



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1852881 B

(45) 授权公告日 2010.09.29

(21) 申请号 200480027064.5

C07D 311/78(2006.01)

(22) 申请日 2004.08.30

C07D 315/00(2006.01)

A61K 31/12(2006.01)

(30) 优先权数据

10/652,813 2003.08.29 US

(56) 对比文件

US 6113965 A, 2000.09.05,

Inhibition of 12-0-tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Inflammatory Skin Edema and Ornithine Decarboxylase Activity by Theaflavin-3',3'-Digallate in Mouse. Nutrition and Cancer 42 2. 2002, 42(2), 218.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.03.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/028164 2004.08.30

(87) PCT申请的公布数据

W02005/021479 EN 2005.03.10

Theadibenzotropolone A, a new type of pigment from enzymatic oxidation of (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechingallate and characterized from black tea using LC/Mc/MS. tetrahedron letters 43. 2002, 437131.

(73) 专利权人 维尔金有限公司

地址 美国新泽西州

专利权人 新泽西州立拉特格斯大学

Theaflavate B, Isotheaflavin-3'-o-gallate and neotheaflavin-3'-o-gallate: three polyphenolic pigments from black tea. Phytochemistry 49 8. 1998, 49(8), 2512.

(72) 发明人 何志腾 吉萨·哥亥 桑生民

胡智友 黄谋团 罗伯特·T·罗森

斯莱维克·杜什科夫

审查员 周元

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 3 页

(51) Int. Cl.

C07C 45/00(2006.01)

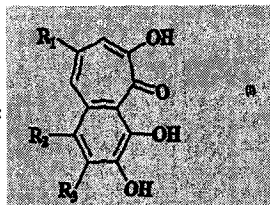
(54) 发明名称

苯并环庚三烯酚酮衍生物以及炎症反应的调节

(57) 摘要

本发明涉及以下通式所示的新型苯并环庚三

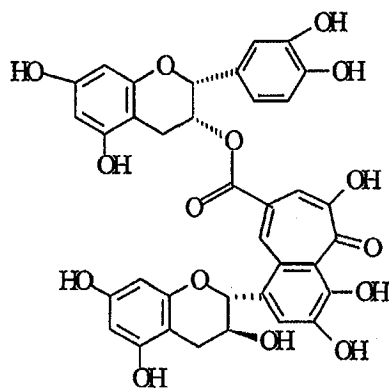
烯酚酮衍生物:



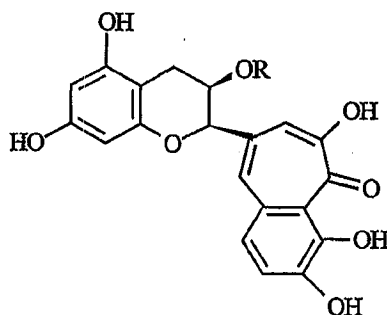
其包括新

茶鞣酸酯 B 和 EGCGa。本发明所述苯并环庚三烯酚酮衍生物是有效的抗氧化剂和消炎剂。本发明也提供一种高产率合成苯并环庚三烯酚酮化合物的新方法以及使用包含苯并环庚三烯酚酮的化合物治疗炎症的方法。

1. 下式的新茶典烷酸酯 B 或其盐



2. 下式的表没食子儿茶素儿茶酚没食子酸酯或其盐



其中 R 是没食子酸。

3. 包含如权利要求 1 和 2 所述的化合物的药物组合物。
4. 包含如权利要求 1 和 2 所述的化合物的营养组合物。
5. 包含如权利要求 1 和 2 所述的化合物的食品添加剂。
6. 包含如权利要求 1 和 2 所述的化合物的饮食补充物。
7. 如权利要求 1 或 2 所述的化合物在制备用于治疗或降低炎症疾病的发展的药物中的用途。
8. 如权利要求 1 或 2 所述的化合物在制备用于中和患者的自由基的药物中的用途。
9. 如权利要求 7 或 8 所述的用途,其中所述的药物还包含载体,该载体选自药学上可接受的载体、兽医学上可接受的载体、饮食补充载体或食物。
10. 如权利要求 7 或 8 所述的用途,其中所述药物用于局部使用、口服使用或肠胃外使用。
11. 如权利要求 7 或 8 所述的用途,其中权利要求 1 或 2 所述的化合物的浓度至少为约 0.5 重量%。

苯并环庚三烯酚酮衍生物以及炎症反应的调节

[0001] 本申请是于 2003 年 8 月 29 日提交的已有申请 No. 10/652813 的部分继续申请,其内容整体参考引用于本申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及一种包含苯并环庚三烯酚酮部分的化合物,它们作为抗氧化剂和消炎剂的应用,以及制备这种化合物的新方法。

[0003] 发明背景

[0004] 已经研制出许多作为抗氧化剂和消炎剂的药剂。这些药剂,尤其是消炎剂具有副作用,如嗜睡、肠胃不适问题,并且连续长期服用会出现问题。由于这些副作用,有强烈需求需要研制一种来自天然产物的抗氧化剂和消炎剂,其可以长期安全服用,并且不会产生副作用。

[0005] 茶 (*Camellia sinensis*(L.)Kuntze) 是最受欢迎的饮料之一。已知茶叶富含类黄酮(包括儿茶酚)及其衍生物,它们是多酚类化合物(由一个芳环(包含至少一个羟基)组成的化合物称为单酚,因此多酚由多个芳环组成,并且具有两个以上羟基)。

[0006] 许多研究表明绿茶和红茶中的多酚类具有消炎、抗肿瘤和抗心血管疾病的效果(Vinson,2000, *Biofactors* 13:127-132;Weisburger 等,2002, *Food & Chemical Toxicology*,40:1145-1154)。这些生物活性被认为是来自其抗氧化活性,通过清除活性氧(ROS)和自由基来发挥作用。茶黄素被认为是红茶中一种重要的生物活性化合物,而绿茶中的儿茶酚也具有类似的重要作用。实际上,已经有许多报道公开了茶黄素混合物的生物活性。但是尽管茶世界范围内被每天大量地消费,涉及单独茶组分的生物活性或其作为药剂的用途的信息极其有限。

[0007] 有许多现有技术资料公开了具有本发明所述化学通式的化合物(Coxon 等,1970, *Tetrahedron Letters*,60:5241-5246;Leung 等,2001, *The Journal of Nutrition*,2248-2251;Lewis 等,1998, *Phytochemistry*,49:2511-2519;Lin 等,1999, *European Journal of Pharmacology*,376:379-388;Miller 等,1996, *FEBS Letters*,392:40-44;Obanda 等,2001, *Food Chemistry*,75:395-404;Shiraki 等,1994, *Mutat. Res.*,323:29-34;Tanaka 等,2001, *J. Agric. Food Chem*,49:5785-5789;Tanaka 等,2002, *J. Agric. Food Chem*,50:2142-2148;Wan et.al.,1997, *J. Sci. Food Agric.*,74:401-408;Wiseman 等,1997, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,37:705-718;Yang 等,1997, *Carcinogenesis*,18:2361-2365)。这些现有技术资料公开了从茶中分离得到的多酚化合物的化学性质。其中一些化合物包含苯并环庚三烯酚酮部分。

[0008] 本发明人致力于发现具有抗氧化和消炎活性的药剂,及鉴别用于治疗炎症的必需制剂。本发明人已经发现了具有苯并环庚三烯酚酮主要部分的本发明化合物具有消炎活性,并且本发明的化合物可以用简单和独特的合成方法来制备。

[0009] 发明概述

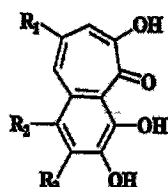
[0010] 本发明提供一种用于清除自由基和炎症的治疗和预防药剂,其长期服用的安全性

高,并且能够作为日常使用的食物、饮料和 / 或化妆品。

[0011] 一方面,本发明公开了其结构中具有苯并环庚三烯酚酮部分的各种化合物,这些化合物呈现出潜在的消炎活性。此外,一个惊奇的发现是:在 H_2O_2 存在下,使用过氧化酶来氧化耦合包含焦棓酚单元分子(如表儿茶酸或表儿茶酸没食子酸酯)和包含儿茶酚单元分子(如表儿茶酚或表儿茶酚没食子酸酯)可以高产率地合成基本上纯的该化合物。

[0012] 具体地说,本发明公开了以下通式所示的包含苯并环庚三烯酚酮的化合物以及苯并环庚三烯酚酮衍生物:

[0013]



[0014] 在本发明中,术语“包含苯并环庚三烯酚酮的化合物”指一大类化合物,即本领域已知的以及本领域未知的那些新化合物。在本发明中,术语“苯并环庚三烯酚酮衍生物”仅指本发明公开的和 / 或本领域未知的那些新化合物,本领域技术人员可以在本发明公开内容的教导下制得这些化合物。因此,苯并环庚三烯酚酮衍生物是本发明所预测大类化合物中的一个小类。

[0015] 在一个实施方式中,本发明提供一种组合物,其可用于调节炎症和 / 或用作哺乳动物用抗氧化剂,其含有一种或多种苯并环庚三烯酚酮衍生物和任选的载体、稀释剂或赋形剂。本发明所述包含苯并环庚三烯酚酮的化合物可以从天然产物中提取或者合成制得;所述组合物可以是一种药物成分或者营养成分,或者是这些成分的组合,它们作为生物活性成分用于调节炎症和 / 或用作哺乳动物的抗氧化剂。

[0016] 在另一实施方式中,提供了通过服用含有包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的组合物来治疗或缓解哺乳动物炎症恶化的方法。

[0017] 本发明所述包含苯并环庚三烯酚酮的化合物可以制成适于口服或非口服递送(例如,局部给药)的形式。在口服给药时,服用包含苯并环庚三烯酚酮的本发明化合物能够维持足够的血药浓度而显示其药理学效果,并且每天的口服次数可以根据需求设定,尤其是鉴于使本发明化合物的毒性(若有的话)最小化时。

[0018] 在另一个实施方式中,提供了一种简单易控且能过重复合成苯并环庚三烯酚酮衍生物的方法。其中,所述合成方法涉及在过氧化酶和 H_2O_2 存在下使包含焦棓酚单元分子与包含儿茶酚单元分子反应。

[0019] 附图简要说明

[0020] 图 1 显示茶黄素混合物 (TF)、EGCCa 和 EGCGCa 对 CD-1 小鼠耳部中 TPA- 诱发炎症的效果。

[0021] 图 2 显示 TF、EGCCa 和 EGCGCa 对 CD-1 小鼠耳部中 TPA- 诱发炎症以及白细胞介素 -6 (IL-6) 形成的效果。

[0022] 图 3 显示 TF、EGCCa 和 EGCGCa 对 CD-1 小鼠耳部中 TPA- 诱发炎症以及白细胞三烯 B4 (LTB4) 形成的效果。

[0023] 优选实施方式详述

[0024] 根据本发明的另一个方面,本发明涉及含有包含苯并环庚三烯酚酮的化合物(即具有苯并环庚三烯酚酮环结构的化合物)的组合物。苯并环庚三烯酚酮是许多天然产物的主要部分。例如,在茶中发现的茶黄素包含苯并环庚三烯酚酮核。从红茶中获得的四种主要茶黄素化合物是茶黄素、茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯和茶黄素-3,3'-二没食子酸酯。从红茶中获得的其它包含苯并环庚三烯酚酮的化合物是表茶黄酸(epitheaflavic acid)、表茶黄酸-3'-O-没食子酸酯、异茶黄素、茶典烷酸酯(theaflavate)A、茶典烷酸酯B、异茶黄素-3'-O-没食子酸酯和新茶典烷酸酯。

