

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 36/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910145538.0

[43] 公开日 2009年12月30日

[11] 公开号 CN 101612181A

[22] 申请日 2009.5.26

[21] 申请号 200910145538.0

[71] 申请人 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所

地址 571737 海南省儋州市宝岛新村中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所

[72] 发明人 王祝年 王茂媛 李海燕 王建荣  
晏小霞

权利要求书 1 页 说明书 5 页

### [54] 发明名称

海杧果及其粗提物在制备抗肿瘤药物中的新用途

### [57] 摘要

本发明公开了海杧果及其提取物在制备抗肿瘤药物中的新用途，属于中药、天然药物领域。海杧果通过乙醇提取，用石油醚进行萃取，剩下的水液经过滤后上大孔吸附树脂(D101)柱层析，先后用水和甲醇洗脱，收集甲醇洗脱液，经浓缩得到甲醇部位，经实验证明，提取所得到的甲醇部位具有抗肿瘤细胞的作用。

1、海杧果在制备抗肿瘤药物中的新用途,其特征在于所述海杧果(*Cerbera manghas* Linnaeus) 又称海芒果,为夹竹桃科(Apocynaceae)海杧果属(*Cerbera* Linnaeus)植物,药用全株。

2、海杧果提取物在制备抗肿瘤药物中的新用途,其特征在于海杧果提取物可通过下述步骤获得:

海杧果干燥根,适当粉碎后用 8-11 倍量 95%乙醇室温浸泡提取 3 次,也可渗漉提取,将提取液减压回收乙醇至无醇味。将乙醇提取物分散于水中成悬浊液,经石油醚萃取得到石油醚浸膏 A,剩下的水液经过滤后上大孔吸附树脂(D-101)柱层析,先后用水和甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,经浓缩得到甲醇浸膏 B。浸膏 A、B 干燥即得海杧果提取物 A、海杧果提取物 B。

3、根据权利要求 2 所述海杧果提取物,其特征在于所述海杧果提取物 B 含有强心苷类化合物。

4、根据权利要求 1、2 所述用途,其特征在于:将海杧果提取物 B 和/或海杧果 95%乙醇提取物,添加适当的药用辅料,按常规的制剂工艺,即可制成片剂、胶囊剂、颗粒剂、滴丸剂、口服液等口服药物制剂和冻干粉针、水针等注射药物制剂。

## 海杧果及其粗提物在制备抗肿瘤药物中的新用途

### 技术领域

本发明涉及一种药用植物新的医疗用途，尤其是海杧果(*Cerbera manghas* Linnaeus)及其提取物在制备抗肿瘤药物中的新用途，属于中药、天然药物领域。

### 背景技术

海杧果(*Cerbera manghas* Linnaeus)又称海芒果，别名山样子、猴欢喜(台湾)、黄金茄(琼海)、牛金茄、牛心荔、黄金调(文昌)，为夹竹桃科(Apocynaceae)海杧果属(*Cerbera* Linnaeus)植物。海杧果属植物约9种，分布于亚洲和澳大利亚热带地区；我国产1种，即海杧果 *C. manghas*，分布于广东、广西、台湾等地。其树皮和乳汁药用，有催吐、下泻的功效。主治心力衰竭的急性病例，可能优于哇巴因。也用做镇痛、抗惊厥、强心和降血压药。

目前，已从海杧果植物中分离出90余种化合物，其中有效成分主要为强心苷类化合物。Chang L C. (2000年)等从海杧果根中分到5个化合物，其中2个新强心苷具有明显抗肿瘤活性。(Chang Leng Chee, Gills Joell J, Bhat Krishna P L, et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2000, 10(21): 2431~2434)，“一类海芒果苷衍生物、其制备方法及其用途” (专利 C07J 71/00、A61K 31/704、A61P 35/00) 涉及一类从红树林植物海芒果中提取、分离获得的新的具有显著抗肿瘤活性的海芒果类衍生物制备方法及其用途等。

