

# 一种被毛孢(*Hirsutella* sp.)培养液中自由基清除剂的分析、分离和制备

胡丰林, 陆瑞利, 黄勃, 李增智\*

(安徽省微生物防治重点实验室, 安徽农业大学, 合肥 230036)

**摘要:**【目的】在一次对虫生真菌代谢物进行大规模的清除自由基活性物质筛选中,发现一种被毛孢(*Hirsutella* sp.)菌株 RCEF0881 发酵液中存在有较强的清除自由基活性物质。本研究目的是初步搞清这些活性成分的具体组成,并制备出一定量的纯品用于进一步的结构鉴定。【方法】用有机溶剂法提取活性成分;用二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)酶标仪法和薄层色谱法进行活性测定;用高分辨液质联用方法进行活性成分初步分析和鉴定;用反相制备色谱法制备活性组分。【结果】提取实验结果表明具清除自由基活性的物质能较好地被乙酸乙酯提取出来;液相色谱-质谱-活性测定分析表明提取物中活性组分的可能分子式分别为  $C_7H_6O_4$ 、 $C_8H_8O_3$  和  $C_{12}H_{14}N_2O$ 。结合色谱特性、紫外光谱特征、质谱碎片和数据库查询可初步推断它们分别为二羟基苯甲酸、羟基甲基苯甲酸和生物碱类物质,但具体结构还有待于进一步确认。从高效液相色谱和质谱离子流的峰面积可知上述 3 种活性物质中  $C_{12}H_{14}N_2O$  的含量最高。本研究成功地用反相制备色谱制备出该天然活性组分的纯品。该 3 种清除自由基活性物质都是首次发现存在于虫生真菌的代谢物中。

**关键词:**一种被毛孢(*Hirsutella* sp.);自由基清除剂;分析;制备;二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)  
中图分类号:Q939.93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2008)08-1035-07

自由基,从化学结构上看是指含未配对电子的基团、原子或分子。自由基清除剂指能与自由基反应并使之还原成非自由基化合物的物质。医学研究和自由基生物学的成果已证明了自由基清除剂具有十分广泛的生理活性,由于自由基的产生和清除涉及生命的多个方面,近年来有关研究不仅成为药物活性研究的重要方面,同时它逐渐成为研究多种生命现象的有效手段,因而有关研究受到世界各国的普遍重视<sup>[1~8]</sup>。在一次对虫生真菌代谢物进行大规模的清除自由基活性物质筛选中,发现一株被毛孢发酵液甲醇提取物有较强的清除二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)活性,在浓度为 2.5 mg/mL 时,其自由基清除率为 79.17±0.70%。目前尚未见有关被毛孢中自由基清除

剂分析和分离纯化的报道。鉴于自由基清除剂的广泛生理作用,有必要搞清其具体组成和结构。该研究对进一步研究虫生真菌的抗逆性和研究虫生真菌与昆虫相互关系具有重要指导意义,目前国内外尚无有关研究报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种来源:**一种被毛孢 *Hirsutella* sp.(菌株号为 RCEF0881),由安徽农业大学虫生真菌研究中心提供。

**1.1.2 培养基:**菌株固体斜面培养基(g/L):葡萄糖 40、蛋白胨 10、酵母浸出粉 10 和琼脂 20。液体摇瓶

基金项目:国家自然科学基金项目(30570189);国家“863 计划”(2007AA021506);安徽高校自然科学研究重点项目(DT 200708)

