



(21)申請案號：108107255

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 05 日

(51)Int. Cl. :

*A61K36/185 (2006.01)**A23L33/105 (2016.01)**A61K8/9789 (2017.01)**A61K36/28 (2006.01)**A61K36/31 (2006.01)**A61K36/355 (2006.01)**A61K36/48 (2006.01)**A61K36/53 (2006.01)**A61K36/73 (2006.01)**A61P1/02 (2006.01)**A61P1/16 (2006.01)**A61P3/04 (2006.01)**A61P9/10 (2006.01)**A61P9/12 (2006.01)**A61P9/14 (2006.01)**A61P15/08 (2006.01)**A61P15/10 (2006.01)**A61P19/10 (2006.01)**A61P25/28 (2006.01)**A61P27/12 (2006.01)**A61P29/00 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**A61Q19/00 (2006.01)**A61K127/00 (2006.01)**A61K131/00 (2006.01)**A61K135/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/03/05 日本

2018-038864

(71)申請人：日商日本新藥股份有限公司(日本) NIPPON SHINYAKU COMPANY, LIMITED

(JP)

日本

(72)發明人：佐藤弘一(JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：4 項 圖式數：0 共 21 頁

(54)名稱

糖化反應抑制劑

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種新穎糖化反應抑制劑。

本發明之糖化反應抑制劑含有選自由西洋山葵、藍靛果忍冬、擬美國薄荷、大頭橐吾、直立委陵菜、扯根菜、木槿及巴西羊蹄甲所組成之植物群中之 1 種或 2 種以上之植物之萃取物作為有效成分。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

糖化反應抑制劑

【技術領域】

【0001】

本發明係關於一種糖化反應抑制劑。

【先前技術】

【0002】

糖化反應係以蛋白質或胺基酸之胺基與葡萄糖等還原糖之羰基非酶性地進行鍵結作為起點之一系列之反應，包含經由希夫鹼生成安瑪多立化合物之前期反應；及經過脫水、氧化、縮合、重排等反應而生成糖化終產物(AGEs)之後期反應。報告有生成之AGEs係AGEs之受體之一種，與單核球/巨噬細胞、T細胞、內皮細胞、纖維母細胞、平滑肌細胞、神經細胞、神經膠細胞、軟骨細胞等之細胞膜中表現之RAGE(Receptor for AGEs，晚期糖化終產物受體)結合，使RAGE訊息活化，使NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)氧化酶活化，藉此產生活性氧種，引起經由轉錄因子NF- κ B之炎症反應(例如參照非專利文獻1及2)。又，認為由於RAGE局部存在於血管內皮，故而RAGE訊息之活化參與與動脈硬化相關之疾病之發病或發展，除此以外，亦報告有參與糖尿病性併發症(例如糖尿病性腎病、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性神經障礙)、高血壓、癡呆症、癌症、非酒精性脂肪肝炎、不孕症、肥胖、男性勃起功能障礙、牙周病、阿爾茨海默氏病、白內障、骨質疏鬆症等之發展(例如參照專利文獻1、2及非專利文

獻及非專利文獻3)。

【0003】

源自乙二醛(GO)、乙醇醛(GA)、甲基乙二醛(MGO)、3-脫氧葡萄糖醛酮等糖化反應中間物、或甘油醛(GLA)等糖代謝產物之AGEs之生成亦包括於糖化反應中。已知該等AGEs遠早於源自葡萄糖之AGEs生成。報告有源自GLA之GLAP(glyceraldehyde-derived pyridinium, 甘油醛衍生之吡啶鎗)、或源自MGO之MG-H1(methylglyoxal-derived hydroimidazolone 1, 甲基乙二醛衍生之氫化咪唑酮1)、源自GA之GA-吡啶(GA-pyridine)、GO、或因氧化壓力所生成之CML(N ϵ -(carboxymethyl)lysine, N ϵ -(羧甲基)離胺酸)與RAGE結合(例如參照非專利文獻4~6)。又, 源自GLA之AGEs被稱為毒性AGEs(Toxic AGEs)(TAGE), 提示經由RAGE與各種疾病有關(例如參照非專利文獻7)。生物體內之糖化反應之控制可成為旨在預防、改善或治療生活習慣疾病或衰老相關疾病之發病、發展之目標。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

[專利文獻1]日本專利第3837494號公報

[專利文獻2]日本專利第4143716號公報

[非專利文獻]

