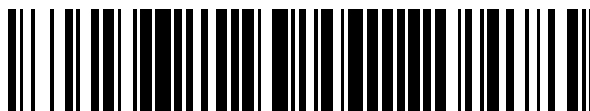


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 197**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/353** (2006.01)  
**A61P 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07113610 .5**  
96 Fecha de presentación: **01.08.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2033641**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.2009**

54 Título: **Procedimiento de preparación de extractos ricos en proantocianidinas**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.04.2012**

73 Titular/es:  
**FERLUX S.A.**  
**24 AVENUE D'AUBIÈRE**  
**63800 CURNON D'AUVERGNE, FR**

72 Inventor/es:  
**Soulier, Chrystèle;**  
**Alcouffe, Natacha y**  
**Laplaige, Gilles**

74 Agente/Representante:  
**Ruo, Alessandro**

ES 2 379 197 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

Procedimiento de preparación de extractos ricos en proantocianidinas

5 **Campo de la invención**

10 [0001] La presente invención se refiere a extractos que contienen altas cantidades de proantocianidinas y al procedimiento de preparación relacionado que implica el uso como reactivos de partida de frutas, o extractos ya previamente purificados de fruta rica en proantocianidinas, siendo dicha fruta el arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*).

**Antecedentes tecnológicos**

15 [0002] Las proantocianidinas, concretamente los taninos condensados, son ubicuos y se encuentran entre los derivados de fenol naturales más abundantes. Las proantocianidinas son mezcla de oligómeros y polímeros compuestos por unidades de repetición de flavan-3-ol unidas a través de enlaces C4-C8 o C4-C6. Las unidades de flavan-3-ol pueden estar también doblemente unidas mediante un doble enlace adicional entre C2-O7 (tipo A). Las dimensiones de las proantocianidinas se definen por el grado de polimerización (GP).

20 [0003] Los flavan-3-oles más comunes contenidos en proantocianidinas son afzalequina, epiafzalequina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina. Las proantocianidinas que consisten exclusivamente en catequina y epicatequina son las denominadas procianidinas, mientras que aquéllas que contienen afzalequina y epiafzalequina o galocatequina y epigalocatequina son la propelargonidina y prodelfinidina. Las procianidinas son las más abundantes en la naturaleza.

25 [0004] Las actividades biológicas de las proantocianidinas de las que se ha informado en la bibliografía incluyen la actividad antitumoral, antiinflamatoria, antienvjecimiento, antioxidante, antialérgica, antibacteriana especialmente de las vías urinarias, promover el crecimiento capilar, etc. (Bart Schwitters/Jack Masquelier "21st century Biophylaxis substance OPC, *Fragrance Journal* , 50-135 (1997); Tomoya Takajashi y col., *Journal of investigative dermatology* 112 (310,316 (1999)).

30 [0005] Se conocen muchos métodos para preparar extractos enriquecidos en proantocianidinas a partir de plantas o frutas de diverso origen tales como el arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*), semillas de uva, hojas de té, cacahuetes, corteza de pino etc.

35 [0006] Algunos de estos procedimientos abarcan etapas de extracción llevadas a cabo con disolventes alcohólicos acuosos en presencia de ácidos minerales como por ejemplo el procedimiento en el documento CN1454896, o abarcan el uso de disolventes supercríticos como CO<sub>2</sub> tal como se da a conocer en el documento CN174923, o requieren el uso de una membrana de ultrafiltración o implican filtración por ósmosis inversa tal como en el procedimiento dado a conocer en el documento JP63267774.

40 [0007] Otros procedimientos requieren una combinación de múltiples etapas de extracción, usando varios tipos de disolventes orgánicos o bien solos o combinados entre sí, asociados mediante al menos una etapa en la que una disolución que contiene los extractos se absorbe en una resina polimérica macrorreticular, el líquido absorbido se eluye posteriormente, se concentra y se atomiza tal como se da a conocer en los procedimientos descritos en los documentos US6608102, US 6.440.471.

