

银杏内生镰刀菌 GI024 挥发油成分及溶栓活性*

鞠秀云^{1,2} 冯友建¹ 陈凤美¹ 蒋继宏^{1**}

(徐州师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室 徐州 221116)¹

(徐州师范大学化学系 徐州 221116)²

摘要: 采用气-质联用法对银杏内生菌发酵液中挥发油成分进行了研究, 分离出 18 个峰, 被确认为 17 种化合物。应用色谱峰面积归一法分析各成分的质量分数, 含量较高的物质有: 苯乙醇 (80.103%), 4-乙基-2-甲氧基-酚 (3.346%), 十二烷 (2.534%), 邻苯二甲酸异辛酯 (2.204%), 邻苯二甲酸二丁酯 (2.158%), 4-乙基-酚 (2.157%)。化合物的类型主要为醇类 (80.341%), 酚类 (5.503%) 和酯类化合物 (4.844%)。该挥发油只在未加热的纤维蛋白平板上表现活性, 说明其具有纤溶酶原激活剂的作用。

关键词: 银杏内生菌, 挥发油, 气相色谱-质谱联用

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0008-04

Volatile Constituents and Their Fibrinolytic Activity of Endophytic Fungus *Fusarium* sp. GI024 from *Ginkgo biloba**

JU Xiu-Yun^{1,2} FENG You-Jian¹ CHEN Feng-Mei¹ JIANG Ji-Hong^{1**}

(Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116)¹

(Department of Chemistry, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116)²

Abstract: A volatile oil from aroma producing endophytic fungus from ginkgo was analyzed by GC/MS, 18 peaks were isolated, and 17 components were identified. Phenylethyl alcohol (80.103%), 4-ethyl-2-methoxyphenol (3.346%), dodecane (2.534%), 1, 2-benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (2.204%), dibutyl phthalate (2.158%), 4-ethylphenol (2.157%) accounted for most of them. The main components were alcohol (80.341%), phenol (5.503%) and ester (4.844%). The volatile oil has ability of converting plasminogen to plasmin.

Key words: Endophytic fungus from ginkgo, Volatile oil, GC/MS

植物内生真菌是指存在于健康植物的茎叶中, 不形成明显病症的真菌^[1]。近年来, 内生真菌成为研究的热点之一, 研究得较多的是一些对抗癌、抗菌等有潜在应用价值的代谢产物^[2,3]。银杏内生真菌的研究主要集中在生物学特性^[4,5]及其发酵液的化学成分^[6]的初步研究, 对银杏内生真菌挥发油成分的研究很少。仅蒋继宏等^[7]对一产香银杏内生真菌的挥发油成分进行了研究, 但他们鉴定出的成分仅占其色谱流出组分的 51.07%。本研究对另一株银杏内生真菌的挥发油及其溶栓活性进行了初步研究, 旨在为进一步阐明银杏内生真菌挥发油成分, 为今后银杏内生真菌的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

银杏内生真菌由江苏省药用植物生物技术重点实验室提供。6890/5973NGC/MS 联用仪 (美国安捷伦公司); 培养基为 PD 培养基; 提取试剂为市售化学试剂; 冻干人纤

* 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放课题 (No. 02AXLI2)

** 通讯作者 Tel: 0516-83403515, E-mail: jjh669@126.com

收稿日期: 2006-01-12, 修回日期: 2006-03-31

维蛋白原 (Shanghai RAAS Blood Products Co., Ltd.)。

1.2 方法

1.2.1 银杏内生真菌的培养: 从斜面培养基取适量菌种接于装有 200mL PD 培养基的摇瓶中, 26℃、120r/min 摇动培养 14d, 以此为菌种, 再进行扩大培养。将所得培养液以 4,000r/min 离心 10min, 弃去沉淀, 上清液备用。

1.2.2 挥发油提取: 取上述上清液, 用水蒸气蒸馏-乙醚萃取法提取出挥发油。以无水硫酸钠为干燥剂, 得到淡色挥发油液体。挥发油含量为 10μL/L。

1.2.3 成分测定: 色谱条件: 6890 型气相色谱仪, HP-5MS 弹性石英毛细管柱 (30m × 0.25 mm × 0.25μm), 载气为高纯氮气, 柱流量 60 mL/min, 气化室温度: 280℃, 毛细管柱程序升温从 70℃ 开始, 保持 2 min, 以 10℃/min 的速度升到 255℃ 并保持 25 min, 再以 10℃/min 的速度升到 270℃ 并保持 5 min。质谱条件: 5973N 型质谱仪, EI 离子源 (电子轰击源), 电离电压为 70 eV, 离子源温度为 230℃, 相对分子质量扫描范围 30 ~ 550AMU, 进样量 1.0μL, 分流比 50:1, 扫描周期 1s。

