部分萃取液中棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷和异槲皮苷的含量，选择不同的萃取液进行混合来达到棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲

皮素-3'-葡萄糖苷或异槲皮苷三者的重量比例至 (11-16): (2.5-6): (4-6.5) 即可。

该方法中的醇提工艺优选为加入 12 倍量的 60%乙醇, 提取 2 次, 每次 2 小时, 浓缩液相对密度为 1.15; 或加入 10 倍量的 80%乙醇, 提取 2 次, 每次 1.5 小时, 浓缩液相对密度为 1.20; 或加入 8 倍量的 90%乙醇, 提取 2 次, 每次 1 小时, 浓缩液相对密度为 1.18。

大孔吸附树脂或聚酰胺树脂洗脱工艺优选为浓缩液以 1-3BV/h (倍柱体积/小时) 的速度吸附, 以 1BV/h 的速度用水洗脱 3 倍柱体积, 再以 1BV/h 的速度用 15%乙醇溶液洗脱 3 倍柱体积, 再以 1BV/h 的速度用 70%乙醇溶液洗脱 4 倍柱体积, 收集 70%乙醇或甲醇溶液的洗脱液。

目前的黄蜀葵花总黄酮提取物中黄酮化合物的含量棉皮素-3'-葡萄糖苷 < 槲皮素-3'-葡萄糖苷 ≤ 异槲皮苷, 且棉皮素-3'-葡萄糖苷的含量通常为异槲皮苷或者槲皮素-3'-葡萄糖苷的一半, 本发明通过了上述制备方法进一步优化主要活性成分之间的重量比例, 本发明的黄蜀葵花总黄酮提取物棉皮素-3'-葡萄糖苷的含量基本为异槲皮苷或者槲皮素-3'-葡萄糖苷的 2 倍以上, 同时本发明的总黄酮提取物相比目前的黄蜀葵花总黄酮提取物在治疗肾炎疾病中也获得了更好的效果。

以下通过试验例来进一步阐述本发明黄蜀葵花总黄酮提取物及其优选剂型的有益效果:

本发明各组黄蜀葵花总黄酮提取物治疗大鼠肾病模型的实验

实验动物及分组: 雄性 SD 大白鼠 40 只, 健康成年 (5 周龄), 体重 150 ± 25g/只, 江苏省实验动物中心提供。适应性喂养 7 天, 按体重随机分为 5 组, 每组 8 只。除空白对照组外, 其余 4 组均按下述方法制备嘌呤霉素所

致大鼠肾病模型。制备动物模型：大鼠分组后第一天，大鼠腹腔一次性注射嘌呤霉素氨基核苷（PAN）100mg/kg 体重。

1) 空白对照组：不给任何药物，亦不造模。

2) 病理模型组：按上述方法制备嘌呤霉素所致大鼠肾病模型。

3) 对照组：从造模日开始每日一次灌服按照 CN200610097615.6 实施例 1 制备的黄葵提取物药粉，相当于生药材 8.4 g/kg · d，连续二周。

4) 试验组 1：从造模日开始每日一次灌服本发明实施例 1 制备的黄葵提取物药粉，相当于生药材 8.4 g/kg · d，连续二周。

5) 试验组 2：从造模日开始每日一次灌服本发明实施例 2 制备的黄葵提取物药粉，相当于生药材 8.4 g/kg · d，连续二周

于造模前、造模第 7 天、造模第 12 天、造模第 16 测定每只大鼠尿蛋白。实验结果见下表。

表 1 各组尿蛋白定量变化 (mg/24hr 均值±SD)

