

· 研究论文 ·

## 苦皮藤内生真菌 Hd3 菌株抑菌活性成分分离及结构鉴定

张继文<sup>1a 1b</sup>, 杨春平<sup>1a 2</sup>, 姬志勤<sup>1a</sup>, 魏少鹏<sup>1a</sup>, 吴文君<sup>\* 1a 1b</sup>

(1. 西北农林科技大学 a 农药研究所, b 理学院, 陕西 杨凌 712100; 2 四川农业大学, 四川 雅安 625014)

**摘要:** 根据活性追踪原理, 采用硅胶柱层析以及高效液相色谱等技术对苦皮藤内生真菌 Hd3 菌株发酵液中的抑菌活性成分进行了分离纯化, 得到 5 个具有抑菌活性的化合物, 经质谱和核磁共振波谱技术分别鉴定为 3'-氯代杀锥曲菌素、曲地酸、曲地酸甲酯、4', 6'-二氯代曲地酸甲酯和 4'-氯代曲地酸甲酯。它们在 500 mg/L 的浓度下对玉米弯孢菌 *Curvularia lunata* 的孢子萌发抑制率分别为 100%、67.6%、17.3%、29.1% 和 30.4%, 其中化合物 3'-氯代杀锥曲菌素和曲地酸还对枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 具有强烈的抑制作用。

**关键词:** 苦皮藤; 内生真菌; 抑菌活性成分; 结构鉴定

中图分类号: S482.292.0658.1.0657.2

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)02-0225-05

### Isolation and Identification of the Antibacterial Component from the Fermentation Broth of Endophytes in *Celastrus angulatus* (Strain Hd3)

ZHANG Ji-wen<sup>1a 1b</sup>, YANG Chun-ping<sup>1a 2</sup>, JI Zhi-qin<sup>1a</sup>, WEI Shao-peng<sup>1a</sup>, WU Wen-jun<sup>\* 1a 1b</sup>

(1a Institute of Pesticide Science, 1b College of Science, Northwest Agricultural & Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2 Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan Province, China)

**Abstract** Five antibacterial compounds were isolated from the fermentation broth of endophytes in *Celastrus angulatus* (strain Hd3) through silica gel columns and HPLC by bioassay-guided fractionation. These chemicals were elucidated as 3'-chlorotyrapacilin, asteric acid, methyl asterate, methyl dichloroasterate and methyl chloroasterate by NMR and MS. The bioassay results showed that the inhibition rates of 5 compounds against spore germination of *Curvularia lunata* were 100%, 67.6%, 17.3%, 29.1%, 30.4% at the concentration of 500 mg/L, respectively, and 3'-chlorotyrapacilin and asteric acid showed strong antibacterial activity on *Bacillus subtilis*.

**Key words** *Celastrus angulatus*; endophytes; antibiotic ingredients; structure elucidation

从植物内生菌的代谢产物中寻找和发现活性化合物已经成为天然产物化学一个新的研究热点<sup>[1]</sup>。在研究苦皮藤内生真菌代谢产物的过程中, 笔者筛选到 Hd3 菌株, 除从其发酵产物中分离

得到了具有杀虫活性的化合物 2, 3-二甲氧基-5-甲氧基苯酚外<sup>[2]</sup>, 还在抑菌活性生物测定的追踪下, 从其发酵产物中分离鉴定出了 5 个具有抑菌活性的化合物。现将部分结果报道如下。

收稿日期: 2008-11-30; 修回日期: 2009-02-23.

作者简介: 张继文 (1976-), 男, 山东滕州人, 讲师, 主要从事天然产物化学研究, E-mail: nwzjw@163.com; \* 通讯作者 (Author for correspondence): 吴文君 (1945-), 男, 四川洪雅人, 教授, 研究方向为天然产物农药, 联系电话: 029-87093987, E-mail: wuwenj@nwsuaf.edu.cn  
基金项目: 国家重点基础研究发展规划 ("973" 计划) 资助项目 (2003CB114404).

