[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03813429.2

[51] Int. Cl.
A61K 36/286 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23L 1/36 (2006.01)
A61K 131/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 100475229C

[22] 申请日 2003.4.11 [21] 申请号 03813429.2

[30] 优先权

[32] 2002. 4.12 [33] JP [31] 110932/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/004607 2003.4.11

[87] 国际公布 WO2003/086437 日 2003.10.23

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.10

[73] 专利权人 味之素株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 小山直人 K·栗林 石井康一 小林克德

[56] 参考文献

Effects of defatted safflower seed eztracts on plasma andliver lipid in ovariectomized female rats fed high cholesteroldiets. Cho, Sung. Hee rt al. FASEB Journal, Vol. 16 No. 5. 2002

审查员 陈龙飞

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭 煜 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 5 页

[54] 发明名称

预防动脉硬化的组合物

[57] 摘要

本发明提供优良的预防动脉硬化的组合物，以及含有该组合物的食品和药物组合物。 它们是可通过有机溶剂萃取，由脱脂后的植物种子得到的组合物、以及含有该组合物的食品和药物组合物。

1. 一种组合物在制备用于抑制低密度脂蛋白的氧化的药物或食品中的应用，其中该组合物通过有机溶剂萃取脱脂后的红花种子得到。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其中，有机溶剂萃取包括用低级醇从脱脂后的红花种子中萃取。

3. 如权利要求 2 所述的应用，其中，有机溶剂萃取包括用低级醇萃取后，用乙酸酯萃取。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的应用，其中，有机溶剂萃取包括用低级醇萃取后，馏去低级醇，加入水，用非极性溶剂洗涤水相。

5. 如权利要求 2 或 3 所述的应用，其中，低级醇为乙醇或甲醇。

6. 如权利要求 2 或 3 所述的应用，其中，乙酸酯为乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙酸丙酯。

7. 如权利要求 4 所述的应用，其中，非极性溶剂为正己烷。

8. 如权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中，所述组合物含有羟色胺衍生物。

9. 如权利要求 1 所述的应用，其中，所述组合物包含在食品中。

10. 一种组合物和医药上可接受的载体在制备用于抑制低密度脂蛋白的氧化的药物中的应用，其中该组合物通过有机溶剂萃取脱脂后的红花种子得到。

预防动脉硬化的组合物

技术领域

本发明涉及可通过有机溶剂萃取，从脱脂后的植物种子中获得的预防动脉硬化的组合物，以及含有该预防动脉硬化的组合物的食品和药物组合物。

背景技术

近年来，随着生活方式的欧化，心绞痛、间歇性跛行、心肌梗塞、脑梗塞等动脉硬化性疾病与癌并列，成为日本人死亡病因的首位。这些疾病一旦发病，非常难治愈，QQL（生活质量）显著降低，因此毋庸讳言，其预防、或对病态发展的控制方案，对于社会来讲是极为重要的。动脉硬化灶形成早期，LDL（低密度脂蛋白）的氧化起了重要的作用，这是几乎一致的结论，因此不仅要将血液中的胆固醇水平控制在适当的范围，还要控制氧化 LDL 的生成，其重要性在最近得到了人们的认识。已知食品、特别是来自植物的食品中含有丰富的抗氧化物质，有人推断绿茶、红葡萄酒中含有的抗氧化物质被摄取到 LDL 中（或其附近），通过消除自由基，应可以防止氧化 LDL 的生成（Fuhrman 等人、Am. J. Clin. Nutr.，61:549-54 页，1995）。也有了关于主动摄取这些食品来抑制癌症、心脏病的流行病学研究（Renaud 等人、Lancet，339:1523-26 页，1992）。

其中，有报告指出：芝麻种子中的木酚素、葡萄种子中的多酚等来自特定种子的特定成分对实验动物显示抗动脉硬化作用（Kang 等人、J. Nutr.，129:1885-90 页，1999）（Yamakoshi 等人、Atherosclerosis 142:139-49 页，1999）。但是，像这样已明确植物种子成分在动物实验水平具有抗动脉硬化性的例子还为数不多，目前的现状是很多研究还停留于试管水平。例如日本特开平 8-337536 号公报中公开了焙烤植物种子，然后发酵，由其中萃取的抗活性氧作用剂。该技术虽然是利用植物种子作为原料，但需要背靠、发酵处理等操作，因此通用性低，并不是实用的方法。另外，也未明确表示抑制动脉硬化的效果。另外，Zhang 等人（Chem. Pharm. Bull.，45:1910-14 页，

