

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/35

A61K 31/12 A61K 35/78

A23L 1/28 A23L 1/29

A23L 2/66 A23C 9/152

A61P 9/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98108956.9

[43] 授权公告日 2003 年 3 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1102847C

[22] 申请日 1998.5.22 [21] 申请号 98108956.9

[30] 优先权

[32] 1997. 9. 19 [33] US [31] 933788

[71] 专利权人 蛋白质技术国际公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 S·M·波特 E·C·亨利

D·H·韦格尔

[56] 参考文献

US548631 1996.03.12 A61K3135

CA 124:85511 1996-01-01 ANTHONY, MARY S,
SOBEAN ISOFLAVONE IMPROVE CARDIO - VASCULAR
RISK FACTORS WITHOUT AFFECTING THE REPRODUT

审查员 张 伟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 1 页 说明书 18 页

[54] 发明名称 含有大豆黄素物质的药物或营养制
剂

[57] 摘要

本发明提供了改变人体血液中胆固醇成分浓度的方法。将大豆黄素物质施用到人体以增加 HDL - 胆固醇的浓度, 并降低血液中 LDL - 胆固醇的浓度。可以将大豆黄素物质以药物组合物的形式施用, 或者以饮食添加物(包括以大豆蛋白为基础的饮食添加物)的形式施用。使用大豆黄素物质增加血液中的 HDL - 胆固醇浓度和降低 LDL - 胆固醇浓度是通过提供更多对健康有益的 HDL - 胆固醇和降低引起粥样硬化的 LDL - 胆固醇浓度而减少粥样硬化和血管疾病发生的危险。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种药物或者营养制剂，所说的药物或者营养制剂用于改变人血液中胆固醇脂蛋白成分的浓度以减少粥样硬化和血管疾病危险的方法，目的在于增加所说的人血液中的高密度脂蛋白胆固醇的浓度，其特征在于所说的药物或者营养制剂含有大豆黄素物质。

2. 按照权利要求1的用于所说的方法中的药物或者营养制剂，其中每单位剂量中含有10mg至1000mg所说的大豆黄素物质。

3. 按照权利要求2的用于所说的方法中的药物或者营养制剂，其中每单位剂量中含有30mg至500mg所说的大豆黄素物质。

4. 按照权利要求3的用于所说的方法中的药物或者营养制剂，其中每单位剂量中含有50mg至300mg所说的大豆黄素物质。

5. 按照权利要求1的制剂，这种制剂是将所述大豆黄素物质以富含大豆黄素的大豆蛋白物质的形式加入到其中的饮食添加物。

6. 按照权利要求5的制剂，这种制剂是含有所说的大豆蛋白物质的饮料。

7. 按照权利要求5的制剂，这种制剂是含有所说的大豆蛋白物质的食物条。

8. 按照权利要求5的制剂，这种制剂是含有所说的大豆蛋白物质的酸乳。

9. 按照权利要求1的制剂，这种制剂是含有所说的大豆黄素物质的酸乳，其中所述大豆黄素物质是以富含大豆黄素的大豆蛋白物质的形式加入到制剂中的。

10. 按照权利要求1或2的制剂，这种制剂是含有所说的大豆黄素物质的药物组合物，其中所述大豆黄素物质是以富含大豆黄素的大豆蛋白物质的形式加入到制剂中的。

11. 按照权利要求10的制剂，这种制剂是药丸或者胶囊。

含有大豆黄素物质的药物或营养制剂

发明背景

本发明涉及大豆黄素和它的代谢物(0-去甲基安哥拉紫檀素和二氢大豆黄素)，这种物质在通过增加高密度脂蛋白胆固醇的浓度和降低低密度脂蛋白胆固醇的浓度来改变人血液中的胆固醇成分浓度上是有用的。血液中高密度和低密度的脂蛋白胆固醇浓度的变化减少了粥样硬化和血管疾病的危险。

心血管疾病是导致发病和死亡的主要原因(尤其是在美国和西欧国家)。和心血管疾病成因有关的因素包括遗传因素、性、生活方式因素(例如吸烟和饮食)、年龄、高血压和高脂血(包括高胆固醇血)。其中一些因素，特别是高脂血和高胆固醇血容易引起粥样硬化(心血管疾病的主要原因)的发生。

高胆固醇浓度是人类血管疾病和冠状心脏病的主要危险因素之一。升高的低密度脂蛋白胆固醇(此后称为“LDL-胆固醇”)和总胆固醇与冠状心脏病增加的危險直接相关。(胆固醇和死亡率：Framingham 的 30 年不断的研究，Anderson, Castelli, 和 Levy, JAMA, Vol. 257, pp. 2176-80(1987))。

虽然高水平的总胆固醇和 LDL-胆固醇是发生粥样硬化和血管疾病的危险因素，但是最近认为缺乏高密度脂蛋白胆固醇(此后称为“HDL-胆固醇”)是发生这些状况的危险因素。几例临床试验提供了 HDL-胆固醇抗粥样硬化的保护性作用。一项研究表明在妇女血液中每增加 1-mg/dl 的 HDL-胆固醇，冠状血管疾病发生的危險减少 3%(高密度脂蛋白胆固醇和心血管疾病：四个有前景的美国研究，Gordon, Probstfield, 和 Carrison 等，循环，Vol. 79, pp. 8-15(1989))。