\*通讯作者: zqli@auau.edu.cn; hufenglin@hotmail.com

作者简介: 胡丰林(1965-),男,安徽铜陵人,教授,博士,研究方向为虫生真菌代谢物。 E-mail: hufenglin@hotmail.com

收稿日期: 2008-03-24; 修回日期: 2008-05-09

培养基(g/L): 葡萄糖 40、蛋白胨 10 和酵母浸出粉 10。

**1.1.3 仪器和试剂:** 恒温震荡培养箱, 哈尔滨市联电子技术开发有限公司; 2K-15 超速离心机为 Sigma 公司产品; Spectra Max M2 酶标仪, 购自美国 Molecular Device 公司; FreeZone12 冷冻干燥系统, 购自美国 Labconco 公司; 离心真空浓缩仪, 为德国 Christ 公司产品; 高分辨液质联用分析仪(6210 Time of flight LC/MS), 包括 Agilent 1100 高效液相色谱(HPLC)、二极管阵列检测器(DAD)、飞行时间质谱仪(TOF)和电喷雾离子源(ESI), 购于美国 Agilent 公司; 分析柱有: Waters C18 反相柱, 规格为 250 mm×4.6 mm, 5 μm, 填料为 ODS2; Agilent 2.1 mm×30 mm, 3.5 μm, ZORBAX 柱; 反相制备柱规格为 250 mm×19 mm, 5 μm, 填料为 ODS2; 分析纯乙酸乙酯购自安徽淮南化学试剂厂; 分析纯石油醚为上海化学试剂有限公司产品; 分析纯甲醇为上海一试剂有限公司产品; 色谱纯甲醇购自美国 Tedia 公司。

## 1.2 研究方法

在前期已证明菌株 RCEF0881 代谢物中含有生物活性成分的前提下, 进一步用不同溶剂进行提取实验, 找出最佳提取溶剂。用 HPLC-DAD-MS 和活性测定联用法对该成分进行活性组分分析, 并判断活性组分制备的必要性和可行性, 找出目标组分的分离制备条件。然后用活性指导下的分离方法制备出活性组分。用 DPPH-TLC 法确认制备组分的活性。用高分辨液质联用法检验纯度。

## 1.3 活性测定

将不同菌株的提取物样品甲醇溶液和 0.2 mg/mL DPPH 试液各 100 μL 于 96 孔酶标板中或各 20 μL 于 384 孔酶标板中, 震荡 30 s, 于常温下放置 20 min 后于 517 nm 波长下测定其吸光值( $A_s$ )。同时测定不加 DPPH 的样品空白吸收值( $A_c$ )和加 DPPH 但不加样品(以同体积甲醇代替样品)的吸收值( $A_{max}$ )。最后按下列公式计算: 自由基清除率= $[1 - (A_s - A_c) / A_{max}] \times 100\%$

DPPH-TLC 试验按胡丰林等方法<sup>[9]</sup>。

## 1.4 活性组分的分析和分离纯化

将前面的活性提取物配成 10~30 mg/mL 的甲醇溶液(对难溶解的样品可适当添加其它试剂), 进样 10 μL 进行高分辨 HPLC-DAD-MS 分析, 同时按 1:4 的分流比用 1.5 mL Eppendorff 管收集分流物, 每 0.5 min 收集一管。收完 90 管后将收集的 Eppendorff

管进行离心真空干燥。干燥后每管加一定量的甲醇溶解, 用酶标仪进行活性测定, 找出活性组分。

ODS2 分析柱的 HPLC 洗脱条件为: 0~3 min 用 100%水洗脱; 3~33 min 甲醇由 0%上升到 100%; 100%甲醇继续洗脱 12 min。洗脱速度: 为 1.0 mL/min。检测条件为 200 nm 到 400 nm 全波长扫描, 以及质谱检测。

ZORBAX 分析柱的 HPLC 洗脱条件为: 0~6 min 甲醇由 10%上升到 100%; 100%甲醇继续洗脱 4 min。洗脱速度: 为 0.4 mL/min。检测条件为 200 nm 到 400 nm 全波长扫描, 以及质谱检测。

质谱条件: ESI 离子源的雾化气压为 35 Psi, 氮气流速为 10 L/min; 阳离子模式时离子化电压为 4000 V, 碎片电压 215 V; 阴离子模式时离子化电压为 3500 V, 碎片电压 175 V。

## 2 结果和分析

### 2.1 样品的准备

取 1000 mL 三角瓶 20 个, 每瓶装入 400 mL 液体培养基, 按 10%接种量接种供试被毛孢菌株后, 置于 145 r/min、25℃恒温震荡培养箱中震荡培养 20 d。将发酵产物抽滤, 同时用双蒸水洗涤 2 遍, 得滤液 3.1 L, 滤液 45℃减压浓缩后冻干, 得到冻干粉 146.3 g, 4℃密闭保存备用。

### 2.2 活性物质的提取

称取 12 份上述冻干粉 500 mg 左右, 按 10 μL/mg 分别用石油醚、乙酸乙酯、甲醇和水浸提 2 次(每种溶剂 3 个重复), 第一次浸提时间为 24 h, 第 2 次为 2 h(浸提前都先用 40 KHz 的超声波处理 10 分钟), 将两次浸提物合并, 离心后取上清液, 用氮气初步吹干后冻干, 称重, 用甲醇溶解和稀释(溶解慢的样品用超声波处理), 使样品浓度为 5.0 mg/mL, 然后按前述方法进行活性测定。结果见表 1。

