

证书号第 1095183 号



发明专利证书

发明名称: 来自佛手柑果的植物复合物、制造方法及作为膳食补充剂和在制药领域中的应用

发明人: 朱塞佩·隆巴尔多; 多梅尼科·马拉拉; 温琴佐·莫拉斯

专利号: ZL 2009 8 0145544. 4

专利申请日: 2009 年 11 月 13 日

专利权人: 草本植物与抗氧化剂衍生物有限公司

授权公告日: 2012 年 12 月 05 日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查, 决定授予专利权, 颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年, 自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 11 月 13 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的, 专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长

田力普



(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102215853 B

(45) 授权公告日 2012.12.05

(21) 申请号 200980145544.4

A61P 3/06(2006.01)

(22) 申请日 2009.11.13

A61P 39/06(2006.01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

RM2008A000615 2008.11.17 IT

GARDANA CLAUDIO ET AL. Evaluation of flavonoids and furanocoumarins from

(85) PCT申请进入国家阶段日

Citrus bergamia (Bergamot) juice and

2011.05.16

identification of new compounds.《MOLECULES

(86) PCT申请的申请数据

(BASEL, SWITZERLAND)》.2008, 第13卷(第9

PCT/IB2009/055060 2009.11.13

期), 2220-9.

(87) PCT申请的公布数据

审查员 张婷

W02010/055490 EN 2010.05.20

(73) 专利权人 草本植物与抗氧化剂衍生物有限公司

地址 意大利卡拉布里亚区波利斯泰纳市

(72) 发明人 朱塞佩·隆巴尔多

多梅尼科·马拉拉 温琴佐·莫拉斯

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

31002

代理人 王洁

(51) Int. Cl.

A61K 36/752(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

来自佛手柑果的植物复合物、制造方法及作为膳食补充剂和在制药领域中的应用

(57) 摘要

本发明涉及从佛手柑果 (bergamot fruit) 白软皮 (albedo) (Citrus Bergamia Risso & Poiteau) 获得的植物复合物, 其生产方法和应用, 尤其处于干提取物形式, 用作脂血 (lypemic) 和血糖 (glycemic) 类型的代谢不平衡的正常化药物, 在具有发炎或退行特征的皮肤疾病的治疗中, 作为止痛 / 消炎剂, 作为抗肿瘤剂和膳食补充剂。

1. 一种用于从佛手柑果生产植物复合物的方法,其特征在于,包括下列步骤:
 - a) 研磨没有外层表皮层和柑橘外皮的佛手柑果,从而获得混合物;
 - b) 用酶接种所述混合物以降解果胶;
 - c) 从步骤 b) 获得的所述混合物的果肉含量的值降低至低于 0.5%;
 - d) 失活在所述步骤 b) 中引入的所述酶;
 - e) 用具有 30000 道尔顿截留分子量的膜超滤所述的混合物,从而获得澄清的溶液;
 - f) 将所述的澄清的溶液加入到含有聚苯乙烯吸附树脂的柱子上以吸附多酚;
 - g) 用水在 30℃-50℃ 的温度洗涤具有吸附的多酚的所述柱子,使用碱金属氢氧化物,将 pH 升高至 12-14 之间的值,从而获得第一洗脱液;
 - h) 将所述第一洗脱液通过阳离子树脂,然后通过将 pH 降低至低于 3.0 的值进行回收,从而获得所述第二洗脱液;
 - i) 干燥所述第二洗脱液直至产生处于干提取物形式的来自佛手柑果的植物复合物。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,其中所述的使用的佛手柑果属于栽培品种 Femminello、Fantastico 和 / 或 Castagnaro。
3. 根据前述权利要求至少之一所述的方法,其特征在于,其中在所述步骤 b) 中所述酶是果胶类型的。
4. 根据前述权利要求至少之一所述的方法,其特征在于,其中在所述步骤 e) 中所述使溶液变得澄清的行为通过用膨润土处理或通过自然沉降而发生。
5. 根据前述权利要求至少之一所述的方法,其特征在于,其中在所述步骤 i) 中干提取物具有残留湿度 <14%。
6. 根据前述权利要求至少之一所述的方法,其特征在于,其中在所述步骤 i) 后,所述干提取物进行研磨,或进一步进行加工。
7. 从根据权利要求 1 所述的方法的步骤 h) 获得的洗脱液。
8. 从如在权利要求 1-6 至少之一中所要求的方法获得的植物复合物。
9. 根据权利要求 8 所述的植物复合物,其特征在于,处于干提取物形式,显示具有不低于 250g/kg 的圣草酚-7-0-新橙皮糖甙、柚皮苷和新橙皮甙的最小浓度。
10. 具有抗血脂代谢紊乱和降血糖效果的药物组合物,其特征在于,含有根据权利要求 7 所述的洗脱液和,或根据权利要求 8 所述的植物复合物,以及药学上可接受的添加剂。
11. 药物组合物,其特征在于,含有活性剂根据权利要求 7 所述的洗脱液和,或根据权利要求 8 所述的植物复合物。

