

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2005年7月28日(28.07.2005)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2005/067950 A1

(51) 国际分类号⁷: A61K 35/78, 31/37, 38/06, A61P 39/02

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/001558

(22) 国际申请日: 2004年12月29日(29.12.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200410013894.4 2004年1月13日(13.01.2004) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国药科大学
(CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省南京市童家巷24号, Jiangsu 210009
(CN)。

(72) 发明人:及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 余伯阳(YU, Boyang) [CN/
CN]; 刘吉华(LIU, Jihua) [CN/CN]; 邱声祥(QIU,
Shengxiang) [CN/CN]; 李星(LI, Xing) [CN/CN]; 中国
江苏省南京市童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。

(74) 代理人: 永新专利商标代理有限公司北京办事处(NTD
PATENT & TRADEMARK AGENCY LTD.,
BEIJING OFFICE); 中国北京市金融大街27号投资
广场A座10层, Beijing 100032 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护):
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护):
ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: KAVA-KAVA EXTRACT FOR REDUCING THE TOXIC AND SIDE EFFECTS AND COMPOSITION
COMPRISING THE SAME AND PREPARATION THEREOF

(54) 发明名称: 降低毒副作用的咔哇提取物及其组合与制备方法

(57) Abstract: A kava-kava (*Piper methysticum* Forster f., Piperaceae, Kava) extract comprising reduced contents of flavokawain, including flavokawain B, having liver injury effects and/or reducing type glutathiones which are added and having flavokawain hepatotoxic antagonistic effects is disclosed, and a pharmaceutical comprising the extract and a food supplement and a healthy food comprising the same are described; the invention also disclosed a preparation for kava-kava extract comprising the following step: the crude kava-kava extract is treated with a macroporous resin, silica gel, alumina, polyamide; or flavokawain B and flavokawain A are removed with a low polarity organic solvent in aqueous alkane solution, the aqueous solution is further adjusted to be acidic with acids and extracted by organic solvents; or reducing type glutathiones capable of antagonising flavokawain hepatotoxic effects are added to the kava-kava extract or preparation so that the content of flavokawain B is less than and equivalent to 1.0% and/or the contents of glutathiones is greater than and equivalent to 1.0% in resulting refined extract.

(57) 摘要

降低有肝损伤作用的黄醇椒素, 主要是黄醇椒素 B 含量和/或加入拮抗黄醇椒素肝毒性作用的还原型谷胱甘肽的咔哇 (*Piper methysticum* Forster f., Piperaceae, Kava) 提取物, 以及包含有该提取物的药物、食品添加剂和保健食品; 其制备方法中用大孔树脂、硅胶、氧化铝、聚酰胺处理咔哇粗提取物; 或者, 在碱水液中, 用低极性有机溶剂除去黄醇椒素 B 和黄醇椒素 A, 再以酸调节水液至酸性后, 用有机溶剂萃取; 或者, 在咔哇提取物或其制剂中加入能拮抗黄醇椒素肝毒性作用的还原型谷胱甘肽, 所得精制咔哇提取物中的黄醇椒素 B 含量 $\leq 1.0\%$ 和/或咔哇提取物中还原型谷胱甘肽含量 $\geq 1.0\%$ 。

WO 2005/067950 A1

降低毒副作用的咔哇提取物及含其组合物与制备方法

技术领域

本发明涉及含有降低有毒副作用成分含量的咔哇提取物和/或加入毒副作用成分拮抗剂的咔哇提取物、其制备方法和包含有该提取物组合物，具体为含有该降低了有毒副作用成分含量、甚至去除了有毒副作用成分的咔哇提取物和/或加入有毒副作用成分拮抗剂的药物、食品添加剂和保健食品。

背景技术

咔哇 (*Piper methysticum* Forster f., Piperaceae, Kava) 为胡椒科植物咔哇 (*Piper methysticum*) 的干燥根。在南太平洋岛国具有 2000 多年的使用历史，传统上咔哇的根被用来制备咔哇茶或直接咀嚼，使人产生放松和愉悦的感觉。近代药理研究表明，咔哇中的主要成分咔哇内酯类化合物具有良好的抗焦虑、抗抑郁和镇静功能并在全世界得到广泛的应用，参见：M. H. Pittler, E. Ernst, J. Clin. Psychopharmacol 20,84(2000)。咔哇内酯类化合物中已有 6 个咔哇吡喃酮经鉴定，其中醉椒素(kawain)、二氢醉椒素 (dihydrokawain)、麻醉椒素 (methysticin)、二氢麻醉椒素 (dihydromethysticin)、甲氧基醉椒素 (yangonin)、去甲氧基醉椒素 (desmethoxyyangonin) 被认为是抗焦虑、抗抑郁和镇静的活性成分。咔哇还含有两个黄色色素：黄醉椒素 A 和 B (flavokawain A 和 B)，一般认为这两种成分使长期食用咔哇者肤色变黄。有药理实验证明黄醉椒素 A 作用于膀胱肿瘤细胞。

咔哇的传统制法是用椰子奶或水提取，在使用中未见明显的毒副作用，动物实验也证明咔哇的水提取物没有肝脏毒性。但是由于水或椰子奶提取的咔哇提取物中的咔哇内酯含量低，不适合现代制剂的需要。目前商业上所使用的咔哇提取物是以乙醇水溶液、丙酮水溶液或氯仿等溶