【0005】

[非專利文獻1]日藥理誌(Folia Pharmacol. Jpn.), 2014, Vol.143, p.10-13

[非專利文獻2]Journal of Leukocyte Biology, 2013, Vol.94, p.55-68

[非專利文獻3]MINERVA ENDOCRINOL, 2014, Vol.39, p.167-74

[非專利文獻4]Biosci Biotechnol Biochem., 2018, Vol.82, p.312-319

[非專利文獻5]Biochemistry, 2014, Vol.53, p.3327-3335

[非專利文獻6]J Biol Chem, 1999, Vol.274, p.31740-31749

[非專利文獻7]日藥理志(Folia Pharmacol. Jpn), 2012, Vol.139.

p.193-197

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0006】

本發明之主要之目的在於提供一種新穎糖化反應抑制劑。

[解決問題之技術手段]

【0007】

本發明者等人為了解決上述問題而進行努力研究，結果發現特定之植物萃取物具有優異之糖化反應抑制作用，從而完成本發明。

【0008】

作為本發明，例如可列舉下述者。

(1)一種糖化反應抑制劑(以下，稱為「本發明抑制劑」)，其含有選自由西洋山葵、藍靛果忍冬、擬美國薄荷、大頭橐吾、直立委陵菜、扯根菜、木槿及巴西羊蹄甲所組成之植物群中之1種或2種以上之植物之萃取物作為有效成分。

(2)一種高血壓、癡呆症、癌症、非酒精性脂肪肝炎、不孕症、肥胖、男性勃起功能障礙、牙周病、阿爾茨海默氏病、白內障、骨質疏鬆症

之預防、改善或治療用組合物，其含有如上述(1)記載之植物萃取物。

(3)一種血管病之預防、改善或治療用組合物，其含有如上述(1)記載之植物萃取物。

(4)如上述(3)記載之血管病之預防、改善或治療用組合物，其中血管病為血管之炎症、動脈硬化、糖尿病性血管併發症或血管內皮功能障礙。

[發明之效果]

【0009】

本發明之糖化反應抑制劑具有優異之糖化反應抑制作用。又，本發明之糖化反應抑制劑含有具有食用經驗且副作用較少之植物萃取物作為有效成分，安全性較高。

【實施方式】

【0010】

植物萃取物

本發明之植物萃取物係選自由西洋山葵、藍靛果忍冬、擬美國薄荷、大頭橐吾、直立委陵菜、扯根菜、木槿及巴西羊蹄甲所組成之植物群中之1種或2種以上之植物之萃取物。

西洋山葵係十字花科辣根屬之植物，學名稱為 *Armoracia rusticana* P. Gaertn., B. Mey. et Schreb.。別名亦稱為辣根、raifort、辣根菜、馬山葵、馬蘿蔔或蝦夷山葵。

藍靛果忍冬係忍冬科忍冬屬之植物，學名稱為 *Lonicera caerulea* L.。別名亦稱為黑瞎子果、藍果或藍靛果。

擬美國薄荷係唇形科美國薄荷屬之植物，學名稱為 *Monarda fistulosa* L.。別名亦稱為馬薄荷。

【0011】

大頭橐吾係菊科橐吾屬之植物，學名稱為*Ligularia japonica* Less.。

直立委陵菜係薔薇科委陵菜屬之植物，學名稱為*Potentilla erecta* (L.) *Raesch*。別名亦稱為洋委陵菜或雉子筵根。

扯根菜係扯根菜科扯根菜屬之植物，學名稱為*Penthorum chinense* *Pursh*。別名亦稱為趕黃草。

木槿係錦葵科木槿屬之植物，學名稱為*Hibiscus syriacus* L.。

巴西羊蹄甲係豆科羊蹄甲屬之植物，學名稱為*Bauhinia forficata* *Link*。別名亦被稱為pata de vaca。

【0012】

本發明之植物萃取物之製造中所使用之植物之部位並無特別限定，可使用上述植物之各部位。例如可使用花、花穗、果皮、果實、莖、葉、枝、枝葉、幹、樹皮、根莖、根皮、根、種子、蟲癭、心材、地上部、地下部或全草。