45 [0008] Según otros procedimientos es posible obtener extractos que contienen cantidades muy altas de proantocianidinas. Por ejemplo es posible obtener extractos con un contenido total en proantocianidinas que oscila desde el 80-90 % con proantocianidinas oligoméricas (OPC) en cantidades de desde el 23 hasta el 45 % con el procedimiento dado a conocer en el documento CA2539724 que implica el tratamiento de una planta como la corteza de pino o un extracto o jugo de la misma, con al menos dos tipos de resinas absorbentes que difieren en al menos una de las siguientes características, concretamente el tipo de material, radio de poro, área superficial específica y intervalo de distribución de peso molecular o es posible obtener extractos que tienen un contenido total en proantocianidinas de desde el 67 hasta el 85 % y un contenido en OPC de desde el 12,5 hasta el 51 %, comprendiendo el procedimiento dado a conocer en el documento EP1602653 someter un extracto o un jugo exprimido de una planta a una combinación de un tratamiento con una sal o un alcaloide y un tratamiento con una resina absorbente sintética.

50 [0009] A pesar de la gran abundancia de procedimientos de la técnica anterior que permiten obtener un extracto que tenga un alto título en proantocianidinas, los extractos comercialmente disponibles tienen un título en proantocianidinas que no supera el 7 %.

55 [0010] Por lo tanto, esto significa que los procedimientos de la técnica anterior para preparar un extracto que tenga un alto título en proantocianidinas no son fácilmente realizables a escala industrial, por muchos motivos tales como por ejemplo el uso de disolventes de extracción tóxicos o una temperatura de extracción extrema (aproximadamente

100 °C) durante largos periodos de tiempo (aproximadamente 24 horas), el uso de dispositivos a presión como en el caso de fluidos supercríticos, o el uso de membrana de ultrafiltración.

5 [0011] Se sentía por lo tanto la necesidad de tener un procedimiento para preparar extractos que tienen un alto título en proantocianidinas que no padezca la desventaja de los procedimientos de la técnica anterior y que por lo tanto pudiera realizarse fácilmente a escala industrial.

### Sumario de la invención

10 [0012] El solicitante ha descubierto un procedimiento fácilmente realizable a escala industrial que permite obtener un extracto que tenga un alto título en proantocianidinas.

15 [0013] Este procedimiento permite obtener un extracto rico en proantocianidinas partiendo de extractos ya previamente purificados de fruta o de frutas ricas en proantocianidinas siendo dicha fruta el arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*), y comprende las siguientes etapas:

- a) tratar la fruta triturada que contiene altas cantidades en proantocianidinas o un extracto ya previamente purificado rico en proantocianidinas con etanol acuoso, teniendo una concentración de etanol que oscila desde el 50 hasta el 80 % en volumen,
- 20 b) filtrar la mezcla procedente de la etapa (a),
- c) concentrar la disolución filtrada procedente de la etapa (b) a vacío,
- d) opcionalmente almacenar el producto concentrado procedente de la etapa (c), producto que opcionalmente se diluyó previamente con agua desmineralizada, durante un tiempo que oscila desde 5 hasta 24 horas,
- 25 e) diluir con agua desmineralizada el producto almacenado procedente de la etapa (c) o el producto almacenado concentrado procedente de (d) en caso de que esta dilución con agua no se llevara a cabo en la etapa (d),
- f) filtrar la mezcla procedente de la etapa (e)
- g) cargar la disolución en una resina polimérica reticulada alifática macrorreticular,
- h) lavar con agua dicha resina,
- 30 i) eluir la resina polimérica reticulada alifática macrorreticular procedente de la etapa (h) con etanol acuoso teniendo un contenido en etanol de desde el 50 hasta el 80 % en volumen,
- j) concentrar la disolución eluida procedente de la etapa anterior a vacío,
- k) secar el producto concentrado procedente de la etapa (j) a vacío, o mediante secado por pulverización, en el que dicha etapa (a) se lleva a cabo durante tiempos que oscilan desde 10 minutos hasta 2 horas.