1.2.4 纤溶活性测定: 将挥发油作 1:10 稀释后, 取 10μL 样点在纤维蛋白平板上 (25mg 冻干人纤维蛋白原溶于 5mL 0.9% 生理盐水后, 加 15μL 300U/mL 凝血酶), 再取同样量的样品点在加过热的纤维蛋白平板上 (将按上法制好的纤维蛋白平板于 80℃ 加热处理 30min), 室温放置观察。

2 结果

2.1 挥发油成分及相对含量

对银杏内生真菌挥发油成分进行 GC-MS 分析, 气相色谱共得到 18 个色谱峰, 根据 GC-MS 联用所得质谱信息与计算机质谱数据库标准谱图对照分析, 对基峰质荷比、相对丰度和保留时间等进行直观比较, 按面积归一法确定各组分相对含量, 分别对各色谱峰加以确认, 鉴定该挥发油的化学成分, 结果列于表 1。

表 1 银杏内生镰刀菌 GI024 挥发油成分及相对含量

峰号	出峰时间 (min)	分子式	化合物名称	相对含量 (%)
1	4.194	C ₁₀ H ₂₂	(正) 癸烷 Decane	0.228
2	4.537	C ₈ H ₁₈ O	2-乙基-1-己醇 2-Ethyl-1-hexanol	0.238
3	5.717	C ₈ H ₁₀ O	苯乙醇 Phenylethyl Alcohol	80.103
4	6.192	C ₈ H ₁₈ O ₃	2-丁醇-3, 3'-醚 2-Butanol, 3, 3'-oxybis-	0.281
5	6.239	C ₈ H ₁₈ O ₃	2-丁醇-3, 3'-醚 2-Butanol, 3, 3'-oxybis-	0.480
6	6.340	C ₈ H ₁₀ O	4-乙基-酚 4-Ethylphenol	2.157
7	6.761	C ₁₂ H ₂₆	十二烷 Dodecane	2.534
8	7.294	C ₇ H ₅ NS	1, 2-苯并异噻唑 1, 2-Benzisothiazole	0.296
9	7.923	C ₉ H ₁₂ O ₂	4-乙基-2-甲氧基-酚 4-Ethyl-2-methoxyphenol	3.346
10	9.393	C ₁₄ H ₃₀	十四烷 Tetradecane	1.280

续表 1

11	10.146	$C_8H_7NO_3$	对硝基乙酰苯 p-Nitroacetophenone	1.347
12	10.929	$C_{10}H_{12}O_2$	2, 3, 5, 6-四甲基-对苯醌 2, 3, 5, 6-Tetramethyl-p-benzoquinone	1.259
13	11.836	$C_{16}H_{34}$	十六烷 Hexadecane	0.518
14	14.053	$C_{20}H_{42}$	二十烷 Eicosane	0.279
15	14.854	$C_{16}H_{22}O_4$	邻苯二甲酸异丁酯 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) ester	0.482
16	15.796	$C_{16}H_{22}O_4$	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	2.158
17	15.868	$C_{15}H_{14}N_2$	1, 3-二苯基-2-吡唑啉 1, 3-Diphenyl-2-pyrazoline	0.585
18	22.134	$C_{24}H_{38}O_4$	邻苯二甲酸异辛酯 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	2.204

由表 1 可知, 峰 4 和峰 5 为同一物质, 故该菌株挥发油实际检出 17 种成分, 其主要成分为: 苯乙醇, 4-乙基-酚, 十二烷, 4-乙基-2-甲氧基-酚, 十四烷, 对硝基乙酰苯, 2, 3, 5, 6-四甲基-对苯醌, 邻苯二甲酸二丁酯, 邻苯二甲酸异辛酯。将这些成分按化合物的类型分, 主要为醇类 (80.341%), 酚类 (5.503%) 和酯类化合物 (4.844%)。

2.2 纤溶活性

该挥发油的 1:10 稀释液在纤维蛋白平板上 20min 即显出明显溶圈, 说明该挥发油有纤溶活性, 如图 1 所示。但同样的样品在加过热的纤维蛋白平板上不显纤溶活性, 如图 2 所示 (箭头所指为加样处), 说明该挥发油只具有激活纤溶酶原活性的作用。

