



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106132425 A

(43)申请公布日 2016. 11. 16

(21)申请号 201480077486.7

(22)申请日 2014.11.14

(30)优先权数据

2014-026763 2014.02.14 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.09.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/080256 2014.11.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/122067 JA 2015.08.20

(71)申请人 龟甲万株式会社

地址 日本千叶县

(72)发明人 堀场太郎

(74)专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理
事务所(普通合伙) 11017

代理人 韩登营

(51)Int.Cl.

A61K 36/75(2006.01)

A61K 31/366(2006.01)

A61K 36/00(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 21/00(2006.01)

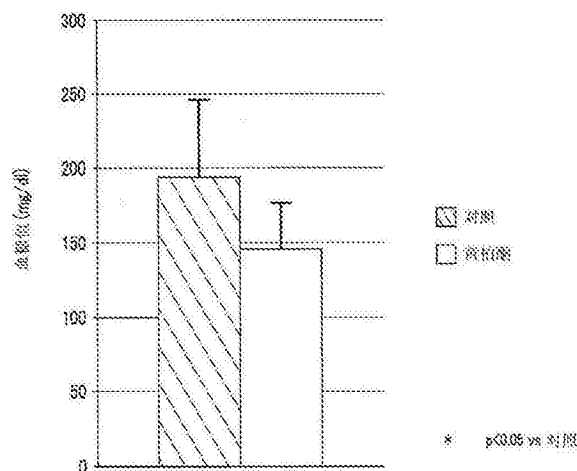
权利要求书1页 说明书15页 附图17页

(54)发明名称

包含柑橘类种子提取物的组合物、食品、药
品和包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法

(57)摘要

本发明提供一种能充分发挥柑橘类(具体为柑橘类种子提取物)新作用的包含柑橘类种子提取物的组合物、食品、药品和包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法。能通过以下技术方案来解决上述课题:一种包含柑橘类种子提取物的组合物,其包含来自柑橘类种子提取物的黄柏酮和诺米林,所述黄柏酮的含量相对于所述诺米林的含量(=所述黄柏酮的含量/所述诺米林的含量)在0.020以上。



1. 一种包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,
包含来自柑橘类种子提取物的黄柏酮和诺米林,
所述黄柏酮的含量相对于所述诺米林的含量、即所述黄柏酮的含量/所述诺米林的含量在0.020以上。
2. 根据权利要求1所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,所述黄柏酮的含量相对于所述诺米林的含量、即所述黄柏酮的含量/所述诺米林的含量在0.100以上。
3. 根据权利要求1或2所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,所述黄柏酮的含量相对于所述诺米林的含量、即所述黄柏酮的含量/所述诺米林的含量在0.300以上。
4. 根据权利要求1~3的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,所述柑橘类种子提取物为香橙种子提取物。
5. 根据权利要求1~4中任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,其用于降低血糖。
6. 根据权利要求1~5中任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,其用于增加骨骼肌。
7. 根据权利要求1~6中任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,其用于降低体脂肪。
8. 一种食品,其特征在于,包含权利要求1~7的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物。
9. 一种药品,其特征在于,包含作为有效成分的权利要求1~7的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物。
10. 一种包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,其特征在于,包含如下工序:
加热工序,以60℃以上的温度加热柑橘类种子;
提取工序,从加热后的所述柑橘类种子提取柑橘类种子提取物。
11. 根据权利要求10所述的包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,其特征在于,所述加热工序为以100℃以上的温度加热所述柑橘类种子的工序。
12. 根据权利要求10或11所述的包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,其特征在于,所述加热工序为对所述柑橘类种子加热5分钟以上的工序。
13. 根据权利要求10~12中任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,其特征在于,所述柑橘类种子为香橙种子。

包含柑橘类种子提取物的组合物、食品、药品和包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含柑橘类种子提取物的组合物、食品、药品和包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,尤其是涉及一种具有新用途的包含柑橘类种子提取物的组合物、食品、药品和包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法。

背景技术

[0002] 在世界各地,柑橘类(无患子目橘科橘属、枳属、金橘属)的果实被广泛应用于生吃、果汁、点心制作材料、烹饪调味等。另外,由于柑橘类富含维生素C、食物纤维等,人们认识到柑橘类的果实是有助于促进健康的食物。

对于该柑橘类,在最近的研究中,尤其是针对香橙(学名:Citrus junos),发布有其具有各种各样优异作用的报告。

[0003] 例如在专利文献1中,公开有香橙提取物具有促进透明质酸产生能力的作用。还有,在专利文献2中,公开有香橙的单细胞化处理物具有使角质剥离的作用。

即,在专利文献1和专利文献2中,公开有香橙提取物的用途(用于促进透明质酸产生能力、用于剥离角质)。

现有技术文献

专利文献

[0004] 专利文献1:日本发明专利公开公报特开2001-158728号

专利文献2:日本发明专利公开公报特开2004-10480号

发明内容

[0005] 但是,香橙等柑橘类的提取物,不仅具有专利文献1和专利文献2所公开的作用,还可能具有除上述作用以外的至今尚未发现的其他新作用。

[0006] 还有,人们不仅希望发现柑橘类的新作用,还希望在柑橘类(详细地讲为柑橘类种子)内部确定用于有效地发挥新作用的有效成分,通过发现用于增加该有效成分的方法,以提供能充分发挥新作用的可利用性较高的组合物。

[0007] 有鉴于此,本发明的课题在于提供一种能充分发挥柑橘类(详细地讲为柑橘类种子提取物)新作用的包含柑橘类种子提取物的组合物、食品、药品和包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法。

[0008] 能通过以下技术方案来解决上述课题。

(1)一种包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,包含来自柑橘类种子提取物的黄柏酮和诺米林,所述黄柏酮的含量相对于所述诺米林的含量(=所述黄柏酮的含量/所述诺米林的含量)在0.020以上。

(2)如上述(1)所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,所述黄柏酮的含量相对于所述诺米林的含量(=所述黄柏酮的含量/所述诺米林的含量)在0.100以上。

(3)如上述(1)或上述(2)所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,所述黄柏酮的含量相对于所述诺米林的含量(=所述黄柏酮的含量/所述诺米林的含量)在0.300以上。

(4)如上述(1)~上述(3)的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,所述柑橘类种子提取物为香橙种子提取物。

(5)如上述(1)~上述(4)的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,用于降低血糖。

(6)如上述(1)~上述(5)的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,用于增加骨骼肌。

(7)如上述(1)~上述(6)的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,其特征在于,用于降低体脂肪。

(8)一种食品,其特征在于,包含上述(1)~上述(7)的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物。

(9)一种药品,其特征在于,包含作为有效成分的上述(1)~上述(7)的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物。

(10)一种包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,其特征在于,包含如下工序:加热工序,以60℃以上的温度加热柑橘类种子;提取工序,从加热后的所述柑橘类种子提取柑橘类种子提取物。

(11)如上述(10)所述的包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,其特征在于,所述加热工序为以100℃以上的温度加热所述柑橘类种子的工序。

(12)如上述(10)或上述(11)所述的包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,其特征在于,所述加热工序为对所述柑橘类种子加热5分钟以上的工序。

(13)如上述(10)~上述(12)的任意一项所述的包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,其特征在于,所述柑橘类种子为香橙种子。

发明效果

[0009] 本发明所述的包含柑橘类种子提取物的组合物,通过将黄柏酮的含量相对于诺米林的含量特定为规定值以上,能较多地包含黄柏酮,从而能充分发挥新作用(降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪)。

[0010] 本发明所述的食品和药品,由于包含较多地含有黄柏酮的包含柑橘类种子提取物的组合物,因此能充分发挥新作用(降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪)。

[0011] 本发明所述的包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法,由于包含以规定温度以上的温度加热柑橘类种子的加热工序,通过较多地含有黄柏酮,因此能制造出能充分发挥新作用(降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪)的包含柑橘类种子提取物的组合物。

附图说明

[0012] 图1是表示KKAY鼠的血糖值随时间变动的测定数据。

图2是表示KKAY鼠的HbA1c(糖化血红蛋白)随时间变动的测定数据。

图3是表示KKAY鼠的血糖值随时间变动的测定数据。

图4是表示KKAY鼠的HbA1c随时间变动的测定数据。

图5是表示实验饲养开始后第28天的KKAY鼠的腓肠肌的重量比例的测定数据。

图6是表示实验饲养开始后第28天的KKAY鼠的各脂肪的重量比例的测定数据,其中,(a)为肾脏周围脂肪的测定数据、(b)为肠系膜脂肪的测定数据、(c)为精巢上体周围脂肪的测定数据、(d)为皮下脂肪的测定数据。

图7是柠檬苦素苷元类(脱乙酰诺米林)的LC-MS(液相色谱质谱联用)解析数据。

图8是柠檬苦素苷元类(柠檬苦素)的LC-MS解析数据。

图9是柠檬苦素苷元类(诺米林)的LC-MS解析数据。

图10是柠檬苦素苷元类(黄柏酮)的LC-MS解析数据。

图11是表示实验饲养开始后第28天的KKAY鼠的血糖值的测定数据。

图12是表示KKAY鼠的HbA1c随时间变动的测定数据。

图13是表示加热温度对黄柏酮的相对量和黄柏酮的含量/诺米林的含量产生的影响的数据。

图14是表示加热时间对黄柏酮的相对量和黄柏酮的含量/诺米林的含量产生的影响的数据。

图15是柠檬种子的HPLC分析(高效液相色谱法分析)数据。

图16是葡萄柚种子的HPLC分析数据。

图17是用于说明本实施方式的包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法的内容的流程图。

具体实施方式

[0013] 以下,说明本发明的包含柑橘类种子提取物的组合物、食品、药品和用于实施包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法的方式(实施方式)。

[0014] 《包含柑橘类种子提取物的组合物》

本实施方式的包含柑橘类种子提取物的组合物(以下,适当地称为“组合物”),其特征在于,包含来自柑橘类种子提取物的黄柏酮和诺米林,黄柏酮的含量相对于诺米林的含量在规定值以上。

以下,对于本实施方式的组合物,首先说明柑橘类种子提取物和用途,其后说明组合物的构成。

[0015] [柑橘类种子提取物]

所谓柑橘类种子是属于无患子目橘科橘属、枳属、金橘属的植物的种子,所谓柑橘类种子提取物是从这些种子提取而得的提取物。

另外,具体地讲,柑橘类包含橘科橘属的香橙(学名:Citrus junos)、橘科橘属的柠檬(学名:Citrus limon)、橘科橘属的葡萄柚(学名:Citrus X paradisi)等。

还有,发明人在确认属于柑橘类的多个果实的各个部位的组成等时,确认到柑橘类中尤其是种子部分的提取物中较多地包含柠檬苦素苷元类,其发挥提高降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪这样的作用。

因此,通过使用柑橘类种子提取物的柠檬苦素苷元类,由于能从少量原料(香橙种子、柠檬种子、葡萄柚种子等)获得大量的柠檬苦素苷元类,因此不仅能降低原料使用量、原料成本,还有助于减轻制造工序中提取作业的负担、缩短提取时间。

[0016] [用途]

作为本实施方式的包含柑橘类种子提取物的组合物的新用途,包含如下所示的用途。

[0017] (用于降低血糖)

所谓用于降低血糖是降低血糖值、HbA1c的用途,作为详细的用途,例如为降血糖剂、降血糖食品(健康食品)、降血糖药品。

应予说明,所谓HbA1c是如下求得的数值:测定葡萄糖稳定地结合在血红蛋白的β链的N末端的缬氨酸上的血红蛋白,计算这样的血红蛋白占全部血红蛋白量的比例而求得。

[0018] (用于增加骨骼肌)

所谓用于增加骨骼肌是增加骨骼肌数量的用途,作为详细的用途,例如为骨骼肌增量剂、骨骼肌增量食品(健康食品)、骨骼肌增量药品。

这里,所谓骨骼肌是肌肉的一个分类,表示使骨骼动作的肌肉。另外,作为骨骼肌,例如有腓肠肌等。

[0019] (用于降低体脂肪)

所谓用于降低体脂肪是降低体脂肪量的用途,作为详细的用途,例如为降低体脂肪用剂、降低体脂肪用食品(健康食品)、降低体脂肪用药品。

另外,作为体脂肪(脂肪组织),例如有肾脏周围脂肪、肠系膜脂肪、精巢上体周围脂肪、皮下脂肪等。

[0020] [组合物的构成]

本实施方式的组合物构成为包含来自柑橘类种子提取物的柠檬苦素苷元类、柠檬苦素配糖类。

[柠檬苦素苷元类]

