

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102006879 B

(45) 授权公告日 2012.10.03

(21) 申请号 200980104730.3

(22) 申请日 2009.02.10

(30) 优先权数据

2008-031274 2008.02.13 JP

2008-228161 2008.09.05 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.08.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/052602 2009.02.10

(87) PCT申请的公布数据

W02009/102075 EN 2009.08.20

(73) 专利权人 花王株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 龟山明代 藤村努

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳 李巍

(51) Int. Cl.

A61K 36/77(2006.01)

(56) 对比文件

DE 3700188 A1, 1988.07.21,

赵鑫. 植物药数据库. 《国外医药(植物药分册)》. 2008, 第23卷(第1期),

审查员 白雪

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 5 页

(54) 发明名称

生产七叶树科植物种子提取物的方法

(57) 摘要

本发明提供一种生产七叶树科植物种子提取物的方法,该提取物的颜色较淡并且适当地掺入诸如药物产品或化妆品组合物的组合物中。一种生产七叶树科植物种子提取物的方法,其包括从七叶树科植物的种子去除外壳,然后用溶剂提取。

1. 一种生产七叶树科植物种子提取物的方法,包括步骤为:利用粉末机械将七叶树科植物的种子碾碎而使外壳从种子上剥离,随后,将碾碎的种子应用到密闭循环式风力分选机,从而基于种子的外壳和种子剩余部分之间的重量差去除外壳,然后用溶剂提取种子剩余部分。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中用于提取的所述溶剂是水-醇混合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述七叶树科植物是欧洲七叶树。

4. 一种七叶树科植物种子提取物,其通过如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的方法制备。

生产七叶树科植物种子提取物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及从属于七叶树科 (Hippocastanaceae) 家族的植物的种子产生提取物的方法。

背景技术

[0002] 通常,属于七叶树科家族的植物(以后此类植物可称为“七叶树科植物”),诸如欧洲七叶树 (*Aesculus Hippocastanum*) (马栗树) 或日本七叶树 (*Aesculus turbinata*) 的种子用作羊或猪的饲料,或用作淀粉的来源。如已经知道的,七叶树科植物的提取物或从该提取物中分离的三萜皂甙(称为七叶素)显示优异的抗炎和收敛作用。因此,例如,来自马栗树种子的提取物已经用作口服、肌内注射或外用形式的抗炎药物,用于手术后治疗或治疗创伤后肿胀。此外,来自马栗树的提取物已经用作化妆品组合物的原料。最近的研究已经揭示来自马栗树的提取物显示具有预防或减轻皮肤皱纹或皮肤下垂的作用(专利文件 1)。

[0003] 然而,由于七叶树科植物的种子具有深褐色外壳,因此当通过用溶剂提取破碎的植物种子制备提取物时,提取物产生的问题在于其呈褐色,并且在含水药物产品中很容易褪色。

[0004] 迄今,还没有发现含有显示预防或减轻皮肤皱纹或皮肤下垂的成分的植物种子的部位。

[0005] 专利文件 1 :JP-A-2005-8571

发明内容

[0006] 本发明提供了一种从七叶树科植物的种子中生产提取物(以后该提取物可称为“七叶树科植物种子提取物”)的方法,包括从七叶树科植物的种子去除外壳,然后用溶剂进行提取。

[0007] 本发明还提供通过上述方法产生的七叶树科植物种子提取物。

附图说明

[0008] 图 1 显示了本发明的提取物和比较的提取物的色泽。

[0009] 图 2 显示从其获得印模 (replica) 用于线粗糙度分析 (line roughness analysis) 的面部区域,以及印模的分析区 (L :位于离眼外角侧一端 10mm 远处的线 (L = 10mm), S :离眼外角侧一端 2mm 至 14mm 远的区域 (面积 :12mm×10mm))。

[0010] 图 3 显示通过对眼外角的照片肉眼观察确定的评分的变化。

[0011] 图 4 显示通过印模的线粗糙度分析获得的 Ra 和 Rz 的数据。

[0012] 图 5 显示通过印模的表面粗糙度分析获得的 Sa 和 Sz 的数据 (# :来自 6 名受试者的印模的分析数据 (n = 6),其中含有气泡的一个印模被排除在外)。

具体实施方式

[0013] 本发明涉及一种生产七叶树科植物种子提取物的方法,该提取物颜色较淡,并适于掺入到组合物中(例如,药物组合物或化妆品组合物)。

[0014] 本发明已经基于下列发现而完成:当通过从七叶树科植物的种子去除外壳,然后用溶剂提取而产生七叶树科植物种子提取物时,提取物不利的着色明显地被抑制,而不丧失有用的活性成分。

