

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/35
C07D313/00 C07D493/00
A61P 43/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98809098.8

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1155377C

[22] 申请日 1998.8.26 [21] 申请号 98809098.8
[30] 优先权
[32] 1997. 8.26 [33] US [31] 60/056,382
[32] 1997. 12.23 [33] US [31] 08/997,259
[32] 1997. 12.30 [33] US [31] 09/001,218
[86] 国际申请 PCT/US1998/017332 1998.8.26
[87] 国际公布 WO1999/009976 英 1999.3.4
[85] 进入国家阶段日期 2000.3.14
[71] 专利权人 生物利用率系统有限责任公司
地址 美国佛罗里达州
[72] 发明人 J·M·哈里斯
审查员 王晶晶

[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有限公司
代理人 张金海

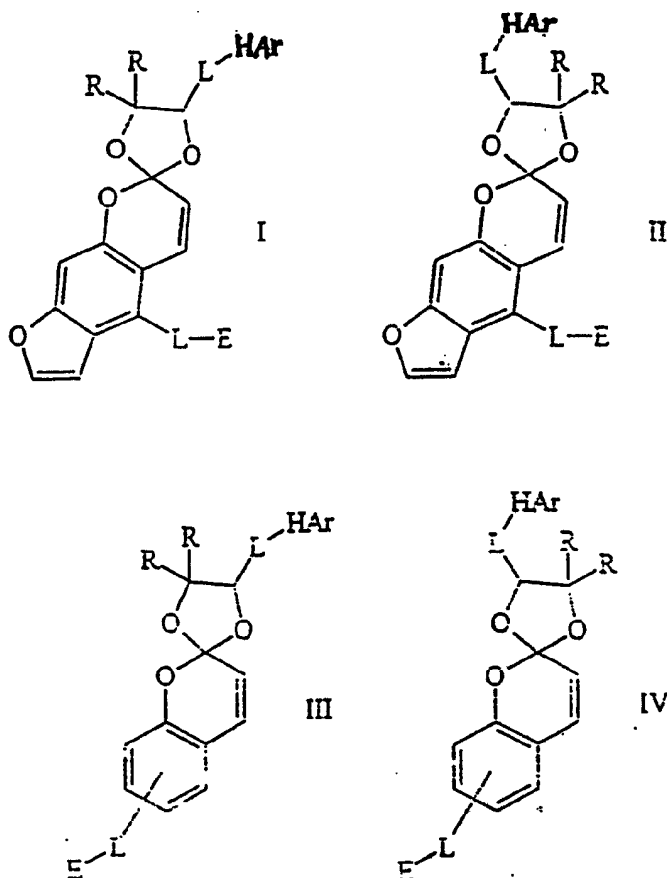
权利要求书 12 页 说明书 45 页 附图 2 页

[54] 发明名称 抗首过效应的化合物
[57] 摘要

本发明提供了安全、有效的首过抑制性化合物。 本发明还提供了含该化合物的制剂及其制备方法和抑制首过效应的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 式 I-IV 的基本上纯的化合物



其中上述各个结构中, R 独立是 H 或取代或未取代的 C_1-C_{15} 烷基,

L 是取代或未取代的 C_1-C_{15} 直链或支链、饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 并且链端选择性有一个或两个氧末端,

HAr 是选择性取代或未取代的 C_6-C_{24} 芳基或杂芳基, 其中选择性包含一个或多个选自 N、O、S 和 P 的成环原子, 并且 E 是 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-COOR$, 其中 R 如上定义, 或取代或不取代 C_1-C_8 直链或支链、饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位氧或硫原子, 或者 E 是 C_3-C_8 选择性取代的环状饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位氧或硫原子, 或者 E 是选择性取代的 HAr,

其中 R, L, HAr 和 E 的选择性取代基选自 C_1-C_6 直链、支链或环状烷

基, $-OH$, 卤素, C_1-C_5 烷氧基, C_1-C_5 羧氧基和 C_1-C_5 烷氧羰基。

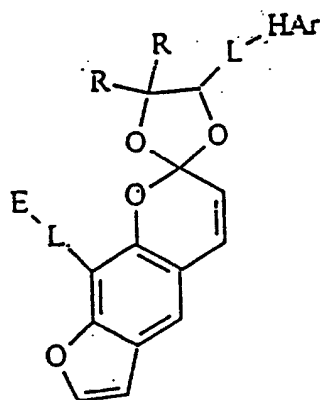
2. 权利要求 1 的化合物, 其具有式 I 结构。

3. 权利要求 1 的化合物, 其具有式 II 结构。

4. 权利要求 1 的化合物, 其具有式 III 结构。

5. 权利要求 1 的化合物, 其具有式 IV 结构。

6. 下式基本纯的化合物



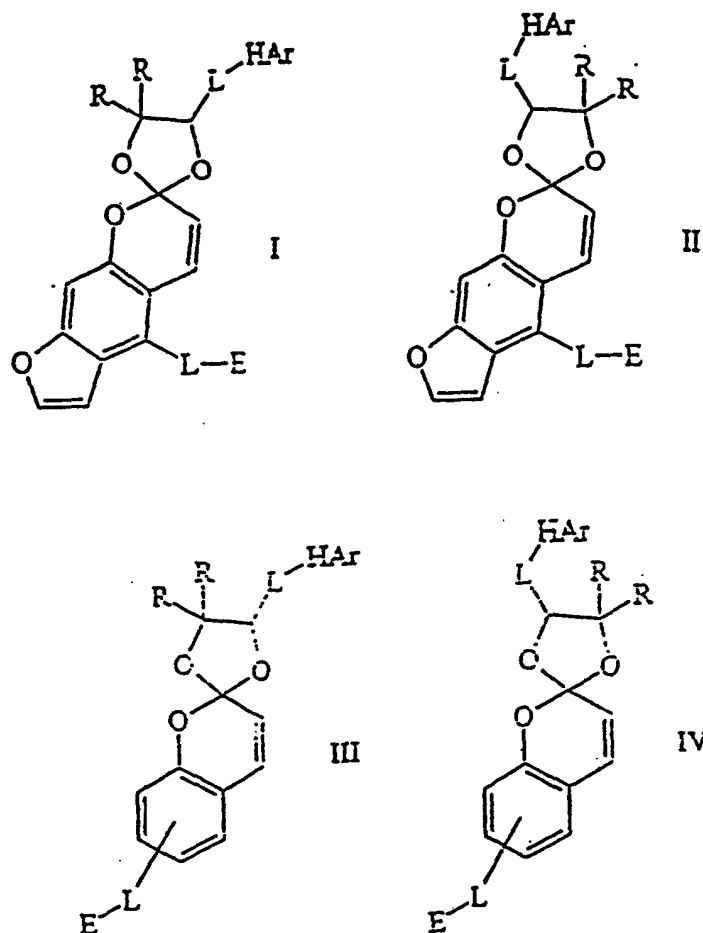
其中上述各个结构中, R 独立是 H 或取代或未取代的 C_1-C_{15} 烷基,

L 是取代或未取代的 C_1-C_{15} 直链或支链、饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 并且链端选择性有一个或两个氧末端,

HAr 是选择性取代或未取代的 C_6-C_{24} 芳基或杂芳基, 其中选择性包含一个或多个选自 N 、 O 、 S 和 P 的成环原子, 并且 E 是 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-COOR$, 其中 R 如上定义, 或取代或不取代 C_1-C_8 直链或支链、饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位氧或硫原子, 或者 E 是 C_3-C_8 选择性取代的环状饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位氧或硫原子, 或者 E 是选择性取代的 HAr ,

其中 R , L , HAr 和 E 的选择性取代基选自 C_1-C_6 直链、支链或环状烷基, $-OH$, 卤素, C_1-C_5 烷氧基, C_1-C_5 羧氧基和 C_1-C_5 烷氧羰基。

7. 式 I-IV 基本纯的化合物,

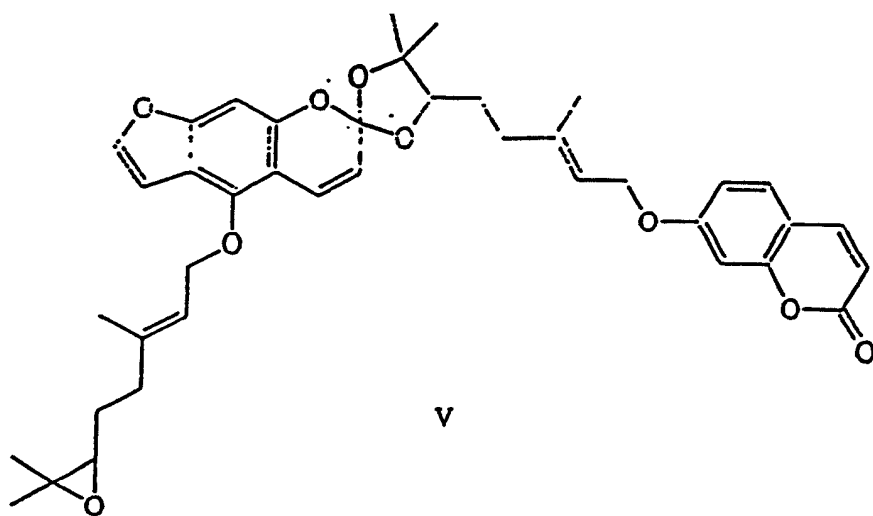


其中上述各个结构中, R 独立是 H 或取代或未取代的 C_1-C_{15} 烷基,

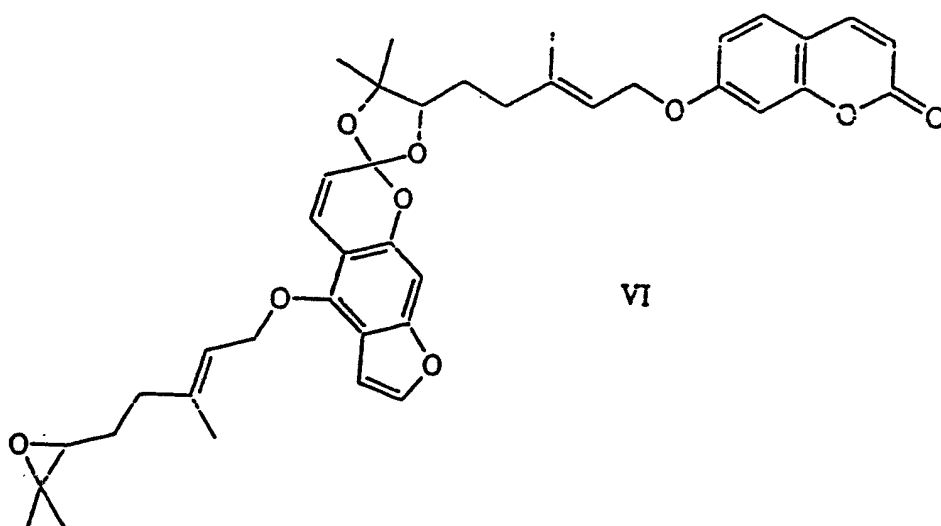
L 是取代或未取代的 C_1-C_{15} 直链或支链、饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位硫或氧原子, 并且链端选择性有一个或两个氧末端,

HAr 是选择性取代或未取代的 C_6-C_{24} 芳基或杂芳基, 其中选择性包含一个或多个选自 N、O、S 和 P 的成环原子, 并且 E 是 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-COOR$, 其中 R 如上定义, 或取代或不取代 C_1-C_8 直链或支链、饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位氧或硫原子, 或者 E 是 C_3-C_8 选择性取代的环状饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位氧或硫原子, 或者 E 是选择性取代的 HAr.