柠檬苦素苷元类来自柑橘类种子提取物(包含于柑橘类种子提取物),是发挥降低血糖、增加骨骼肌数量、降低体脂肪作用的化合物群。

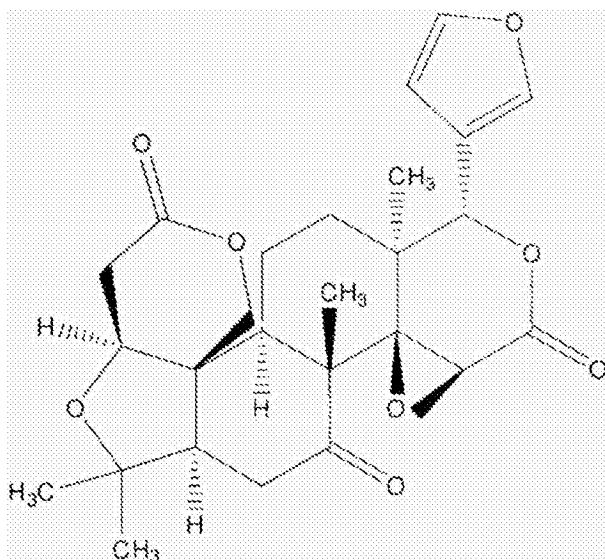
[0021] 另外,所谓柠檬苦素苷元类中的柠檬苦素是较多地包含于柑橘类植物的天然化学物质(植物化学物质),在化学结构方面是具有呋喃内酯(Furanolactone)骨架的化学物质。另外,所谓柠檬苦素苷元类中的苷元,是表示从配糖类(配糖物)中除去糖分而得的非糖状态。

[0022] 另外,所谓柠檬苦素苷元类构成为包含以下所示的柠檬苦素、诺米林、脱乙酰诺米林和黄柏酮。

[0023] (柠檬苦素)

所谓柠檬苦素($C_{26}H_{30}O_8$)用以下结构式表示。

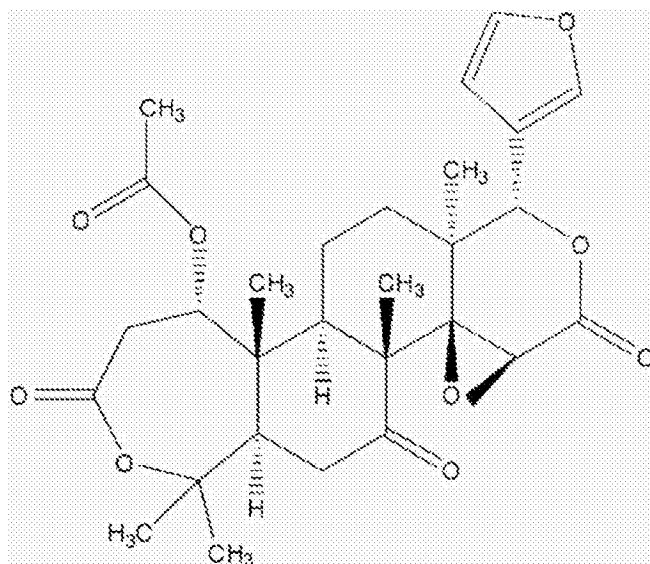
[化学式1]



[0024] (诺米林)

所谓诺米林($C_{28}H_{34}O_9$)用以下结构式表示。

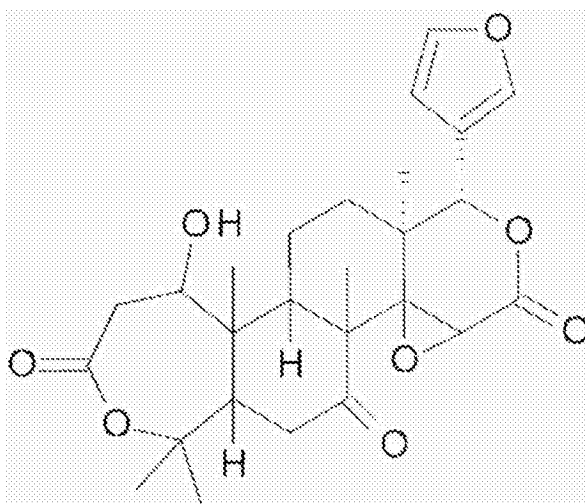
[化学式2]



[0025] (脱乙酰诺米林)

所谓脱乙酰诺米林($C_{26}H_{32}O_8$)用以下结构式表示。

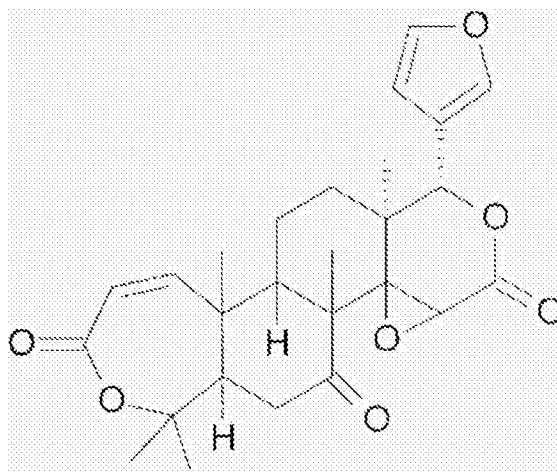
[化学式3]



[0026] (黄柏酮)

所谓黄柏酮($C_{26}H_{30}O_7$)用以下结构式表示。

[化学式4]



[0027] [黄柏酮的包含比例]

本实施方式的组合物为:黄柏酮的含量相对于诺米林的含量(=黄柏酮的含量/诺米林的含量:以下,适当地称为“黄柏酮的包含比例”)在0.020以上。

在上述柠檬苦素苷元类中,尤其是黄柏酮,即使是极少量也能发挥降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪的作用。因此,只要本实施方式的组合物的黄柏酮的包含比例在0.020以上,就能充分发挥上述各个作用。另外,为了切实发挥上述各个作用,优选黄柏酮的包含比例在0.100以上,更优选在0.300以上。

还有,不特别限定黄柏酮的包含比例的上限,但根据后述的本实施方式的组合物的制造方法,其为5.000以下。

另外,优选包含柑橘类种子提取物的组合物的固态成分中黄柏酮占0.001~10质量%,更优选占0.005~5质量%。

[0028] 对于本实施方式的组合物的黄柏酮的包含比例、含量,能通过后述的加热工序的处理来控制。

[0029] [柠檬苦素配糖类]

柠檬苦素配糖类来自柑橘类种子提取物(包含于柑橘类种子提取物),是糖结合

(glycosidic bond, 配基结合)在上述柠檬苦素苷元类上的化合物群。

[0030] [其他包含物]

本实施方式的组合物除了包含上述柠檬苦素苷元类和柠檬苦素配糖类以外,也可包含作为提取残渣的糖类等。

还有,为了使本实施方式的组合物处于适合用作食品、药品等的原材料(材料、药剂)的形态,可制成粉末状、颗粒状、粒状、糊状、凝胶状、固态、胶囊型或液态。

另外,由于本实施方式的组合物只要是包含柑橘类提取物的组合物即可,因此,当然也可只由柑橘类提取物构成。

[0031] 本实施方式的组合物的用量可根据对象的用途、使用对象的年龄、体重等不同而适当设定,一般情况下对于成人而言,将黄柏酮换算为干燥物时,一天的用量为0.1~2000mg/kg体重,优选为2~300mg/kg体重。还有,使用可以为单次,也可以为多次。

[0032] 接下来说明包含上述本实施方式的包含柑橘类种子提取物的组合物的食品。

《食品》

所谓本实施方式的食品是包含上述组合物的食品,可用作降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪的健康食品。

另外,所谓本实施方式的食品,可例举点心、面包、牛奶、各种饮料、面条、荞麦面条、意大利面、米饭、调料、香辛料、副食、含油脂食品、酒精、清凉饮料。还有,本实施方式的食品根据上述食品的种类将本领域技术人员公知的各种成分进行调配而构成即可。

[0033] 接下来说明包含作为有效成分的上述本实施方式的包含柑橘类种子提取物的组合物的药品。

《药品》

所谓本实施方式的药品是包含上述组合物作为有效成分的药品,可用作降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪的药品。

另外,本实施方式的药品,为了提高作为药剂的操作性或用于生命体时的吸收性等,优选根据常用方法,将上述组合物与合适的赋形剂等药用辅料进行组合而实现制剂化。

还有,本实施方式的药品能以各种剂型使用,例如作为口服制剂可例举胶囊型制剂、片剂、颗粒剂、微粒剂、糖浆制剂、干糖浆制剂。另外,作为非口服制剂可例举软膏、透皮吸收性贴剂等皮肤吸收剂、注射剂、栓剂、阴道栓剂、喷雾剂等经鼻给药制剂。

[0034] 接下来说明上述本实施方式的包含柑橘类种子提取物的组合物、食品和药品的制造方法。

《包含柑橘类种子提取物的组合物等的制造方法》

如图17所示,本实施方式的组合物的制造方法的特征为包含加热工序S1和提取工序S2。另外,本实施方式的组合物的制造方法也可包含后述的粉碎工序。

[0035] (加热工序)

所谓加热工序S1是对柑橘类种子进行加热的工序。

另外,加热工序S1的加热温度为60℃以上,优选为100℃以上。通过这样对柑橘类种子加热至规定温度以上,能使柑橘类种子内出现黄柏酮而使黄柏酮的含量增加。其结果,从该柑橘类种子提取出的包含提取物的组合物能充分发挥降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪的作用。

不特别限定加热工序S1的加热温度的上限,但如果超过150℃,则包含黄柏酮的柠檬苦素苷元类有可能会减少,基于这点,优选为150℃以下,更优选为140℃以下。

[0036] 这里,如上所述,所谓加热工序S1,只要是对柑橘类种子进行加热的工序则不特别限定,但也可以是通过加热而使柑橘类种子干燥的工序、即干燥工序,还可以是不进行加湿而使柑橘类种子干燥的干热干燥工序。

另外,在加热工序S1中,通过上述规定温度加热柑橘类种子而使柑橘类种子干燥时,能使加热后的柑橘类种子的状况(状态)大致保持恒定。其结果,不仅后述提取工序S2的提取条件容易设定,而且也能使最终获得的组合物的品质稳定。

[0037] 还有,详细地讲,所谓上述加热温度是加热工序S1中测到的加热环境内(气氛内)的温度。但是,在加热工序S1中,作为加热对象的柑橘类种子的温度也大致同于加热环境的温度。

[0038] 加热工序S1的加热时间若在5分钟以上,优选为10分钟以上,更优选为30分钟以上时,能充分获得增加柑橘类种子内的黄柏酮的含量的效果。还有,即使加热时间超过1440分钟,黄柏酮的含量也几乎不增加,而且黄柏酮以外的柠檬苦素苷元类有可能会减少,基于这点,优选在1440分钟以内,更优选在720分钟以内,特别优选在360分钟以内。

[0039] 还有,加热工序S1中的处理方法采用如下公知方法即可:将柑橘类种子静置于上述规定温度以上的温度环境(干燥炉等)中的方法;向柑橘类种子吹送热风的方法等。

[0040] (粉碎工序)

所谓粉碎工序是使柑橘类种子粉碎的工序。不特别限定粉碎工序中的粉碎方法,采用粉碎处理机等以公知方法进行即可。

另外,该粉碎工序在上述加热工序S1之后、后述提取工序S2之前进行,但也可在加热工序S1之前进行。

[0041] (提取工序)

所谓提取工序S2是从柑橘类种子提取提取物的工序。

另外,提取工序S2中的提取处理是用极性溶剂提取上述加热工序S1后(或粉碎工序后)的柑橘类种子的处理。

[0042] 提取工序S2中使用极性溶剂的提取温度在0℃~极性溶剂的沸点左右,通常在常温下进行。例如,将乙醇用作极性溶剂时,从提取效率的观点考虑,优选为0℃以上且低于70℃,更优选为5℃以上60℃以下。将水用作极性溶剂时,从提取效率考虑,优选为0℃以上100℃以下,更优选为25℃以上100℃以下。

[0043] 提取工序S2中的提取时间优选为1分钟~24小时,但提取时间也可以比它长。另外,提取方法可以使用静置、搅拌中的任一方法。

作为提取工序S2中的提取处理,例如为:在上述加热工序S1后(或粉碎工序后)的柑橘类种子中,加入1~50倍、优选为5~20倍左右的极性溶剂进行提取,由此能获得柑橘类提取物。此后,依照合适、确定的方法进行稀释、浓缩、干燥、精制等可获得包含柑橘类种子提取物的组合物。

[0044] 作为提取工序S2中所用的极性溶剂,只要是可作为食品添加剂的提取溶剂的极性溶剂则不特别限定,例如可使用选自如下有机溶剂中的一种或多种:丙酮、乙醇、甲基乙基甲酮、丙三醇、醋酸乙酯、醋酸甲酯、乙醚、环己烷、二氯甲烷、食用油脂、1,1,2,2-四氟乙烷、

1,1,2-三氯乙烯、1-丁醇、2-丁醇、1-丙醇、2-丙醇、丙二醇、己烷、水、甲醇等。

其中优选使用选自如下的有机溶剂：乙醇(10体积%以上100体积%以下)、甲醇(10体积%以上且不足99.5体积%)、1-丁醇(30体积%以上且不足99.5体积%)、己烷(5体积%且不足70体积%)、水，可更优选使用乙醇或水，最优选使用乙醇。

例如，作为极性溶剂，可使用10体积%以上100体积%以下的乙醇溶剂，可优选使用50体积%以上100体积%以下的乙醇溶剂，可更优选使用70体积%左右的乙醇溶剂。应予说明，所谓70体积%的乙醇溶剂是指水和乙醇的体积比为3:7的混合物。

