



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107105695 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580066582.6

(22)申请日 2015.10.08

(30)优先权数据

62/062,744 2014.10.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2015/002114 2015.10.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/055860 EN 2016.04.14

(71)申请人 恩兹莫特克有限公司

地址 以色列米格达勒埃梅克

(72)发明人 盖·本-德罗尔 拉恩·努马

沙尼·谢费尔·迪-努尔

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 刘明海 周瑞

(51)Int.Cl.

A23D 9/007(2006.01)

A23D 9/013(2006.01)

C11B 1/10(2006.01)

C11B 5/00(2006.01)

A23L 29/10(2016.01)

A23L 33/10(2016.01)

A23L 33/105(2016.01)

A23L 33/115(2016.01)

A23L 33/12(2016.01)

A61K 31/685(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 1/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

(54)发明名称

具有增强的抗氧化性的海洋卵磷脂制剂

(57)摘要

本发明提供海洋卵磷脂制剂,其包括海洋卵磷脂和一种或多种外源性抗氧化剂。还提供了包含海洋卵磷脂制剂的营养、药物或保健组合物或功能食品或医学食品。还提供了制备海洋卵磷脂制剂的方法。还提供了治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的海洋卵磷脂制剂。还提供降低施用于需要海洋卵磷脂的受试者的组合物的氧化状态的方法,所述方法包括施用所述组合物并将有效量的海洋卵磷脂制剂共同施用于需要海洋卵磷脂的受试者。

1. 海洋卵磷脂制剂,其包含:
海洋卵磷脂;和
一种或多种外源性抗氧化剂,其中所述制剂具有的所述一种或多种外源性抗氧化剂的浓度为10mg/kg或更多。
2. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述一种或多种外源性抗氧化剂的浓度为1000mg/kg或更多。
3. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述一种或多种外源性抗氧化剂以有效减少胃肠道条件中的脂质过氧化的量提供。
4. 根据前述权利要求任一项所述的制剂,其中所述制剂具有25mgN/100g或更少的三甲胺N-氧化物(TMAO)浓度。
5. 根据权利要求4所述的的制剂,其中TMAO的浓度为5mgN/100g或更低。
6. 根据前述权利要求任一项所述的制剂,其还包含油。
7. 根据权利要求6所述的制剂,其中所述油选自鱼油、藻油、植物油及其组合。
8. 根据权利要求7所述的制剂,其中所述油包含至少一种 ω -3脂肪酸,其中所述油具有25% (w/w) 或更高浓度的所述至少一种 ω -3脂肪酸。
9. 根据前述权利要求任一项所述的制剂,其中所述一种或多种外源性抗氧化剂包括至少一种生育酚。
10. 根据前述权利要求任一项的制剂,其中所述一种或多种外源性抗氧化剂包括两种或更多种不同的生育酚的混合物。
11. 根据前述权利要求任一项的制剂,其中所述海洋卵磷脂来自磷虾源或鱼源。
12. 根据权利要求11所述的制剂,其中所述海洋卵磷脂来自磷虾源。
13. 根据前述权利要求任一项所述的制剂,其中所述制剂具有高于700mg/kg的外源性钙浓度。
14. 根据前述权利要求任一项所述的制剂,其中所述制剂具有低于1200mg/kg的钠浓度。
15. 根据前述权利要求任一项所述的制剂,其中所述制剂具有5mgN/100g或更少的三甲胺(TMA)浓度。
16. 根据前述权利要求任一项的制剂,其中在胃模型中孵育180分钟后,所述制剂中丙二醛(MDA)水平不超过6 μ mol/g。
17. 根据前述权利要求任一项的制剂,其中在胃模型中孵育180分钟后,所述制剂中氢过氧化物(LOOH)水平不超过10 μ mol/g。
18. 根据前述权利要求任一项所述的制剂,其中在胃模型中孵育180分钟后,磷脂、甘油三酯、脂肪酸、虾青素或任何其它活性成分的水平为孵育前其初始值的80%或更高。
19. 一种营养组合物,其包含根据权利要求1-18任一项所述的制剂。
20. 一种保健组合物,其包含根据权利要求1-18任一项所述的制剂。
21. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-18任一项所述的制剂。
22. 一种膳食补充剂组合物,其包含根据权利要求1-18任一项所述的制剂。
23. 一种医用食品组合物,其包含根据权利要求1-18任一项所述的制剂。
24. 制备包含海洋卵磷脂和外源性抗氧化剂的海洋卵磷脂制剂的方法,其包括:

- 将海洋生物质与至少一种有机溶剂混合；
- 将所述至少一种有机溶剂与脱脂生物质分离，得到含有所述至少一种有机溶剂和海洋卵磷脂的液相；
- 从液相中蒸发出至少一种有机溶剂；
- 获得海洋卵磷脂；和
- 在该方法的任何阶段加入一种或多种外源性抗氧化剂。
25. 制备包含海洋卵磷脂和外源性抗氧化剂的海洋卵磷脂制剂的方法，其包括：
- 在生物质的制备过程中加入一种或多种外源性抗氧化剂；
- 将海洋生物质与至少一种有机溶剂混合；
- 将所述至少一种有机溶剂与脱脂生物质分离，得到含有所述至少一种有机溶剂和海洋卵磷脂的液相；
- 从液相中蒸发出至少一种有机溶剂并获得海洋卵磷脂。
26. 根据权利要求24或25所述的方法，其还包括至少一个用水洗涤的步骤。
27. 根据权利要求26所述的方法，其中当进行所述至少一个用水洗涤提取的海洋卵磷脂的步骤时，将提取的海洋卵磷脂溶解在有机溶剂混合物中。
28. 根据权利要求24至27任一项所述的方法，其还包括浓缩所述海洋卵磷脂。
29. 根据权利要求28所述的方法，其还包括将海洋卵磷脂与一种或多种油混合。
30. 根据权利要求24至29任一项所述的方法，其中将所述一种或多种外源性抗氧化剂添加至10mg/kg或更高浓度的海洋卵磷脂制剂。
31. 根据权利要求30所述的方法，其中将所述一种或多种外源性抗氧化剂添加至1000mg/kg或更高浓度的海洋卵磷脂制剂。
32. 根据权利要求24至31任一项所述的方法，其中所述一种或多种外源性抗氧化剂包括生育酚。
33. 根据权利要求24至31任一项所述的方法，其中所述一种或多种外源性抗氧化剂包括两种或更多种不同的生育酚的混合物。
34. 治疗或预防心血管疾病、认知疾病、炎症、关节炎、抑郁或经前期综合征的方法，其包括：
- 向受试者施用治疗有效量的如权利要求1至23任一项所述的制剂。
35. 一种降低施用于需要海洋卵磷脂的受试者的组合物的氧化状态的方法，其包括：
- 施用所述组合物；和
- 将有效量的如权利要求1-23任一项所述的海洋卵磷脂制剂共同施用给需要海洋卵磷脂的受试者。
36. 根据权利要求34或35所述的方法，其中受试者患有胃肠道疾病或病症。
37. 根据权利要求36所述的方法，其中所述胃肠道疾病或病症是炎症性肠病。
38. 根据权利要求37所述的方法，其中所述炎症性肠病是克罗恩病或溃疡性结肠炎。
39. 根据权利要求36所述的方法，其中所述胃肠道疾病或病症是消化性胃溃疡、胃食管反流病(GERD)或肠易激综合征(IBS)。

