

# 拟细羽束梗孢发酵菌丝体中自由基清除活性成分分析

李康乐<sup>1</sup> 王小董<sup>1</sup> 张德龙<sup>1</sup> 陆瑞利<sup>2</sup> 胡丰林<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学 微生物防治省重点实验室 安徽 合肥 230036)

(2. 安徽农业大学 应用化学系 安徽 合肥 230036)

**摘要:** 用二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基法,首次对拟细羽束梗孢(*Isaria gracilioides* RCEF3 279)菌丝体的不同溶剂提取物进行了自由基清除活性的定性定量分析,发现其甲醇提取物具有较强的清除自由基活性,当菌丝浓度为 10 g/L 时,其甲醇提取物的自由基清除率达到了 92.4%±0.3%。DPPH 自显影-薄层色谱分析结果显示有 4 个具自由基清除活性主要成分。高分辨液质联用和活性联合分析发现,提取物中 4 个具自由基清除活性成分的可能分子式分别为 C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub> (1)、C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub> (2)、C<sub>30</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> (3)和 C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4)。经天然产物数据库查询发现,化合物 3 和 4 可能分别为 Viscumamide 和 Dehydrocyclopepti,这两个化合物在虫生真菌代谢产物中属首次发现。数据库查询没有发现与分子式 C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub> 和 C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub> 匹配的结构式,因此化合物 1 和 2 可能为新化合物。

**关键词:** 拟细羽束梗孢,清除自由基,活性测定,液质联用,二苯基苦基苯肼(DPPH)

## Analysis of radical scavenging active constituents in the mycelia of *Isaria gracilioides*

LI Kang-Le<sup>1</sup> WANG Xiao-Dong<sup>1</sup> ZHANG De-Long<sup>1</sup> LU Rui-Li<sup>2</sup> HU Feng-Lin<sup>1\*</sup>

(1. Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(2. Department of Applied Chemistry, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

**Abstract:** A DPPH-microplate assay was employed for quantitative analysis of the free radical scavenging activity of the extracts extracted with different solvents from mycelia of *Isaria gracilioides*. The results showed that the methanol extract had the strongest free radical scavenging activity. At the concentration of 10 mg mycelium per milliliter methanol, the radical scavenging rate of the extract reached 92.4%±0.3%. The results of DPPH-TLC assays showed that the methanol extract contained four main

free radical scavenging components. The combined LC-DAD-HRMS and DPPH assay revealed that the molecular formulas of the four free radical scavengers were possibly  $C_{15}H_{16}NO_3$  (**1**),  $C_{32}H_{40}N_2O_{18}$  (**2**),  $C_{30}H_{55}N_5O_5$  (**3**) and  $C_{17}H_{14}N_2O_2$  (**4**). Natural products database query showed that compounds **3** and **4** were possibly viscumamide and dehydrocyclopeptin, respectively, and compounds **1** and **2** were novel molecules. Viscumamide and dehydrocyclopeptin were detected from entomogenous fungi for the first time.

**Keywords:** *Isaria gracilioides*, Ree radical scavenger, LC-HRMS, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

拟细羽束梗孢(*Isaria gracilioides*)是拟细虫草(*Cordyceps gracilioides*)的无性型<sup>[1]</sup>。拟细虫草是2000年9月在我国安徽省牯牛降自然保护区发现的中国新纪录种,其寄主为鞘翅目幼虫<sup>[2]</sup>,目前尚无有关拟细虫草和拟细羽束梗孢中生物活性物质的研究报道。由于与昆虫长期协同进行的关系,虫生真菌被认为是最有潜力从中发现新型生物活性物质的类群<sup>[3-7]</sup>,因此本研究对拟细羽束梗孢菌丝体进行自由基清除活性成分的研究。有关研究将一方面有助于虫生真菌中生物活性物质的开发利用,另一方面为虫生真菌化学生态研究以及虫菌相互关系研究积累科学数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 拟细羽束梗孢 *Isaria gracilioides* 菌株号为 RCEF3279, 由安徽农业大学虫生真菌研究中心提供。

