

百两金皂苷 A 的微生物转化及其产物的细胞毒活性研究

王志平¹, 赵艳敏², 隋玉辉³, 贺凌霜², 刘岱琳^{2*}

1. 郑州人民医院 药学部, 河南 郑州 450003

2. 中国人民武装警察部队后勤学院 军事药学教研室, 天津 300309

3. 清华大学医院, 北京 100084

摘要: 目的 利用燕麦曲霉 *Aspergillus avenaceus* AA 3.4454 对百两金皂苷 A 进行微生物转化, 并对转化产物进行细胞毒活性研究。方法 将百两金皂苷 A 放置燕麦曲霉液体培养基中, 28 °C、160 r/min 条件下共培养 3 d 后, 利用多种柱色谱分离转化产物, 采用核磁共振等波谱手段鉴定结构; 采用 MTT 法测定转化产物对肿瘤细胞系的细胞毒活性。结果 从百两金皂苷 A 的燕麦曲霉液体发酵液中分离出 3 个主要转化产物, 其结构分别鉴定为西克拉明皂苷元 A-3 β -O-{ α -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-阿拉伯吡喃糖基} (1)、西克拉明皂苷元 A-3 β -O-{ α -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-阿拉伯吡喃糖基} (2)、西克拉明皂苷元 A-3 β -O-{ β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]-[α -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]- α -L-阿拉伯吡喃糖基} (3)。结论 首次利用燕麦曲霉对百两金皂苷 A 进行微生物转化并分离得到在糖链的不同位置增加了 α -D 型半乳糖的转化产物, 3 个转化产物均为新化合物, 均具有一定的细胞毒活性, 且转化产物 1 对大细胞肺癌细胞的细胞毒活性略优于底物。

关键词: 燕麦曲霉; 百两金皂苷 A; 微生物转化; 抗肿瘤活性; 西克拉明皂苷元 A; 糖苷化

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)15-3581-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.010

Study on biotransformation of ardisiacrispin A and cytotoxic activity of transformed products

WANG Zhi-ping¹, ZHAO Yan-min², SUI Yu-hui³, HE Ling-shuang², LIU Dai-lin²

1. Department of Pharmacy, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China

2. Department of Military Pharmacy, Logistics University of PAPF, Tianjin 300309, China

3. Tsinghua University Hospital, Beijing 100084, China

Abstract: **Objective** To study the microbial transformation of ardisiacrispin A by *Aspergillus avenaceus* AA 3.4454 and the cytotoxic activity of the transformed products. **Methods** Ardisiacrispin A was put into the fluid medium inoculated with the *A. avenaceus* and cultured in the shaker at 28 °C and 160 r/min for 3 d. Three transformed products were separated and purified from the crude extract whose structures were elucidated based on spectrum data. And the cytotoxic activity of the transformed products on tumor cells was determined by MTT assay. **Results** Three major transformed products were elucidated as cyclamiretin A-3 β -O-{ α -D-galactopyranosyl-(14)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-arabinopyranoside} (1), cyclamiretin A-3 β -O-{ α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-arabinopyranoside} (2), and cyclamiretin A-3 β -O-{ β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- α -L-arabinopyranoside} (3). **Conclusion** It is the first time that the three major derivatives could be microbial synthesized from ardisiacrispin A by *A. avenaceus* AA 3.4454. And the three transformation products are all new compounds which increase α -D galactose at different positions of the sugar chain. All the transformed products have certain cytotoxic activity, and the cytotoxic activity of the transformed product 1 to NCI-H460 cells is slightly better than the substrate.

Key words: *Aspergillus avenaceus*; ardisiacrispin A; microbial transformation; anti-tumor activity; cyclamiretin A; glycosylation

收稿日期: 2019-01-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673693)

作者简介: 王志平 (1980—), 男, 临床药师, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 13693716726@163.com

*通信作者 刘岱琳 (1973—), 女, 教授, 研究方向为中药活性成分研究。E-mail: dailinlch@163.com

百两金皂苷 A (ardisiacrispin A) [西克拉明皂苷元 A-3 β -O-[β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-阿拉伯吡喃糖苷] 属于齐墩果烷型五环三萜类皂苷, 最早是从紫砂根中获得的一种抗肿瘤活性成分, 研究发现其主要分布于紫金牛科紫金牛属植物中^[1]。药理活性研究显示百两金皂苷 A 能诱导白血病细胞 HL-60、肝癌细胞 Bel-7402、口腔上皮癌细胞 KB、宫颈癌细胞 HeLa、卵巢癌细胞 SKOV-3、胃癌细胞 BGC-823、乳腺癌细胞 MCF-7 等多种肿瘤细胞凋亡, 具有较强抗癌活性^[2-6], 是一个潜在的具有抗肿瘤活性的先导化合物。为了获取该化合物的衍生物, 进一步研究其构效关系, 本课题组前期利用长柄链格孢 (3.2875) 对百两金皂苷 A 进行微生物转化研究, 得到极性减小的去糖基化产物西克拉明皂苷元 A-3 β -O- β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-阿拉伯吡喃糖苷, 该产物对大细胞肺癌 NCI-H460 细胞表现出较好的生长抑制作用^[7], 显示百两金皂苷 A 及其类似物具有潜在的抗肿瘤药物研究开发价值。

