



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201014591 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：098129103

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 08 月 28 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/353 (2006.01)* *A23L1/30 (2006.01)*

(30)優先權：2008/08/29 日本 2008-222935

(71)申請人：三得利控股股份有限公司 (日本) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)  
日本

(72)發明人：福井祐子 FUKUI, YUKO (JP) ; 今本麻依 IMAMOTO, MAI (JP)

(74)代理人：林志剛

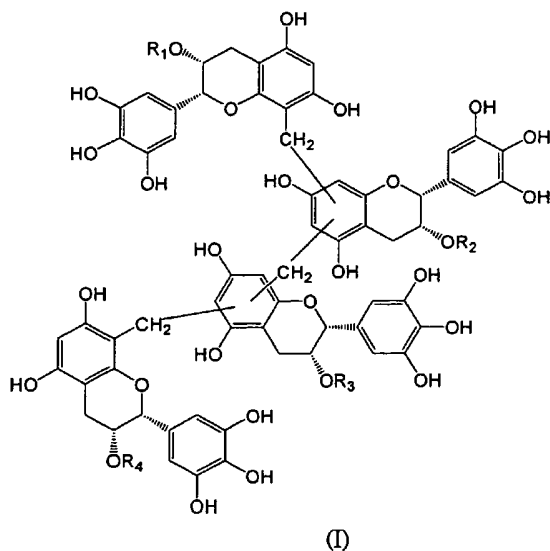
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：12 共 45 頁

(54)名稱

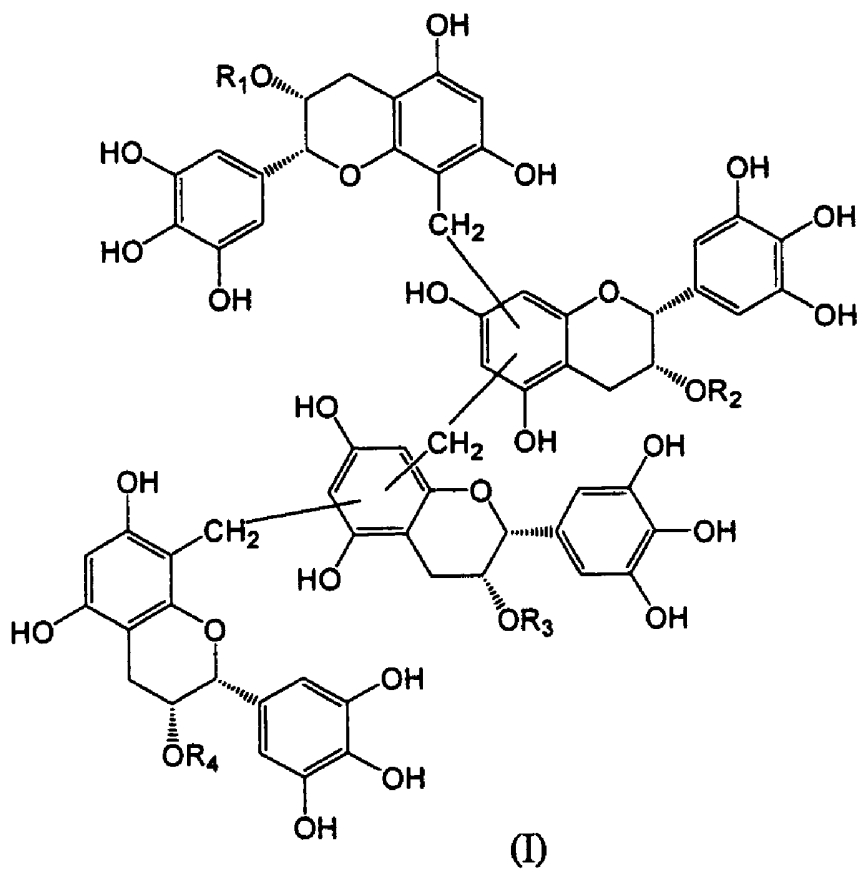
新穎的表沒食子兒茶素沒食子酸酯 4 聚物、及含其之血管內皮功能改善劑

(57)摘要

本發明係提供可持續攝取，且具有藉由增強來自血管內皮細胞的 NO 之作用等，而改善血管內皮功能的作用之化合物。本發明係有關以式(I)(式中 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 及 R<sub>4</sub> 係分別為 H 或沒食子酸酯基)所示之化合物或其鹽，以及含該化合物之血管內皮功能改善劑、飲食品或醫藥組成物。



## 【化 1】





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201014591 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：098129103

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 08 月 28 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/353 (2006.01)*

*A23L1/30 (2006.01)*

(30)優先權：2008/08/29 日本

2008-222935

(71)申請人：三得利控股股份有限公司 (日本) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)  
日本

(72)發明人：福井祐子 FUKUI, YUKO (JP) ; 今本麻依 IMAMOTO, MAI (JP)

(74)代理人：林志剛

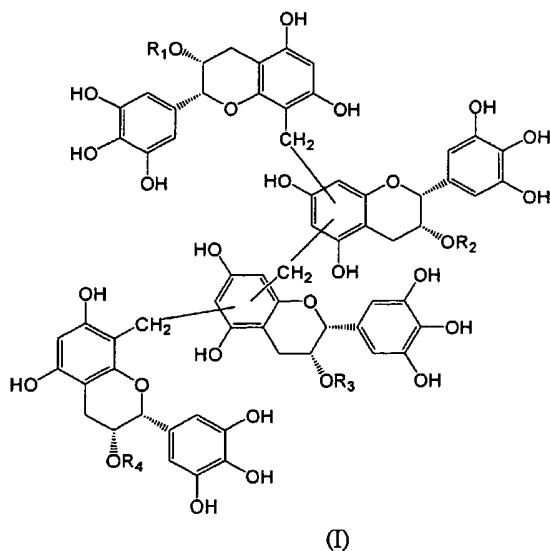
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：12 共 45 頁

(54)名稱

新穎的表沒食子兒茶素沒食子酸酯 4 聚物、及含其之血管內皮功能改善劑

(57)摘要

本發明係提供可持續攝取，且具有藉由增強來自血管內皮細胞的 NO 之作用等，而改善血管內皮功能的作用之化合物。本發明係有關以式(I)(式中 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 及 R<sub>4</sub> 係分別為 H 或沒食子酸酯基)所示之化合物或其鹽，以及含該化合物之血管內皮功能改善劑、飲食品或醫藥組成物。



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係有關新穎的表沒食子兒茶素沒食子酸酯 4 聚合物化合物、該化合物之製造方法，及含該化合物之飲食品及醫藥組成物，特別係具有血管內皮功能改善作用之飲食品及醫藥組成物。

### 【先前技術】

代謝性症候群係由於生活習慣及遺傳性的因素，結果發生內臟脂肪蓄積量增加，胰島素阻抗被誘發而出現脂質代謝異常、高血壓、葡萄糖耐受不良等症狀，轉變為容易引起血管病變之病態。而該病態最終引起心肌梗塞、腦梗塞等動脈硬化症，最壞的情況下有時足以致命。

隱喻在認為胰島素阻抗是起因於代謝性症候群時，血管內皮細胞的功能會被損害，其原因目前被指向是在血管內皮細胞的一氧化氮（以下簡寫為 NO）發生系統異常（非專利文件 1）。

NO 係藉由血管內皮細胞中內皮型 NO 合成酵素（以下簡寫為 eNOS），由 L-精胺酸與氧分子所生成。來自血管內皮的血管鬆弛因子 NO，其任務主要是對增殖性變化、發炎性變化、血小板凝集、氧化壓力的抑制作用，而於動脈硬化、高血脂症等各種危險因子存在下，發現 NO 的產生降低及作用不足（非專利文件 2）。特別係於代謝性症候群伴隨胰島素阻抗的狀態下，已知 eNOS 的輔酶四氫

生喋呤（以下簡寫作 BH<sub>4</sub>）產生酵素之 GTP 環水解酶 I（以下簡寫作 GTP-CH1）的活性降低（非專利文件 1）。NO 產生降低、產生不足的機轉相當複雜，但已知可藉由 L-精胺酸的代謝物 *asymmetric dimethylarginine*（以下簡寫作 ADMA）抑制 eNOS 的活性。另外，於 eNOS 活性已降低之狀態下，氧分子會優先被 NADPH 氧化酶代謝而產生活性氧，進而招致血管內皮功能降低（非專利文件 3）。反之血管內皮細胞可藉由產生 ADMA 分解酵素之 *dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2*（以下簡寫作 DDAH2）而保持血管內皮細胞功能良好。另外亦可藉由使存在於血管內皮細胞之 NADPH 氧化酶的活性降低，而保持良好的血管內皮細胞功能。

具有血管內皮功能改善效果之食品素材已知有綠茶所含之（-）-表沒食子兒茶素-3-O-沒食子酸酯（以下亦稱做 EGCG）（非專利文件 4）。另外雖然目前亦顯示藉由攝取紅茶可改善人類上臂的血流依賴性血管擴張反應（非專利文件 5），及使用紅茶萃取物進行 *in vitro* 檢討時發現 eNOS 被促進活性化（非專利文件 6），但該等活性成份尚未被解明。另外，至今亦尚未進行有關烏龍茶及其成份之檢討。

藉由烏龍茶原有的發酵過程而生成之 EGCG 聚合物，其 2 聚物（*oolonghomobisflavanA* 以及 *oolonghomobisflavanB*）（非專利文件 7）與 3 聚物（專利文件 1）已經分離、鑑定，且該等化合物被報告為具有

非常強的抑制胰脂肪酶活性（非專利文件 8、專利文件 1）。

專利文件 1：國際公開第 2005/116005 號

非專利文件 1：Folia Pharmacol. Jpn. Vol. 125:p285-290, 2005

非專利文件 2：Journal of clinical Investigation, vol. 95, p1747-1755, 1995

非專利文件 3：Endocrinology, vol. 148, p3773-3780, 2007

非專利文件 4：Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p6190-6195, 2004

非專利文件 5：Circulation. Vol. 104, p151-156, 2001

非專利文件 6：Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p46637-46643, 2004

非專利文件 7：Chem. Pharm. Bull. 37(12), 3255-3263, 1989

非專利文件 8：J. Agric. Food Chem. 53, 4593-4598(2005)

### 【發明內容】

[發明欲解決之課題]

雖於非專利文件 4 中記載有 EGCG 之血管內皮功能改善效果，但於使用培養細胞進行的檢討，為使 eNOS 活性上升至少需要 30~50 $\mu$ M 之較高的濃度。另外於非專利文

件 5 中，雖揭示有紅茶之血管內皮功能改善效果，但記載內容的是使人於 4 週間每日攝取 900ml 紅茶之情況與對照組進行比較，改善上臂的血流依賴性血管擴張反應。

如此 EGCG 之血管內皮功能改善效果雖有奏效，但其效果並不充分，為藉由攝取紅茶中所含之 EGCG 而獲得其效果，必須要攝取相對較多的紅茶等。另外，由於 EGCG 是苦味及澀味的原因，對於持續攝取會有香味上的問題，進而，大量攝取紅茶亦與大量攝取咖啡因等物質相聯繫，認為以維持血管內皮功能為目的而持續性地攝取並不適當。

本發明之目的係提供可持續攝取，且具有藉由增強來自血管內皮細胞的 NO 之作用等，而改善血管內皮功能的作用之化合物，進而為提供含有該相關化合物之飲食品。

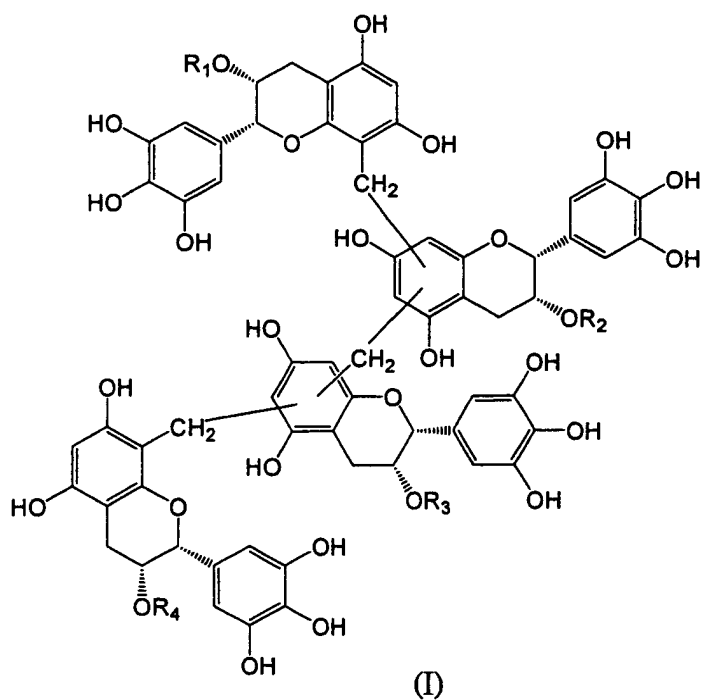
#### [解決課題之手段]

