

南海红树林内生真菌 *Aspergillus* sp. 9H 次级代谢产物的研究*

王艳磊, 蓝雄, 黄华容, 张焜
(广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: 对南海红树林内生真菌 *Aspergillus* sp. 9H 的次级代谢产物进行研究。利用土豆培养基对菌种进行培养, 综合采用多种柱层析技术从 *Aspergillus* sp. 9H 的次级代谢产物中分离得到了 5 个单体化合物, 运用质谱、核磁等现代波谱技术鉴定其结构分别为 brefeldin A (1), methoxyvermistatin (2), 6-demethylvermistatin (3), purpurester A (4) 和 十一烷酸甘油酯 (5)。其中化合物 2, 3, 4 均为首次从曲霉属海洋真菌中分离得到。

关键词: 红树林; 内生真菌; 次级代谢产物

中图分类号: 0629 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2015) 04-0099-03

Secondary Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus* sp. 9H in the South China Sea

WANG Yanlei, LAN Xiong, HUANG Huarong, ZHANG Kun

(School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Seven compounds, including brefeldin A (1), methoxyvermistatin (2), 6-demethylvermistatin (3), purpurester A (4), and glyceroll-hendecanoate (5), were isolated from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 9H, obtained from the Kandeliacandel (Linn.) Druce, collected from Yangjiang, Guangdong. Their structures were identified through mass analysis and NMR spectroscopy. Compounds 2, 4, 5 were isolated from marine fungus *Aspergillus* sp. for the first time.

Key words: mangrove; endophytic fungus; secondary metabolites

内生真菌是指在宿主植物组织内生存并完成生活周期的真菌, 它与宿主植物协同进化、互惠共生, 具有重要的生物学功能, 红树林生长在热带, 亚热带的海岸潮间带, 是陆地与海洋的过渡地带, 特殊的生态环境使得生长在其组织内的内生真菌能代谢出丰富的、具有特殊化学结构的代谢产物, 已成为新型药物的又一重要来源^[1-5]。笔者对红树林曲霉属真菌 9H 的次级代谢产物进行研究, 以期获得结构新颖, 药理活性独特的化合物。从中分离得到了 5 个单体化合物, 分别鉴定为: brefeldin A

(1), methoxyvermistatin (2), 6-demethylvermistatin (3), purpurester A (4) 和 十一烷酸甘油酯 (5)。化合物 2, 3, 4 均为首次从该属真菌中分离得到。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

核磁共振波谱仪 Bruker AVANCE 400, Bruker 公司; 电子轰击电离质谱仪 - 低分辨, 美国 Thermo 公司; 日本岛津 LC-20A 半制备高效液相色谱

* 收稿日期: 2015-01-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21102020)

作者简介: 王艳磊 (1988 年生), 男; 研究方向: 天然有机化学; 通讯作者: 黄华容; E-mail: hrhuang@gdut.edu.cn

谱; 薄层层析板 (GF₂₅₄) 和柱层析硅胶 (200 ~ 300) 购自青岛海洋化工厂; C₁₈反相硅胶 (40 ~ 75 μm), Fuji Silysia Chemical Ltd; 凝胶 Sephadex LH-20 (18 ~ 110 μm), A-mersham Biosciences; 其他试剂均为国产分析纯。

发酵培养基为土豆液体培养基: 土豆 200 g · L⁻¹ (土豆去皮, 切成小块, 煮沸 30 min, 过滤, 取滤液)、葡萄糖 10 g · L⁻¹、海盐 3 g · L⁻¹。

1.2 菌种

红树林内生真菌 *Aspergillus* sp. 9H 采自广东阳江红树林秋茄根部, 现保存于中山大学化学与化学工程学院。

1.3 菌株发酵培养

1 L 三角瓶, 内装土豆培养液 300 mL, 经 121 °C (0.1 mPa) 高温灭菌 30 min, 冷却后接种。共接种 100 L, 25 °C 静置培养 30 d。

1.4 提取分离

发酵液用纱布过滤, 菌体和发酵液分别收集。发酵液 45 °C 浓缩至 3 L, 乙酸乙酯萃取 3 次; 菌体晒干, 甲醇浸泡 3 次。将萃取物和浸提物混合后上硅胶柱, 以石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱, 收集各组分, 再经过反复柱层析、HPLC、重结晶纯化等操作, 从该菌株的次级代谢产物中分别得到化合物 **1** (500 mg), **2** (13 mg), **3** (15 mg), **4** (17 mg) 和 **5** (15mg)。

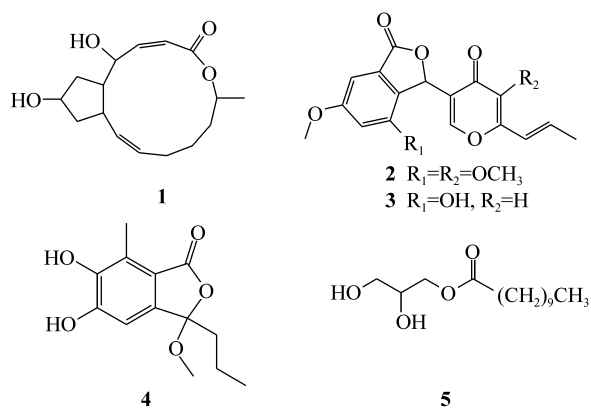


图 1 化合物 **1**, **2**, **3**, **4**, **5** 的结构式

Fig. 1 The structure of compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5**

