

长柄链格孢对百两金皂苷的生物转化

隋玉辉^{1,2}, 刘岱琳^{1*}, 邱峰², 陈虹¹

(1. 中国人民武装警察部队医学院 生药教研室, 天津 300162; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

朱砂根为紫金牛科紫金牛属植物朱砂根 *Ardisia crenata* Sims 的根。性味苦辛、凉, 具有清热解毒、散瘀止痛的作用。用于治疗心胃气痛、风湿骨痛、跌打损伤等症^[1]。现代药理研究发现朱砂根中的三萜皂苷类化合物具有较强的抗癌活性, 百两金皂苷 A 和 B 是从朱砂根中分离得到的主要抗癌活性化合物^[2], 其化学结构已经通过理化方法结合光谱分

析得到了确认。本实验对百两金皂苷 A 和 B 进行微生物转化研究, 期望能够得到具有很强活性和高选择性的抗癌化合物, 同时为三萜皂苷类化合物微生物转化研究奠定实验基础。

经菌种筛选得到长柄链格孢(3. 2875)对百两金皂苷 A 和 B 的 C-3 位的糖链有选择性的水解作用, 得到极性变小的去糖基转化产物, 见图 1。

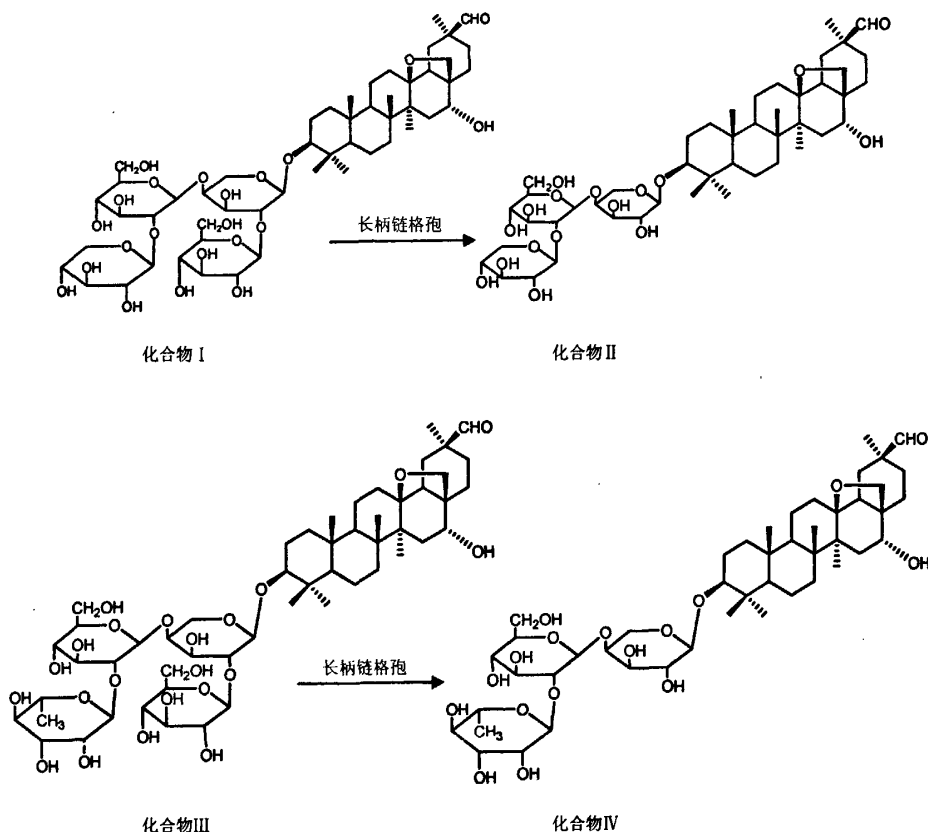


图1 化合物 I 和 II 的生物转化途径

Fig. 1 Biotransformation pathway of compounds I and II

1 实验材料

1.1 实验材料及试剂: 菌种为长柄链格孢 *Alternaria longipes* 3. 287 5(购自中国科学院微生物研究所)。

培养基: A. 斜面固体培养基: 马铃薯汁 250 mL、葡萄糖 5 g、琼脂 7.5 g; B. 发酵培养基: 马铃薯汁 300 mL、葡萄糖 6 g。底物: 化合物 I 和化合物

