

# 黄花蒿内生放线菌 A5 次生代谢产物分离鉴定

于哲<sup>1,3</sup>, 何媛媛<sup>1,3</sup>, 高小宁<sup>2,3</sup>, 王惠<sup>1\*</sup>, 黄丽丽<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>西北农林科技大学理学院; <sup>2</sup>西北农林科技大学植物保护学院;

<sup>3</sup>西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 杨凌 712100

**摘要:**通过硅胶、反相、凝胶等分离方法从放线菌 A5 发酵液乙酸乙酯萃取相分离得到 4 个化合物, 采用 MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、COSY 等对其结构进行鉴定, 分别是 6-benzyl-3-isopropylpyrazin-2(1H)-one (**1**), N-(4-hydroxyphenethyl) acetamide (**2**), 3-(4-hydroxyphenyl)-2-((2-oxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)oxy) propanoic acid (**3**) 和尿嘧啶(**4**)。其中 **3** 的波谱数据首次报道。生测结果表明, 在样品浓度为 0.1 mg/mL 时, **1**、**2** 和 **3** 的海虾校正死亡率依次是 43.2%、38.3%、43.2%, 表明均具有一定的细胞毒活性。

**关键词:**植物内生放线菌; 代谢产物; 分离鉴定; 活性测定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Isolation and Identification of the Metabolites Produced by Actinomycetes A5 from *Annua*

YU Zhe<sup>1,3</sup>, HE Yuan-yuan<sup>1,3</sup>, GAO Xiao-ning<sup>2,3</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, HUANG Li-li<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>College of Science, Northwest A&F University; <sup>2</sup>College of Plant Protection, Northwest A&F University;

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Northwest A&F University, Yang Ling, Shaanxi 712100, China

**Abstract:** Four compounds were isolated from EtoAc fraction of the fermentation of actinomycetes A5 by silica gel, antiphase and Sephadex LH-20 column chromatography. The structure of the four compounds were identified by MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY, etc. The four compounds are 6-benzyl-3-isopropylpyrazin-2(1H)-one (**1**), N-(4-hydroxyphenethyl) acetamide (**2**), 3-(4-hydroxyphenyl)-2-((2-oxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)oxy) propanoic acid (**3**) and uracil (**4**). The spectral date of compound **3** was the first reported. The result of brine shrimp bioassay showed the mortality rates of compound **1** to **3** to *Artemia salina* were 43.2%, 38.3% and 43.2% respectively at 0.1 mg/mL, showing certain cytotoxic activity.

**Key words:** endophytic actinomycetes; metabolite; isolation and identification; biological activity

植物内生菌是一种重要的微生物资源,也是新型天然活性物质的重要来源之一<sup>[1]</sup>,普遍存在于各种植物组织中,具有丰富的生物多样性和功能多样性<sup>[2]</sup>。特别是药用植物内生放线菌在药用活性物质筛选方面具有很大的研究价值和开发潜力。黄花蒿是我国传统的中草药,自从 20 世纪 70 年代,我国工作者从黄花蒿中分离出青蒿素后,黄花蒿就一直被用于提取青蒿素<sup>[3]</sup>。目前,黄花蒿的药物作用已逐渐被人们重视,提取黄花蒿中的药用成分的研究也越来越多<sup>[4]</sup>。刘金华<sup>[5]</sup>等对黄花蒿内生菌进行分离和初步鉴定,发现黄花蒿内生菌具有丰富多样

性。但对黄花蒿内生菌的代谢产物研究报道较少。本研究主要对一株黄花蒿内生放线菌发酵液活性成分进行分离提取,旨在了解该内生放线菌的代谢产物的组成和结构,为该菌的进一步研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器

BrukerDRX-400 核磁共振仪,德国 Bruker 公司; LCQ Fleet 质谱仪,美国金泰科技公司; RV10 DS25 真空旋转蒸发仪,德国 IKA 公司; SB-5200 DTD 超声波清洗机,宁波新生生物科技有限公司。

### 1.2 材料和试剂

实验菌株 A5 菌由西北农林科技大学植物保护学院黄丽丽教授实验室提供。

甲醇、乙酸乙酯、氯仿等均为分析纯(天津市富

收稿日期: 2013-09-11

接受日期: 2014-01-21

基金项目: 陕西省科技统筹计划工程项目(2012KTJD03-02; 2011KTZB02-02); 公益性行业(农业)科研专项项目(201203034)

\* 通讯作者 Tel: 86-966-833058; E-mail: wanghuiab@sina.com.cn

宇精细化工有限公司); Sephadex LH-20 (Waltman 公司); 硅胶 (100 ~ 200 目, 300 ~ 400 目, 青岛海浪硅胶干燥剂厂); 制备薄层硅胶 (HG/T2354-92, GF<sub>254</sub>, 青岛海浪硅胶干燥剂厂); 薄层硅胶板 (0.2 ~ 0.25 nm, GF<sub>254</sub>, 青岛海浪硅胶干燥剂厂); 丰年海虾卵。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 培养基

