

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 955**

51 Int. Cl.:

C07D 311/62 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 36/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2006 PCT/JP2006/303402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2006 WO06090830**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2006 E 06714541 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 1852430**

54 Título: **Procedimiento de producción de un oligómero de proantocianidina**

30 Prioridad:

25.02.2005 JP 2005051070

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.03.2020

73 Titular/es:

**NAGASAKI UNIVERSITY (33.3%)
1-14, Bunkyo-machi Nagasaki-Shi
Nagasaki, 8528521, JP;
USAIEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (33.3%) y
AMINO UP CO., LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**TANAKA, TAKASHI;
NONAKA, GEN-ICHIRO;
KOHNO, ISAO;
FUJII, HAJIME;
NAKAGAWA, TAKASHI y
NISHIOKA, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 746 955 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 producción de un oligómero de proantocianidina.

5 **[Campo técnico]**

La invención se refiere a un procedimiento para producir una composición que contiene un oligómero de proantocianidina, que puede reducir el peso molecular de un polímero de proantocianidina en una planta hasta un nivel en el que pueda ser absorbido (fácilmente por el tubo digestivo) en un cuerpo vivo.

10 La composición que contiene oligómero de proantocianidina obtenida según la invención se puede utilizar en productos alimenticios, productos alimenticios para mejorar la salud, alimentos para uso sanitario específico, productos cosméticos y productos médicos. Especialmente, la composición es útil como composición para productos alimenticios para mejorar la salud y productos médicos para la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida causadas por la generación de especies de oxígeno reactivas, la prevención y el tratamiento de enfermedades cerebrales o la prevención del envejecimiento.

15 **[Antecedentes de la técnica]**

20 Como consecuencia de la ingesta de grasa excesiva debido a cambios en nuestros hábitos alimenticios, el aumento de la exposición a los rayos UV debido a cambios ambientales, el agotamiento de la capa de ozono y similares, el aumento de los contaminantes ambientales y similares, las tasas de incidencia de las denominadas enfermedades relacionadas con el estilo de vida, tales como la hiperlipemia, la hipercolesteremia, la hipertensión, la diabetes y los cánceres están aumentando y el número de pacientes con alergias o con enfermedades cerebrales tales como la demencia también está aumentando. Existe la preocupación de que la cifra de pacientes con síndromes de demencia o Alzheimer aumentará en el futuro con el rápido envejecimiento de la sociedad. La implicación de especies de oxígeno reactivas generadas *in vivo* se ha señalado como un factor que contribuye a estas enfermedades. (Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 10 (2002), p. 2497-2509; documento no de patente 1). Sin embargo, dado que aún no se ha desarrollado una tecnología perfecta para suprimir o controlar la generación de especies de oxígeno reactivas, no se ha establecido una tecnología médica suficientemente segura útil en el tratamiento y la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida, enfermedades cerebrales y trastornos similares.

35 Recientemente se ha prestado atención a sustancias naturales presentes en plantas y que muestran actividades fisiológicas, especialmente compuestos de polifenoles. Se puede esperar que los polifenoles, que generalmente se encuentran en té, verduras, frutas, hierbas y similares, se ingieran como alimentos y bebidas durante un largo período de tiempo y sirvan como agentes de tratamiento/prevención sin efectos secundarios.

40 Los compuestos de polifenol, metabolitos secundarios de las plantas, que existen universalmente en el mundo de las plantas en gran cantidad y se sabe que muestran diversas actividades fisiológicas, atrajeron la atención en los campos de los productos farmacéuticos y la fitoquímica en tiempos pasados, y recientemente han estado llamando la atención en el campo de los alimentos para mejorar la salud. Por ejemplo, se sabe que los polifenoles del té, especialmente las catequinas, tienen una amplia gama de actividades fisiológicas tales como propiedades antibióticas, actividad antiviral, propiedades antimutágenas, efecto antioxidante, supresión del aumento de la tensión arterial, propiedades reductoras del colesterol en la sangre, propiedades anticánceres, actividad antialérgica, mejora de la flora entérica, actividad eliminadora de olores y similares.

50 Entre los polifenoles, las proantocianidinas están presentes en una amplia serie de plantas. Para que las proantocianidinas presenten diversas actividades fisiológicas, el compuesto de proantocianidina debe absorberse en el cuerpo vivo a través del tubo digestivo. Sin embargo, en general se dice que los pesos moleculares de las proantocianidinas son del orden de varios miles a varias decenas de miles. Una sustancia que tiene un peso molecular tan grande es difícil de absorber por el tubo digestivo y, en muchos casos, incluso si se ingiere, no se absorbe en el cuerpo vivo y no se utiliza como nutrición.

55 El término "proantocianidinas", es una denominación genérica para procianidina, prodelphinidina, propelargonidina y similares de polímeros diméricos, triméricos, tetraméricos, decaméricos o u oligoméricos superiores que tienen como unidad constitutiva flavan-3-ol (también denominados catequinas) y aquellas con ácido gálico esterificado a las mismas, y estereoisómeros de las mismas, que son compuestos de polifenol que generan antocianidinas mediante tratamiento con ácido. Las unidades constituyentes están unidas entre sí por medio de un enlace carbono-carbono entre la posición 4 y la posición 8 del esqueleto de carbono o entre la posición 4 y la posición 6, o algunas veces mediante enlace éter entre la posición 2 y la posición 7 además del enlace carbono-carbono.

60 La proantocianidina posee un excelente efecto antioxidante (Arch. Biochem. Biophys., Vol. 374, p. 347-355, 2000; documento no de patente 2) y además, dado que posee otros efectos tales como mejora del flujo sanguíneo, actividad antiestrés, eficacia antihipertensiva, efecto antibiótico, efecto antitumoral, actividad anticataratas y efecto antidiarreico, se ha utilizado como una sustancia de origen natural que tiene un efecto de mantenimiento de la

salud.

Las proantocianidinas se aíslan en forma de mezcla a partir de corteza de pino, manzana inmadura, semillas de uva y similares, y actualmente se mezclan en bebidas, productos de confitería, alimentos para mejorar la salud, productos cosméticos, fármacos para el crecimiento del cabello y similares que están disponibles comercialmente.

En muchas plantas que contienen proantocianidina, diversas proantocianidinas, desde las que tienen un grado de polimerización reducido hasta las que tienen un peso molecular elevado, están presentes en forma de mezcla, y muchas de ellas son plantas que contienen principalmente proantocianidinas con un grado de polimerización elevado, tales como el caqui, el plátano y el membrillo chino. Sin embargo, entre las proantocianidinas, se dice que un polímero de proantocianidina que tiene un grado de polimerización elevado presenta actividades farmacológicas inferiores a oligómeros de proantocianidina que tienen un grado de polimerización de 2 a 4 debido a su escasa absorción por el intestino. Además, es preferible que dichos polímeros de proantocianidina, que poseen una fuerte astringencia y una solubilidad en agua deficiente, se eliminen cuando la planta se utilice en productos alimenticios (Free Radical Res., Vol. 29, p. 351-358, 1998: documento no de patente 3). Sobre la base de estos hechos, el oligómero de proantocianidina que posee un grado de polimerización de 2 a 4 ha llamado la atención por su excelente efecto de mantenimiento de la salud y aquellos derivados de corteza de pino se utilizan en bebidas y alimentos para mejorar la salud.

Para obtener solo proantocianidina a partir de extracto de planta, se emplea el procedimiento de absorción (ver, por ejemplo, el documento H06-49053: documento de patente 1) y procedimientos similares. Pero es difícil aislar aquellos que presentan grados de polimerización diferentes. Con el fin de obtener solo oligómeros de proantocianidina de grado de polimerización de 2 a 4, se emplean el procedimiento de partición con disolventes utilizando acetato de etilo, el procedimiento de extracción en fase sólida con acetato de metilo y procedimientos cromatográficos (Publicación PCT WO00/64883: documento de patente 2), el procedimiento de absorción de quitina (Publicación PCT WO03/091237: documento de patente 3) y similares para aislar solo proantocianidinas de bajo peso molecular mediante extracción. Sin embargo, en estos procedimientos, se desecha una gran cantidad de polímeros de proantocianidina de alto peso molecular, lo que representa una desventaja en términos de rendimiento.

Como procedimiento alternativo para reemplazar los procedimientos para aislar oligómeros de proantocianidina de grado de polimerización de 2 a 4 a partir de plantas que contienen polímeros de proantocianidina, en el contexto de la presente invención se propuso previamente un procedimiento en el que se hace reaccionar un material que contiene polímero de proantocianidina con un compuesto que contiene SH tal como cisteína en una solución ácida para reducir el peso molecular del oligómero de proantocianidina (Publicación PCT WO2004/103988: documento de patente 4). Según el procedimiento, se puede obtener un oligómero de proantocianidina que presenta la cisteína unida al mismo para que, de esta forma, se reduzca su peso molecular y presente una absorción sistémica excelente. Se ha confirmado que el oligómero de proantocianidina no posee toxicidad y se puede utilizar de forma segura. Sin embargo, en la actualidad, en algunos países (incluido Japón), existe el problema de que se requieren procedimientos estrictos para obtener la aprobación de aplicaciones de productos alimenticios para mejorar la salud que contengan proantocianidina y que presenten cisteína unido a los mismos, que es una sustancia química no natural.

[Documento de patente 1] Solicitud de patente japonesa abierta al público H06-49053

[Documento de patente 2] N° de publicación PCT WO00/64883

[Documento de patente 3] N° de publicación PCT WO03/091237

[Documento de patente 4] N° de publicación PCT WO2004/103988

[Documento no de patente 1] Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 10 (2002), p. 2497-2509

[Documento no de patente 2] Arch. Biochem. Biophys., Vol. 374, p. 347-355, 2000

[Documento no de patente 3] Free Radical Res., Vol. 29, p. 351-358, 1998

[Divulgación de la invención]

[Problemas que se van a resolver por medio de la invención]

El objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento conveniente y eficaz para reducir el peso molecular de un oligómero de proantocianidina, que está ampliamente distribuido en la naturaleza como polímero de proantocianidina, pero limitado en materiales derivados de productos naturales como oligómero, utilizando como material de partida un polímero de proantocianidina de partida, la planta que contiene el polímero de proantocianidina o un extracto de la misma y uniendo el material a una sustancia que tiene una estructura de anillo de floriglucinol o una estructura de anillo de resorcinol.

[Medios para resolver el problema]

Con el fin de lograr el objetivo anterior, en el contexto de la presente invención se han realizado estudios

exhaustivos y, como resultado, se ha descubierto que la proantocianidina se puede fraccionar y reducir su peso molecular y, al mismo tiempo, se puede convertir en oligómero de proantocianidina que tiene catequina unida al mismo de forma terminal sometiendo a ebullición suave frutas, pieles de frutas, cortezas, hojas o extractos de las mismas que contienen polímero de proantocianidina, tales como *Palo santo*, plátano, uva, pino, *Chamaecyparis obtusa*, alcanforero, árbol de la cera, membrillo chino, lichí, *Myrica rubra* y Cinnamomi Cortex junto con té verde u hojas de té frescas que contienen una gran cantidad de catequinas de bajo peso molecular en una solución ácida durante 2 a 3 horas.

Además, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que la proantocianidina se puede fraccionar, reducir su peso molecular y convertirse en oligómero de proantocianidina que tiene una sustancia que posee una estructura de anillo de floroglucinol o una estructura de anillo de resorcinol unida al mismo utilizando la sustancia que tiene una estructura de anillo de floroglucinol o una estructura de anillo de resorcinol y otros materiales vegetales (tales como semilla de uva y piel de uva) que contienen dicha sustancia en lugar de té verde u hojas de té frescas, y han completado la invención basándose en los hallazgos.

Es decir, la invención se refiere a los puntos [1] a [4] siguientes,

[1] Un procedimiento para producir la composición que contiene como su componente principal oligómero de proantocianidina que tiene un grado de polimerización de 2 a 4, en el que son compuestos terminales galato de catequina o de epigallocatequina, que comprende una etapa de calentamiento de materiales vegetales que contienen polímero de proantocianidina o un extracto de los mismos con té verde, un extracto del mismo o galato de epigallocatequina, plantas que contienen dicha sustancia o un extracto de las mismas en una solución acuosa ácida utilizando ácido en una concentración del 0.1 al 1.0 N, y una etapa de concentración de la solución de reacción que contiene oligómero de proantocianidina que tiene un grado de polimerización de 2 a 4 y que tiene galato de catequina o epigallocatequina unido a los extremos y de secado de la solución o de sometimiento de la solución concentrada a tratamiento de fraccionamiento.

