

南海红树林内生真菌 SK7RN3G1 代谢产物研究

杨建香^{1,2*}, 邱声祥¹, 佘志刚², 林永成²

(1. 中国科学院华南植物园 植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650;
2. 中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

[摘要] 目的:研究南海红树林内生真菌 SK7RN3G₁ 的代谢产物。方法:采用反复硅胶柱色谱法、Sephadex LH-20 凝胶色谱法等进行分离纯化,并通过理化常数测定和光谱分析鉴定其化学结构。结果:从南海红树林内生真菌 SK7RN3G₁ 的菌体中分离得到 6 个代谢产物。经波谱解析,分别为:3,8-dihydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate (**1**), lichenxanthone (**2**), griseoxanthone C (**3**), 1,3,6-trihydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one (**4**), harman(1-甲基-β-咔啉) (**5**), N9-甲基-1-甲基-β-咔啉(**6**)。初步药理活性显示化合物 **1** 和 **2** 对人体肝癌细胞 HepG2 抑制的 IC₅₀ 分别为 20,25 mg · L⁻¹。根据文献报道,化合物 **5** 具有抗 HIV 活性,其 EC₅₀ 为 10.7 μmol · L⁻¹, 化合物 **6** 具有抗 HIV 和抗癌重要生理活性。结论:所有化合物均首次从南海红树林内生真菌 SK7RN3G₁ 中分离得到。

[关键词] 红树林; 内生真菌; 代谢产物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0095-04

Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus SK7RN3G1 from South China Sea

YANG Jian-xiang^{1,2*}, QIU Sheng-xiang¹, SHE Zhi-gang², LIN Yong-cheng²

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

[Abstract] **Objective:** To study on secondary metabolites of mangrove endophytic fungus No·SK7RN3G₁ from the south china sea. **Method:** The compounds were isolated by column chromatography and identified on the basia of physic-chemical constants and spectral analysis. **Result:** Six metabolites were obtained and elucidated as 3, 8-dihydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate (**1**), lichenxanthone (**2**), Griseoxanthone C (**3**), 1,

[收稿日期] 20120519(008)

[基金项目] 国家 863 计划项目(2007AA09Z448);国家自然科学基金项目(20772162)

[通讯作者] * 杨建香, 博士,副教授,从事天然产物化学研究,Tel:020-37082553,E-mail:791011@126.com

[5] 陈凯, 窦月, 陈智, 等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 275.
[6] 张汉明, 张戈, 乔传卓. 板蓝根和大青叶不同部位的靛蓝、靛玉红含量测定及其部分成分的抗内毒素作用比较[J]. 药学实践杂志. 2000, 18(5): 347.
[7] 马莉, 金城, 李祖伦, 等. 生物检定与板蓝根质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 134.
[8] 马琳, 孟祥超, 李兰芳. 板蓝根药材及板蓝根颗粒中有机酸成分薄层色谱鉴别分析[J]. 国际医药卫生导

报, 2008, 14(10): 74.
[9] 马莉, 唐建元, 李祖伦, 等. 板蓝根提取物中总有机酸和水杨酸含量测定方法研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 804.
[10] 王小雪, 郑文捷, 谢国祥, 等. 高效毛细管电泳同时测定板蓝根中水杨酸、丁香酸、苯甲酸和邻氨基苯甲酸[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2): 189.
[11] 施峰, 安益强, 贾晓斌, 等. 不同产地板蓝根药材中水杨酸量的比较[J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 271.

[责任编辑 顾雪竹]

3, 6-trihydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one (4), harman (1-methyl- β -carboline) (5), N9-methyl-1-methyl- β -carboline (6). In the preliminary bioassay, 1 and 2 show inhibitory activity on the HepG2 cell line with IC_{50} values of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. According to the literatures, 5 shows anti HIV activity with EC_{50} values of 10.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 6 has important physiological activity of anti HIV and anticancer. **Conclusion:** The six metabolites were obtained from endophytic fungus No. SK7RN3G₁ for the first time.