35 [0014] Este procedimiento permite obtener extractos que contiene más del 10 % de proantocianidinas, preferiblemente más del 15 %, incluso más preferiblemente más del 20 %, usando condiciones de extracción leves con etanol acuoso, y también sólo una absorción con una resina polimérica macrorreticular usando en la etapa de desorción disolventes no tóxicos como etanol acuoso.

40 [0015] La figura 1 notifica el cromatograma de HPLC, la figura 2: los tiempos de retención, el área, la concentración correspondiente expresada en mg/ml de cada pico, y finalmente la concentración total de la muestra analizada tal como se prepara en el ejemplo 1.

### Descripción de las figuras

45 [0015] La figura 1 notifica el cromatograma de HPLC, la figura 2: los tiempos de retención, el área, la concentración correspondiente expresada en mg/ml de cada pico, y finalmente la concentración total de la muestra analizada tal como se prepara en el ejemplo 1.

### Descripción detallada de la invención

50 [0016] Como fruta rica en proantocianidinas para el fin de la presente invención se pretende indicar el arándano rojo.

[0017] En el procedimiento según la presente invención se usa arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*) como material de partida.

55 [0018] En la etapa (a) el disolvente de extracción tiene preferiblemente un contenido etanólico de desde el 60 hasta el 75 %, más preferiblemente el 70 % en volumen.

[0019] El tiempo de extracción está comprendido preferiblemente entre 10' y 2 horas, más preferiblemente es de 30'.

60 [0020] El procedimiento según la presente invención, cuando como material de partida en la etapa (a) se usa una planta o fruta triturada, abarca una etapa adicional, en la que dicha planta o fruta triturada procedente de la etapa de extracción (a) con etanol acuoso se prensa antes de llevarse a cabo la filtración de la etapa (b).

[0021] La etapa (d) es una etapa opcional y en cualquier caso, cuanto se lleva a cabo esta etapa, el tiempo de almacenamiento está comprendido preferiblemente entre 8 h y 20 horas, más preferiblemente 15 horas.

65 [0022] El lavado con agua desmineralizada de la resina que contiene la disolución absorbida, concretamente la

etapa (h) del procedimiento de la invención se realiza con el fin de eliminar azúcares y ácido fenólico.

**[0023]** En caso de que la fruta sea también rica en antocianinas el procedimiento puede comprender una etapa de lavado adicional, después de la etapa de lavado con agua, para eliminar las antocianinas de la resina con metanol acuoso teniendo un contenido en metanol del 60 % (volumen/volumen).

**[0024]** En la etapa (i) la concentración del disolvente de elución, concretamente etanol acuoso tiene un contenido en etanol de desde el 60 hasta el 75 % en volumen, más preferiblemente del 70 % en volumen. La resina reticulada alifática macrorreticular utilizada en dicha etapa puede seleccionarse de las ya conocidas y comercialmente disponibles.

**[0025]** La etapa (j) se lleva a cabo preferiblemente a vacío a temperaturas comprendidas entre 35 y 45 °C, más preferiblemente a 40 °C.

**[0026]** El solicitante ha optimizado también un método analítico para determinar mediante HPLC el título de proantocianidinas en el extracto final.

**[0027]** Este método comprende dos etapas separadas:

1. La purificación del extracto que va a analizarse
2. El análisis.

### **Etapa 1: Purificación del extracto que va a analizarse**

#### **Preparación de la columna Sephadex LH20**

**[0028]** Se hincharon 10 g de Sephadex LH20 con agua desmineralizada (aproximadamente 50 ml) en al menos 3 horas, y entonces se introdujeron en una columna de vidrio C16 vendida por Pharmacia Biotech. La resina se lavó con aproximadamente 130 ml de agua desmineralizada.

#### **Preparación de la disolución que va a cargarse en la resina Sephadex LH20.**

**[0029]** Con el fin de obtener un tenor de compuestos que absorban a  $\lambda=280$  nm cargado en la columna que fuera siempre aproximadamente el mismo, se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico.