為解決該等問題之發明者們，針對 EGCG 等具有色滿環之化合物所衍生之化合物進行檢討後，發現具有 4 個色滿環之新穎的化合物，較 EGCG 能夠達成更優異的改善血管內皮功能的作用，本發明遂至完成。

亦即本發明係如下所述。

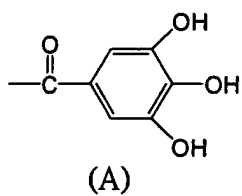
1. 一種以式 (I) 所示之化合物，或其鹽，

## 【化 1】



(式中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  係分別為 H 或以式 (A) :

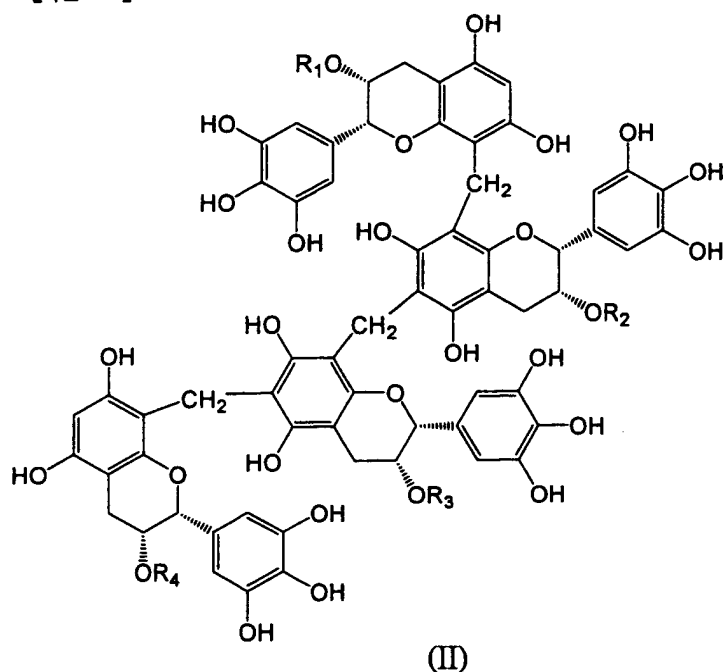
## 【化 2】



所示之基)。

2. 如 1 之化合物、或其鹽，其係以式 (II) :

## 【化 3】

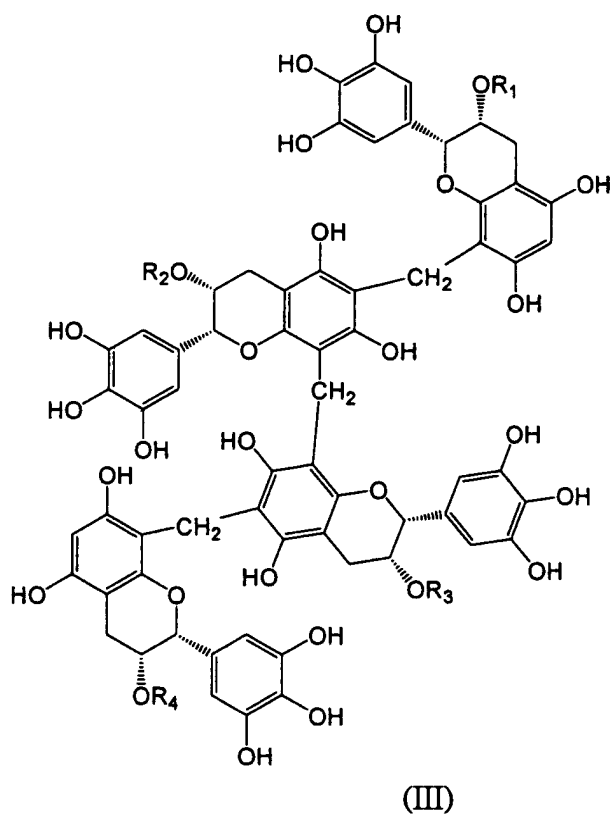


(式中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  係與前述相同)

所示。

3. 如 1 之化合物、或其鹽，其係以式 (III)：

## 【化 4】

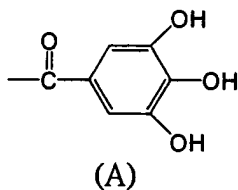


(式中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  係與前述相同)

所示。

4. 如 1~3 中任一項之化合物或其鹽，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  均係以式 (A)：

【化 5】



所示之基。

5. 一種血管內皮功能改善劑，其係含有如 1~4 項中任一項之化合物或其鹽。

6. 一種飲食品，其係經混合如 1~4 項中任一項之化合物或其鹽。

7. 一種醫藥組成物，其係含有如 1~4 項中任一項之化合物或其鹽。

8. 一種 1~4 項中任一項之化合物之製造方法，其係包含於酸存在下，使表沒食子兒茶素沒食子酸酯或表沒食子兒茶素與甲醛進行反應之步驟。

[發明的效果]

藉由將本發明之 4 聚物與飲食品混合，可提供以改善血管內皮功能及增進健康為目的之飲料或營養補充品。另

外由於該等化合物與飲食品混合時不會損及香味，偏好性高，且由於其亦具優異的安全性，為維持血管內皮功能可持續性地攝取。

本發明係有關 4 個色滿環以亞甲基連結之以式 (I) 所示之新穎的 EGCG 4 聚物化合物、式 (I) 之化合物的製造方法、以及含式 (I) 之化合物之血管內皮功能改善劑、飲食品及醫藥組成物。以下針對本發明進行說明。

#### < EGCG 4 聚物化合物 >

本發明以式 (I) 所示之 EGCG 4 聚物化合物係可根據下述方式進行製造。

可藉由將均以式 (A) 所示之  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  之基（沒食子酸酯基）之式 (I) 之化合物，與 (-)-表沒食子兒茶素-3-O-沒食子酸酯於溶媒中，使其於在酸的存在下與甲醛進行反應而製造。

可使用於反應之溶媒可舉出例如甲醇、乙醇、正丙醇、異丙醇等醇類。針對溶媒之使用量並無別的限制，例如相對於 1 質量份之 EGCG 可使用 20~200 質量份之溶媒。

酸可使用鹽酸、硫酸及硝酸等無機酸，及蟻酸、醋酸等有機酸。針對酸的使用量無特別限制，例如相對於 1 莫耳之 EGCG 可使用 0.01~2 莫耳之酸。

甲醛則為例如相對於 1 莫耳之 EGCG，可使用 1~100 莫耳。

反應溫度及時間依所使用的溶媒量而定，例如反應溫

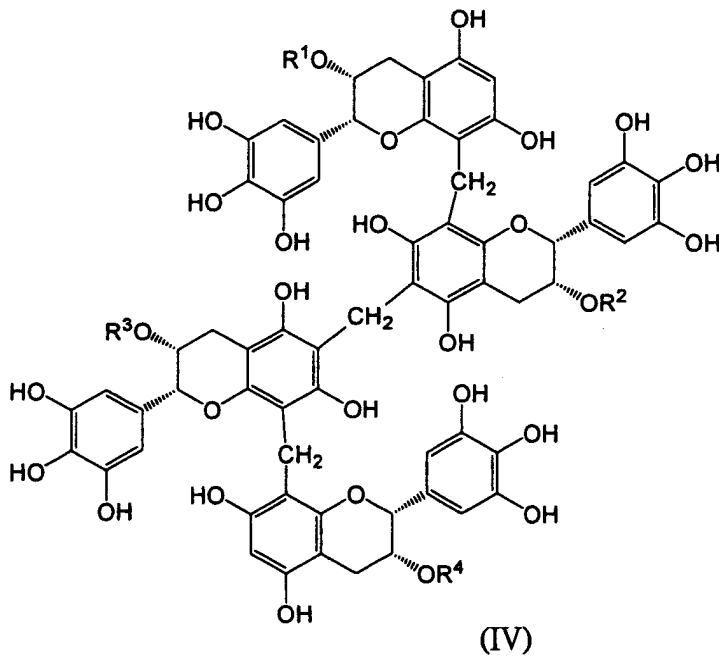
度為  $-10\sim 50^{\circ}\text{C}$ ，反應時間為  $0.2\sim 12$  小時，典型反應溫度為室溫（ $25^{\circ}\text{C}$  左右）。

可藉由將  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  均為 H（氫原子）之式（I）之化合物，取代（-）-表沒食子兒茶素-3-O-沒食子酸酯的是使用（-）-表沒食子兒茶素，與前述相同地使其與甲醛進行反應而製造。

於與甲醛之反應使用（-）-表沒食子兒茶素-3-O-沒食子酸酯或（-）-表沒食子兒茶素時，所得之式（I）之化合物，各色滿環第 2 位置之取代基與第 3 位置之取代基之相對立體配置為順式（cis）。

藉由使（-）-表沒食子兒茶素-3-O-沒食子酸酯或（-）-表沒食子兒茶素與甲醛進行反應而得之 4 聚物生成物，一般係含有介以亞甲基之色滿環聯結形式相異之式（II）、式（III）及式（IV）此 3 種化合物之至少 2 種化合物之 4 聚物生成物的混合物。故可藉由使用例如 HP-20（三菱化學股份有限公司製）等苯乙烯系吸附樹脂，及藉由如 Shephadex LH-20 般之聚葡萄糖系樹脂之開放式管柱層析儀，以及高速液相層析儀（HPLC）等周知之純化方法，由該等混合物中，分離出式（II）、式（III）及式（IV）之各化合物。

## 【化 6】



$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  的 1 至 4 個為 H 之式 (I) 之化合物，尚可由  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  均為沒食子酸酯基之式 (I) 之化合物，藉由將沒食子酸酯基以水解方式去除而製造。該等水解可使用氫氧化鈉、氫氧化鉀等鹼性化合物之水溶液，或使用具有鞣酸酶活性之酵素等水解酵素而進行。

於該等水解一般係由  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  均為沒食子酸酯基之式 (I) 之化合物，去除掉 1 個、2 個、3 個或 4 個沒食子酸酯基，而使其成為複數種化合物之混合物。此時可藉由使用例如 HP-20 (三菱化學股份有限公司製) 等苯乙烯系吸附樹脂，及藉由如 Shephadex LH-20 般之聚葡萄糖系樹脂之開放式管柱層析儀，以及高速液相層析儀 (HPLC) 等周知之純化方法，由該等混合物中分離出各化合物。

本發明另亦係有關式 (I) 之化合物之鹽。

該等鹽若為可由式 (I) 之化合物形成之鹽則無特別限制，但以醫藥許可之鹽為佳。

該等鹽可舉出例如式 (I) 之化合物之鋰鹽、鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽及鎂鹽等，與週期表 IA 族或 IIA 族之金屬元素所形成之金屬鹽。該等金屬鹽可於例如式 (I) 之化合物之羥基（酚性羥基、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  的任一個或均為 H 時之羥基）上形成。

例如於非質子性溶媒中，使式 (I) 之化合物與金屬鈉或氫化鈉進行反應，藉由使羥基 (-OH) 轉變為醇鈉基 (-ONa) 而可製造式 (I) 之化合物之鈉鹽。故可藉由調節金屬鈉或氫化鈉的使用量，使式 (I) 之化合物中所含羥基全部轉變為醇鈉基，另外，亦可僅將一部分的羥基轉變為醇鈉基。

本發明之式 (I) 之化合物係新穎的化合物，發明者們將所製造之式 (II) 及式 (III) 之化合物作為標準品進行檢討時，判明如同後述實施例所述，式 (II) 及式 (III) 之化合物亦存在於烏龍茶中。因此式 (II) 及式 (III) 之化合物，係可將 *Camellia sinensis* 的葉子為原料之茶類，其中以烏龍茶、紅茶等發酵茶及焙茶為佳，自該等茶類藉由萃取或純化而進行分離。

