



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102160863 A

(43) 申请公布日 2011.08.24

(21) 申请号 201110044543.X

(22) 申请日 2008.07.10

(62) 分案原申请数据

200810055376.7 2008.07.10

(71) 申请人 河北医科大学

地址 050017 河北省石家庄市中山路 361 号

(72) 发明人 丛斌 史清文 董玫

(74) 专利代理机构 石家庄国域专利商标事务所  
有限公司 13112

代理人 白海静

(51) Int. Cl.

A61K 31/365 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种异土木香内酯的提纯制备方法和其在制备抗肿瘤药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种异土木香内酯的提纯制备方法及其在制备抗癌药物中的应用。本发明方法包括以下步骤:土木香为原料,用 90-99% 的乙醇冷浸提取,滤液减压浓缩得浸膏;将浸膏悬浮在饱和的盐水中,在 60 ~ 90℃ 条件下,用石油醚萃取 3 次,合并石油醚萃取液,并用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脱水后减压浓缩至近干,分别得石油醚提取物;采用硅胶柱色谱进行分离,石油醚-乙酸乙酯溶剂系统进行梯度洗脱,依次用乙酸乙酯、甲醇冲柱至洗脱完全,洗脱液按体积接收,每份 500mL,减压浓缩各流份将相同流份,进行合并;在 8-19 流份得化合物异土木香内酯。本发明方法制备的异土木香内酯其纯度高、晶型好、产量大。

1. 异土木香内酯在制备抗癌药物中的应用。
2. 异土木香内酯在制备抗消化道肿瘤药物中的应用。
3. 异土木香内酯在制备抑制消化道肿瘤细胞增殖药物中的应用。

## 一种异土木香内酯的提纯制备方法和其在制备抗肿瘤药物中的应用

[0001] 本专利申请是申请日为 2008 年 7 月 10 日、申请号为 200810055376.7, 发明名称为“一种异土木香内酯的提纯制备方法和其在制备抗肿瘤药物中的应用”的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及一种化合物的提纯制备方法和其医药用途, 具体地说是一种异土木香内酯的提纯制备方法和其在制备抗肿瘤药物中的应用。

### 技术背景

[0003] 土木香为菊科土木香 (*Inula helenium* L) 的干燥根。土木香根中含有 1-3% 的挥发油, 油中的主要成分为土木香内酯、异土木香内酯、二氢土木香内酯等。在传统医学中, 土木香的功能主要为健脾和胃, 行气解郁, 止痛安胎。临床上主要用于治疗胸腹胀满疼痛, 呕吐泄泻, 痢疾, 胎动不安。现代药理学研究已确认土木香挥发油具有抗菌, 驱虫, 镇痛, 影响平滑肌、心血管的作用。在传统医学应用中, 土木香的提取物通常为混合物, 故其疗效不确切, 毒副作用大。例如, 土木香挥发油所含的土木香内酯及其衍生物均易溶于醇, 故其提取物不纯且副作用多 (详见中国医学科学院药物研究所等. 中药志 (第一册) (M) 北京: 人民卫生出版社, 1979, 86)。因此, 长期以来人们一直都在致力于寻找更好的土木香有效成分的提纯制备方法, 同时也在积极探索土木香有效成分的新医药用途。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的就是要提供一种异土木香内酯的提纯制备方法, 同时提供一种异土木香内酯的新的医药用途。

[0005] 本发明的目的是这样实现的:

[0006] 本发明所提供的异土木香内酯的提纯制备方法, 包括以下步骤:

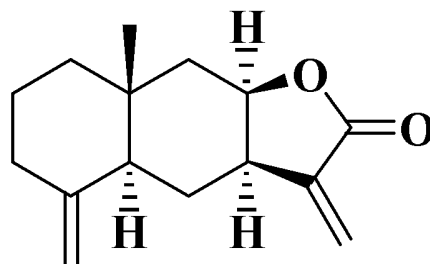
[0007] (a) 以菊科旋覆花属植物土木香为原料, 用 90--99% 的乙醇冷浸提取, 过滤, 滤液减压浓缩得浸膏;