[0025] 茶黄素可以通过将其母体黄酮醇类(即,儿茶酚或二羟基化B环单元以及焦棓酚或三羟基化B环单元)酶催化氧化成其醌类,之后进行缩合来制备。例如,茶黄素是一类化合物,该化合物是(-)-表儿茶酚和(-)-表儿茶酸的氧化和缩合产物。下表1是本发明一些包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的母体黄酮醇类。

[0026] 表1:茶黄素类和表茶黄酸类的母体黄酮醇类

茶黄素类	母体黄酮醇类
茶黄素	(-)-表儿茶酸(EC)和(-)-表没食子儿茶素(EGC)
茶黄素-3-没食子酸酯	(-)-表儿茶酸和(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)
茶黄素-3'-没食子酸酯	(-)-表儿茶酸没食子酸酯(EGC)和(-)-表儿茶酸
茶黄素-3,3'-二没食子酸酯	(-)-表儿茶酸没食子酸酯和(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯
表茶黄酸	(-)-表儿茶酸和没食子酸(GA)
表茶黄酸没食子酸酯	(-)-表儿茶酸没食子酸酯和没食子酸

[0027] 本发明包含苯并环庚三烯酚酮的化合物是从茶提取物中分离的和/或通过化学氧化具体的前体化合物(如包含焦棓酚单元的分子和包含儿茶酚单元的分子)来合成的。

[0028] 用于本发明的包含苯并环庚三烯酚酮的优选化合物是:

[0029] 第一组:茶黄素类(红茶茶黄素的一般结构):化合物1、2、3、4、5、6:

[0030] 1. 茶黄素

[0031] 2. 茶黄素-3-没食子酸酯

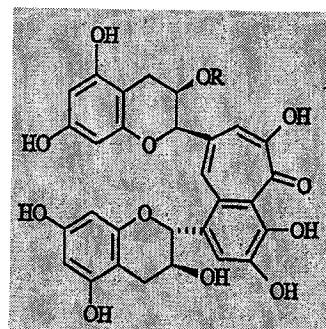
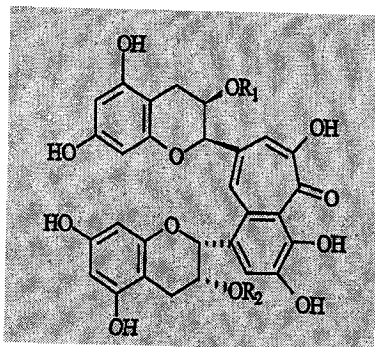
[0032] 3. 茶黄素-3'-没食子酸酯

[0033] 4. 茶黄素-3,3'-二没食子酸酯

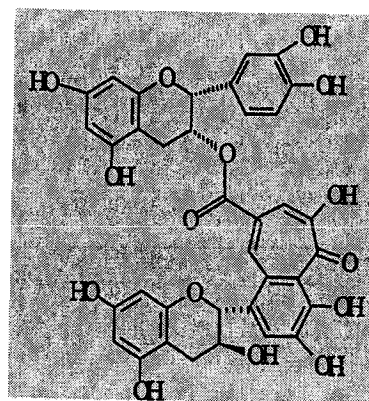
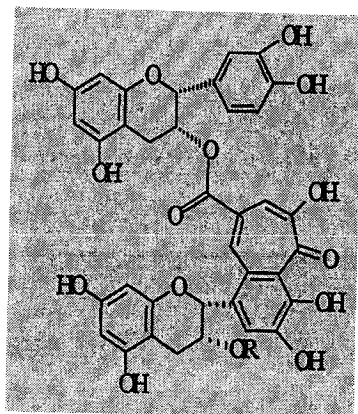
[0034] 5. 新茶黄素

[0035] 6. 新茶黄素-3-没食子酸酯

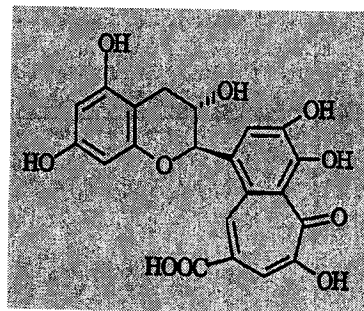
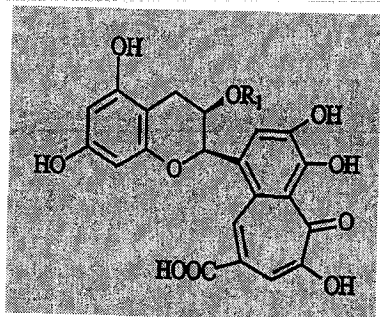
[0036]



- [0037] (EC, EGC) 茶黄素 : $R_1 = R_2 = H$ (C, EGC) 新茶黄素 : $R = H$
 [0038] (EC, EGCG) 茶黄素 -3- 没食子酸酯 : (C, EGCG) 新茶黄素 -3- 没食子酸酯 : $R =$ 没食子酰基
 [0039] $R_1 =$ 没食子酰基 ; $R_2 = H$
 [0040] (EGC, ECG) 茶黄素 -3' - 没食子酸酯 : $R_1 = H$;
 [0041] $R_2 =$ 没食子酰基
 [0042] (ECG, EGCG) 茶黄素 -3, 3' - 二没食子酸酯 :
 [0043] $R_1 = R_2 =$ 没食子酰基
 [0044] 第二组 : 茶典烷酸酯 (苯并环庚三烯酚酮结构含有酯基) : 化合物 7、8、9 :
 [0045] 7. 茶典烷酸酯 A
 [0046] 8. 茶典烷酸酯 B
 [0047] 9. 新茶典烷酸酯 (neotheaflavate) B
 [0048]



- [0049] (ECG) 茶典烷酸酯 A : (C, ECG)
 [0050] (EC, ECG) 茶典烷酸酯 B
 [0051] 第三组 : 茶黄酸 (苯并环庚三烯酚酮结构含有羧基) : 化合物 10、11、12、17 :
 [0052] 10. 茶黄酸 (CGA)
 [0053] 11. 表茶黄酸
 [0054] 12. 表茶黄酸 -3- 没食子酸酯
 [0055] 17. 红梣酚羧酸
 [0056]



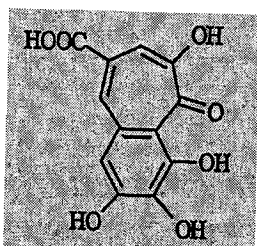
[0057] (EC, 没食子酸) 表茶黄酸 :R = H

(C, 没食子酸) 茶黄酸

[0058] (ECG, 没食子酸) 表茶黄酸 -3' - 没食子酸酯 :

[0059] R = 没食子酰基

[0060]



[0061] (没食子酸) 红梲酚羧酸

[0062] 第四组 : 衍生自儿茶酚的苯并环庚三烯酚酮 : 化合物 13、14、15、16 :

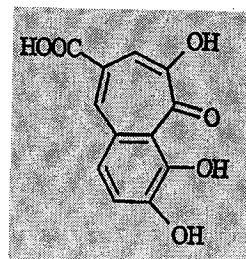
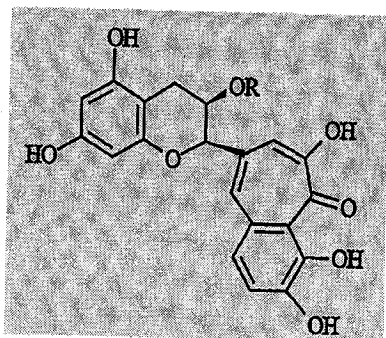
[0063] 13. EGCCa

[0064] 14. EGCGCa

[0065] 15. GACa

[0066] 16. 红梲酚

[0067]

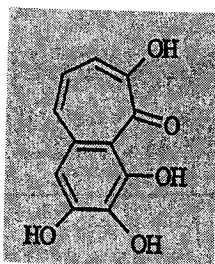


[0068] (儿茶酚, EGC) EGCCa :R = H

(儿茶酚, 没食子酸) GACa

[0069] (儿茶酚, EGCG) EGCGCa :R = 没食子酸

[0070]

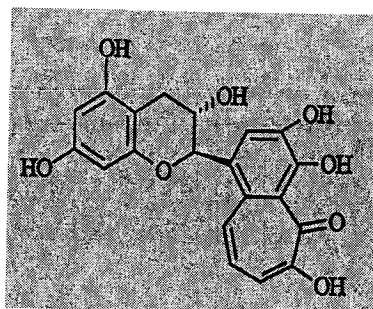
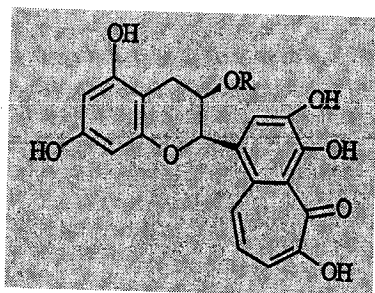


[0071] (焦棓酚) 红棓酚

[0072] 第五组:焦棓酚和茶儿茶酸类、儿茶酚和咖啡酸的反应产物:

[0073] 化合物 18、19、20、21、22:

[0074]

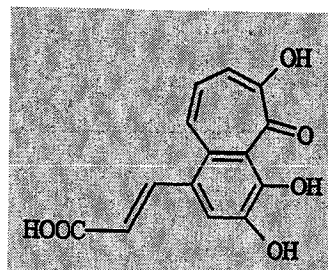
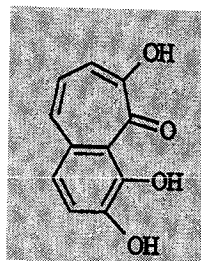


[0075] (EC, 焦棓酚) 18 :R = H

(C, 焦棓酚) 20

[0076] (ECG, 焦棓酚) 19 :R = 没食子酰基

[0077]

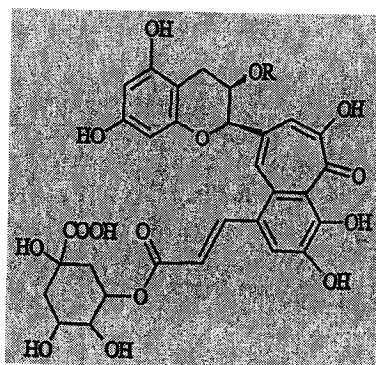
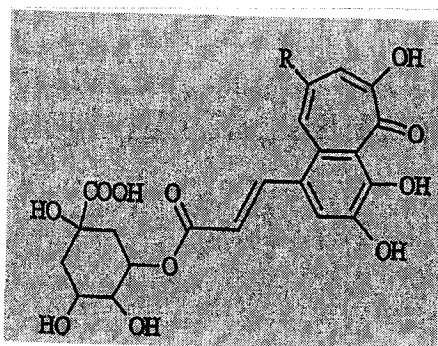


