

南海红树林内生真菌 B77 次级代谢产物研究*

邵长伦^{1,2}, 胡谷平², 杨瑞云^{2,3}, 夏雪奎², 王长云¹, 余志刚², 林永成²

(1. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

3. 广西师范大学化学化工学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 红树林真菌 B77 是一株采自湛江红树 *Kandelia candel* 种子的内生真菌, 该菌的种属尚未鉴定, 首次研究了该菌的次级代谢产物。从该菌的培养液中分离得到 4 个化合物, 通过波谱解析以及文献对照, 分别鉴定为 3-O-methylfusarubin, Fusarubin, 大黄素, 大黄素甲醚。3-O-methylfusarubin 和 Fusarubin 为首次从海洋真菌中分离得到的化合物, 初步的药理活性显示, 它们对 *Staphyococcus aureus* ATCC 27154 的 MIC 分别为 50.0 和 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词: 红树林内生真菌; 次级代谢产物; 生物活性

中图分类号: O656.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 01-0056-03

红树林是热带和亚热带沿海地区特有的植物群落。具有十分独特的生理和生态: 为胎萌植物, 生活力极强; 根系十分发达; 叶根的渗透压高; 耐盐, 有的种属甚至有泌盐机制。这些独特的生理生态, 使得红树林具有独特的代谢过程, 代谢产物和独特的共生菌。红树林生态系是世界上最富多样性、生产力最强的海洋生态系之一。

在过去的十几年里, 红树林栖息地被证明是真菌新种属的丰富来源, 红树林区具有丰富的内生微生物, 这形成了海洋真菌第二大的生态学亚类, 产生极其丰富的新的代谢产物。我们研究组已经对中国南海红树林内生真菌进行了较系统的研究, 并从中得到了一系列结构新颖的或药理活性良好的化合物^[1-4]。

红树林真菌 B77 是一株采自湛江红树 *Kandelia candel* 种子的内生真菌, 该菌的种属尚未鉴定, 在实验室人工培养发酵 130 L。本文首次研究了该菌的次级代谢产物, 从培养液中分离得到 4 个化合物, 通过波谱解析以及文献对照, 分别鉴定为 3-O-methylfusarubin (A), Fusarubin (B), 大黄素 (C), 大黄素甲醚 (D), 见图 1。3-O-methylfusarubin 和 Fusarubin 为首次从海洋真菌中分离得到的化合物, 初步的药理活性显示, 它们对 *Staphyococcus aureus* ATCC 27154 的 MIC 分别为 50.0 和 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1 结果与讨论

1.1 结构解析

化合物 A 为红色固体。LC MS 表明该化合物的相对分子质量为 320, 结合该化合物的氢谱和碳谱由此可以确定其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_7$, 不饱和度为 9。从该化合物的 ^1H NMR 谱中可以得到如下信息: 两个形成分子内氢键的酚羟基 (δ 12.91 和 12.63), δ 6.17 处有一个单峰氢质子, 有一个分裂成两组 d 峰的亚甲基 [4.90 (d, 18.0), 4.59 (d, 18.0)], 有 2 个甲氧基分别在 δ 3.93 (s), 3.31 (s), 还有一个分裂成两组 d 峰的亚甲基 [3.05 (d, 18.3), 2.70 (d, 18.3)], 另外还有一个甲基在 δ 1.55 处。 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱中显示该分子有 16 个碳信号, 1 个 CH, 2 个 CH_2 , 1 个 CH_3 , 2 个 $-\text{OCH}_3$, 其余 10 个均为季碳, 以上结果也与氢谱的信息相符。碳谱中, 化学位移在 δ 160.95, 160.80, 160.53, 157.30, 137.15, 132.84, 109.55, 109.54 的碳应该是 sp^2 杂化的碳, 它们共占去 4 个不饱和度, 而化学位移在 δ 184.39 和 177.85 的碳肯定是羰基碳, 则需要占掉 2 个不饱和度, 这样分子中还剩下 3 个不饱和度, 由此说明该结构中应该含有 3 个环。通过对上面的分析可以

* 收稿日期: 2007-09-03

基金项目: 国家“863”科技攻关计划资助项目 (2006AA09Z422, 2006AA09Z419); 国家自然科学基金资助项目 (40776073, 20572136); 国家教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-05-0600); 国家教育部科技创新工程重大项目培养资金资助项目 (706038); 中国海洋大学博士启动基金资助项目 (1404-82421036)