CA124: 85511 公开了用于降低心血管疾病风险的大豆异黄酮类，并教导某些大豆异黄酮(如植物雌激素)可调节猴的体内胆固醇水平，尤其是可明显升高雌性的 HDLC，并降低其 LDLD。

在饮食中用摄取植物蛋白质取代动物蛋白质，这和低的冠状心脏病发生相关，这可以使血清胆固醇水平降低。已知植物蛋白质物质，

特别是大豆蛋白质物质能降低动物血液中的总胆固醇和 LDL-胆固醇水平。最近对人类血清脂类的大豆蛋白质吸收效应的 meta-分析表明饮食中的大豆蛋白质与人总胆固醇及 LDL-胆固醇的血清浓度降低显著相关,而没有明显地影响 HDL-胆固醇浓度(对血清脂类的大豆蛋白质吸收效应的 meta-分析: Anderson, Johnstone, 和 Cook-Newell, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 333, No. 5, pp.276-82(1995))。认为大豆蛋白质中的植物雌激素(Phytoestrogens)是作为大豆蛋白质的血胆固醇减少效应的潜在重要因子。

植物雌激素(如在大豆中发现的)是一种在结构上类似于来源于植物的雌激素的化合物。已经确定了雌激素本身是一种重要的心脏保护性因子。绝经后的妇女采取雌激素替代治疗结果能减少冠状心脏病和心肌梗塞的发生。认为雌激素能减少冠状心脏病发生的危险的一种机理是通过血液中致动脉粥样硬化的化合物(如 LDL 胆固醇)浓度的雌激素减少来抑制粥样硬化的发展。然而,对雌激素缺乏的妇女施用雌激素与乳房和子宫内膜癌的发生增加有关,从而限制了使用雌激素作为血管和心脏的保护药剂。

植物雌激素,特别是来源于大豆和苜蓿的异黄酮(例如染料木黄酮、大豆黄素、黄豆黄素、它们的糖苷衍生物、鹰嘴豆素和芒柄花黄素)在一些哺乳动物和人组织中表现出雌激素的性质,并且在其它的组织中通过在雌激素的受体位点竞争性地抑制雌激素表现出抗雌激素的性质。和雌激素不同,这些异黄酮植物雌激素和癌的发生增加无关,并且实际上能抑制乳房和子宫癌的发展。

最近的研究已经确定了这些异黄酮能降低动物血液中的总胆固醇和 LDL-胆固醇的浓度,并因此能抑制或者减缓粥样硬化的发展。这些异黄酮对人血液中胆固醇水平的影响还不太清楚(如在 meta-分析所示),然而异黄酮降低血液中总胆固醇与 LDL-胆固醇浓度是一定的。

尽管在开发用于降低人血液中总胆固醇和 LDL-胆固醇的化合物和方法上取得了进步,但仍然需要能够安全地提供对血液中的胆固醇水平的这些作用以降低粥样硬化和血管疾病发生的危险的其它化合物。还需要开发用于增加人血液中 HDL-胆固醇水平以提供这种胆固醇保护

心脏的作用的化合物和方法。

发明概述

本发明提供了改变人血液中胆固醇成分浓度以减少粥样硬化和血管疾病发生危险的方法。将含有大豆黄素的物质以有效的量施用到人体以增加人血液中 HDL-胆固醇的浓度并减少 LDL-胆固醇的浓度。

在本发明的一个实施方案中，将大豆黄素以大豆蛋白质物质饮食添加物的形式施用到人体。

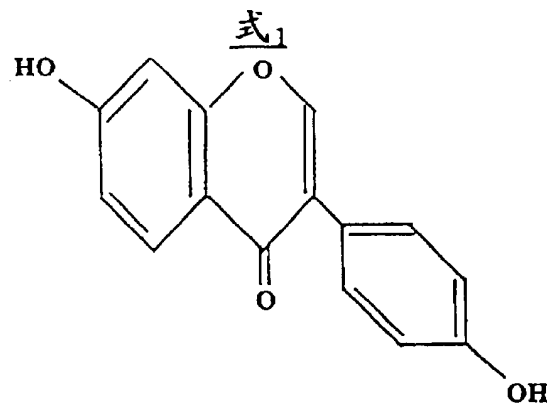
在本发明的另一个实施方案中，将大豆黄素以药物组合物的形式施用到人体。

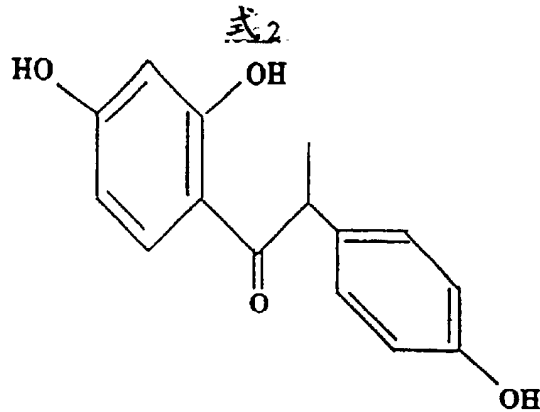
在另一个实施方案中，施用含有大豆黄素的物质以引起人血液中的 O-去甲基安哥拉紫檀素的浓度增加。

