

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 國科會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 92-2320-B-038-040

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：林淑娟 台北醫學大學藥學系

共同主持人：楊禮明 國立中國醫藥研究所

### 一、中文摘要

利用 *Nocardia* sp. 進行微生物轉換 andrographolide (穿心蓮內酯) 可將 acetyl group 引入 19-、3- 以及 3,19- 的位置 (2-4)；此外也得到一新的 hydroxylated 化合物 *ent*-(14*R*)-3 $\alpha$ ,14,15,19-tetrahydroxy-labda-8(20),12*E*-dien-16-oic acid-15-lactone (5)，這是第一次發現 *Nocardia* sp. 具 acetylation 及 hydroxylation 的作用。此外受質以化學合成方式進行乙醯化反應可得到代謝物 2 和 4。將 4 結構中的 14-OH 進行化學修飾得到 andrographolide 3,14,19-*O*-triacetate (6)、andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-propionate (7)、andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-butyrate (8)、andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-valerate (9)、andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-isovalerate (10)、andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-*trans*-cinnamate (11) 以及 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide 3,19-*O*-diacetate (12)。經過 DPPH 和 superoxide anion 清除實驗，化合物 12 具抗氧化的活性，這些 andrographolide 類似物將繼續進行其它生物活性試驗及作為代謝相關研究之標準品。

**關鍵詞：**穿心蓮內酯、抗氧化、微生物轉換、*Nocardia* sp.

### Abstract

Utilizing *Nocardia* sp. to preparative-scale microbial transformation of andrographolide, the acetyl group is introduced into 19-, 3-, and 3,19- positions (2-4). A new hydroxylated compound, *ent*-(14*R*)-3 $\alpha$ ,14,15,19-tetrahydroxy-labda-8(20),12*E*-dien-16-oic acid-15-lactone (5) is also obtained. This is the first report that *Nocardia* sp. could proceed acetylation and hydroxylation. In addition, chemical acetylation of

andrographolide yielded metabolites 2 and 4. In order to prepare more andrographolide analogues for biological evaluation, chemical modification of 14-OH of 4 was carried out. Thus, andrographolide 3,14,19-*O*-tri-acetate (6), andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-propionate (7), andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-butyrate (8), andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-valerate (9), andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-isovalerate (10), andrographolide 3,19-*O*-diacetyl-14-*O*-*trans*-cinnamate (11) and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide 3,19-*O*-diacetate (12) were obtained. By DPPH and superoxide anion scavenging testings, the results indicate that compound 12, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide 3,19-*O*-diacetate, displaces the antioxidant activity. These analogues will be tested for other biological activities, and used as reference standards for monitoring our continuing studies on the mammalian metabolism of andrographolide.

**Keywords:** andrographolide, antioxidant, microbial transformation, *Nocardia* sp.

### 二、緣由與目的

利用微生物及其所含酵素於 biocatalyst 的研究已有很長歷史。早在 1878 年時，Pasteur 利用微生物將植物的醣轉變成 ethanol<sup>1</sup>；於 1896 年 Bertrand 利用 *Acetobacter xylinum* 氧化一系列 polyhydric alcohols<sup>2</sup>；一年後 Büchner 利用酵母菌的 cell-free extracts 進行酒精發酵，探討醣酵解 (glycolysis) 的作用機制，發現酶的存在，因而找到微生物轉換的重要關鍵<sup>3</sup>。之後於 1952 年，Peterson 和 Murray 利用 *Rhizopus arrhizus* 將羥基引入 progesterone 的 11 $\alpha$  位置，得到 11 $\alpha$ -hydroxy progesterone，作為

合成 cortisone 的原料藥<sup>4</sup>。漸漸地，人類發現微生物轉換具有高的化學選擇性包括 regioselectivity<sup>5</sup>、diastereoselectivity 及 enantioselectivity<sup>6,7</sup>，這些反應特性一直是實驗室化學合成的困擾。近年來更有人提出利用微生物的酵素來進行化學反應，例如具立體選擇性的鹵化反應<sup>8</sup>。利用微生物酵素系統進行反應，除了具有高立體選擇性以外，還包括許多的優勢，如反應效率高、可被環境接受、不易造成化學物品污染、反應條件溫和，以及可在同一個容器中進行一系列的反應等，因此目前微生物轉換已用於修飾各種有機化合物，例如類<sup>9</sup>、生物鹼<sup>10</sup>、類固醇以及抗生素等<sup>11-13</sup>。