[0045] 另外，如上所述，本实施方式的包含柑橘类种子提取物的组合物优选为柑橘类种子的有机溶剂提取物，更优选为柑橘类种子的醇类提取物，特别优选为柑橘类种子的乙醇提取物。

[0046] 对于本实施方式的食品和药品的制造方法，只要如下制造即可：将依照上述方法制造出的包含柑橘类种子提取物的组合物，混合到食品、药品材料中，之后依照本领域技术人员公知的食品、药品制造方法进行制造。

实施例

[0047] 接下来例示满足本发明要件的实施例和不满足本发明要件的对比例，说明本发明的包含柑橘类种子提取物的组合物、食品和药品。

[0048] 详细地讲，首先根据实验1~3说明香橙种子提取物和柠檬苦素苷元类发挥降低血糖、增加骨骼肌量、降低体脂肪作用这一点。

接下来根据实验4来确定构成柠檬苦素苷元类的化合物。

其次根据实验5说明柠檬苦素苷元类中尤其是黄柏酮充分发挥降低血糖作用这一点。

还有，根据实验6说明对香橙种子实施干热干燥的温度和时间对黄柏酮的相对量和包含比例产生的影响。

最后根据实验7说明在使用香橙种子以外的柑橘类种子时干热干燥对黄柏酮的出现产生的影响。

[0049] [实验1：用KKAY鼠做的动物实验(血糖值和HbA1c)]

(实验饲养的条件)

作为糖尿病发病模型鼠，从日本CLEA公司买来3周龄的KKAY鼠，进行7天的预备饲养后进行实验饲养。应予说明，鼠的饲养条件为温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、上午7点~下午7点之间亮灯(其他时间关灯)、使鼠自由摄取水和饲料。

[0050] (实验饲料的组成)

实验饲料使用AIN-93G，在饲料中按1质量%或3质量%混合香橙种子提取物，或按0.03质量%混合吡格列酮，进行投喂。

应予说明，实验1所用的香橙种子提取物如下制得：以 100°C 、720min对香橙种子进行干热干燥后，粉碎成粒径(直径)大致在1mm以下，在常温下用10倍于粉碎后的香橙种子的100%乙醇对该粉碎后的香橙种子进行10分钟的提取。

[0051] (实验结果的测定方法)

对于对照组(投喂了未对饲料进行任何混合的AIN-93G的组)、添加1质量%香橙种子提取物的组、添加3质量%香橙种子提取物的组、添加0.03质量%吡格列酮的组，每组10只进行7天的预备饲养后，用实验饲料饲养了28天。

实验饲养开始后,在经过规定天数当日上午9~11点之间从尾静脉进行采血,用血糖值检查装置(HORIBA公司制AntsenseⅢ和拜耳公司制DCA2000)测量血糖值和HbA1c。之后,对于测量的血糖值和HbA1c,求出各组的平均值。

应予说明,实验中测量和求出的HbA1c均为JDS值。

[0052] 图1表示投喂了实验饲料的KKAY鼠的血糖值随时间变动,图2表示投喂了实验饲料的KKAY鼠的HbA1c随时间变动。应予说明,图1的纵轴为血糖值(mg/dl),图2的纵轴为HbA1c(%),横轴均为实验饲养开始后经过的天数(天)。

应予说明,图中的“ $p < \text{数值 vs 对照}$ ”,意为相对于对照组, p 值小于所标记的数值。

[0053] (实验结果的研讨)

如图1的所示结果可知,对照组的血糖值随着天数的推移而上升,相对于此,香橙种子提取物添加组则抑制血糖值的上升而使血糖值降低。另外,从香橙种子提取物为1质量%添加组的结果来看,能充分确认到血糖值下降的效果,尤其是香橙种子提取物为3质量%添加组的结果可确认到,与第0天相比第14、27天的血糖值变低,而且即使和投喂了吡格列酮的组相比也取得同等以上的血糖值下降效果。

[0054] 如图2的所示结果可知,香橙种子提取物添加组使HbA1c下降。另外,从香橙种子提取物为1和3质量%添加组的结果来看,能充分确认到HbA1c下降的效果。

[0055] 从以上结果能确认到:本发明的包含柑橘类种子(香橙种子)提取物的组合物不仅具有能降低平常时的血糖值的效果,还具有能降低慢性高血糖状态时的血糖值的效果。

[0056] [实验2:用KKAY鼠做的动物实验(血糖值和HbA1c)]

对于实验饲养的条件、实验结果的测定方法,使用同于上述实验1的条件(但各组为8只或9只)和方法。

[0057] (实验饲料的组成)

对于实验饲料,也使用基本同于上述实验1的实验饲料,但除了使用使实验饲料中包含香橙种子提取物(饲料中3质量%)的饲料以外,还使用包含有柠檬苦素苷元类、柠檬苦素配糖类(均调制成为与香橙种子提取物组的摄取量等量)的饲料。

应予说明,柠檬苦素苷元类和柠檬苦素配糖类使用从通过与实验1相同的方法准备的香橙种子提取物中分离而得到的柠檬苦素苷元类和柠檬苦素配糖类。

[0058] 图3表示投喂了实验饲料的KKAY鼠的血糖值随时间变动,图4表示投喂了实验饲料的KKAY鼠的HbA1c随时间变动。应予说明,图3的纵轴为血糖值(mg/dl),图4的纵轴为HbA1c(%),横轴均为实验饲养开始后经过的天数(天)。

[0059] (实验结果的研讨)

如图3的所示结果,其结果为:与对照组相比,柠檬苦素配糖类添加组在第7天在一定程度上抑制了血糖值上升,但随着天数的推移则显示出大致同于对照组所示的血糖值的数值。

相对于此,与对照组相比,柠檬苦素苷元类添加组在第7天之后呈现出大幅降低血糖值的结果。另外,柠檬苦素苷元类添加组显示出大致同于香橙种子提取物添加组(图3中的total)所示的血糖值的数值。

[0060] 如图4的所示结果可知,在第28天,与对照组和柠檬苦素配糖类添加组相比,柠檬苦素苷元类添加组大幅抑制HbA1c的上升,降低HbA1c。另外,柠檬苦素苷元类添加组显示出

大致同于香橙种子提取物添加组(图中的total)所示的HbA1c的数值。

[0061] 从以上结果能确认到:在本发明的包含柑橘类种子(香橙种子)提取物的组合物中,主要由柠檬苦素苷元类发挥降低血中的血糖值的效果和降低慢性高血糖状态时的血糖值的效果。

[0062] [实验3:用KKAy鼠做的动物实验(增加骨骼肌量和降低体脂肪)]

对于实验饲养的条件,使用同于上述实验1的条件(但各组为8只或9只)进行,对于实验饲料,也使用同于上述实验2的饲料。

[0063] (实验结果的测定方法)

对照组、柠檬苦素配糖类添加组、柠檬苦素苷元添加组、香橙种子提取物添加组每组8只或9只进行7天的预备饲养后,用实验饲料饲养了28天。

[0064] 为了确认骨骼肌的肌肉量的变动情况,对实验饲养开始后第28天的鼠测量了“腓肠肌”相对于鼠体重的重量比例(=腓肠肌重量(g)/鼠体重(g))。

为了测定脂肪量的变动情况,对实验饲养开始后第28天的鼠测量了“肾脏周围脂肪”、“肠系膜脂肪”、“精巢上体周围脂肪”、“皮下脂肪”相对于鼠体重的重量比例(=各脂肪重量(g)/鼠体重(g))。

另外,对于测到的肌肉和脂肪的重量比例,求出各组的平均值。

应予说明,上述肌肉和脂肪的重量测定这样进行:摘出各组织并用生理盐水洗净后再用脱脂棉除去水分。

[0065] 图5表示实验饲养开始后第28天的KKAy鼠的腓肠肌的重量比例。另外,图6的(a)、(b)、(c)、(d)分别表示实验饲养开始后第28天的KKAy鼠的肾脏周围脂肪、肠系膜脂肪、精巢上体周围脂肪、皮下脂肪的重量比例。

[0066] (实验结果的研讨)

如图5的所示结果,结果显示柠檬苦素苷元添加组提高了腓肠肌的重量比例。

[0067] 如图6的(a)、(b)、(c)、(d)的所示结果,结果显示柠檬苦素苷元添加组的肾脏周围脂肪、肠系膜脂肪、精巢上体周围脂肪、皮下脂肪的重量比例均下降。

[0068] 从以上结果能确认到:在本发明的包含柑橘类种子(香橙种子)提取物的组合物中,主要由柠檬苦素苷元类发挥增加骨骼肌量的效果和降低体脂肪的效果。

[0069] [实验4:包含于柑橘类种子提取物的柠檬苦素苷元类]

用硅胶柱(daisogel 1002A IR60-40/63A)对实验3所获得的柠檬苦素苷元类进行分离,获得4种柠檬苦素苷元类。图7~10表示依照确定的方法对这些样品进行LC-MS解析的结果。

[0070] (实验结果的研讨)

由图7可知,该样品的m/z为473.2162,该柠檬苦素苷元类为脱乙酰诺米林([M+H]⁺为473.2175)。另外,由图8可知,该样品的m/z为471.2006,该柠檬苦素苷元类为柠檬苦素([M+H]⁺为471.2019)。另外,由图9可知,该样品的m/z为515.2283,该柠檬苦素苷元类为诺米林([M+H]⁺为515.2281)。另外,由图10可知,该样品的m/z为455.2055,该柠檬苦素苷元类为黄柏酮([M+H]⁺为455.2070)。

[0071] 从以上结果能确认到:本发明的包含柑橘类种子(香橙种子)提取物的组合物的柠檬苦素苷元中,包含脱乙酰诺米林、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮。

[0072] [实验5:用KKAy鼠做的动物实验(血糖值和HbA1c)]

对于实验饲养的条件和实验结果的测定方法,使用同于上述实验1的条件(但各组为8只,不能自由摄取水和饲料,配对饲养)和测定方法。

[0073] (实验饲料的组成)

实验饲料使用AIN-93G,使其包含黄柏酮0.035质量%。

应予说明,实验5所用的黄柏酮如下制得:以100℃、720min对香橙种子进行干热干燥后,粉碎成粒径(直径)大致在1mm以下,在常温下用10倍于粉碎后的香橙种子的100%乙醇对该粉碎后的香橙种子进行10分钟的提取,用硅胶柱(daisogel 1002A IR60-40/63A)对所获得的提取物进行分离而得。

[0074] 图11表示投喂了实验饲料的KKAy鼠的血糖值(从实验开始第28天),图12表示投喂了实验饲料的KKAy鼠的HbA1c随时间变动。应予说明,图11的纵轴为血糖值(mg/dl),图12的纵轴为HbA1c(%),图12的横轴为实验饲养开始后经过的天数(天)。

[0075] (实验结果的研讨)

如图11的所示结果可知,与对照组相比,黄柏酮添加组的血糖值低50mg/dl左右。另外,如图12的所示结果可知,黄柏酮添加组的HbA1c在下降。

另外,尽管黄柏酮添加组的实验饲料仅混合有极少量的0.035质量%的黄柏酮,但从获得了图11、12所示的效果来看,能确认到即使黄柏酮为极少量也大大有助于降低血糖值和HbA1c。

[0076] 从以上结果能确认到:由于本发明的包含柑橘类种子(香橙种子)提取物的组合物包含黄柏酮,所以能切实地发挥降低血糖值和HbA1c的效果。

[0077] [实验6:黄柏酮因干热干燥而出现和出现量因干热干燥温度、时间的变动]

(实验样品的调整)

作为柑橘类种子而准备了“香橙种子”。另外,对香橙种子实施了干热干燥。之后,将香橙种子粉碎成粒径(直径)大致在1mm以下,在常温下用10倍于粉碎后的香橙种子的100%乙醇对该粉碎后的香橙种子进行10分钟的提取而获得各样品。

应予说明,实验6中的“干热干燥”,意为按规定时间将香橙种子静置于设定至规定温度的干燥炉内。

[0078] (实验样品的测定方法)

依照确定的方法,对按上述调整方法获得的样品、诺米林标准品和黄柏酮标准品(ChromaDex公司制造)进行HPLC分析,对诺米林、黄柏酮进行定量。根据其测定值求出“黄柏酮的相对量”和“黄柏酮的含量/诺米林的含量”。HPLC分析如下进行:使用Waters公司Detector2996-controller600-auto sampler717plus系统和资生堂公司色谱柱CAPCELL PAK C18 UG120(150mm×4.6mm I.D.),再用水-乙腈的梯度(0min 85:15→5min 77:23→25min 74:26→30min 60:40→45min 54:46之后至65min)进行洗提。流速为1ml/min,检测波长为210nm。

应予说明,所谓“黄柏酮的相对量”,对于图13和表1所示的样品(将干热干燥时间固定为24小时)是将干热干燥温度为100℃时的值规定为1.0000时的相对量,而对于图14和表2所示的样品(将干燥时间的温度固定为150℃)是将干热干燥时间为30min时的值规定为1.0000时的相对量。

另外,所谓“黄柏酮的含量/诺米林的含量”是用以下参数求出的值:比较诺米林标准品和样品所示的诺米林的值而求出的样品内的“诺米林的含量”,和比较黄柏酮标准品和样品所示的黄柏酮的值而求出的样品内的“黄柏酮的含量”。

