

红树植物老鼠簕内生真菌 *Aspergillus flavipes* AIL8 化学成分的研究

王 宾¹, 白志强², 林秀萍², 杨 斌², 周雪峰², 刘永宏^{2*}

¹ 深圳市宝安区沙井人民医院药剂科, 深圳 518104; ² 中国科学院南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室, 广州 510301

摘要: 利用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析及半制备高效液相色谱等分离手段对红树林老鼠簕内生真菌 *Aspergillus flavipes* AIL8 的提取物进行分离纯化, 并利用各种波谱方法, 结合文献对照, 确定化合物结构。从提取物中分离得到 6 个化合物, 经鉴定为 4-羟基-3-甲氧基-5-[(2*E*, 6*E*)-3, 7, 11-三甲基十二烷-2, 6, 10-三烯-1-基] 苯甲酸(1)、芳香类内酯化合物(2)、一癸酸甘油酯(3)、菜子甾醇(4)、7, 22(*E*)-麦角二烯-3 β , 5 α , 6 β -三醇(5)和麦角甾-6, 22-二烯-5 α , 8 α -环二氧-3 β -醇(6)。6 个化合物均为首次从红树林老鼠簕内生真菌 *A. flavipes* AIL8 中分离得到, 其中化合物 1 为新天然产物。

关键词: 红树林; 老鼠簕; 内生真菌; *Aspergillus flavipes* AIL8

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.6.008

Chemical Constituents of an Endophytic Fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 obtained from Mangrove *Acanthus ilicifolius*

WANG Bin¹, BAI Zhi-qiang², LIN Xiu-ping², YANG Bin², ZHOU Xue-feng², LIU Yong-hong^{2*}

¹ Department of pharmacy, Shenzhen Bao'an District Shajing People's Hospital, Shenzhen 5180036, China;

² Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology,

Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

Abstract: In this study, the chemical constituents of an endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 obtained from mangrove *Acanthus ilicifolius* were isolated and purified by column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC. The structures of the isolated compounds were determined on the basis of spectroscopic analysis and comparison with literature data. Six compounds were identified as 4-hydroxy-3-methoxy-5-[(2*E*, 6*E*)-3, 7, 11-trimethyl-dodeca-2, 6, 10-trien-1-yl] benzoic acid (1), aromatic lactone derivative (2), 2, 3-dihydroxypropyl decanoate (3), brassicasterol (4), 7, 22(*E*)-ergostadiene-3 β , 5 α , 6 β -triol (5) and ergosterol-6, 22-diene-5 α , 8 α -epidioxy-3 β -ol (6). All the 6 compounds were isolated from this strain for the first time, in which compound 1 was a new natural product.

Key words: mangrove; *Acanthus ilicifolius*; endophytic fungus; *Aspergillus flavipes* AIL8

红树林来源微生物活性代谢产物由于其特殊的生物活性, 日渐成为海洋生物活性代谢产物研究的热点^[1]。目前, 已从红树林老鼠簕 *Acanthus ilicifolius* 内生真菌 *Aspergillus flavipes* 中分离得到喹唑啉类^[3]、脑苷脂^[4]、苯并咪唑类^[5, 6]、细胞松弛素^[2, 7-9]、丁酰内酯^[10]和混源萜类^[11]等化合物。它们具有抗菌^[9, 12, 13]、细胞毒^[7]、抑制 p 物质^[3]、抑制肽去甲酰酶^[5, 6]以及抑制 HIV-1 整合酶等活性^[8]。

目前关于红树林老鼠簕内生真菌化学成分研究的文献报道较少, 在我们先前的研究中, 从采自南海的红树林老鼠簕内生真菌 *Aspergillus flavipes* 中分离得到具有抗菌生物膜活性的 2 个芳香丁酰内酯^[14]和 4 个混源萜类^[11]化合物。进一步研究该真菌, 从中又分离得到 6 个次级代谢产物。

1 材料与方法

1.1 样品

从采自我国南海海域的红树植物老鼠簕叶片分离得到一株内生真菌(菌株编号为 AIL8), 鉴定为 *Aspergillus flavipes*, 通过活性初筛发现该菌株具有抗

