

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0186-05

一株桐花树内生真菌代谢产物中的甾醇类物质

李盈蕾^{1,2,3},林秀萍¹,刘永宏^{1*}¹中国科学院南海海洋研究所 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室,广州 510301;²中国科学院大学,北京 100049; ³淮海工学院化学工程学院,连云港 222005

摘要:利用 pTLC、硅胶、Sephadex LH-20 及半制备 HPLC 等柱色谱手段,从一株桐花树内生真菌的次生代谢产物中分离得到了 8 个甾醇类化合物,经波谱学数据分析鉴定为麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇(**1**)、24-methylcholest-5,22(*E*)-3 β ,7 α -diol(**2**)、麦角甾-22-烯-3-醇(**3**)、5 α ,8 α -环氧-6-胆甾烯-3 β -醇(**4**)、5 α ,8 α -环氧-22E 麦角甾-6,22-二烯-3 β -醇(**5**)、3 β -羟基-胆甾烷(**6**)、3 β ,5 α ,9 α -三羟基-7,22-麦角甾二烯-6-酮(**7**)、3 β -羟基-5,8,22-麦角甾三烯-7-酮(**8**)。

关键词:桐花树;内生真菌;代谢产物;甾醇

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Sterols in secondary metabolites produced by an endophytic fungus isolated from *Aegiceras corniculatum*

LI Ying-lei^{1,2,3}, LIN Xiu-ping¹, LIU Yong-hong^{1*}¹Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;³Department of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China.

Abstract: Eight compounds were purified from an endophytic fungus by extensive chromatography and spectroscopic analysis. The endophytic fungus was isolated from *Aegiceras corniculatum*. They were identified as ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol(**1**), 24-methylcholest-5,22(*E*)-3 β ,7 α -diol, ergost-22-en-3-ol(**3**), 5 α ,8 α -epidioxy-cholest-6-en-3 β -ol(**4**), 5 α ,8 α -epidioxy-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol(**5**), 3 β -hydroxy-cholestan(**6**), 3 β -hydroxy-ergosta-5,8,22-trien-7-one(**7**), 3 β -hydroxy-ergosta-5,8,22-trien-7-one(**8**).

Key words: *Aegiceras corniculatum*; endophytic fungus; secondary metabolites; sterols

桐花树 *Aegiceras corniculatum* 属于紫金牛科 (Myrsinaceae), 桐花树属 (*Aegiceras*), 是红树林 (*Mangrove*) 组成树种之一, 主要分布在我国广西、广东、福建及南海诸岛。其生存环境位于热带和亚热带海岸及河口潮间带, 属于陆地到海洋过渡的生态系, 地处高盐、频繁的潮汐、强风、高温、强紫外辐射和缺氧污泥的海陆潮间带中, 鉴于其如此独特的生长环境, 它不仅具有丰富的内生真菌资源, 而且其内生真菌还具有独特的代谢途径和遗传背景, 及丰富的次级代谢产物。这些代谢产物不仅结构多样化, 且具有抗菌、抗肿瘤等多种重要的生物活性。近年, 红树林内生真菌作为一种海洋微生物资源, 已成为

新药及先导化合物研究开发的重要源泉^[1,2]。

甾醇类化合物是一种广泛存在的次级代谢产物, 从生源观点来说, 它是通过甲戊二羟酸的生物合成途径转化而来的, 并可以通过环结构和侧链的变化, 产生多种衍生物^[3], 而且据报道, 甾醇具有抗炎、利尿、降脂、抗癌等多种生物活性^[4]。本实验对来源于桐花树的一株真菌进行了次级代谢产物研究, 从中分离得到了 8 个甾醇类化合物。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Bruker DRX-500 MHz 核磁共振仪, TMS 为内标; 高效液相色谱仪: 岛津 LC-20A, YMC-Pack, ODS-S-5 μm 250 × 10 mm i. d., SPD-M20A 检测器; Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech Sweden); 柱色谱硅胶 (100 ~ 200 目, 200 ~ 300 目), TLC 和 pTLC (GF₂₅₄)

收稿日期:2014-01-22 接受日期:2014-06-11

基金项目:国家自然科学基金(31270402)

*通讯作者 Tel:86-20-89023144; E-mail:yonghongliu@scsio.ac.cn

购自烟台江友硅胶开发有限公司;所用试剂均为分析纯试剂。

真菌从珠江口红树林桐花树叶中分离得到,菌种保存于中国科学院微生物中心。

真菌分离培养基(Medium A):麦芽浸膏 1.5%,粗海盐 1%,氯霉素 0.02%,琼脂粉 1.5%,pH7.4~7.8,121 °C 灭菌 30 min 备用。

