

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610099610.7

[51] Int. Cl.

A61K 36/66 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 12 月 6 日

[11] 公开号 CN 1872172A

[22] 申请日 2006.5.30

[21] 申请号 200610099610.7

[30] 优先权

[32] 2005.5.31 [33] EP [31] 05011690.4

[71] 申请人 卡夫食品研发公司

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 A·布拉德博里 G·科普

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘维升 李炳爱

权利要求书 3 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称

从可可壳提取的富多酚组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种可可壳的提取方法，其提供了富可可碱部分或组合物以及富多酚部分或组合物。

1、一种从可可壳生产富可可碱组合物和富多酚组合物的方法，所述方法包括：

5 (1) 提供脱脂可可壳；

 (2) 用丙酮水溶液对脱脂可可壳进行提取，所述丙酮水溶液含有约 30—约 80%的丙酮，从而提供液体可可壳提取材料；

 (3) 对可可壳提取材料进行处理以除去悬浮固体，从而提供经处理的液体可可壳提取材料；

10 (4) 从经处理的液体可可壳提取材料中除去丙酮，从而提供含水的提取材料；

 (5) 将含水提取材料浓缩到约 1.5—约 5%固体，从而提供经浓缩的提取材料；

15 (6) 将经浓缩的提取材料应用于凝胶过滤柱，所述柱含有适于将可可碱和多酚相互分离的凝胶过滤介质；

 (7) 用水对凝胶过滤柱进行冲洗，从而收集富可可碱的组合物；和

 (8) 用低分子量的有机溶剂对已经用水冲洗过的凝胶过滤柱进行洗脱，从而收集富多酚组合物，其中，富多酚组合物基本上不含有植物甾醇和可可碱。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中，丙酮水溶液含有约 40—约 60%的丙酮。

20 3. 根据权利要求 1 的方法，其中，丙酮水溶液含有约 50%的丙酮。

 4. 根据权利要求 2 的方法，其中，对富可可碱组合物进行处理以使富可可碱组合物中的可可碱得以浓缩。

 5. 根据权利要求 2 的方法，其中，对富多酚部分进行处理以使富多酚组合物中的多酚得以浓缩。

25 6. 根据权利要求 5 的方法，其中，对富多酚部分进行处理以使富多酚组合物中的多酚得以浓缩。

 7. 根据权利要求 1 的方法，其中，重复步骤 (2) 中的提取 2—5 次，合并每次重复的提取所得的液体可可壳提取材料。

30 8. 根据权利要求 2 的方法，其中，重复步骤 (2) 中的提取 2—5 次，合并每次重复的提取所得的液体可可壳提取材料。

9. 根据权利要求1的方法, 其中, 可可壳获自经烘烤发酵的可可豆。
10. 根据权利要求1的方法, 其中, 可可壳获自经烘烤未发酵的可可豆。
11. 根据权利要求1的方法, 其中, 可可壳获自未烘烤经发酵的可可豆。
12. 根据权利要求1的方法, 其中, 可可壳获自未经烘烤并且未发酵的可
5 可豆。

13. 一种基本上不含植物甾醇和可可碱的富多酚组合物, 所述组合物由包括下述步骤的方法制成:

- (1) 提供脱脂可可壳;
- (2) 用丙酮水溶液对脱脂可可壳进行提取, 所述丙酮水溶液含有约 30—
10 约 80%的丙酮, 从而提供液体可可壳提取材料;
- (3) 对可可壳提取材料进行处理以除去悬浮固体, 从而提供经处理的液体可可壳提取材料;
- (4) 从经处理的可可壳提取材料中除去丙酮, 从而提供含水的提取材料;
- 15 (5) 将含水提取材料浓缩到约 1.5—约 5%固体, 从而提供经浓缩的提取材料;
- (6) 将经浓缩的提取材料应用于凝胶过滤柱, 所述柱含有适于将可可碱和多酚相互分离的凝胶过滤介质;
- (7) 用水对凝胶过滤柱进行冲洗, 以去除富可可碱组合物, 并且;
- 20 (8) 用低分子量的有机溶剂对已经用水冲洗过的凝胶过滤柱进行洗脱, 从而收集富多酚组合物, 其中, 富多酚组合物基本上不含有植物甾醇和可可碱。