本实验在前期研究的基础上, 进一步采用燕麦曲霉 *Aspergillus avenaceus* AA 3.4454 对百两金皂苷

A 进行微生物转化研究, 获得了在糖链的不同位置增加 α -D 型半乳糖的 3 个极性变大的转化产物, 分别鉴定为西克拉明皂苷元 A-3 β -O-{ α -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-阿拉伯吡喃糖苷} (cyclamiretin A-3 β -O-{ α -D-galactopyranosyl-(14)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-arabinopyranoside}, 1)、西克拉明皂苷元 A-3 β -O-{ α -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-阿拉伯吡喃糖苷} (cyclamiretin A-3 β -O-{ α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-arabinopyranoside}, 2)、西克拉明皂苷元 A-3 β -O-{ β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]-[α -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]- α -L-阿拉伯吡喃糖苷} (cyclamiretin A-3 β -O-{ β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- α -L-arabinopyranoside}, 3)。化合物 1~3 均为新化合物, 结构见图 1。利用

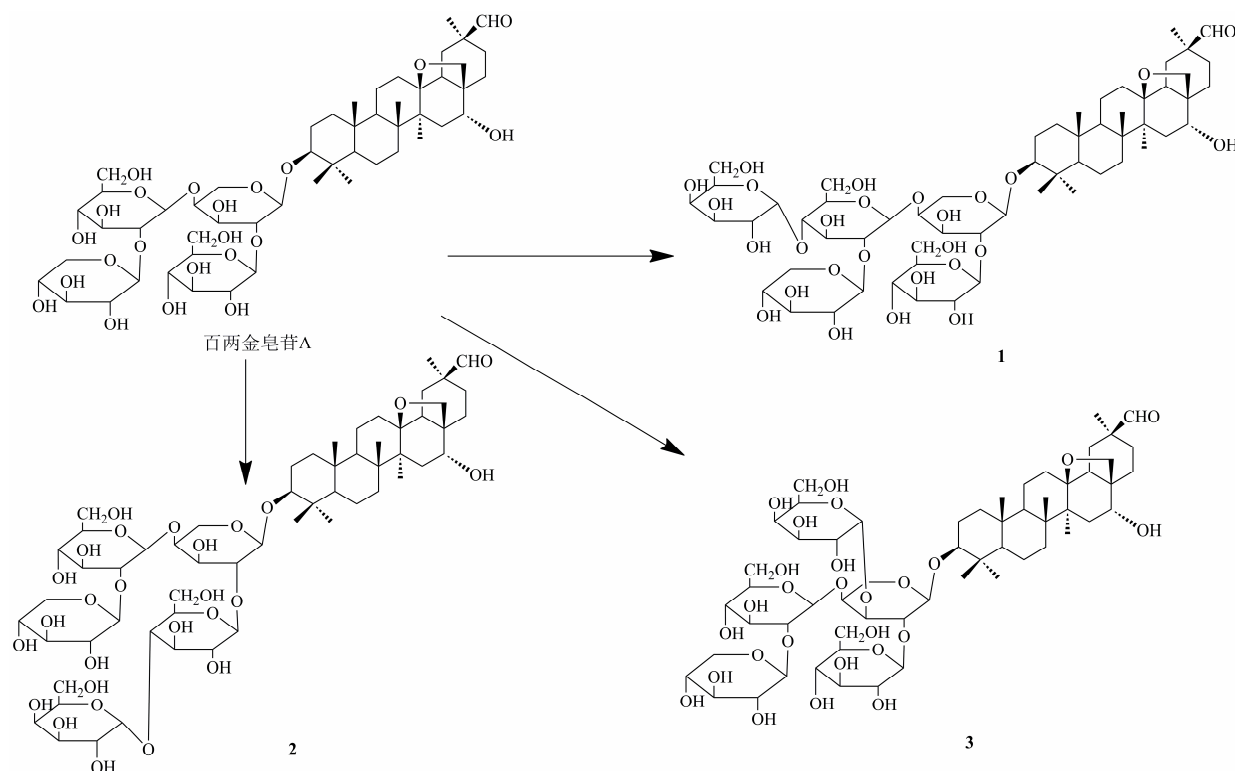


图1 底物和转化产物的结构

Fig. 1 Structures of substrate and transformed products

MTT 法初步测定了 3 个转化产物的抗肿瘤活性, 转化产物均具有一定的抗肿瘤活性, 且转化产物 1 对 NCI-H460 细胞的细胞毒活性略优于底物。该研究为获得更强活性和高选择性的抗癌百两金皂苷 A 类似物提供可能, 同时为三萜皂苷类化合物微生物转化研究奠定实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BRUCK AV-400 超导核磁共振谱仪 (瑞士布鲁克公司); LC-MSD-Trap-SL HR-ESI-MS 质谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); LC-6A 半制备高效液相色谱仪 (RID-20A 示差检测器, 日本岛津公司), 色谱柱: COSMOSIL C₁₈ 柱, 250 mm×10 mm, 5 μm, 购自苏州麦可旺志公司); LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPD-M20A 型紫外检测器、CTO-20 柱温箱, 日本岛津公司); GCMS-QP-2010 气相色谱质谱联用仪, 配有 DB-5 ms32 色谱柱 (30 m×0.32 mm, 0.25 μm, 日本岛津公司); N-1001 型 EYELA 旋转蒸发仪 (日本东京理化有限公司); 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)。

