

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 869**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/18** (2006.01)

**A61K 31/045** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2005 PCT/CN2005/000333**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2005 WO05087242**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2005 E 05729109 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 1741439**

54 Título: **Preparación de medicina tradicional china para enfermedades de vasos sanguíneos cardio-cerebrales y su método de preparación**

30 Prioridad:

**17.03.2004 CN 200410018758**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.10.2017**

73 Titular/es:

**TASLY PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.  
(100.0%)  
No. 1, Liaohedong Road, Xinyibai Avenue  
Beichen District, Tianjin 300402, CN**

72 Inventor/es:

**CHENG, YIYU;  
ZHANG, HAIJIANG y  
YE, ZHENGLIANG**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 635 869 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Preparación de medicina tradicional china para enfermedades de vasos sanguíneos cardio-cerebrales y su método de preparación

### Campo técnico

- 5 La invención se refiere a un medicamento, y en particular, a una preparación de medicamento tradicional chino para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.

### Antecedentes de la técnica

10 Las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares son enfermedades comunes que causan un gran daño a la salud de los seres humanos. Recientemente, tales enfermedades tienen una incidencia creciente debido a cambios de trabajo, vidas, patrones de dieta, entornos y similares con desarrollo social. La medicina tradicional china (MTC), a pesar de su inferior actividad hacia una única diana en relación con la medicina occidental, se caracteriza por sus múltiples rutas y dianas, tratamiento dinámico y holístico y bajos efectos secundarios, que están muy lejos de los efectos de la medicina occidental. La preparación de MTC con efecto terapéutico definido tendrá un efecto terapéutico global superior al de la medicina occidental. Existe ahora una pluralidad de preparaciones de MTC para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, tales como comprimidos de compuesto Danshen y sus preparaciones de MTC, pastillas de gotas de Guanxin Danshen y comprimidos Xinkeshu, etc. Estas preparaciones de MTC, todas de las cuales contienen raíz de *Salviae miltiorrhizae* (también conocida como danshen) y raíz de *Notoginseng*, tienen diferentes efectos terapéuticos para sus diferentes formulaciones, proporciones de componentes, procedimientos de extracción y purificación o formas de dosificación. Además, 15 apenas puede controlarse la calidad de estas preparaciones de MTC, puesto que no está disponible ningún método de detección de calidad eficaz en la actualidad para caracterizar completamente las propiedades físicas y químicas de estos medicamentos, y en su lugar, sólo uno o dos compuestos, tales como Danshensu o Tanshinone II A, se usan para representar los principios biológicamente activos complejos en estos medicamentos. Por tanto, es necesario mejorar los procedimientos para extraer y purificar tales preparaciones de MTC y también el método para controlar sus calidades. 20 25

El documento WO04/012651 da a conocer composiciones para tratar enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares basadas en extractos herbales de raíz de *Salviae miltiorrhizae*, *Panax notoginseng* y borneol. El documento WO02/058625 describe composiciones que comprenden extractos de raíz de *Salviae Miltiorrhizae*, raíz de *Notoginseng* y borneol (DSP) para su uso en el tratamiento de cardiopatía coronaria, angina de pecho y para reducir el nivel de colesterol en suero. El documento US2005/037094 da a conocer composiciones para tratar enfermedades cardíacas (entre otras angina de pecho, arteriopatía coronaria, ritmo cardíaco anómalo, cardiomiopatía y enfermedad pericárdica) basadas en extractos herbales sin procesar de raíz de *Salviae miltiorrhizae*, *Panax notoginseng* y borneol. El documento WO02/085398 describe composiciones basadas en *Tournefortia samentosa* y *Salvia miltiorrhiza* y su uso en el tratamiento de arteriosclerosis o reestenosis. 30 35

### Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una preparación de MTC más eficaz para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. También se proporciona en el presente documento un método de detección para la caracterización relativamente completa y exacta de las propiedades físicas y químicas de la misma.

- 40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar la preparación de MTC anterior.

Los objetos de la presente invención se logran a través de lo siguiente:

La preparación de MTC según la presente invención puede prepararse a través de un procedimiento que comprende las siguientes etapas de:

- 45 mezclar raíz de *Salviae miltiorrhizae* y Raíz de *Notoginseng* con hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de potasio o una mezcla de los mismos en una cantidad del 0,5%-4,0% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales para obtener una mezcla;

someter a ebullición la mezcla en 3-6 veces de agua durante 2-4 horas;

someter la mezcla a filtración y concentrar los filtrados combinados;

- 50 añadir un etanol con una alta concentración (por encima del 70%) en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 65-70% del etanol;

permitir que la mezcla repose y separar el sobrenadante;

recuperar el etanol del sobrenadante y concentrar el residuo hasta que tiene una densidad relativa de 1,20-1,50 (55-60°C), que es un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*;

mezclar el extracto anterior con borneol (o un aceite de madera de *Dalbergiae odoriferae*); y

5 añadir uno o más excipientes farmacológicos, tales como almidón, dextrina, lactosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, polietilenglicol, estearato de magnesio, gel de microsilicio, xilitol, lactitol, glucosa, glicina, manitol, metilalmidón sódico, carboximetilcelulosa de sodio reticulada, polivinilpirrolidona reticulada etc., para formular la mezcla en diversas formas de dosificación, tales como inyección, comprimido, comprimido de liberación sostenida, pastilla de gota, gránulo, polvo de inyección, cápsula, microgránulo, disgregante oral.

10 Preferiblemente, la preparación de MTC anterior se prepara a través de un procedimiento que comprende las siguientes etapas de:

pesar raíz de *Salviae miltiorrhizae* y raíz de *Notoginseng*;

añadir bicarbonato de sodio en una cantidad del 1,4%-1,9% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales para obtener una mezcla;

15 someter a ebullición la mezcla en 4-5 veces de agua durante 2-3 horas, y luego en 3-4 veces de agua durante otras 1-2 horas;

someter la mezcla a filtración y concentrar los filtrados combinados hasta que se logre un peso específico de 1,16-1,20 (80±5°C);

añadir un etanol con una alta concentración (por encima del 70%) en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 65-70% (20°C) del etanol;

20 permitir que la mezcla repose durante 8-12 horas y separar el sobrenadante;

recuperar el etanol del sobrenadante y concentrar el residuo hasta que tenga una densidad relativa de 1,32-1,40 (55-60°C), que es un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*;

mezclar el extracto anterior con borneol (o un aceite de madera de *Dalbergiae odoriferae*); y

25 añadir uno o más excipientes farmacológicos seleccionados del grupo que consiste en almidón, dextrina, lactosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, polietilenglicol, estearato de magnesio, gel de microsilicio, xilitol, lactitol, glucosa, glicina, manitol, metilalmidón sódico, carboximetilcelulosa de sodio reticulada, polivinilpirrolidona reticulada etc. para formular la mezcla en un comprimido, pastilla de gota, polvo de inyección, cápsula, gránulo, microgránulo o disgregante oral.

30 El borneol usado en el presente documento puede ser uno que se produce de manera natural o uno sintetizado. El aceite de madera de *Dalbergiae odoriferae* usado en el presente documento se obtiene a través de destilación de madera de *Dalbergiae odoriferae*.

La preparación de MTC anterior está preferiblemente en la forma de dosificación de pastilla de gota.

La preparación de MTC según la presente invención se caracteriza usando los siguientes parámetros físicos y químicos:

35 en el espectro de HPLC, hay 8 picos que tienen una razón de área de pico individual con respecto a área de pico total mayor del 2%; el tiempo de retención promedio de estos 8 picos es de 6,04, 9,90, 16,89, 17,84, 20,31, 23,74, 27,73 y 31,02 respectivamente, y el % de DER del tiempo de retención es de 0,31, 0,25, 0,61, 0,70, 0,96, 0,76, 0,50 y 1,18 respectivamente; su área de pico promedio es de 1627,92, 2575,54, 366,89, 381,40, 186,08, 555,35, 281,91 y 1852,33 respectivamente, y el % de DER del área de pico es de 5,91, 13,53, 10,92, 13,81, 12,04, 10,48, 18,08 y 14,84 respectivamente; y la razón de área de pico individual con respecto a área de pico total representa el 19,6%-22,0%, 28,5%-37,4%, 4,2%-5,2%, 4,2%-5,5%, 2,1%-2,7%, 6,4%-7,8%, 3,0%-4,3% y 20,2%-27,2% respectivamente.

40 Los parámetros físicos y químicos anteriores se obtuvieron en las siguientes condiciones de detección:

(1) Cromatografía de líquidos de alta resolución

45 Se usó gel de octadecilsilil-sílice como carga para la columna de cromatografía, con una velocidad de flujo de 1.000 ml/min y una longitud de onda de detección de 280 nm. Se llevó a cabo la elución en las siguientes condiciones: siendo la fase móvil A una disolución acuosa de ácido fosfórico al 0,02%, siendo la fase móvil B una disolución acuosa de ácido fosfórico al 0,02%-acetronitrilo al 80%, cambiándose la fase móvil A desde el 90% hasta el 78% homogéneamente y cambiándose la fase móvil B desde el 10% hasta el 22% homogéneamente durante de 0 a 8 min; la fase móvil A desde el 78% hasta el 74% y la fase móvil B desde el 22% hasta el 26% durante de 8 a 15 min; y la fase móvil A desde el 74% hasta el 48% y la fase móvil B desde el 26% hasta el 52% durante de 15 a 55

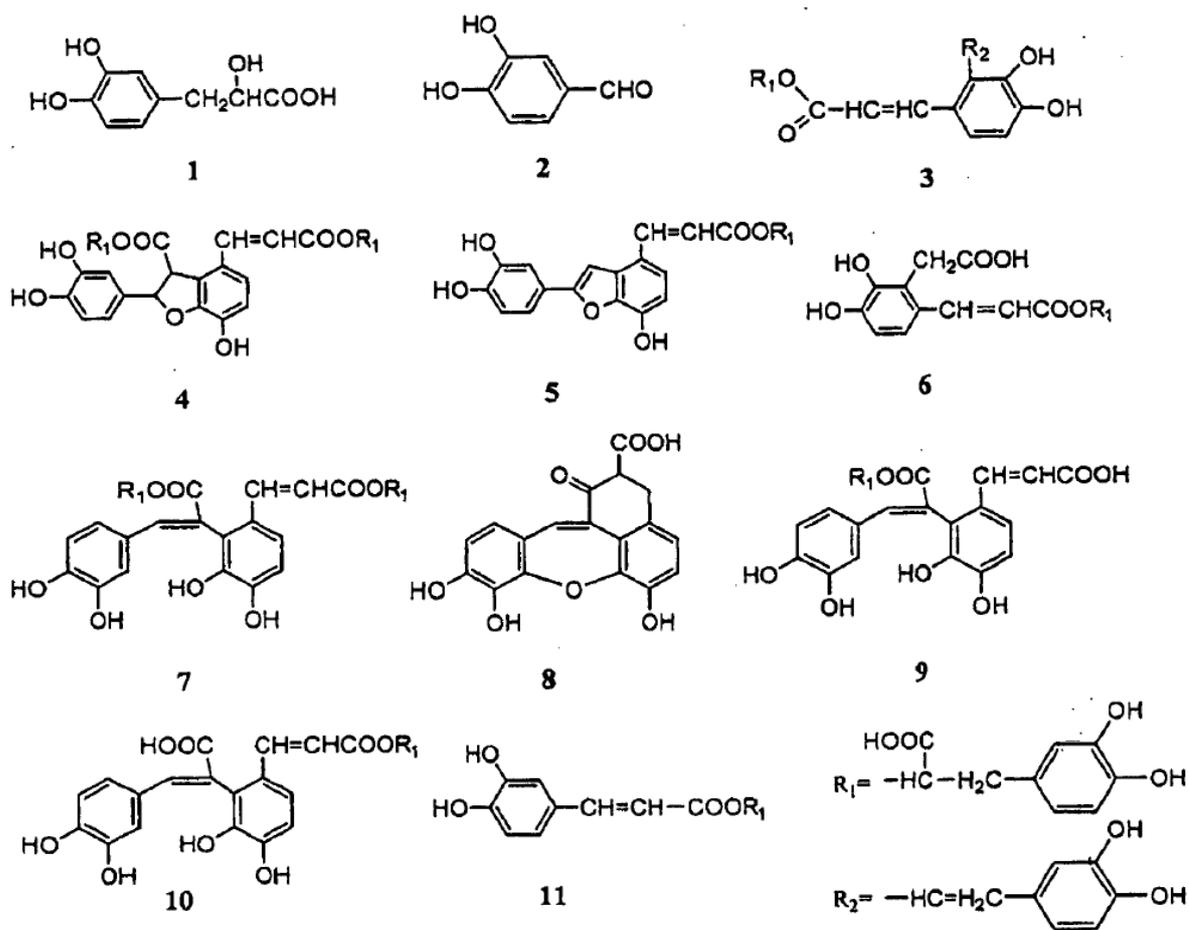
min.