穿心蓮內酯 (1) (andrographolide, *ent*-(14*R*)-3 $\beta$ ,14,15,19-tetrahydroxy-labda-8(20),12*E*-dien-16-oic acid-15-lactone) 存於穿心蓮 *Andrographis paniculata* Nees，屬於 labdane 結構的二萜類 (diterpenes)，具有多種生物活性，包括解熱及抗菌<sup>14</sup>、抗病毒<sup>15-20</sup>、抗發炎<sup>21,22</sup>、免疫調節<sup>23</sup>、抗腫瘤<sup>24</sup>、抗心血管疾病<sup>25,26</sup>、抗生育<sup>27,28</sup>、保肝利膽<sup>29</sup>及降血糖作用<sup>30,31</sup>。由於穿心蓮內酯屬於 labdane diterpene，具有一個五環內酯 (lactone) 及一組  $\alpha\beta$ -不飽和雙鍵，因此對於其衍生物的製備皆以多個化學步驟，在 3-, 14-及 19-OH，以及 C-7 引入不同的官能基，或是將 C-8,20 的雙鍵反應成 epoxide，進行抗癌的研究。此外對於其代謝途徑和代謝物的研究目前只有 Xiangjiu He 等人餵食大白鼠，取得六個代謝物<sup>32,33</sup>。由於穿心蓮內酯具有相當多的藥理活性，目前並無人提出此化合物的毒性，且二萜類的化合物具有多個 chiral center，若要完全採用化學合成的方式進行衍生物合成，實有其困難性，加上文獻上並未有穿心蓮內酯之微生物轉換的研究，因此，本研究以此為受質進行微生物轉換，以期能發現新化合物；此外也將進行化學修飾，得到 andrographolide 類似物，以進行藥理活性之探討。

### 三、 結果與討論

#### A) Andrographolide 之微生物轉換

運用 *Nocardia* sp.，以穿心蓮內酯作為受質進行微生物轉換實驗，得到四個代謝物 (Figure 1)，分別為 andrographolide 19-*O*-

acetate (2)、andrographolide 3-*O*-acetate (3)、andrographolide 3,19-*O*-diacetate (4) 及 *ent*-(14*R*)-3 $\alpha$ ,14,15,19-tetrahydroxy-labda-8(20),12-dien-16-oic acid-15-lactone (5)。化合物 2 經純化，利用乙醇再結晶得無色柱狀結晶，熔點 175-176 °C，HREIMS  $m/z$  392.2197 [M]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>, 392.2199)，確定分子式為 C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>；化合物 3 經純化得到無晶形白色粉狀，HREIMS [M]<sup>+</sup>  $m/z$  392.2210 (calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>, 392.2199)；化合物 4 經純化，利用乙醇再結晶得到無色針狀結晶，熔點 225-226 °C，HREIMS [M]<sup>+</sup>  $m/z$  434.2310 (calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>, 434.2305)，確定分子式為 C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>；運用 1D- [<sup>1</sup>H- 及 <sup>13</sup>C-NMR (Table 1 and 2)] 及 2D NMR (HMBC 及 HMQC) 決定代謝物 2、3 及 4 的結構。

