



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102766180 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201210178973. 5

(22) 申请日 2012. 06. 01

(71) 申请人 贵州师范大学

地址 550001 贵州省贵阳市宝山北路 116 号

(72) 发明人 周欣 陈华国 龚小见 赵超

先春 黄志金

(74) 专利代理机构 北京联创佳为专利事务所

(普通合伙) 11362

代理人 郭防 王娟

(51) Int. Cl.

C07H 17/07(2006. 01)

C07H 1/08(2006. 01)

A61K 31/7048(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

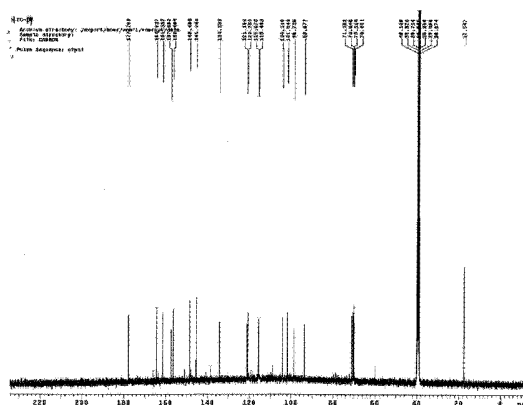
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 6 页

(54) 发明名称

虎耳草中两个活性单体化合物的提纯方法及其产品的用途

(57) 摘要

本发明公开了虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化方法及其产品的用途:将虎耳草用乙醇提取,提取物依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯萃取物再采用硅胶柱层析、中压柱层析、凝胶柱层析等分离手段,从虎耳草中分离得到两个单体化合物(槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷);且生物活性测定结果表明,本发明所得虎耳草提取物和两个单体化合物均对前列腺癌细胞的生长扩散有较好的抑制作用,可将其用于制备治疗前列腺癌的药物,在前列腺癌的治疗药物中具有有良好的应用前景。



1. 虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化方法,其特征在于:虎耳草乙醇提取物经石油醚、乙酸乙酯萃取,然后采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分段,以石油醚-乙酸乙酯及氯仿-甲醇梯度洗脱;对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、中压硅胶以及硅胶 H 柱层析纯化,以氯仿-甲醇梯度洗脱,再反复采用凝胶柱层析纯化,以氯仿-甲醇梯度洗脱,最后用甲醇溶解重结晶,即得两个单体化合物:槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

2. 根据权利要求 1 所述虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 取虎耳草全草,粉碎,加入乙醇回流提取,滤过,滤液减压回收乙醇,余液浓缩至稠膏,得虎耳草乙醇提取物;

(2) 虎耳草乙醇提取物依次用 4 倍体积量石油醚、乙酸乙酯各萃取 2 次,合并乙酸乙酯萃取液,减压蒸发至干,得乙酸乙酯萃取物;

(3) 乙酸乙酯萃取物采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分段,以石油醚-乙酸乙酯及氯仿-甲醇梯度洗脱;对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、中压硅胶以及硅胶 H 柱层析纯化,以氯仿-甲醇梯度洗脱,再反复采用凝胶柱层析纯化,以氯仿-甲醇梯度洗脱,最后用甲醇溶解重结晶,即得两个单体化合物:槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

3. 根据权利要求 2 所述虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化方法,其特征在于:所述步骤(1)为:取虎耳草全草干品,粉碎成粗粉,加 8 倍体积量 80% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 小时,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,余液浓缩至相对密度为 1.25 的稠膏,减压干燥,得虎耳草乙醇提取物。

4. 根据权利要求 2 所述虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化方法,其特征在于:所述步骤(3)为:乙酸乙酯萃取物采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分段,以石油醚:乙酸乙酯=30:1 ~ 1:1 及氯仿:甲醇=30:1 ~ 0:1 梯度洗脱;对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、300 ~ 400 目中压硅胶以及硅胶 H 柱层析纯化,以氯仿:甲醇=20:1 ~ 1:1 梯度洗脱,再反复采用凝胶柱层析纯化,以氯仿:甲醇=5:1 ~ 0:1 梯度洗脱,最后用甲醇溶解重结晶,即得两个单体化合物:槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

5. 虎耳草提取物的制备方法,其特征在于:取虎耳草全草,粉碎,加入乙醇回流提取,滤过,滤液减压回收乙醇,余液浓缩至稠膏,即得。

6. 根据权利要求 5 所述虎耳草提取物的制备方法,其特征在于:取虎耳草全草干品,粉碎成粗粉,加 8 倍体积量 80% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 小时,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,余液浓缩至相对密度为 1.25 的稠膏,即得。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述虎耳草提取物的制备方法,其特征在于:将浓缩后的稠膏依次用 4 倍体积量石油醚、乙酸乙酯各萃取 2 次,合并乙酸乙酯萃取液,减压蒸发至干,即得。

8. 如权利要求 1-4 中任一项所述方法提取纯化得到的单体化合物槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷在制备治疗前列腺癌的药物中的用途。

9. 如权利要求 1-4 中任一项所述方法提取纯化得到的单体化合物槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡

葡萄糖苷在制备治疗前列腺癌的药物中的用途。

10. 如权利要求 5-7 中任一项所述方法制备得到的虎耳草提取物在制备治疗前列腺癌的药物中的用途。

## 虎耳草中两个活性单体化合物的提纯方法及其产品的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化方法及其产品的用途,属于中药技术领域。

### 背景技术

[0002] 前列腺癌是发生于男性前列腺组织中的恶性肿瘤,是前列腺腺泡细胞异常无序生长的结果。前列腺癌的发病率具有明显的地理和种族差异。在欧美等发达国家和地区,它是男性最常见的恶性肿瘤,其死亡率居各种癌症的第二位;在亚洲,其发病率低于西方国家,但近年来呈迅速上升趋势。

[0003] 前列腺癌骨转移的治疗方法除了内分泌治疗(雄激素的抵抗治疗)、双膦酸盐类药物治疗外,根据不同的病情还可以采用化学药物治疗、外放射治疗、外放射性核素内放射治疗以及各种疗法的综合应用等。另外中医治疗也取得了良好的效果,对于末期的前列腺癌症患者来说,一些抗癌中药能够很好地缓解疼痛,提高患者的生活质量,延长了者的生存期限。

