



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101200752 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200610128390.6

(22) 申请日 2006.12.15

(73) 专利权人 河南农业大学

地址 450002 河南省郑州市文化路 95 号

(72) 发明人 麻兵继 刘吉开

(74) 专利代理机构 郑州中原专利事务所有限公

司 41109

代理人 王聚才

(51) Int. Cl.

C12P 33/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

C07J 9/00(2006.01)

C12R 1/645(2006.01)

(56) 对比文件

US 20040086580 A1, 2004.05.06, 全文.

US 3442916, 1969.05.06, 全文.

陈志辉等. 两株多孔菌属担子菌菌丝

体中的三萜成分. 热带亚热带植物学报 13

5. 2005, 13(5), 399-402.

J. T. Pinhey. Extraction of Fungi. I. The
Constituent of Trametes. LilacinoGilva.

Aust. J. Chem 23. 1970, 232141-2146.

刘吉开等. 高等真菌次生代谢产物及其生物
活性. 中草药 34 1. 2003, 34(1), 84-86.

刘吉开. 一些引人注目的药用天然产物. 化
学通报 3. 1996, (3), 15-19.

审查员 马驰

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

利用长毛囊孔菌的发酵液进行分离制备齿孔
酸化合物的方法

(57) 摘要

利用长毛囊孔菌的发酵液进行分离制备齿孔
酸化合物的方法, 采用平皿转摇瓶液体培养的方法, 首先用葡萄糖, 去皮土豆, MgSO₄, KH₂PO₄, VB₁
加水混合搅拌制成培养基; 然后培养发酵得发酵
液, 萃取发酵液得到浸膏, 烘干菌丝体以氯仿-甲
醇提取得到浸膏; 合并两部分浸膏, 上柱层析分
离, 以氯仿-甲醇系统梯度洗脱; 在氯仿-甲醇洗
脱部分经反复柱层析得到含化合物齿孔酸的一组
混合物; 该混合物采用石油醚-丙酮洗脱分离, 得
到化合物齿孔酸纯品. 本发明可以为将齿孔酸开
发成治疗人类白血病药物的原料药解决齿孔酸的
原料来源问题, 具有培养条件温和、培养基配制简
单易行、发酵时间短、产量大、易于大规模生产等
优点.

CN 101200752 B

1. 一种利用长毛囊孔菌的发酵液进行分离制备齿孔酸化合物的方法,其特征是按下述具体步骤操作制成:采用平皿转摇瓶液体培养的方法,首先用葡萄糖 15-25g,去皮土豆 180-250g, $MgSO_4$ 1-2g, KH_2PO_4 2.5-3.5g, VB_1 8-12mg,加水混合搅拌至 1000ml 制成培养基;然后在温度:20-32℃,转速:150-200r/min 条件下于暗中培养发酵 12-20 天后共得发酵液 8-11 升,分为发酵液和菌丝体两个部分;发酵液以乙酸乙酯萃取两遍,得到 1.8-2.4 克浸膏;菌丝体湿重 400-450 克,烘干后重 70-85 克;烘干后的菌丝体以体积比为 30-70 : 70-30 的氯仿-甲醇提取两次,共得到 5.5-6.5 克的浸膏;经 TLC 检测后合并两部分浸膏,上硅胶柱分离,以体积比为 100-80 : 0-20 的氯仿-甲醇系统梯度洗脱,每 100ml 为一个流份;在以体积比为 99-90 : 1-10 的氯仿-甲醇洗脱部分经反复柱层析得到含化合物齿孔酸的一组混合物;采用体积比为 75-65 : 25-35 的石油醚-丙酮洗脱分离,得到化合物齿孔酸纯品。

利用长毛囊孔菌的发酵液进行分离制备齿孔酸化合物的方法

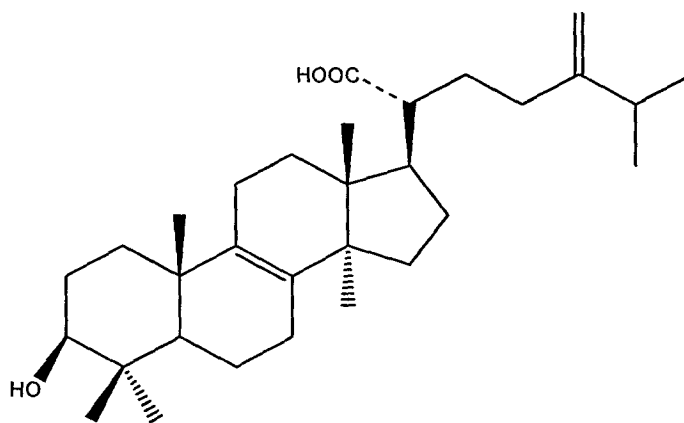
技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用长毛囊孔菌的发酵液进行分离制备齿孔酸化合物的方法。

