

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 12 月 12 日 (12.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/251002 A1

(51) 国际专利分类号:

C07H 15/18 (2006.01) *A61P 17/18* (2006.01)
C12P 19/44 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)
A61K 31/7032 (2006.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/095989

(22) 国际申请日: 2024 年 5 月 29 日 (29.05.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

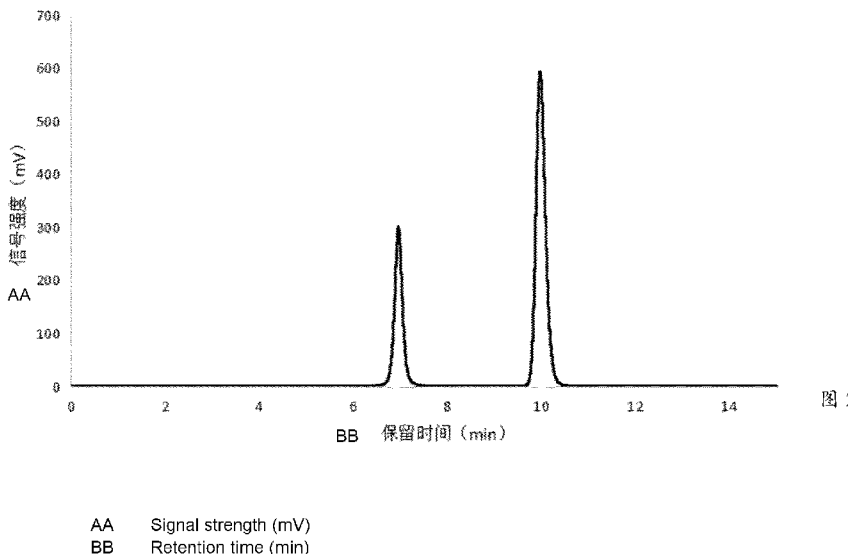
202310670529.3 2023年6月8日 (08.06.2023) CN
202410159803.5 2024年2月4日 (04.02.2024) CN

(71) 申请人: 恒睿 (青岛) 生物科技有限公司 (HENRUI (QINGDAO) BIOTECH. CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山东省青岛市高新区河东路 368 号 4 号楼 201, Shandong 266114 (CN)。

(72) 发明人: 方诩 (FANG, Xu); 中国山东省青岛市高新区河东路 368 号 4 号楼 201, Shandong 266114 (CN)。刘大明 (LIU, Daming); 中国山东省青岛市高新区河东路 368 号 4 号楼 201, Shandong 266114 (CN)。殷文成 (YIN, Wencheng); 中国山东省青岛市高新区河东路 368 号 4 号楼 201, Shandong 266114 (CN)。张爽 (ZHANG, Shuang); 中国山东省青岛市高新区河东路 368 号 4 号楼 201, Shandong 266114 (CN)。广濑芳彦 (HIROSE, Yoshihiko); 日本岐阜县长松町 733, Gifu 〒503-0097 (JP)。

(54) Title: SALIDROSIDE DERIVATIVE, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 红景天苷的衍生物及制备方法和应用



(57) Abstract: The present invention relates to a salidroside derivative, and particularly relates to a hydroxy- α -salidroside compound. The hydroxy- α -salidroside compound is superior to α -salidroside in the aspects of scavenging DPPH free radicals, whitening and ameliorating learning and memory disorders, and can be added as a new functional component to cosmetics, functional foods or pharmaceutical compositions. According to the preparation method for hydroxy- α -salidroside of the present invention, α -salidroside is used as a substrate, and hydroxy- α -salidroside is synthesized under the action of hydroxylase.

(57) 摘要: 本发明涉及一种红景天苷的衍生物, 具体涉及一种羟基- α -红景天苷化合物, 所述羟基- α -红景天苷化合物, 在清除 DPPH 自由基、美白方面以及在改善学习记忆障碍方面优于 α -红景天苷, 可作为新的功能性成分添加到化妆品、功能食品或药品组合物中。本发明所述羟基- α -红景天苷的制备方法, 以 α -红景天苷为底物, 在羟化酶的作用下, 合成羟基- α -红景天苷。

[见续页]

(74) 代理人: 济南圣达知识产权代理有限公司(JINAN SHENGDA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国山东省济南市历下区经十路17703号华特广场B510室, Shandong 250014 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

红景天苷的衍生物及制备方法和应用

相关申请的交叉引用

本发明要求于2023年6月8日提交的标题为“一种红景天苷的衍生物及制备方法和应用”的中国专利申请CN202310670529.3的优先权,并且要求于2024年2月24日提交的标题为“红景天苷的衍生物及制备方法和应用”的中国专利申请CN202410159803.5的优先权。上述申请的全部内容通过引用并入本文,用于所有目的。

技术领域

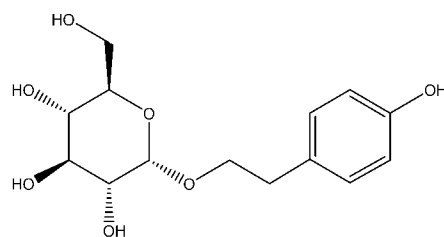
本发明涉及一种红景天苷的衍生物,具体涉及一种羟基- α -红景天苷化合物。

背景技术

公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

红景天是一味珍贵中药,2020版《中国药典》收录为景天科大花红景天的干燥根和根茎,产于中国西藏等地,生长于海拔4050米至5400米左右的地区。由红景天制备的红景天片、心脑血管胶囊等药品具有活血化瘀,通脉止痛的功效,红景天胶囊等保健食品的功能为增强免疫力、缓解体力疲劳。红景天苷是中药红景天的有效活性成分,据报道,红景天苷具有保护心脑血管、抗疲劳、抗抑郁、抗衰老、抗缺氧、抗辐射、抗肿瘤、免疫调节、美白祛斑等生理活性。天然状态下的红景天苷(植物来源红景天苷)为 β -红景天苷,其糖苷键为 β 型。

中国专利202211359878.5,公开了一种 α -红景天苷及其制备方法与应用,所述 α -红景天苷,化学名称为:2-(4-羟基苯基)乙基- α -D-葡萄糖苷,分子量为300.23,化学式如下,其具有优异的清除自由基活性,可作为化妆品、抗疲劳保健品等产品的主要原料。



α -红景天苷结构式。

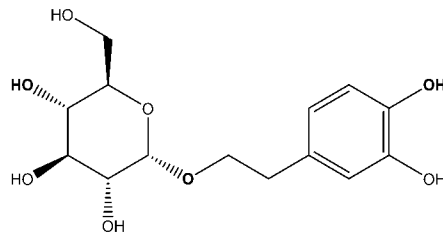
发明内容

发明目的:处于对产品迭代的需求,申请人对红景天苷及其衍生物进行了研究,获得了羟基- α -红景天苷。另外,本发明还提供了羟基- α -红景天苷的制备方法及应用。

现有技术没有关于羟基- α -红景天苷的报道。

技术方案：

第一方面，本发明提供了一种羟基- α -红景天苷化合物，化学名称：2-(3,4-二羟基苯基)乙基- α -D-葡萄糖苷，化学式见式 I，其在羟基酪醇的醇羟基上具有 α -葡萄糖苷键。



式 I

本发明所述羟基- α -红景天苷经 LC-MS 分析，其分子量为 316.108。

本发明所述羟基- α -红景天苷的 ^1H -NMR 谱： ^1H NMR(600MHz, DMSO): δ 2.64-2.72(m, 2H), 3.02-3.08(m, 1H), 3.17-3.21(m, 1H), 3.31-3.37(m, 4H), 3.37-3.46(m, 2H), 3.46-3.51(m, 1H), 3.57-3.63(m, 1H), 3.67-3.73(m, 1H), 4.44(t, 1H), 4.57(d, 1H), 4.68(d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H: β -H), 4.73(d, 1H), 4.83(d, 1H), 8.64(s, 1H: OH), 8.69(s, 1H: OH)。

所述羟基- α -红景天苷的 ^{13}C -NMR 谱： ^{13}C NMR (151MHz, DMSO): δ 35.5, 61.4, 68.9, 70.8, 72.5, 73.3, 73.8, 99.1, 115.9, 116.7, 120.0, 129.9, 144.0, 145.5。

