[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01811942.5

[51] Int. Cl.
A61K 31/12 (2006.01)
A61K 36/489 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 5/30 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1299672C

[51] Int. Cl. (续)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)

[22] 申请日 2001.6.29 [21] 申请号 01811942.5

[30] 优先权

[32] 2000. 6.29 [33] DE [31] 10031651.4

[86] 国际申请 PCT/DE2001/002460 2001.6.29

[87] 国际公布 WO2002/000236 德 2002.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.27

[73] 专利权人 威廉施瓦布博士有限公司

地址 德国卡尔斯鲁厄

[72] 发明人 C·埃德勒迈尔 H·贾格伊

E·科赫

[56] 参考文献

EP0998824A1 2000.5.10

JP02073079A 1990.3.13

审查员 郑红蕾

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 刘金辉

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 3 页

[54] 发明名称

槐属物种的提取物,它们的生产方法和用途

[57] 摘要

本发明涉及槐属物种提取物、该提取物的生产方法和它们在预防和治疗由雌激素缺乏或其它激素调节障碍导致的病症中的用途。

1、来自选自苦参、山豆根、苦豆子、槐树、广豆根、绒毛槐、砂生槐和 Sophora leachiana 的槐属物种的提取物，其特征在于所述提取物包含总量不大于 0.2%的生物碱，并且它包含黄酮、异黄酮、查耳酮和紫檀烷类化合物，其中的黄酮类化合物包括 8-异戊烯基柚配基、苦参醇 X、8-异戊烯基茨非醇、leachianon G 和苦参醇 E，其中的异黄酮类化合物包括大豆黄素和染料木黄酮，其中的查耳酮类化合物包括 2,4,4',6'-四羟基-3'-熏衣草基-2'-甲氧基查耳酮，其中的紫檀烷类化合物包括高丽槐素和高丽槐素葡糖苷。

2、根据权利要求 1 的提取物，其特征在于它包含总量不大于 0.1%的生物碱。

3、根据权利要求 1 的提取物，其特征在于它不含生物碱。

4、根据权利要求 1 至 3 之任一项的提取物，其中的槐属物种选自苦参和山豆根。

5、获得选自苦参、山豆根、苦豆子、槐树、广豆根、绒毛槐、砂生槐和 Sophora leachiana 的槐属物种的提取物的方法，其特征在于包括以下步骤:

a) 用选自下列的溶剂对作为药物的所述槐属物种进行一次或多次提取;

i) 醇的水溶液和丙酮水溶液，其中步骤 a)i)中所用的醇以 10-96% [v/v]或[w/w]的含水混合物的形式存在，或者步骤 a)i)中所用的丙酮以 10-99% [v/v]或[w/w]的含水混合物的形式存在; 和

ii) 乙酸乙酯，包括含水或水饱和的乙酸乙酯;

其中在每次提取时药物与溶剂的比例为 1: 7 至 1: 10;

b) 除去在步骤 a) i)中得到的醇或丙酮提取溶液中的溶剂;

c) i) 将步骤 b)中得到的残余物在选自乙酸乙酯、叔丁基甲基醚、正丁醇和丁酮的有机溶剂和水之间进行一次或多次分配，然后合并如此得

到的溶剂相；或者

c) ii) 用水直接对在步骤 a) ii)中得到的乙酸乙酯提取液进行一次或多次分配；和

d) 将步骤 c)中得到的合并的有机溶剂相浓缩至干。

6、根据权利要求 5 的方法，其中步骤 a)的提取进行两次。

7、根据权利要求 5 的方法，其中在步骤 a)i)中所用的溶剂为乙醇水溶液。

8、根据权利要求 5 的方法，其中步骤 a)i)中所用的醇或步骤 a)i)中所用的丙酮以 50-92%[v/v]或[w/w]的含水混合物的形式存在。

9、根据权利要求 5 的方法，其中步骤 a)i)中所用的溶剂为 70% [v/v]或 60% [w/w]的乙醇水溶液。

10、根据权利要求 5 的方法，其中步骤 c)i)中所用的溶剂为乙酸乙酯。

11、根据权利要求 5 至 10 之任一项的方法，其中的槐属物种选自苦参和山豆根。

12、包含权利要求 1 至 4 之任一项的提取物和药学上可接受的赋形剂的药物制剂。

13、根据权利要求 1 至 4 之任一项的提取物，或根据权利要求 12 的药物制剂在制备用于预防和治疗由雌激素缺乏或性激素代谢调节障碍所导致的病症的药物中的用途。

14、根据权利要求 13 的用途，其中的病症选自更年期不适、性激素依赖性癌症、良性前列腺增生、骨质疏松、阿耳茨海默氏病和心血管疾病。

15、根据权利要求 14 的用途，其中的性激素依赖性癌症选自乳腺癌、前列腺癌和子宫癌。

16、根据权利要求 13 的用途，其中的性激素代谢调节障碍是雌激素代谢调节障碍。

槐属物种的提取物，它们的生产方法和用途

本发明涉及槐属(Sophora)物种的提取物，它们的生产方法和它们用于预防和治疗由雌激素缺乏或由性激素代谢、特别是雌激素代谢调节障碍所导致的病症的用途。

妇女在40岁左右出现不规律的月经周期，这标志着绝经期的开始。这种内分泌系统变化的时期称为更年期，它可能持续十年或更长。它是卵泡生长衰竭和对促性腺激素反应降低的结果。卵泡缺乏的结果是雌激素的生产降低并最终完全停止。伴随它可能会产生多种症状，如潮热、抑郁、焦虑、精神错乱、失眠等。除此之外，雌激素生产的降低还可能引起严重的健康问题，如骨质疏松、心功能不全、脑梗塞(中风)和癌症。