组 别	造模前	第 7 天	第 12 天	第 16 天
空白 对照组	2.9±1.8	3.4±2.1	3.2±1.3	2.6±1.4
病理模型组	2.5±1.3	335.3±62.6	412.1±104.5	386.3±92.7
阳性对照组	2.7±1.9	262.65±81.9 ^{###}	241.6±72.24 ^{##}	218.7±63.8 ^{##}
试验组 1	2.8±2.4	201.0±65.4 ^{***}	187.7±53.6 ^{***}	165.3±52.5 ^{***}
试验组 2	3.0±2.3	180.4±62.6 ^{****}	172.1±52.7 ^{****}	154.4±41.8 ^{****}

^{###}表示与病理模型组比较 P<0.01; *表示与阳性对照组比较 P<0.05; **表示与阳性对照组比较 P<0.01

结论:通过上述试验表明,经本发明制得的黄蜀葵花提取物能显著减轻

嘌呤霉素所致大鼠肾病的尿蛋白量，其药理活性高于利用现有技术生产的黄葵总黄酮。

本发明药物用于临床观察的情况：

1、一般资料

收治门诊患者共 242 例，其中男性 128 例，女性 114 例。年龄 18-30 岁 30 例，31-40 岁 32 例，41-50 岁 44 例，51-70 岁 16 例。

2、诊断标准

(1) 中医诊断标准

慢性肾炎湿热证

主症：1) 面目或肢体浮肿。

2) 腰胀痛、热痛、叩击痛。

3) 经常咽痛，乳蛾肿大，或因上感诱发病情加重。

4) 皮肤疖肿、疮疡等，或因皮肤感染诱发病情加重。

5) 尿深黄，浑浊，泡沫多，血尿，小便灼热，涩痛不利，或因尿路感染诱发病情加重。

6) 舌苔黄腻，或舌根黄腻，舌质红。

7) 尿脓细胞>5 个/HP，或尿沉渣计数 WBC>40 万/hr。

次症：1) 口苦，口臭，口粘，或口干。

2) 胸脘痞闷，腹胀，纳呆。

3) 恶心，呕吐。

4) 大便溏垢，滞涩不爽，或大便干结或闭。

5) 脉濡术，或滑术。

6) 尿唾液酸 (U_{SA}) >90mg/L。

7) 尿 N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶 (U_{NAG}) $>25^U/L$ 。

凡具备主症项目 1), 并兼次症 1 项以上者; 或主症 2 项以上者; 或次症 3 项以上者, 即可诊断为本病症。

(2) 西医诊断标准

慢性肾炎

- 1) 起病缓慢, 病情迁延, 时轻时重, 后期可出现肾功能逐步减退, 贫血, 电解质紊乱, 血 BUN、Cr 升高等表现。
- 2) 有不同程度的蛋白尿、血尿、水肿及高血压等表现, 轻重不一。
- 3) 病程中可因呼吸道感染等原因诱发急性发作, 出现类似急性肾炎的表现。

(3) 慢性肾炎轻重分级标准

病情的轻重主要从蛋白尿、肾功能、水肿、高血压等方面判断。凡具备下列任何 1 项即可确定。

轻度: 1) 尿蛋白定性检查持续+~++ , 或尿蛋白定量持续 1g/日以下, 肾功能正常; 2) 浮肿不明显, 血压正常。

中度: 1) 尿蛋白定性检查持续+ +~+ + + , 或尿蛋白定量持续 1~2g/日, 肾功能正常; 2) 浮肿可轻可重, 可有高血压。

重度: 1) 尿蛋白定性检查持续+ + +~+ + + + , 或尿蛋白定量持续 2.1~3.5g/日 (血白蛋白 $>30g/L$); 2) 肾功能异常; 3) 明显浮肿及高血压。