(2) Preparación y determinación de disolución de muestra

Se pesan de manera precisa 10 pastillas de la preparación de MTC según la presente invención, y entonces se añaden a una botella de medición de 10 ml. Se añadió agua destilada en una cantidad suficiente para disolver las pastillas a través de agitación con ultrasonidos durante 15 minutos. Y entonces se añadió más agua destilada para lograr un volumen de 10 ml. Se sometió la disolución resultante a centrifugación o filtración para obtener una disolución de muestra. Se inyectaron con precisión 10  $\mu$ l de la disolución de muestra en un aparato de HPLC, y entonces se determinó a modo de cromatografía HPLC para obtener un espectro de HPLC.

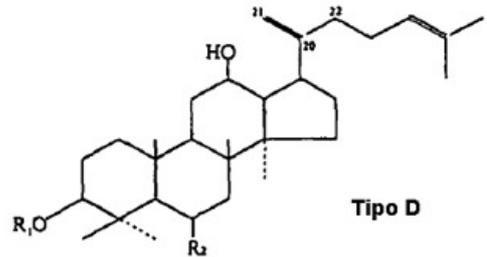
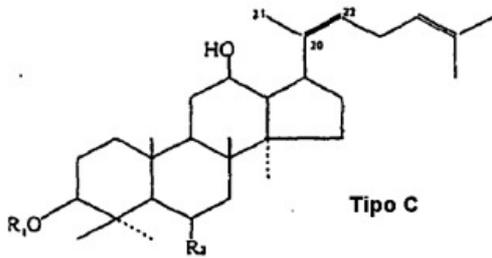
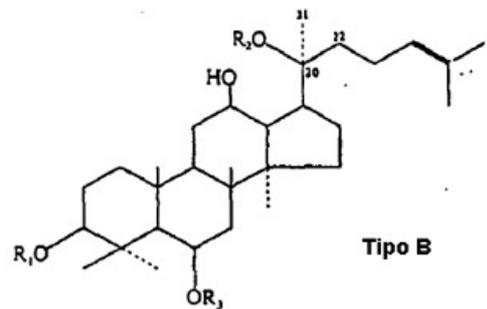
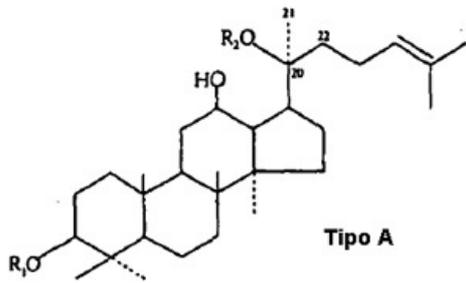
Con la ayuda de un método de análisis, tal como una comparación con una muestra patrón y espectros de masas, se identificó que los 8 picos anteriores con un tiempo de retención promedio de 6,04, 9,90, 16,89, 17,84, 20,31, 23,74, 27,73 y 31,02 correspondían a Danshensu, protocatchualdehído, ácido isolitospérmico A, ácido isolitospérmico B, ácido salvianólico D, Ácido rosmarínico, ácido salvianólico B y ácido salvianólico A, respectivamente (véase la figura 1).

Usando un método de HPLC-EM particular, se determinó que la preparación de MTC de la presente invención comprendía Danshensu, protocatchualdehído, ácido isolitospérmico A, ácido isolitospérmico B, ácido salvianólico D, ácido salvianólico E, ácido rosmarínico, ácido salvianólico B, ácido salvianólico G, ácido salvianólico A, tanshinona I, tanshinona II A, notoginsenósido R<sub>1</sub>, ginsenósido Re, ginsenósido Rg1, ginsenósido Rb1, notoginsenósido R2, notoginsenósido R2 iso., ginsenósido Rg2, ginsenósido Rh1, ginsenósido Rh1 iso., ginsenósido Rd, ginsenósido Rd iso., ginsenósido Rf-H<sub>2</sub>O, notoginsenósido R2-H<sub>2</sub>O, ginsenósido Rg6 o F4, ginsenósido Rk3, ginsenósido (Rh4), ginsenósido 20(R)-Rg3, ginsenósido 20(S)-Rg3, ginsenósido (Rk1), ginsenósido (Rg5) y similares.



- |    |                         |        |
|----|-------------------------|--------|
| 1. | Danshensu               | PM=198 |
| 2. | Protocatechualdehído    | PM=138 |
| 25 | 3. Ácido salvianólico A | PM=494 |

- 4. Ácido salvianólico B                      PM=718
- 5. Ácido salvianólico C                      PM=492
- 6. Ácido salvianólico D                      PM=418
- 7. Ácido salvianólico E                      PM=718
- 5 8. Ácido salvianólico G                      PM=340
- 9. Ácido isolitospérmico A                      PM=538
- 10. Ácido isolitospérmico B                      PM=538
- 11. Ácido rosmarínico                      PM=360



10

Estructura tipo A	Ginsenósido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Peso molecular (PM)
	Ginsenósido Rb <sub>1</sub>	Glc-Glc	Glc-Glc	1108
	Ginsenósido Rd	Glc-Glc	Glc	946
	Ginsenósido Rg <sub>3</sub>	Glc-Glc	H	784
	Ginsenósido F <sub>2</sub>	Glc	Glc	784

Estructura tipo B	Ginsenósido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	PM
	Ginsenósido Re	H	Glc	O-Glc-Rham	946
	Ginsenósido Rf	H	H	O-Glc-Glc	800
	Ginsenósido Rg <sub>1</sub>	H	Glc	O-Glc	800
	Ginsenósido Rg <sub>2</sub>	H	H	O-Glc-Rham	784
	Ginsenósido Rh <sub>1</sub>	H	H	O-Glc	638
	Notoginsenósido R <sub>2</sub>	H	H	O-Glc-Xyl	770
	Notoginsenósido R <sub>1</sub>	H	Glc	O-Glc-Xyl	932
Ginsenósido F <sub>1</sub>	H	Glc	OH	638	

Estructura tipo C	Ginsenósido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PM
	Ginsenósido Rg <sub>5</sub>	Glc-Glc-	H	766
	Ginsenósido Rh <sub>4</sub>	H	Glc-O-	620
	Ginsenósido F <sub>4</sub>	H	Rham-Glc-O-	766

Estructura tipo D	Ginsenósido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PM
	Ginsenósido Rg <sub>6</sub>	H	Rham-Glc-O-	766
	Ginsenósido Rk <sub>1</sub>	Glc-Glc	H	766
	Ginsenósido Rk <sub>3</sub>	H	Glc-O-	620

Glc=  $\beta$ -D-glucosa

Rham=  $\alpha$ -L-ramnosa

Xyl=  $\beta$ -D-xilosa

5 En el procedimiento de extracción y método de análisis de la presente invención, se usó un atlas de huellas para caracterizar completamente las propiedades físicas y químicas de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* y la raíz de *Notoginseng* en la preparación de MTC. En comparación con la técnica anterior en la que sólo uno o dos compuestos se usan para representar principios biológicamente activos complejos en preparaciones de MTC, este medio de caracterización es más adecuado para controlar la calidad de las preparaciones de MTC.

10 Los principios biológicamente activos en las presentes preparaciones de MTC se detectaron usando el método de análisis de HPLC-EM según la presente invención. Como resultado, se han identificado 12 componentes de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 21 componentes de la raíz de *Notoginseng* en total. Los compuestos se identificaron principalmente basándose en el análisis de datos de EM<sup>n</sup> y comparación con datos de la bibliografía. Finalmente, se confirmó completamente un gran número de los componentes con respecto a sus estructuras a través de comparación con las muestras de control. Puede concluirse de ese modo que el análisis de la composición química de la presente preparación de MTC usando el método de HPLC-EM de la presente invención puede producir abundante información sobre la estructura de los principios biológicamente activos. La caracterización mediante esta información de las propiedades físicas y químicas de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* y raíz de *Notoginseng* en la presente preparación de MTC tiene en consecuencia un efecto mucho mejor que los métodos en la técnica anterior.

20 Las siguientes pruebas demuestran que la presente preparación de MTC tiene un efecto sobre el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.

#### 1. Efectos de la preparación de MTC sobre isquemia miocárdica e infarto de miocardio en perro anestesiado

25 Se usó un electrograma epicárdico para mapear una gama de isquemia miocárdica e indicar la extensión de la misma. Se usó histología cuantitativa (método de tinción con N-BT) para determinar un área de infarto de miocardio. También se determinaron cambios del flujo sanguíneo de la arteria coronaria, consumo de oxígeno miocárdico y actividades de CK y LDH en suero, y ET, TXB<sub>2</sub> y 6-ceto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  en plasma sanguíneo. La preparación de MTC según la presente invención se estudió tras la administración alimentaria con respecto a su efecto sobre isquemia miocárdica aguda, infarto de miocardio e indicadores relacionados en perros de prueba.

30 Los resultados de prueba muestran que la preparación de MTC según la presente invención tiene un efecto significativo en la mejora de la isquemia miocárdica aguda e infarto de miocardio de perros. Puede conducir a una extensión reducida de la isquemia miocárdica ( $\Sigma$ -ST) indicada por el electrograma epicárdico (P<0,001 en relación con el grupo de control que usa solución salina normal), un área de infarto significativamente reducida indicada a través de la tinción de N-ST (P<0,001 en relación con el grupo de control que usa solución salina normal), y un flujo de sangre significativamente aumentado de la arteria coronaria en un corazón isquémico (P<0,001 en relación con el grupo de control que usa solución salina normal). Tiene una acción inhibitoria contra la liberación de lactato dehidrogenasa (LDH) sérica que resulta de isquemia miocárdica e infarto de miocardio (con una razón de cambio relativa significativamente inferior a la del grupo de control que usa solución salina normal, P<0,001), así como contra el aumento de la actividad de creatina fosfoquinasa (CK) (con una razón de cambio relativa significativamente inferior a la del grupo de control que usa solución salina normal; P<0,05). Tiene también un efecto en la reducción de ET en plasma sanguíneo (P<0,001 en relación con el grupo de control que usa solución salina normal) y el nivel de TXB<sub>2</sub> (P<0,001 en relación con el grupo de control que usa solución salina normal, P<0,05 en relación con el grupo que usa una preparación de MTC) de plasma sanguíneo, y en la mejora de la razón de 6-ceto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> /TXB<sub>2</sub> (P<0,001 en relación con el grupo de control que usa solución salina normal, P<0,05 en relación con el grupo que usa una preparación de MTC).