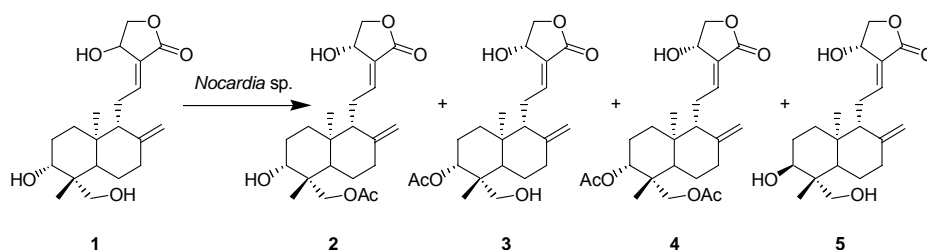
化合物 5 經純化得到白色粉狀，HREIMS [M]<sup>+</sup>  $m/z$  350.2088 (calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>, 350.2093)，確定分子式為 C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>。NMR 圖譜和受質比較，於 <sup>13</sup>C-NMR 並無明顯差異，然而於 <sup>1</sup>H-NMR，H-3 的化學位移由  $\delta$  3.41 往低磁場方向移動至 3.81，同時 H-3 的 pattern 由 multiple 轉變成 broad singlet；此外，HMBC 及 HMQC 圖譜碳氫之間的 correlations 皆和受質相同，推測化合物 5 可能和受質具有相同的分子式，而為不同的立體異構物，且位置最有可能於 C-3。透過 NOESY 圖譜的分析，受質的 H-3 和 H-5 具有 correlation spot，H-3 和 H-19 則沒有；而化合物 5 的 H-3 和 H-19 具有 correlation spot，H-3 和 H-5 反而沒有，因此，判定 C-3 上的氫由 H-3 $\beta$  轉變成 H-3 $\alpha$ ，也就是 hydroxyl group 由  $\alpha$ -configuration 轉變成  $\beta$ -configuration，因而確定化合物 5 的結構為 *ent*-(14*R*)-3 $\alpha$ ,14,15,19-tetrahydroxy-labda-8(20),12*E*-dien-16-oic acid-15-lactone，此為一新的化合物。

#### B) 化學半合成 andrographolide 衍生物

利用醋酸酐加熱迴流進行乙醯化反應合成 andrographolide 3,19-*O*-diacetate (4)，以 TLC 確認反應的進行程度，先得到 andrographolide 19-*O*-acetate (2)，而後才得到 andrographolide 3,19-*O*-diacetate (4)，經過 <sup>1</sup>H-NMR 和 TLC 確認與原來代謝物 2 和 4 相同；反應並未停止繼續進行可得到 andrographolide 3,14,19-*O*-triacetate

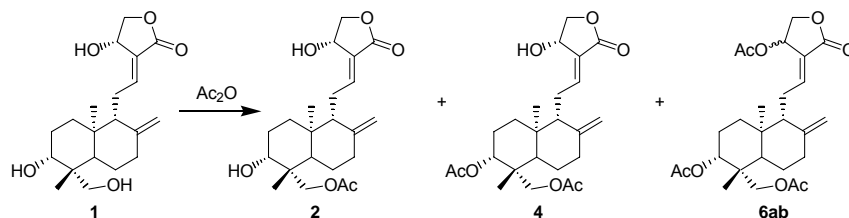
**Figure 1**

Microbial transformation of andrographolide by *Nocardia* sp.



**Figure 2**

Semi-synthesis of metabolites 2 and 4



(6ab), 但是由化合物 6ab 的  $^1\text{H-NMR}$  發現各組訊號呈現 twin peaks, 然而各種不同的溶媒系統所得到的 TLC 結果都是一個點, 推測該化合物為同分異構物的混合物, 且異構位置為 C-14。將所得化合物 4 利用 acyl chloride 於鹼性下進行 14-OH 之酯化反應, 發現除了 C-14 的 hydroxyl group 進行酯化外, 另外也得到具兩組雙鍵的化合物 14-deoxy-11,12-didehydro-andrographolide (12), 因此改以 indium (III) chloride 作為催化劑, 在酸性環境下進行酯化反應, 得到不同的衍生物 (7-11); 此外, 在合成的過程當中, 我們發現直鏈的有機酸或酸酐可以順利的進行反應, 然而具有 phenyl group 的 acid 或者 anhydride 則不容易進行反應, 必須 carbonyl group 和 phenyl 之間至少要距離兩個碳原子, 如 cinnamic acid 才能順利進行酯化反應, 而 benzoic acid 或 phenylacetic acid 皆無法進行。

