

發明專利說明書

[本說明書格式，順序及粗體字，請勿任意更動，※號部份請勿填寫]

※申請案號： 089102999
※申請日期： 20000218
※IPC分類：Int.Cl.(6) A61K 35/00

一、發明名稱：(中文/英文)

蛇床子素之製備方法與活性的測定
Method for the preparation of osthole, and determination of its activity

二、申請人：共 1 人

1.
姓名或名稱：(中文/英文)

詹道明 / CHAN, TAO MING

代 表 人：(中文/英文)

/

住居所或營業所地址：(中文/英文)

高雄市三民區同盟一路三九三號十樓之二 /

國 籍：(中文/英文)

中華民國 / TW

三、發明人：共 2 人

1.
姓名：(中文/英文)

詹道明 / CHAN, TAO MING

國 籍：(中文/英文)

中華民國 / TW

2.
姓名：(中文/英文)

余建志 / YU, JIAN-JR

國 籍：(中文/英文)

中華民國 / TW

四、聲明事項

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為：年 月 日

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號、順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號、順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料【格式請依：寄存機構、日期、號碼、順序註記】

國外生物材料【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼、順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係揭示一種新穎方法而獲得純度高大量蛇床子素(Osthole)方法，較之傳統之管注層析法，具備有快速、省時及低污染之優點。本發明經由實驗證實蛇床子具有抑制陰道滴蟲之作用。因此可以發展出一種滴蟲抑制製劑，其係含有蛇床子素(Osthole)為主成分，並含有必要之賦形劑。

六、英文發明摘要：

This invention discloses a new and effective method for obtaining large quantity of osthole with high purity from herbal medicines, more particularly, from Cnidii fructus. In comparison with the conventional column chromatographic method, it has the advantages of rapid, less time consuming, and no environmental pollution. In the present invention it has also been proved experimentally that Cnidii fructus, including osthole and extract of Cnidii fructus, has significant inhibition and lethal effect on Trichomonas vaginalis. Therefore, an anti-Trichomonas vaginalis preparation containing osthole as the main ingredient with essential excipient (s) can be developed.

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

產業上之利用領域

本發明係使用一種新穎方法可自植物中獲得大量且純度高的蛇床子素(Osthole)方法；較之傳統之管柱層析法(Column Chromatography)，具備有快速、省時及低污染之優點。

本發明經由實驗證實蛇床子（包括蛇床子素及蛇床子浸膏）具有抑制陰道滴蟲之作用。因此可以發展出一種滴蟲抑制製劑，其係含有蛇床子素為主成分，並可含有必要之賦形劑。

背景

蛇床子(Cnidii Fructus)係一種傳統大量使用之中藥材，本草綱目記載以及國內外有關蛇床子之臨床研究文獻報告謂，蛇床子具有溫腎壯陽，燥濕，祛風，殺蟲之作用，主用於陽痿，宮

冷，寒溼帶下，外治外陰濕疹，婦人陰癢，滴蟲性陰道炎。目前中醫界多以蛇床子煎湯薰洗使用於治療陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)感染之症狀，只是目前尚未有相關文獻或科學證據可以直接證明蛇床子具有抑制陰道滴蟲之作用。

在臨床使用蛇床子作為治療劑時，也沒有切確的劑量與療效相關的數據加以依據。根據文獻報導，臨床治療陰道滴蟲感染時，在藥品劑量不正確時將導至滴蟲產生抗藥性，而增加治療的困難性。甚至於在某些文獻，呈現無效。

於不同品種、產地之蛇床子其中所含化學成分有明顯差異，然而文獻資料顯示蛇床子的代表性成分為蛇床子素。一般植物化學、生藥學研究中藥材化學成分皆採用管柱層析分離方法，使用各種有機溶媒經過繁複之層析，萃取中藥材之成分。既耗費許多有機溶媒，造成污染環境之困擾，也不容易獲得快速大量之效果。

發明目標

本發明揭示一種新穎方法而獲得純度高大量蛇床子素方法，較之傳統之管柱層析法，具備有快速、省時及低污染之優點。

本發明亦經由實驗，證實蛇床子素具有抑制陰道滴蟲之作用。

凡是熟悉該技藝的人士在閱讀下列經由不同圖解所展示之較佳實施例詳細說明後，無疑地將非常清楚本發明所揭示之目的和優點。

表列之說明：

表一. 真空分段蒸餾法與管柱層析法之比較。

表二. 七種抽提溶媒系統及蛇床子素抽提率之相關性。

圖式簡單說明

圖1. 蛇床子素之化學結構

圖2. 蛇床子素濃度與時間對滴蟲成長之效應

圖3. 蛇床子浸膏濃度與時間對滴蟲成長之效應

圖4. 陰道滴蟲之成長(a)旺盛，48小時(b)衰亡期，96小時

圖5. 低濃度秘妥搭挪(Metronidazole)與蛇床子素對陰道滴蟲成長之效應(a)旺盛，秘妥搭挪(Metronidazole) 5×10^{-6} mg/ml(b)衰亡期，蛇床子素(Osthole) 5×10^{-6} mg/ml

圖6高濃度秘妥搭挪(Metronidazole)與蛇床子素對陰道滴蟲成長之效應(a)旺盛，秘妥搭挪(Metronidazole)0.25mg/ml(b)衰亡期，蛇床子素(Osthole)0.25mg/ml

圖7. 秘妥搭挪(Metronidazole)濃度與時間對滴蟲成長之效應

主要元件符號說明

1 . . . 空白組

2 . . . 對照組

3 . . . 蛇床子素0.5mg/ml

4 . . . 蛇床子素0.25mg/ml

5 . . . 蛇床子素 5×10^{-2} mg/ml

6 . . . 蛇床子素 5×10^{-3} mg/ml

7 . . . 蛇床子素 5×10^{-4} mg/ml

8 . . . 蛇床子素 5×10^{-5} mg/ml

9 . . . 蛇床子素0.5mg/ml

10 . . . 蛇床子素0.25mg/ml

11 . . . 蛇床子素0.05mg/ml

12 . . . 秘妥搭挪(Metronidazole)0.5mg/ml

13 . . . 秘妥搭挪(Metronidazole) 5×10^{-2} mg/ml

14 . . . 秘妥搭挪(Metronidazole) 5×10^{-3} mg/ml

15 . . . 秘妥搭挪(Metronidazole) 5×10^{-4} mg/ml

16 . . . 秘妥搭挪(Metronidazole) 5×10^{-5} mg/ml

17 . . . 秘妥搭挪(Metronidazole) 5×10^{-6} mg/ml

發明之詳細說明

中藥材蛇床子(*Cnidii Fructus*)係傘形科蛇床屬植物之果實，已知其中化學成分複雜，且於不同品種、產地之蛇床子其中所含成分有明顯差異。許多文獻資料顯示蛇床子的代表性成分為

蛇床子素(Osthole)，其化學結構如圖1所示。

目前天然物中的成分純化暨分離主要採用管柱層析法(Column Chromatography)，但採用管柱層析方法，有以下缺點：

- A. 操作者需有經驗。
- B. 時間很長。
- C. 有機溶媒使用量大，且幾乎無法回收（造成環境污染）。
- D. 相關耗材，如指標品和檢視(SCAN)的層析薄版(TLC)板使用量均很大。
- E. 若分離不完全，需再反覆。

