



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102630142 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 08

(21) 申请号 201080052123. X

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

(22) 申请日 2010. 09. 17

代理人 金鲜英 冯云

(30) 优先权数据

2009-218055 2009. 09. 18 JP

(51) Int. Cl.

A23F 3/16 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 17

A23K 1/00 (2006. 01)

A23K 1/16 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/066741 2010. 09. 17

A23L 1/221 (2006. 01)

A23L 1/30 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02011/034218 JA 2011. 03. 24

A61K 8/49 (2006. 01)

A61K 8/97 (2006. 01)

A61Q 19/00 (2006. 01)

(71) 申请人 株式会社里维松

地址 日本静冈县

申请人 国立大学法人佐贺大学

长崎县公立大学法人

(72) 发明人 柳田晃良 石丸干二 田中隆

古场一哲 宫崎均 青木直人

河村传兵卫

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 11 页

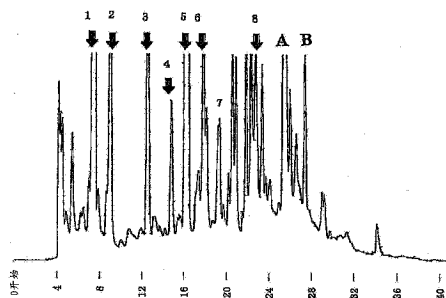
(54) 发明名称

含有多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物及其制造方法

(57) 摘要

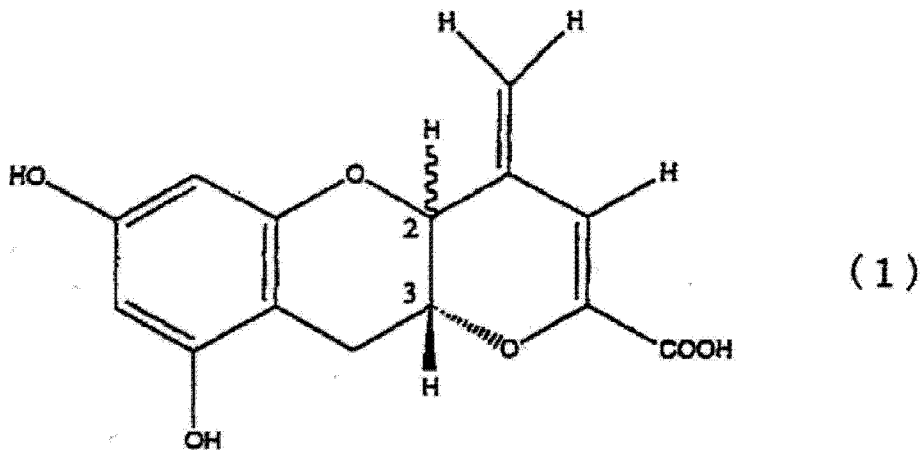
本发明提供一种含有新颖的多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物及其制造方法。含有多种提取物和新颖的多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物通过使微生物发酵茶叶经提取处理而获得,所述微生物发酵茶叶通过将选自曲霉属的种(PK-1) [Aspergillus sp. (PK-1)]、米曲霉属(NBRS 4214)的种(AO-1) [Aspergillus oryzae(NBRS 4214) sp. (AO-1)]、泡盛曲霉属(NBRS 4122)的种(SK-1) [Aspergillus awamori(NBRS 4122) sp. (SK-1)]和散囊菌属的种(KA-1) [Eurotium sp. (KA-1)]中的一种与茶叶一起培养而获得。此外,例如,制造富含新颖的多酚衍生物的功能性发酵茶提取物。

1: 没食子酸
2: GC
3: EGC
4: C
5: 咖啡因
6: EGCG
7: KTG
8: ECG
A: 本发明的顺式多酚
B: 本发明的反式多酚



1. 一种功能性微生物发酵茶提取物,其包含多种提取物以及由下述通式(1)表示的多酚衍生物,所述功能性微生物发酵茶提取物为通过使微生物发酵茶叶经提取处理而获得,所述微生物发酵茶叶通过将选自曲霉属的种(PK-1) [*Aspergillus* sp. (PK-1)]、米曲霉属(NBRS 4214)的种(A0-1) [*Aspergillus oryzae* (NBRS 4214) sp. (A0-1)]、泡盛曲霉属(NBRS 4122)的种(SK-1) [*Aspergillus awamori* (NBRS 4122) sp. (SK-1)] 和散囊菌属的种(KA-1) [*Eurotium* sp. (KA-1)] 中的一种与茶叶一起培养而获得;或者一种功能性微生物发酵茶提取物,其富含由下述通式(1)表示的多酚衍生物,所述富含由下述通式(1)表示的多酚衍生物的功能性发酵茶提取物通过将由下述通式(1)表示的多酚衍生物添加到所述发酵茶提取物中获得:

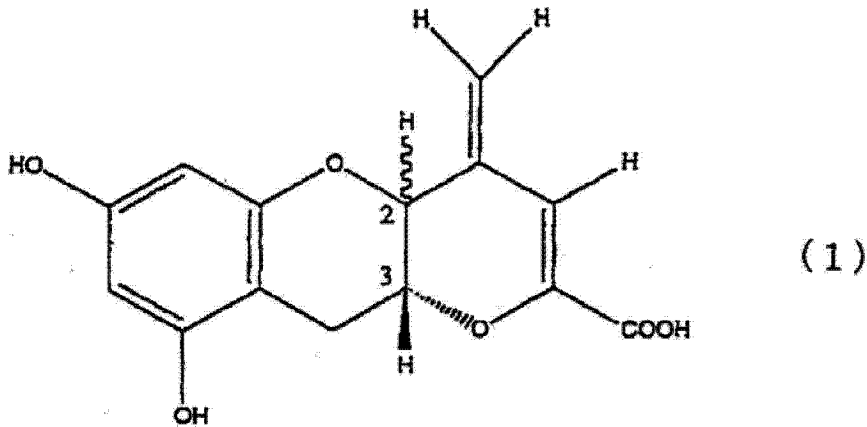
[化学式 1]



2. 根据权利要求 1 所述的功能性微生物发酵茶提取物,其中,获得的多种提取物包括没食子酸、没食子儿茶精、表没食子儿茶素、儿茶酸、表儿茶素、表没食子儿茶酚没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯以及山奈酚三糖苷。

3. 一种用于制造包含多种提取物以及由下述通式(1)表示的多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物的方法,其包括使微生物发酵茶叶经过提取处理,所述微生物发酵茶叶为通过将选自曲霉属的种(PK-1) [*Aspergillus* sp. (PK-1)]、米曲霉属(NBRS 4214)的种(A0-1) [*Aspergillus oryzae* (NBRS 4214) sp. (A0-1)]、泡盛曲霉属(NBRS 4122)的种(SK-1) [*Aspergillus awamori* (NBRS4122) sp. (SK-1)] 和散囊菌属的种(KA-1) [*Eurotium* sp. (KA-1)] 中的一种与茶叶一起培养而获得;或者用于制造富含由下述通式(1)表示的多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物的方法,其包括将由下述通式(1)表示的多酚衍生物添加到发酵茶提取物中:

[化学式 2]



4. 根据权利要求 3 所述的用于制造功能性微生物发酵茶提取物的方法,其中,获得的多种提取物包括没食子酸、没食子儿茶精、表没食子儿茶素、儿茶酸、表儿茶素、表没食子儿茶酚没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯以及山奈酚三糖苷。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的用于制造含有多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物的方法,所述方法进一步包括在培养前灭菌所述茶叶以及在培养后干燥所述茶叶。

6. 根据权利要求 3-5 中任意一项所述的用于制造含有多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物的方法,其中,乙醇、含水乙醇或水用作提取处理的溶剂。

7. 一种用于制造粉末形式的含有多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物的方法,其包括将例如糊精、淀粉以及阿拉伯树胶的赋形剂添加 / 混合到浓缩的提取物中以制造浆状混合物,所述浓缩的提取物通过使根据权利要求 3-6 中任意一项所述的微生物发酵茶叶经提取处理而获得,或者将例如糊精、淀粉以及阿拉伯树胶的赋形剂添加 / 混合到富含由通式(1)表示的多酚衍生物的浓缩的提取物中以制造浆状混合物;以及喷雾干燥该浆状混合物以制造粉末形式的含有多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物。

8. 一种加工食品,其包含根据权利要求 1 或 2 所述的功能性微生物发酵茶提取物。

9. 一种调味品,其包含根据权利要求 1 或 2 所述的功能性微生物发酵茶提取物。

10. 一种健康补充剂,其包含根据权利要求 1 所述的功能性微生物发酵茶提取物。

11. 一种动物饲料,其包含根据权利要求 1 所述的功能性微生物发酵茶提取物。

12. 一种化妆品,其包含根据权利要求 1 所述的功能性微生物发酵茶提取物。

含有多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物及其制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及含有新颖的多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物及其制造方法，以及进一步涉及其应用。

背景技术

[0002] 通常已知的多酚衍生物包括茶叶中含有的儿茶酸(catechin)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate)、表没食子儿茶素(epigallocatechin)、表没食子儿茶酚没食子酸酯(epigallocatechin gallate)以及儿茶素没食子酸酯(gallocatechin gallate)，它们已经用作显示多种生理活性的生理功能物质。

[0003] 此外，也已经提出通过使用属于曲霉属(*Aspergillus*)的微生物PK-1 (FERM P-21280)或属于散囊菌属(*Eurotium*)的微生物KA-1 (FERM P-21291)发酵茶叶制造含有4-乙烯基-1,2-二甲氧基苯(4-ethenyl-1,2-dimethoxybenzene)、乙酰丁香酚(aceteugenol)或异丁香酚(isoeugenol)的后发酵茶叶(日本特开2008-263831号公报)。

[0004] 专利文献1:日本特开2008-263831号公报

发明内容

[0005] 技术问题

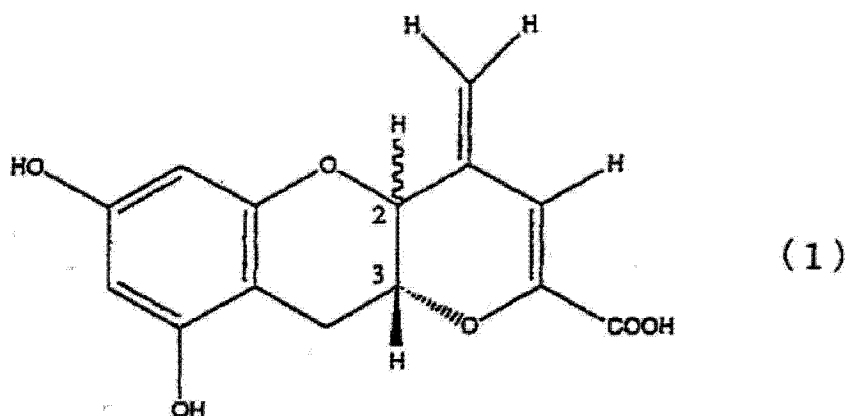
[0006] 本发明的目的是提供一种功能性微生物发酵茶提取物，所述功能性微生物发酵茶提取物从发酵茶叶中获得，含有新颖的显示生理活性作用的物质。

[0007] 解决问题的技术方案

[0008] 本发明的发明人已经发现：使微生物发酵茶叶经过提取处理而分离到由下述通式(1)表示的新颖的多酚衍生物，所述微生物发酵茶叶通过将茶叶与选自曲霉的种(PK-1) [*Aspergillus* sp. (PK-1)] (FERM P-21280)、米曲霉属(NBRS4214)的种(AO-1) [*Aspergillus oryzae*(NBRS 4214) sp. (AO-1)]、泡盛曲霉属(NBRS 4122)的种(SK-1) [*Aspergillus awamori*(NBRS 4122) sp. (SK-1)]和散囊菌属的种(KA-1) [*Eurotium* sp. (KA-1)] (FERM P-21291)的一种与茶叶一起培养而获得：

[0009] [化学式1]

[0010]

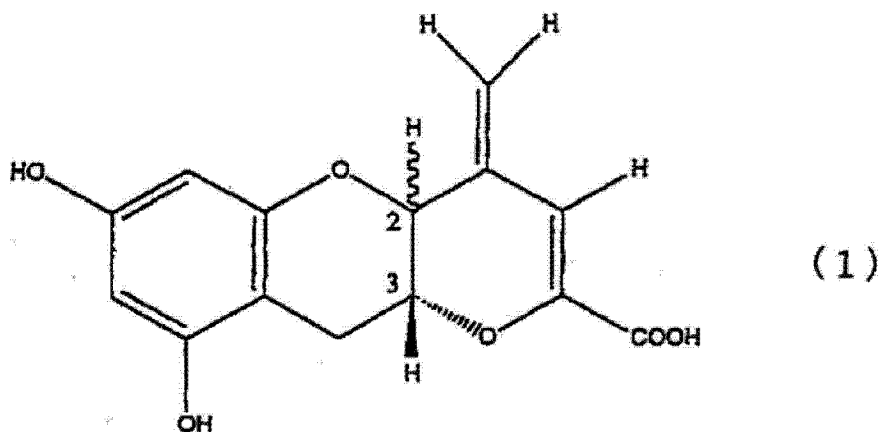


[0011] 基于这些发现本发明得以完成,本发明涉及:

[0012] 1. 功能微生物发酵茶提取物,其含有多种提取物和由下述通式(1)表示的多酚衍生物;所述功能发酵茶叶提取物为使微生物发酵茶叶经过提取处理而获得;所述微生物发酵茶叶为将茶叶与选自曲霉的种(PK-1) [*Aspergillus* sp. (PK-1)] (FERM P-21280)、米曲霉属(NBRS 4214)的种(A0-1) [*Aspergillus oryzae* (NBRS 4214) sp. (A0-1)]、泡盛曲霉属(NBRS 4122)的种(SK-1) [*Aspergillus awamori* (NBRS 4122) sp. (SK-1)] 和散囊菌属的种(KA-1) [*Eurotium* sp. (KA-1)] (FERM P-21291)的一种与茶叶一起培养而获得;或者一种功能性发酵茶提取物,其富含由下述通式(1)表示的多酚衍生物,所述富含由下述通式(1)表示的多酚衍生物的发酵茶提取物通过将由下述通式(1)表示的多酚衍生物添加到所述发酵茶提取物而获得:

[0013] [化学式 2]

[0014]



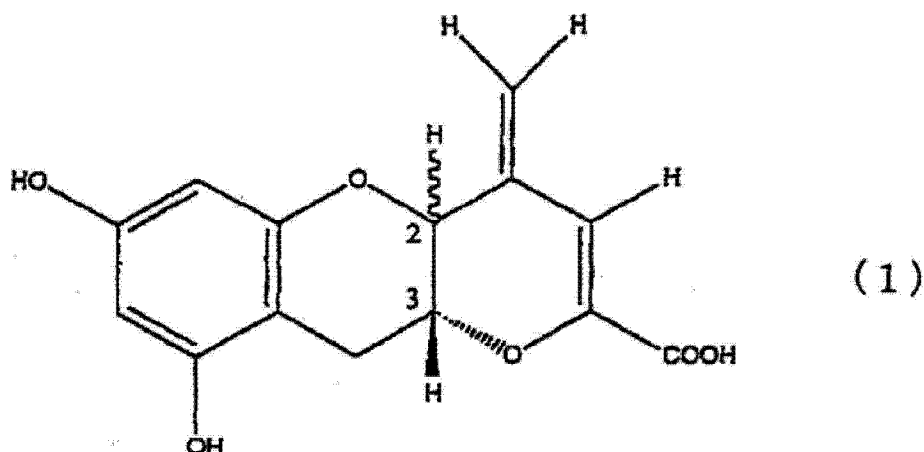
[0015] 以及

[0016] 2. 一种用于制造功能性微生物发酵茶提取物的方法,所述功能性微生物发酵茶提取物含有多种提取物和由下述通式(1)表示的多酚衍生物;该方法包括使微生物发酵茶叶经过提取处理;所述微生物发酵茶叶为将茶叶与选自曲霉属的种(PK-1) [*Aspergillus* sp. (PK-1)] (FERM P-21280)、米曲霉属(NBRS4214)的种(A0-1) [*Aspergillus oryzae* (NBRS 4214) sp. (A0-1)]、泡盛曲霉属(NBRS 4122)的种(SK-1) [*Aspergillus awamori* (NBRS 4122) sp. (SK-1)] 和散囊菌属的种(KA-1) [*Eurotium* sp. (KA-1)] (FERM P-21291)的一种一起培养而获得;或者一种用于制造富含由下述通式(1)表示的多酚衍生物的功能性发酵茶提取物的方法,该方法包括将由下述通式(1)表示的多酚衍生物添加到所述发酵茶提取

物中：

[0017] [化学式 3]

[0018]



[0019] 本发明进一步涉及功能性微生物发酵茶提取物以及用于制造功能性微生物发酵茶提取物的方法,以及包含所述功能性微生物发酵茶提取物的加工食品等;其中,获得的多种提取物包括没食子酸(gallic acid)、没食子儿茶精(gallocatechin)、表没食子儿茶素(epigallocatechin)、儿茶酸(catechin)、表儿茶素(epicatechin)、表没食子儿茶酚没食子酸酯(epigallocatechin gallate)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate)以及山奈酚三糖苷(kaempferol triglycoside)。

[0020] 本发明的有益效果

[0021] 本发明可以提供一种功能性微生物发酵茶提取物,以及包括该提取物的食品、饲料等;所述功能性微生物发酵茶提取物具有,例如降低内脏脂肪和增加脂联素以及表现特定生理活性作用的功能。富含通式(1)化合物的提取物具有较高的、有益的生物活性,可以用于多种用途。

附图说明

[0022] 图 1 为显示对本发明实施例的微生物发酵茶提取物进行高效液相色谱(HPLC)分析的结果的分析图。

[0023] 图 2 为微生物发酵茶(RS 茶)的 HPLC 曲线图,在图中,

[0024] 1:没食子酸(gallic acid)的峰,

[0025] 2:(+)-没食子儿茶精(gallocatechin)(GC)的峰,

[0026] 3:(-)-表没食子儿茶素(epigallocatechin)(EGC)的峰,

[0027] 4:(+)-儿茶酸(catechin)(C)的峰,

[0028] 5:咖啡因(caffeine)的峰,

[0029] 6:表没食子儿茶酚 3-O-没食子酸酯(epigallocatechin 3-O-gallate)(EGCG)的峰,

[0030] 8:表儿茶素 3-O-没食子酸酯(epicatechin 3-O-gallate)(ECG)的峰,

[0031] RS-3:根据本发明的顺式多酚衍生物(化合物(2))的峰,以及

[0032] RS-4:根据本发明的反式多酚衍生物(化合物(3))的峰。

[0033] 图 3 为在多种茶品种(5 种品种:绿茶、乌龙茶、红茶、中国产普洱茶以及 RS 茶)中含有的成分的液相色谱-飞行时间质谱联用(LC-TOF/MS)分析图;

[0034] A:在 5 种茶品种中含有的分子量小于等于 1000 的成分的图

[0035] B:仅在除 RS 茶外的 4 种茶品种中含有的成分的图。

[0036] 图 4 为在多种茶品种(5 种品种:绿茶、乌龙茶、红茶、中国产普洱茶以及 RS 茶)中含有的成分的液相色谱-飞行时间质谱联用(LC-TOF/MS)分析图;

[0037] A:仅在 RS 茶中含有的成分的图,以及

[0038] B:在 RS 茶中(横坐标)和在其他 4 种茶品种(纵坐标)中所含有成分的对比图。

[0039] 图 5 为泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 的脂联素分泌促进活性的分析结果。

[0040] A 和 B:第一运行(run)的结果,

[0041] C 和 D:第二运行的结果,以及

[0042] E 和 F:第三运行的结果。

[0043] A, C 和 E:蛋白免疫印迹图。

[0044] 图 6 为泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 的脂联素分泌促进活性的分析结果以及显示添加泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 后分泌的脂联素的量与经过的时间之间的关系。

[0045] 图 7 为泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 的 PTP1B 表达抑制活性的分析结果(第一运行(first run))。

[0046] A 和 B:PTP1B 表达水平的分析结果,以及

[0047] C 和 D: α -微管蛋白的量的分析结果。

[0048] A 和 C:蛋白免疫印迹图。

[0049] 图 8 为泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 的 PTP1B 表达抑制活性的分析结果(第二运行)。

[0050] A 和 B:PTP1B 表达水平的分析结果,以及

[0051] C 和 D: α -微管蛋白的量的分析结果。

[0052] A 和 C:蛋白免疫印迹图。

[0053] 图 9 为泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 的 PTP1B 表达抑制活性的分析结果(第三运行)。

[0054] A 和 B:PTP1B 表达水平的分析结果,以及

[0055] C 和 D: α -微管蛋白的量的分析结果。

[0056] A 和 C:蛋白免疫印迹图。

[0057] 图 10 为泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 的 PTP1B 表达抑制活性的分析结果。

[0058] D:三个运行的结果的总结。

[0059] 图 11 为泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 的 PTP1B 表达抑制活性的分析结果。

[0060] 其显示添加泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 后 PTP1B 表达水平与经过的时间之间的关系。

具体实施方式

[0061] 如与本申请人的申请相关的上述日本特开 2008-263831 号公报所述,上述曲霉属的种(PK-1) [*Aspergillus* sp. (PK-1)] 已经登记,登记编号为 FERM P-21280。

[0062] 此外,现有技术中也已知米曲霉属(NBRS 4214) 的种(A0-1) [*Aspergillus oryzae*(NBRS 4214) sp. (A0-1)]、泡盛曲霉属(NBRS 4122) 的种(SK-1) [*Aspergillus awamori*(NBRS 4122) sp. (SK-1)] 和散囊菌属的种(KA-1) [*Eurotium* sp. (KA-1)] (FERM P-21291)。

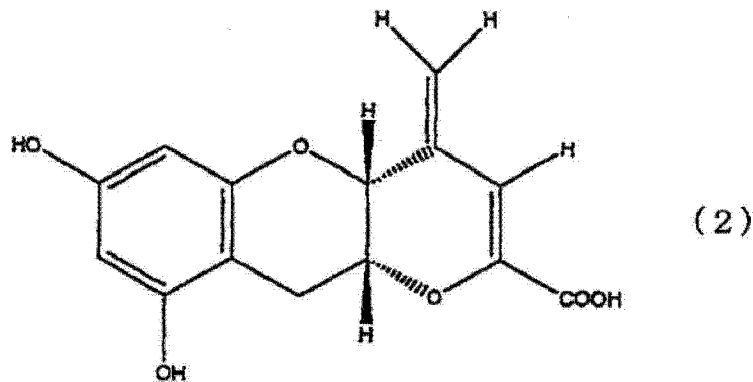
[0063] 由上述制造方法获得根据本发明的多酚衍生物和多种提取物。通过 HPLC 分析检测从微生物发酵茶叶中提取的提取物并确认它们。

[0064] 附图的图 1 显示分析图的一个实例,该分析图显示通过 HPLC 分析的所述提取物分析结果。此外,在该分析图中,1 表示没食子酸的峰,2 表示没食子儿茶精(gallocatechin) (GC) 的峰,3 表示表没食子儿茶素(epigallocatechin) (EGC) 的峰,4 表示儿茶酸(catechin) (C) 的峰,5 表示咖啡因的峰,6 表示表没食子儿茶酚没食子酸酯(epigallocatechin gallate) (EGCG) 的峰,7 表示山柰酚三糖苷(kaempferol triglycoside) (KTG) 的峰,8 表示表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate) (ECG) 的峰,A 表示根据本发明的顺式多酚衍生物的峰,B 表示根据本发明的反式多酚衍生物的峰。

[0065] 此外,本发明的多酚衍生物具有立体异构体,其存在两种形式:如上所述的顺式和反式。所述顺式由如下结构式(2)所示:

[0066] [化学式 4]

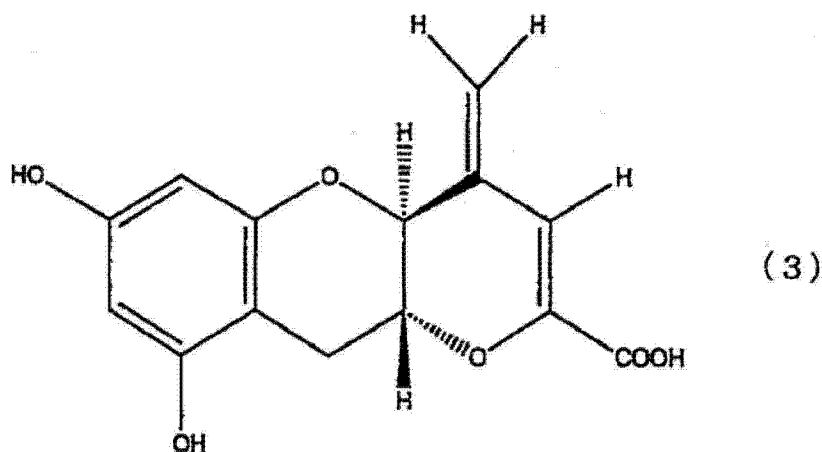
[0067]



[0068] 此外,所述反式由如下结构式(3)所示:

[0069] [化学式 5]

[0070]



[0071] 为了制造本发明的多酚衍生物和多种提取物,通常可以用任何品种或国家的茶(*Camellia sinensis* L.)的叶作为培养材料。例如,使用一级茶(first-grade tea)、二级茶或甚至三级茶。

[0072] 此外,对制造本发明的微生物发酵茶叶,为阻止由茶叶中含有的酶介导的氧化反应等的目的,优选在发酵处理之前进行热处理。可以使用通过使采收的茶叶直接经过热处理而获得的茶叶。加热的方法没有特别地限制,可以使用任何方法或设备,例如使用锅的直接加热,使用电、燃气等作为热源的各种烘干机的加热,使用蒸汽的蒸汽热烘干机,在太阳下烘干等,只要其是一种通过对茶叶热处理可以灭活酶的方法。

