

發明專利說明書

※申請案號：090129888

※IPC分類：

一、發明名稱：

以樟芝菌絲體製備環二肽之方法及含彼之組成物

二、中文發明摘要：

本發明係有關一種環二肽之製備方法，且特別者，以僅生長於台灣特有物種牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirae*) 樹心內的菇類-樟芝 (*Antrodia camphorata* 或 *Antridia cinnamomea*)-之菌絲體製備環二肽之方法，其包括將經冷凍乾燥之樟芝菌絲體用有機溶劑萃取後，由矽膠層析術收集其區分物，再由氣相層析及質譜分析鑑定其化合物。本發明亦有關於一種按上述製備環二肽之方法製備成的含環二肽物質及醫葯或食品上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第1A圖

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

1 . . . 波峰

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 本發明係關於一種環二肽之製備方法，且特別者，以僅生長於台灣特有物種牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirae*) 樹心內的菇類-樟芝 (*Antrodia camphorata* 或 *Antridia cinnamomea*)-之菌絲體製備環二肽之方法。本發明亦有關於一種按上述製備環二肽之方法製備成的含環二肽物質。本發明更有關於一種組成物，其包括按上述製備環二肽之方法製備成的含環二肽物質及醫葯上或食品上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑。

【先前技術】

[0002] 環二肽 [cyclic dipeptide] 為一群由兩個胺基酸經環化脫水形成之化合物；某些環二肽經報導具有生物活性，包括抗病毒、抗腫瘤及具抗生素之活性等。環二肽之製造方法，目前可經由化學合成法或是經由培養真菌過程之中間產物來收集純化之。

[0003] 樟芝又名牛樟菇、樟菰、樟窟內菰，台灣有稱陰陽對口菇。樟芝子實體屬多年生，具有強烈沖鼻的樟樹香氣，此與一般靈芝類有很大的差異，其外型呈板狀或鐘狀。板狀型態者，面為橘紅(黃)色，整面全有菌孔，板底層有淺黃白色的木栓質，藉此木栓質附著在牛樟樹中空材內壁上生長。鐘狀型態，子實層(鐘面)亦呈橘(黃)色，充滿菌孔(4~5個菌孔/毫米)，內有孢子味極苦，新鮮時為橘紅色，之後會成為橘褐色或褐色，鐘體則呈暗綠褐色的皮殼。以顯微鏡觀察其擔孢子，其型態為平滑無色之透明微彎柱形。

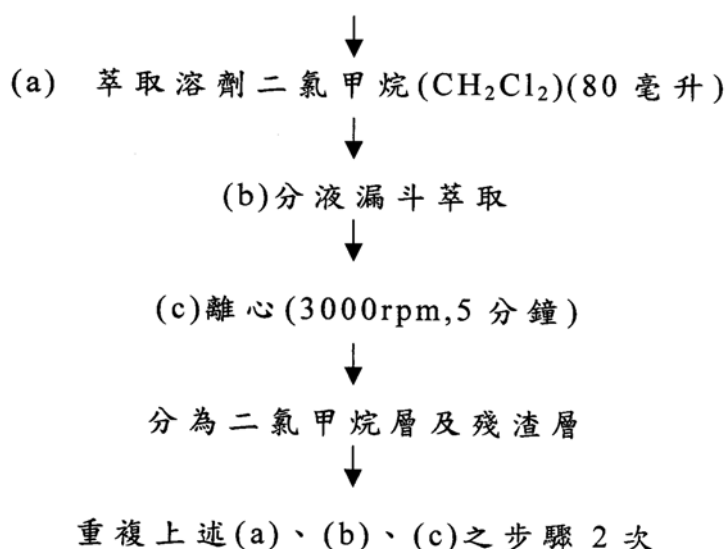
[0004] 樟芝目前已經可以用發酵法大量生產其菌絲體。在樟芝菌絲體之發酵過程中發現亦有此類環二肽類物質產生。根據此項發現，乃提出一種以樟芝菌絲體製備環二肽之方法。

