



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 046**

51 Int. Cl.:
C07D 311/60 (2006.01)
C07D 311/62 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05024213 .0**
86 Fecha de presentación : **03.03.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1666476**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Un procedimiento para la purificación de oligómeros de proantocianidina.**

30 Prioridad: **23.04.1999 JP 11-116380**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **KYOWA HAKKO KOGYO Co., Ltd.**
6-1, Ohtemachi 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP
THE NIKKA WHISKY DISTILLING Co., Ltd.

72 Inventor/es: **Honda, Shinkichi;**
Takahashi, Tomoya;
Kamimura, Ayako;
Matsuoka, Takako;
Kanda, Tomomasa;
Yanagida, Akio y
Hieda, Kazuo

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 296 046 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un procedimiento para la purificación de oligómeros de proantocianidina.

5 La presente invención se refiere a un proceso para purificar de forma eficaz oligómeros de proantocianidina con una gran pureza, que tienen una diversidad de actividades biológicas, que incluyen actividad antineoplásica, antiinflamatoria, antienvjecimiento, antioxidante, antialérgica, antibacteriana y de crecimiento capilar, y que se pueden aplicar de manera provechosa a alimentos, cosméticos, fármacos o similares.

10 En general, proantocianidina, que se conoce como una sustancia de bioprofilaxis de las plantas superiores, es un nombre genérico para polímeros en forma de dímero o de orden superior que polimerizan mediante formatos de unión tales como $4\beta\rightarrow 6$, $4\beta\rightarrow 8$, $4\beta\rightarrow 8\cdot 2\beta\rightarrow 7$, con flavan-7-ol como unidad constitutiva. También se denominan taninos condensados ("E. Steinegger R. Hänsel, Pharmacognosy [1^{er} vol.], Approach to Chemistry and Pharmacology" (traducido por Shuji Itokawa *et al.*, Hirokawa Publishing Co.), 204-208 (1977); Porter L.J., Flavans and proanthocyanidins, In: Harborne J. B. (ed.), "The Flavonoids, Advances in Research Science 1986", Chapman & Hall, 23-55 (1994)). Se denominan en general proantocianidinas porque producen antocianidina y viran a rojo mediante tratamiento ácido. Se sabe que las proantocianidinas muestran una diversidad de actividades biológicas. Las actividades que se han informado incluyen actividad antineoplásica, antiinflamatoria, antienvjecimiento, antioxidante, antialérgica, antibacteriana y de crecimiento capilar (Bart Schwitters/Jack Masquelier, "21st century Biophylaxis Substance OPC", traducido por Akira Sasaki, Fragrance Journal, 50-135 (1997); Tomoya Takahashi, *et al.*, Journal of Investigative Dermatology, 112, 310-316 (1999)). No se han clarificado todas las relaciones entre estructura y actividad que hay entre estas actividades biológicas y el grado de polimerización de las proantocianidinas. Por ejemplo, con respecto a la actividad de crecimiento capilar, se ha informado que los oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos (especialmente el dímero y el trímero) de proantocianidinas tienen la actividad más elevada (documento WO96/00561).

Con respecto a la separación y purificación de proantocianidinas a partir de vegetales, se han hecho intentos para separar y purificar proantocianidinas a partir de diversos vegetales, que incluyen semillas de uvas, cortezas de pino, hojas de ginkgo, cacahuetes y granos de cacao. Los ejemplos de extracción industrial a partir de estas materias primas incluyen la extracción a partir de semillas de uva (Solicitud Japonesa sin examinar publicada n° 3-200781, documentos WO97/39632, US5484594), corteza de pino (documentos US4698360, WO97/44407) o similares. En el método según la Solicitud Japonesa sin examinar publicada n° 3-200781, se realiza un pretratamiento poniendo en contacto semillas de uva blanca con agua a menos de 70°C, seguido de extracción con agua caliente. El extracto resultante se aplica a una columna de Sephadex LH-20TM, y después se eluye con etanol del 70%, por lo que se obtiene un polvo que contiene proantocianidinas con una pureza de aproximadamente el 90%. En el método según el documento US4698360, se somete a una tonelada de corteza de pino marítimo a extracción con agua caliente a presión, y después se repite la elución con acetato de etilo y la precipitación mediante la adición de cloroformo, de forma que se obtiene un polvo que contiene proantocianidinas. Sin embargo, ninguno de los productos purificados resultantes de los métodos anteriores contiene un 90% o más de oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos solamente. Todos estos productos purificados contienen también monómeros, polímeros hexaméricos o de orden superior, u otros ácidos orgánicos.

Como proceso para purificar proantocianidinas que usa el método de distribución líquido-líquido en contracorriente, por ejemplo, se describe un método que usa agua y acetato de etilo en Andrew G.H. Lea, J. Sci. Fd. Agric., 29, 471-477 (1978), en la Solicitud Japonesa sin examinar publicada n° 61-16982 y similares.

Como proceso para purificar proantocianidinas que usa la extracción sólido-líquido, por ejemplo, se describe un método que usa acetato de etilo en la Solicitud Japonesa sin examinar publicada n° 8-176137 y en el documento EP0707005. Por ejemplo, se extraen 100 kg de uvas prensadas con un disolvente mixto de agua (1650 L), cloruro sódico (300 kg) y acetona (550 L). A continuación, se elimina la acetona mediante destilación para obtener el residuo. El residuo se somete después a extracción sólido-líquido usando acetato de etilo, y después se le añade dicloroetano (45 L), por lo que se obtiene de 1,5 kg a 2,5 kg de un precipitado de proantocianidina (documento EP0707005).

Además, los métodos conocidos para purificar proantocianidinas que usan cromatografía incluyen un método que usa la columna anterior de Sephadex LH-20TM (un método para la extracción a partir de semillas de uva, Solicitud Japonesa sin examinar publicada n° 3-200781), y un método que usa resina de adsorción basada en poliestireno (un método para la extracción a partir de judías rojas, Solicitud Japonesa sin examinar publicada n° 7-62014). Por ejemplo, se añade la resina de adsorción basada en poliestireno "Sepabeads SP-850TM" (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) a agua obtenida sumergiendo judías rojas secas en ella, y la mezcla se agita, por lo que se permite que las proantocianidinas se adsorban. Después, se seca la resina a menos de 70°C y posteriormente se eluye con etanol del 80% (v/v) a 70°C, de forma que se puede obtener un polvo que contiene proantocianidinas brutas con una pureza de aproximadamente el 60%.

Sin embargo, todos estos procesos sirven para purificar mezclas de proantocianidinas independientemente del grado de polimerización. Es decir, estos procesos no sirven para obtener de forma eficaz y selectiva oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos. Sus porcentajes de recuperación de oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos son bajos.

ES 2 296 046 T3

Con respecto a la separación de proantocianidinas por grado de polimerización, se conoce un método que usa cromatografía líquida de gel de sílice en fase normal (A method for extraction from cocoa beans: J. Rigaud *et al.*, J. Chromatogr. A, 654, 255-260 (1993), A method for extraction from grape seeds: Corine Prieur *et al.*, Phytochemistry, 36, 781-784 (1994)). El primer método comprende cargar una disolución de muestra que contiene proantocianidinas, que se ha obtenido mediante extracción con metanol a partir de granos de cacao, en una columna de gel de sílice, seguido de elución en gradiente usando un disolvente mixto de diclorometano : metanol : ácido fórmico : agua ((41→5):(7→43):1:1) como fase móvil. El segundo método comprende cargar una disolución de muestra que contiene proantocianidinas, que se ha obtenido mediante extracción con metanol a partir de semillas de uva, en una columna de gel de sílice, seguido de elución en gradiente usando un disolvente mixto de diclorometano : metanol : agua : ácido trifluoroacético ((82→10):(18→86):2:0,05) como fase móvil.

Gariboldi E. *et al.*, Pharmaceutical Research, vol. 15, n° 6, 1998, páginas 936-943, estudió las técnicas analíticas para la caracterización rápida de compuestos en mezclas complejas, lo que evita el aislamiento previo que requiere tiempo. El objetivo del estudio fue identificar compuestos con propiedades anti-xantina oxidasa. Con este fin, se emplearon técnicas de espectrometría de masas en tándem con electronebulización (ESI-MS-MS) acoplada a LC con detección mediante UV y red de diodos.

Un estudio de Hammerstone J. F. *et al.*, J. Agric. Food Chem., vol. 47, 1999, páginas 490-496, se refiere a la separación e identificación de proantocianidinas monoméricas y oligoméricas en cacao y chocolate que usa un método modificado de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase normal acoplada a análisis de espectrometría de masas (MS) en línea que usa una cámara de ionización por electronebulización a presión atmosférica. La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante el uso de una fase estacionaria de sílice en combinación con un gradiente creciente de polaridad.

Sin embargo, estos métodos ocasionan problemas, tales como que la recuperación y la reutilización de los disolventes es difícil, debido al uso de un disolvente que contiene cloro y a la complejidad de la composición del disolvente. Además, es necesaria la elución en gradiente para aplicar gradientes de concentración a una fase móvil. Por lo tanto, estos métodos no son apropiados para los métodos industriales de separación orientados a purificación en masa, teniendo en cuenta estas consideraciones económicas y de seguridad.

El objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para purificar de forma eficaz oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos con gran pureza, a partir de materias primas que contienen proantocianidinas o de sus productos de purificación brutos.

Una combinación de técnicas convencionales no es lo suficientemente buena para eliminar las sustancias distintas de los componentes de interés, que son los oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, por ejemplo monómeros que constituyen proantocianidinas, tales como flavonoides, catequina o epicatequina, polímeros de proantocianidina hexaméricos o de orden superior, u otros contaminantes. Es decir, es difícil obtener de forma eficaz con gran pureza oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, que son los componentes de interés de esta invención. Además, la mayoría de los métodos conocidos no son apropiados para los procesos industriales, teniendo en cuenta la complejidad de la composición disolvente utilizada, las consideraciones económicas, la seguridad o similares.

Como resultado de estudios rigurosos para resolver estos problemas, se ha completado un proceso para purificar de forma eficaz oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos con una gran pureza.

En un primer aspecto, se describe un proceso para purificar oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, que comprende extraer los oligómeros de proantocianidina mediante un método de extracción sólido-líquido que usa acetato de metilo como fase líquida de las materias primas que contienen los oligómeros de proantocianidina o de sus productos de purificación brutos.

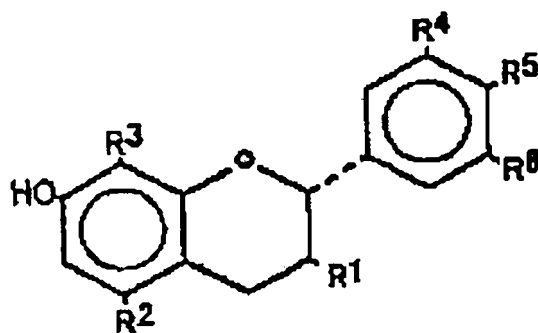
Como la fase líquida anterior, se puede usar acetato de metilo como disolvente simple o como disolvente mixto, que es una combinación de acetato de metilo y un disolvente orgánico miscible con acetato de metilo, que se prepara añadiendo tal disolvente orgánico a acetato de metilo.

En un segundo aspecto, se describe un proceso para purificar oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, que comprende pretratar con una enzima para hidrolizar las materias primas que contienen los oligómeros de proantocianidina, sus productos de purificación brutos, o una disolución que contiene uno de éstos.

La invención proporciona un proceso para purificar oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos con un grado de polimerización uniforme, en el que los oligómeros de proantocianidina se separan y se purifican por grado de polimerización a partir de materias primas que contienen los oligómeros de proantocianidina o de sus productos de purificación brutos, mediante cromatografía líquida de gel de sílice en fase normal según una elución isocrática que usa como fase móvil un disolvente simple o un disolvente mixto de dos o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en un disolvente de éster, un disolvente de cetona, un disolvente de hidrocarburo, un disolvente de éter y un disolvente de alcohol. Preferiblemente, se usa como la fase móvil anterior un disolvente mixto de dos o más disolventes.

Además, la presente invención puede proporcionar oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos purificados con una pureza del 90% (p/p) o más, proantocianidinas diméricas con una pureza del 90% (p/p) o más, y proantocianidinas triméricas con una pureza del 90% (p/p) o más, que son obtenibles mediante los procesos de purificación anteriores.

