



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101732419 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 201010010026.6

A61K 131/00(2006.01)

(22) 申请日 2010.01.06

(71) 申请人 辽宁中医药大学

地址 110032 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路
79号辽宁中医药大学科研处

(72) 发明人 孟宪生 翟延君 卢秉久 丑静
康廷国 曹爱民

(74) 专利代理机构 沈阳利泰专利商标代理有限
公司 21209

代理人 艾福义

(51) Int. Cl.

A61K 36/70(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

A61K 9/20(2006.01)

A61K 9/48(2006.01)

A61K 9/12(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种水红花子提取物的用途及制备方法

(57) 摘要

一种水红花子提取物的用途及制备方法,本发明公开了一种从水红花子中提取的具有抗癌作用的黄酮类化合物,其提取方法为醇提法,再用大孔树脂层析分离,依次用水、不同浓度的乙醇溶液洗脱,通过大孔树脂吸附技术富集其有效成分黄酮类化合物,得水红花子总黄酮提取物。经体外实验 MTT 法验证水红花子总黄酮具有较好的抗肝癌、宫颈癌、腺癌的作用,体内实验也验证了水红花子总黄酮提取物对肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用。

1. 一种水红花子提取物的用途,其特征在于水红花子提取物为水红花子总黄酮,用于制备抗癌药物;能制成以下剂型:口服给药制剂:口服液、片剂、胶囊、含片、丸剂;注射给药制剂:注射剂;喷雾给药制剂。

2. 根据权利要求1所述的一种水红花子提取物的用途,其特征在于所述的具有抗癌作用的水红花子提取物的化学物质组,其化学鉴别反应和光谱学特征如下:

(1) 金属盐类试剂的络合反应:

① 盐酸-镁粉反应:在水红花子提取液中加入少量镁粉,再加1-2滴浓盐酸,在水浴中加热3分钟,溶液颜色变为红色;

② $AlCl_3$ 显色反应:将水红花子提取液滴于滤纸上形成斑点,再往斑点上喷1% $AlCl_3$ 乙醇溶液,置紫外灯下检视,斑点显黄色;

(2) 碱性试剂显色反应

常温下往提取液中滴加NaOH水溶液,摇匀,溶液颜色变为橙红色;

(3) 紫外吸收光谱特征

样品液中用甲醇或乙醇溶解,在紫外段波长测定吸收峰,结果表明,在290nm和371nm出现最大吸收峰。

3. 根据权利要求1所述的一种水红花子提取物的制备方法,其特征在于所述的具有抗癌活性的水红花子总黄酮提取工艺包含以下步骤:水红花子药材的前处理;溶剂提取;树脂吸附纯化处理;浓缩、干燥药液得到总黄酮固体产物。

4. 根据权利要求3所述的一种水红花子提取物的制备方法,其特征在于所述的该工艺包含将药材干燥,粉碎过程。

5. 根据权利要求3所述的一种水红花子提取物的制备方法,其特征在于所述的该工艺包含将经过前处理的药材用溶剂加热回流法提取。

6. 根据权利要求5所述的一种水红花子提取物的制备方法,其特征在于该工艺加热回流提取的溶剂为乙醇溶液。

7. 根据权利要求3所述的一种水红花子提取物的制备方法,其特征在于该工艺纯化处理为利用大孔吸附树脂对提取液进行吸附,再用水-乙醇溶液洗涤、解吸附,得到纯化提取液;该工艺树脂液洗涤、解吸附步骤所用溶液为水和乙醇溶液。

8. 根据权利要求3所述的一种水红花子提取物的制备方法,其特征在于该工艺干燥步骤可用减压干燥、冷冻干燥、喷雾干燥。

一种水红花子提取物的用途及制备方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种医药中间体水红花子总黄酮提取物及其提取方法，特别是从水红花子中提取的黄酮类化合物用于抗癌作用。

技术背景：

[0002] 水红花子为蓼科植物红蓼 (*Polygonum orientale* L.) 的干燥成熟果实，呈棕黑色扁圆形，有光泽，双面微凹，中部略有纵向隆起。水红花子归肝、胃经，具有散血消癥、消积止痛的功效，善消气血水互结之癥瘕积聚。主要含有槲皮素、花旗松素及三羟基二氢黄酮等。黄酮类化合物具有广泛的生物活性，作为一种功能成分，其主要作用有：抗肿瘤，延缓衰老，增强心血管功能，治疗慢性前列腺炎，增强免疫力，调解内分泌系统，护肝，抗炎，抗过敏，抑菌，抗病毒等。所以黄酮类化合物的研究日益引起了人们的重视。其中水红花子中黄酮类成分槲皮素具有较强的抗癌活性，对恶性肿瘤生长和转移具有良好的抑制作用，被认为是已知最强的抗癌剂之一，特别是作为化学预防剂能全面地作用于癌发生的始发、促癌和演进 3 个阶段，兼有抗致癌、抗促癌和诱导分化的作用。花旗松素具有较强的抗氧化，抗影射作用。具有再生，解毒和抗体逆流的作用。能抑制过酸氧化脂化合物及细胞膜的病变。阻滞自由基的破坏作用，阻碍细胞老化及各种疾病的发展过程。临床上主要用于抗菌消炎、保护肝脏性能治疗和预防心脑血管疾病、呼吸系统疾病糖尿病的预防和治疗等。

