



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104546876 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410385606. 1

A61K 31/575(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 08. 07

(30) 优先权数据

2013-224483 2013. 10. 29 JP

(71) 申请人 株式会社芳珂

地址 日本神奈川县横滨市中区山下町 89 番
地 1

申请人 株式会社冈安商店

(72) 发明人 奥原康英 伊藤幸彦 冈安武藏
西尾和正 小林真起子 山川淳子

(74) 专利代理机构 北京连和连知识产权代理有
限公司 11278

代理人 初学平

(51) Int. Cl.

A61K 31/704(2006. 01)

A61P 39/06(2006. 01)

A23L 1/29(2006. 01)

A61K 31/685(2006. 01)

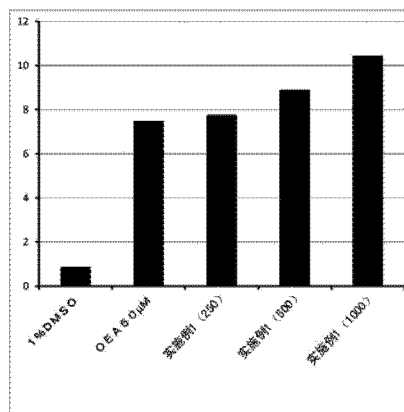
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

米糠提取物

(57) 摘要

本发明的课题在于提供具有抗氧化活性及 GLP-1 产生促进作用的米糠提取物。一种米糠提取物,其特征在于,含有 2.7 ~ 4.1 质量%的酰化甾醇糖苷、1.4 ~ 2.1 质量%的 γ -谷维素、以硬脂酰·油酰·卵磷脂换算 18 ~ 28 质量%的磷脂,且在水解时相对于水解前的质量含有 20 ~ 30 质量%的亚油酸、24 ~ 37 质量%的油酸、11 ~ 17 质量%的棕榈酸、1.7 ~ 2.6 质量%的植物甾醇。



1. 一种米糠提取物,其特征在于,含有 2.7 ~ 4.1 质量%的酰化甾醇糖苷、1.4 ~ 2.1 质量%的 γ -谷维素、以硬脂酰·油酰·卵磷脂换算 18 ~ 28 质量%的磷脂,且在水解时相对于水解前的质量含有 20 ~ 30 质量%的亚油酸、24 ~ 37 质量%的油酸、11 ~ 17 质量%的棕榈酸、1.7 ~ 2.6 质量%的植物甾醇。

2. 一种抗氧化剂,其特征在于,以权利要求 1 所述的米糠提取物作为有效成分。

3. 一种 GLP-1 产生促进剂,其特征在于,以权利要求 1 所述的米糠提取物作为有效成分。

米糠提取物

技术领域

[0001] 本发明涉及米糠提取物。

背景技术

[0002] 米糠是将糙米进行精白时产生的果皮、种皮、胚芽等的部分。在米糠中含有各种有用成分。作为代表性的成分,可例示植酸、肌醇、阿魏酸、 γ -谷维素、膳食纤维、蛋白质、维生素B1、维生素B6、维生素E、矿物质等。提出了利用了上述成分的米糠的提取物配合食品、饮料。在专利文献1(日本特开2002-20307号公报)中记载了以米糠中的含无机质、维生素B族、膳食纤维、植酸及蛋白质的水溶性米糠提取物作为有效成分,且具有活性氧去除功能的抗氧化性组合物。在专利文献2(日本特开2007-223990号公报)中记载了使用亚临界乙醇或者超临界乙醇从糙米、白米及米糠提取的抗氧化组合物。在专利文献3(日本特开2012-188574号公报)中记载了将脱脂米糠等用微细化处理及加热处理中的至少一种进行处理而形成的抗氧化物质。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1 日本特开2002-20307号公报

[0006] 专利文献2 日本特开2007-223990号公报

[0007] 专利文献3 日本特开2012-188574号公报

发明内容

[0008] 本发明的课题在于提供具有抗氧化活性及GLP-1产生促进作用的米糠提取物。

[0009] 本发明的主要构成如下。

[0010] (1) 一种米糠提取物,其特征在于,含有2.7~4.1质量%的酰化甾醇糖苷、1.4~2.1质量%的 γ -谷维素、以硬脂酰·油酰·卵磷脂换算18~28质量%的磷脂,且在水解时相对于水解前的质量含有20~30质量%的亚油酸、24~37质量%的油酸、11~17质量%的棕榈酸、1.7~2.6质量%的植物甾醇。