Las proantocianidinas son taninos condensados presentes en diversos vegetales, y poseen una estructura básica en la que flavan-7-ol se condensa o polimeriza secuencialmente mediante uniones $4\beta \rightarrow 6$, $4\beta \rightarrow 8$, $4\beta \rightarrow 8:2\beta \rightarrow 7$, o similares. En esta memoria descriptiva, los dímeros a pentámeros de proantocianidinas y los hexámeros o polímeros de orden superior de proantocianidinas se definen como oligómeros de proantocianidina y polímeros de proantocianidina, respectivamente. Además, un monómero de flavan-7-ol se define como un monómero que constituye proantocianidinas. Los ejemplos de oligómeros de proantocianidina incluyen proantocianidinas, tales como procianidina, prodelphinidina y propelargonidina, y todos sus estereoisómeros. Se muestra un monómero que constituye proantocianidinas en la siguiente fórmula (I):



(en la que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son iguales o diferentes, y representan hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo galoilo).

Los ejemplos de las materias primas o de sus productos de purificación brutos usados en esta invención incluyen cualquiera que contenga oligómeros de proantocianidina, y los ejemplos particularmente preferibles de éstos incluyen materias primas vegetales, tales como frutos, pericarpios, semillas y cortezas de vegetales, sus extractos, y sus productos de purificación brutos. Por ejemplo, son preferibles aquellos ricos en contenido de oligómeros de proantocianidina, que incluyen zumos de frutos, o extractos de pericarpios o semillas, de uvas, caquis, manzanas, arándanos, arándanos agrios, o similares; o extractos de la epidermis de cacahuets, castañas o similares, cáscaras de salvado de cebada o alforfón, hojas de caqui, pino marítimo, palmera, o similares.

Además, se pueden usar también como materias primas los productos brutos o sus productos de purificación brutos obtenidos mediante métodos no enzimáticos o enzimáticos. Los ejemplos de un proceso sintético para sintetizar oligómeros de proantocianidina incluyen el proceso de fabricación de un dímero de epicatequina o catequina descrito en *Journal of Chemical Society Perkin Transaction I*, 1535-1543 (1983), y el proceso de fabricación de un trímero de epicatequina o catequina descrito en *Phytochemistry*, 25, 1209-1215 (1986). Los productos brutos o sus productos de purificación brutos obtenidos de una manera similar a estos procesos también se pueden usar como materias primas para el proceso de esta invención.

Es preferible un disolvente orgánico volátil como disolvente orgánico miscible con el acetato de metilo usado para el primer aspecto descrito aquí. Los ejemplos de tales disolventes orgánicos incluyen disolventes de alcohol, tales como metanol, etanol, propanol y butanol; disolventes de éster, tales como formiato de metilo, formiato de etilo y acetato de etilo; disolventes de cetona, tales como acetona; disolventes de nitrilo, tales como acetonitrilo; disolventes de éter, tales como tetrahidrofurano y 1,2-dimetoxietano; disolventes de hidrocarburo, tales como hexano; y disolventes de ácido carboxílico, tales como ácido acético. Cuando se usa un disolvente orgánico miscible con acetato de metilo, el disolvente total de extracción contiene preferiblemente acetato de metilo en un 50% (volumen) o más, más preferiblemente en un 70% (volumen) o más, y aún más preferiblemente en un 90% (volumen) o más.

Los ejemplos de la enzima para hidrólisis usada en el segundo aspecto descrito aquí incluyen glicosidasa y esterasa.

Los ejemplos de glicosidasa incluyen una única sustancia o una mezcla de dos o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en amilasa, celulasa, glucanasa, xilanas, glucosidasa, dextranasa, quitinasa, galacturonidasa, lisozima, galactosidasa, manosidasa, fructofuranosidasa, trehalasa, glucosaminidasa, pululanasa, ceramidasa, fucosidasa y agarasa. Los ejemplos de esterasa incluyen una única sustancia o una mezcla de dos o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en carboxiesterasa, arilesterasa, lipasa, acetilesterasa, colinesterasa, pectinesterasa, colesterol esterasa, clorofilasa, lactonasa, tanasa e hidrolasa.

En el segundo aspecto descrito aquí, los ejemplos de la disolución que contiene materias primas que contienen oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos o sus productos de purificación brutos incluyen en general una disolución acuosa, o una disolución acuosa que contiene un 10% o menos de un disolvente orgánico, tal como un alcohol, éster o cetona.

5

Según la presente invención, los ejemplos del disolvente de éster usado como fase móvil incluyen formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de isopropilo, formiato de butilo, formiato de isobutilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, propionato de metilo, propionato de etilo, propionato de propilo, propionato de isopropilo, propionato de butilo, propionato de isobutilo, butirato de metilo, butirato de etilo, butirato de propilo, butirato de isopropilo, butirato de butilo y butirato de isobutilo. Los ejemplos del disolvente de cetona incluyen acetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, metilisopropilcetona, metilbutilcetona, metilisobutilcetona, metiltert-butilcetona, dietilcetona, diisopropilcetona, metilvinilcetona, ciclobutanona, ciclopentanona y ciclohexanona. Los ejemplos del disolvente de hidrocarburo incluyen pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, nonadecano, ciclohexano, xileno y tolueno. Los ejemplos del disolvente de éter incluyen tetrahidrofurano y 1,2-dimetoxietano. Los ejemplos del disolvente de alcohol incluyen metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, sec-butanol, tert-butanol y similares.

10

15

La extracción y la purificación bruta de las materias primas vegetales se puede realizar, por ejemplo, mediante procesos conocidos como se describe más adelante.

20

Las materias primas vegetales, que incluyen frutos, pericarpios, semillas, pieles, cáscaras, hojas y cortezas vegetales, se usan como materiales para la extracción después de un proceso de secado, tal como en general el secado al aire. Las materias primas vegetales intactas se pueden usar también como materiales para la extracción.

25

30

35

La extracción bruta de proantocianidinas a partir de los materiales anteriores para la extracción se puede realizar con referencia a procesos conocidos (Chem. Pharm. Bull., 38, 3218 (1990), Chem. Pharm. Bull., 40, 889-898 (1992)). Por ejemplo, las materias primas vegetales prensadas o trituradas se someten a extracción usando un disolvente. Como disolvente para la extracción, se puede usar un disolvente simple o un disolvente mixto de dos o más disolventes seleccionados de un disolvente hidrófilo y un disolvente lipófilo. Tales disolventes incluyen agua, disolventes de alcohol tales como metanol, etanol e isopropanol, disolventes de cetona tales como acetona y metiletilcetona, y disolventes de éster tales como acetato de metilo y acetato de etilo. La temperatura para la extracción oscila generalmente de 0 a 100°C, preferiblemente de 5 a 50°C. Un material, tal como semillas que contienen aceite, se puede someter como tal a extracción sin prensar. La extracción se puede repetir de dos a tres veces, si es necesario. El residuo insoluble se elimina mediante filtración o centrifugación de la disolución de extracto bruto obtenida mediante la etapa anterior, por lo que se obtiene una disolución de extracto bruto. Las materias primas vegetales, tales como zumo, savia o similares, se pueden usar directamente como materiales para la extracción, o se puede preparar una disolución de extracto bruto concentrada de taninos condensados con referencia a Agric. Biol. Chem., 45, 1885-1887 (1981).

40

La extracción y la purificación bruta a partir de productos brutos obtenidos mediante un método químico, tal como métodos no enzimáticos o enzimáticos, se puede realizar también de una manera similar a las descritas anteriormente.

A continuación se dará una descripción detallada del proceso de purificación de esta invención con ejemplos.

45

50

55

60

En el primer aspecto descrito aquí, se purifican oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos sometiendo a las materias primas que contienen los oligómeros de proantocianidina o a sus productos de purificación brutos a extracción sólido-líquido, que usa un disolvente simple de acetato de metilo o un disolvente mixto de acetato de metilo y un disolvente orgánico miscible con acetato de metilo como fase líquida. Cuando las materias primas o sus productos de purificación brutos son líquidos, se realiza preferiblemente la solidificación previa mediante secado por pulverización o mediante liofilización. En general, la proporción de mezcla (p/v) de un sólido y acetato de metilo, o de un sólido y un disolvente mixto de acetato de metilo y un disolvente orgánico miscible con acetato de metilo, es aproximadamente de 1:1 a 1:1000. Se realiza la extracción a temperatura ambiente o calentando con agitación durante un periodo corto de tiempo. Preferiblemente, la proporción de mezcla (p/v) de un sólido y acetato de metilo, o de un sólido y un disolvente mixto de acetato de metilo y un disolvente orgánico miscible con acetato de metilo es de 1:5 a 1:100. Se prefiere la extracción a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, y la extracción repetida subsiguiente (varias veces) del residuo en las mismas condiciones. Se prefiere un tamaño de partícula de polvo más fino para una extracción sólido-líquido eficaz. Cuando la extracción se realiza usando un disolvente mixto, es preferible que el disolvente mixto tenga una polaridad análoga a la del acetato de metilo mezclando los disolventes. La extracción sólido-líquido que usa estos disolventes elimina la elución de polímeros de proantocianidina y otros contaminantes, y permite la purificación eficaz de oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos. En el primer aspecto descrito aquí, los oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos se pueden recuperar mediante liofilización o secado por pulverización, después de concentrar el extracto de acetato de metilo resultante y disolver otra vez el residuo concentrado en agua o en un disolvente acuoso, tal como un tampón.

65

En el segundo aspecto descrito aquí, se purifican oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos pretratando con una enzima para la hidrólisis de las materias primas que contienen los oligómeros de proantocianidina, sus productos de purificación brutos o una disolución que contiene uno de éstos. Las materias primas o sus productos de purificación brutos contienen generalmente muchos contaminantes distintos de los oligómeros de proantocianidina.

Particularmente cuando las materias primas o sus productos de purificación brutos proceden de vegetales, hay presentes en una elevada proporción glicósidos de polifenol, ésteres o similares, además de oligómeros de proantocianidina. El pretratamiento de tales glicósidos o ésteres, que son contaminantes, con la hidrolasa anterior para obtener agliconas permite la eliminación eficaz de los contaminantes en la próxima etapa de purificación, y permite mejoras en la pureza de los oligómeros de proantocianidina. Por ejemplo, mediante tratamiento con β -glicosidasa, la rutina, que es un glucósido flavonoide abundante en la planta *Fagopyrum esculentum* de la familia *Polygonaceae*, da como resultado quercetina, que es una aglicona. Cuando se tratan ácido clorogénico y ácido p-cumaroilquínico, que son hidroxycinamatos y los frutos u hojas de las dicotiledóneas los contienen en abundancia, con hidroxycinamato hidrolasa, sus enlaces depsídicos, que son enlaces éster intramoleculares, se hidrolizan, lo que da como resultado ácido cafeico y ácido quínico, y ácido p-cumárico y ácido quínico, respectivamente. Las condiciones de reacción para el tratamiento con la enzima de hidrólisis difieren dependiendo del tipo de enzimas o similares. En general, las condiciones son pH 3 a 8, 25 a 55°C, y 1 a 24 horas. Los componentes de aglicona anteriores, carbohidratos libres o ácidos carboxílicos resultantes del tratamiento con la enzima de hidrólisis, se pueden eliminar fácilmente mediante técnicas convencionales, tales como refrigeración, extracción líquido-líquido o sólido-líquido, o adsorción en columna, o una combinación de estos métodos y cromatografía en fase normal. Estas etapas permiten la eliminación eficaz de contaminantes de las materias primas que contienen oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos o de sus productos de purificación brutos, y permiten la mejora de la pureza de los componentes de interés, es decir, de los oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos.

Según la presente invención, se pueden obtener oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos con un grado de polimerización uniforme mediante separación y purificación por grado de polimerización, a partir de materias primas que contienen los oligómeros de proantocianidina o de sus productos de purificación brutos mediante cromatografía líquida de gel de sílice en fase normal según una elución isocrática que usa como fase móvil un disolvente simple o un disolvente mixto de dos o más disolventes, seleccionados del grupo que consiste en un disolvente de éster, un disolvente de cetona, un disolvente de hidrocarburo, un disolvente de éter y un disolvente de alcohol. Para la cromatografía líquida de gel de sílice en fase normal anterior, se puede aplicar un método que usa cromatografía en columna abierta o el que usa cromatografía líquida de alta eficacia. El disolvente o el agua se eliminan de la disolución que contiene oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, y después el residuo se disuelve en una fase móvil o en un disolvente orgánico soluble en una fase móvil. Cuando las materias primas o sus productos de purificación brutos son sólidos, se disuelven directamente en la fase móvil o en un disolvente orgánico soluble en la fase móvil. Si es necesario, se filtran a través de un filtro de membrana o similar, y después se cargan en la columna. En la elución de un componente de interés, se lleva a cabo elución isocrática, que no aplica gradiente de concentración en la fase móvil, teniendo en cuenta la simplificación de la operación. Los ejemplos de fase móvil preferible en la elución isocrática incluyen disolventes mixtos, tales como hexano/metanol/acetato de etilo, hexano/acetona, hexano/metanol/tetrahidrofurano/ácido acético, hexano/metanol/tetrahidrofurano/ácido fórmico, hexano/metanol/acetato de metilo/ácido acético, hexano/metanol/acetato de metilo y hexano/acetato de metilo/acetona.