[0079] 应予说明,图13和表1表示将干热干燥时间固定为24小时而改变干热干燥温度时的“黄柏酮的相对量”和“黄柏酮的含量/诺米林的含量”。另外,图14和表2表示将干热干燥温度固定为150℃而改变干热干燥时间时的“黄柏酮的相对量”和“黄柏酮的含量/诺米林的含量”。

应予说明,图或表中的“黄柏酮”表示“黄柏酮的相对量”,“黄柏酮/诺米林”表示“黄柏酮的含量/诺米林的含量”。

[0080] [表1]

干热干燥温度(℃)	黄柏酮/诺米林(-)	黄柏酮(-)
0	0.0000	0.0000
40	0.0000	0.0000
50	0.0000	0.0000
60	0.0274	0.2396
70	0.0232	0.2273
80	0.0303	0.2718
90	0.0802	0.6537
100	0.1150	1.0000
110	0.2951	2.0789
120	0.4314	2.4512
130	0.5257	2.6816
140	1.0237	4.6148
150	1.3404	3.6509

[0081] [表2]

干热干燥时间(min)	黄柏酮/诺米林(-)	黄柏酮(-)
0	0.0000	0.0000
5	0.0064	0.0255
10	0.0245	0.0985
30	0.2228	1.0000
60	0.3451	1.3467
180	0.6356	1.7616
360	0.9342	2.3202
720	1.2583	2.4326
1440	1.5490	2.2784
2880	3.9184	2.3585
4320	2.8865	2.1438

[0082] (实验结果的研讨)

如图13和表1的所示结果可知,干热干燥(加热)温度为60℃以上时出现黄柏酮。另外,

干热干燥(加热)温度为60℃以上时“黄柏酮的含量/诺米林的含量”的值在0.020以上。

如图14和表2的所示结果可知,干热干燥(加热)时间为5分钟以上时出现黄柏酮。另外,干热干燥(加热)时间为10分钟以上时“黄柏酮的含量/诺米林的含量”的值在0.020以上。应予说明,干热干燥(加热)为1440分钟时提取样品中的诺米林含量、黄柏酮含量分别为133.7 μg/ml、207.1 μg/ml,干热干燥(加热)为4320分钟时提取样品中的诺米林含量、黄柏酮含量分别为67.5 μg/ml、194.8 μg/ml。

[0083] 从以上结果能确认到:本发明的包含柑橘类种子(香橙种子)提取物的组合物的制造方法,通过包含用60℃以上的温度加热柑橘类种子的加热工序,能制造“黄柏酮的含量/诺米林的含量”的值在0.020以上的组合物,即能制造可切实发挥降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪效果的组合物。

[0084] [实验7:香橙种子以外的柑橘种子中黄柏酮因干热干燥而出现]

(实验样品的调整)

作为柑橘类种子而准备了“柠檬种子”、“葡萄柚种子”。另外,对各种种子实施了冻结干燥或干热干燥(100℃、24小时)。之后,将各种种子粉碎成粒径(直径)大致在1mm以下,在常温下用10倍于粉碎后的香橙种子的100%乙醇对该粉碎后的香橙种子进行10分钟的提取而获得各样品。

应予说明,实验7中的“冻结干燥”方法如下进行:用共和真空技术制造的冻结干燥器RLE-103,使在-30℃下冻结的样品干燥96小时。另外,实验7中的“干热干燥”,意为将各种种子静置于设定至100℃环境温度的干燥炉内达24小时。

[0085] (实验样品的测定方法)

用同于实验6的条件,对按照上述调整方法获得的样品和黄柏酮标准品(ChromaDex公司制造)进行HPLC分析,结果表示在图15、16中。

[0086] 应予说明,图15的(a)、(b)、(c)分别表示被冻结干燥的柠檬种子样品的测定结果、被干热干燥的柠檬种子样品的测定结果、黄柏酮标准品的测定结果。另外,图16的(a)、(b)、(c)分别表示被冻结干燥的葡萄柚种子样品的测定结果、被干热干燥的葡萄柚种子样品的测定结果、黄柏酮标准品的测定结果。

[0087] (实验结果的研讨)

由图15的(a)、图16的(a)的测定结果,均未确认到黄柏酮标准品所示时间内的峰值,即得到几乎不包含黄柏酮的结果。相对于此,由图15的(b)、图16的(b)的测定结果,均能确认到黄柏酮标准品所示时间内的较大峰值,即得到包含黄柏酮的结果。

换言之,可知如下情况:柑橘类种子被冻结干燥时几乎不包含黄柏酮,但通过干热干燥(加热)柑橘类种子则出现该黄柏酮。

[0088] 从以上结果能确认到:本发明的包含柑橘类种子(柠檬种子、葡萄柚种子)提取物的组合物的制造方法,通过包含加热柑橘类种子的加热工序,能制造包含黄柏酮且可切实发挥降低血糖、增加骨骼肌、降低体脂肪效果的组合物。

[0089] 上面出示实施方式和实施例对本发明的包含柑橘类种子提取物的组合物、食品、药品和包含柑橘类种子提取物的组合物制造方法进行了详细说明,但是本发明的主旨并不限于上述内容,也可根据权利要求书的记载进行改变・变更等。