[0078] (儿茶酚, 焦棓酚) 21

(咖啡酸, 焦棓酚) 22

[0079] 第六组:绿原酸或咖啡酸和儿茶酸的反应产物:化合物 23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33:

[0080]



[0081] (绿原酸, 焦棓酚) 23 :R = H

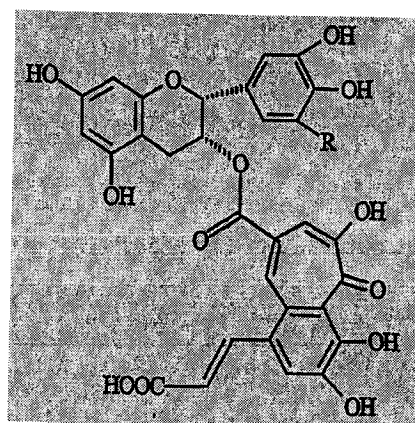
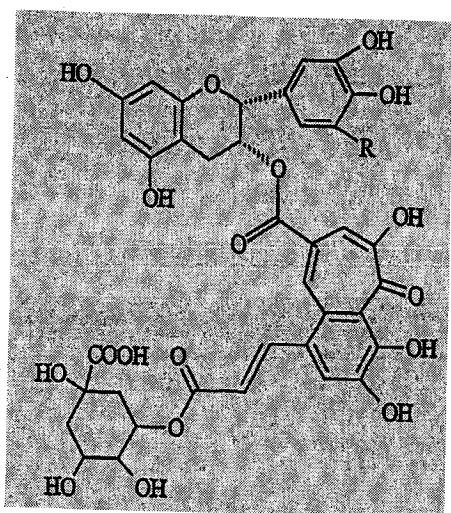
(绿原酸, EGC) 25 :R = H

[0082] (绿原酸, 没食子酸) 24 :R = COOH

(绿原酸, EGCG) 26 :R = 没

食子酰基

[0083]



[0084] (绿原酸, ECG) 27 :R = H

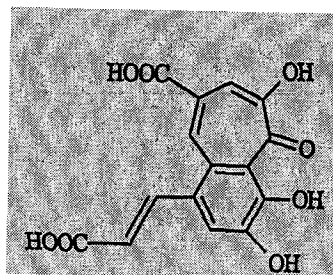
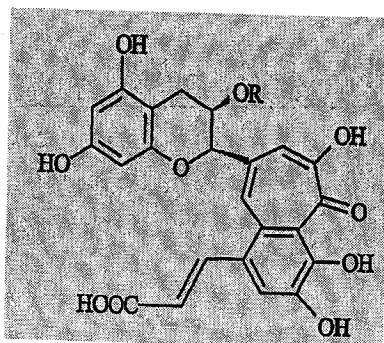
(咖啡酸, ECG) 29 :R = H

[0085] (绿原酸, EGCG) 28 :R = OH

(咖啡酸, EGCG) 30 :R =

OH

[0086]



[0087] (咖啡酸, EGC) 31 :R = H

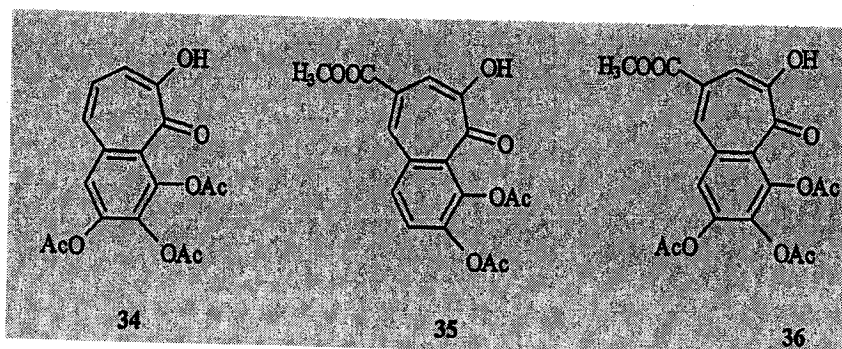
(咖啡酸, 没食子酸) 33

[0088] (咖啡酸, EGCG) 32 :R = 没食子酰基

[0089] 第七组 :红棓酚、红棓酚羧酸和 GACa 或其它苯并环庚三烯酚酮分子的衍生物 (OH

基团中的 H 被乙酸根、甲基、乙基、丙基或高级烷基取代), 如化合物 34、35、36:

[0090]



[0091] 在以上所列化合物中, 一些化合物已经记录在文献中并为本领域技术人员所知; 而一些则是新的, 并且不为本领域技术人员所知。例如, 化合物 9 (第 2 组) 或化合物 14 (第 4 组) 或第 5-7 组所列化合物是新的化合物。

[0092] 另一方面, 本发明涉及一种独特简单、容易控制且可重复的制备方法, 该方法能高产高效地制备基本上纯的包含苯并环庚三烯酚酮的化合物。例如, 按照本发明所述方法以最简单的形式已经能使茶黄素类产率达到至少与用本领域已知方法所得产率相符。例如, 对于茶黄素-3-没食子酸酯, 当原料 (母体黄酮醇类) 各为 1 克时 (EC 和 EGCG 各 1 克), 通过本发明可以使茶黄素-3-没食子酸酯的产率至少为 0.2 克。所述方法涉及在 H_2O_2 存在下, 用过氧化酶催化耦合包含焦棓酚单元的分子和 / 或包含儿茶酚单元的分子。

[0093] 例如, 为了按照本发明的方法制备上述第 1-4 组中的化合物 1-17, 将母体黄酮醇类溶解于包含过氧化酶的合适缓冲液。将所述酶底物、 H_2O_2 加入所述混合物, 并通过合适的溶剂来提取所述反应混合物。将所述提取物进行柱分离, 并用合适的溶剂系统进行洗提, 从而高产率地制得包含苯并环庚三烯酚酮的化合物。有关合成这些化合物的细节如本说明书所述。基于这些实施例, 本领域技术人员应知道如何选择母体化合物 (或母体黄酮醇) 和合适的反应试剂以及反应条件来合成本发明所述各种包含苯并环庚三烯酚酮的化合物或苯并环庚三烯酚酮衍生物。

[0094] 例如, 为了制备以上所述化合物 18-23, 可以使用以下所述的方法: 第一, 将合适的母体黄酮醇类溶解在丙酮与 pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 (1:10, 体积比, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含山葵过氧化酶和 1.0ml 的 3.13% H_2O_2 。然后, 在搅拌过程中逐滴加入用冰冷却过的焦棓酚水溶液约 45 分钟。用乙酸乙酯 (50ml \times 3) 提取反应混合物。浓缩之后, 将残留物进行 Sephadex LH 20 柱处理, 并用丙酮-水溶剂体系 (40%) 来洗提。在各种情况下合适的母体化合物如下: EC (针对化合物 18)、ECG (针对化合物 19)、儿茶酸 (针对化合物 20)、儿茶酚 (针对化合物 21)、咖啡酸 (针对化合物 22) 和绿原酸 (针对化合物 23)。

[0095] 类似地, 例如为了制备以上所述化合物 24-33, 可以使用以下所述方法: 第一, 将合适的母体黄酮醇类溶解在丙酮与 pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 (1:10, 体积比, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含山葵过氧化酶。然后, 在搅拌过程中在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% H_2O_2 四次。用乙酸乙酯 (50ml \times 3) 提取反应混合物。浓缩之后, 将残留物进行 SephadexLH 20 柱处理, 并用丙酮-水溶剂体系 (40%) 来洗提。

[0096] 在各情况下合适的母体化合物如下：绿原酸和没食子酸（针对化合物 24）、绿原酸和 EGC（针对化合物 25）、绿原酸和 EGCG（针对化合物 26）、绿原酸和 ECG（针对化合物 27）、绿原酸和 EGCG（针对化合物 28）、咖啡酸和 ECG（针对化合物 29）、咖啡酸和 EGCG（针对化合物 30）、咖啡酸和 EGC（针对化合物 31）、咖啡酸和 EGCG（针对化合物 32）、和咖啡酸和没食子酸（garlic acid）（针对化合物 33）。

[0097] 为了制备以上所述化合物 34，首先要在室温下、在吡啶中使红梣酚与乙酸酐反应过夜。然后，在真空蒸发所述溶剂之后，将残留物进行 Sephadex LH 20 柱处理，并用丙酮-水溶剂体系（40%）洗提，制得所述化合物。

[0098] 为了制备以上所述化合物 35，首先要用浓盐酸酸化 GACa 的甲醇溶液。然后，搅拌所述混合物并加热回流 30 分钟，然后用乙酸乙酯提取。蒸发后，残留物在室温下、在吡啶中与乙酸酐反应过夜。在真空蒸发所述溶剂之后，将残留物进行 Sephadex LH 20 柱处理，并用丙酮-水溶剂体系（40%）洗提，制得所述化合物。

[0099] 为了制备以上所述化合物 36，首先要用浓盐酸酸化红梣酚的甲醇溶液。然后，搅拌所述混合物并加热回流 30 分钟，然后用乙酸乙酯提取。在蒸发之后，残留物在室温下、在吡啶中与乙酸酐反应过夜。在真空蒸发所述溶剂之后，将残留物进行 Sephadex LH 20 柱处理，并用丙酮-水溶剂体系（40%）洗提，制得所述化合物。

[0100] 本发明一方面公开了含有可用于治疗或预防疾病或其症状（例如，炎症）的药物制剂或营养制剂的组合物。本发明所述组合物也可以用作抗氧化剂。所述组合物中的药物制剂或营养制剂包括至少一种作为生物活性剂的苯并环庚三烯酚酮化合物或其衍生物。所述组合物可以配成液体、固体或粉末形式，并按需施用到哺乳动物（包括人）上。

[0101] 在本文中，药物是一种合成制备的生物活性化合物，不存在与合成的生物活性化合物结构类似且天然产生的类似物。或者，药物是一种来自自然资源（例如植物和植物产品）的生物活性化合物，但它不是食物、食物添加剂或者饮食补充物。本文中所述营养是指食物、食物添加剂或者饮食补充物，它们提供改善健康或体格的效果，包括预防和 / 或治疗疾病。饮食补充物是一种用于补充一种或多种饮食（食物）成分的物质，包括矿物质、维生素、草本植物、草药提取物、碳水化合物、脂肪、蛋白质或这些成分的组合。