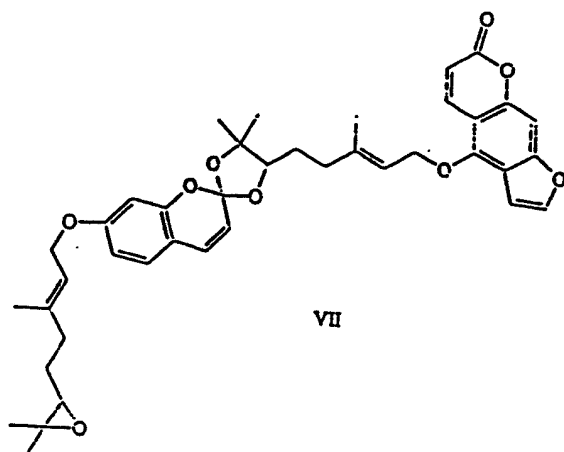
8. 权利要求 7 的化合物, 具有下式



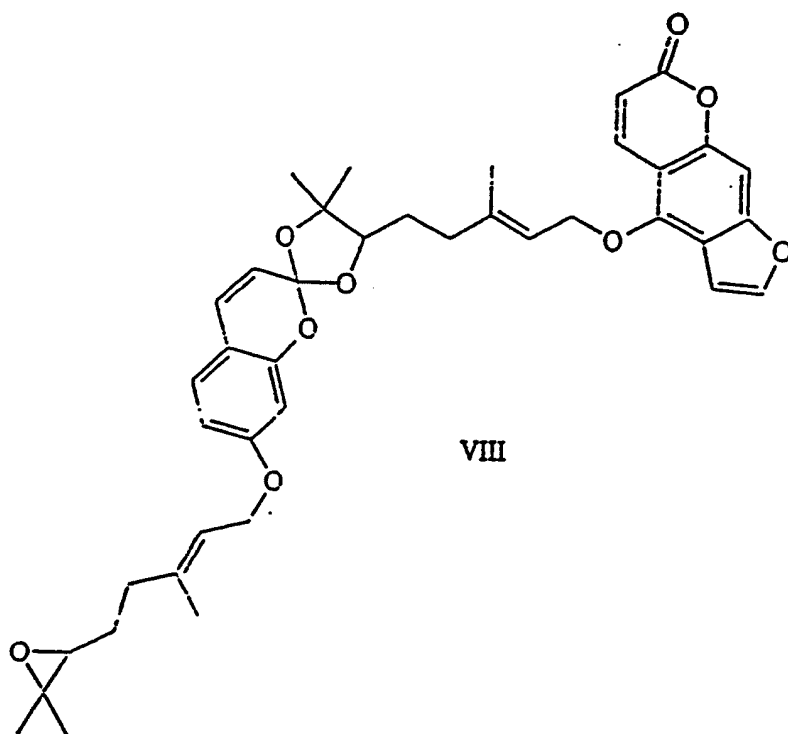
9. 权利要求 7 的化合物，具有下式



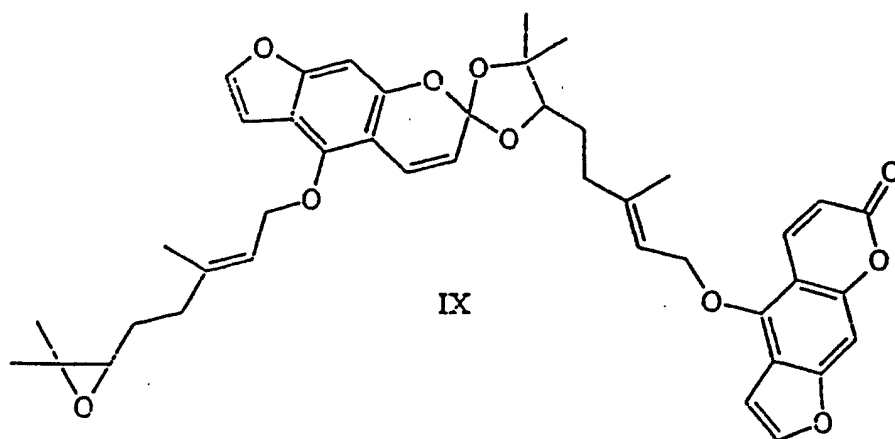
10. 权利要求 7 的化合物，具有下式



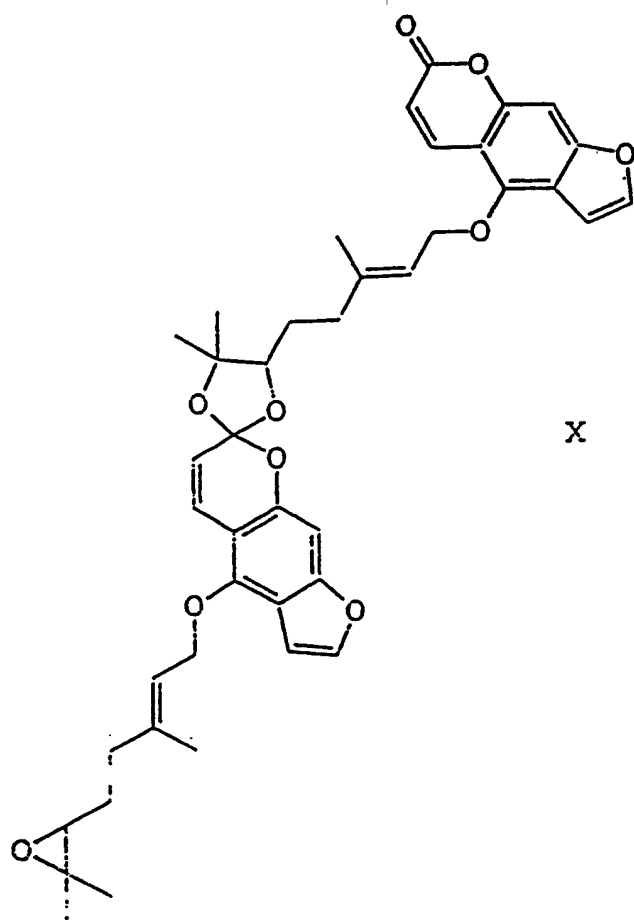
11. 权利要求 7 的化合物，具有下式



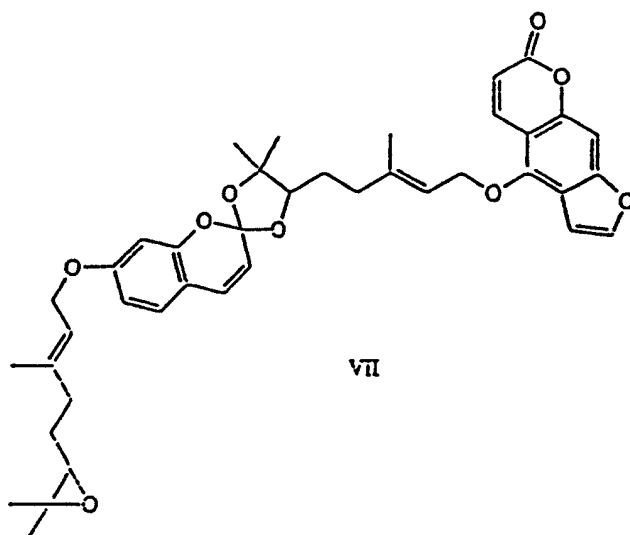
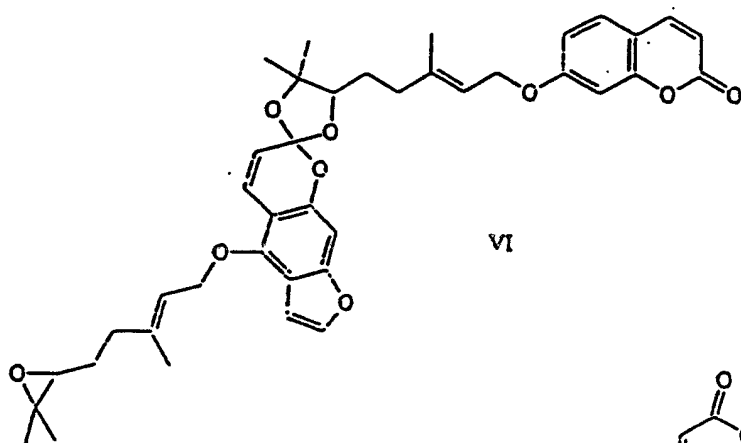
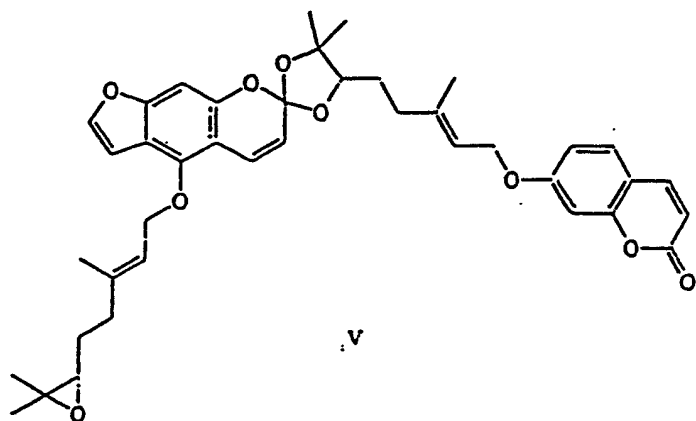
12. 权利要求 7 的化合物，具有下式

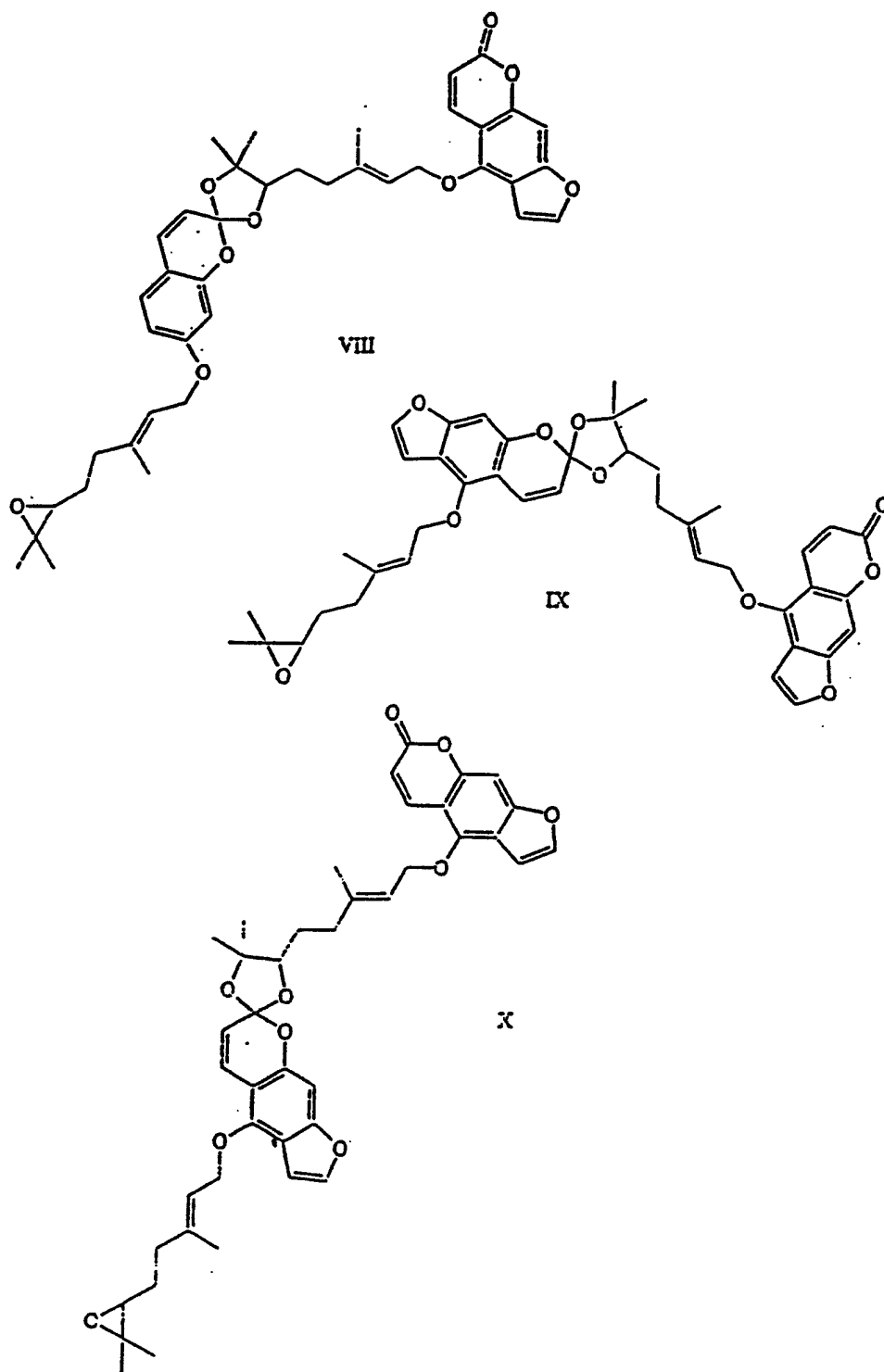


13. 权利要求 7 的化合物，具有下式

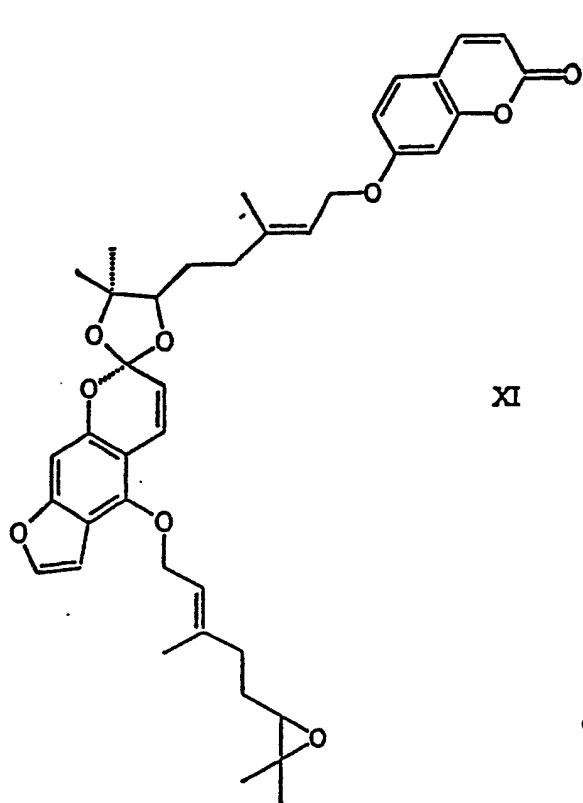


14. 选自式 V-X 的基本纯的化合物

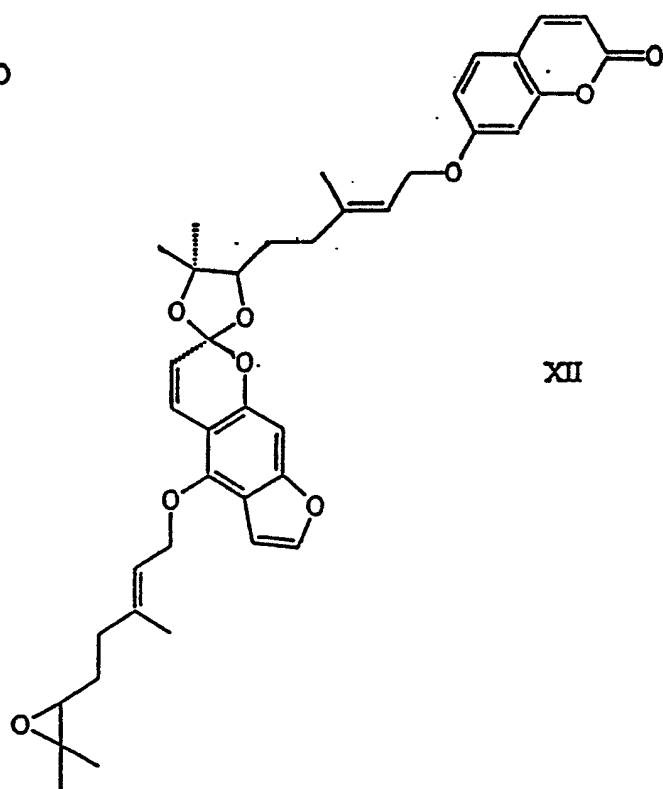




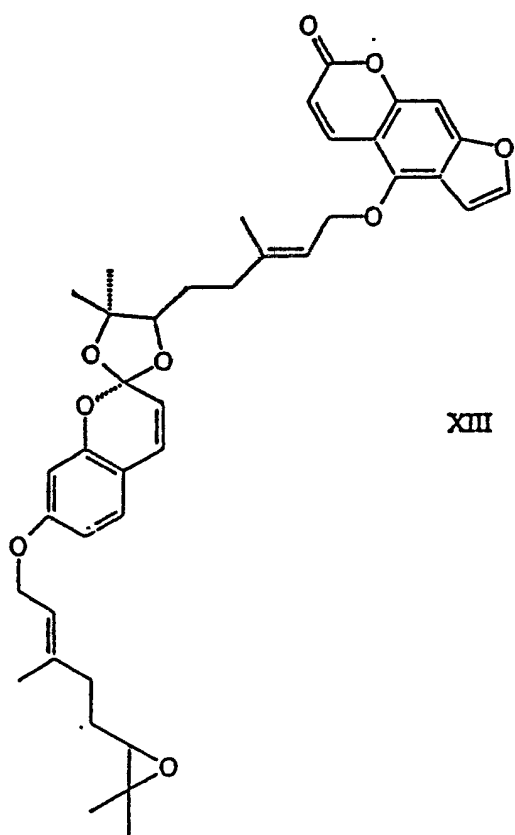
15. 权利要求 14 的基本纯化合物, 其中所述化合物是式 V 化合物.
16. 权利要求 14 的基本纯化合物, 其中所述化合物是式 VI 化合物.
17. 权利要求 14 的基本纯化合物, 其中所述化合物是式 VII 化合物.
18. 权利要求 14 的基本纯化合物, 其中所述化合物是式 VIII 化合物.
19. 权利要求 14 的基本纯化合物, 其中所述化合物是式 IX 化合物.
20. 权利要求 14 的基本纯化合物, 其中所述化合物是式 X 化合物.
21. 选自式 XI - XVI 的基本纯化合物:



