

杨建香,邱声祥,余志刚,等. 南海红树林内生真菌 GX-5b 代谢产物研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):330-332.

南海红树林内生真菌 GX-5b 代谢产物研究

杨建香^{1,2}, 邱声祥¹, 余志刚², 林永成²

(1. 中国科学院华南植物园植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广东广州 510650; 2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东广州 510275)

摘要:采用反复硅胶柱色谱法、Sephadex LH-20 凝胶色谱法等进行分离纯化, 研究南海红树林内生真菌 GX-5b 的代谢产物, 并通过理化常数测定和光谱分析鉴定其化学结构。结果表明: 从南海红树林内生真菌 GX-5b 的培养液中首次分离得到 6 个代谢产物, 分别为 3-(羟甲基)-6,8-二甲氧基香豆素、二甲基异喹啉、(E)-4,5-二羟基-3-(丙烯基)环戊-2-烯酮、2,8-二羟基-3,4-二氢萘酮、环(脯-甘)二肽、麦角甾醇。初步药理活性显示, 化合物 1 对口腔癌细胞 KB、KBv200 的抗肿瘤活性分别为 8.5、13.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词:南海; 红树林; 内生真菌; 代谢产物; 化学结构

中图分类号: O629 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0330-03

海洋微生物由于生活在高盐、高压的特殊环境中, 具有独特的代谢方式^[1]。据报道, 绝大多数海洋真菌都与红树林有着紧密的联系^[2-3], 而海洋微生物中的红树林是生长在热带亚热带海岸潮间带、受周期性潮水浸淹、以红树植物为主体的潮滩湿地木本生物群落, 是海洋环境中特有的高等植物^[4]。红树林具有独特的生理生态, 使其具有独特的代谢过程、代谢产物和独特的共生菌, 这些共生菌同样能产生极其丰富的新

的活性次级代谢产物。近十几年来, 笔者所在的课题组已经对中国南海红树林内生真菌进行了系统的研究, 从中分离获得一系列结构新颖或药理活性良好的海洋天然化合物^[5-8]。本试验对南海红树林内生真菌 GX-5b 代谢产物进行研究, 从培养液中分离得到 6 个化合物, 并通过理化常数测定和光谱分析鉴定其化学结构, 为南海红树林内生真菌代谢研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

INOVA-500NB 超导核磁共振谱仪和 INOVA-300NB 核磁共振仪(美国 Varian 公司); VG ZAB-HS 双聚焦质谱仪, Thermo DSQ 电子轰击电离质谱仪, Thermo MAT95XP 高分辨质谱仪; X-4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司)。所用试剂均为广东省广州化学试剂厂生产, 为化学纯, 溶剂经重蒸后使用。柱色谱硅胶为山东省青岛海洋化

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31100260); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(编号: KSCX2-YW-R-217、KSCX2-EW-J-28); 广东省广州市科技局项目(编号: 12C14061559); 广西壮族自治区教育厅科研项目(编号: 201204LX497)。

作者简介: 杨建香(1979—), 女, 山西原平人, 博士, 副教授, 从事天然产物的提取和分离。Tel: (020) 37082553; E-mail: 791011@126.com。

一段时间后转换成弱光照射试验。在持续光照条件下, 摇蚊经历至少 26 h 才开始产卵, 强光照射 10 h 条件下, 摇蚊精卵已经成熟, 不是 24 h 内周期性光照影响着受精率和产卵率, 而是摇蚊有效的完成婚飞和产卵。此外, 间歇性弱光光照导致在真正产卵高峰出现之前, 出现了一些产卵的峰值, 摇蚊不能在 1 h 之内全部完成婚飞和产卵, 如果摇蚊已经完成婚飞准备产卵, 而此时突然转换成强光, 摇蚊便会停止产卵, 并等待下一次弱光的出现。不合理的光周期直接延长了摇蚊产卵的持续时间, 这可能是由于刚羽化的摇蚊精卵都未完全成熟, 强光照可以起到催熟的效果, 而弱光可以诱导摇蚊完成婚飞, 且摇蚊产卵也需要在弱光条件下完成。试验结果表明, 摇蚊精卵成熟对强光照射时间的要求, 12 h 强光照射应该是最理想的。