[0073] 在制造本发明的微生物发酵茶叶中,可以使用,例如,杀青(fixation)后的茶叶,初级揉捻和干燥后的茶叶,揉破(crumpling)后的茶叶,中级揉捻和干燥后的茶叶,最终揉捻和干燥后的茶叶或者传统的蒸青茶(Sencha)制造加工中干燥后的茶叶(中级绿茶)作为通过加热已经灭活酶的茶叶。

[0074] 对于茶叶的微生物发酵处理,必要保持原料茶叶处于与在其中接种的微生物进行发酵的条件下。可以使用水含量已经调整到大约15重量%至80重量%水的茶叶。优选地,使用含有30重量%至40重量%水的茶叶。例如,由于中级揉捻和干燥后的茶叶含有大约25重量%至40重量%水,在本发明的发酵处理中使用中级揉捻和干燥后的茶叶无需调整其水含量。

[0075] 本发明的发酵温度优选为大约15°C至50°C。发酵处理通常进行1至60连续日,优选3至15连续日,其仍然比传统的后发酵茶的制造所需的周期短。因此,可以实现有效率的制造。优选通过适当地选择茶叶的水含量、发酵温度、发酵周期等进行微生物发酵处理,以使本发明的有益成分的产量在微生物发酵处理过程中尽可能的提高。

[0076] 在培养之前,茶叶通常经灭菌,例如,通过在高压灭菌器中121°C对茶叶灭菌15分钟进行灭菌。

[0077] 在培养之后通过干燥培养的茶叶而进行本发明的制造方法。

[0078] 在提取方法中,通常使用水、亲水性有机溶剂或所述亲水性有机溶剂的水溶液。优选地,使用乙醇水溶液、乙醇或水。

[0079] 例如,使用柱层析的方法从由提取处理获得的提取物中获得本发明的多酚衍生物和各种提取物。

[0080] 具有由通式(1)(化合物(1))表示的化学结构的新颖的多酚衍生物由如下方法获

得:例如,使发酵茶叶经提取处理以分离由通式(1)表示的多酚衍生物,所述发酵茶叶通过将预定的微生物(包括曲霉属的种(PK-1) [Aspergillus sp. (PK-1)])与茶叶一起培养获得;和/或使(-)-表没食子儿茶酚 3-O-没食子酸酯(epigallocatechin 3-O-gallate) (EGCG)和/或其 C-2 差向异构体与曲霉属的种(PK-1) [Aspergillus sp. (PK-1)] 等或其提取物接触而形成由通式(1)表示的多酚衍生物;富含化合物(1)的提取物可以通过将化合物(1)即泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 和/或泰阿戴诺录 B (teadenol B, テアデノール B) 添加到多种提取物(包括含有浓缩的化合物(1)的提取物)中而获得;所述多种提取物通过使发酵茶叶经提取处理而获得。富含化合物(1)的发酵茶提取物具有如下优点,例如,可以进一步地预期由化合物(1)发挥的生物活性。

[0081] 具有由通式(1)(化合物)表示的化学结构的新颖的多酚衍生物是一种具有有益的生理活性/生物活性的物质,并且已经确认具有例如脂联素分泌促进作用以及蛋白酪氨酸磷酸酶-1B (protein tyrosine phosphatase-1B, PTP1B) 表达抑制作用。因此,含有化合物(1)的提取物,尤其,富含化合物(1)的提取物或含有浓缩的化合物(1)的提取物在多种应用中具有潜力,例如制药、食品成分、动物饲料成分、化妆品成分以及测试试剂。

[0082] 已知脂联素是由脂肪细胞分泌的分泌蛋白。其血液浓度远大于普通激素的血液浓度,据称达到 $\mu\text{g/ml}$ 级别。作为脂联素的作用已经报道多种作用,例如基于肝 AMPK (AMP-活化蛋白激酶) 的活性,增强胰岛素敏感性,抑制动脉硬化,抗炎作用以及抑制心肌肥大。已知血液脂联素浓度与内脏脂肪的量成反向关联。对于其机制尽管大多数尚待阐明,例如,肥胖的脂肪组织的肿瘤坏死因子 α (TNF α) 增加,据认为 TNF α 对此负有部分责任。

[0083] 已经报道:更多的肥胖个体具有较低量的分泌的脂联素;内脏脂肪积累导致分泌的脂联素的量降低;通过保持血液脂联素的量在某个水平或更高可以延缓动脉硬化的发展;以及所述脂联素表现出氧化胁迫抑制作用。因此,利用其脂联素分泌促进活性,本发明的含有化合物(1)的提取物可以用在糖尿病的改善、糖尿病发病的预防、抗癌应用、生活方式相关疾病(代谢综合症)的改善、生活方式相关疾病发病的预防、肥胖的改善、高血压的改善、高血压发病的预防、动脉硬化的改善、动脉硬化发病的预防等,以及用作药物、食品或食品添加剂、调味品、健康补充剂、补品、功能性食品、动物饲料、化妆品或化妆品添加剂、用于药物开发的试剂、用于生物活性检测的试剂等。

[0084] 蛋白酪氨酸磷酸酶(PTPs)是一组酶(酪氨酸去磷酸化酶组),其特异性地使具有磷酸化的酪氨酸残基的蛋白去磷酸化,并且是控制细胞内信号转导的重要的分子。因此,这些酶被认为参与多种疾病,并且已经报道作为其典型的 PTP 的 PTP1B。1988 年从人类胎盘中鉴定 PTP1B,并且由于 PTP1B 牵涉胰岛素抗性、糖尿病或肥胖而受到关注。由于 PTP1B 核苷酸序列中的单核苷酸多态性(SNPs)影响胰岛素的敏感性或血糖浓度,PTP1B 也被认为在胰岛素的敏感性或血糖浓度的调控中发挥重要作用。通过胰岛素调控血糖浓度的主要组织是肝、肌肉和脂肪。对这些组织或细胞特异性的 PTP1B 的过表达或敲除导致胰岛素敏感性或血糖浓度显著的变化。考虑到,与正常小鼠相比,PTP1B 的表达水平增加大约 7 倍,尤其在大量给予高脂膳食的肥胖小鼠模型的脂肪组织中,并且在肝或肌肉中表达水平为大约 1.5 至 2 倍,与肥胖相关的胰岛素抗性可能很大程度上受胰岛素敏感性减少的影响,该胰岛素敏感性减少由脂肪细胞中 PTP1B 的表达增加引起。

[0085] 对抗这种背景,希望开发靶向 PTP1B 的药物,例如,PTP1B 抑制剂。然而,在现状

下,这样的开发难以实现。同时,最近已经报道,红葡萄酒中含有的白藜芦醇通过降低肝中 PTP1B 的表达水平而提高胰岛素敏感性,说明通过控制 PTP1B 的活性或表达,食品成分可以改善代谢综合症的可能性。近年来,也已经发现 PTP1B 参与乳腺癌的发展以及其转移到肺部,PTP1B 再次受到关注。因此,据认为抑制 PTP1B 表达和活性的食品成分不仅改善代谢综合症而且在涉及 PTP1B 的疾病方面,例如癌症方面,潜在地发挥极大的作用。

[0086] 通过利用本发明含有抑制 PTP1B 表达和活性的化合物(1)的提取物的活性,其中牵涉 PTP1B 的胰岛素作用的负调控、致使乳腺癌发展的细胞间信号的介导等可以受到控制。除上述应用外,含有本发明的化合物(1)的提取物,也可以用于来自食品衍生成分的能够负调控糖尿或乳腺癌的物质的开发。

[0087] 实施例

[0088] 如下实施例用于具体说明本发明优选的实施方式,这些实施例不用于限制本发明。

[0089] 实施例 1

[0090] 曲霉属的种(PK-1) [*Aspergillus* sp. (PK-1)] 被接种到 200g 在高压灭菌器中 121°C 灭菌 15 分钟的中级揉捻 / 烘干的绿茶中,然后在 30°C 培养 7 天。

[0091] 因此获得的培养后的茶叶用热空气在 80°C 下干燥。

[0092] 2.0g 干燥的茶叶用研钵粉碎,然后经 30ml 60% 的乙醇水溶液的提取处理。由此分离的提取物过 HPLC (柱:TOSH ODS 80Ts (4.6mm i.d. × 250mm), 流动相:1% 乙酸-CH₃CN(90:10 → 20:80, 30 分钟内),流速:0.6ml/min,柱温:40°C,检测:280nm (UV))。

[0093] 获得的分析结果如表 1 所示。

[0094] [表 1]

[0095] 表 1 多种茶品种的的成分的含量(%干重)如下表所示:

[0096]

化合物	PK-1	AO-1	SK-1	KA-1
	%干重			
G	1.05	8.52	9.95	5.21
GC	2.51	2.98	2.58	3.15
EGC	1.32	0.95	1.30	0.48
C	0.22	0.20	0.24	0.15
咖啡因	2.58	2.48	2.78	2.40
EC	0.03	0.05	0.07	0.05
EGCG	0.46	1.14	0.75	3.53
EGC	0.08	0.10	0.14	0.98
顺式的通式(1)的多酚	1.01	1.03	1.79	0.23
反式的通式(1)的多酚	0.23	0.16	0.37	0.02

[0097] G:没食子酸(gallic acid)

[0098] GC:(+)-没食子儿茶精(galocatechin)

[0099] EGC:(-)-表没食子儿茶素(epigallocatechin)

[0100] C:(+)-儿茶酸(catechin)

[0101] EC:(-)-表儿茶素(epicatechin)

[0102] EGCG:(-)-表没食子儿茶酚 3-0-没食子酸酯(epigallocatechin3-0-gallate)

[0103] ECG:(-)-表儿茶素 3-0-没食子酸酯(epicatechin 3-0-gallate)

[0104] 此外,通过核磁共振光谱分析由此分离的新颖的物质,并且这些物质因此被确认为具有由通式(1)所示的化学结构的新颖的多酚衍生物,这些物质为立体异构体,其包含由结构式(2)表示的顺式和由结构式(3)表示的反式。

[0105] 此外,作为试验结果,已证实由结构式(2)表示的新颖的多酚衍生物具有减少内脏脂肪以及增加脂联素的功能。

[0106] 实施例 2

[0107] 在茶园(日本静冈静冈市清水区薮北茶园)从每个新的嫩枝上采摘芽和叶。根据加工茶的标准方法进行蒸烘、初级揉捻和干燥、揉破、中级揉捻和干燥。然后其中 1000g 茶储存在冰箱中(-20℃)。1000g 室温下解冻的绿茶与 100g 预培养的 PK-1 混合,所得混合物在大约 25℃下培养 2 周和 4 周,培养中每几天搅拌一次(处理 1)。

[0108] 在本文中,所述预培养的 PK-1 通过将 PK-1 接种到 50g 在高压灭菌器中 121℃灭菌 15 分钟的中级揉捻(secondarily rolled)/干燥的绿茶中,然后在 30℃培养 7 天获得。

[0109] 随后,将 2000ml 热水(95℃)加入到 1000g 通过培养由此获得的微生物发酵茶中,然后将混合物静止在室温下 2 小时以进行提取物的提取处理。提取处理之后,将茶叶过滤获得 750ml 提取物。

[0110] 获得的 750ml 提取物与 750g 糊精混合,然后喷雾干燥这种浆状混合物。

[0111] 喷雾干燥获得的粉末的成分分析结果如下表 2 所示。

[0112] 由于其粉末形式,喷雾干燥产品具有令人满意的保存期,易于操作并且也利于将其加入到其他物质中。

[0113] [表 2]

[0114] 表 2

[0115]

成分	喷雾干燥产品中每种成分的量 (g/100g)
没食子酸 (gallic acid)	0.40
GC	0.36
EGC	0.92
儿茶酸 (catechin)	0.07
EC	0.02
EGCG	0.16
EGC	0.05
咖啡因	0.55
泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A)	0.12
泰阿戴诺录 B (teadenol B, テアデノール B)	0.05
糊精	97.30

[0116] 接着,用以本发明的喷雾干燥的产品(以下将本发明的喷雾干燥产品称为“SDP”)添加的饲料喂食大鼠并饲养大鼠。结果如下。

[0117] (1) 用于试验的饲料的制备

[0118] 根据表 3 所示的组合物制备三种饲料:添加 1% 的上述获得的本发明的喷雾干燥的产品(SDP)的饲料(1% 添加组),添加 3% 的 SDP 的饲料(3% 添加组),以及未添加的饲料(对照组)。

[0119] [表 3]

[0120] 表 3. 膳食组合物(g/kg 膳食)

[0121]

	对照组	1% 添加组	3% 添加组
酪蛋白	200	200	200
玉米油	50	50	50
猪油	50	50	50
玉米淀粉	150	150	150
纤维素	50	50	50
AIN-76 矿物混合物	35	35	35
AIN-76 维生素混合物	10	10	10

DL- 蛋氨酸	3	3	3
胆碱酒石酸氢盐	2	2	2
SDP*	0	10	30
蔗糖	450	440	420

[0122] SDP* :本发明实施例的喷雾干燥产品。

[0123] (2) 实验动物(大鼠)和饲养条件

[0124] 使用 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 雄性大鼠(大冢制药德岛研究所)作为肥胖大鼠模型。18 只 4 周龄 OLETF 大鼠分别放入笼子中,以市场上可买到的固体饲料(NMF 型,东方酵母公司,东京)初步饲养 5 天。然后,将大鼠分成 3 组,每组包括 6 只。