[0102] 除了在组合物中作为生物活性化合物的苯并环庚三烯酚酮化合物或其衍生物以外，本发明组合物中所用的药物制剂或营养制剂还包含用于治疗或预防特定疾病的常用化合物（例如，布洛芬、阿司匹林、NSAID、维生素 E 和 / 或橙皮提取物或其它草药提取物，见 W001/21137，其内容参考引用于此）。而且，本发明所用药物和营养物包括包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的等价盐，它可以获得与所述药物或营养物基本相同的效果。在本发明一个实施方式中，所述组合物可以任选地使用营养制剂，以提高组合物中药物制剂用于治疗或预防指定疾病的功效。类似地，所述组合物可以任选地使用药物制剂，以提高组合物中营养制剂用于治疗或预防指定疾病的功效。或者，所述药物和营养物可以混合在一起，加工成合适的制剂。

[0103] 如上所述，本发明组合物包含有效量的作为生物活性剂的至少一种苯并环庚三烯酚酮化合物或其衍生物。在一个实施方式中，所述组合物可以使用一种以上的苯并环庚三烯酚酮化合物或其衍生物，它们可以从零有效量到完全有效量，或者到小于完全有效量的比例或量存在，前提是至少一种苯并环庚三烯酚酮化合物或其衍生物的量能够有效治疗或

预防炎症。例如,组合物可以含有有效量的EC、焦槲酚(即上述化合物18),作为包含苯并环庚三烯酚酮的化合物或其衍生物。此外,例如,所述组合物可以含有新茶典烷酸酯B和/或EGCGCa,作为其它包含苯并环庚三烯酚酮的化合物或衍生物。所述其它包含苯并环庚三烯酚酮的化合物或衍生物可以从零有效量到部分或到完全有效量存在,作为消炎化合物或抗氧化剂。而其它包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的存在不会影响所述组合物的有效性,它们可以提高(或促进)所述组合物中包含苯并环庚三烯酚酮的化合物或其衍生物的功效。

[0104] 另一方面,本发明也公开了含有本文所述化合物的组合物的抗氧化活性,该化合物包含苯并环庚三烯酚酮。氧自由基的吸收能力(ORAC)检测是一种自由基清除能力的测量方法,它是测量氧自由基吸收能力的一种简单和灵敏的方法,其已广泛地用于测量食物和营养组分的抗氧化活性。ORAC检测由Cao等发明(1993, Free Radical Biol. Med. 14: 303-311)。在该检测中,用 β -藻红蛋白(β -PE)作为荧光指示蛋白,用二盐酸2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)(AAPH)作为过氧化自由基形成剂。 β -PE是在红藻中发现的光合蛋白。 β -PE已经因其具有不同的激发波长和发射波长(激发波长:540nm;发射波长:565nm)而被用作荧光探针。但是,使用 β -PE作为荧光探针存在某些缺陷。当活性氧攻击 β -PE时,它容易丧失荧光性。而且,多酚类和蛋白质之间可能的相互作用会影响ORAC值。最近,Ou等(2001, J. Agric. Food Chem. 49:4619-4626)报道了一种使用荧光素代替 β -PE作为荧光探针的改进ORAC方法。因此,在ORAC检测中使用荧光素作为荧光探针来检测本发明化合物的抗氧化活性。

[0105] 在本发明另一方面中,本发明涉及一种使用本文所述含有包含苯并环庚三烯酚酮化合物的组合物来预防和/或治疗动物炎症的方法。对大量流行病学证据的研究表明:绿茶和红茶多酚类具有消炎活性。本发明包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的消炎活性(或抗肿瘤)可以使用12-O-四癸酰基佛波醇-13-乙酸酯(TPA)诱导的炎症皮肤水肿检测方法来进行测定。将TPA施用到皮肤上会导致在施用位点上产生鸟氨酸脱羧酶活性(提高了多胺水平和表皮增生)、炎症、早期炎症细胞因子(例如,IL-1 β)和产生前列腺素(前列腺素E2)。所述包含苯并环庚三烯酚酮的化合物可以在将TPA局部施涂到皮肤组织(例如,小鼠耳部)之前、或之后、或同时施加。

[0106] 实际上,最近已经研究了某些红茶多酚类(包括茶黄素,茶黄素-3-没食子酸酯和茶黄素-3'-没食子酸酯的混合物,茶黄素-3,3'-二没食子酸酯)以及绿茶多酚(-)-表儿茶酸-3-没食子酸酯(EGCG)对12-O-四癸酰基佛波醇-13-乙酸酯(TPA)诱导水肿和鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性的抑制效果(Liang等,2002, Nutrition and Cancer 42(2): 217-223)。将这些多酚类局部施涂到试验小鼠身上后,对TPA诱导的耳部肿瘤和皮肤表皮ODC活性产生抑制作用。

[0107] 为了解释三种茶黄素与消炎活性之间结构-活性关系,本领域存在两种通行的假说。

[0108] (a) 由于TF-3分子具有13个OH(酚)基团,TF-2具有10个OH基团,而TF-1具有7个OH基团,因此,OH基团越多,则消炎活性越强。

[0109] (b) 由于TF-3包含两个没食子酸酯基团,TF-2包含一个没食子酸酯基团,而TF-1不含没食子酸酯,因此,没食子酸酯基团越多则消炎活性越强。

[0110] 但是,本发明人意外地发现这些解释并不正确,重要的是存在包含苯并环庚三烯

酚酮单元或部分,它的存在甚至能过提供消炎性能。例如,已经发现 OH 基团的数量和消炎活性之间并没有什么关系。没有没食子酸基团的许多化合物如 EGCCa 显示出与茶黄素单没食子酸酯相当的活性。参见以下实施例 V。在本发明的消炎剂中,优选苯并环庚三烯酚酮衍生物。

[0111] 用于本发明方法的组合物可以使用任意合适的装置或途径施用于动物(尤其是哺乳动物,优选是人)。优选口服,但是也可以使用其它给药途径,如非肠道给药和局部给药。本发明所述化合物可以单独给药,或者可以根据给药方式与药物可接受的载体或稀释剂混合。例如对于口服,本发明化合物可以按照标准医药实践以纯的粉末形式或者以片剂、胶囊剂、锭剂、糖浆剂、酞剂、溶液剂、悬浮剂等形式给药。

[0112] 含有本发明化合物和衍生物的组合物(不论口服还是局部递送)通过使用本领域公认的动物模型系统得以证实(Sala 等,2003, European Journal of Pharmacology 461(1):53-61;Ukiya 等,2001, Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(7):3187-3197;Huang 等,2003, Protective effect of dibenzoylmethane on chemically-and UV light-induced skin, inflammation, sunburn lesions, and skin carcinogenesis in mice, In: Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention, F. Shahidi, C.-T. Ho, S. Watanabe 和 T. Osawa. Washington, D. C, American Chemical Society:196-207;Huang 等,1988, Cancer Research. 48:5941-5946)。涉及包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的消炎活性的详细描述见下述实施例部分。如以下实施例所示,本发明包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的确在体内有效。

[0113] 苯并环庚三烯酚酮化合物或衍生物的日剂量可以按情况确定,没有什么特殊限制。但是在大多数情况下,待治疗患者所需的有效剂量为每天每千克体重 0.1-300 毫克。在任何情况下,本发明活性化合物以达到接受治疗的患者所需治疗效果,而不会出现任何严重的副作用治疗有效量给药。对于各种活性化合物,所述治疗有效量随如下因素变化而变化:包括但不限于所用化合物的活性、要消除症状的严重程度、要治疗患者的年龄和敏感性等,这些对于技术人员来说是显而易见的。所述给药量根据一定时间内各种因素的变化而调整。

[0114] 实施例

[0115] 以下实施例进一步说明了本发明。除非另有详述,以下实施例使用本领域技术人员熟知和惯用的标准技术来实施。所述实施例是示例性的,对本发明不产生任何限定作用。

[0116] I. 合成茶黄素混合物

[0117] 使用酶催化氧化方法从其母体黄酮醇类合成茶黄素混合物。

[0118] 特别地,在过滤之后,直接将粗制绿茶多酚(1.8g,包含 80% 儿茶酸的市售样品)加入到 Sephadex LH-20 柱中,首先用 95% 乙醇洗提,除去非儿茶酸类黄酮,然后,用丙酮洗提所述柱,得到茶儿茶酸混合物(1.34g)。将所述茶儿茶酸溶解在 pH5 缓冲液(50mL)中,该缓冲液包含 4mg 山葵过氧化酶。在搅拌时,在 1 小时内加入 3.0ml 3.13% 的 H₂O₂ 5 次。在氧化反应过程中,包含儿茶酸和粗制过氧化酶的酶催化反应溶液变成微红色溶液。用乙酸乙酯(50ml × 3)提取所述反应混合物。在浓缩之后,将残留物(0.97g)加入到 Sephadex LH-20 柱中,用丙酮-水溶剂系统(35-50%)洗提。制得 350mg 茶黄素混合物。

[0119] II. 制备茶儿茶酸

[0120] 过滤之后,直接将粗制绿茶多酚(10g)加入到 Sephadex LH-20 柱中,用 95%乙醇洗提,制得三种儿茶酸,即表儿茶酸没食子酸酯(ECG)、表儿茶酸(EGC)和表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)。各儿茶酸还通过 RPC-18 柱进行洗提,并用甲醇-水溶剂系统洗提。

[0121] III. 合成纯的包含苯并环庚三烯酚酮的化合物

[0122] 使用山葵过氧化酶或多酚氧化酶,在 H_2O_2 存在下通过酶催化氧化耦合包含焦棓酚单元分子(如表没食子儿茶素)和包含儿茶酚单元分子(如表儿茶酸)来合成各种包含苯并环庚三烯酚酮的化合物。

[0123] 使用以下分析程序:在 Sigma-Aldrich 硅胶 TLC 板(250 微米厚度,2-25 微米粒度)上进行薄层色谱法,并通过 UV 照度检测斑点,并喷涂 5%(体积)的硫酸乙醇溶液。在 Varian 600 设备(Varian Inc., Palo Alto, CA)上得到 1H NMR 光谱。按照内部标准在具有 TMS 的 CH_3OH-d_4 中分析所述化合物。在配置有 Digital DECPC XL 560 计算机(用于数据分析)的 Micromass Platform II 系统(Micromass Co., Beverly, MA)上记录 APCI-质谱。

[0124] A. 使用过氧化酶催化合成包含苯并环庚三烯酚酮的化合物

[0125] 在 H_2O_2 存在下,使用山葵过氧化酶通过使包含焦棓酚单元分子和包含儿茶酚单元分子反应,合成以下 17 种包含苯并环庚三烯酚酮的化合物。

[0126] 1. 茶黄素

[0127] 将 EC(1g)和 EGC(1g)溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1:10,体积/体积,50mL)的混合物中,所述混合物包含 4mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时,在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13%的 H_2O_2 4 次。使用乙酸乙酯(50ml×3)提取所述反应混合物。浓缩之后,将残留物用丙酮-水溶剂系统(40%)在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 250mg 的茶黄素。