#### 2. Efectos de la preparación de MTC sobre infarto de miocardio provocado por reperfusión isquémica

45 Se encontró a través de una observación en un modelo de rata con el daño de reperfusión por isquemia miocárdica que la preparación de MTC según la presente invención podría conducir a un grado significativamente reducido de daño miocárdico, una disminución del área de infarto de miocardio (p<0,05-0,01 en relación con el grupo modelo) y un menor peso de una parte de infarto (p<0,05 en relación con el grupo modelo). Tiene también un efecto en el aumento significativo de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) (p<0,01 en relación con el grupo modelo).

50 3. Efectos de la preparación de MTC sobre la dinámica del flujo de sangre cardíaco y consumo de oxígeno miocárdico en perros

La preparación de MTC de la presente invención se evaluó con respecto a su efecto sobre la dinámica de flujo de sangre cardiaco y consumo de oxígeno miocárdico en perros normales anestesiados.

5 Los resultados muestran que la preparación de MTC según la presente invención puede conducir a un flujo de sangre significativamente mejorado de la arteria coronaria ( $p < 0,01-0,001$  en relación con el grupo antes de la administración y el grupo de control que usa solución salina normal), un vaso coronario expandido, un contenido de oxígeno aumentado en seno venoso coronario ( $p < 0,05-0,001$  en relación con el grupo antes de la administración y el grupo de control que usa solución salina normal), un indicador de consumo de oxígeno miocárdico reducido, un suministro mejorado de sangre y oxígeno a músculo cardiaco y un aumento del gasto por latido y gasto cardiaco ( $p < 0,05-0,01$  en relación con el grupo antes de la administración y el grupo de control que usa solución salina normal) sin aumentar el trabajo del ventrículo izquierdo. La presente preparación de MTC tiene también un efecto en el ajuste de la complacencia cardiaca, y por tanto, en la adaptación y mejora de un sistema cardiovascular.

#### 4. Efectos de la preparación de MTC sobre la aglutinación plaquetaria en conejos

La preparación de MTC de la presente invención se evaluó a través de nefelometría de Born con respecto a su efecto sobre la aglutinación plaquetaria en conejos.

15 Los resultados muestran que la preparación de MTC, tras una administración intragástrica durante 7 días sucesivos, puede conducir a una reducción significativa de la aglutinación plaquetaria en conejos inducida por ácido araquidónico (AA) ( $p < 0,05-0,01$  en relación con el grupo de control que usa agua destilada) y colágeno ( $p < 0,01$  en relación con el grupo de control que usa agua destilada). Esto indica que la preparación de MTC según la presente invención tiene un efecto inhibitor sobre la aglutinación plaquetaria.

#### 20 5. Efectos de la preparación de MTC sobre la trombogénesis *in vitro* y la viscosidad sanguínea en ratas

La preparación de MTC de la presente invención se evaluó con respecto a su efecto sobre la trombogénesis *in vitro* y la viscosidad sanguínea en ratas.

25 Los resultados muestran que la preparación de MTC, tras una administración intragástrica durante 7 días sucesivos, puede conducir a un trombo considerablemente acortado ( $p < 0,01$  en relación con el grupo de control que usa agua destilada), un peso en húmedo y en seco disminuido del trombo ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de control que usa agua destilada), una viscosidad reducida del plasma sanguíneo ( $p < 0,001$  en relación con el grupo de control que usa agua destilada) y una viscosidad de sangre completa disminuida a diversas velocidades de cizalladura ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de control que usa agua destilada). Esto indica que la preparación de MTC según la presente invención tiene un efecto en la inhibición de la trombogénesis, y la reducción de la viscosidad de plasma sanguíneo y de sangre completa.

#### 30 6. Efectos de la preparación de MTC sobre la hiperlipidemia y aterosclerosis en conejos

Se estableció un modelo de hiperlipidemia y aterosclerosis (AS) para la prueba a través de la alimentación con forraje con un alto contenido de colesterol a un conejo. La preparación de MTC de la presente invención se evaluó con respecto a su efecto sobre este modelo.

35 Los resultados muestran que la preparación de MTC según la presente invención puede conducir a una concentración significativamente disminuida de TC, TG, LDL-C, VLDL-C en suero y una razón de TC/HDL-C disminuida ( $p < 0,05-0,001$  en relación con el grupo de control que padece hiperlipidemia) en conejos, una concentración de HDL-C significativamente aumentada ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de control que padece hiperlipidemia), un contenido disminuido de TC en la aorta ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de control que padece hiperlipidemia), un contenido disminuido de TG en el hígado ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de control que padece hiperlipidemia) y un contenido disminuido de MDA en el hígado ( $p < 0,001$  en relación con el grupo de control que padece hiperlipidemia). La presente preparación de MTC tiene un efecto significativo en la mejora de la actividad de SOD en el hígado ( $p < 0,01$  en relación con el grupo de control que padece hiperlipidemia). Además, tiene un efecto significativo en la reducción del grosor de la placa de la aorta y la cantidad de las células espumosas formadas en la aorta ( $p < 0,05$  en relación con el grupo de control que padece hiperlipidemia). También conduce a una tendencia decreciente del área de la placa de la aorta. Esto indica que la preparación de MTC según la presente invención tiene un efecto en el ajuste de la grasa sanguínea, y al mismo tiempo, un determinado efecto de la anti-peroxidación de lípidos y prevención de la arteriosclerosis.

#### 7. Efectos de la preparación de MTC sobre la isquemia cerebral localizada en ratas

50 Usando un modelo de rata con una trombosis de la arteria cerebral media (MCAT), se determinó la preparación de MTC de la presente invención con respecto a su efecto sobre un área de infarto cerebral en ratas con MCAT.

Los resultados demuestran que la preparación de MTC según la presente invención tiene un efecto significativo contra la isquemia cerebral.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un atlas de huellas de los componentes de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en las pastillas de gotas como una de las formas de dosificación de la presente preparación de MTC. En esta figura, el pico 1 representa Danshensu; el pico 2 representa protocatechualdehído; el pico 3 representa ácido isolitospérmico A; el pico 4 representa ácido isolitospérmico B; el pico 5 representa ácido salvianólico D; el pico 6 representa ácido rosmarínico; el pico 7 representa ácido salvianólico B; y el pico 8 representa ácido salvianólico A.

La figura 2 es un espectro de HPLC de los componentes solubles en agua de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la presente preparación de MTC. En esta figura, el pico 1 representa Danshensu; el pico 2 representa protocatechualdehído; el pico 3 representa ácido isolitospérmico A; el pico 4 representa ácido isolitospérmico B; el pico 5 representa ácido salvianólico D; el pico 6 representa ácido salvianólico E; el pico 7 representa ácido rosmarínico; el pico 8 representa ácido salvianólico B; el pico 9 representa ácido salvianólico G; y el pico 10 representa ácido salvianólico A.

La figura 3 es un espectro de EM-TIC de los componentes solubles en agua de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la presente preparación de MTC.

La figura 4 es un espectro de HPLC de los componentes liposolubles de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la presente preparación de MTC. En esta figura, el pico 1 representa tanshinona I; y el pico 2 representa tanshinona II A.

La figura 5 es un espectro de EM-TIC de los componentes liposolubles de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la presente preparación de MTC.

La figura 6 es un espectro de EM-TIC de los componentes de la raíz de *Notoginseng* en la presente preparación de MTC.

### Descripción detallada

La divulgación se ilustrará adicionalmente en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 (ejemplo de preparación)

Se pesaron 41,06 g de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 8,03 g de raíz de *Notoginseng*, a los que se añadió bicarbonato de sodio en una cantidad del 1,8% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales. Se sometió a ebullición la mezcla resultante en 4 veces de agua durante 2 horas, y luego en 3 veces de agua durante otra hora. Tras la filtración, se concentraron los filtrados combinados hasta que se logró un peso específico de 1,19-1,20 ( $75\pm 1^\circ\text{C}$ ). Entonces, se añadió un etanol al 95% en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 65% del etanol ( $20^\circ\text{C}$ ). Se permitió posteriormente que la mezcla reposara durante 12 horas, y se separó el sobrenadante. Se recuperó el etanol del sobrenadante, y se concentró el residuo hasta que tenía una densidad relativa de 1,37 ( $55-60^\circ\text{C}$ ), que era un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*.

Entonces se mezcló el extracto anterior uniformemente con 0,46 g de borneol y 18 g de polietilenglicol-6000. Se fundió la mezcla a una temperatura de  $85^\circ\text{C}$  durante 80 min. Entonces se introdujo la disolución de fusión en el tanque de goteo de una máquina de pastillas de gotas manteniéndose la temperatura del tanque a  $86^\circ\text{C}$ , en el que se hizo gotear la disolución en una parafina líquida a  $8^\circ\text{C}$ . Se extrajeron las pastillas de gotas obtenidas, se sometieron a una eliminación de aceite y luego se tamizaron a través de un tamiz para obtener la preparación deseada.

#### Ejemplo 2 (ejemplo de preparación)

Se pesaron 59,36 g de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 6,38 g de raíz de *Notoginseng*, a los que se añadió carbonato de potasio en una cantidad del 1,0% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales. Se sometió a ebullición la mezcla resultante en 4 veces de agua durante 2,5 horas, y luego en 3 veces de agua durante otras 1,5 horas. Tras la filtración, se concentraron los filtrados combinados hasta que se logró un peso específico de 1,19-1,20 ( $75\pm 1^\circ\text{C}$ ). Entonces, se añadió un etanol al 85% en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 70% del etanol ( $20^\circ\text{C}$ ). Se permitió posteriormente que la mezcla reposara durante 10 horas, y se separó el sobrenadante. Se recuperó el etanol del sobrenadante, y se concentró el residuo hasta que tenía una densidad relativa de 1,35 ( $55-60^\circ\text{C}$ ), que era un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*.

Entonces se mezcló el extracto anterior uniformemente con 0,34 g de borneol y 23 g de polietilenglicol-6000. Se fundió la mezcla a una temperatura de  $89^\circ\text{C}$  durante 100 min. Entonces se introdujo la disolución de fusión en el tanque de goteo de una máquina de pastillas de gotas manteniéndose la temperatura del tanque a  $85^\circ\text{C}$ , en el que se hizo gotear la disolución en un aceite de metilsilicona a  $8^\circ\text{C}$ . Se extrajeron las pastillas de gotas obtenidas, se sometieron a una eliminación de aceite y luego se tamizaron a través de un tamiz para obtener la preparación deseada.

## Ejemplo 3 (ejemplo de preparación)

Se pesaron 12,60 g de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 56,15 g de raíz de *Notoginseng*, a los que se añadió bicarbonato de potasio en una cantidad del 1,0% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales. Se sometió a ebullición la mezcla resultante en 4 veces de agua durante 2,5 horas, y luego en 3 veces de agua durante

5

otras 1,5 horas. Tras la filtración, se concentraron los filtrados combinados hasta que se logró un peso específico de 1,19-1,20 ( $75\pm 1^\circ\text{C}$ ). Entonces, se añadió un etanol al 95% en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 70% del etanol ( $20^\circ\text{C}$ ). Se permitió posteriormente que la mezcla reposara durante 10 horas, y se separó el sobrenadante. Se recuperó el etanol del sobrenadante, y se concentró el residuo hasta que tenía una densidad relativa de 1,35 ( $55-60^\circ\text{C}$ ), que era un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*.

