



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101287482 B

(45) 授权公告日 2014.06.04

(21) 申请号 200680035499.3

(22) 申请日 2006.09.27

(30) 优先权数据

60/721,721 2005.09.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008.03.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/037904 2006.09.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/038685 EN 2007.04.05

(73) 专利权人 星座公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 阿尼尔·J·什里克汉德 王海波

史蒂夫·A·库皮娜

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 韩宏星

(51) Int. Cl.

C12P 7/62 (2006.01)

A61K 36/87 (2006.01)

A23L 2/00 (2006.01)

(56) 对比文件

US 6544581 A, 2003.04.08,

US 6706756 B1, 2004.03.16,

JP 特开平 8-283257 A, 1996.10.29,

A. CARIDI et al. Influence of Yeast on Polyphenol Composition of Wine. 《Food Technol Biotechnol》. 2004, 第 42 卷 (第 1 期),

审查员 张娜

权利要求书2页 说明书19页 附图2页

(54) 发明名称

葡萄提取物、其膳食补充剂及其方法

(57) 摘要

本发明涉及新的葡萄提取物及其生产方法,所述葡萄提取物特别是可用于治疗高血压前期、代谢综合征和/或包括代谢综合征的病症。本发明的方法通过使单体和寡聚体原花青素的提取最大化并使多聚体原花青素的提取最小化来产生高度浓缩的多酚产品。本发明的葡萄提取物包含以重量计约 5-15% 的单体、约 5-20% 的二聚体、约 3-10% 的三聚体、约 2-10% 的四聚体以及约 2-10% 的五聚体。本发明的葡萄提取物可配制到膳食补充剂中,包括胶囊剂、片剂、粉剂、溶液剂、凝胶剂、混悬剂、霜剂、凝胶剂等。可将例如粉剂或溶液剂形式的这些膳食补充剂添加至营养品、食品和/或饮料中,以形成功能性营养品、食品和/或饮料产品。

1. 用于生产来自葡萄的多酚提取物的方法,其包括以下步骤:(1) 在升高的温度下,使选自完整葡萄、葡萄籽、葡萄渣及其混合物的成员与水接触,以获得葡萄-水粗提取物;(2) 在 70-100° F 的温度下,用选自酵母、细菌、真菌及其混合物的活培养物处理所述葡萄-水粗提取物 1 至 10 天,以获得包含 2 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元以及 12 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元的多酚葡萄提取物。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述接触步骤还包括以下步骤:(1a) 将所述葡萄-水粗提取物与不溶性葡萄固体分开,以及 (1b) 冷却已分开的葡萄-水粗提取物。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述处理步骤还包括添加溶果胶酶。

4. 权利要求 1 的方法,还包括以下步骤:(3) 将所述多酚葡萄提取物酸化至 pH 为 1.5 至 2.5,以获得酸化的多酚提取物;(4) 冷却所述酸化的多酚提取物;以及 (5) 过滤所述经冷却的酸化多酚提取物,以得到经过滤的多酚提取物。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述过滤步骤还包括以下步骤:用吸附性树脂处理所述经冷却的酸化多酚提取物,以获得纯化的多酚提取物。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述方法生产的纯化的多酚提取物,其中所述提取物包含 2 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元以及 12 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元。

7. 权利要求 6 的提取物,其中所述提取物包含 400-1500ppm 的没食子酸。

8. 用于生产来自葡萄的多酚提取物的方法,其包括以下步骤:(1) 在升高的温度下,使选自完整葡萄、葡萄籽、葡萄渣及其混合物的成员与水接触,以获得葡萄-水粗提取物;(2) 在升高的温度下,用鞣酶处理所述葡萄-水粗提取物,以获得包含 2 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元以及 12 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元的多酚葡萄提取物。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述接触步骤还包括以下步骤:(1a) 将所述葡萄-水粗提取物与不溶性葡萄固体分开,以及 (1b) 冷却已分开的葡萄-水粗提取物。

10. 权利要求 8 的方法,其中所述鞣酶来自选自酵母、细菌、真菌及其混合物的成员。

11. 权利要求 8 的方法,其还包括以下步骤:(3) 将所述多酚葡萄提取物酸化至 pH 为 1.5 至 2.5,以获得酸化的多酚提取物;(4) 冷却所述酸化的多酚提取物;以及 (5) 过滤所述经冷却的酸化多酚提取物,以得到经过滤的多酚提取物。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述过滤步骤还包括以下步骤:用吸附性树脂处理所述冷却的酸化多酚提取物,以获得纯化的多酚提取物。

13. 根据权利要求 8-12 中任一项所述方法生产的纯化的多酚提取物,其中所述提取物包含 2 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元以及 12 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元。

14. 权利要求 13 的提取物,其中所述提取物包含 400-1500ppm 的没食子酸。

15. 一种来自葡萄的多酚提取物,其包含以重量计 5-15%的单体、5-20%的二聚体、3-10%的三聚体、2-10%的四聚体、2-10%的五聚体和 2 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元。

16. 权利要求 15 的提取物,其中所述单体、二聚体、三聚体、四聚体和五聚体的总量为 25-50 重量%。

17. 权利要求 15 的提取物,其包含 80 重量%或更多的总酚类化合物。
18. 权利要求 17 的提取物,其包含 90 重量%或更多的总酚类化合物。
19. 权利要求 15 的提取物,其中所述单体、二聚体、三聚体、四聚体和五聚体的总量为 25-50 重量%;酚类化合物的总量为 80 重量%或更多;表儿茶素没食子酸酯延伸单元的总量为 12 重量%或更少。
20. 权利要求 15 的提取物,其中所述提取物包含 400-1500ppm 的没食子酸。
21. 权利要求 15 的提取物,其包含 12 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元。
22. 权利要求 15 的提取物,其包含 1 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元。
23. 权利要求 15 的提取物,其包含 5 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元。
24. 包含权利要求 15 所述多酚提取物的经口施用制剂。
25. 包含权利要求 15 所述多酚提取物的食品产品。
26. 包含权利要求 15 所述多酚提取物的饮料。
27. 包含权利要求 15 所述多酚提取物的膳食补充剂。
28. 包含权利要求 15 所述多酚提取物的营养品。
29. 一种包含来自葡萄的多酚提取物的膳食补充剂,含有 5-15 重量%的单体、5-20 重量%的二聚体、3-10 重量%的三聚体、2-10 重量%的四聚体、2-10 重量%的五聚体和 2 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元,以及至少一种可药用赋形剂。
30. 权利要求 29 的膳食补充剂,其中所述多酚提取物包含 400-1500ppm 的没食子酸。
31. 权利要求 29 的膳食补充剂,其中所述多酚提取物包含 80 重量%或更多的总酚类化合物。
32. 权利要求 29 的膳食补充剂,其中所述多酚提取物包含 12 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元。
33. 权利要求 29 的膳食补充剂,其中所述多酚提取物包含 90 重量%或更多的总酚类化合物。
34. 权利要求 29 的膳食补充剂,其中所述多酚提取物包含 1 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元。
35. 权利要求 29 的膳食补充剂,其中所述多酚提取物包含 5 重量%或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元。
36. 权利要求 29 的膳食补充剂,其中该膳食补充剂中所述多酚提取物的量为 50-1000mg。
37. 包含权利要求 29 所述膳食补充剂的经口施用制剂。
38. 包含权利要求 29 所述膳食补充剂的食物产品。
39. 包含权利要求 29 所述膳食补充剂的饮料。
40. 包含权利要求 29 所述膳食补充剂的营养品。
41. 权利要求 8 的方法,其中所述处理步骤还包括添加溶果胶酶。

葡萄提取物、其膳食补充剂及其方法

[0001] 本申请要求 2005 年 9 月 28 日提交的美国临时申请序列号 60/721, 721 的优先权，其通过参考整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及新的葡萄提取物以及用于生产该葡萄提取物的方法。所述新葡萄提取物特别是可用于在例如患有高血压前期或代谢性综合征的个体中降低血压。本发明还涉及包含本发明葡萄提取物的膳食补充剂。

