

青霉属真菌 P-9 生物转化罗汉果总苷的研究

赵丽娟, 司鹏鹏, 茅仁刚*

上海师范大学, 上海 200234

摘要: 采用青霉属真菌 P-9 对罗汉果总苷进行生物转化, 主要转化产物 A、B、C 经熔点、比旋度、质谱 (MS)、红外光谱 (IR) 和核磁共振 (NMR) 波谱分析, 鉴定为: A 为罗汉果醇-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷; B 为罗汉果醇-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷; C 为 11-酮-罗汉果醇-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷, A、B、C 三种化合物均未见文献报道。采用高效液相色谱法, 以 C₁₈-ODS 为色谱柱, 乙腈 (A)-水 (B) 作为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为: 203 nm, 柱温: 30 °C, 流速: 1 mL/min, 进样量: 10 μ L, 测得在底物加量为 0.5%, 28 °C, 220 r/min 下摇瓶培养 120 h, 主要产物 A、B、C 的含量最高分别为 1.006、0.293、0.025 mg/mL。在选定的色谱条件下转化产物 A、B 线性范围良好, 转化产物 A、B 的平均加样回收率分别为 99.3%、97.8%, RSD 分别为 1.9%、1.2%。

关键词: 高效液相色谱; 微生物转化; 罗汉果总苷; 转化产物 A、B、C

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

Determination of Transformation Products in Microbial Transformation of Cucurbitane Triterpene Glycosides from *Momordica grosvenori* by *Penicillium* sp P-9 by HPLC

ZHAO Li-juan, SI Peng-peng, MAO Ren-gang*

Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract: We found a penicillium sp J-9 which can transform *Momordica grosvenori* into products A, B and C. Three products were identified by melting point, MS, IR, NMR. The method of HPLC for the transformation products A, B and C. ZW&A C₁₈ (250 \times 4.60 mm, 5 μ m) column was used as the stationary phase. The mobile phase was acetonitrile; water, the UV detection wavelength was 203 nm, the column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 10 μ L. The transformation last 120 h under 28 °C, 220r/min and substrate at a concentration of 0.5%. The three kinds of products had changeable contents in different time. Results show that the content of products A and B indicates a good linearity under these conditions with average recoveries of (99.3 \pm 1.12)% and (97.8 \pm 1.68)% and RSDs of 1.9% and 1.2%.

Key words: HPLC; microbial transformation; mogrosides; transformation products A, B and C

罗汉果总苷为一类葫芦烷 (cucurbitane) 型四环三萜类皂苷, 是罗汉果的甜味成分, 具有生理活性。罗汉果属于葫芦科植物, 是学名为 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) Jeffrey 或 *Momordica grosvenori* Swingle 的干燥果实, 主要生长于我国华南地区。罗汉果总苷具有降血糖、保肝、抗肿瘤, 免疫调节、抗氧化、止咳祛痰、抑菌等作用。李典鹏^[1] 等人也证明了罗汉果酸乙苷 II B (*Siraitic acid II B*) 和罗汉果酸丙苷 II C (*Siraitic acid II C*) 分别对肺癌细胞 A549 和肝癌细胞 Hep-G2 都具有一定的抑制作用。李晓波^[2] 现了

罗汉果醇能够抑制肿瘤的生长。

罗汉果总苷是一类以罗汉果醇为母核的糖苷混合物, 其中以含有 4-6 个糖苷键的皂苷为主, 极性大、生物利用度低。作者以罗汉果总苷为底物, 利用微生物作为生物催化剂, 水解得到了部分去糖基的高活性水解产物。同时考察了青霉属真菌 P-9 对底物的催化作用, 对转化产物进行了结构鉴定和含量测定。此类研究未见有文献报道。