[0125] 所述大鼠给予表 3 中所示的饲料(实验膳食)并且以配对喂养方式(pair feeding)饲养 28 天。

[0126] 在此期间,允许大鼠自由饮水。对于实验的膳食,根据 AIN-76 组合物的合成膳食用作对照膳食,该合成膳食含有作为膳食脂肪的玉米油和猪油的每种各 5%。

[0127] 将 1.0% 或 3.0%SDP 粉末添加到对照膳食中并用蔗糖调整其到 100% 获得的合成膳食作为试验膳食。

[0128] 饲养环境设定为光周期 12 小时(从上午 8 点到下午 8 点光照),包括室温 22°C 至 24°C。在饲养阶段的最后一天,大鼠禁食一夜(0:00 至 9:00),在苯巴比妥麻醉下从腹部大动脉采集血液。

[0129] 从每只大鼠中切除脂肪组织(附睾的、肾周围的以及肠系膜的)和肝,然后称重。通过离心制备血清,并使用市场上可买到的试剂盒测定每种脂质的浓度和脂联素的浓度。通过 Folch 等人的方法从所述肝中提取脂质,然后测量每种脂质的浓度。此外,将部分肝匀浆,然后按常规方法分离成线粒体、细胞质、微粒体部分。对微粒体部分的肉毒碱棕榈酰转移酶(CPT)的活性和细胞质部分的脂肪酸合成酶(FAS)的活性进行测定。

[0130] (3) 统计处理

[0131] 根据单因素方差分析(ANOVA),之后 Tukey-kramer 多重分析方法,对获得的结果进行显著性差异检验($p < 0.05$)。

[0132] (4) 结果和讨论

[0133] (a) 体重和食物消耗

[0134] 大鼠的体重和食物消耗如表 4 所示。尽管证实在组间食物消耗和最终体重没有差异,但是接受 3%SDP 的组与其他两组相比趋向具有较轻的最终体重。

[0135] 与其他两组相比,接受 3%SDP 的组饲料转化率显示了较低的值。

[0136] (b) 肝和脂肪组织的重量

[0137] 基于本发明的喷雾干燥产品(SDP)的消耗,尽管每单位体重的肝重量显示轻微降低趋势,但没有显著效果。对于此次分析的所有脂肪组织(附睾的、肾周围的以及肠系膜的),白色脂肪组织的重量以依赖 SDP 消耗的方式显著降低(表 4)。表明此次使用的 SDP 含有具有减少身体脂肪作用的成分。

[0138] [表 4]

[0139] 表 4. SDP 消耗对体重增加量、食物消耗量以及各个组织重量的影响

[0140]

	对照组	1%添加组	3%添加组
起始体重 (g)	117 ± 5	117 ± 3	116 ± 4
最终体重 (g)	307 ± 14	320 ± 2	295 ± 6
食物消耗 (g/天)	20.6 ± 0.1	20.6 ± 0.1	19.6 ± 0.4
饲料转化率 (g 增加/g 膳食)	0.364 ± 0.006 ^a	0.365 ± 0.006 ^a	0.339 ± 0.004 ^b
组织重量 (g/100g)			
肝	4.43 ± 0.28	4.08 ± 0.06	3.99 ± 0.08
附睾组织	1.77 ± 0.05 ^a	1.48 ± 0.03 ^b	1.31 ± 0.05 ^c
肾周围组织	2.94 ± 0.12 ^a	2.30 ± 0.07 ^b	2.00 ± 0.10 ^b
肠系膜的组织	1.52 ± 0.07 ^a	1.22 ± 0.03 ^b	0.985 ± 0.045 ^c

[0141] 平均值 ± 标准方差 (n=6), 不同符号间有显著性差异 ($p < 0.05$)

[0142] (c) 血清成分分析

[0143] 血清总胆固醇浓度没有表现出依赖于 SDP 消耗的稳定趋势, 但是 3% 添加组倾向于高 (见表 5)。血清 HDL- 胆固醇浓度依赖于 SDP 消耗方式倾向于高, 显示在 3% 添加组中比其他两组显著更高的值。

[0144] 尽管 SDP 消耗对血清甘油三酯浓度的影响尚未明确, 在 3% 添加组中, 血清游离脂肪酸浓度显示显著高的值。这表明, 在接受 SDP 组中脂肪组织中脂类分解增强 (从脂肪组织中释放游离脂肪酸) 可能导致每个脂肪组织的重量的减少, 如表 2 所示。

[0145] 血清脂联素浓度被证实依赖于 SDP 消耗有增加的趋势, 但是, 不存在统计学上的显著变化 (表 5)。

[0146] [表 5]

[0147] 表 5. SDP 消耗对血清脂质和脂联素浓度的影响

[0148]

	对照组	1% 添加组	3% 添加组
总胆固醇 (mg/dL)	167 ± 6 ^{ab}	147 ± 6 ^a	185 ± 7 ^b
HDL- 胆固醇 (mg/dL)	82.3 ± 5.1 ^a	85.6 ± 2.4 ^a	101.1 ± 3.3 ^b
HDL/ 总胆固醇的比值	0.492 ± 0.022 ^a	0.586 ± 0.027 ^b	0.548 ± 0.017 ^{ab}

磷脂(mg/dL)	264±8 ^a	220±9 ^b	239±14 ^{ab}
甘油三酸酯(mg/dL)	97.5±10.9	85.0±10.4	93.2±16.8
游离脂肪酸(mmol/dL)	484±49 ^a	493±24 ^a	641±33 ^b
脂联素(μg/dL)	4.35±0.18	4.97±0.31	5.32±0.51

[0149] 平均值 ± 标准方差(n=6),不同符号间有显著性差异(p < 0.05)

[0150] 表 4 中证实由 SDP 消耗引起的每个脂肪组织重量的减少。这表明脂肪细胞的大小减少,这似乎与血清中脂联素浓度的增加有关。由于证实了血清脂联素浓度增加的作用,虽然轻微,表明 SDP 成分起到作为预防生活方式相关疾病的潜在因子的作用。

[0151] (d) 肝脂质浓度和酶活性

[0152] 肝甘油三酯浓度以依赖于 SDP 消耗的方式降低,在 3% 添加组中显示比对照组显著更低的值(表 6)。

[0153] [表 6]

[0154] 表 6. SDP 消耗对肝脂质浓度和脂肪酸代谢相关酶活性的影响

[0155]

	对照组	1%添加组	3%添加组
脂质浓度 (mg/g 肝)			
胆固醇	2.42 ± 0.10	2.47 ± 0.08	2.56 ± 0.09
磷脂	31.0 ± 0.5 ^a	31.9 ± 0.5 ^{ab}	34.0 ± 0.6 ^b
甘油三酯	18.5 ± 1.9 ^a	13.7 ± 1.5 ^{ab}	12.4 ± 0.5 ^b
酶活性 (nmol/min/mg 蛋白)			
FAS ^{*1}	27.8 ± 2.2 ^a	22.8 ± 0.9 ^{ab}	17.5 ± 1.2 ^b
CPT ^{*2}	4.00 ± 0.32	4.42 ± 0.49	4.28 ± 0.24

[0156] ^{*1}FAS: 脂肪酸合成酶(肝细胞质部分)

[0157] ^{*2}CPT: 肉毒碱棕榈酰转移酶(肝线粒体部分)

[0158] 平均值 ± 标准方差(Mean ± SE)(n=5 或 6),不同符号间有显著性差异(p < 0.05)

[0159] 同样,在肝细胞质中 FAS 活性也以依赖 SDP 消耗的方式降低(表 6),这似乎是肝甘油三酯浓度降低的一个原因。

[0160] 另一方面,在这些组中,观察到肝线粒体中 CPT 活性没有差别。通常已知肝的脂肪酸 β 氧化能力受脂联素影响。然而,在这些实验条件下假定由 SDP 引起的血清脂联素浓度的增加不影响肝 CPT 活性。

[0161] 在该实验中,证实了由 SDP 消耗引起的脂肪组织的重量下降和肝甘油三酯浓度降低的作用,并且观察到血清脂联素浓度增加,虽然轻微。

[0162] 这些结果显示,从脂肪组织中释放游离脂肪酸以及降低肝中脂肪酸合成能力的作用,为其一个原因。

[0163] 因此,在这个实验中,证实在 3% 的添加组中饲料转化率显著降低。

[0164] 实施例 3

[0165] [用 HPLC 的成分分析]

[0166] 使用经过曲霉属的种(*Aspergillus* sp.) (PK-1, FERM P-21280) 发酵处理的茶叶(RS 茶)。将 80℃ 的热水(蒸馏水, 30 毫升)加入到干燥的发酵茶叶(4.5 克)中, 并使所述混合物在室温下静置过夜以进行提取处理。过滤后, 获得提取物(滤液)。滤液(2.5 μl)经 HPLC 分析。HPLC 分析中使用的条件如下:

[0167] 柱:TOSH ODS 80Ts (4.6mm i.d. × 250mm)

[0168] 流动相:1mM TBA (四丁铵)水溶液(pH 值 2.9)-CH₃CN(90:10 → 20:80, 30 分钟内)

[0169] [TBA 溶液用含有约 0.1% 醋酸的水溶液调整 pH 至 2.9]

[0170] 流速:0.6ml/分钟, 柱温:40℃,

[0171] 检测:280nm (UV)

[0172] HPLC 洗脱模式如图 2 所示。

[0173] 在图 2 中 RS 茶的多种成分的含量(每 % 干重)如下:

[0174] 1:没食子酸(1.09% 干重)

[0175] 2:GC [(+) - 没食子儿茶精(gallocatechin)] (3.96% 干重)

[0176] 3:EGC [(-) - 表没食子儿茶素(epigallocatechin)] (2.14% 干重)

[0177] 4:C [(+) - 儿茶酸(catechin)] (0.21% 干重)

[0178] 5:咖啡因(1.92% 干重)

[0179] 6:EGCG [(-) - 表没食子儿茶酚 3-0-没食子酸酯(epigallocatechin3-0-gallate)] (0.24% 干重)

[0180] 8:ECG [(-) - 表儿茶素 3-0-没食子酸酯(epicatechin 3-0-gallate)] (0.14% 干重)

[0181] RS-3:0.54% 干重[化合物(2)]

[0182] RS-4:0.06% 干重[化合物(3)]

[0183] 在本文中, EC [(-) 表儿茶素(0.49% 干重)] 在图 2 中未显示。

[0184] [用 LC-TOF/MS 的成分分析]

[0185] 如实施例 1 中经过曲霉属的种(*Aspergillus* sp.) PK-1 发酵处理的微生物发酵茶(RS 茶)中的成分与多种茶品种(绿茶、乌龙茶、红茶、中国产普洱茶)中成分进行比较。将 80℃ 热水(蒸馏水, 30 毫升)加入到这 5 个茶品种的每种中(例如各 4.5 克), 每种混合物在室温下静置过夜以进行提取处理。过滤后, 获得提取物(滤液)。用 LC-TOF/MS 进行成分分析。在 LC-TOF/MS 分析中使用的 HPLC 和 TOF/MS 条件如下:

[0186] HPLC (安捷伦 1100 系列):

[0187] 柱:采用 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱, 内部直径 2.1mm × 长度 100mm, 粒度:3.5 μm

[0188] 柱温:40℃, 流速:0.2mL/min

[0189] 流动相:0.1% 甲酸 + 10mM AcONH₄ (A), 乙腈 CH₃CN (B)

[0190] 梯度条件:A:B (时间)

[0191] 95:5 (0min) → 50:50 (30min) → 10:90 (40min) → 10:90 (45min)

[0192] [→ 95:5 (50min) → 95:5 (60min)]

[0193] TOF/MS (安捷伦 G 1969A)

[0194] 电离 :ESI, 正

[0195] 干燥气体 :氮气, 350℃时, 10L/min

[0196] 雾化器 :氮气, 50 磅 / 平方英寸 (psig)

[0197] 毛细管电压 4000V

[0198] 碎裂电压 :100V

[0199] 扫描范围 :80 至 1200 (m/Z)

[0200] 参照质量 :121. 0509 和 922. 0098

[0201] 获得的结果如图 3 和图 4 所示。如图 4B 所示的成分 RS-3 是 RS 茶叶所含的特殊成分之一, 被推定为一种新的物质。这种成分最终确定为相当于如下所述的分离物 A。RS-3 以及 RS-1、RS2 和 RS-2', 似乎为 RS 茶叶中所含的特殊成分, 它们具有与 RS-2 相同的组成。

[0202] 实施例 4

[0203] [通过柱层析提取和分离新颖的成分(化合物(2)和(3))]

[0204] [处理 1]

[0205] 由于成分 RS-3 (即, 分离物 A) 被推定为一种新颖的物质, 试图从茶叶中提取并分离这种成分。在所述分离过程中, 具有与分离物 A 相同的组成的分离物 B 也被分离。分离这些新颖的成分的步骤如下所示。