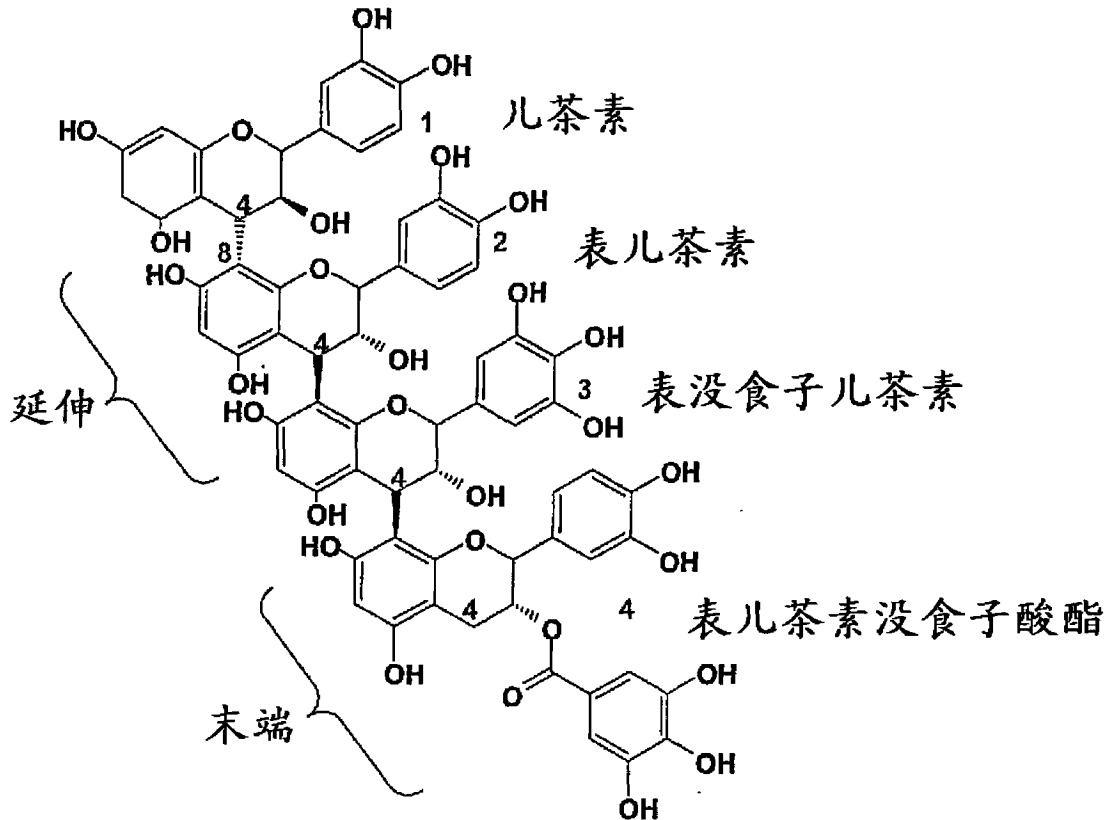
背景技术

[0003] 葡萄籽含有约 5-8% (以重量计) 的类黄酮。类黄酮构成了植物中广泛分布的一组重要的饮食多酚化合物。已在植物来源 (如水果、蔬菜、豆类、坚果、种子、草本植物、香料、花) 中和饮料 (如茶、可可、啤酒、葡萄酒和葡萄汁) 中鉴定了超过 4000 种化学性质独特的类黄酮。

[0004] 就葡萄籽而言, 术语类黄酮是指单体黄烷 -3- 醇, 特别是 (+)- 儿茶素、(-)- 表儿茶素和 (-)- 表儿茶素 3- 没食子酸酯。化学连接的两个或更多黄烷 -3- 醇单体称为原花色素或寡聚原花色素 (“oligomeric proanthocyanidin, OPC”), 包括原花青素和原翠雀素 (prodelphinidin)。包含两个单体的 OPC 称为二聚体, 包含三个单体的称为三聚体, 包含四个单体的称为四聚体, 包含五个单体的称为五聚体, 等等。在实践中, 寡聚体的链长为 2 至 7 (二聚体至七聚体); 而多聚体代表链长大于 7 的组分。在大量讨论后, 葡萄籽方法评估委员会 (通过国家营养食品协会) 一致同意将 OPC 定义为包含两个或更多单体的所有原花色素, 其包括多聚体或缩合的鞣质。因此, 葡萄提取物中的寡聚体包括如二聚体和三聚体, 并且有证据表明多聚体可包含多至 16 个单元。

[0005] 以下是原花色素的典型结构, 其显示表儿茶素没食子酸酯的延伸单元和末端单元。例如, 延伸单元以表儿茶素 (2) 和表没食子儿茶素 (3) 连接基团为代表。而末端单元以表儿茶素没食子酸酯 (4) 基团为代表。

[0006]



[0007] 为了使多酚化合物作为葡萄提取物用于商业用途,必须以更浓缩的形式将这些化合物从葡萄中分离出来。从完整葡萄、葡萄渣和葡萄籽中提取、纯化和浓缩多酚化合物的一般方法公开于美国专利 No. 6, 544, 581 中,其通过参考并入本文。

[0008] 除了抗氧化活性以外,已有报道类黄酮在动物研究中通过降低新生血管的生长而发挥抗癌作用,并具有抗炎、抗微生物和抗变应原活性。还发现本发明的葡萄提取物可用于在高血压前期个体和患有代谢性综合征的个体中降低血压。除了降低血压以外,还提出本发明的葡萄提取物会在患有代谢综合征的个体中减少氧化 LDL 胆固醇。LDL 胆固醇增加是公认的动脉粥样硬化风险因素。有强有力的证据表明,经氧化修饰的 LDL 起始了该病理过程的发生。因此,在代谢综合征个体中降低氧化 LDL 的浓度可减少和 / 或预防动脉粥样硬化。

[0009] 高血压前期个体分为收缩压为 120 至 139mmHg 的个体或舒张压为 81 至 89mmHg 的个体。该分类基于美国国家高血压预防、检测、评估和治疗联合委员会 (Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure) 第 7 次报告 (JNC 7) 第 87 页,NIH 出版号 No. 04-5230。高血压前期个体通常不使用药物治疗,而是给予健康生活方式的建议。这些建议包括维持健康体重;多锻炼身体;遵循强调水果、蔬菜和低脂肪乳制品的健康饮食计划;选择和准备含有较少钠的食品;并且即使饮用酒精饮料,也要适度。采用健康的生活方式习惯通常是有效预防和控制异常血压的第一步。

[0010] “代谢综合征”也称为“X 综合征”、“胰岛素抗性综合征”或“致命四重奏”,其特征为心血管疾病、中风和 / 或 II 型糖尿病风险因素的累积。代谢综合征可由皮质醇(一种应激激素)的过度产生而引起,其导致腹腔内的脂肪积累以及胰岛素抗性。目前不推荐患代谢性综合症的个体使用药物治疗。表征代谢综合征的风险因素包括:腹腔内脂肪组织的量

增加（腹部肥胖）、胰岛素抗性以及发生糖尿病风险的提高、高胰岛素血症、高血脂水平、血压升高以及血清脂肪升高。美国国家胆固醇教育计划成人治疗组（ATP III）将代谢综合征定义为具有至少 3 项以下风险因素的个体：

风险因素	定义水平
腹部肥胖，以腰围给出 ^{*†} 男性 女性	>102 cm (>40 英寸) >88 cm (>35 英寸)
甘油三酯	≥150 mg/dL
[0011] HDL 胆固醇 男性 女性	<40 mg/dl <50 mg/dL
血压	≥130/≥85 mm Hg
空腹血糖	≥110 mg/dL [‡]

[0012] * 超重和肥胖与胰岛素抗性和代谢综合征有关。然而，与 BMI 升高相比，腹部肥胖与代谢风险因素更为相关。因此，推荐以简单的腰围测量确定代谢综合征的体重因素。

[0013] † 一些男性患者在腰围仅有边缘性增加时（例如 94 至 102cm (37 至 39 英寸)）也可形成多种代谢风险因素。这些患者可能具有胰岛素抗性的强遗传因素。与腰围明确增加的人类似，他们应该通过改变生活习惯而获益。

[0014] ‡ 美国糖尿病协会最近确立 ≥ 100mg/dL 的截止点，该截止点以上的个体患有前期糖尿病（空腹血糖受损）或糖尿病。这个新的截止点应该可用于确定将血糖升高定义为代谢综合征一个标准的下限。

[0015] 与代谢综合征相关的病症包括 II 型糖尿病、异常脂蛋白血症、心肌梗死、中风及其它动脉硬化疾病以及这些疾病的风险因素，包括一般胰岛素抗性、腹内脂肪积累引起的腹部肥胖、血清脂肪和血糖升高、舒张压和 / 或收缩压升高以及高血压。

[0016] 需要可作为辅助疗法的葡萄提取物以及包含该葡萄提取物的膳食补充剂，其在高血压前期个体或患有代谢性综合征的个体中有效地有益于健康，如降低血压。

附图说明

[0017] 图 1 显示用本发明所使用葡萄提取物进行治疗的患有代谢综合征的个体中基线血压与收缩压下降之间的关系。

[0018] 图 2 显示用本发明所使用葡萄提取物进行治疗的患有代谢综合征的个体中基线血压与舒张压下降之间的关系。

[0019] 图 3 显示在用本发明所使用葡萄提取物进行治疗的患有代谢综合征的个体中氧化 LDL 浓度的变化。

[0020] 图 4 显示在给予 300mg 本发明所使用葡萄提取物的个体中氧化 LDL 浓度的变化与氧化 LDL 基线浓度之间的关系。

[0021] 发明详述

[0022] 本发明提供了有效治疗高血压前期以及代谢性综合征和 / 或包括代谢性综合征的病症的葡萄提取物。一般地,本发明的葡萄提取物包含约 5-15% 的单体、约 5-20% 的二聚体、约 3-10% 的三聚体、约 2-10% 的四聚体以及约 2-10% 的五聚体 (以重量计)。包括单体、二聚体、三聚体、四聚体和五聚体的低分子量酚类化合物的总量约为 25-50% (以重量计),优选约为 25-40% (以重量计),更优选约为 30-40% (以重量计),并且更优选约为 25-35% (以重量计)。酚类化合物的总量约为 80% (以重量计) 或更多,并且优选约为 90% (以重量计) 或更多。