由該等茶類中分離式 (II) 及式 (III) 之化合物，可藉由例如吸附管柱色層分析及高速液相層析儀 (HPLC) 等而進行。

< 血管內皮功能改善劑、飲食品及醫藥組成物 >

本發明之化合物顯示具有血管內皮功能的改善作用。

亦即本發明之化合物，係藉由增強 eNOS 基因的表現、增強 GTP-CH1 基因的表現、增強 DDAH2 基因的表現、及/或使 NADPH 氧化酶基因的表現降低，而達成血管內皮功能的改善作用。eNOS 基因、GTP-CH1 基因、DDAH2 及 NADPH 氧化酶基因表現的評價係根據文獻周知之方法，或可根據以下實施例記載之方法而進行。

如此，本發明之化合物由顯示具有血管內皮功能的改善作用，而可使用為血管內皮功能改善劑。另由於本發明之化合物顯示具有血管內皮功能的改善作用，藉由將本發明之化合物混合入飲食品、或使之為醫藥組成物之形態，及使之為適於人類等哺乳動物攝取之形態，而後使用該當飲食品或醫藥品，可達成對哺乳動物之血管內皮功能的改善作用。

因此，本發明另亦係有關與本發明之化合物或其鹽混合之飲食品，以及含有本發明之化合物或其鹽之醫藥組成物。

本發明之化合物可與各種飲食品混合。可與本發明之化合物混合之飲食品並無特別限制，可與現存的、各種飲食品混合。飲食品例如清涼飲料、茶飲料、液狀強壯劑、健康飲料、營養補給飲料、運動飲料、碳酸飲料（包含該等飲料之濃縮原液及調製用粉末）等飲料，以及口香糖、糖果、果凍、錠菓、健康食品、營養補給食品、營養補充

品等食品，於該等飲食品中本發明之化合物的比例，例如可使之為 0.01~1000ppm ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 而進行混合。以 0.06~2000ppm 為佳，使之為 0.1~1000ppm 而進行混合更佳。

將本發明之化合物使用為醫藥時，可以散劑、顆粒劑、錠劑、膠囊劑、液劑及注射劑等形態提供。本發明之化合物或其鹽可直接地，或以水等進行稀釋後經口投予。或藉由將其與周知之醫藥用載體一同製劑化而調製。例如將本發明之化合物或其鹽製作為糖漿劑等經口液狀製劑，或加工為萃取物、粉末等，與醫藥上容許之載體混合，以錠劑、膠囊劑、顆粒劑、散劑等經口固形製劑進行投予。藥學上可容許之載體，可使用作為製劑素材慣用的各種有機或無機的載體物質，固形製劑則可與賦形劑、滑澤劑、結合劑、崩解劑、液狀製劑之溶劑、賦形劑、懸濁化劑、結合劑等混合而進行製作。另外亦可因應需要使用防腐劑、抗氧化劑、著色料、甜味劑等製劑添加物。

有效用量則可依患者的年齡及體重，疾病種類及嚴重程度以及投予路徑適當地選擇。

## 【實施方式】

### [實施例]

本發明藉由以下實施例更詳細地說明本發明，但本發明並未因該等實施例而被限定。

[實施例 1]式 (II) 及式 (III) 之化合物的合成與分離

A. 合成與藉由開放式管柱進行劃分：

將 6g (13 毫莫耳) (-)-表沒食子兒茶素-3-O-沒食子酸酯 (EGCG) (Teavigo™, Roche 公司), 溶解於 HCl 之 120ml 乙醇溶液 (0.02N, HCl 為 2.4 毫莫耳) 中, 再加入 180ml 之甲醛之乙醇溶液 (4 質量%, 甲醛為 240 毫莫耳), 於室溫下進行 4 小時攪拌。停止反應後以純水進行 10 倍稀釋, 再使其通過吸附樹脂 CHP-20P 管柱 (600ml、37-75 $\mu$ m、三菱化學股份有限公司)。以 1200 ml 之水進行洗淨後, 依序使用 900 ml 之 25V/V%乙腈水溶液, 1200 ml 之 30 V/V%乙腈水溶液進行溶出, 將以 25V/V%乙腈水溶液之溶出劃分以每 300 ml 分做 3 個劃分 (fr.1 至 fr.3), 30V/V%乙腈水溶液溶出劃分以每 300 ml 分做 4 個劃分 (fr.4 至 fr.7)。

B. 製備型 HPLC 條件

將 CHP-20P 管柱純化所得之劃分物再以逆相製備型 HPLC 進行純化。

< 條件 >

管柱：Develosil ODS-HG-5 (5cm  $\phi$  x50cm, 野村化學股份有限公司)

移動相 A：0.05 V/V%TFA/H<sub>2</sub>O (TFA：三氟醋酸)

移動相 B：90 V/V%CH<sub>3</sub>CN, 0.05 V/V%TFA/H<sub>2</sub>O

流速：32mL/分鐘

梯度程式：A/B = 80/20 ( 30 分鐘 ) ， A/B = 80/20 → 60/40 ( 100 分鐘 ) ， A/B = 60/40 ( 30 分鐘 )

檢出器：紫外線可視析光檢出器 SPD-6AV ( ( 股份有限 ) 島津製作所 ) 檢出波長：A280nm

檢體：將 CHP-20P 管柱純化所得之 fr.2 至 fr.7 分別以 20 V/V% 乙腈水溶液溶解，再分做數次將其全量通過管柱。

#### < 劃分 >

於上述各條件下，收集滯留時間 109 分鐘 ( 化合物 1 ) 、 113 分鐘 ( 化合物 2 ) 及滯留時間 85 分鐘 ( 化合物 3 ) 、滯留時間 106 分鐘 ( 化合物 4 ) 、滯留時間 104 分鐘 ( 化合物 5 ) 及滯留時間 135 分鐘 ( 化合物 6 ) 之各波峰。

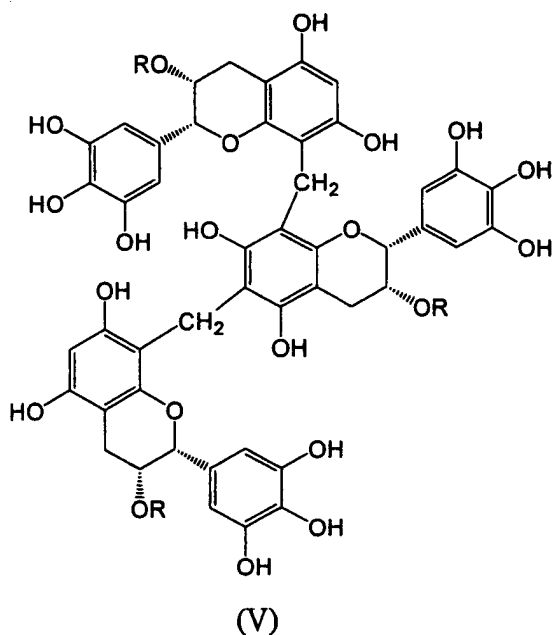
#### C. 化合物的構造解析：

對以 HPLC 分離之化合物進行 MS 及 NMR 測定。

化合物 3~6 進行 MS 測定時係藉由 Q-TOF Premier ( Micromass 公司製，英國 ) ，以 negative、V mode 測定後，發現分別為 m/z927.160、927.163、1397.248、927.161 「M-H」<sup>-</sup>離子波峰。另外，化合物 3 之 NMR 光譜數據係與文獻 ( Chem. Pharm. Bull 37 (12), 3255-3563 (1989) ) 所載之烏龍酮雙黃烷-A 之 NMR 光譜數據一致。化合物 4 之 NMR 光譜數據係與文獻 ( Chem. Pharm. Bull 37(12),

3255-3563(1989)) 所載之烏龍酮雙黃烷-B 之 NMR 光譜數據一致。另外，由化合物 5 之 NMR 光譜數據與記載於國際公開第 2005/116005 號之圖 4 及圖 5 之 NMR 光譜數據一致。化合物 6 之 NMR 光譜數據與記載於國際公開第 2005/116005 號之圖 2 及圖 3 之 NMR 光譜數據一致。由該等結果可以確認化合物 3 為烏龍酮雙黃烷-A，化合物 4 係烏龍酮雙黃烷-B，化合物 5 係下述式 (V) 之化合物 (式中 R 係表示沒食子酸酯基)，化合物 6 係烏龍酮雙黃烷-C

【化 7】



針對化合物 1 及化合物 2，以下以 MS、NMR 進行構造分析。

MS 係使用離子光源附有電噴灑離子源之 ESI 之 Q-TOF Premier (Micromass 公司製，英國) 以 negative、V

mode 測定。Cone volt : 45V , Capillary voltage : 3KV , Desolvation Temp : 180°C , 進行藉由 lock spray 之質量補正 , 使用 Leucine enkepharine 作為對照 ( m/z554.2615 「 M-H 」<sup>-</sup> ) 。

其結果計算出化合物 1 係 m/z1867.3112 「 M-H 」<sup>-</sup> 之分子離子以及 2 價之 933.1517 「 M-2H 」<sup>2-</sup> , 分子式為 C<sub>91</sub>H<sub>72</sub>O<sub>44</sub> ( err. : -11.0ppm ) , 化合物 2 係 m/z1867.3100 「 M-H 」<sup>-</sup> 之分子離子以及 2 價之 933.1151 「 M-2H 」<sup>2-</sup> , 分子式為 C<sub>91</sub>H<sub>72</sub>O<sub>44</sub> ( err. : -11.7ppm ) , 推測 2 個化合物均為 EGCG4 分子係藉由 3 個亞甲基而交聯之化合物。

NMR 係根據下述條件進行測定。將化合物 1 及化合物 2 溶解於 DMSO-d<sub>6</sub> ( (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO ) , 以 <sup>1</sup>H 及 <sup>13</sup>C 之殘留波峰之 δ 2.50 及 δ 39.43 作為內標準進行 NMR 測定。測定項目係藉由 <sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR、<sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C}-HSQC、<sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C}-HMBC、以及將 TOCSY 及 DQF-COSY 以 DMX-750 分光光度計 ( BRUKER BIOSPIN, 德國 ) 進行測定。由 NMR 的結果可明確得知化合物 1 係具有 EGCG8 : 8EGCG6 : 8EGCG6 : 8EGCG 之鍵結形式之化合物 ( 式(II) ) , 化合物 2 係具有 EGCG8 : 6EGCG8 : 8EGCG6 : 8EGCG 鍵結形式之化合物 ( 式(III) ) 。化合物 1 之 <sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR 光譜分別圖示於圖 1 及圖 2 , 化合物 2 之 <sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR 光譜圖示於圖 3 及圖 4 。

化合物 1 :

$^1\text{H NMR}$  ( DMSO- $d_6$  中 ) 係可見  $\delta$  10.34, 9.37, 9.17, 9.09, 9.01, 8.88, 8.75, 8.71, 8.68, 8.08, 8.04, 7.62, 6.81, 6.77, 6.72, 6.55, 6.49, 6.39, 6.04, 5.86, 5.55, 5.47, 5.34, 5.23, 4.96, 4.79, 4.64, 4.04, 4.02, 3.92, 3.90, 3.85, 3.83, 3.73, 3.71, 3.64, 3.62, 3.54, 3.52, 3.07, 3.05, 2.96, 2.93, 2.74, 2.72, 2.70 之訊號。

$^{13}\text{C NMR}$  則可見  $\delta$  165.29, 165.13, 165.02, 165.01, 154.45, 154.44, 154.25, 152.33, 152.20, 151.97, 151.66, 151.62, 150.82, 150.66, 150.52, 149.66, 145.63, 145.56, 145.54, 145.50, 145.50, 145.27, 145.23, 145.18, 138.46, 138.38, 132.77, 132.26, 132.12, 128.50, 127.61, 119.20, 119.17, 118.96, 118.90, 108.73, 108.55, 107.05, 106.19, 105.19, 105.05, 104.31, 103.77, 99.01, 98.52, 77.44, 76.65, 76.51, 76.10, 67.53, 67.50, 66.95, 66.63, 25.94, 25.63, 25.49, 25.30, 17.14, 16.74, 15.81 之訊號。

化合物 2 :

$^1\text{H NMR}$  ( DMSO- $d_6$  中 ) 係可見  $\delta$  9.91, 9.25, 9.16, 8.09, 7.22, 6.81, 6.76, 6.74, 6.52, 5.94, 5.50, 5.38, 4.77, 4.52, 3.95, 3.95, 3.80, 3.54, 2.80, 2.74, 2.73, 2.67 之訊號。

$^{13}\text{C NMR}$  則可見  $\delta$  165.08, 165.01, 154.06, 152.83, 152.35, 151.45, 150.78, 150.26, 145.52, 145.52, 145.24, 145.18, 138.49, 138.44, 132.21, 132.10, 128.42, 127.63,