1 材料与方法

1.1 菌种

青霉属真菌 P-9 由上海新康制药厂筛选并保

存。

1.2 培养基

斜面培养基: PDA 培养基。

液体转化培养基: 土豆 15%, 葡萄糖 0.5%, 麸皮 2%, 罗汉果苷 0.5%。

空白对照培养基: 土豆 15%, 葡萄糖 0.5%, 麸皮 2%。

1.3 主要仪器设备

TG332A 型微量分析天平(上海天平仪器厂); 80-2 型离心沉淀器(上海手术器械厂); RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); Agilent1100 高效液相色谱仪; 52DX 型红外光谱仪(Bruker); Bruker 型超导核磁共振仪; Q-tof 质谱仪(Water)。

1.4 微生物转化

将活化的青霉属真菌 P-9 菌种斜面接装入液体转化培养基的三角烧瓶(50 mL/250 mL)中, 设 6 组平行实验和 2 组空白对照培养基实验, 在 28 °C, 220 rpm 下摇瓶培养 120h, 平行组实验与对照组实验在摇瓶培养过程中分别于 0、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h 在无菌操作台分别取发酵液 2 mL 于 5 mL EP 管中, 再加入 2 mL 乙醇混匀后放入 4 °C 冰箱保存。

1.5 样品前处理

取不同时间点取得的样品在 20000 rpm 条件下高速离心 20 min, 取上清 2 mL, 旋转蒸发仪蒸干后再加入 2 mL 甲醇, 充分溶解后在 20000 rpm 条件下高速离心 20 min, 取上清 2 mL 即得样品进行 HPLC 检测。

1.6 HPLC 分析

色谱条件: 色谱条件为色谱柱: Luna 5u C18 100A(250 mm × 4.60 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~10 min: 25% 乙腈; 20~30 min: 30% 乙腈; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 203 nm; 进样量 10 μL。

罗汉果苷 V 对照品溶液的配制:

混合对照品溶液的配制: 取对照品 A、B 适量, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 制成每 1 mL 分别含 A0.992 mg 和 B0.229 mg 的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备:

标准曲线的制备: 标准曲线的制备依次取混合对照品溶液 1、2.5、8、10 μL, 按照色谱条件连续进样测定, 重复两次, 计算峰面积。

2 结果分析

2.1 微生物转化及产物的提取

罗汉果总苷通过 P-9 菌的转化作用在 28 °C, 220 rpm 下摇瓶培养 120 h 后得到 1 L 发酵菌液, 4000 rpm 离心 20 min 得上清液, 置于分液漏斗中, 加入 60% 上清液体积的正丁醇, 充分振荡, 静置分层, 分出上层有机相。下层水相再加入适量体积正丁醇, 同法萃取 3 次。将所得到的有机相合并, 置于分液漏斗中, 加入少量水, 充分振荡, 静置分层, 收集有机相, 减压浓缩至干, 于 80 °C 真空干燥 4 h 得到约 7 g 转化产物, 碾碎, 置于干燥器中保存, 备用。

2.2 转化产物 A、B、C 的分离纯化

将提取到的转化产物经过硅胶柱层析, 用洗脱液洗脱, 一共收集了 370 管, 根据 TLC(展开剂: 氯仿: 甲醇: 水 = 10: 4: 0.3) 检测发现, 93-127 管洗脱液的 R_f 值相同, 205-250 管洗脱液具有相同的 R_f 值, 291-350 管洗脱液的 R_f 值相同, 合并相同 R_f 值的试管, 减压蒸干。93-127 管蒸干后为类白色粉末, 得 1.006 g, 为转化产物 A。205-250 管蒸干后为淡黄色粉末, 得 0.025 g, 为转化产物 C。291-350 管再进行 C₁₈ 反相柱层析, 用洗脱液洗脱, 一共收集 150 管, 同法进行 TLC 检测, 结果 79-100 管 R_f 值相同, 合并后减压蒸干, 得淡黄色粉末 0.293 g, 为转化产物 B。

分离得到的转化产物 A、B、C 置于真空干燥箱中 80 °C 干燥 4 小时, 置 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.3 转化产物 A、B、C 的结构鉴定

