



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106176984 A

(43)申请公布日 2016.12.07

(21)申请号 201610761170.0

(22)申请日 2016.08.30

(71)申请人 青海民族大学

地址 810007 青海省西宁市八一中路3号

(72)发明人 林鹏程 吴疆 吴江 却生

包婷雯

(74)专利代理机构 淄博佳和专利代理事务所

37223

代理人 杨娜

(51)Int.Cl.

A61K 36/66(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

(54)发明名称

斑花黄堇有效部位及其制备方法和应用

(57)摘要

斑花黄堇有效部位及其制备方法和应用,属于植物提取物技术领域。选自斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位中的一种或两种以上的任意质量比的混合物。将斑花黄堇全草粉碎,加入体积百分比浓度65%~95%乙醇溶液回流提取,将所得提取液浓缩、干燥,得浸膏;将浸膏加蒸馏水分散,得浸膏分散液;依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇作为溶剂萃取浸膏分散液,挥去溶剂后得斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位;将萃取后的浸膏分散液浓缩、干燥,得斑花黄堇水相萃取部位。本发明的斑花黄堇有效部位在制备抑制CDC25酶和抑制HDAC1酶药物方面的应用,能够用于制备抗肿瘤药物。

1. 斑花黄堇有效部位,其特征在于:选自斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位中的一种或两种以上的任意质量比的混合物。

2. 根据权利要求1所述的斑花黄堇有效部位,其特征在於:选自斑花黄堇乙酸乙酯部位。

3. 权利要求1所述的斑花黄堇有效部位的制备方法,其特征在於,包括下述步骤:将斑花黄堇全草粉碎,加入体积百分比浓度65%~95%乙醇溶液回流提取,将所得提取液浓缩、干燥,得浸膏;将浸膏加蒸馏水分散,得浸膏分散液,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇作为溶剂萃取浸膏分散液,挥去溶剂后得斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位;将萃取后的浸膏分散液浓缩、干燥,得斑花黄堇水相萃取部位。

4. 根据权利要求3所述的斑花黄堇有效部位的制备方法,其特征在於:所述的回流提取为超声波辅助回流提取;超声波辅助回流提取的具体操作为:将粉碎后的斑花黄堇全草加入体积百分比浓度65%~95%乙醇溶液超声波提取0.5~3小时,过滤,滤渣加入体积百分比浓度65%~95%乙醇溶液回流提取1~3次,合并提取液,即得。

5. 权利要求1所述的斑花黄堇有效部位的应用,其特征在於:在制备抑制CDC25酶和抑制HDAC1酶药物方面的应用。

6. 根据权利要求5所述的斑花黄堇有效部位的应用,其特征在於:所述制备抑制CDC25酶药物和抑制HDAC1酶药物是通过斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位中的一种或两种以上的任意质量比的混合物,与药用辅料混合制成的口服制剂或注射制剂。

7. 根据权利要求6所述的斑花黄堇有效部位的应用,其特征在於:所述的注射制剂为脂质体注射剂、纳米粒注射剂或微球注射剂。

8. 根据权利要求6所述的斑花黄堇有效部位的应用,其特征在於:所述的口服制剂为散剂、片剂、颗粒剂、胶囊剂或溶液剂。

斑花黄堇有效部位及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 斑花黄堇有效部位及其制备方法和应用,属于植物提取物技术领域。

背景技术

[0002] 斑花黄堇(*Corydalis conspersa* Maxim.)为罂粟科紫堇属植物[参见:中国植物志.第三十二卷.北京:科学出版社,1999:266],是藏医传统药用植物。分布在我国产甘肃西南部、青海中南部、四川西北及西部地区 and 西藏东部和中部,生于海拔(3800~5700)米的多石河岸和高山砾石地。《中国藏药》记载其全草用于瘟病时疫,火烧伤,赤巴病之热症。主治热性传染性病,胃炎,胃溃疡,感冒发热,,外治疮疡。