[0206] 使用如实施例 1 所述的经曲霉属的种 (*Aspergillus sp.*) (PK-1, FERM P-21280) 发酵处理的茶叶。207g 干燥的茶叶经 80% 的乙醇(800ml) 过夜提取, 之后通过纱布过滤。残留的茶叶经 800ml 80℃ 的热水过夜提取, 之后再次过滤。用蒸发器浓缩每次的滤液, 然后将滤液应用于 DIAION 柱(4×33cm, 三菱化学公司), 之后用甲醇水混合溶液洗脱(0%-20%-40%-60%-100%, 每次 500ml)。浓缩 40% 甲醇洗脱部分, 然后应用于 Sephadex LH20 柱(4×50cm, 玛西亚公司), 之后用 60% 甲醇水溶液洗脱以获得两部分。

[0207] 通过结晶从部分 1 获得分离物 A (化合物(2), 290mg) (溶剂 :水)。

[0208] 部分 2 应用于葡聚糖凝胶(Sephadex) LH20 柱(4×32cm, 法玛西亚公司), 之后用 80% 乙醇水溶液洗脱以获得含有 RS-4 的部分。浓缩该部分, 然后应用制备 C18 柱(Preparative C18) (3×20cm, 沃特斯公司 (Waters Corporation)), 之后用甲醇水混合溶液洗脱(0%-20%-40%-60%-100%, 每次 300ml) 以获得 20% 甲醇洗脱部分。浓缩该部分, 然后应用于富士胶十八碳柱(Fuji-gel ODS) (3×19cm, Fujigel Hanbai 公司), 之后用甲醇水混合溶液洗脱(0%-20%-40%-60%-100%, 每次 300ml)。将 20% 甲醇洗脱部分浓缩并结晶(溶剂 :水) 以获得分离物 B (化合物(3), 43mg), 其相当于成分 RS-4。

[0209] [处理 2]

[0210] 使用如上所述的经曲霉属的种 (*Aspergillus sp.*) (PK-1, FERM P-21280) 发酵处理的微生物发酵茶叶。干燥的茶叶(207g) 经 80% 乙醇(800ml) 在室温下提取 12 小时。将获得的提取物真空浓缩。接着, 将获得的浓缩的提取物(37g) 应用于 DIAION HP20SS 柱(三菱化学公司), 之后用甲醇水混合溶液(0 : 0 → 100 : 0) 提取。

[0211] 获得四个部分 :部分 1 (5g)、部分 2 (1g)、部分 3 (17g) 以及部分 4 (3g)。部分 3 应用于 Sephadex LH20 柱(法玛西亚公司), 之后用 60% 甲醇水溶液洗脱以获得两个部分(部分 3-1 和部分 3-2)。

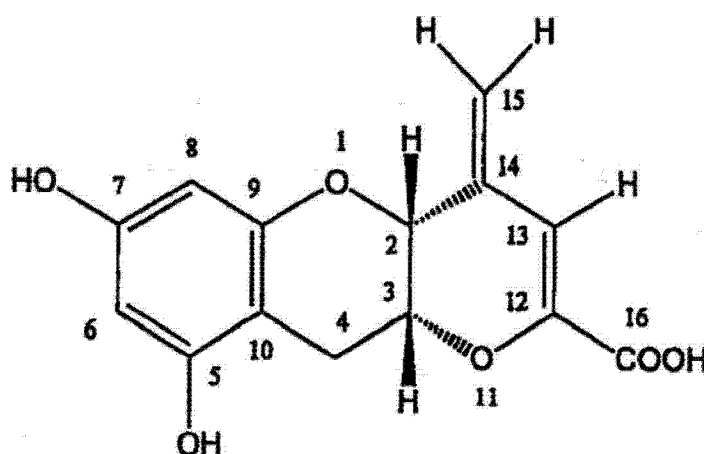
[0212] 部分 3-1 (13g) 应用于 ODS-G3 柱 (Fujigel Hanbai 公司), 之后用水和甲醇逐步洗脱处理已获得分离物 A (化合物 (2), 390mg)。

[0213] 部分 3-2 (2.3g) 应用于葡聚糖凝胶 (Sephadex) LH20 柱 (法玛西亚公司), 之后用 80% 的甲醇水溶液洗脱。接着, 将洗脱部分应用于 ODS-G3 柱 (Fujigel Hanbai 公司), 之后用水和甲醇逐步洗脱处理。洗脱部分进一步应用于制备 (Preparative) C18 125Å (沃特斯公司), 之后用水和甲醇逐步洗脱处理以获得分离物 B (化合物 (3) 88mg)。

[0214] 分离物 A 的化学结构通过质谱分析法 (MS)、红外光谱 (IR)、核磁共振分析 (NMR) 等测定。因此, 确定分离物为具有由下面的式子表示的化学结构的化合物:

[0215] [化学式 6]

[0216]



[0217] 如上所述, 这种化合物被称为泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A), 证实可能是一种新的化合物。

[0218] 分离物 A: 白色晶体, mp 235-240°C (分解), $[\alpha]_D^{21} +467.8^\circ$ (C 0.15, 二甲亚砜 (DMSO)), m/z 276.0638, $C_{14}H_{12}O_6$, 核磁共振 (DMSO-d₆): 见表 7。

[0219] IR (KBR) cm^{-1} : 3420, 1700, 1632, 1611, 1386, 1273, 1260, 935。

[0220] [表 7]

[0221] 表 7NMR (DMSO-d₆)

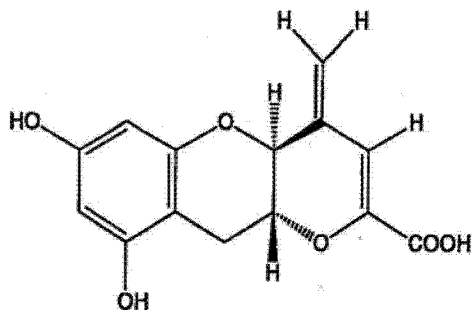
[0222]

位置	δ_C	δ_H	HMBC(1H - ^{13}C)	NOE(1H - 1H)
2	70.9	4.56 (1H, s)	C-13, 14, 15	H-3, 4, 13, 15
3	70.8	4.36 (1H, m)	C-2, 10	H-2, 4
4	24.1	2.76 (2H, m)	C-2, 3, 5, 10	H-2, 3, 8
5	156.3	-		
6	95.6	5.91 (1H, d, J=2.3 Hz)	C-8, 10	H-8, 15
7	156.6	-		
8	94.2	5.64 (1H, d, J=2.3 Hz)	C-6, 10	H-4, 6
9	154.7	-		
10	96.9	-		
12	144.1	-		
13	110.2	6.51 (1H, d, J=0.9 Hz)	C-2, 12, 14, 16	H-2, 15
14	136.5	-		
15	118.0	5.27 (1H, br.s) 5.39 (1H, br.s)	C-2, 13, 14 C-2, 13, 14	H-2, 6, 13, 15 H-2, 13, 15
16	163.2	-		
5-OH		9.00	C-5, 6, 10	
7-OH		9.33	C-6, 7, 8	

[0223] 分离物 B 具有与 teadenol A 相同的分子式 $C_{14}H_{12}O_6$ 并且被确定为具有由下式所表示的化学结构的化合物：

[0224] [化学式 7]

[0225]



[0226] 该化合物被称为泰阿戴诺录 B (teadenol B, テアデノール B)。

[0227] 分离物 B：灰白色晶体，mp 258-275°C (分解)， $[\alpha]_D^{20}$ -27.7° (C 0.18, MeOH)，m/z 276.0640, $C_{14}H_{12}O_6$ ，核磁共振 (CD_3OD)：见表 8。

[0228] [表 8]

[0229] 表 8NMR (CD3OD)

[0230]

位置	δ_c	δ_E	HMBC(^1H - ^{13}C)	NOE(^1H - ^1H)
2	73.2	4.36 (1H, d, J=10.5 Hz)	C-14	H-3, 15
3	75.0	4.01 (1H, m)	C-2, 4	H-2, 4
4	27.1	2.66(1H, dd, J=10.3, 15.7 Hz)	C-3, 9, 10	H-3, 4
		3.20(1H, dd, J=5.9, 15.7 Hz)	C-2, 3, 5, 9, 10	H-3, 4
5	157.7	-		
6	96.9	5.96 (1H, d, J=2.3 Hz)	C-5, 7, 8, 10	
7	158.2	-		
8	95.6	5.91 (1H, d, J=2.3 Hz)	C-7, 9, 10	H-15
9	156.0	-		
10	100.0	-		
12	145.0	-		
13	113.2	6.63 (1H, s)	C-2, 16	H-2, 15
14	138.6	-		
15	113.3	5.33 (1H, s)	C-2, 13	H-2, 13, 15
		5.51 (1H, s)	C-2, 13, 14	H-2, 13, 15
16	166.0	-		

[0231] [泰阿戴诺录(teadenol, テアデノール)的制备]

[0232] EGCG [(-)-表没食子儿茶酚 3-O-没食子酸酯(epigallocatechin 3-O-gallate)] (购自西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)公司, 16mg)溶解于水(20ml), 然后该溶液经高压灭菌处理(121°C, 15min), 高压灭菌处理将几乎 50%的 EGCG 分子转换成其 C-2 差向异构体。在固体培养基(马铃薯葡萄糖琼脂)中传代培养的曲霉属的种(*Aspergillus* sp.) (PK-1, FERM P-21280) (1cm×1cm 片)接种到高压灭菌的含 EGCG 的溶液中(EGCG 和 GCG 的混合物)。所获得的混合物溶液在旋转振荡器(60 转每分钟(rpm))中 25°C 黑暗条件下培养。经过 2 周的培养, 对培养处理所获得的溶液的成分进行分析。该溶液用微孔过滤器(0.45 μm)过滤, 然后经 HPLC。分析中使用的 HPLC 条件如下:

[0233] 柱:TOSOH ODS 80Ts (4.6mm×250mm, ToSoh 公司), 流动相:0.1% 甲酸-CH₃CN (9:1 → 1:4, 30 分钟内), 流速:0.6ml/min, 柱温:40°C, 检测:80nm (UV), 化合物的保留时间(min):EGCG (18.7), GCG (19.8), teadenol A (24.9), teadenol B (27.7)。检测到 62.5±15.6 μg teadenol A 和 24.4±7.3 teadenol B (3 次实验的平均值 ± 标准偏差(mean ± SD))。

[0234] 实施例 5

[0235] [脂联素分泌促进作用]

[0236] 3T3-L1 脂肪细胞可以在 5%CO₂ 环境下在含有 50U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素和 10% 的胎牛血清(FCS)的高糖 DMEM 中生长并保持。3T3-L1 细胞在直径为 3.5cm 的皿中传代培养直到汇合,然后通过存在胰岛素(10 μg/ml)、地塞米松(0.25 μM)和 IBMX (3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)(0.5mM)下再培养两天充分分化成脂肪细胞。将 Teadenol A (10 μM) 或二甲亚砜(DMSO)(载体对照(vehicle control))添加到充分分化的 3T3-L1 脂肪细胞中,并且在 8、24、32 和 48 小时后收集每种培养的上清液。脂联素分泌量通过蛋白免疫印迹法测定。结果如图 5 所示。此图显示了典型的蛋白免疫印迹图并显示三次运行的结果。结果总结在表 9 中。

[0237] [表 9]

[0238] 表 9 总结

[0239]

3 次运行	样品名称		平均值	标准方差
1	Teadenol A	8h	166.0	34.12
2	Teadenol A	24h	214.67	39.84
3	Teadenol A	32h	153.33	22.60
4	Teadenol A	48h	147.67	12.91
5	100%DMSO	8h	100.00	3.82
6	100%DMSO	24h	100.00	13.77
7	100%DMSO	32h	100.00	6.20
8	100%DMSO	48h	100.00	10.13

[0240] 添加泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) 之后,脂联素分泌量和经过的时间之间的关系如图 6 所示。在图 6 中,“泰阿戴诺录(teadenol, テアデノール)”代表 teadenol A。此外,将泰阿戴诺录(teadenol, テアデノール)添加到样品中 24 小时和 48 小时后,证实泰阿戴诺录(teadenol, テアデノール)的添加对脂联素分泌促进活性有效,具有统计学上显著差异。同样,可以证实 teadenol B 的添加对脂联素分泌促进作用有效。

[0241] 实施例 6

[0242] [PTP1B 表达的抑制作用]

[0243] 将泰阿戴诺录 A (teadenol A, テアデノール A) (10 μM) 或 DMSO (载体对照) 添加到充分分化的 3T3-L1 脂肪细胞中。培养 8、24、32 和 48 小时后,收集细胞,通过蛋白免疫印迹法测定 PTP1B 分泌量和 α-微管蛋白的量。结果如图 7-11 所示。在这些图中,“teadenol”代表 teadenol A:图 7-9 的每个显示典型的蛋白免疫印迹图。3 次运行的结果总结于图 10 中。

[0244] 添加 teadenol A 之后,PTP1B 表达水平和经过的时间之间的关系如图 11 所示。将 teadenol A 添加到样品中 32 小时之后,证实 teadenol A 的添加对 PTP1B 表达抑制活性有效,具有统计学上的显著差异。同样,可以证实 teadenol B 的添加对 PTP1B 表达的抑制作

