

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 35/32

A61K 35/60 A61K 9/48

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99100076.5

[43]公开日 2000年7月12日

[11]公开号 CN 1259353A

[22]申请日 1999.1.7 [21]申请号 99100076.5  
 [71]申请人 中国科学院生物物理研究所  
 地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号  
 [72]发明人 张春爱 赵保路 忻文娟 侯京武

[74]专利代理机构 上海华东专利事务所  
 代理人 高存秀

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 一种抑制肿瘤生长、清除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊及其制备方法

[57]摘要

本发明涉及一种抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊及制法,本发明的保健胶囊主要填充物为动物软骨粉,还包括添加药用维生素,其中药用维生素按总填充物重量 0—30% 添加,余量为动物软骨粉,还可以加入天然药物粉,制备方法是将动物软骨干燥、粉碎、消毒、混合之后再消毒杀菌包装,本发明的保健胶囊可抑制肿瘤生长,抗衰老,对心血管有保健功能。制备方法简单,易于工业化生产。

ISSN 1008-4274

## 权利要求书

---

1. 一种抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：主要填充物包括作为活性成分的动物软骨粉，还包括药用维生素；其中药用维生素占填充物总重量的0-30%，余量为动物软骨粉。
2. 按权利要求1所述的抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：还包括添加占填充物总重量的5-12%的天然药物粉。
3. 按权利要求1、2所述的抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：所述的动物软骨，包括猪、牛、羊、鸡、鸭、兔陆生和禽类的动物软骨以及鲨鱼软骨。
4. 按权利要求1所述的具有抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：所述添加的药用维生素占填充物总重量的0-30%的维生素C。
5. 按权利要求1、2所述的抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：所述的添加药用维生素占填充物总重量的3-7%的维生素E。
6. 按权利要求1、2所述的抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：所述的添加药用维生素占填充物总重量的3-7%的维生素A。
7. 按权利要求2所述的抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：所述的添加天然药物粉包括占填充物总重量的5-12%茶多酚。
8. 按权利要求2所述的抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：所述的添加天然药物粉包括占填充物总重量的0.5-1.5%的银杏叶提取物。
9. 按权利要求2所述的抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊，其特征在于：所述的添加天然药物粉包括占填充物总重量的5-12%的丹参粉。

10. 一种制备权利要求1-9所述的抑制肿瘤生长、消除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊方法，包括依下列步骤进行：

(1) 取清洗干净动物软骨，在低于20℃下干燥；

(2) 干燥后的动物软骨经通常粉碎方法粉碎成60目以下的粉末，经用食品加工业通用的紫外线杀菌消毒装置进行消毒，之后，按装入每粒胶囊中的填充物总重量的0-30%药用维生素，余量为动物软骨粉的比例配料，经混合均匀装入医用胶囊；

(3) 把已装好的医用胶囊再重复紫外杀菌消毒包装。

# 说明书

---

## 一种抑制肿瘤生长,清除自由基和抗脂质过氧化的 动物软骨保健胶囊及其制备方法

本发明涉及一种保健软骨胶囊,特别涉及一种用于抑制肿瘤生长,清除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊及其制备方法。

目前市场出售几种抑制肿瘤生长的保健品,特别是鲨鱼软骨胶囊,如:一种品牌为“海之宝”的鲨鱼软骨胶囊,由清华大学生命与工程研究院,清华大学天地科技发展有限公司联合研制。该产品由鲨鱼软骨和地龙经加工成粉末制备而成。另一种品牌为

鲨鱼软骨和硬脂酸镁经加工成粉末配制而成。关于鲨鱼软骨胶囊抑制肿瘤的专利也有报导,如:文献1中国专利申请号961008613,名称为“一种鲨鱼软骨胶囊及其制造工艺”的发明专利,该专利申请公开“一种鲨鱼软骨胶囊及其制造工艺,其特征是胶囊中鲨鱼软骨含量为80%至100%,胶囊的制造工艺为(1)将软骨从鲨鱼体内取出;(2)将鲨鱼软骨进行粉碎;(3)将鲨鱼软骨杀菌后封在胶囊中,二次杀菌后包装。

虽然鲨鱼软骨具有防癌抗癌作用,但是鲨鱼软骨资源短缺,相应价格也昂贵,不是公众普遍可以承受的。另外鲨鱼软骨抑制肿瘤生长的途径较单一,因此保健功能不够高。

本发明的目的在于寻找一种原料来源丰富,且价格便宜,具有防癌和抗癌功能的动物软骨;本发明的目的之二为了提高动物软骨抗癌和防癌的效率 and 扩大抑制肿瘤的途径;本发明的目的之三是为了提供一种制备方法简单,原料价格便宜,工艺简单,可进行工业化生产的方法,所制备的胶囊无化学甜味剂,无毒无害,从而提供一种动物软骨粉、维生素或天然抗氧化剂制作的具有抑制肿瘤,清除自由基,抗脂质过氧化的动物软骨胶囊及其制备方法。

本发明的目的是这样实现的:

本发明提供一种抑制肿瘤生长,清除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶

囊，主要填充物包括作为活性成分的动物软骨粉，还包括药用维生素，其中维生素添加量为填充物总重量0-30%，余量为动物软骨粉。还包括加入按填充物总重量计5-12%的天然药物粉（均以重量百分比计算）；动物软骨粉可以是猪、牛、羊、鸡、鸭、陆生动物和禽类、鲨鱼等软骨制做的；维生素可以是维生素C、A、E；天然药物粉可以是茶多酚、银杏叶提取物、丹参粉。

本发明的一种抑制肿瘤生长，清除自由基和抗脂质过氧化的动物软骨保健胶囊及其制备方法，包括下列步骤：将洗净的动物软骨在低于20℃下干燥，经干燥后粉碎、研磨至小于60目的粉末，采用食品工业通用的紫外线杀菌消毒之后，与药用维生素按总重量计含维生素0-30%，余量为动物软骨粉的比例称料混合均匀，装入医用胶囊中再重复紫外杀菌消毒工艺，进行包装。