[0023] 在一个实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 6-15% 的单体、约 7-15% 的单体、约 8-15% 的单体、约 9-15% 的单体、约 10-15% 的单体、约 11-15% 的单体、约 12-15% 的单体、约 13-15% 的单体以及约 14-15% 的单体。在另一实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 5-14% 的单体、约 5-13% 的单体、约 5-12% 的单体、约 5-11% 的单体、约 5-10% 的单体、约 5-9% 的单体、约 5-8% 的单体、约 5-7% 的单体以及约 5-6% 的单体。在又一实施方案中,本发明中单体的量选自约 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14% 和 15%。

[0024] 在一个实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 6-20% 的二聚体、约 7-20% 的二聚体、约 8-20% 的二聚体、约 9-20% 的二聚体、约 10-20% 的二聚体、约 11-20% 的二聚体、约 12-20% 的二聚体、约 13-20% 的二聚体、约 14-20% 的二聚体、约 15-20% 的二聚体、约 16-20% 的二聚体、约 17-20% 的二聚体、约 18-20% 的二聚体以及约 19-20% 的二聚体。在另一实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 5-19% 的二聚体、约 5-18% 的二聚体、约 5-17% 的二聚体、约 5-16% 的二聚体、约 5-15% 的二聚体、约 5-14% 的二聚体、约 5-13% 的二聚体、约 5-12% 的二聚体、约 5-11% 的二聚体、约 5-10% 的二聚体、约 5-9% 的二聚体、约 5-8% 的二聚体、约 5-7% 的二聚体以及约 5-6% 的二聚体。在又一实施方案中,本发明中二聚体的量选自约 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19% 和 20%。

[0025] 在一个实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 4-10% 的三聚体、约 5-10% 的三聚体、约 6-10% 的三聚体、约 7-10% 的三聚体、约 8-10% 的三聚体以及约 9-10% 的三聚体。在另一实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 3-9% 的三聚体、约 3-8% 的三聚体、约 3-7% 的三聚体、约 3-6% 的三聚体、约 3-5% 的三聚体以及约 3-4% 的三聚体。在又一实施方案中,本发明中三聚体的量选自约 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 和 10%。

[0026] 在一个实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 3-10% 的四聚体、约 4-10% 的四聚体、约 5-10% 的四聚体、约 6-10% 的四聚体、约 7-10% 的四聚体、约 8-10% 的四聚体以及约 9-10% 的四聚体。在另一实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 2-9% 的四聚体、约 2-8% 的四聚体、约 2-7% 的四聚体、约 2-6% 的四聚体、约 2-5% 的四聚体、约 2-4% 的四聚体以及约 2-3% 的四聚体。在又一实施方案中,本发明中四聚体的量选自约 2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 和 10%。

[0027] 在一个实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 3-10% 的五聚体、约 4-10% 的五聚体、约 5-10% 的五聚体、约 6-10% 的五聚体、约 7-10% 的五聚体、约 8-10% 的五聚体以及约 9-10% 的五聚体。在另一实施方案中,本发明的葡萄提取物包含约 2-9% 的五聚体、约

2-8%的五聚体、约 2-7%的五聚体、约 2-6%的五聚体、约 2-5%的五聚体、约 2-4%的五聚体以及约 2-3%的五聚体。在又一实施方案中,本发明中五聚体的量选自约 2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%和 10%。

[0028] 在一个实施方案中,低分子量酚类化合物(即单体、二聚体、三聚体、四聚体和五聚体)的总量为约 25%或更多、约 30%或更多、约 35%或更多、约 40%或更多、约 45%或更多,可多达约 50%(以重量计)。在另一实施方案中,低分子量酚类化合物的总量为约 25%或更多、26%或更多、27%或更多、28%或更多、29%或更多、30%或更多、31%或更多、32%或更多、33%或更多、34%或更多、35%或更多、36%或更多、37%或更多、38%或更多、39%或更多、40%或更多、41%或更多、42%或更多、43%或更多、44%或更多、45%或更多、46%或更多、47%或更多、48%或更多、49%或更多,可多达约 50%(以重量计)。

[0029] 如正相高效液相层析(“HPLC”)所测定的,本发明葡萄提取物的酚谱为约 5-15%的单体、约 5-20%的二聚体、约 4-10%的三聚体、约 2-10%的四聚体以及约 2-10%的五聚体(以重量计)。如 Folin Ciocalteu 法所测定的,本发明的葡萄提取物还包含约 80%(以重量计)或更多、优选约 90%(以重量计)或更多的总酚类化合物。如在硫解反应之后进行反相 HPLC 所测定的,本发明的葡萄提取物还包含约 2%(以重量计)或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元,更优选约 1%(以重量计)或更少。如在硫解反应之后进行反相 HPLC 所测定的,本发明的葡萄提取物还包含约 12%(以重量计)或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元,优选约 8%(以重量计)或更少,并且更优选约 5%(以重量计)或更少。

[0030] 可以通过改进公开于美国专利 No. 6, 544, 581 中的热水提取法来生产本发明的葡萄提取物,如下文所述。热水提取法(如' 581 专利所公开的)通常包括以下步骤。在步骤(1)中,可用热水将干燥或新鲜的葡萄籽加热足以提取大部分多酚的时间。可使用 140-212 °F 的温度,优选 160-212 °F、更优选 180-212 °F,更优选 190-212 °F,时间为约 1-6 小时。加热时间可根据所使用温度而不同。通常,较低的温度需要较长的提取时间。在步骤(2)中,可通过流经金属筛将葡萄籽-水粗提物与用过的种子分开。然后,可冷却该提取物,并用任何适当的市售溶果胶酶(如 Novo Nordisk 生产的 Pectinex[®] Ultra SP-L)(以约为 50-200ppm 的浓度)进行处理,从而破坏细胞壁组分。优选地,可以在 80-120 °F 温度下用酶将所述种子水提取物处理 2 小时。或者,可以在约 40-50 °F 下用酶将所述种子的水提取物处理 7-14 天或更长。在步骤(3)中,可以将得到的混浊种子提取物用酸(优选无机酸,更优选硫酸)酸化至 pH 为约 1.5-2.5,并反应约 1 小时至约 2 天。可将该酸化提取物冷却长达数周,以使高分子(包括蛋白质及其它多糖)沉降。然后,使用硅藻土过滤该冷却的酸化提取物,以得到澄清的种子提取物。也可使用其它助滤剂如珍珠岩。

[0031] 可以通过在约 80-120 °F 温度下用酶处理种子的水提取物 4 至 5 天来改良' 581 专利的步骤(2),从而生产本发明的葡萄提取物。不限于任何理论地,相信在该步骤规定的温度范围中使用比' 581 专利中更长的持续时间是得到新葡萄提取物的原因。酶处理的时间可根据所使用的温度而不同。一般地,较低的温度需要较长的处理时间。因此,在约 60-80 °F 温度下种子-水提取物可用酶处理长达 2 周或更长时间。

[0032] 在一个实施方案中,可以通过以下步骤生产本发明的葡萄提取物。在' 581 专利中步骤(1)的提取之后或者步骤(2)的果胶酶处理之后,可将所述提取物涂在细菌用琼脂

平板上。孵育后可存在多种酵母、细菌和 / 或真菌,这取决于起始材料。这些活培养物可作为混合物分离。分离后,所述混合物即可用于后续的提取和 / 或果胶酶处理步骤。例如,可以用任何适当的市售溶果胶酶对种子-水提取物进行酶处理,并与分离的酵母、细菌和 / 或真菌混合物合并。所述合并的混合物可置于约 70-100 °F 的温度下约 1 至 10 天,优选约 2 至 5 天。酶处理的时间可根据所使用的温度和接种数而不同。可如上文所述用适当的酸将得到的混浊种子提取物酸化至 pH 为 1.5-2.5,并反应约 1 小时至约 2 天。可将该酸化提取物冷却并保存几天,以使蛋白质和多糖絮凝。然后,可以使用硅藻土将该冷却的酸化提取物过滤,从而得到澄清的种子提取物,其可以根据 ' 581 专利进一步加工以生产适于降低血压和减少氧化 LDL 的纯化的葡萄提取物。