El proceso de purificación de la invención permite la eliminación eficaz de contaminantes, es decir, monómeros que constituyen proantocianidinas, tales como (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina y (-)-epigalocatequina, y polímeros de proantocianidina hexaméricos o de orden superior; y permite la separación y purificación por grado de polimerización de los componentes de interés, es decir, oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos.

El proceso de la presente invención se puede combinar con otros procesos conocidos. Cuando los procesos de purificación se combinan, las etapas a usar y su orden se pueden seleccionar libremente.

Mediante estos procesos, se pueden obtener de forma eficaz oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, proantocianidinas diméricas, y proantocianidinas triméricas con gran pureza (pureza del 90% (p/p) o más).

Los oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, proantocianidinas diméricas y proantocianidinas triméricas purificadas mediante los procesos de purificación de esta invención se pueden usar como materias primas para fabricar alimentos, cosméticos, fármacos o similares.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 (Referencia) muestra el resultado de la cromatografía líquida en fase inversa. Los símbolos en la Fig. 1 indican lo siguiente.

1. PB1
2. (+)-catequina
3. PB2
4. ácido clorogénico
5. ácido cafeico

ES 2 296 046 T3

6. PC1
7. (-)-epicatequina
- 5 8. éster de ácido p-cumárico
9. ácido p-cumárico
- 10 10. floricina
11. floretina

La Fig. 2 muestra el resultado de la cromatografía líquida en fase normal.

15 La Fig. 3 muestra el resultado de la cromatografía líquida en fase normal.

La Fig. 4 muestra el resultado de la cromatografía líquida en fase inversa. Los símbolos de la Fig. 4 indican lo siguiente.

- 20 1. PB1
2. (+)-catequina
- 25 3. PB2
4. PC1
- 30 5. (-)-epicatequina

[5], [6] Fracciones de monómeros que corresponden a los n^{os} de fracción de la Fig. 3.

[7] - [11] Fracciones de dímeros que corresponden a los n^{os} de fracción de la Fig. 3.

35 [12] - [20] Fracciones de trímeros que corresponden a los n^{os} de fracción de la Fig. 3.

La Fig. 5 muestra el resultado de la cromatografía líquida en fase normal.

40 La Fig. 6 muestra el resultado de la cromatografía líquida en fase inversa. Los símbolos de la Fig. 6 indican lo siguiente.

1. PB1
- 45 2. (+)-catequina
3. PB2
4. PC1
- 50 5. (-)-epicatequina

[2] - [4] Fracciones de monómeros que corresponden a los n^{os} de fracción de la Fig. 5.

55 [5] - [9] Fracciones de dímeros que corresponden a los n^{os} de fracción de la Fig. 5.

[10] - [15] Fracciones de trímeros que corresponden a los n^{os} de fracción de la Fig. 5.

60 La Fig. 7 muestra el resultado de analizar la distribución de los grados de polimerización de los oligómeros de proantocianidina.

A continuación, la presente invención se describirá adicionalmente con Ejemplos, pero no se limita por ninguno de estos Ejemplos o similares.

65

Ejemplo 1

(Referencia)

5 Purificación mediante extracción sólido-líquido (A)

Se añadieron 300 ml de acetato de metilo a 30 g de la fracción de proantocianidina obtenida en el Ejemplo de Referencia 1, y después se realizó extracción sólido-líquido a temperatura ambiente durante 1 hora. La extracción se realizó dos veces en total, los dos extractos resultantes de la extracción se mezclaron y después se sometieron a filtración. Después, el residuo de la extracción se lavó con una pequeña cantidad de acetato de metilo. Los extractos de acetato de metilo y el lavado se combinaron y se concentraron a presión reducida. Se añadió una pequeña cantidad de agua destilada, y se realizó otra vez concentración a presión reducida, y el componente extraído se disolvió en una disolución acuosa. La disolución acuosa resultante se liofilizó para dar 17,5 g de un extracto de acetato de metilo en forma de polvo. Además, el residuo de la extracción se secó para dar 12,5 g de un residuo sin extraer de la extracción de acetato de metilo en forma de polvo. El contenido de los componentes de proantocianidina diméricos y triméricos contenidos en ambos productos en polvo se determinó mediante cromatografía líquida en fase inversa como se describe en el Ejemplo de Referencia 2. Los componentes de proantocianidina diméricos determinados fueron procianidina B1 (epicatequina-(4 β →8)-catequina; en adelante abreviado como PB1) y procianidina B2 (epicatequina-(4 β →8)-epicatequina; en adelante abreviado como PB2). El componente de trimero determinado fue procianidina C1 (epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina; en adelante abreviado como PC1). La Tabla 1 muestra los resultados de la extracción con acetato de metilo, así como los rendimientos (%) de contenido sólido.

TABLA 1

	Rendimiento (g)	Rendimiento de contenido sólido (%)	PB1		PB2		PC1		PB1 + PB2 + PC1		
			Contenido (g)	Rendimiento (%)	Contenido (g)	Rendimiento (%)	Contenido (g)	Rendimiento (%)	Contenido (g)	Rendimiento (%)	Pureza (%)
Muestra antes de la extracción	(30,0)		(1,22)		(4,34)		(1,96)		(7,52)		(25,1)
Extracto de acetato de metilo	17,5	58,3	1,16	95,1	4,03	92,8	1,65	84,2	6,84	91,0	39,1
Residuo sin extraer de la extracción de acetato de metilo	12,5	41,7	0,06	4,9	0,31	7,2	0,31	15,8	0,68	9,0	5,4

Como se muestra en la Tabla 1, se consiguió de forma eficaz la extracción selectiva y la mejora de la pureza de los componentes de oligómeros de proantocianidina representados por PB1, PB2 y PC1 mediante extracción sólido-líquido con acetato de metilo.

50 Ejemplo 2

(Referencia)

55 Purificación mediante extracción sólido-líquido (B)

Se mezclaron acetato de metilo y diversos disolventes en una proporción de volúmenes de 9 : 1 (en el caso de acetato de metilo : hexano, la proporción es 95 : 5), y así se prepararon disolventes para la extracción sólido-líquido. El disolvente orgánico miscible con acetato de metilo usado en estos diversos disolventes fue metanol, etanol, propanol, butanol, formiato de etilo, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, hexano o ácido acético. Se añadieron 10 ml del disolvente de extracción a 1 g de cada fracción de proantocianidina obtenida en el Ejemplo de Referencia 1, y la mezcla se sometió a extracción sólido-líquido a temperatura ambiente durante 1 hora (extracción única). Tras la eliminación de los componentes sólidos del extracto mediante centrifugación, se diluyó una cierta cantidad del extracto 100 veces con agua destilada (0,01→1 ml). Después se determinó el contenido de PB1, PB2 y PC1 mediante la cromatografía líquida en fase inversa descrita en el Ejemplo de Referencia 2. De forma simultánea, se tomó una muestra de 1 ml de cada uno de los extractos para eliminar los disolventes, y después se liofilizó, por lo que se determinó la cantidad de extracto sólido. La Tabla 2 muestra las eficacias de extracción y los rendimientos (%) del contenido sólido para PB1, PB2 y PC1 en el extracto procedente de la extracción sólido-líquido

ES 2 296 046 T3

con cada disolvente de extracción. Además, como ejemplo comparativo, se realizó extracción sólido-líquido solamente con acetato de etilo de una manera similar a la descrita anteriormente (excepto que se usaron 20 ml de acetato de etilo para 2 g de la fracción de proantocianidina). La Tabla 2 también muestra los resultados del experimento comparativo.

TABLA 2

Disolvente para extracción	Rendimiento de contenido sólido (%)	PB1 (mg)	PB2 (mg)	PC1 (mg)	PB1 + PB2 + PC1		
					Cantidad de extracto (mg)	Rendimiento (%)	Pureza (%)
Sin tratar con disolvente para extracción	(100)	36,4	136,1	63,0	235,5	(100)	23,6
Acetato de etilo (Ejemplo Comparativo)	9,8	6,2	24,3	7,0	37,5	15,1	38,3
Acetato de metilo 100%	39,9	25,9	87,7	31,1	144,7	61,5	36,3
Acetato de metilo/ metanol (9/1)	82,8	39,5	137,1	62,7	239,3	101,6	28,9
Acetato de metilo/ etanol (9/1)	80,5	39,8	140,1	64,6	244,4	103,8	30,4
Acetato de metilo/ propanol (9/1)	77,2	38,9	134,0	62,4	235,3	99,9	30,5
Acetato de metilo/ butanol (9/1)	79,0	38,4	136,6	62,7	237,7	100,9	30,1
Acetato de metilo/ formiato de etilo (9/1)	40,0	26,3	89,9	31,1	147,3	62,5	36,8
Acetato de metilo/ acetato de etilo (9/1)	39,6	25,4	86,6	30,1	142,1	60,3	35,9
Acetato de metilo/ acetona (9/1)	56,1	33,5	120,7	50,2	204,4	86,8	36,5
Acetato de metilo/ acetonitrilo (9/1)	59,3	35,8	123,2	51,3	210,4	89,3	35,5
Acetato de metilo/ tetrahidrofurano (9/1)	83,7	34,4	120,1	51,3	205,8	87,4	24,6
Acetato de metilo/ ácido acético (9/1)	70,5	38,3	131,1	56,5	225,9	95,9	32,1
Acetato de metilo/ hexano (95/5)	15,7	10,7	41,0	9,9	61,6	24,8	39,2

Ejemplo 3

(Referencia)

Purificación mediante extracción sólido-líquido (C)

Se mezclaron acetato de metilo y acetato de etilo en una proporción en volumen como se muestra en la Tabla 3, y después se realizó extracción sólido-líquido. Se añadieron 10 ml de cada uno de los disolventes de extracción en la proporción en volumen respectiva a 1 g de la fracción de proantocianidina obtenida en el Ejemplo de Referencia 1, seguido de extracción sólido-líquido a 30°C durante 1,5 horas. Esta etapa se repitió tres veces. Estos extractos se combinaron, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron, por lo que se obtuvieron productos en polvo (extracto). Se determinaron los contenidos de PB1, PB2 y PC1 en los productos en polvo mediante la cromatografía líquida en fase inversa descrita en el Ejemplo de Referencia 2. La Tabla 3 muestra los resultados de la extracción con un disolvente en la proporción de volúmenes respectivos, e incluye los rendimientos (%) de contenido sólido, las cantidades del extracto y los rendimientos de cada uno de PB1, PB2 y PC1, y las cantidades del extracto, rendimientos (%) y pureza del total de PB1, PB2 y PC1.

TABLA 3

Disolvente para extracción	Rendimiento de contenido sólido (%)	PB1 (mg) (%)	PB2 (mg) (%)	PC1 (mg) (%)	PB1 + PB2 + PC1		
					Cantidad de extracto (mg)	Rendimiento (%)	Pureza (%)
Sin tratar con disolvente para extracción	100	39,9 (100)	153,4 (100)	66,9 (100)	260,2	100	26
Acetato de etilo (Ejemplo Comparativo)	34,9	23,0 (57,6)	90,4 (58,9)	28,7 (42,9)	142,1	54,6	40,7
Acetato de etilo/acetato de metilo (9/1)	39,2	25,8 (64,7)	100,9 (65,8)	32,3 (48,3)	159	61,1	40,6
Acetato de etilo/acetato de metilo (7/3)	42,5	28,6 (71,7)	110,2 (71,8)	35,5 (53,1)	174,3	67	41
Acetato de etilo/acetato de metilo (5/5)	46,5	31,0 (77,7)	121,0 (78,9)	39,9 (59,6)	191,9	73,8	41,3
Acetato de etilo/acetato de metilo (3/7)	51	33,8 (84,7)	130,1 (84,8)	44,5 (66,5)	208,4	80,1	40,9
Acetato de etilo/acetato de metilo (1/9)	51,6	33,0 (82,7)	127,7 (83,2)	45,4 (67,9)	206,1	79,2	39,9
Acetato de etilo/acetato de metilo (1/10)	52,4	33,3 (83,5)	128,9 (84,0)	47,1 (70,4)	209,3	80,4	39,9

Como se muestra en la Tabla 3, la extracción selectiva y la mejora de los rendimientos de los componentes de oligómeros de proantocianidina representados por PB1, PB2 y PC1 se consiguieron de forma eficaz mediante extracción sólido-líquido con un disolvente de extracción que contenía acetato de metilo.