119.05, 118.95, 108.58, 108.46, 108.46, 106.95, 105.74, 104.92, 104.06, 98.32, 97.81, 76.59, 75.94, 66.69, 66.35, 26.33, 25.26, 16.72, 15.99 之訊號。

藉由該合成及純化所得之各化合物分別為化合物 3 (烏龍酮雙黃烷-A, 984mg), 化合物 4 (烏龍酮雙黃烷-B, 374mg), 化合物 5 (468mg), 化合物 6 (烏龍酮雙黃烷-C, 33mg), 化合物 1 (15mg) 及化合物 2 (44mg)。

[實施例 2] 使用培養血管內皮細胞之血管內皮功能改善效果檢討

(A) 式 (II)、式 (III) 之血管內皮功能改善效果

針對於實施例 1 所合成・純化之式 (II)、式 (III) 之化合物, 針對與血管內皮功能有關的基因表現之影響進行檢討。另外比較對象係使用已知血管內皮功能改善作用之 EGCG 單量體 (和光純藥工業股份有限公司製) 與茶黃素、茶黃素 3-O-沒食子酸酯、茶黃素 3'-O-沒食子酸酯及茶黃素 3, 3'-O-雙沒食子酸酯 (長良科學股份有限公司製)。

將該等化合物溶解於經滅菌完成之二甲基亞砜 (DMSO, NACALAI TESQUE 股份有限公司), 調製為濃度 10mM 之溶液。

再將該等溶液使用 HuMedia-EG2 培養基 (倉敷紡績股份有限公司) 進行 1000 倍稀釋, 調製成最終濃度為 10 $\mu$ M 之溶液 (DMSO 最終濃度為 0.1 V/V%)。將該等檢

體溶液以 3mL/孔，對培養於 6 孔細胞培養盤中之人類臍帶血管內皮細胞（倉敷紡績股份有限公司）進行添加，並於 37°C，5%CO<sub>2</sub> 之條件下進行 8 小時培養。

將細胞以 ISOGEN（股份有限公司日本基因）進行回收，載自細胞中脆取 RNA。進而使用 RNeasy Mini Kit（QIAGEN）進行 RNA 純化。將純化後之總 RNA 200ng 作為鑄型，再使用 High-Capacity cDNA reverse transcription kit（Appliedbiosystems 股份有限公司）合成 cDNA，並進行定量 PCR。使用 GAPDH 基因作為內部標準，並以 Ct 法進行解析，計算出相對於未進行處置之細胞，被驗檢體之基因表現變化率（相對於對照組之倍率）。

EGCG、式（II）（OHBF-Tet-1）、式（III）（OHBF-Tet-2）、茶黃素（THF）、茶黃素 3-O-沒食子酸酯（THF3G）、茶黃素 3'-O-沒食子酸酯（THF3'G）及茶黃素 3, 3'-O-雙沒食子酸酯（THFDiG）之各基因表現變化率圖示於圖 5~8。

使式（II）及式（III）之化合物之 eNOS 基因表現增強為 3 倍左右（圖 5），GTP-CH1 基因表現為 7 倍左右（圖 6），DDAH2 基因表現為 3 倍左右（圖 7）。另外，作用為使血管內皮細胞產生活性氧，使血管內皮功能降低之 NADPH 氧化酶的 Nox4 次型基因之表現，於式（II）及式（III）之化合物存在下，顯示了戲劇性地降低（圖 8）。

反之 EGCG 單量體及茶黃素類於此次檢討的濃度下，所有的基因表現幾乎沒有變化，可明確得知本發明之

EGCG 4 聚物，較 EGCG 單量體及茶黃素類於低濃度下有效。

(B) 各種 EGCG 聚合物之血管內皮功能改善效果

針對 EGCG 2 聚物及 3 聚物對與血管內皮功能有關之基因的表現之影響進行檢討。於評價時所使用之 EGCG 聚合物中，茶雙沒食子兒茶素 (TSN) -A 係使用以論文 (Hashimoto, F. Nonaka, G. Nishioka, I. Chem. Pharm. Bull. 36(5), 1676-1684(1988)為準而合成者，烏龍酮雙黃烷-A、烏龍酮雙黃烷-B、烏龍酮雙黃烷-C 及化合物 5 係使用於實施例 1 中所合成・純化者，評價以前述 (A) 相同方法進行。

烏龍酮雙黃烷-A (OHBF-A)、烏龍酮雙黃烷-B (OHBF-B)、烏龍酮雙黃烷-C (OHBF-C)、化合物 5 (OHBF Tri-1)、茶雙沒食子兒茶素-A (TSN-A) 之各基因表現變化率圖示於圖 9~12。

如圖 9~12 所示，EGCG 2 聚物之烏龍酮雙黃烷-A、烏龍酮雙黃烷-B、烏龍酮雙黃烷-C、茶雙沒食子兒茶素-A 及 EGCG 3 聚物之化合物 5，於與前述 A 中檢討之式 (II) 及式 (III) 之化合物相同濃度時，幾乎沒有使任一基因表現產生變化。

由以上結果可明確得知本發明之 EGCG 4 聚物之血管內皮功能改善效果，於 EGCG 聚合物中尤其係以本發明之化合物具有特徵性的作用。

[實施例 3] LC-MS/MS 之測定條件及測定黑烏龍茶

LC-MS/MS 測定係以 4000 Q TRAP (Applied 公司製) , 使用 Turbo Ion Spray , 以 negative mode , 根據以下條件進行測定 ; Collision energy : 46eV(nega.) , Ionspray voltage : 4500V , 溫度 : 450°C 。

於 MRM (multiple reaction monitoring) 之測定頻道為 EGCG 4 聚物化合物 , 以 933.16/168.90 (nega. 2 價) , 以下述測定條件進行。標準物質係使用式 (III) 之化合物。

管柱 : Develosil C30-UG-3 (野村化學 , 3mm  $\phi$   $\times$  150mm)

流速 : 0.3mL/分鐘

管柱溫度 : 40°C

移動相 A : 0.1 V/V% HCOOH/H<sub>2</sub>O

移動相 B : 0.1 V/V% HCOOH/CH<sub>3</sub>CN

梯度程式 : A/B = 91/9 (0 分鐘)  $\rightarrow$  A/B = 40/60 (17 分鐘)  $\rightarrow$  A/B = 15/85 (17.1 分鐘)  $\rightarrow$  A/B = 15/85 (17.1 分鐘 ~ 19 分鐘)

使用上述條件進行黑烏龍茶之測定。

將黑烏龍茶之調和液 (殺菌前溶液) 以 CHP-20P 管柱 (三菱化學股份有限) 逐步進行劃分 , 並進行各劃分之定量。將以各劃分中被檢出之濃度合算起來作為調和液中濃度。調和液中之濃度係以 EGCG 4 聚物被檢出 , 將 4 個成

份合算，再換算為式（III）之化合物為 55ng/ml。

【圖式簡單說明】

[圖 1]圖 1 係化合物 1 之  $^1\text{H}$ NMR 光譜圖。

[圖 2]圖 2 係化合物 1 之  $^{13}\text{C}$ NMR 光譜圖。

[圖 3]圖 3 係化合物 2 之  $^1\text{H}$ NMR 光譜圖。

[圖 4]圖 4 係化合物 2 之  $^{13}\text{C}$ NMR 光譜圖。

[圖 5]圖 5 係顯示 eNOS 表現結果之柱狀圖。

[圖 6]圖 6 係顯示 GTP-CH1 表現結果之柱狀圖。

[圖 7]圖 7 係顯示 DDAH2 表現結果之柱狀圖。

[圖 8]圖 8 係顯示 NADPH 氧化酶之 Nox4 次型基因表現結果之柱狀圖。

[圖 9]圖 9 係顯示 eNOS 表現結果之柱狀圖。

[圖 10]圖 10 係顯示 GTP-CH1 表現結果之柱狀圖。

[圖 11]圖 11 係顯示 DDAH2 表現結果之柱狀圖。

[圖 12]圖 12 係顯示 NADPH 氧化酶之 Nox4 次型基因表現結果之柱狀圖。

# 發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98129103

AGK 31 / 253

2006.01

※申請日：98年08月28日

※IPC分類：

A23L 1/30

2006.01

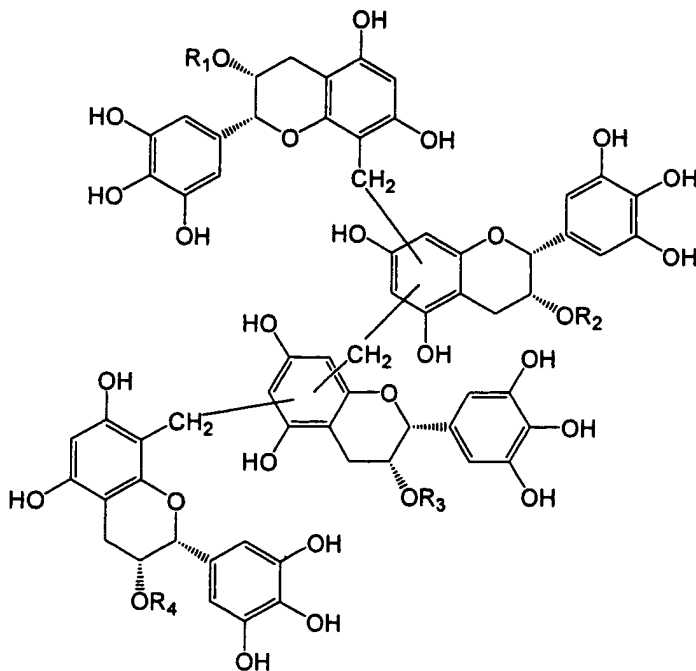
一、發明名稱：(中文/英文)

新穎的表沒食子兒茶素沒食子酸酯4聚物、及含其之血管內皮功能改善劑

## 二、中文發明摘要：

本發明係提供可持續攝取，且具有藉由增強來自血管內皮細胞的 NO 之作用等，而改善血管內皮功能的作用之化合物。

本發明係有關以式(I)(式中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  係分別為 H 或沒食子酸酯基)所示之化合物或其鹽，以及含該化合物之血管內皮功能改善劑、飲食品或醫藥組成物。



(I)