**1.1.2 培养基(g/L):** 蛋白胨 10, 酵母浸出粉 10, 葡萄糖 40, 琼脂 20, pH 5.5。

**1.1.3 主要仪器:** 2K-15 超速离心机为 Sigma 公司产品; SpectraMaxM2 酶标仪, 购自美国 Molecular Device 公司; KQ5 200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FreeZone12 冷冻干燥系统, 美国 Labonconco 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 (Agilent 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; 分析高效液相色谱柱 Atlantis RP C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m, 3.9 mm $\times$ 150 mm, 美国

Waters 公司; 2020D 凝胶成相系统, 美国 Cold Spring 公司; 硅胶 GF<sub>254</sub> 高效薄层铝板, 德国 Merck 公司;

**1.1.4 主要试剂:** 分析纯甲醇, 上海建信化工有限公司; 色谱纯甲醇, 美国 Tedia 公司; 分析纯三氯甲烷, 无锡市亚盛化工有限公司; 分析纯乙酸乙酯, 上海建信化工有限公司; 石油醚, 汕头市西陇化工有限公司; 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Sigma 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 真菌培养和处理:** 用接种针挑去一定量的斜面种子接入到 SDAY 液体培养基中, 250 mL 的三角瓶装液 100 mL, 在 120 r/min、25  $^{\circ}$ C 的全温振荡培养箱中振荡培养 10 d 左右。然后配制 SDAY 平板培养基,  $1\times 10^5$  Pa 高压灭菌 20 min, 冷却至 50  $^{\circ}$ C–60  $^{\circ}$ C 后倒平板, 每皿控制在 20 mL。待凝固后, 用灭过菌的玻璃纸覆盖在培养基表面, 用移液枪吸取 0.5 mL 种子液转入平板培养基中, 并使其覆盖均匀, 置于恒温培养箱中培养, 培养温度为 25  $^{\circ}$ C, 周期为 15 d 左右。刮下菌丝, 冷冻干燥粉碎备用。分别称取 7 份 30 mg 菌丝粉于 7 个 Eppendorf 管中, 按 1:30 料液比 (*W/V*) 分别加水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇和石油醚, 超声波 (100 W, 30 kHz) 处理 0.5 h 后, 浸置 24 h, 离心后取上清液备用。

**1.2.2 活性测定方法:** 将样品提取物溶液和 0.4 g/L DPPH 试液各 100  $\mu$ L 于 96 孔酶标板中或各 20  $\mu$ L 于 384 孔酶标板中, 振荡 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 ( $A_{max}$ ), 每个样品

3个重复。最后按下列公式计算:

$$\text{自由基清除率} = [1 - (A_s - A_c) / A_{\max}] \times 100\%$$

以 1 g/L 抗坏血酸为阳性对照。

DPPH-TLC 实验按胡丰林等方法<sup>[5,8]</sup>。

**1.2.3 活性组分的分离和鉴定:** 将活性提取液进样 20  $\mu\text{L}$  进行高分辨 LC-DAD-MS 分析, 按 1:4 的分流比用 1.5 mL Eppendorff 管收集分流物, 每 1 min 收集一管。然后将收集的 Eppendorff 管于真空离心浓缩仪中浓缩至干。干燥后每管加甲醇 70  $\mu\text{L}$  溶解, 溶解后转移至 384 孔酶标板中, 按照 1.2.2 方法测定每个收集管的清除自由基活性。HPLC 洗脱条件为 0–10 min 甲醇由 0 上升到 20%; 10–20 min 甲醇由 20% 上升到 50%; 20–35 min 甲醇由 50% 上升到 100%; 最后 100% 甲醇洗脱 10 min。洗脱速度为 0.000 8 L/min。检测条件为 200 到 600 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 12 L/min, 温度为 325  $^{\circ}\text{C}$ ; 阳离子模式时离子化电压为 4 000 V, 碎片电压 250 V; 阴离子模式时离子化电压为 3 500 V, 碎片电压 175 V。

