



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106109862 A

(43)申请公布日 2016. 11. 16

(21)申请号 201610743055.0

(22)申请日 2016.08.28

(71)申请人 成都宝科生物科技有限公司

地址 610000 四川省成都市高新区紫荆北路45号

(72)发明人 钟雪萍

(51) Int. Cl.

A61K 36/896(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

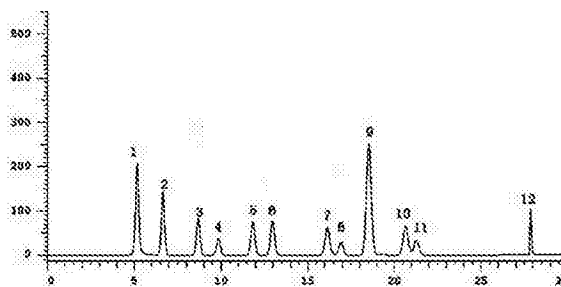
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种治疗病毒性感冒的重楼提取物

(57)摘要

本发明公开了一种治疗病毒性感冒的重楼提取物,提取物制备方法包括:(a)将干燥的重楼根茎用55%乙醇溶液热回流提取,合并提取液,浓缩至无醇味得到乙醇提取浓缩液;(b)将步骤(a)所得乙醇提取浓缩液用水稀释,依次用石油醚、乙酸乙酯和水饱和的正丁醇萃取,减压浓缩,分别得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物;(c)正丁醇萃取物用水溶解,过滤,用大孔树脂富集活性成分,先用10%乙醇冲洗8个柱体积除去大极性成分,再用70%乙醇洗脱12个柱体积,收集70%洗脱液,减压浓缩即得。该提取物可以应用于病毒性感冒,开发成治疗和预防病毒性感冒的药物。



1. 一种重楼提取物,其特征在于所述提取物由以下方法制备:

(a)将干燥的重楼根茎用55%乙醇溶液热回流提取,合并提取液,浓缩至无醇味得到乙醇提取浓缩液;(b)将步骤(a)所得乙醇提取浓缩液用水稀释,依次用石油醚、乙酸乙酯和水饱和的正丁醇萃取,减压浓缩,分别得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物;(c)正丁醇萃取物用水溶解,过滤,用大孔树脂富集活性成分,先用10%乙醇冲洗8个柱体积除去大极性成分,再用70%乙醇洗脱12个柱体积,收集70%洗脱液,减压浓缩即得。

2. 根据权利要求1所述的提取物,其特征在于:步骤(c)中所述大孔树脂为AB-8型大孔树脂。

3. 根据权利要求1所述的提取物,其特征在于:所述提取物的液相分析方法为:

色谱柱:Agilent Zorbax Extent-C18柱(4.6mm×250mm,5 μ m);

流动相:A为乙腈,B为0.5%磷酸溶液;

梯度洗脱程序:0.01~5min,A 10%→15%;5~10min,A 15%→48%;10~25min,A 48%→78%;25~30min,A 78%→10%;

流动相流速:1.0mL·min⁻¹;

检测波长:280nm;

柱温:30℃;

进样量:10 μ L。

4. 药物制剂,其特征在于:含有治疗有效量的权利要求1所述的提取物和药学上可接受的载体。

5. 权利要求1所述的提取物在制备治疗病毒性感冒的药物中的应用。

6. 权利要求4所述的药物制剂在制备治疗病毒性感冒的药物中的应用。

一种治疗病毒性感冒的重楼提取物

技术领域

[0001] 本发明涉及中药提取物领域,具体涉及一种重楼提取物及含有该提取物的药物制剂,该提取物可以应用于治疗病毒性感冒。

背景技术

[0002] 重楼属植物是一类极具药用价值的植物,全世界共有24种,我国拥有19种,其中西南各省区种类和资源极为丰富。国内外学者很重视对重楼的研究,其具有较强的生理活性及独特的药用价值。重楼在李时珍所著的《本草纲目》中以蚤休之名收载,为下品;并以重台根等异名被历代本草古籍记载。《中华人民共和国药典》收载该药为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (F.) Hara 的干燥根茎。又名蚤休、七叶一枝花、草河车。主产于长江流域及南方各省。秋季采挖,除去须根,洗净,晒干。切片生用。