[0015] 本发明的生产方法可产生颜色较淡的七叶树科植物种子提取物,而不丧失表现出防止或减轻皮肤皱纹或皮肤下垂的作用的七叶树科植物种子的有用活性成分。因此,通过本发明的生产方法制备的七叶树科植物种子提取物可用作,例如,化妆品组合物或药物产品的成分,其有效地利用了七叶树科植物种子的药理学作用(例如,防止或减轻皮肤皱纹或皮肤下垂的作用)。

[0016] 本发明的生产七叶树科植物种子提取物的方法包括从七叶树科植物的种子去除外壳的步骤,然后用溶剂提取。

[0017] 本发明中采用的七叶树科植物优选地是属于七叶树属(genus *Aesculus*)的植物。七叶树科植物的实例包括日本七叶树、欧洲七叶树(马栗树)和中国七叶树(*Aesculus chinensis*)(中国马栗树),它们均属于七叶树科家族。在这些植物中,优选欧洲七叶树(马栗树)。

[0018] 对从七叶树植物的种子去除外壳的方法没有特别的限制。例如,外壳可借助于粉末机械诸如研磨机或研磨制粒机通过将种子碾碎而从种子上剥离。随后,破碎的种子可应用到密闭循环式风力分选机,从而基于外壳和种子剩余部分之间的重量差去除外壳。

[0019] 与外壳分离的种子(主要含有胚乳)可直接进行溶剂提取,或可在溶剂提取之前被碾碎。

[0020] 提取溶剂可以是极性溶剂、非极性溶剂或其混合物。提取溶剂的实例包括水;醇类如甲醇、乙醇、丙醇和丁醇;多元醇类如丙二醇和丁二醇;酮类如丙酮和甲基乙基酮;酯类如乙酸甲酯和乙酸乙酯;无环和环醚类如四氢呋喃和二乙醚;聚醚类如聚乙二醇;卤代烃类如二氯甲烷、氯仿、和四氯化碳;烃类如己烷、环己烷和石油醚;芳香烃类如苯和甲苯;吡啶化合物;超临界二氧化碳;油脂;蜡;以及其他油类。其中,优选水、醇和水-醇混合物。更优选地,采用乙醇水溶液(具体地,20至80%(vol/vol)乙醇水溶液)。

[0021] 提取条件可随着采用的溶剂的类型而变化。例如,当提取溶剂是水、醇或水-醇混合物时,优选地,基于1质量份的与外壳分离的七叶树科植物种子,使用1-50体积份的溶剂在4-100°C(优选20-60°C)下提取1小时至30天(更优选1至14天,进一步优选1至3天)。

[0022] 由此产生的提取物的颜色较淡,并且具有较少的气味,因此该提取物可直接用作本发明的七叶树科植物种子提取物。或者,提取物可被稀释、浓缩或冻干,然后任选地以粉末或糊剂的形式制备。

[0023] 惰性污染物可通过液液分配或类似的技术从提取物中去除。任选地,生成的提取物可根据已知技术进一步进行除臭、脱色或其他处理。

[0024] 由此制备的七叶树科植物种子提取物与从包括外壳的整个七叶树科植物种子以相同的方式制备的提取物相比,颜色显著变浅(见测试例2)。此外,由此制备的七叶树科植物种子提取物与从包括外壳的整个七叶树科植物种子以相同的方式制备的提取物相比,显

著地增加人皮肤成纤维细胞产生的收缩力（见测试例 1 和 3）。由皮肤成纤维细胞产生的收缩力归因于伴随着肌动蛋白聚合的张力纤维的形成，并且增加由皮肤成纤维细胞产生的收缩力的物质被认为有效地防止皮肤组织的衰老，诸如皮肤的下垂、丧失皮肤弹性或形成皱纹（J. Cosmet. Sci., 57, 369-376, 2006）。由此，通过本发明的方法制备的七叶树科植物种子提取物可用作有效地利用该提取物的药理学作用（例如，预防或减轻皮肤皱纹或皮肤下垂的作用）的化妆品组合物、药物组合物或其他组合物的成分。