收稿日期: 2007-09-12

基金项目: 天津市应用基础研究面上项目(YFJMJC08300)

作者简介: 隋玉辉(1980-), 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物的生物转化与分离。

Tel: (022) 60578194 E-mail: sytf99@163.com

* 通讯作者 刘岱琳 Tel: (022) 60578194 E-mail: dailinlch@163.com

Ⅰ由朱砂根中提取分离得到(本实验室自制)。

1.2 实验仪器及试剂:ESI-MS 质谱仪(LC-MSD-Trap-SL, Agilent Technologies);超导核磁共振谱仪(Bruker AV-600),溶剂为氘代吡啶;Waters 600 高效液相色谱仪,色谱柱: C_{18} 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), C_{18} 制备柱(250 mm×10 mm, 5 μ m),检测器:Alltech ELSD;N-1001 型 EYELA 旋转蒸发器(上海爱即仪器有限公司);HZQ-QX 全温振荡器(哈尔滨东联电子技术有限公司);无菌操作台(苏州净化设备厂),LHS-150SC 恒温恒湿箱(上海一恒科技有限公司)。

Sephadex LH-20(北京金欧亚科技发展有限公司);大孔树脂 Diaion HP20(Tokyo, Kyushu);ODS (YMC-Pack Pro.);D101 大孔树脂(天津农药总厂);氯仿、甲醇、乙醇、正丁醇均为天津市百世化工有限公司产品;硫酸(天津市化学试剂六厂);葡萄糖(天津市文达稀贵试剂化工厂),以上试剂均为分析纯。色谱甲醇(天津市康科德科技有限公司);反相板(Merck);薄层色谱硅胶 G(60 型)(中国青岛海洋化工集团公司);琼脂粉(联星生物)。

2 实验方法

2.1 底物的制备:朱砂根根茎,60%乙醇溶液回流提取2次(第一次8倍量,第二次6倍量),每次2 h,合并提取液,减压回收溶剂得乙醇提取浸膏。取浸膏的醇溶水沉部分,进行D101大孔吸附树脂柱(137 cm×11 cm)色谱分离,乙醇-水溶液梯度洗脱,TLC检测,收集富含百两金皂苷的75~105份洗脱液,分别合并,浓缩抽滤,得化合物百两金皂苷A和B。

2.2 菌株的斜面培养:在无菌条件下,将长柄链格孢接种于马铃薯琼脂斜面培养基上,28℃恒温培养箱中培养7 d。

2.3 生物转化培养方法

2.3.1 发酵培养:在无菌操作台上,用接菌环将斜面培养菌株的孢子接种到液体培养基中,恒温摇床28℃,160 r/min 振荡培养48 h。

2.3.2 转化培养:60 mL 液体培养基中加入预处理的底物0.5 mL(甲醇为溶剂,质量浓度100 mg/mL),空白组中加入0.5 mL 甲醇对照,恒温摇床28℃,160 r/min,振荡培养72 h。

2.4 转化产物的萃取分离与纯化

2.4.1 培养液萃取:将培养完全的培养液抽滤,滤液用等量的正丁醇萃取3次,合并正丁醇液,减压浓缩干燥,得转化产物粗品。

2.4.2 转化产物的分离纯化:30%乙醇溶解转化产

物粗品,上大孔树脂 Diaion HP20 开放柱进行分离,依次用30%、50%、70%、95%乙醇溶液进行梯度洗脱,分步收集洗脱液,TLC检测合并相同组分,再将转化产物的组分干法拌样,进行ODS开放柱色谱分离,依次用30%、50%、60%、70%甲醇溶液梯度洗脱,每个梯度洗5个保留体积,依次接流份,TLC检测合并相同组分,最后再利用PHPLC进行纯化得转化产物Ⅲ和Ⅳ。

