

海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCS-KFD66 的次级代谢产物研究安昶亮^{1,2}, 孔凡栋², 马青云², 谢晴宜², 葛亚哲¹, 戴好富², 郁志芳^{1*}, 赵友兴^{2*}

1. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095

2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 海口 571101

摘要: **目的** 对海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCS-KFD66 发酵液中次级代谢产物进行分离鉴定, 并测定其生物活性。**方法** 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和高效液相色谱等技术对化合物进行分离纯化; 运用多种波谱方法对分离所得化合物进行结构鉴定; 分别采用 DPPH 法、Ellman 比色法和 PNP 法对化合物的自由基清除能力、乙酰胆碱酯酶抑制活性及 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行测试; 采用 96 孔板微量法测定所得化合物对大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 的抑制活性及最小抑菌浓度。**结果** 从海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCS-KFD66 发酵液中分离得到 13 个化合物, 分别鉴定为 3-*epi-trans*-4-hydroxylinalool-3,6-oxide (1)、*trans*-4-hydroxylinalool-3,6-oxide (2)、芦荟大黄素 (3)、大黄素 (4)、6-羟基芦荟大黄素 (5)、原儿茶醛 (6)、2,5-二羟基苯甲醛 (7)、对羟基苯甲酸甲酯 (8)、对羟基苯甲酸 (9)、对羟基苯乙酸 (10)、2-(4-羟基苯基)乙醇 (11)、对羟基反式肉桂酸 (12)、反式阿魏酸 (13)。活性测试结果表明化合物 1、6、7、9~13 都具有清除自由基活性, 化合物 4 和 6 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, 化合物 6 和 7 具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性; 化合物 4 具有金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌抑制活性, MIC 值分别为 16、64 $\mu\text{g/mL}$; 化合物 6 具有抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和单增李斯特菌活性, MIC 值分别为 64、128 和 128 $\mu\text{g/mL}$ 。**结论** 分离得到 12 个已知化合物和 1 个新化合物, 其中化合物 1 为新化合物, 命名为曲霉呋喃醇。

关键词: 海洋真菌; 曲霉属; 次级代谢产物; 生物活性; 大黄素; 原儿茶醛; 曲霉呋喃醇**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)13-3001-07**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.002Secondary metabolites from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCS-KFD66AN Chang-liang^{1,2}, KONG Fan-dong², MA Qing-yun², XIE Qing-yi², GE Ya-zhe¹, DAI Hao-fu², YU Zhi-fang¹, ZHAO You-xing²

1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: **Objective** To study the secondary metabolites from the fermentation broth of marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCS-KFD66. **Methods** The constituents were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC methods. The structures of the compounds were identified by spectral data analysis. The DPPH radical scavenging, acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibitory activities of compounds were evaluated by DPPH method, Ellman colorimetric method and PNP method, respectively. The inhibitory effect and the minimal inhibitory concentration (MIC) of compounds on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Listeria monocytogenes* were tested using 96-well microtiter plates method. **Results** A total of 13 compounds were isolated from the fermentation broth of marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCS-KFD66 and identified as 3-*epi-trans*-4-hydroxylinalool 3,6-oxide (1), *trans*-4-hydroxylinalool 3,6-oxide (2), aloe emodin (3), emodin (4), citreorosein (5), protocatechualdehyde (6), 2,5-dihydroxybenzaldehyde (7), methyl 4-hydroxyphenylacetate (8), 4-hydroxybenzoic acid (9), 4-hydroxyphenylacetic acid (10), 2-(4-hydroxyphenyl) ethanol (11), (*E*)-*p*-hydroxycinnamic acid (12) and (*E*)-ferulic

收稿日期: 2019-01-10**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (41606088); 国家自然科学基金项目 (81741157); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-21); 农业农村部财政专项项目 (NFZX2018); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项 (17CXTD-15); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项 (1630052016008)**作者简介:** 安昶亮 (1994—), 女, 黑龙江人, 硕士, 从事天然产物化学研究。E-mail: annncl@163.com***通信作者** 郁志芳, 男, 博士, 教授。Tel: 13951692350 E-mail: yuzhifang@njau.edu.cn

赵友兴, 男, 博士, 研究员。Tel: (0898)66989095 E-mail: zhaoyx1011@163.com

acid (13), respectively. Compounds 1, 6, 7 and 9—13 showed DPPH radical scavenging activities; Compounds 4 and 6 showed acetylcholinesterase inhibitory activity; Compounds 6 and 7 exhibited inhibitory activity against α -glucosidase. Compound 4 has inhibitory activity against *S. aureus* and *B. subtilis* with the MIC values of 16 $\mu\text{g/mL}$ and 64 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Compound 6 showed inhibitory activity against *E. coli*, *B. subtilis* and *L. monocytogenes*, with MIC values of 64, 128 and 128 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Conclusion Twelve known compounds and one new compound were isolated. Compound 1 is a new compound named as asperguranol.

