

• 化学成分 •

一株海洋曲霉 MDCW-15 中的新烟曲霉素

高谕康¹, 邱子言¹, 宋永清², 王 坤¹, 陆远玉¹, 唐思艳¹, 陆焕云¹, 王 聪^{1*}

1. 广西民族大学化学化工学院 广西林产化学与工程重点实验室, 广西林产化学与工程协同创新中心, 广西高校食品安全与药物分析化学重点实验室, 广西 南宁 530006
2. 山东省滨州市人民医院 药学部, 山东 滨州 256611

摘要: 目的 对海洋曲霉 MDCW-15 的次级代谢产物进行研究。方法 利用柱色谱等方法对菌株次级代谢产物进行分离纯化, 运用核磁共振、质谱等波谱分析方法对化合物进行结构鉴定, 采用药敏纸片法评价化合物的抗真菌活性。结果 从发酵产物中分离鉴定了 1 个新的烟曲霉素类化合物 2'-顺式-富马霉素 (1) 及已知化合物 fumagiringillin (2), 对化合物进行了抑菌活性测试。结果显示化合物 1 和 2 对白色念珠菌的最小抑菌浓度 (MIC) 值均为 32.0 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 化合物 1 为新化合物; 化合物 1 和 2 具有一定的抗真菌活性。

关键词: 海洋曲霉 MDCW-15; 烟曲霉素类化合物; 次级代谢产物; 抑菌活性; 2'-顺式-富马霉素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)24-6137-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.001

A new fumagillin compound from marine-derived *Aspergillus fumigatus* MDCW-15GAO Yu-kang¹, QIU Zi-yan¹, SONG Yong-qing², WANG Kun¹, LU Yuan-yu¹, TANG Si-yan¹, LU Huan-yun¹, WANG Cong¹

1. Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Collaborative Innovation Center for Chemistry and Engineering of Forest Products, Key Laboratory of Guangxi Colleges and Universities for Food Safety and Pharmaceutical Analytical Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China
2. Department of Pharmaceutical, Binzhou People's Hospital of Shandong Province, Binzhou 256611, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of marine-derived *Aspergillus fumigatus* MDCW-15. **Methods** The secondary metabolites were isolated and purified by column chromatography over silica gel. And their structures were identified by the spectroscopic analysis of NMR and MS. The antifungal bioactivities were assayed by paper diffusion. **Results** A new fumagillin compound 1 and a known compound 2 were isolated from the fermentation broth of marine-derived *Aspergillus fumigatus* MDCW-15. The antifungal bioactivities were assayed by paper diffusion. Compounds 1 and 2 showed antifungal activity against *Candida albicans* with an equal MIC value of 32.0 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Compound 1 is a new compound named 2'-cis-fumagiringillin. Compounds 1 and 2 exhibit antifungal activities.

Key words: marine-derived *Aspergillus fumigatus* MDCW-15; fumagillin; secondary metabolites; antifungal activity; 2'-cis-fumagiringillin

海洋真菌由于代谢产物种类丰富、生物活性多样等特点, 已成为重要的天然抗生素来源^[1]。朱伟

明教授课题组报道了 2010—2013 年初的海洋真菌来源的新化合物, 其中曲霉 *Aspergillus* sp. 研究最

收稿日期: 2020-07-19

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2019GXNSFBA185002); 国家级大学生创新创业训练计划 (201910608025、201910608026); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD18126005)

作者简介: 高谕康, 研究方向为海洋药物化学。E-mail: 935039058@qq.com

*通信作者 王 聪, 博士, 讲师, 研究方向为海洋药物化学。Tel: 18776156656 E-mail: wangcong123206@163.com

多, 约占海洋真菌来源的新化合物的 31%^[2]。海洋曲霉来源新化合物的研究始于 1992 年, 截止至 2014 年 8 月, 已报道了 512 个海洋曲霉来源的新化合物, 36% 海洋曲霉来源的新化合物具有生物活性^[3]。广西北部湾具有丰富的海洋生物资源^[4]。前期课题组从广西北部湾来源的海洋真菌 *Penicillium* sp. H1 的发酵提取物中分离得到新的二萜糖酯类化合物 xylinonericins D 和 E^[5-6], 从 MDCW-15 的代谢产

