



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104684544 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 03

(21) 申请号 201380037947. 3

(22) 申请日 2013. 06. 17

(30) 优先权数据

CU/P/2012/000097 2012. 06. 19 CU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 01. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CU2013/000003 2013. 06. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/189467 ES 2013. 12. 27

(71) 申请人 国家科学研究中心(CNIC)

地址 古巴哈瓦那

(72) 发明人 维克多·路易斯·冈萨雷斯 卡纳维  
西罗

罗克珊娜·德·拉·卡里戴德·西拉  
佩雷斯

罗萨·玛丽·马斯 费列罗

尤哈尼·佩雷斯 格拉

安巴尔·欧雅扎巴 伊尔

爱德华多·安东尼·罗德里格斯 里  
耶斯

维维安·莫利纳 奎瓦斯

拉斐尔·戈麦斯 梅嫩德斯

(74) 专利代理机构 中国商标专利事务所有限公  
司 11234

代理人 宋义兴 桑丽茹

(51) Int. Cl.

A61K 9/14(2006. 01)

A61K 36/889(2006. 01)

权利要求书2页 说明书17页

### (54) 发明名称

来源于古巴腹棕榈 (*Acrocomia crisper*) 和格  
鲁格鲁棕榈 (*Acrocomia aculeata*) 果实用作抗  
炎和抗氧化应激的化合物

### (57) 摘要

本发明涉及从棕榈科古巴腹棕榈 (*Acrocomia crisper*) 及 / 或 格 鲁 格 鲁 棕 榈 (*Acrocomia aculeata*) 的未成熟或成熟果实中获取一种新活性成分, 以及获取该活性成分的方法。该活性成分可在化妆治疗制型中或者药物组合物中用作营养补充剂, 用于预防及 / 或治疗氧化应激及炎症。该成分包含脂肪酸 (游离型及 / 或酰基甘油型或乙酯型) 混合物, 这些脂肪酸含 6 和 28 个之间的碳原子, 大部分为直链、含 8、10、12、14、16 及 18 个碳原子的饱和脂肪酸以及 16 和 18 个碳原子的不饱和脂肪酸。所述活性成分也可含有甾醇及高分子量脂肪醇。

1. 得自于棕榈科古巴腹棕榈 (*Acrocomia crispa*) 及 / 或格鲁格鲁棕榈 (*Acrocomia aculeata*) 种属果实的活性成分, 其含有 6 至 28 个碳原子的脂肪酸 (游离型或作为酰基甘油型或作为乙酯型) 混合物, 也可能含有甾醇和高分子量的脂肪酸, 主要包含下列酸: 辛酸 ( $C_{8:0}$ )、癸酸 ( $C_{10:0}$ )、月桂酸 ( $C_{12:0}$ )、肉豆蔻酸 ( $C_{14:0}$ )、棕榈酸 ( $C_{16:0}$ )、棕榈油酸 ( $C_{16:1}$ )、硬脂酸 ( $C_{18:0}$ )、油酸 ( $C_{18:1}$ )、亚油酸 ( $C_{18:2}$ ) 及亚麻酸 ( $C_{18:3}$ ), 其比例为:

| 组分                  | 相对含量 (%)     |
|---------------------|--------------|
| 辛酸 ( $C_{8:0}$ )    | <3.0         |
| 癸酸 ( $C_{10:0}$ )   | <3.0         |
| 月桂酸 ( $C_{12:0}$ )  | 30.0 ~ 40.0  |
| 肉豆蔻酸 ( $C_{14:0}$ ) | 8.0 ~ 15.0   |
| 棕榈酸 ( $C_{16:0}$ )  | 5.0 ~ 12.0   |
| 棕榈油酸 ( $C_{16:1}$ ) | <3.0         |
| 硬脂酸 ( $C_{18:0}$ )  | 1.0 ~ 5.0    |
| 油酸 ( $C_{18:1}$ )*  | 20.0 ~ 35.0* |

\* 以油酸测定并报告, 包含油酸  $C_{18:1}$  (60 ~ 70%)、亚油酸  $C_{18:2}$  (25 ~ 40%) 和亚麻酸  $C_{18:3}$  (<10%) 的混合物。

2. 根据权利要求 1 所述的活性成分, 其特征在于该活性成分是果实中所含有的酰基甘油经过部分或完全水解 (酶水解、碱水解或酸水解) 而获得, 可以从植物材料或得自此类植物材料的脂质提取物获得该酰基甘油。

3. 根据权利要求 1 和 2 所述的活性成分, 其特征在于该活性成分用脂肪酶、氢氧化碱 (氢氧化钠或氢氧化钾)、碱土氢氧化物 (氢氧化镁或氢氧化钙)、氢氧化铵或有机氢氧化物, 以及盐酸、柠檬酸或硫酸获得。

4. 根据权利要求 1、2 和 3 所述的活性成分, 其特征在于活性成分获得的过程中包含下列步骤: 将果实干燥、研磨并过筛 (颗粒大小 <3mm), 然后用  $CO_2$  超临界流体提取或使用有机溶剂如烃、醇、乙酸乙酯、丙酮或其混合物在摇动式反应器或索氏抽提器中进行固液提取进一步分离脂质物质; 之后进行过滤和溶剂蒸发。

5. 根据权利要求 1、2、3 和 4 所述的活性成分, 其特征在于所述烃选自戊烷、己烷、庚烷及辛烷; 所述醇选自甲醇、乙醇、丙醇及 2-丙醇。

6. 权利要求 1 所述的活性成分的用途, 其特征在于治疗及 / 或预防急慢性炎症、增强的氧化应激以及骨关节炎。

7. 权利要求 1 所述的活性成分的用途, 其特征在于治疗及 / 或预防良性前列腺增生及前列腺炎。

8. 一种药物组合物, 其特征在于其含有权利要求 1 所述的活性成分, 剂量为 50mg 到

1000mg。

9. 根据权利要求 8 所述药物组合物,其特征在于剂型为固体口服剂型(硬胶囊、软胶囊、片剂)、半固体(栓剂、乳膏、软膏)或液体剂型(乳剂、悬浮剂、酏剂、洗液或香波)。

10. 根据权利要求 8 和 9 所述的药物组合物,特征在于其用于治疗及/或预防急慢性炎症、增强的氧化应激以及骨关节炎的用途。

11. 根据权利要求 8 和 9 所述的药物组合物,特征在于其用于治疗及/或预防良性前列腺增生及前列腺炎的用途。

12. 一种营养补充剂,其特征在于其含有权利要求 1 所述活性成分,剂量为 50mg 到 1000mg。

13. 根据权利要求 12 所述的营养补充剂,特征在于作为功能性食物、营养品、饮食、食物添加剂、饮料及化妆品的用途。

14. 根据权利要求 12 和 13 所述的营养补充剂,特征在于其预防炎症和氧化应激的用途。

15. 具有化妆治疗功能的制剂,特征在于含用浓度为 0.1% 和 90% 之间的权利要求 1 所述的活性成分。

16. 根据权利要求 15 所述的具有化妆治疗功能的制剂,其特征在于其以乳膏、肥皂、洗液、香波、沐浴啫喱、头发啫喱、软膏、体油、嘴唇保护剂及皮肤护理产品包括防晒剂施用。

17. 根据权利要求 15 和 16 所述的具有有化妆治疗功能的制剂,特征在于其预防炎症及氧化应激的用途。

## 来源于古巴腹棕榈 (*Acrocomia crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*Acrocomia aculeata*) 果实用作抗炎和抗氧化应激的化合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种新活性成分的获取,该活性成分可用作营养补充剂、药学或化妆品,用于预防及/或治疗衰老和许多病理过程所伴随的炎症反应及氧化应激,如特别地良性前列腺肥大(BPH)、前列腺炎、骨关节炎;本发明也涉及从棕榈科(*Acrocomia*)的古巴腹棕榈(*Acrocomia crispa*)和格鲁格鲁棕榈(*Acrocomia aculeata*)种属的绿色或成熟果实获取该活性成分的工艺。该活性成分包含6~28个碳原子的直链脂肪酸混合物,主要为饱和脂肪酸 $C_{8:0}$ 、 $C_{10:0}$ 、 $C_{12:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 和 $C_{18:0}$ 以及不饱和脂肪酸 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 和 $C_{18:3}$ ,也可含有甾醇及高分子量的脂肪醇。

