

海洋曲霉 *Aspergillus ruber* TX-M4-1 的次级代谢产物研究

王聪, 王玉妃, 孙建, 王诗怡, 蓝坤燕, 杜为胜, 孔凡栋, 周丽曼*

广西民族大学化学化工学院, 林产化学与工程国家民委重点实验室, 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, 广西南宁 530006

摘要: 目的 对来自涠洲岛火山口的海洋曲霉 *Aspergillus ruber* TX-M4-1 的次级代谢产物进行研究。方法 利用硅胶、凝胶和高效液相等柱色谱方法进行分离纯化, 运用紫外、红外、质谱和核磁共振波谱等分析方法对化合物进行结构鉴定, 分别采用 96 孔板微量法、CCK-8 法和 DPPH 法对化合物的抗菌活性、肿瘤细胞毒活性及抗氧化活性进行测试。结果 从海洋曲霉 *Aspergillus ruber* TX-M4-1 的发酵产物中分离鉴定了 1 个新的苯甲醛类化合物及 10 个已知结构的化合物, 分别鉴定为 5'-顺式-四氢金色灰绿曲霉素 (1)、2-(1',5'-庚二烯基)-3,6-二羟基-5-(3"-甲基-2"-丁烯基)苯甲醛 (2)、异二氢金色灰绿曲霉素 (3)、二氢金色灰绿曲霉素 (4)、四氢金色灰绿曲霉素 (5)、灰绿曲霉黄色素 (6)、谷甾醇 (7)、胆固醇 (8)、链霉菌素 (9)、脱氢海胆灵 (10) 和新海胆灵 A (11)。化合物 1、5 和 6 具有清除自由基活性, 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下其 DPPH 自由基清除率分别为 61.9%、88.0% 和 91.9%。结论 化合物 1 为新的苯甲醛类化合物。化合物 1、5 和 6 具有强的抗氧化活性。

关键词: 海洋曲霉 TX-M4-1; 苯甲醛类化合物; 抗氧化活性; 5'-顺式-四氢金色灰绿曲霉素; 灰绿曲霉黄色素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)18-5600-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.002

Secondary metabolites from marine-derived *Aspergillus ruber* TX-M4-1

WANG Cong, WANG Yu-fei, SUN Jian, WANG Shi-yi, LAN Kun-yan, DU Wei-sheng, KONG Fan-dong, ZHOU Li-man

Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, State Ethnic Affairs Commission, Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Collaborative Innovation Center for Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of marine-derived *Aspergillus ruber* TX-M4-1. **Methods** The secondary metabolites were isolated and purified by silica gel column chromatography, gel column chromatography and HPLC methods. The structures of the compounds were identified by UV, IR, MS and NMR. The antimicrobial, antitumor and antioxidant activities of compounds were evaluated by 96-well microtiter plate method, CCK-8 method and DPPH method, respectively. **Results** One new benzaldehyde compound and 10 compounds with known structures were isolated from the fermentation products of marine-derived *Aspergillus ruber* TX-M4-1. 5'-cis-isotetrahydroauroglaucin (1), 2-(1',5'-heptadienyl)-3,6-dihydroxy-5-(3"-methyl-2"-butenyl) benzaldehyde (2), isodihydroauroglaucin (3), dihydroauroglaucin (4), tetrahydroauroglaucin (5), flavoglaucin (6), β -sitosterol (7), cholesterol (8), catenarin (9), dehydroechinulin (10) and neocheinulin A (11), respectively. Compounds 1, 5 and 6 exhibited radical scavenging activity against DPPH with inhibition rates of 61.9%, 88.0% and 91.9% at a DPPH concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new benzaldehyde. Compounds 1, 5 and 6 exhibited strong antioxidant activity.