1997）给出了通过各种溶剂的分配操作，由红花油的油粕中萃取的化合物组，并指出其中有具有体外抗氧化活性的物质。但是，目前并不明确这些具有抗氧化活性的化合物是否对于预防动脉硬化有效。考虑到目前已知体外的抗氧化活性未必与生物体内的抗动脉硬化活性有关（Fruebis 等人、J. Lipid Res., 38:2455-64 页，1997; Fruebis 等人、Atherosclerosis 117:217-24 页，1995; Mundy 等人、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 18:114-19 页，1998; Wagberg 等人、J. Pharmacol. Exp. Ther.，299:76-82 页，2001），则至少需要在实验动物水平验证植物种子中的抗氧化物质是否具有抗动脉硬化性。

发明说明

本发明的目的在于提供对预防生活方式病之一的动脉硬化有效的组合物、以及含有该组合物的食品和药物组合物。

本发明人为了实现上述目的，进行了深入地研究，结果发现通过有机溶剂萃取，从脱脂后的植物种子中萃取的组合物不仅具有体外抗氧化作用，在实验动物中有动脉硬化预防作用，从而根据该认识完成了本发明。

本发明提供以下内容。即，

（1）预防动脉硬化组合物，该组合物可通过有机溶剂萃取，从脱脂后的植物种子中得到。

（2）上述（1）的组合物，其中植物种子为红花或油菜的种子。

（3）上述（1）或（2）的组合物，其中有机溶剂萃取包括用低级醇从脱脂后的植物种子中萃取。

（4）上述（3）的组合物，其中有机溶剂萃取包括用低级醇萃取后，用乙酸酯萃取。

（5）上述（3）或（4）的组合物，其中有机溶剂萃取包括用低级醇萃取后，馏去低级醇，加入水，用非极性溶剂洗涤水相。

（6）上述（3）-（5）中任一项的组合物，其中低级醇为乙醇或甲醇。

（7）上述（4）-（6）中任一项的组合物，其中乙酸酯为乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙酸丙酯。

（8）上述（5）-（7）中任一项的组合物，其中非极性溶剂为正

己烷。

（9）食品，该食品含有上述（1）-（8）中任一项的预防动脉硬化的组合物。

（10）药物组合物，该组合物含有上述（1）-（8）中任一项的预防动脉硬化的组合物。

附图说明

图 1 是表示实施例 1 中，各试样影响 LDL 的被氧化性的效果图。

图 2 是表示实施例 2 中，红花粕萃取的组合物、油菜粕萃取的组合物具有抑制 apoE（-/-）小鼠[动脉硬化模型小鼠]（给予第 5 周、14 周龄）主动脉的动脉硬化的效果的照片，（a）表示对照组，（b）表示红花组，（c）表示油菜组。

图 3 是图 2 的概略图。（a-1）是图 2（a）的概略图，（b-1）是图 2（b）的概略图，（c-1）是图 2（c）的概略图。图 2 原本是彩色照片，染成红色的部分是粥样斑。为了明确图 2 染成红色的部分，将图 2 的照片制成图，图 3 是将染成红色的部分涂成黑色表示的概略图。

图 4 是表示添加 V70 而诱导出的 LDL 氧化曲线（过氧化脂质生成曲线）的图。

图 5 是表示实施例 3 中，给予各试样第 15 周时 apoE 基因敲除小鼠（21 周龄、雄性）的主动脉起始部分病变面积的图。图中，SFM 表示红花粕萃取的组合物，CS 表示对香豆酰 5-羟色胺（p-coumaroylserotonin），FS 表示阿魏酰 5-羟色胺（feruloylserotonin）。

发明内容

本发明中使用的植物种子可以是任何植物的种子，例如有红花、油菜、大豆等种子，优选红花或油菜的种子。本发明中，植物种子可以是构成植物种子的全部或其部分，例如可以使用取出种皮、胚乳、胚芽等的种子，也可以是它们的混合物。

本发明中，使用脱脂后的植物种子，即脱脂物（粕）作为原料。植物种子的脱脂物可以通过公知的方法将植物种子脱脂而得到，例如可将种子压榨萃取，或向种子的破碎物中加入正己烷等进行萃

取，然后由萃取体系中取出固体部分，将该固体部分干燥得到。脱脂程度通常为6成或以上，优选8成或以上。

下面对本说明书中所使用的“有机溶剂萃取”进行说明。本发明中使用的有机溶剂萃取中，作为第1阶段——从脱脂后的种子中进行萃取的阶段中所使用的溶剂，例如有低级醇（也包括含水低级醇）、丙酮（也包括含水丙酮）、乙腈（也包括含水乙腈）以及它们的混合溶剂等，但并不限于这些。优选低级醇。低级醇例如有碳原子数1-4的醇，具体的例子有甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇等，但并不限于这些。低级醇优选乙醇或甲醇（包括含水乙醇或含水甲醇）。用这些溶剂萃取出的组合物，以该纯度即可作为本发明的组合物使用，但也可以进一步提高纯度（可以纯化）。