本发明提供的配方之一是按每粒胶囊内的总填充物600mg计，添加总填充物重量0-30%的药用维生素C，余量为动物软骨粉组成。

肿瘤的一个主要特征是无限生长和到处转移，这就需要大量营养，因此肿瘤的形成必须在其周围首先形成大量血管，以供应其生长的营养。已有技术所述的鲨鱼软骨的一个重要功能是可以抑制血管的形成，但是抑制率低且价格贵。如果肿瘤周围不能形成血管，就得不到其生长所需的营养，肿瘤生长就被抑制。体内需要氧自由基代谢平衡，只有氧自由基的产生和清除处于平衡时，身体才能保持健康。如果体内产生氧自由基过多或清除能力降低，体内就有多余有害氧自由基，会引起细胞成分的损伤，细胞膜的脂质过氧化，酶的失活，蛋白质变性，DNA突变，导致疾病的发生，最明显的是癌，心血管疾病和衰老的发生。这时就需要引入外加的抗氧化剂和自由基清除剂，帮助体内维持自由基代谢的平衡，防止这几种严重疾病的发生。本发明利用在动物软骨粉中再加入水溶性抗氧化剂维生素C制成复合胶囊，经实验证明既具有清除自由基，抗脂质过氧化，又能抑制肿瘤生长具有保健功能。

经过用每组20只小鼠作实验发现，与对照组相比，喂食该胶囊可以抑制接种H22肿瘤生长，而且该胶囊能够清除有害氧自由基，抑制脂质过氧化等作用，还具有抗衰老，抗心血管病功能。经科学实验表明，在Fenton反应体系中，可有效清除反应活性最大的羟基自由基，清除该体系产生的羟基自由基的 $I_{c50}=0.045\%$ ；该胶囊可有效清除黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基，在该体系其清除超

氧阴离子自由基的 $Ic_{50}=0.0050\%$ ;在卵磷脂和细胞膜体系中,该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成,其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.40\%$ ;在小鼠接种H22实体瘤实验中,除正常饮食外,每天喂食该胶囊130-270mg/kg,连续7天,与对照组相比可以抑制肿瘤生长26%.

本发明提供的配方2:是按每粒胶囊内的总填充物600mg计,添加总填充物重量3-7%的药用维生素E,余量为动物软骨粉组成。其中维生素E是一种脂溶性抗氧化剂,它与动物软骨粉有抑制肿瘤生长的协同作用。

用每组20只小鼠作实验发现,与对照组相比,喂食该胶囊可以抑制接种H22肿瘤生长,而且该胶囊能够清除有害氧自由基,抑制脂质过氧化等作用,还具有抗衰老,抗心血管病功能。经科学实验表明,在卵磷脂和红细胞膜体系中,该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成,其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.30-0.35\%$ ;在小鼠接种H22实体瘤实验中,除正常饮食外,每天喂食该配方的胶囊130-270mg/kg,连续7天,与对照组相比可以抑制肿瘤生长20-35%.

本发明提供配方3:是按每粒胶囊内的总填充物600mg计,添加总填充物重量3-7%的药用维生素E和15%-30%维生素C,余量为动物软骨粉组成。其中维生素E是一种脂溶性抗氧化剂,可以和维生素C协同抗氧化和清除自由基,进而与动物软骨协同抑制肿瘤生长。

本发明提供的配方4:在上述配方1中,再加入填充物总重量5-12%的茶多酚,余量为动物软骨粉组成。

本发明提供的配方5:是在上述配方3中,再加入填充物总重量5-12%的茶多酚,组成。以上两个配方中使用了茶多酚,因为茶多酚是既可溶于水又可溶于有机溶剂的物质,可以和水溶性维生素C和脂溶性维生素E协同提高本发明的动物软骨胶囊的保健功能,

本发明提供的配方6:在上述配方5中,再添加以填充物总重量0.5-1.5%的银杏叶提取物组成。

本发明提供的配方7:在上述配方3中,再添加以填充物总重量0.5-1.5%的银杏叶提取物组成。

本发明提供的配方8:是按每粒胶囊内的填充物总重量600mg计,添加总填充物重量5-12%的丹参粉和余量为动物软骨粉组成。

用每组20只小鼠作实验方法同上，在Fenton反应体系中，该胶囊可有效清除反应活性最大的羟基自由基，清除该体系产生的羟基自由基的 $Ic_{50}=0.05-0.06\%$ ；该胶囊可有效清除黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基，在该体系其清除超氧阴离子自由基的 $Ic_{50}=0.02-0.25\%$ ；在卵磷脂和红细胞膜体系中，该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成，其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.2-0.25\%$ ；在小鼠接种H22实体瘤实验中，除正常饮食外，每天喂食该130-270mg/kg，连续7天，与对照组相比可以抑制肿瘤生长15-25%。另外，用阿霉素诱导小鼠引起心脏病，每天喂食该胶囊130-270mg/kg，可减少阿霉素对小鼠的毒性。可以看出增加了丹参粉后，不仅是含有活性成份动物软骨粉具有抑制肿瘤作用，而增加丹参粉对心脏也有保护作用。

本发明提供的配方9：在上述配方中，再添加总重量5-12%的丹参粉。配方6、7、8、9中增加天然药物粉是为了进一步提高本发明的动物软骨胶囊的保健功能，特别是对心脏的保健功能。