Key words: marine-derived fungus; *Aspergillus* sp.; secondary metabolites; biological activity; emodin; protocatechualdehyde; asperguranol

在过去的几十年中,天然产物在现代药物研究与开发中占据非常重要的地位,为人类保健、营养、医疗等方面提供更高效的手段^[1-2]。美国国家癌症研究所统计表明,自 1940 至 2014 年,全世界有 175 个新抗癌药物批准上市,其中 75% 的药物是来源于天然产物或其衍生物^[3]。因此天然产物研究对药物研发有重要的意义。由于所处生态环境的特殊导致海洋生物形成的独特的次生代谢产物生物合成途径以及酶反应系统与陆地生物产生巨大差异,使得海洋生物常产生许多结构复杂、活性显著、产量相对较高的化合物^[4-5]。海洋真菌是海洋微生物的重要组成部分,迄今为止,已从海洋真菌的发酵产物中发现超过 1 500 个新次生代谢产物,为新药的研发提供大量模式结构和前体药物。

为了发现新颖活性海洋天然产物,本研究对来源于海洋动物中华紫蛤的真菌菌株 *Aspergillus* sp. SCS-KFD66 进行发酵培养,从发酵产物的醋酸乙酯萃取物中分离得到了 13 个化合物,包括 1 个新化合物 3-*epi-trans*-4-hydroxylinalool-3,6-oxide (1) 和 12 个已知化合物 *trans*-4-hydroxylinalool-3,6-oxide (2)、芦荟大黄素 (aloe emodin, 3)、大黄素 (emodin, 4)、6-羟基芦荟大黄素 (citreorosein, 5)、原儿茶醛 (protocatechualdehyde, 6)、2,5-二羟基苯甲醛 (2,5-dihydroxybenzaldehyde, 7)、对羟基苯乙酸甲酯 (methyl 4-hydroxyphenylacetate, 8)、对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid, 9)、对羟基苯乙酸 (4-hydroxyphenylacetic acid, 10)、2-(4-羟基苯基)乙醇 [2-(4-hydroxyphenyl) ethanol, 11]、对羟基反式肉桂酸 [(*E*)-*p*-hydroxycinnamic acid, 12]、反式阿魏酸 [(*E*)-ferulic acid, 13]。化合物 1 命名为曲霉呋喃醇。测定了所有分离的单体化合物的自由基清除能力、乙酰胆碱酯酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性以及抗菌活性。

1 仪器与材料

CCA-1112A 冷却水循环装置、N-1100 旋转蒸发仪均购自上海爱朗仪器有限公司; SHZ-DIII 循环

水真空泵购自郑州英峪予华仪器有限公司; 超净工作台购自苏州净化有限公司; Bruker AV-500 型超导核磁共振波谱仪购自美国 Bruker 公司,以 TMS 为内标; ELX-800 酶标仪购自美国 Bio Tex 公司; Agilent 1260 分析型高效液相色谱仪购自 Agilent 公司, COSMOSIL 色谱柱 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 和 COSMOSIL 色谱柱 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm) 购于日本 Nacalai Tesque 公司; SUMMITP680A 半制备高效液相色谱仪购自 Dionex 公司。GF-254 薄层色谱硅胶板、柱色谱用硅胶 (200~300 目) 和硅胶 H 均购自青岛海洋化工厂; 反相材料 C_{18} 购自 Fuji 公司; Sephadex LH-20 凝胶购自 GE 公司; 乙酰胆碱酯酶购自北京 Solarbio 公司; 4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG)、碘化硫代乙酰胆碱、二硫代二硝基苯甲酸 (DTNB)、 α -葡萄糖苷酶 (酵母来源)、阿卡波糖、他克林等均购自 Sigma 公司; 氨苄青霉素购自 Solarbio 公司; 薄层色谱 (TLC) 显色为 10% H_2SO_4 乙醇显色剂, 喷后烘烤。

