

• 化学成分 •

海洋真菌 *Aspergillus* sp. 中的苯甲醛衍生物研究黄玉玲¹, 马丽英¹, 荣先国¹, 刘德胜¹, 刘绍君², 刘为忠^{1*}

1. 滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003

2. 滨州医学院基础学院, 山东 烟台 264003

摘要: **目的** 研究海洋真菌 *Aspergillus* sp. 的化学成分及其抗氧化活性。**方法** 采用硅胶柱色谱、高效液相色谱等方法进行分离纯化, 以现代波谱技术和理化性质鉴定化合物的结构, 并测定了所得化合物清除 DPPH 自由基的活性。**结果** 分离得到 6 个苯甲醛衍生物, 分别鉴定为 2-(*E*-3-庚烯基)-5-异戊烯基-3, 6-二羟基苯甲醛 (**1**)、二氢金(色)灰绿曲霉素 (**2**)、异二氢金(色)灰绿曲霉素 (**3**)、曲霉素 (**4**)、灰绿曲霉黄色素 (**5**) 和毛壳菌吡喃宁 (**6**)。**结论** 化合物 **1** 为新化合物, 命名为异曲霉素, 化合物 **1**~**6** 具有很强的清除 DPPH 自由基的活性。

关键词: *Aspergillus* sp.; 海洋真菌; 苯甲醛衍生物; 异曲霉素; 抗氧化活性; DPPH**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)05-0837-04Benzaldehyde derivatives from a marine fungus *Aspergillus* sp.HUANG Yu-ling¹, MA Li-ying¹, RONG Xian-guo¹, LIU De-sheng¹, LIU Shao-jun², LIU Wei-zhong¹

1. College of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

2. College of Basic Sciences, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract: **Objective** To study the constituents from a marine fungus *Aspergillus* sp. YT-008 and their anti-oxidant activity. **Methods** Compounds were isolated and purified by chromatography on silica gel column and HPLC, and their structures were elucidated by spectral analyses and physicochemical properties. In addition, their radical scavenging activity was evaluated against 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). **Results** Six benzaldehyde derivatives were obtained and identified as 2-(*E*-3-heptenyl)-3, 6-dihydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzaldehyde (**1**), dihydroauroglaucin (**2**), isodihydroauroglaucin (**3**), aspergin (**4**), flavoglaucin (**5**), and chaetopyranin (**6**). **Conclusion** Compound **1** is a new compound named isoaspergin. The six benzaldehyde derivatives (compounds **1**—**6**) show very strong radical scavenging activity.

Key words: *Aspergillus* sp.; marine fungus; benzaldehyde derivatives; isoaspergin; anti-oxidant activity; DPPH

在动植物和微生物这三大天然药用资源中, 微生物中的真菌相对高等, 代谢能力强, 生命活动更复杂, 代谢产物更丰富, 因而受到特别的关注。海洋的独特环境使海洋真菌具有特殊的代谢和防御体系, 从而使海洋真菌能够产生许多不同于陆生真菌的结构新颖和活性优良的化合物, 因此从海洋真菌中寻找活性化合物的研究已成为天然药物化学的热点^[1-2]。本课题组在从海洋真菌中寻找活性化合物的过程中, 从烟台海域的海泥中分离得到 1 株具有抗肿瘤和抗氧化活性的曲霉菌 *Aspergillus* sp.。利用色谱技术对该菌的醋酸乙酯萃取物进行分离, 得到 6 个苯甲醛衍生物 (图 1), 其中 1 个为新化合物, 命

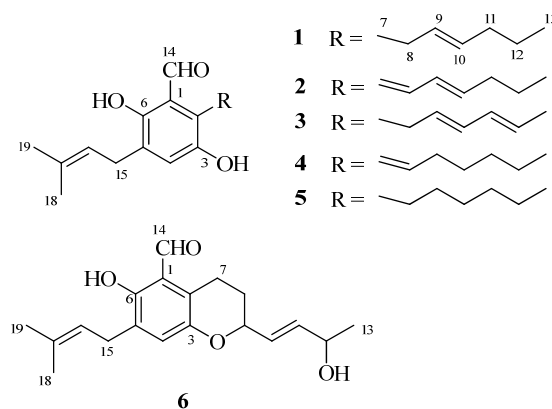


图 1 化合物 1~6 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—6

收稿日期: 2012-01-10

基金项目: 滨州医学院科研启动基金 (BY2006KYQD14)