用每组20只小鼠作实验，实验方法如上所述，实验发现与对照组相比，喂食该胶囊可以抑制接种H22肿瘤生长，而且该胶囊能够清除有害氧自由基，抑制脂质过氧化等作用，还具有抗衰老，抗心血管病功能。经科学实验表明，在Fenton反应体系中，该胶囊可有效清除反应活性最大的羟基自由基，清除该体系产生的羟基自由基的 $Ic_{50}=0.018-0.019\%$ ；该胶囊可有效清除黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基，在该体系其清除超氧阴离子自由基的 $Ic_{50}=0.0012-15\%$ ；在卵磷脂和红细胞膜体系中，该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成，其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.115-0.120\%$ ；在小鼠接种H22实体瘤实验中，除正常饮食外，每天喂食该130-270mg/kg，连续7天，与对照组相比可以抑制肿瘤生长30-46%。另外，用阿霉素诱导小鼠引起心脏病，每天喂食该胶囊130-270mg/kg，可减少阿霉素对小鼠的毒性。可以看出增加了丹参粉后，不仅协同增效作用进一步增大，而且对心脏也有保护作用。

本发明的效果：

1. 本发明的动物软骨胶囊中主要添加动物软骨粉，维生素和天然植物提取物，可以有效抑制肿瘤生长，其抑制率26-46%；
2. 本发明的动物软骨胶囊能够有效清除有害氧自由基，其消除羟基自由基的 $Ic$

50=0.045-0.050%；其清除超氧阳离子自由基的 $Ic_{50}$ =0.0050-0.012%；

3. 本发明的动物软骨胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化作用 $Ic_{50}$ =0.115-0.120%；

4. 本发明的动物软骨胶囊可能还具有抗衰老抗心血管病功能；

5. 本发明的动物软骨胶囊选用药膳同源的天然食用动物软骨粉，维生素和天然植物提取物为原料，各组分符合药政法规定，利用各组分之间的协同作用，达到有效抑制肿瘤生长，清除有害自由基，防止脂质过氧化的作用；

6. 本发明无须煎煮，无苦涩感，服用方便，符合国家食品卫生法规定；

7. 本发明的胶囊，原料易得，价格便宜；

8. 本发明不含任何其它添加剂，对人体无害无毒；

9. 制备方法简单，采用通常干燥，粉碎，杀菌消毒工艺，易于工业化生产。

本发明的用途：

1. 本发明用于抑制肿瘤生长，适用剂量8-12粒/次，每日3次；

2. 本发明能够有效清除人体内有害氧自由基；

3. 本发明可以有效抑制细胞膜脂质过氧化作用；

4. 本发明还具有预防心血管病的功能；

图1 AAA对Fenton体系产生的羟基自由基的清除作用；

图2 AAA对黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基的清除作用。

图3 AAA对羟基自由基引起红细胞膜脂质过氧化的保护作用。

附图说明：说明书、图和表中AAA代表本发明的动物软骨粉保健胶囊。

#### 实施例1

配制按每粒胶囊100mg计，取猪软骨粉+维生素C+维生素E+茶多酚+丹参粉+银杏叶提取物=67.5mg+13.5mg+6mg+6mg+6.3mg+0.7mg组成。其制备方法是：将猪软骨经清洗干净，放在烘箱内20℃烘干，再用食品加工器粉碎，经研磨通过60目孔筛，把按上述比例称好的料经通常食品工业用的紫外线消毒装置照射消毒后，与医用维生素、天然药物粉混合均匀装入医用胶囊内，再重复紫外消毒一次包装即可。

上述制备的复合猪软骨胶囊对Fenton反应体系产生羟基自由基的清除作用



羟基自由基是所有氧自由基中氧化性质最强的自由基，寿命极短(10<sup>-6</sup>), 反应性极强，它可以和细胞所有成分发生反应，引起细胞膜的脂质过氧化，酶的失活和蛋白质的变性，造成DNA突变。

本实验采用Fenton反应体系产生羟基自由基，用自旋捕集ESR技术或化学发光法，检测产生的羟基自由基，本发明动物软骨胶囊可以有效清除在这一体系中产生的羟基自由基，其清除羟基自由基的Ic=0.018%。

### 一、配制复合猪软骨提取溶液

1. 本实施例配制的100mg/粒复合猪软骨胶囊（67.5%猪软骨粉, 13.5%维生素C, 6.0%维生素E, 6%茶多酚, 6.3%丹参粉, 0.7%银杏叶提取物）溶于1ml磷酸缓冲液, 振荡，离心，取上清液，作为实验用。

2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5%, 自旋捕集剂DMPO(5, 5' dimethyl-pyrroline-oxyl, SigmaChemCo.) 0.4mol/L。

3. Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶于pH5.0弱酸中。

### 二、复合猪软骨胶囊对Fenton反应产生羟基自由基的清除作用

用Fenton反应体系产生羟基自由基，用自旋捕集剂DMPO捕集产生的羟基自由基，用ESR或用化学发光技术测量产生的羟基自由基。在此体系中加入步骤一制做的复合猪软骨提取液，测量复合猪软骨胶囊对羟基自由基的清除作用。具体反应体系为：

1. 10μlPBS+10μlH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+10μlFe<sup>2+</sup>+10μlDMPO

2. 10μl(0.0035%)复合猪软骨胶囊+10μlH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+10μlFe<sup>2+</sup>+10μlDMPO

3. 10μl(0.035%)复合猪软骨胶囊+10μlH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+10μlFe<sup>2+</sup>+10μlDMPO

4. 10μl(0.35%)复合猪软骨胶囊+10μlH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+10μlFe<sup>2+</sup>+10μlDMPO

5. 10μl(3.5%)复合猪软骨胶囊+10μlH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+10μlFe<sup>2+</sup>+10μlDMPO

利用下式计算清除率：

$$E = \frac{H_0 - H_x}{H_0} \times 100\%$$

这里 $H_0$ 和 $H_x$ 分别为对照和实验样品自由基的浓度。

### 三、结果

表1和图1给出了复合猪软骨胶囊对Fenton体系产生的羟基自由基的清除作用。

表1复合猪软骨胶囊对Fenton体系产生的羟基自由基的清除作用

浓度 (%)	O H (相对浓度)	清除率 (%)
0	840, 860, 720, 800	0
0.017	553, 600, 500	31.6±5.07
0.17	258, 300, 350	62.4±4.7
1.7	100, 96, 98	87.8±6.21
3.4	22, 20, 21	97.4±0.28