[Key words] mangrove; endophytic fungus; metabolites

海洋微生物由于生活在高盐、高压的特殊环境中,具有独特的代谢方式^[1]。而海洋微生物中的红树林是生长在热带亚热带海岸潮间带,受周期性潮水浸淹,以红树植物为主体的潮滩湿地木本生物群落,是海洋环境中特有的高等植物。红树林特殊的生态环境,蕴育了红树林真菌独特的代谢途径和遗传背景,其代谢产物具有类型丰富多样,骨架复杂新奇,生物活性多样化等特点^[2],我们在对中国南海红树林内生真菌的研究中,发现了大量的生物活性化合物,这些内生真菌的代谢产物在抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、杀虫等方面显示出潜在的应用价值^[3-4],这也揭示了我国南海海洋真菌具有极大的药用开发前景^[5-8]。

本文对南海红树林内生真菌 SK7RN3G₁ 代谢产物进行研究,从菌体中分离得到 6 个化合物:3,8-dihydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthen-1-carboxylate (1), lichenxanthone(2), GriseoxanthoneC (3), 1,3,6-trihydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one (4), harman (1-甲基- β -咔啉) (5), N9-甲基-1-甲基- β -咔啉(6), 通过 MS, NMR 等波谱分析方法确定它们的结构。初步药理活性显示化合物 1 和 2 对人体肝癌细胞 hepG2 抑制的 IC_{50} 值为 20, 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。化合物 5 具有抗 HIV 活性,其 EC_{50} 为 10.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 化合物 6 具有抗 HIV 和抗癌重要生理活性。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂 美国 Varian 公司 INOVA-500NB 超导核磁共振谱仪和 INOVA-300NB 核磁共振仪; VG ZAB-HS 双聚焦质谱仪, Thermo DSQ 电子轰击电离质谱仪, Thermo MAT95XP 高分辨质谱仪; 北京泰克仪器有限公司 X-4 数字显示显微熔点测定仪。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。柱色谱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。

1.2 菌种培养 红树林内生真菌 SK7RN3G₁ 采自广东省珠海市, 经鉴定为拟茎点霉菌 (*Phomopsis* sp.), 保存于中山大学化学与化学工程学院。发酵培养基为葡萄糖 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母膏

1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 粗海盐 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0。500 mL 三角瓶内装培养基 200 mL, 1.25 $\times 10^5$ Pa 灭菌 15 min 后接种 100 L, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 30 d。分别收集发酵液和菌体。

1.3 提取与分离 100 L 发酵物过滤得菌体和发酵液, 发酵液浓缩后用乙酸乙酯充分萃取, 菌体用甲醇多次浸泡。提取浓缩物分别以体积比 1:2 拌硅胶 (200~300 目) 进行柱色谱, 以石油醚/乙酸乙酯/甲醇进行梯度加压洗脱。收集各组分再经反复柱色谱, 制备薄层色谱, 重结晶等方法进行纯化。从菌体粗提物 (约 20 g) 分离得到化合物 1 (10 mg), 2 (20 mg), 3 (15 mg), 4 (10 mg), 5 (20 mg), 6 (15 mg)。

1.4 细胞毒活性实验 采用 MTT 法^[9] 测定了化合物 1 和 2 对人体肝癌细胞 hepG2 细胞毒的活性。

1.5 化合物数据 化合物 1 白色晶体, HR-EIMS: 300.062 8 [M]⁺ (计算值 300.063 4)。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ_{H} : 6.74 (1H, d), 6.47 (1H, d), 6.64 (1H, d), 6.83 (1H, d), 3.78 (3H, s), 2.28 (3H, s); ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 125 MHz) δ_{C} : 181.5 (C), 170.2 (C), 165.5 (C), 163.2 (C), 160.1 (C), 157.7 (C), 150.7 (C), 137.8 (C), 114.5 (CH), 113.1 (CH), 112.1 (C), 109.1 (CH), 108.1 (C), 105.2 (CH), 53.9 (CH₃), 23.4 (CH₃)。