物中分离了化合物 fumagillin^[1], 为了继续研究此海洋真菌来源的抗菌活性新物质, 本实验从来自广西北部湾秋茄根来源的 *Aspergillus fumigatus* MDCW-15 的代谢产物中分离了 1 个新的烟曲霉素化合物 2'-顺式-富马霉素 (2'-*cis*-fumagiringillin, **1**) 和 1 个已知化合物 fumagiringillin (**2**) (图 1)。化合物 **1** 和 **2** 对白色念珠菌的最小抑菌浓度 (MIC) 均为 32.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

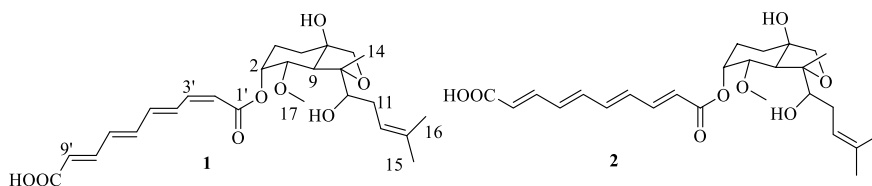


图 1 化合物 1、2 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

1 仪器与材料

LRH-500A 型生化培养箱 (广东泰宏君科学仪器股份有限公司)、YXQ-LS-75SII 型高压灭菌锅 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、HCB-1300V 型洁净工作台 (青岛海尔特种电器有限公司)、KQ-500DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、Nicolet NEXUS 470 型红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司)、Mariner API-TOF 型质谱仪 (美国应用生物系统公司)、高分辨 ESIMS Q-TOF ULTIMA GLOBAL GAA076 LC (美国 Waters 公司)、POLAX-L 型旋光仪 (美国 ATAGO 公司)、Agilent-DD2 500 型核磁共振仪 (Agilent 公司)、正相硅胶 200~300 目 (青岛海洋化工集团公司)、反相硅胶 YMC*GEL ODS-A-HG (日本 YMC Group)。提取分离用醋酸乙酯、甲醇、二氯甲烷等均为工业用化学纯产品。

海洋真菌 *Aspergillus fumigatus* MDCW-15 分离于广西北部湾来源的秋茄根 (N21°44'39", E108°35'38")^[1]。综合菌株的生长形态与序列比对 (GenBank accession No. MN013975), 将此菌株鉴定为 *Aspergillus fumigatus* MDCW-15。

2 方法

2.1 菌株发酵

将菌株 *Aspergillus fumigatus* MDCW-15 接种于真菌 2 号培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 3 d, 将此菌株接种于 300 mL 培养液 (甘露醇 20 g、葡萄糖 10 g、玉米浆 1 g、酵母膏 3 g、味精 10 g、 KH_2PO_4

0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g、NaCl 33 g, 自来水 1 000 mL) 的锥形瓶 (1 000 mL) 中, 室温静置培养 30 d, 发酵规模为 20 L。

2.2 菌株分子鉴定

海洋真菌基因组 DNA 的提取、扩增以及测序纯化 3 部分由上海生工生物工程股份有限公司测试^[4]。

2.3 活性产物的提取分离

2.3.1 菌株 *Aspergillus fumigatus* MDCW-15 提取物的制备 将培养物采用醋酸乙酯萃取, 滤过, 减压浓缩后得到浸膏 6.7 g。