癌症是一组可影响身体任何部位的100多种疾病的通称。使用的其它术语为恶性肿瘤和肿瘤。癌症是全世界一个主要死亡原因。在2005年全世界5800万死亡总数中，癌症占有所有死亡的760万(或13%)。导致癌症总死亡率的主要癌症种类为：肺(130万死亡/年)，胃(约100万死亡/年)，肝(662 000死亡/年)，结肠(655 000死亡/年)，乳腺(502 000死亡/年)。目前的治疗手段为临床用药从单一药物治疗过渡到多药联合化疗，但是，绝大多数的治疗仅能延长生命而不能根除病症，伴随治疗产生的许多毒副作用如肝功能衰竭和糖尿病等，使得患者的免疫系统受到损害。目前从天然药物中寻找抗肿瘤药物是研究的热门课题。一些中草药的提取物如延命素(《云南植物研究》，2006，28：95)、牡荆苷(《热带亚热带植物学报》，2008，16：51)、亚油酸(《上海医学》，1994，17：635)等具有抗肿瘤的活性，其化学结构包括二萜、黄酮苷、有机酸等。大蒜、蘑菇、灵芝和人参等已被许多国家用于癌症治疗。

本发明所述的海杧果及其提取物在制备抗肿瘤药物中的新用途，至今尚未见文献报道和专利公开。

## 发明内容

本发明的目的是提供海杧果新的医疗用途，即海杧果及其提取物在制备抗肿瘤药物中的用途。

本发明的内容是海杧果及其提取物在制备抗肿瘤药物中的用途，所述用途特征在于：1、海杧果提取物可通过下述步骤获得：海杧果干燥根，适当粉碎后用 8-11 倍量 95%乙醇室温浸泡提取 3 次，也可渗漉提取，将提取液减压回收乙醇至无醇味。将乙醇提取物分散于水中成悬浊液，经石油醚萃取得到石油醚浸膏 A，剩下的水液经过滤后上大孔吸附树脂(D-101)柱层析，先后用水和甲醇洗脱，收集甲醇洗脱液，经浓缩得到甲醇浸膏 B。浸膏 A、B 干燥即得海杧果提取物 A、海杧果提取物 B；2、海杧果提取物 B 和/或海杧果 95%乙醇提取物，添加适当的药用辅料，按常规的制剂工艺，即可制成片剂、胶囊剂、颗粒剂、滴丸剂、口服液等口服药物制剂和注射药物制剂。

海杧果提取物 B 经薄层层析，用强心苷显色剂显色，显示海杧果提取物 B 含有强心苷类化合物。

本发明的海杧果提取物 B，经体外活性筛选，统计处理结果显示有较好的抗肿瘤活性。为了进一步验证海杧果及其提取物在治疗肿瘤方面的功效，对海杧果提取物 B 进行了 100 例病人初步的临床疗效观察，结果表明海杧果提取物 B 是有效的。由海杧果提取物 B 的体外活性筛选和病人初步临床疗效观察结果，可以合理推导海杧果及其提取物可用于制备抗肿瘤药物，即海杧果及其提取物在制备抗肿瘤药物方面的用途。

本发明的有益效果，提供了海杧果在民间通常用于制备治疗催吐、下泻以及常规用于镇痛、抗惊厥、强心和降血压等药物以外的新的医疗用途，即海杧果及其提取物在制备抗肿瘤药物方面的用途，并采用不同的溶媒萃取得到海杧果提取物 B，海杧果提取物 B 添加适当的药用辅料，按常规的制剂工艺，即可制成口服和注射药物制剂。

下面是海杧果提取物 B 的体外活性筛选和病人初步临床疗效观察试验及其结果。

### 一、体外活性筛选

试验方法：

采用 MTT 法测试了海杧果提取物 B 对人体口腔表皮癌细胞 KB、乳腺癌 BC 和肺癌 NCI-H187、人体结肠癌(Col2)、子宫内膜癌(Ishikawa)等细胞株的体外抑瘤活性(结果见附表 1)。活性测试方法如下：实验设阴性对照组(水)、DMSO 溶剂对照组、阳性对照组(丝裂霉素 C)和 8 个不同浓度(0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50, 100)的待测样品，每个浓度设 2 个平行。收集对数生长期细胞，血球计数板计数，按每孔 4500 个癌细胞量接种于 96 孔平底细胞培养

板中，置于 5% CO<sub>2</sub>、湿度 90%以上、37 °C 培养箱中培养。24 h 后取出加入一定量的待测样品，继续培养 3 d 后取出置于显微镜下观察每孔细胞形态，记录细胞形态变化情况，接着每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液（溶于平衡盐溶液 PBS）50 μL，37 °C 反应 4 h 后，将细胞培养液吸出，每孔加入 100 μL DMSO 将 Formazane 充分溶解，将细胞培养板置于 MK3 酶标仪上，用 570 nm 波长测各孔的吸光度(A)，按下列公式求生长抑制率。

$$\text{生长抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{用药组平均A值}}{\text{阴性对照组平均A值}}\right) \times 100\%$$