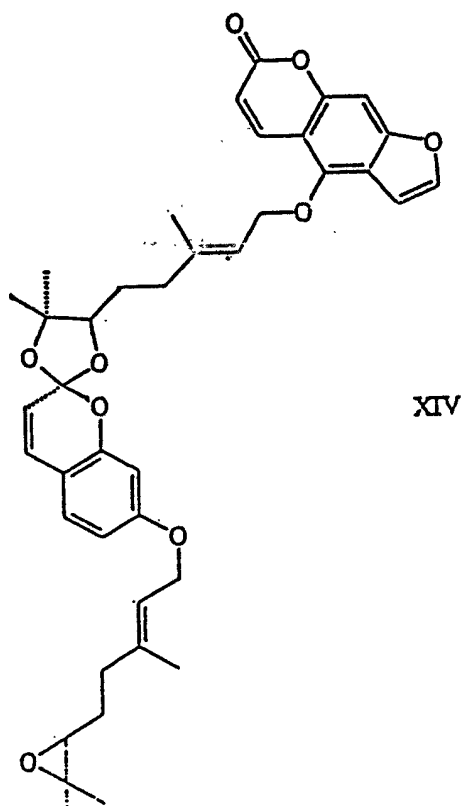
XI



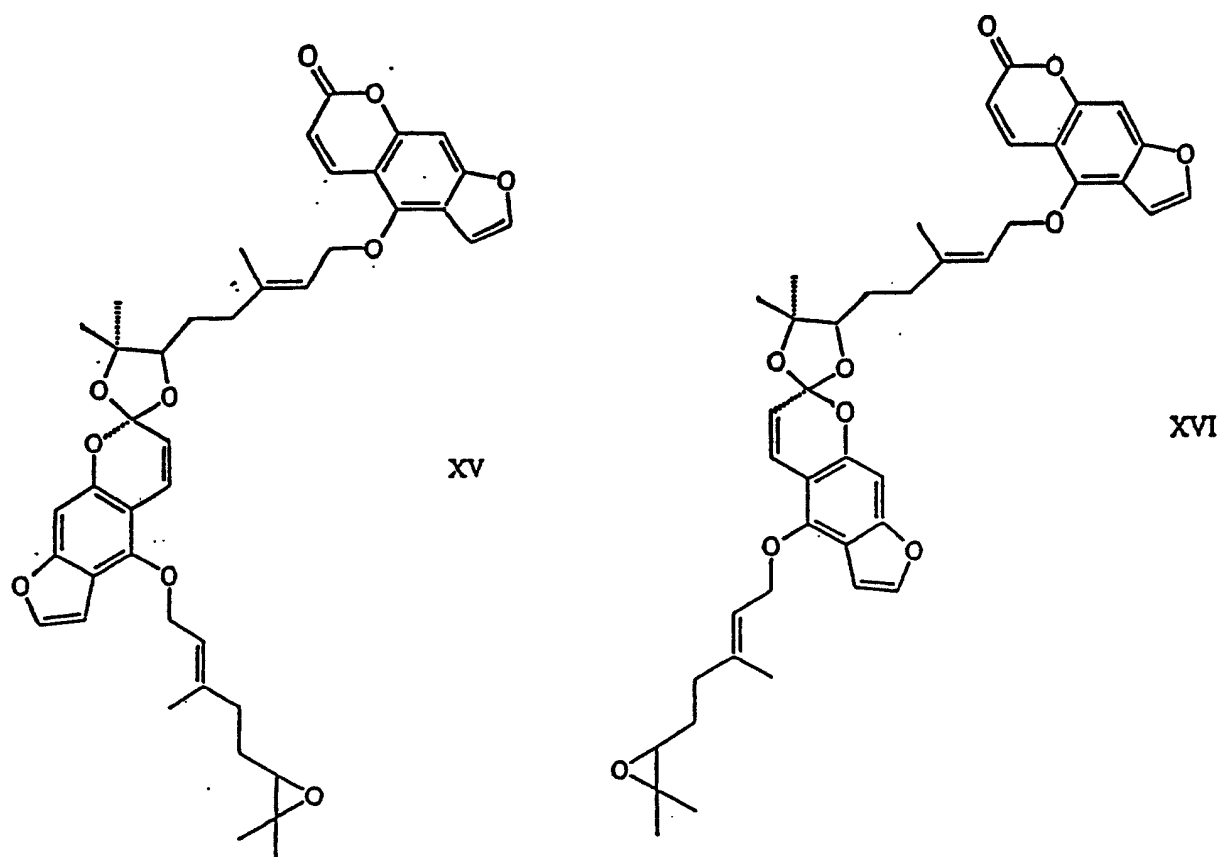
XII



XIII

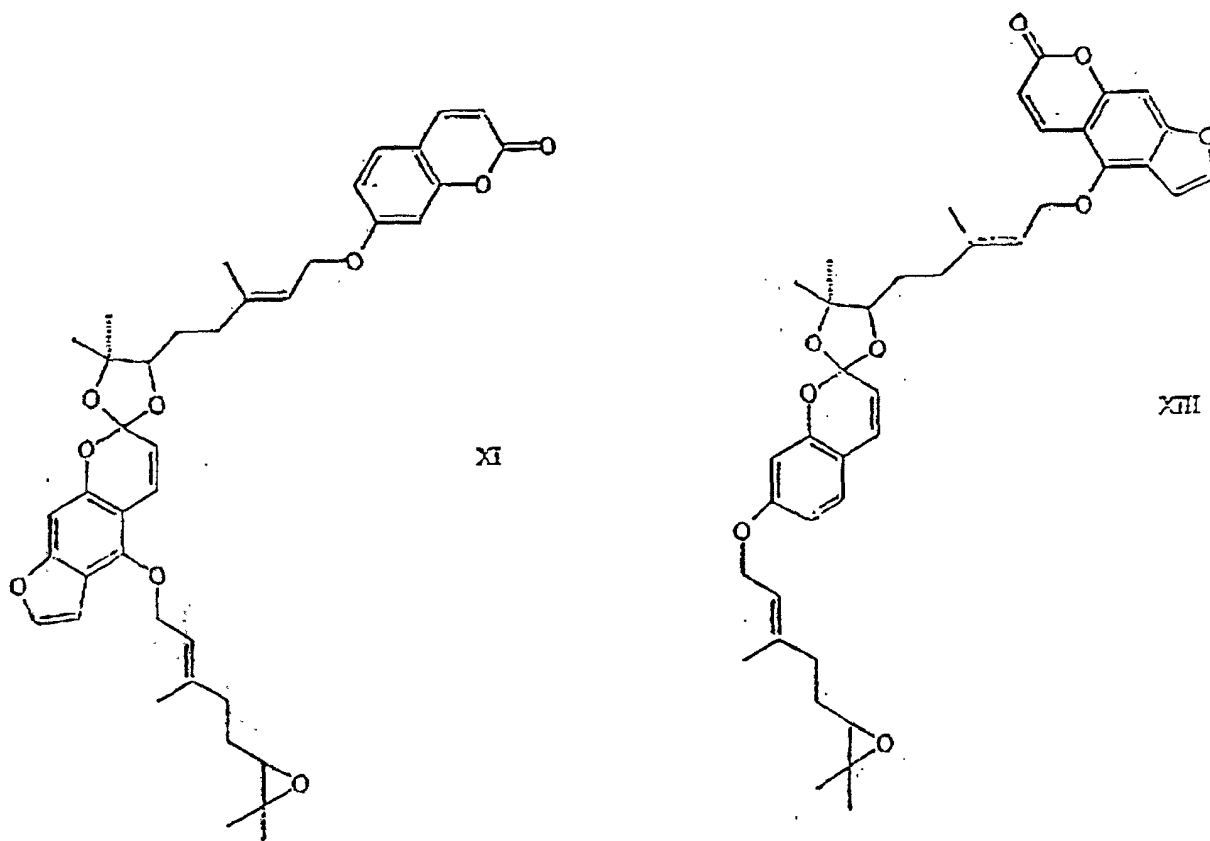


XIV



22. 权利要求 21 的基本纯化合物, 其是式 XI.
23. 权利要求 21 的基本纯化合物, 其是式 XII.
24. 权利要求 21 的基本纯化合物, 其是式 XIII.
25. 权利要求 21 的基本纯化合物, 其是式 XIV.
26. 权利要求 21 的基本纯化合物, 其是式 XV.
27. 权利要求 21 的基本纯化合物, 其是式 XVI.

28. 式 XI 或式 XIII 的化合物用于制备抑制药物口服给人时的首过效应的药物的用途:



29. 权利要求 28 的用途, 其中所述化合物是式 XI 化合物。
30. 权利要求 28 的用途, 其中所述化合物是式 XIII 化合物。
31. 一种首过有效组合物, 其中包括式 XI 或式 XIII 的化合物和药用载体。
32. 权利要求 31 的组合物, 其中所述化合物是式 XI 化合物。
33. 权利要求 31 的组合物, 其中所述化合物是式 XIII 化合物。

抗首过效应的化合物

本发明涉及抗首过效应的化合物、组合物以及它们使用、制备、合成和配制的方法。优选，本发明的化合物和组合物被提供作为饮食补剂或保健食品或其它一些类型的食品，或者作为药物或者药用或药物制剂，或者以其它一些物理形式。除了它们所具有的任何其它功能外，本发明的化合物和组合物还可起口服给药药物的首过效应抑制剂作用。本发明的受益者是需要受首过效应影响的药物等的动物、优选哺乳动物、特别是人。

口服给药药物的“首过效应”是指药物从最初摄取到在血液流中循环的药物转变期间药物降解的过程。通常说到“生物可利用性”，由于药物在摄取之后于患者体内发生降解，给需要口服给药的患者施用最终必需量 5 倍或者更大量的药物并不罕见。例如，抗组胺药特非那定的情况便可以反映首过效应的影响，其中通过口服用的药片的 99.5%很快转变成代谢物；因此，特非那定的生物利用度为大约 0.5%(D. Garteiz 等, *Arzneim-Forsch.*, 1982; 32: 1185-1190)。另一个实例是，给器官移植患者施用的环孢菌素 A，具有大约 30%的平均口服生物利用度，并且在患者之间其生物利用度大约为 8-92%。由于每个个体间的环孢菌素生物利用度差异很大，因而治疗初期必需要时常监测血液浓度。

作为一般作用机理的特定异种生物代谢的抑制、以及特别是用化学试剂抑制首过效应为本领域所公知并且使用过一段时间。其实例包括用乙醇治疗甲醇(木醇)中毒和用酮康唑抑制环孢菌素的首过效应。例如参见 First, R. M. et al., *The Lancet*, 1198, 189.11.18(引入作为参考)。

虽然对首过效应起作用的试剂、酶型、生物方法等没有被完全识别，但研究集中在能够抑制细胞色素 P450 系统的试剂。P450 系统的抑制是体外测定体内生物利用度增强的模型。例如参见 US 专利 5,478,723 和 5,567,592(均引入作为参考)关于 P450 系统的较完整描述。正如 Keogh 等(N.

Eng. J. Med., Vol. 333, No. 10, p. 628, 1995)和 S. Butman 等 (J. Heart Lung Transpl., Vol. 10, No. 3, p. 351, 1991)的报道,当环孢菌素与酮康唑共同施用心脏移植患者所需要的环孢菌素剂量可以减少大约 85%。从经济方面讲,两篇文献估计了节约的成本等于大约每年每位患者\$5,000。其它受首过效应影响并且其生物利用性可通常通过给人的抑制剂来增加的药物包括咪达唑仑 (K. Olakkola 等, Clin. Pharmacol. Ther., 1993, 53:298-305)、特非那定 (Seldane®) (P. Honig 等, JAMA, Vol. 269, No. 12, 1513)和三唑仑 (Varhe, A. 等, Clin. Pharmacol. Ther., 1994, 56:601-7)。

除酮康唑,药物氟康唑、瑞惜洛韦 (ritonavir)、依他康唑、咪康唑、红霉素和醋竹桃霉素,除了它们具有的任何药理学效应外,还被识别为是首过效应的抑制剂。但这些化合物是抗病毒、抗微生物或抗真菌剂。由于目前日益认识到过度使用这些试剂可以导致耐微生物菌株,因为大部分有效的抑制剂是抗微生物的,并且因为移植和 HIV 感染的患者具有受损免疫系统,所以使用这些首过效应抑制剂具有明显的缺陷,例如使用酮康唑的情况,因此,将这些抑制剂与易受首过效应影响的药物有意图的共同施用并没有得到广泛应用。事实上,在免疫受损患者中抗真菌药物抗性的出现早已为人所知 (T. J. Walsh: “免疫受损患者中抗真菌药物抗性的出现”专题讨论, National Institutes of Health, 1996. 2. 7; Geogopapadakou, N.H. 等, Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 1996. 2, p. 279-291)。

基于天然分离原料的饮食补剂、药品、化合物、提取物等正越来越得到研究和可被消费者利用。由于获得对这些原料的专利保护变为常规,这种趋势很盛 (例如参见 US 专利 4,708,948; 5,409,938; 5,314,899; 5,591,770 和 5,654,432, 所有均引入作为参考)。令人并不意外,现在这种趋势发展到首过效应剂。

在 1991 年, Baily 等报道了 (Bailey, D.G. 等, The Lancet, Vol. 337, 1991. 2. 2, p. 268, 引入作为参考)葡萄柚汁了增加非洛地平的生物利用性,并且指出细胞色素 P450 酶被生物黄酮素抑制解释了他们的

发现。这种将生物黄酮素识别为葡萄柚汁中的活性成分受到了 R. Chayen 等的怀疑(The Lancet, Vol. 337, 1991. 4. 6, p. 854), 他认为倍半萜类化合物是葡萄柚汁中起抑制首过效应作用的活性成分, 而非类黄酮。虽然 bailey 和 Edar 获得了涉及通过共同施用类黄酮如柚苷来增加药剂生物利用性方法的专利权(US 专利 5, 229, 116, 引入作为参考), 但他们自己的工作也公然出现了他们早期识别类黄酮为活性成分的正确性的问题。例如参见 Bailey 等的 Clin, Pharmacokinet, 26 (2):91-98, 1994, 特别是其第 95 和 96 页。也可参见 Edwards. D. J. 等的 Life Sciences, Vol, 59, No. 13, pp. 1025-1030, 1996。

葡萄柚汁作为首过效应有效抑制剂的报道结果导致了很多关于葡萄柚汁对例如硝苯地平、尼群地平、尼索地平、环孢菌素 A、咪达唑仑、三唑仑、香豆素和咖啡因的首过效应抑制的研究文章。随着这些结果更为公知, 所谓“葡萄柚汁作用”成为报纸文章、时事通讯、公众医学课文的主题。例如参见“The Medical Letter”, Vol, 37 (issue 955) 1995. 8. 18, The Peoples Pharmacy, 第 4 章 (St. Martin's Press) 1996, p41; 1991. 2. 19 纽约时报关于费乐地平和葡萄柚汁的文章(C 版, 第 3 页 1 栏)以及华盛顿邮报的最新文章(A 版, p11, 8/30/96)。

回顾关于证明葡萄柚汁作用的研究出版物, 还看出葡萄柚汁作用的程度变化很大, 并且本发明者怀疑这种变化可追溯于葡萄柚汁的来源。事实上, 市售柑橘类汁的生产中包含了增加最终产品组成可变性的复杂系列因素。这些因素包括压榨技术、浓缩技术、汁的来源、采摘时水果的成熟度、来源和成熟度不同水果的混合、果汁和下脚料的混合等。由于葡萄柚汁中抑制首过效应的活性成分是未知的或者是错误识别的, 科学家和消费者不可能选择葡萄柚汁制品并且依赖其效用来抑制首过效应。

此外, 具体的葡萄柚汁及通常的柑橘类产品中已知含有光毒性呋喃并香豆素衍生物, 包括补骨脂素、氧化补骨脂素和佛手内酯。当这些化合物对控制、临床治疗所选择的皮肤疾病(包括白癜风、牛皮癣和蕁样真菌病)有效时, 它们还已知是毒性的, 具体说是光毒性的。从人的研究中

清楚描述出呋喃并香豆素光毒性的结构-活性关系(例如 L. Musajo 等, *Herba Hungarica*, 1971, Tom. 10, No. 2-3, pp:79-94), 并且这些研究表明光敏感活性可通过环羟基化或通过加长醚取代基的长度来消除。

仔细评价文献看出给人以大剂量的补骨脂素和某些低碳数醚取代的呋喃并香豆素确实可抑制细胞色素 P450。例如参见 D.Bickers 等的 *J. Investigative Dermatology*, 79:2-1-205, 1982; M. Tinel 等的 *Biochemical Therapeutics*, Vol. 36, No. 6, 951-955, 1987; H. Fouin-Fortunet 等的 *J. Pharm. Experiment Therapeutics*, Vol. 236, No. 1, 237-247, 1986 以及 D.Mays 等的 *Clin. Pharmacol. Ther.*, 42:621-626, 1987。因此, 并且因为首过效应的已知成功的抑制剂通常抑制细胞色素 P450, 一个诱人的结论, 特别是考虑到 Bailey 近来的放弃以及其它, 是柑橘类中存在的低分子量呋喃并香豆素是葡萄柚汁中活性首过抑制剂。事实上, 并且正如以下关于本发明的较完整的描述, 本发明者发现情况不是这样。由于本发明者发现了抑制首过效应的特定化合物, 因此现在可以生产一种可靠、安全的组合物, 该组合物既可抑制首过效应, 并且如果需要也可可是以柑橘类为基料的或来源柑橘类的, 并且该组合物不含或者含少量的低分子量光毒性呋喃并香豆素。

附图简述

图 1 显示了各种抑制剂的抑制剂结果。

图 2 显示了各种抑制剂的抑制剂结果。

本发明的一个目的是提供一种首过效应的化学化合物和组合物, 并且所说的化合物和组合物的形式、浓度、纯度等不同于天然或市售产品。

本发明的另一个目的是提供可靠、安全的以柑橘类为基料或柑橘类源的产品, 该产品含有一种或多种本发明的非天然和非市售存在量的抑制首过效应的化合物, 并且所说的化合物选择性不含或含少量(与天然或市售产品中存在的量相比)的光毒性, 和选择性不含或含少量非首过效应抑制性的低分子量呋喃并香豆素, 该产品可有效用作食品或饮食补剂、药品、药物等。

本发明的另一个目的是提供含一种或多种本发明化合物的组合物, 其

中所说的本发明的化合物是抗首过效应有效的。

本发明的另一个目的是提供含一种或多种本发明化合物并且不含或含比天然或市售产品中存在量少的光毒性低分子量呋喃并香豆素的组合物。

本发明的另一个目的是提供含至少一种本发明化合物并且提供始终和可靠首过抑制活性的组合物。

本发明的另一个目的是提供上述化合物和组合物，作为提供活性成分、治疗剂、药物等或其它受人首过效应影响之物质的产品或混合物的组分。

本发明的另一个目的是提供非天然和非市售产品存在形式的首过效应抑制性化合物，这里也称作生物增强剂和抑制剂。

本发明的另一个目的是提供一种或多种本发明首过效应抑制性化合物与各种治疗剂、活性剂、药物或其它受首过效应影响之物质(以下称“药物”)的混合物。

本发明的另一个目的是用具首过效应的药物抑制病人、动物等的首过效应的方法。

本发明的另一个目的是制备上述化合物、组合物、混合物等的方法。

本发明的另一个目的是制备以柑橘类为基料或柑橘源的组合物的方法，其中所说的组合物中不含或含比天然和市售产品存在量少的光毒性和非首过抑制性呋喃并香豆素，优选使用美国食品和药物署认可食品或药物制造使用的试剂，包括 GRAS 原料(本申请中，“非首过抑制”包括根据以下 C 或 C' 方案由 2000nM 佛手素(bergamottin)或戊烯氧呋豆素提供的首过活性)。

本发明的另一个目的是提供和使用首过效应化合物和含至少一种首过有效量(合计或单计)本发明化合物的组合物，其中本发明的化合物是以分离的形式和/或无热原形式和/或无菌形式和/或基本上纯的形式和/或药品形式和/或化学纯的形式和/或比天然和市售产品含更高浓度或纯度本发明化合物的形式。这里“市售产品”是指地区、国家和跨国生产和销售的产品，特别是由柑橘类加工工业生产的产品。正如它们的名称说

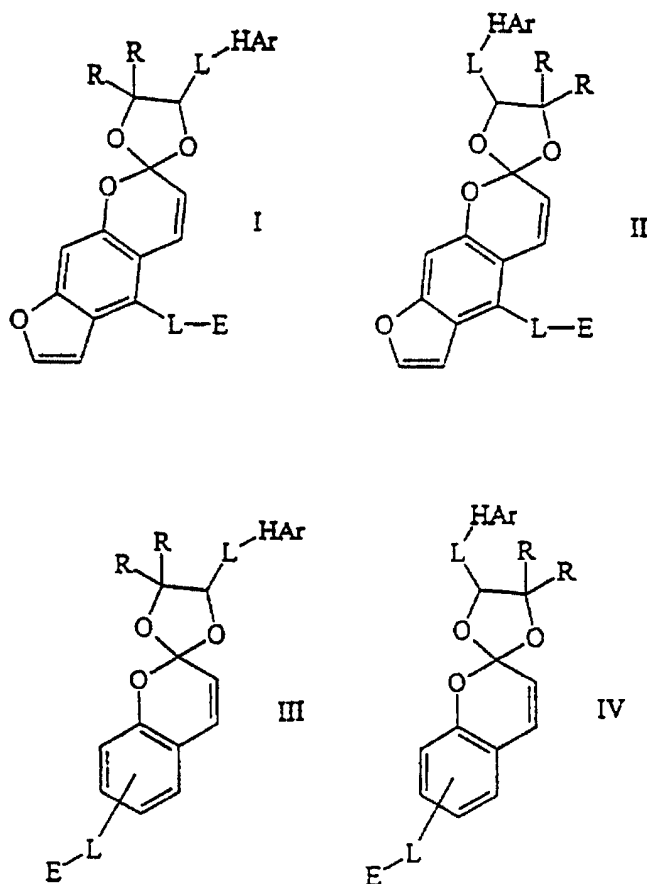
明的, 这些形式不同于本发明的化合物, 它们天然存在于例如市售柑橘和柑橘制品如汁、冷榨油、浓缩汁等中。