[0033] 将 ' 581 方法生产的葡萄提取物与包括酵母、细菌和 / 或真菌混合物的方法所生产的葡萄提取物相比,通过 HPLC 分析没食子酸的量。该分析显示,从 ' 581 方法的葡萄提取物中约 50-150ppm 没食子酸的值增加到使用所述混合物的本发明葡萄提取物中约 400-1500ppm 没食子酸的值。没食子酸的增加表明,表儿茶素没食子酸酯的末端和延伸单元从原花青素上去酯化。不限于任何理论地,相信酵母、细菌和 / 或真菌混合物使用葡萄提取物作为底物,用于生长和产生鞣酶的酶活性,这引起原花青素的去酯化作用以及没食子酸的释放。因而,使用活酵母、细菌和 / 或真菌的混合物产生了本发明使用的葡萄提取物,其具有约 2% (以重量计) 或更少、更优选约 1% (以重量计) 或更少的表儿茶素没食子酸酯末端单元,以及约 12% (以重量计) 或更少、优选约 8% (以重量计) 或更少、更优选约 5% (以重量计) 或更少的表儿茶素没食子酸酯延伸单元。

[0034] 在一个实施方案中,可以通过以下步骤生产本发明的葡萄提取物。在 ' 581 专利步骤 (1) 的提取之后或者步骤 (2) 的果胶酶处理之后,可以以约 5-1000ppm 的浓度添加任何适当的商品鞣酶,例如真菌鞣酶,如鞣质酰基水解酶,E. C3. 1. 1. 20。取决于所使用鞣酶的浓度,所述混合物可反应约 1 小时至约 2 天,优选 1 至 2 天,或者直至末端单元减少至约 2% 或更少,优选 1% 或更少,延伸单元减少至 8% 或更少,优选约 5% 或更少。在足够的反应时间后,可将该提取物酸化至 pH 为 1.5 至 2.5,这在 40-60 °F 的较低温保存时使蛋白质和多糖絮凝。可根据 ' 581 专利将该提取物过滤至澄清并进一步加工,从而生产具有降低血压特征的葡萄提取物。

[0035] 可将本发明的葡萄提取物配制成膳食补充剂,包括胶囊剂、片剂、粉剂、溶液剂、凝胶剂、混悬剂、霜剂、糊剂、凝胶剂、栓剂、透皮贴剂等。可以将例如粉剂或溶液剂形式的这些膳食补充剂添加至营养品、食品和 / 或饮料中,以形成功能性营养品、食品和 / 或饮料产品。例如,可以将该膳食补充剂配制为粉剂,用于与可消费液体(如奶、果汁、水)或可消费凝胶剂或糖浆剂混合,以混入其他食用液体或食品中。可将本发明的膳食补充剂与其它食品或液体配制在一起,从而提供预称量的补充食品,如单个包装的条。可掺入本发明所使用葡萄提取物的典型食品包括乳制品(如酸乳)、谷类、面包、快餐食品、果汁及其它软饮料。可根据需要添加调味剂、粘合剂、蛋白质、复合碳水化合物、维生素、矿物质等。优选地,将该葡萄提取物配制成用于经口施用。

[0036] 本发明还提供包含本发明的葡萄提取物的膳食补充剂。在施用于哺乳动物(包括人)时,该膳食补充剂在患有如高血压前期或代谢综合征的个体中降低血压。特别地,治疗如患有高血压前期或代谢性综合征的个体或者预防这些疾病的病症的成功疗程表征为使

收缩压和 / 或舒张压之其一或其二降低至少约 2%，优选至少约 5%，更优选至少约 8%，并且胰岛素抗性的提高极少（如果有的话）。

[0037] 本发明所使用的膳食补充剂计划用于每天施用或根据需要施用。该膳食补充剂在高血压前期个体或患代谢综合征个体中预防或治疗剂量的高低将随着受治病症的严重程度和给药途径而变化。剂量（可能还有给药频率）还将根据个体的年龄、体重和应答而变化。一般而言，对于本文所述的病症来说，总日剂量范围为约 50mg 至约 1,000mg 葡萄提取物，其以单剂量或分次剂量经口、局部或透皮给药，优选经口给药。优选的经口日剂量范围为 50mg 至约 500mg、更优选约 150mg 至约 300mg 葡萄提取物（即排除赋形剂和载体）。例如，胶囊剂或片剂可配制为 150mg 或 300mg 剂量，而饮料可配制为含有 50mg 葡萄提取物。优选将这样的给药方案维持至少一个月，更优选六个月或更长。

[0038] 本发明的膳食补充剂可以与可药用载体、赋形剂、维生素、矿物质和 / 或其它营养物质混合以常规方式（即干燥混合、湿法造粒或干法造粒、直接压制）配制。对于经口固体制剂（如粉剂、胶囊剂和片剂）的情况，代表性载体和赋形剂包括但不限于淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、造粒剂、滑润剂、粘合剂、崩解剂等。

[0039] 可以使用任何适当的给药途径对个体施用本发明的膳食补充剂。合适的途径包括如经口、直肠、胃肠外、静脉内、局部、透皮、皮下和肌内。尽管可以使用任何适当的给药途径来对个体提供有效量的本发明方法的葡萄提取物，但优选经口给药，包括固体剂型如片剂、胶囊剂或粉剂。还优选将所述葡萄提取物配制成用于功能性营养品、食品或饮料产品。

[0040] 本发明所使用的葡萄提取物还可与其它活性剂组合，所述活性剂包括而不仅限于利尿剂、 β -阻断剂、ACE 抑制剂、血管紧张素拮抗剂、钙通道阻断剂、 α -阻断剂、 α - β -阻断剂、神经系统抑制剂、血管扩张剂、抗氧化剂。

[0041] 1. 葡萄提取物的表征

[0042] 最近，据报道，在高血压个体中与维生素 C 联合使用时，葡萄籽多酚不降低收缩压，并且事实上提高收缩压。参阅 Ward 等“*The combination of vitamin C and grape-seed polyphenols increases blood pressure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*,” *Journal of Hypertension* 2005;23:427-434。不限于任何理论地，相信葡萄提取物的酚谱对于其在降低血压中的有效性是很重要的。Ward 的研究中所评估的葡萄提取物是 Vinlife[®]，其酚谱为通过 Folin Ciocalteu 法测定的 50.6% 总酚类化合物，通过硫解反应后反相 HPLC 测定的 11.2% 表儿茶素没食子酸酯末端单元和 11.8% 表儿茶素没食子酸酯延伸单元，以及通过正相 HPLC 所测定的 7.3% 单体、4.4% 二聚体、2.0% 三聚体、1.9% 四聚体和 1.1% 五聚体，单体至五聚体共为 16.7%。

[0043] 市售的葡萄籽提取物包含多种单体和原花色素。一些市售提取物的通过反相 HPLC 所测定的酚谱示于表 1，通过正相 HPLC 所测定的示于表 2。从这些分析来看，本发明的葡萄提取物 (MegaNatural[®]-BP，目前由 Polyphenols, Inc. 生产) 具有区别于其它葡萄提取物的 3 个区分因素：

[0044] 1. 高纯度，如通过 Folin Ciocalteu 法所测定的，总酚类化合物的量高于约 80%（以重量计），并且更优选高于约 90%（以重量计）；

[0045] 2. 低分子量酚类化合物的量高，例如约为 25-50%（以重量计），其中低分子量的

酚类化合物为单体、二聚体、三聚体、四聚体和五聚体 ;以及

[0046] 3. 末端单元中表儿茶素没食子酸酯的量极低或没有,例如低于约 2%,优选低于约 1%,并且延伸单元中表儿茶素没食子酸酯的量较低,例如低于约 12%,优选低于约 5%。

[0047] 同样,不限于任何理论地,相信葡萄提取物的酚谱对其在治疗或预防高血压前期或代谢综合征中的有效性是很重要的。特别地,相信在本发明所使用葡萄提取物的末端单元中表儿茶素没食子酸酯的缺乏和其延伸单元中少量的表儿茶素没食子酸酯以及存在较大量的低分子量化合物是血管舒张增强的原因,所述血管舒张的增强相信是下述的对患有代谢综合征和高血压前期个体的临床研究中血压下降的原因。测定单体、寡聚体和多聚体百分比的反相 HPLC 方法

[0048] 可使用反相 HPLC 分析基于 280nm 处的峰面积来测定葡萄提取物中单体、寡聚体和多聚体的比例。

[0049] HPLC 条件 :

[0050] 流动相 :A :2%冰乙酸

[0051] B :80%乙腈,0.4%乙酸

[0052] 梯度 :时间

[0053]	(分钟)	% A	% B	曲线
[0054]	0.00	100	0	-
[0055]	3.00	100	0	6
[0056]	6.00	96	4	6
[0057]	15.00	90	10	6
[0058]	30.00	85	15	6
[0059]	50.00	77	23	6
[0060]	60.00	75	25	6
[0061]	66.00	70	30	6
[0062]	80.00	50	50	6
[0063]	83.00	20	80	6
[0064]	85.00	100	0	6
[0065]	105.00	100	0	6
[0066]	110.00	100	0	6

[0067] 柱 :250mm×4.6mm, Prodigy 5 μ ODS(3) 100 \AA

[0068] (Phenomenex, Torrance, CA)

