



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1893963 B

(45) 授权公告日 2010.09.29

(21) 申请号 200480037757.2

A61P 15/12(2006.01)

(22) 申请日 2004.12.15

A61P 19/10(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 5/24(2006.01)

03447290.2 2003.12.16 EP

A61P 9/10(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2006.06.16

CN 1541262 A, 2004.10.27, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

姜廷福

PCT/BE2004/000176 2004.12.15

师彦平

(87) PCT申请的公布数据

W02005/058336 EN 2005.06.30

. 天然产物黄酮类化合物的高效液相色谱分析. 分析测试技术与仪器 8 4. 2002, 8(4), 199-207.

(73) 专利权人 麦珍尼克斯比利时有限公司

地址 比利时奥斯坦德

王凤强. 8- 异戊烯基柚皮素的分离及其构效关系研究. 国外医药. 植物药分册 5. 1999, (5), 211.

(72) 发明人 F·梅斯 D·德科伊克雷

A·海伊瑞克

审查员 韩宁

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 唐晓峰

(51) Int. Cl.

A61K 36/60(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

具有雌激素和抗增殖活性的啤酒花提取物的生产方法

(57) 摘要

本发明涉及制备富含 8- 异戊烯基柚皮素高于 6- 异戊烯基柚皮素的啤酒花提取物的方法, 该方法包含使啤酒花产物进行 (1) 在作为溶剂的水和一定量的碱的存在下进行异构化反应, 和 (2) 至少一种提取的步骤。用这种方法, 得到提取的啤酒花提取物, 其包含的 6- 异戊烯基柚皮素和 8- 异戊烯基柚皮素的比例 (8- 异戊烯基柚皮素 x 100%) / (8- 异戊烯基柚皮素 + 6- 异戊烯基柚皮素) 为至少 50%。所述提取物优选还包含黄腐酚, 黄腐酚与 8- 异戊烯基柚皮素的重量比为至少 10。

1. 制备相对于 6- 异戊烯基柚皮素富含 8- 异戊烯基柚皮素的啤酒花提取物的方法, 其特征在于该方法包括对啤酒花或啤酒花产物进行 (1) 在作为溶剂的水和一定量的碱的存在下进行异构化反应, 和 (2) 至少一种提取的步骤。

2. 权利要求 1 的方法, 其特征在于异构化反应是在碱性条件下进行的, 所述碱性条件相当于 KOH 的 w/v% 浓度为至少 0.1。

3. 权利要求 2 的方法, 其特征在于异构化反应是在碱性条件下进行的, 所述碱性条件相当于 KOH 的 w/v% 浓度为至少 0.5。

4. 权利要求 3 的方法, 其特征在于异构化反应是在碱性条件下进行的, 所述碱性条件相当于 KOH 的 w/v% 浓度为至少 5。

5. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 在啤酒花或啤酒花产物进行至少一种提取和异构化反应之前, 在存在液体或超临界 CO<sub>2</sub> 或至少一种实质上非极性有机溶剂下进行提取啤酒花或啤酒花产物, 接着回收包含富含异戊烯化的类黄酮类的提取物的残余物。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其特征在于该方法进一步包括将一定量的通过至少一种提取和异构化反应得到的啤酒花提取物与一定量的富含黄腐酚的啤酒花提取物混合。

7. 根据权利要求 6 的方法, 其特征在于异构化反应和至少一种提取是连续的, 直到得到包含至少 0.15wt. % 的 8- 异戊烯基柚皮素和至少 3wt. % 的黄腐酚的提取物。

8. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于异构化反应和至少一种提取是连续的, 直到得到包含黄腐酚 /8- 异戊烯基柚皮素比例为至少 10 的提取物。

9. 根据权利要求 8 的方法, 其特征在于异构化反应和至少一种提取是连续的, 直到得到包含黄腐酚 /8- 异戊烯基柚皮素比例为至少 30 的提取物。

10. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于异构化反应和至少一种提取是连续的, 直到得到包含 6- 异戊烯基柚皮素和 8- 异戊烯基柚皮素比例 (8- 异戊烯基柚皮素 x100%) / (8- 异戊烯基柚皮素 +6- 异戊烯基柚皮素) 为至少 50% 的提取物。

11. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于至少一种提取用至少一种选自醇、水基醇、酮类、水基酮类或酯类或其混合物的有机溶剂或碱水进行。

12. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于异构化反应是在反应混合物的凝固点和沸点温度间进行的。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其特征在于异构化反应是在室温至 60°C 之间进行的。

14. 根据权利要求 13 的方法, 其特征在于异构化反应是在约为室温的温度下进行的。

15. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于异构化反应是在惰性大气下进行的。

16. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于异构化反应进行的时间段为 0.25 至 4 小时。

17. 根据权利要求 10 的方法, 其特征在于该方法进一步包括混合一定量的从至少一种提取和异构化反应得到的富含啤酒花提取物与一定量的富含 8- 烷基柚皮素的啤酒花提取物的步骤。

18. 根据权利要求 17 的方法, 其中所述 8- 烷基柚皮素为 8- 异戊基柚皮素。

19. 根据权利要求 18 的方法, 其特征在于富含 8- 异戊基柚皮素的啤酒花提取物是通过包括下述步骤的方法得到的:

(a) 使富含黄腐酚的啤酒花提取物进行异构化反应, 将黄腐酚转化成异黄腐酚;

(b) 使步骤 (a) 中得到的提取物进行催化氢化反应, 将异黄腐酚转化为二氢异黄腐酚;

(c) 使步骤 (b) 中得到的提取物进行脱甲基反应,将二氢异黄腐酚转化成 8- 异戊基柚皮素。

20. 根据权利要求 19 的方法,其特征在于步骤 (a) 中的异构化反应是在碱性条件下进行的。

21. 根据权利要求 17 的方法,其特征在于富含 8- 烷基柚皮素的啤酒花提取物是通过加入一定量的合成的 8- 烷基柚皮素得到的。

22. 根据权利要求 21 的方法,其特征在于富含 8- 烷基柚皮素的啤酒花提取物是通过加入一定量的合成的 8- 异戊基柚皮素得到的。

23. 啤酒花提取物,包含 8- 异戊烯基柚皮素和 6- 异戊烯基柚皮素的混合物,其中  $(8\text{- 异戊烯基柚皮素} \times 100\%) / (8\text{- 异戊烯基柚皮素} + 6\text{- 异戊烯基柚皮素})$  的比例为至少 50%。

24. 如权利要求 24 的啤酒花提取物,包含 8- 异戊烯基柚皮素和 6- 异戊烯基柚皮素的混合物,其中  $(8\text{- 异戊烯基柚皮素} \times 100\%) / (8\text{- 异戊烯基柚皮素} + 6\text{- 异戊烯基柚皮素})$  的比例为至少 60%。