来自佛手柑果的植物复合物、制造方法及作为膳食补充剂 和在制药领域中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及从佛手柑果白软皮获得的植物复合物 (phytoextract) (尤其干提取物),其生产方法和在制药领域中和作为膳食补充剂的应用。如果通过口服途径施用,植物复合物具有对血液中胆固醇水平、甘油三酯和血糖施加正常化和控制作用并随之发生强同质 (atherogenic) 作用的特性。这种作用的效果显得更加有趣,因为与在人有机体中与高血糖和肥胖 (代谢症候群) 相关的临界因子的存在直接成比例。此外,在实验动物中,植物复合物施加抗氧化 / 消炎作用,在口服后连同止痛效果一起出现,以及,对于局部使用,在已经引起皮肤炎症的区域涂敷后出现。最后,从对培养基中的肿瘤系上进行的研究,植物复合物显示出抑制细胞增殖的持续活性。

背景技术

[0002] 佛手柑 (Citrus Bergamia Risso & Poiteau) 是一种基本上只生长在卡拉布里亚 (Calabria) 有限区域的柑橘类水果,已知其 3 个主要品种分别称为 Femminello、Fantastico 和 Castagnaro。

[0003] 已知在 Calabrese 柑橘类水果中,佛手柑代表了一种特别珍贵的利基产品 (niche product)。事实上,这种柑橘类水果生长在雷焦卡拉布里亚 (Reggio Calabria) 省境内的有限地带,从第勒尼安 (Tyrrhenian) 南面跨越墨西拿海峡 (Messina strait) 地区到 Jonic 南面。因此,长不超过 150 公里的地带,从雷焦卡拉布里亚的更严格说来海岸地区延伸至腹地的前山地区。截至目前,因为精油的特性,佛手柑已经得到专门使用,因为赋予专有香味在香料中特别需要,其仍然使用用于由最著名的香水企业制备几种香水和用于生产 "Acqua di Colonia" 的基本成分。这种油是通过剥离佛手柑果皮的最外面部分 (表皮 (cuticola)) 获得的。

[0004] 还已知,佛手柑具有显著的防腐特性,从而数年来,一种佛手柑衍生物, Bergamon, 已经生产并使用作为手术室的消毒剂。此外,从传统医学上,佛手柑提取物的令人放松的性能和营养性能是众所周知的。最后,使用佛手柑香精的水醇溶液用于制备某些产品 (特别是具有 "Bergarytal" 名称的产品),已被建议作为喷剂,赋予皮肤消肿作用以及在驱蚊中特别有效。但是,佛手柑香精的某些组分,例如佛手柑内酯 (bergaptene),可能显示毒性作用,这一发现通过为精油提取物的安全使用而要求远离这种化合物的规定限制了其应用。

[0005] 文献 Gardana Claudio et al " Evaluation of flavonoids and furanocoumarins from Citrus Bergamia (Bergamot) juice and identification of new compounds " MOLECULES (BASEL, SWITZERLAND) 2008, vol. 13, NO. 9, 18 September 2008 (2008-09-18), pages 2220-2228 只针对佛手柑果汁样本中类黄酮 (flavonoids) 和呋喃香豆素 (furanocoumarins) 的含量的研究。

[0006] WO2008/061536 (COSMEDICAL APS [DK]) 描述了,除其它外,用于治疗眼部疾病的组

合物,也含有生物类黄酮(bioflavonoids),以及从佛手柑中提取这种生物类黄酮的方法。这种方法不使用果胶酶或用阳离子树脂分离,没有提及所获得的产物的呋喃香豆素的含量。

[0007] Mandalari Giuseppina et al " Enzymatic hydrolysis of flavonoids and pectic oligosaccharides from bergamot(Citrus bergamia Risso)peel " Journal of Agricultural and Food Chemistry, American Chemical Society, Washington, US vol. 54, Nr. 21 1 October 2006 pages 8307-8313 描述了从佛手柑果的果皮开始的类黄酮和其它化合物的提取,果皮被认为是香精油企业的副产品。