[0002] 该活性成分的获取工艺从果实的干燥和研磨开始,并且可包含植物材料或其脂质组分的部分或完全水解(酶水解、碱水解或酸水解),然后进一步回收脂肪酸;可以用有机溶剂选择提取脂类组分或用超临界流体提取。无论是否进行水解,两种方法均可得到相似药理学及生理学作用的活性成分。

[0003] 本发明涉及食品及制药工业,因为所述活性成分可以这样使用或最好以50mg和1000mg的剂量使用,作为营养品、化妆品及/或药制剂的一部分,用于预防和/或治疗炎症和氧化应激,包括BPH、前列腺炎和骨关节炎。

[0004] 现有技术及类似技术解决方案的特征

[0005] 炎症,即组织抗感染、刺激或外来物质的血管及细胞应答,是机体最重要防御机制之一,但此应答过于增强时可能是有害甚至是致命的。炎症代表了慢性疾病尤其是骨关节炎、BPH、前列腺炎、炎性肠病和癌症等发展过程中的一类重要病原学因素。慢性炎症性疾病随着年龄及平均寿命的增长而发病率上升。

[0006] 炎症过程中,活化细胞能够利用细胞膜的脂质来产生脂质介体充当细胞内或细胞外的信号。物理、化学及生物学刺激激活磷脂酶A2后膜磷脂释放出花生四烯酸(AA),该酸为20个碳原子多元不饱和脂肪酸(5,8,11,14二十碳四烯酸),来自食物或经亚油酸转化而得(Aster,2009)。花生四烯酸衍生的代谢物类花生酸类物质由环加氧酶(COX)(COX-1及COX-2)合成,导致前列腺素和血栓烷的生成;类花生酸类物质也可由脂氧合酶(LOX)类细胞质酶家族5-LOX、15-LOX和12-LOX生成,这生成了白三烯和脂氧素(Diaz,2001;Gajraj,2003)。类花生酸类物质可参与炎症反应的不同阶段,因而它们存在于炎性分泌液中,在炎症部位的合成增加。炎症根据应答的强度和持续时间分为急性炎症和慢性炎症。急性炎症特征为时间短,尽管有多种事件参与如吞噬、再生及细胞修复,其涉及三大主要机制:血管舒张、毛细血管渗透性升高,以及白细胞(主要是嗜中性白细胞)从血液向炎症部位的迁移(Gallin等,1992)。急性炎症的典型症状为发红、肿、发热、疼痛及功能缺损(Parakrama和Clive,2005;Porth,2007)。

[0007] 另一方面慢性炎症可能持续数周或数月,主要特征为淋巴细胞和巨噬细胞浸润至受损部位,但嗜伊红性粒细胞、肥大细胞及嗜中性白细胞也参与其中。血管增生和出现组织

纤维化和坏死也是这一阶段的特征。

[0008] 由于多元不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的酶催化脂质过氧化 (LP) 所产生脂质自由基受到参与细胞代谢途径的酶所调控, 炎症和氧化应激是紧密相关的。由于 LOX 和 COX 均催化  $O_2$  和一些 PUFAs 之间反应生成脂质氢过氧化物及内过氧化物, 这两类酶催化作用均参与该类型的 LP。尤其是 LOX 酶催化作用 AA 生成脂质氢过氧化物 (HPETE), 后者可转化为羟基化产物 (HETE)。

[0009] 另一方面, 尽管由此产生的有机氢过氧化物结构稳定, 在过渡金属 (铜和亚铁离子) 前仍可受到破坏生成次级过氧化产物的复杂混合物如气态烃 (乙烷和戊烷) 和醛 (丙二醛和 4- 羟壬烯醛), 使细胞结构受到破坏 (Halliwell, 1995)。

[0010] 在这方面, 已研发出大量不同的合成及天然抗炎药剂来缓解炎症过程。治疗类广泛使用的非甾族抗炎药 (NSAID) 和甾族 (SAID) 抗炎药均公知为治疗急性和慢性炎症及相关疼痛非常有效的抗炎药。但是这些药剂有各种各样的不良反应 (AE), 其中胃肠道、肾脏及心血管 AE 是这些特异性抗炎药所带来的最常见不良反应 (Salles, 2007)。

[0011] NSAID 的抗炎机制依赖于抑制 COX 酶途径, NSAID 归为非选择性或非特异性 (抑制 1 型和 2 型 COX 同工型) 以及选择性 COX-2 抑制剂 (Sciulli 等, 2005)。非选择性 NSAID (尤其是乙酰水杨酸、消炎痛、萘普生、布洛芬及双氯芬酸) 有效地缓解疼痛及急慢性炎症性疾病的进展, 其主要限制是会发生胃肠道 AE, 长期服用或老年患者服用时可能为严重的胃肠道 AE。高血压和肾毒性是另一 NSAID 相关的 AE (García 和 Hernández-Díaz, 2004; Lanás 和 Fernández, 2006)。

[0012] 特异性 COX-2 抑制剂 (塞来考昔 (celecoxib)、艾托考昔 (etoricoxib)) 是更新一代的药物, 对 COX-2 同工型具有高度选择性, 因而胃肠道耐受性更好 (Silverstein 等, 2000)。但是这些药物的使用会有严重的心血管 AE, 该 AE 导致罗非考昔 (rofecoxib) 和伐地考昔 (valdecoxib) 撤市 (Blandizzi 等, 2008)。

[0013] SAID (尤其是强的松、强的松龙、地塞米松) 带来数种 AE, 象高血糖症、库欣 (Cushing) 综合征、高血压、面部发红、眩晕以及胃肠道和骨骼 AE (骨质疏松和骨坏死, 导致骨折) (Mazziotti 等, 2006; Kerachian 等, 2009)。

[0014] 最后双重抗炎药物 (5-LOX 和 COX 抑制剂) 缩短慢性炎症过程进展而没有表现出非特异性 NSAID 的典型胃肠道毒性特征 (Whitehouse y Butters, 2003, Whitehouse, 2004)。

[0015] 良性前列腺增生 (BPH) 这种疾病的进展提示前列腺内有细胞炎性浸润, 其发病机理与慢性炎症相关 (Roehrborn, 2008; Zhu y McGinley, 2009), 因而抗炎物质可以用于治疗该疾病。

[0016] BPH 和癌症及前列腺炎一起是影响前列腺并使成年男性人群主要是年龄大于 50 岁的男性生活质量下降最相关的病理 (Fernández 和 Pereira, 2008; Alcaraz 等, 2008)。BPH 主要是前列腺 (一个环绕着膀胱颈和尿道开始部分的腺体) 非恶性且不受控制的生长, 它变大后导致尿道阻塞。结果大部分 BPH 患者有下尿道症状 (LUTS) 如尿潴留、尿少、尿流不畅、尿频尿急、尿路刺激, 充盈性尿失禁及夜尿 (Nix y Carson, 2007; Roehrborn, 2008; Zhu y McGinley, 2009)。

[0017] 尽管 BPH 的病因是多因素的, 也没有完全清楚, 大量文献充分表明其涉及到激素及非激素因素。主要的激素因素在于前列腺  $5\alpha$ -还原酶所催化的二氢睾酮中睾酮激素转

化的增加,导致细胞增生和前列腺增长(BPH的静态部分),而主要的非激素因素在于肾上腺素能受体( $\alpha$ 1-ADR)介导的前列腺及膀胱平滑肌伸缩性上升(BPH的动态部分)(Nix和Carson,2007;Zhuy和McGinley,2009)。激素因子在增生和前列腺扩大的发展中起关键作用,泌尿生殖道平滑肌伸缩性上升是LUTS发生的关键因素(Roehrborn,2008)。

