

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610131613.4

[51] Int. Cl.

*C12P 17/04 (2006.01)*

*A61P 15/12 (2006.01)*

*A61P 19/10 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2007年5月9日

[11] 公开号 CN 1958805A

[22] 申请日 2006.11.9

[21] 申请号 200610131613.4

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 刘淑莹 赵宇峰 刘志强 宋凤瑞

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司  
代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

## [54] 发明名称

一种由牛蒡苷生物制备 4,4' - 二羟基肠内酯的方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种由牛蒡苷生物制备 4,4' - 二羟基肠内酯的方法。本发明是以牛蒡苷为先导化合物,在厌氧条件下,以肠道细菌将牛蒡苷转化为 4,4' - 二羟基肠内酯。4,4' - 二羟基肠内酯为木脂素类化合物,在人的肠道中能被转化为植物雌激素—肠内酯而发挥药理作用。本发明简化了化学合成 4,4' - 二羟基肠内酯的步骤,同时也为扩大牛蒡苷的药用范围,提高它的药用价值提供了新途径;也为预防和治疗更年期综合征、骨质疏松、血脂升高,乳腺癌、子宫内膜炎等提供了一种新的保健产品。

1、一种生物转化法制备 4,4'-二羟基肠内酯的方法，其特征在于，步骤和条件如下：

**(1)、菌种培育：**

将牛蒡苷加入GAM肉汤培养基中，牛蒡苷重量mg与GAM肉汤培养基的体积mL比为1-500：100，再加入健康人的新鲜粪便，健康人的新鲜粪便重量g与GAM体积mL比为1-200：1000，35-40℃厌氧培养24-48小时，得到培养液；

将得到的培养液加入到上述的含有牛蒡苷的GAM肉汤培养基中，该培养液与含有牛蒡苷的GAM肉汤培养基的体积比为1-400：100，35-40℃厌氧培养24-48小时；反复1-5次即可得到活性增强的细菌培养液，将此细菌培养液作为菌种；

**(2)、4,4'-二羟基肠内酯的制备：**

将牛蒡苷加入GAM肉汤培养基中，牛蒡苷重量mg与GAM肉汤培养基的体积mL比为1-500：100，加入按照上述步骤(1)制备的菌种，菌种与加入牛蒡苷的GAM肉汤培养基的体积比为1-400：100，35-40℃厌氧培养1-10天，得到培养液；用乙酸乙酯提取该培养液，乙酸乙酯与培养液体积比为1：1；减压浓缩提取液，经硅胶柱分离、纯化提取物，得到4,4'-二羟基肠内酯。

## 一种由牛蒡苷生物制备 4,4'-二羟基肠内酯的方法

### 技术领域

本发明涉及一种由牛蒡苷生物制备 4,4'-二羟基肠内酯的方法。

### 背景技术

植物雌激素是一类非甾体化合物，包括异黄酮、木脂素两大类。目前研究最透彻的是大豆异黄酮，木脂素类发现较晚，已知木脂素类植物有亚麻子、杜仲、牛蒡子、刺五加、厚朴等。亚麻子中的开环异落叶松脂素双糖苷被用作癌症辅助药物，其代谢产物肠二醇、肠内酯具有与雌二醇相似的结构，能与雌激素受体竞争性结合而发挥类雌激素样作用，对更年期综合征、骨质疏松、心血管疾病有保护作用。Hutchins 等发现绝经后妇女尿中木脂素排泄量与服用剂量依赖之间成正比，肠内酯的雌激素活性是肠二醇的 10 倍，在抗肿瘤方面肠内酯也更有效（Hutchins A M, 亚麻子对绝经后妇女尿中木脂素的排泄呈剂量依赖 / 生物标记癌症预防流行病学 Hutchins A M, *et al* . Flaxseed influences urinary lignan excretion in a dose-dependent manner in postmenopausal women [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, 9(10):1113-1118.）。