**[0030]** Los extractos o la disolución se diluyó en metanol al 20 % para obtener una absorbancia que oscila desde 32 hasta 48 (o tras dilución a 1/50 ABS= 0,8 ± 20 %) a  $\lambda=280$  nm.

#### **Purificación sobre Sephadex LH20**

**[0031]** La disolución diluida con metanol al 20 % con la absorbancia comprendida en el intervalo mencionado anteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 4000 rpm.

**[0032]** Se cargaron 20 ml de esta disolución decantada sobre la resina mencionada anteriormente y se llevaron a cabo las tres siguientes eluciones:

- Elución 1, 80 ml de metanol al 20 %,
- Elución 2, 160 ml de metanol 60 %,
- Elución 3, 240 ml de metanol 100 %.

**[0033]** Estas eluciones se realizaron a una velocidad de flujo de aproximadamente 2 ml/min. Se desechó la disolución eluida procedente de la elución 1 y 2.

**[0034]** Los primeros 20-30 ml de la disolución procedente de la elución 3 se desecharon, entonces se recogió la disolución eluida restante.

**[0035]** El disolvente se eliminó mediante evaporación a partir de la disolución eluida y se secó el residuo obtenido.

**[0036]** El extracto seco se diluyó en una mezcla de acetona/agua/ácido acético que tenía la siguiente razón volumétrica 79:29,5:0,5 para analizarse mediante HPLC, con el fin de obtener un volumen final comprendido entre 1 y 1,7 ml, este volumen se indicó como  $V_1$ .

## **2. El análisis de HPLC**

### **Tabla de calibración**

[0037] El patrón utilizado para el análisis de proantocianidinas es procianidina B2 (epicatequina 4β→8)

[0038] Las siguientes disoluciones se prepararon tal como se notifica en la siguiente tabla

Disolución	procianidina B2 (mg)	Acetona/agua/ácido acético (70:29,5:0,5) (ml)
1	0,15	10
2	0,75	5
3	1,7	5
4	0,6	1
5	0,9	1

5

Cálculo de la concentración de procianidina B2

[0039]

10

$$C_{B2} = (m \times 1000) / V$$

en la que  $C_{B2}$  es la concentración de procianidina B2 en mg/l

m es el peso de procianidina en mg

V es el volumen de acetona/agua/ácido acético en ml.

15

Condiciones de HPLC:

[0040]

20

Columna:

Luna sílice 5µm (250x4,6 mm) Phenomenex,

Cartucho de detección (*Cartouche de garde*) 3 mm

Disolventes de elución:

25

Disolvente (A): Metanol,

Disolvente (B): Diclorometano,

Disolvente (C): Ácido acético /agua (1:1) (V/V)

Tiempos de elución (min)	Disolvente (A) (%) <sup>1</sup>	Disolvente (B) (%) <sup>1</sup>	Disolvente (C) (%) <sup>1</sup>
0	14,0	82,0	4
20	23,6	72,4	4
50	35,0	61,0	4
55	86,0	10,0	4
65	86,0	10,0	4
70	14,0	82,0	4

<sup>1</sup>porcentajes en volumen

30

Velocidad de flujo de elución: 1 ml/min

Temperatura de la columna: 37 °C

Intervalo de espectros: 200-700 nm

Longitud de onda:  $\lambda = 280$  nm

Volumen inyectado = 5 µl

35

Análisis de la disolución patrón

[0041] Las disoluciones patrón mencionadas anteriormente se analizaron mediante HPLC.

40

[0042] Después del análisis la tabla de calibración se inserta en software de HPLC (área en función de la concentración de procianidina B2).

Análisis de la muestra

45

[0043] La muestra diluida en acetona/agua/ácido acético (70:29:0,5) se analizó mediante HPLC.

Análisis de cromatograma

50

[0044] Arándanos rojos *Vaccinium macrocarpon* obtenidos tras la purificación y el análisis de HPLC se identificaron mediante espectrometría de masas; las proantocianidinas son los picos que tienen un tiempo de retención de entre 13,5 y 50 minutos.