Key words: marine-derived *Aspergillus ruber* TX-M4-1; benzaldehyde; antioxidant activity; 5'-cis-isotetrahydroauroglaucin; flavoglaucin

海洋环境相较于陆地环境有高压、高盐、高渗、低温、营养少等特点。海洋微生物在长期适应这种特殊生存环境的过程中进化出了有别于陆生生物的新陈代谢途径和适应机制, 进而产生了大量结构新

收稿日期: 2022-07-17

基金项目: 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD20297036); 广西自然科学基金项目 (2021GXNSFBA220040, 2021GXNSFBA075036); 国家自然科学基金青年项目 (82104034); 广西民族大学校级引进人才科研启动项目 (2020KJQD09, 2021KJQD09); 广西民族大学相思湖青年创新团队项目 (2021RSCXSHQN01)

作者简介: 王聪, 副教授, 研究方向为海洋药物化学。E-mail: wangcong123206@163.com

*通信作者: 周丽曼, 博士, 讲师, 研究方向为天然产物化学。Tel: 15621369181 E-mail: zhouliman88@126.com

颖、活性显著的次级代谢产物，是发现药物先导化合物的主要途径^[1]。海洋曲霉来源新化合物的研究始于1992年，截至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，海洋曲霉已成为海洋药物研究的热点来源^[2-3]。

涠洲岛地处北部湾海域，是我国最大、最年轻的火山喷发堆积形成的岛屿，其具有独特的火山兼海洋地貌，生态环境特殊。特殊环境中的微生物为适应外部特殊环境演变出独特的次生代谢途径，产生结构新颖的活性化合物。因此对特境微生物次级代谢产物的研究及天然产物的扩充及药源分子的发现具有十分重要的意义^[4-5]。

本研究通过梯度稀释法，从采自涠洲岛火山口的苔藓样品中分离得到了一株海洋真菌 *Aspergillus ruber* TX-M4-1，对其进行固态培养后从

发酵提取物中分离得到了1个新的苯甲醛类化合物 5'-顺式-四氢金色灰绿曲霉素 (5'-*cis*-isotetrahydroauroglaucin, **1**) 和10个已知化合物 2-(1',5'-庚二烯基)-3,6-二羟基-5-(3''-甲基-2''-丁烯基)苯甲醛 [2-(1',5'-heptadienyl)-3,6-dihydroxy-5-(3''-methyl-2''-butenyl)benzaldehyde, **2**]、异二氢金色灰绿曲霉素 (isodihydroauroglaucin, **3**)、二氢金色灰绿曲霉素 (dihydroauroglaucin, **4**)、四氢金色灰绿曲霉素 (tetrahydroauroglaucin, **5**)、灰绿曲霉黄色素 (flavoglaucin, **6**)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, **7**)、胆固醇 (cholesterol, **8**)、链霉菌素 (catenarin, **9**)、脱氢海胆灵 (dehydroechinulin, **10**) 和新海胆灵 A (neoechinulin A, **11**)。结构见图1。对以上分离得到的化合物进行了抗菌、肿瘤细胞毒活性以及自由基清除能力活性测试，结果显示化合物 **1**、**5** 和 **6** 具有清除自由基活性，20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的 DPPH