合成 3,14,19,-O-triacetate 的過程中, 透過  $^1\text{H-NMR}$  圖譜, 發現化合物 6ab 於 C-14 具有立體異構物, 接下來一系列的合成反應, 我們也發現化合物 7-11 也有相似的結果, 且於  $^1\text{H-NMR}$  可看到訊號強度比例差異相當大的 twin peaks 訊號, 因此透過分析級 HPLC 的分析與計算, 分別得到化合物 6、7、8、9、10 和 11 立體異構物比例及立體異構物 R-form 的 enantiomeric excess value, 約為 80-90%。

#### A) 抗氧化試驗

DPPH 和 superoxide anion 清除能力試驗

顯示, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide 3,19-O-diacetate (12) 具有抗氧化的活性, 接下來將繼續進行其它的活性試驗。

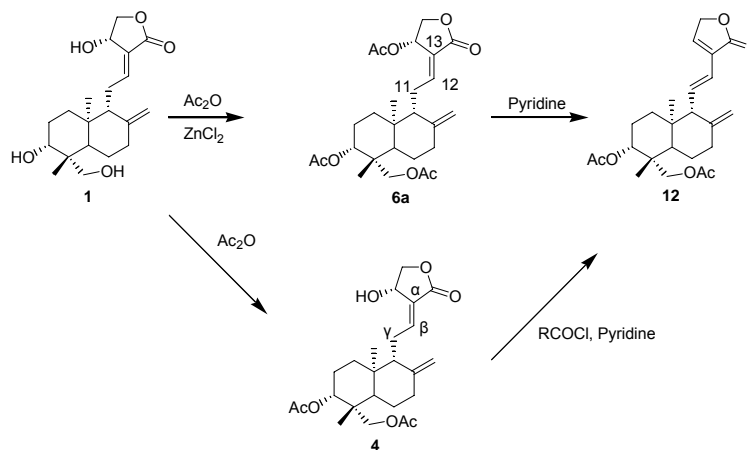
#### 五、計畫成果自評

穿心蓮內酯經過 *Nocardia* sp. 轉換得到四個代謝物 (2-5), 其中代謝物 5 是新化合物。同時, 也是第一次發現 *Nocardia* sp. 具有進行乙醯化的能力; 另外代謝物 2 和 4 可由化學合成得到, 然而 3 則必須經由微生物轉換的方式才能以 one-step 得到, 若是經由化學合成方式, 則須經過數個步驟。比較穿心蓮內酯三個氫氧基於微生物進行乙醯化的反應活性為 C-19 > C-3, C-14 不易引入; 然而化學乙醯化反應只能將 acetyl group 引入 C-19, C-3,19 或 C-3,14,19, 而不能單獨引入 C-3 的位置。

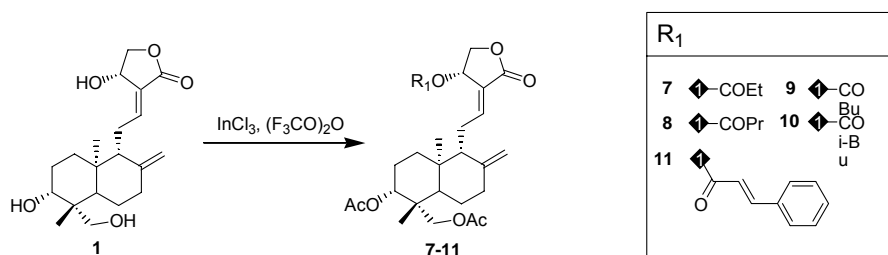
經由半合成的方式對於 C-14 的 OH 進行不同取代基的酯化反應, 發現 C-14 具有立體障礙, 直鏈的 alkanolic acid 較容易進行反應, 若具有苯環的 acid 或 anhydride 則不容易進行, 需間隔兩個碳才能順利進行。此外, 實驗結果發現 C-14 會出現 R-form 和 S-form 的異構物, 且以 R-form 為主要產物。