[0003] 经过我们检索还得到以下的关于水红花子的研究内容，例如：谢周涛，何再安，楼一层，刘焱文在《中药材》发表了“水红花子黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱研究”的文章，该文章对不同产地水红花子进行 HPLC 指纹图谱比较研究，可以对不同产地水红花子药材进行鉴别，并可在一定程度上进行质量控制。

[0004] 葛斌，张振明，许爱霞，高湘，雷晓燕在《第三军医大学学报》发表了“水红花子醇提物抑制大鼠组织脂质过氧化反应的体外作用研究”的文章，研究了水红花子醇提物的抗氧化活性。方法用 $\cdot\text{OH}$ 生成系统 Fe^{2+} 抗坏血酸诱导大鼠心、肝、肾组织匀浆脂质过氧化，用 TBA 比色法测定 MDA 含量；用 NBT 还原法测酵母多糖 A 刺激大鼠中性白细胞产生的 O_2^- ；用分光光度法测 H_2O_2 诱发的大鼠红细胞溶血度。结果 6.3、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{L}$ EFPO 能不同程度抑制 Fe^{2+} 抗坏血酸诱导的大鼠心、肝、肾脂质过氧化产物 MDA 生成，其抑制心、肝、肾 MDA 生成的 IC_{50} 分别为 31.8、32.5、40.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，量效关系均呈负相关， r 分别为 -0.886、-0.874 及 -0.918 ($P < 0.01$)；能不同程度抑制酵母多糖 A 刺激中性粒细胞生成 O_2^- ， IC_{50} 为 31.9 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，量效关系呈负相关， $r = -0.873$ ($P < 0.01$)；能不同程度抑制 H_2O_2 诱发的红细胞氧化溶血， IC_{50} 为 56.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，量效关系呈负相关， $r = -0.888$ ($P < 0.01$)。结论水红花子醇提物通过清除 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 及 H_2O_2 发挥抗氧化活性。

[0005] 翟延君，张淑荣，郝宁，康廷国在《辽宁中医学院学报》发表了“水红花子研究概况”的文章，通过对水红花子的研究综述，为该药的开发、临床应用及进一步深入研究提供参考，经查阅水红花子近 40 年的有关文献资料总结了水红花子在本草考证、生药鉴别、化学成分、药理作用及现代临床应用的研究现状。结论：该药的研究缺少质量控制指标，药用

机理、药效学方面的研究还处于初步探索阶段,现代科技手段的应用则处于空白。对水红花子还应进行深入研究。

[0006] 谢周涛,何再安,刘焱文在《时珍国医国药》发表了“红蓼的化学成分及药理研究”的文章,红蓼性味凉辛有毒,具有祛风除湿,清热解毒,活血祛瘀之功效。主治风湿痹痛,痢疾,腹泻,吐泻转筋,水肿,脚气,痈疮疔疖,蛇虫咬伤,小儿疳积疝气,跌打损伤,疟疾。有文献报道:分别从红蓼的叶、果实和全草中分离得到黄酮类化合物,其全草中还分离得到木脂素类和二苯乙烯类化合物。现代药理研究表明:该药具有抗急性心肌缺血,扩张血管,降血压,抗菌和抗肿瘤等广泛的药理活性。

[0007] 翟延君,初正云,程嘉艺,康廷国在《中药材》发表了“水红花子消积止痛药效学实验研究”的文章,通过药理学实验,比较水红花子生品与制品的水提取物与醇提取物消积止痛作用药效学差异。利用离体肠管法、小肠炭末推进法、热板法、醋酸扭体法结果表明水红花子生品与制品的水溶性与醇溶性提取物的消积止痛作用药效不同,制品水提取物的消积止痛作用佳,与传统中医用药理论一致。

[0008] 魏艳,陈晓青,马志祥,蒋新宇在《中成药》发表了“红蓼不同提取部位花旗松素和总黄酮含量的测定”的文章,该实验分别测定了红蓼生药果实、茎、叶等部位中花旗松素和总黄酮的含量,为红蓼资源开发和品质评价提供了科学依据。