剂进行提取,制备的咔哇提取物含有 30% 以上的咔哇内酯,一般称为“标准提取物”。HPLC 检测表明,按照美国制备标准提取物的方法提取的咔哇提取物中,黄醉椒素 B 的含量大于 2%。自 1999 年以后,大量文献报道含有该咔哇提取物的药物或保健食品可能引起严重的肝损伤。参见: Center for Food Safety and Applied Nutrition, *Morbidity Mortality Weekly Rep.* **51**, 1065 (2002); M. Blumenthal, *Herbal. Gram.* **47**, 64(1999); A.Denham, M.A.McIntyre, J.Whitehouse, *J. Altern. Complement. Med.* **8**,237(2002)。

发明内容

本发明要解决的技术问题是降低或去除咔哇提取物中对肝有毒副作用的成分,提供基本上不含有毒副作用成分或显著降低有毒副作用成分含量的咔哇提取物;或者,在咔哇提取物中加入能拮抗肝毒性作用成分的解毒物质,提供降低或没有肝毒性作用的咔哇提取物,其含有公认的六种主要咔哇内酯活性成分:去甲氧基醉椒素、甲氧基醉椒素、二氢醉椒素、醉椒素、二氢麻醉椒素和麻醉椒素;其咔哇内酯的总含量(以六种主要咔哇内酯含量计)大于 10%,可达 11-90%。本发明还包括研究纯化咔哇提取物的方法,以及含有所述提取物的组合物,如药物、食品添加剂和保健食品。

为解决上述技术问题,本发明提供如下技术方案。

一种降低或去除毒副作用的咔哇提取物,其中黄醉椒素 B 含量按重量计黄醉椒素 B 含量 $\leq 1.0\%$ 和/或加入的还原型谷胱甘肽含量 $\geq 1.0\%$ 。

在本发明的咔哇提取物中,按提取物的总重量计咔哇内酯的含量 $\geq 10\%$,黄醉椒素 B 的含量为 0-1.0%;咔哇提取物中咔哇内酯含量可以为 11-90%,黄醉椒素 B 含量可以为 0-0.5%。或者,所述咔哇提取物中加入拮抗肝毒性的物质还原型谷胱甘肽,其中按提取物的总重量计咔哇内酯的含量 $\geq 10\%$,而还原型谷胱甘肽的含量 $\geq 1.0\%$ 。

本发明的另一个方面是提供含咔哇提取物的组合物,其中含有前述

的咔哇提取物以及常规药用、食用或保健品用的辅料、赋形剂或载体。

本发明的组合物可以为片剂、颗粒剂、溶液剂或混悬剂的形式，而且还可根据本领域已知的方法制成缓释制剂。

对于片剂、颗粒剂或缓释制剂，其辅料、赋形剂或载体包括但不限于崩解剂如羟丙纤维素，羧甲基淀粉钠，交联聚维酮，交联羧甲基纤维素钠；填充剂如乳糖，微晶纤维素，糊精，淀粉，磷酸钙；粘合剂如：预胶化淀粉，聚维酮，羧甲基纤维素钠，羟丙甲纤维素；润滑剂如滑石粉，硬脂酸镁，微粉硅胶，氢化植物油；润湿剂如十二烷基硫酸钠，吐温 80；骨架材料如羟丙甲纤维素，乙基纤维素等。

对于液体制剂或混悬液，其辅料、赋形剂或载体包括但不限于增溶剂如吐温 80，普流罗尼 F-68，聚氧乙烯氢化蓖麻油等；助悬剂如羧甲基纤维素钠，聚维酮，羟丙甲纤维素等；防腐剂如尼泊金甲酯、乙酯、丙酯和丁酯；pH 调节剂如枸橼酸及枸橼酸盐；磷酸盐等。

根据本发明的再一个方面，其提供一种制备咔哇提取物的方法，其包括如下步骤：

取咔哇原料，用水、含水或不含水的低级醇、含水或不含水的低级酮、含水或不含水的含 4-10 个碳原子的酯类、含水或不含水的氯代低级烷烃或者这些溶剂的混合物提取，提取液除去溶剂，得粗咔哇提取物；低级醇可以是甲醇、乙醇，低级酮可以是丙酮，4-10 个碳原子的酯类可以是乙酸乙酯；用大孔树脂、聚酰胺、硅胶、氧化铝、壳聚糖常规处理粗咔哇提取物；或者，对碱性水液中的粗咔哇提取物，用沸点为 30 至 100℃ 的脂族溶剂和/或脂环族溶剂萃取去除黄醇椒素 B 后；将水相调至酸性，用含 4-10 个碳原子的酯类和/或氯代低级烷烃萃取水相，浓缩萃取液至干，得精制咔哇提取物；

或者，将用沸点为 30 至 100℃ 的脂族溶剂和/或脂环族溶剂提取了黄醇椒素 B 后的咔哇，再用含水或不含水的低级醇、含水或不含水的低级酮、含水或不含水的含 4-10 个碳原子的酯类、含水或不含水的氯代低级烷烃或者这些溶剂的混合物提取，浓缩提取液至干，得降低黄醇椒

