

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12P 33/00 (2006.01)  
C12R 1/01 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610131642.0

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 1999754A

[22] 申请日 2006.11.16

[21] 申请号 200610131642.0

[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 宋风瑞

[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 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种植物雌激素 - 肠二醇的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及利用生物转化法合成木脂素类植物雌激素——肠二醇的方法。本发明以代谢 4, 4' - 二羟基肠二醇为底物, 在厌氧条件下以人的肠道细菌生物合成肠二醇。利用此方法可以大量合成肠二醇, 可以得到纯的 (-) 肠二醇。木脂素类植物雌激素的肠二醇、肠内酯是近年来兴起的一类植物雌激素, 具有类雌激素和抗雌激素双向调节作用, 可防治更年期综合征、骨质疏松、心血管疾病、血脂升高、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等症, 具有良好的药用价值。

1、一种植物雌激素—肠二醇，其特征在于，步骤和条件如下：

**(1)、菌种培育：**

将4,4'-二羟基肠二醇加入GAM肉汤培养基中，4,4'-二羟基肠二醇重量mg与GAM肉汤培养基的体积mL比为1-300：100，再加入健康人的新鲜粪便，健康人的新鲜粪便重量g与GAM肉汤培养基的体积mL比为1-200：1000，于35-40℃厌氧培养24—48小时，得到细菌培养液；将此细菌培养液作为菌种；

**(2)、制备一种植物雌激素—肠二醇：**

将4,4'-二羟基肠二醇加入GAM肉汤培养基中，4,4'-二羟基肠二醇重量mg与GAM肉汤培养基的体积mL比为1-300：100，加入按照上述步骤（1）制备的菌种，菌种与加入4,4'-二羟基肠二醇的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；用浓度为0.1%(v/v)醋酸水饱和正丁醇提取培养液，醋酸水饱和正丁醇溶液与培养液的体积比为1：1，减压浓缩提取液，经硅胶柱分离、纯化，得到一种植物雌激素—肠二醇。

## 一种植物雌激素—肠二醇的制备方法

### 技术领域

发明涉及一种植物雌激素—肠二醇的制备方法。

### 背景技术

目前，一些内分泌的血疾病，如骨质疏松、更年期综合征、老年性痴呆症等，使用雌激素替代疗法取得了较好的疗效。但是，雌激素不仅有副作用和禁忌症，而且长期使用有诱发乳腺癌和子宫内膜癌的危险。因此，从天然植物中寻找毒副作用小、具有雌激素样作用的天然品替代化学合成品，具有重要的现实意义和广阔的应用前景。

植物雌激素主要有两大类：异黄酮类和木脂素类。而今大豆异黄酮研究最为透彻，木脂素类发现较晚，已知的植物中，亚麻子和牛蒡子的含量高。1996年 Rickard S 等首次发现亚麻子中的开环异落叶松脂素双糖苷（secoisolaricoresinol diglucoside, SDG），研究表明亚麻子木脂素可以与雌激素受体结合改变体内雌激素代谢（癌症与营养/Nutrition and Cancer, 1999, 35 (1) :50-57）。

汪礼权等研究了亚麻子中的开环异落叶松脂素双糖苷在肠内细菌中的转化途径，开环异落叶松脂素双糖苷经过 4,4'-二羟基肠二醇、肠二醇等过程，最终转化成肠内酯。（化学与药物快报 *Cham.Pharm.Bull.* 48(11) 1606-1610(2000)）。

木脂素类植物雌激素的肠二醇、肠内酯是近年来在欧洲兴起的一类植物雌激素，以亚麻子为首开发出了各种不同的功能食品，尤其对一些内分泌的血疾病，如骨质疏松、更年期综合征、心血管疾病、老年性痴呆症等取得了较好的疗效。因其独特的保健作用而受到欧洲等地人民的欢迎。但用亚麻子生物合成肠二醇，不仅产量很少，而且很难得到纯的肠二醇。由牛蒡子生物合成的植物雌激素(-)肠二醇，除了同样具备由亚麻子生物合成的(+)肠二醇的药理活性外，还可以大量合成较纯的肠二醇。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种植物雌激素—肠二醇的制备方法。以牛蒡苷为原料通过生物合成方法得到 4,4'-二羟基肠内酯，再通过化学方法得到 4,4'-二羟基肠二醇。以 4,4'-二羟基肠二醇为底物，加入人的肠道细菌进行厌氧培养，用此方法制备一种植物雌激素—肠二醇。