转化产物 A: 为类白色粉末, mp. 为 175 ~ 179 °C, $[\alpha]_D^{20} + 24.4^\circ$ (C 0.00832, MeOH), API-ES MS *m/z*: 823 [M + Na]⁺, 分子量为 800, 符合分子式 C₄₂H₇₂O₁₄, ¹H NMR 显示有 2 个 β-D-葡萄糖吡喃糖端基质子信号 δ_H 分别为 4.86 (1H, d, J = 7.8 Hz) 和 5.16 (1H, d, J = 7.8 Hz), ¹H NMR 亦显示有 8 个甲基信号, 其中一个是双峰, 其 ¹³C NMR 显示 42 个碳信号, 与罗汉果醇(mogrol)的碳谱相比较^[3,4] 在 60 ~ 110 ppm 之间多出两个葡萄糖的碳信号, 即两个端基碳信号为 106.28 d 和 101.72 d, 2 个葡萄糖 6 位碳信号为 62.51 ppm 和 63.30 ppm, 另外在 δ_C 71 ~ 84 ppm 之间有 8 个 -CH-OH 的碳信号, 并且两个葡萄糖之间的连接显示(1→2)连接。因为有一个 δ_C 84.00 d 的碳信号正是与罗汉果苷 V(mogroside V) 的结构中 24 位上内侧葡萄糖的 2 位碳的化学结构位移值相符合。δ_C 77.88 d 碳信号与罗汉果醇的 3

位碳化学位移值相近,也与 11-oxomogroside I A₁ 碳的化学位移值相一致^[5]说明该 J-9 菌先将罗汉果苷 V 的 3 位和 24 位上糖链中的(1→6)连接的葡萄糖水解,少了两个葡萄糖,再将 3 位上的内侧β-D-葡萄糖吡喃糖也水解了,所以该转化产物 A 的结构为:罗汉果醇-24-O-β-D-葡萄糖吡喃糖基-(1→2)-β-D-葡萄糖吡喃糖苷(mogrol-24-D-O-β-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside)。

转化产物 B:为淡黄色粉末,mp 为 190 ~ 194 °C, $[\alpha]_D^{20} + 13.7^\circ$ (C 0.00797, MeOH), API-ES MS m/z :985 $[M + Na]^+$, 分子量为 962, 符合分子式 C₄₈H₈₂O₁₉, 碳谱显示有 48 个碳信号,有 3 个葡萄糖端基碳信号分别在 δ_c 101.93 d、 δ_c 106.46 d 和 δ_c 107.48 d;有 3 个葡萄糖吡喃糖的 6 位碳信号 δ_c 62.66 t、 δ_c 63.17 t 和 δ_c 63.46 t。成苷位置分别在碳 3 位(δ_c 88.04 d)和碳 24 位(δ_c 88.11 d),与 A 产物的 24 位上的 2 个糖一样,为外侧的葡萄糖吡喃糖的 1 位苷键连接到内侧的葡萄糖吡喃糖的 2 位上,其内侧葡萄糖 2 位碳为 δ_c 84.10d,与 A 产物相比较,B 由于碳 3 位连糖而产生糖苷化位移值 δ_c 88.04 d 与罗汉果苷 V 的相一致^[6,7],¹H NMR 显示有 3 个 β-D-葡萄糖端基质子信号分别为 δ_H 4.96 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 5.15 (1H, d, $J = 7.5$ Hz) 和 5.40 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 同时见到碳 6 位双键质子信号 δ_H 5.55 (1H, d, $J = 5.5$ Hz)。说明转化产物 B 可看成是罗汉果苷中主要成分罗汉果苷 V 在 J-9 菌产生的 1-6 糖苷键水解酶的作用下选择性地水解了末端的 1→6 连接的葡萄糖,所以该化合物 B 的结构为:罗汉果醇-3-O-β-葡萄糖吡喃糖基-24-O-β-D-葡萄糖吡喃糖基(1→2)-β-D-葡萄糖吡喃糖苷(mogrol-3-O-β-glucopyranosyl-24-O-

