

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00477

## 一株耐酸链霉菌菌丝体化学成分的研究

杨晓军

延安大学化学与化工学院有机化学教研室, 延安 716000

**[摘要]** **目的** 研究耐酸链霉菌(*Streptosporangium* sp.)菌丝体的化学成分。**方法** 应用多种色谱方法对耐酸链霉菌菌丝体的化学成分进行分离和纯化,用NMR、IR和MS等方法解析其结构;并初步考察了它们对II型胶原蛋白(CII-A)诱导大鼠足趾肿胀的影响。**结果** 从中得到4个单体化合物,它们的结构分别为8-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)-2,3-二甲氧基-1,6-萘二酚(**1**)、7,4'-二羟基异黄酮(**2**)、5,7,4'-三羟基异黄酮(**3**)、3,4,5-三羟基苯甲酸(**4**);当对大鼠的给药剂量为10 mg/(kg·d)时,化合物**2**、**3**、**4**对CII-A大鼠足趾肿胀有一定的抑制作用。**结论** 化合物**1**为新化合物,其余化合物均为首次从耐酸链霉菌中分离得到的化合物;且化合物**2**、**3**、**4**具有一定的抗炎活性。

**[关键词]** 链霉菌;菌丝体;8-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)-2,3-二甲氧基-1,6-萘二酚

**[中图分类号]** R 931.711

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0477-04

### Chemical constituents in the mycelia of an acidoduric streptomycetes

YANG Xiao-jun

Department of Organic Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the chemical constituents in the mycelia of an acidoduric streptomycetes. **Methods** Multiple chromatographic methods were used to isolate and purify the constituents, and their chemical structures were identified by NMR, IR, and MS. The anti-inflammatory activities of four compounds were observed in rats with CII-A-induced toe swelling experiments. **Results** Four compounds were identified: 8-(4-hydroxy-3,5-di-methoxy phenyl)-2,3-dimethoxy-1,6-naphthalenediol (**1**), 7,4'-dihydroxy isoflavone (**2**), 5,7,4'-trihydroxyisoflavone (**3**), and 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (**4**). Compound of **2**, **3**, and **4** could inhibit CII-A-induced toe swelling in rats at 10 mg/(kg·d). **Conclusion** Compound **1** is a novel compound, and other compounds have been isolated from the acidoduric *Streptosporangium* sp. for the first time. Compounds **2**, **3**, and **4** possess anti-inflammatory activities.

**[Key words]** *Streptosporangium* sp.; mycelium; 8-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy phenyl)-2,3-dimethoxy-1,6-naphthalenediol

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(5): 477-480]

极端环境微生物是指能在异常环境中生存的生物。极端环境微生物为了适应特殊的生存环境,形成了独特的基因类型,其特殊的代谢产物是一类具有很大开发潜力的生物资源<sup>[1]</sup>。自20世纪80年代开始,许多新药开发研究工作者开展了对极端环境微生物的研究,并得到了一些生物活性物质<sup>[2]</sup>。本课题组从陕西省定边县酸性土壤中分离到一株耐酸性链霉菌,发现该菌的菌丝体丙酮提取部分[300 mg/(kg·d)]能显著抑制CII-A所致的大鼠足趾的肿胀(抑制率为73%,未公开资料)。于是笔者对该菌株的菌丝体化学成分进行了研究,并初步对其化

学成分进行了抗炎实验,现报告如下。

### 1 材料和方法

1.1 菌株和培养液 实验菌株分离自中国陕西省定边县酸性土壤中,由延安大学生命科学院微生物研究所任桂梅教授利用16S rRNA基因序列分析法鉴定为链霉菌(*Streptosporangium* sp.)。

种子培养液:淀粉24 g,葡萄糖1 g,蛋白胨3 g,牛肉膏3 g,酵母膏5 g, CaCO<sub>3</sub> 4 g,水1 000 ml, pH 6.5。

发酵培养液:大豆粉20 g,蛋白胨2 g,葡萄糖20

**[收稿日期]** 2011-01-13

**[接受日期]** 2011-04-02

**[基金项目]** 陕西省教育厅自然科学基金(2010JK912)。Supported by Natural Science Foundation of Education Department of Shaanxi Province (2010JK912)。

