



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101522204 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200780016196. 1

A61P 3/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 04. 27

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

778/2006 2006. 05. 05 AT  
11/740, 583 2007. 04. 26 US

(56) 对比文件

CN 1678333 A, 2005. 10. 05, 全文.  
孙敏等. 《猕猴桃汁多酚类物质的提取工艺研究》. 《农产品加工. 学刊》. 2007, (第3期), 40-43.  
朱建华等. 《猕猴桃生物活性物质研究进展》. 《酿酒》. 2006, 第33卷(第3期), 57-59.  
周跃勇等. 《从猕猴桃中提取多酚的研究》. 《食品研究与开发》. 2007, 第28卷(第3期), 56-60.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 11. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2007/003265 2007. 04. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02008/023266 EN 2008. 02. 28

审查员 王静

(73) 专利权人 欧博康有限公司

地址 德国汉堡

(72) 发明人 托马斯·爱丁伯格

(74) 专利代理机构 北京元中知识产权代理有限公司  
11223

代理人 王明霞

(51) Int. Cl.

A61K 36/185 (2006. 01)  
A61K 31/192 (2006. 01)  
A61K 31/235 (2006. 01)  
A61P 3/06 (2006. 01)

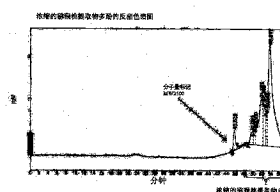
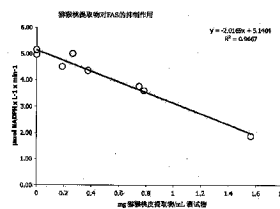
权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 9 页

(54) 发明名称

猕猴桃提取物

(57) 摘要

本发明描述了一种猕猴桃果实提取物的配制品、分离过程和用途,用于治疗与人胰脂肪酶和/或人脂肪酸合成酶有联系的,由其导致的或由其作为媒介引起的疾病或症状。



1. 一种分离的猕猴桃提取物,包括重量比大于 10%的缀合多酚衍生物,所述猕猴桃提取物的制备方法如下:

1000Kg 新鲜的猕猴桃被碾碎并被压榨,得到 350kg 的汁液,得到 650Kg 剩余物作为原料,在室温下,3500 升 80%乙醇水溶液作为溶剂添加到原料中,并搅拌混合物 1 小时,过滤提取物,原料残渣再用 3500 升 80%乙醇在室温下进一步提取 1 小时,过滤提取物,两次提取物与榨出的汁液合并,然后在 42℃和压力为 -0.085MPa 的条件下浓缩到 600 升,12kg  $\beta$ -环糊精在搅拌下被加入浓缩物,直至环糊精完全溶解,经喷雾干燥,得到 62.5Kg 包埋后的猕猴桃提取物得到猕猴桃提取物;或者

1000Kg 新鲜的猕猴桃被碾碎并被压榨,得到 600Kg 剩余物作为原料,得到 600Kg 果汁,在室温下,2500 升的 90%乙醇作为溶剂添加到原料中,并搅拌混合物 2 小时,过滤提取物,残渣用 2500 升的 90%乙醇在室温下进一步提取,混合物搅拌 1 小时,提取物离心分离,提取物与榨出的果汁合并,然后在 40℃和压力为 -0.090MPa 的条件下被浓缩到大约 650 升,10kg  $\beta$ -环糊精在搅拌下被加入浓缩物,直至环糊精完全溶解,经冻干,得到 61.2Kg 包埋后的猕猴桃提取物。

2. 根据权利要求 1 所述的猕猴桃提取物,其特征在于,按照 Folin-Ciocalteu 分析法,所述提取物在 90℃的甲醇 /1.2M HCl (v/v) 溶液中水解 2 小时后,多酚的总含量高于 10%,儿茶酸的含量为高于 4%,没食子酸的含量高于 1%。

3. 根据权利要求 1 所述的分离的猕猴桃提取物,其中缀合态多酚衍生物的分子量为 3000。

4. 根据权利要求 1 所述的分离的猕猴桃提取物,其中所述的缀合多酚衍生物的聚合度为 20。

5. 一种权利要求 1 所述的分离的猕猴桃提取物制备治疗新陈代谢紊乱药物的应用,所述提取物含有重量比大于 10%的缀合多酚衍生物,其中,新陈代谢紊乱为肥胖。

6. 一种权利要求 1 所述的分离的猕猴桃提取物制备预防新陈代谢紊乱药物的应用,所述提取物含有重量比大于 10%的缀合多酚衍生物,其中,新陈代谢紊乱为结肠癌或乳腺癌。

7. 一种用于治疗肥胖的软胶囊,包括权利要求 1 所述的分离的猕猴桃提取物,所述提取物包括重量比大于 10%的缀合多酚衍生物。

8. 一种用于治疗肥胖的经包装的制剂包括:一种含有权利要求 1 所述分离的猕猴桃提取物的组合物,所述的组合物包括重量比大于 10%的缀合多酚衍生物;以及用于治疗或预防与新陈代谢紊乱有联系的疾病或病症的有效治疗方式的使用说明书。

9. 根据权利要求 8 所述的制剂,其中,所述的新陈代谢紊乱为肥胖。

## 猕猴桃提取物

- [0001] 相关申请的交叉引用
- [0002] 本申请要求下列申请的优先权：
- [0003] 申请日为 2006 年 5 月 5 日，申请号为 A778/2006，奥地利专利申请；
- [0004] 申请日为 2007 年 4 月 26 日，申请号为 11/740, 583，美国专利申请；
- [0005] 上述专利申请的内容通过引用的方式被合并于此。

### 技术领域

- [0006] 本发明主要涉及猕猴桃提取物的分离和纯化方法及其组合物。

### 背景技术

[0007] 多酚广泛地分布于植物和主要的植物副产品中。超过 5000 种不同的多酚已被识别确定，并且自然界中多酚预计的数量很可能超过其化合物的复杂程度。总之，多酚在植物中以游离态多酚单体被发现（例如黄烷醇类，黄烷酮类，黄酮，花色素类）或者以缀合单宁被发现，如可水解单宁，单宁衍生物，或缩合单宁和原花青素。

[0008] 茶，水果和蔬菜的许多健康益处都归因于多酚。例如，绿茶多酚受到重视，因为其经证实的抗氧化特性，抗诱变特性，抗癌特性，降胆甾醇作用，还有在预防心脑血管疾病方面的能力。

[0009] 文献资料中普遍对茶多酚有很好的描述。据报道，200mL 绿茶含有相当于 140mg(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)，65mg(-)-表没食子儿茶素 (EGC)，28mg(-)-表儿茶素没食子酸盐 (ECG) 和 17mg(-)-表儿茶素。高含量的 3,4,5-三羟苯甲酰单元已经被证实与前列腺癌细胞和乳腺癌细胞中诱发的细胞凋亡，以及抑制脂肪酸合成酶有联系。

[0010] 脂肪酸合成酶 (FAS) 是一种重要的酶，其参与体内能量代谢，并被证实与人类的各种疾病有关系。

[0011] 根据研究，两种酶系统被识别确认，称之为 I 型和 II 型。I 型 FAS 在高等动物和酵母中被发现，而 II 型主要出现在植物和细菌中。动物 FAS 由两条相同的多功能多肽链构成，每条链含有 6 个不连续的具有酶活性的功能区。通过下列反应机理，FAS 由底物乙酰辅酶 A (Ac-CoA)、丙二酰辅酶 A (Mal-CoA) 和 NADPH 主要地从头合成棕榈酸：

[0012] 
$$\text{Ac-CoA} + 7 \text{ Mal-CoA} + 14 \text{ NADPH} + 14 \text{ H}^+ \rightarrow \text{Palmitinic Acid} + 14 \text{ NADP}^+ + 6 \text{ H}_2\text{O} + 8 \text{ CoA-SH} + 7 \text{ CO}_2$$

[0013] FAS 存在于大多数动物组织中，肝脏中的数量高。由于摄入足量的饮食脂肪，通常条件下组织中 FAS 活性被下调。在不同的病理生理条件下，如结肠癌，前列腺癌，乳腺癌，子宫内膜癌或者卵巢癌中的恶性肿瘤，FAS 活性表现出被上调到了一个意外的高水平。因此，抑制 FAS 被发现与肿瘤生长的减慢和恶性肿瘤细胞的凋亡有联系，这可能用作治疗癌症的有价值的目标。

[0014] 最近的研究显示，抑制 FAS 能够减少老鼠的食物摄入量和体重。其进一步显示人

体内经由 FAS 的全程脂肪合成促使循环甘油三酸酯水平。与血浆中游离脂肪酸的再酯化过程一同,其贡献了大约 50% 的甘油三酸酯,而剩余的 50% 来源于食物中脂蛋白的分解和吸收以及人体内的脂肪储备。

[0015] 应该注意的是,根据对健康的,非肥胖的人的脂肪合成研究显示,就甘油三酸酯的转化和分泌而言,经由 FAS 系统的脂肪合成不是一个主要路径。因此,在健康的,非肥胖的人体内抑制 FAS 通常不认为是减少体内脂肪含量的一个有效的方法。但是,根据对老鼠的研究得出结论,FAS 抑制剂也是造成减少的食物摄入量和减轻的体重的原因,这可能归结于脂肪的减少。

[0016] 此外,对肥胖人士和糖尿病人的研究显示,与碳水化合物摄入有紧密联系的高甘油三酸酯血症很可能是由于通过新生脂肪合成将糖酵解的代谢产物转化为脂质导致的。

[0017] 肥胖是由于能量的摄入与消耗的不平衡的结果导致的。过量的能量被储存在增大的或数量增多的脂肪细胞中。此外,肥胖是导致各种疾病的一个强危害因素,例如高血压,高血脂,动脉硬化和糖尿病。因此,避免肥胖的有效的途径是抑制从肠内吸收脂肪。

[0018] 胰脂肪酶在脂质吸收中是一种关键的酶。众所周知,如果不经过胰脂肪酶的作用,饮食中的脂肪不能从肠内被直接吸收。因此,为避免体重增加,抑制脂肪酶可有效地减少脂肪吸收。

[0019] 所以,需要一种能够帮助减少一种或多种普遍症状的组合物,和 / 或一种可提供适合的组合物方法,尤其是来自天然存在的原料。

[0020] 简要说明

[0021] 本发明特别地提供分离的猕猴桃提取物,其重量比大于 10% 的一种或多种缀合多酚衍生物。这些多酚衍生物来源于没食子酸衍生物,咖啡酸衍生物和儿茶酸衍生物的单体亚单元或其混合物。

[0022] 所述的分离的提取物可以选择性地包括一种粘结剂,例如环糊精作为一种载体。

[0023] 本发明也涉及制备上述猕猴桃提取物的方法。

[0024] 本发明进一步涉及通过服用药剂学上有效量的上述猕猴桃提取物来治疗多种疾病的方法。

[0025] 一方面,本发明提供了一种治疗与人胰腺脂肪酶 (LPS) 和 / 或人脂肪酸合成酶 (FAS) 活性有联系或由其导致的疾病或症状的方法。

[0026] 所以,本发明进一步提供了源于上述的猕猴桃提取物的具有治疗水平的可生物利用的缀合多酚衍生物。

[0027] 虽然披露了多种具体方案,但根据下列详细描述内容,其它具体方案对于本领域技术人员而言将仍是显而易见的。正因是显而易见的,本发明能够在多种显著的方面进行改良变换,而所有这些并不脱离本发明的主旨与范围。因此,详细说明部分应被视为对本质的说明的而非限制。

#### 附图说明

[0028] 图 1、和图 2 分别显示了多酚不经过水解或经过水解的鲜猕猴桃样品和猕猴桃提取物中的儿茶酸 (C),表儿茶酸 (EC) 和没食子酸 (GA) 含量。

[0029] 图 3 显示了猕猴桃和猕猴桃提取物的 LPS 抑制实验的结果。

- [0030] 图 4 显示了 LPS 抑制实验与多酚低聚 / 高聚分子的 GA 代表物的相互关系。
- [0031] 图 5 提供了缀合猕猴桃多酚与 LPS 抑制程度之间的剂量特性曲线图。
- [0032] 图 6 显示了 FAS 酶实验分析中蛋白质的线性关系。
- [0033] 图 7 显示了 FAS 酶实验分析中底物的线性关系。
- [0034] 图 8 显示了 FAS 酶实验分析中最佳 pH。
- [0035] 图 9 显示了猕猴桃提取物对 FAS 的抑制作用。
- [0036] 图 10 为浓缩的猕猴桃提取物多酚的反相色谱图。
- [0037] 图 11 为浓缩的猕猴桃提取物多酚凝胶渗透色谱图。
- [0038] 图 12 为猕猴桃提取物对 I 型 FAS 抑制效果的线性抑制曲线典型图。
- [0039] 图 13 为猕猴桃提取物对 I 型 FAS 抑制效果的 IC<sub>50</sub> 典型图。
- [0040] 图 14 为猕猴桃提取物对 LPS 抑制效果的线性抑制曲线典型图。
- [0041] 图 15 为猕猴桃提取物对 LPS 抑制效果的 IC<sub>50</sub> 测定典型图。
- [0042] 图 16 为纯化的浓缩猕猴桃提取物多酚和猕猴桃提取物的 LPS 活性的相对抑制效果典型图。
- [0043] 图 17 为纯化的浓缩猕猴桃提取物多酚和水解浓缩后猕猴桃提取物多酚的 LPS 活性的相对抑制效果典型图。
- [0044] 详细说明
- [0045] 本发明涉及猕猴桃提取物,其含有重量份增加的缀合多酚物质的成分,该浓度的缀合多酚物质在天然存在的猕猴桃中未发现。
- [0046] 在说明书和权利要求书中,所述的“包括”和“包含”是开放式术语,应被解释为“包括,但不限于...”。这些术语包括了较多限制性的术语“基本上由...组成”和“由...组成”。
- [0047] 不同来源的猕猴桃均是可接受的。虽然不限于后面的描述,但猕猴桃果实可从 *Actinidia Chinensis* 或 *Actinidia Deliciosa* 的果实中理想地得到。
- [0048] 所述的“提取物”意为猕猴桃植物获得的猕猴桃组合物,诸如从叶,嫩枝,树皮,根,茎,籽,花,浆果,果实,例如借助于这里所述的分离方法而获得。意外地发现猕猴桃原料的提取物中含有的缀合多酚重量百分比高,相对于猕猴桃果实本身或其冻干的产品。理想情况下,使用猕猴桃的果肉和果汁。
- [0049] 猕猴桃果实提取物主要通过一种选择性溶剂从脂肪醇中获得,例如,乙醇,丙酮,己烷,氯仿,乙酸乙酯,石油醚,或其混合物和 / 或其混合物与水的混合。特别地,猕猴桃果实的乙醇提取物能够通过乙醇或乙醇和水的混合物制备得到。
- [0050] 按照本发明,分离的猕猴桃提取物含有一种或多种缀合多酚,其来源于没食子酸衍生物,咖啡酸衍生物和儿茶酸衍生物或其混合物。在另一具体实施例中,所述的提取物含有至少一种来源于没食子酸衍生物的缀合多酚。一个具体实施例中,所述的提取物含有至少一种来源于咖啡酸衍生物的缀合多酚。仍是在另一具体实施例中,所述的提取物含有至少一种来源于儿茶酸衍生物的缀合多酚。
- [0051] 所述的没食子酸衍生物包括没食子酸、二羟基苯甲酸和对羟基苯甲酸。
- [0052] 所述的咖啡酸衍生物意指包括咖啡酸、香豆酸和阿魏酸。
- [0053] 所述的儿茶酸衍生物意指包括儿茶酸和没食子儿茶素。