从表 1 可看到, 菌株 RCEF0881 发酵液的乙酸乙酯提取物活性最强, 其次是甲醇提取物, 水提取物也有一定的活性, 石油醚提取物的活性最弱。由此可知发酵液中的活性组分为中等偏上极性的化合物, 乙酸乙酯是较理想的提取剂。

称取 RCEF0881 发酵液冻干粉 120 g, 分两次共加入 1.2 L 乙酸乙酯, 按前述方法浸提, 过滤得到的提取液 40℃低温真空浓缩后冻干, 加氩气保护, 4℃低温保存以备进一步的活性成分分析和分离纯化。

表 1 发酵液不同溶剂提取物的自由基清除率

Table 1 Radical scavenging rates of extracts from culture broth with different solvents

Serial number	Name	Rate of radical scavenging /%			
		Petroleum ether	Ethylacetate	Methanol	Water
RCEF0881	<i>Hirsutella sp.</i>	13.52±0.71	92.08±1.93	78.44±1.30	31.76±0.97

### 2.3 RCEF0881 提取物中活性成分分析

成分分析的目的是初步确定活性化合物的种类性质,判断活性组分制备必要性和可行性,找出目标组分的分离制备条件。对于含量高、活性强和可能的未知化合物要重点分析。

将 20 mg/mL 的菌株 RCEF0881 发酵液的乙酸乙酯提取物进样 10  $\mu$ L 进行高分辨 HPLC-DAD-MS 分析,同时按 1:4 的分流比用 1.5 mL Eppendorff 管收集分流物,每 0.5 min 收集一管。重复进样 2 次,收集于对应时间的同一管中,然后将收集的 Eppendorff 管于真空离心浓缩仪中干燥。干燥后每管加甲醇 70  $\mu$ L 溶解,同时加 70  $\mu$ L 浓度为 0.2 mg/mL 的 DPPH 自由基溶液,混合后转移到 384

孔酶标板(3 个重复),按 DPPH-Microplate 法于 517 nm 下测定,并计算每个收集管的清除自由基活性平均值。

RCEF0881 乙酸乙酯提取物的 HPLC-DAD-MS-DPPH assay 分析结果见图 1、2、3 和 4。

从活性测定图中可看到,活性组分主要分 3 个部分,即:4.5~5.0 min 收集的流份、10~10.5 收集的流份、22~22.5 内 min 收集的流份。它们对应 HPLC 的保留时间(HPRt)分别为 4.1~4.6 min、9.6~10.1 min 和 21.6~22.1 min。它们对应 MS 离子流峰的保留时间(MSRt)分别为 4.5~5.0、10.0~10.5 和 22.0~22.5 min,因为 HPLC 的 DAD 检测器与 MS 的 TOF 检测器间以及自动收集器间的死时间约 0.4 min。

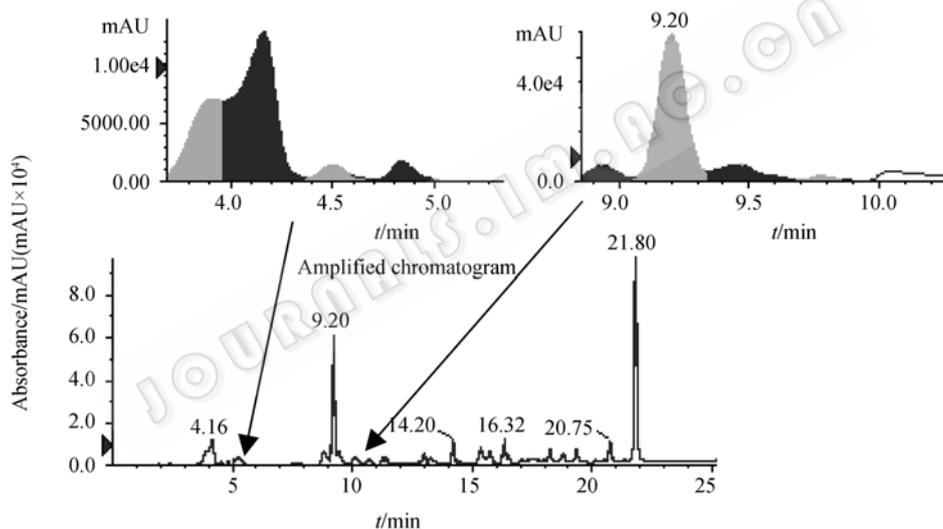


图 1 RCEF0881 发酵液乙酸乙酯提取物的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of ethylacetate extract from culture broth of RCEF0881.

