

高速逆流色谱分离真菌 *Aspergillus versicolor* 中二苯醚类化合物

周珂昕, 朱静轩, 丁立建*, 何山

李达三海洋生物医药研究中心 浙江省海洋生物工程重点实验室 宁波大学, 宁波 315211

摘要:首次运用高速逆流色谱(HSCCC)技术从经表观遗传试剂诱导的曲霉属真菌 *Aspergillus versicolor* 的次级代谢产物中快速分离纯化得到二苯醚类化合物 diorcinol, 建立了快速分离制备杂色曲霉次级代谢产物中的二苯醚类化合物的方法。本研究首先对经过表观遗传试剂诱导的菌株 DJ013 的发酵液用乙酸乙酯浸提, 萃取富集二苯醚类成分, 然后以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(4:5:4:5, v/v) 为两相溶剂系统进行高速逆流色谱分离纯化, 上相为固定相, 下相为流动相, 流速 5.0 mL/min, 实验温度 25 °C, 转速为 800 rpm, 检测波长为 220 nm。对所得到的目标化合物经超高效液相色谱(UPLC)纯度分析, 其纯度在 97% 以上。通过质谱、核磁等波谱技术鉴定所分离得到的目标化合物为二苯醚类化合物 diorcinol。与前期研究中采用的柱色谱法、HPLC 等多种方法相结合的长达 48 h 的制备周期相比, 高速逆流色谱法仅需 55 min, 效率大大提高。该结果表明, 本研究建立的高速逆流色谱方法可高效高纯度获得具有抗菌活性的二苯醚类化合物, 将为二苯醚类化合物的进一步研究提供高效制备方法。

关键词: 曲霉属真菌; 二苯醚; 高速逆流色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.009

Separation and Purification of a Diphenyl Ether from *Aspergillus versicolor* by High Speed Counter Current Chromatography

ZHOU Ke-xin, ZHU Jing-xuan, DING Li-jian*, HE Shan

Li Dak Sum Yip Yio Chin Kenneth Li Marine Biopharmaceutical Research Centre, Key

Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: Preparative high speed counter-current chromatography (HSCCC) was applied for the isolation and purification of a diorcinol from the fungus *Aspergillus versicolor* DJ013 regulated by epigenetic manipulation for the first time using stepwise elution with the two-phase solvent system composed of petroleum ether-ether acetate-methanol-water at (4:5:4:5, v/v). The preparative HSCCC separation was performed on crude sample yielding diorcinol in a one-step separation, with purities over 97% as determined by UPLC. The temperature was 25 °C and the revolution speed was 800 rpm with a flow rate of 5.0 mL/min. The eluent was continuously monitored by a UV monitor at 220 nm. The structure of this compound was identified by ESI-MS and NMR. Compared with the 48-hour preparation period combined with column chromatography and HPLC, the high speed countercurrent chromatography only needs 55 min, and the efficiency is greatly improved. Our results demonstrated that HSCCC was an efficient technique to separate diorcinol, which provide an approach to solve the problem of their sample availability for drug development.

Key words: *Aspergillus versicolor*; diphenyl ether; high speed counter-current chromatography

Diorcinol 是一种二苯醚类化合物, 1968 年第一次作为天然产物在皱纹曲霉 *Aspergillus Regulosus* 中被 Ballatine 等人^[1] 发现。它可以抑制脱氢的杂萜

化合物 austinol 在菌丝表面形成结晶并增加其亲脂性, 二者作用的结果是抑制构巢曲霉菌丝的生长^[2]。后期的研究表明该类化合物常有抗肿瘤、抗植物病毒、抑藻、除草、抗炎、抑制血管紧张素转换酶、氨基肽酶、HIV 蛋白酶和果胶酶等重要的生物活性^[3-6], 因此, 吸引了药学家和化学家的极大兴趣。然而由于难以得到高纯度的样品供应阻碍了进一步

收稿日期: 2017-09-11

接受日期: 2017-11-28

基金项目: 国家自然科学基金(41776168; 41706167); 宁波大学科研基金(XYL17016); 浙江省教育厅科研项目(Y201737271)

* 通信作者 Tel: 86-574-87600458; E-mail: dinglijian@nbu.edu.cn

的药理学研究,成为了最大的瓶颈。

在前期研究中,本课题组采用柱色谱法、HPLC 等方法从经过表观遗传试剂诱导的杂色曲霉发酵液中分离纯化出二苯醚类化合物 diorcinol 的次级代谢产物。由于这些方法存在不可逆吸附严重,纯度低、过程复杂等缺点,制备量较少^[7],为了得到大量高纯度的二苯醚类化合物 diorcinol,我们对分离制备 diorcinol 的方法做了进一步研究,最终采用 HSCCC 法研究表观遗传试剂诱导下的杂色曲霉中的二苯醚类化合物 diorcinol,并用优化后的 HSCCC 法直接分离得到 diorcinol,经超高效液相色谱(UPLC)纯度分析,其纯度可达到 97% 以上。

