

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0706865-4 A2**

(22) Data de Depósito: 12/01/2007
(43) Data da Publicação: 12/04/2011
(RPI 2101)



(51) Int.Cl.:
A61K 36/77
A61K 131/00
A61P 13/00
A61P 25/16
A61P 25/28

(54) Título: **MÉTODO PARA PREPARAR EXTRATO DE SHINYLEAF YELLOWHORN E EXTRATO DE SHINYLEAF YELLOWHORN**

(30) Prioridade Unionista: 12/01/2006 CN 200610009619.4

(73) Titular(es): TONY LIU

(72) Inventor(es): TONY LIU

(74) Procurador(es): Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) Pedido Internacional: PCT CN2007000123 de 12/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/079695 de 19/07/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PREPARAR EXTRATO DE SHINYLEAF YELLOWHORN E EXTRATO DE SHINYLEAF YELLOWHORN. A presente invenção divulga uma espécie de extrato de Shinyleaf Yellowhorn consistindo principalmente de saponinas totais de Shinyleaf Yellowhorn, que representam mais que 50% do peso total do extrato de Shinyleaf Yellowhorn. A presente invenção também provê um método para a preparação do extrato acima, bem como seu uso no tratamento da incontinência urinária e micção freqüente devido à demência senil ou degradação da bexiga urinária, enurese infantil, retardamento mental pediátrico, demência da meia idade e senil e síndrome de Parkinson. As preparações farmacêuticas da presente invenção incluem injeções, comprimidos, cápsulas, cápsulas macias, líquido oral, pilulas, etc.



PI0706865-4

"MÉTODO PARA PREPARAR EXTRATO DE SHINYLEAF YELLOWHORN E EXTRATO DE SHINYLEAF YELLOWHORN".

Campo da invenção

5 A presente invenção relaciona-se com extrato de Shinyleaf Yellowhorn [chifre amarelo de folha brilhante], métodos para extração, e usos do mesmo na preparação de fármaco para o tratamento de incontinência urinária e micção freqüente devido à demência senil ou degradação da bexiga urinária, e enurese infantil.

10 Antecedentes da invenção

Shinyleaf Yellowhorn, também conhecida como Wenguanguo e Yanmugua, é a fruta da erva vivaz Xanthoceras sorbifolia Bunge (família: Soapberry; gênero: Xanthoceras). A origem da Xanthoceras sorbifolia selvagem é a parte norte da
15 China, correntemente a Xanthoceras sorbifolia é na maior parte cultivada. Shinyleaf Yellowhorn tem sido usada principalmente para o tratamento de artrite reumática, calor interno reumático e reumatismo dérmico, e foi registrada na Farmacopéia Chinesa em 1977.

20 Em anos recentes Shinyleaf Yellowhorn e seu extrato alcoólico tem se provado a melhorar as funções de aprendizado e memória, e tem sido usada para tratamento de retardamento mental e demência senil. O Journal of Medicine & Pharmacy of Chinese Minorities [Jornal de
25 Medicina e Farmácia de Minorias Chinesas], 1997, vol. 3(1) relatou uma observação clínica de usar diretamente Shinyleaf Yellowhorn seca para tratar 120 casos de enurese. A CN1092991A relatou o uso de extrato de álcool de Shinyleaf Yellowhorn para melhorar as funções do
30 cérebro, e a preparação do mesmo. Entretanto, é difícil de extrair as saponinas de Shinyleaf Yellowhorn. O conteúdo de saponinas totais em extrato de Shinyleaf Yellowhorn obtido por técnicas existentes é geralmente 18 a 28%, e aquele de cascas de noz de Shinyleaf Yellowhorn
35 é 15 a 25% (veja, CN1250001 'Nutshells for extration of Shinyleaf Yellowhorn saponin, crude fat, crude protein and sugar' [Cascas de nozes para a extração de saponina,

gordura bruta, proteína bruta e açúcar de Shinyleaf Yellowhorn]. O método existente para avaliar o conteúdo de saponinas totais em extrato de Shinyleaf Yellowhorn é de pouca precisão, o que impede diretamente a precisão da dosagem, controle de qualidade e efeito terapêutico dos fármacos.

Devido aos componentes químicos de Shinyleaf Yellowhorn serem razoavelmente complexos, é muito difícil usar a técnica cromatográfica, que é adequada e amplamente adotada em produção industrial, para obter alto teor (>50%) de saponinas totais de Shinyleaf Yellowhorn. Até agora, não existe relato sobre a preparação de extrato de Shinyleaf Yellowhorn contendo alto teor (>50%) de saponinas totais, nem método para a preparação de extrato de Shinyleaf Yellowhorn contendo alto teor de saponinas totais por técnica cromatográfica.

Correntemente não há fármaco seguro, efetivo e euterapêutico para o tratamento de incontinência urinária e micção freqüente devido à demência senil ou degradação da bexiga urinária, enurese infantil e retardamento mental pediátrico, envelhecimento do cérebro e demência de média idade e senil. A presente invenção resolveu esta necessidade provendo extrato de Shinyleaf Yellowhorn como uma preparação farmacêutica de planta que tem bons efeitos terapêuticos sem efeitos tóxicos e laterais.

Descrição da invenção

O propósito da presente invenção é prover uma espécie de extrato de Shinyleaf Yellowhorn com alto teor de saponinas totais. Um segundo propósito da presente invenção é prover um método para preparar o citado extrato. Um outro propósito é prover um método para medir o teor de saponinas totais no extrato de Shinyleaf Yellowhorn. Ainda um outro propósito é lidar com o uso do extrato de Shinyleaf Yellowhorn na preparação de fármacos para o tratamento da incontinência urinária e micção freqüente devido à demência senil ou degradação da bexiga urinária e enurese infantil. Ainda um outro propósito é

prover um método para o tratamento das doenças acima com o extrato acima.

Os propósitos acima são alcançados pela configuração preferida seguinte:

5 A presente invenção provê uma espécie de extrato de Shinyleaf Yellowhorn compreendendo principalmente as saponinas totais, que representam mais que 50% do peso bruto do extrato de Shinyleaf Yellowhorn seco (mais que 60% na configuração preferida, mais preferivelmente mais
10 que 70%, o mais preferivelmente mais que 80%, e até mesmo 90% ou mais). A saponina B no extrato de Shinyleaf Yellowhorn representa mais que 15%, mais que 18% na configuração preferida, mais preferivelmente mais que 21%, baseado no peso total de extrato de Shinyleaf
15 Yellowhorn seco.

A presente invenção também provê um método para preparar o extrato acima. O presente inventor descobriu que é possível obter extrato de Shinyleaf Yellowhorn contendo mais que 50% de saponinas totais por uma técnica de
20 extração e refino única.

O método para preparar o extrato de Shinyleaf Yellowhorn compreende as seguintes etapas:

A. Matéria-prima de Shinyleaf Yellowhorn é secada e desoleada (preferivelmente usando uma prensa de óleo)
25 para conseguir pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn. O pó de torta é extraído com Extrator A ou extraído por extração com CO₂ supercrítico. Então o extrato resultante é secado para conseguir creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. O Extrator A é selecionado de n-hexano, éter
30 de petróleo, dietil éter e clorofórmio, com n-hexano preferido.