[0025] 实施例

[0026] 实施例 1 七叶树科植物种子提取物的制备

[0027] (1) 采用的植物

[0028] i) 欧洲七叶树（马栗树）（来自波兰）

[0029] ii) 中国七叶树（来自中国）

[0030] iii) 日本七叶树（来自日本）

[0031] (2) 制备方法

[0032] 各种植物的种子（10kg）通过研磨造粒机（Dalton Co., Ltd. 的产品）碾碎 5 分钟，由此碾碎的种子用密闭循环式风力分选机（Nihon Senki 的产品）（风能：20%）处理 20 分钟，从而将种子分离成剥离的外壳和碾碎的物质（主要含有胚乳）。因此，制备用于提取的碾碎产物（8kg）。将 50vol% 乙醇（1L）加入至碾碎产物（100g）中，混合物在 50℃ 下搅拌 24 小时进行提取，紧接着过滤。将 50vol% 乙醇（1L）加入至残渣中，并再次进行提取。由此获得的提取物合并，并通过减压蒸发去除溶剂，然后制备 50vol% EtOH 溶液（固体含量：1.0w/v% 和 0.5w/v%）。由此获得的溶液用作下列测试例中的本发明的提取物 1-3。

[0033] 本发明的提取物 1：来自欧洲七叶树的无壳种子的提取物

[0034] 本发明的提取物 2：来自中国七叶树的无壳种子的提取物

[0035] 本发明的提取物 3：来自日本七叶树的无壳种子的提取物

[0036] 为了比较，如下所述从带壳的上述各种七叶树科植物的种子制备提取物。

[0037] 将 50vol% 乙醇（1L）加入至从各种植物的种子制备的碾碎产物（100g）中，混合物在 50℃ 下搅拌 24 小时进行提取，紧接着过滤。将 50vol% 乙醇（1L）加入至残渣中，并且再次进行提取。由此获得的提取物合并，并通过减压蒸发去除溶剂，然后制备 50vol% EtOH 溶液（固体含量：1.0w/v% 和 0.5w/v%）。由此获得的溶液用作下列测试例中的比较提取物 1-3。

[0038] 比较提取物 1：带壳的欧洲七叶树种子的提取物

[0039] 比较提取物 2：带壳的中国七叶树种子的提取物

[0040] 比较提取物 3：带壳的日本七叶树种子的提取物

[0041] 测试例 1 色泽的测定

[0042] 根据“JIS K0071-2, 化学产品的颜色的测试方法, 第 2 部分, Gardner 色标”中所述的方法, 通过 Gardner 比色计测定实施例 1 (即, 50vol% EtOH 溶液 (固体含量: 1.0% 或 0.5%)) 中制备的本发明的提取物 1-3 和比较提取物 1-3 中各个提取物的色泽 (Gardner 色标)。结果显示在表 1 中。图 1 显示了本发明的提取物 1 和比较提取物 1 (50vol% EtOH 溶液 (固体含量: 1.0%)) 的外观。

[0043] 如表 1 和图 1 中所示, 在本发明的提取物中, 与比较提取物相比, 着色显著被抑制。

此外,本发明的提取物的气味也得到改善。

[0044] [表 1]

[0045]

		Gardner 色标			
		提取物中固体含量: 1.0 w/v%		提取物中固体含量: 0.5 w/v%	
		本发明的 提取物	比较 提取物	本发明的 提取物	比较 提取物
1	欧洲七叶树	3	6	1	4
2	中国七叶树	4	6	3	5
3	日本七叶树	4	6	2	5

[0046] 测试例 2 细胞产生的收缩力的测量

[0047] 细胞产生的收缩力的测量根据 Kolodney 等人的方法 (Kolodney MS., Wysolmerski RB., Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture :a quantitative study. (组织培养中成纤维细胞和内皮细胞的等距收缩:定量研究) J. Cell Biol., 117, 73-82(1992), Kolodney MS., Elson EL., Correlation of myosin light chain phosphorylation with isometric contraction of fibroblasts. (肌球蛋白轻链磷酸化与成纤维细胞的等距收缩的相关性) J. Biol. Chem., 268, 23850-23855(1993)) 在胶原凝胶培养系统中进行。采用人皮肤成纤维细胞 (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., 大阪, 日本, 传代数:3-8)。将成纤维细胞包埋的胶原凝胶 (1.5×10^6 细胞, 1.5mg/mL 胶原, I-A 型 Nitta 明胶) 悬浮并固定在装有约 70mL 无血清培养基 (Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM)) (培养基温度:37°C) 的烧杯中, 使胶原凝胶在约 200mg 重量的张力下稳定 1 小时。此后, 用无血清 DMEM 稀释至其终浓度的约 70 倍 (最终的固体浓度:0.00025-0.001%) 的实施例 1 中制备的本发明的提取物 1 或比较提取物 1 (1.0mL), 加入至胶原凝胶培养物中。人皮肤成纤维细胞产生的收缩力通过等张传感器 (8gf, T-7-8-240, ORIENTEC, 日本) 测量, 并通过 BIOPAC 系统 (BIOPAC Systems Inc., 圣巴巴拉, CA, 美国) 记录。结果显示在表 2 中。