2.3.2 化合物的分离 对浸膏进行减压硅胶柱色谱, 采用石油醚-醋酸乙酯 (10:1、7:1、5:1、3:1、1:1、1:3) 梯度洗脱, 收集、浓缩后经薄层色谱 (TLC) 检测合并获得 6 个流分 (Fr. 1~6)。HPLC 指纹图谱分析发现, Fr. 3 中含有紫外吸收在 350 nm 左右的 2 个系列吸收, 提示其共轭系统较大, 可能为复杂化合物, 因此选择通过 HPLC 检测对这 2 个化合物进行定向分离。对 Fr. 3 (1.5 g) 采用反相硅胶柱色谱 (30%~100% 甲醇) 洗脱, 收集、浓缩后经 TLC 检测合并得到 7 个流分 Fr. 3.1~3.7。HPLC 分析显示, Fr. 3.3 中含有这 2 个化合物。对 Fr. 3.3 (325 mg) 采用硅胶柱色谱以石油醚-醋酸乙酯 (6:1~1:1) 梯度洗脱纯化得到化合物 **1** (2.8 mg) 和 **2** (6.0 mg)。

2.4 抑菌活性评价方法

抑菌活性测试采用药敏纸片法和二倍稀释法^[1,7]。将白色念珠菌^[1]均匀涂布到 YPD 培养基 (葡萄糖

20 g、蛋白胨 20 g、酵母浸膏 10 g、琼脂 20 g，自来水 1 000 mL) 上。吸取样品 10 μ L 于直径为 6 mm 无菌滤纸片上，待纸片干燥后将其贴于培养基上，28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养时间为 12 h，观察有无抑菌圈产生。阳性药酮康唑的最小抑菌浓度(MIC)为 4 μ g/mL。对有活性的化合物继续以二倍稀释法测定其 MIC。

3 结果与分析

3.1 菌株鉴定结果

菌株 MDCW-15 的 18S rDNA 基因的 PCR 扩增

序列的长度为 572 bp，与 NCBI 数据库中的菌株 *Aspergillus fumigatus* [*Aspergillus fumigatus* OHIG AV (MF540309.1)] 的 18S rDNA 基因序列同源性为 100%，亲缘关系在系统发育树上处于同一分支。初步鉴定海洋真菌 MDCW-15 (GenBank MN013975) 为曲霉属 *Aspergillus* sp. (图 2)。菌株生长一段时间后进一步观察其形态特征，菌落呈暗烟绿色，绒状，与烟曲霉的形态特征一致^[8]，故鉴定菌株 MDCW-15 为曲霉菌 *Aspergillus fumigatus*。