具有增强的抗氧化性的海洋卵磷脂制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及具有增强的抗氧化性的海洋卵磷脂制剂。

背景技术

[0002] 流行病学研究和临床研究已经将各种健康益处与鱼和海产品的消耗相关联。归因于长链n-3多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)的存在的这些正面健康结果包括降低心血管疾病(CVD)(Hu和Willett 2002)、抗炎性质(Calder 2004)、关节炎(Deutsch 2007)、经前期综合征等的风险。

[0003] LC-PUFA对脂质过氧化反应非常敏感,并且可以在整个加工过程中以及随后的封装或制剂中迅速氧化(Hamilton 1998;Undeland等人1998;Baik等人2004)。

[0004] 脂质过氧化是指脂质的氧化降解。它是一种自由基介导的反应链,一旦启动,导致多不饱和脂质的氧化变质。这些反应可以由许多有毒产物包括氢过氧化物(LOOH)和醛引发或增强。可以通过测量脂质过氧化产物如LOOH和丙二醛(MDA)来监测脂质过氧化过程的进展。

[0005] 初级过氧化产物是氢过氧化物,其中双键可能已经移动和/或改变构型。这些产物可以在结构上重新排列并转化成二级过氧化产物,通过裂解产生更小的分子或通过二聚合产生更大的分子。脂质氢过氧化物是不稳定的,它们的断裂产生诸如MDA的产物。

[0006] MDA是三碳低分子量醛,是脂质氧化的二级产物之一,对健康有害,并且是由含有至少三个双键的脂肪酸的氧化过程形成的。虽然MDA不是脂质过氧化反应的化学计量标记,但与LOOH积累相比,其积累反映了脂质过氧化反应过程的强度。这些物种以及一些其他物质的测量可以评估不同阶段的氧化途径,提供该动态过程的详细信息。

[0007] 脂质过氧化是一个关键的降解过程,负责降低海洋 ω -3油的质量,包括气味、颜料和质地的变化。脂质过氧化还负责产生大量的细胞毒性化合物(Addis1986;Kubow 1992)。此外,已经表明,氧化的海洋 ω -3油可能具有受损的功效,导致补充有效性的变化(Turner 2006)。重要的是,几项研究表明,消耗含有脂质氧化终产物的膳食或油后血浆过氧化脂质标志物增加,表明氧化脂质具有被肠吸收的能力。Strapans和同事(1994,1999)表明,膳食氧化脂质是人血清乳糜微粒中氧化脂质的来源。Naruszewicz发现,热处理油的消耗导致脂质过氧化物的餐后血浆水平显著增加(Naruszewicz等人1987)。

[0008] 除了磷脂(主要是磷脂酰胆碱)结合的LC-PUFA之外,海洋卵磷脂如磷虾油含有天然抗氧化剂(虾青素)。已知这些卵磷脂在保质期内是稳定的,这可能是由于天然抗氧化剂的存在。本申请的发明人发现,在其保质期内显示出稳定性的海洋卵磷脂具有最小的过氧化作用,在胃肠道条件下易受脂质过氧化的影响。发明人能够通过向具有优选低三甲胺N-氧化物(TMAO)水平的海洋卵磷脂添加某些抗氧化剂来解决这个问题。

发明内容

[0009] 本发明提供了包含海洋卵磷脂和一种或多种外源性抗氧化剂的海洋卵磷脂制剂,

其中所述制剂具有的所述一种或多种外源性抗氧化剂的浓度为10mg/kg或更多。有时,所述一种或多种外源性抗氧化剂的浓度为100mg/kg或更多,有时为500mg/kg或更多,有时为1000mg/kg或更多,有时为1200mg/kg或更多,有时为1400mg/kg或更多,有时为1600mg/kg或更多,有时为2000mg/kg或更多,有时为2500mg/kg或更多,有时为3000mg/kg或更多,有时为4000mg/kg或更多。

[0010] 优选地,所述一种或多种外源性抗氧化剂以有效减少胃肠道条件中的脂质过氧化的量提供。优选地,海洋卵磷脂来自磷虾或鱼源。优选地,所述一种或多种外源性抗氧化剂包含至少一种生育酚。有时,所述一种或多种外源性抗氧化剂包含两种或更多种不同生育酚(例如 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚)的混合物。

[0011] 在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂具有大于700mg/kg的内源性钙浓度。在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂具有大于500mg/kg的内源性镁浓度。在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂具有至少2% (w/w) 的磷脂。在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂具有至少3% (w/w) 的EPA和至少2% (w/w) 的DHA。

[0012] 在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂具有25mgN/100g或更少的三甲胺N-氧化物(TMAO)浓度。有时,所述TMAO浓度为15mgN/100g或更少,有时为10mgN/100g或更少,有时为7mgN/100g或更少,有时为5mgN/100g或更少,有时为3mgN/100g或更少,和有时为1mgN/100g或更少。在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂具有5mgN/100g或更少的三甲胺(TMA)浓度。在本发明的某些实施方案中,在40°C或以下储存3个月,优选6个月后,磷虾油具有5mgN/100g或更少的TMA。在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂具有少于1200mg/kg的钠浓度。在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂具有的游离胆碱浓度小于450mg/kg和/或甜菜碱浓度低于1000mg/kg和/或总氨基酸浓度小于0.3g/100g。

[0013] 在本发明的某些其它非限制性实施方案中,在胃模型中孵育制剂180分钟后,所述制剂中丙二醛(MDA)水平不超过6 μ mol/g,有时为4 μ mol/g,有时为2 μ mol/g,有时为0 μ mol/g。

[0014] 在本发明的某些其它非限制性实施方案中,在胃模型中孵育制剂180分钟后,所述制剂中氢过氧化物(LOOH)水平不超过10 μ mol/g,有时为6 μ mol/g,有时为4 μ mol/g,有时为2 μ mol/g,和有时为0 μ mol/g。

[0015] 在本发明的某些其它非限制性实施方案中,在胃模型中孵育制剂180分钟后,磷脂、甘油三酯、脂肪酸、虾青素或任何其它活性成分的水平为孵育前其初始值的80%或更高。优选地,其水平为孵育前其初始值的85%或更高,更优选90%或更高,进一步优选97%或更高,最优选99%或更高。

[0016] 在本发明的某些其它非限制性实施方案中,所述制剂还包含油。优选地,所述油是鱼油、藻油、植物油或其组合。更优选地,所述油包含至少一种 ω -3脂肪酸,其中所述油具有的所述至少一种 ω -3脂肪酸的浓度为25% (w/w) 或更高。

[0017] 本发明还提供了包含上述任一种制剂的营养、药物或保健组合物或功能食品或医疗食品。

[0018] 本发明还提供了制备根据本发明的海洋卵磷脂制剂的方法,包括:将海洋生物物质与至少一种有机溶剂混合;将所述至少一种有机溶剂与脱脂生物物质分离,得到含有所述至