牛蒡子为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实。牛蒡苷具有抗肾病变作用，增强机体免疫功能，具有抗补体活性，钙拮

抗及抗高血压等药理作用(王劲等,牛蒡苷的制备与纯化.中草药 2002 年第33卷第9期)。

谢丽华等的研究证明:牛蒡苷在肠内细菌作用下被转化为其它代谢产物。牛蒡苷的代谢产物具有抗乳腺癌细胞活性 (*Cham.Pharm.Bull.* 51(4) 378-384(2003))。 Satu Heinonen 报道了牛蒡苷元在肠内细菌中最终被转化为肠内酯,转化率为 4% (农业与食品化学 *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3178-3186)。

目前植物雌激素的研究已引起广泛关注,木脂素类植物牛蒡子在我国资源丰富。是一种重要的植物雌激素来源,具有广阔的应用前景。因此,研究从由牛蒡苷生物合成肠内酯及其前体化合物的方法就显得尤为重要。但是,由于牛蒡苷元在肠内细菌中转化为肠内酯的转化率很低,不适合作为肠内酯的前体药物。因此,寻找一种更易转化成肠内酯的前体化合物将有较高的理论价值和经济效益。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种由牛蒡苷生物制备 4,4'-二羟基肠内酯的方法。本发明的步骤和条件如下:

### 1、菌种培育:

将牛蒡苷加入GAM肉汤培养基中,牛蒡苷重量mg与GAM肉汤培养基的体积mL比为1-500: 100,再加入健康人的新鲜粪便,健康人的新鲜粪便重量g与GAM肉汤培养基体积mL比为1-200: 1000, 35-40℃厌氧培养24-48小时,得到培养液;

将得到的培养液加入到上述的含有牛蒡苷的GAM肉汤培养基中,

该培养液与含有牛蒡苷的GAM肉汤培养基的体积比为1-400：100，35-40℃厌氧培养24-48小时，反复1-5次即可得到活性增强的细菌培养液，将此细菌培养液作为菌种；

## 2、4,4'-二羟基肠内酯的制备：

将牛蒡苷加入 GAM 肉汤培养基中，牛蒡苷重量 mg 与 GAM 肉汤培养基的体积 mL 比为 1-500：100，加入按照上述步骤（1）制备的菌种，菌种与加入牛蒡苷的 GAM 肉汤培养基的体积比为 1-400：100，35-40℃厌氧培养 1-10 天，得到培养液；用乙酸乙酯提取该培养液，乙酸乙酯与培养液体积比为 1：1；减压浓缩提取液，经硅胶柱分离、纯化提取物，得到 4,4'-二羟基肠内酯。

图 2 为 4,4'-二羟基肠内酯的二级质谱图。

上述方法使用如下仪器及培养基：

1、EAN-140型手套式厌氧培养箱（日本.大阪.ESPEC公司）。

2、GAM肉汤培养基：胰蛋白胨10g、胨蛋白胨10g、大豆蛋白胨3g、消化血清粉13.5g、酵母浸膏5g、牛肝浸出粉1.2g、牛肉膏2.2g、葡萄糖3g、磷酸二氢钾2.5g、氯化钠5g、可溶性淀粉5g、L-半胱氨酸盐0.3g、硫代乙醇酸钠0.3g，加蒸馏水至1升，调PH7.1-7.2。

3、牛蒡苷的制备方法：见中草药 2002 年第 33 卷 9 期，第 378 页；其结构表征见图 1。

**有益效果：**木脂素类植物重要的植物来源有亚麻子和牛蒡子等，亚麻子中的开环异落叶松脂素双糖苷被用作癌症辅助药物，其代谢产物肠二醇、肠内酯具有雌激素样作用，对更年期综合征、骨质疏松、

心血管疾病有保护作用，在抗肿瘤方面也有效。但要从亚麻子中很难得到较纯的肠内酯、肠二醇。而牛蒡子在我国资源丰富，是一种重要的植物雌激素来源，具有广阔的应用前景。因此，由牛蒡苷生物合成肠内酯及其代谢前体化合物的方法就显得尤为重要，也为开发新的保健品提供了技术支持。而且生物合成的方法经济、安全、环保，具有较高的理论价值和经济效益。利用本发明的方法制备 4,4'-二羟基肠内酯，可以得到植物雌激素-肠内酯的前体化合物，提供一种新的植物雌激素口服药物。