虽然采用雌激素的激素替代疗法对于缓解与更年期有关的不适是非常有效的，但许多研究表明乳腺癌和子宫癌、心血管疾病和肝代谢改变的风险增加可能与这种治疗有关。通过施用孕激素可以降低癌症的风险。但是，孕激素的保护作用似乎随着长期使用而削弱，并且认为激素替代疗法(HRT)与 35-40%的乳腺癌风险增加有关。由于存在这些副作用以及对这种类型治疗可靠性的明显怀疑，已趋于拒绝在 40 岁以上的绝经后妇女中使用 HRT 药物。据估计仅大约 20%的绝经后美国妇女接受 HRT，其中仅有 40%持续治疗 1 年以上。

已在许多植物中发现了在人或动物中具有雌激素-激动作用或可与雌激素相互作用的物质。已发现了至少 20 类不同的具有雌激素/抗雌激素性能的物质，它们来自 16 个科的植物中的 300 种以上的植物。大部分已知的植物雌激素属于异黄酮、木脂素或 Cumestane 家族。仅在最近，又发现了一种高效的植物雌激素——8-异戊烯基柚配基(S. R. Milligan 等人; Journal of Clin. Endocrinol. Metab.(临床内分泌代谢杂志) 84, 2249-2252 [1999])。通过刺激 Ishikawa-Var-I 细胞内的碱性磷酸酯酶测

试了 8-异戊烯基柚配基的体内雌激素效力。结果发现 8-异戊烯基柚配基比长期以来为人们所熟悉的植物激素如香豆雌酚、染料木黄酮或黄豆苷明显具有更大活性，且产生的作用仅微弱于 17β 雌二醇。

对美国、欧洲、中国和日本人群的流行病控制研究已表明在随食物一起摄入植物雌激素与多种肿瘤，特别是乳腺癌和前列腺癌的出现之间存在密切的负相关关系。还在动物实验中证明了植物雌激素对乳腺和前列腺肿瘤细胞生长的抑制作用。植物雌激素的保护性能显然是基于大量不同的生物学特征，而这些生物学特征在这些合成和天然雌激素的组合之间是有区别的。依赖于剂量和内源激素的状况，植物雌激素还具有雌激素作用或者甚至抗雌激素作用。其它的生物学作用包括，例如抑制酪氨酸激酶、DNA 拓扑异构酶、核糖体 s6 激酶、鸟氨酸脱羧酶、芳香酶或 5α 还原酶。此外植物雌激素通常还具有抗氧化性能，而且显然所有这些不同作用的总和在抑制肿瘤的出现和生长中起作用(Tham 等人, Journal of Clin. Endocrin. Metab.(临床内分泌代谢杂志) 83, 2223-2235 [1998])。

本发明的目的是提供适于预防和治疗由雌激素缺乏或与性激素有关的代谢、特别是雌激素代谢调节障碍导致的病症的植物提取物。

本发明的另一目的是提供一种这些提取物的生产方法。

因此，第一方面，本发明提供了一种来自选自苦参、山豆根、苦豆子、槐树、广豆根、绒毛槐、砂生槐和 Sophora leachiana 的槐属物种的提取物，其特征在于所述提取物包含总量不大于 0.2%的生物碱，并且它包含黄酮、异黄酮、查耳酮和紫檀烷类化合物，其中的黄酮类化合物包括 8-异戊烯基柚配基、苦参醇 X、8-异戊烯基茨非醇、leachianon G 和苦参醇 E，其中的异黄酮类化合物包括大豆黄素和染料木黄酮，其中的查耳酮类化合物包括 2,4,4',6'-四羟基-3'-薰衣草基-2'-甲氧基查耳酮，其中的紫檀烷类化合物包括高丽槐素和高丽槐素葡糖苷。优选地，该提取物包含总量不大于 0.1%的生物碱，更优选不含生物碱。

