

# 松针褐斑病菌毒素 LA<sup>-</sup> 的分离纯化及其化学结构<sup>\*</sup>

杨 斌<sup>1</sup>, 刘吉开<sup>2</sup>, 叶建仁<sup>1</sup>, 包 宏<sup>1</sup>, 董泽军<sup>2</sup>

(1. 南京林业大学, 江苏 南京 210037; 2. 中科院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

**摘 要:**松针褐斑病 (*Lecanosticta acicola*) 是中国南方松树上的一种重要病害。松针褐斑病菌的代谢产物中含有可致松针萎蔫的有毒物质, 经 Rp-18 柱反复分离松针褐斑病菌的次生代谢产物, 获得有活性的黄色固体物质, 采用丙酮结晶和重结晶纯化得到一无色针状晶体, 生测有活性, 记为 LA<sup>-</sup>。高效液相检测表明: LA<sup>-</sup> 为一纯物质。采用质谱、红外光谱、核磁共振等波谱手段分析可知: LA<sup>-</sup> 分子量为 118, 其化学组成为 C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S, 分子结构为 CH<sub>3</sub>COSCOCH<sub>3</sub>。

**关键词:**松针褐斑病菌; LA<sup>-</sup> 毒素; 分离; 纯化; 化学结构

中图分类号: S688

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 2006(2001)03 - 0021 - 05

## Studies on the Separation, Purification, Structure of LA<sup>-</sup> Toxin Producing by Brown Spot Needle Blight Fungus (*Lecanosticta acicola*)

YANG Bin<sup>1</sup>, LIU Ji-kai<sup>2</sup>, YE Jian-ren<sup>1</sup>, BAO Hong<sup>1</sup>, DONG Ze-jun<sup>2</sup>

(1. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Kunming Institute of Botany Academia Sinica, Kunming 650204, China)

**Abstract:** Brown spot needle blight is one of important pine diseases in South China. The pathogen fungus (*Lecanosticta acicola*) could produce toxic substances to make the needle wilt. Rp-18 reversed-phase silica gel column was repeatedly used to separate crude LA<sup>-</sup> toxins. One colorless needle crystal was obtained. It is a phytotoxic substance named LA<sup>-</sup>. HPLC analysis indicated LA<sup>-</sup> was a pure compound. The molecular weight and molecular formula were determined by FAB-MS and HRFAB-MS as 118 and C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S respectively. According to IR, MS, NMR spectra data, the structure of LA<sup>-</sup> was elucidated as CH<sub>3</sub>COSCOCH<sub>3</sub>.

**Key words:** *Lecanosticta acicola*; LA<sup>-</sup> toxin; Separation; Purification; Chemical structure

色谱技术是天然产物研究中应用最广泛的技术, 通过改变分离条件, 能实现许多次生代谢产物的分离和纯化。色谱条件变化很多, 概括起来, 主要可分为固定相改变和流动相改变<sup>[1]</sup>。过去对松针褐斑病菌毒素的分离采用正相硅胶作固定相<sup>[2]</sup>。祁高富用硅胶 GF<sub>254</sub> 为固定相, 用极性较小的展开剂 B (乙酸 丙酮 甲醇 苯 = 1 1 4 14) 展开时, 活性组分在薄层层析板上迁移率较小,  $R_f = 0.02$  和  $R_f = 0.08$ ; 用展开系统 H (正丁醇 水 = 7 3) 作为展开剂, 活性组分在 GF<sub>254</sub> 硅胶板上迁移率较大,  $R_f = 0.77$  和  $R_f = 0.67$ <sup>[2]</sup>。笔者用硅胶 H 作固定相, 选用氯仿作洗脱剂无法将活性物质洗下, 当选用氯仿甲醇混合液 (氯仿 甲醇 = 3 1) 很快就可以将活性组分洗下。从以上研究可以看出, 松针褐斑病菌产生的毒素物

\* 收稿日期: 2000 - 03 - 03 修订日期: 2000 - 11 - 28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870627)

