

# 红豆杉愈伤组织中紫杉烷类成分 sinenxan A 的微生物转化研究

占纪勋<sup>1,2</sup>, 钟建江<sup>2</sup>, 戴均贵<sup>1</sup>, 郭洪祝<sup>1</sup>, 朱蔚华<sup>3</sup>, 张元兴<sup>2</sup>, 果德安<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083; 2. 华东理工大学生物反应器工程重点实验室, 上海 200237; 3. 中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 目的 研究紫杉烷类化合物 sinenxan A 的微生物转化情况。方法 分别利用两株真菌(刺囊毛霉 AS 3.345 0、刺孢小克银汉霉 AS 3.340 0)和一株细菌(普通变形菌 AS 1.120 8)对 sinenxan A 进行生物转化。结果 得到 3 个转化产物, 分别为 10-去乙酰-sinenxan A1, 6 $\alpha$ -羟基-10-去乙酰 sinenxan A2, 9 $\alpha$ -羟基-10-去乙酰 sinenxan A3。结论 Sinenxan A 易被微生物转化, 10 位乙酰基化学性质比较活泼。

**关键词:** sinenxan A; 刺囊毛霉; 刺孢小克银汉霉; 普通变形菌; 微生物转化

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)07 - 0555 - 04

## Microbial transformation of sinenxan A, a rich constituent in callus cultures of *Taxus*

ZHAN Ji-xun<sup>1,2</sup>, ZHONG Jian-jiang<sup>2</sup>, DAI Jun-gui<sup>1</sup>, GUO Hong-zhu<sup>1</sup>, ZHU Wei-hua<sup>3</sup>, ZHANG Yuan-xing<sup>2</sup>, GUO De-an<sup>1\*</sup>

(1. The State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** **Aim** To study the microbial transformation of sinenxan A. **Methods** Choose two strains of Fungi (*Mucor spinosus* AS 3.345 0 and *Cunninghamella echinulata* AS 3.340 0) and a strain of bacterium (*Proteus vulgaris* AS 1.120 8) to transform the substrate. **Results** Three products were obtained and identified as 10-deacetylsinenxan A1, 6 $\alpha$ -hydroxy-10-deacetylsinenxan A2 and 9 $\alpha$ -hydroxy-10-deacetylsinenxan A3 respectively. **Conclusion** Sinenxan A is facile to be transformed by microorganisms, the 10-acetyl group of which is an active group.

**Key words:** sinenxan A; *Mucor spinosus*; *Cunninghamella echinulata*; *Proteus vulgaris*; microbial transformation

Sinenxans A, B 和 C 是从红豆杉植物愈伤组织培养物中分离得到的一类新的紫杉烷类化合物<sup>[1,2]</sup>, 虽然尚未发现该类化合物具有明显的生物活性, 但由于其具有与紫杉醇相似的基本母核结构(图 1), 而且含量(约占培养物干重的 2% ~ 3%)明显高于

其他的紫杉烷类化合物, 所以可望通过结构改造合成紫杉醇或其他具有药理活性的紫杉烷类化合物。Sinexan A 是其中含量最高的一个成分, 近年来利用生物<sup>[3-7]</sup>和化学的手段<sup>[8]</sup>对其进行了许多结构改造工作, 并衍生出许多新的产物。微生物转化就是利用微生物生长、代谢过程中产生的酶对底物进行结构修饰的一种化学反应。它具有选择性高、反应条件温和、副产物少及污染小等优点, 并已日渐成为天然产物结构修饰和寻找新的先导化合物的一个有效的工具。本文利用 3 种不同的微生物(包括两株

收稿日期: 2002-11-01

基金项目: “国家杰出青年基金(39925040)和教育部“跨世纪优秀人才基金”资助项目。

\* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 62091516, Fax: 86 - 10 - 62092700, E-mail: gda@bjmu.edu.cn