**[作者简介]** 杨晓军,讲师。E-mail: yangxiaojun2002@126.com

g, 淀粉 5 g, 酵母膏 2 g, NaCl 4 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,  $CaCO_3$  2 g, 水 1 000 ml, pH 6.5。

1.2 仪器、试剂和动物 IR Prestige-21 红外光谱仪(日本岛津公司); AV-500 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); MAT-711 型质谱仪(美国 Thermo 公司); Vario EL 有机元素分析仪(德国 Elementar 公司); 1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Sephadex LH-20 (Pharmacia 产品); YLS-7A 足趾容积测量仪(山东省医学科学院设备站); 柱层析硅胶 100~200 目(青岛海洋化工厂)。SD 大鼠 36 只, 体重 120~130 g, 雌雄各半, 由延安大学医学院实验动物中心提供; II 型胶原蛋白(CII-A)与弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司)。地塞米松磷酸钠注射液(贵州华圣制药有限公司, 批号: 080321)。

1.3 发酵方法 将生长良好的斜面接种于种子培养液, 28℃、300 转/min 摇床培养 48 h, 再接种于发酵培养液, 接种量为 1:10, 置于 28℃、300 转/min 摇床培养 120 h。

1.4 提取与分离 将发酵 120 h 的发酵液以  $3\ 021 \times g$  离心 20 min, 得上清液和菌丝体两部分。菌丝体部分用蒸馏水洗涤后, 经 50℃ 烘箱中鼓风干燥并研磨破碎。取干菌丝体共 28.6 kg 用丙酮浸泡 2 d 后超声提取 4 次, 每次提取 2 h, 提取液过滤后浓缩, 得到丙酮提取浸膏 338.7 g。丙酮提取浸膏用 2 L 水溶解, 溶解部分用乙酸乙酯振荡萃取 3 次, 减压浓缩后得菌丝乙酸乙酯提取物 93.8 g, 用柱层析硅胶(100~200 目)拌样, 湿法上硅胶柱, 以氯仿: 甲醇(V:V) = 16:1 → 14:1 → 12:1 → 9:1 → 5:1 → 0:1 梯度洗脱并分段收集得目的组分 A 和 B。将组分 A 和 B 继续上 Sephadex LH-20 凝胶柱, 甲醇为洗脱剂进行纯化, 各流分以高效液相色谱仪检测, 从组分 A 中分离得到化合物 1 (87 mg)、2 (74 mg)、3 (53 mg), 从组分 B 中分离得到化合物 4 (119 mg)。

1.5 4 个单体化合物对 CII-A 大鼠足趾肿胀的影响 将 36 只 SD 大鼠随机分为模型组、阳性对照组、化合物 1 组、化合物 2 组、化合物 3 组和化合物 4 组。每组 6 只, 雌雄各半, 除模型组外, 其余 5 组每日定时腹腔注射地塞米松磷酸钠注射液 1 次(剂量均为 10 mg/kg), 连续 5 d, 第 5 天给药 2 h 后, 6 组大鼠右后足趾皮下均注射 1 mg/ml CII-A 溶液(配制方法见文献[3])0.1 ml, 在致炎后第 10 天, 用排水法求出肿胀度, 计算抑制率。抑制率(%) = (模型