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器及试剂

Shimadzu LC-6AD 高效液相色谱仪, X4 型显微熔点测定仪(温度计未校正), Bruker DRX 400 MHz 核磁共振波谱仪(CDC<sub>1</sub>作溶剂, TMS为内标), LCQ Advantage MAX 质谱仪。

柱层析硅胶(200~300目, 青岛海洋化工厂); 丙酮、甲醇等均为国产分析纯。

### 1.2 供试真菌及细菌

玉米弯孢菌 *Curvularia lunata* 由西北农林科技大学植物病理室提供; 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 购自中国科学院普通微生物菌种保藏中心。

$$\text{孢子萌发抑制率}(\%) = \frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100$$

1.3.2 抑制细菌活性测定 采用管碟法<sup>[4]</sup>。取 10 mL 融化好的水琼脂培养基倒入直径 9 cm 的培养皿中, 冷却后, 将培养好的供试细菌与适量培养基充分混匀, 取 5 mL 倒入培养皿中, 制成带菌双层平板, 每个平板上放 3 个牛津杯(内径 0.6 cm, 外径 0.8 cm, 高 1.0 cm 的不锈钢杯), 每杯加入药液 0.2 mL, 4℃ 下放置 2 h 后置于 37℃ 恒温箱中培养 20 h 用十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.3.3 活性成分分离 Hd3 发酵液乙酸乙酯萃取物经过一级硅胶柱层析分段后进行生物活性测定, 对有活性段再进行二级硅胶柱层析: 层析柱(40 mm × 900 mm), 依次用  $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 9:1 \sim 1:9$ ,  $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{甲醇}} = 9:1 \sim 1:9$  以及纯甲醇梯度洗脱, 得 17 个馏分, 测定每个馏分的杀菌活性, 其中馏分 15(189.3 mg) 用甲醇重结晶, 得到化合物 **b**(129 mg)。利用 HPLC 对硅胶柱层析所得具有强抑菌活性的馏分 **13**(412.5 mg) 进行纯化。HPLC 条件为: 色谱柱 Hypersil C<sub>18</sub>, 250 mm × 20.0 mm, 10 μm; 流动相为甲醇-水 = 80:20(体积比)和甲醇-水 = 65:35(体积比); 流速 5 mL/min; 检测波长 UV 230 nm。分别得到化合物 **a**(12.7 mg)、**c**(3.3 mg)、**d**(9.2 mg) 和 **e**(8.5 mg)。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性成分的结构鉴定

化合物 **a** 淡黄色结晶, m. p. 179~189℃(文献

### 1.3 实验方法

1.3.1 抑制真菌活性测定 采用抑制孢子萌发法<sup>[3]</sup>。将供试病原菌的孢子配制成适当浓度的孢子悬浮液(在 10 × 10 的低倍镜下, 每个视野有 30~40 个孢子)。将待测样品以少量丙酮溶解, 滴加少量土温-80 后以蒸馏水稀释配制成一定浓度的样品溶液, 将样品溶液与孢子悬浮液等体积混合, 滴加一滴混合液在凹玻片上, 将凹玻片迅速翻转使液滴倒悬在凹玻片下表面, 小心将凹玻片放在保湿器架上, 使液滴倒悬在保湿的小环境中。以不加样品的等量丙酮 + 土温-80 + 蒸馏水为对照, 重复 3 次。在 25℃ 下培养 6 h 后检查对照孢子的萌发情况。当对照的萌发率达到 85% 后, 检查所有处理的萌发率。以孢子芽管长度大于孢子短半径者为萌发。