[0048] [表 2]

[0049]

评价的提取物	均值 (达因)	SD
本发明的提取物 1 0.001%	28	9.1
本发明的提取物 1 0.0005%	22	7.5
本发明的提取物 1 0.00025%	16.25	5.7
比较提取物 1 0.001%	15.75	1.5

[0050] 如表 2 中所示, 就由人皮肤成纤维细胞产生的收缩力相当时的提取物浓度而言,

在本发明的提取物 1 (即, 来自欧洲七叶树的无壳种子的提取物) 的情况下, 由人皮肤成纤维细胞产生的收缩力较比较提取物 1 (即, 带壳的欧洲七叶树种子的提取物) 增加了 4 倍或以上。

[0051] 实施例 2 由人评价的提取物的制备

[0052] 来自欧洲七叶树的无壳种子的碾碎产物以与实施例 1 中所述的类似方式制备。将 75vol% 乙醇 (1L) 加入至该碾碎产物 (100g) 中, 混合物在搅拌下于 50°C 加热 6 小时以进行提取。冷却至室温后, 进行过滤, 并将 75vol% 乙醇 (1L) 加入至残渣中。在如上所述的相同条件下再次进行提取, 紧接着过滤。生成的两个提取物合并, 并向混合物中加入 1,3- 丁二醇 (240g)。该混合物减压浓缩, 浓缩物在低温下静置 1 周, 紧接着过滤, 从而去除不溶的物质。向得到的产物中加入 1,3- 丁二醇和水, 从而制备 80% 1,3- 丁二醇溶液 (3.5L) (固体含量 :0.5w/v%)。由此, 制备本发明的提取物 4。

[0053] 重复上述步骤, 不同之处在于将来自欧洲七叶树的无壳种子的碾碎产物替换为带壳的欧洲七叶树种子的碾碎产物, 从而制备比较提取物 4。

[0054] 测试例 3 细胞产生的收缩力的测量

[0055] 以与测试例 2 中所述相似的方式, 在实施例 2 (固体含量 :0.5w/v%) 中制备的本发明的提取物 4 或比较提取物 4 以 0.01% 的最终固体浓度的存在下, 测量人皮肤成纤维细胞产生的收缩力。结果显示在表 3 中。

[0056] [表 3]

[0057]

评价的提取物	均值 (达因)	SD
本发明的提取物 4	9.5	1.3
比较提取物 4	2.8	0.5

[0058] 如表 3 中所示, 来自欧洲七叶树的无壳种子的提取物增加由人皮肤成纤维细胞产生的收缩力, 甚至当该提取物已经进行了固 - 液分配或类似的提取后处理时。

[0059] 测试例 4 在人体上的测试

[0060] (1) 测试设计

[0061] 在 7 名健康女性受试者 (年龄 :30 多岁至 40 多岁) 的半侧脸上进行双盲比较试验, 这些受试者在其眼的外角处有皱纹, 使用含有实施例 2 中制备的本发明的提取物 4 的测试样品和不含有本发明的提取物 4 的安慰剂样品。各受试者每天将预定的样品涂抹在其眼周围区域上 (每天两次或三次) 持续两个月。表 4 显示测试的样品的配方。

[0062] [表 4]

[0063]

成分 (质量%)	测试样品	安慰剂样品
本发明的提取物 4	3.0	-
黄原胶	0.1	0.1

86%甘油	5.0	5.0
甲基聚硅氧烷	4.0	4.0
羧基乙烯基聚合物	0.4	0.4
氢氧化钾	0.6	0.6
鲸蜡基二甲丁基醚	0.1	0.1
新戊二醇二癸酸酯	0.1	0.1
1,3-丁二醇	3.0	3.0
聚乙二醇	3.0	3.0
琥珀酸	0.3	0.3
聚氧乙烯醚氢化蓖麻油	0.5	0.5
防腐剂	0.3	0.3
香料	少量	少量
95%合成醇	0.5	0.5
纯水	余量	余量

[0064] (2) 评价样品对皱纹的功效的方法

[0065] (A) 通过肉眼观察照片确定的评分

[0066] 用数码照相机对就座并轻微闭眼的各受试者的右眼和左眼周围区域进行拍照(近距摄影),然后打印在 2L 大小的纸上。

[0067] 根据下列的分级基于在照片中观察到的眼外角处的皱纹的程度评价样品:0分:无皱纹,1分:少许皱纹,2分:一些皱纹,3分:许多皱纹,以及4分:相当多的皱纹(从1分至5分以0.25递增;即,总共17个级别)。在2个月试验开始时的分数减去试验结束时的分数(试验期:2个月),就分数的变化比较各样品。

