

挥发油成分进行研究,对深化其化学成分系统研究具有一定的意义。

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edits. *Florae Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 31. Beijing: Science Press,

1999.

- [2] Lee S S, Wang P H. Isoquinoline alkaloids from *Litsea garci-ae* and *Neolitsea villosa* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 1995, 47(1): 69-75.
- [3] Gunatilaka A A L, Sotheeswaran S. Isoboline and lupenone from *Neolitsea fuscata* [J]. *Planta Med*, 1981, 43(3): 309-310.

黄柏酮微生物转化研究

杨若林^{1,2}, 郑桂兰¹, 张荣庆¹

(1. 清华大学 生物系 海洋生物技术研究所, 北京 100084; 2. 上海第二医科大学 化学教研室, 上海 200025)

微生物转化是指利用微生物代谢过程中产生的酶催化底物发生化学反应, 又称为微生物酶法转化, 可直接应用微生物, 也可用从微生物中提取的酶作为催化剂。目前微生物转化已应用于多种药物如抗生素、维生素、甾体激素、氨基酸、芳基丙酸和前列腺素等的合成^[1]。用微生物转化可以催化底物与氧气、水等发生化学反应。与传统的有机反应相比, 微生物转化具有底物特异性高, 产物立体选择性强, 反应条件温和、无污染等特点。近年来, 对天然产物进行微生物转化成为结构修饰的辅助手段, 也是获取新化合物从而筛选具有生物活性化合物的一种方法^[2~4]。

柠檬苦素类化合物(limonoids)是三萜类植物次生代谢产物, 主要分布于芸香科和楝科植物中, 尤其在柑橘属植物中的量较为丰富。同时, 柠檬苦素类化合物也是多种中药如白鲜皮、吴茱萸、川黄柏等的活性成分。黄柏酮(obacunone)是白鲜皮中量较高的一个柠檬苦素类化合物, 可使昆虫产生拒食行为^[5], 并能增强具有抑制微管作用的抗肿瘤药(如长春新碱)的活性^[6]。为了研究微生物对柠檬苦素类化合物的转化作用, 本研究应用黑曲霉等真菌对黄柏酮进行了转化试验。结果表明雅致小克银汉霉在培养温度低于30℃时可以催化黄柏酮的结构转化, 使其C-11位被羟基化, 见表1。含有转化产物的发酵液经醋酸乙酯萃取, 再经硅胶柱色谱分离, 得到化合物I。

1 实验部分

1.1 仪器与材料: 白鲜皮购于北京同仁堂药店清华大学分店; 微生物转化所用真菌购于中国科学院微生物所菌种保藏中心; 熔点用X-4型显微熔点仪测定; 质谱用Esquire-LC 00136测定; 红外用Perkin-Elmer Spectrum GX测定; 核磁用ARX 400

表1 用于黄柏酮微生物转化初筛的真菌

Table 1 Fungi used for preliminary screening for microbial transformation of obacunone

微生物	代谢产物
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i> AS 3.421)	—
雅致小克银汉霉(<i>Cunninghamella elegans</i> AS 3.156)	+
黄色镰孢(<i>Fusarium culmorum</i> AS 3.4595)	—
梨形毛霉(<i>Mucor piriformis</i> AS 3.3442)	—
产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i> AS 3.3871)	—
常见青霉(<i>Penicillium frequentans</i> AS 3.2556)	—
少根根霉(<i>Rhizopus arrhizus</i> AS 3.3457)	—

核磁仪测定(TMS为内标); 色谱硅胶为青岛海洋化工厂生产, 其他试剂均为分析纯。

1.2 黄柏酮的分离: 白鲜皮药材(3 kg)用醋酸乙酯回流提取3次, 提取液减压蒸除溶剂, 浸膏(90 g)经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱, 在石油醚-醋酸乙酯(1:1)洗脱时得到化合物黄柏酮。

1.3 培养基配制: 去皮马铃薯200 g切成小块, 加蒸馏水1 000 mL, 煮沸30 min, 滤去马铃薯块, 将滤液补足至1 000 mL, 加20 g葡萄糖。

1.4 转化过程: 将真菌从斜面接种到盛有100 mL无菌培养基的250 mL锥形瓶中, 振荡48 h(180 r/min)后加入黄柏酮(278 mg)的DMSO溶液, 每瓶7.6 mg(0.2 mL)。培养4 d后, 滤过菌体, 滤液用醋酸乙酯萃取3次, 合并滤液, 减压蒸除溶剂, 得到浸膏约100 mg。

1.5 转化产物分离: 将浸膏用硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱, 在石油醚-醋酸乙酯(2:1)洗脱时得到化合物I。

2 化合物鉴定

化合物I: 无色晶体, mp 270~271℃。将该化合物与黄柏酮的NMR谱(DMSO-d₆为溶剂)相比

较并结合 ESI-MS 谱(m/z 493, $M^+ + Na$), 可以发现化合物 I 在结构上比黄柏酮多一个仲羟基, 相应地少一个亚甲基, 即分子式为 $C_{26}H_{30}O_8$ 。从其 NMR 谱还可得知, 与黄柏酮相比, 化合物 I 的羰基、双键、H-15 和 H-17 的化学位移都没有发生变化, 即环 A、B、D 及呋喃环与黄柏酮相同。据此推测羟基应在 C 环上。在 NOESY 谱中可以看到与该羟基相连的碳上的氢质子与 H-1 有明显的 NOE 效应, 据此确定该羟基位于 C-11, 构型为 β 。经与文献对照, 确定化