值<sup>[5]</sup> 193~196℃)。ESMS 负离子:  $[M-H]^{-} m/z$  362.9(100%), 364.8(38%), 表明化合物 **a** 的相对分子质量为 364 并且分子中含有一个氯。<sup>13</sup>C NMR(DEPT)显示化合物 **a** 有 17 个碳, 其中有 1 个 CH<sub>3</sub>(δ 21.05), 2 个 OCH<sub>3</sub>(δ 57.05, 53.11), 3 个羰基(δ 185.17, 167.01, 194.30), 8 个季碳(δ 168.27, 163.42, 154.00, 150.14, 137.51, 109.02, 108.44, 84.5) 及 3 个叔碳(δ 137.35, 104.43, 111.69)。结合 MS 和 NMR, 化合物 **a** 的分子式可确定为 C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>7</sub>。<sup>1</sup>H NMR 显示在 δ 7.15, 6.53 和 5.82 存在 3 个芳环质子, δ 3.74, 3.71 存在两个甲氧基, δ 2.44 存在一个甲基。化合物 **a** 的 NMR 数据与日本专利<sup>[6]</sup>中报道的化合物 3'-氯代杀锥曲菌素(SS19508D)基本一致, 将化合物 **a** 鉴定为 3'-氯代杀锥曲菌素(ch brotypacilin)。NMR 数据见表 1 和表 2 结构见图 1。

化合物 **b** 淡黄色结晶, m. p. 208~210℃(文献值<sup>[5]</sup> 209~210℃)。ESMS 负离子:  $[M-H]^{-} m/z$  346.7(100%), 表明化合物 **b** 的相对分子质量为 348。<sup>13</sup>C NMR(DEPT)显示化合物 **b** 有 17 个碳, 其中有 1 个 CH<sub>3</sub>(δ 22.00), 2 个 OCH<sub>3</sub>(δ 56.73, 52.74), 2 个羰基(δ 165.64, 171.63), 8 个季碳(δ 134.73, 125.71, 156.89, 155.62, 164.26, 106.07, 159.44, 147.82) 及 4 个叔碳(δ 109.31, 105.00, 100.63, 112.61)。结合 MS 和 NMR, 化合物 **b** 的分子式可确定为 C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>。<sup>1</sup>H NMR 显示在

$\delta$  7.05, 6.93, 6.49, 5.92 存在 4 个芳环质子,  $\delta$  3.82, 3.74 存在两个甲氧基,  $\delta$  2.17 存在一个甲基。根据化合物 **b** 的 COSY、HSQC、HMBC 谱确定了各取代基的位置以及两个苯环间的连接关系。化合物 **b** 的 NMR 数据与文献报道的曲地酸一致<sup>[5]</sup>, 由此推断化合物 **b** 为曲地酸 (asterric acid)。NMR 数据见表 1 和表 2 结构见图 1。

化合物 **c** 淡黄色柱状结晶, m. p 180~186°C (文献值<sup>[5]</sup> 185~186°C)。ES/MS 负离子:  $[M-H]^-$  m/z 360.9 (100%), 表明化合物 **c** 的相对分子质量为 362。<sup>13</sup>C NMR (DEPT) 显示化合物 **c** 有 18 个碳, 其中有 1 个 CH<sub>3</sub> ( $\delta$  22.15), 3 个 OCH<sub>3</sub> ( $\delta$  56.52, 52.52, 52.36), 2 个羰基 ( $\delta$  165.77, 171.77), 8 个季碳 ( $\delta$  136.82, 125.91, 154.06, 153.26, 163.17, 100.88, 159.95, 146.14) 及 4 个叔碳 ( $\delta$  108.49, 105.02, 105.89, 111.16)。结合 MS 和 NMR, 化合物 **c** 的分子式可确定为 C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>。与化合物 **b** 相比, 化合物 **c** 多了一个甲氧基 ( $\delta$  C: 52.36,  $\delta$  H: 3.75), 其余 NMR 数据与化合物 **b** 基本一致, 推测化合物 **c** 是 **b** 的甲酯。化合物 **c** 的 NMR 数据与文献报道的曲地酸甲酯基本一致<sup>[5]</sup>, 由此推断化合物 **c** 为曲地酸甲酯 (methyl asterrate)。NMR 数据见表 1 和表 2 结构见图 1。