2 菌株来源与发酵

海洋动物样品中华紫蛤 *Sanguinolaria chinensis* Morch 2015 年 8 月采集自海口湾, 由中国热带农业科学院热带生物技术研究黄圣卓博士鉴定, 从中分离得到真菌菌株 SCS-KFD66, 经 18 S rRNA 序列分析鉴定为曲霉属 *Aspergillus* sp. 真菌。将菌株接种于斜面培养基 (马铃薯葡萄糖琼脂, PDA), 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3~5 d。配制 200 瓶大米培养基 (大米 80 g、海水 120 mL), 经高压灭菌锅 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 25 min 后备用。从斜面培养基中接种适量孢子到灭菌后的三角瓶中, 放置于培养架上室温培养 30 d。

3 提取与分离

发酵结束后, 向锥形瓶中加入 2 倍体积的醋酸乙酯, 经过浸泡、破碎、超声等过程, 用纱布滤过得发酵产物上清液, 将其减压浓缩得到浸膏 409.57 g。醋酸乙酯提取物经减压硅胶柱 (200~300 目) 色谱, 以石油醚-醋酸乙酯为流动相梯度洗脱 (10:

1→1:2) 得到 7 个组分 (Fr. 1~7)。Fr. 7 (28.3 g) 经减压硅胶柱 (200~300 目) 色谱, 以三氯甲烷-甲醇 (1:0→0:1) 梯度洗脱, 得到 18 个组分 (Fr. 7.1~7.18)。Fr. 7.4 (184.9 mg) 通过 Sephadex LH-20 (甲醇) 得到化合物 **6** (18.7 mg) 和 Fr. 7.4.1, Fr. 7.4.1 (149.6 mg) 通过半制备型高效液相色谱仪, 经 C₁₈ 半制备柱 (COSMOSIL-packed, 250 mm×4.6 mm), 以甲醇-水 (40:60) 洗脱得到化合物 **7** (t_R = 6.7 min, 9.3 mg) 和 **8** (t_R = 9.8 min, 5.9 mg)。Fr. 6 (4.0 g) 通过反相硅胶柱色谱 (甲醇-水 20%~100%) 梯度洗脱后, 得到化合物 **1** (4.1 mg) 和 Fr. 6.1~Fr. 6.3; Fr. 6.1 (21.4 mg) 通过半制备型高效液相色谱仪, 经 C₁₈ 半制备柱, 以乙腈-三氟乙酸 (TFA) 水 (8:92) 洗脱, 得到化合物 **9** (t_R = 17.6 min, 2.6 mg)、**10** (t_R = 21.4 min, 7.9 mg) 和 **11** (t_R = 16.4 min, 2.3 mg); Fr. 6.2 (21.9 mg) 以甲醇-0.1% TFA 水 (30:70) 洗脱, 得到化合物 **12** (t_R = 20.3 min, 2.8 mg) 和 **13** (t_R = 22.6 min, 6.4 mg); Fr. 6.3 (84.6 mg) 经 Ph 半制备柱, 以乙腈-0.1% TFA 水 (40:60) 系统洗脱, 得到化合物 **5** (t_R = 7.6 min, 8.6 mg)。Fr. 5 (3.7 g) 通过反相硅胶柱色谱 (甲醇-水 20%~100%,) 梯度洗脱后, 得到化合物 **2** (6.7 mg) 和 Fr. 5.1~5.3; Fr. 5.1 (12.1 mg) 通过半制备型高效液相色谱仪, 经 C₁₈ 半制备柱, 以乙腈-0.1% TFA 水 (50:50) 洗脱后, 得到化合物 **3** (t_R = 20.8 min, 2.7 mg); Fr. 5.2 (11.6 mg) 通过半制备型高效液相色谱仪, 经 C₁₈ 半制备柱 (COSMOSIL-packed, C₁₈, 250 mm×4.6 mm), 以乙腈-0.1% TFA 水 (65:35) 系统洗脱后, 得到化合物 **4** (t_R = 8.5 min, 2.2 mg)。