Ejemplo 4

(Referencia)

Purificación combinada con tratamiento de lisis enzimática

El extracto de polifenol obtenido en el Ejemplo de Referencia 1 se trató con una preparación enzimática disponible comercialmente para procesado de alimentos. Las preparaciones enzimáticas usadas aquí fueron una preparación de lipasa derivada del género *Aspergillus* (Lipase Sankyo™, SANKYO CO., LTD.) y una preparación de hidrolasa (hidroxycinamato hidrolasa (Seishin Co., Ltd.)). Previamente se han ajustado 100 ml del extracto de polifenol al valor de pH 5 con 5 moles/l de NaOH, y se han diluido 10 veces con agua destilada, por lo que se obtiene una disolución de muestra. Se añadió 1 g de la anterior preparación de lipasa y de la anterior preparación de hidrolasa a 1 L de la disolución de muestra (concentración final: 0,1%), y se dejó desarrollar la reacción enzimática a 45°C durante 16 horas. Se muestran los resultados del análisis de la cromatografía líquida en fase inversa descrita en el Ejemplo de Referencia 2 realizada sobre la disolución de muestra antes y después de la reacción en la Fig. 1-a y 1-b, respectivamente. Como se muestra en la figura, la mayoría de los contaminantes principales, ácido clorogénico y floricina, desaparecieron, y en su lugar se incrementaron ácido cafeico, ácido p-cumárico y floretina libres, debido a la reacción enzimática anterior. A continuación, se concentró la disolución tras la reacción y después se sometió a secado por pulverización, por lo que se obtuvieron 20 g de polvo. Después, se le añadieron 200 ml de acetato de metilo, y se realizó extracción sólido-líquido. Se muestra un cromatograma del extracto de acetato de metilo en la Fig. 1-c. Los polímeros de proantocianidina, que aparecieron como una elevación de la línea base de la Fig. 1-a y 1-b, se eliminaron mediante extracción sólido-líquido. Además, se añadió una pequeña cantidad de agua destilada a este extracto, y después se eliminó acetato de metilo mediante concentración a presión reducida, por lo que los componentes extraídos se disolvieron en agua. Se añadió acetato de etilo/n-hexano (8/2) (en una cantidad equivalente a la disolución acuosa) a la disolución acuosa obtenida (50 ml) para realizar extracción líquido-líquido. Se muestran los cromatogramas de la capa de disolvente orgánico (capa superior) y de la capa acuosa (capa inferior) resultantes en las Fig. 1-d y Fig. 1-e, respectivamente. Así, parte de los monómeros que constituyen proantocianidinas (catequina, epicatequina) y la mayoría de los productos principales del tratamiento enzimático previo, ácido cafeico, ácido p-cumárico y floretina libres, se extrajeron hacia la capa de disolvente orgánico (Fig. 1-d). La mayoría de los oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos representados por PB1, PB2 y PC1 permanecieron en la capa acuosa tras la extracción líquido-líquido (Fig. 1-e). La capa acuosa obtenida finalmente se concentró y se liofilizó, por lo que se obtuvieron 5,7 g de polvo. Como resultado de una serie de etapas, la pureza de PB1 + PB2 + PC1 en contenido sólido total mejoró alrededor de 4

ES 2 296 046 T3

veces, de 11,5% a 40,3%. Como se describió anteriormente, la pureza de los componentes de interés, oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, se puede mejorar de forma eficaz mediante tratamiento de lisis enzimática de los extractos procedentes de las materias primas, seguido de una combinación de múltiples procesos de purificación.

5

Ejemplo 5

Purificación mediante cromatografía líquida en fase normal (A)

10

Se añadieron 100 ml de acetato de metilo a 10 g de la fracción de proantocianidina obtenida en el Ejemplo de Referencia 1 para realizar extracción sólido-líquido. El extracto se concentró a presión reducida hasta un volumen constante de 20 ml de líquido concentrado. Después se realizó la cromatografía líquida de fase normal que usa gel de sílice como relleno para separar los componentes. Las condiciones para la cromatografía son las siguientes:

15

Columna: Inertsil SIL™ (4,6 mm de D.I. x 150 mm, GL Science)

Fase móvil para separación isocrática: hexano/metanol/acetato de etilo (70/30/10)

20

Dosis de carga de la muestra: 0,01 ml

Caudal: 1,8 ml/min

25

Detección: UV 280 nm

El cromatograma obtenido se muestra en la Fig. 2. En estas condiciones, los componentes de oligómeros de proantocianidina se separaron por grado de polimerización de dímero a orden superior, y después eluyeron de la columna. Es decir, se confirmó que la separación selectiva de componentes de oligómeros con un grado de polimerización uniforme, dímeros, trímeros y similares, dependiendo del propósito, se consiguió mediante cromatografía líquida en fase normal que usa gel de sílice como relleno.

30

Además, usando las mismas muestras líquidas concentradas, se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía líquida en fase normal a escala preparativa. Las condiciones para el fraccionamiento son las siguientes:

35

Relleno de gel de sílice: gel de sílice multiporoso esférico (75 μ m, 120 A)

Tamaño de columna: 6 mm de D.I. x 500 mm x 2 columnas

40

Fase móvil para separación isocrática: hexano/metanol/acetato de etilo (70/30/10)

Dosis de carga de la muestra: 0,5 ml

Caudal: 3 ml/min

45

Fraccionamiento: 15 ml/5 min/1 fracción

Detección: UV 280 nm

50

Como se muestra en la Fig. 3, los oligómeros de proantocianidina de las muestras se separaron también por grado de polimerización incluso a escala preparativa.

Posteriormente, se tomaron muestras de las fracciones eluidas que correspondían a monómeros, dímeros y trímeros en el cromatograma. Después, se examinó la constitución de los componentes de oligómeros en cada fracción eluida usando la cromatografía líquida en fase inversa descrita en el Ejemplo de Referencia 2. Como se muestra en la Fig. 4-[5] y en la Fig. 4-[6], las fracciones de monómero estaban compuestas principalmente de catequina y epicatequina, como se muestra en la Fig. 4-[7] a [11], las fracciones de dímeros estaban compuestas principalmente de PB1 y PB2, y como se muestra en la Fig. 4-[12] a [20], las fracciones de trímero estaban compuestas principalmente de PC1. Las fracciones separadas estaban cada una compuestas de componentes de oligómeros con un grado de polimerización uniforme.

60

La pureza de los productos de proantocianidina diméricos y triméricos purificados obtenidos anteriormente fue del 93% y 92% (p/p), respectivamente.

65

Ejemplo 6

Purificación mediante cromatografía líquida en fase normal (B)

5 Usando la muestra líquida concentrada obtenida en el Ejemplo 5, se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía líquida en fase normal. Las condiciones para el fraccionamiento fueron las siguientes:

Relleno de gel de sílice: gel de sílice multiporoso esférico (75 μ m, 120 A)

10 Tamaño de columna: 6 mm de D.I. x 500 mm x 2 columnas

Fase móvil para separación isocrática: hexano/acetona (40/60)

Dosis de carga de la muestra: 0,05 ml

15 Caudal: 3 ml/min

Fraccionamiento: 15 ml/5 min/1 fracción

20 Detección: UV 280 nm

La Fig. 5 muestra el cromatograma obtenido. Además, se tomaron muestras de las fracciones eluidas correspondientes a monómeros, dímeros y trímeros del cromatograma. Después, se examinó la constitución de los componentes de oligómeros en cada fracción eluida usando la cromatografía líquida en fase inversa descrita en el Ejemplo de Referencia 2. Como se muestra en la Fig. 6-[2] a [4], las fracciones de monómeros estaban compuestas principalmente de catequina y epicatequina, como se muestra en la Fig. 6-[5] a [9], las fracciones de dímeros estaban compuestas principalmente de PB1 y PB2, y como se muestra en la Fig. 6-[10] a [15], las fracciones de trímero estaban compuestas principalmente de PC1. De forma similar al Ejemplo 5, las fracciones separadas estaban cada una compuestas de componentes de oligómeros con un grado de polimerización uniforme.

30 La pureza de los productos de proantocianidina diméricos y triméricos purificados obtenidos anteriormente fue del 95% y 93% (p/p), respectivamente.

Ejemplo de Referencia 1

35 *Preparación de una fracción de proantocianidina a partir de manzana*

Se preparó un extracto de polifenol y una fracción de proantocianidina a partir de manzanas según el método descrito en Rapid Communication of Mass Spectrometry, 11, 31-36 (1997). Se usaron manzanas inmaduras (3 kg) de la variedad "Fuji" como materia prima. Los frutos se prensaron a la vez que se les añadían 3 g de metabisulfito potásico, y se exprimieron para obtener el zumo. El zumo se centrifugó y se filtró para su clarificación, por lo que se obtuvieron 1,8 L de zumo claro. A continuación, el zumo se añadió a una columna rellena con Sepabeads SP-850TM (Nippon Rensui) (25 mm de D.I. x 285 mm), y se dejó que los componentes de polifenol del zumo se adsorbieran en ella. Después de eliminar los carbohidratos y ácidos orgánicos presentes en el zumo lavando con 300 ml de agua destilada, los componentes de polifenol se eluyeron con 200 ml de una disolución de etanol acuoso del 80%. Además, el eluido recogido se concentró hasta 65 ml a presión reducida, de forma que se obtuvo el extracto de polifenol. El extracto de polifenol (25 ml) se añadió después a una columna rellena con TSK-GEL Toyopearl HW-40ECTM (TOSOH) (25 mm de D.I. x 285 mm), y la columna se lavó con 200 ml de agua destilada, de forma que se eliminó la mayoría de los contaminantes, ácidos carboxílicos fenólicos. Después, se añadieron 250 ml de una disolución de etanol acuoso del 40% a la columna, de forma que se eluyeron otros polifenoles de bajo peso molecular. Posteriormente, se añadieron 100 ml de una disolución de acetona acuosa del 60% a la columna, por lo que se eluyó y se recuperó la mayoría de las proantocianidinas. Aquí, parte de los oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos se mezclaron en el eluido con una disolución de etanol acuoso del 40%. Así, el eluido se sometió a eliminación de etanol mediante concentración a presión reducida, el concentrado se añadió después a una columna Sep-pak C18ENVTM (Waters), por lo que se repurificaron y se recuperaron solamente los componentes de proantocianidina de la mezcla. La disolución recuperada y el eluido procedente de la elución con una disolución de acetona acuosa del 60% se mezclaron, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron, por lo que se obtuvo una fracción de proantocianidina (zumo claro 1,8 L \rightarrow 8 g). Un análisis de espectrometría de masas reveló que esta fracción consistía en proantocianidinas monoméricas a 15-méricas. Según la demanda, esta etapa se realizó a una escala mayor, de forma que se preparó un extracto de polifenol o una fracción de proantocianidina en la cantidad necesaria en cada ejemplo.

Ejemplo de Referencia 2

65 *Análisis de polifenol*

La composición de componentes de polifenol en las diversas muestras descritas en los Ejemplos se analizó mediante cromatografía líquida en fase inversa en las siguientes condiciones, según la demanda.

ES 2 296 046 T3

Columna: Inertsil ODS-3™ (4,6 x 15 mm, GL Science)

Eluyente: A) 0,1 moles/l de tampón fosfato (pH 2)/metanol (8/2) B) 0,1 moles/l de tampón fosfato (pH 2)/metanol (5/5)

Condiciones de elución en gradiente: 0 → 10 min (100% A), 10 min → 50 min (100% A → 100% B), 50 min → 65 min (100% B)

Dosis de carga por muestra: 10 µl

Caudal: 1 ml/min

Detección: 280 nm

Ejemplo de Referencia 3

Análisis de la distribución por grado de polimerización de oligómeros de proantocianidina

Se analizó la distribución por grado de polimerización de los oligómeros de proantocianidina en los productos en polvo obtenidos en el Ejemplo 1 a partir del extracto o del residuo sin extraer de la extracción con acetato de metilo mediante cromatografía de penetrabilidad en gel. Las condiciones para el análisis son las siguientes:

Columna: TSK-GEL Toyopearl HW-40F™ (2,5 x 95 cm, TOSOH)

Eluyente: acetona/urea 8 mol/l (6/4)

Caudal: 1,0 ml/min

Fraccionamiento: 3 ml/3 min./1 fracción (se descartaron los 80 ml iniciales)

Detección: Colorimetría mediante la adición de un reactivo de fenol (detectado a VIS 760 nm)

Además, una mezcla de catequinas patrón (2 mg de epicatequina, PB2 y PC1), una mezcla de proantocianidina (10 mg), un producto en polvo extraído con acetato de metilo de la mezcla de proantocianidina (5,83 mg), y un producto en polvo sin extraer con acetato de metilo de la misma mezcla (4,17 mg) se disolvieron separadamente en 0,5 ml de un eluyente, y se sometieron a análisis. La Fig. 7 muestra los resultados.

Como se muestra en la Fig. 7, en las condiciones anteriores de análisis, los oligómeros de proantocianidina de una muestra eluyeron en orden de mayor a menor grado de polimerización, basándose en el efecto de tamiz molecular del relleno. Particularmente los componentes de trímero, dímero y monómero aparecieron como picos individuales en el cromatograma. Como se muestra en la Fig. 7, el producto en polvo extraído con acetato de metilo consistió principalmente en componentes de oligómeros de proantocianidina monoméricos, diméricos y triméricos. Por otra parte, el producto en polvo sin extraer con acetato de metilo consistió principalmente en componentes poliméricos de proantocianidina con pesos moleculares elevados.

