



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101585859 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 04

(21) 申请号 200810097677. 6

CN 101148459 A, 2008. 03. 26, 全文.

(22) 申请日 2008. 05. 22

审查员 杨轶

(73) 专利权人 昆明制药集团股份有限公司

地址 650106 云南省昆明市国家高新技术产业
业开发区科医路 166 号

(72) 发明人 朱华结 金毅 徐树光 杨兆祥
普俊学

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 张建山 逯长明

(51) Int. Cl.

C07H 17/07 (2006. 01)

A61K 31/7048 (2006. 01)

A61P 9/00 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101095956 A, 2008. 01. 02, 全文.

权利要求书 2 页 说明书 13 页

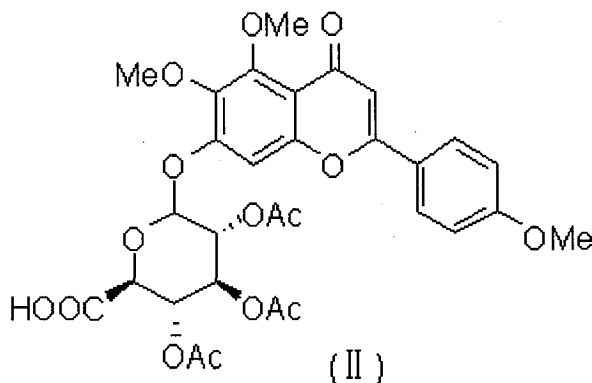
(54) 发明名称

一种新的灯盏花乙素衍生物、其制备方法及其
药物组合物

(57) 摘要

本发明公开了一种新的灯盏花乙素衍生物、
其制备方法及其药物组合物。本发明化合物可以
灯盏花素作为起始原料,经甲醚化和乙酰化两步
反应后再经分离得到,其化学名称为 4',5,6-三
甲氧基-8-(3,4,5-三乙酰基-葡萄糖醛酸)-黄芩
素。本发明化合物及其药物组合物可用于心脑血管
疾病、炎症和肿瘤的治疗,具有溶解性能好、生
物利用度高及疗效显著的优点。

1. 一种新的灯盏花乙素衍生物,其结构如式 (II) 所示:



2. 权利要求 1 所述灯盏花乙素衍生物的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

- a、将灯盏花素溶于有机溶剂中,加入甲醚化反应试剂和碱,于室温下搅拌;
- b、步骤 a 反应得到的产物经分离提取得到 4',5,6-三甲氧基灯盏花乙素;
- c、将步骤 b 得到的 4',5,6-三甲氧基灯盏花乙素溶解于有机溶剂中,加入乙酰化试剂和碱,于室温下搅拌;
- d、将步骤 c 反应得到的产物经分离提取后即得。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤 a 所述有机溶剂是 N,N-二甲基甲酰胺和二氯甲烷按体积比 10 : 0-10 : 5 得到的混合溶剂,用量为 10-100 毫升/克。

4. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤 a 中所述甲醚化反应试剂为碘甲烷,其用量按摩尔比相对于反应底物为 3-5 : 1。

5. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤 a 中所述的碱为 M_2CO_3 或 $MHCO_3$,其中 M 为 Na、K 或 Li,用量按摩尔比相对于反应底物为 3-10 : 1。

6. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤 b 具体为:步骤 a 反应得到的产物以乙酸乙酯/甲醇的体积比为 1-10 : 1 用硅胶柱分离提取得到 4',5,6-三甲氧基灯盏花乙素。

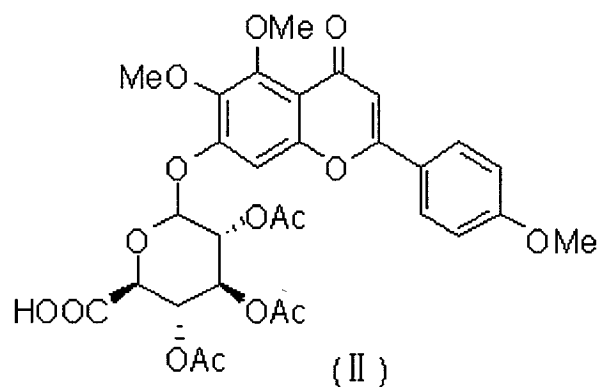
7. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤 c 所述有机溶剂是乙酸乙酯和二氯甲烷按体积比 10 : 0-10 : 5 得到的混合溶剂,其用量为 10-100 毫升/克。

8. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤 c 所述乙酰化试剂为醋酸酐或乙酰氯,用量按摩尔比相对于反应底物为 3-5 : 1。

9. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤 c 所述碱为吡啶或三乙胺或二异丙基乙基胺,用量按摩尔比相对于反应底物为 3-10 : 1。

10. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于步骤 d 具体为:将步骤 c 反应得到的产物以乙酸乙酯/石油醚按体积比为 1 : 1-10 用硅胶柱分离提取后即得。

