# 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*)-3α,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*)-3α,14,15,19-tetrahydroxy-labda-8(20),12*E*-dien-16-oic acid 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:** andrographloide, 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¡C早在 1878 年時，Pasteur 利用微生物將植物的醣轉變成 ethanol[1]；於 1896 年 Bertrand 利用 *Acetobacter xylinum* 氧化一系列 polyhydric alcohols[2]；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[3]。之後於 1952 年，Peterson 和 Murray 利用 *Rhizopus arrhizus* 將羥基引入 progesterone 的 11α 位置，得到 11α-hydroxy progesterone，作為

合成 cortisone 的原料藥[4]。漸漸地，人類發現微生物轉換具有高的化學選擇性包括 regioselectivity[5]、diastereoselectivity 及 enantioselectivity[6,7]，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[8]。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[9]、生物鹼[10]、類固醇以及抗生素等[11-13]。

穿心蓮內酯 (**1**) (andrographolide, *ent*-(14*R*)-3β,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[14]、抗病毒[15-20]、抗發炎[21,22]、免疫調節[23]、抗腫瘤[24]、抗心血管疾病[25,26]、抗生育[27,28]、保肝利膽[29]及降血糖作用[30,31]。由於穿心蓮內酯屬於 labdane diterpene，具有一個五環內酯 (lactone)及一組 αβ-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[32,33]；C 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*)-3α,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 ℃，HREIMS *m/z* 392.2197 $[M]^+$ (calcd. for $C_{24}H_{34}O_7$, 392.2199)，確定分子式為 $C_{22}H_{32}O_6$；化合物 **3** 經純化得到無晶形白色粉狀，HREIMS $[M]^+$ *m/z* 392.2210 (calcd. for $C_{24}H_{34}O_7$, 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℃，HREIMS $[M]^+$ *m/z* 434.2310 (calcd. for $C_{24}H_{34}O_7$, 434.2305)，確定分子式為 $C_{24}H_{34}O_7$；運用 1D- [$^1$H- 及 $^{13}$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 $[M]^+$ *m/z* 350.2088 (calcd. for $C_{20}H_{30}O_5$, 350.2093)，確定分子式為 $C_{20}H_{30}O_5$。NMR 圖譜和受質比較，於 $^{13}$C-NMR 並無明顯差異，然而於 $^1$H-NMR，H-3 的化學位移由 δ 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-3β 轉變成 H-3α，也就是 hydroxyl group 由 α-configuration 轉變成 β-configuration，因而確定化合物 **5** 的結構為 *ent*-(14*R*)-3α,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 $^1$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.

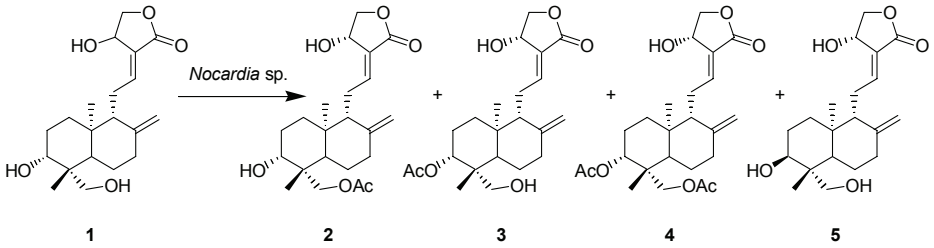
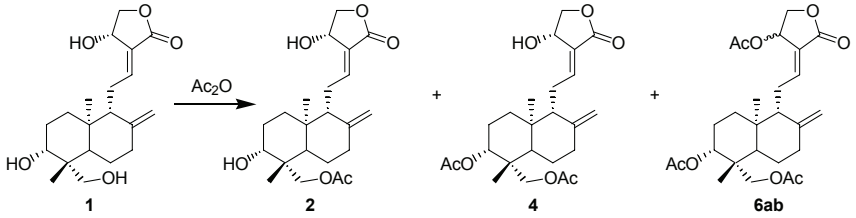



**Figure 2**

Semi-synthesis of metabolites **2** and **4**




(**6ab**)，但是由化合物 **6ab** 的 $^{1}$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 $^{1}$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 $^{1}$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 alkanoic 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**