3.4 密度与受精率和产卵率

代田昭彦认为密度对受精率有着显著的影响^[2]。本试验未对摇蚊的密度做精确控制, 但从试验结果来看, 受精率和产卵率都未因此表现出太大差异。不同摇蚊婚飞时要求的数量是不同的, 在试验过程中均可观察到婚飞现象, 至于不同摇

蚊婚飞密度要求, 有待进一步验证。

4 结论

在人工采卵实际应用中, 要求摇蚊产卵时间早且集中、产卵高峰突出、受精率和产卵率高。综合本次试验结果, 得出人工诱导摇蚊产卵的最佳光照条件是: 在摇蚊幼虫羽化后, 利用 >100 lx 的强光照射 12 h, 然后换成 20 lx 的弱光照射 4 h 左右。

参考文献:

- [1] Armitage P D, Cranston P S, Pinder L V. The chironomidae biology and ecology of non biting midges [M]. London: Chapman and Hall, 1995.
- [2] 代田昭彦. 摇蚊幼虫的研究: 养鱼饵料的饲育培养法[M]. 鲁守范, 韩华文, 译. 北京: 农业出版社, 1968: 52-57.
- [3] 陆开宏, 钱云霞. 细长摇蚊 *Tendipes attenuates* 生物学及人工采卵技术的研究[J]. 浙江水产学院学报, 1995, 14(4): 247-253.
- [4] 贺蓉, 唐琼英, 尹晓波, 等. 羽摇蚊 (*Tendipes plumosus*) 人工采卵的研究[J]. 四川畜牧兽医学院学报, 2000, 14(3): 32-35.

工厂生产的 200 ~ 300 目硅胶;硅胶 H;薄层硅胶 GF254。

1.2 菌种培养

红树林内生真菌 GX-5b 采自广西壮族自治区北海市,经鉴定为拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.),保存于中山大学化学与化学工程学院。发酵培养基含 10 g/L 葡萄糖,2 g/L 蛋白胨,1 g/L 酵母膏,2 g/L 粗海盐,pH 值 7.0。500 mL 三角瓶内装培养基 250 mL,0.125 MPa 灭菌 20 min 后接种 120 L,在 25 °C 静置培养 30 d,分别收集发酵液和菌体。

1.3 提取与分离

取 100 L 发酵物过滤得菌体和发酵液,发酵液浓缩后用乙酸乙酯充分萃取,菌体用甲醇多次浸泡。提取浓缩物分别以体积比 1 : 2 拌硅胶(200 ~ 300 目)进行柱色谱,以石油醚/乙酸乙酯/甲醇进行梯度加压洗脱。收集各组分,再经反复柱色谱制备薄层色谱,用重结晶等方法进行纯化。从菌体粗提取物(约 20 g)分离得到化合物 1(10 mg)、化合物 2(12 mg)、化合物 3(10 mg)、化合物 4(8 mg)、化合物 5(10 mg)、化合物 6(15 mg)。

1.4 细胞毒活性试验

采用 MTT 法^[9]测定化合物 1 人体口腔癌细胞 KB 及 KBv200 的抗肿瘤活性。

1.5 化合物的试验数据

化合物 1:淡黄色晶体,熔点 178 ~ 180 °C。¹H NMR(Acetone-d₆, 300 Hz):7.87(1H, t, *J* = 2.0 Hz), 6.77(1H, d, *J* = 3.0 Hz), 6.79(1H, d, *J* = 3.0 Hz), 4.51(2H, dd, *J* = 5.5, 2.0 Hz), 4.43(OH, d, *J* = 5.5 Hz), 3.85(3H, s), 3.94(3H, s); ¹³C NMR spectrum(Acetone-d₆, 75 MHz):160.5(C), 157.4(C), 148.8(C), 138.3(C), 137.8(CH), 130.9(C), 120.9(C), 103.1(CH), 101.5(CH), 59.8(CH₂), 56.6(CH₃), 56.1(CH₃); Mass spectrum(EI, 70 eV, *m/z*, Irel, %):236(100.0), 207(22.5), 193(4.4), 191(17.5), 179(7.5), 166(6.3), 137(6.3), 133(5.3);分子式 C₁₂H₁₂O₅。