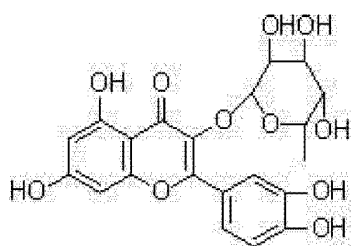
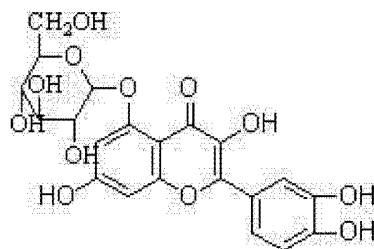
[0004] 虎耳草(*Saxifragastolonifera* (L.) Meerb.)为虎耳草科(*Saxifragaceae*)虎耳草属多年生常绿草本植物,又名金丝荷叶、耳朵红、老虎草、烂耳草、天荷叶等;收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003年版,是贵州特色苗药材,资源丰富;分布于华东、中南、西南及河北、陕西、甘肃等地,是一种蔓生植物,可广泛栽种作为观赏植物。虎耳草全草入药;微苦、辛,寒,有小毒;祛风清热,凉血解毒;常用于治疗中耳炎、外伤出血、牙痛、湿疹、吐血、前列腺增生等多种疾病,疗效显著。

[0005] 目前,对于虎耳草提取物抗前列腺癌的药理学研究较少,尚未发现其活性成分。本发明人经过广泛深入的研究,通过对虎耳草全草的乙醇提取物,特别是乙酸乙酯萃取部位的化学成分进行研究,分离纯化得到2个具有较好活性的单体化合物。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于:提供虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化方法和虎耳草提取物的制备方法以及产品的用途。本发明通过乙醇提取、萃取、柱层析等分离手段,从虎耳草中分离得到两个单体化合物,且活性研究表明所得虎耳草提取物和两个单体化合物均对前列腺癌细胞的生长扩散有较好的抑制作用,可将其用于制备治疗前列腺癌的药物。

[0007] 本发明的技术方案:虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化方法为:虎耳草乙醇提取物经石油醚、乙酸乙酯萃取,然后采用200~300目柱色谱硅胶分段,以石油醚-乙酸乙酯及氯仿-甲醇梯度洗脱;对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、中压硅胶以及硅胶H柱层析纯化,以氯仿-甲醇梯度洗脱,再反复采用凝胶柱层析纯化,以氯仿-甲醇梯度洗脱,最后用甲醇溶解重结晶,即得两个单体化合物:槲皮素3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷(Quercetin 3-O- $\beta$ -L-rhamnopyranoside)、槲皮素5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(Quercetin 5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside),其结构式如下:

Quercitrin 3-O- $\beta$ -L-rhamnosideQuercetin 5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

优选的前述提取纯化方法包括以下步骤：

(1) 取虎耳草全草，粉碎，加入乙醇回流提取，滤过，滤液减压回收乙醇，余液浓缩至稠膏，得虎耳草乙醇提取物；

(2) 虎耳草乙醇提取物依次用 4 倍体积量石油醚、乙酸乙酯各萃取 2 次，合并乙酸乙酯萃取液，减压蒸发至干，得乙酸乙酯萃取物；

(3) 乙酸乙酯萃取物采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分段，以石油醚 - 乙酸乙酯及氯仿 - 甲醇梯度洗脱；对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、中压硅胶以及硅胶 H 柱层析纯化，以氯仿 - 甲醇梯度洗脱，再反复采用凝胶柱层析纯化，以氯仿 - 甲醇梯度洗脱，最后用甲醇溶解重结晶，即得两个单体化合物：槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

[0008] 更优选的，前述步骤(1)为：取虎耳草全草干品，粉碎成粗粉，加 8 倍体积量 80% 乙醇回流提取 2 次，每次 2 小时，滤过，合并滤液，减压回收乙醇，余液浓缩至相对密度为 1.25 的稠膏，得虎耳草乙醇提取物。

[0009] 前述步骤(3)为：乙酸乙酯萃取物采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分段，以石油醚：乙酸乙酯 = 30 : 1 ~ 1 : 1 及氯仿：甲醇 = 30 : 1 ~ 0 : 1 梯度洗脱；对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、300 ~ 400 目中压硅胶以及硅胶 H 柱层析纯化，以氯仿：甲醇 = 20 : 1 ~ 1 : 1 梯度洗脱，再反复采用凝胶 (Sephadex LH-20) 柱层析纯化，以氯仿：甲醇 = 5 : 1 ~ 0 : 1 梯度洗脱，最后用甲醇溶解重结晶，即得两个单体化合物：槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

[0010] 虎耳草提取物的制备方法为：取虎耳草全草，粉碎，加入乙醇回流提取，滤过，滤液减压回收乙醇，余液浓缩至稠膏，即得。

[0011] 优选的虎耳草提取物的制备方法为：取虎耳草全草干品，粉碎成粗粉，加 8 倍体积量 80% 乙醇回流提取 2 次，每次 2 小时，滤过，合并滤液，减压回收乙醇，余液浓缩至相对密度为 1.25 的稠膏，即得。

[0012] 还可进一步将前述虎耳草经提取、浓缩后的稠膏依次用 4 倍体积量石油醚、乙酸乙酯各萃取 2 次，合并乙酸乙酯萃取液，减压蒸发至干，即得虎耳草提取物。

[0013] 以上所述方法提取纯化得到的单体化合物槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷均可用于制备治疗前列腺癌的药物。

[0014] 以上所述方法制备得到的虎耳草提取物也可用于制备治疗前列腺癌的药物。

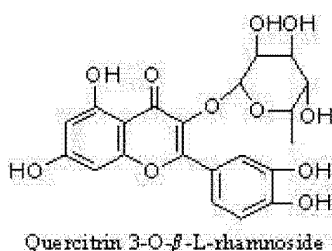
[0015] 为了确证按本发明方法从虎耳草中提取纯化得到的物质，发明人对其进行了结构鉴定：

虎耳草中活性单体化合物 1 在薄层层析实验中以氯仿：甲醇体积比为 5 : 1 的展开剂展开，为黄色圆点， $R_f$  值为 3，得到虎耳草单体化合物 1 为黄色粉末，易溶于吡啶

和 DMSO, 共有 40mg。其质谱图见图 1 所示, $^1\text{H}$ -核磁谱图见图 2 所示, $^{13}\text{C}$ -核磁谱图见图 3 所示。根据图 1-图 3 判断,该化合物为槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷 (Quercetin 3-O- $\beta$ -L-rhamnopyranoside, HEC-1)。该化合物的相关数据如下:

HEC-1 黄色粉末; $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ , mp: 166 ~ 168 $^{\circ}\text{C}$ 。IR (KBr):  $\nu_{\max}\text{cm}^{-1}$ : 3410, 1652, 1497, 1455, 1386, 1360, 1303, 1271, 1201, 1168, 1006, 964, 917, 881, 669. ESI-MS  $m/z$ : 447  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ , 471  $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ .  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO, 400MHz)  $\delta$ : 12.64 (1H, s), 10.89 (1H, s), 7.29 (1H, s), 7.24 (1H, d,  $J=8.2\text{ Hz}$ ), 6.84 (1H, d,  $J=8.2\text{ Hz}$ ), 6.38 (1H, s), 6.19 (1H, s).  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO, 100MHz)  $\delta$ : 156.5 (C-2), 134.2 (C-3), 177.8 (C-4), 161.3 (C-5), 98.7 (C-6), 164.2 (C-7), 93.7 (C-8), 157.4 (C-9), 104.1 (C-10), 120.8 (C-1'), 15.8 (C-2'), 145.2 (C-3'), 148.5 (C-4'), 115.5 (C-5'), 121.2 (C-6'), 101.8 (C-1''), 70.4 (C-2''), 70.6 (C-3''), 71.2 (C-4''), 70.1 (C-5''), 17.5 (C-6'')。

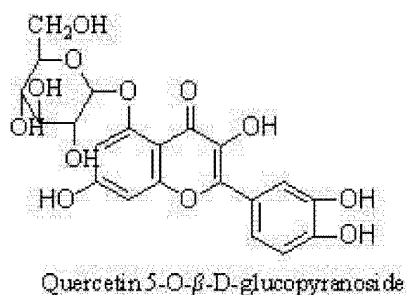
[0016] 其结构式为:



虎耳草中活性单体化合物 2 在薄层层析实验中以氯仿: 甲醇体积比为 7: 3 的展开剂展开, 为黄色圆点,  $R_f$  值为 2.5, 得到虎耳草单体化合物 2 为黄色粉末, 易溶于吡啶和 DMSO, 共有 1.5g。其质谱图见图 4 所示, $^1\text{H}$ -核磁谱图见图 5 所示, $^{13}\text{C}$ -核磁谱图见图 6 所示。根据图 4-图 6 判断,该化合物为槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (Quercetin 5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, HEC-2)。该化合物的相关数据如下:

HEC-2 黄色粉末; $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ , mp: 256 ~ 267 $^{\circ}\text{C}$ 。IR (KBr):  $\nu_{\max}\text{cm}^{-1}$ : 3397, 1623, 1559, 1507, 1457, 1334, 1315, 1276, 1207, 1104, 1075, 1029, 992, 924, 883, 789, 610. ESI-MS  $m/z$ : 463  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ , 487  $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ .  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 400MHz)  $\delta$ : 10.95 (1H, s), 9.56 (1H, s), 9.31 (1H, s), 8.97 (1H, s), 7.64 (1H, s), 7.50 (1H, d,  $J=7.6\text{ Hz}$ ), 6.87 (1H, d,  $J=7.6\text{ Hz}$ ), 6.73 (1H, s), 6.63 (1H, s), 4.77 (1H, s).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 100MHz)  $\delta$ : 143.6 (C-2), 137.4 (C-3), 171.8 (C-4), 158.5 (C-5), 103.1 (C-6), 162.5 (C-7), 97.3 (C-8), 157.2 (C-9), 106.4 (C-10), 122.1 (C-1'), 114.8 (C-2'), 145.1 (C-3'), 147.4 (C-4'), 115.7 (C-5'), 119.6 (C-6'), 103.9 (C-1''), 73.8 (C-2''), 75.7 (C-3''), 69.7 (C-4''), 77.6 (C-5''), 60.8 (C-6'')。

[0017] 其结构式为:



为了确证本发明所得虎耳草提取物以及两个单体化合物的药理活性, 申请人对其进行

了生物活性检测：

试验例一：虎耳草不同提取物的生物活性测定

1、抗 PC-3 前列腺癌活性研究

1.1 材料

RPMI 1640 培养基（美国 HYCLONE）；胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司）；二甲基亚砷（DMSO）（美国 AMRESCO）；胰蛋白酶（美国 HYCLONE）；双抗（青霉素和链霉素）（solarbio）；MTT（四甲基偶氮唑盐）（美国 AMRESCO）；台盼蓝染色液（美国 Sigma 公司）。

[0018] 1.2 主要仪器

二氧化碳培养箱（美国 Thermo 公司）；电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 仪器有限公司）；低温冰箱（Thermo Forma -80℃ 冰箱）；台式高速离心机（sigma 公司）；HH-S 数显恒温水浴锅（常州普天仪器制造有限公司）；Nikon TS-100T 倒置显微镜（日本尼康公司）；双人单面垂直洁净工作台（SW-CJ-2FD 型）；移动式空气自净器（JB-YZJ-800 型）；酶联免疫检测仪（美国 Thermo 公司）；SZ-97 自动三重蒸馏器（上海亚荣生化仪器厂）。

[0019] 1.3 试验方法

细胞增殖检测（MTT 法测定 PC-3 前列腺癌细胞增殖）：调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  /ml，接种在 96 孔培养板上，每孔 200  $\mu$  l，每组三个复孔，各组加入不同浓度药物培养 48h、72h，于培养结束前 4h 加入 MTT (1mg/ml) 20  $\mu$  l。弃去上清液，每孔加入 DMSO 150  $\mu$  l，振荡后在酶标仪 490 nm 波长测定 OD 值，并做 t 检验，计算细胞生长抑制率。

[0020] 1.4 结果与分析

表 1 不同提取物及萃取物 48h 后对 PC-3 前列腺癌细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

试药\给药后 48h	浓度( $\mu$ g/mL)	抑制率(%)
石油醚提取物	500	$4.35 \pm 0.34$
	1000	$9.82 \pm 0.69$
	1500	$19.00 \pm 0.17$
水提取物	500	$12.59 \pm 1.02$
	1000	$18.73 \pm 2.96$
	1500	$33.59 \pm 2.90$
乙醇提取物	500	$14.67 \pm 3.19$
	1000	$31.09 \pm 0.59$
	1500	$36.93 \pm 0.21$
乙酸乙酯萃取物	250	$26.21 \pm 3.53$
	500	$40.41 \pm 4.34$
	1000	$52.01 \pm 0.01$

表 2 不同提取物及萃取物 72h 后对 PC-3 前列腺癌细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

试药\给药后 72h	浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	抑制率(%)
石油醚提取物	500	$3.07 \pm 0.18$
	1000	$12.58 \pm 0.72$
	1500	$32.73 \pm 0.75$
水提取物	250	$23.23 \pm 0.00$
	500	$25.55 \pm 1.39$
	1000	$42.97 \pm 2.20$
	1500	$53.26 \pm 1.43$
乙醇提取物	250	$15.33 \pm 0.00$
	500	$39.11 \pm 2.63$
	1000	$48.64 \pm 2.37$
	1500	$58.42 \pm 2.80$
乙酸乙酯萃取物	250	$33.45 \pm 3.29$
	500	$65.69 \pm 2.63$
	1000	$70.89 \pm 8.41$