合物 I 为香肉果素(zapoterin)^[7], 结构见图 1, NMR 数据见表 2。

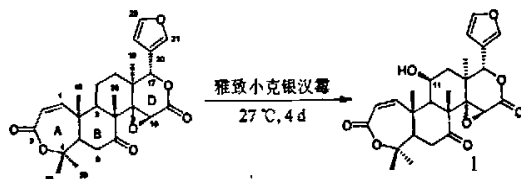


图 1 黄柏酮转化成为化合物 I

Fig. 1 Transformation from obacunone to compound I

表 2 黄柏酮和化合物 I 的 NMR 数据

Table 2 NMR Data of obacunone and compound I

序号	δ_c		δ_H (Hz)		序号	δ_c		δ_H (Hz)	
	黄柏酮	化合物 I	黄柏酮	化合物 I		黄柏酮	化合物 I	黄柏酮	化合物 I
1	156.7	156.7	6.74 d (11.8)	6.82 d (12.1)	13	37.5	35.7		
2	123.0	120.5	5.84 d (11.7)	5.85 d (12.0)	14	65.0	65.4		
3	166.9	167.3			15	53.3	53.0	3.80 s	3.77 s
4	83.9	83.8			16	166.6	166.5		
5	57.3	55.1	2.70 dd (14.0, 4.9)	2.67 dd (14.0, 5.0)	17	78.0	77.7	5.46 s	5.51 s
6	39.9	39.5	3.07 t (14.1)	3.10 t (14.2)	18	21.1	19.7	1.03 s	0.98 s
			2.24 dd (14.1, 4.9)	2.28 dd (14.2, 4.9)	19	16.4	18.0	1.32 s	1.68 s
7	207.4	207.8	7.74 brs	7.71 brs	20	120.1	120.0		
8	53.0	50.9			21	143.2	143.4	7.67 t (1.7)	7.68 t (1.7)
9	49.2	49.4	2.12 brd (10.2)	1.93 s	22	109.7	110.2	6.52 brs	6.49 brs
10	43.1	43.4			23	141.0	141.6		
11	19.5	64.5	1.32~1.35 m	4.52 brt (4.4)	28	32.0	31.5	1.42 s	1.33 s
			1.73~1.85 m		29	26.8	26.2	1.38 s	1.44 s
12	32.8	42.9	1.73~1.85 m	1.68~1.74 m	30	17.0	19.2	1.18 s	1.46 s
				1.61 dd (14.7, 6.3)					

3 讨论

此反应是在微生物体内羟化酶的催化作用下, 黄柏酮被空气中的氧气所氧化。从实验结果来看, C-11 位是黄柏酮结构中较易被氧化的位置。推测在植物体内也存在类似的羟化酶, 使黄柏酮转化为 zapoterin。另外在实验放大过程中发现当培养温度高于 30 °C 时, 无转化产物生成。由此推测催化该羟化反应的酶在温度高于 30 °C 即失活。

References:

- [1] Xu S W. Prospects of application of microbial transformation in pharmaceutical synthesis [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 1996, 27: 422-430.
- [2] Fraga B M, Alvarez L, Suárez S. Biotransformation of the

- diterpenes epicandiciol and candiciol by *Mucor plumbeus* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 327-331.
- [3] Kumari G N K, Masilamani S, Ganesh M R, et al. Microbial transformation of zaluzanin-D [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 1101-1104.
- [4] Chen A R M, Reese P B. Biotransformation of terpenes from *Stemodia maritime* by *Aspergillus niger* ATCC9142 [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59: 57-62.
- [5] Roberto G, Renda A, Tringali C, et al. Citrus limonoids and their semisynthetic derivatives as antifecund agents against *Spodoptera frugiperda* Larvae. A structure-activity relationship study [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 6766-6774.
- [6] Jung H, Sok D E, Kim Y, et al. Potentiating effect of obacunone from *Dictamnus dasycarpus* on cytotoxicity of microtubule inhibitors, vincristine, vinblastine and taxol [J]. *Planta Med*, 2000, 66: 74-76.
- [7] Moss G P, Toubé T P. Structure of the limonoid triterpene zapoterin [J]. *J Chem Soc (C)*, 1970: 694-695.

《中国麝科动物》一书出版

《中国麝科动物》专著近日已由上海科技出版社出版发行, 该书是原中国兽类学会副理事长盛和林教授和几位动物生态、医药专家共同完成的专著, 也是作者 20 多年来研究的成果, 内容富有创新性, 包括麝的生物学、生态学、人工养殖、麝香结构、泌香、活体取香、麝香化学成分、真假麝香的鉴别、麝香的药理及临床应用、麝资源的保护和合理利用, 并提出国家林业部门和医药部门协同保护和持续利用的思路。可供动物学、生态学、中医中药、养殖和野生动物保护工作者参考。

全书 35 万字, 附有数十幅彩色照片和插图, 精 16K, 220 页。书价: 138 元/册。