

## · 化学成分研究 ·

## 毛霉、美丽小汉克银菌和黑曲霉对青蒿素的生物转化研究

徐方方, 韩晓东, 钟金浪, 吴云山, 刘博(广州中医药大学第二附属医院, 广州中药活性成分手性研究重点实验室, 广东 广州 510006)

**摘要:** 目的 利用真菌对抗疟药物青蒿素进行生物转化研究。方法 选择黑曲霉、美丽小汉克银菌和毛霉对青蒿素进行生物转化。转化产物经过多种柱色谱分离, 进而利用波谱法鉴定其结构。结果 青蒿素经 3 种真菌转化共得到 4 种产物, 分别为 7 $\beta$ -hydroxyartemisinin(1)、deoxyartemisinin(2)、4 $\alpha$ -hydroxydesoxy-artemisinin(3)和 4 $\beta$ -hydroxydesoxyartemisinin(4)。结论 青蒿素经 3 株真菌转化后易发生还原反应和羟基化反应, 其结构中过氧桥断裂、失去 1 个氧原子, 从而形成去氧青蒿素类转化产物, 结构中的非活碳原子发生氧化反应产生羟基化产物。

**关键词:** 青蒿素; 生物转化; 真菌; 去氧青蒿素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)01-0099-04

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.01.014

### The Biotransformation of Artemisinin by *Mucor ramannianus* Moeller, *Cunninghamella elegans* and *Aspergillus niger*

XU Fangfang, HAN Xiaodong, ZHONG Jinlang, WU Yunshan, LIU Bo (Guangzhou Key Laboratory of Chirality Research on Active Components of Traditional Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

**Abstract:** **Objective** To study the biotransformation of the artemisinin by fungi. **Methods** Three fungi strains, *Aspergillus niger*, *Cunninghamella elegans* and *Mucor ramannianus* Moeller were selected to be the biocatalysts in biotransformation of artemisinin. The products were separated by various column chromatographies, and identified by NMR, MS, UV and IR. **Results** Four transformation products 7 $\beta$ -hydroxyartemisinin (1), deoxyartemisinin (2), 4 $\alpha$ -hydroxydesoxyartemisinin (3) and 4 $\beta$ -hydroxydesoxyartemisinin (4) were obtained after the conversion of artemisinin by 3 microorganisms. **Conclusion** The reduction and hydroxylation reactions are likely to occur in the biotransformation procedure. It is likely that the deoxyartemisinin-type products were formed by the peroxygen bridge broken and one oxygen atom lost. The non-reactive carbon atoms in the structures are easy to be oxidized to form hydroxylated products.

**Keywords:** Artemisinin; biotransformation; fungi; deoxyartemisinin

青蒿素 (Artemisinin) 是我国科学家屠呦呦等<sup>[1]</sup>从中药黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 中得到的具有过氧桥结构的倍半萜内酯化合物, 同时该成分也是中药青

蒿的薄层鉴别成分<sup>[2]</sup>。现代药理研究<sup>[3-10]</sup>表明其具有抗疟疾、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、免疫抑制等多种生理活性。但青蒿素存在水溶性差、生物利用度低、

收稿日期: 2020-07-10

作者简介: 徐方方, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药化学。Email: xudubfang@163.com。通信作者: 刘博, 博士, 研究员, 研究方向: 中药活性物质化学研究与结构修饰。Email: doctliu@263.net。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1707900); 国家自然科学基金项目(81703379); 广东省中医药局科研项目(20191137, 20191142); 广东省中医院中医药科技专项基金(YN2016QJ05); 广州中医药大学一流学科重点项目(XK2018019); 广州市科技局重点实验室项目(202002010004)。

生物半衰期短等问题,限制了其应用。生物转化法因其绿色、低碳、反应条件温和以及成本低的优点,广泛用于天然产物的结构修饰<sup>[11]</sup>。学者利用生物转化法在青蒿素的惰性碳原子上引入活性基团,丰富了青蒿素的结构修饰位点,为获取活性好、成药性佳的青蒿素衍生物提供了可能<sup>[12]</sup>。本研究利用生物转化法对青蒿素进行结构修饰,以期获得结构新颖的衍生物,丰富青蒿素衍生物类别。

