

红树植物桐花树内生真菌 NAcFL10 次生代谢产物的研究

鞠志冉^{1,2}, 王俊锋², 林秀萍², 田永奇², 刘 芬¹, 徐石海^{1*}, 刘永宏^{2*}

¹暨南大学化学系, 广州 510632; ²中国科学院南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室, 广州 510301

摘要: 对一株红树植物桐花树内生真菌 NAcFL10 的次生代谢产物进行研究, 采用硅胶 MPLC、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、常压硅胶柱色谱以及半制备高效液相色谱仪等手段从红树植物桐花树内生真菌 NAcFL10 的大米发酵物进行分离纯化得到 7 个化合物, 并通过各种波谱数据、文献对照分别鉴定为: leptosphaerin (**1**), 二氢-4-羟基-5-羟甲基-2-呋喃酮 (**2**), 5-羟甲基糠醛 (**3**), 3,5,6-三甲基-2,4-二羟基-苯甲酸乙酯 (**4**), 胸苷 (**5**), 对羟基苯乙醇 (**6**), 麦角甾醇 (**7**)。

关键词: 红树植物; 桐花树; 内生真菌; 次生代谢产物

中图分类号: R284. 2

文献标识码: A

Studies on Secondary Metabolites of an Endophytic Fungus NAcFL10 Obtained from Mangrove Plant *Aegiceras corniculatum*

JU Zhi-ran^{1,2}, WANG Jun-feng², LIN Xiu-ping², TIAN Yong-qi², LIU Fen¹, XU Shi-hai^{1*}, LIU Yong-hong^{2*}

¹Jinan University, Guangzhou, 510632, China; ²Guangdong Key Laboratory of Marine Materia

Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

Abstract: To study the secondary metabolites of an endophytic fungus NAcFL10, which was isolated from a mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. Seven compounds were isolated from the fermentation of the fungus by using silica gel, Sephadex LH-20, MPLC, and HPLC. The structures of the compounds were identified leptosphaerin (**1**), dihydro-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-2-furanone (**2**), 5-hydroxymethyl furaldehyde (**3**), 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate (**4**), thymidine (**5**), tyrosol (**6**), and ergosterol (**7**) on the basis of spectroscopic analysis and comparison with reported data.

Key words: mangrove plant; *Aegiceras corniculatum*; endophytic fungus; secondary metabolites

红树林生态系统是我国海岸带湿地生态系统的重要类型之一, 自然分布于海南、广西、广东、福建、台湾等省区^[1]。内生真菌是指一类生活于健康宿主体内, 而不引起宿主组织发生任何病变的真菌, 它们不仅在维护整个生态系统的平衡中起着重要作用, 而且还具有多样化的应用潜能。由于红树林生长环境独特, 蕴藏着丰富并极具特色的微生物资源, 包括对各类污染物有降解能力的类群, 高效固氮、溶磷能力的类群, 耐盐、嗜盐的类群和能产生各种生理活性物质和代谢产物的类群^[2,3]。红树林真菌是红树林微生物资源的主要类群, 有丰富的多样性。从红树林上分离到的内生真菌可产生多种重要的次生代谢物, 具有抗菌、抗肿瘤等药用价值^[4]。因此, 红树林内生菌成为近些年来药物研发的重要资源。对分离自红树林桐花树的一株内生真菌 NAcFL10

发酵物进行研究, 从其发酵物中共分离得到 7 个化合物, 并通过核磁共振、文献对照等方法鉴定了这些化合物的结构。

1 实验仪器、材料与方法

1.1 实验材料

海洋真菌 NAcFL10 从红树植物桐花树的花中分离得到, 红树林桐花树采自广东省广州市南沙区红树林。该菌株现保存于中国科学院南海海洋研究所, 广东省海洋药物重点实验室。

1.2 仪器和试剂

NMR 谱用 Bruker AV-500 核磁共振仪测定; 中压制备柱色谱为 Buchi 公司产品 (C615/605); 高效液相色谱仪 (Agilent Technologies 1260); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (Pharmacia); 薄层色谱硅胶、柱色谱硅胶和薄层制备板 (20 × 20 × 0.03 cm), 购自青岛海洋化工厂; 化学试剂均为国产分析纯 (天津市富宇精细化工有限公司和广州化学试剂厂)。

