

# 茄病镰刀菌发酵液中环孢菌素同系物的分离纯化和鉴定

杨煌建<sup>#</sup>, 王德森<sup>#</sup>, 张祝兰<sup>\*</sup>, 唐文力, 任林英, 邱观荣, 连云阳<sup>\*</sup>

福建省微生物研究所 福建省新药(微生物)筛选重点实验室, 福州 350007

**摘要:** 采用有机溶剂萃取、硅胶柱层析、反相制备色谱等方法从茄病镰刀菌 FIM116 发酵液中分离得到 2 个环孢菌素同系物, 经理化性质和波谱学方法解析, 证实其分别与环孢菌素 G 和环孢菌素 T 同质。

**关键词:** 茄病镰刀菌; 环孢菌素 G; 环孢菌素 T; 分离纯化; 结构鉴定

中图分类号: R978

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.010

## Isolation, Purification and Structural Identification of Cyclosporine Analogues from Fermentation Broth of Strain *Fusarium solani* sp. FIM116

YANG Huang-jian<sup>#</sup>, WANG De-sen<sup>#</sup>, ZHANG Zhu-lan<sup>\*</sup>, TANG Wen-li,

REN Lin-ying, QIU Guan-rong, LIAN Yun-yang<sup>\*</sup>

Fujian Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007, China

**Abstract:** Two cyclosporine analogues were isolated and purified by solvent extraction, silica gel chromatography, reversed phase chromatography and other ways from the fermentation broth of *Fusarium solani* sp. FIM116. Their structures were identified as cyclosporine G and cyclosporine T by physico-chemical properties and spectroscopic data.

**Key words:** *Fusarium solani*; cyclosporine G; cyclosporine T; isolation and purification; structural identification

环孢菌素是真菌发酵产生的一类环状十一肽代谢产物, 具有免疫抑制、抗真菌、抗寄生虫、抗炎、抗 HIV、逆转肿瘤细胞多药耐药、治疗 I 型糖尿病、疟疾等重要生物活性<sup>[1-3]</sup>, 其中环孢菌素 A (cyclosporine A, CsA) 已作为重要的免疫抑制剂广泛应用于临床器官移植抗排斥反应。目前已报道多达 17 种真菌能够产生环孢菌素类化合物<sup>[1,4,5]</sup>, 并从最早报道的 CsA 产生菌雪白僵菌中分离到了二十多个环孢菌素同系物。筛选毒副作用低、生物利用度高, 或具有其它生物学活性的低毒高效环孢菌素同系物已成为世界范围内研究热点。福建省微生物研究所于 1983 年首次报道了从国内土壤中筛选到 CsA 的产生菌——半知菌属的茄病镰刀菌 (*Fusarium solani* sp.), 已从该菌的代谢产物中分离出多个环孢菌素组分<sup>[5]</sup>。本文报道由茄病镰刀菌产生的环孢菌素 G (CsG) 和环孢菌素 T (CsT) 的分离纯化、理化性质和结构鉴别。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验菌株

茄病镰刀菌 (FIM116) 菌株由本所菌种室提供。

#### 1.1.2 主要实验仪器及材料

NRBP-212K 型双层摇床; Beckman J-20xp 离心机; 旋转蒸发器 (日本 EYELA 公司); 高效液相色谱仪 (Agilent 1260 LC-DAD) (美国安捷伦公司); EZ Purify III 型快速中压制备色谱; P3000A 梯度半制备系统; Bruker AV-400 超导核磁共振波谱仪 (内标物 TMS,  $\delta$  为 ppm,  $J$  为 Hz); Bruker Avance III-400MHz 超导核磁共振仪 (内标物 TMS,  $\delta$  为 ppm,  $J$  为 Hz); 质谱仪 (Agilent 1100 Series LC/MSD Trap); Shimadzu UV2401PC 紫外可见分光光度仪。

高效硅胶薄层板 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工厂); 200~300 目层析用硅胶 (青岛海洋化工厂); ODS-反相 C<sub>18</sub> 分析柱 (4.6 mm × 250 mm, 填料粒径 10  $\mu$ m); ODS-反相 C<sub>18</sub> 中压制备柱 (30 mm × 200 mm, 填料粒径 20  $\mu$ m); 试剂均为分析纯或色谱纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 发酵产物的提取和纯化