[0054] 一方面,本发明所述的分离的猕猴桃提取物提供了不少于 75%,不少于 90%,甚至不

[0055] 少于 95%的以缀合单宁存在的多酚(诸如没食子酸衍生物,咖啡酸衍生物或儿茶酸衍生物)。

[0056] 低聚态和高聚态的多酚具有不同的稳定性。在热水中水解为基本结构的多酚被称为可水解单宁。仅在强酸存在下水解的多酚被称为衍生单宁或缩合单宁。

[0057] 多酚以“游离态”(单分子态)和“聚合态”(低聚态/高聚态)形式存在。

[0058] 在另一方面,本发明所述的分离的猕猴桃提取物含有儿茶酸(C)和没食子酸(GA)。存在于提取物中的儿茶酸和没食子酸分别以不少于 75%,不少于 90%,甚至不少于 95%数量的缀合态形式存在。

[0059] 本发明提供了缀合单宁物质,其显示了比游离态多酚对 LPS 和 FAS 具有较高的抑制效果。所以,含有数量增加的缀合单宁物质的猕猴桃提取物被发现对于 LPS 和 FAS 而言具有一种很好的抑制活性。

[0060] 本发明所述的分离的猕猴桃提取物能够被用于治疗包括新陈代谢紊乱和癌症在内的疾病,所述的新陈代谢紊乱可以是肥胖,高血脂,高血压,动脉硬化,糖尿病,腹泻,便秘,脂肪肝疾病;所述的癌症可以是结肠癌,前列腺癌,乳腺癌,子宫内膜癌或卵巢癌。这些疾病都显示出与 LPS 和 / 或 FAS 活性有联系。

[0061] 在典型的方法中,本发明所述的猕猴桃提取物可以通过基本含有下列步骤的方法分离得到:

[0062] 压榨新鲜的猕猴桃去除果汁。过滤后的滤渣被作为原料或干燥的果实被用做原料。

[0063] 提取:经压榨的新鲜猕猴桃原料或干燥的猕猴桃为原料,在室温下,用大约 3-5 倍原料重量的浓度约 40-90%的乙醇提取,例如重量比为 50%,60%,70%或 80%(余者为水)。混合物搅拌大约 1-6 小时,例如 3 小时,然后重力过滤,抽滤或离心过滤。按照上述方法,将原料使用大约 3-5 倍原料重量的乙醇再提取一或两次以上,过滤,然后将提取物合并。

[0064] 浓缩:然后提取液在 45°C 以下减压浓缩(大约在 -0.09 至 -0.08MPa 之间),得到提取浓缩液。温度越低越好,浓缩的温度范围从室温到大约 45°C,例如 30°C,35°C 或 40°C。

[0065] 选择性包埋:一种赋形剂,诸如一种糊精( $\beta$ -环糊精)或其它淀粉衍生物可以添加到提取浓缩液中。溶液被搅拌至衍生物完全溶解。

[0066] 选择性喷雾干燥:通过喷雾干燥可获得猕猴桃提取物的包埋粉末。

[0067] 也可以选择将提取浓缩液按照上述方法在低于 45°C 的温度下被减压浓缩,直至获得干燥粉末。

[0068] 特别的是分离的猕猴桃提取物通过不同的方法被浓缩后都能得到一种富含缀合多酚的溶液。例如,通过截留分子量,超滤可以用来移除不想要的成分。过滤的截留物被以液体形式存储,例如,然后能够通过喷雾干燥,冷冻干燥,气流干燥,流化床干燥,环形干燥,盘式干燥,真空干燥,高频干燥或微波干燥被进一步浓缩成为粉末。最后,提取物应含有至少 10%重量份的缀合多酚成分。因此,提取物含有缀合多酚衍生物以及选择性的其它植物原料,例如其它黄酮,糖,等等。

[0069] 猕猴桃提取物通过一种或多种现有已知方法进一步纯化,例如色谱,凝胶色谱,高效液相色谱,结晶,亲和层析,分配层析和其它同类方法。特定多酚的鉴定能够通过本领域技术人员已知的多种方法完成,包括<sup>1</sup>HNMR,化学降解,色谱和光谱,特别是用同核和异核二维 NMR(核磁共振)技术来表征分离的多酚化合物。

[0070] 所述的“纯化的”或“分离的”被用于从上述的猕猴桃提取物中纯化和/或分离一种或多种多酚化合物。再次使用现有技术中已知的传统方法,猕猴桃提取物中的不同成分被分离为纯净物质。本发明的一方面,猕猴桃提取物中的多酚利用现有已知技术充分地纯化和分离。经纯化的化合物的纯度以重量比计通常至少为 90%,优选为至少 95%,进一步优选为至少 99%并且甚至更优选至少 99.9%(例如约 100%)。

[0071] 因此,本发明进一步提供可生物利用的分离的猕猴桃提取组合物,这里所述的组合物可用于治疗多种疾痛。猕猴桃提取物按照下文所述的多种方法服用。

[0072] 本发明所述的组合物掺入多种食品,饮料,快餐等中。一方面,该组合物在使用前,能够被喷洒在食物表面。如果被喷洒在食物表面,诸如淀粉、蔗糖或乳糖这些适合的载体可用于帮助分散猕猴桃提取物的浓度使其更容易地应用于食品中。

[0073] 本发明所述的组合物也能够被提供用于作为不同预加工食品的添加剂。为了这种应用目的,本发明所述的组合物被添加到任何天然的,处理的,食物或非食物产品的预加工食品中,本发明所述的组合物能够被直接混合进入很多预加工食物产品中,包括,但不限于膳食饮料,营养饼干或点心(意指各种条块状的固体食物)和预加工的速冻食品。此外,本发明所述的组合物能够被混合进入很多预加工非食物产品,包括,但不限于糖果,诸如薯条之类的零食,预加工肉类食品,牛奶,奶酪,酸奶,运动食品,运动饮料,蛋黄酱,沙拉调味料,面包和其他任何含脂肪或含油食物。正如这里使用的,所述的“食品”是指任何适合人类或动物食用的物质。

[0074] 本发明所述的组合物能够被添加于多种饮料中,诸如果汁,奶昔,牛奶等。

[0075] 优选的服用方式是口服。本发明所述的组合物与适合的载体例如淀粉,蔗糖,乳糖设计成片剂,胶囊,溶液,糖浆和乳剂。本发明所述的片剂或胶囊用肠衣包封,该肠衣可在 pH 为 6.0-7.0 的环境下溶解。适合的肠衣是醋酸邻苯二甲酸纤维素,其可以在小肠中溶解但不在胃中溶解。

[0076] 本发明所述的组合物通过现有技术的多种方法设计成软胶囊制剂。该制剂通常包括一种可接受的载体,诸如油类,或其它悬浮剂或乳化剂。

[0077] 适合的选择性载体包括但不限于,例如,脂肪酸,脂肪酸脂及其盐,其可源于任何资源,包括而不限,天然的或合成的油类,脂肪,蜡或其混合物。而且,脂肪酸可不受限来源于非氢化油类,部分氢化油类,完全氢化油类或其混合物。非限制性的典型脂肪酸(其脂和盐)来源包括种子油,鱼或海油,菜籽油,蔬菜油,红花油,葵花子油,旱金莲花种子油,芥菜子油,橄榄油,芝麻油,大豆油,玉米油,花生油,棉花子油,米糠油,巴西棕榈油,棕榈油,低芥酸菜子油,橄榄核油,羽扇豆油,椰子油,亚麻子油,月见草油,加州希蒙得木,麦芽油,牛油,牛脂,黄油,鸡油,猪油,牛奶中的脂肪,牛油树脂或其混合物。

[0078] 特定的非限制性典型鱼油来源包括甲壳类动物油,金枪鱼油,鲭鱼油,鲑鱼油,鲱鱼油,凤尾鱼油,青鱼油,鳟鱼油,沙丁鱼油或其混合油。特别地,脂肪酸来源是鱼油(DHA 或 EPA),大豆油或亚麻子油。蜂蜡可以替换或者与上述确定载体之一联合作为适合的载体,也

可以作为悬浮剂诸如硅石（二氧化硅）一样。

[0079] 本发明所述的制剂也被考虑作为营养保健品。所述的“营养保健品”在现有技术中是已知的并被用来描述食物中发现的特定的化合物，该化合物能够预防疾病或改善不良症状。

[0080] 本发明所述的制剂进一步包括多种成分，其有助于稳定本发明有益组合物的成分，或有助于促进本发明有益组合物中组分的生物利用度，或作为个人饮食的额外营养。适合的添加剂包括维生素和生理可接受的矿物质。维生素包括但不限于维生素 A，维生素 B，维生素 C，维生素 D，维生素 E，维生素 K 和叶酸。非限制性矿物质包括铁，钙，镁，钾，铜，铬，锌，钼，碘，硼，硒，锰，及其衍生物或混合物。这些维生素和矿物质可不受限制地来源于任何资源或其组合。非限制性典型的维生素 B 包括但不限于硫胺，烟酰胺，维生素 B6，核黄素，维生素 B12，维生素 H，泛酸或其混合物。

[0081] 多种添加剂可掺入本发明组合物。本发明组合物选择性的添加剂包括但不限于透明质酸，磷脂，淀粉，糖，脂肪，抗氧化剂，氨基酸，蛋白质，调味剂，着色剂，水解淀粉和其衍生物或其混合物。

[0082] 如这里使用的，所述的“抗氧化剂”在现有技术中是公知的，并是指防止或延缓化合物的氧化变质的合成物或天然物。典型的抗氧化剂包括生育酚，类黄酮，儿茶酚，超氧化物歧化酶，卵磷脂， $\gamma$ -谷维醇；维生素，例如维生素 A，C（抗坏血酸）和 E 和  $\beta$ -胡萝卜素；天然成分，例如在迷迭香和山楂提取物中发现的鼠尾草酚、鼠尾草酸和迷迭香酚，原花青素，诸如在葡萄籽或松树皮提取物，和绿茶提取物中发现的。

[0083] 本发明中包含猕猴桃提取物的组合物可通过传统的混合，溶解，造粒，糖衣包覆，粉碎，乳化，胶囊化，包埋或冻干加工过程实现。组合物可按照传统的方法采用一种或多种生理学上可接受的载体，稀释液，赋形剂，助剂制成制剂，其便于使稳定的猕猴桃提取物加工成被使用的配制品。

[0084] 本发明组合物能够制成适合实际任何服用方式的剂型，包括，例如，口服，口腔含服，内吸收，注射，皮肤，直肠，阴道等等，或适合于吸入或喷洒服用的方式。

[0085] 体内吸收剂型包括设计成通过注射给药，例如，皮下注射，静脉注射，肌肉注射，鞘内注射或腹腔注射，同时还有那些设计成皮肤吸收，口腔黏膜吸收或肺吸收给药。

[0086] 有用的注射配制品包括消毒的悬浮液，溶于水溶液或油溶液中的猕猴桃提取组合物的溶液或乳液，溶液或乳状液。组合物也可含有配方助剂，例如悬浮剂，稳定剂和 / 或分散剂。用于注射的配方可以单位剂量的形式存在，例如，安瓿或混剂容器，并包含额外的防腐剂。

[0087] 或者，在使用前，可注射制剂可以粉末形式与适合的媒介物再生，媒介物包括但不限于，使用前的无热原的纯净水，缓冲剂，葡萄糖溶液，等等。最终，猕猴桃提取组合物可通过任何已知技术干燥和使用前再生，例如冻干。

[0088] 对于黏膜渗透给药，适于透过屏障的渗透剂在制剂中使用。这类渗透剂在现有技术中是已知的。

[0089] 对于口服给药，采用传统方法本发明组合物与药学上可接受的辅料制成诸如锭剂，片剂或胶囊的制剂，所述的辅料诸如粘合剂（例如，预胶化玉米淀粉，聚乙烯吡咯烷酮或羟甲基纤维素）；填料（例如，乳糖，微晶纤维素或磷酸氢钙）；润滑剂（例如，硬脂酸镁，



滑石或硅石);分解质(例如,马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠)。这些片剂可通过现有技术中已知方法进行包衣,例如,糖,膜或肠衣。

[0090] 用于口服给药的液体剂型可以为诸如酞剂,溶液,糖浆或悬浮液的形式,或其可以干制品存在,其在使用前通过加入水或其它适合的媒介来使用。这样的液体制剂可通过传统的方法引入药剂学上可接受的添加剂制得,诸如悬浮剂(例如,山梨醇糖浆,纤维素衍生物或饱和可食用脂肪);乳化剂(例如,蛋黄素或阿拉伯树胶);非水媒介物(例如,杏仁油,油脂,乙醇,或精馏的植物油);和防腐剂(例如,尼泊金甲酯或尼泊金丙酯或山梨酸)。这些制剂也可含有适合的缓冲盐,防腐剂,调味料,着色剂和甜味剂。

[0091] 口服给药的制剂可以用公知的方式设计成可控释猕猴桃提取组合物给药的形式。

[0092] 对于含服,组合物可采用以传统方式设计成片剂或锭剂的剂型。

[0093] 对于直肠和阴道途径用药,猕猴桃提取组合物可以设计成溶液(用于滞留灌肠剂),栓剂或药膏剂型,其含有传统的栓剂基础成分,例如可可油或其它甘油酯。

[0094] 对于鼻腔用药或通过吸入或喷洒用药方式,猕猴桃提取组合物可通过气雾喷雾,利用适合的挥发剂,从加压包或喷雾器中被方便地给药,所述的挥发剂可以是二氟二氯甲烷,三氟氯甲烷,二氟四氯乙烷,碳氟化合物,二氧化碳或其它适合的气体。在加压气雾剂的情况下,剂量单位可通过一个阀门测量来传递计量数值。用作吸入器或吹药器(例如明胶构成的胶囊或吸收盒)的胶囊和吸收盒可设计成含有特定化合物的粉末混合物和诸如乳糖或淀粉的适合的粉末基质。

