



总状共头霉CGMCC 3.2500对积雪草酸的生物转化

李慧, 王晶, 顾申勇

Microbial transformation of Asiatic acid by *Syncephalastrum racemosum* CGMCC 3.2500

LI Hui, WANG Jing, GU Shenyong

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202012005>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

HPLC法测定积雪草配方颗粒中羟基积雪草苷和积雪草苷含量

Determination of madecassoside and asiaticoside in *Centella asiatica* formula granules by HPLC method

药学实践杂志. 2017, 35(4): 359-361 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.018

6种医院制剂微生物限度检查方法适用性试验研究

Validation of microbial limit test for six hospital preparations

药学实践杂志. 2019, 37(6): 527-531 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.011

复方特比萘芬软膏微生物限度检查方法适用性试验研究

Validation of microbial limit test for compound terbinafine gel

药学实践杂志. 2019, 37(4): 357-360,369 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.014

深绿木霉D16生物菌肥对丹参生长和次生代谢的影响

Effects of fungal biofertilizer from *Trichoderma atroviride* D16 on the growth and secondary metabolism of *Salvia miltiorrhiza*

药学实践杂志. 2019, 37(3): 216-221 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.005

蜂斗菜总内酯对动物高原缺氧保护作用的研究

Protective effects of the total bakkenolides from *Petasites. tricholobus* on high altitude hypoxia

药学实践杂志. 2017, 35(2): 116-120,125 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.005

丙戊酸钠基因组学的研究进展

Research progress of valproic acid genomics

药学实践杂志. 2020, 38(1): 14-17,34 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201906018



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

总状共头霉 CGMCC 3.2500 对积雪草酸的生物转化

李 慧, 王 晶, 顾申勇 (复旦大学附属中山医院青浦分院药剂科, 上海 201700)

[摘要] 目的 积雪草酸是积雪草中的主要药用成分, 为乌苏烷型三萜化合物, 具有多种生物活性, 通过对其进行结构修饰, 以获得活性更好的积雪草酸类似物。方法 使用总状共头霉 CGMCC 3.2500 对积雪草酸进行生物转化, 通过高分辨质谱 (HR-ESI-MS)、核磁共振波谱 (包括 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^1H - ^{13}C HSQC、 ^1H - ^{13}C HMBC、 ^1H - ^1H NOESY) 鉴定其结构。结果 获得一个化合物, 最终确定化合物的结构为 2-氧-3 α , 15 α , 23-三羟基-12-烯-28-油酸, 该化合物为新化合物。结论 总状共头霉 CGMCC 3.2500 能够对积雪草酸进行结构修饰, 获得积雪草酸类似物。

[关键词] 积雪草酸; 生物转化; 总状共头霉

[中图分类号] R914

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)04-0336-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202012005

Microbial transformation of Asiatic acid by *Syncephalastrum racemosum* CGMCC 3.2500

LI Hui, WANG Jing, GU Shenyong (Department of Pharmacy, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China)

[Abstract] **Objective** Asiatic acid is the main medicinal component of aursane pentacyclic triterpene and possessed various biological activities. In order to obtain better active Asiatic acid analogues, microbial transformation was used for structural modification. **Methods** Asiatic acid was biotransformed by *Syncephalum racemosum* CGMCC 3.2500. The structure of the compound was identified by high resolution electrospray ionization mass spectroscopy (HR-ESI-MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (i.e., ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H NOESY). **Results** The structure of the compound was determined as 2-oxo-3 α , 15 α , 23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid which was a new compound. **Conclusion** *Syncephalum racemosum* CGMCC 3.2500 can modify the structure of Asiatic acid and obtain Asiatic acid analogues.

[Key words] asiatic acid; microbial transformation; *Syncephalastrum racemosum*

积雪草酸, 是一种乌苏烷型三萜化合物, 是积雪草中的主要药用成分, 具有保肝、抗肿瘤、改善认知、降血糖、抗炎、抗菌、护肤等药理作用^[1-2]。但是积雪草酸溶解度小, 口服生物利用度低, 较难通过血脑屏障, 使得积雪草酸的使用受到一定限制, 已有研究人员对积雪草酸进行了多种化学修饰, 获得了一系列不同特性的积雪草酸衍生物^[1-5]。由于积雪草酸结构的特殊性, 化学修饰位点较少, 生物修饰是对天然药物进行结构修饰的重要方法, 已有研究报道通过微生物对积雪草酸进行生物修饰^[6-8]。本实验通过总状共头霉 CGMCC 3.2500 对积雪草酸进行结构修饰, 采用高分辨质谱 (HR-ESI-