进一步提高纯度（纯化）的一个例子如下所述，但并不限于此。馏去上述第1阶段的溶剂萃取物中的有机溶剂（特别是减压馏去），向得到的萃取物中加入水，使其悬浮，将该悬浮液（水相）用非极性溶剂例如正己烷、正庚烷、正辛烷等、优选正己烷洗涤，将洗涤后的水层用可分成两层并可萃取目标组合物的溶剂、例如乙酸酯、正丁醇等，优选乙酸酯，特别优选乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙酸丙酯萃取。接着，将萃取液用饱和食盐水等洗涤，得到有机层。用乙酸酯萃取时，将该有机层用例如无水硫酸镁等进行脱水，接着减压浓缩，得到固形物（组合物）。在以上的任一阶段均可停止纯化，可以省略任一步骤，也可以加一些改变，还可以更进一步纯化。也可以改变上述溶液的种类等来使用多级萃取法、逆流分配法等。

由上述方法得到的本发明的组合物作为食品、药物（动脉硬化预防剂等）使用时，当组合物存在于对生理有害的溶剂中时，可使用干燥物、或使该干燥物溶解、混悬或乳化于生理上可接受的溶剂中形成的物质。组合物的形式包括水性溶液等液体、减压浓缩并干燥固化的固体、冻干品等固形物。

本发明的预防动脉硬化的组合物可在体外抑制人血浆中的LDL（低密度脂蛋白）的氧化。特别是由红花和油菜的种子得到的组合物尤其强烈抑制LDL的氧化。特别值得一提的是：本发明的该组合物在体内抑制形成于小鼠血管内壁上的粥样斑（动脉粥样斑）的形成，在实验动物中显示抗动脉硬化作用。以上表明，本发明的该组

合物作为动脉硬化预防剂等药物、预防动脉硬化的食品有效。

本发明的组合物预防动脉硬化的结果是:对于预防起因于动脉硬化的疾病例如心绞痛、心肌梗塞、间歇性跛行、脑梗塞等有效。

本发明的“食品”是指全部食品，除包括所谓的保健食品在内的常规食品外，还包含日本厚生劳动省保健机能食品制度中规定的特定保健食品、营养机能食品，进一步包含营养品。

可以使用本发明的上述组合物本身作为食品或药物组合物.还可以使本发明的上述组合物含在各种食品例如调味汁、蛋黄酱等常规食品（包括所谓的保健食品）中。还可以将本发明的组合物与赋形剂（例如乳糖、蔗糖、淀粉等）、在不同情况下与香料、色素等一起，制成片剂、丸剂、颗粒、细粒、粉末、球剂、胶囊、溶液剂、乳液、混悬剂、糖浆剂和糖锭等制剂，作为特定保健用食品、营养机能食品等保健机能食品、营养品、药物制剂（药物组合物）（主要经口服用）使用。

特别是作为药物组合物使用时，可与医药上可接受的载体(也包括添加剂）一起制成制剂。如本领域人员公知的，医药上可接受的载体例如有赋形剂（例如乳糖、蔗糖、淀粉、D-甘露糖醇等）、粘合剂（例如纤维素、蔗糖、糊精、羟丙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等）、崩解剂（例如淀粉、羧甲基纤维素等）、润滑剂（例如硬脂酸镁等）、表面活性剂（例如月桂基硫酸钠等）、溶剂（例如水、食盐水、大豆油等）、防腐剂（例如对羟基苯甲酸酯等）等，但并不限于这些。

本发明的预防动脉硬化的组合物的摄取量或给予量根据组合物的纯度、服用对象的年龄、体重、健康状态等而不同，作为预防动脉硬化用，通常为成人每天 10 mg-10 g，优选一天一次或分数次摄取或服用 100 mg-10 g。

本发明的组合物使用传统的食用等的植物种子,特别是使用食用油原料红花和油菜，因此毒性极低，几乎未见副作用。

实施例

以下例举实施例更具体地说明本发明,但本发明并不受这些实施例的限定。

实施例 1（体外抗氧化性数据）

向 100 g 榨油后的红花粕中加入 500 ml 90%容量的乙醇水，在 60℃的热水浴中加热搅拌 3 小时，然后过滤。对过滤后的固形部分进行 1 次同样的操作，合并得到的滤液，减压浓缩，得到 60 ml 浓缩液。向浓缩液中加入水，定量为 200 ml，使内容物悬浮，然后用 120 ml 的正己烷洗涤 2 次，用 100 ml 乙酸乙酯萃取洗涤后的水层，共萃取 2 次。用饱和食盐水洗涤乙酸乙酯萃取液，然后用无水硫酸镁对乙酸乙酯层进行脱水，过滤后减压浓缩，得到 1.16 g 固形物。同时对榨油后的油菜粕、大豆粕、大豆胚芽粕、大豆种皮也分别进行同样的处理，向 1/10 量的萃取物中加入 1 ml DMSO，溶解，以此作为试样。