菌活性,故对其进行大规模固体发酵^[11,14]。实验过程中种子液培养基使用 MB 液体培养基,培养时转速设定为 180 rpm,温度为 25 ℃。

将保藏于 4 ℃ 的菌株接种到麦芽糖固体培养基上进行平板培养,置于 25 ℃ 培养 7 d。将生长出来的菌种转接到装有 10 mL 的麦芽糖液体培养基的 100 mL 三角瓶中,28 ℃ 下 180 rpm 摇床培养 3 d。将 10 mL 种子培养液转接于大米固体培养基(200 g/1000 mL 三角瓶),自然光照下,于 25 ℃ 静止培养 60 d,共发酵 30 瓶。

1.2 主要仪器与试剂

NMR 谱用 Bruker AV-500 核磁共振仪测定;UV 谱用 Shimadzu UV-2401PC 紫外光谱仪测定;IR 谱用 JASCO FT/IR-480 红外光谱仪测定;HR-ESI-MS (包括 ESI-MS) 谱用 Applied Biosystems Mariner 5140 质谱仪测定;中压制备柱色谱 [Buchi 公司产品 (C615/605)];ZJY-S 超净工作台(苏州净化设备公司);MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱(SANYO);高效液相色谱仪(岛津公司);葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司);薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶,购自青岛海洋化工厂;化学试剂均为分析纯(天津市富宇精细化工有限公司和广州化学试剂厂)。

1.3 化合物的提取与分离

发酵结束后,对发酵培养产物用丙酮按照 1:1 比例灭活,经超声萃取、浸泡过夜后,再用乙酸乙酯分别进行萃取,合并提取物,经旋转蒸发干燥后得到油状浸膏约 180 g。对此粗提物进行预处理,经处理后得到 99.0 g 待分离组分。

待分离样品与硅胶 H 按 1:1 比例拌匀干燥后,经中压硅胶色谱柱,依次用石油醚:丙酮=1:0~1:5,氯仿:甲醇=1:0~0:1 进行极性梯度分离,经 TLC 分析后合并,得到 9 个馏分。馏分 F₁(1.2 g)反复通过正相硅胶柱(石油醚:丙酮=20:1)梯度洗脱后,得到化合物 **3**(7.0 mg)和 **4**(15.0 mg)。馏分 F₂(1.5 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离后,经正相硅胶柱(石油醚:丙酮=12:1)三次梯度洗脱,得到化合物 **2**(20.0 mg)。馏分 F₃(2.0 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离后,再经正相硅胶柱(石油醚:丙酮=10:1)四次梯度洗脱,通过薄层制备板得到化合物 **5**(20.0 mg)。馏分 F₅(1.0 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离后,通过薄层制备板制备得到化合物 **6**(6.0 mg)。馏分 F₆(0.9 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离后,再经正相硅胶柱(石油醚:丙酮=6:1)洗脱后,通过薄层制备得到化合物 **1**(9.4 mg)。

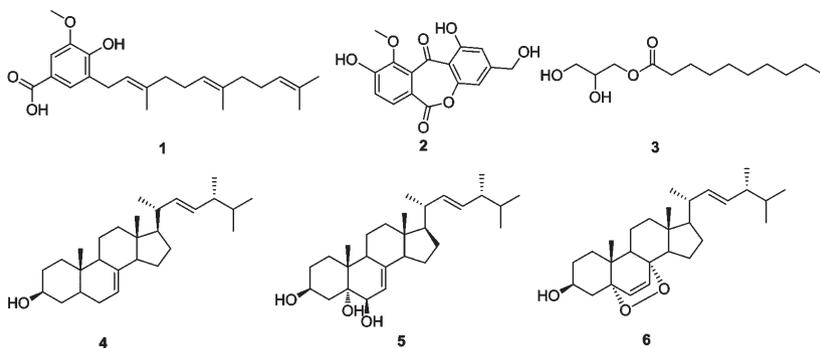


图 1 化合物 1~6 的结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-6

2 结构鉴定

化合物 1 黄色油状物,通过 HR-ESI-MS 得到加氢离子峰 373.2373,推测分子式为 C₂₃H₃₃O₄。化合物氢谱和碳谱显示有 1 个甲氧基(δ_{H} 3.91 和 δ_{C} 56.3, OCH₃-8), 4 个甲基信号(δ_{H} 1.73 和 δ_{C} 25.7, CH₃-20; δ_{H} 1.66 和 δ_{C} 17.7, CH₃-21; δ_{H} 1.59 和 δ_{C} 16.2, CH₃-22; δ_{H} 1.59 和 δ_{C} 16.0, CH₃-23) 和 1 个羰基信号(δ_{C} 171.5, C-7)。通过化合物 C-22 和 C-23 双键上的甲基信号位于高场,所以双键的几何构型

