

# Cladosperanol A, 海洋真菌 *Cladosporium perangustum* FS62 中一个新的二聚萘满酮

范震<sup>1,2,3</sup>, 孙章华<sup>2</sup>, 陈玉婵<sup>2</sup>, 李浩华<sup>2</sup>, 章卫民<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301; <sup>2</sup>广东省微生物研究所 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070; <sup>3</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 采用硅胶柱、凝胶柱、HPLC 等色谱技术从海洋真菌 *Cladosporium perangustum* FS62 的发酵液提取物中分离得到了 1 个化合物(1), 通过波谱数据分析 (HR-ESI-MS, 1D NMR, 2D NMR, CD) 确定该化合物为 1 个新的二聚萘满酮, 结构为 (4S, 4'S)-4, 8, 8'-trihydroxy-2, 3, 2', 3'-tetrahydro-[4', 5-binaphthalene]-1, 1'(4H, 4'H)-dione, 命名为 cladosperanol A。

**关键词:** cladosperanol A; 二聚萘满酮; 次级代谢产物; *Cladosporium perangustum*; 海洋真菌

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.003

## Cladosperanol A, a New Dimeric Tetralone from Marine-derived Fungus *Cladosporium perangustum* FS62

FAN Zhen<sup>1,2,3</sup>, SUN Zhang-hua<sup>2</sup>, CHEN Yu-chan<sup>2</sup>, LI Hao-hua<sup>2</sup>, ZHANG Wei-min<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510006, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; <sup>3</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** A new compound (1) was isolated from the fermentation broth extract of marine fungal strain *Cladosporium perangustum* FS62 by various chromatographic methods such as silica gel, reverse silica gel, Sephadex-LH20, HPLC, etc. On the basis of detailed spectroscopic analysis (HR-ESI-MS, 1D NMR, 2D NMR, CD), 1 was elucidated as a new dimeric tetralone with the structure of (4S, 4'S)-4, 8, 8'-(trihydroxy-2, 3, 2', 3'- tetrahydro-[4', 5-binaphthalene]-1, 1'(4H, 4'H)-dione, named as cladosperanol A.

**Key words:** cladosperanol A; dimeric tetralone; secondary metabolite; *Cladosporium perangustum*; marine-derived fungus

海洋拥有特殊的环境, 如高盐、弱碱性、低营养、缺氧等, 栖息于海洋环境的海洋微生物为了适应这些特殊环境, 产生了独特的代谢途径, 由此能够产生结构特异、生物活性特殊的次级代谢产物。近年来从海洋微生物中发现了大量结构新颖、活性显著的化合物, 如生物碱类、萜类、聚酮类等<sup>[1,2]</sup>。目前, 海洋微生物已经成为天然产物研究的重要资源。与其它海洋微生物相比, 海洋真菌来源的次生代谢产物不仅数量占到整个海洋微生物的一半左右, 还具有

产量大、结构和活性多样性丰富等优势, 已经成为目前海洋微生物的研究热点<sup>[3-6]</sup>。

本课题组前期对南海深海沉积物来源的海洋真菌进行活性筛选, 发现了 1 株真菌 *Cladosporium perangustum* FS62 的发酵提取物对 MCF-7 细胞株具有明显的细胞毒活性, 并对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有较强的抑制作用。为了发掘该真菌的活性代谢产物, 本课题组进一步通过现代色谱学方法对其发酵液乙酸乙酯提取物进行化学成分的分离和结构鉴定, 从中分离得到 1 个新的二聚萘满酮, 命名 cladosperanol A (图 1)。

### 1 仪器与材料

核磁共振波谱仪 500MHz, Bruker 公司;

收稿日期: 2015-11-18 接受日期: 2016-01-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31272087); 国家“863”计划 (2012AA092104); 广东省科技计划 (2014A 020217012); 广州市科技计划 (2013J4100067); 广东省海洋经济创新发展区域示范专项 (GD2012-D01-002)