[0008] Gattuso Giuseppe et al " Flavonoid glycosides in bergamot juice(Citrus bergamia Risso) " Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol 54, Nr. 11, May 2006 描述了基于区分包含在已经用去甲基甲酰胺(dymethylformamide)即在医疗和/或美容产品中没有找到用处的溶剂处理的具有产业原点(industrial origin)的佛手柑果汁中的两个黄酮苷类化合物(glycosidates flavonoids)的唯一目的而发展的研究。

发明内容

[0009] 本发明的发明人令人惊讶地发现,从佛手柑果,特别是从白软皮,有可能获得通过积极影响新陈代谢活动以及正常化由这些病变影响的对象的脂和血糖水平而显示巨大治疗作用的浓缩的植物复合物。白软皮,在柑橘类水果中,是位于包括柑橘外皮(flavedo)的表皮和果肉之间的部分,由管状结构的形成实际网络的细胞形成,大部分组织体积压缩在细胞间空间中。可获得的优选处于干提取物形式的植物复合物,由于特定的提取和纯化工艺,在其组分中存在水果中的被认为是潜在毒性物质的呋喃香豆素(Bergaptene 和 Bergamottine)大幅减少(至接近消除),同时保持甚至增加所描述的治愈作用。

[0010] 因此,本发明的目的是权利要求1要求的方法。

[0011] 该方法将在下文更好地进行描述。

具体实施方式

[0012] 步骤a(研磨部分去油的水果)

[0013] 水果,没有最外面部分(柑橘外皮(flavedo)),并部分去油以去除外层表皮层(outer cuticle),优选通过研磨机绞碎成长度上尺寸小于1cm的小条。

[0014] 步骤b(降低果胶含量)

[0015] 在从第1点获得的混合物中,接种易于降解果胶的酶,果胶酶(pectolytic enzymes),在20-40分钟,优选30分钟,温度取决于所用的酶,获得了具有更加流动性的产物,因此是更好可加工的。

[0016] 步骤c(从液体部分分离纤维部分):

[0017] 有利的,利用顺序通过倾析器(decanter)和离心机的手段,降低第2点的产物至残余果肉含量低于0.5%。

[0018] 步骤d(失活果胶酶):

[0019] 这样的结果将在第C点的液体巴斯德消毒后获得,巴斯德消毒将具有通过蒸发消除残留香精油的绝大部分的副效应。

[0020] 步骤e(使水溶液澄清):

[0021] 这通过在装有等于12.000道尔顿分子量的选择性的半透膜(PM低于12.000道尔顿的颗粒通过该膜)的设备中的超滤工艺获得。本方法的变体,其中通过用膨润土处理的手段发生使澄清作用,这也是可能的,并构成本发明的一部分。

[0022] 步骤f(清澈溶液在含有聚苯乙烯吸附树脂的柱子上的吸附):

[0023] 从剩余溶液中分离多酚通过将多酚捕获在具有直径在100-150埃(Angstrom)的孔的聚苯乙烯吸附树脂(例如SEPE Ξ ABEAD SP 207 Mitsubishi)的孔中获得。根据本发明的方法的变体,多酚也可以用乙醇或甲醇与醋酸以3:1的比例混合的混合物进行提取,通过随后的溶剂浓缩(例如通过蒸发和随后的干燥)进行回收。

[0024] 步骤g(第f点的捕获在树脂的孔中的多酚部分的回收并同时降低呋喃香豆素值高达400毫克/每公斤干产物):

[0025] 在用40°C热水进行树脂的外部洗涤后,为了消除步骤5的溶液中含有的糖和酸,多酚部分的回收这样进行,打开具有圆形空间分布特征的这些有机化合物,从而呈现线性形状,从而从捕获在其中的孔中释放。这种效果是通过升高pH值高达强碱性(pH12-14)获得的。这通过使用也会降解bergaptene和Bergamottine的碱性金属的氢氧化物有利地发生。如果不是使用碱性溶液,而是使用乙醇或甲醇,可以获得同等效果。在这种情况下,将无法获得bergaptene和Bergamottine的降解。

[0026] 步骤h(水相中植物复合物的化学稳定性):

[0027] 多酚在其(打开的)线性形式是极其不稳定的,因为它们往往是氧化现象的对象。必须在非常短的时间内将它们重新形成环形形状。这样的结果通过将pH从值14降低至强酸性值(约pH3)获得。这种效果是通过从溶液中减少阳离子K⁺、Na⁺等等获得的。这通过使用强阳离子树脂(例如Relite CF H⁺ Mitsubishi)发生。这些用阳离子氢(H⁺)取代存在的阳离子。操作效果是溶液酸化至pH=3,以及使用的碱性氢氧化物的阳离子的减少。结果是在营养方面具有更多价值的产物。