1.2 试剂与药品

大孔树脂 Diaion HP20 (日本三菱公司); Sephadex LH-20 (北京金欧亚科技发展有限公司); ODS (北京慧德易有限公司); 氯仿、甲醇、乙醇、正丁醇等试剂 (分析纯, 天津市康科德科技有限公司); 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); 色谱甲醇 (天津市康科德科技有限公司); 反相 Rp₁₈ 薄层板 (德国默克公司); 薄层色谱、柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工集团公司); 琼脂粉 (联星生物有限公司); 无支原体胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); RPMI 1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司); 青霉素 (华北制药有限责任公司产品); 链霉素 (美国 Gibco 公司); 顺铂 (H20040813, 江苏豪森药业集团有限公司)。百两金皂苷 A 化合物由本实验室从中药朱砂根中提取分离得到 (HPLC 测定质量分数大于 96%)。

燕麦曲霉 *Aspergillus avenaceus* AA 3.4454, 购自中国科学院微生物研究所; 固体培养基: PDA 培养基 (马铃薯葡萄糖琼脂培养基); 转化培养基: PDB 培养基 (马铃薯葡萄糖液体培养基)。

MCF-7 细胞、NCI-H460 细胞、人神经胶质瘤细胞 SF-268 均购自中国医学科学院肿瘤研究所。

2 方法

2.1 生物转化方法

基于前期的预实验结果, 并结合课题组前期对于三萜类成分微生物转化的研究方法^[8], 取活化后的燕麦曲霉斜面菌种 1 支, 用无菌水冲洗斜面上的孢子, 振荡得燕麦曲霉孢子悬浮液, 并用无菌水稀释至 1×10^7 个/mL。取 100 μL 孢子悬浮液接入 60 mL 新鲜无菌液体培养基中, 在 28 °C、160 r/min 条件下培养 2 d, 无菌条件下加入预处理的百两金皂苷 A 溶液 0.5 mL (甲醇为溶剂, 质量浓度 30 mg/mL), 空白组中加入 0.5 mL 甲醇对照, 在相同条件下继续培养 3 d。

2.2 转化产物的分离

按照“2.1”项下的转化方法积累样品, 将积累的培养液抽滤后, 用等体积正丁醇萃取 3 次, 合并萃取液, 减压浓缩至干, 得转化产物粗品。取其中 6 g 样品经 Diaion HP20 大孔树脂分离, 以水-乙醇 (100:0→30:70) 梯度洗脱得到 4 个组分 (Fr. 1~4)。将有转化产物的组分 Fr. 2 经干法拌样、通过 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (30:70→70:30) 梯度洗脱后得到 3 个组分 (Fr. 21~23)。Fr. 21 (241 mg) 经反相制备液相色谱, 以 60% 甲醇水溶液等度洗脱得到化合物 1 (53 mg) 和 2 (30 mg)。Fr. 22 (141 mg) 经制备液相纯化 (甲醇-水 60:40) 得化合物 3 (8.6 mg)。

2.3 糖酸水解 GC-MS 测定条件

柱温 150 °C (保持 2 min)~300 °C (保持 10 min); 升温速度 15 °C/min; 气化温度 250 °C; 进样量 0.5 μL; 载气位氦气 (体积流量 1.0 mL/min); 分流比 30:1; 质谱检测器: EI 电离源、电离电压 70 eV、源温 200 °C; 扫描范围 m/z 100~500; 开始时间 3 min; 溶剂切换时间 2 min; 界面温度 250 °C。

2.4 细胞毒活性测定

采用 MTT 法, 使用 MCF-7、NCI-H460、SF-268 细胞系, 以抗癌药顺铂 (CDDP) 做阳性对照, 测定了底物和 3 个转化产物的细胞毒活性。

分别将 MCF-7、NCI-H460、SF-268 细胞系培养于 RPMI 1640 培养液中, 加入 10% 胎牛血清、1% 抗生素 (10 000 U/mL 青霉素、10 000 μg/mL 链霉素) 于 37 °C, 5% CO₂ 条件的湿热培养箱中培养。每 2 天继代培养, 使细胞保持在对数生长期。各个

待测样品均分别用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 用无血清的 RPMI 1640 培养液配制成 1 mg/mL 的储备液, 置于 -20°C 保存。测试前再用无血清的 RPMI 1640 培养液稀释至终质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的待测溶液 (DMSO 的体积分数应小于 0.5%)。MTT 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液配成 5 mg/mL 的母液, 于 4°C 避光保存。

在 96 孔培养板的每孔中加入 90 μL 生长良好的肿瘤细胞 (约含有细胞 1×10^4 个/孔), 24 h 后分别向细胞中加入供试样品、顺铂各 10 μL 作为样品组和阳性对照组; 阴性对照组加入 0.1% DMSO, 空白组加入相应量的培养基。以上每组平行设 4 个复孔。在 37°C 、5% CO_2 条件下共同培养 48 h 后, 除空白组外每孔加入 10 μL 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 (100 μL /孔) 溶解, 待结晶完全溶解后, 用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度 (A) 值, 并按公式计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 = (阴性对照组 A 值的平均值 - 样品组 A 值的平均值) / (阴性对照组 A 值的平均值 - 空白组 A 值的平均值)