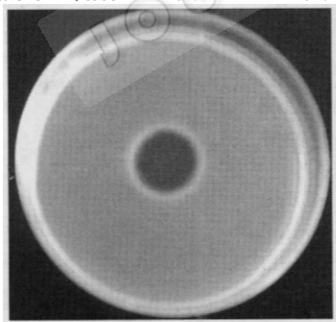


图 1 未加热纤维蛋白平板

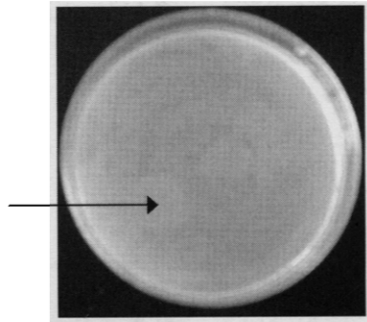


图 2 加热纤维蛋白平板

3 讨论

从表 1 的化合物及其含量可知, 银杏内生镰刀菌 GI024 挥发油成分与蒋继宏等^[7]报道过的一产香银杏内生真菌挥发油成分相比, 仅一组分相同, 该相同组分仅占银杏内生镰刀菌 GI024 挥发油成分的 2.158%。这说明药用植物的内生真菌具有一定的多样性, 同种植物的不同内生真菌的产物是不同的。

将银杏内生镰刀菌 GI024 挥发油成分与银杏叶的挥发性成分相比, 有较大差异。王成章等^[8]报道的 3~5 年银杏苗叶的挥发油成分有 44 种化合物, 含量较高的物质有:

六氢法呢酮 (11.15%)、橙花基酮 (8.68%)、正己烷 (5.94%)、 β -紫罗兰酮 (5.24%)、2, 3-二甲基己烷 (5.20%)、正庚烷 (5.18%)、3-乙基己烷 (4.42%)、2, 3-二甲基辛烷 (4.06%)、法呢酮 (3.73%)、3, 4, 4 α , 5, 6, 7-六氢-1, 1, 4 α -三甲基-2 (1H) 萘酮 (3.58%)、2-异丙基-2, 5-二甲基-环己酮 (3.09%)、棕榈酸 (3.00%)、 α -鸢尾酮 (2.82%)、5, 6, 7, 7 α -四氢-4, 4, 7 α -三甲基-2 (4H) 苯呋喃酮 (2.73%)、硬脂酸 (2.41%)、甲基环戊烷 (2.16%)。张永洪等^[9]报道的 40 年龄银杏雌树叶的挥发油成分有 67 种, 含量较高的物质有: 十六酸 (23.48%), 雪松脑 (15.19%), 6, 10, 14-三甲基-2-十五酮 (10.89%), 邻苯二甲酸丁醇异丁醇二酯 (9.99%), 十四酸 (3.91%), α -雪松烯 (2.69%), 橙花叔醇 (1.95%) 和 β -桉叶醇 (1.29%) 等。而银杏内生镰刀菌 GI024 挥发油成分仅有 17 种化合物, 含量较高的物质有: 苯乙醇 (80.103%), 4-乙基-2-甲氧基-酚 (3.346%), 十二烷 (2.534%), 邻苯二甲酸异辛酯 (2.204%), 邻苯二甲酸二丁酯 (2.158%), 4-乙基-酚 (2.157%)。从这些数据我们可以看出, 银杏内生真菌的挥发油成分不同于银杏叶, 其种类比银杏叶挥发油成分少, 这就为我们进一步分离出其中某一单一组分提供了方便。

另外, 银杏内生镰刀菌 GI024 挥发油成分具有激活纤溶酶原活性的作用, 揭示了银杏内生真菌能产生具有药用功效的物质; 其主要成分苯乙醇是香料用芳香化合物中较为重要和应用广泛的一种食用香料, 揭示其可能具有重要的经济价值。由于内生真菌的发酵培养具有可操作、易控制、周期短、所需条件和成本较低等特点, 因此, 银杏内生真菌资源必将有着很好的实际应用前景。

参考文献

- [1] Carroll G. Ecology, 1988, **69**: 2~9.
- [2] 陈毅坚, 张灼, 王艳, 等. 生物技术, 2003, **13** (2): 10~11.
- [3] 李治滢, 李绍兰, 周斌, 等. 微生物学杂志, 2004, **24** (6): 35~38.
- [4] 蒋继宏, 陈凤美, 曹小迎, 等. 浙江林学院学报, 2004, **21** (3): 299~302.
- [5] 陈凤美, 刘群, 蒋继宏, 等. 西北林学院学报, 2005, **20** (4): 112~114.
- [6] 王梅霞, 陈双林, 霍娟. 工业微生物, 2004, **34** (2): 15~18.
- [7] 蒋继宏, 陈凤美, 孙勇, 等. 微生物学杂志, 2004, **24** (3): 15.
- [8] 王成章, 沈兆邦, 谭卫红, 等. 热带亚热带植物学报, 2000, **8** (4): 329~332.
- [9] 张永洪, 王敬勉, 廖德胜, 等. 天然产物研究与开发, 1999, **11** (2): 62~65.