

海百合 *Comanthina schlegeli* 共附生真菌 *Alternaria brassicae* 93 次级代谢产物研究*

李永芳¹, 王宏维², 许佳怡¹, 李 静¹, 刘 岚¹

(1. 中山大学海洋学院, 广东 广州 510275;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 利用硅胶、Sephadex LH-20 凝胶柱层析和高效液相色谱(HPLC)等方法对采自湛江海百合共附生真菌 *Alternaria brassicae* 93 的次级代谢产物进行分离纯化, 根据化合物的理化性质、波谱数据以及与文献数据对照的方法确定化合物的结构。从海百合共生真菌 *Alternaria brassicae* 93 的次级代谢产物中分离得到 5 个化合物, 分别鉴定为 clavatul (1)、3*R*, 14*S*-ochratoxin A (2)、3*R*, 14*S*-ochratoxin B (3)、chaetoquadrin F (4)、ent-cycloechinulin (5)。化合物 1, 2, 3, 4, 5, 均为首次从海洋真菌中得到。

关键词: 海百合; 共附生真菌; 次级代谢产物

中图分类号: 0629.9 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2015)04-0075-05

The Secondary Metabolites of the Crinoid(*Comanthina schlegeli*) Epipsymbiosis Fungus *Alternaria brassicae* 93

LI Yongfang¹, WANG Hongwei², XU Jiayi¹, LI Jing¹, LIU Lan¹

(1. School of Marine Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Secondary metabolites of the crinoid epipsymbiosis fungus *Alternaria brassicae* 93 from South China Sea were studied. The metabolites of *Alternaria brassicae* 93 were isolated by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography and HPLC, the structures of compounds were eventually identified and confirmed on the basis of physicochemical properties, spectral data and compared with the published spectral information. Five compounds were isolated from marine fungi for the first time and their structures were identified as clavatul (1), 3*R*, 14*S*-ochratoxin A (2), 3*R*, 14*S*-ochratoxin B (3), chaetoquadrin F (4) and ent-cycloechinulin (5).

Key words: crinoid; epipsymbiosis fungus; secondary metabolites

海百合是目前现存的最古老的棘皮动物^[1], 现在通常分为两大类: 有柄海百合和无柄海百合。现存的物种中超过 80% 是无柄的海百合, 只有不到 20% 的是保留着祖先留下的有柄的海百合^[2]。海百合行动迟缓, 为了躲避敌人的进攻, 往往产生

一些具有刺激性的“化学武器”进行防御, 并且大部分的海百合都有着鲜艳的色彩, 而自然界动物鲜艳的色彩往往预示着强活性化合物, 如渔民在打鱼中误接触一些品种的海百合, 皮肤会感觉到如开水烫伤的疼痛, 因此海百合代谢产物引起科学家关

* 收稿日期: 2015-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21272286)

作者简介: 李永芳(1990年生), 女; 研究方向: 有机天然产物化学; 通讯作者: 刘岚, 李静; E-mail: cesllan@mail.sysu.edu.cn, zsulijing@163.com

注。已有文献报道,从海百合中已分离到多种抗肿瘤活性和抗菌活性的化合物^[3-5]。由于活性代谢产物在生物体中含量极低,如将活性化合物进一步开发,需要采集大量的海百合,势必造成海洋生物的生态平衡的破坏。有研究表明,一些生物体的活性代谢产物实际是由其共附生微生物产生的^[6]。海百合具有丰富柔软的羽枝,为微生物的栖息和繁殖提供了丰富的空间和可能。海百合共附生真菌及其代谢产物研究尚未见文献报道。因此,海百合共附生微生物引起了我们的关注。本研究对一株来自广东湛江徐闻珊瑚礁自然保护区的海百合纲动物许氏大羽花 (*Comanthina schlegeli*) 的共附生内生真菌 *Alternaria brassicae* 93 及其代谢产物进行了研究。最终得到了 5 个化合物 (如图 1), 经波谱技术确定了分子结构, 分别为 clavatol (1)、3*R*,14*S*-ochratoxin A (2)、3*R*,14*S*-ochratoxin B (3)、chaetoquadrin F (4)、ent-cycloechinulin (5), 本文首次研了海百合共附生真菌的代谢产物, 所获得化合物均为首次从海洋真菌中得到。