本發明之植物萃取物之製造方法並無特別限定，可藉由通常使用之方法而製造。例如可藉由將植物之各部位直接或切斷為適當之大小進行榨汁或者利用溶劑進行萃取而製造。作為萃取溶劑，例如可使用水、各種有機溶劑或該等之混合溶劑。作為用於萃取之有機溶劑，例如可列舉：低級醇(甲醇、乙醇等)、氯仿、乙酸乙酯、正己烷。於萃取溶劑中，尤佳為水、甲醇、乙醇。又，該等溶劑可使用1種或者亦可混合2種以上使用。萃取溶劑之使用量根據所使用之植物原料或萃取溶劑等而不同，以重量比計，適宜為1：2～1：30(植物原料：萃取溶劑)之範圍內，較佳為1：3～1：20之範圍內，更佳為1：5～1：10之範圍內。萃取時間適宜為1小時～

15天之範圍內。萃取溫度適宜為5~100℃之範圍內。關於萃取方法，並無特別限制，可應用分批萃取、使用管柱之連續萃取等任意之方法。

【0013】

所獲得之植物萃取物亦可於原本狀態下使用，亦可視需要於對其活性無影響之範圍內進而施加精製處理。此種精製處理只要藉由通常之方法進行即可，例如可藉由將植物萃取物利用常規方法進行過濾而進行。其後，可將所獲得之濾液進行減壓濃縮、冷凍乾燥，製成本發明之植物萃取物。

本發明組合物

【0014】

本發明之糖化反應抑制劑、或高血壓、癡呆症、癌症、非酒精性脂肪肝炎、不孕症、肥胖、男性勃起功能障礙、牙周病、阿爾茨海默氏病、白內障、骨質疏鬆症或血管病之預防、改善或治療用組合物(以下，統稱為「本發明組合物」)係含有1種或2種以上之以如上方式獲得之植物萃取物者。本發明組合物例如可藉由將以如上方式獲得之植物萃取物直接使用或者與能夠用作載體之材料進行混合，繼而，利用常規方法加工為粉末狀、塊狀、液狀等各種形態而製造。

於本發明組合物中，可任意地調配醫藥上、化妝料上或食品上所容許之添加物。作為此種添加劑，例如可列舉：結合劑、崩解劑、潤滑劑、分散劑、懸浮劑、乳化劑、緩衝劑、抗氧化劑、賦形劑、界面活性劑、紫外線抑制劑、金屬離子封阻劑、增黏劑、防腐劑、抗菌劑、保濕劑、色素，可使用適當量之該等中之1種或2種以上。

【0015】

本發明組合物中之植物萃取物之調配量並無特別限定，於本發明組合物之總重量中，以固形物換算計，為0.0001重量%(以下，簡稱為「%」)以上，較佳為0.01重量%以上，進而較佳為0.05~50%。

本發明組合物可藉由常規方法，適當製備為錠劑、散劑、顆粒劑、膠囊劑、液劑、糖漿劑、滴劑、調理液、洗劑、軟膏、乳霜等劑型。

本發明組合物之攝取量根據含有之植物萃取物之種類、劑型、投予方法、投予對象者之年齡、體重、症狀等而不同，通常成人每天以植物萃取物之重量計，適宜為設為0.1~100 g之範圍內，較佳為設為1~60 g之範圍內，但未必限於該範圍。此種每天之攝取量可1次攝取，又，亦可分為複數次攝取。

本發明組合物之使用形態並無特別限制，作為醫藥組合物、食品組合物或化妝料組合物等，例如可以經口劑、飲食品、外用劑之形態使用。

【0016】

於以經口劑之形態使用本發明組合物之情形時，可藉由將本發明之植物萃取物直接或視需要適量調配製造經口劑時使用之醫藥上或食品上所容許之添加劑後利用常規方法進行製劑化而獲得。作為此種添加劑，可列舉：賦形劑、填充劑、增量劑、結合劑、崩解劑、界面活性劑、調味料、香料、潤滑劑等。於經口劑之製劑化時，亦可調配具有其他生理功能材料。又，經口劑之劑型並無特別限定，例如可列舉：錠劑、散劑、顆粒劑、膠囊劑、液劑、糖漿劑、滴劑之形態。

作為經口劑中之植物萃取物之含量，只要依照植物萃取物之種類、劑型等適當製備即可，例如只要於製劑總量中，以固形物成分換算計，於0.5~60%、較佳為3~50%、尤佳為5~10%之範圍內調配植物萃取物即