少一种有机溶剂和海洋卵磷脂的液相；从液相中蒸发出所述至少一种有机溶剂；获得海洋卵磷脂；并在该过程的任何阶段加入一种或多种外源性抗氧化剂。

[0019] 本发明还提供了制备根据本发明的海洋卵磷脂制剂的方法，包括：在生物质的制备过程中加入一种或多种外源性抗氧化剂；将海洋生物质与至少一种有机溶剂混合；将所述至少一种有机溶剂与脱脂生物质分离，得到含有所述至少一种有机溶剂和海洋卵磷脂的液相；从液相中蒸发出所述至少一种有机溶剂并获得海洋卵磷脂。

[0020] 有时，所描述的方法中的每一个可以进一步包括至少一个用水洗涤的步骤。任选地，当进行所述至少一个用水洗涤所提取的海洋卵磷脂的步骤时，将提取的海洋卵磷脂溶解在有机溶剂混合物中。有时，这些方法的每一个还可以包括浓缩海洋卵磷脂并任选地与一种或多种油混合。

[0021] 有时，所述一种或多种外源性抗氧化剂的加入量导致海洋卵磷脂制剂中外源性抗氧化剂的最终浓度为10mg/kg或更多，有时为100mg/kg或更多，有时为500mg/kg或更多，有时为1000mg/kg或更多，有时为1200mg/kg或更多，有时为1400mg/kg或更多，有时为1600mg/kg或更多，有时为2000mg/kg或更多，有时为2500mg/kg或更多，有时为3000mg/kg或更多，有时为4000mg/kg或更多。优选地，所述一种或多种外源性抗氧化剂包含生育酚。有时，所述一种或多种外源性抗氧化剂包含两种或更多种不同生育酚（例如 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚）的混合物。

[0022] 本发明还提供了治疗或预防疾病或病症的方法，包括向受试者施用治疗有效量的如上文所公开的本发明海洋卵磷脂制剂中任一种的制剂。优选地，疾病或病症是心血管疾病、认知疾病、炎症、炎性疾病、关节炎、抑郁症或经前期综合征。在某些非限制性实施方案中，受试者患有心血管疾病、认知疾病、炎症、炎性疾病、关节炎、抑郁症或经前期综合征。在本发明的某些其它非限制性实施方案中，受试者患有胃肠道疾病或病症。胃肠道疾病和病症包括：克罗恩病或溃疡性结肠炎、消化性溃疡、胃溃疡、胃食管反流病（GERD）和肠易激综合征（IBS）等炎症性肠病。

[0023] 本发明还提供降低施用于需要海洋卵磷脂的受试者的组合物的氧化状态的方法，包括施用所述组合物并将有效量的任何一种上述公开的海洋卵磷脂制剂共同施用于需要海洋卵磷脂的受试者。在某些非限制性实施方案中，受试者患有心血管疾病、认知疾病、炎症、炎性疾病、关节炎、抑郁症或经前期综合征。在本发明的某些其它非限制性实施方案中，受试者患有胃肠道疾病或病症。胃肠道疾病和病症包括：克罗恩病或溃疡性结肠炎、消化性溃疡、胃溃疡、胃食管反流病（GERD）和肠易激综合征（IBS）等炎症性肠病。

具体实施方案

[0024] 本发明首次公开了含有一种或多种外源性抗氧化剂的海洋卵磷脂制剂。

[0025] 术语“卵磷脂”是指含有1%w/w或更多种磷脂的脂质组合物。

[0026] 术语“外源性抗氧化剂”是指至少一种天然或合成的抗氧化剂或其组合，其加入到海洋卵磷脂中，和/或加入到海洋卵磷脂的原料中，和/或在生产海洋卵磷脂的任何步骤期间，并且至少部分地存在于海洋卵磷脂制剂中。

[0027] 如本文所用，术语“海洋卵磷脂制剂”和“制剂”或其任意的语言变体是可互换的。

[0028] 天然抗氧化剂从天然来源分离或源自天然来源，例如但不限于：海洋来源（如鱼、

鱼类部分、磷虾、鱿鱼、小虾 (shrimp) 或其他甲壳类动物)、植物来源 (如大豆、向日葵、油菜籽、油菜 (canola)、玉米、橄榄、迷迭香、茉莉、水果、草本、牛至属植物 (origanum)、梅利莎 (Melissa)、葡萄、人参、蔓越莓和茶)、微生物 (野生发现的、发酵生长的或其他的) 和动物来源 (例如蛋、牛奶、羊毛、牛肉、猪油脂肪等)。

[0029] 根据一个实施方案,从磷虾 (磷虾油)、鱼或鱼部分、鱿鱼、小虾或其他甲壳类动物中提取海洋卵磷脂。

[0030] 根据另一个实施方案,本发明的海洋卵磷脂制剂还包含油。任选地,所述油选自鱼油、藻油、植物油及其任何组合。任选地,油包含的 ω 3 脂肪酸浓度为 25% (w/w) 或更高,有时为 35% (w/w) 或更高,有时为 50% (w/w) 或更高。

[0031] 在本发明的一个实施方案中,海洋卵磷脂制剂含有的外源性抗氧化剂水平为 10mg/kg 或以上,有时为 100mg/kg 或以上,有时为 500mg/kg 或以上,有时为 1000mg/kg 或以上,有时为 1200mg/kg 或以上,有时为 1400mg/kg 或以上,有时为 1600mg/kg 或以上,有时为 2000mg/kg 或以上,有时为 2500mg/kg 或以上,有时为 3000mg/kg 或以上,有时为 4000mg/kg 或更多。

[0032] 根据另一个实施方案,所述一种或多种外源性抗氧化剂选自:生育酚、生育三烯酚、抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸、迷迭香提取物、鼠尾草酸、多酚、酚类及其任意组合。多酚和/或酚类可以是天然来源的 (例如,来自茶、葡萄酒或橄榄),合成来源的,或其混合物,并且可以包括:酚酸 (没食子酸、鞣花酸、丹宁酸、咖啡酸、绿原酸、肉桂酸、阿魏酸和香豆素)、单宁、木质素、类黄酮亚类,其中包括黄酮醇 (如槲皮素、高良姜素、山奈酚、杨梅酮、非瑟酮、异鼠李素、藜香黄酮醇 (pachypodol)、鼠李素 (rhamnazin)、芦丁、羟乙基云香甙 (hydroxyethylrutin)、黄酮 (金合欢素 (acacetin)、芹黄素、柯因 (chrysin)、香叶木素、橘黄酮、木犀草素)、异黄酮、黄烷酮 (橙皮苷、柚皮素、水飞蓟宾、圣草酚)、花青素 (anthocyanidin)、黄烷醇 (儿茶素、没食子儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、原花青素 (Proanthocyanidin)、芪、原花青素 (proanthocyanidin) (或无色花青素 (leucoanthocyanidin))、原矢车菊素 (procyanidin)、茶黄素、茶红素黄酮醇、3-羟基黄烷酮 (如二氢槲皮素、二氢山奈酚)、异黄酮 (如染料木素、黄豆苷元、黄豆黄素)、矢车菊素 (cyanidin)、飞燕草色素 (delphinidin)、锦葵色素 (malvidin)、天竺葵色素 (pelargonidin)、芍药花色素 (peonidin)、牵牛花色素 (petunidin)、白藜芦醇、苯丙素、花青素脱氢聚酯型儿茶素 (anthocyanidins dehydrotheasinensin)、聚酯型儿茶素醌 (theasinensin quinone)、表茶黄倍灵 (epitheaflagallin)、羟基茶黄素、前表茶黄倍灵 (proepitheaflagallin) 和羟基酪醇。优选地,所述一种或多种外源性抗氧化剂是不含任何另外的抗氧化剂的生育酚。优选地,所述一种或多种外源性抗氧化剂包含两种或更多种不同生育酚 (例如 α -生育酚和 β -生育酚) 的混合物。