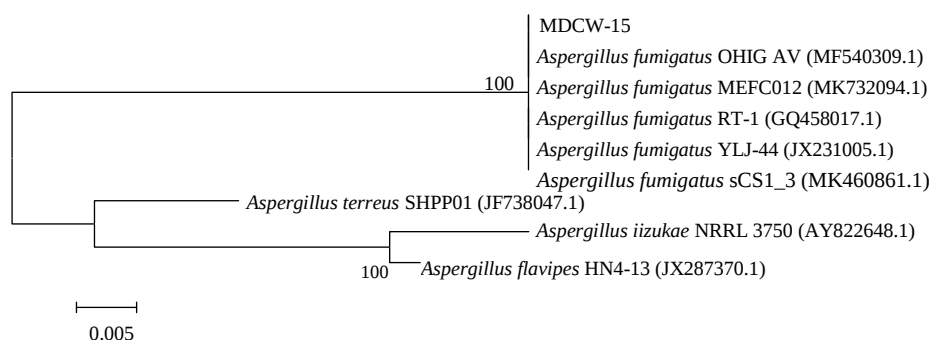


图 2 MDCW-15 菌株的系统发育树状关系

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of strain MDCW-15

3.2 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色油状物, $[\alpha]_D^{25} -18.9^{\circ}$ (c 0.1, MeOH)。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 317 (2.20), 331 (2.31), 348 (2.22)。正离子高分辨质谱 HRESIMS 在 m/z 477.249 0 (计算值 477.248 3) 给出准分子离子峰 $[M+H]^+$ ，提示分子式为 $C_{26}H_{36}O_8$ 。红外光谱给出羧基 (3 405、1 721、1 610、1 209、1 067 cm^{-1}) 等官能团的特征吸收峰。该化合物与 fumagiringillin (化合物 **2**)^[9] 紫外吸收相似，为同系列化合物，初步判断为烟曲霉素类化合物。化合物 **1** 的 ^{13}C -NMR 和 HSQC 谱图给出 9 个 sp^2 次甲基 (δ_{C} 123.4、119.9、144.9、133.3、141.6、140.8、135.3、145.3、124.3)、1 个酯羰基 (δ_{C} 169.7)、3 个连氧次甲基 ($\delta_{\text{C/H}}$ 78.4/3.74、68.3/5.63、80.7/3.30)、1 个连氧亚甲基 ($\delta_{\text{C/H}}$ 78.7/3.79、3.61)、1 个甲氧基 ($\delta_{\text{C/H}}$ 57.2/3.38)、3 个亚甲基 ($\delta_{\text{C/H}}$ 26.8/1.89、2.10、29.5/1.61、1.64、31.3/2.01、2.34)、1 个次甲基 ($\delta_{\text{C/H}}$ 54.0/2.19)、3 个甲基 ($\delta_{\text{C/H}}$ 16.5/1.29、18.0/1.57、26.0/1.64)、1 个羧基 (δ_{C} 170.4) 和 2 个连氧季碳 (δ_{C} 81.2、86.9)。这些数据与化合物 **2** 的非常相似，仅是侧链上 2' 和 3' 位碳的化学位移稍有差别。分析化合物 **1** 的 ^1H -NMR 谱图发现 H-2'/H-3' 的偶合常数为 11.3 Hz，

提示 Δ^2 双键的构型为 *Z* 型，与化合物 **2** 不同。化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 谱中给出 H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'/H-7'/H-8'/H-9'，H-9/H-1/H-2/H-3/H-4 和 H-10/H-11/H-12 的相关信号 (图 3)。化合物 **1** 的 HMBC 谱图中出现了关键的远程偶合相关信号 (图 3): H-8'、H-9' 和 C-10' 有相关信号; H-2、H-2'、H-3' 和 C-1' 有相关信号; H-11 和 C-10、C-12 有相关信号; H-12 和 C-15、C-16 有相关信号; H-17 和 C-1 有相关信号; H-1 和 C-3、C-5 有相关信号; H-4 和 C-5 有相关信号; H-6 和 C-5、C-8、C-9 有相关信号; H-9 和 C-8、C-10 有相关信号; H-14 和 C-8、C-10 有相关信号。这些数据进一步确证了化合物 **1** 的结构。分析化合物 **1** 的核磁数据 (表 1)，H-1 和 H-9 之间大的偶合常数 ($J = 12.0$ Hz) 提示它们为反式相邻 α 键的关系，而 H-1 和 H-2 之间小的偶合常数提示 H-2 为 *e* 键且与 H-1 同面。在 ROESY 谱中，H-1/H-4a/H₃-14 相关，提示 H₃-14 和 H-1 同面; H-9/H-10 相关，提示 H-9 和 H-1 异面。此外，H-1 和 H₂-6 之间无 ROESY 相关 (图 4)，提示化合物 **1** 母核中五元环和六元环为反式骈和，和化合物 **2** 一致。至此，化合物 **1** 中的 C-10 的构型仍未解决。本课题组曾考虑用 Mosher 反应确定 C-10 的绝对构