在另一方面，本发明是一种改变人血液中胆固醇成分浓度以减少粥样硬化和血管疾病发生危险的方法，其中将大豆黄素物质以一有效的量施用到人体以增加人血液中的 HDL-胆固醇的浓度。

优选实施方案的描述

本发明是关于大豆黄素(下面的式 1)的浓度和大豆黄素的代谢物，特别是 O-去甲基安哥拉紫檀素(式 2)的发明，在人血液中，大豆黄素的消耗量与血液中 HDL-胆固醇浓度增加以及非 HDL 胆固醇浓度的减少有明显的关系，大豆黄素的消耗量和在血液中胆固醇浓度的这些变化比和其它存在于大豆中的异黄酮的关系更显著。本发明包括大豆黄素在人体中的治疗应用，通过增加血液中 HDL-胆固醇浓度和减少 LDL-胆固醇浓度来抑制粥样硬化和血管疾病的发展。





大豆黄素是天然存在的物质，其主要存在于植物(如豆科植物、苜蓿、 kudzu vine(葛根)的根中。大豆黄素的一般豆科植物来源包括大豆、鹰嘴豆和各种类型的大豆和豌豆。大豆黄素的首蓿来源包括红苜蓿和地下苜蓿。大豆是特别优选的大豆黄素来源。

可以从天然存在或者合成制备的植物来源分离大豆黄素。可以如 Wong(食品农业科学杂志, Vol.13, P. 304(1962))公开的从红苜蓿分离大豆黄素或者如 Ganguly 和 Sarre(Chem & Ind. (London), p. 201(1970))提供的从霉菌盐生植小单孢菌中分离大豆黄素，以上的两篇参考文献本文一并参考。可以通过 Baker 等(化学协会杂志, p. 274(1933))、 Wesley 等(Ber. Vol. 66, p. 685(1933))、 Mahal 等(化学协会杂志, p. 1769(1934))、 Baker 等(化学协会杂志, p. 1852(1953))或者 Farkas(Ber. Vol.90, p. 2940(1957)(每一篇参考文献本文一并参考))提供的方法通过合成来制备大豆黄素。大豆黄素是市售的，并且能够买到，例如从 Indofine 化学公司(P.O. BOX473, Somerville, 新泽西, 08876)可以买到。

在优选的实施方案中，从大豆物质中分离大豆黄素。可以从其中分离出来大豆黄素的大豆物质包括：大豆、去荚的大豆、大豆粗粉、大豆粉、大豆石细胞团、大豆片(全脂和脱脂)、大豆糖浆、大豆蛋白浓缩物、大豆乳清、大豆乳清蛋白和大豆蛋白质分离物。在一个实施方案中，含有大豆黄素的异黄酮是利用低分子量的有机萃取剂(优选的是醇、乙酸乙酯、丙酮或醚，最优选的是乙醇或甲醇水溶液)从大豆、去荚的大豆、大豆粗粉、大豆粉、大豆石细胞团、大豆片、大豆蛋白浓缩物、大豆乳清蛋白或大豆蛋白分离物中分离出来的，最优选的是从大豆粗粉、大豆粉、大豆石细胞团、大豆片中分离出来的。最优选

的萃取剂具有同大豆蛋白等电点大约相同的 pH(大约 pH4 或 pH5) 以使通过大豆萃取剂提取的大豆蛋白的量减到最少。

从不溶的大豆物质中分离含有异黄酮的萃取剂以形成富含异黄酮的提取物, 通过将提取物与能吸附提取物中异黄酮的物质相接触, 用从吸附剂物质中特异洗脱异黄酮的溶剂把吸附的异黄酮从吸附剂物质中洗脱出来, 将大豆黄素与提取物中的其它异黄酮和杂质分离。

在优选的实施方案中, 通过常规的反相高效液相色谱 (“HPLC”) 分离法将大豆黄素与提取物中的异黄酮和杂质分离。在从大豆物质中提取出异黄酮和从不溶的大豆物质中分离出提取物后, 将提取物过滤以便除去可能堵塞 HPLC 柱的不溶性物质。用能够与大豆黄素及提取物中其它的异黄酮和杂质以一种化合物特异性方式可释放性地结合的颗粒吸附剂物质包装常规市售的 HPLC 柱来制备 HPLC 柱。吸附剂可以是任何的反相 HPLC 填柱物质, 然而, 可以通过载荷量、分离效能和成本等标准来选择优选的填柱物质, 这样一种优选的填柱物质是从 Eka Nobel, Nobel 工业公司(瑞典)得到的 Kromasil C18 16 μ m 100Å 珠。

将过滤的提取物通过填好的 HPLC 柱, 直到柱的所有结合位点全都和异黄酮结合为止, 这可以通过柱的流出物中出现异黄酮来检测。然后可以用溶剂洗脱 HPLC 柱以进行分离。在优选的实施方案中, 洗脱液是极性溶剂, 例如乙醇、甲醇、乙酸乙酯或者乙腈, 优选的是含水的醇, 醇的含量在大约 30 % 至大约 90 % 之间, 最优选的是大约 50 %, 最优选的醇是乙醇。

从柱流出物中分别收集大豆黄素物质、其它异黄酮物质和杂质。可以根据常规 HPLC 和分析化学技术将洗脱液中的大豆黄素组分与其它洗脱液组分区分开来。含有大豆黄素的洗脱液组分中的配基异黄酮物质先从柱中洗脱出来, 接下来是黄豆黄素组分, 然后是更极性的染料木黄酮。