作者简介: 杨 斌 (1971 - ), 男, 四川仁寿人, 南京林业大学森林资源与环境学院博士

通讯作者 (Correspondence author): 叶建仁。

质极性比较大。虽然,在过去研究中试验了几十种展开剂和洗脱剂,均未分离出致病毒素。笔者通过薄层层析和柱层析相结合,分离出两个活性组分 m 和 p,试验多种展开系统,m 和 p 均为一个点,但用高效液相色谱检测 m 和 p 分别有 3 个和 4 个峰,且各个峰能完全分开。从保留时间也可以看出 m 和 p 中均含极性较大的物质。这一系列的试验结果显示:用反相硅胶作固定相进行松针褐斑病菌毒素的分离可能会获得较好的结果。笔者采用 Rp-18 反相柱对松针褐斑病菌次生代谢产物进行反复分离,获得一具活性的纯物质 LA<sup>-</sup>,并对其化学组成和分子结构进行了分析。

## 1 材料与方 法

(1) 试验材料 供试菌株由福建沙县官庄林场患松针褐斑病的湿地松松针上分离得到。MS 培养液,每升加蔗糖 20 g 得到试验用培养液。试剂有甲醇、丙酮、氯仿(AR,天津化学试剂厂)、无水硫酸钠(上海化学试剂厂)。仪器为 Rp-18 预装柱(10bar 柱,规格:25 mm ×310 mm,德国 Bayer 公司产品)、高效液相色谱仪(Waters 公司产品)。生测材料选用湿地松幼苗(培养 2 个月左右)、紫茎泽兰(采自西南林学院校园)。

(2) 培养与初提 将分离获得的松针褐斑病菌扩大培养后,直接接种在 MS 培养液中(共培养 10 L,于 25 ℃ 下摇床振荡培养 25 d。用双层纱布滤去菌丝,得培养滤液。将培养滤液置于旋转蒸发仪(Büchi,瑞士,容量 20 L)中,50 ℃ 下抽真空旋转蒸发至干。分两次加 5 L 甲醇(经无水硫酸钠干燥过)在 40 ℃ 下振荡提取 3 h,过滤,合并甲醇溶液,用旋转蒸发仪蒸干。再分两次加入 5 L 经无水硫酸钠干燥过的氯仿甲醇混合溶液(氯仿:甲醇=3:2),滤去不溶物,经旋转蒸干得毒素粗提物。加适量蒸馏水,配成 0.5 g/mL 浓溶液,置于冰箱中保存备用。

(3) 生测 将生测液蒸干,加适量蒸馏水配成 2 mg/mL 溶液进行生测,生测方法用针刺法(用针尖在松针基部造成微小伤口,在伤口处分 3 次滴加 20~30 μL 生测液,置于培养皿中保湿培养)。记录伤害情况,其中“-”表示生测材料反应不明显,“+”表示生测材料受到伤害。

(4) 毒素的分离 取 2 mL 样品溶液从层析柱顶端缓慢加入 Rp-18 柱,使样品被固定相充分吸附,洗脱时先用蒸馏水 200 mL 冲洗,除去部分样品中的大极性糖类物质,再用 20%、30%、50%、75%、100% 甲醇溶液进行梯度洗脱,每个梯度 100 mL,调节蠕动泵,使流速为 1 mL/min,用三角瓶等体积收集洗脱液,每瓶 15 mL,按顺序编号,多次层析合并相同序号的收集液生测。将生测有活性的收集液合并,蒸干加少许蒸馏水配成浓溶液,用 Rp-18 柱再分离一次,梯度洗脱液选用 5%、10%、15%、20%、25%、30% 甲醇溶液,每个梯度 150 mL,用三角瓶收集,每瓶 15 mL,并编号,收集完后分别蒸干,加水配成 2 mg/mL 溶液,生测。

(5) 毒素的纯化 将生测有活性的 14、15 号瓶中的收集液用旋转蒸发仪蒸干,加入经无水硫酸钠干燥过的热丙酮少量,使黄色物质充分溶解成饱和溶液,在室温下挥发去部分丙酮后有物质结晶。将析出晶体转移出来,再用丙酮进行重结晶,得无色针状晶体,将晶体和结晶母液分别用于生测。