附图标记说明

[0090] S1:加热工序;S2:提取工序。

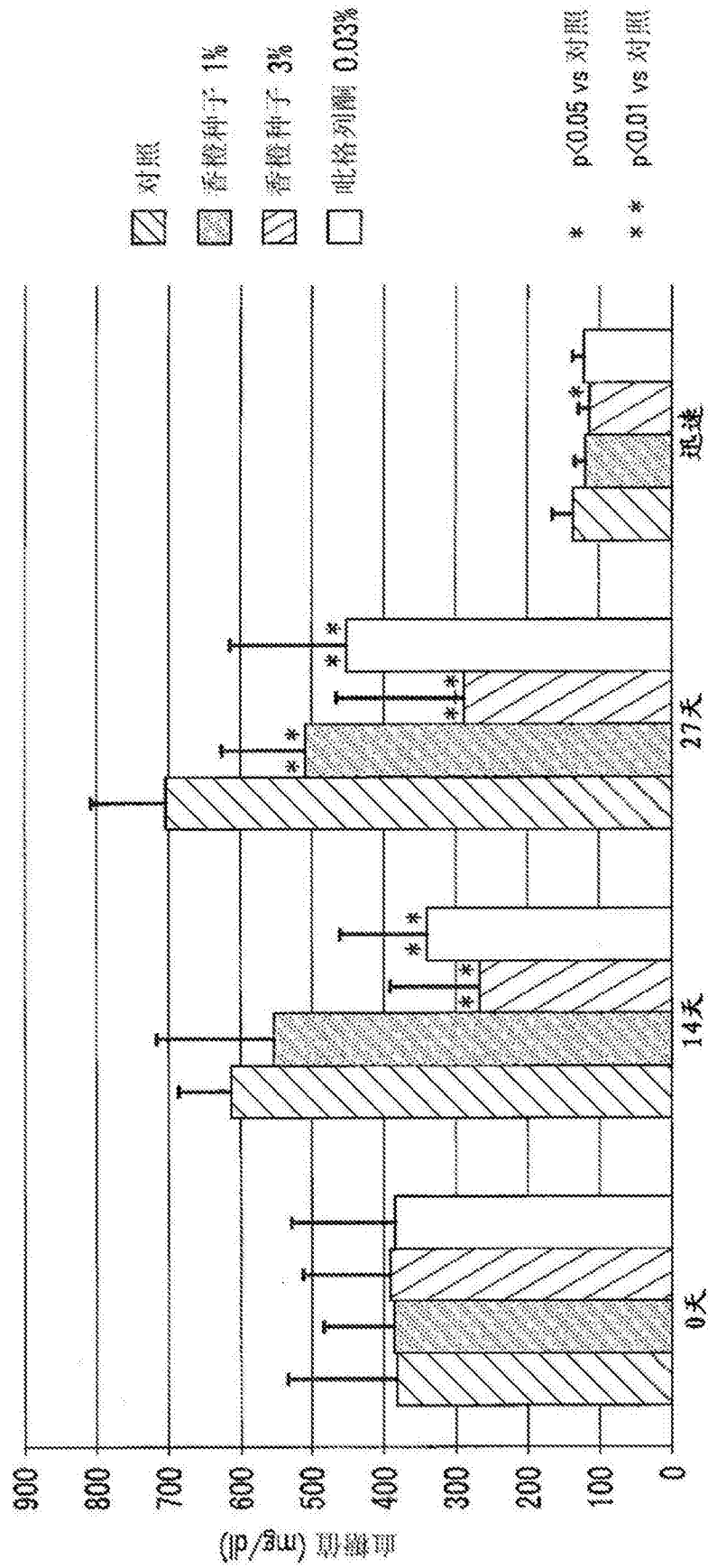


图1

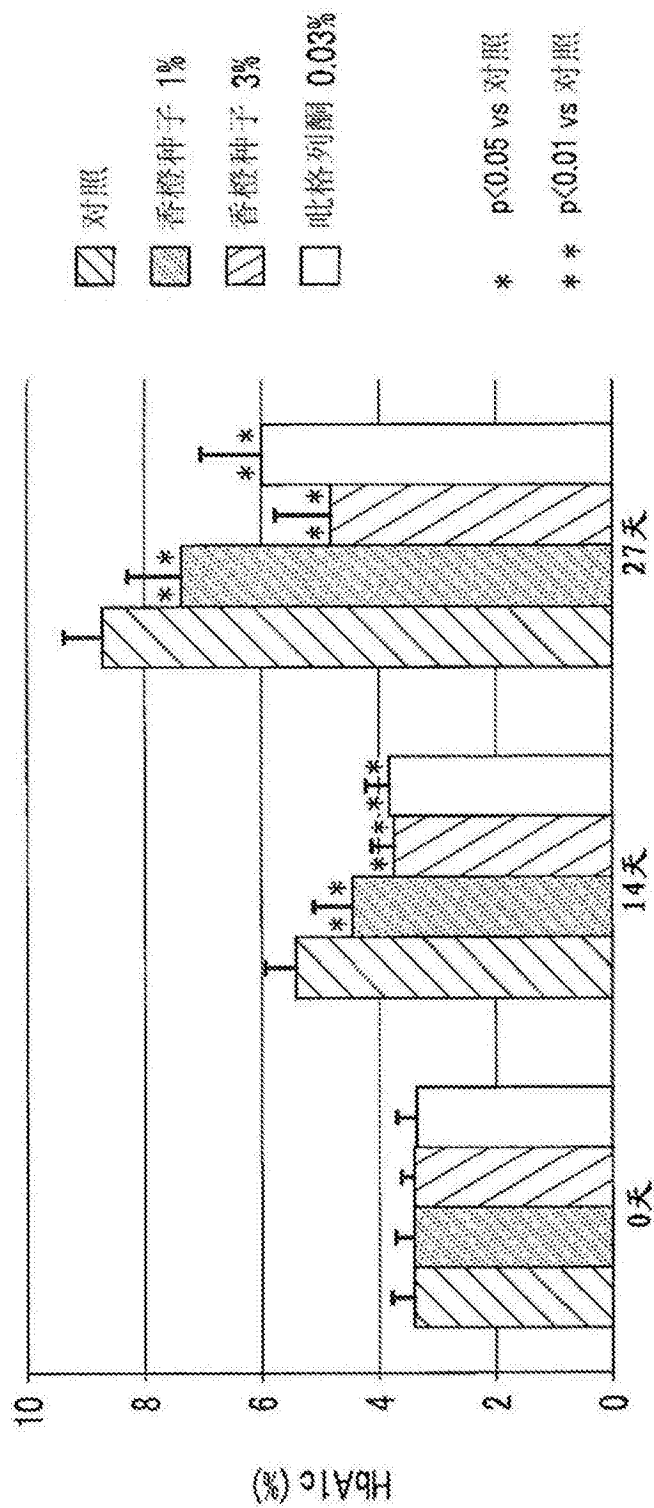


图2

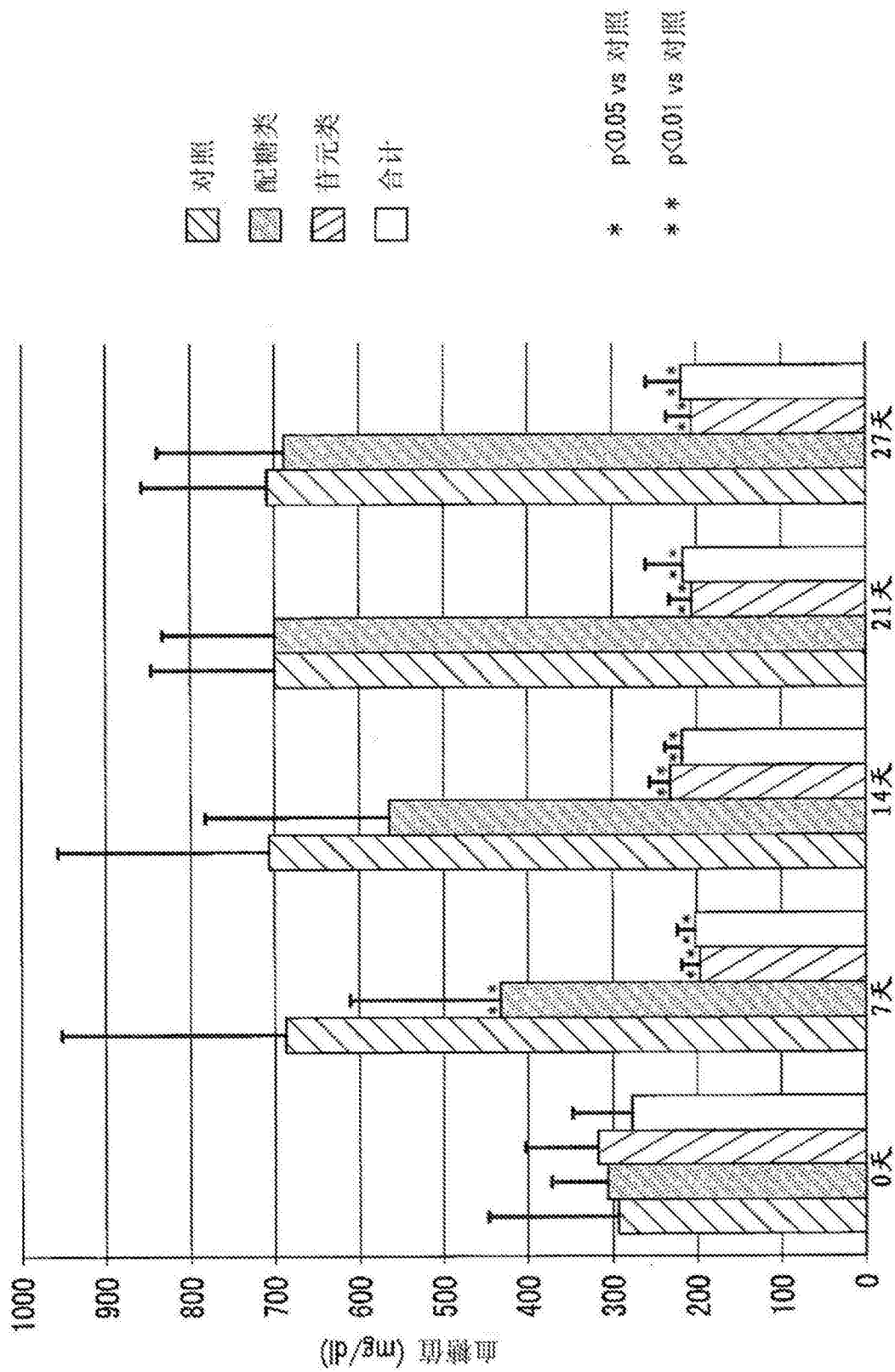


图3

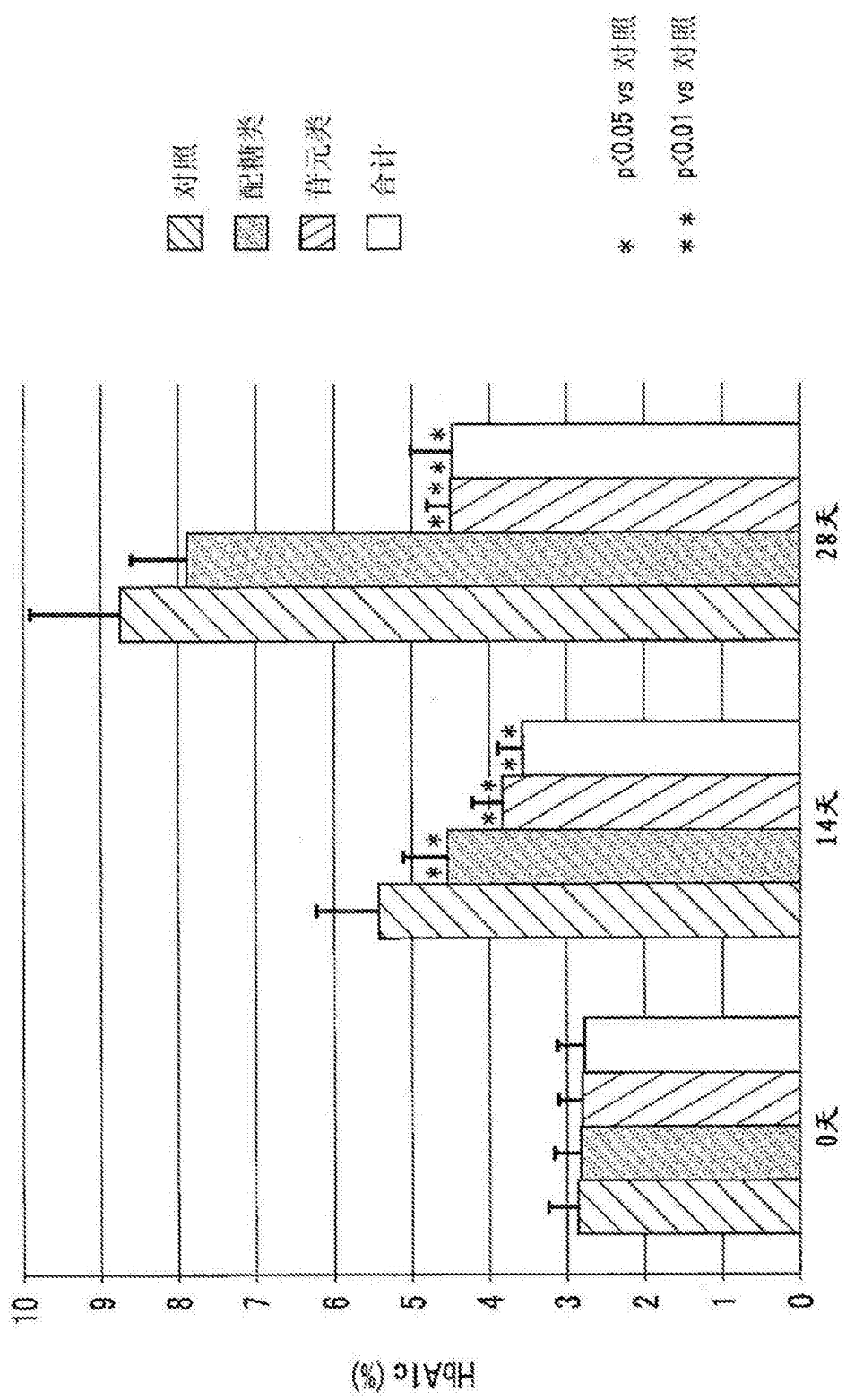