[0069] 流速 :1.0mL/分钟

[0070] 检测波长 :280nm

[0071] 温度 :30 $^{\circ}$ C

[0072] 注入量 :25 μ L

[0073] 样品制备 :准确称重 0.1g 葡萄提取物并放入 100mL 容量瓶中。将该样品溶解在少量甲醇中 (≤ 5 mL),必要时进行超声处理。用 18 兆欧的水填满体积。在注入前将该样品离心 (14,000rpm, 10 分钟) 或者通过 0.45 μ M 玻璃滤器进行过滤。基于峰面积和标准品的浓度测定单体、寡聚体和多聚体的重量百分比。基于疏解反应之后 HPLC 分析来测定原花色素

中末端和延伸单元的方法

[0074] 硫解作用是测定葡萄提取物中原花色苷平均分子大小(聚合度)和基本结构的方法。所提供的信息可表明葡萄提取物用于机体营养吸收的生物学品质。

[0075] 硫解试剂:含有 0.2N HCl 的甲醇中的 5% 苯基甲硫醇(苄硫醇)。

[0076] 条件:将 0.1% 葡萄提取物甲醇溶液与等体积的硫解试剂混合、搅拌并在 90℃ 加热 2 分钟。加水终止反应。然后,以 14000rpm 将反应物离心 2 分钟。直接通过 HPLC 分析上清液。

[0077] HPLC 条件:

[0078] 流动相:A:10% 乙酸 /0.1% TFA/5% 乙腈 /84.9% 水(体积

[0079] / 体积 / 体积 / 体积)

[0080] B:乙腈

[0081] 梯度:0-30 分钟 0-50% B

[0082] 30-35 分钟 50-100% B

[0083] 柱:150cm×2.0mm i.d.,4 μm Synergi hydro-RP 80

[0084] Å (Phenomenex, Torrance, CA)

[0085] 流速:0.3mL/min

[0086] 检测波长:HP 1100FLD,在 276nm 处激发,在 316nm 处

[0087] 发射,以及 HP DAD 在 280nm 处

[0088] 温度:30℃

[0089] 注入量:1-3 μL

[0090] 将待分析的葡萄提取物溶于甲醇中,与等体积的硫解试剂混合并在 90℃ 加热 2 分钟。通过质谱分析法鉴定所释放的单元,并在上述条件下通过 HPLC 进行定量测定。通过计算所有黄烷-3-醇单元(硫醚加合物加末端单元)与末端单元的相应儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的摩尔比例来计算平均聚合度。基于表儿茶素没食子酸酯在末端单元总摩尔数中的摩尔比例来测定表儿茶素没食子酸酯末端单元的百分比,所述表儿茶素没食子酸酯末端单元包括儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯。基于表儿茶素没食子酸酯硫醚加合物在延伸单元的硫醚加合物总摩尔数中的摩尔比例来测定表儿茶素没食子酸酯延伸单元的百分比,所述延伸单元硫醚加合物包括儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯硫醚加合物。利用 Folin Ciocalteu 法以没食子酸当量(Gallic Acid Equivalent, GAE)来定量酚类化合物总量。Folin Ciocalteu 分析法的更多细节参阅 Waterhouse, A. L., Determination of Total Phenolics, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 11.1.1-11.1.8, Wrolstad, R. E., Wiley, 2001 或者 Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent," Methods in Enzymology 1999, 299, 152-178, 二者均通过参考并入本文。

[0091] 表 1:通过反相 HPLC 测定的 MegaNatural[®]-BP 与市场中其它葡萄提取物的特征比较

[0092]

来源	产品名称	总酚 g GAE/100 g(本身)	表儿茶素 没食子 酸酯 末端 (%)	表儿茶素 没食子 酸酯 延伸 (%)	通过反相HPLC 使用峰面积测定		
					单体 (%)	寡聚体 (%)	多聚体 (%)
美国	MegaNatural®-BP	93.8	0.0	6.8	12.8	62.6	24.6
美国	MegaNatural®-BP	91.0	0.0	5.4	9.2	69.6	21.2
美国	MegaNatural®-BP	95.2	0.0	6.9	13.8	64.7	21.5
美国	MegaNatural®-BP	98.6	0.0	8.2	11.3	68.0	20.7
美国	MegaNatural®-BP	91.1	0.0	5.4	5.4	71.5	23.2
美国	MegaNatural®-BP	95.5	0.0	5.1	6.5	73.3	20.3
美国	MegaNatural®-BP	92.7	0.0	3.0	8.5	69.8	21.7
美国	MegaNatural®-BP	93.5	0.0	4.8	5.4	69.9	24.7
美国	MegaNatural Gold®	93.0	10.5	11.7	7.8	74.7	17.6
美国	MegaNatural Gold®	91.9	4.3	14.6	12.3	76.7	11.0
美国	MegaNatural Gold®	92.4	11.0	11.9	10.2	77.7	12.1
美国	MegaNatural Gold®	89.1	5.2	12.9	9.9	73.7	16.4
美国	MegaNatural Gold®	90.1	3.6	14.5	11.1	73.4	15.6
美国	MegaNatural Gold®	90.3	2.8	8.8	13.2	65.5	21.3
美国	MegaNatural Gold®	89.6	8.7	11.8	10.0	65.2	24.8
澳大利亚	Vinlife®	50.6	11.2	11.8	6.3	60.6	33.1
欧洲	Masqueller OPC®	98.0	8.5	7.5	12.1	68.4	19.5
欧洲	Naturex®	78.5	8.3	6.2	6.3	64.2	29.5
欧洲	Indena®	93.0	10.5	8.8	10.1	64.4	25.5
中国	Lycome®	88.5	10.6	7.5	5.3	63.1	31.7
中国	Recovery®	95.8	3.9	5.4	9.1	58.4	32.5
中国	Grape P E®	92.6	9.8	6.8	3.6	51.9	44.4
中国	MA®	70.1	8.7	10.5	4.6	55.3	40.1
美国	ME®	68.9	12.1	6.3	1.9	52.6	45.4
美国	San Joaquin®	74.9	17.7	6.7	2.2	56.1	41.8
美国	Activin®	84.3	14.8	11.1	3.0	55.9	41.1
日本	KIKKOMAN®	44.5	5.2	13.1	8.1	52.9	38.9

[0093] 对原花色素进行正相 HPLC 分析

[0094] 原花色素的 HPLC 分析：利用配备有自动进样器 / 注射器、二元梯度泵 (binary pump)、柱温箱、二极管阵列检测器、荧光检测器以及用于数据收集和处理的 HP ChemStation 的 HP 1100 系列 HPLC 进行层析分析。在 Phenomenex Luna Silica(2) 柱上进

行原花色素寡聚体的正相分离。

[0095] 流动相 :A :二氯甲烷、甲醇、水和乙酸 (83 : 13 : 2 : 2 (体积 / 体积))

[0096] B :甲醇、水和乙酸 (96 : 2 : 2 (体积 / 体积))

[0097] 梯度 :0-30 分钟 线性 0-17.6% B

[0098] 30-45 分钟 线性 17.6-30.7% B

[0099] 45-50 分钟 线性 30.7-87.8% B

[0100] 50-60 分钟 线性 87.8% B

[0101] 柱 :Phenomenex LUNA Silica (3.0×150mm ;3.0 μ m)

[0102] 流速 :0.5mL/ 分钟

[0103] 检测 :HP 1100 FLD, 在 276nm 处激发, 在 316nm 处发射

[0104] 温度 :25℃

[0105] 注入量 :3 μ L

[0106] 在所有的情况下, 在注射之间均用相当于 5mL 的初始流动相将柱再次平衡。制备并分析儿茶素标准品以建立响应标准曲线, 由此计算样品中原花色素的浓度。荧光检测中二聚体、三聚体、四聚体和五聚体相对于单体的响应因子报道于 R. L. Prior 和 L. Gu, "Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in American diet," *Phytochemistry* 2005, 66 (18) 2264-2280, 其中使用分离和纯化自可可豆的标准品。这些响应因子用于计算相对于单体的二聚体、三聚体、四聚体和五聚体。