收稿日期: 2014-01-22 接受日期: 2014-04-22

基金项目: 国家自然科学基金 (31270402)

* 通讯作者 Tel: 86-20-89023244; E-mail: yonghongliu@scsio. ac. cn

1.3 真菌发酵

将保藏于 4 °C 的菌株接种到 MB 固体培养基(麦芽浸膏 1.5 g,粗海盐 1 g,琼脂粉 1.5 g,蒸馏水 100 mL,pH 7.4~7.8)平板上,并将平板置于 25 °C 保温箱中培养 7 d。将活化后的菌株转接到装有 10 mL 的 PDA 液体培养基(马铃薯浸提液 100 mL,葡萄糖 2 g,粗海盐 0.025 g,pH 7.4~7.8,加玻璃珠)的 100 mL 三角瓶中,于 28 °C 下 180 rpm 条件下,摇床培养 48 h。将 10 mL 种子培养液转接入装有 10 mL 固体培养基(大米 200 g,自来水 200 mL,粗海盐)的 1 L 三角瓶中,于 25 °C 静止培养 50 d,共发酵 20 瓶。

1.4 化合物提取分离

大米发酵物用丙酮浸泡过夜,搅拌粉碎,超声提取 9~11 min。提取物抽滤,蒸去丙酮,水层浓缩体积,用乙酸乙酯萃取两次,收集上清液。大米残渣再用乙酸乙酯浸提三次,每次浸泡过夜,抽滤,收集上清液。将五次得到的上清液合并,减压旋转蒸发,共得浸膏 20 g。粗浸膏以 1:1 的比例与 100~200 的硅胶 H 拌匀,待干燥后填入中压正相硅胶柱分离,二氯甲烷-甲醇(1:0~0:1)梯度洗脱,TLC 薄层检测后合并,得到 8 个馏分 Frs. 1-8。Frs. 2 经 Sephadex-LH-20 凝胶柱(氯仿-甲醇,1:1)分离,得到 3 个馏分 Frs. 21-Frs. 23,其中 Frs. 22 经重结晶,得到化合物 4(20 mg); Frs. 4 经 SephadexLH-20 凝胶柱(甲醇)分离,得到 4 个馏分 Frs. 41-Frs. 44, Frs. 42 经重结晶,得到化合物 7(25 mg); Frs. 6 经 Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇)分离,得到 3 个馏分 Frs. 61-Frs. 63,其中 Frs. 62 经正相硅胶柱分离,又经 HPLC 纯化,得到化合物 1(6 mg)。Frs. 63 经正相硅胶柱分离,二氯甲烷-甲醇(100:0,30:1,15:1,5:1)梯度洗脱,TLC 点板检测,得到化合物 5(5 mg); Frs. 7 经 SephadexLH-20 凝胶柱(甲醇)分离,得到 4 个馏分 Frs. 71-Frs. 74,其中 Frs. 72 经正相硅胶柱分离,二氯甲烷-甲醇(100:0,50:1,30:1,10:1,3:1)梯度洗脱,又经 HPLC 纯化,分别得到化合物 2(12 mg)和化合物 3(15 mg); Frs. 8 经 Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇)分离,得到 3 个馏分 Frs. 81-Frs. 83,其中 Frs. 82 经正相硅胶柱分离,氯仿-甲醇(100:0,40:1,25:1,10:1,1:1)梯度洗脱,又经 HPLC 纯化,得到化合物 6(12 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1 白色固体,溶于甲醇。 $[\alpha]_D^{25} + 20 (c$

0.4, CH₃OH); ¹H NMR(500 MHz, MeOD), δ_H : 7.58(1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-3), 5.16(1H, dd, $J = 5.2, 1.8$ Hz, H-4), 3.80(1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-5), 3.69(2H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 2.16(1H, s, H-8); ¹³C NMR(125 MHz, MeOD) δ_C : 172.4(C-1), 170.8(C-7), 129.3(C-2), 128.2(C-3), 82.9(C-4), 73.5(C-5), 64.1(C-6), 23.1(C-8); 以上数据与文献^[5]对照,基本一致,确定化合物结构为 leptosphaerin。

