



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113262258 B

(45) 授权公告日 2022.05.31

(21) 申请号 202110731199.5

(22) 申请日 2021.06.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113262258 A

(43) 申请公布日 2021.08.17

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市盘龙区蓝黑路
132号

专利权人 勐海滇峰林业有限责任公司

(72) 发明人 杨珺 王跃虎 罗吉凤 夏梦媛
张云峰

(74) 专利代理机构 昆明祥和知识产权代理有限公司 53114
专利代理师 马晓青

(51) Int.Cl.

A61K 36/835 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 135/00 (2006.01)

审查员 张慧艳

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

白木香花提取物及其药物与其制备方法和其应用

(57) 摘要

提供白木香 [*Aquilariasinensis* (Lour.) Spreng.] 花的植物药活性部位及其制备方法, 以及以该活性部位组成的药物组合物, 以及它们在制备治疗肿瘤或癌症的药物中的应用。将干燥的白木香花, 用溶剂提取和萃取, 制备得到PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2和PXS66-3。其对肺癌SPC-A-1细胞、肺癌NCI-H520细胞、肺癌A549细胞、宫颈癌HeLa细胞、人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞、卵巢癌SK-OV-3细胞、白血病MT4细胞、前列腺癌PC-3细胞、肝癌SMMC-7721细胞、乳腺癌MDA-MB-231细胞、肺癌NCI-H446细胞和肺癌紫衫醇耐药株A549/Taxol1细胞等癌症细胞株具显著的抑制活性。本发明的白木香花提取物为治疗或预防肿瘤或癌症药物和改善肿瘤或癌症耐药的药物提供了新的选择。

1. 白木香花提取物在制备治疗或预防肺癌、宫颈癌、人神经母细胞瘤、卵巢癌、白血病、前列腺癌、肝癌、乳腺癌的药物中的应用,其特征在于所述的白木香花提取物为PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2或PXS66-3,是由下述方法制备而得的:(a)白木香干燥的花,粉碎后用蒸馏水,60 °C水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,滤液不要;蒸馏水提取后的样品,继续加入90%乙醇,60 °C水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,回收溶剂,得浸膏即PXS65;(b)白木香干燥的花,粉碎后用90%乙醇,60 °C水浴超声提取30 min,重复4次,合并过滤,回收溶剂,得浸膏即PXS66;将PXS66用水制成混悬液,用石油醚萃取,回收石油醚,得石油醚萃取部位PXS66-1;石油醚萃取后的水相溶液,继续用乙酸乙酯萃取,回收乙酸乙酯,得乙酸乙酯萃取部位PXS66-2;乙酸乙酯萃取后的水相溶液,继续用正丁醇萃取,回收正丁醇,得正丁醇萃取部位PXS66-3。

2. 白木香花提取物在制备改善肺癌耐药的药物中的应用,其特征在于所述的白木香花提取物为PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2或PXS66-3,是由下述方法制备而得的:(a)白木香干燥的花,粉碎后用蒸馏水,60 °C水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,滤液不要;蒸馏水提取后的样品,继续加入90%乙醇,60 °C水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,回收溶剂,得浸膏即PXS65;(b)白木香干燥的花,粉碎后用90%乙醇,60 °C水浴超声提取30 min,重复4次,合并过滤,回收溶剂,得浸膏即PXS66;将PXS66用水制成混悬液,用石油醚萃取,回收石油醚,得石油醚萃取部位PXS66-1;石油醚萃取后的水相溶液,继续用乙酸乙酯萃取,回收乙酸乙酯,得乙酸乙酯萃取部位PXS66-2;乙酸乙酯萃取后的水相溶液,继续用正丁醇萃取,回收正丁醇,得正丁醇萃取部位PXS66-3。

白木香花提取物及其药物与其制备方法和其应用

[0001] 技术领域:

[0002] 本发明属于医药技术领域,具体地,涉及植物药技术领域,更具体地,涉及白木香花提取物及其药物组合物与其制备方法和其在制备治疗或预防肿瘤或癌症的药物中的应用。

[0003] 背景技术:

[0004] 白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.] 为瑞香科沉香属植物,其含有树脂的心材,即为中药沉香。目前对白木香心材的研究比较广泛,而对于白木香花研究较少,除了有一篇文献报道了白木香花的精油中的化学成分外[梅文莉,林峰,戴好富. 白木香花和果实挥发油成分的GC-MS分析,热带亚热带植物学报, 2009, 17(3), 305-308],还没有其它化学成分报道。肺癌是当今世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,且呈逐年上升趋势。肺癌治疗包括手术、放化疗、靶向治疗和支持治疗,化疗是临床治疗肺癌的主要手段之一,但肺癌患者在化疗后出现的不同程度耐药是目前阻碍肿瘤化疗的重要原因,研究克服耐药的有效途径是当前肿瘤治疗迫切需要解决的问题 [李全志, 刘志强, 赵玉霞, 孙太振. 榄香烯对人肺癌A549细胞系耐顺铂细胞株多药耐药的改善作用及机制研究. 浙江中医药大学学报, 2021, 45(1), 16-22; 褚文希. 徐长卿逆转肿瘤多药耐药作用物质基础研究, 青岛大学. 2016; 姚慧丽. 萝藦逆转肿瘤多耐药物物质基础研究. 青岛大学, 2017]。白木香花在抗肿瘤方面的研究尚未见报道。

[0005] 发明内容:

[0006] 本发明的目的是提供白木香花提取物,其制备方法或其在制备治疗或预防肿瘤或癌症药物中的应用。

[0007] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0008] 白木香花提取物,其是以水提后乙醇提取或乙醇提取的花提取物。

[0009] 根据所述的白木香提取物,其是取白木香干燥的花,粉碎后(a)用蒸馏水,60℃水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,滤液不要;蒸馏水提取后的样品,继续加入90%乙醇,60℃水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,回收溶剂,得水提后乙醇提取粗提物浸膏。(b)用90%乙醇,60℃水浴超声提取30 min,重复4次,合并过滤,回收溶剂,得乙醇粗提物浸膏;将浸膏用水制成混悬液,用石油醚萃取,回收石油醚,得石油醚萃取部位;石油醚萃取后的水相溶液,继续用乙酸乙酯萃取,回收乙酸乙酯,得乙酸乙酯萃取部位;乙酸乙酯萃取后的水相溶液,继续用正丁醇萃取,回收正丁醇,得正丁醇萃取部位。

[0010] 根据所述的白木香花提取物,其是白木香花的水提取后乙醇提取物或乙醇提取物或石油醚萃取部位或乙酸乙酯萃取部位或正丁醇萃取部位。

[0011] 本发明同时提供了一种预防或治疗肿瘤的药物组合物,其含有治疗有效量的白木香花提取物或白木香花提取物PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3任其一或其任意组合,以及药学上可接受的载体。

[0012] 本发明还提供了制备所述的白木香提取物的方法,取白木香花,干燥,粉碎后(a)用蒸馏水,60℃水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,滤液不要;蒸馏水提取后的样品,

继续加入90%乙醇,60℃水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,回收溶剂,得水提后乙醇提取粗提物浸膏。(b)用90%乙醇,60℃水浴超声提取30 min,重复4次,合并过滤,回收溶剂,得浸膏;将浸膏用水制成混悬液,用石油醚萃取,回收石油醚,得石油醚萃取部位;石油醚萃取后的水相溶液,继续用乙酸乙酯萃取,回收乙酸乙酯,得乙酸乙酯萃取部位;乙酸乙酯萃取后的水相溶液,继续用正丁醇萃取,回收正丁醇,得正丁醇萃取部位。

