



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94193092.0

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

A61K 35/78

[43]公开日 1996年8月21日

[22]申请日 94.7.28

[30]优先权

[32]93.7.29 [33]DE[31]P4325532.9

[86]国际申请 PCT/EP94/02497 94.7.28

[87]国际公布 WO95/03816 英 95.2.9

[85]进入国家阶段日期 96.2.15

[71]申请人 威廉施瓦布博士有限公司

地址 联邦德国卡尔斯鲁厄

[72]发明人 S·S·查特杰

H·E·W·加吉

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 张元忠

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 山楂的制剂、药用组合物及其预防由心动停止引起的突然死亡和再灌注引起的心血管损伤的用途

[57]摘要

描述了制备合适的山楂叶和花的总提取物以及所述总提取物的三个新的部分及其作为预防由心动停止引起的突然死亡和再灌注引起的心血管伤和其它再灌注引起的威胁生命的病理疾病的药物组合物的用途。

## 权 利 要 求 书

---

1. 可由山楂用 45% (重量) 乙醇在 60°C 温度下提取山楂带花叶并经截止限为 3000 道尔顿的膜滤器超滤所获得的提取物(部分(a))来获得的制剂 (b)。

2. 可由山楂用 45% (重量) 乙醇在 60°C 温度下提取山楂带花叶并通过在丁醇/水中对获得的总提取物(部分(a))进行液—液分布而分离低分子量化合物来获得的制剂 (c)。

3. 可由山楂用 45% (重量) 乙醇在 60°C 温度下提取山楂带花叶并将由此获得的总提取物(部分(a))经凝胶过滤分离类黄酮和原花色素来获得的制剂 (d)。

4. 可由山楂用 45% (重量) 乙醇在 60°C 下提取山楂带花叶并将存在于由此获得的总提取物(部分(a))中的类黄酮和原花青素吸附在能与这些成分结合的吸附剂上来获得的制剂 (d)。

5. 药用组合物, 其特征在于含有按权利要求 1 到 4 任一制剂。

6. 权利要求 5 的药用组合物, 用于预防由心动停止引起的突然死亡和再灌注引起的心血管损伤和其它再灌注引起的威胁生命的病理疾病。

7. 通过水、丙酮、C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub> 烷醇或水和可与所述水混合的有机溶剂的混合物提取山楂带花叶获得的总提取物用来预防由心动停止引起的突然死亡和再灌注引起的心血管疾病和其它再灌注引起的威胁生命的病理疾病的用途。

# 说 明 书

---

## 山楂的制剂、药用组合物及其 预防由心动停止引起的突然死亡和 再灌注引起的心血管损伤的用途

许多临床研究表明山楂种的叶和花和/或果实的提取物对心功能减退病人的治疗是有益的。多年的治疗经验也表明此提取物在不稳定功能性—植物性心绞痛以及轻度心动过缓性心律失常情况下的治疗作用。这些发现使 Commission E of the German Health Authorities [Kommission E beim deutschen Bundesgesundheitsamt] 公布了具有下列适应症的专题文章 (见 official Federal Gazette [Bundesanzeiger] dated 03. 01. 1984)。

与 NYHA I 到 II 阶段相对应的心功能减退；血压敏感和心区狭窄，还不需要洋地黄治疗的老年心脏早衰和轻度心动过缓心律失常。

直到目前，通常因山楂提取物中存在有类黄酮和低聚原花青素来解释这些山楂提取物的已知的有益治疗作用以及药代动力学作用谱。所以，药物制剂按这些成分来标准化。这些已知的山楂提取物之一 (WS 1442) 大约含有 18.5—19.5% 的低聚原花青素 (Oligomeric Procyanidin)。

用实验诱导局部缺血的大鼠，在动物上进行试验，获得了本发明意外的发现。这些发现是，通过用水混合物和与水混溶的有机溶

剂如乙醇提取获得的合适山楂植物种带花叶的提取物 a) 在心肌缺血和再灌注诱导的威胁生命的心血损伤具有心脏保护作用, (b) 而目前已知的山楂提取物的活性物质不产生这些作用; 合适的山楂植物种如单于山楂 (*Crataegus monogyna* TAQUIN emend. LINDMAN), *Crataegus laevigata* (POIRET) DE CANDOLLE syn. 欧洲产山楂 (*Crataegus oxyacantha* L. P. P. et duct. ), *Crataegus azarolus* L. , *Crataegus nigra* WALDSTEIN et KITAIBEL 和五蕊山楂 (*Crataegus pentagyna* WALDSTEIN et KITAIBEL ex WILLDENOW)。