通过考察不同溶剂的虎耳草提取物对 PC-3 抗前列腺癌细胞的药理实验研究,由实验结果可知,采用不同溶剂提取的效果依次为:乙醇提取物>水提取物>石油醚提取物,由此表明采用乙醇提取虎耳草具有较好的抗癌活性。进一步研究表明,虎耳草通过乙醇提取后再用乙酸乙酯萃取得到的萃取物,对 PC-3 前列腺癌细胞的增殖具有较好的抑制作用,同时从实验结果可看出乙酸乙酯萃取物的抑制率差不多达到 50% 以上。

[0021] 试验例二:虎耳草中 2 个单体化合物的生物活性测定

#### 1、抗 PC-3 前列腺癌活性研究

##### 1.1 材料

RPMI 1640 培养基(美国 HYCLONE);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);二甲基亚砷(DMSO)(美国 AMRESCO);胰蛋白酶(美国 HYCLONE);双抗(青霉素和链霉素)(solarbio);MTT(四甲基偶氮唑盐)(美国 AMRESCO);台盼蓝染色液(美国 Sigma 公司)。

[0022] 1.2 主要仪器

二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 仪器有限公司);低温冰箱(Thermo Forma -80℃冰箱);台式高速离心机(sigma 公司);HH-S 数显恒温水浴锅(常州普天仪器制造有限公司);Nikon TS-100T 倒置显微镜(日本尼康公司);双人单面垂直洁净工作台(SW-CJ-2FD 型);移动式空气自净器(JB-YZJ-800 型);酶联免疫检测仪(美国 Thermo 公司);SZ-97 自动三重蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

[0023] 1.3 试验方法

细胞增殖检测(MTT 法测定 PC-3 前列腺癌细胞增殖):调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  /ml,接种在 96 孔培养板上,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,每组三个复孔,各组加入不同浓度药物培养 48h、72h,于培养结束前 4h 加入 MTT(1mg/ml)20  $\mu\text{L}$ 。弃去上清液,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,振荡后在酶标仪 490nm 波长测定 OD 值,并做 t 检验,计算细胞生长抑制率。

[0024] 1.4 结果与分析

表 3 虎耳草中两个单体化合物对 PC-3 前列腺癌细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )



试药 \ 给药后 48h	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	抑制率 (%)	试药 \ 给药后 72h	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	抑制率 (%)
HEC-1	150	$36.03 \pm 0.02$	HEC-1	150	$41.67 \pm 1.81$
	200	$43.56 \pm 0.01$		200	$50.83 \pm 0.04$
	300	$56.04 \pm 0.02$		300	$69.45 \pm 0.01$
	400	$71.59 \pm 0.01$		400	$75.84 \pm 0.01$
HEC-2	150	$40.98 \pm 0.01$	HEC-2	150	$48.38 \pm 0.01$
	200	$46.8 \pm 0.01$		200	$46.96 \pm 3.26$
	300	$48.03 \pm 0.04$		300	$58.59 \pm 0.7$
	400	$60.46 \pm 0.02$		400	$58.67 \pm 0.01$

结果显示,从虎耳草乙酸乙酯萃取物中分离得到的 2 个活性单体化合物分别是:槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷 (HEC-1) 和槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (HEC-2),两者对 PC-3 前列腺癌细胞的生长扩散均有较好的抑制作用。

[0025] 与现有技术相比,本发明将虎耳草乙醇提取物经石油醚、乙酸乙酯萃取,然后采用硅胶柱层析、中压柱层析、凝胶柱层析等分离手段,从虎耳草中分离得到两个单体化合物;且生物活性测定结果表明,本发明所得虎耳草提取物和两个单体化合物均对前列腺癌细胞的生长扩散有较好的抑制作用,可将其用于制备治疗前列腺癌的药物,在前列腺癌的治疗药物中具有良好的应用前景。

#### 附图说明

[0026] 图 1 为虎耳草中单体化合物 1 (槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷) 的质谱图;  
图 2 为虎耳草中单体化合物 1 (槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷) 的  $^1\text{H}$ -核磁谱图;  
图 3 为虎耳草中单体化合物 1 (槲皮素 3-O- $\beta$ -L-鼠李糖苷) 的  $^{13}\text{C}$ -核磁谱图;  
图 4 为虎耳草中单体化合物 2 (槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷) 的质谱图;  
图 5 为虎耳草中单体化合物 2 (槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷) 的  $^1\text{H}$ -核磁谱图;  
图 6 为虎耳草中单体化合物 2 (槲皮素 5-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷) 的  $^{13}\text{C}$ -核磁谱图。

#### 具体实施方式

[0027] 本发明的实施例 1:虎耳草提取物的制备:

取虎耳草全草干品,粉碎成粗粉,加 8 倍体积量 80% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 小时,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,余液浓缩至相对密度为 1.25 的稠膏,即得虎耳草提取物 I。

[0028] 本发明的实施例 2:虎耳草提取物的制备:

取虎耳草全草干品,粉碎成粗粉,加 8 倍体积量 80% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 小时,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,余液浓缩至相对密度为 1.25 的稠膏,依次用 4 倍体积量石油醚、乙酸乙酯各萃取 2 次,合并乙酸乙酯萃取液,减压蒸发至干,即得虎耳草提取物 II。

[0029] 本发明的实施例 3:虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化:

(1) 取虎耳草全草干品,粉碎成粗粉,加 8 倍体积量 80% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 小时,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,余液浓缩至相对密度为 1.25 的稠膏,得虎耳草乙醇提取物;

(2) 虎耳草乙醇提取物依次用 4 倍体积量石油醚、乙酸乙酯各萃取 2 次,合并乙酸乙酯萃取液,减压蒸发至干,得乙酸乙酯萃取物;

(3) 乙酸乙酯萃取物采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分段, 以石油醚 : 乙酸乙酯 = 30 : 1 ~ 1 : 1 及氯仿 : 甲醇 = 30 : 1 ~ 0 : 1 梯度洗脱 ; 对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、300 ~ 400 目中压硅胶以及硅胶 H 柱层析纯化, 以氯仿 : 甲醇 = 20 : 1 ~ 1 : 1 梯度洗脱, 再反复采用凝胶 (Sephadex LH-20) 柱层析纯化, 以氯仿 : 甲醇 = 5 : 1 ~ 0 : 1 梯度洗脱, 最后用甲醇溶解重结晶, 即得两个单体化合物 : 槲皮素 3-O- $\beta$ -L- 鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D- 葡萄糖苷。

[0030] 实施例 4 : 虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化 :