由表1的数据和图1的清除曲线可以看出复合猪软骨胶囊可以有效清除Fenton体系产生的羟基自由基，其清除羟基自由基的 $IC_{50}=0.018\%$ 。

#### 实施例2

制备方法及配方同实施的1相同，复合猪软骨胶囊对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶(X/XO)体系产生 $O_2^-$ 的清除作用

复合猪软骨胶囊对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶(X/XO)体系产生 $O_2^-$ 有清除作用， $O_2^-$ 是体内产生的第一个氧自由基，它可以直接和细胞成分反应， $O_2^-$ 也可以插入DNA引起细胞突变，产生细胞毒性和损伤。另外它还可以歧化生成 $H_2O_2$ ，再经Fenton反应生成羟基自由基，引起细胞成分的损伤。本实验采用X/XO体系产生 $O_2^-$ ，用ESR技术或Luminol的化学发光法检测产生 $O_2^-$ 。复合猪软骨胶囊可以有效清除这一体系产生的 $O_2^-$ ，其清除 $O_2^-$ 的 $Ic_{50}=0.0012\%$

#### 一、溶液配制

1. 100mg复合猪软骨胶囊 (67.5%猪软骨粉, 13.5%维生素C, 6.0%维生素E, 6%茶多酚,

6. 3%丹参粉, 0. 7%银杏叶提取物) 溶于1mL磷酸缓冲液, 振荡, 离心, 取上清液, 作为实验用。

2. 黄嘌呤50mg/L, 黄嘌呤氧化酶35U/mL, 自旋捕集剂DMPO0. 4mol/L。

二、复合猪软骨胶囊对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生超氧阴离子自由基的清除作用

用黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生超氧阴离子自由基, 用DMPO捕集产生的超氧阴离子自由基, 用ESR或化学发光技术测量产生的超氧阴离子自由基。在体系中加入复合猪软骨胶囊提取液, 测量复合猪软骨胶囊对超氧阴离子自由基的清除作用。

具体反应体系为:

1. 10 $\mu$ lPBS+10 $\mu$ lX+10 $\mu$ lXO++10 $\mu$ lDMPO

2. 10 $\mu$ l (0. 0035%) 复合猪软骨胶囊+10 $\mu$ lX+10 $\mu$ lXO+10 $\mu$ lDMPO

3. 10 $\mu$ l (0. 035%) 复合猪软骨胶囊+10 $\mu$ lX+10 $\mu$ lXO+10 $\mu$ lDMPO

4. 10 $\mu$ l (0. 35%) 复合猪软骨胶囊+10 $\mu$ lX+10 $\mu$ lXO+10 $\mu$ lDMPO

5. 10 $\mu$ l (3. 5%) 复合猪软骨胶囊+10 $\mu$ lX+10 $\mu$ lXO+10 $\mu$ lDMPO

利用下式计算清除率:

$$E = \frac{H_o - H_x}{H_o} \times 100\%$$

这里H<sub>o</sub>和H<sub>x</sub>分别为对照组和实验样品自由基的浓度。

三、结果

表2和图2给出了复合猪软骨胶囊对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基的清除作用。

表2复合猪软骨胶囊对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基的清除作用。

浓度	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (相对浓度)	清除率 (%)
0	590, 650, 489, 459	0
0.0018	355, 400, 415	28.7 ± 4.7
0.018	79, 78, 76	85.8 ± 0.22
0.18	7.0, 10, 11	98.3 ± 0.31
1.8	1.8, 2.1, 2.0	99.6 ± 0.05

由表2的数据和图2的清除曲线可以看出复合猪软骨胶囊可以有效清除黄嘌呤/氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基，其清除超氧阴离子自由基的 IC<sub>50</sub>=0.0012%。

### 实施例3

配制每粒复合猪软骨胶囊100mg计，其中添充物为：13.5%维生素C, 6.0%维生素E, 6%茶多酚, 6.3%丹参粉, 0.7%银杏叶提取物，余量为猪软骨粉组成，该复合猪软骨胶囊有抑制细胞膜脂质过氧化作用；制备方法与实施1相同。

红细胞在血液中具有携带和运输O<sub>2</sub>的作用，很容易引起氧自由基对机体的损伤，导致红细胞膜脂质过氧化。细胞膜脂质过氧化最终产生细胞膜脂质断裂形成醛类，典型的是丙二醛。利用TBA与MDA反应生成TBA反应物TBARS可以定量测定红细胞膜脂质过氧化程度。本实验采用Fenton反应引起红细胞膜脂质过氧化，复合猪软骨胶囊可以有效抑制该体系产生的TBARS。其抑制脂质过氧化的IC<sub>50</sub>=0.115%，实验如下：

#### 一、溶液配制

1. 取上述配制的100mg复合猪软骨胶囊（67.5%软骨粉, 13.5%维生素C, 6.0%维生素E, 6%茶多酚, 6.3%丹参粉, 0.7%银杏叶提取物）溶于1ml磷酸缓冲液，振荡，离心，取上清液，作为实验用；

2. 红细胞膜的提取，健康志愿者献血，肝素抗凝，离心沉淀收集红细胞，用冷冻低渗溶液涨破红细胞，高速离心沉淀红细胞膜，用磷酸缓冲液洗涤后待用。

3. Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶于pH5.0弱酸中;