化合物 2 无色针状晶体, mp 175~176 $^{\circ}\text{C}$ 。EIMS (m/z): 286 [M]⁺。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz) δ_{H} : 13.36 (1H, s), 6.86 (1H, d), 6.80 (1H, d), 6.77 (1H, d), 6.29 (1H, d), 3.96 (3H, s), 3.92 (3H, s), 2.81 (3H, s)。¹³C-NMR (CD₃COCD₃, TMS) δ_{C} : 182.51 (C), 165.94 (C), 163.88 (C), 163.89 (C), 159.52 (C), 157.06 (C), 143.60 (C), 115.45 (CH), 103.08 (C), 104.2 (C), 98.53 (CH), 96.81 (CH), 92.09 (CH), 55.65 (CH₃), 55.60 (CH₃), 23.31 (CH₃)。

化合物 3 白色晶体, mp 209~211 $^{\circ}\text{C}$ 。EIMS (m/z): 272 [M]⁺。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 500 MHz) δ_{H} : 13.40 (1H, s), 9.79 (1H, br s), 6.69 (2H, s), 6.30 (1H, d, 2.0), 6.18 (1H, d, 2.0), 3.92 (3H,

s), 2.78 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , 125 MHz) δ_c : 182.0 (C), 164.4 (C), 163.9 (C), 162.4 (C), 159.3 (C), 157.1 (C), 143.4 (C), 111.7 (C), 102.8 (C), 115.9 (CH), 100.5 (CH), 97.7 (CH), 93.0 (CH), 56.3 (CH₃), 22.4 (CH₃)。

化合物 4 淡黄色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (CD₃COCD₃, 300 MHz): 13.41 (OH, s), 6.67 (1H, s), 6.27 (1H, d, 2.0), 6.16 (1H, d, 2.0), 2.76 (3H, s)。EIMS m/z (rel. int.): 258 (100), 242 (3.0), 229 (14.2), 213 (1.4), 201 (4.0), 187 (1.0), 173 (0.8), 155 (1.0), 151 (1.2), 145 (1.0), 129 (2.8), 115 (2.8)。

化合物 5 白色晶体, mp 227 ~ 229 °C。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 11.22 (1H, brs), 8.20 (1H, d, $J = 5.0$ Hz), 8.01 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.79 (1H, d, $J = 5.0$ Hz), 7.56 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.49 (1H, td, $J = 7.0, 1.2$ Hz), 7.19 (1H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz), 2.85 (3H, s)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 140.1 (C), 138.6 (C), 135.4 (CH), 132.7 (C), 125.7 (CH), 125.2 (C), 119.6 (C), 119.2 (CH), 117.2 (CH), 110.6 (CH), 110.0 (CH), 18.7 (CH₃)。EIMS (m/z): 182 [M]⁺。

化合物 6 白色晶体, mp 103 ~ 105 °C。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 8.31 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 8.15 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.86 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 7.63 (1H, t, $J = 7.1$ Hz), 7.47 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.10 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 4.14 (3H, s), 3.11 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 141.56, 136.64, 134.94, 128.1, 127.70, 121.35, 120.01, 119.29, 112.89, 110.10, 110.03, 32.0, 22.93。ESI-MS (m/z) 196 [M]⁺。

2 结果与讨论

化合物 1 由 NMR 数据以及 HR-EIMS 谱中分子离子峰为 300.062 8 [M]⁺ (计算值 300.063 4), 确定分子式为 C₁₆H₁₂O₆, 不饱和度 U = 11。 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱显示该化合物有 4 个 CH, 2 个 CH₃, 10 个季碳, 其中有 1 个酮羰基碳 δ_c 181.5, 1 个酯基碳 δ_c 170.2, 1 个氧甲基碳 δ_c 53.9; $^1\text{H-NMR}$ 谱显示有 2 个酚羟基 δ_H 12.4, δ_H 12.3, δ_H 6.75 (1H, d, 2.4), 6.83 (1H, d, 2.4) 显示出 1 个苯环上 2 个间位氢, δ_H 6.47 (1H, d, 2.4), 6.64 (1H, d, 2.4), 显示出另 1 个苯环上 2 个间位氢, δ_H 3.78 (1H, s) 显示出甲氧基上的氢, δ_H 2.28 (1H, s) 显示出甲基上的氢,