由山楂提取物(下文称作部分(a))的这些作用会推断出山楂提取物在预防和治疗短期心缺血(心脏循环障碍)、再灌注引起的心损伤和由于心动停止的突然死亡以及其它由病理疾病引起的其它威胁生命的再灌注方面的治疗用途。

用三个新的山楂提取物部分进行的试验表明: 山楂提取物特有的活性成分的分子量大于 3000 道尔顿。仍不知道该成分的结构。

试验物:

部分(a) 单于山楂、*laevigata* 山楂、*azarolus* 山楂、*nigra* 山楂和五蕊山楂的带花叶的总提取物, 是用 45% (重量) 乙醇在 60°C 温度下提取得到的, 含有 18.5 到 19.5% 低聚原花青素;

部分(b) 分子量大于 3000 道尔顿的化合物部分, 是用截止限 3000 道尔顿的膜过滤器对部分(a) 进行超滤而获得的;

部分(c), 通过部分(a) 在丁醇/水中液-液分布法(逆流萃取)获得的;

部分(d) 从部分(a) 中用吸附剂吸附除去类黄酮和原花色素(Proanthocyanidins) 而获得的, 该吸附剂可与这些化合物结合, 特别

是羟丙基化的多聚葡聚糖、聚酰胺、氧化铝或活性炭。

#### 试验方法：

我们使用 Selye (H. Selge 等, *Angiology* 11 (1960), 398—407) 所描述的方法, 该方法使用体重为 250—350g 的雄性 Sprayue—Dawley 大鼠并用戊巴比妥麻醉。通过冠状动脉结扎来引起心缺血并在缺血 7 分钟后再打开结扎口来开始再灌注。缺血前及期间以及再灌注后测量动物血压和心率; 我们也测定了再灌注期间心律失常的期限和类型。在这样的试验条件下, 大约 50% 的对照组动物在 15 分钟的再灌注期内死亡。这种死亡的原因是低血压危象和再灌注后诱导和立即产生的心室纤颤。所以, 这种药理模型适于试验药物的效能, 该药物可预防或对心动停止或心血管损伤引起的再灌注引起的突然死亡具有有益的作用。

#### 试验结果：

在该模型中, 山楂总提取物 (即部分 (a)) 和部分 (b)、(c) 和 (d) 被调查。在第一个试验系列中, 以 100mg/kg/天的剂量灌胃给予总提取物, 共 6 天, 在第 7 天, 口服给予动物 50mg/kg 剂量的药物, 在 1 小时后进行试验。

在表 I 和图 1 中概述了用总提取物治疗的动物和仅用溶剂治疗的对照组动物的试验结果。图 1 显示对照组 (n=8) 和山楂提取物治疗组 (n=16) 中存活动物的平均血压 (mmHg  $\pm$  标准差)。这些试验结果表明给予山楂总提取物保护动物对抗由短时间缺血和再灌注诱导的心律失常, 对抗低血压危象对生命的威胁和死亡的可能。

#### 表 I

组别	纤颤		心动过速		死亡率
	出现率 (%)	期限 (秒)	出现率 (%)	期限 (秒)	(%)
对照组	100	27.8+	100	47.1+	50
		5.37		6.74	
部分 (a)	0	0	62	20.0+	4.56
				0	

另外的试验中，以不同的剂量并按不同的治疗方案来研究部分(a)。在表 II 中概述了试验结果。

表 II

剂量 (mg/ kg)	治疗方案	死亡率	保护对抗	
			心律失常	从血压衰竭
100	日剂量，共 6 天 + 50mg/kg 试验前 1 小 时	+++	+++	+++
100	前 1 天给药 + 50mg/ kg 试验前 1 小时	++	+++	—
100	前 1 天给药 + 100mg/kg 试验前 1 小时	+++	+++	+
100	试验前 1 小时	+	++	—
50	试验前 1 小时	+	+	—
25	试验前 1 小时	—	—	—