[0033] 根据本发明的另一个实施方案,海洋卵磷脂制剂中的 TMAO 水平为 25mgN/100g 或更少,有时 15mgN/100g 或更少,有时为 10mgN/100g 或更少,有时为 7mgN/100g 或更少,有时为 5mgN/100g 或更少,有时为 5mgN/100g 或更少,有时为 3mgN/100g 或更少,和有时为 1mgN/100g 或更少。

[0034] 术语“内源性钙水平”或“内源性镁水平”是指从海洋卵磷脂生物质中提取而不添加天然或合成钙或镁的钙或镁水平。

[0035] 在本发明的一个实施方案中,海洋卵磷脂制剂含有高的内源性钙水平,优选700mg/kg或更高,低水平的钠,优选1200mg/kg或更低,和/或低的TMA含量,优选5mgN/100g或更低。

[0036] 根据本发明的另一个实施方案,海洋卵磷脂制剂中的内源性钙水平高于700mg/kg,有时高于1000mg/kg,有时高于1200mg/kg,有时高于2000mg/kg,有时高于3000mg/kg,和有时高于4000mg/kg。

[0037] 根据本发明的另一个实施方案,海洋卵磷脂制剂中的钠水平低于1200mg/kg,有时低于1100mg/kg,有时低于1000mg/kg,有时低于900mg/kg,有时低于700mg/kg,和有时低于500mg/kg。根据本发明的另一个实施方案,海洋卵磷脂制剂中的钙水平高于钠水平;有时Ca/Na的比率大于1,有时大于2,有时比率大于3,有时比率大于4。

[0038] 在本发明的一个实施方案中,储存至少4个月后,海洋卵磷脂制剂的TMA水平不会增加高于5mgN/100g,有时为4mgN/100g,有时为3mgN/100g,有时为1mgN/100g。在本发明的另一个实施方案中,在储存至少5个月,至少6个月,至少7个月,至少8个月,至少9个月,至少10个月,至少11个月,或至少一年后,TMA水平不会增加高于5mgN/100g,有时为4mgN/100g,有时为3mgN/100g,有时为1mgN/100g。

[0039] 在本发明的一个优选实施方案中,在环境温度(20-30℃)下至少6个月的时间,或在40℃或更低至少3个月的时间内,海洋卵磷脂制剂的TMA水平不会增加高于5mgN/100g,优选4mgN/100g,更优选3mgN/100g,最优选1mgN/100g。

[0040] 根据本发明的一个实施方案,海洋卵磷脂制剂含有高的内源性镁水平,为高于500mg/kg,有时高于750mg/kg,有时高于1000mg/kg,和有时高于2000mg/kg。

[0041] 根据本发明的一个实施方案,海洋卵磷脂制剂含有低的游离胆碱水平,有时少于450mg/kg,有时少于300mg/kg,有时少于200mg/kg,和有时少于100mg/kg。

[0042] 根据本发明的一个实施方案,海洋卵磷脂制剂含有低的甜菜碱水平,有时少于1000mg/kg或750mg/kg,有时少于500mg/kg或250mg/kg,有时少于50mg/kg,和有时少于10mg/kg。

[0043] 根据本发明的一个实施方案,海洋卵磷脂制剂含有低的总氨基酸水平,有时少于0.3g/100g,有时少于0.1g/100g,和有时少于0.05g/100g。

[0044] 根据本发明的另一个实施方案,磷虾油制剂含有低水平的以下氨基酸:丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、羟脯氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸。优选地,所述氨基酸之一的每一种的水平小于0.15g/100g或0.1g/100g,优选小于0.05g/100g,更优选小于0.04g/100g,甚至更优选小于0.02g/100g,最优选小于0.006g/100g。

[0045] 根据本发明的另一个实施方案,海洋卵磷脂制剂包含至少2% (w/w) 的磷脂,有时高于10% (w/w),有时高于25% (w/w),有时高于35% (w/w) 磷脂,有时高于40% (w/w),有时高于45% (w/w),有时高于50% (w/w),和有时高于60% (w/w)。

[0046] 根据本发明的另一个实施方案,海洋卵磷脂制剂包含至少3% (w/w) 的EPA,有时高于5% (w/w) EPA,有时高于6% (w/w) EPA,有时高于8% (w/w) EPA,有时高于10% (w/w) EPA,和有时高于12% (w/w) EPA。根据本发明的另一个实施方案,海洋卵磷脂制剂包含至少2% (w/w) DHA,有时高于3% (w/w) DHA,有时高于5% (w/w) DHA,有时高于7% (w/w) DHA,和有时高于

10% (w/w) DHA。

[0047] 本发明的海洋卵磷脂制剂可以是流体油、粉末、颗粒、蜡、糊、油或水乳液形式,以及使其能够使用的任何其它形式。在本发明的另一方面,海洋卵磷脂制剂与营养、药物或保健组合物或功能食品或医疗食品结合使用或是其一部分。

[0048] 本发明还提供了包含上述任一种海洋卵磷脂制剂的营养、药物或保健组合物或功能食品或医疗食品。

[0049] 本文使用的医疗食品是特别配制的并且旨在用于具有不能通过单独的正常饮食满足的独特营养需要的疾病/病症的膳食管理。

[0050] 本文使用的营养组合物可以是任何营养组合物,包括但不限于:人乳脂替代品、婴儿配方、成人配方、乳制品、奶粉、饮料、奶昔、冰淇淋、饼干、大豆产品、焙烤制品、糕点、面包、蛋糕、酱汁、汤、预制食品、冷冻食品、调味品、糖食、油、脂肪、人造黄油、涂抹食品、填充料、谷物、即食产品、婴儿食品、幼儿食品、棒(bar)、小吃、糖果和巧克力产品。

[0051] 本文使用的功能性食品可以是任何功能性食品,包括但不限于乳制品、冰淇淋、饼干、大豆制品、焙烤制品、糕点、蛋糕和面包、即食产品、酱汁、汤、预制食品、冷冻食品、调味品、糖食、油和脂肪、人造黄油、涂抹食品、填充料、谷物、即食产品、饮料和奶昔、婴儿食品、棒、小吃、糖果和巧克力产品。

[0052] 本文使用的保健组合物可以是任何保健品,其可以是可以被认为是食物或食物的一部分并提供医学或健康益处(包括预防和治疗疾病或病症)的任何物质。这种保健组合物包括但不限于:食品添加剂、食品补充剂、膳食补充剂、基因工程食品(例如蔬菜、草药产品和加工食品如谷物、汤和饮料)、兴奋性功能食品、临床营养产品、医用食品和药用食品(pharmafood)。膳食补充剂可以以软凝胶胶囊、片剂、糖浆和其它已知的膳食补充剂递送系统的形式递送。