Según esta invención, se purificaron de forma eficaz oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos, y proantocianidinas diméricas y triméricas con un grado de polimerización uniforme con gran pureza, a partir de materias primas que contienen proantocianidinas o de sus productos de purificación brutos. Los oligómeros de proantocianidina obtenidos mediante la presente invención poseen una diversidad de actividades biológicas, que incluyen actividad antineoplásica, antiinflamatoria, antienvjecimiento, antioxidante, antialérgica, antibacteriana, y de crecimiento capilar y similares, de forma que son útiles en aplicaciones que incluyen alimentos, cosméticos y fármacos.

REIVINDICACIONES

5 1. Un proceso para la purificación de oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos con un grado de polimerización uniforme, que comprende: separar y purificar los oligómeros de proantocianidina por grado de polimerización a partir de las materias primas que contienen oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos o de sus productos de purificación brutos mediante cromatografía líquida de gel de sílice en fase normal, según una elución isocrática que usa como fase móvil un disolvente simple o un disolvente mixto de dos o más disolventes, seleccionados del grupo que consiste en un disolvente de éster, un disolvente de cetona, un disolvente de hidrocarburo, un disolvente de éter y un disolvente de alcohol.

10 2. El proceso de purificación de la reivindicación 1, en el que las materias primas que contienen oligómeros de proantocianidina diméricos a pentaméricos o sus productos de purificación brutos proceden de un vegetal.

15 3. El proceso de purificación de la reivindicación 1, en el que el disolvente usado como fase móvil es un disolvente mixto de dos o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en un disolvente de éster, un disolvente de cetona, un disolvente de hidrocarburo, un disolvente de éter y un disolvente de alcohol.

20 4. El proceso de purificación de la reivindicación 1, en el que el disolvente de éster es un disolvente seleccionado del grupo que consiste en formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de isopropilo, formiato de butilo, formiato de isobutilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, propionato de metilo, propionato de etilo, propionato de propilo, propionato de isopropilo, propionato de butilo, propionato de isobutilo, butirato de metilo, butirato de etilo, butirato de propilo, butirato de isopropilo, butirato de butilo y butirato de isobutilo.

25 5. El proceso de purificación de la reivindicación 1, en el que el disolvente de cetona es un disolvente seleccionado del grupo que consiste en acetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, metilisopropilcetona, metilbutilcetona, metil-sobutilcetona, metiltert-butilcetona, dietilcetona, diisopropilcetona, metilvinilcetona, ciclobutanona, ciclopentanona y ciclohexanona.

30 6. El proceso de purificación de la reivindicación 1, en el que el disolvente de hidrocarburo se selecciona del grupo que consiste en pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, nonadecano, ciclohexano, xileno y tolueno.

35 7. El proceso de purificación de la reivindicación 1, en el que el disolvente de éter es tetrahidrofurano o 1,2-dimetoxietano.

40 8. El proceso de purificación de la reivindicación 1, en el que el disolvente de alcohol es un disolvente seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, sec-butanol y tert-butanol.

45

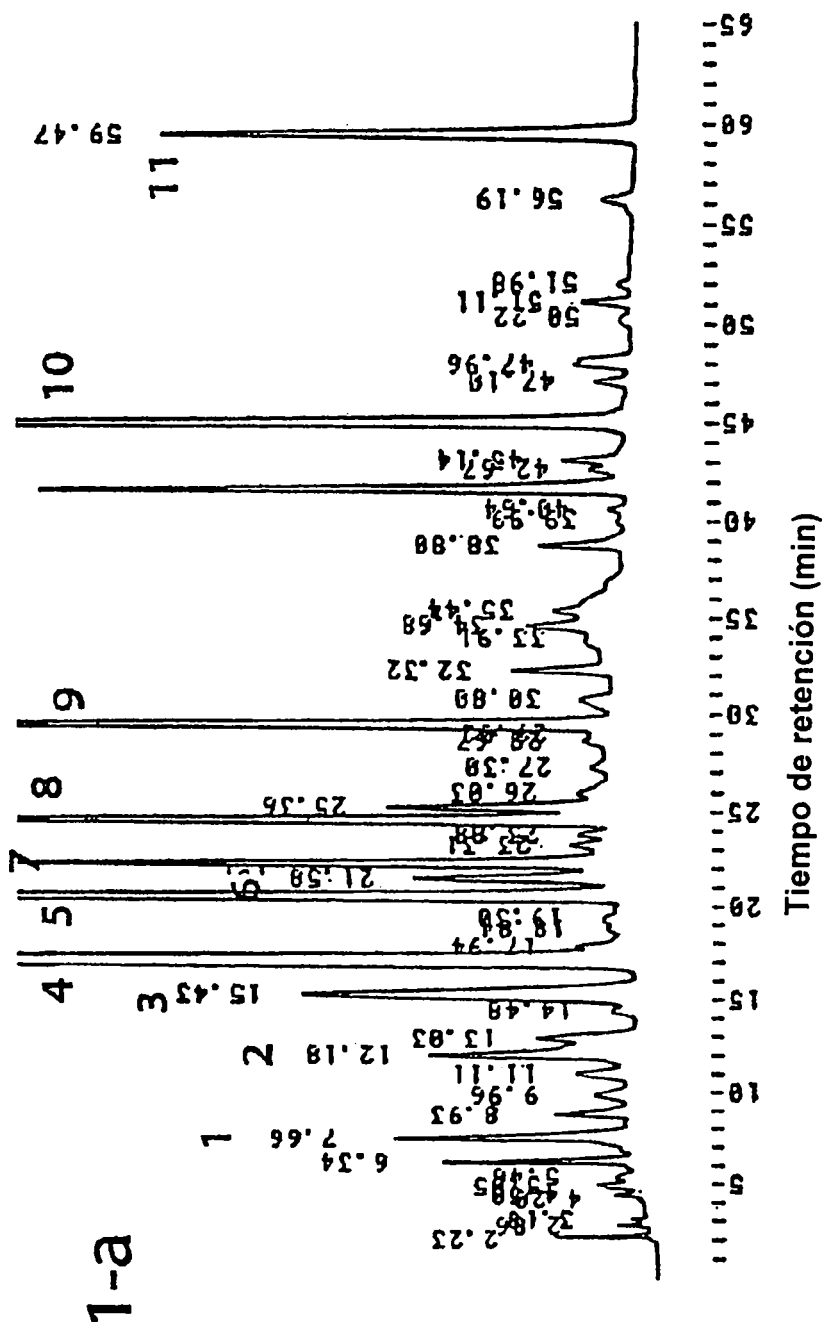
50

55

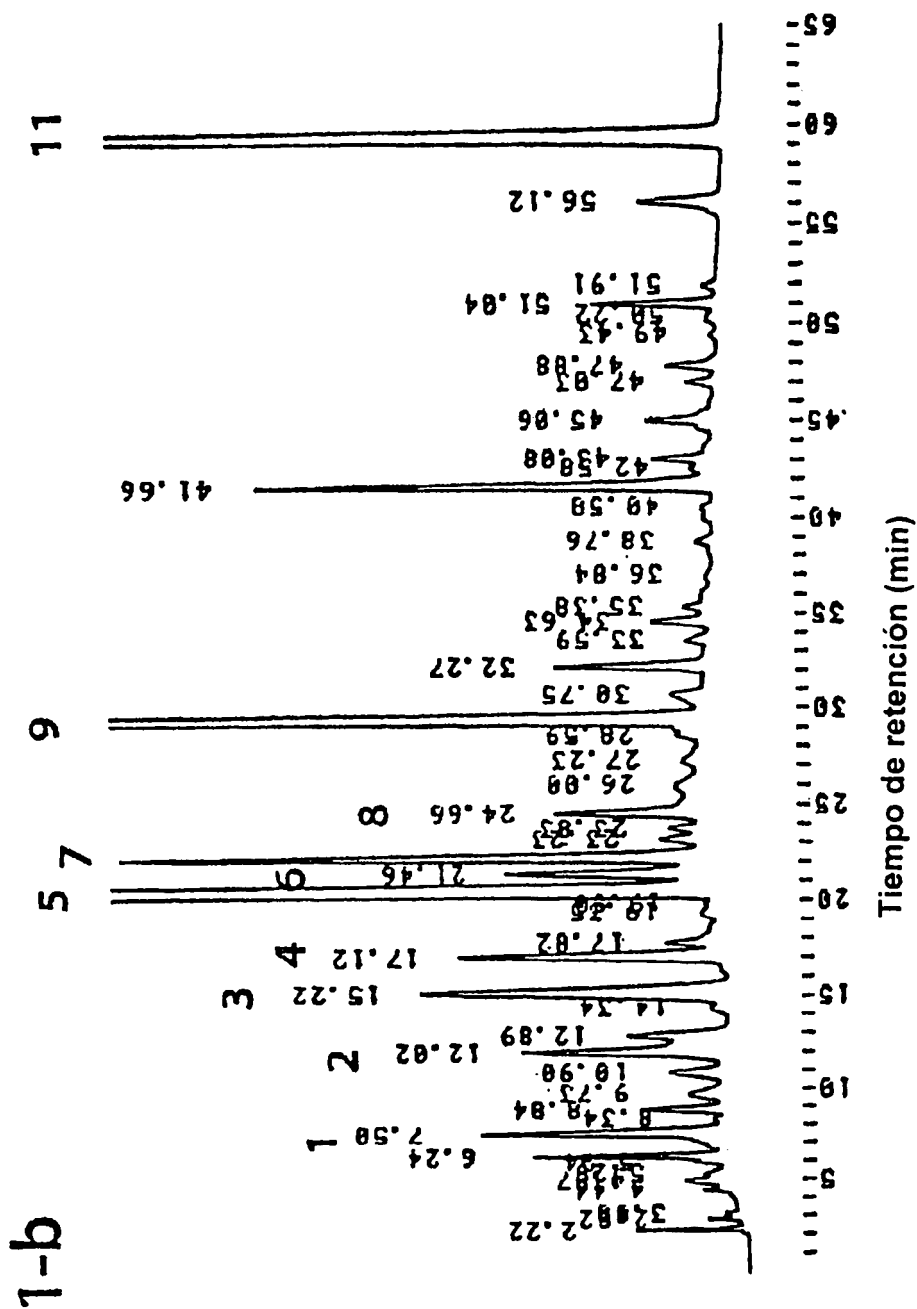
60

65

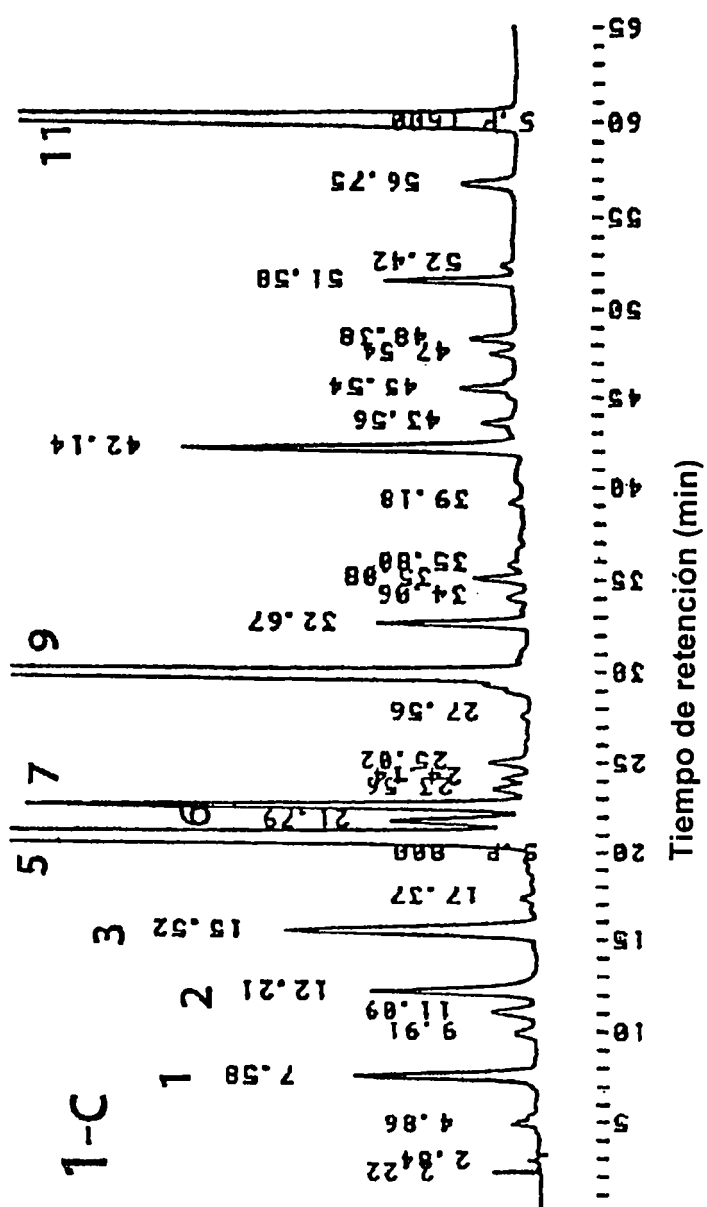
FIG. 1 (Referencia)