用有效。

[0245] 工业应用性

[0246] 预期含有根据本发明的新型的多酚衍生物的提取物将用作功能性物质,该功能性物质与多种提取物一起表现出特定的生理活性作用,该多种提取物即为没食子酸、没食子儿茶精(gallocatechin)、表没食子儿茶素(epigallocatechin)、儿茶酸(catechin)、表儿茶素(epicatechin)、表没食子儿茶酚没食子酸酯(epigallocatechin gallate)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate)和山奈酚三糖苷(kaempferol triglycoside)。

[0247] 因此,含有本发明获得的多酚衍生物的功能性微生物发酵茶提取物可以用于加工食品、调味料、健康补充剂(例如,补品)、动物饲料(如,宠物食品),化妆品等。

[0248] 附图标记表

[0249] 1:没食子酸的峰

[0250] 2:没食子儿茶精(gallocatechin)的峰

[0251] 3:表没食子儿茶素(epigallocatechin)的峰

[0252] 4:儿茶酸(catechin)的峰

[0253] 5:咖啡因的峰

[0254] 6:表没食子儿茶酚没食子酸酯(epigallocatechin gallate)的峰

[0255] 7:山奈酚三糖苷(kaempferol triglycoside)的峰

[0256] 8:表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate)的峰

[0257] A:根据本发明的顺式多酚衍生物的峰

[0258] B:根据本发明的反式多酚衍生物的峰

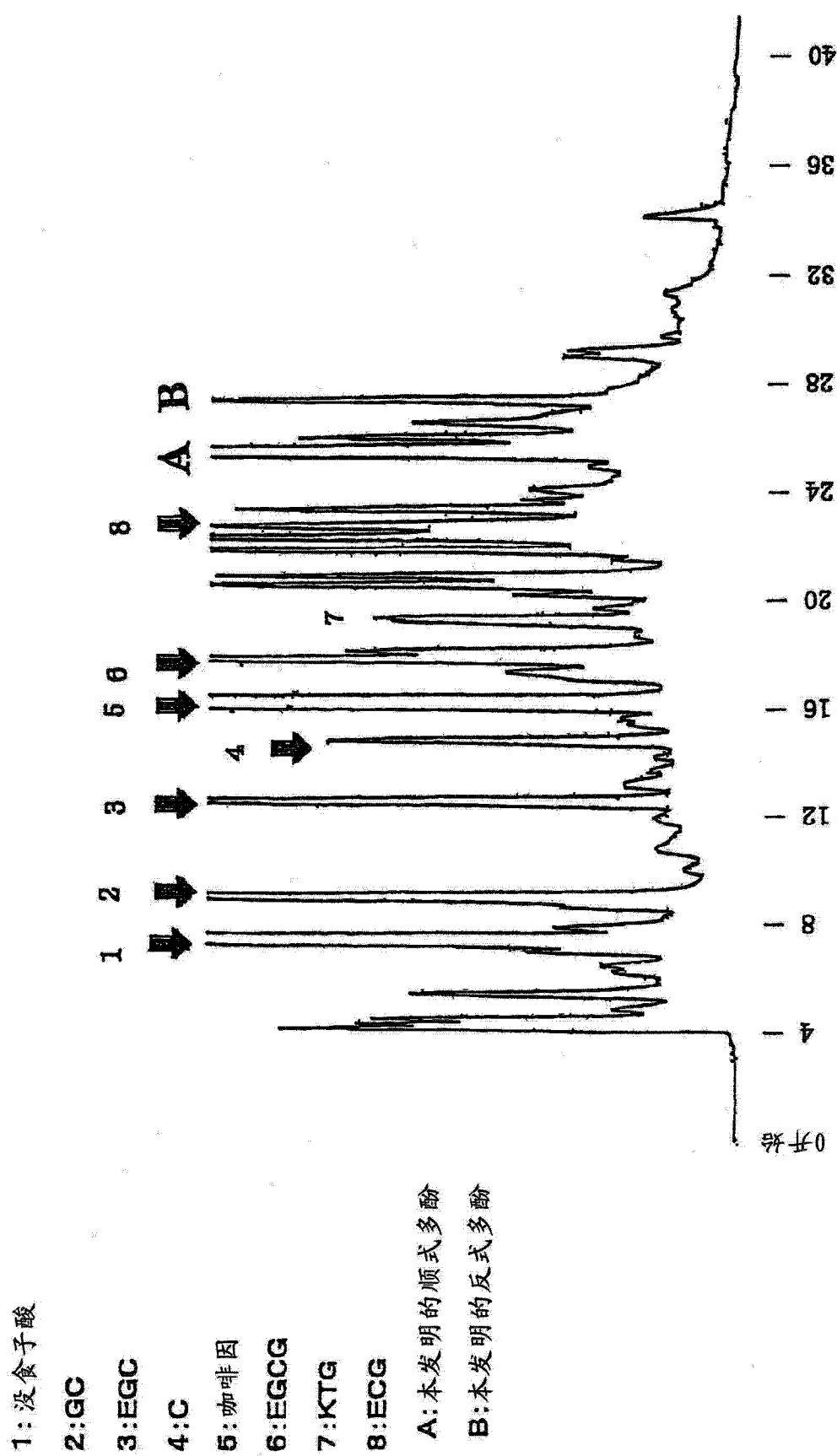


图 1

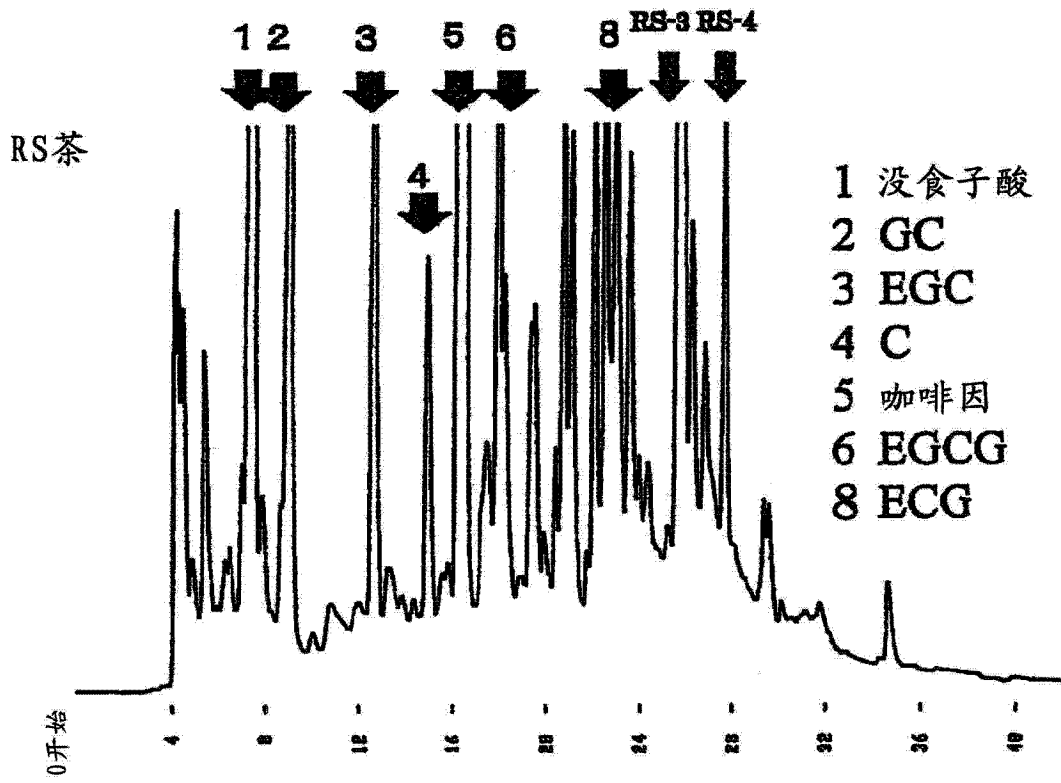
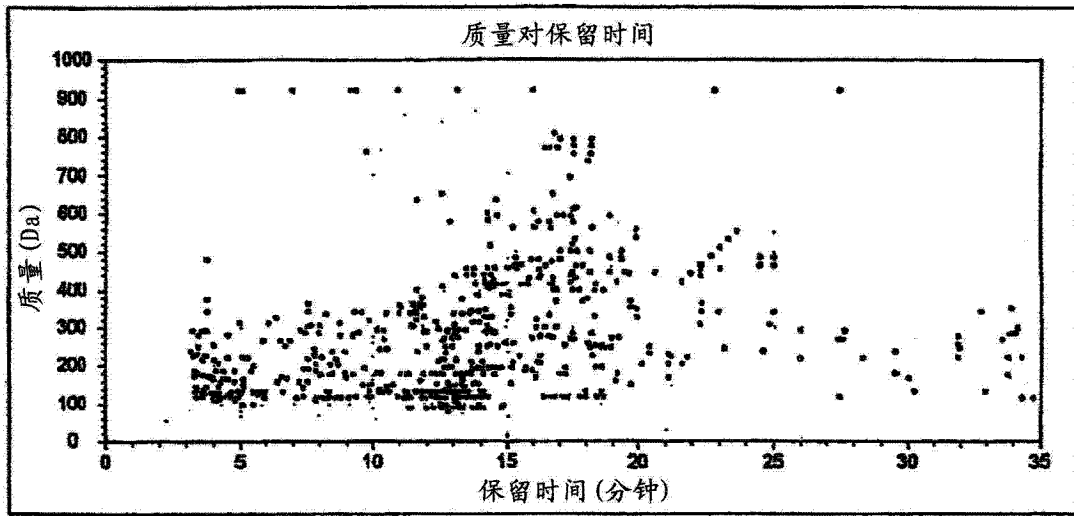
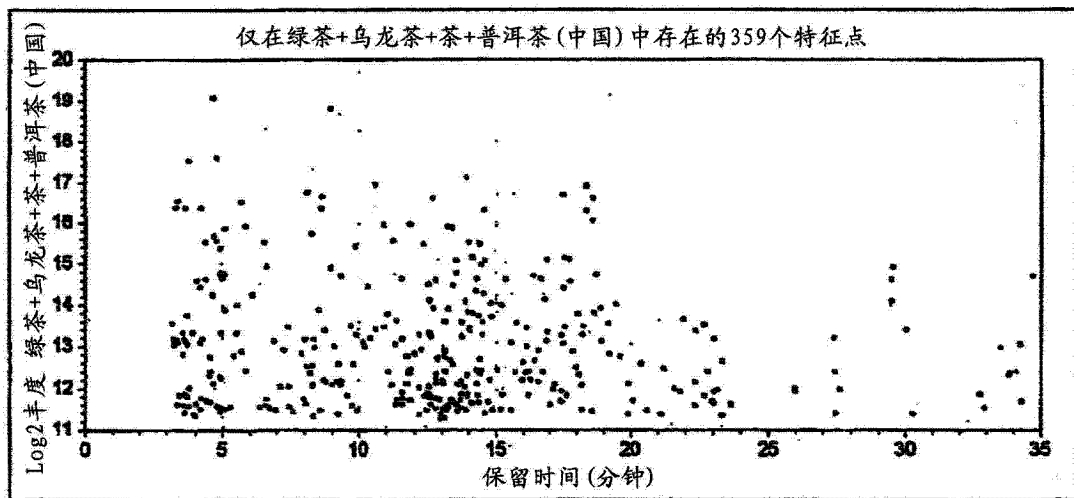