4 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{29} +9^\circ$ (c 0.1, MeOH); HR-ESI-MS 在 m/z 209.114 0 (理论值 209.114 8) 处给出 $[M+Na]^+$ 峰, 化合物 **1** 的分子式为 C₁₀H₁₈O₃。IR $\nu_{\max}^{KBr}$ (cm⁻¹): 3 413, 2 926, 1 682, 1 375, 1 258, 1 086 提示结构中存在双键和羟基基团。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱图显示化合物 **1** 具有 1 个单取代的双键信号 CH₂ (1)-CH (2), 3 个单峰的甲基信号 8-CH₃、9-CH₃ 和 10-CH₃, 1 个亚甲基信号 CH₂-5, 2 个连氧季碳 C-3 和 C-7, 以及 2 个连氧次甲基信号 4-CH 和 6-CH。COSY 谱中给出 H-1/H-2 以及 H-4/H-5/H-6 之间的相关信号。HMBC 谱中给出 10-CH₃ 与 C-2、C-3 和 C-4 的相关信号; 8-CH₃ 和 9-CH₃ 与 C-6 和 C-7 的相关信号; 以及 H-6 与 C-3

的相关信号 (图 1)。综合以上数据, 化合物 **1** 的平面结构见图 1, 与已知化合物 *trans*-4-hydroxylinalool-3,6-oxide^[6] 具有相同的平面结构。ROESY 图谱中给出 H-2 和 H-4 与 H-8 的相关信号, 提示这 3 个氢位于呋喃环的同一面。因此, 化合物 **1** 被鉴定为 3-*epi-trans*-4-hydroxylinalool-3,6-oxide, 核磁数据见表 1。

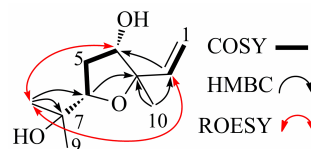


图 1 化合物 **1** 的关键 HMBC、COSY 和 ROESY 信号
Fig. 1 Key HMBC, COSY, and ROESY correlations of compound **1**

表 1 化合物 **1** 的核磁数据 (500/125 MHz, CD₃OD)
Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data (500/125 MHz, CD₃OD) of compound **1**

碳位	δ_C	δ_H
1	112.4, CH ₂	5.18 (dd, J = 17.6, 1.6 Hz) 4.99 (dd, J = 11.0, 1.6 Hz)
2	146.6, CH	5.96 (dd, J = 17.6, 11.0 Hz)
3	78.2, C	
4	73.0, CH	3.55 (dd, J = 10.2, 4.1 Hz)
5	33.6, CH ₂	1.99 (dt, J = 12.7, 4.0 Hz) 1.85 (dt, J = 12.7, 10.2 Hz)
6	74.3, CH	3.42 (dd, J = 10.2, 4.1 Hz)
7	76.9, C	
8	29.5, CH ₃	1.22 (s)
9	23.5, CH ₃	1.25 (s)
10	21.7, CH ₃	1.22 (s)

化合物 **2**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 209 $[M+Na]^+$, 分子式 C₁₀H₁₈O₃。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.88 (1H, dd, J = 17.3, 10.8 Hz, H-2), 5.24 (1H, dd, J = 17.3, 1.7 Hz, H-1a), 5.04 (1H, dd, J = 10.8, 1.7 Hz, H-1b), 3.92 (1H, dd, J = 5.9, 3.4 Hz, H-4), 3.83 (1H, dd, J = 8.4, 5.5 Hz, H-6), 2.22 (1H, m, H-5a), 2.45 (1H, ddd, J = 11.7, 4.8, 2.4 Hz, H-5b), 1.26 (3H, s, H-9), 1.24 (3H, s, H-10), 1.14 (3H, s, H-8); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 143.8 (C-2), 112.8 (C-1), 87.5 (C-3), 84.4 (C-6), 76.8 (C-4), 72.0 (C-7), 35.4 (C-5), 26.6 (C-8), 26.5 (C-9), 21.5 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[6-7], 故鉴定化合物 **2** 为 *trans*-4-hydroxylinalool-3,6-oxide。

化合物 **3**: 橙红色细针晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 293 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{15}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.81 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-6), 7.72 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 7.69 (1H, s, H-4), 7.39 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-7), 7.29 (1H, s, H-2), 4.63 (2H, d, $J = 5.5$ Hz, H-15); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 191.7 (C-9), 181.5 (C-10), 161.6 (C-1), 161.3 (C-8), 153.7 (C-3), 137.3 (C-6), 133.4 (C-14), 133.1 (C-11), 124.4 (C-7), 120.7 (C-2), 119.4 (C-5), 117.1 (C-4), 115.9 (C-12), 114.5 (C-13), 62.1 (C-15)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为芦荟大黄素。