[0005] 綜上所述，本發明提出一種以樟芝菌絲體製備環二肽之方法，其包括將經冷凍乾燥之樟芝菌絲體用有機溶劑萃取後，由矽膠層析術收集其區分物，再由氣相層析及質譜分析鑑定其化合物。

【發明內容】

【實施方式】

- [0006] 於本發明以樟芝菌絲體製備環二肽之方法一具體實例中所用的樟芝菌株為購自新竹食品工業發展研究所菌種中心的 *Antrodia camphorate* CCRC 35398，以馬鈴薯葡萄糖瓊脂 ((potato dextrose agar)(PDA))(購自美國Difco公司)斜面培養基培養及保存。
- [0007] 此菌絲體之大量培養係利用液態深層培養方法連續培養，離心採收並乾燥而得。
- [0008] 將此乾燥菌絲體用溶劑例如水、二氯甲烷、氯仿、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯等予以萃取，視需要在回流條件下進行，並離心收集萃取液。將菌絲體與液體分開之方法可採用習知技術，例如離心，過濾，沉著(settling)，傾析(decantation)，等。於本發明一較佳實施例中，係採用離心法，使用習用的離心機，例如歐式離心脫水機，如可得自瑞典ALFA LAVAL公司之Decater NX418S；以3200rpm(4000xg)離心即分離出菌絲體和澄清液。
- [0009] 將上述諸步驟重複數次後，將合併萃取液濃縮成濃縮物。將此濃縮物以氧化矽管柱層析術分離所欲成分並以質譜分析法(MS)分析其質譜並與質譜庫，例如Wiley Mass SpectralLibrary(Hewlett-Packard)及標準品比對予以鑑定。
- [0010] 本發明也提出一種按上述製備環二肽之方法製備成的含環二肽物質。
- [0011] 本發明更提出一種組成物，其中包括按上述本發明製備環二肽之方法製備成的含環二肽物及醫葯上或食品上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑。該等醫葯上或食品上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑可為習用的醫葯上或食品上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑。
- [0012] 本發明要以下面的實施例予以示範闡明，但本發明不受彼等實施例所限制。
- [0013] 材料與方法
- [0014] 1. 生產菌株
- [0015] 樟芝(*Antrodia camphorate*)CCRC 35398和CCRC25396購自新竹食品工業發展研究所菌種中心，以馬鈴薯葡萄糖瓊脂((potato dextrose agar(PDA))(購自美國Difco公司)斜面培養及保存。
- [0016] 2. 菌絲體之培養
- [0017] 利用液態深層培養方法連續培養七天，溫度盪30°C，接種之菌數為培養基含是之1.0%，培養基之組成如下：每公升去離子水中含有蔗糖：20克；(NH₄)₂SO₄；3克；MgSO₄；3克；KH₂PO₄；3克；檸檬酸：0.5克；酵母萃取物：5克；培養液之pH值調整在5.5。
- [0018] 用二氯甲烷萃取菌絲體成分與其區分係按下面的流程進行：
- [0019] (1) 萃取
- [0020] 冷凍乾燥之樟芝菌絲體 20 克粉末加水 200 毫升



[0021]



合併收集二氯甲烷層溶液



減壓濃縮 (40°C, 50mTorr)



濃縮物

[0022] (2) 區分

[0023] 取濃縮物(0.5克)+氧化矽凝膠(1.0克)*



減壓濃縮機罩旋轉混合



取混合物，置入 Silica gel 管柱
(管內充填 30 克之氧化矽凝膠)*



分別以下述之溶劑各 100 毫升進行區分

[0024]

沖提次序	1	2	3	4	5
正己烷(%)	100	80	60	0	0
乙酸乙酯(%)	0	20	40	50	0
甲醇(%)	0	0	0	50	100
總體積(ml)	100	100	100	100	100