[0128] 1H NMR(CD_3OD ,600MHz): δ H 7.97 1H s,7.85 1H s,7.34 1H s,6.02 1H d, J = 2.4Hz,5.99 1H d, J = 2.4Hz,5.97 1H d, J = 2.4Hz,5.96 1H d, J = 2.4Hz,5.64 1H brs,4.91 1H brs,4.45 1H d, J = 2.4Hz,4.32 1H brs,2.98 1H dd, J = 4.8,16.8Hz,2.94 1H dd, J = 4.8,16.8,2.84 1H brd, J = 16.8Hz,2.82 1H brd, J = 16.8Hz; ^{13}C NMR(CD_3OD ,150MHz): δ C 185.1,158.1,158.0,157.6,157.5,157.3,156.6,155.1,150.9,146.1,134.4,131.2,129.0,126.6,123.7,121.9,118.3,100.3,99.8,96.8,96.1,96.0,81.2,77.1,66.7,65.6,30.0,29.4ppm。

[0129] 2. 茶黄素-3-没食子酸酯

[0130] 将 EC(1g)和 EGCG(1g)溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1:10,体积/体积,50mL)的混合物中,所述混合物包含 4mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时,在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13%的 H_2O_2 4 次。使用乙酸乙酯(50ml×3)提取所述反应混合物。浓缩之后,将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%)在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 220mg 的茶黄素-3-没食子酸酯。

[0131] 1H NMR(CD_3OD ,600MHz): δ H 7.91 1H s,7.80 1H s,7.38 1H s,6.80 2H s,6.02 1H d, J = 1.8Hz,6.00 1H d, J = 2.4Hz,5.99 2H s,5.78 1H brs,5.55 1H brs,5.11 1H s,4.16 brd, J = 2.4Hz,3.07 dd, J = 4.8,16.8Hz,2.99 dd, J = 4.2,16.8,2.91 brd, J = 16.8Hz,2.83 brd, J = 16.8Hz; ^{13}C NMR(CD_3OD ,150MHz): δ C 185.6,167.4,158.0,157.9,

157.8, 157.3, 156.4, 156.3, 155.4, 151.2, 146.4, 146.3, 139.9, 133.5, 131.3, 128.7, 125.7, 123.8, 121.9, 121.0, 117.0, 110.1, 100.2, 99.3, 96.9, 96.8, 96.2, 95.8, 79.8, 77.0, 69.0, 65.7, 30.1, 27.1 ppm。

[0132] 3. 茶黄素-3'-没食子酸酯

[0133] 将 ECG(1g) 和 EGC(1g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1:10, 体积/体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 4mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H₂O₂ 4 次。用乙酸乙酯(50ml×3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 110mg 的茶黄素-3'-没食子酸酯。

[0134] ¹H NMR(CD₃OD, 600MHz): δ H 7.88 1H s, 7.87 1H s, 7.37 1H s, 6.84 2H s, 6.06d, J = 2.4Hz, 6.00 1H d, J = 2.4Hz, 5.98 1H d, J = 2.4Hz, 5.97d, J = 2.4Hz, 5.87brs, 5.81 1H brd J = 3.0Hz, 4.94 1H brs, 4.33 1H brs, 3.09 1H dd, J = 4.8, 17.4Hz, 2.96 1H dd, J = 4.8, 16.8, 2.88 1H brd, J = 17.4Hz, 2.86dd, J = 2.4, 16.8Hz; ¹³C NMR(CD₃OD, 150MHz): δ C 185.6, 167.2, 158.0, 157.9, 157.8, 157.7, 157.0, 156.6, 156.0, 155.5, 151.1, 146.2, 139.7, 134.8, 130.3, 128.8, 125.9, 123.0, 121.9, 120.9, 118.3, 99.8, 99.6, 96.8, 96.7, 95.8, 95.7, 81.2, 75.8, 68.3, 66.5, 29.3, 27.2 ppm。

[0135] 4. 茶黄素-3,3'-二没食子酸酯

[0136] 将 ECG(1g) 和 EGCG(1g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1:10, 体积/体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 4mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H₂O₂ 4 次。用乙酸乙酯(50ml×3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 100mg 的茶黄素-3,3'-二没食子酸酯。

[0137] ¹H NMR(CD₃OD, 600MHz): δ H 7.79 1H s, 7.76 1H s, 7.47 1H s, 6.88 2H s, 6.80 2H s, 6.07 1H d, J = 2.4Hz, 6.03 2H d, J = 2.4Hz, 6.00 1H d, J = 2.4Hz, 5.86 1H brs, 5.76 1H m, 5.67 1H m, 5.21 1H s, 3.17 1H dd, J = 4.8, 16.8Hz, 3.09 1H dd, J = 4.8, 17.4, 2.91 2H m。

[0138] 5. 新茶黄素

[0139] 将 C(儿茶酸, 0.8g) 和 EGC(0.8g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1:10, 体积/体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 4mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H₂O₂ 4 次。用乙酸乙酯(50ml×3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 120mg 的新茶黄素。

[0140] ¹H NMR((CD₃)₂CO, 600MHz): δ H 8.26 1H s, 7.46 1H s, 7.63 1H s, 6.06d, J = 2.4Hz, 6.03d, J = 2.4Hz, 5.96d, J = 2.4Hz, 5.95d, J = 2.4Hz, 5.62d, J = 7.8Hz, 5.01 1H s, 4.39 1H m, 4.15 1H m, 2.97dd, J = 5.4, 15.6Hz, 2.91dd, J = 4.2, 16.8, 2.84dd, J = 1.2, 16.8Hz, 2.66dd, J = 9.6, 15.6Hz; ¹³C NMR((CD₃)₂CO, 150MHz): δ C 184.8, 157.6, 157.5, 157.4, 157.0, 156.7, 156.6, 154.4, 150.5, 146.2, 134.8, 132.2, 130.8, 128.6, 122.3, 121.6, 119.2, 100.7, 99.2, 96.4, 96.3, 95.6, 95.4, 81.5, 79.1, 69.5, 66.6, 30.0, 29.3 ppm。

[0141] 6. 新茶黄素-3-没食子酸酯

[0142] 将 C(1g) 和 EGCG(1g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1 : 10, 体积 / 体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 4mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H₂O₂ 4 次。用乙酸乙酯(50ml × 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 170mg 的新茶黄素 3-没食子酸酯。

[0143] ¹H NMR(CD₃OD, 600MHz) : δ H 8.04 1H s, 7.59 1H s, 7.49 1H s, 6.922H s, 6.01 2H d, J = 2.4Hz, 5.98 1H d, J = 2.4Hz, 5.97 1H d, J = 2.4Hz, 5.67 1H brs, 5.56 1H brd, J = 6.6Hz, 5.11 1H s, 4.22 1H m, 3.03 1H dd, J = 4.8, 17.4Hz, 2.92 1H brd, J = 16.8Hz, 2.83 1H dd, J = 4.8, 16.8, 2.66dd, J = 8.4, 16.8 ; ¹³C NMR(CD₃OD, 150MHz) : δ C 185.8, 167.4, 158.0, 157.9, 157.8, 156.7, 156.5, 155.3, 151.6, 146.9, 146.2, 139.9, 134.0, 132.0, 130.4, 127.7, 122.3, 121.0, 117.6, 110.2, 100.6, 99.2, 96.9, 96.7, 95.9, 95.6, 80.5, 77.1, 69.9, 68.8, 28.5, 27.0ppm。

[0144] 7. 茶典烷酸酯 A

[0145] 将 ECG(0.85g) 溶解在 pH5 缓冲液(1 : 10, 体积 / 体积, 50mL) 中, 该缓冲液含有 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 30 分钟内加入 1.5ml 3.13% 的 H₂O₂ 3 次。用乙酸乙酯(50ml × 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 60mg 茶典烷酸酯 A, 并回收 600mg 的 ECG。

[0146] ¹H NMR(CD₃OD, 600MHz) : δ H 8.33 1H s, 7.81 1H s, 7.65 1H s, 6.871H dd, J = 1.8, 7.8Hz, 6.85 1H d, J = 1.8Hz, 6.80 2H s, 6.53 1H d, J = 7.8Hz, 6.15 1H d, J = 2.4Hz, 6.11 1H d, J = 2.4, 6.09 1H d, J = 2.4Hz, 5.981H, d, J = 2.4Hz, 5.69 1H brs, 5.64 1H brs, 5.52 1H, brd, J = 3.6Hz, 5.11 1H s, 3.32dd, J = 4.8, 18.0Hz, 3.10dd, J = 4.8, 18.0Hz, 3.05dd, J = 1.8, 16.8Hz, 2.91d, J = 16.8 ; ¹³C NMR(CD₃OD, 150MHz) : δ C 186.8, 167.8, 167.3, 158.2, 158.1, 158.0, 157.9, 157.2, 157.1, 155.3, 149.5, 146.4, 146.3, 146.0, 140.0, 133.5, 131.2, 126.6, 124.8, 122.9, 122.6, 121.0, 119.0, 116.4, 115.8, 114.2, 110.2, 100.0, 99.4, 97.3, 97.2, 96.5, 96.4, 78.0, 75.6, 72.1, 68.9, 27.3, 26.7ppm。

[0147] 8. 茶典烷酸酯 B

[0148] 将 EC(0.5g) 和 ECG(0.5g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1 : 10, 体积 / 体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H₂O₂ 4 次。用乙酸乙酯(50ml × 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 200mg 的茶典烷酸酯 B。

[0149] ¹H NMR(CD₃OD, 600MHz) : δ H 8.26 1H s, 7.88 1H s, 7.59 1H s, 6.871H dd, J = 1.8, 7.8Hz, 6.86 1H d, J = 1.8Hz, 6.55 1H d, J = 7.8Hz, 6.161H d, J = 2.4Hz, 6.08 1H d, J = 2.4, 6.05 1H d, J = 2.4Hz, 5.98 1H, d, J = 2.4Hz, 5.66 1H brs, 5.46 1H brs, 5.08 1H s, 4.14 1H brs, 3.34dd, J = 4.8, 16.8Hz, 3.21dd, J = 4.8, 16.8Hz, 3.17dd, J = 3.6, 16.2Hz, 2.88d, J = 16.8 ; ¹³C NMR(CD₃OD, 150MHz) : δ C 186.4, 167.8, 158.3, 158.0, 157.9, 157.7, 157.4, 157.1, 154.9, 151.8, 149.5, 146.3, 146.0, 134.8, 132.3, 131.3, 126.5, 124.4, 123.7, 122.4, 119.2, 116.3, 115.8, 114.4, 100.7, 99.5, 97.2, 97.1, 96.6, 96.5, 78.1, 77.0, 72.1, 66.7, 30.0, 26.7ppm。

[0150] 9. 新茶典烷酸酯 B

[0151] 将 C (0.5g) 和 ECG (0.5g) 溶解在丙酮 - pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液 (1 : 10, 体积 / 体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H_2O_2 4 次。用乙酸乙酯 (50ml × 3) 提取所述反应混合物。在浓缩之后, 将残留物用丙酮 - 水溶剂系统 (45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 90mg 的新茶典烷酸酯 B。