化合物 2 无色油状物,溶于甲醇,在 254 nm 紫外下显色。¹H NMR(500 MHz, MeOD), δ_H : 2.40(1H, dd, $J = 18.0, 2.4$ Hz, H-3a), 2.94(1H, dd, $J = 18.0, 6.8$ Hz, H-3b), 3.73(1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-6a), 3.77(1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-6b), 4.39(1H, dd, $J = 5.4, 3.2$ Hz, H-5), 4.45(1H, dt, $J = 6.7, 2.3$ Hz, H-4); ¹³C NMR(125 MHz, MeOD) δ_C : 178.7(C-2), 90.1(C-5), 69.7(C-4), 62.5(C-6), 39.1(C-3); 以上数据与文献^[6]对照,基本一致,确定化合物结构为 dihydro-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-2-furanone。

化合物 3 黄色油状物,溶于甲醇。¹H NMR(500 MHz, MeOD), δ_H : 9.55(1H, s, CHO), 7.41(1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-3), 6.61(1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-4), 4.67(2H, s, 5-CH₂); ¹³C NMR(125 MHz, MeOD) δ_C : 180.4(C-1), 161.3(C-5), 151.8(C-2), 126.7(C-3), 110.9(C-4), 56.0(C-6); 以上数据与文献^[7]对照,基本一致,确定化合物结构为 5-hydroxymethyl furaldehyde。

化合物 4 白色针状结晶(氯仿),在 254 nm 紫外下显色,TLC 展开香草醛硫酸显蓝紫色斑点。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃), δ_H : 1.43(3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂CH₃), 2.16(3H, s, 5-ArCH₃), 2.17(3H, s, 6-ArCH₃), 2.47(3H, s, 3-ArCH₃), 4.43(2H, q, $J = 7.1$ Hz, CH₂CH₃), 5.20(1H, s, 4-ArOH) and 11.54(1H, s, 2-ArOH); ¹³C NMR(125 MHz, CDCl₃) δ_C : 8.0(6 ArCH₃), 11.85(5 ArCH₃), 14.24(3 ArCH₃), 18.8(CH₂CH₃), 61.2(CH₂CH₃), 106.3(C-1), 107.2(C-2), 114.7(C-3), 137.5(C-5), 156.5(C-4), 159.5(C-6) and 172.2(CO₂C₂H₅); 以上数据与文献^[8]对照,基本一致,确定化合物结构为 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate。

化合物 5 白色粉末,溶于甲醇。¹H NMR(500 MHz, MeOD), δ_H : 1.90(1H, s, H-7), 2.23~2.26(2H, m, H-2'), 3.74-3.77(1H, dd, $J = 12.0, 3.7$ Hz, H-5'a), 3.80-3.83(1H, dd, $J = 12.0, 3.2$ Hz, H-5'

b), 3.92 (1H, dd, $J = 6.7, 3.4$ Hz, H-3'), 4.42 (1H, dt, $J = 6.5, 3.4$ Hz, H-4'), 6.30 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 7.83 (1H, d, H-2); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ_{C} : 11.1 (C-7), 39.8 (C-2'), 61.4 (C-5'), 70.8 (C-3'), 84.8 (C-4'), 87.3 (C-1'), 110.1 (C-3), 136.6 (C-2), 151.4 (C-6), 165.7 (C-4); 以上数据与文献^[9]对照,基本一致,确定化合物结构为 thymidine。

化合物 6 无色粉末,溶于甲醇。 ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ_{H} : 2.83 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-7), 3.85 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-8), 6.81 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, H-5), 7.12 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ_{C} : 154.3 (C-4), 130.4 (C-1), 130.1 (C-2, C-6), 115.4 (C-3, C-5), 63.8 (C-8), 38.2 (C-7); 以上数据与文献^[10]对照,基本一致,确定化合物结构为 tyrosol。