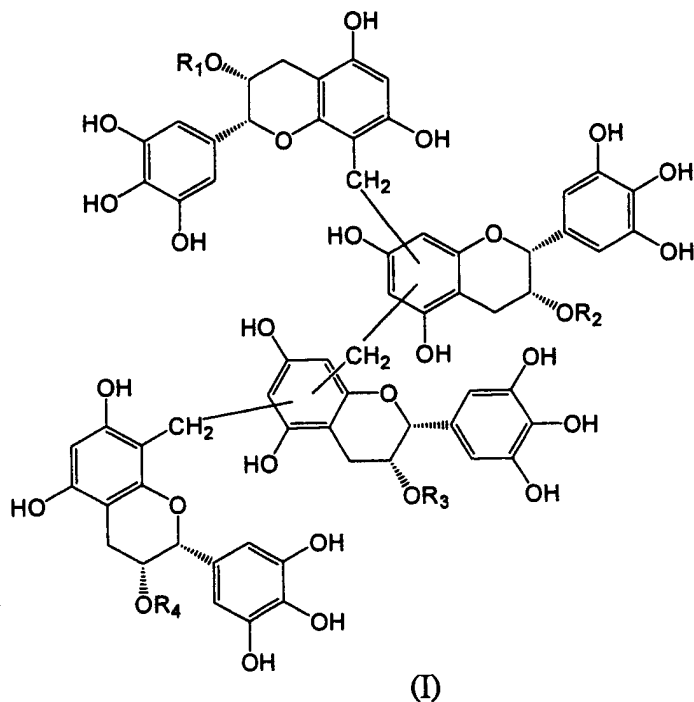
201014591

三、英文發明摘要：

## 七、申請專利範圍：

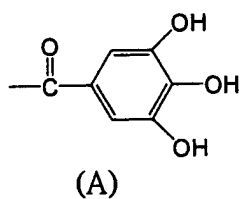
1. 一種以式 (I) 所示之化合物、或其鹽，

## 【化 1】



(式中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  係分別為 H 或以式 (A)：

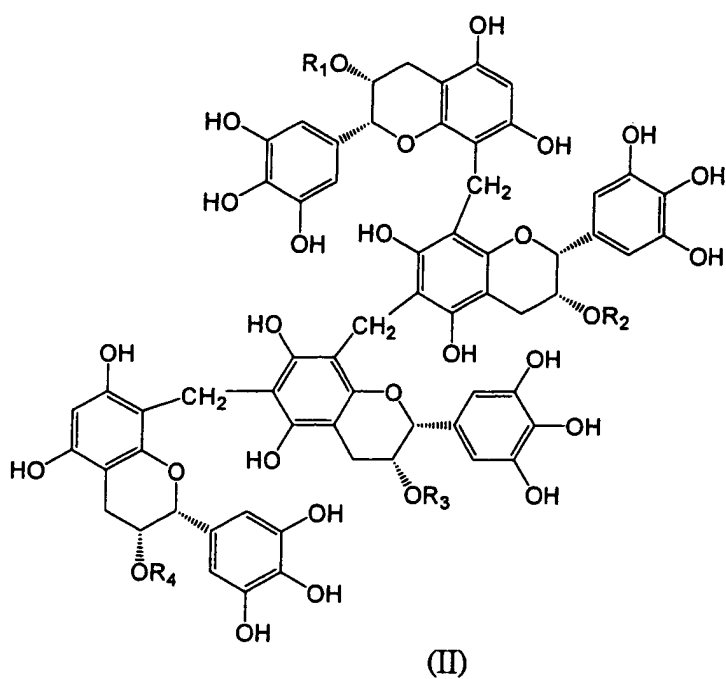
## 【化 2】



所示之基)。

2. 如申請專利範圍第 1 項之化合物、或其鹽，其特徵係以式 (II)：

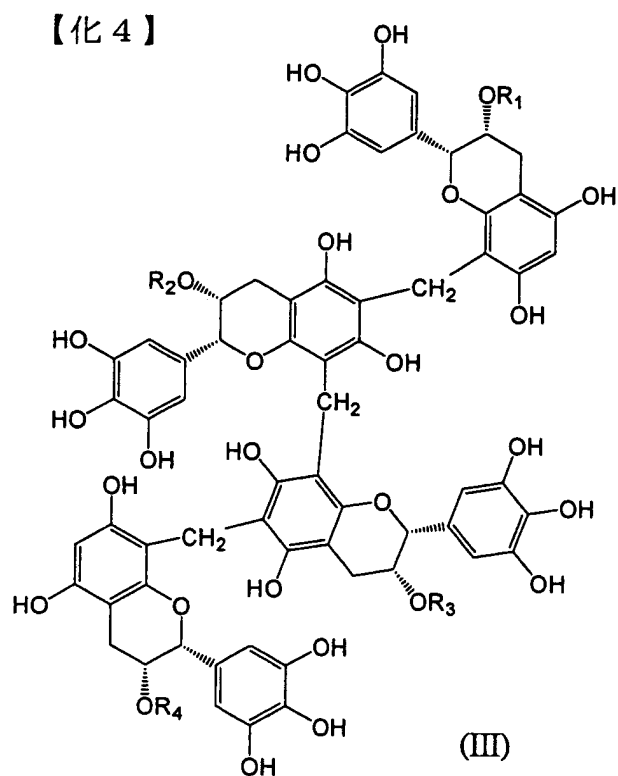
## 【化 3】



(式中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  係與前述相同)

所示。

3. 如申請專利範圍第 1 項之化合物、或其鹽，其特徵係以式 (III)：

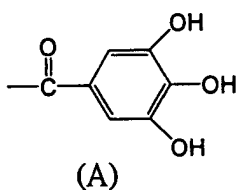


(式中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  係與前述相同)

所示。

4. 如申請專利範圍第 1~3 項中任一項之化合物或其鹽，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及  $R_4$  均係以式 (A)：