[0107] 表 2 :通过正相 HPLC 测定的 MegaNatural[®]-BP 与市场中其它葡萄提取物的特征比较

		使用儿茶素和表儿茶素等价物通过正相HPLC测定 (重量百分比)						
来源	产品名称	单体	二聚体	三聚体	四聚体	五聚体	单体至五聚体	其它
美国	MegaNatural®-BP	6.3	8.7	4.0	4.4	2.8	26.2	73.8
美国	MegaNatural®-BP	9.1	13.6	5.6	6.2	3.5	38.1	61.9
美国	MegaNatural®-BP	9.2	14.8	5.2	5.4	2.7	37.3	62.7
美国	MegaNatural®-BP	10.0	14.2	5.4	5.2	2.8	37.6	62.4
美国	MegaNatural®-BP	7.5	11.9	5.2	5.5	3.4	33.4	66.6
美国	MegaNatural®-BP	8.2	12.1	5.4	5.7	3.5	34.9	65.1
美国	MegaNatural®-BP	9.0	11.3	5.4	4.7	2.5	32.9	67.1
美国	MegaNatural®-BP	5.2	9.8	4.1	4.8	2.6	26.4	73.6
[0108] 澳大利亚	Vinliffe®	7.3	4.4	2.0	1.9	1.1	16.7	83.3
欧洲	Masquelier OPC®	15.5	14.2	6.2	4.8	2.9	43.6	56.4
欧洲	Naturex®	8.3	6.4	3.6	3.0	2.0	23.2	76.8
欧洲	Indena®	16.6	12.4	6.2	4.8	3.3	43.3	56.7
中国	Lycome®	7.6	6.2	3.4	2.8	1.9	22.0	78.0
中国	Recovery®	17.5	8.1	4.4	2.8	2.0	34.8	65.2
中国	Grape P E®	3.9	3.2	1.9	1.5	1.1	11.6	88.4
中国	MA®	4.1	3.8	1.9	1.7	0.8	12.3	87.7
美国	ME®	1.8	1.8	0.9	0.8	0.5	5.8	94.2
美国	San Joaquin®	5.3	5.8	2.6	1.8	1.3	16.8	83.2
美国	Activin®	5.5	4.8	2.1	1.3	1.3	15.1	84.9
日本	KIKKOMAN®	0.9	1.1	0.7	0.7	0.4	3.7	96.3

[0109] 表 1 和表 2 所显示的结果使用不同方法获得,其解释了例如单体百分数的不同范围。例如,使用反相 HPLC 基于单体、寡聚体和多聚体的峰面积测定这三组化合物的百分比。包括了没食子酸作为单体。在正相 HPLC 中,使用儿茶素和表儿茶素作为标准品以测定葡萄提取物中单体、二聚体、三聚体、四聚体和五聚体的量(以重量计)。使用 R. L. Prior 和 L. Gu 所报道的二聚体、三聚体、四聚体和五聚体相对于单体的相对响应因子来计算二聚体、三聚体、四聚体和五聚体。

[0110] 2. 葡萄提取物对患有代谢综合征的个体中血压的影响

[0111] 在 24 个诊断为患有代谢综合征的个体中研究本发明所使用葡萄提取物对血压的影响。该研究包括相等数量的 20 至 50 岁的男性和女性。基于由美国国家胆固醇教育计划成人治疗组 III 定义的标准诊断代谢综合征。每名受试者均显示至少三个以下特征:1) 空腹血糖 > 110mg/dL, 2) HDL (男性中 < 40mg/dL, 女性中 < 45mg/dL), 3) 血压 > 130/85, 以及 4) 腹部肥胖 (男性 > 102cm, 女性 > 88cm)。如果个体:吸烟或者从前吸烟 (< 3 年);服用抗炎或高血压药物;或者服用非处方药抗氧化剂化合物,则排除他们。

[0112] 将所述个体分组随机化 (block randomize) 分为三组, 每组 8 人, 并根据其分组给予以下胶囊之一。

[0113] 第一组给予安慰剂胶囊

[0114] 第二组给予含有 150mg 葡萄提取物的胶囊

[0115] 第三组给予含有 300mg 葡萄提取物的胶囊

[0116] 给所述个体足够的胶囊, 以使其在接下来的 28 天中每天服用同样剂量一次。在该阶段结束时测量血压。在研究开始时记录 12 小时的动态血压, 并且在四周后再次记录。该方法是非侵入性的, 包括将血压袖带置于上臂。所述袖带与 FDA 批准的自动充气装置相连, 并靠带子佩戴。

[0117] 表 3 显示三组代谢综合征个体的血压数据。在每天接受 300mg 和 150mg 本发明所使用的葡萄提取物的个体中, 收缩压和舒张压均有显著降低。在给予安慰剂的组中无显著变化。

[0118] 表 3. 本发明所使用的葡萄提取物在代谢综合征个体血压上的结果

[0119]

	每天 300 mg		每天 150 mg		安慰剂	
	收缩压	舒张压	收缩压	舒张压	收缩压	舒张压
开始	129 ± 4	79 ± 3	137 ± 4	84 ± 3.3	124 ± 4	74 ± 4
4 周	117 ± 3	71 ± 3	125 ± 4	78 ± 1.9	123 ± 4	71 ± 4
p*	0.007	0.006	0.003	0.009	不显著	不显著

[0120] *p 是开始和结束值相同的概率。通常认为 p 为 0.05 或更小 (5%) 是显著的。

[0121] 基线血压与收缩压和舒张压下降之间的关系示于图 1 和图 2。血压用 mmHg 表示。因为代谢综合征的诊断是基于存在所列出的三个风险因素 (其中之一为血压), 所以该研究不根据血压对个体进行集区随机化分组。因此, 三组中的平均血压不相似 (但是在窄范围内变化)。

[0122] 该研究证明, 日剂量 150mg 和 300mg 的本发明葡萄提取物降低代谢综合征个体的收缩压和舒张压。对于所使用的两种提取物剂量, 血压降低都是统计学显著的。事实上, 使用葡萄提取物观察到的血压变化与大多数临床试验中使用药物试剂所观察到的相当。

[0123] 3. 葡萄提取物对代谢综合征个体中氧化 LDL 的影响

[0124] 在如上述同样的 24 个诊断为患有代谢综合征的个体中研究了本发明所使用的葡萄提取物对于氧化 LDL 的影响。在研究开始测量氧化 LDL 的浓度, 并在治疗 4 周后再次测量。为了测量氧化 LDL 的浓度, 从每名个体取血并进行分析。

[0125] 三个组的氧化 LDL 浓度变化总结于图 3。图 3 显示, 服用安慰剂的个体的氧化 LDL 有轻微下降, 服用 150mg 本发明所使用葡萄提取物的个体中氧化 LDL 有下降趋势, 服用 300mg 本发明所使用葡萄提取物的个体中氧化 LDL 具有统计学显著的下降 ($p < 0.05$)。图 4 描绘了给予 300mg 本研究所使用葡萄提取物的个体中氧化 LDL 变化与氧化 LDL 基线浓度之间的关系。回归系数 $R^2 = 0.52$ 。图 4 显示, 在以较高的氧化 LDL 水平开始治疗的个体中

氧化 LDL 的浓度有更显著的降低。

[0126] 该研究表明,本发明的葡萄提取物以日剂量 150mg 和 300mg 降低了患有代谢综合征的个体血浆中氧化 LDL 的浓度。另外,给予本发明所使用葡萄提取物 300mg 的个体的氧化 LDL 浓度具有统计学显著的下降。

[0127] 4. 葡萄提取物对于患有高血压前期的个体的影响

[0128] 研究了本发明所使用的葡萄提取物对 24 名诊断为患有高血压前期的个体的影响。该研究包括相等数量的 30 至 60 岁之间的男性和女性。基于美国国家高血压预防、检测、评估和治疗委员会第 7 次报告定义的标准诊断高血压。每个受试者具有 120 至 139mmHg 的收缩压和 / 或 81 至 89mmHG 的舒张压。如果个体 :吸烟或者从前吸烟 (< 3 年);服用抗炎或高血压药物 ;或者服用非处方药抗氧化剂化合物,则排除他们。

[0129] 将所述个体按性别分组随机化分为两组,每组 12 人,根据分组情况给予他们以下胶囊之一。

[0130] 第一组给予安慰剂胶囊

[0131] 第二组给予含有 300mg MegaNatural[®]-BP 的胶囊

[0132] 给所述个体足够的胶囊,以使其在接下来的八周中每天服用同样剂量一次。在该阶段结束时测量血压。在研究开始时记录 12 小时的动态血压,并且在八周后再次记录。该方法是非侵入性的,包括将血压袖带置于上臂。所述袖带与 FDA 批准的自动充气装置相连,并靠带子佩戴。

[0133] 表 4 显示两组患有高血压前期的个体的血压数据。基线血压在两组之间没有显著差异。在每天接受 300mg 本发明所使用葡萄提取物的个体中,收缩压和舒张压均显著降低;然而,在给予安慰剂的组中无显著变化。例如,在用 MegaNatural[®]-BP 治疗的组中收缩压平均降低 7.2 ± 2.5 mmHg,而在安慰剂组中收缩压提高了 0.03 ± 1.5 mmHg。所述数据总结于下文。数值以 mmHg 给出(平均值 \pm 标准差)。

[0134] 表 4. MegaNatural[®]-BP 在高血压前期个体血压上的结果

	每天 300 mg MegaNatural [®] -BP		安慰剂	
	收缩压	舒张压	收缩压	舒张压
[0135] - 开始	133 \pm 2	80 \pm 2	134 \pm 2	79 \pm 2
8 周	126 \pm 2	73 \pm 2	134 \pm 2	80 \pm 2
p*	0.021	0.042	不显著	不显著