[0068] (B) 对印模的粗糙度的分析

[0069] 从仰卧并轻微闭眼的各受试者取右眼和左眼周围区域的印模(Gcexafine, GC Co. Ltd., 东京,日本)。由此制备的印模使用 PRIMOS 软件包(GF Messetechnik GmbH, 柏林)进行三维粗糙度分析。图2显示了获得印模的脸部区域、和用于分析的区域。

[0070] 使用 PRIMOS 软件(英文版 4.0),在2个月试验开始时获得的印模(参照)与试验结束时获得的相应印模之间进行布局匹配(configuration matching)。如图2中所示,印模的布局相配的部位被指定为用于眼外角的粗糙度分析的区域。使用软件确定该区域中的线粗糙度和表面粗糙度。采用的线粗糙度参数为 Ra(算术平均粗糙度)和 Rz(10点平均粗

糙度),采用的表面粗糙度参数为 Sa(算术平均高度)和 Sz(标度限制表面(scale limited surface)的最大高度)。

[0071] (3) 结果

[0072] 1) 图 3 显示通过肉眼观察眼外角的照片确定的评分变化。

[0073] 在安慰剂组中,在 2 个月试验开始时的评分和试验结束时的评分之间没有显著差异。相反,在本发明的提取物 4 应用组中,观察到评分的显著减小。

[0074] 2) 图 4 显示通过印模的线粗糙度分析获得的 Ra 和 Rz 的数据。图 5 显示通过印模的表面粗糙度分析获得的 Sa 和 Sz 的数据(图 5 显示 6 个受试者的分析数据,该分析数据排除了一个受试者,因为来自该受试者的印模在分析区域中有气泡。

[0075] 在安慰剂组中,线粗糙度分析显示在试验开始时的数据与试验结束时的数据之间没有显著差异。相反,在本发明的提取物 4 应用组中,在试验开始时的线粗糙度与试验结束时的线粗糙度之间观察到显著差异;即,观察到 Ra 和 Rz 的显著减小。

[0076] 类似于上述情况,安慰剂组中的表面粗糙度分析显示试验开始时的数据与试验结束时的数据之间没有显著差异。相反,在本发明的提取物 4 应用组中,观察到 Sa 和 Sz 的显著减小。