11. 一种用于治疗心脑血管疾病的药物组合物,其特征在于以式 (II) 所述的灯盏花乙素衍生物为活性组分,



还包含药学上可接受的载体。

12. 根据权利要求 11 所述的药物组合物,其特征在於按照制剂的常规制备方法制成包括口服剂、注射制剂或鼻喷雾剂的常规制剂。

13. 权利要求 1 所述的灯盏花乙素衍生物在制备治疗心脑血管疾病的药物中的应用。

一种新的灯盏花乙素衍生物、其制备方法及其药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及灯盏花乙素衍生物,具体涉及一种新颖的灯盏花乙素衍生物,其制备方法及其含有该化合物的药物组合物,以及它们在心、脑血管疾病等方面的应用。

背景技术

[0002] 灯盏花素是从灯盏花全株植物中分离提取出的以含灯盏花乙素为主 (> 90%)、还含有少量灯盏花甲素的混合物(有效部位),灯盏花乙素又称野黄芩苷。灯盏花素具有活血化瘀、散寒解表、舒筋活络、祛风除湿之功效,临床上常用于治疗心血管疾病。目前临床中使用的灯盏花制剂,其有效成分一般都是利用乙醇和乙酸乙酯进行提取的灯盏花素制剂,灯盏花素在心脑血管疾病治疗发明已有许多文献报道。临床应用表明其具有增加脑、冠状血管血流量,降低血管阻力,抗血小板、红细胞凝聚,降低血液粘稠度等作用,疗效确切。还有大量的研究证实灯盏花素具有抗炎、抗氧化、蛋白激酶抑制剂、糖尿病、肾病、风湿类风湿等疾病的治疗作用等。灯盏花素在临床上广泛用于治疗脑血栓、脑梗塞以及类型未定的中风后瘫痪、高血压、脑栓塞、多发性神经炎、慢性蛛网膜等脑血管意外所致瘫痪以及冠心病、心绞痛、治疗痛风性关节炎等症。

[0003] 由于灯盏花乙素难溶于水,口服生物半衰期短,绝对生物利用度低,限制了它在医药领域中的应用。为了改善灯盏花乙素上述缺点以及扩大其应用范围,人们对其进行改造,旨在寻找新型的活性化合物。文献报道(Eur. J. Pharm. Sci, 2006, 29, 5, 385-393),在灯盏花乙素糖甙羧基上进行乙酯、苄酯和羟乙酰胺酯的前药合成,发现灯盏花乙素羟乙酰胺酯在缓冲溶液(PH = 4.2)和水中的溶解度比灯盏花乙素分别提高了近10倍和35倍。

[0004] 然而,现有的灯盏花乙素或其衍生物溶解性能不好,生物利用度不高,治疗效果也不够理想。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一新的灯盏花乙素衍生化合物,该化合物溶解性能好,生物利用度高,疗效确切,可用于心脑血管疾病等的预防和治疗。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种本发明新的化合物的制备方法。

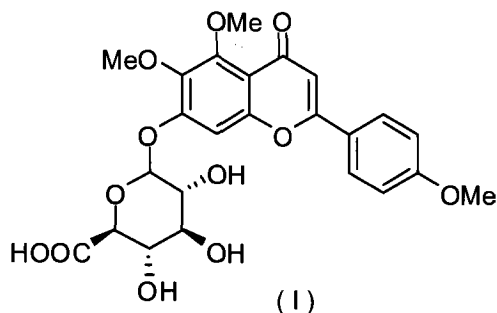
[0007] 本发明进一步的目的在于提供一种改善或治疗心脑血管、炎症和肿瘤的药物组合物。

[0008] 本发明提供了一种新的灯盏花乙素衍生化合物,在灯盏花乙素黄酮结构的酚羟基上引入甲基后,进一步在糖羟基上引入乙酰基,获得一新结构的灯盏花乙素衍生物,其化学名称为4',5,6-三甲氧基-8-(3,4,5-三乙酰基-葡萄糖醛酸)-黄芩素。

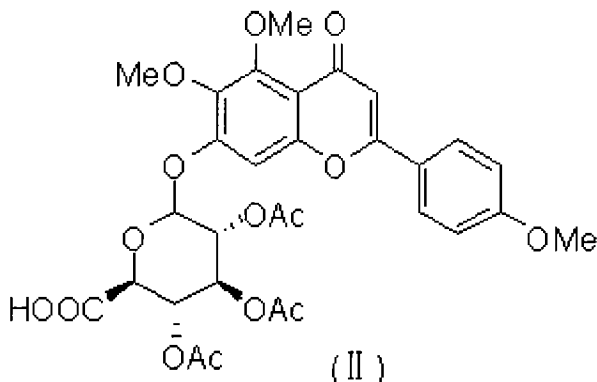
[0009] 为了描述上的便利,下文中将在灯盏花乙素黄酮结构的酚羟基上引入甲基后得到的产物4',5,6-三甲氧基灯盏花乙素简称为A1,进一步引入乙酰基后得到的产物4',5,6-三甲氧基-8-(3,4,5-三乙酰基-葡萄糖醛酸)-黄芩素简称为A2。

[0010] A1的结构用式(I)表示,A2的结构用式(II)所示。

[0011]



[0012]



[0013] 式 (II) 所示的新的灯盏花乙素衍生化合物还可以其盐的形式出现,包括与无机碱或有机碱形成的盐。

[0014] 本发明的 A2 的制备方法简便,它是用工业化植物提取原料灯盏花素作为起始原料,经过二步易于工业化的化学反应合成得到 A2。具体包括如下步骤:

[0015] a、将灯盏花素溶于有机溶剂中,加入甲醚化反应试剂和碱,于室温下搅拌;

[0016] b、步骤 a 反应得到的产物经分离提取得到 A1;

[0017] c、将 A1 溶解于有机溶剂中,加入乙酰化试剂和碱,于室温下搅拌;

[0018] d、将步骤 c 反应得到的产物经分离提取得到 A2。

[0019] 其中,步骤 a 所述有机溶剂是 DMF(N, N-二甲基甲酰胺)和二氯甲烷按体积比 10 : 0-10 : 5 得到的混合溶剂,用量为 10-100 毫升/克。混合溶剂的用量是按照每克灯盏花素所需要的混合溶剂的毫升量计算。其中用二甲亚砜(DMSO)可替代 N, N-二甲基甲酰胺(DMF),二氯乙烷可替代二氯甲烷,其它类似的替换也是可以的。

[0020] 其中,步骤 a 中所述甲醚化反应试剂优选碘甲烷,其用量按摩尔比相对于反应底物为 3-5 : 1。

[0021] 其中,步骤 a 中所述的碱为 M_2CO_3 或 $MHCO_3$,其中 M 为钠 Na, K, Li,用量按摩尔比相对于反应底物为 3-10 : 1。

[0022] 其中,步骤 b 具体为:步骤 a 反应得到的产物以乙酸乙酯/甲醇为 1-10 : 1(V/V)用硅胶柱分离提取得到 A1。

[0023] 其中,步骤 c 所述有机溶剂是乙酸乙酯和二氯甲烷按体积比 10 : 0-10 : 5 得到的混合溶剂,其用量为 10-100 毫升/克。所述混合溶剂的用量是按照每克 A1 需要的混合溶剂的毫升量来计算,其中有机溶剂可在类似的有机溶剂中选择替换。

[0024] 其中,步骤 c 所述乙酰化试剂优选醋酸酐或乙酰氯,用量按摩尔比相对于反应底物为 3-5 : 1。

[0025] 其中,步骤 c 所述碱为吡啶或三乙胺或二异丙基乙基胺,用量按摩尔比相对于反应底物为 3-10 : 1。

[0026] 其中,步骤 d 具体为:将步骤 c 反应得到的产物以乙酸乙酯 / 石油醚按体积比为 1 : 1-10 用硅胶柱分离提取得到 A2。

[0027] 上述制备 A1 的方法具有反应条件温和、成本较低、易于操作及适宜于工业化生产等优点。

[0028] 发明人采用两种与人类疾病相近的动物模型,测定多种药效学指标,综合评价 A2 对急性心脑血管缺血的影响。动物实验结果表明,A2 在实验条件下,对心肌缺血有明显保护作用,A2 高剂量组 40mg/kg 显示出了比 40mg/kg 灯盏花素片和 50mg/kg 的尼莫地平片还要好的作用。本发明化合物大剂量的使用,也没有发现该化合物的毒副作用,证明其用药安全。

[0029] 本发明还提供了含有 A2 的药物组合物,其中 A2 作为活性组分,还包含药学上可接受的载体。

[0030] 本发明的化合物 A2 和药物组合物可用于制备治疗心脑血管疾病、炎症或肿瘤的药物。

[0031] 所述药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体,如赋形剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、芳香剂、表面活性剂等。

[0032] 以 A2 作为活性组分,加入药学上常规的载体,按照制备制剂的常规方法可以制成多种剂型,如口服剂、注射制剂、鼻喷雾剂等等。

[0033] 本发明的药物组合物可按照各种制剂类型的常规方法使用,使用剂量根据不同疾病的类型、病情程度以及给药途径等进行调整,如口服途径每次服用剂量在 10mg-100mg,每天剂量在 20mg-300mg ;注射途径每次 5mg-80mg,每天 1-2 次。根据患者个体情况用药,通常每天治疗剂量口服 50mg-200mg、注射剂量 20mg-100mg,预防口服用药为 :15mg-60mg。

具体实施方式

[0034] 下面具体描述 A1 和 A2 的制备方法,A2 的药理学作用以及本发明药物组合物的常规制剂的制备方法。

[0035] 制备实施例 1 A1 的制备

[0036] 5 克 (10.8mmol) 灯盏花素溶解于 100 毫升 DMF 和二氯甲烷混合溶剂中,加入 4.6 克碘甲烷和 7.5 克 (54mmol) 碳酸钾,于室温下搅拌 2 天,TLC(薄层层析法)显示反应原料已完全,加入 50 毫升 1N 盐酸,并用 50 毫升乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相,用无色硫酸钠干燥,旋干有机溶剂,以乙酸乙酯 / 甲醇为 1-10 : 1(V/V) 用硅胶柱分离提取,得到 3.1 克淡黄色固体 A1,产率为 60%。 $H^1NMR(400MHz, CDCl_3)$ δ 7.78(d, 2H), 6.92(d, 2H), 6.60(s, 1H), 6.50(s, 1H), 4.94(d, 1H), 4.01(d, 1H), 3.83(s, 3H), 3.81(s, 3H), 3.71(s, 3H), 3.47-3.67(m, 5H); $C^{13}NMR(100MHz, CDCl_3)$ δ 181.76, 181.68, 168.14, 163.59, 163.54, 161.79, 155.15, 152.38, 152.10, 151.62, 132.25, 127.28, 122.17, 113.62, 105.97, 102.82, 100.13, 93.63, 75.02, 74.77, 71.90, 70.31, 60.00, 54.63, 51.54; MS(ESI) M^+ 504。

