

- [J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(4): 5-8.
- [4] 沃联群, 罗光明, 王保秀, 等. 草泽泻三萜类化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(16): 1263-1265.
- [5] Nakajima Y, Satoh Y, Masumi K, et al. Terpenoids of *Alisma orientale* rhizomes and the crude drug *Alismatis rhizoma* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(1): 119-127.
- [6] 张玉梅, 谭宁华. 黑西哥落羽杉中三个活性双黄酮研究 [J]. 云南植物研究, 2005, 27(1): 107-110.
- [7] 于德泉. 分析化学手册·核磁共振波谱分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.

灰色链霉菌对 8 个植物 C₂₁甙体的生物转化

范黎明^{1,2}, 沈月毛^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204;

2. 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘要:目的 研究灰色链霉菌对 8 个 C₂₁甙体的生物转化作用。方法 通过灰色链霉菌在 YS 培养基中发酵, 对 C₂₁甙体进行转化。结果 告达亨(I)和乙酰告达亨(V)的 C-12 位 ikematic 酯基发生羟基化, 产生一个相同的新化合物 4'-羟基告达亨(Ia)。而两个乙酰化的衍生物包括乙酰告达亨(V)和二乙酰基青阳参苷元(VI)发生去乙酰化。青阳参苷元(II)、青阳参苷甲(III)、青阳参苷乙(IV)、去乙酰基萝藦苷元(VII)和 3-乙酰基去乙酰基萝藦苷元(VIII)没有检测到明显的转化。结论 灰色链霉菌降低了所饲喂 C₂₁甙体的亲脂性而不是形成色素或 C₂₁甙体皂苷所具有的脱氧糖侧链。

关键词:生物转化; C₂₁甙体; 灰色链霉菌; 羟基化; 4'-羟基告达亨

中图分类号: R284.18

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1790-03

C₂₁甙体皂苷是萝藦科植物的特征性成分, 在青阳参 *Cynanchum otophyllum* Schneid. 中也有大量发现。青阳参是萝藦科鹅绒藤属植物, 广布于我国西南地区, 云南民间用其根做滋补强壮药, 治疗小儿惊风症和风湿关节痛。化学成分研究表明, 其根含有较高量的 C₂₁甙体皂苷^[1~3], 其中青阳参苷甲 (otophylloside A) 和青阳参苷乙 (otophylloside B) 显示抗癫痫活性, 可以保护小鼠免于听源性痉挛 (audiogenic seizures) 发作, ED₅₀ 值为 10.20 mg/kg^[3]。

链霉菌属 (*Streptomyces*) 放线菌同高等植物有密切关系, 也是研究最多的微生物, 其中灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* 的许多基因已经被克隆并分析^[4,5], 包括许多次生代谢产物生物合成途径的基因簇。在灰色链霉菌所产生的次生代谢产物中, 色素及其衍生物例如色素 A₃^[6,7], 在结构上含有脱氧糖链, 这一点同青阳参中发现的 C₂₁甙体皂苷^[3]相类似。这表明, 灰色链霉菌的脱氧糖转移酶可能具有与植物青阳参中相应酶类似的功能。因此, 本实验使用灰色链霉菌对一些来自青阳参的 C₂₁甙体及其衍生物进行了生物转化研究, 以探讨灰色链霉菌的脱氧糖转移酶是否能够对植物成分起作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料: 旋光用 Jasco DIP-370 数码旋光仪测定, 红外光谱用 Bruker Tensor 27 型红外光谱仪测定, KBr 压片。核磁共振谱用 Bruker AM-400 型核磁共振仪测定, 以 TMS 为内标。质谱用 VG Autospec-3000 型质谱仪测定。薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶 (200~300 目) 均为中国青岛海洋化工集团产品。

1.2 底物的准备: 青阳参植物材料粉碎的根以醋酸乙酯提取, 提取物进一步用石油醚提取得到石油醚不溶的粗苷部分。取部分粗苷, 以 1% 硫酸-甲醇回流水解。反应体系以 5% 氢氧化钠水溶液中和之后, 减压除去甲醇, 残液以氯仿提取。氯仿液经无水硫酸钠干燥, 浓缩得到的提取物用硅胶柱色谱, 依次用氯仿-甲醇 (50:1, 20:1) 洗脱, 分别得到化合物告达亨(I)和青阳参苷元(II)。另一部分粗苷依次以四氯化碳-醋酸乙酯 (95:5, 85:15) 提取, 提取物分别以硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇 (99:1) 洗脱, 得化合物 III 和 IV。