化合物 2:黄色粉末,熔点 298 ~ 300 °C。¹H NMR(DMSO-d₆, 500 MHz):11.69(s, 1H), 11.86(s, 1H), 7.91(s, 1H), 7.70(s, 1H), 2.46(s, 3H), 2.48(s, 3H); ¹³C NMR(DMSO-d₆, 125 MHz):150.0(C), 160.6(C), 130.6(C), 138.4(C), 128.7(CH), 144.6(C), 138.9(C), 125.8(CH), 141.6(C), 146.4(C), 19.5(CH₃), 20.2(CH₃)。

化合物 3:无色块状晶体,易溶于常用溶剂。¹H NMR(300 MHz, Acetone-d₆):6.83(1H, m), 6.45(1H, d, 15.6), 5.96(1H, s), 4.73(1H, s), 4.08(1H, s), 1.91(3H, d, 6.6); EIMS *m/z*(rel. int.):154(3.8), 139(100), 135(5.8), 126(5.8), 121(41.8), 111(12.4), 109(13.0), 95(11.6), 79(51.8), 65(21.6);分子式 C₈H₁₀O₃。

化合物 4:褐色固体,易溶于常用溶剂。¹H NMR(300 MHz, Acetone-d₆):12.22(OH, s), 7.31(1H, t, *J* = 8.0), 6.90(1H, d, *J* = 8.0), 6.61(1H, d, *J* = 8.0), 4.68(1H, m), 4.44(OH, brd), 2.66(1H, m), 2.49(1H, m), 2.11(1H, m), 1.95(1H, m); ¹³C-NMR(300 MHz, Acetone-d₆):204.7(C), 163.0(C), 145.7(C), 137.6(CH), 119.7(CH), 115.9(CH), 115.5(C), 73.6(CH), 32.5(CH₂), 28.2(CH₂); EIMS

m/z[⁺]:178;分子式 C₁₀H₁₀O₃。

化合物 5:透明粒状晶体;熔点 213 ~ 215 °C。¹H NMR(DMSO-d₆, 300 Hz):4.22(m, 1H), 4.09(dq, 17 Hz, 1H), 3.73(d, 17Hz, 1H), 3.53(m, 2H), 2.31(m, 1H), 1.99(m, 1H), 1.95(m, 2H); ¹³C NMR(DMSO-d₆, 75 Hz):171.9(C), 166.4(C), 46.9(CH₂), 46.6(CH₂), 59.8(CH), 29.3(CH₂), 23.2(CH₂); FAB-MS(*m/z*):155[M + 1]⁺, 136, 120, 107, 90, 89, 70, 51。

化合物 6:白色针晶,熔点 155 ~ 157 °C。¹H NMR(CDCl₃, 300 Hz):0.63(s, 3H), 0.83(d, 6.0 Hz, 3H), 0.84(d, 6.0 Hz, 3H), 0.92(s, 3H), 1.03(d, 6.5 Hz, 3H), 3.64(m, 1H), 5.19(dd, 15.5, 8 Hz, 1H), 5.22(dd, 15, 7 Hz, 1H), 5.38(d, 6.0 Hz, 1H), 5.57(d, 4.0 Hz, 1H)。

2 结果与分析(图 1)

化合物 1: EIMS 显示分子离子峰 236, 可知分子式为 C₁₂H₁₂O₅。¹H NMR 显示该化合物有 2 个间位的苯环氢[6.77(1H, d, *J* = 3.0 Hz), 6.79(1H, d, *J* = 3.0 Hz)], 1 个双键氢[7.87(1H, t, *J* = 2.0 Hz)], 1 个连在不饱和碳上的 CH₂[4.51(2H, dd, *J* = 5.5, 2.0 Hz)], 1 个活泼氢[4.43(OH, d, *J* = 5.5 Hz)], 2 个连在芳香环上的甲氧基[3.85(3H, s), 3.94(3H, s)]。¹³C NMR 显示该化合物有 1 个香豆素的骨架。结合 2D NMR 并与文献对照后确定化合物的结构为 3-(羟甲基)-6,8-二甲氧基香豆素^[10]。