25. 如权利要求 23 所述的啤酒花提取物,其特征在于提取物包含黄腐酚和 8- 异戊烯基柚皮素的混合物,黄腐酚与 8- 异戊烯基柚皮素的重量比为至少 10。

26. 如权利要求 25 所述的啤酒花提取物,其特征在于啤酒花提取物包含至少 0.15% w/w 的 8- 异戊烯基柚皮素和至少 3% w/w 的黄腐酚。

27. 如权利要求 26 所述的啤酒花提取物,其特征在于啤酒花提取物包含至少 0.33% w/w 的 8- 异戊烯基柚皮素和至少 10% w/w 的黄腐酚。

28. 如权利要求 23-27 中任一项所述的啤酒花提取物,其特征在于啤酒花提取物还包含异黄腐酚。

29. 如权利要求 23 所述的啤酒花提取物,其特征在于啤酒花提取物还包含一定量的 8- 烷基柚皮素。

30. 如权利要求 29 所述的啤酒花提取物,其特征在于啤酒花提取物还包含一定量的 8- 异戊基柚皮素。

31. 根据权利要求 23-30 中任一项的啤酒花提取物或用权利要求 1-22 中任一项的方法获得的啤酒花提取物在制备药物或植物药的用途,其中 8- 异戊烯基柚皮素的雌激素活性引起的可能的增殖活性被黄腐酚的抗增殖活性抑制。

32. 根据权利要求 23-30 中任一项的啤酒花提取物用权利要求 1-22 中任一项的方法获得的啤酒花提取物用于制备治疗或预防任意雌激素性质的病症、症状、主诉或平衡中的药物或植物药的用途。

33. 如权利要求 32 所述的用途,其中所述的由雌激素性质激素平衡失调引起的病症、症状、主诉或疾病态是绝经。

34. 如权利要求 32 中所述的啤酒花提取物的用途,其中所述的疾病态为骨质疏松症。

35. 如权利要求 32 中所述的啤酒花提取物的用途,其中所述的疾病态选自性激素依赖性癌症、心血管疾病、前列腺功能障碍、结肠癌。

36. 营养组合物/补品,包含一定量的根据权利要求 23-30 的任一项的啤酒花提取物或一定量的用权利要求 1-22 中任一项的方法得到的啤酒花提取物。

37. 化妆品组合物,包含一定量的根据权利要求 23-30 的任一项的啤酒花提取物或一定量的用权利要求 1-22 中任一项的方法得到的啤酒花提取物。

## 具有雌激素和抗增殖活性的啤酒花提取物的生产方法

[0001] 根据第一个权利要求的前序部分,本发明涉及制备就 6- 异戊烯基柚皮素而言富含 8- 异戊烯基柚皮素 (prenylnaringenin) 的啤酒花提取物的方法。

[0002] 啤酒花包含三种主要类型的次级代谢产物,即啤酒花(苦味)酸类、啤酒花精油和啤酒花多元酚类。啤酒花酸类和啤酒花精油和一定量的低分子量的多元酚类是用于啤酒酿造目的的最主要的啤酒花成分。为了得到包含想要比例的上述的次级代谢产物,用于酿酒目的的啤酒花提取物通常由用液体或超临界 CO<sub>2</sub> 提取啤酒花或啤酒花产物来制备。

[0003] 最近,重要的研究集中于异戊烯化的类黄酮类的生物活性上,其由特定类型的多元酚类构成。存在于新鲜啤酒花中的最重要的异戊烯化的类黄酮类为查耳酮类,尤其是黄腐酚和脱甲基黄腐酚。这些查耳酮类是黄烷酮类的前体,例如异黄腐酚(来自黄腐酚)、8- 异戊烯基柚皮素和 6- 异戊烯基柚皮素(这两者都来自脱甲基黄腐酚)(参见图 1)。已经证实 8- 异戊烯基柚皮素是啤酒花的雌激素活性的主要成分,具有高于其它确定的植物雌激素活性(Milligan et al.,1999)。发现除了 8- 异戊烯基柚皮素,其它类似的源自啤酒花的化合物例如 6- 异戊烯基柚皮素、异黄腐酚、6,8- 二异戊烯基柚皮素和 8- 香叶基柚皮素(geranyl naringenin)(Milligan et al.,2000) 仅仅具有弱雌激素性。体内试验证实了 8- 异戊烯基柚皮素的高雌激素活性(Milligan et al.,2002)。

[0004] 另一方面,体外已经表明黄腐酚是非常有效力的化学预防癌症的化合物,另外,黄腐酚在癌发生的初始、增长和进展期具有广谱抑制作用(Gerhauser et al.,2002)。与抗 anti-initiating 能力一致,黄腐酚有有效地调节参与致癌物代谢和解毒的酶的活性,所述酶例如 CYP450- 酶类(Henderson et al.,2000;Miranda et al.,2000c) 和醌还原酶(Miranda et al.,2000a)。而且,已经发现黄腐酚能清除包括羟基和过氧自由基类的活性氧(Miranda et al.,2000b;Rodriguez et al.,2001),并抑制超氧阴离子自由基和一氧化氮产物(Zhao et al.,2003)。由于可能的抗肿瘤促进活性,证实黄腐酚通过抑制环氧合酶 -1 和环氧合酶 -2 活性而具有抗炎活性(Gerhauser et al.,2002)。在进展期(progression phase)中防止癌发生的抗增殖机理包括抑制 DNA 合成和诱导细胞周期停滞在 S- 期、细胞凋亡和诱导细胞分化(Miranda et al.,1999;Gerhauser et al.,2002)。而且,证实黄腐酚以纳摩尔(nanomolar)浓度就可预防小鼠乳腺器官培养物中致癌物诱导的肿瘤发生前损害,该模型可作体外短期和体内长期癌发生模型的连接(link)用(Gerhauser et al.,2002)。

[0005] 上述描述的类黄酮类是在啤酒酿造中的非必需产品。在用液体或超临界流体 CO<sub>2</sub> 提取想要的化合物后,他们大量存在于剩余的残余物中。在其中使用整个啤酒花、啤酒花产物或具体的啤酒花成分的正常酿造条件下,异戊烯化的类黄酮类的总浓度可以达到 4mg 每升啤酒(Stevens et al.,1999)。

[0006] 在 DE199 39 350 中,公开了制备富含黄腐酚的啤酒花提取物的方法,根据该方法,用有机溶剂或碱水提取啤酒花产物。在这种提取之前,可以用水提取啤酒花产物除去亲水性物质。其公开了水/醇溶液可作为适宜的有机溶剂。然而,在啤酒花的提取物中,根本没有提到有关异戊烯化的黄烷酮类的存在。