高速逆流色谱(High Speed Counter Current Chromatography, HSCCC)是一种不使用固态支撑体或载体的液液分配色谱技术^[8,9]。它利用被分离物质在两相中的分配差异实现物质的高效分离,由于它的流动相和固定相均为液体,不需要固相载体,因而避免了样品的不可逆吸附、失活等问题^[10,11]。根据励林等人^[12]的研究,HSCCC 法的样品容量达 HPLC 法样品容量的 10 倍,溶解单位质量样品所需溶剂的量为 HPLC 法的三分之一,单位时间内的制备量达 HPLC 法的 5 倍,样品回收率达 HPLC 的两倍,同时具备高效、环保、制备量大等优点,特别适合从天然产物中快速筛选活性成分^[13-15]。本研究首次采用高速逆流色谱法从曲霉属真菌 *A. versicolor* 中分离纯化得到 diorcinol(图 1)高纯度单体化合物,为进一步研究二苯醚类化合物提供了高效的制备方法。

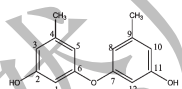


图 1 Diorcinol 的结构式

Fig. 1 Chemical structure of diorcinol

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

TBE-300B 高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司),TBP-50 恒压恒流泵(上海同田生化技术有限公司),TBE2000 紫外检测器(上海同田生化技术有限公司);ACQUITY H-Class UPLC 超高效液相色谱仪(上海 Waters 有限公司,配有 8823B 型紫外检测器);真空旋转蒸发浓缩仪(IKA 公司);Bruker AVANCE 400MHz 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker

公司);Q-TOF Premier 质谱仪(上海 Waters 有限公司);超净工作台(Spetec 公司);超低温冰箱(海尔公司);高压灭菌锅(Sanyo 公司);恒温培养摇床(Eppendorf 公司);超声波清洗机(广州科洁仪器有限公司)。

1.2 材料和试剂

1.2.1 菌种

菌株 DJ013 采自浙江东极岛海域的沉积物。经 ITS 基因序列克隆及测序鉴定为曲霉属真菌 *Aspergillus versicolor*,菌株保藏在宁波大学海洋药物实验室。

1.2.2 试剂

高效液相色谱仪所用甲醇为色谱纯有机试剂(Sigma 公司),提取分离所用石油醚、乙酸乙酯、正己烷以及甲醇均为分析纯,组蛋白去乙酰化抑制剂 2-hexyl-4-pentynoic acid(C646)。

1.2.3 培养基

(1)PDA 培养基:马铃薯 10 g;葡萄糖 20 g;琼脂 20 g;海水 1 L;氨基青霉素 0.5 g/L;链霉素 0.5 g/L。(2)PDB 培养基:马铃薯 10 g;葡萄糖 20 g;海水 1 L。

2 实验方法

2.1 菌种鉴定

通过分子克隆手段以 NS1:5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3'和 NS8:5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3'为引物,对该菌株 ITS 基因序列进行克隆以及测序,将测序结果与 Gen-Bank 中已知真菌菌株相应序列比对。

2.2 次级代谢产物粗提物的制备

发酵液的乙酸乙酯提取方法同前期研究^[7]。-20 °C 条件下保藏的菌株取出平板活化两次,活化后的菌株以 5% 的接种量加入 PDB 液体种子培养基中,28 °C 培养 3 d。3 d 后取出加入 37.5 mg/L 组蛋白去乙酰化抑制剂 C646 继续培养至 15 d。15 d 后将发酵产物取出离心,发酵液和菌体分开收集,得 20 L 发酵液,用等体积乙酸乙酯萃取三次;菌体用甲醇浸泡过夜,抽滤、减压浓缩后用等体积乙酸乙酯萃取三次。两部分乙酸乙酯提取液合并蒸干得粗提物 10g,用于进一步分离纯化。

2.3 分配系数(K_D)的测定

目标化合物在不同的两相溶剂体系中的分配系数(K_D)通过 UPLC 以下述方法测定:取少量(5 mg)

粗浸膏加入装有 5 mL 预平衡过的两相溶剂体系的试管中,用力振摇后离心(3000 rpm)。取含有样品的等体积(2 μ L)上相及下相,用超高效液相 UPLC 检测(0-10 min, 甲醇 10% ~ 90% 梯度, 流速 0.5 mL/min)。上相中目标化合物的色谱峰面积记为 A1, 下相中目标化合物的色谱峰面积记为 A2, 则分配系数 $K_D = A1/A2$ 。