第二方面，本发明提供了所述羟基- α -红景天苷化合物的制备方法。

所述制备方法，包括将 α -红景天苷溶解于缓冲溶液中，再加入羟化酶，在反应体系中进行羟化反应制备得到。

优选的，所述羟化酶可以选择市售商品化羟化酶 (Hydroxylase) 制剂。

进一步优选的，所述市售商品化羟化酶酶制剂来源于默克有限公司、上海麦克林生化科技股份有限公司和上海源叶生物科技有限公司，包括但不限于单酚单加氧酶 (Monophenol monooxygenase)、多酚氧化酶 (Polyphenol Oxidase)、酪氨酸酶 (Tyrosinase) 等。

优选的，所述反应体系中还可以加入不影响酶促反应的表面活性剂，如聚山梨酯 (Tween-20) 或失水山梨醇脂肪酸酯 (Span)。

本发明中，所述羟基- α -红景天苷的制备也可以在有机溶剂中进行，反应中使用的有机溶剂只要是不影响反应的种类和浓度范围即可，具体包括 DMSO、2-丙醇、乙醇中的一种溶剂或两种以上的混合溶剂。

优选的，所述反应体系中，含有铵盐。

所述铵盐，优选的，包括但不限于氯化铵、乙酸铵、或硫酸铵。

铵盐能够提高底物 α -红景天苷的转化率。

第三方面，本发明提供了所述羟基- α -红景天苷化合物在制备具有清除自由基功能的产品中的应用；或具有美白功能的化妆品方面的应用。

优选的，所述自由基为 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）自由基。

所述应用，优选的，所述产品为具有清除自由基功能的化妆品。

优选的，所述清除自由基功能的产品为功能食品。

本发明进一步提供了一种组合物，含有羟基- α -红景天苷。

优选的，所述组合物具有清除自由基的功能，或美白肌肤的功能。

优选的，所述自由基为 DPPH 自由基。

所述含有羟基- α -红景天苷的化妆品组合物，其品类选自水剂类、油剂类、乳剂类、凝胶类产品、膏状产品，或其他，可以按现有化妆品技术规范生产。

含有羟基- α -红景天苷的功能食品组合物，其剂型选自胶囊剂、片剂、膏剂、水剂，或其他，可以按现有功能食品技术规范生产。

第四方面，本发明还提供了所述羟基- α -红景天苷化合物在制备改善学习记忆障碍药品中的应用。

优选的，所述改善学习记忆障碍药品包括但不限于治疗阿尔兹海默症的药品。

优选的，所述改善学习记忆障碍药品包括但不限于治疗帕金森症的药品。

学习记忆障碍是许多疾病可能出现的症状群。引起学习记忆障碍的原因多种多样，如阿尔茨海默病和帕金森病等在内的神经退行性病变、应激、衰老、脑缺血性损伤、脑外伤、高血压、糖尿病、更年期综合症和抑郁症等。其中阿尔茨海默病是最常见的一种学习记忆障碍性疾病，临床上的药物只能减轻症状，不能延缓或终止其进程，并且在不同患者身上产生的疗效不一致，有较多的不良反应。另外，目前人们的工作和生活节奏加快，竞争压力增加，长期处于慢性应激状态中，导致机体协调失衡、功能紊乱，尤其是影响大脑认知功能，导致学习记忆能力下降等。因此，现在迫切需要改善学习记忆障碍的药物。研究发现本发明所述羟基- α -红景天苷具有改善模型鼠的学习记忆水平，表现在可显著提高大鼠对新位置物体的相对辨别指数，缩短水迷宫实验中的寻台潜伏期，提高穿台次数，降低避暗实验中的错误次数和暗室时间，表明羟基- α -红景天苷能够较好地改善学习记忆障碍。

第五方面，提供了一种清除自由基的方法，包括向目标区域或受试者施用有效量的羟基- α -红景天苷或包含有效量的羟基- α -红景天苷的组合物。所述自由基为 DPPH 自由基。

第六方面，提供了一种美白皮肤的方法，包括向皮肤施用有效量的羟基- α -红景天苷或包含有效量的羟基- α -红景天苷的组合物。

第七方面，提供了一种改善学习记忆障碍的方法，包括向受试者施用有效量的羟基- α -红景天苷或包含有效量的羟基- α -红景天苷的组合物。

本发明所述“受试者”指任何需要治疗、预防或诊断的生物体，优选为哺乳动物，更优选为人类。

本发明所述“有效量”指足以实现所需治疗、预防或诊断效果的化合物的量。该量可以根据受试者的年龄、体重、健康状况、性别以及具体的治疗、预防或诊断目的进行调整。有效量可通过常规药理学测试方法、体外试验、动物模型试验或临床试验测得。通常，所述有效量在约 0.01 mg/kg 至 1000 mg/kg 体重范围内，更优选在约 0.1 mg/kg 至 100 mg/kg 体重范围内。

有益效果：

本发明提供了一种红景天苷衍生物，即羟基- α -红景天苷，与 α -红景天苷相比，在清除 DPPH 自由基方面，具有更高的活性，可作为新的功能性成分添加入化妆品中或保健品中；所述羟基- α -红景天苷还具有改善模型鼠的学习记忆水平的优异性能，可作为制备阿尔兹海默症药物、或帕金森症药物的开发应用。

附图说明

构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

图 1：实施例 1 酶催化反应液的 TLC 谱图；图中，从左至右分别为泳道 1、泳道 2；泳道 1 为 α -红景天苷，泳道 2 为羟基- α -红景天苷。

图 2：实施例 1 酶催化反应液的 HPLC 谱图。

图 3：实施例 1 酶催化反应液 HPLC 谱图中，rt=6.97 min 物质的 LC-MS 谱图。

图 4：实施例 1 酶催化反应液 HPLC 谱图中，rt=6.97 min 物质的 H-NMR 谱图。

图 5：实施例 1 酶催化反应液 HPLC 谱图中，rt=6.97 min 物质的 C-NMR 谱图。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。本发明所使用的试剂或原料均可通过常规途径购买获得，如无特殊说明，本发明所使用的试剂或原料均按照本领域常规方式使用或者按照产品说明书使用。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

本发明所述羟基- α -红景天苷，化学名称为：2-(3,4-二羟基苯基)乙基- α -D-葡萄糖苷，结构式见式 I。

本发明所述羟基- α -红景天苷的制备方法，以 α -红景天苷为底物，在羟化酶的作用下实现羟基化。

所述羟化酶，可以选择市售商品化羟化酶制剂，来源于默克有限公司、上海麦克林生化科技股份有限公司和上海源叶生物科技有限公司，包括儿茶酚氧化酶但不限于单酚单加氧酶、多酚氧化酶、酪氨酸酶等。

羟化酶制剂的使用方法包括以粉末或液体的形式加入反应体系中，也可将酶制剂固定在树脂上制成固定化酶制剂加入到反应体系中，固定化酶制剂可以重复使用。

本发明所述羟基- α -红景天苷的制备方法，是将羟化酶加入 α -红景天苷磷酸缓冲液中，进行羟化酶反应。酶反应溶液中可加入不影响酶促反应的表面活性剂，例如 Tween-20 和 Span 等试剂。

在使用上述羟化酶制备羟基- α -红景天苷化合物时，羟化酶的用量和反应条件对生产效率有很大的影响，因此选择合适的酶量和反应时间等反应条件至关重要。

反应可以在溶剂存在的情况下进行，反应中使用的溶剂只要是不影响反应的种类和浓度范围即可，具体可包括 DMSO、2-丙醇、乙醇等常用试剂。这些溶剂可以单独使用，也可以同时使用两种或两种以上。

通过加热或改变 pH 值等方法可以导致本发明使用的酶失活，从而停止酶催化反应。

上述含羟基- α -红景天苷化合物的混合物、混合物的水解产物、混合物的酶灭活产物、混合物的纯化产物，其干燥的粉末产品可用于含羟基- α -红景天苷化合物的食品、饮料和化妆品中，也可作为食品、特医食品、保健品或药品的成分，用于食品和饮料、化妆品、特医食品、保健品或药品的生产。

TLC 分析条件：采用薄层色谱法对酶反应溶液进行快速分析，具体分析条件如下：使用 Merck 公司生产的 TLC 板(Merck Kieselgel 60 F254)，以氯仿:甲醇:乙酸=5:1:1 的溶液为展开溶剂。

HPLC 分析条件: 高效液相色谱仪: 日立 HPLC 5440 色谱仪, 色谱柱: Kromasil 100-5 C18 (250 * 4.6 mm), 检测器: 光电二极管阵列(DAD 280 nm), 检测波长: UV 280 nm, 进样量: 10 μ L, 流速: 1 mL/min, 柱温: 30°C, 流动相: 乙腈: 0.1%甲酸水溶液(v/v)等度洗脱。