B. O creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn é extraído com Extrator B. Os extratos líquidos resultantes são filtrados, combinados, adicionados a água para dissolver,
35 e então filtrados para conseguir Extrato Líquido I. O Extrator B pode ser metanol ou etanol;

C. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com

Extrator C. Os extratos líquidos resultantes são filtrados, combinados, adicionados a água para dissolver, e então filtrados para conseguir Extrato Líquido II. O Extrator C pode ser selecionado de n-butanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, e pentanol, preferivelmente n-butanol, n-propanol, e isopropanol.

D. O Extrato Líquido II é carregado na coluna de resina macroporosa de estireno para processo de adsorção. Então eluído com solução de metanol ou etanol. O eluato é coletado, concentrado e secado para obter extrato de Shinyleaf Yellowhorn refinado.

De acordo com uma configuração preferida da presente invenção, o método para preparar extrato de Shinyleaf Yellowhorn compreende as seguintes etapas:

A. Matérias-prima de Shinyleaf Yellowhorn é secada e desoleada (preferivelmente usando uma prensa de óleo) para obter pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn. O pó de torta é extraído com extrator A ou por extração com CO₂ supercrítico. O extrato resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn.

No caso de extração com Extrator A, é preferido extrair com Extrator A em uma razão de peso/peso de 1~5:1, preferivelmente 2~3:1, e executar o procedimento de extração 2~6 vezes, preferivelmente 3~5 vezes. O solvente é então recuperado do extrato resultante sob pressão reduzida, e secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn.

No caso de extração por extração supercrítica de CO₂, o pó de torta é adicionado a CO₂ supercrítico para executar a extração. Os parâmetros técnicos para extração com CO₂ supercrítico são como seguem: pressão de extração: 10~50 MPa (preferivelmente 20~30 MPa); temperatura de extração: 20~60°C (preferivelmente 40~50°C); tempos executados: 2~5; agente de arraste: etanol, fração em volume: 60~95%, quantidade: 1~6% (preferivelmente 2~4%).

B. O creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn é extraído com Extrator B por 1 ou 2 vezes, cada uma durando cerca

- de 2~4 horas, preferivelmente com Extrator B de uma concentração de 50~90% (preferivelmente 55~85%, mais preferivelmente 65~80%) em uma razão de volume/peso de 2~9:1 (preferivelmente 4~8:1). Os extratos líquidos resultantes são filtrados e combinados, e então álcool é recuperado sob pressão reduzida, preferivelmente a 60~70°C, até que não haja odor de álcoois. Adicionados 0,5~3 volumes (preferivelmente 1~2 volumes) de água e filtrado novamente para obter o Extrato Líquido I.
- 10 C. O Extrato Líquido I é adicionado a Extrator C para executar extração 1~3 vezes. É preferido usar o Extrator C de uma razão de volume/volume de 0,5~3:1 (preferivelmente 1~2:1), cada uma por 2~4 horas. Os extratos líquidos resultantes são filtrados, combinados, e então o álcool recuperado sob pressão reduzida (preferivelmente a 60~70°C), até que não haja odor de álcoois. Adicionados 0,2~2 volumes (preferivelmente 0,5~1 volume) de água e filtrado novamente para obter o Extrato Líquido II.
- 15 D. O Extrato Líquido II é carregado na coluna de resina macroporosa de estireno para processo de adsorção. É preferido para o processo de adsorção executá-lo por 10~60 min (mais preferivelmente por 20~40 min). Eluído com 600~1500 ml de água, preferido uma taxa de fluxo de 1,0~4,0 ml/min. Então eluato com 800~3000 ml de solução de etanol a 30~80% (preferivelmente 40~70%, mais preferivelmente 60~70%), preferivelmente a uma taxa de fluxo de 0,5~2 ml/min. Um eluato de álcool a 20~30% é coletado e o álcool recuperado sob pressão reduzida (preferivelmente a 60~70°C), até que não haja odor de álcoois. A solução resultante é concentrada e secada para obter um extrato de Shinyleaf Yellowhorn refinado.
- 20 Os procedimentos de extração preferidos mencionados acima são preferivelmente extração por refluxo térmico ou extração ultra-sônica. A razão de peso/volume como usada aqui é kg/l.
- 25 30 35
- De acordo com uma configuração da presente invenção, a

coluna de resina macroporosa de estireno como usada aqui pode ser polar, polar fraca, ou não polar. Antes do processo de adsorção, a coluna de resina pode ser pré-tratada com metanol ou etanol e lavada com água antes de

5 adicionada com extrator. Em configuração particular da presente invenção, a resina usada pode ser qualquer uma das seguintes: DA201 (polímeros de alto peso molecular de poliestireno macroporoso polar com partículas esféricas opacas leitosas ou amarelo claro, produzidas por Tianjin

10 University Chemical Plant), AB8 (polímeros de alto peso molecular de poliestireno macroporoso não polar com as partículas esféricas opacas leitosas ou amarelo claro, produzidas pela Tianjin AAA Plant), D101 (polímeros de alto peso molecular de poliestireno microporoso polar

15 fraco com as partículas esféricas opacas leitosas ou amarelo claro, produzidas pela Tianjin University Chemical Plant), HP20 (polímeros de alto peso molecular de poliestireno macroporoso polar fraco com as partículas esféricas leitosas, produzidas pela Japanese Mitsubishi

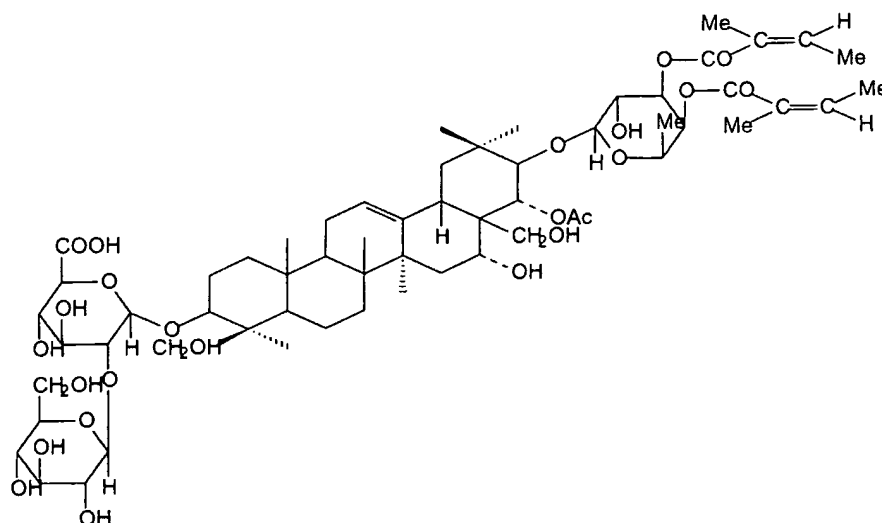
20 Chemical Industrial Corporation), SP825 (polímeros de alto peso molecular de poliestireno macroporoso polar fraco com as partículas esféricas opacas marrons, produzidas pela Japanese Mitsubishi Chemical Industrial Corporation).