14. 权利要求13的富多酚组合物, 其中, 丙酮水溶液含有约 40—约 60%的丙酮。

15. 权利要求13的富多酚组合物, 其中, 丙酮水溶液含有约 50%的丙酮。

25 16. 权利要求13的富多酚组合物, 其中, 对富多酚部分进行处理以使富多酚组合物中的多酚得以浓缩。

17. 权利要求13的富多酚组合物, 其中, 重复步骤(2)中的提取 2—5次, 合并每次重复的提取所得的液体可可壳提取材料。

30 18. 权利要求14的富多酚组合物, 其中, 重复步骤(2)中的提取 2—5次, 合并每次重复的提取所得的液体可可壳提取材料。

19. 权利要求 13 的富多酚组合物, 其中, 可可壳获自经烘烤发酵的可可豆。

20. 权利要求 13 的富多酚组合物, 其中, 可可壳获自经烘烤未发酵的可可豆。

5 21. 权利要求 13 的富多酚组合物, 其中, 可可壳获自未烘烤经发酵的可可豆。

22. 权利要求 13 的富多酚组合物, 其中, 可可壳获自未经烘烤的未发酵的可可豆。

从可可壳提取的富多酚组合物

5 技术领域

本发明涉及一种可可壳的提取方法，以产生富可可碱的部分或组合物以及富多酚的部分或组合物。

背景技术

众所周知，源自植物或植物材料（比如茶、可可豆等）的天然多酚具有抗氧化性能，并能提供其他潜在的健康益处。因此，对于获得这些多酚、包括可可多酚的方法，以及使用它们的方法，近年来开展了大量的研究。

美国专利 5554645（1996 年 9 月 10 日）提出了一种从脱壳、脱脂、冻干的可可豆粉中提取多酚的方法，其使用了一种丙酮:水为 70:30 的溶剂。然后通过凝胶渗透层析法或高速液相层析法对提取物进行纯化，从而获得基本上由 3—12 的寡聚体所组成的多酚。

国际专利公开 WO00/45769（2000 年 8 月 10 日）以及相应的美国专利 6576275（2003 年 6 月 10 日）提出了一种从可可和其他植物材料中提取多酚的方法，以产生一种嘌呤含量降低的多酚材料。起始可可材料包括，例如鲜可可豆、脱脂可可固体、可可粉、低脂可可粉、可可壳、可可废弃料或其他含可可的原材料，这些优选被碾磨成小于 250 μm 的粒度。然后用羟基溶剂（比如水、低级醇，和其混合物）对经碾磨的可可材料进行提取。之后将所得提取物应用到具有高的多酚/嘌呤吸附比，至少为约 5/1 的吸附材料上。合适的吸附剂包括聚乙烯吡咯烷酮和壳聚糖，以及其衍生物、变体和它们的混合物。然后用脱附溶剂比如水、可与水混溶的醇、水和可与水混溶的醇的混合物、水和可与水混溶的酮的混合物来将多酚从吸附材料中分离出。然后含多酚材料可通过脱附溶剂的蒸发而得以浓缩。虽然这种方法降低了嘌呤（即可可碱和咖啡因）的相对量，但仍然有显著量的嘌呤残留在所收集到的含多酚材料中。

美国专利 6159451（2000 年 12 月 12 日）提出了一种生产可可豆壳部分的方法，所述部分能在防止牙齿损害中具有抗葡糖基转移酶活性。在这种方法中，将 4—10 份的 50%丙酮水溶液加入 1 份干可可豆壳中，在 40—80℃下回流搅

拌 4—6 小时，从而形成提取物。重复该程序 2 次。然后用真空技术将提取物浓缩并干燥。之后将所得提取物加入苯乙烯基吸附树脂中，用 1—2 份的 20% 乙醇进行洗脱，接着加入 1-2 份 50% 的乙醇。将来自 50% 乙醇洗脱液的部分收集并在 40—50℃ 和减压下进行浓缩，从而产生所需的具有抗葡萄糖基转移酶活性的部分。