[0018] BPH的治疗根据疾病的严重性从观察监控到手术都有,但是药物治疗更常用,主要是使用5 $\alpha$ -还原酶抑制剂(非那司提(finasteride)、度他雄胺(dutasteride))和 $\alpha$ 1-ADR抑制剂(阿夫唑嗪(alfuzosin)、多沙唑嗪(doxazosin)、哌唑嗪(prazosin)、特拉唑嗪(terazosin)、坦索洛新(tamsulosin))(Doggrell,2004;Roehrborn等,2008;Schwinn和Roehrborn;2008)。

[0019] 然而尽管前者(非那司提(finasteride)、度他雄胺(dutasteride))治疗可以预防BPH进展和适度地减少前列腺体积增大,其并不一定就减轻症状,还可能发生AE如性欲下降、阳痿及射精障碍等(Sandhu和Te,2004;González和Vegas,2007;Roehrborn,2008;Roehrborn等,2008)。另一方面, $\alpha$ 1-ADR阻断剂(阿夫唑嗪、多沙唑嗪、哌唑嗪、特拉唑嗪、坦索洛新)常可以减轻 $\alpha$ 1-ADR的症状,而不改变前列腺的体积,也可能发生AE如直立性低血压、疲乏、眩晕、射精机能障碍、虹膜肌改变(Lepor,2006;Van Dijk等,2006;Bar-Yosef等,2008;Prata等,2009)。

[0020] 另外,慢性炎症和氧化应激与BPH发病紧密相关,不断增加的证据表明慢性炎症与BPH的发病和进展相关,因此已增加了使用抗炎物质来控制此病理。另一方面,一些证据表明前列腺组织中的氧化应激与BPH的发展有因果关系,因此可以使前列腺增生(PH)减少又具有抗氧化作用的物质可能给肥大的前列腺带来额外的益处(Aydin等,2006;Aryal等,2007;Siddiqui等,2006;Belostotttskaia等2006;Prasad等,2006)。

[0021] 用来自锯棕榈(*Serenoa repens*)果实、西葫芦(*Cucurbita pepo*)种子、非洲李(*Prunus africana*)的树脂以及大荨麻(*Urtica dioica*)根的提取物进行植物治疗属于AE较少的BPH/LUTS一体化药理学治疗(Wilt等,2000;Koch,2001;Curtis,2008)。这些治疗当中,锯棕榈(*Serenoa repens*)果实的脂质提取物(LESR)应用最为广泛,其主要为游离及酯化的脂肪酸、甾醇及脂肪醇的混合物。LESR的作用机制为多因素起作用,涉及前述数种因素,如抑制5 $\alpha$ -还原酶(Raynaud等,2000;Abe等,2009)、拮抗 $\alpha$ 1-ADR(Gerber等,2001;Debruyne等,2002;Abe等,2009),其抗炎作用由抑制COX和5-LOX(Mogul等,2000;Potenziani,2003;Raman等,2007;Curtis,2008)及其抗氧化作用(Henry,2000;Perona,2005;Chapkin等2007)所介导。尽管LESR的临床前毒理学数据非常少,其耐受良好,AE发生率低(Rockville,2005)。

[0022] D-004是最近从大王棕(*Roystonea regia*)果实研制出来的另一种脂质提取物,对治疗BPH具有潜在的价值。支持其对PH实验模型疗效的作用机制是多因素的,涉及到前列腺5 $\alpha$ -还原酶的竞争抑制以及 $\alpha$ 1-ADR介导的前列腺组织收缩应答的非竞争性拮抗。而且D-004具有多向性的抗炎(与COX和5-LOX抑制均相关)及抗氧化作用(对正常及肥大的前列腺组织均有作用),这些均可能潜在的对其疗效有一定的贡献(Menéndez,2006;Pérez,2008)。

[0023] 骨关节炎(OA)为最常见的退行性关节炎,是另一种与炎症过程相关的病理,其特征在于软骨基质(由蛋白聚糖、胶原和水构成)的合成和降解之间的不平衡、软骨破坏、

软骨下骨骼受损以及进一步的炎症应答,此时软骨非但不会再生,还有可能消失 (Little, 2008)。

[0024] 过去对 OA 的研究集中在软骨退化,因为大家认为这是最相关的潜在病变,但目前大家已认同除了软骨之外 OA 涉及到所有关节组分如软骨下骨骼、韧带、关节囊、滑膜、关节旁肌肉、半月板以及神经末梢 (Lotz, 2010 ;Heinegard, 2011)。OA 时的软骨下骨骼应答包括新骨生成,导致出现边界骨赘,这些骨赘呈结节突出,可能进一步发炎或作为骨性副产物刺激邻近的结构 (Buckland-Wright, 2004 ;Little, 2008)。

[0025] 治疗 OA 的主要药物是缓解疼痛和改善功能不足的药物,象 NSAID 和 SAID 更多地用于治疗 OA,但是由于不能预防软骨的损害因此并不改变疾病的进程 (McMahon, 2008)。骨吸收抑制药 (Antiresorptive) 也已用于控制 OA,已证实和未经治疗的老年女性相比,阿伦膦酸盐 (alendronate) 和雌激素可以显著减少患有膝盖 OA 的老年女性的软骨下骨骼损伤 (Carbone, 2004),这支持 OA 涉及所有关节组分 (软骨和骨骼) 这一观点。

[0026] 氧化应激上升,细胞代谢诱导活性氧簇 (ROS) 及自由基 (FR) 生成与抗氧化系统用于抵消这些物质生成及 / 或效应的能力之间不平衡,被认为是 OA 发病机理的贡献因素,所述机理涉及 LP 上升同时内源性抗氧化防护如维生素 C 和过氧化物歧化酶 (SOD) 活性降低 (Manesh, 2005 ;Chandran, 2009)。

[0027] 然而从棕榈科的古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 及 / 或格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 种的果实获取具有抗氧化作用以及预防和治疗炎症过程,包括前文所述的炎症过程的活性成分,尚未见报道;获取此类物质简便而经济的方法也未见报道。

[0028] 本发明所要求保护的活性成分其疗效和效力优于前文所述的天然来源提取物,未见合成药物表现出来的 AE。

## 发明内容

[0029] 获取本发明目标活性成分的过程,采用棕榈科的古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 及 / 或格鲁格鲁棕榈 (*A. Aculeata*) 种属的绿色或成熟果实,将其在环境条件下或烘箱中干燥好后,在地上用锤子、刀片或层压圆盘研磨机研磨,最终获得 <3mm 的颗粒大小。从该干燥和研磨的材料获得的脂质活性成分主要由游离脂肪酸构成,但也可以含有低比例的甾醇和脂肪醇。该活性成分的获取可以包含酶水解、碱水解或酸水解 (部分或完全水解),然后进一步回收脂肪酸;或者用有机溶剂 (烃、醇、乙酸乙酯、丙酮或其混合物) 进行选择提取或用超临界流体提取。可直接对研磨的植物材料施加水解工艺,也可以对得自此类植物材料的脂质活性成分进行水解。

[0030] 为获得绝大部分脂肪酸为酰基甘油或乙酯的活性成分,将干燥和研磨的植物材料用有机溶剂进行选择提取,然后过滤并低压加热除去溶剂,或者在超临界条件下提取。尽管提取过程可以用 CO<sub>2</sub> 通过超临界提取来完成,提取过程可以用常规固液提取器,如摇动反应器或索氏抽提器完成,用充足的溶剂如 1 和 3 个碳原子之间的醇 (甲醇、乙醇、2- 丙醇)、5 到 8 个碳原子的烷烃 (戊烷、异戊烷、己烷、庚烷和辛烷)、乙酸乙酯、丙酮或其混合物进行选择提取将脂肪酸 (以酰基甘油或乙酯存在,还有少部分游离形式) 与植物材料中存在的其它组分分离出来。乙醇提取有助于获得乙酯,后者在果实中的比例非常低,但在酸性溶媒中易于提取。

