

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02014/136681**

発行日 平成29年2月9日 (2017.2.9)

(43) 国際公開日 **平成26年9月12日 (2014.9.12)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 2 3 L 33/10 (2016.01)</b>	A 2 3 L 1/30 B	4 B 0 1 7
<b>A 2 3 L 2/52 (2006.01)</b>	A 2 3 L 2/00 F	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 K 31/7048 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7048	4 B 1 1 7
<b>A 6 1 P 9/14 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/14	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 9/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/12	4 C 0 8 8
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 37 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2015-504277 (P2015-504277)	(71) 出願人	000214191 長崎県 長崎県長崎市江戸町2番13号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/055080	(71) 出願人	504205521 国立大学法人 長崎大学 長崎県長崎市文教町1-14
(22) 国際出願日	平成26年2月28日 (2014.2.28)	(71) 出願人	505225197 長崎県公立大学法人 長崎県佐世保市川下町123番地1
(31) 優先権主張番号	特願2013-47321 (P2013-47321)	(71) 出願人	504145342 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
(32) 優先日	平成25年3月8日 (2013.3.8)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 水溶性フラボノイド組成物、これを含有する飲料、食品、医薬品、化粧品及び水溶性フラボノイド組成物の製造方法

## (57) 【要約】

容易に調製でき、かつ水への溶解性に優れる水溶性フラボノイド組成物を提供する。フラバノン配糖体と茶ポリフェノールとを含有する水溶性フラボノイド組成物である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

フラバノン配糖体と茶ポリフェノールとを含有する水溶性フラボノイド組成物。

## 【請求項 2】

前記フラバノン配糖体と前記茶ポリフェノールとの会合体を含有する、請求項 1 に記載の水溶性フラボノイド組成物。

## 【請求項 3】

前記茶ポリフェノールは、カテキン、プロトシアニジン、フラボノール配糖体及び紅茶ポリフェノールから選択される 1 種以上である請求項 1 又は 2 に記載の水溶性フラボノイド組成物。

10

## 【請求項 4】

前記フラバノン配糖体はヘスペリジンであり、前記茶ポリフェノールは少なくともテアシネンシン A を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の水溶性フラボノイド組成物。

## 【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の水溶性フラボノイド組成物を含有する飲料。

## 【請求項 6】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の水溶性フラボノイド組成物を含有する食品。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の水溶性フラボノイド組成物を含有する医薬品。

20

## 【請求項 8】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の水溶性フラボノイド組成物を含有する化粧品。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の水溶性フラボノイド組成物の製造方法であって、前記フラバノン配糖体を含有する原料 a と前記茶ポリフェノールを含有する原料 b とを揉捻して混合揉捻物を得る揉捻物調製工程と、前記混合揉捻物を抽出溶媒に浸漬する抽出工程と、を備える水溶性フラボノイド組成物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

30

本発明は、水溶性フラボノイド組成物、これを含有する飲料、食品、医薬品、化粧品及び水溶性フラボノイド組成物の製造方法に関する。

本願は、2013年3月8日に日本に出願された特願2013-47321号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

## 【背景技術】

## 【0002】

フラバノン配糖体はミカン等の柑橘類に多く含まれており、脂質の酸化防止作用等を有することが知られている。

中でもヘスペリジンは、血管強化、血圧低下、コレステロール低減、中性脂肪低減及び血流改善作用等の効能が認められているフラバノン配糖体である。しかし、ヘスペリジンは、水に溶けにくいいため、生体内への吸収性が低く、効果が発揮されにくいという問題がある。

40

## 【0003】

こうした問題に対し、例えば、ヘスペリジンに D - グルコース残基が等モル以上結合している - グリコシルヘスペリジンが提案されている（特許文献 1）。特許文献 1 の発明は、ヘスペリジンの一部にグルコースを結合させ、酵素処理することによって、水溶性を付与するものである。

特許文献 1 の発明においては、ミカンからヘスペリジンを抽出する抽出工程と、ヘスペリジンを糖転移する糖転移工程とにより製造される。抽出工程では、未熟ミカンエキスをエタノール溶液中に浸漬し、ヘスペリジンを溶出する。糖転移工程では、ヘスペリジン及びデキ

50

ストリンを含有する水溶液中で、70、18時間の酵素（シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ）処理を施し、次いで、酵素を加熱失活させる。糖転移工程を経ることで、ヘスペリジンにグルコースが結合し、 $\alpha$ -グルコシルヘスペリジンが得られる。その後、糖転移工程で生じた特異な風味をなくすために、55、5時間の酵素（グルコアミラーゼ）処理を施し、エタノール濃度を段階的に高めながら濾過し、乾燥する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平3-7593号公報

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、特許文献1の発明は、製造工程が煩雑であり、かつ歩留が低いためにコスト高である。加えて、特許文献1の発明では、廃液処理等の問題がある。

そこで、本発明は、容易に調製でき、かつ水への溶解性に優れた水溶性フラボノイド組成物を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは鋭意検討した結果、フラバノン配糖体と茶ポリフェノールとを含有する水溶性フラボノイド組成物が、水への溶解性に優れたことを見出し、本発明に至った。

20

【0007】

即ち、本発明の一実施態様に係る水溶性フラボノイド組成物は、フラバノン配糖体と茶ポリフェノールとを含有することを特徴とする。

【0008】

本発明の一実施態様に係る水溶性フラボノイド組成物は、前記フラバノン配糖体と前記茶ポリフェノールとの会合体を含有する。

【0009】

本発明の一実施態様に係る水溶性フラボノイド組成物は、前記茶ポリフェノールが、カテキン、プロトシアニジン、フラボノール配糖体及び紅茶ポリフェノールから選択される1種以上である。

30

【0010】

本発明の一実施態様に係る飲料は、前記フラバノン配糖体はヘスペリジンであり、前記茶ポリフェノールは少なくともテアシネンシンAを含む。

【0011】

本発明の一実施態様に係る飲料は、前記の本発明の水溶性フラボノイド組成物を含有する。

【0012】

本発明の一実施態様に係る食品は、前記の本発明の水溶性フラボノイド組成物を含有する。

40

【0013】

本発明の一実施態様に係る医薬品は、前記の本発明の水溶性フラボノイド組成物を含有する。

【0014】

本発明の一実施態様に係る化粧品は、前記の水溶性フラボノイド組成物を含有することを特徴とする。

【0015】

本発明の一実施態様に係る水溶性フラボノイド組成物の製造方法は、前記水溶性フラボノイド組成物の製造方法であって、前記フラバノン配糖体を含有する原料aと前記茶ポリフェノールを含有する原料bとを揉捻して混合揉捻物を得る揉捻物調製工程と、前記混合

50

揉捻物を抽出溶媒に浸漬する抽出工程と、を備える。

【発明の効果】

【0016】

本発明の水溶性フラボノイド組成物によれば、容易に調製でき、かつ水への溶解性に優れる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】実施例2-1~2-4、比較例2-1の溶解量比を示すグラフである。

【図2】フラバノン配糖体と茶ポリフェノールとの会合状態を表した模式図である。

【図3】ヘスペリジンの構造を説明する図面である。

10

【図4】茶ポリフェノールの添加量に伴うヘスペリジンのケミカルシフト変化を示すグラフである。

【図5】紅茶熱水抽出物のHPLCチャートを示すグラフ図である。

【図6】紅茶熱水抽出物のHPLC溶出フラクションの添加量ごとのヘスペリジンのピーク面積を示すグラフ図である。

【図7】ヘスペリジン標品の溶解性に対する紅茶熱水抽出物ならびに各画分の影響を示すグラフ図である。

【図8】紅茶熱水抽出物の各フラクションの相互作用によるヘスペリジン溶解性への影響を示すグラフ図である。

【図9】LC-TOFMS分析によるヘスペリジン溶解性試験の結果を示すグラフ図である。

20

【図10】ヘスペリジンの化学構造を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

(水溶性フラボノイド組成物)

本実施形態の水溶性フラボノイド組成物は、フラバノン配糖体(以下、(A)成分とすることがある)と茶ポリフェノール(以下、(B)成分とすることがある)とを含有する。

水溶性フラボノイド組成物は、粉粒状、タブレット状等の固体でもよいし、液体でもよい。

30

【0019】

<(A)成分：フラバノン配糖体>

(A)成分はフラバノン配糖体である。(A)成分は、フラバノン骨格を有するフラボノイドに糖が結合した配糖体であり、例えば、ヘスペリジン、ナリルチン、ナリンギン、ネオヘスペリジン等が挙げられる。

(A)成分としては、例えば、未熟ミカン等の柑橘類から、公知の方法で抽出されたものが挙げられる。

【0020】

水溶性フラボノイド組成物中の(A)成分の含有量は、水溶性フラボノイド組成物の剤形に応じて適宜決定される。

40

【0021】

<(B)成分：茶ポリフェノール>

(B)成分は、茶ポリフェノールである。(B)成分としては、茶葉に含まれるポリフェノールあるいは茶葉から抽出されるポリフェノールであれば特に限定されない。茶葉としては、緑茶等の非発酵茶葉、紅茶やウーロン茶等の発酵茶葉等のいずれでもよい。

(B)成分としては、カテキン、プロトシアニジン、フラボノール配糖体及び紅茶ポリフェノールから選択される1種以上が好ましい。水溶性フラボノイド組成物は、これらの(B)成分を含有することで、(A)成分の水への溶解性のさらなる向上を図れる。

【0022】

(B)成分の供給源としては、カテキン、プロトシアニジン、フラボノール配糖体又は

50

紅茶ポリフェノール等の精製品でもよいし、例えば、紅茶抽出物である紅茶エキスや、緑茶抽出物である緑茶エキス等のエキスでもよい。

【0023】

(B)成分を含有することで(A)成分の水への溶解性が高まる理由は定かではないが、次のように推測される。

一般に(A)成分は、疎水性の部位(例えば、ヘスペリジンにおいてはヘスペレチン部分)同士が強固に会合して結晶を形成しているため、水への溶解性に劣る。(A)成分と(B)成分とを共存させると、(B)成分が(A)成分同士の会合部分を切り離し、(A)成分との会合体を形成する。そして、形成された会合体は、水への溶解性が高いため、(A)成分の水への溶解性を高められると考えられる。

10

【0024】

水溶性フラボノイド組成物中、(B)成分/(A)成分で表される質量比(以下、B/A比ということがある)は、特に限定されないが、例えば、1~100が好ましく、1超100以下がより好ましく、5~50がさらに好ましく、10~30が特に好ましい。B/A比が上記下限値未満では、(A)成分の水への溶解性が低下するおそれがあり、上記上限値超としても、(A)成分の水への溶解性のさらなる向上を図れないおそれがある。

【0025】

<任意成分>

水溶性フラボノイド組成物は、例えば、剤形等に応じて、(A)~(B)成分以外の任意成分を含有してもよい。

20

例えば、固形の水溶性フラボノイド組成物においては、造粒又は成形性を高める観点から、デンプン等のバインダーを含有してもよい。

【0026】

(製造方法)

水溶性フラボノイド組成物の製造方法は、剤形等に応じて適宜決定される。

例えば、(A)成分と(B)成分とを水に分散し混合して、液体の水溶性フラボノイド組成物を得たり、この液体の水溶性フラボノイド組成物を凍結乾燥等により乾燥して、固体の水溶性フラボノイド組成物を得る方法が挙げられる。

【0027】

あるいは、例えば、(A)成分を含有する原料(以下、原料aということがある)と、(B)成分を含有する原料(以下、原料bということがある)とから、水溶性フラボノイド組成物を得る方法が挙げられる。

30

【0028】

原料aと原料bとから水溶性フラボノイド組成物を得る製造方法の一例について、以下に説明する。

本例の水溶性フラボノイド組成物の製造方法は、原料aと原料bとを揉捻して混合揉捻物を得る工程(揉捻物調製工程、揉捻工程)と、混合揉捻物から水溶性フラボノイド組成物を抽出する工程(抽出工程)とを備える。