高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20 g、KNO<sub>3</sub> 1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、NaCl 0.5 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g、琼脂粉 13 g、蒸馏水 1000 mL、pH 7.2。

黄豆粉培养基: 黄豆粉 20 g (沸水煮 30 min, 过滤保留滤液)、蔗糖 10 g、可溶性淀粉 5 g、蛋白胨 2 g、酵母浸粉 2 g、NaCl 2 g、CaCO<sub>3</sub> 1 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1000 mL、pH 7.0。

#### 1.3.2 发酵液的制备

将在高氏一号平板上培养 5 d 的 A5 菌用内径为 4 mm 的打孔器打成菌饼, 接入黄豆粉培养液中培养 36 h 后即为种子液, 然后分别按 10% 的接种量转接到新鲜的黄豆粉培养液中, 28 °C 振荡 (150 rpm) 培养 5 d 后, 用布氏漏斗过滤, 弃去菌体, 得发酵液。

#### 1.3.3 发酵液活性成分的提取分离

将 80L 发酵液减压浓缩至其体积的 1/10, 依次用等体积的乙酸乙酯对滤液连续萃取 3 次。合并乙酸乙酯相, 减压浓缩至干, 得到乙酸乙酯萃取物 (7.9 g)。

对乙酸乙酯萃取物硅胶层析 (d = 60 mm, h = 600 cm, 100 ~ 200 目硅胶 400 g)。依次用氯仿-甲醇体积比 100:1、50:1、20:1、10:1 按照极性逐渐递增的顺序洗脱。每个梯度洗脱约 1 L, 收集各梯度洗脱液减压蒸出溶剂。分别得 A1 (1.3 g)、A2 (2.1 g)、A3 (1.9 g)、A4 (1.2 g) 洗脱物。A1 硅胶薄层显示, 采用硅胶层析, 反相, Sephadex LH-20 等分离方法得化合物 1 (23 mg)。在氯仿: 甲醇 = 9:1 展开剂展开后, 选择合适的洗脱剂, 对 A2 反复硅胶, 凝胶层析, 分离得化合物 2 (30 mg)。通过硅胶, 凝胶, 制备薄层等分离方法从 A3 中得化合物 3 (11 mg) 和化合物 4 (10 mg)。

#### 1.3.4 海虾致死活性测定

采用海虾致死法对得到的化合物 1、2、3 进行生物测定。依照 Solis 改良法<sup>[6]</sup>: 配制浓度为 2.5% 的

人工海水, 将 PH 调至 8.0 ~ 8.5, 取适量的海虾卵放到装有 100 mL 人工海水的烧杯中, 28 °C 孵化 48 h, 待用。将待测样品配成 2 mg/mL 的 DMSO 溶液, 用移液枪分别吸取: 10、8、6、4、2、1 uL 加入 96 孔板中。再加入相应的海虾海水使每个孔板的溶液补充到 200 uL 且每个孔板有大约 15 ~ 20 只卤虫。用相应体积的 DMSO 为空白对照, 每个梯度重复 3 次。放置 28 °C 培养 24 h 后在显微镜下观察, 记录海虾死亡数, 按下式计算矫正死亡率。

$$\text{矫正死亡率} = (A - CK) / (1 - CK) \times 100\%$$

公式中, A-样品孔致死率, CK-对照孔致死率。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物的结构鉴定

化合物 1 白色结晶, 结合<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 波谱数据推断分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 1.25 (6H, d, J = 6.8, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.42 (1H, m, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.83 (2H, s, -CH<sub>2</sub>Ph), 7.25-7.26 (3H, m, Ph-H, H-5), 7.32 ~ 7.33 (3H, m, Ph-H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 20.0 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 30.1 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 36.7 (-CH<sub>2</sub>Ph), 122.2 (C-5), 127.5 (Ph-C), 128.9 (Ph-C), 129.2 (Ph-C), 135.8 (C-6), 136.8 (Ph-C), 157.4 (C-3), 162.0 (C-2); 以上数据与文献<sup>[7]</sup>报道数据一致, 故化合物 1 为 6-benzyl-3-isopropylpyrazin-2(1H)-one。

化合物 2 白色结晶, 结合<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 波谱数据推断分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ 7.04 (2H, d, J = 8.5, H-6, 10), 6.75 (2H, d, J = 8.5, H-7, 9), 3.34 (2H, t, J = 7.4, H-3), 2.70 (2H, t, J = 7.4, H-4), 1.92 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ 21.2 (-COCH<sub>3</sub>), 34.3 (C-4), 41.0 (C-3), 114.8 (C-7, 9), 129.3 (C-6, 10), 129.8 (C-5), 155.5 (C-8), 171.8 (C-1); 以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道数据一致, 故化合物 2 为 N-(4-hydroxyphenethyl)acetamide。

化合物 3 微黄色油状, 结合<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和二维波谱数据推断分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ 10.01 (1H, s, -PhOH), 8.69 (1H, s, -COOH), 7.87 (2H, d, J = 8.5, H-3', 7'), 7.45 (2H, d, J = 8.5, H-4', 6'), 5.06 (1H, d, J = 4.7, H-2), 4.86 (1H, dd, J = 9.2, 7.2, H-4), 4.22 (1H, m, H-7a), 4.08 (1H, m, H-7b), 3.74 (2H, d, J = 4.7, H-1'), 2.82 (1H, m, H-9a), 2.54 (1H, m, H-