作者简介: 黄玉玲 (1979—), 女, 山东滨州市人, 硕士, 主要从事天然产物化学成分研究。

*通讯作者 刘为忠 Tel: (0535)6913205 E-mail: lwz1963@163.com

网络出版时间: 2012-03-29 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120329.1604.004.html>

名为异曲霉素 (isoaspergin, **1**)。5 个已知化合物分别鉴定为二氢金 (色) 灰绿曲霉素 (dihydro-auroglauin, **2**)、异二氢金 (色) 灰绿曲霉素 (iso-dihydroauroglauin, **3**)、曲霉素 (aspergin, **4**)、灰绿曲霉黄色素 (flavoglaucin, **5**)、毛壳菌吡喃宁 (chaetopyranin, **6**)。并用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 法测定了它们的抗氧化活性, 化合物 **1**~**6** 均表现出很强的清除 DPPH 自由基的活性。

1 仪器与材料

XRC-1 型显微熔点测定仪 (四川大学科学仪器厂); Nicolet 6700 型红外光谱仪 (塞默飞世尔科技公司); TU-1901 型紫外光谱仪 (北京普析通用仪器有限责任公司); Bruker Avance 400 (瑞士布鲁克拜厄斯宾有限公司) 和 JEOL JNM-ECP 600 型核磁共振仪 (日本电子株式会社公司), TMS 为内标; Q-TOF Ultima Global GAA076 质谱仪 (美国 Waters 公司); Synergy HT 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); 岛津 LC-6AD 型半制备高压液相 (日本岛津公司), SPD-20A 检测器 (日本岛津公司); Hyper Clone 反相 C₁₈ 柱 (250 mm×10 mm, 5 μm); 色谱用硅胶 (200~300 目) 为青岛海洋化工厂产品。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH, Sigma); V_C (国药集团化学试剂有限公司)。

菌株 *Aspergillus* sp. 分离于烟台市周围海域的海泥中, 由中国海洋大学朱天骄博士鉴定。

2 菌株的发酵

取少量在培养皿平板上生长良好的菌体, 接种到装有 180 mL 培养基 (1 L 海水中含 200 g 土豆浸汁, 20 g 葡萄糖, 10 g 麦芽糖, 10 g 甘露醇, 3 g 酵母膏, 0.3 g FeSO₄·7H₂O, 0.5 g KH₂PO₄) 的 500 mL 锥形瓶中, 在 28 °C 转速为 170 r/min 的条件下摇床培养 9 d, 获得发酵物。

3 提取与分离

将发酵物 (50 L) 通过棉布分离为菌丝体和上清液, 菌丝体用甲醇浸提 4 次, 减压浓缩至无醇味, 然后用醋酸乙酯萃取 4 次; 上清液用醋酸乙酯萃取 3 次, 合并醋酸乙酯萃取液, 浓缩后得浸膏 56 g。浸膏上硅胶柱 (200~300 目), 用石油醚-三氯甲烷和三氯甲烷-甲醇进行梯度洗脱, 分为多个组分。将石油醚-三氯甲烷 (1:1~1:2) 分离得到的组分再经正、反相硅胶柱和高压液相色谱进行分离, 得到化合物 **1** (16 mg)、**2** (50 mg)、**3** (13 mg)、**4** (45 mg)、**5** (27 mg)、**6** (18 mg)。

4 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色针状晶体 (甲醇), mp 89~90 °C; HR-ESI-MS 给出 m/z 301.179 5 的 [M-H]⁻ 峰 (理论值 C₁₉H₂₅O₃, 301.180 4), 结合碳谱和氢谱确定其分子式为 C₁₉H₂₆O₃。红外光谱 [衰减全反射 (ATR) 法测定] 给出 IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 319, 2 962, 2 928, 2 867, 1 624, 1 588, 1 487, 1 440, 1 263, 968 和 709 的吸收峰, 提示分子中含有醛基 (1 624 cm⁻¹ 共轭羰基的伸展振动, 1 440 cm⁻¹ 醛基上 C-H 的面内弯曲振动, 2 867 cm⁻¹ 醛基上 C-H 的伸展振动)、芳环 (1 599, 1 580 和 1 483 cm⁻¹) 和羟基 (3 319 cm⁻¹)。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 388, 274, 238 和 205, 提示分子中含有连接助色团的苯环。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (表 1) 中 δ_{H} 10.23 (1H, s) 和 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 中 δ_{C} 195.6 的信号进一步说明化合物 **1** 含有醛基, 从 HMBC 谱 (图 2) 中 H-14 与 C-2 和 C-6 存在远程相关, 推测出其与 C-1 相连。¹H-NMR 中 δ_{H} 5.28 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 3.29 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.76 (3H, brs) 和 1.70 (3H, brs) 的信号提示分子中含有 1 个异戊烯基。根据 ¹³C-NMR 推测分子中含有 2 个甲基 (δ_{C} 17.8, 25.8), 1 个脂肪族的次甲基 (δ_{C} 27.0), 1 个 sp² 杂化的次甲