β-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside); 葡萄糖。

转化产物 C:为淡黄色粉末, API-ES MS m/z : 983 $[M + Na]^+$, 分子量为 960, 符合¹³C NMR 显示 48 个碳信号,符合分子式 C₄₈H₈₀O₁₉, 其碳谱与转化产物 B 相比,多个羰基碳信号 δ_c 213.98s, 少了一个连氧糖碳信号,其余碳信号相似。三个葡萄糖吡喃糖信号亦十分相近,即可见 3 个 β-D-葡萄糖吡喃糖的端基碳信号: δ_c 102.02 d、 δ_c 106.40 d、 δ_c 107.43 d 和 3 个葡萄糖吡喃糖的 6 位碳信号 δ_c 62.68t、 δ_c 63.12t、 δ_c 63.39t。从¹H NMR 可见 3 个 β-D-葡萄糖吡喃糖的端基质子信号 δ_H 4.93 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.13 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.42 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)。另外还可看到苷元 6 位上双键质子信号 δ_H 5.57 (1H, d, $J = 5.0$ Hz) 和 5.6 位双键碳信号 δ_c 141.35 s 和 δ_c 118.62 d, 与文献 11-oxomogroside I A₁ 相比较,其 11 位碳化学位移相同均为 213.9 ppm 单峰,除了 3 位碳连糖为 δ_c 87.32 d 以外,其余苷元部分都十分相似。说明 J-9 菌产生的酶先水解罗汉果苷的 3 位和 24 位的糖链上外侧的以 1→6 相连的糖键,然后 11 位上的 α-羟基继而氧化成酮基,因此转化产物 C 为 11-酮-罗汉果醇-3-O-β-D-葡萄糖吡喃糖基-(1→2)-β-D-葡萄糖吡喃糖苷(11-oxo-mogrol-3-O-β-D-glucopyranosyl-24-O-β-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside),这一类含酮基的葫芦烷成分陈等^[4]从越瓜中也分出来过类似的成分。

以上从罗汉果总苷经青霉属真菌 P-9 转化而产生的 A、B、C 三个产物,其结构尚未见报道,其它生物活性有待进一步研究。转化产物 A、B、C 的化学结构式见图 3, C 谱数据见表 1。

表 1 转化产物 A、B、C 的化学结构式

Table 1 The ¹³C NMR spectral data of Mogrol, Mogroside V, 11-oxomogroside I A₁ and A, B, C (ppm. in C₅D₅N)

| Carbon | Mogrol | Mogroside V | 转化产物 A | 转化产物 B | 转化产物 C | 11-Oxomogroside I A ₁ ^[64] |
|--------|--------|-------------|---------|---------|---------|--|
| 1 | 25.8t | 26.8t | 26.12t | 26.91t | 22.26t | 21.3t |
| 2 | 30.8t | 29.4t | 30.73t | 29.66t | 28.59t | 29.8t |
| 3 | 76.2d | 87.7d | 77.88d | 88.04d | 87.32d | 75.6d |
| 4 | 42.2s | 42.3s | 42.28s | 42.49s | 42.14s | 41.9s |
| 5 | 144.3s | 144.5s | 144.14s | 144.34s | 141.35s | 141.5s |
| 6 | 119.1d | 118.2d | 119.15d | 118.58d | 118.62d | 119.0d |
| 7 | 24.5t | 24.7t | 24.59t | 24.70t | 24.23t | 24.2t |
| 8 | 43.6d | 43.7d | 43.60d | 43.65d | 44.10d | 44.1d |