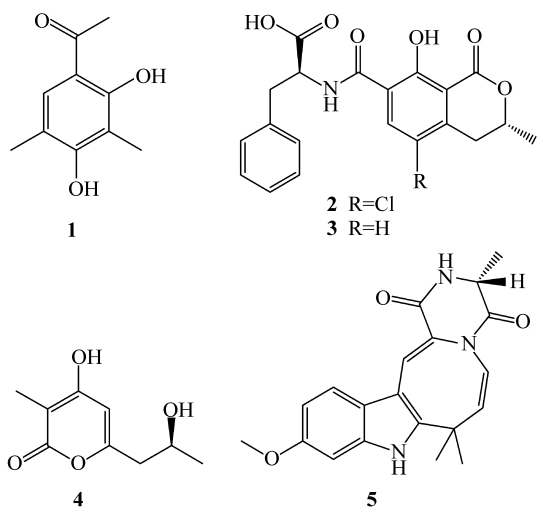


图 1 1, 2, 3, 4, 5 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of 1, 2, 3, 4, 5

1 仪器与材料

Bruker AVANCE 400 和 Bruker AVANCE 500 型核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司), LC1620 型高效液相色谱仪 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司), 高效液相色谱仪 (Agilent HP 1100), MAT95XP 型高分辨质谱仪 (美国 Thermo 公司), ZAB-HS 型双聚焦磁质谱仪 (FAB, 英国 VG 公司), X 射线粉末衍射仪 (日本理学, D-MAX

2200VPC), 旋光仪为 ADP440 型 (英国 B + S 公司)。

薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目、300 ~ 400 目) 为青岛海洋化工厂产品; Sephadex LH-20 凝胶 (GE healthcare); 研究过程中所用试剂均为广州化学试剂厂的分析纯试剂。

2 菌种来源和菌种的发酵培养

本研究组从广州湛江徐闻珊瑚礁自然保护区采样得许氏大羽花 (*Comanthina schlegeli*), 通过稀释平板法对其共生真菌进行分离纯化, 得到 13 株形态不同的共附生真菌, 对这些真菌的初提物经高效液相色谱指纹图谱分析及薄层色谱 (TLC) 分析发现 *Alternaria brassicae* 93 的次级代谢产物非常丰富, 有望从中取得活性化合物。通过对其形态特征和 16s rRNA 基因测序分析, 鉴定为芸苔生链格孢菌 (*Alternaria brassicae*)。对该菌株进行放大培养, 菌种培养液采用 PDB 液体培养基摇床培养, 发酵培养基采用大米固体培养基。大米培养基配方: 1 000 mL 三角瓶, 80 mL 大米, 80 mL 培养液 (粗海盐 30 g/L, 水溶液 pH 7.0), 经 121 °C (0.1 MPa) 高温灭菌 20 min。每瓶接种 5 mL 菌种培养液, 共接种 120 瓶。接种后的大米培养基在 28 °C 室温条件下静置培养 30 d。

3 提取与分离

用甲醇对静置培养的培养基浸泡 3 次, 过滤收集甲醇相, 经减压浓缩, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 收集乙酸乙酯相, 减压浓缩得到粗提物 (50 g)。粗提物采用硅胶 (300 ~ 400 目) 柱色谱分离, 以流动相为石油醚/乙酸乙酯体系及乙酸乙酯/甲醇体系进行梯度洗脱, 收集各极性段组分, 共 12 个组分, 其中编号为 M、N、O 的 3 个组分进行进一步分离。在石油醚/乙酸乙酯体系: $V(\text{PE}):V(\text{EA}) = 85:1$ 的极性段析出固体, 对固体进行重结晶, 得到化合物 1 (56 mg); M 组分经正相硅胶 (200 ~ 300 目) 柱色谱分离 (流动相: $V(\text{PE}):V(\text{EA})$ 为 100:0 ~ 0:100 梯度洗脱), 得五个组分 (M-1、M-2、M-3、M-4、M-5), 其中 M-2 (即化合物 2) (46.5 mg); M-4 组分经 Sephadex LH-20, ($V(\text{DCM}):V(\text{MO}) = 1:1$) 凝胶柱色谱纯化, 得到化合物 3 (34.2 mg); N 组分经正相硅胶 (200 ~ 300 目) 柱色谱 ($\varphi = 100\%$ 氯仿 - $\varphi = 5\%$ 甲醇, $\varphi = 0.1\%$ 冰醋酸), 得到 3 个组分 (A, B, C), B 组分经 Sephadex LH-20 凝胶柱色

谱 ($V(\text{DCM}) : V(\text{MO}) = 1:1$) 得到 2 个组分, 第一个组分经 HPLC ($V(\text{MO}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1:1$, $t_{\text{R}} = 35 \text{ min}$), 得到化合物 **4** (38.1 mg); 0 组分再进一步经正相硅胶 (200 ~ 300 目) 色谱柱 (流动相: $V(\text{PE}) : V(\text{EA}) = 100:0 \sim 40:60$ 梯度洗脱), 得到 5 个 (A, B, C, D, E) 组分, B 组分经 HPLC ($V(\text{MO}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 3:2$, $t_{\text{R}} = 28 \text{ min}$) 得到化合物 **5** (52.6 mg)。