F I G . 1 (Referencia)



F I G. 1 (Referencia)



F I G . 1 (Referencia)

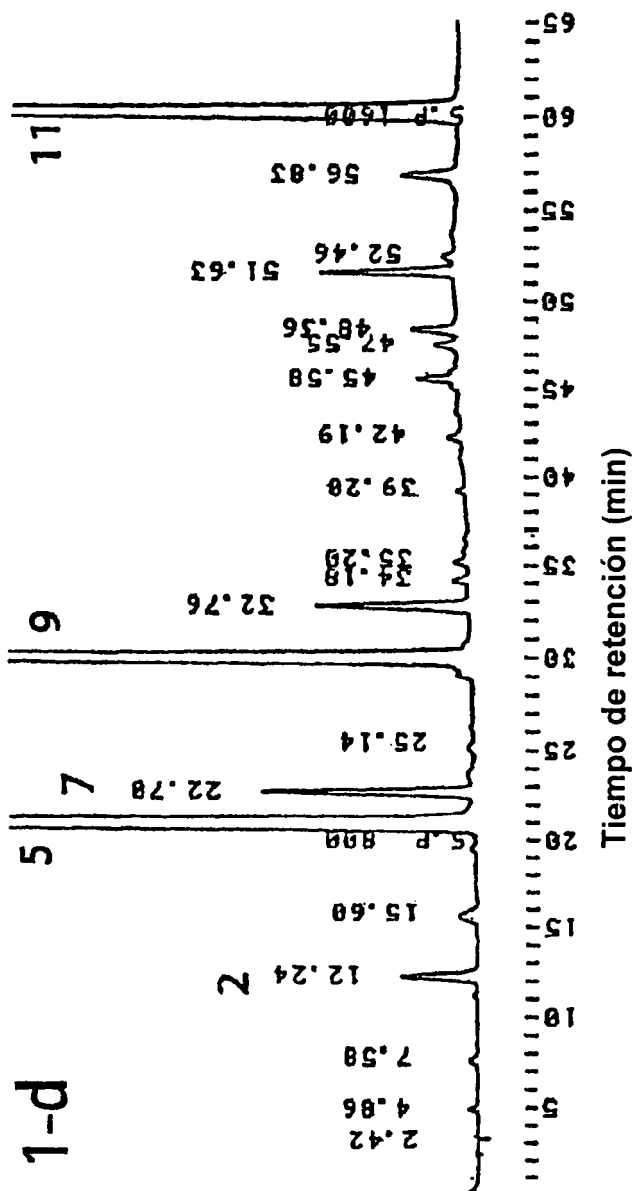


FIG. 1 (Referencia)