真菌纯化及短期保藏培养基(Medium B):麦芽浸膏 1.5%,粗海盐 1%,琼脂粉 1.5%,pH7.4~7.8,121 °C 灭菌 30 min 备用。

PDA 培养基:马铃薯浸提液 20%,葡萄糖 2%,琼脂粉 1.5%,粗海盐 0.025%,121 °C 灭菌 30 min 备用。

种子培养基:马铃薯浸提液 20%,葡萄糖 2%,粗海盐 0.025%,121 °C 灭菌 30 min 备用。

大米固体培养基:大米 200 g,粗海盐 0.25 g,自来水 200 mL,置于 1000 mL 三角瓶中,浸泡过夜,121 °C 灭菌 30 min 备用。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离、纯化及保藏

将桐花树树叶切成 1 cm × 1 cm 的小块,用无菌水洗涤表面,浸泡到 70% 乙醇中约 60~120 s 以进行表面消毒,用无菌纱布吸去乙醇,将其在 Medium A 平板上划线(作为阴性对照),再把它放到无菌纱布上,用无菌剪刀剪成更小块,并将这些小块放置到其他的新鲜 Medium A 平板上,使其与培养基充分接触,置 25 °C 培养 7~35 d。

待菌丝长满平板,将生长出的真菌菌丝尖端进行切割,转接到新鲜 Medium B 培养基上,置 25 °C 培养 7~35 d,直到得到纯菌株。

将纯化得到的真菌菌株接种到 Medium B 的试管斜面培养基上,置 25 °C 培养 7~35 d 后,放置于 4 °C 冰箱进行短期保藏。

1.2.2 菌株的发酵培养

将保藏于 4 °C PDA 培养基的菌株转接到 PDA 平板上,置于 25 °C 培养 7 d。将平板菌种转接到装有 50 mL 的种子培养基 200 mL 三角瓶中,于 25 °C,180 rpm 摆床培养 48 h。将 10 mL 种子液转接于大米固体培养基(装于 1000 mL 三角瓶)中,在自然光下,于 25 °C 静置培养。50 d 后,收获 20 瓶培养物,用于该菌化学成分的研究。

1.2.3 发酵产物的提取与分离

将固体发酵物粉碎后加入 2 倍体积丙酮,搅拌

后超声提取 10 min,后浸泡过夜,抽滤,收集上清液,残渣以乙酸乙酯浸提 3 次,每次 24 h,抽滤,收集上清,并与丙酮提取液合并。浓缩提取液,得浸膏 158 g。

将乙酸乙酯萃取的浸膏经中压硅胶(100~200 目)柱层析,以石油醚/乙酸乙酯(1:0~0:1)系统进行梯度洗脱,结合薄层色谱(TLC)点板情况,合并为 12 个流分(Fr01~Fr012)。

中压洗脱流分第 53 瓶(属 Fr01 流分其中 1 瓶,因出现结晶,没有合并到 Fr01 中)经放置产生结晶状物质,经甲醇反复重结晶得化合物 1(8.9 mg)。

流分 Fr02(812 mg)经过 Sephadex LH-20 柱层析,以氯仿/甲醇(1:1)洗脱,亚流分 Fr0105(35 mg)经薄层制备板(氯仿/甲醇,20:1)得到化合物 2。亚流分 Fr0103 经薄层制备板(氯仿/甲醇,20:1)得到化合物 6。

流分 Fr04 先通过葡聚糖凝胶柱(氯仿/甲醇 1:1)分离得到 7 个小组分(7A-7G),7B 经正相硅胶柱层析,经梯度洗脱(氯仿-丙酮,10:1)得到 4 个馏分(7B1-B4)。7B4 经过薄层板制备(氯仿-甲醇,15:1)得到化合物 3。

Fr06(3.4 g)经中压硅胶(100~200 目)柱层析,以石油醚/乙酸乙酯(6:1)洗脱,得到的相似流分相合并成为 10 个组分,组分 3(497 mg)经过 Sephadex LH-20 凝胶柱(氯仿/甲醇,1:1)脱色素,得到 8 个流分,将流分 8 经 PTLC(石油醚/乙酸乙酯,10:1)制备,得到化合物 4,化合物 5。将组分 8(1.2 g)经过 Sephadex LH-20 凝胶柱(氯仿/甲醇,1:1)脱色素,得到 9 个流分,将流分 6(235 mg)经硅胶柱层析(200~300 目),以氯仿/甲醇(49:1)进行洗脱,得到的相似流分合并为 8 个组分,将组分 4 经半制备 HPLC 进一步纯化,得到化合物 7(YMC-Pack,ODS-S-5 μ 250 × 10 mm i. d, 3 mL/min, 甲醇/水,(v/v 65:35), t_R = 50 min, 6.1 mg),化合物 8(甲醇/水,(v/v 65:35), t_R = 54 min, 5.7 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1 白色针状结晶(甲醇),254 nm 下有紫外吸收,TLC 展开 10% H_2SO_4 醇溶液显红色斑点。 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 5.56(1H, brs, H-6), 5.38(1H, brs, H-7), 5.22(1H, dd, J = 15.5, 7.0 Hz, H-22), 5.17(1H, dd, J = 15.5, 7.5 Hz, H-23), 3.63(1H, m, H-3), 1.03(3H, d, J = 6.5 Hz, H-21),