此外，还优选所述的槐属物种选自苦参和山豆根。

第二方面，本发明提供了一种获得选自苦参、山豆根、苦豆子、槐树、广豆根、绒毛槐、砂生槐和 Sophora leachiana 的槐属物种的提取物的方法，其特征在于包括以下步骤：

a) 用选自下列的溶剂对作为药物的所述槐属物种进行一次或多次、优选两次提取；

i) 醇的水溶液和丙酮水溶液，其中步骤 a)i)中所用的醇以 10-96% [v/v]或[w/w]的含水混合物的形式存在，或者步骤 a)i)中所用的丙酮以 10-99% [v/v]或[w/w]的含水混合物的形式存在，优选地，步骤 a)i)中所用的醇或步骤 a)i)中所用的丙酮以 50-92%[v/v]或[w/w]的含水混合物的形式存在；和

ii) 乙酸乙酯，包括含水或水饱和的乙酸乙酯；

其中在每次提取时药物与溶剂的比例为 1：7 至 1：10；

b) 除去在步骤 a) i)中得到的醇或丙酮提取溶液中的溶剂；

c) i) 将步骤 b)中得到的残余物在选自乙酸乙酯、叔丁基甲基醚、正丁醇和丁酮的有机溶剂和水之间进行一次或多次分配，然后合并如此得到的溶剂相；或者

c) ii) 用水直接对在步骤 a) ii)中得到的乙酸乙酯提取液进行一次或多次分配；和

d) 将步骤 c)中得到的合并的有机溶剂相浓缩至干。

优选地，在上述方法中，步骤 a)i)中所用的溶剂为乙醇水溶液，更优选为 70% [v/v]或 60% [w/w]的乙醇水溶液。

优选地，在上述方法中，步骤 c)i)中所用的溶剂为乙酸乙酯。

此外，在上述方法中，优选所用的槐属物种选自苦参和山豆根。

第三方面，本发明涉及包含本发明的提取物和药学上可接受的赋形剂的药物制剂。

最后，本发明还涉及本发明的提取物或包含本发明提取物的药物制剂在制备用于预防和治疗由雌激素缺乏或性激素代谢调节障碍、特别是雌激素代谢调节障碍所导致的病症的药物中的用途，所述病症优选选自

更年期不适、性激素依赖性癌症例如乳腺癌、前列腺癌和子宫癌、良性前列腺增生、骨质疏松、阿耳茨海默氏病和心血管疾病。

传统中医药中已知许多槐属物种(豆科)的根可以药用。这些物种是苦参(Sophora flavescens)、山豆根(S. subprostrata)、苦豆子(S. alopeouloides)、槐树(S. japonica)、广豆根(S. tonkinensis)、绒毛槐(S. tomentosa)、砂生槐和 S. leachiana。其中，苦参是特别重要的一种。因此，它可见于中国药典(“苦参”，中国药典 9/1997)并传统用于治疗腹泻、胃肠出血和湿疹(W. Tang, G. Eisenbrand, Chinese Drugs of Plant Origin(中国植物药), Springer verlag, Berlin 1992)。

苦参根，以及其它槐属物种的根，包含多种喹诺里西啶(chinolizidine)生物碱作为它们的主要成分。中国药典规定生物碱的总滴定含量不可以低于 2%。主要生物碱为苦参碱和氧化苦参碱。

除生物碱以外，在苦参和相当一些其它槐属物种的根中还发现了大量的黄酮类化合物和相关化合物以及三萜皂甙。

关于苦参以及单个成分或成组的成分的多种药理学性能已有记载。具体地讲，认为生物碱与抗心律失常、抗哮喘和止咳作用以及抗溃疡作用有关(Tang 和 Eisenbrand, 见上述)。还观察到了抗肿瘤作用和免疫抑制性能。

M. Kuroyanagi 等人, Journal of Natural Products(天然产物杂志) 1999, 62(12) 1595-1599，报道了来自苦参的抗菌和抗雄激素的类黄酮化合物。已发现实际上所有从苦参中分离出的异戊烯基黄酮衍生物均表现出抗雄激素作用。

W.M. Mazur 等人, Nutritional Biochemistry(营养生物化学) 1998, 9, 193-200，报道了对槐树种子中异黄酮化合物芒柄花黄素、鸡豆黄素、大豆黄素、染料木黄酮和香豆雌酚及木脂素类化合物闭联异松脂醇和罗汉松脂素的定量测定，除此之外还研究了其它的豆科种子。

在毒理学方面，苦参和槐树归类为毒物。具体而言，认为苦参碱类型的生物碱是有毒的(T. Blaszczyk, Deutsche Apotheke Zeitung 2001,

141[14], 1687-1696)。在临床试样中，在槐属生物碱的情况下观察到毒性作用如严重的心悸、呼吸困难和痉挛。在动物研究中，氧化苦参碱表现出毒性作用(K.-C. Huang, The Pharmacology of Chinese Herbs(中草药药理学), CRC 出版, Boca Raton, 1993)。

EP 0 998 924 A1 描述了一种抗肿瘤剂，它包含可从植物中获得的具有拓扑异构酶 II-抑制活性的化合物。因此，在实施例 8 中包括关于从槐属中获得 leachianol A 的的描述。在此实施例中，用丙酮和甲醇连续回流提取槐属的干粉。减压浓缩丙酮提取物并与水混合。使用苯、乙酸乙酯和正丁醇对所得的混合物进行增量分配提取。减压浓缩乙酸乙酯提取液，以这种方式获得残余物。采用硅胶色谱法，使用苯-丙酮溶剂混合物纯化如此得到的残余物；在此操作中获得 leachianol A。实施例 8 中描述的乙酸乙酯提取物不同于本发明提取物之处是根据本发明获得的提取物包含高丽槐素，并大量地富集高丽槐素苷(大约 5 倍)。在这些化合物中，我们对与本发明提取物的效力有关的成分进行处理，本发明者借助实施例 5 的雌激素受体结合试验第一次能够表明这一点。EP 0 998 924 A1 没有建议使用槐属物种的提取物来预防和治疗由雌激素缺乏或由性激素代谢、特别是雌激素代谢调节障碍所导致的病症。