2.4 HSCCC 溶剂体系的配制和样品溶液的准备

本实验的 HSCCC 溶剂体系为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(4:5:4:5, v/v), 按比例将各试剂加入分液漏斗中, 充分摇匀, 静置分层。分别取出上相和下相, 上相作为流动相, 下相作为固定相, 超声脱气除去气泡备用。称取 2 g 真菌次级代谢产物粗提物, 加入等体积上相和下相, 充分振荡使溶解, 作为样品备用。

2.5 HSCCC 分离

将所选溶剂体系中超声脱气的上相(固定相)以 50 mL/min 流速泵入螺旋管, 待上相充满螺旋管后, 调节恒温水浴至 25 $^{\circ}$ C, 启动色谱仪, 设置主机旋转方向为顺时针, 转速稳定在 800 rpm 后, 下相(流动相)以 5.0 mL/min 的流速泵入, 当流动相被置换出来时, 体系达到了流体动力学平衡^[16], 将样品通过进样阀注入高速逆流色谱仪, 开启记录仪和紫外检测器, 波长设置为 220 nm, 根据色谱流出图手动

收集馏分。

2.6 纯度测定及结构鉴定

粗提物以及经 HSCCC 所得的馏分均采用 UPLC 进行分析纯度。色谱柱为 Venusil-ASB-C₁₈ (4.6 \times 250 mm, 5 μ m); 检测波长 220 nm; 流动相为 (A) 超纯水, (B) 甲醇, 二元梯度洗脱: 0 ~ 10 min, 10 ~ 90% (B), 流速为 0.8 mL/min。根据该波长下的色谱图采取面积归一法计算纯度。采用 MS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 对化合物进行结构鉴定, 质谱采用电喷雾电离源 (ESI), 阳离子模式; 核磁共振测定样品用 Methanol-d₄ 溶解, 频率为 400 MHz。

3 结果与讨论

3.1 菌种鉴定结果

将菌株 DJ013 的 ITS 序列与 GenBank 数据库中的已知真菌菌株序列比对, 鉴定该菌株为曲霉属真菌 *Aspergillus versicolor*。

3.2 真菌发酵液的 UPLC 分析

利用组蛋白去乙酰化抑制剂 C646 对曲霉属真菌 *Aspergillus versicolor* 的菌株 DJ013 进行表观遗传诱导, 得到 10 g 表观遗传试剂诱导下的真菌发酵液乙酸乙酯提取物。通过 UPLC 检测, 发现经过表观遗传诱导的提取物比空白组多出 3 个组分, 标示峰为 diorcinol 所在组分(图 2)。

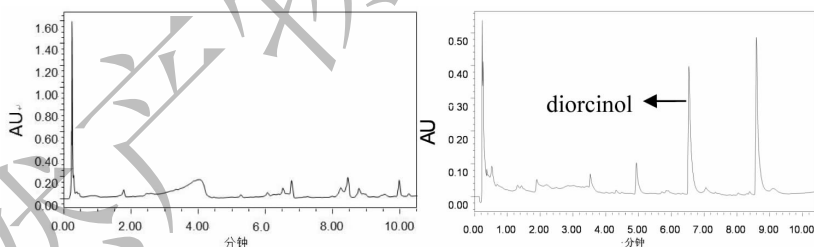


图 2 菌株 DJ013 表观遗传诱导代谢物分析

Fig. 2 Metabolite analysis of the strain DJ013 via epigenetic change

3.3 HSCCC 条件的优化

溶剂体系的选择对高速逆流色谱分离效果的影响是十分巨大的, 为获得最适分离条件, 最初采用 5 种两相溶剂体系, 分别为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(1:5:1:5, v/v)、(2:5:2:5, v/v)、(3:5:3:5, v/v)、(4:5:4:5, v/v) 和 (7:3:5:5, v/v), 通过测定目标化合物在不同的两相溶剂中的分配系数 (K_D) 来选择适合的溶剂系统, 根据文献报道, 分配系数 K_D 的适宜范围是 0.5 ~ 1.5 (K_D 值接近 1 较适宜)^[17]。结

果见表 1。从表 1 中可以看出, 当溶剂体系的配比关系为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(1:5:1:5, v/v)、(2:5:2:5, v/v) 时, K_D 均大于 2.0, 该分配系数下进行分离会导致分离时间过长, 效率低; 当溶剂体系的配比关系为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(7:3:5:5, v/v) 时, K_D 值小于 0.5, 该分配系数下进行分离会导致分离时间过短, 难以达到良好的分离效果; 当溶剂体系配比关系为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(4:5:4:5, v/v) 时, K_D 值最接近于 1, 分离效果最好。