【0029】

<揉捻物調製工程>

揉捻物調製工程は、原料aと原料bとの混合揉捻物を得る工程である。

40

まず、原料aをスライスあるいは粉碎する等して小片とする。小片とした原料aを原料bに混合し、揉捻して(揉捻操作)、混合揉捻物を得る。

【0030】

原料aとしては、(A)成分を含有するものであればよく、例えば、ミカン、オレンジ、イヨカン、ポンカン、ブタン、ヒュウガナツ、ハッサク、ダイダイ、ナツミカン、グレープフルーツ、ユズ、カボス又はカラタチ等、柑橘類の果実が挙げられ、中でも、ミカンの果実が好ましく、未熟ミカンの果実がより好ましい。これらの原料aは、(A)成分の含有量が多いためである。

原料aは、青果でもよいし、乾燥物でもよく、中でも乾燥物が好ましい。乾燥物であれ

50

ば、揉捻操作において水分が揉み出されにくくなって、原料 a 中の ( A ) 成分が流失されにくくなる。

【 0 0 3 1 】

原料 b は、茶葉であり、茶生葉でもよいし、発酵茶葉でもよいし、これらが予め萎凋されたものでもよい。

原料 b は、原料 a と混合されるに際し、予め萎凋されていることが好ましい。予め萎凋された原料 b は、揉捻操作において水分が揉み出されにくくなって、原料 b 中の ( B ) 成分が流失されにくくなる。

萎凋された原料 b の水分量は、例えば、45 ~ 65 質量% が好ましい。水分量は 45 ~ 60 質量% であってもよい。

10

【 0 0 3 2 】

揉捻方法としては、特に限定されず、例えば、原料 b を任意の時間揉捻し、次いで、原料 a を加えて揉捻してもよいし、予め原料 a と原料 b とを仕込み、これを揉捻してもよい。

【 0 0 3 3 】

原料 b / 原料 a で表される質量比 ( 以下、b / a 比ということがある ) は、原料 a 及び原料 b の水分量等を勘案して決定される。例えば、原料 a が青果で、原料 b が茶生葉であれば、b / a 比は、1 ~ 10 が好ましく、2 ~ 8 がより好ましく、3 ~ 6 がさらに好ましい。b / a 比が上記下限値未満では、得られる水溶性フラボノイド組成物の水に対する溶解性が低下するおそれがあり、上記上限値超としても、水溶性フラボノイド組成物の水に対する溶解性のさらなる向上を図れないおそれがある。また、例えば、原料 b として茶、原料 a として未熟ミカンを用いる場合、茶の量に対して未熟ミカンを 10 ~ 50 重量% 添加してもよい。さらに、茶の量に対して未熟ミカンを 21 ~ 30 重量% 添加してもさらによい。

20

【 0 0 3 4 】

揉捻操作における原料の温度は、例えば、20 ~ 40 とされる。

揉捻操作の時間は、例えば、10 ~ 60 分間が好ましく、15 ~ 25 分間がより好ましい。

【 0 0 3 5 】

揉捻物調製工程は、揉捻操作の後、発酵操作を行う工程 ( 発酵工程 ) を備えてもよい。

30

発酵操作においては、混合揉捻物を数 cm の厚さに堆積させた状態で、温度 20 ~ 27、湿度 30 ~ 60 % RH の発酵室内等の環境下に静置する。

発酵操作の時間は、例えば、0 ~ 4 時間とされる。なお、揉捻操作の開始と同時に原料 a 又は原料 b の発酵が開始する場合がある。その場合、発酵が早めに行われることを考慮すると、発酵操作の時間は、例えば 0 ~ 1 時間であってもよい。

【 0 0 3 6 】

加えて、揉捻物調製工程は、揉捻操作の後 ( 発酵操作を備える場合には、発酵操作の後 ) に、乾燥操作を備えてもよい。乾燥操作を備えることで、混合揉捻物中の酸化酵素 ( ポリフェノールオキシダーゼ等 ) を失活させ、水分量を低減させて、混合揉捻物の品質安定性を高められる。

40

乾燥操作は、例えば、連続式乾燥機に原料を投入し、これに温度 80 ~ 120 の熱風を吹き込み、排気温度が 50 ~ 60 となるように操作する。乾燥操作の時間は、特に限定されず、例えば、10 ~ 60 分間とされる。

乾燥操作後の混合揉捻物の水分量は、例えば、5 質量% 以下が好ましい。

【 0 0 3 7 】

< 抽出工程 >

抽出工程は、揉捻物調製工程で得られた混合揉捻物から、水溶性フラボノイド組成物を抽出する工程である。

抽出工程としては、例えば、混合揉捻物を抽出溶媒に浸漬し、任意の温度で加熱して、抽出溶媒に水溶性フラボノイド組成物を抽出して、液体の水溶性フラボノイド組成物を得

50

る方法が挙げられる。

【0038】

抽出溶媒としては、例えば、水、炭素数1～6の低級アルコール及びこれらの混合液等が挙げられる。

抽出工程における加熱温度は、特に限定されず、例えば、20～100 が好ましい。

抽出時間は、特に限定されず、例えば、3～30分間が好ましい。

【0039】

抽出工程の後、液体の水溶性フラボノイド組成物を乾燥して、固体の水溶性フラボノイド組成物としてもよい。乾燥方法としては、例えば、凍結乾燥法等が挙げられる。

【0040】

(飲料)

本実施形態の飲料は、水溶性フラボノイド組成物を含有するものである。

例えば、混合揉捻物を水やエタノールに浸漬し、これを任意の温度で加熱したり、混合揉捻物を任意の温度の水やエタノールに浸漬して得られる抽出液が挙げられる。即ち、従来公知の茶の飲用方法と同様にして、本実施形態の飲料を得られる。

あるいは、液体又は固体の水溶性フラボノイド組成物を任意の飲料(例えば、清涼飲料水、アルコール飲料)に添加する方法が挙げられる。

【0041】

(食品)

本実施形態の食品は、水溶性フラボノイド組成物を含有するものである。

対象となる食品は、特に限定されない。例えば、上記した本実施形態の飲料に増粘多糖類やゼラチン等を加え、これを冷却して得られるゲル状食品等が挙げられる。

また、例えば、加工食品、菓子類等が挙げられる。

【0042】

(医薬品)

本実施形態の医薬品は、水溶性フラボノイド組成物を含有するものである。

フラバノン配糖体、特にヘスペリジンは、血管強化、血圧低下、コレステロール低減、中性脂肪低減及び血流改善作用等を有している。

従って、本実施形態の医薬品は、水溶性フラボノイド組成物を血管強化剤、血圧低下剤、コレステロール低減剤、中性脂肪低減剤、血流改善剤として含有するものが好ましい。

【0043】

医薬品中の水溶性フラボノイド組成物の含有量は、医薬品の剤形等を勘案して適宜決定される。

例えば、医薬品中の水溶性フラボノイド組成物の含有量は、1回の服用で、(A)成分500～2000mgを摂取できる量が好ましい。

【0044】

上述の通り、本実施形態の水溶性フラボノイド組成物は、水への溶解性に優れる。

加えて、本実施形態の水溶性フラボノイド組成物は、(A)成分と(B)成分とを混合したり、あるいは原料aと原料bとが揉捻された混合揉捻物から水等の抽出溶媒で抽出するという簡単な方法で得られる。

さらに、本実施形態の水溶性フラボノイド組成物は、水への溶解性に優れるため、生体内への吸収性を高められる。

【0045】

(化粧品)

本実施形態の化粧品は、水溶性フラボノイド組成物を含有するものである。対象となる化粧品は、特に限定されない。例えば、上記した本実施形態の水溶性フラボノイド組成物に水等の溶媒、又は各種の化粧品用添加物を加えた化粧品としてもよい。本実施形態の水溶性フラボノイド組成物は、水への溶解性に優れるため、生体内への吸収性を高められる。

【実施例】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

以下に、実施例を示して本実施形態を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 【 0 0 4 7 】

( 実施例 1 - 1 )

生茶葉 ( 原料 b ) 3 0 k g を萎凋して、水分量 5 0 質量 % の原料 b 1 9 k g を得た。萎凋後の原料 b 1 9 k g と、スライスした未熟ミカンの青果 ( 原料 a ) 1 0 k g とを混合し揉捻して、混合揉捻物を得た ( 揉捻操作 ) 。揉捻時間は 2 0 分間であり、揉捻温度は 3 5 であった。

揉捻操作の後、得られた混合揉捻物を温度 3 5 、湿度 6 5 % R H の発酵室内で、表 1 に示す発酵時間で発酵した ( 発酵操作 ) 。

発酵操作後、混合揉捻物に 1 0 0 の空気を 3 0 分間当てて、乾燥した ( 乾燥操作 ) 。

乾燥操作を施した混合揉捻物について、以下の抽出試験を行い、その結果を表 1 ~ 2 に示す。

なお、表中の溶出率は、下記 ( 1 ) 式により求められる値である。

## 【 0 0 4 8 】

溶出率 ( 質量 % ) = [ ミカン単位の溶出量 ] ÷ [ 原料 a の乾燥物 ( 1 0 0 m g ) 中のヘスペリジン量 ] × 1 0 0 . . . ( 1 )

[ ( 1 ) 式中、ミカン単位の溶出量は、後述する抽出試験で求められた溶出量 ( 混合揉捻物から溶出した ( A ) 成分の量 ( m g ) ) を、実施例 1 - 1、1 - 2 では 4 倍、実施例 1 - 3、1 - 4 では 2 倍した値である。 ]

## 【 0 0 4 9 】

< 抽出試験 >

水抽出

2 5 の水 1 0 0 m L に各例の混合揉捻物 1 0 0 m g を浸漬し、2 5 で 2 4 時間放置して、抽出液を得た。

得られた抽出液を 0 . 4 5 μ m メンブランフィルターでろ過し、ろ液中のヘスペリジン量を超高速液体クロマトグラフィー U F L C ( H P L C、株式会社島津製作所製 ) で測定した。1 試料につき 3 回測定し、得られた面積からヘスペリジンの溶出量を算出した。

H P L C の分析条件は、以下の通りである。なお、原料 a の乾燥物 ( 1 0 0 m g ) に含まれるヘスペリジン量は 2 0 . 8 m g であった。

## 【 0 0 5 0 】

[ 分析条件 ]

カラム . . . S h i m - p a c k C <sub>18</sub> ( 3 . 0 × 5 0 m m、株式会社島津製作所製 ) 。

移動相 A 液 . . . C H <sub>3</sub> C N : 1 0 m M リン酸 = 2 0 : 8 0 ( 体積比 ) 。

移動相 B 液 . . . C H <sub>3</sub> C N : 1 0 m M リン酸 = 3 0 : 7 0 ( 体積比 ) 。

グラジェント構成 . . . 移動相 A 液 : 移動相 B 液 = 1 0 0 : 0 ( 体積基準 ) を 7 分間で直線的に、移動相 A 液 : 移動相 B 液 = 0 : 1 0 0 ( 体積基準 ) とした。

流速 : 0 . 6 m L / 分。

カラム温度 : 4 0 。

検出波長 : 2 8 0 n m 。

## 【 0 0 5 1 】

熱水抽出

2 5 の水を 1 0 0 の水に換えた以外は、「 水抽出 」と同様にして抽出液を得、このろ液中のヘスペリジン量を測定した。

## 【 0 0 5 2 】

6 0 質量 % アルコール抽出

2 5 の水を 2 5 の 6 0 質量 % アルコールに換えた以外は、「 水抽出 」と同様にして抽出液を得、このろ液中のヘスペリジン量を測定した。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 5 3 】

( 実施例 1 - 2 )

揉捻時間を 4 0 分間とした以外は、実施例 1 - 1 と同様にして混合揉捻物を得た。  
得られた混合揉捻物について抽出試験を行い、その結果を表 1 ~ 2 に示す。

## 【 0 0 5 4 】

( 実施例 1 - 3 )