[0152] 1H NMR (CD_3OD , 600MHz) : δ H 8.77 1H s, 7.64 1H s, 7.61 1H s, 6.88 1H d, J = 1.8Hz, 6.82 1H dd, J = 1.8, 8.4Hz, 6.64 1H d, J = 8.4Hz, 6.03 1H d, J = 2.4Hz, 5.98 1H d, J = 2.4, 5.96 2H brs, 5.58 1H brs, 5.38 1H brd, J = 7.2Hz, 5.04 1H s, 4.07 1H m, 3.03 dd, J = 4.8, 16.8Hz, 2.95 brd, J = 16.8, 2.91 dd, J = 4.8, 16.8Hz, 2.66 dd, J = 3.6, 16.2Hz ; ^{13}C NMR (CD_3OD , 150MHz) : δ C 186.6, 167.7, 157.9, 157.7, 157.3, 157.0, 156.8, 154.7, 152.3, 149.8, 146.0, 145.8, 135.0, 134.3, 131.2, 128.8, 124.0, 122.5, 119.0, 116.2, 115.8, 114.4, 101.2, 99.2, 97.0, 96.8, 96.1, 95.9, 79.7, 78.0, 72.0, 69.6, 29.6, 26.6ppm。

[0153] 10. 茶黄酸

[0154] 将 C (0.5g) 和没食子酸 (0.5g) 溶解在丙酮 - pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液 (1 : 10, 体积 / 体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H_2O_2 4 次。用乙酸乙酯 (50ml × 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮 - 水溶剂系统 (45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 60mg 茶黄酸和 20mg 红梲酚羧酸。

[0155] 1H NMR (CD_3OD , 600MHz) : δ H 9.00 1H s, 7.82 1H s, 7.66 1H s, 5.98 1H d, J = 2.4Hz, 5.91 1H d, J = 2.4, 5.43 1H brd, J = 7.2Hz, 4.21 1H m, 2.94 dd, J = 4.8, 16.2Hz, 2.64 dd, J = 4.8, 16.2Hz ; ^{13}C NMR (CD_3OD , 150MHz) : δ C 186.6, 170.3, 157.9, 157.6, 156.6, 154.7, 152.2, 149.3, 139.5, 134.4, 132.2, 128.9, 125.0, 122.7, 116.5, 100.7, 96.8, 96.1, 80.0, 69.1, 29.3ppm。

[0156] 11. 表茶黄酸

[0157] 将表儿茶酸 (EC, 0.5g) 和没食子酸 (1g) 溶解在丙酮 - pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液 (1 : 10, 体积 / 体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H_2O_2 4 次。用乙酸乙酯 (50ml × 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮 - 水溶剂系统 (45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 70mg 表茶黄酸和 25mg 红梲酚羧酸。

[0158] 1H NMR (CD_3OD , 600MHz) : δ H 8.60 1H s, 7.95 1H s, 7.80 1H s, 6.09 1H s, 6.00 1H s, 5.88 1H s, 5.77 1H m, 3.17 1H dd, J = 4.8, 17.4Hz, 2.94 1H d, J = 17.4Hz ; ^{13}C NMR (CD_3OD , 150MHz) : δ C 186.5, 170.1, 158.2, 157.7, 157.2, 155.0, 151.6, 149.2, 134.2, 132.2, 126.7, 125.2, 123.4, 122.6, 116.2, 99.2, 96.8, 96.1, 77.0, 66.4, 30.0ppm。

[0159] 12. 表茶黄酸 -3- 没食子酸酯

[0160] 将 ECG (0.5g) 和没食子酸 (1g) 溶解在丙酮 - pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液 (1 : 10, 体积 / 体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H_2O_2 4 次。用乙酸乙酯 (50ml × 3) 提取所述反应混合物。浓缩之

后,将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%)在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 20mg 表茶黄酸-3-没食子酸酯、40g 茶典烷酸酯 A 和 10mg 红梲酚羧酸。

[0161] ^1H NMR(CD_3OD , 600MHz): δ H 8.64 1H s, 7.84 1H s, 7.83 1H s, 6.832H s, 6.02 1H d, J = 2.4Hz, 5.98 1H d, J = 2.4, 5.61 1H s, 4.37 1H, m, 3.03 1H dd, J = 4.8, 16.8Hz, 2.87d, J = 16.8Hz; ^{13}C NMR(CD_3OD , 150MHz): δ C 186.5, 170.1, 167.1, 158.0, 156.9, 155.1, 151.7, 148.9, 146.2, 139.8, 132.8, 131.6, 126.8, 122.6, 122.5, 120.8, 116.3, 110.0, 99.3, 96.9, 96.0, 75.7, 68.6, 27.2ppm。

[0162] 13. EGCCa

[0163] 将 EGC(1g) 和儿茶酚(1.5g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1:10, 体积/体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H_2O_2 4 次。用乙酸乙酯(50ml \times 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 226mg EGCCa。

[0164] ^1H NMR($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600MHz): δ H 8.15 1H s, 7.99 1H s, 7.66 1H d, J = 8.4Hz, 7.41 1H d, J = 8.4Hz, 6.75 1H brs, 6.74 1H brs, 5.23 1H s, 4.76 1H, s, 3.67d, J = 16.2Hz, 3.44dd, J = 3.6, 16.2Hz; ^{13}C NMR($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 150MHz): δ C 184.9, 158.8, 157.2, 151.8, 151.4, 147.8, 134.6, 134.5, 132.0, 126.4, 123.3, 121.2, 119.9, 119.8, 99.9, 97.1, 96.0, 81.8, 66.6, 30.3ppm。

[0165] 14. EGCGCa

[0166] 将 EGCG(1g) 和儿茶酚(1.5g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1:10, 体积/体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H_2O_2 4 次。用乙酸乙酯(50ml \times 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 230mg EGCGCa(表没食子儿茶素儿茶酚没食子酸酯(epigallo-catechinocatechol gallate))。

[0167] ^1H NMR($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600MHz): δ H 8.01 1H s, 7.97 1H s, 7.54 1H d, J = 8.4Hz, 7.29 1H d, J = 8.4Hz, 6.74 1H d, J = 2.4Hz, 6.70 1H d, J = 2.4, 6.181H s, 5.38 1H, s, 3.71d, J = 17.4Hz, 3.51dd, J = 3.0, 17.4Hz; ^{13}C NMR($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 150MHz): δ c 185.0, 166.8, 159.0, 158.8, 156.9, 155.4, 151.9, 148.1, 147.7, 141.4, 134.5, 133.0, 131.6, 126.4, 123.2, 121.2, 120.8, 118.8, 110.4, 98.9, 97.5, 96.0, 80.1, 69.1, 27.5ppm。

[0168] 15. GACa

[0169] 将没食子酸(2g) 和儿茶酚(2g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液(1:10, 体积/体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 4mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H_2O_2 4 次。用乙酸乙酯(50ml \times 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮-水溶剂系统(45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 400mg GACa。

[0170] ^1H NMR($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600MHz): δ H 8.08 1H brs, 7.68 1H dd, J = 1.2, 8.4Hz, 7.56 1H d, J = 8.4Hz, 7.19 1H s; ^{13}C NMR($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 150MHz): δ C 186.0, 169.6, 154.8, 152.6, 150.5, 140.0, 130.2, 128.8, 125.6, 123.0, 121.6, 117.9ppm。

[0171] 16. 红梲酚

[0172] 将焦棓酚 (1g) 和儿茶酚 (1.5g) 溶解在丙酮-pH5.0 磷酸盐柠檬酸缓冲液 (1 : 10, 体积 / 体积, 50mL) 的混合物中, 所述混合物包含 2mg 的山葵过氧化酶。在搅拌时, 在 45 分钟内加入 2.0ml 3.13% 的 H_2O_2 4 次。用乙酸乙酯 (50ml \times 3) 提取所述反应混合物。浓缩之后, 将残留物用丙酮 - 水溶剂系统 (45%) 在 Sephadex LH-20 柱中进行洗提。制得 300mg 红棓酚。

[0173] 1H NMR (C_5D_5N , 600MHz) : δ H 7.35 1H d, J = 11.4Hz, 7.29 1H s, 7.24 1H d, J = 9.6Hz, 6.66 1H dd, J = 9.6, 11.4Hz; ^{13}C NMR (C_5D_5N , 150MHz) : δ c 183.4, 156.3, 154.0, 153.3, 137.1, 135.1, 134.4, 123.8, 116.8, 116.2, 112.0ppm。

[0174] 17. 红棓酚羧酸

[0175] 1HNMR (CD_3OD , 600MHz) : δ H 8.17 1H s, 7.66 1H s, 6.94 1H s; $^{13}CNMR$ (CD_3OD , 150MHz) : δ C 184.0, 170.0, 156.6, 154.4, 153.2, 152.2, 137.8, 134.2, 125.9, 123.0, 116.3, 114.5ppm。

[0176] 在以上 17 种化合物中, 新茶典烷酸酯 B (化合物 9) 和 EGCGCa (化合物 14) 是本领域未知的新化合物。其它化合物是本领域已知的, 即化合物 1-8、10-12 在红茶中已经得到鉴定, 化合物 13 和 15-17 已经通过化学氧化方法制得, 但是已有技术已知的化合物可以通过过氧化酶催化氧化反应以外的其它方法合成。

[0177] 因此, 17 种包含苯并环庚三烯酚酮的化合物通过过氧化酶 / H_2O_2 系统来合成。

[0178] B. 通过多酚氧化酶 (PPO) 催化合成包含苯并环庚三烯酚酮的化合物

[0179] 从香蕉 (从当地市场购得) 中分离粗制的多酚氧化酶 (PPO)。简而言之, 用 800mL 冷的 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 4°C) 均化新鲜的香蕉 (400g)。将该均匀溶液在 4°C 下离心分离 20 分钟 (10,000g)。将透明的上清液小心收集到烧瓶中, 并将烧瓶置于冰浴中。然后, 在搅拌条件下将相同体积的冷丙酮 (置于冷却器中过夜) 缓慢加入到所述收集的溶液中。在 4°C 下通过离心分离 (10,000g, 20 分钟) 来收集所得蛋白质沉积物。在离心分离之后, 将上清液丢弃, 并用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 小心洗涤所得颗粒物三次。然后, 将所述颗粒物溶解在相同的缓冲液中, 并冻干。

[0180] 通过比色法测量酶的活性。所述酶反应溶液由 2mL 的 0.1M 儿茶酚溶液和 1mL 的磷酸盐缓冲液 (50mM, pH7.0) 和 20 μ L 酶溶液组成。在 420nm 下根据吸收光度的增大来测量酶活性 5 分钟 (25°C)。PPO 活性定义为每分钟吸光度增大 0.001 的酶量。