[0003] 重楼具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,用于臃肿、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌打伤痛、凉风抽搐等症。现已从该属植物中分离鉴定了50余种化合物,主要有C27甾体皂苷、C21孕甾烷苷、脂肪酸酯、甾醇及其苷、黄酮苷、B2蜕皮激素及多糖。其中甾体皂苷44种,占总化合物的80%以上,甾体皂苷元为螺甾烷醇类、异螺甾烷醇类、味甾烷醇类以及变形螺甾类,均有很强的生理和药理活性。现代药理研究重楼有止血、祛痰和抑菌、镇静镇痛、抗早孕杀灭精子、抗细胞毒等作用,临床用于治疗功能性子宫出血、神经性皮炎、外科炎症以及肿瘤等,都有显著的疗效。在我国,重楼是著名的中成药云南白药、季德胜蛇药片、宫血宁胶囊等的主要组成药物。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种重楼提取物,其制备方法和液相分析方法,含有该提取物的药物制剂及利用该提取物制备治疗病毒性感冒的药物的用途。

[0005] 本发明的上述目的是通过下面的技术方案得以实现的:

[0006] 一种重楼提取物,该提取物由以下方法制备:

[0007] (a)将干燥的重楼根茎用55%乙醇溶液热回流提取,合并提取液,浓缩至无醇味得到乙醇提取浓缩液;(b)将步骤(a)所得乙醇提取浓缩液用水稀释,依次用石油醚、乙酸乙酯和水饱和的正丁醇萃取,减压浓缩,分别得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物;(c)正丁醇萃取物用水溶解,过滤,用大孔树脂富集活性成分,先用10%乙醇冲洗8个柱体积除去大极性成分,再用70%乙醇洗脱12个柱体积,收集70%洗脱液,减压浓缩即得。

[0008] 进一步地,步骤(c)中所述大孔树脂为AB-8型大孔树脂。

[0009] 为了能够通过建立HPLC指纹图谱的方法控制不同批次制备的提取物的批间差异,所述提取物的液相分析方法为:

[0010] 色谱柱:Agilent Zorbax Extent-C18柱(4.6mm×250mm,5 μ m);

[0011] 流动相:A为乙腈,B为0.5%磷酸溶液;

- [0012] 梯度洗脱程序:0.01~5min,A 10%→15%;5~10min,A 15%→48%;10~25min,A 48%→78%;25~30min,A 78%→10%;
- [0013] 流动相流速:1.0mL·min⁻¹;
- [0014] 检测波长:280nm;
- [0015] 柱温:30℃;
- [0016] 进样量:10μL。
- [0017] 药物制剂,含有治疗有效量的所述提取物和药学上可接受的载体。
- [0018] 所述的提取物在制备治疗病毒性感冒的药物中的应用。
- [0019] 所述的药物制剂在制备治疗病毒性感冒的药物中的应用。
- [0020] 本发明提取物用作药物时,可以直接使用,或者以药物制剂的形式使用。
- [0021] 所述药物制剂含有治疗有效量的本发明重楼提取物,其余为药物学上可接受的、对人和动物无毒和惰性的可药用载体和/或赋形剂。
- [0022] 所述的可药用载体或赋形剂是一种或多种选自固体、半固体和液体稀释剂、填料以及药物制品辅剂。将本发明的药物制剂以单位体重服用量的形式使用。本发明提取物可通过口服或注射的形式施用于需要治疗的患者。用于口服时,可将其制成片剂、缓释片、控释片、胶囊、滴丸、微丸、混悬剂、乳剂、散剂或颗粒剂、口服液等;用于注射时,可制成灭菌的水性或油性溶液、无菌粉针、脂质体或乳剂等。
- [0023] 本发明的优点:本发明通过对干燥的重楼根茎进行提取、除杂、富集处理,能得到具有治疗病毒性感冒的提取物;本发明提供的液相分析方法可以用于建立该提取物的指纹图谱,用于控制不同批次制备的提取物的批间差异。