2.5 分析检测

2.5.1 TLC检测:分别将化合物Ⅰ和Ⅱ对照品、化合物Ⅰ转化产物和化合物Ⅱ转化产物及不加底物的空白对照样品点样于GF₂₅₄硅胶板,氯仿-甲醇-水(70:30:5)展开,挥干后喷10%硫酸溶液,105℃加热显色。

2.5.2 HPLC检测:将转化产物粗品用甲醇溶解后滤过,HPLC分析。流动相条件为甲醇-水(1:1)溶液,检测器为Alltech ELSD。

2.6 底物和转化产物的抗肿瘤活性测试:采用MTT法^[3]。在96孔培养板的每一个孔中加入90 μ L生长良好的NCI-H460(人非小细胞肺癌)肿瘤细胞(约含有 1×10^4 /孔),24 h后加入供试样品,每组平行设4个复孔,同时设阳性对照、阴性对照和空白对照,在37℃、5% CO₂条件下共同培养48 h。然后,每孔加入10 μ L的MTT溶液(5 mg/mL)继续培养4 h。离心弃去培养液,染色的细胞用DMSO(10 μ L/孔)溶解,待结晶完全溶解后,用酶标仪于570 nm处测吸光度A值,计算细胞增殖抑制率[细胞增殖抑制率=($A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}$)/ $A_{\text{空白}} \times 100\%$],并进一步测定了抑制肿瘤细胞生长的IC₅₀值。

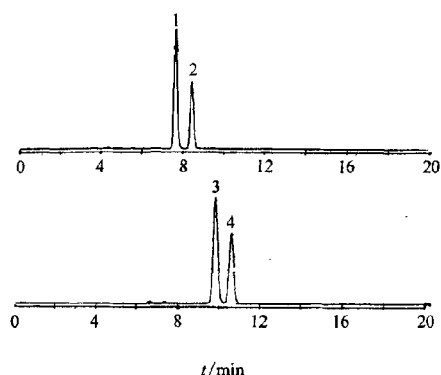
3 结果

3.1 TLC分析结果:底物即化合物Ⅰ和Ⅱ的微生物酶解反应有新的斑点产生,而不加微生物的空白对照组均没有新的斑点,结果显示,两种主要转化产物极性小于底物。说明化合物Ⅰ和Ⅱ在转化过程中发生了变化,有新的化合物产生。

3.2 HPLC分析结果:见图2。主要转化产物的极性比底物小,推测可能是长柄链格孢水解底物的糖基而产生新的化合物。

3.3 转化产物的分离:将转化产物粗品进行Diaion HP20和ODS开放柱分离,分别用不同体积分数乙醇水溶液和甲醇水溶液进行梯度洗脱,再进一步用制备HPLC分离,减压浓缩,真空干燥,得单体化合物Ⅲ和Ⅳ。

3.4 结构鉴定



1-化合物 I (百两金皂苷 A) 2-化合物 II (百两金皂苷 B)

3-化合物 III (百两金皂苷 A 转化产物)

4-化合物 IV (百两金皂苷 B 转化产物)

1-compound I (ardisiacrispin A)

2-compound II (ardisiacrispin B)

3-compound III (products of ardisiacrispin A)

4-compound IV (products of ardisiacrispin B)

图2 化合物 I (A)和 II (B)转化后的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatogram of compounds I (A) and II (B) after biotransformation

化合物 III: 白色粉末, $[\alpha]_D^{25} - 18.4^\circ$ (MeOH, c 0.2)。Libermann-Burchard 反应阳性, 表明该化合物为三萜皂苷类化合物。酸水解薄层色谱检出阿拉伯糖、葡萄糖和木糖。ESI-MS(positive) 给出 m/z : 921 $[M+Na]^+$, 其 ESI-MS² 中给出 m/z : 789 $[M+Na-132]^+$ 和 627 $[M+Na-132-162]^+$; 同样, ESI-MS(negative) 给出 m/z : 879 $[M-H]^-$, 其 ESI-MS² 中给出 m/z : 765 $[M-H-132]^-$ 和 603 $[M-H-132-162]^-$ 。ESI-MS 的结果结合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 确定分子式为 $C_{46}H_{74}O_{17}$, 再将 ESI-MS 提供的信息结合酸水解薄层的结果, 说明结构中存在一个阿拉伯糖、一个葡萄糖和一个木糖。 1H -NMR (300 MHz, in Pyridine- d_5) 中, 高场显示了 6 个角甲基氢信号 [δ 0.85 (3H, s, Me-25), 0.98 (3H, s, Me-24), 0.99 (3H, s, Me-29), 1.27 (3H, s, Me-23), 1.28 (3H, s, Me-26), 1.54 (3H, s, Me-27)], 6 个角甲基氢信号是三萜皂苷类化合物的特征信号; 低场区出现了 3 个糖的端基质子信号 [δ 5.04 (1H, d, $J=7.6$ Hz, Glc-1), 4.89 (1H, d, $J=6.48$ Hz, Xyl-1), 4.65 (1H, d, $J=6.96$ Hz, Ara-1)] 以及 1 个醛氢信号 δ 9.60 (s)。化合物 III 的 ^{13}C -NMR (150 MHz, in Pyridine- d_5) 谱数据见表 1, 其中共显示了 46 条谱线, 低场区有 δ 207.5 的羰基碳信号; 在 δ 100~110 处有 3 个端基碳信号 (δ 105.5, 107.7, 108.1)。以上数据与文献报道^[4]的西克拉明皂苷元 A-3 β -O- β -D-