[0003] 恶性肿瘤是严重危害人类健康的重大疾病之一,已成为人类致死的首要原因。恶性癌细胞的防治已成为医学界所关注的重要课题。但是,恶性肿瘤发病隐匿,病因复杂,病理变化多样,对其治疗仍局限于癌症疾病的多样性及反复性。然而,尽管不同的癌症的致癌原因可能不尽相同,但其组织观察均表现出相似的细胞周期紊乱以及迅速不可控制的细胞生长及转移。因此,对参与细胞周期调控的一些家族蛋白的研究在推动癌症治疗中成为重要因素。其中,细胞分裂周期激酶(Cdk/cyclins)作为真核细胞周期的主要调控蛋白,负责推动相应阶段的细胞分裂。CDC25 磷酸蛋白酶(CDC25 phosphatases)作为细胞分裂周期蛋白激酶家族(Cdk/cyclins)的活化蛋白酶,在真核细胞的分裂周期中起了十分重要的调节作用。目前临床研究表明,这一家族的蛋白酶在多种癌症组织中均表现出过量的表达,且往往与较差的癌症早期预测有关,这些均使CDC25磷酸蛋白酶成为具有巨大潜力的癌症治疗药物靶标。近年来,许多关于CDC25磷酸蛋白酶家族的酶学研究为相关抑制剂及癌症药物的研发提供了相当重要的信息。

[0004] 申请人在研究中发现:目前抗肿瘤药物的原料较少,特别是用于制备抑制CDC25酶药物的中药原料较为匮乏。斑花黄堇植物含有生物碱类、多糖、黄酮化合物等多种化学成分,现有技术中主要用于治疗热性传染性病,胃炎,胃溃疡,感冒发热,外治疮疡。目前,尚未见到关于斑花黄堇抑制CDC25酶和HDAC1酶方面的研究和应用的报道。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是:克服现有技术的不足,提供斑花黄堇有效部位及其制备方法和应用,该斑花黄堇有效部位能有效抑制CDC25酶药物和HDAC1酶的活性,用于制备抑制CDC25酶药物和抑制HDAC1酶药物,具有较好的抗肿瘤作用。

[0006] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:该斑花黄堇有效部位,其特征在于:选自斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位中的一种或两种以上的任意质量比的混合物。

[0007] 该斑花黄堇有效部位,其特征在于:选自斑花黄堇乙酸乙酯部位。

[0008] 该斑花黄堇有效部位的制备方法,其特征在于,包括下述步骤:将斑花黄堇全草粉碎,加入体积百分比浓度65%~95%乙醇溶液回流提取,将所得提取液浓缩、干燥,得浸膏;将

浸膏加蒸馏水分散,得浸膏分散液,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇作为溶剂萃取浸膏分散液,挥去溶剂后得斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位;将萃取后的浸膏分散液浓缩、干燥,得斑花黄堇水相萃取部位。

[0009] 优选的,所述的回流提取为超声波辅助回流提取,超声波辅助回流提取的具体操作为:将粉碎后的斑花黄堇全草加入体积百分比浓度65%~95%乙醇溶液超声波提取0.5~3小时,过滤,滤渣加入体积百分比浓度65%~95%乙醇溶液回流提取1~3次,合并提取液,即得。

[0010] 该斑花黄堇有效部位的应用,其特征在于:在制备抑制CDC25酶药物和抑制HDAC1酶药物方面的应用。

[0011] 所述制备抑制CDC25酶药物和抑制HDAC1酶药物是通过斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位中的一种或两种以上的任意质量比的混合物,与药用辅料混合制成的口服制剂或注射制剂。

[0012] 所述的注射制剂为脂质体注射剂、纳米粒注射剂或微球注射剂。

[0013] 所述的口服制剂为散剂、片剂、颗粒剂、胶囊剂或溶液剂。

[0014] 申请人对于本发明的说明如下:现有技术中,斑花黄堇常规用途为治疗感冒发热和疮疡,未见其有抗肿瘤功效的相关报道。申请人通过大量研究发现:斑花黄堇中的部分提取物还具有抗菌、抗肿瘤的作用,但是其功效不明显,不能确定其具体的有效部位。因此通过怎样的溶剂、采用怎样制备方法,才能获得抑制CDC25酶活性效果最好的有效部位,是必须要解决的问题。申请人通过研究发现:采用本发明制备方法,筛选出的斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、和斑花黄堇水相萃取部位,不但对于抑制CDC25酶效果较好,同时对于抑制HDAC1酶也有较好的效果。