素 B 含量的精制咔哇提取物；

或者，将粗咔哇提取物加入小于 50 倍体积的水制备成混悬液，用石油醚、环己烷和/或己烷萃取水相，将萃取后的水相浓缩至干，得降低黄醇椒素 B 含量的精制咔哇提取物；

或者，向粗咔哇提取物或精制咔哇提取物中加入拮抗黄醇椒素毒副作用的还原型谷胱甘肽，使其在咔哇提取物中的含量以重量计 $\geq 1.0\%$ ，最高可为 90%，得降低或去除毒副作用的咔哇提取物。

或者，选择上述方法组合使用。

所述咔哇提取物的制备方法中：脂族溶剂和/或脂环族溶剂是石油醚、环己烷、正己烷和/或汽油；氯代低级烷烃是二氯乙烷、三氯甲烷；大孔树脂为非极性或弱极性大孔树脂；氧化铝为酸性或中性氧化铝；壳聚糖为甲壳素脱乙酰基后的产物；大孔树脂或聚酰胺层析柱的洗脱液选用含水乙醇、含水甲醇和/或含水丙酮；硅胶柱层析的洗脱液先选石油醚、环己烷和/或乙酸乙酯，再选异丙醇、乙酸乙酯、氯代低级烷烃、甲醇或含水甲醇、乙醇或含水乙醇、丙酮或含水丙酮，或者它们的混合物洗脱；碱水液含无机碱和/或有机碱与水；酸水液含无机酸和/或有机酸与水。其中，大孔树脂可以选用 HP20、AB-8、XAD-2、D-101、HP21、SP825、SP850、SP70、SP700、SP207、H107；无机碱可以为碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾和/或磷酸氢二钠，有机碱可以为柠檬酸盐、葡甲胺、泛酸钠、L-半胱氨酸、苯甲酰胺、烟酰胺、硫脲、乙醇胺和/或脲；无机酸为硫酸和/或盐酸；有机酸可以为柠檬酸、醋酸、草酸、马来酸、琥珀酸、富马酸、苹果酸、酒石酸和/或抗坏血酸。

咔哇提取物具体的制备方法是：将粗咔哇提取物上硅胶柱，先用石油醚或环己烷与乙酸乙酯的体积比为 10-20: 1 的混合溶剂洗脱硅胶柱，再用异丙醇、乙酸乙酯、氯代低级烷烃、甲醇或含水甲醇、乙醇或含水乙醇、丙酮或含水丙酮，或者它们的混合物洗脱，回收溶剂至干得降低黄醇椒素 B 含量的精制咔哇提取物。

咔哇提取物具体的制备方法还有：向粗咔哇提取物的水混悬液中，

加入小于混悬液 50 倍体积的甲醇和/或乙醇，形成咔哇提取物溶液后，加入壳聚糖；或者向粗咔哇提取物的水混悬液中加入壳聚糖物溶液；混匀，放置后，离心或过滤去除沉淀物，将清液浓缩干燥，得降低黄醉椒素 B 含量的精制咔哇提取物。

咔哇提取物较好的制备方法是：向粗咔哇提取物的水溶液或水混悬液中加入如上所述的有机碱和/或无机碱，使水溶液或水混悬液呈碱性，混合后，用石油醚、环己烷和/或己烷萃取去除黄醉椒素 B，获得的水相加入无机酸和/或有机酸，使溶液成酸性，混匀后，用乙酸乙酯、氯仿和/或二氯甲烷萃取酸性溶液，回收萃取液至干，得降低黄醉椒素 B 含量的精制咔哇提取物。

咔哇提取物更为理想的制备方法是：将咔哇的水、含水或不含水乙醇、含水或不含水甲醇、含水或不含水丙酮的提取液，除去有机溶剂得到溶液或混悬液，或者用小于咔哇提取物 10 倍体积且与水能混溶的溶剂如甲醇、乙醇、丙酮等溶解粗咔哇提取物形成溶液或混悬液，然后加入小于所述溶液或混悬液 50 倍体积的水制成咔哇提取物的溶液或混悬液，上大孔树脂柱，用含水或不含水的乙醇、含水或不含水的甲醇、含水或不含水的丙酮、氯代烷烃和/或甲醇的混和物、乙酸乙酯和/或石油醚的混合物洗脱，洗脱液浓缩至干，得降低黄醉椒素 B 含量的精制咔哇提取物。

降低或去除毒副作用的咔哇提取物的更便捷的制备方法是：向咔哇的粗提取物或精制咔哇提取物中加入能拮抗黄醉椒素毒副作用的还原型谷胱甘肽，使其在咔哇提取物中的含量 ≥ 1.0 重量%，谷胱甘肽的含量最高可达 90 重量%，得降低或去除肝毒副作用的咔哇提取物。

我们的非常偶然地发现，咔哇提取物中的查尔酮类成分（flavokawin），具体地说主要是黄醉椒素 B，表现出强烈的肝脏毒性作用，是咔哇提取物中的主要毒性成分；还原型谷胱甘肽能拮抗黄醉椒素的肝毒性作用，为此，进行了大量实验研究，相关的结果可参考以下的实施例。

