



(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103054854 A

(43) 申请公布日 2013.04.24

(21) 申请号 201310034969.6

(22) 申请日 2013.01.29

(71) 申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市新港西路 135 号  
中山大学

(72) 发明人 李沛波 苏薇薇 王永刚 彭维  
吴忠

(74) 专利代理机构 广州市越秀区海心联合专  
利代理事务所(普通合伙)  
44295

代理人 黄为

(51) Int. Cl.

A61K 31/37(2006.01)

A61P 11/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

印枳素在制备镇咳药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了印枳素在制备镇咳药物中的应用。本发明首次发现印枳素具有显著镇咳作用,且其镇咳方式为非中枢性镇咳,不产生常规中枢性镇咳药在中枢神经系统方面的不良反应。本发明为目前咳嗽的治疗提供了一种全新的选择和思路,拓宽了镇咳药物的选择领域,也为该技术领域的发展做出了贡献;本发明是具有明确化学结构的化合物,用于制药时可量化投料,用于制备现代剂型。且该药物安全性高。具有发展成为治疗咳嗽药物的潜力。

1. 印枳素在制备镇咳药物中的应用。
2. 含有有效量印枳素适合于临床应用的制剂。
3. 如权利要求 2 所述的制剂,其特征在于所述的制剂是片剂、胶囊剂、颗粒剂或注射剂。

## 印枳素在制备镇咳药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及印枳素的一种新用途,具体地说是印枳素在制备镇咳药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 呼吸系统疾病是常见病、多发病,咳嗽是其常见的临床症状。一般情况下,呼吸道受到刺激(如炎症、异物)后,呼吸道里各种感受器便将这种刺激转变为神经冲动,沿着传入神经传给咳嗽中枢,咳嗽中枢受到冲动刺激被兴奋,便发出咳嗽指令,这种指令通过神经传到呼吸道的平滑肌、呼吸肌、喉头肌,引起咳嗽。所以说咳嗽是呼吸系统受到刺激时产生的一种防御性反射活动。但咳嗽也是病理性的反应,是呼吸道疾病的最常见的症状之一。过于频繁或剧烈的咳嗽,会增加患者的痛苦,影响休息和睡眠,增加体力消耗;严重时还会加重心肺功能负担,促进病症的发展,导致其他并发症的产生。

[0003] 目前,临床上常用的镇咳化学药大多属于择性地直接抑制延脑咳嗽中枢而产生镇咳作用的中枢性镇咳药,如可待因和右美沙芬等。该类镇咳药作用较强,但由于常具有明显不良反应而不适合长期服用,如右美沙芬可引起脑损伤、癫痫发作、意识丧失、心跳不规则、呼吸抑制,甚至导致死亡等,可待因易产生成瘾性。

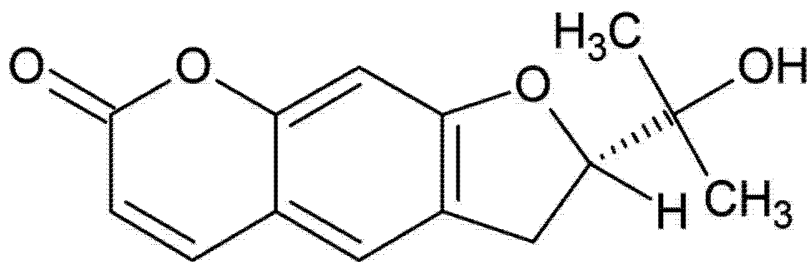
[0004] 印枳素(印枳树皮素,Marmesin,Nodakenetin)是一种香豆素类化学成分,在前胡、无花果、羌活等中药中广泛存在。已有研究表明印枳素具有肝保护作用。目前尚没有关于印枳素具有镇咳活性的研究报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种印枳素在制备镇咳药物中的应用,为现有制备镇咳药物的技术领域提供一种新途径。

[0006] 印枳素为香豆素类化学成分,印枳素的分子式为: $C_{14}H_{14}O_4$ ,结构式如式 I:

[0007]



(I)

[0008] 本发明的技术方案是:

[0009] 印枳素的应用,具体是应用于制备镇咳药物。

[0010] 所述镇咳药物可以制备成目前适于人用临床应用的药物制剂,如片剂、胶囊剂、颗粒剂、注射剂等。

[0011] 本发明的有益效果是：

[0012] (1) 本发明为目前镇咳药物提供了一种全新的选择和思路,拓宽了镇咳药物的选择领域,也为该技术领域的发展作出了贡献。

[0013] (2) 本发明首次证明印枳素具有显著的镇咳效果,且其镇咳方式为非中枢性镇咳,不产生常规中枢性镇咳药在中枢神经系统方面的不良反应。

[0014] (3) 急性毒性试验表明,印枳素无严重急性中毒的危险性,安全性高。

[0015] (4) 本发明是具有明确化学结构的化合物,用于制药时可量化投料,有利于制备现代剂型。

## 具体实施方式

[0016] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案。

[0017] 本发明实施例的印枳素购自美国 Stanford Chemicals Corporation,经 HPLC 分析,纯度 > 98%)。

[0018] 实施例 1 印枳素对枸橼酸所致豚鼠咳嗽的镇咳作用

[0019] (一) 材料

[0020] 1、实验动物: Hartly 豚鼠,普通级,雌雄各半,120 只,体重 250 ~ 350g,广东省医学实验动物中心提供,实验动物许可证号: SCXK (粤) 2008 — 0002。

[0021] 2、试剂与仪器:

[0022] 枸橼酸溶液: 取枸橼酸(广东光华化学厂有限公司产品)加生理盐水制成 17.5% 的溶液。灌胃针: 广东省职业卫生检验中心实验动物中心定制。YLS-8A 诱咳引喘仪: 山东省医学科学设备站产品。

[0023] (二) 实验方法

[0024] 取豚鼠 120 只,将其逐一置于 6L 喷雾塑料容器内,用超声喷雾法以 600mmHg 的压力通过玻璃喷头喷入 17.5% 枸橼酸溶液,持续 2min(喷雾条件为: 超声雾化器雾 1.2ml/min,风量小,雾化 2 分钟),由经过训练的观察者观察有无咳嗽反应,并记录自喷雾起 5min 内咳嗽次数,挑选咳嗽次数多于 10 次的豚鼠为合格动物用于实验。取合格豚鼠共 60 只,随机分成 5 组: 空白对照组、印枳素低、中、高剂量组、阳性对照磷酸可待因组,每组 12 只。豚鼠饲养 4 天后进行镇咳实验。方法为: 实验前禁食不禁水 12 小时,豚鼠按各组按 0.4ml/100g 体重灌胃给药,给药后 1 小时开始接受枸橼酸溶液喷雾(喷雾条件同前)。由经过训练的观察者观察有无咳嗽反应,并记录自喷雾起 5min 内咳嗽次数。并按照公式“镇咳率 =  $(N_{\text{空白对照组}} - N_{\text{给药组}}) / N_{\text{空白对照组}} \times 100\%$ ”计算各给药组的镇咳率。

[0025] (三) 实验结果

[0026] 经统计,各组动物喷雾后五分钟内咳嗽次数见表 1,由表 1 可见: 印枳素中、高剂量组的咳嗽次数与空白对照组比较,在统计学上,差异具有非常显著性 ( $P < 0.01$ ),说明印枳素能抑制枸橼酸所致豚鼠咳嗽,具有明显镇咳作用。

[0027] 表 1 各组动物喷雾后 5 分钟内咳嗽次数 (n=12)

| [0028] | 组别      | 剂量(mg/kg) | 咳嗽数(次)     | 镇咳率(%) |
|--------|---------|-----------|------------|--------|
|        | 空白对照组   | /         | 20.3±3.3   | /      |
|        | 磷酸可待因组  | 10        | 9.5±2.8**  | 53.2%  |
|        | 印枳素低剂量组 | 10        | 16.9±5.6   | 16.7%  |
|        | 印枳素中剂量组 | 20        | 13.1±4.7** | 35.5%  |
|        | 印枳素高剂量组 | 40        | 10.9±2.2** | 46.3%  |