Entonces se mezcló el extracto anterior con 0,34 g de borneol y 23 g de polietilenglicol-6000. Se fundió la mezcla a una temperatura de  $89^\circ\text{C}$  durante 100 min. Entonces se introdujo la disolución de fusión en el tanque de goteo de una máquina de pastillas de gotas manteniéndose la temperatura del tanque a  $85^\circ\text{C}$ , en el que se hizo gotear la disolución en un aceite de metilsilicona a  $8^\circ\text{C}$ . Se extrajeron las pastillas de gotas obtenidas, se sometieron a una eliminación de aceite y luego se tamizaron a través de un tamiz para obtener la preparación deseada.

## 15 Ejemplo 4 (ejemplo de preparación)

Se pesaron 31,12 g de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 9,21 g de raíz de *Notoginseng*, a los que se añadió hidróxido de sodio en una cantidad del 0,5% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales. Se sometió a ebullición la mezcla resultante en 4 veces de agua durante 1,5 horas, y luego en 3 veces de agua durante otras 1,5 horas. Tras la filtración, se concentraron los filtrados combinados hasta que se logró un peso específico de 1,19-1,20 ( $75\pm 1^\circ\text{C}$ ). Entonces, se añadió un etanol al 88% en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 66% del etanol ( $20^\circ\text{C}$ ). Se permitió posteriormente que la mezcla reposara durante 10 horas, y se separó el sobrenadante. Se recuperó el etanol del sobrenadante, y se concentró el residuo hasta que tenía una densidad relativa de 1,40 ( $55-60^\circ\text{C}$ ), que era un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*.

20

Entonces se mezcló el extracto anterior uniformemente con 0,50 g de borneol, 90 g de manitol, 15 g de edetato de calcio y sodio y 15 ml de agua destilada. Se liofilizó la mezcla resultante, y finalmente se formuló en polvos de inyección.

25

## Ejemplo 5 (ejemplo de preparación)

Se pesaron 116,35 g de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 58,21 g de raíz de *Notoginseng*, a los que se añadió bicarbonato de sodio en una cantidad del 2,0% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales. Se sometió a ebullición la mezcla resultante en 4 veces de agua durante 2 horas, y luego en 3 veces de agua durante

30

1,5 horas. Tras la filtración, se concentraron los filtrados combinados hasta que se logró un peso específico de 1,19-1,20 ( $75\pm 1^\circ\text{C}$ ). Entonces, se añadió un etanol al 88% en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 66% del etanol ( $20^\circ\text{C}$ ). Se permitió posteriormente que la mezcla reposara durante 10 horas, y se separó el sobrenadante. Se recuperó el etanol del sobrenadante, y se concentró el residuo hasta que tenía una densidad

35

relativa de 1,40 ( $55-60^\circ\text{C}$ ), que era un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*. Entonces se mezcló el extracto anterior uniformemente con 1,80 g de aceite de madera de *Dalbergiae odoriferae* y 40 g de celulosa microcristalina. Se añadió una disolución al 3% de polividona en etanol para ablandar la masa. Entonces se tamizó la masa ablandada a través de una malla de tamiz 18 para formar gránulos. Se secaron los gránulos a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$  durante 35 min, se recortaron y entonces se mezclaron uniformemente con 4 g de polvos de talco. Se encapsuló la mezcla obtenida para obtener la preparación deseada.

40

## Ejemplo 6 (ejemplo de preparación)

Se pesaron 116,35 g de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 58,21 g de raíz de *Notoginseng*, a los que se añadió bicarbonato de sodio en una cantidad del 2,0% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales. Se sometió a ebullición la mezcla resultante en 4 veces de agua durante 2 horas, y luego en 3 veces de agua durante

45

1,5 horas. Tras la filtración, se concentraron los filtrados combinados hasta que se logró un peso específico de 1,19-1,20 ( $75\pm 1^\circ\text{C}$ ). Entonces, se añadió un etanol al 88% en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 66% del etanol ( $20^\circ\text{C}$ ). Se permitió posteriormente que la mezcla reposara durante 10 horas, y se separó el sobrenadante. Se recuperó el etanol del sobrenadante, y se concentró el residuo hasta que tenía una densidad relativa de 1,40 ( $55-60^\circ\text{C}$ ), que era un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*.

Entonces se mezcló el extracto anterior uniformemente con 0,90 g de borneol, 120 g de celulosa microcristalina, 40 g de hidroxipropilmetilcelulosa, 5 g de xilitol y 2 g de estearato de magnesio. Se comprimió la mezcla obtenida en comprimidos para obtener la preparación deseada.

50

## Ejemplo 7 (ejemplo de preparación)

Se pesaron 140,35 g de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 36,42 g de raíz de *Notoginseng*, a los que se añadió bicarbonato de sodio en una cantidad del 2,5% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales. Se

55

sometió a ebullición la mezcla resultante en 4 veces de agua durante 2 horas, y luego en 3 veces de agua durante 1,5 horas. Tras la filtración, se concentraron los filtrados combinados hasta que se logró un peso específico de 1,19-1,20 (75±1°C). Entonces, se añadió un etanol al 90% en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 65% del etanol (20°C). Se permitió posteriormente que la mezcla reposara durante 8 horas, y se separó el sobrenadante. Se recuperó el etanol del sobrenadante, y se concentró el residuo hasta que tenía una densidad relativa de 1,35 (55-60°C), que era un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*.

Entonces se mezcló el extracto anterior uniformemente con 1,00 g de borneol y 46 g de celulosa microcristalina. Se añadió una disolución al 3% de polividona en etanol para ablandar la masa. Entonces se tamizó la masa ablandada a través de una malla de tamiz 18 para formar gránulos. Se secaron los gránulos a una temperatura de 60°C durante 30 min, se recortaron y entonces se mezclaron uniformemente con 4 g de polvos de talco. Se comprimó la mezcla obtenida en comprimidos para obtener la preparación deseada.

Ejemplo 8 (ejemplo de detección para componente activo)

1. Preparación de la muestra

(1) Los componentes solubles en agua de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la presente preparación de MTC

Se pesaron 148,4 mg de cada una de las pastillas de gotas de MTC de los ejemplos 1, 2 y 3, los polvos de inyección de MTC del ejemplo 4, las cápsulas de MTC del ejemplo 5, los comprimidos de disgregante oral de MTC del ejemplo 6 y los comprimidos de MTC del ejemplo 7. Se disolvieron dichas preparaciones en 6 ml de agua a través de ultrasonidos durante 15 min, y luego se filtraron a través de una película de nailon de 0,45 µm para obtener una disolución de muestra amarilla, respectivamente.

(2) Los componentes de la raíz de *Notoginseng* y componentes liposolubles de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la presente preparación de MTC

Se pesaron 1003,8 mg de cada una de las pastillas de gotas de MTC de los ejemplos 1, 2 y 3, los polvos de inyección de MTC del ejemplo 4, las cápsulas de MTC del ejemplo 5, los comprimidos de disgregante oral de MTC del ejemplo 6 y los comprimidos de MTC del ejemplo 7. Se disolvieron dichas preparaciones en 10 ml de amoníaco acuoso al 4% a través de ultrasonidos durante 15 min, y luego se filtraron a través de una película de nailon de 0,45 µm, respectivamente. Se pretrató el filtrado en una columna Extract-Clean C<sub>18</sub> (Alltech Associates, Inc, EE.UU.). Esta muestra, tras cargarse en la columna, se lavó con 10 ml de agua, y luego se eluyó con 2 ml de metanol para obtener la muestra de prueba como un eluyente amarillo, respectivamente.

2. Análisis de la muestra

(1) Instrumentos y agentes

Cromatógrafo de líquidos Agilent serie-1100 (Agilent); detector de matriz de diodos G1315A; inyector de muestras automático G1313A; termostato G1316A; desaireador G1322A y bomba Duplex; estación de trabajo cromatográfica HP Instrument.

Espectrógrafo de masas de trampa/CL-MSD de tipo G2445A serie 1100 (Bruker); se llevó a cabo la ionización por medio de electropulverización; columna Extract-Clean C<sub>18</sub> (100 mg/ml, Alltech Associates, Inc, EE.UU.), siendo el acetonitrilo cromatográficamente puro (TEDIA), siendo el agua agua redestilada, y siendo el ácido acético analíticamente puro.

(2) Condiciones de detección de los instrumentos

Se usó una columna cromatográfica Agilent Zorbax SB-C18 (5 µm, 4,6 mm X 25 cm, Agilent, SN: USCL009296) para el análisis de HPLC. Se realizaron la elución en gradiente y la detección del espectro de masas de cada muestra en las siguientes condiciones.

(1) Los componentes solubles en agua de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la preparación de MTC de cada ejemplo

Condiciones de elución de HPLC:

tiempo (min)	fase móvil A (%)	fase móvil B (%)	fase móvil A: ácido acético:agua = 0,01:100 fase móvil B: ácido acético:acetonitrilo = 0,01:100 velocidad de flujo: 0,5 ml/min temperatura: 30°C longitud de onda de detección: longitud de onda múltiple (280 nm de longitud de onda indicada)
0	95,0	5,0	
15	78,3	21,7	
33	78,3	21,7	
38	65,0	35,0	

Condiciones de análisis de EM:

	HPLC-EM	HPLC-EM <sup>n</sup>
--	---------	----------------------

Manera de detección de ión	detección de ión negativo	
Velocidad de flujo de gas seco (l/min)	10	10
Presión de nebulizador (psi)	60	60
Temperatura seca (°C)	350	350
Voltaje capilar (v)	3500	3500
Intervalo de barrido de masa (m/z)	100-1200	100-800
Amplitud de fragmento (ev)		1,5-3,0

(2) Los componentes de la raíz de *Notoginseng* en la preparación de MTC de cada ejemplo

Condiciones de elución de HPLC:

tiempo (min)	fase móvil A (%)	fase móvil B (%)	fase móvil A: ácido acético:agua = 0,01:100 fase móvil B: ácido acético:acetonitrilo = 0,01:100 velocidad de flujo: 0,8 ml/min temperatura: 30°C longitud de onda de detección: longitud de onda múltiple (203 nm de longitud de onda indicada)
0	80	20	
15	65	35	
25	65	35	
40	57	43	
50	54	46	
65	42	58	
75	25	75	

Condiciones de análisis de EM:

	HPLC-EM	HPLC-EM <sup>n</sup>
Manera de detección de ión	detección de ión negativo	
Velocidad de flujo de gas seco (l/min)	10	10
Presión de nebulizador (psi)	60	60
Temperatura seca (°C)	350	350
Voltaje capilar (v)	3500	3500
Intervalo de barrido de masa (m/z)	400-1500	400-1200
Amplitud de fragmento (ev)		1,2-1,5

3. Resultados del análisis e identificación de picos

5 Se identificaron los componentes en los siguientes dos aspectos: (1) usando muestras de control; (2) usando las propiedades de absorción de UV e información de fragmento de ión de EM<sup>n</sup> en combinación con datos de la bibliografía.

4. Resultados de identificación

10 (1) Los componentes solubles en agua de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la preparación de raíz de *Salviae miltiorrhizae* de cada ejemplo tal como se describe en el presente documento (véanse las tablas 1 y 2, y las figuras 2 y 3).