化合物 2: EI-MS 显示分子量为 243, 结合核磁数据, 推断出该化合物的分子式为 C₁₂H₁₀N₄O₂。¹³C NMR 和 DEPT 谱显示该化合物有 12 个碳, 其中包括 2 个酰亚胺羰基(160.6, 150.0), 6 个芳香季碳[146.4(C), 144.6(C), 141.6(C), 138.9(C), 138.4(C), 130.6(C)], 2 个次甲基碳[128.7(CH), 125.8(CH)], 2 个甲基碳[20.2(CH₃), 19.5(CH₃)]。¹H NMR 谱显示该化合物有 2 个活泼的酰亚胺质子[11.86(s, 1H), 11.69(1H, s)], 2 个芳香质子[7.91(s, 1H), 7.70(s, 1H)], 2 个甲基质子[2.48(s, 3H), 2.46(3H, s)]。通过这些信息, 进一步与文献[11]对照, 确定该化合物为二甲基异咯嗪。

化合物 3: ¹H NMR 显示该化合物有 3 个烯氢, 2 个连氧的次甲基, 1 个甲基。结合 EIMS *m/z*(rel. int.) 与数据库并与文献[12]对照后, 确定化合物为(E)-4,5-二羟基-3-(丙烯基)环戊-2-烯酮。

化合物 4: EIMS 显示分子量为 178, 结合核磁数据得到分子式为 C₁₀H₁₀O₃, 不饱和度为 6。¹³C NMR 显示该化合物有 1 个三取代苯环, 2 个亚甲基, 1 个羰基, 1 个连氧次甲基。¹H NMR 显示该化合物有 3 个相邻的苯环氢, 1 个共轭的羟基活泼氢, 4 个互相耦合的环上碳氢, 1 个连氧的碳氢和 1 个脂肪碳上的羟基氢。把化合物数据与文献[13]对照后确定化合物为 2,8-二羟基-3,4-二氢茶酮。

化合物 5: EIMS 显示分子离子峰为 154[M + 1]⁺, 再根据核磁数据, 推出分子式为 C₇H₁₀N₂O₂, 不饱和度为 4。¹³C NMR 和 DEPT 显示分子中存在 2 个季碳, 1 个—CH, 4 个—CH₂, 没有甲基, 有 1 个活泼氢。从¹H NMR 结果[4.22(m, 1H), 4.09

(dq, 17Hz, 1H), 3. 73 (d, 17Hz, 1H)] 以及 ^{13}C NMR 结果 [171. 9(C), 166. 4(C)] 可推测, 化合物 5 为环二肽, 根据核磁数据与文献[14]推定其为环(脯-甘)二肽。

化合物 6: 将该化合物与麦角甾醇标准品进行 TLC 展开, 二者的 R_f 一致, $R_f=0.5$ (硅胶板, 展开剂为 25% 乙酸乙酯/石

油醚), 吸碘很强, 从碘中取出的薄层板上的颜色变成浓浓的黑色。将熔点、红外光谱数据、NMR 数据与麦角甾醇的标准图谱比较, 基本一致。可确认该化合物为麦角甾醇 (ergosterol)。