\* 通讯作者 E-mail: wmzhang58@qq.com

MAT95XP HR-ESI-MS 高分辨质谱仪, Thermo 公司; API 2000 LC/MS/MS 质谱仪, MDS SCIEX 公司; UV-2600 紫外光谱仪, 日本岛津公司; JascoJ-810 圆二色光谱仪, 日本分光公司; IRAffinity-1 傅里叶变换红外光谱仪, 日本岛津公司; Anton Paar 旋光仪, 奥地利安东帕公司; 岛津制备型高效液相色谱仪 (LC-20A), 日本岛津公司; PZ1000B 旋转式大容量普通摇床, 武汉瑞华仪器设备有限公司; RE-2000 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 超净工作台, 上海恒益科技有限公司。柱色谱硅胶 (100 ~ 200 目、200 ~ 300 目);  $C_{18}$  反相硅胶 (40 ~ 75  $\mu\text{m}$ ), Fuji Silysia Chemical Ltd.; GF-高效薄层层析硅胶, 青岛海洋化工厂; 凝胶 Sephadex LH-20 (18 ~ 110  $\mu\text{m}$ ), Amersham Biosciences; YMC-pack ODS-A 制备柱 (20  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), YMC 公司; 其他有机溶剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

## 2 菌种与发酵培养

海洋真菌 FS62 于 2008 年 11 月采集自南海 995 m 深处的沉积物中分离得到, 将分离得到的菌株经总 DNA 制备, 采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3', 正向) 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3', 反向) 扩增分离菌株 rDNA ITS 区, 测序获得的序列通过 BLAST 程序在 GenBank 上进行相似性序列检索分析, 结果与菌株 *Cladosporium perangustum* MGEF8 (GenBank 登录号为 KC492451) 的相似度为 100%, 因此鉴定菌株 FS62 为 *Cladosporium perangustum* (GenBank 登录号为 KT989307), 菌种保存于广东省微生物研究所。发酵培养基为马铃薯葡萄糖 (PD) 添加海盐的液体培养基: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{MgSO}_4$  0.15%, 维生素  $B_1$  10 mg/L, 海盐 15 g/L, pH 自然。将活化后的菌株 FS62 挑取适量菌丝体接种至含 250 mL 培养液的 500 mL 三角瓶中, 28  $^\circ\text{C}$ 、120 rpm 摇床培养 5 d, 获得种子液, 将适量种子液转接到装有 250 mL 培养液的 500 mL 锥形瓶中, 培养条件与种子液相同, 培养 7 d, 共发酵 100 L。

## 3 提取与分离

100 L 发酵产物经纱布过滤得发酵液和菌丝体, 发酵液经乙酸乙酯萃取 4 次, 40  $^\circ\text{C}$  下减压浓缩得浸膏 18.0 g。浸膏通过反相硅胶柱, 以甲醇/水 (30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、

100:0) 梯度洗脱, 用薄层色谱 (TLC) 检测 (显色剂为茴香醛-浓硫酸试剂), 合并相似流分, 得到 9 个组分 (F1 ~ F9), F6 组分经 Sephadex LH20 以氯仿/甲醇 (1:1) 洗脱得到 F6-1, F6-1 经正向硅胶柱得 F6-1-1, F6-1-1 经制备 HPLC (ODS-A 制备柱, 甲醇/水 = 90/10) 纯化得化合物 **1** (2.0 mg)。