[2] El procedimiento descrito en el punto [1], en el que la planta que contiene oligómero de proantocianidina es por lo menos un tipo seleccionado de entre un grupo que consiste en uva, pino, *Chamaecyparis obtusa*, alcanforero, árbol de la cera, cacao, *Palo santo*, plátano, membrillo chino, manzana, espino, lichí, *Myrica rubra* y Cinnamomi Cortex.

[3] El procedimiento descrito en el punto [1] o [2], en el que las condiciones ácidas se preparan utilizando un ácido inorgánico, un ácido orgánico o ambos.

[4] El procedimiento descrito en el punto [3], en el que como el ácido se utiliza por lo menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico y ácido málico.

[Efecto de la invención]

La invención proporciona un procedimiento para producir una composición que contiene como componente principal un oligómero de proantocianidina al que se ha unido una sustancia que posee estructura de anillo de floroglucinol o estructura de anillo de resorcinol en los extremos y a la que, por lo tanto, se ha reducido su peso molecular, composición que se obtiene concentrando y secando una solución de reacción obtenida mediante el calentamiento de materiales vegetales que contienen polímero de proantocianidina o un extracto de los mismos con una sustancia o plantas que tienen una estructura de anillo de floroglucinol o estructura de anillo de resorcinol o un extracto de las mismas en una solución acuosa ácida. Según la invención, el oligómero de proantocianidina al que se ha unido en los extremos una sustancia que posee estructura de anillo de floroglucinol o estructura de anillo de resorcinol y al que, por lo tanto, se ha reducido su peso molecular, y que es útil como composición para productos alimenticios para mejorar la salud y productos farmacéuticos para el tratamiento/la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida causadas por la generación de especies de oxígeno reactivas y enfermedades cerebrales o para la prevención del envejecimiento se puede producir de forma eficaz a partir de materiales que contienen polímeros de proantocianidina.

[Mejor modo de poner en práctica la invención]

La invención se describe a continuación con mayor detalle.

Las materias primas utilizadas para producir oligómero de proantocianidina según el procedimiento de la invención son plantas que contienen polímero de proantocianidina (tales como fruta, piel de fruta, corteza y hojas) o extractos de las mismas.

En la presente memoria, los ejemplos de plantas que contienen polímero de proantocianidina incluyen frutas tales como caqui astringente, plátano, manzana, pera, uva, fresa, aguacate, arándano, espino, raíz de loto, trigo sarraceno, lichí y *Myrica rubra*, hierbas, especias, madera, Cinnamomi Cortex y corteza de pino. Entre los mismos,

se utilizan preferentemente caqui astringente, plátano, uva, pino, *Chamaecyparis obtusa*, alcanforero, árbol de la cera, membrillo chino, lichi y *Myrica rubra*.

5 En la invención, estas plantas que contienen polímero de proantocianidina se trocean (se cortan) o se trituran y después se utilizan, y se usan extractos obtenidos por calentamiento y concentración/secado de estos materiales en un disolvente acuoso.

10 No existe ninguna limitación particular sobre la sustancia que tiene estructura de anillo de floroglucinol o estructura de anillo de resorcinol que se utiliza en la reacción de la presente invención, siempre que la sustancia sea una planta que contenga resveratrol, floroglucinol, flavonoide y flavanoide (éster galoílico de catequina) o extractos de la misma. Los ejemplos de las mismas incluyen té verde, hojas de té frescas, semilla de uva, tegumento de semilla de uva, gambir en cubos, algas rojas y extractos de los mismos. Entre los mismos, considerando que los principales usos del oligómero de proantocianidina producido en la presente invención son productos alimenticios para mejorar la salud, ingredientes para alimentos para uso sanitario específico, productos cosméticos y productos farmacéuticos, especialmente alimentos para uso sanitario específico y productos farmacéuticos, se prefieren 15 semillas de uva, tegumento de semilla de uva, té verde, hojas de té frescas y extractos de los mismos, que se han aplicado convencionalmente a bebidas y cuya seguridad se ha confirmado.

20 La proporción de materiales vegetales que contienen polímero de proantocianidina y sustancia que posee estructura de anillo de floroglucinol o estructura de anillo de resorcinol utilizada en la reacción se selecciona arbitrariamente. Se prefiere que la cantidad de esta última sea lo suficientemente grande como para unirse a los fragmentos del polímero de proantocianidina al que se ha reducido su peso molecular. Si la cantidad de la sustancia que tiene estructura de anillo de floroglucinol o estructura de anillo de resorcinol es demasiado pequeña, la proantocianidina que tiene un alto peso molecular puede permanecer sin reaccionar, y en ese caso, la proantocianidina remanente que tiene un alto peso molecular se puede eliminar fácilmente mediante cromatografía en columna. 25

30 La reacción entre la planta que contiene proantocianidinas o las proantocianidinas contenidas en el extracto de la misma y la sustancia que posee estructura de anillo de floroglucinol o estructura de anillo de resorcinol (en adelante, denominada a veces sencillamente "sustancia que contiene anillo de floro/resorcinol") se realiza en un disolvente mediante calentamiento.

35 Como disolvente de reacción se utiliza agua, metanol, etanol y una mezcla de dos o más de los mismos. Considerando que el producto se utiliza en alimentos o productos farmacéuticos, se prefieren el agua y el etanol.

40 La reacción se lleve a cabo en condiciones ácidas. Se utiliza un ácido seleccionado apropiadamente de entre ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico y ácido málico en una concentración de 0.1 a 1.0 N, preferentemente de aproximadamente 0.5 N.

45 La reacción entre la planta o el extracto de la planta que contiene proantocianidinas y la sustancia que contiene el anillo de floro/resorcinol se lleva a cabo a una temperatura de temperatura ambiente de 100°C durante 0.5 horas a 1 semana, preferentemente de 90 a 100°C durante 1 a 4 horas.

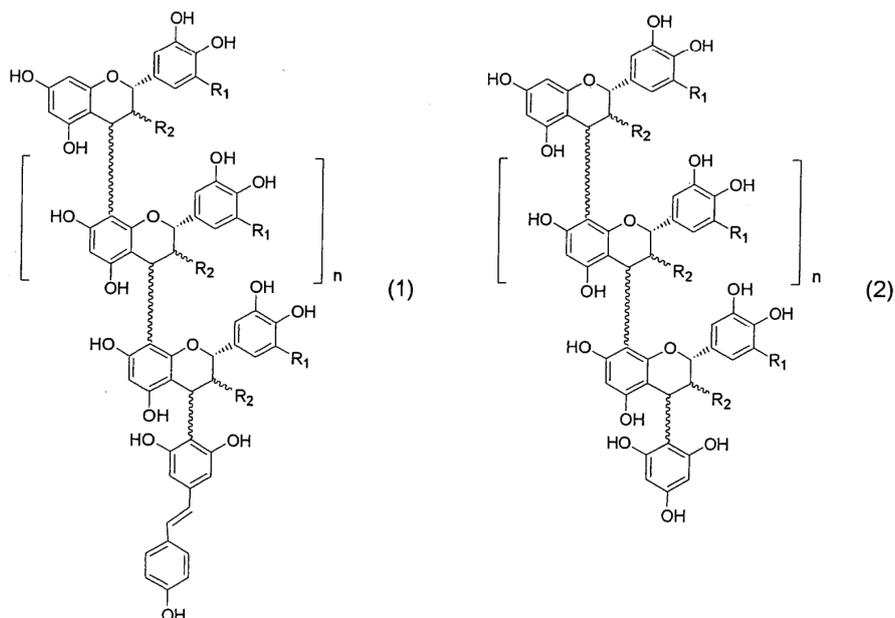
50 La solución de reacción después de la reacción se somete a filtración o un tratamiento similar para eliminar así el contenido sólido y aislar el líquido. El extracto resultante (líquido) que contiene oligómero de proantocianidina se puede utilizar en diversas formas tales como líquido, polvo, gel, producto moldeado sólido o similares, después de condensarlo y secarlo. La solución de reacción después de la reacción se puede concentrar y secar o concentrar y fraccionar. Mediante estos procedimientos, la sustancia objetivo se separa de la solución de reacción, se concentra y se purifica mediante un procedimiento convencional. Por ejemplo, los residuos se separan mediante filtración y después de concentrar el filtrado, el líquido concentrado se puede purificar sometiendo el extracto a un tratamiento de película (tal como ultrafiltración y tratamiento de ósmosis inversa) o a un tratamiento con un adsorbente o un tratamiento similar para, de esta forma, concentrarlo y aislar la sustancia objetivo.

55 Los ejemplos de adsorbentes incluyen adsorbente de estireno-divinilbenceno, adsorbente de ácido metacrílico, polímero de vinilo hidrófilo, gel de dextrano modificado, gel de poliacrilamida, gel de sílice de fase inversa y resina de intercambio iónico. En caso de que se utilice un adsorbente de este tipo, los oligómeros de proantocianidina, a los que se ha reducido su peso molecular mediante reacción con la sustancia que contiene el anillo de floro/resorcinol, están contenidos en la fracción adsorbida en el adsorbente (en adelante denominada "fracción o fracciones adsorbidas"). Mediante elución de la fracción adsorbida con hidroalcohol, alcohol, acetona o similares, se pueden obtener componentes que tienen diversos pesos moleculares. En esta ocasión, aislando el oligómero de proantocianidina objetivo que tiene un grado de polimerización de 2 a 4 de la solución de reacción mediante cromatografía en columna utilizando un adsorbente sintético basado en un compuesto aromático, la proantocianidina que tiene un alto peso molecular puede separarse y la concentración del eluido es sencilla, lo que se prefiere. Los ejemplos preferidos de adsorbente sintético basado en un compuesto aromático incluyen un polímero poroso basado en estireno reticulado tal como SEPABEADS. 60 65

Mediante los resultados de mediciones realizadas utilizando RMN de ¹H, UV, HPLC, GPC y TLC, se confirma que el oligómero de proantocianidina así obtenido contiene de dímeros a tetrameros de proantocianidina cuyas estructuras químicas típicas están representadas por las fórmulas (1) y (2).

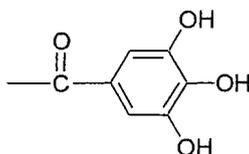
5

[Quím. 3]



10 (En la fórmula, R₁ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R₂ representa un átomo de hidrógeno o un grupo galóilo,

[Quím. 4]



15

y n representa 0 o un número entero de 1 a 2).

20 Aunque en las fórmulas (1) y (2), solo se muestran estructuras que se han unido entre la posición 4 y la posición 8, también existen aquellas que tienen la unión entre la posición 4 y la posición 6 o la unión de 2-O-7.

25 Mediante la reacción entre el polímero de proantocianidina y la sustancia que contiene un anillo de floro/resorcinol según la invención, el polímero de proantocianidina que tiene un alto peso molecular (5 en términos de grado de polimerización) y no puede absorberse en el cuerpo vivo puede fragmentarse fácilmente para hacer que el polímero sea una sustancia de bajo peso molecular absorbible y, al mismo tiempo, se puede obtener una composición que contiene principalmente oligómeros de proantocianidina de diméricos a tetraméricos.

30 El oligómero de proantocianidina que tiene una sustancia que contiene una estructura de anillo de floro/resorcinol unida a su extremo, obtenido según la invención, que muestra una fuerte actividad antioxidante en los ensayos de antioxidación de DPPH, TEAC y FRAP, tiene una actividad antioxidante alta en comparación con otros materiales de polifenol. Además, en experimentos con animales sobre enfermedades relacionadas con el estilo de vida y ensayos de seguimiento del índice de antioxidación en humanos, se han obtenido datos que evidencian que el efecto se puede basar en una actividad antioxidante.

35 En consecuencia, los productos que contienen el oligómero de proantocianidina de la invención como ingrediente activo no solo tienen una acción supresora de la generación de peróxido de lípidos *in vivo*, sino también efectos sobre enfermedades causadas por oxidación inducida debido al oxígeno activo. Por lo tanto, los productos, que tienen efectos preventivos de diversas deficiencias de órganos causadas por la generación de peróxidos de lípidos

u oxígeno activo y que también previenen el envejecimiento, son eficaces para prevenir y tratar diversas enfermedades causadas por dichas deficiencias de órganos y el envejecimiento. Además, los productos pueden considerarse eficaces en la supresión/la prevención/el tratamiento de disfunciones cerebrales tales como la demencia presuntamente causada por el envejecimiento cerebral. Al mismo tiempo, junto con la mejora en las funciones cerebrales, se puede esperar una mejora en la función de aprendizaje, aliviar la irritación, aliviar el insomnio, aliviar el desconcierto y efectos similares. Por lo tanto, los productos que contienen oligómero de proantocianidina de la invención como ingrediente activo se pueden utilizar en productos alimenticios para mejorar la salud, productos farmacéuticos, cosméticos y similares.

