

# 异紫杉脂素的酶法糖基化

杨亚波, 王<sup>①</sup>, 梁研, 梁敬钰<sup>1</sup>

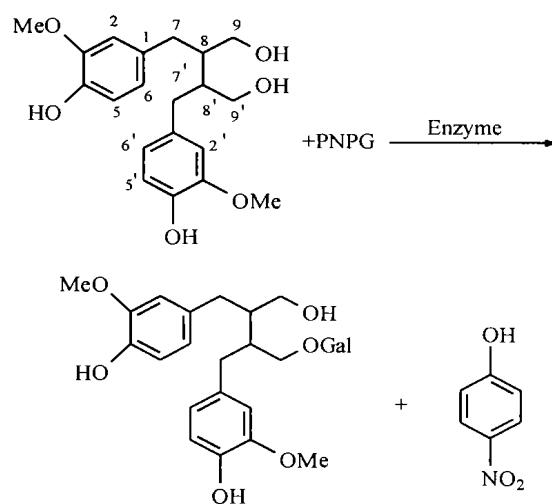
(中国药科大学生物制药学院; <sup>1</sup>中药学院, 南京 210009)

**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、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR数据结果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<sup>[1]</sup>。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GF<sub>254</sub>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 Brucker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 μl, 乙腈80 μl, 振摇溶解后, 加入β-巯基乙醇3.0 μl, 混匀, 加入乳糖酶20 μl, 在28~29℃下搅拌反应约2.5 h, 加入1倍体积0.2 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液, 于100℃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 μl依次点样于硅胶GF<sub>254</sub>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%FeCl<sub>3</sub>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、PN PG 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 C<sub>18</sub>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 20 μl,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  $\lambda_s = 288$  nm, 参比波长  $\lambda_r = 360$  nm

### 2.5 产物的制备、分离与纯化

称取异紫杉脂素 100 mg, PN PG 300 mg, 加入 PBS 16 ml, 乙腈 4 ml, 溶解后, 再加入  $\beta$ -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 GF<sub>254</sub> 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 Brucker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 PN PG 的地方能明显看到新斑点。喷上 5% FeCl<sub>3</sub> 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 PN PG 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 PN PG 杂质 异紫杉脂素峰。

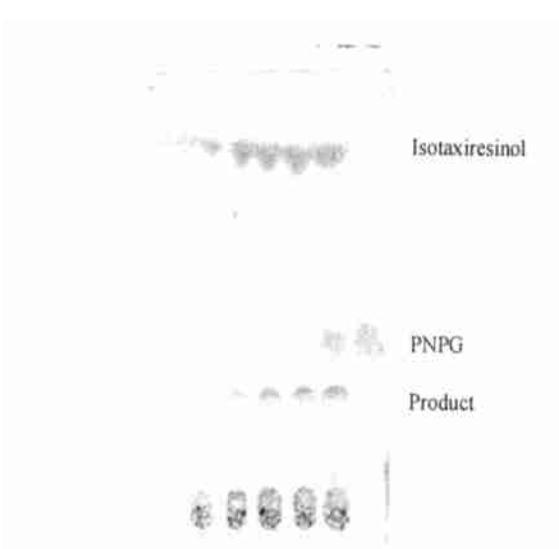


Fig. 1. TLC of the reaction mixture of glycosylation of isotaxiresinol

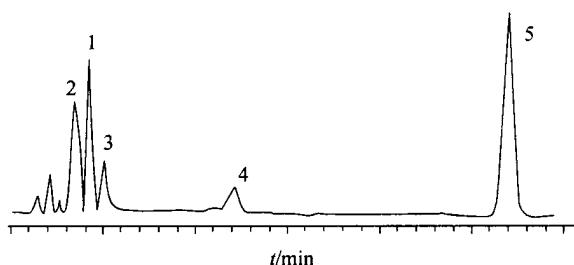


Fig. 2. HPLC of the reaction mixture of glycosylation of iso taxiresinol  
1. product; 2. glycerin; 3. PN PG; 4. impurity; 5. isotaxiresinol

### 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]<sup>+</sup> 559.2, [M+Na]<sup>+</sup> 547.5 IR(KBr 片) cm<sup>-1</sup>: 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。<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-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 δ 4.15 (J=7.8) 为糖端基质子信号, 从碳谱中 δ 103.83 可看出化合物

Tab 1.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the product

Pos.	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}$
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 $\alpha$	1.90 m	2.14 m	42.693	42.616
9 $a$	3.61br. s	3.61br. s	60.721	61.369
9 $b$	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 $\alpha$		2.84 br. dd	34.194	
8 $\beta$		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	

<sup>a</sup> NMR data of isotaxiresinol in same conditions

中存在  $\beta$  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<sup>[2]</sup>、环糊精<sup>[3]</sup>等。研究发现从大肠杆菌和酵母来源的  $\beta$ -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,  $\beta$ -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  $\alpha$ -mannosidase from Jack bean [J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(5): 825-829.

## Transgalactosylation of Isotaxiresinol by $\beta$ -Galactosidase

YANG Ya-Bo, WANG Min, LIANG Yan, LIANG Jing-Yu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Bio-Pharmaceutics; <sup>1</sup> 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  $\beta$ -galactosidase to synthesize galactosyl-isotaxiresinol with pNPG or lactose as sugar donor. **RESULTS** TLC, EIS-MS, FT-IR, HPLC,  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra proved the modification results and the products was galactosylisotaxiresinol. **CONCLUSION**  $\beta$ -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** Iso taxiresinol; Transgalactosylation;  $\beta$ -Galactosidase