【化 5】



所示之基。

5. 一種血管內皮功能改善劑，其特徵係含有如申請專利範圍第 1~4 項中任一項之化合物或其鹽。

6. 一種飲食品，其特徵係經混合如申請專利範圍第 1~4 項中任一項之化合物或其鹽。

7. 一種醫藥組成物，其特徵係含有如申請專利範圍第 1~4 項中任一項之化合物或其鹽。

8. 一種申請專利範圍第 1~4 項中任一項之化合物之製造方法，其特徵係包含於酸存在下，使表沒食子兒茶素沒食子酸酯或表沒食子兒茶素與甲醛進行反應之步驟。

圖1

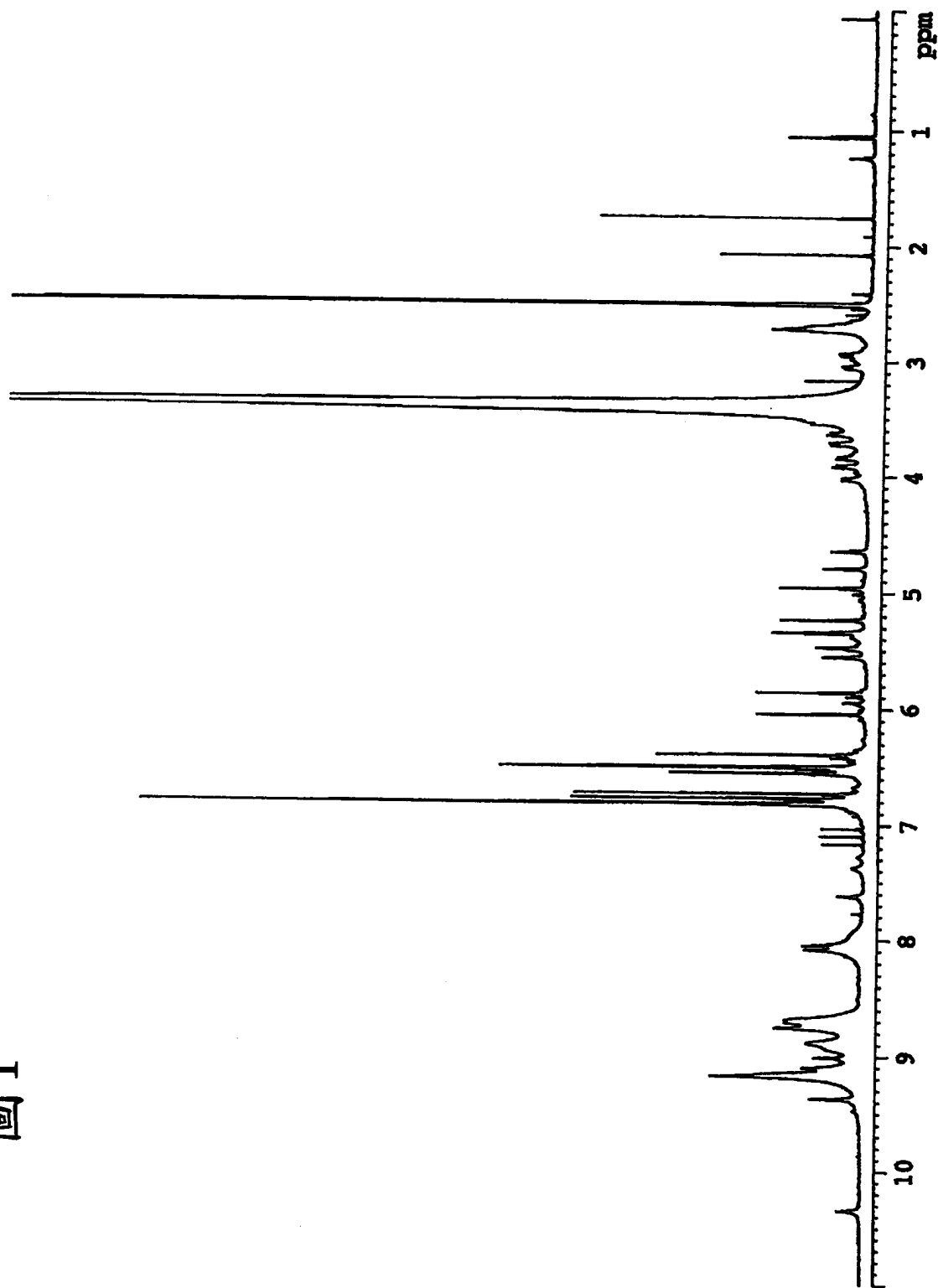


圖2