本发明特别优选的槐属物种是苦参和山豆根，因为在本发明的上下文中已发现它们的水-醇根提取物具有令人惊奇的强大的雌激素作用。可以通过进一步分离和纯化而富集这些水-醇提取物。结果是所观察到的药理学作用是由于提取物中存在的以下异黄酮化合物的相互作用而导致的：染料木黄酮和大豆黄素、黄酮类化合物如 8-异戊烯基柚配基、苦参醇 X、8-异戊烯基茨非醇、leachianon G 和苦参醇 E、查耳酮类化合物和紫檀烷类化合物(pterocarpanes)如高丽槐素和高丽槐素葡糖苷，以及其它未鉴定的类黄酮化合物。在这一点上，还应该提及由本发明者最新发现的查耳酮：下式的 2,4,4',6'-四羟基-3'-薰衣草基-2'-甲氧基查耳酮。

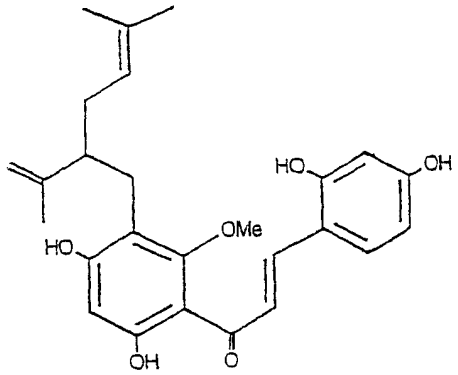


图 1 显示苦参和山豆根的 70% [v/v](62%[w/w])乙醇提取物(根据实施例 1a)和 2a))在酵母试验中与 17β 雌二醇相比的雌激素活性。

图 2 显示来自苦参和山豆根的本发明提取物(用乙酸乙酯分配之后的 70%[v/v]或 62%[w/w]乙醇提取物；根据实施例 1b)和 2b))在酵母试验中与 17β 雌二醇相比的雌激素活性。

图 3 显示来自苦参的本发明提取物(根据实施例 3 用乙酸乙酯分配之后的 60%[w/w]乙醇提取物)在酵母试验中与 17β 雌二醇相比的雌激素活性。

一般可以通过以下方法获得类似的提取物：用中等极性的溶剂提取，这些中等极性的溶剂选自醇的水溶液、酮的水溶液和酯，包括含水或水饱和的酯，除去溶剂然后在有机溶剂和水之间进行液-液分配。

根据本发明，提供了一种槐属物种的提取物，它可以通过以下步骤获得：

a) 用选自下列的溶剂对槐属物种进行一次或多次提取；

i) 醇的水溶液和酮的水溶液；和

ii) 酯，包括含水或水饱和的酯；

b) 除去在步骤 a) i)中得到的醇或酮溶液中的溶剂；

c) i) 将步骤 b)中得到的残余物在选自乙酸乙酯、叔丁基甲基醚、正丁醇和丁酮的有机溶剂和水之间进行一次或多次分配，然后合并如此得到的溶剂相；或者

c) ii) 用水直接对在步骤 a) ii)中得到的乙酸乙酯提取液进行一次或多次分配；和

d) 将步骤 c)中得到的合并的有机溶剂相浓缩至干。

每次提取时药物与溶剂的比例范围为大约 1:7 至 1:10。

在一个优选的实施方案中，步骤 a)的提取进行两次。

步骤 a)中所用的溶剂应该优选选自乙醇水溶液、丙酮水溶液和含水或水饱和的乙酸乙酯。具体而言，步骤 a)所用的溶剂为 70%[v/v](62%[w/w])乙醇、60%[w/w]乙醇或水饱和的乙酸乙酯。

步骤 a) i)中所用的醇或酮优选以 10-96% [v/v]或[w/w]，或者 10-99% [v/v]或[w/w]，特别是 50-92%[v/v]或[w/w]的含水混合物的形式应用。

在步骤 c) i)中，乙酸乙酯为优选的溶剂。

在该方法的步骤 c)中，所发生的情况是基本上使总生物碱含量稀少。可通过本发明获得的提取物的特征是它的总生物碱含量低于 0.2%，优选低于 0.1%。具体而言，通过本发明获得的提取物不含生物碱。在本文中，术语“不含生物碱的”意指使用标准分析方法如 HPLC 法无法检测到生物碱。而且本发明的提取物的特征还在于包含黄酮、异黄酮、查耳酮和紫檀烷类化合物。黄酮化合物可以是异戊烯基化的，如柚配基的异戊烯基衍生物。如果需要的话，异黄酮化合物可以是一、二或三羟基取代的或 O-甲基化的。此外，该提取物可以包含苷化的黄酮和异黄酮化合物。具体而言，本发明的提取物包含高丽槐素、高丽槐素葡糖苷、8-异戊烯基柚配基、苦参醇 X、8-异戊烯基茨非醇、leachianon G、苦参醇 E 和 2,4,4',6'-四羟基-3'-薰衣草基-2'-甲氧基查耳酮。