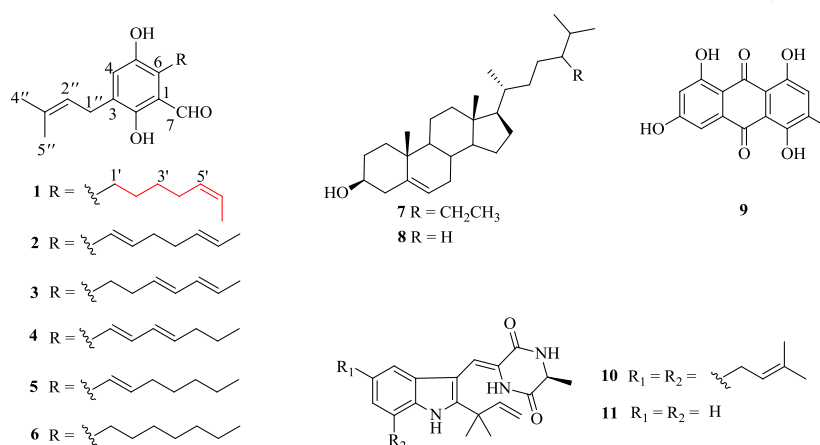


图1 化合物1~11的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—11

自由基清除率分别为61.9%、88.0%和91.9%。

1 仪器与材料

HCB-1300V型洁净工作台(青岛海尔特种电器有限公司)、LRH-500A型生化培养箱(广东泰宏君科学仪器股份有限公司)、核磁共振波谱仪(布鲁克400 MHz)、CR-080R型春霖超声波清洗机(深圳市春霖清洗设备有限公司)、YXQ-LS-75SII型高压灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、TD4N离心机(长沙英泰仪器有限公司)、Mariner API-TOF型质谱仪(美国应用生物系统公司)、K3 TOUCH酶标仪(飞世尔实验器材有限公司)、Agilent 1260高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、SCI-VS混匀仪(美国塞洛捷克公司)、AL104型分析天平(瑞士梅特勒公司)、200~300目正相硅胶(青岛海洋

化工集团公司)、YMC*GEL ODS-A-HG反相硅胶(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。

一株海洋真菌分离于广西涠洲岛来源的苔藓(N21°1'42.97", E109°7'46.29")。综合菌株的生长形态与序列比对(GenBank accession No. OL989330),此菌株鉴定为 *Aspergillus ruber* TX-M4-1。

2 方法

2.1 菌株发酵

将菌株 *Aspergillus ruber* TX-M4-1 接种于PDA平板培养基中，在28℃培养3 d，将此菌株接种于大米培养基(大米80 g、海水120 mL)的锥形瓶(1000 mL)中，室温静置培养32 d，发酵规模为100瓶。

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 部分是由上海生工生物工程股份有限公司测试^[6]。

2.3 产物的提取分离

2.3.1 菌株提取物制备 采用醋酸乙酯对菌株 *Aspergillus ruber* TX-M4-1 发酵物萃取 3 次, 滤过和减压浓缩后得到 83.47 g 粗提物。

2.3.2 产物的提取 采用石油醚、90%甲醇-水各 2 L 萃取上述粗提物, 得到石油醚萃取物 25.1 g, 甲醇-水萃取物 90.16 g (未完全蒸干水分)。

2.3.3 化合物的分离 对石油醚萃取物进行减压硅胶柱色谱, 采用石油醚-醋酸乙酯 (1:0、10:1、9:1、8:1、6:1、4:1、2:1、1:1、0:1) 梯度洗脱, 共 9 个梯度 (Fr. 1~9), 每个梯度分 4 次收集。以 Fr. 2 为例, 编号依次为 Fr. 2.1~2.4。Fr. 2.1 (100 mg) 通过 HPLC 制备 (C₁₈ 半制备柱, 甲醇-水 85:15, 体积流量 4 mL/min), 得到化合物 **1** ($t_R=17.1$ min, 16.6 mg)、**2** ($t_R=16.3$ min, 31.3 mg)、**3** ($t_R=13.6$ min, 2.5 mg)、**4** ($t_R=18.1$ min, 12 mg)、**5** ($t_R=20.2$ min, 13 mg) 和 **6** ($t_R=22.2$ min, 18 mg)。Fr. 2.4 (640 mg) 通过凝胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, TLC 检测合并、浓缩后得到 5 个流分 Fr. 2.4.1~2.4.5。Fr. 2.4.1 (350 mg) 通过硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 50:1 洗脱), TLC 检测、合并得到

化合物 **7** ($t_R=7.1$ min, 7.1 mg) 和 **8** ($t_R=10.4$ min, 65.1 mg)。Fr. 3.2 (100 mg) 通过凝胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, TLC 检测浓缩后得到 6 个流分 Fr. 3.2.1~3.2.6。Fr. 3.2.5 (63 mg) 通过 HPLC 制备 (C₁₈ 半制备柱, 乙腈-水 80:20, 流量 4 mL/min), 得到化合物 **9** ($t_R=6.8$ min, 25 mg)。Fr. 7.2 (164 mg) 通过凝胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, TLC 检测合并浓缩后得到 3 个流分 Fr. 7.2.1~7.2.3。Fr. 7.2.2 (127 mg) 通过 HPLC 制备 (C₁₈ 半制备柱, 乙腈-水 80:20, 流量 4 mL/min), 得到化合物 **10** ($t_R=17.2$ min, 62.7 mg)。Fr. 7.2.2 (127 mg) 通过 HPLC 制备 (5PFP 半制备柱, 乙腈-水 70:30, 体积流量 4 mL/min), 得到化合物 **11** ($t_R=10.4$ min, 4.8 mg)。