2 结构鉴定

1) 化合物 **1**: 无色晶体, ESI-MS m/z 280 [M + H]⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5.70 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H - 2), 7.38 (1H, dd, $J = 2.5$, 15.5 Hz, H - 3), 4.86 (1H, dd, $J = 5.8$, 10.7 Hz,

H - 4), 4.33 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H - 4a), 2.35 (1H, s, H - 5), 1.94 (2H, m, H - 6a), 1.74 (2H, m, H - 6b), 4.10 (1H, dd, $J = 9.0$, 4.6 Hz, H - 7), 4.91 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H - 7a), 1.72 (2H, m, H - 8a), 1.47 (2H, m, H - 8b), 2.35 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H - 9), 5.29 (1H, dd, $J = 15.0$, 9.7 Hz, H - 10), 5.70 (1H, dd, $J = 10.4$, 4.3 Hz, H - 11), 1.94 (2H, m, H - 12a), 1.72 (2H, m, H - 12b), 1.83 (2H, m, H - 13a), 0.87 (2H, m, H - 13b), 1.85 (2H, m, H - 14a), 1.45 (2H, m, H - 14b), 3.98 (1H, s, H - 15), 1.19 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H - 16); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 166.3 (C - 1), 130.6 (C - 2), 151.6 (C - 3), 72.7 (C - 4), 44.4 (C - 5), 76.1 (C - 15), 31.9 (C - 6), 71.9 (C - 7), 34.26 (C - 8), 52.2 (C - 9), 136.6 (C - 10), 117.7 (C - 11), 41.4 (C - 12), 26.8 (C - 13), 43.3 (C - 14), 21.0 (C - 16)。以上数据与文献 [6] 对照一致, 鉴定该化合物为 brefeldin A。

2) 化合物 **2**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z 385 [M + H]⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.93 (1H, s, H - 2'), 6.82 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H - 5), 6.91 (2H, m, H - 7), 6.58 ~ 6.61 (1H, m, H - 1''), 6.58 ~ 6.61 (1H, m, H - 2''), 6.32 (1H, s, H - 3), 3.92 (3H, s, H - 10), 3.84 (3H, s, H - 11), 3.82 (3H, s, H - 12), 1.94 (1H, dd, $J = 2.8$, 2.0 Hz, H - 3''); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 170.4 (C - 1), 75.1 (C - 3), 154.8 (C - 4), 174.0 (C - 4'), 105.7 (C - 5), 143.5 (C - 5'), 164.1 (C - 6), 156.2 (C - 6'), 155.5 (C - 2'), 135.4 (C - 2''), 100.0 (C - 7), 130.6 (C - 3a), 128.8 (C - 7a), 56.7 (C - 8), 56.7 (C - 9), 60.8 (C - 10), 124.4 (C - 3'), 119.7 (C - 1'), 19.2 (C - 3'')。以上数据与文献 [7 - 8] 对照一致, 鉴定该化合物为 methoxyvermistatin。

3) 化合物 **3**: 白色粉末, ESI-MS m/z 314 [M + H]⁺. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.95 (1H, s, H - 5'), 6.30 (1H, s, H - 3), 6.75 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H - 5), 6.83 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H - 7), 3.91 (3H, s, H - 8), 6.20 (1H, s, H - 5'), 6.24 (1H, dq, $J = 15.6$, 2.0 Hz, H - 1''), 6.78 (1H, dq, $J = 7.0$, 15.6 Hz, H - 2''), 1.91 (1H, dd, $J = 7.0$, 2.0 Hz, H - 3''); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 172.7 (C - 1), 76.2 (C - 3), 156.7 (C - 4), 106.0 (C - 5), 162.4 (C - 6), 102.9 (C

-7), 127.0 (C-3a), 130.1 (C-7a), 157.3 (C-2'), 124.0 (C-3'), 179.4 (C-4'), 113.4 (C-5'), 164.9 (C-6'), 124.0 (C-1'), 135.0 (C-2''), 56.3 (C-8), 18.9 (C-3'')。以上数据与文献 [9-10] 对照一致, 鉴定该化合物为 6-demethylvermistatin。

4) 化合物 4: 白色固体, ESI-MS m/z 252 $[M+H]^+$ 。 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 2.90 (3H, s, H-3'), 6.70 (1H, s, H-4), 2.26 (3H, s, H-7'), 2.05 (2H, m, H-8), 0.99 ~ 1.21 (2H, m, H-9), 0.80 (3H, dd, $J=7.4, 7.3$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 168.9 (C-1), 109.7 (C-3), 50.9 (C-3'), 121.8 (C-3a), 108.4 (C-4), 151.6 (C-5), 159.1 (C-6), 127.5 (C-7), 9.8 (C-7'), 115.0 (C-7a), 39.1 (C-8), 17.2 (C-9), 14.5 (C-10)。以上数据与文献 [11] 对照一致, 鉴定该化合物为 *purpurester A*。