**[0045]** El método de integración se derivó de "Fractionation of polymeric from low bush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with optimised normal phase HPLC.MS fluorescent detection method", Gu L. Kelm y col. J. Agr, Food Chem. 2002, 50, 4852-4860).

5 **[0046]** Consiste en dibujar una línea de base horizontal desde el inicio del pase hasta el final. Se dibujó una línea perpendicular desde el punto más bajo del valle entre picos adyacentes de oligómeros hasta la línea de base horizontal. Se integró el área encerrada por los picos de la curva, dos líneas perpendiculares adyacentes y la línea de base horizontal. Esta área debe estar comprendida en la tabla de calibración anterior.

10 Análisis de los datos obtenidos

**[0047]** El software de HPLC permite calcular la concentración de proantocianidinas (mg/l) de la disolución analizada.

15 **[0048]** La tabla de calibración de procianidina B2 permite tener la concentración de proantocianidinas correspondiente al área de cada pico.

**[0049]** Se añadió la concentración de cada pico de proantocianidinas, los resultados corresponden a la concentración de proantocianidinas de la disolución analizada ( $C_{LUE}$  en mg/l).

20 **[0050]** Concretamente la concentración en proantocianidinas C (mg/l) de la disolución cargada sobre Sephadex, expresada en equivalentes de procianidina B2 puede obtenerse aplicando la siguiente ecuación:

$$C = (C_{LUE} \times V_1) / 20$$

25 **[0051]** En la que  $V_1$ : volumen de la disolución analizada (1-1,7 ml)

**[0052]** En el presente documento a continuación, para fines ilustrativos pero no limitativos, los ejemplos de preparación partiendo de arándano rojo triturado (ejemplo 1) y partiendo de extractos ya previamente purificados (ejemplo 2).

30 EJEMPLO 1 - EXTRACTO RICO EN PROANTOCIANIDINAS A PARTIR DE ARÁNDANO ROJO TRITURADO

**[0053]** Se agitaron 50 kg de arándano rojo triturado (*Vaccinium macrocarpon*), 100 l de etanol acuoso el 70 % (V/V) durante 30 minutos, después se prensaron las frutas trituradas y se filtró toda la mezcla en un tamiz de 25  $\mu$ m, obteniendo de ese modo un extracto etanólico transparente que pesaba aproximadamente 120 kg.

**[0054]** Este extracto etanólico se concentró a vacío a una temperatura de 40 °C, obteniendo de ese modo un residuo que pesaba aproximadamente 10 kg. Entonces se diluyó con 10 l de agua desmineralizada obteniendo de ese modo un extracto diluido que pesaba aproximadamente 20 kg, que se almacena a temperatura ambiente durante 15 horas.

40 **[0055]** El extracto diluido se filtró entonces en un tamiz de 10  $\mu$ m, se lavaron 25 l de una resina alifática macrorreticular comercial con 75 l de agua desmineralizada, entonces se cargaron en una columna de vidrio y se les añadieron 20 kg de la disolución acuosa filtrada mencionada anteriormente. La resina con los extractos adsorbidos se lavó con 100 l de agua desmineralizada y entonces se eluyó con 100 l de etanol al 70 % V/V.

45 **[0056]** La disolución eluida se concentró entonces a vacío a 40 °C obteniendo de ese modo aproximadamente 20 kg de extracto concentrado, que se atomiza finalmente obteniendo de ese modo un polvo.

50 **[0057]** El extracto se analizó con el método analítico notificado anteriormente, las figuras 1 y 2 notifican el cromatograma de HPLC, los tiempos de retención, el área de cada pico y la concentración correspondiente expresada en mg/ml de cada pico, y finalmente la concentración total de proantocianidinas o  $C_{LUE}$  que es 6824,24 mg/l  $V_1 = 1,7$  ml (disolución analizada total mediante HPLC).