附图说明

- [0024] 图1为重楼提取物HPLC液相图谱。

具体实施方式

- [0025] 下面结合实施例进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此限定本发明保护范围。尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。
- [0026] 实施例1:提取物制备
- [0027] 药材来源:重楼购自安徽亳州中药材市场,产地云南。
- [0028] 主要试剂:食品级乙醇购自上海凌峰化学试剂有限公司;医药级AB-8大孔树脂购自天津波鸿树脂有限公司;乙腈为HPLC级,购于TEDIA;85%磷酸为HPLC级,购于TEDIA;色谱用纯净水为哇哈哈纯净水。
- [0029] 制备方法:将8kg干燥的重楼根茎用55%乙醇溶液热回流提取(25L×3次),合并提取液,浓缩至无醇味得到乙醇提取浓缩液(2L);将所得乙醇提取浓缩液用水稀释至3L,依次用石油醚(3L×3次)、乙酸乙酯(3L×3次)和水饱和的正丁醇(3L×3次)萃取,减压浓缩,分别得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物232g;(c)正丁醇萃取物用1.5L水溶解,医用脱脂棉过滤,用AB-8大孔树脂(2kg,柱体积1.5L)富集活性成分,先用10%乙醇冲洗8个柱体积(12L)除去大极性成分,再用70%乙醇洗脱12个柱体积(18L),收集70%洗脱液,

减压浓缩,即得重楼提取物105g。

[0030] 实施例2:液相色谱分析

[0031] 供试品溶液配制:取实施例1方法制得的提取物5mg至50mL棕色容量瓶中,加30mL 10%乙腈水溶液超声溶解,冷却至室温后,继续加10%乙腈水溶液定容。

[0032] 分析方法:

[0033] 高效液相色谱仪:Agilent 1260,二元泵;

[0034] 色谱柱:Agilent Zorbax Extent-C18柱(4.6mm×250mm,5 μ m);

[0035] 流动相:A为乙腈,B为0.5%磷酸溶液;

[0036] 梯度洗脱程序:0.01~5min,A 10%→15%;5~10min,A 15%→48%;10~25min,A 48%→78%;25~30min,A 78%→10%;

[0037] 流动相流速:1.0mL·min⁻¹;

[0038] 检测波长:280nm;

[0039] 柱温:30℃;

[0040] 进样量:10 μ L。

[0041] 用制备的10批次的重楼提取物进行分析,进行色谱峰匹配,结果1~12号峰在10批样品色谱图中均出现。因此标定12个峰为共有色谱峰,据此建立该提取物的HPLC质量控制图谱,结果见图1。该10批次的重楼提取物药理活性相似。

[0042] 实施例3:提取物药理试验

[0043] 一、实验材料

[0044] 1、细胞株及病毒:狗肾传代细胞(madin darby canine kidney,MDCK)、甲型流感病毒(济防90-15)、乙型流感病毒(济防97-13)、流感病毒鼠肺适应株PR8均购自中国预防医科院病毒研究所,病毒经鸡胚传代后-70℃低温冰箱保存备用。

[0045] 2、样品与试剂:重楼提取物制备方法见实施例1。阳性对照药利巴韦林片,0.1g/片,国药准字H20033538,江西汇仁药业有限公司生产,批号:1411025。DMEM液体培养基,批号:701998,GIBCO公司;细胞培养液,含10%胎牛血清的DMEM液体培养基。维持液,除不含胎牛血清外,其他均同细胞培养液。洗液为含有2%双抗硫酸链霉素和硫酸卡那霉素的MEM培养液。

[0046] 3、动物:清洁级昆明种小鼠120只,体质量16-20g,雌雄各半,由新疆实验动物研究中心提供,动物合格证号:SCXK(新)2013-0002。

[0047] 4、仪器:BHC-1300IIA/B3型生物安全柜,苏净集团安泰公司;HH.CP-01型CO₂培养箱,上海福玛试验设备有限公司;XDS-1B倒置显微镜,重庆光学仪器厂;MDF-382E型超低温冰箱,日本三洋电器;UPH-II-5型纯水仪,成都超纯科技有限公司。

[0048] 二、方法与结果

[0049] 1、体外抗病毒实验

[0050] (1)测定对MDCK细胞的毒性

[0051] 取重楼提取物用维持液配成5mg/mL的原液,利巴韦林配成4mg/mL的原液再用维持液稀释成1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256共8个浓度,加到接种MDCK细胞并已长成单层的96孔培养板中,100 μ L/孔,每稀释度4个复孔,同时设细胞对照。将培养板置37℃、5%CO₂培养箱中培养,每日观察细胞生长情况,观察4d,确定细胞不出现明显退变的最

低稀释倍数为最大无毒浓度 TC_0 ，并按Reed-Muench法计算50%毒性浓度 TC_{50} 。见表1。

[0052] 表1重楼提取物细胞毒性测试结果

[0053]

样品	原液 (mg/mL)	TC_0 (μ g/mL)	TC_{50} (μ g/mL)
----	------------	----------------------	-------------------------