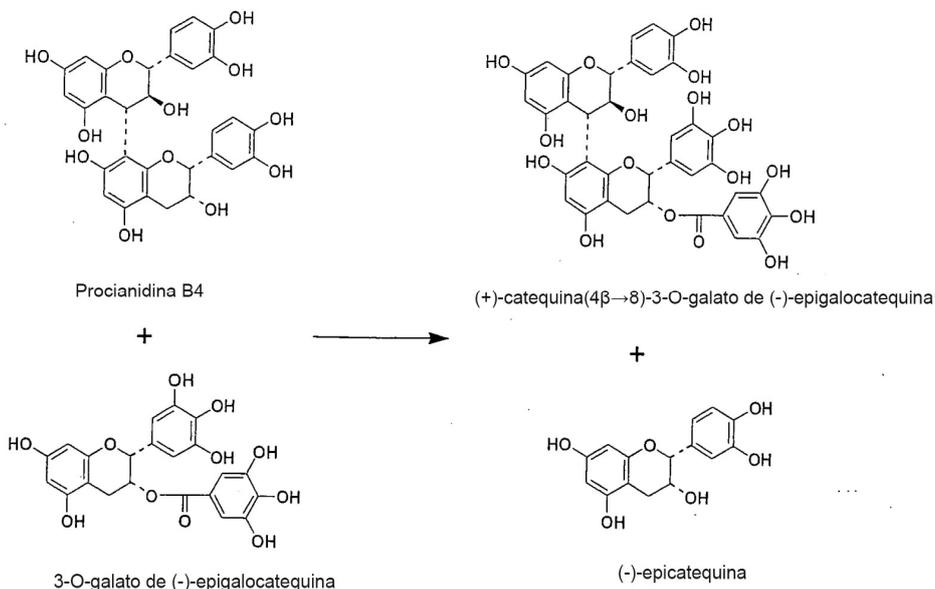
No se observa toxicidad con los productos que contienen oligómero de proantocianidina de la invención como ingrediente activo y los productos se pueden utilizar de forma segura. Estos productos se utilizan por vía oral o parenteral. La cantidad de dosificación en caso de uso oral difiere según la edad, el peso, los síntomas, el efecto terapéutico objetivo, el procedimiento de administración y similares. En general, se encuentra en un intervalo de 50 a 1000 mg por dosis para adultos. En caso de administración oral, los productos de la invención se utilizan en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, polvo, polvo granulado, jarabe y similares. En caso de administración parenteral, se utilizan en forma de solución inyectable, agente de recubrimiento y similares. En caso de preparación de productos granulados, productos comprimidos o productos de jarabe, se pueden utilizar agentes auxiliares apropiados (tales como almidones, dextrinas, agentes edulcorantes, colorantes y agentes saborizantes).

[Ejemplos]

En adelante, la invención se describe específicamente haciendo referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1

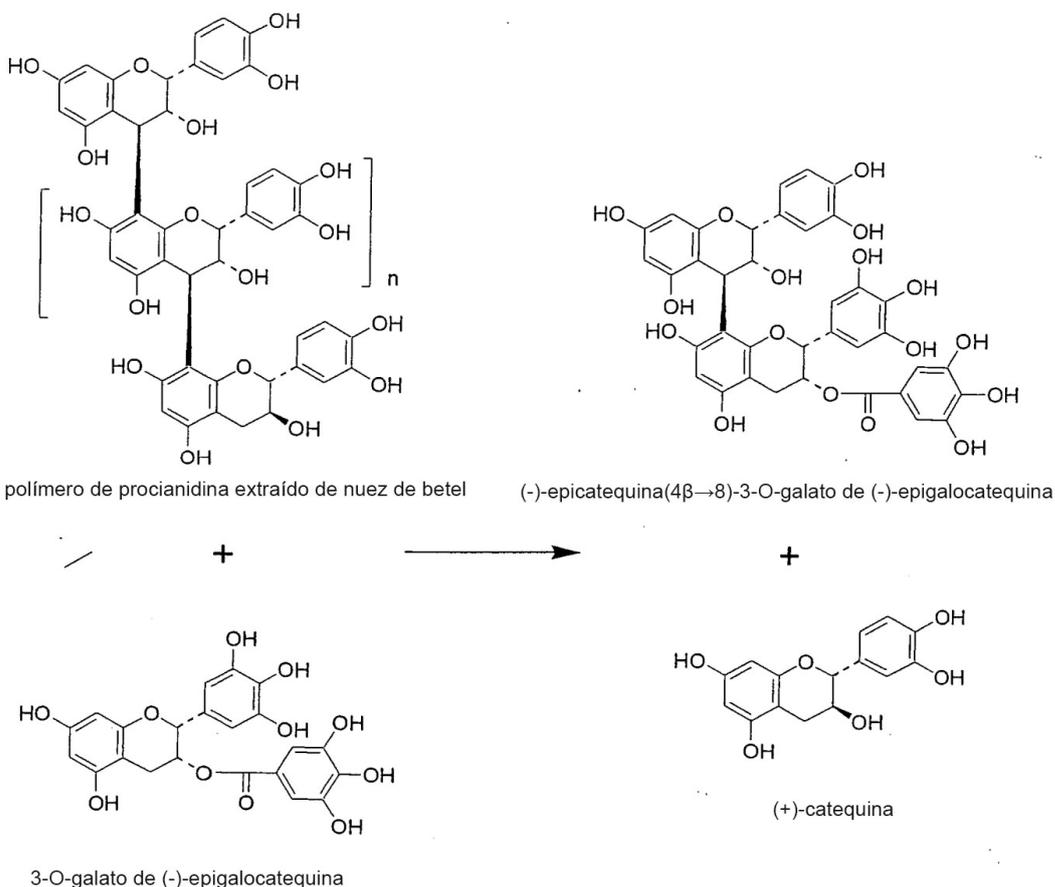
[Quím. 5]



Se disolvieron procianidina B4 (100 mg) y 3-O-galato de epigallocatequina (100 mg) en 40 ml de una solución de ácido cítrico al 2% y se calentaron a 100°C durante 2 horas. Después de enfriarla, la solución de reacción se sometió a cromatografía en columna MCI-gel CHP20P (metanol acuoso) y después a cromatografía en columna Sephadex LH-20 (metanol al 60%), para recuperar así como materia prima procianidina B4 (10 mg) y 3-O-galato de epigallocatequina (59.2 mg) y también obtener (-)-epicatequina recién generada (25.4 mg) y (+)-catequina(4β→8)-3-O-galato de (-)-epigallocatequina (17.3 mg). Mediante comparación de los espectros de RMN de ¹H, la catequina generada y la proantocianidina con composiciones de la técnica anterior, se llevó a cabo la identificación de las composiciones obtenidas. (Véanse las fórmulas estructurales anteriores).

Ejemplo 2

[Quím. 6]



5

Se disolvieron 0.5 g de polímero de procianidina extraído de nuez de betel y 3-O-galato de (-)-epigallocatequina (0.5 g) en 200 ml de una solución de ácido cítrico al 2% y se calentaron a 95°C durante 3 horas. La solución de reacción se sometió a cromatografía en columna de la misma forma que en el ejemplo 1, obteniéndose 3-O-galato de epigallocatequina (403 mg), (+)-catequina (48.6 mg) recién generada y (-)-epicatequina(4β→8)-3-O-galato de (-)-epigallocatequina (148.3 mg) que es una proantocianidina (véanse las fórmulas estructurales anteriores).

10

Ejemplo 3

Se disolvieron 5 g de corteza de ciprés japonés que contenía una mezcla de catequina y procianidina y 1 g de té verde en 100 ml de solución de ácido cítrico al 2% y se calentaron a 95°C durante 3 horas. Después de enfriarla, se añadieron 100 ml de etanol a la solución y la solución se sometió a filtración con succión. El filtrado se analizó por HPLC. Las condiciones para el análisis por HPLC fueron las siguientes.

20 Columna: Cosmosil 5C18 ARII (4.6x250 mm),

Temperatura de la columna: 35°C,

25 Fase móvil: A; ácido fosfórico 50 mM,

B; CH₃CN,

B del 4% al 30% (durante 39 minutos),
del 30 al 75% (durante 15 minutos),

30

Caudal: 0.8 ml/min,

Detección: detección de matriz de fotodiodos

Se calentaron 5 g de corteza de ciprés japonés y 1 g de té verde por separado en solución de ácido cítrico en las mismas condiciones y luego se sometieron a un tratamiento de extracción. El análisis por HPLC se realizó de la misma forma (véase HPLC en la figura 1). En la solución de extracto obtenida mediante tratamiento de la mezcla de corteza de ciprés japonés y té verde en la solución de ácido cítrico, se detectaron picos derivados de muchos compuestos nuevos, que no se encontraron en los casos del tratamiento de la corteza de ciprés japonés y el té verde por separado. Se supuso por comparación en los espectros de absorción ultravioletas entre los picos obtenidos en este ejemplo y los obtenidos en los ejemplos 1 y 2 que todos los compuestos eran proantocianidinas.

El líquido de extracto obtenido en el ejemplo 3 calentando la corteza de ciprés japonés y el té verde en la solución de ácido cítrico se concentró y después se sometió a partición con disolvente con 50 ml de agua y 50 ml de acetato de etilo 5 veces. La capa de acetato de etilo obtenida se reunió y también se concentró para obtener de este modo 0.67 g de producto extraído con acetato de etilo. Los extractos obtenidos de la corteza de ciprés japonés y el té verde tratados por separado respectivamente se sometieron a partición con disolvente de la misma forma, para obtener de este modo 0.30 g de producto extraído con acetato de etilo de la corteza de ciprés japonés y 0.37 g de producto extraído con acetato de etilo del té verde. Los tres extractos así obtenidos de acetato de etilo se analizaron por TLC. Las condiciones de TLC son las siguientes.

Gel de sílice 60,

Disolvente de desarrollo:

benceno-formato de etilo-ácido fórmico (1:7:1, v/v)

Reactivo de coloración: reactivo de vainillina-ácido clorhídrico (ver TLC en la figura 2).

El reactivo de vainillina-ácido clorhídrico, que es un reactivo de detección para catequinas y proantocianidinas, adquiere un color rojo característico cuando estas sustancias están presentes. Con respecto al extracto obtenido mediante el tratamiento de la corteza de ciprés japonés y el té verde en la solución de ácido cítrico, se reconocieron las manchas derivadas de proantocianidina dimérica y trimérica.

En la capa de agua remanente después de la partición con acetato de etilo en el ejemplo 3, permanece la proantocianidina, que tiene un peso molecular más alto que el peso molecular de los productos transferidos a la capa de acetato de etilo. Después se compararon los pesos moleculares de los compuestos acetilados de proantocianidinas contenidos en la capa acuosa mediante análisis de cromatografía de permeación de gel. A continuación, la capa acuosa, después de tratar la corteza de ciprés japonés y el té verde con una solución de ácido cítrico y la capa acuosa de corteza de ciprés japonés se concentraron y se secaron hasta obtener un sólido. Después de disolverse en anhídrido acético-piridina, la solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 8 horas. Las soluciones de reacción se vertieron respectivamente en agua con hielo y la materia insoluble depositada se eliminó por filtración y se secó al vacío. El cuerpo acetilado obtenido se analizó en condiciones siguientes: columna TSK-GEL G4000H6, disolvente de tetrahidrofurano y detección con absorción de UV de 254 nm. Según el peso molecular de los productos obtenidos estimado en función de las curvas de calibración preparadas mediante el uso de benceno y poliestirenos que poseen pesos moleculares de 4000, 25000 y 50000, la parte superior del pico de proantocianidina contenido en la capa acuosa después de tratar la corteza de ciprés japonés y el té verde con ácido cítrico era de aproximadamente 1300, mientras que la parte superior del pico de proantocianidina contenida en la capa acuosa de corteza de ciprés japonés era de aproximadamente 2000. Se descubrió que al añadir té verde en el tratamiento con ácido cítrico, el peso molecular se redujo.