化合物 **4**: 橙黄色粉末, ESI-MS m/z : 293 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{15}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.08 (1H, s, 8-OH), 12.02 (1H, s, HO-1), 7.48 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-4), 7.16 (1H, brs, H-2), 7.10 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.57 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 2.40 (3H, s, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 189.8 (C-9), 181.5 (C-10), 165.6 (C-3), 164.5 (C-1), 161.4 (C-8), 148.3 (C-6), 135.2 (C-4a), 132.9 (C-5a), 124.2 (C-7), 120.5 (C-5), 113.4 (C-8a), 109.0 (C-4), 108.8 (C-1a), 108.0 (C-2), 21.6 (C-11)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **4** 为大黄素。

化合物 **5**: 橙黄色粉末, ESI-MS m/z : 309 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{15}H_{10}O_6$ 。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.99 (1H, s, 1/8-OH), 11.97 (1H, s, 1/8-OH), 11.32 (1H, s, 6-OH), 7.54 (1H, s, H-4), 7.15 (1H, s, H-2), 7.03 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.50 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 5.52 (1H, brs, 11-OH), 4.53 (2H, brs, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 189.7 (C-9), 181.3 (C-10), 165.6 (C-8), 164.5 (C-1), 161.5 (C-6), 152.9 (C-3), 135.1 (C-5a), 132.9 (C-4a), 120.8 (C-2), 117.1 (C-4), 114.1 (C-1a), 109.0 (C-8a), 108.9 (C-5), 107.9 (C-7), 62.1 (C-11)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为6-羟基芦荟大黄素。

化合物 **6**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 161 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 9.92 (1H, s, -CHO), 7.04~6.97 (2H, overlapped, H-2, 6), 6.78 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 196.6 (1-CHO), 155.9 (C-4), 151.5 (C-3), 126.1 (C-6), 122.6 (C-1), 119.0 (C-5), 117.4

(C-2)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **6** 为原儿茶醛。

化合物 **7**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 161 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.84 (1H, s, H-7), 7.10 (1H, dd, $J = 8.9, 3.1$ Hz, H-4), 7.03 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-6), 6.91 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 196.2 (C-7), 155.9 (C-2), 148.7 (C-5), 125.7 (C-4), 120.4 (C-1), 118.8 (C-6), 118.1 (C-3)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为2,5-二羟基苯甲醛。

化合物 **8**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 189 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_9H_{10}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.12 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.76 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 3.70 (3H, s, H-9), 3.56 (2H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.0 (C-8), 155.0 (C-4), 130.6 (C-2, 6), 125.9 (C-1), 115.6 (C-3, 5), 52.3 (C-9), 40.4 (C-7)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为对羟基苯乙酸甲酯。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 161 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.89 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.2 (C-7), 163.3 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 122.8 (C-1), 116.0 (C-3, 5)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **10**: 白色针晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 175 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_8H_8O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.11 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.75 (2H, dd, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 3.50 (2H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 176.2 (C-8), 157.4 (C-4), 131.3 (C-2, 6), 126.8 (C-1), 116.2 (C-3, 5), 41.1 (C-7)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **10** 为对羟基苯乙酸。

化合物 **11**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 161 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_8H_{10}O_2$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.01 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2, 6), 6.69 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3, 5), 3.67 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 2.70 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 156.7 (C-4), 131.0 (C-1), 130.9 (C-3, 5), 116.1 (C-2, 6), 64.6 (C-8), 39.4 (C-7)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **11** 为2-(4-羟基苯基)乙醇。

化合物 **12**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 187 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_9H_8O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD)

δ : 7.57 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.42 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2, 6), 6.78 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3, 5), 6.25 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 171.4 (C-9), 161.1 (C-4), 146.6 (C-7), 131.1 (C-2, 6), 127.2 (C-1), 116.8 (C-3, 5), 116.1 (C-8)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **12** 为对羟基反式肉桂酸。

化合物 **13**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 217 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.55 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.13 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.01 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.27 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 3.84 (3H, s, H-10); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 171.1 (C-9), 150.4 (C-3), 149.3 (C-4), 146.8 (C-7), 127.8 (C-1), 124.0 (C-6), 116.4 (C-5), 114.8 (C-8), 111.6 (C-2), 56.4 (C-10)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **13** 为反式阿魏酸。