*矽膠(Silica gel 60,0.063~0.200mm,Merck)

矽膠管柱(Silica gel,30g,管徑：40cm×1.5cm)

[0025] 將所分離出的諸區分物以GC/MS進行鑑定分析，其條件如下：

[0026] 機型：HP5890GC及HP5972A MSD

[0027] 管柱：HP-5MS(0.25mm i.d.×30M)

[0028] 分析條件：起始溫度80°C(1min)

[0029] 升溫10°C/min

[0030] 終溫280°C

[0031] 成分之鑑定：比對Wiley Mass Spectra(Hewlett-Packard)之質譜，並與合成之標準品比對，合成方法係參考Ginz和Engelhardt方法(2000)。

[0032] 圖一A係為樟芝菌絲體萃取物之總離子層析圖譜，波峰(peak)1所代表之物質為樟芝菌絲體萃取物之主要成分，其與圖二A之環(脯胺酸-脯胺酸)標準溶液之總離子層析圖譜比對後，可看出波峰1與波峰2具有相同之停留時間，而波峰2則所代表之物質為環(脯胺酸-脯胺酸)，從而判斷樟芝菌絲體萃取物之主要成分為環(脯胺酸-脯胺酸)。

[0033] 圖一B係為樟芝菌絲體萃取物之質譜，與圖二B之環(脯胺酸-脯胺酸)標準溶液之質譜作指紋比對後，可進一步確定該樟芝菌絲體萃取物為環(脯胺酸-脯胺酸)。

[0034] 環二肽之定量分析係按如下所述進行：將GC/MS分析獲得之總離子層析譜(Total ion chromatogram)換算面積，用所得之面積求得環(脯胺酸-脯胺酸)之含量。其產率為相對於菌絲體的0.115%(w/w)。

【圖式簡單說明】

[0037] 圖一A為樟芝菌絲體萃取物之總離子層析譜(以二氯甲烷萃取)；

[0038] 圖一B為樟芝菌絲體萃取物之質譜(以二氯甲烷萃取)；

[0039] 圖二A為環(脯胺酸-脯胺酸)之總離子層析譜；

[0040] 圖二B為環(脯胺酸-脯胺酸)之質譜。

【主要元件符號說明】

[0035] 1 . . . 波峰

[0036] 2 . . . 波峰

七、申請專利範圍：

1. 一種從樟芝(*Antrodia camphorata*)菌絲體製備環二肽之方法，其包括將經冷凍乾燥之樟芝菌絲體用二氯甲烷萃取後，收集二氯甲烷層溶液進行濃縮以製得濃縮物，再將濃縮物用矽膠管柱層析術純化收集；其中該矽膠管柱層析術係將濃縮物與氧化矽凝膠混合置入矽膠管柱內，再依序以a. 100%正己烷、b. 80%正己烷及20%乙酸乙酯、c. 60%正己烷及40%乙酸乙酯、d. 50%乙酸乙酯及50%甲醇沖提區分之，以製得環(脯胺酸-脯胺酸)(cyclo(pro-pro))。