化合物 I 在 10% 氢氧化钾-甲醇溶液中回流加热 30 h, 得去乙酰基萝藦苷元(VI)。

收稿日期: 2008-04-26

基金项目: 云南省自然科学基金项目 (30070007)

作者简介: 范黎明 (1976-), 男, 河南人, 博士研究生, 主要从事天然产物的分离研究。 E-mail: fanliming1976@gmail.com

* 通讯作者 沈月毛 Tel: (0871) 5223111 Fax: (0871) 5150227 E-mail: yshen@mail.kib.ac.cn

化合物 I、II、VI 分别溶于吡啶,室温下与醋酸酐反应过夜,进行乙酰化。粗产物通过进一步的硅胶柱色谱,得到化合物 V、VI 和 VII。

化合物 I、II、III 和 IV 通过与对照品的 TLC 对比而鉴定。

化合物 V: 白色固体, EI-MS m/z : 532 [M^+] (1), 489 (28) ($M^+ - COCH_3$), 404 (3) [$M^+ - (CH_3)_2CH(CH_3)C = CHCOOH$], 361 (34) (404 - $COCH_3$)。

化合物 VI: 白色固体, EI-MS m/z : 566 (1) ($M^+ - H_2O$), 541 (6) ($M^+ - COCH_3$), 524 (9), 506 (2), 481 (4), 445 (3), 404 (2), 361 (26), 343 (12), 301 (35), 283 (50), 180 (12), 163 (55), 121 (100)。

化合物 VII: 白色固体, EI-MS m/z : 380 [M^+], 337 (80) ($M^+ - COCH_3$), 319 (100), 301 (68), 283 (66)。

化合物 VIII: 白色固体, EI-MS m/z : 422 [M^+], 404 (4) ($M^+ - H_2O$), 387 (3) (404 - H_2O), 379 (62) (422 - $COCH_3$), 361 (73), 343 (32), 319 (25), 301 (72), 283 (100)。

1.3 生物转化实验: 灰色链霉菌单菌落菌种接种在固体培养基平板上, 所用培养基为 YS 培养基: 酵母提取物 3 g, 可溶性淀粉 10 g, 琼脂 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.2; 28 °C 置培养 1 周。

菌种活化采用液体活化法, 挑取单菌落接种于液体 YS 培养基, 28 °C、180 r/min 振荡培养 72 h 后, 转接于新鲜 YS 液体培养基 (1 000 mL 的三角瓶中装入 100 mL 液体培养基), 接种量 2%, 同条件培养 48 h 再饲喂底物; 底物溶解于乙醇或醋酸乙酯, 饲喂量为 10 mg 底物/100 mL 培养液, 继续培养 72 h 后, 停止发酵, 发酵液在 20 °C 下以 7 000 r/min 离心 30 min, 分离上清液和菌丝体。上清液经过减压浓缩, 以醋酸乙酯萃取 3 次, 无水硫酸钠干燥, 回收溶剂得到粗提物, 通过 TLC 检测生物转化情况, 进一步通过反相硅胶柱色谱 (丙酮-水梯度洗脱)、硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇梯度洗脱) 和葡聚糖凝胶柱 Sephadex LH-20 (甲醇洗脱) 色谱分离, 得到转化产物。

化合物 4'-羟基告达亭 (I a): 白色粉末, $[\alpha]_D^{20}$ (c 0.4, $CHCl_3$), $IR_{\nu_{max}}^{KBr}$ (cm^{-1}): 3 444, 2 975, 2 933, 1 709, 1 642, 1 466, 1 386; EI-MS m/z : 506 [M^+] (2), 488 (3) ($M^+ - H_2O$), 463 (27) ($M^+ - COCH_3$), 445 (68), 427 (4), 405 (2), 362 (23), 344 (24), 319 (60), 301 (59), 283 (57), 144 (10), 127 (100), 111

(62); HR-EI-MS m/z 506.287 3 ($C_{28}H_{42}O_8$, 计算值 506.288 0); 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (400 MHz, $C_5D_5N-d_5$) 见表 1。