国际专利公开 WO00/62631 (2000 年 10 月 26 日) 提出了一种生产含有膳食纤维（尤其是不溶性膳食纤维）的可可提取物的方法，该提取物据报道可用于治疗糖尿病。用乙醇对经热处理的可可壳进行提取，然后离心并分配入上清液和残留物。残留物部分据报道可用于治疗糖尿病。上清液据报道含有多酚并可用于饮料中。

欧洲专利申请 EP1304047 (公开于 2003 年 4 月 23 日) 提出了一种获得可可豆或可可豆壳的提取物的方法，该提取物据报道抑制了间隙联结处胞间传达的遏制和癌细胞的 DNA 合成。在除去可可油后，用 50% 丙酮对可可豆壳在 60℃ 下回流提取 5 小时。对提取物进行离心并对上清液进行收集、过滤、浓缩和冷冻干燥。所得可可壳部分用聚苯乙烯疏水吸附树脂进行吸附，然后用水/丙酮或水/甲醇混合物进行分配，从而获得活性材料。

欧洲专利申请 EP1346640 (公开于 2003 年 9 月 24 日) 提出了一种生产低脂可可提取物的方法，该提取物具有高水平的可可风味和/或可可风味前体物以及高水平的抗氧化剂（比如多酚）。该方法包括将可可种子置于乙酸溶液中、加热混合物、除去种子、并且浓缩溶液中溶解的固体。

美国专利 6627232 (2003 年 9 月 30 日) 提出了一种选择性提取四聚物、五聚物和更高分子量的可可原花青素低聚物的方法，该方法以部分脱脂或全部脱脂的可可固体为原料，而上述固体则由未被烘烤的可可豆制得。在一个实施方案中，该方法包括下述步骤：(a) 用乙酸乙酯对可可固体进行提取；(b) 回收经提取的可可固体；(c) 对所回收的经提取的可可固体进行提取，所用溶剂选自于丙酮、乙醇及其混合物并伴有可高达 50% 体积的水；(d) 将可可固体从步骤 (c) 的可可提取物分离出来，从而获得原花青素提取物。

美国专利公开 US2004/0096566 (2004 年 5 月 20 日) 提出了一种从可可豆中获得多酚的方法。对鲜豆（未经预处理或脱脂）进行处理以分离壳和果肉，在溶剂存在下进行研磨，用溶剂浸泡几小时至几天，过滤，用同一溶剂进行冲

洗，在真空下通过蒸馏来除去溶剂以获得所需残留物。

虽然这些方法通常能够从可可豆的不同部分制得多酚，但是仍然需要提供一种方法来获得富多酚的部分和富可可碱的部分，从而使更多的成分得以利用。此外，使用通常被认为是废料（即可可壳）来生产这些部分，这也是合乎需要的。本发明就提供了这样的方法。

发明内容

发明概述

本发明涉及一种从可可壳生产富可可碱组合物和富多酚组合物的方法，所述方法包括：（1）提供脱脂可可壳；

- （2）用丙酮水溶液对脱脂可可壳进行提取，所述丙酮水溶液含有约 30—约 80 %的丙酮，从而提供可可壳提取材料；（3）对可可壳提取材料进行处理以除去悬浮固体，从而提供经处理的可可壳提取材料；（4）从经处理的可可壳提取材料中除去丙酮，从而提供含水的提取材料；（5）将含水提取材料浓缩到约 1.5—约 5%固体，从而提供经浓缩的提取材料；（6）将经浓缩的提取材料应用于凝胶过滤柱，所述柱含有适于将可可碱和多酚相互分离的凝胶过滤介质；（7）用水对凝胶过滤柱进行冲洗，从而收集富可可碱的部分；（8）用低分子量的极性有机溶剂对已经用水冲洗过的凝胶过滤柱进行洗脱，从而收集富多酚部分，其中，富多酚部分基本上不含有植物甾醇和可可碱；（9）将富可可碱部分浓缩以获得富可可碱组合物；和（10）将富多酚部分浓缩以获得富多酚组合物。优选的用于本发明的凝胶过滤介质包括来自 Amersham Biosciences (GM Healthcare 的一部分) 的 Sephadex™ 型凝胶过滤介质；尤其优选 Sephadex™ LH-20。低分子量极性有机溶剂优选是甲醇。本发明所用可可壳可以来自烘烤或未烘烤的可可豆和/或发酵或未发酵的可可豆。