本发明的另一个目的是提供通过给人施用至少一种本发明的化合物、组合物等来抑制首过效应的方法。

根据以下描述的关于本发明的完整解释并结合优选实施方案, 上述这些和其它目的对本领域技术人员来说将是显而易见的。

本发明者发现了能够抑制人口服施用药物的首过效应的化学化合物。本发明者还发现了天然存在于柑橘类提取物、果汁、副产品等中的光毒性的低分子量呋喃并香豆素和某些醚取代的呋喃并香豆素可以从中除去, 或者浓度被减少, 并且不破坏其中的首过效应抑制性化合物。本发明者还发现了仅使用 FDA 或 USP 认可的试剂来制备以柑橘类为基料的组合物的方法。基于这些发现完成了本发明并且下面将作较详细的描述。

在一个优选的实施方案中, 本发明的抑制动物(包括人)首过效应的化学化合物是以下 20 种式 I-IV 的化合物:



上述各个结构中, R独立是H或取代或未取代的 C_1-C_{15} 烷基,

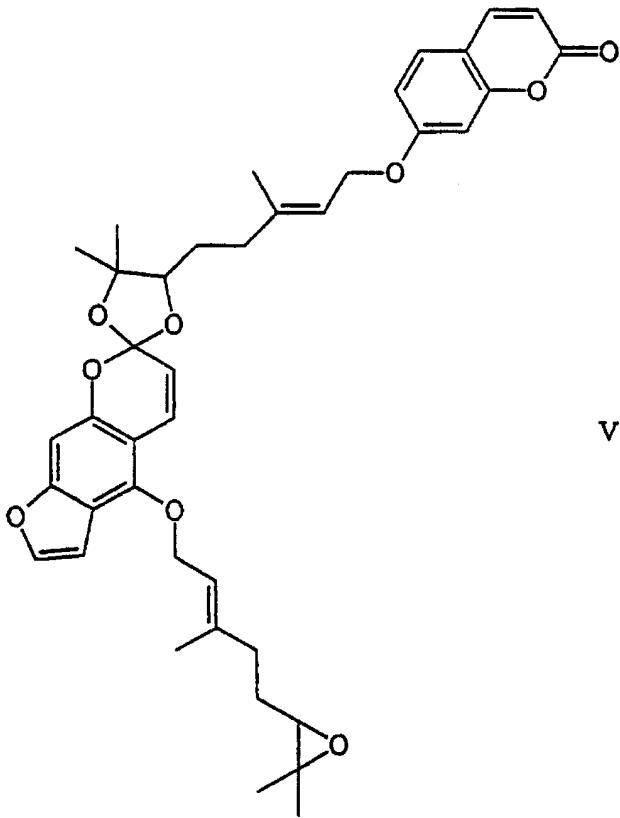
L 是取代或未取代的 C_1-C_{15} 直链或支链、饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位硫或氧原子, 并且链端选择性地由一个或两个氧结尾,

HAr 是取代或未取代的 C_6-C_{24} 芳基或杂芳基, 其中选择性包含一个或多个选自 N、O、S 和 P 的成环原子, 并且 E 是 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-COOR$ (其中 R 如上定义) 或取代或未取代 C_1-C_8 直链或支链、饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位氧或硫原子, 或者 E 是 C_3-C_8 选择性取代的环状饱和、单不饱和或多不饱和烷基, 其中选择性掺杂一个或多个非邻位氧或硫原子, 或者 E 是选择性取代的 HAr。优选, 式 I-IV 的化合物以及以下描述的化合物不含过氧基团 (O-O)。二硫基团 (S-S) 不优选, 但可以存在。优选 E 是环氧或二羟基基团, 例如 $-CH(OH)_2$ 。E 还可以是酸打开的环氧基。

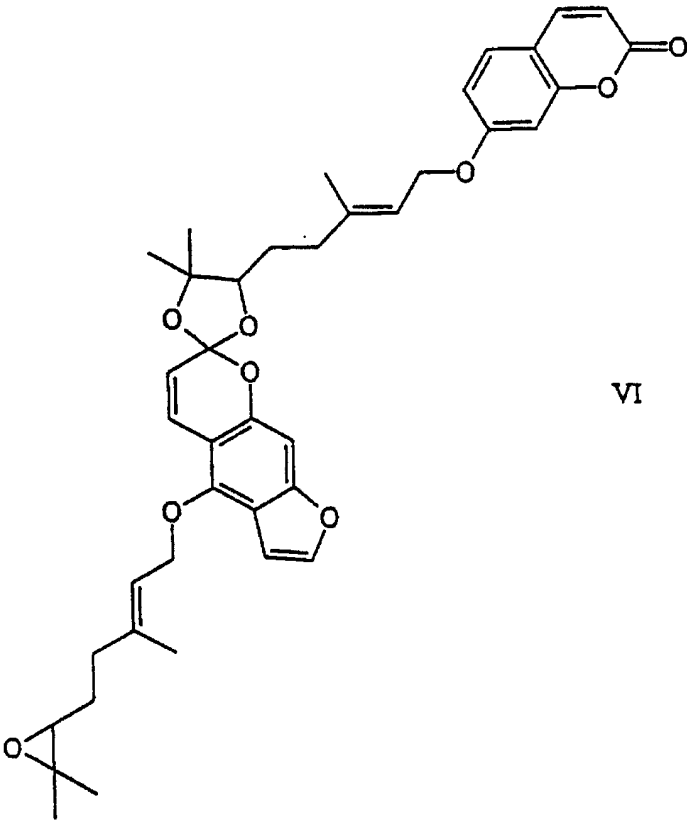
如上所述的本发明的化合物不受立体化学、E-Z 异构的限制, 包括所有可能的异构体。包括外消旋混合物, 为每种和各个对映体和非对映体。优选的立体化学后面说明。

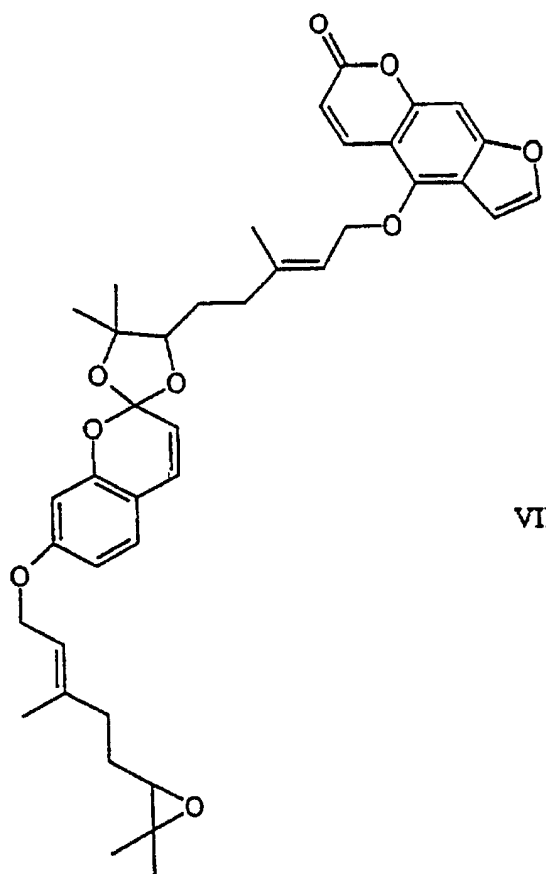
R、L、HAr 和 E 可以选择性被 C_1-C_6 直链、支链或环状烷基、 $-OH$ 、卤原子、 C_1-C_5 烷基、 C_1-C_5 烷基羰基氧基、 C_1-C_5 烷氧基羰基等取代。这些取代基还可以选择性被直接取代到式 I-IV 的环状结构上, 无论这些取代基是否出现在 R、L、HAr 和 E 上。

本发明第二个优选实施方案的抑制首过效应的化学化合物为式 V-X 所示:

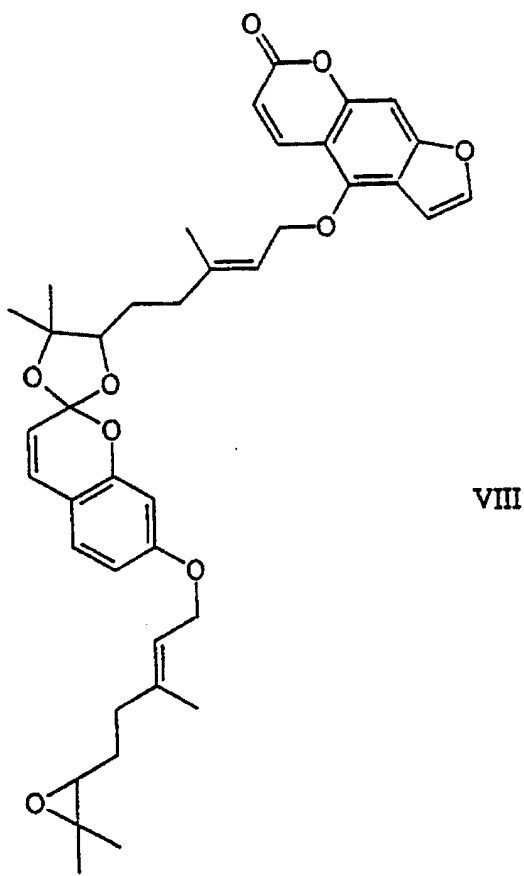


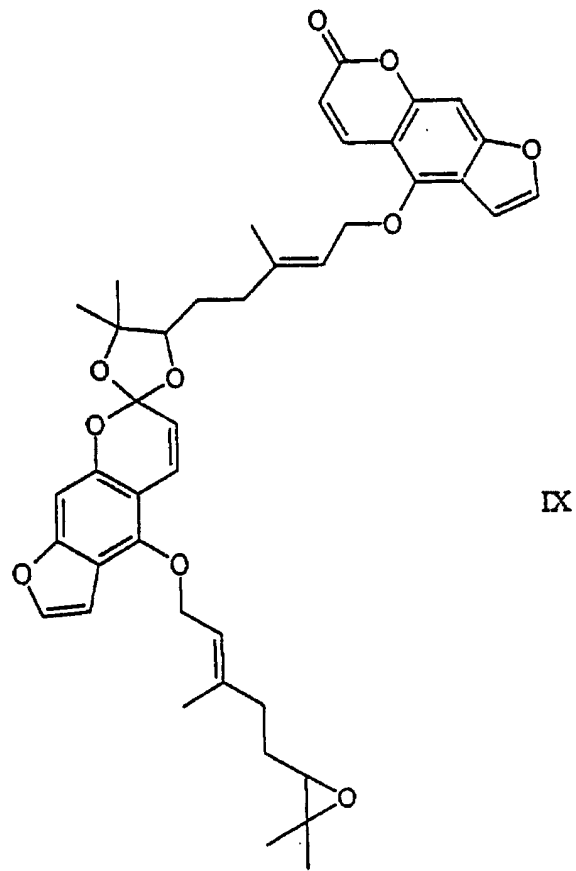
V



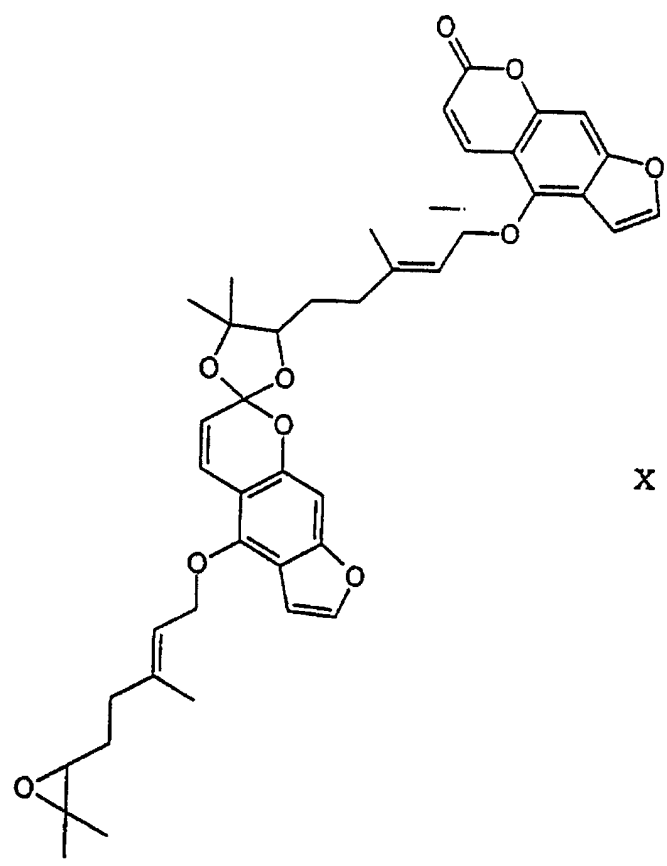


VII



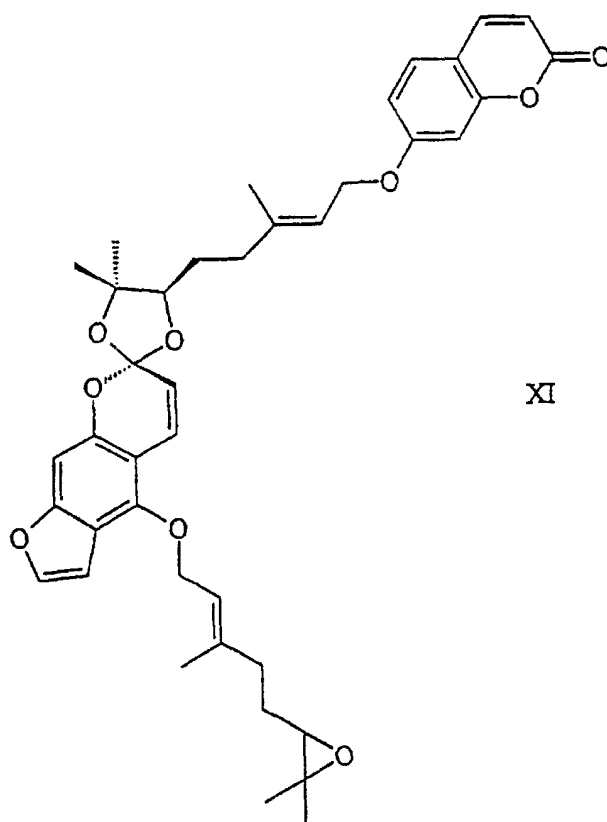


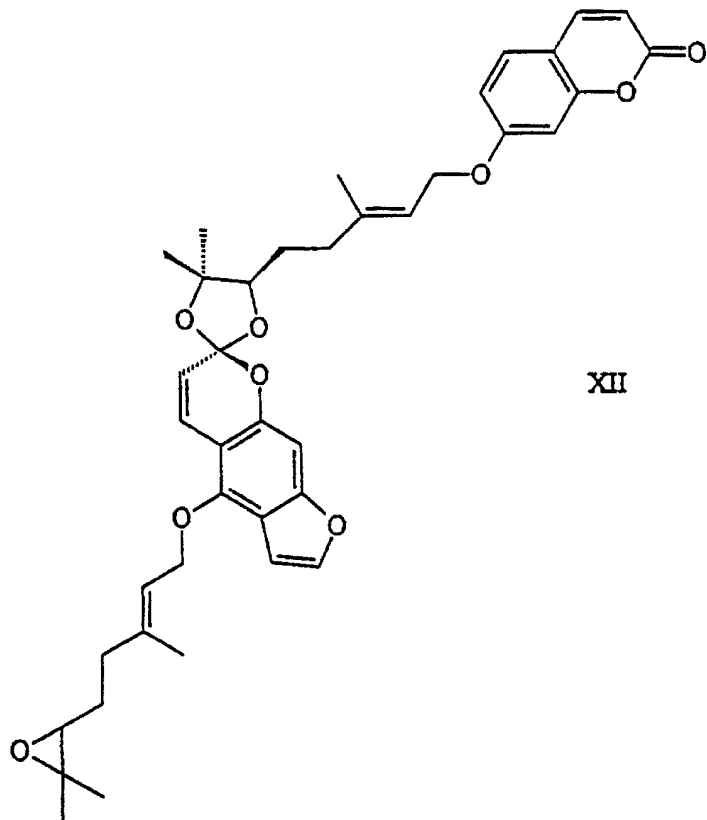
IX



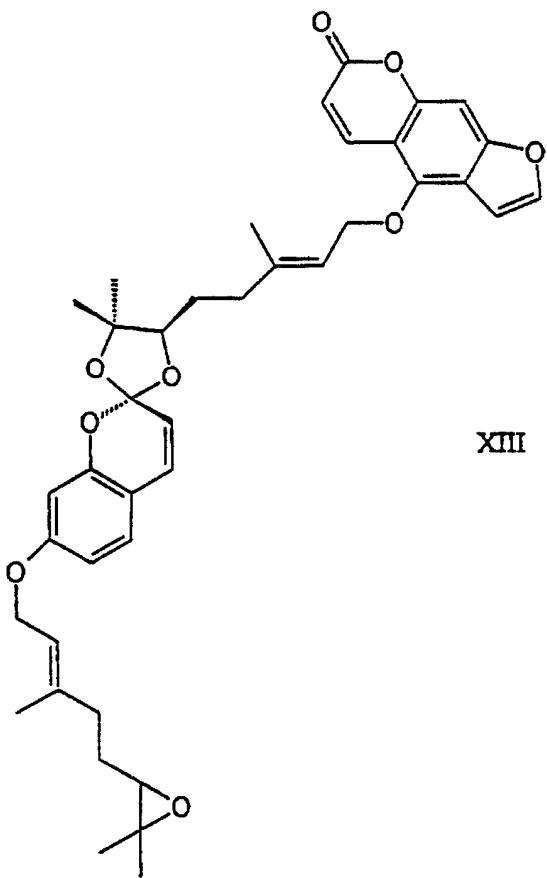
如上述式 I-IV 所说的, 式 V-X 不受立体化学、E-Z 异构的限制。

本发明首选的抑制首过效应的化合物是根据上述第二个实施方案并且具有以下立体化学的化合物(式 XI-XVI):