Ejemplo 4

Se pulverizaron 100 g de piel de plátano fresca junto con 300 ml de una solución de mezcla de acetona y agua (4:1, v/v) utilizando un mezclador giratorio y se sometieron a filtración con succión. La acetona se eliminó por destilación del filtrado utilizando un evaporador para preparar de esta forma una solución acuosa, la materia insoluble se eliminó por filtración y se añadió agua a la solución para obtener una cantidad total de 200 ml. Por separado, se extrajeron por ebullición 3 g de hojas de té verde en 300 ml de agua y, después de someter el producto resultante a filtración con succión, se añadió agua para obtener una cantidad total de 300 ml. Se mezclaron entre sí 100 ml de extracto de plátano (correspondiente a 50 g de piel de plátano) y 100 ml de extracto de té verde (correspondiente a 1 g de té verde) y se disolvieron 2 g de ácido cítrico en la mezcla. A continuación, la mezcla se calentó a 95°C durante 3 horas. Después de enfriarla, la solución se extrajo con acetato de etilo 3 veces para obtener de esta forma 0.312 g de producto extraído con acetato de etilo. De la misma manera, el líquido de extracto de plátano y el líquido de extracto de té verde se sometieron por separado a partición con acetato de etilo, obteniéndose de esta forma 0.015 g y 0.18 g de extractos de acetato de etilo respectivamente. Los extractos de acetato de etilo obtenidos se analizaron por TLC (véase TLC en la figura 3). Debido al alto peso molecular de la proantocianidina en el extracto de piel de plátano, el extracto es positivo para el reactivo de vainillina-ácido clorhídrico solo en el punto de origen en el análisis por TLC, mientras que en el producto obtenido tratando extracto de piel de plátano y extracto de té verde con ácido cítrico se observaron manchas derivadas de la nueva

proantocianidina dimérica y trimérica, que no existían en los extractos originales antes del tratamiento.

Ejemplo 5

5 El componente astringente contenido en gran cantidad en el caqui astringente es proantocianidina que tiene un peso molecular muy alto y está constituida por cuatro tipos de catequinas del té (Tanaka et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1013-1022, 1994). Se pulverizaron 100 g de fruta caqui inmadura fresca junto con 500 ml de solución de ácido cítrico al 1% utilizando un mezclador giratorio y, además, se mezclaron 500 ml de solución de ácido cítrico al 1% y 20 g de té verde en la misma y la mezcla se sometió suavemente a ebullición durante 3 horas. La solución de reacción se sometió a filtración con succión mientras estaba caliente, para obtener de esta forma 950 ml de filtrado. Una mitad de la cantidad del filtrado, 475 ml, se sometió a partición con acetato de etilo 4 veces, para obtener de esta forma 2.56 g de una capa de acetato de etilo. La mitad restante, 475 ml, se hizo pasar a través de una columna de Sepabeads SP850 (200 ml) y, después de lavar con agua para eliminar así el azúcar, los polifenoles adsorbidos se eluyeron con etanol al 40-60%. El eluato se concentró para obtener de esta forma 3.26 g de fracción que contenía catequina y proantocianidina. Por otra parte, se pulverizaron 200 g de fruta caqui inmadura junto con 900 ml de solución mixta de acetona-agua (4:1, v/v) y se sometieron a extracción. La acetona se eliminó completamente por destilación del filtrado y la solución de extracto obtenida se hizo pasar a través de una columna de Sepabeads SP850 (200 ml). Como resultado, la mayor parte de las proantocianidinas de caqui (tanino de caqui) no se adsorbieron sino que se eluyeron solo con agua. La cantidad de fracción de polifenol adsorbida en la columna y eluida con alcohol acuoso fue tan solo de 0.76 g. Se asume que el peso molecular de la proantocianidina en el caqui es de aproximadamente 1.38×10^4 (Mastuo, T. et al., Agric. Biol. Chem., 42, 1637-1643, 1978), demasiado grande para penetrar en los poros de Sepabeads. Por otra parte, la proantocianidina de caqui tratada con té verde, fraccionada y a la que se redujo su peso molecular, puede penetrar en los poros de Sepabeads para ser adsorbida. Mediante el presente ejemplo, se descubrió que Sepabeads podía separar proantocianidinas que tienen pesos moleculares elevados. El producto extraído con acetato de etilo obtenido tratando el caqui con té verde y ácido cítrico y la sustancia adsorbida en Sepabeads SP825 se compararon con el producto extraído con acetato de etilo de té verde y extracto de acetona acuosa de caqui inmaduro utilizando TLC (véase TLC en la figura 4). Con respecto a la porción adsorbida en Sepabeads SP825, se realizó un análisis por HPLC de fase normal y se realizó una comparación con la fracción de polifenol (que contiene catequina monomérica, procianidina dimérica, trimérica y tetramérica y procianidina que tiene un peso molecular superior) obtenida separando el producto extraído con agua caliente de ciprés japonés con cromatografía en columna DIAION HP20SS (véase HPLC en la figura 5). Las condiciones del análisis de HPLC en fase normal fueron las siguientes:

35 columna: LiChroCART Superspher Si 60 (4.6 x 250 mm),
temperatura de la columna: 28°C,
fase móvil:
hexano: metanol: tetrahydrofurano: trifluoroacetato (45:40:13.5:1.5),
caudal: 1.0 ml/min,
40 detección: 254 nm.

Como controles, se utilizaron (-)-epicatequina (monómero), procianidina B4 (dímero), procianidina C1 (trímero) y cinnamtanina A2 (tetramero). Estos controles se separaron de las semillas de níspero y se identificaron mediante la comparación de espectros de RMN de ^1H con los valores descritos en las referencias. En la HPLC, aunque se observó un pico para la cafeína y además se confirmó que había polímeros de hasta cuatro moléculas de monómero, implicó menos cola de pico posteriormente en comparación con la proantocianidina de ciprés japonés.

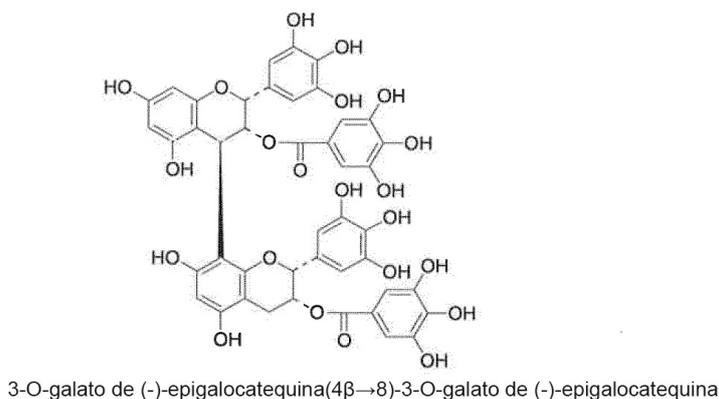
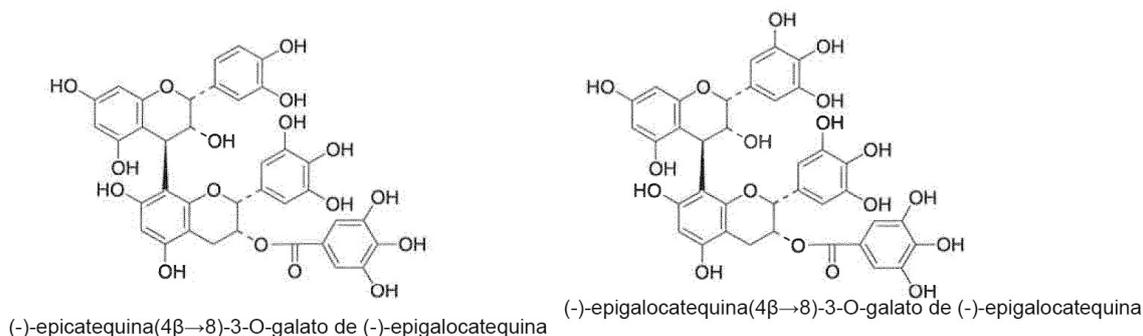
Ejemplo 6

50 Se pulverizó 1 kg de fruta caqui inmadura fresca junto con 2 l de agua y el resultado se mezcló con 200 g de té verde y 80 g de ácido cítrico. Se añadió agua para producir una cantidad total de 8 l y después la mezcla se sometió a ebullición suavemente durante 3 horas. Después del calentamiento, se realizó una filtración mientras estaba caliente. El filtrado obtenido se enfrió, se hizo pasar a través de una columna de Sepabeads SP825 y se lavó con agua. La porción adsorbida se eluyó con etanol acuoso, se concentró y después se liofilizó para obtener 59.0 g de una mezcla de catequina-proantocianidina. Se hicieron pasar 6 g de la mezcla obtenida a través de una columna de Sephadex LH-20 para fraccionarla así en ocho fracciones (Fr.) (véase la figura 6). La cantidad obtenida de Fr. 1, que contenía principalmente epicatequina y epigallocatequina, fue de 0.79 g. La cantidad obtenida de Fr. 2, que contenía principalmente 3-O-galato de epicatequina, fue de 0.15 g. La cantidad obtenida de Fr. 3, que contenía principalmente 3-O-galato de epigallocatequina, fue de 0.87 g. La cantidad obtenida de Fr. 4, que era una mezcla de 3-O-galato de epigallocatequina y proantocianidina dimérica, fue de 0.2 g. Las cantidades obtenidas de Fr. 5 y Fr. 6, que contenían proantocianidina dimérica, fueron de 0.25 g y 0.51 g respectivamente. La cantidad obtenida de Fr. 7, que contenía principalmente proantocianidina trimérica, fue de 0.88 g. La cantidad obtenida de Fr. 8, que contenía el mismo trímero que Fr. 7 o proantocianidinas que tienen un peso molecular superior al mismo, fue de 1.63 g. Entre estas fracciones, Fr. 5 y Fr. 6 se purificaron mediante cromatografía en columna MCI-gel CHP20P y cromatografía en columna ODS Chromatorex (utilizando ambas metanol acuoso como disolvente) para obtener de este modo 101.6 mg de (-)-epicatequina(4 β - \rightarrow 8)-3-O-galato de (-)-epigallocatequina, 121.1 mg de (-)

epigallocatequina(4 β →8)-3-O-galato de (-)-epigallocatequina y 24.3 mg de 3-O-galato de (-)-epigallocatequina(4 β →8)-3-O-galato de (-)-epigallocatequina (véanse las fórmulas estructurales siguientes). Además, aunque había presencia de muchos tipos de dímeros de proantocianidina, se logró la separación pura de los tres tipos anteriores, identificando sus estructuras mediante comparación de espectros de RMN de ^1H .

5

[Quím 7]

**Ejemplo 7 (únicamente de referencia): ejemplo de producción de compuesto unido a resveratrol**

10

Se disolvieron 100 mg de polvo de polifenol de semilla de uva (Grape Seed PE, productos de Guilin Layn Natural Ingredients Corp., contenido de proantocianidinas: 95% o superior) y 120 mg de resveratrol, junto con 100 mg de ácido cítrico, en 10 ml de agua, se dispusieron en agua caliente durante 3 horas (87 a 93°C) para permitir que la reacción se produjera, y el producto resultante se dejó en reposo para enfriarlo a temperatura ambiente. Con este líquido se cargó una columna de Sephadex LH-20 (diámetro interno 2 cm, longitud 15 cm, aproximadamente 50 ml, metanol al 70%). Se vertieron 50 ml de metanol al 70% y después 50 ml de metanol al 100% secuencialmente para hacerlos pasar a través de la columna, para concentrar así la fracción de la sustancia objetivo. Después del tratamiento de liofilización, se obtuvieron 6.0 mg de un polvo (en adelante, abreviado como Sustancia A).

15

20

Este polvo seco se disolvió en 1 ml de metanol al 70% y con esta solución, se cargó una columna MCI-gel CHP-20 (diámetro interno 2 cm, longitud 15 cm aproximadamente 50 ml). Se hicieron pasar 50 ml del mismo disolvente a través de la columna para concentrar así la fracción de la sustancia objetivo. Después del tratamiento de liofilización, se obtuvieron 2.4 mg de un polvo. El polvo obtenido se sometió a HR-FAB-MS (Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución) y RMN de ^1H (espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, véase la tabla 1). $[M]^+$ del compuesto, la fracción obtenida contenida principalmente se observó a m/z : 516.1404 en HR-FAB-MS, que coincidió con el valor 516.1420 correspondiente a una fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{O}_9$ con un error de 3.1 ppm. Por lo tanto, se asumió que la fracción contenía un compuesto representado por la fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{O}_9$, lo que condujo a una estructura química que se consideró como resveratrol unido a catequina o epicatequina a través de un enlace carbono-carbono.