为了实现上述目的，本发明采用技术方案如下：

### (1)、菌种培育：

将4,4'-二羟基肠二醇加入GAM肉汤培养基中，4,4'-二羟基肠二醇重量mg与GAM肉汤培养基的体积mL比为1-300：100，再加入健康人的新鲜粪便，健康人的新鲜粪便重量g与GAM肉汤培养基的体积mL比为1-200：1000，于35-40℃厌氧培养24—48小时，得到细菌培养液；将此细菌培养液作为菌种。

### (2)、制备一种植物雌激素—肠二醇：

将 4,4'-二羟基肠二醇加入 GAM 肉汤培养基中，4,4'-二羟基肠二

醇重量 mg 与 GAM 肉汤培养基的体积 mL 比为 1-300 : 100, 加入按照上述步骤 (1) 制备的菌种, 菌种与加入 4,4'-二羟基肠二醇的 GAM 肉汤培养基的体积比为 1-400 : 100, 35-40°C 厌氧培养 1-10 天, 得到培养液; 用浓度为 0.1 % (v/v) 醋酸水饱和正丁醇提取培养液, 醋酸水饱和正丁醇溶液与培养液的体积比为 1: 1, 减压浓缩提取液, 经硅胶柱分离、纯化, 得到一种植物雌激素—肠二醇。

肠二醇的结构表征见图 2。

本发明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、**4,4'-二羟基肠二醇的制备方法:**

1) **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) “菌种培育” 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°C 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。(详见: 中国专利申请书: 《一种由牛蒡苷生物制备 4,4'-二羟基肠内酯的方法》)

发明人：赵宇峰 申请人：中国科学院长春应用化学研究所 申请号：  
200610131613.4 申请日：061109)

(2) **4,4'-二羟基肠二醇的制备方法**：将四氢化锂铝溶解在四氢呋喃中，四氢化锂铝重量 mg 与四氢呋喃的体积 mL 比为 1—100：10；与 4,4'-二羟基肠内酯发生还原反应，4,4'-二羟基肠内酯重量 mg 与四氢化锂铝四的氢呋喃溶液的体积 mL 的比为 1—100：1，待 4,4'-二羟基肠内酯被还原成 4,4'-二羟基肠二醇后，用乙酸乙酯提取，经硅胶柱分离、纯化得到 4,4'-二羟基肠二醇。

4,4'-二羟基肠二醇的结构表征见图 1。

本发明的有益效果：木脂素类植物雌激素发现较晚，肠二醇、肠内酯是近年来兴起的一类植物雌激素，在欧美等国对亚麻子木脂素的研究已经日趋深入，开发出各种不同的功能食品，因其独特的保健作用而受到这些根据人民的欢迎。尤其对一些内分泌的血疾病，如骨质疏松、更年期综合征、心血管疾病、老年性痴呆症以及对乳腺癌、前列腺疾病等取得了较好的疗效。用亚麻子生物合成肠二醇，分离较困难，产量也很少，不利于工业化生产。牛蒡子所含的植物雌激素除了同样具备亚麻子的功效外，在某些方面优于后者。另外，本发明的方法可以大量合成一种植物雌激素—肠二醇的制备方法。

**附图说明：**

图 1. 为 4,4'-二羟基肠二醇的一级全扫描质谱图；

图 2. 为本发明的一种植物雌激素—肠二醇的一级全扫描质谱图。

---

**具体实施方式：****实施例 1****(1)、菌种培育：**

将1 mg 4,4'-二羟基肠二醇加入100 mL GAM肉汤培养基中，再加入0.1 g健康人的新鲜粪便，35℃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)、制备一种植物雌激素—肠二醇：**

“将30 mg 4,4'-二羟基肠二醇加入900 mL GAM肉汤培养基中，再加入100 mL按照上述步骤（1）制备的菌种，35℃厌氧培养1天，得到培养液。用浓度为0.1 % (v/v) 醋酸水饱和正丁醇提取培养液，醋酸水饱和正丁醇溶液与菌种培养液体积比为1：1。减压浓缩提取液，经硅胶柱分离、纯化，得到20 mg一种植物雌激素—肠二醇。

**实施例 2****(1)、菌种培育：**

将100 mg 4,4'-二羟基肠二醇加入600 mL GAM肉汤培养基中，再加入6.0 g健康人的新鲜粪便，37℃厌氧培养36小时，得到细菌培养液；将此细菌培养液作为菌种。

**(2)、制备一种植物雌激素—肠二醇：**

将700 mg 4,4'-二羟基肠二醇加入400 mL GAM肉汤培养基中，再加入600 mL按照上述步骤（1）制备的菌种，37℃厌氧培养5天。用浓度为0.1 % (v/v) 醋酸水饱和正丁醇提取培养液，醋酸水饱和正丁醇溶液与培养液体积比为1：1。减压浓缩提取液，经硅胶柱分离、纯化，

