

表 1 提取条件因素水平

水平	A	B	C	D
	提取次数	提取时间/min	乙醇体积分数/%	液料比(ml/g)
1	1	3	60	25:1
2	2	5	70	30:1
3	3	7	80	35:1

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验表及极差分析结果

实验序号	提取因素				总黄酮提取量 /mg·g ⁻¹
	A	B	C	D	
1	1	3	60	25:1	6.84
2	2	3	70	30:1	11.77
3	3	3	80	35:1	15.21
4	1	5	70	35:1	9.35
5	2	5	80	25:1	10.45
6	3	5	60	30:1	12.38
7	1	7	80	30:1	8.68
8	2	7	60	35:1	12.49
9	3	7	70	25:1	12.29
K_1	24.87	33.82	31.71	29.57	
K_2	34.71	32.17	33.41	32.83	
K_3	39.87	33.46	34.34	37.05	
k_1	8.29	11.27	10.57	9.86	
k_2	11.57	10.73	11.14	10.94	
k_3	13.29	11.15	11.45	12.35	
R	5.00	0.55	0.88	2.49	

表中实验数据为 2 次重复实验的平均值

3.3 验证性实验 精确称取石仙桃果样品 1.000g,在最佳工艺 $A_3B_1C_3D_3$ 条件下,即提取次数 3 次,提取时间 3min,乙醇体积分数为 80%,液料比 35:1 条件下,按“2.2”项下的实验方法操作,测定吸光度,并且计算出石仙桃果中总黄酮提取量。进行三次平行验证性实验,得到的验证结果:石仙桃果中的总黄酮平均提取量为 15.19(mg/g), RSD 为 1.08%。说明实验条件下筛选的最佳提取工艺稳定性较好,可行性高。

4 讨论

黄酮类物质极易溶于水、乙醇、甲醇等极性强的溶剂中,且乙醇毒性小,可以回收利用,因而选择乙醇作为提取石仙桃果中总黄酮的提取剂。闪式提取方法是利用高速机械剪刀力和搅拌力,迅速破坏植物细胞组织,使组织细胞内部的成分快速溶解,该方法具有提取时间短、提取效率高、操作简单、生产成本低、能最大限度保护植物的有效成分不受热破坏优点。与传统提取方法相比,闪式提取时间大大缩短,且闪式提取法总黄酮含量较传统方法为高^[6]。

通过实验得到了石仙桃果中总黄酮闪式提取的最佳工艺条件,即为提取时间 3min,乙醇体积分数 80%,液料比 35:1,反复提取 3 次。在验证性实验条件下,石仙桃果中的总黄酮平均提取量可达 15.19(mg/g), $RSD = 1.08\%$ ($n = 3$),说明在该工艺条件下石仙桃果中总黄酮的提取量稳定、最产,因此也是闪式提取法提取石仙桃果中总黄酮的最佳工艺条件。

参考文献:

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社 2006: 837.
- [2] 马雪梅,章萍,于苏萍,等. 云南石仙桃及石斛总生物碱和多糖含量的分析[J]. 中草药,1997,28(9):561.
- [3] 易绮斐,荆福武,陈红锋,等. 我国石仙桃属植物的分布和开发利用[J]. 华南农业大学学报,2004,25(3):94.
- [4] 李建晨,冯丽,野原稔弘. 细叶石仙桃的化学成分[J]. 中国中药杂志,2008,33(14):1691.
- [5] 廖彭莹,李兵,苗伟生,等. 细叶石仙桃挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 安徽农业科学,2011,39(22):13394.
- [6] 王玥,杜守颖,吴清,等. 红花中羟基红花黄色素 A 的闪式提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(9):2144.

一株红豆杉内生真菌 *Xylariales* sp. 次级代谢产物的研究

于森¹,林筱²,张连茹^{3*}

(1. 宁夏大学生命科学学院,宁夏 银川 750021;

2. 厦门大学医学院,福建 厦门 361102; 3. 厦门大学生命科学院,福建 厦门 361005)

摘要: 对一株药用植物南方红豆杉内生真菌 *Xylariales* sp. 的次级代谢产物进行了分离纯化、结构鉴定和抗菌活性测定。用反相 (RP-18) 中压液相柱层析、凝胶 (Sephadex LH-20) 柱层析和硅胶柱层析等方法从该菌株固体发酵产物的乙酸乙酯相中初步分离得到了 4 个化合物。运用现代波谱技术结合文献数据对照,鉴定其结构分别是: 10,13-Octadecadienoic acid (1), Naphthalenemethanol, 1,4,5,6,7,8-octahydro-2,5,5,8a-tetramethyl- (2), 4H-Phenalenone [1,2-b]furan-4,6(5H)-dione, 8,9-dihydro-3,5,7-trihydroxy-1,8,8,9-tetramethyl-5-(2-oxopropyl)- (3), Roussellianone A (4)。化合物 3 与化合物 4 表现出了针对枯草芽孢杆菌专一的生长抑制活性,四个化合物在浓度为 10 μ g/ml 对 HeLa 细胞无毒性。