[0095] 为了延长给药,猕猴桃提取组合物可被设计成作为补给制品用来通过植入或肌肉注射方式用药。猕猴桃提取组合物可与适合的聚合物或憎水性物质(例如,在一种可接受的油中作为乳剂)或离子交换树脂,或作为溶解性差的衍生物复配制造,采用,如一种溶解性差的盐。作为另一种选择,经皮给药系统制成为一种吸盘或贴片被使用,其缓慢释放猕猴桃提取组合物使其经皮肤吸收。最后,渗透增强剂可被用来促进猕猴桃提取组合物的经皮渗透。适合的皮肤贴片在诸如美国专利 5,407,713;美国专利 5,352,456;美国专利 5,332,213;美国专利 5,336,168;美国专利 5,290,561;美国专利 5,254,346;美国专利 5,164,189;美国专利 5,163,899;美国专利 5,088,977;美国专利 5,087,240;美国专利 5,008,110;和美国专利 4,921,475 中有描述。

[0096] 另外,其它给药系统可被使用。脂质体和乳液是公知的能够用于输送猕猴桃提取组合物的给药载体的例子。特定有机溶剂诸如二甲基亚砷(DMSO)也能够被使用,虽然通常要以较高毒性为代价。

[0097] 如果愿意,组合物可以存在于包裹或分散载体内,其可以含有一种或多种含有猕猴桃提取组合物的单位剂量形式。例如,包裹可以含有金属或塑料薄片,例如水泡包装。包裹或分散载体可附有服用说明。

[0098] 可制成软凝胶或软胶囊,例如但不受限于将配方组分散于合适的载体(例如,米糠油,和/或蜂蜡)以形成高粘度混合物。然后,使用对于软胶囊工业从业人员来说已知的技术和设备,用明胶基质薄膜将这种混合物封装成胶囊。然后胶囊被干燥成恒重。典型地,胶囊的重量介于 100-2500mg,优选其重量介于 1500-1900,更优选其重量介于 1500-2000mg。

[0099] 例如,当制备软胶囊外壳时,壳体可包含 20-70%的明胶,通常还有可塑剂和大约

5-60%重量的山梨醇。软胶囊填充物是液体（如果愿意，主要的载体诸如米糠油或麦芽油和 / 或蜂蜡），并可包括除猕猴桃提取组合物以外的亲水基质。亲水基质，如果存在，为具有平均分子量 200-1000 的聚乙二醇。进一步的成分的选择性的增厚剂和 / 或乳化剂。在一个具体方案中，亲水基质包括具有平均分子量 200-1000 的聚乙二醇，5-15%的甘油，和 5-15%重量的水。聚乙二醇也可和丙二醇和 / 或碳酸丙烯酯混合。

[0100] 在另外一个具体方案中，软胶囊由明胶，甘油，水和不同的添加剂制得。典型地，明胶的百分比（重量比）介于 30-50%重量比之间，优选介于 35% - 重量比之间，更优选为 42%重量比。配方包括 15-25%重量比的甘油，优选为 17-23%重量比的甘油，更优选为 20%重量比的甘油。[094] 胶囊中的剩余物是有代表性的水。其用量变化在 25% -40%重量比之间，优选在 30-35%重量比之间，更优选为 35%重量比。由调味剂，糖，着色剂等，或其混合物构成的胶囊的剩余物通常可在 2-10%重量比之间变化。胶囊制备后，最终胶囊中的含水量通常为 5-10%重量比，特别是 7-12%重量比，尤其是 9-10%重量比。

[0101] 对于制备过程，要估计标准软壳胶囊制造技术可被用于制备软壳产品。实用的制备技术的实例为平板法，R. P. Scherer 倡导的旋转模具工艺，使用诺顿胶囊机器的工艺，和由 Lederle 发展的 Accogel 机器和工艺。这些工艺中的每一种都是成熟的技术并可广泛应用于任何一个想制备的软胶囊。

[0102] 乳化剂可被用于增溶软胶囊内的成分。特定的表面活性剂，乳化剂，或起泡剂包括 D- 山梨醇、乙醇、角夹胶、聚乙烯羧、羧甲基纤维素钠、瓜耳豆胶、甘油、甘油脂肪酸酯、胆固醇、白蜂蜡、磺琥辛酯钠、脂肪酸糖酯、十八醇、硬脂酸、聚乙二醇 -40 硬脂酸酯，倍半异硬脂酸山梨糖醇酐、鲸蜡醇、白明胶、山梨糖醇脂肪酸酯、滑石、去水山梨糖醇三油酸酯、石蜡，马铃薯淀粉、羟丙基纤维素、丙二醇、丙二醇脂肪酸酯、果胶、聚氧乙烯 (105) 聚氧丙烯 (5) 乙二醇、聚氧乙烯 (160) 聚氧丙烯 (30) 乙二醇、聚氧乙烯型氢化蓖麻油、聚氧乙烯型氢化蓖麻油 40、聚氧乙烯型氢化蓖麻油 60、聚乙二醇 -35 蓖麻油、聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 80、聚乙二醇 400、十二烷基肉豆蔻酸盐、甲基纤维素、单油酸山梨醇酐酯、单硬脂酸甘油酯、失水山梨醇单棕榈酸酯、单月桂酸山梨醇酐酯、十二烷基二甲胺氧化物溶液、十二烷基硫酸钠、聚桂醇、无水碳酸钠、酒石酸、氢氧化钠、纯化大豆磷脂、大豆磷脂、碳酸钾、碳酸氢钠、中链的甘油三酸酯、柠檬酸酐、棉籽油 - 豆油混合物和液体石蜡。

[0103] 本发明也提供了经包装的本发明组合物的剂型以及适当条件下该产品使用的说明。典型地，无论以什么形式，经包装的剂型均可被有需要的人服用。典型的剂量要求介于 1-4 剂 / 天。[098] 虽然本发明描述了用于治疗不同症状的软胶囊中的本发明组合物的制剂，用途，生产和包装，但是其不应当被认为是仅限制在软胶囊产品中。可吸收的本发明组合物可通过上述传统的片剂，药丸，锭剂，酏剂，乳化剂，硬胶囊，液体，悬浮液等给药。

[0104] 本发明所述的猕猴桃提取物，或其组合物，通常以有效量被用来实现预计的结果，例如，以有效量来治疗或预防特定的处于被治疗中的相关疾病。该组合物可给予实现治疗益处或实现预防益处。治疗益处意指为接受治疗的潜在的紊乱的根除或改善，和 / 或一种或多种与潜在的紊乱有联系的病症的根除或改善，以致于虽然这些患者仍在遭受潜在的紊乱的折磨，但是患者说感受或症状方面有改善。例如，不仅在潜在的病症被根除或改善的时候，而且在患者报告与病痛有联系的身体不舒服的延续时间和严重性都降低时，本发明组合物的服用对受病痛折磨的患者均提供治疗益处。

[0105] 通过预防性的服用,该组合物可给予处于前面描述过的某一种病症的风险之下的患者服用。

[0106] 组合物的摄入量将决定于多种因素,包括,例如,经治疗的特定迹象,给药方式,期望的效果是否是预防性或治疗性的,经治疗迹象的严重性,以及患者的年龄和体重等。属领域技术人员能够决定有效剂量。

[0107] 猕猴桃提取物的典型的总剂量范围从 0.0001 或 0.001 或 001mg/Kg/天至 100mg/Kg/天,但是,剂量范围根据其它因素可以更高或更低,其包括成分活性,其生物利用度,给药的方式和上述讨论的多种因素。用量和间隔时间可以个别被调整以提供足够的化合物血药浓度来维持治疗和预防效果。例如,根据其它因素,包括给药方式,经治疗的特定迹象,开药医生的判断,化合物可一周服用一次,每周几次(例如,每几天),每天一次或每天几次。所属领域技术人员将不需要额外实验就能够优化有效局部剂量。

[0108] 下列段落从 1 至 15 连续地列举给出的本发明的各个方面。在其中一个实施例中,在第一段(1),本发明给出

[0109] 1. 一种分离的猕猴桃提取物,含有超过大约 10%重量比的缀合多酚衍生物。

[0110] 2. 根据段 1 所述的分离的猕猴桃提取物,其中缀合多酚衍生物包括没食子酸衍生物,咖啡酸衍生物和儿茶酸衍生物或其混合物。

[0111] 3. 根据段 2 所述的分离的猕猴桃提取物,其中多酚态没食子酸衍生物与儿茶酸衍生物的比例大约为从 1:1 到 10:1。

[0112] 4. 根据段 2 所述的分离的猕猴桃提取物,其中多酚态咖啡酸衍生物与儿茶酸衍生物的比例大约为从 1:1 到 10:1。

[0113] 5. 根据段 2 所述的分离的猕猴桃提取物,其中多酚态没食子酸衍生物,咖啡酸衍生物与儿茶酸衍生物浓缩物的比例大约为从 1:1:1 到 10:10:1。

[0114] 6. 根据从段 2 到段 5 任意一段所述的分离的猕猴桃提取物,其中多酚态没食子酸衍生物为没食子酸、二羟基苯甲酸或对羟基苯甲酸,多酚态咖啡酸衍生物为咖啡酸、香豆酸或阿魏酸,多酚态儿茶酸衍生物为儿茶酸或没食子儿茶素,或其混合物。

[0115] 7. 根据从段 1 到段 6 任意一段所述的分离的猕猴桃提取物,其中缀合多酚衍生物的分子量大约为 2000-4000。

[0116] 8. 根据段 7 所述的分离的猕猴桃提取物,其中缀合多酚衍生物的分子量为大约 3000。

[0117] 9. 根据从段 2 到段 6 任意一段所述的分离的猕猴桃提取物,其中缀合多酚衍生物的聚合度大约为 15-25。

[0118] 10. 根据从段 9 所述的分离的猕猴桃提取物,其中所述的缀合多酚衍生物的聚合度为大约 20。

[0119] 11. 根据从段 1 到段 10 任意一段所述的分离的猕猴桃提取物,其中 1g 的分离的猕猴桃提取物包含大约 500-700  $\mu\text{mol}$  没食子酸等同物。

[0120] 12. 根据从段 1 到段 10 任意一段所述的分离的猕猴桃提取物,其中 1g 的分离的猕猴桃提取物包含大约 250-400  $\mu\text{mol}$  儿茶酸等同物。

[0121] 13. 前述任意一段所述提取物用于治疗疾病的用途,包含新陈代谢紊乱,诸如肥胖,高血脂,高血压,动脉硬化,糖尿病,腹泻,便秘,脂肪肝;以及癌症,诸如结肠癌,前列腺

癌,子宫内膜癌或卵巢癌。

[0122] 14. 一种软胶囊,包括:

[0123] 一种装有前述段 1 至段 12 任意一段所述的任意组合物的软胶囊。

[0124] 段 1 至段 12 任意一段所述的组合物;以及

[0125] 治疗与新陈代谢紊乱有关的疾病或病症的治疗有效方法的使用说明书,所述的代谢紊乱诸如肥胖,高血脂,高血压,动脉硬化,糖尿病,腹泻,便秘,脂肪肝;以及癌,诸如结肠癌,前列腺癌,子宫内膜癌或卵巢癌。

[0126] 下列实施例不是限制而是被理解为对本发明提供附加说明和支持。

### [0123] 具体实施方式

#### [0127] 实施例 1- 猕猴桃果实提取物

[0128] 1000Kg 新鲜的猕猴桃被碾碎并被压榨。得到 350kg 的汁液,得到 650Kg 剩余物作为原料。在室温下,3500 升 80%乙醇(乙醇水溶液)作为溶剂添加到原料中,并搅拌混合物 1 小时。过滤提取物。原料残渣再用 3500 升 80%乙醇在室温下(21°C)进一步提取 1 小时。过滤提取物。两次提取物与榨出的汁液合并,然后在 42°C和减压(-0.085MPa)的条件下浓缩到大约 600 升。12kg  $\beta$ -环糊精在搅拌下被加入浓缩物,直至环糊精完全溶解。经喷雾干燥,得到 62.5Kg 包埋后的猕猴桃提取物。

[0129] 提取物被发现含有 113,000IU/g 生物活性的 5.0%猕猴桃碱。按照 Folin-Ciocalteu 分析法,在 90°C的甲醇/1.2M HCl(v/v)溶液中水解 2 小时后,发现多酚的总含量高于 10%(m/m)(重量比),儿茶酸的含量为高于 4%(m/m),没食子酸的含量高于 1%。此外,提取物含有大约 1.52%维生素 C 和大约 66.1%的多糖。

#### [0130] 实施例 2

[0131] 1000Kg 新鲜的猕猴桃被碾碎并被压榨,得到 600Kg 剩余物作为原料。得到 600Kg 果汁。在室温下(20°C)2500 升的 90%乙醇作为溶剂添加到原料中,并搅拌混合物 2 小时。过滤提取物。残渣用 2500 升的 89%乙醇在室温下(19°C)进一步提取,混合物搅拌 1 小时。提取物离心分离。提取物与榨出的果汁合并,然后在 40°C和减压(-0.090MPa)的条件下被浓缩到大约 650 升。10kg  $\beta$ -环糊精在搅拌下被加入浓缩物,直至环糊精完全溶解。经冻干,得到 61.2Kg 包埋后的猕猴桃提取物。

[0132] 提取物含有 113,000IU/g 生物活性的 4.8%猕猴桃碱。按照 Folin-Ciocalteu 分析法,在 90°C的甲醇/1.2MHCl(v/v)溶液中水解 2 小时后,多酚的总含量为高于 10%(重量比),儿茶酸的含量为高于 4%(m/m),没食子酸的含量高于 1%。此外,提取物含有约 1.48%维生素 C 和约 65.3%的多糖。

#### [0133] 实施例 3- 游离态和总多酚的测定

[0134] 猕猴桃样品的准备:

[0135] 新鲜的猕猴桃(包括果皮)经彻底清洗和混合,切细成细小颗粒再在-20°C真空冷冻干燥 48 小时。冻干产物处理为细粉,用于下列实验。

[0136] 为了制备猕猴桃提取物,新鲜的猕猴桃需经压榨。残渣经 80%乙醇(残渣/80%乙醇=1/5)在室温下提取两次,每次 2 小时。醇提物与果汁合并,并在 42°C下减压浓缩至干。由 10Kg 猕猴桃果实可得到 0.50Kg 提取物干粉。

[0137] 游离态和总多酚的提取：

[0138] 1.0g 冻干猕猴桃果实或猕猴桃提取物（如上述过程制得）与 25mL 甲醇 / 水（1/1，体积比）混合并在塑料螺帽试管中加热到 90℃，间歇摇晃 2 小时后测定相应样品中存在的游离态多酚。另一个含有冻干的猕猴桃果实和猕猴桃提取物其中之一的 1.0g 样品与 25mL 甲醇 / 1.2M HCl（1/1v/v）在 90℃ 加热 2 小时，以测量相应样品中存在的总多酚 [Vinson, JA, Yong H., Xuehui, S, Ligia Z, et al. J. Agric. Food Chem. (2001) 49 :5315-5321]。每个样品至少提取 3 次（如上述制备中的冻干或提取）。

[0139] 儿茶酸 (C), 表儿茶酸 (EC), 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG), 表没食子儿茶酸 (EGC) 和没食子酸 (GA) 的测定：