[0028] 步骤i(产物的物理稳定性;"干燥"):

[0029] 这通过去除水的手段获得,有利地通过高真空蒸发,然后在低于60°C的温度中直至完全干燥(即获得低于14%的残余湿度)。在这样的湿度值,任何类型的有机污染物(酵母菌,细菌等)的增值受到抑制。获得了干燥的产物。

[0030] 需要强调,提取和纯化工艺允许以剧烈的方式减少含有的呋喃香豆素(bergaptene和Bergamottine),其代表了由于它们的潜在毒性的特征导致的问题,但是只在皮肤水平发现,并以比在果汁中发现的那些高得多的剂量。

[0031] 本发明的植物复合物,处于干提取物的形式,看起来像非常精细的、水溶性的粉末,带有黄-棕色,具有特征性的香气和苦味。它可以被封装,放进封膜中,与油混合用于包装面霜等,并因此与药物上相容的赋形剂形成制剂,通常是膳食补充剂的制剂。

[0032] 本发明的另一目的是植物复合物,优选处于干提取物形式,可根据本发明的方法从佛手柑果的白软皮中获得。

[0033] 本发明的发明人还发现-且这也形成本发明的目的-植物复合物可用于临床实践和/或作为膳食补充剂,因为它在营养物质(叶酸,维生素等)和抗氧化剂(特别是类黄酮)之间具有有利的比例,允许其用作抗血脂代谢紊乱(antidislipidemic)和抗同质

(antiaterogeneous) 剂。基于佛手柑干提取物的组合物作为抗血脂代谢紊乱和,或抗同质和,或消炎/止痛的局部或全身药物和,或含有本发明的植物复合物的抗肿瘤剂,有利地处于干提取物形式,与在药学中通常使用的添加剂和/或载体一起,也是本发明的目的。

[0034] 组合物可以以液体形式或其它形式,冻干、颗粒、粉末进行使用。已经证明植物复合物,如果采用局部途径涂敷,对具有发炎特征的皮肤病变实施其治疗作用,在实验动物中在全身施用后具有消炎/止痛作用,对培养基中的人肿瘤细胞具有抑制增殖作用。有利地,建议剂量范围从 20 至 40 毫克/公斤体重,优选 30 毫克/公斤体重。

[0035] 本发明的其它目的是膳食补充剂,基于本发明的植物复合物,作为在抗血脂代谢紊乱和,或抗同质类型的治疗中和,或用于血管保护的佐剂。

[0036] 本发明的植物复合物是一种天然来源的产物,用于膳食补充或药物应用,通过由其内含有的多酚部分施加的抑制已在肠胃水平的胆固醇前体的吸收,以及抑制 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶在哺乳动物中的活性的联合作用的手段,施加正常化血液中的胆固醇水平、脂肪和血糖的作用。

[0037] 此外,在研究根据本发明的植物复合物的效果中,发现在实验动物中,通过证明缺乏毒性效果,主要血液生化学 (hematochemical) 指标 (全血球计数、肝转氨酶和高肌酸血症 (hypercreatininemia)) 在正常范围的绝对保持。这些数据通过在处理的动物中在死后用显微镜检查在肝和肾水平脂肪变性 (steatotic) 或坏死 (necrosis) 现象的缺乏进行了证实。此外,脑组织及周围神经的组织病理学 (histopathological) 分析证明了诱导的轴突病变 (axonopathies) 或髓鞘质病 (myelinopathies) 的缺乏。植物复合物的毒性研究具有以下结果:“根据现行法律框架,毒理学分析没有显示毒性因子”。特别是,加上普通柑橘类水果的污染物缺乏的情况,发现只要重金属、杀虫剂、多氯联苯、亚硝酸盐、硝酸盐、染料、霉菌存在,除去赭曲霉毒素 (ochratoxins)、细菌内毒素、厌氧细菌和霉菌缺乏外,还考虑到病理值或正常参考值以外的任何值的缺乏。从取自豚鼠的器官 (肝、肾) 的检查中,注意到在口服施用中相当于 80mg./Kg 体重/天的施用没有毒性效果。

[0038] 需要强调,碱金属氢氧化物的使用,尤其 KOH,大大降低存在的呋喃香豆素的量,所获得的植物复合物从功能方面看起来更加浓缩。

[0039] 本发明的植物复合物目标的特征是具有处于以下百分比的主要生物类黄酮的多酚物质的生物单一性:

[0040]	圣草酚-7-0-新橙皮糖甙 (Neohesperidin)	29.6 % +/- 6.0
	柚皮苷 (Naringin)	32.4 % +/- 4.0
	新橙皮甙 (Neohesperidin)	38.0 % +/- 6.0
	总计	100.0%