## 2. 结果与分析

### 2.1 不同溶剂提取物的活性测定

按方法 1.2.1 进行样品提取, 按 1.2.2 对拟细羽束梗孢菌丝体的不同溶剂浸提物进行活性测定。结果见图 1。

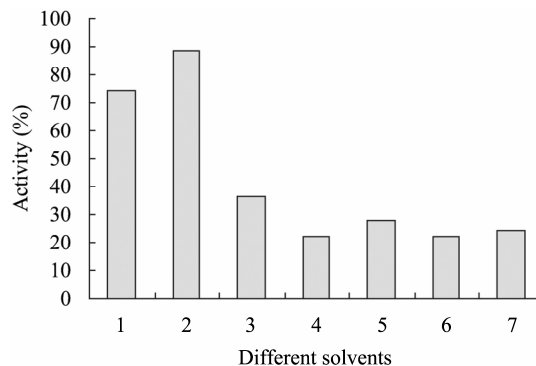


图 1 拟细羽束梗孢菌丝体不同溶剂提取物的清除自由基活性

Fig. 1 Radical scavenging rate of the extracts from the mycelia of *Isaria gracilioides* with different solvents

注: 1: 水; 2: 甲醇; 3: 乙醇; 4: 乙酸乙酯; 5: 氯仿; 6: 正丁醇; 7: 石油醚。

Note: 1: Water; 2: Methanol; 3: Ethanol; 4: Ethyl acetate; 5: Trichloromethane; 6: n-Butanol; 7: Petroleum ether.

从图 1 可看出, 拟细羽束梗孢菌丝体提取物中, 甲醇提取物的清除自由基活性最强, 其次是水提取物, 乙酸乙酯提取物的活性最弱, 表明拟细羽束梗孢菌丝体中具清除自由基活性物质较易溶于甲醇。根据相似相容原理可推知拟细羽束梗孢中活性组分以中强极性的化合物为主。

### 2.2 拟细羽束梗孢菌丝体的甲醇提取物清除自由基活性的定量分析

按照方法 1.2.2, 用甲醇进行拟细羽束梗孢菌丝体的活性物质提取, 稀释到不同浓度后, 进行活性测定, 结果见表 1。

表 1 不同浓度拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物对 DPPH 自由基的相对清除率  
Table 1 DPPH radical scavenging activities of the methanol extract from the mycelia of *Isaria gracilioides* at different concentrations

样品浓度 Concentration (g/L)	自由基相对清除率 Rate of radical scavenging (%)			
	0 min	10 min	20 min	30 min
1.0	10.84±0.76	17.82±0.80	19.48±0.76	20.68±1.14
2.5	15.27±0.78	25.95±1.59	31.15±1.18	33.56±0.94
5.0	42.16±1.03	62.54±0.40	71.95±0.31	80.75±1.07
7.5	52.93±0.32	82.24±1.37	91.39±0.81	92.42±0.17
10.0	67.25±0.62	91.36±0.54	92.40±0.30	93.72±0.21
CK	97.29±0.17	97.38±0.42	97.56±0.16	97.23±0.30

注: CK: 为抗坏血酸(1 g/L).

Note: CK: Ascorbic acid (1 g/L).

从表 1 可以看出, 不同浓度样品对 DPPH 自由基的清除能力是不同的, 随着样品浓度的递增, 对 DPPH 自由基清除活性增强; 当样品的浓度较高时, 随着保温时间的延长其自由基清除率增加幅度越来越小。

### 2.3 拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物清除自由基活性的定性分析

将拟细羽束梗孢菌丝体 10 g/L 甲醇提取物点样到高效薄层层析板上(点样体积为 5  $\mu$ L), 以 1 g/L 的抗坏血酸为阳性对照(点样体积为 1  $\mu$ L), 然后在以  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=50:55:5$  ( $V/V/V$ ) 的展开剂中展开。展开剂至离前沿 1 cm 时取出薄层板, 先记下自然光下斑点及颜色; 后在波长为 254 nm 的紫外光下, 用铅笔划下荧光猝灭点斑点和荧光激发斑点; 然后喷浓度为 0.2 g/L 的 DPPH 乙醇溶液, 3 min 后用数码相机或扫描仪记录下图谱, 显黄色处为清除自由基成分(图 2)<sup>[6]</sup>。

从图 2 可看出, 拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物成分比较复杂, 在  $R_f$  值为 0.1、0.2、0.4 和 0.9