採用真空減壓蒸餾法，則無以上困難處。其間之耗費主要為電費，不需使用有機溶媒，不使用其他耗材。如表一所示，真空分段蒸餾法與管柱層析法之比較，將濃縮液真空分段蒸餾操作簡單，以及污染小等優點。

一般沸點的定義為：於常溫常壓時，使液體產生一大氣壓之表面蒸氣壓時的溫度，謂之沸點。但若可以將環境壓力降低時，沸點亦會隨之下降，如高山上煮開水即是。試想，若將壓力降到趨近真空時，其沸點必定也會大幅下降，使本來在常壓下無法蒸餾獲得的化合物，變得可以蒸餾方式蒸餾獲得。

又，並非任何化合物均可以由採用真空減壓蒸餾法獲得。當化合物結構中存在有分子內和分子間氫鍵者，是難於以真空蒸餾的方式來將其蒸餾出來的。在有機物蒸餾，溫度超過250°C時，即產生明顯之碳化反應，絕大部分之有機物在來不及蒸餾出來就被碳化破壞掉了。

蒸餾法一直是被廣泛利用於低沸點之溶媒純化暨分離，唯高溫低壓的蒸餾方法則較少被利用於植物成分之純化暨分離，原因是其特定成分含量通常都很低，不利於此法之實施。若蒸餾的量為可以造成飽和蒸氣壓的量則適合採用此方法，可以大幅下降化合物之沸點，順利將化合物蒸餾出來。本發明即是將採用減壓蒸餾法，以低壓方式蒸餾蛇床子浸膏，所獲得之蛇床子素產率較之其它傳統純化暨分離方法高出許多。

蛇床子素之融點為82-83°C，然而在習知文獻中沒有沸點之數據，若以減壓蒸餾時，沸點約140-160°C(0.01mmHg)。本發明製備蛇床子素方法，其係選用氫甲烷(Acetonitrile)、水、乙醇(Ethanol)、氯仿(Chloroform)、乙酸乙酯(Ethylacetate)、己烷(n-Hexane)之一，或是任意混合之溶媒系統。以氫甲烷(Acetonitrile)與水等體積混之溶媒系統可以獲得100.0%抽提率，而選用氫甲烷(Acetonitrile)、水、乙醇(Ethanol)、氯仿(Chloroform)、乙酸乙酯(Ethylacetate)、己烷(n-Hexane)作為蛇床子素抽提溶媒系統，經與氫甲烷水溶液為基準進行比較，如表二所示。單純氫甲烷(Acetonitrile)可以獲得88.0%抽提率，水僅能獲得5.4%抽提率。在有機溶媒中抽提率依序為乙醇(Ethanol)、氯仿(Chloroform)、乙酸乙酯(Ethylacetate)、己烷(n-Hexane)。

本發明所揭示新穎製備蛇床子素(Osthole)方法，係將中藥材蛇床子(Cnidii Fructus)先行研成粉末，置入索式(Soxhlet)抽取裝置中，以乙醇進行抽提；經減壓濃縮，除去溶媒，將濃縮液真空分段蒸餾，以稀乙醇再結晶。

國內學者研究報導蛇床子素具有廣泛之抗菌活性(Antibiotic Activity)，但是沒有報導抗陰道滴蟲作用(Yang與Yen, 1999)。本發明所採用之陰道滴蟲數目之檢測方法是依據HSu等人(1991)及Humphreys等人(1994)所發表之方法。而證實蛇床子具有抑制陰道滴蟲之作用。圖2. 為蛇床子素濃度對陰道滴蟲成長抑制之初步篩選結果。明顯示出當濃度低於0.05mg/ml時，滴蟲之成長與對照組相當。圖3. 為蛇床子浸膏對陰道滴蟲成長之抑制表現。可以看出浸膏中所含蛇床子素溶液濃度在0.25mg/ml時，即可有效抑制滴蟲，但濃度為0.05mg/ml時，則無法有效抑制滴蟲生長，呈現抑制不完全之現象。浸膏所呈現之結果與相同濃度之蛇床子素溶液之抑制結果相符合。圖4. a, b. 以流式細胞分析儀(Flow cytometry)方法，檢驗對照組之陰道滴蟲在48小時培養時(旺盛期)及在96小時培養時(衰亡期)之圖示。在旺盛期極大多數為活的細胞而在衰亡期時則只有極為少數為活的細胞。圖5. a, b. 分別顯示陰道滴蟲在含有濃度為 5×10^{-6} mg/ml的秘妥搭挪(Metronidazole)與蛇床子素(Osthole)時的48小時成長並沒有受到影響。圖6a, b. 分別顯示陰道滴蟲在含有濃度為0.25mg/ml的秘妥搭挪(Metronidazole)與蛇床子素(Osthole)時的48小時成長，其成長完全被抑制。

秘妥搭挪(Metronidazole)為目前市面上治療陰道滴蟲之典型藥物，如圖7所示其最小抑制滴蟲成長濃度為 5×10^{-4} mg/ml。但若考慮藥物之毒性，副作用與其它療效，蛇床子素(Osthole)似乎

也是一個很好的選擇。

本發明之化合物於添加各種賦形劑，如硬脂酸鎂、玉米粉、澱粉、乳糖、羥酸甲基纖維素鈉、乙醇、甘油等，或稀釋劑(diluents)、潤滑劑(lubricants)、矯味劑、崩散劑(disintegrants)、粘合劑(binders)，或著色劑、甜味劑製成錠劑或其他固形製劑，而用磷酸鹽類緩衝液調整酸鹼度(pH)值可製成注射劑或其他液劑及各種劑型。其中固體劑型係包括片劑、錠劑、粉末、膠囊、舌下片、顆粒等劑型，本發明之藥學可容許加酸成鹽，以及該藥學可容許加酸成鹽之藥學製品，除供口服給藥、直腸投與之固體劑型外、亦可製備為有效量之注射劑型、液體劑型，或非經腸道使用之注射劑型，或直接塗敷患處之軟膏劑型。一般投藥劑量可隨症狀需要而加以調配，通常為每人每次50mg到300mg，每天3次。

綜上所述，本發明具備原創性、新穎性及進步性。雖然本發明以一些較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技術者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作為些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請發明所界定為準。

以下揭示實施例以進一步說明本發明之製法以及產物所達成之功效，但不宜以最佳實施例限制本發明之範圍。

蛇床子素活性試驗

依照1991年Hsu SY等人於Journal of Chinese Medicines第1卷第2期第95-99頁，1994年Humphreys等人於Cytometry第15卷第343-348頁，進行蛇床子素抑制陰道滴蟲試驗。

1. 培養基之調製(1)綜合維生素溶液-107之配製：儲存溶液A：

(a).

成 分	濃 度
菸鹼酸 (Nicotinic acid)	0.0625 克(g)
對-氨基苯酸 (P-aminobenzoic acid)	0.1250 克(g)

溶於 100 毫升(ml) 或克(g)之沸水中(微波加熱)

(b).