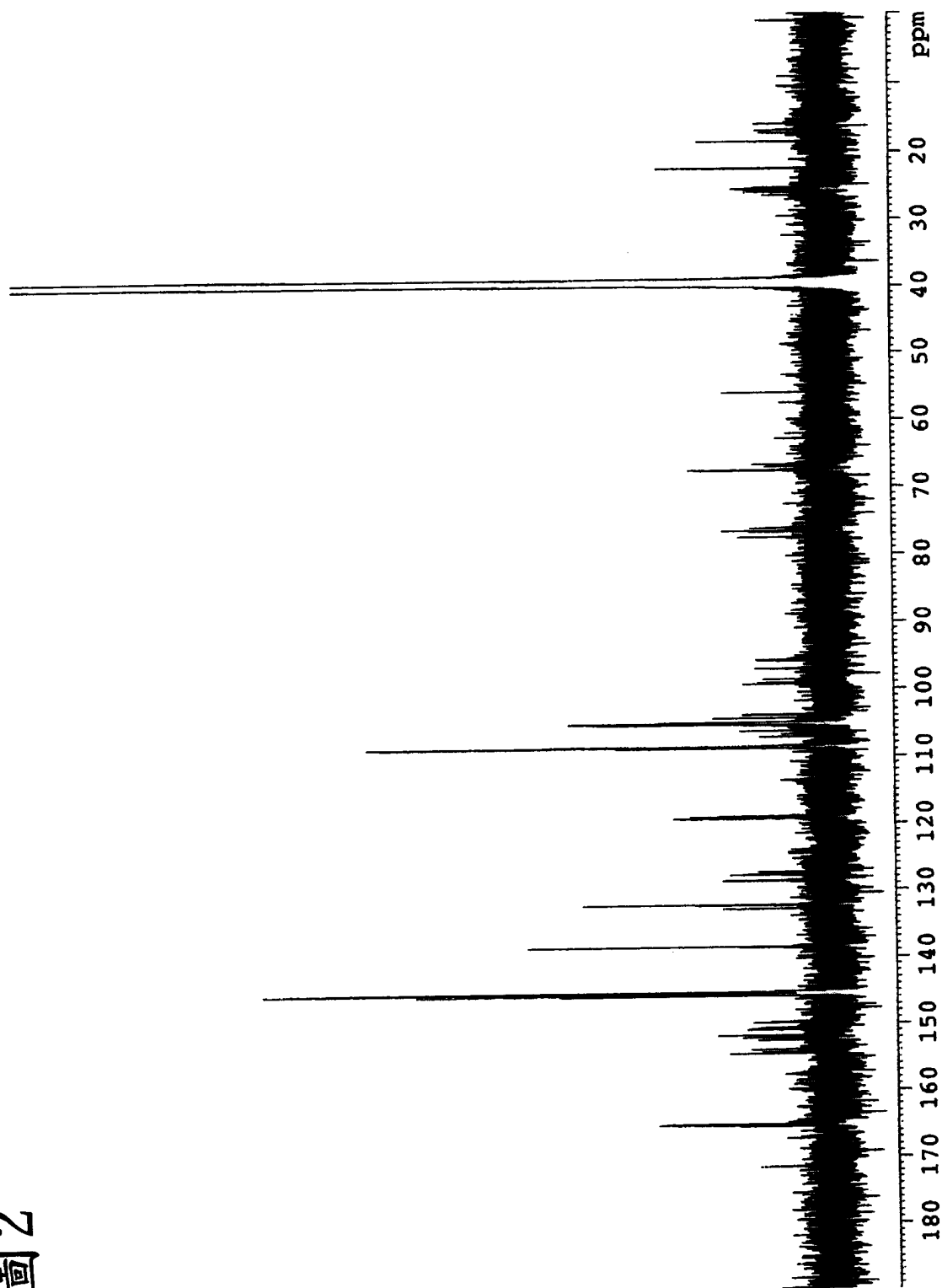


圖3

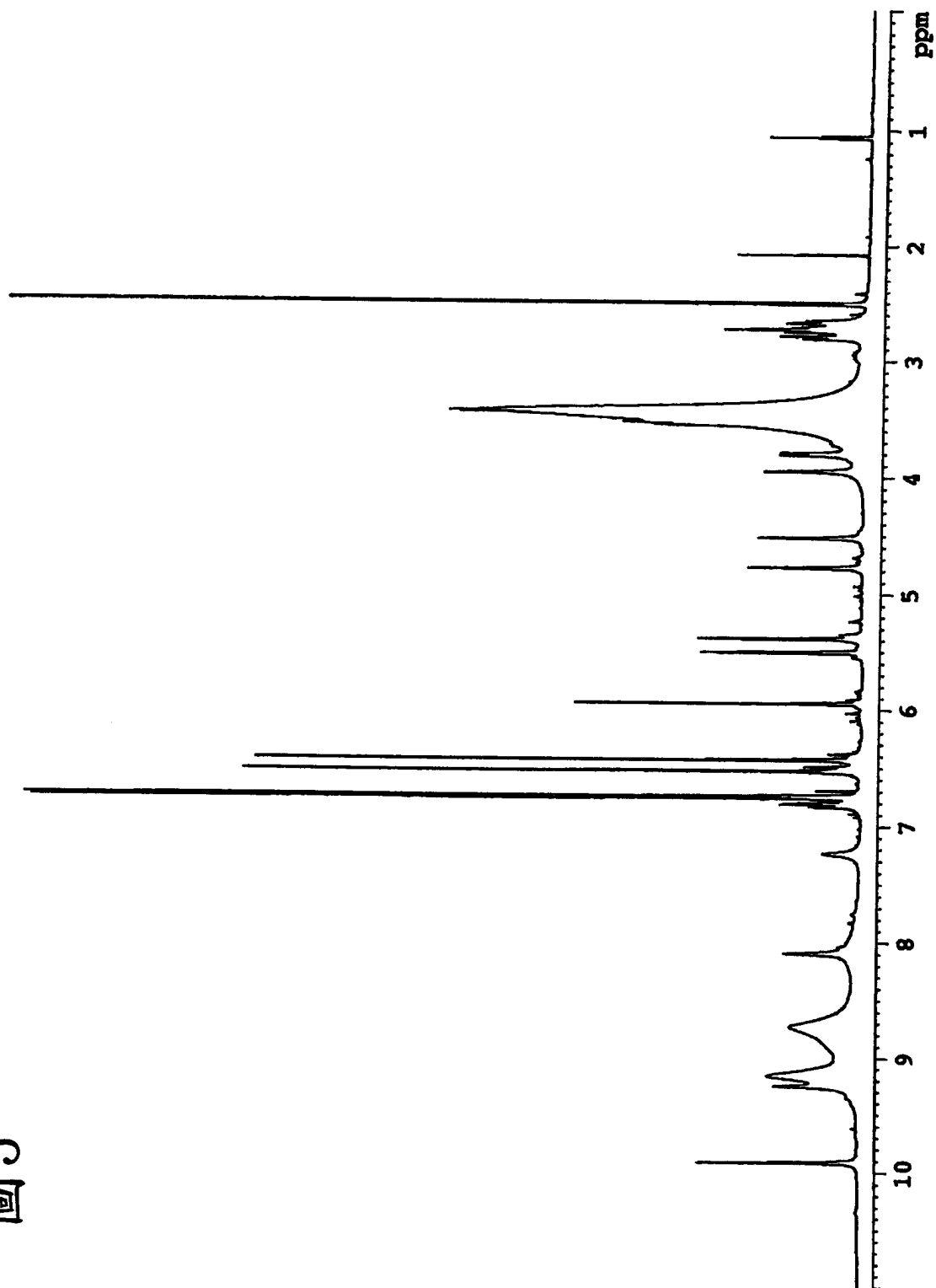


圖4

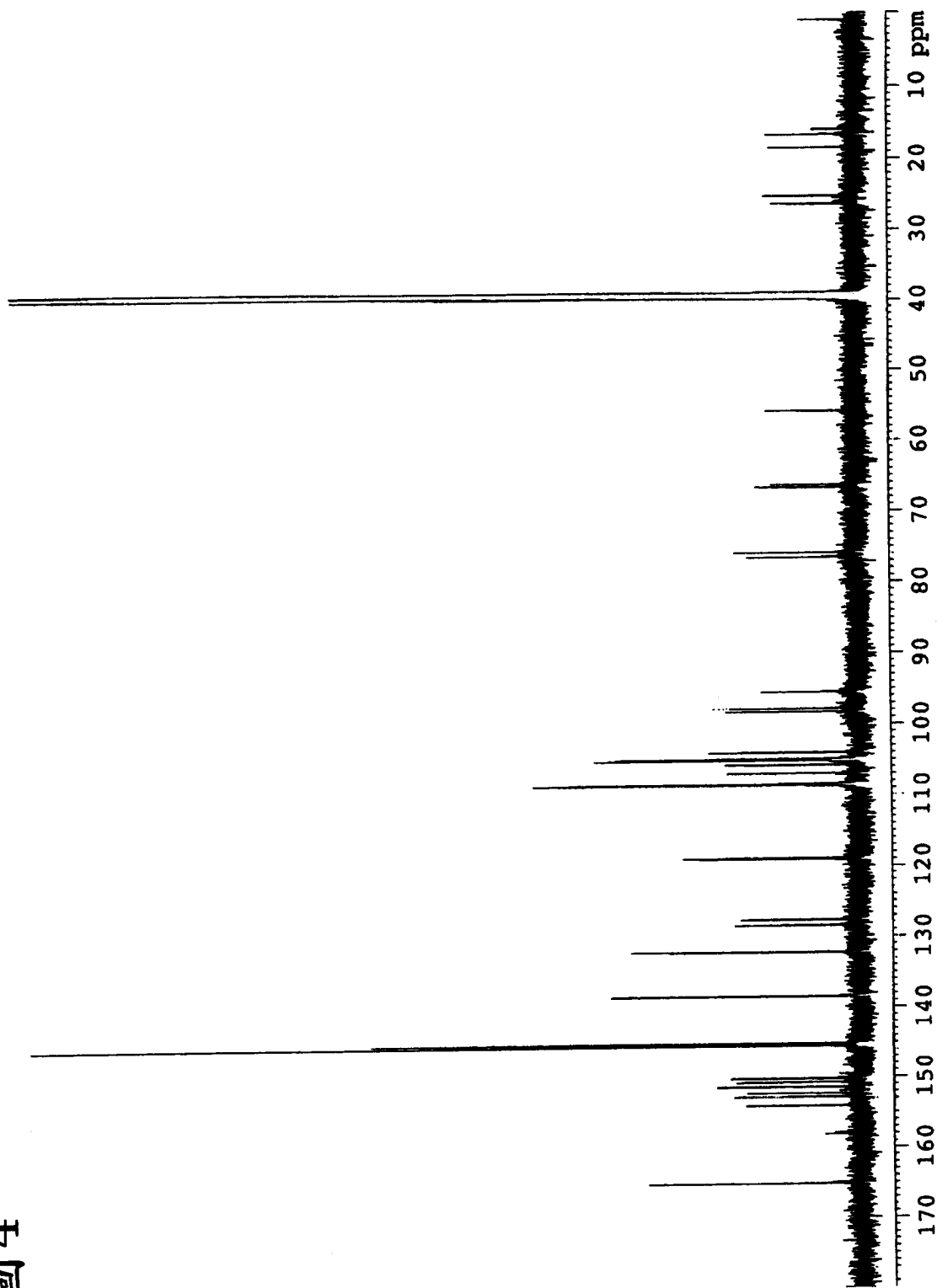


圖5

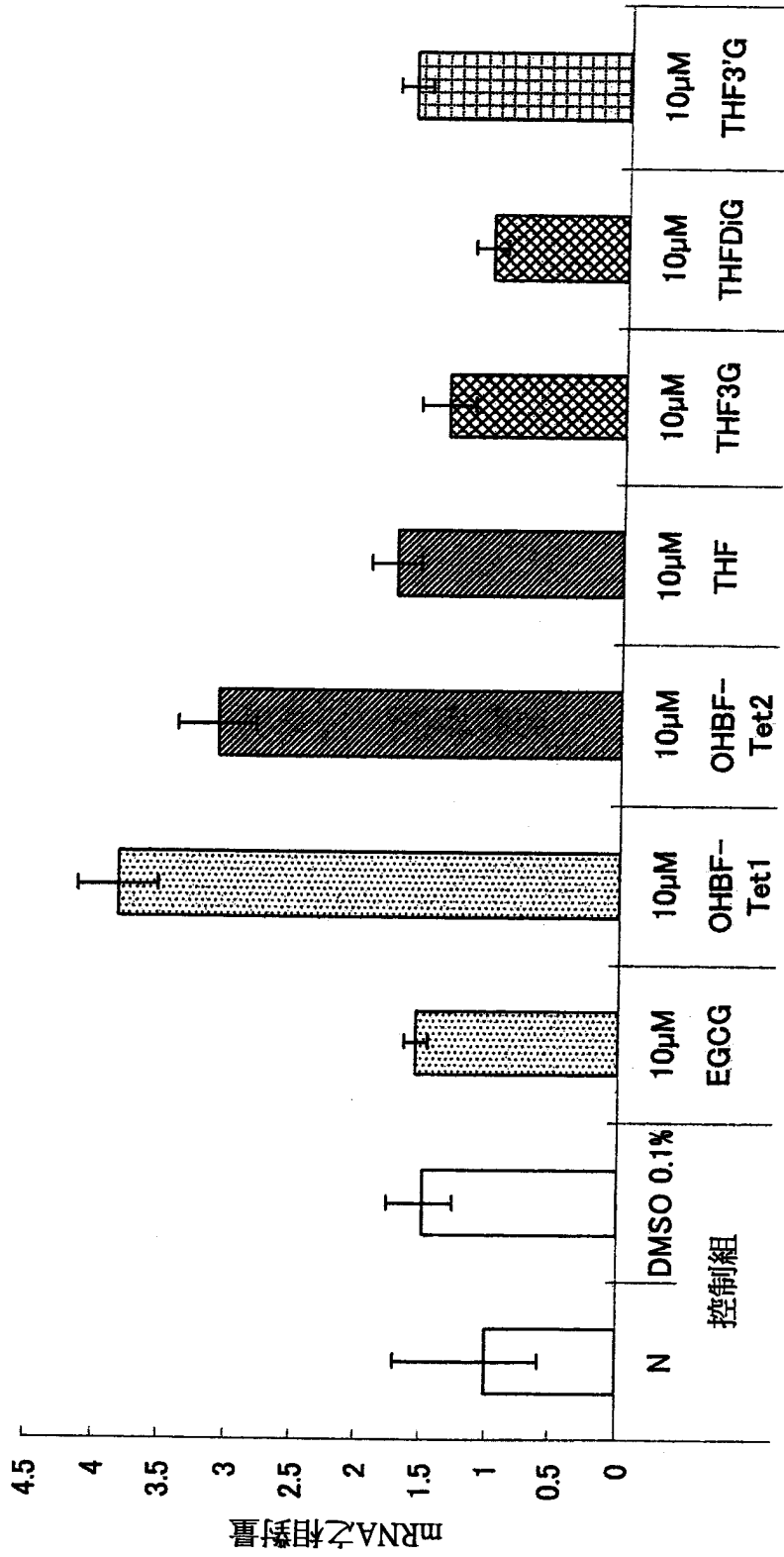


圖6

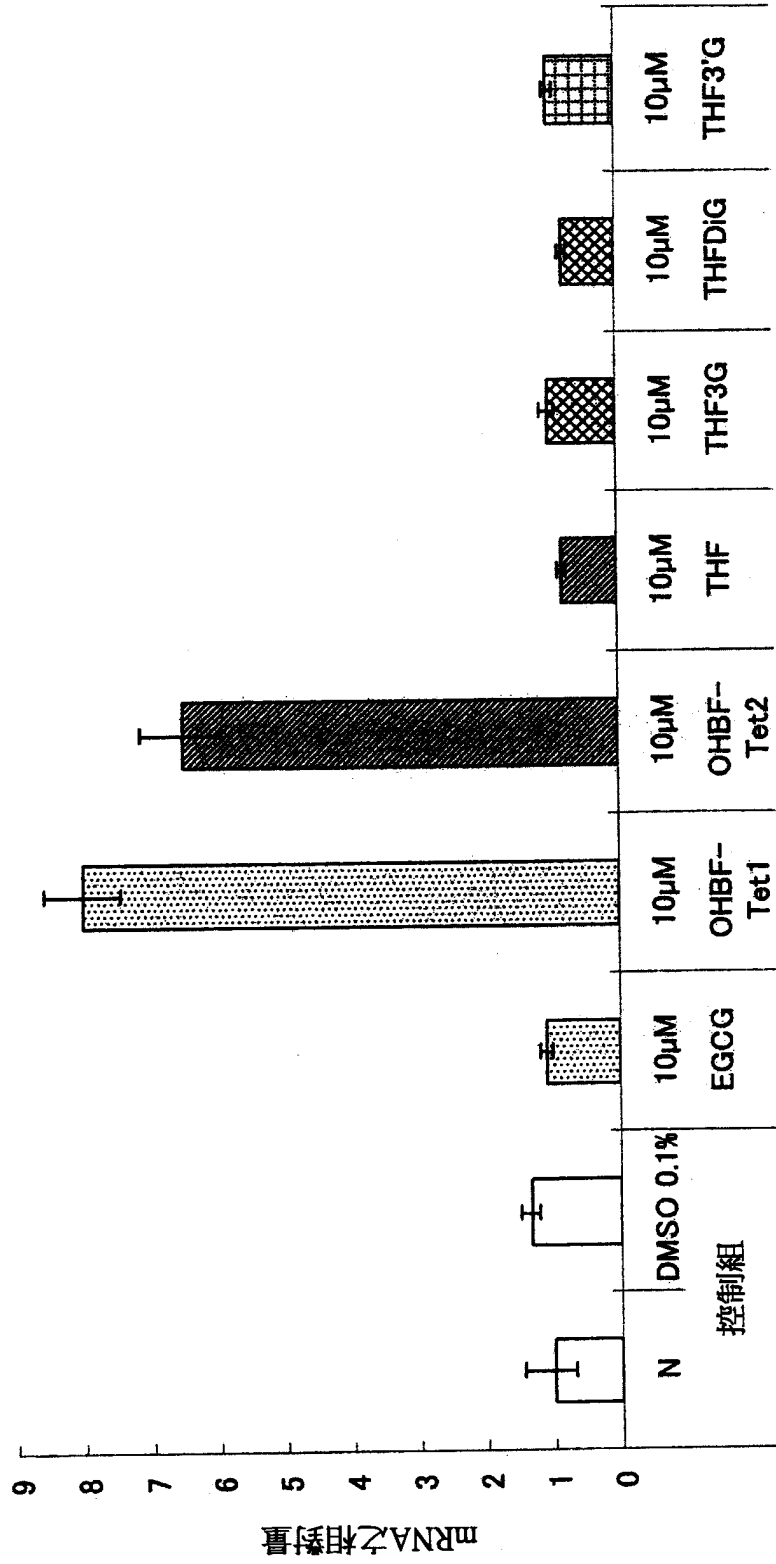


圖7

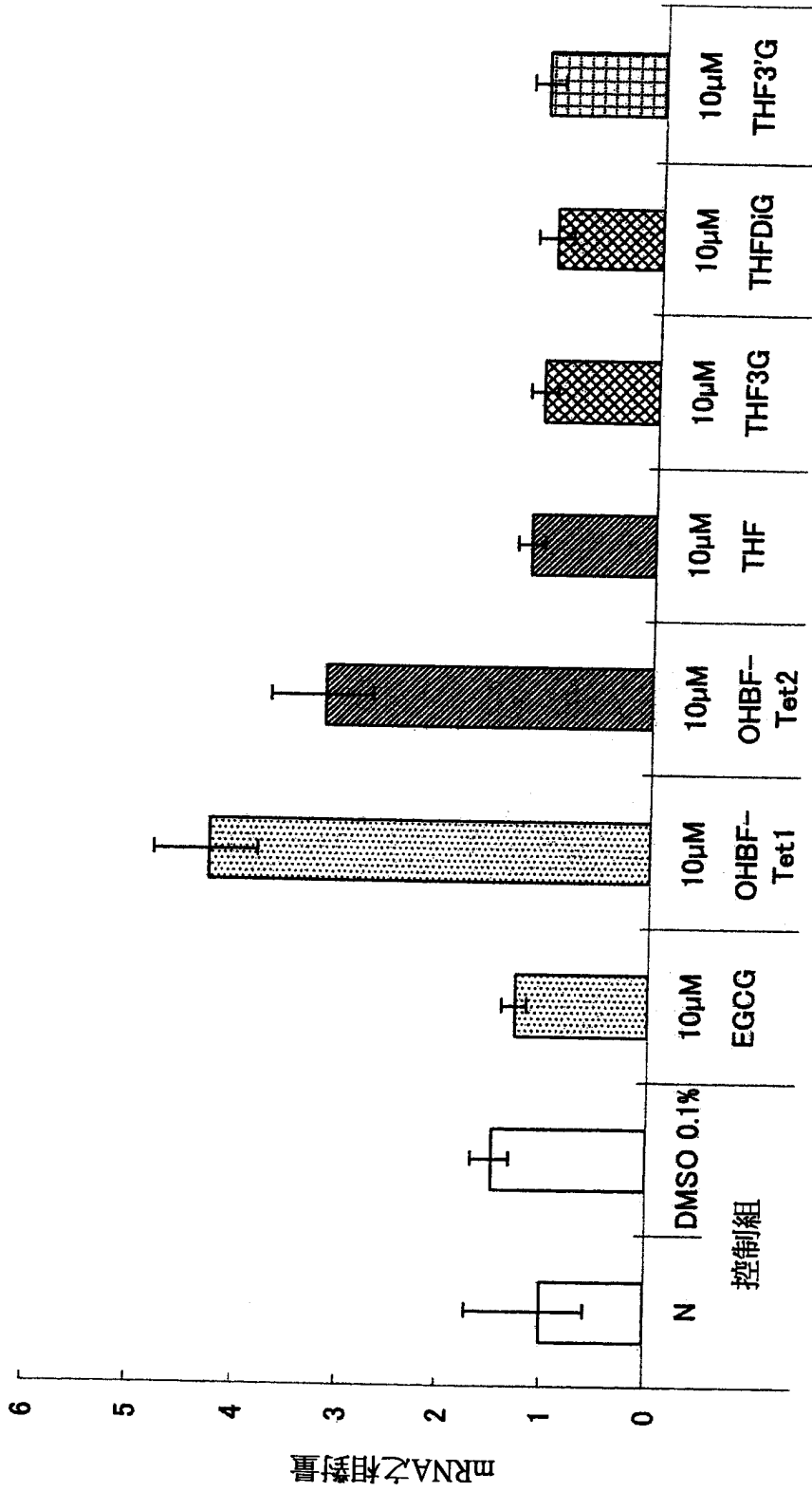


圖8