表 1 化合物 **1** 的 NMR 数据 (400/100 MHz, CDCl₃)
Table 1 NMR data of compound **1** (400/100 MHz, CDCl₃)

碳位	δ_{C}	δ_{H}
1	117.3	
2	128.8	
3	145.1	
4	125.9	6.91 (1H, s)
5	127.6	
6	155.8	
7	24.3	2.96 (2H, t, $J = 7.5$ Hz)
8	34.2	2.28 (2H, m)
9	128.3	5.46 (1H, m)
10	132.6	5.46 (1H, m)
11	34.6	1.96 (2H, m)
12	22.5	1.37 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz)
13	13.6	0.86 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)
14	195.6	10.23 (1H, s)
15	27.0	3.29 (2H, d, $J = 7.3$ Hz)
16	121.1	5.28 (1H, brt, $J = 7.3$ Hz)
17	133.8	
18	17.8	1.70 (3H, brs)
19	25.8	1.76 (3H, brs)
3-OH		4.53 (1H, brs)
6-OH		11.95 (1H, s)

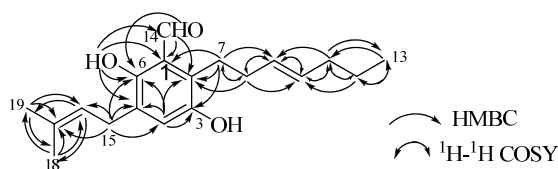


图 2 化合物 1 的主要 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关

Fig. 2 Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compound 1

基 (δ_{C} 121.1) 和 1 个 sp^2 杂化的季碳 (δ_{C} 133.8)。在 HMBC 谱中 H-15 与 C-4、C-5 和 C-6 存在远程相关, 说明异戊烯基与 C-5 相连。另外, 由 ^1H - ^1H COSY 谱推出分子中含有 1 个 3-庚烯基, 其与 C-2 相连可由 HMBC 谱中 H-7 与 C-1、C-2 和 C-3 存在远程相关而确定。C-11 的化学位移 (δ_{C} 34.6) 提示双键的构型为反式^[3], 红外光谱中 968 cm^{-1} 的吸收峰进一步证明分子含有反式二取代烯烃的片段。至此确定化合物 1 为 2-(*E*-3-庚烯基)-5-异戊烯基-3, 6-二羟基苯甲醛, 命名为异曲霉素。

化合物 2: 黄色细针状晶体 (丙酮); mp 91~93 °C; ESI-MS m/z : 299 $[\text{M}-\text{H}]^-$; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 407, 296, 249; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 265, 2 959, 2 927, 2 852, 1 619, 1 599, 1 580, 1 483, 1 440, 1 262, 997, 955, 705; ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 11.78 (1H, s, 6-OH), 10.09 (1H, s, H-14), 7.01 (1H, s, H-4), 6.56 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.44 (1H, dd, $J = 16.0, 10.3$ Hz, H-8), 6.27 (1H, dd, $J = 15.0, 10.3$ Hz, H-9), 5.89 (1H, dt, $J = 15.0, 7.3$ Hz, H-10), 5.29 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-16), 4.96 (1H, s, 3-OH), 3.32 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-15), 2.14 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-11), 1.76 (3H, brs, H-19), 1.70 (3H, brs, H-18), 1.46 (2H, m, H-12), 0.94 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-13); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 196.2 (C-14), 155.3 (C-16), 150.0 (C-3), 139.9 (C-8), 138.9 (C-10), 134.0 (C-17), 130.5 (C-2), 129.5 (C-9), 125.1 (C-4), 124.0 (C-5), 120.9 (C-16), 119.3 (C-7), 117.0 (C-1), 34.8 (C-11), 27.2 (C-15), 25.8 (C-19), 22.2 (C-12), 17.8 (C-18), 13.7 (C-13)。经与文献报道对比^[4], 鉴定化合物 2 为二氢金 (色) 灰绿曲霉素。