[0053] 药物或保健组合物可以是本领域通常使用的许多剂量递送形式中的任一种。适合于口服施用的药物组合物可以作为离散的剂量单位(例如丸剂、片剂、微丸、糖衣丸、胶囊或软凝胶)、作为粉剂或颗粒剂或作为溶液剂、混悬剂、糖浆剂或酞剂形式提供。

[0054] 用于本发明组合物的合适的施用途径是口服、颊含、舌下、经由饲管的肠内、局部、透皮、皮下或肠胃外(包括皮下、肌内、静脉内和皮内)施用。在一个实施方案中,化合物经口服施用。

[0055] 本发明还提供药物组合物,其中海洋卵磷脂制剂与(药学上)可接受的助剂和任选的其它治疗剂混合。助剂在与组合物的其它成分相容的意义上必须是“可接受的”,并且对其接收者无害。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药物组合物还包含至少一种另外的药物活性剂。

[0057] 本发明提供了制备本发明的海洋卵磷脂制剂的方法,其包括提取过程、任选洗涤和抗氧化剂富集。

[0058] 在本发明的另一个方面,本发明提供本发明的海洋卵磷脂制剂,其用于降低CVD危险因素,和/或治疗或预防CVD,和/或改善患有CVD的受试者的病况和/或改善患有认知疾病或病症的受试者的病况,和/或治疗或预防认知疾病或病症,和/或治疗或预防炎症或炎性疾病和/或改善患有炎症或炎性疾病或病症的受试者的病况,和/或治疗或预防抑郁症和/

或改善患有抑郁症的受试者的病况,和/或治疗或预防经前期综合症,和/或改善患有经前期综合症的受试者的病况。

[0059] 在一个实施方案中,本发明提供了用于减轻体重、降低血压或心率和/或用于改善血清脂质谱(profile)的本发明制剂。

[0060] 提取卵磷脂的阶段任选地通过向海洋生物质中加入一种或多种有机溶剂来形成卵磷脂提取物而进行。生物质可以是磷虾粉、鱼粉的形式,新鲜或冷冻的磷虾或鱼的形式,或新鲜或冷冻的磷虾或鱼通过烹饪和倾析处理除去一些含水量的形式。在制备生物质例如磷虾粉或鱼粉时,任选加入抗氧化剂。任选地,在磷虾或鱼粉生产的情况下,在干燥阶段之前、期间和/或之后加入这些抗氧化剂。任选地,通过离心、过滤、重力分离或其它方法将液相(含有溶于有机溶剂中的卵磷脂)与脱脂生物质分离。任选地,通过重复上述方法从生物质中提取与脱脂生物质一起留下的残留卵磷脂:向脱脂的生物质中加入一种或多种有机溶剂并通过相同的任选方法(即离心、过滤、重力分离等)分离液体。在进行再提取的情况下,将从提取和再提取获得的液相合并以形成最终的液相。

[0061] 在选择过滤作为分离方法的情况下,可以通过在从其中除去第一液相之后简单地洗涤作为“滤饼”剩下的脱脂生物质进行重复提取。通过洗涤进行的所述再提取将再次通过使用一种或多种有机溶剂进行。从提取和再提取获得的滤液(即液相)合并形成最终的液相。

[0062] 任选地通过加入水,任选地还加入有机溶剂,将水和有机溶剂与最终液相混合,洗涤最终液相。混合后,任选地通过重力进行分离或通过离心进行分离,形成两个不同的相:含有海洋卵磷脂的有机相和含有大部分水的第二相(即水相)。有机相可任选地用水和任选的有机溶剂以相同的程序洗涤。无论是否洗涤,最终液相任选进行蒸发阶段,以除去有机溶剂并获得卵磷脂。蒸发可以在减压下进行。

[0063] 提取或再提取阶段期间溶剂与海洋生物质(溶剂体积与生物质重量)之比小于10:1,优选小于5:1,更优选小于4:1。

[0064] 应该控制提取条件,并且可以任选地保持在10-60°C之间,优选在30-40°C之间,并且保持1分钟至10小时,优选保持1-3小时,更优选保持2-2.5小时。提取可以分批进行,例如在间歇反应器中,或任选地通过连续提取工艺进行。在连续提取系统如本领域已知的那些中,可以以并流或逆流模式进行连续提取。在连续提取中溶剂与海洋生物质的比例被认为是系统中两种料流的流量之比。

[0065] 水洗阶段也可以任选地连续地进行。任选地,水和有机相可以通过在线混合器(in-line mixer)或通过CSTR或通过混合器-沉降器系统混合。混合的水-有机相可以通过连续或分批重力分离罐,或任选地通过连续离心分离。在连续洗涤的情况下,水、有机溶剂和最终液相之间的比率将被认为是三个料流中每一个的流量之间的比率。

[0066] 有机溶剂任选地包含这样的有机溶剂,其任选地包含极性和非极性溶剂的混合物。极性溶剂可以包括以下的一种或多种:乙醇、甲醇、2-丙醇和丁醇。非极性溶剂可以包括以下的一种或多种:己烷、庚烷和石油醚。极性和非极性溶剂(体积与体积)之比优选为1:99-99:1,更优选为5:95-50:50,最优选为10:90-20:80。优选的溶剂混合物是己烷和乙醇混合物。

[0067] 在洗涤阶段期间用于洗涤有机相(含有溶解在有机溶剂中的卵磷脂)的水相体积

任选地小于最终液相体积的100%，有时小于最终液相的50%，有时小于最终液相体积的10%。

[0068] 在蒸发后获得的卵磷脂任选地进行水洗阶段，其中卵磷脂优选再溶解在有机溶剂中以形成有机相。加入水，任选地与有机溶剂一起，或任选地在其后加入到有机相中，与之一起混合，并任选地通过重力分离或离心与其分离。水洗阶段可任选地重复一次或几次。最终的海洋卵磷脂制剂将通过从洗涤的卵磷脂中去除溶剂，任选地通过蒸发有机溶剂，优选在减压下蒸发而获得。

[0069] 进行水洗时形成有机相的卵磷脂和有机溶剂之间的比例有时是(卵磷脂重量与有机溶剂体积之比)1:1-1:40，有时为1:2-1:30，有时为1:3-1:10，有时1:5-1:8。

[0070] 有机溶剂任选地包含这样的有机溶剂，其任选地包含极性和非极性溶剂的混合物。极性溶剂可包括：乙醇、甲醇、丁醇等。非极性溶剂可以来自以下的一种或多种：己烷、庚烷等。极性和非极性溶剂(体积与体积)之比优选为1:99-99:1，更优选为5:95-50:50，更优选为10:90-20:80。优选的溶剂混合物是己烷和乙醇混合物。

[0071] 在水洗涤阶段用于洗涤有机相(含卵磷脂+有机溶剂)的水相体积小于有机相体积的100%，有时小于有机相体积的50%，有时小于有机相体积的40%，有时小于有机相体积的30%，有时小于有机相体积的20%，有时小于有机相体积的10%。