8), 2.22 (1H, m, H-9b);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  179.2 (C-5), 175.4 (C-1), 166.2 (C-5'), 141.1 (C-3', 7'), 137.4 (C-2'), 125.1 (C-4', 6'), 68.7 (C-4), 66.7 (C-2), 54.9 (C-7), 45.1 (C-1'), 38.2 (C-9), 32.2 (C-8); ESI-MS (negative)  $m/z$ : 280.18  $[\text{M}]^-$ ; 从  $^{13}\text{C}$  NMR 和 DEPT 可以判断化合物有四个亚甲基和两个次甲基, 并且两个次甲基链接不饱和基团, 苯环上有两组碳。通过 HMQC、HMBC、COSY 对其结构进行确定, 检索发现其波谱数据未曾报道, 命名为 3-(4-hydroxyphenyl)-2-((2-oxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)oxy) propanoic acid。其核磁数据及二维相关数据见表 1。

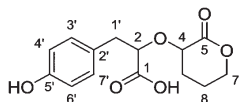
表 1 化合物 III 核磁数据

Table 1  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and HMBC data of compound III

编号 No	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	HMBC
1		175.4	H-1', H-2
2	5.06	66.7	-COOH, H-1'
4	4.86	68.7	H-7, H-8, H-9
5		179.2	H-4, H-9
7	4.22a, 4.08b	54.9	H-8, H-9
8	2.54	32.2	H-7, H-9
9	2.82a, 2.22b, 3.74	38.2	H-4, H-7, H-8
1'	7.87	45.1	-COOH, H-3', 7', H-2
3', 7'	7.45	141.1	H-1'
4', 6'		125.1	-Ph-OH, H-3', 7'
5'		166.2	H-3', 7', H-4', 6'
2'		137.4	H-1', H-2, H-4', 6'

**化合物 4** 白色无定型粉末, 分子式为  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$ 。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  7.24 (1H, d,  $J = 7.6$ , H-6), 5.63 (1H, d,  $J = 7.6$ , H-5);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  152.1 (C-2), 164.7 (C-4), 100.3 (C-5), 142.2 (C-6); ESI-MS (positive)  $m/z = 112.1$   $[\text{M}]^+$ ; 以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道数据一致, 故化合物 4 为尿嘧啶。

化合物 3 的化学结构见图 1。



3 3-(4-hydroxyphenyl)-2-((2-oxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)oxy)propanoic acid

图 1 化合物 3 的化学结构

Fig. 1 The Structures of Compound 3

## 2.2 海虾致死活性测定

化合物 1~3 的海虾致死率测定结果见图 2。

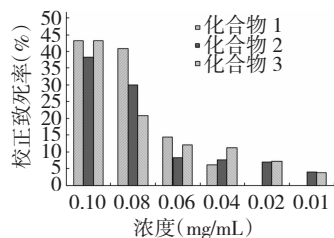


图 2 化合物 1~3 的海虾致死率

Fig. 2 Shrimp death rate of compounds 1-3

由图 2 可见, 化合物 1、2、3 在 0.04 mg/mL 到 0.1 mg/mL 浓度下均对海虾有一定的致死率, 在浓度为 0.1 mg/mL 时的海虾致死率依次为 43.2%, 38.3%, 43.2%。随着浓度的下降对海虾致死率也逐步降低。化合物 2 和 3 在 0.01 mg/mL 时也表现出来微弱的活性。

## 3 讨论

本试验从黄花蒿内生放线菌中分离到的化合物 1 是个吡嗪酮类化合物, 最早 Alvarez<sup>[10]</sup> 在链霉菌属 SC433 代谢产物中分离得到的, 报道其具有蛋白酶抑制剂作用。吡嗪酮是新型吡啶杂环类杀虫剂, 具有高效、低毒, 与环境友好等特点, 在害虫综合防治中有良好的发展前景<sup>[11]</sup>。本试验从黄花蒿内生放线菌中分离到的化合物 2 是酪胺生物碱, 从真菌和放线菌中都分离得到过。Gareez 等<sup>[12]</sup> 发现其对真菌球孢枝孢有细胞毒活性, Kanou 等<sup>[13]</sup> 发现其对人类黑素瘤 A375 细胞和人类白血病细胞 K562 有抗肿瘤活性。化合物 3 的波谱数据首次报道。三种化合物均有一定的海虾致死活性。可见从黄花蒿内生放线菌发酵液中分离出的几个化合物都具有较广的生物活性, 因此黄花蒿内生菌在开发新的活性物质方面具有很大的开发潜力, 值得进行进一步深入研究。

### 参考文献

- Zhang HW, Song YC, Tan RX. Chemistry and biology of endophytes. *Nat Prod Rep*, 2006, 23: 753-771.
- Zou WX (邹文欣), Tan RX (谭仁祥). Recent Advances on Endophyte Research. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2001, 43: 881-892.