[0140] 多酚的分离在带有紫外检测 (280nm) 的 Merck HPLC 梯度系统进行。在 40℃ 下用的乙腈和水（用 HCl 调整 pH 为 2.5）的线性梯度使用一个反相 spherisorb C-18 柱 (250×4.6mm, 5 μm, Waters) 来分离。流速为 1mL/分钟条件下，流动相梯度被调整为水中的乙腈从在 0 时的 3% 到 44 分钟时的 40%。所有样品的注射体积为 10 μL。提取物中的游离态和总多酚测定在过滤后注射 (0.3 μm, 针筒过滤器) [Dawes HM, Keene JB., J. Agric. Food Chem. (1999) 47 :2398-2403]。

[0141] C、EC、EGCG、EGC 和 GA 被用作外标物。标定溶液的配制是在 0.5mL 甲醇中溶解 25mg 标准品并将其用水稀释至 10mL 制备得到。通过加水进一步的制备稀释液。对 3 个参考化合物 (C, EC 和 GA) 而言，该方法的线性响应区被确定在 0.6mg/10mL 至 25.0mg/10mL 之间。

[0142] 【0139】在提取条件下被测的多酚单体的稳定性测定。经过甲醇 / 水提取和甲醇 / 酸提取后的全部 3 个标准品的回收率高于 95%（3 个浓缩物，重复提取）。

[0143] 【0140】分析结果以平均值 (± 标准偏差) 给出。结果被转化为 mmol/Kg 干物质。

[0144] 【0141】游离态和总多酚的测定：

[0145] 【0142】样品中的多酚单体和低聚 / 高聚体的总量，通过 Folin—Ciocalteu 方法分析经分光光度法在 720nm 的测定 [singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos, RM. Methods Enzymol. (1999) 299 :152-178]。GA 被用做外部标准。结果以 GA 当量 (GA-E) 表示。对照实验显示，当以 GA-E 表示时，c 和 EC 的回收率是 75%，这表明用 GA 的外部校准偏低估算了提交样品中的 C 和 EC。

[0146] 【0143】结果：

[0147] 【0144】C、EC、EGCG、EGC 和 GA 的数量：

[0148] 【0145】在新鲜的，冻干的猕猴桃果实中，EGCG 和 EGC 没有被检测到 (<5Hg/g 样品)，在经过如上所述用甲醇 / 水在加热下得到提取后的猕猴桃提取物中也没有被检测到。图 1 和图 2 显示了多酚经过水解和不经水解的两种样品中的 C、ECT 和 GA 的含量。

[0149] 【0146】根据检测经过水解和不经水解的 C、EC 和 GA 的含量，依据多酚单体和缀合单宁的相对作用，得出下列判断（见表 1）。

[0150] 【0147】表 1，来自多酚单体和低聚 / 高聚体的 C、EC 和 GA 的相对作用

[0151]

化合物	单体 (%)		缀合单宁 (%)	
	猕猴桃提取物	猕猴桃果实	猕猴桃提取物	猕猴桃果实
C	0.8	9.5	99.2	90.5
EC	30.1	32.5	69.9	67.5
GA	2.1	14.4	97.9	85.6

[0152] 【0148】游离态和总多酚的测定：

[0153] 【0149】通过 Folin-Ciocalteu 分析法得到的多酚单体和缀合单宁的总量被显示在表 2 中。

[0154] 【0150】表 2, 通过 Folin-Ciocalteu 法得到的多酚总量 (mmol/Kg 干物质)

[0155]

游离态多酚 (GA-E*)		总多酚 (GA-E)	
猕猴桃提取物	猕猴桃果实	猕猴桃提取物	猕猴桃果实
56.5	16.0	710	210

[0156] \* 没食子酸等同物

[0157] “猕猴桃果实”是指上述的冻干物质。

[0158] 【0151】甲醇 / 水提取的结果显示猕猴桃提取物比冻干的猕猴桃果实含有明显较少的游离态多酚。相反, 比较甲醇 / 酸提取物显示猕猴桃提取物比冻干的猕猴桃果实含有更多的缀合单宁。

[0159] 【0152】与水提取的猕猴桃提取物相比, 发现酸性提取后的猕猴桃提取物中 GA 和 C 的含量的有实质上的不同。GA、C 和 EC 的增 K 比例分别为 47、120 和 2.3 的系数。对于冻干猕猴桃果实中的增加比例分别为 6、10 和 2.0 的系数。最有趣的是, 与冻干猕猴桃果实相比, 在猕猴桃提取物中, GA 和 C 的增加是很高的, 而 EC 的增加是相当的。这些发现显示, 首先, 猕猴桃提取物富含缀合单宁, 其次, 在主要数量中 EC 未显示对浓缩单宁含量有贡献。

[0160] 【0153】也被发现的是, 在猕猴桃提取物中, 超过 97% 的多酚由缀合单宁组成。在冻干猕猴桃果实中, 相当低的比例的大约 73% 的多酚属于缀合单宁。

[0161] 通过 Folin-Ciocalteu 分析, 在猕猴桃提取物和冻干猕猴桃果实中分别有大约 30% 和 23% 的游离态多酚以 GA、C 和 EC 表示。在猕猴桃提取物和冻干猕猴桃果实中分别有大约 45% 和 30% 的总多酚以 GA、C 和 EC 表示。

[0162] 实施例 4- 脂肪酶抑制测试

[0163] 脂肪酶抑制实验

[0164] 化学试剂：

[0165] 参考标准品和有机溶剂 (ASC 或 HPLC 级) 从 Sigma Aldrich (维也纳, 奥地利) 买到。标准实验室化学药品为分析用规格。脂肪酶测试盒来自 Trinity Biotech (Jamestown, NY, USA, CatNo. :805)。

[0166] 猕猴桃样品：

[0167] 新鲜的猕猴桃 (来自新西兰的普通消费的栽培品种) 被彻底清洗、混合和冻干。冻干产物被粉碎并标记作猕猴桃粉末的样品。由 10Kg 猕猴桃果实可得到 1.20Kg 猕猴桃冻干品。

[0168] 猕猴桃提取物由经压榨排出猕猴桃汁的新鲜的猕猴桃制得。滤饼用 80% 乙醇 (滤饼 / 乙醇 = 1/5) 提取两次。乙醇提取物与果汁合并, 并在 45°C 下减压蒸发至干。平均每

10Kg 猕猴桃果实产出 0.50Kg 猕猴桃提取物干粉。

[0169] 样品制备：

[0170] 0.5-4.0g 猕猴桃冻干品或猕猴桃提取物悬浮在 100mL 的丙酮 / 水 (6/4) 中,并在室温下搅拌 12 小时以提取多酚。接下来以 5000rpm 转速离心分离 10 分钟,上层清液在 45℃ 下减压蒸发至干。干燥剩余物被用于下列研究。

[0171] 游离态多酚的提取,缀合多酚的水解

[0172] 将用于制备干剩余物样品的 1g 猕猴桃冻干品或猕猴桃提取物的干渣样品溶于 100mL 甲醇 / 水 (1/1 体积比) 中,并在塑料螺封试管中被加热到 90℃ 后,在间歇摇晃下保持 2 个小时,以提取存在于样品中的“游离态多酚”。另一组同等制备的样品溶解于 100mL 甲醇 / 1.2M 盐酸 (1/1 体积比) 中,加热至 90℃ 保持 2 小时,通过存在于样品中的缀合多酚的水解产生“总多酚”。在检测多酚之前,样品需经离心分离 (5000rpm, 5 分钟) 并经进一步过滤 (针筒过滤器 (syringefilter) 2  $\mu$  M) 清洗。每个样品最少重复 3 次。

[0173] 多酚的测定：

[0174] 多酚经分光光度法在 720nm 处测定, Folin-Ciocalteu 分析。没食子酸 (GA) 用做外部标准。结果以 GA 等同物 (GA-E) 表示。用含有儿茶酸、表儿茶酸、丹宁酸和香豆酸的溶液的控制组实验显示, 当以 GA-E 表示 (数据未显示) 时, 可获得大于 80% 的回收率。由“游离态多酚”和“总多酚”获得的浓缩物之间的不同在于“缀合多酚”的部分。

[0175] 分析结果以平均值 ( $n = 3$ ) 给出。结果被转换为  $\mu$  mol GA-E/mg 干物质。

[0176] 脂肪酶活性测试

[0177] 将 0.5、1.0、1.5 和 4.0g 起始物质 (猕猴桃冻干品或猕猴桃提取物) 制备的干渣样品溶解于 100mL 的甲醇 / 水 (1/1 体积比), 离心分离 (5000rpm 5 分钟) 并通过过滤纯化 (针筒过滤器 20  $\mu$  M)。这些样品在每毫升溶剂中含有 5、10、15 和 40mg 猕猴桃冻干品或猕猴桃提取物。控制实验用溶剂进行。

[0178] 另一组样品由 4.0g 起始物质在 100mL 的甲醇 / 1.2M 盐酸 (1/1 体积比) 加热配制而成。然后这些样品 (用 NaOH) 被中和至 pH7.0, 并在 45℃ 下减压蒸发至干。将残留物溶解于 100mL 的甲醇 / 水 (1/1 体积比), 离心分离 (5000rpm 5 分钟) 并通过过滤纯化 (针筒过滤器 20  $\mu$  M)。

[0179] 脂肪酶活性用市场上可买到的试剂盒测定。总之, 将测定量的 LPS 标准品, 溶剂或样品加入到 500  $\mu$  L 的培养基溶液, 轻轻混合并在 37℃ 下培养 5 分钟。加入触媒试剂后, 记录 10 分钟内在 550nm 下的吸光率的变化。活性等级是以控制组样品的 LPS (labeled with 327 IU/L) 的活性百分比给出。

[0180] 结果：

[0181] 用丙酮 / 水提取 0.5-4.0g 样品后, 来自猕猴桃冻干品和猕猴桃提取物的干质量平均分别为  $25 \pm 3\%$  和  $48 \pm 2\%$ 。这些样品中游离态、聚合态以及总多酚的分布和含量显示在表 1 中。猕猴桃冻干品或猕猴桃提取物分别含有占总多酚数量 26.5% 和 7.9% 的游离态多酚。相应的缀合多酚分别为 73.5% 和 92.1%。

[0182] 表 1, 游离态和总多酚 ( $\mu$  mol GA-E/mg 干物质)

[0183]

	猕猴桃冻干品	猕猴桃提取物
游离态多酚 (GA-E*)	0.076	0.057
缀合多酚 (GA-E)	0.21	0.653
总多酚 (GA-E)	0.286	0.710

[0184] \*... 没食子酸等同物

[0185] 脂肪酶活性：

[0186] 不同浓度的猕猴桃冻干品和猕猴桃提取物对 LPS 的影响显示在图 3 中。以起始物的浓度为基础,发现猕猴桃提取物抑制 LPS 的能力明显强于猕猴桃冻干品。

[0187] 如表 1 所示,猕猴桃提取物比猕猴桃冻干品含有相当多的缀合多酚。为修正这些不同,给出的浓度被转换为来自缀合多酚的部分(图 4)的 GA-E。这一转换产生了 LPS 抑制效果的按剂量比例增加,几乎与样品类型(猕猴桃提取物或猕猴桃冻干品)无关。

[0188] 为进一步探索缀合多酚的作用,测试了酸水解后的猕猴桃冻干品和猕猴桃提取物(每个浓度为 40mg/mL)存在下的 LPS 的活性。这些本质上不含缀合多酚样品得到的结果与相同浓度含有缀合多酚的完整部分样品得到的结果相比较(表 2)。可见,多酚水解后以及缀合多酚部分消失后,LPS 抑制效果几乎完全消失。

[0189] 表 2,酸水解 / 不经酸水解的 LPS 活性 (%)

[0190]

	% LPS-活性	
	猕猴桃冻干品	猕猴桃提取物
未水解多酚	35	72
水解后多酚	93	95

[0191] 如图 5 所示。LPS 抑制效果与以 GA-E 表示的缀合多酚的碎片的汇总结果得到了一个平滑的剂量响应曲线。

[0192] 讨论：

[0193] 多酚测定的结果显示猕猴桃提取物和猕猴桃冻干品中游离态多酚的含量相似,这表示提取过程保留了这部分多酚。猕猴桃冻干品观测到的游离态和总多酚的绝对数量和比例均在公开数据的范围内。在猕猴桃冻干品中,总多酚的大约 70% 以聚合态存在。猕猴桃提取物中观测到相当高比例的缀合多酚,超过总多酚的 92%。除了相对比例,猕猴桃提取物中缀合多酚绝对数量也是增加的,即使对不同的提取率进行修正。所以,可以断定提取过程从猕猴桃果实中有效地聚集了缀合多酚。

[0194] 所述的高比例的缀合多酚对本研究特别重要,因为游离态多酚,显示了较弱的 LPS 抑制能力,儿茶酸、表儿茶酸和没食子酸的  $IC_{50}$  值均大于  $20 \mu M$ 。

[0195] 目前研究中,猕猴桃冻干品和猕猴桃提取物显示了可抑制 LPS。基于浓度 (mg 干物质 / mL),猕猴桃提取物比猕猴桃冻干品更为有效。当修正包含在相应样品中的缀合多酚的 GA-E 浓度时,发现 LPS 抑制效果与剂量成比例的增加。有趣的是,得到的剂量比例与缀合多酚部分来源(猕猴桃冻干品和猕猴桃提取物)无关。这有助于维持猕猴桃提取物含有相似的多酚组合,而且是高浓度,如果不是相同的。当认为存在于猕猴桃冻干品和猕猴桃提取物中的游离态多酚的数量相似时,LPS 抑制特性明显地归因于缀合多酚部分。

[0196] 为进一步证实这些结果,基本上不含缀合多酚的冻干的猕猴桃样品被用来测试对 LPS 的抑制性。测试结果明显地显示,当样品中没有缀合多酚存在时,LPS 抑制特性几乎完



全丧失。这些结果再一次表明可溶的多酚仅仅是 LPS 的弱抑制剂的已公开的发现。

[0197] 实施例 5- 猕猴桃提取物对鸡肝脂肪酸合成酶的抑制

[0198] 材料和方法：

[0199] 化学药品：

[0200]  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -MerckA168646, 甘油 -SigmaG5516,  $\text{NaOH}$ -Aldrich22,146-5, SephadexG-50-Sigma G-50-80, 乙二胺四乙酸 (EDTA)-Sigma E9884, 二硫苏糖醇 (DTT)-Sigma D-9779, 聚乙二醇 6000Fluka-81255, DEAE- 纤维素 -Fluka30477, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐  $\text{NADPH}_2$ -SIGMA N-7505, 丙二酰辅酶 A-Sigma M-4263, 乙酰辅酶 A-Sigma A-2056, 全蛋白试剂盒 -SIGMA TP0200, 牛白蛋白 -Fluka05473。