- [0029] 注：与空白对照组比较，\*P<0.05；\*\* P<0.01.
- [0030] 实施例2 印枳素对辣椒素所致豚鼠咳嗽的镇咳作用
- [0031] （一）材料
- [0032] 1、实验动物：Hartley 豚鼠，雌雄各半，体重 250 ～ 350g，普通级，由广东省医学实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK（粤）2008-0002。
- [0033] 3、试剂与仪器：
- [0034] 辣椒素溶液：辣椒素由湖北阿泰克糖化学有限公司提供，批号：20080604。实验前称取辣椒素粉末，以乙醇：吐温 80：0.9% 生理盐水为 1：1：8 的溶液配制成 3mg/ml 的溶液为母液，实验时将母液以 0.9% 生理盐水 1：100 稀释，其终浓度为 30 μg/ml。灌胃针：广东省职业卫生检验中心实验动物中心定制。
- [0035] （二）实验方法
- [0036] 取豚鼠 100 只，于实验前一天将其逐一置于 6 L 聚乙烯容器内，用超声雾化器喷入浓度为 0.3 mol/L 的辣椒素溶液，雾化速率为 0.7 ml/min，雾化 2 min，观察并记录 10 min 内咳嗽次数，挑选咳嗽次数多于 10 次的豚鼠为合格动物用于实验。取合格豚鼠共 60 只，随机分成 5 组：空白对照组、印枳素低、中、高剂量组、磷酸可待因组，每组 12 只。实验前禁食不禁水 12 h，然后按 1 mL/100 g 体重灌胃给药，空白对照组给予等体积蒸馏水，给药后 1 h，按前法用辣椒素引咳。观察并记录豚鼠的咳嗽潜伏期和 10 min 内咳嗽次数。并按照公式“镇咳率 = (N<sub>空白对照组</sub> - N<sub>给药组</sub>) / N<sub>空白对照组</sub> × 100%”计算各给药组的镇咳率。
- [0037] （三）实验结果
- [0038] 经统计，各组动物喷雾后五分钟内咳嗽次数见表 2，由表 2 可见：印枳素中、高剂量组的咳嗽次数与空白对照组比较，在统计学上，差异具有非常显著性 (P<0.01)，说明印枳素能抑制辣椒素所致豚鼠咳嗽，具有明显镇咳作用。
- [0039] 表 2 印枳素对辣椒素所致豚鼠咳嗽的影响 (n=12)
- [0040]

| 组别      | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 咳嗽次数/次    | 镇咳率/% |
|---------|---------------------------|-----------|-------|
| 空白对照组   | —                         | 19.8±3.1  | —     |
| 磷酸可待因组  | 10                        | 6.1±1.3** | 69.2  |
| 印枳素低剂量组 | 10                        | 13.1±5.4  | 33.8  |
| 印枳素中剂量组 | 20                        | 8.7±2.3** | 56.1  |
| 印枳素高剂量组 | 40                        | 7.8±2.4** | 60.6  |

- [0041] 注：与空白对照组比较，\*\*P<0.01，\*P<0.05。
- [0042] 实施例3 印枳素对电刺激猫喉上神经咳嗽的影响

[0043] (一) 材料

[0044] 1、实验动物 :家猫,雌雄各半,体重 2.0 ~ 3.0 kg,24 只。购于广州从化。

[0045] 2、试剂与仪器 :

[0046] 氯醛糖 :A Johnson Matthey Company 公司生产,批号 :15879-93-3 ;NaCl :汕头光华化学厂,AR,批号 :20051208 ;生物机能实验系统 :成都泰盟科技,BL-420E ;PEG400 :光华化学厂有限公司,AR,批号 :20050423。

[0047] (二) 实验方法

[0048] 取家猫,随机分为印枳素(20、40mg/kg)、磷酸可待因(6 mg/kg)及空白对照组,每组 6 只,雌雄各半。以 1% 氯醛糖 30 mg/kg ip. 麻醉。将猫背位固定于手术台上,分离出喉上神经,安置铂丝电极,连接于刺激器。暴露部分腹直肌与生理记录仪的张力换能器相连,记录咳嗽信号。找出每只猫的电刺激引咳阈值,刺激参数 :频率 32 Hz,脉冲宽度 0.5 ms ,连续刺激 5 s,两次刺激时间间隔 5 min,刺激电压由小至大逐渐递增 (从 0.2 V 开始),直至出现咳嗽,此电压即为该猫致咳阈值。然后,股静脉注射给予印枳素、磷酸可待因及溶剂,给药后 0.5、1、2、3、4、5 h 分别以药前同样参数测定致咳电压值,比较用药前后各时间点的致咳阈电压值 (t 检验)。

[0049] (三) 实验结果

[0050] 经统计,各组动物在给药后不同时间点的致咳电压值见表 3,由表 3 可见 :股静脉注射磷酸可待因后,在各个时间点(0.5、1、2、3 h)的致咳阈电压值与相应时间点的空白对照组的致咳阈电压值相比,差异具有非常显著性(P<0.01),说明静脉注射磷酸可待因可明显增高猫的致咳阈电压值。而印枳素两个剂量组(20、40 mg/kg)均不能增高猫致咳阈值,即印枳素对电刺激猫喉上神经咳嗽不具有抑制作用。说明印枳素不是中枢性镇咳药物。