可以从如下槐属物种之一生产该提取物：苦参、山豆根、苦豆子、槐树、广豆根、绒毛槐、砂生槐和 Sophora leachiana；优选苦参或山豆根。

可以根据本发明获得的提取物可以与常规的药学上可接受的添加剂一起加工成药物制剂如胶囊、薄膜片剂(film tablets)或包衣片，其中，作为常规的药学上可接受的添加剂，可以使用填充剂、粘合剂、分散剂、

润滑剂和用于薄膜片剂和包衣片的包衣以及作为胶囊赋形剂的油或脂肪。

可根据本发明获得的提取物可以用于预防和治疗由雌激素缺乏或由性激素代谢、特别是雌激素代谢调节障碍所导致的病症。

这些病症可以选自属于以下种类的病症：更年期不适、性激素依赖性癌症、良性前列腺增生、骨质疏松、阿耳茨海默氏病和心血管疾病，这里的癌症包括乳腺癌、前列腺癌和子宫癌。

根据本发明的提取物可以每天 1-1000mg，优选每天 100-1000mg 的剂量应用于人。

根据本发明，可以通过使用包括黄酮、异黄酮、查耳酮、紫檀烷和其它特别适于治疗由雌激素缺乏或由性激素代谢、特别是雌激素代谢调节障碍所导致的病症的类似化合物的组合而进行治疗。

以下实施例描述了本发明，不应将其看作是对本发明的限定。除非另外特别指出，所有百分比详细数据均是指重量。

实施例 1: 苦参提取物的生产

a) 提取

将 2kg 磨碎的苦参根与 14kg 70%[v/v] (62%[w/w])的乙醇混合，旋转(Ultraturrax)提取 5 分钟，然后在 50℃下剧烈搅拌 1 小时。接着用 Supra Seitz 1500 过滤器将其抽滤，然后以相同的方式再次提取药渣。合并两份提取溶液并使用等分试样测定干燥提取物含量。结果得到 475.6 g 干燥残余物，其对应的产率为 23.8%。

b) 分配

50℃下在旋转蒸发器中除去提取溶液中的乙醇。将含水残余物(5 升)与乙酸乙酯一起搅拌三次，每次 2 升乙酸乙酯，合并乙酸乙酯相并用旋转蒸发器浓缩至干。

乙酸乙酯提取物= 67.84 g (以药材计为 3.4%；以总提取物计为 14.3%)

根据 HPLC 分析，乙酸乙酯提取物包含黄酮、异黄酮、查耳酮、紫檀烷类化合物(如 8-异戊烯基柚配基、大豆黄素、苦参醇 X、norkurarinon、高丽槐素、染料木黄酮、8-异戊烯基茨非醇)。没有生物碱的迹象。

这种物质的组合优选适于预防和治疗由雌激素缺乏或与性激素有关的代谢、特别是雌激素代谢调节障碍所导致的病症(比较实施例 5)。

实施例 2: 山豆根提取物的生产

a) 提取

将 1kg 磨碎的山豆根的根与 7kg 70% [v/v](62%[w/w])的乙醇混合，旋转(Ultraturrax)提取 5 分钟，然后在 50℃下剧烈搅拌 1 小时。接着用 Supra Seitz 1500 过滤器将其抽滤，然后以相同的方式再次提取药渣。合并两份提取溶液并使用等分试样测定干燥提取物含量。结果得到 111.8 g 干燥残余物，其对应的产率为 11.2%。

b) 分配

50℃下在旋转蒸发器中除去提取溶液中的乙醇。将含水残余物(2.5 升)与乙酸乙酯一起搅拌三次，每次 1 升乙酸乙酯，合并乙酸乙酯相并用旋转蒸发器浓缩至干。

乙酸乙酯提取物= 10.4g (以药材计为 1.0%; 以总提取物计为 9.3%)

实施例 3

将 36kg 磨碎的苦参药材与其重量的 7.7 倍的 60%(w/w)的乙醇混合。剧烈搅拌并在循环中使用 Dispax (Ultraturrax)，在 50℃下将提取溶液提取 1 小时。将提取溶液过滤澄清，药渣再次用其重量的 7 倍的 60%(w/w)的乙醇在相同的条件下提取，最后过滤。

然后用离心蒸发器将提取溶液浓缩至乙醇含量为 3.5%，而干提取物含量为 10.52%。然后将该浓缩的溶液以 1:0.4 的体积比对水饱和的乙酸乙酯分配三次。用旋转蒸发器浓缩乙酸乙酯相，并在 60℃下在干燥柜

中干燥。

结果得到:

乙酸乙酯提取物: 研磨后 1.188 kg (以药材计为 3.3%)。

药理学相关物质的 HPLC 含量

高丽槐素葡糖苷	2.8%
8-异戊烯基柚配基	0.4%
高丽槐素	0.6%
苦参醇 X	1.3%
8-异戊烯基茨非醇	0.7%
leachianon G	6.6%
苦参醇 E	0.3%
2,4,4',6'-四羟基- 3'-熏衣草基- 2' -甲氧基查耳酮	0.7%