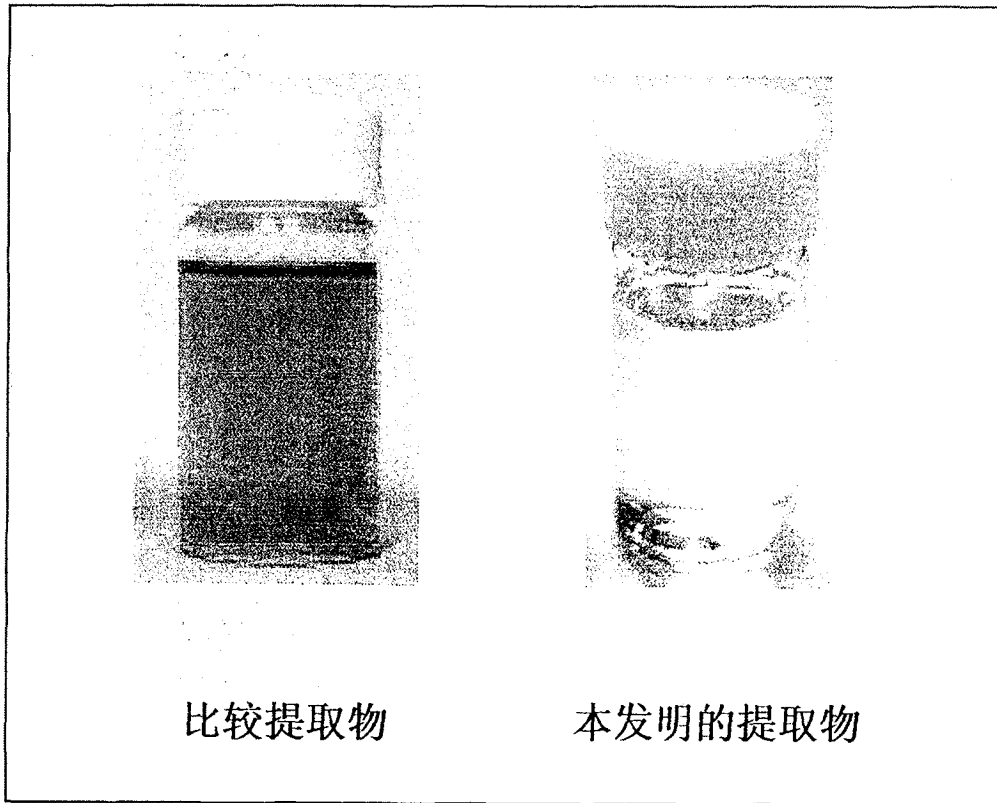


图 1

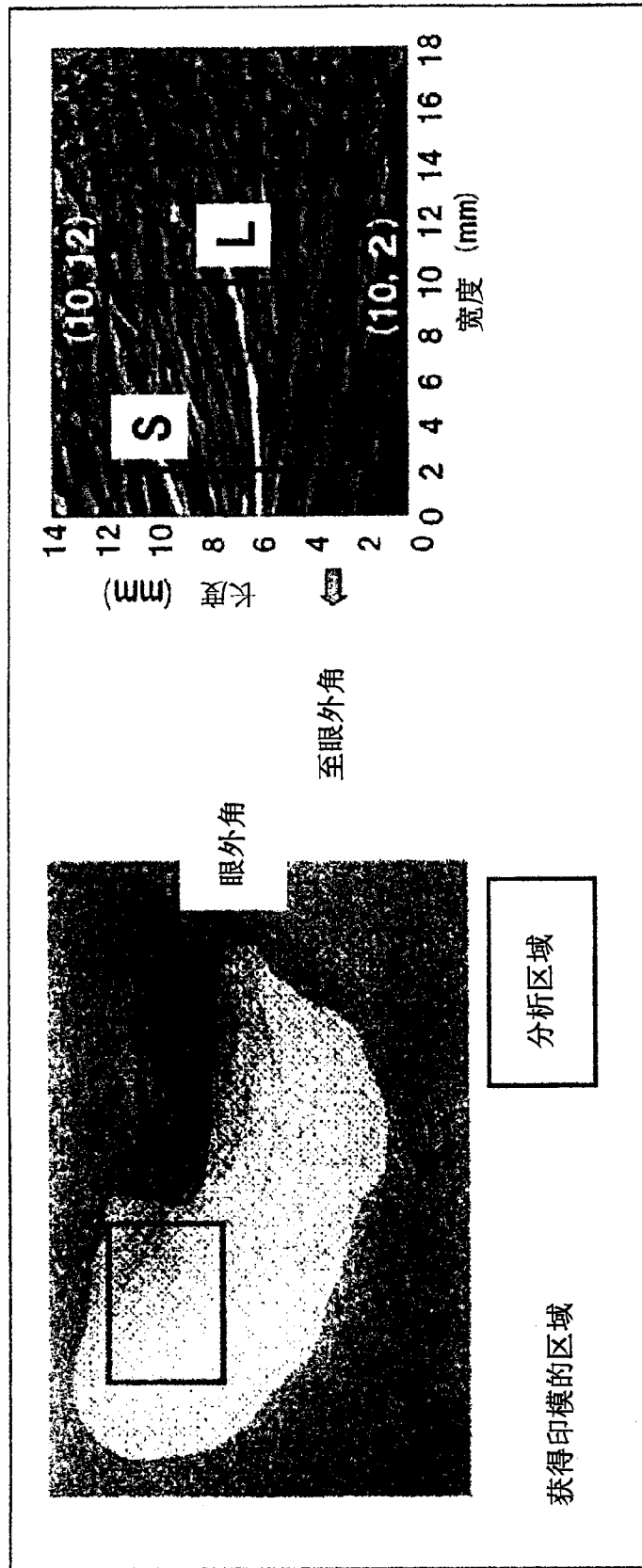