[0007] 根据 W003014287,啤酒花提取物的雌激素活性必须主要地归于 8- 异戊烯基柚皮

素的存在,已经发现其是表现出最主要的雌激素活性的化合物。据报道,6-异戊烯基柚皮素也表现出雌激素活性,尽管其低于8-异戊烯基柚皮素,黄腐酚可干扰细胞代谢,可被认为是预防癌症的药剂。在W003014287中公开的啤酒花提取物适宜用于预防或治疗由雌激素缺乏或性甾体激素尤其是雌激素代谢紊乱引起的疾病态。

[0008] W003014287也公开了制备啤酒花提取物的方法,该啤酒花提取物富含查耳酮类和黄烷酮类,例如黄腐酚、异黄腐酚、6-异戊烯基柚皮素和8-异戊烯基柚皮素。该方法包括步骤:

[0009] (1)用C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>链烷或超临界CO<sub>2</sub>提取啤酒花或啤酒花产物,用于除去包含在啤酒花中的疏水性物质,

[0010] (2)用水提取在步骤(1)中得到的残余物,以便除去包含在啤酒花中的亲水性物质,和最后

[0011] (3)用选自乙醇、水基乙醇、酮类、水基酮类或酯类或其混合物的有机溶剂提取步骤(2)中得到的残余物。

[0012] 已经发现,在步骤(2)的水提取过程中,提高温度可增加在这样得到的啤酒花提取物中的异黄腐酚、6-异戊烯基柚皮素和8-异戊烯基柚皮素的浓度。然而,在所有的实施例中,8-PN/(8-PN+6PN)的重量比在18%-25%范围内。

[0013] 据报道,在W002/085393中公开的啤酒花提取物包含至少3wt.%的异戊烯化的类黄酮类,尤其是黄腐酚、异黄腐酚和8-异戊烯基柚皮素。然而,当与常规的、没有富含的提取物相比,W002/085393的主要提取物并没有表现出增强的雌激素活性。因而,表明提取物组合物和雌激素活性之间不相关。而且,雌激素性不应归于8-异戊烯基柚皮素。进一步断定,当提取物包含1-30wt.%的黄腐酚、0.01-50wt.%的异黄腐酚、0.0005-10wt.%的8-异戊烯基柚皮素时,提取物的雌激素性质将特定表达。据说,W002/085393啤酒花提取物适于制备具有雌激素性质的药物、化妆品组合物、营养补品和饮食制剂。

[0014] Hänsel和Schulz(1988)公开了在5%的乙醇化氢氧化钾溶液中进行从新鲜收割的啤酒花球果中分离的脱甲基黄腐酚和黄腐酚的异构化。

[0015] 黄腐酚异构化为异黄腐酚,回收率为80%,然而脱甲基黄腐酚的异构化得到6-异戊烯基柚皮素和8-异戊烯基柚皮素,或回收率分别为35%和30%。因此,可得到46%比例的8-PN/(8-PN+6-PN),表明热力学稳定的6-异戊烯基柚皮素的生成是有利的。

[0016] 另外,Milligan et al.(2002)公开了通过异黄腐酚的脱甲基制备8-异戊烯基柚皮素,其是在5%乙醇化氢氧化钾溶液中异构化干燥的啤酒花球果的二氯甲烷提取物的残余物后分离得到的。在乙腈和二氯甲烷的混合物中使用三氯化硼进行脱甲基过程,发现产率仅为53%。

[0017] 大量专利,例如US 5.370.897、US 3.839.588和US 1.246.425公开了当产生异- $\alpha$ -酸时,使用 $\alpha$ -酸类进行碱性异构化的方法。然而,适宜用作这样的异构化反应的提取物主要是通过用己烷、超临界或液体二氧化碳作为提取溶剂获得的。由于这样的提取物不包含黄腐酚,也不包含脱甲基黄腐酚,异构化的提取物不包含相应的异戊烯化的黄烷酮类。而且,US 1.274.678公开了当经由苯提取得到包含 $\alpha$ -酸的最初提取物时,发现必需除去异戊烯化的类黄酮类、黄腐酚和异黄腐酚,因为它们干扰制备方法。因此,在碱性介质异构化中的这些发现与本发明没有相关性。

[0018] 虽然已经研究了浓集包含异戊烯化的类黄酮类的啤酒花的方法, 目前没有发现获得在其中主要存在与其异构体 6- 异戊烯基柚皮素相比具有高雌激素 8- 异戊烯基柚皮素的啤酒花提取物的方法。

[0019] 因此, 本发明的一个主题是提供用于制备具有提高的 8- 异戊烯基柚皮素的产率的啤酒花提取物的方法, 尤其是制备在其中与其异构体 6- 异戊烯基柚皮素相比, 主要富含 8- 异戊烯基柚皮素的啤酒花提取物的方法。

[0020] 本发明的进一步主题是提供一种啤酒花提取物, 考虑到它们的生物活性其具有特定和优化的所有相关异戊烯化类黄酮类或其衍生物的组成。

[0021] 用具有第一个权利要求的特征部分的技术特征的方法实现本发明。

[0022] 本发明的方法的特征在于啤酒花或啤酒花产物进行 (1) 在作为溶剂的水和一定量的碱的存在下进行异构化反应和 (2) 至少一种提取。

[0023] 在本发明的方法中, 优选地在异构化反应中使用水作为溶剂。

[0024] 应当理解啤酒花或酒花产物包含任意形式的处理的啤酒花, 即 palletised 啤酒花或任意啤酒花提取物或任意包含异戊烯化的类黄酮类的啤酒花衍生的残余物。

[0025] 本发明人已经发现当在水作为溶剂的存在下进行异构化反应时, 可得到进一步富含异戊烯化的类黄酮类的啤酒花提取物。尤其是使用本发明可得到与现有技术相比富含高于 6- 异戊烯基柚皮素的 8- 异戊烯基柚皮素 (和黄腐酚) 的提取物, 当在异构化反应中仅使用水作为溶剂时, 浓集是特定表达的。由于富含 8- 异戊烯基柚皮素, 可得到具有高雌激素活性的啤酒花提取物, 而且, 其中 8- 异戊烯基柚皮素的存在引起的可能的增殖活性受到黄腐酚的抗增殖活性的抑制 (参见图 2)。在这一方面, 注意对所有的癌发生期即初始 (initiation), 增长 (promotion) 和进展 (progression) 表现出特别广谱的抑制机理的黄腐酚是很重要的 (Gerhauser et al., 2002)。

