

發明專利說明書

200626164

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：94101377

※申請日期：94.1.18

※IPC 分類：

A61K 35/178

一、發明名稱：(中文/英文)

以茶葉黑色素預防及改善乙醯胺酚(acetaminophen)毒性

PREVENTION AND AMELIORATION OF ACETAMINOPHEN TOXICITY WITH TEA
MELANIN

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立交通大學

NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

張俊彥/CHANG, CHUN-YEN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

新竹市大學路 1001 號

1001 Ta-Hsueh Rd., Hsinchu, Taiwan R.O.C.

國籍：(中文/英文)

中華民國/R.O.C

三、發明人：(共 1 人)

姓名：(中文/英文)

黃國華/HUANG, G. STEVEN

國籍：(中文/英文)

中華民國/R.O.C

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為：93年7月20日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

五、中文發明摘要：

本發明係關於以茶葉黑色素預防及/或改善乙醯胺酚 (acetaminophen) 毒性之方法，其包括於攝取過量乙醯胺酚之前或同時對哺乳動物投與有效量之茶葉黑色素；一種可用於預防或降低乙醯胺酚毒性之含有茶葉黑色素之醫藥組成物，以及含有茶葉黑色素與乙醯胺酚之醫藥組成物。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to a method for preventing and/or reducing the toxicity of acetaminophen which comprises administering to a mammal an amount of tea melanin before or simultaneous with dosage of acetaminophen, a pharmaceutical composition containing tea melanin, and a pharmaceutical composition containing tea melanin and acetaminophen for preventing and/or reducing the toxicity of acetaminophen.

七、指定代表圖：

- (一)本案指定代表圖為：無。
- (二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於以茶葉黑色素預防及改善乙醯胺酚 (acetaminophen) 毒性之方法，以及可用於預防或降低乙醯胺酚毒性之含茶葉黑色素與乙醯胺酚之醫藥組成物。

【先前技術】

N-乙醯基-對-胺酚 (NAPAP) 為常見之止痛藥及退熱藥成分，亦知為乙醯胺酚 (acetaminophen)、撲熱息痛 (paracetamol)、或泰樂諾 (Tylenol)。治療劑量範圍內之乙醯胺酚 (以下文中稱為 NAPAP) 是安全的，但使用過量可引起肝臟損害，造成小葉中心性肝壞死、肝衰竭、甚至死亡 (Ray, S. D. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 279, 1470-1483.)。嚴重的 NAPAP 中毒常需肝臟移植 (Koivusalo, A. M. et al., *Duodecim* 2002, 118, 649-650.)。此外，亦發現 NAPAP 可抑制抗體的製造 (Yamaura, K. et al., *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25, 201-205.)。

NAPAP 之肝毒與細胞色素 P450 加單氧酶 (cytochrome P450 monooxygenase) 產生之高反應性中間代謝物 N-乙醯基-對-苯并醌亞胺 (NAPQI) 之聚積有極大關聯性 (Ray, S. D. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 279, 1470-1483.; Esterline, R. L. et al., *Biochem Pharmacol.* 1989, 38, 2387-2390.)。通常 NAPQI 可與還原型穀胱甘肽 (GSH) 結合而去毒性，但當 GSH 含量被耗盡，NAPQI 將共價結合到其他細胞構造而造成肝臟損害 (Albano, E. et al., *Mol.*

Pharmacol. 1985, 28, 306-322.)。抑制 P450 可降低該反應性中間代謝物的形成，因此可用於防止 NAPAP 所致之肝毒 (Jeong, H. G. et al., *Biochem. Mol. Biol. Intl.* 1998, 45, 163-170.; Jorgensen, L. et al., *Pharmacol. Toxicol.* 1988, 62, 267-271)。

此外，氧化性壓力，尤其是脂質過氧化作用，亦促進 NAPAP 引發肝毒 (Wendel, A. et al., *Biochem. Pharmacol.* 1979, 28, 2051-2055.)。目前已證實內生性抗氧化劑的減少在 NAPAP 所致肝臟損害上扮演關鍵性角色 (Amimoto, T. et al., *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 19, 169-176.)。因此，補充抗氧化劑可作為對抗 NAPAP 所致肝毒之預防措施。就此特點觀之，食物中的天然抗氧化劑可能特別引人關注 (Stavric B. *Clinical Biochemistry* 1994, 27, 319-332.)。例如使用 β -胡蘿蔔素預防或降低 NAPAP 毒性 (U.S. Pat. No. 5,260,340)，以及使用 β -胡蘿蔔素治療肝毒 (U.S. Pat. No. 5,670,549)。又如茶葉之抗氧化功能亦有多所研究。由於茶葉具解毒特性，故於 5000 年前已為中國最古老的民間用藥。目前已知茶葉所含之抗氧化劑為極具潛能之天然保護劑 (Katiyar, S. K. et al., *Cancer Letters* 1993, 73, 167-172.; Wang Z. Y. et al., *Carcinogenesis* 1989, 10, 411-415.)。雖然茶葉抗氧化劑之主要組成物及特性已被充分證實，但有關其高分子形式之資料仍極為不足 (Balentine, D. A. et al., *Critical Rev. Food Sci. Nutrition* 1997, 37, 693-704.)。