25 Os experimentos mostraram que as saponinas totais de Shinyleaf Yellowhorn consistem principalmente de saponinas A, B, C e D, e estes componentes têm uma razão relativamente estável. Foi relatado (veja 'Progress in the study of chemical components of Shinyleaf Yellowhorn and their pharmacological actions' [Progresso no estudo

30 de componentes químicos de Shinyleaf Yellowhorn e suas ações farmacológicas], Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2004, 21(6)) que o núcleo de saponinas totais de Shinyleaf Yellowhorn é uma classe de compostos com

35 triterpenóides pentacíclicos tipo oleanano. A fórmula molecular da saponina B em Shinyleaf Yellowhorn é $C_{60}H_{92}O_{24}$ com um peso molecular de 1196, e sua estrutura química é

como segue:



- Em Shinyleaf Yellowhorn e seu extrato, a razão de saponina B ($C_{60}H_{92}O_{24}$) em relação às saponinas totais é razoavelmente constante. A saponina B representa 30 a 35% da soma das saponinas A, B, C e D. Assim, o inventor descobriu que a determinação precisa do teor de saponina B em Shinyleaf Yellowhorn permitirá o cálculo do teor relativo de saponinas totais.
- A análise racional para determinar o conteúdo de saponinas totais é: 1 g de extrato de Shinyleaf Yellowhorn obtido pelo método de extração da presente invenção contém mais que 150 mg da saponina B ($C_{60}H_{92}O_{24}$), isto é, o teor de saponina B de Shinyleaf Yellowhorn excede 15%. Conseqüentemente, dado o fato que a saponina B representa 30% da soma das saponinas A, B, C e D, 1 g de extrato de Shinyleaf Yellowhorn contém mais que 500 mg de saponinas totais, isto é, o teor de saponinas totais em extrato de Shinyleaf Yellowhorn excede 50% calculado a partir do teor de saponina B.
- Na presente invenção, as saponinas totais representam mais que 50% do extrato de Shinyleaf Yellowhorn total, baseado em massa seca. Entretanto, a saponina B ($C_{60}H_{92}O_{24}$) representa 30-35% das saponinas totais. Conseqüentemente, o teor de saponina B no extrato de Shinyleaf Yellowhorn seco é maior que 15%. O método para preparar extrato de

Shinyleaf Yellowhorn divulgado na presente invenção é estável e confiável, e pode produzir um extrato contendo alto teor de saponinas totais, dessa forma habilitando a qualidade estável de preparações farmacêuticas, a dosagem
5 diminuída de fármaco, o efeito terapêutico aumentado, e a facilidade para preparações farmacêuticas.

Mostrando os efeitos de extrato de Shinyleaf Yellowhorn na frequência de urinação do camundongo cheio de água, sobre o músculo liso excisado de bexiga de ratos, e sobre
10 a bioeletricidade do eletrodo extracelular do esfíncter externo da bexiga urinária de coelhos, bem como sua ação antagonista na contração induzida por Ach (acetilcolina) do músculo liso excisado de bexiga de ratos, a presente invenção demonstrou que o extrato de Shinyleaf Yellowhorn
15 é efetivo no tratamento da incontinência urinária e micção freqüente devido à demência senil ou degradação da bexiga urinária. Mostrando os efeitos de extrato de Shinyleaf Yellowhorn no tempo de sono de camundongos, a presente invenção provou que o extrato de Shinyleaf
20 Yellowhorn é efetivo no tratamento de enurese infantil. Mostrando os efeitos melhorados de extrato de Shinyleaf Yellowhorn na incapacidade da memória de rato induzida por anisodina, e seu efeito na anulação do reflexo condicionado do modelo de rato com demência com ganglia
25 basal de Meynert e neurônio colinérgico destruídos, a presente invenção demonstrou a eficácia do extrato de Shinyleaf Yellowhorn no tratamento de demência. Foi provado que o extrato de Shinyleaf Yellowhorn divulgado na presente invenção tem os efeitos de melhorar as
30 funções cerebrais e intensificar a atividade do cérebro, e pode ser usado para tratar a incontinência urinária e micção freqüente devido à demência senil ou degradação da bexiga urinária, enurese infantil, retardamento mental, envelhecimento do cérebro, demência de meia idade e senil
35 e síndrome de Parkinson.

O extrato de planta obtido pelo método da presente invenção pode ser usado junto com portadores

farmaceuticamente aceitáveis, para fabricar composições de fármacos, por exemplo na forma de comprimidos, cápsulas, líquidos orais, injeções, e pílulas. Os métodos convencionais de produção de fármaco no campo farmacêutico podem ser usados para a produção de várias preparações farmacêuticas com o presente extrato de planta. A preparação farmacêutica é preferivelmente para administração oral ou parenteral, mais preferivelmente para administração oral.

A composição de fármaco divulgada na presente invenção pode ser administrada oralmente como qualquer tipo de preparações farmacêuticas adequadas para administração oral, incluindo mas não limitada a cápsulas, comprimidos, suspensões e soluções aquosas. No caso de comprimido oral, os portadores comumente usados incluem lactose e amido de milho, e usualmente adicionados com lubrificantes, tais como estearato de magnésio. Como para cápsulas administradas oralmente, os diluentes adequados incluem lactose e amido de milho. Como para as suspensões aquosas administradas oralmente, os ingredientes ativos são combinados com agentes emulsificantes e de suspensão. Se necessário, agente adoçante, ou agente aromatizante ou corante podem ser adicionados à composição do fármaco.

Em uma configuração preferida da presente invenção, a forma de dosagem aceitável oralmente contém 10~90% (preferivelmente 40~80%) de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. Se calculado em termos de saponinas totais de Shinyleaf Yellowhorn, o teor é de 5~80% (preferivelmente 20~40%). A forma de dosagem é preferivelmente administrada 1~4 (preferivelmente 2~3) vezes por dia, cada dose de 0,1~1 g (preferivelmente 0,2~0,4 g).

As formas injetáveis estéreis da composição de fármaco divulgada na presente invenção podem ser as suspensões aquosas ou oleosas. Estas suspensões podem ser preparadas com os agentes dispersantes ou umidificantes adequados juntos com o agente de suspensão por técnicas estabelecidas na arte. As preparações farmacêuticas

injetáveis estéreis também podem ser o licor ou suspensão injetável estéril no agente diluente ou solvente parenteralmente aceitável, não tóxico, tal como uma solução de 1,3-butanodiol. Os portadores e solventes
5 aceitáveis incluem água, solução de Ringer e solução de cloreto de sódio isotônica. Em adição, o óleo fixado estéril é freqüentemente usado como solvente ou meio de suspensão.

Se necessário, a dose de manutenção da presente
10 composição de composto ou combinações da mesma podem ser prescritas para o paciente uma vez que seu status de saúde tenha melhorado. Subseqüentemente, a dose e/ou freqüência de administração de fármaco pode ser reduzida ao nível mínimo requerido para manter o status de saúde
15 melhorado. Uma vez que a melhoria dos sintomas alcance o nível requerido, o tratamento deve ser descontinuado. Entretanto, uma vez que os sintomas da doença tenham qualquer recorrência, o paciente pode necessitar tratamentos intermitentes durante um longo período.

20 As preparações farmacêuticas divulgadas na presente invenção também podem conter ou podem ser usadas em combinação com ou em ordem correta com, outro agente ativo ou fármacos para incontinência urinária e micção freqüente devido à demência senil ou degradação da bexiga
25 urinária, enurese infantil, retardamento mental pediátrico, envelhecimento do cérebro, demência de meia idade e senil e síndrome de Parkinson.

Também é notado que a dose específica de administração de fármaco e o regime específico de tratamento para um
30 paciente específico dependem de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do extrato específico, a idade, o peso corporal, o status de saúde geral, o gênero, a dieta do paciente, o tempo de administração, a taxa de excreção, a composição do fármaco, o julgamento do médico
35 acompanhando e a gravidade da doença específica a ser tratada.