可以从柱中收集洗脱液的大豆黄素组分, 可以通过蒸发除去易挥发的溶剂(例如醇)。如果所有的溶剂都能通过蒸发除去, 那么可以直接回收大豆黄素物质, 或者可以通过冷却剩下的溶剂(如水)和离心或过滤剩下的溶剂来回收大豆黄素物质。

在特别优选的实施方案中，在将与其它的异黄酮分离前，大豆黄素的异黄酮葡糖苷—黄豆甙和大豆黄素的异黄酮缀合物—6'-O-丙二酰黄豆甙(6'-O-Mal 黄豆甙)以及 6'-O-乙酰黄豆甙(“6'-O-Ac 黄豆甙”)转化成大豆黄素，因此增加了回收的大豆黄素物质的量。异黄酮缀合物和大豆黄素的葡糖苷转化为大豆黄素可以发生在大豆底物中(在提取前要从大豆底物中提取大豆黄素)，或者可以发生在富含异黄酮的提取物中(在从不溶的大豆物质分离提取物之后)。

优选地，通过形成大约为 pH 8-13(优选的 pH 大约为 9-11)的大豆底物的含水碱性溶液(从此溶液中提取异黄酮)，在大约 25 °C 至大约 75 °C 将含水的碱性溶液处理一段时间(优选的大约为 30 分钟至 5 小时)以使至少大部分的大豆黄素异黄酮缀合物转化为大豆黄素，使大豆黄素的异黄酮缀合物转化为异黄酮葡糖苷黄豆甙。最优选地，在大约 pH 11、温度为大约 35 °C、处理大约 45 分钟将大豆黄素异黄酮缀合物转化为大豆黄素。

基本上所有的异黄酮葡糖苷黄豆甙都可以转化为大豆黄素，优选的是在大豆黄素的异黄酮缀合物转化为黄豆甙之后。通过将黄豆甙与能够切割 α 1, 4- β 糖苷键的酶(优选的是市售的 β -葡糖苷酶、 α 或 β -半乳糖苷酶、果胶酶、乳糖酶或葡萄糖淀粉酶)接触将黄豆甙转化为大豆黄素，此转化发生在使酶活化的 pH 下(一般从大约 pH3 到大约 pH9)、大约 25 °C 至 75 °C 的温度下和能够发生转变的一段时间(一般大约 1 小时至 24 小时，更优选的为大约 1 小时至 3 小时)。

在大豆黄素的异黄酮缀合物和黄豆甙转化为大豆黄素后，可以按照以上所述的方法将大豆黄素从大豆底物中提取出来并从提取物中分离出来。大豆黄素的异黄酮缀合物和黄豆甙转化为大豆黄素明显地增加了通过分离方法可回收的大豆黄素的量，因为大量大豆黄素的异黄酮缀合物和黄豆甙存在于大豆物质中。

可以将大豆黄素以药物制剂的形式施用到人体内，以降低血液中的 LDL-胆固醇浓度和增加 HDL-胆固醇浓度来减少粥样硬化和血管疾病的危险。可以通过本领域熟知的方法制备由任何以上所述的方法得到的或从商业途径买到的掺加大豆黄素的药物制剂。例如可以将大豆黄

素配制成片剂、胶囊、粉剂、悬浮液、非肠道使用(包括静脉内、肌肉内和皮下使用)的溶液和与常规载体、粘合剂、稀释剂、赋形剂一起经皮定点使用的溶液。

按照本发明的用于形成药物制剂的药理学上可接受的情性载体包括淀粉、甘露糖醇、硫酸钙、磷酸二钙、硬脂酸镁、硅的衍生物和/或糖类(如蔗糖、乳糖、葡萄糖)等。粘合剂包括羧甲基纤维素和其它纤维素衍生物、明胶、天然及合成的树脂(包括藻酸盐如藻酸钠、聚乙二醇、蜡等)。用于本发明的稀释剂包括合适的油、盐水、糖溶液(如含水的右旋糖或含水的葡萄糖)和二醇(如聚乙二醇或聚丙二醇)。其它的赋形剂包括润滑剂如油酸钠、乙酸钠、硬脂酸钠、氯化钠、苯甲酸钠、滑石和硬脂酸镁等;崩解剂包括琼脂、碳酸钙、碳酸氢钠、淀粉、黄原胶等;吸附性载体如皂土和陶土等。也可以将着色剂和调味剂加入到药物制剂中。

也可以将大豆黄素以饮食添加物的形式施用到人体内,以降低血液中的 LDL-胆固醇浓度和增加 HDL-胆固醇浓度来减少粥样硬化和血管疾病的危险。在制备食品的过程中,可以将各种来源的大豆黄素加入到食物中来制备掺加大豆黄素的饮食添加物。可以加入大豆黄素的食品包括几乎所有的食品。例如,可以加入大豆黄素的食品包括(但不限于)肉(如切碎的肉、乳化肉、腌肉和注射大豆黄素的肉)、饮料(如有营养的饮料、运动饮料、加入了蛋白质的饮料、果汁、牛奶、牛奶替代品和减重饮料)、乳酪(如硬乳酪和软乳酪、奶油乳酪和白(cottage)乳酪)、冷冻的甜食(如冰激凌、冷冻牛奶、低脂肪冷冻甜食、和不含奶制品的冷冻甜食)、酸乳、汤、布丁、烘烤产品、色拉调味剂、酱(dip)和涂抹食品(如蛋黄酱和 chip dips)。加入到食品中的大豆黄素可选的量大小以能够向食物消费者中提供所需剂量的大豆黄素为依据。