也有存在大豆黄素和染料木黄酮的迹象。没有任何生物碱的迹象。

可以在实施例 5 的酵母试验中证实所提到的每一种物质的雌激素活性。通过 Reportergen 试验，使用实施例 5 的酵母细胞证实提取物的雌激素活性: 比较图 3。

HPLC 法

柱	LiChrospher 100 5 μm, 250×4mm	
洗脱剂	A: 1000ml 双蒸水/3ml 磷酸(85%)/2ml 三乙胺	
	B: 100ml 乙腈/3ml 磷酸(85%)/2ml 三乙胺/60ml 双蒸水	
梯度	% A	%B
	0 分钟 70	30
	30 分钟 30	70
	35 分钟 0	100
流速	1.2 ml/分钟	
检测	220nm	

实施例 4

用水饱和的乙酸乙酯将 150g 磨碎的苦参药材提取两次，比率 1:7 (m/m)。因此，事先用 Ultra-Turrax 将药材粉碎 5 分钟(运动提取)。然后在 60℃下将药材回流提取 1 小时。随后将合并的提取溶液过滤，将如此得到的乙酸乙酯提取液与乙酸乙酯饱和的水以 1:1 [v/v]的比率一起振荡两次。将合并的乙酸乙酯相浓缩至干。

产率：以药材计为 3.99%。

实施例 5: 使用表达人 α 雌激素受体的转染的酵母细胞测试所得到的乙酸乙酯提取物的雌激素活性。

采用 Reportergen 试验，使用酵母细胞(酵母属)测定提取物的雌激素性能。这些细胞稳定表达人 α 雌激素受体和一种表达质粒，所述表达质粒含有雌激素响应单元和 β 半乳糖苷酶的基因。将所有试样以 20mg/ml 的浓度溶于 DMSO，并且将其不经稀释或者在用 DMSO 以 1/10、1/100 的比例稀释后以 1μl 的体积加到 96 孔平底微滴定平皿中的 100μl 培养基中。接着，加入 100 μl 酵母悬浮液和显色底物氯酚红-β-D-吡喃半乳糖苷。在每个平皿上均提供对照孔，所述对照孔仅用培养基或溶剂填充，或者包含标准浓度的 17β 雌二醇。将酵母细胞在 32℃下培养 72 小时，然后在 540nm 下在微滴定板光度计中测定培养基的吸收值。有时检测试样两次。

结果:

试样浓度:

稀释度	浓度
未稀释的	100 μg/ml
1:10	10 μg/ml
1:100	1 μg/ml

试样命名：

试样号	试样	试验编号	槐属物种
A	实施例 1a)的 70% [v/v] (62%[w/w]) 乙醇提取物	1	苦参
B	实施例 2a)的 70% [v/v] (62%[w/w]) 乙醇提取物	1	山豆根
C	实施例 1a)的 70% [v/v] (62%[w/w]) 乙醇提取物	2	苦参
D	实施例 1b)的乙酸乙酯提取物	1	苦参
E	实施例 2b)的乙酸乙酯提取物	1	山豆根
F	实施例 3 的乙酸乙酯提取物	1	苦参

在图 1、2 和 3 中描述了试验结果。其中，将提取物的雌激素活性与 17β 雌二醇的活性进行了比较。为此目的，可以称为“有活性的”提取物的是这样的提取物：当与 17β 雌二醇相比时，其活性与在 17β 雌二醇活性曲线的明显上升区段范围内(浓度为大约 0.1 - 0.2nM 17β 雌二醇)的 17β 雌二醇的活性相当。

具体而言，图 1 显示来自苦参和山豆根的 70%[v/v] (62% [w/w])乙醇提取物(根据实施例 1a)和 2a))在酵母试验中与 17β 雌二醇相比的雌激素活性。

图 2 显示来自苦参和山豆根的本发明提取物(用乙酸乙酯分配之后的 70%[v/v]或 62% [w/w]乙醇提取物；根据实施例 1b)和 2b))在酵母试验中与 17β 雌二醇相比的雌激素活性。