55 **[0058]** Por lo tanto, si se aplica la ecuación anterior

$$C = (C_{LUE} \times V_1) / 20$$

$$C = 6824,24 \times 1,7 / 20 = 580,06 \text{ mg/l}$$

60 **[0059]** Se preparó una disolución metabólica acuosa (MeOH al 20 %) con 201,5 mg del extracto final, cuyo volumen =  $V_2 = 72$  ml.

$$580,06 \times 0,072 = 41,76 \text{ mg de proantocianidinas}$$

$$(41,76 / 201,5) \times 100 = 20,73 \%$$

65

EJEMPLO 2 - EXTRACTOS PREPARADOS A PARTIR DE EXTRACTOS YA PREVIAMENTE PURIFICADOS

5 **[0060]** El extracto de arándano rojo usado para este ensayo es EXOCYAN CRAN 10, producido por Tournay technologies lote N° L7015, que se analizó con el método dado a conocer anteriormente. Contenido en proantocianidinas: 7 %

10 **[0061]** Se trataron 607,7 mg del extracto de arándano rojo con 100 ml al 70 % (V/V) durante 30 minutos. La disolución se filtró y entonces se concentró a vacío usando las modalidades del ejemplo 1, y se almacenó durante 1 noche.

10 **[0062]** Se diluyó la disolución concentrada con 10 ml de agua desmineralizada, luego se filtró.

15 **[0063]** La disolución se cargó en una resina reticulada alifática macrorreticular comercial, entonces se enjuagó con agua (200 ml) y se eluyó con etanol al 70 %. La disolución obtenida se concentró a vacío.

15 **[0064]** El concentrado obtenido se secó y se analizó el extracto final obtenido (158,2 mg). Su contenido en proantocianidina evaluado con el método anterior es del 18,0 %.

20 **[0065]** Por lo tanto, la concentración de proantocianidinas en el extracto final fue 2,6 veces superior que en el extracto de partida.

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Un procedimiento para obtener un extracto rico en proantocianidinas partiendo de frutas o extractos ya previamente purificados de fruta rica en proantocianidinas, en el que dicha fruta es el arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*), que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) tratar la fruta triturada o un extracto ya previamente purificado rico en proantocianidinas con etanol acuoso, teniendo una concentración de etanol que oscila desde el 50 hasta el 80 % en volumen,  
 b) filtrar la mezcla procedente de la etapa (a),  
 c) concentrar la disolución filtrada procedente de la etapa (b) a vacío,  
 d) opcionalmente almacenar el producto concentrado procedente de la etapa (c), producto que opcionalmente se diluyó previamente con agua desmineralizada, durante un tiempo que oscila desde 5 hasta 24 horas,  
 e) diluir con agua desmineralizada el producto almacenado procedente de la etapa (c) o el producto almacenado concentrado procedente de (d) en caso de que esta dilución con agua no se llevara a cabo en la etapa (d),  
 15 f) filtrar la mezcla procedente de la etapa (e),  
 g) cargar la disolución en una resina polimérica reticulada alifática macrorreticular,  
 h) lavar con agua desmineralizada dicha resina,  
 i) eluir la resina polimérica reticulada alifática macrorreticular procedente de la etapa (h) con etanol acuoso teniendo un contenido en etanol de desde el 50 hasta el 80 % en volumen,  
 20 j) concentrar la disolución eluida procedente de la etapa anterior a vacío,  
 k) secar el producto concentrado procedente de la etapa (j) a vacío, o secar por pulverización,
- en el que dicha etapa (a) se lleva a cabo durante tiempos que oscilan desde 10 minutos hasta 2 horas.
- 25 **2.** El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho etanol acuoso usado en la etapa (a) tiene un contenido etanólico de desde el 60 hasta el 75 % en volumen.
- 3.** El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho etanol acuoso tiene un contenido en etanol del 70 % en volumen.
- 30 **4.** El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho tiempo es 30'.
- 5.** El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la fruta triturada procedente del tratamiento con etanol se prensa antes de llevar a cabo la etapa (b).
- 35 **6.** El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que los tiempos para el almacenamiento de la etapa (d) están comprendidos entre 8 h y 20 horas.
- 7.** El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho tiempo de almacenamiento es de 15 horas.
- 40 **8.** El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que en la etapa (i) se usa un etanol acuoso teniendo un contenido en etanol de desde el 60 hasta el 75 % en volumen.
- 9.** El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho etanol acuoso tiene un contenido en etanol del 70 % en volumen.
- 45