也可以将大豆黄素以富含大豆黄素的大豆蛋白物的形式加入到饮食添加物制剂施用,以降低血液中的 LDL-胆固醇浓度和增加 HDL-胆固醇浓度来减少粥样硬化和血管疾病的危险。由市售的脱脂大豆片制备富含大豆黄素的大豆蛋白质物质的一种方法是用含水的碱性溶液提取大豆片,含水的碱性溶液一般为大约 pH 8-10(优选的是大约 pH 9-10)

的氢氧化钙或氢氧化钠溶液；从不溶的大豆物质分离提取物以便形成含有大豆黄素、蛋白质以及大豆片中其它的含水碱性可溶性组分的含水提取物。然后将提取物用酸(优选的是无机酸)处理以使提取物的 pH 降至大约为蛋白质的等电点, 优选的是大约 pH4-5, 最优选的是大约 pH4.4-4.6, 由此从提取物中沉淀出含有大量大豆黄素的蛋白质凝乳。优选地, 如上所述将大豆黄素的异黄酮缀合物和黄豆甙转化成大豆黄素以增加沉淀的蛋白质凝乳中捕集的大豆黄素的量。然后, 优选地通过离心从提取物中分离出蛋白质凝乳, 并干燥以形成蛋白质分离物。优选地, 与产生蛋白质分离物的常规方法不同, 可不用水洗涤凝乳或者用最小量的水洗涤凝乳, 以使从蛋白质分离物中损失的大豆黄素的量降至最小。

产生富含大豆黄素的大豆蛋白质物质的其它方法包括如上所述在大豆蛋白浓缩物和大豆乳清蛋白质物质中将黄豆甙和大豆黄素的异黄酮缀合物转化成大豆黄素。

要施用的大豆黄素的具体的剂量应该能有效地降低血液中的 LDL-胆固醇浓度和增加 HDL-胆固醇浓度, 并且将取决于施用途径和其它的产生粥样硬化或者血管疾病的危险因素, 例如遗传因素、血浆胆固醇和脂质浓度。一般可接受的有效的每日剂量可以为大约 10-1000 mg/天, 更典型的大约 30-500 mg/天, 最优选的大约 50-300 mg/天。

应以有效的量施用大豆黄素来增加被施用大豆黄素的人的血液中的 O-去甲基安哥拉紫檀素的浓度。优选地, 也应该以能有效增加施用大豆黄素的人的血液中二氢大豆黄素浓度的量施用大豆黄素。O-去甲基安哥拉紫檀素和二氢大豆黄素是通过人体在大豆黄素分解代谢中产生的两种代谢物。参见“饮食中植物雌激素在尿中的分布研究”, 新型异黄酮的鉴定和代谢方式, Joannou 等, 类固醇生物化学和分子生物学杂志, Vol. 54, No. 3/4, pp.167-84 (1995), 本文一并参考。在本发明中, 已经发现在施用大豆黄素后, 血液中 O-去甲基安哥拉紫檀素和二氢大豆黄素的浓度, 特别是 O-去甲基安哥拉紫檀素的浓度与血液中 HDL-胆固醇水平的增加和 LDL-胆固醇水平的减少明显相关。

下列非限制性的制剂说明了可以按照本发明的方法使用的含有大

大豆黄素的药物和饮食制剂。

制剂

下面的制剂 1-4 说明了含有大豆黄素的药物制剂。在制剂中，“活性成分”是指大豆黄素。

制剂 1

明胶胶囊

使用下列组分制备了硬明胶胶囊：活性成分 10-1000 mg/胶囊；淀粉，NF 0-600 mg/胶囊；淀粉流动粉 0-600mg/胶囊；聚硅氧烷液体 350 厘沱 0 - 20mg/胶囊。将成分混合、过筛，并装入胶囊。

制剂 2

片剂

使用下列组分制备了片剂：活性成分 10-1000 mg/片；微晶纤维素 20-300 mg/片；淀粉 0-50 mg/片；硬脂酸镁或硬脂酸 0-15mg/片；二氧化硅(发烟的) 0-400 mg/片；二氧化硅(胶体) 0-1mg/片和乳糖 0-100 mg/片。将组分混合并压制成片剂。

制剂 3

悬浮液

使用下列组分制备了悬浮液：活性成分 10-1000 mg/5ml；羧甲基纤维素钠 50-700 mg/5ml；苯甲酸钠 0-10mg/5ml；纯水 5ml；如需要，可使用调味剂和生色剂。

制剂 4

非肠道施用的溶液

通过在 10 % (体积) 丙二醇和水中搅拌 1.5 % (重量) 的活性成分来制备肠道外组合物。用氯化钠将溶液配制成等渗溶液并灭菌。

下面的制剂 5-8 说明了可以使用分离的富含大豆黄素的大豆蛋白制备的饮食添加物。在下面的例子中分离的富含大豆黄素的大豆蛋白一般每克含有大约 1 至 3 毫克的大豆黄素。