得到400 mg一种植物雌激素—肠二醇。

### 实施例 3

#### (1)、菌种培育：

将2000 mg 4,4'-二羟基肠二醇加入800 mL GAM肉汤培养基中，再加入160 g健康人的新鲜粪便，40℃厌氧培养48小时，得到细菌培养液；将此细菌培养液作为菌种。

#### (2)、制备一种植物雌激素—肠二醇：

将3000 mg 4,4'-二羟基肠二醇加入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，35—40℃厌氧培养10天。用浓度为0.1% (v/v) 醋酸水饱和正丁醇提取培养液，醋酸水饱和正丁醇溶液与培养液体积比为1：1。减压浓缩提取液，经硅胶柱分离、纯化，得到1500 mg一种植物雌激素—肠二醇。

### 实施例 4 4,4'-二羟基肠内酯的制备：

#### 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℃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℃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℃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 5 4,4'-二羟基肠内酯的制备

### 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。

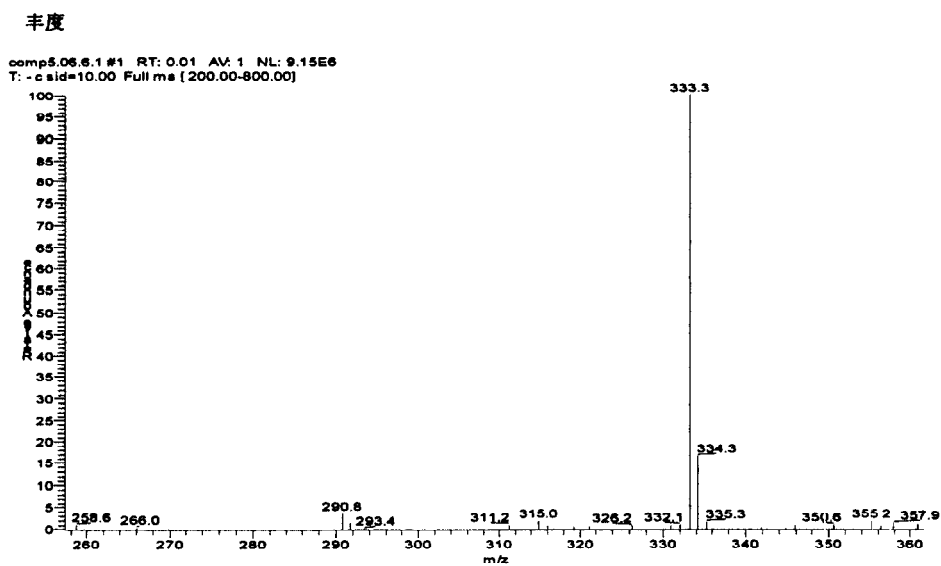


图 1.

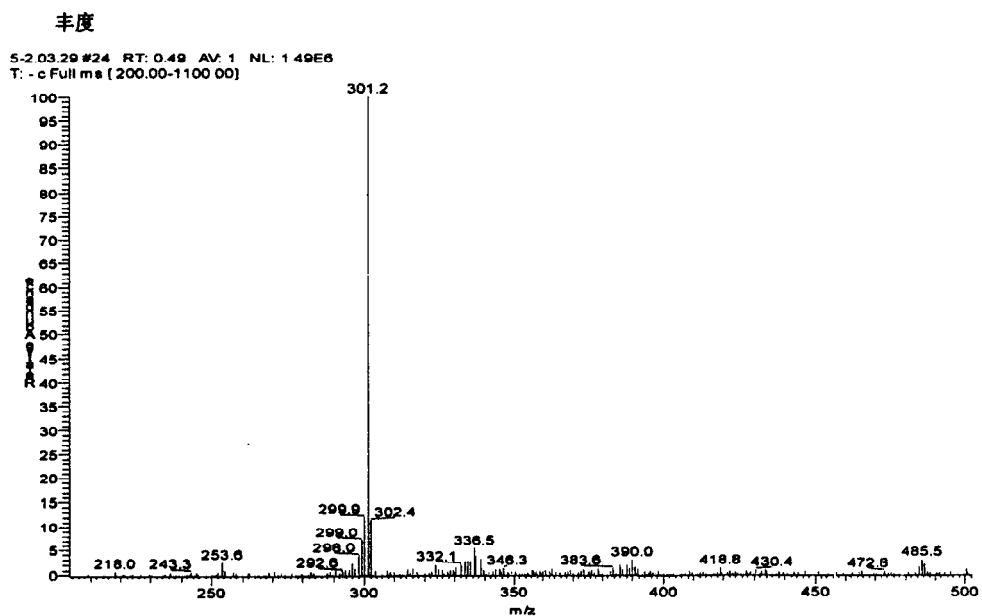


图 2.