附图简要说明

- 图 1 是描述本发明的总流程图。

图 2 是描述本发明一个优选实施方案的详细流程图。

详细说明

- 如图 1 所示，获得脱脂可可壳。该可可壳可来自发酵或未发酵的豆，任何一种都可以是未烘烤或经烘烤的；在本发明提取过程中所用的壳可以是整个的、破碎的、研磨的、或其混合物。这种脱脂可可壳可以用常规技术来制备，

例如,使用己烷或其他低分子量的,非极性或微极性溶剂(比如戊烷、乙醚、石油醚等)通过提取来对可可壳进行脱脂,非极性溶剂通常优选己烷。尽管不希望受约束于理论,但据信,对可可壳脱脂有助于在下一提取步骤之前除去植物甾醇,并且在该过程的之后步骤中能改善分离效果。脱脂可可壳用丙酮水溶液进行提取。通常,这种丙酮水溶液含有约30—约80%的丙酮,优选是约40—约60%的丙酮、更优选是约50%的丙酮。然后用常规技术(比如过滤、倾析、离心等)从提取材料的丙酮水溶液中除去悬浮固体。使用常规技术(比如蒸馏、真空蒸馏等)来除去至少部分丙酮(通常约80%或更多,优选约95%至基本上100%),从而获得含水提取材料。之后用适于分离可可碱和多酚的凝胶过滤介质来对所得含水提取材料进行凝胶过滤。用于本发明中的优选的凝胶过滤介质包括Amersham Biosciences(GM Healthcare的一部分)的Sephadex™型凝胶过滤介质(通常来自三维交联的多糖葡聚糖);尤其优选Sephadex™ LH-20。首先,用水对于含有含水提取材料的凝胶过滤柱进行冲洗,从而除去富可可碱的部分;收集富可可碱的部分。然后用低分子量极性有机溶剂对凝胶过滤柱进行洗脱,从而除去富多酚的部分;之后收集富多酚的部分。合适的低分子量极性有机溶剂包括,例如甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮等;通常优选甲醇。

富多酚部分基本上不含植物甾醇和可可碱。出于本发明的目的,“基本上不含植物甾醇”意指包括其中原可可壳中的至少约90%、优选约95%、最优选基本上100%(即仅有痕量保留)的植物甾醇已被除去的富多酚组合物。同样,出于本发明的目的,“基本上不含可可碱”意指包括包括其中在原可可壳中的至少约90%、优选约95%、最优选基本上100%(即仅有痕量保留)的可可碱已被除去的富多酚组合物。

如前所述,用于本发明的可可壳可以源自烘烤或未烘烤的可可豆和/或发酵或未发酵的可可豆。通常,相对于发酵壳以及相对于未烘烤壳而言,用未发酵壳以及烘烤壳可望获得更高产率的多酚。

图2描述了本发明的一个优选实施方案。在该实施方案中,用丙酮水溶液对脱脂可可壳进行多次提取。通常,该丙酮水溶液含有30—约80%的丙酮,优选为约40—约60%的丙酮,更优选为约50%的丙酮。出于本发明的目的,“多次”意指至少2次提取,优选约2—5次提取,更优选约2—3次提取。优选地,

每次提取都用新鲜的丙酮水溶液（即之前未被用于提取的）来实施。优选对液体提取物进行合并，然后用常规技术（比如过滤、带有或未带离心的倾析等）进行处理以除去悬浮固体。使用常规技术（比如蒸馏、真空蒸馏等）来除去至少部分丙酮（通常约 80%或更多，优选至少约 95%至基本上 100%），从而获得含水提取材料。之后用适于分离可可碱和多酚的凝胶过滤介质来对所得含水提取材料进行凝胶过滤。用于本发明中的优选凝胶过滤介质包括 Amersham Biosciences（GM Healthcare 的一部分）的 Sephadex™ 型凝胶过滤介质（通常来自三维交联的葡聚糖多糖）；尤其优选 Sephadex™ LH-20。首先，用水对于含有含水提取材料的凝胶过滤柱进行冲洗，从而除去富可可碱的部分；收集富可可碱的部分。然后用低分子量极性有机溶剂、优选用甲醇对凝胶过滤柱进行洗脱，从而除去富多酚的部分；之后收集富多酚的部分。