[0037] 制备实施例 2 A2 的制备

[0038] 将实施例 1 得到的 504 毫克 4',5,6-三甲氧基灯盏花乙素 (A1) (溶解于 10 毫升乙酸乙酯和二氯甲烷混合溶剂中,加入 0.5 毫升乙酸酐和一滴吡啶于室温下搅拌 6 小时,

TLC 检测原料反应完毕,加入 20 毫升饱和食盐水和 10 毫升乙酸乙酯,萃取留下有机相,无水硫酸钠干燥,蒸干溶剂,以乙酸乙酯 / 石油醚按体积比为 1 : 1-10 用硅胶柱分离提取得到 421 毫克淡黄色产物 A2,产率为 66.8%。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.86(d, 2H), 7.03(d, 2H), 6.75(s, 1H), 6.59(s, 1H), 5.40(m, 3H), 5.26(d, 1H), 4.25(d, 1H), 3.90(s, 3H), 3.85(s, 3H), 3.76(s, 3H), 2.11(s, 3H), 2.08(s, 3H), 2.07(s, 3H), ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3) δ 182.78, 169.98, 169.36, 169.23, 166.82, 164.54, 162.71, 155.26, 153.94, 152.27, 134.45, 128.13, 123.19, 114.49, 107.96, 103.98, 99.63, 96.26, 72.78, 71.21, 70.51, 68.95, 61.09, 55.51, 53.09, 20.59, 20.48.

[0039] 实验例一 A2 对心脑血管缺血保护作用的药理学研究

[0040] 大量的药理研究证明,灯盏花素具有扩张脑血管,降低脑血管阻力,增加脑血流量,改善微循环,提高血脑屏障通透性,增强机体巨噬细胞吞噬免疫作用,对抗垂体后叶素所至脑缺血缺氧,并能对抗由二磷酸腺苷 (ADP) 引起的血小板凝聚作用。灯盏花素在临床上广泛用于治疗脑血栓、脑梗塞以及类型未定的中风后瘫痪、高血压、脑栓塞、多发性神经炎、慢性蛛网膜等脑血管意外所致瘫痪以及冠心病、心绞痛、治疗痛风性关节炎等症。

[0041] 下面通过动物药理学实验来说明本发明化合物 A2 的活性,并且通过与灯盏花素及尼莫地平的对比较研究来说明其显著的治疗效果。

[0042] 选择与人类疾病相近且重复性好的动物模型,是评价药物治疗效果的基础。下面生物实验中采用两种与人类疾病相近的动物模型,测定多种药效学指标,综合评价 A2 对心脑血管缺血的作用。

[0043] 1 材料

[0044] 1.1 药品与试剂

[0045] 实施例合成 A2 纯品。市售灯盏花素片,20mg/片,批号 20070418,由云南省药物研究所制药厂生产。尼莫地平(尼达尔片),20mg/片,天津市中央药业有限公司生产,批号 070301。以上样品均用 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配制成所需浓度的混悬液供大鼠灌胃用。

[0046] 红四氮唑(TTC),进口,AMRESCO 分装,批号 0765,上海生工出品。腺苷二磷酸钠(ADP),批号 A2754, Sigma 公司生产,进口分装,北京鼎国生物技术发展中心出品。

[0047] AST(紫外动力学法,批号 0704151)、LDH(紫外动力学法,批号 0704102)、CK-MB(选择性抑制动力学法,批号 100412)、TT(批号 0504052)、PT(批号 0604161)、APTT(批号 0604131)及 FIB(批号 060405)测定试剂盒,均为四川迈克科技有限公司出品。

[0048] 1.2 动物

[0049] 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 240 ~ 385g,合格证号:SCXK(沪)2003-0002,来源于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,由昆明医学院实验动物中心代购。

[0050] 1.3 仪器

[0051] TM1024 全自动生化分析仪,日本东京株式会社;Centrifuge 5810R 型冷冻离心机,德国 eppendorf 公司;BS110 型电子分析天平,赛多利斯公司;Millipore 超纯水处理系统,美国 Millipore 公司;6951D 型心电图机,上海光电公司;C2000-4 血凝仪及 LBY-NS 血小板聚集仪,北京普利生集团。

[0052] 1.4 统计

[0053] 结果以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 正态分布数据用 t 检验, 偏态分布数据用秩和检验。

[0054] 2 方法

[0055] 2.1 大鼠冠状动脉结扎心肌缺血实验^[1]

[0056] 2.1.1 实验分组及造型:

[0057] 雄性 SD 大鼠, 330 ~ 385g, 按体重随机分为: 空白组、模型组、灯盏花素片 40mg/kg 组、A2 20mg/kg 组及 A2 40mg/kg 组。各组动物按剂量每日灌胃给药一次, 连续 5 天, 空白组和模型组给予等容量 0.5% CMC-Na 10ml/kg 体重。末次给药后 30min, 用 12% 水合氯醛腹腔注射 350mg/kg 麻醉动物, 行开胸手术暴露心脏, 于肺动脉圆锥及左心房间找出冠状动脉左前降支, 距根部 2 ~ 3mm 处结扎, 快速心脏复位关闭胸腔。假手术组仅置线头而不结扎。