本发明提供的技术方案降低或去除咔哇提取物中对肝有毒副作用的成分，提供基本上不含有毒副作用成分或显著降低有毒副作用成分含量的咔哇提取物；或者，在咔哇的粗提取物或精制提取物中加入能拮抗黄醉椒素肝毒性作用的还原型谷胱甘肽，提供降低或没有毒副作用的咔哇提取物，其含有公认的六种主要咔哇内酯活性成分：去甲氧基醉椒素、甲氧基醉椒素、二氢醉椒素、醉椒素、二氢麻醉椒素和麻醉椒素；其咔哇内酯的总含量大于 10 重量%，可达 11—90 重量%。本发明研究的纯化咔哇提取物的方法简便、实用。

附图说明

图 1 是咔哇丙酮提取物 HPLC 图（箭头所指色谱峰为黄醉椒素 B）。

图 2 是咔哇丙酮提取物经大孔树脂 HP20 精制后，含有降低黄醉椒素 B 含量的咔哇提取物 HPLC 图（箭头所指色谱峰为黄醉椒素 B）。

具体实施方式

在本发明中，术语“低级醇”是指包含 1—10 个碳原子的醇，优选包含 1—6 个碳原子，更优选包含 1—4 个碳原子。其具体的例子包括甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、叔丁醇、正己醇、正辛醇和正癸醇，其中尤其优选的是甲醇和乙醇。

本发明所用的术语“低级酮”是指包含 3—10 个碳原子的酮，例如丙酮、甲基丁基酮等，其中优选是丙酮。

本发明中所用的术语“氯代低级烷烃”是指烷基链中的一个或者多个氢原子被氯原子取代的基团，其中所述烷基链包含 1—10 个碳原子，优选 1—6 个碳原子，更优选为 1—4 个碳原子，且可以是直链或支链的。氯代低级烷烃的具体例子包括氯仿、四氯化碳、二氯甲烷等。

本发明使用的咔哇原料为来源于斐济群岛的咔哇（*Piper methysticum* Forster f., Piperaceae）根粉末（100-200 目），购自美国夏威夷 Kava Kauai 公司（Kava Kauai, PO Box 1202, Kapaa Kauai Hawaii,

96746, USA)。

本发明中咔哇提取物中咔哇内酯的含量测定方法见文献 H. S. Alexander, M. Imre, Journal of Chromatography A, 948, 51(2002)

以下将通过实施例更为详细地描述本发明。但对于本领域技术人员应理解的是, 这些实施例仅是具体的说明本发明, 而绝不是对本发明范围的限制。

实施例 1

取咔哇原料, 粉碎后, 分别用水、60%丙酮(含水 40%)、丙酮、95%乙醇提取, 除去溶剂后, 分别得到咔哇水提取物、咔哇 60%丙酮提取物、咔哇丙酮提取物、咔哇 95%乙醇提取物, 测定其相应的咔哇内酯与黄醉椒素 B 的含量, 测定结果表明丙酮提取物中黄醉椒素 B 的含量最高。具体的结果参见下表。因此, 在以下的制备方法中, 除了咔哇的水提取物外, 均用咔哇丙酮提取物作为粗咔哇提取物的代表。

不同溶剂提取的咔哇提取物中咔哇内酯的总含量以及黄醉椒素 B 的百分含量

提取溶剂	干提取物中的黄醉椒素B(%)	干提取物中的咔哇内酯(%)
水	0.02	4.66
60%丙酮	2.60	47.48
丙酮	3.37	57.00
95%乙醇	3.23	54.88

实施例 2

以大孔树脂层析制备含有降低的黄醉椒素 B 含量的咔哇提取物

取 1 克如实施例 1 中所述制得的咔哇丙酮提取物, 加入 1ml 乙醇溶解, 再加入 10ml 水制成咔哇提取物悬液, 加入柱体积为 50 毫升的 HP20

大孔树脂层析柱，以 200 毫升 35% 的乙醇（体积比）溶液洗脱，将洗脱液浓缩至干，HPLC 法测定，提取物中内酯的总含量为 58.2%，黄酞椒素 B 的含量为 0.04%。从图 1 和图 2 的对比可以看出，在经过本发明的方法处理后，咔哇提取物中的黄酞椒素 B 的含量显著下降。

实施例 3

通过硅胶层析制备降低黄酞椒素 B 的提取物

取 1 克如实施例 1 中所述制得的咔哇丙酮提取物，加入 1ml 乙酸乙酯溶解，加入约 3 克硅胶拌样，挥干有机溶剂，获得硅胶柱层析样品。将层析样品加于柱体积为 50 毫升的硅胶柱顶端，以石油醚与乙酸乙酯的体积比为 10:1 的混合溶剂洗脱硅胶柱。由于黄酞椒素 B 具有黄颜色并且极性比活性成分咔哇内酯小，层析洗脱的第一个黄颜色的色带即为黄酞椒素 B。在层析洗脱第一个黄颜色的色带黄酞椒素 B 后，以 TLC 检测后面的洗脱液中无黄酞椒素 B，以甲醇洗脱层析柱上的其它成分，将甲醇洗脱液浓缩至干，获得降低黄酞椒素 B 含量的咔哇提取物。HPLC 测定，提取物中的内酯总含量为 61.2%，不含有黄酞椒素 B 成分。