根据以上信息表明有 2 个苯环、1 个酮羰基、1 个酯基、再根据不饱和度为 11, 说明还应该有一个环, 根据所得核磁数据, 与文献对照^[10], 确定化合物为 3, 8-dihydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthen-1-carboxylate。

化合物 2 从 EIMS 谱得到其分子离子峰 m/z 286; 结合 NMR 推出其分子式为 C₁₆H₁₄O₅, 计算得不饱和度为 10。 $^1\text{H-NMR}$ (CD₃COCD₃, 400 MHz) 中, 8 组信号峰出现, 其中 δ_H 13.36 (1H, s) 位于低场, 并且是尖峰, 说明其为一活泼氢信号, 此氢原子应与羰基相邻形成分子内氢键, δ_H 6.86 (1H, d)、 δ_H 6.80 (1H, d)、 δ_H 6.44 (1H, d)、 δ_H 6.29 (1H, d) 为苯环上间位氢信号, δ_H 3.96 (3H, s), δ_H 3.92 (3H, s) 为甲氧基上的氢信号, δ_H 2.81 (3H, s) 应为与苯环相连的甲基氢。 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱显示有 9 个季碳, 其中包括 1 个羰基季碳 δ_c 182.51, 另外的为 δ_c 163.88, δ_c 96.81, δ_c 165.94, δ_c 92.09, δ_c 157.06, δ_c 159.52, δ_c 98.53, δ_c 163.89, δ_c 115.45, δ_c 143.60, δ_c 113.05, δ_c 104.20, 2 个甲氧基碳 δ_c 55.60, δ_c 55.65, 1 个甲基碳 δ_c 23.3。与文献 [11] 对照, 推测化合物为 Lichenxanthone。

化合物 3 与化合物 2 非常类似, 二者的区别在于化合物 3 的一个甲氧基变成了羟基。EIMS 显示分子离子峰为 272, 结合核磁数据, 化合物的分子式被确定为 C₁₅H₁₂O₅, 不饱和度为 7; $^1\text{H-NMR}$ (CD₃COCD₃, 500 MHz) 中, δ_H 13.40 (1H, s), 9.79 (brs) 为活泼氢信号, δ_H 6.40 (1H, d), 6.26 (1H, d), 6.72 (1H, d), 6.72 (1H, d) 为苯环上间位氢, 2.23 (3H, s) 为甲基氢, 3.92 (s) 为氧甲基氢。与文献 [12] 对照, 最后确定该化合物为 griseoxanthone C。

化合物 4 EIMS 显示分子离子峰 258, 结合核磁数据, 可得化合物分子式为 C₁₄H₁₀O₅。 $^1\text{H-NMR}$ 显示化合物有 4 个苯环氢, 1 个共轭的活泼氢, 一个甲基, 根据所得数据与文献 [13] 对照确定化合物的结构为 1, 3, 6-trihydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one。

化合物 5 由质谱 (EIMS m/z : 182) 和 NMR 推出分子式为 C₁₂H₁₀N₂, 不饱和度是 9。NMR 数据显示该化合物除了 1 个甲基外, 其余 11 个 C 的化学位移在 141.5 ~ 110.0 (没有羰基碳), 其 6 个 H 的化学位移处于 8.31 ~ 7.10, 而且每个峰为 1 个质子, 这表明该化合物可能为芳香分子。 δ : 11.22 (1H, brs) 可能是 =NH。 δ 8.01 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.79 (1H, d, $J = 5.0$ Hz), 7.56 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.49 (1H, td, $J = 7.0, 1.2$ Hz), 7.19 (1H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz), 4 个 H 之间的偶合关系表明