目前已完成 DPPH 和 superoxide anion 清除能力試驗, 發現化合物 12 具有這方面的抗氧化活性, 將予以整理投稿。

**Figure 3**  
Semi-synthesis of  
compound **12**



**Figure 4**  
Semi-synthesis  
of andrographolide  
analogues



## 六、参考文献

- Pasteur, L. *Compt. Rend.*, 45, 913, **1857**..
- Bertrand, G. *Bull. Soc. Chim. France*, 15, 627, **1896**..
- Büchner, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 30, 117, **1897**.
- Peterson, D. H. & Murry, H. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 1871-1872, **1952**.
- Sweer, HM. & Wong, C-H. *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 6421-6422, **1986**.
- Bashir, N. B., Phythian, S. J., Reason, A. J. & Roberts, S. M. *J. Chem. Soc., Perkin I*, 91, 2203-2222, **1995**.
- Sariaslani F. S. *Critic. Rev. Biotech.*, 9, 171-257, **1989**.
- van Pee K. H. *Arch. Microbiol.*, 175, 250-258, **2001**.
- Hsu, F. L., Hou, C. C., Yang, L. M., Cheng, J. T., Chi, T. C., Liu, P. C. & Lin, S. J. *J. Nat. Prod.*, 65, 273-277, **2002**.
- Rathbone, D. A. & Bruce, N. C. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 274-281, **2002**.
- Abourashed, E. A.; Clark, A. M.; Hufford, C. D. *Curr. Med. Chem.* **1999**, 6, 359-374.
- Venisetty, R. K. & Ciddi, V. *Curr. Pharm. Biotech.*, 4, 153-167, **2003**.
- Srisilam, K. & Veeresham, C. *Biotech. Adv.*, 21, 3-39, **2003**.
- Liu, X., Wang, Y. & Li, G. *Zhong Yao Cai*, 26, 135-138, **2003**.
- Chang, R. S., Ding, L., Chen, G. Q., Pan, Q.C., Zhao, Z. L. & Smith, K. M. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 197, 59-66, **1991**.
- Basak, A., Cooper, S., Roberge, A. G., Banik, U. K., Chretien, M. & Seidah, N. G. *Biochem. J.*, 338, 107-113, **1999**.
- Basak, A., Zhong, M., Munzer, J. S., Chretien, M. & Seidah, N. G. *Biochem. J.*, 353, 537-545, **2001**.
- Chang, R. S., & Yeung, H. W. *Antiviral Res.*, 9, 163-175, **1988**.
- Otake, T., Mori, H. & Morimoto, M. *Phyther. Res.*, 9, 6-10, **1995**.
- Calabrese, C., Berman, S. H., Babish, J. G., Ma, X., Shinto, L., Dorr, M., Wells, K., Wenner, C. A. & Standish, L. J. *Phyther. Res.*, 14, 333-338, **2000**.
- Shen, Y. C., Chen, C. F. & Chiou, W. F.: *Planta Med.*, 66, 314-317, **2000**.
- Shen, Y. C., Chen, C. F. & Chiou, W. F. *British J. Pharm.*, 135, 399-406, **2002**.
- Peng, G. Y., Zhou, F., Ding, R. L., Li, H. D. & Yao, K. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 27, 147-150, **2002**.
- Rajagopal, S., Ajaya kumar, R., Deevi, D. S., Satyanarayana, C. & Rajagopalan, R. *J. Exp. Therapeutics and Oncology.*, 3, 147-158, **2003**.
- Chiou, W. F., Lin, J. J. & Chen, C. F. *British J. Pharm.*, 125, 327-334, **1998**.
- Chiou, W. F., Chen, C. F. & Lin, J. J.