近來本案發明人已從山茶 (*Thea sinensis* Linn) 萃取茶葉黑色素 (*Thea sinensis* melanin, 以下文中稱為 TSM) (Sava, V. M. et al., *Food Chemistry* 2001, 73, 177-184.), 至於衍生自不同來源之類似黑色素則早被多所研究, 且有關黑色素螯合及自由基特性等重要性質亦已揭示 (Nicolaus, R. *Melanins*, Hermann; Paris, France, 1968.; Prota, G. *Melanins and melanogenesis*, Academic Press; San Diego, 1998.)。TSM 是茶多酚的高分子聚合物, 具有類似於典型黑色素物化特性的 (Hung, Y.-C. et al., *J. Ethnopharmacol.* 2002, 79, 75-79.)。TSM 於動物體內具有廣泛的生化及藥理活性, 包括抗氧化、消除自由基、以及免疫調節功效 (Sava, V. M. et al., *Food Chemistry* 2001, 73, 177-184.; Sava, V. M. et al., *Food Res. Int.* 2001, 34, 337-343.; Hung, Y-C. et al., *Food Chemistry* 2002, 78, 233-240.)。此外, 令人意想不到的的是 TSM 也展現對抗各種毒性物質如聯苯胺 (benzidine)、聯胺 (hydrazine) 及蛇毒等之保護活性 (Sava, V. M. et al., *Food Res. Int.* 2002, 35, 619-626; Sava, V. M. et al., *Food Res. Intl.* 2003, 36, 505-511.; Hung, Y-C. et al., *Life Sci.* 2003, 72, 1061-1071.; Hung, Y-C. et al., *Life Sci.* 2004, 74:2037-47.)。

目前尚無文獻研究茶葉黑色素於肝毒預防上之功效如何, 因此茶葉黑色素可否用於預防因過量 NAPAP 所致之肝臟損害, 以及可否以其免疫刺激特性如免疫刺激劑般作用於

肝臟的網狀內皮系統(Kate, K. et al., *J. Hepatol.* 1995, 23, 81-94.)等作用，實具有深入探討之必要。再者，目前對於攝取過量 NAPAP 中毒之治療方法包括催吐、洗胃、投與乙醯基乙半胱胺以補充穀胱甘肽等等。雖然在攝取過量 NAPAP 之 24 小時內採取這些治療方法，可有效預防肝毒傷害，但這些治療方法的缺點為無法輕易立即或於適當時間內進行且需醫療人員協助。由於 NAPAP 是不需醫師處方且易於取得之藥物，因此，極有需要簡易且有效預防 NAPAP 所致肝毒之方法。

【發明內容】

發明概述

本發明提供一種預防或降低因攝取乙醯胺酚所致毒性之方法，其包括對攝取過量乙醯胺酚之哺乳動物投與有效量之茶葉黑色素。

本發明亦提供一種用於預防或降低因攝取乙醯胺酚所致毒性之醫藥組成物，其包括預防有效量之茶葉黑色素為活性成分。

本發明進一步提供一種用於預防因攝取乙醯胺酚所致毒性之含乙醯胺酚之醫藥組成物，其包括乙醯胺酚以及茶葉黑色素為活性成分。

發明之詳細說明

本案發明人發現茶葉黑色素對細胞色素 P450 具有抑制功效，以及茶葉黑色素可回復 NAPAP 所抑制之免疫力。因此，本發明目的為利用茶葉黑色素的抗氧化作用、對細胞色

素 P450 之抑制功效、以及免疫調節功效等特性來預防及 / 或降低攝取過量乙醯胺酚所致之毒性，特別是肝臟毒性。換言之，本發明目的係利用茶葉黑色素阻斷 NAPAP 數個引發毒性之主要路徑，達到有效預防及 / 或降低 NAPAP 之中毒情形，如此可使病人於攝取較高劑量乙醯胺酚尋求較佳治療效果之際，可藉由茶葉黑色素免除中毒之危險性。此外，茶葉黑色素亦可用於對乙醯胺酚特別敏感的病人，例如酒精中毒者，防止受到乙醯胺酚的毒性影響。

本發明之一具體例中，TSM(10 mg/kg 至 40 mg/kg)可有效預防 NAPAP(400 mg/kg)中毒之致死率，經由丙胺酸胺基轉移酶 (ALT)、還原型穀胱甘肽 (GSH)、以及氧化型穀胱甘肽 (GSSG)活性分析可知，TSM 可有效抑制 GSH 的減少及 NAPAP 引起的肝臟損害。又另一具體例中，TSM 對細胞色素同功酶 P450 2E1 具有劑量依存性抑制作用，因此經由抑制 P450 2E1 活性來減少 NAPAP 產生 NAPQI，藉此減少 NAPQI 與 GSH 共價結合，進而防止 NAPQI 聚積於肝臟。根據此二具體例，茶葉黑色素具有抑制細胞色素同功酶 P450 2E1 之功效，以及有效降低 NAPAP 誘發之肝臟 GSH 的消耗。