[0201] 鸡肝中 FAS 的提取

[0202] 幼鸡 (0.5Kg 体重) 死后, 将鸡肝立即切除, 在进一步处理前在冰中保存。10g 切碎的肝在 100mL 冰冷的缓冲液 (含有 20% 甘油的 0.1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液, 用  $\text{NaOH}$  调 pH 至 7.5) 中用机械搅拌器匀浆。匀浆在 4°C、30000g 的离心力下离心 15 分钟。

[0203] 最终的清液 (来自于脂肪层) 通过凝胶过滤 (填料型号 Sephadex G-50) 被立即进一步处理。用充满悬浮在水中的 Sephadex G-50 的 100mL 保护管 (来自 Pharmacia) 进行凝胶过滤。流速设定为大约 4mL/ 分钟。洗脱剂接着通过 214nm 的紫外检测。流动相由 0.1M 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液、45mM 的甘油、1mM 的 EDTA 和 1mM 的 DTT 构成, pH 用  $\text{NaOH}$  调整到 7.5。对应蛋白质部分的第一个峰被收集和合并 (40mL 体积)。

[0204] 蛋白质部分被加入 5% (质量 / 体积) 聚乙二醇并在 4°C 下搅拌 30 分钟。沉淀物通过离心 (离心力 9000g, 30 分钟, 4°C) 被分离, 上清液加入 12% 的聚乙二醇中。最终的沉淀通过离心 (离心力 9000g, 30 分钟, 4°C) 被收集, 用于进一步处理。

[0205] 颗粒被仔细地清洗, 然后溶解于 5mL 的 0.1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液、45mM 甘油、1mMEDTA 和 1mM DTT, pH 用  $\text{NaOH}$  调整到 7.5。如果必要, 溶液过滤后在 -20°C 存放 4 周, 不会失活。

[0206] 检测前立即进行最后的纯化步骤, 最终的溶液通过使用 DEAE- 纤维素的离子交换色谱法纯化。在这种情况下, 玻璃吸液管内充满 1ml 体积的 DEAE- 纤维素并与 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液、45mM 甘油、1mM EDTA 和 1mM DTT, pH 用  $\text{NaOH}$  调整到 7.5 保持均衡。0.5mL 的蛋白质溶液被装入柱内并通过逐步加入 0.5mL 的相同缓冲液进行洗提。1.5-2.5mL 之间的洗提部分被收集并用于 FAS 测试。

[0207] FAS 检测分析 (FAS 检测)：

[0208] 150  $\mu\text{L}$  纯化的提取物与 100  $\mu\text{L}$   $\text{NADPH}_2/\text{Ac-CoA}$  (2.5/0.8mg/2ml 水分别对应最终浓度 150 和 50  $\mu\text{M}$ ) 混合。如下述制备的猕猴桃提取物溶液被加入体积为 250  $\mu\text{L}$ 。

[0209] 测试物用溶液 (0.1M 浓度的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液、45mM 甘油、1mM EDTA 和 1mM DTT, pH 用  $\text{NaOH}$  调整到 7.5) 填充至 1mL。经过 25°C 下的 30 分钟的预培养期后, 加入 100  $\mu\text{L}$  malonyl-CoA (1mg/2ml 水对应 55  $\mu\text{M}$ ) 作为反应激发剂。反应通过 UV/VIS 分光光度计 (JascoV-530) 在 30°C、340nm 在空气空白样下被监测。 $\text{NADPH}_2$  的消耗导致吸收的减少, 根据吸收的减少来计算酶活性。测量时间设定为 15 分钟。

[0210] 在结果部分, 基本程序的变化得以进一步解释

[0211] 猕猴桃提取物样品的制备和评价

[0212] 新鲜的猕猴桃果实被压榨。经压榨的残渣用 80% 乙醇提取两次 (残渣 /80% 乙醇

= 1/5)。该乙醇提取物与果汁合并,在 42℃下减压蒸发至干。由 1000Kg 的猕猴桃果实可得到 50Kg 干燥的粉末提取物。

[0213] 将猕猴桃提取物溶解于乙醇中,用测试用的缓冲液稀释到最终浓度为 2mg/mL。

[0214] 游离态和总多酚的提取按照已知程序行进。简言之,重量份 (1.0g) 的猕猴桃提取物与 25 毫升甲醇/水 (1/1 体积比) 混合,然后在一塑料螺封试管中被加热到 90℃,间歇摇晃 2 小时后测定相应提取物中存在的游离态多酚。另一重量份样品在 25 毫升的甲醇/1.2M 盐酸 (1/1 体积比) 中在 90℃下加热 2 小时,以测定对应提取物中存在的总多酚。最少测定 3 个提取过程。

[0215] 多酚的分离使用默克公司 (Merck) 的高效液相色谱分级系统和紫外检测 (280 纳米) 进行。在 40℃下乙腈和水 (用浓盐酸调 pH 至 2.5) 的线性梯度下,Waters spherisorb 反向 C-18 柱 (250\*4.6mm, 5 μm) 被用来分离。在流速为 1ml/min 下,流动相梯度被调整为在时间为 0 时水 (pH = 2.5) 中含有 3% 乙腈,到时间为 44 分钟时水 (pH = 2.5) 中含有 40% 乙腈。所有样品的注射体积为 10 μL。用于检测游离态和总多酚测定的提取物在过滤 (0.3 μm, 针筒过滤器) 并用水 1:4 (体积比) 稀释后注射。

[0216] 没食子酸、儿茶酸和表儿茶酸被用作外部标准品。校准溶液通过在 0.5mL 甲醇中溶解 25 毫克标准品并用水稀释到 10mL 制备得到。进一步稀释液通过加水制备得到。对于这 3 个参考化合物该方法的线性关系是建立在 0.6mg/10ml 到 24.0mg/10ml 之间。

[0217] 提取条件下没食子酸、儿茶酸和表儿茶酸的稳定性被测定。在甲醇/水提取和甲醇/酸提取后,全部 3 个标准品的回收率为高于 95% (3 个浓缩物,重复提取)。

[0218] 蛋白质检测:

[0219] 根据说明手册按照修正的 Micro-Lowry 法 (全部蛋白质试剂盒, Micro Lowry, Onishi & Barr Modification) 检测蛋白质。校准范围为 0.15-1.0mg 蛋白质/ml。该方法用牛白蛋白校准。

[0220] 计算:

[0221] FAS 的活性根据以  $\mu\text{M} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  表示的 NADPH 的消耗量,用得到的吸收值和摩尔消光系数为 6.3 计算得到。

[0222] 结果

[0223] 酶特性:

[0224] 蛋白质的线性关系通过向检测系统添加不同体积的纯化酶提取物进行估算,其含有 1.8g 蛋白质/L 提取物。最终曲线在图 6 中表示,其中的每一点表示 3 个实验的平均值。正如所看到的,检测分析物的线性部分从 175mg-450mg 蛋白质/L 检测分析物,相关系数为 0.9961。随着浓度提高,可观察到活性的最好效果。从这些研究中,对应的 150 μL 纯化提取物的 270mg 蛋白质/L 的蛋白质含量被选择。

[0225] 为了检测培养基线性度,加入 NADHP 以变化范围在 5-350 μM NADPH/L 检测分析物。丙二酰辅酶 A 加入过量,因此,不需进一步研究。这些结果表示在图 7 中,其中每个点表示 3 个实验的平均值。正如所见到的,最大活性值出现在 150 μM NADPH<sub>2</sub>/L 检测分析物,因此,该浓度被选择用于检测。

[0226] 培养时间通过测量 340nm 下在 60 分钟内的吸收变化进行研究。测量 15 分钟后,显示酶的活性消失,对应的吸收没有进一步增加。因此,培养时间被设定在 15 分钟。

[0227] 培养温度被设定在 30°C,因为在 20°C、25°C 和 35°C 下的比较实验产生的 FAS 活性可忽略。可以断定,温度对检测系统没有很大影响。

[0228] 进一步表明,当与对照实验比较时(数据没有显示),用来溶解提取物的可能的溶剂(DMSO,10%乙醇)对酶活性没有影响。

[0229] 为测定最佳 pH 值,测试缓冲液 pH 值被调整在 3-11。结果表示于图形 8 中,其中每个点代表 3 次实验的平均值。正如所见,最佳 pH 大约为 7.5。因此,pH7.5 被选择做进一步研究。

[0230] FAS 的最佳检验分析法被用来进行猕猴桃提取物的抑制实验。

[0231] 抑制实验:

[0232] 猕猴桃提取物被溶于乙醇并用测试缓冲液稀释到最终浓度。过滤后,不同的猕猴桃提取物溶液的剂量(2mg 猕猴桃提取物/ml)加入 FAS 测试试验。所得结果显示在图 9 中,其中每个点表示 3 次实验的平均值。如图所见,提取物以一种很大程度上取决于剂量依赖方式抑制 FAS。在测试的最高浓度下,可看到抑制率约为 60%。

[0233] 讨论

[0234] FAS 从鸡肝中提取并部分纯化。该 FAS 的性质非常类似人 FAS 的性质。提纯过程和检验分析全部研究。它能够有说服力地表明该分析法对研究 FAS 潜在抑制剂形成了很准确的做法。

[0235] 抑制实验结果显示猕猴桃提取物对 FAS 产生很大的抑制效果。现有的猕猴桃提取物在 1.8mg 提取物/mL 测试分析物的浓度下产生的 FAS 活性抑制率高达 60%。除由粗提取物得到的以外,这些抑制性的浓度相当高。如果这些提取物的成分被定性和定量阐明,很有希望发现一种或多种导致活性的主导化合物。根据现有的知识,最可能的有实质活性的备选物是类黄酮或多酚。

[0236] 总地来说,猕猴桃提取物看来具有实质性 FAS 抑制性成分,因此,在高 FAS 活性与甘油三酸酯有联系的情况下,猕猴桃提取物可以被用于抑制人体内 FAS。

[0237] 虽然本发明已经用优选实施例进行了描述,但是所属技术领域的专业人员在形式和细节上的做变化都不会离开本发明的主旨和范围。整篇说明书中的所有引用文献,包括背景技术中出现的引用文献,均以其全部内容包含与此。

[0238] 猕猴桃提取物的特性 - 总结

[0239] 化学 / 分析数据:

[0240] 这里讨论的猕猴桃提取物含有超过 10% (m/m) 的浓缩多酚。

[0241] 1g 猕猴桃提取物含有大约 609  $\mu\text{mol}$  属于酚类化合物的没食子酸等同物。

[0242] 1g 猕猴桃提取物含有大约 398  $\mu\text{mol}$  属于酚类化合物的儿茶酸等同物。

[0243] 浓缩的猕猴桃提取物多酚分别由以统计比例为 10:10:1 的没食子酸、咖啡酸和儿茶酸单体构成。

[0244] 浓缩的猕猴桃提取物多酚的平均分子量为大约 3000,聚合度为大约 20。

[0245] 生物学特性:

[0246] 功效

[0247] 猕猴桃提取物充分地抑制了 FAS(I 型)。

[0248] 在如上所述的 FAS 检验中,在猕猴桃提取物中的 0.8  $\mu\text{mol}$  GA-E 等同物产生了

50%的脂肪酸合成酶（I类）活性抑制率。

[0249] 猕猴桃提取物实质上抑制了人 LPS。

[0250] 在脂肪酶活性测试（如上所述）中，在猕猴桃提取物中的  $18 \mu\text{mol GA-E}$  等同物产生了 50%的人 LPS 活性抑制率。

[0251] 经纯化并浓缩的猕猴桃提取物多酚实质上抑制了人 LPS。

[0252] 在浓缩后的猕猴桃提取物多酚中存在超过 90%的全部人 LPS 抑制活性。说明当浓缩猕猴桃提取物多酚被水解后，抑制活性几乎完全地丧失。

[0253] 根据体外研究表明，有效的口服剂量在大约 0.5-1.0g 之间。评价猕猴桃提取物对大量的人 LPS 抑制力。

[0254] 安全

[0255] 以生物学上相关的剂量，纯化浓缩后的猕猴桃提取物多酚不会使牛血清白蛋白沉淀。

[0256] 猕猴桃提取物的化学特性

[0257] 猕猴桃提取物的多酚组合物

[0258] 猕猴桃提取物中的多酚含量分为以下几类：

[0259] (a) 可溶的或游离态多酚：是指几组简单的酚类化合物，例如没食子酸类、咖啡酸类和儿茶酸类“可溶酚”。在化学性质上它们溶于甲醇/水。

[0260] (b) 浓缩多酚：是指由不同的酚类化合物基团的单体组成的较高分子量的酚。单体的增效部分来源于没食子酸类、咖啡酸类或儿茶酸类化合物。

[0261] 多酚的定量评价以没食子酸为参照标准。因此，多酚的含量可以用“没食子酸等同物”（GA-E）给出。GA-E 的概念是重要的，因为它可以将猕猴桃提取物与现有结果想比较。基本上，GA-E 等同于“以没食子酸表示的多酚含量”。

[0262] 1g 猕猴桃提取物等同于  $609 \mu\text{mol GA-E}$ 。

[0263] 基于猕猴桃提取物中的多酚的测试结果，观察到下列成分：

[0264]

	以 $\mu\text{Mol GA-E/g}$ 干物质表示的多酚		
	可溶部分	浓缩部分	合计
猕猴桃提取物	12	597	609
猕猴桃（平均值） <sup>1)</sup>	48	75	123
苹果（平均值） <sup>1)</sup>	123	67	160
李子（平均值） <sup>1)</sup>	157	23	180

[0265] <sup>1)</sup> 文献值

[0266] 以质量比给出的多酚含量：

[0267] 0.22% (m/m) 可溶多酚等同于大约 2.2g/Kg 猕猴桃提取物

[0268] 11.25% (m/m) 浓缩多酚等同于大约 112.5g/Kg 猕猴桃提取物

[0269] 11.45% (m/m) 总多酚等同于大约 114.5g/Kg 猕猴桃提取物

[0270] 浓缩猕猴桃提取物多酚的性质

[0271] 浓缩多酚被定义为由来自不同酚类的单体组成的低/高聚化合物。

[0272] 浓缩的猕猴桃提取物多酚被分离。使用沿用已久的方法，以固态形式获得 11.25% (m/m) 浓缩的猕猴桃提取物多酚。

[0273] 特征浓缩的多酚的单体部分。通过 HPLC, 单体部分中 3 种典型的主导化合物种类被检测到。获得下列结果：

[0274] 表, 浓缩的多酚的单体部分

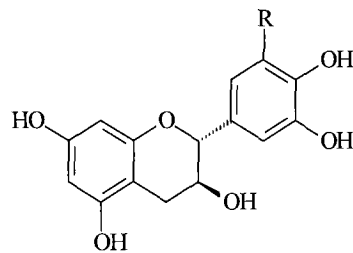
[0275]