[0051] 表 3 各组动物在给药后不同时间点的致咳电压值(n=6)

[0052]

| 组别      | 剂量(mg/kg) | 阈电压值(V)   |             |             |             |            |
|---------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|------------|
|         |           | 0h        | 0.5h        | 1h          | 2h          | 3h         |
| 空白对照组   | 2 ml/kg   | 0.89±0.34 | 1.03±0.35   | 1.12±0.41   | 1.18±0.33   | 1.22±0.29  |
| 可待因组    | 6 mg/kg   | 0.92±0.26 | 1.96±0.36** | 3.25±0.77** | 4.23±0.57** | 5.68±0.98* |
| 印枳素低剂量组 | 20 mg/kg  | 0.95±0.36 | 1.05±0.35   | 1.21±0.36   | 1.18±0.46   | 1.29±0.33  |
| 印枳素高剂量组 | 40 mg/kg  | 0.88±0.37 | 1.06±0.54   | 1.11±0.21   | 1.27±0.41   | 1.31±0.39  |

[0053] 注 :与空白对照组相应时间点比较,\*\* P<0.01。

[0054] 实施例 4 印枳素对电刺激豚鼠喉上神经引咳的影响

[0055] (一) 材料

[0056] 1、实验动物 :Hartly 豚鼠,普通级,32 只,雌雄各半,体重 280 ~ 350g。广东省医学实验动物中心提供,实验动物许可证号 :SCXK (粤)2003-0002,粤监证字 2007A005。

[0057] 3、试剂与仪器 :

[0058] 乌拉坦 :上海润捷化学试剂有限公司,批号 :20070514。PEG400 :广东光华化学厂有限公司,批号 :20060311,A.R.。生理盐水 :取 NaCl (广东光华化学厂有限公司,批

号 :20060311, A. R. ) 0. 9g 加入蒸馏水 100ml 制得。生物机能实验系统 :成都泰盟科技, BL-420E。呼吸记录器 :北京新航兴, HX-101 捆绑式。

[0059] (二) 实验方法

[0060] 取豚鼠,随机分为印枳素(20、40mg/kg)、磷酸可待因(6 mg/kg)及空白对照组,每组 8 只,雌雄各半。豚鼠腹腔注射 20% 乌拉坦浅麻醉后,沿颈部中线剪开皮肤,颈静脉插管用于给药。小心分离喉上神经,然后尽可能靠外周端切断它,将它与一个刺激电极相连。刺激电极接入生理记录仪,并由生理记录仪给予电刺激信号刺激喉上神经引起咳嗽反射。电刺激参数如下 :持续的单一方波,波宽 1ms,频率 5Hz,总持续时间 10 s,电压 0. 5~4 V。根据上下法原理在 0. 5~4V 之间调整刺激电压,直到找到最小引咳电压。各组动物按 1 ml/kg BW 股静脉注射给药,空白对照组按 1 ml/kg BW 股静脉注射 PEG400 :生理盐水(1 : 1)溶液。分别于给药后 5min,10min,15min,30min,60min 后用同样的电刺激条件刺激喉上神经,记录豚鼠是否咳嗽。如果电刺激喉上神经后无咳嗽反射则认为药效为阳性,仍有咳嗽反射则记为阴性。

[0061] (三) 实验结果

[0062] 经统计,受试药物对电刺激喉上神经咳嗽反应的影响见表 4,由表 4 可见 :静脉注射磷酸可待因 6 mg/kg 后,只有在给药后 60 min 时出现咳嗽反射阳性的动物 1 只,与溶剂组相比表现出明显的中枢镇咳作用。而静脉注射印枳素低、高三个剂量(20mg/kg,40mg/kg)时,用最小引咳电压对豚鼠进行电刺激喉上神经时,仍可出现咳嗽反射的现象,咳嗽反应阳性的动物数与溶剂组相比无明显的变化。说明印枳素静脉注射对最小引咳电压刺激豚鼠喉上神经引起的咳嗽无明显影响,因此不是中枢性镇咳药物。