4. TBA 0.65mg/ml;

5. 甲醇:丁醇85: 15

## 二、复合猪软骨胶囊对红细胞膜脂质过氧化的保护作用

1. 对照1: 40μl PBS+20μl PBS+300μl 红细胞膜+50μl TBA+500μl HCl

2. 对照2: 40μl PBS+20μl Fe<sup>2+</sup>+300μl 红细胞膜+50μl TBA+500μl HCl

3. AAA: 40μl 复合猪软骨胶囊(0.0029%)+20μl Fe<sup>2+</sup>+300μl 红细胞膜+50μl TBA+500μl HCl

4. AAA: 40μl 复合猪软骨胶囊(0.029%)+20μl Fe<sup>2+</sup>+300μl 红细胞膜+50μl TBA+500μl HCl

5. AAA: 40μl 复合猪软骨胶囊(0.29%)+20μl Fe<sup>2+</sup>+300μl 红细胞膜+50μl TBA+500μl HCl

6. AAA: 40μl 复合猪软骨胶囊(2.9%)+20μl Fe<sup>2+</sup>+300μl 红细胞膜+50μl TBA+500μl HCl

以上样品在95°C温育40分钟, 冷却到室温后用甲醇丁醇抽提, 有机相在532nm处测定光吸收, 利用下式计算复合猪软骨胶囊对红细胞膜脂质过氧化的抑制率。

$$E = \frac{Ho - Hx}{Ho} \times 100\%$$

这里Ho和Hx分别为对照和实验样品自由基的浓度。

## 三、结果

表3和图3给出了复合猪软骨胶囊对羟基自由基引起红细胞膜脂质过氧化的保护作用。

表3复合猪软骨胶囊对羟基自由基引起红细胞膜脂质过氧化的保护作用

样品	光吸收(532nm)	抑制率(%)	平均抑制率(%)
对照2	1.0954		

	0.9846		
	1.0014	0	0
复合猪软骨胶囊(0.0029%)	0.9533	8.4	
	0.9182	11.8	8.5±2.65
	0.9856	5.3	
复合猪软骨胶囊(0.029%)	0.7793	25.1	
	0.7851	26.0	
	0.7702	25.0	25.4(0.45)
复合猪软骨胶囊(0.29%)	0.5000	51.9	
	0.4838	53.5	
	0.4637	57.4	54.3(2.31)
复合猪软骨胶囊(2.9%)	0.2605	75.0	
	0.5272	75.8	
	0.2656	74.5	75.1(0.54)

由表3的数据和图3的抑制曲线可以看出，本发明的复合猪软骨胶囊可以有效抑制羟基自由基引起红细胞膜的脂质过氧化，其 $IC_{50}=0.115\%$ 。

#### 实施例4

##### 复合猪软骨胶囊对实验小鼠实体瘤生长的抑制作用

癌的发生和发展都有自由基的产生和参与，致癌和促癌作用都与自由基有密切关系。因此，自由基清除剂应对肿瘤有抑制作用。用软骨和天然抗氧化剂科学配制而成的复合猪软骨胶囊对肿瘤的生长具有明显抑制作用。本实验采用H22腹水癌细胞接种于小鼠腋下形成实体瘤。分成两组，每组20只小鼠，一组正常饮食，一组除正常饮食外，每天喂食复合猪软骨胶囊270mg/kg, 7天后将小鼠处死，分离瘤体，称重，列于表8. 由表中数据可以看出，复合猪软骨胶囊可以抑制实体瘤生长37.45%左右。

##### 一、溶液的配制

675g复合猪软骨胶囊（67.5%软骨粉, 13.5%维生素C, 6.0%维生素E, 6%茶多酚,

6. 3%丹参粉0.7%银杏叶提取物) 溶在20ml蒸馏水中, 形成悬浮液。

### 二、H22肿瘤的接种

0.2ml H22腹水癌细胞注射在小鼠腹腔, 培养三天, 将腹水取出, 用生理盐水稀释。将稀释的H22细胞0.2ml接种到40只雄性小鼠(25g左右)腋下。随机将小鼠分为两组, 每组20只, 一组每天灌注0.2ml步骤1配制的复合猪软骨胶囊悬浮液, 另一组灌注0.2ml蒸馏水。

### 三、H22实体瘤的检测

将喂食7天的小鼠处死, 从腋下分离H22实体瘤, 称重。

### 四、结果

1. 对照小鼠组和喂食本实施例配制的复合猪软骨胶囊小鼠腋下实体瘤的重量如表5所示, 其对小鼠接种H22实体瘤生长的抑制作用由下式计算

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组瘤重} - \text{喂食复合猪软骨胶囊小鼠瘤重}}{\text{对照组瘤重}} \times 100\%$$

表4本实施例的复合猪软骨胶囊对H22实体瘤的抑制作用

N	对照(g)	复合猪软骨(g)
1	2.2	2.0
2	2.2	1.8
3	2.0	1.5
4	2.0	1.4
5	2.0	1.4
6	1.8	1.3
7	1.8	1.3
8	1.7	1.2

9	1.6	1.2
10	1.5	1.0
11	1.4	0.9
12	1.4	0.8
13	1.3	0.7
14	1.2	0.6
15	1.2	0.5
16	1.2	0.4
17	1.1	0.4
18	1.1	0.4
19	1.0	0.3
20	1.0	0.3

---

1.55±0.40

0.97±0.50

1.55-0.97

-----×100%=37.5%

1.55

由以上结果可以看出，复合猪软骨胶囊对接种H22肿瘤生长有明显的抑制作用，抑制率为37.5%左右，经统计学处理， $p<0.05$ ，有显著差异。

#### 实施例5

本发明的复合猪软骨胶囊与鲨鱼软骨对实验小鼠实体瘤生长的抑制作用的比较：

为了进一步比较猪复合软骨胶囊和鲨鱼软骨对肿瘤的生长的抑制作用。本实验采用H22腹水癌细胞接种于小鼠腋下形成实体瘤。随机分成四组，每组15只小鼠，一组正常饮食，一组除正常饮食外，每天喂食复合猪软骨胶囊270mg/kg，另外两组分别喂食270mg/kg鲨鱼软骨，7天后将小鼠处死，分离瘤体，称重，列于表5. 由表中



数据可以看出，复合猪软骨胶囊可以抑制实体瘤生长46.5%左右，鲨鱼软骨抑制13.9%左右。

#### 一、溶液的配制

675g复合猪软骨胶囊（67.5%软骨粉，13.5%维生素C，6.0%维生素E，6%茶多酚，6.3%丹参粉0.7银杏叶提取物%）和鲨鱼软骨（美国超健康产品有限公司制备）分别溶在20ml蒸馏水中，形成悬浮液。再提供20ml蒸馏水。

