

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 31/58

A61K 31/7048 A61P 7/02



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410041471.3

[43] 公开日 2005 年 3 月 23 日

[11] 公开号 CN 1596900A

[22] 申请日 2004.7.23

[21] 申请号 200410041471.3

[71] 申请人 中国药科大学

地址 210009 江苏省南京市童家巷 24 号

[72] 发明人 寇俊萍 田友清 李林洲 余伯阳  
朱丹妮 严永清

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 周和平 栗仲平

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 鲁斯可皂苷元及其皂苷在制备防治  
血栓疾病药物中的应用

[57] 摘要

鲁斯可皂苷元和/或鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷，包括麦冬皂苷，在制备防治血栓疾病药物中的应用，鲁斯可皂苷元母核为抗血栓作用重要活性结构，糖链有促进活性作用，所述皂苷元及其苷的疗效好，毒副作用少，临床使用安全，且标本兼治。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、鲁斯可皂苷元和/或鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷在制备防治血栓疾病药物中的应用。

2、权利要求1的血栓疾病包括深静脉血栓、慢性静脉功能不全和/或血栓栓塞性疾病。

3、权利要求1的鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷，包括在C1位或C3位上连接岩藻糖或葡萄糖形成的苷。

4、权利要求3的鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷，其糖链为在C1位或C3位连接的岩藻糖或葡萄糖，再与选自鼠李糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖中的糖结合，形成二糖苷、三糖苷或四糖苷。

5、权利要求4的鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷，包括麦冬皂苷。

6、权利要求5麦冬皂苷，包括山麦冬皂苷和/或川麦冬皂苷。

7、权利要求6的山麦冬皂苷包括短葶麦冬总皂苷、短葶麦冬皂苷C；川麦冬皂苷包括川麦冬总皂苷、麦冬皂苷D。

8、权利要求1制备防治血栓疾病药物，包括药用有效量的鲁斯可皂苷元和/或鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷与药用载体。

## 鲁斯可皂苷元及其皂苷在制备防治血栓疾病药物中的应用

### 技术领域

本发明涉及源于中药的鲁斯可皂苷元及其皂苷在制备防治血栓疾病药物中的应用,具体为鲁斯可皂苷元及麦冬皂苷在制备防治静脉血栓疾病药物中的应用。

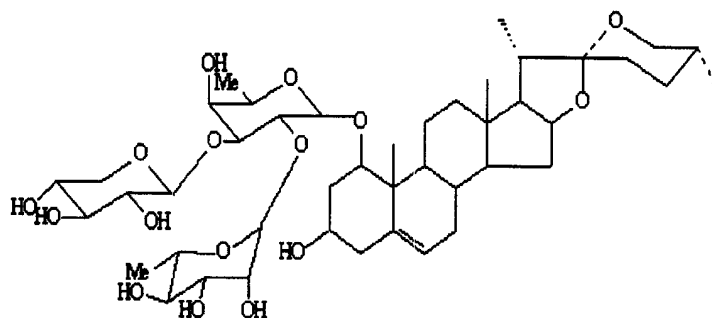
### 技术背景

血栓疾病是一种常见病、多发病,临床尤以静脉血栓疾病为常见,下肢及盆腔为其好发部位。下肢深静脉血栓(简称DVT)形成急性期表现为患肢疼痛、肿胀、浅静脉曲张,慢性期表现为一系列的综合症,如肢体肿胀、足靴区色素沉着、溃疡形成、下肢深静脉瓣膜功能不全、浅表性皮炎及纤维化所致硬结等,严重者可致坏疽而丧失劳动能力,更甚者可因栓子脱落而致肺栓塞性猝死。有报道美国每年平均有25~50万人患深静脉血栓性疾病,而因该病所导致的死亡率高达20%,仅次于肿瘤和心脏病。据流行病学调查,我国深静脉血栓形成患者亦为常见,发病率高达8.3%,且有逐年上升的趋势。因此加强预防和治疗DVT药物的开发具有重要意义。华法令为防治DVT的有效药物之一,以其服用方便的特点而为临床所常用,其抗血栓作用的机制是拮抗维生素K由环氧化物向氢醌型的转化,因而阻止维生素K的利用,抑制肝凝血酶原及凝血因子Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ的生成,从而产生抗凝作用而达到抗血栓的目的。但本品作用缓慢,同时易引起皮肤黏膜、胃肠道、泌尿生殖道等部位的自发性出血。故开发安全有效、服用方便的治疗血栓性疾病的药物显得迫切。