将市场上购买的虎耳草乙醇提取物经石油醚、乙酸乙酯萃取, 所得乙酸乙酯萃取物采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分段, 以石油醚 : 乙酸乙酯 = 30 : 1 ~ 1 : 1 及氯仿 : 甲醇 = 30 : 1 ~ 0 : 1 梯度洗脱 ; 对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、300 ~ 400 目中压硅胶以及硅胶 H 柱层析纯化, 以氯仿 : 甲醇 = 20 : 1 ~ 1 : 1 梯度洗脱, 再反复采用凝胶柱层析纯化, 以氯仿 : 甲醇 = 5 : 1 ~ 0 : 1 梯度洗脱, 最后用甲醇溶解重结晶, 即得两个单体化合物 : 槲皮素 3-O- $\beta$ -L- 鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D- 葡萄糖苷。

[0031] 实施例 5 : 虎耳草中两个活性单体化合物的提取纯化 :

取实施例 2 所得虎耳草提取物 2 采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分段, 以石油醚 - 乙酸乙酯及氯仿 - 甲醇梯度洗脱 ; 对乙酸乙酯大极性部分先采用常压、中压硅胶以及硅胶 H 柱层析纯化, 以氯仿 - 甲醇梯度洗脱, 再反复采用凝胶柱层析纯化, 以氯仿 - 甲醇梯度洗脱, 最后用甲醇溶解重结晶, 即得两个单体化合物 : 槲皮素 3-O- $\beta$ -L- 鼠李糖苷、槲皮素 5-O- $\beta$ -D- 葡萄糖苷。

[0032] 实施例 6 : 取实施例 1 制得的虎耳草提取物 I 10g 与微晶纤维素 90g 及硬脂酸镁 10g 混合, 混合物用单冲压片机打成  $\Phi$ 6mm、重量 3000mg 的片, 制得片剂。该制剂口服, 每次 2-3 片, 每日服用 2-3 次 ; 可用于预防或治疗前列腺癌。

[0033] 实施例 7 : 取实施例 2 制得的虎耳草提取物 II 5g 与玉米淀粉 90g 混合, 加水制成软材, 过 12 目筛进行造粒, 干燥后得到颗粒剂。该制剂口服, 每次 5-8g, 每日服用 2-3 次 ; 可用于预防或治疗前列腺癌。

[0034] 实施例 8 : 取实施例 3、4 或 5 所制得的单体化合物 (槲皮素 3-O- $\beta$ -L- 鼠李糖苷) 15mg 与乳糖 110g、硬脂酸镁 10g 混合, 以每 500mg 填充胶囊, 得胶囊剂。该制剂口服, 每次 1-2 粒, 每日服用 2-3 次 ; 可用于前列腺癌的治疗。

[0035] 实施例 9 : 取实施例 3、4 或 5 所制得的单体化合物 (槲皮素 5-O- $\beta$ -D- 葡萄糖苷) 20mg 加水 300ml 溶解, 加橙皮甙 4ml, 加单糖浆至 1000ml 得糖浆剂。该制剂口服, 每次 10-15ml, 每日服用 2-3 次 ; 可用于前列腺癌的治疗。

[0036] 实施例 10 : 将实施例 3、4 或 5 所制得的两个单体化合物 (槲皮素 3-O- $\beta$ -L- 鼠李糖苷和槲皮素 5-O- $\beta$ -D- 葡萄糖苷) 各 12mg 与微晶纤维素 90g 及硬脂酸镁 10g 混合, 混合物用单冲压片机打成  $\Phi$ 6mm 的片, 并用 CAP 薄膜包衣, 制成重量 3000mg 的肠溶片剂。该制剂口服, 每次 1-2 片, 每日服用 2-3 次 ; 可用于前列腺癌的治疗。