100	试验前 4 小时	+	++	-
100	试验前 8 小时	-	+	-

这些试验结果表明部分 (a) 对抗心缺血和再灌注诱导的损伤的最大效果仅在长期给予部分 (a) 后产生并预计在给予  $2 \times 100\text{mg/kg}$  部分 (a) (1 天 + 缺血前 1 小时) 后仅有短时间持续而可靠的保护作用。

在以下不同剂量在试验开始前 15 分钟静脉给予部分 (a) 的试验中, 可确定部分 (a) 没有确定的作用。

以类似的方法, 用相对于总提取物各自产量的充足剂量, 试验所述的部分。

表 III

比较总提取物的作用和各部分的作用

部分 (剂量)	死亡率	保护对抗	
		心律失常	低血压兔
部分 (a) (100mg/kg)	+++	+++	+
部分 (b) 超滤所得分子量大于 3000 道尔顿的成分 (20mg/kg)	+++	+++	++
部分 (c) 超滤的滤液中得到 的分子量小于 3000 道尔顿 的部分 (80mg/kg)	++	+	-
部分 (d) 不含类黄酮和原 花色素 (50mg/kg)	+++	+++	++

表 III 中部分效果的比较清楚地表明效果最好的是含较高分子量物质的提取物部分，并且类黄酮或低聚原花青素（直到现在仍认为是山楂提取物的有效成分）的存在不是必需的。

因此，本发明用于预防和治疗因再灌注而引起的心血管损伤，预防因心动停止引起的突然死亡以及其它由再灌注引起的威胁生命的病理疾病的优选的药用组合物含有足够量的非类黄酮聚合化合物的山楂部分，该山楂部分含有大量的这些活性物质。

根据本发明，按下文所述方法来制备

a) 用水、丙酮、C<sub>1-4</sub>烷醇混合物或水和所述的可与水混合的有机溶剂混合物（优选 45%（重量）乙醇）提取粉碎的植物材料（部分 (a)）；

b) 通过用具有截止限（cut-off limit）为 3000 道尔顿的合适滤膜超滤而从部分 (a) 中分去低分子量化合物（部分 (b)）；

c) 部分 (a) 在丁醇/水中液-液分布获得部分 (c)；

d) 利用分子筛孔效应，用多聚葡聚糖或其它适于分离的凝胶对部分 (a) 进行凝胶过滤，分去类黄酮和原花色素及其它低分子量化合物（部分 (d)）。

为了预防和治疗由再灌注引起的心血管损伤和为了预防因心动停止而引起的突然死亡，可在所有口服给药的药物剂型中使用部分 (a)、(b)、(c) 和 (d)，优选部分 (b)，口服剂型如包衣片、片剂、胶囊、溶液。为了制备这些药物制剂，可以常规方法使用载体如乳糖、淀粉、微晶纤维素、硬脂酸镁和滑石或水、醇、聚乙二醇、甘油酯来配制各部分。防腐剂、润滑剂、润湿剂、乳化剂、着色剂、矫味剂和芳香剂可被用作添加剂。



所给的日剂量为 50 到 500mg 的山楂总提取物 (部分 (a)); 在富含活性物质部分 (部分 (b), (c) 和 (d)) 的药物制剂中, 可相应地减小剂量。

实施例说明制备各部分优选的方法。

实施例 1:

将 100kg 干燥山楂叶和花 (购得的混合物含约 77% 的单子山楂、约 2% *Laevigata* 山楂、约 4% *azarolus* 山楂、约 16% *nigra* 山楂和约 1% 五蕊山楂) 经研磨粉碎并在 60°C 温度下用 1000kg 45% (重量) 的乙醇水溶液在 Dispax Generator<sup>®</sup> 中旋涡提取 1 小时。经连续离心法分离提取物。以相同方式, 用 1000kg 45% (重量) 乙醇水溶液在 60°C 温度下再一次提取植物材料 1 小时。在约 400mbar 压力下和 80°C 温度下浓缩合并的提取溶液, 60°C 和 5—10mbar 下, 在真空柜式干燥器中干燥浓缩的提取物。

总提取物 (部分 (a)) 的产量:

按干燥山楂带花叶计算为 20%。该提取含有约 18.75% 的低聚原花青素。

实施例 2

将 200g 山楂带花叶 (约 63% 单子山楂、约 3% *lacvigata* 山楂、约 9% *azarolus* 山楂和约 25% *nigra*/五蕊山楂的混合物) 经研磨粉碎并在搅拌下和回流体系中用 2 升 40% (重量) 丙酮提取 1 小时。分出提取液后, 在搅拌下和回流体系中用 2 升 40% (重量) 丙酮将残渣再一次提取 30 分钟。在 60°C 浴温和 520—20mbar 压力下, 将合并的提取溶液浓缩至干。

产量: 65.6g 干燥提取物部分 (a), 按干燥山楂带花叶计算为

32.8%。

### 实施例 3:

将 20g 按实施例 2 用 40% 丙酮水溶液由山楂带花叶制备的提取物加到搅拌的 70℃ 温度下的 400ml 水中。加入 10g 活性炭后, 将混合物搅拌 1 小时。经滤层滤去活性炭和未溶解的提取物成分。在 60℃ 浴温和 80—20mbar 压力下, 将滤液浓缩至干。

产量: 8.8g 物质部分 (a), 按山楂提取物计算为 44%。

实施例 4: 将 85kg 干燥的山楂带花叶 (约 76% 单于山楂、约 5% *Laevigata* 山楂和约 19% *nigra* 山楂的混合物) 经研磨粉碎并在循环提取器中与 600kg 甲醇在 60℃ 下加热 3 小时, 然后分出提取液。在 60℃ 和 200—260mbar 压力下浓缩提取液并在 60℃ 和 20mbar 压力下, 在真空柜式干燥器中干燥。

产量: 12.75kg 干提取物部分 (a), 按干燥山楂带花叶计算为 15%。

### 实施例 5:

将 200g 山楂带花叶 (约 63% 单于山楂、约 3% *laevigata* 山楂、约 9% *azarolus* 山楂和约 25% *nigra*/五蕊山楂的混合物) 经研磨粉碎并注入 2 升煮沸软化水, 在带叶片的分散装置提取 15 分钟。经纤维素滤层过滤, 滤出提取液。用 2 升煮沸软化水再一次旋涡提取植物残渣 15 分钟。也用纤维素滤床过滤来从第二次提取中滤出提取液。合并提取液并在 60℃ 浴温和 50mbr 压力下在旋转蒸发器中浓缩至干。

产量: 52g 部分 (a), 按干燥的山楂叶和花计算为 26%。

### 实施例 6

将 20g 按实施例 1 从山楂带花叶中得到的提取物搅拌下加到

50ml 45% (体积) 乙醇中并装到含 200g 混悬在 45% 乙醇中的交联聚乙烯吡咯烷酮的柱中。将流速调至每 8 分钟 40ml。通过馏分收集器的方法, 分别以 40ml 来收集馏分。合并含物质的第一馏分并在 60℃ 浴温和 120—50mbar 压力下在旋转蒸发器中浓缩至干。

产量: 8.9g 活性成分浓缩物 (不含类黄酮化合物和原花青素), 按提取物计算为 44.5%。

#### 实施例 7

将 6.65g 按实施例 2 用 40% (重量) 丙酮水溶液由山楂带花叶制备的提取物分散在 20ml 加热到 50℃ 的软化水中并用超声处理。将由此获得的溶液装在由 100g 亲水交联葡聚糖 (Sephadex G—25 medium<sup>®</sup>) 在水中的凝胶床上 (高 57cm, 直径 2.8cm)。合并开始的 240ml 含物质的柱洗脱液并在 60℃ 浴温和 50mbar 压力下在旋转蒸发器上浓缩至干。

产量: 0.13g 残渣 (不含类黄酮化合物和原花青素), 按提取物计算为 1.95%。

#### 实施例 8

将 80g 按实施例 1 制备的总提取物用 1.2 升 50% (体积) 乙醇在 40℃ 温度下搅拌 15 分钟, 离心提取物中未溶解的成分, 经多孔玻璃 D<sub>3</sub> 过滤上清液。将该溶液在 2.5bar 压力下经螺旋形再生纤维素超滤筒 (Amicon<sup>®</sup> Siral—wound ultrafiltration Cartridge type S<sub>1</sub>Y<sub>3</sub>) 超滤, 该超滤筒的截止限为 3000 道尔顿。将滞留的溶液浓缩到 400ml 并用 700ml 50% (体积) 乙醇洗涤四次。移出由此获得的 200ml 滞留液, 并用 1 升 70% (体积) 乙醇漂洗超滤筒。在 60℃ 和 40mbar 下, 在旋转蒸发器上将滞留液和漂洗液浓缩至约 200ml, 由此蒸去乙醇。