[0031] 为了得到脂肪酸为游离形式的活性成分需要进行水解,水解可以是酶水解(用脂肪酶)、碱水解(用碱、碱土、有机氢氧化物或氢氧化铵)或酸水解(用盐酸、柠檬酸或硫酸)。水解可以是部分或完全水解,其可以直接对研磨的植物材料进行,也可以对得自研磨的植物材料的油性提取物进行,然后将脂肪酸回收。使用碱性水解时,在稀释的酸溶媒(用盐酸、柠檬酸或硫酸制备)中适当地进行搅拌可使脂肪酸释放出来,之后通过形成上层油相而与水相分离,之后用处理过的水进行洗涤然后低压加热干燥。

[0032] 用这种方法从干燥和研磨的植物材料确保得到此活性成分的得率是 10 到 40%,该活性成分主要由游离或酯化(如酰基甘油或乙酯)的脂肪酸构成,主要是 8、10、12、14、16 和 18 个碳原子的饱和脂肪酸以及 16 和 18 个碳原子的不饱和酸,但是也可能含有甾醇和脂肪醇。混合物中脂肪酸(游离型或酯化型)的比例见表 1。

[0033] 表 1. 活性成分中脂肪酸的含量

[0034]

| 组分                     | 相对含量(%) |
|------------------------|---------|
| 辛酸(C <sub>8:0</sub> )  | <3.0    |
| 癸酸(C <sub>10:0</sub> ) | <3.0    |

[0035]

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| 月桂酸(C <sub>12:0</sub> )  | 30.0 ~ 40.0  |
| 肉豆蔻酸(C <sub>14:0</sub> ) | 8.0 ~ 15.0   |
| 棕榈酸(C <sub>16:0</sub> )  | 5.0 ~ 12.0   |
| 棕榈油酸(C <sub>16:1</sub> ) | <3.0         |
| 硬脂酸(C <sub>18:0</sub> )  | 1.0 ~ 5.0    |
| 油酸(C <sub>18:1</sub> )*  | 20.0 ~ 35.0* |

[0036] \* 以油酸测定并报告,包含油酸 C<sub>18:1</sub>(60 ~ 70%)、亚油酸 C<sub>18:2</sub>(25 ~ 40%) 和亚麻酸 C<sub>18:3</sub>(<10%) 的混合物。

[0037] 总体评价证实该物质或活性成分比其他来自植物来源的已公知活性成分更有效、更强地预防及/或治疗炎症过程及氧化应激,包括 BPH、前列腺炎和骨关节炎。该活性成分显示在啮齿动物试验中未发现毒性,人类对其耐受良好,对于其潜在用途是一大优势。

## 具体实施方式

[0038] 本发明目的将以不限制本发明范围的实施例方式在下文具体描述。

[0039] 实施例 1

[0040] 取古巴腹棕榈(A. crispa)的新鲜果实 5kg 置于烘箱中,温度控制在 60℃,放置 7 天,进一步放在桨叶研磨机中研磨,最终得到大小为 1500 和 2000 μm 之间的颗粒。取粉

末 1000g 置于摇动反应器中用 10L 己烷于 55℃ 持续摇动 16 小时进行提取, 该过程重复三次。然后将所得产物进行过滤, 在真空辅助蒸发器中于 50℃ 蒸发至干燥。所得物质称重得 120g, 其组成经气相色谱测定如表 2 所示。格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实用同样方法处理后得 150g 活性成分。

[0041] 表 2. 活性成分中的脂肪酸组成 (%)

[0042]

| 组分                  | 自古巴腹棕榈 ( <i>A. crista</i> ) 所得活性成分 (%) | 自格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 所得活性成分 (%) |
|---------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| 辛酸 ( $C_{8:0}$ )    | 1.6                                    | 1.3                                       |
| 癸酸 ( $C_{10:0}$ )   | 0.9                                    | 0.7                                       |
| 月桂酸 ( $C_{12:0}$ )  | 32.2                                   | 31.8                                      |
| 肉豆蔻酸 ( $C_{14:0}$ ) | 14.7                                   | 14.5                                      |
| 棕榈酸 ( $C_{16:0}$ )  | 11.5                                   | 11.7                                      |
| 棕榈油酸 ( $C_{16:1}$ ) | 0.5                                    | 0.8                                       |

[0043]

|                     |      |      |
|---------------------|------|------|
| 硬脂酸 ( $C_{18:0}$ )  | 4.4  | 4.6  |
| 油酸 ( $C_{18:1}$ ) * | 34.2 | 34.6 |

[0044] \* 以油酸测定并报告, 包含油酸  $C_{18:1}$ 、亚油酸  $C_{18:2}$  和亚麻酸  $C_{18:3}$  的混合物。

[0045] 实施例 2

[0046] 取格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeat*) 的新鲜果实 (10kg), 环境条件下干燥 15 天, 然后用锤击式研磨机将其研磨至小于 1500  $\mu m$  的颗粒大小。取粉末 1000g 进行碱水解。脂肪酸用 30% 的 HCl 释放出来, 提取有机相用水洗涤 5 次, 过滤, 在真空辅助蒸发器中于 80℃ 蒸发至干燥。所得物质称重 (200g) 然后用气相色谱进行分行, 所得组成如表 3 所示。古巴腹棕榈 (*A. crista*) 果实用同样方法处理后得 230g 活性成分。

[0047] 表 3. 活性成分中的脂肪酸组成 (%)

[0048]

| 组分                  | 自古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) 所得活性成分 (%) | 自格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 所得活性成分 (%) |
|---------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| 辛酸 ( $C_{8:0}$ )    | 1.2                                    | 0.9                                       |
| 癸酸 ( $C_{10:0}$ )   | 1.9                                    | 1.7                                       |
| 月桂酸 ( $C_{12:0}$ )  | 37.8                                   | 39.0                                      |
| 肉豆蔻酸 ( $C_{14:0}$ ) | 14.3                                   | 14.9                                      |
| 棕榈酸 ( $C_{16:0}$ )  | 10.9                                   | 11.3                                      |
| 棕榈油酸 ( $C_{16:1}$ ) | 0.2                                    | 1.4                                       |
| 硬脂酸 ( $C_{18:0}$ )  | 3.3                                    | 3.6                                       |
| 油酸 ( $C_{18:1}$ ) * | 30.4                                   | 27.2                                      |

[0049] \* 以油酸测定并报告, 包含油酸  $C_{18:1}$ 、亚油酸  $C_{18:2}$  和亚麻酸  $C_{18:3}$  的混合物。

[0050] 实施例 3

[0051] 取古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 的新鲜果实 (5kg) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的新鲜果实 (5kg), 在烘箱中在可控温度 (45℃) 下放置 7 天, 然后用研磨机研磨到 1500 和 1800  $\mu m$  之间的颗粒大小。取粉末 1000g, 然后用 10L 的  $CO_2$  于 35℃ 和 250 巴的条件下进行连续超临界流体提取 16 小时。所得产物进行酶水解, 称重 (150g) 后用气相色谱进行分析, 组成如表 4 所示。

[0052] 表 4. 活性成分中的脂肪酸组成 (%)

[0053]

| 组分 | 自古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) 所得活性成分 | 自格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 所得活性成分 |
|----|------------------------------------|---------------------------------------|
|----|------------------------------------|---------------------------------------|