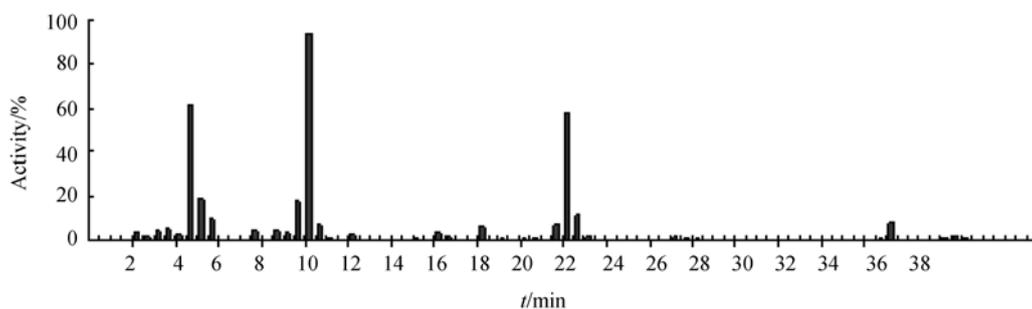


图 2 RCEF0881 发酵液的乙酸乙酯提取物的 HPLC 流分活性

Fig. 2 Activity of the HPLC eluates of ethylacetate extract from culture broth of RCEF0881.

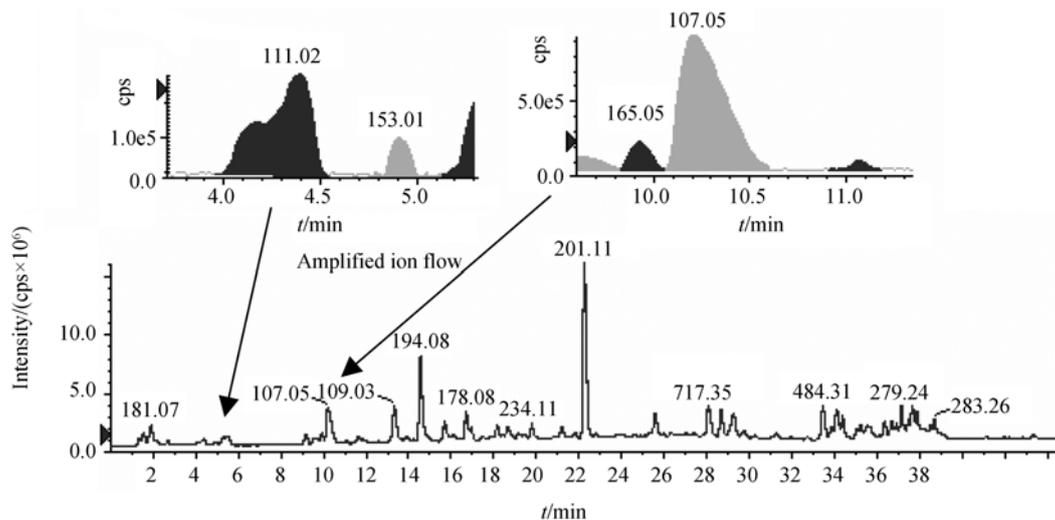


图3 RCEF0881 发酵液乙酸乙酯提取物 HPLC-MS 的阴离子流图谱

Fig. 3 Negative ion flow of HPLC-MS of ethylacetate extract from culture broth of RCEF0881.

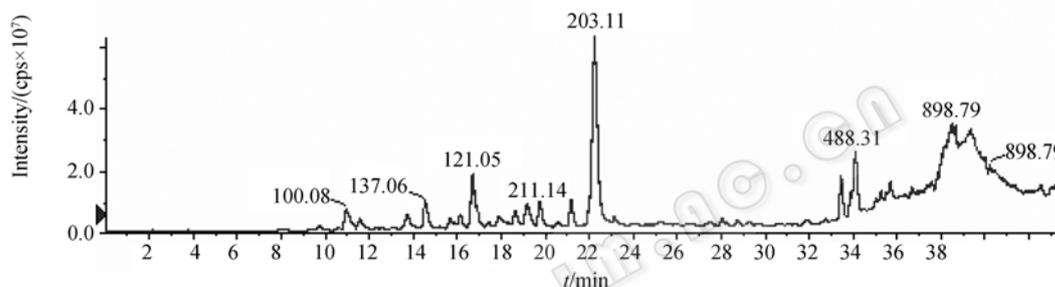


图4 RCEF0881 发酵液乙酸乙酯提取物 HPLC-MS 的阳离子流图谱

Fig. 4 Postive ion flow of HPLC-MS of ethylacetate extract from culture broth of RCEF0881.