| | | | | | | |
|----|-------|-------|--------|--------|---------|--------|
| 9 | 40.2s | 40.3s | 40.17s | 40.24s | 49.17s | 49.2s |
| 10 | 36.9d | 36.8d | 36.66d | 36.87d | 36.05d | 36.0d |
| 11 | 77.8d | 78.0d | 78.22d | 78.58d | 213.98s | 213.9s |
| 12 | 41.2t | 41.2t | 41.13t | 41.23t | 48.88t | 48.8t |
| 13 | 47.4s | 47.6s | 47.41s | 47.53s | 49.10s | 49.1s |
| 14 | 49.8s | 49.8s | 49.71s | 49.83s | 49.77s | 49.7s |
| 15 | 34.5t | 34.7t | 34.53t | 34.66t | 34.70t | 34.6t |
| 16 | 28.4t | 28.6t | 28.47t | 28.64t | 28.37t | 29.5t |
| 17 | 51.0d | 51.2d | 50.84d | 50.99d | 49.85d | 49.9d |
| 18 | 17.0q | 17.2q | 17.04q | 17.19q | 17.12q | 17.0q |
| 19 | 26.7q | 27.1q | 26.12q | 26.41q | 20.44q | 20.2q |
| 20 | 36.3d | 36.5d | 36.77d | 36.94d | 36.62d | 36.6d |
| 21 | 18.9q | 19.2q | 18.99q | 19.18q | 18.86q | 18.6q |
| 22 | 34.2t | 33.4t | 33.80t | 33.97t | 33.74t | 33.3t |
| 23 | 29.0t | 29.6t | 28.47t | 28.64t | 28.37t | 28.1t |
| 24 | 79.0d | 91.7d | 87.86d | 88.11d | 88.19d | 90.7d |
| 25 | 72.0s | 72.8s | 72.17s | 72.49s | 72.50s | 71.8s |
| 26 | 25.8q | 24.7q | 25.74q | 25.95q | 26.01q | 25.4q |
| 27 | 26.2q | 26.3q | 27.02q | 27.82q | 27.24q | 27.0q |
| 28 | 19.3q | 19.5q | 19.35q | 19.49q | 28.46q | 28.7q |
| 29 | 27.3q | 27.8q | 27.02q | 27.21q | 26.01q | 26.3q |
| 30 | 26.2q | 26.3q | 26.63q | 26.48q | 18.44q | 18.3q |

a(3位)

| | | | |
|-------|--------|---------|---------|
| Glc-1 | 106.8d | 106.46d | 107.43d |
| Glc-2 | 75.2d | 75.63d | 75.64d |
| Glc-3 | 78.4d | 78.39d | 78.40d |
| Glc-4 | 71.7d | 71.53d | 71.54d |
| Glc-5 | 77.1d | 77.99d | 78.45d |
| Glc-6 | 70.1t | 62.66t | 62.68t |

B(a-6)

| | |
|-------|--------|
| Glc-1 | 105.3d |
| Glc-2 | 76.0d |
| Glc-3 | 78.6d |
| Glc-4 | 71.9d |
| Glc-5 | 78.1d |
| Glc-6 | 63.0t |

C(24位)

| | | | | | |
|-------|--------|---------|---------|---------|--------|
| Glc-1 | 103.4d | 101.73d | 101.93d | 102.02d | 105.9d |
| Glc-2 | 82.7d | 83.96d | 84.10d | 83.96d | 75.4d |
| Glc-3 | 76.2d | 77.89d | 78.24d | 76.36d | 78.6d |
| Glc-4 | 72.6d | 71.39d | 71.53d | 72.28d | 72.0d |
| Glc-5 | 77.8d | 78.22d | 78.54d | 78.61d | 78.5d |

| | | | | | |
|--------|--------|---------|---------|---------|-------|
| Glc-6 | 70.0t | 62.51t | 63.17t | 63.13t | 62.7t |
| D(c-2) | | | | | |
| Glc-1 | 104.6d | 106.28d | 107.48d | 106.40d | |
| Glc-2 | 75.0d | 76.28d | 76.34d | 75.64d | |
| Glc-3 | 78.2d | 78.34d | 78.47d | 78.36d | |
| Glc-4 | 71.2d | 72.17d | 72.31d | 71.89d | |
| Glc-5 | 78.0d | 78.22d | 78.24d | 78.86d | |
| Glc-6 | 62.3t | 63.30t | 63.46t | 63.39t | |
| E(c-6) | | | | | |
| Glc-1 | 105.2d | | | | |
| Glc-2 | 75.7d | | | | |
| Glc-3 | 78.2d | | | | |
| Glc-4 | 72.3d | | | | |
| Glc-5 | 78.2d | | | | |
| Glc-6 | 63.4t | | | | |