[0054]

重楼提取物	5	312.5	1250.0
利巴韦林	4	125.0	1732.0

[0055] (2)样品对病毒致细胞病变(CPE)的影响

[0056] 取接种MDCK细胞并已长成单层的培养板，吸弃培养液，甲型流感病毒和乙型流感病毒分别接种100倍半数组织感染浓度($TCID_{50}$)的病毒液100 μ L，置35 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中吸附1h后，吸弃病毒液，用洗液洗细胞表面2次，设14个组，分别为细胞对照组、病毒对照组、利巴韦林取62.5 μ g/mL及以下5个2倍稀释度(31.3、15.6、7.8、3.9、2.0 μ g/mL)共6个浓度给药组、重楼提取物 TC_0 (312.5 μ g/mL)及以下5个2倍稀释度(156.3、78.1、39.1、19.5、9.8 μ g/mL)共6个浓度的给药组，4孔/组。利巴韦林和重楼提取物各6个给药组分别加入不同稀释度的药液，细胞对照组和病毒对照组加维持液，100 μ L/孔。培养板置35 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养，每日倒置显微镜下观察细胞病变情况，当病毒对照组细胞病变达4级时记录实验结果，按Reed-Muench法计算半数抑制浓度 IC_{50} ，选择指数 $SI = TC_{50}/IC_{50}$ ，实验重复3次。结果，重楼提取物样品对甲型流感病毒的 IC_{50} 平均为74.6 μ g/mL，SI为16.8，对乙型流感病毒的 IC_{50} 平均为98.6 μ g/mL，SI为12.7。见表2。

[0057] 表2重楼提取物对病毒致细胞病变的影响

[0058]

样品	TC_{50} (μ g/mL)	甲型流感病毒		乙型流感病毒	
		IC_{50} (μ g/mL)	ST	IC_{50} (μ g/mL)	ST
重楼提取物	1250	74.6 \pm 21.5	16.8	98.6 \pm 32.6	12.7
利巴韦林	1732	4.8 \pm 2.1	360.8	10.5 \pm 4.4	164.9

[0059] 2、体内抗病毒实验

[0060] (1)对小鼠流感病毒性肺炎模型的保护作用

[0061] 取小鼠60只，体质量16-18g，按体质量、性别随机分为模型组、利巴韦林(60mg/kg)组和重楼提取物100、200、400mg/kg 3个剂量(根据预试验确定)的给药组，重楼提取物组和利巴韦林组按上述剂量灌胃给药，模型组灌胃等量的蒸馏水，每天2次，连续6d，对照组灌胃等量的蒸馏水。于第3天给药后，各组小鼠用乙醚轻度麻醉，以2LD₅₀浓度的流感病毒鼠肺适应株PR8滴鼻感染，0.05mL/只。记录感染后各组小鼠的死亡情况，计算死亡率、死亡保护率及平均存活天数、生命延长率。结果，重楼提取物200、400mg/kg剂量组对流感病毒性肺炎小

鼠有明显的保护作用($P < 0.05$)。见表3,与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

[0062] 表3对小鼠流感病毒性肺炎模型的保护作用($\bar{X} \pm S, n=12$)

[0063]

组别	剂量 (mg/kg)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	死亡保护 率 (%)	平均存活天 数 ($\bar{X} \pm S$)	生命延长 率 (%)
模型组	-	11	91.7	-	7.8 ± 2.3	-
利巴韦林组	60	1	8.3	90.9	13.5 ± 1.7 $\Delta\Delta$	74.2
重楼提取物	100	10	83.3	9.2	9.2 ± 3.5	18.3
	200	7	58.3	36.4	10.0 ± 3.7 Δ	29.0
	400	5	41.7	54.5	10.8 ± 4.1 Δ	38.2

[0064] (2)对流感病毒性肺炎小鼠肺指数的抑制作用

[0065] 取小鼠60只,体质量18-20g,按体质量、性别随机分为对照组、模型组、利巴韦林(60mg/kg)组和重楼提取物100、200、400mg/kg 3个剂量的给药组,重楼提取物组和利巴韦林组按上述剂量灌胃给药,模型组灌胃等量的蒸馏水,每天2次,连续6d,对照组灌胃等量的蒸馏水。于第3天给药后,除对照组外,各组小鼠用乙醚轻度麻醉,以5LD₅₀浓度的PR8滴鼻感染,每只0.05mL。第7天称取小鼠体质量后解剖,摘取全肺称重,计算肺指数值及抑制率。结果显示,重楼提取物400mg/kg剂量组对流感病毒性肺炎小鼠肺指数有明显的抑制作用。见表4,与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