图4

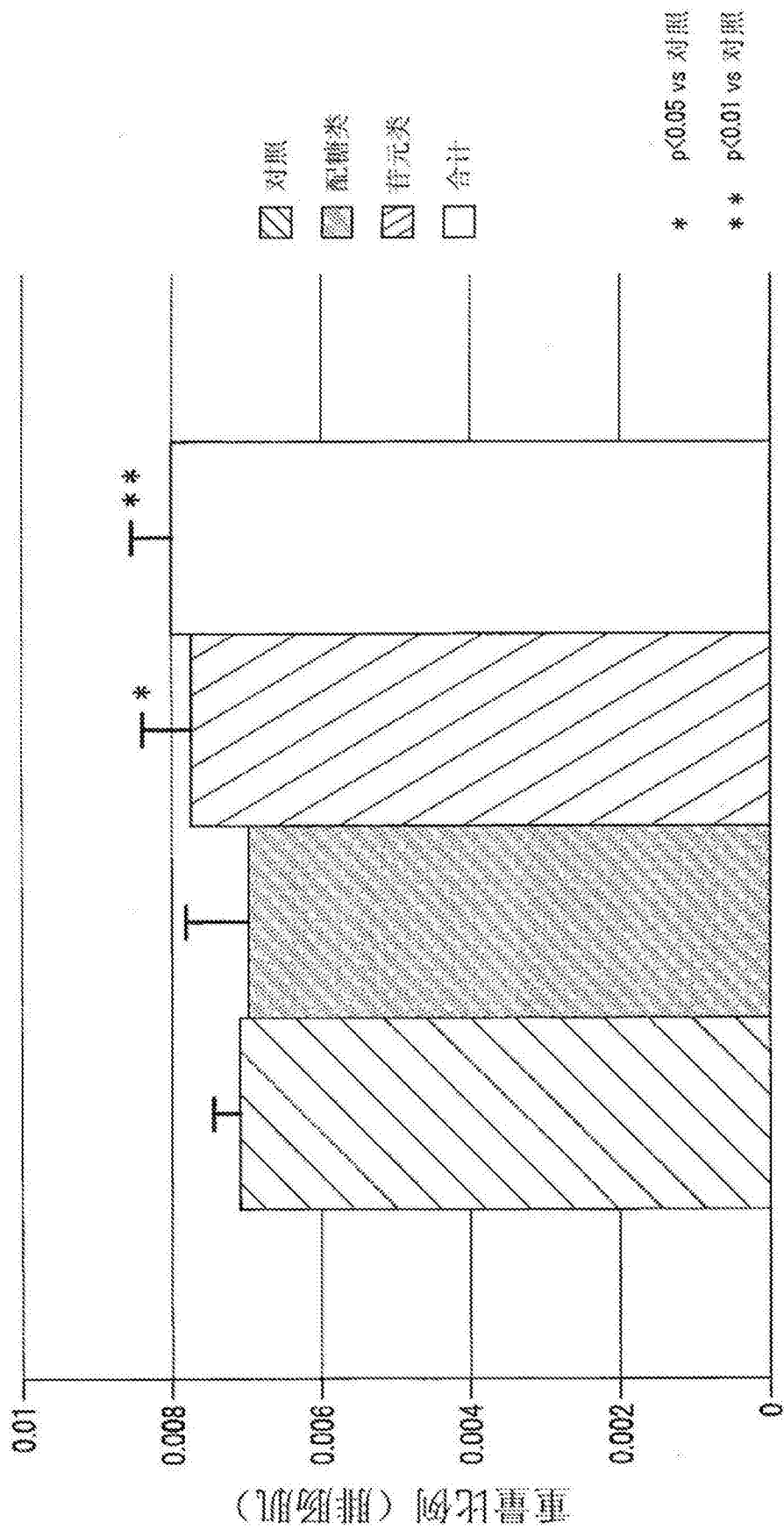


图5

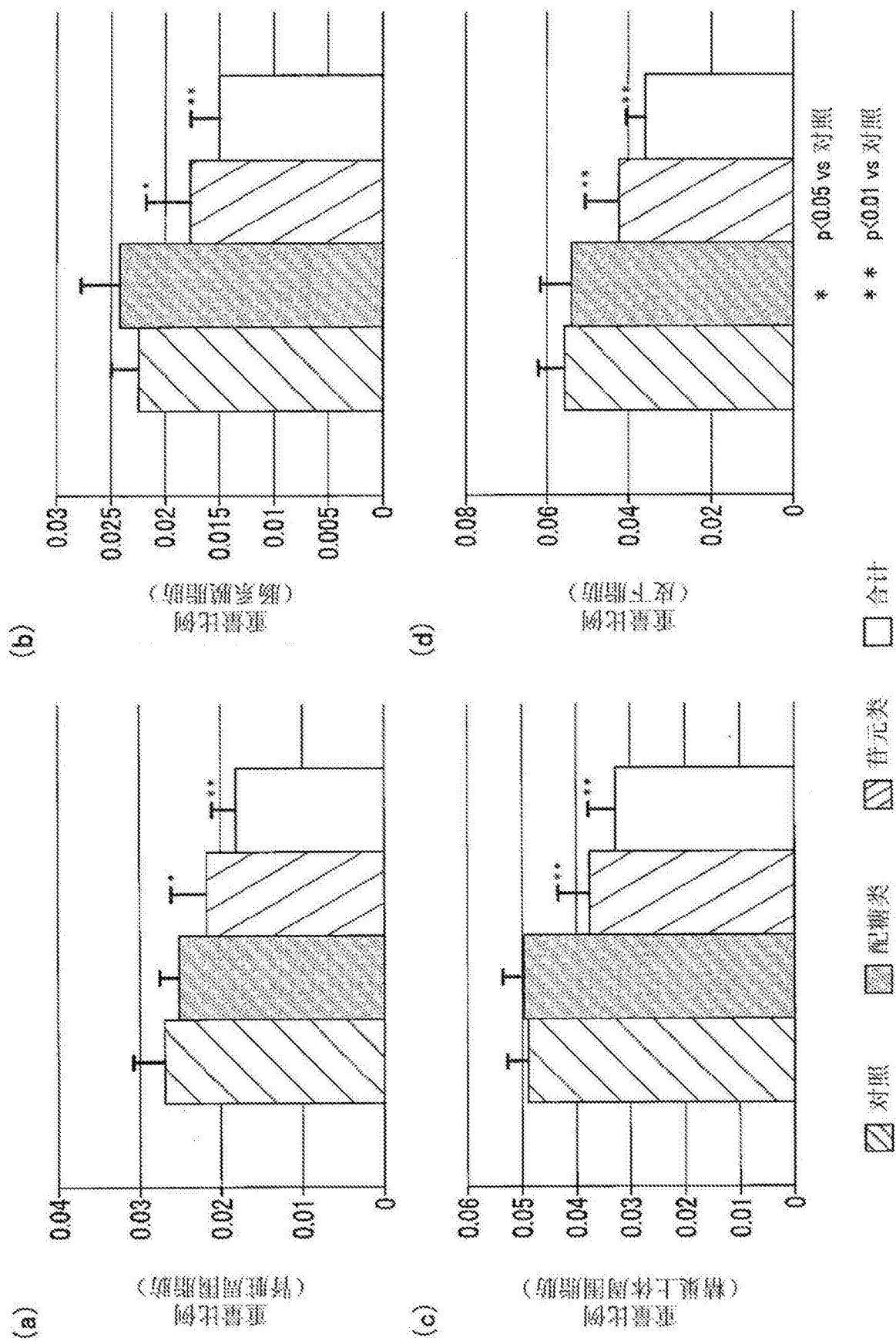


图6

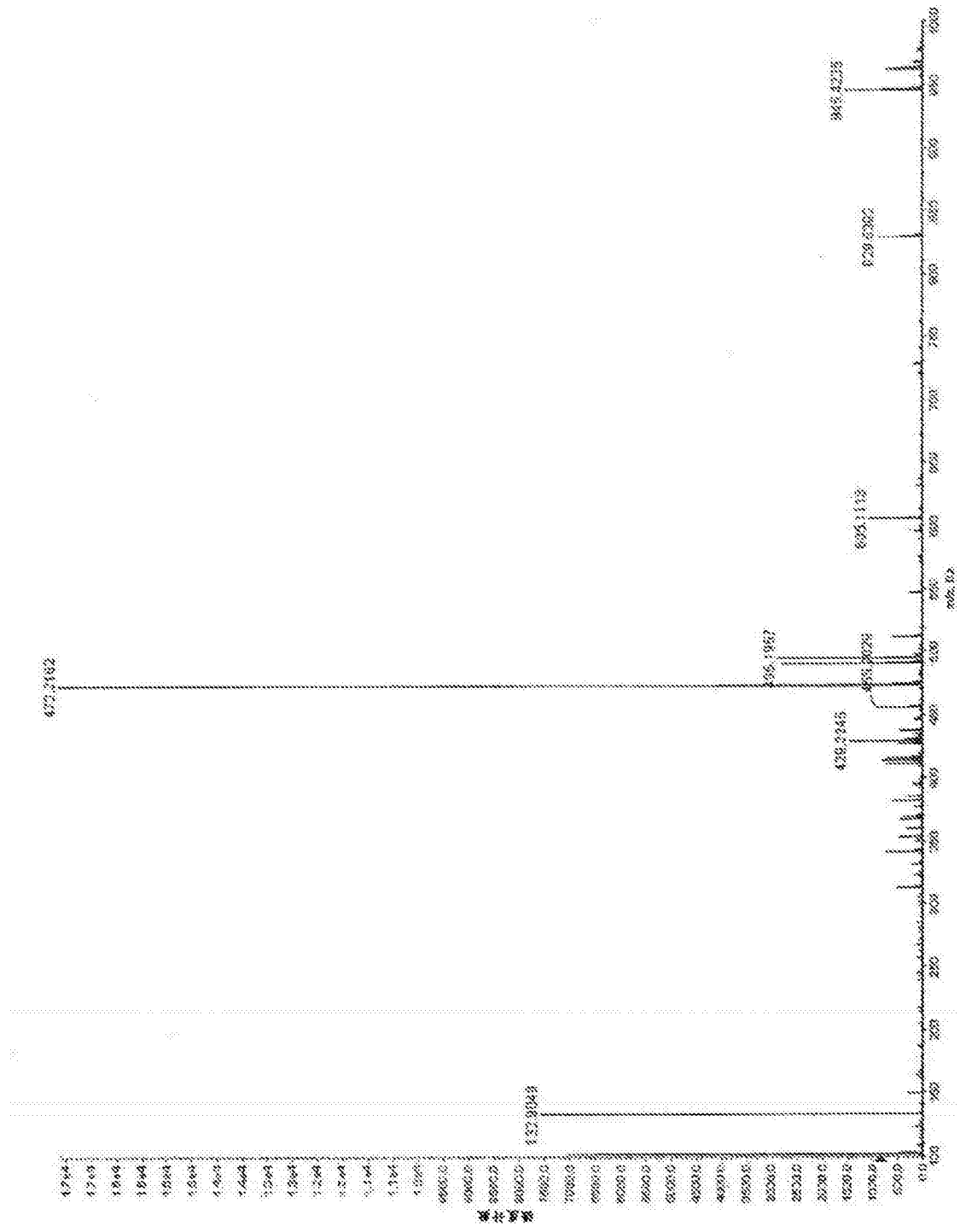


图7

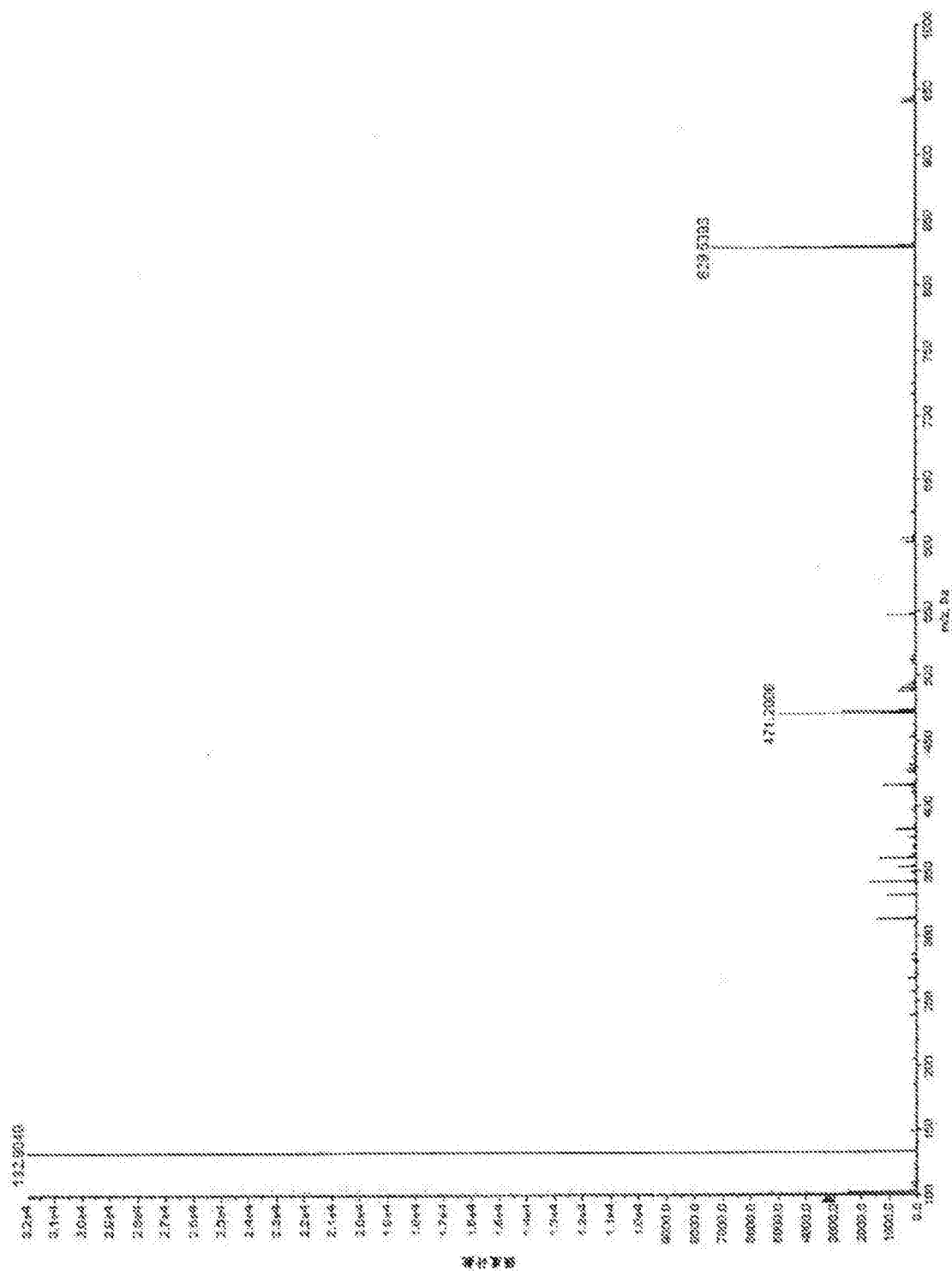


图8