LC-MS 分析条件: 色谱柱: Kromasil 100-5 C18 (250 * 4.6 mm), 检测器: 光电二极管阵列(DAD 280 nm), 检测波长: 280 nm, 进样量: 10 μ L, 流速: 1 mL/min, 柱温: 30°C, 流动相同上检测时间为 5-15 min 的流动相; H-ESI 模式, 分子量扫描范围 50 ~ 800。

文献 Enzymatic routes for the production of mono- and di-glucosylated derivatives of hydroxytyrosol”, Antonio Trincone et al. 《Bioresource Technology》第 115 卷是一篇关于“酶法生产羟基酪醇的单葡萄糖基化和二葡萄糖基化衍生物”的文章, 通过将来自 *Aplysia.fasciata* 的内脏物质匀浆加入到 1.5 mL 在 50 mM 乙酸钾缓冲液中的 10 mM 受体溶液中 (pH 5.5, 含有 150 mM 麦芽糖), 获得了 (3,4-二羟基苯基) 乙基- α -D-吡喃葡萄糖苷化合物, 并通过对反应所得产品进行乙酰化所得核磁数据推断获得了目标化合物。但该文献缺少质谱鉴定数据, 没有公开具体化合物的分子量。也没有作为 α -葡萄糖苷关键氢原子的化学位移数据, 没有公开具体化合物的化学结构式, 不能确认所述化合物的立体构型。

本发明的发明人根据该文献描述的方法, 对本发明所述羟基- α -红景天苷化合物进行乙酰化处理, 然后进行碳谱和氢谱进行分析, 不能获得所述乙酰化产品及其补充文献所述碳谱和氢谱数据, 因此本发明所得羟基- α -红景天苷化合物与文献所得化合物不同。

实施例 1. 酪氨酸酶羟基化实验

取 α -红景天苷 (分子量 300.23) 500 mg, 加入 50 mL 0.2M 磷酸盐缓冲液 (并调整 pH 至 10), 加入 500 mg 抗坏血酸, 再加入 3 mg 酪氨酸酶 (T828256-100KU, 麦克林), 加水补足体积至 100 mL, 25°C 搅拌反应, 反应 24 小时, 得酶催化反应溶液。

实施例 2. 多酚氧化酶羟基化实验

取 α -红景天苷 (分子量 300.23) 100 mg, 加入 50 mL 0.2M 磷酸盐缓冲液 (并调整 pH 至 10), 加入 100 mg 抗坏血酸, 再加入 3 mg 酪氨酸酶 (S10171-100KU, 上海源叶生物科技有限公司), 加水补足体积至 100 mL, 15°C 搅拌反应, 反应 50 小时, 得酶催化反应溶液。

实施例 3. 单酚单加氧酶羟基化实验

取 α -红景天苷 (分子量 300.23) 500 mg, 加入 50 mL 0.2M 磷酸盐缓冲液 (pH9), 加入 500 mg 抗坏血酸, 再加入 1.5 g 单酚单加氧酶 (T3824-50KU, Merck), 加水补足体积至 100 mL, 35°C 搅拌反应, 反应 24 小时, 得酶催化反应溶液。

实施例 4. 单酚单加氧酶羟基化实验

依实施例 3 所述方法，投料量同步放大 10 倍，35°C 搅拌反应，反应 24 小时，得酶催化反应溶液。

实施例 5. 羟基- α -红景天苷的纯化及结构分析

对实施例 1-4 反应液进行 TLC、HPLC、LC-MS、NMR 分析。

(1) TLC 分析

实施例 1 反应液 TLC 分析图谱见图 1，显示酶催化反应液中有新物质产生。图中，从左至右分别为泳道 1、泳道 2；泳道 1 为 α -红景天苷，泳道 2 为酶催化反应产生的新物质。

(2) HPLC 分析

依照上述色谱条件，对实施例 1 纯化后反应液进行 HPLC 分析，HPLC 图谱详见图 2。

图 2 所示 HPLC 图谱显示，实施例 1 纯化后反应液主要有两个峰，出峰时间分别是 $t_r=6.97$ min 和 $t_r=9.98$ min，其中 $t_r=9.98$ min 处的峰是 α -红景天苷， $t_r=6.97$ min 的峰与 α -红景天苷出峰时间有明显的差异。

(3) LC-MS 分析

对实施例 1 反应液 HPLC 图谱中 $t_r=6.97$ min 的物质进行 LC-MS 分析，得到分子离子峰 $[M-1]$ 的测量值为 315.108，LC-MS 图谱见图 3。

根据光电二极管阵列检测器显示的紫外光谱图和 LC-MS 图谱，初步分析 HPLC 图谱中保留时间 $t_r=6.97$ min 的新峰物质的分子量为 316.108，可能是 α -红景天苷羟基化形成的糖苷，可能是羟基- α -红景天苷。

(4) 分离纯化

采用 HPLC 法分离纯化实施例 1-4 得到的酶催化反应液，并收集 $t_r=6.97$ min 的物质，其中，HPLC 法的设备和条件包括：

半制备型高效液相色谱仪（北京橙达仪器有限公司 BRIX 2850），色谱柱为 COSMOSIL 5C18-MS-II (250 * 20 mm)，流动相为乙腈: 0.1% 甲酸水溶液 (v/v) 以 1:9 的比例等度洗脱，使用光电二极管阵列检测器，检测波长为 UV 280 nm，进样量为 100 μ L，流速为 18 mL/min。

将收集得到的分别来自实施例 1-4 的 $t_r=6.97$ min 的物质，分别进行浓缩冻干，得到冻干固体，作为实施例 1-4 的目标物质，用于后续实验。

(5) H-NMR 和 C-NMR 谱图分析

取上述冻干样品进行 H-NMR、C-NMR 分析。

实施例 1 反应液 HPLC 图谱中 $t_r=6.97$ min 的物质的 H-NMR 谱图见图 4，C-NMR 谱图见图 5。

¹H- NMR(600MHz, DMSO): δ2.64-2.72(m, 2H), 3.02-3.08(m, 1H), 3.17-3.21(m, 1H), 3.31-3.37(m, 4H), 3.37-3.46(m, 2H), 3.46-3.51(m, 1H), 3.57-3.63(m, 1H), 3.67-3.73(m, 1H), 4.44(t, 1H), 4.57(d, 1H), 4.68(d, *J*=3.6Hz, 1H:β-H), 4.73(d, 1H), 4.83(d, 1H), 8.64(s, 1H: OH), 8.69(s, 1H: OH)。

¹³C- NMR (151MHz, DMSO):δ35.5, 61.4, 68.9, 70.8, 72.5, 73.3, 73.8, 99.1, 115.9, 116.7, 120.0, 129.9, 144.0, 145.5。

依据实施例 1 产品的 H-NMR 谱和 C-NMR 谱，结合中国专利申请 202211359878 .5 所公开的α-红景天苷的 H-NMR 谱和 C-NMR 谱,实施例 1 产品的 H-NMR 谱在 8.64 ppm 和 8.69 ppm 处，存在两个单峰(s, 1H: OH)，这是“双酚羟基的特征”。α-红景天苷在 9.10 ppm 处是单峰，这是“单酚羟基的特征”，且实施例 1 产品的 C-NMR 谱出现 14 个特征峰，而α-红景天苷只存在 12 个特征峰，二者明显不同。

综上，从 TLC 图谱和 HPLC 图谱可见，酶催化反应产生了新物质；从 LC-MS 分析，新物质分子量为 316.108；再结合 H- NMR 和 C-NMR 图谱，证实实施例 1 酶催化反应所得物质为羟基-α-红景天苷。

实施例 2-4 酶催化反应产物的 HPLC 图谱、LC-MS 图谱、H-NMR、C-NMR 图谱同实施例 1 反应液。因此，实施例 2-4 酶催化反应所得物质也为羟基-α-红景天苷。

HPLC 法测定实施例 1-4 反应液中的羟基-α-红景天苷浓度，结果记录于表 1。

表 1

	羟基-α-红景天苷，g/L	α-红景天苷转化率，%
实施例 1	1.375	26.1
实施例 2	0.146	13.9
实施例 3	1.960	37.2
实施例 4	4.150	39.4