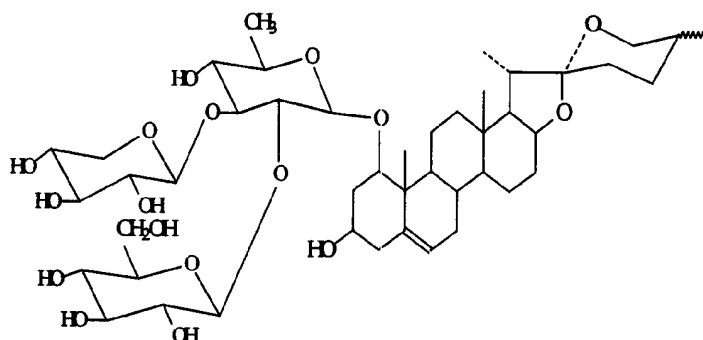
麦冬主要包括两大类,即麦冬和山麦冬,而临床常用的麦冬类中的川麦冬为百合科沿阶草属植物 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. 的块根,山麦冬类中的 为百合科山麦冬属植物 *Liriope muscari* (LM) 的肉质块根及须根,包括短葶山麦冬或湖北麦冬。麦冬和山麦冬皆为2000版《中国药典》所收载。其味甘、微苦,味微寒,具有养阴润肺、益胃生津、清心除烦之功效。现代研究表明:麦冬含有多种沿阶草甾体皂苷、多种类型的多聚糖、高异黄酮类化合物及单萜糖苷等,具有改善心肌收缩力、增强免疫的药理活性。已知的皂

苷类成分有：

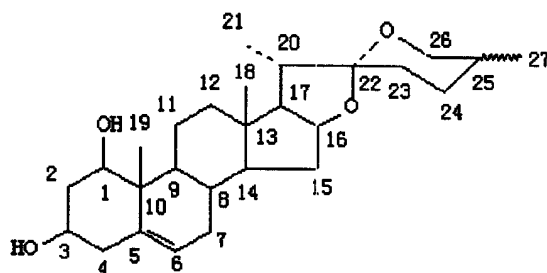
麦冬皂苷 D [ (25R) ruscogenin 1-O-[  $\alpha$  -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)][  $\beta$  -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)]-  $\beta$  -D-fucopyranoside]



LM-C Ruscogenin Fucopyranoside 的结构为 25(R, S) ruscogenin 1-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)][  $\beta$ -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)]-  $\beta$ -D-fucopyranoside。结构式如下：



鲁斯可苷元：25 (R, S) ruscogenin



## 发明内容

本发明要解决的技术问题是寻找和研究源于中药的能有效防治血栓疾病尤其是静脉血栓疾病的有效部位和有效成分，其应疗效好，毒副作用少，临床使用安全，且标本兼治，能与各种药用辅料和/或其它药物组配，适宜开发成各种现代药物剂型。

为解决上述问题，本发明提供如下技术方案：

鲁斯可皂苷元和/或鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷在制备防治血栓疾病药物中的应用。所述血栓疾病包括深静脉血栓、慢性静脉功能不全和/或血栓栓塞性疾病。

所述鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷，包括在 C1 位或 C3 位上连接岩藻糖或葡萄糖形成的苷；其糖链为在 C1 位或 C3 位连接的岩藻糖或葡萄糖后，可再与选自鼠李糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖中的糖结合，形成二糖苷、三糖苷或四糖苷。

