

异紫杉脂素的酶法糖基化

杨亚波, 王^①, 梁 研, 梁敬钰¹

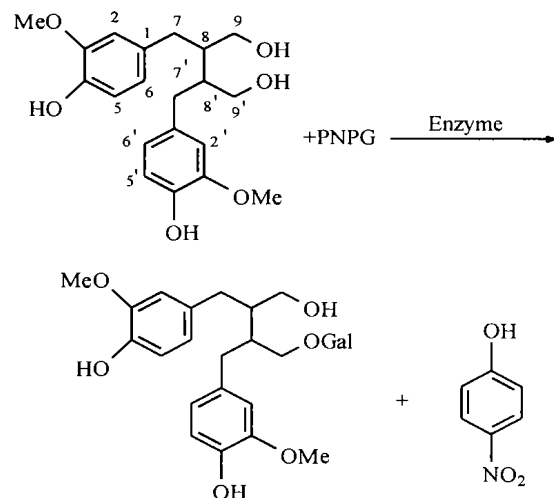
(中国药科大学生物制药学院; ¹ 中药学院, 南京 210009)

摘 要 目的 以异紫杉脂素为例, 探索酶法糖基化的可行性, 为其他具有重要生理活性的天然化合物提供可行的生物转化方法。方法 利用半乳糖苷酶转糖基活性对异紫杉脂素进行了糖基化修饰。结果 通过薄层层析、质谱、红外光谱、¹H NMR、¹³C NMR 数据显示产物即是异紫杉脂素半乳糖苷。结论 *E. coli* 和脆壁酵母来源的 β -半乳糖苷酶可以对异紫杉脂素进行糖基化修饰。

关键词 异紫杉脂素; 半乳糖苷酶; 糖基化

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)06-0526-03

木脂素类化合物具有广泛的生物活性, 如抗肿瘤、抗病毒、抗有丝分裂等^[1]。异紫杉脂素(Isotaxiresinol)是存在于红豆杉中的一类木脂素。本文以异紫杉脂素为例进行酶法糖基化研究, 为今后其他重要天然化合物(如紫杉醇)的糖基化提供可行的方法。酶法糖基化条件温和, 操作简便, 是改善化合物(药物)的水溶性、口感、甜度等非常有效的手段。因此, 对进行糖基化结构修饰后的化合物的理化性质、药效、构效关系及毒副作用的研究十分必要。糖基化反应式如下。



1 实验材料

1.1 药品与试剂

异紫杉脂素(中国药科大学梁敬钰教授提供); 脆壁酵母乳糖酶(由中国药科大学谭树华老师提供); 大肠杆菌 β -半乳糖苷酶为 Amresco 进口分装; PNPG (*p*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside) 为 BBI 进口分装; 硅胶 G F₂₅₄ 高效薄层板(烟台化工研究所), 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

岛津 LC-10AT 高效液相仪, 岛津 CS-930 双波长扫描仪, Agilent 1100 LC/MSD 质谱仪, Nicolet Impact 410 型红外光谱仪, AV-300 Bruker 型核磁共振仪。

2 实验方法

2.1 异紫杉脂素的糖基化反应

称取异紫杉脂素 2 mg, PNPG 6 mg, 加入磷酸缓冲液 (PBS) 320 μ l, 乙腈 80 μ l, 振摇溶解后, 加入 β -巯基乙醇 3.0 μ l, 混匀, 加入乳糖酶 20 μ l, 在 28~29 $^{\circ}$ C 下搅拌反应约 2.5 h。加入 1 倍体积 0.2 mol/L K₂CO₃ 溶液, 于 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮沸 10 min 停止反应。

2.2 薄层层析检定产物

将上反应液离心取上清 2, 4, 6, 8, 10 μ l 依次点样于硅胶 G F₂₅₄ 薄层板上, 置于二氯甲烷-甲醇 (19:5) 展开液中展开, 取出吹干, 于 254 nm 紫外灯下检测。喷 5% FeCl₃ 溶液或香草醛浓硫酸溶液, 烘干, 可见光下检测。

2.3 HPLC鉴定产物

分别取异紫杉脂素、PNPG标准液,酶液及反应液4个样品在以下条件进样分析:

- 岛津 LC-10AT高效液相色谱仪;
- 岛津 SPD-10A紫外检测器;
- 汉邦 C₁₈柱 (200 mm× 4.6 mm);
- 检测波长: 220 nm;
- 流动相: 乙腈-水 (20: 80, v/v);
- 流速: 0.8 ml/min;
- 柱温: 35℃。