[0058] 2.1.2 检测指标:

[0059] 分别记录结扎前及结扎后 5 分、30 分、1h、2h、4h 和 24h 肢体 II 导联心电图, 测量 S-T 段 (J 点) 变化值。待记录 24h 心电图后, 颈动脉插管取血二份: 一份分离血清按试剂盒方法测定 AST、LDH 及 CK-MB 的活性; 一份用 3.8% 枸橼酸钠以 1 : 9 抗凝, 1000rpm 离心 5min 制备富血小板血浆 (PRP), 3500rpm 离心 10min 制备贫血小板血浆 (PPP)。按比浊法测定 ADP-2Na 诱导的血小板聚集率, ADP 的终浓度为 6mol/L; 按试剂盒方法分别测定 TT、PT、APTT 及 FIB。取血后迅速摘出心脏, 置于冰生理盐水中泵出心腔内积血, 去掉心房及脂肪组织, 吸干水分称取心室重, 随后沿冠状切成 5 片, 在 1% TTC 溶液中避光于 37℃ 孵育染色 10min。经染色后, 正常心肌组织呈红色, 而梗死组织呈白色, 将梗塞部位剪下称量, 计算坏死部分占心室重的百分比为心肌梗塞范围。

[0060] 2.2 大鼠 MCAO 局灶性脑缺血实验

[0061] 2.2.1 实验分组及造型:

[0062] 雄性 SD 大鼠, 体重 240-290g, 分组及剂量同前, 另设一阳性对照药尼莫地平 50mg/kg 组。各组动物每日按剂量灌胃给药一次, 连续 5 天。末次灌胃后 30min, 用 12% 水合氯醛腹腔注射 350mg/kg 麻醉动物, 左侧卧位, 沿右耳眼线中点切开皮肤, 分离颞肌, 绞断颞骨, 在颞骨根前方用牙科钻钻孔, 暴露 MCA, 在大脑下静脉和嗅束间用针挑起, 断之, 棉球压迫止血后, 分层缝合肌肉和皮肤。假手术组除了不挑断 MCA 外, 其余步骤相同。

[0063] 2.2.2 观察指标:

[0064] 动物于造模后 6h 及 24h 根据运动等行为表现进行神经功能评分, 以此作为脑功能障碍指标。评分采用盲法, 即评分者不知道给药的情况, 评分标准如下:

[0065] 症状 行为
障碍评分

[0066] 提鼠尾离开地面约一尺, 手术对侧前肢出现腕屈曲, 肘屈曲, 肩内旋 1-4

[0067] 或有腕, 肘屈曲又有内旋。

[0068] 将动物置于平地面上, 分别推双肩向内侧, 检查阻力。 1-3

[0069] 将动物置于金属网面上, 观察两前肢的张力。 1-3

[0070] 将动物置于平地面上, 观察有无转圈。 1-2

[0071] 满分 12

[0072] 以上标准满分为 12 分, 分数越高, 表明动物行为障碍越严重。

[0073] 造模 24h, 经神经功能评分后, 颈动脉插管取血, 一份分离血清按试剂盒方法测定

AST 及 LDH 的活性;一份用 3.8%枸橼酸钠以 1 : 9 抗凝,1000rpm 离心 5min 制备富血小板血浆 (PRP),3500rpm 离心 10min 制备贫血小板血浆 (PPP)。按比浊法测定 ADP-2Na 诱导的血小板聚集率,ADP 的终浓度为 6mol/L;按试剂盒方法分别测定 TT、PT、APTT 及 FIB。取血后快速断头取脑,放入冰生理盐水中去除嗅球、小脑和低位脑干,吸干水分称取脑重,沿冠状切成 5 片,置入 5ml 含有 4% TTC 及 1mol/LK₂HPO₄0.1ml 的溶液中,避光于 37℃温孵 30min,其间每隔 7-8min 翻动一次,经染色后,正常脑组织呈玫瑰红色,而梗死组织呈白色,将梗塞部位剪下称重,以重量求面积法计算梗死组织重量占双侧大脑半球重的百分比作为脑梗塞范围。

[0074] 3 结果

[0075] 3.1 对大鼠冠状动脉结扎心肌缺血的影响

[0076] 3.1.1 对心肌缺血心电图 S-T 段的影响:

[0077] 模型组大鼠结扎冠状动脉后,心电图上 S-T 段(J 点)明显升高或下降,而假手术组则变化不大,表明实验造模成功。A2 高剂量组能明显减少各时间点 S-T 段的变化,表明对心肌缺血时的心电图有明显改善作用;A2 低剂量组仅对缺血 5min、30min 和 24h 的心电图有改善作用。结果见表 1。

[0078] 表 1 A2 对心肌缺血大鼠心电图 S-T 段的影响

[0079]