将由人志愿受试者取得的血浆（用 KBr 调节至密度=1.21（g/ml））进行非连续密度梯度离心（417,000 xg，40 分钟，4℃）（OptimaTLX; Beckman Coulter），用注射器采集 LDL 的条带。测定 LDL 组分的蛋白质含量（BCA 蛋白质测定试剂盒; Pierce），用磷酸缓冲液（PBS）稀释，使终浓度为 100 μg/ml 蛋白质，向其中加入 1/100 量的上述试样，然后添加自由基引发剂（V70; 2,2'-偶氮二（4-甲氧基-2,4-二甲基戊腈）），使终浓度为 1 mM，立即对由过氧化脂质中的共轭二烯结构产生的 234 nm 的吸收监测 5 小时（DU640; Beckman Coulter）。按照近藤等人（J. Nutr. Sci. Vitaminol., 43:435-44 页，1997）的方法，由所得过氧化脂质生成曲线计算滞后时间（log time），以空白（对照）组（只加入溶剂）的值为 100，得出各试样的相对值，由此评价各试样对 LDL 被氧化性的影响（图 1）。可见每种试样对 LDL 被氧化性都有或多或少的抑制（即滞后时间延长）的倾向，其中油菜粕和红花粕尤其强烈地抑制 LDL 的氧化。

上述试验中，在与稀释的人 LDL 混合之前的阶段，各试样的稀释倍率为油菜粕、红花粕稀释 200 倍，其他稀释 50 倍。这些粕的萃取物为液体状态，因此换算成萃取前的粕，则油菜和红花粕的萃取物（稀释 200 倍）分别换算成油菜粕和红花粕为 0.05 g/ml，大豆粕、大豆种皮、大豆胚芽粕（稀释 50 倍）分别换算成大豆粕、大豆种皮、大豆胚芽粕换算为 0.2 g/ml。即，油菜粕和红花粕的萃取物以更低的

浓度显示强烈的抗氧化活性。

实施例 2（体内的动脉硬化预防效果）

油菜粕和红花粕的萃取物的制备如下进行。

向 600 g 榨油后的油菜粕中加入 3000 ml 90%容量的乙醇水，在 60℃的热水浴中加热搅拌 3 小时，然后过滤。对过滤后的固形部分进行 1 次同样的操作，合并得到的滤液，减压浓缩，得到 500 ml 浓缩液。向浓缩液中加入水，定量为 1000 ml，使内容物悬浮，然后用 500 ml 的正己烷洗涤 2 次，用 500 ml 乙酸乙酯萃取洗涤后的水层，共萃取 2 次。用无水硫酸镁对乙酸乙酯层进行脱水，过滤后减压浓缩，得到 12.5 g 固体物质。

对 600 g 榨油后的红花粕进行于上述同样的操作，得到 10.1 g 萃取物。

将 9 周龄的雄性 apoE 基因敲除小鼠（apoE(-/-)；购自 Jackson Laboratory）分成对照/油菜（油菜粕萃取物给予组）/红花（红花粕萃取物给予组）3 组，每组 9 只，使每组分别自由摄取表 1 所示组成的饵料 5 周。第 2 周（n=6）和第 5 周（n=3）处死小鼠，摘出由主动脉根部至股动脉分支部位的主动脉，将血管内壁部分形成的经苏丹 IV 染色的粥样斑（动脉粥样斑）的面积与对照组进行比较。与对照相比，给予 2 周的油菜组、红花组中，显示了动脉粥样斑的形成得到抑制的倾向。之后延长给予 3 周，在各组之间进行比较，上述倾向更加强烈（动脉粥样斑面积：红花<油菜<对照），显示这些油料植物粕的萃取物具有抑制动脉硬化早期病变的形成的效果（图 2 和图 3）。