实施例 4

通过酸性、中性氧化铝柱层析制备降低黄酞椒素 B 的提取物

取 1 克如实施例 1 中所述制得的咔哇丙酮提取物，加入 1ml 氯仿溶解，分别加入柱体积为 30 毫升的酸性、中性氧化铝干柱顶端。酸性、中性氧化铝层析柱分别以 200 毫升的氯仿：甲醇体积比为 2:1 混合溶剂洗脱，TLC 辅助检测。洗脱液浓缩至干，获得降低黄酞椒素 B 含量的咔哇提取物。HPLC 法测定，提取物中咔哇内酯的总含量为 38.2%，黄酞椒素 B 的含量为 0.3%。

实施例 5

通过壳聚糖处理获得降低黄酞椒素 B 的咔哇提取物

取 1 克如实施例 1 中所述制得的咔哇丙酮提取物，以 50 毫升 40% 的乙醇溶解，向此溶液中加入壳聚糖使壳聚糖的在总体积中的浓度为 1%，充分搅拌溶解，在室温下静置 60 分钟，离心去除沉淀物，离心所得清液浓缩至干，获得降低黄醇椒素 B 含量的咔哇提取物。HPLC 法测定，提取物中咔哇内酯的总含量为 46%，黄醇椒素 B 的含量为 0.1%。

实施例 6

通过酸碱处理的降低黄醇椒素 B 的提取物的制备方法

取 1 克如实施例 1 中所述制得的咔哇丙酮提取物，加入 1ml 乙醇溶解，加入 50 毫升水制成咔哇提取物的混悬液，向咔哇提取物悬液中加入碳酸钠，搅拌溶解，使咔哇提取物悬液的 pH 值为 9，充分混匀，30 分钟后用 50 毫升环己烷萃取三次。获得的水相以盐酸调节酸碱性，使溶液的 pH 值为 2，充分混匀，静置 2 小时后用 50 毫升乙酸乙酯萃取三次，合并萃取的乙酸乙酯并回收溶剂至干，获得降低黄醇椒素 B 含量的咔哇提取物。HPLC 法测定，提取物中咔哇内酯的总含量为 41%，黄醇椒素 B 的含量为 0.05%。

实施例 7

通过环己烷萃取处理获得降低黄醇椒素 B 含量的提取物

取 3 克经粉碎的咔哇根，加入 30 毫升 60% 的丙酮溶液，浸泡 30 分钟，然后再超声提取 60 分钟，离心去除药渣，去除药渣的上清液减压回收去除丙酮，剩下的咔哇提取液以 45 毫升的环己烷萃取三次（每次 15 毫升），将经过环己烷萃取后的水相部分浓缩至干，获得降低黄醇椒素 B 含量的咔哇提取物。HPLC 法测定，提取物中咔哇内酯的总含量为 32.5%，黄醇椒素 B 的含量为 0.2%。

实施例 8

以大孔树脂 AB-8 处理制备含有降低的黄醇椒素 B 含量的咔哇提取物

取 1 克如实施例 1 中所述制得的咔哇丙酮提取物, 加入 1ml 乙醇溶解, 再加入 4ml 水制成咔哇提取物悬液, 加入柱体积为 30 毫升的 AB-8 大孔树脂层析柱, 先用 50 毫升的水洗脱, 然后用 150 毫升体积比为 80 % 的乙醇溶液洗脱, 将乙醇洗脱液浓缩至干, HPLC 法测定, 提取物中内酯的总含量为 58.5 %, 黄醉椒素 B 的含量为 0.05 %。

实施例 9

以大孔树脂层析制备含有降低的黄醉椒素 B 含量、提高咔哇内酯含量的咔哇提取物

取 1 克如实施例 1 中所述制得的咔哇水提取物, 加入 1ml 乙醇溶解, 再加入 10ml 水制成咔哇提取物悬液, 加入柱体积为 50 毫升的 HP20 大孔树脂层析柱, 以 200 毫升 35 % 的乙醇 (体积比) 溶液洗脱, 将洗脱液浓缩至干, HPLC 法测定, 提取物中内酯的总含量为 48.2 %, 不含黄醉椒素 B 成分。

实施例 10

A: 黄醉椒素 B 对正常人肝细胞株 L02 的细胞毒性作用

L02 细胞株用含有 10 % 小牛血清的 RPM1640 培养基培养, 以 1×10^5 细胞浓度接入 96 孔细胞培养板, 每孔接种 $100 \mu\text{l}$, 于二氧化碳培养箱培养 24 小时后, 弃去培养液, 加入含有不同浓度黄醉椒素 B 的培养基, 继续培养 48 小时, 以 MTT 法 (参见: T. Mossman, *J. Immunol.* **65**, 55(1983); A. P. Li *et al.*, *Chem. Biol. Interact.* **121**, 117(1999)) 测定细胞存活率。结果表明黄醉椒素 B 对 L02 细胞有显著的细胞毒性, 其 IC_{50} 为 $9.2 \mu\text{g/ml}$ 。

B: 黄醉椒素 B 对 ICR 小鼠的肝脏毒性作用

选用 18-20 克雄性 ICR 小鼠, 随机分组, 每组 6 只。将动物保持在标准化的环境下, 自由进食和饮水。黄醉椒素 B 以 0.5 % 羧甲基纤维素

钠悬浮, 实验组小鼠以 25mg/kg 的剂量灌胃给药 7 天, 对照组平行给以 0.5% 羧甲基纤维素钠。7 天后小鼠取血, 测定血清谷草转氨酶活性, 结果显示, 实验组小鼠血清谷草转氨酶活性显著高于对照组。