[0054]

|                     | (%)  | 分 (%) |
|---------------------|------|-------|
| 辛酸 ( $C_{8:0}$ )    | 2.0  | 1.5   |
| 癸酸 ( $C_{10:0}$ )   | 1.5  | 2.2   |
| 月桂酸 ( $C_{12:0}$ )  | 32.5 | 32.7  |
| 肉豆蔻酸 ( $C_{14:0}$ ) | 13.8 | 14.1  |
| 棕榈酸 ( $C_{16:0}$ )  | 11.9 | 11.6  |
| 棕榈油酸 ( $C_{16:1}$ ) | 1.3  | 1.8   |
| 硬脂酸 ( $C_{18:0}$ )  | 2.6  | 1.9   |
| 油酸 ( $C_{18:1}$ ) * | 34.4 | 34.2  |

[0055] \* 以油酸测定并报告, 包含油酸  $C_{18:1}$ 、亚油酸  $C_{18:2}$  和亚麻酸  $C_{18:3}$  的混合物。

[0056] 实施例 4

[0057] 取古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 的新鲜果实 (10kg), 环境条件下干燥 20 天后于层压圆盘研磨机中研磨至大小 <1000  $\mu m$  的颗粒。取所得粉末 1000g 置于索氏抽提器中, 用 10L 乙

醇提取 36 小时后过滤,用真空辅助蒸发器于 80℃蒸发至干燥。去除溶剂后,用氢氧化铵溶液于 60℃进行部分水解。然后用 10%硫酸将脂肪酸释放出来,然后用水洗涤此提取物,真空干燥,称重 (300g) 并用气相色谱分析,其组成如表 5 所示。格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实用同样方法处理后得 280g 活性成分。

[0058] 表 5. 活性成分中的脂肪酸组成 (%)

[0059]

| 组分                  | 自古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) 所得活性成分 (%) | 自格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 所得活性成分 (%) |
|---------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| 辛酸 ( $C_{8:0}$ )    | 0.9                                    | 0.7                                       |
| 癸酸 ( $C_{10:0}$ )   | 1.5                                    | 1.8                                       |
| 月桂酸 ( $C_{12:0}$ )  | 39.8                                   | 39.9                                      |
| 肉豆蔻酸 ( $C_{14:0}$ ) | 14.3                                   | 14.1                                      |
| 棕榈酸 ( $C_{16:0}$ )  | 7.4                                    | 8.6                                       |
| 棕榈油酸 ( $C_{16:1}$ ) | 1.2                                    | 0.9                                       |
| 硬脂酸 ( $C_{18:0}$ )  | 1.1                                    | 1.3                                       |
| 油酸 ( $C_{18:1}$ ) * | 33.8                                   | 31.7                                      |

[0060] \* 以油酸测定并报告,包含油酸  $C_{18:1}$ 、亚油酸  $C_{18:2}$  和亚麻酸  $C_{18:3}$  的混合物。

[0061] 实施例 5

[0062] 取古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 的新鲜果实 (10kg), 环境条件下干燥 20 天后于层压圆盘研磨机中研磨至  $<1000\ \mu m$  的颗粒大小。取 1000g 置于搅拌式反应器中用 10L 乙醇于 65℃提取 36 小时,过滤,于 80℃减压蒸发到干燥,然后去除溶剂并用 HCl 水解。所得提取物用水洗涤,真空干燥,称重 (250g) 并用气相色谱分析,其组分如表 6 所示。格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实用同样方法处理后得 220g 活性成分。

[0063] 表 6. 活性成分中的脂肪酸组成 (%)

[0064]

| 组分                  | 自古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) 所得活性成分 (%) | 自格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 所得活性成分 (%) |
|---------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| 辛酸 ( $C_{8:0}$ )    | 1.1                                    | 0.8                                       |
| 癸酸 ( $C_{10:0}$ )   | 1.3                                    | 1.3                                       |
| 月桂酸 ( $C_{12:0}$ )  | 39.0                                   | 39.3                                      |
| 肉豆蔻酸 ( $C_{14:0}$ ) | 14.6                                   | 14.0                                      |
| 棕榈酸 ( $C_{16:0}$ )  | 7.1                                    | 8.1                                       |
| 棕榈油酸 ( $C_{16:1}$ ) | 1.1                                    | 1.8                                       |
| 硬脂酸 ( $C_{18:0}$ )  | 1.2                                    | 1.1                                       |
| 油酸 ( $C_{18:1}$ ) * | 34.6                                   | 33.6                                      |

[0065] \* 以油酸测定并报告, 包含油酸  $C_{18:1}$ 、亚油酸  $C_{18:2}$  和亚麻酸  $C_{18:3}$  的混合物。

[0066] 实施例 6

[0067] 雄性斯普拉-道来 (Sprague Dawley) 大鼠 (250 ~ 270g) 适应实验室条件 7 天后在慢性炎症模型 (棉球肉芽肿) 中评价实施例 1 所述活性成分的效果。适应期结束后大鼠随机分成不同的组, 用硫喷妥钠 (30mg/kg, 腹腔内注射) 麻醉, 背部区域用 70% 酒精消毒; 用钝圆的镊子在中间背部侧边做一切口, 这样就形成了皮下通道, 植入 50mg 的无菌棉球。将伤口缝合, 然后局部使用消毒溶液。最后一次给药 18 小时后将大鼠置醚气中处死, 将肉芽肿小心解剖、取走并于 60°C 干燥 24 小时, 从而获得恒定重量。干肉芽肿的重量通过计算干燥肉芽肿重量和植入棉球重量 (50mg) 之间的差值而得。假设阳性对照组中的肉芽肿重量为 100% 来估计抑制程度 (%)。

[0068] 古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实的提取物悬浮于吐温 20/ 水载体中。大鼠随机分成 7 组 (每组 10 只大鼠): 载体对照组, 3 组用古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 提取物治疗, 3 组用格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 提取物 (两种情况均分别为 25、200 及 500mg/kg) 治疗。棉球植入后的 6 天里用胃管给药 (5mL/kg), 然后对肉芽肿干重进行定量。对照组和治疗组之间用曼-惠特尼 (Mann Whitney) U 检验进行比较。

[0069] 在动物的中间背部侧边进行皮下植入棉球诱导了肉芽的形成 (表 7)。与对照组相比, 所有治疗均使肉芽肿的干重显著降低。古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实提取物的效果随剂量增加而加强, 于 500mg/kg 剂量时分别达到了 54.6 和 55.4% 的抑制效果。

[0070] 本实验的结果证明了古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实提取物在大鼠棉球肉芽肿模型中的疗效, 所观察的肉芽肿重量显著下降, 表现出其抗炎的潜在疗效。

[0071] 表 7. 古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 提取物在大鼠棉球肉芽肿模型中的效果

[0072]

| 治疗                                  | 剂量<br>(mg/kg) | 肉芽肿干重<br>(mg)  | I (%) |
|-------------------------------------|---------------|----------------|-------|
| 对照 (载体+肉芽肿)                         | 0             | 258.0 ± 0.12   | -     |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + 肉芽肿    | 25            | 138.0 ± 0.05*  | 46.5  |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + 肉芽肿    | 200           | 132.0 ± 0.11*  | 48.8  |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + 肉芽肿    | 500           | 117.0 ± 0.04** | 54.6  |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + 肉芽肿 | 25            | 135.0 ± 0.05*  | 47.6  |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + 肉芽肿 | 200           | 130.0 ± 0.11*  | 49.6  |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + 肉芽肿 | 500           | 115.0 ± 0.04** | 55.4  |

[0073] 数值以均值 ± SME (标准误差) 表示;

[0074] I(%) :抑制百分比

[0075] \* $p < 0.05$  ;\*\* $p < 0.01$ , 与对照组比较 (曼 - 惠特尼 U 检验)。

[0076] 实施例 7

[0077] 实施例 2 所述活性成分的效果用急性炎症 (角叉菜胶诱发的胸膜炎) 模型进行评价。雄性斯普拉 - 道来大鼠 (190 ~ 290g) 适应实验室条件 7 天后随机分成不同组别。