Tabla 1. Datos de HPLC-EM y resultados de identificación

Pico n.º	Tiempo de retención	M/z de pico de masa de ión cuasi-molecular [M-H] <sup>+</sup>	Identidad	Longitud de onda de absorción máx. $\lambda_{\text{máx}}$
1	12,73	197	Danshensu	280
2	19,69	137	Protocatechualdehído	231, 280, 310
3	22,99	537	Ácido isolitospérmico A	327
4	23,83	537	Ácido isolitospérmico B	327
5	24,89	417	Ácido salvianólico D	247, 321
6	26,70	717	Ácido salvianólico E	330
7	28,51	359	Ácido rosmarínico	329
8	31,93	717	Ácido salvianólico B	254, 286, 309
9	34,86	339	Ácido salvianólico G	395
10	44,64	493	Ácido salvianólico A	288

Tabla 2. Datos de HPLC-EM<sup>n</sup>

Pico n.º	Identidad	m/z de ión de fragmento
3	Ácido isolitospérmico A	Segundo (537): 493[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 295[M-CO <sub>2</sub> -R-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> Tercero (295): 159, 109
4	Ácido isolitospérmico B	Segundo (537): 493[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 295[M-CO <sub>2</sub> -R-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>

		Tercero (295): 159, 109
5	Ácido salvianólico D	Segundo (417): 175[M-CO <sub>2</sub> -R-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 373[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> Tercero (175): 147, 157, 133
6	Ácido salvianólico E	Segundo (717): 519[M-R-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 321[M-2R-2H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> Tercero (519): 321[M-R-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 339[M-R] <sup>-</sup> Tercero (321): 279, 293, 249, 223, 185
7	Ácido rosmarínico	Segundo (359): 161[M-R-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 179[M-R] <sup>-</sup> , 195
8	Ácido salvianólico B	Segundo (717): 519[M-R-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 321[M-2R-2H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> Tercero (519): 321[M-R-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 339[M-R] <sup>-</sup> Cuarto(321): 279, 293, 249, 233, 185
9	Ácido salvianólico G	Segundo (339): 321[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 295[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> Tercero (295): 279, 267 Cuarto (279): 251
10	Ácido salvianólico A	Segundo (493): 295[M-R-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> Tercero(295): 159, 109

Puede observarse a partir de los resultados de EM<sup>n</sup> que el segundo y tercer pico tienen estructuras muy similares al del ácido litospérmico. Sin embargo, son considerablemente diferentes del ácido litospérmico con respecto a la absorción de UV. El ácido litospérmico tiene una absorción relativamente fuerte cerca de 253 nm debido a su estructura principal de fenilcumarano, mientras que el segundo y tercer pico no tienen tal propiedad de absorción.

- 5 Ambos de estos picos tienen una absorción de UV muy similar a la del ácido salvianólico E, lo que demuestra que los dos compuestos correspondientes a estos dos picos es probable que tengan la misma estructura principal que el ácido salvianólico E, es decir la estructura de estructura principal de carboxildifeniletileno. De ese modo se concluye que tienen estructuras como las de los ácidos isolitospérmicos A y B mostradas en la fórmula estructural anterior para los componentes. Estas dos estructuras nunca se han notificado, y por tanto se denominan ácidos isolitospérmicos A y B en el presente documento.
- 10

(2) Los componentes liposolubles de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la preparación de MTC de la presente invención (véanse la tabla 3 y las figuras 4 y 5).

Tabla 3. Datos de HPLC-EM y resultados de identificación

Pico n.º	Tiempo de retención	M/z de pico de masa de ión cuasi-molecular	Identidad
1	24,36	277[M+H] <sup>+</sup> , 575[2M+Na] <sup>+</sup>	Tanshinona I
2	34,85	295[M+H] <sup>+</sup> , 611[2M+Na] <sup>+</sup>	Tanshinona IIA

- 15 (3) Los componentes de la raíz de *Notoginseng* en las pastillas de gotas de *Salviae miltiorrhizae* de la presente invención (véanse las tablas 4 y 5 y la figura 6).

Tabla 4. Datos de HPLC-EM y resultados de identificación

Pico n.º	Tiempo de retención	M/z de pico de masa de ión cuasi-molecular [M-H] <sup>-</sup>	Identidad
1	11,27	931	Notoginsenosido R <sub>1</sub>
2	12,38	945	Ginsenosido Re
2	12,53	799	Ginsenosido Rg <sub>1</sub>
3	20,81	1107	Ginsenosido Rb <sub>1</sub>
4	21,25	769	Notoginsenosido R <sub>2</sub>
5	22,53	769	Notoginsenosido R <sub>2</sub> iso.
6	22,85	783	Ginsenosido Rg <sub>2</sub>
7	23,77	637	Ginsenosido Rh <sub>1</sub>
8	25,00	637	Ginsenosido Rh <sub>1</sub> iso. (F <sub>1</sub> )
9	30,05	945	Ginsenosido Rd
10	34,81	945	Ginsenosido Rd iso.
11	40,00	781	Ginsenosido Rf-H <sub>2</sub> O
12	41,57	751	Notoginsenosido R <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O
13	43,72	751	Notoginsenosido R <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O
14	44,89	765	Ginsenosido Rg <sub>6</sub> /F <sub>4</sub>
15	46,43	619	Ginsenosido Rk <sub>3</sub> /Rh <sub>4</sub> (Rk <sub>3</sub> )
16	48,68	619	Ginsenosido Rk <sub>3</sub> /Rh <sub>4</sub> (Rh <sub>4</sub> )
17	54,97	783	Ginsenosido 20(R)Rg <sub>3</sub>
18	56,48	783	Ginsenosido 20(S)Rg <sub>3</sub>
19	68,35	765	Ginsenosido Rk <sub>1</sub> /Rg <sub>5</sub> (Rk <sub>1</sub> )

20	69,53	765	Ginsenósido Rk <sub>1</sub> /Rg <sub>5</sub> (Rg <sub>5</sub> )
----	-------	-----	---

Tabla 5. Datos de HPLC-EM<sup>n</sup>

Tiempo de retención	Identidad	M/z <sup>-</sup> de pico de masa de ión cuasi-molecular
11,27	Notoginsenósido R <sub>1</sub>	799[M-H-Xyl] <sup>-</sup> ; 637[M-H-Xyl-Glc] <sup>-</sup> ; 475[M-H-Xyl-2Glc] <sup>-</sup>
12,38	Ginsenósido Re	799[M-H-Rham] <sup>-</sup> ; 783[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 637[M-H-Rham-Glc] <sup>-</sup> ; 475[M-H-Rham-2Glc] <sup>-</sup>
12,53	Ginsenósido Rg <sub>1</sub>	637[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 475[M-H-2Glc] <sup>-</sup>
20,81	Ginsenósido Rb <sub>1</sub>	945[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 783[M-H-2Glc] <sup>-</sup> ; 621[M-H-3Glc] <sup>-</sup> ; 459[M-H-4Glc] <sup>-</sup>
21,25	Notoginsenósido R <sub>2</sub>	637[M-H-Xyl] <sup>-</sup> ; 475[M-H-Xyl-Glc] <sup>-</sup>
22,53	Notoginsenósido R <sub>2</sub> iso.	637[M-H-Xyl] <sup>-</sup> ; 475[M-H-Xyl-Glc] <sup>-</sup>
22,85	Ginsenósido Rg <sub>2</sub>	637[M-H-Rham] <sup>-</sup> ; 475[M-H-Rham-Glc] <sup>-</sup>
23,77	Ginsenósido Rh <sub>1</sub>	475[M-H-Glc] <sup>-</sup>
25,00	Ginsenósido Rh <sub>1</sub> iso. (F <sub>1</sub> )	475[M-H-Glc] <sup>-</sup>
30,05	Ginsenósido Rd	783[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 621[M-H-2Glc] <sup>-</sup> ; 459[M-H-3Glc] <sup>-</sup>
34,81	ginsenósidoRdiso.	783[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 621[M-H-2Glc] <sup>-</sup> ; 459[M-H-3Glc] <sup>-</sup>
40,00	Ginsenósido Rf-H <sub>2</sub> O	619[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 457[M-H-2Glc] <sup>-</sup>
41,57	Notoginsenósido R <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	619[M-H-Xyl] <sup>-</sup>
43,72	Notoginsenósido R <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	619[M-H-Xyl] <sup>-</sup>
44,89	Ginsenósido Rg <sub>6</sub> /F <sub>4</sub>	619[M-H-Rham] <sup>-</sup> ; 457[M-H-Rham-Glc] <sup>-</sup>
54,97	Ginsenósido 20(R)Rg <sub>3</sub>	621[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 459[M-H-2Glc] <sup>-</sup>
56,48	Ginsenósido 20(S)Rg <sub>3</sub>	621[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 459[M-H-2Glc] <sup>-</sup>
68,35	Ginsenósido Rk <sub>1</sub> /Rg <sub>5</sub> (Rk <sub>1</sub> )	603[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 441[M-H-2Glc] <sup>-</sup>
69,53	Ginsenósido Rk <sub>1</sub> /Rg <sub>5</sub> (Rg <sub>5</sub> )	603[M-H-Glc] <sup>-</sup> ; 441[M-H-2Glc] <sup>-</sup>

Basándose en la investigación anterior, se establecen el procedimiento de extracción y el método de análisis para la preparación de MTC de la presente invención, que incluyen:

- 5 (1) un procedimiento en fase sólida para extraer los componentes liposolubles de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y los componentes de notoginsenósido de las pastillas de gotas de raíz de *Salviae miltiorrhizae*;

(2) un método de análisis de HPLC-EM para cada muestra.

- 10 Se han identificado en total 12 componentes de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 21 componentes de saponina de la raíz de *Notoginseng*. Entre ellos, se han identificado 4 componentes solubles en agua de la raíz de *Salviae miltiorrhizae*, 2 componentes liposolubles de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* y 9 componentes de saponina a través de comparación con las muestras de control, mientras que se identificaron otros compuestos basándose principalmente en un análisis de datos de EM<sup>n</sup> y comparación con datos de la bibliografía.

Ejemplo 9 (ejemplo de detección del atlas de huellas para los componentes de la raíz de *Salviae miltiorrhizae* en la preparación de MTC)

#### 1. Instrumentos y agentes

- 15 Instrumentos: Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100, que comprende: bomba Quad, sistema de desaireación en línea, inyector de muestras automático, detector DAD, tanque de temperatura de columna, estación de trabajo Chemstation; balanza electrónica BS210S (1/10<sup>-4</sup> g) (Beijing Sartorius Company), balanza electrónica METTLER AE240 ((1/10<sup>-4</sup> g o 1/10<sup>-5</sup> g) (Mettler-Toledo Corporation, Shanghai), centrífuga LD4-2 (4000 r/min) (Beijing Medical Centrifuge Factory), marmita de baño de agua termostática digital (Tianjing Changfeng Corporation), evaporador rotatorio RE-52AA (Shanghai Yarong Biochemical Instrumentation Factory), bomba de vacío de circulación de agua SHE-(III) (Gongyi Yingyuyuhua Instrumentation Factory), limpiador ultrasónico KQ-250B (Kunshan Ultrasonic Instrumentation Corporation), filtro HENGAO T&D (HENGGAO T&D), filtro de membrana de fibras sintéticas (abertura 0,45 μm) (Shanghai Xingya Purifying Materials Factory).

- 25 Agentes: acetonitrilo (cromatográficamente puro, Merck Company, EE.UU.), ácido fosfórico (calidad superior), agua pura Wahaha.

#### 2. Preparación de la muestra de prueba

- 30 Se pesaron de manera precisa 10 pastillas de la preparación de MTC de cada lote del ejemplo 1 y entonces se introdujeron en una botella de medición de 10 ml. Se añadió agua destilada en una cantidad suficiente para disolver las pastillas a través de agitación con ultrasonidos durante 15 min. Y entonces se añadió más agua destilada para lograr un volumen de 10 ml. Se sometió la disolución obtenida a centrifugación o filtración para obtener una disolución de muestra.

## 3. Condiciones de análisis de HPLC

Columna cromatográfica Agilent ZoRBax SB-C18 (4,6x250 mm, 5  $\mu$ m); fase móvil: siendo la fase móvil A una disolución acuosa de ácido fosfórico al 0,02%, siendo la fase móvil B una disolución acuosa de ácido fosfórico al 0,02%-acetonitrilo al 80%; velocidad de flujo: 1.000 ml/min; longitud de onda de detección: 280 nm, temperatura de la columna: 30°C; volumen de muestra inyectado: 10  $\mu$ l.