表 1 不同比例 PE-EtOAc-MeOH-H₂O 体系的分配系数模索Table 1 The distribution constants (K_D) of targeted compounds at different ratio of volume in petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water solvent system for HSCCC separation

Petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (v/v)	K_D 值
1:5:1:5	6.47
2:5:2:5	3.47
3:5:3:5	1.33
4:5:4:5	1.05
7:3:5:5	0.12

3.4 高速逆流分离纯化的结果

选取石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(4:5:4:5, v/v)体系按照 2.5 所述方法进行高速逆流色谱。根据高速逆流色谱图(图 3)手动收集组分,将收集到组分浓缩干燥后采用 UPLC 分析,面积归一化法测定纯度(图 4),纯度约为 97%。

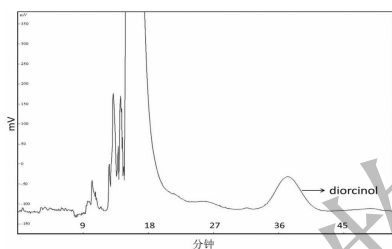


图 3 粗提物的 HSCCC 分离色谱图

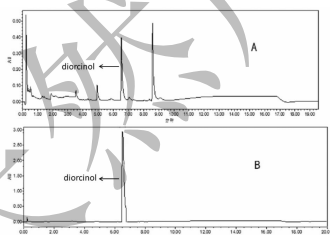
Fig. 3 HSCCC chromatogram of the crude extract from *A. versicolor* DJ013

图 4 经表观遗传后菌株 DJ013 粗提物(A)及高速逆流色谱制备的目标化合物(B)的 UPLC 色谱图

Fig. 4 UPLC chromatograms of crude sample from the strain DJ013 by epigenetic change (A) and targeted compound from HSCCC fraction (B)

3.5 结构鉴定

目标化合物:无色油状。阴离子 ESI-MS 在 m/z :229 处给出分子离子峰 $[M-H]^-$, 推出该化合物的

相对分子量为 230, 结合 1H NMR 和 ^{13}C NMR 推测出分子式为 $C_{14}H_{14}O_3$, 不饱和度为 8。 1H NMR (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 6.35 (1H, s, H-5, 8), 6.25 (1H, s, H-3, 10), 6.18 (1H, s, H-1, 12), 2.20 (3H, s, H-13, 14); ^{13}C NMR (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 159.60 (C-6, 7), 159.47 (C-2, 11), 141.64 (C-14, 9), 112.02 (C-5, 8), 111.80 (C-3, 10), 104.28 (C-1, 12), 21.52 (CH₃)。MS、 1H NMR 及 ^{13}C NMR 与文献记载相符^[19], 确证为二苯醚类化合物 diorcinol。

4 结论

本实验对一株海洋来源的曲霉属真菌进行了表观遗传诱导, 丰富了其次级代谢产物, 并对分离其次级代谢产物进行了方法学研究, 在前期研究中采用了传统的硅胶柱层析、制备型高效液相色谱等手段进行分离制备, 发现该方法耗时长、操作繁琐、回收率低且需要大量有机溶剂, 在本文所述研究中, 对分离制备方法进行了改进, 采用 HSCCC 法对同一菌株的次级代谢产物 diorcinol 进行分离纯化, 结果表明该方法能够在短时间内一步制备出高纯度的单一化合物, 且产量大、有机溶剂使用量少, 这是首次使用高速逆流色谱法对曲霉属真菌 *A. versicolor* 次级代谢产物进行分离制备, 为人们对曲霉属真菌的进一步研究提供了便捷高效的方法。

参考文献

- Ballantine JA, Hassall CH, Jones BD. Some phenolic metabolites of mutant strains of *Aspergillus regulosus* [J]. *Phytochemistry*, 1968, 7: 1529-1534.
- Hsien CL, Chun JG, Jui HH, et al. Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids, austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans* [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 4709-4720.
- Paul L, Schiff J. Bisbenzylisoquinoline alkaloids [J]. *J Nat Prod*, 1983, 46: 1-43.
- Huang YF (黄远帆), Li XX (李小霞), Chen GD (陈国栋), et al. A new diphenyl ether from an endolichenic fungal strain, *Aspergillus sp.* [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2012, 31: 769-774.
- Chen M, Shao C, Fu X, et al. Bioactive Indole alkaloids and phenyl ether derivatives from a marine-derived *Aspergillus sp. fungus* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76: 547-553.
- Gao HQ, Zhou LN, Cai SX, et al. Diorcinols B-E, new prenylated diphenyl ethers from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLN-60 [J]. *J Antibiot*, 2013, 66: 539-542.

(下转第 9 页)