[0011] (2) 一种抗氧化剂,其特征在于,以(1)所述的米糠提取物作为有效成分。

[0012] (3) 一种GLP-1产生促进剂,其特征在于,以(1)所述的米糠提取物作为有效成分。

[0013] 根据本发明可提供抗氧化效果优异的米糠提取物。

[0014] 进而,本发明的米糠提取物具有胰高血糖素样肽-1;glucagon-like peptide-1(以下,简称为GLP-1。)的产生促进作用,作为GLP-1产生促进剂也有用。

附图说明

[0015] 图1为表示本发明的米糠提取物浓度依存性地促进来自人大肠细胞的培养细胞的GLP-1产生的图。

具体实施方式

[0016] 本发明的米糠提取物中所包含的酰化甾醇糖苷是酰基或糖链不同的化合物的总称,在天然物中通常作为多个成分的混合物存在。酰化甾醇糖苷的构成糖主要是葡萄糖。此外,构成甾醇是 β -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇等。表明酰化主要是葡萄糖的 6 位被脂肪酸酰化,构成脂肪酸主要是亚油酸、油酸、棕榈酸(带大研报,10,(1977)507 ~ 514)。

[0017] 本发明的米糠提取物含有 2.7 ~ 4.1 质量%的上述酰化甾醇糖苷。

[0018] 本发明所使用的米糠提取物中的酰化甾醇糖苷的含量测定可通过以下方法进行。

[0019] (1) 适量称取米糠提取物并加入氯仿/甲醇混合液(氯仿:甲醇=2:1),用容量瓶定容。

[0020] (2) 根据成分浓度将通过(1)所得到的溶液适当稀释并作为分析用试样溶液。

[0021] (3) 标准品为酯化硬脂基葡萄糖苷(Funakoshi),通过高效液相色谱法来计算酰化甾醇糖苷的浓度。

[0022] (4) 高效液相色谱法的分析条件

[0023] 分析装置:HPLC

[0024] 流动相 A:甲醇:水=95:5(v/v)

[0025] 流动相 B:氯仿=100(v/v)

[0026] 泵:Model 582

[0027] 溶剂输送系统

[0028] 分析色谱柱:LiChrospher Si60(5 μ m)HPLC-Cartridge(MERCK)

[0029] 检测器:电喷雾检测器(Corona Dionex 公司)

[0030] 进样量:20 μ L

[0031] 柱温箱:40 $^{\circ}$ C (FLO 公司 model502)

[0032] 分析时间:40 分钟

[0033] 脱气装置:uniflows Degasys Ultimate DV 3003

[0034] 流速:1mL/分钟

[0035] 梯度条件如下所示

[0036] 0-15 分钟

[0037] 流动相 A:1% $\rightarrow$ 25%、流动相 B:99% $\rightarrow$ 75%

[0038] 15-20 分钟

[0039] 流动相 A:25% $\rightarrow$ 90%、流动相 B:75% $\rightarrow$ 10%

[0040] 20-25 分钟

[0041] 流动相 A:90%、流动相 B:10%

[0042] 25-30 分钟

[0043] 流动相 A:90% $\rightarrow$ 1%、流动相 B:10% $\rightarrow$ 99%

[0044] 30-40 分钟

[0045] 流动相 A:1%、流动相 B:99%

[0046] 本发明的米糠提取物含有 1.4 ~ 2.1 质量%的 γ -谷维素。 γ -谷维素是米糠的脂质中含有的阿魏酸与甾醇的酯,而且是 24-亚甲基环木菠萝烯醇阿魏酸酯(24-methylene cycloartenyl ferulate)、环木菠萝烯醇阿魏酸酯(Cycloartenyl Ferulate)、菜油甾醇阿

魏酸酯 (Campesteryl ferulate)、 β -谷甾醇阿魏酸酯 (β -Sitosteryl ferulate) 等的混合物。

[0047] 本发明米糠提取物中的 γ -谷维素的含量可通过高效液相色谱使用反相色谱柱用紫外线检测器进行检测。

[0048] 本发明的米糠提取物含有以硬脂酰·油酰·卵磷脂 (stearoyl oleoyl phosphatidylcholine) 换算 18 ~ 28 质量%的磷脂。

[0049] 本发明米糠提取物中的磷脂的含量可通过钼蓝分光光度法测定磷的浓度,并换算成硬脂酰·油酰·卵磷脂的量来求得。具体而言,从米糠提取物用 Folch 法提取脂质并灰化后,通过钼蓝分光光度法测定磷的浓度。