[0015] 制备方法中,超声波提取为常温下进行。过滤并回流提取是指:超声波提取后,过滤获得超声波提取液和滤渣,向滤渣中加质量百分比浓度65%~95%乙醇水溶液回流提取,合并超声波提取和回流提取提取液。回流提取的具体操作为:向回流加热装置中加入粉碎后的药材或超声波提取后的滤渣,加入乙醇水溶液,加热提取,放冷过滤得一次提取液和滤渣;向滤渣中加入乙醇溶液,加热、进行第二次回流提取,放冷过滤得二次提取液和滤渣(以上为回流提取2次);合并多次提取液,即得回流提取提取液。优选的,每次回流提取0.5~2小时;每次回流提取时所加乙醇溶液没过药材表面1cm~2cm。回流提取的温度为乙醇回流提取的常规温度,需高于乙醇的沸点,优选为80℃~100℃。

[0016] 制备方法中,浸膏为粗提取物,采用不同的溶剂萃取浸膏分散液,指的是依次将石油醚加入浸膏分散液萃取分离获得石油醚萃取液、将乙酸乙酯加入浸膏分散液萃取分离获得乙酸乙酯萃取液、将正丁醇加入浸膏分散液萃取分离获得正丁醇萃取液;取乙酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液分别挥发去除溶剂后,获得斑花黄堇乙酸乙酯部位和斑花黄堇正丁醇部位;将萃取后剩余的浸膏分散液(溶剂为水),挥发去除溶剂即得斑花黄堇水相萃取部位。水相萃取部位也可以称作水相萃取物,水相萃取部位易溶于水;而相对的,石油醚、乙酸乙酯和正丁醇为有机相,石油醚部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位对应易溶于石油醚、乙酸乙酯和正丁醇。其中,斑花黄堇乙酸乙酯部位含有生物碱、黄酮类化合物;斑花黄堇正丁醇部位含有皂苷和酚类化合物;斑花黄堇水相萃取部位含有多糖和有机酸类化合物。挥去溶剂即挥发去除溶剂。挥去溶剂可以采用常压加热使溶剂(石油醚、乙酸乙酯和正丁醇)挥发。优选的,挥去溶剂采用减压浓缩,该方法效率高,并且能避免热敏性成分因高温丧失药性。

[0017] 优选的,斑花黄堇制备的抑制CDC25酶药物和抑制HDAC1酶药物,为口服制剂或注射制剂。口服制剂和注射制剂为最佳给药途径,此处所述口服制剂为经肠胃道给药制剂,优选的,口服制剂为缓释型或控释型口服制剂,药用辅料中包含缓释剂或控释剂。也可以为非肠胃道给药的其他,如呼吸道给药制剂(喷雾剂、气雾剂、粉雾剂);皮肤给药制剂(外用溶液剂、洗剂、搽剂、软膏剂、硬膏剂、糊剂、贴剂);膜给药制剂(滴眼剂、滴鼻剂、眼用软膏、含漱剂、舌下片剂);腔道给药制剂(栓剂)。注射制剂可以为常规注射制剂。根据药物传递系统进行分类,优选的,本发明的注射制剂为脂质体注射剂、纳米粒注射剂或微球注射剂;其他的,本发明的注射剂还可以为微囊注射剂、聚合物胶束注射剂、微乳注射剂、亚微乳注射剂、亚微粒注射剂或凝胶注射剂,以上药物传递系统的注射剂能延长药物载体在体内的循环时间、延长载药微粒在吸收部位的停留时间、控制药物在释放初期的突释效应。药用辅料包括药物载体以及溶剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、助悬剂、澄清剂、反絮凝剂、矫味剂、着色剂、防腐剂、化学灭菌剂、吸附剂、助滤剂、抗氧剂、pH调节剂、等渗调节剂、稀释剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、抗粘着剂、缓释剂、控释剂、包衣材料、成膜材料、胶囊材料中的一种或多种。

[0018] 与现有技术相比,本发明的斑花黄堇有效部位及其制备方法和应用所具有的有益效果是:

1、该斑花黄堇有效部位能有效抑制CDC25酶和HDAC1酶的活性,用于制备抑制CDC25酶药物和抑制HDAC1酶药物,具有较好的抗肿瘤作用。申请人经大量研究确定:现有技术中功效为治疗感冒发热和疮疡的斑花黄堇,还具有抗肿瘤的功效。并且申请人首次在CDC25A酶、CDC25B酶和HDAC1酶上进行药效筛选,通过大量研究确定斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位中的一种或两种以上的任意质量比的混合物均具有较好的抑制CDC25A酶和CDC25B酶活性,其CDC25A酶存活率8.7~20.7%、CDC25B酶存活率19.6~31.8%,并且以上三个部位对于HDAC1酶同样有较好的抑制效果,HDAC1酶存活率21.80~29.35%,能够用于开发成抗肿瘤藏药新药。由于不同溶剂萃取获得的各有效部位对CDC25A酶和CDC25B酶活抑制能力不同,申请人通过进一步的研究确定:斑花黄堇乙酸乙酯部位的抑制CDC25酶效果最优,其CDC25A酶存活率8.7%、CDC25B酶存活率19.6%,对HDAC1酶同样能达到较好的抑制效果,HDAC1酶存活率22.88%。综上所述,申请人经研究首次发现斑花黄堇的新功效,并通过研究确定其所抑制的酶的种类,设计制备方法并最终获得对CDC25酶和HDAC1酶均具有较好抑制效果的有效部位,以上过程是付出了大量的创造性劳动的。

[0019] 2、该斑花黄堇有效部位的制备方法提取方便,提取效率高。制备方法中,申请人设计加入体积百分比浓度65%~95%乙醇溶液进行超声波辅助回流提取,提高了提取效率;萃取中,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇作为溶剂萃取浸膏分散液,采用以上溶剂萃取顺序所得的斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位和斑花黄堇水相萃取部位具有较好的抑制CDC25酶和HDAC1酶的效果。

[0020] 3、本发明拓展了抑制CDC25酶药物和抑制HDAC1酶药物的原料渠道,扩大了斑花黄堇的用途,使斑花黄堇发展成为抑制CDC25酶药物和抑制HDAC1酶药物的新原料,可显著提高斑花黄堇的附加值。

具体实施方式

[0021] 实施例1~3是本发明的斑花黄堇有效部位及其制备方法的具体实施方式,其中实施例1为最佳实施例。

[0022] 实施例1

制备方法,包括下述步骤:将斑花黄堇全草粉碎,采用体积百分比浓度75%~85%乙醇溶液超声波提取1小时,然后过滤,滤渣回流提取3次,每次0.5小时,合并提取液、浓缩干燥得浸膏;将浸膏加蒸馏水分散,得浸膏分散液,然后依次采用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇作为溶剂萃取浸膏分散液,取乙酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液分别挥发溶剂,得到斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位;将浸膏分散液萃取后剩余液体浓缩、干燥,得斑花黄堇水相萃取部位。

[0023] 实施例2

制备方法,包括下述步骤:将斑花黄堇全草粉碎,采用体积百分比浓度85%~95%乙醇溶液超声波提取3小时,然后过滤,滤渣回流提取3次,每次1小时,合并提取液、浓缩干燥得浸膏;将浸膏加蒸馏水分散,得浸膏分散液,然后依次采用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇作为溶剂萃取浸膏分散液,取乙酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液分别挥发溶剂,得到斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位;将浸膏分散液萃取后剩余液体浓缩、干燥,得斑花黄堇水相萃取部位。

[0024] 实施例3

制备方法,包括下述步骤:将斑花黄堇全草粉碎,采用体积百分比浓度65%~75%乙醇溶液超声波提取0.5小时,然后过滤,滤渣回流提取2次,每次2小时,合并提取液、浓缩干燥得浸膏;将浸膏加蒸馏水分散,得浸膏分散液,然后依次采用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇作为溶剂萃取浸膏分散液,取乙酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液分别挥发溶剂,得到斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位;将浸膏分散液萃取后剩余液体浓缩、干燥,得斑花黄堇水相萃取部位。

[0025] 将实施例1~3萃取所得石油醚萃取液分别挥去溶剂,得实施例1~3斑花黄堇石油醚部位,留作后续性能测试使用。

[0026] 性能测试

分别各取0.4mg干燥后的斑花黄堇石油醚部位、斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位,各自溶解于100 μ L的二甲基亚砜(DMSO)中形成DMSO溶液,超声5分钟。再分别取1 μ L溶解样品的DMSO溶液,分别加入缓冲液99 μ L,分别得到斑花黄堇石油醚部位的缓冲溶液、斑花黄堇乙酸乙酯部位的缓冲溶液、斑花黄堇正丁醇部位的缓冲溶液和斑花黄堇水相萃取部位的缓冲溶液。缓冲液的配方为:分别取0.2423g Tris-HCl、0.5138g NaCl、0.0330g BSA、0.0154g DTT、0.0167g EDTA于50mL烧杯中,加蒸馏水溶解并混匀,再加入0.5mol/L NaOH水溶液将pH调节至8.4,然后定容至100mL容量瓶中,于4 $^{\circ}$ C保存,作为储备缓冲液(buffer)。