As configurações preferidas da presente invenção

Os exemplos seguintes são usados para a ilustração adicional de, mas não a limitação de, a presente invenção.

Exemplo 1. Efeitos de diferentes solventes na preparação de creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn

Matéria-prima de Shinyleaf Yellowhorn é secada e desoleada (preferivelmente por esmagamento com uma prensa de óleo) para conseguir pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn. 0,15 g do pó de torta é precisamente pesado e extraído com o dobro de peso de Extrator A. A extração é executada 4 vezes, cada uma durando 5 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e secado para obter extrato de Shinyleaf Yellowhorn.

O Extrator A pode ser hexano, dietil éter, clorofórmio, ou éter de petróleo. A extração também pode ser conduzida por procedimento de extração com CO₂ supercrítico. Os parâmetros técnicos para extração com CO₂ supercrítico são como segue: pressão de extração: 25~30 MPa, temperatura de extração: 45°C; vezes executadas: 4; agente de arraste: etanol, fração de volume: 70%, quantidade: 3%. Secar o extrato resultante para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn.

Extraíndo pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn com os citados solventes ou extraído pelo método de extração com CO₂ supercrítico, e medindo e comparando os respectivos resultados, nós descobrimos que todos estes solventes podem realizar uma eficiência de extração de 70% ou mais, enquanto o método de extração com CO₂ supercrítico pode realizar 80% ou mais. Levando em conta que o dietil éter é um anestésico e que clorofórmio é altamente tóxico, e que a produção de éter de petróleo é insegura, é mais preferido selecionar N-hexano como Extrator A. Enquanto isso, o método de extração com CO₂ supercrítico tem o rendimento de extração mais alto, livre de impurezas tóxicas, e pode ser adotado ao invés do método de extração convencional com Extrator A.

Exemplo II:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 10 kg de éter de petróleo para extração. O processo de extração é executado 4 vezes, cada um durando 6 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 6 l da solução de metanol a 55%. O processo de extração é executado 2 vezes, cada um durando 2 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e o solvente é recuperado a 60°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido em 1 l de água e então filtrado para obter Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 1 l de isobutanol por 3 vezes, cada uma durando 2 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e então o solvente é recuperado a 70°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido com 1 l de água, então a solução é filtrada para obter o Extrato Líquido II. Para o propósito de análise, uma porção do Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo III:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 15 kg de dietil éter para extração. O processo de extração é executado 3 vezes, cada uma durando 5 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 7 l da solução de etanol a 65% para executar extração por 3 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e o solvente é recuperado a 65°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido em 2 l de água e então filtrado para obter o Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 2 l de pentanol por 3 horas. Os extratos

líquidos são filtrados e combinados e então o solvente é recuperado a 62°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido com 0,5 l de água, então a solução é filtrada para obter Extrato Líquido II. Para o propósito de análise, uma porção do Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo IV:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 15 kg de éter de petróleo para extração. O processo de extração é executado 5 vezes, cada uma durando 4 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 8 l da solução de etanol a 75% para extração. O processo de extração é executado duas vezes, cada uma durando 2 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e o solvente é recuperado a 70°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido em 1 l de água e então filtrado para obter o Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 2 l de n-butanol por 2 vezes, cada uma durando 4 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e então o solvente é recuperado a 65°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido com 0,7 l de água, então filtrado para obter o Extrato Líquido II. Para o propósito de análise, uma porção do Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo V:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 10 kg de éter de petróleo para extração. O processo de extração é executado 3 vezes, cada uma durando 6 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para

obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 4 l da solução de metanol a 85% para executar a extração por 4 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e o
5 solvente é recuperado a 67°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido em 2 l de água e então filtrado para obter Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 1 l de n-propanol por 3 vezes, cada uma
10 durando 2~4 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e então o solvente é recuperado a 60°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido com 1 l de água, então filtrado para obter Extrato Líquido II. Para o propósito
15 de análise, uma porção do Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo VI:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e
20 adicionados a 10 kg de n-hexano para extração. O processo de extração é executado 4 vezes, cada uma durando 6 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato
25 é pesado e adicionado a 6 l da solução de metanol a 55%. A extração é executada 2 vezes, cada uma durando 2 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e o solvente é recuperado a 60°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é
30 dissolvido em 1 l de água e então filtrado para obter Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 1 l de isobutanol por 3 vezes, cada uma durando 2 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e então o solvente é recuperado a 70°C sob
35 pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido com 1 l de água, então filtrado para obter o Extrato Líquido II. Para o

propósito de análise, uma porção do Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo VII:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 15 kg de n-hexano para extração. O processo de extração é executado 3 vezes, cada uma durando 5 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 7 l da solução de etanol a 65% para executar extração por 3 horas. Os extratos líquidos resultantes são filtrados e combinados, e o solvente é recuperado a 65°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido em 2 l de água e então filtrado para obter o Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 2 l de pentanol por 3 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e então o solvente é recuperado a 62°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido com 0,5 l de água, então filtrado para obter o Extrato Líquido II. Para o propósito de análise, uma porção do Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo VIII:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 15 kg de n-hexano para extração. O processo de extração é executado 5 vezes, cada uma durando 4 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 8 l da solução de etanol a 75%. A extração é executada 2 vezes, cada uma durando 2 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e o solvente é recuperado a 70°C sob pressão reduzida até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é

dissolvido em 1 l de água e então filtrado para obter o Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 2 l de n-butanol, a extração executada 2 vezes, cada uma durando 4 horas. Os extratos líquidos são
5 filtrados e combinados e então o solvente é recuperado a 65°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido com 0,7 l de água, então filtrado para obter Extrato Líquido II. Para o propósito de análise, uma porção de Extrato Líquido II
10 é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo IX:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 10 kg de n-hexano para extração. O processo
15 de extração é executado 3 vezes, cada uma durando 6 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 4 l da solução de metanol a 85%
20 para executar extração por 4 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e o solvente é recuperado a 67°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido em 2 l de água e então filtrado para obter o Extrato Líquido I. O
25 Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 1 l de isopropanol, a extração executada 3 vezes, cada uma durando 2~4 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e então o solvente é recuperado a 60°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O
30 extrato resultante é dissolvido com 1 l de água, então filtrado para obter Extrato Líquido II. Para o propósito de análise, uma porção de Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

35 Exemplo Comparativo I:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 10 kg de água para extração. O processo de

extração é executado 4 vezes, cada uma durando 5 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 6 l da solução de metanol a 70%. O processo de extração é executado 2 vezes, cada uma durando 2 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e o solvente é recuperado a 60~70°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido em 2 l de água e então filtrado para obter o Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 1 l de n-butanol, a extração executada 3 vezes, cada uma durando 2~4 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados e então o solvente é recuperado a 65°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido com 1 l de água, então filtrado para obter o Extrato Líquido II. Para o propósito de análise, uma porção de Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo Comparativo II:

5 kg de pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e adicionados a 10 kg de metanol para extração. O processo de extração é executado 4 vezes, cada uma durando 5 horas. O solvente é recuperado sob pressão reduzida e o extrato líquido resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn. 1 kg do creme de extrato é pesado e adicionado a 6 l de solução de n-butanol. O processo de extração é executado 2 vezes, cada uma durando 2 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados e o solvente é recuperado a 60~70°C sob pressão reduzida, até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é dissolvido em 2 l de água e então filtrado para obter o Extrato Líquido I. O Extrato Líquido I é adicionalmente extraído com 1 l de água, a extração é executada 3 vezes, cada uma durando 2~4 horas. Os extratos líquidos são filtrados e combinados, e então

o solvente é recuperado a 65°C sob pressão reduzida. O extrato resultante é dissolvido com 1 l de água, então filtrado para obter o Extrato Líquido II. Para o propósito de análise, uma porção de Extrato Líquido II é evaporada até a secura para obter um extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo de refinamento I:

O Extrato Líquido II obtido a partir do Exemplo VI é carregado na coluna de resina microporosa de estireno D201 e adsorvido por 20 min. A coluna é lavada com 1500 ml de água a uma taxa de fluxo de 3,0 ml/min e então eluída com 1500 ml de solução de metanol ou etanol a 35% como o agente eluente em uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min. Um eluato de álcool a 20% é coletado e o solvente é recuperado sob pressão reduzida a 68°C até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é concentrado e secado para obter o extrato refinado de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo de refinamento II:

O Extrato Líquido II obtido do Exemplo VII é carregado na coluna de resina microporosa de estireno AB8 e adsorvido por 30 min. A coluna é lavada com 1300 ml de água a uma taxa de fluxo de 4,0 ml/min e então eluída com 1000 ml de solução de metanol ou etanol a 80% como o agente eluente a uma taxa de fluxo de 2 ml/min. Um eluato de álcool a 30% é coletado e o solvente é recuperado sob pressão reduzida a 65°C até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é concentrado e secado para obter o extrato refinado de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo de refinamento III:

O Extrato Líquido II obtido do Exemplo VIII é carregado em coluna de resina microporosa de estireno HP20 e adsorvido por 35 min. A coluna é lavada com 900 ml de água a uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min e então eluída com 3000 ml de solução de metanol ou etanol a 60% como o agente eluente a uma taxa de fluxo de 1 ml/min. Um eluato de álcool a 25% é coletado e o solvente é recuperado sob

pressão reduzida a 60°C até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é concentrado e secado para obter o extrato refinado de Shinyleaf Yellowhorn.

Exemplo de refinamento IV:

5 O Extrato Líquido II obtido do Exemplo IX é carregado na coluna de resina microporosa de estireno D101 e adsorvido por 40 min. A coluna é lavada com 600 ml de água a uma taxa de fluxo de 2,0 ml/min e então eluída com 2000 ml de solução de metanol ou etanol a 40% como o agente eluente
10 a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. Um eluato de álcool a 22% é coletado e o solvente é recuperado sob pressão reduzida a 60°C até que não haja odor de álcoois. O extrato resultante é concentrado e secado para obter o extrato refinado de Shinyleaf Yellowhorn.

15 Exemplo de análise: Determinação do teor de saponina B de Shinyleaf Yellowhorn

Determinar o teor de saponina B por HPLC.

Preparação de amostra de controle: creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn é extraído com metanol ou etanol a
20 55~85%, e o extrato líquido resultante é então carregado na coluna de resina microporosa de estireno para absorção. Eluído com solução de etanol a 20~80% como agente eluente. Um eluato de álcool a 50~70% é coletado e carregado na coluna de sílica. Eluído com
25 clorofórmio/metanol como o agente eluente. Uma 45:55 (V/V, clorofórmio/metanol) do eluato é coletada e cromatografada com um cromatógrafo de líquido preparativo usando metanol/água (V/V de 75/25) como a fase móvel. O eluato resultante é concentrado e secado para obter a
30 amostra de controle de saponina B. Como determinado pelo detector de luz evaporativa para cromatografia líquida, a pureza da amostra de controle de saponina B é maior que 97%.

Condições de detecção cromatográfica e testes de
35 adaptabilidade do sistema: ODS usado como o agente de carga, e a metanol-água-ácido fosfórico (com V/V/V de 75/25/0/01) usada como a fase móvel, o comprimento de

onda de detecção é 215 nm; e o número de placas teóricas (N.T.P.) deve ser não menor que 3000 calculado de acordo com o pico de saponina B de Shinyleaf Yellowhorn.

Preparação da solução de amostra de controle: Algumas amostras de controle de saponina B são precisamente pesadas e misturadas na fase móvel para preparar a solução de 0,04 mg/ml.

Preparação da solução de amostra de teste: 4 g de extrato de Shinyleaf Yellowhorn são pesados e extraídos ultrassonicamente com etanol a 70%. Uma porção de 10 ml é evaporada até a secura, então dissolvida em água e carregada na coluna de resina; de acordo com o teste de 'cromatografia de coluna', um eluato de etanol a 70% é coletado e então filtrado com uma membrana-filtro de 0,45 µm para obter a solução de amostra de teste.

Método de determinação: 10 µl de cada uma de a amostra de controle e a solução de amostra de teste são extraídos e determinada a área pico para o cálculo do teor de saponina B.

Comparação de teores de saponina B nos extratos preparados por vários métodos de extração

O teor de saponina B em extrato de Shinyleaf Yellowhorn obtido a partir de cada exemplo é determinado com o método acima, e então os teores de saponinas totais são extrapolados assumindo que a saponina B represente 30% das saponinas totais. Os resultados são como seguem:

Tabela 1: Teores de saponina B e saponinas totais em extratos de Shinyleaf Yellowhorn

N° do Exemplo a partir do qual o extrato bruto de Shinyleaf Yellowhorn foi obtido	Saponina B	Saponinas totais
Exemplo II	6,03%	20,1%
Exemplo III	5,55%	18,5%
Exemplo IV	7,44%	24,8%
Exemplo V	6,75%	22,5%
Exemplo VI	6,18%	20,6%
Exemplo VII	5,73%	19,1%
Exemplo VII	7,59%	25,3%
Exemplo IX	6,87%	22,9%

Exemplo Comparativo I	1,38%	4,6%
Exemplo Comparativo II	2,16%	7,2%
Exemplo de refinamento I	24,69%	82,3%
Exemplo de refinamento II	27,54%	91,8%
Exemplo de refinamento III	16,68%	55,6%

Exemplo Experimental 1: efeito de extrato de Shinyleaf Yellowhorn na freqüência de urinação de camundongo cheio de água

As cepas de animais experimentais usadas aqui são os camundongos SPF KM e ratos Wistar. Cada rato ou camundongo recebe administração de fármaco por alimentação por sonda esofágica. Extrato de Shinyleaf Yellowhorn é o extrato refinado do Exemplo de Refinamento IV, na forma de cápsulas. O fármaco de controle é imipramina, que tem uma forte ação antidepressiva e uma fraca ação similar à atropina, e é freqüentemente usado para o tratamento de depressão e enurese infantil. O método experimental é calcular a freqüência de urinação de camundongo baseado na reação colorífica ocorrendo quando iodeto de potássio seco e amido são misturados com a urina.

Tabela 2. Efeitos de Extrato de Shinyleaf Yellowhorn na freqüência de urinação de camundongo carregado com água

Grupo	Número de animais	Dose (g/kg*d)	Freqüência de urinação (vezes/cada)			
			X ± DP			
			0,5 h	1,0 h	2,0 h	3,0 h
salmoura fisiológica	10	volume eq. x 10	1,2±1,1	2,9±1,4	2,4±1,6	1,2±1,1
Extrato de imipramina de dose alta	10	0,01x10	0,9±0,7	2,9±1,3	2,6±1,5	1,3±0,8
extrato de dose baixa	10	0,01x10	1,0±0,7	2,4±1,3	2,0±1,5	1,4±1,1
extrato de dose alta	10	0,20x10	0,8±0,6	1,9±1,0*	1,9±1,6	0,8±0,7

*: $P < 0,05$ comparado com o grupo de controle

Os resultados experimentais mostram que a administração de uma certa dose de extrato de Shinyleaf Yellowhorn levará à diminuição na freqüência de urinação do

camundongo cheio de água dentro de um certo período de tempo.