上述试验中，由处死的小鼠的腹腔主静脉采血。用 fractionator（DGF-U；日立）通过非连续密度梯度离心（417,000 xg，1 小时，4℃）（OptimaTLX；Beckman Coulter），由按照常规方法分离的血浆（用 KBr 调节至密度为 1.30（g/ml））中分离出脂蛋白组分。测定通过电泳（Multigel-lipo；第一化学）确认的各组的 VLDL（超低密度脂蛋白）-LDL（低密度脂蛋白）组分的蛋白质含量（BCA 蛋白质测定试剂盒；Pierce），用磷酸盐缓冲液（PBS）稀释，使终浓度为 50 μg 蛋白质/ml，然后添加自由基引发剂（V70；2,2'-偶氮二（4-甲氧基-2,4-二甲基戊腈）），使终浓度为 250 μM，立即在 37℃对由

过氧化脂质中的共轭二烯结构产生的 234 nm 的吸收进行测定（DU-640; Beckman Coulter）。分别制出给予组、对照组的过氧化脂质生成曲线，对生成速度和生成量进行比较（图 4）。结果表明，油菜和红花给予组的脂蛋白组分与对照组相比，最终过氧化脂质的蓄积减少（即难以氧化）（红花<油菜<对照）。

[表 1]

组	饲料组成
对照	普通饵料（20%（w/w）未添加维生素的酪蛋白、66.3%淀粉、5%玉米油、3.5% AIN-93-矿物质混合物、1% AIN-93-维生素混合物、0.2%氯化胆碱、4%纤维素粉末）
油菜	普通饵料+1.3%（w/w）油菜粕的萃取物* *用淀粉平衡
红花	普通饵料+1.0%（w/w）红花粕的萃取物* *用淀粉平衡

实施例 3

将 6-7 周龄的雄性 apoE 基因敲除小鼠（购自 Jackson Laboratory）分成对照/0.2 重量%5-羟色胺衍生物给予组（对香豆酰 5-羟色胺（CS）、阿魏酰 5-羟色胺（FS）各 0.1%）（CS+FS、0.2%）/0.4 重量%5-羟色胺衍生物给予组（对香豆酰 5-羟色胺（CS）、阿魏酰 5-羟色胺（FS）各 0.2%）（CS+FS、0.4%）/0.4 重量%阿魏酰 5-羟色胺（FS、0.4%）/1 重量%红花粕的萃取物（SFM）给予组（SFM、1%）共 5 组，每组 7-10 只，使每组分别自由摄取表 2 所示组成的饵料 15 周。本实施例中使用的红花粕的萃取物（SFM）按照实施例 2 所示的方法制备。给予期结束后，处死小鼠，制备主动脉根部的切片，用油红 0 对脂质沉积部位（动脉硬化病变）染色。每个个体制备 3 枚切片，对其中主动脉瓣最清晰的标本进行图像分析（用 WinROOF（三谷商事）），根据 Rajendra 等人的方法（J. Lipid Res., 36:2320-2328 页，1995）测定病变面积。对于所得病变面积进行各组间的方差分析，判明有显著差异时，通过 Scheffe 检验对组间的平均值进行比较。证实已知具有体外抗氧化活性、抗炎性的红花粕中主要的酚性物质 5-羟色胺衍生物（Zhang 等人、Chem. Pharm. Bull., 44:874-876 页，1996; Kawashima 等人、j. Interferon Cytokine Res., 18:423-428 页，1998）部分地抑制了 apaE 基因敲除小鼠的病变形成，

但红花粕的萃取物（SFM、含有 10-30 重量%5-羟色胺衍生物）却可比其更强烈地抑制（图 5）。

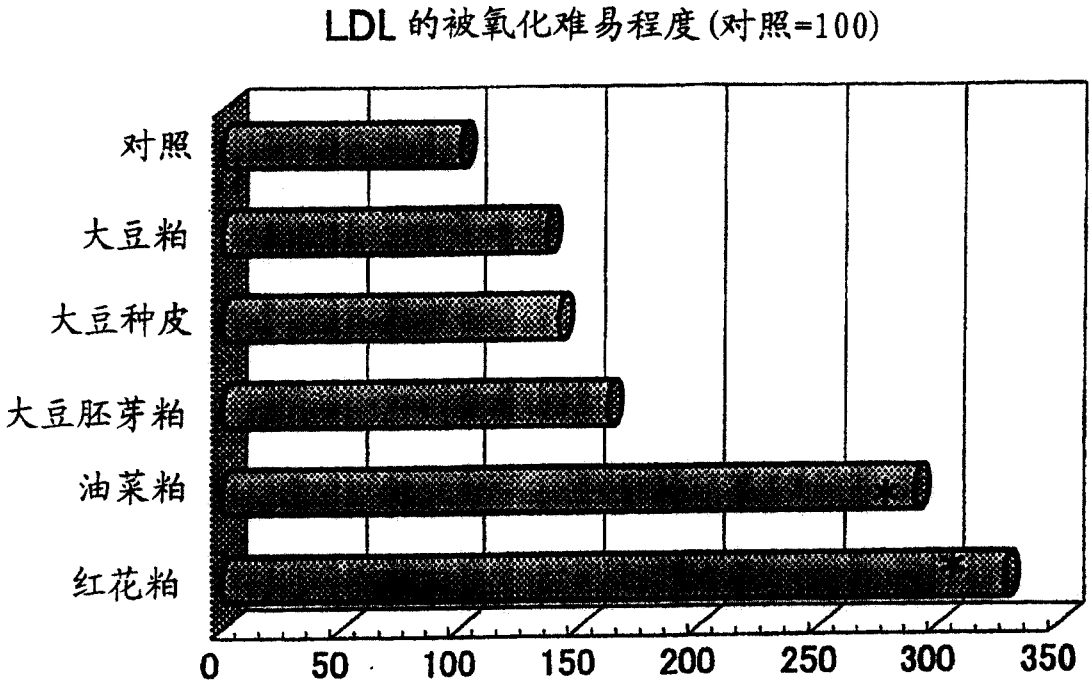
[表 2]