[0027] 一、抑制CDC25A酶和CDC25B酶实验。

[0028] 主要实验材料为:

CDC25A酶、CDC25B酶,北京乐博生物科技有限公司产品;

Tris-HCl, 上海杰美基因医药科技有限公司;
 EDTA, 上海居里生物科技有限公司;
 DTT, 上海生工生物工程股份有限公司;
 BSA, 上海江莱生物科技有限公司;
 DMSO, 上海伊卡生物技术有限公司;
 NaCl(分析纯), 天津红岩化学试剂厂;
 NaOH(分析纯), 天津河东区红岩试剂厂。

[0029] 主要实验仪器为:

FLUOstar Omega全自动多功能酶标仪, 广东省广州伯齐生物科技有限公司;
 MP511型pH计电计, 上海三信有限公司;
 BRAND8道移液枪, 浙江杭州汇尔仪器有限公司;
 500 μ L移液枪、50 μ L移液枪, 上海荣泰生化仪器有限公司;
 电子天平XPE105, 梅特勒-托利多仪器有限公司。

[0030] 以实施例1得到的斑花黄堇各部位为测试物, 检测斑花黄堇各部位抑制CDC25A酶和CDC25B酶的活性。

[0031] 其方法是: 分别取2.7 μ L 330 μ mol/L FDP、1.8 μ L 100 μ mol/L测试物、2 μ L 0.1 μ mol/L CDC25A/CDC25B、11.5 μ L FDP buffer组成18 μ L体系的实验组; 然后取2.7 μ L 330 μ mol/L FDP、2 μ L 0.1 μ mol/L CDC25A/CDC25B、13.3 μ L FDP buffer组成18 μ L体系的对照组1; 再取2.7 μ L 330 μ mol/L FDP、1.8 μ L 100 μ mol/L测试物、13.5 μ L FDP buffer组成18 μ L体系的对照组2; 将需要加CDC25A/CDC25B酶的体系于37 $^{\circ}$ C条件下孵育60 min, 之后加酶, 于同样条件下反应60 min, 待反应完全, 检测在485 nm激发光作用下反应产物于520 nm处的荧光强度。对照组在不加入测试物在同样条件下进行: 酶存活效率(%)= 实验组测定值/对照组1测定值 \times 100%; 其中酶存活效率越低, 说明测试样品对组蛋白磷酸化酶CDC25A/CDC25B的抑制效果越强。

[0032] 表1 斑花黄堇有效部位抑制CDC25A酶和CDC25B酶的活性测试结果

浓度 mg/mL	CDC25A 酶存活率 %*	CDC25B 酶存活率 %*
斑花黄堇石油醚部位	67.2	77.1
斑花黄堇乙酸乙酯部位	8.7	19.6
斑花黄堇正丁醇部位	20.1	30.7
斑花黄堇水相萃取部位	20.7	31.8
对照组 1	100.0	100.0

[0033] 表1中* $P < 0.01$, 通过表1可以看出: 斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位和斑花黄堇水相萃取部位对于CDC25A酶CDC25B酶存在较好的抑制效果, 其中斑花黄堇乙酸乙酯部位的抑制效果最优。

[0034] 二、抗HDAC1酶实验。

[0035] 主要实验材料和主要仪器同实验一。主要区别的是:HDAC1酶,Cisbio Bioassays 公司产品。

[0036] 以实施例1得到的斑花黄堇有效部位为受试药物。其代表实验为斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇乙酸乙酯部位和斑花黄堇水相萃取部位抑制HDAC1酶的活性。其方法是,分别另取4 μ L的斑花黄堇含乙酸乙酯部位的缓冲溶液(标号E)、斑花黄堇正丁醇部位的缓冲溶液(标号F)和斑花黄堇水相萃取部位的缓冲溶液(标号G),分别进行如下操作:将所取的4 μ L缓冲溶液(E、F、G)置于96孔板中,再分别加入2 μ L HDAC1酶,室温条件下反应5min,加入4 μ L H3(1-21)K9底物,37 $^{\circ}$ C,培养箱中培养60分钟。加入5 μ L SA-XL665 和5 μ L H3K9me0 抗体,665nm测值,得实验组吸光度。