MS) 以及多种核磁共振 (NMR) 波谱: 氢谱 (^1H NMR)、碳谱 (^{13}C NMR)、 ^1H - ^{13}C 异核单量子相干谱 (^1H - ^{13}C HSQC)、 ^1H - ^{13}C 异核多键相关谱 (^1H - ^{13}C HMBC)、 ^1H - ^1H 核 Overhauser 效应谱 (^1H - ^1H NOESY) 等技术对其结构进行确证, 获得了一个新的化合物, 为积雪草酸的应用与开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

总状共头霉 CGMCC 3.2500 (中国普通微生物菌种保藏管理中心), 4 °C 斜面保藏。

1.1.2 培养基

马铃薯培养基 (PDA): 将 200 g 马铃薯去皮切块置于 1000 ml 蒸馏水中, 煮沸 1 h, 用纱布过滤, 加葡萄糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, 将滤液补足至 1.0 L, 分装, 121 °C、30 min 灭菌后, 将试管倾斜放置, 冷

[基金项目] 上海市青浦区卫健委资助项目 (W2018-02)

[作者简介] 李 慧, 硕士, 主管药师, 研究方向: 临床药学, Email: penguinhui@126.com

[通信作者] 顾申勇, 副主任药师, 研究方向: 临床药学, Email: gusy5555@163.com

凝后即得固体马铃薯培养基。液体培养基的制备不加琼脂,其余步骤同上。

1.1.3 试剂和仪器

DRX-600 光谱仪(德国 Rheinstetten 公司); Agilent 6538 VAD Accurate-Mass QTOF 液质联用系统(美国安捷伦); Agilent 1260 高效液相色谱仪(含 G1311C 1260 VL 型四元泵、G1316A 1260 柱温箱、G1315D 1260 VL 型全波长扫描检测器、G1364C 1260 FC-AS, 美国安捷伦), ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱; 氘代吡啶(剑桥同位素实验室); 积雪草酸(广西昌洲天然药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种的筛选

将已经恢复培养的菌种接种至无菌的 250 ml 三角瓶(装有 100 ml 液体培养基)中, 180 r/min、27 °C 下震荡培养 72 h 后取出, 每瓶加入 500 μ l 的积雪草酸乙醇溶液(4 mg/ml), 相同条件继续培养 10 d。设两组对照, 一组接种微生物后只加入等体积的乙醇溶液(无底物); 另一组加入等量的底物到空白培养基中, 在相同条件下培养。发酵完成后过滤菌丝体, 滤液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 菌丝体用 500 ml 乙酸乙酯超声提取 3 次, 每次 30 min, 合并乙酸乙酯萃取液及提取液, 在 60 °C 下真空浓缩至小体积, 薄层色谱法(TLC)比较实验组与空白组的显色斑点, 以氯仿/甲醇(9:1)为展开剂, 10% 的硫酸乙醇溶液显色。

1.2.2 扩大培养及产物分离

在 10 个 1000 ml 三角瓶中(每瓶装有 400 ml 培

养基)以 2% 的接种量接入已恢复培养的总状共头霉 CGMCC 3.2500 菌种, 置恒温振荡器中, 180 r/min、27 °C 培养 72 h 后加入 200.0 mg 底物积雪草酸(溶于 20 ml 乙醇, 每瓶加入 2 ml), 继续培养 10 d。发酵完成后过滤菌丝体, 滤液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 将乙酸乙酯萃取液置旋转蒸发仪上浓缩至小体积, 干燥, 分别获得转化反应提取物 0.4 g; 转化反应提取物经凝胶柱纯化后, 用半制备型高效液相色谱仪制备, 流动相: 甲醇/水/甲酸(60:40:0.05, V/V/V), 流速 3 ml/min, 检测波长: 210 nm, 得到化合物 **1**(10.5 mg, 转化率 5.25%)。

2 结果与分析

2.1 转化产物的结构鉴定

化合物 **1** 为白色固体粉末, 高分辨质谱显示出 [M-H]⁻ 分子离子峰 m/z 501.3240, 结合 ¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱推断确定分子式为 C₃₀H₄₆O₆。 ¹H NMR(600 MHz, pyridine-*d*₅) 中, 高场处有 6 组甲基氢信号 δ 1.47 (3H, s)、 δ 1.18 (3H, s)、 δ 1.03 (3H, d, 6.6)、 δ 0.98 (3H, s)、 δ 0.92 (3H, d, 6.0)、 δ 0.82 (3H, s); 低场处有一活泼氢信号: δ 5.61 (t, 3.6), 推测为双键上的氢。 ¹³C NMR 谱检测结果显示两个不饱和碳原子 δ 127.04 和 δ 140.86, 一个羧基碳原子 δ 180.36, 一个羰基碳原子 δ 213.29, 综合以上信息可以推断该化合物为乌苏烷型五环三萜酸类化合物。