表 1 化合物 I a 的 NMR 数据
Table 1 NMR Data for compound I a

位置	^{13}C -NMR	1H -NMR	HMBC
1	39.3(t)	1.86~1.90(1H, overlap) 1.21(m)	C-3, C-5, C-10, C-19 C-2, C-10
2	32.1(t)	1.86~1.90(2H, overlap)	C-3, C-4, C-10
3	71.6(d)	3.91(m)	/
4	43.4(t)	2.63~2.65(overlap)	C-2, C-3, C-5, C-6, C-10
5	140.3(s)	/	/
6	118.6(d)	5.33(d, 3.7)	C-4, C-5, C-8, C-10
7	34.8(t)	2.45(m) 2.30~2.34(overlap)	C-5, C-8, C-9 C-5, C-6, C-9, C-14
8	74.4(s)	/	/
9	44.7(d)	1.78(dd, 2.6, 10.3)	C-1, C-10, C-11, C-19
10	37.4(s)	/	/
11	25.2(t)	2.30~2.34(overlap) 2.22(m)	C-9, C-10, C-12, C-13 C-8, C-13
12	72.7(d)	5.11(m)	C-1', C-9, C-13, C-14, C-17, C-18
13	58.0(s)	/	/
14	89.6(s)	/	/
15	33.9(t)	2.13(m), 2.05(m)	C-8, C-13, C-14, C-16, C-17
16	33.0(t)	3.33(m)	C-14, C-15, C-17, C-20
17	92.5(s)	/	/
18	10.7(q)	1.96(s)	C-12, C-13, C-14, C-17
19	18.4(q)	1.38(s)	C-1, C-5, C-9, C-10
20	209.6(s)	/	/
21	27.5(q)	2.43(s)	C-17, C-20
1'	166.5(s)	/	/
2'	113.5(d)	6.72(d, 0.9)	C-1', C-3', C-4', C-7'
3'	166.7(s)	/	/
4'	73.3(s)	/	/
5', 6'	29.1/29.0(q)	1.50/1.49(s)	C-3', C-4'
7'	15.7(q)	2.49/2.43(s)	C-3', C-4'
OH-17		6.46	C-13, C-17, C-20

2 结果与讨论

在实验中, 以灰色链霉菌为生物反应器, 对告达亭^[2] (caudatin, I)、青阳参苷元^[2] (qingyangshengennin, II) 及两者的乙酰化产物乙酰基告达亭 (V) 和二乙酰基青阳参苷元 (VI)、去乙酰基萝藦苷元 (deacetylmetaplexigenin, VII)、3-乙酰基去乙酰基萝藦苷元 (3-acetyldeacetylmetaplexigenin, VIII) 和青阳参苷甲^[3] (otophyllosides A, III)、青阳参苷乙^[3] (otophyllosides B, IV) 这样 8 个植物 C_{21} 甾体进行了生物转化。化合物 I 和 V 的主要转化产物是 I a (26 mg 和 3 mg, 得率分别是 13% 和 3%)。化合物 VI 被去乙酰化, 得到化合物 II。化合物 II、III、IV、VII 和 VIII 与空白对照相比, 没有观察到生物转化发生。没有转化的底物通过 TLC 与原有底物相对比而确定。

高分辨质谱确定化合物 I a 的分子式为 $C_{28}H_{42}O_8$ 。包括 2D-NMR 在内的波谱数据表明化合

物 I a 是化合物 I^[2] 的 4' 位羟基化产物。化合物 I a 的¹³C-NMR 谱显示 28 个信号峰, 其中大多数与化合物 I 的信号相似。¹H-NMR 谱中的单峰信号 δ 1.49/1.50 (H-5', H-6') 和 δ 2.43/2.49 (H-7') 与碳信号 δ 73.3 s 有远程相关, 表明羟基化出现在侧链的 C-4' 位置。2' 位质子信号 δ 6.72 与 4' 位碳信号 δ 73.3 的远程相关也证明了这一点。所以, 化合物 I a 被鉴定为 4'-羟基告达亭 (4'-hydroxycadaurin), 见图 1。而¹H-NMR 谱中的质子信号 δ 2.43/2.49 (δ_c 15.7, C-7'), 1.49/1.50 (δ_c 29.0/29.1, C-5', C-6') 成对出现, 表明 I a 是 4' 位差向异构体。