#### 二、H22肿瘤的接种

0.2ml H22腹水癌细胞注射在小鼠腹腔，培养三天，将腹水取出，用生理盐水稀释。将稀释的H22细胞0.2ml接种到45只雄性小鼠(25g左右)腋下。随机将小鼠分为四组，一组每天灌注0.2ml复合猪软骨胶囊悬浮液，一组每天灌注0.2ml鲨鱼软骨悬浮液，另一组灌注0.2ml蒸馏水。

#### 三、H22实体瘤的检测

将喂食7天的小鼠处死，从腋下分离H22实体瘤，称重。

#### 四、结果

1. 对照小鼠和喂食复合猪软骨胶囊和鲨鱼软骨小鼠腋下实体瘤的重量如表5所示。复合猪软骨胶囊和鲨鱼软骨对小鼠接种H22实体瘤生长的抑制作用由下式计算

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组瘤重} - \text{试验小鼠瘤重}}{\text{对照组瘤重}} \times 100\%$$

表5本发明的复合猪软骨胶囊和鲨鱼软骨对H22实体瘤抑制作用的比较

N	对照(g)	复合猪软骨胶囊(g)	美国鲨鱼软骨(g)
1	0.88	0.18	0.30
2	1.04	0.18	0.55
3	0.62	0.60	0.55
4	0.89	0.45	1.57

5	0.68	0.56	0.69
6	0.78	0.25	0.41
7	1.56	0.28	0.32
8	0.64	0.49	0.86
9	0.48	0.60	1.24
10	1.27	1.34	0.71
11	1.02	0.35	0.97
12	0.76	0.49	0.93
13	0.96	0.35	0.68
14	0.68	0.24	0.66
15	0.69	0.56	
<hr/>			
	0.86±0.07	0.460±08	0.740±.12

$$\frac{0.86 - 0.46}{0.86} \times 100\% = 46\%$$

$$\frac{0.86 - 0.74}{0.86} \times 100\% = 13.9\%$$

由以上结果可以看出，复合猪软骨胶囊对接种H22肿瘤生长有明显的抑制作用，抑制率为46%左右。鲨鱼软骨对H22肿瘤也有明显抑制作用，抑制率分别为14%左右，经统计学处理， $p < 0.05$ ，有显著差异。复合猪软骨胶囊抑制肿瘤生长的能力大大超过鲨鱼软骨胶囊。

#### 实施例6

本发明的复合猪软骨胶囊对阿霉素引起小鼠心脏病的保护作用

很多治疗肿瘤的药物都有副作用，阿霉素的副作用就是对心脏的损伤。本发明利用阿霉素建立心脏损伤模型，检验复合猪软骨胶囊对心脏病的保护作用，但是，阿霉素损伤心肌的电镜照片不明显，实验无法判断对心脏病的保护作用。但本发明的复合猪软骨胶囊除含有动物软骨外，还含有多种天然抗氧化剂和治疗心脏病的中药成分，如银杏叶提取物和丹参粉。本发明的复合猪软骨胶囊应当对心脏病具有保护作用。因为实验中发现，阿霉素组，小鼠死亡率为46%，复合猪软骨胶囊组为零。

#### 一、溶液的配制

1. 分别将阿霉素和675g复合猪软骨胶囊（67.5%软骨粉, 13.5%维生素C, 6.0%维生素E, 6%茶多酚, 6.3%丹参粉, 0.7%银杏叶提取物）溶在20ml蒸馏水中，形成悬浮液。

2. 20ml蒸馏水。

#### 二、阿霉素和猪软骨胶囊的注射

随机将30只小鼠分为二组，一组15只每天腹腔注射0.2ml阿霉素，另一组15只除每天注射注射0.2ml阿霉素外，每天灌注0.2ml复合猪软骨胶囊悬浮液。10天以后，实验结果发现，阿霉素组，小鼠死亡率为46%，复合猪软骨胶囊组为零。

#### 实施例7

按600mg/粒计，其配方为占总填充物15%的维生素C和7%的维生素E，余量为主要填充物猪软骨粉，制备方法同实施例1

用每组20小鼠作实验发现，与对照组相比，喂食该胶囊可以抑制接种H22肿瘤生长，而且该胶囊能够清除有害氧自由基，抑制脂质过氧化等作用，还具有抗衰老，抗心血管病功能。经科学实验表明，在Fenton反应体系中，该胶囊可有效清除反应活性最大的羟基自由基，清除该体系产生的羟基自由基的 $Ic_{50}=0.020-25\%$ ；该胶囊可有效清除黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基，在该体系其清除超氧阴离子自由基的 $Ic_{50}=0.0040-0.0045\%$ ；在卵磷脂和红细胞膜体系中，该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成，其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.30-0.35\%$ ；在小鼠接种H22实体瘤实验中，除正常饮食外，每天喂食该胶囊130-270m

g/kg, 连续7天, 与对照组相比可以抑制肿瘤生长20-35%. 因为维生素E是脂溶性的, 可以和维生素C协同抗氧化, 进一步和软骨协同抑制肿瘤生长。可以看出增加了维生素E后, 具有协同增效作用。

#### 实施例8

按实施例7的配方中再添加占总填充物重量12%的茶多酚, 25%维生素C、5%维生素E和余量为动物软骨粉(猪、牛、羊、鲨鱼、鸡、鸭均可), 做成600mg/粒保健胶囊, 制备方法同实施例1