发酵结束后, 发酵液加入硅藻土后搅拌均匀, 过

收稿日期: 2016-10-11 接受日期: 2016-11-22

基金项目: 福州市科技计划 (2015-G-81); 福建省化药技术重大研发平台 (2014Y2001); 福州市生物制药行业技术创新中心 (2016-PT-36)

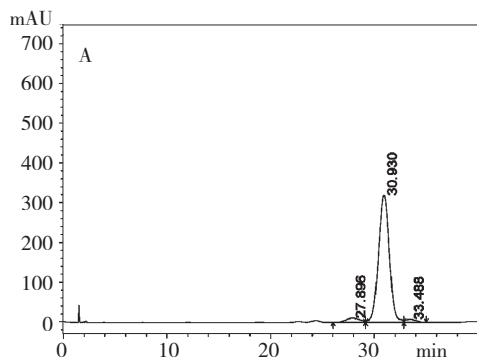
<sup>#</sup> 为共同第一作者

<sup>\*</sup> 通讯作者 E-mail: ylianfim@139.com; jessylan9963@sina.com

滤,菌丝乙醇浸泡,真空浓缩至乙醇几乎全部去除,加入等体积乙酸丁酯萃取3次,合并萃取液,得粗提物。将粗提物采用正相硅胶柱层析(硅胶 G200 ~ 300 目),分别用石油醚:丙酮 = 8:1、石油醚:丙酮 = 5:1、石油醚:丙酮 = 4:1 作为洗脱剂进行洗脱,每个比例各洗脱 10 倍柱体积,分段收集洗脱液,TLC(展层剂:水饱和乙酸乙酯)跟踪检测,合并相同组分,减压浓缩得多个组分;其中 R<sub>f</sub> 值 0.5 组份和 0.36 组份,进一步中压反相制备柱纯化,以乙腈-水-甲基叔丁基醚-磷酸(450:500:50:1)为流动相,HPLC 跟踪检测,单组份收集液经减压浓缩、结晶得到化合物 FIM116-A, FIM116-B。

### 1.2.2 HPLC 检测条件

色谱柱:C<sub>18</sub>(4.6 × 250 mm, 10 μm);流动相:乙腈-水-叔丁基甲醚-磷酸(535:440:50:1);流速:1.2



mL/min;柱温:70 °C;检测波长:210 nm;进样量:10 μL。

### 1.2.3 结构鉴定

采用紫外分光光度仪分析 FIM116-A 和 FIM116-B 的紫外吸收光谱;高分辨质谱分析得到化合物分子量;以 CDCl<sub>3</sub> 为溶剂,进行核磁 (<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、DEPT、HSQC、HMBC 和 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY) 分析,解析化合物结构。

## 2 实验结果

### 2.1 活性组分的纯化与制备

茄病镰刀菌(FIM116)发酵液经离心、有机溶剂萃取、硅胶层析、中压反相色谱、结晶等步骤获得化合物 FIM116-A 和 FIM116-B, HPLC 分析结果如图 1 所示。

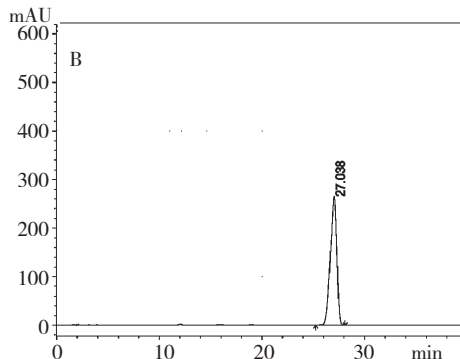


图 1 化合物 FIM116-A (A) 和化合物 FIM116-B (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of compound FIM116-A (A) and FIM116-B (B)

### 2.2 理化性质

化合物 FIM116-A 和 FIM116-B 理化性质相似,溶于甲醇、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、乙醚等有机溶剂,不溶于水、石油醚和正己烷等。以高效硅胶薄板为

载体,化合物 FIM116-A 和 FIM116-B 在不同展开剂中的 R<sub>f</sub> 值见表 1,其行为与已报道的 CsG 和 CsT 的硅胶薄板层析行为相似<sup>[6,7]</sup>。

表 1 环孢菌素 A、FIM116-A 和 FIM116-B 的高效硅胶薄板层析行为 (R<sub>f</sub>)