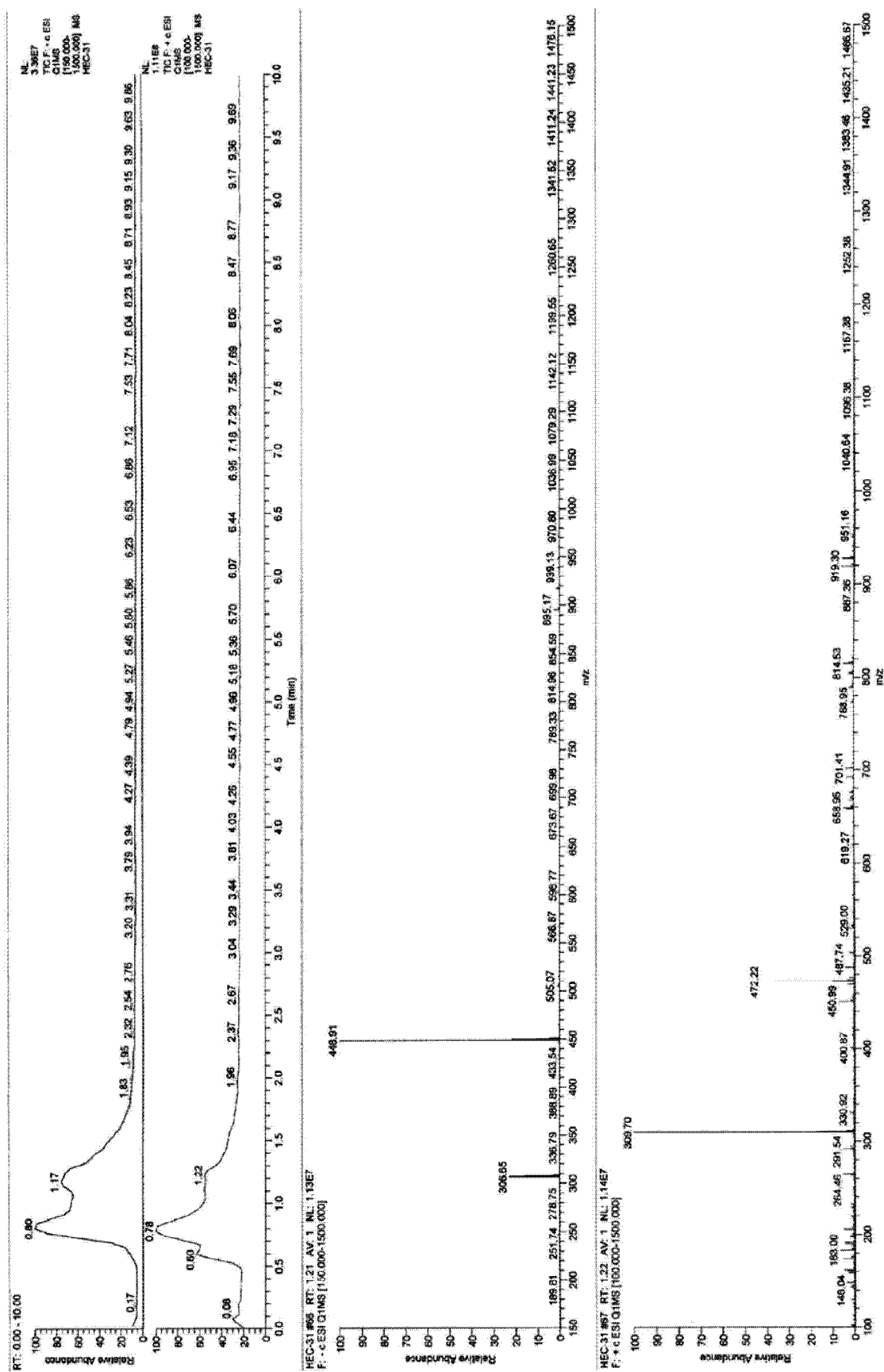


图 1

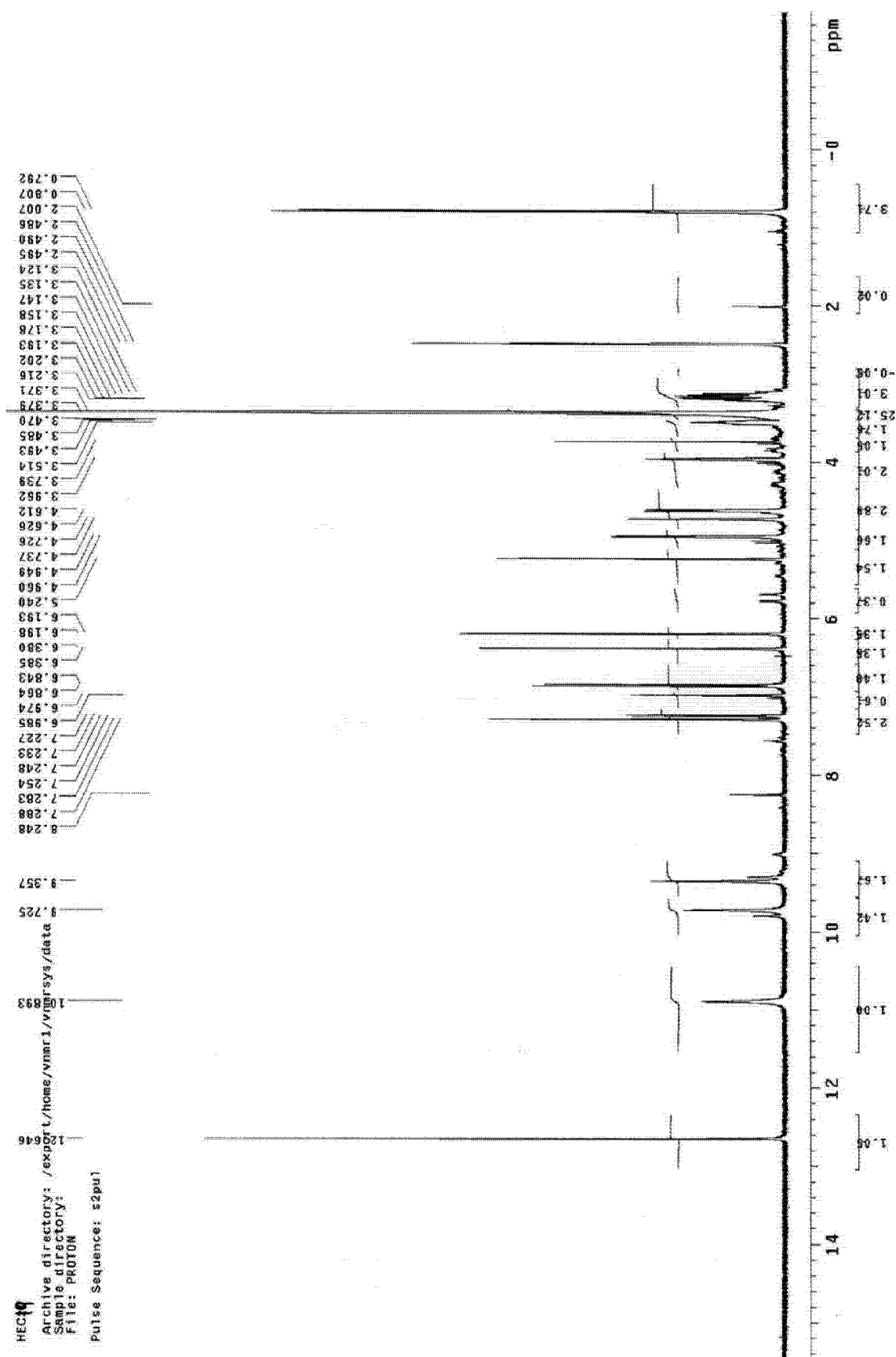


图 2