[0026] 进行异构化和至少一种提取的顺序对本发明并不重要。实际上, 这意味着可首先进行异构化或至少一种提取的任一种。

#### [0027] 异构化反应

[0028] 已知, 在提高的温度下, 存在于啤酒花或啤酒花产品中的脱甲基黄腐酚和黄腐酚 - 最重要的异戊烯化的类黄酮类 (查耳酮类) 经过 Michael- 类型的易做到的热异构化, 分子内环化成它们相应的黄烷酮类。虽然黄腐酚实质上专一性地异构化为异黄腐酚, 脱甲基黄腐酚的异构化导致形成 8- 异戊烯基柚皮素 (8-PN) 和 6- 异戊烯基柚皮素 (6-PN) 的混合物, 其中  $(8\text{-PN} \times 100\%) / (8\text{-PN} + 6\text{-PN})$  的摩尔比例通常为 15% 至 25%, 这最可能地是由于 8-PN 比 6-PN 的热稳定性低。令人惊奇地发现, 当在存在水和特定的碱性条件下进行异构化反应时, 由于 8-PN 的热力学不稳定性,  $(8\text{-PN} \times 100\%) / (8\text{-PN} + 6\text{-PN})$  的比例改变,  $(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$  保持的总比例几乎不受影响。由于当与 6- 异戊烯基柚皮素或任意其它的衍生自啤酒花的化合物相比时, 8-PN 是具有较高雌激素活性的化合物, 因此, 与已知的啤酒花提取物 (例如在提高的温度下含水酒精的提取物) 相比, 得到的啤酒花提取物的雌激素活性可以增加 3-5 倍。已经发现在异构化反应中, 当使用水作为唯一溶剂时, 提高 8-PN 的浓集。

[0029] 本发明的方法优选的一个实施方案特征在于, 在相对于 KOH 水溶液浓度 (w/v%) 为至少 0.5, 优选为至少 1, 更优选为至少 5 的碱性条件下进行异构化反应。

[0030] 如本领域已知的情况, 当使用水作为溶剂时, 在提高的碱性条件进行的异构化反

应允许  $(8\text{-PN} \times 100\%) / (8\text{-PN} + 6\text{-PN})$  的比例从 15-25% 改变为超过 50%，通常高于 60 和 75%，或者 8-PN 的量更高，尽管  $(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$  的总产率实质上保持不受影响。结果是可得到其中富含 8-PN 的啤酒花提取物。或者换句话说，根据本发明，6-PN/8-PN 的比例可以逆转，就本领域技术情况而言，可得到 6-PN 的选择性浓集，本发明提供 8PN 的选择性浓集，8-PN 为具有较高雌激素活性的化合物。在本发明的方法中占优势的反应条件下，存在于用于反应的啤酒花产物中的高达约 95% 的黄腐酚可异构化为异黄腐酚。已经发现，也可以对提取物按这种方式进行异构化处理，其中所有的脱甲基黄腐酚之前就已经定量地转化为一定比例的  $(8\text{-PN} \times 100\%) / (8\text{-PN} + 6\text{-PN})$ 。

[0031] 本领域应当注意，在回流的条件下，查耳酮类转化成它们相应的黄烷酮类的异构化通常在 5% 氢氧化钾乙醇溶液中（例如 Hänsel 和 Schulz, 1988）中进行 30 分钟，得到比例为 40-46% 的  $(8\text{-PN} \times 100\%) / (8\text{-PN} + 6\text{-PN})$ 。然而，根据本发明，可通过在水中，尤其是在室温下，进行异构化反应可显著性增加热力学不稳定的 8-PN 的浓集。

[0032] 为了降低反应物或反应产物的氧化，异构化反应优选在惰性大气中进行。反应物尤其是黄腐酚和脱甲基黄腐酚以及反应产物异黄腐酚和 8-异戊烯基柚皮素包含双键和酚基，其易于氧化。

[0033] 对本发明而言，进行异构化的温度并不重要，可以是反应混合物的凝固点至沸点之间的任意温度。最适宜的是，反应在室温进行，包括 40 至 60°C 的温度，尤其是约 50°C 也认为是适宜的。

[0034] 本发明人还发现异构化反应可以以高反应速率进行，可实际上在小于 15 分钟内完成，甚至在室温下。为了有利于生成 8-异戊烯基柚皮素，优选进行异构化反应的时间段为 0.25 至 4 小时。本领域技术人员将通常能调整异构化反应进行的时间和温度，以得到对想要的终产物的最适宜的转换和选择性，并最小化形成在异构化反应持续太长时间的情形下可能存在不想要的副产物的风险。

#### [0035] 提取方法

[0036] 在终止异构化反应之前或之后为了从啤酒花或啤酒花产物中分离想要的化合物，啤酒花或啤酒花产物进行至少一次提取。

[0037] 异戊烯化的类黄酮类的提取是通过用至少一种选自醇、水基醇、酮类、水基酮类或酯类或其混合物的有机溶剂或碱水提取啤酒花或啤酒花产物得到的。适宜使用的有机溶剂的实例包含中度的极性溶剂，例如乙酸乙酯或丙酮，或者高极性溶剂，例如乙醇或甲醇，或其混合物例如由 90/10 (v/v) 乙酸乙酯 / 甲醇组成的混合物或含水酒精混合物 (75/25 (v/v) 乙醇 / 水)。

[0038] 优选地，在啤酒花或啤酒花产物进行至少一种提取之前或之后，或在啤酒花或啤酒花产物进行异构化反应之前或之后，用水和 / 或至少一种非极性溶剂对啤酒花或啤酒花产物进行另外的提取步骤，接着回收富含异戊烯化的类黄酮类的残余物或提取物。用水进行的另外的提取是为了在富含啤酒花的提取物中得到异戊烯化的类黄酮类的高度富集，其是通过尽可能地除去存在于富含啤酒花的提取物中的非功能化亲水性压载物质实现的。这样的非功能化压载物质的实例包含蛋白质。用至少一种非极性有机溶剂另外的提取使得非功能化疏水性（亲脂性）压载物质的含量降低了，因而导致在富含异戊烯化的类黄酮类的提取物中异戊烯化的类黄酮类浓度的更高的富集。



[0039] 在啤酒花或啤酒花产物起始物质中进行异构化反应和提取的疏水性压载物质浓度太高的情况下,可采用至少一种非极性有机溶剂实施另外的提取。在非极限(non-exhaustive)(适度的温度和压力下)用液体或超临界 CO<sub>2</sub> 对啤酒花的首次提取后的保留的主要是啤酒花残余物的产物进行另外的提取,以从含更多含有有关异戊烯化的类黄酮类的极性次级代谢物的残余物分离啤酒酿造感兴趣的化合物。