[0136] *p 是开始和结束时数值相同的概率。通常认为 p 为 0.05 或更小 (5%) 是显著的。

[0137] 该研究证明,300mg 日剂量的本发明葡萄提取物降低了高血压前期个体的收缩压和舒张压。血压降低是统计学显著的。事实上,使用葡萄提取物观察到的血压变化与使用药物试剂的多数临床试验中所观察到的相当。

[0138] 实施例

[0139] 通过参考以下实施例进一步定义本发明,所述实施例描述了用于生产葡萄提取物

和制备膳食补充剂的方法。所述实施例是代表性的,它们不应理解为限制本发明的范围。

[0140] 实施例 1 :用于生产葡萄提取物的方法

[0141] 在 200 °F 下用水提取干葡萄籽 2 小时,用金属筛将提取物与种子分开。将提取物冷却至 90-100 °F,并以 200ppm 的浓度加入果胶酶。将提取物分成两部分。向一部分中以 1000ppm 的浓度加入商品真菌鞣酶(鞣质酰基水解酶, E. C3. 1. 1. 20)。向另一部分中以 50ppm 的浓度加入该鞣酶。原始提取物中没食子酸的残留浓度为 117ppm,其中有 18.9% 的末端单元和 11.1% 的延伸单元。用 1000ppm 鞣酶处理约 2 小时内,没食子酸浓度升至 904ppm,其中有 0% 末端单元和约 5.5% 延伸单元。用 50ppm 鞣酶需处理约 34 小时以使没食子酸到达 810ppm,其中有少于 1% 的末端单元和少于 6% 的延伸单元。约 2 天后,将两份提取物均酸化至 pH 1.5 至 2.5,这使得蛋白质和多糖在 40-60 °F 的较低温保存时发生絮凝。将提取物过滤并根据 ' 581 专利进一步加工,以产生具有降低血压和减少氧化 LDL 浓度特征的葡萄提取物。

[0142] 实施例 2 :胶囊剂

[0143] 将 MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物(150mg 或 300mg)与硬脂酸镁(分别为 3mg 或 6mg)干燥混合并装入硬壳明胶胶囊(由明胶和水制得)中。在 150mg 配方中,该葡萄提取物含有至少 90% 的酚类,或每 150mg 葡萄提取物中至少 135mg 酚类。在 300mg 配方中,该葡萄提取物含有至少 90% 的酚类,或每 300mg 葡萄提取物中至少 270mg 酚类。日剂量为每天一粒胶囊。

[0144] 实施例 3 :粉剂

[0145] 如表 4 所示将 MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物与赋形剂配制成干混合物以用于饮料中,其中所述成分均干燥混合。为制备最终的饮料,将 9.47g 所述干混合物与 500mL 冷水混合并搅拌。500mL 的一份中包含 16 卡路里。每 1L 的一份最终饮料中含有 100mg MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物和 120mg 维生素 C,其 ORAC 值为 2200TE。

[0146] ORAC 代表“氧自由基吸收能力(Oxygen Radical Absorbance Capacity)”,以每克中毫摩尔 Trolox(一种非商品化的维生素 E 水溶性衍生物)当量(Trolox equivalent, TE)来衡量。科学家通过该标准来测量食品和补充剂中的抗氧化活性。一份新鲜的或新烹制的水果和蔬菜提供平均为 600 至 800ORAC 单位。已经提出,每天增加摄入具有 2,000 至 5,000ORAC 单位的食物或添加剂对健康有益。

[0147] 表 4

[0148]

成分	%干混合物 (g)
----	-----------

麦芽糖糊精	37.48
柠檬酸	29.99
混浊剂(纯胶 2000)*	5.25
阿斯巴甜	3.85
柠檬酸钠, FCC 级	3.75
Ultra Guar**	3.75
N&A 桔子香精 (SN313897)***	7.5
Nat FF 西番莲香精 (SN 313898)***	4.27
FD&C 黄 #6(20 : 1 在麦芽糖糊精中)	2.24
FD&C 黄 #5(20 : 1 在麦芽糖糊精中)	0.75
维生素 C	0.64
MegaNatural [®] -BP 葡萄提取物 (Polyphenolics, Inc.)	0.53
总计	100

[0149] * 可得自 National Starch & Chemical Corporation, Bridgewater, NJ

[0150] ** 可得自 P. L. Thomas & Co., Inc. Morristown, NJ

[0151] *** 可得自 International Flavors & Fragrances, Dayton, NJ

[0152] 实施例 4 : 饮料

[0153] 如表 5 所示将 MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物与赋形剂配制成饮料。每 8 液体盎司 (fl oz) 的一份以下饮料中含有 50mg MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物和 60mg 维生素 C (100% RDI)。8 液体盎司的一份该饮料含有 0 卡路里和 0.15g 总碳水化合物。16 液体盎司一份的 ORAC 值为 2200TE。

[0154] 表 5

[0155]

成分	重量百分比
水	99.4373
柠檬酸	0.2640
MegaNatural 紫色颜料 (Canandaigua Conc.)	0.0528
Sethness-Greenleaf 香精体系	0.0867
苯甲酸钠	0.0448
山梨酸钾	0.0448
维生素 C	0.0338
MegaNatural [®] -BP 葡萄提取物 (Polyphenolics, Inc.)	0.0211
阿斯巴甜	<u>0.0147</u>
总计	100.0000%

[0156] 实施例 5 : 饮料

[0157] 如表 6 所示将 MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物与赋形剂配制成饮料。每 8 液体

盎司的一份以下饮料中含有 50mg MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物和 60mg 维生素 C(100% RDI)。8 液体盎司的一份该饮料含有 15 卡路里和 4g 总碳水化合物。16 液体盎司一份的 ORAC 值为 2200TE。

[0158] 表 6

[0159]

<u>成分</u>	<u>重量百分比</u>
水	95.8778
橙汁浓缩物 65	1.3973
蔓越橘汁浓缩物 50	0.8691
MegaNatural 紫色颜料 (Canandaigua Conc.)	0.5032
Sethness-Greenleaf 香精体系	1.1074
苯甲酸钠	0.0444
山梨酸钾	0.0444
维生素 C	0.0357
MegaNatural [®] -BP 葡萄提取物 (Polyphenolics, Inc.)	0.0210
纽甜 (The NutraSweet Co.)	<u>0.0997</u>
总计	100.0000%

[0160] 实施例 6 : 维生素 / 矿物质补充剂

[0161] 将 MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物 (150mg) 与以下表 7 中列出的赋形剂干燥混合, 并压制成片剂以形成复合维生素 / 无机物补充剂。日剂量为每天一片, 优选伴随食品服用。

[0162] 表 7

[0163]

<u>成分</u>	<u>每日摄取量 百分比</u>

维生素 A 3500IU(29%为 β -胡萝卜素)	70
维生素 C 60mg	100
维生素 D 400IU	100
维生素 E 45IU	150
维生素 K 10mcg	13
硫胺素 1.5mg	100
核黄素 1.7mg	100
烟酸 20mg	100
维生素 B6 3mg	150
叶酸 400mcg	100
维生素 B12 25mcg	417
生物素 30mcg	10
泛酸 10mg	100
钙 299mg	20
磷 48mg	5
碘 150mcg	100
镁 100mg	25
锌 15mg	100
硒 20mg	29
铜 2mg	100
锰 2mg	100
铬 150mcg	125
钼 75mcg	100
氯 72mg	2
钾 80mg	2
MegaNatural [®] -BP 葡萄提取物 150mg	*
硼 150mcg	*
镍 5mcg	*
硅 2mg	*
钒 10mcg	*
叶黄素 250mcg	*
番茄红素 300mcg	*

[0164] * 无明确每日摄取量 (% DV)

[0165] 实施例 7 : 维生素 / 矿物质补充剂

[0166] 将 MegaNatural[®]-BP 葡萄提取物 (150mg) 与表 8 中列出的以下成分和赋形剂在 V 形搅拌器中混合均匀。将混合物压制成特定重量 (775mg \pm 2%) 的药片, 从而形成复合维生素 / 矿物质补充剂。用水溶性树胶 (如羟丙基甲基纤维素) 透明包衣喷涂所述片剂并干燥。日剂量为每天一片。表 8 中配方的批次规模为 500,000 片。

[0167] 表 8

[0168]