可。

【0017】

於以外用劑之形態使用本發明組合物之情形時，可藉由將本發明之植物萃取物直接或視需要適量調配製造外用劑時使用之醫藥上或化妝料上所容許之添加劑，利用常規方法進行製劑化而獲得。作為此種添加劑，可列舉：軟膏用基材、醇、多元醇、水溶性高分子、抗氧化劑、pH值調整劑、紫外線抑制劑、金屬離子封阻劑、增黏劑、界面活性劑、純化水、防腐劑、抗菌劑、油劑、高級脂肪酸、脂肪酸酯、保濕劑、色素、維生素類、胺基酸類等。進而，亦可將本發明組合物調配於公知之準藥品、化妝品等中以外用劑之形式使用。於外用劑中，除本發明組合物以外，亦可進而調配用以提高糖化反應抑制作用之成分，或者調配具有其他生理功能材料。作為此種成分，例如可列舉：紫外線抑制劑、抗氧化劑、保濕劑、細胞活化劑、血流促進劑。可使用適當量之該等中之1種或2種以上。作為外用劑之具體之使用態樣，並無特別限定，例如可列舉：化妝水、乳液、乳霜、軟膏、洗劑、油劑、敷劑。

作為外用劑中之植物萃取物之含量，只要依照含有之本發明之植物萃取物之種類、劑型等適當製備即可，例如只要於製劑總量中，以固形物成分換算計，於0.0001～30%、較佳為0.001～25%、尤佳為0.5～20%之範圍內調配即可。

【0018】

於以飲食品之形態使用本發明組合物之情形時，可藉由將本發明之植物萃取物與公知之食材或飲食品進行混合，利用常規方法加工為食品而獲得。此種飲食品之形態並無特別限定，例如可列舉：粉末狀、塊狀、液

狀、糖漿狀、果凍狀。於飲食品中，可調配食品上所容許之其他成分。作為此種成分，例如可列舉：營養素、賦形劑、增量劑、甜味料、香味劑、著色劑、防腐劑、乳化劑、助溶劑、多元醇、有機酸、無機酸、水溶性高分子。可使用適當量之該等中之1種或2種以上。作為飲食品之種類，例如可列舉：飲料、粉末飲料、家常菜、麵類、調理麵包、麵包、點心、調味料。

植物萃取物於飲食品中之添加量根據添加劑之有無或食品之種類等而不同，以所含有之植物萃取物之固形物成分換算計，適宜為設為0.01～50%之範圍內，較佳為設為0.1～30%之範圍內，但未必限於該範圍。

【0019】

本說明書中之「糖化反應」係蛋白質或胺基酸之胺基與還原糖之羰基進行反應而生成AGEs之一系列之反應，係亦被稱為梅納反應之反應。AGEs不僅自葡萄糖或果糖生成，亦自糖化反應中間物或糖代謝產物生成。

【0020】

本發明之「糖化反應抑制劑」係具有抑制糖化反應，抑制AGEs之產生之作用之組合物。本發明之糖化反應抑制劑可抑制由糖化反應中間物或糖代謝產物與蛋白質之糖化反應所生成之AGEs之生成，預防、改善或治療隨著糖化反應所產生之各種現象，故而例如可用於已知糖化反應所參與之軟骨之彈力降低、皮膚之老化(成為皮膚之彈力降低、皺紋或鬆弛之原因之膠原蛋白之交聯形成、成為肌膚之暗沉之原因之色素沈積等)、動脈硬化、糖尿病併發症(例如心肌梗塞、糖尿病性腎病、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性神經障礙)、炎症、癌轉移、高血壓、癡呆症、癌症、非酒

精性脂肪肝炎、不孕症、肥胖、男性勃起功能障礙、牙周病、阿爾茨海默氏病、白內障、骨質疏鬆症或血管病(例如血管之炎症、動脈硬化、糖尿病性血管併發症、血管內皮功能障礙)之預防、改善或治療。

[實施例]

【0021】

以下，揭示實施例、試驗例、製造例進一步詳述本發明。但是，本發明並不限定於下述實施例所示之範圍。

【0022】

實施例1 植物萃取物之製造

將表1中所記載之編號1及3~8之各植物進行風乾後，於60℃下乾燥一晚。藉由摻合機進行粉碎後，將所獲得之粉碎物100 g浸漬於甲醇500 mL中，於常溫下靜置一週。對所獲得之萃取液進行過濾所獲得之濾液係藉由旋轉蒸發器蒸餾去除甲醇，獲得編號1及3~8之各植物之萃取物。