	g（1 kg 饲料中）				
组成	对照	CS+FS, 0.2%	CS+FS, 0.4%	SFM, 1%	FS, 0.4%
未添加维生素的酪蛋白	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
玉米淀粉	632.5	630.5	628.5	622.5	628.5
玉米油	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
矿物质混合物（AIN-93G）	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
维生素混合物（AIN-93G）	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
酒石酸胆碱	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
纤维素粉末	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
对香豆酰 5-羟色胺	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0
阿魏酰 5-羟色胺	0.0	1.0	2.0	0.0	4.0
红花粕萃取物	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0
合计	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

工业实用性

本发明的可通过有机溶剂萃取、从脱脂后的植物种子中得到的组合物可用于预防动脉硬化，由于是来自天然的材料，因此安全性高，几乎没有副作用。含有该组合物的食品和药物组合物对于预防动脉硬化有效。

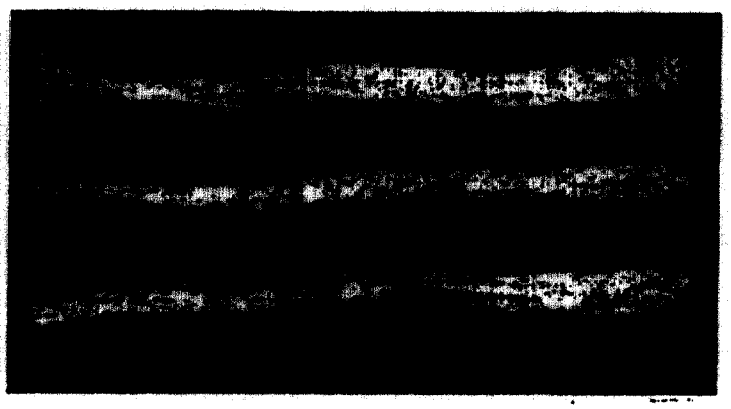
本申请以在日本申请的特愿 2002-110932 为基础，其内容全部包含在本说明书中。



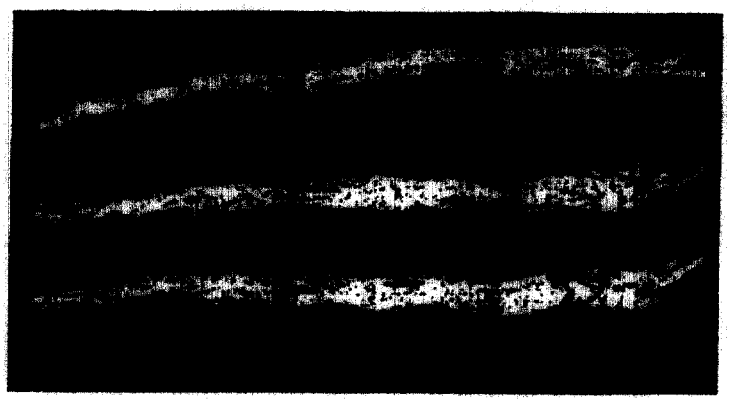
（* 油菜粕、红花粕稀释200倍，其它稀释50倍）

图 1

(a)



(b)