从 HPLC-MS 分析的总体来看, RCEF0881 发酵液的乙酸乙酯提取物成分较复杂, 质谱上有数 10 个峰。3 组活性组分中的 22.0~22.5 min 收集物对应的离子流峰和紫外吸收峰都最强, 应该是提取物中的主成分, 同时其对应的峰与周围峰的分度很高, 因此可能最易制备出大量纯品。10.0~10.5 min 收集物虽然活性最强, 但在 MS 图和 HPLC 图上对应的峰并不强(在 HPLC 的 DAD 图谱上有一 HPRt 为 9.20 min 的强峰, 但对应的是 9.5~10.0 min 收集物), 估计大量制备有一定的难度。4.5~5.0 min 收集物活性也较强, 但其紫外吸收峰(图 1 的放大图)、MS 阳离子和阴离子总流峰都不强(图 3 和 4), 说明该活性组分含量较低, 大量制备难度较大。下面分别详细分析这些活性组分的可能组成及进一步纯化和制备的可行性和必要性。

**2.3.1 4.5~5.0 min 收集的活性组分分析:** 从图 1 的局部放大图可看到 4.5~5.0 min 收集的活性组分对应 HPLC 色谱图上有 2 个峰, HPRt 为 4.16 和 4.50 min

其中 HPRt 4.16 min 是混合峰, 包括部分 HPRt 3.90 min 的成分。4.5~5.0 min 收集物在阳离子流图上对应的峰非常弱(见图 4), 表明对应的化合物可能是偏酸性物质或含量过低。其阴离子流图上(图 3 的放大图), 仅有一离子峰, 对应的  $m/z$  为 153.0192 (计算得到精确离子式为  $C_7H_5O_4^-$ , 相对误差为  $8.6 \times 10^{-7}$ ) 及其碎片 109.0293 (计算得到精确离子式为  $C_6H_5O_2^-$ , 相对误差为  $1.86 \times 10^{-6}$ )。显然该化合物的分子式为  $C_7H_6O_4$ , 上述离子峰分别为  $(M-H)^-$  和  $(M-COOH)^-$  峰。该化合物对应的 DAD 紫外光谱  $\lambda_{max}$  为 246 nm 和 289 nm。从所含的碎片、紫外光谱及色谱保留值来看, 该化合物应该为二羟基苯甲酸类化合物。含酚羟基化合物通常都有较强的清除 DPPH 自由基活性<sup>[3, 10~14]</sup>, 此与本试验结果一致。该类化合物由于结构简单, 已有大量的工业合成, 进一步制备的价值较小, 同时由于含量低, 制备难度较大, 本研究暂不讨论其制备和结构确认。

**2.3.2 10~10.5 min 收集的活性组分分析：**从图 1 的局部放大图可看到 10~10.5 min 收集的活性组分，对应 HPLC 色谱图上有几个很小的峰，其中主要峰的  $R_t$  为 9.78。该峰在阳离子流图上对应的峰非常弱(见图 4)，表明对应的化合物可能也是偏酸性物质或含量很低。其阴离子流图上(图 3 的放大图)，有一较大的离子峰，对应的  $m/z$  为 151.0399 的峰(计算得到精确离子式为  $C_8H_7O_3^-$ ，相对误差为  $1.11 e^{-6}$ )及其碎片  $m/z$  107.0504(计算得到精确离子式为  $C_7H_7O^-$ ，相对误差为  $1.86 e^{-6}$ )。显然该化合物的分子式为  $C_8H_8O_3$ ，上述离子峰分别为  $(M-H)^-$  和  $(M-COOH)^-$  峰。该化合物对应的 DAD 紫外光谱  $\lambda_{max}$  为 276 nm。从所含的碎片、紫外光谱及色谱保留值来看，该化合物应该为羟基甲基苯甲酸类化合物。由于该化合物含酚羟基所以有较强的清除 DPPH 自由基活性<sup>[3, 10~14]</sup>，此与本实验结果一致。该类化合物由于结构简单，同时含量较低，本文暂不讨论其进一步制备和结构确认。