真菌和一株细菌)对 sinenxan A 的微生物转化进行了初步的研究。

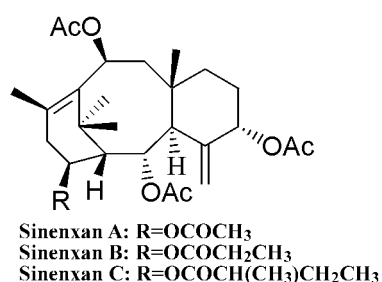


Figure 1 Structures of sinenxan A, B and C

### 材料与方法

**仪器** Varian INOVA-500 型核磁共振仪(TMS 为内标);Perkin Elmer QSTAR 质谱仪;ZD-8802 II 双层大容量振荡器(江苏太仓市科教器材厂);

**药品及试剂** 葡萄糖(分析纯);土豆(市售);牛肉膏、蛋白胨(北京双旋微生物培养基制品厂);氯化钠(分析纯,北京化学试剂公司);柱色谱硅胶 200~300 目、薄层色谱硅胶 G(青岛海洋化工厂,分析纯);乙酸乙酯、丙酮、石油醚(分析纯,北京化学试剂公司);Sinexan A(由中国医科院药物研究所朱蔚华研究员和华东理工大学钟建江教授提供)。

**微生物** 刺囊毛霉(*Mucor spinosus*) AS 3.345 0 刺孢小克银汉霉(*Cunninghamella echinulata*) AS 3.340 0 和普通变形菌(*Proteus vulgaris*) AS 1.120 8 均购自中

国科学院微生物研究所中国普通微生物菌种保藏管理中心。

**培养基** 土豆培养基(霉菌等真菌用);肉汤培养基(细菌用)<sup>[9]</sup>。

**微生物转化** 将真菌和细菌菌株分别接于 250 mL 小摇瓶中(装液量 50 mL),28 °C、一定转速下(真菌 150 r·min<sup>-1</sup>,细菌 200 r·min<sup>-1</sup>)培养,待生长较旺盛时,以 2% 的接种量再分别转接入 20 个 1 L 大三角瓶中(内装 250 mL 土豆培养基)。振荡培养 1 d 后,每个摇瓶中加入一定量的 20 g·L<sup>-1</sup> sinenxan A 丙酮溶液,相同条件下继续转化 4 d,将发酵液过滤,滤液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,菌丝体用适量的乙酸乙酯超声提取 30 min。合并两部分的乙酸乙酯提取液,旋转蒸发除去溶剂,得到转化物残渣。

**产物的分离及纯化** 将残渣溶于少量丙酮,与两倍的柱色谱硅胶(200~300 目)拌样,以一根 20 倍于样品量的硅胶柱分离,丙酮-石油醚(60~90 °C)(7:1)至纯丙酮梯度洗脱,收集流份。

### 结果

利用刺囊毛霉 *Mucor spinosus* AS 3.345 0、刺孢小克银汉霉 *Cunninghamella echinulata* AS 3.340 0 和普通变形菌 *Proteus vulgaris* AS 1.120 8 对 sinenxan A 进行生物转化,共得到 3 个产物,各菌转化情况见表 1。

Table 1 Biotransformation results of sinenxan A by three strains of microorganisms

Total substrate added/ mg	Biotransformation strains	Weight of crude extract/ mg	Products yield/ mg
200	<i>Mucor spinosus</i> AS 3.345 0	463	1 (107), 3 (26)
150	<i>Cunninghamella echinulata</i> AS 3.340 0	521	1 (63), 2 (31)
100	<i>Proteus vulgaris</i> AS 1.120 8	193	1 (66)

FABMS 在 *m/z* 485 处显示 1 个 [M+Na]<sup>+</sup> 的准分子离子峰,表明产物 20 a 的分子量为 462,比底物小 42,应为脱去 1 个乙酰基。其<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>CNMR 与底物 sinenxan A 相比,变化不大,但可以观察到<sup>1</sup>HNMR 谱中只有 7 个 CH<sub>3</sub> 信号,<sup>13</sup>CNMR 谱中也只有 3 个羰基碳信号,进一步证明有 1 个乙酰基被水解下来。<sup>1</sup>HNMR 谱中 10 位质子信号从原来的 δ 6.06 向高场移动到 δ 5.11,同时<sup>13</sup>CNMR 谱中 C-10 的位移从 δ 70.1 向高场移动到 δ 67.3,提示可能是 10 位乙酰基被水解变成羟基。与文献[3]值对照,确定化合物 1 为 10-去乙酰-sinenxan A,NMR 数据见表 2 和表 3。