5 活性测试

5.1 DPPH 自由基清除活性测定

采用 DPPH 法^[19]测定化合物 **1**~**13** 的抗氧化活性, 评价其自由基清除能力。将待测化合物溶解于 DMSO 中, 配制质量浓度为 5 mg/mL 的溶液。精密称定 DPPH 试剂 25.6 mg, 用无水乙醇定容至 100 mL, 4 °C 冷藏备用, 使用前用无水乙醇稀释 10 倍使用。取 20 μL 待测样品溶液与 180 μL DPPH 溶液混合作为实验组; 取 20 μL 10% DMSO-乙醇溶液与 180 μL DPPH 溶液混合作为阴性对照组; 取 20 μL 抗坏血酸溶液 (5 mg/mL) 与 180 μL DPPH 溶液混合作为阳性对照组; 取 20 μL 待测样品溶液与 180 μL 无水乙醇混合作为空白对照组。将各溶液置于 96 孔板内混匀, 25 °C 避光温育 30 min 后, 515 nm 处用酶标仪检测各孔吸光度。反应体系总共 200 μL , 终质量浓度为 0.5 g/L, 实验重复 3 次。按照公式计算化合物对 DPPH 自由基的清除率, 结果见表 2。结果显示, 化合物 **1**、**6**、**7**、**9**~**13** 具有清除自由基活性。

$$\text{清除率} = 1 - (A - A_0) / B$$

A 为待测样品平均吸光度, B 为阴性对照平均吸光度, A_0 为空白对照平均吸光度

5.2 乙酰胆碱酯酶活性测定

采用 Ellman 法^[20]测定化合物 **1**~**13** 的乙酰胆碱酯酶抑制活性。化合物均用 DMSO 溶解配制成待测

化合物溶液 (1 mg/mL)。取 110 μL 磷酸缓冲液 (pH 8.0)、10 μL 待测样品溶液和 40 μL 乙酰胆碱酯酶 (0.1 U/mL) 于 96 孔板中, 30 °C 温育 20 min 后, 加入 DTNB (2.48 mg/mL) 和硫代乙酰胆碱 (1.81 g/L) 等体积混合液 40 μL , 反应体系总共 200 μL 。30 min 后, 于 405 nm 处用酶标仪检测各孔吸光度。以他克林 (反应终浓度为 0.33 $\mu\text{mol/L}$) 为阳性对照, DMSO (体积分数为 0.1%) 为阴性对照, 实验重复 3 次。按照公式计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制率, 结果见表 2。结果显示, 化合物 **4** 和 **6** 具有一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

$$\text{抑制率} = (E - S) / E$$

E 为阴性对照平均吸光度, S 为待测样品平均吸光度

5.3 α -葡萄糖苷酶活性测定

采用 PNP 法^[21]测定化合物 **1**~**13** 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。化合物均用 DMSO 溶解配制成待测化合物溶液 (5 mg/mL)。取 70 μL 磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 6.8) 于 96 孔板中, 再分别加入 20 μL α -葡萄糖苷酶溶液 (2 U/mL) 和 10 μL 待测样品溶液。37 °C 温育 15 min 后加入 20 μL pNP 溶液 (2.5 mmol/L), 在 37 °C 放置 30 min 后加入 80 μL Na_2CO_3 终止液 (0.2 mol/L) 终止反应, 反应总体积为 200 μL 。充分混匀后于 405 nm 处用酶标仪检测各孔吸光度。以阿卡波糖 (反应终质量浓度为 0.25 mg/mL) 为阳性对照, DMSO (体积分数为 0.5%) 为阴性对照, 实验重复 3 次。按照公式计算化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率, 结果见表 2。结果显示, 化合物 **6** 和 **7** 具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

$$\text{抑制率} = [(B - B_0) - (A - A_0)] / (B - B_0)$$

A 为实验组平均吸光度, A_0 为背景对照组平均吸光度, B 为阴性对照平均吸光度, B_0 为空白对照平均吸光度

5.4 抑菌活性测定

采用 96 孔板微量法^[22-23], 测定化合物对 4 种食品常见致病菌 (大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、单增李斯特菌) 的抑制活性及最小抑菌浓度 (MIC)。取 100 μL 病原菌菌液 ($1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ cfu/mL) 加入至 100 mL LB 培养基 (0.3% 牛肉膏、0.2% 酵母浸粉、1% 蛋白胨、0.5% NaCl, pH 7.5) 中, 混匀得病原菌菌液。取 198 μL 病原菌菌液于 96 孔板中, 加入 2 μL 待测化合物溶液 (DMSO 溶解, 终质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$)。以氨苄青霉素 (终质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$) 为阳性对照, 以 DMSO (终质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$) 作为阴性对照, 以 200 μL