图 2

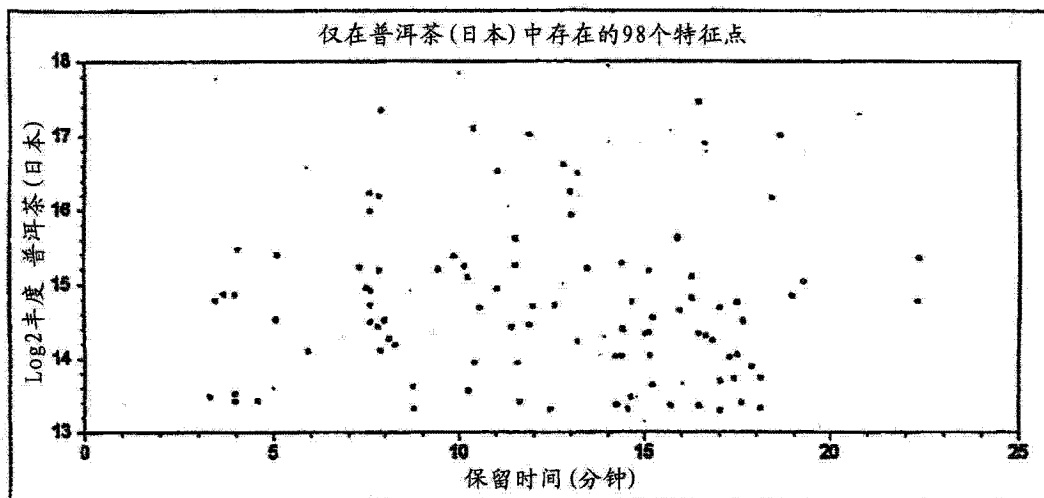


A: 在5种茶品种中含有的分子量小于等于1000的成分的图

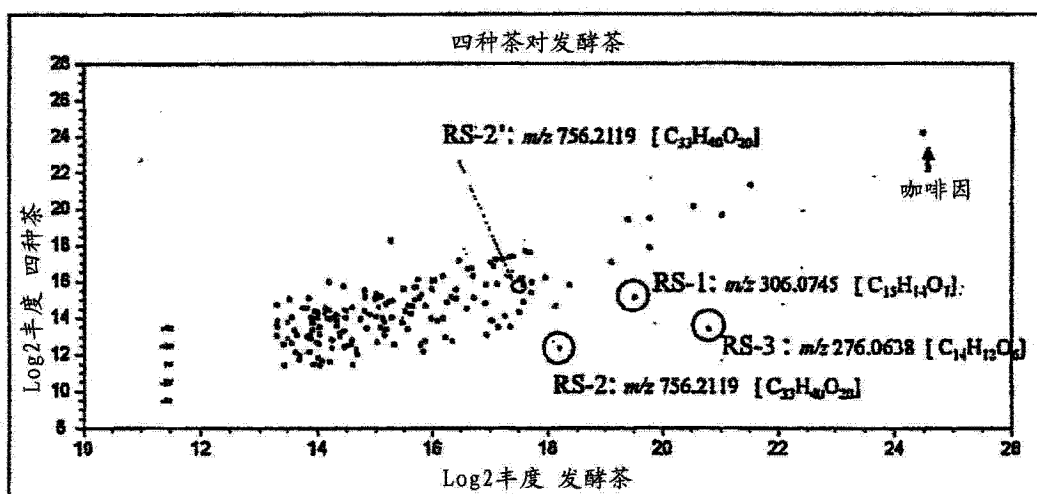


B: 仅在除RS茶外的4种茶品种中含有的成分的图

图 3



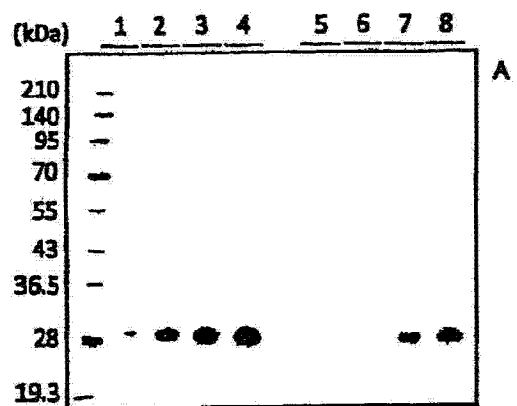
A: 仅在RS茶中含有的成分的图



B: 在RS茶(横坐标)中与在其他四种茶类型(纵坐标)中所含有成分的对比图

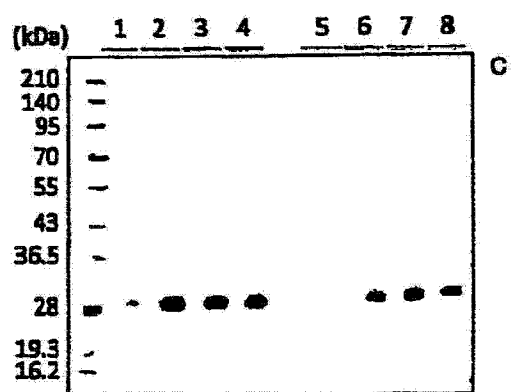
图 4

脂联素



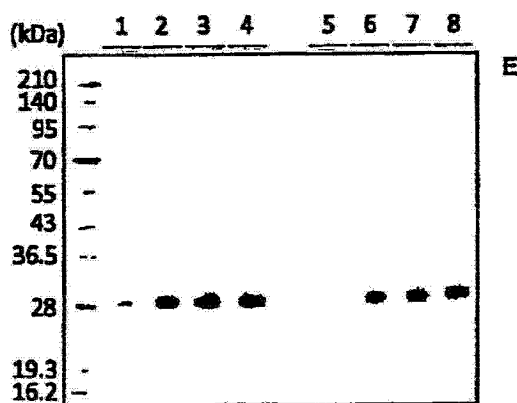
第一运行

泳道	样品名称	综合值	相对值
1	Teadenol A 8 h	3058	118
2	Teadenol A 24 h	8878	288
3	Teadenol A 32 h	14163	198
4	Teadenol A 48 h	17616	172
5	100% DMSO 8 h	2587	100
6	100% DMSO 24 h	3017	100
7	100% DMSO 32 h	7151	100
8	100% DMSO 48 h	10256	100



第二运行

泳道	样品名称	综合值	相对值
1	Teadenol A 8 h	3726	148
2	Teadenol A 24 h	13674	205
3	Teadenol A 32 h	11269	125
4	Teadenol A 48 h	9966	143
5	100% DMSO 8 h	2519	100
6	100% DMSO 24 h	6657	100
7	100% DMSO 32 h	9037	100
8	100% DMSO 48 h	6951	100



第三运行

泳道	样品名称	综合值	相对值
1	Teadenol A 8 h	3261	232
2	Teadenol A 24 h	11369	151
3	Teadenol A 32 h	12330	137
4	Teadenol A 48 h	12348	128
5	100% DMSO 8 h	1408	100
6	100% DMSO 24 h	7505	100
7	100% DMSO 32 h	8983	100
8	100% DMSO 48 h	9626	100