0.94(3H,s,H-19),0.91(3H,d,*J*=6.5 Hz,H-28),0.82(3H,d,*J*=6.5 Hz,H-26),0.83(3H,d,*J*=6.5 Hz,H-27),0.63(3H,s,H-18);¹³C NMR(CDCl₃,125 MHz)δ_c:38.3(C-1),32.0(C-2),70.5(C-3),40.8(C-4),139.8(C-5),119.6(C-6),116.3(C-7),141.3(C-8),46.2(C-9),37.0(C-10),21.0(C-11),39.1(C-12),42.8(C-13),54.7(C-14),23.0(C-15),28.3(C-16),55.7(C-17),12.0(C-18),16.3(C-19),40.4(C-20),21.1(C-21),135.6(C-22),132.0(C-23),42.8(C-24),33.1(C-25),19.9(C-26),19.7(C-27),17.6(C-28)。以上数据与文献报道^[5]基本一致,鉴定化合物**1**为麦角甾-5,7,22-三烯-3β-醇(ergosta-5,7,22-trien-3β-ol)。

化合物2 白色晶体,¹H NMR(500 MHz,CDCl₃)δ_H:5.63(1H,dd,*J*=5.0,1.6 Hz H-6),5.21(1H,dd,*J*=15.3,4.4 Hz H-23),5.17(1H,dd,*J*=15.2,8.0 Hz H-22),3.87(1H,brs,H-7),3.62(1H,m,H-3),2.36(1H,ddd,*J*=13.0,5.3,1.9 Hz,H-4a),2.31(1H,dd,*J*=13.0,13.0 Hz,H-4b),1.04(3H,d,*J*=6.5 Hz,H-21),0.94(3H,d,*J*=6.9 Hz,H-28),0.85(3H,d,*J*=6.7 Hz,H-26),0.83(3H,d,*J*=6.8 Hz,H-27),0.72(3H,s,H-18);¹³C NMR(CDCl₃,125 MHz)δ_c:157.2(C-24),147.8(C-5),124.1(C-6),106.4(C-28),71.8(C-3),65.3(C-7),56.1(C-17),49.8(C-14),42.7(C-9),42.6(C-13),42.4(C-4),39.6(C-12),38.1(C-8),37.8(C-10),37.4(C-1),35.1(C-20),34.2(C-22),32.3(C-25),31.8(C-2),31.2(C-23),28.6(C-16),24.7(C-15),22.5(C-26),22.3(C-27),21.1(C-11),19.9(C-19),18.5(C-21),12.0(C-18)。以上数据与文献报道^[6]一致,确定化合物**2**为24-methylcholest-5,22(*E*)-3β,7α-diol。

化合物3 白色固体¹H NMR(CDCl₃,500 MHz)δ_H:5.23(2H,m),3.80(1H,m),1.16(3H,s),1.05(3H,d,*J*=6.5 Hz),0.95(3H,d,*J*=7.0 Hz),0.87(6H,*J*=6.5 Hz),0.66(3H,s);¹³C NMR(CDCl₃,125 MHz)δ_c:72.1(C-3),28.6(C-5),44.3(C-4),32.1(C-6),56.1(C-14),55.9(C-17),53.6(C-9),42.3(C-13),39.6(C-12),38.5(C-7),38.0(C-10),37.1(C-1),35.2(C-20),34.2(C-2),29.5(C-8),28.1(C-16),135.6(C-22),132.4(C-23),39.9(C-24),28.0(C-25),23.1(C-15),22.8(C-26),22.6(C-27),17.8(C-28),21.0(C-11),12.3

(C-19),17.1(C-21),12.1(C-18)。经文献查阅,核磁数据与文献^[7]基本一致,故该化合物鉴定为麦角甾-22-烯-3-醇(ergost-22-en-3-ol)。