成分 (测量单位)	标签标示	过剩	量 / 片	量 / 批
		(%)*	(mg)	(Kg)
维生素 A 棕榈酸酯 @500KIU/gm (IU)	5000IU	30	13.000	6.500
维生素 D ₃ @850K IU/g (IU)	400IU	30	0.612	0.306
维生素 E 琥珀酸酯 (D-α)@1210IU/g (IU)	15IU	5	13.017	6.508
维生素 C (mg)	30mg	2	30.600	15.300
盐酸硫胺素 @89.2% (mg)	1.5mg	2	1.715	0.858
核黄素 (mg)	1.7mg	2	1.734	0.867
烟酰胺 (mg)	10mg	2	10.200	5.100
盐酸吡哆辛 82.3% (mg)	2mg	5	2.552	1.276
叶酸研制剂 1.0% (mcg)	400mcg	25	50.000	25.000
维生素 B-12 研制剂 1.0% (mcg)	6mcg	20	0.720	0.360
泛酸 (泛酸钙) (mg)	10mg	5	10.500	5.250
生物素研制剂 1.0% (mcg)	30mcg	20	3.600	1.800
钙 (磷酸二钙) 29.46% (mg)	100mg	0	344.119	172.060
磷 (磷酸二钙) 22.77% (mg)	75mg	0	0.000	0.000
镁 (MgO) 60.32% (mg)	20mg	0	33.156	16.578
锌 (ZnO) 80.34 (mg)	5mg	0	6.224	3.112
碘 (KI) 76.45% (mcg)	150mcg	0	0.196	0.098
铜 (葡萄糖酸盐) 14.00% (mg)	2mg	0	14.286	7.143
锰 (葡萄糖酸盐) 12.34% (mg)	2mg	0	16.207	8.104
MegaNatural [®] -BP 葡萄提取物	150mg		150.000	25.000
微晶纤维素			33.750	16.875
交联羧甲基纤维素钠			20.250	10.125
硬脂酸			13.500	6.750
硬脂酸镁			5.063	2.531
总计			775.000	337.500

[0169] * 为达到标示量而超过标签标示的成分量百分比

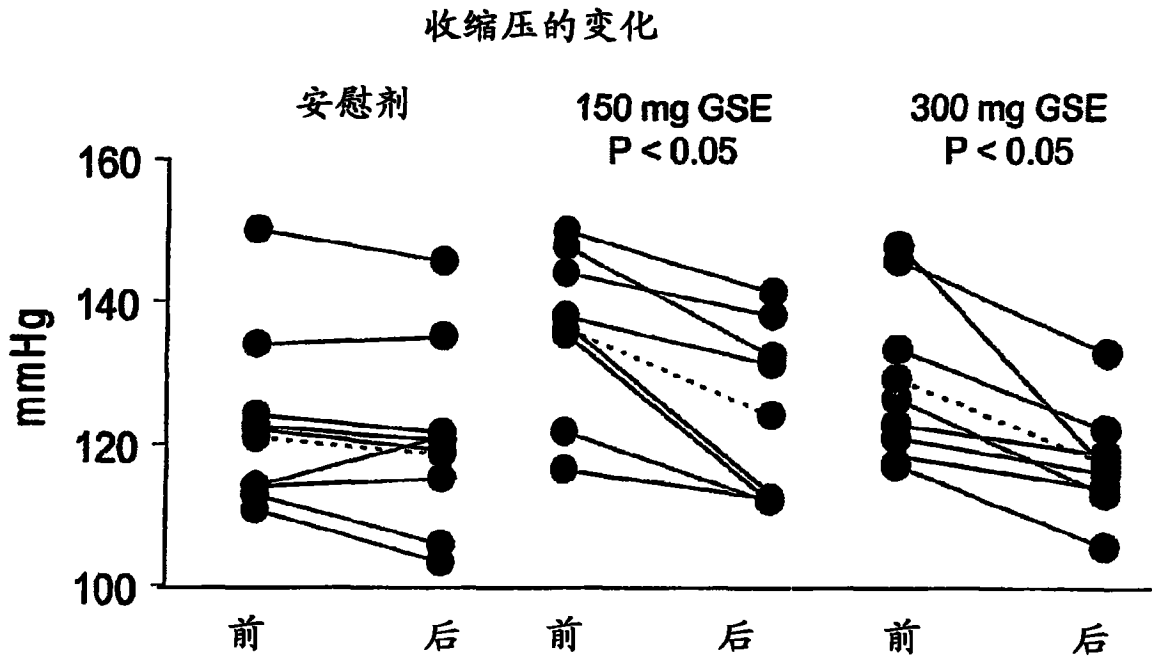


图 1

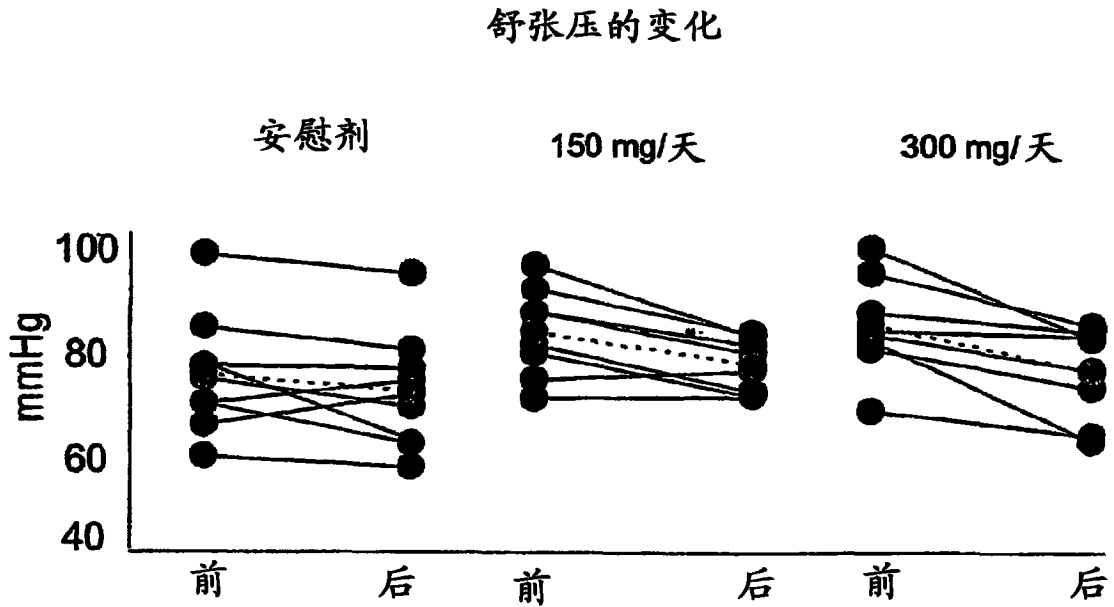


图 2

氧化LDL的变化

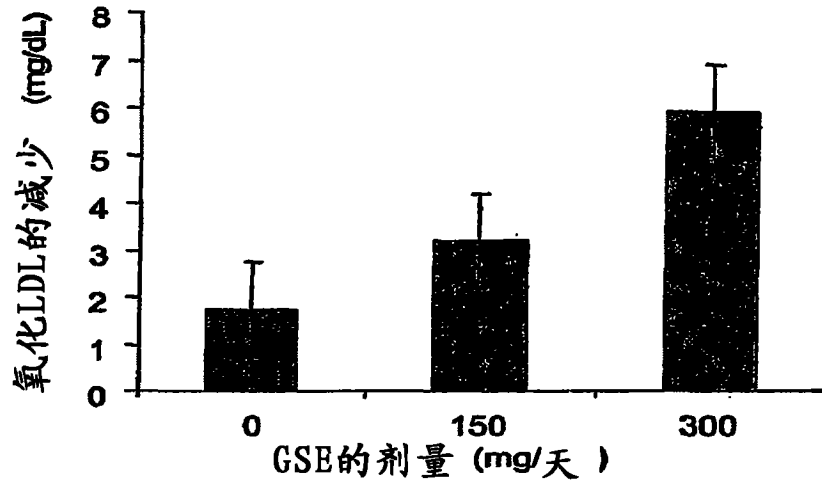


图 3

氧化LDL的变化与氧化LDL基线浓度之间的关系 (300 mg MegaNatural®-BP)

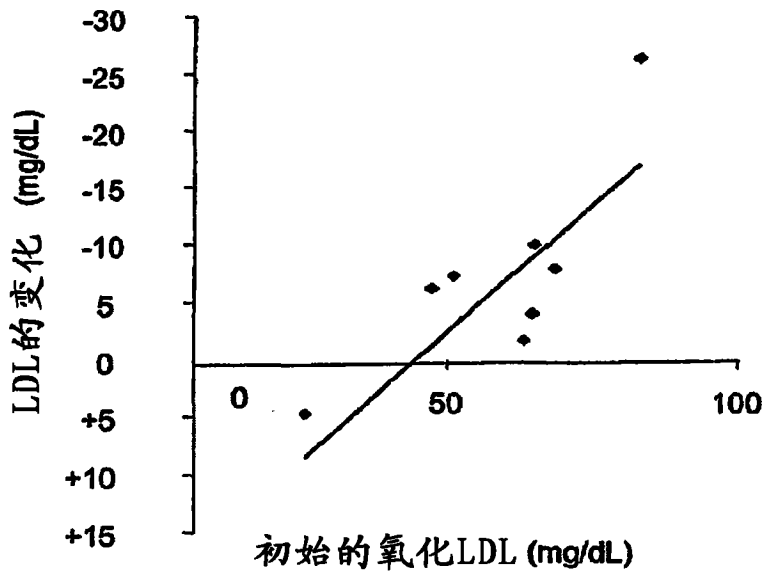


图 4