[0037] 将4 μ L的缓冲溶液置于96孔板中,再分别加入2 μ L HDAC1酶,室温条件下反应5min,加入4 μ L H3(1-21)K9底物,37 $^{\circ}$ C,培养箱中培养60分钟。加入5 μ L SA-XL665和5 μ L H3K9me0 抗体,665nm测值,得对照组吸光度。计算HDAC1酶存活率:存活率(%)=实验组吸光度/对照组吸光度 \times 100%。

[0038] 表2 斑花黄堇有效部位抑制HDAC1酶的活性测试结果

浓度 mg/mL	HDAC1 酶存活率 %*
斑花黄堇石油醚部位	58.62
E (斑花黄堇乙酸乙酯部位)	22.88
F (斑花黄堇正丁醇部位)	29.35
G (斑花黄堇水相萃取部位)	21.80
对照组	100.0

[0039] 表1中* $P < 0.01$,通过表2可以看出:斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇乙酸乙酯部位和斑花黄堇水相萃取部位对于HDAC1酶均有较好的抑制效果。

[0040] 三、抗肿瘤活性测试。

[0041] 利用MTT法测定斑花黄堇有效部位对人肿瘤细胞的细胞毒活性。分别取实施例1所得斑花黄堇浸膏、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水相萃取部位适量,DMSO溶解后,利用MTT法分别测定对人结肠癌HCT-8、人肝癌Be1-7402细胞、人胃癌BGC-803细胞、人肺腺癌A549细胞和人卵巢癌A-2780细胞生长的抑制率。

[0042] 实验方法:将对数生长期的细胞,用0.25%胰酶-EDTA消化后,配制成一定浓度的单细胞悬液,根据细胞生长速度的差异,按800~2000个/孔接种于96孔板,每孔加入细胞悬液100 μ L。24 h后,加入含不同浓度化合物及相应溶剂对照的新鲜培养基,每孔加100 μ L (DMSO

终浓度<0.1%),每种受试化合物设5~7个剂量组,每组至少设3个平行孔,于37℃继续培养72 h后,弃上清液,每孔加入100 μ L新鲜配制的含0.5mg/mL MTT的无血清培养基,继续培养4 h,弃上清液后,每孔加入200 μ L DMSO溶解MTT甲簪沉淀,微型振荡器振荡混匀,用酶标仪在参考波长450 nm,检测波长570 nm条件下测定光密度值(OD),以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组,用以下公式计算化合物对肿瘤细胞的抑制率,并按中效方程计算IC₅₀:抑制率=(对照组平均OD值-给药组平均OD值)÷对照组平均OD值×100%。将制备方法中的浸膏、以及所得的斑花黄堇石油醚部位、斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位进行体外肿瘤细胞毒活性筛选,结果见表3。

[0043] 表3 体外肿瘤细胞毒活性筛选结果

样品	IC ₅₀ (μ g/ml)				
	HCT-8	Be1-7402	BGC-823	A549	A2780
浸膏	33.16	40.11	35.28	39.72	>50
斑花黄堇石油醚部位	47.62	46.35	32.66	36.52	>50
斑花黄堇乙酸乙酯部位	9.76	21.79	12.21	33.74	48.77
斑花黄堇正丁醇部位	30.18	>50	39.32	>50	>50
斑花黄堇水相萃取部位	38.96	>50	46.27	>50	>50

[0044] 注:1)、HCT-8为人结肠癌细胞,Be1-7402为人肝癌细胞,BGC-823为人胃癌细胞,A549为人肺癌细胞,A2780为人卵巢癌细胞。2)、>50表明不具有抗细胞毒活性。通过表2可看出:斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位、斑花黄堇水相萃取部位确实有较好的抗肿瘤的效果。