原料 a を 2 0 k g、原料 b を 2 0 k g として揉捻した以外は、実施例 1 - 1 と同様にして混合揉捻物を得た。

得られた混合揉捻物について抽出試験を行い、その結果を表 1 ~ 2 に示す。

## 【 0 0 5 5 】

( 実施例 1 - 4 )

揉捻時間を 4 0 分間とした以外は、実施例 1 - 3 と同様にして混合揉捻物を得た。  
得られた混合揉捻物について抽出試験を行い、その結果を表 1 ~ 2 に示す。

## 【 0 0 5 6 】

( 比較例 1 - 1 )

原料 a について抽出試験を行い、その結果を表 1 ~ 2 に示す。

## 【 0 0 5 7 】

【表 1】

	製造条件				水抽出		
	混合比率	揉捻時間 (min)	発酵時間 (h)	溶出量 (mg)	ミソ単位溶出量 (mg)	溶出率 (質量%)	
実施例1-1	原料a : 原料b =10kg : 30kg	20	0	0.50 ± 0.03	1.99 ± 0.13	9.56 ± 0.64	
			1	0.41 ± 0.03	1.64 ± 0.12	7.90 ± 0.59	
			2	0.45 ± 0.02	1.78 ± 0.07	8.56 ± 0.34	
			3	0.44 ± 0.03	1.74 ± 0.12	8.38 ± 0.59	
実施例1-2	原料a : 原料b =10kg : 30kg	40	0	0.37 ± 0.03	1.49 ± 0.11	7.15 ± 0.52	
			1	0.31 ± 0.06	1.26 ± 0.23	6.04 ± 1.10	
			2	0.36 ± 0.03	1.45 ± 0.12	6.96 ± 0.58	
			3	0.35 ± 0.02	1.40 ± 0.10	6.74 ± 0.46	
実施例1-3	原料a : 原料b =20kg : 20kg	20	0	0.37 ± 0.09	0.75 ± 0.18	3.60 ± 0.86	
			1	0.47 ± 0.05	0.95 ± 0.09	4.55 ± 0.45	
			2	0.45 ± 0.02	0.90 ± 0.05	4.33 ± 0.23	
			3	0.49 ± 0.09	0.98 ± 0.18	4.69 ± 0.85	
実施例1-4	原料a : 原料b =20kg : 20kg	40	0	0.44 ± 0.05	0.88 ± 0.10	4.22 ± 0.47	
			1	0.43 ± 0.09	0.86 ± 0.17	4.15 ± 0.83	
			2	0.48 ± 0.07	0.95 ± 0.15	4.57 ± 0.71	
			3	0.47 ± 0.07	0.94 ± 0.14	4.50 ± 0.69	
比較例1-1	原料aのみ	—	—	0.79 ± 0.03	0.79 ± 0.03	3.81 ± 0.13	

【表 2】

	熱水抽出			60質量%エタノール抽出		
	溶出量 (mg)	ミソ単位 溶出量(mg)	溶出率 (質量%)	溶出量 (mg)	ミソ単位 溶出量(mg)	溶出率 (質量%)
実施例1-1	1.82 ± 0.11	7.27 ± 0.44	34.9 ± 2.1	1.59 ± 0.30	6.37 ± 1.20	30.6 ± 5.8
	1.84 ± 0.12	7.34 ± 0.47	35.3 ± 2.3	1.56 ± 0.13	6.24 ± 0.53	30.0 ± 2.6
	1.57 ± 0.13	6.26 ± 0.52	30.1 ± 2.5	1.54 ± 0.17	6.14 ± 0.67	29.5 ± 3.2
実施例1-2	1.56 ± 0.29	6.23 ± 1.14	29.9 ± 5.5	1.51 ± 0.16	6.05 ± 0.64	29.1 ± 3.1
	1.33 ± 0.26	5.31 ± 1.05	25.6 ± 5.1	1.41 ± 0.20	5.63 ± 0.79	27.1 ± 3.8
	1.27 ± 0.07	5.07 ± 0.30	24.4 ± 1.4	1.35 ± 0.35	5.42 ± 1.41	26.0 ± 6.8
実施例1-3	1.23 ± 0.05	4.91 ± 0.20	23.6 ± 1.0	1.34 ± 0.11	5.35 ± 0.45	25.7 ± 2.2
	1.29 ± 0.01	5.15 ± 0.04	24.8 ± 0.2	1.31 ± 0.32	5.22 ± 1.26	25.1 ± 6.1
	2.07 ± 0.23	4.14 ± 0.46	19.9 ± 2.2	2.57 ± 0.21	5.13 ± 0.42	24.7 ± 2.0
実施例1-4	1.92 ± 0.32	3.85 ± 0.65	18.5 ± 3.1	2.55 ± 0.10	5.10 ± 0.21	24.5 ± 1.0
	2.15 ± 0.05	4.30 ± 0.10	20.7 ± 0.5	2.55 ± 0.07	5.10 ± 0.15	24.5 ± 0.7
	2.09 ± 0.23	4.19 ± 0.46	20.1 ± 2.2	2.53 ± 0.34	5.05 ± 0.68	24.3 ± 3.3
比較例1-1	2.08 ± 0.09	4.17 ± 0.17	20.0 ± 0.8	2.49 ± 0.24	4.97 ± 0.48	23.9 ± 2.3
	2.04 ± 0.29	4.08 ± 0.57	19.6 ± 2.8	2.51 ± 0.27	5.02 ± 0.53	24.2 ± 2.6
	2.16 ± 0.12	4.33 ± 0.24	20.8 ± 1.2	2.51 ± 0.13	5.01 ± 0.26	24.1 ± 1.2
	2.08 ± 0.13	4.16 ± 0.27	20.0 ± 1.3	2.54 ± 0.25	5.07 ± 0.49	24.4 ± 2.4
	1.99 ± 0.24	1.99 ± 0.24	9.57 ± 1.15	4.81 ± 0.11	4.81 ± 0.11	23.1 ± 0.5

表 1 ~ 2 に示すように、原料 a と原料 b とを揉捻した混合揉捻物を用いた実施例 1 - 1 ~ 1 - 4 は、原料 a のみを用いた比較例 1 - 1 に比べて、総じて溶出率を高められた。

ヘスペリジンの溶出率は、水抽出に比べて、熱水抽出又は 60 質量%エタノール抽出の方が高かった。ただし、熱水抽出と 60 質量%エタノール抽出とでは、ヘスペリジンの溶出率に大きな差は見られなかった。

実施例 1 - 1 と実施例 1 - 3 との比較、実施例 1 - 2 と実施例 1 - 4 との比較において、b / a 比が 3 である実施例 1 - 1、1 - 2 は b / a 比が 1 である実施例 1 - 3、1 - 4 に比べて溶出率が高まっていた。

#### 【0060】

(調製例 1 ~ 3) フラクション 1 ~ 3 の調製

以下の手順により、(B)成分(茶ポリフェノール)を含むフラクション 1 ~ 3 を調製した。

紅茶 20 g に 1 L の熱水 (95 ) を加えて 5 分間抽出し、これをろ過した。ろ液をロータリーエバポレータで濃縮し、これを凍結乾燥して、紅茶ポリフェノールを含む紅茶エキス 6.1 g を得た。水で充填した Sephadex LH-20 カラム (内径 3.0 cm x 長さ 20 cm) に紅茶エキス 4.8 g を付し、これを水 200 mL と、40 体積%メタノール 200 mL とで順次溶出して、糖、カフェイン、フラボノール配糖体を主成分とするフラクション 1 (Fr. 1) を得た。得られた Fr. 1 は 3.04 g (紅茶エキスの 63 質量%) であった。

Fr. 1 を溶出した後、60 体積%メタノール 200 mL と、80 体積%メタノール 200 mL とで順次溶出して、エピカテキン、エピガロカテキン、没食子酸を主成分とするフラクション 2 (Fr. 2) を得た。得られた Fr. 2 は 0.90 g (紅茶エキスの 19 質量%) であった。

Fr. 2 を溶出した後、100 体積%メタノール 200 mL と、60 体積%アセトン 200 mL とで順次溶出して、エピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、テアフラビン、テアフラビン-3-ガレート、テアフラビン-3'-ガレート、テアフラビン-3,3'-ジガレート、テアシネンシン A、テアシネンシン B、カテキン重合ポリフェノールを主成分とするフラクション 3 (Fr. 3) を得た。得られた Fr. 3 は 0.85 g (紅茶エキスの 18 質量%) であった。

#### 【0061】

(実施例 2 - 1)

1.5 mL エッペンドルフチューブに、ヘスペリジンの結晶の水懸濁液 (10 mg / mL) 0.2 mL を入れた。このエッペンドルフチューブに、紅茶エキス水溶液 (20 mg / mL、ヘスペリジン 2 mg に対して紅茶葉 53 mg に相当)、0.8 mL を加えた。

エッペンドルフチューブを密閉後、時々振り混ぜながら 80 で 10 分間加熱し、その後、室温 (25 ) で 2 時間放置した。

2 時間放置した後、遠心分離し、上清をメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過して試料とした。試料 10 μL を高速液体クロマトグラフィーで分析して、試料中のヘスペリジン量 (ピーク面積) を測定した。同様の操作を 3 回行って、その平均値をヘスペリジンの水への溶解量とした。

後述する比較例 2 - 1 における溶解量 (ピーク面積) に対する本例の溶解量 (ピーク面積) の比 (溶解量比) を求め、その結果を図 1 に示す。

高速液体クロマトグラフィーの分析条件は、以下の通りであった。

#### 【0062】

<分析条件>

カラム: Cosmosil 5C<sub>18</sub> ARII (4.6 x 250 mm)。

カラム温度: 35 。

移動相 C 液: 50 mM リン酸。

移動相 D 液: CH<sub>3</sub>CN。

グラジエント構成・・・移動相 C 液: 移動相 D 液 = 96 : 4 (体積基準) を 39 分間で

10

20

30

40

50

直線的に、移動相 C 液：移動相 D 液 = 70 : 30 (体積基準) とし、次いで、15 分間で直線的に、移動相 C 液：移動相 D 液 = 25 : 75 (体積基準) とした。

流速：0.8 mL / 分。

カラム温度：40。

検出方法：フォトダイオードアレイ検出 (Max absorbance)。

【0063】

(実施例 2 - 2)

紅茶エキス水溶液に換えて、Fr. 1 水溶液 (12.6 mg / mL) 0.8 mL を加えた以外は、実施例 2 - 1 と同様にして、溶解量比を求めた。その結果を図 1 に示す。

【0064】

(実施例 2 - 3)

紅茶エキス水溶液に換えて、Fr. 2 水溶液 (3.8 mg / mL) 0.8 mL を加えた以外は、実施例 2 - 1 と同様にして、溶解量比を求めた。その結果を図 1 に示す。

【0065】

(実施例 2 - 4)

紅茶エキス水溶液に換えて、Fr. 3 水溶液 (3.6 mg / mL) 0.8 mL を加えた以外は、実施例 2 - 1 と同様にして、溶解量比を求めた。その結果を図 1 に示す。

【0066】

(比較例 2 - 1)

紅茶エキス水溶液に換えて、水 0.8 mL を加えた以外は、実施例 2 - 1 と同様にして、ヘスペリジンの溶解量 (ピーク面積) を求め、その結果を図 1 に示す。

【0067】

図 1 は、比較例 2 - 1 のヘスペリジンのピーク面積に対し、実施例 2 - 1 ~ 2 - 4 におけるヘスペリジンのピーク面積を相対値で示したグラフである。

本実施形態を適用した実施例 2 - 1 ~ 2 - 4 は、(B) 成分を含有しない比較例 2 - 1 に比べて、ヘスペリジンの水への溶解量が多かった (即ち、水への溶解性に優れていた)。

中でも、(B) 成分として紅茶エキスを用いた実施例 2 - 1 において、ヘスペリジンの溶解量が最も多く、(B) 成分を含有しない比較例 2 - 1 におけるヘスペリジンの溶解量の約 10 倍であった。