## 4 结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色固体 (甲醇),  $[\alpha]_D^{25} + 92.8$  ( $c$  0.1, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) 220 (4.37), 260 (4.09), 339 (3.74) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  3352, 2947, 2852, 1633, 1469, 1454, 1354, 1016  $\text{cm}^{-1}$ 。CD (EtOH,  $c$  0.0005) 208, 225, 347 nm ( $\Delta\epsilon$  -6.0, +15.9, -2.0); HR-ESI-MS  $m/z$  337.1086 [ $\text{M-H}^-$ ] (calcd for 337.1076), 显示其分子式为  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ , 不饱和度为 12。IR 谱显示羟基 (3352  $\text{cm}^{-1}$ ), 羰基 (1633  $\text{cm}^{-1}$ ) 和苯环 (2947  $\text{cm}^{-1}$ , 1469  $\text{cm}^{-1}$ , 1454  $\text{cm}^{-1}$ ) 吸收。 $^1\text{H}$  NMR 谱显示有 2 个不饱和氢质子 ( $\delta_{\text{H}}$  12.76 和 12.62), 5 个芳香质子 [ $\delta_{\text{H}}$  7.22 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-6),  $\delta_{\text{H}}$  6.96 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-7),  $\delta_{\text{H}}$  6.17 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'),  $\delta_{\text{H}}$  7.30 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-6') 和  $\delta_{\text{H}}$  6.85 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-7')] (表 1)。 $^{13}\text{C}$  NMR 与 DEPT135 谱显示有 2 个苯环 [ $\delta_{\text{C}}$  163.4 (C-8'),  $\delta_{\text{C}}$  162.2 (C-8),  $\delta_{\text{C}}$  147.8 (C-4a'),  $\delta_{\text{C}}$  140.9 (C-4a),  $\delta_{\text{C}}$  137.7 (C-6), ( $c$  136.7 (C-6'),  $\delta_{\text{C}}$  132.8 (C-5),  $\delta_{\text{C}}$  119.5 (C-7),  $\delta_{\text{C}}$  119.3 (C-5'),  $\delta_{\text{C}}$  117.3 (C-8a'),  $\delta_{\text{C}}$  116.6 (C-7'),  $\delta_{\text{C}}$  115.3 (C-8a)], 2 个羰基 [ $\delta_{\text{C}}$  205.1 (C-1) 和  $\delta_{\text{C}}$  204.7 (C-1')], 2 个  $\text{sp}^3$  杂化的次甲基 [ $\delta_{\text{C}}$  63.4 (C-4) 和  $\delta_{\text{C}}$  40.4 (C-4')], 4 个  $\text{sp}^3$  杂化的亚甲基 [ $\delta_{\text{C}}$  38.6 (C-2'),  $\delta_{\text{C}}$  32.2 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  31.5 (C-3') 和  $\delta_{\text{C}}$  30.4 (C-3)] (表 1)。以上数据与文献报道的已知化合物 cladosporol C<sup>[7]</sup> 相似, 不同之处是该化合物比 cladosporol C 在低场区多了 1 个活泼氢信号。由于这 2 个化合物的分子式相同, 分析上述现象的原因, 可能是因为 cladosporol C 的结构上只有 1 个酚羟基与附近的羰基形成氢键, 从而在  $^1\text{H}$  NMR 上可以显著看到 1 个活泼氢信号, 而该化合物的结构上可能有 2 个羟基分别与羰基形成氢键。因此我们初步推测该化合物的 A 部分结构羰基和羟基位置与 cladosporol C 不同。化合物 **1** 的平面结构最终通过

2D NMR 图谱(HSQC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC)得以确定(图2)。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 中的相关信号(H-6/H-7, H-5'/H-6'/H-7', H-2/H-3/H-4, H-2'/H-3'/H-4') 并比较氢谱中的耦合常数确定了化合物中的4个片段结构:C-6-C-7, C-5'-C-6'-C-7', C-2-C-3-C-4 以及 C-2'-C-3'-C-4'(图2)。在 HMBC 图谱中,质子信号 HO-8 ( $\delta_{\text{H}}$ 12.76)与 C-7, C-8, C-8a 的相关确定了该羟基与 C-8 的连接;H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  2.67)与 C-8a, C-1 的相关确定了 C-1 位羰基与 C-8a 的连接;H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  2.35)与 C-4a, C-1, H-6 ( $\delta_{\text{H}}$ 7.22)与 C-4a, C-1, C-8 以及 H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  6.95)与 C-8a, C-8, C-5 的相关最终确定了 A 部分结构片段;HO-8' ( $\delta_{\text{H}}$ 12.62)与 C-7', C-8', C-8a' 的相关确定了该羟基与 C-8' 的连接;H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  2.85)与 C-8a', C-1' 的相关确定了 C-1' 羰基与 C-8a' 的连接;H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  2.35)与 C-4a', C-1', H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.17)与 C-4a', C-4', H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  7.30)与 C-4a', C-8' 以及 H-7' ( $\delta_{\text{H}}$  6.84)与 C-8a', C-8', C-5' 的相关最终确定了 B 部分结构片段;通过在 HMBC 图谱上的 H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  4.59)与 C-5, C-6, C-4a 的相关确定化合物 **1** 中 A 和 B 部分的连接位置是 C5-C4'(图2)。