前述鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷，包括麦冬皂苷；所述麦冬皂苷，包括山麦冬皂苷和/或川麦冬皂苷。麦冬皂苷包括短葶麦冬总皂苷、短葶麦冬皂苷 C；川麦冬皂苷包括川麦冬总皂苷、麦冬皂苷 D。

本发明制备防治血栓疾病的药物，包括药用有效量的鲁斯可皂苷元和/或鲁斯可皂苷元与糖链结合形成的苷与药用载体。

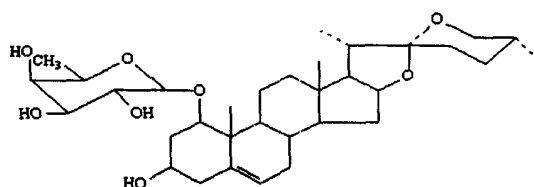
本发明实验表明鲁斯可皂苷元及其与糖链组成的各种苷疗效好、毒副作用少、临床使用安全，且标本兼治，能与各种药用辅料和/或其它药物组配，适宜开发制成各种现代药物剂型。本发明研究了源于中药麦冬的能有效防治血栓疾病尤其是静脉血栓疾病的有效成分鲁斯可皂苷元（Ruscogenin）及其与糖链组成的各种苷，其中包括短葶麦冬总皂苷（简称 LM-ts）、短葶麦冬皂苷 C（简称 LM-C）及川麦冬总皂苷（简称 CS0）、麦冬皂苷 D（又称 Ophiopogon - D）。通过研究 LM-ts、LM-C 及 CS0、麦冬皂苷 D 及鲁斯可皂苷元对静脉血栓形成的影响，为其制备治疗深静脉血栓、慢性静脉功能不全（CVI）及血栓栓塞性疾病的药物提供一定实验依据。LM-ts 中主要含 LM-C；CS0 中主要含麦冬皂苷 D。

本发明 LM-ts 中及 CS0 中含有的其它主要皂苷结构如下：

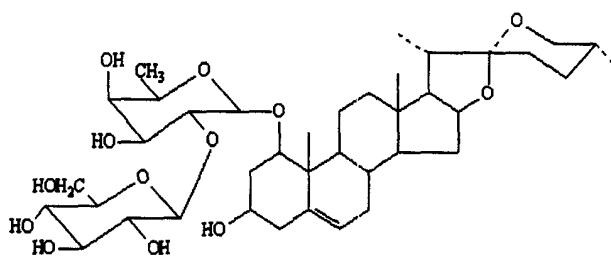
（参见：Bo-Yang Yu, Yasuaki Hirai, Junzo Shoji, Guo-jun Xu, Comparative Studies on the Constituents of Ophiopogonis Tuber and Its Congeners. VI. Studies on the Constituents of the

Subterranean Part of *liriope spicata* var. *prolifera* and *L.muscari*. Chem. Pharm. Bull.,1990,38(7):1931~1935; 余伯阳, 徐国钧, 平井康昭, 庄司顺三, 湖北麦冬与短葶山麦冬的化学成分研究(II)。中国药科大学学报, 1988, 19(4): 296 ; Takayuki Asano, Tetsuya Murayama, Yasuaki Hirai, Junzo Shoji, Comparative Studies on the Constituents of *Ophiopogonis* Tuber and Its Congeners. VIII. Studies on the Glycosides of the Subterranean part of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler cv. *Nanus*. Chem. Pharm. Bull.,1993,41(3):566~570 ; M. S. M. Rawat, D.S.Negi, M.S.Panwar, G. Pant, A spirostanol glycoside from the rhizomes of *Ophiopogon intermedius*. Phytochemistry, 1988, 27(10): 3326~3327)

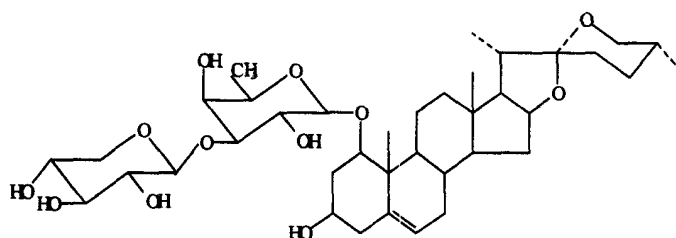
1、(25R)ruscogenin 1-O-β-D-fucopyranoside