实施例 6-8. 在实施例 3 的基础上，向反应体系中添加铵盐，如氯化铵、或乙酸铵、或硫酸铵，进行酶促反应。具体如下：

分别取α-红景天苷（分子量 300.23）500 mg，加入 50 mL 0.2M 磷酸盐缓冲液（pH9），加入 500 mg 抗坏血酸，分别添加 10 mL 的 0.2M 铵盐（具体铵盐品种见表 2），再加入 1.5 g 单酚单加氧酶（T3824-50KU，Merck），加水补足体积至 100 mL，35℃搅拌反应，反应 24 小时，得酶催化反应溶液，HPLC 法检测反应液中羟基-α-红景天苷，结果记录于表 2。

表 2

	实施例 6	实施例 7	实施例 8
--	-------	-------	-------

铵盐	氯化铵	乙酸铵	硫酸铵
羟基- α -红景天苷, g/L	2.280	2.012	1.907
α -红景天苷转化率, %	43.3	38.2	36.2

表 2 数据说明, 氯化铵、乙酸铵均能够提高酶促反应中底物 α -红景天苷的转化率。

实施例 9. 自由基清除实验, 所用物料与试剂如见表 3。

表 3. 物料与试剂

试剂名称	试剂类别	纯度	厂家
无水乙醇	分析纯	$\geq 99.7\%$	国药集团化学试剂有限公司
DPPH	/	98%	上海源叶生物科技有限公司
α -红景天苷	/	/	山东恒鲁生物科技有限公司
β -红景天苷	/	/	山东恒鲁生物科技有限公司

DPPH 自由基的清除实验: 自由基直接或间接地发挥强氧化作用, 广泛地参与机体的生理与病理过程。机体自由基过量时, 能通过氧化作用损伤机体。丹酚酸类化合物是酚羟基的供体, 具有抗氧化活性的结构基础。本实验采用 DPPH 自由基清除反应, 研究羟基- α -红景天苷、 α -红景天苷、 β -红景天苷对 DPPH 自由基的清除效率。

溶液制备:

- (1) 羟基- α -红景天苷溶液制备: 按照实施例 5 的方法分别制备实施例 1-3 的目标物质, 并按常规方法分别制备为 500 mg/L 水溶液。
- (2) α -红景天苷溶液制备: 按常规方法制备为 500 mg/L 水溶液。
- (3) β -红景天苷溶液制备: 按常规方法制备为 500 mg/L 水溶液。
- (4) DPPH 乙醇溶液制备: 按常规方法制备为 0.04 mg/mL 的无水乙醇溶液。

2. DPPH 自由基清除实验:

- (1) 分别取羟基- α -红景天苷、 α -红景天苷、 β -红景天苷水溶液各 0.9 mL, 分别加入 DPPH 无水乙醇溶液 0.9 mL, 混合均匀, 置于暗处静置, 分别于 0.5h、1h、2h、3h、4h、5h 取样, 于 517 nm 波长处测定吸光度, 计算三个平行的平均值, 记为 A_i 。
- (2) 分别取羟基- α -红景天苷、 α -红景天苷、 β -红景天苷水溶液各 0.9 mL, 分别加入无水乙醇 0.9 mL, 混合均匀, 置于暗处静置, 分别于 0.5h、1h、2h、3h、4h、5h 取样, 于 517 nm 波长处测定吸光度, 计算三个平行的平均值, 记为 A_j 。
- (3) 取蒸馏水 0.9 mL, 加入 DPPH 乙醇溶液 0.9 mL, 混合均匀, 于 517 nm 波长处测定吸光度, 计算三个平行的平均值, 记为 A_4 。
- (4) 0.9 mL 无水乙醇, 加蒸馏水 0.9 mL, 混合均匀, 作为空白。

依据如下公式计算 DPPH 自由基清除率，结果见表 4。

DPPH 自由基清除率= $\frac{-A - A_0}{A_0} \times 100\%$ 。

表 4. DPPH 自由基清除率

清除率 样品	DPPH 自由基清除率，%					
	0.5h	1h	2h	3h	4h	5h
α-红景天苷	19.67	28.54	31.14	31.93	33.07	29.32
β-红景天苷	19.96	23.21	28.24	29.27	28.33	31.92
实施例 1 羟基-α-红景天苷	92.10	92.00	91.18	90.56	90.77	90.05
实施例 2 羟基-α-红景天苷	92.36	92.17	91.34	90.68	90.57	90.18
实施例 3 羟基-α-红景天苷	92.20	92.12	91.27	90.61	90.64	90.12

表 4 数据说明：羟基α-红景天苷清除自由基的能力 0.5 小时即达最高值，为α-红景天苷和β-红景天苷的 4 倍以上。

实施例 10.酪氨酸酶活性抑制实验

物料与试剂如见表 5。

表 5.物料与试剂

试剂名称	试剂类别	纯度	厂家
酪氨酸酶	/	>1350 u/mg	北京酷来搏科技有限公司
左旋多巴	/	99%	上海麦克林生化科技股份有限公司
磷酸氢二钠	分析纯	/	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸	分析纯	/	国药集团化学试剂有限公司
α-红景天苷	/	/	山东恒鲁生物科技有限公司

仪器：752N 紫外可见分光光度计，上海佑科仪器仪表有限公司。

溶液配制：

- (1) α-红景天苷溶液配制：按常规方法配制成 1 mg/mL 的水溶液。
- (2) 羟基-α-红景天苷溶液制备：按照实施例 5 的方法分别制备实施例 1-3 的目标物质，并按常规方法分别配制成 1 mg/mL 的水溶液。
- (3) 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制：
 - 1) 配制 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠和 0.1 mol/L 的柠檬酸水溶液。
 - 2) 取磷酸氢二钠水溶液 154.5 mL，柠檬酸水溶液 45.5 mL，混匀，调整 pH 为 6.8（pH 计测量，可用 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠或 0.1 mol/L 的柠檬酸调整 pH 值）。
- (4) 酪氨酸酶溶液配制：用上述磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液制备 100 u/mL 的酪氨酸酶溶液。

(5) 左旋多巴溶液配制：用上述磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液制备 1 mg/mL 左旋多巴溶液。

实验方案：

(1) 分别取羟基-α-红景天苷溶液、α-红景天苷溶液各 1 mL，分别加入酪氨酸酶 0.5 mL，混匀，37°C 水浴 10 min，再分别加入左旋多巴 2 mL，控制反应时间 5 min，立刻分别于 475 nm 处测定吸光度 T。

(2) 样品本底 T₀：分别取羟基-α-红景天苷溶液、α-红景天苷各 1 mL，分别加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 0.5 mL，混匀，37°C 水浴 10 min，再加入左旋多巴 2 mL，控制反应时间 5 min，立刻于 475 nm 处测定吸光度。

(3) 酶反应管 C：取磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 1 mL，加入酪氨酸酶 0.5 mL，混匀，37°C 水浴 10 min，再加入左旋多巴 2 mL，控制反应时间 5 min，立刻于 475 nm 处测定吸光度。

(4) 溶剂本底 C₀：取磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 1.5 mL，37°C 水浴 10 min，加入左旋多巴 2 mL，控制反应时间 5 min，立刻于 475 nm 处测定吸光度。

依据以下公式计算酪氨酸酶活性的抑制率，结果记录于表 6。

酪氨酸酶活性的抑制率 $=\left(1-\frac{\text{样品本底}}{\text{酶反应管 C}}\right)\times 100\%$ 。

表 6

样品	酪氨酸酶活性的抑制率，%
α-红景天苷	1.01
实施例 1 羟基-α-红景天苷	46.3
实施例 3 羟基-α-红景天苷	47.0

表 6 数据说明：实施例 1、实施例 3 所得羟基-α-红景天苷溶液的酪氨酸酶活性抑制率为 α-红景天苷的 46 倍或以上。

实施例 11. 羟基-α-红景天苷对 Wistar 大鼠学习记忆影响实验研究

实验动物：Wistar 雄性青年大鼠，体重 290-315g，56 只。随机分为 4 组，每组 14 只，随机分为空白对照组、AD 模型 1 组、AD 模型 2 组和 AD 模型 3 组。

羟基-α-红景天苷样品溶液：按实施例 5 中所述方法制备实施例 4 的目标物质，并制备为 10 mg/mL 溶液。

α-红景天苷样品溶液：所述 α-红景天苷为实施例中制备羟基-α-红景天苷的原料，配制为 10 mg/mL 溶液。

实验方法

造模：Wistar 雄性大鼠 AD 模型的建立

AD 模型 1 组-3 组造模方法:每日分别给 Wistar 雄性大鼠腹腔注射 D-半乳糖 120 mg/kg 和亚硝酸钠 80 mg/kg，连续 7 周完成造模;空白对照组腹腔注射等体积生理盐水。