图 3 显示来自苦参的本发明提取物(用乙酸乙酯分配之后的 60% [w/w]乙醇提取物；根据实施例 3)在酵母试验中与 17β 雌二醇相比的雌激素活性。

图1

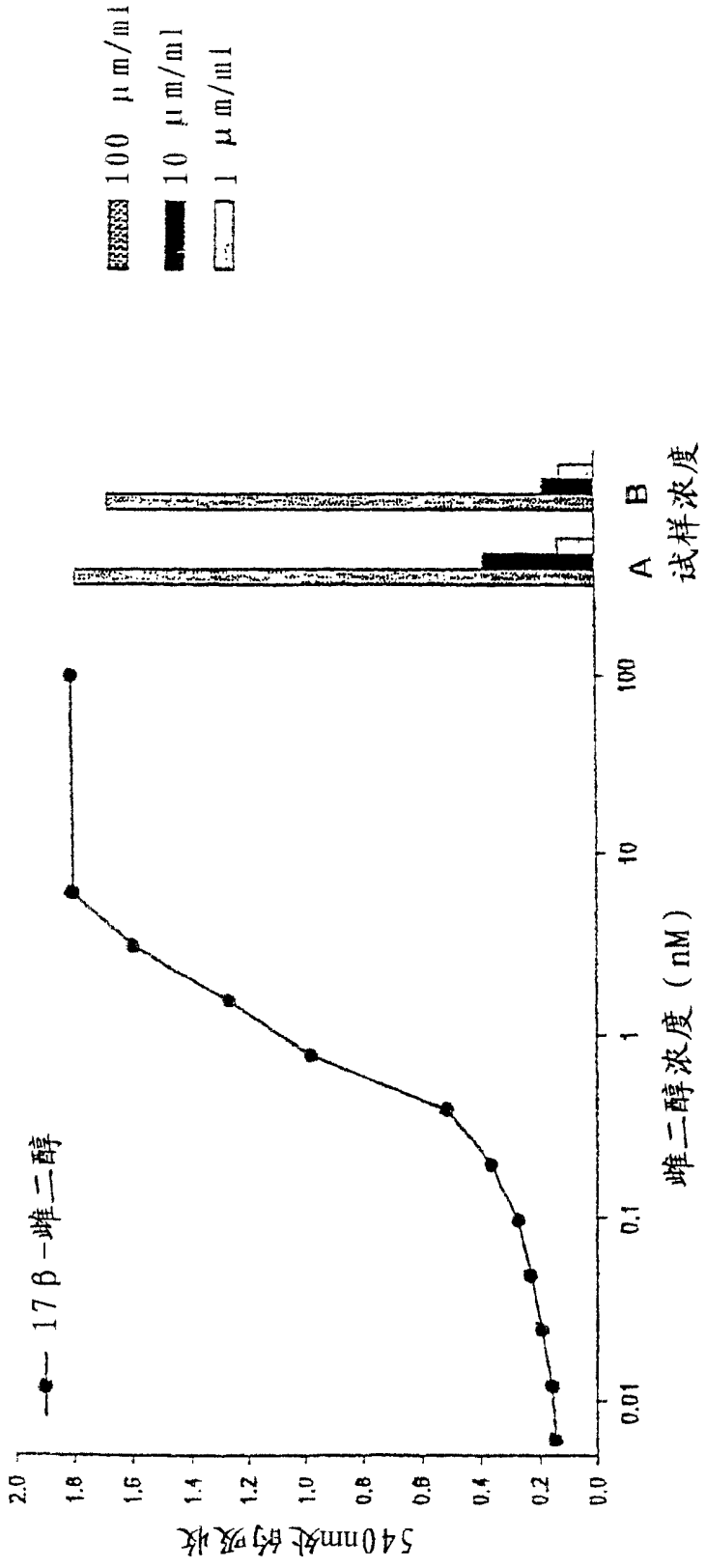

100 μm/ml
10 μm/ml
1 μm/ml
17β-雌二醇
540nm处的吸收
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.01
0.1
1
10
100
雌二醇浓度（nM）
A
B
试样浓度