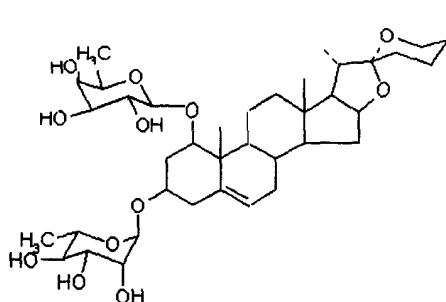
2、25(R) ruscogenin 1-O-[-D-glucopyranosyl(1→2)] β-D- fucopyranoside



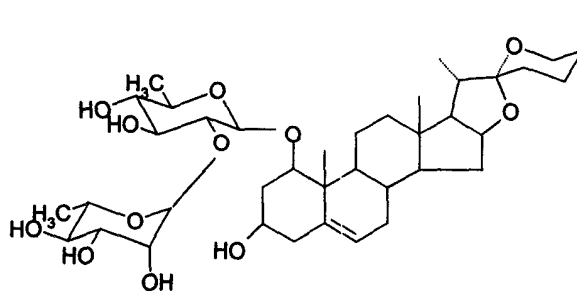
3、(25R,S) ruscogenin 1-O-[-D-xylopyranosyl(1→3)] β-D- fucopyranoside



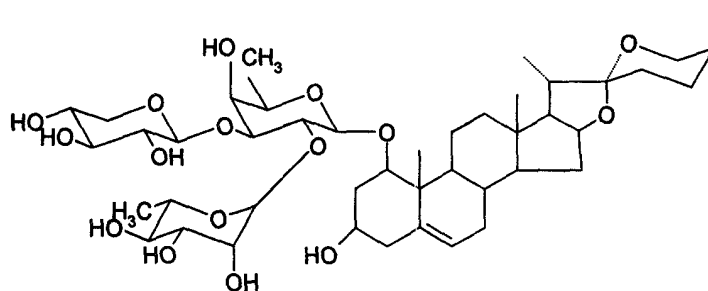
4、山麦冬皂苷 B [25 (S) ruscogenin 1-O-D-fucopyranosy-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosy]



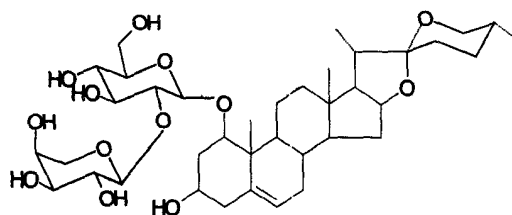
5、25(R,S) ruscogenin 1-O-[L-rhamnopyranosy (1→2)] β-D- fucopyranoside



6、25(S) ruscogenin 1-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosy(1→2)][ $\beta$ -D-xylopyranosy(1→3)]- $\beta$ -D-fucopyranosy



7、25(R) ruscogenin 1-O-[-L-arabinosy(1→2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside



本发明中的单体成分及其部位提取物在制备防治血栓疾病药物时,可以另外加入其它天然成分或组分,所包括的天然成分或组分没有特殊的限制, 首选有改善微循环、减轻炎症作用的三七、当归、丹参、人参、黄芪、山楂、灯盏花及黄花倒水莲等中药及其有效成分, 这些植物药的形态可以是提取的浸膏、精油、粉末等, 并无特殊的限制。

本发明单体成分及有效部位提取物可以制成各种形式的药品。

本发明的药品只要含有的单体成分及其部位提取物即可, 没有特殊限制, 例如其形态可以是溶液、混悬液、粉末、固体成型物等中的任何一种, 其剂型可以为片剂、胶囊、散剂、颗粒剂及注射剂等, 其也可与其它药品合并使用。