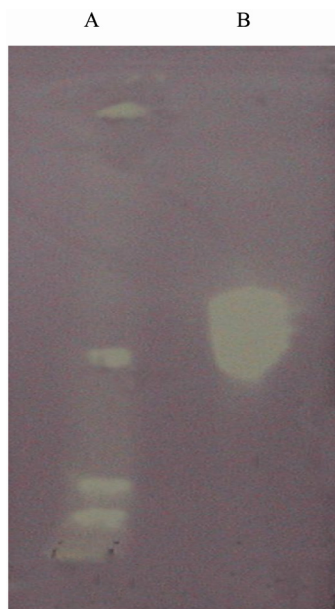


图 2 拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物的 DPPH-TLC 图谱  
Fig. 2 DPPH-TLC assay of the methanol extract from mycelia of *Isaria gracilioides*

注: A: 拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物; B: 抗坏血酸。

Note: A: The methanol extract from the mycelia of *Isaria gracilioides*; B: Ascorbin acid (1 g/L).

处有 4 个明显黄色斑点, 表明其可能有 4 个自由基清除活性成分。而且这 4 个活性成分中, 有 1 个极性较低, 另外 3 个极性较强。

### 2.4 活性提取物的 LC-DAD-HRMS-DPPH 联合分析

将甲醇提取液进样 20  $\mu$ L 进行高分辨 LC-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 1 min 收集一管。然后将收集的 Eppendorff 管于真空离心浓缩仪中浓缩干燥。干燥后每管加甲醇 70  $\mu$ L 溶解, 转移至 384 孔酶标板中, 按照方法 1.2.2 测定每个收集管的自由基清除活性。

拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物的 LC-DAD-DPPH assay 分析结果见图 3 和图 4。

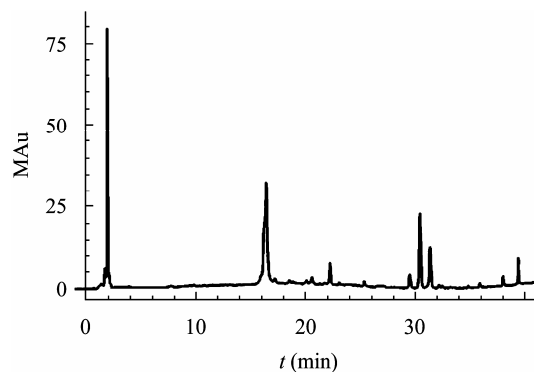


图 3 拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物的 HPLC 图谱  
Fig. 3 HPLC diagram of the methanol extract from mycelia of *Isaria gracilioides*

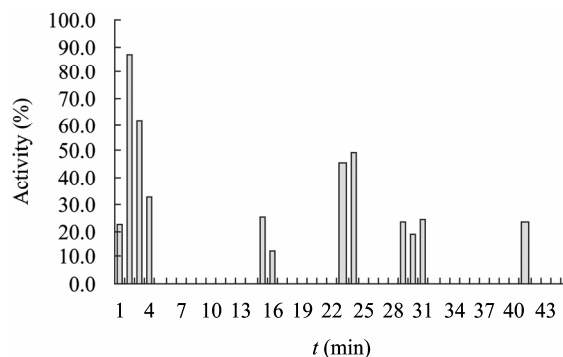


图 4 拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物的 HPLC 流分的 DPPH 自由基清除活性图

Fig. 4 DPPH radical scavenging activities of the HPLC eluates of the methanol extract from mycelia of *Isaria gracilioides*

从图 3 和图 4 可以看出,拟细羽束梗孢菌丝体甲醇提取物有多个组分都有明显的 DPPH 自由基清除活性,与 TLC-DPPH 的分析结果一致。

图 4 中 1.0–3.0 min 收集的活性组分,对应色谱图(图 3)上的主要活性组分的保留时间为 1.7 min,对应的阳离子质荷比( $m/z$ )为 258.109 78 (图 5)。根据 ESI-MS 的离子特点,可推知它是 $[M+H]^+$ 峰。质谱工作站计算出的可能分子式为  $C_{15}H_{16}NO_3$  (相对误差为  $1.07e^{-7}$ ),不饱和度为 9。根据分子式及紫外光谱及色谱性质从 Chapman & Hall 天然产物数据库以及 NIST 数据库中查询,没有发现与之完全相匹配的已知化合物,因此可以初步判断该化合物是一新化合物。