[0181] 对于 PPO 催化氧化反应, 如以下所述合成了 9 种化合物。在该段落中所述化合物编号对应实施例中第三 (A) 部分的化合物编号。

[0182] 1. 茶黄素的酶催化氧化和分离

[0183] 将 EC (1g, 3.5mmol) 和 EGC (1g, 3.3mmol) 与 2g 的粗制 PPO 酶溶解在 200mL 磷酸盐 - 柠檬酸缓冲液 (50mM, pH5.0) 中。在搅拌条件下, 所述酶催化氧化反应在室温下进行 6 小时。然后, 用相同体积的乙酸乙酯分馏所述反应溶液三次。然后, 将有机层在减压条件下浓缩。所得残留物加入到 Sephadex LH-20 色谱柱中, 用乙醇到 20% 丙酮的乙醇溶液的梯度进行洗提。在收集的 14 个馏分 (各自为 90mL) 中, 将 8-10 号馏分混合, 并在减压条件下浓缩。所得残留物在 RP-18 硅胶柱中进一步纯化, 并用 40-50% 的甲醇水溶液梯度进行洗提。在洗提过程中, 收集 38 个馏分 (分别约 13mL)。其中, 将 10-17 号馏分混合, 并在减压条件下浓缩, 进行冻干。它形成深 - 微红色的化合物 1 (280mg)。

[0184] 按照相同的酶反应和分馏步骤,由 EC 和 EGCG 反应制得化合物 2。EGC 和 ECG、ECG 和 EGCG 的酶催化氧化反应分别制得化合物 3 和化合物 4。

[0185] 2. 茶儿茶酸 (EC 和 ECG) 和没食子酸的酶催化反应

[0186] 将 EC (1.160g, 4.0mmol) 和没食子酸 (0.520g, 4.0mmol) 溶解在 100mL 磷酸盐-柠檬酸缓冲液 (50mM, pH5.0) 中,并在搅拌过程中将 1.2g 粗制 PPO 酶加入所述反应溶液中。在室温下进行酶催化氧化反应 3.5 小时。在反应之后,用相同体积的乙酸乙酯提取所述溶液三次。然后,所述乙酸乙酯提取物在真空条件下浓缩。所得残留物加入到 Sephadex LH-20 色谱柱中,用乙醇到 20% 丙酮的乙醇溶液的梯度进行洗提。在收集的 168 个馏分 (分别为 15mL) 中,将 47-52 号馏分混合,并在减压条件下浓缩。所得残留物加入到 RP-18 硅胶柱中,并用 20-50% 的甲醇水溶液梯度进行洗提,制得化合物 5。然后将分离自 Sephadex LH-20 的 72-85 号馏分混合,加入到 RP-18 硅胶柱中,用 10-50% 的甲醇水溶液梯度进行洗提,制得化合物 6。

[0187] 将 ECG (0.66g) 和没食子酸 (0.26g) 溶解在 50mL 磷酸盐-柠檬酸缓冲液 (50mM, pH5.0) 中,并将 1.2g 粗制的 PPO 酶溶解在反应溶液中。在室温下进行酶催化氧化反应 5 小时。然后,用乙酸乙酯提取所述反应溶液三次。然后,所述有机层在减压条件下浓缩。所得残留物加入到 Sephadex LH-20 色谱柱中,用乙醇到 20% 丙酮的乙醇溶液的梯度进行洗提。在收集的 128 个馏分 (各自为 15mL) 中,将 18-20 号馏分混合,并在减压条件下浓缩。所得残留物在 RP-18 硅胶柱中进一步纯化,并用 20-50% 的甲醇水溶液梯度进行洗提,制得化合物 7。将 37-48 号馏分混合,并在 RP-18 硅胶柱中进一步纯化,用 10-30% 的甲醇水溶液梯度进行洗提,制得化合物 8。将 90-108 号馏分混合,在 RP-18 硅胶柱中进一步纯化,用 40-50% 的甲醇水溶液梯度进行洗提,制得化合物 9。

[0188] IV. 氧自由基吸收能力 (ORAC) 检测

[0189] 进行氧自由基吸收能力 (ORAC) 检测,以测定单独的茶黄素和表茶黄酸的抗氧化活性。在 75mM 磷酸盐缓冲液 (pH5.5) 中制备所有试剂。所述反应混合物包括 3mL 荧光溶液 (8.16×10^{-5} mM)、500 μ L AAPH (153mM) 和 500 μ L 样品溶液或空白样。一旦加入了 AAPH,使用 Hitachi F-3010 型荧光光谱计 (发射波长 515nm, 激发波长 493nm) 每隔 1 分钟测量荧光量。以试验化合物存在下荧光素的荧光延迟曲线下的面积为基准,计算所述 ORAC 值,将该值与使用标准 Trolox 和空白样形成的面积进行比较。通过 Cao 等 (Cao 等, 1993) 列出的方程式计算曲线下的净面积和 ORAC 值。

[0190] 用以下方程式计算相对 ORAC 值 (Trolox 等价值):

[0191] 相对 ORAC 值 = $[(AUC_{\text{样品}} - AUC_{\text{空白样}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{空白样}})] \times (\text{Trolox 的摩尔浓度} / \text{样品的摩尔浓度})$

[0192] 根据以下方程式计算曲线下面积 (AUC):

[0193]

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_{119}/f_0 + f_{120}/f_0$$

[0194] f_0 是在 0 分钟时起始荧光读数, f_i 是在时间点 i 处荧光读数。

[0195] 抑制曲线代表了在各种浓度 (0-4 μ M) 下 Trolox 的过氧化氢自由基吸收能力,将该曲线用作标准线 (数据未显示)。抑制曲线的净面积随 Trolox 浓度的增量成比例增大。

检查茶黄素和 EGCG 的抑制曲线（数据未显示）。在相同的测试浓度（0.5 μ M）下，所述 ORAC 值（表 2）显示茶黄素的抗氧化活性比 EGCG 高。也测定表茶黄酸和 EGCG 的抑制曲线（数据未显示）。表茶黄酸的 ORAC 值显示这些化合物的抗氧化活性比 EGCG 稍高。

[0196] 表 2 儿茶酸、表茶黄酸和 EGCG 的相对 ORAC 值

化合物	相对 ORAC 值
茶黄素	11.60 \pm 0.30
茶黄素-3-没食子酸酯	13.17 \pm 0.18
茶黄素-3'-没食子酸酯	12.40 \pm 0.58
茶黄素-3,3'-二没食子酸酯	13.54 \pm 0.69
表茶黄酸 ^a	9.74 \pm 0.38
红梲酚 ^a	6.01 \pm 0.42
EGCG	7.69 \pm 0.35

[0197] 数据表示为平均值 \pm SD, n = 4, ^an = 3

[0198] V. 包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的消炎活性

[0199] 在皮肤炎症模型中进行所述 TPA (12-O-四癸酰基佛波醇佛波醇-13-乙酸酯) 诱导耳水肿检测, 以证实包含苯并环庚三烯酚酮的化合物的消炎活性。在局部施用 20 微升丙酮或溶解在 20 微升丙酮中的 TPA (1nmol) 之前 20 分钟时, 用 20 微升的丙酮和溶解在 20 微升丙酮中的包含苯并环庚三烯酚酮的化合物局部处理雌性 CD-1 小鼠 (年龄: 24-25 天)。然后, 5 小时后, 使颈部错位来杀死小鼠, 取下耳冲孔片 (punch) (直径 6mm), 并称重。

[0200] 所得结果显示于下表 3 中。所述各种包含苯并环庚三烯酚酮的化合物显示出强抑制效果。

[0201] 表 3 茶黄素型化合物对小鼠耳部的 TPA 诱导水肿的抑制效果

处理	耳冲孔片的平均重量 (平均值 \pm SD)	抑制%
丙酮 + 丙酮	7.44 \pm 0.08*	-
丙酮 + TPA (1nmol)	11.7 \pm 1.38	-
茶黄素 (0.5 μ mol) + TPA (1nmol)	7.90 \pm 0.42*	89.2
茶黄素-3-没食子酸酯 (0.5 μ mol) + TPA (1nmol)	7.86 \pm 0.24*	91.5
茶黄素-3'-没食子酸酯 (0.5 μ mol) + TPA (1nmol)	7.44 \pm 0.18*	100.0
茶黄素-3,3'-二没食子酸酯 (0.5 μ mol) + TPA (1nmol)	7.03 \pm 0.18*	100.0

处理	耳冲孔片的平均重量 (平均值 ±SD)	抑制%
EGCG (0.5 μmol)+TPA (1nmol)	8.79±0.54*	68.3

处理	耳冲孔片的平均重量 (平均值 ±SD)	抑制%
丙酮 + 丙酮	7.44±0.07*	-
丙酮 +TPA (1nmol)	15.91±0.51	-
茶典烷酸酯 B(0.5 μmol) +TPA (1nmol)	8.35±0.32*	89.2
茶典烷酸酯 A(0.5 μmol) +TPA (1nmol)	8.52±0.26*	87.2
新茶典烷酸酯 A(0.5 μmol)	8.65±0.64	85.7

+TPA (1nmol)		
新茶黄素 (0.5 μmol)+TPA (1nmol)	10.58±0.73	62.9
新茶黄素 3- 没食子酸酯 (0.5 μmol)+TPA (1nmol)	8.42±0.42*	88.4
茶黄酸 (0.5 μmol)+TPA (1nmol)	9.28±0.37*	78.3

处理	耳冲孔片的平均重量 (平均值 ±SD)	抑制%
丙酮 + 丙酮	7.17±0.18*	-
丙酮 +TPA (1nmol)	15.85±0.86	-
茶黄酸 (0.5 μmol)+TPA (1nmol)	8.95±0.43*	79.5
表茶黄酸 (0.5 μmol)+TPA (1nmol)	9.39±0.43*	74.4
GACa(0.5 μmol)+TPA (1nmol)	8.61±0.54*	83.3
EGCCa(0.5 μmol)+TPA (1nmol)	7.86±0.18*	92.1

处理	耳冲孔片的平均重量 (平均值 ±SD)	抑制%
EGCGCa (0.5 μmol) + TPA (1nmol)	7.49 ± 0.12*	96.3
茶黄素 (0.5 μmol) + TPA (1nmol)	8.23 ± 0.40*	87.8

[0202] 这些结果是最近 Liang 等 (2002, Nutrition and Cancer 42(2) :217-223) 报道的出乎意料的假定情况。Liang 比较了红茶中三种茶黄素的消炎活性。他们研究的三种化合物是 TF-1 (即, 茶黄素, 以上实施例中的化合物 1)、TF-2 (即, 茶黄素 3-没食子酸酯和茶黄素 3'-没食子酸酯的混合物、以上实施例中的化合物 2 和化合物 3 的混合物)、TF-3 (即, 茶黄素 -3,3' -二没食子酸酯, 以上实施例中的化合物 4)。Liang 中所用的消炎测验方法与本发明所用方法相同。从 Liang 等的报道来看 (见 Liang 等的公报表 1), TF-3 的消炎活性明显强于 TF-2, 而 TF-2 应强于 TF-1。