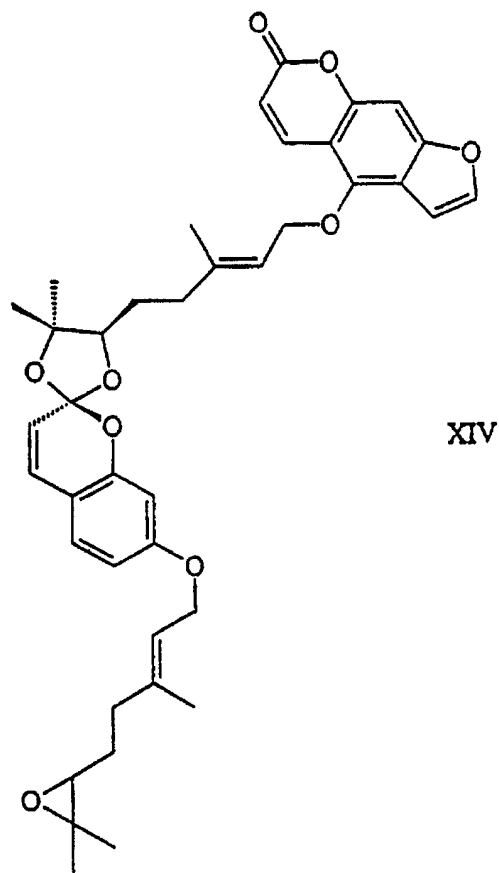




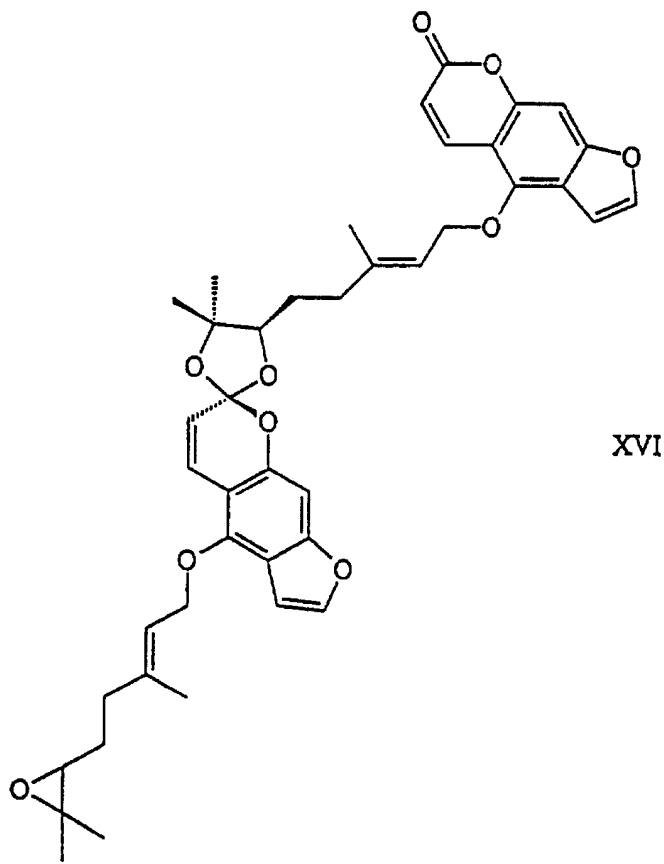
XIII



XIII



XIV



XVI

本发明的组合物包含至少一种本发明的首过有效化学化合物，优选首过有效量的。本发明以柑橘类为原料的组合物还包含得自柑橘类的提取物、浓缩物、皮、汁、油、副产物等(以下称为得自柑橘类的物质)，并且可以由这些物质的任何组合形式提供并且可以得自一种以上的柑橘类水果。适用于这里的柑橘类水果包括葡萄柚、柠檬、莱姆酸橙，优选含有本发明首过效应抑制性化合物或这些化合物之混合物的任何柑橘类水果。本领域现有技术指出普通类型的橙(*Citrus sinensis*)不能抑制首过效应。含有一种或多种抑制水果效应的柑橘类水果均包含于本发明中，包括所有的杂交种等，并且在这里称作“首过柑橘类”。适合本发明的优选的柑橘类水果是葡萄柚。

这里所述的首过有效化合物、物质和组合物是可防止和延迟口服施用药物在体内降解的物料。优选，本发明的首过有效物料(包括物质、组合物、混合物、本发明化合物等)可增加至少 1% 的药物生物利用度，优选增加 5% 以上，并且首选 15% 以上包括 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300% 等，其中所说的百分比通过曲线下面积(AUC)法测定。参见 US 专利 5,567,592(引入作为参考)。生物利用度增加几倍包括 5、10、15、20 倍(即 AUC 百分比增加几百或几千)对本发明并非不可能。本发明化合物、组合物、混合物、物料等的首过有效性也可以通过 W097/15269、US5,665,386 和 PCT/US96/09607 中所述的方法和特征来测定(均引入作为参考)，并且优选符合其标准。

本发明的优选的得自柑橘类的物质包括柑橘类冷榨油，特别是葡萄柚、莱姆酸橙、柠檬等的冷榨油，和柑橘类副产品包括柑橘类包装/果汁厂的尾料。柑橘类冷榨油包括橙(除了 *Citrus sinensis*)、葡萄柚、莱姆酸橙、柠檬等的冷榨油是商品并且在例如 Food Chemicals Codex 第 4 版，National Academy Press(Washington D.C.)1996 中有所描述(引入作为参考)。其它适合本发明的得自柑橘类的物质包括各种其它柑橘类油(蒸馏的、精油、粗油(desert)型等)、苦冷榨油等。本发明提供得自柑橘类的物质的柑橘类的地理来源并不重要。还可以使用柑橘类的汁或皮(壳)，

以及首过柑橘类的任何首过有效的固体、半固体或液体部分。可以使用混合物。

本发明组合物中存在的得自柑橘类的物质可以构成总的以柑橘类为基料的组合物，或者可以是其一部分。因此，如果所制备的以柑橘类为基料的物质为含有首过有效量的一种或多种根据式 I-XVI 的化合物，则不需要添加任何其它的化合物。如果需要，可以添加食用级或药用稀释剂、赋形剂、载体等。

优选处理本发明组合物的得自柑橘类的物质，以便减少其中天然存在的光毒性和选择性是非首过有效的呋喃并香豆素的量。优选，完全除去这些呋喃并香豆素，即将它们去除到它们的存在用液相和优选气相色谱无法检测到的程度。

本发明从柑橘类派生组分中去除光毒性低分子量呋喃并香豆素的方法优选包括选择性除去挥发组分(在 10^{-2} - 10^{-3} 托压力下 12-48 小时之后除去的组分)，并且用至少一种 C_1 - C_{10} 醇(优选乙醇)和水提取，选择性在碱的存在下。在某些情况下，优选不除去挥发组分如天然存在的萜烯，而是使用这些挥发物主要作为进一步加工的溶剂。醇和水的提取混合物可以丢弃并且剩余的物质为本发明有用的。 C_2 - C_5 醇也是优选的，如 C_2 和 C_3 和 C_4 醇。醇(乙醇)可以是 100%醇，也可以是常规提供的和使用的可普通获得的醇-水稀释液(如 95%乙醇/5%水等)。无论哪种情况，醇(乙醇)试剂优选是 U.S.P. 级别或更好的。提取本发明柑橘派生物质(组分)所用的水优选是蒸馏水，并且还优选是 U.S.P. 级别或更好的。任何混合溶剂或单个溶剂都可以用于提取。溶剂优选是 FDA 认可食品和药物制造用的。

本发明去除光毒性低分子量呋喃并香豆素的方法可以包括用醇(乙醇)/水混合物连续提取，并且连续所用的醇(乙醇)/水混合物可以具有相同体积比或不同体积比。优选醇(乙醇):水体积比为 1:10-10:1，更优选 1:1($\pm$ 3%、5%、8%或 10%)并且按体积/体积计可以是 20-80 或 45-60%的醇(乙醇)，包括 2:1、3:1、1:2、1:3 等，以及 55/45、60/40、65/35、70/30、10/90、15/85、20/80、25/75、30/70、35/65、40/60、45/55、40/60、35/65、30/70 等的醇/水。提取可以通过任何本领域已知的方法完成，包

括液液提取、液固萃取、连续提取等。当用来制备本发明柑橘类派生提取物的原料是例如油时，可以将提取用的醇(乙醇)/水混合物简单加入、摇动并且自然分离或借助于离心。重复提取是有益的，正如连续提取法例如逆流萃取等。

如上所述，碱在去除光毒性呋喃并香豆素中是优选使用的，并且可以添加到水或醇或者两者中。优选的碱是碱金属和碱土金属氢氧化物和氧化物，首选氢氧化钠和氢氧化钾。碱一般存在的量为 0.01-80 克每升醇/水混合物。

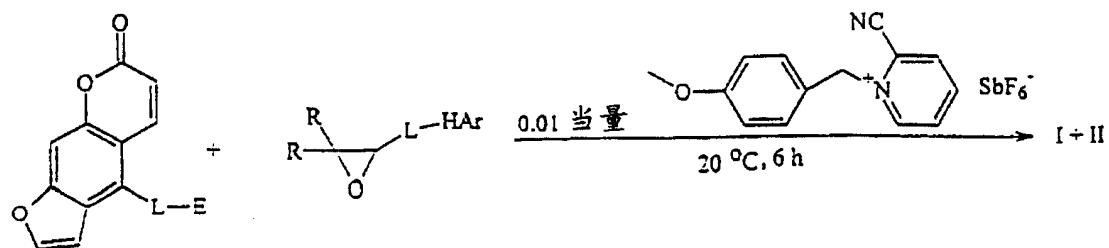
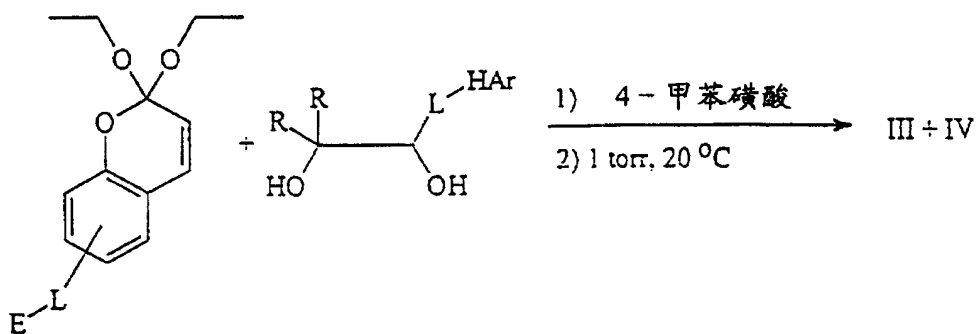
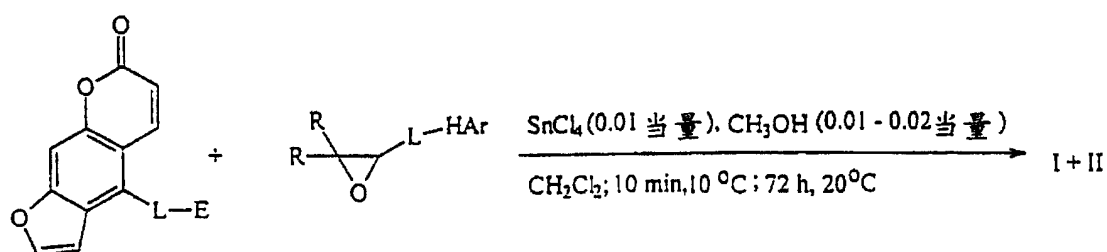
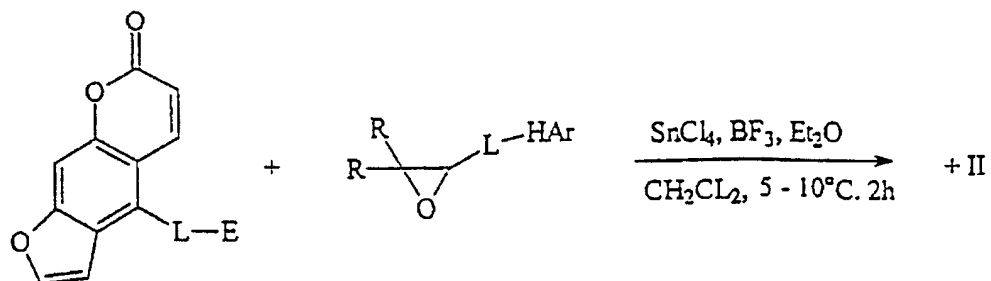
优选，本发明去除光毒性低分子量呋喃并香豆素的方法可将甲氧基取代的线形和角形呋喃并香豆素包括氧化补骨脂素(8-甲氧基补骨脂素)、佛手内酯(5-甲氧基补骨脂素)、异佛手内酯、异虎耳草素等、和未取代线形和角形呋喃并香豆素(补骨脂素、当归根素等)显著减少，优选完全除去超过液相优选气相色谱的检测限度。如果需要，还可以除去被测定为是无效首过效应呋喃并香豆素的呋喃并香豆素。这些化合物包括佛手素、补骨脂素、当归根素、异虎耳草素、吗味(marmin)、6',7-二羟基佛手素和戊烯氧呋豆素。

本发明得自柑橘类的物质、本发明组合物、本发明混合物、本发明药物组合物等优选含有首过有效量的至少一种上式 I-XVI 的首过有效化合物。或者，可以存在多种式 I-XVI 的化合物，其中每种为非首过有效量，所述化合物的浓度总和具有首过有效性。

除以上所述外，这些式(即式 I-XVI)中的一个或多个氢原子可以被羟基、卤素、直链或支链 C_1-C_{40} 烃、 C_1-C_{40} 直链或支链醚(-OR，其中 R 是直链或支链烃)、 C_1-C_{40} 烷基羟基(-ROH，其中 R 是直链或支链烃而 OH 键合到伯、仲或叔碳上)等的一个或者两个或多个的任何组合所置换。这里所说的“烃”是指支链和直链烷基和支链和直链链烯基。链烯基是具有至少一个双键的任何烃，但包括多个共轭和非共轭双键。还包括所有的盐、特别是药用盐，和立体异构体、物理形式等。式 I-XVI 所述的化合物可以通过本领域已知的任何常规技术来合成，并且其合成属于本领域技术人员知识。既然它们已经被识别，它们也可以从这里所示的得自柑橘

类的物质中分离出来。

制备本发明式 I-XVI 化合物的优选方法包括以下线路:



情况相比增加了任何程度(如 1%、5%、10%等; 参见描述 AUC 法的部分, 包括这些值之间的所有数值和范围)的任何量。“首过有效”的本发明得自柑橘类的物质、混合物、组合物或化合物是指抑制动物(优选人)中至少一种药物觉察到的首过效应(优选由细胞色素 P450 系统仪器的首过效应)的物料。这里还称为抗首过活性。给药优选共同给药, 即在受首过效应影响的药物、活性剂、治疗剂、保健食品等的不久之前、不久之后、或与其一起。“不久之前”和“不久之后”包括所有的其中本发明物料通过抑制首过效应提供有益作用的时间。本发明的优选给药形式包括本发明的化合物、得自柑橘类的物质、混合物、组合物等, 包含在例如凝胶胶囊中, 或与食用级或药用粘合剂、稀释剂等共配制。有用的剂量形式(盐或碱、片剂或树胶等)以及粘合剂、盐形式、赋形剂等可见例如 US 专利 5,576,448; 5,576,446; 5,576,437; 5,576,439; 5,576,438; 5,576,337; 5,576,339 和 5,576,336 中, 所有均引入作为参考。优选以能够逐批提供始终、可靠效能的量提供本发明的得自柑橘类的物质、混合物、组合物和化合物, 无论所提供的形式。