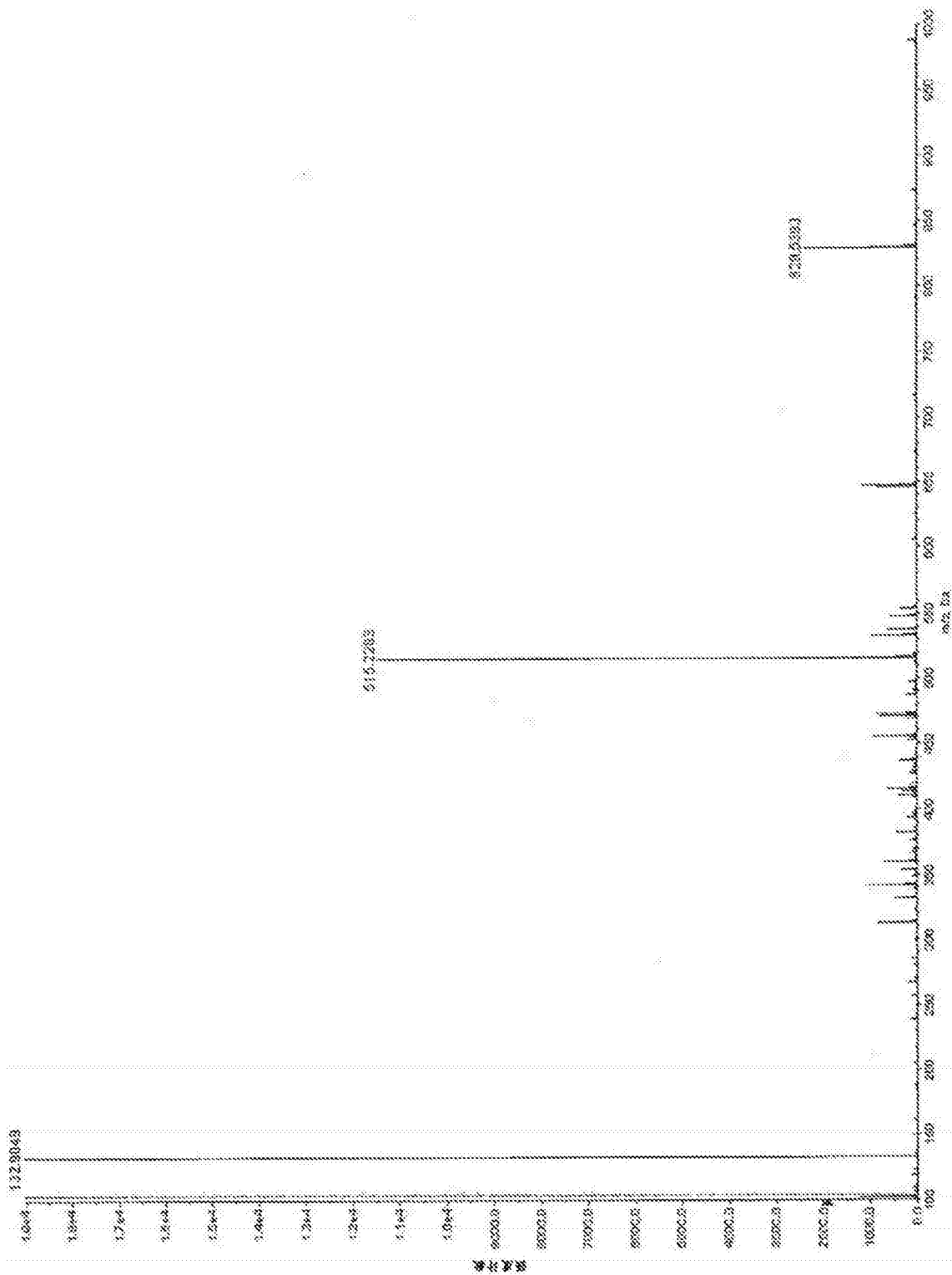


图9

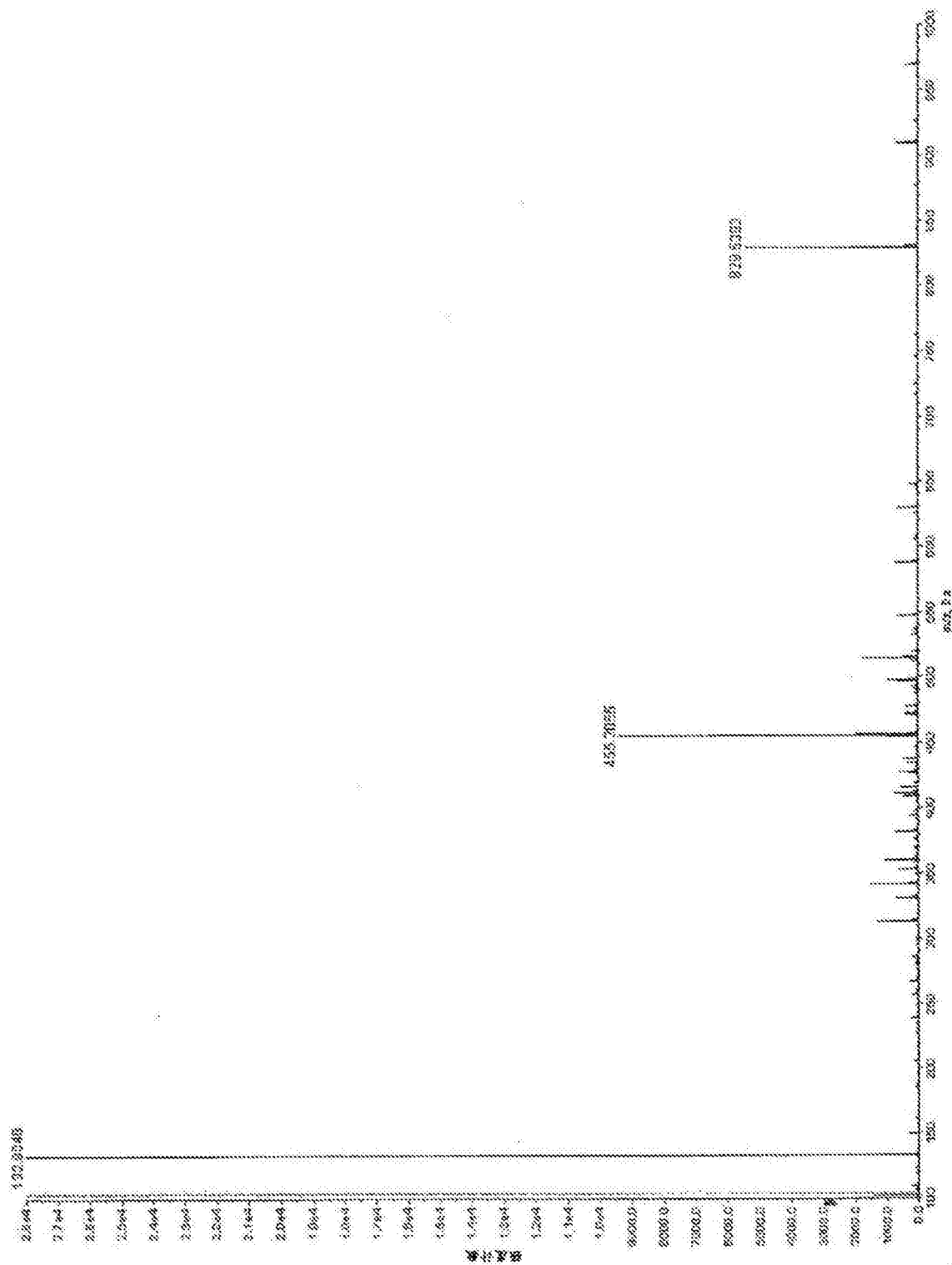


图10

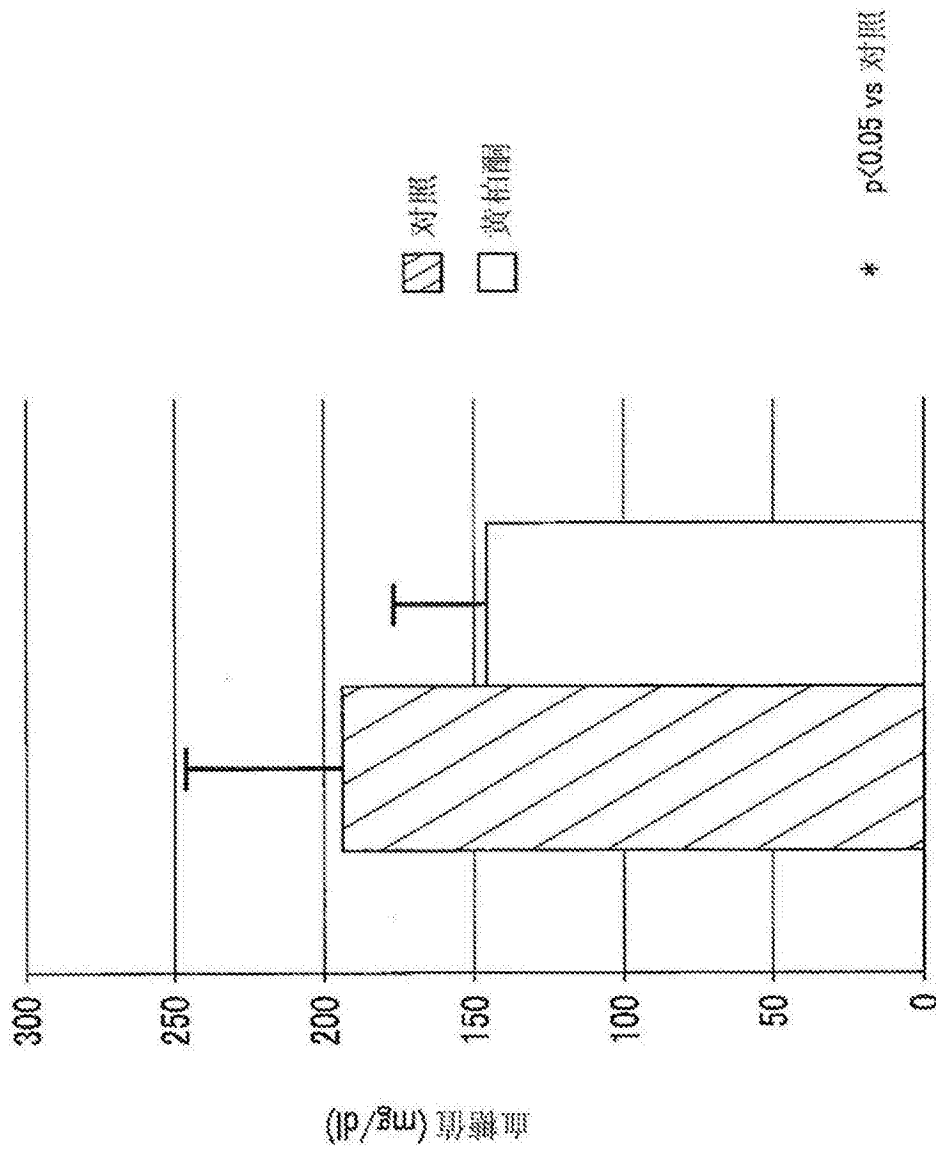


图11

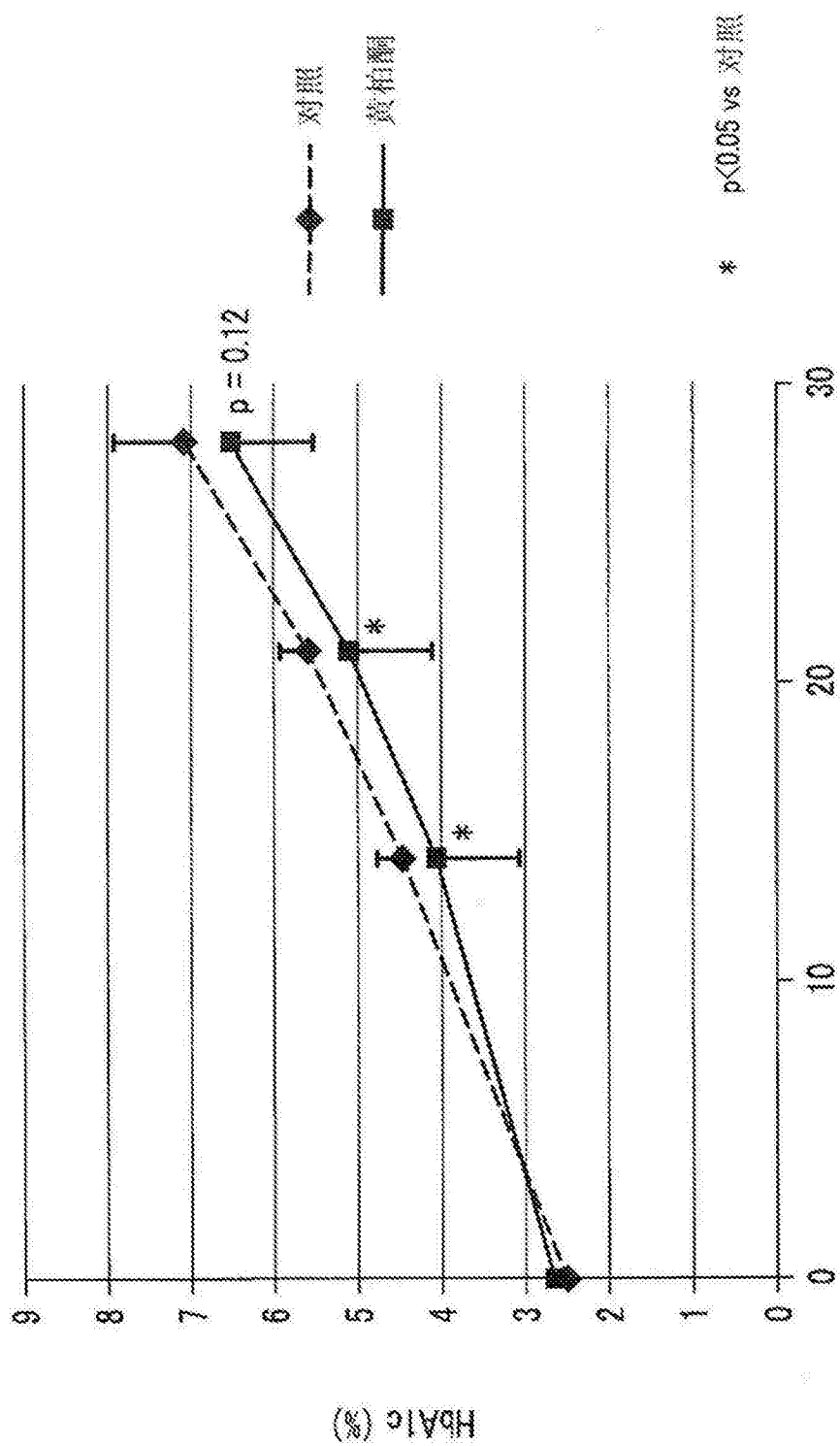


图12

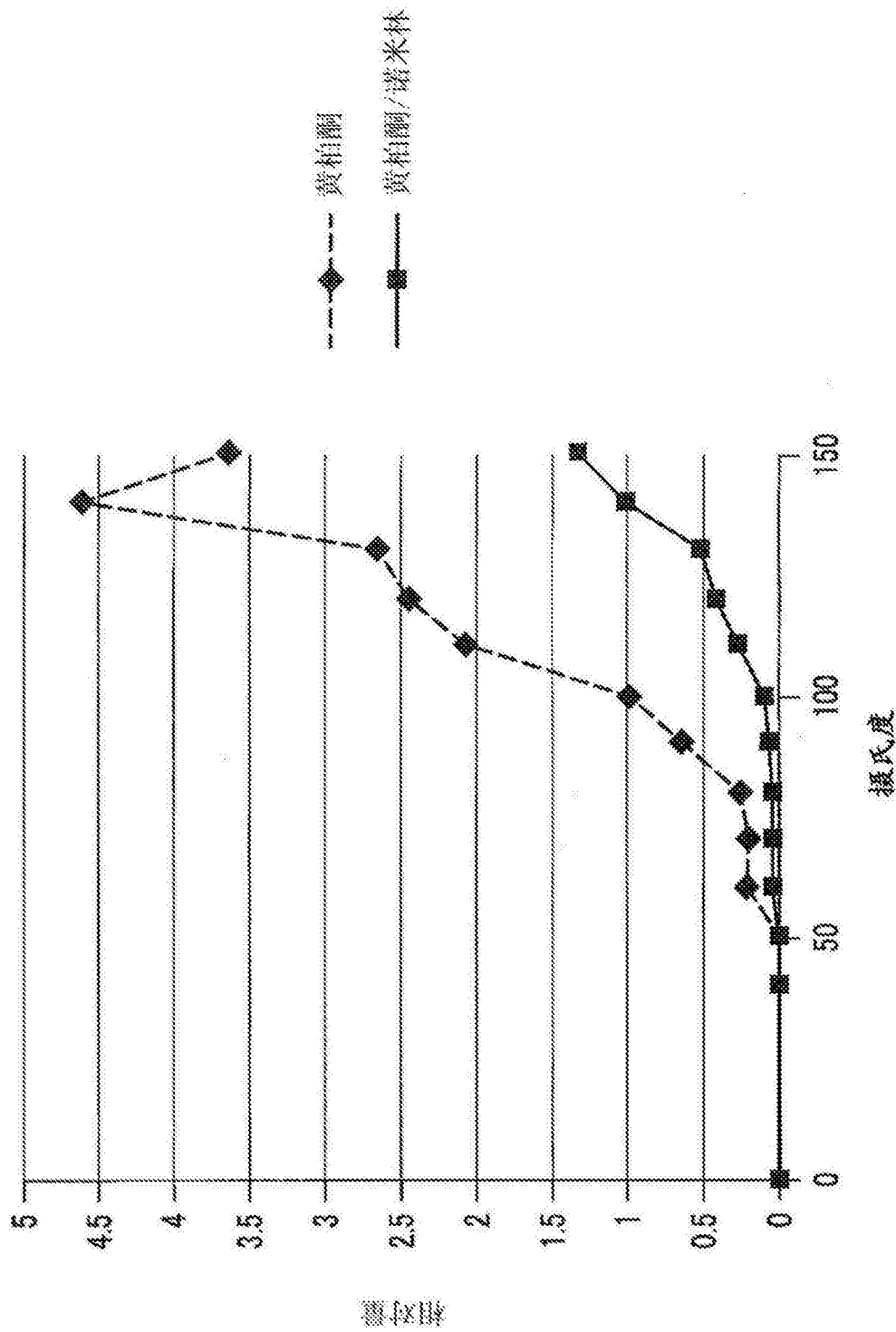