化合物 **d** 淡黄色柱状结晶, m. p 144~147°C (文献值<sup>[5]</sup> 144~147°C)。ES/MS 负离子:  $[M-H]^-$  m/z 429.0 (100%), 431.1 (67%), 表明化合物 **d** 的分子中含有两个氯原子, 相对分子质量为 430。<sup>13</sup>C NMR (DEPT) 显示化合物 **d** 中含有 18 个碳, 其中有 1 个 CH<sub>3</sub> ( $\delta$  18.79), 3 个 OCH<sub>3</sub> ( $\delta$  56.62, 53.01, 52.52), 2 个羰基 ( $\delta$  166.66, 170.11), 10 个季碳 ( $\delta$  139.27, 123.23, 151.02, 152.46, 155.44, 106.65, 151.36, 118.38, 141.54,

117.86) 及 2 个叔碳 ( $\delta$  108.46, 105.13)。结合 MS 和 NMR, 化合物 **d** 的分子式可确定为 C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>8</sub>。与 **c** 相比, 化合物 **d** 减少了两个芳氢质子而多出了两个季碳, 减少了两个叔碳, 其中 C-1'、C-3'、C-5' 化学位移向高场移动 ( $\delta$  5~8), 而 C-2'、C-4'、C-6' 化学位移向低场移动 ( $\delta$  3~6), 推测化合物 **d** 是两个氯原子取代了化合物 **c** 中的两个芳氢所得到的二氯代曲地酸甲酯。化合物 **d** 的 NMR 数据与文献报道的 4', 6'-二氯代曲地酸甲酯基本一致<sup>[5]</sup>, 由此推断化合物 **d** 为 4', 6'-二氯代曲地酸甲酯 (methyl 4', 6'-dichloroasterrate)。NMR 数据见表 1 和表 2 结构见图 1。

表 1 化合物 a b c d e 的 <sup>13</sup>C NMR 数据Table 1 <sup>13</sup>C NMR data of compounds

a b c d and e

位置编号 Position	a	b	c	d	e
1	84.56	134.73	136.82	139.27	136.23
2	137.51	125.71	125.91	123.23	126.78
3	137.35	109.31	108.49	108.46	108.53
4	185.17	156.89	154.06	151.02	154.65
5	104.43	105.00	105.02	105.13	105.03
6	168.27	155.62	153.26	152.46	154.89
7	57.05	56.73	56.52	56.62	56.47
8	167.01	165.64	165.77	166.66	166.71
9	53.11	52.74	52.52	53.01	52.96
1'	109.02	164.26	163.17	155.44	157.94
2'	154.00	106.07	100.88	106.65	101.97
3'	108.44	159.44	159.95	151.36	158.49
4'	150.14	100.63	105.89	118.38	106.68
5'	111.69	147.82	146.14	141.54	143.73
6'	163.42	112.61	111.16	117.86	114.82
7'	21.05	22.00	22.15	18.79	21.24
8'	194.30	171.63	171.77	170.11	171.65
9'	\	\	52.36	52.52	52.48

表 2 化合物 a b c d e 的 <sup>1</sup>H NMR 数据Table 2 <sup>1</sup>H NMR data of compounds a b c d and e

位置编号 Position	a	b	c	d	e
3	7.15 (s)	6.93 (d J = 3.0 Hz)	6.97 (s)	6.86 (s)	6.98 (s)
5	5.82 (s)	7.05 (d J = 3.0 Hz)	6.72 (s)	6.56 (s)	6.72 (s)
7	3.74 (s)	3.82 (s)	3.94 (s)	3.80 (s)	3.97 (s)
9	3.71 (s)	3.74 (s)	3.69 (s)	3.78 (s)	3.75 (s)
4'	\	6.49 (s)	5.75 (s)	\	5.87 (s)
6'	6.53 (s)	5.92 (s)	6.42 (s)	\	\
7'	2.44 (s)	2.17 (s)	2.14 (s)	2.50 (s)	2.23 (s)
9'	\	\	3.75 (s)	3.75 (s)	3.70 (s)