成 分	濃 度
尼 雅 酸 氨(Niacinamide)	0.0625 克(g)
維 生 素 B6 鹽 酸 鹽(Pyridoxal HCl)	0.0625 克(g)
吡 哆 醇 鹽 酸 鹽(Pyridoxine HCl)	0.0625 克(g)
維 生 素 B1 鹽 酸 鹽(Thiamine HCl)	0.2500 克(g)
肌 醇(Inositol)	0.1250 克(g)
膽 鹼 鹽 酸 鹽(Choline HCl)	1.2000 克(g)

溶於150毫升(ml)或克(g)之純水中將上述(a)與(b)溶液混和，共250毫升成為儲存溶液A。

儲存溶液B：以0.1N氫氧化鈉(NaOH)溶解0.0300克(g)之維生素H(D-Biotin)，加入純水至300毫升。

儲存溶液C：以0.1N氫氧化鈉溶解0.0300克之葉酸(Folicacid)，加入純水至300毫升。

儲存溶液D：將0.0600克之維生素K3(Vitamin K3, Menadionesodium bisulfite)溶於300毫升之5% Tween80中。

儲存溶液E：將0.0250克之維生素E(Vitamin E, Tocopherolacetate)溶於250毫升之純水中。

綜合維他命溶液 -107 含：

儲存溶液標示	體積 毫升(ml)
(A)	133
(B)	66
(C)	66
(D)	66
(E)	66

以純水加至1,000毫升(ml)後，經0.2 μ m之鐘罩型過濾膜過濾，保存於-20°C。

(2)綜合維他命溶液之配製A. 綜合維他命溶液-107B. 0.01克之維生素B12(Vitamin-B12)溶於25毫升純水中C. 0.025克之D. L-卵蛋白腩(D. L-Thioctic acid)溶於25毫升純水中D. 12.5克之吐恩80(Tween80)溶於25毫升乙醇中取A液1,000毫升，B液12毫升，C液及D液各4毫升加純水至1,200毫升，成為綜合維他命溶液。

(3) 培養基之成份：

成 分	濃 度 (毫升(ml), 克(g))
生薩胰蛋白腺(Biosate Tryptone)	20.0
酵母萃取(Yeast extract)	10.0
葡萄糖(Glucose)	10.0
L-半胱胺酸 (L-Cysteine)	1.0
氯化鈉 (NaCl)	2.0
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	1.0
磷酸二氫鉀 (KH_2PH_4)	0.6
維生素 C (L-Ascorbic acid, Vitamin C)	0.2
檸檬酸鐵銨(Ferric ammonium citrate)	1.0 ml (0.022 g/ml)
綜合維他命溶液	30.0 ml
去活性馬血清	50.0 ml
(☆註：馬血清於 56 °C 加熱 30 分鐘)	

2. 蛇床子素檢液泡製方法取1000mg蛇床子素(Osthole)，以二甲亞楓(DMSO, dimethylsulfoxide)為稀釋溶媒，溶解製成10ml(100mg/ml)溶液，作為母液，並以二甲亞楓為稀釋溶媒，製備了一系列濃度之蛇床子素檢液，計六種濃度分別為100mg/ml, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml, 0.001mg/ml。

3. 蛇床子素抑制陰道滴蟲的之濃度篩選於平流層無菌操作箱(Laminar flow)中，取100 μ l 已培養40小時之含滴蟲液；加入於10毫升(ml)的新鮮培養基中，加入50 μ l 蛇床子素檢液至培養基中，將離心管混合均勻，並置於充滿5%二氧化碳；37°C之培養箱中培養，於分段之預定時間內0hr、6hr、12hr、24hr、30hr、36hr、48hr、54hr、60hr、72hr，以細胞計數器(Coulter Counter)測試生長曲線。

並與二甲亞楓處理之滴蟲為對照組，單純二甲亞楓之培養基為空白組做比較，觀察其對滴蟲成長是否有具抑制性，及其有效抑制濃度之測定。

培養基中蛇床子素(Osthole)濃度計算方法：以濃度為0.005mg/ml為例。取1mg/ml蛇床子素(Osthole)溶液50 μ l 所獲得蛇床子素(Osthole)為0.05mg。計算方式為50 μ l \times 1mg/ml = 0.05ml \times 1mg/ml = 0.05mg。

將0.05mg蛇床子素(Osthole)加入10ml的溶媒(medium)中，故最終濃度為0.005mg/ml，以

5E-3mg/ml來表示(計算方式為0.05mg/10ml=0.005mg/ml)。

4. 滴蟲生長曲線之檢測：(1)以細胞計數器(Coulter Counter)於預定之時間內檢測蟲體生長狀態，其參數(parameter)設定如下：成分參數(parameter)1%食鹽水(Isoton II) 100 ml 透析管型號(Aperture Diameter 100 μ m(S/N:9697)測試容積(Manometer, Count Volume) 2ml(2,000 μ l)(2)取40 μ l之蟲液，於100毫升(ml)的1%食鹽水(Isoton II)內混合，以細胞計數器(Coulter Counter)測量之，待測量完成，曲線輸入電腦後選取6-24 μ m大小之數據，讀取及記錄之。

實施例1

稱取10kg蛇床子粉末置入索式(Soxhlet)抽取裝置，以乙醇進行抽提；經減壓濃縮，除去溶媒(回收可再利用)，將濃縮液真空分段蒸餾，以稀乙醇再結晶得純度高之蛇床子素(Osthole)。

表一 真空分段蒸餾法與管柱層析法之比較：

項目	真空分段蒸餾法	管柱層析法
產率	85-92%	75-85%
溶媒	不用	大量溶媒
時間	1天	7天
環保	污染小	大量廢液
純度	100.02%	99.83%
設備	蒸餾裝置+真空抽氣機 +抽氣管	玻璃管柱 +分段收集器
操作	簡單	略需訓練

註：以分離純化1Kg蛇床子粉末為比較基準，不含前處理狀況及再結晶過程。

表二 七種抽提溶媒系統及蛇床子素抽提率之相關性

溶媒系統	抽提率(%)
氰甲烷水溶液 (Acetonitrile : water= 1 : 1)	100.0
己烷 (n-Hexane)	62.4
氯仿 (Chloroform)	81.6
乙酸乙酯 (Ethyl acetate)	79.6
乙醇 (Ethanol)	95.4
氰甲烷 (Acetonitrile)	88.0
水 (Water)	5.4

註：以氰甲烷：水=1:1抽提所得之量作為100.0%計算。

十、申請專利範圍：

1. 一種抽提蛇床子素之方法，其係將蛇床子粉末置入索式(S Soxhlet)抽取裝置，以溶媒系統進行抽提；經減壓濃縮，除去溶媒，將濃縮液真空分段蒸餾，以稀乙醇再結晶。
2. 如申請專利範圍第1項抽提蛇床子素之方法，其溶媒系統係選用氰甲烷(Acetonitrile)、氰甲烷：水之1:1(V/V)溶液、或乙醇(Ethanol)。
3. 一種滴蟲抑制製劑，其係含有蛇床子素(Osthole)為主成分，並含有必要之賦形劑。