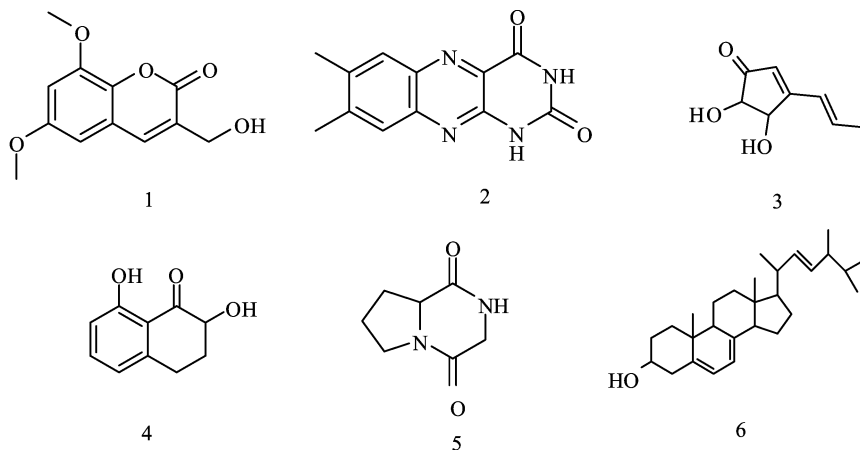


图1 化合物1至化合物6的化学结构

3 结论

本试验对南海红树林内生真菌 GX-5b 代谢产物进行研究, 从培养液中分离得到 6 个化合物: 3-(羟甲基)-6, 8-二甲氧基香豆素、二甲基异咯嗪、(E)-4, 5-二羟基-3-(丙烯基)环戊-2-烯酮、2, 8-二羟基-3, 4-二氢萘酮、环(脯甘)二肽、麦角甾醇。初步药理活性显示, 化合物 1 对口腔癌细胞 KB、KBv200 的抗肿瘤活性值分别为 8. 5、13. 0 $\mu\text{g/mL}$ 。本研究所有化合物均首次从南海红树林内生真菌 GX-5b 中分离得到。

参考文献:

- [1] 周中流. 红树林底泥放线菌(N2010-37)发酵液的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 98-100.
- [2] Bugni T S, Ireland C M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms[J]. Natural Product Reports, 2004, 21(1): 143-163.
- [3] Sadaba R B, Vrijmoed L L P, Jones E B G, et al. Observations on vertical distribution of fungi associated with standing senescent *Acanthus ilicifolius* stems at Mai Po Mangrove, Hong Kong[J]. Hydrobiologia, 1995, 295: 119-126.
- [4] 杨建香, 邱声祥, 余志刚, 等. 南海红树林内生真菌 SK7RN3G1 代谢产物研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 95-98.
- [5] Li H, Huang H, Shao C, et al. Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala* [J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(5): 1230-1235.
- [6] Shao C L, Wang C Y, Wei M Y, et al. Aspergilones A and B, two

benzylazaphilones with an unprecedented carbon skeleton from the gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011, 21(2): 690-693.

- [7] Wei M Y, Wang C Y, Liu Q A, et al. Five sesquiterpenoids from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. isolated from a gorgonian *Dichotella gemmacea* [J]. Marine Drugs, 2010, 8(4): 941-949.
- [8] 魏美燕, 邵长伦, 谭 倪, 等. 南海海洋真菌 *Penicillium* sp. (386#) 次级代谢产物再研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2010, 49(4): 77-80.
- [9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [10] Ayer W A, Racok J S. The metabolites of *Talaromyces flavus*; Part 1. metabolites of the organic extracts[J]. Can J Chem, 1990, 68(11): 2085-2094.
- [11] Ding Z G, Zhao J Y, Yang P W, et al. ^1H and ^{13}C NMR assignments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia alba* sp. nov (YIM 30243T) [J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2009, 47(4): 366-370.
- [12] Ghisalberti E L, Narbey M J, Rowland C Y. Metabolites of *Aspergillus terreus* antagonistic towards the take-all fungus [J]. J Nat Prod, 1990, 53(2): 520-522.
- [13] Couché E, Fkyerat A, Tabacchi R. Asymmetric synthesis of the *cis*- and *trans*-3, 4-dihydro-2, 4, 8-trihydroxynaphthalen-1(2H)-ones [J]. Helv Chim Acta, 2003, 86(1): 210-221.
- [14] 李厚金, 林永成, 刘晓红, 等. 红树林内生真菌 2524 号的肽类成分(I) [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41(1): 110-112.