4 结构鉴定

化合物 **1**: 无色针状晶体, ESI-MS m/z : 181.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6) δ : 12.96 (1H, s, $\text{H}_1 - 2'$), 8.47 (1H, s, $\text{H}_1 - 4'$), 7.52 (1H, s, $\text{H}_1 - 6'$), 2.53 (3H, s, $\text{H}_3 - 1$), 2.19 (3H, s, $\text{H}_3 - 8'$), 2.09 (3H, s, $\text{H}_3 - 7'$); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, Acetone- d_6) δ : 203.0 (C-2), 161.3 (C-2'), 160.4 (C-4'), 130.1 (C-6'), 115.6 (C-5'), 112.7 (C-1'), 110.5 (C-3'), 25.4 (C-1), 15.4 (C-8'), 7.2 (C-7')。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为 clavatul (2',4'-Dihydroxy-3',5'-dimethylacetophenone)。

化合物 **2**: 白色粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 63^\circ$, ($c = 0.35$, CD_3OD), ESI-MS m/z : 402.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{NCl}$ 。 $^1\text{H NMR}$: (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.61 (3H, d, $J = 6.45 \text{ Hz}$, H-11), 2.87 (1H, dd, $J = 11.6, 17.3 \text{ Hz}$, H-4a), 3.29 (1H, dd, $J = 3.53, 17.4 \text{ Hz}$, H-4b), 3.24 (1H, dd, $J = 7.1, 14.1 \text{ Hz}$, H-15a), 3.36 (1H, dd, $J = 5.2, 14.2 \text{ Hz}$, H-15b), 4.77 (1H, ddd, $J = 3.5, 6.3, 9.9 \text{ Hz}$, H-3), 5.09 (1H, m, H-14), 7.2 ~ 7.3 (5H, m, H-17 ~ H-21), 8.5 (1H, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-13), 8.3 (1H, s, H-6), 12.7 (1H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ : 20.7 (C-11), 32.3 (C-4), 37.4 (C-15), 54.3 (C-14), 80.0 (C-3), 110.1 (C-9), 120.3 (C-7), 123.2 (C-5), 127.3 (C-18), 128.7 (C-17, C-21), 129.4 (C-18, C-20), 135.8 (C-16), 139.0 (C-6), 141.0 (C-10), 159.1 (C-8), 163.0 (C-12), 169.8 (C-1), 175.4 (C-22)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为 3R, 14S-ochratoxin A。

化合物 **3**: 白色针状晶体, ESI-MS m/z : 369 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ 。 $^1\text{H NMR}$: (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.42 (3H, d, $J = 6.2 \text{ Hz}$, H-11), 2.87 (1H, dd, $J = 11.6, 17.0 \text{ Hz}$, H-4a), 3.10 (1H, dd, $J = 3.8, 17.4 \text{ Hz}$, H-4b), 3.24 (1H, dd, $J = 7.5,$

13.5 Hz, H-15a), 3.36 (1H, dd, $J = 5.0, 13.9 \text{ Hz}$, H-15b), 4.77 (1H, ddd, $J = 3.5, 6.3, 11.0 \text{ Hz}$, H-3), 5.09 (1H, m, H-14), 6.95 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-6), 7.2 ~ 7.3 (5H, m, H-17 ~ H-21), 8.5 (1H, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-13), 8.3 (1H, s, H-6), 12.7 (1H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ : 20.7 (C-11), 32.3 (C-4), 36.7 (C-15), 53.8 (C-14), 80.0 (C-3), 110.1 (C-9), 120.3 (C-7), 120.2 (C-5), 126.6 (C-18), 128.7 (C-17, C-21), 129.4 (C-18, C-20), 136.8 (C-16), 139.0 (C-6), 141.0 (C-10), 159.1 (C-8), 163.0 (C-12), 169.8 (C-1), 172.4 (C-22)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 经 X-ray 单晶衍射, 确定了其绝对构型为 3R, 14S-ochratoxin B (图 2)。