十一、圖式：

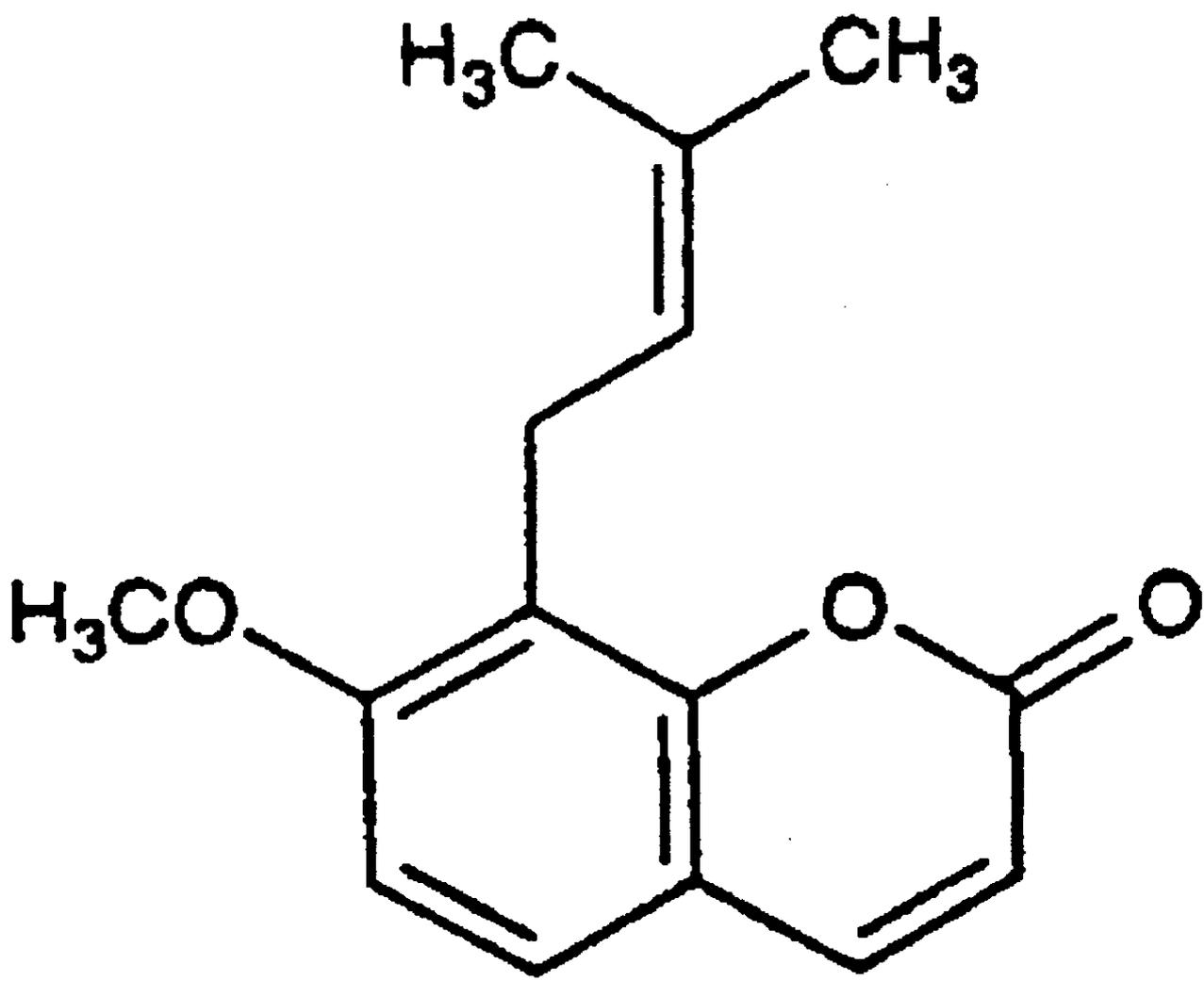


圖 1

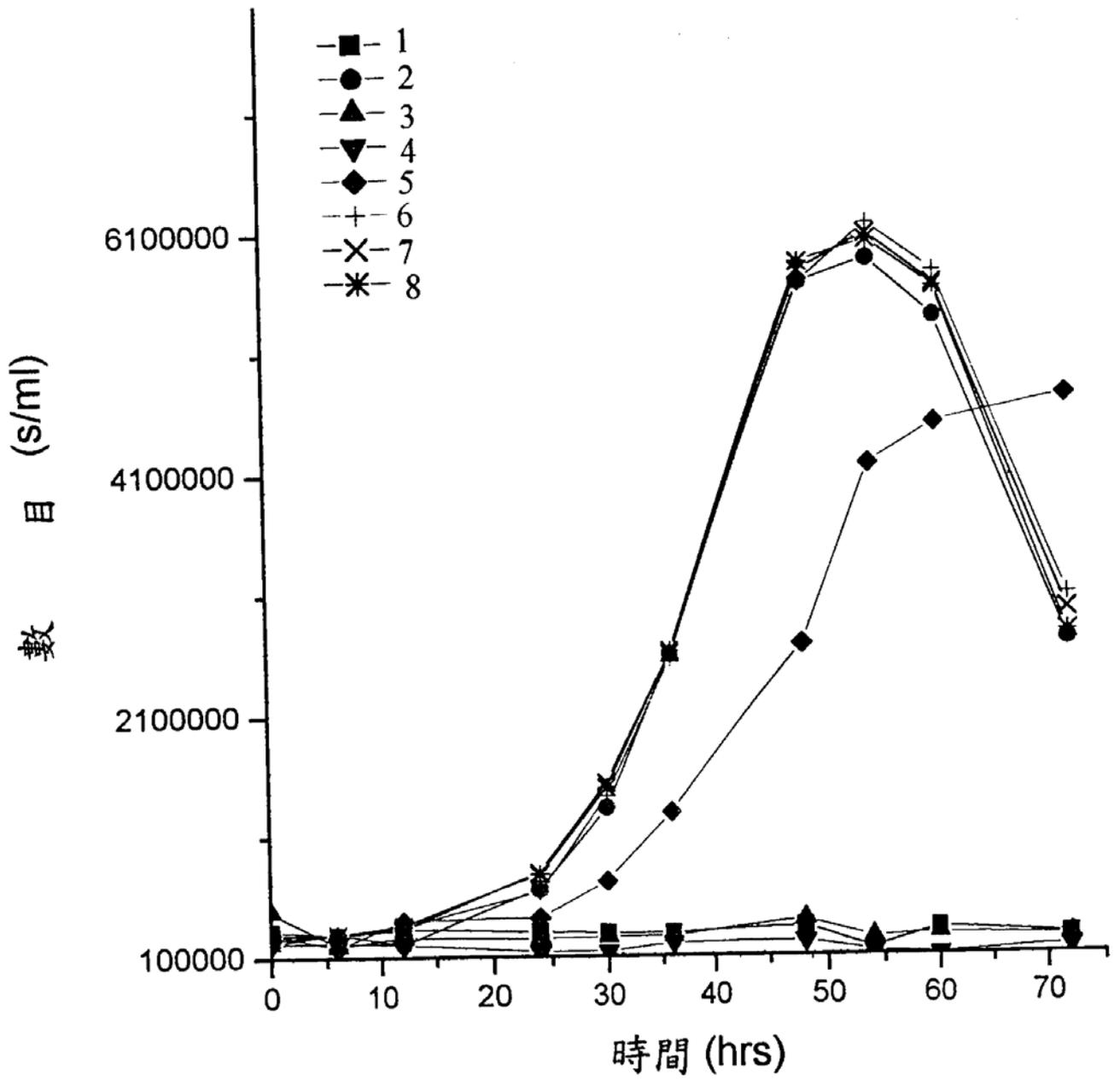


圖 2