关键词: 红豆杉内生真菌; *Xylariales* sp.; 结构鉴定; 生物活性

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.02.022

中图分类号: RQ178.531 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2016)02-0319-03

收稿日期: 2015-06-02; 修订日期: 2015-11-20

基金项目: 宁夏大学自然科学基金 (No. ZR1324)

作者简介: 于森 (1984-), 男 (满族), 宁夏银川人, 宁夏大学生命科学学院助理实验师, 硕士学位, 主要从事天然产物活性物质提取与活性研究工作。

* 通讯作者简介: 张连茹 (1964-), 女 (汉族), 河北阜城人, 厦门大学生命科学院教授, 博士学位, 主要从事天然产物中基于分子靶点的潜在小分子药物的开发工作。

红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)为常绿乔木或灌木植物,民间一般称“紫杉”,含有多药用成分,被誉为“植物黄金”。红豆杉属植物药用功能最早记载于《本草纲目》,传统中医和民间利用红豆杉来治疗积食、润燥、通经、炎症、寄生虫病也已经有悠久的历史^[1]。上世纪七十年代,由 Wani 等^[2]从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)提取分离得到天然抗癌产物紫杉醇,被证实具有独特的抑制微管解聚和稳定微管作用,对多种癌症均有很好的治疗效果。从此,对红豆杉及其内生真菌的研究逐渐成为天然产物药物发掘的热门方向。

内生真菌(endophytic fungi)是指那些在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内部,但是不引起植物组织症状明显改变的菌^[3]。几乎所有种类的植物组织内都有内生真菌的存在^[4]。1993年,Strobel等^[5]从短叶红豆杉*Taxus brevifolia* Nutt.的树皮中分离出两百多种微生物,其中有一株内生真菌*Taxomyces andreanae*能够产生紫杉醇,这一研究结果引起了人们广泛的兴趣。根据内共生理论,植物内生真菌长期生活在植物体内的特殊环境中,可能产生与宿主相同或相似的具有生物活性的次级代谢产物。很可能是由于内生真菌吸收了来自宿主植物的基因片段,或者通过共进化而获得相似的基因。而且近年来对植物内生真菌代谢产物的研究,不断的印证了植物内生真菌的这一特性。郭波等^[6]从长春花(*Catharanthus roseus*)中分离出产长春花碱的内生真菌,阎长莉等^[7]从喜树果实中分离筛选得到一株能产生喜树碱的类似物。因此,药用植物内生菌是具有潜在治疗效果的新结构化合物的重要来源。对人类健康相关的生物活性成分的研究,以期得到对疾病具有治疗作用的先导化合物。同时,筛选具有与宿主植物相同或相似活性成分的内生真菌菌株并加以利用,是实现珍惜濒危药用植物资源保护与资源再生的重要途径。

1 材料与实验方法

1.1 试剂与实验仪器 德国 Bruker 公司 DRX-500 and Avance III-600 NMR 核磁共振仪;美国 Thermo 公司 Finnigan LCQ Advantage 质谱仪;柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 200~300 目硅胶,薄层硅胶为 GF254 薄层层析高效板;柱层析凝胶 Sephadex LH-20 为 GE Healthcare 公司进口;分析纯甲醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿等试剂均购买自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验菌株和肿瘤细胞 植物内生真菌真菌 Hds65,从采集自福建龙岩山区的红豆杉植物枝条中分离得到。经形态学和 ITS 序列分析,鉴定为炭角菌 *Xylariales sp.*。抑菌实验所用的 6 种指示菌为:枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、短小芽孢杆菌 *Baellius pumilus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphalococcus aureus*、藤黄八叠球菌 *Sarcina lutea*、白色假丝酵母 *Candida albicans* 均为本实验室保存菌种。细胞毒活性实验所用肿瘤细胞株为:人宫颈癌(HeLa)细胞,购于中科院上海细胞所。

1.3 菌种发酵 按照微生物培养的常规方法,将菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)平板中,28℃倒置培养 4d 作为种子平板,再从种子平板上挑取菌丝块接种于新鲜 PDA 平板进行固体发酵。每平板发酵量约为 20ml,发酵量为 10L,28℃倒置培养 15d。