木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-阿拉伯吡喃糖苷]的核磁数据相同。

表 1 化合物 III 和 IV 的 ^{13}C -NMR 数据

Table 1 ^{13}C -NMR Spectra data of compounds III and IV

碳位	苷元部分		糖部分	
	III	IV	3-O-sugars chain	III IV
1	39.3	39.2	Ara-1	107.7 107.1
2	26.9	26.7	2	73.8 73.8
3	88.8	89.0	3	74.6 72.8
4	39.8	39.7	4	81.4 78.9
5	55.8	55.7	5	66.5 65.3
6	18.0	18.0	Glc-1	105.5 105.2
7	34.4	34.3	2	86.4 78.3
8	42.6	42.6	3	77.7 78.9
9	50.5	50.4	4	71.1 71.7
10	36.9	36.9	5	78.4 78.2
11	19.2	19.2	6	62.4 62.6
12	32.7	32.7	Xyl-1	108.1
13	86.4	86.4	2	76.4
14	44.6	44.6	3	78.0
15	36.8	36.8	4	70.5
16	76.9	76.9	5	67.3
17	44.1	44.1	Rha-1	102.0
18	53.4	53.4	2	72.4
19	33.4	33.4	3	72.1
20	48.3	48.3	4	74.6
21	30.5	30.5	5	70.0
22	32.4	32.4	6	18.7
23	28.1	28.1		
24	16.8	16.7		
25	16.5	16.4		
26	18.6	18.6		
27	19.8	19.8		
28	77.7	77.7		
29	24.1	24.1		
30	207.5	207.5		

化合物 IV: 白色粉末, $[\alpha]_D^{25} - 12.2^\circ$ (MeOH, c 0.2)。Libermann-Burchard 反应阳性, 表明该化合物为三萜皂苷类化合物。酸水解薄层色谱检出阿拉伯糖、葡萄糖和鼠李糖。ESI-MS(positive) 给出 m/z : 935 $[M+Na]^+$, 其 ESI-MS² 给出 m/z : 789 $[M+Na-146]^+$ 和 627 $[M+Na-146-162]^+$; 同样, ESI-MS(negative) 给出 m/z : 911 $[M-H]^-$, 其 ESI-MS² 中给出了 m/z : 765 $[M-H-146]^-$ 和 603 $[M-H-146-162]^-$ 。ESI-MS 的结果结合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 确定分子式为 $C_{47}H_{76}O_{17}$, 再将 ESI-MS 的数据结合酸水解薄层的结果, 说明结构中存在一个阿拉伯糖、一个葡萄糖和一个鼠李糖。 1H -NMR (300 MHz, in Pyridine- d_5) 中, 高场显示了 6 个角甲基氢信号 [δ 0.83 (3H, s, Me-25), 0.94 (3H, s, Me-24), 1.00 (3H, s, Me-29), 1.20 (3H, s, Me-23), 1.28

(3H,s,Me-26),1.54(3H,s,Me-27)]以及鼠李糖6位的甲基信号 $[\delta 1.66(3H,d,J=5.61\text{ Hz,Rham-6})]$,6个角甲基氢信号是三萜皂苷类化合物的特征信号;低场区出现了3个糖的端基质子信号 $[\delta 6.26(1H,s,Rham-1),5.15(1H,d,J=7.1\text{ Hz,Glc-1}),4.74(1H,d,J=6.0\text{ Hz,Ara-1})]$ 以及1个醛氢信号 $[\delta 9.61(s)]$ 。化合物IV的 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz,in Pyridine- d_5)谱中共显示了47条谱线,低场区有 $\delta 207.5$ 的羰基碳信号;在 $\delta 100\sim 110$ 处有3个端基碳信号($\delta 102.0,105.2,107.1$)。将化合物IV的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道^[4]的西克拉明皂苷元A-3 β -O-[α -L-鼠李吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-阿拉伯吡喃糖基]的核磁数据相对照基本一致。