	浓缩的猕猴桃提取物多酚的单体部分[% m/m]		
	没食子酸类	咖啡酸类	儿茶酸类
猕猴桃提取物	4.34	4.45	0.43

[0276] 浓缩的猕猴桃提取物多酚的单体部分的选择性化学结构：

[0277] 浓缩的猕猴桃提取物多酚的单体部分的选择性化学结构：

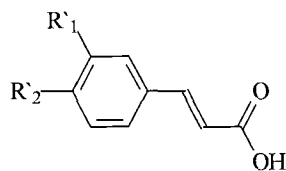
[0278]



R=H: (+)-儿茶酸

R=OH: (+)-表儿茶酸

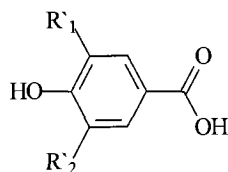
[0279]



R'1=R'2=OH: 咖啡酸

R'1=OH, R'2=H: 香豆酸

R'1=OCH<sub>3</sub>, R'2=OH: 阿魏酸



R'1=R'2=OH: 没食子酸

R'1=OH, R'2=H: 二羟基苯甲酸

R'1=R'2=H: 对羟基苯甲酸

[0280] 根据 HPLC 研究 (体积排阻和反相色谱法), 浓缩的猕猴桃提取物多酚的平均分子量被测定为大约 3000, 平均为大约 20 个上述给出的结构 (参见图 10 和图 11) 单体部分。

[0281] 猕猴桃提取物的生物特性：

[0282] I 型 FAS 的抑制

[0283] I 型 FAS 酶是参与体内能量代谢的重要的酶。除了在肝脏中棕榈酸的从头合成外, I 型 FAS 活性显示与各种的人类疾病有关系。最近, 发现 I 型 FAS 的抑制与肿瘤生长的减少和恶性肿瘤细胞的凋亡有关系。

[0284] 猕猴桃提取物的生物体外检测得出结论是对 I 型 FAS 抑制力基本上取决于剂量。(参见图 12 和图 13)

[0285] 在如上所述的 FAS 活性检验中, 在猕猴桃提取物中 0.8 μmol GA-E 足够产生 50% 的 I 型 FAS 活性的抑制率。0.8 μmol GA-E 相当于 1.31mg 猕猴桃提取物。

[0286] 在检验分析物 (部分纯化的鸡肝蛋白) 中, 在猕猴桃提取物中 0.8 μmol GA-E 足够产生 50% 的 I 型 FAS 活性的抑制率。0.8 μmol GA-E 相当于 1.31mg 猕猴桃提取物。

[0287] 人脂肪酶 (胰腺来源) 的抑制

[0288] 胰腺来源的人脂肪酶 (LPS) 对于消化和吸收甘油三酸酯而言是一种关键的酶。

LPS 的抑制以及由此而阻止了脂肪的分解和吸收,被认为是一成功的治疗肥胖的方法。

[0289] 通过如上所述(参见图 14 和 15)的脂肪酶活性试验,猕猴桃提取物的生物体外测试得出的结论是对 LPS 抑制力基本上取决于剂量。

[0290] 在脂肪酶活性试验分析物(1mL 测试体系含有 0.3IU LPS)中,猕猴桃提取物中的 18  $\mu$  mol GA-E 足够产生 50%的 LPS 活性抑制率。18GA-E 相当于 30mg 猕猴桃提取物。

[0291] 来自猕猴桃提取物的纯化的多酚的研究

[0292] 纯化(如脂肪酶活性试验所述)浓缩的猕猴桃提取物多酚通过进行 LPS 抑制实验来显示它们对猕猴桃提取物活性的贡献。

[0293] 针对质量比为 11.25%的浓缩猕猴桃提取物多酚,1.125-3.735mg 纯化浓缩多酚/mL 的配制品被当作 10-30mg 猕猴桃提取物/mL 测试分析物(参见图 16)。

[0294] 如图 16 所示,猕猴桃提取物的超过 90%的 LPS 活性抑制很可能来自于浓缩的(聚合态)猕猴桃提取物多酚。

[0295] 纯化浓缩的猕猴桃提取物多酚被水解并蒸干。在缓冲液中重现后,水解产物进行脂肪酶抑制实验。水解后,典型浓度直到 3.3mg 的浓缩猕猴桃提取物多酚没有抑制 LPS(参见图 17)。

[0296] 有效量的计算:

[0297] 猕猴桃提取物中 60  $\mu$  mol GA-E 能抑制 50%的 1IU 脂肪酶。考虑到 50-100IU/L 胃液或肠液的 LPS 活性,300-600  $\mu$  molGA-E 足够阻塞 50% LPS 活性。

[0298] 其转化为 0.5-1.0g 猕猴桃提取物剂量。优选地,猕猴桃提取物应在摄入脂肪前服用。

[0299] 蛋白沉淀分析:

[0300] 纯化浓缩的猕猴桃提取物多酚测试对蛋白质沉淀能力。

[0301] 将 0.15-1.0mg 牛血清白蛋白(BSA)溶于 1mL 缓冲液(反应试管)。0-0.5mg 之间的纯化多酚添加到反应试管中。在 37°C 下进行 30 分钟培养后,试管离心分离(15000rpm, 5 分钟)。根据使用说明,通过修正的 Micro-Lowry 法(总蛋白试剂盒, Micro Lowry, Onishi&BarrModification)来检测上层清液的蛋白含量。0.15-1.0mg BSA/mL 作为标定范围。

[0302] 在被选的范围里,纯化浓缩的猕猴桃提取物多酚与 BSA 不发生相互作用。在培养样品中没有 BSA 损失的标记,说明多酚-蛋白质之间存在相互作用。

[0303] 所属领域技术人员将意识到或能确定,仅仅使用常规实验,许多技术方案是等同于本发明这里明确描述的具体实施例。这样的等同方案被包含在下列权利要求的范围中。