(6) 毒素的纯度检验 分别用薄层层析和高效液相色谱对所得毒素物质进行纯度检验。将 LA<sup>-</sup>溶于少许甲醇中,用毛细管点样于 GF254 薄层层析板和 Rp-18 反相硅胶板上,再分别用氯仿甲醇(3:1)和 15% 甲醇水溶液展开,展开后分别在 254 和 365 nm 的紫外光下观察,另外用碘和硫酸显色。根据过去的研究结果,活性物质组极性大,最大吸收在 210 nm<sup>[3]</sup>,故色谱条件为 486UV 检测器,检测波长 210 nm,进样量 5 μL,C18 柱(规格:4 mm ×150 mm),Waters Millennium 2010 色谱管理系统,运行时间 18 min,流动相为甲醇/水梯度洗脱。

(7) 分子量测定 试验用仪器为 VG Autospec 3000 型质谱仪(Beckman),分别用电子轰击法(EI<sup>+</sup>)和快原子轰击法(FAB)测 LA<sup>-</sup> 分子量,用高分辨质谱精确测定 LA<sup>-</sup> 分子量,计算其化学组成。

(8) 核磁共振谱(NMR) <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C 核磁共振谱(NMR)由 Bruker 公司生产的 Amr-400 型波谱仪测定。氘化水(D<sub>2</sub>O)为溶剂,TMS(四甲基硅烷)作内标。

(9) 红外光谱 (IR) 试验用仪器为 Perkin-Elmer-577 型红外光谱仪, 采用 KBr 压片制样。

## 2 结果与分析

松针褐斑病菌培养 25 d 后, 培养液呈黄褐色, 并产生大量白色菌丝团, 菌丝团表面可见许多黑色小点, 即病菌产生的分生孢子器。滤去菌丝, 蒸干, 粗提后得 25 g 粗提物。粗提物为黄褐色粘稠物, 毒素粗提过程中, 有大量无色针状晶体从甲醇浓缩液中析出, 这些晶体经甲醇结晶和重结晶后得到一纯化化合物, 经过多次生测均显示无活性, 后来经质谱分析证实, 该化合物为糖醇, 分子式为  $C_6H_{14}O_6$ , 由于没有致萎活性, 故未作深入研究。

松针褐斑病菌粗提物用 Rp-18 柱反相柱层析时, 水洗看不见黄色样品带有分离现象。加大甲醇含量, 洗脱能力大大提高, 可见黄色样品带逐渐被分离成多个整齐黄色色带。因此, 不论从色带数目上还是从色带整齐程度上考虑, 用 Rp-18 反相柱分离松针褐斑病菌毒素效果均较好。考虑到毒素物质不一定有颜色, 故没有按色带顺序收集洗脱液, 而是等体积收集洗脱液。研究中一次柱层析共收集 35 瓶洗脱液。照此方法重复多次, 合并相同瓶号的收集液, 蒸干, 生测。

生测结果表明: 第 1 次柱层析后 6~11 号瓶生测有活性, 第 7、8 两瓶干物质含量最多, 活性最强。有生物活性的收集液合并蒸干后得黄褐色粘稠物。从生测结果可看出, 用 30% 甲醇液可将毒素完全洗下来。因此, 第 2 次柱层析时选用 30% 甲醇溶液作为最大极性的洗脱梯度, 从 5% 甲醇溶液开始, 每个梯度增加 5% 甲醇。期望洗脱梯度进一步细化, 能将第 1 次洗脱下来的活性组分分开。第 2 次柱层析共收集到 37 瓶收集液。第 2 次柱层析生测显示第 13~17 号瓶有活性, 其中 14、15 号瓶蒸干后为黄色固体物质且含量较多, 有结晶的可能, 可采用结晶和重结晶方法纯化。考虑到 14、15 号瓶蒸干后有较多黄色固体物质, 且有生物活性, 其他 13、16、17 号瓶虽有生物活性, 但含量少, 为粘稠状物。因此, 先采用结晶和重结晶方法分离 14、15 号瓶中物质, 先获得易结晶的物质, 然后分析 13、16、17 中的化学成分。生测证明析出的结晶物质和结晶母液均有活性。无色晶体标为 LA<sup>-</sup>。后又合并 13、16、17 号瓶及丙酮结晶母液, 生测有活性, 蒸干后进行第 2 次柱层析, 但因干物质含量少, 难以进行第 2 次分离, 未能再从中分离出其他活性物质。经丙酮结晶和重结晶后获 17 mg 无色针状晶体, 生测晶体及结晶母液均具活性 (图 1)。在 GF<sub>254</sub> 薄层层析板和 Rp-18 硅胶板上点样