造模第 7 周结束后第 2 天开始按如下方案给药，连续给药 30 天。

AD 模型 1 组:各大鼠每天灌胃羟基- α -红景天苷样品溶液 1 次，剂量按每 kg 体重给药 5 mg 计算。

AD 模型 3 组：各大鼠每天灌胃 α -红景天苷样品溶液 1 次，剂量按每 kg 体重给药 5 mg 计算。

AD 模型 2 组、空白对照组：各大鼠每天灌胃样品溶液一次，剂量为与 AD 模型 1 组相同体积的蒸馏水。

1. 水迷宫实验

第 31 天开始，进行 Morris 水迷宫试验，试验期间继续按如上方案给药。

试验用恒温游泳池直径为 120 cm、高 50 cm，池中水深 30 cm，水温维持在 $(22\pm1)^{\circ}\text{C}$ ，池壁上随意挂两个物体作为近距离视觉暗示。内置平台直径 7 cm，平台没于水下 2 cm，上面有几个小孔以提供一个大鼠容易站稳的表面。

整个实验周期内保持环境信息固定不变。水池中加入牛奶，使平台不可见。迷宫被均分为 4 个象限，将平台置于其中一个象限中央，作为实验中动物逃离水环境的唯一途径。

Morris 水迷宫试验的第 1 天将大鼠放入水池中（不放入平台）自由游泳 2 min，使其熟悉迷宫内的环境。

Morris 水迷宫试验第 2 天起，将平台置于某一象限，进行定位航行试验，记录逃逸潜伏期，连续试验 3 天，每天 3 次，每次变换入水点位置，且每天所有大鼠入水点的顺序保持一致(顺时针)。试验期间，应注意保持平台位置固定不变，选择未放平台的其他 3 个象限作为大鼠的入水点，将大鼠向池壁轻放入水中。设定 120s 为最长逃避潜伏期，120s 后自动停止记录。如果大鼠在 120s 内找到平台，记录其实际逃避潜伏期；如果在 120s 未找到平台，由实验者将其引上平台并停留 10s，逃避潜伏期记为 120s。

记录各组大鼠的水迷宫逃避潜伏期，每组每日逃避潜伏期平均值记录于表 7。

表 7 大鼠水迷宫逃避潜伏期测定结果

组别	第 2 天潜伏期, s	第 3 天潜伏期, s	第 4 天潜伏期, s
空白对照组	76.3 $\pm$ 25.5	53.6 $\pm$ 26.8	37.8 $\pm$ 14.6
AD 模型 1 组(羟基- α -红景天苷)	98.8 $\pm$ 29.2	76.4 $\pm$ 20.4	56.0 $\pm$ 16.6
AD 模型 2 组	116.2 $\pm$ 22.8	110.6 $\pm$ 24.8	101.2 $\pm$ 18.4
AD 模型 3 组 (α -红景天苷)	109.3 $\pm$ 27.8	100.4 $\pm$ 20.1	89.4 $\pm$ 20.6

Morris 水迷宫试验是一种强迫实验动物（大鼠、小鼠）游泳，学习寻找隐藏在水中平台的一种实验，主要用于测试实验动物对空间位置觉和方向觉（空间定位）的学习记忆能力。

逃逸潜伏期（Escape Latency）：逃逸潜伏期是指动物从水迷宫中的起始位置游动到找到隐藏平台所需的时间。随着实验次数的增加，动物找到平台的时间应逐渐缩短，这表明它们在学习和记忆平台位置方面取得了进步。较长的逃逸潜伏期可能表示动物的空间学习和记忆能力受到损害。

表 7 数据说明：

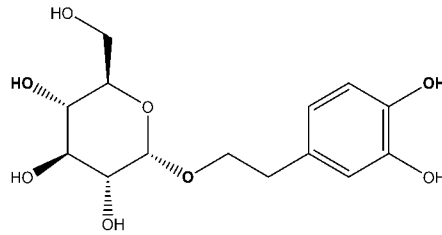
（1）在定位航行实验的第 2-4 天，AD1-3 组模型大鼠的逃逸潜伏期较空白对照组大鼠更长（ $P<0.05$ ），说明 AD1-3 组模型大鼠找到水下隐藏平台需要更长的时间。

（2）AD 模型 1 组为羟基- α -红景天苷用药组，其逃逸潜伏期较 AD 模型 3 组（ α -红景天苷用药组）、AD 模型 2 组更短（空白模型组），说明 AD3 组模型大鼠找到水下隐藏平台需要更短的时间，以及羟基- α -红景天苷对 AD 模型大鼠有一定的提高空间学习记忆能力。

应注意的是，以上实例仅用于说明本发明的技术方案而非对其进行限制。尽管参照所给出的实例对本发明进行了详细说明，但是本领域的普通技术人员可根据需要对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

权 利 要 求

1. 一种羟基- α -红景天苷，化学名称为：2-(3,4-二羟基苯基)乙基- α -D-葡萄糖苷，其结构式如式 I，



式 I。

2. 权利要求书 1 所述羟基- α -红景天苷在制备具有清除自由基功能的产品中的应用；
优选的，所述自由基为 DPPH 自由基，所述产品为化妆品或功能食品。
3. 权利要求书 1 所述羟基- α -红景天苷在制备具有美白功能的产品中的应用。
4. 权利要求 1 所述羟基- α -红景天苷在制备改善学习记忆障碍的药品中的应用；
优选的，所述改善学习记忆障碍的药品包括但不限于治疗阿尔兹海默症的药品；
优选的，所述改善学习记忆障碍的药品包括但不限于治疗帕金森症的药品。
5. 一种组合物，其特征在于，含有权利要求 1 所述的羟基- α -红景天苷。
6. 如权利要求 5 所述的组合物在清除自由基方面的应用。
7. 如权利要求 5 所述的组合物在制备美白化妆品方面的应用。
8. 权利要求 5 所述的组合物在制备改善学习记忆障碍的药品中的应用；
优选的，所述改善学习记忆障碍的药品包括但不限于治疗阿尔兹海默症的药品；
优选的，所述改善学习记忆障碍的药品包括但不限于治疗帕金森症的药品。
9. 权利要求 1 所述羟基- α -红景天苷的制备方法，其特征在于，在含有 α -红景天苷的溶液中，加入羟化酶进行反应；
优选的，所述羟化酶选自单酚单加氧酶、多酚氧化酶或酪氨酸酶。
10. 如权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于，所述反应中还加入铵盐；
优选的，所述铵盐为氯化铵、乙酸铵或硫酸铵。