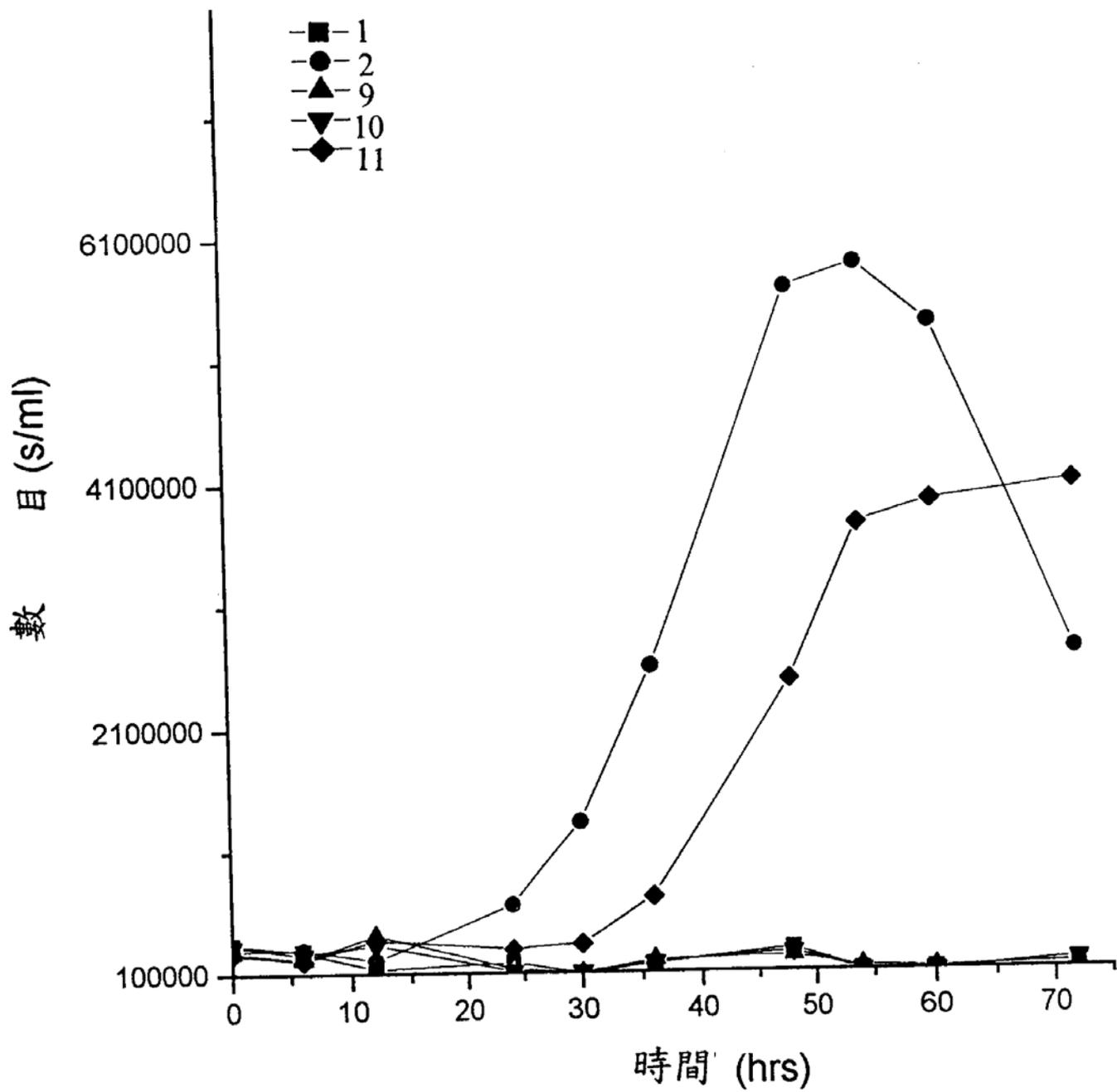


圖 3

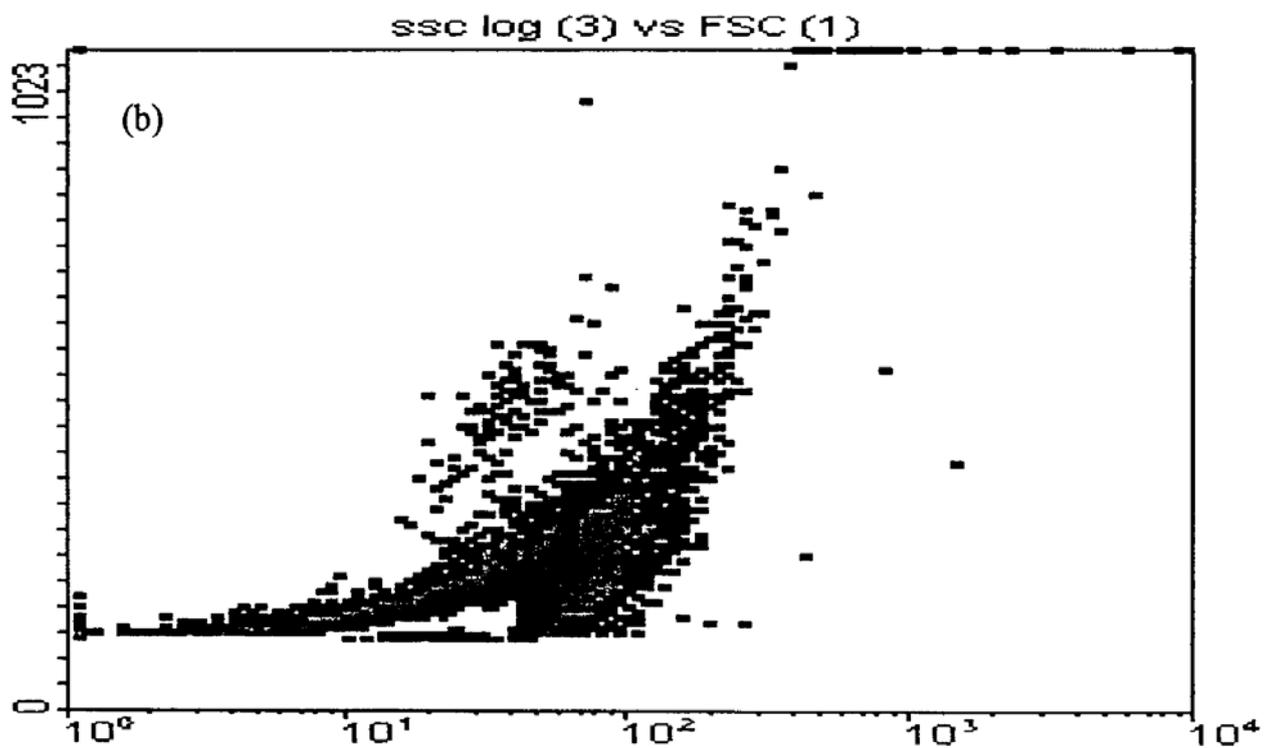
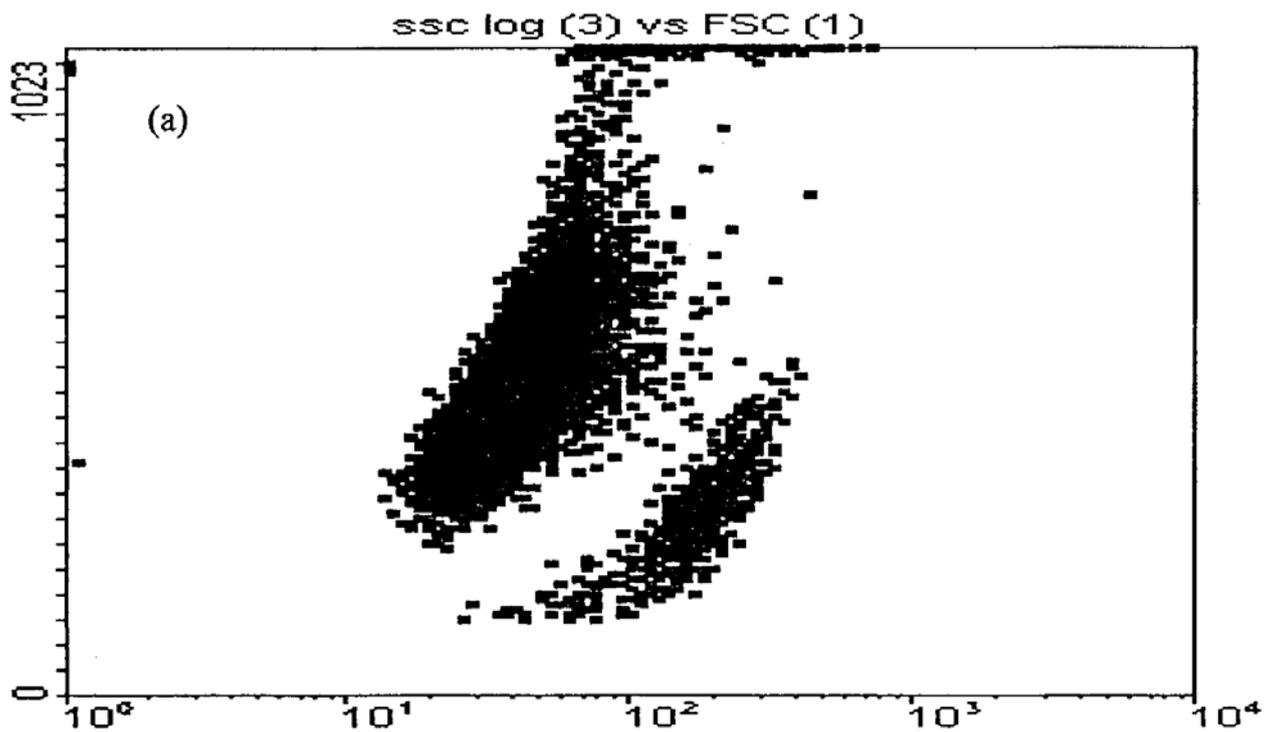