[0078] 大鼠口服治疗物一小时后刺激引发角叉菜胶诱发的胸膜炎。概括地说, 大鼠在醚气中麻醉。在大鼠中胸膜内给药 1% (w/v) 角叉菜胶的生理盐水悬浮液 300  $\mu$ L, 以此诱发胸膜炎。将特别改制的针头插入大鼠胸腔右侧注射角叉菜胶悬浮液, 阴性对照组则注射等量的无菌生理盐水。五小时后, 大鼠醚麻醉下处死, 打开胸腔并收集胸膜分泌液, 在 1mL 的 3.15% 柠檬酸钠中均质化, 置入带刻度的塑料试管中测定作为分泌物体积 (EV)。血液污染的分分泌物弃之不用。

[0079] 古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的果实提取物悬于吐温 20/ 水溶液中, 用胃管饲法单剂给药 (5ml/kg)。大鼠随机分成 8 组 (每组 10 只大鼠): 阴性对照组在胸腔内注射生理盐水, 七组用角叉菜胶注射: 分别地, 阳性对照组用载体治疗、三组用古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 提取物治疗、另三组用格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 提取物治疗 (25、200 及 500mg/kg)。对照组和治疗组之间用曼 - 惠特尼 U 检验进行比较。

[0080] 与阴性对照组相比, 注射角叉菜胶后阳性对照组分泌物中的 EV 及 MPO 活性显著上升 (表 8)。

[0081] 单剂量给药本发明目的两种物质 (25、200 及 500mg/kg) 可以显著并呈剂量依赖性地减少 EV 及抑制 MPO 的酶活性, 与对照组相比主要评价剂量下 (500mg/kg) 的抑制百分比达到 >50%。

[0082] 结果证实古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的果实提取物对大鼠角叉菜胶所诱导胸膜炎的疗效, 显著并呈剂量依赖性的减少 EV 和 MPO 活性, 表明其有潜在抗炎作用。

[0083] 表 8. 口服古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的果实提取物治疗对角叉菜胶所诱导胸膜炎的大鼠胸膜分泌物中 EV 及 MPO 的作用

[0084]

| 治疗                             | 剂量<br>(mg/kg) | EV<br>(mL)          | I<br>(%) | MPO<br>(U/mg 蛋白质)   | I<br>(%) |
|--------------------------------|---------------|---------------------|----------|---------------------|----------|
| 阴性对照 (载体)                      | 0             | 0.01 $\pm$ 0.01 *** | -        | 0.37 $\pm$ 0.16 *** | -        |
| 阳性对照 (载体 + C)                  | 0             | 1.45 $\pm$ 0.03     | -        | 43.58 $\pm$ 1.84    | -        |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + C | 25            | 1.12 $\pm$ 0.06 **  | 22.9     | 36.70 $\pm$ 1.25 *  | 15.9     |

[0085]

|                                   |     |                       |      |                        |      |
|-----------------------------------|-----|-----------------------|------|------------------------|------|
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + C    | 200 | $0.95 \pm 0.06^{***}$ | 34.7 | $29.93 \pm 0.97^{***}$ | 31.6 |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + C    | 500 | $0.73 \pm 0.05^{***}$ | 50.0 | $21.82 \pm 1.11^{***}$ | 50.0 |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + C | 25  | $1.11 \pm 0.06^{**}$  | 23.6 | $35.35 \pm 1.27^*$     | 19.0 |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + C | 200 | $0.94 \pm 0.05^{***}$ | 35.4 | $29.99 \pm 0.97^{***}$ | 31.4 |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + C | 500 | $0.73 \pm 0.05^{***}$ | 50.0 | $21.85 \pm 1.15^{***}$ | 50.0 |

[0086] 数值以均值  $\pm$  SME (标准误差) 表示;

[0087] EV:分泌物体积;MPO:髓过氧化物酶 (myeloperoxidase);I(%):抑制百分比;C:解叉菜胶。

[0088] \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。与阳性对照组比较 (曼-惠特尼 U 检验)。

[0089] 实施例 8

[0090] 实施例 3 所述活性成分与锯棕榈 (*S. repens*) 果实脂质提取物 (LESR) 及大王棕 (*S. repens*) 果实 (D-004) 脂质提取物在急性炎症模型 (二甲苯所诱导小鼠耳内水肿) 效果的对比试验。

[0091] 做该试验时,取雄性 0F1 幼鼠 (20 ~ 30g) 适应实验室条件 7 天。适应期结束后,小鼠随机分成 6 组:阴性对照组 (载体)、阳性对照组 (载体+施用二甲苯) 以及四个治疗组施用二甲苯后分别用 400mg/kg 剂量的古巴腹棕榈 (*A. crispa*)、格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*)、LESR 及 D-004 提取物治疗。所有治疗均在水肿诱导前一个小时给药。

[0092] 将 30  $\mu$ L 二甲苯局部施用于小鼠右耳后背面,以此来诱导水肿。两小时后小鼠于醚气中麻醉、采用颈脱位法处死小鼠,对水肿进行定量。两只耳朵均切下来并用分析天平 (Mettler Toledo) 称重。通过计算右耳 (有水肿) 与左耳 (无水肿) 的重量差值 ( $\Delta 0$ ) 来计算水肿形成。对照组与治疗组之间用曼-惠特尼 U 检验进行比较。

[0093] 局部施用二甲苯使两耳之间的重量差别显著加大,表明与阴性对照组相比有水肿形成 (表 9)。所有治疗均显著抑制水肿增长。古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的提取物效果 (分别减少 54.5% 和 52.9%) 优于 LESR (减少 26.7%) 和 D-004 (减少 34%)。

[0094] 这些结果表明口服。古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实提取物 (400mg/kg) 治疗二甲苯局部施用于小鼠耳朵所致水肿的效果优于类似剂量的 LESR 和 D-004。

[0095] 表 9. 古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的提取物、LESR 及 D-004 对二甲苯所诱导小鼠耳部水肿的效果

[0096]

| 治疗                                  | 剂量<br>(mg/kg) | 水肿<br>(ΔO)      | I<br>(%) |
|-------------------------------------|---------------|-----------------|----------|
| 阴性对照                                | 0             | 2.67 ± 1.08***  | —        |
| 阳性对照 + 二甲苯                          | 0             | 37.87 ± 5.34    | —        |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + 二甲苯    | 400           | 18.67 ± 3.25**  | 54.5     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + 二甲苯 | 400           | 19.25 ± 3.71**  | 52.9     |
| LESR + 二甲苯                          | 400           | 28.48 ± 2.74*+† | 26.7     |
| D-004 + 二甲苯                         | 400           | 25.89 ± 2.36*+† | 34.0     |

[0097] 数值以均值 ± SME (标准误差) 表示；

[0098] I (%) :抑制百分比；

[0099] \*p<0.05, \*\*p<0.01, 与阳性对照组比较；

[0100] +p<0.05 与古巴腹棕榈 (*A. Crispa*) 比较, † p<0.05 与格鲁格鲁棕榈 (*A. Aculeata*) 比较, (曼-惠特尼 U 检验)。

[0101] 实施例 9

[0102] 为评价实施例 4 所述活性成分的抗氧化效果, 将雄性斯普拉-道来大鼠 (体重为 200 ~ 250g) 适应实验室条件 7 天。适应期结束后大鼠随机分到不同的组别中, 在醚气中麻醉并从腹主动脉放血。

[0103] 用 EDTA (10%) 收集血液 (终浓度为 1mg/ml 血)。于 3000rpm 离心 10 分钟获得血浆, 用于测定丙二醛 (MDA) 及巯基 (SHG) (分别为 LP 和蛋白质的氧化标记物) 的浓度。

[0104] 古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的果实提取物悬浮于吐温 20/ 水溶液中。大鼠随机分成 9 组 (每组 10 只大鼠): 对照组用载体治疗, 四组用古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 提取物治疗、另四组用格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 提取物治疗 (5、25、50 及 200mg/kg)。用胃管饲法将治疗给药 30 天。之后用生化方法测定 MDA 和 SHG 血浆浓度。对照组和治疗组之间用曼-惠特尼 U 检验进行比较。