表 2 化合物 1~13 的生物活性评价 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Evaluation of bioactivities of compounds 1—13 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	自由基清除		乙酰胆碱酯酶		α -葡萄糖苷酶	
	剂量/(mg·mL ⁻¹)	清除率/%	剂量/(mg·mL ⁻¹)	抑制率/%	剂量/(mg·mL ⁻¹)	抑制率/%
1	0.5	50.3±2.1	0.5	<30	0.25	<30
2	0.5	<50	0.5	<30	0.25	<30
3	0.5	<50	0.5	<30	0.25	<30
4	0.5	<50	0.5	38.2±1.1	0.25	<30
5	0.5	<50	0.5	<30	0.25	<30
6	0.5	76.6±3.2	0.5	52.2±1.6	0.25	92.8±0.9
7	0.5	72.1±4.9	0.5	<30	0.25	33.7±0.3
8	0.5	<50	0.5	<30	0.25	<30
9	0.5	58.1±1.2	0.5	<30	0.25	<30
10	0.5	56.8±0.7	0.5	<30	0.25	<30
11	0.5	66.0±2.2	0.5	<30	0.25	<30
12	0.5	64.8±0.4	0.5	<30	0.25	<30
13	0.5	80.7±0.2	0.5	<30	0.25	<30
抗坏血酸	0.5	84.9±0.4	—	—	—	—
他克林	—	—	0.5	86.3±0.1	—	—
阿卡波糖	—	—	—	—	0.25	32.3±2.2

病原菌菌液作为空白对照,实验重复 3 次。震荡混合后于 37 ℃ 培养 18~22 h,观察各孔中菌的生长情况后,对能完全抑制细菌生长的样品进行最小浓度测试:向第 1 个孔里加入化合物,使其终质量浓度为 64 $\mu\text{g/mL}$,混匀后利用 2 倍稀释法使 2~7 孔终质量浓度为 32、16、8、4、2、1 $\mu\text{g/mL}$ 。37 ℃ 培养 18~22 h 后观察,如该孔中成浑浊状态,说明相应浓度的化合物无抗病菌活性;如该孔中呈澄清状态,说明相应浓度的化合物具有抗病菌活性。病菌生长被完全抑制的孔所对应的化合物浓度即为化合物对该种病菌的最低抑菌浓度。

实验结果表明,化合物 4 具有抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌活性, MIC 值分别为 16 和 64 $\mu\text{g/mL}$;化合物 6 具有抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和单增李斯特菌活性, MIC 值分别为 64、128 和 128 $\mu\text{g/mL}$ 。

6 讨论

海洋曲霉属真菌是新天然产物的重要来源,因此从其次级代谢产物中寻找结构新颖,活性优良的化合物具有重要意义。本研究从海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCS-KFD66 中分离得到 13 个化合物(1~13),其中化合物 1 为新化合物。活性测试结

果显示,化合物 1、6、7、9~13 都具有清除自由基活性,化合物 4 和 6 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性,化合物 6 和 7 具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,化合物 4 具有抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌活性,化合物 6 具有抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和单增李斯特菌活性。本研究进一步丰富曲霉属真菌来源天然产物的结构多样性,并筛选出了一些生物活性较为显著的次级代谢产物,为海洋来源新天然产物以及先导化合物的发现奠定基础。

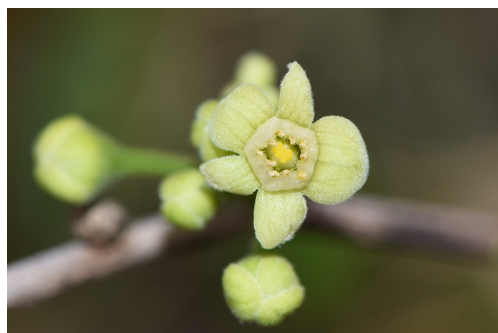
参考文献

- [1] Kusari S, Singh S, Jayabaskaran C. Rethinking production of taxol (R) (paclitaxel) using endophyte biotechnology [J]. *Trends Biotechnol*, 2014, 32(6): 304-311.
- [2] Gill S S, Gill R, Trivedi D K, et al. Piriformospora indica: Potential and significance in plant stress tolerance [J]. *Front Microbiol*, 2016, 332(7): 1-20.
- [3] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(3): 629-661.
- [4] Hamed I, Ozogul F, Ozogul Y, et al. Marine bioactive compounds and their health benefits: A review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Safety*, 2015, 14(4): 446-465.
- [5] Ren J W, Niu S B, Li L, et al. Identification of