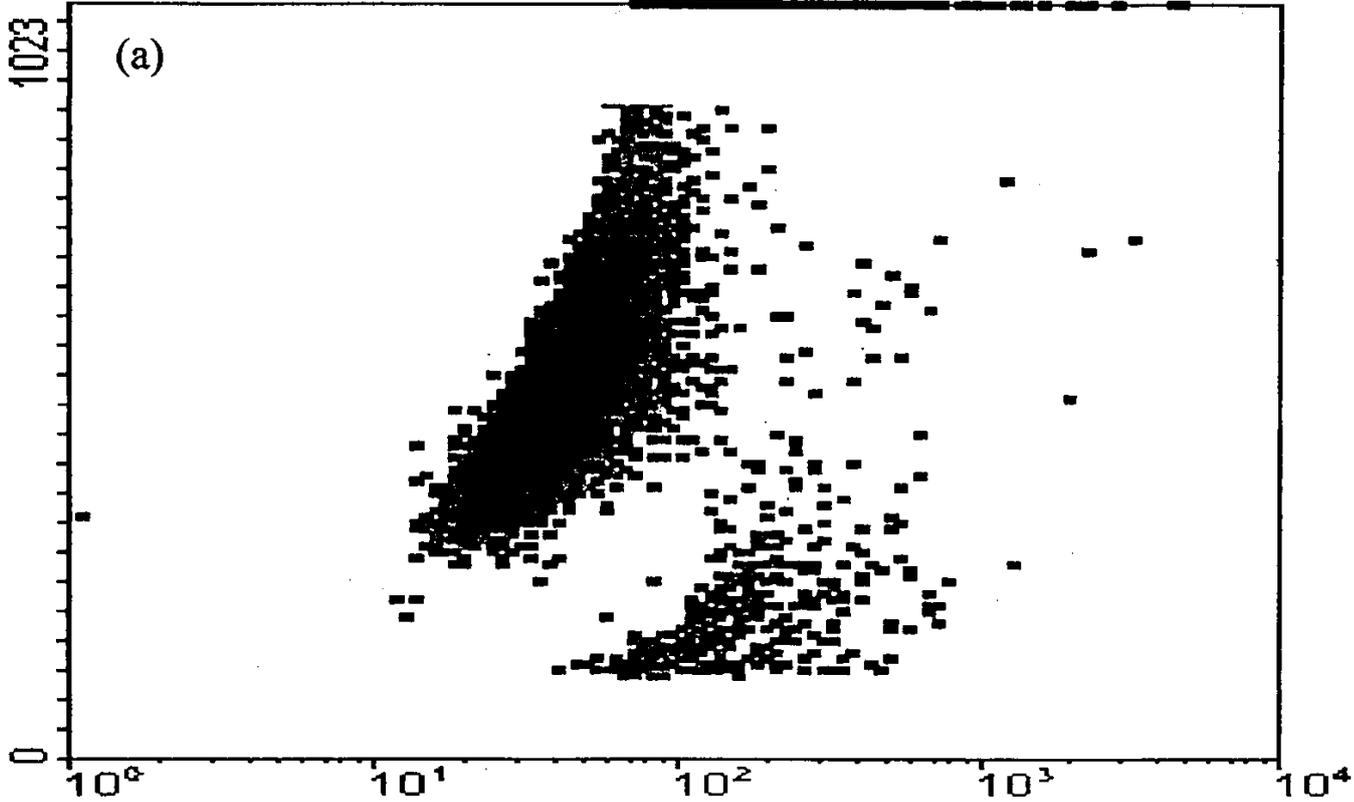


圖 4

ssc log (3) vs FSC (1)



ssc log (3) vs FSC (1)