[0040] 亲水性和疏水性压载物质的提取可通过本领域技术人员已知的任意适宜的提取方法进行。适宜的提取方法包括溶剂-溶剂提取法(例如水对乙酸乙酯、己烷对含水酒精混合物)或固相提取法(分别将亲水性和疏水性物质溶解在水和非极性溶剂中或使用硅石或衍生的硅石)。

[0041] 在分别用水和非极性溶剂提取后,可通过例如倾析、过滤和/或离心法进行包含异戊烯化的类黄酮类的组分的分离。

[0042] 一种可能的提取方法例如包括使用液体或超临界 CO<sub>2</sub> 提取啤酒花,并回收得到的产物,然后在碱条件中进行异构化反应。接着酸化包含煮沸的废啤酒花的反应混合物至中性 pH,用水洗涤,之后例如通过过滤或离心回收残余物。然后,可采用适宜的溶剂或其混合物从残余物中选择性提取异戊烯化的类黄酮类。

#### [0043] 前处理

[0044] 为了提高本发明的经济可行性和进一步浓集想要的化合物,在进行异构化反应和提取之前,在液体或超临界 CO<sub>2</sub> 或者至少一种实质上非极性有机溶剂中进行提取啤酒花或啤酒花产物,接着回收包含异戊烯化的类黄酮类的残余物。

[0045] 实质上,其意思是指当残余物富含异戊烯化的类黄酮类时,回收用于酿造目的感兴趣的提取物,并通过预提取除去绝大部分的疏水性压载物质。然后对这种富含前述物质的残余物进行以任意顺序的异构化和至少一种提取。

[0046] 另一个可行的方法包括使用乙醇性的称之为“纯树脂提取”的液体或超临界 CO<sub>2</sub> 提取,其是用载体(例如 Kieselguhr)混合,再回收载体上的残余物。然后对这种包含异戊烯化的类黄酮类的残余物进行任意顺序的异构化和至少一种提取。

#### [0047] 适宜的制剂

[0048] 本发明人已经发现,通过在富含的提取物中包含一定量的黄腐酚,则由 8-异戊烯基柚皮素的雌激素活性导致的本发明的富含啤酒花提取物的可能的增殖可被抑制或抵消,因为已经发现黄腐酚具有抗增殖活性。然而,本发明人已经发现仅仅在黄腐酚与 8-异戊烯基柚皮素的重量比足够高时才可得到这样的抑制。特别地,本发明人已经发现充分抑制需要黄腐酚对 8-异戊烯基柚皮素的重量比为至少 10,优选至少 30。该比例可通过给富含的提取物中加入过量黄腐酚来得到(参见图 2)。换句话说,黄腐酚与 8-异戊烯基柚皮素以特定的比例存在,通过黄腐酚的抗增殖活性可得到与 8-异戊烯基柚皮素的雌激素性相关的增殖活性的有效抑制。

[0049] 一方面,图 2 表明增加 8-异戊烯基柚皮素的浓度导致 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖增加。本发明人令人惊奇地发现,对于每种浓度的 8-异戊烯基柚皮素,低浓度的黄腐酚(< 1 μM)刺激 8-异戊烯基柚皮素诱导的增殖,特别是那些浓度为黄腐酚与 8-异戊烯基柚皮素的比例低于 10,然而发现至少 5 μM 较高浓度的黄腐酚可显著地抑制 8-异戊烯基柚皮素诱导的增殖。

[0050] 遗憾的是,在能最有效地将脱甲基黄腐酚异构化为 8- 异戊烯基柚皮素并同时有利于形成 8- 异戊烯基柚皮素的异构化反应条件下,黄腐酚几乎定量地异构化为异黄腐酚。另一方面,富含黄腐酚的啤酒花提取物可通过使啤酒花或啤酒花产物在非异构条件下进行至少一种提取得到(在室温下和中性或酸性条件下提取)。因此,优选的本发明的方法包含混合按上述描述的组合异构化-提取步骤的方法得到的提取物和另一种富含黄腐酚的啤酒花提取物。这样,可得到特定重量比例的包含黄腐酚和 8- 异戊烯基柚皮素的提取物。优选地是,黄腐酚与 8- 异戊烯基柚皮素的重量比为至少 10,更优选至少 30。当在该范围内时,得到的混合物可表现出由于存在 8- 异戊烯基柚皮素引起的适宜的雌激素活性和由于存在黄腐酚引起的化学预防癌症的活性。因此,由于黄腐酚异构化为异黄腐酚,这种混合允许补偿起始原料和随后的至少一种异构化反应中任意黄腐酚含量的减少。通过混合从本发明的组合提取-异构化中得到的富含 8- 异戊烯基柚皮素的提取物和富含黄腐酚的提取物,本发明能够得到含有特定重量比 8- 异戊烯基柚皮素与黄腐酚的啤酒花提取物,而不受异构化反应中黄腐酚与异黄腐酚转化度的影响。

[0051] 因此,根据本发明,可得到包含至少 0.15wt. % 的 8- 异戊烯基柚皮素和至少 3wt. % 的黄腐酚,更优选为至少 0.33wt. % 的 8- 异戊烯基柚皮素和至少 10wt. % 的黄腐酚的啤酒花提取物。

[0052] 得到富含黄腐酚的提取物的适宜方法包含采用液体或超临界 CO<sub>2</sub> 或至少一种实质上非极性有机溶剂使啤酒花或酒花产物进行至少一种提取,接着回收富含黄腐酚的残余物,并为了进一步浓集黄腐酚,采用适宜的溶剂或其混合物使残余物进行至少再一次提取的步骤。

[0053] 另外,称之为用乙醇化的液体或超临界 CO<sub>2</sub> 提取的“纯树脂提取’”,其与载体(例如 Kieselguhr)混合,导致载体上富含异戊烯化的类黄酮类的残余物。然后,这种残余物可用适宜的溶剂或其混合物进行至少一种提取。

#### [0054] 提高雌激素能力

[0055] 在本发明的用于制备啤酒花提取物的进一步优选的实施方案中,该方法还包括混合通过至少一种提取和异构化反应得到的提取物与一定量的富含具有高雌激素活性的化合物例如 8- 烷基柚皮素,优选氢化的 8- 异戊烯基柚皮素的 8- 异戊基柚皮素的提取物。加入 8- 异戊烯基柚皮素的原因是由于本发明人令人惊奇地发现 8- 异戊基柚皮素显示出雌激素活性,而这种雌激素活性仅仅比 8- 异戊烯基柚皮素的活性弱 3-4 倍(参见图 4)。发现与 8- 异戊基柚皮素相比,8- 异戊烯基柚皮素显示出高生物利用度和良好的稳定性,由于它更不容易代谢。最可能地是,这可能应归于其在侧链上不存在双键。

[0056] 可使用多种方法得到富含 8- 异戊基柚皮素的提取物。

[0057] 一种可能的方法包括步骤:

[0058] a. 使富含黄腐酚的啤酒花提取物进行异构化反应,将黄腐酚转化为异黄腐酚;

[0059] b. 使步骤 (a) 中得到的提取物进行催化氢化反应,将异黄腐酚转化为二氢异黄腐酚。所述的催化氢化优选是通过使 H<sub>2</sub> 进入在存在氢化催化剂例如载体化的 Pt 或 Pd 或其它催化剂下进行的。适宜载体的实例例如活性碳。氢化反应优选在甲醇中进行。

[0060] c. 步骤 (b) 中的反应产物进行脱甲基反应。这样可将二氢异黄腐酚转化为 8- 异戊基柚皮素。例如可以使用三溴化硼或其它适宜的甲基化试剂进行脱甲基反应。

[0061] 因此,根据上述的方法,雌激素性钝化 (inactive) 黄腐酚可转化成具有高雌激素活性的化合物,即 8- 异戊基柚皮素。啤酒花中的黄腐酚浓度 (0.3-1.2wt. %) 高于 8- 异戊烯基柚皮素的前体脱甲基黄腐酚的浓度 (0.005-0.2wt. %) 是非常重要的优点。根据上述的方法,得到的啤酒花提取物不仅富含 8-PN,而且富含 8- 异戊基柚皮素,结果是雌激素活性显著地增强。

[0062] 得到包含 8- 异戊基柚皮素的另一个可能的的方法是加入由合成方法得到的这种产品。尽管由于包含大量的反应步骤,在 8- 位的取代通常具有低选择性和产率,目前本发明人研究了一种用于合成 8- 异戊基柚皮素的高产率方法,其仅包含有限的反应步骤。

[0063] 根据该方法,在有机金属试剂 (例如异戊基锂) 存在下,2,4,6- 三甲氧基 - 苯甲醛 (参见图 3) 进行烷基化反应,然后进行脱氧,转化成 1- 烷基 -2,4,6- 三甲氧基苯 (例如 1- 异戊基 -2,4,6- 三甲氧基苯)。脱氧优选是在三氟乙酸中存在三乙基硅氧烷下进行的。1- 烷基 -2,4,6- 三甲氧基苯进行乙酰化反应,然后进行脱甲基反应,最终得到 3- 烷基 -2,4,6- 三羟基苯乙酮 (例如 3- 异戊基 -2,4,6- 三羟基苯乙酮)。乙酰化反应优选是在乙酰氯和四氯化锡下进行的。脱甲基化优选是在存在三溴化硼下进行的。

[0064] 在该合成途径的过程中,优选以甲氧基甲基醚 (MOM) 选择性保护两个酚基。已经发现,由于强的分子内氢键,第三个酚基抵制反应。

[0065] 因此,得到的脱甲基反应产物进行涉及 MOM- 保护的苯甲醛的混合羟醛反应,形成查耳酮类,其经过分子内 Michael-type 环加成,成为相应的黄烷酮类。通过在酸性环境中除去保护基,得到 -8 烷基柚皮素类 (例如 8- 异戊基柚皮素)。

[0066] 本发明还涉及啤酒花提取物本身,包含 8- 异戊烯基柚皮素和 6- 异戊烯基柚皮素的混合物,其中 (8- 异戊烯基柚皮素  $\times 100\%$ ) / (8- 异戊烯基柚皮素 + 6- 异戊烯基柚皮素) 的比例为至少 50%, 优选至少 60%, 更优选至少 75%。因此,啤酒花提取物优选包含一定量的黄腐酚,其中黄腐酚与 8- 异戊烯基柚皮素的重量比为至少 10, 优选至少 20, 更优选至少 30。优选地,啤酒花提取物包含至少 0.15% (w/w), 优选至少 0.33% 的 8- 异戊烯基柚皮素和至少 3%, 优选至少 10% (w/w) 的黄腐酚。最优选地,啤酒花提取物还包含一定量的异黄腐酚和一定量的 8- 烷基柚皮素, 优选 8- 异戊基柚皮素。

#### [0067] 适应症

[0068] 本发明的啤酒花提取物或用本发明的方法得到的啤酒花提取物可用于制备具有雌激素和化学预防癌症活性的药物或植物药,其中由于存在植物雌激素 8- 异戊烯基柚皮素而引起的可能的增殖活性被黄腐酚的抗增殖活性抵消。而且,本发明的啤酒花提取物或用本发明的方法得到的啤酒花提取物可用于治疗或预防由雌激素性的激素平衡紊乱导致的病症或症状或主诉或疾病的药物或植物药。

[0069] 优选地,由雌激素性的激素平衡紊乱导致的病症或症状或主诉或疾病为绝经相关的疾病 (包括更年期)。因此,优选地,所述疾病是骨质疏松症。在另一个优选的实施方案中,所述疾病选自性激素依赖性癌、心血管疾病、前列腺功能障碍和结肠癌。

[0070] 本发明还涉及营养组合物 / 补品,包含本发明的啤酒花提取物或用本发明的方法得到的啤酒花提取物。

[0071] 本发明还涉及化妆品组合物,包含本发明的啤酒花提取物或用本发明的方法得到的啤酒花提取物。

[0072] 为了得到最好的使用情况和生物利用度,来自本发明的啤酒花提取物可加入到多种制剂中,所述制剂包括丸剂、胶囊、gelules、溶液等,同时使用常规赋形剂。

[0073] 在本发明的从属权利要求中要求另外优选的实施方案。

[0074] 实施例和附图

[0075] 本发明进一步用下述的实施例和附图阐述。

[0076] 实施例 1. 提取

[0077] 为了从废 (Spent) 啤酒花中选择性提取黄腐酚和脱甲基黄腐酚,在室温下,用 1L 的 90/10 (v/v) 乙酸乙酯和甲醇的溶剂混合物浸渍提取废啤酒花 (啤酒花品种 Nugget ; 202.74g),即用液体或超临界 CO<sub>2</sub> 对天然啤酒花提取后剩余的残余物。滤出提取物,回收富含黄腐酚和脱甲基黄腐酚 (720ml) 的提取物。减压蒸除溶剂后,将残余物再溶解在 100ml 的己烷 / 甲醇 1/1 (v/v) 混合物中,以便于提取亲脂性压载物质,转移到分液漏斗中。加入 30ml 酸性水溶液 (1N HCl) 后,弃去包含亲脂性压载物质的己烷层。减压蒸除剩余的甲醇层溶剂。加入水 (70ml) 和乙酸乙酯 (100ml),相分离,干燥包含最终啤酒花提取物的有机层。

[0078] 产率:

[0079] - 最终啤酒花提取物 4.64g (2.3%)