本發明之另一具體例中，TSM(10 mg/kg 至 40 mg/kg)以劑量依存性方式減少 NAPAP 引起的脂質過氧化作用。又本發明之一具體例中，TSM 可活化肝臟超氧化物歧化酶 (SOD)。以及本發明之另一具體例中，TSM 可回復受 NAPAP 影響而減少的肝臟內生性 CoQ₉ 及 CoQ₁₀ 含量。根據此等具體例，茶葉黑色素之抗氧化劑特性可降低 NAPAP 造成的細

胞氧化性壓力，進而達到預防 NAPAP 中毒之功效。

又本發明之另一具體例中，透過活體內抗體形成細胞 (AFC) 反應，證明 TSM 可恢復 NAPAP 所抑制之免疫力。因此茶葉黑色素具有免疫調節功能，預防 NAPAP 引起免疫抑制之情形。

根據本發明，本發明係關於一種預防或降低因攝取乙醯胺酚所致毒性之方法，其包括對攝取過量乙醯胺酚之哺乳動物投與有效量之茶葉黑色素，其中茶葉黑色素可在攝取乙醯胺酚之前、同時或之後投與哺乳動物。

本發明之一部分係關於一種用於預防或降低因攝取乙醯胺酚所致毒性之醫藥組成物，其包括有效量之茶葉黑色素為活性成分。

本發明之另一部分係關於一種用於預防因攝取乙醯胺酚所致毒性之含乙醯胺酚之醫藥組成物，其包括乙醯胺酚以及茶葉黑色素為活性成分。

本發明之另一部分係關於一種用於預防因攝取乙醯胺酚所致毒性之含乙醯胺酚之醫藥組成物，其包括乙醯胺酚以及茶葉黑色素為活性成分。

根據本發明之方法，其中對病人投與有效量之茶葉黑色素時，該劑量以 0.1 mg/kg 體重至 3 mg/kg 體重為佳。又根據本發明之醫藥組成物，其中茶葉黑色素之有效劑量以 0.1 mg/kg 體重至 3 mg/kg 體重為佳。

本發明中所指之哺乳動物，較佳為人類。

本發明之醫藥組成物製作為藥劑時，可與活性成分醫藥

上可接受之載劑混合製作為製劑形式，包括但不限制為錠劑，膠囊，粉末，溶液，或懸浮液等形式。

本發明之方法以及醫藥組成物之投與方式，包括但不限制為口服，非經腸或腹膜內投與，例如靜脈內投與以及肌肉內投與。此外，本發明之方法，對攝取乙醯胺酚之哺乳動物投與有效量茶葉黑色素時，其中茶葉黑色素可與乙醯胺酚以分開之劑形投與，或二者共同於一醫藥組成物中一起投與。

【實施方式】

以下提供具體實施例詳細說明本發明，藉此舉例說明達到清楚了解本發明之目的，故不因該實施例而於任何方面限制本發明。

材料及方法

材料

下文中有關預防乙醯胺酚毒性試驗所用之茶葉黑色素是萃取自山茶 (*Thea sinensis* Linn, 採收自臺灣苗栗) 樹葉之茶葉黑色素 (TSM)，該山茶 (*Thea sinensis* Linn) 樹葉樣品業已經中國醫藥大學中國藥學研究所 (Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical University, Taichung, Taiwan.) 鑑定，並寄存於該所植物標本室，寄存編號：GSH-001。NAPAP，EDTA，Tris-HCl，Triton X-100，Sephadex G-75，分子大小標記，以及血清丙胺酸胺基轉移酶活性測試套組是購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。全部其他化學試劑購自 Merck (Darmstadt, Germany)，皆為分析級或更高級。

TSM 之萃取、純化及其物化特性

TSM 的萃取是依據 Sava, V. M. et al., Food Chemistry 2001, 73, 177-184.發表之方法，作適度修改進行。詳言之，萃取時間減少至 12 小時以避免 TSM 過度氧化。萃取之後，過濾混合物並以 15,000 g 離心 30 分鐘得到 TSM 萃取物。添加 2 N HCl 至 pH 2.5 酸化萃取物，以 15,000 g 離心 15 分鐘成小片形式。進行酸解純化 TSM。將所得純化產物溶解於 0.2% NH₄OH，然後將該溶液進行反覆沉澱作用。沉澱步驟另重覆 3 次使 TSM 從低分子不純物中分出，並增進其均質性。透過 Nalgene 0.45 μm 注射過濾器過濾所得溶液。最後，在 Sephadex G-75 管柱(管柱尺寸為 1.6×40 cm)於 50 mM 磷酸緩衝液(pH 7.5)中以 0.5 ml·min⁻¹ 流速純化 TSM。在 280 nm 偵測各部分。Sephadex G-75 管柱經大小標記：牛血清白蛋白(MM 66,000)、碳酸酐酶(MM 29,000)、細胞色素 C (MM 12,400)、以及抑肽酶(aprotinin)(MM 6,500)校正，估算 TSM 的分子質量(MM)。

TSM 之物化特性依據慣用方法進行(Nicolaus, R. *Melanins*, Hermann; Paris, France, 1968. ; Prota, G. *Melanins and melanogenesis*, Academic Press; San Diego, 1998.)。以 JASCO V-530 UV-Visible 分光光度計(Jasco Ltd., Great Dunmow, UK)獲得 UV 吸收光譜。於 Perkin-Elmer spectrometer 1600 FT (Perkin-Elmer Instruments, Norwalk, CT)記錄 KBr 樣品紅外線(IR)光譜。此外，亦利用水、酸水溶液及常用有機溶劑之溶解度，經由 KMnO₄、K₂Cr₂O₇、