化合物4 无色针晶,254 nm 紫外吸收微弱,TLC 展开 10% 硫酸乙醇显深蓝色。¹H NMR(500 MHz,CDCl₃)δ_H:6.50(1H,d,*J*=8.5 Hz,H-6),6.24(1H,d,*J*=8.5 Hz,H-7),3.94(1H,m,H-3),0.99(3H,d,*J*=6.5 Hz,H-21),0.86(3H,s,H-19),0.82(3H,s,H-18),0.81(6H,m,H-26,27);¹³C NMR(CDCl₃,125 MHz)δ_c:34.7(C-1),30.1(C-2),66.5(C-3),37.0(C-4),82.1(C-5),135.4(C-6),130.5(C-7),79.5(C-8),51.1(C-9),36.8(C-10),23.4(C-11),39.4(C-12),44.5(C-13),51.7(C-14),20.6(C-15),28.5(C-16),56.2(C-17),12.3(C-18),18.6(C-19),39.9(C-20),19.6(C-21),36.2(C-22),23.5(C-23),39.8(C-24),28.9(C-25),22.9(C-26),22.6(C-27)。以上数据与文献报道^[8]一致,确定化合物**5α,8α-环二氧-6-胆甾烯-3β-醇**(5α,8α-epidioxy-cholest-6-en-3β-ol)。

化合物5 无色针晶:254 nm 紫外吸收微弱,TLC 展开 10% 硫酸乙醇显深蓝色。¹H NMR(500 MHz,CDCl₃)δ_H:6.49(1H,d,*J*=8.5 Hz,H-6),6.23(1H,d,*J*=8.5 Hz,H-7),5.16(2H,m,H-22,23),3.94(1H,m,H-3),0.99(3H,d,*J*=6.5 Hz,H-21),0.90(3H,d,*J*=6.5 Hz,H-28),0.86(3H,s,H-19),0.82(3H,s,H-18),0.81(6H,m,H-26,27);¹³C NMR(CDCl₃,125 MHz)δ_c:34.7(C-1),30.1(C-2),66.5(C-3),37.0(C-4),82.2(C-5),135.4(C-6),130.7(C-7),79.5(C-8),51.1(C-9),37.0(C-10),23.4(C-11),39.4(C-12),44.6(C-13),51.7(C-14),20.5(C-15),29.7(C-16),56.3(C-17),12.9(C-18),17.6(C-19),20.9(C-20),39.4(C-21),135.2(C-22),132.3(C-23),42.8(C-24),33.1(C-25),20.1(C-26),19.6(C-27),18.0(C-28)。以上数据与文献报道^[9,10]一致,确定化合物为**5α,8α-环氧-22E 麦角甾-6,22-二烯-3β-醇**(5α,8α-epidioxy-22E-ergosta-6,22-dien-3β-ol)。

化合物6 白色固体,¹H NMR(CDCl₃,500 MHz)δ_H:3.62(1H,m),1.01(3H,s),0.95(3H,m),0.91(3H,m),0.86(3H,m),0.67(3H,s);¹³C NMR(CDCl₃,125 MHz)δ_c:71.6(C-3),8.8(C-5),44.8(C-4),32.1(C-6),56.1(C-14),55.9(C-17),53.6(C-9),42.5(C-13),39.6(C-12),39.5(C-24),

38.5(C-7),38.0(C-10),37.1(C-1),36.1(C-22),35.2(C-20),34.2(C-2),29.5(C-8),28.1(C-16),28.0(C-25),24.1(C-23),23.1(C-15),22.8(C-26),22.6(C-27),21.0(C-11),12.3(C-19),17.1(C-21),12.1(C-18)。以上数据与文献报道^[11]一致,确定化合物为3 β -羟基-胆甾烷。

化合物7 白色无定型粉末,254 nm下有紫外吸收,¹H NMR(500 MHz,CD₃OD) δ_{H} :5.60(1H,s,H-7),5.28(2H,m,H-22,H-23),3.95(1H,m,H-3),1.07(3H,d,J=6.5 Hz,H-21),1.01(3H,s,H-19),0.97(3H,d,J=6.5 Hz,H-28),0.88(6H,d,J=7.0 Hz,H-26,H-27),0.69(3H,s,H-18);³C NMR(CDCl₃,125 MHz) δ_{C} :25.5(C-1),30.1(C-2),67.3(C-3),37.1(C-4),79.8(C-5),197.7(C-6),119.7(C-7),164.4(C-8),74.8(C-9),41.7(C-10),28.7(C-11),34.8(C-12),45.4(C-13),51.7(C-14),22.5(C-15),22.8(C-16),56.1(C-17),12.2(C-18),20.4(C-19),40.3(C-20),21.1(C-21),135.2(C-22),132.3(C-23),42.8(C-24),33.1(C-25),19.6(C-26)。以上数据与文献^[12]对照基本一致,因此鉴定化合物7为3 β ,5 α ,9 α -三羟基-7,22-麦角甾二烯-6-酮。