组平均肿胀度 - 给药组平均肿胀度) / 模型组平均肿胀度 × 100%。

## 2 结果

2.1 结构鉴定 化合物 1: 淡黄色固体。与三氯化铁反应为阳性, 提示含有酚羟基; HR-ESI-MS  $m/z$ : 显示准分子离子峰  $m/z$  373.381 3  $[M+H]^+$  ( $C_{20}H_{21}O_7$ , 计算值 373.381 7), 确定相对分子质量为 372, 分子式为  $C_{20}H_{20}O_7$ , 不饱和度为 11。IR (KBr)  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3 357 (酚羟基), 3 021 (Ar-H 伸缩振动), 1 608, 1 529 (苯环伸缩振动), 1 224, 878, 841。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) 显示 20 个氢信号, 包括 3 个活泼质子信号 9.02 (1H, br s, OH), 8.46 (1H, br s, OH), 8.42 (1H, br s, OH), 5 个芳香氢信号 6.93 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-5), 7.36 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-7), 7.42 (1H, s, H-4), 6.52 (2H, s, H-2', 6'), 以及 4 个甲氧基氢信号 3.85 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.78 (6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.46 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>)。在 HMBC 谱中, 观察到重叠的芳香质子 6.52 (2H, s, H-2', 6') 与 C-1', 3', 4', 5' 有相关, 由此推出该化合物中含有一个对称的 1,3,4,5-四取代苯环的结构片段; 3.78 (6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>) 的 2 个重叠甲氧基氢信号与 146.7 (C-3', 5') 相关, 8.46 (1H, s, OH) 的活泼质子信号与 C-4' 相关, 进一步提示该片段结构中 2 个甲氧基在 3', 5' 位, 羟基在苯环的 4' 位, 即该化合物的第一片段结构为 3', 5'-二甲氧基-4'-羟基-1'-苯基。在 <sup>13</sup>C NMR 谱中除了第一片段结构中的 2 个重叠甲氧基碳信号和 6 个不饱和碳信号外, 在高场区还有 2 个甲氧基碳信号 60.2 (s), 55.9 (s) 和 10 个不饱和碳信号 150.1 (s), 149.8 (s), 142.3 (s), 140.9 (s), 135.4 (s), 127.0 (s), 120.9 (s), 116.0 (d), 108.4 (d), 105.3 (d), 结合分子的不饱和度和 <sup>1</sup>H NMR 信号, 推测该化合物的结构骨架为萘环。而且萘环片段结构中有 5 个取代基; 在 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 谱中仅观察到芳香氢 6.93 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz) 与 7.36 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz) 相关, 进一步推出芳香氢 6.93 (1H) 与 7.36 (1H) 在萘环的 B 环中, 且在间位, 芳香氢 7.42 (1H) 在萘环的 A 环中。在 HMBC 谱中芳香氢  $\delta$  7.36 与该化合物的第一结构片段中的 C-1' 相关, 而  $\delta$  6.93 与 C-1' 无相关, 推出第一结构片段连接在萘环的 8 位,  $\delta$  7.36 (1H) 为 7-H,  $\delta$  6.93 (1H) 为 5-H; 根据 HMBC 谱, 确定化学位移在 9.02 的羟基连接在  $\delta$  150.1 碳原子上, 5-H 与 7-H 也

与此碳原子相关,说明此羟基在萘环的6-位;此外5-H与芳香次甲基 $\delta$ 105.3碳相关,推测 $\delta$ 7.42(1H,s)在萘环的4-H,4-H又与2个连接甲氧基的季碳149.8(s),140.9(s)相关,说明这2个甲氧基分别连接在萘环的2,3位,则第3个羟基连接在萘环的1位。该化合物的 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 数据和HMBC见表1。综合以上分析,化合物1的结构推定为8-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)-2,3-二甲氧基-1,6-萘二酚(图1),该化合物尚未见文献报道。

表1 化合物1的NMR光谱数据(溶剂:DMSO- $d_6$ )Tab 1 NMR spectral data of compound 1(in DMSO- $d_6$ )

Position	$\delta_{\text{H}}$ (mult, J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1		142.3(s)	
1-OH	8.42(1H, br s)		C-1
2		140.9(s)	
2-OCH <sub>3</sub>	3.46(3H, s)	60.2(q)	C-2
3		149.8(s)	
3-OCH <sub>3</sub>	3.85(3H, s)	55.9(q)	C-3
4	7.42(1H, s)	105.3(d)	C-2, 3, 5, 9, 10
5	6.93(1H, d, 2.0)	108.4(d)	C-4, 7, 9, 6, 10
6		150.1(s)	
6-OH	9.02(1H, br s)		C-6
7	7.36(1H, d, 2.0)	116.0(d)	C-1', 5, 9, 6, 8
8		135.4(s)	
9		120.9(s)	
10		127.0(s)	
1'		133.5(s)	
2', 6'	6.52(2H, s)	106.8(d)	C-3', 4', 5', 8
3', 5'		146.7(s)	
3', 5'-OCH <sub>3</sub>	3.78(6H, s)	56.4(q)	C-3', 5'
4'		136.9(s)	
4'-OH	8.46(1H, br s)		C-4'