**Table 1.** <sup>13</sup>C-NMR assignments of compounds **1-5**.

Carbon No.	Compound				
	1	2	3	4	5
1	37.4	37.6	37.3	36.9	32.9
2	29.1	28.7	24.8	24.8	26.8
3	79.9	77.8	81.0	79.8	71.1
4	43.3	42.8	43.1	41.7	44.4
5	55.4	55.2	55.6	55.0	50.3
6	24.4	25.5	25.5	24.8	25.0
7	38.2	38.5	38.5	38.1	39.2
8	148.0	148.1	148.1	147.4	149.2
9	56.4	56.5	56.4	56.1	57.7
10	39.2	39.4	39.3	39.1	40.1
11	25.0	25.0	24.9	24.6	25.6
12	147.1	147.0	146.9	146.6	149.6
13	130.3	130.3	130.4	130.5	129.8
14	66.1	66.0	66.0	66.0	66.7
15	75.5	75.5	75.5	75.4	76.2
16	170.8	170.8	170.6	170.8	172.7
17	15.2	14.5	14.6	14.5	15.5
18	23.8	23.4	23.3	22.7	23.1
19	64.2	66.0	62.9	64.6	66.0
20	108.8	108.8	108.7	109.1	108.8
3-CO			170.8	170.4	
3-COCH <sub>3</sub>			21.1	20.9	
19-CO		171.0		170.7	
19-COCH <sub>3</sub>		21.1		21.0	

& Yao, X. *Drug. Metab. Dispos.*, 31, 983-985, **2003**.

**Table 2.** <sup>13</sup>C-NMR assignments of compounds **6-12**.

Carbon No.	Compound							
	6	7	8	9	10	11	12	
1	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	38.3	
2	25.2	24.2	25.1	24.2	24.2	25.2	24.1	
3	79.6	79.6	79.6	79.6	79.6	79.6	80.0	
4	41.3	41.2	41.2	41.3	41.3	41.2	41.4	
5	55.3	55.2	55.2	55.2	55.2	55.2	54.8	
6	24.6	24.6	24.2	24.6	24.5	24.6	23.9	
7	37.9	37.8	37.8	37.8	37.8	37.8	36.7	
8	150.1	146.5	146.4	146.5	146.4	146.7	147.9	
9	55.8	55.8	55.8	55.8	55.8	55.9	61.7	
10	38.9	38.9	38.9	38.9	38.9	38.9	38.6	
11	24.2	25.1	24.6	25.1	25.2	24.2	135.6	
12	146.5	150.1	150.1	150.0	150.1	150.3	121.4	
13	124.0	124.1	124.1	124.1	124.1	124.2	129.2	
14	67.8	67.6	67.6	67.6	67.5	67.7	143.2	
15	71.6	71.6	71.7	71.7	71.8	71.7	69.6	
16	170.9	169.0	169.0	169.0	169.0	169.1	172.1	
17	14.5	14.5	18.4	14.5	14.5	14.5	15.2	
18	22.7	22.7	22.7	22.7	22.7	22.7	22.7	
19	64.7	64.7	64.7	64.7	64.7	64.7	64.8	
20	108.9	109.0	109.0	109.0	109.3	108.9	109.3	
3-CO	170.4	170.5	170.5	170.5	170.5	170.5	170.5	
3-COCH <sub>3</sub>	21.0	20.1	21.0	21.1	21.1	21.0	21.1	
19-CO	170.5	170.8	170.9	170.8	170.9	170.8	170.9	
19-COCH <sub>3</sub>	21.1	21.1	21.1	21.1	21.2	21.1	21.2	
1	170.0	173.9	173.1	173.3	172.6	166.2		
2	20.7	27.4	35.9	33.8	43.1	116.4		
3		9.0	14.5	27.0	25.8	146.5		
4			13.6	22.2	22.4	133.8		
5				13.6	22.3	128.3		
6						129.0		
7						130.9		
8						129.0		
9						128.3		

27. Akbarsha, M. A., Latha, P. N. & Murugaian, P. *J. Reprod. Fertil.*, 120, 385-390, **2000**.
28. Akbarsha, M. A. & Murugaian, P. *Phytother. Res.*, 14, 432-435, **2000**.
29. Kapil, A., Koul, I. B., Banerjee, S. K. & Gupta, B. D. *Biochem. Pharm.*, 46, 182-185, **1993**.
30. Yu, B. C., Hung, C. R., Chen, W. C. & Cheng, J. T. *Planta Med.*, 69, 1075-1079, **2003**.
31. Zhang, X. F. & Tan, B. K. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 27, 358-363, **2000**.
32. He, X., Li, J., Gao, H., Qiu, F., Cui, X. & Yao, X. *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 586-589, **2003**.
33. He, X., Li, J., Gao, H., Qiu, F., Cui, X.