(4) 治疗方法

试验组胶囊 (按照本发明实施例 4 制备的胶囊剂): 一次 3 粒, 一日三次。

对照组胶囊 (按照 CN200610097615.6 实施例 8 制备的胶囊剂): 口

服，一次 3 粒，一日三次。

连续用药 8 周。完全缓解、基本缓解的部分比例继续随访治疗 12 周。
合并高血压、糖尿病者，允许继续使用原先服用的降压药。

(5) 疗效评定标准

1) 疗效分级

■完全缓解：水肿等症状与体征完全消失、尿蛋白检查持续阴性或“±”，或 24 小时尿蛋白定量持续小于 0.2g，高倍镜下尿红细胞消失，肾功能正常。

■基本缓解：水肿等症状与体征基本消失，尿蛋白检查持续减少 50% 以上，高倍镜下尿红细胞不超过 3~5 个，肾功能正常或基本正常（与正常值相差不超过 15%）。

■好转：水肿等症状与体征明显好转，尿蛋白检查持续减少一个+，或 24 小时尿蛋白定量持续减少 25~49%，高倍镜下尿红细胞不超过 5~8 个，肾功能正常或有改善。

■无效：临床表现与上述实验室检查均无明显改善或加重者。

2) 不能评价：因病人依从性或其他主、客观原因无法准确评价疗效。

3) 比较各主要观察指标组间及治疗前后的变化。

(6) 疗效分析

表 12 经过一个疗程治疗后疗效观察

	例 数	综合疗效				总有效率 (%)
		完全缓解率 (%)	基本缓解率 (%)	好转 (%)	无效(%)	
试验组	80	26/80	43/80	5/80	6/80	92.5
对照组	80	15/80	40/80	4/80	21/80	73.7
两组疗效比较	P	< 0.01				

从上表所列的结果显示，试验组优于对照组，本发明的黄蜀葵花制剂具有良好的治疗效果。

以下对本发明黄蜀葵花总黄酮提取物及其制剂的含量测定方法：

依照高效液相色谱法（中国药典 2005 年版一部附录 VI D）测定。

色谱条件与系统适应性试验 用十八烷基键合硅胶为填充剂，检测波长 360nm；柱温：室温；流动相：乙腈（A）—2%醋酸（B），梯度： 0min: A-16%, B-84% , 20min: A-16%, B-84% , 30min: A-20%, B-80% , 40min: A-16%, B-84%。

理论板数以各主峰计不得低于 5000。金丝桃苷和异槲皮苷的分离度大于 1.5，槲皮素-3'-葡萄糖苷和棉皮素-3'-葡萄糖苷分离度良好。对照品溶液的制备：取金丝桃苷对照品、异槲皮苷对照品和槲皮素-3'-葡萄糖苷对照品适量，加甲醇制成 100 μ g/ml、40 μ g/ml、40 μ g/ml 的溶液；另取棉皮素-3'-葡萄糖苷对照品适量，加流动相制成 80 μ g/ml 的浓度。

供试品溶液的制备：取本品装量差异项下的内容物，研细，取 0.1g，精密称定，置 25ml 量瓶中，加甲醇约 15ml，超声处理 30 分钟（频率 40KHz，功率 100W，电源 220V）。放冷，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

测定法：分别精密吸取各对照品溶液与供试品溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定，按照外标法计算即得。

总黄酮含量的测定采用 $AlCl_3$ 络合比色法进行测定，本品含总黄酮（以芦丁计）为 50-90%。

本发明提取物中槲皮素、槲皮素-3-洋槐糖苷、棉皮素、杨梅素和杨梅素-3-葡萄糖苷采用 LC-MS 色谱定性分析，LC-MS 色谱条件：1、液相色谱条

件：色谱柱：Hypersil ODS C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)；检测波长：358 nm；流动相：甲醇-水-冰醋酸(60：40：0.5)，流速：0.5 mL/min，柱温：室温，进样量：50 μL。2. 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源，其喷射电压为 4500 eV；雾化气(N₂)压力 50 psi，流速为 50 流量单位(a. u.)，干燥气(N₂)流速为 10 a. u.；正负离子全扫描模式。将所得结果与现有质谱数据比对分析。