化合物 7 白色针状晶体,在 254 nm 紫外下显色,香草醛硫酸显紫红色斑点。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.59 (1H, dd, $J = 5.6, 2.4$ Hz, H-6), 5.40 (1H, dt, $J = 5.4, 2.6$ Hz, H-7), 5.22 (2H, qd, $J = 15.3, 7.4$ Hz, H-22 and 23), 3.63 (1H, tt, $J = 11.2, 4.2$ Hz, H-3), 1.06 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.97 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.86 (3H, d, $J = 3.4$ Hz, H-26 或 H-27), 0.84 (3H, d, $J = 3.8$ Hz, H-26 或 H-27), 0.65 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 141.3 (C-8), 139.8 (C-5), 135.5 (C-22), 131.9 (C-23), 119.5 (C-6), 116.2 (C-7), 70.4 (C-3), 55.7 (C-17), 54.5 (C-14), 46.2 (C-9), 42.8 (C-24), 40.7 (C-4), 40.4 (C-20), 39.0 (C-12), 38.3 (C-1), 37.0 (C-10), 33.0 (C-25), 31.9 (C-2), 28.3 (C-16), 23.0 (C-15), 21.1 (C-11), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28), 16.2 (C-19), 12.0 (C-18); 以上数据与文献^[11]对照,基本一致,确定化合物结构为 ergosterol。

3 结论

从一株红树植物桐花树内生真菌 NAcFL10 的大米发酵物中共分离得到 7 个化合物,其中化合物 1 为一种活跃的竞争性酶抑制剂,具有明显的抗菌活性^[12,13]。其余化合物则没有抗肿瘤、抗菌活性的

文献报道。

参考文献

- Zhao S (赵晟), Hong HS (洪华生), Zhang LP (张璐平), *et al.* The energy value of China mangrove ecosystem service. *Resources Science*, 2007, 29(1): 147-154.
- Gao J (高健), Li C (李赤), Wang Y (王燕), *et al.* The diversity and application potential of mangrove endophytic fungi. *J Fungal Res*, 2013, 11: 212-216.
- Liu AR (刘爱荣), Wu XP (吴晓鹏), Xu T (徐同). Research progress of mangrove endophytic fungi. *Chin J Appl Ecol*, 2007, 18: 912-918.
- Lin P (林鹏). *Mangrove Ecosystems*. Beijing: Science Press, 1997 (in Chinese).
- White JD, Badger RA, Kezar III HS, *et al.* Structure, synthesis and absolute configuration of leptosphaerin, a metabolite of the marine ascomycete *Leptosphaeria oraemaris*. *Tetrahedron*, 1989, 21: 6631-6644.
- He M (何明), Zhang JH (张静华), Hu CQ (胡昌奇). Studies on chemical constituents of *Clematis chinensis* Osbeck. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2001, 36: 278-280.
- Song QY (宋秋月), Fu YB (付迎波), Liu J (刘江), *et al.* Chemical constituents from *Angelica sinensis*. *Chin Trad Herb Drugs*, 2011, 42: 1900-1904.
- Kosemura S, Miyata H, Yamamura S, *et al.* Biosynthetic studies on citreohybridones, metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *J Chem Society*, 1994, 1: 135-139.
- Kapustina II, Makar'eva TN, Kalinovskii AI and Stonik VA. Polyhydroxysteroids and thymidine from the sea *Pavonaria finmarchica*. *Chem Nat Comp*, 2003, 39: 50-51.
- Shen MX, Li W, Ma HM, *et al.* Isolation and structure identification of chemical constituents from marine bacterium *Pantoea agglomerans*. *Chin J Med Chem*, 2012, 22: 127-130.
- Fan XF (樊晓飞), Yang M (杨明), Jiang L (姜磊), *et al.* Studies on chemical constituents of *Paecilomyces hepiali*. *J Fungal Res*, 2013, 11(2): 72-77.
- Schiehser GA, White JD. The structure of leptosphaerin. *Tetrahedron Letters*, 1986, 27: 5587-5590.
- Pokorny M, Zissis E, *et al.* The inhibitory activities of 2-acetamido-2,3-dideoxy-d-hex-2-enonolactones on 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosidase. *Carbohydrate Research*, 1975, 43: 345-354.