

文章编号:1001-6880(2014)3-0358-03

朱红栓菌中两个吩噁嗪酮类生物碱的分离与鉴定

朱 峰^{1*}, 卢卫红², 陈 忻¹, 吴静姝¹¹佛山科学技术学院化学与化工系, 佛山 528000; ²佛山科学技术学院动物医学系, 佛山 528231

摘要:本文首次研究了采自广东省上川岛的野生朱红栓菌的化学成分。体外抗菌试验显示其甲醇粗提物对大肠杆菌、沙门氏菌、链球菌和金黄葡萄球菌表现出有意义的抗菌活性。从该粗提物分离获得两个吩噁嗪酮类生物碱,通过波谱分析分别鉴定为朱红菌素(1)和朱红栓菌素(2)。

关键词:朱红栓菌; 吩噁嗪酮; 朱红菌素; 朱红栓菌素; 抗菌活性

中图分类号:O629.3

文献标识码:A

Isolation and Identification of Two Phenoxazone Alkaloids from *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh

ZHU Feng^{1*}, LU Wei-hong², CHEN Xin¹, WU Jing-shu¹¹Department of Chemistry and Chemical Engineering, Foshan 528000, China;²Department of Veterinary Medicine, Foshan University, Foshan 528231, China

Abstract: The chemical constituents of the wild mushroom *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh collected from the Shangchuan Island in Guangdong province were investigated firstly in this paper. In the antibacterial assays, the methanol crude extract showed significant antibacterial activities *in vitro* against *Escherich coli*, *Salmonella*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus aureus*. Two phenoxazone alkaloids were isolated from the crude extract and identified as cinnabarin (1) and tramesanguin (2) by spectral analysis, respectively.

Key words: *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh; phenoxazone alkaloid; cinnabarin; tramesanguin; antibacterial activity.

朱红栓菌 *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh 是一种野生高等真菌, 在分类上属于多孔菌科 (Polyporaceae), 生于栎、桦、椴、榉等阔叶树的腐木上, 偶尔生于松木上。分布于华北、西北及黑龙江、吉林、江苏、安徽、浙江、江西、河南、湖南、广东、广西等省区。在香菇、木耳栽培的段木上, 常出现此菌, 属食菌段木上常见的“杂菌”。它具有多种药用价值, 具有祛风除湿, 清热解毒, 行气, 止血, 止痒等功效。其提取物对小白鼠肉瘤 S₁₈₀ 和艾氏腹水癌的抑制率达 90%, 能明显增加小鼠免疫器官胸腺和脾脏的重量, 提高巨噬细胞的吞噬活力, 促进 T 细胞体外增殖及接触性皮炎反应, 提高小鼠血清凝集素滴度, 具有很高的开发利用价值^[1,2]。

本文首次对采自广东省上川岛的野生朱红栓菌化学成分进行了研究, 发现其甲醇粗提物对大肠杆菌、沙门氏菌、链球菌和金黄葡萄球菌表现出有意义的抗菌活性, 从该粗提物分离获得两个吩噁嗪酮类

生物碱, 通过波谱分析分别鉴定为朱红菌素(1)和朱红栓菌素(2), 结构式见图 1。

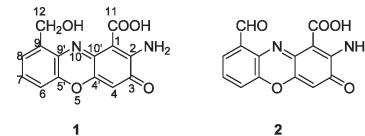


图 1 朱红菌素(1)和朱红栓菌素(2)的结构式

Fig. 1 The structures of cinnabarin (1) and tramesanguin (2)

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器

INOVA 500 NB 超导核磁共振仪(美国 Varian 公司); ZAB-HS 双聚焦磁质谱仪(英国 VG 公司); X4 型显微熔点测定仪(上海荆和分析仪器有限公司)。

1.1.2 材料

野生朱红栓菌(2009 年 6 月 3 日采自广东省上川岛, 根据文献^[1,2]鉴定为朱红栓菌 *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh)

barina (Jacq.) Franeh); 微晶纤维素薄层色谱板。

1.2 方法

1.2.1 甲醇粗提物的制备

137 g 风干野生朱红栓菌子实体粉碎后用 1 L 甲醇室温浸泡提取 3 次, 每次 7 d, 提取液合并减压浓缩至一半体积, 析出红色沉淀, 抽滤, 得甲醇粗提物。

1.2.2 甲醇粗提物的抗菌活性

甲醇粗提物用 DMSO 配成 1 和 5 mg/mL 浓度样品液。采用 K-B 纸片扩散法^[3], 将试验微生物菌株用无菌生理盐水配置成为 0.5 麦氏单位的悬液, 接种于 M-H 琼脂平皿上, 分别贴上 1 和 5 mg/mL 甲醇粗提物药敏纸片, 于 35 °C 孵育 24 h, 测定抑菌圈大小。