所獲得之各植物萃取物(表1之編號1及3~8)分別以50 mg/mL之濃度溶解於二甲基亞砷(DMSO)中，製成檢體。

表1中所記載之編號2之植物係將冷凍果實解凍後，分離為固體部及液體部。將固體部100 g浸漬於70%含水乙醇1 L中，於常溫下靜置1小時。於將所獲得之萃取液進行過濾所獲得之濾液及殘渣中，將殘渣進而浸漬於10倍量之70%含水乙醇中，於85℃下靜置1小時。混合對所獲得之萃取液進行過濾所獲得之濾液、解凍後之液體部、及最初進行過濾所獲得之濾液，藉由苯乙烯-二乙基苯系管柱進行精製，並將所得者進行濃縮、噴霧乾燥，獲得萃取物。

將所獲得之萃取物(表1之編號2)以10 mg/mL之濃度溶解於二甲基亞

礆(DMSO)中，製成檢體。

[表1]

編號	植物	學名	部位
1	西洋山葵	<i>Armoracia rusticana</i> P. Gaertn., B. Mey. et Schreb.	葉
2	藍靛果忍冬	<i>Lonicera caerulea</i> L.	果實
3	擬美國薄荷	<i>Monarda fistulosa</i> L.	莖葉
4	大頭橐吾	<i>Ligularia japonica</i> Less.	莖葉
5	直立委陵菜	<i>Potentilla erecta</i> (L.) Raeusch	全草(包含花)
6	扯根菜	<i>Penthorum chinense</i> Pursh	莖葉
7	木槿	<i>Hibiscus syriacus</i> L.	葉
8	巴西羊蹄甲	<i>Bauhinia forficata</i> Link	葉

【0023】

試驗例1 源自甘油醛(GLA)之AGEs生成抑制活性測定

(1)試驗方法

將實施例1中所獲得之各檢體以最終濃度成為10、100、500 $\mu\text{g/mL}$ 之方式藉由DMSO進行稀釋後，將各檢體25 μL 與50 mg/mL 牛血清白蛋白(Sigma公司製造)50 μL 、100 mM DL-甘油醛(和光純藥工業公司製造)(以下，稱為「GLA溶液」)25 μL 、1 M 磷酸緩衝液(pH值7.4)50 μL 、超純水100 μL 進行混合，藉由96孔板(IWAKI公司製造)於37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應24小時，獲得反應液。作為陽性對照，使用胺基胍代替檢體。

所獲得之反應液係使用微盤讀取器(Corona Electric公司製造，SH-9000)，測定激發波長370 nm 、螢光波長440 nm 之螢光強度。又，於上述反應液之組成中，分別添加DMSO代替檢體，添加超純水代替GLA溶液製備不添加GLA溶液之反應液(空白樣品1)、僅不添加檢體之反應液(檢體-)、既不添加檢體亦不添加GLA溶液之反應液(空白樣品2)，以與上述相同之方式測定螢光強度。

使用所獲得之螢光強度之值，藉由以下之計算式算出糖化反應之抑

制活性率(%)。

【0024】

[數1]

糖化反應之抑制活性率(%)

$$= [1 - \{(\text{檢體}(+) - \text{空白樣品1}) / (\text{檢體}(-) - \text{空白樣品2})\}] \times 100$$

根據將所獲得之抑制活性率設為縱軸，將檢體濃度($\mu\text{g/mL}$)設為橫軸進行繪製之對數近似曲線之式，算出50%抑制濃度(IC_{50})(ppm)。

將結果示於表2。

【0025】

(2)結果

根據表2可知，顯示出：本發明之植物萃取物表現出與已知為強力之糖化反應抑制劑之胺基胍同等或其以上地抑制源自GLA之AGEs(以下，亦稱為「GLA-AGEs」)之生成的活性，具有優異之糖化反應抑制作用。