[0072] 根据另一个实施方案，可以处理海洋卵磷脂以便将磷脂浓度增加至40% (w/w) 或更高，时间为50% (w/w) 或更高，有时为60% (w/w) 或更高。可以使用溶剂进行磷脂浓缩阶段。浓缩的海洋卵磷脂可以任选地与一种或多种油混合以形成海洋卵磷脂制剂，其中磷脂浓度任选为30% (w/w) 或更高，有时为40% (w/w) 或更高，有时为50% (w/w) 或更高。用于共混的一种或多种油可以任选地选自：鱼油、藻油、植物油或其任何组合。任选地，用于共混的一种或多种油可以包含25% (w/w) 或更高，有时为35% (w/w) 或更高，有时为50% (w/w) 或更高的 ω 3脂肪酸浓度。任选地， ω 3脂肪酸是EPA和/或DHA。用于共混的一种或多种油可以任选地呈甘油三酯形式、乙基酯形式、游离脂肪酸形式或其任何组合。外源性抗氧化剂可以在如下过程阶段的一个或多个中加入到海洋卵磷脂中：在其经历磷脂浓缩阶段之前，在磷脂浓缩阶段期间，在海洋卵磷脂与一种或多种油混合的阶段期间，加入到包含一种或多种油或其任何组合的海洋卵磷脂制剂中。

[0073] 海洋卵磷脂样品中的三甲胺(TMA)水平由挪威的Nofima BioLab的外部实验室测试。根据Conway和Byrne的微扩散方法的修改版本在Conway盘中进行测量(E. J. Conway等人, 1933; K. J. Obink 1955)。

[0074] 海洋卵磷脂样品中的TMAO水平由挪威的Nofima BioLab的外部实验室测试。根据Conway和Byrne的微扩散方法的修改版本在Conway盘中进行测量(E. J. Conway等人, 1933; K. J. Obink 1955)。

[0075] 通过FOX分析测试氢过氧化物水平。在562nm处进行测量，其是铁-二甲酚橙复合物的吸光度(Gay 1999)。

[0076] 丙二醛(MDA)水平通过改良的TBARS试验进行测试。通过HPLC(Fenaille 2001)或分光光度计定量硫代巴比妥酸-MDA加合物。

[0077] 海洋卵磷脂样品中的磷脂(PL)含量由第三方实验室(Spectral Services)通过 ^{31}P -NMR分析，或由HPTLC分析计算。通过用氯仿和甲醇溶液(95:5的体积比体积)溶解样品，

使用含有水、甲醇、乙酸、丙酮和氯仿的洗脱液在HPTLC硅胶板上运行样品,然后用含有水、硫酸和无水硫酸铜的染色溶液染色该板,进行HPTLC分析。通过气相色谱(改性AOCs官方方法Ce 1b-89或改性AOCs Ce 1i-07)分析EPA和DHA含量。

[0078] 通过加拿大POS Bio-sciences的ICP方法进行海洋卵磷脂样品中矿物质和金属含量的元素分析。

[0079] 海洋卵磷脂样品中的胆碱和甜菜碱由德国的Eurofins Analytik GmbH使用LC-MS-MS分析。

[0080] 根据参考方法ISO 13903:2005;EC 152/2009 (F)和ISO 13904:2005;EC 152/2009 (F),由Eurofins Analytik GmbH分析总氨基酸含量。

[0081] 加速稳定性试验是药物和产品的标准的加速储存条件模型(“新药物和产品稳定性测试Q1A (R2)”, ICH协调三方指南,2003年2月)。

[0082] 本文所用的术语百分比(%)与化合物的量和浓度结合使用,表示重量百分比。

[0083] 实施例

[0084] 实施例1:根据本发明的海洋卵磷脂制剂的制备

[0085] 实施例1A.

[0086] 通过向200克磷虾粉中加入800毫升溶剂并在约40°C下振荡约2小时来进行从磷虾粉中提取油。溶剂混合物分别含有体积比约为90:10的己烷和乙醇。使用Buchner真空系统从粉末中过滤溶剂(包括提取的油)。剩下作为“滤饼”的脱脂粉末用另外400毫升相同的溶剂混合物洗涤,以进一步提取留在脱脂粉末中的油。将所有滤液合并,并将溶剂在旋转蒸发器中减压蒸发,在约50°C的浴中进行约1小时,直至达到小于10毫巴的真空,并且油相中没有可见的沸腾。获得约50克油。

[0087] 将50克所获得的油中的约30克溶解在约930毫升的溶剂混合物中,其中包括体积比如下的己烷、乙醇和水:87.1%己烷,9.7%乙醇,3.2%水。搅拌该溶液,使有机相和水相在分液漏斗中分离。向上部的有机相中加入相当于最终磷虾油重量0.14%的混合天然生育酚。之后,蒸发(上部)有机相的溶剂,以在旋转蒸发器中减压制备磷虾油,在约50°C的浴中进行约1小时,直至达到小于10毫巴的真空,并且油相中没有可见的沸腾。

[0088] 所描述的过程导致磷虾油制剂包含:PL=25.8g/100g;EPA=8.2g/100g;DHA=4.8g/100g;TMAO<1mgN/100g。

[0089] 实施例1B.

[0090] 使用连续工业单元逆流地提取磷虾油。提取在约40°C下用溶剂混合物进行,所述溶剂混合物分别含有体积比约为90:10的己烷和乙醇。设定系统参数以确保300kg/h的磷虾粉和1140L/h的溶剂的流量。含有溶解油的溶剂通过重力从脱脂粉末中连续分离。在约50°C下减压蒸发溶剂。将400kg所接收的油溶解在约2748L包括己烷、乙醇和水的溶剂混合物中。搅拌该溶液,使有机相和水相分离。将(上部)有机相的溶剂蒸发,以减压生成磷虾油。

[0091] 将得到的油用由己烷、乙醇和水组成的相同溶剂混合物进行第二次洗涤。

[0092] 所描述的过程导致磷虾油制剂包含:PL=36.4g/100g;EPA=11.2g/100g;DHA=6.5g/100g;TMAO<1mgN/100g;游离胆碱=87.1mg/kg;甜菜碱<2mg/kg;Ca=1800mg/kg;Na=400mg/kg和以下的氨基酸组合物:

[0093]

氨基酸	g/100g
丙氨酸	<0.015
精氨酸	<0.042
天冬氨酸	<0.017
半胱氨酸	<0.006
谷氨酸	<0.021
甘氨酸	<0.019
组氨酸	<0.02
羟脯氨酸	<0.05
异亮氨酸	<0.035
亮氨酸	<0.015
赖氨酸	<0.014
甲硫氨酸	<0.024
鸟氨酸	<0.05
苯丙氨酸	<0.031
脯氨酸	<0.02
丝氨酸	<0.016
苏氨酸	<0.006
色氨酸	<0.01
酪氨酸	<0.023
缬氨酸	<0.016