化合物 2 的 TOFMS 在 *m/z* 501,517 处分别显示

[M+Na]<sup>+</sup> 和 [M+K]<sup>+</sup> 的准分子离子峰,表明该化合物分子量为 478,比产物 1 多 16,提示可能为 1 个羟基化产物。与底物对比同样发现<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>CNMR 中少了 1 个乙酰基的信号。DEPT 谱中发现新出现 1 个 δ 70.2 的 CH 信号,表明可能有 1 个 CH<sub>2</sub> 被羟基取代,与文献[3]的核磁数据对比,确定该产物为 6α-羟基-10-去乙酰 sinenxan A,其<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>CNMR 数据见表 2 和 3。

化合物 3 的 FABMS 在 *m/z* 501 处有 1 个 [M+Na]<sup>+</sup> 的准分子离子峰,提示其分子量为 478,比产物 1 多 16,提示也可能为 sinenxan A 脱掉 1 个乙酰基后再羟基化的产物。与产物 2 一样,<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>CNMR 中

**Table 2** <sup>1</sup>H NMR spectral data (500 MHz, δ<sub>H</sub>) of compounds 1 ~ 3 (CDCl<sub>3</sub>)

No.	10- deacetyl sinenxan A1	6 α-hydroxy-10- deacetyl-sinenxan A2	9 α-hydroxy-10- deacetyl-sinenxan A3
1	1.88(1 H,d, J = 2.5 Hz)	1.90(1 H,d, J = 2.0 Hz)	1.86(1 H,d, J = 2.1 Hz)
2	5.35(1 H,dd, J = 7.5,2.5 Hz)	5.36(1 H,dd, J = 6.0,2.0 Hz)	5.37(1 H,dd, J = 6.5,2.3 Hz)
3	2.92(1 H,d, J = 6.5 Hz)	2.95(1 H,d, J = 6.0 Hz)	2.93(1 H,d, J = 6.5 Hz)
5	5.28(1 H,t, J = 2.5 Hz)	5.04(1 H,br s)	5.31(1 H,br s)
6	1.78(1 H,m)	3.89(1 H,m)	1.75(1 H,m), 1.81(1 H,m)
7	1.21(1 H,m), 1.90(1 H,m)	1.48(1 H,d, J = 14.5 Hz), 1.98(1 H, dd, J = 14.5,4.5 Hz)	1.50(1 H,m), 1.77(1 H,m)
9	1.67(1 H,dd, J = 14.5,5.5 Hz), 2.35(1 H,m)	1.67(1 H,dd, J = 15.0,5.5 Hz), 2.39(1 H,m)	4.09(1 H,d, J = 9.6 Hz)
10	5.11(1 H,dd, J = 11.5,5.5 Hz)	5.06(1 H,dd, J = 12.0,6.0 Hz)	4.80(1 H,d, J = 9.5 Hz)
13	2.40(1 H,m), 2.80(1 H,dd, J = 18.5,9.5 Hz)	2.42(1 H,dd, J = 19.0,3.5 Hz), 2.80(1 H,dd, J = 19.0,9.0 Hz)	2.46(1 H,dd, J = 19.0,5.0 Hz), 2.82(1 H,dd, J = 9.5,8.5 Hz)
14	4.99(1 H,dd, J = 9.0,4.5 Hz)	5.01(1 H,dd, J = 9.5,5.5 Hz)	4.97(1 H,d, J = 6.5 Hz)
16	1.72(3 H,s)	1.72(3 H,s)	1.65(3 H,s)
17	1.18(3 H,s)	1.19(3 H,s)	1.20(3 H,s)
18	1.98(3 H,s)	2.20(3 H,s)	2.18(3 H,s)
19	0.84(3 H,s)	1.04(3 H,s)	1.03(3 H,s)
20	4.86(1 H,br s), 5.26(1 H,br s)	4.97(1 H,s), 5.41(1 H,s)	4.90(1 H,s), 5.31(1 H,s)
2-OAc	2.02(3 H,s)	2.02(3 H,s)	2.00(3 H,s)
4-OAc	2.05(3 H,s)	2.06(3 H,s)	2.02(3 H,s)
14-OAc	2.18(3 H,s)	1.94(3 H,s)	2.05(3 H,s)