## 1 仪器与材料

**1.1 仪器** RODI-220B1 水纯化机(锐思捷水纯化技术有限公司); Delta320 桌上型电子 pH 计、ME203E 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多国际有限公司); MLS-3750 高压蒸汽灭菌器(日本三洋电机株式会社); LD5-10B 低速离心机(北京京立离心机有限公司); DNP-9162 电热恒温培养箱(上海精宏试验设备有限公司); NV-15G 氮吹仪(博纳艾杰尔科技有限公司); PG 1000/100 移液器(北京吉尔森有限公司); Hei-VAP Precision ML/63 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); Thermo MaxQ 8000 摇床(美国赛默飞世尔科技有限公司); Spectrum Two 傅立叶变换红外光谱仪(美国珀金埃尔默股份有限公司); Bruker AV-600 核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司); Rudolph Autopol 全自动高精度旋光仪(美国鲁道夫公司); Thermo Scientific Q Exactive Plus 质谱(美国赛默飞世尔科技有限公司); 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)。

**1.2 菌种** 毛霉(*Mucor ramannianus* Moeller, ATCC MYA-883), 美丽小汉克银菌(*Cunninghamella elegans*, ATCC-9245)购自美国 ATCC 保藏中心; 黑曲霉(*Aspergillus niger*, CICC 2487)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心; 青蒿素单体, 纯度 > 98%, 重庆科瑞南海制药有限责任公司。

**1.3 材料** 柱层层析硅胶(青岛海洋化工厂); 薄层层析硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司); 血平板琼脂培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、蛋白胨、蔗糖均为青岛海博生物技术有限公司产品; 高效液相所用试剂为色谱纯, 其余试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 液体培养基配置**<sup>[13]</sup> 称取蛋白胨(40.0 g)、蔗糖(60.0 g)以及沙氏葡萄糖液体培养基(80.0 g), 加入 4.0 L 水, 而后用 NaOH 溶液(1.0 mol·L<sup>-1</sup>)调节培养基 pH 为 6.5, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min, 备用。

**2.2 微生物转化方法**<sup>[13]</sup> 将黑曲霉、美丽小汉克银菌和毛霉分别接种在三角瓶中(250 mL, 含 50 mL 培养基), 在摇床中培养 2 d(28 °C, 180 r·min<sup>-1</sup>)。而后用无菌移液管吸取 10 mL 种子液, 分别加入到三角瓶中(2 L, 含 500 mL 培养基)。振荡培养 2 d 后, 每个摇瓶中分别加入 10 mL 青蒿素溶液(25 mg·mL<sup>-1</sup>, 甲醇)。相同条件下继续培养 14 d。

**2.3 转化物的提取分离** 用纱布过滤除去培养基中的菌丝体, 所得滤液用同体积乙酸乙酯萃取 3 次。合并萃取液, 经减压浓缩后得到转化产物浸膏。浸膏经硅胶柱层析进一步分离, 使用石油醚-乙酸乙酯系统梯度洗脱, 经薄层色谱指示、合并得到多个洗脱部位。进一步经制备型高效液相色谱分离, 得到转化产物 1~4。转化产物 1~4 的结构通过质谱、核磁共振波谱等方法确定。

**2.4 研究结果** 青蒿素经 3 株真菌转化后, 共得到 4 种转化单体, 分别 7β-hydroxyartemisinin (1)、deoxyartemisinin (2)、4α-hydroxydesoxyartemisinin (3) 和 4β-hydroxydesoxyartemisinin (4)。

**2.4.1 毛霉对青蒿素的生物转化** 见图 1。青蒿素经毛霉转化得到 2 个产物, 通过与文献数据对比, 分别鉴定为 7β-hydroxyartemisinin (1)<sup>[14-15]</sup> 和 deoxyartemisinin (2)<sup>[16]</sup>。其反应过程可能为一方面青蒿素在毛霉中羟基化酶的作用下产生产物 1, 另一方面经过氧化物酶的还原性裂解而转化产物 2。

