

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.11.026

角果木内生真菌代谢产物的分离鉴定^①

邓鹏飞^{1,2}, 罗由萍^{1,2}, 刘莉¹,
李杰丞¹, 朱之贵¹, 郑仲奇¹

1. 海南师范大学 化学与化工学院, 海口 571158; 2. 教育部热带植物化学重点实验室, 海口 571158

摘要: 通过多种色谱分离方法对角果木根部真菌 *Fusarium* sp. JG13 代谢产物的化学成分进行研究, 从其发酵液中分离得到 6 个化合物, 利用波谱等方法分别鉴定为 Sorbicillin (1), 2', 3'-Dihydrosorbicillin (2), Sohirnone A (3), 5'-hydroxyprenyl salicylate (4), N-(2-Hydroxyphenyl)-acetamide (5), 2-(E-3-heptenyl)-3, 6-dihydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzaldehyde (6). 所有化合物均为首次从角果木真菌发酵产物中分离得到.

关键词: 角果木; 内生真菌; 次级代谢产物; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)11-0177-04

自然界中的绝大多数植物与菌根真菌(mycorrhizal fungi)或内生真菌(fungal endophytes)产生共生关系^[1], 内生真菌和寄主植物的共生关系体现在内生真菌获得寄主植物的营养和保护, 而寄主植物通过内生真菌提高竞争力以及抵抗食草动物, 病菌和不同的非生物的侵袭^[2-3]. 内生真菌能够产生必要的酶穿透并寄宿在寄主植物组织中; 真菌产生的防御代谢产物的浓度要高于病原体感染产生的代谢产物的浓度^[4]. 由于内生真菌代谢产物与植物病原体的毒素强烈相关^[5], 而且新陈代谢的相互作用能增强次级代谢产物的合成. 故内生真菌是植物代谢产物重要来源, 也是筛选新药先导物的快捷途径^[6-7]. 红树林植物由于处于高盐高温等恶劣环境, 其内生真菌次级代谢产物具有结构多样性和显著生物活性等特征, 引起了研究人员的广泛关注.

红树药用植物角果木(*Ceriops tagal*)可用于止血、通便和治疗恶疮等, 我国植物化学家对其化学成分进行了研究^[8-9]. 为了寻找新的具有生物活性的化合物, 笔者对海南红树林植物角果木根部内生真菌 *Fusarium* sp. JG13 的代谢产物进行分离提纯, 得到 6 个化合物单体, 运用 HR-ESIMS, 1D 和 2D NMR 等波谱技术确定了它们的结构.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

核磁共振谱 Brucker AVANCE 400, 超高效液相色谱(ACQUITY UPLC I-Class)与四级杆飞行时间质谱(Xevo G2-S QToF)(waters 公司), 制备高效液相色谱仪安捷伦 1260(Agilent 公司), 层析用硅胶 G 和 H (青岛海洋化工厂), 其余试剂均为分析纯试剂.

1.2 实验样品

菌株采集于海口市东寨港红树林自然保护区红树林植物角果木的根部, 经分离鉴定该菌株为镰孢霉

① 收稿日期: 2017-04-11

基金项目: 海南自然科学基金(20162030).

作者简介: 邓鹏飞(1974-), 男, 江西新余人, 副教授, 博士, 主要从事有机化学研究.

通信作者: 罗由萍, 博士研究生, 实验员.

属真菌, 样本保存于教育部热带药用植物化学重点实验室. 分离纯化方法: 超净工作台上将角样品用无菌水冲洗 3 遍, 用 1% 氯化汞溶液浸泡 1 min, 再用无菌蒸馏水冲洗 3 遍, 用 75% 乙醇水溶液浸泡 30 s, 最后用无菌蒸馏水冲洗 3 遍. 将样品组织切块, 置于 PDA(琼脂 7.5 g、葡萄糖 10 g、马铃薯 100 g、陈海水 500 mL, pH=7.2) 培养基中, 于 28 °C 恒温下倒置培养. 待新的菌丝长出后, 挑取尖端菌丝并转接至新的培养基, 数次纯化后试管斜面保存备用. 发酵培养基选用 PDA 培养基, 并加葡萄糖(25 g/L)和粗海盐(36 g/L), 在 1 L 锥形瓶内加入 0.4 L 培养液, 于 121 °C, 0.1 MPa 下高温灭菌 25 min, 超净工作台上接种 100 L, 每瓶接种量为 5 mL, 于 28 °C 恒温下静置培养 60 d.