[0094] 实施例2:海洋卵磷脂稳定性

[0095] 商业海洋卵磷脂的稳定性根据ICH“新药物和产品Q1A的稳定性试验”指南的推荐条件进行评估。为了长期稳定性,将海洋卵磷脂在 $25 \pm 2^\circ\text{C}/60\% \pm 5\% \text{RH}$ 下保存12个月,在加速条件下,海洋卵磷脂在 $40 \pm 2^\circ\text{C}/75\% \pm 5\% \text{RH}$ 下保存。

[0096] 在每个测试点,分析样品的过氧化值(PV)(根据美国药典<401>脂肪和固定油;EP药典5.0 2.5.5)和对茴香胺。(根据美国药典<401>脂肪和固定油的修改版本;EP药典5.0 2.5.36)

[0097] 如表1和表2所示,测试的海洋卵磷脂的稳定性没有显示任何降低,因为PV和对茴香胺水平保持低于药典接受水平。海洋卵磷脂的这种公认的稳定性的通常归因于卵磷脂中天然抗氧化剂的存在(例如磷虾油中的虾青素),并且是经常不向海洋卵磷脂中添加外源性抗氧化剂的原因。

[0098] 表1:在 $25 \pm 2^\circ\text{C}/60\% \pm 5\% \text{RH}$ 下海洋卵磷脂的稳定性数据

[0099]

月	过氧化物值($\text{meO}_2\text{q/Kg}$)	对茴香胺
0	<0.2	3.5
3	<0.2	6.0
6	<0.2	7.5

9	<0.2	2.6
12	<0.2	5.3

[0100] 表2:在40±2°C/75%±5%RH下海洋卵磷脂的稳定性数据

[0101]

月	PV (meqO ₂ /Kg)	对茴香胺
0	<0.2	3.5
1	<0.2	0.8
2	<0.2	5.4
3	<0.2	4.3
6	<0.2	7.3

[0102] 实施例3:在胃模型中本发明的海洋卵磷脂制剂与常规海洋卵磷脂相比的抗氧化性评分

[0103] 在含有2mg/ml NaCl、3.2mg/ml HCl 37%和7mg/ml胃蛋白酶(Pepsine)的模拟胃液(SGF)中,在200μM抗坏血酸和50μM FeCl₃作为氧化催化剂的情况下,将根据本发明的海洋卵磷脂制剂和常规海洋卵磷脂在37°C下摇动孵育180分钟。油的最终浓度为10mg/ml。在胃模型中孵育180分钟后分析过氧化标记物氢过氧化物(LOOH,通过Ferric-Xylenol Orange Complex-FOX测定)和丙二醛(MDA-TBA2HPLC分析)。

[0104] 结果总结在表3中,该结果表明海洋卵磷脂在体外胃模型条件下倾向于氧化,脂质过氧化产物形成混合物(LOOH和MDA)。

[0105] 为了根据其在胃模型中的抗氧化性对油进行分级,开发了评分量表。通过以下方法将每个样品按增加的抗氧化性顺序分为0至4:3mM或以下的LOOH或MDA水平被认为是低的,每个都为油提供了2分的得分。大于3并低于10mM的LOOH或MDA水平被认为是中等,得分为1。10mM或以上的LOOH或MDA水平被认为是高的,并且得分为0。总抗氧化性评分计算为LOOH和MDA评分的总和,并显示于下表3中。

[0106] 有趣的是,获得了油之间的显著差异。具体来说,向高TMAO海洋卵磷脂(>25mgN TMAO/100g磷虾油)中加入混合天然生育酚降低了氧化参数的水平,从而使抗氧化性评分从0增加到1-2。类似地,与TMAO水平高且没有加入生育酚的油(0抗性评分)相比,低TMAO水平导致油具有更高的抗性评分(1)。最重要的是,如本发明的海洋卵磷脂制剂的高抗性得分(4)所证明的,在低TMAO水平和存在生育酚之间获得协同效应。这种协同效应是意想不到的,特别是相对于出版物来说,其指出TMAO存在增强了生育酚的抗氧化活性。Ishikawa(1978)证实,在TMAO的存在下,生育酚活性得到提高,并导致对亚油酸甲酯的自氧化的抑制,而在没有TMAO的情况下观察到过氧化值的显著增加。

[0107] 类似地,Ishikawa和Yuki(1975)证明了生育酚和TMAO之间在抑制在60°C黑暗中保持的猪油氧化方面的协同作用。

[0108] 表3

[0109]

	商业磷虾油1	商业磷虾油2	商业磷虾油3	商业磷虾油4	低TMAO磷虾油	根据本发明的磷虾油	低TMAO鱼类磷脂	根据本发明的鱼类磷脂
--	--------	--------	--------	--------	----------	-----------	-----------	------------

[0110]

外源性混合天然生育酚* (mg/kg)	-	1400	-	1400	-	1400	-	1400	-	1400	-	1400
TMAO (mgN/100g)	28	28	97	97	65	65	113	113	4	4	<1	<1
在胃模型中180min时的LOOH (μmole/g)	11	4	24	19	34	26	27	12	30	2	4	0
在胃模型中180min时的MDA (μmole/g)	10	6	13	5	10	6	11	4	9	2	11	2
LOOH得分	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2
MDA得分	0	1	0	1	0	1	0	1	1	2	0	2
抗氧化性得分(LOOH和MDA得分总和)	0	2	0	1	0	1	0	1	1	4	1	4

[0111] *Cognis的Covi-OX;天然生育酚的混合物>700mg/g

[0112] 评分:MDA;LOOH≤3microM-2点

[0113] MDA;LOOH>3和<10microM-1点

[0114] MDA;LOOH≥10microM-0点

[0115] 实施例4:在胃模型中本发明的海洋卵磷脂制剂与常规海洋卵磷脂相比的ω3水平

[0116] 含有超过1000mg/kg外源性混合天然生育酚和小于5mgN/100g TMAO的根据本发明的海洋卵磷脂制剂(磷虾油)和不含外源性抗氧化剂和超过30mgN/100g TMAO的常规海洋卵磷脂(磷虾油)在含有2mg/ml NaCl、3.2mg/ml HCl 37%和7mg/ml胃蛋白酶的模拟胃液(SGF)中以及200μM抗坏血酸和50μMFeCl3作为氧化催化剂的情况下,在37℃下摇动孵育180分钟。在胃模型中孵育180分钟后分析过氧化标记物氢过氧化物(LOOH,通过Ferric-Xylenol Orange Complex-FOX测定)和丙二醛(MDA-TBA2HPLC分析)。

[0117] 结果表明,在商业海洋卵磷脂中,ω-3脂肪酸水平——EPA和DHA降低约15%。然而,根据本发明的海洋卵磷脂的检测显示胃模型孵育后EPA和DHA水平的降低低于5%。

[0118] 实施例5:选择用于本发明制剂的抗氧化剂

[0119] A. 优选的鱼油用抗氧化剂

[0120] 如实施例2所示,海洋卵磷脂在其保质期内是稳定的,因此通常在卵磷脂中不加抗氧化剂。与海洋卵磷脂相反,已知鱼油易于氧化,因此需要加入抗氧化剂(R. J. Hamilton 1998; P. K. J. P. Wandasundara等人)。