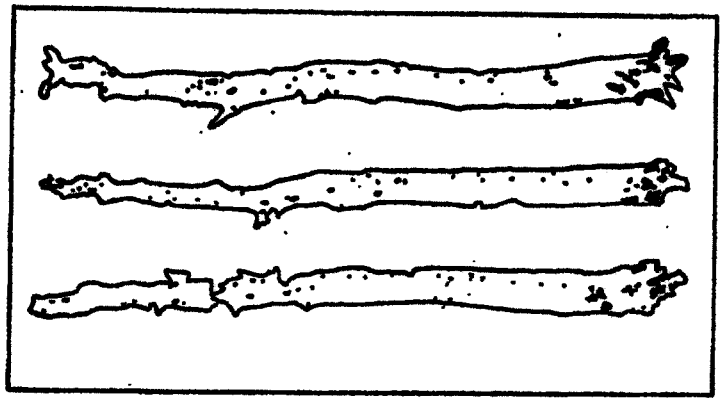


(c)

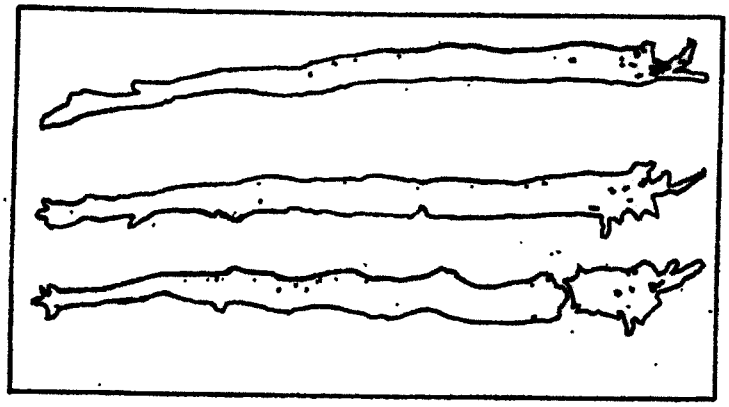


图 2

(a-1)



(b-1)



(c-1)