NaOCl 及 H₂O₂ 之氧化漂白，多酚之陽性反應等進行黑色素之典型測試。

動物及處理

使用成年 ICR 雄鼠 (30±5 g) 進行全部實驗。將動物飼養於溫度 25±2°C 以及 12 小時日/夜循環之經調控環境下，可自由攝取食物及飲水，但於實驗處理前禁食隔夜。動物分成數組，包括對照組 (未接受任何處理)，負對照組 (單獨接受 TSM)，正對照組 (單獨接受 NAPAP)，以及實驗組 (接受 NAPAP 及 TSM)。每一試驗組有 6 隻老鼠。NAPAP 是溶解於標準生理食鹽水 (pH 7.4)，並以 400 mg/kg 之劑量腹膜內 (i.p.) 投與。TSM 是溶解於蒸餾水 (pH 7.2)，並以 10 mg/kg、20 mg/kg、30 mg/kg、或 40 mg/kg 之劑量於中毒 2 小時之前由腹膜內 (i.p.) 投與。全部動物於曝露 NAPAP 24 小時中毒後以乙醚麻醉犧牲。使用市售套組 (Sigma 505-P) 經由心臟穿刺抽取血液樣品用於丙胺酸胺基轉移酶 (ALT) 活性分析。取出肝臟並以標準生理食鹽水洗除血液，然後用於測定還原型穀胱甘肽 (GSH)、氧化型穀胱甘肽 (GSSG)、超氧化物歧化酶 (SOD)、硫巴比妥酸反應性物質 (TBARS)、以及還原型輔酶 Q9 (CoQ9) 及 Q10 (CoQ10)。

實施例 1

TSM 於乙醯胺酚毒性之影響：GSH 及 GSSG 分析以及 ALT 活性分析

冷凍肝臟組織於補充以 5 mM EDTA 之 5% 三氯乙酸 (TCA) 中，在氮氣流下進行均質化，然後在 4 °C 以 20,000 g

離心 10 分鐘。以二乙基醚萃取 3 次將上清液內的 TCA 移除。總肝臟穀胱甘肽濃度代表使用二硫貳-2-硝基苯甲酸所測定之 GSH 及 GSSG 的總和 (Griffith, O.W. *Anal. Biochem.* 1980, 106, 207-212.)。經由與 2-乙炔基吡啶反應消除 GSH 後測定 GSSG 濃度，實際 GSH 濃度之計算則由總穀胱甘肽濃度扣除 GSSG 濃度。

表 1 顯示 TSM 對 NAPAP 毒性之影響。單獨投與 40 mg/kg TSM 並未造成任何毒性。由活動性觀之，實驗組與對照組動物的行為類似。但相較於對照組，單獨處以 NAPAP(400 mg/kg)的全部動物皆生病而無法於籠子內移動。由 ALT 濃度急遽顯著地提高可知，如此處理造成老鼠肝細胞受損。中毒前預先處以 TSM 2 小時之動物呈現抗 NAPAP 之保護作用。TSM 對 NAPAP 之挑釁引起劑量依存性效果，亦即以 10 mg/kg、20 mg/kg、30 mg/kg 劑量之 TSM 給予動物時，血漿 ALT 濃度分別降低至正對照組的 74%、14%、以及 3%。投與最高 TSM 劑量(40 mg/kg)之組別完全阻斷 NAPAP 肝毒。單獨投與 400 mg/kg NAPAP 之動物致死率為 66%。而單獨投與 40 mg/kg TSM 本身並未造成動物死亡。因此，先於 NAPAP 將 TSM(10-40 mg/kg)投與動物，可預防動物致死之情形。

表 1 亦顯示投與 NAPAP 24 小時後測定之肝臟 GSH 濃度不受 TSM 本身影響。單獨投與 NAPAP 之組別顯著耗盡 GSH 濃度(相較於對照組 2.6 倍)。預處以 TSM 可減少 GSH 消耗之情形證明 TSM 具有劑量依存性之保護功效。由 GSSG

濃度恢復至約相同程度可推測，GSH 的減少並非因 GSH 與穀胱甘肽過氧化酶反應所致，而是穀胱甘肽與 NAPQI 結合所致。

表 1：TSM 對 NAPAP 毒性之影響

動物組別 ^a	死亡率 (死亡/總數)	ALT (U/L)	GSH (nmol/mg 蛋白質)	GSSG (nmol/mg 蛋白質)
對照組	0/6	42±4 ^b	39±4	3.5±0.4
TSM (40 mg/kg)	0/6	40±5	40±3	3.6±0.3
NAPAP (400 mg/kg)	2/6	2043±231 ^{**} , ^c	13±1 ^{**}	3.2±0.4
TSM (10 mg/kg) + NAPAP (400 mg/kg)	0/6	1528±142 ^{**}	15±2 ^{**}	3.5±0.3
TSM (20 mg/kg) + NAPAP (400 mg/kg)	0/6	298±30 ^{**}	22±2 [*]	2.9±0.2
TSM (30 mg/kg) + NAPAP (400 mg/kg)	0/6	63±5 [*]	28±3 [*]	3.3±0.2
TSM (40 mg/kg) + NAPAP (400 mg/kg)	0/6	43±5	28±2 [*]	3.1±0.3