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末 (甲醇), Libermann-Burchard 和 Molish 反应阳性, 提示该化合物与底物类似, 为三萜皂苷类化合物。HR-ESI-MS 给出 m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+ 1\,245.564\,3$, 计算值为 $1\,245.587\,5$, 确定分子式 $\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{O}_{27}$ 。 $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +21.0^{\circ}$ ($c\,0.4$, MeOH), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 给出 3 419, 2 923, 1 713, 1 044, IR 光谱显示化合物 **1** 中存在羟基 (3 419 cm^{-1})、醛基 (2 903、1 713 cm^{-1})、C-O (1 044 cm^{-1}) 等特征官能团信号峰。

^1H -NMR 谱 (400 MHz, pyridine- d_6 , 表 1) 给出 6 个角甲基质子信号 ($\delta\,0.78, 1.00, 1.06, 1.19, 1.26, 1.52$)、1 个醛基质子信号 ($\delta\,9.62$) 和 5 个糖端基质子信号 [$\delta\,5.50$ (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc-H-1), 5.49 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, Gal-H-1), 4.93 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Glc-H-1), 4.84 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, Xyl-H-1), 4.77 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, Ara-H-1)], 说明该化合物为含有 5 个糖的五环三萜皂苷。 ^{13}C -NMR (100 MHz, pyridine- d_6) 中显示有 58 个碳信号, 结合 DEPT135 和 HSQC 谱, 将 30 个碳信号归属为苷元上的碳信号, 其中有 6 个甲基信号 ($\delta\,16.4, 16.7, 18.6, 19.8, 24.2, 28.1$)、10 个亚甲基信号 ($\delta\,39.2, 36.9, 34.4, 33.4, 32.7,$

32.4, 30.5, 26.6, 19.2, 18.0)、1 个连氧亚甲基信号 ($\delta\,77.7$)、3 个次甲基信号 ($\delta\,55.7, 53.4, 50.4$)、2 个连氧次甲基信号 ($\delta\,89.0, 77.0$)、6 个季碳信号 ($\delta\,48.4, 44.6, 44.1, 42.5, 39.8, 36.9$)、1 个连氧季碳信号 ($\delta\,86.4$)、1 个醛基碳信号 ($\delta\,207.6$)。将苷元的数据与文献报道的西克拉明皂苷元 A 的数据进行对比基本一致^[9], 说明化合物 **1** 的苷元结构未发生变化, 仍然为西克拉明皂苷元 A。

通过气质联用法测定结果检出化合物 **1** 中含有 *L*-阿拉伯糖、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、*D*-木糖, ESI-MS 给出 m/z : $1\,245\, [\text{M}+\text{Na}]^+$, 与底物结构的相对分子质量相比多出 1 个 162 单元的六碳糖结构片段, 其 ESI-MS² 中给出 m/z : $1\,083\, [\text{M}+\text{Na}-162]^+$ 和 $951\, [\text{M}+\text{Na}-162-132]^+$, $951\, [\text{M}+\text{Na}-162-132]^+$ 的 ESI-MS³ 中给出了 m/z : $789\, [\text{M}+\text{Na}-162-132-162]^+$ 离子峰, 质谱分析数据结合酸水解气质分析的结果, 可知阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和木糖为 1:2:1:1。根据氢谱中葡萄糖端基质子的 $^3J_{\text{H1}, \text{H2}}$ (7.8, 8.0 Hz), 木糖端基质子的 $^3J_{\text{H1}, \text{H2}}$ (7.3 Hz), 确定其均为 β 构型; 半乳糖端基质子的 $^3J_{\text{H1}, \text{H2}}$ (3.2 Hz), 确定其为 α 构型。将阿拉伯糖的 ^1H 和 ^{13}C -NMR 数据与文献对照^[10], 确定为 α 构型。因此, 化合物 **1** 中的 5 个糖片段被确定为 1 个 α -*L*-阿拉伯糖、2 个 β -*D*-葡萄糖、1 个 β -*D*-木糖和 1 个 α -*D*-半乳糖。

^1H - ^1H COSY 谱中, $\delta\,5.49$ (Gal-H-1) 与 4.15 (Gal-H-2)、 $\delta\,4.63$ (Gal-H-3) 与 4.22 (Gal-H-4)、 $\delta\,3.86$ (Gal-H-5) 与 4.38 (Gal-H-6) 存在相关峰; 在 TOCSY 谱中 $\delta\,5.49$ (Gal-H-1) 与 4.15 (Gal-H-2)、 4.22 (Gal-H-4) 存在相关峰; HMBC 谱中 $\delta\,100.5$ (Gal-C-1) 与 4.38 (Gal-H-6)、 76.2 (Gal-C-5) 与 4.38 (Gal-H-6)、 75.4 (Gal-C-3) 与 4.22 (Gal-H-4) 和 5.49 (Gal-H-1)、 74.0 (Gal-C-2) 与 4.63 (Gal-H-3)、 72.1 (Gal-C-4) 与 4.63 (Gal-H-3) 存在相关峰, 从而将新增片段-半乳糖的碳氢数据进行了全归属。在 HMBC 谱中 $\delta\,89.0$ (C-3-aglycone) 与 4.77 (Ara-H-1), $\delta\,79.8$ (Ara-C-2) 与 5.50 (H-1-terminal Glc), $\delta\,78.2$ (Ara-C-4) 与 4.93 (H-1-inner Glc), $\delta\,85.3$ (C-2-inner Glc) 与 4.84 (Xyl-H-1), $\delta\,74.3$ (C-4-inner Glc) 与 5.49 (Gal-H-1) 存在相关峰, 从而确定 3 位糖链间的连接顺序为: 阿拉伯糖的 1 位与苷元的 3 位相连, 1 个葡萄糖的 1 位与阿拉伯糖的 2 位相连, 另一个葡萄糖的 1 位与阿拉伯糖的 4 位相连, 其 2 位又与木糖的 1 位相连, 4 位与半乳糖的 1 位相连。