发明内容:

[0009] 本发明的目的是从水红花子中分离出有抗癌作用的有效物质组分(水红花子总黄酮),为抗癌药物的研发提供中间体,为更合理的开发和利用水红花子奠定基础,为更好的利用我国的中草药资源丰富中草药治疗疾病的领域提供条件。

[0010] 本发明通过对水红花子的乙醇提取液通过大孔吸附树脂梯度洗脱的提取物进行研究,发现具有抗癌作用的成分为黄酮类化合物。在体外的抗癌试验研究表明,其黄酮类化合物具有良好的抗癌效果。从水红花子中提取的抗癌有效成分黄酮类化合物,其化学鉴别反应和光谱特征如下:

[0011] (1) 金属盐类试剂的络合反应:

[0012] ① 盐酸-镁粉反应:在水红花子提取液中加入少量镁粉,再加 1-2 滴浓盐酸,在水浴中加热 3 分钟,溶液颜色变为红色;

[0013] ② $AlCl_3$ 显色反应:将水红花子提取液滴于滤纸上形成斑点,再往斑点喷 1% $AlCl_3$ 乙醇溶液,置紫外灯下检视,斑点显黄色;

[0014] (2) 碱性试剂显色反应

[0015] 常温下往提取液中滴加 NaOH 水溶液,摇匀,溶液颜色变为橙红色;

[0016] (3) 紫外吸收光谱特征

[0017] 样品液中用甲醇或乙醇溶解,在紫外段波长测定吸收峰,结果表明,在 290nm 和 371nm 出现最大吸收峰。

具体实施例:

[0018] 一、水红花子有效物质组的提取

[0019] 提取前处理:水红花子药材(以下简称药材)烘干、粉碎制成粗粉。

[0020] 提取方法:药材粗粉,加乙醇溶液加热回流提取,合并醇提液,过滤,浓缩,浓缩液用大孔树脂吸附,水洗柱后不同浓度的乙醇溶液依次洗脱,洗脱液回收溶剂,干燥,即得水红花子总黄酮提取物。

[0021] 二、水红花子有效物质组的药理研究

[0022] 本发明通过对水红花子总黄酮的提取物药理实验研究结果表明,水红花子总黄酮提取物体外、体内的抗癌作用试验中,具有良好的效果。

[0023] 1、实验材料

[0024] 1.1 水红花子总黄酮提取物自制,临用前溶解后除菌过滤备用。

[0025] 1.2 肿瘤细胞株肝癌细胞株 Hep G₂、人宫颈癌细胞株 HeLa、人大肠腺癌细胞株 SW-480 均购自于上海细胞生物研究所细胞库。

[0026] 1.3 实验试剂溴化四氮唑蓝 (MTT),Sigma 公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM 培养基、胰酶为美国 GIBCO 公司;DMSO 为天津市博迪化工有限公司。

[0027] 1.4 实验仪器 CO₂ 培养箱,长沙华曦电子科技有限公司;低温冰箱. (-80℃, Innova U570), 武汉理想科学仪器有限公司;超净工作台,苏州佳宝净化工程设备有限公司;低速离心机,北京时代北利离心机有限公司;倒置显微镜,上海万衡精密仪器有限公司;酶标仪 (Sunrise), 北京东胜创新生物科技有限公司。

[0028] 2、实验方法

[0029] MTT 法:将细胞经胰酶消化后计数,制成 6×10^4 个 /ml 的细胞悬液,以 100 μ L/ 孔接种于 96 孔板中,培养 24h 后,每孔加药物溶液 100 μ L,每孔总液量为 200 μ L,每个药物浓度设 5 个重复孔,并设空白对照 (DMEM 培养液)。培养 48h 后,弃去原培养液,在 96 孔板中每孔加入 100 μ L DMEM 培养液,再加入 5mg/mL 的 MTT20 μ L,继续培养 4h,弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L,振荡 5min 后,在酶标仪测 OD490nm 值。

[0030] 细胞生长抑制率 = (对照组 OD 值 - 试验组 OD 值) / 对照组 OD \times 100%。

[0031] 3、实验结果

[0032] MTT 法测定水红花子总黄酮提取物对人肝癌细胞 HepG₂、人宫颈癌细胞 HeLa、人大肠腺癌细胞 SW-480 生长的抑制作用,结果如下。

[0033] 表 1 以 MTT 法检测水红花子总黄酮提取物对人肝癌细胞株 HepG₂ 的生长抑制作用 (%) (n = 5)