[0041] 根据本发明,在本方法的步骤 i) 后,获得了植物复合物,处于干提取物形式,其具有不低于 250gr/kg 即 25% 的圣草酚-7-0-新橙皮糖甙、柚皮苷和新橙皮甙的最小浓度。此外,指的是 Bergapten 和 Bergamottin 的呋喃香豆素在量上不超过 400mg/kg。

[0042] 不同于市场上的类黄酮的提取物的最大部分,在室温 (20°C),除了乙醇外,本发明的植物复合物在水中也是极度可溶的。干提取物的分析进一步显示与佛手柑果汁中含有的物质的等价性。

[0043] 例子

[0044] 植物复合物的效果在患有原始家族性高胆固醇血症 (primitive familial hypercholesterolemia) 并伴随有或没有高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia) 的 100 例病人身上进行了测试。病人在两性 (48 名男性和 52 名女性) 之间,年龄在 45-70 岁之间以平衡方式随机分组。根据由国家卫生研究所 (NHI, National Health Institute) 的国家胆固醇教育计划 (NCEP ATP III) 确定的风险等级,关于血胆固醇低密度脂蛋白水平 (hematic cholesterol LDL level, cLDL), 对病人进行了分类。对所有对象施用 500mg/die 的药丸,为期 30 天。用于提取植物复合物的植物类型是 Citrus Bergamia Risso and Poiteau, 使用了来自栽培品种 Castagnaro, Femminello 和 Fantastico 的水果。治疗持续了 1 个月。同时服用他汀类药物 (statine) 或其它抗血脂代谢紊乱药物的病人 (总人数中 32 例) 被邀请继续已经开始的治疗。在治疗结束时,植物复合物起作用后,对象被连续观察 30 天。所获得的数据显示如下结果:

[0045] 1) 在所有对象中,注意到在总胆固醇和低密度脂蛋白中有 20 至 32% 的血浆水平的减少,在高密度脂蛋白胆固醇水平 (HDL cholesterol levels) 具有 30% 的平均增加。

[0046] 2) 患有家族性高胆固醇血症的对象,只用饮食治疗,具有 230 至 280mg/dl 胆固醇的基础血浆水平,显示出 34±4% 的总胆固醇水平、32±5 的 LDL 胆固醇水平的减少,以及 28±3% 的 HDL 胆固醇水平的增加。

[0047] 3) 患有家族性高胆固醇血症的对象,只用饮食治疗,具有 200 至 230 的基础总胆固醇水平,具有 28±4% 的总胆固醇血浆水平、22±2% 的 LDL 胆固醇水平的减少,以及 24±5% 的 HDL 胆固醇水平的增加。

[0048] 4) 已经服用 statine 的两个在先组的对象具有 20±3% 的总胆固醇血浆水平和 20±4% 的 LDL 胆固醇水平的额外的减少,以及 15±3% 的 HDL 胆固醇水平的增加。

[0049] 5) 具有血脂代谢紊乱 (高胆固醇血症和高甘油三酯血症) 的混合形式的检测对象,占总数的 40% (100 中 40), 平均具有 38±6% 的甘油三酯的血浆水平的减少。

[0050] 6) 抗血脂代谢紊乱效果,持续至在中断植物复合物摄取后第 60 天依旧非常好,平均总胆固醇等于治疗前地基础值的 20±2%。

[0051] 7) 在测试结束时,通过血管回波多普勒检测手段,检查了血管反应性,结果是与对照参数相比,在所有治疗的病人中,平均改善 34±5%。

[0052] 8) 注意到关于测试对象的性别和年龄方面在反应上没有很大差别。此外,通过临床检查或通过血液生化学检查的手段,除了在对象中在压力和血糖水平有较好的降低,即血糖代谢 (21%) 或高血压 (总数的 24%) 的改变,以外,治疗不会引起主要器官功能参数的副作用或病理变化。

[0053] 9) 另外的影响在实验动物 (Wistar 大鼠) 上进行了研究,其中痛苦的炎症反应是通过在动物腿中施用角叉胶 (carragenine) 来诱导的。在这些动物中,无论是局部还是全身涂敷佛手柑植物复合物均导致水肿性 (oedematogenous) 发炎的局部区域反应的减少和由角叉胶诱导的痛觉过敏的减少。

[0054] 10) 最后,将本发明的植物复合物和人星形细胞瘤细胞在培养基中孵育减少了细胞的增殖,暗示在抗肿瘤意义上的潜在用途。