表 1 化合物 1~3 的 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 和 ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 数据
Table 1 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) and ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) data of compound 1, 2, and 3

碳位	1		2		3	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	1.58 (o), 0.82 (o) ^a	39.2 t	1.57 (o), 0.82 (o)	39.2 t	1.61 (o), 0.84 (o)	39.3 t
2	2.09 (o), 1.80 (o)	26.6 t	1.98 (o), 1.83 (o)	26.6 t	1.98 (o), 1.78 (o)	26.6 t
3	3.16 (o)	89.0 d	3.18 (o)	89.1 d	3.15 (o)	89.0 d
4		39.8 s		39.8 s		39.7 s
5	0.66 (d, $J = 9.5$ Hz)	55.7 d	0.69 (d, $J = 11.9$ Hz)	55.7 d	0.66 (d, $J = 11.7$ Hz)	55.7 d
6	1.40 (o), 1.35 (o)	18.0 t	1.49 (o), 1.35 (o)	18.0 t	1.42 (o), 1.36 (o)	18.0 t
7	1.16 (o)	34.4 t	1.15 (o)	34.4 t	1.52 (o), 1.17 (o)	34.4 t
8		42.5 s		42.6 s		42.6 s
9	1.23 (o)	50.4 d	1.24 (o)	50.4 d	1.25 (o)	50.5 d
10		36.9 s		36.8 s		36.9 s
11	1.75 (m), 1.40 (o)	19.2 t	1.74 (m), 1.39 (o)	19.2 t	1.72 (o), 1.40 (o)	19.2 t
12	2.04 (o), 1.38 (o)	32.7 t	2.08 (o), 1.40 (o)	32.7 t	1.94 (o), 1.58 (o)	32.7 t
13		86.4 s		86.4 s		86.4 s
14		44.6 s		44.6 s		44.6 s
15	2.21 (o), 1.45 (o)	36.9 t	2.20 (o), 1.45 (o)	36.9 t	2.19 (o), 1.47 (o)	36.9 t
16	4.19 (o)	77.0 d	4.19 (o)	76.9 d	4.20 (o)	77.0 d
17		44.1 s		44.1 s		44.1 s
18	1.38 (o)	53.4 d	1.36 (o)	53.4 d	1.38 (o)	53.4 d
19	2.84 (o), 2.10 (o)	33.4 t	2.84 (o), 2.09 (o)	33.4 t	2.84 (o), 2.08 (o)	33.4 t
20		48.4 s		48.4 s		48.4 s
21	2.53 (o), 2.09 (o)	30.5 t	2.54 (o), 2.09 (o)	30.5 t	2.54 (o), 2.08 (o)	30.5 t
22	1.94 (o), 1.56 (o)	32.4 t	1.94 (o), 1.56 (o)	32.4 t	1.95 (o), 1.56 (o)	32.4 t
23	1.19 (s)	28.1 q	1.28 (s)	28.2 q	1.25 (s)	28.1 q
24	1.06 (s)	16.7 q	1.15 (s)	16.8 q	1.09 (s)	16.7 q
25	0.78 (s)	16.4 q	0.83 (s)	16.5 q	0.83 (s)	16.5 q
26	1.26 (s)	18.6 q	1.27 (s)	18.6 q	1.27 (s)	18.6 q
27	1.52 (s)	19.8 q	1.54 (s)	19.8 q	1.53 (s)	19.8 q
28	3.52 (d, $J = 7.3$ Hz), 3.14 (s)	77.7 t	3.53 (d, $J = 7.3$ Hz), 3.15 (s)	77.7 t	3.53 (d, $J = 7.2$ Hz), 3.14 (s)	77.7 t
29	1.00 (s)	24.2 q	1.00 (s)	24.1 q	1.00 (s)	24.1 q
30	9.62 (s)	207.6 t	9.61 (s)	207.6 t	9.61 (s)	207.6 t
3- <i>O</i> -sugars chain						
Ara-1	4.77 (d, $J = 5.8$ Hz)	104.7 d	4.83 (d, $J = 5.2$ Hz)	104.6 d	4.79 (d, $J = 5.1$ Hz)	104.8 d
2	4.58 (o)	79.8 d	4.59 (o)	80.1 d	4.52 (o)	81.1 d
3	4.23 (o)	73.2 d	4.33 (o)	72.3 d	4.54 (o)	75.2 d
4	4.21 (o)	78.2 d	4.22 (o)	78.3 d	4.52 (o), 4.22 (o)	79.4 d
5	4.73 (o), 3.73 (o)	64.2 t	4.61 (o), 3.66 (o)	63.8 t	3.78 (o)	62.7 t
Glc-1	5.50 (d, $J = 8.0$ Hz)	104.9 d	5.37 (d, $J = 7.8$ Hz)	105.1 d	5.30 (d, $J = 7.5$ Hz)	106.2 d
2	4.09 (o)	76.4 d	4.05 (o)	76.1 d	4.08 (o)	76.5 d
3	4.27 (o)	78.3 d	4.30 (o)	78.0 d	4.26 (o)	78.3 d