【0026】

試驗例2. 源自甲基乙二醛(MGO)之AGEs生成抑制測定

(1)試驗方法

將實施例1中所獲得之各檢體以最終濃度成為10、100、500 $\mu\text{g/mL}$ 之方式藉由DMSO進行稀釋。將各檢體25 μL 與50 mg/mL 牛血清白蛋白(Sigma公司製造)50 μL 、100 mM 甲基乙二醛溶液(Sigma公司製造)(以下，稱為「MGO溶液」)25 μL 、1 M 磷酸緩衝液(pH值7.4)50 μL 、超純水100 μL 進行混合，藉由96孔板(IWAKI公司製造)於37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應72小時，獲得反應液。作為陽性對照，使用胺基胍代替檢體。

所獲得之反應液係使用微盤讀取器(Corona Electric公司製造，SH-

9000)，測定激發波長370 nm、螢光波長440 nm之螢光強度。又，於上述組成之反應液中，分別添加DMSO代替檢體，添加超純水代替MGO溶液製備不添加MGO溶液之反應液(空白樣品1)、僅不添加檢體之反應液(檢體-)、既不添加檢體亦不添加MGO溶液之反應液(空白樣品2)，以與上述相同之方式測定螢光強度。

使用所獲得之螢光強度之值，藉由以下之計算式算出糖化反應之抑制活性率(%)。

【0027】

[數2]

糖化反應抑制活性率(%)

$$= [1 - \{(\text{檢體}(+) - \text{空白樣品1}) / (\text{檢體}(-) - \text{空白樣品2})\}] \times 100$$

根據將所獲得之抑制活性率設為縱軸，將檢體濃度($\mu\text{g/mL}$)設為橫軸進行繪製之對數近似曲線之式，算出50%抑制濃度(IC_{50})(ppm)。

將結果示於表2。

【0028】

(2)結果

根據表2可知，顯示：本發明之植物萃取物表現出抑制源自MGO之AGEs(以下，亦稱為「MGO-AGEs」)之生成的活性，具有優異之糖化反應抑制作用。

【0029】

[表2]

編號	植物	GLA-AGEs				MGO-AGEs			
		抑制活性率%			IC ₅₀ (ppm)	抑制活性率%			IC ₅₀ (ppm)
		10 ppm	100 ppm	500 ppm		10 ppm	100 ppm	500 ppm	
1	西洋山葵(葉)	4.6	41.4	79.6	121.9	5.5	34.0	71.9	171.9
2	藍靛果忍冬(果實)	8.8	41.2	79.9	115.3	4.9	28.0	64.7	255.6
3	擬美國薄荷(莖葉)	6.3	36.1	74.3	152.3	3.6	22.7	53.7	514.0
4	大頭橐吾(莖葉)	5.9	32.2	68.0	203.5	4.4	25.4	57.8	377.4
5	直立委陵菜(全草 包含花)	2.7	29.6	70.5	201.1	8.5	32.2	70.1	186.0
6	扯根菜(莖葉)	0.7	27.2	68.4	228.4	8.8	28.1	64.5	256.5
7	木槿(葉)	6.3	30.1	64.8	241.1	1.4	22.8	55.5	449.0
8	巴西羊蹄甲(葉)	3.6	28.6	65.4	245.4	4.7	21.2	52.2	606.1
-	胺基胍	6.2	25.7	67.6	240.1	4.4	23.3	67.7	254.3

實施例2 植物萃取物之製造

將表1中所記載之編號5及6之各植物進行風乾後，於60°C下乾燥一晚。藉由摻合機進行粉碎後，將所獲得之粉碎物100 g浸漬於水或乙醇500 mL中，於80°C下靜置1小時。對所獲得之萃取液進行過濾所獲得之濾液係藉由旋轉蒸發器蒸餾去除溶劑，獲得編號5及6之各植物之萃取物。

所獲得之各植物萃取物(表1之編號5及6)分別以50 mg/mL之濃度溶解於二甲基亞砷(DMSO)中，製成檢體。

試驗例3 源自GLA、MGO及乙醇醛(GA)之AGEs生成抑制活性測定

(1)試驗方法

將實施例2中所獲得之各檢體以最終濃度成為500 µg/mL之方式藉由DMSO進行稀釋。GLA-AGEs、MGO-AGEs之生成抑制活性係藉由與試驗例1及2之記載方法相同之方法進行測定。

源自GA之AGEs(以下，亦稱為「GA-AGEs」)之生成抑制活性係藉由以下之方法進行測定。將各檢體25 µL與100 mg/mL牛血清白蛋白(Sigma公司製造)50 µL、30 mM乙醇醛二聚物(Sigma公司製造)(以下，稱為「GA溶液」)25 µL、1 M磷酸緩衝液(pH值7.4)25 µL、超純水125 µL

