

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410060753.8

A61K 31/58 (2006.01)
A61K 36/888 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 11/10 (2006.01)
A61P 11/14 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 3 月 1 日

[11] 公开号 CN 1739528A

[22] 申请日 2004.8.23

[21] 申请号 200410060753.8

[71] 申请人 华中科技大学同济医学院

地址 430030 湖北省武汉市航空路 13 号

[72] 发明人 吴继洲 张勇慧 阮汉利 皮慧芳

[74] 专利代理机构 武汉楚天专利事务所

代理人 雷 速

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

湖北贝母中提取的单体生物碱在制备镇咳祛痰平喘药物中的应用

[57] 摘要

本发明公开了湖北贝母生物碱或生物碱苷单体在镇咳、祛痰和平喘药物中的用途。湖北贝母生物碱和生物碱苷单体的镇咳、祛痰、平喘活性与总生物碱比较：在同等剂量条件下，鄂贝新具有较好作用；在同等毒性条件下，浙贝乙素具有较好作用。

1、从湖北贝母中提取的生物碱或生物碱苷单体在制备镇咳祛痰平喘药物中的应用。

2、权利要求1所述的从湖北贝母中提取的生物碱或生物碱苷单体包括浙贝甲素、浙贝乙素、湖贝甲素、湖贝乙素、湖贝嗉、湖贝甲素苷、湖贝苷、湖贝啖、湖贝新、鄂贝甲素、鄂贝乙素和鄂贝新。

3、湖贝甲素苷在制备镇咳祛痰平喘药物中的应用。

4、鄂贝甲素、鄂贝新、湖贝甲素苷、湖贝甲素、浙贝甲素或浙贝乙素在制备祛痰药物中的应用。

5、鄂贝新制备祛痰药物中的应用。

6、鄂贝乙素、浙贝甲素、浙贝乙素或鄂贝新在制备平喘药物中的应用。

7、浙贝乙素或鄂贝新在制备平喘药物中的应用。

湖北贝母中提取的单体生物碱在制备镇咳祛痰平喘药物中的应用

技术领域:

本发明涉及中药提取物及其应用,具体涉及从湖北贝母中提取的几种单体生物碱在制备镇咳祛痰平喘药物中的应用。

背景技术:

湖北贝母为百合科贝母属植物湖北贝母(*Fritillaria Hupehensis* Hsiao et K. C.Hsia)的干燥鳞茎,微苦、凉,入肺、心经,具有清热润肺、化痰止咳及散结之功效。1991年湖北贝母被部颁中药材标准收载,现已收载于《中华人民共和国药典》(2000年版)中,发展成为仅次于浙贝母的第二大主流品种。在化学成分研究方面,已从湖北贝母(简称湖贝)的鳞茎中分离鉴定了11种生物碱:湖贝酯(Hupeheninetate)、浙贝甲素(peimine)、浙贝乙素(peiminine)、湖贝甲素(hupehenine)、湖贝乙素(hupehenirine)、湖贝嗉(hupehenizine)、湖贝甲素苷(hupeheninoside)、湖贝苷(hupehemonoside)、湖贝啉(hupehenidine)、湖贝新(hupehenisine)和鄂贝新(ebeiensine)。另外,我们从湖北产贝母属植物中鄂北贝母和紫花鄂北贝母中分离得到鄂贝甲素(ebeinine)、鄂贝乙素(ebeinone)等生物碱。

现代药理研究表明[参见:熊玮,郭小玲,何嘉琅.湖北贝母药理作用的初步研究(J).中草药,1986,17(3):115-118.]湖北贝母乙醇提取物对多种平滑肌有明显松弛作用,对豚鼠有平喘作用,能提高小鼠耐受常压缺氧能力;总生物碱是其生物活性有效部位;总生物碱有镇咳、祛痰、平喘作用,其生物碱含量及生物活性较川贝、浙贝高,但毒性也较川贝、浙贝大。

咳、痰、喘是呼吸系统疾病的常见症状,尤其是支气管哮喘。目前在这一领域的治疗药物研究进展缓慢,尚无理想药物。常见的止咳平喘药物如麻黄制剂,不良反应多,如血压升高,失眠、头痛、及快速耐受现象。西药如氨茶碱只可平喘而无镇咳、祛痰作用,且可产生耐受现象。因此,从祖国传统的医药宝库中挖掘一种安全、稳定、高疗效、无耐受性的止咳平喘药物有着重要意义。

发明内容:

本发明的目的是在湖北产贝母中的几种单体生物碱中筛选出镇咳、祛痰、平喘活

性优良的单体，开发成为一种天然、高效、低毒的镇咳、祛痰、平喘药物。

本发明的目的是通过如下措施来达到：

从湖北产贝母中提取分离得到生物碱和生物碱苷单体，分别在同等剂量条件下和同等毒性条件下对生物碱和生物碱苷单体进行了镇咳、祛痰、平喘实验。

对湖北产贝母生物碱和生物碱苷单体进行了镇咳、祛痰、平喘实验，并与总生物碱比较，得出如下结论：(1)在同等剂量条件下：鄂贝甲素、湖贝甲素苷显示显著的镇咳作用；鄂贝甲素、鄂贝新显示显著的祛痰活性；鄂贝乙素、浙贝乙素、鄂贝新具较好的平喘作用；(2)在同等毒性条件下，湖贝乙素、浙贝乙素、湖贝甲素苷、湖贝甲素在相当于各生物碱样品 LD₅₀ 的 1/10 量时显示显著的镇咳作用；湖贝甲素苷、浙贝乙素剂量为 LD₅₀ 的 1/10，浙贝甲素、湖贝甲素、鄂贝新剂量为 LD₅₀ 的 1/5 时显示显著的祛痰活性；浙贝甲素、浙贝乙素、鄂贝新在相当于各生物碱样品 LD₅₀ 的 3/20 量时显示非常显著的平喘活性。

具体实施方式：

实施例 1：同等剂量条件下各单体镇咳、祛痰、平喘活性实验

样品的配制：用万分之一天平准确称取各单体 3 mg，用 0.1%CMC-Na 溶液定容至 10ml,至超声波清洗器中超声 10 分钟，摇匀，备用。

(一) 镇咳实验

取体重 20±2g 小白鼠 100 只，雌雄各半，随机分为 10 组，按表 1 i.g 给药 1h 后，置于倒置的 500ml 烧杯内，用 1ml 注射器吸取氨水 0.15ml 注入烧杯内放的一棉球中，观察咳嗽潜伏期和 3 分钟内咳嗽次数。

表 1 湖北贝母各单体灌胃给药小鼠镇咳作用实验

组别	动物 只数	剂量及途径 (mg/kg)	咳嗽潜伏期（秒）	咳嗽次数 (3 分钟内)
阴 性	10	0 i.g	58.9±14.1	13.1±4.2
阳 性	10	30 i.g	91.1±25.2**	7.4±2.4*
鄂贝甲素	10	3 i.g	87.0±30.7*	3.9±1.9**
鄂贝乙素	10	3 i.g	71.1±18.6	15.2±6.1
浙贝甲素	10	3 i.g	76.2±25.2	12.0 ±5.7
浙贝乙素	10	3 i.g	65.5±21.9	11.0±4.2
湖贝甲素苷	10	3 i.g	83.6±24.4*	10.8±5.1
湖贝甲素	10	3 i.g	50.3±13.9	15.3±7.8

鄂贝新	10	3	i.g	62.1±28.1	15.1±5.8
总 碱	10	3	i.g	98.7±15.6	6.8±1.7

阴性组: 0.1%CMC-Na 溶液; 阳性组: 可待因

与阴性比较 *P<0.05 **P<0.01

鄂贝甲素、湖贝甲素、总碱组显示显著的镇咳作用, 与阴性比较有显著性差异 (p<0.01-0.05)。

(二) 祛痰实验

取体重 20±2g 小鼠 80 只, 雌雄各半, 随机分为 10 组, 实验前禁食不禁水 12 h, 按表 2 i.g 给药, 给药后 0.5h 腹腔注射 0.5% 酚红溶液 0.5ml, 30 分钟后处死小鼠 (尽量不损伤气管), 仰位固定于手术板上, 剪开颈正中皮肤, 分离气管, 于喉头下将头磨平的 7 号针头插入气管内 0.3cm, 用丝线结扎固定后以 1ml 注射器吸取 5%NaHCO₃ 溶液 0.5ml, 通过针头来回灌洗呼吸道 3 次 (每次不作停留), 将灌洗液注入一比色管中, 重新吸取 5%NaHCO₃ 溶液 0.5ml 如上再灌洗 3 次, 再第 3 次同样灌洗, 如此共用洗液 1.5ml, 抽洗 9 次, 合并洗出液, 用分光光度计在波长 546nm 处测 A 值。