图 2

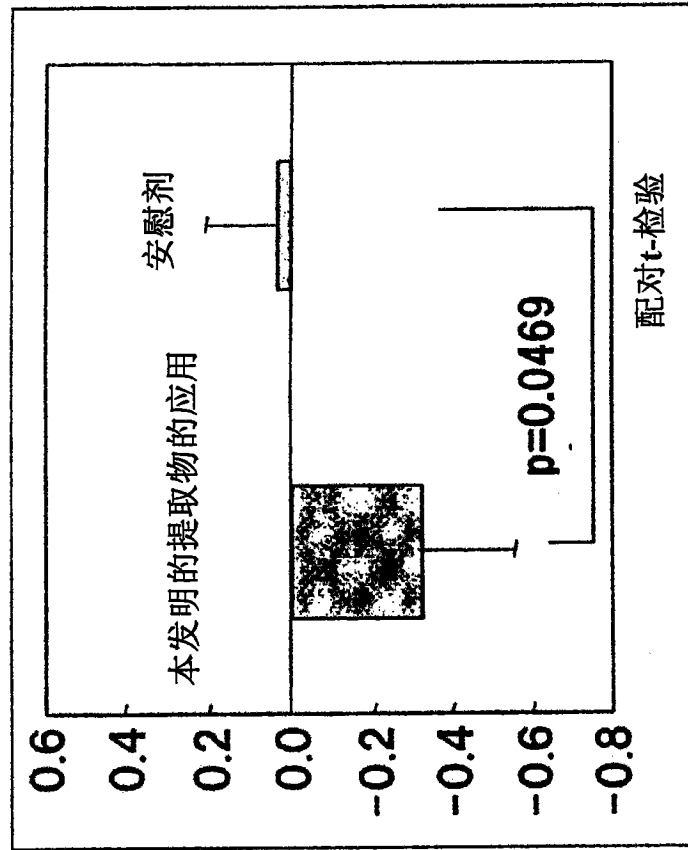


图 3