收集到的富可可碱部分可以被用作富可可碱组合物，或者如果需要，可被浓缩以获得富可可碱组合物。这种浓缩可用常规技术来实施，比如冷冻干燥、热干燥、结晶、用氯仿或二氯甲烷的液体分配技术等，通常优选冷冻干燥。

收集到的富多酚部分可以被用作富多酚组合物，或者如果需要，可被浓缩以获得富多酚组合物。这种浓缩可用下述方式来实现：首先用常规技术（比如蒸发、真空蒸馏等）来除去至少部分甲醇，接着用常规技术（比如冷冻干燥、热干燥、结晶、液体分配等）、优选冷冻干燥来除去至少部分水。

现在用描述本发明优选实施方案的具体实施例对本发明进行详细说明。它们并非旨在限制本发明的范围。除非另有说明，否则整个说明书中的比例和百分比都以重量计。本说明书中讨论的所有专利和其他公开文献都在此引入以作参考。

实施例 1 该实施例描述了从可可壳中分离富多酚部分和富可可碱部分。可可壳以普通方法获自未烘烤发酵可可豆。如果需要，来自发酵或未发酵可可豆的烘烤或未烘烤可可壳可以相同方式使用。用己烷（220 ml）对可可壳（60 g）在索氏提取器中提取 6 小时。将脱脂壳真空干燥，之后用 50%丙酮水溶液（350 ml）在装有冷凝器的烧瓶中以及 70℃下打浆 45 分钟。离心和倾析出提取物，残留物再用 50%丙酮溶液（200 ml）进行提取，提取/分离工序重复至多 4 次。将提取物合并，用旋转蒸发来浓缩到约 2×。通过冷冻干燥来将所得的浓缩水溶液干燥。通过 Folin-Cloaiteu 方法来测定多酚含量（参见，比如 Singleton 等，

Am. J. Enol Vit., 37, 144-158(1965)). 获得下述结果:

提取次数	提取物的相对多酚含量 (%)
1	49
2	28
3	9
4	7
5	7

合并所有 5 次提取物, 将所获冻干的浓缩提取物加入 Sephadex LH-20 凝胶渗透柱中 (直径 4.5 cm, 长 30 cm)。用水对该柱进行冲洗, 从而产生富可可碱部分, 该部分通过冷冻干燥而以干燥态获得。然后用甲醇来洗脱富多酚部分, 之后通过甲醇蒸发和冷冻干燥将该部分干燥, 从而获得固体富多酚组合物或残留物。

获得下述结果:

部分	wt (g/100 g 壳)	多酚		可可碱 (mg/100 g 壳)	咖啡因 (mg/100 g 壳)
		(占部分的 %)	(g/100 g 壳)		
50%丙酮	15.0	12.7	1.90	680	65
水洗脱物	12.7	6.9	0.76	665	60
甲醇洗脱物	1.37	56.3	0.77	2	2

该实施例清楚地说明了使用本发明可从可可壳中获得富可可碱部分 (即水洗脱物) 和富多酚部分 (即甲醇洗脱物)。而且, 该实施例也说明了富多酚部分基本上不含有可可碱 (以及咖啡因)。在甲醇洗脱后, 多酚保留在柱上 (约 $1.90-0.75-0.77=0.38$ g/100 g 壳); 如果需要, 通过另外的用甲醇对柱洗脱以及上面的洗脱物处理, 可进一步获得回收多酚。