1.4 提取与分离 收集菌株 15d 的培养物,将培养物切割成小块状后用乙酸乙酯:甲醇:乙酸(80:15:5)的混合溶液过夜提取 4 次,合并提取液,旋转蒸发仪 40℃减压浓缩得到发酵提取浸膏,浸膏加入水:乙酸乙酯(1:1)的混合溶液 600ml 萃取 6 次,合并乙酸乙酯相并用旋转蒸发仪 40℃减压浓缩至干,用甲醇溶解过滤,蒸干后得到粗提物 3.81g。

Hds65 菌株发酵粗提物 3.81g 经反相(80 g RP-18)中压液相柱层析,丙酮-水梯度(30:70;50:50;70:30;V/V)洗脱,每个梯度各洗脱 2000ml,220 ml/tube 收集,根据 TLC 检测结果合并为组分 30%-2(363mg)、50%-1(150mg)、50%-2(150mg)、50%-3(325mg)和 70%-1(1.15mg) 5 个组分。

70%-1 组分(1.1g)用甲醇溶解,经凝胶柱(Sephadex LH-20,140g)层析,甲醇洗脱,流速 4 mL/h,经 TLC 检测,合并第 19~26 管(263mg)和第 29~35 管(110mg)。

第 19~26 管(263mg)经反相中压液相柱(RP-18,30g)层析,分别用 80% 甲醇 1100ml、100% 甲醇 300ml 洗脱,流速为 20 ml/min,每 20 ml 收集一管,根据 TLC 检测结果合并 80% 甲醇洗脱的 35~46 管(54mg)。然后经正相硅胶柱层析(石油醚饱和 1.8g 硅胶装柱,0.4g 硅胶拌样),石油醚:乙酸乙酯梯度洗脱(100:0,400:1,V/V),10 ml/tube 收集,合并第 2~14 管,旋转蒸干得到化合物 1(10mg)。

第 29~35 管(110mg)经反相中压液相柱(RP-18,30g)层析,用 80% 甲醇洗脱 600ml,流速为 20 ml/min,每 20 ml 收集一管,根据 TLC 检测结果合并第 15~17 管(4mg)。然后经正相硅胶柱层析,石油醚:乙酸乙酯梯度洗脱(100:0,100:1,V/V),5 mL/tube 收集,经薄层层析结果收集石油醚:乙酸乙酯(100:1,V/V)洗脱出的第 1 管,旋转蒸干得到化合物 2(2mg)。

50%-2 组分(150mg)用甲醇溶解,经凝胶柱(Sephadex LH-20,140g)层析,甲醇洗脱,流速 4 ml/h,每管收集 4 ml,经 TLC 检测,合并 38~51 管(14mg)、61~69 管(70mg)和 99~104 管(10mg)。99~104 管(10mg)经正相硅胶柱层析,石油醚:丙酮梯度洗脱(400:1,200:1,V/V),每管收集 4 ml,经薄层层析结果合并石油醚:丙酮(200:1)洗脱出的 4~13 管和 17~25 管。分别旋转蒸干,得到化合物 3(2mg)、化合物 4(2mg)。

1.5 化合物生物活性测定 化合物的抑菌活性测定采用药敏纸片法进行测定^[8]。化合物的细胞毒活性测定按照 MTT 法进行测定^[9]。

2 结果

2.1 化合物 1 的结构鉴定 化合物 1 为无色透明油状物 ESI-MS m/z : 281.2 $[M + H]^+$, m/z 303.2 $[M + Na]^+$, 319.2 $[M + K]^+$ 。¹H-NMR($CDCl_3$, 600MHz) 2.23(t, 7.4, H-2), 1.52(m, H-3), 1.23(m, H-4), 1.23(m, H-5), 1.23(m, H-6), 1.23(m, H-7), 1.23(m, H-8), 1.95(m, H-9), 5.28(m, H-10), 5.28(m, H-11), 2.65(t, 6.6, H-12), 5.28(m, H-13), 5.28(m, H-14), 1.95(m, H-15), 1.23(m, H-16), 1.23(m, H-17), 0.76(m, H-18); ¹³C-NMR($CDCl_3$, 150MHz) 178.9(C-1), 33.4(C-2), 24.2(C-3), 28.8(C-4), 28.62(C-5), 28.56(C-6), 28.51(C-7), 29.1(C-8), 26.69(C-9), 129.7(C-10), 127.6(C-11), 25.1(C-12), 127.4(C-13), 129.5(C-14), 26.67(C-15), 31.0(C-16), 22.1(C-17), 13.5(C-18)。与文献^[10]报道的核磁数据对比进一步确定了化合物 1 的结构为 10,13-Octadecadienoic acid。