这里所说的术语“药物”定义为能够施用给生物改进或改变生物体生理机能的化学物质。更优选, 这里所说的术语“药物”定义为欲用于治疗或防止疾病(特别是对人而言)的任何物质。药物包括合成的和天然存在的毒素和生物影响性物质以及被认可的药品, 例如 Merck Index. 第 12 版, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, 1996;

“The Physicians Desk Reference”第 47 版, 1993, p101-321; “Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics”第 8 版 (1990)p84-1614 和 1655-1715; 以及 “The United States Pharmacopoeia, The National Formulary”, USP XXII NF XVII(1990)中列出的药品, 这些文献中的化合物引入作为参考。术语药物还包括尚未被发现或者不能在 US 获得的具有指定特性的化合物。术语药物包括药物的前体活性、活化的和代谢的形式。本发明可以带电、未带电、亲水、两性离子、或疏水种类、以及这些物理性质的任何组合组成的药物使用。疏水药物定义为在脂类或脂肪中溶解性比在水中高的以其非离子化形式的药物。优

选, 疏水药物定义为在辛醇中的溶解性比在水中高的药物。参见 US 专利 5,567,592, 引入作为参考。本发明还用于人和动物例如哺乳动物。

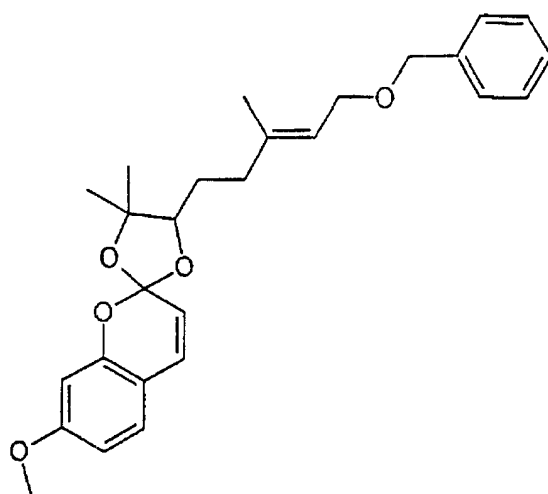
本发明的化合物和得自柑橘类的物质可以与药物、优选受首过效应影响的药物共同配制。优选, 药物的口服生物利用度为 92%或更低, 更优选 50%或更低。除上述引入参考的药物外, 其实例还包括噻嗪努佛、印达洛韦 (indinavir)、L-地帕尼 (L-deprenyl)、他克莫司、环孢菌素 A (Sandimmune®)、环孢菌素 A (Neoral®)、那非洛韦 (nelfinavir)、VX-478/141 W94、非洛地平、硝苯地平和舒马曲坦。这种共同制剂包括以上提及量的本发明的得自柑橘类的物质和/或一种或多种化合物, 一般来说其量比受首过效应影响的药物活性成分当前所必需的量要少。还可以加入药用粘合剂、稀释剂等。本领域技术人员根据本领域公知的简单试验过程(包括测定给药后一定时期内血液流中药物量的药理学实验)能够确定本发明化合物的剂量。

适合共同配制的其它产品是任何和所有的药物、保健食品或其它受首过效应影响的制品。药物的实例列于 Merck Index. 第 12 版, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, 1996 中(引入作为参考)。确定物质是否受首过效应的影响是本领域普通技术人员的知识。

优选本发明的物料得到保护不受胃酸影响, 例如通过包衣。包衣为本领域公知的, 并且包括肠包衣等。参见 Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 第 3 版, Vol.17, p.281 ff, 引入作为参考。也可以使用其它适宜的药品形式, 如缓释形式(包衣)、硬壳和软壳明胶胶囊等。

实施例

螺环原酸酯(式 XVII)的合成:



XVII

将苄基 6,7-环氧香叶草基醚放入真空室(0.1 托)中过夜,以便从样品中除去外来水分;称重 190mg(730 μmol)。将三当量的 7-甲氧基香豆素(0.386g)溶解于 3mL CH_2Cl_2 中,并且将该溶液移至密封玻璃容器中。反应期间用氦气吹扫系统,容器保持在 5-6 $^{\circ}\text{C}$,并且将反应溶液磁力搅拌。加入 43 μL SnCl_4 的 1M CH_2Cl_2 溶液和 16 μmol $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$;经过 5 分钟,然后将溶解于 4mL CH_2Cl_2 的环氧化物分 4 等份加入;每份之后加入 4 μmol $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 。将反应保持于 5-6 $^{\circ}\text{C}$ 下并且搅拌 3.5 小时,然后拆开反应装置。立即如下处理反应混合物:混合物含有总共 75 μmol 的 BF_3 和 SnCl_4 ,所以加入(反应混合物保持在 5-6 $^{\circ}\text{C}$ 同时搅拌)3 当量的吡啶(225 μmol)以破坏路易斯酸催化剂。搅拌 30 分钟之后,除去溶剂,并且将剩余物溶解于 3.16mL 95%乙醇;加入 0.6mL 50%的 KOH 水溶液(w/v),并且剧烈搅拌溶液。加入水(2.24mL),然后将该溶液放入加速真空(Speed Vac)装置中过夜,以除去乙醇。剩余大约 50%的原体积。水溶液用 3mL CH_2Cl_2 提取两次,并且将合并的 CH_2Cl_2 用 10mL 5% KOH 水溶液(w/v)提取两次并用 10mL 5%的 NaCl 水溶液(w/v)提取两次。除去 CH_2Cl_2 ,并将剩余物溶于乙腈。

可以将该乙腈溶液直接用于螺环原酸酯产品的 HPLC 纯化,通过如下优选的条件。使用线性梯度洗脱,并且通过将由水组成的流动相 A 与由乙腈组成的流动相 B 混合形成线性梯度(仪器: Hewlett Packard)。洗脱时间(以分钟计)以及混合流动相中存在的乙腈百分含量如下: 0, 55; 5, 55; 10, 90; 11, 98; 17, 98; 18, 55; 22, 55。色谱柱的尺寸为 250nm

长×4.6mm 内径, 带有结合到 4 微米硅颗粒的 C18(9%碳载荷; YMC 公司), 用包含相同物料的 23mm 长×4mm 内径柱子和 0.5 微米滤器保护, 并且保持在 $40\pm0.2^{\circ}\text{C}$ 。将流速保持为 1.0mL/min, 进行 22 分钟的运行周期。在 259 ± 2 下检测每 10 μL 的柱洗脱液, 并且使用自动收集器 (Gilson) 分级。式 XVII 化合物在该系统中的停留时间为 13.4 分钟。 $^1\text{H N.M.R. } \delta$ (400MHZ, CD_3OD) 1.15, s 和 1.26, s 和 1.39, s, 4'-Me (非对映体); 1.64, s, 8'-Me; 1.6-1.9, m, H6', 6'; 2.0-2.3, m, H7'; 3.70, s, 7-OMe; 3.83, m 和 4.20, t, H5' (非对映体); 4.01, d, H10'; 4.45, s, H12'; 5.39, t, H9'; 5.45, d, H3; 6.40, s, H8; 6.49, d, H6; 6.71, d H4; 7.06, d, H5; 7.02-7.35, m, 苯基。质谱 m/z (电喷): MS, 437 (MH^+); MS/MS, 261, 177, 153 (MH^+ 的片断)。

用于此后反相 HPLC 分级的冷榨葡萄柚油的批量预处理,

- 1、使用变性试剂醇制备含 12.5g KOH/L 的 1:1 乙醇:水 (v/v) 溶液。
- 2、在 2L 分液漏斗中混合 1.0L 冷榨葡萄柚油和 330mL 碱性乙醇溶液 2.0 分钟。
- 3、等待 5.0 分钟, 然后从漏斗中除去底部乙醇相。
- 4、使用新的 330mL 碱性乙醇溶液重复步骤 2 和 3 四次。
- 5、使用 330mL 不含 KOH 的 1:1 乙醇:水 (v/v) 溶液重复步骤 2 和 3 一次。当没有 KOH 时, 需要等待数小时 (优选过夜) 以便相明显分离。底部乙醇用 pH 试纸测试相应当显示溶液接近中性 (大部分情况下约等于 6)。
- 6、将油相 (产量应当大于 0.9L) 放入真空容器中, 并且将系统置于真空下 (0.5 托或更低) 3-4 天。当旋转粘性溶液同时在真空下不再引起沸腾时过程完成。
- 7、用一部分乙腈洗涤非挥发物质, 达到总共 200mL, 并且离心分离乙腈可溶物和乙腈不溶物 (5 分钟, 速度 50, IEC 型号 K2)。
- 8、使用加速真空 (Speed Vac) 装置从乙腈可溶相 (步骤 7) 中除去乙腈, 并且称重剩余物 (预计 22-25g)。

- 9、向剩余物添加乙腈，以致每 5mL 中含有 1.5g 剩余物，并且将溶液分成 5mL 的部分。
- 10、向每个 5mL 部分添加 15mL 异辛烷，封盖，涡流混合，并且离心混合物(2 分钟，速度 35)。抛弃顶部异辛烷相。
- 11、重复步骤 10 九次；应当不时添加乙腈以保证底部相体积为大约 5mL。
- 12、使用加速真空(Speed Vac)装置从底部相(步骤 11)中除去乙腈，并且称重剩余物(预计为原重量(步骤 8)的大约 20%)。
- 13、将剩余物(步骤 12)溶于乙腈，以便制成 0.25-0.30g/mL 溶液，通过 0.2 μ m 聚四氟乙烯树脂(塔夫纶)滤筒过滤溶液，并且溶液储藏于-20℃。

用于进一步作为饮食补剂、药物、共同制剂成分等使用的冷榨葡萄柚油的批量预处理

- 1、使用 USP 级乙醇、NF/FCC 级 KOH 和纯化水制备含 5%氢氧化钾(w/v)的 70:30 水:乙醇(v/v)溶液。
- 2、将步骤 1 制备的乙醇溶液与等体积(或稍微过量)的整个、未处理冷榨葡萄柚油(Food Chemicals Codex 级)混合，并且将混合物移至耐热耐压食用级容器中。
- 3、密封容器，在 95-100℃下保持 1 小时。冷却容器，除去乙醇相(两相体系中的较低相)，并且添加一部分新的乙醇溶液(等于步骤 2 所用的体积)。
- 4、重复沸腾周期(步骤 3)直至样品纯度达到所需程度。进行十次循环将除去>99%的极性香豆素和呋喃并香豆素，除去>90%主要的非极性香豆素和呋喃并香豆素(如环氧橙皮油素、环氧佛手素)，并且不会明显降低抑制性螺状原酸酯的含量。
- 5、用纯化水洗涤油，直至丢弃的洗涤用水的 pH 变成中性。
- 6、将油相置于真空(0.1-0.3 托)直至样品中不再产生挥发物(例如通过检验保持于-60 至-90℃下相连的排空捕集器来估计)。一般来说，该步

骤将除去样品的大约 95%体积。

7、将步骤 6 的产物与等体积 USP 乙醇混合，并且离心混合物。重复直至底部相基本上不含螺状原酸酯为止。该方法从油非挥发制备中去除醇不溶性物质。

8、选择性地，但优选，将合并的步骤 7 的乙醇提取物置于真空下，直至乙醇基本上被除去（例如 99%）或减少（例如 10%）。

由于食品、调味剂和香料工业中已知原料的掺杂，本发明的柑橘类派生组分（包括柑橘类冷榨油）应当优选在其进一步使用之前对其进行估价，例如在用来生产含首过有效量式的一种 I-XVI 化合物或其混合物的饮食补剂组合物之前。一种策略包括样品制备（方案 A、方案 A'），接下来色谱（方案 B、方案 B'、方案 B''），最后与先前的标准比较。这种评价可以提供一致性。

以下方案在准备本发明各种实施方案中是有用的。

方案 A：通过除去毒性低分子量呋喃并香豆素制备用于进一步色谱处理或用于人施用的柑橘类油

将一定体积的柑橘类冷榨油（Food Chemicals Codex 级）移至容器中，并且除去所有的挥发性物质。虽然现有数种除去挥发物的方法（例如，蒸馏，减压蒸馏、大气条件蒸发），优选的方法使用加速真空（Speed Vac）浓缩器（Savant 仪器，过程需要 12-24 小时和 10^{-2} - 10^{-3} 托压力，并且体系运行无需添加热量），因为该方法温和且方便。非挥发产物的产量一般为原体积的 0.04-0.1 倍，并且是粘性液体。

通过液液萃取从非挥发性制品中除去低分子量光毒性呋喃并香豆素：向非挥发物添加 16 倍体积的 1:1 乙醇:水（v/v，USP 级）粘液体，将容器封盖，剧烈混合溶液，离心容器（International Equipment 公司，型号 K2-5，设定 35，5 分钟），并且丢弃顶部乙醇相。重复萃取两次。如果需要可以通过使用如加速真空（Speed Vac）装置从制品中除去外来水分和乙醇。该过程的产物可以用于人施用，例如以填充胶囊的形式。

方案 A': 色谱前柑橘类油的预处理

由于在优选的流动相体系中存在溶解性差的物料, 大部分柑橘类油不适合直接用于长时间制备高压液相色谱。因此在色谱之前施用以下的样品制备方案。

将柑橘类冷榨油 (Food Chemicals Codex 级) 移至适宜容器中, 并且减压除去所有的挥发性物质 (10^{-2} – 10^{-3} 托, 3–4 天)。非挥发性产物的产量一般仅为原体积的 5–10%。将柑橘类非挥发物与乙腈按 2:1 (w/w) 混合, 离心混合物 (International Equipment 公司, 型号 K2-5, 设定 35, 5 分钟), 并且除去上层含乙腈的相。用乙腈重复萃取一次, 抛弃底层相, 将第一和第二乙腈相合并, 并且使用加速真空 (Speed Vac) 浓缩器除去乙腈 (Savant 仪器, 10^{-2} – 10^{-3} 托, 12 小时, 无需添加热量)。将非挥发性物质与乙醇碱液 (含 12.5g 氢氧化钾/L 的 1:1 乙醇:水 (v/v, USP 级)) 按 1:4 (w/v) 混合, 将混合物离心 5 分钟 (速度设定为 35), 除去和丢弃上层乙醇相。将非挥发性物质用乙醇碱液再洗涤九次, 然后用 1:1 乙醇:水 (v/v) 洗涤一次。剩余物用足够体积的乙腈提取两次, 以便所有的带色物料被除去。用两体积的己烷或异辛烷洗涤乙腈溶液 6 次, 每次都应将己烷提取物 (上层) 除去和丢弃, 并且所得的乙腈溶液通过 0.2 微米塔夫纶®膜过滤并且使用加速真空 (Speed Vac) 浓缩器挥发至干。

方案 B: 经过加工的柑橘类油的色谱方法

由于在优选的流动相体系中存在不溶性的物料, 上述方案 A 的产品不适合用于任何高压液相色谱。因此在色谱之前施用以下的样品制备方案。将 1 体积方案 A 的产品与 4 体积的乙腈混合, 将容器封盖, 剧烈混合溶液, 离心容器 (5 分钟, 设定为 35), 并且通过 0.2 微米塔夫纶®膜过滤滤掉顶部乙腈层。将过滤的溶液储放在密封容器中于 -20°C 下 2 天或更长, 然后边冷冻边通过滤纸, 以除去其中大量的沉淀。重复进行一次沉淀和过滤步骤。记下乙腈溶液的体积, 并且施用加速真空 (Speed Vac) 装置除去乙腈。将剩余物溶于原体积一半的乙腈, 注意不要破坏后面的晶体沉淀, 现在的溶液可以用于 HPLC 评价了。

如果期望制备分级柑橘类油经洗涤的非挥发性部分,则优选以下 HPLC 条件。使用线性梯度洗脱,并且通过将由水组成的流动相 A 与由乙腈组成的流动相 B 混合形成线性梯度(仪器: Hewlett Packard)。洗脱时间(以分钟计)以及混合流动相中存在的乙腈百分含量如下: 0, 75; 5, 75; 10, 90; 11, 98; 17, 98; 18, 75; 22, 75。色谱柱的尺寸为 250nm 长 × 4.6mm 内径,带有结合到 4 微米硅颗粒的 C18(9%碳载荷; ODS-L80, YMC 公司),用包含相同物料的 23mm 长 × 4mm 内径柱子和 0.5 微米滤器保护,并且保持在 40+/-0.2℃。将流速保持为 1.0mL/min,进行 22 分钟的运行周期。在 400+/-200nm 和 210+/-2nm 下检测每注射 25 μL 的柱洗脱液,并且使用自动收集器(Gilson)分级。