3 结果与分析

3.1 菌株鉴定结果

菌株 TX-M4-1 的 PCR 扩增序列的长度为 502 bp, 与 NCBI 数据库中的菌株 [*Aspergillus ruber* (OL989330)] 的 ITS 序列同源率为 100%, 亲缘关系在系统发育树上处于同一分支。初步鉴定该海洋真菌 TX-M4-1 (GenBank OL989330) 为曲霉属 *Aspergillus* sp. (图 2)。菌株生长一段时间后再进一步观察其形态特征, 菌落呈黄绿色、绒状, 与赤曲霉的形态特征一致, 故鉴定菌株 TX-M4-1 为赤曲霉 *Aspergillus ruber*^[7]。

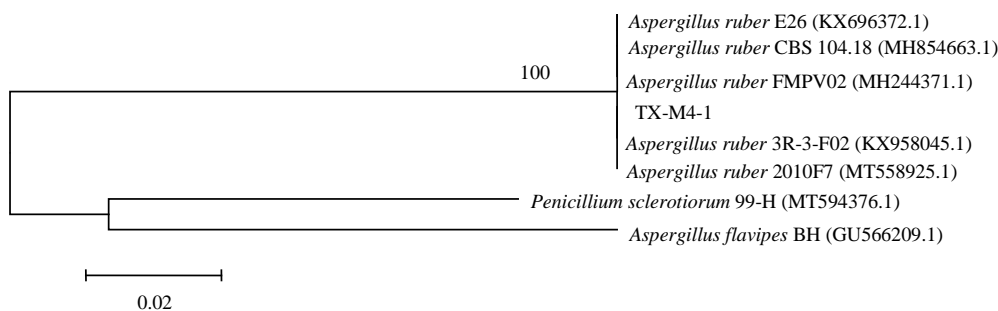


图 2 TX-M4-1 菌株的系统发育树状关系图

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of strain TX-M4-1

3.2 化合物结构鉴定

化合物 **1**: 橙黄色油状物; 正离子高分辨质谱 HR-ESI-MS 在 m/z 303.195 1 给出准分子离子峰 $[M+H]^+$, 提示分子式为 C₁₉H₂₆O₃; 红外光谱给出羟基和羰基 (3442 cm⁻¹ 和 1647 cm⁻¹) 等官能团的特征吸收峰; UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 200 (4.33), 224 (3.80) nm, 该化合物与异二氢金色灰绿曲霉素 (**3**) 紫外

吸收相似, 为同系列化合物, 初步判断为苯甲醛类化合物。化合物 **1** 的 ¹³C-NMR 和 HSQC 谱图给出 10 个苯环或双键碳 (δ_C 117.4, 156.0, 128.8, 125.8, 145.1, 128.5, 131.1, 125.5, 121.3, 134.0)、1 个醛基 (δ_C 195.7)、5 个亚甲基 ($\delta_{C/H}$ 23.8/2.88, 31.4/1.60, 29.4/1.46, 32.4/2.03, 27.1/3.29) 和 3 个甲基 ($\delta_{C/H}$ 18.1/1.64, 17.9/1.69, 26.0/1.76)。这些数据与化合物