依据 ¹H-¹³C HSQC 谱(图 1)、¹H-¹³C HMBC 谱(图 2)可以对该化合物的碳氢作进一步的归属。

与底物积雪草酸比较, 在 ¹³C NMR 谱中,

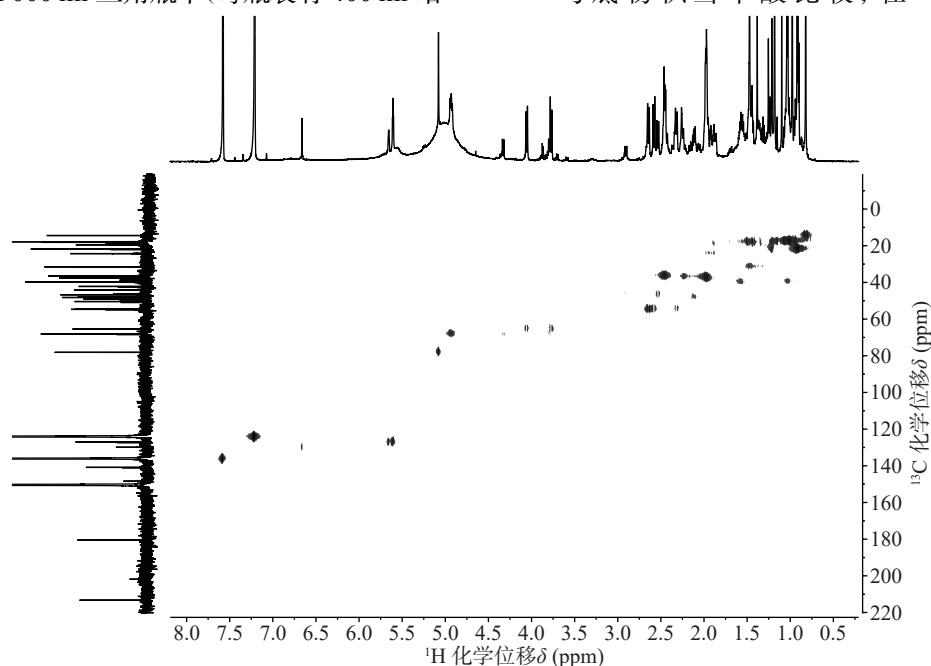


图 1 化合物 **1** 的 HSQC 谱图

213.29 ppm 出现一个羰基碳信号,该羰基碳与 H-1 (δ 2.58, d, 12.0)、H-3 (δ 5.08, s) 远程相关,说明 C-2 位的羟基被氧化成羰基。H-3 (δ 5.08, s) 和 C-3 (δ 78.14) 的化学位移未发生显著变化,但是在 ^1H - ^1H NOESY(图 3)中,可以观察到 H-3 (δ 5.08, s) 和 H-24 (δ 0.82) 之间的 NOE 效应,说明 3 位的羟基构型发生了变化,由 β 构型转变为 α 构型。

在 ^{13}C NMR 谱中, 68.12 ppm 处出现一个连氧碳信号,在 ^1H NMR 谱中, 4.93 ppm(1H, dd, $J=6.6, 9.6$ Hz) 出现一个氢原子信号,二者在 ^1H - ^{13}C HSQC

谱中可观察到相关信号。在 ^1H - ^{13}C HMBC 谱中,可观察到 H-27 (δ 1.47, s)、H-16 (δ 2.45, m) 和 δ 68.12 的相关信号,说明 15 位发生了羟基化反应。同时 H-15ax 与 H-16ax 的耦合常数为 9.6 Hz, 确定该羟基为 α 型。

具体的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据及归属见表 1。

综上,化合物 1 的结构确定为 2-氧-3 α ,15 α , 23-三羟基-12-烯-28-油酸(图 4)。经文献检索,未发现与该化合物结构相同的报道,确定该化合物为新化合物。