组别	剂量 (/kg)	动物数 (只)	结扎后 ST 段变化 (X ± SD, mv)					
			5min	30min	1h	2h	4h	24h
假手术	10ml	10	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.05	0.04 ± 0.05	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.05	0.01 ± 0.02
			0.12 ^{△△}	± 0.09 ^{△△}	± 0.08 [△]	0.08 ^{△△}	± 0.10 ^{△△}	± 0.14 ^{△△}
模型	10ml	11	0.37 ± 0.12	0.24 ± 0.09	0.14 ± 0.08	0.16 ± 0.08	0.16 ± 0.10	0.18 ± 0.14
			0.15 ± 0.14	0.09 ± 0.08	0.07 ± 0.06	0.07 ± 0.07	0.08 ± 0.06	0.02 ± 0.03
灯盏花素片	40mg	12	0.15 ± 0.14	0.09 ± 0.08	0.07 ± 0.06	0.07 ± 0.07	0.08 ± 0.06	0.02 ± 0.03
			0.14 ± 0.11	0.08 ± 0.05	0.06 ± 0.04	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.05	0.03 ± 0.02
A2	40mg	12	0.14 ± 0.11	0.06 ± 0.05	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.04	0.06 ± 0.05	0.02 ± 0.02
			0.17 ± 0.14	0.12 ± 0.08	0.11 ± 0.09	0.11 ± 0.07	0.11 ± 0.09	0.07 ± 0.08
A2	20mg	12	0.17 ± 0.14	0.12 ± 0.08	0.11 ± 0.09	0.11 ± 0.07	0.11 ± 0.09	0.07 ± 0.08

[0080] 与假手术组相比: ^{△△}P < 0.01; 与模型组相比: *P < 0.05, **P < 0.01。

[0081] 3.1.2 对心肌缺血大鼠心肌酶学的影响:

[0082] 模型组大鼠血清 AST、LDH 及 CK-MB 活性有不同程度的增高,尤以 CK-MB 及 LDH 活性增高更明显,表明心肌损伤造模成功。A2 两种剂量均能明显降低 CK-MB 和 LDH 的释放,并具有降低 AST 的趋势,表明减轻心肌细胞损伤作用显著;两个给药组大鼠的心肌梗塞范围均显著小于模型对照组,与模型组相比分别缩小 60.87%和 45.65%。结果见表 2。

[0083] 表 2 A2 对大鼠心肌梗塞范围和酶学的影响

[0084]

组别	剂量 (/kg)	动物数 (只)	心肌酶学 ($X \pm SD$, ku/L)			心肌梗塞范围 ($X \pm SD$, 缩小率 %)	
			AST	LDH	CK-MB	($X \pm SD$, 缩小率 %)	缩小率
假手术	10ml	10	0.52 ± 0.21	0.82 ± 0.21	0.65 ± 0.26	0.19 ± 0.27	—
模型	10ml	11	0.72 ± 0.35	1.08 ± 0.27 [△]	2.06 ± 1.30 ^{△△}	6.44 ± 3.62 ^{△△}	—
灯盏花素片	40mg	12	0.68 ± 0.33	0.94 ± 0.42	0.92 ± 0.64 [*]	3.09 ± 1.58 [*]	52.02
A2	40mg	12	0.61 ± 0.19	0.61 ± 0.25 ^{**}	0.80 ± 0.67 [*]	2.52 ± 2.14 [*]	60.87
A2	20mg	12	0.61 ± 0.25	0.66 ± 0.31 ^{**}	0.71 ± 0.46 ^{**}	3.50 ± 2.68 [*]	45.65

[0085] 与假手术组相比:[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01;与模型组相比: *P < 0.05, **P < 0.01。

[0086] 3.1.3 对冠状动脉结扎心肌缺血大鼠血小板聚集及凝血的影响

[0087] 大鼠冠状动脉结扎致心肌缺血造模后,血小板聚集率明显升高,ATPP 时间有缩短趋势,纤维蛋白原的含量明显增加。各给药组能明显抑制 ADP 诱导的血小板聚集,并有延长 TT、APTT 时间的趋势,A2 还具有降低纤维蛋白原含量的趋势。结果见表 3。

[0088] 表 3 A2 对冠状动脉结扎致心肌缺血大鼠血凝及血小板聚集的影响

[0089]

组别	剂量 (/kg)	动物数 (只)	血凝指标				血小板
			TT (s)	PT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	聚集率 (%)
假手术	10ml	10	77.14 ± 25.12	23.74 ± 6.65	85.95 ± 30.16	3.57 ± 0.49	49.00 ± 6.34
模型	10ml	11	72.37 ± 40.79	24.56 ± 4.96	56.58 ± 41.58	4.75 ± 1.19 ^{△△}	57.50 ± 4.00 ^{△△}
灯盏花素片	40mg	12	92.49 ± 34.44	26.58 ± 3.81	69.74 ± 33.82	3.90 ± 0.96	48.93 ± 7.22 ^{**}
A2	40mg	12	93.04 ± 35.67	25.75 ± 5.25	75.96 ± 35.86	3.95 ± 0.84	48.22 ± 5.55 ^{**}
A2	20mg	12	92.41 ± 42.38	25.90 ± 3.52	78.17 ± 28.13	4.77 ± 1.11	51.20 ± 7.41 [*]

[0090] 与假手术组相比：[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01；与模型组相比：^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01。