5

Gradiente de elución de la fase móvil:

Tiempo de retención	Fase móvil A (v/v)	Fase móvil B (v/v)
0 min	90%	10%
8 min	78%	22%
15 min	74%	26%
55 min	48%	52%

## 4. Resultados de detección (véase la tabla 7)

Tabla 7. Resultados de detección para los componentes de raíz de *Salviae miltiorrhizae* en 200 lotes de las pastillas de gotas de MTC anteriores

Pico n.º	Tiempo de retención promedio	% de DER del tiempo de retención	Área de pico promedio	% de DER del área de pico	Porcentaje de área de pico individual con respecto a área de pico total	Intervalo en porcentaje del área de pico individual con respecto a área de pico total
1	6,04	0,31	1627,92	5,91	20,80%	19,6%-22,0%
2	9,90	0,25	2575,54	13,53	32,90%	28,5%-37,4%
3	16,89	0,61	366,89	10,92	4,69%	4,2%-5,2%
4	17,84	0,70	381,40	13,81	4,87%	4,2%-5,5%
5	20,31	0,96	186,08	12,04	2,38%	2,1%-2,7%
6	23,74	0,76	555,35	10,48	7,09%	6,4%-7,8%
7	27,73	0,50	281,91	18,08	3,60%	3,0%-4,3%
8	31,02	1,18	1852,33	14,84	23,66%	20,2%-27,2%

10 Nota:

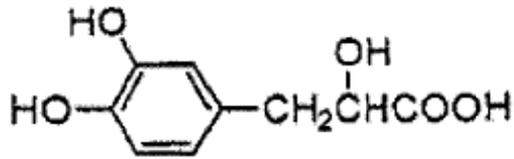
El pico 1 representa Danshensu; el pico 2 representa protocatechualdehído; el pico 3 representa ácido isolitospérmico A; el pico 4 representa ácido isolitospérmico B; el pico 5 representa ácido salvianólico D; el pico 6 representa ácido rosmarínico; el pico 7 representa ácido salvianólico B; y el pico 8 representa ácido salvianólico A (véase la figura 1).

15

La tabla 7 muestra las posiciones relativas y las razones de área (tiempo de retención y área de pico) de 8 picos, en los que 3 picos tienen una razón de área de pico individual con respecto a área de pico total mayor del 10% y los 8 picos tienen una razón de área de pico individual con respecto a área de pico total mayor del 2%.

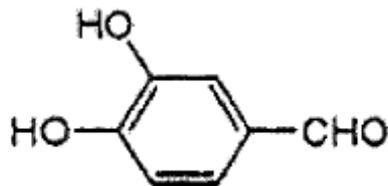
REIVINDICACIONES

1. Preparación de medicamento basada en extractos obtenidos de raíz de *Salviae miltiorrhizae* y raíz de *Notoginseng* para su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, caracterizada porque los extractos comprenden:

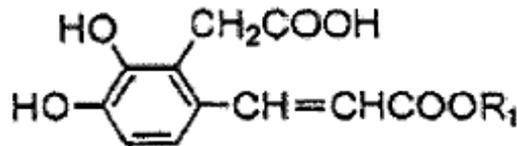


Danshensu

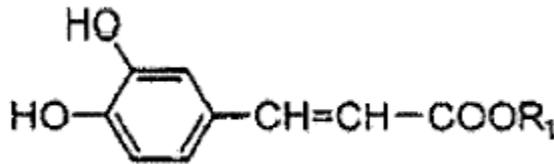
5



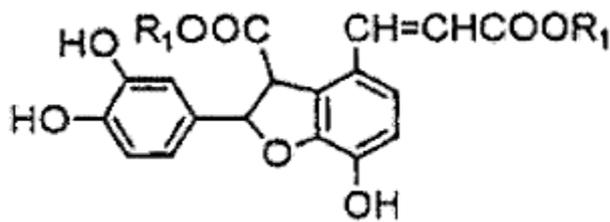
Protocatechualdehído



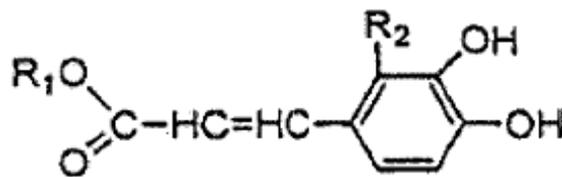
Ácido salvianólico D



Ácido rosmarínico

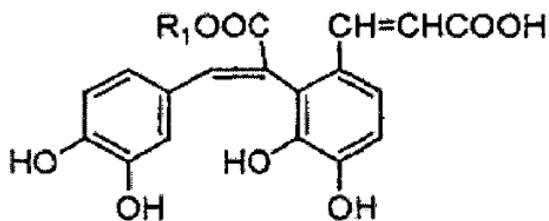


Ácido salvianólico B,

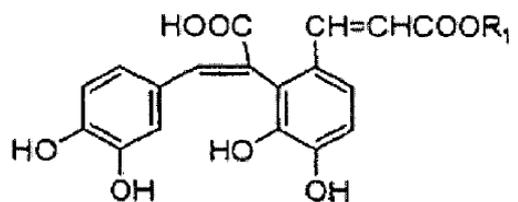


Ácido salvianólico

10

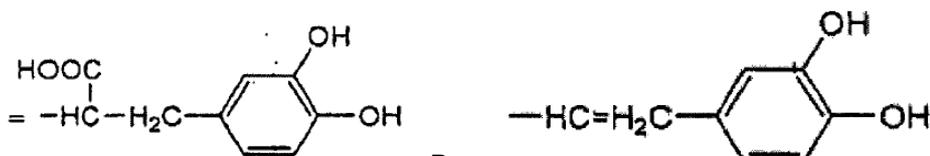


ácido isolitospérmico A



y

ácido isolitospérmico B



en los que  $R_1$  es  $\text{—HC(=O)CH}_2\text{—}$  y  $R_2$  es  $\text{—HC=CH}_2\text{—}$ , en la que la preparación de medicamento tiene los parámetros físicos y químicos caracterizados tal como sigue:

5 en el espectro de HPLC, hay 8 picos que tienen una razón de área de pico individual con respecto a área de pico total mayor del 2%; el tiempo de retención promedio de estos 8 picos es de 6,04, 9,90, 16,89, 17,84, 20,31, 23,74, 27,73 y 31,02 respectivamente, el % de DER del tiempo de retención es de 0,31, 0,25, 0,61, 0,70, 0,96, 0,76, 0,50 y 1,18 respectivamente; el área de pico promedio es de 1627,92, 2575,54, 366,89, 381,40, 186,08, 555,35, 281,91 y 1852,33 respectivamente, el % de DER del área de pico es de 5,91, 13,53, 10,92, 13,81, 12,04, 10,48, 18,08 y 14,84, respectivamente; y el intervalo de la razón de área de pico individual con respecto a área de pico total representa el 19,6%-22,0%, 28,5-37,4%, 4,2%-5,2%, 4,2%-5,5%, 2,1%-2,7%, 6,4%-7,8%, 3,0%-4,3% y 20,2%-27,2% respectivamente;

en la que los parámetros físicos y químicos anteriores se determinan en las siguientes condiciones:

(1) cromatografía de líquidos de alta resolución:

15 carga: gel de octadecilsilil-sílice; velocidad de flujo: 1.000 ml/min; y longitud de onda de detección: 280 nm; y

(2) elución:

20 fase móvil A: disolución acuosa de ácido fosfórico al 0,02%; fase móvil B: disolución acuosa de ácido fosfórico al 0,02%-acetonitrilo al 80%; y elución en gradiente: cambiándose la fase móvil A desde el 90% hasta el 78% homogéneamente y cambiándose la fase móvil B desde el 10% hasta el 22% homogéneamente durante de 0 a 8 min, la fase móvil A desde el 78% hasta el 74% y la fase móvil B desde el 22% hasta el 26% durante de 8 a 15 min, y la fase móvil A desde el 74% hasta el 48% y la fase móvil B desde el 26% hasta el 52% durante de 15 a 55 min;

25 y en la que la disolución de muestra se prepara y se determina a través de las siguientes etapas de: pesar 10 pastillas de las preparaciones de medicamento de manera precisa y añadirlas a una botella de medición de 10 ml; añadir agua destilada en una cantidad suficiente para disolver las preparaciones a través de agitación con ultrasonidos durante 15 minutos; añadir más agua destilada para lograr un volumen de 10 ml; someter la disolución resultante a centrifugación o filtración para obtener la disolución de muestra; inyectar de manera precisa 10  $\mu\text{l}$  de la disolución de muestra en el sistema de HPLC; y determinar la disolución de muestra según la cromatografía HPLC para obtener el espectro de HPLC.

30 2. Preparación de medicamento según la reivindicación 1, caracterizada porque los extractos comprenden los componentes que tienen una  $m/z$  de pico de masa de ión cuasi-molecular de 417, 717, 359, 717, 339 y 493  $[\text{M-H}]^-$  respectivamente, en la que

el componente con 417  $[\text{M-H}]^-$  tiene una segunda  $m/z$  de ión de fragmento de 175 $[\text{M-CO}_2\text{-R-H}_2\text{O}]^-$  y 373 $[\text{M-H-CO}_2]^-$ , y una tercera  $m/z$  de ión de fragmento de 147, 157 y 133;

35 el componente con 717  $[\text{M-H}]^-$  tiene una segunda  $m/z$  de ión de fragmento de 519 $[\text{M-R-H}_2\text{O}]^-$  y 321  $[\text{M-2R-2H}_2\text{O}]^-$ , una tercera  $m/z$  de ión de fragmento de 321  $[\text{M-R-H}_2\text{O}]^-$  y 339 $[\text{M-R}]^-$ , y una tercera  $m/z$  de ión de fragmento de 279, 293, 249, 223 y 185;

el componente con 359  $[\text{M-H}]^-$  tiene una segunda  $m/z$  de ión de fragmento de 161 $[\text{M-R-H}_2\text{O}]^-$ , 179 $[\text{M-R}]^-$ , y 195;

40 el componente con 717  $[\text{M-H}]^-$  tiene una segunda  $m/z$  de ión de fragmento de 519 $[\text{M-R-H}_2\text{O}]^-$  y 321 $[\text{M-2R-2H}_2\text{O}]^-$ , una tercera  $m/z$  de ión de fragmento de 321  $[\text{M-R-H}_2\text{O}]^-$  y 339 $[\text{M-R}]^-$ , y una cuarta  $m/z$  de ión de fragmento de 279, 293, 249, 233 y 185;

el componente con 339  $[\text{M-H}]^-$  tiene una segunda  $m/z$  de ión de fragmento de 321 $[\text{M-H-H}_2\text{O}]^-$  y 295 $[\text{M-HCO}_2]^-$ , una tercera  $m/z$  de ión de fragmento de 279 y 267, y una cuarta  $m/z$  de ión de fragmento de 251; y

45 el componente con 493  $[\text{M-H}]^-$  tiene una segunda  $m/z$  de ión de fragmento de 295 $[\text{M-R-H}_2\text{O}]^-$ , y una tercera  $m/z$  de ión de fragmento de 159 y 109;

en la que el análisis de espectro de masas se lleva a cabo tal como sigue:

(1) la HPLC-EM se lleva a cabo a través de la detección de ión negativo en las siguientes condiciones de velocidad de flujo de gas seco: 10 l/min; presión de nebulizador: 60 psi; temperatura de gas seco: 350°C; voltaje capilar: 3500 v; e intervalo de barrido de m/z: 100-1200; y

5 (2) la HPLC-EM<sup>n</sup> se lleva a cabo a través de la detección de ión negativo en las siguientes condiciones de velocidad de flujo de gas seco: 10 l/min; presión de nebulizador: 60 psi; temperatura de gas seco: 350°C; voltaje capilar: 3500 v; intervalo de barrido de m/z: 100-800; y amplitud de fragmento: 1,5-3,0 v.