[0066] 表4对流感病毒性肺炎小鼠肺指数的抑制作用($\bar{X} \pm S, n=10$)

[0067]

组别	剂量 (mg/kg)	肺指数	抑制率 (%)
对照组	-	0.66 ± 0.13	-
模型组	-	1.46 ± 0.32 **	-
利巴韦林组	60	0.90 ± 0.08 Δ Δ	38.5
重楼提取物组	100	1.28 ± 0.28	12.4

[0068]

	200	1.27 ± 0.19	13.2
	400	1.09 ± 0.16 Δ	25.9

- [0069] 实施例4:片剂的制备
- [0070] 按实施例1方法制得提取物,按其与赋形剂重量比为1:10的比例加入赋形剂,制粒压片。
- [0071] 实施例5:口服液的制备
- [0072] 按实施例1方法先制得提取物,按常规口服液制法制成口服液。
- [0073] 实施例6:胶囊剂或颗粒剂的制备
- [0074] 按实施例1方法先制得提取物,按其与赋形剂重量比为1:9的比例加入赋形剂,制成胶囊或颗粒剂。
- [0075] 实施例7:注射液的制备
- [0076] 按实施例1方法制得提取物,加注射用水,精滤,灌封灭菌制成注射液。
- [0077] 实施例8:无菌粉针的制备
- [0078] 按实施例1方法先制得提取物,溶于无菌注射用水中,搅拌使溶,用无菌抽滤漏斗过滤,再无菌精滤,分装于安瓿,低温冷冻干燥后无菌熔封得粉针剂。

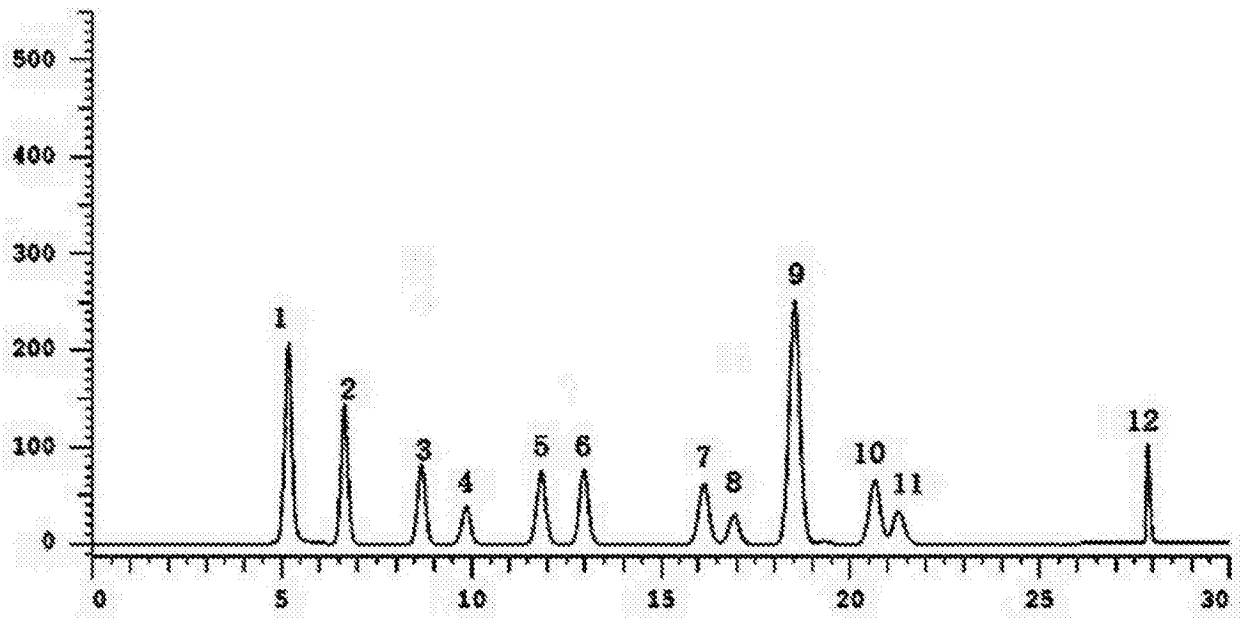


图1