被鉴定为 *E* 构型。通过对 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱进行仔细观察,发现此化合物可能含有苯环,根据 δ_{H} 7.46, 7.61 的裂分和耦合常数推测这一对烯质子可能在苯环上互为间位。HMBC 谱表明 C-2, 7 都对这一对芳香氢有相关信号,确认 C-7 为羰基碳,而 H-9 同时还对 C-2, 6 有相关信号,确认 C-1 位置取代的异戊二烯支链。HMQC 谱显示 C-2 化学位移值位于低场,表明芳香氢可能被一酚羟基取代。同时发现 C-1 对 H-6, 9, 10 具有相关信号,则确定了该苯环母核的基本骨架结构,再根据其他 H 与苯环碳无相关

信号,则推测其余部分为在 C-1 位置取代的异戊二烯支链,根据 HMBC 相关信号推测到该化合物的结构。HMQC 谱验证了 C-H 相关。经一维和二维核磁共振波谱进行结构鉴定,为辅酶 Q 衍生物。经查阅文献发现这类化合物为辅酶 Q 的合成前体(Coenzyme Q derivative)^[15],为新的天然产物。

黄色油状物(氯仿); $[\alpha]_{20}^D$ 4.5 (*c* 0.94, 丙酮); IR 3398, 1681, 1200, 1076 cm^{-1} ; UV λ_{max} (log ϵ) 335, 300 nm; HR-ESI-MS m/z 395.2193 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Na}$, calcd for 395.2198), HR-ESI-MS m/z 373.2373 $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{O}_4$, calcd for 373.2379)。¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), δ : 7.61 (1H, s, H-4), 7.46 (1H, s, H-6), 3.91 (3H, s, OCH₃-8), 5.33 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-10), 5.33 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-10), 5.12 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-14), 5.08 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, H-18), 3.39 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-9), 1.91-2.14 (10H, m, H-9, 12, 13, 16, 17), 1.73 (3H, s, CH₃-20), 1.66 (3H, s, CH₃-21), 1.59 (3H, s, CH₃-22), 1.59 (3H, s, CH₃-23); ¹³C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 127.4 (C-1), 148.6 (C-2), 146.0 (C-3), 109.9 (C-4), 120.3 (C-5), 125.4 (C-6), 171.5 (C-7), 56.3 (C-8), 27.9 (C-9), 121.3 (C-10), 137.0 (C-11), 39.7 (C-12), 26.8 (C-13), 124.5 (C-14), 135.1 (C-15), 39.8 (C-16), 26.6 (C-17), 124.1 (C-18), 131.3 (C-19), 25.7 (C-20), 17.7 (C-21), 16.2 (C-22), 16.0 (C-23)。

化合物 2 黄色油状物(氯仿), $[\alpha]_{20}^D$ 3.7 (*c* 1.3, 丙酮); 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$, LR-MS ($[\text{M}-\text{H}]^-$: m/z 315, $[\text{2M} + \text{Na}]^+$, 655); ¹H NMR (DMSO, 500 MHz), δ : 12.19 (OH, s, OH-1), 6.75 (1H, s, H-2), 6.99 (1H, s, H-4), 7.64 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 7.48 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-6), 10.48 (brs, OH), 5.55 (brs, OH-15), 4.59 (2H, d, *J* = 4.5 Hz, H-15), 3.85 (3H, s, H-16); ¹³C NMR (DMSO, 125 MHz) δ : 160.4 (C-1), 107.1 (C-2), 153.9 (C-3), 103.9 (C-4), 120.0 (C-5), 125.3 (C-6), 148.3 (C-7), 166.7 (C-8), 180.2 (C-9), 150.6 (C-10), 106.5 (C-11), 155.4 (C-12), 117.0 (C-13), 117.0 (C-14), 62.3 (C-15), 52.1 (C-16)。UV λ_{max} (log ϵ) 412, 406, 404 nm; IR ν_{max} 3275, 3197 (OH), 2927, 1701, 1651, 1608 (C=C), 1010 cm^{-1} 。经与文献比对确定为一已知的芳香类内酯化合物(aromatic lactone derivative)^[16]。