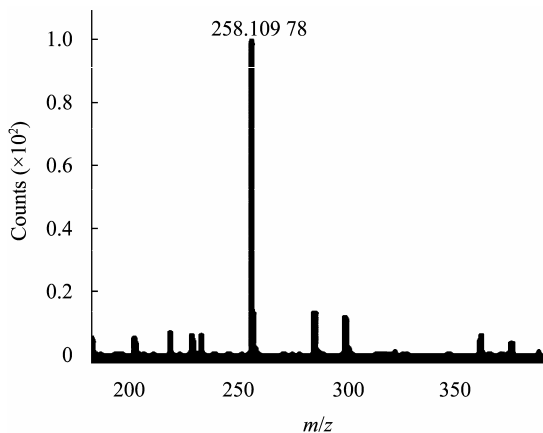


图 5 目标化合物 1 的质谱图  
Fig. 5 HR MS of compound 1

图 4 中 15.0–16.0 min 收集的活性组分,对应色谱图(图 3)上的主要活性组分的保留时间为 15.2 min,对应的阳离子的质荷比( $m/z$ )为 741.236 17 和 763.217 21 (图 6),根据 ESI-MS 的离子特点,可推知它们分别为准分子离子峰 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ ,经计算得到可能分子式为  $C_{32}H_{40}N_2O_{18}$  (相对误差为  $0.41e^{-7}$ ),根据分子式和紫外吸收峰及色谱性质从 Chapman & Hall 天然产物数据库中查询,发现没有与之完全匹配的已知化合物,因此可以初步判断该化合物是一新化合物。

图 4 中 19.5–24.0 min 收集的活性组分,对应色谱图(图 3)上的主要活性组分的保留时间分别为

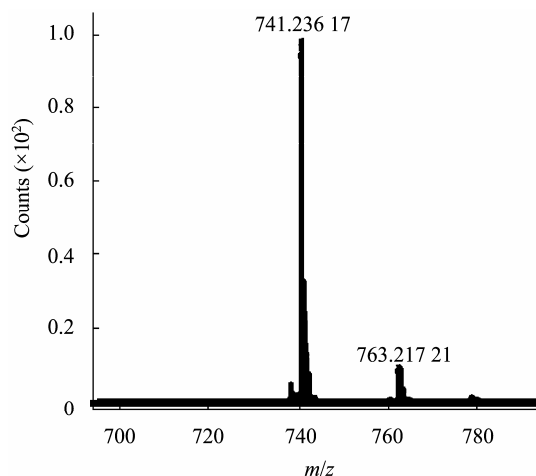


图 6 目标化合物 2 的质谱图  
Fig. 6 HR MS of compound 2

22.9 min 和 23.3 min。其中,22.9 min 峰对应的质谱图上有离子峰  $m/z$  为 279.112 64 (图 7)。根据 ESI 离子化特点,可知该峰应该是准分子离子峰 $[M+H]^+$ ,经计算得到可能离子式为  $C_{17}H_{15}N_2O_2^+$  (相对误差为  $0.6e^{-7}$ ),其对应的分子式为  $C_{17}H_{14}N_2O_2$ 。从 Chapman & Hall 天然产物数据库中查询,发现 Dehydrocyclopeptine 与之相匹配,其结构式见图 8。

23.3 min 峰对应的质谱图上有两个离子峰  $m/z$  为 588.4116 4 和 566.425 79 (图 9,它们应该分别为准分子离子峰 $[M+Na]^+$ 和 $[M+H]^+$ ,经计算得到可能