進行混合，藉由96孔板(IWAKI公司製造)於37°C下反應24小時，獲得反應液。作為陽性對照，使用胺基胍代替檢體。

所獲得之反應液係使用微盤讀取器(Corona Electric公司製造，SH-9000)，測定激發波長370 nm、螢光波長440 nm之螢光強度。又，於上述反應液之組成中，分別添加DMSO代替檢體、添加超純水代替GA溶液製備不添加GA溶液之反應液(空白樣品1)、僅不添加檢體之反應液(檢體-)、既不添加檢體亦不添加GA溶液之反應液(空白樣品2)，以與上述相同之方式測定螢光強度。

使用所獲得之螢光強度之值，藉由以下之計算式算出糖化反應之抑制活性率(%)。

【0030】

[數3]

糖化反應之抑制活性率(%)

$$= [1 - \{(\text{檢體}(+) - \text{空白樣品1}) / (\text{檢體}(-) - \text{空白樣品2})\}] \times 100$$

將結果示於表3。

(2)結果

根據表3可知，顯示：直立委陵菜、扯根菜之水及乙醇萃取物表現出抑制GLA-AGEs、MGO-AGEs及GA-AGEs之生成之活性，具有優異之糖化反應抑制作用。

試驗例4 羧甲基離胺酸(CML)生成抑制活性測定

(1)試驗方法

將實施例2中所獲得之各檢體以最終濃度成為1 μg/mL之方式藉由DMSO進行稀釋後，將各檢體5 μL與4 mg/mL牛血清白蛋白(Sigma公司製

造)50 μL 、2 M葡萄糖(Nacalai Tesque公司製造)25 μL 、100 mM磷酸緩衝液(pH值7.4)125 μL 、超純水45 μL 進行混合，藉由96孔板(IWAKI公司製造)於60°C下反應24小時，獲得反應液。作為陽性對照，使用胺基胍代替檢體。

其次，將0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之CML-BSA/ $\text{N}\epsilon$ -(羧甲基)離胺酸-BSA(CycLex公司製造)以100 $\mu\text{L}/$ 孔添加於ELISA(enzyme linked immunosorbent assay，酵素結合免疫吸附分析)板，於37°C下培養1小時進行固相化後，使用0.05%含Tween-20磷酸緩衝液進行清洗。其後，以200 $\mu\text{L}/$ 孔添加1%Block Ace(Megmilk Snow Brand公司製造)，於37°C下封閉1小時後，使用0.05%含Tween-20磷酸緩衝液進行清洗。進而，添加0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 $\text{N}\epsilon$ -(羧甲基)離胺酸(Anti $\text{N}\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine)(Cosmo Bio公司製造)50 $\mu\text{L}/$ 孔與CML-BSA(校準曲線用)或上述反應液50 $\mu\text{L}/$ 孔之混合液，於室溫下靜置1小時。使用0.05%含Tween-20磷酸緩衝液進行清洗後，以100 $\mu\text{L}/$ 孔添加稀釋5000倍之抗小鼠IgG(γ -鏈特異性)-山羊產生之過氧化物酶抗體 (Anti-Mouse IgG(γ -chain specific)-peroxidase antibody produced in goat)(Sigma公司製造)後，於室溫下靜置1小時。使用0.05%含Tween-20磷酸緩衝液進行清洗後，以100 $\mu\text{L}/$ 孔添加TMB溶液(Nacalai Tesque公司製造)，10分鐘後以100 $\mu\text{L}/$ 孔加入1 N硫酸後，使用微盤讀取器(Corona Electric公司製造，SH-9000)測定450 nm之吸光度。

根據校準曲線求出各反應液中之CML量，將未添加檢體之反應液之CML量設為100%，算出由添加檢體產生之CML生成抑制率(%)。

(2)結果

根據表3可知，顯示：扯根菜之水及乙醇萃取物與已知為強力之糖化

反應抑制劑之胺基胍相比，表現出更高程度地抑制CML之生成之活性，具有優異之糖化反應抑制作用。

[表3]