通过结构鉴定确定,两种主要转化产物分别为西克拉明皂苷元A-3 β -O- β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-阿拉伯吡喃糖苷和西克拉明皂苷元A-3 β -O- α -L-鼠李吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-阿拉伯吡喃糖苷。

3.5 活性结果:底物化合物I、II和转化产物化合物III、IV针对肿瘤细胞NCI-H460的 IC_{50} 分别为23.58、12.10、4.51、8.31 $\mu\text{mol/L}$ 。结果显示C-3位末端去糖基后的转化产物对NCI-H460也具有很强的抑制作用,活性稍强于转化前的底物。

4 讨论

本实验首次发现了长柄链格孢(3.2875)对三萜皂苷C-3位糖链末端的葡萄糖有选择性的水解作用,为三萜皂苷去糖基衍生物的制备提供了依据,也为扩宽该菌株的应用范围提供了依据。

通过薄层色谱、液相色谱和结构鉴定结果可看出,微生物长柄链格孢(3.2875)能将化合物I和II C-3位末端的葡萄糖水解掉,转化为剩3个糖链的皂苷,即西克拉明皂苷元A-3 β -O- β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-阿拉伯吡喃糖苷和西克拉明皂苷元A-3 β -O- α -L-鼠李吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-阿拉伯吡喃糖苷。

利用MTT法测定底物和转化产物抑制NCI-H460肿瘤细胞生长的 IC_{50} 值,比较转化产物和底物的抗肿瘤活性,结果显示转化产物对于NCI-H460的生长抑制作用强于底物,转化产物的抗肿瘤活性仍需要大量的试验工作加以确认。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005.
- [2] 边宝林,王素芬,杨健,等. 朱砂根及同属植物中三萜皂甙及制备方法[P]. 中国专利:CN2000-10-18.
- [3] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. *Immunol Meth.* 1993, 13: 711-719.
- [4] Lavaud C, Massiot G, Barrera J B, et al. Triterpenoid saponins from *Myrsine pellucida* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37: 1671-1677.

红外光谱分析技术提高班通知

红外光谱分析技术在药物、天然产物、食品等领域的化合物的鉴定、未知化合物的结构分析、化合物的定量分析过程中起着非常重要的作用。为了提高红外光谱仪器分析技术人员的专业素质和技术水平,国家电化学与光谱研究分析中心与仪器信息网培训中心(<http://training.instrument.com.cn>)将于7月28日在长春联合举办“红外光谱分析技术提高班”,欢迎有关单位派人参加。

培训对象:具有一定的红外光谱方面的理论知识和操作仪器的经验,具有大专以上的学历或者相应的水平,希望能够在理论水平和实验技术上进一步提高的有关人员。

培训目的:通过培训班的学习,使学员系统的掌握红外光谱理论、仪器操作和谱图解析方法。

培训内容:

一、理论部分:1. 红外光谱的基本原理及理论基础;2. 红外光谱仪的构造和工作原理;3. 多原子分子的红外谱图及其解析方法;4. 红外成像及ATR方法。

二、实验部分(欢迎学员自带样品或谱图来参加学习):1. 红外制样技术及红外附件;2. 数据的采集及处理方法;3. 谱图解析及未知化合物的结构鉴定;4. 红外定量分析;5. 红外光谱仪的维护

讲师介绍

徐经纬研究员:国家电化学和光谱研究分析中心主任,博士生导师。1997年在加拿大McGill大学获得博士学位,2002年回国,长期从事红外光谱研究分析和研究生教学工作,具有较高的理论和研究水平,2003年以来获4项美国专利,9项国内专利,在国际杂志上发表30多篇文章。

汪冬梅高级工程师:在国家电化学和光谱研究分析中心长期从事红外、拉曼方面的试验和仪器操作,并利用红外进行过大量药品检验工作,具有丰富的实践经验和高超的仪器操作水平。