取小鼠肝脏进行病理切片, 常规染色, 显微镜观擦, 结果显示, 所有对照组小鼠的肝脏细胞正常, 所有实验组小鼠 (黄酞椒素 B 25mg/kg) 的肝脏汇管区浸润, 有大量炎症细胞, 肝细胞浊肿, 空泡化, 与文献报道服用含有咔哇提取物导致肝损伤的临床病例肝脏病理切片现象一致 (参见: J. G. Paul, J. C. Nathan, L. H. Richard, C. Peter, W. A. Peter. *Med. J. Aust.* **178**, 442(2003))。

C: 还原型谷胱甘肽对黄酞椒素 B 和咔哇丙酮提取物干细胞毒性的拮抗作用

L02 细胞株用含有 10% 小牛血清的 RPM1640 培养基培养, 以 1×10^5 细胞浓度接入 96 孔细胞培养板, 每孔接种 $100 \mu\text{l}$, 于二氧化碳培养箱培养 24 小时后, 弃去培养液, 加入含有 $500.00 \mu\text{g/ml}$ 的还原型谷胱甘肽和不同浓度黄酞椒素 B 的培养基; 或者加入含有 $500.00 \mu\text{g/ml}$ 的还原型谷胱甘肽和不同浓度咔哇丙酮提取物的培养基, 继续培养 48 小时, 以 MTT 法 (参见: T. Mossman, *J. Immunol.* **65**, 55(1983); A. P. Li *et al.*, *Chem. Biol. Interact.* **121**, 117(1999)) 测定细胞存活率。结果表明还原型谷胱甘肽能显著拮抗黄酞椒素 B 和咔哇丙酮提取物对正常人肝细胞 L02 细胞毒性。在含有 $500.00 \mu\text{g/ml}$ 还原型谷胱甘肽 (GSH) 的培养基中, 黄酞椒素 B 的 IC_{50} 大于 $200 \mu\text{g/ml}$, 咔哇丙酮提取物的 IC_{50} 大于 $500 \mu\text{g/ml}$, 由此说明还原型谷胱甘肽可以大大降低黄酞椒素 B 和咔哇丙酮提取物的毒性。

权利要求书

1、一种降低毒副作用的咔哇（*Piper methysticum* Forster f. , Piperaceae, Kava）提取物，其中按该提取物的重量计黄醇椒素 B 的含量 $\leq 1.0\%$ ，和/或该提取物含有 $\geq 1.0\%$ 、最高含量可达 90%的还原型谷胱甘肽。

2、如权利要求 1 所述的咔哇提取物，其中按该咔哇提取物的重量计咔哇内酯的含量 $\geq 10\%$ 、优选为 11—90%，黄醇椒素 B 的含量为 0—1.0%、优选为 0—0.5%。

3、含咔哇提取物的组合物，其含有如权利要求 1 或 2 所述的咔哇提取物以及常规药用、食用或保健品用的载体。

4、制备如权利要求 1 或 2 所述的咔哇提取物的方法，其包括如下步骤：

取咔哇原料，用水、含水或不含水的低级醇、含水或不含水的低级酮、含水或不含水的含 4-10 个碳原子的酯类、含水或不含水的氯代低级烷烃或者这些溶剂的混合物提取，提取液除去溶剂，得粗咔哇提取物；

用大孔树脂、聚酰胺、硅胶、氧化铝、壳聚糖处理粗咔哇提取物；

或者，对碱性水液中的粗咔哇提取物，用沸点为 30 至 100℃的脂族溶剂和/或脂环族溶剂萃取去除黄醇椒素 B 后；将水相调至酸性，用含 4-10 个碳原子的酯类和/或氯代低级烷烃萃取水相，浓缩萃取液至干，得精制咔哇提取物；

或者，将用沸点为 30 至 100℃的脂族溶剂和/或脂环族溶剂提取了黄醇椒素 B 后的咔哇，再用含水或不含水的低级醇、含水或不含水的低级酮、含水或不含水的含 4-10 个碳原子的酯类、含水或不含水的氯代低级烷烃或者这些溶剂的混合物提取，浓缩提取液至干，得降低黄醇椒

素 B 含量的精制咔哇提取物；

或者，将粗咔哇提取物加入小于 100 倍体积的水制成咔哇提取物的溶液或混悬液，用石油醚、环己烷和/或己烷萃取水相，将萃取后的水相浓缩至干，得降低黄醇椒素 B 含量的精制咔哇提取物；

或者，向粗咔哇提取物或精制咔哇提取物中加入能拮抗黄醇椒素毒副作用的还原型谷胱甘肽，得降低或去除毒副作用的咔哇提取物，

或者，选择上述方法组合使用。

5、如权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于：

低级醇是甲醇、乙醇；低级酮是丙酮；4-10 个碳原子的酯类是乙酸乙酯；脂族溶剂和/或脂环族溶剂是石油醚、环己烷、正己烷和/或汽油；氯代低级烷烃是二氯乙烷、三氯甲烷；大孔树脂为非极性或弱极性大孔树脂；氧化铝为酸性或中性氧化铝；壳聚糖为甲壳素脱乙酰基后的产物；大孔树脂或聚酰胺层析柱的洗脱液选用含水乙醇、含水甲醇和/或含水丙酮；硅胶柱层析的洗脱液先选用石油醚、环己烷和/或乙酸乙酯，再用异丙醇、乙酸乙酯、氯代低级烷烃、甲醇或含水甲醇、乙醇或含水乙醇、丙酮或含水丙酮，或者它们的混合物洗脱；碱水液含无机碱和/或有机碱与水；酸水液含无机酸和/或有机酸与水。