[0050] 本发明的米糠提取物在水解时相对于水解前的质量含有 20 ~ 30 质量%的亚油酸、24 ~ 37 质量%的油酸、11 ~ 17 质量%的棕榈酸。

[0051] 所述水解后的亚油酸、油酸、棕榈酸的量可通过以下方法进行测定。在米糠提取物中加入 0.5mol/L 氢氧化钠的甲醇溶液进行皂化,并添加三氟化硼甲醇络合物甲醇溶液进行甲酯化。加入己烷与饱和生理盐水分提取脂肪酸的甲酯化物,并通过气相色谱使用氢火焰离子化检测器进行定量分析。

[0052] 本发明所使用的米糠提取物在水解时相对于水解前的质量含有 1.7 ~ 2.6 质量%的植物甾醇。植物甾醇的主成分是 β -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇。

[0053] 水解后的植物甾醇的量可通过以下方法进行测定。在米糠提取物中依次加入氯化钠水溶液、邻苯三酚-乙醇溶液、氢氧化钾水溶液、氢氧化钾进行皂化。添加氯化钠水溶液与己烷、乙酸乙酯混合液来分配提取不皂化物。使用 silica cartridge 色谱柱从不皂化物分离植物甾醇组分,并将植物甾醇组分中的植物甾醇通过气相色谱使用氢火焰离子化检测器进行定量分析。

[0054] 作为本发明的米糠提取物的提取方法,可列举溶剂提取法、超临界提取法、柱色谱法等。

[0055] 此外,具体的提取操作如下所示。

[0056] <提取方法>

[0057] 筛选在市场上流通的米糠后,使用正己烷等的溶剂进行脱脂。将所得到的油、脱脂糠等的粗原料通过蒸馏装置进行脱溶剂,再进一步通过正己烷、丙酮、乙醇、水等的溶剂进行提取。将这样所得到的提取液使用脱溶剂装置再次进行脱溶剂可得到米糠提取物。

[0058] 本发明的米糠提取物可作为期待有抗氧化效果的制剂或者食品利用。此外,本发明的米糠提取物可作为期待有 GLP-1 的产生促进的制剂或者食品利用。剂型可通过公知的方法与助剂一起制剂化成任意的形态来经口摄取(给予)。可作为胶囊剂或者片剂、颗粒剂、细粒剂、散剂、液状来摄取(给予)。

[0059] 摄取(给予)量可根据摄取(给予)方法与对象者的年龄、病状、一般状态等来改变,通常成人每 1kg 体重、每 1 天作为有效成分 0.1 ~ 500mg 较为适合。

[0060] 实施例

[0061] 以下示出实施例并进一步详细地说明本发明。

[0062] <实施例 1:米糠提取物的制备(溶剂提取)>

[0063] 将市场上流通的米糠进行筛选并得到去除了胚乳、异物的米糠。相对于 10kg 所得

到的筛选完成的米糠使用 50L 的正己烷进行脱脂。重复 1 次该脱脂作业并得到脱脂米糠。通过蒸馏装置从所得到的脱脂米糠中除去溶剂。

[0064] 相对于 8kg 所得到的脱脂米糠,以 50L 的比例使用乙醇在 $70 \pm 3^\circ\text{C}$ 的温度条件下回流提取 1 小时。重复 3 次该操作,对所得到的提取液使用脱溶剂装置除去乙醇。米糠提取物中的酰化甾醇糖苷、 γ -谷维素、硬脂酰·油酰·卵磷脂换算的磷脂的浓度以及相对于水解前的质量的水解后的亚油酸、油酸、棕榈酸、植物甾醇的浓度如下述表 1 所示。

[0065] <对比例 1:米糠提取物的制备(溶剂提取)>

[0066] 将市场上流通的米糠进行筛选并得到去除了胚乳、异物的米糠。相对于 10kg 所得到的筛选完成的米糠使用 50L 的正己烷进行脱脂。重复 3 次该脱脂作业并得到脱脂米糠。通过蒸馏装置从所得到的脱脂米糠中除去溶剂。

[0067] 相对于 8kg 所得到的脱脂米糠,以 50L 的比例使用丙酮在 $50 \pm 3^\circ\text{C}$ 的温度条件下回流提取 1 小时。重复 3 次该操作,对所得到的提取液使用脱溶剂装置除去丙酮。米糠提取物中的酰化甾醇糖苷、 γ -谷维素、硬脂酰·油酰·卵磷脂换算的磷脂的浓度以及相对于水解前的质量的水解后的亚油酸、油酸、棕榈酸、植物甾醇的浓度如表 1 所示。