また、実施例 2 - 2 ~ 2 - 4 の比較において、紅茶の主要ポリフェノールを主成分とする Fr. 3 を加えた実施例 2 - 3 において、ヘスペリジンの溶解量が最も多かった。なお、Fr. 3 の内、テアフラビン類 4 種、テアシネンシン A 及び B、カテキン重合ポリフェノールが紅茶特有の成分である。

【0068】

(A) 成分と (B) 成分とが共存することにより、(A) 成分の水溶性が高まるイメージについて、図 2 を参照して説明する。

(A) 成分単独では、水中で複数のヘスペリジン 1 a が互いに強固に会合し、ヘスペリジン結晶 1 を形成してしまう。

(A) 成分と (B) 成分とが共存すると、実施例 2 - 1 や 2 - 4 では、カテキン重合ポリフェノール 2 のベンゼン環がヘスペリジン 1 a のヘスペレチン部分にスタッキングすることでヘスペリジン 1 a 同士の強い会合が崩され、水溶性を高めていると推測される。実施例 2 - 2 や 2 - 3 では、カフェイン 3、フラボノール配糖体、カテキン類 (フラボノール配糖体及びカテキン類は、図 2 中の符号 4) がヘスペリジン 1 a のヘスペレチン部分にスタッキングして、(A) 成分の水溶性を高めていると推測される。紅茶エキスでは、これらの会合が相加的に作用して、水溶性を大きく高めていると考えられる。

【0069】

(実験例 1)

水素核磁気共鳴 ( $^1\text{H-NMR}$ ) スペクトルを測定した場合、測定している化合物の水素に共存物質のベンゼン環が近づくとベンゼン環の電子の影響を受けて、水素シグナル

10

20

30

40

50

が高磁場側へシフトする。ポリフェノール類は多くのベンゼン環を有する。このため、水素シグナルが高磁場側へシフトする現象を利用して、(B)成分による(A)成分の溶解性の向上が、(A)成分への(B)成分の会合によるものであることを示すための実験を行った。(A)成分と(B)成分とが会合しているのであれば、両者を混合するとヘスペリジン分子の水素のシグナルが高磁場にシフトするはずである。

#### 【0070】

ヘスペリジン1mgを0.1mLのジメチルスルホキシド-d<sub>6</sub>に溶解し、ここに0.9mLの重水を加えて、1液とした。1mLの1液に10mgのFr.3を溶解して、1液とした。1液0.75mLをNMR測定管に入れて、水素核磁気共鳴(<sup>1</sup>H-NMR)でNMRスペクトルを測定した。NMRスペクトルを測定した後、NMR測定管に1液0.05mLを加えて混合し、この試料のNMRスペクトルを測定した(スペクトル測定操作)。この時の測定試料中のFr.3の濃度は、0.6mg/mLである。

この測定後のNMR測定管中に1液0.05mLを加え、NMRスペクトルを測定した。この時の測定試料中のFr.3の濃度は、1.2mg/mLである。

NMR測定管中に1液0.05mLを加え、NMRスペクトルを測定する操作をさらに3回繰り返した。それぞれのNMRスペクトルの測定時における測定試料中のFr.3の濃度は、2.1mg/mL、2.9mg/mL、4.0mg/mLである。このNMRスペクトルの測定操作を通じて、測定試料中のヘスペリジンの濃度は、1.0mg/mLである。

各測定操作でのケミカルシフト値を比較した。観測可能なグルコース1位、ヘスペレチンA環6位及び8位、B環2位及びメトキシ基由来のシグナルのケミカルシフト変化を図4に示す。

#### 【0071】

図3にヘスペリジンの構造を示す。

図3中、符号10は、ヘスペレチンA環、符号20は、ヘスペレチンB環、符号30は、ヘスペレチンC環を表す。図3中、符号40は、ラムノースを示し、符号50は、グルコースを示す。

#### 【0072】

図4は、縦軸にヘスペリジンのケミカルシフト変化を取り、横軸に測定試料中のFr.3の濃度を取ったグラフである。

図4に示すように、Fr.3の濃度に依存して、(B)成分のヘスペレチン部分のケミカルシフト値が変化した。特にB環のケミカルシフトは、高磁場に大きくシフトし、メトキシ基とA環のシグナルも変化していた。この結果から、水酸基が存在せず最も疎水性が高いヘスペレチンC環付近で、(B)成分が(A)成分に会合していることが確認された。この結果は(A)成分の水への溶解性の向上が、(B)成分との会合によることを示すものである。

#### 【0073】

(実験例2-1)

ヘスペリジン4.0mg(6.56μM)を0.4mLのジメチルスルホキシド-d<sub>6</sub>に溶解し、これに重水3.6mLを加えて、2液(1.64μM/mL-10%ジメチルスルホキシド)とした。1mLの2液をNMR測定管に入れスペクトル測定を行った。本例の結果を表3に示す。

#### 【0074】

(実験例2-2)

NMR測定管に、(B)成分であるエピガロカテキンガレート1.5mg(3.28μM)を測り取り、これを1mLの2液で溶解し、NMRスペクトルを測定した。本例の結果を表3に示す。

下記(I)式は、エピガロカテキンガレートの構造式である。

#### 【0075】

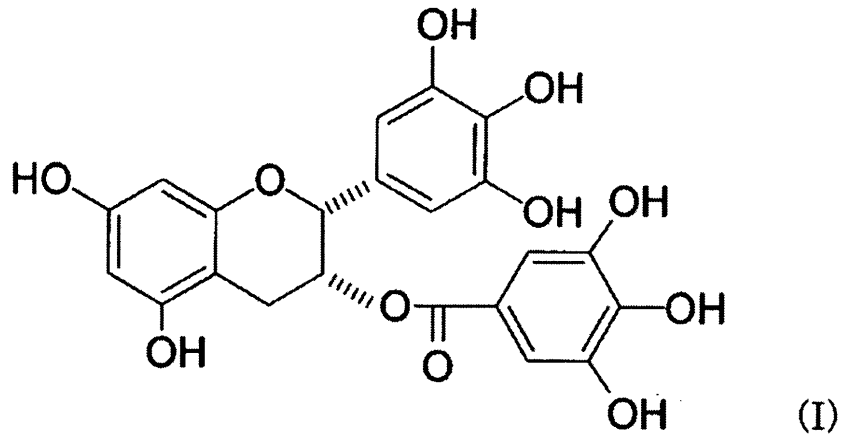
10

20

30

40

【化 1】



10

【0076】

(実験例 2 - 3)

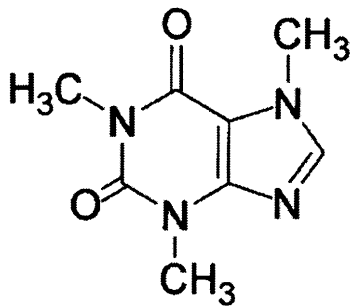
NMR測定管に、カフェイン0.6mg(3.09 $\mu$ M)を測り取り、これを2液1mLに溶解し、NMRスペクトルを測定した。本例の結果を表3に示す。

下記(II)式は、カフェインの構造式である。

【0077】

20

【化 2】



30

【0078】

【表3】

観測位置	実験例2-1		実験例2-2		実験例2-3	
	ケミカルシフト ( $\delta$ H)	ケミカルシフト ( $\delta$ H)	ケミカルシフト ( $\Delta \delta$ H)	ケミカルシフト ( $\Delta \delta$ H)	ケミカルシフト ( $\delta$ H)	ケミカルシフト ( $\Delta \delta$ H)
A環6位の水素	6.26	6.24	-0.02		6.27	0.01
A環8位の水素	6.26	6.22	-0.04		6.27	0.01
B環の芳香族水素	7.03~7.08	6.97~7.04	-0.05		7.05~7.10	0.02
B環の4'-OMe	3.88	3.87	-0.01		3.9	0.02
C環2位の水素	5.51	5.41	-0.1		5.53	0.02
C環3位の水素	2.92	2.84	-0.08		2.95	0.03
ラムノース6位の水素	1.17	1.17	0		1.2	0.03



表 3 に示すように、エピガロカテキンガレートと共存させた実験例 2 - 2 は、( A ) 成分のみの実験例 2 - 1 に比べて、C 環の 2 位及び 3 位のシグナルが高磁場に大きくシフトしていた。このことから、水中で、( A ) 成分の C 環の水素がエピガロカテキンガレートの芳香環に近接していることが示された。C 環は、水分子が水和する水酸基がないため、ヘスペリジン分子で最も疎水性の高い部分である。この疎水性の高い部分がエピガロカテキンガレートで塞がれることで、( A ) 成分の疎水性が減弱されて、水溶性が高まるものと考えられる。

( B ) 成分に換えて、カフェインを加えた実験例 2 - 3 においては、ケミカルシフトはほとんど変化していなかった。

#### 【 0 0 8 0 】

##### ( 実施例 3 - 1 )

生茶葉 ( 原料 b ) 3 0 k g を萎凋して、水分量 5 0 質量 % の原料 b 1 9 k g を得た。萎凋後の原料 b 1 9 k g と、スライスした未熟ミカンの青果 ( 原料 a ) 1 0 k g とを混合し揉捻して、混合揉捻物を得た ( 揉捻操作 ) 。揉捻時間は 2 0 分間であり、揉捻温度は 3 5 であった。本例における発酵時間は、0 時間 ( 即ち、発酵操作が施されていない ) であった。

混合揉捻物に 1 0 0 の空気を 3 0 分間当てて、乾燥した ( 乾燥操作 ) 。

乾燥操作を施した混合揉捻物に 5 0 倍量 ( 質量基準 ) の熱水 ( 9 0 ) を加え、3 0 分間放置して、水溶性フラボノイド組成物を抽出した。水溶性フラボノイド組成物を抽出した液をエバポレータで濃縮し、その後、凍結乾燥機にて乾燥して、固形の水溶性フラボノイド組成物を得た。

得られた水溶性フラボノイド組成物について、後述する方法で機能性を評価し、その結果を表 4 に示す。

#### 【 0 0 8 1 】

##### ( 比較例 3 - 1 )

水溶性フラボノイド組成物に換えて、糖転移ヘスペリジン ( G ヘスペリジン H ( 商品名 ) 、 2 7 % 、株式会社林原 ) を用いた以外は、実施例 3 - 1 と同様にして機能性を評価し、その結果を表 4 に示す。

#### 【 0 0 8 2 】

##### < 機能性の評価 >

##### 検体の採取

実験動物には、5 週齢の S D 系雄ラット ( 日本クレア株式会社 ) を用いた。ラットを温度  $22 \pm 1$  、湿度  $55 \pm 5$  % R H 、 1 2 時間明暗サイクル ( 明期 : 8 ~ 2 0 時 ) に設定した長崎県立大学動物実験室内で飼育した。動物を馴化させるために、M F 固形飼料と蒸留水を自由に摂取させ、7 日間の予備飼育を行った。

予備飼育終了後、ラットの体重に群間で差がないように、2 群に群分けした。

A m e r i c a n I n s t i t u t e o f N u t r i t i o n ( A I N ) - 7 6 組成に基づくコントロール食に、水溶性フラボノイド組成物を 0 . 5 質量 % となるように加え、これを一方の群のラットに摂食させた。また、コントロール食に糖転移ヘスペリジンを 0 . 2 質量 % となるように加え、これを他方の群のラットに摂食させた。

A I N - 7 6 の組成 ( g / k g ) は、カゼイン 2 0 0 、コーン油 5 0 、コーンスターチ 1 5 0 、セルロース 5 0 、ミネラル混合 3 5 、ビタミン混合 1 0 、D L - メチオニン 3 、重酒石酸コリン 2 及びショ糖 5 0 0 である。水溶性フラボノイド組成物又は糖転移ヘスペリジンを添加した分をショ糖 5 0 0 から減じた。

飼育期間中、体重及び摂食量を毎日測定した。4 週間の飼育終了後、6 時間絶食させ、断頭屠殺した後、血液、肝臓及び白色脂肪組織 ( 腎臓、睾丸及び腸間膜周辺脂肪組織 ) を採取した。各組織を生理食塩水で洗浄後、質量を測定した。本試験は「長崎県立大学動物実験規程」 ( 長崎県立大学動物実験委員会監修、平成 2 3 年 1 2 月 6 日改正 ) 及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」 ( 昭和 5 5 年 3 月総理府告示第 6 号 ) に則って実施した。