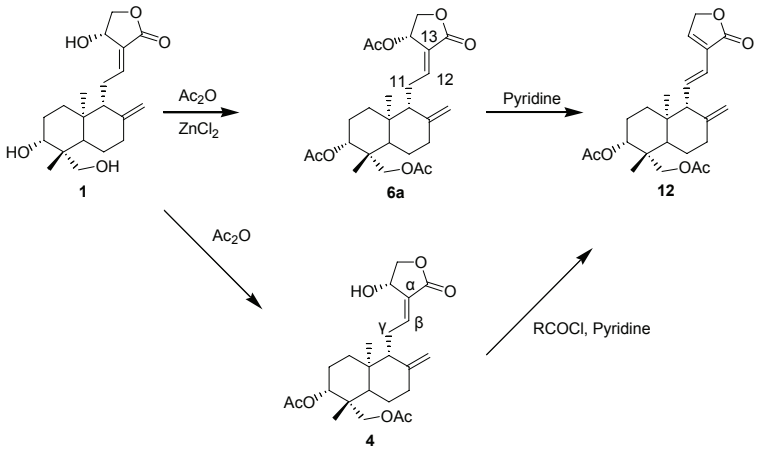
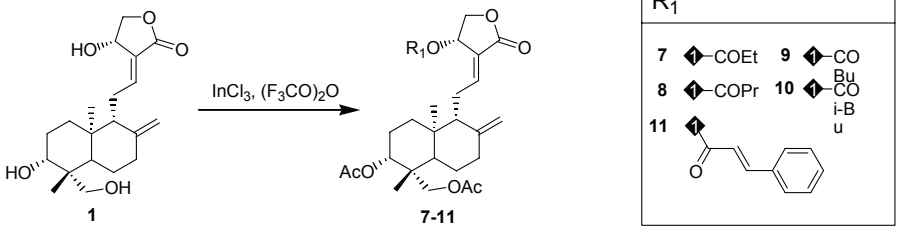



**Figure 4**
Semi-synthesis of andrographolide analogues




## 六、參考文獻


1. Pasteur, L. *Compt. Rend,* 45, 913, **1857**..
2. Bertrand, G. *Bull. Soc. Chim. France*, 15, 627, **1896**..
3. Bűchner, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 30, 117, **1897**.
4. Peterson, D. H. & Murry, H. C. *J. Am. Chem. Soc.,* 74, 1871-1872, **1952**.
5. Sweer, HM. & Wong, C-H. *J. Am. Chem. Soc.,* 108, 6421-6422, **1986**.
6. Bashir, N. B., Phythian, S. J., Reason, A. J. & Roberts, S. M. *J. Chem. Soc., Perkin 1*, 91, 2203-2222, **1995**.
7. Sariaslani F. S. *Critic. Rev. Biotech.,* 9, 171-257, **1989**.
8. van Pee K. H. *Arch. Microbiol.,* 175, 250-258, **2001**.
9. 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**.
10. Rathbone, D. A. & Bruce, N. C. *Curr. Opin. Microbiol*., 5, 274-281, **2002**.
11. Abourashed, E. A.; Clark, A. M.; Hufford, C. D. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 359-374.
12. Venisetty, R. K. & Ciddi, V. *Curr. Pharm. Biotech.,* 4, 153-167, **2003**.
13. Srisilam, K. & Veeresham, C. *Biotech. Adv.,* 21, 3-39, **2003**.
14. Liu, X., Wang, Y. & Li, G. *Zhong Yao Cai,* 26, 135-138, **2003**.
15. 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**.
16. Basak, A., Cooper, S., Roberge, A. G., Banik, U. K., Chretien, M. & Seidah, N. G. *Biochem. J.,* 338, 107-113, **1999**.
17. Basak, A., Zhong, M., Munzer, J. S., Chretien, M. & Seidah, N. G. *Biochem. J.,* 353, 537-545, **2001**.
18. Chang, R. S., & Yeung, H. W. *Antiviral Res*.., 9, 163-175, **1988**.
19. Otake, T., Mori, H. & Morimoto, M. *Phytother. Res.,* 9, 6-10, **1995**.
20. Calabrese, C., Berman, S. H., Babish, J. G., Ma, X., Shinto, L., Dorr, M., Wells, K., Wenner, C. A. & Standish, L. J. *Phytother. Res.,* 14, 333-338, **2000**.
21. Shen, Y. C., Chen, C. F. & Chiou, W. F.: *Planta Med.,* 66, 314-317, **2000**.
22. Shen, Y. C., Chen, C. F. & Chiou, W. F. *British J. Pharm.,* 135, 399-406, **2002**.
23. Peng, G. Y., Zhou, F., Ding, R. L., Li, H. D. & Yao, K. *Zhongguo Zhongyao Zazhi,* 27, 147-150, **2002**.
24. Rajagopal, S., Ajaya kumar, R., Deevi, D. S., Satyanarayana, C. & Rajagopalan, R. *J. Exp. Therapeutics and Oncology.,* 3, 147-158, **2003**.
25. Chiou, W. F., Lin, J. J. & Chen, C. F. *British J. Pharm.,* 125, 327-334, **1998**.
26. Chiou, W. F., Chen, C. F. & Lin, J. J.

**Table 1.** $^{13}$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-$COCH_3$ | | | 21.1 | 20.9 | |
| 19-CO | | 171.0 | | 170.7 | |
| 19-$COCH_3$ | | 21.1 | | 21.0 | |


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


**Table 2.** $^{13}$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-*C*O | 170.4 | 170.5 | 170.5 | 170.5 | 170.5 | 170.5 | 170.5 |
| 3-$COCH_3$ | 21.0 | 20.1 | 21.0 | 21.1 | 21.1 | 21.0 | 21.1 |
| 19-*C*O | 170.5 | 170.8 | 170.9 | 170.8 | 170.9 | 170.8 | 170.9 |
| 19-$COCH_3$ | 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 | |