6、如权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于：

大孔树脂选用 HP20、AB-8、XAD-2、D-101、HP21、SP825、SP850、SP70、SP700、SP207、H107；无机碱为碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾和/或磷酸氢二钠，有机碱为柠檬酸盐、葡甲胺、泛酸钠、L-半胱氨酸、苯甲酰胺、烟酰胺、硫脲、乙醇胺和/或脲；无机酸为硫酸和/或盐酸；有机酸为柠檬酸、醋酸、草酸、马来酸、琥珀酸、富马酸、苹果酸、酒石酸和/或抗坏血酸。

7、如权利要求 4 所述的制备方法，其包括如下步骤：

将粗咔哇提取物上硅胶柱，先用石油醚或环己烷与乙酸乙酯的体积比为 10-20: 1 的混合溶剂洗脱硅胶柱，再用异丙醇、乙酸乙酯、氯代低级烷烃、甲醇或含水甲醇、乙醇或含水乙醇、丙酮或含水丙酮，或者它们的混合物洗脱，回收溶剂至干得降低黄醉椒素 B 含量的精制咔哇提取物。

8、如权利要求 4 所述的制备方法，其包括如下步骤：

向粗咔哇提取物的水混悬液中加入小于 10 倍混悬液体积的甲醇和/或乙醇，形成咔哇提取物溶液后，加入壳聚糖；或者向粗咔哇提取物的水混悬液中加入壳聚糖物溶液；混匀，放置后，离心或过滤去除沉淀物，将清液浓缩干燥，得降低黄醉椒素 B 含量的精制咔哇提取物。

9、如权利要求 4 所述的制备方法，其包括如下步骤：

向粗咔哇提取物的水溶液或水混悬液中加入有机碱和/或无机碱，使水溶液或水混悬液呈碱性，混合后，用石油醚、环己烷和/或己烷萃取去除黄醉椒素 B，获得的水相加入无机酸和/或有机酸，使溶液成酸性，混匀后，用乙酸乙酯、氯仿和/或二氯甲烷萃取酸性溶液，回收萃取液至干，得降低黄醉椒素 B 含量的精制咔哇提取物。

10、如权利要求 4 所述的制备方法，其包括如下步骤：

将咔哇的水、含水或不含水乙醇、含水或不含水甲醇、含水或不含水丙酮的提取液，除去有机溶剂得到的溶液或混悬液，或者用小于 10 倍咔哇溶液或混悬液体积的能与水混溶的溶剂如甲醇、乙醇、丙酮等溶解粗咔哇提取物，然后加入小于混悬液 100 倍体积的水制成咔哇提取物的溶液或混悬液，上大孔树脂柱，用含水或不含水的乙醇、含水或不含水的甲醇、含水或不含水的丙酮、氯代烷烃和/或甲醇的混和物、乙酸乙酯和/或石油醚的混合物洗脱，洗脱液浓缩至干，得降低黄醉椒素 B 含量的精制咔哇提取物。