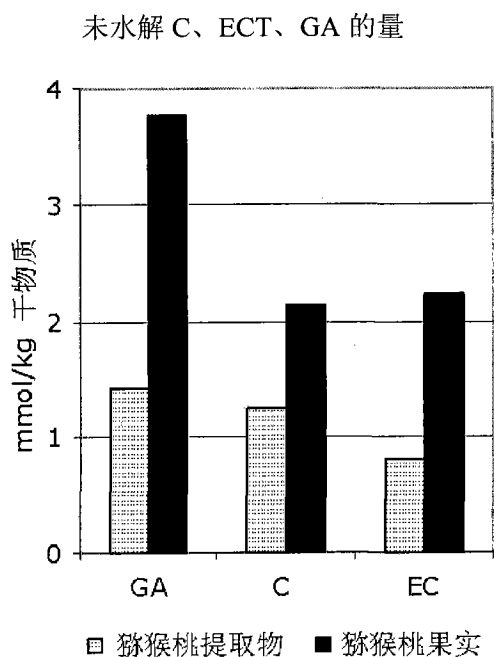


图 1

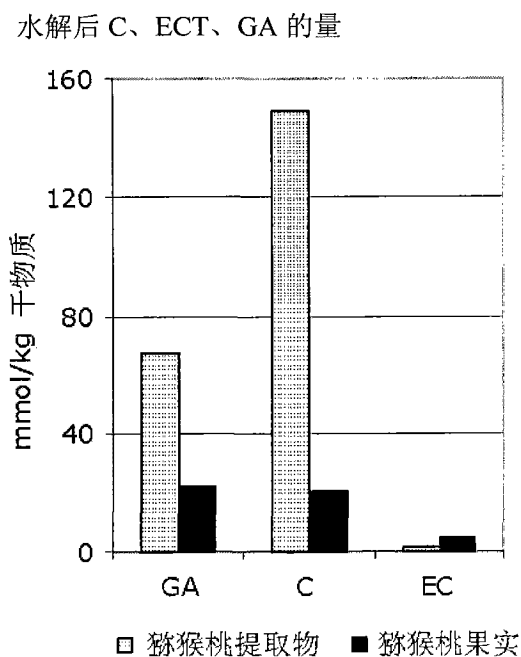


图 2

猕猴桃果实和猕猴桃提取物的 LPS 抑制率

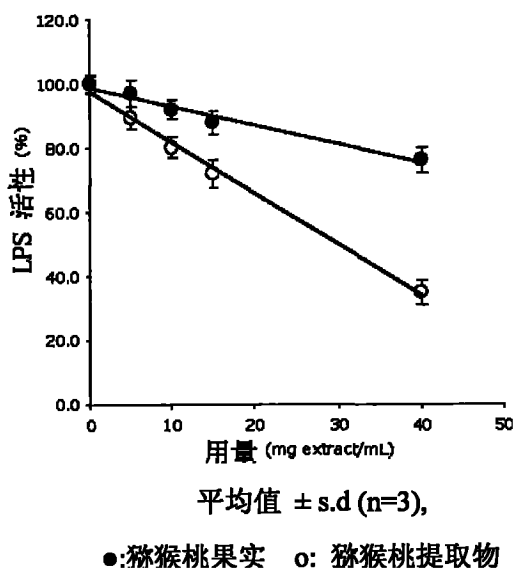


图 3

多酚低聚/高聚分子的 GA 的 LPS 抑制的相互关系

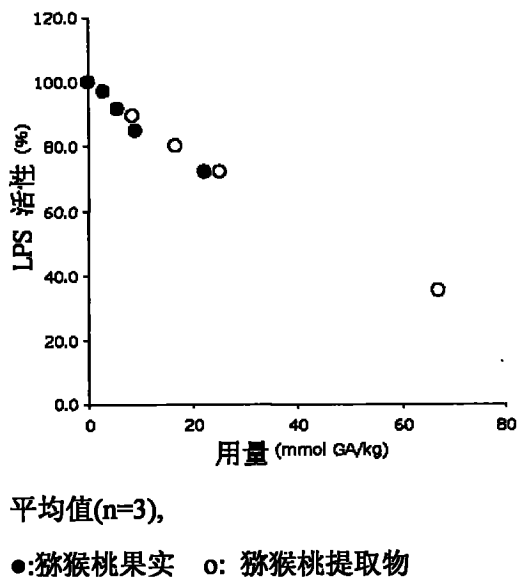


图 4

缀合猕猴桃多酚与 LPS 抑制程度之间的剂量特性曲线图

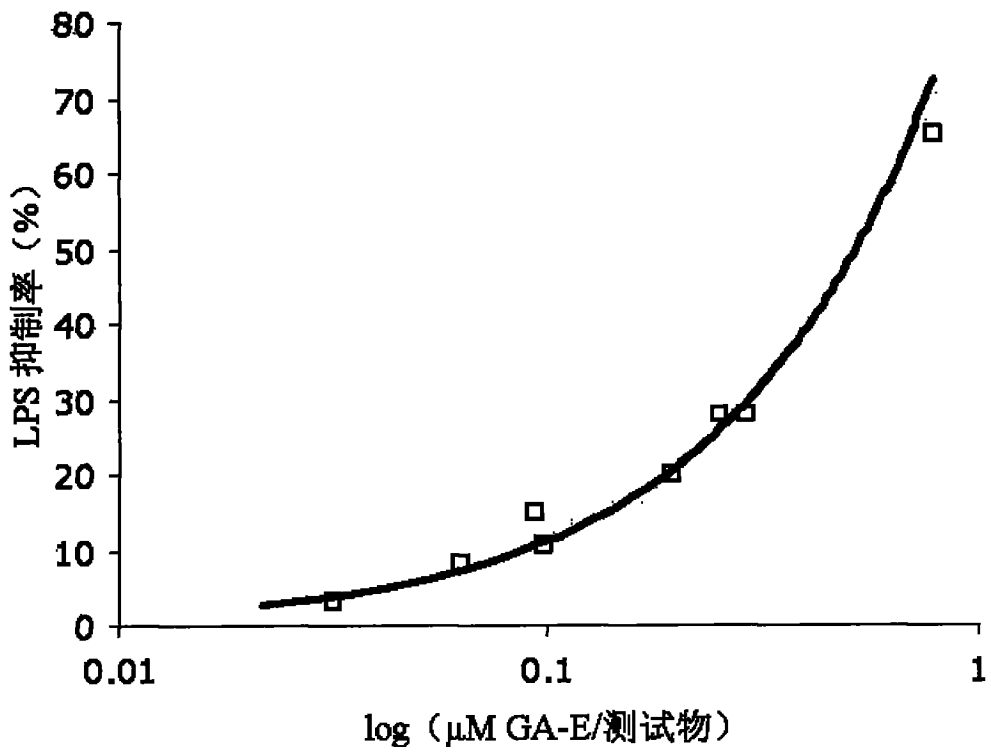


图 5



酶实验分析中蛋白质的线性关系

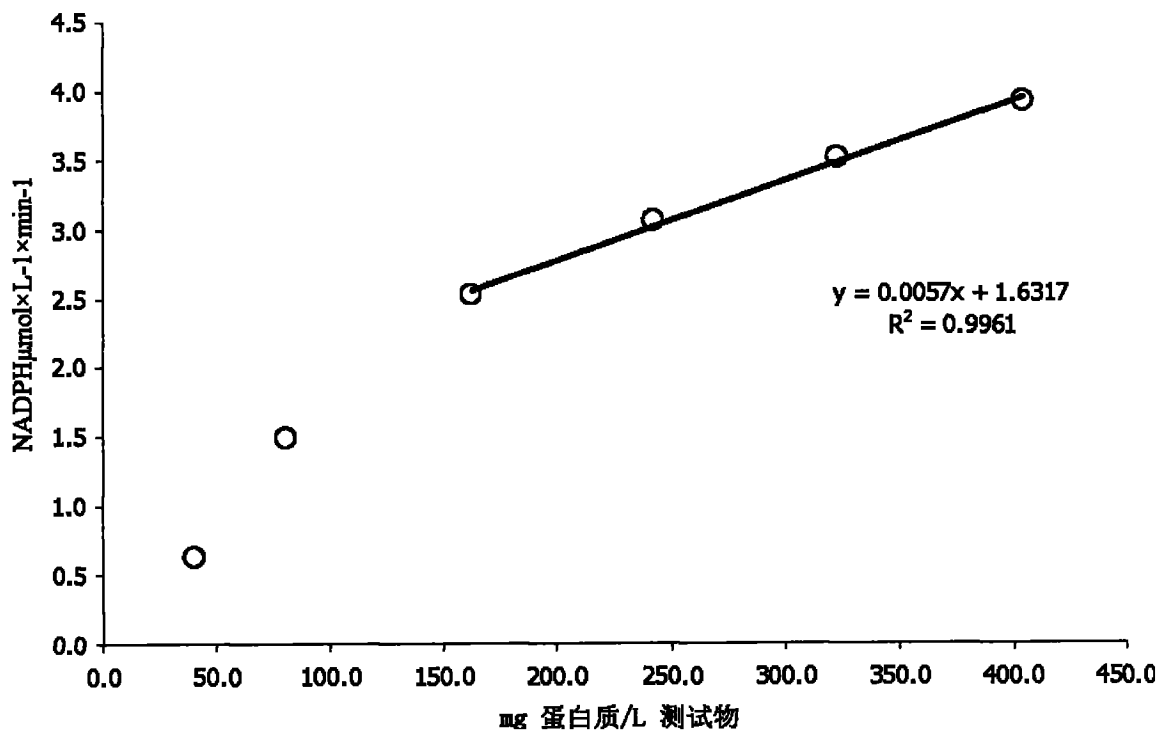


图 6

酶实验分析中底物的线性关系

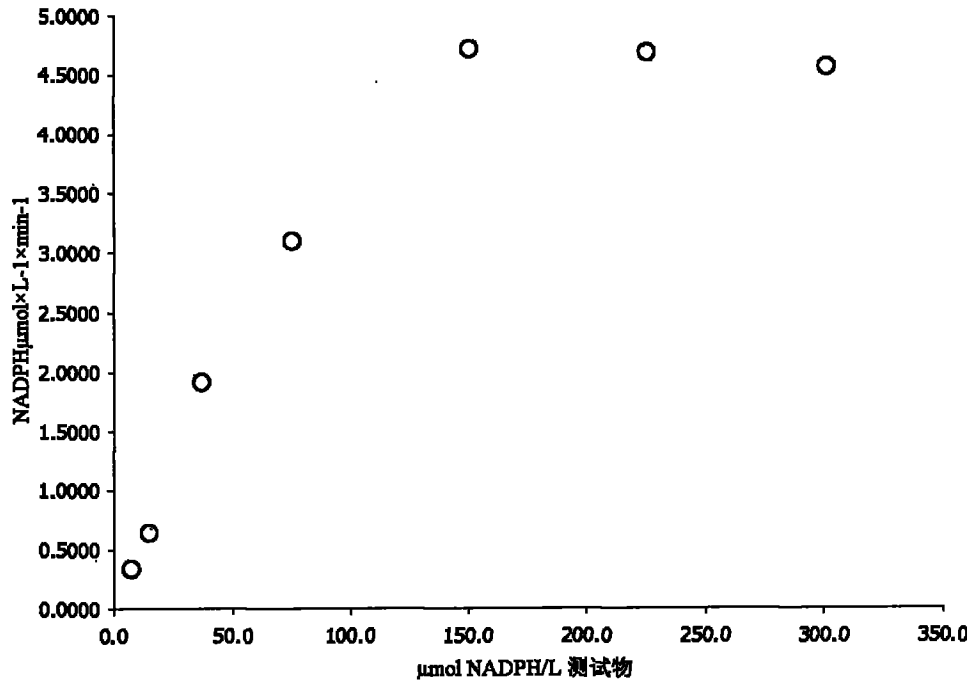


图 7

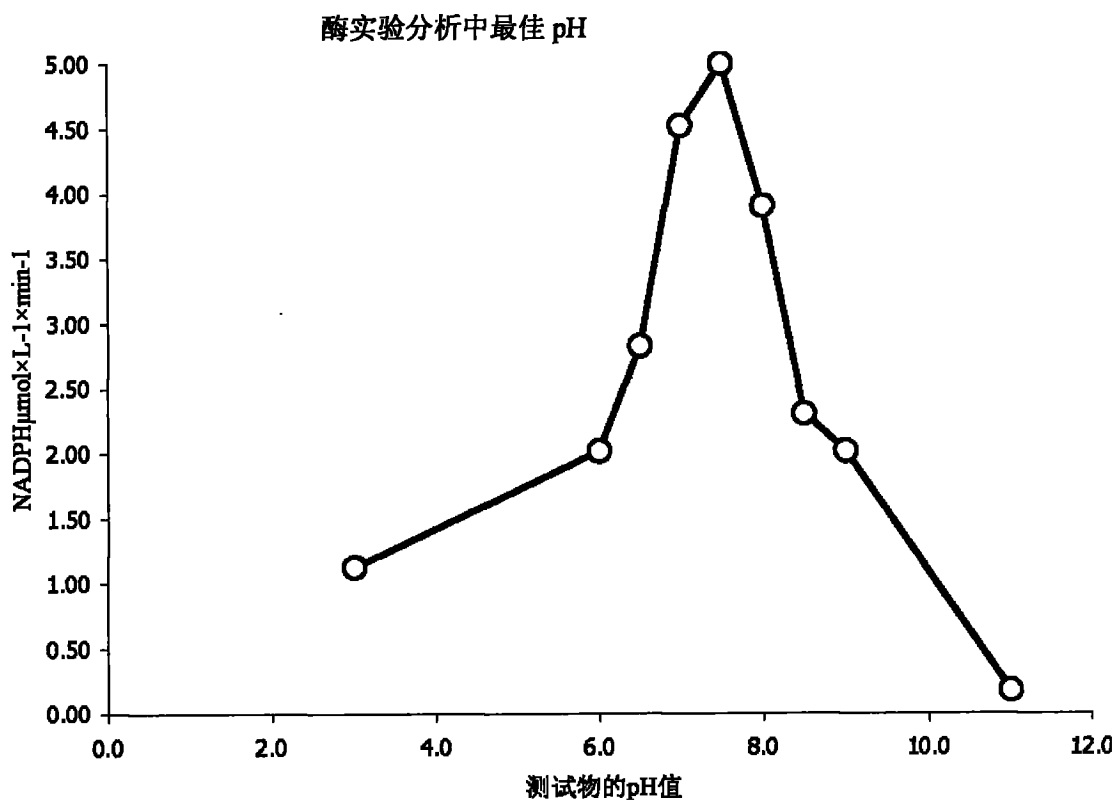


图 8

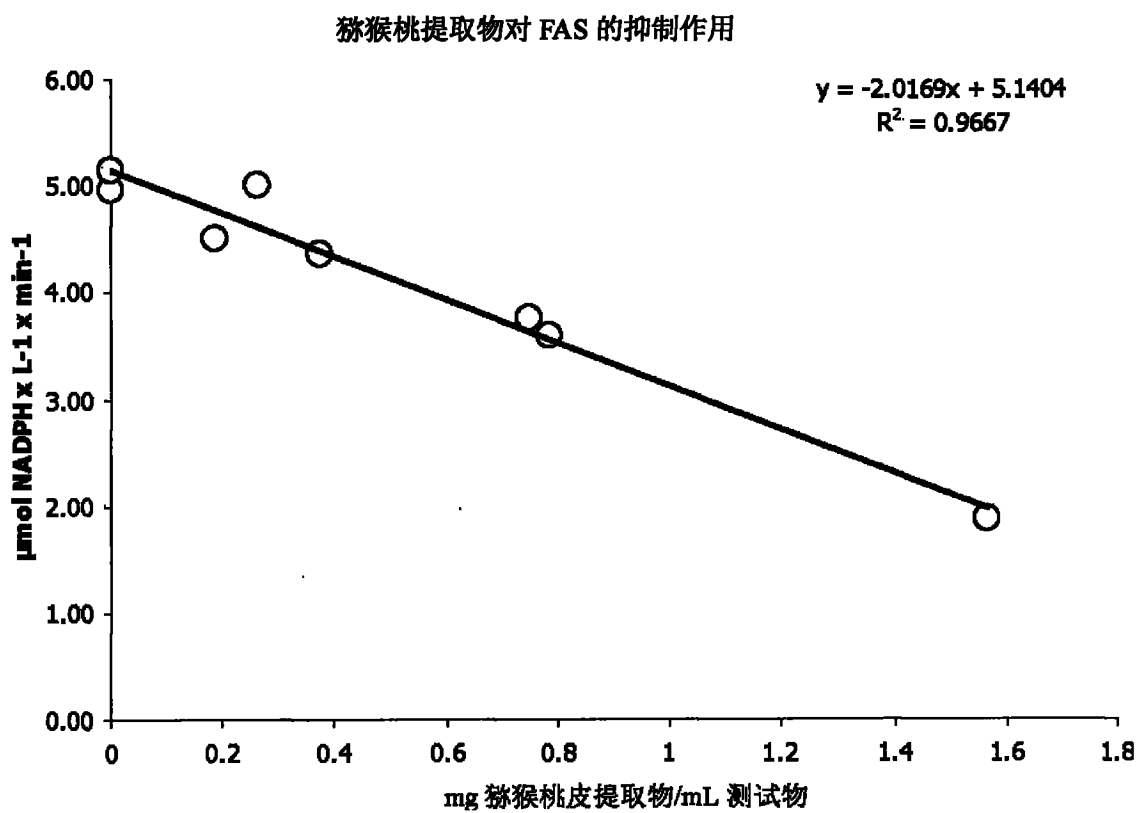


图 9

浓缩的猕猴桃提取物多酚的反相色谱图

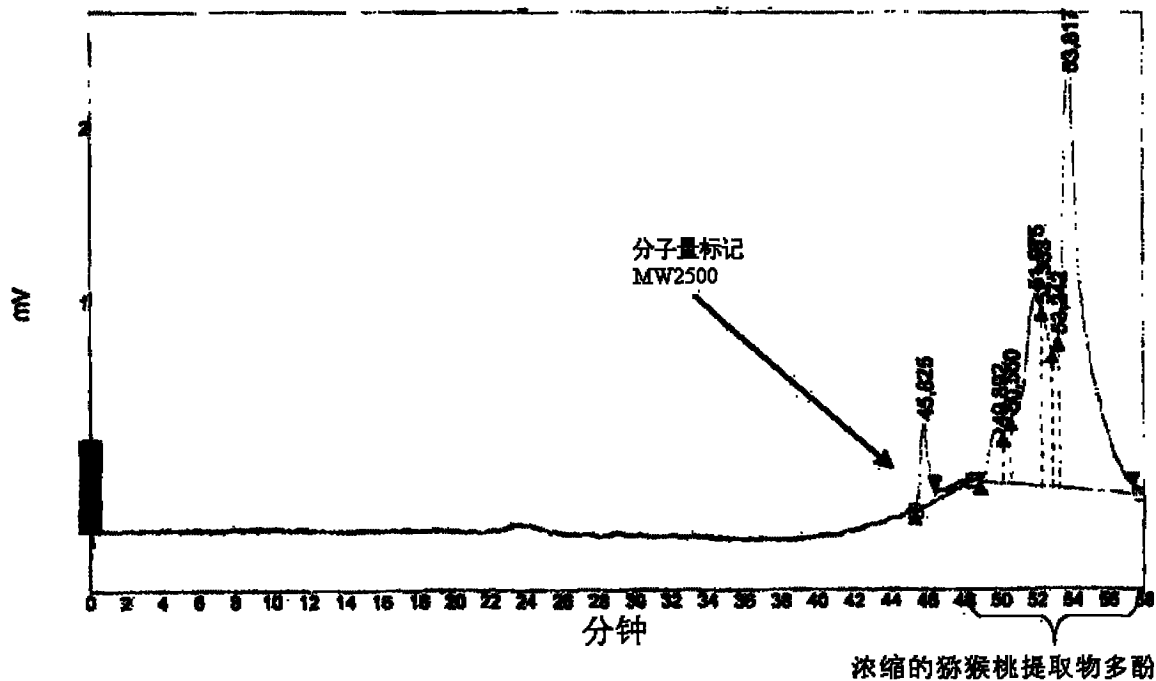