续表 1

碳位	1		2		3	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
4	4.25 (o)	71.9 d	4.52 (o)	74.3 d	4.27 (o)	71.6 d
5	4.02 (o)	78.1 d	4.18 (o)	77.8 d	4.01 (o)	78.3 d
6	4.57 (o), 4.41 (o)	63.0 t	4.48 (o), 4.40 (o)	62.6 t	4.43 (o), 4.37 (o)	62.7 t
Glc'-1	4.93 (d, $J = 7.8$ Hz)	103.7 d	5.04 (o)	104.0 d	4.94 (d, $J = 7.7$ Hz)	104.5 d
2	3.81 (o)	85.3 d	3.97 (o)	85.3 d	3.87 (o)	85.0 d
3	4.05 (o)	71.7 d	4.20 (o)	77.5 d	4.19 (o)	77.6 d
4	4.47 (o)	74.3 d	4.23 (o)	71.0 d	4.15 (o)	71.8 d
5	4.11 (o)	77.5 d	3.78 (o)	78.4 d	3.78 (o)	78.4 d
6	4.49 (o), 4.39 (o)	62.8 t	4.40 (o), 4.32 (o)	62.3 t	4.43 (o), 4.31 (o)	62.3 t
Xyl-1	4.84 (d, $J = 7.3$ Hz)	107.8 d	5.02 (o)	107.7 d	4.84 (s)	107.6 d
2	4.01 (o)	76.2 d	4.04 (o)	76.0 d	4.02 (o)	76.0 d
3	4.04 (o)	77.8 d	4.07 (o)	77.8 d	4.01 (o)	78.4 d
4	4.12 (o)	70.8 d	4.14 (o)	70.7 d	4.19 (o)	70.9 d
5	4.60 (o), 3.78 (o)	67.5 t	4.55 (o), 3.70 (o)	67.5 t	4.55 (o), 3.70 (o)	67.5 t
Gal-1	5.49 (d, $J = 3.2$ Hz)	100.5 d	5.57 (d, $J = 3.7$ Hz)	100.9 d	5.80 (d, $J = 3.6$ Hz)	101.5 d
2	4.15 (o)	74.0 d	4.13 (o)	74.0 d	4.05 (o)	74.0 d
3	4.63 (o)	75.4 d	4.58 (o)	75.5 d	4.54 (o)	75.2 d
4	4.22 (o)	72.1 d	4.22 (o)	72.0 d	4.22 (o)	72.0 d
5	3.86 (o)	76.2 d	4.09 (o)	76.4 d	3.96 (o)	76.9 t
6	4.38 (o), 4.33 (o)	68.1 t	4.68 (o), 4.38 (o)	68.9 t	4.68 (o), 4.38 (o)	66.3 d

通过HSQC, HMBC和TOCSY 可以对碳信号和氢信号进行明确归属。

The carbon and proton signals were unambiguously assigned through HSQC, HMBC, and TOCSY

综上所述, 化合物 **1** 的结构被鉴定为西克拉明皂苷元 A-3 β -O- $\{\alpha$ -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-阿拉伯吡喃糖苷}。

化合物 **2**: 白色粉末 (甲醇), Libermann-Burchard 和 Molish 反应阳性, 提示该化合物与底物类似, 为三萜皂苷类化合物。HR-ESI-MS 给出 m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1 245.620 9, 计算值为 1 245.587 5, 确定分子式 $\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{O}_{27}$ 。 $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +21.4^\circ$ (c 0.3, MeOH), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 414, 2 924, 1 718, 1 045, IR 光谱显示化合物 **2** 中存在羟基 (3 414 cm^{-1})、醛基 (2 924、1 718 cm^{-1})、C-O (1 045 cm^{-1}) 等特征官能团信号峰。

比较化合物 **2** 和 **1** 的 1D-NMR 数据, 发现 2 个化合物苷元部分数据基本相同, 说明化合物 **2** 的苷元骨架未发生变化, 仍为西克拉明皂苷元 A。对比分析化合物 **2** 和 **1** 酸水解后气质测定结果、高分辨质谱数据以及糖端基质子信息可以确定化合物 **2** 的糖链部分糖的种类、数目、构型与化合物 **1** 相同,

即仍有 1 个 α -L-阿拉伯糖、2 个 β -D-葡萄糖、1 个 β -D-木糖和 1 个 α -D-半乳糖组成。2 个化合物的差异则是糖的连接顺序及位置不同。