作者简介: 邵长伦 (1979 年生), 男, 博士; 通讯联系人: 余志刚, 林永成; E-mail: ceshzhzg@mail.sysu.edu.cn

推断该化合物可能为萘醌类 (δ 184.39, 177.85 处的碳信号正好是醌类两个酮羰基信号)。通过对上面的综合分析后我们得到了该化合物的基本结构。通过与相关文献对照后发现该化合物与 3-O-methylfusarubin^[5] 非常相似, 波谱数据基本吻合, 由此可以确定化合物 A 的结构。

化合物 B 为红色固体, LC MS 表明该化合物的相对分子质量为 306, 结合该化合物的氢谱和碳谱由此可以确定其分子式为 $C_{15}H_{14}O_7$, 不饱和度为 9。该化合物的 1H NMR 谱与化合物 A 的谱图比较相近, 也有 2 个形成分子内氢键得酚羟基 (δ 12.93, 12.66), δ 6.19 处有 1 个氢, 有 1 个单峰的亚甲基 [4.90 (s, CH_2)], 有 1 个甲氧基在 δ 3.95 (s), 也有 1 个分裂成两组 d 峰的亚甲基 [3.05 (d, 18.3), 2.70 (d, 18.3)], 2.23 处是 1 个醇羟基, 1.67 处是 1 个甲基。与化合物 A 相比较, 化合物 B 少了 1 个甲氧基而多了 1 个醇羟基 (δ 2.23)。碳谱中也证实了这一点, δ 48.9 处的甲氧基碳消失了。根据上面的推导, 可以得到化合物 B 的结构, 经文献查阅后判断化合物 B 即为 Fusarubin^[6]。

化合物 C 和 D 分别与标准品对照其熔点, 相同展开剂下的 R_f 值, 从而确定这 2 个化合物分别为大黄素和大黄素甲醚。

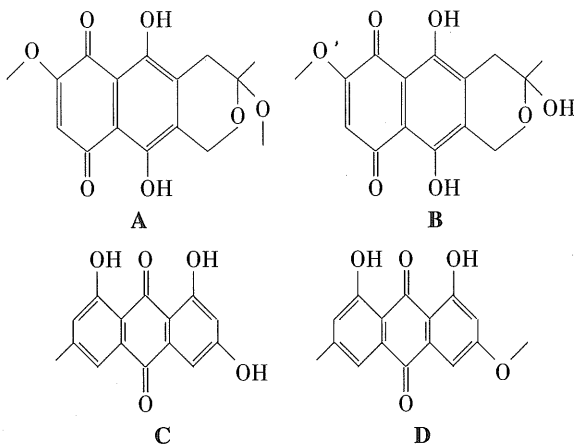


图 1 化合物 A, B, C, D 的结构式

Fig. 1 The structures of compounds A, B, C and D

1.2 抗菌活性

本文采用液体二倍稀释法对化合物 A 和 B 做了抗菌活性测试, 结果表明这 2 个化合物对 *Staphyococcus aureus* ATCC 27154 均有抗菌活性, 其 MIC 分别为 50.0 和 12.5 $\mu g/mL$ 。

2 实验部分

2.1 试剂与实验仪器

美国 Varian 公司 INOVA 300NB 超导核磁共振

仪; VG ZAB-HS 质谱仪; 德国 Elementar 公司 Vario EL CHNS-O 元素分析仪; 北京泰克仪器公司的 X-4 数字显示显微熔点测试仪。所用试剂均为广州化学试剂厂生产, 化学纯, 溶剂经重蒸后使用。柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 200~300 目硅胶, 硅胶 H, 薄层硅胶 GF254。

2.2 菌种及其测试菌

海洋真菌 B77 从湛江红树林植物分离得到, 菌种由中山大学生命科学院提供, 保存在 4 $^{\circ}C$ 下的玉米海水琼脂培养基中。测试菌株 *Staphyococcus aureus* ATCC 27154 由中山大学生命科学学院陈志仕博士惠赠, 保藏在本实验室。

2.3 菌种发酵培养

采用悬浮培养方式: 发酵培养基 (w) 为葡萄糖 1.0%, 蛋白胨 0.2%, 酵母膏 0.1%, 粗海盐 0.25%, pH 7.0。500 mL 三角瓶, 内装培养液 300 mL, 经 121 $^{\circ}C$ (0.1 MPa) 高温灭菌 25 min 后在超净工作台上接种。共接种 130 L, 25 $^{\circ}C$ 静置培养 30 d。

2.4 提取分离

发酵液用纱布过滤, 菌体和培养液分别收集, 培养液浓缩, 130 L 浓缩至 5 L, 乙酸乙酯提取。提取浓缩物分别拌硅胶过柱, 以石油醚/乙酸乙酯/甲醇梯度淋洗。收集各组分再经反复柱层析, 制备薄层层析和重结晶纯化后分别得到化合物 D (3.5 mg), C (4.2 mg), A (5.3 mg), B (2.5 mg)。