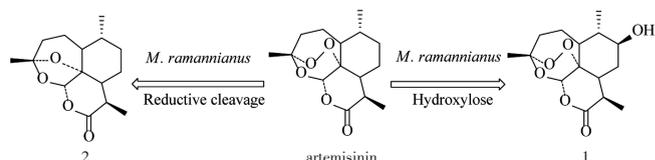


图 1 毛霉对青蒿素的生物转化

Figure 1 The biotransformation of artemisinin by *M. ramannianus*

**2.4.2 美丽小汉克银菌对青蒿素的生物转化** 见图 2。青蒿素经美丽小汉克银菌转化得到 3 个产物, 通过与文献对比分别鉴定为 7β-hydroxyartemisinin (1)<sup>[14-15]</sup>、deoxyartemisinin (2)<sup>[16]</sup> 和 4α-hydroxydesoxyartemisinin (3)<sup>[17]</sup>。其反应过程与在毛霉的转化下类似, 不同之处在于产物 2 继续在羟基化酶的氧化下产生产物 3。

**2.4.3 黑曲霉对青蒿素的生物转化** 见图 3。青蒿素经黑曲霉转化得到 2 个产物, 分子量均为 284, 分子式均为 C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>。通过与文献对比核磁、旋光等数据, 分别鉴定为 4α-hydroxydesoxyartemisinin (3)<sup>[17]</sup> 和 4β-hydroxydesoxyartemisinin (4)<sup>[18]</sup>。其反应过程可能为, 青蒿素在黑曲霉转化条件下经过氧化物酶还原

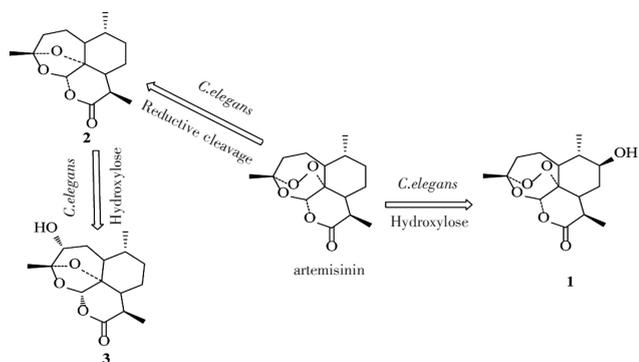


图 2 美丽小汉克银菌对青蒿素的生物转化  
Figure 2 The biotransformation of artemisinin by *C. elegans*

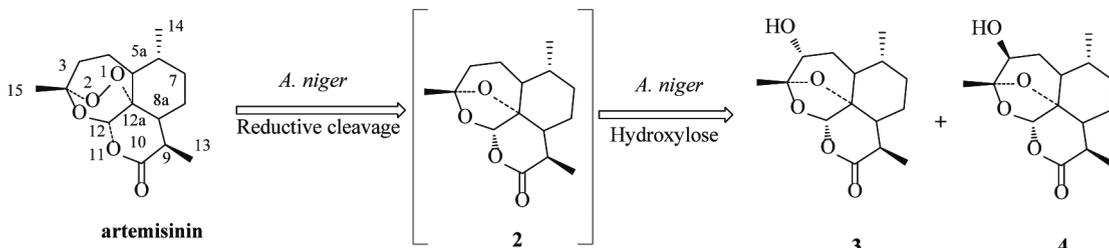


图 3 黑曲霉对青蒿素的生物转化  
Figure 3 The biotransformation of artemisinin by *A. niger*

3), 36.8(C-4), 26.0(C-5), 49.3(C-5a), 45.4(C-6), 74.1(C-7), 32.9(C-8), 43.1(C-8a), 33.9(C-9), 174.3(C-10), 95.5(C-12), 80.3(C-12a), 25.4(C-13), 15.8(C-14), 12.9(C-15)。