**Table 3** <sup>13</sup>C NMR spectral data (125 MHz, δ<sub>C</sub>) of compounds 1 - 3 (CDCl<sub>3</sub>)

No.	10- deacetylsinenxan A1	6 α-hydroxy-10- deacetylsinenxan A2	9α-hydroxy-10- deacetylsinenxan A3
1	59.0 d	58.8 d	59.0 d
2	70.7 d	70.6 d	70.2 d
3	41.8 d	41.5 d	44.3 d
4	142.3 s	138.6 s	142.1 s
5	78.3 d	81.6 d	78.5 d
6	28.9 t	70.2 d	28.5 t
7	33.8 t	41.3 t	26.1 t
8	37.4 s	39.4 s	44.5 s
9	47.0 t	47.4 t	78.8 d
10	67.3 d	67.3 d	72.2 d
11	138.5 s	138.5 s	136.7 s
12	132.4 s	132.3 s	134.5 s
13	39.4 t	37.5 t	39.6 t
14	70.6 d	70.2 d	70.6 d
15	39.6 s	39.6 s	37.5 s
16	25.3 q	25.4 q	26.6 q
17	32.1 q	32.1 q	31.9 q
18	21.8 q	21.5 q	21.8 q
19	22.5 q	25.4 q	17.6 q
20	116.8 t	120.4 t	117.6 t
2-OAc	170.0 s, 21.4 q	170.1 s, 21.4 q	169.9 s, 21.3 q
4-OAc	170.0 s, 21.0 q	170.0 s, 21.4 q	169.9 s, 21.3 q
14-OAc	169.8 s, 21.4 q	169.5 s, 21.0 q	169.9 s, 21.3 q

δ 6.06的 dd 峰向高场移到 δ 4.79 且变成 d 峰,表明 10 位乙酰基被水解下来。同时峰形的变化表明 10-H 受邻位 1 个 H 的偶合,提示 9 位有 1 个 H 被羟基取代,相应地 9-H 信号也变成 δ 4.09 处的 1 个 d 峰,进一步表明该产物为 9-羟基-10-去乙酰-sinenxan A。与文献[6]对比,确定产物 3 为 9β-羟基-10-去乙酰-sinenxan A,该产物曾是 sinenxan A 植物细胞(如银杏悬浮细胞)的转化产物,但在微生物转化中还是首次得到,其<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C NMR 数据见表 2 和 3。

### 讨论

实验结果表明,刺囊毛霉 *Mucor spinosus* AS 3.345 0,刺孢小克银汉霉 *Cunninghamella echinulata* AS 3.340 0 和普通变形菌 *Proteus vulgaris* AS 1.120 8 对紫杉烷类化合物 sinenxan A 均有转化能力,得到 1 个共同的产物 1,说明 sinenxan A 的 10 位乙酰基是个很活泼的基团,极易被微生物酶解下来,得到 10-去乙酰-sinenxan A,这种活泼性可能与它的空间位阻比较小有关,同时也说明了不同的微生物体系中存在一些功能相同的酶。在产物 1 的基础上 *Cunninghamella echinulata* AS 3.340 0 和 *Mucor spinosus* AS 3.345 0 中的羟基化酶分别进行羟基化反应得到 6α-羟基-10-去乙酰 sinenxan A2, 9α-羟基-10-去乙酰 sinenxan A3,其反应式见图 2,这体现了不同种类的微生物有着各自独特的酶体系。微生物繁殖快,种