制剂 5

备饮饮料

用下面的成分制备备饮饮料：

成分	组分的百分比(重量)
水	80-85
富含大豆黄素的分离的大豆蛋白	10-15
蔗糖	5-8
可可	0.1-1
维生素/矿物质	0.1-1
调味剂	0.1-1
纤维素凝胶	0.1-0.5

这种饮料可以分装成每份 8 盎司，其中含有大约 20 克分离的大豆蛋白(其中包括大约 20 至 60 毫克大豆黄素)。

制剂 6

粉末饮料

用下面的成分制备粉末饮料:

成分	组分的百分比(重量)
富含大豆黄素的分离的大豆蛋白	85-90
蔗糖	8-15
麦芽糖糊精	1-5
维生素/矿物质	0.5-2
天冬甜素	0-0.5
调味剂	0-0.5

可以将 30 克的粉末饮料加入水中制备含有大约 20 克分离的大豆蛋白(其中包括大约 20 至 60 毫克大豆黄素)的一份制剂。

制剂 7

食物条

使用下列组分制备食物条:

成分	组分的百分比(重量)
富含大豆黄素的分离的大豆蛋白	20-30
玉米糖浆	35-45
稻米糖浆固体	7-14
甘油	1-5

可可	2-7
化合物包衣	15-25

食物条每份 70 克, 含有大约 15 克分离的大豆蛋白(其中包括大约 15 至 45 毫克大豆黄素)。

制剂 8

大豆酸乳

使用下列组分配制大豆酸乳:

成分	组分的百分比(重量)
水	65-75
富含大豆黄素的分离的大豆蛋白	5-15
蔗糖	3-8
玉米淀粉	1-5
糊精	0.3-1
纤维素凝胶	1-3
培养物(酸乳)	0.01-0.1
水果	10-20
维生素/矿物质	0.05-0.3

大豆酸乳每份 170 克, 含有大约 8 克的大豆蛋白质(其中含有大约 18-大约 24 毫克的大豆黄素)。

下列的非限制性试验实施例说明了本发明的方法。

实施例 1

对于异黄酮染料木黄酮、大豆黄素和黄豆黄素对绝经后的妇女血液中 HDL-胆固醇、非 HDL 胆固醇、总胆固醇浓度的影响, 进行了时间长达 6 个月的研究。如果在二者之间存在明显的关系, 在统计学上异黄酮和它们代谢物的浓度与测定到的产生的胆固醇水平相关。

选择了六十六个血胆固醇过多的绝经后妇女进行统计研究, 这些妇女自从最后一个月经期至少有整整一年的绝经期, 并且血浆胆固醇的含量在 6.2 和 7.8 mmol/L 之间。在开始研究的前两周, 对每一个妇女进行两天摄取饮食记录, 并且和注册的饮食学家面谈以计算在国家胆固醇教育计划第 I 步的基本低脂肪、低胆固醇饮食情况下每一个人

每天的能量需求。给每一个受治疗者一本由美国心脏协会出版的具有长的食物目录的小册子，这个小册子还列出了已计算好的符合基本日常饮食标准的"限定的脂肪克数"。

对于所有受治疗者给予至少十四天的基本饮食。此后，分别在两天抽出基线血液样品，并将受治疗者随机地分成饮食治疗小组。所有三个小组继续给予基本饮食，并在他们的饮食中加入四十克的试验蛋白质。试验蛋白质分别为如下：含有中等水平异黄酮的分离的大豆蛋白质(St. Louis (Missouri) 国际蛋白质技术公司的 Supro® 675，其含有 1.39mg 异黄酮/g 蛋白质，其中的异黄酮是染料木黄酮、大豆黄素、黄豆黄素、和它们各自的葡萄糖苷和丙二酰以及乙酰缀合物)，这里被命名为"ISP"组；含有较高水平异黄酮的分离的大豆蛋白质(2.25mg 异黄酮/g 蛋白质，其中的异黄酮是染料木黄酮、大豆黄素、黄豆黄素、和他们各自的葡萄糖苷和丙二酰以及乙酰缀合物)，这里被命名为"ISP+"组；或者酪蛋白/无脂肪干牛奶(0mg 总异黄酮/g 蛋白质，新西兰牛奶产品公司，Wellington, 新西兰)，在这里被命名为"酪蛋白"组。在 ISP 和 ISP+ 蛋白质中添加钙以提供每天 800 至 900mg 磷酸钙的形式的钙，钙的量与酪蛋白组通过奶制品成分提供的钙的量一致。

ISP、ISP+和酪蛋白组蛋白质中的异黄酮含量如下面的表 1 所示。

表 1

异黄酮	ISP+异黄酮	ISP 异黄酮	酪蛋白异黄酮
	(mg/100g 产物)	(mg/100g 产物)	(mg/100g 产物)
黄豆甙	16.8	40.1	0
6'-O-Mal 黄豆甙	31.5	54.4	0
6'-O-Ac 黄豆甙	0	5.2	0
大豆黄素	4.3	3.6	0
总大豆黄素(配基单位)	30.5	58.5	0
mg/g 蛋白质	0.44	0.82	0
染料木黄酮	35.3	66.4	0
6'-O-Mal 染料木黄酮	58.9	80.4	0
6'-O-Ac 染料木黄酮	0	0	0
染料木黄酮	6.2	4.5	0
总染料木黄酮(配基单位)	59	87.9	0
mg/g 蛋白质	0.84	1.23	0
Glycitin	3	5.7	0
6'-O-Mal Glycitin	5.5	8.2	0
黄豆黄素	3	7.2	0
总黄豆黄素(配基单位)	7.8	15.2	0
mg/g 蛋白质	0.11	0.21	0