2.4 转化率测定

取未经离心的反应液 20μl,于薄层板上点样,展开,取出吹干,在岛津 CS-930双波长扫描仪上进行扫描。测定波长 λ_s= 288 nm,参比波长 λ_r= 360 nm

2.5 产物的制备、分离与纯化

称取异紫杉脂素 100 mg, PNPG 300 mg,加入 PBS 16 ml,乙腈 4 ml,溶解后,再加入 β 巯基乙醇 150 μl,混匀后加入乳糖酶液 1 ml,在 28~ 29℃ 下搅拌反应约 5 h,于 100℃沸水中煮沸 10 min 停止反应。离心取上清,条状点样于 1 mm 厚的自制 GF₂₅₄硅胶板上,19: 5的二氯甲烷-甲醇中展开,取出吹干,紫外灯下标出产物的位置,剥下硅胶,丙酮洗脱,抽滤,旋转蒸干,重复二次。用少量甲醇溶解后,取少量点样,检测分离情况

2.6 仪器分析

分子量在 Agilent 1100 LC/MSD质谱仪上测定,样品用甲醇溶解。红外光谱数据在 Nicolet Impact 410型红外光谱仪 (KBr压片)上测定。核磁共振光谱数据用 AV-300 Bruker型核磁共振仪测定,样品用氘代甲醇溶解, TMS为内标

3 实验结果

3.1 薄层层析鉴定结果

薄层板展开后,紫外灯下在 R 值小于异紫杉脂素和 PNPG 的地方能明显看到新斑点。喷上 5% FeCl₃ 溶液后烘干,异紫杉脂素与新斑点显蓝紫色,其它斑点不显色。喷上香草醛浓硫酸溶液后烘干,异紫杉脂素呈紫红色,新斑点呈深棕色,其它斑点为棕黄色。在不存在酶或 PNPG 的情况下不出现该斑点。证明的确有产物生成。图 1 为喷过香草醛浓硫酸溶液的薄层图谱

3.2 HPLC的分析结果

从图 2 可看到产物峰存在 t= 4.80 min 处为产物峰, t= 4.46 min 处为酶液中的甘油峰,依次向右的三个峰分别为 PNPG 杂质、异紫杉脂素峰

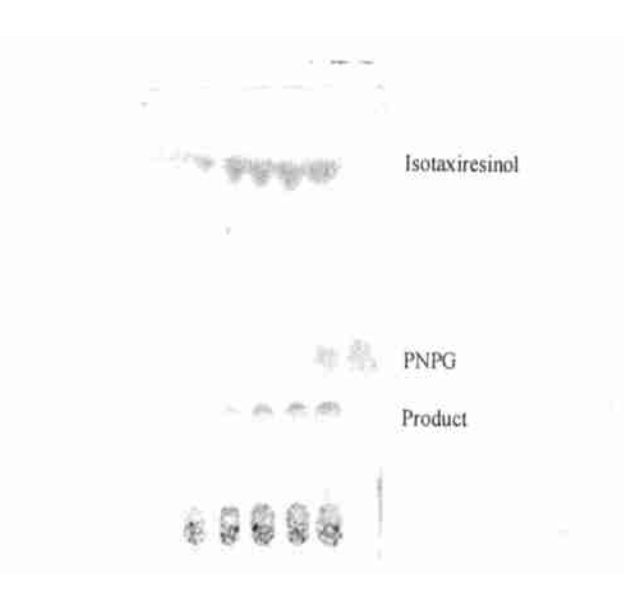


Fig 1. TLC of the reaction mixture of glycosylation of isotaxiresinol

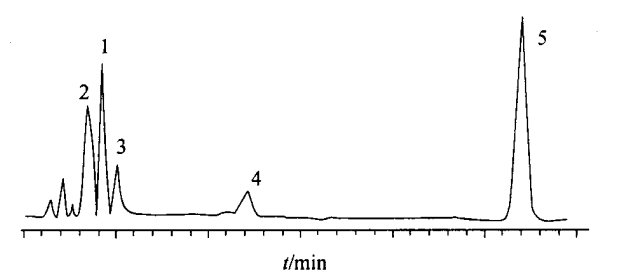


Fig 2. HPLC of the reaction mixture of glycosylation of isotaxiresinol
1. product; 2. glycerin; 3. PNPG; 4. impurity; 5. isotaxiresinol