有 1 个邻位二取代苯环; δ : 8.20 (1H, d, $J = 5.0$ Hz), 8.01 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 可能为吡啶环上邻位偶合的 2 个 H。一个苯环和一个吡啶环的不饱和度为 8, 那么分子中另有一个环 (不可能为双键) 才符合该分子的不饱和度。综合分析推断该化合物属于咪啉类化合物 (含一个苯环、一个吡啶环和一个含 N 的环)。根据所得核磁数据与文献 [14] 对照一致, 为 1-甲基- β -咪啉 (Harman), 化合物 5 具有抗 HIV 活性^[15], 其 EC_{50} 为 $10.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

化合物 6 由质谱和 NMR 推出分子式为 $C_{13}H_{12}N_2$, 不饱和度是 9。NMR 显示该化合物除了 2 个甲基碳外, 有 11 个 C 的化学位移在 141.5 ~ 110.0 (没有羰基碳), 其质子的化学位移处于 8.31 ~ 7.10 之间, 而且每个峰为 1 个质子, 这表明该化合物为芳香分子。该化合物与化合物 5 的 ¹H-NMR 极其相似, 仅在 δ 4.14 处多 1 个 -CH₃ 峰, 而在 δ 11.22 处 NH 峰消失。该化合物波谱数据与文献 [13] 报道的 *N*-methylharman 波谱数据一致, 因此确定化合物 6 为 *N*-methylharman, 即为 *N*9-甲基-1-甲基- β -咪啉, 据文献 [16] 报道, *N*-methylharman 具有抗 HIV 和抗癌重要生理活性。

[参考文献]

[1] 周中流. 红树林底泥放线菌 (N2010-37) 发酵液的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 98.
[2] PAN J H, Jones E B G, SHE Z G, et al. Review of bioactive compounds from fungi in the South China Sea [J]. Botanica Marina, 2008, 51(3): 179.
[3] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. J Nat Prod, 2004, 67(2): 257.
[4] 马养民, 徐晓娜, 张弘驰. 无花果内生真菌分离鉴定及其活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 86.
[5] 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(19): 6252.
[6] Wen L, Cai X L, Xu F, et al. Three metabolites from

the mangrove endophytic fungus *sporothrix* sp. (# 4335) from the South China Sea [J]. J Org Chem, 2009, 74(3): 1093.
[7] Huang Z J, Cai X L, Shao C L, et al. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsis produced by mangrove endophytic fungus *phomopsis* sp. ZSU-H76 [J]. Phytochemistry, 2008, 69(7): 1604.
[8] XU F, Zhang Y, Wang J J, et al. Benzofuran derivatives from the mangrove endophytic fungus *xylaria* sp. (#2508) [J]. J Nat Prod, 2008, 71(7): 1251.
[9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunological Methods, 1983, 65(1/2): 55.
[10] T Hamasaki, Y Kimura. Isolation and structures of Four new metabolites from *Aspergillus wentii* [J]. Agric Biol Chem, 1983, 47(1): 163.
[11] George R Pettit, Qingwen Zhang, Veronique Pinilla, et al. Isolation and structure of gustastatin from the brazilian nut tree *Gustavia hexapetala* [J]. J Nat Prod, 2004, 67(6): 983.
[12] McMaster W J, Scott A I, Trippett S. Metabolic products of *Penicillium patulum* [J]. J Chem Soc, 1960, 46: 28.
[13] Aghoramurthy K, Seshadri T R. Chemical investigation of Indian Lichens. XV. A species of *Parmelia* containing lichexanthone [J]. J Sci Ind Res, 1953, 12B: 73.
[14] Aassila H, Bourguet-Kondracki M L, Rifai S, et al. Identification of harman as the antibiotic compound produced by a tunicate-associated bacterium [J]. Mar Biotechnol, 2003, 5(2): 163.
[15] Ishida J, Wang H K, Oyama M, et al. Anti-AIDS Agents. 46¹. Anti-HIV activity of Harman, an anti-HIV principle from *symplocos setchensis*, and its derivatives [J]. J Nat Prod, 2001, 64: 958.
[16] Kusurkar R S, Goswami S K. Efficient one-pot synthesis of anti-HIV and anti-tumour β -carboline [J]. Tetrahedron, 2004, 60(25): 5315.

[责任编辑 邹晓翠]