受治疗者每天消耗的组合物提供 40g 的试验蛋白质。研究出了加入酪蛋白和大豆蛋白质分离物的面包产品的各种食谱，并制成了产品，施用于受治疗者。也使用含有分离的大豆蛋白质和酪蛋白的备混饮料和汤。

在本项研究的整个过程中，由注册的饮食学家指导所有受治疗者保持体重、日常活动、饮食需要和可用的食品以及摄入的饮料。每隔 4 周，随机地选择 3 天(包括 2 个平日和 1 天周末)，要求受治疗者记录 3 天摄入的饮食。使用营养分析软件程序(营养学家 IV, 3.0 版; N-平方

计算, Salem Park, OR)分析每天实际摄入的营养。每周利用天平称量体重,以予以每周校准。利用受治疗者的3天食物摄取记录的活动报告评价每天的日常活动。

在不连续的2天中(在两周适应时期(基线)和每6周(整个研究共24周)结束时),在禁食12小时后,将受治疗者的血液样品收集到含有肝素、EDTA和没有抗凝剂的管中。4℃下在1190 x g下离心15分钟分离血浆和血清。

按照如下的方法测量收集的样品中HDL、HDL₂、HDL₃(总“HDL-胆固醇”)、总血浆胆固醇(“TC”)和非HDL胆固醇(LDL-胆固醇+极低密度脂蛋白胆固醇(“VLDL-胆固醇”)、大多数非HDL胆固醇是LDL-胆固醇)、脱辅基脂蛋白A-I和B的水平。立即通过肝素-Mn²⁺沉淀分离HDL和HDL₃脂蛋白组分,将血浆血清样品分别以等分试样存储用于以后的分析。使用自动技术(Boehringer Mannheim Hitachi 704自动分析仪,Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO; Raichem, San Diego, CA)定量总血浆胆固醇(“TC”)HDL、HDL₃、脱辅基脂蛋白A-I和B的水平。通过使用CDC或国际谷物化学家联盟(IFCC)已知浓度的质量对照血浆样品(西北脂质研究实验室,Seattle, WA)检验血浆测量方法的准确度。通过从TC中减去HDL计算非HDL胆固醇。从HDL和HDL₃组分之间的差得到HDL₂值。

使用多元线型回归分析评价饮食添加物对总胆固醇、HDL胆固醇、非HDL胆固醇以及饮食摄入、身体质量指数、日常活动的影响。使用两个虚假编码(dummy-coded)的变量(一个将ISP+饮食与酪蛋白饮食对比,另一个将ISP饮食与酪蛋白饮食对比)表明了处理效果。在每一个分析中,结果变量的基线值包含在模型中作为协变量。通过Weigel和Narvaez(对照的临床试验,Vol.12, pp. 378-94(1991))概述的方法检验通过协变量交互作用的处理。如果不存在显著的交互作用,将交互作用一词从模型中删除。通过对剩余值对预测值标绘图检查来评价剩余方差的正常性和均一性的回归模型假定。通过检验18周、12周和6周的显著性处理效应的存在和按顺序进入早期时间(只有在后期已经确定了显著效应时)来连续检测效应的短暂开始。此外,

通过单向方差分析对每组之间每一时刻在营养摄入、日常活动、身体质量指数 (ht/wt^2) 的差异进行比较。使用成对的 T-测验评价每组内基线的变化。此外, 对所有基线量度和可测量的能够评价组间均一性的受治疗者特征进行了方差分析。所有统计方法是利用统计分析系统 (SAS 研究所公司, Cary, N. C.) 来进行的。在所有的统计测验中使用了 $\alpha_{0.05}$ 水平。

单向方差分析表明, 在饮食摄入中除了蛋白质外, 任何选择的营养物没有显著性差异。和所有三组 (ISP、ISP + 和酪蛋白) 的基线相比, 在 24 周摄入的蛋白质明显地增加。在身体质量指数和日常活动方面, 三个组中都没有显著的变化。

ISP 饮食、ISP + 饮食和酪蛋白饮食对总胆固醇、非 HDL 胆固醇、HDL-胆固醇、HDL₂-胆固醇、HDL₃-胆固醇影响的评价测量值列于下面的表 2, 也列出了统计分析结果的标准偏差值。同时此表也包含每种饮食值的调整平均偏差 (“AMD”) 和可能值 (“p-值”)。

表 2

总胆固醇 (mmol/L)	ISP	ISP+	酪蛋白	AMD	p-值
0 周	6.57±.85	6.47±.88	6.26±.67		
6 周	6.23±.91	6.08±.80	6.03±.70	不显著	---
12 周	6.34±.98	6.13±.75	6.10±.65	不显著	---
18 周	6.10±1.11	6.13±.85	5.90±.62	不显著	---
24 周	6.18±.91	6.13±.91	6.08±.72	不显著	---