背景技术

[0002] 根据文献 L. Francisco, Q. Jose, R. Augusto, et al., Lanostanoid triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and apoptosis induction on HL-60 human myeloid leukemia cells. *J. Nat. Prod.*, 2004, 67(12), 2008. 记载, 化合物齿孔酸有诱导人 HL-60 骨髓白血病细胞凋亡的作用, 其 $IC_{50} = 23-27 \mu M$, 3β -羟基乙酰化齿孔酸表现出最强的诱导人 HL-60 骨髓白血病细胞凋亡的作用 ($IC_{50} = 13-15 \mu M$)。其化学结构如下:

[0003]



[0004] 鉴于该化合物及其乙酰化物在诱导人 HL-60 骨髓白血病细胞凋亡方面表现出的很好活性, 将齿孔酸开发成治疗人类白血病药物的原料药的工作有进一步深入研究的价值。

[0005] 长毛囊孔菌 (*Trametes versatilis*. Berk) 为多孔菌科 (Polyporaceae) 真菌, 子实体一般中等大, 革质, $3-7\text{cm} \times 4-10\text{cm}$, 厚 $2-3\text{mm}$, 表面被有长毛, 灰色。菌肉近白色, 厚 $2-3\text{mm}$ 。菌管长 7mm , 壁薄, 管口直径 $0.5-1.5\text{mm}$, 多角, 长形, 灰色。生于针叶或阔叶林腐木上, 主要分布在河北、安徽、江苏、江西、海南、广东、云南等地。迄今, 长毛囊孔菌子实体及发酵液化学成分皆未见报道。我们在研究长毛囊孔菌过程中发现该菌是一个很好的产生齿孔酸的菌种, 我们利用常规分离手段对长毛囊孔菌的发酵液进行了分离鉴定, 研究结果表明齿孔酸是主要成分, 主要来自菌丝体 (其含量约占菌丝体干重的 1%)。研究结果表明该菌种产菌丝多 (每升发酵液可产干燥的菌丝体 8g), 发酵时间短 (14天)。因此继续开展培养基配方的优化工作有很高的研究价值和应用价值。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种利用长毛囊孔菌的发酵液进行分离制备齿孔酸化合物的方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:一种利用长毛囊孔菌的发酵液进行分离制备齿孔酸化合物的方法,按下述步骤操作制成:采用平皿转摇瓶液体培养的方法,首先用葡萄糖,去皮土豆, $MgSO_4$, KH_2PO_4 , VB_1 加水混合搅拌制成培养基;然后于暗中培养发酵得发酵液,分为发酵液和菌丝体两个部分;萃取发酵液得到浸膏;烘干菌丝体以氯仿-甲醇提取得到浸膏;经 TLC 检测后合并两部分浸膏,上柱层析分离,以氯仿-甲醇系统梯度洗脱;在氯仿-甲醇洗脱部分经反复柱层析得到含化合物齿孔酸的一组混合物;该混合物采用石油醚-丙酮洗脱分离,得到化合物齿孔酸纯品。

[0008] 本发明方法可以按下述具体步骤操作制成:采用平皿转摇瓶液体培养的方法,首先用葡萄糖 15-25g,去皮土豆 180-250g, $MgSO_4$ 1-2g, KH_2PO_4 2.5-3.5g, VB_1 8-12mg,加水混合搅拌至 1000ml 制成培养基;然后在温度:20-32℃,转速:150-200r/min 条件下于暗中培养发酵 12-20 天后共得发酵液 8-11 升,分为发酵液和菌丝体两个部分;发酵液以乙酸乙酯萃取两遍,得到 1.8-2.4 克浸膏;菌丝体湿重 400-450 克,烘干后重 70-85 克;烘干后的菌丝体以体积比为 30-70 : 70-30 的氯仿-甲醇提取两次,共得到 5.5-6.5 克的浸膏;经 TLC 检测后合并两部分浸膏,上硅胶柱分离,以体积比为 100-80 : 0-20 的氯仿-甲醇系统梯度洗脱,每 100ml 为一个流份;在以体积比为 99-90 : 1-10 的氯仿-甲醇洗脱部分经反复柱层析得到含化合物齿孔酸的一组混合物;该混合物采用体积比为 75-65 : 25-35 的石油醚-丙酮洗脱分离,得到化合物齿孔酸纯品。

[0009] 采用本发明所述的技术方案可以为将齿孔酸开发成治疗人类白血病药物的原料药解决齿孔酸的原料来源问题,该技术具有培养条件温和、培养基配制简单易行、发酵时间短、产量大、易于大规模生产等优点。

具体实施方式

[0010] 实例 1

[0011] 采用平皿转摇瓶液体培养的方法,首先用葡萄糖 20g,去皮土豆 200g, $MgSO_4$ 1.5g, KH_2PO_4 3g, VB_1 10mg,加水混合搅拌至 1000ml 制成培养基;然后在温度:25℃,转速:170r/min 条件下于暗中培养发酵 15 天后共得发酵液 10 升,分为发酵液和菌丝体两个部分;发酵液以乙酸乙酯萃取两遍,得到 2 克浸膏;菌丝体湿重 420 克,烘干后重 80 克;干燥的菌丝体以氯仿-甲醇(体积比 40 : 60)提取两次,共得到 6 克的浸膏;经 TLC 检测后合并两部分浸膏,上硅胶柱分离,以体积比为 100-80 : 0-20 的氯仿-甲醇系统梯度洗脱,每 100ml 为一个流份;在氯仿-甲醇(体积比 95 : 5)洗脱部分经反复柱层析得到含化合物齿孔酸的一组混合物;该混合物采用石油醚-丙酮(体积比 70 : 30)洗脱分离,得到化合物齿孔酸纯品。