Fecha de inyección : 17/01/2007 17:34:57  
 Nombre de muestra : P071201 EF Atom  
 Operario adq. : NA  
 Instrumento adq. : HPLC  
 Método adq. : C:\HPCHEM\1\METHODS\PROANS.  
 Último cambio : 04/12/2006 14:14:51 por BM  
 Método de análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\PROANS.M  
 Último cambio : 18/01/2007 15:22:18 por BM  
 (modificado tras cargar)  
 ANÁLISIS DE PROANTOCIANIDINAS  
 Inyección de 5 µl

Línea sec. : 1  
 Ubicación : Vial 1  
 Iny. : 2  
 Volumen de iny. : 5 µl

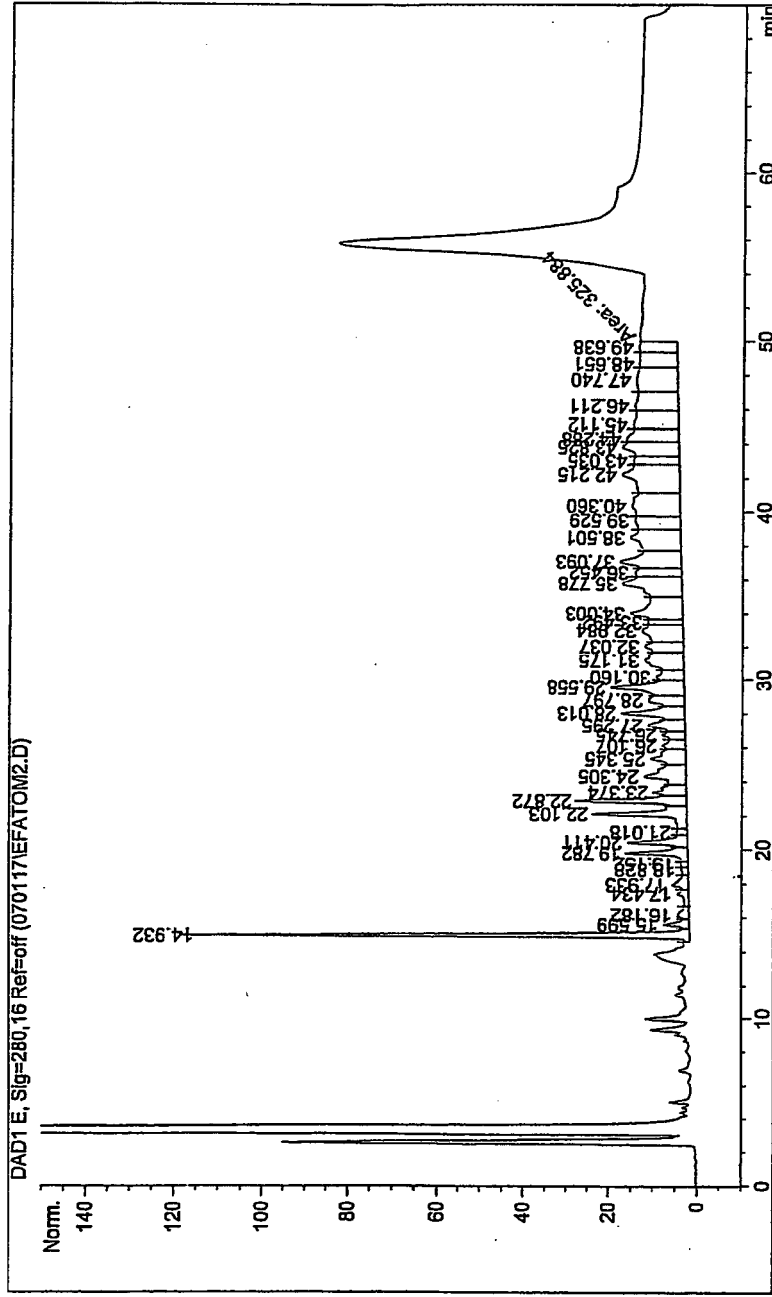


FIG. 1

ES 2 379 197 T3

Clasificado por : Señal  
 Datos de calib. modificados: Jueves 18 de enero de 2007 15:17:13  
 Multiplicador : 1.0000  
 Dilución : 1.0000  
 Uso de factor de multiplicador & dilución con ISTD

Señal 1: DAD1 E, Sig=280,16 Ref=off  
 Picos no calibrados : usar compuesto procianidina B2

Tiempo ret. Tipo:	Area	Amt/Area	Cantidad	Grp	Nombre
[min]	[mAU*s]		[mg/l]		
14.932 VV	1316.00208	3.85264e-1	507.00851	?	
15.599 VV	102.12812	4.54741e-1	46.44182	?	
16.182 VV	81.99210	4.73239e-1	38.80183	?	
17.434 VV	89.01481	4.65837e-1	41.46638	?	
17.933 VV	106.14445	4.51891e-1	47.96569	?	Procianidina B2
18.828 VV	42.62174	5.59901e-1	23.86397	?	
19.152 VV	29.81884	6.37393e-1	19.00631	?	
19.782 VV	261.30582	4.08857e-1	106.83684	?	
20.411 VV	253.24040	4.09795e-1	103.77667	?	
21.018 VV	50.52187	5.31679e-1	26.86143	?	
22.103 VV	494.07385	3.94988e-1	195.15342	?	