10

20

30

40

50

## 【0083】

## 血清コレステロール濃度の測定

血清コレステロール濃度は、*cholesterol oxidase*・*3,5-dimethoxy-N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-aniline sodium* (DAOS) 法によるコレステロールE-テストワコー（和光純薬工業株式会社製）を用いて測定した。血清コレステロール濃度の測定では、キットに付属の標準血清を用い、50、100、200、397.4、592.2 mg/dLの標準溶液を作成した。

検体として採取した血液を、25℃で20分間静置した後、4℃、1200×g（3000 rpm）で20分間、遠心処理した。遠心処理後、上清の血清を採取した。

10

試験管に盲検用の蒸留水、標準溶液又は血清を10μLサンプリングし、これに付属の発色試薬を1.5 mL加え、攪拌し、ウォーターバスにて37℃で5分間加温した。加温後、盲検を対象として、吸光度計を用いて波長600 nmの吸光度を測定し、標準溶液を用いて得られた標準直線の式より、血清コレステロール濃度を算出した。

## 【0084】

## 肝臓中の中性脂肪濃度の測定

肝臓の総脂質は、Folchら（Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497-509）の方法に従って抽出した。摘出したラットの肝臓0.5 gをガラスのホモジナイズチューブに入れた。15 mLのメタノールを準備し、まず、5~7 mLのメタノールを用い、肝臓片が完全に潰れるまでホモジナイズし、ホモジネートを50 mLのメスフラスコにロートを用いて移した。残りのメタノールでホモジナイザー及びホモジナイズチューブを洗浄し、メスフラスコに加えた。その後、クロロホルム30 mLを用いてホモジナイザーを3回に分けて洗浄しながら、メスフラスコに加えた。ロート及び50 mLメスフラスコの内壁はクロロホルム：メタノール=2：1（体積比）の溶媒で容量が約49 mLになるまで洗い込んだ。続いて、メスフラスコに軽く栓をして40℃の湯浴で振とうしながら30分間インキュベートし、加温抽出を行った。その後、抽出液を室温まで冷却し、クロロホルム：メタノール=2：1（体積比）の溶媒で50 mLに調整した。この抽出液をNo. 2のろ紙でろ過し、ろ液を50 mLの共栓付メスシリンダーに入れた。ろ液量を記録し、蒸留水9 mLを加え、2回、転倒混和した。-4℃で一晩静置して、分離した上層（蒸留水及びメタノール層）を廃棄して、脂質を含む下層（クロロホルム層）を得た。

20

30

下層をフラスコに移し、50℃の湯浴上で、ロータリーエバポレータで減圧しながらクロロホルムを吸引除去した。次に、ヘキサンを用いてフラスコ内壁に付着した脂質を25 mLのメスフラスコに回収し、フィルアップした。これを肝臓総脂質濃縮液とし、-20℃で保存した。

肝臓中の中性脂肪濃度の測定には、肝臓総脂質濃縮液をヘキサンで10倍量希釈（体積換算）した溶液0.5 mLをサンプリングし、窒素乾固したものを供した。乾固されたものに100μLのイソプロピルアルコールを加え、*glycerol 3-phosphate oxidase*・DAOS法によるトリグリセライドE-テストワコー（和光純薬工業株式会社製）を用いて測定した。測定は「血清コレステロール濃度の測定」と同様に行った。標準溶液による標準曲線より抽出液中の中性脂肪濃度を算出した。

40

## 【0085】

【表 4】

	実施例3-1	比較例3-1
白色脂肪組織質量 (g/体重100g)	3.81 ± 0.31	4.56 ± 0.25
血清コレステロール濃度 (mg/100mL)	91.3 ± 7.9	113 ± 9
肝臓中の中性脂肪濃度 (mg/g)	36.8 ± 6.9	56.3 ± 8.8

10

## 【0086】

表4は、白色脂肪組織質量（ラットの体重100g当たりの量）、血清コレステロール濃度（mg/100mL）、肝臓中の中性脂肪濃度（mg/g）を示したものである。

表4に示すように、水溶性フラボノイド組成物を摂食した群（実施例3-1）は、糖転移ヘスペリジンを摂食した群（比較例3-1）に比べ、白色脂肪組織質量、血清コレステロール濃度、肝臓中の中性脂肪濃度が低かった。

## 【0087】

（実験例3）

上述の実施例1～4と同様の試験を行い、乾燥サンプル100mgあたりのヘスペリジンの溶出量及び溶出率を求めた。溶出量及び溶出率の計算は以下に行った。

20

平均値 ± 標準偏差（n = 3）

1）溶出量；乾燥サンプル100mgから溶け出しているヘスペリジンの量

2）溶出率の計算方法

茶生葉に含まれる水分含量75%、青ミカンに含まれる水分含量82%、青ミカン乾燥粉末に含まれるヘスペリジン含量は20.8%

・ミカン10kg：茶30kgの場合

ミカン 10kg × 0.18 = 1.8kg、茶 30kg × 0.25 = 7.5kg より、合計 9.3kg 乾燥サンプルが製造できる。全乾燥物に19.35%の青ミカンが含まれる。

よって、乾燥混合ミカン100mgにヘスペリジンが4.02mg含まれている。

30

・ミカン20kg：茶20kgの場合

ミカン 20kg × 0.18 = 3.6kg、茶 20kg × 0.25 = 5kg より、合計 8.6kg 乾燥サンプルが製造できる。全乾燥物に41.9%の青ミカンが含まれる。

よって、乾燥混合ミカン100mgにヘスペリジンが8.72mg含まれている。

## 【0088】

上述の抽出を行い溶出量と溶出率を求めた結果を、表5（水抽出）、表6（熱湯抽出）、及び表7（60%エタノール抽出）に示す。

【表 5】

製造条件			水	
混合比率	揉捻時間	発酵時間(h)	溶出量 <sup>1)</sup> (mg)	溶出率 <sup>2)</sup> (%)
ミカン10kg : 茶30kg	20分	0	0.50 ± 0.03	12.4 ± 1.0
		1	0.41 ± 0.03	10.2 ± 0.9
		2	0.45 ± 0.02	11.1 ± 0.5
		3	0.44 ± 0.03	10.8 ± 0.9
ミカン10kg : 茶30kg	40分	0	0.37 ± 0.03	9.24 ± 0.82
		1	0.31 ± 0.06	7.81 ± 1.74
		2	0.36 ± 0.03	9.01 ± 0.92
		3	0.35 ± 0.02	8.71 ± 0.73
ミカン20kg : 茶20kg	20分	0	0.37 ± 0.09	4.30 ± 1.25
		1	0.47 ± 0.05	5.43 ± 0.66
		2	0.45 ± 0.02	5.17 ± 0.34
		3	0.49 ± 0.09	5.59 ± 1.24
ミカン20kg : 茶20kg	40分	0	0.44 ± 0.05	5.04 ± 0.69
		1	0.43 ± 0.09	4.95 ± 1.22
		2	0.48 ± 0.07	5.45 ± 1.04
		3	0.47 ± 0.07	5.39 ± 1.00
未熟みかんのみ			0.79 ± 0.03	3.81 ± 0.16

【表 6】

製造条件			熱湯	
混合比率	揉捻 時間	発酵 時間 (h)	溶出量 <sup>1)</sup> (mg)	溶出率 <sup>2)</sup> (%)
ミカン10kg : 茶30kg	20分	0	1.82 ± 0.11	45.2 ± 2.7
		1	1.84 ± 0.12	45.7 ± 2.9
		2	1.57 ± 0.13	39.0 ± 3.3
		3	1.56 ± 0.29	38.7 ± 7.1
ミカン10kg : 茶30kg	40分	0	1.33 ± 0.26	33.1 ± 6.5
		1	1.27 ± 0.07	31.5 ± 1.9
		2	1.23 ± 0.05	30.5 ± 1.3
		3	1.29 ± 0.01	32.0 ± 0.3
ミカン20kg : 茶20kg	20分	0	2.07 ± 0.23	23.7 ± 2.6
		1	1.92 ± 0.32	22.1 ± 3.7
		2	2.15 ± 0.05	24.6 ± 0.6
		3	2.09 ± 0.23	24.0 ± 2.7
ミカン20kg : 茶20kg	40分	0	2.08 ± 0.09	23.9 ± 1.0
		1	2.04 ± 0.29	23.4 ± 3.3
		2	2.16 ± 0.12	24.8 ± 1.4
		3	2.08 ± 0.13	27.6 ± 1.4
未熟みかんのみ				
			1.99 ± 0.24	9.57 ± 1.15

【表 7】

製造条件		60%エタノール		
混合比率	揉捻時間	発酵時間(h)	溶出量 <sup>1)</sup> (mg)	溶出率 <sup>2)</sup> (%)
ミカン10kg : 茶30kg	20分	0	1.59 ± 0.30	39.6 ± 7.4
		1	1.56 ± 0.13	38.8 ± 3.3
		2	1.54 ± 0.17	38.2 ± 4.2
		3	1.51 ± 0.16	37.6 ± 4.0
ミカン10kg : 茶30kg	40分	0	1.41 ± 0.20	35.0 ± 4.9
		1	1.35 ± 0.35	33.7 ± 8.8
		2	1.34 ± 0.11	33.3 ± 2.8
		3	1.31 ± 0.32	32.5 ± 7.8
ミカン20kg : 茶20kg	20分	0	2.57 ± 0.21	29.4 ± 2.4
		1	2.55 ± 0.10	29.2 ± 1.2
		2	2.55 ± 0.07	29.2 ± 0.9
		3	2.53 ± 0.34	29.0 ± 3.9
ミカン20kg : 茶20kg	40分	0	2.49 ± 0.24	28.5 ± 2.7
		1	2.51 ± 0.27	28.8 ± 3.1
		2	2.51 ± 0.13	28.8 ± 1.5
		3	2.54 ± 0.25	29.1 ± 2.8
未熟みかんのみ			4.81 ± 0.11	23.1 ± 0.5

10

20

30

## 【0089】

表5～7に示すように、ミカンと茶とを揉捻した混合揉捻物を用いた例は、総じて高いヘスペリジンの溶出量及び溶出率を得られた。ヘスペリジンの溶出率は、水抽出に比べて、熱水抽出又は60質量%エタノール抽出の方が高かった。熱水抽出と60質量%エタノール抽出との比較では、短時間では熱湯抽出が、長時間ではエタノール抽出が、若干ながら高い溶出率という傾向が得られた。

40

## 【0090】

(実験例4：水溶性フラボノイド組成物の機能性評価)

(実験試料)

乾燥した水溶性フラボノイド組成物の熱水抽出物を凍結乾燥し、粉末にしたものを試料として用いた。20gの水溶性フラボノイド組成物を熱水1L中で抽出、乾燥後、6.38gの粉末が回収された。

## 【0091】

(動物実験)

50

動物は4週齢のSD系雄ラット(九動、佐賀)を用いた。ラットを温度 $22 \pm 1$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間明暗サイクル(明期:8~20時)に設定した長崎県立大学動物実験室内で飼育した。動物を馴化させるために、MF固形飼料と蒸留水を自由摂取させ1週間の予備飼育を行った。

予備飼育終了後、ラットの体重に群間で差がないように、コントロール群および水溶性フラボノイド組成物群に群分けし、試験食および蒸留水を2週間自由摂取させた。

#### 【0092】

食餌はAmerican Institute of Nutrition (AIN) - 93G組成に基づく純化食をコントロール食とした。AIN - 93G組成(g/kg)は、カゼイン 200、大豆油70、 $\alpha$ -コングスターチ 132、ショ糖 100、セルロース50、ミネラル混合35、ビタミン混合10、*t*-ブチルヒドロキノン 0.014、重酒石酸コリン2.5、L-シスチン 3 および  $\alpha$ -コングスターチ397.486である。コントロール食に水溶性フラボノイド組成物粉末を食餌総重量の0.75%になるように添加した食餌を水溶性フラボノイド組成物食とし、全量を  $\alpha$ -コングスターチで調整した。その組成は(g/kg)、水溶性フラボノイド組成物7.5、 $\alpha$ -コングスターチ 389.986、その他の配合はコントロール食と同様に調製した。