图2

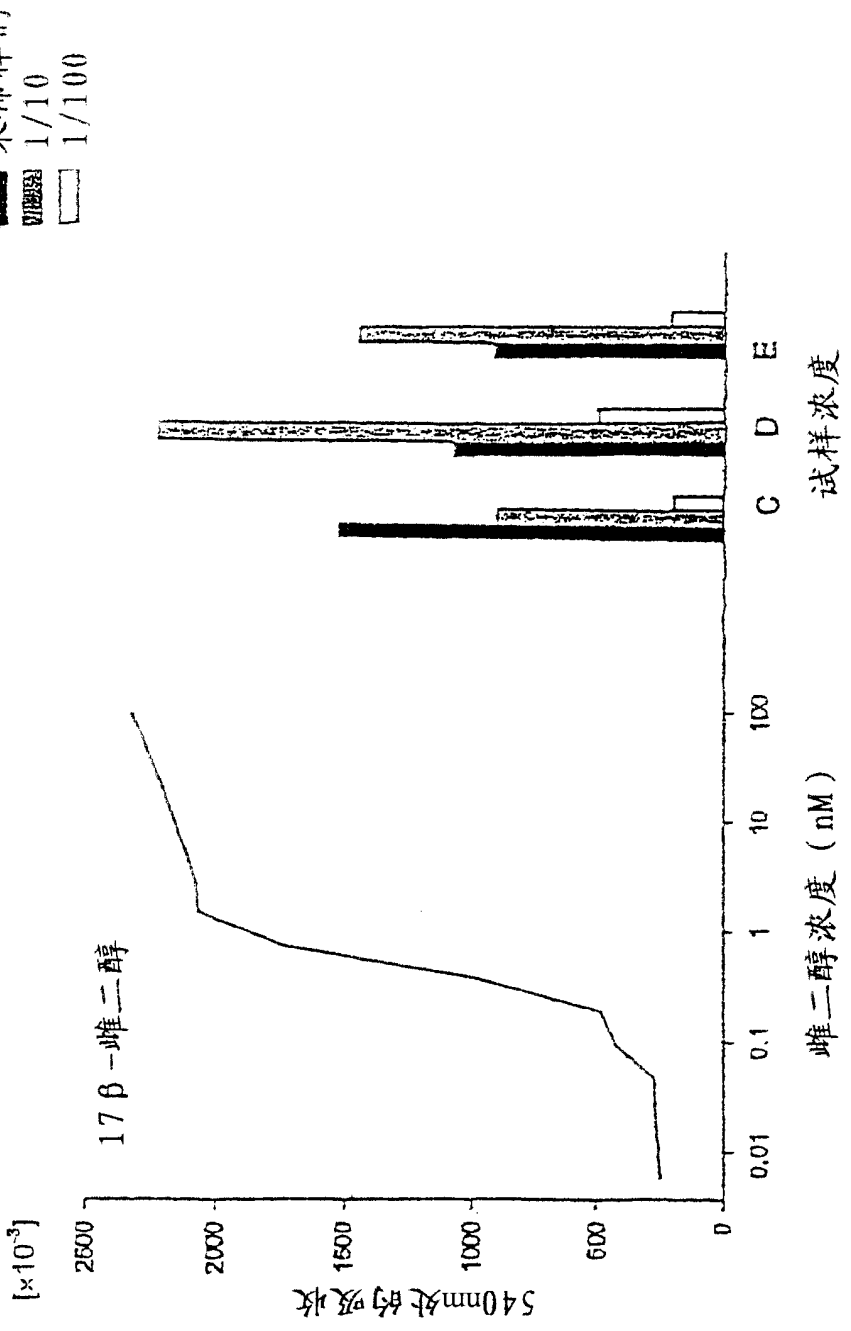
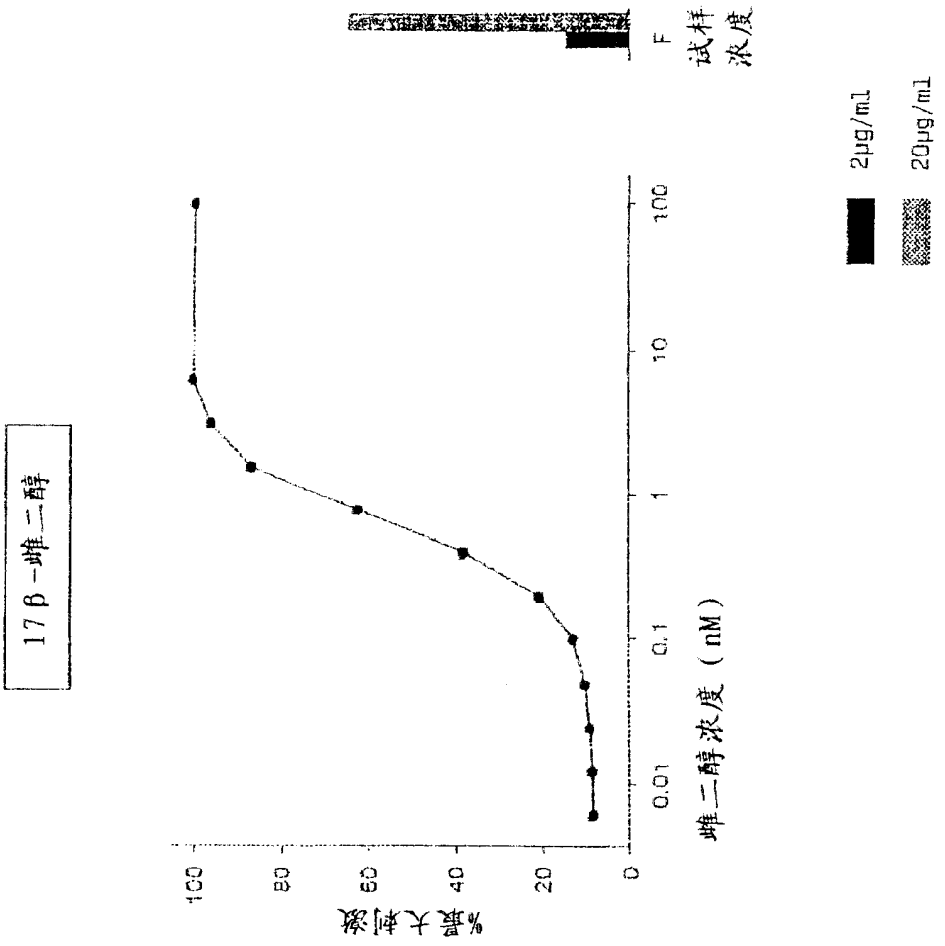

未稀释的
1/10
1/100
17β-雌二醇
[×10⁻³]
2500
2000
1500
1000
500
0
540nm处的吸光度
0.01
0.1
1
10
100
雌二醇浓度（nM）
C
D
E
试样浓度

图3


17β-雌二醇
%最大刺激
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
雌二醇浓度（nM）
F
试样浓度
2μg/ml
20μg/ml