[0008] (b) 将浸膏悬浮在饱和的盐水中, 使其浓度达到 0.8-1.2g/ml, 在 60 ~ 90℃ 条件下, 用石油醚萃取 3 次, 萃取溶剂体积分别为相当于水溶液体积的 2/3, 1/2, 1/3, 合并石油醚萃取液, 并用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  脱水后减压浓缩至近干, 分别得石油醚提取物;

[0009] (c) 采用硅胶柱色谱进行分离, 石油醚-乙酸乙酯溶剂系统进行梯度洗脱, 洗脱液配比为 10 : 1, 8 : 2, 6 : 4, 5 : 5, 最后依次用乙酸乙酯、甲醇冲柱至洗脱完全, 洗脱液按体积接收, 每份 500mL, 减压浓缩各流份, 采用薄层色谱进行检测, 按照薄层色谱结果将相同流份进行合并; 在 8-19 流份得化合物异土木香内酯。

[0010] 本发明方法中所用的倍半萜化合物异土木香内酯, 其化学结构如下:

[0011]



[0012] 其波谱数据为： $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  ppm: 6.13 (1H, br. s, H-13a), 5.59 (1H, br. s, H-13b), 4.77 (1H, br. s, H-15a), 4.44 (1H, br. s, H-15b), 4.50 (1H, br. S, H-8), 2.99 (1H, m, H-7), 2.34 (1H, d,  $J = 12.0\text{Hz}$ , H-3b), 2.20 (1H, d,  $J = 16.0\text{Hz}$ , H-9a), 2.01 (1H, m, H-3a), 1.85 (1H,  $J = 12.5\text{Hz}$ , H-5), 1.75 (1H, o. m, H-6a), 1.71 (1H, o. m, H-9b), 1.60 (2H, o. m, H-2), 1.54 (1H, o. m, H-1a), 1.40 (1H, m, H-6b), 1.25 (1H, m, H-1b), 0.83 (3H, s, 14- $\text{CH}_3$ )。  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$  ppm: 41.33 (C-1), 22.68 (C-2), 36.79 (C-3), 148.97 (C-4), 46.18 (C-5), 27.45 (C-6), 40.51 (C-7), 76.82 (C-8), 42.16 (C-9), 34.26 (C-10), 142.16 (C-11), 170.67 (C-12), 120.18 (C-13), 17.65 (C-14), 106.61 (C-15)。

[0013] 本发明方法制备的异土木香内酯其纯度高、晶型好、产量大。

[0014] 试验表明,采用本发明方法提纯制备异土木香内酯,其纯度可达 80--97%,产品收率与一般的醇提法相比可提高 2-3 倍。

[0015] 本发明人经过长期大量的研究还发现了异土木香内酯的新的药理活性,从而完成了异土木香内酯在制备抗肿瘤药物中的应用的发明目的。

[0016] 本发明所述异土木香内酯尤其适于在制备抗消化道肿瘤药物中应用。特别是在制备抑制消化道肿瘤细胞增殖药物中的应用。

[0017] 本发明所述异土木香内酯的新的药理活性通过以下试验得到了验证。

[0018] 试验用细胞株:

[0019] HeLa:人宫颈癌细胞株;HEC-1:人子宫内膜癌细胞株;SHIN-3 和 HOC-21:人卵巢透明癌细胞株;HAC-2:人卵巢囊腺癌细胞株;T-98 和 U251-SP:人脑神经胶质瘤细胞株;HLE:人肝癌细胞株;MM1-CB 和 HMV-1:人黑色素瘤细胞株;KT:脑转移细胞株。

[0020] (一) 异土木香内酯抑制肿瘤细胞增殖活性试验:

[0021] 实验方法:细胞增殖实验法。

[0022] 在含有 20%胎牛血清的 D-MEM/hams 培养基中,将被试细胞调成密度为  $2 \times 10^5$  细胞/mL。将上述肿瘤细胞株悬液接种于 96 孔培养板,每孔 50 $\mu\text{l}$ ,分别加入空白对照磷酸盐缓冲液 (PBS)、溶剂对照 0.1%二甲基亚砷、阳性对照顺铂 (DDP) 以及不同浓度单体化合物各 50 $\mu\text{l}$ ,每组均设 3 个复孔。置于饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 小时,于培养结束前 4 小时,各培养孔加入 5mg/ml 四氮唑盐 (MTT) 10 $\mu\text{l}$ ,培养结束后,弃去培养上清,悬浮细胞需离心后弃去上清,每孔加入反应停止液 150  $\mu\text{l}$ ,静置 1 小时,用酶联免疫检测仪检测各孔吸光度 (OD) 值,测定波长  $\lambda = 570\text{nm}$ ,参考波长  $\lambda = 630\text{nm}$ ,并计算肿瘤细胞生存率。

[0023] 本发明化合物溶解于 DMSO,添加后的最终浓度在 0.1%以下。以只添加 DMSO 的培养基作为对照。

[0024] 试验结果:

[0025] 本发明化合物的抑制肿瘤细胞增殖活性以相对于对照 (添加 DMSO) 的结果在下表

1、表 2 中表示。

[0026] 表 1 异土木香内酯抗妇科肿瘤细胞增殖活性

	异土木香内酯		抑制细胞增殖活性 (%)			
	浓度 ( $\mu M$ )	Hela	HEC-1	SHIN-3	HAC-2	HOC-21
[0027]	100	82	67	46	80	16
	10	34	32	14	51	27
	1	9	8	6	15	19

[0028] 表 2 异土木香内酯抗其它肿瘤细胞增殖活性

	异土木香内酯		抑制细胞增殖活性 (%)				
	浓度 ( $\mu M$ )	T-98	U251-SP	HLE	MM1-CB	HMV-1	KT
[0029]	100	56	71	64	78	85	63
	10	42	29	7	14	27	20
	1	22	6	0	12	2	4

[0030] (二) 异土木香内酯抑制体内移植肿瘤细胞增殖活性试验：

[0031] 实验方法：体内移植肿瘤细胞实验法。

[0032] 取冷冻保存的腹水型肉瘤 S180 和腹水型肝癌 H22 细胞, 2000r/min 离心 5min, 弃上清液, 用无菌生理盐水稀释, 调整瘤细胞至  $2 \times 10^6$  细胞 /mL; 取 5 只健康昆明种小鼠, 每只用上述细胞悬液 0.4mL, 腹腔注射, 7 ~ 10 天后接种小鼠腹部明显增大, 凸出。将其麻醉处死, 无菌抽取乳白色腹水液, 以生理盐水 1:1 稀释后计算活细胞数 > 95%, 调整瘤细胞密度为  $2 \times 10^6$  细胞 /mL, 待用。

[0033] 将腹腔传代的肝癌细胞 (H<sub>22</sub>) 及肉瘤细胞 (S<sub>180</sub>) 接种部位位于小鼠右前肢腋下, 接种量为  $2 \times 10^6$  细胞 / 只, 分别灌胃给予自来水, 腹腔给予环磷酰胺 (30mg/kg), 灌胃给予各浓度的异土木香内酯 (100mg/kg, 10mg/kg 和 1mg/kg), 各处理组的给药溶剂为 0.2mL/10g 体重, 连续给药 10 天。于给药的第 10 天, 脱颈椎处死小鼠, 立即剥取肿瘤, 摘取荷瘤小鼠的胸腺和脾脏, 分别称重, 计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数。