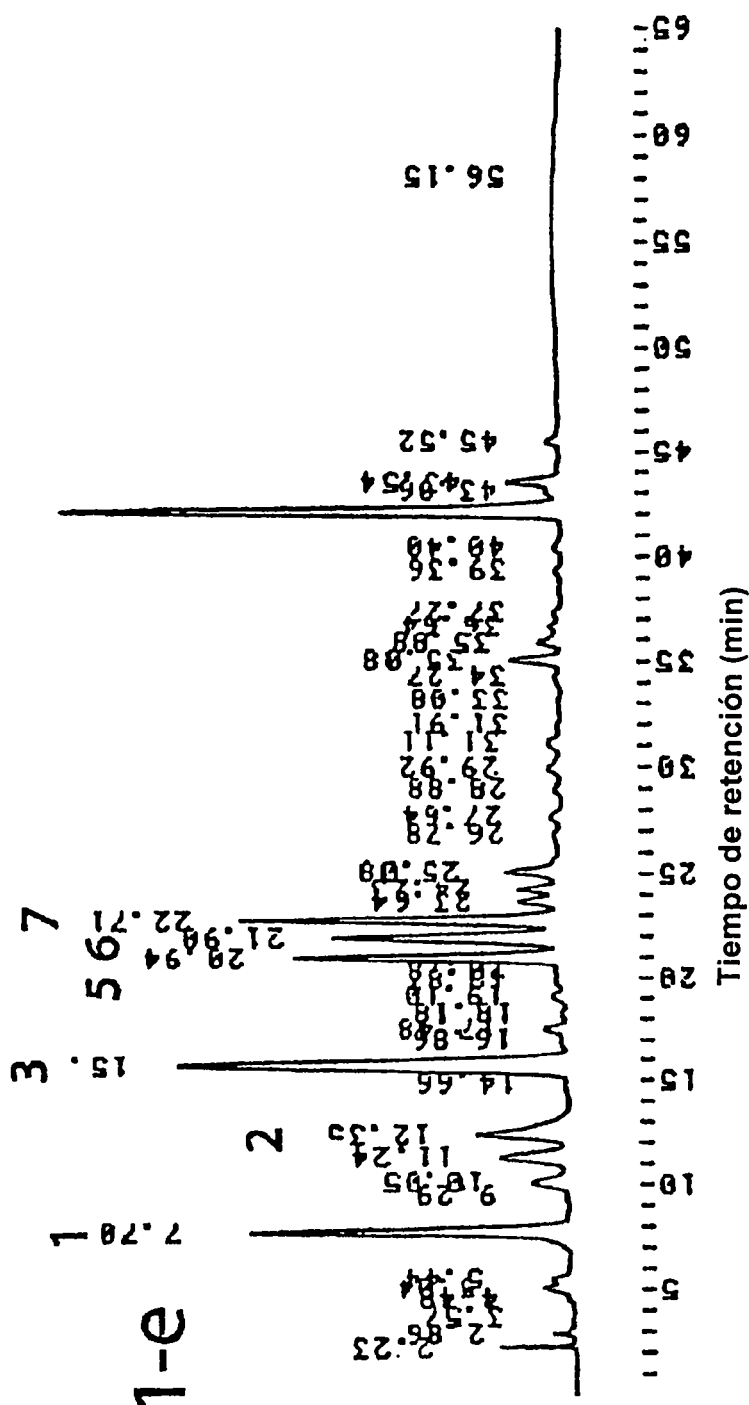


FIG. 2

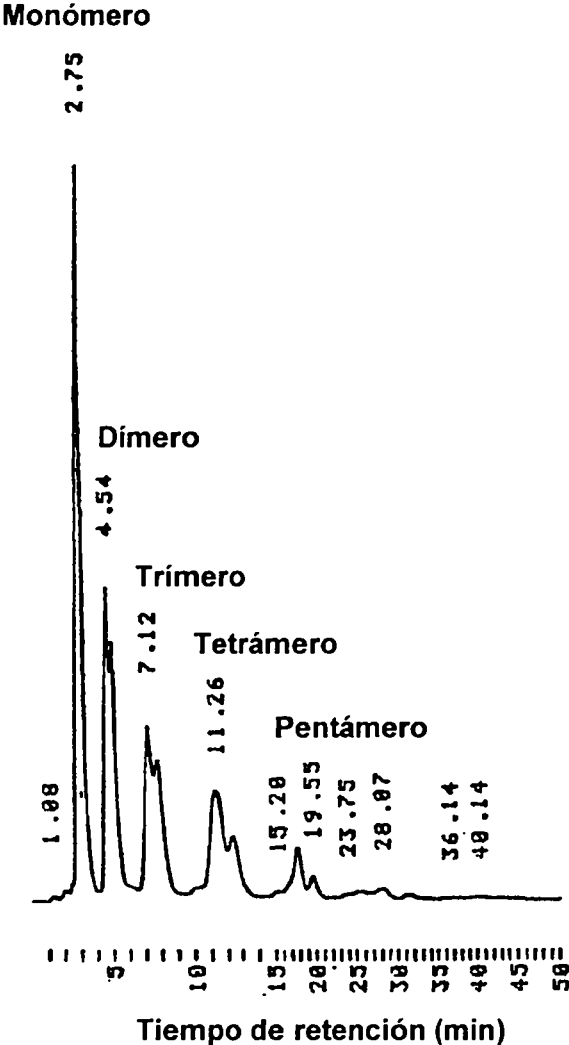


FIG. 3

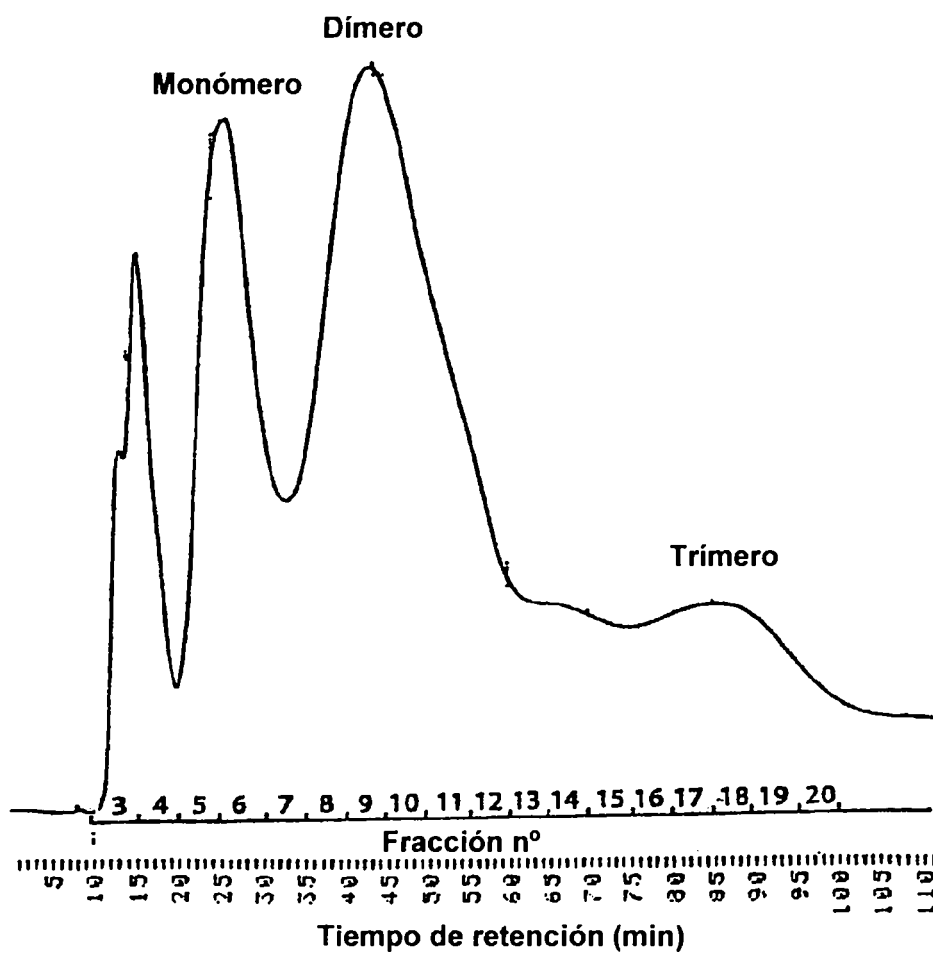


FIG. 4

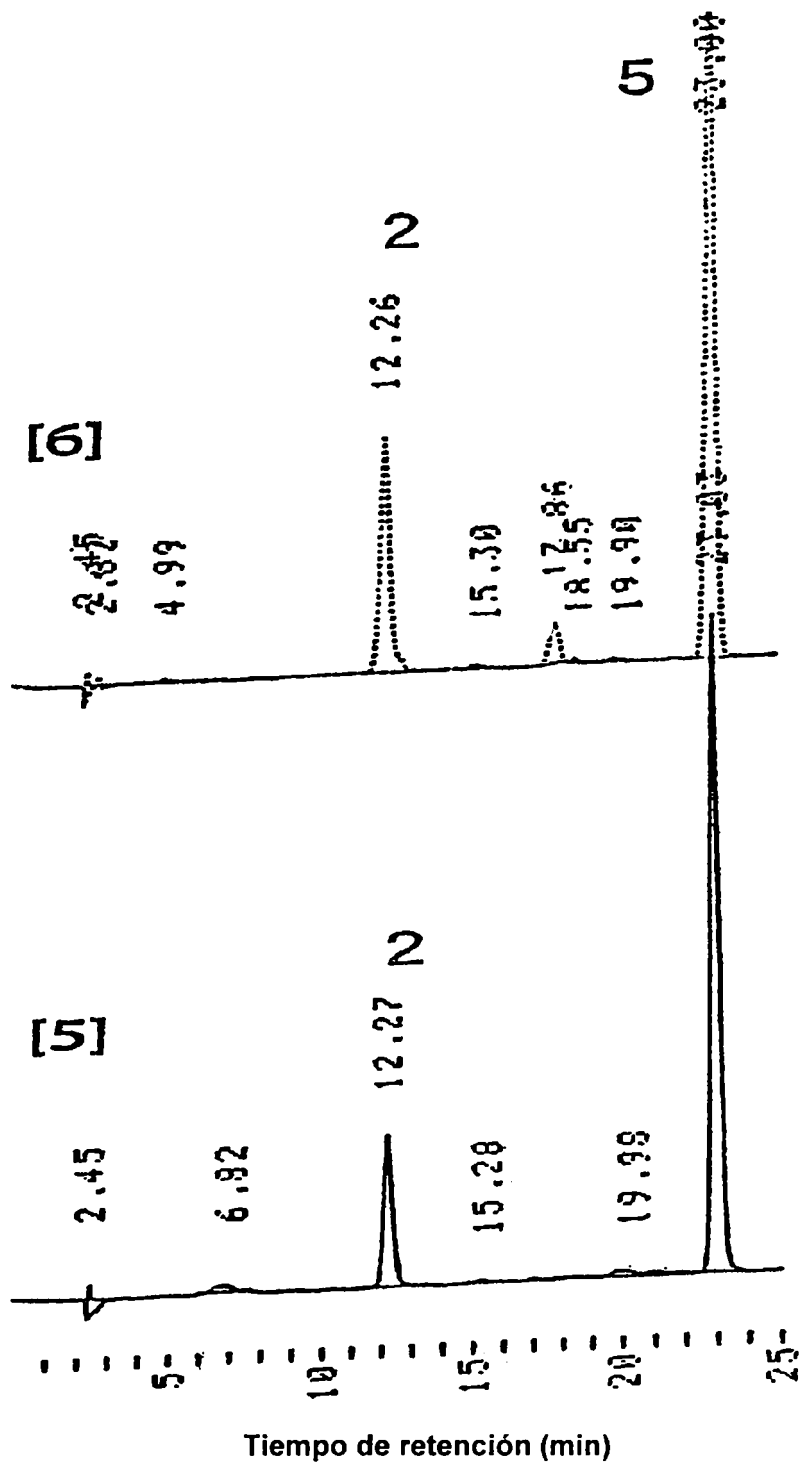
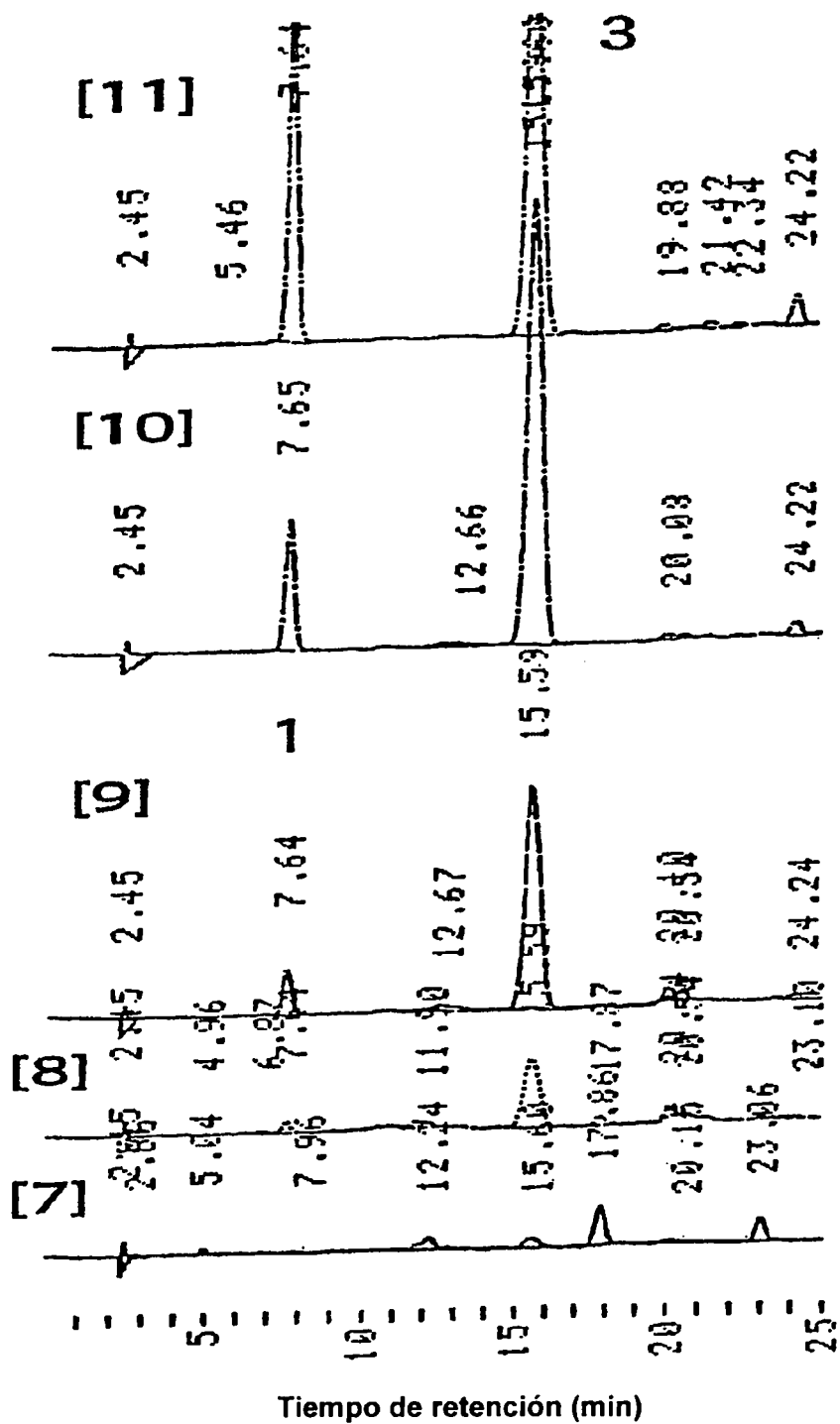