1.3 提取与分离

将过滤所得的发酵液用乙酸乙酯(10 L)反复萃取 3 次, 萃取相用旋转蒸发仪浓缩后得到褐色粘稠状浸膏 510 g, 取 500 g 浸膏悬浮于 50 °C 热水中, 依次用石油醚(1 L)、乙酸乙酯(1 L)、正丁醇(1 L)重复萃取 3 次, 旋蒸后分别得到石油醚部位 A(130 g), 乙酸乙酯部位 B(150 g), 正丁醇部位 C(180 g). 正丁醇部位 C 经硅胶柱色谱(V(石油醚): V(乙酸乙酯)=1: 0~0: 1)分离得到 C1~C16 共 16 个部分. C8(4 g)部分经过正相硅胶柱色谱(V(石油醚): V(乙酸乙酯)=10: 1~0: 1)得到的 C8-5(0.5 g), 再用制备薄层色谱分离(V(石油醚): V(乙酸乙酯)=3: 1), 得到化合物 5(30 mg). C8-7(7.5 g)部分经过正相硅胶柱色谱(V(二氯甲烷): V(甲醇)=10: 1~0: 1)得到的 C8-7-4(2.4 g)部分经过反相硅胶柱色谱(V(甲醇): V(水)=5: 95~50: 50)得到的 C8-7-4-3(500 mg)部分经制备高效液相色谱(V(乙腈): V(水)=1: 9~5: 5, 流速 10 mL/min, 检测波长 240 nm)分离得到化合物 4(15 mg). C9(12 g)部分经过正相硅胶柱色谱(V(二氯甲烷): V(甲醇)=10: 1~0: 1)得到的 C9-5(3.5 g)部分经过反相硅胶柱色谱(V(甲醇): V(水)=5: 95~50: 50)得到的 C9-5-3(700 mg)部分经制备高效液相色谱(V(乙腈): V(水)=1: 9~5: 5, 流速 10 mL/min, 检测波长 240 nm)分离得到化合物 1(12 mg), 2(25 mg), 3(16 mg)和 6(20 mg).

2 结构鉴定

化合物 1 淡黄色固体; ESI-MS m/z : 233; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 13.6(1H, s, H-6), 7.44(1H, dd, $J=11.0, 3.6$, H-4'), 7.14(1H, d, $J=14$, H-2'), 6.48(1H, t, $J=11.3$, H-3'), 6.33(1H, m, H-5'), 2.22(3H, s, 5- CH_3), 2.11(3H, s, 3- CH_3), 1.94(3H, d, $J=6.6$, 6'- CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CD_3OD) δ 192.6(C-1'), 162.2(C-2), 160.8(C-4), 144.0(C-4'), 140.4(C-6), 130.6(C-5'), 128.7(C-5), 122.1(C-3), 115.9(C-1), 112.6(C-2'), 110.7(C-3'), 17.3(6'- CH_3), 15.0(5- CH_3), 6.7(3- CH_3). 依据 NMR 波谱数据并与已知文献[10]对照, 鉴定该化合物结构为 Sorbicillin.

化合物 2 淡黄色固体; ESI-MS m/z : 234; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 7.50(1H, s, H-6), 5.54(2H, m, H-4', H-5'), 3.00(2H, t, $J=7.3$, H-2'), 2.39(2H, m, H-3'), 2.20(3H, s, 5- CH_3), 2.10(3H, s, 3- CH_3), 1.66(3H, s, 6'- CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CD_3OD) δ 204.7(C-1'), 161.1(C-2), 160.6(C-4), 129.6(C-4'), 129.1(C-6), 125.5(C-5'), 115.8(C-5), 112.0(C-3), 110.6(C-1), 37.3(C-2'), 27.6(C-3'), 16.7(6'- CH_3), 15.0(5- CH_3), 6.6(3- CH_3). 依据波谱数据并与已知文献[11]对照, 鉴定该化合物结构为 2', 3'-Dihydrosorbicillin.

化合物 3 黄色粉末; ESI-MS m/z : 219; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 12.61(1H, s, -OH), 7.59(1H, s, H-3), 6.28(1H, s, H-6), 5.54(2H, s, H-4', 5'), 2.99(2H, t, $J=7.4$, H-2'), 2.39(2H, s, H-3'), 2.19(3H, s, 4- CH_3), 1.67(3H, s, H-6'); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CD_3OD) δ 204.2(C-1'), 163.4(C-1), 160.6(C-5), 132.0(C-3), 129.6(C-4'), 125.5(C-5'), 116.9(C-4), 112.2(C-2), 101.6(C-6), 37.3(C-2'), 27.5(C-3, 5), 16.7(C-6'), 14.1(4- CH_3). 依据波谱数据并与已知文献[12]对照, 鉴定该化合物结构为 Sohirnone A.