[0034] 异土木香内酯在体内抑制肿瘤细胞增殖活性的结果见表 3：

[0035] 表 3 异土木香内酯体内移植肿瘤细胞增殖活性

[0036]

异土木香内酯 给药量 (mg/kg)	抑制细胞增殖活性(%)		胸腺指数(mg/10g)		脾指数(mg/10g)	
	S180	H22	S180	H22	S180	H22
100	69	66	53	43	102	41
10	52	42	53	49	93	105
1	42	23	54	40	92	106

[0037] 以上试验表明,异土木香内酯具有良好的肿瘤细胞增殖活性抑制作用。其可在制备抗癌药物中得到应用。

[0038] 肿瘤是一种常见病、多发病,其中恶性肿瘤是目前危害人类健康最严重的一类疾病。目前临床上用于治疗食道癌、胃癌和妇科等恶性肿瘤的药物,因其在抑制癌细胞增殖的同时,无选择地也抑制骨髓等细胞的增殖,因而普遍存在毒副作用大的问题。目前临床急切期待研究人员能够研发出毒副作用低、选择性高的抗恶性肿瘤药物。

[0039] 本发明为人们制备抗癌药物提供了一种新的选择。

[0040] 本发明所述异土木香内酯在制备抗肿瘤药物时,可按照常规的制剂方法以异土木香内酯为药物活性成分,添加适宜的药物载体,制成各种药物剂型,如片剂、滴丸、胶囊剂、散剂、注射剂、缓控释剂等等。

[0041] 在用于治疗肿瘤疾病时,口服制剂的用量一般可控制在每日服用异土木香内酯 300-600mg。其他剂型的用量可参考该用量。本发明的药物用法用量,也不完全限于此,临床医师也可以根据病人的具体情况决定药物的用法用量。

### 具体实施方式

[0042] 下面的实施例可更详细地说明本发明,但不以任何形式限制本发明。

[0043] 实施例 1

[0044] 异土木香内酯的提纯制备

[0045] a) 以河北菊科旋覆花属植物土木香为原料,用 99% 的乙醇冷浸提取,过滤,滤液减压浓缩得浸膏;

[0046] b) 将浸膏悬浮在饱和盐水中,使其浓度达到约 1g/ml,在 75℃ 条件下,用石油醚萃取 3 次,萃取溶剂体积分别为相当于水溶液体积的 2/3,1/2,1/3,合并石油醚萃取液,并用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  脱水后减压浓缩至接近无水分,分别得石油醚提取物;

[0047] c) 采用硅胶柱色谱进行分离,石油醚-乙酸乙酯溶剂系统进行梯度洗脱,洗脱液配比为 10 : 1,8 : 2,6 : 4,5 : 5,最后依次用乙酸乙酯、甲醇冲柱至洗脱完全,洗脱液按体积接收,每份 500mL,减压浓缩各流份,采用薄层色谱进行检测按照薄层色谱结果将相同流份进行合并;在 8-19 流份得化合物异土木香内酯。其含量为 87.6%。

[0048] 实施例 2 本发明药物颗粒剂

[0049] 将实施例 1 所制异土木香内酯干燥物粉碎成粉,加入乙醇作黏合剂,加入淀粉作填充剂,压制成颗粒。

[0050] 实施例 3:本发明药物口服液:

[0051] 将实施例 1 所制异土木香内酯溶于 1000ml 水中,制成 2.5% 浓度的水溶液,加入适量的混悬剂,混合均匀,装入 20ml 药瓶中,封口、消毒。

[0052] 实施例 4:本发明药物片剂:

[0053] 将实施例 1 所制异土木香内酯 10 公斤,按常规片剂制备方法,加入淀粉,糊精、硬酯酸镁等,混合制成湿粒,机器冲压成片,每片含本发明药物干浸膏 200mg。

[0054] 本发明的药物剂型不完全限于此,它可以制备成更多的剂型,如滴丸、胶囊剂、软胶囊剂、缓控释制剂、注射剂等等。