25

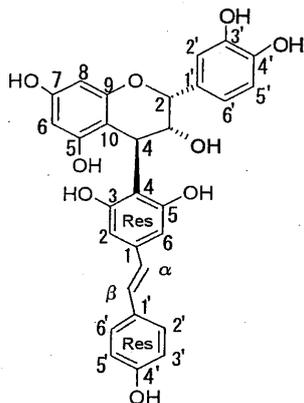
30

En el RMN de ^1H (ver la tabla 1) del compuesto, además de las cinco señales de protones en el anillo aromático que son comunes en catequina y epicatequina, se observó un grupo de señales que tenían átomos de oxígeno en bases a δ 5.04 (1H, s. ancho, 2-H) y δ 4.01 (1H, s. ancho, 3-H), que sugirieron la presencia de una configuración estérica de epicatequina. La señal en δ 4.64 (1H, s. ancho) se atribuyó a la posición 4a de la porción de epicatequina, y se asumió que la porción de resveratrol estaba ubicada en la posición 4b. Además, se observó una envoltura en 2H que tenía la misma forma que la de la señal observada en δ 6.55 en el floroglucinol, desplazándose

35

0.56 ppm de la presentación inferior, lo que muestra que el enlace C-C recién formado también tiene un entorno estérico similar. Además, se observaron el sistema AB en el doble enlace conjugado de tipo E derivado de una estructura transestilbeno de resveratrol (δ 6.79, 6.97, cada una 1H, $J = 16.5$ Hz), y A2B2 señalan en el otro anillo aromático (δ 6.80, 7.36, cada una 2H, $J = 8.6$ Hz). Sobre la base de la información, se asumió que la estructura química del compuesto es 4b-(4-resveratrol)-(-)-epicatequina, tal como se muestra a continuación.

[Quím. 8]



10

[Tabla 1]

Tabla 1: Asignación de la señal de RMN de ^1H de la sustancia A (δ en ppm)

Nº de H	
2-H	5.01(s. ancho)
3-H	3.96 (s. ancho)
4-H	4.53 (s. ancho)
6-H	6.01 (d, $J = 2.2$ Hz)
8-H	5.98 (d, $J = 2.2$ Hz)
2'-H	6.96 (d, $J = 1.7$ Hz)
5'-H	6.74 (d, $J = 8.3$ Hz)
6'-H	6.67 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz)
Ph 4-H	5.99 (envoltura)
6-H	5.99 (envoltura)

Nota 1) La sustancia se midió en acetona- d_6 - D_2O .

Ejemplo 8 (únicamente referencia): ejemplo de producción de compuesto unido a floroglucinol

15

Cada 1.00 g de polifenol de semilla de uva y floroglucinol se disolvieron junto con 500 mg de ácido cítrico en 50 ml de agua y la mezcla se dispuso en agua caliente (87 a 93°C) durante 3 horas. Después de la reacción, se dejó en reposo el producto resultante para enfriarlo a temperatura ambiente. Después de cargar una columna de DIAION HP20 (diámetro interior 3 cm, longitud 14 cm, aproximadamente 100 ml) con esta solución, se realizó un lavado con aproximadamente 300 ml de agua. Después se llevó a cabo una elución con aproximadamente 200 ml de metanol, y la fracción objetivo se concentró y se liofilizó para obtener 1.24 g de un polvo (en adelante, abreviado como sustancia B).

20

25

La sustancia B se disolvió en 5 ml de metanol al 70% y se cargó una columna de Sephadex LH-20 (diámetro interno 3 cm, longitud 25 cm, aproximadamente 180 ml) con la solución. Se hicieron pasar 500 ml del mismo disolvente a través de la columna, y la fracción objetivo se concentró y se liofilizó para obtener de esta forma 62.2 mg de un polvo. El polvo obtenido se sometió a análisis por HR-FAB-MS y RMN de ^1H . Con respecto al compuesto que la fracción obtenida contenía principalmente, $[\text{M}]^+$ se observó a m/z : 414.0941, en HR-FAB-MS, que coincidió con el valor de cálculo 414.0950 correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_9$, con un margen de error de 2.2 ppm.

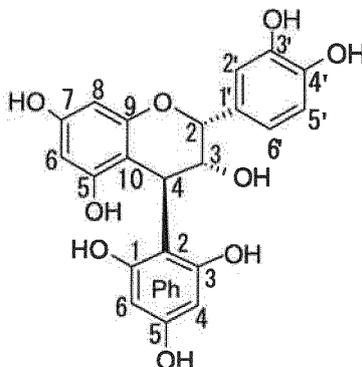
30

(Se permite un error de 10 ppm o inferior). En consecuencia, se asumió que el compuesto tenía una fórmula molecular de $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_9$, lo que sugirió una estructura química en la que el floroglucinol estaba unida a la catequina o epicatequina a través de un enlace carbono-carbono. En el RMN de ^1H del compuesto (véase la tabla 2), además de cinco señales de protones en el anillo aromático común a la catequina y la epicatequina, se observó un grupo de señales que tenían átomos de oxígeno en la base a 5.01 (1H, s. ancho, 2-H) y 3.96 (1H, s. ancho, 3-H), lo que sugiere que el compuesto tenía una configuración estérica de epicatequina. Se asumió que la señal de protones de δ 4.53 (1H, s. ancho) era atribuible a la posición 4 de la porción de epicatequina y que la porción de floroglucinol estaba ubicada en la posición 4. Además, se observó una señal atribuible a c-4 y c-6 derivados de floroglucinol en 2H a δ 5.99 como envoltura equivalente, lo que sugiere que el enlace C-C recién formado generó una barrera de

35

rotación. Sobre la base de esta información, se asumió que la estructura química del compuesto era 4-(2-floroglucinol)-(-)-epicatequina, tal como se muestra en la fórmula siguiente. RMN de ^{13}C (espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13, ver la tabla 3) sobre el compuesto que confirma la estructura química.

5 [Quím. 9]



10

[Tabla 2]

Tabla 2: Asignación de señal de RMN de ^1H de la sustancia B (δ en ppm)

Nº de H	
2-H	5.04 (s. ancho)
3-H	4.01 (s. ancho)
4-H	4.64 (s. ancho)
6-H	6.00 (d, $J = 2.2$ Hz)
8-H	6.02 (d, $J = 2.2$ Hz)
2'-H	6.97 (d, $J = 1.7$ Hz)
5'-H	6.74 (d, $J = 8.3$ Hz)
6'-H	6.67 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz)
Res 2 y 6-H	6.55 (envoltura)
α -H	6.79 (d, $J = 16.5$ Hz) ^{a)}
β -H	6.97 (d, $J = 16.5$ Hz) ^{a)}
2' y 6'-H	6.80 (d, $J = 8.6$ Hz) ^{c)}
3' y 5'-H	7.36 (d, $J = 8.6$ Hz) ^{c)}

Nota 1) La sustancia B se midió en acetona- d_6 -D₂₀.

2) Si la misma letra se adjunta como superíndice derecho, la asignación puede intercambiarse entre sí.

[Tabla 3]

Tabla 3: Asignación de señal de RMN de ^{13}C de la sustancia B (δ en ppm)

Nº de C	
C-2	76.8
- 3	72.3
- 4	36.7
- 5	157.7 ^{a)}
- 6	95.4
- 7	158.4 ^{b)}
- 8	96
- 9	158.5 ^{b)}
- 10	100.3
- 1'	132.2
- 2'	115
- 3'	145.0 ^{c)}
- 4'	145.3 ^{c)}
- 5'	115.1
- 6'	119
Ph - 1	157.7 ^{a)}
- 2	100.3
- 3	157.5 ^{a)}

Tabla 3: Asignación de señal de RMN de ^{13}C de la sustancia B (δ en ppm)

Nº de C	
- 4	106.6
- 5	157.7 ^{a)}
- 6	106.6

Nota 1) La sustancia B se midió en acetona- d_6 D₂O.

2) Si la misma letra se adjunta como superíndice derecho, la asignación puede intercambiarse entre sí.

Ejemplo 9: ejemplo de producción de compuesto que presenta galato de epigallocatequina (EGCG) derivado de semilla de uva unido al mismo

5 Se dispersaron 5.00 g de polvo de polifenol de semilla de uva (Grape Seed P.E., LAYN, contenido de proantocianidina: 95%) y se disolvieron en aproximadamente 100 ml de agua y después la solución se vertió en una columna de SEPABEADS SP850 (diámetro interno 3.8 cm, longitud 20 cm, aproximadamente 230 ml) y se eluyó con agua. La fracción obtenida se concentró y se liofilizó para obtener de esta forma 2.44 g de un polvo de polímero (48.8%).

10 Cada 1.00 g del polvo de polímero de polifenol de semilla de uva obtenido y EGCG se disolvieron junto con 500 mg de ácido cítrico en 50 ml de agua y el recipiente que contenía la mezcla se dispuso en agua caliente (87 a 93°C) durante tres horas. Después de la reacción, se dejó en reposo para enfriarlo a temperatura ambiente. Se cargó una columna de DIAION HP20 (diámetro interno 3 cm, longitud 14 cm, aproximadamente 100 ml) con este líquido y se realizó un lavado con aproximadamente 300 ml de agua. La fracción obtenida mediante elución con aproximadamente 200 ml de metanol se concentró y se liofilizó para obtener de esta forma 1.85 g de un polvo (en adelante abreviado como sustancia C).

20 **Ejemplo 10: ejemplo de producción de un compuesto que tiene polifenol EGCG (polímero EGCG) de Myricae Cortex unido al mismo**

25 Un trozo de árbol de la cera (Myricaceae), un trozo de corteza de Myrica rubra (Myricaceae), es decir, "Myricae Cortex", se sumergió en acetona fría al 50% en una cantidad de 5 a 10 veces (P/V) la del trozo durante 3 a 7 días para obtener de este modo un extracto marrón oscuro líquido. El líquido obtenido se concentró y el cristal amarillo de miricitrina (3-O- α -L-rhamnospiranósido de miricetina) se eliminó por filtración repetidamente utilizando papel de filtro. El filtrado obtenido, después de una concentración adicional, se liofilizó para obtener de esta forma un polvo marrón oscuro con un rendimiento del 14% del trozo de resina. Se disolvieron 14.0 g de este polvo en aproximadamente 70 ml de metanol al 50% y se cargó una columna de Sephadex LH-20 (diámetro interno 5 cm, longitud 20 cm, aproximadamente 400 ml) con la solución. Después hacer pasar 1.5 l del mismo disolvente y después 0.7 l de metanol al 70% a través de la columna, se hizo pasar 1 l de acetona al 70% a través de la misma, para recuperar la fracción de polímero EGCG. La fracción obtenida se concentró y se liofilizó para obtener 9.37 g de un polvo de polímero de EGCG (66.9%). Cada 1 g de polímero de EGCG derivado de Myricae Cortex y EGCG se disolvió con 500 mg de ácido cítrico en 50 ml de agua y el recipiente que contenía la mezcla se dispuso en agua caliente (87 a 93°C) durante 3 horas. Después de la reacción, se dejó en reposo el producto resultante para enfriarlo a temperatura ambiente. Se cargó una columna de DIAION HP20 (diámetro interno 3 cm, longitud 14 cm, aproximadamente 100 ml) con este líquido, se realizó un lavado con aproximadamente 300 ml de agua. La fracción obtenida eluyendo con aproximadamente 200 ml de metanol se concentró y se liofilizó, para obtener de este modo 1.85 g de un polvo (en adelante denominado "sustancia D").

40 **Ejemplo 11: ejemplo de producción de un compuesto derivado de la piel de caqui que tiene polifenol de té unido al mismo**

45 1.00 g de polvo seco de piel de caqui y 300 mg de extracto de té (PF-TP 90, fabricado por Pharma Foods International co., Ltd., contenido de polifenol de té: 90% o superior, contenido total de catequina: 80% o superior (siendo el contenido de EGCG del 50% o superior) se disolvió con 500 mg de ácido cítrico en 50 ml de agua y el recipiente que contenía la mezcla se dispuso en agua caliente (87 a 93°C) durante 3 horas. Después de la reacción, se dejó en reposo el producto resultante para enfriarlo a temperatura ambiente. Después de cargar una columna de SEPABEADS SP850 (diámetro interno 3 cm, longitud 14 cm, aproximadamente 100 ml) con este líquido, se llevó a cabo un lavado con aproximadamente 300 ml de agua y se eluyó con aproximadamente 200 ml de metanol. Después de cargar una columna de DIAION HP20 (diámetro interno 3 cm, longitud 14 cm, aproximadamente 100 ml) con la fracción obtenida, se realizó un lavado con aproximadamente 300 ml de agua. Después se realizó la fracción obtenida por elución con aproximadamente 200 ml de agua. El metanol se concentró y se liofilizó para obtener de esta forma 464 mg de un polvo (en adelante, denominado "sustancia E").