- oxaphenalenone ketals from the ascomycete fungus *Neonectria* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(6): 1316-1321.
- [6] Coralia O, Carmenza D. *Food Flavor* [M]. Washington DC: American Chemical Society, 2008.
- [7] Coralia O, Carmenza D, Margoth S, *et al.* Free, glycosidically bound, and phosphate bound flavor constituents of badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp [J]. *J Separ Sci*, 2002, 25(3): 147-154.
- [8] Zhang S W, Xuan L J. New phenolic constituents from the stems of *Spatholobus suberectus* [J]. *Helv Chim Acta*, 2006, 89(6): 1241-1245.
- [9] Guo L, Wang C. Optimized production and isolation of antibacterial agent from marine *Aspergillus flavipes* against *Vibrio harveyi* [J]. *Biotech*, 2017, 7(6): 383.
- [10] Cui X, Zhu G, Liu H, *et al.* Diversity and function of the antarctic krill microorganisms from *Euphausia superba* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 1-17.
- [11] 齐 曼, 郑晓珂, 曹彦刚, 等. 皂角刺醋酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5510-5515.
- [12] 邵延琳, 刘 坤, 房芯羽, 等. 褐藻羊栖菜 *Sargassum fusi forme* (Harv.) Setch. 化学成分研究 [J]. 中国海洋药物, 2018, 37(1): 20-24.
- [13] 李浩华, 潘清灵, 陈玉婵, 等. 深海真菌 *Penicillium herquei* FS83 次生代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(3): 327-330.
- [14] 孙爱静, 庞素秋, 王国权. 白及化学成分与抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(2): 101-104.
- [15] Zuo W J, Jin P F, Dong W H, *et al.* Metabolites from the endophytic fungus HP-1 of Chinese eaglewood [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(2): 151-153.
- [16] Zhou L, Zheng X, Wan C, *et al.* Chemical constituents of the fungus *Veronaea* sp. [J]. *Chem Nat Compd*, 2015, 51(2): 270-272.
- [17] 魏荷琳, 周思祥, 姜 勇, 等. Chemical constituents from leaves of *Evodia leptota* [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1193-1197.
- [18] Taewoong R, Kee D Y. Chemical constituents of *Nelumbo nucifera* seeds [J]. *Nat Prod Sci*, 2017, 23(4): 253-257.
- [19] Gil M I, Tomas-Barberan F A, Hess-Pierce B, *et al.* Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(10): 4581-4589.
- [20] Ellman G L, Courtney K D, Andres V J, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2): 88-95.
- [21] Nilubon J A, Megh R B, Jun K. α -glucosidase inhibitors from devil tree (*Alstonia scholaris*) [J]. *Food Chem*, 2007, 103(4): 1319-1323.
- [22] 李 丹. 两株海洋共附生真菌的次级代谢产物及其生物活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [23] 董 飞, 郭晓农. 藜麦种子总黄酮的提取及体外抑菌作用 [J]. 甘肃农业科技, 2018(4): 14-18.

• 封面图片介绍 •

土沉香花



土沉香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng. 为瑞香科乔木, 高可达 15 m, 树皮暗灰色, 小枝圆柱形, 叶革质, 圆形、椭圆形至长圆形, 有时近倒卵形, 上面暗绿色或紫绿色, 下面淡绿色, 两面均无毛, 边缘有时被稀疏的柔毛; 叶柄被毛; 伞形花序有花, 花芳香, 黄绿色, 萼筒浅钟状, 裂片卵形, 花瓣鳞片状, 着生于花萼筒喉部, 花药长圆形, 子房卵形; 蒴果果梗短, 卵球形, 种子褐色, 花期春夏, 果期夏秋。其分布于中国广东、海南、广西、福建, 喜生于低海拔的山地、丘陵以及路边阳处疏林中。

土沉香老茎受伤后所积得的树脂俗称沉香, 可作香料原料, 并为治胃病特效药; 树皮纤维柔韧, 色白而细致可做高级纸原料及人造棉; 木质部可提取芳香油, 花可制浸膏。