2.2 化合物 2 的结构鉴定 化合物 2 无色透明油状物 ESI-MS m/z : 223.1 $[M + H]^+$, m/z 245.1 $[M + Na]^+$, 261.1 $[M + K]^+$ 。¹H-NMR($CDCl_3$, 600MHz) 0.98(m, H-1), 1.93(m, H-1), 1.32(m, H-2), 1.49(m, H-2), 1.11(m, H-3), 1.30(m, H-3), 1.11(m, H-5), 1.74(m, H-6), 1.89(m, H-6), 5.34(s, H-7), 1.69(s, H-9), 0.70(s, H-11), 0.79(s, H-12), 0.75(s, H-13), 1.63(s, H-14), 3.48(m, H-15),

3.69 (m, H-15); ^{13}C -NMR (CDCl₃, 150MHz) 39.0 (C-1), 18.1 (C-2), 41.6 (C-3), 32.2 (C-4), 49.5 (C-5), 22.9 (C-6), 121.6 (C-7), 133.4 (C-8), 56.7 (C-9), 35.3 (C-10), 13.5 (C-11), 20.9 (C-12), 32.3 (C-13), 21.0 (C-14), 59.3 (C-15)。与文献^[11]报道的核磁数据对比进一步确定了化合物 2 的结构为 Naphthalenemethanol, 1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-。

2.3 化合物 3 的结构鉴定 化合物 3 为淡黄色透明油状物 ESI-MS m/z : 399.1 [M + H]⁺, m/z 421.1 [M + Na]⁺, 437.1 [M + K]⁺。 ^1H -NMR (CDCl₃, 600MHz) 6.63 (s, H-8), 2.65 (s, H-14), 4.53 (m, H-15), 1.35 (s, H-17), 1.40 (s, H-18), 1.19 (s, H-19), 3.13 (s, H-20), 3.17 (s, H-20), 2.08 (s, H-22), 3.58 (m, OH-2), 12.68 (m, OH-4), 13.20 (m, OH-9); ^{13}C -NMR (CDCl₃, 150MHz) 196.7 (C-1), 78.4 (C-2), 198.7 (C-3), 164.9 (C-4), 118.0 (C-5), 165.6 (C-6), 109.1 (C-7), 117.5 (C-8), 165.8 (C-9), 105.0 (C-10), 148.7 (C-11), 102.1 (C-12), 139.9 (C-13), 23.7 (C-14), 91.1 (C-15), 42.8 (C-16), 14.2 (C-17), 25.3 (C-18), 20.0 (C-19), 51.7 (C-20), 205.1 (C-21), 30.6 (C-22)。与文献^[12]报道的核磁数据对比进一步确定了化合物 3 的结构为 4H-Phenalenone [1,2-b]furan-4,6(5H)-dione, 8,9-dihydro-3,5,7-trihydroxy-1,8,8,9-tetramethyl-5-(2-oxopropyl)-。

2.4 化合物 4 的结构鉴定 化合物 4 为淡黄色透明油状物 ESI-MS m/z : 399.1 [M + H]⁺, m/z 421.1 [M + Na]⁺, 437.1 [M + K]⁺。 ^1H -NMR (CDCl₃, 600MHz) 6.79 (s, H-5), 6.39 (s, H-8), 4.70 (d, 6.5, H-14), 5.55 (t, H-15), 1.79 (s, H-17), 1.84 (s, H-18), 2.80 (s, H-19), 3.25 (s, H-20), 2.20 (s, H-22), 3.73 (s, OH-2), 12.67 (s, OH-4), 13.24 (s, OH-9); ^{13}C -NMR (CDCl₃, 150MHz) 198.7 (C-1), 77.2 (C-2), 196.6 (C-3), 165.1 (C-4), 118.7 (C-5), 149.6 (C-6), 166.0 (C-7), 96.6 (C-8), 168.3 (C-9), 101.3 (C-10), 113.3 (C-11), 105.1 (C-12), 136.7 (C-13), 65.8 (C-14), 117.3 (C-15), 139.4 (C-16), 17.8 (C-17), 25.3 (C-18), 26.1 (C-19), 51.5 (C-20), 205.0 (C-21), 30.6 (C-22)。与文献^[13]报道的核磁数据对比进一步确定了化合物 4 的结构为 Rousselianone A。