非-HDL 胆固醇 (mmol/L)	ISP	ISP+	酪蛋白	AMD	p-值
0 周	5.22±.91	5.09±1.03	4.86±.78		
6 周	4.91±.96	4.78±.98	4.78±.78	不显著	---
12 周	4.97±.96	4.78±.96	4.81±.67	不显著	---
18 周	4.73±1.14	4.73±.98	4.58±.72	不显著	---
24 周	4.76±.93	4.71±1.09	4.76±.83	-0.28	0.03

HDL 胆固醇 (mmol/L)	ISP	ISP+	酪蛋白	AMD	p-值
0 周	1.34±.27	1.38±.32	1.38±.31		
6 周	1.32±.28	1.31±.32	1.26±.23	0.08	0.01
12 周	1.37±.27	1.32±.33	1.29±.26	0.11	0.02
18 周	1.38±.31	1.40±.32	1.32±.24	0.09	0.02
24 周	1.42±.31	1.42±.31	1.32±.30	0.12	0.01

HDL ₂ 胆固醇 (mmol/L)	ISP	ISP+	酪蛋白	AMD	p-值
0 周	.30±.17	.36±.23	.36±.18		
6 周	.29±.19	.34±.21	.31±.15	不显著	----
12 周	.32±.21	.35±.25	.28±.18	不显著	----
18 周	.29±.19	.34±.25	.29±.14	不显著	----
24 周	.29±.18	.34±.20	.29±.17	不显著	----

表 2(含量)

HDL ₃ 胆固醇 (mmol/L)	ISP	ISP+	酪蛋白	AMD	p-值
0 周	1.04±.24	1.02±.19	1.02±.19		
6 周	1.03±.18	.97±.18	.96±.13	不显著	
12 周	1.04±.19	.99±.16	1.01±.15	不显著	
18 周	1.10±.21	1.06±.18	1.03±.15	0.05	0.05
24 周	1.13±.24	1.09±.21	1.03±.20	0.08	0.03

研究结果表明,和含有对照酪蛋白而不含有异黄酮的蛋白质饮食相比,含有异黄酮的蛋白质饮食组能显著地增加 HDL 胆固醇浓度和显著地减少非 HDL 胆固醇浓度。在食用 ISP 饮食的受治疗者中 HDL-胆固醇浓度增加了 5.2%,食用 ISP+ 饮食者增加了 3.6%。和那些食用不含异黄酮的酪蛋白对照饮食的受治疗者相比,在处理时期内的食用异

黄酮饮食的受治疗者的 HDL-胆固醇浓度增加在统计学上达到显著 ($p < 0.05$)。和那些食用酪蛋白对照饮食的受治疗者相比, 在处理时期内的食用异黄酮饮食的受治疗者的非 HDL-胆固醇浓度降低在统计学上达到显著 ($p < 0.05$)。

为了进一步评价本研究的结果, 把受治疗者的血液中每种异黄酮化合物和它的代谢物的浓度与 HDL-胆固醇的增加及非 HDL (LDL)-胆固醇的减少相比较, 以确定在某种特异性的异黄酮和它的代谢物与血液中胆固醇浓度之间的变化是否存在相关。大豆黄素代谢物包括 O-去甲基安哥拉紫檀素 (“DMA”)、二氢大豆黄素 (“DHD”) 和雌马酚。对从受治疗者中收集的样品进行血浆异黄酮值和血浆脂蛋白值进行线型相关分析。为了排除假定正常性的需要和减少边远数据点的影响进行了 Spearman 排列顺序相关分析。从 0 至 6 月的数值的变化产生了相关 (如下面的表 3 所示)。在表中统计上显著的结果标记如下: *代表 $p < 0.10$; **代表 $p < 0.05$; ***代表 $p < 0.01$ 。

表 3

胆固醇	雌马酚	大豆黄素	o-DMA	DHD	染料木黄酮	总异黄酮
总 (“TC”)	-0.02	-0.02	-0.07	-0.17	0.00	-0.01
非 HDL	-0.05	-0.13	-0.25**	-0.29**	-0.11	-0.13
HDL	0.20	0.22*	0.30**	0.23*	0.26**	0.27**
HDL ₂	0.04	0.13	0.17	0.12	0.14	0.13
HDL ₃	0.19	0.22*	0.30**	0.22*	0.27**	0.29**
TC/HDL	-0.11	-0.24**	-0.37***	-0.33***	-0.24*	-0.27**
HDL/NIIDL	0.13	0.26**	0.41***	0.36***	0.26**	0.31**

如表 3 所示, 在本研究的基础上, 大豆黄素和其代谢物 (作为一组) 与受治疗者的血液中 HDL-胆固醇的增加和非 HDL 胆固醇 (包括 LDL-胆固醇) 的减少明显相关。O-DMA--大豆黄素最终代谢产物与受治疗者血液中胆固醇水平的变化特别相关。

通过以上实施例表明可以通过增加血液中 HDL-胆固醇的浓度和减

少 LDL-胆固醇的浓度，使用大豆黄素来改变人血液中胆固醇成分的浓度，特别是用来改变绝经后妇女血液中胆固醇成分的浓度。

应该理解，以上所述只是本发明优选的实施方案，在不背离本发明的宗旨及所附的权利要求中阐述的更广的方面可以进行各种改变，这些改变应被理解为符合专利法的原理，包括等同原则。