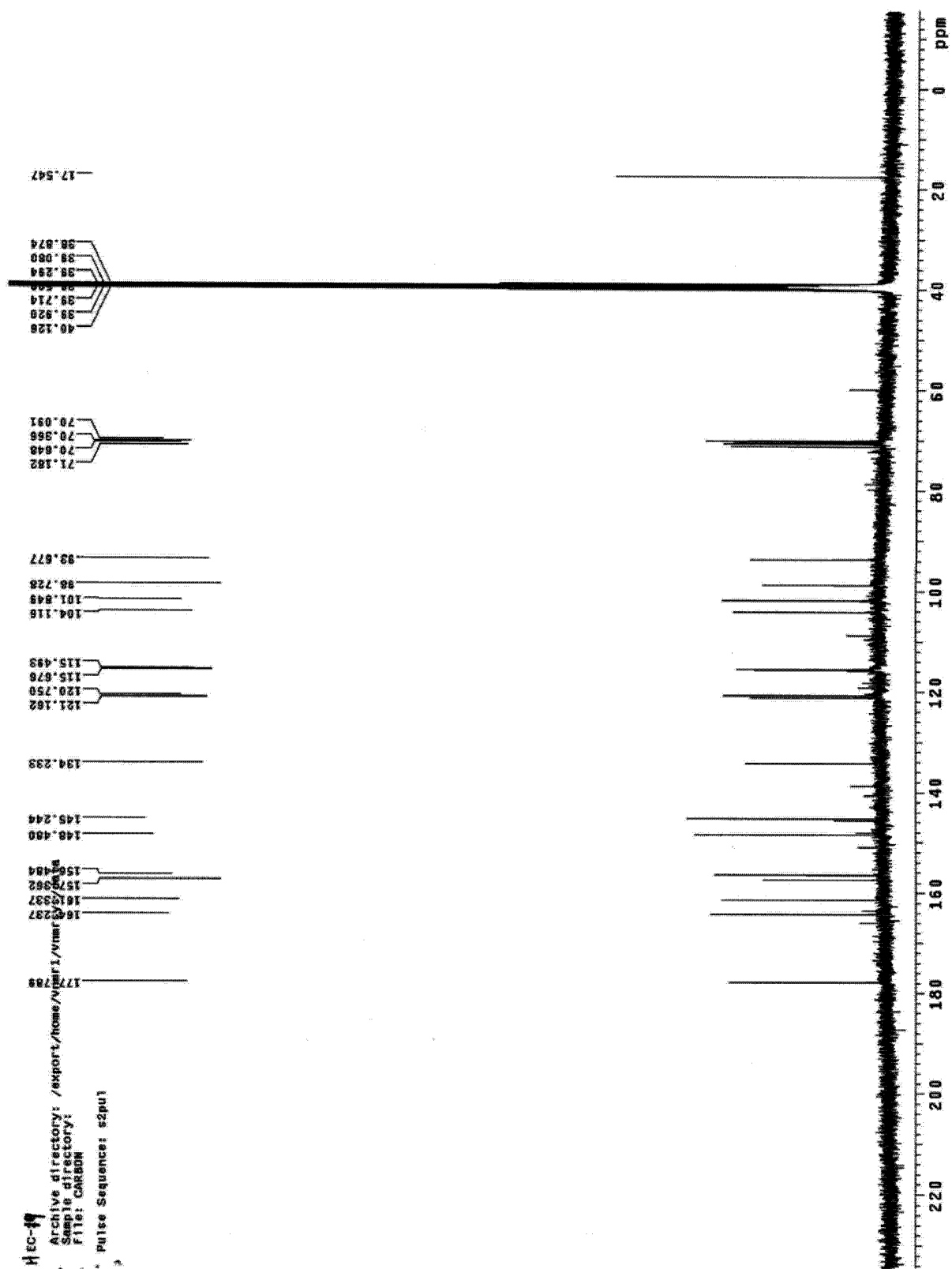


图 3

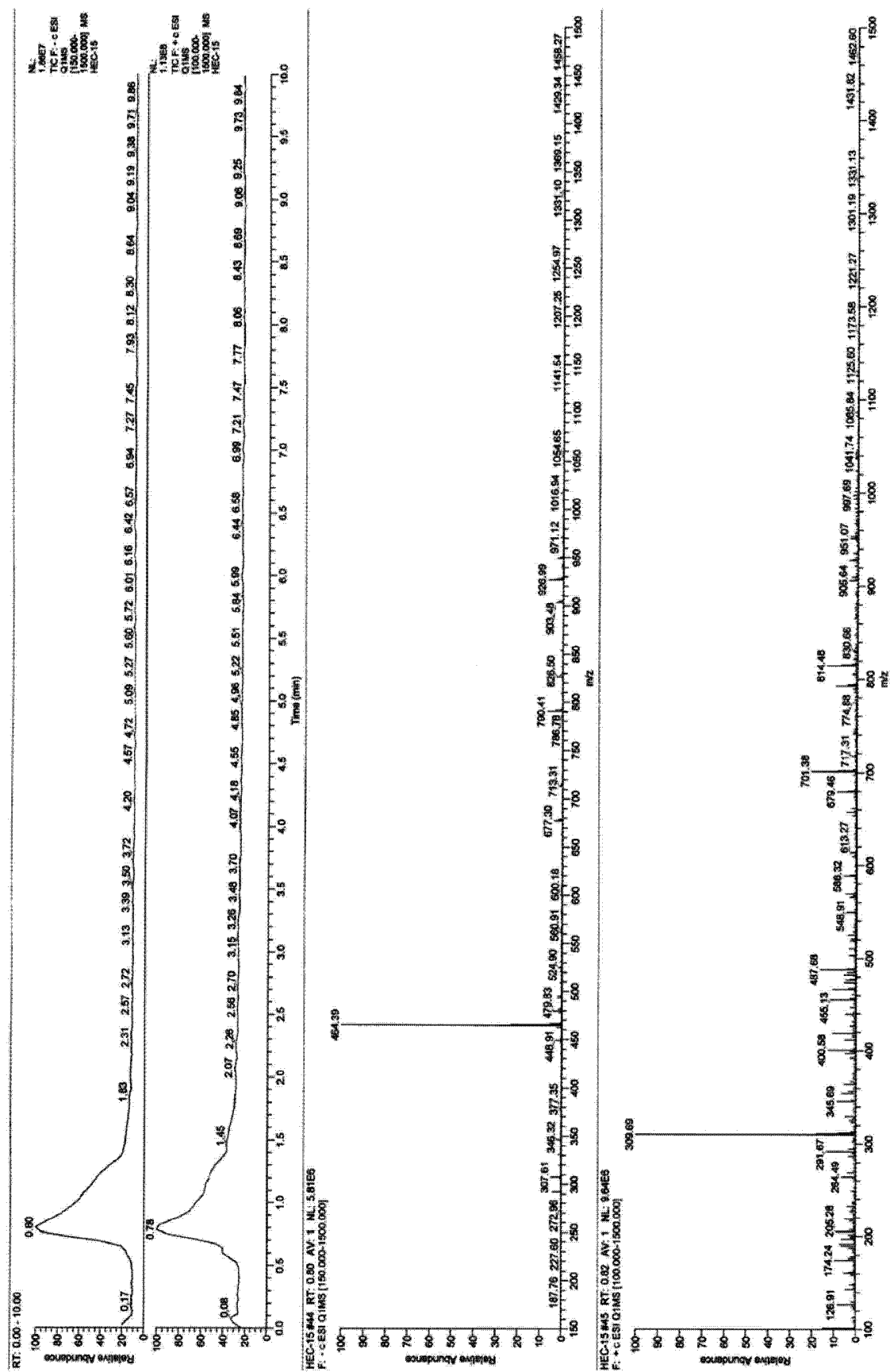


图 4