将浓缩液深度冷冻在 $-40^{\circ}\text{C}$ 下的乙醇/干冰浴中并在 $0.22\text{mbar}$ 下冷冻干燥。

产量：15.35g 部分 (b)，按总提取物计算为 19.19%

### 实施例 9

a) 将 100g 按实施例 1 制备的总提取物溶于加热到 $50^{\circ}\text{C}$ 的 1 升软化水中。冷却到室温后，每次以 400ml 水饱和的正丁醇，将水溶液提取 5 次。贮存水相并进行步骤 b)。合并丁醇相。此后用 500ml 软化水再一次洗涤所获得的正丁醇溶液。贮存水溶液并进行步骤 b)。

在 $60^{\circ}\text{C}/30\text{mbar}$ 下，真空浓缩丁醇溶液，加水蒸去正丁醇。在 $60^{\circ}\text{C}/17\text{mbar}$ 下真空干燥残渣。

最终正丁醇部分的重量：29.5g。

b) 将步骤 a) 中获得的水相以及再一次洗涤丁醇溶液获得的水溶液在 $60^{\circ}\text{C}/55\text{mbar}$ 下真空浓缩并经 $17\text{mbar}$ 下蒸发而减少。最后在 $60^{\circ}\text{C}/20\text{mbar}$ 下用真空柜式干燥器干燥，而由水相产生 71.4g 部分 (c) 残渣，按总提取物计算为 71.4%。

按实施例 10 描述的溶剂系统，采用薄层层析法，可检测正丁醇部分中的叶绿素、类黄酮化合物和部分低聚原花青素。

水相部分 (部分 (c)) 含有原花青素和作为未知活性化合物的成分。

### 实施例 10

将 50g 由山楂带花叶获得的总提取物在 $50^{\circ}\text{C}$ 温度下用 200ml 软化水搅拌。含未溶解成分的混悬液装在 1kg 混悬在水中的在直径 7.4cm 且填充高度 100cm 玻璃柱中的 Sephadex-LH20<sup>R</sup> (羟丙基化的交联多聚葡聚糖) 凝胶床上。用 5 升软化水洗脱柱。在硅胶板上

以乙酸乙酯/甲酸/乙酸/水 (体积份 100+11+11+27) 溶剂, 用薄层层析法检测洗脱液不含山楂芹菜配基型典型的黄酮甙 (Vitexin、 $\text{Vitexin}-2''-\text{O}-\text{rhamnoside}$  等) 和槲皮黄素黄酮醇甙 (Hyperoside—槲皮黄素—3—O—半乳糖甙, 芦丁=槲皮黄素—3—O—芸香糖甙等)。

合并 1 升前洗脱液后到 5 升洗脱液的馏分并在  $60^{\circ}\text{C}/20\text{mbar}$  下在旋转蒸发仪中浓缩至干。

产量: 25.36g 部分 (d), 按总提取物计算为 50.72%。

实施例 11:

含 50mg 山楂总提取物 (部分 (a)) 的片剂:

50g 部分 (a)

50g 胶体硅酸 (Aerosil<sup>R</sup>)

100g 乳糖

25g 微晶纤维素

24g 玉米淀粉

1g 硬脂酸镁

将前 5 种组分混合、制粒并在加入硬脂酸镁后在压片机中压制成 250mg 的片剂。

实施例 12:

含 50mg 山楂提取物 (部分 (b)) 的胶囊

30g 部分 (b)

120g 乳糖

50g 胶体硅酸

将各组分混合均匀并按常规方法制成填充重量为 200mg 的胶

囊。

实施例 13:

包衣片:

部分 (d)	40.00mg
微晶纤维素	100.00mg
乳糖	60.00mg
胶体硅酸	50.00mg
滑石 (片心中)	4.50mg
硬脂酸镁	0.50mg
羟丙基纤维素	12.00mg
滑石 (包衣层中)	<u>0.50mg</u>
包衣片重	约 267.50mg

实施例 14:

溶液剂

40g 部分 (c)

10g 香精

5 糖二酸钠

460g 乙醇

475g 纯水

# 说明书附图