化合物 4 棕色油状物; ESI-MS m/z : 222; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, acetone- d_6): δ 11.2(1H, s, -OH), 7.91(1H, dd, $J=6.76, 2.08$, H-6), 7.60(1H, dd, $J=8.4, 7.44$, H-4), 7.01(1H, d, $J=7.36$, H-3), 6.97(1H, dd, $J=8.4, 0.96$, H-5), 4.93(1H, dd, $J=2.16$, H-1'), 4.84(1H, d, $J=2.12$, H-2'), 4.81(1H, d, $J=2.12$, H-4'), 4.69(1H, br s, -OH), 1.54(1H, d, $J=6.56$, H-5'); $^{13}\text{C NMR}$

(100MHz, acetone- d_6) δ 169.5(C-7), 161.6(C-2), 142.3(C-3'), 136.3(C-6), 130.6(C-2'), 118.5(C-4), 117.4(C-5), 117.0(C-3), 107.4(C-1), 78.6(C-1'), 66.2(C-4'), 15.4(C-3'). 依据波谱数据并与已知文献[13]对照, 鉴定该化合物结构为 5'-hydroxyphenyl salicylate.

化合物 5 淡黄色固体; ESI-MS m/z : 152; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 6.28(1H, dd, $J=7.9$, 1.4, H-2), 5.71(1H, td, $J=8.0$, 1.5, H-4), 5.56(1H, dd, $J=8.0$, 1.16, H-3), 5.51(1H, td, $J=8.0$, 1.28, H-4), 0.88(3H, s, $-\text{CH}_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, Methanol- d_4) δ 170.8(C-7), 148.4(C-6), 125.7(C-1), 125.4(C-4, 5), 122.6(C-2), 119.2(C-3), 115.9(C-5), 22.1(C-8). 依据波谱数据并与已知文献[14]对照, 鉴定该化合物结构为 N-(2-Hydroxyphenyl)-acetamide.

化合物 6 淡黄色针状晶体(甲醇); ESI-MS m/z : 301; $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 11.98(1H, s, 6-OH), 10.27(1H, s, $-\text{CHO}$), 6.95(1H, s, H-4), 5.50(2H, s, H-9, 10), 5.32(1H, t, $J=6.9$, H-16), 4.49(1H, s, 3-OH), 3.33(2H, d, $J=6.9$, H-15), 2.99(2H, t, $J=7.4$, H-7), 2.32(2H, m, H-8), 1.99(2H, m, H-11), 1.80(3H, s, $-\text{CH}_3$), 1.74(3H, s, $-\text{CH}_3$), 1.38(2H, q, $J=7.2$, H-12), 0.90(3H, t, $J=7.2$, H-13); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3) δ 195.5(C-14), 155.9(C-6), 145.1(C-3) 133.9(C-17), 132.7(C-10), 128.9(C-2) 128.3(C-9), 127.6(C-5), 125.9(C-4), 121.2(C-16), 117.3(C-1), 34.6(C-11) 34.2(C-8), 27.0(C-15), 25.8(C-19), 24.3(C-7), 22.5(C-12), 17.8(C-18), 13.7(C-13). 依据波谱数据并与已知文献[15]对照, 鉴定该化合物结构为 2-(E-3-heptenyl)-3, 6-dihydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzaldehyde.

化合物 1-6 的结构见图 1.

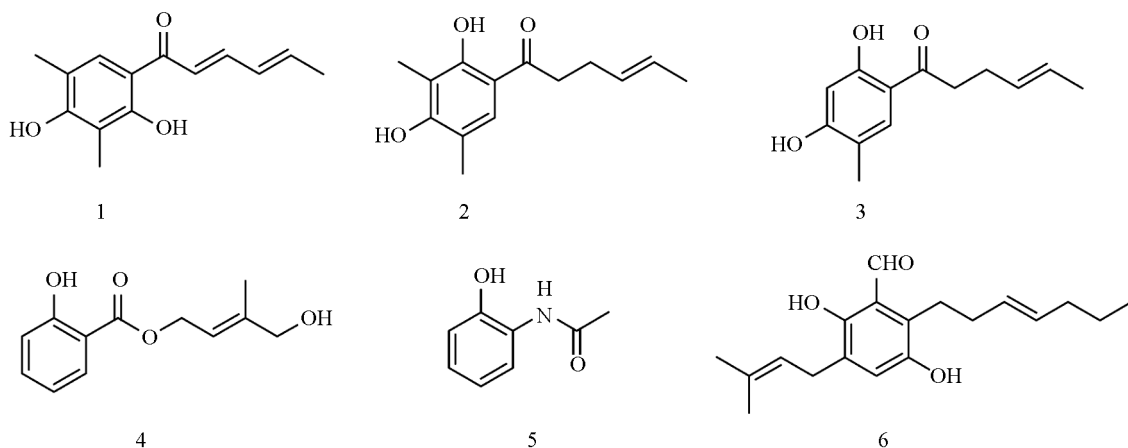


图 1 化合物 1-6 化学结构

参考文献:

- [1] PETRINI O. Taxonomy of Endophytic Fungi of Aerial Plant Tissues [M]. Cambridge UK: Cambridge University Press, 1991: 175-187.
- [2] RODRIGUEZ R J, WHITE J F, ARNOLD A E, et al. Fungal Endophytes: Diversity and Functional Roles [J]. New Phytologist, 2009, 182(2): 314-330.
- [3] SAIKKONEN K, FAETH S H, HELANDER M, et al. FUNGALENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants [J]. Annu Rev Ecol Syst, 1998, 29(1): 319-343.
- [4] SCHULZ B, BOYLE C, DRAEGER S, et al. Endophytic Fungi: a Source of Novel Biologically Active Secondary Metabolites [J]. Mycol Res, 2002, 106(9): 996-1004.
- [5] JEGOROV A, SIMEK P, HEYDOVA, et al. Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products [C] // WICKLOW D T, SODERSTROM B E. Environmental and Microbial Relationships. New York: Springer-Verlag, 2007: 257-283.
- [6] AMAL H A, DEBBAB A, KJER J, et al. Fungal Endophytes from Higher Plants: a Prolific Source of Phytochemicals and Other Bioactive Natural Products [J]. Fungal Diversity, 2010, 41(1): 1-16.

- [7] CHANDRA S. Endophytic Fungi: Novel Sources of Anticancer Lead Molecules [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 95(1): 47–59.
- [8] 张 炎, 邓志威, 高天翔, 等. 中国红树植物角果木的化学成分 [J]. 药学学报, 2005, 40(10): 935–939.
- [9] 何 磊, 王友绍, 王清吉, 等. 药用红树植物角果木化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(5): 341–342, 374.
- [10] 赵 瑞, 李进军, 彭海燕, 等. 海洋青霉属真菌菌株 XGH2321 抑菌活性代谢产物的分离与鉴定 [J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(4): 261–264.
- [11] MASKEY R P, GRÜN_WOLLNY I, LAATSCH H. Sorbicillin Analogues and Related Dimeric Compounds from *Penicillium Notatum* [J]. J Nat Prod, 2005, 68(6): 865–870.
- [12] XUAN Q C, HUANG R, CHEN Y W, et al. Cyclonerol Derivatives from *Trichoderma Longibrachiatum* YM311505 [J]. Natural Product Communications, 2014, 9(3): 313–314.
- [13] RUSTAIYAN A, JAKUPOVIC J, CHAU_THI T V, et al. Further Sesquiterpene Lactones from the Genus *Dittrichia* [J]. Phymchemistry, 1987, 26(9): 2603–2606.
- [14] 赵卫权, 崔承彬, 田从魁, 等. 3 株抗生素抗性放线菌活性突变株新产代谢产物及其抗肿瘤活性初步测试 [J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(5): 53–56.
- [15] 黄玉玲, 马丽英, 荣先国, 等. 海洋真菌 *Aspergillus* sp. 中的苯甲醛衍生物研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 837–840.

Isolation and Identification of the Chemical Constituents from Root-Endophytic Fungus Metabolites in *Ceriops tagal*

DENG Peng-fei^{1,2}, LUO You-ping¹, LIU Li¹,
LI Jie-cheng¹, ZHU Zhi-gui¹, ZHENG Zhong-qi¹

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158, China;

2. Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Ministry of Education, Haikou 571158, China

Abstract: Several methods of chromatography were used to study the chemical constitution of the root-endophytic fungi of *Ceriops tagal*. Six compounds were isolated from the fermentation broth. On the basis of spectral evidences, they were identified as sorbicillin, 2', 3'-dihydrosorbicillin, sohirnone A, 5'-hydroxy-prenyl salicylate, N-(2-hydroxyphenyl)-acetamide and 2-(E-3-heptenyl)-3, 6-dihydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzaldehyde.

Key words: *Ceriops tagal*; endophytic fungi; secondary metabolite; chemical constituent

责任编辑 潘春燕