FIG. 4



F I G . 4

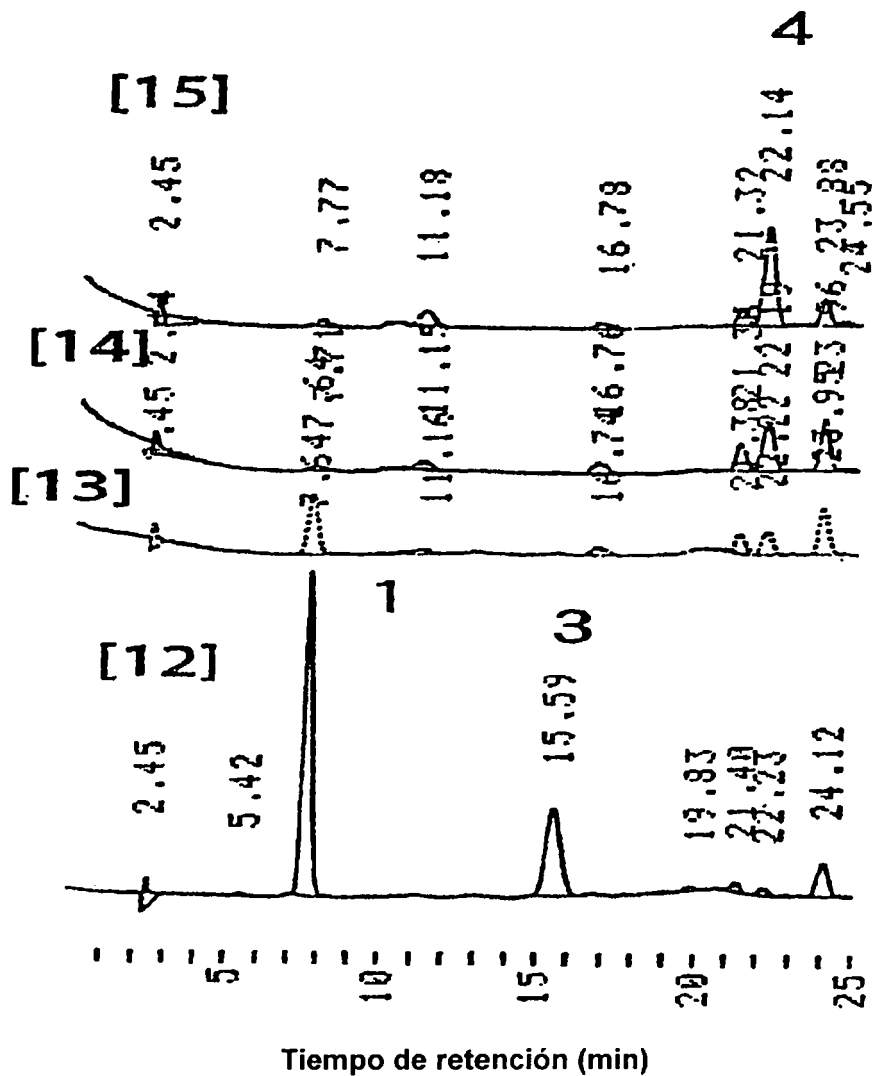


FIG. 4

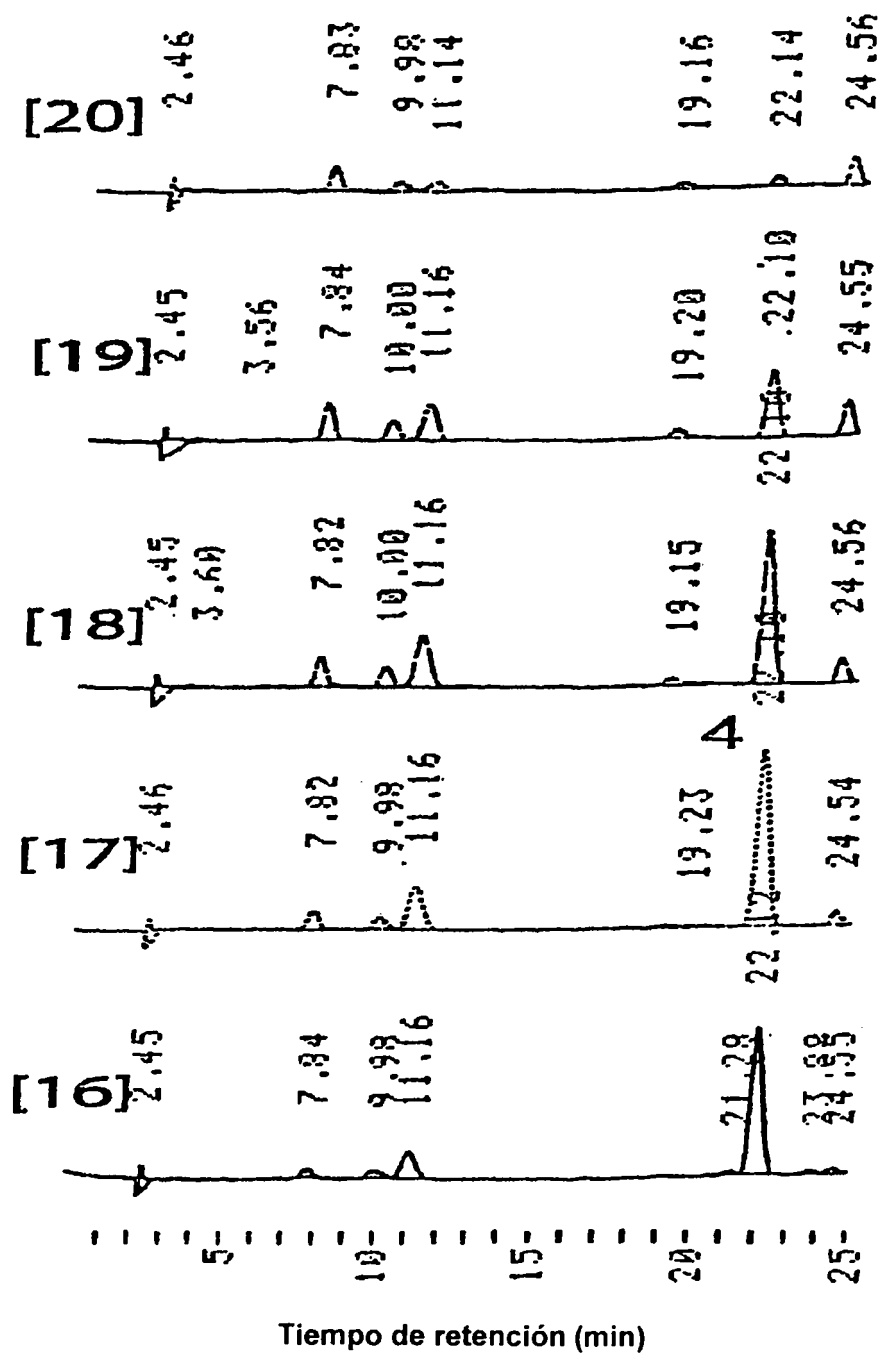


FIG. 5

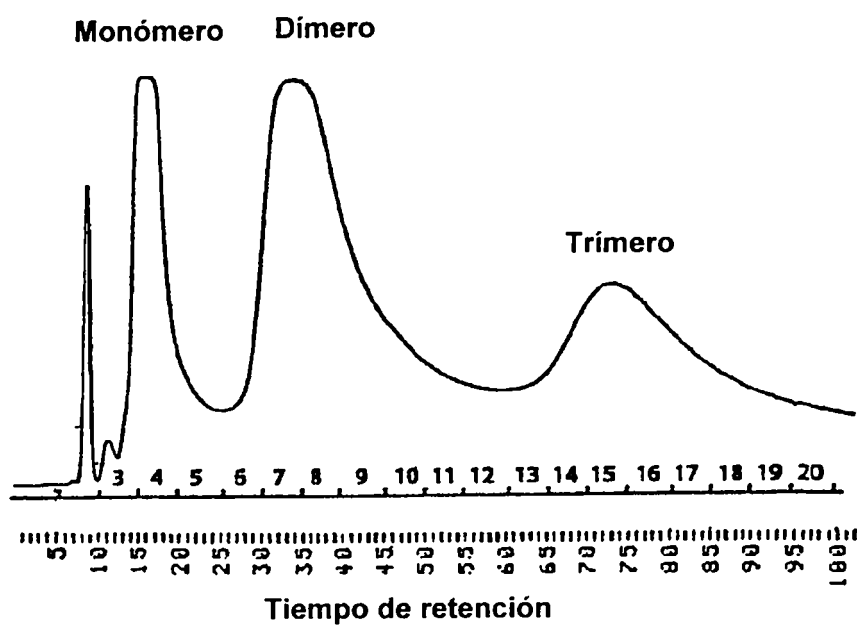


FIG. 6

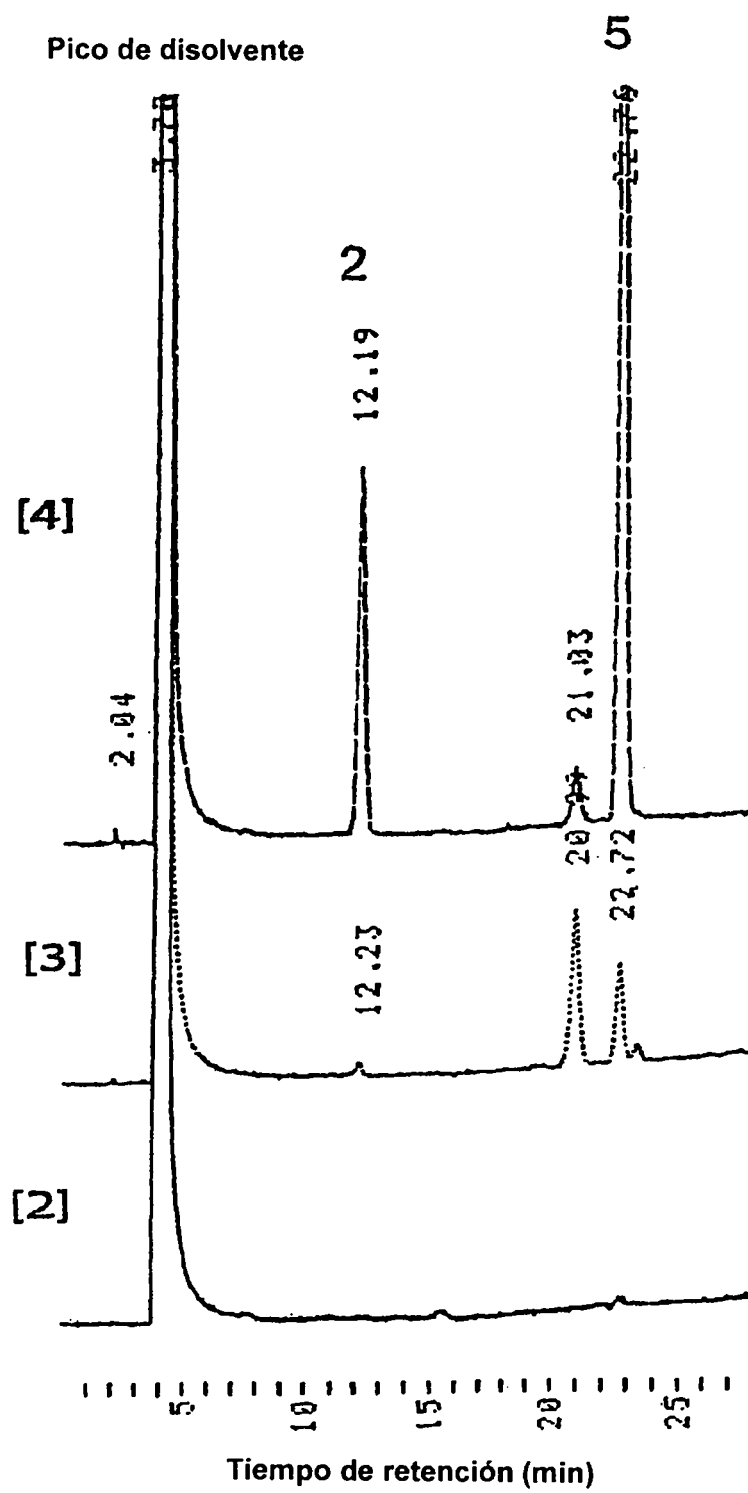


FIG. 6

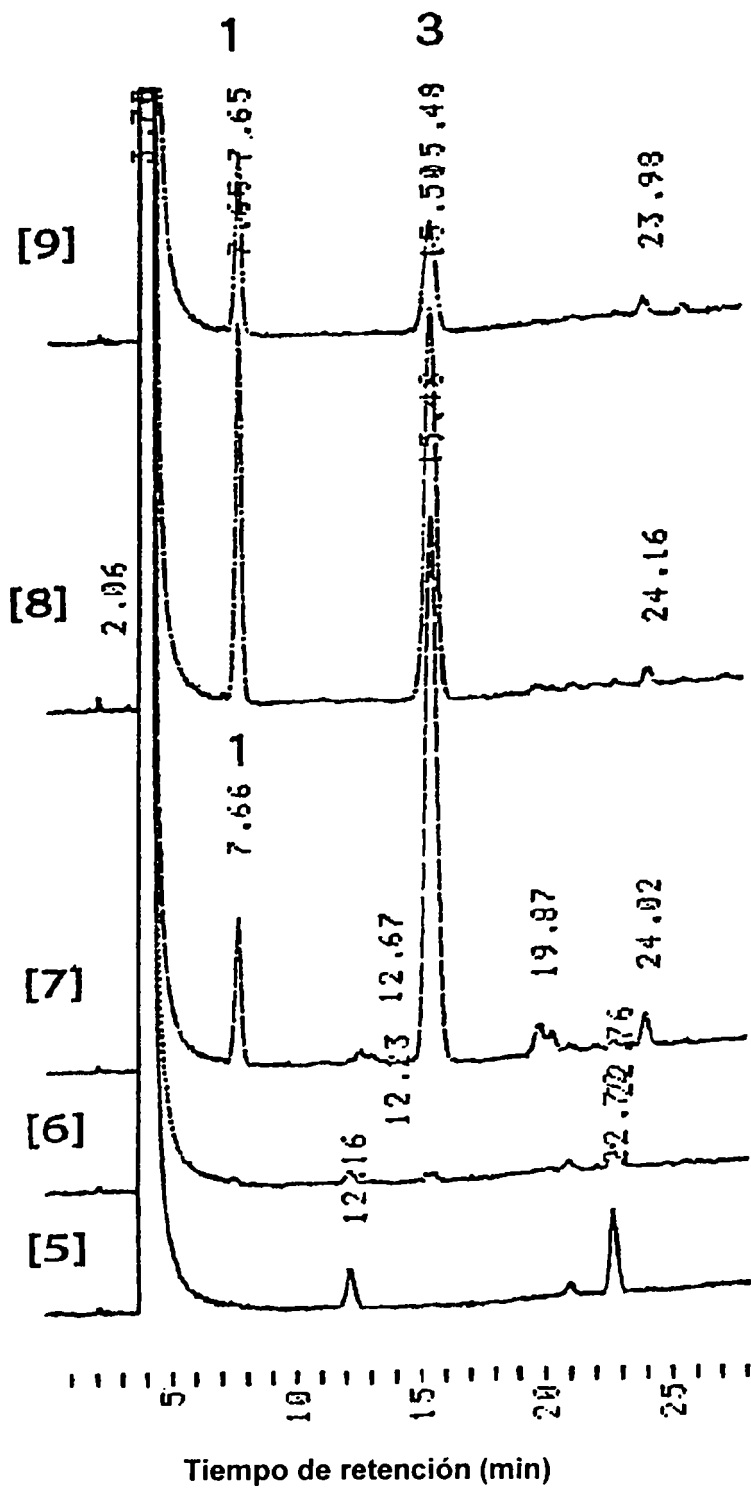


FIG. 6

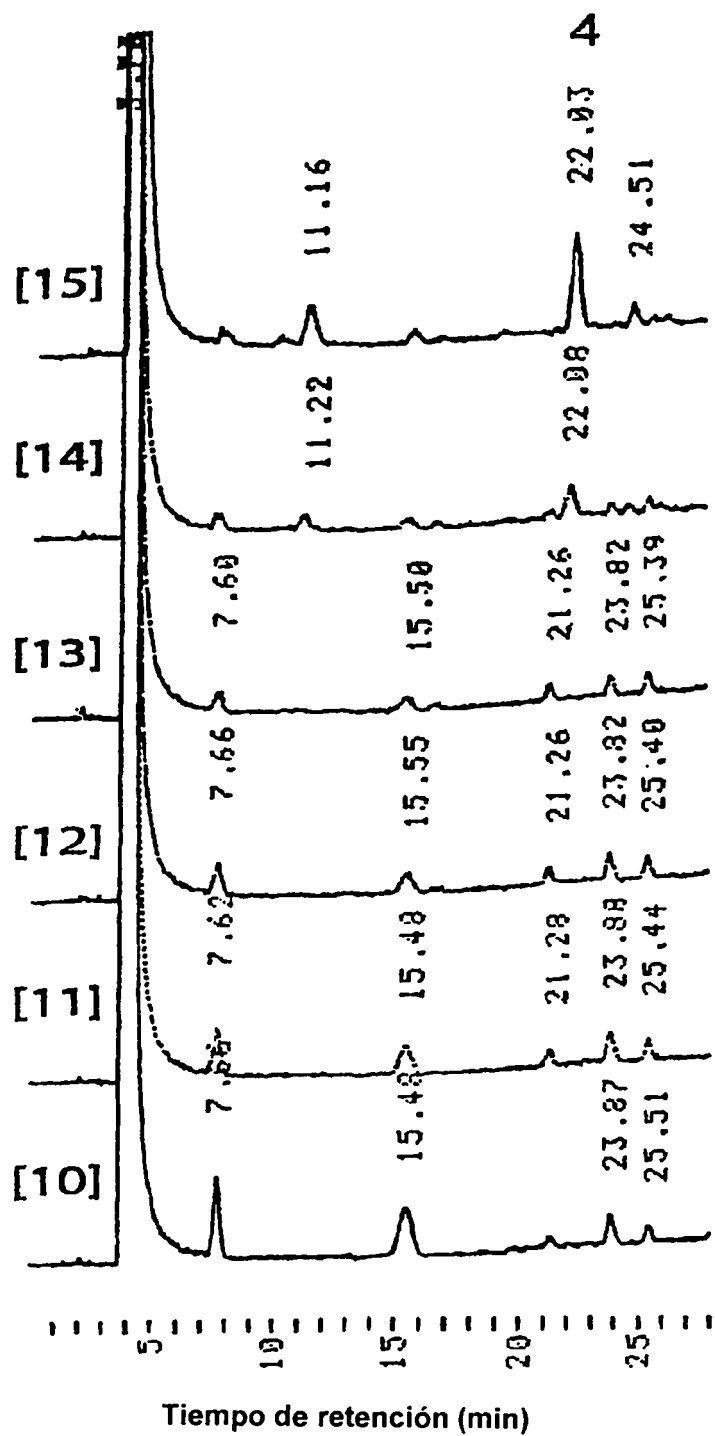


FIG. 7