[0068] 表 1

[0069]

	实施例1 (质量%)	对比例1 (质量%)
酰化甾醇糖苷	3.4	3.2
γ -谷维素	1.7	0.6
磷脂(测定磷的浓度,并换算成硬脂酰·油酰·卵磷脂的量)	22.9	0.0
水解后的亚油酸	25.0	26.7
水解后的油酸	30.5	34.6
水解后的棕榈酸	13.8	13.0
水解后的植物甾醇	2.1	1.6
以下为植物甾醇分类		
(菜油甾醇)	0.49	0.35
(豆甾醇)	0.29	0.21
(γ -麦角甾醇)	0.02	0.03
(β -谷甾醇)	1.08	0.77
(异岩藻甾醇)	0.14	0.14
(γ -豆甾醇)	0.04	0.06
(燕麦甾醇)	0.06	0.06

[0070] <过氧化物价试验>

[0071] 在三角烧瓶(200mL)中按照下述所示的过氧化物价(以下为 POV)与采集量的关

系采集实施例 1、对比例 1 的米糠提取物。在其中加入 15mL 氯仿溶解。进而,加入 15mL 醋酸及 1mL 碘化钾饱和溶液,放置 5 分钟并加入 75mL 水激烈振荡混合后,加入数滴 1% 淀粉溶液,用 0.01mol/L 硫代硫酸钠溶液进行滴定,并将成为无色的时刻作为终点。与正式试验平行进行空白试验。从 $POV = (a-b) \times F \times 10 / S$ (a: 正式试验的滴定量、b: 空白试验的滴定量、F: 0.01mol/L 硫代硫酸钠溶液的效价、S: 试样的采集量) 式求得 POV。且,预先通过预试验求得 POV 的估算值,按照下述表 2 的采集量的范围称量测定试样。过氧化物价测定结果如表 3 所示。

[0072] 表 2

[0073]

POV	采集量 (g)
1 以下	10
1 ~ 10	10 ~ 5
10 ~ 50	5 ~ 1
50 以上	1 ~ 0.5

[0074] 表 3

[0075]

	实施例 1	对比例 1
POV (meq/kg)	0.1	26.4

[0076] 实施例 1 的米糠提取物显示出显著的抗氧化效果。

[0077] < DPPH 自由基去除活性试验 >

[0078] 在 96 孔中分注入各 150 μ L 的用 100% 乙醇将浓度调节为 3 个水平的样品 (实施例 1 或者对比例 1)。接着,在各孔中加入 90 μ L 的 200 μ mol/L 的 DPPH 乙醇溶液使其反应,用分光光度计测定 2 分钟后的 520nm 处的吸光度 (OD)。且,将加入乙醇来代替 DPPH 溶液的物质作为各样品浓度的空白,将加入乙醇来代替样品的物质作为对照,将不加入 DPPH 及样品而仅加入乙醇的物质作为空白对照。从下式计算各浓度的 DPPH 去除率 (%),并求得具有 DPPH 自由基 50% 去除功能的样品浓度 (EC50)。

[0079] 去除率 (%) = $(1 - (\text{样品 OD} - \text{空白 OD}) / (\text{对照 OD} - \text{空白对照 OD})) \times 100$

[0080] 结果如表 4 所示。

[0081] 表 4

[0082]

	EC50 (μ g/ml)
实施例 1	1143
对比例 1	1887

[0083] 实施例 1 的米糠提取物显示出显著的抗氧化效果。

[0084] < GLP-1 产生试验 >

[0085] 按照以下的方法对 GLP-1 产生促进作用进行试验。

[0086] [使用了培养细胞的 GLP-1 产生试验]

[0087] 将 NCI-H716 细胞 (来自人结肠癌的细胞) 1×10^5 个细胞接种到 75cm^2 的细胞培养瓶中, 用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基在 37°C 、5% CO_2 的条件下进行 14 天培养。且, NCI-H716 细胞从 ATCC (American Type Culture Collection) 获得。培养后, 在涂布了基质胶 (matrigel) 的 24 孔板中使成为 4×10^4 细胞 / 孔来进行接种, 并用含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行 1 天培养。