[0203] 也在皮肤炎症模型中进行 TPA 诱导耳水肿检测, 证明包含苯并环庚三烯酚酮的化合物对长期炎症 (刺激性慢性炎症) 的效果。从 Charles River Breeding Laboratories (Kingston, NY) 购得雌性 CD-1 小鼠 (年龄: 3-4 周)。如上所述制备茶黄素相关化合物。所述茶黄素混合物基本上由茶黄素 (约 33 重量%)、茶黄素 -3-没食子酸酯 (约 17 重量%)、茶黄素 -3'-没食子酸酯 (约 17 重量%) 和茶黄素 -3,3' -二没食子酸酯 (约 33 重量%) 组成。丙酮、12-O-四癸酰基佛波醇佛波醇 -13-乙酸酯和其它化学试剂可以从 Sigma Chemicals (St. Louis, MO) 购得。使用每毫升中包含 0.4M NaCl、0.05% 的 Tween-20、0.5% 牛血清蛋白、0.1mM 苯基甲基磺酰氟、0.1mM 苯甲乙氧铵、10mM EDTA 和 20KI 抑肽酶的磷酸盐缓冲液盐水均化小鼠耳部组织样品。

[0204] 将小鼠分成 6 组, 每组 6-7 只动物。将所有试验化合物溶解在丙酮中。丙酮起到溶剂 (阴性) 对照样的作用, 它不会引起炎症。也保持一组 TPA 对照组, 以表示小鼠耳部中诱发的最大炎症。

[0205] 在将丙酮 (溶剂对照样) 或 0.4nmol TPA 局部施用到小鼠耳部上之前 20 分钟, 用 20 微升的丙酮 (溶剂对照组)、TPA (TPA 对照组) 或溶解在 20 微升丙酮中的试验化合物处理 CD-1 小鼠的两只耳朵。这种处理每天进行两次, 持续 3.5 天 (总共 7 次)。在处理周期结束时, 使颈部错位来杀死小鼠, 将耳部冲孔。分别将耳冲孔片称重, 测定小鼠耳部中炎症水平。

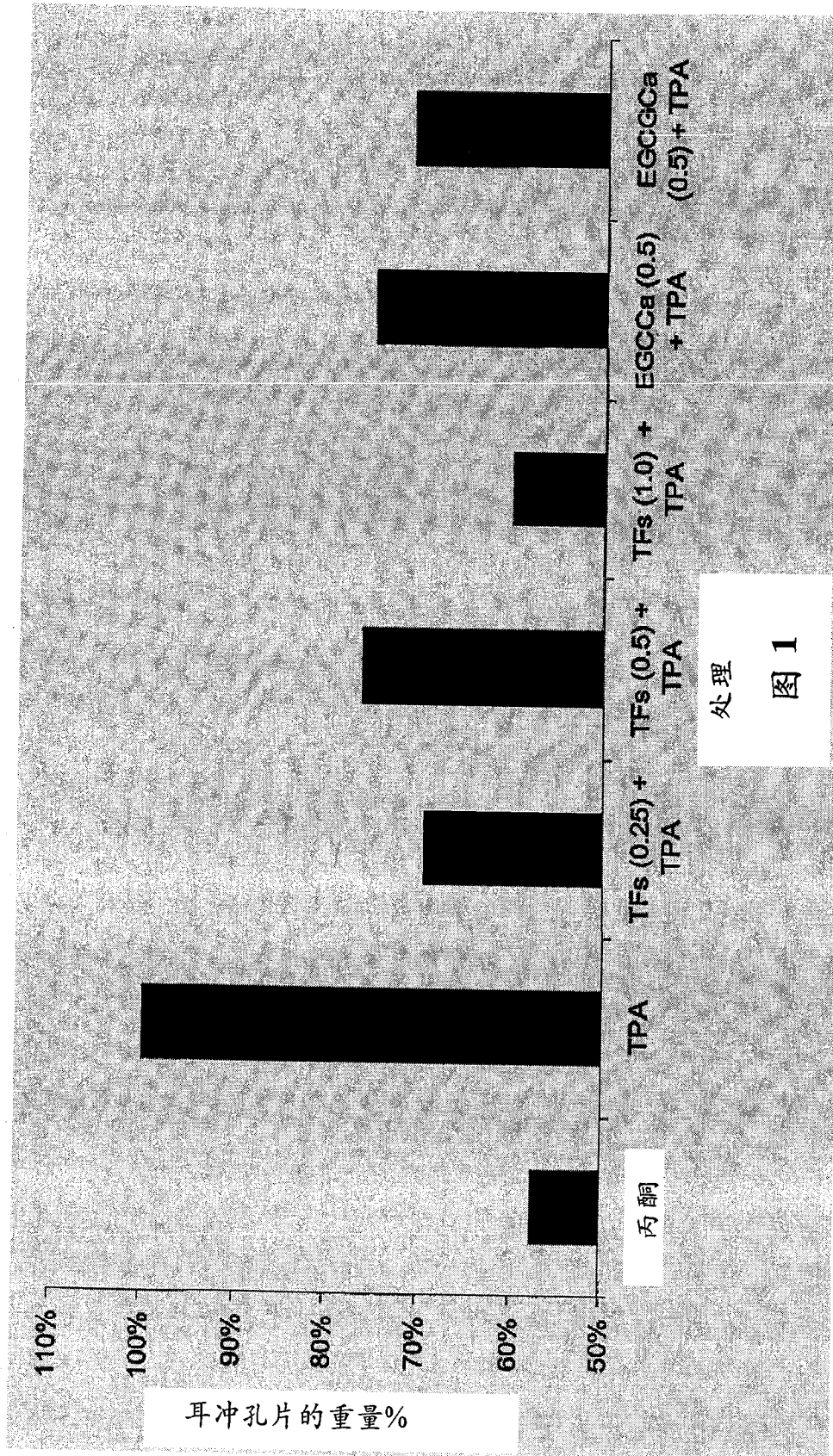
[0206] 将各组的耳冲孔片组合, 并用磷酸盐缓冲盐水均化。将所得均化物离心分离, 施用酶联免疫吸收剂检测法 (ELISA) 检测上清液, 测出各种炎症生物标记化合物的浓度。

[0207] 通过测量各冲孔片的重量、炎症的重要生物标记化合物如白细胞三烯 B4 (LTB4) 和白细胞介素 (IL-6) 来量化炎症的程度。如各耳冲孔片重量 (图 1) 以及炎症生物标记化合物, IL-6 (图 2) 和 LTB4 (图 3) 所示, 所述茶黄素混合物 (EGCGCa 和 RGCGCa) 抑制了耳部中的炎症。所述数据针对 TPA 诱发小鼠耳部水肿 (TPA 处理) 进行了归一化。

[0208] 在本说明书中提到的所有公开、专利和专利申请说明了本发明相关领域技术人员的水平。所有公开、专利和专利申请的内容均参考引用于此, 如同单独参考引用各公开、专

利或专利申请一样。

[0209] 虽然为了便于理解,通过说明例和实施例详细描述了以上发明,明显地,各种改变和改进均涵盖在附带权利要求书的范围之内。



处理
图 1

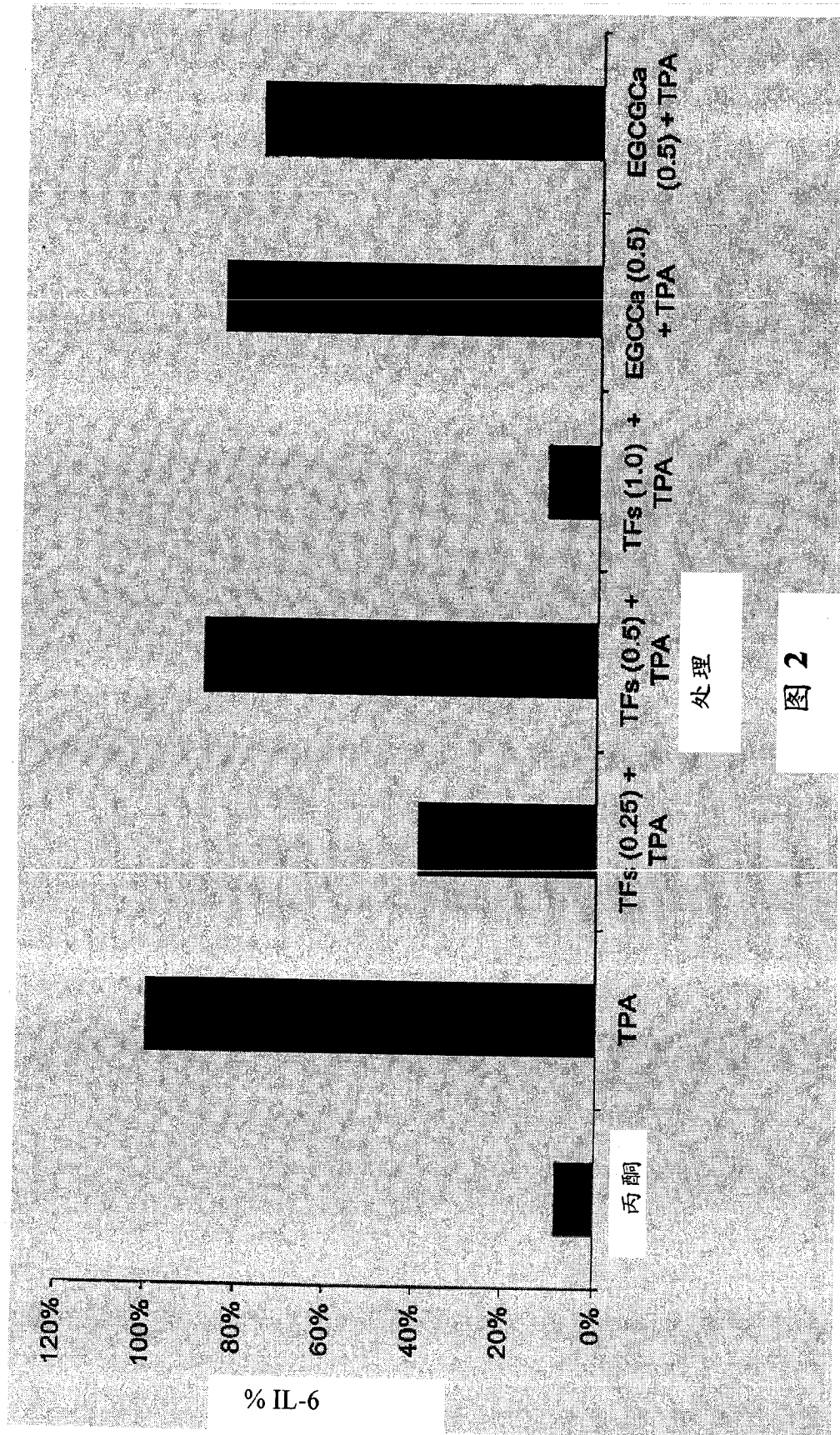


图 2