[0105] 如表 10 所示, 两种治疗均显著地和明显地使血浆 MDA 和 SHG 数值下降。古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 治疗后下降达到 63.4% (MDA) 和 59.4% (SHG)。本试验结果证实了古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实提取物降低 MDA 及 SHG 血浆水平的效果, 证明了这些提取物的抗氧化作用。

[0106] 表 10. 口服古巴腹棕榈 (*A. Crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. Aculeata*) 提取物治疗对大鼠中血浆 MDA 和 SHG 值的作用

[0107]

| 治疗                            | 剂量<br>(mg/kg) | MDA (nmol<br>MDA/mg 蛋白) | I<br>(%) | SHG (mmol)    | I<br>(%) |
|-------------------------------|---------------|-------------------------|----------|---------------|----------|
| 对照组                           |               | 100.75 ± 3.13           | -        | 1.48 ± 0.10   | -        |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crisper</i> )   | 5             | 81.57 ± 3.48*           | 19.0     | 1.27 ± 0.14   | 14.1     |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crisper</i> )   | 25            | 71.33 ± 3.51*           | 29.2     | 0.88 ± 0.04*  | 40.5     |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crisper</i> )   | 50            | 38.57 ± 7.66**          | 61.7     | 0.72 ± 0.04** | 51.3     |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crisper</i> )   | 200           | 36.01 ± 5.22**          | 64.2     | 0.61 ± 0.05** | 58.7     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) | 5             | 82.57 ± 3.48*           | 18.0     | 1.25 ± 0.11   | 15.5     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) | 25            | 70.14 ± 3.08*           | 30.3     | 0.86 ± 0.03*  | 41.8     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) | 50            | 37.71 ± 7.31**          | 62.5     | 0.70 ± 0.07** | 52.7     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) | 200           | 36.8 ± 5.33**           | 63.4     | 0.60 ± 0.06** | 59.4     |

[0108] 数值以均值 ± SME (标准误差) 表示；

[0109] I (%) :抑制百分比；

[0110] \*p<0.05, \*\*p<0.01, 与对照组比较 (曼 - 惠特尼 U 检验)。

[0111] 实施例 10

[0112] 为了评价实施例 5 所述活性成分对大鼠前列腺增生的可能作用,将活性成分悬浮于吐温 20/ 水载体中。雄性斯普拉 - 道来大鼠 (体重为 300 ~ 360g) 适应实验室条件 7 天后随机分成 8 个试验组:一个阴性对照组 (载体) 及 7 个注射睾丸激素 (4mg/kg) 致前列腺增生组;一个只用载体治疗的阳性对照组和 6 个用古巴腹棕榈 (*A. crisper*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) (50、200 及 400mg/kg) 提取物治疗的组。睾丸激素丙酸盐溶于植物油并于每日皮下注射,持续 14 天。

[0113] 用胃管饲法进行口服给药 (5ml/kg), 每日一次持续 14 天。大鼠于醚气中处死, 放血, 在腹部中线切割打开腹部, 解剖前列腺及膀胱, 摘下并称重。对照组与治疗组之间用曼 - 惠特尼 U 检验进行比较。

[0114] 与阴性对照组相比,注射睾丸激素后前列腺重量以及前列腺重量 / 体重比值均显著上升 (表 11)。连续 14 天给大鼠口服给药古巴腹棕榈 (*A. crisper*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实提取物,使注射睾丸激素所诱导的前列腺大小显著减小 (口服主要评价剂量时减少约 44%)。

[0115] 这些结果表明古巴腹棕榈 (*A. crisper*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实提取物在啮齿动物中使注射睾丸激素所诱导的前列腺大小显著减小的疗效,说明这些提取物对前列腺增生有潜在效果。

[0116] 表 11. 古巴腹棕榈 (*A. crisper*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 果实提取物对睾丸激素所诱导大鼠前列腺增生的效果

[0117]

| 治疗                                | 剂量<br>(mg/kg) | BW           | PW               | I<br>(%) | PW/BW          | I<br>(%) |
|-----------------------------------|---------------|--------------|------------------|----------|----------------|----------|
| 阴性对照                              | 0             | 359,7 ± 6,9  | 576,03 ± 51,4*** | -        | 1,60 ± 0,15*** | -        |
| 阳性对照                              | 0             | 338,5 ± 6,5  | 916,07 ± 34,4    | -        | 2,70 ± 0,12    | -        |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + T    | 50            | 338,5 ± 10,2 | 895,4 ± 34,6     | 6,0      | 2,64 ± 0,11    | 5,45     |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + T    | 200           | 335,3 ± 6,4  | 838,05 ± 30,9*   | 23,0     | 2,50 ± 0,09    | 18,1     |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) + T    | 400           | 349,0 ± 6,4  | 775,02 ± 31,1 ** | 41,4     | 2,22 ± 0,06 ** | 43,6     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + T | 50            | 342,8 ± 10,2 | 890,8 ± 35,1     | 7,4      | 2,60 ± 0,12    | 9,0      |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + T | 200           | 332,1 ± 6,4  | 840,03 ± 31,0*   | 22,3     | 2,52 ± 0,15    | 16,3     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) + T | 400           | 350,4 ± 6,4  | 776,01 ± 35,4 ** | 41,1     | 2,21 ± 0,11 ** | 44,5     |

[0118] 数值以均值 ± SME (标准误差) 表示；

[0119] T : 睾丸激素 ; BW : 体重 (g) ; PW : 前列腺重量 (mg) ；

[0120] I (%) : 抑制百分比 ；

[0121] \*p<0. 05, \*\*p<0. 01, 与阳性对照组比较 (曼 - 惠特尼 U 检验) 。

[0122] 实施例 11

[0123] 实施例 1 所述活性成分在骨关节炎模型中的效果用单碘乙酸盐 (monoiodoacetate, MIA) 所诱导大鼠关节炎模型进行评价。雄性斯普拉 - 道来大鼠 (150 ~ 175g) 适应实验室条件 7 天后随机分成 8 个试验组 : 一个阴性对照组 (载体) 及 7 个 MIA 诱导骨关节炎组——一个只用载体治疗的阳性对照组和 6 个用古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) (100、200 及 400mg/kg) 提取物治疗的组。

[0124] 向左膝的滑液腔内单次注射 MIA (50 μ l), 以此造成关节损伤。右膝则注射等量的生理盐水。诱导关节损伤后立即用胃管饲法 (5mL/kg) 给药治疗。之后大鼠麻醉处死。

[0125] 取出左膝关节于福尔马林中贮存 24 小时后进行组织学研究。之后样本在 0. 5M 的 EDTA 二钠 (pH 7. 4) 中于 4℃ 脱钙 4 周。脱钙完成后关节沿纵平面切片成两半, 进一步埋于石蜡中切割并用苏木精、伊红及甲苯胺蓝进行染色, 进行软骨分析。采用下列修订后曼金 (Mankin) 评分标准根据深度和广度来评价软骨的损害程度：

[0126] • 深度 (0 ~ 5) : 0——正常 ; 1——极少浸润, 仅影响表面区 ; 2——轻度浸润至中间上部区 ; 3——也中度浸润中间区 ; 4——明显浸润到深度区, 但未钙化软骨和钙化软骨之间没有分隔线或界面 (潮标) ; 5——所有厚度严重退化到未钙化软骨与钙化软骨之间出现分隔线。

[0127] • 基质着色减少 (0 ~ 4) : 0——正常 / 轻度着色减少 ; 1——径向层着色减少 ; 2——区间基质着色减少 ; 3——仅细胞外基质有着色 ; 4——着色缺失。

[0128] • 软骨变化 (0 ~ 6) : 0——正常 ; 1——不规则表面, 包括径向层中的裂隙 ; 2——血

管翳 ;3——软骨表面层缺失 ;4——结构轻度破坏 (蜂窝柱缺失,些许细小表层堆积 ;5——软骨钙化层裂隙 ;6——结构破坏 (结构无序、堆积物集块、破坏骨的活动)。