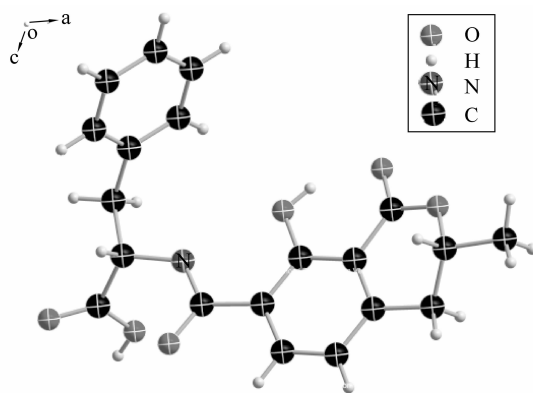


图 2 化合物 **3** 的晶体结构

Fig. 2 Crystal structure of **3**

化合物 **4**: 白色粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 40.1$ ($c = 0.24$, CD_3OD) ESI-MS m/z : 185.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.07 (1H, s, $\text{H}_1 - 5$), 4.1 (1H, m, $\text{H}_1 - 2'$), 2.54 (dd, 14.9, 7.7, H-1'), 2.60 (dd, 13.95, 5.34, H-1'), 1.87 (3H, s, H-CH₃), 1.24 (3H, d, 6.51, H₃-3'), $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ : 167.7 (C-2), 166.3 (C-4), 160.6 (C-6), 101.4 (C-5), 97.9 (C-3), 64.8 (C-2'), 42.6 (C-1'), 22.0 (C-3'), 6.9 (C-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[10]。故鉴定化合物 **4** 为 chaetoquadrin F。

化合物 **5**: 黄色针状固体, $[\alpha]_{\text{D}}^{24.3} + 12.5^\circ$ ($c = 0.16$, CDCl_3), 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$ 。ESI-MS m/z : 350.2 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.45 (1H, brs, $\text{H}_1 - \text{N}$), 7.64 (1H, d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, $\text{H}_1 - 4$), 7.60 (1H, s, $\text{H}_1 - 10$), 6.86 (1H, dd, $J = 2.1, 8.7 \text{ Hz}$, $\text{H}_1 - 5$), 6.84 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, $\text{H}_1 -$

7), 5.97 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, $H_1 - 18$), 5.83 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, $H_1 - 17$), 4.15 (1H, dq, $J = 2.3, 7.1$ Hz, $H_1 - 14$), 3.83 (3H, s, $H_3 - 23$), 1.71 (3H, s, $H_3 - 20$), 1.69 (3H, s, $H_3 - 21$), 1.54 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, $H_3 - 22$)。 ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 167.3 (C - 15), 164.8 (C - 12), 156.9 (C - 6), 145.7 (C - 2), 139.8 (C - 18), 134.1 (C - 8), 124.9 (C - 11), 124.5 (C - 9), 122.4 (C - 17), 118.7 (C - 4), 115.4 (C - 10), 110.9 (C - 5), 105.7 (C - 3), 94.9 (C - 7), 55.8 (C - 23), 51.1 (C - 14), 36.0 (C - 19), 27.3 (C - 20), 27.1 (C - 21), 18.5 (C - 22)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为 ent - cycloechinulin。

5 结果与讨论

Alternaria brassicae 93 菌落生长形态如图 3 所示。其指纹图谱如图 4 所示, 表明该菌株代谢产物丰富, 并且代谢产物主要集中在中高极性段, 为下一步的分离工作的进行提供了依据。

从海百合共附生真菌 *Alternaria brassicae* 93 中共分离得到 5 个化合物, 其中化合物 **1** 对金黄色酿脓葡萄球菌 *S. aureus*、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA 和多重耐药金黄色葡萄球菌 MDRSA 有中等程度的抑制活性^[7]; 化合物 **2** 具有一定的细胞毒性, 有强烈的肾脏毒性、神经毒性、免疫毒性, 并具有致癌、致畸、致突变性^[12]; 化合物 **4** 是一种单胺氧化酶抑制剂^[10], 而且对人类癌细胞有一定的抑制作用^[13]。化合物所显示强烈的生理活性, 表明海百合内生微生物可能为海百合生物竞争中的生物武器。



图 3 *Alternaria brassicae* 93

生长 5 d 的菌落图片 (PDA 培养基)

Fig. 3 An image of *Alternaria brassicae* 93 growth for 5 days (PDA medium)

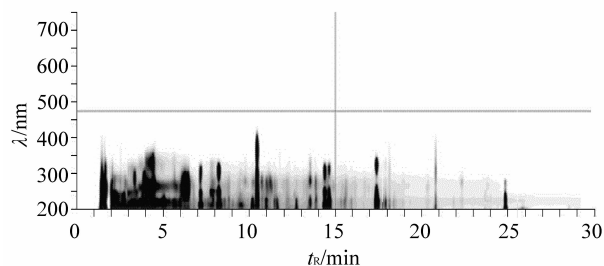


图 4 *Alternaria brassicae* 93 的指纹图谱 [85% 水和 15% 乙腈、0.1% 冰醋酸梯度洗脱至 15% 水和 85% 乙腈、0.1% 冰醋酸 (全部以 φ 计), 洗脱时间 30 min]