3. Preparación de medicamento según la reivindicación 1, caracterizada porque los extractos comprenden los componentes que tienen una m/z de pico de masa de ión cuasi-molecular de 931, 945, 799, 1107, 769, 783, 637, 637, 945, 945, 781, 751, 751, 765, 783, 783, 765 y 765 [M-H]<sup>-</sup> respectivamente, en la que:

10 el componente con 931 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 799[M-H-Xyl]<sup>-</sup>, 637[M-H-Xyl-Glc]<sup>-</sup> y 475[M-H-Xyl-2Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 945 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 799[M-H-Rham]<sup>-</sup>, 783[M-H-Glc]<sup>-</sup>, 637[M-H-Rham-Glc]<sup>-</sup> y 475[M-H-Rham-2Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 799 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 637[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 475[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

15 el componente con 1107 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 945[M-H-Glc]<sup>-</sup>, 783[M-H-2Glc]<sup>-</sup>, 621[M-H-3Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-4Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 769 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 637[M-H-Xyl]<sup>-</sup> y 475[M-H-Xyl-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 769 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 637[M-H-Xyl]<sup>-</sup> y 475[M-H-Xyl-Glc]<sup>-</sup>;

20 el componente con 783 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 637[M-H-Rham]<sup>-</sup> y 475[M-H-Rham-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 637 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 475[M-H-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 637 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 475[M-H-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 945 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 783[M-H-Glc]<sup>-</sup>, 621[M-H-2Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-3Glc]<sup>-</sup>;

25 el componente con 945 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 783[M-H-Glc]<sup>-</sup>, 621[M-H-2Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-3Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 781 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 619[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 457[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 751 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 619[M-H-Xyl]<sup>-</sup>;

el componente con 751 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 619[M-H-Xyl]<sup>-</sup>;

30 el componente con 765 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 619[M-H-Rham]<sup>-</sup> y 457[M-H-Rham-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 783 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 621[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 783 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 621[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 765 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 603[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 441[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

35 el componente con 765 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 603[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 441[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

en la que el análisis de espectro de masas se lleva a cabo tal como sigue:

(1) la HPLC-EM se lleva a cabo a través de la detección de ión negativo en las siguientes condiciones de velocidad de flujo de gas seco: 10 l/min; presión de nebulizador: 60 psi; temperatura de gas seco: 350°C; voltaje capilar: 3500 v; e intervalo de barrido de m/z: 400-1500; y

40 (2) la HPLC-EM<sup>n</sup> se lleva a cabo a través de la detección de ión negativo en las siguientes condiciones de velocidad de flujo de gas seco: 10 l/min; presión de nebulizador: 60 psi; temperatura de gas seco: 350°C; voltaje capilar: 3500 v; intervalo de barrido de m/z: 400-1200; y amplitud de fragmento: 1,2-1,5 v.

4. Preparación de medicamento según la reivindicación 1, caracterizada porque los extractos comprenden los componentes que tienen una m/z de pico de masa de ión cuasi-molecular de 417, 717, 359, 717, 339 y 493 [M-H]<sup>-</sup> respectivamente, en la que

45

el componente con 417 [M-H]<sup>-</sup> tiene una segunda m/z de ión de fragmento de 175[M-CO<sub>2</sub>-R-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> y 373[M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, y una tercera m/z de ión de fragmento de 147, 157 y 133;

5 el componente con 717 [M-H]<sup>-</sup> tiene una segunda m/z de ión de fragmento de 519[M-R-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> y 321[M-2R-2H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> una tercera m/z de ión de fragmento de 321[M-R-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> y 339[M-R]<sup>-</sup> y una tercera m/z de ión de fragmento de 279, 293, 249, 223 y 185;

el componente con 359 [M-H]<sup>-</sup> tiene una segunda m/z de ión de fragmento de 161[M-R-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 179[M-R]<sup>-</sup> y 195;

10 el componente con 717 [M-H]<sup>-</sup> tiene una segunda m/z de ión de fragmento de 519[M-R-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> y 321[M-2R-2H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, una tercera m/z de ión de fragmento de 321[M-R-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> y 339[M-R]<sup>-</sup>, y una cuarta m/z de ión de fragmento de 279, 293, 249, 233 y 185;

el componente con 339 [M-H]<sup>-</sup> tiene una segunda m/z de ión de fragmento de 321[M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> y 295[M-HCO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, una tercera m/z de ión de fragmento de 279 y 267, y una cuarta m/z de ión de fragmento de 251; y

el componente con 493 [M-H]<sup>-</sup> tiene una segunda m/z de ión de fragmento de 295[M-R-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, y una tercera m/z de ión de fragmento de 159 y 109;

15 en la que el análisis de espectro de masas se lleva a cabo tal como sigue:

(1) la HPLC-EM se lleva a cabo a través de la detección de ión negativo en las siguientes condiciones de velocidad de flujo de gas seco: 10 l/min; presión de nebulizador: 60 psi; temperatura de gas seco: 350°C; voltaje capilar: 3500 v; e intervalo de barrido de m/z: 100-1200; y

20 (2) la HPLC-EM<sup>n</sup> se lleva a cabo a través de la detección de ión negativo en las siguientes condiciones de velocidad de flujo de gas seco: 10 l/min; presión de nebulizador: 60 psi; temperatura de gas seco: 350°C; voltaje capilar: 3500 v; intervalo de barrido de m/z: 100-800; y amplitud de fragmento: 1,5-3,0 v;

dicha preparación de medicamento comprende además los componentes que tienen una m/z de pico de masa de ión cuasi-molecular de 931, 945, 799, 1107, 769, 769, 783, 637, 637, 945, 945, 781, 751, 751, 765, 783, 783, 765 y 765 [M-H]<sup>-</sup>, en la que:

25 el componente con 931 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 799[M-H-Xyl]<sup>-</sup>, 637[M-H-Xyl-Glc]<sup>-</sup> y 475[M-H-Xyl-2Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 945 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 799[M-H-Rham]<sup>-</sup>, 783[M-H-Glc]<sup>-</sup>, 637[M-H-Rham-Glc]<sup>-</sup> y 475[M-H-Rham-2Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 799 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 637[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 475[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

30 el componente con 1107 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 945[M-H-Glc]<sup>-</sup>, 783[M-H-2Glc]<sup>-</sup>, 621 [M-H-3Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-4Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 769 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 637[M-H-Xyl]<sup>-</sup> y 475[M-H-Xyl-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 769 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 637[M-H-Xyl]<sup>-</sup> y 475[M-H-Xyl-Glc]<sup>-</sup>;

35 el componente con 783 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 637[M-H-Rham]<sup>-</sup> y 475[M-H-Rham-Glc]<sup>-</sup> ;

el componente con 637 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 475[M-H-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 637 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 475[M-H-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 945 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 783 [M-H-Glc]<sup>-</sup>, 621 [M-H-2Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-3Glc]<sup>-</sup>;

40 el componente con 945 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 783 [M-H-Glc]<sup>-</sup>, 621 [M-H-2Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-3Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 781 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 619[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 457[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 751 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 619[M-H-Xyl]<sup>-</sup>;

el componente con 751 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 619[M-H-Xyl]<sup>-</sup>;

45 el componente con 765 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 619[M-H-Rham]<sup>-</sup> y 457[M-H-Rham-Glc]<sup>-</sup>;

el componente con 783 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 621[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;  
 el componente con 783 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 621[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 459[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;  
 el componente con 765 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 603[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 441[M-H-2Glc]<sup>-</sup>;  
 el componente con 765 [M-H]<sup>-</sup> tiene una m/z de ión de fragmento de 603[M-H-Glc]<sup>-</sup> y 441 [M-H-2Glc]<sup>-</sup>;

5 en la que el análisis de espectro de masas se lleva a cabo tal como sigue:

(1) la HPLC-EM se lleva a cabo a través de la detección de ión negativo en las siguientes condiciones de velocidad de flujo de gas seco: 10 l/min; presión de nebulizador: 60 psi; temperatura de gas seco: 350°C; voltaje capilar: 3500 v; e intervalo de barrido de m/z: 400-1500; y

10 (2) la HPLC-EM<sup>n</sup> se lleva a cabo a través de la detección de ión negativo en las siguientes condiciones de velocidad de flujo de gas seco: 10 l/min; presión de nebulizador: 60 psi; temperatura de gas seco: 350°C; voltaje capilar: 3500 v; intervalo de barrido de m/z: 400-1200; y amplitud de fragmento: 1,2-1,5 v.

5. Preparación de medicamento según la reivindicación 4, caracterizada porque los componentes solubles en agua de los extractos comprenden ácido salvianólico D, ácido salvianólico E, ácido rosmarínico, ácido salvianólico B, ácido salvianólico G, ácido salvianólico A, Danshensu, protocatchualdehído, ácido isolitospérmico A, ácido isolitospérmico B, tanshinona I, tanshinona IIA, notoginsenosido R<sub>1</sub>, ginsenosido Re, ginsenosido Rg<sub>1</sub>, ginsenosido Rb<sub>1</sub>, notoginsenosido R2, notoginsenosido R2 iso., ginsenosido Rg<sub>2</sub>, ginsenosido Rh<sub>1</sub>, ginsenosido Rh<sub>1</sub> iso., ginsenosido Rd, ginsenosido Rd iso., ginsenosido Rf-H<sub>2</sub>O, notoginsenosido R2-H<sub>2</sub>O, ginsenosido Rg<sub>6</sub> o F4, ginsenosido 20(R)-Rg<sub>3</sub>, ginsenosido 20(S)-Rg<sub>3</sub>, ginsenosido Rk<sub>1</sub>, ginsenosido Rg<sub>5</sub>, ginsenosido Rk<sub>3</sub> y ginsenosido Rh<sub>4</sub>.

20 6. Preparación de medicamento según la reivindicación 1, caracterizada porque los 8 picos con un tiempo de retención promedio de 6,04, 9,90, 16,89, 17,84, 20,31, 23,74, 27,73 y 31,02 se corresponden con Danshensu, protocatchualdehído, ácido isolitospérmico A, ácido isolitospérmico B, ácido salvianólico D, ácido rosmarínico, ácido salvianólico B y ácido salvianólico A, respectivamente.

25 7. Procedimiento para preparar la preparación de medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende:

pesar raíz de *Salviae miltiorrhizae* y raíz de *Notoginseng*;

añadir hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de potasio o una mezcla de los mismos en una cantidad del 0,5%-4,0% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales;

30 someter a ebullición la mezcla resultante en 3-6 veces de agua durante 2-4 horas;

someter la mezcla a filtración y concentrar los filtrados combinados;

añadir un etanol con la concentración por encima del 70% en una cantidad suficiente para lograr un contenido del 65-70% del etanol;

permitir que la mezcla repose y separar el sobrenadante;

35 recuperar el etanol del sobrenadante, y concentrar el residuo hasta que tenga una densidad relativa de 1,20-1,50, que es un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*;

mezclar el extracto anterior con borneol o un aceite de madera de *Dalbergiae odoriferae*; y

añadir un excipiente para obtener la preparación.

40 8. Procedimiento para preparar la preparación de medicamento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho excipiente es almidón, dextrina, lactosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, polietilenglicol, estearato de magnesio, gel de silicio en micropolvo, xilitol, lactitol, glucosa, glicina, manitol, metilalmidón sódico, carboximetilcelulosa de sodio reticulada, polivinilpirrolidona reticulada como tal o en agua, o una mezcla de más de uno de los adyuvantes anteriores; dicha preparación está en la forma de dosificación de inyección, comprimido, comprimido de liberación sostenida, pastilla de gota, gránulo, polvo de inyección, cápsula, microgránulo o disgregante oral.