[0012] 实例 2

[0013] 采用平皿转摇瓶液体培养的方法,首先用葡萄糖 15g,去皮土豆 180g, $MgSO_4$ 1.0g, KH_2PO_4 2.5g, VB_1 8mg,加水混合搅拌至 1000ml 制成培养基;然后在温度:20℃,转速:150r/min 条件下于暗中培养发酵 12 天后共得发酵液约 10 升,分为发酵液和菌丝体两个部分;发酵液以乙酸乙酯萃取两遍,得到 1.8 克浸膏;菌丝体湿重 400 克,烘干后重 75 克;干燥的菌丝体以氯仿-甲醇(体积比 70 : 30)提取两次,共得到 5.5 克的浸膏;经 TLC 检测后合并两部分浸膏,上硅胶柱分离,以体积比为 100-80 : 0-20 的氯仿-甲醇系统梯度洗脱,每 100ml 为一个流份;在氯仿-甲醇(体积比 90 : 10)洗脱部分经反复柱层析得到含化合物齿孔酸

的一组混合物；该混合物采用石油醚 - 丙酮（体积比 75 : 25）洗脱分离，得到化合物齿孔酸纯品。

[0014] 实例 3

[0015] 采用平皿转摇瓶液体培养的方法，首先用葡萄糖 25g，去皮土豆 220g， $MgSO_4 \cdot 2.0g$ ， $KH_2PO_4 \cdot 3.2g$ ， $VB_1 \cdot 12mg$ ，加水混合搅拌至 1000ml 制成培养基；然后在温度：32℃，转速：200r/min 条件下于暗中培养发酵 18 天后共得发酵液 12 升，分为发酵液和菌丝体两个部分；发酵液以乙酸乙酯萃取两遍，得到 2.5 克浸膏；菌丝体湿重 450 克，烘干后重 82 克；干燥的菌丝体以氯仿 - 甲醇（体积比 65 : 35）提取两次，共得到 6.5 克的浸膏；经 TLC 检测后合并两部分浸膏，上硅胶柱分离，以体积比为 100-80 : 0-20 的氯仿 - 甲醇系统梯度洗脱，每 100ml 为一个流份；在氯仿 - 甲醇（体积比 92 : 8）洗脱部分经反复柱层析得到含化合物齿孔酸的一组混合物；该混合物采用石油醚 - 丙酮（体积比 65 : 35）洗脱分离，得到化合物齿孔酸纯品。

[0016] 分别对实例 1、2、3 中所得化合物齿孔酸纯品进行理化及波谱数据分析，结果如下：

[0017] 齿孔酸， $C_{31}H_{50}O_3$ ，无色针晶，m. p. :274-275℃， $[\alpha]_D^{26} = +39^\circ$ （pyridine；c = 1.0）。EI-MS m/z（%）：470（14， $[M]^+$ ），455（30），437（100），419（48），55（88）。HR-ESI-MS：470.3712（计算值为 470.3759）。 ^1H-NMR （ C_5D_5N ，400MHz）： δ 1.03（3H，d，J = 7.0Hz，H-26），1.04（3H，d，J = 7.0Hz，H-27），1.04（6H，br. s H-18，H-26），1.08（3H，s，H-19），1.10（3H，s，H-30），1.25（3H，s，H-28），2.29（1H，m，H-25），2.66（1H，t，J = 11.3Hz，H-20），3.45（1H，m，H-3），4.90（1H，s，H-31a），4.94（1H，s，H-31b）。 $^{13}C-NMR$ （ C_5D_5N ，100MHz）： δ 36.1（t，C-1），28.7（t，C-2），78.0（d，C-3），39.5（s，C-4），50.9（d，C-5），18.7（t，C-6），28.7（t，C-7），135.2（s，C-8），134.3（s，C-9），37.4（s，C-10），21.3（t，C-11），29.4（t，C-12），44.9（s，C-13），49.9（s，C-14），30.9（t，C-15），27.5（t，C-16），47.7（d，C-17），16.3（q，C-18），19.4（q，C-19），49.2（d，C-20），178.6（s，C-21），31.8（t，C-22），32.8（t，C-23），155.9（s，C-24），34.2（d，C-25），22.0（q，C-26），21.9（q，C-27），28.6（q，C-28），16.4（q，C-29），24.5（q，C-30），107.0（t，C-31）。以上数据与文献 T. Tai, A. Akahori, T. Shingu, Triterpenes of *Poria cocos*. *Phytochemistry*, 1993, 32, 1239. 中记载值一致。