1 / 1

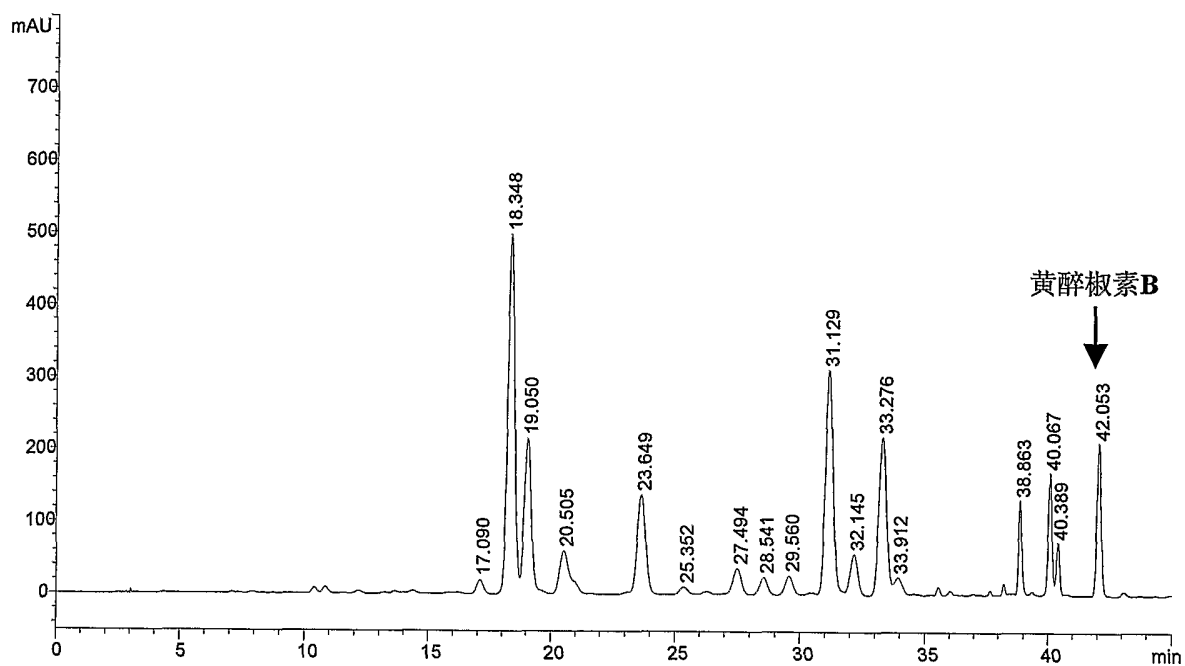


图 1

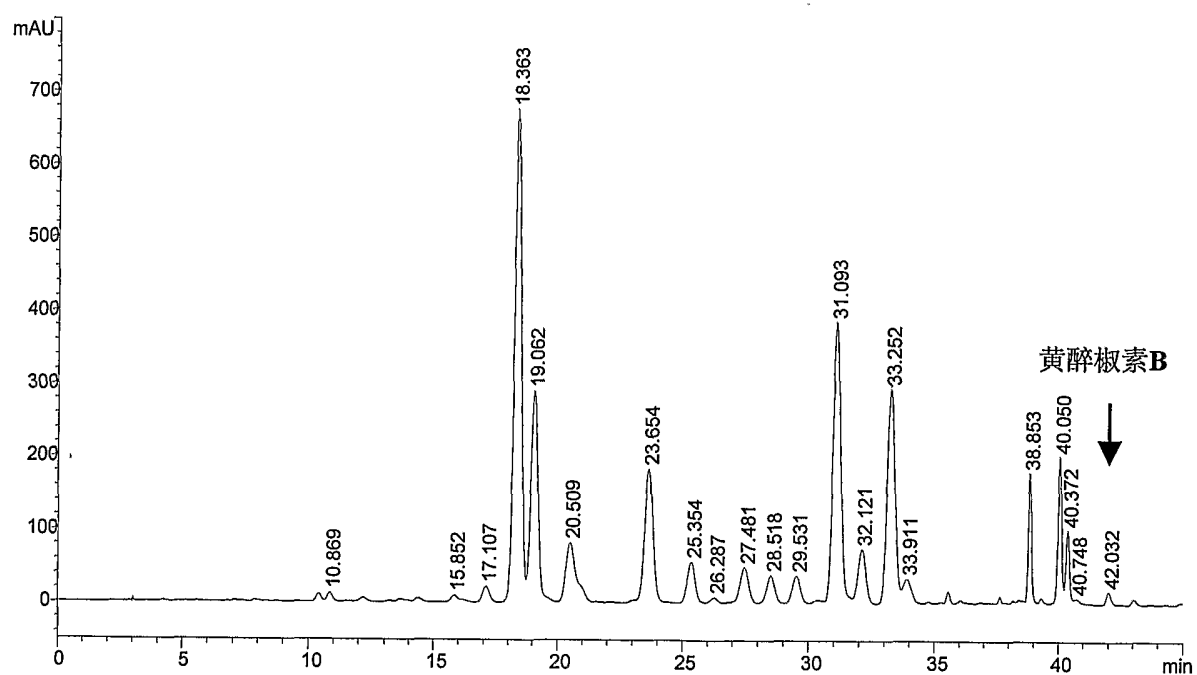


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 2004/001558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC (7): A61K35/78 31/37, 38/06, A61P39/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC (7): A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese Patent Application Published Or Announced Since 1985 And Chinese Non-Patent Documents

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS EPODOC WPI PAJ FTR2000 CNKI (Piper methysticum flavokawain glutathion(e) detoxication hepatoxic)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	US A 2004029831 ((KAVA-N) KAVA PGARM INC) 12.02.2004, abstract	1-10
X	US B 6537592 (Kava Pharmaceuticals, Inc.) 25.03.2003, column 8, 26-32	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17.Mar.2005 (17.03.2005)

Date of mailing of the international search report

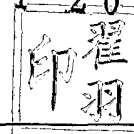
21 · APR 2005 (21 · 04 · 2005)

Name and mailing address of the ISA/
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

ZhaiYu

Telephone No. 86-10-62085330



国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/001558

A. 主题的分类

IPC (7) : A61K35/78, 31/37, 38/06, A61P39/02

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC (7) : A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

从 1985 年以来中国专利局公布的专利申请或公告的专利以及中国出版的非专利文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS EPODOC WPI PAJ FTR2000 CNPAT CNKI (卡哇 黄醉椒素 谷胱甘肽 解毒 肝毒

Piper methysticum flavokawain glutathion(e) detoxication hepatotoxic)

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	US A 2004029831 ((KAVA-N) KAVA PGARM INC) 12 2 月 2004(12.02.04)	1-10
X	摘要 US B 6537592 (Kava Pharmaceuticals, Inc.) 25.3 月 2003(25.03.2003) 第 8 栏, 26-32	1

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

17.3 月 2005 (17.03.05)

国际检索报告邮寄日期

21.4 月 2005 (21.04.2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

翟羽



电话号码: (86-10)60285330