[0088] 其后, 用 Hanks 缓冲液进行 2 次洗净并添加试验试样, 用无血清 DMEM 培养基进行 2 小时培养。培养结束后, 将在培养液中产生的 GLP-1 量使用“GLP-1 ELISA kit (Glucagon-Like Peptide-1 Cat#EGLP-35K : Millipore 公司)”进行测定。且, 对照为 1% DMSO, 作为阳性对照所使用的油酰乙醇胺 (OEA) 是已知具有 GLP-1 产生促进作用的化合物。添加该 OEA 使成为 $50\ \mu\text{M}$ 。

[0089] [试验物质]

[0090] 将实施例 1 所得到的米糠提取物用于试验。如下进行添加, 以便使米糠提取物的浓度成为 $1000\ \mu\text{g/ml}$ / 1% DMSO (二甲基亚砷), 用 DMEM (FBS-, PS-) 培养基溶解且最终培养液中的米糠提取物的浓度成为 $250\ \mu\text{g/ml}$ 、 $500\ \mu\text{g/ml}$ 、 $1000\ \mu\text{g/ml}$ 。

[0091] [结果]

[0092] GLP-1 测定结果通过将仅有 1% DMSO 时所得到的测定值作为 1 时的相对值来求得。测定结果如图 1 所示。在实施例 1 的米糠提取物中确认到了与 OEA 同等以上的 GLP-1 产生促进作用, 进而, 也看到了浓度依存性。

[0093] 从该试验表明, 本发明的米糠提取物具有 GLP-1 产生促进作用, 在生体机能维持上有用。

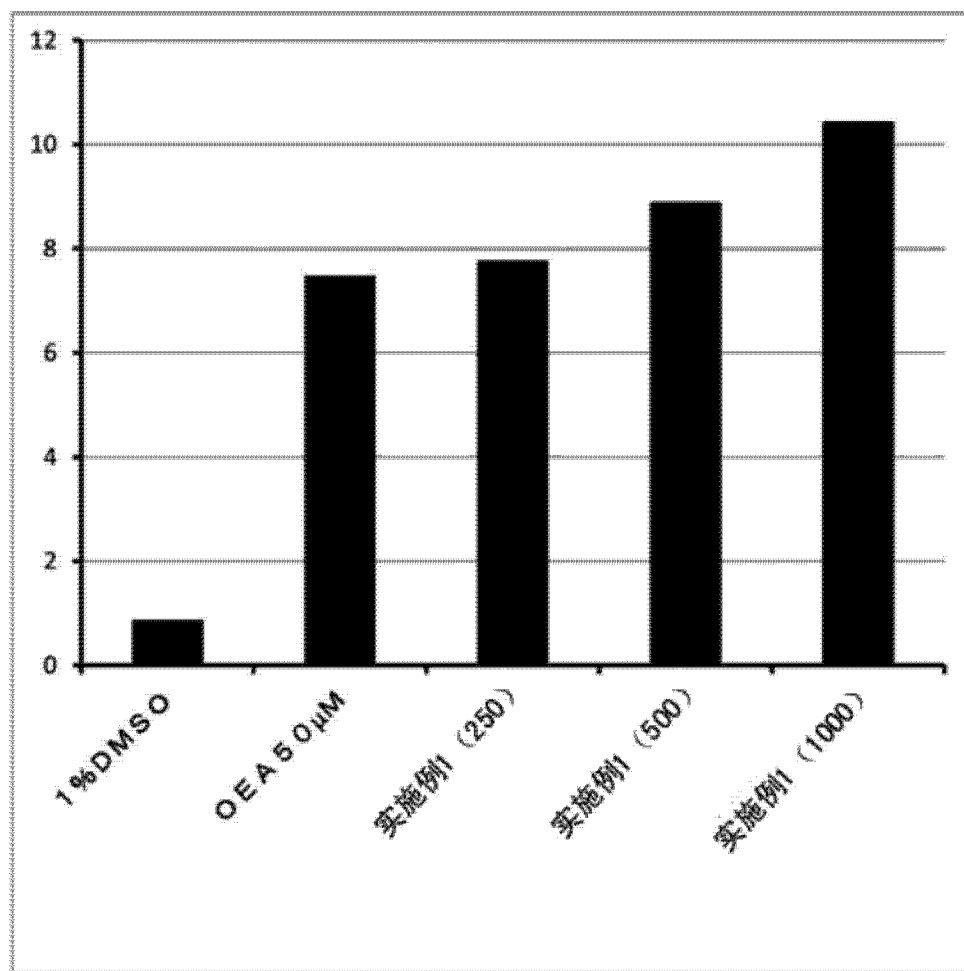


图 1