^a 對照組老鼠給予生理食鹽水。實驗組動物接受 TSM (10, 20, 30 或 40 mg/kg, i.p.) 以及 NAPAP (400 mg/kg, i.p.)，NAPAP 於投與 TSM 2 小時後注射。

^b 曝露 NAPAP 24 小時後評估毒性效力，數據以平均±SEM 表示。

^c 與對照組具有意義之差異 [(*)P<0.05; (**P)<0.01]。

實施例 2TSM 對細胞色素 P450 加單氧酶之肝臟同功酶活性之影響：P450 同功酶之活性評估

實驗於 5 組 ICR 老鼠進行，每一組有 6 隻老鼠。以 i.p 對動物投與不同劑量 TSM (0 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 以及 40 mg/kg)。注射 24 小時後犧牲動物，移出肝臟並注滿冰冷 KCl(154 mM)，於含有 50 mM Tris-HCl 及 154 mM KCl (pH 7.4)之緩衝液中均質化。在 4 °C 以 9,000 g 離心均質物 20 分鐘，然後在 4 °C 以 105,000 g 離心 90 分鐘將微粒體部分從上清液分出。以均質化緩衝液清洗微粒體小片，在 4 °C 以 105,000 g 再次離心 90 分鐘，然後懸浮於 250 mM 蔗糖。根據 Burke 及 Mayer (Burke, M. D. et al., *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48, 923-36.)所述方法測量乙氧基試鹵靈 O-脫烷脛酶(ethoxyresorufin O-dealkylase)(P450 2A1)及戊氧基試鹵靈 O-脫烷脛酶(pentoxyresorufin O-alkylase)(P450 2B1)活性。以 Peng 等人之方法(Peng, R. et al., *Carcinogenesis* 1982, 3, 1457-1461.)測定 N-亞硝基二甲基胺脫甲基酶(P450 2E1)活性，作為 P450 2E1 活性指數。

表 2 顯示 TSM 對細胞色素 P450 加單氧酶之肝臟同功酶活性之影響。結果顯示預投與 TSM 引起細胞色素 P450 之肝臟同功酶活性受到抑制。為測定 TSM 對各種 P450 同功酶之相對抑制效果，使用不同受質與肝臟微粒體一起培育。TSM 造成 P450 2E1 的劑量依存性抑制作用，其專一 N-亞硝基二

甲基胺脫甲基酶活性具有 ED_{50} 值為 15.8 mg/kg 體重。P450 2A1 及 P450 2B1 活性未顯著改變。

表 2：TSM 對細胞色素 P450 加單氧酶之肝臟同功酶活性之影響

實驗條件	P450 同功酶之活性 ^a		
	2A1	2B1	2E1
對照組(賦形劑)	7.35±1.23	1.4±0.13	2.85±0.33
TSM 10mg/kg	7.5±1.41	1.6±0.12	2.52±0.25
TSM 20mg/kg	7.28±1.11	1.4±0.15	1.51±0.19 ^b
TSM 30mg/kg	7.44±1.25	1.3±0.13	1.1±0.09 ^b
TSM 40mg/kg	7.64±1.52	1.5±0.16	0.93±0.1 ^b

^a 活性以 6 隻老鼠的平均 ± SEM 表示。酵素活性如下表示：2A1 及 2B1 - 來自試鹵靈之量 (pmol/min.mg 蛋白質)；2E1 - 來自甲醛之量 (nmol/min.mg 蛋白質)。

^b 值與對照組具有意義之差異 ($P < 0.01$)。

實施例 3

TSM 對 NAPAP 引起脂質過氧化作用之影響：TBARS 之測定

脂質過氧化衍生物之形成是依據 Cascio 人之方法，經由測量 TBARS 來評估 (Cascio, C. et al., *J. Neurochem.* 2000, 74, 2380-2391.)。簡言之，肝臟於冰冷 1.15% KCl (w/v) 中；然後取 0.4 mL 均質物與 1mL 之 0.375% 硫巴比妥酸、15% TCA (w/v)、0.25 N HCl、及 6.8 mM 丁基化羥甲苯混合，置入沸水水浴 10 分鐘，移出，然後置冰上冷卻。以

3,000 r.p.m. 離心 10 分鐘後測量上清液的吸光度 (532 nm)。所產生之 TBARS 量以每毫克蛋白質之 nmol TBARS 來表示，並使用丙二醛貳 (二甲基乙縮醛) 校正之。

第 1 圖為投與 NAPAP(400 mg/kg) 前 2 小時對老鼠投與各種劑量 TSM，評估 TSM 對 TBARS 聚積於肝臟之影響。實驗結果顯示，預先投予的 TSM 可以劑量依存性方式顯著減少 NAPAP 引起脂質過氧化作用。其中 TSM 劑量增加至最高量時，對過氧化作用之抑制造成 TBARS 的完全阻斷。相較於對照組 (未處理)，單獨投與 TSM (負對照組) 時未造成任何顯著影響。