5) 化合物 5: 淡黄色固体, ESI-MS m/z 283 $[M+Na]^+$ 。 1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ : 4.24 (1H, m, H-1a), 4.21 (1H, m, H-1b), 3.94 (1H, m, H-2), 3.72 (1H, m, H-3a), 3.60 (1H, m, H-3b), 2.35 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H_2 -2'), 0.90 (3H, t, $J=7.2$ Hz, H_3 -11'); ^{13}C NMR (d_6 -DMSO, 100 MHz) δ : 65.2 (C-1), 70.8 (C-2), 63.7 (C-3), 174.6 (C-1'), 34.2 (C-2'), 14.1 (C-11')。以上数据与文献 [12] 对照一致, 鉴定该化合物为十一烷酸甘油酯。

3 讨论

本文首次研究了一株红树林内生真菌 *Aspergillus* sp. 9H 的次级代谢产物, 从该菌株的土豆培养液中分离得到了 5 个单体化合物: brefeldin A (1), methoxyvermistatin (2), 6-demethylvermistatin (3), *purpurester A* (4) 和十一烷酸甘油酯 (5)。文献报道^[13-14] 化合物 1 能有效抑制蛋白质由内质网向高尔基体的转运过程, 此外还具有抗真菌、抗病毒、抗有丝分裂、抗肿瘤等生物活性, 是一种新型抗肿瘤抗生素, 是当前抗癌药物开发、研究的一个热点, 且化合物 1 在菌株 9H 土豆发酵液中的产率高达 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此, 该菌株具有较高的应用价值; 化合物 2, 3 和 4 有报道从真菌 *Guignardia* sp. 和 *Penicillium* sp. 的代谢产物中发现过, 但在 *Aspergillus* sp. 的代谢产物中尚属首次发现, 且化合物 4 具有一定的抗 H1N1 病毒的活性^[15]。海洋真

菌 9H 次级代谢产物的研究结果为开发南海微生物资源提供了一定的参考依据。

参考文献:

- [1] 洪葵. 红树林放线菌及其天然产物研究进展[J]. 微生物学报, 2013, 53(11):1131-1141.
- [2] 张磊, 吴莺, 王菲, 等. 红树林植物的研究进展[J]. 海峡药学, 2014, 26(4):11-16.
- [3] 蒋莲秀, 莫刚, 戴支凯, 等. 红树林放线菌生物多样性及其代谢产物的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(10):158-163.
- [4] 曹启民, 郑康振, 陈耿, 等. 红树林生态系统微生物学研究进展[J]. 生态环境, 2008, 17(2): 839-845.
- [5] 林鹏. 中国红树林研究进展[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2001, 40(2): 593-599.
- [6] 李海燕, 黄容, 卿晨, 等. 法夏内生菌株 D126 产细胞毒活性物质布雷菲德菌素 A 的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(1): 26-29.
- [7] XIA X K, HUANG H R, SHE Z G, et al. Structural and biological properties of vermistatin and two new vermistatin derivatives isolated from the marine-mangrove endophytic fungus *Guignardia* sp. NO. 4382 [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2007, 90(1): 1926-1933.
- [8] LIU Z M, XIA G P, CHEN S H, et al. Eurothiocin A and B, sulfur-containing benzofurans from a soft coral derived fungus *Eurotium rubrum* SH-823 [J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(6): 3669-3680.
- [9] XIA X K, LIU F, SHE Z G, et al. 1H and ^{13}C NMR assignments for 6-demethylvermistatin and two penicillide derivatives from the mangrove fungus *Guignardia* sp. (No. 4382) from the South China Sea [J]. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2008, 46(7): 695-702.
- [10] LIU Y Y, XIA G P, LI H X, et al. Vermistatin derivatives with α -glucosidase inhibitory activity from the mangrove endophytic fungus *Penicillium* sp. HN29-3B1 [J]. *Planta Medica*, 2014, 80(11): 912-915.
- [11] CHEUNG R C F, WONG J H, PAN W L, et al. Antifungal and antiviral products of marine organisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 3475-3494.
- [12] 邱敏, 谢瑞生, 史或, 等. 植物内生真菌抗肿瘤药物研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(1): 198-201.
- [13] 薛泽, 王亚军, 郑裕国. 新型抗肿瘤抗生素布雷菲德菌素 A 的研究进展[J]. 科技通报, 2010, 26(4): 538-541.
- [14] 林生, 张中晓, 沈云亭, 等. 菊叶千里光乙酸酯部位化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(9): 1140-1143.
- [15] WANG H, WANG Y, WANG W, et al. Anti-influenza Virus Polyketides from the Acid-Tolerant Fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21 [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(7):2017-2021.