化合物 3 黄色油状物(氯仿)。¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), δ : 4.18 (1H, m, H-3), 3.94 (1H, m, H-2), 3.58 (H, m, H-1a), 3.68 (H, m, H-1b), 2.36 (2H, m, H-6), 1.28 (10H, m, H-8, 9, 10, 11, 12), 1.60 (2H, d, H-7), 1.28 (2H, m, H-13), 0.88 (3H, m, H-14); ¹³C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 174.4 (C-5), 70.2 (C-2), 65.1 (C-3), 63.4 (C-1), 34.1 (C-6), 31.9 (C-12), 65.8 (C-7), 29.0 (C-8), 29.1 (C-9), 29.3 (C-11), 29.6 (C-10), 31.9 (C-12), 22.6 (C-13), 14.1 (C-14)。经与数据库对照,确定为化合物一癸酸甘油酯(2,3-dihydroxypropyl decanoate)。

化合物 4 无色晶体(氯仿)。¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), δ : 5.35 (1H, m, H-7), 5.23 (2H, m, H-22, 23), 3.54 (1H, m, H-3), 0.69 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, H-27), 0.84 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-26), 0.92 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-28), 1.01 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, *J* = 4.5 Hz, H-21)。ESI-MS m/z 399 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。发现此化合物的 H 谱数据与化合物 brassicasterol 的核磁数据最为接近,由此确定该化合物为菜子甾醇(brassicasterol)^[17]。

化合物 5 无色晶体(氯仿),紫外 254 nm 下不显色。¹H NMR (DMSO, 500 MHz), δ : 5.26 (2H, m, H-22, 23), 5.08 (1H, m, H-7), 4.25 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-6), 3.78 (1H, m, H-3), 0.54 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.82 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.89 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-28), 0.90 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-21); ¹³C NMR (DMSO, 125 MHz) δ : 139.5 (C-8), 135.2 (C-22), 131.3 (C-23), 119.3 (C-7), 74.4 (C-5), 72.0 (C-6), 65.8 (C-7)。通过与文献比对,发现核磁数据和耦合常数等与文献基本一致,为已知化合物 7,22(*E*)-麦角二烯-3 β ,5 α ,6 β -三醇[7,22(*E*)-ergostadiene-3 β ,5 α ,6 β -triol]^[18,19]。

化合物 6 无色针状晶体(氯仿)。在紫外 254 nm 下无吸收, TLC 5% 硫酸乙醇显蓝色斑点。¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), δ : 6.51 (1H, d, *J* = 8.5, H-7), 6.25 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 5.24 (2H, m, H-22, 23), 4.01 (1H, m, H-3), 0.88 (3H, s, H-18), 1.09 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.84 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-27), 0.82 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-28), 0.81 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-21); ¹³C NMR (CDCl_3 , 125 MHz), δ : 135.7 (C-23), 135.4 (C-6), 132.2 (C-22), 130.5 (C-7), 82.1 (C-

5), 79.4 (C-8), 66.2 (C-3)。以上数据与文献对照基本一致,确定为麦角甾-6,22-二烯-5 α ,8 α -环二氧-3 β -醇(ergosterol-6,22-diene-5 α ,8 α -epidioxy-3 β -ol)^[20]。

3 讨论

从红树林植物老鼠簕内生真菌 *Aspergillus flavipes* AIL8 中分离得到 6 个次级代谢产物。这些化合物均为首次从老鼠簕内生真菌 *A. flavipes* AIL8 中分离得到,化合物 1 为新的天然产物,为辅酶 Q 类似物,4-羟基-3-甲氧基-5-[(2*E*,6*E*)-3,7,11-三甲基十二烷-2,6,10-三烯-1-基]苯甲酸。辅酶 Q 是一类广泛存在于自然界真核生物细胞膜上的脂溶性醌类化合物,在细胞线粒体呼吸链上作为关键的电子传递中间体参与有关生物氧化的能量转换过程,是细胞呼吸和细胞代谢的激活剂,也是重要的抗氧化剂和非特异性免疫增强剂^[15]。对产辅酶 Q 衍生物的海洋红树林微生物,今后将从以下几方面进行研究:第一,通过改变培养条件和其他诱导手段,分离出新颖的同系物,以期得到更多有活性的辅酶 Q 类化合物,供药物活性筛选。第二,通过优化培养基,提高辅酶 Q 衍生物的产量,以实现工业化生产做准备。本研究为红树林微生物来源的辅酶 Q 类化合物进一步的研究奠定了基础。