[0080] - 脱甲基黄腐酚 2.41wt. %

[0081] (用 HPLC 测定)

[0082] - 黄腐酚 33.62wt. %

[0083] (用 HPLC 测定)

[0084] 实施例 2. 异构化

[0085] 在含有各种含量的 KOH (分别为 0g、0.2g、0.4g 和 2g) 中,在水中 (40ml) 搅拌实施例 1 中得到的 0.5g 的啤酒花提取物 1 小时。随后,使用 6N HCl 酸化溶液至 pH = 4-5。用乙酸乙酯提取回收的提取物,除去溶剂,干燥。定量 HPLC 分析的结果显示在表 1 中。应当认识到,不加入碱搅拌得到的提取物包含非常类似于市售的啤酒花提取物比例的 8- 异戊烯基柚皮素和 6- 异戊烯基柚皮素,然而,加入增加量的碱有利于增加 8- 异戊烯基柚皮素,显著提高了 (8- 异戊烯基柚皮素 x100%) / (8- 异戊烯基柚皮素 + 6- 异戊烯基柚皮素) 的比例。

[0086] 表 1. 在各种碱性条件下, (8- 异戊烯基柚皮素 x100) / (8- 异戊烯基柚皮素 + 6- 异戊烯基柚皮素) 的比例

[0087]

KOH (w/v%)	比例 (%)
0	22.4
0.5	34.7
1	58.6
5	74.8

[0088] 实施例 3

[0089] 在室温下,于 5% 氢氧化钾水溶液中,包含 8- 异戊烯基柚皮素和 6 异戊烯基柚皮素的啤酒花提取物进行异构化反应 30 分钟。定量 HPLC- 分析的结果,显示在表 2 中。如在

表 2 中可看到的,在有利于 8- 异戊烯基柚皮素的异构化后, (8- 异戊烯基柚皮素 x100% ) / (8- 异戊烯基柚皮素 +6- 异戊烯基柚皮素) 的比例从最初提取物中的 23% 增加至 73%。

[0090] 比较例 A

[0091] 重复实施例 3 的异构化反应,使用 5% 的氢氧化钾乙醇溶液代替 5% 氢氧化钾水溶液。定量 HPLC- 分析的结果,显示在表 2 中,显示出在异构化产物中得到的提取物具有的 (8- 异戊烯基柚皮素 x100% ) / (8- 异戊烯基柚皮素 +6- 异戊烯基柚皮素) 比例从最初提取物中的 23% 仅增加至异构化产物中的 43%。

[0092] 表 2. 在各种溶剂中异构化之前或之后的啤酒花提取物组合物

[0093]

组合物 (w/w%)	异构化之前的提取物	在 5% KOH 乙醇溶液中异构化后的提取物	在 5% KOH 水溶液中异构化后的提取物
8- 异戊烯基柚皮素 (8-PN)	0.17	0.31	0.52
6- 异戊烯基柚皮素 (6-PN)	0.58	0.41	0.19
(8-PNx100% ) / (8-PN+6-PN) 的比例	23%	43%	73%
异黄腐酚	0.60	2.37	41.29
黄腐酚	14.42	12.62	0.79

[0094] 适宜的制剂

[0095] 图 2 显示了 8- 异戊烯基柚皮素对 MCF-7 乳腺癌细胞的生长刺激和在增加黄腐酚浓度下这种增殖的抑制。

[0096] 进行生物试验来探测 8- 异戊烯基柚皮素对雌激素依赖性癌细胞的增殖,确定需要抑制该 8- 异戊烯基柚皮素诱导的增殖的黄腐酚浓度。因此,在 96 孔板上,在存在固定的生长刺激浓度的 8- 异戊烯基柚皮素和各种浓度的黄腐酚下培养雌激素易感性 MCF-7 乳腺癌细胞。对于每种浓度的 8- 异戊烯基柚皮素 (1nM、10nM 和 100nM),黄腐酚的浓度分别为 0  $\mu$  M、0.1  $\mu$  M、1  $\mu$  M、5  $\mu$  M、10  $\mu$  M 和 25  $\mu$  M。

[0097] 提高雌激素能力

[0098] 图 4 显示了当用雌激素诱导的酵母筛选 (yeast screen) (Saccharomyces cerevisiae) 测定时 17  $\beta$  - 雌二醇 (E2)、8- 异戊烯基柚皮素 (8PN)、8- 异戊基柚皮素 (8PN-H2) 和中间体异黄腐酚 (IsoXH2) 的雌激素活性剂量反应曲线,所述的 yeast screen 表达人类雌激素受体,并包含运载控制受体基因 Lac-Z 的雌激素应答序列的表达质粒 (Milligan et al., 2001)。所述酵母是在包含增加浓度的 17  $\beta$  - 雌二醇 (阳性对照)、8- 异戊烯基柚皮素 (8PN)、8- 异戊基柚皮素 (8PN-H2) 或二氢异黄腐酚 (IsoX-H2) 的培养基中培养的。用分光光度计检测和定量 Lac-Z 受体基因的表达。