同样只能观察到 3 个乙酰基的信号,进一步证明也有 1 个乙酰基被水解。<sup>1</sup>H NMR 中 10-H 信号从

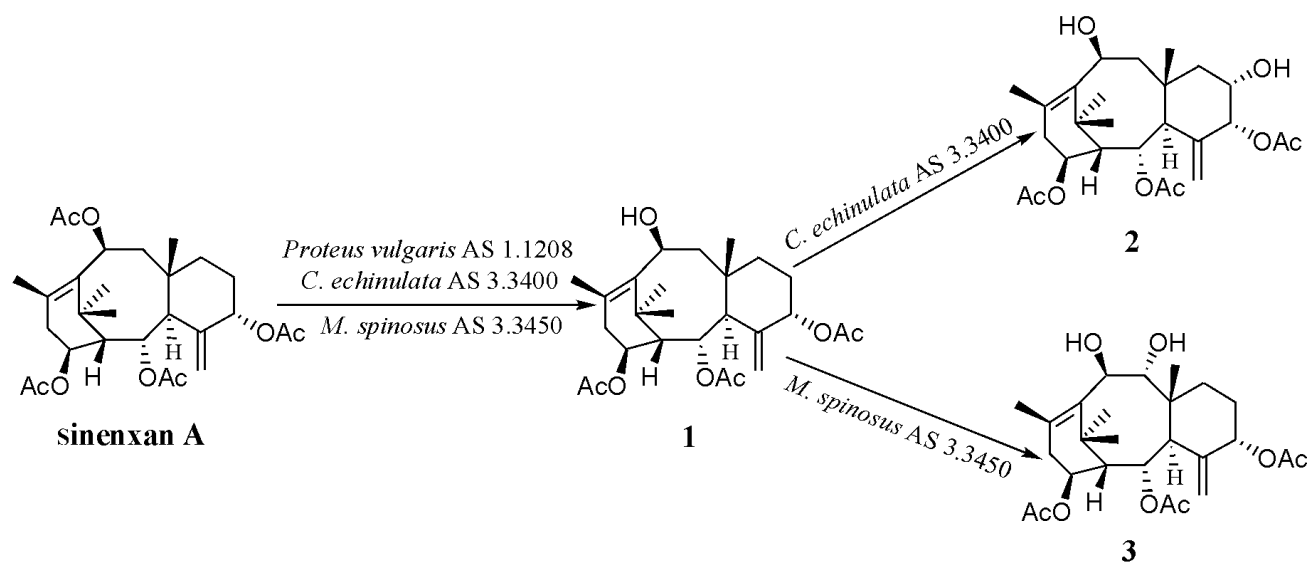


Figure 2 Microbial transformations of sinenxan A2

类多,根据不同种类微生物不同的酶体系可以对天然产物进行不同位点的修饰,从而得到更多的产物。

本实验首次利用细菌 *Proteus vulgaris* AS 1.1208 对紫杉烷类化合物 sinenxan A 进行微生物转化,选择性地对 10 位乙酰基水解,得到单一的产物 10-去乙酰-sinenxan A,得率达 66%; *Mucor spinosus* AS 3.3450 转化 sinenxan A 得到 9 $\alpha$ -羟基-10-去乙酰 sinenxan A,虽然该产物在利用植物细胞的生物转化中也得到过,但相比之下,微生物转化具有时间短、效率高、易工业化扩大等特点。因此微生物转化是对天然产物进行结构改造和进一步研究开发的一个可行方法。

#### References:

- [1] Cheng KD, Chen WM, Zhu WH, *et al.* Manufacture of taxane analogue by callus culture of *Taxus* plants [P]. WO: 9406, **740** (CI. C07035/37), 1994 - 3 - 31.
- [2] Wu YQ, Zhu WH, Lu J, *et al.* Selection and culture of high-yield sinenxans cell lines of *Taxus* spp. distributed in China [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1998, **33** (1): 15 - 18.
- [3] Hu S, Tian X, Zhu W, *et al.* Microbial transformation of

taxoids: selective deacetylation and hydroxylation of 2 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 14 $\beta$  tetra-4 (20), 11-taxadiene by the Fungus *Cunninghamella echinulata* [J]. *Tetrahedron*, 1996, **52** (26): 8739 - 8746.

- [4] Hu S, Tian X, Zhu W, *et al.* Biotransformation of 2 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 14 $\beta$  tetraacetoxy-4 (20), 11-taxadiene by the fungi *Cunninghamella elegans* and *Cunninghamella echinulata*. [J] *J Nat Prod*, 1996, **59**: 1006 - 1009.
- [5] Hu SH, Tian XF, Zhu WH, *et al.* Biotransformation of 2 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 14 $\beta$  tetra-acetoxy-4 (20), 11-taxadiene by the fungus *Cunninghamella echinulata* [J]. *Chin Chem Lett*, 1996, **7**: 543 - 544.
- [6] Dai J, Guo H, Lu D, *et al.* Biotransformation of 2 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 14 $\beta$  tetra-acetoxy-4(20), 11-taxadiene by *Ginkgo* cell suspension cultures. *Tetrahedron Lett* [J], 2001, **42**: 4677 - 4679.
- [7] Dai J, Ye M, Guo H, *et al.* Regio and stereo selective biotransformation of 2 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 14 $\beta$  tetra-acetoxy-4(20), 11-taxadiene by ginkgo cell suspension cultures, *Tetrahedron*, 2002, **58**: 5659 - 5668.
- [8] Zhang M, Yin DL, Guo JY, *et al.* Entry into major groups retaining taxol *via* sinenxan A. *Chin Chem Lett* [J], 2002, **13**(2): 135 - 138.
- [9] Du LX. *Experimental Techniques in Industrial Microbiology* (工业微生物学实验技术) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1992. 273 - 275.