[0129] •炎症扩张 (0 ~ 4) :0——正常 (无浸润) ;1——极少炎性浸润 ;2——轻度浸润 ;3——中度浸润 ;4——明显浸润。

[0130] •细胞异常 (0 ~ 3) :0——正常 ;1——细胞过多,包括小的表层堆积 ;2——堆积物集块 ;3——细胞过少。

[0131] •胫骨损伤的程度 (0 ~ 3) :0——正常 ;1——轻度 ;2——中度 ;3——严重。

[0132] •骨皮质或脊柱骨的损失 (0 ~ 4) :0——正常 ;1——在数个位点有极轻的骨皮质损失 ;2——骨皮质或脊柱骨轻度损失 ;3——多个位点中度骨损失 ;4——多个位点明显骨损失并伴有骨皮质中所有厚度的血管翳炎症过程中碎片化和渗入。

[0133] •破骨细胞的存在 (0 ~ 4) :0——正常 (基本无破骨细胞) ;1——少量破骨细胞 (占受影响骨表面主要部分的 5%) ;2——些许破骨细胞 (占受影响骨表面主要部分的 5 ~ 25%) ;3——许多破骨细胞 (占受影响骨表面主要部分的 26 ~ 50%) ;4——大量破骨细胞 (占受影响骨表面主要部分的 50% 以上)。

[0134] 计算所研究组织学参数评分的中位数 (Median) ;组织学评分计算为所有评价的组织学变量的均值。对照组与治疗组之间用曼 - 惠特尼 U 检验进行比较。

[0135] 从所研究的变量看阴性对照组无一动物有损伤的证据,而阳性对照组的所有动物均有证据表明受到损伤 (表 12、13 及 14)。服用古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的果实提取物使 MIA 所诱导膝盖中关节的组织学评分升高显著降低 (主要评价剂量时降低 50%)。

[0136] 这些结果说明古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的果实提取物可以显著而明显地降低单次注射 MIA 所诱导的左膝滑液腔损伤,表明其对骨关节炎有潜在的疗效。

[0137] 表 12. 古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的果实提取物对组织学总评分的影响

[0138]

| 治疗                            | 剂量<br>(mg/kg) | 组织学评分          | I<br>(%) |
|-------------------------------|---------------|----------------|----------|
| 阴性对照                          | 0             | 0**            | -        |
| 阳性对照                          | 0             | 3.55 ± 0.22    | -        |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> )    | 100           | 2.39 ± 0.24**  | 32.7     |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> )    | 200           | 1.98 ± 0.27*** | 44.2     |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> )    | 400           | 1.75 ± 0.20*** | 50.1     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) | 100           | 2.37 ± 0.21**  | 33.2     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) | 200           | 1.97 ± 0.23*** | 44.5     |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) | 400           | 1.76 ± 0.27*** | 50.0     |

[0139] 阳性对照组和所有提取物治疗的组均接受 MIA 注射。

[0140] 数值以均值  $\pm$  SME (标准误差) 表示；

[0141] I (%) :抑制百分比；

[0142] \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 与阳性对照组比较 (曼 - 惠特尼 U 检验)。

[0143] 表 13. 古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的提取物对软骨损伤的作用

[0144]

| 治疗                                     | 损伤深度             |       | 基质着色的下降           |       |
|----------------------------------------|------------------|-------|-------------------|-------|
|                                        |                  | I (%) |                   | I (%) |
| 阴性对照                                   | 0**              |       | 0**               |       |
| 阳性对照                                   | 4.63 $\pm$ 0.52  |       | 3.00 $\pm$ 0.0    |       |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) 100mg/kg    | 2.63 $\pm$ 0.5   | 43.2  | 1.88 $\pm$ 0.6**  | 37.3  |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) 200mg/kg    | 2.38 $\pm$ 0.5*  | 48.6  | 1.50 $\pm$ 0.5*** | 50.0  |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crispa</i> ) 400mg/kg    | 2.05 $\pm$ 0.6** | 55.7  | 1.15 $\pm$ 0.5*** | 61.6  |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 100mg/kg | 2.61 $\pm$ 0.5   | 43.6  | 1.89 $\pm$ 0.6**  | 37.0  |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 200mg/kg | 2.37 $\pm$ 0.5*  | 48.8  | 1.51 $\pm$ 0.5*** | 49.6  |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 400mg/kg | 2.03 $\pm$ 0.61* | 56.1  | 1.22 $\pm$ 0.6*** | 59.3  |

[0145] 阳性对照组和所有提取物治疗的组均接受 MIA 注射。

[0146] 数值以均值  $\pm$  SME (标准误差) 表示；

[0147] I (%) :抑制百分比；

[0148] \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , 与阳性对照组比较 (曼 - 惠特尼 U 检验)。

[0149] 表 14. 古巴腹棕榈 (*A. crispa*) 和格鲁格鲁棕榈 (*A. aculeata*) 的提取物对软骨损伤的作用

[0150]

| 治疗                                     | 软骨变化         |      | 炎症程度       |      | 细胞异常        |      |
|----------------------------------------|--------------|------|------------|------|-------------|------|
|                                        |              | I(%) |            | I(%) |             | I(%) |
| 阴性对照                                   | 0**          |      | 0**        |      | 0**         |      |
| 阳性对照                                   | 5.38±0.74    |      | 3.63±0.52  |      | 2.88±0.4    |      |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crista</i> ) 100mg/kg    | 3.88±0.6**   | 27.9 | 3.25±0.4** | 10.5 | 1.88±0.6*   | 34.7 |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crista</i> ) 200mg/kg    | 3.13±0.6***  | 41.8 | 2.88±0.4*  | 20.7 | 1.38±0.5*   | 52.1 |
| 古巴腹棕榈 ( <i>A. crista</i> ) 400mg/kg    | 2.75±0.46*** | 48.9 | 2.88±0.35* | 20.7 | 1.05±0.5*** | 63.6 |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 100mg/kg | 3.85±0.6**   | 28.4 | 3.25±0.5** | 10.5 | 1.89±0.7*   | 34.3 |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 200mg/kg | 3.12±0.7***  | 41.9 | 2.87±0.3*  | 20.8 | 1.38±0.6**  | 52.1 |
| 格鲁格鲁棕榈 ( <i>A. aculeata</i> ) 400mg/kg | 2.74±0.5***  | 49.0 | 2.87±0.3*  | 20.9 | 1.03±0.4*** | 64.2 |

[0151] 阳性对照组和所有提取物治疗的组均接受 MIA 注射。

[0152] 数值以均值 ±SME (标准误差) 表示；

[0153] I(%) :抑制百分比；

[0154] \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, 与阳性对照组比较 (曼-惠特尼 U 检验)。

[0155] 实施例 12

[0156] 使用实施例所述活性成分研发了如下数种剂型：剂量在 50 和 1000mg 之间的固体口服制剂，像含玉米淀粉、乳糖、滑石粉、明胶、交联羧甲基纤维素钠、硬脂酸镁以及羧甲基纤维素的片剂；或硬胶囊及软胶囊；含浓度 0.1 和 90% 之间的实施例 1 所述活性成分并含有固体矿脂、十六醇、聚山梨醇酯、丙二醇、甘油、硬脂醇、硫酸月桂酸钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、磷酸二氢钠、纯化水、. 乙二胺四乙酸二钠、聚羧乙烯 (carbopol)、二甲硅油、蜂蜡以及三乙胺作为赋形剂的乳膏；含浓度在 0.1 和 90% 之间的实施例 1 所述活性成分并含有聚山梨醇酯、丙二醇、羧甲基纤维素、甘油、硫酸月桂酸钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、磷酸二氢钠、纯化水及三乙胺作为赋形剂的洗液和香波。