[0121] 相信由于不同的抗氧化剂通过不同的机制起作用,不同抗氧化剂的组合将产生最好的抗氧化活性。通过将四种不同的抗氧化剂(混合天然生育酚、抗坏血酸棕榈酸酯、迷迭香提取物和D-生育酚)及其组合添加到鱼油(含21%w/w EPA和52%w/w DHA)并评估称为油稳定指数(OSI)的在加速模型中的油稳定性(基于AOCs官方方法Cd 12b-92),测试该假设。

[0122] 油稳定性指数定义为在分析条件下获得氧化快速加速之前的时间长度。抗氧化性的测度通常称为诱导期。因此,较高的值预测有更长的稳定期。

[0123] 实际上,如表4所示,三种抗氧化剂的混合物表现出最好的抗氧化活性,两种抗氧化剂的混合物提供中度抗氧化活性,生育酚单独仅提供最小的活性。

[0124] 表4:添加到鱼油中的不同抗氧化剂组合的OSI结果

[0125]

样品	油中的混合天然生育酚 (mg/kg)	油中的 D-α-生育酚 (mg/kg)	油中的抗坏血酸棕榈酸酯 (mg/kg)	油中的迷迭香提取物 (mg/kg)	在 80°C 由 OSI 的诱导时间(小时)
1	1000	-	2000	3000	9.15
2	2000	-	2000	3000	8.31
3	2000	-	1000	3000	7.73
4	2000	-	2000	1500	6.71
5	-	2000	2000	3000	6.21
6	2000	-	2000	-	4.99
7	-	2000	2000	-	4.48
8	-	2000	-	-	2.82
9	2000	-	-	-	2.74

[0126]

10	-	-	-	-	2.48
----	---	---	---	---	------

[0127] 混合天然生育酚=来自Cognis的Covi-0x;12.5%抗坏血酸棕榈酸酯=来自Vitablend的Vitablend™160IP

[0128] 迷迭香提取物=来自Naturex的StabilEnhance OSR

[0129] B. 在胃模型中富含虾青素的商业磷虾油制剂的抗氧化性评分

[0130] 含有高浓度TMAO的常规磷虾油富含三种浓度的虾青素,并如实施例3所述在模拟胃液(SGF)中孵育。在180分钟后分析作为过氧化标记物的氢过氧化物(LOOH,由Ferric-Xylenol Orange Complex-FOX测定-参见上述方法)。

[0131] 结果总结在表5中,该结果确认商业磷虾油在体外胃模型条件下倾向被氧化,脂质过氧化产物形成混合物;例如氢过氧化物(LOOH)。令人感兴趣的是,虽然实施例3的结果表明,抗氧化剂(生育酚)的添加提高了抗性评分,但是即使虾青素浓度增加10倍以上,通过虾青素富集仅获得LOOH水平的最小变化。这个结果是意想不到的,特别是考虑到使用其它模型证明虾青素与生育酚相比具有更好的抗氧化活性的出版物(Hama等人2012;Miki W 1991)。

[0132] 表5

[0133]

	商业磷虾油	商业磷虾油+虾青素		
虾青素(mg/kg)	394	1394	2894	5394
TMAO(mgN/100g 样品)	65	65	65	65
LOOH , 在 180min 时 (μmole/g 油)	34	32	31	29
抗氧化性得分	0	0	0	0

[0134] C. 本发明不同海洋卵磷脂制剂的抗氧化性评分

[0135] 具有低TMAO水平的海洋卵磷脂与不同的抗氧化剂混合并在模拟胃液(SGF)中孵育。孵育180分钟后分析过氧化标记物氢过氧化物(LOOH,通过Ferric-Xylenol Orange Complex-FOX测定)和丙二醛(MDA-TBA2 HPLC分析)。

[0136] 表6中总结的结果表明,虽然所有的抗氧化剂都改善了胃模型中的抗氧化性评分(一个或两个点的升高),但只有含有生育酚的抗氧化剂导致氧化分数提高了3到4个点。令人感兴趣的是,如果生育酚是唯一添加的抗氧化剂,或者如果将生育酚作为抗氧化剂混合物的一部分加入,则抗氧化性评分是相当的。鉴于使用抗氧化剂混合物观察到的增加鱼油稳定性的优点,这一结果是出人意料的。

[0137] 表6

[0138]

抗氧化剂			海洋卵磷脂制剂中外源性抗氧化剂 浓度 (mg/kg)	LOOH ($\mu\text{mol/g}$ 脂质, 在180min时)	MDA ($\mu\text{mol/g}$ 脂质, 在180min时)	LOOH评分	MDA评分	抗氧化性评分
抗氧化剂名称	生产商	活性成分						
Covi-0X	Cognis	混合的天然生育酚 >70%	2000	2	3	2	2	1
Covi-0X StabilEnhance OSR 5% Vitablend [®] 1601 P	+ - + -	混合的天然生育酚 >70%; 迷迭香提取物, 鼠尾草酸> 5%; 12.5%抗坏血酸棕榈酸酯, 2.5%D,L- α -生育酚, 35%卵磷脂, 50%葵花籽油	2000; 3000; 2000	2	2	2	2	1
D- α -生育酚	HSF Biotech	生育酚>99%	2000	4	3	1	2	3
StabilEnhance	Naturex	迷迭香提取物; 鼠	3000	6	4	1	1	2

[0139]

OSR 5%		尾草酸>5%						
Origanox	Frutarom	来源于食用草本植物 种牛至 (Origanum Vulgare) 和维莉 姪 (Melissa Officinalis) 的 油溶性植物提取物	2000	10	5	0	1	1
Origanox WS-T	Frutarom	茉莉花 (Jasmine officinalis) 水 溶性天然提取物	2000	5	5	1	1	2
GREENOX-0	Shiran Representatives 2008 Ltd	一种“天然绿色” 植物提取物, 经 纯化 以 产生富含多酚的混 合物	2000	9	7	1	1	2
葡萄籽干提取物	Biosearch life	90%多酚葡萄 (vi tis.vinifera L.)	2000	7	6	1	1	2
Polyfence™油	Martech Research LLC	水果提取物和天然 抗氧化剂的共混物	2000	10	8	0	1	1
Hydrolive + 粉末油橄榄 (ole a eurpaea L)	Biosearch life	水果提取物	2000	9	7	1	1	2
NexOlive	Nexira	橄榄调味粉末	2000	8	7	1	1	2
越桔提取物花青 素	HSF Biotech	花青素≥25%	2000	9	5	1	1	2
西伯利亚人参提	HSF Biotech	E1 eutherosi des	2000	14	6	0	1	1

[0140]

取物		(B+E)>0.8%						
蔓越莓提取物	HSF Biotech	水果提取物	2000	8	8	1	1	2
叶黄素80%HSF	HSF Biotech	叶黄素>80%; 玉米黄质<10%	2000	13	7	0	1	1
PROVINOLS™红葡萄酒提取物	Vitimed	红葡萄酒提取物, 由赤霞珠 (Cabernet-Sauvignon) 红多酚组成, 95%总多酚	2000	12	7	0	1	1
Vitablend 160IP	Vitablend	12.5%抗坏血酸棕榈酸酯; 2.5%D,L- α -生育酚; 35%卵磷脂; 50%葵花籽油	2000	13	6	0	1	1
无	-	-	0	29	19	0	0	0