**2.3.3 22.0~22.5 min 收集的活性组分分析：**从 HPLC-MS 的液相色谱和质谱图上(图 1、3 和 4)可看到 22.0~22.5 min 收集的是 RCEF0881 乙酸乙酯提取物的主成分。虽然它的活性不是最强的，但由于含量较高，在发酵生产上仍有一定的应用潜力。进一步的高分辨质谱分析发现，该组分在阳离子模式的质谱图上有 203.1178、186.0913 和 225.0998 三个离子峰，经计算得到精确的离子式分别为  $C_{12}H_{15}N_2O^+$ (相对误差  $4.4 \times 10^{-7} mol/L$ )、 $C_{12}H_{12}NO^+$ (相对误差  $2.1 e^{-7}$ ) 和  $C_{12}H_{14}N_2O Na^+$ (相对误差  $1.5 e^{-7}$ )。它们应该分别为  $(M+H)^+$  峰、 $(M-NH_3+H)^+$  和  $(M+Na)^+$  峰。阴离子模式的质谱图上有 201.1036 离子峰，经计算得到精确的离子式为  $C_{12}H_{13}N_2O^-$ (相对误差  $1.8 e^{-7}$ )，此为  $(M-H)^-$  峰。综合阴阳离子分析结果，可知该化合物的分子式为  $C_{12}H_{14}N_2O$ 。经 Chapman&Hall 天然产物数据库查询发现该分子已有多个化合物被报道，但在虫生真菌中尚无该化合物报道，也无有关活性报道，因此该化合物是一新活性化合物，并且也是首次从虫生真菌中发现，值得进一步分离纯化以进行结构鉴定。

#### 2.4 提取物中主要活性成分分离制备

从上面分析可知，保留时间为 21.80 min 的活性成分峰在反相高效液相色谱柱中能很好地分离，所以本研究采用反相高效液相制备色谱进行制备。根据

HPLC 分析结果，及制备液相的特点确定制备条件如下：

首先配制 30 mg/mL 的菌株 RCEF0881 的乙酸乙酯提取物甲醇溶液，然后进样 600  $\mu$ L 进行 Prep-HPLC 分离。色谱柱为 Waters 19 mm $\times$ 250 mm, 10  $\mu$ m, ODS2。流动相为 0~12 min 100%水，12~26 min 40% 甲醇，26~40 min 100%甲醇，40~50 min 100%水。洗脱速度为 15 mL/min。检测条件为 280 nm 单波长检测。样品收集：重点收集目标峰，同时对其它峰也收集以利进一步研究，同时防止目标组份流失。50 min 后接着进第二次样，共进样 20 次。合并目标组分，低温真空浓缩后冻干，得目标化合物 17 mg。加氩气保护，低温保存备用。下面对其进行活性和纯度鉴定。

**2.4.1 目标成分活性确认：**将上述制备的组分进行 DPPH-TLC 法活性测定，测定结果见图 5。从图中可看到制备的化合物在喷 DPPH 试剂后显明显的黄色斑点，表明它具有清除自由基活性，因为 DPPH 为一稳定的自由基，它能够强烈地吸收 517 nm 的光而呈紫色，当它与自由基清除剂反应时，其孤电子被配对，此时其吸收光发生蓝移而呈现黄色<sup>[9, 10, 15]</sup>。可见该活性化合物的制备是成功的，制备过程中活性没有丢失。

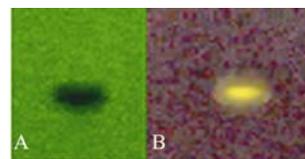


图 5 制备出的化合物的紫外和 DPPH 薄层色谱图  
Fig. 5 TLC chromatogram of the prepared compound under UV 254 nm and developed with DPPH. A: UV; B: DPPH

**2.4.2 目标成分纯度鉴定：**在保证制备组分活性的前提下，样品需要达到一定的纯度才可用于进一步的结构分析。下面用 HPLC-DAD-MS 法对上述收集的两组分进行纯度分析，结果见图 5、6、7 和 8。从 200 到 400 nm 全波长扫描累加得到的 HPLC 色谱图上，仅看到一个峰(图 6)，该峰的前段、中间和后段的紫外光谱都完全一致，说明制备的化合物中无具紫外吸收的杂质。该化合物质谱的离子流图上也仅有一个峰(图 7)，仅对应一个离子，无其它杂离子(图 8)，可见制备的化合物中无可离子化的杂质。同时活性确认中的 DPPH-TLC 图谱上制备样品也仅呈现单个斑点(图 5)，表明在本研究的薄层色谱条件下该制备