#### 【0093】

飼育期間中、体重および摂食量を2日に1回測定した。2週間の飼育終了後、それぞれの群内で平均的な体重のラットの肝臓を細胞培養に用いた。

肝細胞の分離および培養に用いた試薬、調製した溶液、器具および機器はすべて滅菌済みのものを用いた。ラットをペントバルビタールナトリウム(0.1 mL / 100 g 体重)の腹腔内注射により麻酔した後、開腹した。門脈に留置針をカニューレションして糸で結紮した。次いで、留置針にチューブをつなぎ、37℃の湯浴中で保温された前灌流液をペリスタポンプで流入させた。下部大動脈に予め糸をかけておき、切断・脱血後糸で結紮した。次に、上部大静脈に留置針をカニューレションして糸で結紮した後チューブをつなぎ、門脈から流入させた前灌流液が肝臓を通り上部大静脈から放血される状態を維持し、約20 mL/minの流速で約10分間灌流した。肝臓が完全に脱血されたことを確認した後、37℃の湯浴中で保温されたコラゲナーゼ溶液を同流速にて約10分間再循環方式で灌流した。

#### 【0094】

消化された肝臓を回収し、Hank's水溶液(9.8 g/L)を30 mL加え、はさみを用いて細分した後、ガーゼ(二重)を用いて遠心チューブへろ過した。ろ液をピペティングして肝細胞を分散させた後、50 × g (600 rpm)で1分間遠心分離した。上清を廃棄した後、再びHank's水溶液を加え、沈殿物となった肝細胞をピペティングにより分散させ、同様に遠心分離および上清破棄を行った。このように、Hank's水溶液による肝細胞の洗浄操作を3回行い、得られた細胞画分を肝実質細胞とした。

#### 【0095】

次にWE培地を30 mL加え、ピペティングにより分散させて細胞懸濁液を調製した。トリパンブルー染色法にて血球計測板を用いて生細胞数をカウントし、生細胞数が $5 \times 10^5$  cells/mLとなるようにWE培地で希釈した。希釈する際、肝細胞の接着と伸長に必要なFBSを培地中の含有量が10%となるように加えた。コラーゲンコートディッシュ(35 mm, 6 well)に $1 \times 10^6$  cells/2 mL/well播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ(37℃, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, ASTEMC、福岡)で3時間前培養した。培地を廃棄し、ディッシュの底面に接着した細胞をPhosphate buffered Saline (PBS)で2回洗浄後、引き続き5% FBS含有培地を用いて24時間前培養し、コンフルエントに達したものを実験に用いた。

#### 【0096】

コンフルエントに達した肝細胞に、脂質合成の基質として[1, 2-<sup>14</sup>C] 酢酸を1.4 μCi (1 mCi / mmol / dish) 添加した無血清培地に交換し、5時間培養した。培養終了後、培地2 mLをすべて回収した。細胞はPBSで2回洗浄した後、

ラバーポリスマンを用いてはぎ取り、PBS溶液として回収し、全量を1.5 mLとした。培地および細胞溶液は分析に供するまで-80 で保存した。

【0097】

培地および細胞中の総脂質抽出はFolchらの方法に準じて行った。細胞はPBSでホモジナイズし、全量を2.5 mLとした。細胞ホモジネートあるいは培地0.4 mLに、脂質画分のキャリアーとしてAIN-93G組成に基づく純化食を2週間摂食させたSD系雄ラットの血清を100  $\mu$ L加えよく混合し、次いでクロロホルム：メタノール=2：1溶液を10 mL加えよく混合した後、40 で30分加温して総脂質を抽出した。20% (v/v) 量の水を加えて転倒混和し、上層を破棄した。破棄した上層とほぼ同量の割合のメタノール：水=16：9溶液を6 mL加えて転倒混和し、再び上層を破棄した。下層(クロロホルム層)を5 mLサンプリングし窒素乾固した後、少量のメタノールを加えて再び窒素乾固することで純化した。クロロホルムを1、2滴加え、毛細管を用いて薄層板(TLC Silica gel 60, 20x20 cm, Merck)にプロットした。展開溶媒(hexane : diethylether : acetic acid = 80 : 20 : 1 mL)を満たした展開層に薄層板を入れた。展開終了後、リン脂質(PL)、遊離脂肪酸(FFA)、トリグリセリド(TG)およびコレステロールエステル(CE)画分のバンドは、ヨウ素の蒸気にさらして着色することで確認した後、薄層版から剥ぎ取り、トルエンベースのシンチレーションカクテルを10 mL入れたバイアルに回収し、液体シンチレーションカウンターにより、各脂質画分の[<sup>14</sup>C]放射性活性を測定した。

10

20

【0098】

表8に、2週間実験食を摂食したラットの肝臓から分離した細胞および培地における[<sup>14</sup>C] 酢酸の各脂質画分への取り込みを示す。



【表 8】

	コントロール ( $\times 10^3$ dpm / dish)	水溶性フラボノイド組成物
細胞		
トリグリセリド	8.69 $\pm$ 0.56	4.75 $\pm$ 0.50 *
リン脂質	4.20 $\pm$ 0.20	2.21 $\pm$ 0.16 *
コレステロールエステル	2.48 $\pm$ 0.14	1.85 $\pm$ 0.10 *
遊離脂肪酸	1.25 $\pm$ 0.37	0.387 $\pm$ 0.055*
培地		
トリグリセリド	0.827 $\pm$ 0.083	0.216 $\pm$ 0.030*
リン脂質	0.329 $\pm$ 0.041	0.272 $\pm$ 0.045
コレステロールエステル	0.181 $\pm$ 0.064	0.0231 $\pm$ 0.0082
遊離脂肪酸	0.0647 $\pm$ 0.0140	0.124 $\pm$ 0.032
平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 6)		
*, コントロール群に対して有意差あり (p < 0.05)		

10

20

30

## 【0099】

細胞中への取り込みは、肝臓の細胞での合成を示し、培地への取り込みは、肝臓からの分泌を示している。細胞中のトリグリセリド、リン脂質、コレステロールエステルおよび遊離脂肪酸画分への放射能活性の取り込みは、コントロール群と比較して、水溶性フラボノイド組成物添加群で有意に低値を示し、それぞれ45%、47%、25%、69%低下した。このことから肝臓細胞において、フラボノイド組成物は $[^{14}C]$ 酢酸を基質とする脂質の合成を抑制することが示された。

40

## 【0100】

培地中のトリグリセリド画分への放射能活性の取り込みは、コントロール群に比べ水溶性フラボノイド組成物添加群で有意に低値を示した。食餌の違いはリン脂質画分への取り込みに影響しなかった。コレステロールエステル画分への取り込みは、水溶性フラボノイド組成物摂取によって低下傾向を示した。遊離脂肪酸画分への取り込みは水溶性フラボノイド組成物添加群において高値であったが、有意な差は認められなかった。このことから水溶性フラボノイド組成物は、肝細胞内で合成された脂質の培地への分泌を抑制することが示された。

50

これらの結果から、水溶性フラボノイド組成物は肝臓での脂質の合成と肝臓から血液中への脂質の分泌を抑制することで脂質代謝改善効果を発揮することが明らかとなった。

【0101】

(実験例5：ヘスペリジン可溶化実験)

(紅茶熱水抽出物の乾燥粉末の調製)

紅茶(2013年に長崎県農林技術開発センター茶業研究室で製造した)およそ40gをワーリングブレンダーで粉碎し、得られた粉末状試料を沸騰水2Lで2分間煮沸後、吸引ろ過を行った。ろ液をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥して紅茶熱水抽出物の乾燥粉末11gを得た。これをHPLCにて分析し、茶カテキンやその他の各種ポリフェノール類のピークを確認した(図5)。

10

【0102】

HPLC分析条件

カラム：COSMOSIL 5C18-AR-II (4.6×250mm, ナカライ)

カラム温度：35

移動相：A；50mMリン酸水溶液，B；アセトニトリル，Bを4%から30%(39分間)，30%から75%(15分間)，75%から95%(6分間)，5%から4%(5分間)

流速：0.8mL/min

検出：フォトダイオードアレイ，検出波長200-550nm

20

【0103】

(紅茶熱水抽出物の乾燥粉末の分画)

上記のようにして得られた乾燥粉末の9.9gをダイアイオンHP-20SSカラム(5×24cm、三菱化学)を用いたクロマトグラフィーに付し、水から徐々にメタノール濃度を上げ、最後に60%含水アセトンにて溶出させることで、4つの画分(フラクション1-4)に分画した。各画分を減圧濃縮後、凍結乾燥した。フラクション1(3.0g)は主に糖、没食子酸、テオガリンを、フラクション2(1.9g)は主にエピガロカテキン、テアシネンシンB、テアシネンシンC、テアルビジンを、フラクション3(1.7g)は主にエピカテキン、エピガロカテキンガラート、エピカテキンガラート、テアシネンシンA、フラボノール配糖体、およびテアルビジンを、フラクション4(1.7g)は主にカフェイン、テアフラビンを含むことをシリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開溶媒トルエン：ギ酸エチル：ギ酸=1：7：1，検出は紫外吸収および塩化鉄(III)試薬噴霧)ならびにHPLC分析(フォトダイオードアレイ，検出波長200-550nm)により確認した。

30

【0104】

(未熟ミカン乾燥粉末からのヘスペリジン溶出に対する紅茶熱水抽出物ならびに各画分の影響)

エッペンドルフチューブ(容量1.5mL)に未熟ミカン乾燥粉末4.0mgを入れ、紅茶熱水抽出物を4、8、16mg、またはそれを分画して得た4つのフラクションを1、2、4、8mg加えた。各チューブに蒸留水1.0mLを加えて懸濁し、湯浴中80で10分間加熱した。室温で2時間冷却した後、遠心器(2000×g)で約1分間の遠心分離を行った。上清はメンブランフィルター(0.45μm)でろ過後、ろ液をHPLCで分析し、283nmにおけるヘスペリジンのピーク面積を比較した。

40

【0105】

HPLC分析条件

カラム：COSMOSIL 5C18-AR-II (4.6×250mm, ナカライ)

カラム温度：35

移動相：A；50mMリン酸水溶液，B；アセトニトリル，Bを15%から45%(15分間)，45%から90%(3分間)，90%で2分間，90%から10%(2分間)

50

流速：0.8 mL/min

検出：283 nmにおけるUV吸収

【0106】

結果を図6に示す。何も加えず未熟ミカン乾燥粉末だけを抽出した場合に比べて、紅茶熱水抽出物を加えるとヘスペリジンの溶出量が増加した。抽出物を分画したフラクションのうち、フラクション1はヘスペリジンの溶出にほとんど寄与していないが、他のフラクションは添加量に依存してヘスペリジンの溶出量は増大した。

【0107】

(ヘスペリジン標品の溶解性に対する紅茶熱水抽出物ならびに各画分の影響)

未熟ミカン乾燥粉末の代わりに市販のヘスペリジン(和光純薬)2mgを用い、紅茶熱水抽出物、それを分画して得た4つの画分を加えて前記と同様の操作を行った。ただし、添加量は紅茶熱水抽出物を16mg(未熟ミカン乾燥粉末に対する重量比1:4)とし、分画フラクションについてはそれぞれの収率を考慮してフラクション1を5.7mg、フラクション2を3.6mg、フラクション3を3.3mg、フラクション4を3.4mg加えた。結果を図7に示す。この結果から、テアシネンシンA、エピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、エピカテキン、フラボノール配糖体、およびテアルビジンを含むフラクション3が最もヘスペリジンの溶解に寄与しており、次いでエピガロカテキン、テアシネンシンB、テアシネンシンC、テアルビジンを含むフラクション2の寄与が大きいことが分かる。