八、圖式：

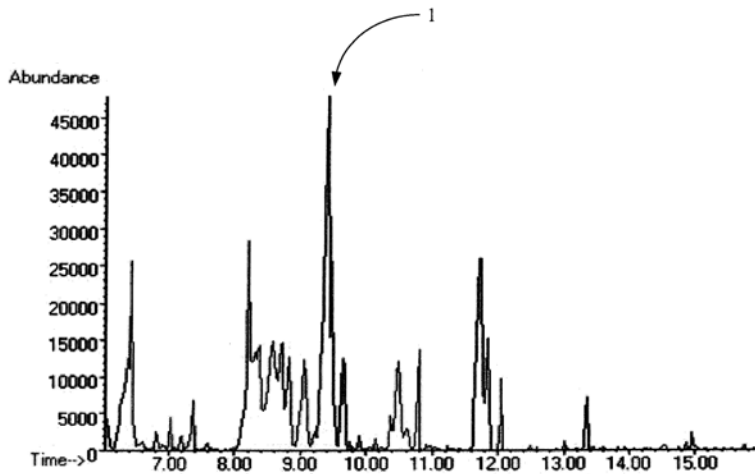


圖 一 A

圖一A

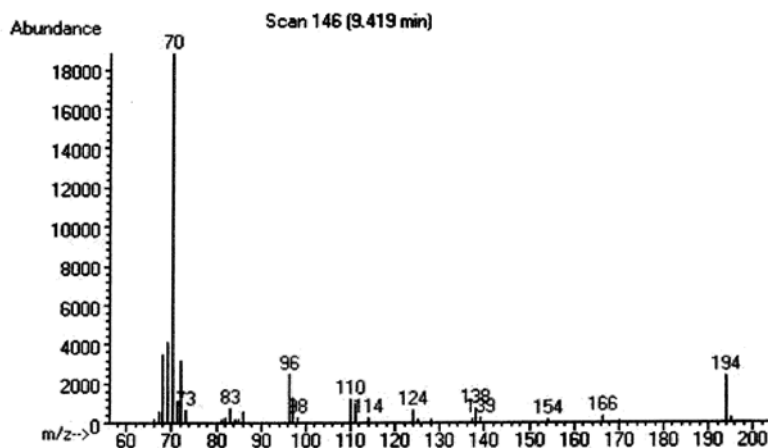


圖 一 B

圖一B

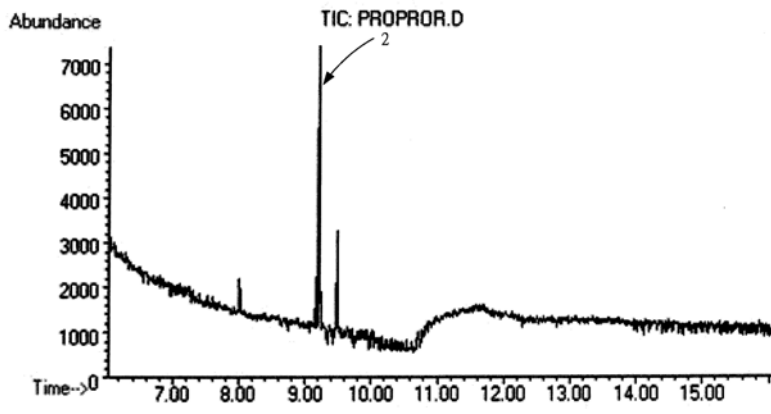


圖 二 A

圖二A

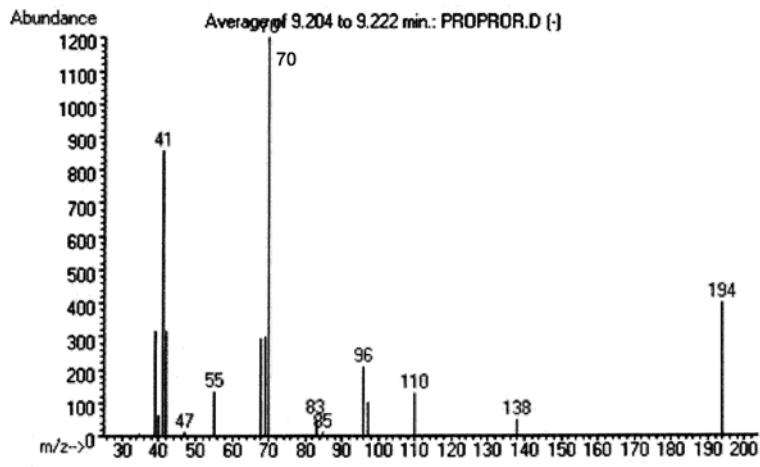


圖 二 B

圖二B