表 2 湖北贝母各单体灌胃给药小鼠祛痰作用实验

组别	动物数	剂量及途径 (mg/kg)		酚红排泄量 (ug/ml) (X ±SD)
阴 性	10	0	i.g	0.0760±0.03
阳 性	10	25	i.g	0.1020±0.03*
鄂贝甲素	10	3	i.g	0.0994±0.02**
鄂贝乙素	10	3	i.g	0.0582±0.03
浙贝甲素	10	3	i.g	0.0610±0.01
浙贝乙素	10	3	i.g	0.0650±0.02
湖贝甲素	10	3	i.g	0.0780±0.03
湖贝甲素	10	3	i.g	0.0800±0.03
鄂贝新	10	3	i.g	0.0910±0.03*
总 碱	10	3	i.g	0.0730±0.03

阴性组: 0.1%CMC-Na 溶液; 阳性组: 愈创木酚甘油醚

与阴性比较 *P<0.05 **P<0.01

鄂贝甲素、鄂贝新显示显著的祛痰活性, 与阴性比较有显著性差异, 其中鄂贝甲素 P<0.01,

鄂贝新 $P < 0.05$ ，均强于总碱。

(三) 平喘实验

取 170 ± 20 g 的豚鼠（幼年豚鼠），雌雄均可，逐一测定引喘潜伏期，挑选合格者。将豚鼠放入 402 型超声雾化器中，以 53Kpa(400mmHg) 的恒压喷入 2% 氯化乙酰胆碱和 0.4% 组胺的等量混合液 15 秒，密切注意豚鼠的反应，观察 6 分钟内豚鼠出现喘息性抽搐的潜伏期即引喘潜伏期（从喷雾停止到出现喘息性抽搐的时间）与发生抽搐的动物数。如见到豚鼠跌倒应立即取出，以免死亡，并记录引喘潜伏期，若引喘潜伏期大于 150 秒则认为不敏感而不予选用，次日将合格豚鼠（60 只）按体重随机分组，每组 6 只，将 9 组豚鼠分别给予待试样品及对照组，i.g 给药 30 分钟后以同样条件引喘并测定引喘潜伏期与发生抽搐动物数的变化。如引喘潜伏期延长，发生抽搐的动物数减少，经统计处理有显著意义的，即可认为该药具有平喘作用。

表 3 湖北贝母各单体灌胃给药小鼠平喘作用实验

组别	动物 只数	剂量及途 径 (mg/kg)	用药前 引喘潜伏期 (秒)	抽搐 动物数	用药后 引喘潜伏期 (秒)	差值 (秒)
阴 性	6	0	34.2 ± 9.9	0/6	49.2 ± 16.8	15.0 ± 12.07
阳 性	6	4	35.0 ± 9.5	6/6	76.7 ± 15.1	$41.8 \pm 17.0^*$
鄂贝甲素	6	3.3	33.2 ± 9.1	6/6	47.5 ± 9.7	14.3 ± 7.9
鄂贝乙素	6	3.3	31.0 ± 9.4	6/6	78.7 ± 57.6	47.7 ± 49.9
浙贝甲素	6	3.3	33.0 ± 6.7	6/6	68.0 ± 21.0	35.0 ± 26.0
浙贝乙素	6	3.3	32.8 ± 8.7	6/6	81.7 ± 57.8	48.8 ± 56.2
湖贝甲素苷	6	3.3	33.7 ± 12.7	6/6	48.5 ± 21.5	14.8 ± 16.4
湖贝甲素	6	3.3	33.7 ± 5.4	6/6	50.2 ± 15.7	16.5 ± 15.2
鄂贝新	6	3.3	33.0 ± 13.1	6/6	82.0 ± 42.4	49.0 ± 38.3
总 碱	6	3.3	30.5 ± 3.6	6/6	52.7 ± 16.2	22.2 ± 13.8

阴性组：0.1%CMC-Na 溶液； 阳性组：麻黄碱

与阴性比较 ** $P < 0.01$

鄂贝乙素、浙贝乙素、鄂贝新给药前与给药后引喘潜伏期差值较接近；差值较大，虽与阴性比 $P > 0.05$ ，但差值明显长于总生物碱，可能是动物数较少的原因。

结论：

在同等剂量条件下，湖北产贝母各单体灌胃给药对小鼠（3mg/kg）的镇咳祛痰作用，

对豚鼠(3.3mg/kg)的平喘作用:

- (1) 鄂贝甲素、湖贝甲素苷显示显著的镇咳作用, 与阴性比较有显著性差异 ($p<0.01-0.05$), 而总碱在同等剂量条件下显示很强的毒性。
- (2) 鄂贝甲素、鄂贝新显示显著的祛痰活性, 与阴性比较有显著性差异, 其中鄂贝甲素 $P<0.01$, 鄂贝新 $P<0.05$, 均强于总碱。
- (3) 鄂贝乙素、浙贝乙素、鄂贝新具较好的平喘作用, 给药前与给药后引喘潜伏期差值长于总生物碱。

实施例 2: 同等毒性条件下各单体镇咳、祛痰、平喘活性实验

样品的配制: 按药理要求配制样品, 小鼠按每只 0.2ml (相当于 LD₅₀ 的 1/5 量) 尾静脉给药; 豚鼠按每只 0.4ml (相当于 LD₅₀ 的 1/10 量) 腹腔注射给药; 并用稀硫酸调 PH 约 5, 摇匀, 备用。

(一) 镇咳实验

取体重 20±2g 小白鼠 100 只, 雌雄各半, 随机分为 10 组, 按表 4 i.v(尾静脉注射)给药 1h 后, 置于倒置的 500ml 烧杯内, 用 1ml 注射器吸取氨水 0.15ml 注入烧杯内放的一棉球中, 观察咳嗽潜伏期和 3 分钟内咳嗽次数。

表 4 湖北贝母各单体尾静脉注射小鼠镇咳作用实验

组别	动物 只数	剂量(mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)	咳嗽潜伏期 (秒)	咳嗽次数 (3 分钟内)
阴 性	10	0		58.3±34.84	81.8±31.16
阳 性	10	4		75.6±48.22	53.3±28.30 [*]
总 碱	10	1.3	13.17	77.8±35.59	102.3±59.33
湖贝乙素	10	5.2	51.89	100.6±50.75 [*]	74.6±46.32
浙贝甲素	10	1.5	14.29	93.7±47.77	63.6±40.07
浙贝乙素	10	1.3	13.08	46.4±36.80	38.2±22.46 ^{**}
湖贝甲素苷	10	2.0	20.80	51.6±25.29	53.3±27.47 [*]
湖贝甲素	10	4.2	41.84	57.0±28.51	52.3±29.50 [*]
鄂贝新	10	3.9	39.31	66.1±33.60	55.4±28.35

阴性组: 注射用水; 阳性组: 磷酸可待因, i.g

与阴性比较 *: $p<0.05$ ** $p<0.01$

湖贝乙素、浙贝乙素、湖贝甲素苷、湖贝甲素在相当于各生物碱样品 LD₅₀ 的 1/10 量时显示显著的镇咳作用，优于总碱，与阴性比有显著性差异（p<0.01-0.05）。

（二）祛痰实验

取体重 20±2g 小鼠 80 只，雌雄各半，随机分为 10 组，实验前禁食不禁水 12 h，按表 5 i.g 给药，给药后 0.5h 腹腔注射 0.5% 酚红溶液 0.5ml,30 分钟后处死小鼠（尽量不损伤气管），仰位固定于手术板上，剪开颈正中皮肤，分离气管，于喉头下将头磨平的 7 号针头插入气管内 0.3cm,用丝线结扎固定后以 1ml 注射器吸取 5%NaHCO₃ 溶液 0.5ml,通过针头来回灌洗呼吸道 3 次（每次不作停留），将灌洗液注入一比色管中，重新吸取 5%NaHCO₃ 溶液 0.5ml 如上再灌洗 3 次，再第 3 次同样灌洗，如此共用洗液 1.5ml,抽洗 9 次，合并洗出液，用分光光度计在波长 546nm 处测 OD 值。

表 5 湖北贝母各单体尾静脉注射小鼠祛痰作用实验

组别	动物 只数	剂量 (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)	酚红排泌量(ug/ml) X±SD
阴性	10	0		0.207±0.039
阳性	10	500		0.273±0.040**
总碱	10	2.6	13.17	0.263±0.040*
湖贝乙素	10	10.4	51.89	0.215±0.030
浙贝甲素	10	3.0	14.29	0.242±0.033*
浙贝乙素	10	1.3	13.08	0.244±0.032*
湖贝甲素苷	10	2.0	20.80	0.298±0.032***
湖贝甲素	10	8.4	41.84	0.271±0.046***
鄂贝新	10	7.8	39.31	0.257±0.031*