Exemplo Experimental II: Efeitos de extrato de Shinyleaf Yellowhorn e imipramina em músculo liso excisado de bexiga de ratos

A cepa de animal experimental usada aqui são os ratos SPF Wistar. O processo de experimento é como segue: a bexiga do rato é excisada cirurgicamente para preparar as tiras de músculo liso; colocar o músculo liso na solução de nutriente termostática, e então adicionar extrato de Shinyleaf Yellowhorn (o extrato refinado do Exemplo de Refinamento IV, na forma de cápsulas) e a imipramina respectivamente, sob as condições de suprimento de oxigênio, para observar as mudanças no músculo liso.

Critério para graduação: depois da calibração por um transdutor, uma queda de 0,5 mm da linha base indica o relaxamento completo do músculo liso, uma linha base inalterada indica a não resposta do músculo liso, enquanto uma subida da linha base mostra a contração do músculo liso.

Tabela 3. Concentrações de soluções à medida que o músculo liso mostra relaxamento completo

Grupo	Número de vezes do experimento	Concentração da solução (mg/ml)
Imipramina	12	0,15
Extrato de Shinyleaf Yellowhorn	12	0,80

O resultado experimental mostra que extrato de Shinyleaf Yellowhorn pode atuar diretamente no músculo liso de bexiga de ratos, fazendo-o relaxar.

Exemplo Experimental III: a ação antagonística de extrato de Shinyleaf Yellowhorn em contração induzida por Ach do músculo liso excisado da bexiga de ratos

O método experimental é o mesmo que aquele descrito no Exemplo Experimental II.

Tabela 4: EC50 Determinação da ação de extrato de Shinyleaf Yellowhorn e/ou Ach na concentração do músculo

liso excisado de bexiga do rato

Fármaco	EC ₅₀ (mg/ml)	P (f=∞) (t=2,5)
Ach	$3,4 \times 10^{-11}$	--
Extrato de Shinyleaf Yellowhorn mais Ach	$2,9 \times 10^{-10}$	<0,05

Os resultados experimentais mostram que extrato de Shinyleaf Yellowhorn (o extrato refinado do Exemplo de Refinamento IV, produzido na forma de cápsulas) tem a
5 ação antagonística na contração induzida por Ach do músculo liso excisado de bexiga do rato, tornando o músculo liso contraído completamente relaxado.

Exemplo Experimental IV: Efeito de extrato de Shinyleaf Yellowhorn na bioeletricidade do eletrodo extracelular do
10 esfíncter externo da bexiga do coelho

Método experimental: implantar cirurgicamente eletrodo residente e registrar as mudanças do esfíncter externo da bexiga do coelho com um gravador fisiológico. Modo de administração: administração por sonda esofágica. O
15 fármaco adrenomimético Midodrina é um agonista adrenoceptor α_1 seletivo, comumente usado para tratamento de incontinência por estresse clinicamente.

Tabela 5. Efeitos de extrato de Shinyleaf Yellowhorn no esfíncter externo de bexiga do coelho (X±DP)

Grupo	Animais (n)	Dose	Frequência (vezes/min)	Amplitude da onda (mv)	Tempo de duração (min)
Grupo de controle	30		$5,5 \pm 3,0$	$4,2 \pm 1,8$	$0,2 \pm 0,1$
Midodrina	10	0,4 mg/kg	$35,4 \pm 11,6^{**}$	$14,9 \pm 6,7^{**}$	$18,7 \pm 10,3^{**}$
Dose baixa	10	0,1 g/kg	$25,6 \pm 10,1^{**}$	$9,7 \pm 4,2^{**}$	$8,2 \pm 3,6^{**}$
Dose alta	10	0,2 g/kg	$31,3 \pm 5,4^{**}$	$13,9 \pm 5,4^{**}$	$12,6 \pm 6,3^{**}$

20 *: P<0,05, comparado com o grupo de controle

** : P<0,01, comparado com o grupo de controle

Os resultados experimentais mostram que tanto extrato de Shinyleaf Yellowhorn (o extrato refinado do Exemplo de Refinamento IV, na forma de cápsulas) quanto a Midodrina
25 podem elevar significativamente a frequência e amplitude

de onda da bioeletricidade do eletrodo extracelular do esfíncter externo da bexiga do coelho, provendo assim seu efeito para significativamente intensificar a excitabilidade do esfíncter da bexiga.

5 Exemplo Experimental V: Efeito de extrato de Shinyleaf Yellowhorn nas horas de sono do camundongo

Estabelecer o modelo animal de sono do camundongo por uma injeção intraperitoneal de pentobarbital. Administrar fármaco por administração por sonda esofágica uma hora
10 antes da injeção, de modo a observar o tempo de recuperação para o reflexo de normalização do camundongo. Modo de administração: administração por sonda esofágica. A telucidona (meclofenoxato ou centrofenoxina) tem uma ação excitante no nervo central e é comumente usada para
15 o tratamento clínico de perturbação inconsciente traumática e enurese infantil.

Tabela 6. Efeito de extrato de Shinyleaf Yellowhorn nas horas de sono de camundongo ($\bar{X} \pm DP$)

Grupo	animais (n)	Dose (g/kg)	Horas de sono
controle de sono	15		78,6 $\pm$ 15,3
Telucidona	15	0,02	61,2 $\pm$ 10,7*
Dose baixa de extrato	15	0,10	63,6 $\pm$ 11,2*
Dose alta de extrato	15	0,20	57,5 $\pm$ 9,4**

*: $P < 0,05$, comparado com o grupo de controle de sono

20 **: $P < 0,01$, comparado com o grupo de controle de sono

Os resultados experimentais mostram que extrato de Shinyleaf Yellowhorn (o extrato refinado do Exemplo de Refinamento IV, na forma de cápsulas) pode encurtar significativamente as horas de sono prolongadas pelo
25 pentobarbital de sódio em camundongo, indicando que ele pode intensificar significativamente a excitabilidade do nervo central.

Exemplo Experimental VI: Efeitos de extrato de Shinyleaf Yellowhorn em deterioração da memória

30 Estabelecer o modelo animal de deterioração da memória conforme o método divulgado em "Memory Impairment Animal

Models" [Modelos animais de deterioração de memória] (Pharmacological Experimental Methodology, Terceira Edição, P829). Anisodina é um fármaco anticolinérgico, com toxicidade menor do que aquela da atropina.

- 5 Modo de administração: administração por sonda esofágica. O fármaco colinomimético Donepezil (Aricept) é um nootrópico do metabolismo cerebral e é um inibidor reversível específico de acetilcolinesterase. O fármaco
10 sináptica, reforçando assim o teor de acetilcolina, e é comumente usado para tratamento clínico da demência senil de Alzheimer.