图13

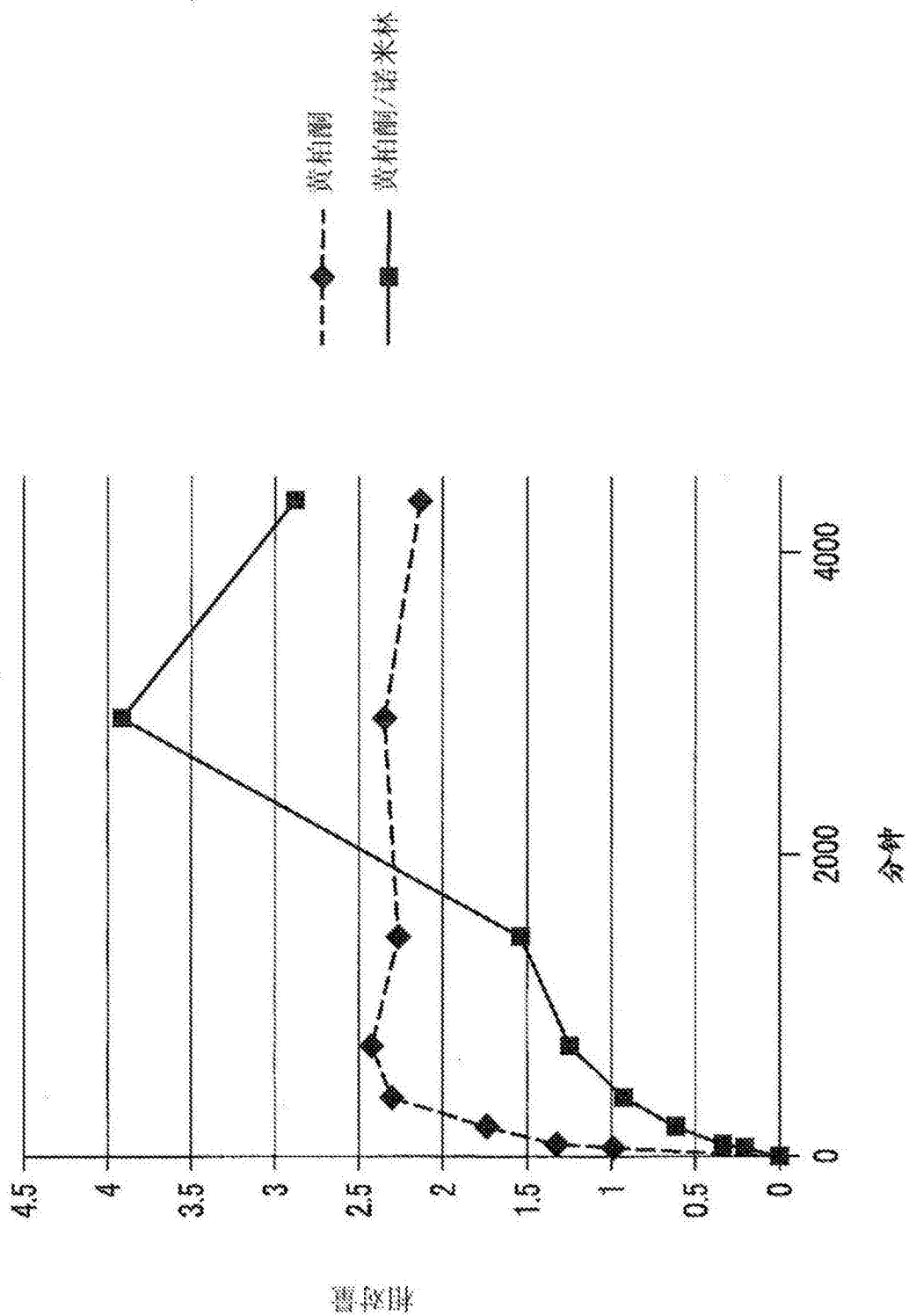


图14

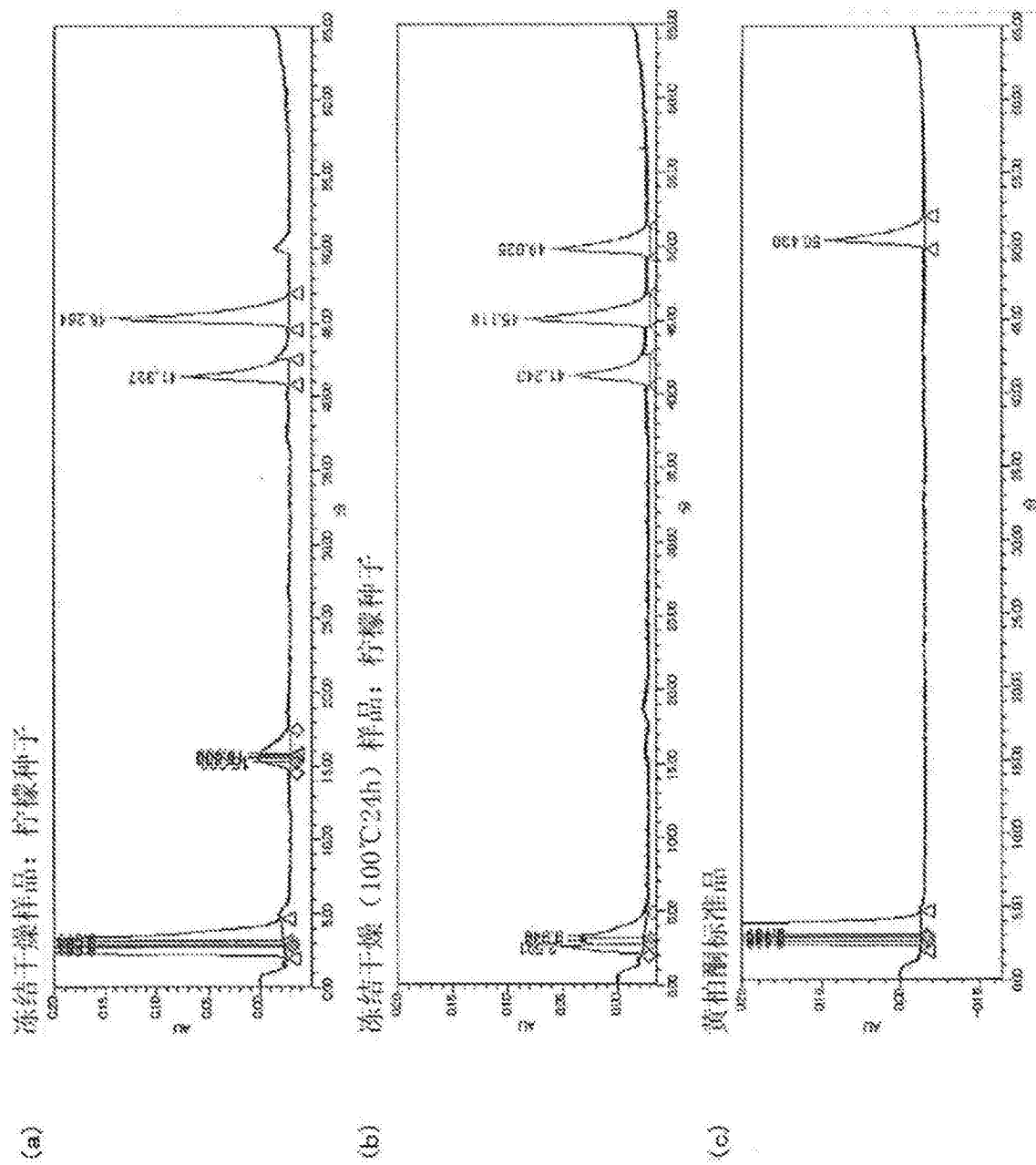


图15

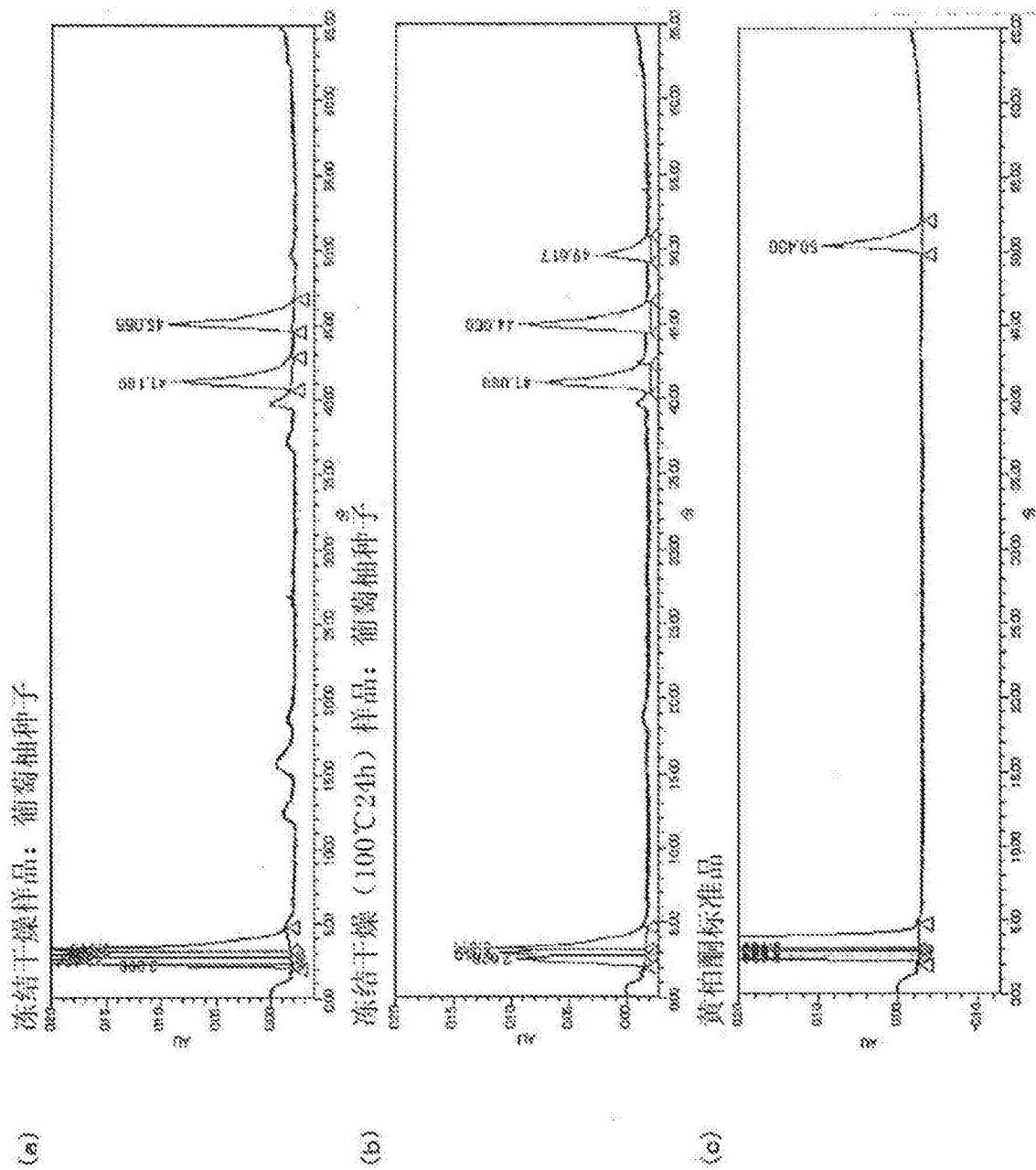


图16

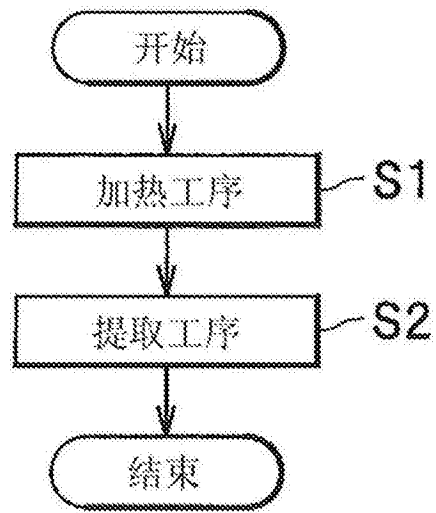


图17