化合物 3: 黄色细针状晶体 (丙酮); mp 112~113 °C; ESI-MS m/z : 299 $[\text{M}-\text{H}]^-$; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 390, 274, 227; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 300, 2 927, 2 843, 1 622, 1 588, 1 489, 1 449, 1 258, 987, 693。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 11.94 (1H, s, 6-OH), 10.22 (1H,

s, H-14), 6.90 (1H, s, H-4), 6.05 (1H, dd, $J = 14.3, 10.3$ Hz, H-11), 6.00 (1H, m, H-9), 5.60 (1H, dq, $J = 14.3, 7.0$ Hz, H-12), 5.57 (1H, dd, $J = 14.5, 7.3$ Hz, H-10), 5.28 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-16), 4.49 (1H, brs, 3-OH), 3.29 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-15), 2.98 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-7), 2.35 (2H, q, $J = 7.7$ Hz, H-8), 1.76 (3H, brs, H-19), 1.73 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13), 1.69 (3H, brs, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 195.4 (C-14), 155.8 (C-6), 145.0 (C-3), 133.9 (C-17), 132.0 (C-10), 131.1 (C-12), 129.3 (C-11), 128.9 (C-2), 128.4 (C-9), 127.4 (C-5), 125.8 (C-4), 121.0 (C-16), 117.2 (C-1), 34.2 (C-8), 27.0 (C-15), 25.8 (C-19), 24.1 (C-7), 18.0 (C-13), 17.8 (C-18)。上述数据与文献报道一致^[5], 鉴定化合物 3 为异二氢金 (色) 灰绿曲霉素。

化合物 4: 黄色片状晶体 (丙酮); mp 71~72 °C; ESI-MS m/z : 301 $[\text{M}-\text{H}]^-$; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 396, 274, 229; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 420, 2 958, 2 926, 2 857, 1 622, 1 581, 1 489, 1 439, 1 262。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 11.73 (1H, s, 6-OH), 10.01 (1H, s, H-14), 7.02 (1H, s, H-4), 6.48 (1H, brd, $J = 16.1$ Hz, H-7), 5.99 (1H, dt, $J = 16.1, 6.9$ Hz, H-8), 5.29 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-16), 5.01 (1H, brs, 3-OH), 3.31 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-15), 2.32 (2H, qd, $J = 6.9, 1.6$ Hz, H-9), 1.76 (3H, d, $J = 0.7$ Hz, H-19), 1.70 (3H, brs, H-18), 1.52 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-10), 1.35 (4H, m, H-11, 12), 0.92 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-13); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 196.3 (C-14), 155.1 (C-6), 144.7 (C-3), 142.7 (C-8), 133.9 (C-17), 130.3 (C-2), 125.0 (C-4), 123.9 (C-5), 120.9 (C-16), 120.1 (C-7), 117.1 (C-1), 33.4 (C-9), 31.4 (C-11), 28.7 (C-10), 27.2 (C-15), 25.8 (C-19), 22.4 (C-12), 17.8 (C-18), 14.0 (C-13)。与文献报道对比^[6-7], 鉴定化合物 4 为曲霉素。

化合物 5: 黄色片状晶体 (丙酮); mp 106~108 °C; ESI-MS m/z : 305 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 327 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 391, 276, 239, 203; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 297, 2 962, 2 924, 2 854, 1 630, 1 589, 1 489, 1 451, 1 308, 1 260, 1 122, 939, 703。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 11.93 (1H, s, 6-OH), 10.25 (1H, s, H-14), 6.89 (1H, s, H-4), 5.28 (1H, brt, $J = 7.3$ Hz, H-16), 4.48 (1H, brs, 3-OH), 3.28 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-15), 2.88 (2H, t, $J = 7.9$ Hz, H-7), 1.76 (3H, d, brs, H-19), 1.69 (3H, brs, H-18), 1.57 (2H, m, H-8), 1.39 (2H, m, H-9), 1.29 (6H, m, H-10, 11, 12), 0.87 (3H, t, $J = 6.7$