植物	萃取法	抑制活性率(%)			
		螢光			CML
		GLA-AGEs	MGO-AGEs	GA-AGEs	
直立委陵菜 (全草包含花)	水 乙醇	48.8 65.5	29.5 48.6	- 63.7	- -
扯根菜 (莖葉)	水 乙醇	47.7 76.6	44.8 69.4	51.2 73.5	73.9 95.5
胺基胍	-	69.7	66.1	71.6	14.6

-：無活性

【0031】

其次，示出含有本發明抑制劑之經口劑、外用劑、飲食品之製造例。

製造例1 經口劑(錠劑)之製備

按照以下之調配比率混合各成分，按照常規方法製造錠劑。

【0032】

[表3]

成分	調配量(重量%)
實施例1中所獲得之任一種植物萃取物	5
玉米澱粉	61
結晶纖維素	30
甲基纖維素	3
硬脂酸鎂	1

製造例2 經口劑(顆粒劑)之製備

按照以下之調配比率混合各成分，按照常規方法製造顆粒劑。

【0033】

[表4]

成分	調配量(重量%)
實施例1中所獲得之任一種植物萃取物	5
乳糖	84
低取代度羥丙基纖維素	7
羥丙基纖維素	4

製造例3 經口劑(軟膠囊劑)之製備

按照以下之調配比率混合各成分，按照常規方法製造軟膠囊劑。

【0034】

[表5]

成分	調配量(重量%)
實施例1中所獲得之任一種植物萃取物	5
植物油	85
蜂蠟	8
卵磷脂	2

製造例4 外用劑(乳霜)之製備

按照以下之調配比率混合各成分，按照常規方法製造乳霜。

【0035】

[表6]

成分	調配量
實施例1中所獲得之任一種植物萃取物	5
蜂蠟	6
鯨蠟醇	5
氫化油	5
角鯊烷	30
親油型單硬脂酸甘油酯	4
聚氧乙炔山梨醇酐單月桂酸酯(20E.O.)	2
防腐劑	適量
香料	適量
純化水	剩餘量

製造例5 外用劑(化妝水)之製備

按照以下之調配比率混合各成分，按照常規方法製造化妝水。

【0036】

[表7]

成分	調配量(重量%)
實施例1中所獲得之任一種植物萃取物	5
甘油	10
1,3-丁二醇	6
鹽酸吡哆醇	0.1
檸檬酸	0.1
檸檬酸鈉	0.3
聚氧乙烯氫化蓖麻油(60E.O.)	0.5
乙醇	8
防腐劑	適量
香料	適量
純化水	剩餘量

製造例6 飲食品(飲料)之製備

按照以下之調配比率混合各成分，按照常規方法製造飲料。

【0037】

[表8]

成分	調配量(重量%)
實施例1中所獲得之任一種植物萃取物	5
蔗糖	2
抗壞血酸	1.5
山梨酸	微量
香料	微量
水	剩餘部分

製造例7 飲食品(糖果)之製備

按照以下之調配比率混合各成分，按照常規方法製造糖果。

【0038】

[表9]

成分	調配量(重量%)
實施例1中所獲得之任一種植物萃取物	5
蔗糖	60
麥芽糖醇	32
檸檬酸	3
香料	微量



202000220

【發明摘要】

【中文發明名稱】

糖化反應抑制劑

【中文】

本發明之課題在於提供一種新穎糖化反應抑制劑。

本發明之糖化反應抑制劑含有選自由西洋山葵、藍靛果忍冬、擬美國薄荷、大頭橐吾、直立委陵菜、扯根菜、木槿及巴西羊蹄甲所組成之植物群中之1種或2種以上之植物之萃取物作為有效成分。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種糖化反應抑制劑，其含有選自由西洋山葵、藍靛果忍冬、擬美國薄荷、大頭橐吾、直立委陵菜、扯根菜、木槿及巴西羊蹄甲所組成之植物群中之1種或2種以上之植物之萃取物作為有效成分。

【第2項】

一種高血壓、癡呆症、癌症、非酒精性脂肪肝炎、不孕症、肥胖、男性勃起功能障礙、牙周病、阿爾茨海默氏病、白內障或骨質疏鬆症之預防、改善或治療用組合物，其含有如請求項1之植物萃取物。

【第3項】

一種血管病之預防、改善或治療用組合物，其含有如請求項1之植物萃取物。

【第4項】

如請求項3之血管病之預防、改善或治療用組合物，其中血管病為血管之炎症、動脈硬化、糖尿病性血管併發症或血管內皮功能障礙。