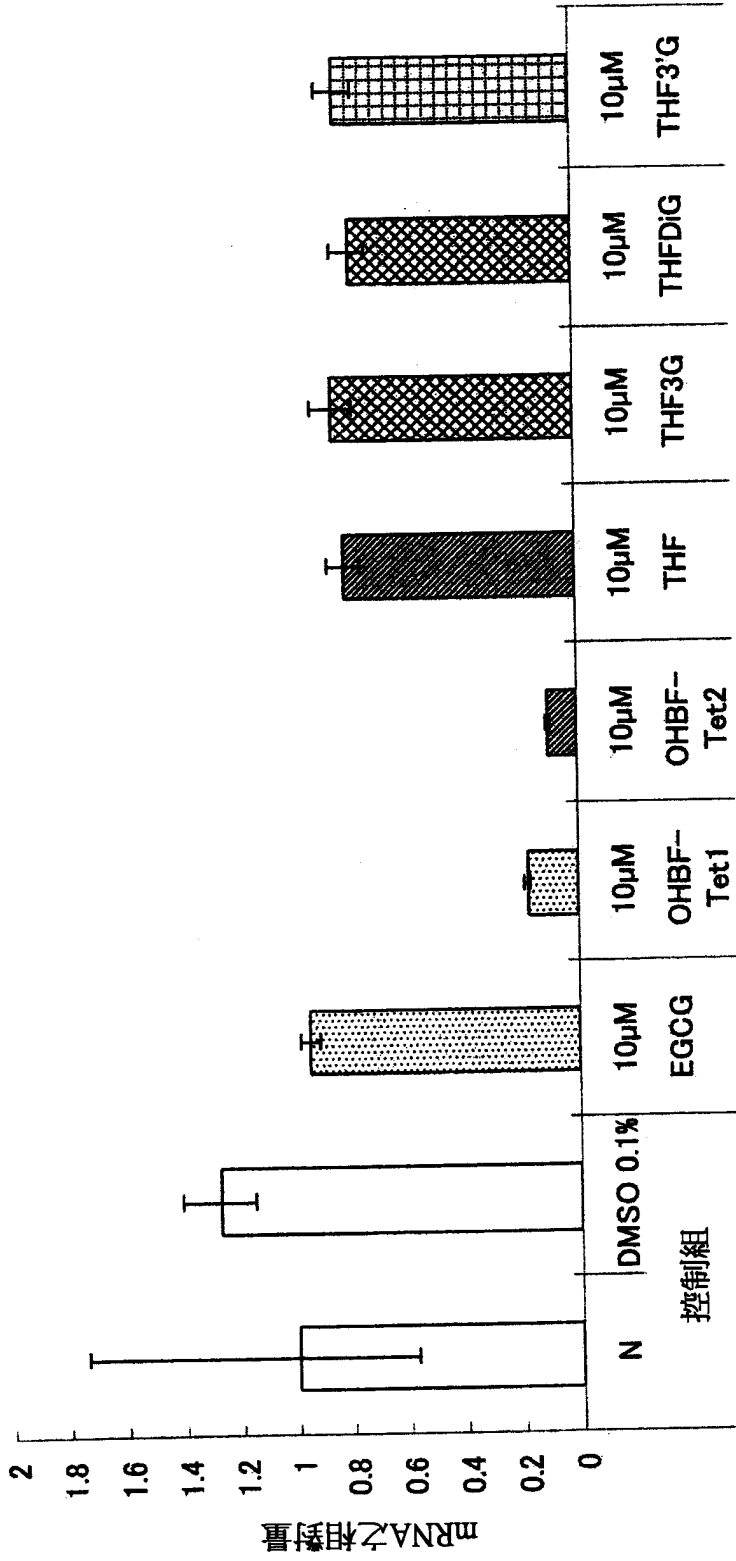


圖9

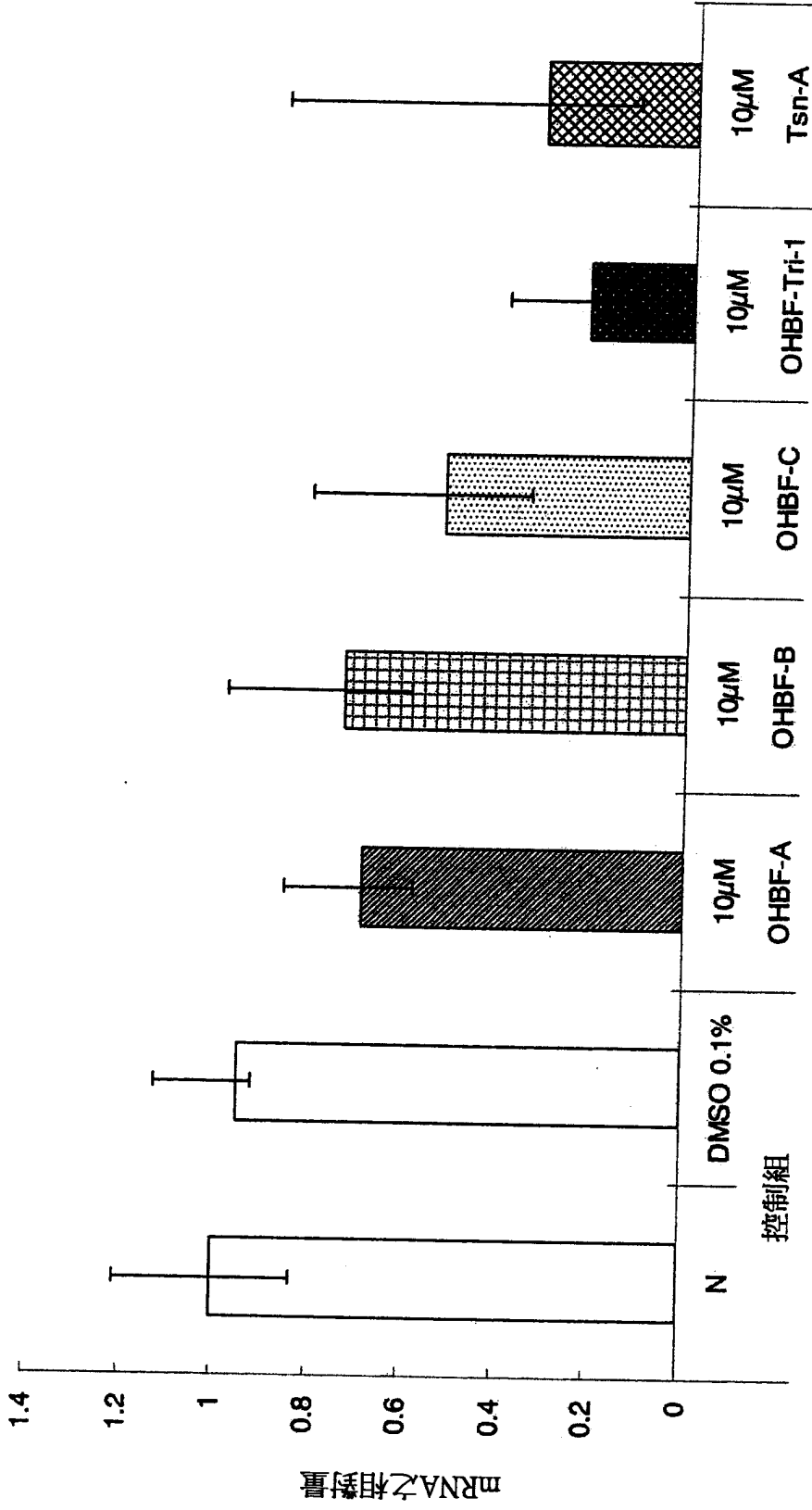


圖10

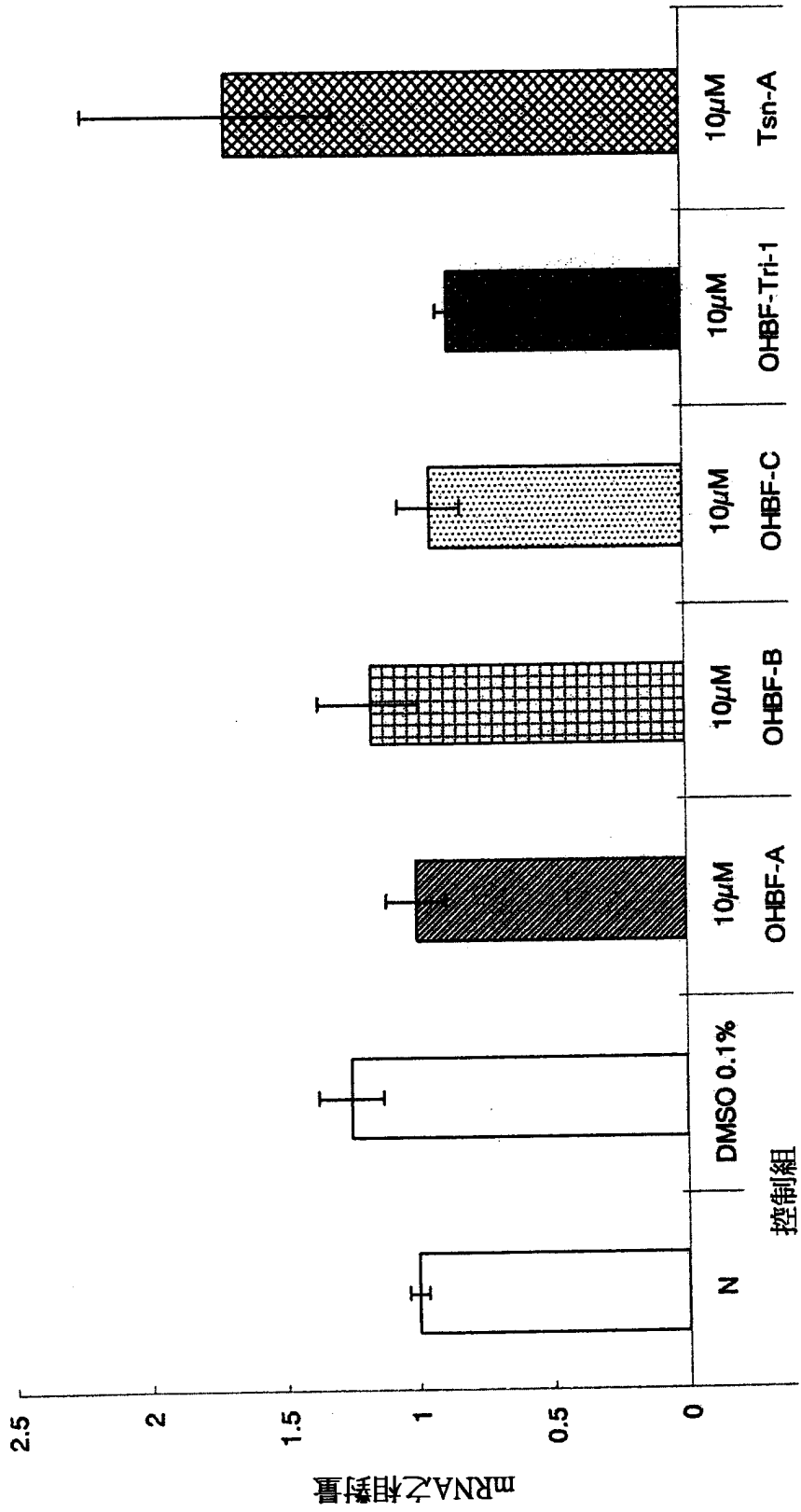


圖11

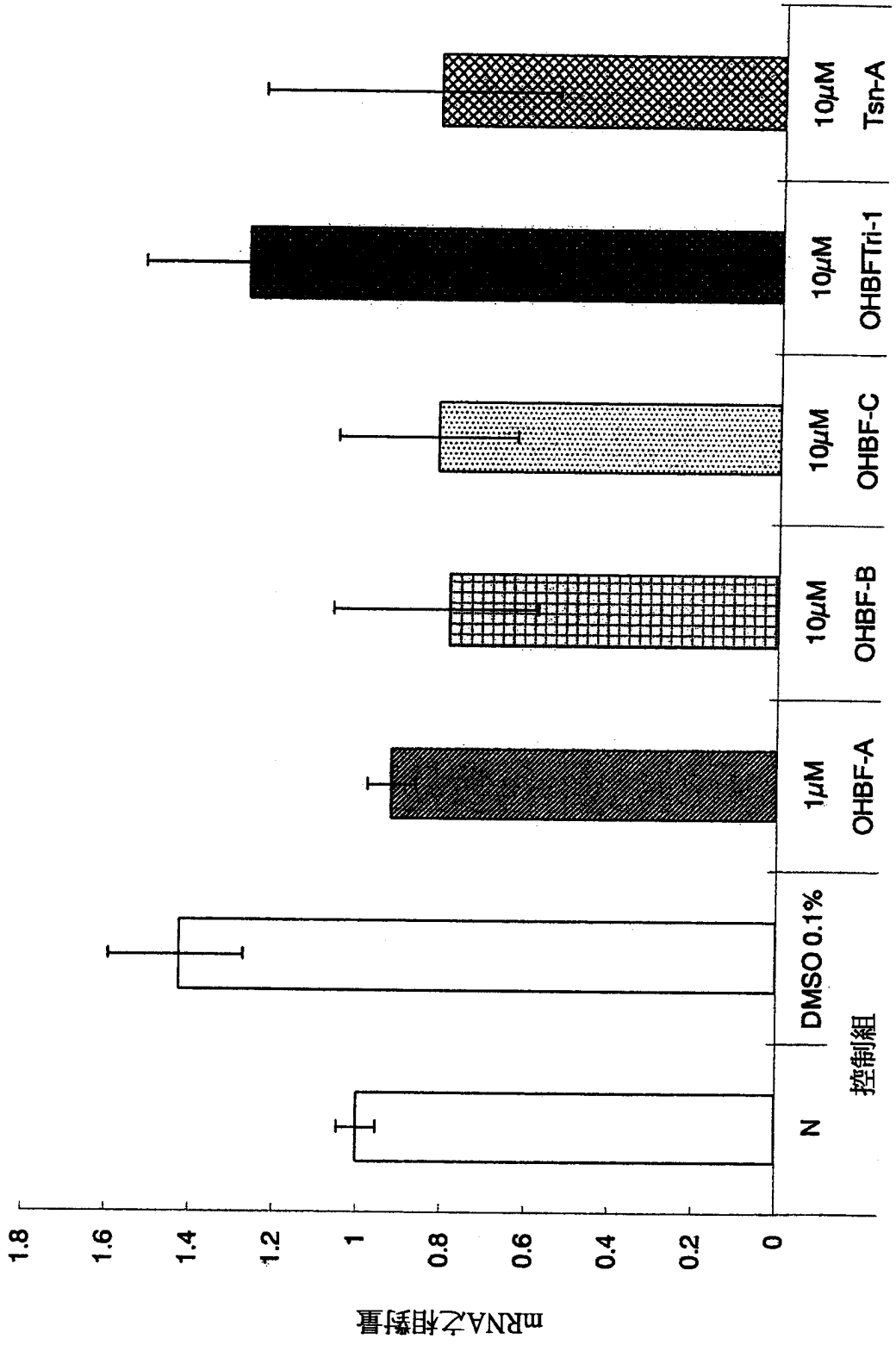
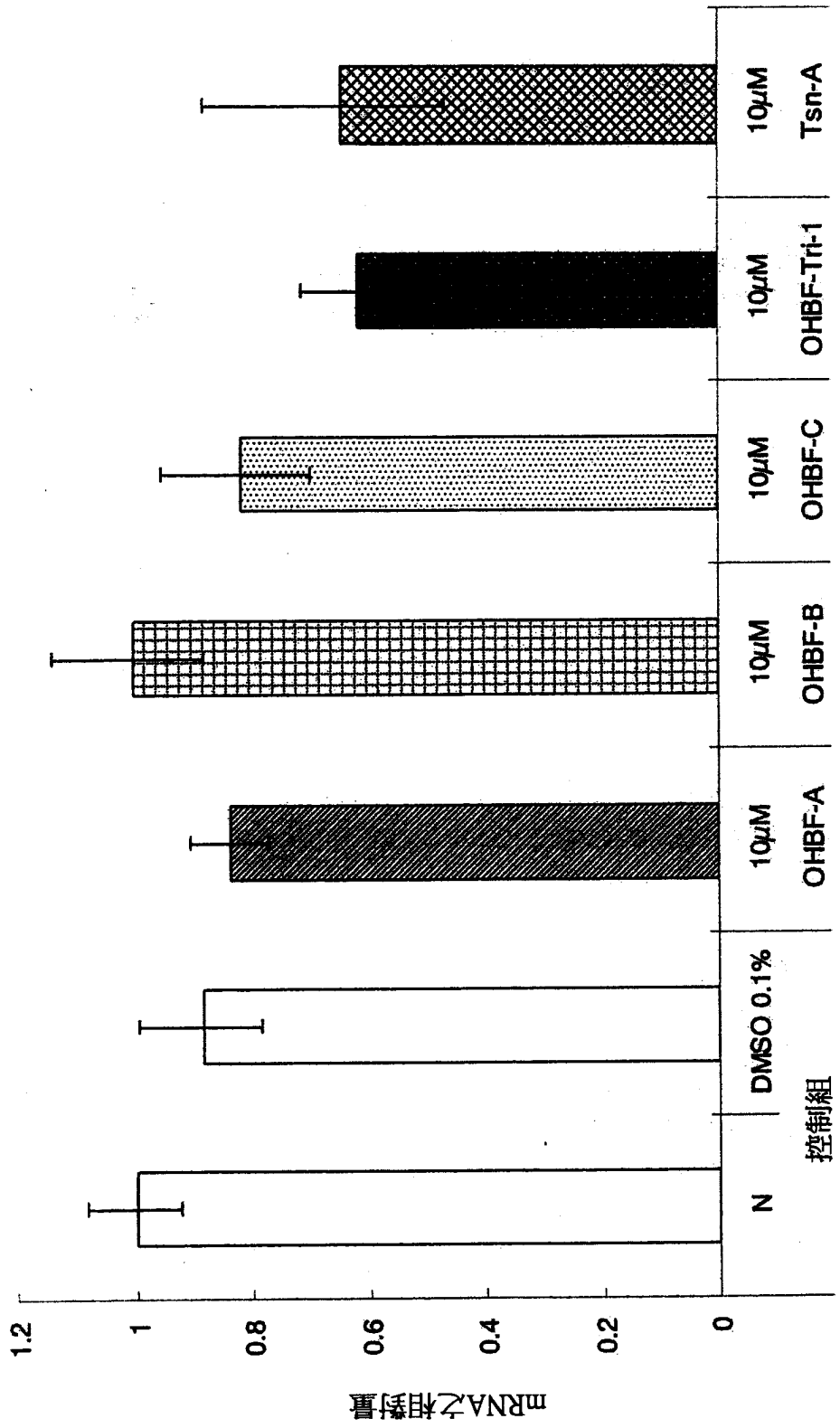


圖12



四、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：化 1

【化 1】