[0045] 四、体外S₁₈₀荷瘤小鼠抗肿瘤实验。

[0046] 1、实施例1各部位的S₁₈₀荷瘤小鼠抗肿瘤实验方法如下:

a)5~6周龄昆明小鼠,随机选鼠分组,每组10只,每组雌雄各半;分组名称为:空白对照组,环磷酰胺组,给药组;给药组包括:斑花黄堇石油醚部位低、中、高剂量组,斑花黄堇乙酸乙酯部位低、中、高剂量组,斑花黄堇正丁醇部位低、中、高剂量组,斑花黄堇水相萃取部位低、中、高剂量组;对每只小鼠进行皮肤消毒;

b)于右前肢皮下接种S₁₈₀瘤液0.2ml(S₁₈₀瘤细胞数在 $2.0 \times 10^6 \sim 2.2 \times 10^6$ 范围内);

c)步骤b)接种24小时后给药;空白对照组灌胃给药10mL/kg注射用生理盐水;环磷酰胺组腹腔注射环磷酰胺20mg/kg;给药组采用灌胃给药实施例1制得的斑花黄堇石油醚部位、斑花黄堇乙酸乙酯部位、斑花黄堇正丁醇部位和斑花黄堇水相萃取部位;首次给药后,隔日称小鼠首次体重;每组每天给药1次,每次给药剂量详见表4,连续给药14天;

d)末次给药1小时后,处死小鼠,称小鼠末次体重,剥瘤块称重,计算抑瘤率。抑瘤率=(空白对照组平均瘤重-给药组平均瘤重)÷空白对照组平均瘤重×100%,将抑瘤率计算结果录入表4。

[0047] 表4 实施例1各部位对小鼠S₁₈₀实体瘤的影响

组别	剂量 (mg/kg/d)	S ₁₈₀ 抑瘤率 (%)
空白对照组	—	—
环磷酰胺组	20	63.45
斑花黄蘗石油醚部位低剂量组	200	5.59
斑花黄蘗石油醚部位中剂量组	500	9.44
斑花黄蘗石油醚部位高剂量组	800	8.11
斑花黄蘗乙酸乙酯部位低剂量组	200	23.55
斑花黄蘗乙酸乙酯部位中剂量组	500	49.29
斑花黄蘗乙酸乙酯部位高剂量组	800	59.63
斑花黄蘗正丁醇部位低剂量组	200	7.47
斑花黄蘗正丁醇部位中剂量组	500	15.55
斑花黄蘗正丁醇部位高剂量组	800	29.99
斑花黄蘗水相萃取部位低剂量组	200	9.99
斑花黄蘗水相萃取部位中剂量组	500	27.01
斑花黄蘗水相萃取部位高剂量组	800	45.11

[0048] 2、实施例2各部位的S₁₈₀荷瘤小鼠方法同实施例1,数据录入表5。

[0049] 表5 实施例2各部位对小鼠S₁₈₀实体瘤的影响

组别	剂量 (mg/kg/d)	S ₁₈₀ 抑瘤率 (%)
空白对照组	—	—
环磷酰胺组	20	63.45
斑花黄蘗石油醚部位低剂量组	200	3.00
斑花黄蘗石油醚部位中剂量组	500	6.59
斑花黄蘗石油醚部位高剂量组	800	5.27
斑花黄蘗乙酸乙酯部位低剂量组	200	24.38
斑花黄蘗乙酸乙酯部位中剂量组	500	46.11
斑花黄蘗乙酸乙酯部位高剂量组	800	58.14
斑花黄蘗正丁醇部位低剂量组	200	10.13
斑花黄蘗正丁醇部位中剂量组	500	16.99
斑花黄蘗正丁醇部位高剂量组	800	38.99
斑花黄蘗水相萃取部位低剂量组	200	9.78
斑花黄蘗水相萃取部位中剂量组	500	42.96
斑花黄蘗水相萃取部位高剂量组	800	54.33

[0050] 3、实施例3各部位的S₁₈₀荷瘤小鼠抗肿瘤实验的方法同实施例1,数据录入表6。

[0051] 表6实施例3各部位对小鼠S₁₈₀实体瘤的影响

组别	剂量 (mg/kg/d)	S ₁₈₀ 抑瘤率 (%)
空白对照组	—	—
环磷酰胺组	20	63.45
斑花黄堇石油醚部位低剂量组	200	2.47
斑花黄堇石油醚部位中剂量组	500	7.99
斑花黄堇石油醚部位高剂量组	800	4.49
斑花黄堇乙酸乙酯部位低剂量组	200	25.67
斑花黄堇乙酸乙酯部位中剂量组	500	49.54
斑花黄堇乙酸乙酯部位高剂量组	800	60.17
斑花黄堇正丁醇部位低剂量组	200	12.11
斑花黄堇正丁醇部位中剂量组	500	35.01
斑花黄堇正丁醇部位高剂量组	800	39.47
斑花黄堇水相萃取部位低剂量组	200	15.11
斑花黄堇水相萃取部位中剂量组	500	47.55
斑花黄堇水相萃取部位高剂量组	800	45.99