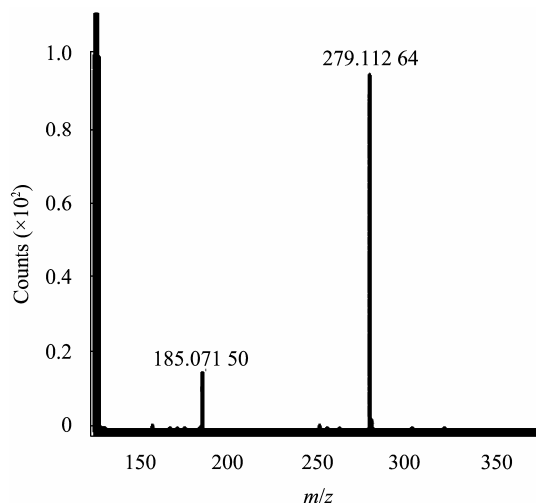


图 7 目标化合物 3 的质谱图  
Fig. 7 HR MS of compound 3

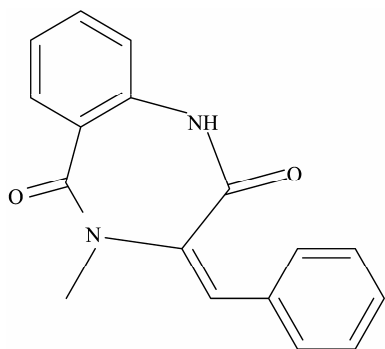


图 8 Dehydrocyclopeptine 的化学结构  
Fig. 8 Chemical structure of dehydrocyclopeptine

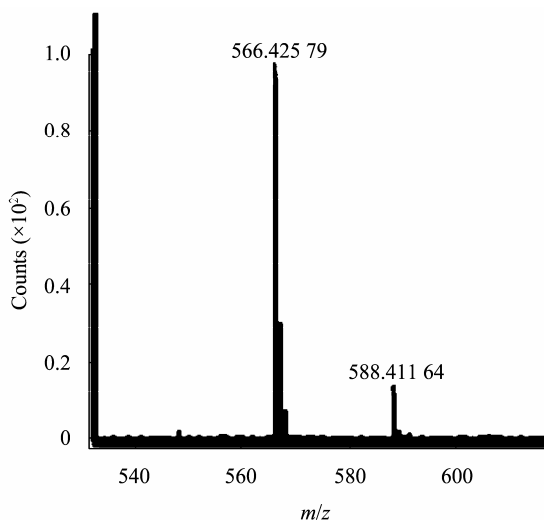


图 9 目标化合物 4 的质谱图  
Fig. 9 HR MS of compound 4

分子式为  $C_{30}H_{55}N_5O_5$  (相对误差为  $1.8e^{-8}$ )。从 Chapman & Hall 天然产物数据库中查询, 发现 Viscumamide 与之相匹配, 其结构式见图 10。

### 3 小结与讨论

综上所述可知, 拟细羽束梗孢菌丝体的 DPPH 自由基清除活性成分比较复杂, 该活性成分可较好地被甲醇提取出来。TLC 和 HPLC-MS 分析表明, 其活性成分是以中强极性为主的化合物。其中分子式为  $C_{15}H_{16}NO_3$  的化合物是其 DPPH 自由基清除活性的主要成分之一, 根据它的分子式特点、极性、不饱和度和具有清除自由基活性物质的特点<sup>[4-5,10-12]</sup>, 可推知该成分可能为含酚羟基的氨基酸类化合物。