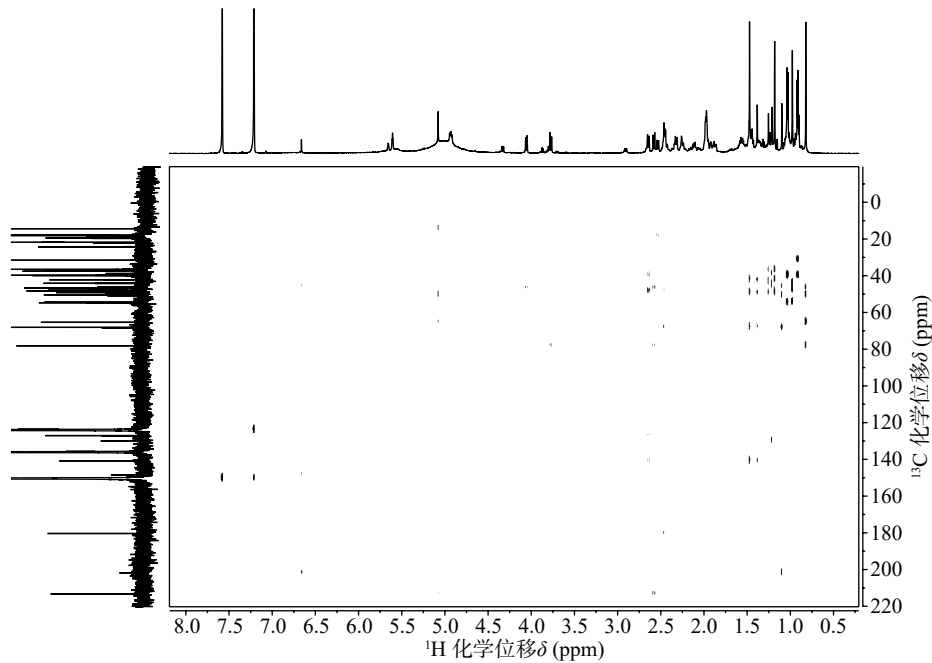


图 2 化合物 1 的 HMBC 谱图

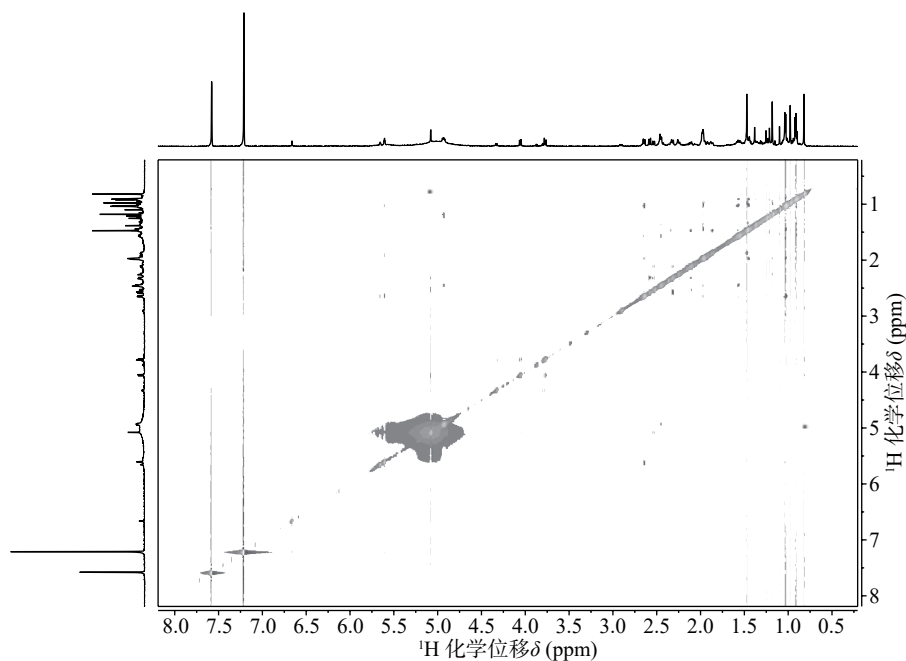


图 3 化合物 1 的 NOESY 图

表1 化合物1的NMR数据

位点	C	H	HMBC
1	54.41	2.58 (d, 12.0); 2.31 (o)	2, 3, 5, 10, 25
2	213.29	/	
3	78.14	5.08 (s)	2, 23, 24, 4
4	50.42	/	
5	46.73	2.53 (d, 10.8)	4, 10, 7, 25, 24
6	19.48	1.87 (m), 1.97 (m)	
7	36.52	2.46 (m); 2.33 (o)	
8	42.19	/	
9	48.22	2.12 (m)	1, 14, 8, 26
10	44.13	/	
11	24.29	1.92 (t, 4.2); 1.96 (m)	8, 9, 13, 12
12	127.04	5.61 (t, 3.6)	14
13	140.86	/	
14	49.18	/	
15	68.12	4.93 (dd, 9.6, 6.6)	
16	36.83	2.45 (m); 2.44 (m)	15, 18, 17, 28
17	47.89	/	
18	54.70	2.64 (d, 11.4)	28, 13, 12, 17, 19, 22, 29
19	39.92	1.57 (m)	
20	39.71	1.55 (m)	
21	31.49	1.44 (m); 1.38 (s)	
22	37.55	1.98 (m); 1.99 (m)	17, 20, 21, 28
23	65.38	4.06 (d, 11.4); 3.77 (d, 11.4)	3, 4, 5
24	14.43	0.82 (s)	3, 23, 4, 5
25	18.14	0.98 (s)	1, 5, 10
26	17.91	1.18 (s)	14, 8, 7
27	18.17	1.47 (s)	13, 15, 14, 8
28	180.36	/	
29	17.78	1.03 (d, 6.6)	19, 20
30	21.79	0.92 (d, 6.0)	20, 21

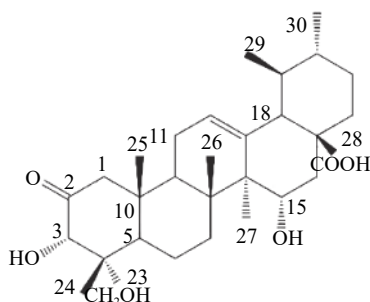


图4 2-氧-3 α ,15 α ,23-三羟基-12-烯-28-油酸结构式

3 讨论

积雪草酸是中药积雪草中的主要有效成分,具有多种生物活性^[9]。微生物转化具有专一性强、条件温和等优点^[10]。本研究通过总状共头霉 CGMCC 3.2500 对积雪草酸的生物转化,获得一个新化合物:2-氧-3 α 15 α ,23-三羟基-12-烯-28-油酸。从催化反应的位置看,2位的羟基发生氧化生成了羰基,3位的羟基的立体结构由 β 变成 α ,15位发生羟基化反应。这些结构的变化由化学反应很难实现,也体现了生物转化高度的位置选择性和立体选择性。化合物1的转化率为5.25%,需要进一步优化转化条件,以提高转化效率。

【参考文献】

- [1] 冯旭,郭飞飞,赵龙,等.积雪草酸药理作用及其结构修饰的研究进展[J].中草药,2014,45(07):1037-1042.