化合物 **1** 的相对构型通过 NOESY 图谱确定。在 NOESY 谱中,  $\delta_{\text{H}}$  5.25 (1H, s, H-4) 与  $\delta_{\text{H}}$  4.59 (1H, dd,  $J = 10.7, 4.7$  Hz, H-4') 的相关显示分别代表2个手性中心的 H-4 和 H-4' 是处于同一朝向(图2)。化合物 **1** 的绝对构型通过与文献比对 CD 数据确定。文献<sup>[7,8]</sup>中指出 cladosporol C 在 340 nm 附近负的 Cotton 效应表明 C-4 位的 *R* 构型, 2 个强的分裂的 Cotton 效应(206 附近负的和 230 nm 附近正的 Cotton 效应)表明 C-4' 位的 *R* 构型。在化合物 **1** 的 CD 谱中, 340 nm, 230 nm 和 206 nm 分别显示正的, 负的和正的 Cotton 效应, 因此化合物 **1** 在 C-4 与 C-4' 分别为 *S* 与 *S* 构型。经文献检索, 该化合物为新化合物, 命名为 cladosperanol A。化合物 **1** 相关详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 ([www.trcw.ac.cn](http://www.trcw.ac.cn))。

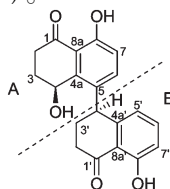


图1 化合物 **1** 的结构

Fig. 1 Chemical structure of **1**

表1 化合物 **1** 的  $^1\text{H}$  与  $^{13}\text{C}$  谱数据

Table 1  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of **1**

No.	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , <i>mult.</i>
1		205.1, C
2	3.19, ddd (18.4, 12.6, 6.5) 2.67, m	32.2, CH <sub>2</sub>
3	2.35, m	30.4, CH <sub>2</sub>
4	5.25, s	63.4, CH
4a		140.9, C
5		132.8, C
6	7.21, d(8.8)	137.7, CH
7	6.95, d(8.8)	119.5, CH
8		162.2, C
8a		115.3, C
1'		204.7, C
2'	2.85, m	38.6, CH
3'	2.35, m	31.5, CH
4'	4.59, dd(10.7, 4.7)	40.4, CH
4a'		147.8, CH
5'	6.17, d (8.0)	119.3, CH
6'	7.30, t (8.0)	136.7, CH
7'	6.84, d(8.0)	116.6, CH
8'		163.4, CH
8a'		117.3, CH
8-OH	12.76, s	
8'-OH	12.62, s	

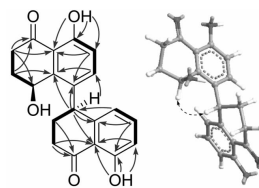


图2 化合物 **1** 的主要 COSY (—)、HMBC (→) 及 NOESY (↖↘) 相关

Fig. 2 Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (—), HMBC (→) and NOESY (↖↘) correlations of **1**

## 5 讨论

从来源于南海深海沉积物的真菌 *C. perangustum* FS62 中分离鉴定了1个新的二聚萘满酮类化合物 cladosperanol A。*Cladosporium* 属真菌能够产生一类与 cladosperanol A 结构相似的二聚萘满酮类化合物<sup>[7-8,10]</sup>。据报道 cladosporol A 的手性异构体维