Table 1 TLC R<sub>f</sub> values of compound CsA, FIM116-A and FIM116-B

组份 Group	乙酸乙酯 Ethyl acetate	丙酮-正己烷(1:1) Acetone-butane (1:1)	氯仿-甲醇(96:4) CHCl <sub>3</sub> -MeOH (96:4)	乙醚-甲醇(9:1) Diethyl ether-MeOH (9:1)
CyA	0.40	0.37	0.27	0.35
FIM116-A	0.51	0.43	0.34	0.38
FIM116-B	0.36	0.28	0.23	0.34

### 2.3 结构鉴定

化合物 FIM116-A 白色结晶性粉末(乙酸乙酯/正己烷); mp. 196 ~ 197 °C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -245° (c 0.5,

CHCl<sub>3</sub>) 和 -191° (c 0.75, MeOH); UVλ<sub>max</sub> (MeOH): 201 nm; IR ν<sub>max</sub> KBr (cm<sup>-1</sup>): 与 CsA 有相似的特征吸收峰, 3505 (γOH), 3416 (γNH), 3319 (γNH),

2960 ~ 2872 ( $\gamma$ C-H), 1630 ( $\gamma$  酰胺谱带 I), 1485 ( $\gamma$  酰胺谱带 II), 994 ( $\gamma$ CH = CH, 反式)。ESI-HR-MS:  $[M + H]^+$  实测值为 1216.8653, 计算值为 1216.8643, 分子式为  $C_{63}H_{113}N_{11}O_{12}$ , 与 CsG 分子式一致, 分子量比 CsA 的分子量多 14。

$^{13}C$  NMR 谱中给出了 63 个碳原子 (见表 2), 其中  $\delta$ 174.0、173.9、173.7、173.6、171.7、171.4、171.3、170.5、170.4、170.3、170.2 ppm 分别为 11 个氨基酸的羰基信号;  $\delta$ 58.9、47.2、50.5、55.6、55.4、55.5、48.8、45.3、48.4、57.7、58.0 ppm 分别为氨基酸的  $\alpha$ -C 信号。与 CsA 相比, 只第 2 位氨基酸的  $\beta$ -C,  $\gamma$ -C 信号向低场位移, 分别为  $\delta$ 34.1、18.7, 明显在  $\delta$  位多了一个  $\delta$ 14.1 的单峰信号。 $^1H$  NMR 谱:  $\delta$ 7.93 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz),  $\delta$ 7.68 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz),  $\delta$ 7.47 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz),  $\delta$ 7.16 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 分别为 4 个氨基酸 NH 的活泼氢信号;  $\delta$ 5.68 (1H, dd,  $J = 11.0, 4.5$  Hz),  $\delta$ 5.45 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta$ 5.36 ~  $\delta$ 5.30 (3H, m),  $\delta$ 5.12 (1H, dd,  $J = 10.0, 4.5$  Hz),  $\delta$ 5.07 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz),  $\delta$ 4.98 (1H, dd,  $J = 10.0, 6.0$  Hz),  $\delta$ 4.82 (1H, t,  $J = 8.2$  Hz),  $\delta$ 4.72 (1H, d,  $J = 14.0$  Hz),  $\delta$ 4.64 (1H, dd,  $J = 10.0, 8.5$  Hz),  $\delta$ 4.51 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 分别为 11 个氨基酸  $\alpha$ -C 氢信号和 1 位氨基酸烯氢质子信号;  $\delta$ 3.79 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz), 为 1 位氨基酸  $\beta$ -C 氢信号;  $\delta$ 3.50 (3H, s),  $\delta$ 3.38 (3H, s),  $\delta$ 3.24 (3H, s),  $\delta$ 3.11 (6H, d,  $J = 5.5$  Hz),  $\delta$ 2.70 (6H, d,  $J = 8.0$  Hz), 分别为 7 个氨基酸 N-CH<sub>3</sub> 的氢信号;  $\delta$ 3.19 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz), 为 3 位氨基酸  $\alpha$ -C 氢信号;  $\delta$ 0.7-2.5 (72H, m), 其中  $\delta$ 0.70 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz) 为 1 位氨基酸  $\gamma$ -CH<sub>3</sub> 氢信号。