在化合物 **2** 的 HMBC 谱中 δ 89.1 (C-3-aglycone) 与 4.83 (Ara-H-1), 80.1 (Ara-C-2) 与 5.37 (Glc-H-1), 78.3 (Ara-C-4) 与 5.04 (Glc'-H-1), 85.3 (Glc'-C-2) 与 5.02 (Xyl-H-1), 74.3 (Glc-C-4) 与 5.57 (Gal-H-1) 存在相关峰; 且 δ 75.5 (Gal-C-3) 与 5.57 (Gal-H-1)、 δ 74.0 (Gal-C-2) 与 4.58 (Gal-H-3) 也存在相关峰, 从而确定了 3 位糖链间的连接顺序为阿拉伯糖的 1 位与苷元的 3 位相连, 1 个葡萄糖的 1 位与阿拉伯糖的 2 位相连, 其 4 位又与半乳糖的 1 位相连, 另一个葡萄糖的 1 位与阿拉伯糖的 4 位相连, 其 2 位又与木糖的 1 位相连。

因此, 化合物 **2** 的结构被鉴定为西克拉明皂苷元 A-3 β -O- $\{\alpha$ -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-阿拉伯吡喃糖苷}。

化合物 **3**: 白色粉末 (甲醇), Libermann-Burchard 和 Molish 反应阳性, 提示该化合物与底物类似, 为三萜皂苷类化合物。HR-ESI-MS (正离子检测) 给出 m/z : $[M+Na]^+$ 1 245.591 7, 计算值为 1 245.587 5, 确定分子式 $C_{58}H_{94}O_{27}$ 。IR $\nu_{\max}^{KBr}$ (cm^{-1}): 3 425, 2 827, 1 714, 1 043, IR 光谱显示化合物 **3** 中存在羟基 ($3\ 425\ cm^{-1}$)、醛基 ($2\ 827$ 、 $1\ 714\ cm^{-1}$)、C-O ($1\ 043\ cm^{-1}$) 等特征官能团信号峰。将化合物 **3** 的 1D-NMR 数据与化合物 **1** 相比较, 发现其苷元部分数据基本相同, 仅是糖链部分存在差异。酸水解结合质谱数据分析该化合物也是连接 5 个糖, 且糖的种类、构型也与化合物 **1** 相同, 仅为连接位置不同。在 HMBC 谱中 $\delta\ 89.0$ (C-3-aglycone) 与 4.79 (Ara-H-1), 81.1 (C-2-Ara) 与 5.30 (H-1-terminal Glc), 79.4 (C-4-Ara) 与 4.94 (H-1-inner Glc), 85.0 (C-2-inner Glc) 与 4.84 (Xyl-H-1), 75.2 (Ara-C-3) 与 5.80 (Gal-H-1) 存在相关峰, 由此确定了化合物 **3** 的糖链连接顺序为阿拉伯糖的 1 位与苷元的 3 位相

连, 1 个葡萄糖的 1 位与阿拉伯糖的 2 位相连, 另一个葡萄糖的 1 位与阿拉伯糖的 4 位相连, 其 2 位又与木糖的 1 位相连, 半乳糖的 1 位与阿拉伯糖的 3 位相连。利用 HMBC 和 HSQC 谱对化合物 **3** 的数据进行全归属, 归属后的阿拉伯糖的 3 位的碳谱数据大幅度向低场位移, 进一步说明半乳糖的 1 位连接在阿拉伯糖的 3 位上。

因此, 化合物 **3** 鉴定为西克拉明皂苷元 A-3 β -O- $\{\beta$ -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- $[\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- $[\alpha$ -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]- α -L-阿拉伯吡喃糖基 $\}$ 。

3.2 细胞毒活性

研究结果如表 2 所示, 化合物 **1**~**3** 对 3 种肿瘤细胞均具有一定的细胞毒活性, 其中化合物 **1** 的抑制作用最为显著, 且对 NCI-H460 细胞的细胞毒作用优于底物; 化合物 **2** 的抑制作用略弱一些, 而化合物 **3** 仅对 MCF-7 和 SF-268 细胞体现一定的细胞毒活性。

表 2 3 个转化产物对不同肿瘤细胞的抑制活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 IC₅₀ value of three transformed products on different tumor cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

化合物	IC ₅₀ /(μ mol·L ⁻¹)		
	MCF-7	NCI-H460	SF-268
1	5.11 $\pm$ 0.53	10.23 $\pm$ 0.64	5.11 $\pm$ 0.47
2	10.23 $\pm$ 0.72	20.46 $\pm$ 0.57	10.23 $\pm$ 0.51
3	20.46 $\pm$ 0.95	>40.92	10.23 $\pm$ 0.59
百两金皂苷 A	4.72 $\pm$ 0.49	>23.58	2.36 $\pm$ 0.48
顺铂	1.27 $\pm$ 0.41	2.54 $\pm$ 0.62	0.64 $\pm$ 0.48

4 讨论

本实验首次利用燕麦曲霉对百两金皂苷 A 进行微生物转化研究, 分离并鉴定了 3 个转化产物, 依次为西克拉明皂苷元 A-3 β -O- $\{\alpha$ -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- $[\beta$ -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- $[\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-阿拉伯吡喃糖基 $\}$ (**1**)、西克拉明皂苷元 A-3 β -O- $\{\alpha$ -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $[\beta$ -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-阿拉伯吡喃糖基 $\}$ (**2**)、西克拉明皂苷元 A-3 β -O- $\{\beta$ -D-木吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- $[\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- $[\alpha$ -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 3)]- α -L-阿拉伯吡喃糖基 $\}$ (**3**)。这 3 个化合物是利用燕麦曲霉转化百两金皂苷 A 获得的增加糖链的新产物。