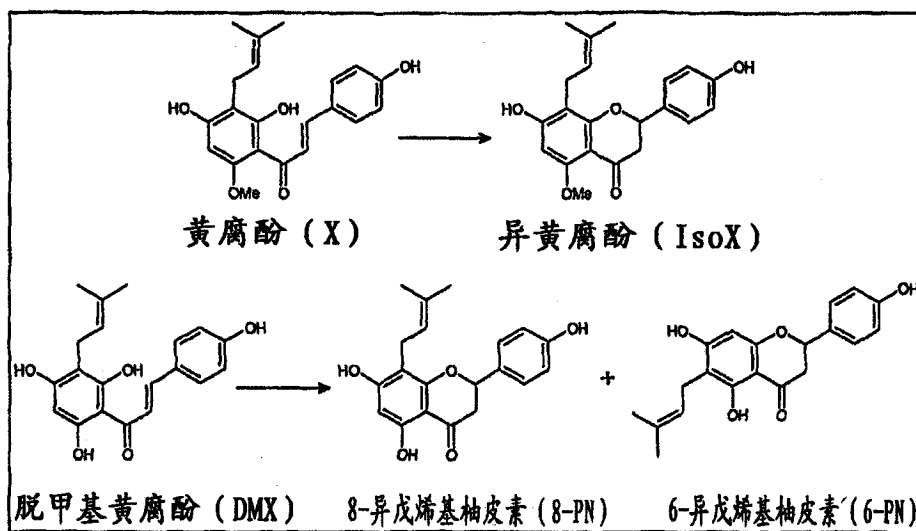


图1. 啤酒花 (香蛇麻) 中主要异戊烯化的类黄酮类

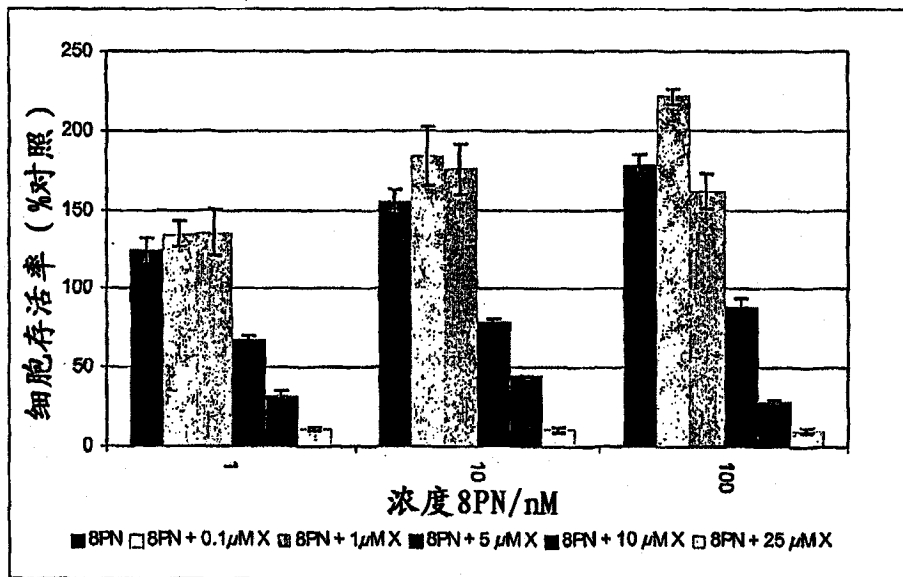


图2. 8-异戊烯基柚皮素刺激的MCF-7乳腺癌细胞的增殖和在增加的黄腐酚浓度存在下增殖的抑制

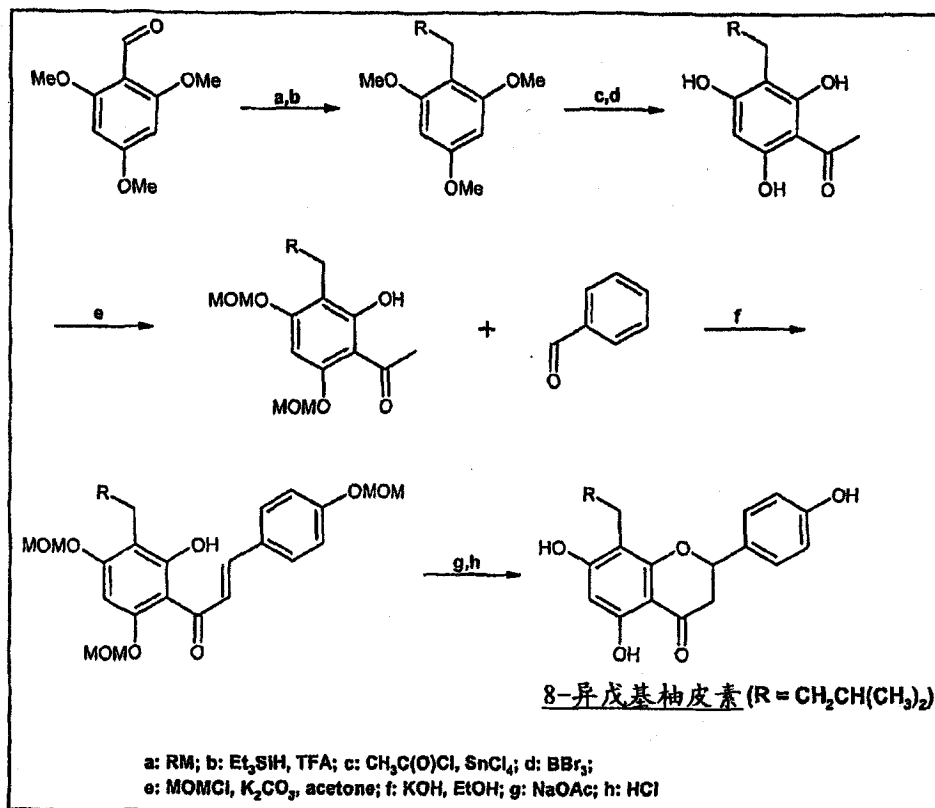


图3. 制备包括8-异戊烯柚皮素的8-烷基柚皮素的合成图

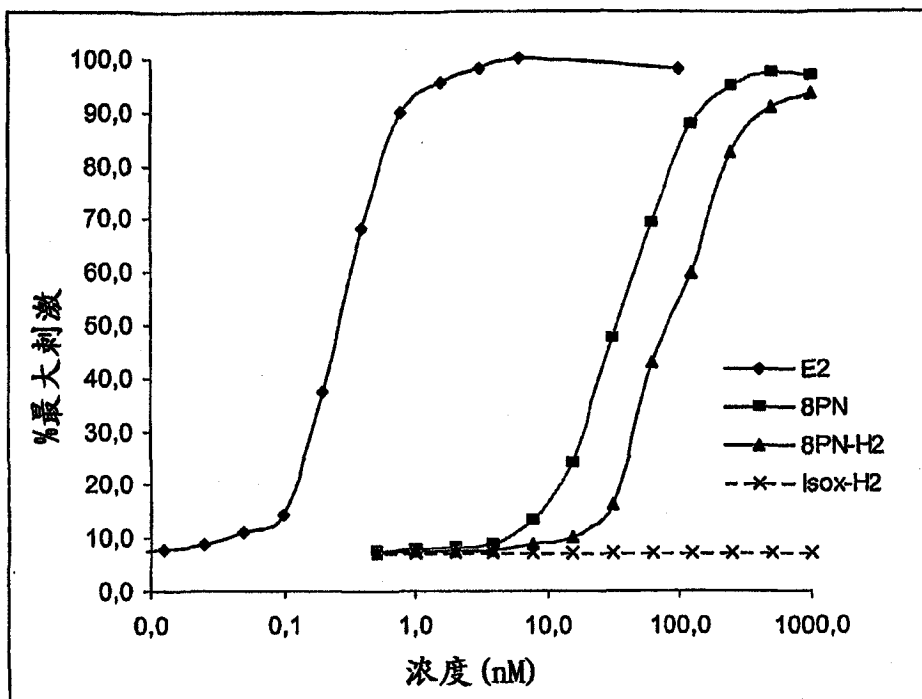


图 4. 在雌激素诱导的 yeast screen 中  $17\beta$ -雌二醇 ( $E_2$ )、8-异戊烯基柚皮素 (8PN)、8-异戊基柚皮素 (8PN-H2) 和二氢黄腐酚的雌激素活性的剂量响应曲线