22.872 VV	440.56726	3.96879e-1	174.85201	?	
23.374 VV	206.70851	4.16633e-1	86.12159	?	
24.305 VV	422.84692	3.97611e-1	168.12858	?	
25.345 VV	296.36871	4.05375e-1	120.14036	?	
26.107 VV	146.14180	4.32056e-1	63.14144	?	
26.745 VV	130.00999	4.38587e-1	57.02073	?	
27.295 VV	253.74248	4.09735e-1	103.96716	?	
28.013 VV	389.70178	3.99158e-1	155.55269	?	
28.797 VV	255.96692	4.09472e-1	104.81116	?	
29.558 VV	523.09656	3.94125e-1	206.16519	?	
30.160 VV	204.09650	4.17109e-1	85.13054	?	
31.175 VV	473.07843	3.95679e-1	187.18737	?	
32.037 VV	276.88333	4.07201e-1	112.74724	?	
32.984 VV	503.29977	3.94703e-1	198.65391	?	
33.492 VV	143.91916	4.32869e-1	62.29812	?	
34.003 VV	676.52338	3.90789e-1	264.37822	?	
35.778 VV	735.83820	3.89873e-1	286.88338	?	
36.452 VV	321.70267	4.03331e-1	129.75254	?	
37.093 VV	648.44556	3.91282e-1	253.72496	?	
38.501 VV	729.89099	3.89958e-1	284.62690	?	
39.529 VV	462.05762	3.96067e-1	183.00586	?	
40.360 VV	851.02496	3.88458e-1	330.58741	?	
42.215 VV	1060.90784	3.86670e-1	410.22094	?	
43.035 VV	297.67297	4.05261e-1	120.63522	?	
43.825 VV	570.42358	3.92904e-1	224.12195	?	
44.288 VV	493.98444	3.94991e-1	195.11950	?	
45.112 VV	623.98340	3.91747e-1	244.44356	?	
46.211 VV	627.75800	3.91673e-1	245.87571	?	
47.740 VV	767.23108	3.89445e-1	298.79443	?	
48.651 VV	447.89734	3.96594e-1	177.63318	?	
49.638 MF	325.88446	4.03024e-1	131.33919	?	
Total :			6824.24394		

FIG. 2