用 TECA (Trolox 当量抗氧化能力) 方法 (Re 等, *Free Radical biology & Medicine*, 26, 1231-1237(1999)) 来测定富多酚甲醇部分的抗氧化能力。结果发现抗氧化能力为 $1.8 \mu\text{mol Trolox/mg}$ 。相对于市售迷迭香、葡萄和接骨木提取物样本 (相应为 0.83、0.76 和 $0.42 \mu\text{mol Trolox/mg}$), 这种抗氧化能力显然要高出

很多。

实施例 2 该实施例描述了实施例 1 中所用过程的变型。在用水冲洗之后，用 50% 甲醇水溶液洗脱，接着用纯甲醇进行洗脱，除此之外，所用工序与实施例 1 的基本上相同。洗脱物用实施例 1 中所述的进行干燥。

5 获得的结果如下：

部分	产率 (g/100 g 壳)	多酚 (占部分的%)
水洗脱物	12.7	5.31
50% 甲醇洗脱物	0.98	39.2
100% 甲醇洗脱物	0.32	54.4

实施例 3 该实施例描述了从富可可碱部分中分离出高可可碱含量固体制剂。富可可碱部分由实施例 1 中获得。收集水冲洗物并缩减到低体积（到混浊变得明显为止）。将少量的活性炭加入并将混合物过滤。用热水通过残留物，然后收集冲洗物并加入到滤液中。将溶液缩减到 100 ml 体积，然后倒入分液漏斗。加入冲洗烧杯的冲洗物和二氯甲烷（50 ml），晃动该混合物（3—4 次），
10 静置，然后分出底层相（氯化溶剂）。重复添加二氯甲烷、晃动、静置、和分离步骤 3 次。然后二氯甲烷通过在硫酸钠上干燥来除去，后者则通过过滤除去，并通过在旋转蒸发器上蒸发来获得富可可碱的产品。据 HPLC 测定，固体制剂的
15 可可碱含量为约 84%。用氯仿而不是二氯甲烷作为溶剂而制得的相似固体组合物制剂含有约 64% 的可可碱。