用每组20只小鼠作实验方法同实施例1, 实验表明在Fenton反应体系中, 该胶囊可有效清除反应活性最大的羟基自由基, 清除该体系产生的羟基自由基的 $Ic_{50}=0.025-0.030\%$ ; 该胶囊可有效清除黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基, 在该体系其清除超氧阴离子自由基的 $Ic_{50}=0.0022-0.0030\%$ ; 在卵磷脂和红细胞膜体系中, 该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成, 其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.20\%$ ; 在小鼠接种H22实体瘤实验中, 除正常饮食外, 每天喂食该130-270mg/kg, 连续7天, 与对照组相比可以抑制肿瘤生长35-40%. 因为茶多酚具有脂水双溶性, 可以和维生素E及维生素C协同抗氧化, 可以看出增加了茶多酚后, 协同增效作用更大。

#### 实施例9

按实施例1的方法制做600mg/粒的本发明胶囊, 其配比为: 占总填充物重量30%维生素C, 12%茶多酚, 余量为猪软骨粉;

用每组20只小鼠作实验方法同前, 实验表明在Fenton反应体系中, 该胶囊可有效清除反应活性最大的羟基自由基, 清除该体系产生的羟基自由基的 $Ic_{50}=0.02-0.025\%$ ; 该胶囊可有效清除黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基, 在该体系其清除超氧阴离子自由基的 $Ic_{50}=0.002-0.0025\%$ ; 在卵磷脂和红细胞膜体系中, 该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成, 其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.15-20\%$ ; 在小鼠接种H22实体瘤实验中, 除正常饮食外, 每天喂食该130-270mg/kg, 连续7天, 与对照组相比可以抑制肿瘤生长25-30%. 因为茶多酚具有脂水双溶性, 可以和维生素E及维生素C协同抗氧化, 可以看出增加了茶多酚后, 协同增效作用更大。

#### 实施例10

按实施例1的方法制做600mg/粒的本发明胶囊，其配比为：占总填充物重量5%维生素C，12%维生素E，3%维生素A，0.5%茶多酚，1.5%银杏叶提取物1.5%，和余量为猪软骨粉。

用每组20只小鼠作实验方法同前，实验发现，与对照组相比，喂食该胶囊可以抑制接种H22肿瘤生长，而且该胶囊能够清除有害氧自由基，抑制脂质过氧化等作用，还具有抗衰老，抗心血管病功能。经科学实验表明，在Fenton反应体系中，该胶囊可有效清除反应活性最大的羟基自由基，清除该体系产生的羟基自由基的 $Ic_{50}=0.020-0.025\%$ ；该胶囊可有效清除黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基，在该体系其清除超氧阴离子自由基的 $Ic_{50}=0.0015-0.020\%$ ；在卵磷脂和红细胞膜体系中，该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成，其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.12-0.15\%$ ；在小鼠接种H22实体瘤实验中，除正常饮食外，每天喂食该胶囊130-270mg/kg，连续7天，与对照组相比可以抑制肿瘤生长20-25%。因为银杏叶提取物活性成分也具有抗氧化和抗癌作用，可以看出增加了银杏叶提取物后，与软骨有协同增效作用。

#### 实施例11

按实施例1的方法制做600mg/粒的本发明胶囊，其配比为：占总填充物重量15%维生素C，3%维生素E，6%茶多酚，0.5%银杏叶提取物1.5%，和余量为猪软骨粉。

用每组20只小鼠作实验方法同前，实验表明，在Fenton反应体系中，该胶囊可有效清除反应活性最大的羟基自由基，清除该体系产生的羟基自由基的 $Ic_{50}=0.018-0.020\%$ ；该胶囊可有效清除黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基，在该体系其清除超氧阴离子自由基的 $Ic_{50}=0.0012-0.015\%$ ；在卵磷脂和红细胞膜体系中，该胶囊可以有效抑制细胞膜脂质过氧化产生的最终产物MDA的形成，其抑制MDA的 $Ic_{50}=0.115-0.12\%$ ；在小鼠接种H22实体瘤实验中，除正常饮食外，每天喂食该胶囊130-270mg/kg，连续7天，与对照组相比可以抑制肿瘤生长30-44%。因为银杏叶提取物活性成分也具有抗氧化和抗癌作用，可以看出增加了银杏叶提取物后，协同增效作用进一步增大。

# 说明书附图

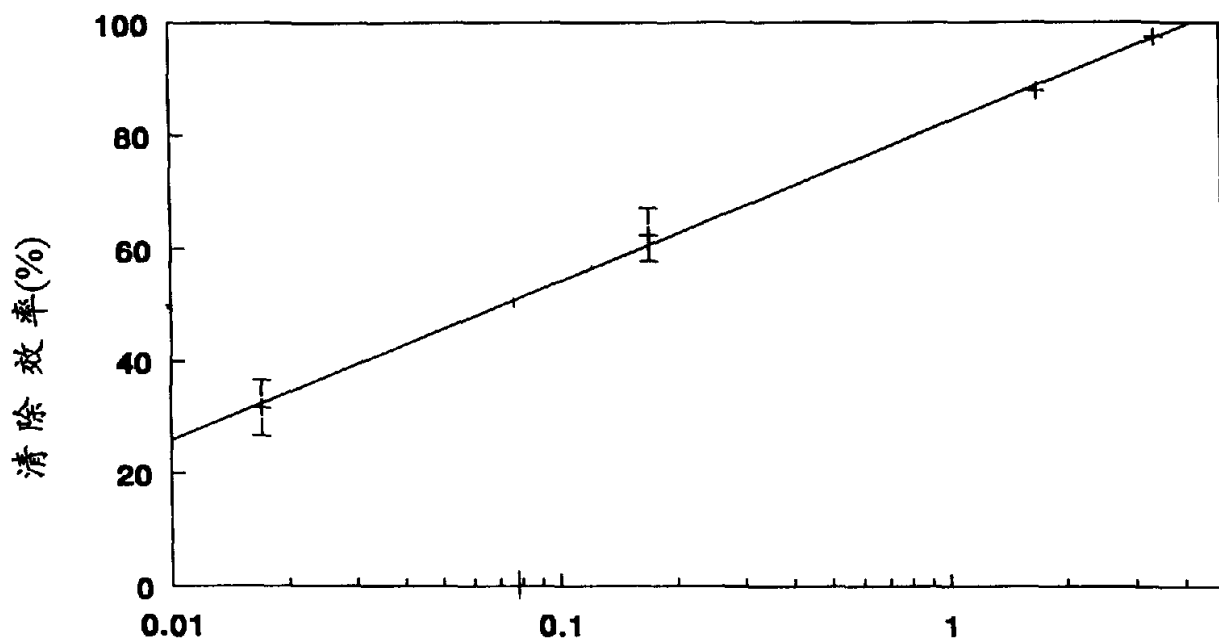


图 1 AAA 浓度 (%)