阴性组：注射用水；阳性组：愈创木酚甘油醚，皮下注射

与阴性比较 *：p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

浙贝甲素、浙贝乙素、湖贝甲素苷、湖贝甲素、鄂贝新（其中湖贝甲素苷、浙贝乙素剂量为 LD₅₀ 的 1/10，浙贝甲素、湖贝甲素、鄂贝新剂量为 LD₅₀ 的 1/5）显示显著的祛痰活性，与阴性比有显著性差异，其中湖贝甲素苷、湖贝甲素 p<0.001，强于总碱，浙贝甲素、浙贝乙素、鄂贝新 p<0.05。

（三）平喘实验

取 170±20 g 的豚鼠（幼年豚鼠），雌雄均可，逐一测定引喘潜伏期，挑选合格者。将豚鼠放入 402 型超声雾化器中，以 53Kpa(400mmHg)的恒压喷入 2%氯化乙酰胆碱和 0.4%组

胺的等量混合液 15 秒，密切注意豚鼠的反应，观察 6 分钟内豚鼠出现喘息性抽搐的潜伏期即引喘潜伏期（从喷雾停止到出现喘息性抽搐的时间）与发生抽搐的动物数。如见到豚鼠跌倒应立即取出，以免死亡，并记录引喘潜伏期，若引喘潜伏期大于 150 秒则认为不敏感而不予选用，次日将合格豚鼠（72 只）按体重随机分组，每组 8 只，将 9 组豚鼠分别给予待试样品及对照组，i.g 给药 30 分钟后以同样条件引喘并测定引喘潜伏期与发生抽搐动物数的变化。

表 6 湖北贝母各单体豚鼠腹腔注射平喘作用实验

组别	动物 只数	剂量 (mg/kg)	LD ₅₀ (mg/kg)	用药前	用药后	差值 (秒)
				引喘潜伏期 (秒)	引喘潜伏期 (秒)	
阴性	8	0		58.09±13.78	69.6±31.83	16.91±37.89
阳性	8	125		77.75±30.45	335.88±68.24	258.13± 70.25**
总碱	8	1.98	13.17	53.14±12.12	62.71±28.63	9.57±29.31
湖贝乙素	8	7.8	51.89	67.88±20.30	66.00±18.32	5.38±23.83
浙贝甲素	8	2.28	14.29	53.38±11.73	151.88±132.17	95.51±121.79*
浙贝乙素	8	2.28	13.08	62.63±28.48	161.13±128.98	98.51±131.34*
湖贝甲素苷	8	1.98	20.80	53.25±14.08	71.38±37.40	18.12±27.12
湖贝甲素	8	3.06	41.84	58.88±17.61	55.38±25.63	-4.13±30.39
鄂贝新	8	5.88	39.31	49.25±7.81	84.5±39.51	41.63±51.16*

阴性组：注射用水；阳性组：氨茶碱

与阴性比较 *p<0.05 **p<0.01

浙贝甲素、浙贝乙素、鄂贝新在相当于各生物碱样品 LD₅₀ 的 3/20 量时显示非常显著的平喘活性，用药前后引喘潜伏期差值有较大的增加，差值与阴性比有显著性差异（p<0.05）。

结论：

在同等毒性条件下，湖北产贝母中各单体对小鼠尾静脉给药的镇咳祛痰作用，对豚鼠腹腔注射的平喘作用：

(1) 湖贝乙素、浙贝乙素、湖贝甲素甙、湖贝甲素在相当于各生物碱样品 LD₅₀ 的 1/10 量时显示显著的镇咳作用，优于总碱，与阴性比有显著性差异(p<0.01-0.05)。

(2) 浙贝甲素、浙贝乙素、湖贝甲素甙、湖贝甲素、鄂贝新（其中湖贝甲素苷、浙贝乙素剂量为 LD₅₀ 的 1/10，浙贝甲素、湖贝甲素、鄂贝新剂量为 LD₅₀ 的 1/5）显示显著的祛痰

活性，与阴性比有显著性差异，其中湖贝甲素苷、湖贝甲素 $p < 0.001$ ，强于总碱，浙贝甲素、浙贝乙素、鄂贝新 $p < 0.05$ 。

(3) 浙贝甲素、浙贝乙素、鄂贝新在相当于各生物碱样品 LD50 的 3/20 量时显示非常显著的平喘活性，用药前后引喘潜伏期差值有较大的增加，差值与阴性比有显著性差异 ($p < 0.05$)。