异四氢金色灰绿曲霉素 (isotetrahydroauroglaucin) 的核磁共振波谱数据非常相似^[8], 仅是侧链上 5' 和 6' 位碳和氢的化学位移有差别 (化合物 **1**: $\delta_{C/H}$ 131.1/5.40、125.5/5.41; 异四氢金色灰绿曲霉素: $\delta_{C/H}$ 133.1/5.39、125.5/5.26)。这些数据提示化合物 **1** 的 Δ^5 双键的构型与异四氢金色灰绿曲霉素不同, 即为 *Z* 型。化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 谱中给出 H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'/H-7', H-1'' 和 H-2'' 的相关信号 (图 3)。它的 HMBC 谱图中出现了关键的氢-碳远程耦合相关信号 (H-1' 与 C-2'、C-1、C-5、C-6 有相关信号; H-2' 与 C-3'、C-6 有相关信号; H-3' 与 C-1'、C-5' 有相关信号; H-4' 与 C-3'、C-5'、C-6' 有相关信号; H-5' 与 C-7' 有相关信号; H-6' 与 C-4' 有相关信号; H-7' 与 C-6'、C-7' 有相关信号; H-7 与 C-1、C-6 以及 C-2 有相关信号; 2-OH 与 C-1、C-2 以及 C-3 有相关信号; H-4 与 C-1、C-5、C-6、C-2、C-1'' 有相关信号; H-1'' 与 C-2、C-3、C-4、C-2''、C-3'' 有相关信号; H-2'' 与 C-4''、C-5'' 有相关信号; H-4'' 与 C-2''、C-3''、C-5'' 有相关信号; H-5'' 与 C-2''、C-3''、C-4'' 有相关信号) (图 3)。此外, NOESY 图中给出 H-4' (δ_{H} 2.03) 和 H₃-7' (δ_{H} 1.64) 的相关信号。这些数据进一步确证了化合物 **1** 的结构。化合物 **1** 与文献报道的区别仅为 Δ^5 双键的构型, 故化合物 **1** 命名为 5'-顺式-四氢金色灰绿曲霉素。

化合物 **2**: 无色粉末, ESI-MS m/z 301.2 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 分子式 C₁₉H₂₄O₃; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.70 (1H, s, 6-OH), 10.08 (1H, s, H-7), 7.02 (1H, s, H-4), 6.44 (1H, d, $J = 16.3$ Hz, H-1'), 5.90 (1H, dt, $J = 16.2, 6.9$ Hz, H-2'), 5.50 (1H, m, H-6'), 5.43 (1H, m, H-5'), 5.29 (1H, m, H-2''), 3.31 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 2.40 (2H, q, $J = 6.8$ Hz, H-3'), 2.22 (2H, q, $J = 6.8$ Hz, H-4'), 1.76 (3H, s, H-4''), 1.70 (3H, m, H-5''), 1.69 (3H, m, H-7'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 196.5 (CH, C-7), 154.7 (C, C-6), 145.0 (C, C-3), 142.1

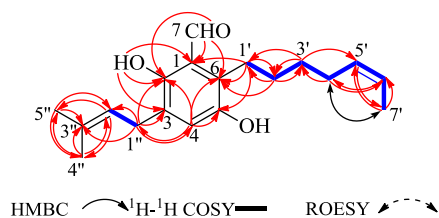


图 3 化合物 **1** 的重要 ^1H - ^1H COSY、HMBC 和 NOESY 相关
Fig. 3 Key ^1H - ^1H COSY, HMBC, and NOESY correlations of compound **1**

表 1 化合物 **1** 的 ^1H - (400 MHz, CDCl₃) 和 ^{13}C - (100 MHz, CDCl₃) NMR 数据

Table 1 ^1H - (400 MHz, CDCl₃) and ^{13}C - (100 MHz, CDCl₃) NMR data of compound **1**

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1		117.4, C
2		156.0, C
3		128.8, C
4	6.89 (1H, s)	125.8, C
5		145.1, C
6		128.5, C
7	10.24 (1H, s)	195.7, CH
1'	2.88 (2H, t, $J = 7.7$ Hz)	23.8, CH ₂
2'	1.60 (2H, m)	31.4, CH ₂
3'	1.46 (2H, m)	29.4, CH ₂
4'	2.03 (2H, m)	32.4, CH ₂
5'	5.40 (1H, overlapped)	131.1, CH
6'	5.41 (1H, overlapped)	125.5, CH
7'	1.64 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	18.1, CH ₃
1''	3.29 (2H, d, $J = 7.4$ Hz)	27.1, CH ₂
2''	5.28 (1H, m)	121.3, CH
3''		134.0, C
4''	1.69 (3H, s)	17.9, CH ₃
5''	1.76 (3H, s)	26.0, CH ₃
2-OH	11.92 (1H, s)	