### 附图说明

图 1 为牛蒡苷的二级电喷雾质谱图。

图 2 为 4,4'-二羟基肠内酯的二级质谱图。

### 具体实施方式：

#### 实施例 1：

##### 1、菌种培育：

将 0.2 mg 牛蒡苷加入 20 mL GAM 肉汤培养基中，再加入 0.02 g 健康 35°C 厌氧培养 24 小时，得到培养液。将 10 mL 该培养液加入到含有 1.0 mg 牛蒡苷的 90 mL GAM 肉汤培养基中，35°C 厌氧培养 24 小时，得到细菌培养液，将此细菌培养液作为菌种。

##### 2、4,4'-二羟基肠内酯的制备：

将 50 mg 牛蒡苷加入到 900 mL GAM 肉汤培养基中，再加入 100 mL 上述的步骤（1）制备的菌种，35°C 厌氧培养 1 天。用乙酸乙酯提取，减压浓缩提取液，经硅胶柱分离、纯化，得到 20 mg 的 4,4'-二羟基肠

内酯。

## 实施例 2:

### 1、菌种培育:

将2 mg牛蒡苷加入10 mL GAM肉汤培养基中, 再加入1.0 g健康人的新鲜粪便, 37℃厌氧培养24小时, 得到培养液。将10 mL该培养液加入到100 mL含有20 mg牛蒡苷的GAM肉汤培养基中, 37℃厌氧培养36小时。再将100 mL该培养液加入到400 mL含有100 mg牛蒡苷的GAM肉汤培养基中, 37℃厌氧培养36小时, 得到500 mL活性增强的细菌培养液。将此细菌培养液作为菌种。

### 2、4,4'-二羟基肠内酯的制备:

将500 mg牛蒡苷加入到500 mL GAM肉汤培养基中, 再加入500 mL上述的步骤(1)制备的菌种, 37℃厌氧培养5天。用乙酸乙酯提取, 减压浓缩提取液, 经硅胶柱分离、纯化, 得到150 mg的4,4'-二羟基肠内酯。

## 实施例 3:

### 1、菌种培育:

将10 mg牛蒡苷加入10 mL GAM肉汤培养基中, 再加入2.0 g健康人的新鲜粪便, 40℃厌氧培养24小时, 得到培养液。

将10 mL该培养液加入到40 mL含有40 mg牛蒡苷的GAM肉汤培养基中, 40℃厌氧培养48小时。再将50 mL该培养液加入到50 mL含有50 mg牛蒡苷的GAM肉汤培养基中, 37℃厌氧培养48小时。再将100 mL该培养液加入到100 mL含有100 mg牛蒡苷的GAM肉汤培养

基中, 37℃厌氧培养 48 小时。再将 200 mL 该培养液加入到 200 mL 含有 200 mg 牛蒡苷的 GAM 肉汤培养基中, 37℃厌氧培养 48 小时。再将 400 mL 该培养液加入到 400 mL 含有 400 mg 牛蒡苷的 GAM 肉汤培养基中, 37℃厌氧培养 48 小时, 得到 800 mL 活性增强的细菌培养液。将此细菌培养液作为菌种。

## 2、 4,4'-二羟基肠内酯的制备:

将 5000 mg 牛蒡苷加入到 200 mL GAM 肉汤培养基中, 再加入 800 mL 上述的步骤 (1) 制备的菌种, 40℃厌氧培养 10 天。用乙酸乙酯提取, 减压浓缩提取液, 经硅胶柱分离、纯化, 得到 2000 mg 的 4,4'-二羟基肠内酯。