【0108】

(紅茶熱水抽出物の各画分の相互作用によるヘスペリジン溶解性への影響)

未熟ミカン乾燥粉末に、紅茶熱水抽出物を分画して得た4つの画分を単独もしくは全てのパターンの組合せ(計15通り)で添加し、上述の操作を行った。添加量は分画前の熱水抽出物を16mg(未熟ミカン乾燥粉末に対する重量比1:4)とし、さらにその中で各画分が占める割合を考慮してフラクション1を5.7mg、フラクション2を3.6mg、フラクション3を3.3mg、フラクション4を3.4mgとした。結果を図8に示す。この結果から、ほとんどの組合せにおいてヘスペリジンの溶解性は相加的に向上することがわかる。ただし、フラクション1はほとんどヘスペリジン溶解に寄与しておらず、フラクション3の寄与が最も大きい。

【0109】

(実験例6:ヘスペリジンのLC-TOF/MS測定)

ヘスペリジン終濃度1mM及びエピガロカテキンガレート、テアシネンシンA、テアシネンシンB、カフェイン終濃度10mMとなるように、10%ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて各種混合溶液を作製した。これらを37°Cで24時間静置した。遠心分離後(10,000×g, 20°C, 5min)、回収した上清を10%DMSOで100倍希釈した。これをLC-TOF/MS分析に供した(Injection volume; 20mL)。

【0110】

<LC-TOF/MS分析条件>

Gradient: 0 - 100% Methanol / 0.1% Formic acid (20 min)

Column: Cosmosil 5C<sub>18</sub> - MS - II (2.0 mm x 150 mm)

Column Temperature: 40 °C

Sample Injection volume: 20 mL

Flow rate: 0.2 mL/min

Negative mode, Expert mode

target mass range: 100 - 1000 m/z

ESI source: Hexapole RF 400 Vpp, Capillary Exit - 130 V

10

20

30

40

50

Dry Gas : 8.0 L/min  
 Dry Temperature : 200 °C  
 Nebulizer gas : 1.6 Bar

・装置

micrOTOF II - MA1 : Bruker Daltonics GmbH  
 Agilent 1200 series : Agilent Technologies  
 Nitrogen Generator JAN3-08D-MSF : JAPAN  
 THERMAL ENGINEERING  
 Compass 1.3 SR1 for micrOTOF : Bruker Daltonics GmbH  
 micrOTOF 3.0  
 Hyster 3.2  
 Data Analysis 4.0  
 Target Analysis 4.0  
 Centrifuge 5417R : eppendorf

10

【0111】

(<sup>1</sup>H-NMR測定)

全てのNMR測定は、日本電子製 ECS-400を使用した。サンプルは、ヘスペリジン終濃度 1 mM となるように 10% DMSO-d<sub>6</sub> を用いて作製した。内標準物質は DSS-d<sub>6</sub> を用い、内径 5 mm のサンプルチューブに液高 4.2 cm となるように添加した。本サンプルをNMR装置に挿入後、グラジエントシム調整を行い、<sup>1</sup>H-NMR測定 (acquisition points : 16,384 ; relaxation delay : 15 sec ; temperature : 25°C) に供した。得られたヘスペリジンのスペクトルを d<sub>ヘスペリジン</sub> (ppm) とした。続いて、同サンプルを<sup>1</sup>H-NMR-DOSY測定 (diffusion time : 0.1 msec ; field gradient pulse : 50-300 mT/m ; acquisition points : 16,384 ; receiver gain : 24 ; relaxation delay : 50 sec ; temperature : 25 °C ; spinner : OFF) に供した。測定終了後、SPLMOD (display range : 1.0 - 100 × 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>/sec) を用いて、2D スペクトルを処理した。得られたスペクトルより、拡散係数 D<sub>ヘスペリジン</sub> (× 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>/sec) を求めた。また、ヘスペリジン終濃度 1 mM 及び アシネンシン A 終濃度 10 mM となるように、10% DMSO-d<sub>6</sub> を用いてヘスペリジン-テアシネンシン A 混合溶液を作製した。本サンプルに内標準物質 DSS-d<sub>6</sub> を添加後、内径 5 mm のサンプルチューブに液高 4.2 cm となるように添加し、前述と同様に<sup>1</sup>H-NMR測定及び<sup>1</sup>H-NMR-DOSY測定を行った。得られたスペクトルより、d<sub>ヘスペリジン+テアシネンシン A</sub> (ppm) 及び D<sub>ヘスペリジン+テアシネンシン A</sub> (× 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>/sec) を求めた。ヘスペリジン及びテアシネンシン A を混合したことによる化学シフト値の変化を  $\Delta d = d_{\text{ヘスペリジン}} - d_{\text{ヘスペリジン+テアシネンシン A}}$ 、拡散係数の変化を  $\Delta D = D_{\text{ヘスペリジン}} - D_{\text{ヘスペリジン+テアシネンシン A}}$  とし算出した。

20

30

40

【0112】

(測定結果)

(1) LC-TOFMS分析によるヘスペリジンの溶解性試験

ヘスペリジンの溶解性試験の結果を図9に示す。本結果より、ヘスペリジン及びテアシネンシン A 1 : 10 混合時に、溶解度が3倍程度増加することが明らかとなった。

(2) <sup>1</sup>H-NMR測定によるヘスペリジン及びテアシネンシン A の相互作用メカ

50

## ニズムの解明

ヘスペリジンの構造（図10）並びにヘスペリジンの化学シフト値  $d_{\text{ヘスペリジン}}$  (ppm)（表9）を示す。ヘスペリジン及びテアシネンシンAを混合したことによる化学シフト値の変化（表10）より、ヘスペリジンの疎水性骨格部C環由来プロトンにおいて、顕著な変化（ $< -0.2$  ppm）が観測された。また、ヘスペリジン及びテアシネンシンAを混合したことにより、拡散係数について  $\Delta D = 1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{sec}$  の変化が観測された（表11）。以上のことから、ヘスペリジンは疎水性骨格部C環において、テアシネンシンAと相互作用していることが示唆された。

【0113】

10

【表9】

Proton	$d_{\text{ヘスペリジン}}$ (ppm)
$\text{H}_2', \text{H}_5', \text{H}_6'$	7.06
$\text{H}_6, \text{H}_8$	6.26
$\text{H}_2$	5.56
$\text{H}_3$	2.96

20

【表10】

Proton	Delta $d$ (ppm)
$\text{H}_2', \text{H}_5', \text{H}_6'$	$< -0.02$
$\text{H}_6, \text{H}_8$	$-0.10$
$\text{H}_2$	$< -0.20$
$\text{H}_3$	$< -0.03$

30

【表11】

$D_{\text{ヘスペリジン}}$ ( $\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{sec}$ )	$D_{\text{ヘスペリジン+TSA}}$ ( $\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{sec}$ )	delta $D$ ( $\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{sec}$ )
2.87	1.74	-1.13