(2) 白色粉末,  $[\alpha]_D^{25} - 130$  ( $c$  0.50, MeOH); IR  $v_{max}$  (film) 2 913, 1 739, 1 437, 1 358  $cm^{-1}$ ; HREIMS  $m/z$  267.159 7 [M+H]<sup>+</sup>, 289.141 6 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$ ): 5.67(d,  $J=8.4$  Hz, H-12), 1.51(d,  $J=8.8$  Hz, H-15), 1.18(m, H-13), 0.92(d,  $J=7.2$  Hz, H-14); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>, 100 MHz,  $\delta$ ): 109.4(C-3), 34.1(C-4), 22.2(C-5), 44.7(C-5a), 35.5(C-6), 33.6(C-7), 23.7(C-8), 42.5(C-8a), 32.9(C-9), 172.0(C-10), 99.8(C-12), 82.6(C-12a), 18.7(C-13), 24.1(C-14), 12.8(C-15)。

(3) 白色粉末,  $[\alpha]_D^{25} + 68$  ( $c$  0.30, MeOH); IR  $v_{max}$  (film) 3502, 1754, 1729, 1725, 1390, 1148, 1019, 1 015  $cm^{-1}$ ; HREIMS  $m/z$  283.154 5 [M+H]<sup>+</sup>, 305.136 4 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz,  $\delta$ ): 5.74(s, H-12), 3.51(d,  $J=3.0$  Hz, H-4), 1.48(s, H-14), 1.13(d,  $J=7.8$  Hz, H-15), 0.90(d,  $J=7.2$  Hz, H-13); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz,  $\delta$ ): 110.2(C-3), 69.5(C-4), 31.4(C-5), 41.6(C-5a), 35.9(C-6), 34.6(C-7), 24.5(C-8), 43.2(C-8a), 34.0(C-9), 174.1(C-10), 100.8(C-12), 84.1(C-12a), 18.8(C-

性脱氧反应产生产物 2, 而后在继续羟基化酶的氧化下产生产物 3 和 4。本反应没有获得产物 2 的单体, 可能是由于转化时间太久而耗尽。

**2.5 转化产物的波谱数据** (1) 白色粉末,  $[\alpha]_D^{25} + 40$  ( $c$  0.40, MeOH); IR  $v_{max}$  (film) 3 303, 1 650, 1 457, 1 361, 1 220, 1 050  $cm^{-1}$ ; HREIMS  $m/z$  321.131 2 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$ ): 6.09(s, H-12), 3.21(ddd,  $J=14.9, 10.4$  Hz), 1.41(s, H-13), 1.10(d,  $J=7.3$  Hz, H-14), 1.09(d,  $J=6.2$  Hz, H-15); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>, 100 MHz,  $\delta$ ): 106.7(C-

13), 21.0(C-14), 12.9(C-15)。

(4) 白色粉末,  $[\alpha]_D^{25} + 32$  ( $c$  0.72, MeOH); IR  $v_{max}$  (film) 3 544, 1 751, 1 722, 1 386, 1 153, 1 026, 1 011  $cm^{-1}$ ; HREIMS  $m/z$  283.154 3 [M+H]<sup>+</sup>, 305.135 9 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz,  $\delta$ ): 5.74(s, H-12), 3.46(dd,  $J=6.0, 10.2$  Hz, H-4), 1.56(s, H-14), 1.17(d,  $J=7.8$  Hz, H-15), 0.95(d,  $J=6.0$  Hz, H-13); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz,  $\delta$ ): 111.4(C-3), 72.0(C-4), 32.1(C-5), 46.5(C-5a), 36.2(C-6), 34.2(C-7), 24.4(C-8), 43.1(C-8a), 34.4(C-9), 174.4(C-10), 100.8(C-12), 83.4(C-12a), 18.9(C-13), 21.3(C-14), 12.9(C-15)。