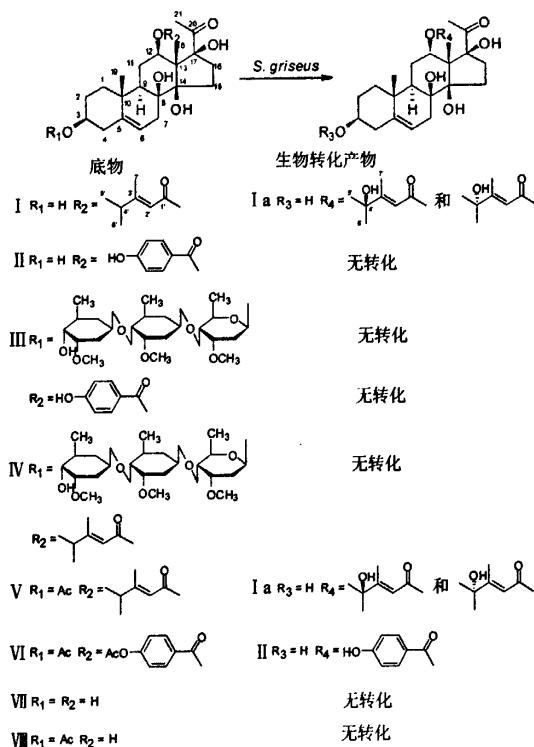


图 1 化合物 I ~ VIII 及 I a 的生物转化与结构

Fig. 1 Structures and biotransformation of compounds I ~ VIII and I a

实验显示灰色链霉菌对 C₂₁ 甾体的骨架不敏感, 但是化合物 I 和 V 的 C-12 位 ikemaic 酯基都被羟基化, 而 12 位侧链基团是对羟基苯甲酸的化合物 II 则没有发生转化, 这表明 12 位侧链基团的 ikemaic 酯基很可能是一个活性中心, 它的存在可能使化合物 I 和 V 对灰色链霉菌产生某种毒性或抑制作用。

实验中观察到的另外一个有趣现象是所有饲喂的乙酰化 C₂₁ 甾体底物都被灰色链霉菌除去了乙酰基, 这表明灰色链霉菌对这些化合物的“解毒”机制可能是通过降低其脂溶性来阻止它们通过灰色链霉菌的细胞膜。这一点同告达亭侧链的羟基化是一致的。此外, 所有的转化产物以及没有转化的底物都存在于培养液中而不是从菌体中提取得到, 这意味着底物可能并没有进入细胞内, 灰色链霉菌对底物告达亭 C-12 位侧链的羟基化可能是由胞外的细胞色素 P-450 酶系来催化的。众所周知, 细胞色素 P-450 酶系是一类功能多样的血红素蛋白, 广泛分布于动物、植物和微生物, 负责催化与调控多种内源物质的代谢与转化或外源化合物的活化与降解^[8]。微生物中的许多外来化合物生物转化通常都是被细胞色素 P-450 酶系催化的, 这已经被许多报道证实^[9,10]。

致谢: 2D-、1D-NMR 和 HREIMS 数据分别由中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室王德祖研究员、何以能先生和梁惠玲女士测定。

参考文献:

- [1] 木全章, 周茜兰. 青阳参的成分研究 [J]. 云南植物研究, 1983, 5(1): 99-103.
- [2] 木全章, 周茜兰. 青阳参化学成分的研究 [J]. 药学报, 1983, 18(5): 356-362.
- [3] Mu Q Z, Lu J R, Zhou Q L. Two new antiepilepsy compounds-otophyllosides A and B [J]. Scientia Sinica (Series B), 1986, 29: 295-301.
- [4] Jiang H, Kendrick K E. Characterization of *ssfR* and *ssgA*, two genes involved in sporulation of *Streptomyces griseus* [J]. J Bacteriol, 2000, 182: 5521-5529.
- [5] Ohnishi Y, Nishiyama Y, Sato R, et al. An oligoribonuclease gene in *Streptomyces griseus* [J]. J Bacteriol, 2000, 182: 4647-4653.
- [6] Distler J, Mansouri K, Mayer G, et al. Streptomycin biosynthesis and its regulation in *Streptomyces* [J]. Gene, 1992, 115: 105-111.
- [7] Montanari A, Rosazza J P N. The biosynthesis of chromomycin-A₃ [J]. Tetrahedron Lett, 1988, 29: 5513-5516.
- [8] Nelson D R. Cytochrome P450 and the individuality of species [J]. Arch Biochem Bioph, 1999, 369: 1-10.
- [9] Karlson U, Dwyer D F, Hooper S W, et al. Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate [J]. J Bacteriol, 1993, 175: 1467-1474.
- [10] O'Keefe D P, Harder P A. Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes [J]. Mol Microbiol, 1991, 5: 2099-2105.