康芬净具有较强的抗真菌活性<sup>[9]</sup>。此外,二聚萘满酮类化合物还具有植物生长调节作用和一定的抗肿瘤活性<sup>[10]</sup>,因此该类化合物具有很好的开发前景。

#### 参考文献

- 1 Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, *et al.* Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2015, 32:116-211.
- 2 Yang JG(杨加庚), Mei YQ(梅益勤), Pei YH(裴月湖). Research progress on the second metabolites produced by marine fungi and their bioactivities. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2013, 30:72-82.
- 3 Bugni TS, Ireland CM. Marine derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep*, 2004, 21:143-163.
- 4 Saleem M, Ali MS, Hussain S, *et al.* Marine natural products of fungal origin. *Nat Prod Rep*, 2007, 24:1142-1152.
- 5 Rateb ME, Ebel R. Secondary metabolites of fungi from ma-

- rine habitats. *Nat Prod Rep*, 2011, 28:290-344.
- 6 Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, *et al.* Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2012, 29:144-222.
- 7 Nasini G, Arnone A, Assante G, *et al.* Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi. *Phytochemistry*, 2004, 65:2107-2111.
- 8 Sakagami Y, Sano A, Hara O, *et al.* Cladosporol,  $\beta$ -1,3-glucan biosynthesis inhibitor, isolated from fungus, *Cladosporium cladosporioides*. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36:1469-1472.
- 9 Chen JP(陈杰鹏), Duan LL(段丽丽), Chen HR(陈鸿锐), *et al.* Studies on the antifungal activities of alterfungin and its derivatives. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2009, 34:15-17, 60
- 10 Ai W, Lin XP, Wang Z, *et al.* Cladosporone A, a new dimeric tetralone from fungus *Cladosporium* sp. KcFL6' derived of mangrove plant *Kandelia candel*. *J Antibiot*, 2014, 68:213-215.

(上接第 518 页)

- 7 Wang ZH(王志宏), Peng S(彭胜), Lei MS(雷明盛), *et al.* Hydrolyzing flavonoids and enriching flavonoid aglycones from Leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:289-293.
- 8 Lv MJ(吕梦捷), Zeng YY(曾耀英), Song B(宋兵). Effects of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on activation, proliferation, and apoptosis of murine T lymphocytes *in vitro*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42:743-748.
- 9 Jin LQ(金丽琴), Xue SX(薛胜霞), Lv JX(吕建新), *et al.* Effect of derivatives of *Achyranthes bidentata* polysaccharides on lymphocyte proliferation and induction of IL-2 and TNF- $\alpha$ . *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2008, 29:312-314.
- 10 Yu ES, Min HJ, An SY, *et al.* Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN- $\gamma$  suppression by quercetin in T helper cells. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(1):70-78.
- 11 Mu JJ(慕静静), Ceng YY(曾耀英), Huang XY(黄秀艳), *et al.* Effects of kaempferol on activation, proliferation and

- cell cycle of mouse T lymphocytes *in vitro*. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2009, 25:1106-1108.
- 12 Liu ZY(刘中原), Li YP(李延平). Biological activity and mechanism of bacterial lipopolysaccharide. *Med Recapitulate* (医学综述), 2010, 16:166-169.
- 13 Hager-Theodorides AL, Goliomytis M, Delis S, *et al.* Effects of dietary supplementation with quercetin on broiler immunological characteristics. *Anim Feed Sci Tech*, 2014, 198:224-230.
- 14 Nair MP, Kandaswami C, Mahajan S, *et al.* The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN- $\gamma$ ) and Th-2 (IL-4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *BBA-Mol Cell Res*, 2002, 1593(1):29-36.
- 15 Okamoto I, Iwaki K, Koya-Miyata S, *et al.* The flavonoid kaempferol suppresses the graft-versus-host reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8 + T cell engraftment. *Clin Immunol*, 2002, 103:132-144.