1.2.3 化合物分离纯化

甲醇粗提物用吡啶重结晶, 得红色物质(120 mg)。微晶纤维素薄层色谱分析表明, 该红色物质

由两个主要成分组成。因此取 20 mg 红色物质用少量混合溶剂(吡啶: 正丁醇: 水 v/v/v 6: 2: 2)溶解, 进一步通过制备微晶纤维素薄层色谱分离纯化(展开溶剂系统为吡啶: 正丁醇: 水 v/v/v 6: 2: 2), 先后得到两个红色组分, 这两个红色组分进一步通过吡啶重结晶, 分别得到红色晶体 1(5 mg) 和红色晶体 2(9 mg)。

2 结果与讨论

2.1 甲醇粗提物及其抗菌活性

甲醇提取液在浓缩到一半体积时便析出大量红色固体, 发现该固体很难再次溶解于甲醇, 并且难溶于一般的有机溶剂和水, 在吡啶和乙酸中溶解性能有所增加。采用 K-B 纸片扩散法^[3], 以链霉素为参照, 测定该甲醇粗提物对大肠杆菌、沙门氏菌、链球菌和金黄葡萄球菌等 4 种试验微生物的体外抗菌活性, 试验结果见表 1。

表 1 朱红栓菌甲醇粗提物的体外抗菌活性

Table 1 Antibacterial activities *in vitro* of the methanol crude extract of *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh

受试菌 Tested bacteria	大肠杆菌 <i>Escherich coli</i>		沙门氏菌 <i>Salmonella</i>		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>		链球菌 <i>Streptococcus</i>	
样品浓度 Concentration(mg/mL)	1.0	5.0	1.0	5.0	1.0	5.0	1.0	5.0
抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)	11.0 ± 1.0	16.5 ± 1.5	8.5 ± 0.5	9.0 ± 1.0	8.5 ± 0.5	9.0 ± 1.0	9.0 ± 1.0	9.0 ± 1.0

注: 链霉素为参照物。

Note: Streptomycin was used as the reference compound for the antibacterial activity.

体外抗菌试验结果表明, 甲醇粗提物对 4 种试验菌株显示出有意义的抑菌活性, 其中对大肠杆菌的抑菌活性最强。

2.2 化合物结构鉴定

化合物 1 红色晶体(吡啶), mp. 温度大于 300 °C 时逐渐分解。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.56 (br s, 1H, 2-NH_α), 8.69 (br s, 1H, 2-NH_β), 7.55 (m, 1H, H-7), 7.53 (m, 1H, H-8), 7.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-6), 6.58 (s, 1H, H-4), 4.86 (s, 2H, H-12); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.6 (s, C-3), 169.0 (s, C-11), 152.0 (s, C-2), 151.1 (s, C-10'), 146.1 (s, C-4'), 142.0 (s, C-5'), 138.2 (s, C-9), 129.2 (d, C-7), 126.6 (s, C-9'), 123.6 (d, C-8), 114.5 (d, C-6), 105.0 (d, C-4), 92.2 (s, C-1), 58.7 (s, C-12); FABMS: *m/z* 285 [M + H]⁺。NMR 谱表明这是一个吩噁嗪酮类生物碱, 其波谱数据与文献^[4]报道的朱红菌素一致, 因此鉴定为朱红菌素, 结构式见图 1。

化合物 2 红色晶体(吡啶), mp. 温度大于 250 °C 逐渐分解; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.33 (s, 1H, H-12), 9.78 (br s, 1H, 2-NH_α), 8.90 (br s, 1H, 2-NH_β), 7.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-8), 7.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6), 7.72 (dd, *J* = 7.5, 7.8 Hz, 1H, H-7), 6.63 (s, 1H, H-4); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 191.4 (d, C-12), 168.7 (s, C-11), 177.8 (s, C-3), 152.6 (s, C-2), 150.4 (s, C-10'), 148.6 (s, C-4'), 142.0 (s, C-5'), 131.2 (d, C-8), 128.9 (d, C-7), 128.7 (s, C-9'), 128.4 (s, C-9), 121.6 (d, C-6), 105.0 (d, C-4), 92.1 (s, C-1); FABMS: *m/z* 285 [M + H]⁺。化合物 2 的 NMR 谱与化合物 1 的 NMR 谱非常相似, 也是一个吩噁嗪酮类生物碱, 其波谱数据与文献^[4]报道的朱红栓菌素一致, 因此鉴定为朱红栓菌素, 结构式见图 1。

2.3 讨论

生物碱广泛存在于药用植物中^[5,6], 并且是许多微生物代谢产物的主要成分^[7,8], 具有各种各样的生物活性。吩噁嗪酮类生物碱也发现存在于其它多孔菌科高等真菌之中, 比如 *Pycnoporus cinnabari-*

化合物 2 红色晶体(吡啶), mp. 温度大于 250

nus^[4]、*Trametes cinnabarina* var. *sanguinea* (L.) Pilat^[9]、*T. cinnabarina* Jacq.^[10] 和 *Coriolus sanguineus* (*Polystictus cinnabarinus*)^[11]，并且被认为是这些真菌呈现鲜艳的红色的主要原因^[4,9-12]。近年来，发现海洋放线菌 ACMA006 也能产生吩噁嗪酮类生物碱^[13]，其中放线菌素 D 还具有显著的抗肿瘤活性^[14]。因而吩噁嗪酮类生物碱引起了人们的重视。