图 1

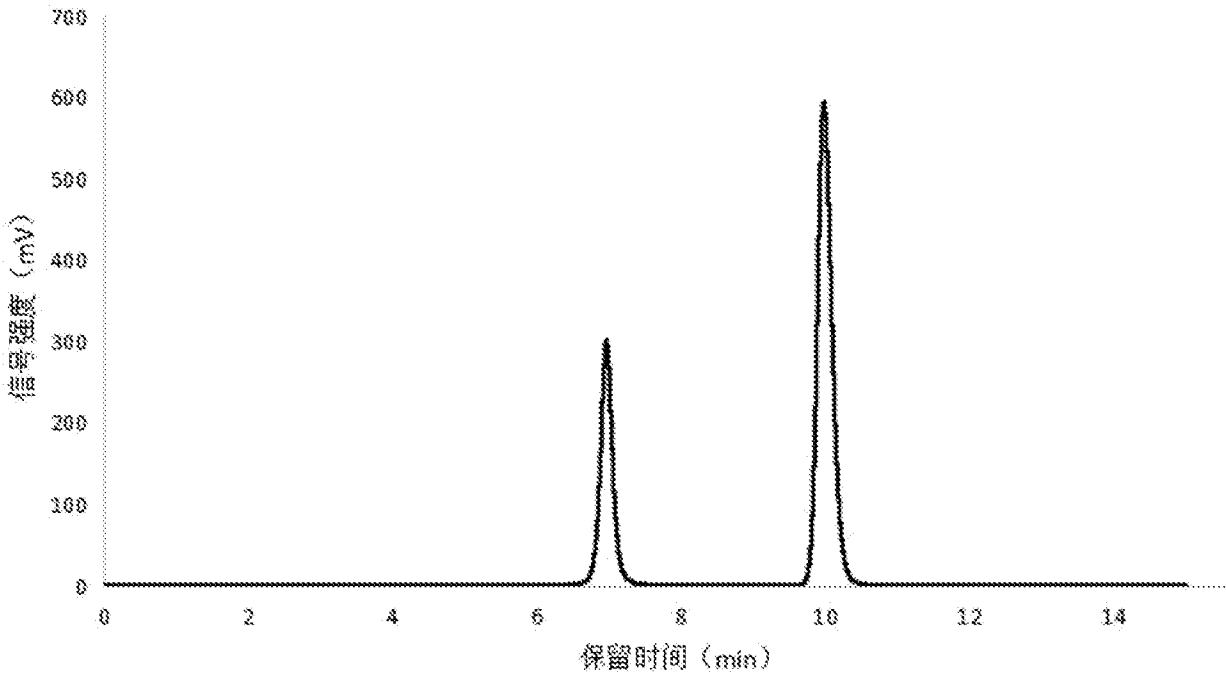


图 2

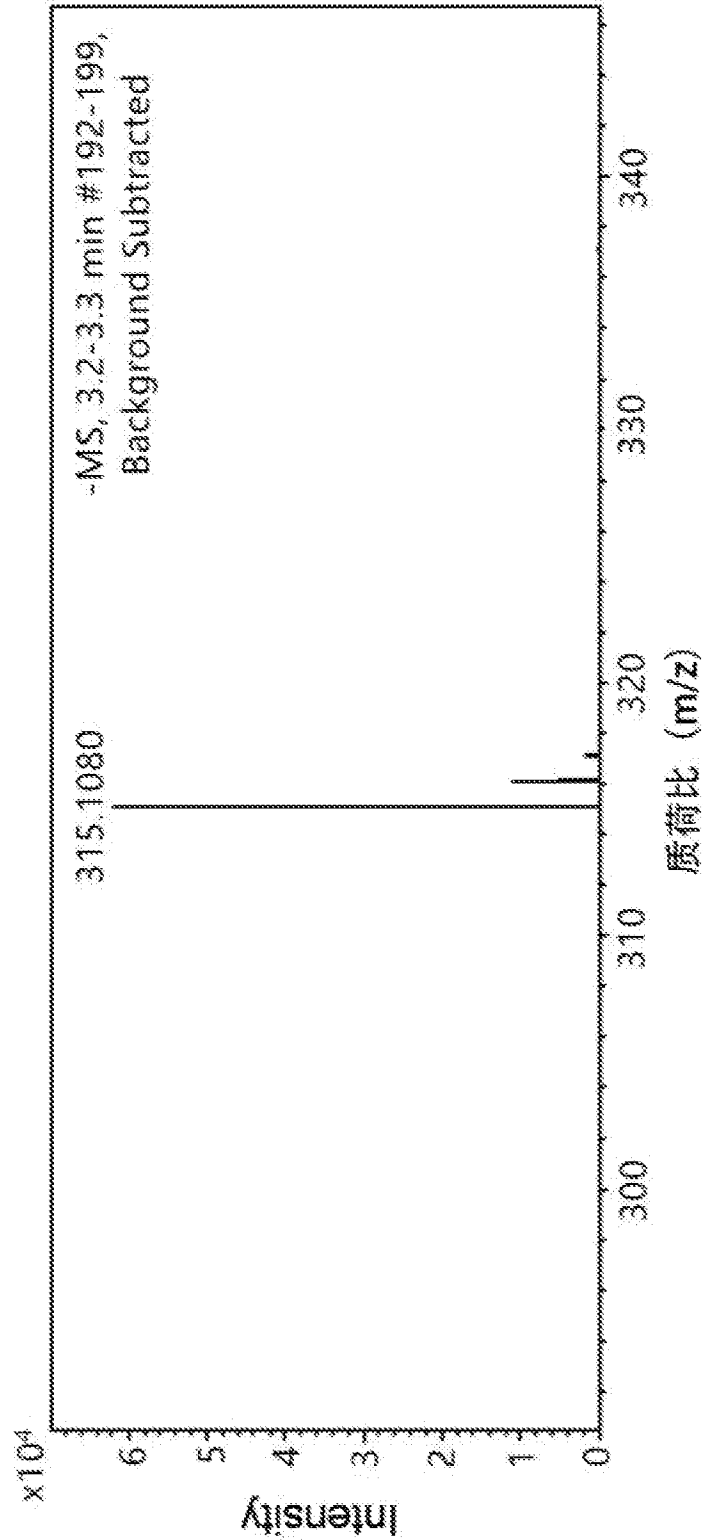


图 3

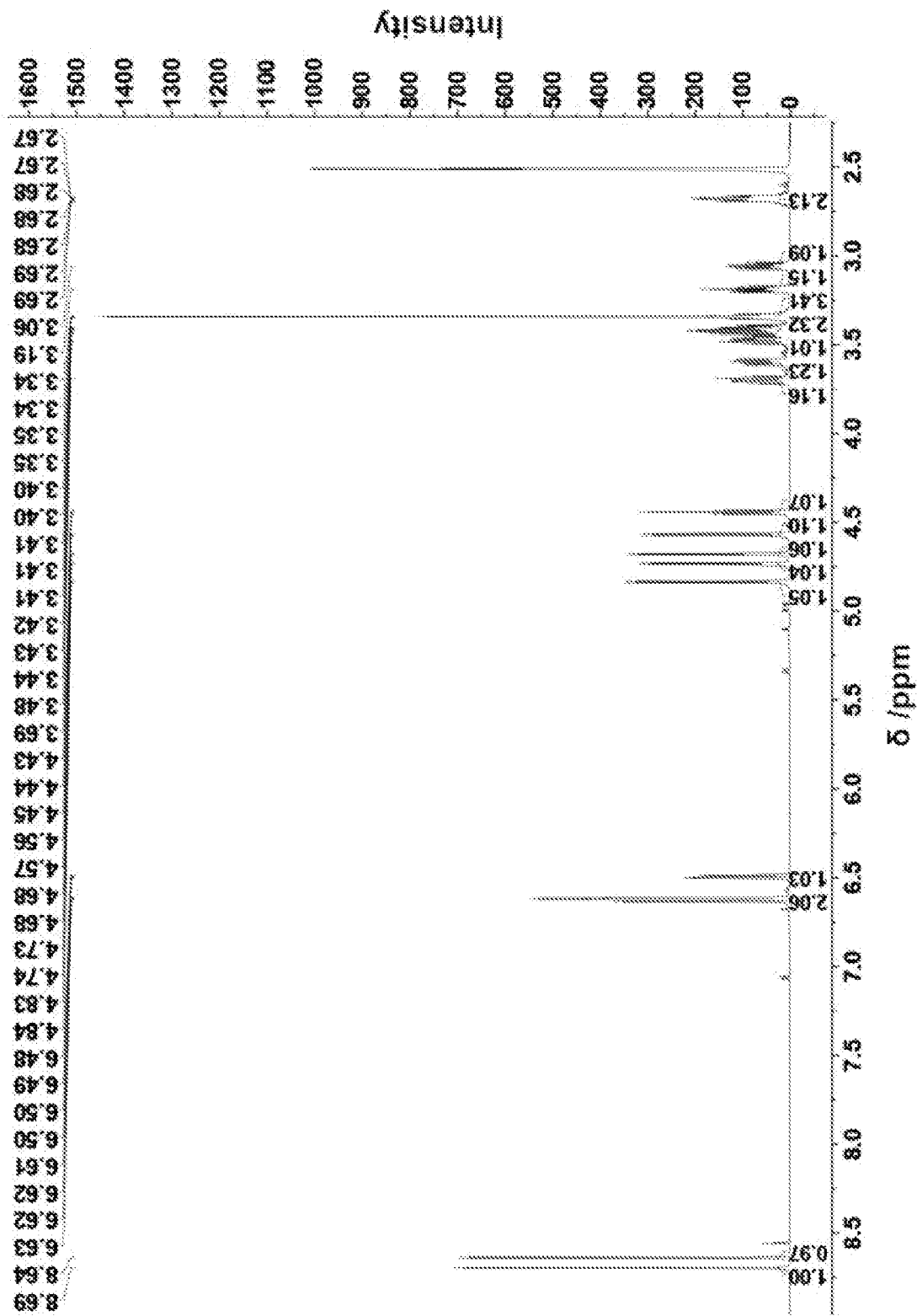


图 4

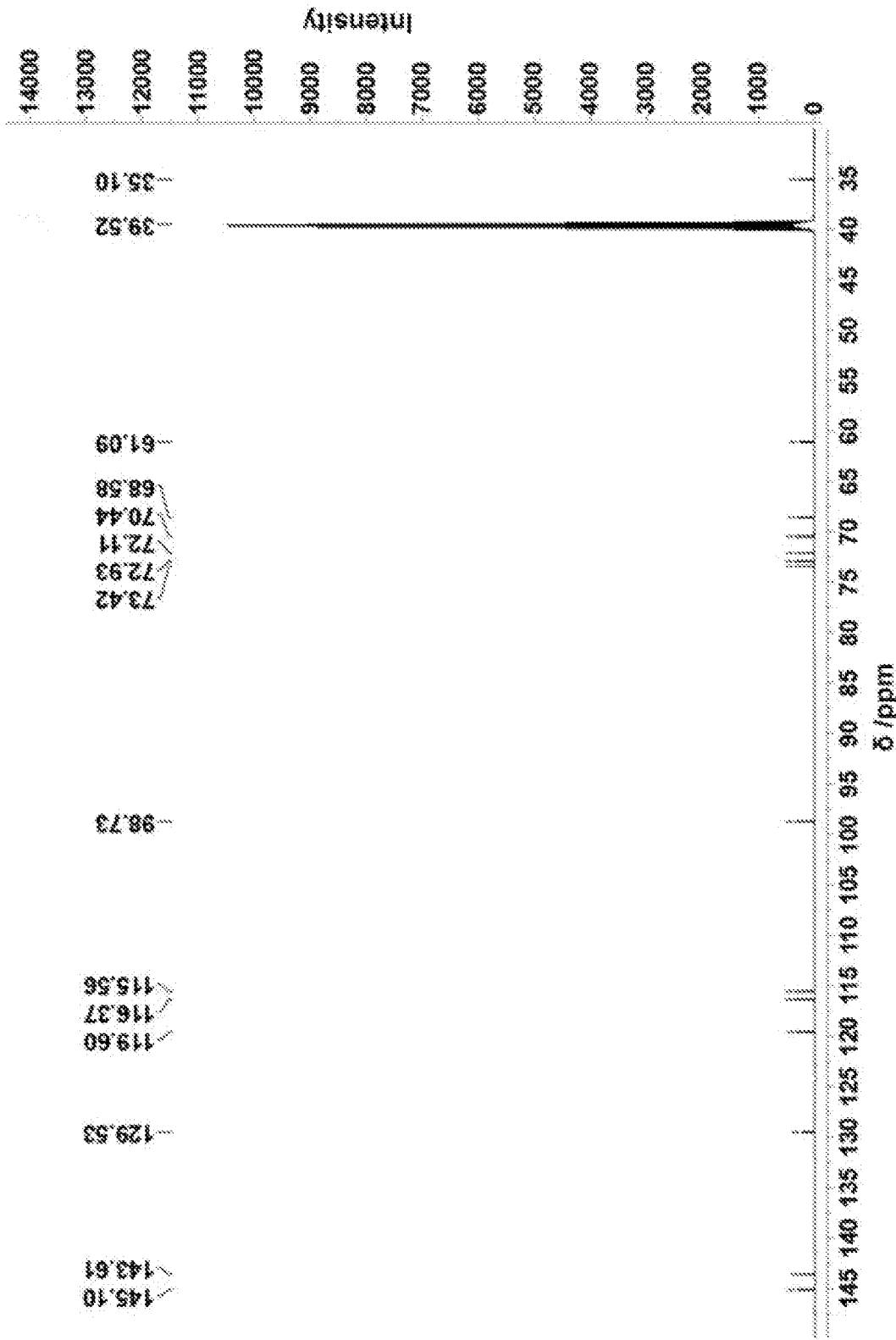


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/095989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H15/18(2006.01)i; C12P19/44(2006.01)i; A61K31/7032(2006.01)i; A61P25/28(2006.01)i; A61P25/16(2006.01)i;
A61P17/18(2006.01)i; A61P39/06(2006.01)i; A61K8/60(2006.01)i; A61Q19/02(2006.01)i; A23L33/125(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07H C12P A61K A61P A61Q A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; ENTXTC; ENTXT; STN; Web of Science; DWPI; CNKI: 红景天苷, 红景天甙, 羟基苯基, 羟基苯乙基, 葡萄糖苷, 葡萄糖甙, α -红景天苷, α -红景天甙, α -红景天甙, α -红景天苷, 酪醇, 羟基酪醇, 自由基, DPPH, 美白, 学习记忆, 神经保护, 阿尔茨海默, 老年痴呆, 帕金森, 酪氨酸酶, 抑制剂, salidroside, hydroxyphenyl, glycoside, tyrosol, hydroxytyrosol, neuroprotective, alzheimer, parkinson, tyrosinase, 结构式检索, structural formula search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 118027118 A (RONGCHENG HUIHAI CHUANGDA BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 14 May 2024 (2024-05-14) claims 1-10	1-10
PX	CN 116396342 A (RONGCHENG HUIHAI CHUANGDA BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 07 July 2023 (2023-07-07) claims 1-6	1-3, 5-7, 9
X	Trincone, A. et al. "Enzymatic Routes for the Production of Mono- and Di-glucosylated Derivatives of Hydroxytyrosol" <i>Bioresource Technology</i> , Vol. vol. 115, 30 October 2011 (2011-10-30), ISSN: 0960-8524, pages 79-83, and supporting information	1-3, 5-7, 9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 August 2024

Date of mailing of the international search report

27 August 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/095989

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Trincone, A. et al. "Enzymatic Routes for the Production of Mono- and Di-glucosylated Derivatives of Hydroxytyrosol" <i>Bioresource Technology</i> , Vol. vol. 115, 30 October 2011 (2011-10-30), ISSN: 0960-8524, pages 79-83, and supporting information	9-10
Y	CN 101464392 A (SUZHOU ANJ BIOTECH CO., LTD.) 24 June 2009 (2009-06-24) claims 1-6	10