[0013] 另外,本发明提供了所述的白木香花提取物或其药物组合物在制备治疗或预防癌症疾病的药物中的应用。

[0014] 根据所述的白木香花提取物或其药物组合物在制备治疗或预防癌症疾病的药物中的应用,其所述的癌症为肺癌、宫颈癌、人神经母细胞瘤、卵巢癌、白血病、前列腺癌、肝癌和乳腺癌。

[0015] 以及,所述的白木香花提取物中的石油醚萃取部位或乙酸乙酯萃取部位或正丁醇萃取部位在制备治疗或预防癌症疾病的药物中的应用。

[0016] 一种预防或治疗肿瘤的植物药在制备治疗或预防癌症疾病的药物中的应用,所述的癌症为肺癌、宫颈癌、人神经母细胞瘤、卵巢癌、白血病、前列腺癌、肝癌和乳腺癌。

[0017] 本发明将干燥的白木香花,用溶剂提取和萃取,制备得到PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2和PXS66-3。PXS65对肺癌SPC-A-1、肺癌NCI-H520、肺癌A549、宫颈癌HeLa、人神经母细胞瘤SH-SY5Y、卵巢癌SK-OV-3、白血病MT4和前列腺癌PC-3等癌症细胞株具有显著的抑制活性,其半数抑制浓度(IC₅₀)均小于1 μg/mL;对结肠癌SW480、乳腺癌MCF-7、白血病HL-60和结肠癌Caco2等癌症细胞株,以及人正常肺上皮BEAS-2B细胞的抑制作用较弱,其IC₅₀值大于20 μg/mL,这说明PXS65对不同的癌症细胞以及人正常肺上皮细胞的抑制作用中,具有一定的选择性。PXS66、PXS66-1、PXS66-2和PXS66-3对肺癌A549细胞、肺癌NCL-H520细胞、肺癌SPC-A-1细胞和癌症紫杉醇耐药株A549/Taxol细胞均具及其显著的抑制活性。尤其是PXS66-2(IC₅₀ = 0.08 μg/mL)对肺癌紫杉醇耐药株A-549/Taxol的抑制活性高于紫杉醇(IC₅₀ = 0.54 μg/mL),且PXS66-2对人正常肺上皮BEAS-2B细胞的毒性(IC₅₀ = 4.48 μg/mL)弱于紫杉醇(IC₅₀ = 1.85 μg/mL)。PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2和PXS66-3及其不同的组合,提供了新的治疗或预防肿瘤或癌症药物和改善肿瘤或癌症耐药的药物。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有下述的优益效果:白木香花提取物,特别是水提后乙醇提取物(PXS65)对肺癌SPC-A-1细胞、肺癌NCI-H520细胞、肺癌A549细胞、宫颈癌HeLa细胞、人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞、卵巢癌SK-OV-3细胞、前列腺癌PC-3细胞、肝癌SMMC-7721细胞和乳腺癌MDA-MB-231细胞具有显著的抑制活性,其活性强于阳性对照药物顺铂。PXS65对结肠癌SW480、乳腺癌MCF-7、白血病HL-60和结肠癌Caco2等癌症细胞株,以及人正常肺上皮BEAS-2B细胞的抑制作用较弱,其IC₅₀值大于20 μg/mL,这说明PXS65对不同的癌症细胞以及人正常肺上皮细胞的抑制作用中,具有一定的选择性。乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位PXS66-2对肺癌紫杉醇耐药株A-549/Taxol的抑制活性高于紫杉醇,且PXS66-2对人正常肺上皮BEAS-2B细胞的毒性弱于紫杉醇。

[0019] 本发明所述的白木香花及其提取物为原料预防和治疗肿瘤或癌症的药物,是在现有技术的基础上,采用中药制剂常规方法制备成任何药用的制剂。例如,将白木香花制成散剂冲服;将提取物制成片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂,但这并不限制本发明的保护范围。

[0020] 具体实施方式:

[0021] 下面用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。

[0022] 实施例1:

[0023] PXS65的制备。

[0024] 取白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.] 的花干燥后的样品50 g,粉碎后用蒸馏水(0.5 L),60℃水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,滤液不要。蒸馏水提取后的样品,继续加入90%乙醇,60℃水浴超声提取30 min,重复3次,合并过滤,回收溶剂,得乙醇提取物(编号PXS65)2.43 g。

[0025] 实施例2:

[0026] PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3和PXS66-4的制备。

[0027] 取白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.] 的花干燥后的样品1.15 kg,粉碎后用90%乙醇(2 L),60℃水浴超声提取30 min,重复4次,合并过滤,回收溶剂,得到乙醇提取物(编号PXS66)174.2 g。取PXS66计172.0 g,加水(1 L)制成混悬液,用石油醚萃取(1 L × 3),回收石油醚,得石油醚萃取部位(编号PXS66-1)21.15 g;石油醚萃取后的水相溶液,继续用乙酸乙酯萃取(1 L × 3),回收乙酸乙酯,得乙酸乙酯萃取部位(编号PXS66-2)23.0 g;乙酸乙酯萃取后的水相溶液,继续用正丁醇萃取(1 L × 3),回收正丁醇,得正丁醇萃取部位(编号PXS66-3)54.03 g;正丁醇萃取后的水相溶液,回收溶剂,得水溶性部位(编号PXS66-4)54.89 g。

[0028] 实施例3:

[0029] PXS65对癌症细胞生长的抑制作用。

[0030] 癌症细胞毒活性测试采用MTS法[Yang J, Su Y, Luo J-F, Gu W, Niu H-M, Li Y, Wang Y-H, Long C-L. New amide alkaloids from *Piper longum* fruits. *Natural Products and Bioprospecting*, 2013, 3, 277-281],顺铂和紫杉醇作为阳性对照。细胞毒活性测试结果见表1。结果显示,PXS65对肺癌SPC-A-1、肺癌NCI-H520、肺癌A549、宫颈癌Hela、人神经母细胞瘤SH-SY5Y、卵巢癌SK-OV-3、白血病MT4和前列腺癌PC-3等癌症细胞株具有显著的抑制活性,其半数抑制浓度(IC₅₀)均小于1 μg/mL;对结肠癌SW480、乳腺癌MCF-7、白血病HL-60和结肠癌Caco2等癌症细胞株,以及人正常肺上皮BEAS-2B细胞的抑制作用较弱,其IC₅₀值大于20 μg/mL,这说明PXS65对不同的癌症细胞以及人正常肺上皮细胞的抑制作用中,具有一定的选择性。

[0031] 表1 PXS65细胞毒活性

序号	细胞	半数抑制浓度 (IC ₅₀ , μg/mL)		
		PXS65	顺铂	紫杉醇
1	肺癌 SPC-A-1	0.11±0.00	1.76±0.40	<0.007
2	肺癌 NCI-H520	0.25±0.02	6.69±1.46	<0.007
3	肺癌 A549	0.44±0.00	3.83±0.79	<0.007
4	宫颈癌 HeLa	0.46±0.01	1.14±0.152	<0.007
5	人神经母细胞瘤 SH-SY5Y	0.48±0.02	2.85±0.272	0.008±0.001
6	卵巢癌 SK-OV-3	0.55±0.03	3.67±0.97	<0.007
7	白血病 MT4	0.59±0.074	0.16±0.01	<0.008
[0032] 8	前列腺癌 PC-3	0.84±0.01	1.38±0.23	<0.007
9	肝癌 SMMC-7721	1.36±0.38	1.53±0.11	0.15±0.02
10	乳腺癌 MDA-MB-231	1.39±0.04	3.16±0.97	<0.007
11	肺癌 NCI-H446	5.51±0.41	3.78±0.79	<0.007
12	肺癌 NCI-H460	12.24±0.63	5.29±0.48	<0.007
13	结肠癌 SW480	21.94±1.18	2.00±0.52	<0.007
14	乳腺癌 MCF-7	33.29±2.23	2.00±0.93	<0.007
15	白血病 HL-60	36.68±1.20	1.97±1.30	<0.007
16	结肠癌 Caco2	>40	3.24±0.09	0.02±0.02
17	人正常肺上皮细胞 BEAS-2B	28.73±1.42	9.14±1.41	3.66±0.30