### 3 讨论

本研究中, 青蒿素经毛霉、美丽小汉克银菌和黑曲霉转化后得到 4 种产物, 其中去氧化产物有 3 个(2~4), 羟基化产物有 3 个(1, 3~4)。利用生物转化技术能够在青蒿素中引入羟基基团, 对改善化合物的极性有积极意义。体外抗疟活性表明<sup>[19]</sup>, 相比青蒿素, 转化产物 2 和 3 对恶性疟原虫的氯喹敏感 3D7 菌株和耐多药的 Dd 2 菌株的活性均有不同程度的降低, 表明过氧桥是青蒿素发挥抗疟作用的必需结构, 如果破坏或者通过结构改造合成出无过氧桥结构的青蒿素衍生物, 则抗疟作用降低或者消

失<sup>[20-21]</sup>。本研究得到的转化产物的活性以及构效关系需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 刘静明, 倪慕云, 樊菊芬, 等. 青蒿素(Arteannuin)的结构和反应[J]. 化学学报, 1979, 37(2): 129-142.
- [2] 谢斐然. 中国药学家屠呦呦获诺贝尔生理学或医学奖[EB/OL]. [2015-10-06]. <http://sl.china.com.cn/2015/1006/2937.shtml>.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 198.
- [4] 青蒿研究协作组. 抗疟新药青蒿素的研究[J]. 药学通报, 1979, 14(2): 49-53.
- [5] 徐继红. 青蒿素类药物的药理和毒理(综述)[J]. 浙江医科大学学报, 1996, 25(1): 43-46.
- [6] 蒋为薇, 钱妍. 青蒿素类药物的抗炎免疫作用机制及其安全性研究进展[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(7): 630-636.
- [7] 吴言为. 青蒿素衍生物SM934对系统性红斑狼疮的疗效及作用机制研究[D]. 上海: 中国科学院上海药物研究所, 2016.
- [8] ZHANG Y Q, XU G W, ZHANG S Q, et al. Antitumor research on artemisinin and its bioactive derivatives[J]. Natural Products and Bioprospecting, 2018, 8(4): 303-319.
- [9] YAO W B, WANG F, WANG H. Immunomodulation of artemisinin and its derivatives[J]. Science Bulletin, 2016, 61: 1399-1406.
- [10] WANG J G, XU C C, WONG Y K, et al. Artemisinin, the magic drug discovered from traditional chinese medicine[J]. Engineering, 2019, 5(1): 32-39.
- [11] 张翔, 胡昌华. 二萜类化合物微生物转化研究进展[J]. 化学工程与装备, 2010, 5: 115-117.
- [12] 王闻翰, 刘吉华. 青蒿素类化合物的微生物转化研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(3): 54-58.
- [13] XU F F, LIAO K S, LIU Y H, et al. Biotransformation of patchoulol by *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*[J]. Fitoterapia, 2016, 109: 201-205.
- [14] PARSHIKOV I A, MURALEEDHARAN K M, AVERY M A, et al. Transformation of artemisinin by *Cunninghamella elegans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64: 782-786.
- [15] CARVALHO P B, LIU B, WU Y S, et al. 7 $\beta$ -Hydroxyartemisinin [J]. Acta Crystallographica, 2008, E64: o395 - o396
- [16] GAUR R, DAROKAR M P, AJAYALCUMAR P V, et al. In vitro antimalarial studies of novel artemisinin biotransformed products and its derivatives[J]. Phytochemistry, 2014, 107: 135-140
- [17] SY L K, BROWN G D. Three sesquiterpenes from *Artemisia annua* [J]. Phytochemistry, 1998, 48(7): 1207-1211.
- [18] ZHAN J X, ZHANG Y X, GUO H Z, et al. Microbial metabolism of artemisinin by *Mucor polymorphosporus* and *Aspergillus niger*[J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(11): 1693-1695.
- [19] PONNAPALLI M G, SUR A M B, Sudhakar R, et al. Biotransformation of Artemisinin to 14-hydroxydeoxyartemisinin: C-14 hydroxylation by *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(40): 10490-10495
- [20] OLLIARO P L, HAYNES R K, MEUNIER B, et al. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds[J]. Trends in Parasitology, 2001, 17(3): 122-126.
- [21] VENNERSTROM J L, ARBE-BARNES S, BRUN R, et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate[J]. Nature, 2004, 430: 900-904.

(编辑: 梁进权)