具体实施方式

以下通过实施例来进一步阐述本发明黄蜀葵花总黄酮提取物及其制剂的制备方法。

具体实施方式

黄蜀葵花为锦葵科(Malvaceae)秋葵属植物黄蜀葵 *Abelmoschus Manihot* (L.) Medic 的干燥花。

黄蜀葵花原料由江苏苏中药业集团股份有限公司黄蜀葵 GAP 种植基地提供，其他原料均为市售，且符合中华人民共和国药典 2010 年版一部“黄蜀葵花”项下的标准。

实施例 1：黄蜀葵花总黄酮提取物的制备

本发明原料药材黄蜀葵花 2000g

黄蜀葵花用 8 倍量的 95%的乙醇，回流提取 2 次，每次 1 小时，过滤，合并滤液回收乙醇至尽，浓缩滤液至比重 1.20，浓缩液在 0℃～4℃静置 24～48 小时，调 pH 值 6.0，将冷藏液采用薄层快速干燥，即得黄蜀葵花粗提取物。

上述提取物按重量百分比总黄酮含量达到 55.0%，其中所述总黄酮提取物含有：金丝桃苷 1.20%、异槲皮苷 1.50%、槲皮素-3'-葡萄糖苷 1.00%、

棉皮素-3'-葡萄糖苷 0.9%。取适量上述粗提取物，加入槲皮素-3'-葡萄糖苷和棉皮素-3'-葡萄糖苷调整至棉皮素-3'-葡萄糖苷：槲皮素-3'-葡萄糖苷：异槲皮苷的重量比例为 16：4：4，经 LC-MS 色谱鉴定该提取物中还含有槲皮素、槲皮素-3-洋槐糖苷、棉皮素、杨梅素和杨梅素-3-葡萄糖苷。

实施例 2：黄蜀葵花总黄酮提取物的制备

本发明原料药材黄蜀葵花 1000g

黄蜀葵花用 10 倍量的 85%的乙醇，回流提取 3 次，每次 2 小时，过滤，合并滤液回收乙醇至尽，浓缩滤液至比重 1.35，将浓缩液通过硅胶柱，采用氯仿-甲醇梯度洗脱，收集洗脱液浓缩、干燥、粉碎后得到黄蜀葵花总黄酮提取物。氯仿-甲醇的体积比可依次按 20：80、30：70、40：60、50：50、60：40、70：30、80：20 进行梯度洗脱 3 倍柱体积，收集氯仿-甲醇的体积比为（30：70）、（50：50）和（80：20）的洗脱液。

上述提取物按重量百分比总黄酮含量达到 79.0%，其中所述总黄酮提取物含有：金丝桃苷 2.30%、异槲皮苷 0.6%、槲皮素-3'-葡萄糖苷 0.52%、棉皮素-3'-葡萄糖苷 1.46%，经 LC-MS 色谱鉴定该提取物中还含有槲皮素、槲皮素-3-洋槐糖苷、棉皮素、杨梅素和杨梅素-3-葡萄糖苷。

实施例 3：黄蜀葵花总黄酮提取物的制备

本发明原料药材黄蜀葵花 800g

黄蜀葵花用 12 倍量的 90%的乙醇，回流提取 2 次，每次 2 小时，过滤，合并滤液回收乙醇至尽，浓缩滤液至比重 1.20，浓缩液过 AB-8 大孔吸附树脂，先用水以洗脱 4 倍柱体积，再以 1BV/h 的速度用 15%乙醇溶液洗脱 3 倍柱体积，再以 1BV/h 的速度用 70%乙醇溶液洗脱 3 倍柱体积，收集 70%乙醇溶液的洗脱液，浓缩干燥后得到粗提取物，粗提取物用醋酸乙酯-乙醇

混合液按体积比可依次按 18: 82, 38: 62, 52: 48, 68: 32 进行梯度萃取, 合并体积比 (18: 82) 和 (68: 32) 的萃取液, 然后浓缩干燥。