45 9. Procedimiento para preparar la preparación de medicamento según la reivindicación 8, caracterizado porque dicha preparación está en forma de dosificación de pastilla de gota.

10. Procedimiento para preparar la preparación de medicamento según la reivindicación 9, caracterizado porque comprende las etapas de:

- pesar raíz de *Salviae miltiorrhizae* y raíz de *Notoginseng*;
- añadir bicarbonato de sodio en una cantidad del 1,4%-1,9% basándose en el peso total de dichos materiales medicinales;
- 5 someter a ebullición la mezcla resultante en 4-5 veces de agua durante 2-3 horas, y luego en 3-4 veces de agua durante 1-2 horas;
- someter la mezcla a filtración y concentrar los filtrados combinados hasta que se logre un peso específico de 1,16-1,20;
- añadir un etanol con la concentración por encima del 70% en una cantidad suficiente para obtener un contenido del 65-70% del etanol;
- 10 permitir que la mezcla repose durante 8-12 horas y separar el sobrenadante;
- recuperar el etanol del sobrenadante y concentrar el residuo hasta que tenga una densidad relativa de 1,32-1,40, que es un extracto de raíz de *Salviae miltiorrhizae*-raíz de *Notoginseng*;
- mezclar el extracto anterior con borneol o un aceite de madera de *Dalbergiae odoriferae*, y polietilenglicol-6000 uniformemente;
- 15 calentar la mezcla hasta la fusión;
- hacer gotear la masa fundida en un refrigerante de parafina líquida o aceite de metilsilicona a través de una máquina de pastillas de gotas;
- tomar las pastillas de gotas obtenidas y someterlas a una eliminación de aceite; y
- tamizar las pastillas para obtener la preparación deseada.
- 20 11. Uso de una preparación de medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento para tratar enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.

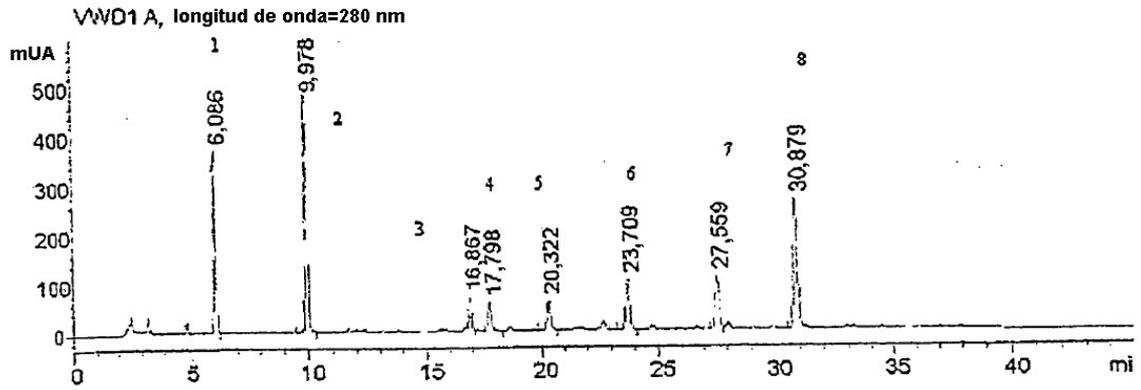


Fig 1

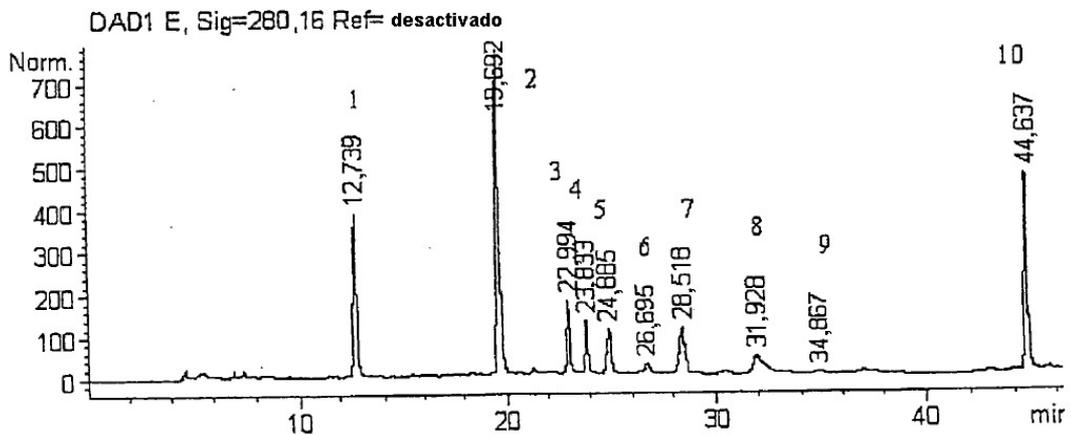


Fig 2

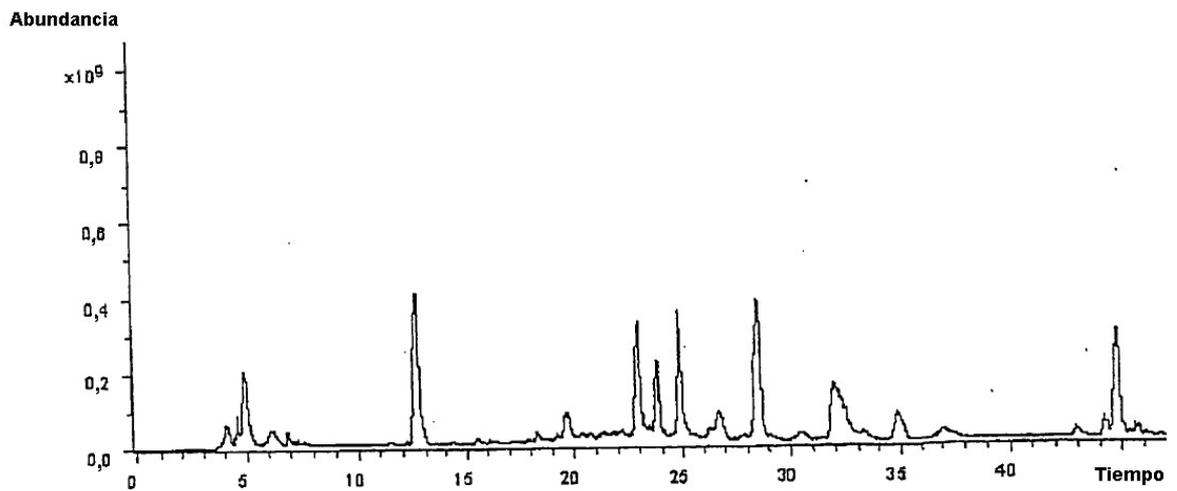


Fig 3

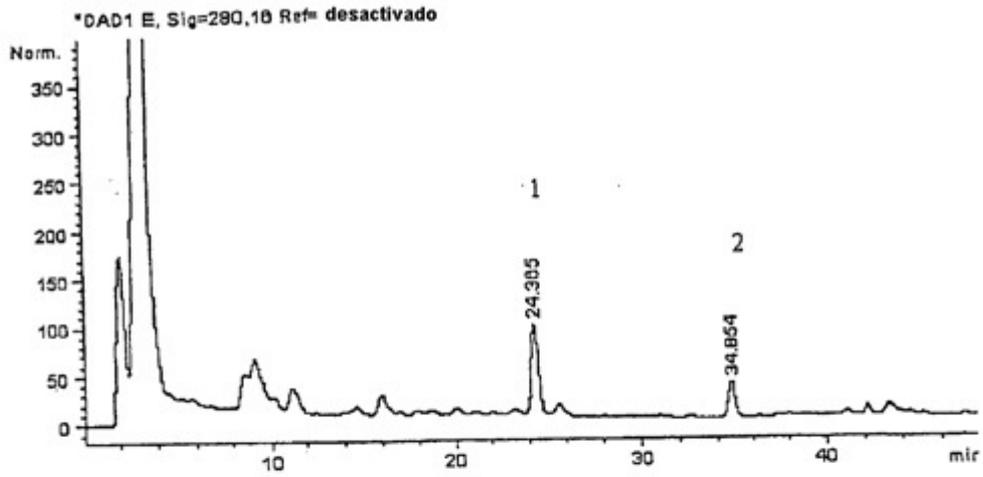


Fig 4

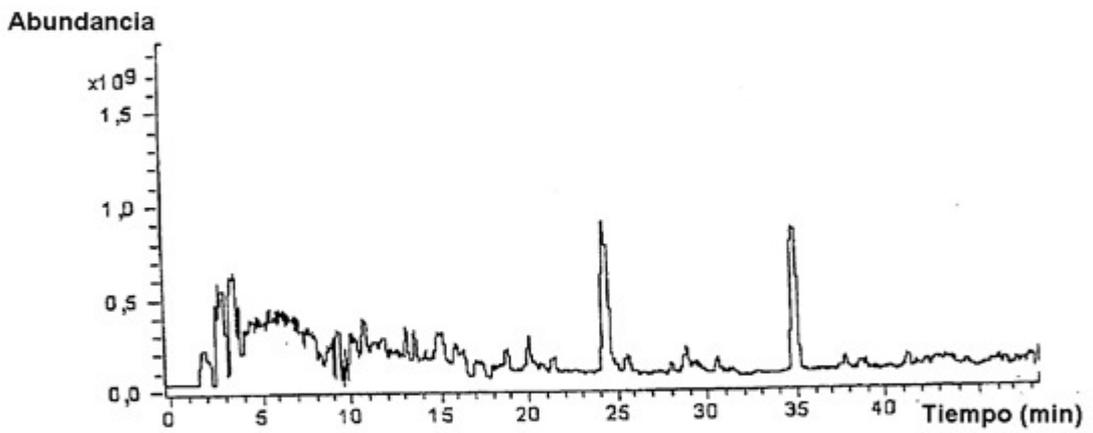


Fig 5

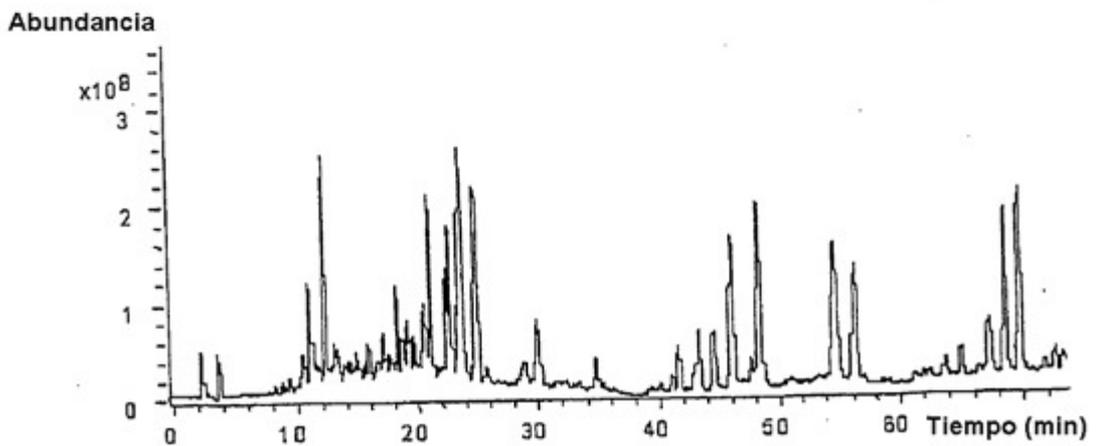


Fig 6