Fig. 4 The fingerprint of *Alternaria brassicae* 93 (85% water, 15% acetonitrile and 0.1% acetic acid gradient elution to 15% water, 85% acetonitrile and 0.1% acetic acid, elution time 30 min)

参考文献:

- [1] OMORI A, AKASAKA K, KUROKAWA D, et al. Gene expression analysis of Six3, Pax6, and Otx in the early development of the stalked crinoid *Metacrinus rotundus* [J]. Gene Expression Patterns, 2011, 11 (1/2): 48 - 56.
- [2] KITAZAWA K, OJI T. Active feeding behavior of and current modification by the sea lily *Metacrinus rotundus* (Echin-odermata; Crinoidea) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2014, 453: 13 - 21.
- [3] SHAO N, YAO G M, LENG C. Bioactive constituents from the marine crinoid *Himerometra magnipinna* [J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(6): 869 - 871.
- [4] HILAIRE V, KEMAMI W, ALEXANDER W, et al. Gymnochromes E and F, cytotoxic phenanthroperylenequinones from a deep-water crinoid, *Holopus rangii* [J]. Journal of Natural Products, 2010, 73(4): 712 - 715.
- [5] BOKESCH H R, CARTNER L K, FULLER R W, et al. Inhibition of ABCG2-mediated drug efflux by naphthopyrones from marine crinoids [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010, 20: 3848 - 3850.
- [6] ABDELMOHSEN U R, BAYER K, HENTSCHEL U. Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes [J]. Natural Product Reports, 2014, 31: 381.
- [7] YANG G H, NENKEP V N, SIWE X N, et al. An acetophenone derivative, clavatul, and a benzodiazepine alkaloid, circumdatin A, from the marine-derived fungus *Cladosporium* [J]. Natural Product Sciences, 2009, 15 (3): 130 - 133.

- 其光电性能 [J]. 合成化学, 2013, 21(2): 189 - 192.
- [11] SMRCINA M, LORENC M, HANUS V, et al. A facile synthesis of 2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaphthyl and 2,2'-diamino-1,1'-binaphthyl by oxidative coupling using copper(II) chloride [J]. Synlett, 1991: 231.
- [12] SMRCINA M, LORENC M, HANUS V, et al. Synthesis of enantiomerically pure 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl, 2,2'-diamino-1,1'-binaphthyl, and 2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaphthyl. Comparison of processed operating as diastereoselective crystallization and as second-order asymmetric transformation [J]. J Org Chem, 1992, 57: 1917 - 1920.
- [13] KORBER K, TANG W J, HU X Q, et al. A practical synthesis of 2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaphthyl (NOBIN) [J]. Tetrahedron Lett, 2002, 43: 7163 - 7165.
- [14] 杨会来, 联萘酚胺的合成及拆分研究 [J]. 杭州化工, 2006, 36(4): 12 - 14.
-
- (上接第79页)
- [8] CRAMER B, HARRER H, NAKAMURA K, et al. Total synthesis and cytotoxicity evaluation of all ochratoxin A stereoisomers [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010, 18: 343 - 347.
- [9] BREDEKAMP M W, DILLEN J L M, VAN ROOYEN P H, et al. Crystal structures and conformational analysis of ochratoxin A and ochratoxin B: probing the chemical structure causing toxicity [J]. Journal of Chemical Society, 1989, 36: 1835 - 1839.
- [10] FUJIMOTO H, NOZAWA M, OKUYAMA E, et al. Six new constituents from an ascomycete, *Chaetomium quadragulatum*, found in a screening study focused on monoamine oxidase inhibitory activity [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 51(3): 247 - 251.
- [11] ISHIKAWA K, HOSOE T, ITABASHI T, et al. No-voamauromine and ent-cycloechinulin: two new diketopiperazine derivatives from *Aspergillus novofumigatus* [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2010, 58(5): 717 - 719.
- [12] WANG H W, WANG J Q, ZHENG B Q, et al. Cytotoxicity induced by ochratoxin A, zearalenone, and α -zearalenol: Effects of individual and combined treatment [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 17: 217 - 224.
- [13] CHEN X W, LI C W, CUI C B, et al. Nine new and five known polyketides derived from a deep sea-sourced *Aspergillus* sp. 16-02-1 [J]. Marine Drugs, 2014, 12: 3116 - 3137.