上述提取物按重量百分比总黄酮含量达到 82.0%, 其中所述总黄酮提取物含有: 金丝桃苷 2.40%、异槲皮苷 0.55%、槲皮素-3'-葡萄糖苷 0.48%、棉皮素-3'-葡萄糖苷 1.5%, 经 LC-MS 色谱鉴定该提取物中还含有槲皮素、槲皮素-3-洋槐糖苷、棉皮素、杨梅素和杨梅素-3-葡萄糖苷。

实施例 4: 黄蜀葵花总黄酮提取物胶囊

黄蜀葵花总黄酮提取物 (实施例 3 方法制得) 400g

羟丙基纤维素 20g

滑石粉 15g

微晶纤维素 20g

硫酸钙 20g

无水乙醇适量

将黄蜀葵花提取物粉碎后, 加入上述重量份的羟丙基纤维素、滑石粉、微晶纤维素、硫酸钙混匀, 过 80 目筛, 加入适量的无水乙醇, 制软材, 再用 20 目筛制颗粒, 干燥, 整粒, 装胶囊, 共制成 1000 粒。

实施例 5: 黄蜀葵花总黄酮提取物颗粒

黄蜀葵花总黄酮提取物 (实施例 2 方法制得) 400g

滑石粉 15g

微晶纤维素 20g

糖粉 10g

3%聚维酮乙醇溶液适量

将黄蜀葵花提取物粉碎后，加入上述重量份的微晶纤维素、糖粉混合均匀，加 3%聚维酮乙醇溶液适量制软材，过 18 目筛，60℃干燥 30～45 分钟，整粒，加入滑石粉，混匀，整粒，装袋，共制成 1000 袋。

实施例 6：黄蜀葵花总黄酮提取物片

黄蜀葵花总黄酮提取物（实施例 1 方法制得）400g

糊精 15g

微晶纤维素 20g

低取代羟丙甲纤维素 20g

硬脂酸镁 20g

无水乙醇适量

将黄蜀葵花提取物、低取代羟丙甲纤维素、硬脂酸镁分别粉碎过 80 目筛后，混合均匀，加无水乙醇溶液适量制软材，过 20 目筛，60℃干燥 30～45 分钟，整粒，加入微晶纤维素，混匀，压片，共压 1000 片。

实施例 7：黄蜀葵花总黄酮提取物滴丸

黄蜀葵花总黄酮提取物（实施例 3 方法制得）400g

蜂蜡 40g

液体石蜡 40g

食用植物油 150g

明胶 40g

甘油 10g

注射用水适量

将黄蜀葵花提取物与经过加热灭菌、澄清的食用植物油及蜂蜡熔融

物混合，充分搅匀即得囊心物。取明胶加入适量水使其膨胀，将甘油与适量的注射用水置煮胶锅中加热至 70℃～80℃，混合均匀，加入膨胀的明胶搅拌，熔化，保温，静置 1-2 小时，除去上层的泡沫，乘热过滤，置于明胶槽中，温度 60℃，将黄蜀葵花提取物缓缓加入明胶槽内；液体石蜡温度以 25℃为宜，室温 15℃～20℃，滴头温度 50℃～60℃，开始滴丸。滴出的胶丸均匀摊于纱网传送带上，10℃低温吹风 6 小时，去除胶丸表面石蜡，10℃低温吹风 24 小时，45℃干燥 12 小时，去除废丸，检验合格后，包装。

实施例 8：黄蜀葵花总黄酮提取物注射液

黄蜀葵花提取物（实施例 3 方法制得）400g

羟丙基-β-环糊精 225g

甘露醇 115g

注射用水适量

将黄蜀葵花提取物粉碎后，羟丙基-β-环糊精 225g 搅拌混匀，加入 5 倍量的注射用水，搅拌，60℃搅拌 1～2 小时，加入甘露醇 115g，搅拌使溶解，调 pH 值 7.0，加注射用水至总体积，继续搅拌 10 分钟后，超滤，滤液灌装于西林瓶中，冷冻干燥，压塞、加盖，即得。