表 1 化合物 1 的 NMR 数据 (500/125 MHz, CD₃OD)Table 1 NMR Data of compound 1 (500/125 MHz, CD₃OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	3.74 (1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz)	78.4, CH
2	5.63 (1H, m)	68.3, CH
3	1.89 (1H, m, H-3 β), 2.10 (1H, m, H-3 α)	26.8, CH ₂
4	1.61 (1H, m, H-4 α), 1.64 (1H, m, H-4 β)	29.5, CH ₂
5		81.2, C
6	3.79 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-6a), 3.61(1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-6b)	78.7, CH ₂
7		
8		86.9, C
9	2.19 (1H, d, $J = 12.0$ Hz)	54.0, CH
10	3.30 (1H, m)	80.7, CH
11	2.01 (1H, m, H-11a), 2.34 (1H, m, H-11b)	31.3, CH ₂
12	5.22 (1H, m)	123.4, CH
13		133.2, C
14	1.29 (3H, s)	16.5, CH ₃
15	1.57 (3H, s)	18.0, CH ₃
16	1.64 (3H, s)	26.0, CH ₃
17	3.38 (3H, s)	57.2, CH ₃
1'		167.0, C
2'	5.74 (1H, d, $J = 11.3$ Hz)	119.9, CH
3'	6.72 (1H, dd, $J = 11.3, 10.7$ Hz)	144.9, CH
4'	7.61 (1H, dd, $J = 14.5, 10.7$ Hz)	133.3, CH
5'	6.65 (1H, dd, $J = 14.5, 10.8$ Hz)	141.6, CH
6'	6.79 (1H, dd, $J = 15.2, 10.8$ Hz)	140.8, CH
7'	6.58 (1H, dd, $J = 15.2, 11.0$ Hz)	135.3, CH
8'	7.31 (1H, dd, $J = 15.1, 11.0$ Hz)	145.3, CH
9'	5.94 (1H, d, $J = 15.1$ Hz)	124.3, CH
10'		170.4, C

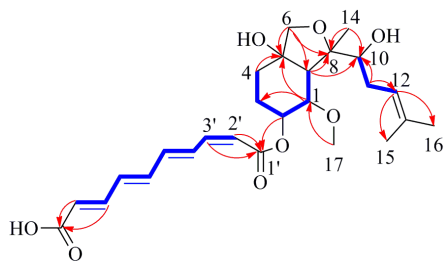
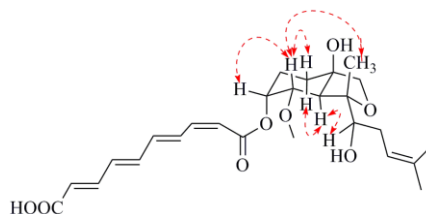
图 3 化合物 1 的主要 ¹H-¹H COSY (粗线)、HMBC (箭头) 相关Fig. 3 Key ¹H-¹H COSY (boldse) and HMBC (solid arrows) correlations of compound 1

图 4 化合物 1 的主要 ROESY 相关 (虚线箭头)

Fig. 4 Key ROESY (broken arrows) correlations of compound 1

型,但是由于获得的化合物 1 的量不高 (2.8 mg),此方法未能实行。但是根据化合物 1 和 2 的母核的基本一致的核磁数据,可以推断它们的母核具有相同的构型。化合物 1 与文献报道的 fumagiringillin^[9]的区别仅为 Δ^2 双键的构型,经 Scifinder 数据库检索,确定化合物 1 为新化合物,命名为 2'-顺式-富马霉素。