實施例 4

超氧化物歧化酶 (SOD) 之分析

老鼠肝臟超氧化物歧化酶 (SOD) 活性之測定，是根據羥基氮與超氧化物陰離子基之氧化反應中，抑制亞硝酸鹽之形成 (Elstner, E. F. and Heupel, A. *Anal. Biochem.* 1976, 70, 616-620.)。亞硝酸鹽產生於含有 25 μ L 黃嘌呤素 (15 mM)、25 μ L 氯化羥基氮 (10 mM)、250 μ L 磷酸緩衝液 (65 mM, pH 7.8)、90 μ L 蒸餾水及 100 μ L 黃嘌呤素氧化酶 (0.1 U/ μ L) 之混合物中。在 25 °C 與 10 μ L 肝臟萃取物作用 20 分鐘來分析 SOD 之抑制效果。所得亞硝酸鹽之測定是在 0.5 mL 磺胺酸 (3.3 mg/mL) 與 0.5 mL α -萘胺 (1 mg/mL) 之反應 (在室溫 20 分鐘) 中進行。以 Ultrospec III 分光光度計 (Pharmacia, LKB) 測量在 530 nm 之吸光度。所得結果以每毫克蛋白質之經計算 SOD 活性單位表示之。

第 2 圖為各種劑量 TSM 對經 NAPAP 中毒之 ICR 老鼠的肝臟 SOD 活性影響。結果顯示相較於對照組，NAPAP 的導入造成 SOD 活性減少約 4 倍。而注射 NAPAP 之 2 小時前投與 TSM (10-40 mg/kg)，可顯著恢復 SOD 活性。在較高劑量 TSM 可回復 SOD 活性達到高峰，代表 TSM 維持 SOD 活性於負對照組程度之能力。單獨投與 TSM 不影響 SOD 活性。此結果指示 TSM 對 SOD 活化為間接影響。

實施例 5

輔酶 Q 之分析

以 Ikenoya 等人之方法進行還原型 CoQ₉ 及 CoQ₁₀ 之測定 (Ikenoya, S. et al., *Chem Pharm Bull.* 1981, 29, 158-64. 28)。肝臟組織於冰冷水中在氮氣流下均質化。以乙醇：正己烷 (2:5 v/v) 之混合物萃取輔酶 Q，然後收集正己烷層。使用旋轉蒸發器蒸發溶劑，然後再溶解於乙醇中。利用 HPLC 以 Jasco 840 EC 偵測器及 Chemosorb ODS-H 管柱 (4.6×250 mm) 分析萃取物。動相由補充以 0.7% NaClO₄ H₂O 之乙醇：甲醇：70% HClO₄ (700: 300: 1 v/v) 所組成。

第 3 圖為各種劑量 TSM 對投與 400 mg/kg NAPAP 之老鼠肝臟內生性 CoQ₉ 及 CoQ₁₀ 含量的影響。結果顯示 NAPAP 本身即可顯著減少動物肝臟中還原型抗氧化劑酵素 CoQ₉ 及 CoQ₁₀ 的含量。亦即相較於負對照組，輔酶 Q₁₀ 含量減少 55%。CoQ₉ 含量減少 60%。投與 NAPAP 之 2 小時前投與 TSM，可以劑量依存性方式增加兩種抗氧化劑的量。最高劑量 TSM (40 mg/kg) 降低輔酶 Q₉ 含量至對照組的 83%，但增

加 Q₁₀ 至 113%。然而相較於對照組，單獨投與相同劑量 TSM 並未產生任何顯著差異，此結果指示 TSM 對輔酶 Q 為間接影響。

實施例 6

抗體製造反應之評估

實驗分為 10 組 ICR 老鼠進行，每一組有 4 隻老鼠。前 5 組以 i.p. 注射下列單劑 TSM: 0 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 以及 40 mg/kg。後 5 組類似前組注射 TSM, 但 2 小時後對動物 i.p. 注射 400 mg/kg NAPAP。TSM 或 TSM + NAPAP 投與 1 天之後，將製備於 0.2 mL 生理食鹽水之 1×10^8 綿羊紅血球 (SRBC) 注入尾巴靜脈。額外 4 隻動物僅接受 SRBC (抗原對照組)。以 SRBC 激敏作用 4 天之後，犧牲動物並取出脾臟。從每一脾臟製備單一脾細胞於 5 mL 的 RPMI-1640 培養基。使用斑點分析 (plaque assay) 進行抗體形成細胞 (AFC) 之計算 (Jerne, N. K. and Nordin, A. A. *Science* 1963, 140, 405.)。以 10^6 脾細胞為單位計算 AFC 值。

第 4 圖為各種劑量 TSM 對投與 NAPAP 老鼠脾細胞之抗體形成反應的影響。進行活體內抗體形成反應，評估單獨投與 TSM 與 TSM+NAPAP 對 ICR 老鼠體液性免疫力的影響。結果證明 TSM 具有劑量依存性免疫刺激功效，類似於前述 BALB/C 老鼠所得結果 (Sava, V. M. et al., *Food Res. Int.* 2001, 34, 337-343.)。投與 30-40 mg/kg 劑量 TSM 之組別，抗體分泌細胞比抗原對照組顯著 ($P < 0.05$) 製造更多抗體 (26-28%)。NAPAP 的投與相對於抗原對照組造成 26% 的