- [2] LV J W, SHARMA A, ZHANG T, et al. Pharmacological review on Asiatic acid and its derivatives: A potential compound[J]. SLAS Technol, 2018, 23(2): 111-127.
- [3] 赖俞瑾,王胜浩,曾苏.积雪草有效成分ADME的特性概述[J].中国现代应用药学,2013,30(7):805-808.
- [4] ZHANG L Y, CHEN J, GONG Y C, et al. Synthesis and biological evaluation of Asiatic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases[J]. Chem Biodivers, 2009, 6(6): 864-874.
- [5] ZHAO L X, PARK H G, JEW S S, et al. Modification of C11, C28, C2, 3, 23 or C2, 23, 28 functional groups on Asiatic acid and evaluation of hepatoprotective effects[J]. Bull Korean Chem Soc, 2007, 28(6): 970-976.
- [6] HE W N, DAI J G, YE M, et al. Microbial transformation of Asiatic acid by *Alternaria longipes*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12(9): 760-764.
- [7] GUO F F, FENG X, CHU Z Y, et al. Microbial transformation of Asiatic acid[J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15(1): 15-21.
- [8] HUANG F X, LIN X H, HE W N, et al. Two new oxidation products obtained from the biotransformation of Asiatic acid by the fungus *Fusarium avenaceum* AS 3.4594[J]. J Asian Nat Prod Res, 2012, 14(11): 1039-1045.
- [9] NAGOOR MEERAN M F, GOYAL S N, SUCHAL K, et al. Pharmacological properties, molecular mechanisms, and pharmaceutical development of Asiatic acid: a pentacyclic triterpenoid of therapeutic promise[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 892.
- [10] 王珊珊,胡萍,余少文.天然产物微生物转化的研究进展[J].中国新药杂志,2016,25(01):71-75.

[收稿日期] 2020-12-03 [修回日期] 2021-06-26

[本文编辑] 陈盛新