化合物8 白色无定型粉末,254 nm下有紫外吸收,TLC展开10%硫酸乙醇显红色。¹H NMR(500 MHz,CDCl₃) δ_{H} :0.65(3H,s,H-18),1.35(3H,s,H-19),1.05(3H,d,J=6.5 Hz,H-21),0.82(3H,d,J=7.0 Hz,H-26),0.85(3H,d,J=7.0 Hz,H-27),0.92(3H,d,J=7.0 Hz,H-28),3.68(1H,m,H-3),6.03(1H,s,H-6),5.22(1H,m,H-22),5.21(1H,m,H-23);¹³C NMR(125 MHz,CDCl₃) δ_{C} :34.7(C-1),30.6(C-2),71.9(C-3),41.8(C-4),161.1(C-5),126.7(C-6),186.3(C-7),134.1(C-8),161.7(C-9),41.9(C-10),24.5(C-11),35.6(C-12),42.4(C-13),48.5(C-14),24.8(C-15),29.7(C-16),53.3(C-17),11.9(C-18),23.6(C-19),40.3(C-20),21.2(C-21),135.4(C-22),132.1(C-23),42.8(C-24),33.1(C-25),19.9(C-26),19.6(C-27),17.7(C-28)。以上数据与文献^[13]对照基本一致,故鉴定8为3 β -羟基-5,8,22-麦角甾三烯-7-酮。

3 结果与讨论

从该菌的固体发酵产物乙酸乙酯萃取部位提取得到8个甾醇类化合物。分别鉴定为麦角甾-5,7,

22-三烯-3 β -醇(化合物1),24-methylcholest-5,22(E)-3 β ,7 α -diol(化合物2),麦角甾-22-烯-3-醇(化合物3),5 α ,8 α -环二氧-6-胆甾烯-3 β -醇(化合物4),5 α ,8 α -环氧-22E麦角甾-6,22-二烯-3 β -醇(化合物5),3 β -羟基-胆甾烷(化合物6),3 β ,5 α ,9 α -三羟基-7,22-麦角甾二烯-6-酮(化合物7),3 β -羟基-5,8,22-麦角甾三烯-7-酮(化合物8)。本实验研究的主要乙酸乙酯萃取物中极性偏小的部分,甾醇类物质主要是真菌细胞壁的组成成分,在性质上属于小极性化合物,本次实验在小极性部分分离得到的化合物主要为甾醇类,可能与本次真菌发酵时间稍长,代谢产物已逐渐分解有关。考虑在以后实验中做一下发酵时间的筛选,优选最佳代谢产物发酵条件,本次实验其他极性萃取物的分离鉴定还在进一步实验中。

参考文献

- Li MS, Lee SY. Mangroves of China: a brief review. Forest Ecology and Management, 1997, 96:241-259.
- Liu AR(刘爱荣), Wu XP(吴晓鹏), Xu T(徐同). Research advances in endophytic fungi of mangrove. Chin J Appl Ecol(应用生态学报), 2007, 18:912-918.
- John D. Weete. Sterols of the fungi: Distribution and biosynthesis. Phytochemistry, 1973, 12:1843-1864.
- Xu JJ(徐佳佳), Long SJ(龙盛京). Research overview of chemical constituents and biological activity of the *Aegiceras corniculatum*. LiShiZhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006, 17:2393-2395.
- Zou JH(邹建华), Dan JG(戴均贵). Study on chemical constituents in marine fungus of cladosporium cladosporioides. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2009, 4:418-421.
- Notaro G, Piccalli V, Sica D. New steroid hydroxyketones and closely related diols from the marine sponge *Cliona Cipiosa*. J Nat Prod, 1992, 55:1588-1594.
- Erdman TR, Thomson RH. Sterols from the sponges clionaceata grant and hymeniacidon perleve montagu. Tetrahedron 1972, 28:5163-5173.
- Ioannou E, et al. 5 α ,8 α -Epidioxysterols from the gorgonian *Eunicella cavolini* and the ascidian *Trididemnum inarmatum*: Isolation and evaluation of their antiproliferative activity. Steroids 2009, 74:73-80.
- Wang GH, Huang HC, Su JH, et al. Paralemnolins J-P, New sesquiterpenoids from the soft coral paralemnalia thyrsoide. Chem Pharm Bull, 2010, 58, 30-33.

(下转第210页)