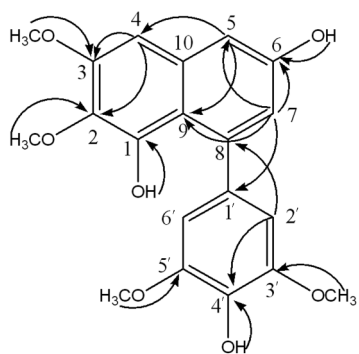


图1 化合物1的化学结构式与主要HMBC

Fig 1 Structure and key HMBC of compound 1

化合物2:浅黄色针晶。三氯化铁反应阳性,提示有酚羟基存在。ESI(+)-MS: ( $m/z$ ) 255 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, 547[2 $\text{M} + \text{K}$ ]<sup>+</sup>; 从元素分析得知碳、氢的含

量分别为70.81%和3.98%;质谱结合元素分析提示该化合物的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ ; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3 229 (-OH), 3 031 (Ar-H 伸缩振动), 1 632 (C=O), 1 601, 1 518, 1 452 (苯环骨架伸缩振动)。 $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 10.79(1H, s, 7-OH), 9.54(1H, s, 4'-OH)为2个酚羟基质子信号; 8.30(1H, s, H-2)为异黄酮2位质子的特征信号; 7.97(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5), 7.38(2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2', 6'), 6.93(1H, dd,  $J=8.0$ , 2.0 Hz, H-6), 6.84(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-8), 6.80(2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3', 5')。  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 174.5 (C-4), 162.3 (C-7), 157.2 (C-4'), 157.3 (C-9), 152.6 (C-2), 130.2 (C-2', 6'), 127.4 (C-5), 123.6 (C-3), 122.5 (C-1'), 116.3 (C-10), 115.2 (C-6), 114.8 (C-3', 5'), 101.8 (C-8)。以上数据与文献<sup>[4]</sup>报道的7,4'-二羟基异黄酮数据一致,故化合物2为7,4'-二羟基异黄酮。

化合物3:浅黄色针晶。三氯化铁反应阳性,提示有酚羟基存在。ESI(+)-MS: ( $m/z$ ) 271 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, 293[ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>; 从元素分析得知碳、氢的含量分别为65.93%和3.78%;质谱结合元素分析提示该化合物的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3 415 (-OH), 3 029 (Ar-H 伸缩振动), 1 658 (C=O), 1 611, 1 569 (苯环骨架伸缩振动), 1 309, 1 046, 785;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$ : 12.89(1H, s, 5-OH), 10.76(1H, s, 7-OH), 9.53(1H, s, 4'-OH)为3个酚羟基质子信号; 8.26(1H, s, H-2)为异黄酮2位质子的特征信号; 7.36(2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2', 6'), 6.83(2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3', 5'), 6.35(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-8), 6.20(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6)。  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$ : 181.7 (C-4), 165.9 (C-7), 163.3 (C-5), 159.0 (C-4'), 158.6 (C-9), 154.5 (C-2), 131.0 (2C, C-2', 6'), 124.3 (C-1'), 123.1 (C-3), 115.8 (2C, C-3', 5'), 105.6 (C-10), 100.2 (C-6), 94.8 (C-8)。以上数据与文献<sup>[5]</sup>报道的5,7,4'-三羟基异黄酮数据一致,故化合物3为5,7,4'-三羟基异黄酮。

化合物4:无色针状晶体。EI-MS: ( $m/z$ ) 170 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>; 从元素分析得知碳、氢的含量分别为49.32%和3.56%;质谱结合元素分析提示该化合物的分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3 402 (游离酚-OH), 3 100 (缔合酚-OH), 3 028 (Ar-H 伸缩振动), 3 000~2 500 (多重峰组合,羧基上的游离羟基与缔合羟基), 1 670 (C=O), 1 632, 1 567, 1 428 (苯环骨架伸缩振动), 1 170, 1 075, 890, 780,

740; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500MHz) δ<sub>H</sub>: 12.48 (br s, COOH), 9.24 (br s, 3,5-OH), 8.85 (br s, 4-OH), 7.15 (2H, s, H-2, H-6)。<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ<sub>C</sub>: 168.3 (s, -COOH), 110.2 (d, C-2, 6), 145.9 (s, C-3, 5), 138.5 (s, C-4), 122.1 (s, C-1)。以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道的 3,4,5-三羟基苯甲酸数据一致,故化合物 **4** 为 3,4,5-三羟基苯甲酸。

2.2 4 个单体化合物对 CⅡ-A 大鼠足趾肿胀的影响 实验结果表明在给药剂量相同的条件下,地塞米松磷酸钠、化合物 **2**、**3** 和 **4** 对 CⅡ-A 所致大鼠足趾肿胀的抑制率分别为 53.7%、35.6%、42.3% 和 28.9%,化合物 **1** 无抑制作用。

### 3 讨论

本实验从一株耐酸链霉菌的菌丝体中分离得到 4 个单体化合物,其中化合物 **1** 为新化合物,其余化合物均为首次从耐酸链霉菌中分离得到。抗炎实验研究表明,化合物 **2**、**3** 和 **4** 均有一定的抗炎作用,其中化合物 **3** 能有效抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的数目增长<sup>[7]</sup>,因此本实验研究结果为寻找预

防或治疗类风湿性关节炎的活性物质提供了一定依据。

### [参考文献]

[1] 徐丽华,李文均,刘志恒,姜成林.放线菌系统学——原理方法及实践[M].北京:科学出版社,2007:23-24.  
 [2] 黎唯,李一青,李铭刚,赵江源,崔晓龙,彭谦,等.极端环境微生物源活性物质的研究进展[J].国外医药:抗生素分册,2007,28:1-4.  
 [3] 胡晨霞,何嘉琪,刘戈,李燕舞,姜黄对胶原诱导性关节炎大鼠抗炎作用的研究[J].中药新药与临床药理,2010,21:363-365.  
 [4] 吉文亮,秦民坚,王峥涛.射干的化学成分研究(I)[J].中国药科大学学报,2001,32:197-199.  
 [5] Hirakura K, Morita M, Nakajima K, Sugama K, Takagi K, Niitsu K, et al. Phenolic glucosides from the root of *Pueraria lobata* [J]. Phytochemistry, 1997, 46: 921-928.  
 [6] 王雪松,车庆明,李艳梅,何云庆.山楂核化学成分研究[J].中国中药杂志,1999,24:739-740.  
 [7] 孙铁铮,吕厚山,药立波,燕太强,杨刚.染料木黄酮对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞生长的影响[J].中华风湿病学杂志,2000,4:266-269.

[本文编辑] 尹茶

## · 消息 ·

### 我校长征医院获得 ISO15189 医学实验室认可

我校长征医院已获得 ISO15189 医学实验室认证并于近日举行了揭牌仪式。

ISO15189 是国际公认的医学实验室认可标准,医学实验室要获得认可,就必须在软、硬件建设和检验能力等方面达到其标准。近年来,国际医学界非常重视医学实验室的质量管理,国际标准化组织颁布了《医学实验室质量和能力专用要求》,即 ISO15189 标准,以加强医学实验室的质量管理,推动全球医学实验室的标准化、规范化建设。凡获此资质认证的医疗机构,其出具的检验报告可被国际上多数国家的医疗机构认可。

长征医院实验诊断科作为全军临床免疫中心,始终高度重视质量控制工作,其学科建设、科学研究、人才培养在全国享有盛誉,是全国临床免疫学会、上海检验学会的主任委员和上海免疫学会理事长挂靠单位。该科从 2010 年开始着手实验室认可的准备工作,相继派出 22 人参加国家认可委员会组织的内审员、评审员学习班,邀请了近 20 位专家来科室讲课,撰写了近 100 万字的质量管理体系文件,各级人员职责明确,体系运行实施良好。2010 年 12 月 14 日顺利通过考核,获得了中国合格评定国家认可委员会的现场评审。通过 ISO15189 医学实验室的认可,即医院的检验报告获得了国际“通行证”,今后长征医院医学实验室出具的检验报告将得到全世界 54 个国家的医疗机构的认可,这标志着长征医院医学实验室已具备了国际标准的管理与技术水平,已迈进国际一流临床实验室的行列。