Y	Yang, Y.H. et al. "Functional Characterization of Tyrosine Decarboxylase Genes that Contribute to Acteoside Biosynthesis in <i>Rehmannia glutinosa</i> " <i>Planta</i> , Vol. vol. 255, 11 February 2022 (2022-02-11), ISSN: 0032-0935, p. 64	9-10
A	Liu, Y.G. et al. "Synthetic Phenylethanoid Glycoside Derivatives as Potent Neuroprotective Agents" <i>European Journal of Medicinal Chemistry</i> , Vol. vol. 95, 18 March 2015 (2015-03-18), ISSN: 0223-5234, pages 313-323	1-10
A	Yang, Z.L. et al. "Synthesis and Identification of a Novel Derivative of Salidroside as a Selective, Competitive Inhibitor of Monoamine Oxidase B with Enhanced Neuroprotective Properties" <i>European Journal of Medicinal Chemistry</i> , Vol. vol. 209, 15 October 2020 (2020-10-15), ISSN: 0223-5234, page 112935	1-10
A	CN 115819479 A (SHANDONG HENGLU BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 21 March 2023 (2023-03-21) claims 1-10, and description, pages 1-13	1-3, 5-7
A	WO 2023083226 A1 (SHANDONG HENGLU BIOTECH. CO., LTD.) 19 May 2023 (2023-05-19) claims 1-9, and description, pages 1-13	1-3, 5-7
A	CN 109223734 A (SHANDONG ACADEMY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES) 18 January 2019 (2019-01-18) description, pages 1-12	1-10
A	CN 114317480 A (HUBEI CARBON ELEMENT HERBAL BIOTECHNOLOGY LIMITED COMPANY) 12 April 2022 (2022-04-12) description, pages 1-6	1-10
A	Manuel, N.D. et al. "Enzymatic Synthesis of a Novel Neuroprotective Hydroxytyrosyl Glycoside" <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , Vol. 65, No. (48), 09 November 2017 (2017-11-09), ISSN: 0021-8561, pages 10526-10533	1-10
A	Wang, S.H. et al. "Protective Effects of Salidroside in the MPTP/MPP+-Induced Model of Parkinson's Disease through ROS-NO-Related Mitochondrion Pathway" <i>Molecular Neurobiology</i> , Vol. vol. 51, 07 June 2014 (2014-06-07), ISSN: 0893-7648, pages 718-728	1-10
A	徐玉莲 等 (XU, Yulian et al.). "对羟基苯乙基- α -D-葡萄糖甙对小鼠天然杀伤细胞的体外影响 (Effect of p-hydroxyphenethyl- α -D-glucosides on natural killer cell in mice in vitro)" <i>中国药理学与毒理学杂志 (Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology)</i> , Vol. 12, No. (3), 31 August 1998 (1998-08-31), ISSN: 1000-3002, pp. 207-209	1-10