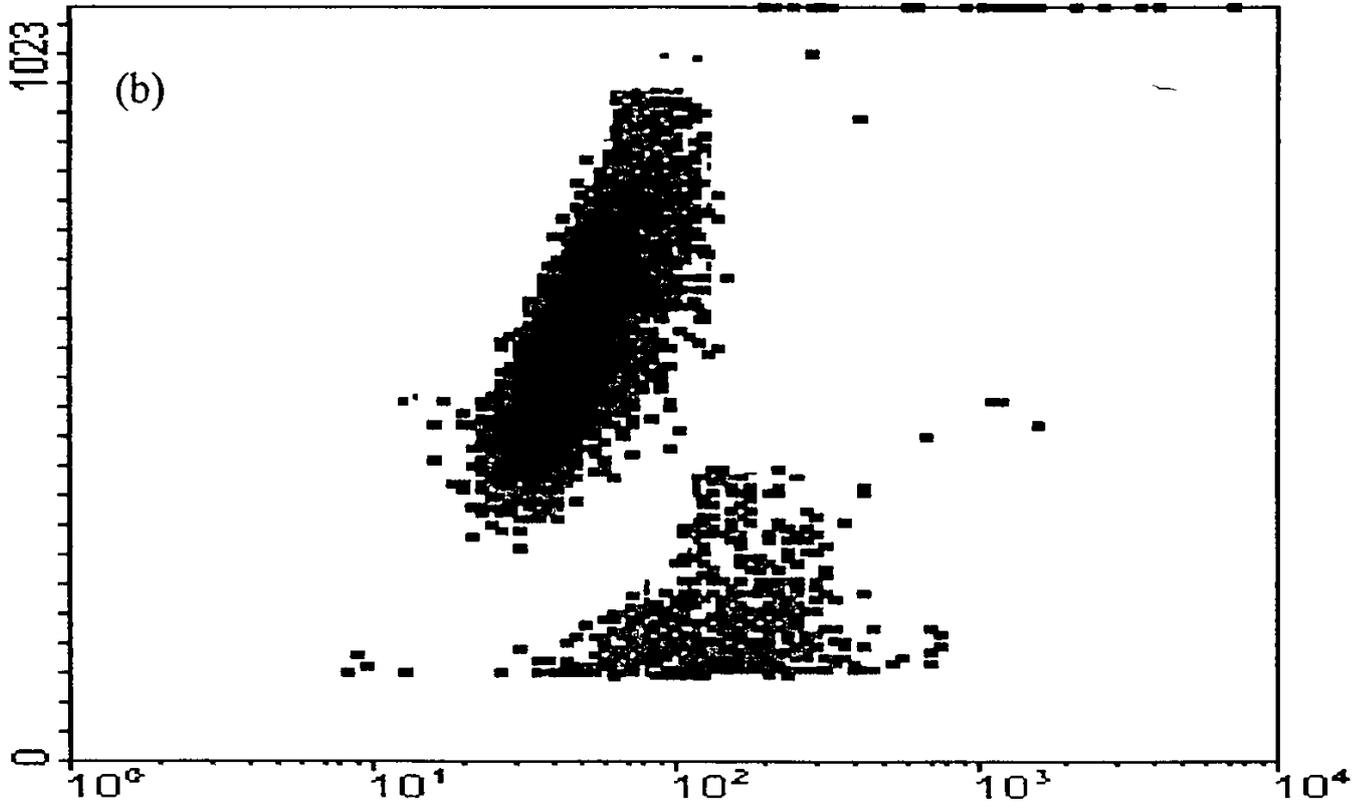


圖 5

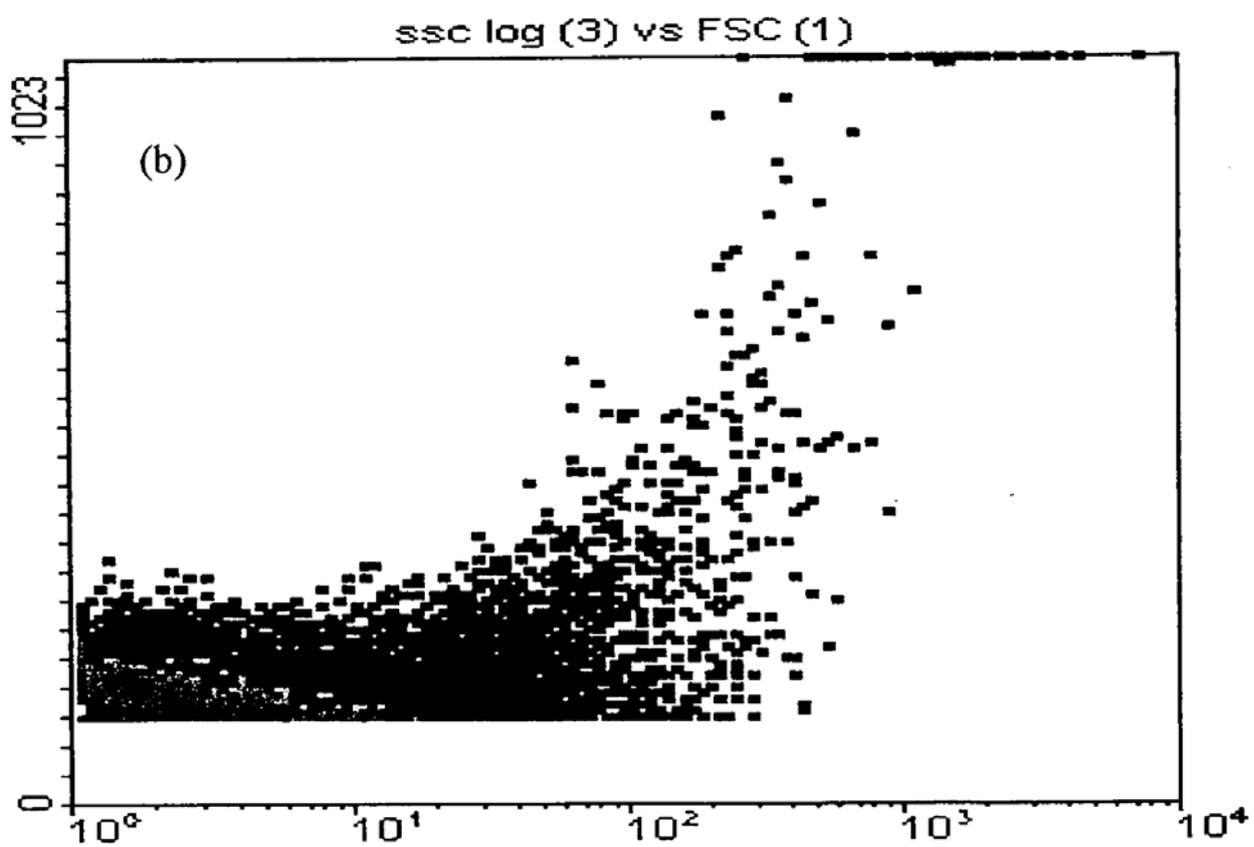
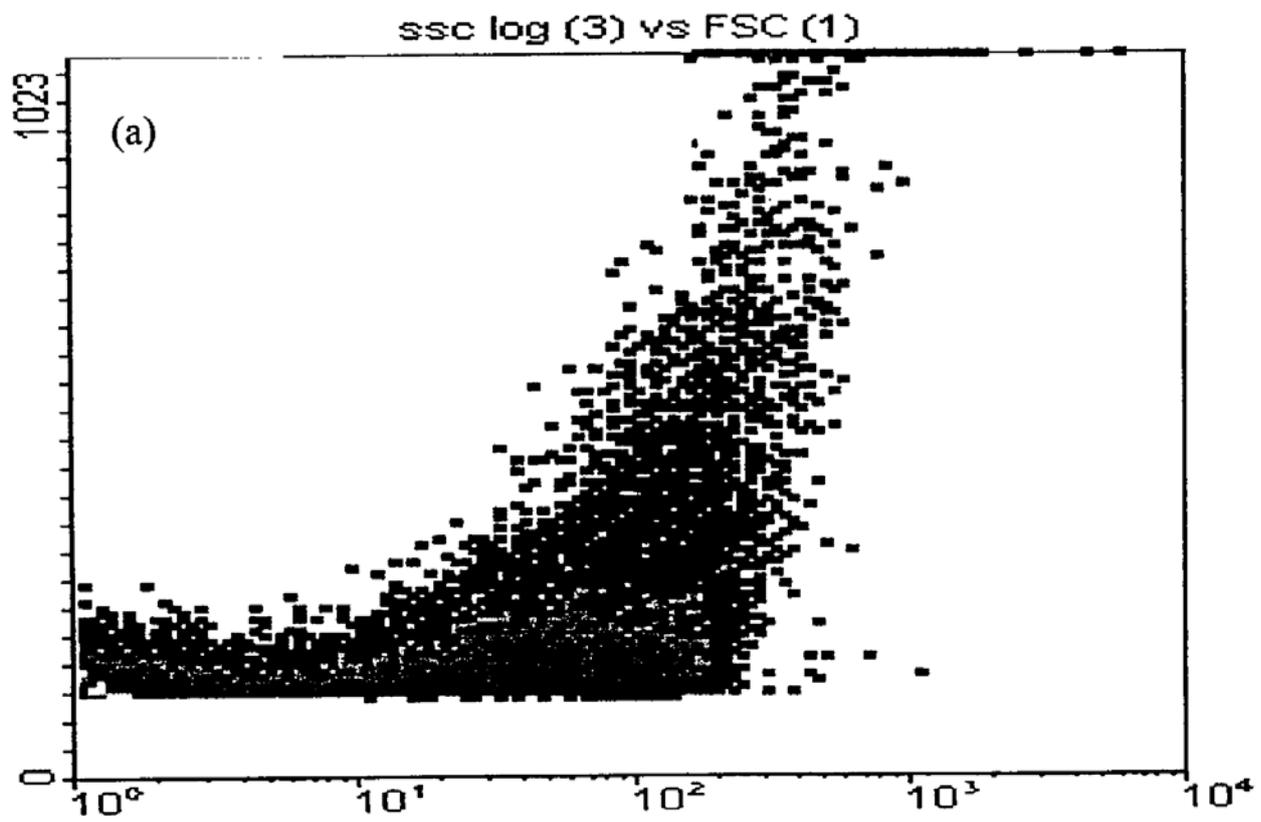