以样品浓度为横坐标，以抑制率为纵坐标，作图并求出抑制率为 50%时样品的浓度(IC<sub>50</sub>)，样品活性结果即以半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)表示。

实验结果：

附表 1 样品对 SGC-7901、K562 等肿瘤细胞株的毒性作用

Cell line	Human origin	海杧果提取物 B
		IC <sub>50</sub> (μg/ml)
KB	Oral human epidermoid carcinoma	1.03
BC	human breast cancer cells	0.7502
NCI-H187	human small cells lung cancer	6.36
Co12	human colon cancer cells	0.045
Ishikawa	human endometrial adenocarcinoma	0.0341

注：毒性值 IC<sub>50</sub>，即药物对细胞杀灭 50%时的浓度值。IC<sub>50</sub> 值越小则毒性越大。

## 二、初步临床疗效观察

研究对象：肿瘤患者，其中男 34 例，女 66 例，年龄最小者 34 岁，最大者 65 岁。

诊断标准：1、无其他任何不良症状；2、没有服用过任何其他抗肿瘤药物。

研究方法：该试验以 100 名肿瘤患者为研究对象，受试物为本发明成药（约含 0.15 海杧果提取物 B 的 0 号胶囊）服用，一日三次，每次二粒，开水冲服。每 40 天为一个疗程，连续两个疗程后停药休息一周，详细观察病情变化进行检查。然后进行第三个疗程治疗，在服药期间停药其它药品。

临床治愈：症状及客观检查阳性征象消失，连续半年无复发者。

临床显著：症状基本消失，癌灶缩小一半以上，其它客观检查有明显好转，观察半年以上不再发展者。

临床有效：症状有所改善，病灶基本稳定，观察在一个月以上者。

临床无效：症状及客观检查无改善，或仅有短期改善，而又迅速恶化者。

疗效结果：

疗效	总例数	百分比	备注
临床治愈	60	60%	
临床显著	18	78%	
临床有效	13	91%	
临床无效	9	9%	扩散转移

本发明的优点是：

- 1、本发明选用的天然药物为原料，低毒，副作用小。
- 2、本发明无须煎煮，治疗方便，有效率达 91%。
- 3、本发明能够控制癌细胞增生，防止癌细胞扩散，使癌细胞枯萎脱落消失。
- 4、本发明提供低剂量（0.5~2 mg/kg）即可产生抗肿瘤活性，因此长期低剂量（如 0.6~1.25 mg/kg）比高剂量（5~10 mg/kg）的抗肿瘤作用更强。

## 具体实施方式

### 实施例 1

取海杧果干燥品 2.0 kg，用 10 倍量 95%乙醇分 3 次（5、3、3 天）浸提，减压回收乙醇，浓缩干燥得到浸膏粉，浸膏粉加入淀粉适量，混均、制粒、干燥、整粒，装入胶囊，制成 1000 粒即可。

### 实施例 2

取海杧果干燥品 10.0 kg，用 9 倍量 90%乙醇渗漉，减压浓缩渗漉液至无醇味得浓缩液，浓缩液分散于水中成悬浊液，经石油醚萃取得到石油醚浸膏 A，剩下的水液经过滤后上大孔吸附树脂(D-101)柱层析，先后用水和甲醇洗脱，收集甲醇洗脱液，经浓缩得到甲醇浸膏 B，浸膏 B 干燥即得海杧果提取物 B。取海杧果提取物 B 100 g，加入淀粉等适量辅料，混均、制粒、干燥，压制成 1000 片即可。

### 实施例 3

取海杧果干燥品 5.0 kg，用 8 倍量 80%乙醇渗漉，减压浓缩渗漉液至无醇味得浓缩液，浓缩液分散于水中成悬浊液，经石油醚萃取得到石油醚浸膏，剩下的水液经过滤后上大孔吸附树脂(D-101)柱层析，先后用水和甲醇洗脱，收集甲醇洗脱液，经浓缩得到甲醇浸膏，甲醇浸膏干燥即得海杧果提取物 B；取海杧果提取物 B 25g,加适量注射用水溶解，按常规的水针制剂工艺，调 PH 值、过滤、灌封、灭菌制成 1000 ml 即可；或者添加适量附加剂如甘露醇，

溶解搅匀，过滤、冻干、分装制成 500 瓶即可。