图 5

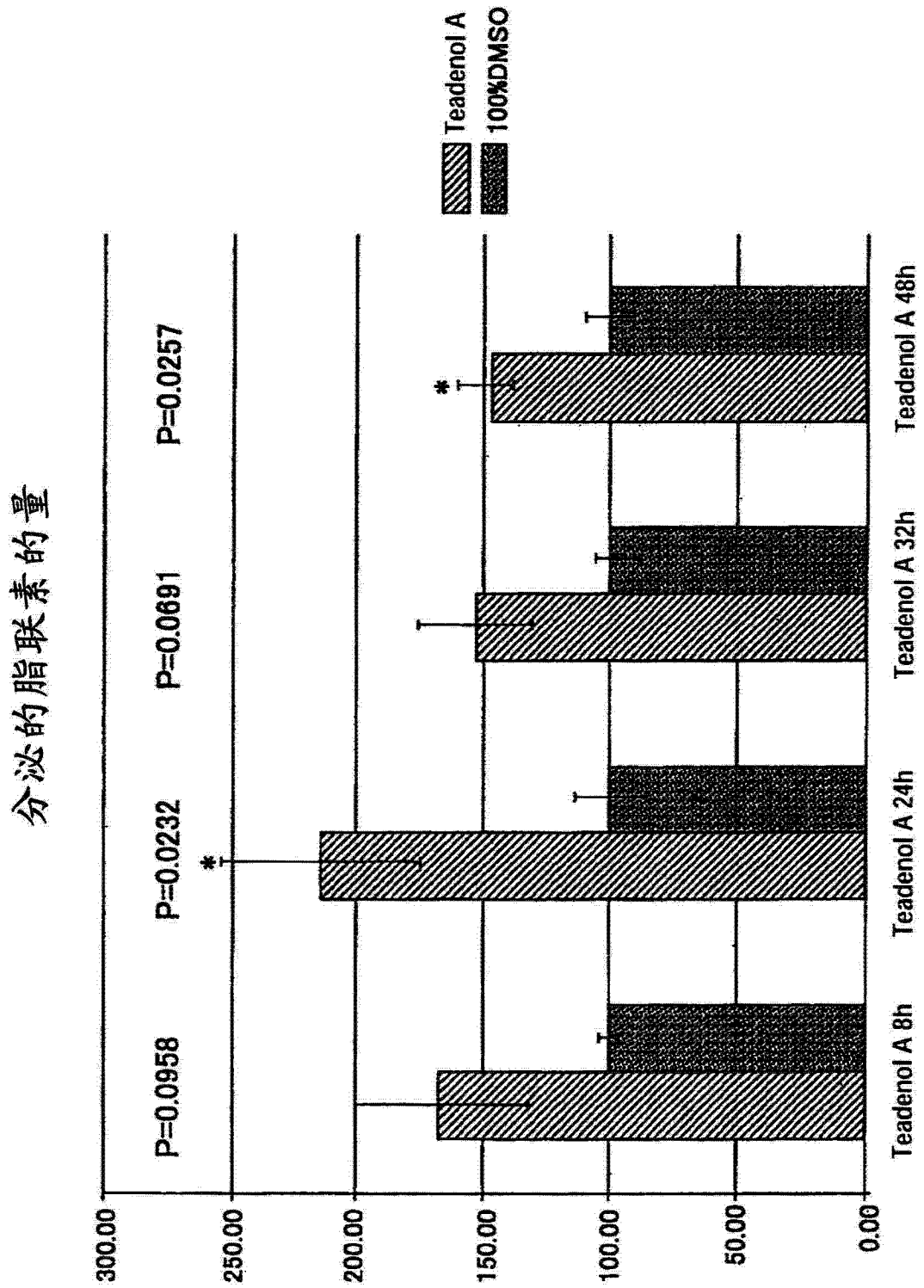


图 6

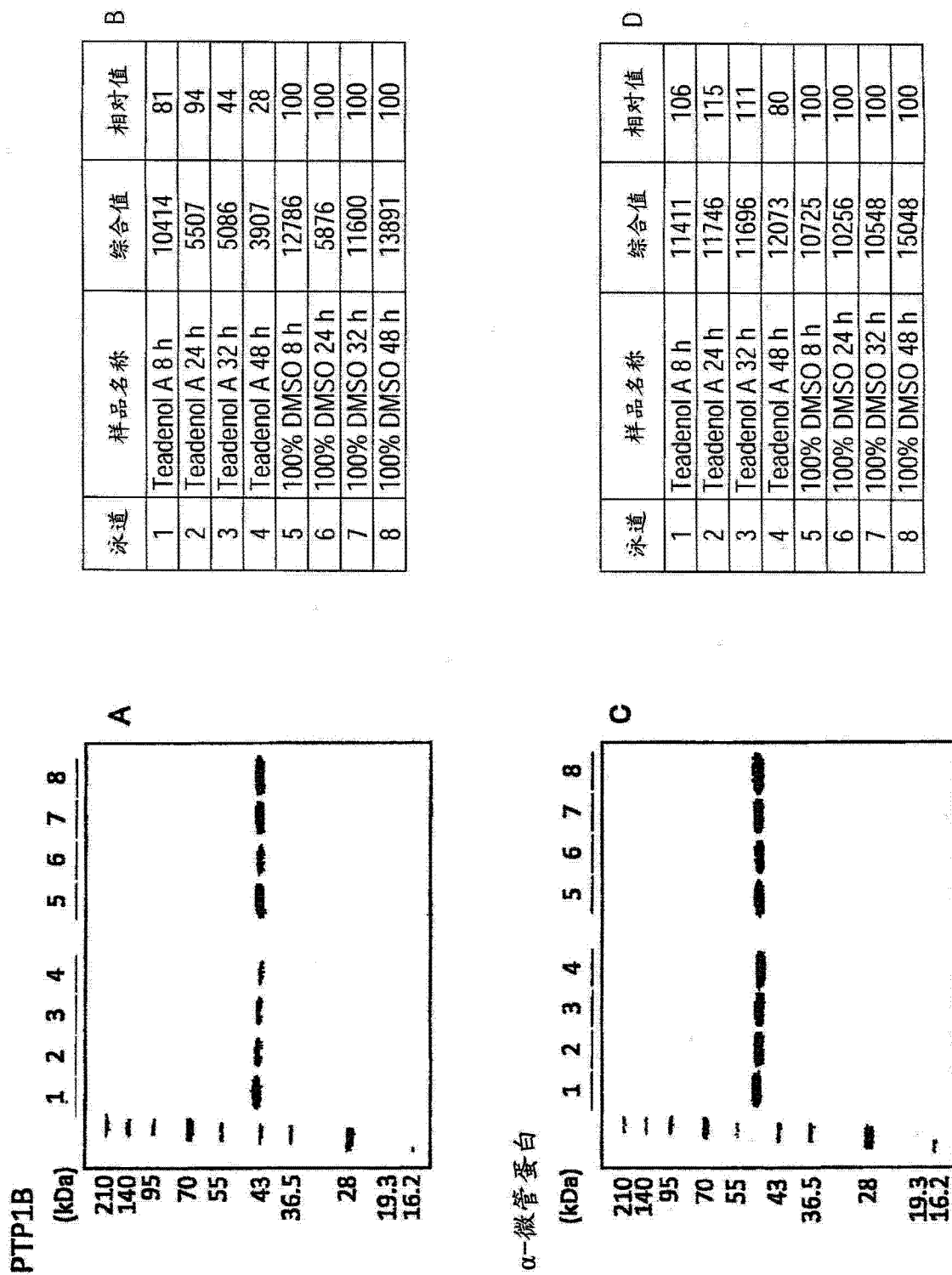


图 7

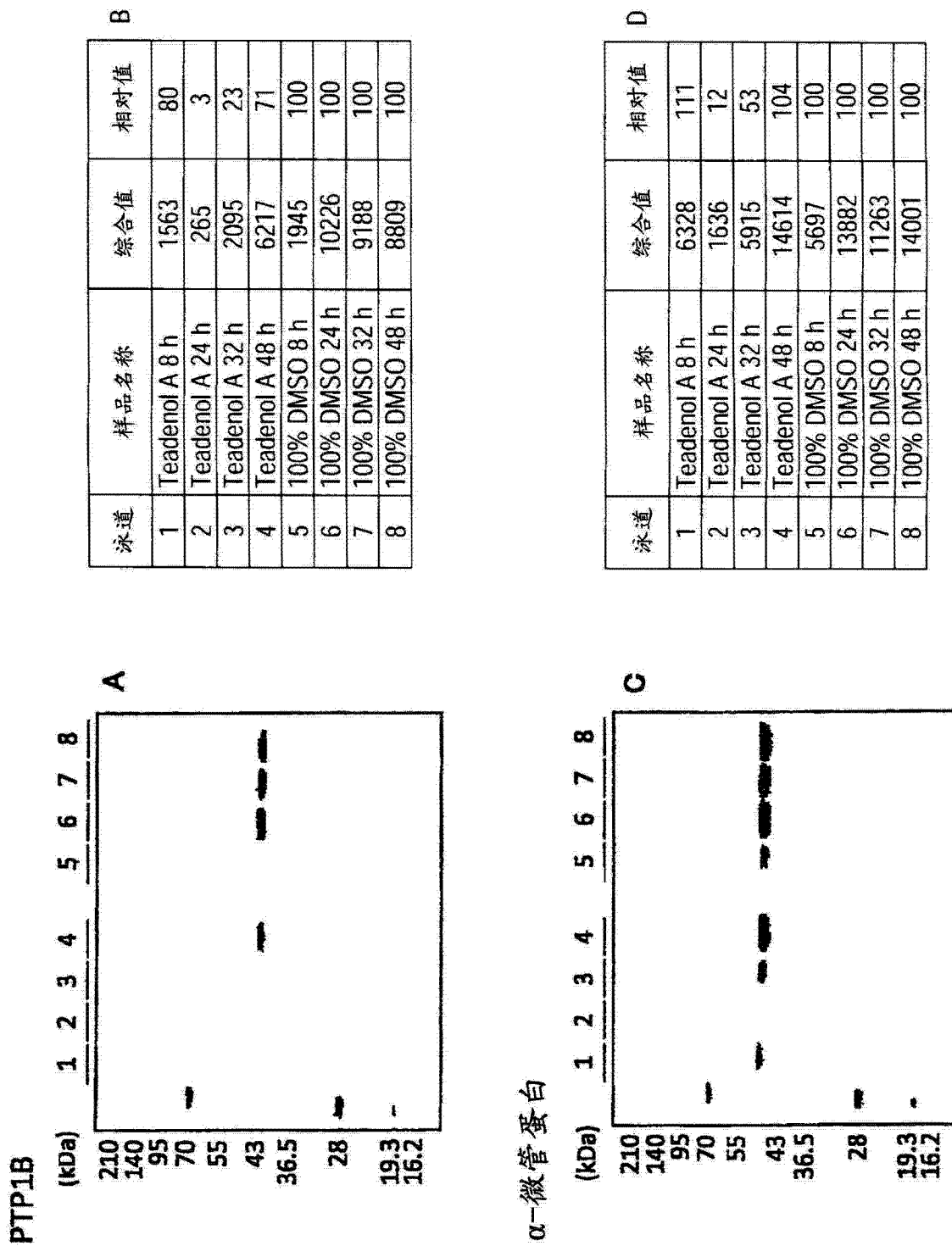


图 8

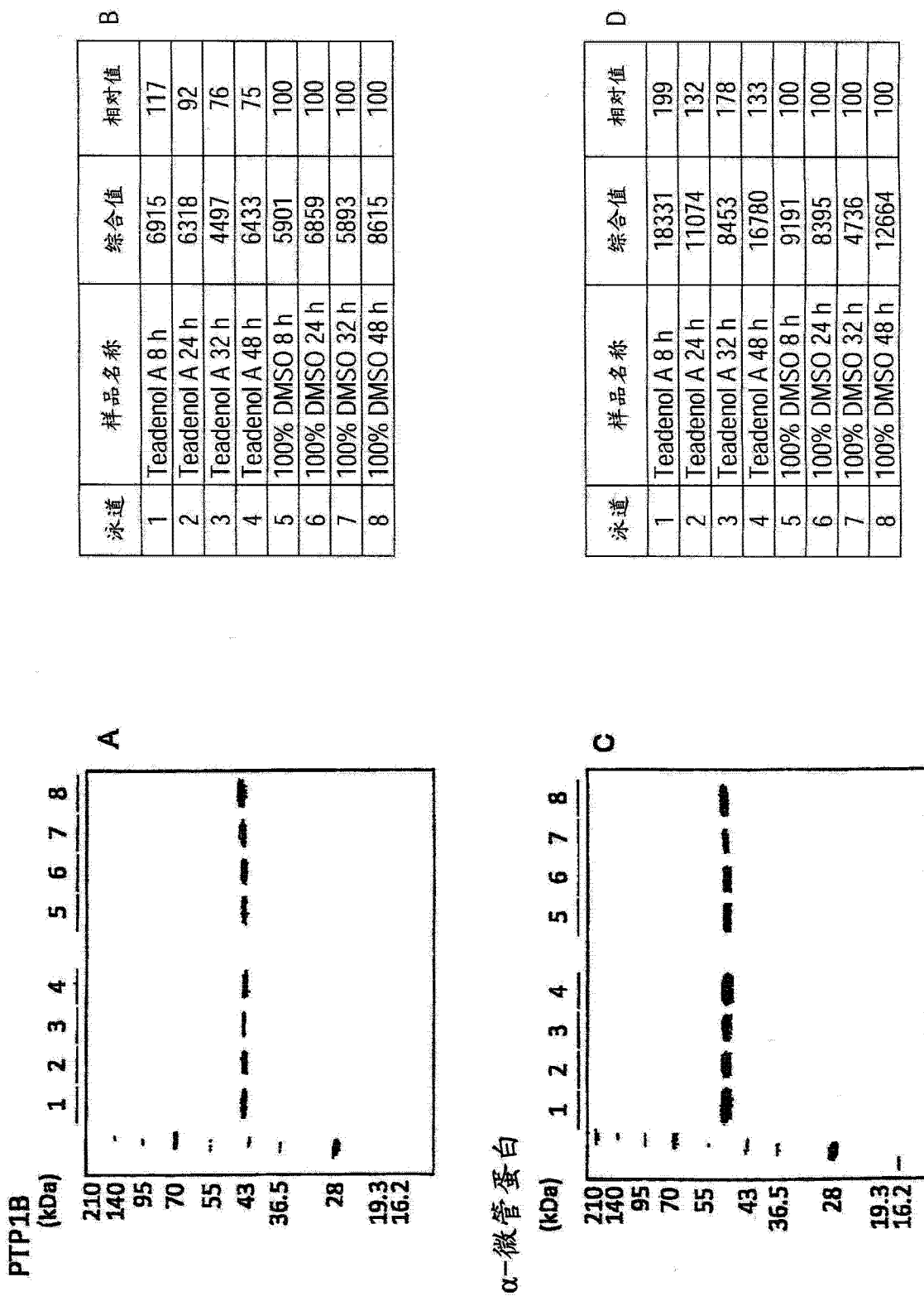


图 9

B

泳道	第二运行		PTP1B 相对值	α-微管蛋白 相对值	校正值 (PTP1B/α- 微管蛋白*100)
	样品名称	泳道			
1	Teadenol A 8 h	111	80	111	0.72
2	Teadenol A 24 h	12	3	12	0.22
3	Teadenol A 32 h	53	23	53	0.43
4	Teadenol A 48 h	104	71	104	0.68
5	100% DMSO 8 h	100	100	100	1.00
6	100% DMSO 24 h	100	100	100	1.00
7	100% DMSO 32 h	100	100	100	1.00
8	100% DMSO 48 h	100	100	100	1.00

A

泳道	第一运行		PTP1B 相对值	α-微管蛋白 相对值	校正值 (PTP1B/α- 微管蛋白*100)
	样品名称	泳道			
1	Teadenol A 8 h	106	81	106	0.77
2	Teadenol A 24 h	115	94	115	0.82
3	Teadenol A 32 h	111	44	111	0.40
4	Teadenol A 48 h	80	28	80	0.35
5	100% DMSO 8 h	100	100	100	1.00
6	100% DMSO 24 h	100	100	100	1.00
7	100% DMSO 32 h	100	100	100	1.00
8	100% DMSO 48 h	100	100	100	1.00

C

泳道	第三运行		PTP1B 相对值	α-微管蛋白 相对值	校正值 (PTP1B/α- 微管蛋白*100)
	样品名称	泳道			
1	Teadenol A 8 h	199	117	199	0.59
2	Teadenol A 24 h	132	92	132	0.70
3	Teadenol A 32 h	178	76	178	0.43
4	Teadenol A 48 h	133	75	133	0.56
5	100% DMSO 8 h	100	100	100	1.00
6	100% DMSO 24 h	100	100	100	1.00
7	100% DMSO 32 h	100	100	100	1.00
8	100% DMSO 48 h	100	100	100	1.00

D

三次的运行	样品名称	平均值	标准差
1	Teadenol A 8 h	69.22	5.37
2	Teadenol A 24 h	57.88	18.28
3	Teadenol A 32 h	41.90	1.20
4	Teadenol A 48 h	53.01	9.55
5	100% DMSO 8 h	100.00	9.36
6	100% DMSO 24 h	100.00	10.21
7	100% DMSO 32 h	100.00	4.54
8	100% DMSO 48 h	100.00	28.84

图 10

PTP1B 表达水平

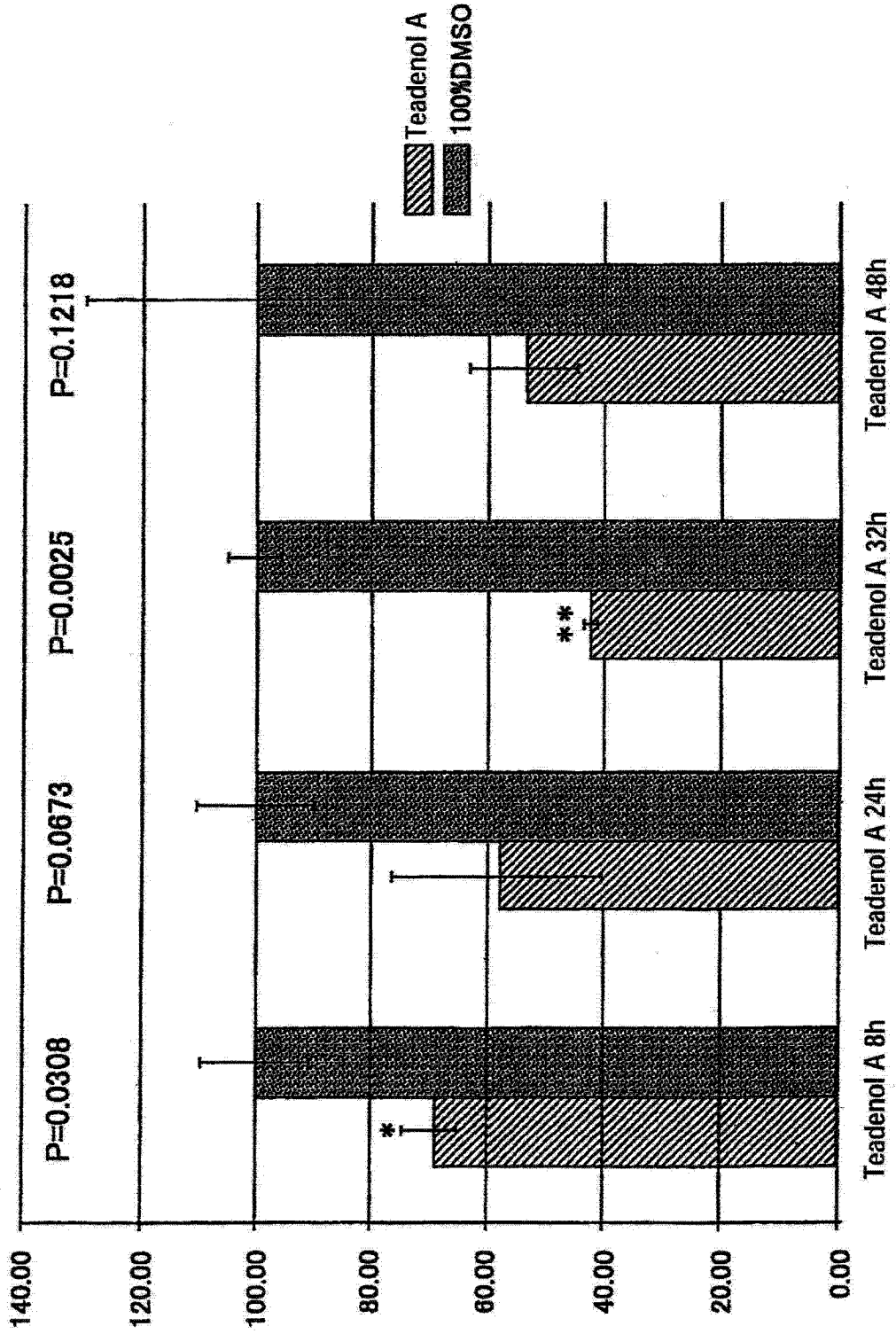


图 11