圖 6

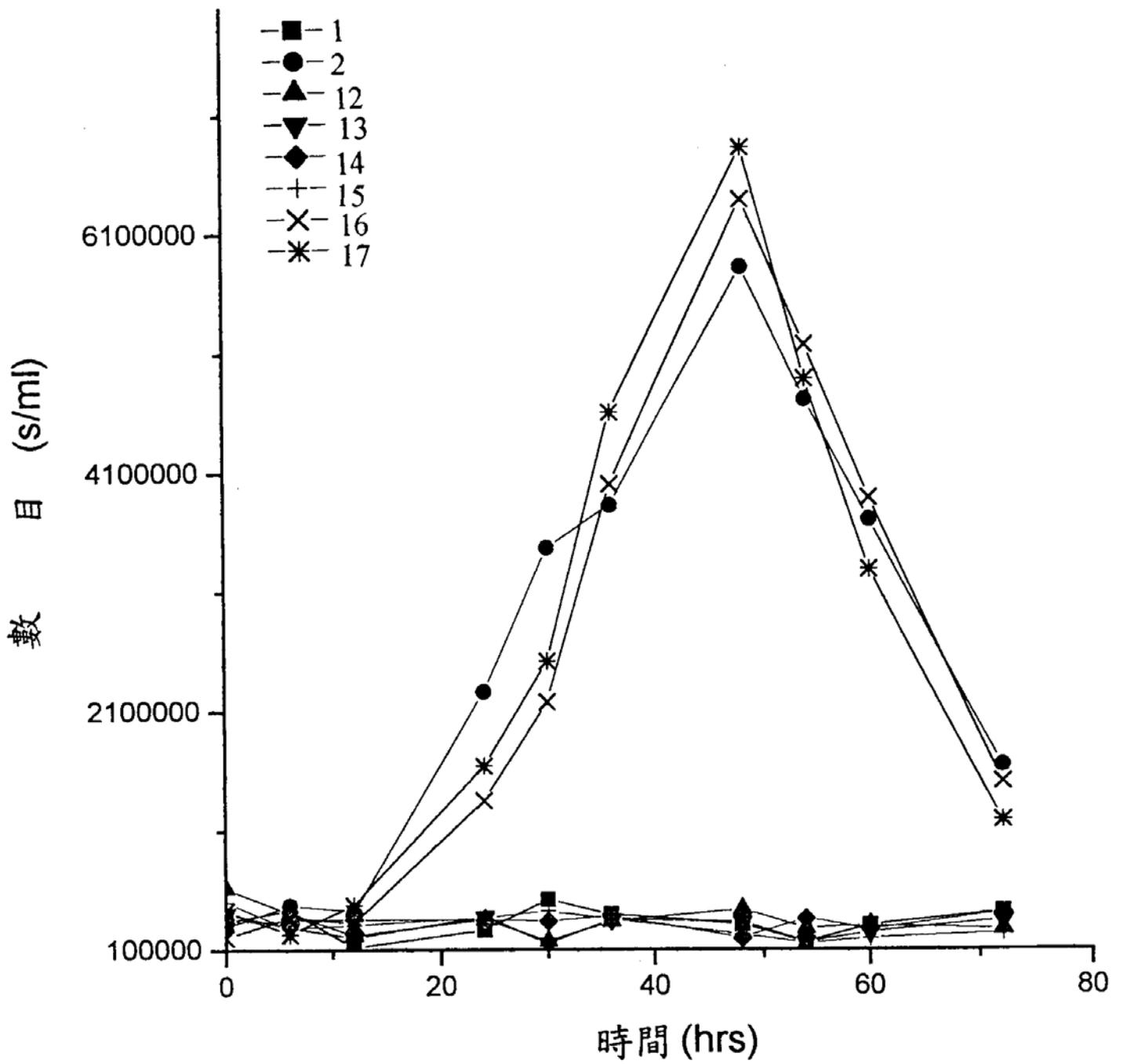


圖 7