Hz, H-13); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 195.6 (C-14), 155.8 (C-6), 144.9 (C-3), 133.9 (C-17), 128.6 (C-2, 5), 125.7 (C-4), 121.1 (C-16), 117.3 (C-1), 32.0 (C-8), 31.8 (C-11), 29.6 (C-9), 29.1 (C-10), 27.0 (C-15), 25.7 (C-19), 23.9 (C-7), 22.6 (C-12), 17.8 (C-18), 14.1 (C-13)。根据文献报道^[4-5], 鉴定化合物 5 为灰绿曲霉黄色素。

化合物 6: 为黄色固体, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -18.6$ (c 0.011, MeOH)。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 386, 276, 235, 207; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.99 (1H, s, 6-OH), 10.20 (1H, s, H-14), 6.96 (1H, s, H-4), 5.85 (1H, dd, $J = 15.7, 5.5$ Hz, H-11), 5.82 (1H, dd, $J = 15.7, 5.8$ Hz, H-10), 5.28 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-16), 4.47 (1H, brt, $J = 7.0$ Hz, H-9), 4.38 (1H, q, $J = 6.4$ Hz, H-12), 3.29 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-15), 3.13 (1H, m, H-7), 3.06 (1H, m, H-7), 2.12 (1H, m, H-8), 1.86 (1H, m, H-8), 1.75 (3H, s, H-19), 1.69 (3H, s, H-18), 1.32 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-13); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 194.4 (C-14), 156.3 (C-6), 146.4 (C-3), 136.6 (C-11), 133.8 (C-17), 130.1 (C-5), 128.5 (C-10), 127.4 (C-4), 121.0 (C-16), 119.2 (C-2), 116.5 (C-1), 74.8 (C-9), 68.1 (C-12), 27.3 (C-8), 27.0 (C-15), 25.8 (C-19), 23.3 (C-13), 20.3 (C-7), 17.7 (C-18)。数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 6 为毛壳菌吡喃宁。

5 抗氧化活性测试

将 DPPH 用甲醇配成浓度为 3.0×10^{-4} mol/L, 然后取 40 μL 分别加入 96 孔板中; 样品用甲醇溶解后加入 96 孔板中, 最后用甲醇定容至 200 μL , 使样品的最终浓度分别为 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-8} mol/L。每个浓度平行 3 次。混合均匀后在暗处放置 30 min, 然后用酶标仪测定 517 nm 处其吸光度 (A) 值。 V_{C} 为阳性对照。 $A_{\text{样品}}$: 样品 + DPPH + 甲醇; $A_{\text{阴性对照}}$: DPPH + 甲醇; $A_{\text{样品对照}}$:

样品 + 甲醇; 用下列公式计算其自由基清除率: 清除率 = $[A_{\text{阴性对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}})] / A_{\text{阴性对照}}$ 。计算化合物对 DPPH 消除作用的半数抑制浓度 (IC_{50})。

化合物 1~6 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别 18.0、9.6、19.6、10.5、15.3 和 17.8 $\mu\text{mol/L}$ 。阳性对照 V_{C} 的 IC_{50} 为 21.0 $\mu\text{mol/L}$ 。由实验结果可以看出, 化合物 1~6 均具有非常强的清除自由基的活性, 提示其具有抗氧化活性。并且如果侧链能与苯环形成共轭体系, 则可能明显提高化合物清除自由基的活性。

参考文献

- [1] 孙利, 李冬利, 陈玉婵, 等. 南海海洋真菌帚状弯孢聚壳次级代谢产物及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 432-436.
- [2] 史清文, 李力更, 霍长虹, 等. 海洋天然产物研究概述 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1031-1047.
- [3] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [4] Takashi H, Yasuo K, Yuichi H, *et al.* Structure of a new metabolite, dihydroauroglaucon, produced by *Aspergillus chevalieri* [J]. *Agric Biol Chem*, 1981, 45(1): 313-314.
- [5] Takashi H, Mamoru F, Yasuo K, *et al.* Isolation and structures of two new metabolites from *Aspergillus rubber* [J]. *Agric Bio Chem*, 1980, 44(7): 1685-1687.
- [6] Kunitoshi Y, Chikako T, Setsuko S, *et al.* Tetrahydro-auroglaucon from *Penicillium charlesii* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20(12): 2727-2728.
- [7] Sokolov L B, Alekseeva, L E, Kulbakh V O, *et al.* Chemical structure of aspergin, a metabolite of *Aspergillus* species [J]. *Antibiotiki*, 1971, 16(6): 504-510.
- [8] Wang S, Li X M, Wang B G, *et al.* Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(11): 1622-1625.