[0033] 实施例4:

[0034] PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3和PXS66-4对癌症细胞生长的抑制作用。

[0035] 癌症细胞毒活性测试采用MTS法[Yang J, Su Y, Luo J-F, Gu W, Niu H-M, Li Y, Wang Y-H, Long C-L. New amide alkaloids from *Piper longum* fruits. Natural Products and Bioprospecting, 2013, 3, 277-281],顺铂和紫杉醇作为阳性对照。细胞毒活性测试结果见表2。PXS66、PXS66-1、PXS66-2和PXS66-3对肺癌A549细胞、肺癌NCL-H520细胞、肺癌SPC-A-1细胞和癌症紫杉醇耐药株A549/Taxol细胞均具及其显著的抑制活性。尤其是PXS66-2(IC₅₀ = 0.08 μg/mL)对肺癌紫杉醇耐药株A-549/Taxol的抑制活性高于紫杉醇(IC₅₀ = 0.54 μg/mL),且PXS66-2对人正常肺上皮BEAS-2B细胞的毒性(IC₅₀ = 4.48 μg/mL)弱于紫杉醇(IC₅₀ = 1.85 μg/mL)。

[0036] 表2 PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3和PXS66-4的细胞毒活性

提取物	半数抑制浓度 (IC ₅₀ , μg/mL)				
	肺癌 A-549	肺癌 NCI-H520	肺癌 SPC-A-1	人正常肺上皮细胞 BEAS-2B	肺癌紫杉醇耐药株 A-549/Taxol
[0037] PXS66	2.04±0.01	0.72±0.06	1.59±0.15	30.97±0.76	1.49±0.20
PXS66-1	2.05±0.08	1.39±0.03	1.63±0.05	13.59±0.57	1.87±0.05
PXS66-2	0.17±0.02	0.08±0.00	0.08±0.00	4.48±0.16	0.08±0.00
PXS66-3	13.56±0.32	11.06±0.81	8.30±0.15	>100	10.11±0.31
PXS66-4	>100	>100	>100	>100	>100
顺铂	4.99±0.08	3.12±0.18	3.10±0.13	7.36±0.56	4.29±0.26
紫杉醇	<0.007	<0.007	<0.007	1.85±0.19	0.54±0.09

[0038] 实施例5

[0039] PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3、PXS66-4其一或任其组合物,与赋形剂重量比1:1的比例加入赋形剂,制粒压片。

[0040] 实施例6:

[0041] PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3、PXS66-4其一或任其组合物,按常规胶囊制剂方法制成胶囊。

[0042] 实施例7:

[0043] 按下述配方制成片剂

[0044] 片剂:PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3、PXS66-4其一或任其组合物, 100mg

[0045] 淀粉 适量

[0046] 玉米浆 适量

[0047] 硬脂酸镁 适量

[0048] 实施例8:

[0049] 胶囊剂:PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3、PXS66-4其一或任其组合物, 100mg

[0050] 淀粉 适量

[0051] 硬脂酸镁 适量

[0052] 制备方法:将PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3、PXS66-4其一或任其组合物,与助剂混合,过筛,在合适的容器中均匀混合,把得到的混合物装入硬明胶胶囊。

[0053] 实施例9:

[0054] 安瓿剂:PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3、PXS66-4其一或任其组合物2 mg,氯化钠10 mg;

[0055] 制备方法:将PXS65、PXS66、PXS66-1、PXS66-2、PXS66-3、PXS66-4其一或任其组合物,和氯化钠溶解于适量的注射用水中,过滤所得溶液,在无菌条件下装入安瓿瓶中。