[0063] 表 4 受试药物对电刺激豚鼠喉上神经咳嗽反应的影响

[0064]

| 组别      | 给药剂量     | n | 给药物/溶剂后咳嗽反应阳性的动物数 |       |       |       |       |
|---------|----------|---|-------------------|-------|-------|-------|-------|
|         |          |   | 5min              | 10min | 15min | 30min | 60min |
| 空白对照组   | 1 ml/kg  | 8 | 8                 | 8     | 8     | 8     | 8     |
| 磷酸可待因组  | 6 mg/kg  | 8 | 0**               | 0**   | 0**   | 0**   | 1**   |
| 印枳素低剂量组 | 20 mg/kg | 8 | 8                 | 8     | 8     | 8     | 8     |
| 印枳素高剂量组 | 40 mg/kg | 8 | 8                 | 8     | 8     | 8     | 8     |

[0065] 注 :与空白对照组相应时间点比较, \*\* P<0. 01。

[0066] 实施例 5 SD 大鼠经口灌胃给予印枳素急性毒性试验

[0067] (一) 实验动物 :

[0068] SPF 级 SD 大鼠 22 只,雌雄各半,体重 130 ~ 150g,由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号 :SCXK( 粤 )2008-0002。

[0069] (二) 实验方法 :

[0070] 参照《化学药物急性毒性试验技术指导原则》,采用“固定剂量法”考察印枳素经口给予大鼠急性毒性试验。试验选择 5、50、500 和 2000mg/kg 四个固定剂量进行试验。先以 500mg/kg 作为初始剂量进行预试,如初始剂量出现严重的毒性反应,即降低一个档次的剂

量进行预试,如初始剂量无毒性反应,则用 2000mg/kg 进行预试,此剂量如无死亡发生即可结束预试。在上述预试的基础上进行正式试验。每个剂量至少用 10 只动物,雌雄各半。根据预试的结果,在上述四种剂量中选择一个可能产生明显毒性但又不引起死亡的剂量进行正式试验。

[0071] 正式试验给受试药物后至少应观察 2 周,对每只动物均仔细观察并详细记录各种毒性反应出现和消失的时间。观察记录的内容包括皮肤、粘膜、毛色、眼睛、呼吸、循环、自主活动及中枢神经系统行为表现等。给予受试物前、后各 1 周、动物死亡及试验结束时应称取动物的体重。所有动物包括死亡或处死的动物均进行尸检,尸检异常的器官应作组织病理学检查。

[0072] (三) 实验结果:

[0073] 预实验结果表明:按剂量 500mg/kg 经口给药,5 只大鼠均无毒性反应。继续以 2000mg/kg 的剂量进行实验,仍无严重毒性反应。因此,选择 2000mg/kg 的剂量作为正式试验的剂量。

[0074] 正式试验结果表明:以 2000mg/kg 的剂量经口给予大鼠,给药后直至第 14 天,未见动物死亡,各动物精神及行为活动状况良好、皮肤被毛清洁、大小便、体重和摄食量的增长均正常,亦未见其他毒性反应症状。观察结束后大体解剖未见脏器明显异常。参照固定剂量法试验结果的评价表,印枳素的  $LD_{50} > 2000\text{mg/kg}$ 。

[0075] 以上结果说明,印枳素的安全性高,无严重急性中毒的危险性。

[0076] 表 5 印枳素单次经口灌胃给药对 SD 大鼠体重的影响

| 组别     | 动物数<br>(只) | 体重 (g)      |             |             |
|--------|------------|-------------|-------------|-------------|
|        |            | 第 1 天       | 第 7 天       | 第 15 天      |
| 雄性     |            |             |             |             |
| 印枳素给药组 | 6          | 131.55±6.38 | 190.56±6.38 | 289.36±9.66 |
| 雌性     |            |             |             |             |
| 印枳素给药组 | 6          | 136.21±4.21 | 168.95±5.68 | 203.56±4.57 |

[0078] 表 6 印枳素单次经口灌胃给药对 SD 大鼠平均摄食量的影响

[0079]

| 组别     | 动物数<br>(只) | 摄食量 (g) |       |        |
|--------|------------|---------|-------|--------|
|        |            | 第 1 天   | 第 7 天 | 第 15 天 |
| 雄性     |            |         |       |        |
| 印枳素给药组 | 6          | 27.3    | 33.2  | 34.2   |
| 雌性     |            |         |       |        |
| 印枳素给药组 | 6          | 22.6    | 24.3  | 25.9   |