[0052] 经申请人统计:给药组与空白对照组相比,小鼠体重变化无显著性差异($P>0.05$)。表4~6中:S₁₈₀是指小鼠腹水瘤细胞,表4~6中抑瘤率数值越大表示抗肿瘤效果越好。由表4~6可以看出:首先,实施例1~3均有较好的抗肿瘤效果,实施例1~3中相同部位相同剂量时,各组间的抗肿瘤效果无明显差别。其次,与空白对照组相比,斑花黄堇乙酸乙酯部位低、中、高剂量组,斑花黄堇正丁醇中、高剂量组,斑花黄堇水相萃取部位中、高剂量组,环磷酰胺化疗组,均可显著抑制S₁₈₀肿瘤的生长。

[0053] 实施例4

将斑花黄堇有效部位制备为片剂,采用如下步骤:将斑花黄堇乙酸乙酯部位300mg和淀粉100mg混匀,加体积百分比浓度10%的淀粉糊40mg制成软材,过筛得湿颗粒,干燥得干颗粒,整粒,加硬脂酸镁4mg混匀、压片,即得。

[0054] 实施例5

冲剂的制备方法:按重量份配比将斑花黄堇水相萃取部位5份、蔗糖1份、糊精3份混匀,加入适量质量百分比95%乙醇溶液2~5份,边加边搅拌,制得软材,将软材干燥、过16目筛,分装即得。

[0055] 实施例6

微丸胶囊由以下重量份原料组成:斑花黄堇正丁醇部位30份、卵磷脂5份、牛黄胆酸钠5份、微晶纤维素30份;

微丸胶囊的制备方法:按配比将斑花黄堇正丁醇部位、卵磷脂、牛黄胆酸钠和微晶纤维素混均,倒入乙醇水溶液搅匀获得软材,将软材倒入挤出机中挤出,经滚圆获得颗粒,挤出

转速250r/min,滚圆转速800r/min,滚圆时间20min,干燥、过24~30目筛获得微丸,将微丸灌装入胶囊壳内,即得。

[0056] 实施例7

脂质体注射剂的制备方法:1)在氮气保护下,将50g胆固醇琥珀酸酯、250g二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、40g大豆卵磷脂、50g泊洛沙姆-188、和10g斑花黄堇正丁醇部位溶解于1500ml体积比为1:1的乙醇和正丁醇的有机溶剂中,搅拌使其溶解获得混悬液;将混悬液通过减压浓缩挥去有机溶剂,获得磷脂膜;

2)在氮气保护下,向磷脂膜中加入8000ml pH为6.8的磷酸盐缓冲溶液,搅拌,使磷脂膜洗脱并充分溶胀水合,经0.22 μ m微孔滤膜过滤,得斑花黄堇正丁醇部位的脂质体;

3)在无菌条件下,向斑花黄堇正丁醇部位的脂质体中,加入100g海藻糖,搅拌均匀,超声波处理0.5~1小时,加注射用水定容,经0.22 μ m微孔滤膜过滤,灌装,即得斑花黄堇正丁醇部位的脂质体注射剂。

[0057] 实施例8

纳米粒注射剂的制备方法:取25g斑花黄堇乙酸乙酯部位和100g泊洛沙姆407用3000ml无水乙醇溶解,加入30ml 1mol/L氯化锌的乙醇溶液,搅拌混合,超声波处理0.5~1小时使其溶解,获得混合液;将混合液减压浓缩挥去溶剂,放入-20℃冰箱冷冻2小时;取出加注射用水定容,超声波处理0.5~1小时,经0.22 μ m微孔滤膜过滤,灌装,即得斑花黄堇乙酸乙酯部位的纳米粒注射剂。

[0058] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非是对本发明作其它形式的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。