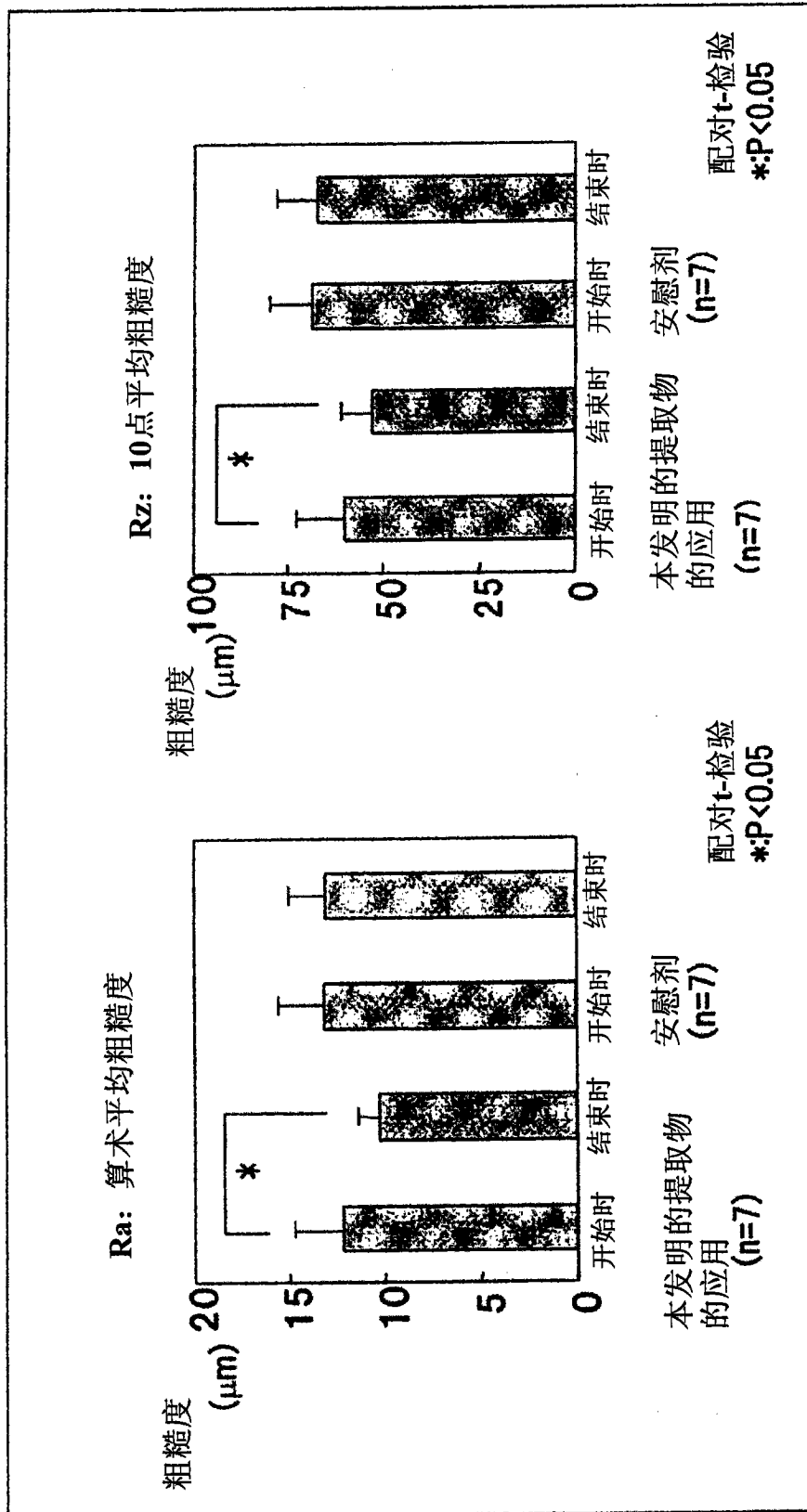


图 4

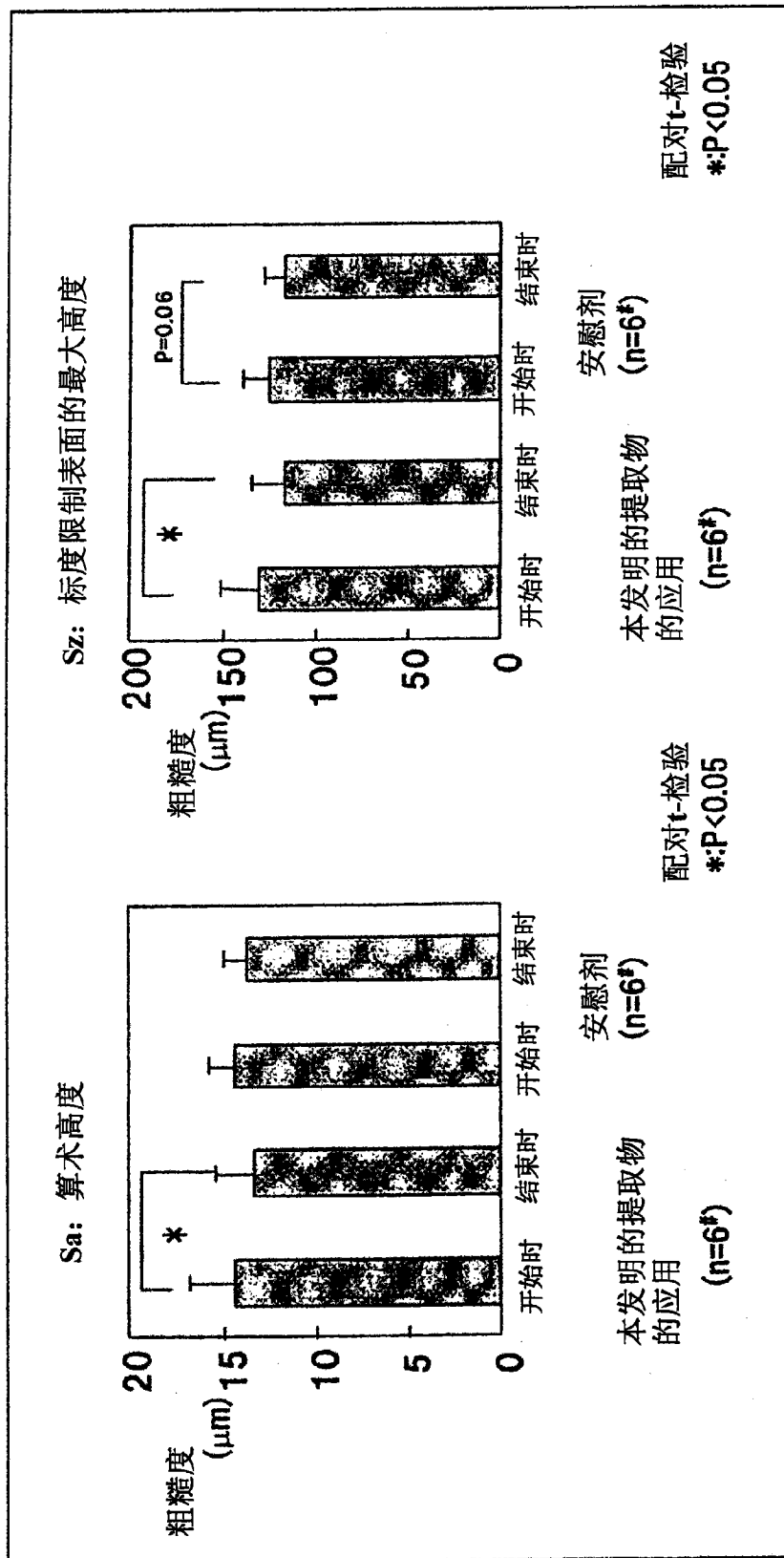


图 5