2.4 罗汉果总苷的转化过程

线性关系考察结果表明,罗汉果苷 V、化合物 A 和 B 的线性回归方程依次为; $Y = 459.9X + 0.2252, r = 1.0000$; $Y = 642.53X + 25.17, r = 1.0000$, 罗汉果苷 V、化合物 A 和 B 在 $0.99 \sim 9.9 \mu\text{g}$ 和 $0.3 \sim 2.99 \mu\text{g}$ 范围之间线性关系良好。

图 1 为罗汉果总苷在空白培养基中转化 2 d 的 HPLC 图谱,图 2 为罗汉果总苷在青霉属真菌 P-9 转化 2 d 后的 HPLC 图谱,图 3 为罗汉果总苷在青霉属真菌 P-9 转化 5 d 的不同成分的含量曲线图。经比较得知,培养基与罗汉果总苷不发生转化反应,图

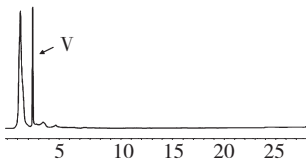


图 1 罗汉果总苷底物 (V) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of mogroside V

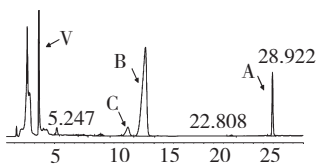


图 2 转化产物 A、B、C (48 小时) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of transformation products A, B and C(48 h)

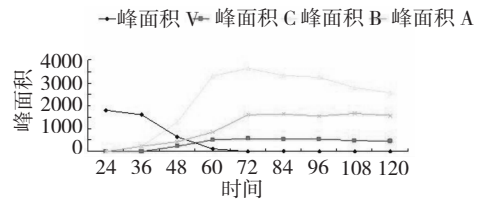


图 3 罗汉果总苷的微生物转化曲线

Fig. 3 Microbial transformation curve of mogroside V

2 中的转化产物 A、B、C 是青霉属真菌 P-9 对罗汉果总苷转化所得。

由图 3 可以看出,底物罗汉果总苷中的罗汉果苷 V 在 24 h 开始降解,转化产物 A、B、C 在 24 h 后开始逐渐生成,其中底物罗汉果苷 V 从 36 h 开始迅速减少,至 60 h 转化基本完成。转化产物 A、B 在 36 至 72 h 内迅速生成,72 h 后转化产物 A 基本维持稳定,转化产物 B 开始慢慢降低。转化产物 C 在 36 至 60 h 迅速生成,60 以后趋于稳定。罗汉果总苷转化产物中的主要化合物是罗汉果二葡萄糖苷和罗汉果三葡萄糖苷,根据底物和各转化产物的化学结构可以推断出转化过程,即罗汉果苷 V \rightarrow 转化产物 B \rightarrow 转化产物 A; 11-O-罗汉果苷 V \rightarrow 转化产物 C。进而可以推测青霉属真菌 P-9 产生的 β -葡萄糖苷酶能裂解罗汉果苷 V 上的 (1 \rightarrow 6)- β -D-葡萄糖苷键和 3 位上糖基与母核相链接的 β -D-葡萄糖苷键,但不能水解 (1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖苷键,说明该酶对于糖苷键的专一性非常强。