## 具体实施方式

### 实施例 1

#### 鲁斯可皂苷元及其皂苷的制备方法

##### 1. 山麦冬总皂苷

取山麦冬(短萼山麦冬或湖北麦冬)干燥须根 2kg, 浸泡 1h, 煎煮 3 次, 每次 1h, 合并煎煮液, 静止沉淀, 取上清液, 将其过大孔树脂, 先用蒸馏水冲洗, 洗出物弃去, 再用 40% 乙醇冲洗, 洗出物弃去(经检测不含皂苷类成分), 后用 80%乙醇冲洗, 洗出物浓缩蒸干, 即山麦冬总皂苷(其中短萼麦冬总皂苷简称 LM-ts)。

##### 2. 短萼麦冬皂苷 C (LM-C) 及鲁斯可皂苷元

短萼山麦冬须根 7.0kg, 95%乙醇冷浸 1 月, 乙醇渗漉 3 次, 合并, 浓缩至浸膏状乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 浓缩, 拌样, 分别用石油醚、甲醇索氏提取, 硅胶柱层析, 分离得到鲁斯可皂苷元和 LM-C (Boyang Yu, Yasuiaki, Junzo Sholi, et al. Comparative studies on the constituents of *Ophiopogonis tuber* and its congeners.<sup>√</sup> . Studies on the constituents of the



subterranean part of *Liriope spicata* var. *prolifer* and *L. muscari* (1). *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38(7): 1931-1935).

### 3. CSO、麦冬皂苷 D、鲁斯可皂苷元

麦冬块根 50kg, 热水浸泡提取 2 次, 合并浓缩, 分级醇沉, 过滤, 浓缩至无醇味, 过 D101 大孔树脂, 分别用水, 30% 及 75% 乙醇洗脱, 后者浓缩得到 CSO。CSO 浸膏经硅胶柱层析, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 分别得到麦冬皂苷 D 和鲁斯可皂苷元 (Akihiro Tada, Junzo Shoji. *Studies on the constituents of Ophiopogonis tuber*. © . On the structure of Ophiopogonin D. *Chem. Pharm. Bull.* 1973, 21(2): 308-301)。

## 实施例 2 鲁斯可皂苷元及其皂苷剂型的制法

### 1. 胶囊剂制法

#### 处方组成

CSO	50.0 g	淀粉	47.5 g	微晶纤维素	95.5 g
5% 淀粉浆	适量	滑石粉	2.0 g	制成胶囊	1000 粒

#### 制备工艺

取麦冬总皂苷粉碎成细粉, 加辅料混匀, 制成颗粒, 干燥, 装入胶囊, 质检包装即得。

### 2. 片剂制法

#### 处方组成

LM-C	20g	淀粉	400g	淀粉浆 (8%)	适量	硬脂酸镁	适量
制成 1000 片							

#### 制备工艺

取 LM-C 与淀粉混匀, 用 8% 的淀粉浆做粘合剂, 制成软材, 过 12~14 目筛制粒, 70~80℃ 干燥, 制粒, 加硬脂酸镁混合后压片, 质检包装即得成品。

### 3. 注射剂制法

## 处方组成

LM-C 2g       $\beta$ -CYD 5.0g      注射用水      制成 1000ml

## 制备工艺

先将  $\beta$ -CYD 溶于适量注射用水，配成 10% 的溶液，再将 LM-C 加入，搅拌以充分溶解，然后加入注射用水至适量，调节 pH 值，再加水至足量，搅匀，过滤分装于中性玻璃容器中，用流通蒸汽 100℃ 30 分钟灭菌。

## 实施例 3 鲁斯可皂苷元及其皂苷的抗血栓活性研究

### 1 实验材料

#### 1.1 药品与试剂

LM-ts, CS0, 麦冬皂苷 D, LM-C, 鲁斯可皂苷元，纯度均在 80% 以上。阿司匹林肠溶片（简称 ASA，，南京恒生制药厂，批号 030304）；角叉菜胶（Carrageenan, Type I, Sigma, C1013）；华法林钠片（Warfarin, 上海九福药业有限公司，批号：030601）。