的活性化合物是纯一的。综上所述可初步判断本研究制备的化合物是一具清除 DPPH 自由基的纯化合物, 可用于进一步的结构研究和应用研究。

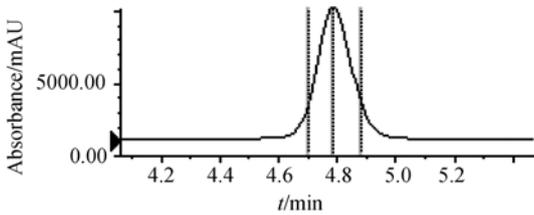


图 6 制备出的化合物 HPLC 色谱图  
Fig. 6 HPLC chromatogram of the prepared compound.

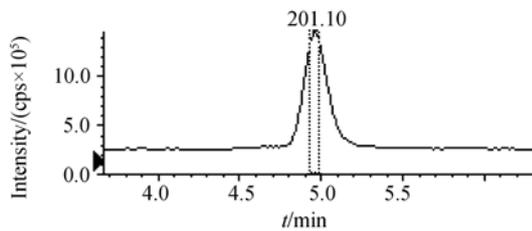


图 7 制备出的化合物阴离子总离子流图  
Fig. 7 Negative total ion flow of the prepared compound.

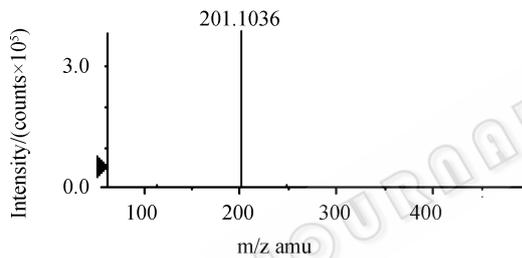


图 8 制备出的化合物高分辨质谱图  
Fig. 8 HR MS of the prepared compound.

由于该活性化合物纯品的质荷比(图 8)与分离纯化前的提取物分析结果完全一致(都为 201.1036), 表明该制备出的化合物确实是 RCEF0881 发酵液中存在的天然化合物。分离制备是成功的。

### 3 结论和讨论

从上面的分析可得到如下结论: 菌株 RCEF0881 发酵液中存在具有清除自由基活性的物质, 该活性物质能较好地被乙酸乙酯提取出来。高分辨液质联用和活性测定结果发现, 活性组分主要有 3 种, 其可能分子式分别为  $C_7H_6O_4$ 、 $C_8H_8O_3$  和  $C_{12}H_{14}N_2O$ 。结合紫外光谱特征、色谱保留时间、离子化特性、质谱碎片

和数据库查询可初步推断它们分别为二羟基苯甲酸、羟基甲基苯甲酸和生物碱类物质, 但具体结构还有待于进一步确认。其中二羟基苯甲酸和羟基甲基苯甲酸普遍存在于植物代谢物中, 也有报道存在于一种青霉菌中<sup>[12,13]</sup>, 但首次发现存在于被毛孢中。该类化合物市场上已有大量人工合成产品, 是重要的医药合成中间体、抗氧化剂和药物有效成分<sup>[1, 16]</sup>。从高效液相色谱和质谱离子流的峰值可知上述三种活性物质中, 化合物  $C_{12}H_{14}N_2O$  的含量最高。该天然活性组分可用反相制备色谱成功地制备出来。其结构已被鉴定为一种酰胺类化合物, 将另文报道。该化合物的清除自由基活性是首次发现, 也是首次发现存在于虫生真菌的代谢物中。二羟基苯甲酸和羟基甲基苯甲酸虽然是已知物, 但发现存在虫生真菌代谢物中尚述首次, 初步研究表明它们在虫生菌的抗逆性和致病性中起有重要作用, 其结构确认和药理作用将另文报道。