化合物 FIM116-B 白色无定型粉末; mp. 168 ~ 171  $^{\circ}C$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -245^{\circ}$  (c 0.78, CHCl<sub>3</sub>) 和  $-196^{\circ}$  (c 0.85, MeOH); UV $\lambda$ max (MeOH): 201 nm; IR  $\nu$ max

KBr (cm<sup>-1</sup>): 3498 ( $\gamma$ OH), 3418 ( $\gamma$ NH), 3322 ( $\gamma$ NH), 2960 ~ 2873 ( $\gamma$ C-H), 1631 ( $\gamma$  酰胺谱带 I), 1485 ( $\gamma$  酰胺谱带 II), 983 ( $\gamma$ CH = CH, 反式)。ESI-HR-MS:  $[M + H]^+$  实测值为 1188.8308, 计算值为 1188.8330, 分子式为  $C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$ , 与 CsT 分子式一致, 分子量比 CsA 的分子量少 14。

$^{13}C$  NMR 谱中给出了 61 个碳原子 (见表 2), 其中  $\delta$ 174.4、173.9、173.9、172.6、172.3、172.3、171.9、170.8、169.7、169.2、168.6 ppm 分别为 11 个氨基酸的羰基信号;  $\delta$ 59.9、50.9、48.7、59.1、54.8、53.7、46.6、45.7、55.3、47.7、57.1 ppm 分别为氨基酸的  $\alpha$ -C 信号。与 CsA 相比, 只第 10 位氨基酸的 N-CH<sub>3</sub> 的甲基信号消失,  $\alpha$ -C 信号向高场位移。 $^1H$  NMR 谱:  $\delta$ 8.13 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz),  $\delta$ 8.09 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz),  $\delta$ 7.10 (2H, m),  $\delta$ 6.97 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 分别为 5 个氨基酸 NH 的活泼氢信号, 与 CsA 相比增加 1 个 NH 活泼氢信号;  $\delta$ 5.93 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz),  $\delta$ 5.53-5.34 (1H, m),  $\delta$ 5.33-5.25 (3H, m),  $\delta$ 5.01 (1H, m),  $\delta$ 4.83 (2H, dd,  $J = 10.4, 4.0$  Hz),  $\delta$ 4.68 (2H, td,  $J = 7.0, 4.2$  Hz),  $\delta$ 4.59-4.45 (2H, m),  $\delta$ 4.23 (1H, dd,  $J = 10.5, 3.7$  Hz), 分别为 11 个氨基酸  $\alpha$ -C 氢信号和 1 位氨基酸烯氢质子信号; 与 CsA 相比, 只有 6 个氨基酸 N-CH<sub>3</sub> 的氢信号:  $\delta$ 3.41 (6H, d,  $J = 7.2$  Hz),  $\delta$ 3.18 (3H, s),  $\delta$ 3.07 (3H, s),  $\delta$ 3.04 (3H, s),  $\delta$ 2.74 (3H, s)。高场区的裂峰与报道<sup>[7]</sup>的 CsT 氢谱呈现规律相一致。

综合 NMR 的图谱信息以及 UV、MS、IR 数据比较, 化合物 FIM116-A 和 FIM116-B 分别与文献<sup>[6,7]</sup>报道的数据基本一致, 由此可确认化合物 FIM116-A 与 CsG 同质, 化合物 FIM116-B 与 CsT 同质, 其结构式如图 2。

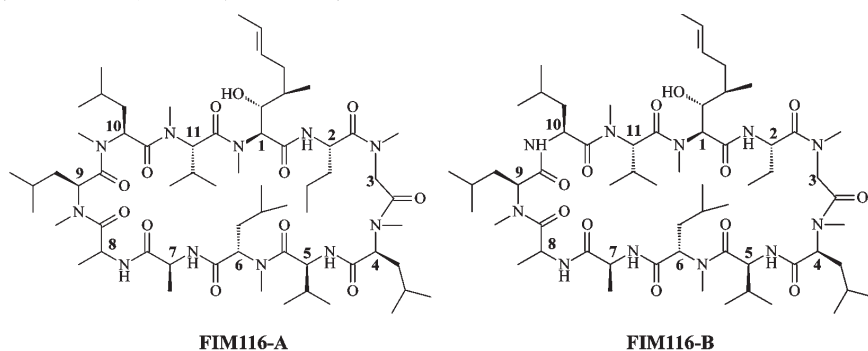


图 2 FIM116-A 和 FIM116-B 的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of FIM116-A 和 FIM116-B