#### 1.2 实验动物

昆明系小鼠，雄性，18~22 g 及 25~30g；ICR 系小鼠，雄性 25~30g，由中国药科大学新中新药研究中心动物室提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 对下腔静脉血栓形成的影响

#### 2.1.1 CS0 对小鼠下腔静脉血栓形成的影响

雄性昆明系小鼠 50 只，25~30g，禁食 12h，分为 5 组，每组 10 只，分别灌胃给予等容量 NS、华法令 2mg/kg（手术前 18 小时给药）、CS0 6.25、12.5、25mg/kg。给药后 1h，小鼠腹腔注射 3.5% 水合氯醛溶液（0.1ml/10g）麻醉仰卧固定，于腹正中线切开皮肤约 1.5cm，从腹白线切开腹膜，分离下腔静脉，于左肾静脉下方用粗丝线结扎下腔静脉，缝合腹膜。6h 后重新打开腹腔，在结扎线下方 2cm 处用止血钳夹住血管，剪断取出该段血管，观察有无血栓形成，若已形成，将血栓取出放入烘箱内，60℃ 干燥 24h 后称重。结果见表 1，CS0 可剂量依赖性抑制下腔静脉结扎所致小鼠静脉血栓形成，经计算其 ED<sub>50</sub> 为 15 mg/kg。

表 1 CSO 对小鼠下腔静脉血栓形成的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=18$ )

组别	剂量 (mg/kg)	血栓干重 (mg)	抑制率 (%)
模型		1.69±0.74	
华法令	2.00	0.66±0.41**	59.42
CSO	6.25	1.20±0.52	25.79
	12.5	1.03±0.53*	36.02
	25.0	0.48±0.24**	70.61

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  与模型组比较

## 2.1.2 CSO 对大鼠下腔静脉血栓形成的影响

雄性 SD 大鼠, 36 只, 280~340g, 禁食 12h 后, 分为 6 组, 每组 6 只, 分别为正常组、假手术组及模型组(均灌胃给予等容量 NS), 华法令 1mg/kg 组(手术前 18h 给药), CSO12.5、25mg/kg 组, 给药后 1h, 同 2.1.1 操作, 麻醉固定, 手术后 24h, 取出血栓烘干称重。结果见表 2, CSO12.5、25mg/kg 可显著或极显著抑制下腔静脉结扎所致大鼠静脉血栓形成。

表 2 CSO 对大鼠下腔静脉血栓形成的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	剂 量 (mg/kg)	血栓干重 (mg)	抑制率 (%)
模型		29.2±0.74	
华法令	1.00	3.3±0.41**	88.71
CSO	12.5	17.1±0.5*	41.42
	25.0	7.3±0.53**	75.03

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  与模型组比较

## 2.1.3 LM-ts 及 LM-C 对小鼠下腔静脉血栓形成的影响

雄性 ICR 系小鼠 32 只, 按体重随机分为 4 组, 每组 8 只, 分别为空白对照组、LM-ts 20mg/kg 组、阳性药 ASA 20mg/kg 组、LM-C 10mg/kg 组。灌胃给药 1h 后, 同 2.1.1 操作, 造模观察。由表 3 可见, LM-ts、LM-C 具有明显的抗血栓作用, 与空白组对照比较有显著性差异。

表3 LM-ts、LM-C 对小鼠下腔静脉血栓形成的影响( $\bar{x} \pm s$ , n= 18)

组别	剂量 (mg/kg)	血栓干重 (mg)	抑制率 (%)
模型		0.91±0.57	
ASA	20.0	0.76±0.77	16.48
LM-ts	20.0	0.35±0.30*	61.53
LM-C	10.0	0.21±0.31*	76.92