如果期望定性或定量评价柑橘类油、其级分、或对照标准,则优选以下 HPLC 条件。使用线性梯度洗脱,并且通过将由水组成的流动相 A 与由乙腈组成的流动相 B 混合形成线性梯度(仪器: Hewlett Packard)。洗脱时间(以分钟计)以及混合流动相中存在的乙腈百分含量如下: 0, 10; 5, 10; 30, 80; 40, 80; 41, 95; 50, 95; 53, 10; 60, 10。色谱柱的具有 150nm 长 × 2.0mm 内径的直径,带有结合到 4 微米硅颗粒的 C18(14%碳载荷; ODS-L80, YMC 公司),用填充专有材料(Prism, Keystone Scientific 公司)的 2mm 内径柱和 PTFE 滤器保护,并且保持在 35+/-0.2℃。将流速保持为 0.20mL/min,进行 60 分钟的运行周期。在 400+/-200nm 和 210+/-2nm 下检测每注射 10 μL 的柱洗脱液的吸光度和荧光性,在 229nm 下激发,450nm 发射,370nm 带滤(bandpassfiltration)。

方案 B': 加工柑橘类油的色谱方法

如果期望制备分级柑橘类油经洗涤的非挥发性部分(方案 A' 的产品),则优选以下 HPLC 条件。使用线性梯度洗脱,并且通过将由水组成的流动相 A 与由乙腈组成的流动相 B 混合形成线性梯度(仪器: Hewlett Packard)。洗脱时间(以分钟计)以及混合流动相中存在的乙腈百分含量如下: 0, 75; 5, 75; 10, 90; 11, 98; 17, 98; 18, 75; 22, 75。色谱柱具有 250nm 长 × 4.6mm 内径的直径,带有结合到 4 微米硅颗粒的 C18(9%

碳载荷; ODS-L80, YMC 公司), 用包含相同物料的 23mm 长×4mm 内径柱子和 0.5 微米滤器保护, 并且保持在 40+/-0.2℃。将流速保持为 1.0mL/min, 进行 22 分钟的运行周期。在 400+/-200nm 和 310+/-2nm 下检测每注射 25μL 方案 A' 所得乙腈溶液的柱洗脱液, 并且使用自动收集器(Gilson)分级。

如果期望定性或定量评价柑橘类油、其级分、或对照标准, 则优选以下 HPLC 条件。使用线性梯度洗脱, 并且通过将由水组成的流动相 A 与由乙腈组成的流动相 B 混合形成线性梯度(仪器: Hewlett Packard)。洗脱时间(以分钟计)以及混合流动相中存在的乙腈百分含量如下: 0, 10; 5, 10; 30, 80; 40, 80; 41, 95; 50, 95; 53, 10; 60, 10。色谱柱具有 250mm 长×2.0mm 内径的直径, 带有结合到 4 微米硅颗粒的 C18(14%碳载荷; ODS-L80, YMC 公司), 用填充专有材料(Prism, Keystone Scientific 公司)的 2mm 内径柱和 PTFE 滤器保护, 并且保持在 35+/-0.2℃。将流速保持为 0.20mL/min, 进行 60 分钟的运行周期。在 400+/-200nm 和 310+/-2nm 下检测每注射 10μL 的柱洗脱液的吸光度和荧光性, 在 229nm 下激发, 450nm 发射, 370nm 带滤。

方案 B': 使用手性 HPLC 柱纯化本发明的化合物

将 11-12.5 分钟区域(方案 B 或 B')分级获得并除去溶剂(Speed Vac, 无需添加热量)的残余物合并, 进行手性液相色谱。使用等度洗脱(流动相由 3.4L 异辛烷、0.6L 95%乙醇(剩余是水)和 0.2L 异丙醇组成), 以便在小于 34 分钟内从柱(250×4.6mm, Keystone Scientific 公司, 手性 DNB{S})中洗脱抑制剂 XI-XVI(仪器: Hewlett Packard)。将流速保持为 1.0mL/min, 进行 22 分钟的运行周期。在 400+/-200nm 和 310+/-2nm 下检测每注射 25μL(残余物溶于流动相)的柱洗脱液, 并且使用自动收集器(Gilson)分级。

方案 C: 评价人细胞色素 P450 介导的生物转化

通过室温下将 10μL 乙醇或含抑制剂的乙醇溶液与 100μL 溶于反应

缓冲剂的 100mg/mL 牛血清白蛋白(Sigma)混合, 开始制备培养混合物。反应缓冲剂由 0.10M 磷酸钠、1.0mM 乙二胺四乙酸和 5.0mM 氯化镁组成, pH7.4(所有试剂: Fisher Scientific)。所用的抑制性化学物质是酮康唑(Research Diagnostic 公司)、咪康唑、佛手内酯、甲氧苄二氧嘧啶(以上三种均来自 Sigma)、佛手素、戊烯氧苄二氧嘧啶、异虎耳草素、补骨脂素、当归根素(前面五种来自 Indofine 化学公司)、以及方案 A、A'、B、B' 或 B'' 所得的级分或沉淀。如可能, 最终抑制剂浓度表示为体积摩尔浓度, 其通过从称重原料中计算或通过由对照原料制备的 HPLC 校准曲线内推; 或者, 浓度表示为重量/体积。将反应试管放在冰上准备进行如下操作。添加足够的反应缓冲剂以便每个试管的最终体积为 500 μ L, 加入 5 μ L 产生降低的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐的 100 倍浓缩物(以便整个反应混合物中含有 1.0mM 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐、1U/mL 葡萄糖-6-磷酸盐脱氢酶、和 10mM 葡萄糖-6-磷酸盐; 均来自 Sigma), 然后将人肝脏 S9(Anatomic Gift Foundation)解冻并且以足够的量加入, 以造成容易检测量的代谢物将在对照反应中形成(各个反应所需的量不同, 一般为 10 μ L)。将反应在 Dubnoff 型水浴中 37 $^{\circ}$ C 下预保温 3 分钟, 通过添加 10 μ L 溶于 1:1 乙腈:水的 10 μ M 特非那定(Sigma)并且通过轻微混合完成反应混合物, 将样品在 37 $^{\circ}$ C 下保温 15 分钟, 并且通过将试管放在冰上并且添加 2.5mL 溶于乙腈的 300nM 特非那定相关化合物 A(内标, US 药典)来停止反应。

使用如下方案将上述制备的样品用于 HPLC 评价。将各试管涡流混合并且离心 10 分钟(设定为 35), 将所得上清液移至干净试管, 并且使用加速真空(Speed Vac)装置蒸发液体。将各个试管的剩余物首先溶于 40 μ L 1:1 乙腈:水中, 加入 2.5mL 乙腈, 并且重复刚才描述的离心-转移-蒸发步骤。

可以使用以下所述的 HPLC 法分析由上述实验和样品制备方案获得的干剩余物中的特非那定代谢物, 并且还可以用于定量测定向反应添加的抑制性化学物质(参见方案 B 和 B')。使用线性梯度洗脱, 并且通过将由水组成的流动相 A 与由 0.025%(v/v)甲酸/乙腈组成的流动相 B 混合形成

线性梯度(仪器: Hewlett Packard)。洗脱时间(以分钟计)、混合流动相中存在的流动相 B 的百分含量、以及流速(mL/min)如下: 0, 10, 0.10; 2, 10, 0.10; 3.5, 10, 0.20; 4, 10, 0.25; 5, 10, 0.25; 30, 55, 0.25; 32, 98, 0.25; 33, 98, 0.40; 39.8, 98, 0.40; 40, 98, 0.25; 45, 10, 0.25; 45.25, 10, 0.20; 50, 10, 0.20; 50.25, 10, 0.10。色谱柱的尺寸为 150nm 长 $\times$ 2.1mm 内径, 填充专有材料(Prism, Keystone Scientific 公司), 用含相同材料的 2mm 内径柱和 PTFE 滤器保护, 并且保持在 $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 。在每进行 50.25 分钟运行周期不久之前, 将干样品剩余物与 60 μL 1:1 乙腈:水混合, 接着加入 40 μL 水。检测每注射 10 μL 的柱洗脱液的荧光性, 在 228nm 下激发, 291nm 发射, 和 280nm 带滤。在这些条件下, 特非那定醇代谢物、特非那定羧酸代谢物和内标的停留时间分别为 16.2、17.4 和 22.2 分钟。

方案 C': 评价人细胞色素 P450 介异的生物转化

通过室温下将 10 μL 乙醇(对照反应)或含抑制剂的乙醇溶液与 100 μL 溶于反应缓冲剂的 100mg/mL 牛血清白蛋白(Sigma)混合, 开始制备培育混合物。反应缓冲剂由 0.10M 磷酸钠、1.0mM 乙二胺四乙酸和 5.0mM 氯化镁组成, pH7.4(所有试剂: Fisher Scientific)。所用的抑制性化学物质是酮康唑(Research Diagnostic 公司)、瑞惜洛韦(Norvir™, Abbott Laboratories)、方案 C 所述的抑制性化学物质、和方案 B' 中所得的级分。如可能, 最终抑制剂浓度表示为体积摩尔浓度, 其通过从称重原料中计算或通过使用比尔定律; 或者, 浓度表示为重量/体积。将反应试管放在冰上准备进行如下操作。添加足够的反应缓冲剂以便每个试管的最终体积为 500 μL , 加入 5 μL 产生降低的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐的 100 倍浓缩物(以便整个反应混合物中含有 1.0mM 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐、1U/mL 葡萄糖-6-磷酸盐脱氢酶、和 10mM 葡萄糖-6-磷酸盐; 均来自 Sigma), 然后将人肝脏 S9(Anatomic Gift Foundation)解冻并且以足够的量加入, 以造成容易检测量的代谢物将在对照反应中形成(各个反应所需的量不同, 一般为 10 μL)。将反应在 Dubnoff 型水浴中 37°C 下预

保温 3 分钟, 通过添加 10 μ L 溶于 1:1 乙醇:水的噻唑努佛 (Invirase™, Roche Laboratories) 并且通过轻微混合完成反应混合物, 将样品在 37℃ 下保温 15 分钟, 并且通过将试管放在冰上并且添加 2.5mL 乙腈来停止反应。

使用如下方案将上述制备的样品用于 HPLC 评价。将各试管涡流混合并且离心 10 分钟(设定为 35), 将所得上清液移至干净试管, 并且使用加速真空 (Speed Vac) 装置蒸发液体。将各个试管的剩余物首先溶于 40 μ L 1:1 乙腈:水中, 加入 2.5mL 乙腈, 并且重复刚才描述的离心-转移-蒸发步骤。可以使用以下所述的 HPLC 法分析由上述实验和样品制备方案获得的干剩余物中的噻唑努佛和噻唑努佛代谢物, 并且还可以用于定量测定向反应添加的抑制性化学物质(参见方案 B 和 B')。使用线性梯度洗脱, 并且通过将由水组成的流动相 A 与由乙腈组成的流动相 B 混合形成线性梯度(仪器: Hewlett Packard)。洗脱时间(以分钟计)、以及混合流动相中存在的流动相 B 的百分含量如下: 0, 10; 5, 10; 30, 80; 31, 95; 40, 95; 43, 10; 48, 10。整个运行中流速为 0.2mL/min。色谱柱的尺寸为 150mm 长 $\times$ 2.1mm 内径, 填充专有材料 (Prism, Keystone Scientific 公司), 用含相同材料的 2mm 内径柱和 PTFE 滤器保护, 并且保持在 35 $\pm$ 0.2℃。为了减小分析物的降解, 在每进行 48 分钟运行之前的不久之前, 将干样品剩余物与 50 μ L 1:1 乙腈:水混合。检测每注射 10 μ L 的柱洗脱液的吸光度。在这些条件下, 噻唑努佛主要代谢物 A、噻唑努佛主要代谢物 B 和噻唑努佛的停留时间分别为 24.2、26.0 和 30.0 分钟。

有效性的证明

为证明本发明的首过有效性, 按照方案 C' 对本发明化合物和本发明的得自柑橘类的物质进行实验, 其中在各种浓度的抑制剂的存在下测定噻唑努佛代谢物的产生。按照方案 A'、B' 和 B'' 制备本发明的得自柑橘类的物质, 并且与已知的抑制剂酮康唑比较。图 1 显示了本发明式 XI 和 XIII 化合物的结果, 还显示了佛手素和戊烯氧呋豆素是基本上无效的首过抑制剂。图 2 显示了本发明化合物与已知抑制剂 Ritonavir 和酮康唑

比较的情况。

在本发明的化合物中，优选呋喃并香豆素环的呋喃环位置根本没有取代。

关于纯化和加工的方法，优选以下实施方案：

A、加工柑橘类并从首过有效的得自柑橘类的物质中选择去除光毒性呋喃并香豆素的方法，包括用至少一种 C_2 - C_4 醇、水和可选性的碱的混合物提取所说的得自柑橘类的物质，经过所说的提取之后，所说的首过有效的得自柑橘类的物质保持抗首过活性。

B、实施方案 A 的方法，其中所说的得自柑橘类的物质是柑橘类冷榨油。

C、实施方案 A 的方法，其中所说的醇和水的混合物是乙醇和水的 30/70 体积/体积混合物，其中还选择性含有 1-10% 的氢氧化钾 (W/V)。

其它优选的实施方案包括：

D、用至少一种 C_2 - C_4 醇、水的混合物提取的首过有效的得自柑橘类的物质，以便减少其中的光毒性呋喃并香豆素的量。

E、实施方案 D 的得自柑橘类的物质，其中所说的得自柑橘类的物质是柑橘类冷榨油。

F、实施方案 D 的得自柑橘类的物质，其是用乙醇和水的 30/70 体积/体积混合物提取的，其中还选择性含有 1-10% 的氢氧化钾 (W/V)。

G、抑制患者口服摄取的受首过效应影响的物质之首过效应的方法，包括给所说的患者共同施用实施方案 A 和 D 的首过有效的得自柑橘类的物质。

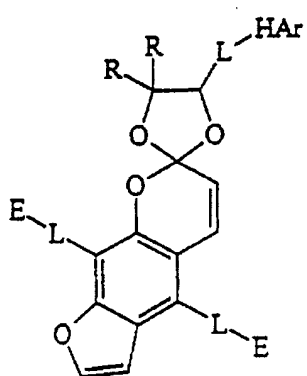
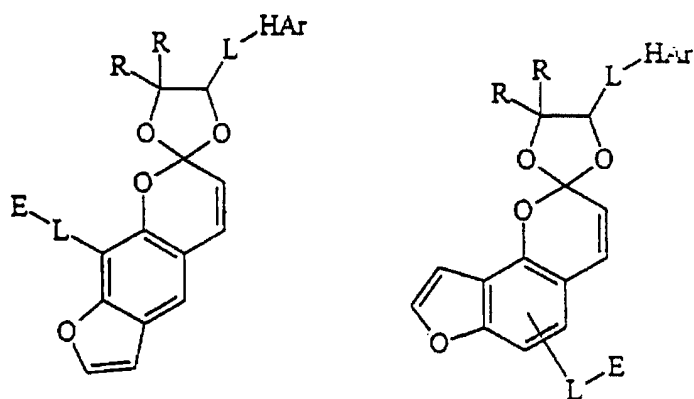
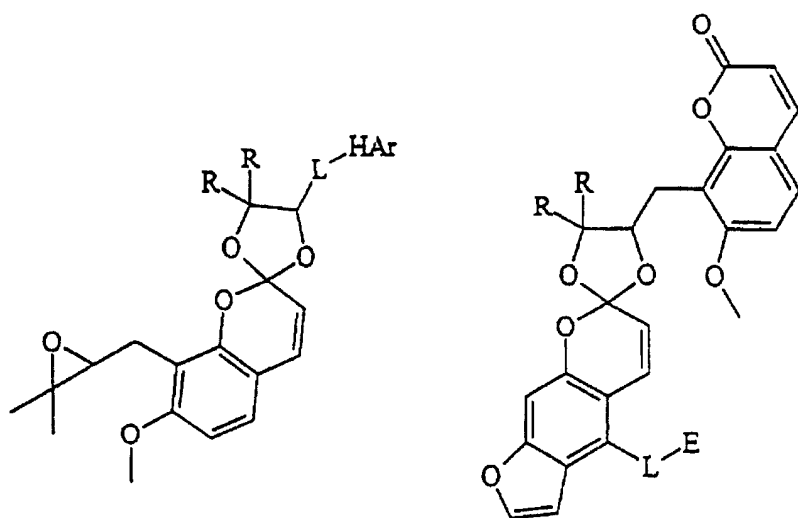
本发明的组合物优选包含本发明的抑制剂物质(化合物等)(例如，单独含有，与药物、和/或稀释剂和/或载体等混合)，从而它们遵照方案 C' 抑制噻唑努佛的生物转化，好于纯酮康唑(基于相等的摩尔浓度(优选)或重量浓度)。或者，本发明的化合物、组合物、混合物、制剂等(物质)优选在方案 C' 中提供小于 0.5 的 Y 轴值(见图 1)，优选 0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.22、0.2、0.18、0.15、0.12、0.1、0.08、0.05 或 0.03 或更小，当将 0.01-0.25mg(包括 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12、