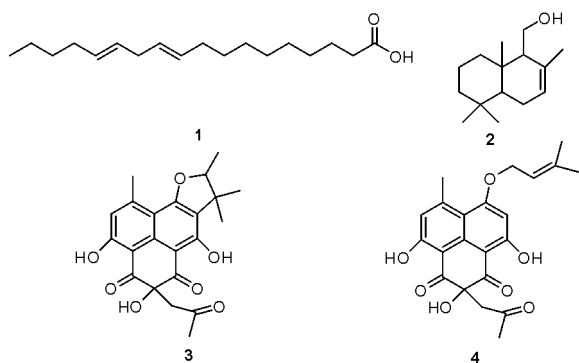


图 1 化合物 1~4 的结构图

2.5 化合物的生物活性测定 采用 MTT 法测定本次鉴定的化合物 1~4 的细胞毒性,在化合物浓度在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时未见四种化

合物对肿瘤细胞株 HeLa 的细胞毒活性。采用滤纸片法测定化合物 1~4 对 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Candida albicans* 指示菌的抗菌活性,在每片滤纸片含有 50 μg 样品时,化合物 3 和化合物 4 仅对枯草芽孢杆菌指示菌表现出了中度的抑制活性,抑制率分别为 32.2% 和 40.0%。

3 结论

本论文从一株南方红豆杉内生真菌 *Xylariales* sp. 的次级代谢产物中共分离到了 4 个化合物,10,13-Octadecadienoic acid (1), Naphthalenemethanol, 1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2,5,5,8a-tetramethyl- (2), 4H-Phenalenone [1,2-b]furan-4,6(5H)-dione, 8,9-dihydro-3,5,7-trihydroxy-1,8,8,9-tetramethyl-5-(2-oxopropyl)- (3), Rousselianone A (4)。其中化合物 1 属于不饱和脂肪酸类,同类的十八碳二烯酸已被用作治疗动脉硬化与高血脂等症的药物,有进一步开发的潜力。化合物 2 属于倍半萜类,是一类重要的香料,主要用于作为化妆品和食品工业的原料。化合物 3 和 4 属于萜类的衍生物,本文首次发现其具有特异性的对真菌类枯草芽孢杆菌的生长抑制作用,对进一步进行生物活性及其机理的研究具有重要的参考价值。

对药用植物内生真菌次级代谢产物的扩大研究,从中分离鉴定结构新颖或者具有生物活性的化合物,不仅为新药的研发提供了丰富的资源,同时对保护日益稀少的药用植物资源具有重大意义。

参考文献:

- [1] 王亚飞,王强,阮晓,等. 红豆杉属植物资源的研究现状与开发利用对策[J]. 林业科学, 2012, 48(5): 116.
- [2] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents VI: the isolation and structure of taxol, a novel antineoplastic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. J Am Chem Soc, 1971, 95(9): 23.
- [3] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial Ecology of Leaves [M]. New York: Springer-Verlag, 1991: 179.
- [4] Dreyfuss, M. M. Chapela, I. H. In the discovery of natural products with therapeutic potential [M]. Boston, 1994: 49.
- [5] Strobel G A. A proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycetes associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. Mycotaxon, 1993, 107: 71.
- [6] 郭波,李海燕,张玲琪. 一种产长春碱真菌的分离[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1998, 20(3): 214.
- [7] 阎长莉,袁萍. 喜树内生真菌的分离及其代谢产物 10 羟基喜树碱的分析[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2009, (5): 94.
- [8] Zaika L L. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination [J]. Food Safety, 1988, 9(2): 97.
- [9] Wang X X, Shigemori H, Kobayashi J. New taxoids from Japanese yew *Taxus cuspidata* [J]. J Nat Prod, 1998, 61: 474.
- [10] 陈红红,李孝铮. 银环蛇蛇蜕的化学成分研究 II. 脂肪酸和氨基酸组分 [J]. 分析测试学报, 2001, 20(3): 70.
- [11] Masao T, Yoshinori A. Sesquiterpenoids from the liverwort *Bazzania fauriana* [J]. Phytochemistry, 1988, 27(7): 2155.
- [12] Williams A, et al. Metabolites produced by the *Scleroderris* canker fungus, *Gremmeniella abietina*. Part I [J]. Can J Chem, 1986, 64: 1585.
- [13] Xiao J Z, et al. Rousselianone A, novel antibiotic related to phenalenone produced by *Phaeosphaeria rousseliana* [J]. J Antibiot, 1993, 46(10): 1570.