\* $P<0.05$  与模型组比较

2.1.4 麦冬皂苷类单体成分对小鼠下腔静脉血栓形成的影响

雄性 ICR 小鼠 100 只，禁食 12h，分为 10 组，每组 10 只，分别灌胃给予等容量 NS，华法令 2mg/kg（手术前 22h 给药），麦冬皂苷 D 0.5、1、2mM/kg， LM-C 0.5、1、2mM/kg 以及 Ruscogenin 0.5、1、2mM/kg，给药 1h 后，同 2.1.1 操作，造模观察。结果见表 4，几种单体成分均可显著或极显著抑制小鼠静脉血栓形成，其  $ED_{50}$  分别为：Ruscogenin2.95 mM/kg，Ophiopogon - D 1.49 mM/kg，LM-C 1.69 mM/kg。

实验表明鲁斯可皂苷元母核为抑制血栓形成的重要活性结构，糖链有促进活性作用。

表4 麦冬皂苷类单体成分对小鼠下腔静脉血栓形成的影响( $\bar{x} \pm s$ , n= 18)

组别	剂量 (mM/kg)	血栓干重 (mg)	抑制率 (%)	$ED_{50}$ (mM/kg)
模型		1.11±0.51		
华法令	2.0mg/kg	0.50±0.19	53.26	
ruscogenin	0.5	1.06±0.24	4.64	
	1.0	0.86±0.48	22.11	2.95
	2.0	0.62±0.38**	43.11	
ophiopogon-D	0.5	0.82±0.49	25.07	
	1.0	0.55±0.29**	48.91	1.49
	2.0	0.51±0.19**	52.48	
LM-C	0.5	0.83±0.81	24.24	
	1.0	0.63±0.34*	42.17	1.69
	2.0	0.42±0.22**	60.43	

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  与模型组比较

2.2 对角叉菜胶致小鼠尾血栓形成的影响

2.2.1 CSO 对角叉菜胶致小鼠尾血栓形成的影响

雄性昆明系小鼠 40 只，禁食 12h，分为 4 组，每组 10 只，分别灌胃给予等容量 NS，ASA 50mg/kg，CSO12.5、25mg/kg，给药后 1h，小鼠右后足跖皮下注射 2%角叉菜胶悬液 10μl。24h 后，小鼠尾部出现淤血，变黑，形成暗红色血栓区，并维持至 72 h。分别于注射后 24h、48h、72 h 观察各组小鼠尾部血栓形成情况。结果由表 5 可见，CSO25、50 mg/kg 可显著或极显著缩短角叉菜胶引起尾血栓长度，与阳性药作用相当。

表 5 CSO 对对角叉菜胶致小鼠尾血栓形成的影响( $\bar{x} \pm s$ , n= 10).

组别	剂 量 (mg/kg)	血 栓 长 度 (cm)		
		24h	48h	72h
模		4.26±2.12	5.20±2.13	4.95±2.28
型	50.0	2.43±1.44	2.33±1.54**	2.24±1.44*
ASA	12.5	2.67±0.89	2.48±0.94**	2.35±1.06*
CSO	25.0	2.46±1.21	1.98±1.02**	2.20±1.13**

\*P<0.05, \*\*P<0.01 与模型组比较

2.2.2 LM-ts 及 LM-C 对角叉菜胶致小鼠尾血栓形成的影响

取雄性 ICR 小鼠 32 只，按体重随机均分为 4 组，每组 8 只，分别为空白对照组、LM-ts 20mg/kg 组、阳性药 ASA 20mg/kg 组、LM-C 10mg/kg 组。灌胃给药 1h 后，同 2.2.1 造模观察。结果由表 6 可见，LM-ts、LM-C 具有明显抗血栓作用，与空白组对照，具有显著性差异。

表 6 LM-ts, LM-C 对对角叉菜胶致小鼠尾血栓形成的影响( $\bar{x} \pm s$ , n= 10).

组别	剂 量 (mg/kg)	血 栓 长 度 (cm)	
		24h	48h
模型		3.74±1.10	3.79±1.18
ASA	20.0	3.76±0.79	4.00±1.01
LM-ts	20.0	1.98±1.49	2.31±1.47*
LM-C	10.0	2.02±1.40*	2.04±0.88*

\*P<0.05 与模型组比较