55 **Ejemplo 12: ejemplo de producción de un compuesto que tiene polifenol galato de epigallocatequina (EGCG) derivado de lichi unido al mismo**

Se dispersaron 5.00 g de polifenol en polvo de lichi (Litchi P.E., producto de Guilin Layn Natural Ingredients Corp.,

contenido de proantocianidina: 90% o superior) y se disolvieron en aproximadamente 100 ml de agua y se cargó una columna de SEPABEADS SP850 (diámetro interior de 3.8 cm, longitud 20 cm, aproximadamente 230 ml) con la mezcla. La fracción obtenida eluyendo con agua se concentró y se liofilizó para obtener de esta forma 3.02 g de un polvo de polímero (60.4%).

Cada 1.00 g del polvo de polímero de polifenol de lichi obtenido y EGCG se disolvieron con 500 mg de ácido cítrico en 50 ml de agua y el recipiente que contenía la mezcla se dispuso en agua caliente (87 a 93°C) durante 3 horas. Después de la reacción, se dejó en reposo el producto resultante para enfriarlo a temperatura ambiente. Después de cargar una columna de DIAION HP20 (diámetro interno 3 cm, longitud 14 cm, aproximadamente 100 ml) con este líquido, se llevó a cabo un lavado con aproximadamente 300 ml de agua. La fracción obtenida eluyendo con aproximadamente 200 ml de agua se concentró y se liofilizó para obtener de esta forma 1.80 g de un polvo (en adelante denominada sustancia F).

Ejemplo de ensayo 1:

Con respecto a las sustancias A a E obtenidas en los ejemplos 7 a 11, respectivamente, se realizaron ensayos de evaluación de las propiedades antioxidantes midiendo la actividad de captación del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y el procedimiento TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox).

[Ensayo DPPH]

Procedimientos:

Con respecto a cada muestra, se evaluó la actividad de captación del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) de la forma siguiente. En una microplaca de 96 orificios, se colocaron 100 µl de solución de DPPH (solución de etanol 60 µM). A la misma se añadieron 100 µl de solución de etanol de la muestra de ensayo o 100 µl de etanol como control, y la mezcla se mezcló suavemente y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se midió la absorbancia a 520 nm. La actividad de captación del radical DPPH se calculó mediante la fórmula siguiente y se calculó una concentración eficaz al 50% (CE50) a partir del valor de la actividad de captación del radical DPPH de la muestra de ensayo diluida gradualmente y su concentración.

[Fórmula 1]

$$\text{Actividad de captación del radical DPPH (\%)} = (1 - \text{absorbancia de la muestra de ensayo}) / \text{absorbancia del control} \times 100$$

Como sustancia que se va a comparar con la sustancia A, se utilizaron epicatequina (EP) y resveratrol (RS). Como sustancia que se va a comparar con la sustancia B, se utilizaron epicatequina y floroglucinol (PL). Como sustancia que se va a comparar con las sustancias C a E, se utilizó polímero de polifenol (GP) de semilla de uva. Los resultados de la medición se muestran en las figuras 7 a 9, junto con datos de sustancias comparadas.

En la epicatequina, se reconoció una actividad de DPPH del 48.7%, mientras que en el resveratrol, la actividad fue solo del 23.1%. En la sustancia A, en la que se combinaron la epicatequina y el resveratrol, la actividad fue tan alta como 76.1%, que era significativamente excelente (figura 7).

En la epicatequina, se observó una actividad de DPPH del 43.0%, mientras que en la floroglucinol se observó poca actividad de este tipo. La sustancia B, en la que se combinó el floroglucinol con epicatequina, mostró una actividad de captación significativamente alta en comparación con ambas sustancias (figura 8).

Además, las sustancias C (41.3%) y D (35.1%) mostraron mayores actividades de captación que las sustancias comparadas (26.9%). La actividad de captación de la sustancia E (26.8%) demostró ser equivalente a la de las sustancias comparadas (figura 9).

[TEAC]

Procedimiento: el procedimiento TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox) es un procedimiento para evaluar la fuerza antioxidante mediante la conversión de la actividad antioxidante de un compuesto en la actividad antioxidante de Trolox, que es un derivado de α-tocoferol, y el procedimiento se emplea ampliamente como índice de actividad antioxidante.

A 36 µl de solución de metamioglobina 70 µM, se añadieron 300 µl de solución ABTS y 487 µM de solución salina tamponada con fosfato 5 mM. Posteriormente, se añadió solución de muestra o solución de Trolox 1.25 mM y se mezcló suavemente durante 5 minutos a 0°C. Después de añadir 167 µl de solución de peróxido de hidrógeno 450 µM y de mezclar durante 10 segundos, se dejó que la reacción transcurriera durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 734 nm y se calculó la relación de absorbancia entre la muestra y la solución de Trolox que servía como valor TEAC de la muestra frente a Trolox 1.00 mM.

Como en el ensayo DPPH descrito anteriormente, como sustancia que se va a comparar con la sustancia A, se utilizaron epicatequina y resveratrol y como sustancia que se va a comparar con la sustancia B se utilizaron epicatequina y floroglucinol. Como sustancia que se va a comparar con las sustancias C a E, se utilizó el polímero de polifenol de semilla de uva. Los resultados de la medición se muestran en las figuras 10 a 12, junto con datos de sustancias comparadas.

En la epicatequina, se observó una actividad de TEAC de 1.2 mM, mientras que en el resveratrol, la actividad fue de solo 1.11 mM. En la sustancia A, en la que la epicatequina y el resveratrol se combinaron entre sí, la actividad fue de 1.33 mM, que fue significativamente alta (figura 10). En el floroglucinol, la actividad de TEAC fue de tan solo 0.52 mM mientras que en la Sustancia B en la que se combinó la epicatequina con el floroglucinol, la actividad fue de 1.44 mM, que fue significativamente mayor que los dos cuando estaban solo (figura 11).

Las sustancias C (1.11), D (1.11) y E (0.97) mostraron valores de TEAC elevados en comparación con la sustancia comparada (0.73) (figura 12).

Ejemplo de ensayo 2:

Como sustancia que se va a comparar con la sustancia F obtenida en el ejemplo 12, se utilizaron polifenol de nuez de lichi (LP) y extracto de té para realizar un experimento comparativo.

[Ensayo *in vitro*]

Procedimiento de ensayo: se sembraron células NIH3T3 en una placa de 96 orificios y se cultivaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, el medio se cambió a un medio de cultivo exento de suero y se añadió la sustancia que se va a analizar y se llevó a cabo un cultivo adicional durante una hora. Luego, se irradió UV durante 20 minutos. El medio se cambió a un medio que contenía suero y el cultivo se llevó a cabo durante la noche a 37°C. La viabilidad celular se evaluó mediante el procedimiento MTT. La célula en el medio sin adición de la sustancia que se va a analizar se utilizó como grupo de control (C).

Los resultados se muestran en la figura 13. En el grupo de control, la viabilidad celular frente a la radiación UV fue de aproximadamente el 20%, mientras que en la sustancia F, la viabilidad fue la más alta, lo que mostró que la sustancia F redujo significativamente el número de muertes celulares. En comparación con la sustancia comparada, tenía efecto de protección UV.

[Ensayo *in vivo*]

Procedimiento de ensayo: Se administraron a ratones macho Slc:ddY de 9 semanas de edad la sustancia F, LP y TE, respectivamente, por vía oral de forma forzada, cada una en una cantidad de 50 mg/kg de peso corporal todos los días durante 3 semanas. A un grupo control de ratones (C), se administró la misma cantidad de agua. Dos horas después de la administración de la sustancia de ensayo el último día, se midieron la actividad antioxidante de TEAC y la cantidad de peróxido de lípidos en el suero mediante la recolección de sangre del corazón bajo anestesia con éter. La medición de TEAC se realizó de la forma descrita anteriormente. La cantidad de peróxido de lípidos se midió utilizando un kit disponible comercialmente (ensayo de peróxido de lípido Wako, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y midiendo la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 515 nm y una longitud de onda fluorescente de 553 nm en reacción entre la precipitación del peróxido de lípidos y reactivo de ácido 2-tiobarbitúrico en solución de ácido fosfotúngstico en condiciones ácidas de ácido sulfúrico.

Los resultados se pueden observar en las figuras 14 y 15. La sustancia F mostró una actividad antioxidante significativamente alta en comparación con la sustancia comparada y el grupo de control. Además, la cantidad de peróxido de lípido en el suero fue significativamente baja en comparación con el caso en el que se utiliza la sustancia comparada.

[Ensayo *in vivo*]

Procedimiento de ensayo: Se administró a ratones macho Slc:ddY de 6 semanas de edad la sustancia F, LP y TE, respectivamente, por vía oral de forma forzada, cada una en una cantidad de 50 mg/kg de peso corporal todos los días durante 3 semanas. A un grupo control de ratones (C), se administró la misma cantidad de agua.

El día antes de la disección, se administró por vía intraperitoneal 2-NP (70 mg/kg de peso corporal) y 24 horas después, se realizó la recolección de sangre del corazón bajo anestesia con éter para medir así GOT y GPT en el suero. Además, se aisló el hígado para medir la cantidad de peróxido de lípido en el órgano.

Los resultados son visibles en las figuras 16 y 17. Debido a la administración de 2-NP, se produjo un trastorno en el hígado, que dio como resultado un aumento de las concentraciones de GOT y GPT. Sin embargo, la sustancia F redujo significativamente dichos aumentos en comparación con el grupo de control y la sustancia comparada.

Además, la cantidad de peróxido de lípidos en el hígado fue significativamente baja en comparación con el caso en el que se utiliza la sustancia comparada.

[Breve descripción de los dibujos]

5 La figura 1 (A) es un cromatograma de HPLC del ejemplo 3 en el que se trata la corteza de ciprés japonés y el té verde térmicamente en condiciones ácidas. Las figuras 1 (B) y (C) son cromatogramas de HPLC del ejemplo 3, en las que se tratan corteza de ciprés japonés (figura 1 (B)) y té verde (figura 1 (C)), cada uno independientemente con calor en condiciones ácidas, respectivamente.

10 La figura 2 es una fotografía de TLC que muestra que las nuevas proantocianidinas que no habían estado presentes en la materia prima corteza de ciprés japonés y té verde se generaron tratando térmicamente los materiales con calor en el ejemplo 4. En la figura, A es el resultado en la capa de acetato de etilo del té verde después del tratamiento, B es el resultado en la capa de acetato de etilo de la corteza del ciprés japonés después del tratamiento y C es el resultado en la capa de acetato de etilo de la corteza del ciprés japonés y el té verde después del tratamiento. La mancha M se deriva de un monómero no galoilado, la MG se deriva de un monómero de proantocianidina galoilado, la D se deriva principalmente de un dímero de proantocianidina galoilado y la T se deriva principalmente de un trímero de proantocianidina galoilado.

20 La figura 3 es una fotografía de TLC que muestra que las nuevas proantocianidinas que no habían estado presentes en la materia prima extracto de piel de plátano y té verde se generaron tratando térmicamente los materiales con calor en el ejemplo 6. En la figura, A es el resultado en la capa de acetato de etilo del té verde solo después del tratamiento, B es el resultado en la capa de acetato de etilo del extracto de piel de plátano solo después del tratamiento, y C es el resultado en la capa de acetato de etilo del extracto de piel de plátano y del té verde después del tratamiento.

25 La figura 4 es una fotografía de TLC que muestra que las nuevas proantocianidinas que no habían estado presentes en la materia prima fruta caqui inmadura y té verde se generaron tratando térmicamente los materiales con calor en el ejemplo 5. En la figura, A es el resultado en la capa de acetato de etilo del té verde solo después del tratamiento, B es el resultado en la capa de acetato de etilo de la fruta caqui inmadura sola después del tratamiento, C es el resultado en la capa de acetato de etilo de la fruta caqui inmadura y té verde después del tratamiento y D es el resultado del producto obtenido al permitir que el resultante (extracto líquido) obtenido tratando la fruta caqui inmadura y el té verde pase a través de Sepabead 825 y eluyendo la porción adsorbida con agua-etanol. Los puntos M, MG, D y T son los mismos que en la figura 2.