3.3 转化率

扫描后经归一法计算得转化率为 11.9%。

3.4 仪器分析结果

EIS-MS 给出产物分子离子峰为 [M+ Cl]⁻ 559.2, [M+ Na]⁺ 547.5 IR (KBr 片) cm⁻¹: 3800-3000 (OH), 2930.9 (甲氧基), 3033, 1612, 1516, 870 (苯环), 1452, 544 (脂链), 1366 (酚羟基面内弯曲振动) 1272-1035 (碳氧振动), 其中 1153-1035 为糖上的碳氧振动。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据见表 1 (由于异紫杉脂素为 1 型对称结构木脂素, 所以表 1 中其对称部分数据省略)。氢谱中的 δ4.15 (J= 7.8) 为糖端基质子信号, 从碳谱中 δ103.83 可看出化合物的

Tab 1. ¹H, ¹³C-NMR spectra of the product

Pos.	¹ H	¹ H	¹³ C	¹³ C
1			132.498	132.591
2	6.57 d(2)	6.57 d(2)	112.009	112.228
3			147.390	147.390
4			144.013	143.999
5	6.66 d(8)	6.66 d(8)	114.385	114.387
6	6.54 dd(8, 2)	6.55 dd(8, 2)	121.311	121.412
7	2.61 br. dd	2.65 br. dd	34.642	34.240
8 α	1.90 m	2.14 m	42.693	42.616
9 α	3.61br. s	3.61br. s	60.721	61.369
9b	3.55br. s	3.55br. s		
1'				132.591
2'		6.57 d(2)		112.228
3'				147.390
4'				143.999
5'		6.66 d(8)		114.387
6'		6.55 dd(8, 2)		121.412
7 α		2.84 br. dd		34.194
8 β		2.16m		40.231
9'a		3.64br. s		69.022
9'b		3.56br. s		
OMe	3.72s	3.74s	54.815	54.920
Sugar moiety				
1''		4.15d(7.8)		103.831
2''		3.47dd		71.221
3''		3.51dd		73.676
4''		3.83d		68.883
5''		3.54-3.58m		75.218
6''		3.54-3.58m		61.064

^a NMR data of isotaxiresinol in same conditions

中存在 β 构型的糖苷键。产物 C-9 的碳谱数据相对于未经修饰的异紫杉脂素向低场移动了约 8, C-8 数据则降低了约 2.5, 由此可以确定半乳糖基连接在 C-9 端的羟基上。红外光谱中也可看到糖的羟基和碳氧振动信号。由这些信号可以推出异紫杉脂素被成功地

进行了半乳糖苷化。

4 讨 论

中草药中存在许多有效成分,其中一部分水溶性或稳定性不好或毒副作用太强,影响了它们的应用。因此,对这些化合物进行结构改造是非常必要的。目前,化合物的糖基化修饰越来越受到重视,这方面的研究报道有脂溶性维生素、核黄素^[2]、环糊精^[3]等。研究发现从大肠杆菌和酵母来源的 β -半乳糖苷酶都能对异紫杉脂素进行糖基化修饰,说明这一类结构的化合物可以用此酶进行水溶性结构改造。

本文工作成功对异紫杉脂素进行了修饰,极大地提高了它的水溶性,有关转糖基化条件的优化及其它性质研究将另文发表

参 考 文 献

[1] 俞培忠 (Yu PZ),王丽萍 (Wang LP),陈泽乃 (Chen ZN).木脂素研究的新进展 [J]. 国外医药植物药分册 (World Notes Plant Med), 1996, 6(1): 4-8.

[2] Yukio Suzuki, Kei Uchida. Enzymatic formation of a new derivative of thiamin, β -galactosylthiamin [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(7): 1273-1276.

[3] Kenichi Hamayasu, Koji Hara, Koji Fujita, et al. Enzymatic synthesis of mannosyl cyclodextrin by α -mannosidase from Jack bean [J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(5): 825-829.

Transgalactosylation of Isotaxiresinol by β -Galactosidase

YANG Ya-Bo, WANG Min, LIANG Yan, LIANG Jing-Yu¹

School of Bio-Pharmaceutics; ¹ School of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

ABSTRACT **AIM** To take isotaxiresinol as an example for establishing a method of glycosylation of other important natural products, such as taxol. **METHODS** Using glycosyl transfer activity of β -galactosidase to synthesize galactosyl-isotaxiresinol with pNPG or lactose as sugar donor. **RESULTS** TLC, EIS-MS, FT-IR, HPLC, ¹H- and ¹³C-NMR spectra proved the modification results and the products was galactosylisotaxiresinol. **CONCLUSION** β -Galactosidase from *E. coli* and Yeast *Kluyveromyces Fragilis* could transfer the galactosyl moiety of the donor to isotaxiresinol, and it preferred aliphatic chain hydroxyl group to phenol hydroxyl group.

KEY WORDS Isotaxiresinol; Transgalactosylation; β -Galactosidase