培训费用:2000元,含学习费、上机费、实验耗材费、证书费、资料费等。

关于培训班的详细信息请查看<http://www.instrument.com.cn/training/100192/>

联系人:齐老师 Tel:010-51299927-101 13910105388 Fax:010-51299927-108

E-mail:training@instrument.com.cn 培训中心网址:<http://training.instrument.com.cn>

长柄链格孢对百两金皂苷的生物转化

作者：[隋玉辉](#)，[刘岱琳](#)，[邱峰](#)，[陈虹](#)
作者单位：[隋玉辉\(中国人民武装警察部队医学院, 生药教研室, 天津, 300162; 沈阳药科大学中药学院, 辽宁, 沈阳, 110016\)](#)，[刘岱琳, 陈虹\(中国人民武装警察部队医学院, 生药教研室, 天津, 300162\)](#)，[邱峰\(沈阳药科大学中药学院, 辽宁, 沈阳, 110016\)](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(7)
被引用次数：1次

参考文献(4条)

1. [江苏新医学院](#) [中药大辞典](#) 2005
2. [边宝林](#); [王素芬](#); [杨健](#) [朱砂根及同属植物中三萜总皂甙及制备方法](#) 2000
3. [Mosmann T](#) [Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay](#) 1993
4. [Lavaud C](#); [Massiot G](#); [Barrera J B](#) [Triterpenoid saponins from Myrsine pellucida](#) [外文期刊] 1994

本文读者也读过(10条)

1. [李伟](#). [曹庸](#). [雷勇](#). [陈雪香](#). [LI Wei](#). [CAO Yong](#). [LEI Yong](#). [CHEN Xue-xiang](#) [八角茴香渣生物转化法制莽草酸的初步研究](#) [期刊论文] - [林产化学与工业](#) 2007, 27(z1)
2. [黄伟](#) [百两金抗肿瘤活性成分研究](#) [学位论文] 2007
3. [董建建](#). [石贵阳](#). [卢燕](#). [张梁](#). [蔡宇杰](#) [微生物转化法生产d-伪麻黄碱](#) [期刊论文] - [无锡轻工大学学报](#) 2004, 23(2)
4. [康旭](#). [李冬生](#). [胡征](#). [袁江兰](#) [微生物转化半枝莲抑菌活性的研究](#) [期刊论文] - [时珍国医国药](#) 2010, 21(12)
5. [欧巧明](#). [丁兰](#). [OU Qiao-ming](#). [DING Lan](#) [酿酒酵母悬浮培养体系的建立及其对香豆素的微生物转化研究](#) [期刊论文] - [现代食品科技](#) 2007, 23(6)
6. [占纪勋](#). [钟建江](#). [戴均贵](#). [郭洪祝](#). [朱蔚华](#). [张元兴](#). [果德安](#) [红豆杉愈伤组织中紫杉烷类成分sinenxan A的微生物转化研究](#) [期刊论文] - [药学报](#) 2003, 38(7)
7. [邹萍](#). [黄静](#). [郭弘川](#). [田祥琴](#). [郭明娟](#). [胡小斌](#). [ZOU Ping](#). [HUANG Jing](#). [GUO Hong-chuan](#). [TIAN Xiang-qin](#). [GUO Ming-juan](#). [HU Xiao-bin](#) [红凉伞根茎皂苷化学成分研究](#) [期刊论文] - [天然产物研究与开发](#) 2009, 21(2)
8. [邵云东](#). [苏艳芳](#). [於洪建](#). [李复明](#) [RP-HPLC法测定不同品种和产地红景天中指标成分的含量](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2004, 35(5)
9. [惠秋沙](#) [微生物转化发酵技术及在中药中的应用](#) [期刊论文] - [医学信息 \(下旬刊\)](#) 2011, 24(8)
10. [韩颖](#). [赵余庆](#). [姜彬慧](#). [胡筱敏](#) [抗肿瘤成分C-K微生物转化高效菌株的筛选](#) [期刊论文] - [中药研究与信息](#) 2005, 7(2)

引证文献(1条)

1. [韩斌青](#). [冯冰](#). [马百平](#) [皂苷的生物转化研究进展](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2009(10)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200807011.aspx