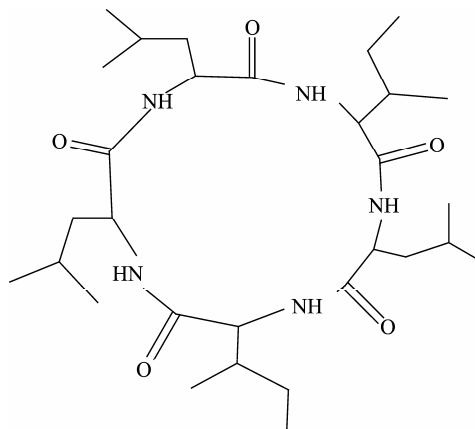


图 10 Viscumamid 的化学结构  
Fig. 10 Chemical structure of viscumamide

分子为  $C_{32}H_{40}N_2O_{18}$  的化合物, 不饱和度为 14, 具有中强极性, 根据具有 DPPH 自由基清除活性的化合物的特点以及虫生真菌代谢产物的结构类型<sup>[4-5,10-12]</sup>, 推测该化合物可能为含酚羟基的二肽。化合物 Dehydrocyclopeptine 是 *Penicillium cyclopium*、*Penicillium expansum* 和 *Penicillium puberulum* 的代谢产物之一<sup>[13]</sup>, 是苯并二氮类化合物, 但尚未见自由基清除活性的报道。活性成分 4 可能为 Viscumamide, 该化合物是红树植物内生真菌 *Paecilomyces* sp. (一种拟青霉) 的次级代谢产物<sup>[14]</sup>, 由于拟青霉和本研究的羽束梗孢在老的分类系统中属于同一属<sup>[1-2,9]</sup>, 因此推测活性成分 4 可能为 Viscumamide。药理活性试验表明 Viscumamide 有抑制细菌活性, 还有抗炎、驱虫的活性<sup>[9]</sup>, 但尚未见其自由基清除活性的报道。由于自由基清除剂能清除自由基或阻断自由基参与的氧化反应, 它在生命活动中起广泛而重要的作用<sup>[12-13,16]</sup>, 所以拟细羽束梗孢 RCEF3 279 菌株的自由基清除活性成分值得深入研究。

### 参考文献

- [1] Li CR, Ming L, Fan MZ, et al. *Paraisaria graciloides* comb. nov., the anamorph of *Cordyceps graciloides*[J]. *Mycosystema*, 2004, 23(1): 165-166.
- [2] Fan MZ, Li CR, Chen YY, et al. *Cordyceps raciloides*, a new record for China[J]. *Mycosystema*, 2001, 20(2): 273-274.

- [3] Jiang MY, Feng T, Liu JK. N-containing compounds of macromycetes[J]. Nat Prod Rep, 2011 Feb 8.[Epub ahead of print]
- [4] 胡丰林, 李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性[J]. 菌物学报, 2007, 26(4): 607-632.
- [5] Hu FL, Schmidt K, Stoyanova S, et al. Radical scavengers from the entomogenous deuteromycete *Beauveria amorpha*[J]. Planta Medica, 2002, 68(1): 64-66.
- [6] 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 I. 具有清除自由基的活性物质的分离和制备[J]. 菌物系统, 2000, 19(4): 522-528.
- [7] 黄德见, 胡丰林, 徐莉, 等. 双梭隔梭孢中天然色素的提取分离和高分辨液质联用分析[J]. 食品发酵与工业, 2008, 34(11): 167-170.
- [8] 胡丰林, 陆瑞利, 黄勃, 等. 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[J]. 微生物学报, 2008, 48(8): 1035-1041.
- [9] 梁宗琦. 中国真菌志·第三十二卷 虫草属[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 132-134.
- [10] Bandonienė D, Murkovic M, Pfannhauser W, et al. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods[J]. Eur Food Res Technol, 2002, 214(2): 143-147.
- [11] Gaikwad P, Barik A, Priyadarsini KI, et al. Antioxidant activities of phenols in different solvents using DPPH assay[J]. Res Chem Intermed, 2010, 36(9): 1065-1072.
- [12] Zheng WF, Dai YC, Sun J, et al. Metabonomic analysis on production of antioxidant secondary metabolites by two geographically isolated strains of *Inonotus obliquus* in submerged cultures[J]. Mycosystema, 2010, 29(6): 897-910.
- [13] Solov'eva TF. Isolation of dehydrocyclopeptin from *Penicillium cyclopium*[J]. Mikrobiologiya, 1992, 61: 395.
- [14] 郭志勇, 黄忠京, 温露, 等. 三种红树林内生真菌的环肽类次级代谢产物的研究[J]. 中药材, 2007, 30(12): 1526-1529.

## 稿件书写规范

### 论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写  $x$ , 不用大写  $X$ , 也不用  $Mean$ 。标准差用英文小写  $s$ , 不用  $SD$ 。标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ , 不用  $SE$ 。 $t$  检验用英文小写  $t$ 。 $F$  检验用英文大写  $F$ 。卡方检验用希文小写  $\chi^2$ 。相关系数用英文小写  $r$ 。样本数用英文小写  $n$ 。概率用英文大写  $P$ 。