权利要求

1、一种黄蜀葵花的总黄酮提取物，其特征在于所述提取物含有棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷和异槲皮苷，其重量比例为棉皮素-3'-葡萄糖苷：槲皮素-3'-葡萄糖苷：异槲皮苷=（11-16）：（2.5-6）：（4-6.5）。

2、如权利要求 1 所述的黄蜀葵花的总黄酮提取物，其特征在于以提取物总重量为基准，按重量百分比，所述提取物中总黄酮含量大于 50%。

3、一种制备黄蜀葵花的总黄酮提取物的制备方法，其特征在于所述制备方法包括以下步骤：

将黄蜀葵花用 6-18 倍量（即液固比为 6-18ml/g）的 40%-95%乙醇溶液提取 1-3 次，每次 1-4 小时，醇提液回收乙醇后浓缩至相对密度在 1.10-1.35 之间，得浓缩液，根据浓缩液中棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷和异槲皮苷的含量，通过向上述浓缩液加入棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷或异槲皮苷的单体化合物来调整三者的重量比例至（11-16）：（2.5-6）：（4-6.5）得到黄蜀葵花的总黄酮提取物。

4、一种制备黄蜀葵花的总黄酮提取物的制备方法，其特征在于所述制备方法包括以下步骤：

将黄蜀葵花用 6-18 倍量（即液固比为 6-18ml/g）的 40%-95%乙醇溶液提取 1-3 次，每次 1-4 小时，醇提液回收乙醇后浓缩至相对密

度在 1.10-1.35 之间，得浓缩液，将浓缩液通过硅胶柱，采用氯仿-甲醇梯度洗脱，根据各部分洗脱液中棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷和异槲皮苷的含量，选择不同的洗脱液进行混合来达到棉皮素-3'-葡萄糖苷、槲皮素-3'-葡萄糖苷或异槲皮苷三者的重量比例至 (11-16): (2.5-6): (4-6.5)，收集洗脱液干燥、粉碎后得到黄蜀葵花总黄酮提取物。

5、如权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于所述制备方法中的氯仿-甲醇的体积比依次按 20: 80、30: 70、40: 60、50: 50、60: 40、70: 30、80: 20 进行梯度洗脱，收集氯仿-甲醇的体积比为 (30: 70)、(50: 50) 和 (80: 20) 的洗脱液；或者，氯仿-甲醇的体积比依次按 10: 90、25: 75、44: 66、55: 45、67: 33、85: 15 进行梯度洗脱，收集氯仿-甲醇的体积比为 (25: 75) 和 (67: 33) 的洗脱液。

6、一种制备黄蜀葵花的总黄酮提取物的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括以下步骤：

将黄蜀葵花用 6-18 倍量（即液固比为 6-18ml/g）的 40%-95%乙醇溶液提取 1-3 次，每次 1-4 小时，醇提液回收乙醇后浓缩至相对密度在 1.10-1.35 之间，得浓缩液，将浓缩液大孔吸附树脂或聚酰胺树脂，先用水洗脱 1-5 倍柱体积，再用 10%-20%乙醇或甲醇溶液洗脱 1-4 倍柱体积，再用 60-80%乙醇或甲醇溶液洗脱 1-4 倍柱体积，收集 60-80%乙醇或甲醇溶液的洗脱液，浓缩干燥后得到粗提取物，粗提取物用不同比例的醋酸乙酯-乙醇混合液或醋酸乙酯-甲醇混合液依次梯度萃取后，合并部分萃取液后浓缩干燥，得到黄蜀葵花总黄酮提

取物。

7、如权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，所述制备方法中的醋酸乙酯-乙醇混合液或醋酸乙酯-甲醇混合液按体积比可依次按 18：82，38：62，52：48，68：32 进行梯度萃取，合并体积比（18：82）和（68：32）的萃取液。