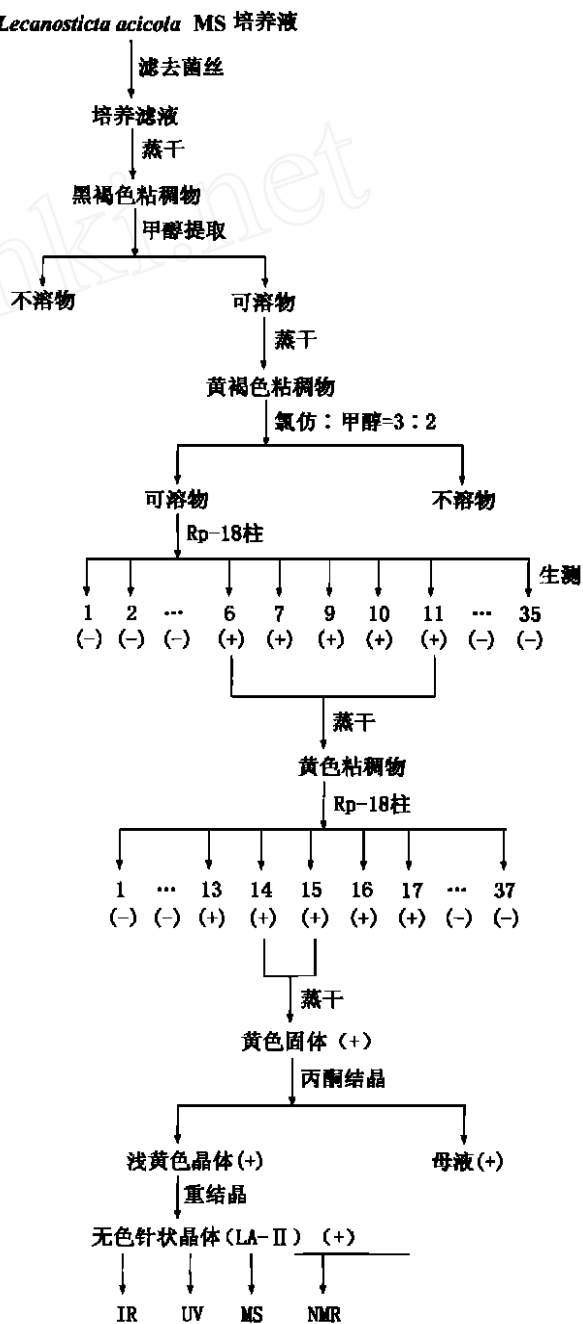
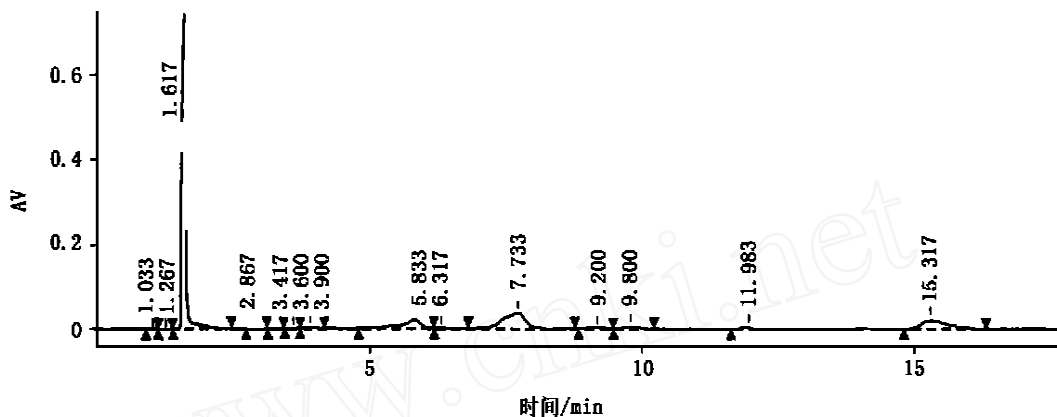