由于吩噁嗪酮类生物碱难溶于大多数有机溶剂和水溶液，因此人们一直致力于研究这类化合物的有效提取分离方法。早期对这类化合物的结构分析手段主要是运用红外和拉曼光谱、紫外光谱并结合化学合成与修饰方法^[9-12,15-19]。近年来才开始逐渐应用 NMR 手段对这类化合物进行表征，并导致发现了一些新的吩噁嗪酮类生物碱^[4,20,21]。

本文从广东省上川岛采集的野生朱红栓菌分离获得 2 个吩噁嗪酮类生物碱，经 NMR 谱鉴定为朱红菌素(1)和朱红栓菌素(2)。由于这 2 个化合物难溶于一般有机溶剂，因而其生物活性还未得到有效研究。对其结构进行修饰以增强其溶解性，从而深入研究其生物活性，开发其潜在的药用价值，这些工作正在进一步研究之中。

参考文献

- Ying JZ(应建浙), Mao XL(卯晓岚). Illustrated handbook of Chinese medicinal fungus(中国药用真菌图鉴). Beijing: Science Press, 1987. 218-219.
- Zhou WN(周文能), Zhang DZ(张东柱). Illustrated handbook of wild mushroom(野菇图鉴). Taipei: Publishing business Limited by Share Ltd, 2005. 439.
- Tan Y(谭瑤), Zhao Q(赵清). Antimicrobial susceptibility tested by Kirby-Bauer disk diffusion method. *Lab Med Clin* (检验医学与临床), 2010, 7: 2290-2291.
- Daniel AD, Sylvia U. HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Nat Prod Comm*, 2009, 4:489-498.
- Huang SZ(黄圣卓), Cao JX(曹金鑫), Jiang SP(蒋思萍), et al. Alkaloids of the Tibetan medicinal plant *Aconitum napiculare* Stapf. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23:655-657.
- Wang H(王欢), Wang YH(王跃虎), Chen LJ(陈丽娟), et al. Research progress of alkaloids from *Lycoris*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:691-697.
- Zhou JY(周俊勇), Huang HB(黄洪波), Wang ZW(汪中文), et al. The Metabolites of indolocarbazole alkaloids from the marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 1667. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23:415-419.
- Zhu F, Chen GY, Chen X, et al. Aspergicin, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. *Chem Nat Comp*, 2011, 47:767-769.
- Gripenberg J. XIII. Tramesanguin, the pigment of *Trametes cinnabarina* var. *sanguinea* (L.) Pilat. *Acta Chem Scand*, 1963, 17:703-708.
- Gripenberg J. Fungus pigments. I. Cinnabarin, a colouring matter from *Trametes cinnabarina* Jacq.. *Acta Chem Scand*, 1951, 5:590-595.
- Lemberg R. Nitrogenous pigments from the fungus *Coriolus sanguineus* (*Polystictus cinnabarinus*). *Aust J Experi Biol & Med Sci*, 1952, 30:271-278.
- Gripenberg J, Honkanen E, Patoharju O. Fungus pigments V. Degradations of cinnabarin. *Acta Chem Scand*, 1957, 11: 1485-1492.
- Cao X(曹雪), Yang RL(杨瑞丽), Yuan XW(袁献温), et al. Separation, purification, and structural identification of antitumor active components from marine actinomycete ACMA006. *J Ocean Taiwan Str* (台湾海峡), 2011, 30: 400-404.
- Zhang BZ(张邦治), Wang KR(王凯荣), Wang ZZ(王则周), et al. Design, synthesis and in vitro antitumor activity of novel actinomycin D analogs. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2010, 31:1346-1352.
- Schatz A, Schatz V, Adelson L M, et al. Spectrophotometric studies of *Polyporus cinnabarinus* and *Polyporus sanguineus*. *Bull Torr Bota Club*, 1956, 83:136-140.
- Cavill GW, Clezy PS, Whitfield FB. The chemistry of mould metabolites-IV. Reductive acetylation and reoxidation of some phenoxazin-3-ones. *Tetrahedron*, 1961, 12:139-145.
- Gripenberg J, Kivalo P. Polarography of cinnabarin. *Suomen Kemistilehti B*, 1957, 30B:134-136.
- Cavill GWK, Ralph BJ, Tetaz JR, et al. The chemistry of mould metabolites Part I. Isolation and characterization of a red pigment from *Coriolus sanguineus* Fr.. *J Chem Soc*, 1953, 525-529.
- de Oliveira LFC, Le Hyaric M, Berg MM, et al. Raman spectroscopic characterization of cinnabarin produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.. *J Raman Spectr*, 2007, 38:1628-1632.
- Graf E, Schneider K, Nicholson G, et al. Elloxazinones A and B, new aminophenoxazinones from *Streptomyces griseus* Acta 2871. *J Antibiot*, 2007, 60:277-284.
- Achenbach H, Blumm E. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* - Pycnosanguin and new phenoxazin-3-ones. *Arch de Pharm*, 1989, 324:3-6.