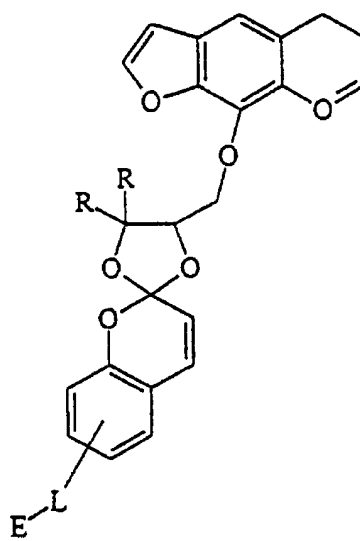
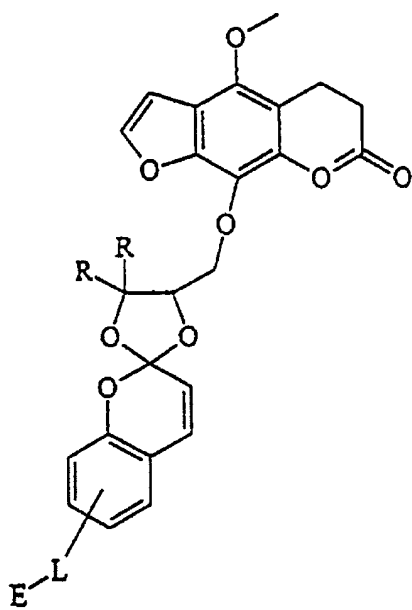
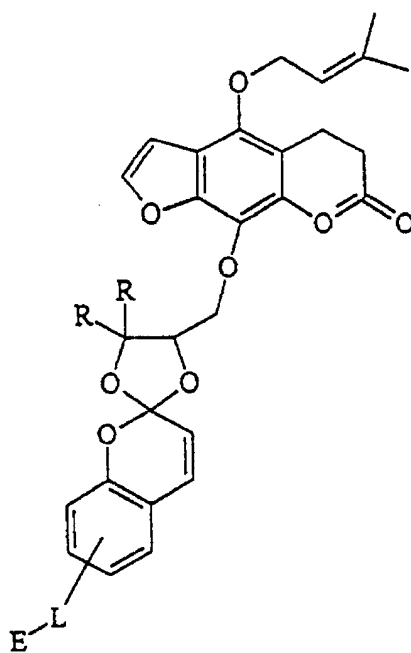
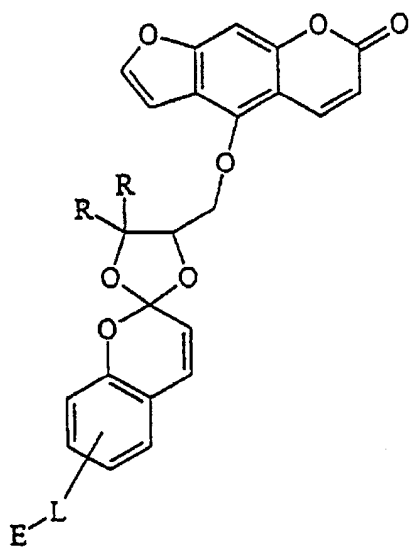
0.14、0.16、0.18、0.2、0.22 和 0.24, 以及所有值之间的范围)的本发明物质稀释或溶解成 1 升时。

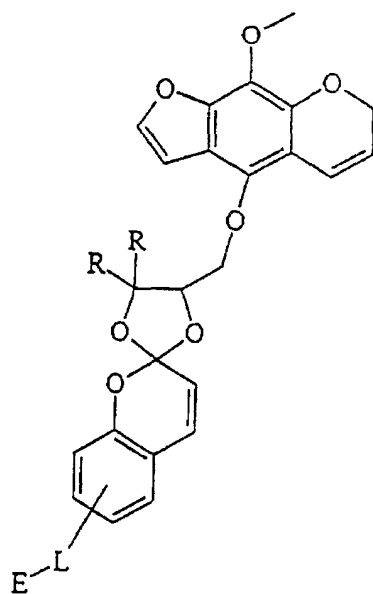
一种含本发明化合物的市售形式的柑橘类是冷榨葡萄柚油, 其中式 XI-XVI 化合物的总浓度可能达到 0.15-0.25mg/ml。这六种化合物的分布如下: XI+XII+XIII+XIV 等于大约 50%, 剩余为 XV 和 XVI。对 XI-XIV, 分布大约是 3: 2: 2: 1, 并且 XV:XVI 约为 2:1。在一个实施方案中本发明的组合物优选含有比天然和市售形式的柑橘类中所存在的浓度高的本发明化合物(即所有本发明化合物的总和)。这些浓度被称为“浓量”。例如, 优选的浓度包括大于 0.25mg/ml、0.3、0.8、1、2、5、8、~~32~~ 128、200mg/ml 等。关于本发明的化合物, 一个实施方案中本发明化合物的形式因纯度而不同于天然或市售产品中存在的形式。术语“基本上纯的”和“基本上纯的形式”指本发明化合物的纯度大于市售产品和天然中存在的化合物纯度。这些浓度和形式对本领域技术人员来说是容易测定的, 既然本发明者识别了造成“葡萄柚作用”的活性化合物。在以下授予 US 政府和其它的专利中可以找到适合描述本发明实施方案并将其专利性区别或与天然或市售存在形式相区别的其它语言、词组等: US 专利 4,708,948; 5,409,938; 5,455,251; 4,977,244; 5,462,956; 5,314,899; 5,104,977; 5,484,889; 5,591,770; 5,599,839; 5,672,607; 5,674,900; 5,648,354; 5,691,386; 5,681,829 和 5,564,432(引入作为参考)。关于本发明以多少量可以施用和怎样施用的另一种描述见 US5,665,386、W097/15269 和 W096/40192(引入作为参考)。

以下专利申请、临时专利引入作为参考: 60/056,382; 60/048,183; 60/043,878; 08/764,081 和 08/673,800(Attorney Docket 号 7552-001-99; 7552-004-99; 7552-005-99; 7552-006-99 和 7552-007-99)和 Attorney Docket 号 7552-008-99; 申请系列号 08/997,259(1997.12.23 递交)。

下式描述本发明有用的其它化合物, 其中 R、L、E 和 HAr 如上所述。针对上述化合物, 这些化合物包括所有的立体异构体、E-Z 异构体等。针对天然或市售产品, 这些化合物优选是上述关于纯度、浓度等的形式。这些化合物可以选择性按照式 I-XVI 化合物的情形被取代。







本发明的化合物中，一组优选的可选择的取代基包括：氢、 C_1 - C_4 烷基、 $-S(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-O(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-N(C_1-C_2 \text{ 烷基})(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、羟基、 $-O(C_1-C_2 \text{ 烷基})$ 、氟、 C_1-C_6 烷基、氯、溴、碘、 C_1-C_4 烷氧基、 $-CF_3$ 、 $-C(=O)O(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-OC(=O)(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-OC(=O)N(C_1-C_4 \text{ 烷基})(C_1-C_2 \text{ 烷基})$ 、 $-NHCO(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-CONH(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-CON(C_1-C_4 \text{ 烷基})(C_1-C_2 \text{ 烷基})$ 、 $-S(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-SO_2(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、和 $-SO_2N(C_1-C_4 \text{ 烷基})(C_1-C_2 \text{ 烷基})$ 。

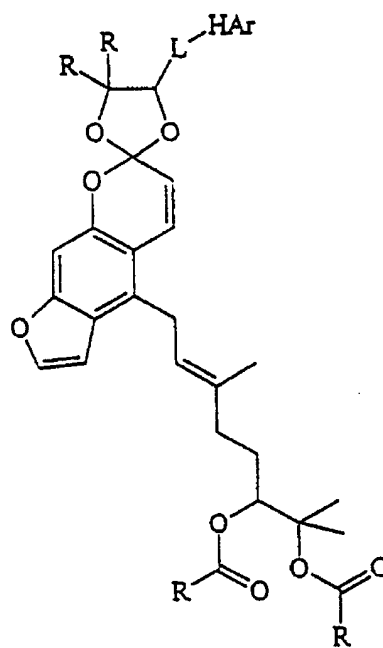
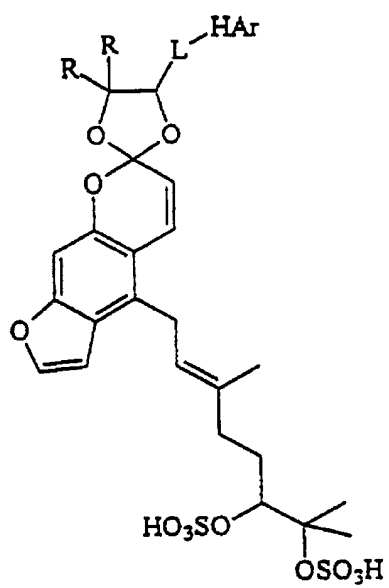
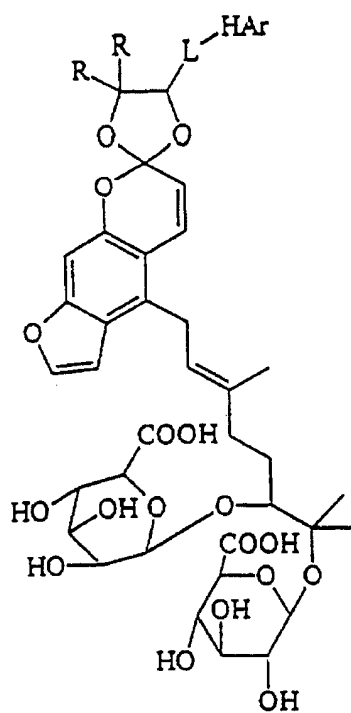
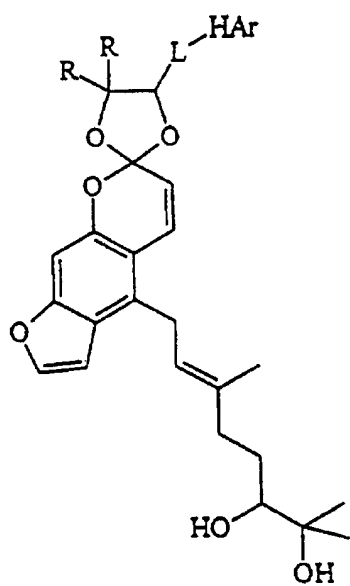
另一组优选的可选择的取代基包括： C_1-C_{12} 烷基、芳基、 $(C_1-C_4 \text{ 亚烷基})$ 芳基、苯基、萘基、噻吩基、苯并噻吩基、吡啶基、噻啉基、吡嗪基、嘧啶基、咪唑基、呋喃基、苯并呋喃基、苯并噻唑基、异噻唑基、吡唑基、吡咯基、吡啶基、吡咯并吡啶基、噁唑基和苯并噁唑基、 C_3-C_8 环烷基或 $(C_1-C_6 \text{ 亚烷基})(C_3-C_8 \text{ 环烷基})$ 、 C_1-C_4 烷基、苄基、 C_1-C_4 链烷醇基、 C_1-C_6 烷氧基、 $-OC(=O)(C_1-C_6 \text{ 烷基})$ 、 $-OC(=O)N(C_1-C_4 \text{ 烷基})(C_1-C_2 \text{ 烷基})$ 、 $-S(C_1-C_6 \text{ 烷基})$ 、氨基、 $-NH(C_1-C_2 \text{ 烷基})$ 、 $-N(C_1-C_2 \text{ 烷基})(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-N(C_1-C_4 \text{ 烷基})CO-(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-NHCO(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-CONH(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、 $-CON(C_1-C_4 \text{ 烷基})(C_1-C_2 \text{ 烷基})$ 、 SH 、 $SO(C_1-C_4 \text{ 烷基})$ 、

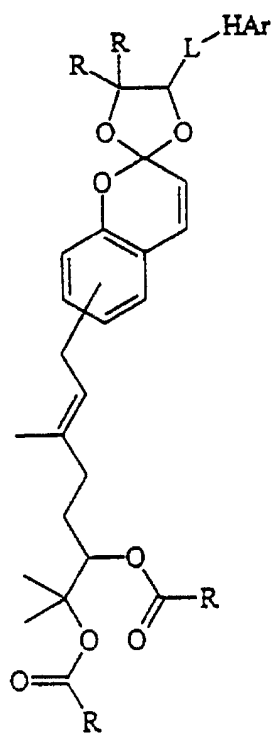
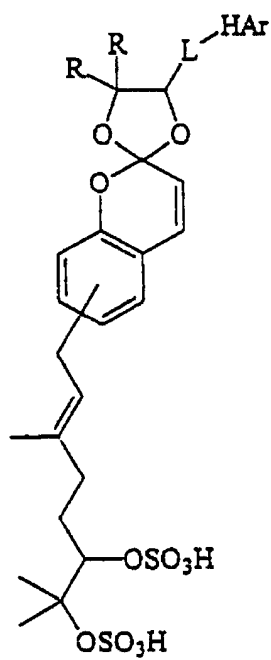
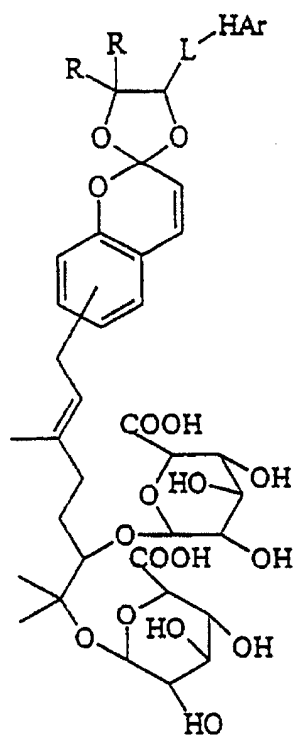
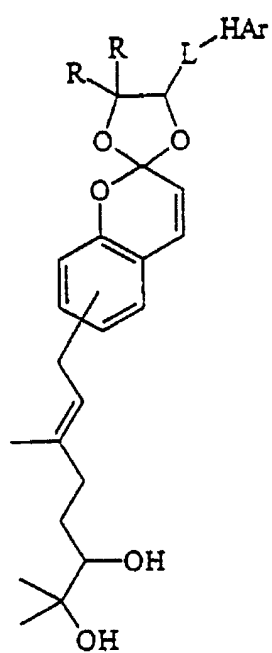
$-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、和 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})(\text{C}_1\text{-C}_2\text{烷基})$ 。

第三组优选的可选择的取代基包括： $-\text{S}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 或 $-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})(\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})(\text{C}_1\text{-C}_2\text{烷基})$ 、 $-\text{S}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{SO}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{CO}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、二甲基氨基、甲基氨基、乙基氨基、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 硫代烷基、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{NO}_2$ 、苯基、萘基、噻吩基、苯并噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡嗪基、呋喃基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并异噁唑基、苯并咪唑基、吡啶基、苯并噻唑基或 $\text{C}_3\text{-C}_8$ 环烷基、氯、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基})$ 溴、碘、甲酰基、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_2\text{烷基})(\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_2\text{烷基})(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{S}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基})$ 和 $-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基})$ 、氟代、羟基、氨基、甲基氨基、二甲基氨基、乙酰基、氨、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基、卤素(例如, 氯、氟、碘或溴)、羧基、 $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{烷基})$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_2\text{烷基})$ 羧基、甲氧基和氟。

这三组优选取代基中, HAr (即, $\text{C}_6\text{-C}_{24}$ 芳族基或杂芳族基)也是具体的实例。

本发明还包括本发明化合物、组合物的前体药物和活性代谢物。前体药物是当施用给哺乳动物如人时产生本发明化合物的化合物。活性代谢物是当施用本发明化合物、组合物等给哺乳动物(优选人)时形成的首过有效的化合物。本发明前体药物和代谢物的一些实例包括:





本发明的化合物、代谢物、前体药物等可以优选被氘和/或氟取代,以便增加在患者/动物/等中的停留时间。

药用载体、稀释剂、赋形剂等为本领域技术人员所已知。例如上述专利和公开出版物中所提及的几种。

在上述“用于进一步作为饮食补剂、药物等使用的冷榨葡萄柚油的预处理”的实施例部分中,示例说明了优选的方法。在此情况中,优选用热和碱的方式除去极性香豆素和呋喃并香豆素(见上),但两种方式是选择性的。还优选含更多水分的 C_2 - C_4 醇,更优选 70:30 (V/V) 水:乙醇。此外,在初期提取阶段,优选不除去首过有效的得自柑橘类的物质中(含至少一种本发明化合物、代谢物、前体药物等的得自柑橘类的物质)的挥发物。优选的得自柑橘类的物质是冷榨葡萄柚油。

如果使用加热,优选 40-120℃,更优选 60-110℃,首选 80-105℃ 包括 80、85、90、95、100 和 105℃。在提取时,醇/水混合物与首过有效的得自柑橘类的物质以本领域已知的任何方式接触一次或者一次以上,选择性通过加热(即升高温度)。可以使用基于水和醇总体积 1-15%、优选 3-10%、更优选 4、5、6、7、8 或 9 (w/v) 的碱,例如 NaOH、KOH 或可溶解醇/水混合物的任何其它碱。

如果准备使用提取产物,则一种测定的方式是检测洗液的 pH,优选单独使用水。优选接近中性值(6-7.5)。pH 调节剂可以使用例如药用或食用级的酸。呋喃并香豆素、香豆素等的被去除程度可以按照上面用 HPLC、GC 等检测。

确保本发明纯化的提取物中不存在醇溶性物质的一种方式是将提取物与醇混合,接着离心除去不溶物质。