30 La figura 5 (A) son los resultados del análisis de HLPC en fase normal en el producto obtenido después de permitir que el resultante (extracto líquido) obtenido al tratar fruta caqui inmadura y té verde pase a través de Sepabead 825 y eluyendo después la porción adsorbida con agua-etanol en el ejemplo 5. La figura 5 (B) son los resultados del análisis de HLPC en fase normal sobre la proantocianidina de ciprés japonés utilizada como ejemplo comparativo.

35 La figura 6 muestra el resultado del análisis de TLC en las fracciones (Fr 1 a Fr 8) obtenidas al tratar fruta caqui inmadura y té verde con calor en condiciones ácidas y luego permitir que las catequinas y proantocianidinas obtenidas pasen a través de una columna cromatográfica Sephadex LH - 20 y sobre una mezcla (E) antes de la separación del ejemplo 6.

La figura 7 representa la actividad de captación de radicales DPPH de la sustancia A obtenida en el ejemplo 7.

40 La figura 8 representa la actividad de captación de radicales DPPH de la sustancia B obtenida en el ejemplo 8.

La figura 9 representa la actividad de captación de radicales DPPH de las sustancias C a E obtenidas en los ejemplos 9-11.

45 La figura 10 representa los resultados de la evaluación mediante el procedimiento TEAC sobre la capacidad antioxidante de la sustancia A obtenida en el ejemplo 7.

La figura 11 representa los resultados de la evaluación mediante el procedimiento TEAC sobre la capacidad antioxidante de la sustancia B obtenida en el ejemplo 8.

50 La figura 12 representa los resultados de la evaluación mediante el procedimiento TEAC sobre la capacidad antioxidante de las sustancias C a E obtenidas en los ejemplos 9 a 11.

La figura 13 representa los resultados del ensayo del efecto de protección UV sobre la sustancia F obtenida en el ejemplo 12.

55 La figura 14 representa los resultados de la evaluación mediante el procedimiento TEAC sobre la capacidad

antioxidante de la sustancia F obtenida en el ejemplo 12.

La figura 15 representa los resultados de medición del nivel de LPO en el suero en el ensayo de capacidad antioxidante sobre la sustancia F obtenida en el ejemplo 12.

5

La figura 16 representa los resultados de medición de los niveles de GOT y GPT en el suero en el ensayo de capacidad antioxidante sobre la sustancia F obtenida en el ejemplo 12.

10

La figura 17 representa los resultados de medición del nivel de LPO en el hígado en el ensayo de capacidad antioxidante sobre la sustancia F obtenida en el ejemplo 12.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para producir la composición que contiene como su componente principal oligómero de proantocianidina que presenta un grado de polimerización de 2 a 4, en el que son compuestos terminales galato de catequina o de epigalocatequina, que comprende una etapa de calentar los materiales vegetales que contienen polímero de proantocianidina o un extracto de los mismos con té verde, un extracto del mismo o galato de epigalocatequina, plantas que contienen dicha sustancia o su extracto en una solución acuosa ácida utilizando ácido en una concentración de 0.1 a 1.0 N y una etapa de concentrar la solución de reacción que contiene oligómero de proantocianidina que presenta un grado de polimerización de 2 a 4 y que presenta galato de catequina o epigalocatequina unido a los extremos y de secar la solución o de someter la solución concentrada a un tratamiento de fraccionamiento.
- 10
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la planta que contiene polímero de proantocianidina es por lo menos un tipo seleccionado de entre un grupo que consiste en uva, pino, *Chamaecyparis obtusa*, alcanforero, árbol de la cera, cacao, palo santo, plátano, membrillo chino, manzana, espino blanco, lichi, *Myrica rubra* y Cinnamomi Cortex.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que las condiciones ácidas se preparan utilizando un ácido inorgánico, un ácido orgánico o ambos.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que como el ácido se utiliza por lo menos un tipo seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico y ácido málico.

Fig1

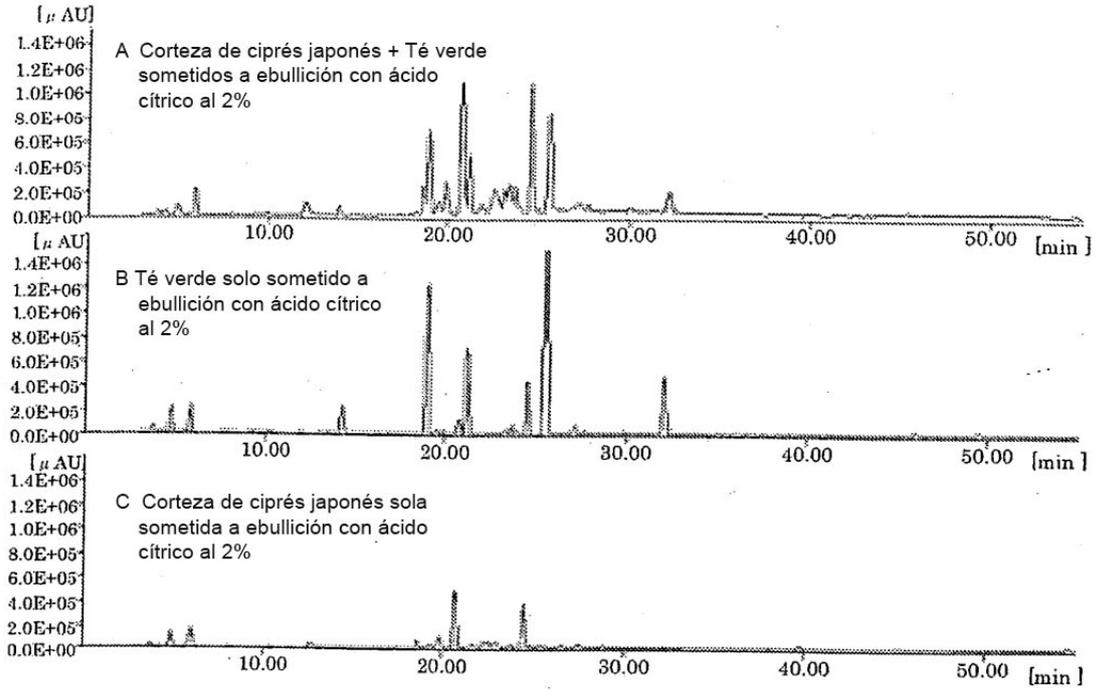


Fig2

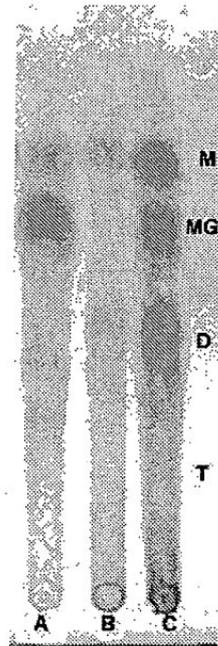


Fig3

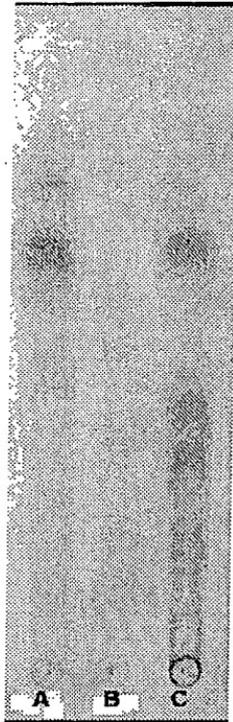


Fig4



Fig5

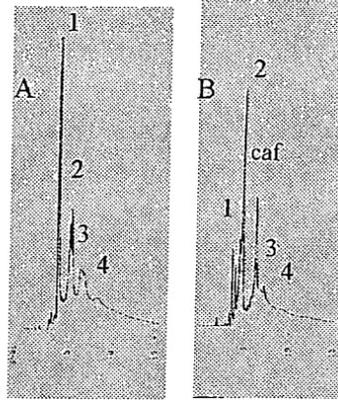
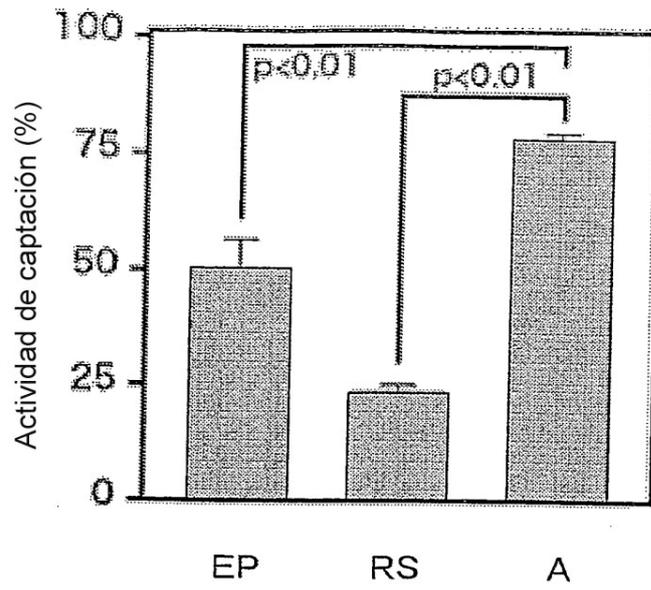
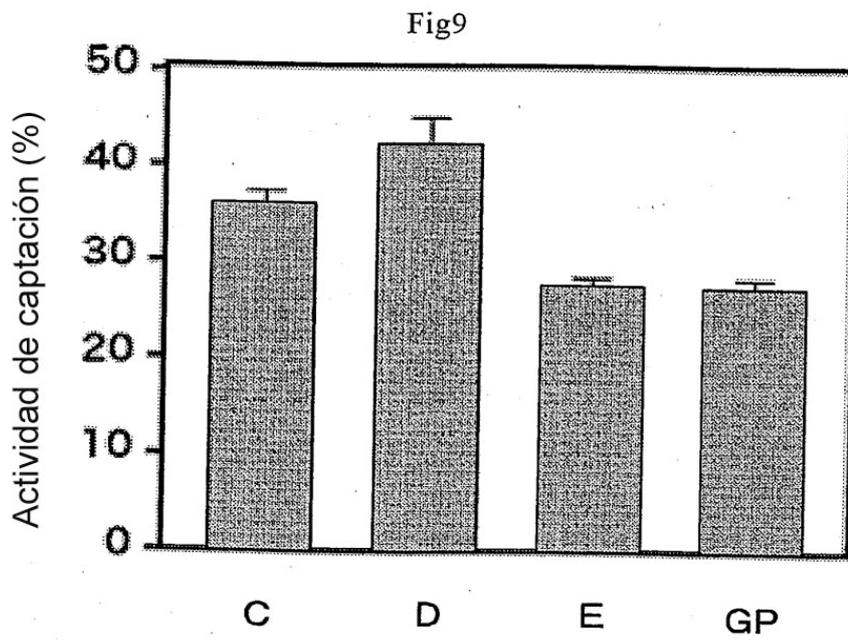
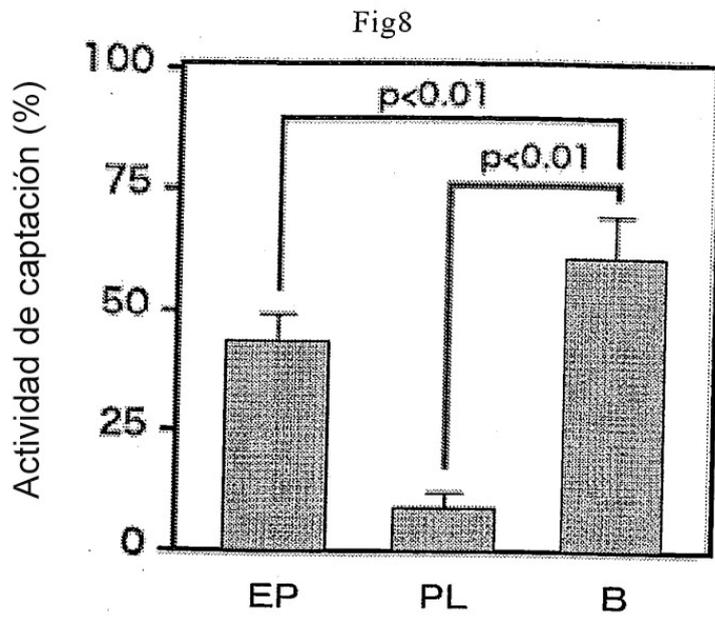