笔者首次从农药学的角度对曲地酸及其衍生物进行了初步研究,发现该类化合物具有类似的生物活性和相似的结构,并且结构相对简单,从化学合成的角度来看,该类结构有可能是一个潜在的杀菌剂先导结构,以此为基础通过人工设计合成一系列衍生物,并从中筛选出高活性抗菌候选化合物将可能具有较好的前景。

## 参考文献:

- [1] TAN R X, ZOU W X. Endophytes A Rich Source of Functional Metabolites [J]. Natural Product Reports, 2001, 18 (4): 448-459.
- [2] YANG Chun-ping(杨春平), CHEN Hua-bao(陈华保), QIAN Yong(钱勇), et al. 苦皮藤内生真菌 Hd3 菌株的研究 [J]. J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed) (西北农林科技大学学报, 自然科学版), 2006, 34(11): 203-206.
- [3] WU Wen-jun(吴文君). Introduction to Plant Chemical Protection Experiment(植物化学保护实验技术指导) [M]. Xi'an

(西安): Shaanxi SciTech Press(陕西科技出版社), 1987: 85-87.

- [4] SBRANA C, BAGNOLI G, BEDINI S et al Adhesion to Hyphal Matrix and Antifungal Activity of Pseudomonas Strains Isolated from Tuber Borchii ascomycetes Can [J]. J Microbiol 2000, 46: 259-268
- [5] HARGREAVES J PARK JO, GHISALBERTI E L, et al New Chlorinated Diphenyl Ethers from an Aspergillus Species [J]. J Nat Prod, 2002, 65(1): 7-10
- [6] MATSUMOTO KACHI, A SAOKA KENKOU, YOKOI KOUCHI, et al Manufacture of New Antibiotic SS19508D: JP 61-043182 [P]. 1986-03-01
- [7] CURTIS R F, HARRIES P C, HASSALL C H, et al The Biosynthesis of Phenols [J]. Biochem J, 1964, 90: 43-51.
- [8] MAHMOODIAN A, STICKINGS C E. Studies in the Biochemistry of Micro-organisms [J]. Biochem J, 1964, 92: 369-378.

(Ed JIN SH)

## • 会讯 •

# 第一届国际作物保护科学大会论文征集

由中国农药工业协会主办的第九届全国农药交流会暨农化产品展览会将于 2009 年 9 月 27 日 ~ 29 日在上海光大会展中心召开,为配合此次农化产品展览会,中国农药工业协会将在会展期间同期举办第一届国际作物保护科学大会,同时编辑出版《第一届国际作物保护科学大会论文集》(中英文双语版)。论文集的主题为“农药科技与和谐社会”。

主要内容包括: (1)政策法规: 各国农药管理与登记; (2)研究开发: 农药原药、中间体、农药前体的合成技术、前景预测等; (3)环境科学: “三废”处理新工艺、新技术; “绿色”工艺研究; 降低能耗与资源综合利用技术; (4)加工应用: 制剂加工、助剂与配方研究、使用与药效研究、药械等; (5)营销策略: 市场开拓、进出口等; (6)植物保护: 植物病虫害草害的发生及防治等; (7)生物农药; (8)其他: 分析方法研究、农药毒性毒理及残留、药效等。

大会诚邀农药科研、生产、营销以及与农药行业相关的人员踊跃投稿。稿件要求有明确的主题和中英文摘要,以及作者详细的联系方式,投稿截止日期为 2009 年 7 月 30 日。论文一经录用,赠送论文集一本。同时,大会将评选出优秀论文,并设立特等奖及一、二、三等奖若干名,颁发优秀论文证书和奖金,并筛选优秀论文在会上宣讲。

论文请发送至: ao\_c@hotmail.com; ccpi\_a\_zw@126.com; ccpi\_a\_lijuan@126.com

(敖聪聪 供稿)