表 2 化合物 FIM116-A 和 FIM116-B 的<sup>13</sup>C NMR (150 MHz) 数据  
Table 2 <sup>13</sup>C NMR (150 MHz) data for FIM116-A and FIM116-B in CDCl<sub>3</sub>

Residue	Position	CsA	FIM116-A	FIM116-B	Residue	Position	CsA	FIM116-A	FIM116-B
AA1	α	58.9	58.9	59.9	AA7	α	48.7	48.8	46.6
	β	74.9	74.9	75.6		β	16.1	16.1	14.9
	γ	36.1	36.2	35.8	AA8	α	45.3	45.3	45.7
	γ-CH <sub>3</sub>	16.9	16.9	15.9		β	18.3	18.3	16.2
	δ	35.8	35.8	36.9	AA9	α	48.4	48.4	55.3
	ε	129.7	129.8	128.4		β	39.1	39.1	36.1
	ζ	126.4	126.4	127.9	γ	24.8	24.8	25.2	
	η	18.05	18.08	18.2	δ	24.0	24.0	22.7	
N-CH <sub>3</sub>	34.1	34.1	33.4	δ'	22.0	22.0	21.3		
AA2	α	48.9	47.2	50.9	AA10	α	57.6	57.7	47.7
	β	25.1	34.1	26.7		β	40.8	40.8	41.4
	γ	10.0	18.7	9.7	γ	24.6	24.6	25.1	
	δ	-	14.1	-	δ	23.8	23.8	23.8	
AA3	α	50.4	50.5	48.7	δ'	δ'	23.5	23.5	21.7
	N-CH <sub>3</sub>	39.5	39.6	38.8		AA11	α	58.0	58.0
AA4	α	55.6	55.6	59.1	β		29.2	29.2	27.2
	β	36.1	36.1	37.8	γ	20.4	20.4	18.7	
	γ	25.0	25.0	24.7	γ'	19.9	20.0	18.2	
	δ	23.6	23.6	23.5	N-CH <sub>3</sub>	N-CH <sub>3</sub>	29.9	29.9	30.0
	δ'	21.3	21.2	23.0		AA5	CO	173.9	174.0
N-CH <sub>3</sub>	31.4	31.5	29.0	AA2	CO	173.8	173.9	173.9	
AA5	α	55.4	55.4	54.8	AA8	CO	173.6	173.7	173.9
	β	31.3	31.2	31.5	AA11	CO	173.6	173.6	172.6
	γ	18.8	18.8	19.5	AA6	CO	171.7	171.7	172.3
	γ'	18.6	18.5	18.6	AA3	CO	171.3	171.4	172.3
AA6	α	55.5	55.5	53.7	AA7	CO	171.3	171.3	171.9
	β	37.5	37.5	35.8	AA9	CO	170.5	170.5	170.8
	γ	25.5	25.5	24.9	AA1	CO	170.5	170.4	169.7
	δ	23.9	23.9	23.1	AA10	CO	170.2	170.3	169.2
	δ'	22.0	22.0	23.0	AA4	CO	170.2	170.2	168.6
	N-CH <sub>3</sub>	31.6	31.7	30.6					

### 3 讨论

扩大微生物菌种资源是进一步开发利用微生物药物的关键。1976 年科学家首次报道了由半知菌属多孔木霉 (*T. inflatum*) 和光泽柱孢菌 (*Cylindrocarpon lucidum*) 产生环孢菌素以来,目前已报道的环孢菌素产生菌多达 17 种。本所于 1983 年首次从国内土壤中筛选到环孢菌素的产生菌—茄病镰刀

菌,并先后从该菌的代谢产物中分离出四个环孢菌素同系物,而国外的茄病镰刀菌只有产生 CsA 和 CsC 的报道。近来课题组从早期菌株进一步诱变选育获得一株茄病镰刀菌 FIM116,通过外源氨基酸的加入调控,从其发酵液中分离出一些含量少的组分, FIM116-A 和 FIM116-B,从化合物的理化性质和有机光谱行为可以判断该两组份分别与环孢菌素 G (CsG) 和环孢菌素 T (CsT) 同质。