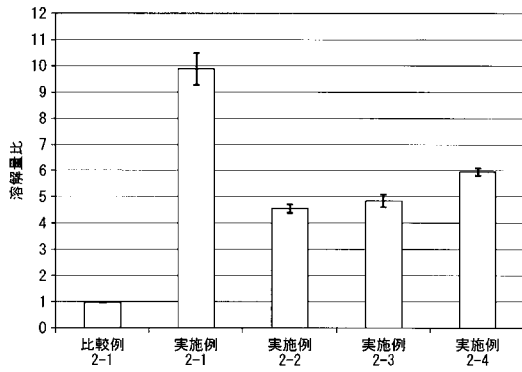
40

【産業上の利用可能性】

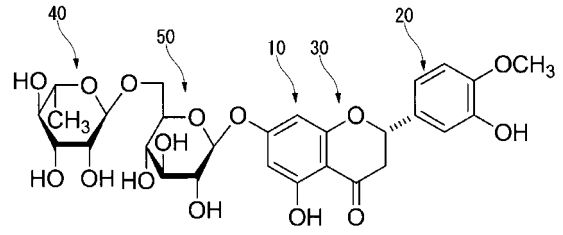
【0114】

本発明の水溶性フラボノイド組成物によれば、容易に調製でき、かつ水への溶解性に優れ、これを含有する飲料、食品及び医薬品を得られる。

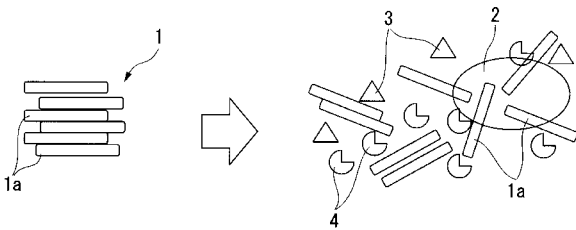
【 図 1 】



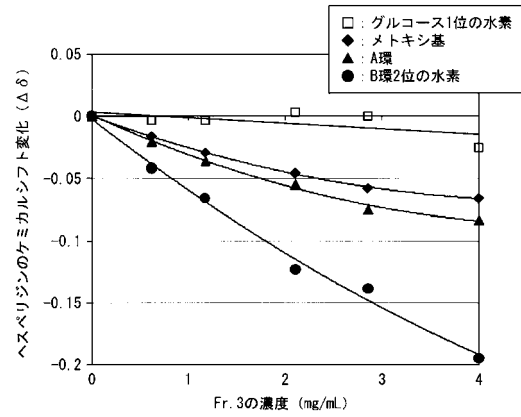
【 図 3 】



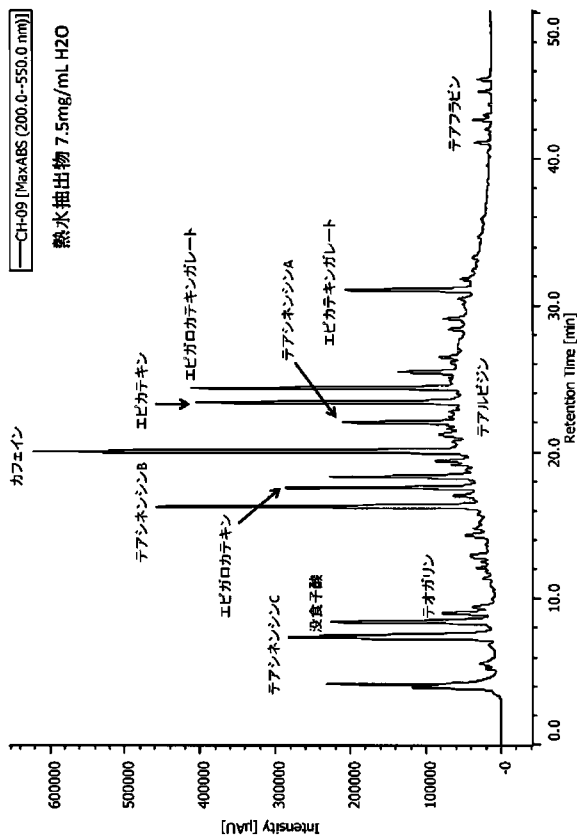
【 図 2 】



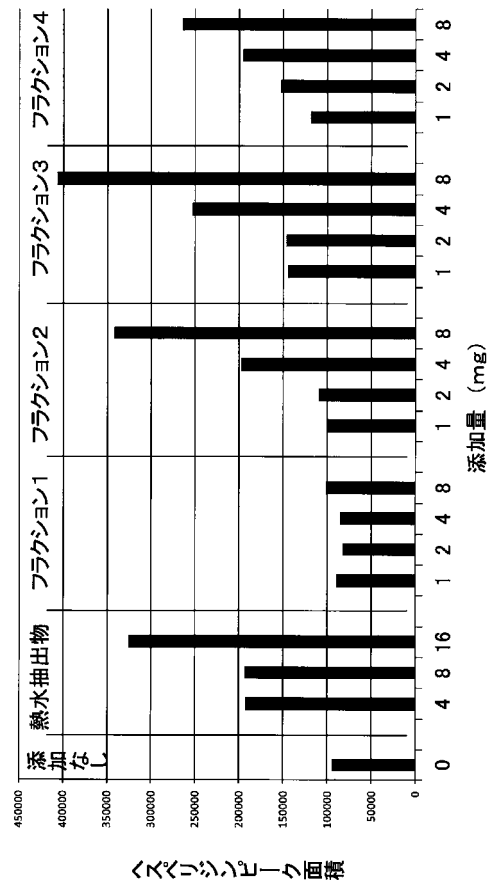
【 図 4 】



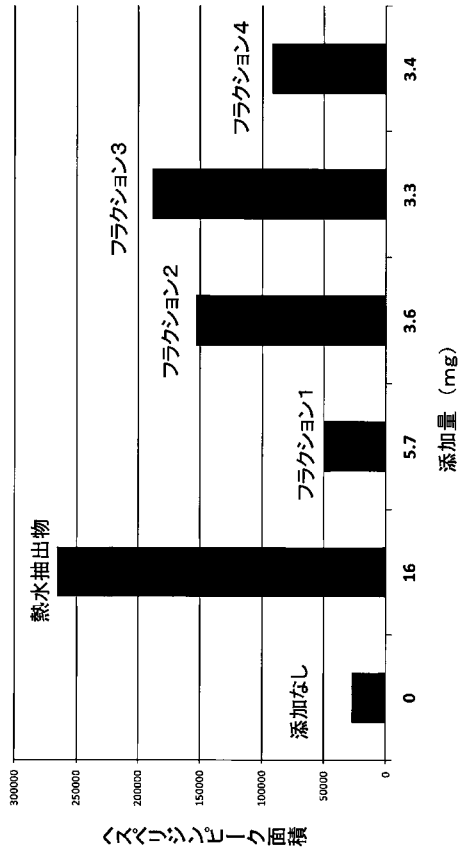
【 図 5 】



【 図 6 】



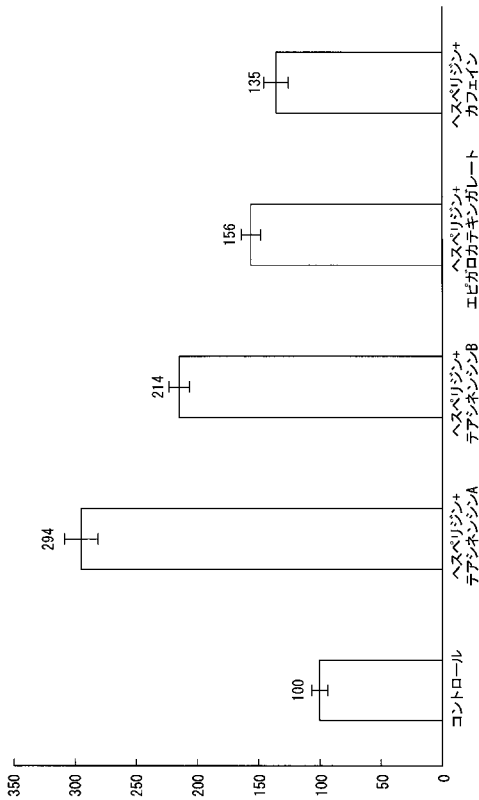
【 図 7 】



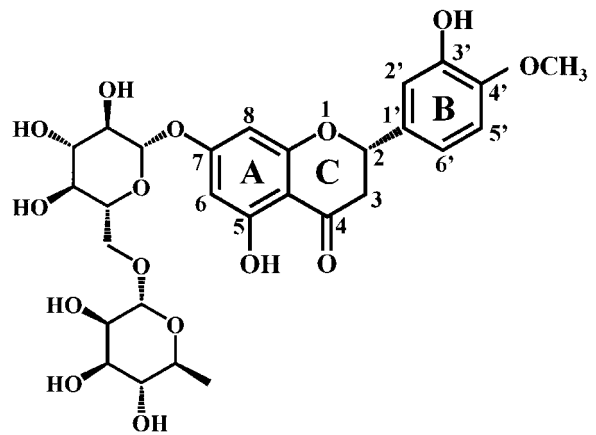
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成27年10月20日(2015.10.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

フラバノン配糖体と茶ポリフェノールとを含有し、

前記フラバノン配糖体はヘスペリジンであり、前記茶ポリフェノールは少なくともテアシネンシンAを含む、水溶性フラボノイド組成物。

【請求項2】

前記フラバノン配糖体と前記茶ポリフェノールとの会合体を含有する、請求項1に記載の水溶性フラボノイド組成物。

【請求項3】

前記茶ポリフェノールは、カテキン、プロトシアニジン、フラボノール配糖体及び紅茶ポリフェノールから選択される1種以上を含む請求項1又は2に記載の水溶性フラボノイド組成物。

【請求項4】

前記ヘスペリジン：テアシネンシンAの含有量比が約1：10である、請求項1から3のいずれか1項に記載の水溶性フラボノイド組成物。

【請求項5】

前記ヘスペリジンは柑橘類から抽出されたものである請求項1から4のいずれか1項に記載の水溶性フラボノイド組成物。

【請求項6】

前記柑橘類はミカンである請求項5に記載の水溶性フラボノイド組成物。

【請求項7】

請求項1から6のいずれか1項に記載の水溶性フラボノイド組成物を含有する飲料。

【請求項8】

請求項1から6のいずれか1項に記載の水溶性フラボノイド組成物を含有する食品。

【請求項9】

請求項1から6のいずれか1項に記載の水溶性フラボノイド組成物を含有する医薬品。

【請求項10】

請求項1から6のいずれか1項に記載の水溶性フラボノイド組成物を含有する化粧品。

【請求項11】

請求項1～6のいずれか1項に記載の水溶性フラボノイド組成物の製造方法であって、前記フラバノン配糖体を含有する原料aと前記茶ポリフェノールを含有する原料bとを揉捻して混合揉捻物を得る揉捻物調製工程と、前記混合揉捻物を抽出溶媒に浸漬する抽出工程と、を備える水溶性フラボノイド組成物の製造方法。

【請求項12】

前記原料aは柑橘類又はその抽出物である請求項11に記載の水溶性フラボノイド組成物の製造方法。

【請求項13】

前記柑橘類はミカンである請求項12に記載の水溶性フラボノイド組成物の製造方法。



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2014/055080
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A23L1/30(2006.01)i, A23L2/52(2006.01)i, A61K31/7048(2006.01)i, A61K36/18(2006.01)i, A61K36/75(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P9/14(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23L1/30, A23L2/52, A61K31/7048, A61K36/18, A61K36/75, A61P3/06, A61P9/00, A61P9/12, A61P9/14 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAlplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-202481 A (Nagasaki-Ken), 16 August 2007 (16.08.2007), particularly, claims 1 to 6; paragraphs [0025] to [0029]; experimental example 1; table 1, 9th line from the bottom (Family: none)	1-9
X A	JP 2013-013392 A (Kao Corp.), 24 January 2013 (24.01.2013), particularly, claims 1, 3, 8; paragraphs [0001], [0006], [0008], [0011], [0013] to [0014], [0040], [0097]; examples 1, 2, 12 & US 2013/0085270 A1 & EP 2581089 A1 & WO 2011/155505 A1 & CN 102933219 A	1-3, 5-8 4, 9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 April, 2014 (14.04.14)		Date of mailing of the international search report 22 April, 2014 (22.04.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/055080

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,A	JP 2013-256483 A (Morinaga & Co., Ltd.), 26 December 2013 (26.12.2013), particularly, claims 1 to 7; paragraphs [0017], [0024] (Family: none)	1-3, 5-8 4, 9
P,X	Hisayuki NAKAYAMA et al., "Mikan Mijukuka to Ryokucha Sanban Chaba o Kongo shite Seizo shita Kayosei Hesperidin Gan'yu Hakkocha no Kaihatsu", The Japanese Society for Food Science and Technology Dai 60 Kai Kinen Taikai Koenshu, 29 August 2013 (29.08.2013), page 189, 3Ba9	1-9
P,X	Hisayuki NAKAYAMA et al., "Mijuku Mikan to Ryokuchaba o Kongo shite Seizo shita Kayosei Hesperidin Gan'yu Hakkocha ga Rat Shishitsu Taisha ni Oyobosu Eikyo", Dai 67 Kai The Japanese Society of Nutrition and Food Science Taikai Koen Yoshishu, 30 April 2013 (30.04.2013), page 136, 2K-14p	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 5 0 8 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23L1/30(2006.01)i, A23L2/52(2006.01)i, A61K31/7048(2006.01)i, A61K36/18(2006.01)i, A61K36/75(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P9/14(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23L1/30, A23L2/52, A61K31/7048, A61K36/18, A61K36/75, A61P3/06, A61P9/00, A61P9/12, A61P9/14			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	JP 2007-202481 A (長崎県) 2007.08.16, 特に、請求項1~6、[0025]-[0029]、実験例1、表1の下から9 行目 (ファミリーなし)	1-9	
C欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 14.04.2014		国際調査報告の発送日 22.04.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 知美	4B 3335
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2014/055080
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2013-013392 A (花王株式会社) 2013. 01. 24, 特に、請求項 1、3、8、[0001]、[0006]、[0008]、[0011]、 [0013]-[0014]、[0040]、[0097]、実施例 1、2 及び 1 2 & US 2013/0085270 A1 & EP 2581089 A1 & WO 2011/155505 A1 & CN 102933219 A	1-3, 5-8 4, 9
PX PA	JP 2013-256483 A (森永製菓株式会社) 2013. 12. 26, 特に、請求項 1~7、[0017]、[0024] (ファミリーなし)	1-3, 5-8 4, 9
PX	中山久之, 外 8 名, ミカン未熟果と緑茶三番茶葉を混合して製造し た可溶性ヘスペリジン含有発酵茶の開発, 日本食品科学工学会第 6 0 回記念大会講演集, 2013. 08. 29, p. 189, 3Ba9	1-9
PX	中山久之, 外 1 0 名, 未熟ミカンと緑茶葉を混合して製造した可溶 性ヘスペリジン含有発酵茶がラット脂質代謝に及ぼす影響, 第 6 7 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, 2013. 04. 30, p. 136, 2K-14p	1-9

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 36/82 (2006.01)	A 6 1 K 36/82	
A 6 1 K 36/752 (2006.01)	A 6 1 K 36/752	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100108578

弁理士 高橋 詔男

(74) 代理人 100094400

弁理士 鈴木 三義

(72) 発明者 宮田 裕次

長崎県東彼杵郡東彼杵町中尾郷 1 4 1 4 長崎県農林技術開発センター茶業研究室内

(72) 発明者 荒牧 貞幸

長崎県大村市鬼橋町 1 3 7 0 長崎県農林技術開発センター果樹研究部門内

(72) 発明者 石本 慶一郎

長崎県大村市鬼橋町 1 3 7 0 長崎県農林技術開発センター果樹研究部門内

(72) 発明者 中山 久之

長崎県諫早市貝津町 3 1 1 8 長崎県農林技術開発センター食品加工研究室内

(72) 発明者 田中 隆

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72) 発明者 永田 保夫

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72) 発明者 田中 一成

長崎県西彼杵郡長与町まなび野 1 - 1 - 1 長崎県公立大学法人長崎県立大学内

(72) 発明者 田丸 静香

長崎県西彼杵郡長与町まなび野 1 - 1 - 1 長崎県公立大学法人長崎県立大学内

(72) 発明者 松井 利郎

福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 0 番 1 号 国立大学法人九州大学内

F ターム (参考) 4B017 LC03 LC08 LG14 LK06 LK11 LP01 LP05 LP18

4B018 MD08 MD27 MD59 ME14 MF01 MF13

4B117 LC04 LC13 LG17 LK06 LK11 LP01 LP05 LP20

4C086 AA01 AA02 EA11 MA02 MA04 MA07 NA05 ZA36 ZA42 ZA44

ZC33

4C088 AB45 AB62 AC04 AC05 BA09 CA03 CA05 CA08 CA25 MA07

NA05 ZA36 ZA42 ZA44 ZC33

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。