图 1 LA<sup>-</sup> 的提取分离流程图

Fig. 1 A procedure used for the separation and purification of LA<sup>-</sup>

"+" 表示生测有活性; "-" 表示生测无活性

后,分别用氯仿甲醇、15%甲醇水溶液展开。 $LA^-$  展开后挥去展开剂,在 254 nm 和 365 nm 下观察无荧光。碘也不能使  $LA^-$  显色。喷洒硫酸后加热,在 GF254 薄层层析板和 Rp-18 反相硅胶板上均出现一个淡褐色斑点, $R_f$  值分别为 0.25 和 0.73。高效液相显示:210 nm 检测波长下仅有一个主要峰,保留时间为 1.617 min,峰形如图 2 所示。综合薄层层析和高效液相色谱检验的结果,基本上可以认为  $LA^-$  为一较纯的化合物。

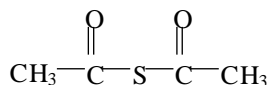
图 2  $LA^-$  的高效液相图谱Fig. 2 HPLC spectrum of  $LA^-$ 

质谱 FAB-MS, EI+MS 均显示  $LA^-$  的分子量为 118。高分辨质谱(HRFAB-MS)精确测得(M-1)分子量为 116.996 174。其可能的元素组成为  $C_4H_6O_2S$ (计算值为 116.997 654)或  $C_7H_2O_2$ (计算值为 117.001 026)。

$^1H$ NMR 谱显示只有一个  $-CH_3$ (2.65)且  $-CH_3$  附近没有质子与之耦合。

$^{13}C$ NMR 谱显示有一个  $-CH_3$ (31.53),无  $-CH_2-$  基团,有  $\begin{matrix} \diagup \\ C=O \\ \diagdown \end{matrix}$  (179.82)。

结合 MS, NMR 分析可知  $C_4H_6O_2S$  这个分子组成是正确的,因为 NMR 显示有一个  $-CH_3$ ,分子中氢原子数应大于 3,  $C_7H_2O_2$  这一化学组成明显不合理。并且根据 MS, NMR 推测该化合物可能为一对称结构,即有 2 个  $\begin{matrix} \diagup \\ C=O \\ \diagdown \end{matrix}$  和 2 个  $CH_3$ ,其化合物分子结构为  $CH_3COSCOCH_3$ ,根据这一分子结构可解释 EIMS 图谱中的 2 个主要碎片峰  $m/e$  为 74 和 89。其中,74 可能是  $LA^-$  分子失去  $-COCH_3$  后产生的,89 则可能为  $LA^-$  失去 2 个  $CH_3$  产生。从分子结构看,这种裂解方式是合理的,证明推测的分子式正确,IR 中出现一个  $\begin{matrix} \diagup \\ C=O \\ \diagdown \end{matrix}$  ( $1699\text{ cm}^{-1}$ ) 峰又从另一个侧面找到该化学结构的一个证据, $2934\text{ cm}^{-1}$  处有一个强宽峰,可能指示  $CH_3$  存在,综合各种图谱分析认为: $LA^-$  的分子结构为:



### 3 结 语

过去研究曾推测,松针褐斑病菌致病活性物质应是分子量较小的非蛋白质类物质<sup>[4~6]</sup>。笔者利用 Rp-18 柱反复柱层析,从松针褐斑病菌 MS 培养液中分离到一个分子量为 118 的含硫化合物,证实过去的推测是正确的。活性物质在反相硅胶柱上吸附力差,易被低浓度甲醇溶液洗脱下来,这一特点与大极性物质的特性是一致的。祁高富在硅胶 GF254 薄层层析板上的研究表明:松针褐斑病菌致病毒素至少存在 2 种物质,用展开系统 A 和 C 进行两次薄层层析分离后分别获得  $R_f = 0.77$ ,  $R_f = 0.67$  的 2 个活性组分。笔者在研究中也分离到 m 和 p 两个活性组分,HPLC 显示 m 和 p 各含 3 个和 4 个峰。且保