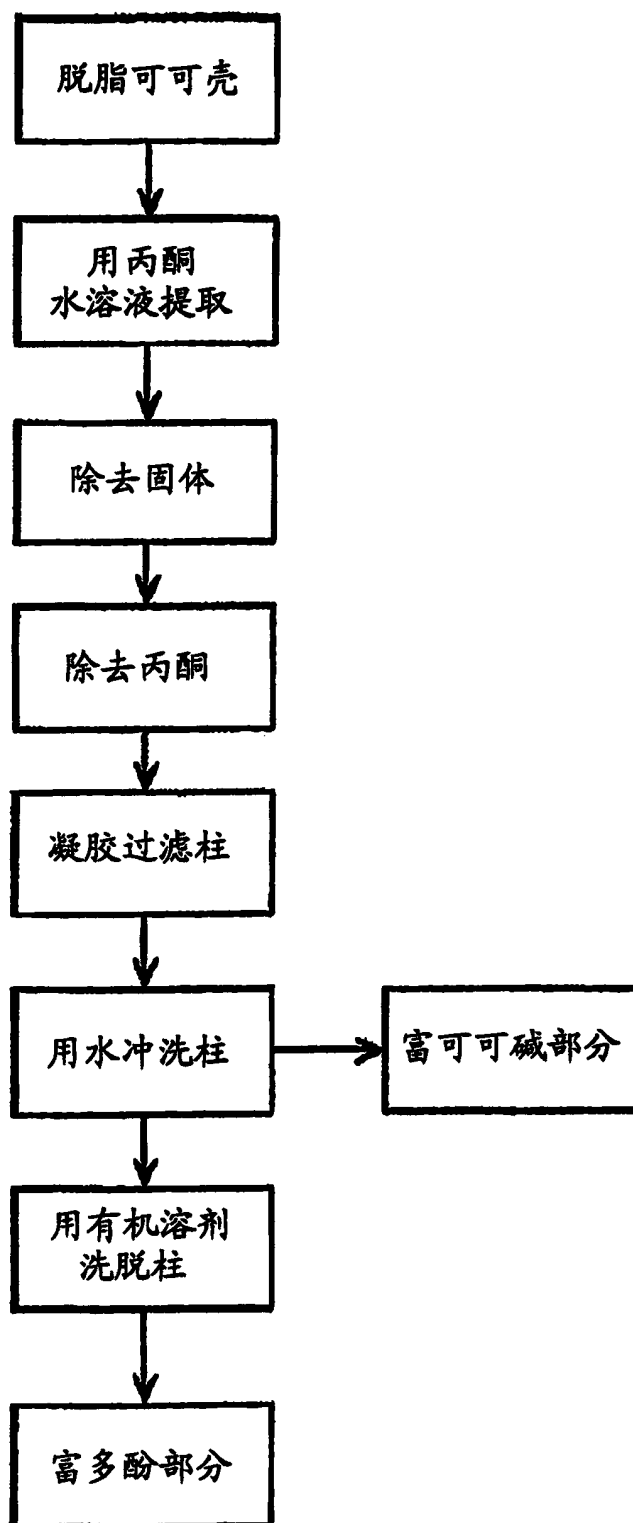


图 1

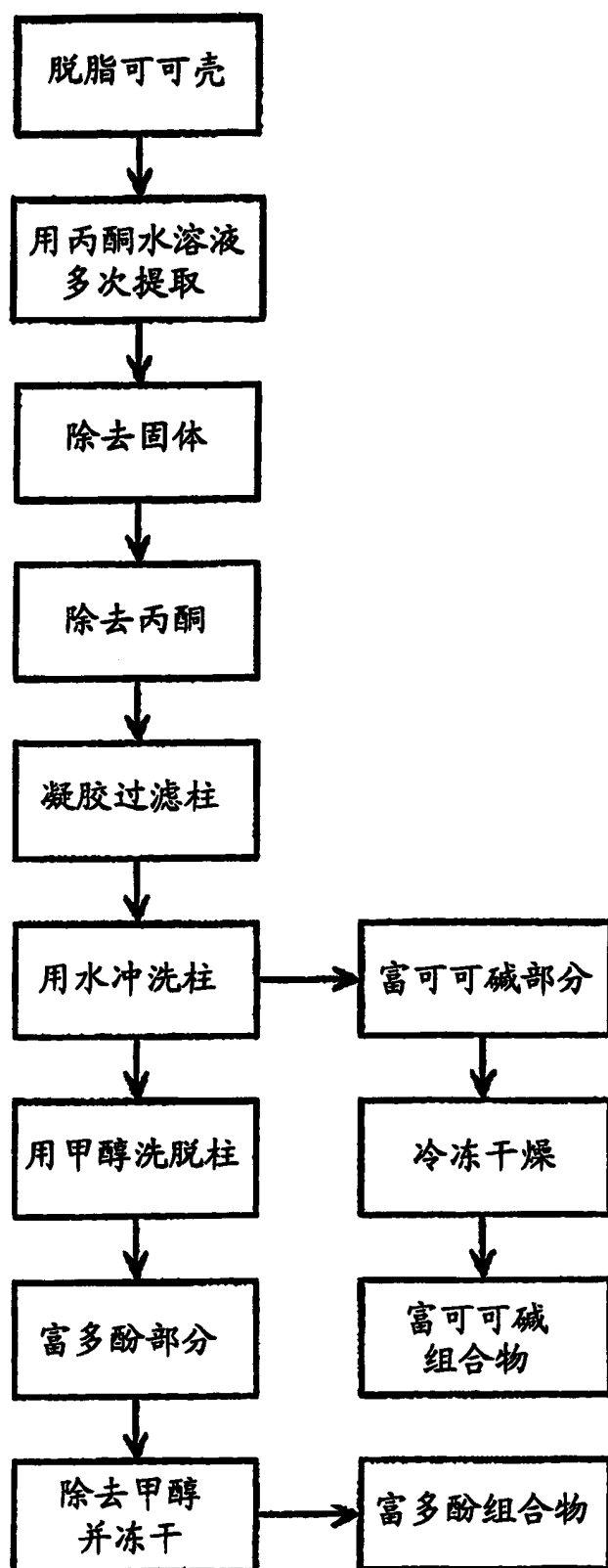


图 2