三萜类化合物发生糖苷化反应尤其是在原有糖链上增加糖基是较为困难的反应, 本研究中 3 个转化产物的获得表明燕麦曲霉可能含有 1 种或几种 α -D 型半乳糖糖苷化或糖基转移酶^[11], 可以在三萜皂苷 C-3 位糖链不同位置增加 α -D 型半乳糖。此外本实验利用 MTT 法测定了 3 种转化产物和底物的细胞毒活性, 结果显示化合物 **1** 的细胞毒活性最为显著, 而化合物 **2** 和 **3** 的作用略弱一些, 说明糖的连接位置对于细胞毒活性具有一定的影响。本研究结果为百两金皂苷 A 及其衍生物的综合利用研究提供依据。

参考文献

- [1] Ma L, Li W, Wang H, *et al.* A simple and rapid method to identify and quantitatively analyze triterpenoid saponins

(下转第 3614 页)

- 2018, 49(18): 42-50.
- [13] 袁源, 周伟, 付云飞, 等. 气相色谱-质谱联用法结合保留指数对高良姜挥发油成分的分析 [J]. 分析测试学报, 2016, 35(6): 692-697.
- [14] 梁文娟, 许洪波, 杨彩艳, 等. 玛咖化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23): 4531-4535.
- [15] 丁林芬, 郭亚东, 吴兴德, 等. 荷花玉兰化学成分的研究 [J]. 中成药, 2017, 39(12): 2534-2538.
- [16] 朱海滨, 王柱石, 杨义, 等. 添加香料植物材料和添加量对烘烤过程烤烟致香成分和感官质量的影响 [J]. 河南农业大学学报, 2017, 51(6): 747-754.
- [17] Saladino F, Quiles J M, Luciano F B, *et al.* Shelf life improvement of the loaf bread using allyl, phenyl and benzyl isothiocyanates against, *Aspergillus parasiticus* [J]. *LWT-Food Sci Tech*, 2017, 78: 208-214.
- [18] Giacomuzzi V, Mattheis J P, Basoalto E, *et al.* Survey of conspecific herbivore-induced volatiles from apple as possible attractants for, *Pandemis pyrusana*, (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. *Pest Management Sci*, 2017, 73(9): 1837-1845.
- [19] Silva R O, Sousa F B M, Damasceno S R B, *et al.* Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress [J]. *Fund Clin Pharmacol*, 2014, 28(4): 455-464.
- [20] Tańska M, Mikołajczak N, Konopka I. Comparison of the effect of sinapic and ferulic acids derivatives (4-vinylsyringol vs. 4-vinylguaiacol) as antioxidants of rapeseed, flaxseed, and extra virgin olive oils [J]. *Food Chem*, 2017, 240: 679-685.
- [21] 周丹丹, 王卓, 邢梦珂, 等. 植物精油抑制炭疽菌及对枇杷采后炭疽病与品质的影响 [J]. 食品科学, 2017, 38(19): 212-217.
- [22] Herrera H, Barros-Parada W, Flores M F, *et al.* Identification of a novel moth sex pheromone component from *Chilecomadia valdiviana* [J]. *J Chem Ecol*, 2016, 42(9): 908-918.
-
- (上接第3587页)
- in *Ardisia crenata* using ultrafast liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102(2015): 400-408.
- [2] 蔡佳仲, 胡英杰. 百两金皂苷类似物的化学与药理学研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(11): 1671-1679.
- [3] 魏少荫, 李敏, 刘岱琳, 等. 三萜皂苷混合物 ardisiacrispin (A+B) 对人白血病 HL-60 细胞的增殖抑制作用及机制探讨 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(5): 586-590.
- [4] Li M, Wei S Y, Xu B, *et al.* Pro-apoptotic and microtubule-disassembly effects of ardisiacrispin (A+B), triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* on human hepatoma Bel-7402 cells [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(8): 729-736.
- [5] 边宝林, 王素芬, 杨健, 等. 朱砂根及同属植物中三萜总皂甙及制备方法: 中国, CN1132841C [P]. 2000-10-18.
- [6] Dai L M, Huang Y Z, Zhang B, *et al.* Cytotoxic triterpenoid saponins from *Lysimachia foenum-graecum* [J]. *Phytochemistry*, 2017, 136: 165-174.
- [7] 隋玉辉, 刘岱琳, 邱峰, 等. 长柄链格孢对百两金皂苷的生物转化 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 990-993.
- [8] Zhang C X, Ma W J, Liu D L, *et al.* Biotransformation of ursolic acid by *Alternaria longipes* AS3.2875 [J]. *Nat Prod Res*, 2017, doi: 10.1080/14786419.2017.1327860.
- [9] Chaweewan J, Herbert B, Lennart K, *et al.* Ardisiacrispin A and B, two utero-contracting saponins from *Ardisia crispa* [J]. *Planta Med*, 1987, 53(5): 405-409.
- [10] Agrawal P K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(10): 3307-3330.
- [11] 杨宁, 杨世林, 赵余庆. 稀有人参皂苷糖苷化合成方法的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 574-582.