参考文献

- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2014, 31:160-258.
- Lin ZJ, Zhang GJ, Zhu TJ, et al. Bioactive cytochalasins from *Aspergillus flavipes*, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Helv Chim Acta*, 2009, 92:1538-1544.
- Barrow CJ, Sun HH. Spiroquinazoline, a novel substance-p inhibitor with a new carbon skeleton, isolated from *Aspergillus flavipes*. *J Nat Prod*, 1994, 57:471-476.
- Jiang T, Li T, Li J, et al. Cerebroside analogues from marine-derived fungus *Aspergillus flavipes*. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 6:249-257.
- Kwon YJ, Sohn MJ, Kim CJ, et al. Flavimycins A and B, dimeric 1,3-dihydroisobenzofurans with peptide deformylase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes*. *J Nat Prod*, 2012, 75:271-274.
- Kwon YJ, Zheng CJ, Kim WG. Isolation and identification of FR198248, a hydroxylated 1,3-dihydroisobenzofuran, from *Aspergillus flavipes* as an inhibitor of peptide deformylase. *Biosci Biotech Bioch*, 2010, 74:390-393.
- Zhou GX, Wijeratne EMK, Bigelow D, et al. Three new cyto-

- toxic cytochalasins of *Aspergillus flavipes* from the rhizosphere of *Ericameria laricifolia* of the Sonoran Desert. *J Nat Prod*, 2004, 67:328-332.
- Rochfort S, Ford J, Ovenden S, et al. A novel aspochalasin with HIV-1 integrase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes*. *J Antibiot*, 2005, 58:279-283.
- Kohn J, Nonaka N, Nishio M, et al. TMC-169, a new antibiotic of the aspochalasin group produced by *Aspergillus flavipes*. *J Antibiot*, 1999, 52:575-577.
- Nagia MM, El-Metwally MM, Shaaban M, et al. Four butyrolactones and diverse bioactive secondary metabolites from terrestrial *Aspergillus flavipes* MM2; isolation and structure determination. *Org Med Chem Lett*, 2012, 2:9-9.
- Bai ZQ, Lin X, Wang J, et al. New meroterpenoids from the endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived from the mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Mar Drugs*, 2015, 13:237-248.
- Casinovi CG, Grandoli G, Mercanti R, et al. A new antibiotic produced by a strain of *Aspergillus flavipes*. *Tetrahedr Lett*, 1968:3175-3178.
- Findlay JA, Radics L, Flavipucine (3'-isovaleryl-6-methylpyridine-3-spiro-2'-oxiran-2(1H),4(3H)-dione), an antibiotic from *Aspergillus flavipes*. *J Chem Soc*, 1972, 16:2071-2074.
- Bai ZQ, Lin X, Wang Y, et al. New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia*, 2014, 95:194-202.
- Shepherd JA, Poon WW, Myles DC, et al. The biosynthesis of ubiquinone; Synthesis and enzymatic modification of biosynthetic precursors. *Tetrahedr Lett*, 1996, 37:2395-2398.
- Carvalho MR, Barbosa LCD, Queiroz JH, et al. Novel lactones from *Aspergillus versicolor*. *Tetrahedr Lett*, 2001, 42:809-811.
- Montielsmith S, Quintero Cortes L, Sandoval Ramirez J, Regioselective reductions of steroidal conjugated dienes by dibah. *Tetrahedr Lett*, 1995, 36:8359-8362.
- Goldstein AS, Synthesis and bioevaluation of δ (7)-5-desaturase inhibitors, an enzyme late in the biosynthesis of the fungal sterol ergosterol. *J Med Chem*, 1996, 39:5092-5099.
- Goldstein AS, Frye LL, Synthesis and bioevaluation of δ (7)-5-desaturase inhibitors, an enzyme late in the biosynthesis of the fungal sterol ergosterol. *J Med Chem*, 1997, 40:3706-3706.
- Ioannou E, Abdel-Razik AF, Zervou M, et al. 5 α ,8 α -epidioxysterols from the gorgonian *Eunicella cavolini* and the ascidian *Trididemnum inarmatum*; Isolation and evaluation of their antiproliferative activity. *Steroids*, 2009, 74:73-80.