环孢菌素 G (CsG) 是研究较多的环孢菌素同系物<sup>[8-10]</sup>。CsG 最早是由不完全真菌的球枝菌 (*Tolypocladium inflatum* Gams) 发酵产生。研究表明, CsG 与 CsA 相比具有更强的免疫抑制作用, 且毒性较低。从体外实验到各种动物实验, 直至接受肾移植人体上的研究资料显示: (1) CsG 与 CsA 的免疫抑制作用基本相似, 甚至超过 CsA; (2) CsG 也可引起肾脏轻微的改变, 但整体而言其肾毒作用小于 CsA; (3) 在人体肾移植受体患者中的实验治疗中, CsG 可以引起肝的谷丙转氨酶或胆红素的升高, 但一般影响不大。从目前的研究资料表明 CsG 的应用已有较良好的开端。相比 CsA, CsT 的生物活性较弱, 其药理研究报道较少<sup>[9]</sup>。

另外, 本研究还发现该菌株的发酵液中存在一些含量微少的小组分, 有待进一步分离鉴定。后期将对该菌株的发酵条件进行深入的研究、优化发酵工艺, 以提高环孢菌素 G (CsG) 和环孢菌素 T (CsT) 等相关小组分的含量, 为该产生菌的研究开发奠定基础, 这对进一步研究低毒高效免疫抑制药物和非免疫抑制的具有其他生物活性的环孢菌素类药物将产生重要的意义。

#### 参考文献

1 von Wartburg A, Traber R. Cyclosporins, fungal metabolites

with immunosuppressive activities. *Prog Med Chem*, 1988, 25:1-33.

2 Lawen A. Biosynthesis and mechanism of action of cyclosporins. *Prog Med Chem*, 1996, 33:53-97.

3 Mann J. Natural products as immunosuppressive agents. *Nat Prod Rep*, 2001, 18:417-430.

4 Traber R, Dreyfuss MM. Occurrence of cyclosporins and cyclosporin-like peptidides in fungi. *J Ind Microbiol*, 1996, 17:397-401.

5 Zheng W, Zhuo JM, Weng QX, et al. Cyclosporin H produced by *Fusarium solani*: Purification and structural identification. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2001, 26:417.

6 von Traber R, Loosli HR, Hofmann H, et al. Isolierung und strukturierung der neuen cyclosporine E, F, G, H und I. *Helv Chim Acta*, 1982, 65:1655-1659.

7 von Traber R, Hofmann H, Loosli HR, et al. Neue cyclosporine aus *Tolypocladium inflatum*, Die cyclosporine K-Z. *Helv Chim Acta*, 1987, 70:13-36.

8 Satta V, Pham-Huy C, Voisin J, et al. Comparative evaluation of *in vitro* and *in vivo* immunosuppressive potential of cyclosporine G with cyclosporine A and FK-506. *Int J Immunopharmac*, 1996, 18(1):79-87.

9 John R. Cyclosporine analogues. *Clin Biochem*, 1991, 24:15-21.

10 Liu W, Huang W. Cyclosporine G. *World Notes on Antibiotics* (国外医药抗生素分册), 1998, 19(1):29-33.

(上接第 248 页)

7 Jeon SH, Chun W, Choi YJ, et al. Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*. *Arch Pharm Res*, 2008, 31:978-982.

8 Junior GMV, Sousa CMS, Cavalleiro AJ, et al. Phenolic derivatives from fruits of *Dipteryx lacunifera* Ducke and evaluation of their antiradical activities. *Helv Chim Acta*, 2008, 91:2159-2167.

9 Li LG (李林光), Liu QB (刘庆波), Huang XX (黄潇潇). Isolation and identification of chemical constituents from leaves of *Pithecellobium clypearia* Benth and their an-

tioxidant activities. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2015, 32:343-347.

10 Garg SK, Gupta SR, Sharma ND. Synthesis of 7-hydroxy-5,6,8-trimethoxyflavanone; revision of structure of didymocarpin. *Indian J Chem B*, 1979, 17B:394.

11 Wu YC, Chang GY, Ko FN, et al. Bioactive constituents from the stems of *Annona montana*. *Planta Med*, 1995, 61:146-149.

12 Tulake AJ (阿不拉江·图拉克), Jiang Y (姜勇), Tu PF (屠鹏飞). Nine lignans from *Artemisia absinthium* L. *J Chin Pharm Sci* (中国药科学英文版), 2012, 21:360-363.