Tabela 7. Efeito melhorador de extrato de Shinyleaf Yellowhorn na deterioração induzida por anisodina da
15 memória do camundongo

Grupo	Animais (n)	Dose	Latência evitando eletricidade (s)	Número de erro (vezes)
Controle normal	15		260,3±133,9*	0,18±0,16**
Controle modelo	15	5 mg/kg	88,7±62,4	1,37±1,10
Aricept	15	0,5 mg/kg	255,9±126,1**	0,20±0,18**
Baixa dose de extrato	15	0,1 g/kg	181,4±103,6*	0,48±0,35*
Alta dose de extrato	15	0,2 g/kg	224,3±118,0**	0,28±0,21**

*: $P < 0,05$, comparado com o grupo controle modelo;

** : $P < 0,01$, comparado com o grupo controle modelo

- Os resultados experimentais mostram que extrato de Shinyleaf Yellowhorn (o extrato refinado do Exemplo de Refinamento IV, na forma de cápsulas) pode prolongar
20 significativamente o tempo evitando eletricidade em camundongo com deterioração de memória, e reduzir o número de erros, indicando que o extrato de Shinyleaf Yellowhorn pode melhorar significativamente a
25 deterioração da memória.

Exemplo Experimental VII: Efeito de extrato de Shinyleaf Yellowhorn na anulação de reflexo condicionado de modelo

de rato com demência com neurônio colinérgico destruído e
gânglia basal de Meynert

O modelo animal de demência senil é estabelecido de acordo com o método divulgado em "Experimental
5 Alzheimer's Disease Animal Model with Destructed Cholinergic Neuron" [Modelo animal de doença de Alzheimer experimental com neurônio colinérgico destruído], Terceira Edição, P848). O ácido caínico é um agonista receptor para o glutamato neurotransmissor excitante
10 central, que foi amplamente usado como um fármaco de ferramenta para estabelecer o modelo de neurotoxicidade pela comunidade internacional.

Modo de administração: administração por sonda esofágica. A Piracetama-NEGPF [piracetama, topiramato de acetamida,
15 anel de amido pirrol (cetona)] é um nootrópico do metabolismo do cérebro que pode proteger e reparar células nervosas do crânio, promover a transformação de ADP em ATP no cérebro e a síntese de acetilcolina e prevenir contra o dano das funções do cérebro provocadas
20 pelos fatores físicos e químicos, e é usada em clínica para o tratamento de desordem de funcionamento do cérebro devido ao envelhecimento, acidente vascular cerebral, ferimento traumático do cérebro, e envenenamento por CO.

Tabela 8. Efeito de extrato de Shinyleaf Yellowhorn na anulação de reflexo condicionado do modelo de rato com demência ($X \pm DP$)

Grupo	Animais (n)	Dose (g/kg)	0 1° dia		0 3° dia		0 5° dia		72 h após a parada do treinamento	
			Taxa positiva (%)	Latência (%)	Taxa positiva (%)	Latência (%)	Taxa positiva (%)	Latência (%)	Taxa positiva (%)	Latência (%)
Controle normal	10		55,7±16,3*	3,1±0,8**	91,2±8,8**	2,1±0,6**	100**	1,3±0,4**	92,3±7,4**	1,7±0,5**
Modelo de rato c/demência	8		28,3±10,2	8,3±3,6	31,0±7,2	6,3±2,9	48,7±10,7	4,8±1,0	37,5±8,0	6,0±1,2
Piracetama- NEGPF	7	0,2	30,5±12,7	7,1±3,3	57,6±8,0*	4,4±1,0*	71,05±8,2*	2,6±0,6*	58,2±7,4*	4,6±0,7*
Extrato de Shinyleaf Yellowhorn	7	0,2	28,8±11,4	7,8±2,6	52,1±8,5*	5,2±1,4*	68,4±9,6*	3,1±1,1*	51,7±6,6*	5,1±0,9*

*: $P < 0,05$, comparado com grupo de modelo de rato com demência;

** : $P < 0,01$, comparado com grupo de modelo de rato com demência.

Os resultados experimentais mostram que extrato de Shinyleaf Yellowhorn (o extrato refinado do Exemplo de Refinamento IV, na forma de cápsulas) pode reforçar significativamente a taxa positiva de resposta de anulação no modelo animal com demência e encurtar a latência da resposta de anulação, o que indica que ele pode melhorar as funções do cérebro em modelo animal com demência.

Exemplo Experimental VIII: Relatório da tentativa clínica de tratamento de demência senil com extrato de Shinyleaf Yellowhorn

Fontes de casos: Um total de 30 pacientes externos, diagnosticados com demência senil, foram selecionados randomicamente para análise. Os 30 sujeitos incluíam 30 machos (76,66%) e sete fêmeas (23,33%). Entre eles estavam 6 casos com idades de 68 a 70 anos, 17 casos com idade de 70 a 80 e sete com idade de 80 a 86, com uma idade média de 77,5.

Os critérios de diagnóstico para demência senil, emitido pela Associação Médica da China em 1989, foram usados para o diagnóstico. O extrato de Shinyleaf Yellowhorn é obtido a partir do Exemplo de Refinamento III e na forma de comprimidos. A dose é 0,2 grama por vez (três vezes ao dia). Após a administração sucessiva por três meses, o efeito terapêutico é avaliado.

Critérios para o efeito terapêutico: os critérios para o efeito terapêutico como revisados na Conferência Nacional sobre Demência Senil realizada pela Sociedade Gerontológica e a Sociedade Médica Interna da Associação Nacional de Medicinas Chinesas Tradicionais em maio de 1990 foram usados para o julgamento do efeito terapêutico do tratamento.

Cura: Os sintomas subjetivos desapareceram completamente; a consciência é clara; a orientação é perfeita; o sujeito pode responder questões corretamente e a resposta é sensível; o sujeito tem a capacidade de cuidar de si, e é capaz de participar em atividades sociais;

Eficácia notada: Os sintomas principais desapareceram; a consciência é clara; a orientação é perfeita; o sujeito pode responder questões substancialmente corretamente e a resposta é razoavelmente sensível; o sujeito tem a capacidade de cuidar de si, e é capaz de participar em atividades sociais normais;

Eficácia: Os sintomas psiquiátricos principais diminuíram ou desapareceram parcialmente; o sujeito tem a capacidade de cuidar de si; o sujeito pode responder a questões substancialmente corretamente mas a resposta é retardada; ainda existem algumas perturbações intelectuais e de personalidade;

Ineficácia: Os sintomas psiquiátricos principais não mostraram sinais de melhoria ou a condição patogênica ainda está piorando; o sujeito é incapaz de cuidar de si, não pode responder questões corretamente, e a consciência é completamente retardada.

Análise de resultados de eficácia: Após a administração sucessiva por três meses, o efeito terapêutico é avaliado. Do total de 30 sujeitos, nove (30%) mostraram eficácia notável, e 19 (63%) mostraram alguma eficácia, enquanto dois (7%) não mostraram sinal de eficácia; a taxa de eficácia total é 93%.

Exemplo Experimental IX: Tentativa clínica de tratamento de retardamento pediátrico com extrato de Shinyleaf Yellowhorn

Fontes de casos: Um total de 30 pacientes externos, diagnosticados a terem retardamento mental pediátrico, foram selecionados randomicamente para análise. Os 30 sujeitos incluíram 18 machos (60%) e 12 fêmeas (40%). Entre eles estavam 16 casos com idade de 5-8, e 14 com idade de 8-13, com uma idade média de 8,1. A graduação da condição do paciente é como segue: 3 com condições graves, 14 médias e 13 suaves, respectivamente.