8、如权利要求 3-7 中任一项所述的制备方法，其特征在于，所述制备方法中的醇提工艺为加入 12 倍量的 60%乙醇，提取 2 次，每次 2 小时，浓缩液相对密度为 1.15；或加入 10 倍量的 80%乙醇，提取 2 次，每次 1.5 小时，浓缩液相对密度为 1.20；或加入 8 倍量的 90%乙醇，提取 2 次，每次 1 小时，浓缩液相对密度为 1.18。

9、一种药物组合物，其特征在于，所述组合物含有权利要求 1-2 中任一项所述的黄蜀葵花的总黄酮提取物和药用可接受载体。

10、如权利要求 1-2 中任一项所述的黄蜀葵花的总黄酮提取物在制备治疗肾炎疾病的药物中的用途。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/080972

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, CNPAT, CNKI, Abelmoschus, Manihot

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 102600219 A (JIANGSU SZYY GROUP PHARMACEUTICAL LTD) 25 July 2012 (25.07.2012) description, paragraphs [0013]-[0032]	1-10
A	CN 1994337 A (ZHOU, Yaqiu et al.) 11 July 2007 (11.07.2007) claims 1-6	1-10
A	CN 101385748 A (ZHOU, Chunxiao et al.) 18 March 2009 (18.03.2009) claims 1-6	1-10
A	CN 1615947 A (LING, Peixue) 18 May 2005 (18.05.2005) claims 1-4	1-10
A	CN 102309275 A (JIANGSU SZYY GROUP PHARMACEUTICAL LTD) 18 January 2012 (18.01.2012) claims 1-10	1-10

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 29 October 2012 (29.10.2012)	Date of mailing of the international search report 13 December 2012 (13.12.2012)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer TIAN, Hongyang Telephone No. (86-10) 62411053

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/080972

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102600219 A	25 July 2012 (25.07.2012)	None	
CN 1994337 A	11 July 2007 (11.07.2007)	None	
CN 101385748 A	18 March 2009 (18.03.2009)	None	
CN 1615947 A	18 May 2005 (18.05.2005)	None	
CN 102319275 A	18 January 2012 (18.01.2012)	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/080972

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/185 (2006.01) i

A61P 13/12 (2006.01) i

A61K 133/00 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/080972

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(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)

IPC 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,CNPAT,CNKI,黄蜀葵,棉皮素,槲皮素,异槲皮苷,Abelmoschus,Manihot

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
PX	CN102600219A (江苏苏中药业集团股份有限公司), 25.7 月 2012 (25.07.2012), 说明书第 13-32 段	1-10
A	CN1994337A (周亚球等), 11.7 月 2007 (11.07.2007), 权利要求 1-6	1-10
A	CN101385748A (周春晓等), 18.3 月 2009 (18.03.2009), 权利要求 1-6	1-10
A	CN1615947A (凌沛学), 18.5 月 2005 (18.05.2005), 权利要求 1-4	1-10
A	CN102319275A (江苏苏中药业集团股份有限公司), 18.1 月 2012 (18.01.2012), 权利要求 1-10	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 (如具体说明的)

“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
29.10 月 2012 (29.10.2012)

国际检索报告邮寄日期
13.12 月 2012 (13.12.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
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

田洪旻
电话号码: (86-10) **62411053**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/080972

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102600219A	25.7 月 2012 (25.07.2012)	无	
CN1994337A	11.7 月 2007 (11.07.2007)	无	
CN101385748A	18.3 月 2009 (18.03.2009)	无	
CN1615947A	18.5 月 2005 (18.05.2005)	无	
CN102319275A	18.1 月 2012 (18.01.2012)	无	

主题的分类

A61K36/185(2006.01)i

A61P13/12(2006.01)i

A61K133/00(2006.01)n