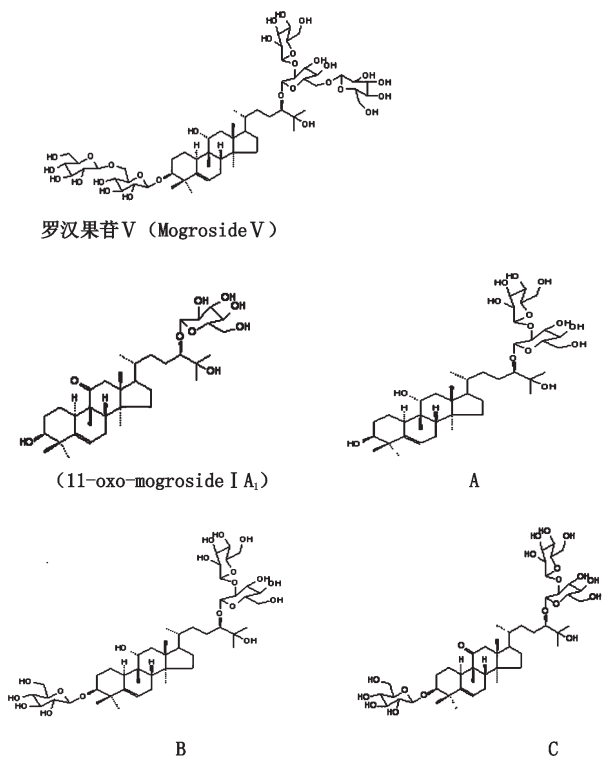


图4 罗汉果苷 V 与转化产物 A、B、C 的化学结构式

Fig. 4 The chemical structures of mogroside V and transformation products A, B and C

罗汉果总苷转化产物中的主要化合物是罗汉果二葡萄糖苷和罗汉果三葡萄糖苷,根据各化合物的化学结构可以推断转化过程,即罗汉果苷 V \rightarrow B 罗汉果醇-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷 \rightarrow A 罗汉果醇-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷; 11-O-罗汉果苷 V \rightarrow C 11-酮-罗汉果醇-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。

3 结论

本实验证明青霉属真菌 P-9 能转化罗汉果总苷产生转化产物 A、B、C,并得出在转化过程中罗汉果总苷底物和转化产物的含量的变化曲线,且主要转化产物 A、B、C 的含量最高分别为 1, 0. 293, 0. 025 mg/mL。主要转化产物 A、B、C 经熔点、比旋度、质谱 (MS)、红外光谱 (IR) 和核磁共振 (NMR) 波谱分析,鉴定为: A 为罗汉果醇-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷; B 为罗汉果醇-3-O- β -葡

萄吡喃糖基-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷; C 为 11-酮-罗汉果醇-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷, A、B、C 三种化合物均未见文献报道。根据各化合物的化学结构可以推断转化过程,即罗汉果苷 V \rightarrow B 罗汉果醇-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷 \rightarrow A 罗汉果醇-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷; 11-O-罗汉果苷 V \rightarrow C 11-酮-罗汉果醇-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-24-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。进而可以推测青霉属真菌 P-9 产生的 β -葡萄糖苷酶能裂解罗汉果苷 V 上的 (1 \rightarrow 6)- β -D-葡萄糖苷键,但不能水解 (1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖苷键,说明该酶对于糖苷键的专一性非常强,如后续研究能证实此酶是专一性很强的 (1 \rightarrow 6)- β -D-葡萄糖苷酶,且活性较高,那么此酶将作为一种工具酶而具有很大的应用前景。

参考文献

- Li DP (李典鹏), *et al.* Saponin compounds, extracted from *Momordica grosvenori* root and its preparing method and use (从罗汉果根中提取的皂苷类化合物,其制备方法及其用途). CN200810107427. 6, 2009-5-27.
- Li XB (李晓波), Wang MY (王梦月). The method of *Momordica grosvenori* extraction and alcohol preparation (罗汉果醇的提取制备方法). CN200710039126. X, 2007-9-12.
- Chang Q (常琪), *et al.* Study on NMR spectrum of *Momordica glycoside V*. *Chin J Magnetic Resonance* (波谱学杂志), 1994, 11: 43-48.
- Chen C (陈川). Cucurbitane type triterpenoids from the stems of *cucumis melo*. *J Nat Prod* (自然产品), 2009, 72: 824-829.
- Motohiko ukiya, *et al.* inhibitory Effects of cucurbitane glycosides and other triterpenoids from the fruit of *Momordica grosvenori* on Epstein-Barr-Virus early antigen induced by tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 6710 ~ 6715.
- You WC (游伟程). The prevalence trends and existing challenges of cancer. *Chin Preventive Med* (中国预防医药杂志), 2008, 42(11): 62-64.
- Shan XL (单晓蕾), *et al.* Inhibitory effect of cucurbitacin E on the proliferation of ovarian cancer cells and its mechanism. *Chin J Cancer* (癌症), 2010, 29: 20-24.