	提取物浓度 (mg/ml)	24h	48h	72h
	2	61.27	69.75	71.23
	1	41.36	59.27	63.19
[0034]	0.5	26.79	46.91	57.19
	0.25	23.95	35.26	38.43
	0.125	11.53	18.79	18.83
	IC ₅₀ (mg/ml)	1.3288	0.6385	0.5242

[0035] 表 2 以 MTT 法检测水红花子总黄酮提取物对人宫颈癌细胞株 HeLa 的生长抑制率 (%) (n = 5)

[0036]

浓度 (mg/ml)	3	1.5	0.75	0.375	0.1875
抑制率 (%)	77.67	68.43	45.80	34.42	15.59
IC ₅₀ (mg/ml)	0.8229				

[0037] 表 3 以 MTT 法检测水红花子总黄酮提取物对人大肠腺癌细胞株 SW-480 的生长抑制作用 (%) (n = 5)

浓度mg/ml	3	1.5	0.75	0.375	0.1875
[0038] 抑制率 (%)	69.81	57.63	45.80	25.78	10.24
IC ₅₀ (mg/ml)	1.1445				

[0039] 4、水红花子总黄酮提取物对小鼠肝肿瘤 H22 的体内抗癌活性研究。

[0040] 4. 1H22 肿瘤细胞的培养与传代

[0041] H22 细胞接种前与 DMEM+10%小牛血清培养液中 37℃、5% CO₂ 传代培养至状态良好,制成 2×10⁷ 个 /ml 的细胞悬液,接种于健康昆明种小鼠腹腔,腹水传代。

[0042] 4. 2 建立 H22 肝癌小鼠实体瘤模型

[0043] 无菌条件下用注射器抽取接种 7-9 天的 H22 小鼠腹水,以灭菌生理盐水稀释调整细胞量为 1×10⁷ 个 /ml,接种到 30 只小鼠腋下,每只 0. 2ml,观察小鼠生长情况,制作实体瘤模型。

[0044] 4. 3 动物分组与给药

[0045] 24h 后随机分成 3 组,每组 10 只 :①阴性对照组,每天上午生理盐水 0. 2ml 灌胃。

②阳性对照组,每天上午环磷酰胺 (20mg/kg) 灌胃 0. 2mL ;③给药组,依据人的给药剂量折合每天上午水红花子总黄酮提取物 (4. 5mg/kg),各组连续灌胃 10d,每天观察实体瘤的生长情况。

[0046] 4. 4 抑瘤率检测

[0047] 小鼠经实验处理后,于第 11d 脱颈椎处死,镊子镊住小鼠右腋肿瘤生长部位皮肤后,用手术剪子剪开皮肤,暴露肿瘤,手术剪钝性剥离肿瘤,用天平称瘤重,计算抑制率。以抑瘤率来判断抑瘤作用。

[0048] 肿瘤抑制率 (%) = [1-(平均实验组瘤重 / 平均对照组瘤重)] × 100%

[0049] 4. 5 统计学处理

[0050] 实验数据采用 SPSS11. 5 统计软件中 Dnuent 单因素方差分析进行统计学处理若 P < 0. 01 表明组间有显著性差异,结果如下表。

[0051] 表 1 水红花子总黄酮提取物对 H22 小鼠的瘤重的影响 (X±s, n = 10)

[0052]

组别	小鼠体重		剂量 (mg/kg)	平均瘤重 (g)	抑制率 (%)
	前	后			
阴性对照组	18.70 ± 0.972	19.21 ± 1.612	—	1.3319 ± 0.137	—
阳性对照组	19.22 ± 0.567	15.78 ± 1.920	20	0.5053 ± 0.099**	62.06
水红花子总黄酮 提取物给药组	18.46 ± 0.680	17.24 ± 0.817	4.5	0.5294 ± 0.073**	60.25

[0053] **P < 0.01

[0054] 实验结果经统计学处理,水红花子总黄酮提取物给药组与 H22 阴性对照组瘤重差异具有统计学意义 (P < 0.01),水红花子总黄酮提取物给药组对 H22 肝癌小鼠肿瘤抑制率高于 30% (中药的瘤重抑制率 > 30%, 评定药物具有抑瘤作用),表明水红花子总黄酮提取物对 H22 肝癌实体瘤具有明显的抑制作用。

[0055] 3、结论

[0056] 实验结果表明在体外实验和体内实验中,水红花子总黄酮提取物对肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用。水红花子总黄酮提取物作为一种医药中间体在制备治疗抗癌药物应用方面可以做成以下制剂或剂型:口服给药制剂:口服液、片剂、胶囊、含片、丸剂;注射给药制剂:注射剂;喷雾给药制剂等。