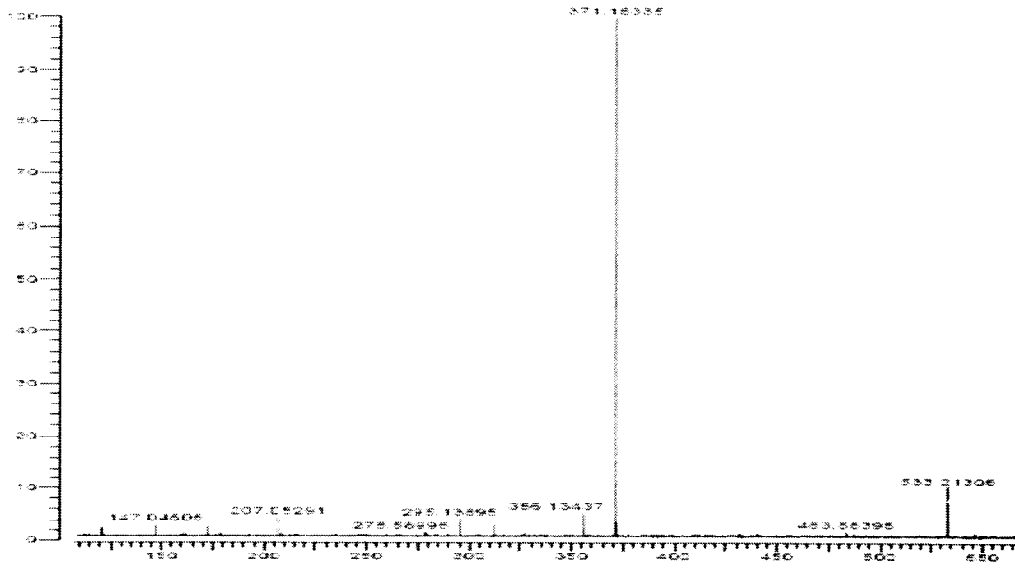


图1.

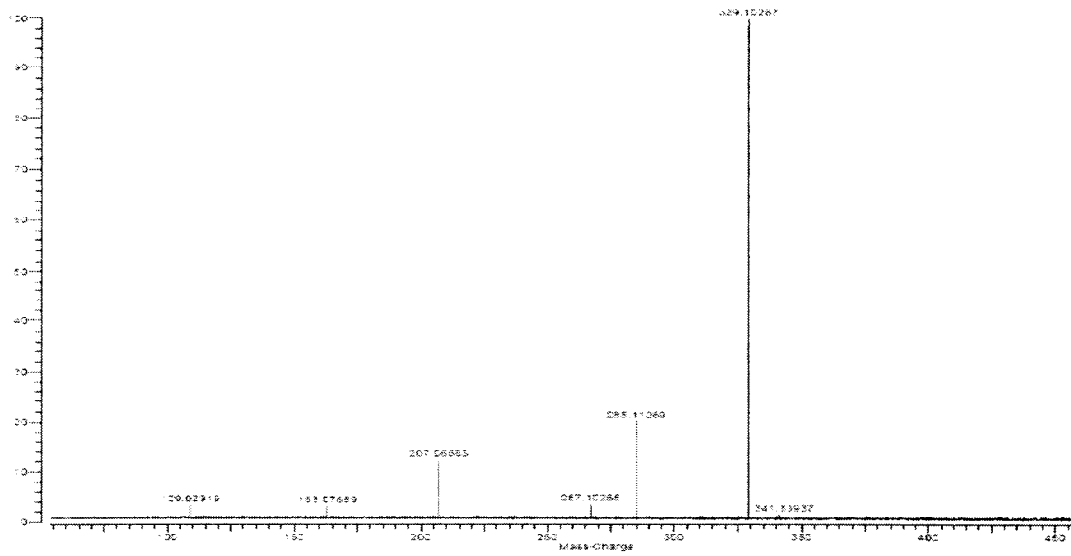


图2.