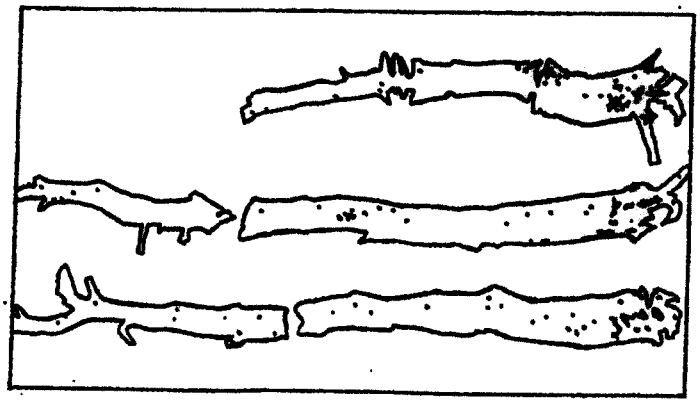


图 3

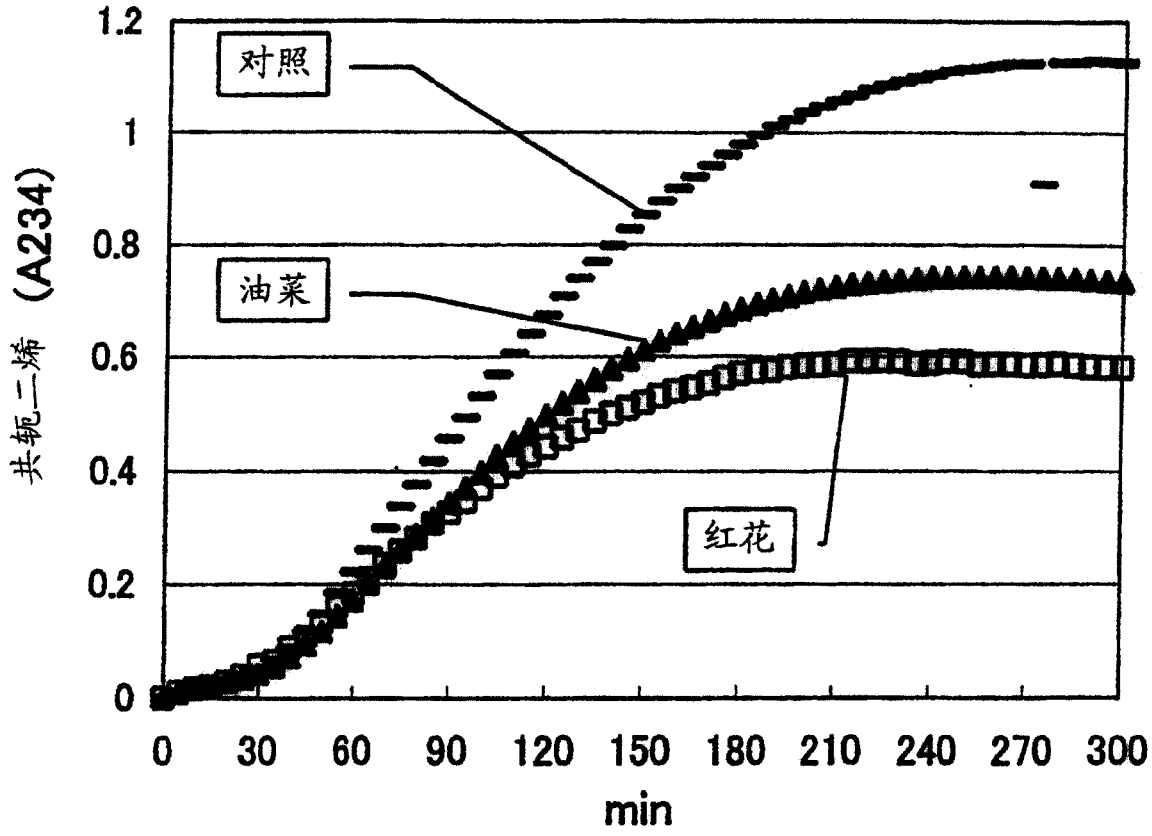

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
共轭二烯 (A234)
对照
油菜
红花
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
min

图 4

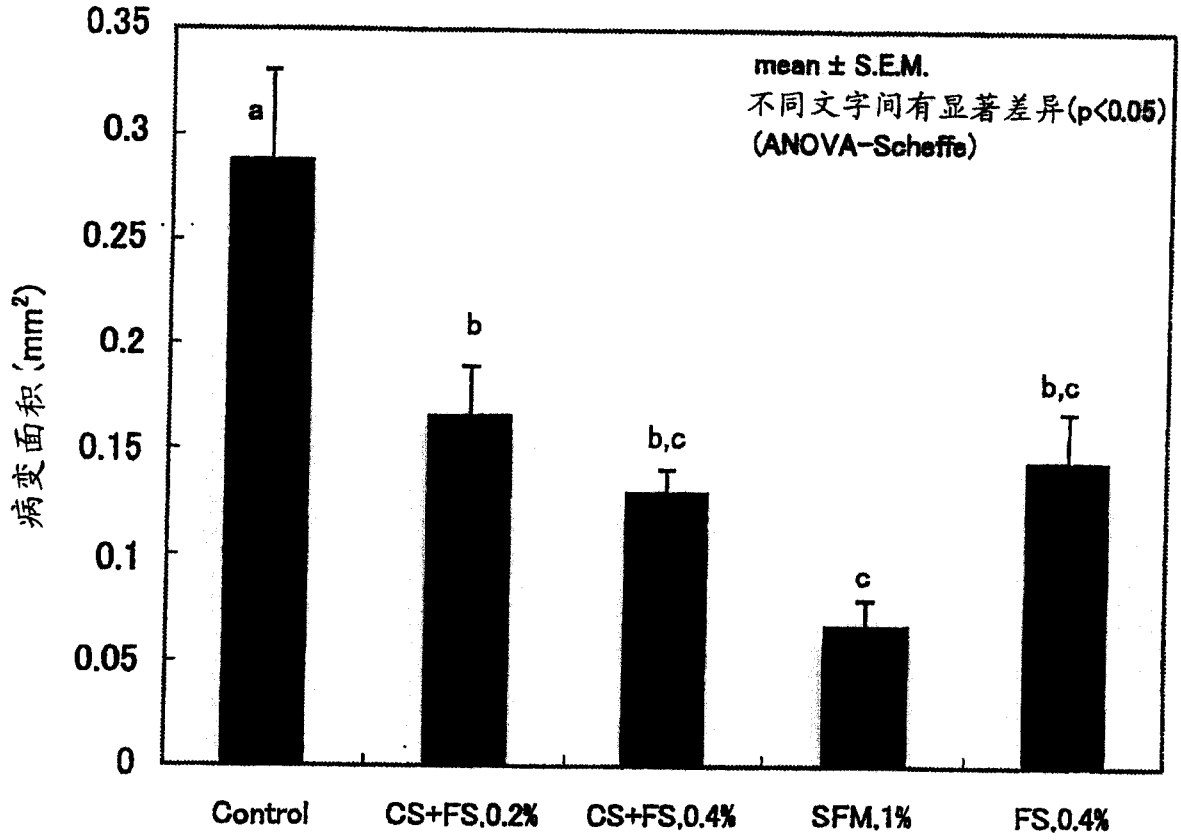

0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
病变面积 (mm²)
mean ± S.E.M.
不同文字间有显著差异(p<0.05)
(ANOVA-Scheffe)
a
b
b,c
c
b,c
Control
CS+FS,0.2%
CS+FS,0.4%
SFM,1%
FS,0.4%

图 5