化合物 2: 淡黄色油状物, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -15^\circ$ (c 0.2, MeOH)。ESI-MS m/z : 477.3 $[M+H]^+$, 分子式 C₂₆H₃₆O₈; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.34 (1H, dd, $J = 15.3, 11.0$ Hz, H-8'), 7.29 (1H, dd, $J = 15.5, 11.5$ Hz, H-3'), 6.74 (1H, m, H-5'), 6.70 (1H, m, H-6'), 6.58 (1H, m, H-7'), 6.55 (1H, m, H-4'), 6.02 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-2'), 5.95 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-9'), 5.63 (1H, m, H-2), 5.22 (1H, m, H-12), 3.76 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 3.73 (1H, dd, $J = 12.0, 2.8$ Hz, H-1), 3.62 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 3.35 (3H, s, H-17), 3.30 (1H, m, H-10), 2.33 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-9), 2.31 (1H, m, H-11), 2.01 (1H, m, H-11), 1.84 (1H, m, H-3), 1.65 (3H, s, H-16), 1.64 (1H, m, H-4), 1.63 (2H, m, H-3, 4), 1.57 (3H, s, H-15), 1.27 (3H, s, H-14); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 169.2 (C, C-10'), 167.7 (C, C-1'), 145.5 (CH, C-8'), 145.0 (CH, C-3'), 141.0 (CH, C-5'), 140.3 (CH, C-6'), 135.2 (CH, C-4'), 134.6 (CH, C-7'), 133.3 (C, C-13), 124.9 (CH, C-9'), 123.5 (CH, C-12, 2'), 86.9 (CH₂, C-8), 81.2 (C, C-5), 80.6 (CH, C-10), 78.7 (CH₂, C-6), 78.6 (CH, C-1), 68.5 (CH, C-2), 57.2 (CH₃, C-17), 53.5 (CH, C-9), 31.3 (CH₂, C-11), 29.5 (CH₂, C-4), 26.9 (CH₂, C-3), 26.0 (CH₃, C-16), 18.0 (CH₃, C-15), 16.6 (CH₃, C-14)。该化合物的数据与文献报道一致^[9],故鉴定化合物 2 为 fumagiringillin。

3.3 抑菌活性测试结果

对化合物 1 和 2 进行白色念珠菌的抑菌活性评价,初筛浓度为 128 $\mu\text{g/mL}$,在此浓度下显示较明

显的抑菌圈。以此浓度为基础进行二倍稀释法测试最小抑制浓度 (MIC), 最终化合物 **1** 和 **2** 对白色念珠菌的 MIC 值被测定为 32.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

4 讨论

本实验对海洋真菌 *Aspergillus fumigatus* MDCW-15 的次生代谢产物进行了研究, 该菌在二号培养基条件下代谢产生 2 个化合物 (**1**、**2**), 其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **1** 和 **2** 对白色念珠菌的 MIC 值均为 32.0 $\mu\text{g/mL}$ 。目前鲜有报道广西北部湾来源海洋真菌的活性成分研究^[10]。

参考文献

- [1] 王 聪, 苏 艳, 高谕康, 等. 广西北部湾真菌的分离筛选及活性产物的鉴定 [J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(4): 270-276.
- [2] 赵成英, 朱统汉, 朱伟明. 2010~2013 之海洋微生物新天然产物 [J]. 有机化学, 2013, 33(6): 1195-1234.
- [3] 赵成英, 刘海珊, 朱伟明. 海洋曲霉来源的新天然产物 [J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 331-362.
- [4] 于清武. 北部湾 (广西海域) 海洋微生物多样性研究现状与对策 [J]. 南方农业学报, 2014, 45(12): 2293-2296.
- [5] 王 聪, 刘春娟, 雷福厚, 等. 海洋真菌 *Penicillium* sp. H1 中 1 个新的二萜糖苷类化合物 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5746-5750.
- [6] 王 聪, 高谕康, 雷福厚, 等. 一株海洋青霉中的新二萜糖苷 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2518-2523.
- [7] 王文玲, 王立平, 王 聪, 等. 珊瑚真菌 *Aspergillus* sp. OUCMDZ-3658 产生的生物碱 [J]. 中国海洋药物, 2015, 34(6): 1-11.
- [8] Wang Y, Li Z L, Bai J, et al. 2, 5-Diketopiperazines from the marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* YK-7 [J]. *Chem Biodivers*, 2012, 9(2): 385-393.
- [9] Jiao W, Blunt J W, Cole A L J, et al. Fumagiringillin, a new fumagillin derivative from a strain of the fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(8): 1434-1437.
- [10] 张 艳, 蓝桃菊, 廖仕同, 等. 广西北部湾红树植物内生真菌多样性. 微生物学通报 [J]. 2017, 44(4): 783-794.