图 10

浓缩的猕猴桃提取物多酚凝胶渗透色谱图

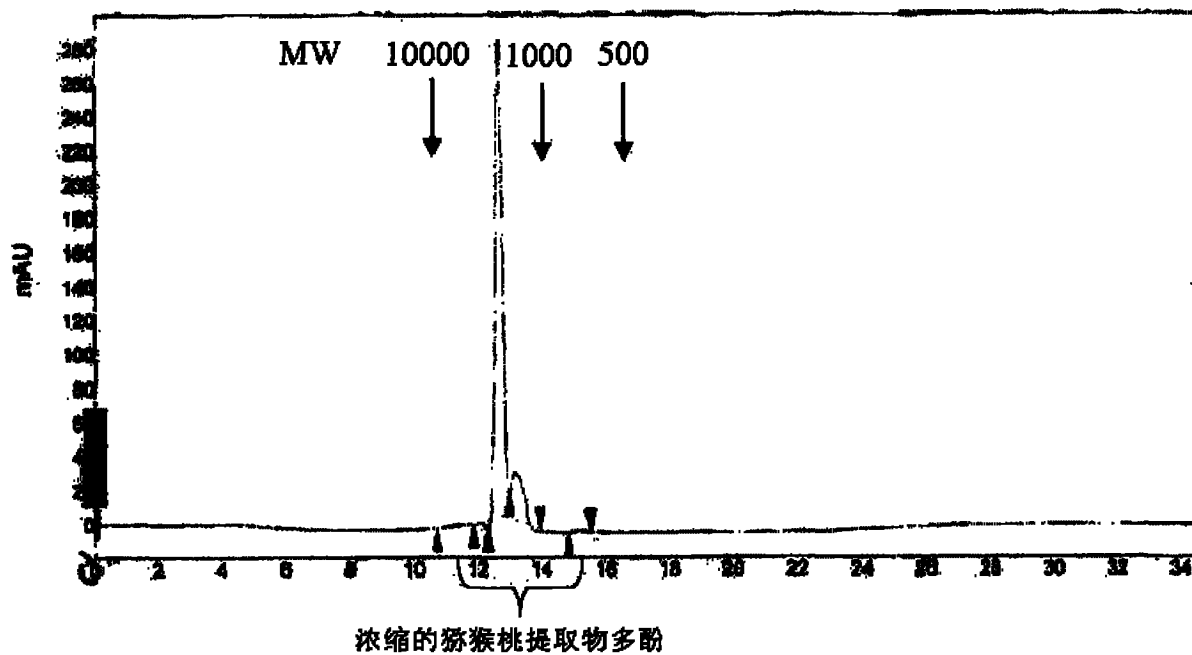


图 11

猕猴桃提取物对I型FAS抑制效果的线性抑制曲线典型图

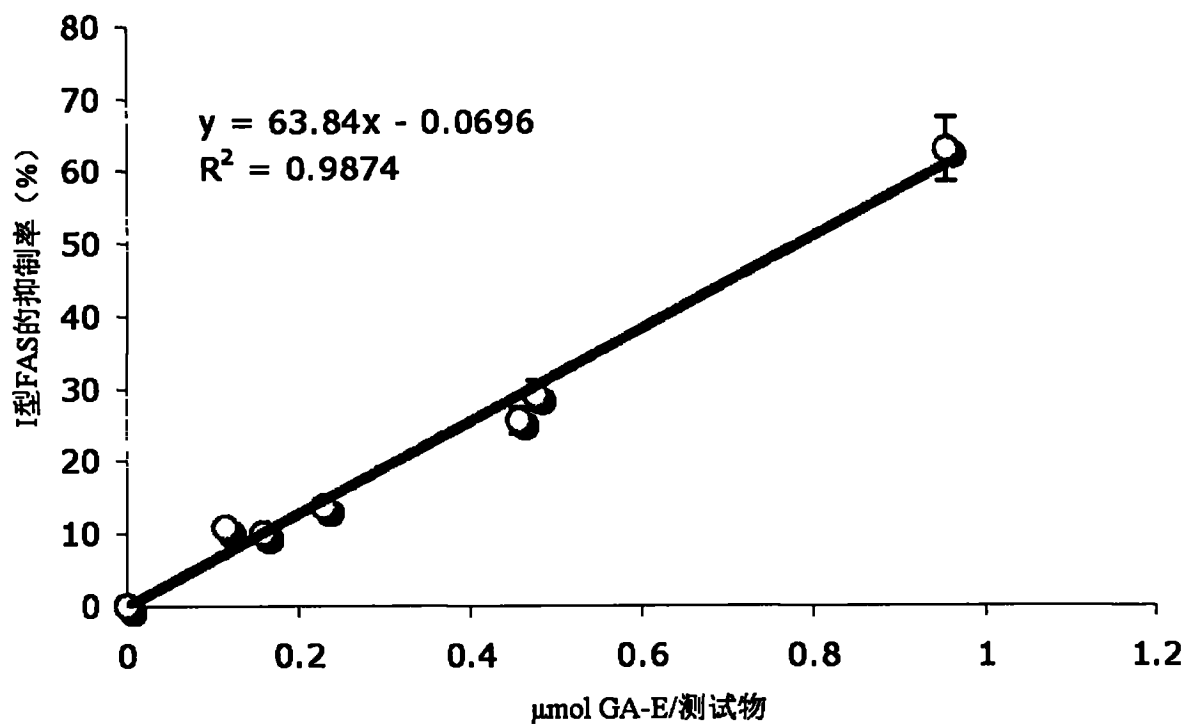


图 12

猕猴桃提取物对I型FAS抑制效果的IC50典型图

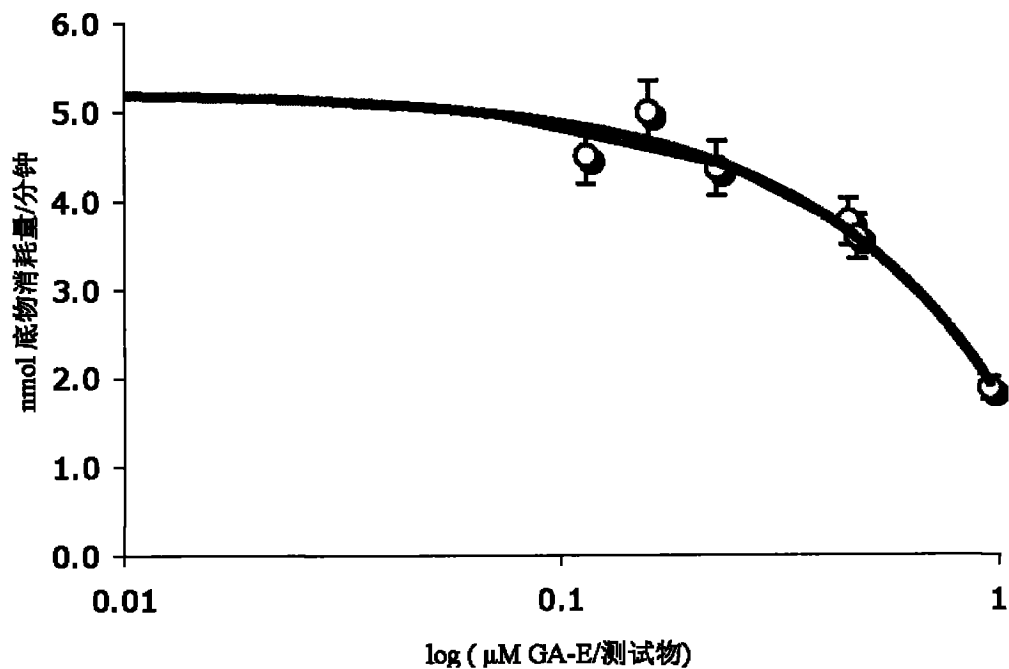


图 13

猕猴桃提取物对LPS抑制效果的线性抑制曲线典型图

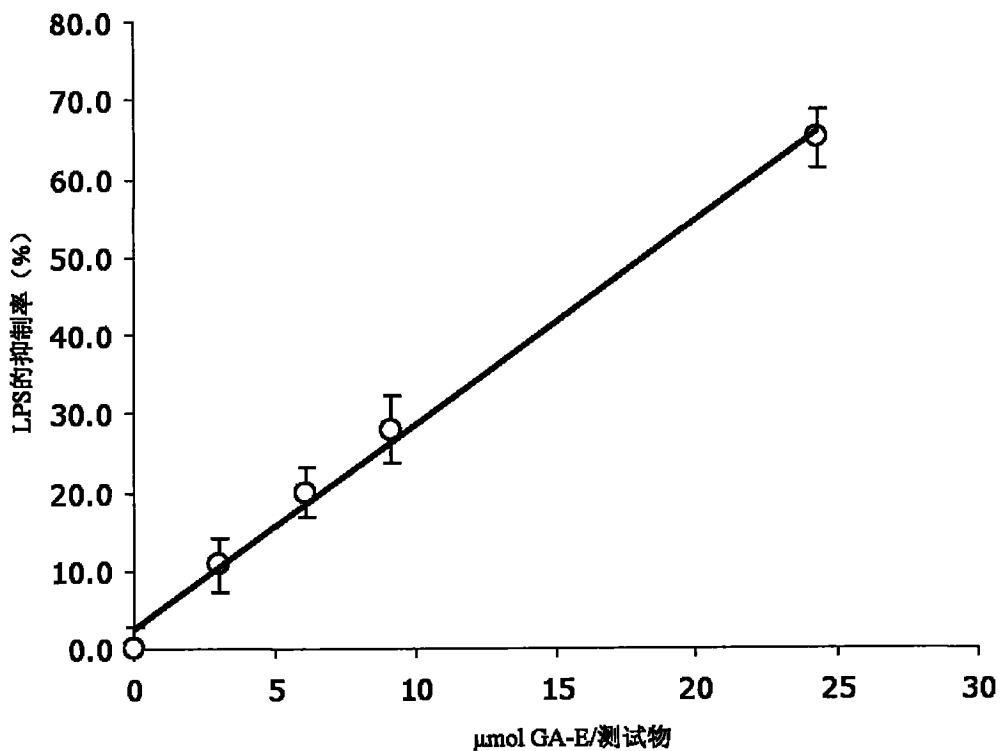


图 14

猕猴桃提取物对LPS抑制效果的IC50测定典型图

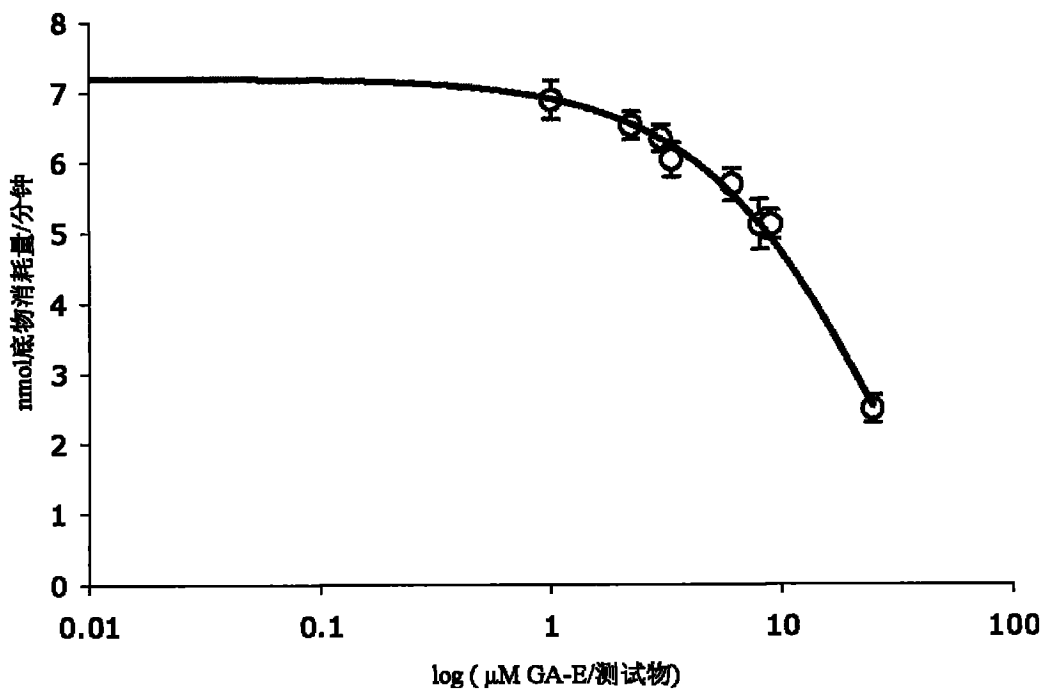
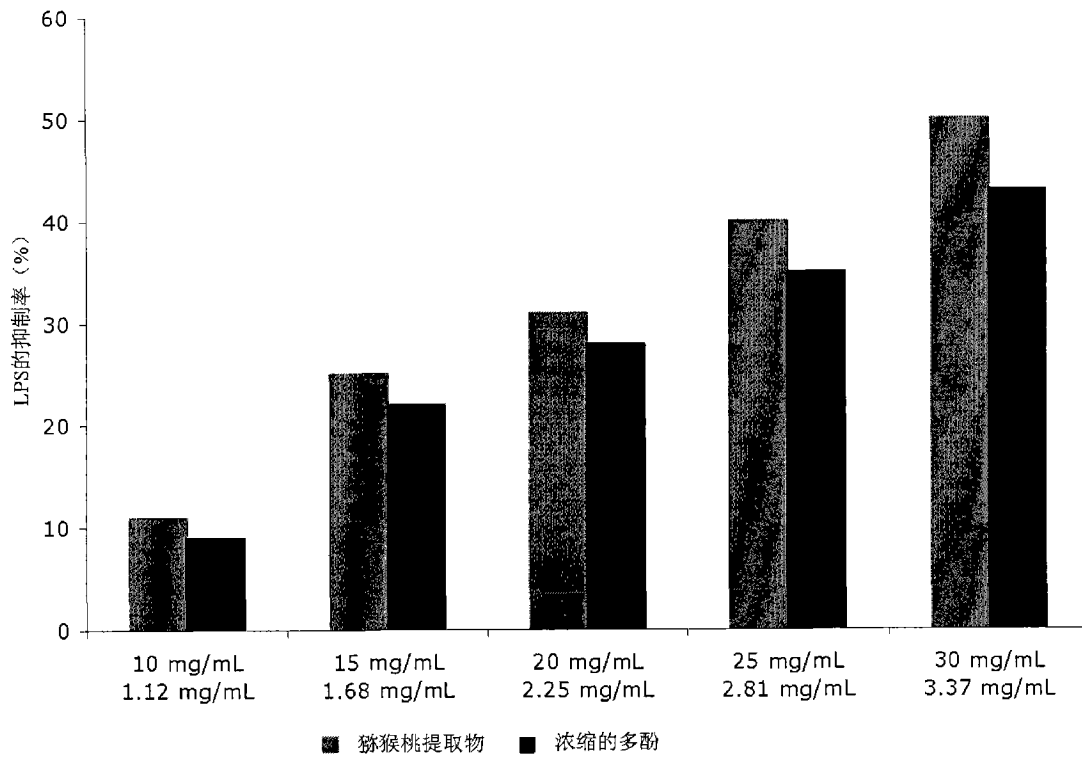


图 15

纯化的浓缩猕猴桃提取物多酚和猕猴桃提取物的LPS活性的相对抑制效果典型图



浓度较高的带指猕猴桃提取物， 较低的带指纯化多酚

图 16

浓缩猕猴桃提取物多酚和水解后的浓缩猕猴桃提取物多酚的LPS活性的相对抑制效果典型图

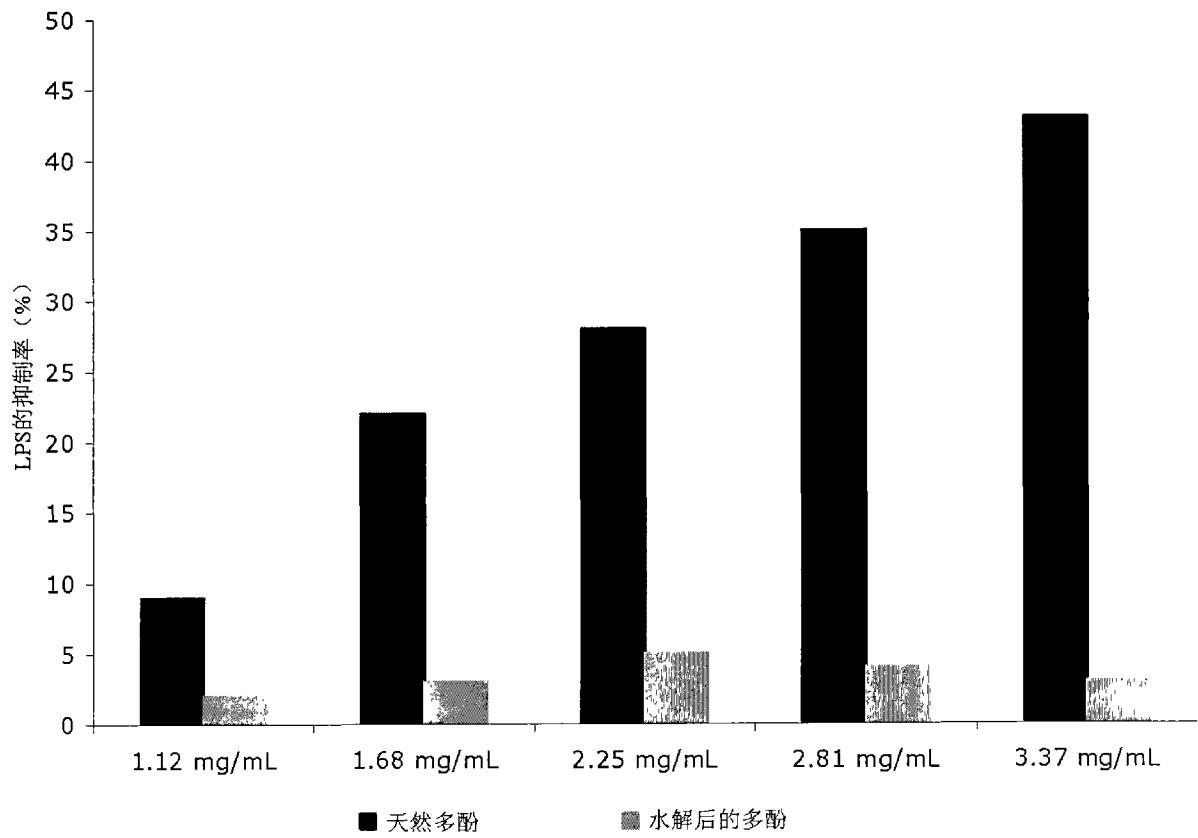


图 17