留时间(Rt)不完全一致,这一结果也显示松针褐斑病菌可能有多个活性成分。该研究中仅获得一个活性物质 LA<sup>-</sup>,说明松针褐斑病菌培养液中可能还有其他活性物质还未被分离出来。有些生物活性物质含量低,在分离过程中易丢失;有些生物活性物质由多个化合物组成,多个化合物协同作用造成植物伤害,当这些化合物完全分离时,可能导致某些化合物活性丧失或活性减弱,这样以生测为导向的分离方法就难以完全检测出这些活性物质。因此,在今后松针褐斑病菌毒素研究中,不但要随时进行活性追踪,而且要注意被分离出来的组分活性变化,确保生物活性物质不在分离过程中损失(丢失)。

LA<sup>-</sup> 经纯化后仍有活性,但在 254 nm 和 365 nm 紫外光下无荧光,遇碘不显色,喷洒硫酸后加热呈淡褐色,在 210 nm 紫外光下,LA<sup>-</sup> 经高效液相检测出现单一峰,证明 LA<sup>-</sup> 在 210 nm 处有吸收,这与已有的研究结果一致<sup>[6]</sup>。此研究加深了对松针褐斑病菌毒素性质的认识,也说明在用薄层层析分离真菌毒素时不仅应当注意生测有荧光部分的活性,对那些无荧光的部分也应加以重视。实际上很多真菌毒素在 254 nm 和 365 nm 下都是无紫外吸收或紫外吸收极弱。比如草酸毒素和温特曲霉菌 (*Aspergillus wentii*) 产生的毒素 1-氨基-2-硝基戊烷酸导致生长失调,这种毒素在 254 nm 和 365 nm 下紫外吸收都较弱<sup>[7]</sup>。

用 Rp-18 反相柱分离极性较大的化合物常能取得较好的分离效果,而且通过水洗脱可除去部分糖类物质,减少糖对目标物质的影响。但由于 Rp-18 柱柱径小,进样量相对较小,不宜用于毒素物质的粗分离,在分离物达到一定纯度时选用该柱进行纯化效果会更好。

通过质谱(MS)、核磁共振谱(<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR)和红外光谱(IR)确定活性物质 LA<sup>-</sup> 的化学组成为 C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S,分子式为:CH<sub>3</sub>COSCOCH<sub>3</sub>,属一对称结构的化合物。目前发现含硫的天然产物多来自于海洋生物,在陆生真菌中发现含硫活性化合物,对于从化学角度阐明海洋生物与陆生生物的关系有一定的意义。Youla S 等人总结过去对含硫化合物的研究指出:含硫化合物在生物体中通常不是主要的生物活性物质,但具有模仿和加强其他生物活性物质的功能,若真如此,除 LA<sup>-</sup> 外,松针褐斑病菌可能还有活性更强或意义更大的化合物。

关于 LA<sup>-</sup> 的其他一些理化性质及作用机制还有待进一步研究。该研究从松针褐斑病菌 MS 发酵液中分离出一小分子致毒活性物质,虽然还不能完全阐明它的致病因子和致病机制,但肯定了过去认为松针褐斑病菌能产生致病毒素的推测,这对认识该病原菌的致病机理有非常积极的理论意义。

## 参 考 文 献

- [1] 徐任生.天然产物化学[M].北京:科学出版社,1993.
- [2] 祁高富.松针褐斑病菌致病毒素研究[D].南京:南京林业大学,1998.
- [3] 杨 斌.松针褐斑病菌毒素的分离及紫外吸收特性研究[D].南京:南京林业大学,2000.
- [4] Huang Z Y, Smalley E B, Li C D. Isolation of a phytotoxin from *Mycosphaerella dearnessii*, the causal agent of brown spot needle blight of pine [J]. *Phytopathology*, 1991, 81(10):1 026.
- [5] 叶建仁,谢春霞,王永银.松针褐斑病致病机制研究[J].林业科学研究,1998,11(3):243-248.
- [6] 祁高富,叶建仁,包 宏.松针褐斑病菌毒素的确定及其基本性质研究[J].南京林业大学学报,1999,23(4):17-21.
- [7] 海蒂弗斯 R,威廉斯 P H.植物病理生理学[M].朱 有,宋佐衡,傅淑云,等.北京:农业出版社,1991.272-345.

(责任编辑 朱 凯)