[0091] 3.2 对 MCAO 致局灶性脑缺血大鼠的影响

[0092] 3.2.1 对 MCAO 大鼠神经功能障碍及脑梗塞范围的影响

[0093] 大鼠 MCAO 造模后, 活动减少, 出现不同程度的运动障碍, 模型组与假手术组相比差异显著。各给药组均能明显改善 MCAO 大鼠的神经功能障碍, 缩小脑梗塞的范围, A2 分别缩小 64.65%、59.11%。结果见表 4。

[0094] 表 4 A2 对 MCAO 大鼠神经功能障碍及脑梗塞范围的影响

[0095]

组别	剂量 (/kg)	动物数 (只)	脑梗塞范围		行为学评分 (X ± SD, 分)	
			(X ± SD, %)	缩小率	6h	24h
假手术	10ml	10	0.04 ± 0.09	-	0.6 ± 0.97	0.60 ± 1.08

[0096]

模 型	10ml	11	5.77 ± 2.59 △△	-	8.73 ± 1.01 ^{△△}	7.54 ± 1.29 △△
尼莫地平	50mg	12	2.27 ± 2.56**	60.66	6.50 ± 1.68**	4.83 ± 1.40**
灯盏花素片	40mg	11	2.70 ± 1.42**	53.21	6.27 ± 1.01**	5.18 ± 1.33**
A2	40mg	12	2.04 ± 1.42**	64.65	5.75 ± 1.40**	4.25 ± 1.59**
A2	20mg	12	2.36 ± 1.80**	59.11	6.42 ± 1.62**	4.92 ± 1.30**

[0097] 与假手术组相比： $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与模型组相比： $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ 。

[0098] 3.2.2 对 ADP 诱导的 MCAO 大鼠血小板聚集及凝血的影响

[0099] 大鼠 MCAO 造模后，血小板聚集率明显增加，凝血时间有所缩短而纤维蛋白原的含量有增加的趋势。两种样品均能明显抑制由 ADP 诱导的血小板聚集，并具有降低纤维蛋白原含量的趋势，A2 有延长 APTT 时间、有延长 TT 时间的趋势。结果见表 5。

[0100] 表 5 A2 对 MCAO 大鼠血凝及血小板聚集的影响 (X ± SD)

[0101]

组 别	剂 量 (/kg)	动 物 数 (只)	血凝指标				血小板 聚集率 (%)
			TT (s)	PT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	
假手术	10ml	10	87.96 ±	28.02 ±	81.63 ±	3.70 ±	46.30 ±
			29.56	5.49	39.80	0.58	10.97

[0102]

模 型	10ml	11	71.58 ± 35.64	25.82 ± 7.79	57.86 ± 32.72	4.50 ± 1.40	60.3 8 ± 9.28 [△]
尼莫地 平	50mg	12	88.55 ± 32.24	23.38 ± 8.23	61.02 ± 44.79	3.52 ± 1.14	54.15 ± 7.76
灯盏花 素片	40mg	11	98.07 ± 36.83	26.78 ± 3.51	74.79 ± 26.26	3.24 ± 0.90*	49.5 ± 6.80**
A2	40mg	12	62.04 ± 40.78	23.43 ± 8.67	75.15 ± 27.40	3.59 ± 0.75	52.38 ± 5.23*
A2	20mg	12	95.55 ± 24.81	25.56 ± 5.31	62.48 ± 29.07	3.38 ± 1.08	50.52 ± 4.06**

[0103] 与假手术组相比：[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01；与模型组相比：^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01。

[0104] 3.2.3 对 MCAO 大鼠血清 AST、LDH 及体重的影响：

[0105] 模型组大鼠血清 AST 及 LDH 活性明显增高而手术后 24h 体重显著下降，两给药组均能明显降低 LDH 的释放，A2 还能明显降低 AST 活性，能明显对抗造模大鼠的体重减轻，表明两样品减轻脑组织损伤作用显著。结果见表 6。

[0106] 表 6 A2 对 MCAO 大鼠血清 AST、LDH 及体重的影响

[0107]

组 别	剂 量 (/kg)	动物数 (只)	体 重 (X ± SD, g)				血清酶 (X ± SD, u/L))	
			给药前	手术前	术后 6h	术后 24h	AST	LDH
假手术	10ml	10	258.0 ± 15.5	269.5 ± 16.6	258.0 ± 15.8	255.5 ± 16.6	156.0 ± 51.0	566.1 ± 191.2

[0108]

模 型	10ml	11	257.3 ± 10.1	267.7 ± 9.6	252.3 ± 7.5	240.0 ± 8.7 [△]	246.6 ± 121.5 [△]	907.1 ± 256.7 ^{△△}
尼莫地 平	50mg	12	259.6 ± 14.5	265.8 ± 12.9	257.1 ± 11.4	249.6 ± 10.5 [*]	198.6 ± 118.2	536.7 ± 262.8 ^{**}
灯盏花 素片	40mg	11	259.1 ± 13.0	267.7 ± 19.4	256.8 ± 15.7	247.3 ± 15.4	244.3 ± 183.6	719.5 ± 133.4 [*]
A2	40mg	12	256.3 ± 13.4	265.8 ± 12.3	253.8 ± 12.0	244.2 ± 12.1	152.9 ± 33.1 [*]	472.0 ± 231.8 ^{**}
A2	20mg	12	257.9 ± 11.5	268.8 ± 12.3	258.3 ± 11.8	250.0 ± 15.2 [*]	171.2 ± 71.5	571.1 ± 287.3 ^{**}