Fig6



Fig7





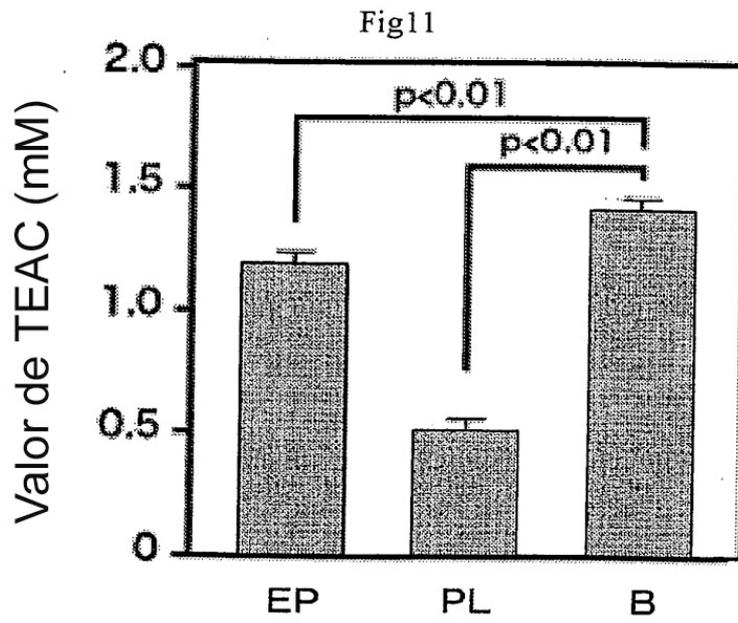
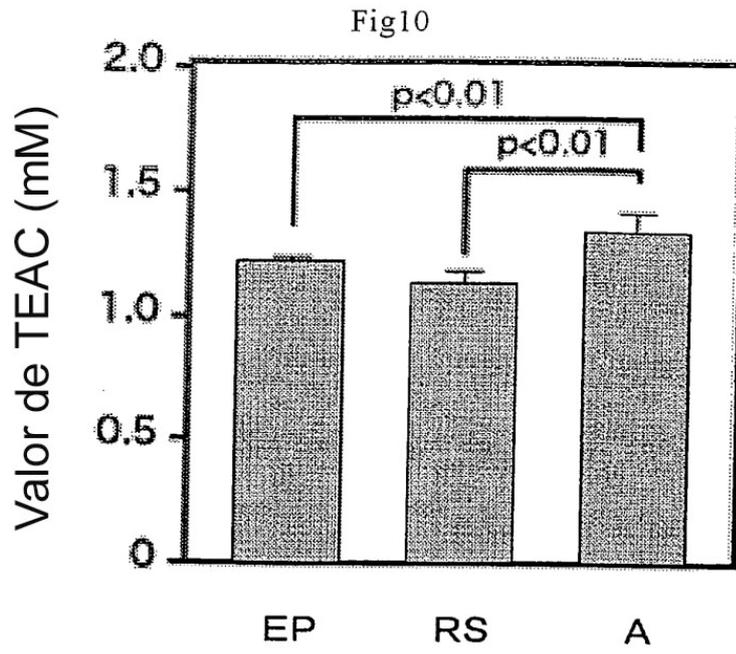


Fig12

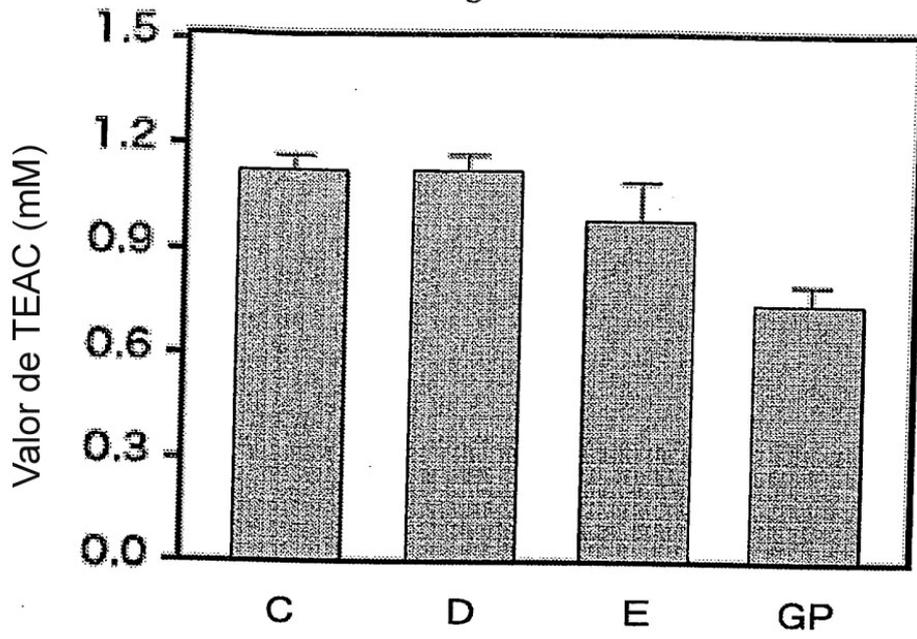


Fig13

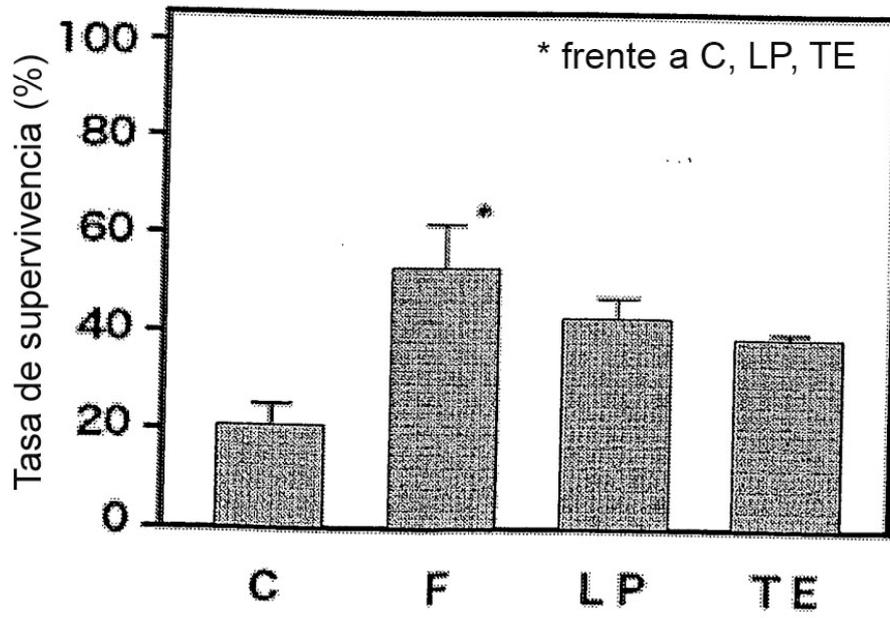


Fig14

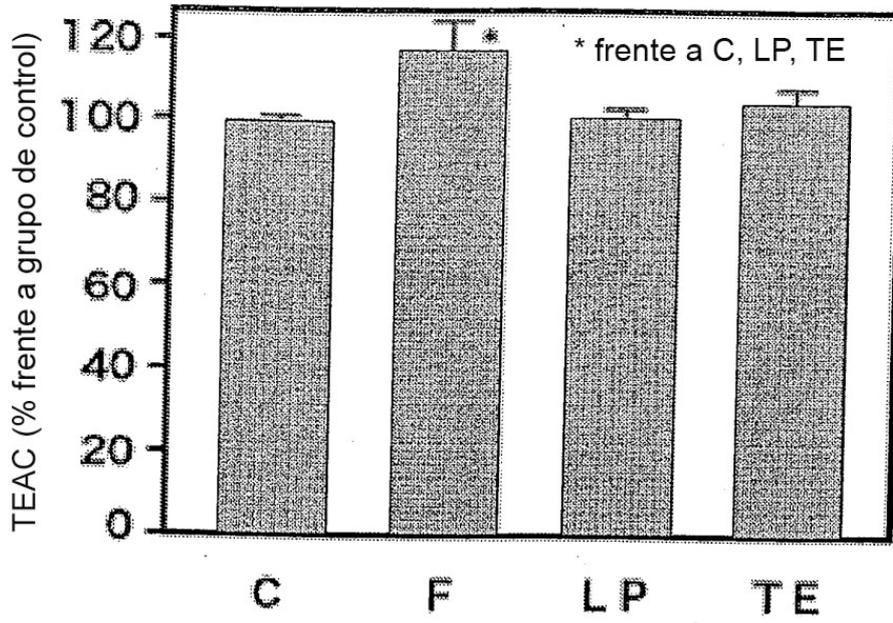


Fig15

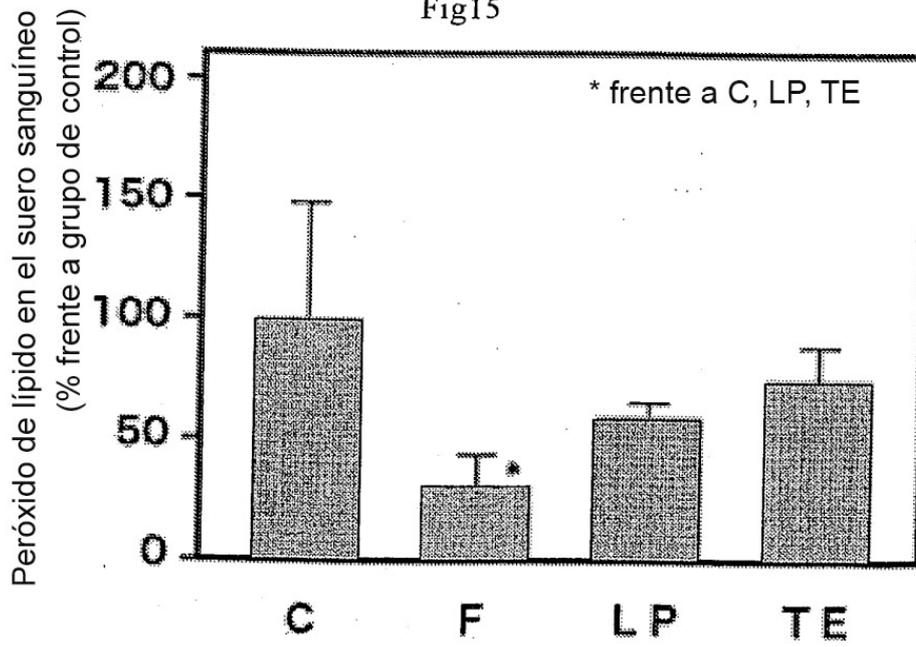


Fig16

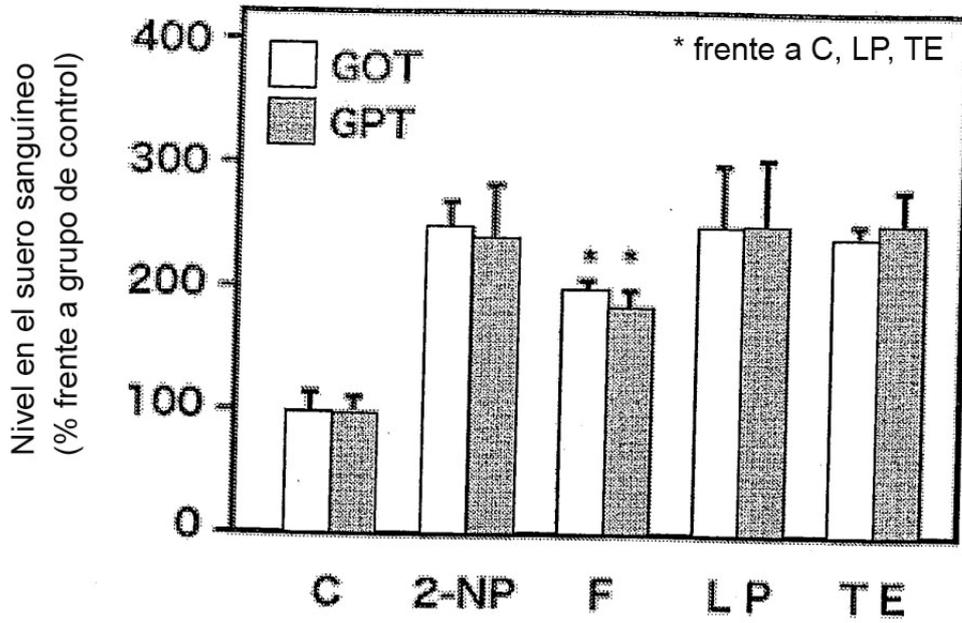


Fig17