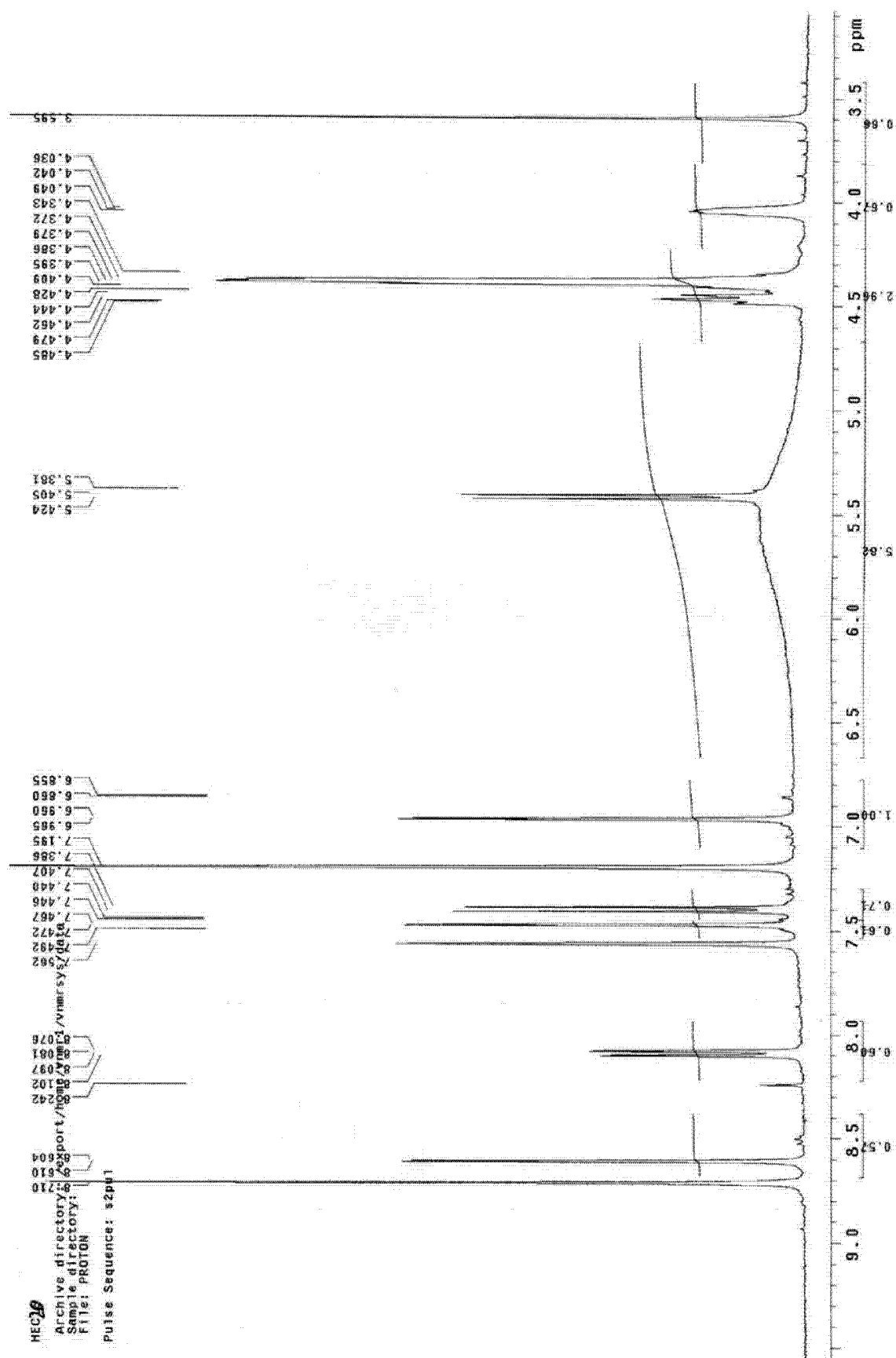


图 5

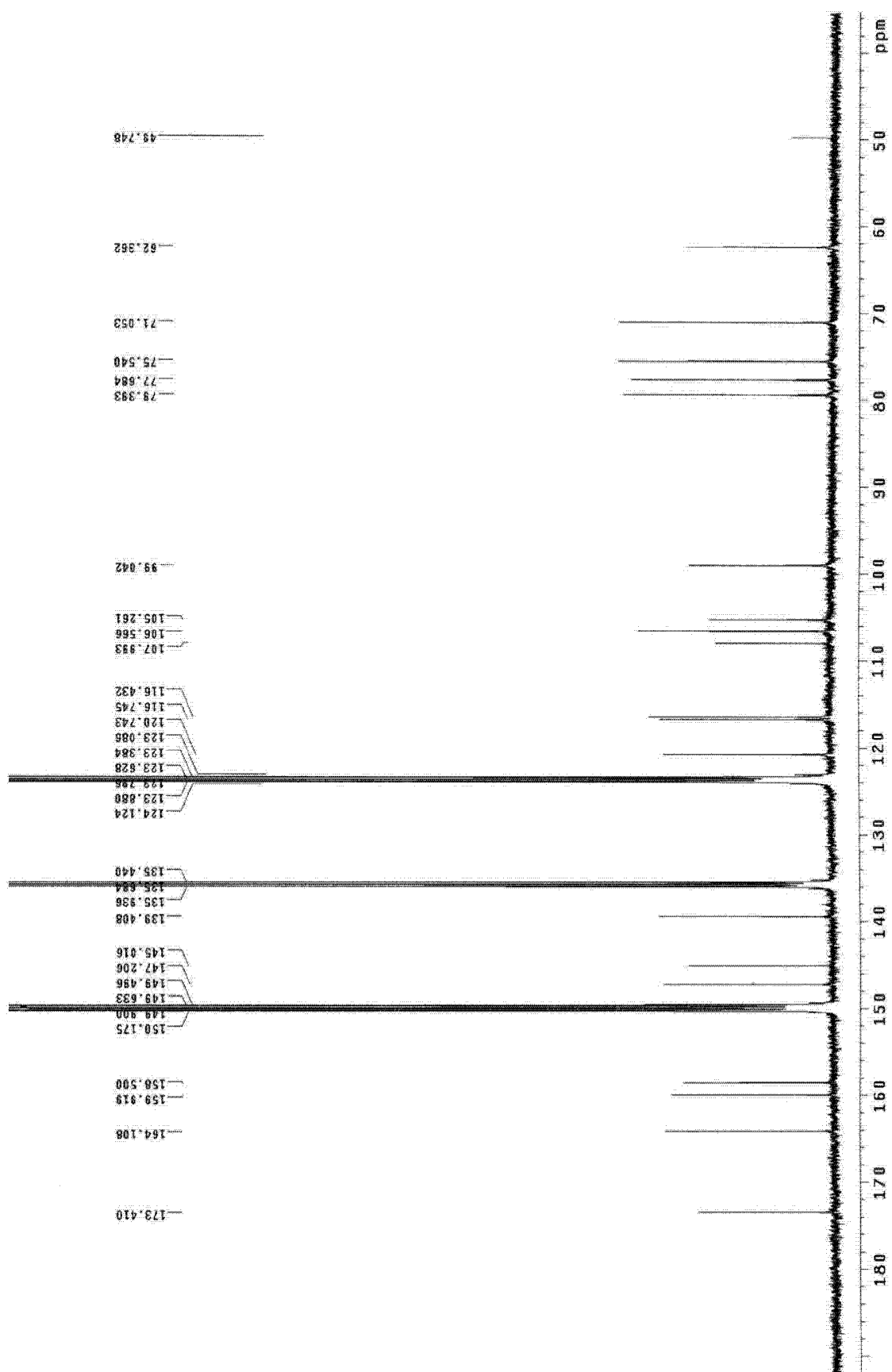


图 6