[0109] 与假手术组相比：[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01；与模型组相比：^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01。

[0110] 4. 结论

[0111] 选择与人类疾病相近且重复性好的动物模型,是评价药物治疗效果的基础。本研究采用两种与人类疾病相近的动物模型,测定多种药效学指标,综合评价两种样品对急性心脑血管缺血的影响。结果表明,A2能明显改善冠状动脉结扎致心肌缺血大鼠的心电图变化,降低血清CK-MB及LDH的活性,缩小心肌梗死范围,抑制血小板聚集,并具有延长凝血时间和降低纤维蛋白原的趋势,提示其对心肌缺血有明显保护作用。A2不仅可以减少MCAO大鼠脑梗塞范围,使行为障碍程度得到明显改善,血清中LDH及AST的活性明显降低;同时还能明显抑制ADP诱导的血小板聚集,并有一定的抗凝趋势,从而抑制血栓形成。研究结果表明,A2对心脑血管缺血具有显著保护作用。

[0112] 在所采用的两种缺血性心脑血管疾病模型上,A2在实验条件下,对心肌缺血有明显保护作用,A2高剂量组显示出了比40mg/kg灯盏花素片和50mg/kg的尼莫地平片还好的作用。

[0113] 实验例二本发明化合物A2和灯盏花乙素的溶解性比较研究

[0114] 表7 本发明化合物A2和灯盏花乙素的溶解性比较

[0115]

化合物	H ₂ O	MeOH	95%EtOH	n-BuOH	0.01NNaOH
灯盏花乙素	极微溶解	略溶	略溶	略溶	溶解
A2	极微溶解	溶解	溶解	易溶	溶解

[0116] 注:按2005CP规定,极易溶解、易溶、溶解、略溶、微溶、极微溶解、几乎不溶和不溶

的定义。

[0117] 从表 7 可以看出,A2 较之灯盏花乙素,生物理化性质明显改善,即脂溶性明显的改善,进而可以明显提高其生物利用度,提高疗效。

[0118] 通过下面的实验说明本发明化合物 A2 在制备药物制剂上的应用。

[0119] 制剂制备实施例 1 :A2 冻干粉针剂的制备

[0120] 原料配方:(制备 1000 支,产品规格:60mg/支)

[0121] A2 60g

[0122] 甘露醇 100g

[0123] NaCl 5g

[0124] 制备方法:

[0125] 按处方称取 A2,加注射用水 1000ml,搅拌、并用 0.01NNaOH 调节使溶解,溶解后加入甘露醇 100g、NaCl 5g,搅拌使溶解完全,加注射用水至总配液量 2000ml,加入总配液量 1%的针用活性炭,吸附 30 分钟,先用滤纸加砂棒过滤除去活性炭,滤液经过 0.45 μm 的滤膜过滤等处理后,在 100 级条件下,用 0.2 μm 以下的滤膜精滤。精滤液送入灌装机,灌装 2.0ml/支,半压塞,送入冷冻真空干燥机,快速冷却至零下 40℃,保持 2 小时,抽真空至约 1Pa 以下,逐步缓慢升温至 31℃,保持 2 小时。压塞,取出制品,扎盖、包装、检验合格得成品 1000 支。

[0126] 制剂制备实施例 2 A2 滴丸的制备

[0127] 成份 1000 丸

[0128] A2 50 克

[0129] 聚乙二醇-6000 200 克

[0130] 制备方法:

[0131] a) 称取粉碎过的 (A2) 50 克。b) 取 200 克聚乙二醇 (6000) 于 100℃左右水浴中熔化,熔化后 65-75℃恒温。c) 将上述药物在搅拌下逐渐加入到聚乙二醇-6000 恒温液中,充分搅拌使其混合均匀,送至滴丸机的贮药罐内。于 65-80℃恒温、搅拌混合均匀后即可滴制。二甲硅油或液体石蜡为冷凝液,冷却液温度为 3.5-11℃,滴速控制在 60-80 滴/分钟。滴制完毕,取出,吸去表面硅油或石蜡油,在室温条件下自然干燥定型后,在 50±2℃干燥制得 (A2) 口服滴丸。

[0132] 制剂制备实施例 3 A2 片剂的制备

[0133] 成份 1000 片

[0134] A2 40 克

[0135] 乳糖 30 克

[0136] 低取代羟丙基纤维素 (L-HPC) 50 克

[0137] 羧甲基淀粉钠 (CMS-Na) 5 克

[0138] 乙醇 30 毫升

[0139] 水 54 毫升

[0140] 微粉硅胶 5 克

[0141] 制备方法:

[0142] 按比例称取粉碎过的 A2、乳糖、低取代羟丙基纤维素、羧甲基淀粉钠等,按常规工

艺处理后,混合均匀,加入适宜乙醇作润湿剂制备软材,制粒,干燥,整粒,取颗粒检查合格后,加入助流剂微粉硅胶,混合均匀后压片。质量检查合格后分装,贴签,包装即得 A2 口腔崩解片。

[0143] 以上实施例只是用于进一步说明本发明,而不是用来限制本发明的保护范围。凡是在本发明保护范围内所做出的具体实施方式及应用范围上的些许变动,也属于本发明的保护范围。