2.5 抗菌活性实验

采用液体二倍稀释法^[7] 测定了化合物对 *Staphyococcus aureus* ATCC 27154 的抗菌活性。

2.6 化合物的物理和波谱数据

化合物 A: 红色固体。 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.91 (OH), 12.63 (OH), 6.17 (s), 4.90 (d, 18.0), 4.59 (d, 18.0), 3.93 (s), 3.31 (s), 3.05 (d, 18.3), 2.70 (d, 18.3), 1.55 (3H)。

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 184.39, 177.85, 160.95, 160.80, 160.53, 157.30, 137.15, 132.84, 109.55, 109.54, 96.83, 58.70, 56.72, 48.94, 33.07, 22.92。LC MS (m/z): 319 (M^+)。

化合物 B: 红色固体。 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.93 (OH), 12.66 (OH), 6.19 (s, CH), 4.90 (s, CH_2), 3.95 (s, OCH_3), 3.05 (1H, d, 18.3), 2.70 (1H, d, 18.3), 2.23 (OH), 1.67 (s, $-CH_3$)。

^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 184.11, 177.15, 160.33, 159.51, 156.17, 156.17, 136.53, 133.04, 109.46, 109.20, 106.87, 57.20, 56.88, 32.72, 28.30。

LC MS (m/z): 305 (M^-), 290, 287, 275, 262, 248。

化合物 C: 黄色晶体。 θ_{mp} : 250 ~ 252 °C。 1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ : 12.16 (OH), 12.04 (OH), 7.56 (d, 1.2), 7.25 (d, 2.4), 7.13 (d, 1.2), 6.66 (d, 2.4), 2.47 (s)。

LC MS (m/z): 269 (M^-), 251, 241, 225。

化合物 D: 橙红色固体。 θ_{mp} : 205 ~ 208 °C。 1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) δ : 12.35 (OH), 12.15 (OH), 7.11 (1H, d, 1.5), 7.63 (1H, d, 1.2), 7.36 (1H, d, 1.2), 6.63 (1H, d, 1.5), 2.46 (3H, s), 3.96 (3H, s)。

LC MS (m/z): 283 (M^-)。

致谢: 菌株 B77 由中山大学生命科学院周世宁教授提供, 在此表示感谢。

参考文献:

- [1] LIN Y C, SHAO Z Y, JIANG G C, et al. Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5,6-dihydro-1,2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (Strain 386) from the South China Sea [J]. Tetrahedron, 2000, 56: 9607.
- [2] CHEN G Y, LIN Y C, WEN L, et al. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast [J]. Tetrahedron, 2003, 59: 4907.
- [3] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. Five unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea coast [J]. J Org Chem, 2001, 66: 6252.
- [4] SHAO C L, SHE Z G, GUO Z Y, et al. 1H and ^{13}C NMR assignments for two anthraquinones and two xanthenes from the mangrove fungus (ZSUH-36) [J]. Magn Reson Chem, 2007, 45: 434.
- [5] JAMES T H, ROBERT B A. Naphthoquinones produced by *Fusarium solani* isolated from citrus [J]. Phytochemistry, 1983, 22: 543.
- [6] RUELIUS H W, GAUHE A. Fusarubin, a naphthoquinone coloring matter from *Fusaria* [J]. Ann, 1950, 569: 38 - 59.
- [7] JORGENSEN J H, TURNIDGE J D, WASHINGTON J A, et al. Manual of clinical microbiology [M]. 7th ed. Washington D. C.: American Society for Microbiology, 1999: 1526.

Secondary Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus B77 in the South China Sea

SHAO Chang-lun^{1,2}, HU Gu-ping², YANG Rui-yun^{2,3}, XIA Xue-kui²,
WANG Chang-yun¹, SHE Zhi-gang², LIN Yong-cheng²

(1. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The secondary metabolites of the fungus B77 were first isolated from the seed of the mangrove sample *Kandelia candel* in Zhanjiang. Four compounds were isolated from the mycelium of this strain. Their structures were identified by comprehensive spectroscopic methods as 3-O-methylfusarubin (A), fusarubin (B), 1, 3, 8-trihydroxy-6-methylanthraquinone (C) and 1, 8-dihydroxy-3-methoxy-6-methylanthraquinone (D). In the primary bioassay, compounds A and B showed inhibitory activities against *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 with MIC value of 50.0 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Key words: mangrove endophytic fungus; secondary metabolites; biological activity