Tabela 9: Distribuição de QI em grupos de idades diferentes antes do tratamento

Faixa de idade	QI		
	20-34	35-49	50-70
5~8	2	7	7
8~13	1	7	6

O padrão de diagnóstico: De acordo com a Escala de Inteligência de Crianças Jovens China-Wechsler (CWYCSI), se o placar de QI é menor que 70, o sujeito foi diagnosticado a ter um retardamento mental, o qual é adicionalmente dividido em três graus: grave (com um placar de QI de 20~34), médio (35~49) e leve (50~70).

O extrato de Shinyleaf Yellowhorn é obtido a partir do Exemplo de Refinamento III e na forma de comprimidos. A dose é 0,1 grama cada vez (três vezes ao dia). Após a administração sucessiva por três meses, o QI é determinado.

Análise dos resultados de eficácia: Após a administração sucessiva por três meses, o QI é determinado. 11 do total de 30 sujeitos mostraram efeito notável, representando 36,66%, e 2 (6,67%) mostraram efeito, enquanto 17 não mostraram efeito, representando 56,55%. A taxa efetiva é 43,33%.

Tabela 10. Distribuição de QI em grupos de idades diferentes após tratamento

Faixa de idade	QI			
	20-34	35-49	50-70	Acima de 70
5~8	1	4	8	3
8~13	1	5	7	1

Todos os sujeitos não mostraram reação adversa durante o tratamento. Portanto, é aparente que o extrato de Shinyleaf Yellowhorn divulgado na presente invenção tem efeito terapêutico no tratamento de retardamento mental pediátrico, e é seguro e confiável.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar extrato de Shinyleaf Yellowhorn, caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

5 A. Matéria-prima de Shinyleaf Yellowhorn ser seca e desoleada (preferivelmente por esmagamento com uma prensa de óleo) para preparar o pó de torta de Shinyleaf Yellowhorn, o pó de torta é extraído com Extrator A ou usando método de extração com CO₂ supercrítico, o extrato
10 resultante é secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn, sendo que o Extrator A é selecionado de n-hexano, éter de petróleo, clorofórmio e dietil éter, com n-hexano preferido;

B. Creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn ser
15 adicionalmente extraído com Extrator B com uma concentração de 50~90%, preferivelmente 55~85%, ou mais preferivelmente 65~80% em uma razão de volume/peso de 2~9:1 (preferivelmente 4~8:1), o processo de extração ser executado 1~2 vezes, cada uma durando 2~4 horas, com o
20 extrato resultante filtrado e combinado, e então dissolvido em água e filtrado novamente para obter Extrato Líquido I, sendo que o Extrator B é metanol ou etanol;

C. O Extrato Líquido I ser adicionalmente extraído com
25 Extrator C, com o extrato resultante filtrado e combinado, e então dissolvido na água e filtrado novamente para obter Extrato Líquido II, sendo que o Extrator C é selecionado de n-butanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, e pentanol, com n-butanol, n-propanol, ou isopropanol preferidos;

D. Extrato Líquido II ser carregado em uma coluna de resina microporosa de estireno para absorção. Então eluído usando a solução de metanol ou etanol como o eluente, o eluato ser coletado, concentrado e secado para
35 obter o extrato refinado de Shinyleaf Yellowhorn.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de na etapa A, quando extraído com Extrator A,

ser preferido adicionar Extrator A ao pó de torta em uma razão de peso/peso de 1~5:1 (preferivelmente 2~3:1), e executar o processo de extração 2~6 vezes, preferivelmente 3~5 vezes, então o solvente ser recuperado sob pressão reduzida e o extrato resultante ser secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de na etapa A, quando extraído pelo método de extração com CO₂ supercrítico, o pó de torta ser colocado no CO₂ supercrítico para a extração, os parâmetros técnicos para a extração com CO₂ supercrítico serem como segue: a pressão de extração ser 10~50 MPa (preferivelmente 20~30 MPa), a temperatura de extração ser 20~60°C (preferivelmente 40~50°C), o número de vezes de extração ser 2~5, o agente de arraste ser etanol com uma fração em volume de 60~95% e a quantidade de agente de arraste usada ser 1~6% (preferivelmente 2~4%); o extrato resultante ser secado para obter creme de extrato de Shinyleaf Yellowhorn.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de na etapa B, os extratos líquidos resultantes serem filtrados e combinados, e então o solvente ser recuperado sob pressão reduzida preferivelmente a 60~70°C, até que não haja odor de álcoois; o extrato resultante ser dissolvido em 0,5~3 volumes, preferivelmente 1~2 volumes de água e então filtrado para obter Extrato Líquido I.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de na etapa C, para extração adicional de Extrato Líquido I com Extrator C, ser preferido usar 0,5~3 volumes, preferivelmente 1~2 volumes de Extrator C, e extrair 1~3 vezes, cada uma por 2~4 horas; então o extrato resultante ser filtrado e combinado, e o solvente ser recuperado sob pressão reduzida, preferivelmente a 60~70°C, até que não haja odor de álcoois; o extrato resultante ser dissolvido em 0,2~2 volumes,

preferivelmente 0,5~1 volume de água, e filtrado para obter Extrato Líquido II.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de na etapa D, quando Extrato Líquido II é
5 carregado na coluna de resina macroporosa de estireno para absorção, ser preferido executar a absorção por 10~60 minutos (preferivelmente 20~40 minutos), e então a coluna ser lavada com 600~1500 ml de água em uma taxa de fluxo preferida de 1,0~4,0 ml/min, então eluído usando
10 800~3000 ml da solução de metanol ou etanol com uma concentração de 30~80%, preferivelmente 40~70%, ou mais preferivelmente 60~70% como eluente, em uma taxa de fluxo preferida de 0,5 a 2,0 ml/min; o eluato de álcool a 20~30% ser coletado e o solvente ser recuperado sob
15 pressão reduzida, preferivelmente a 60~70°C, até que não haja odor de álcoois; a solução resultante ser concentrada e secada para obter o extrato refinado de Shinyleaf Yellowhorn.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de na etapa D, a coluna de resina macroporosa de estireno a ser usada ser polar, ou polar fraca, ou não polar.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1~7, caracterizado pelo fato de o método de extração ser
25 extração por refluxo térmico ou extração ultra-sônica.

9. Extrato de Shinyleaf Yellowhorn, caracterizado pelo fato de ser preparado pelo método como identificado em qualquer uma das reivindicações 1~7, consistindo principalmente de saponinas totais de Shinyleaf
30 Yellowhorn, as quais representam mais que 50%, preferivelmente mais que 60%, mais preferivelmente mais que 70%, e o mais preferivelmente mais que 80% do peso total do extrato de Shinyleaf Yellowhorn.

RESUMO

"MÉTODO PARA PREPARAR EXTRATO DE SHINYLEAF YELLOWHORN E EXTRATO DE SHINYLEAF YELLOWHORN".

5 A presente invenção divulga uma espécie de extrato de
Shinyleaf Yellowhorn consistindo principalmente de
saponinas totais de Shinyleaf Yellowhorn, que representam
mais que 50% do peso total do extrato de Shinyleaf
Yellowhorn. A presente invenção também provê um método
10 para a preparação do extrato acima, bem como seu uso no
tratamento da incontinência urinária e micção freqüente
devido à demência senil ou degradação da bexiga urinária,
enurese infantil, retardamento mental pediátrico,
demência da meia idade e senil e síndrome de Parkinson.
As preparações farmacêuticas da presente invenção incluem
15 injeções, comprimidos, cápsulas, cápsulas macias, líquido
oral, pílulas, etc.