### 参 考 文 献

- [1] Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, et al. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem*, 2008, 15(4): 404-414.
- [2] Inagi R. Oxidative stress in cardiovascular disease: a new avenue toward future therapeutic approaches. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov*, 2006, 1(2): 151-159.
- [3] Hu FL, Karen S, Stefka S, et al. Radical Scavengers from the Entomogenous Deuteromycete *Beauveria amorphosa*. *Planta Medica*, 2002, 68: 64-66.
- [4] Noguchi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants. *Free Radic Res*, 2001, 33 (6): 809-817.
- [5] 李圆圆, 阎春林. 紫外线与细胞信号转导. 国际皮肤性病杂志 (*Journal of Dermatology and Venereology*), 2007, 33(5): 302-306.
- [6] 方允中, 郑荣梁, 主编. 自由基生物学的理论与应用, 北京, 科学出版社, 2002, 1-23.
- [7] 孙存普, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论, 合肥, 中国科学技术大学出版社, 1999, 275-283.
- [8] Meydani S, Meydani M, Blumberg A. Antioxidants and aging immune response. In Be, ndich A, Phillips M, Tengerdy R, eds *Antioxidants Nutrients and Immune Functions*. New York and London: Plenum press, 1990: 57-66.
- [9] 胡丰林, 樊美珍, 李增智, 等. 一种白僵菌代谢产物中生物活性物质的研究. *菌物系统(Mycosystema)*, 2000, 19(4): 479-485.
- [10] 胡丰林, 陆瑞利, Hamburger M. 尼日利亚螫毛果(*Cnesticus feruginea*)中一种具有清除自由基活性的次生代谢产物的制备和

- 结构鉴定. 武汉植物学研究(*Journal of Wuhan Botanical Research*), 2002, 20 (4): 311–316.
- [11] 胡丰林, 李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢物及其活性. 菌物学报(*Mycosystema*), 2007, 26(4): 607–632
- [12] Cos P, Hermans N, Calomme M, *et al.* Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. *J Pharm Pharmacol.* 2003, 55(9): 1291–1297
- [13] Yokozawa T, Chen CP, Dong E. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochen-Pharmacol.* 1998, 56(2): 213–222.
- [14] Ribeiro B, Valentao P, Baptista P, *et al.* Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(10): 1805–13
- [15] Cotellet N, Bernier JL, Cateau JP. Antioxidant Properties of Hydroxy-Flavones. *Free Radical Biology & Medicine.* 1996, 20 (1): 35–43
- [16] Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr.* 2007, 40(2): 92–100.

## Analysis and isolation of radical scavengers from metabolites of *Hirsutella sp.*

Fenglin Hu, Ruili Lu, Bo Huang, Zengzhi Li\*

(Research Center on Entomogenous Fungi, Anhui Agricultural University, Hefei 20036, China)

**Abstract: [Objective]** During a screening for free radical scavengers from metabolites of entomogenous fungi, we found a fermentation broth of the strain RCEF 0881 of *Hirsutella sp.* exhibited strong radical scavenging activity. To make clear of the constituents of the active compounds, and prepare some pure active compound for further structure identification we launched this study. **[Methods]** We used organic solvent for active compounds extraction. DPPH-TLC and DPPH- Microplate assay were used for activity analysis. Components analysis was carried out on a HPLC-DAD-HRMS, and bioactive compound preparation on a preparative RP-HPLC. **[Results]** Our extraction tests showed that ethylacetate was the best solvent for the bioactive constituents extracting. HPLC-DAD-HRMS-DPPH assay revealed that the molecular formula of the radical scavengers existed in the extract were possibly  $C_7H_6O_4$ ,  $C_8H_8O_3$  and  $C_{12}H_{14}N_2O$ . From the chromatographic and UV properties, and the MS fragments, and database consulting, the compounds could be deduced as dihydroxybenzoic acid, methyl-hydroxyl benzoic acid, and an alkaloid, however, the structures are still needed to be confirmed. The peak area of HPLC and MS showed that the compound  $C_{12}H_{14}N_2O$  was the main component of the extract. It was isolated via activity directed fractionation. The activity of the prepared compound was confirmed with DPPH-TLC assay and its purity was confirmed with HPLC-DAD-HR-ESIMS. The occurrence of the three active compounds in entomogenous fungi was revealed for the first time.

**Keywords:** *Hirsutella sp.*; free radical scavengers; analysis; preparation; 1,1-Diphenyl-2- picrylhydrazyl hydrate (DPPH)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570189), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA021506) and the Key Program of Anhui Province for Natural Science Research of Universities in the Province (200708)

\*Corresponding author. zzli@auau.edu.cn, hufenglin@hotmail.com

Received: 24 March 2008/ Revised: 11 May 2008