AFC 抑制。NAPAP 中毒前預投與 TSM，可以劑量依存性方式增加 AFC，並從 20 mg/kg 劑量之 TSM 開始有效回復 TSM 免疫力至抗原對照組程度。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為投與 NAPAP(400mg/kg)前 2 小時，對老鼠投與各種劑量 TSM 後對 TBARS 聚積於肝臟之影響。結果以 6 個實驗之平均 \pm SEM 表示。條狀 C 為未接受任何處理之對照組的 TBARS 濃度。條狀 NC 代表負對照組，條狀 PC 代表正對照組，以及數字表示 TSM 劑量(mg/kg)。星號代表正對照組與 NAPAP 及 TSM 連合效果之間具有顯著差異 [(*)P<0.05; (**P)<0.01]]。

第 2 圖為各種劑量 TSM 對經 NAPAP 中毒之 ICR 老鼠肝臟 SOD 活性之影響。結果以 6 個實驗之平均 \pm SEM 表示。條狀 C 為未接受任何處理之對照組的 SOD 活性。條狀 NC 代表負對照組，條狀 PC 代表正對照組，以及數字表示 TSM 劑量(mg/kg)。星號代表正對照組與 NAPAP 及 TSM 連合效果之間具有顯著差異 [(*)P<0.05; (**P)<0.01]]。

第 3 圖為各種劑量 TSM 對投與 400 mg/kg NAPAP 之老鼠肝臟內生性 CoQ₉(實心條狀)及 CoQ₁₀(空心條狀)含量之影響。結果以 6 個實驗之平均 \pm SEM 表示。條狀 C 為未接受任何處理之對照組的 CoQ₉ 及 CoQ₁₀ 濃度。條狀 NC 代表負對照組，條狀 PC 代表正對照組，以及數字表示 TSM 劑量(mg/kg)。星號代表正對照組與 NAPAP 及 TSM 連合效果之間具有顯著差異 [(*)P<0.05; (**P)<0.01]]。

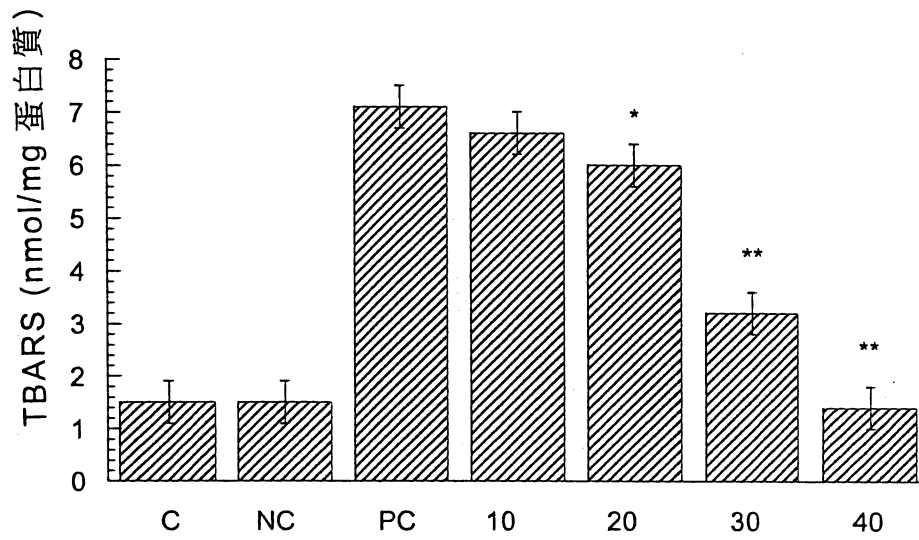
第 4 圖 為 各 種 劑 量 TSM 對 投 與 NAPAP 老 鼠 脾 細 胞 之 抗 體 形 成 反 應 之 影 響 。 方 形 代 表 TSM 本 身 之 效 果 ， 圓 形 代 表 TSM+NAPAP 連 合 之 效 果 。 點 線 代 表 抗 原 對 照 組 。 老 鼠 於 TSM 及 / 或 NAPAP 投 與 1 天 之 後 ， 以 SRBC 激 敏 。 平 均 及 SEM(條 狀 誤 差)是 得 自 4 隻 動 物 。 星 號 代 表 抗 原 對 照 組 與 NAPAP 及 TSM 連 合 效 果 之 間 具 有 顯 著 差 異 [(*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$]。