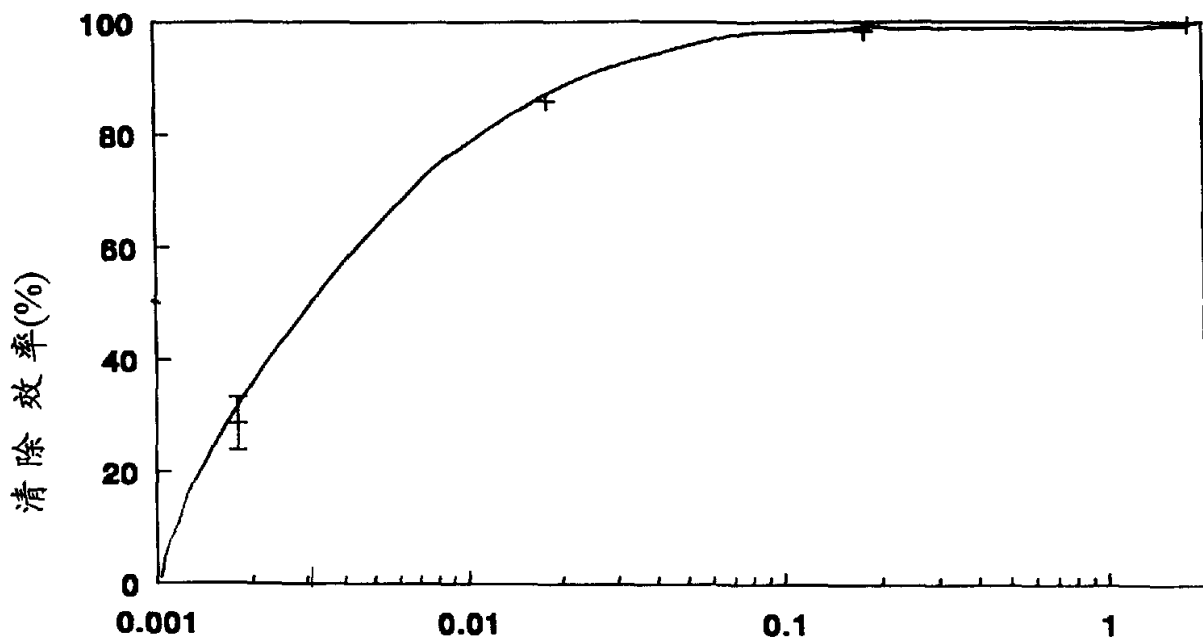


图 2 AAA 浓度 (%)

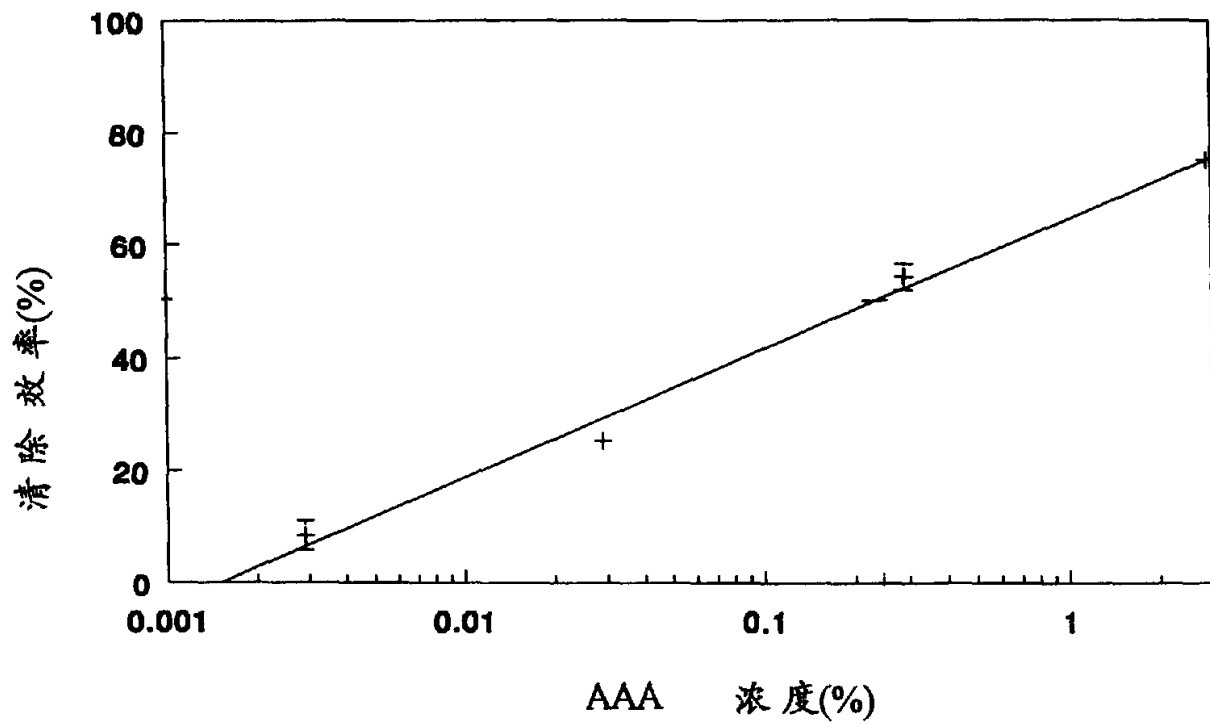


图 3