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	贾倩 等 (JIA, Qian et al.). "阿尔茨海默病氧化应激机制及抗氧化治疗进展 (Non-official translation: Oxidative Stress Mechanism of Alzheimer's Disease and Progress in Antioxidant Therapy)" 临床荟萃 (Clinical Focus), Vol. 30, No. (4), 05 April 2015 (2015-04-05), ISSN: 1004-583X, pages 446-449	1-10
A	刘芳 等 (LIU, Fang et al.). "阿尔茨海默病中的氧化应激及抗氧化治疗 (The Oxidative Stress and Antioxidative Therapy In Alzheimer's disease)" 暨南大学学报(自然科学与医学版) (Journal of Jinan University (Natural Science and Medical Edition)), Vol. 36, No. (5), 31 October 2015 (2015-10-31), ISSN: 1000-9965, pages 406-409	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/095989

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **6**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 relates to the use of the composition of claim 5 in scavenging free radicals, which falls within methods for treatment of the human or animal body by therapy, and falls within subject matter for which no search is required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1(iv). The search is carried out on the basis that the use is reasonably expected to be the subject matter of a pharmaceutical use claim, i.e. "the use of the composition of claim 5 in the preparation of a product for scavenging free radicals".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/095989

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	118027118	A	14 May 2024	None			
CN	116396342	A	07 July 2023	None			
CN	101464392	A	24 June 2009	None			
CN	115819479	A	21 March 2023	None			
WO	2023083226	A1	19 May 2023	EP	4349843	A1	10 April 2024
				EP	4349843	A4	17 April 2024
CN	109223734	A	18 January 2019	WO	2020077915	A1	23 April 2020
				JP	2022514168	A	10 February 2022
				JP	7352623	B2	28 September 2023
CN	114317480	A	12 April 2022	None			

A. 主题的分类

C07H15/18(2006.01)i; C12P19/44(2006.01)i; A61K31/7032(2006.01)i; A61P25/28(2006.01)i; A61P25/16(2006.01)i; A61P17/18(2006.01)i; A61P39/06(2006.01)i; A61K8/60(2006.01)i; A61Q19/02(2006.01)i; A23L33/125(2016.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07H C12P A61K A61P A61Q A23L

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;CNTXT;ENTXTC;ENTXT;STN;Web of Science;DWPI;CNKI: 红景天苷, 红景天甙, 羟基苯基, 羟基苯乙基, 葡萄糖苷, 葡萄糖甙, α -红景天苷, α -红景天甙, α -红景天甙, α -红景天苷, 酪醇, 羟基酪醇, 自由基, DPPH, 美白, 学习记忆, 神经保护, 阿尔茨海默, 老年痴呆, 帕金森, 酪氨酸酶, 抑制剂, salidroside, hydroxyphenyl, glycoside, tyrosol, hydroxytyrosol, neuroprotective, alzheimer, parkinson, tyrosinase, 结构式检索

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 118027118 A (荣成市慧海创达生物科技有限公司) 2024年5月14日 (2024 - 05 - 14) 权利要求第1-10项	1-10
PX	CN 116396342 A (荣成市慧海创达生物科技有限公司) 2023年7月7日 (2023 - 07 - 07) 权利要求第1-6项	1-3、5-7、9
X	Trincone, A. et al. "Enzymatic routes for the production of mono- and di-glucosylated derivatives of hydroxytyrosol" 《Bioresource Technology》, 第115卷, 2011年10月30日 (2011 - 10 - 30), ISSN: 0960-8524, 第79-83页以及supporting information	1-3、5-7、9
Y	Trincone, A. et al. "Enzymatic routes for the production of mono- and di-glucosylated derivatives of hydroxytyrosol" 《Bioresource Technology》, 第115卷, 2011年10月30日 (2011 - 10 - 30), ISSN: 0960-8524, 第79-83页以及supporting information	9-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年8月7日

国际检索报告邮寄日期

2024年8月27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

吴慧

电话号码 (+86) 027-59371362

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 101464392 A (苏州艾杰生物科技有限公司) 2009年6月24日 (2009 - 06 - 24) 权利要求第1-6项	10
Y	Yang, Y.H. et al. "Functional characterization of tyrosine decarboxylase genes that contribute to acteoside biosynthesis in Rehmannia glutinosa" 《Planta》, 第255卷, 2022年2月11日 (2022 - 02 - 11), ISSN: 0032-0935, 第64页	9-10
A	Liu, Y.G. et al. "Synthetic phenylethanoid glycoside derivatives as potent neuroprotective agents" 《European Journal of Medicinal Chemistry》, 第95卷, 2015年3月18日 (2015 - 03 - 18), ISSN: 0223-5234, 第313-323页	1-10
A	Yang, Z.L. et al. "Synthesis and identification of a novel derivative of salidroside as a selective, competitive inhibitor of monoamine oxidase B with enhanced neuroprotective properties" 《European Journal of Medicinal Chemistry》, 第209卷, 2020年10月15日 (2020 - 10 - 15), ISSN: 0223-5234, 第112935页	1-10
A	CN 115819479 A (山东恒鲁生物科技有限公司) 2023年3月21日 (2023 - 03 - 21) 权利要求第1-10项, 说明书第1-13页	1-3、5-7
A	WO 2023083226 A1 (SHANDONG HENGLU BIOTECH CO LTD) 2023年5月19日 (2023 - 05 - 19) 权利要求第1-9项, 说明书第1-13页	1-3、5-7
A	CN 109223734 A (山东省药科学院) 2019年1月18日 (2019 - 01 - 18) 说明书第1-12页	1-10
A	CN 114317480 A (湖北碳元本草生物科技有限公司) 2022年4月12日 (2022 - 04 - 12) 说明书第1-6页	1-10
A	Manuel, N.D. et al. "Enzymatic Synthesis of a Novel Neuroprotective Hydroxytyrosyl Glyco- side" 《J. Agric. Food Chem.》, 第65卷, 第48期, 2017年11月9日 (2017 - 11 - 09), ISSN: 0021-8561, 第10526-10533页	1-10
A	Wang, S.H. et al. "Protective Effects of Salidroside in the MPTP/MPP+-Induced Model of Parkinson's Disease through ROS - NO-Related Mitochondrion Pathway" 《Mol Neurobiol》, 第51卷, 2014年6月7日 (2014 - 06 - 07), ISSN: 0893-7648, 第718-728页	1-10
A	徐玉莲 等. "对羟基苯乙基- α -D-葡萄糖甙对小鼠天然杀伤细胞的体外影响" 《中国药理学与毒理学杂志》, 第12卷, 第3期, 1998年8月31日 (1998 - 08 - 31), ISSN: 1000-3002, 第207-209页	1-10
A	贾倩 等. "阿尔茨海默病氧化应激机制及抗氧化治疗进展" 《临床荟萃》, 第30卷, 第4期, 2015年4月5日 (2015 - 04 - 05), ISSN: 1004-583X, 第446-449页	1-10
A	刘芳 等. "阿尔茨海默病中的氧化应激及抗氧化治疗" 《暨南大学学报(自然科学与医学版)》, 第36卷, 第5期, 2015年10月31日 (2015 - 10 - 31), ISSN: 1000-9965, 第406-409页	1-10

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.

☒

权利要求： 6
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求6涉及将权利要求5的组合物在清除自由基方面的应用，其属于对人体或动物体进行治疗的处置的方法，属于细则39.1(iv)定义的不要求国际检索单位检索的主题。检索是基于将该应用合理预期为制药用途权利要求的主题进行的，即“如权利要求5所述的组合物在制备清除自由基的产品的用途”。
2.

☐

权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.

☐

权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/095989

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	118027118	A	2024年5月14日	无			
CN	116396342	A	2023年7月7日	无			
CN	101464392	A	2009年6月24日	无			
CN	115819479	A	2023年3月21日	无			
WO	2023083226	A1	2023年5月19日	EP	4349843	A1	2024年4月10日
				EP	4349843	A4	2024年4月17日
CN	109223734	A	2019年1月18日	WO	2020077915	A1	2020年4月23日
				JP	2022514168	A	2022年2月10日
				JP	7352623	B2	2023年9月28日
CN	114317480	A	2022年4月12日	无			