十、申請專利範圍：

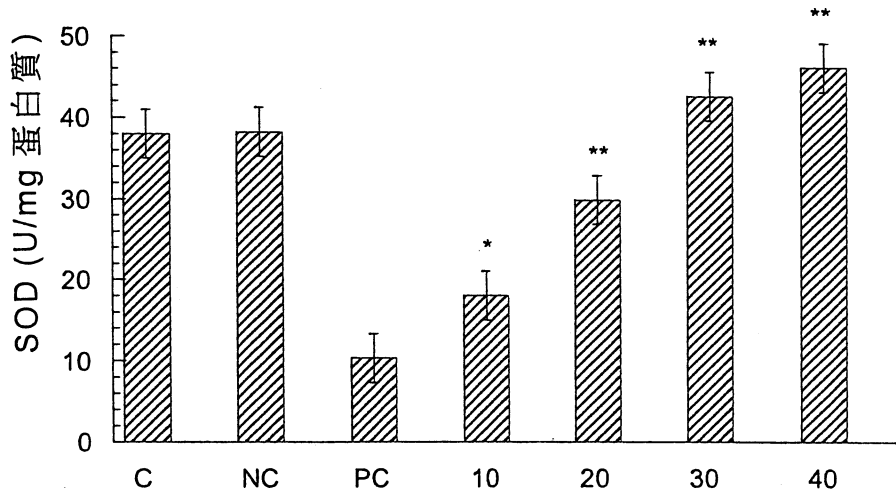
1. 一種用於哺乳動物預防或降低因攝取乙醯胺酚 (acetaminophen) 所致毒性之醫藥組成物，其包括有效量之茶葉黑色素為活性成分。
2. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中哺乳動物為人類。
3. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中茶葉黑色素之有效量為 0.1 mg/kg 體重至 3mg/kg 體重。
4. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該茶葉黑色素係於攝取乙醯胺酚前使用。
5. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該茶葉黑色素係於攝取乙醯胺酚時同時使用。
6. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該茶葉黑色素可用於口服投與。
7. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該茶葉黑色素可用於靜脈內投與。
8. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組成物，其中該茶葉黑色素可用於肌肉內投與。
9. 一種用於哺乳動物預防或降低因攝取乙醯胺酚 (acetaminophen) 所致毒性之含乙醯胺酚之醫藥組成物，其包括乙醯胺酚以及茶葉黑色素為活性成分。
10. 如申請專利範圍第 9 項之醫藥組成物，其中所含茶葉黑色素量可有效預防或降低該醫藥組成物中乙醯胺酚毒性。
11. 如申請專利範圍第 9 項之醫藥組成物，其中哺乳動物為人類。

12. 如申請專利範圍第 9 項之醫藥組成物，其中茶葉黑色素之有效量為 0.1 mg/kg 體重至 3mg/kg 體重。

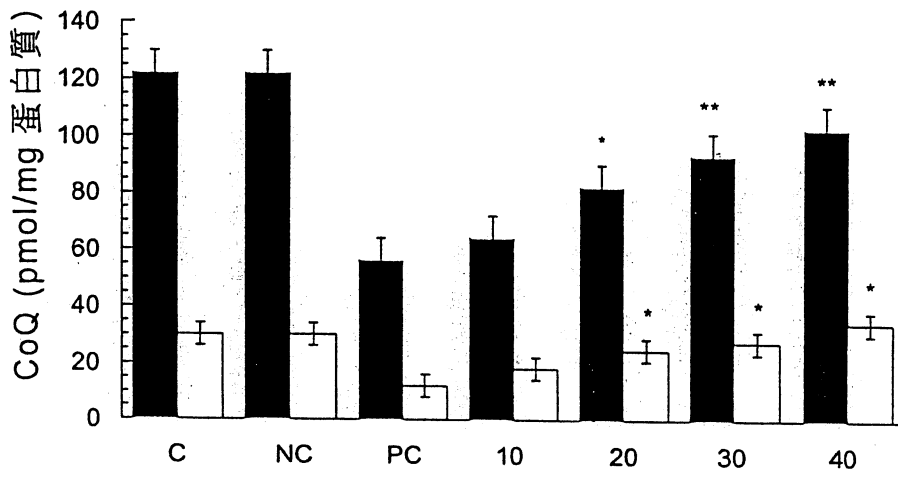
十一、圖式：



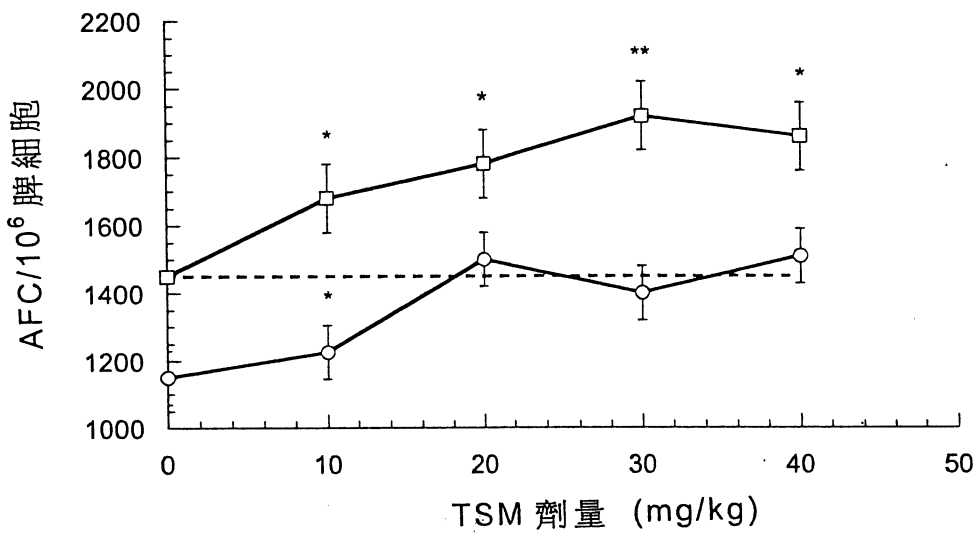
第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