(CH, C-2'), 134.1 (C, C-3''), 130.6 (C, C-5), 130.4 (CH, C-5'), 126.9 (CH, C-6'), 125.2 (CH, C-4), 123.9 (C, C-2), 121.1 (CH, C-2''), 121.0 (CH, C-1'), 117.2 (C, C-1), 33.3 (CH₂, C-3'), 32.1 (CH₂, C-4'), 27.3 (CH₂, C-1''), 25.9 (CH₃, C-4''), 18.0 (CH₃, C-5''), 17.9 (CH₃, C-7')。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **2** 为 2-(1',5'-庚二烯基)-3,6-二羟基-5-(3''-甲基-2''-丁烯基)苯甲醛。

化合物 **3**: 橙红色固体, ESI-MS m/z 301.2 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 分子式 C₁₉H₂₄O₃; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.93 (1H, s, 2-OH), 10.23 (1H, s, 1-CHO), 6.90 (1H, s, H-4), 6.02 (1H, m, H-3'), 5.99 (1H, m, H-4'), 5.59 (1H, m, H-5'), 5.58 (1H, m, H-6'), 5.28 (1H, m, H-2''), 4.51 (1H, brs, 5-OH), 3.29 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 2.98 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 2.34 (2H, q, $J = 7.7$ Hz, H-2'), 1.76 (3H, d, $J = 1.3$ Hz, H-5''), 1.73 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-7'), 1.69 (3H, s, H-4''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 195.5 (C, 1-CHO),

156.0 (C, C-2), 145.2 (C, C-5), 134.1 (C, C-3''), 132.2 (CH, C-3'), 131.3 (CH, C-4'), 129.5 (CH, C-6'), 129.1 (C, C-3), 128.5 (CH, C-5'), 127.5 (C, C-6), 126.0 (CH, C-4), 121.3 (CH, C-2''), 117.4 (C, C-1), 34.4 (CH₂, C-2'), 27.2 (CH₂, C-1''), 26.0 (CH₃, C-5''), 24.3 (CH₂, C-1'), 18.2 (CH₃, C-7'), 17.9 (CH₃, C-4'')。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **3** 为异二氢金色灰绿曲霉素。

化合物 **4**: 棕色油状物; ESI-MS m/z 301.2 [M+H]⁺, 分子式 C₁₉H₂₄O₃; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.78 (1H, s, 2-OH), 10.09 (1H, s, 1-CHO), 7.00 (1H, s, H-4), 6.56 (1H, dd, $J = 15.9$ Hz, H-1'), 6.43 (1H, dd, $J = 15.6, 10.3$ Hz, H-2'), 6.27 (1H, dd, $J = 10.3, 15.1$ Hz, H-3') , 5.89 (1H, dt, $J = 15.1, 7.2$ Hz, H-4') , 5.30 (1H, m, H-2''), 3.32 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 2.15 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-5'), 1.76 (3H, s, H-5''), 1.70 (3H, s, H-4''), 1.47 (2H, sextet, $J = 7.4$ Hz, H-6'), 0.94 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-7'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 196.4 (C, 1-CHO), 155.4 (C, C-2), 145.2 (C, C-5), 140.1 (CH, C-2''), 139.1 (CH, C-4'), 134.2 (C, C-3''), 130.7 (C, C-3), 129.7 (CH, C-3'), 125.3 (CH, C-4), 124.2 (C, C-6), 121.1 (CH, C-2''), 119.5 (CH₂, C-1''), 117.2 (C, C-1), 35.0 (CH₂, C-5'), 27.4 (CH₂, C-1''), 26.0 (CH₃, C-5''), 22.4 (CH₂, C-6'), 17.9 (CH₃, C-4), 13.9 (CH₃, C-7')。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为二氢金色灰绿曲霉素。

化合物 **5**: 红色固体; ESI-MS m/z 341.3 [M+K]⁺, 分子式 C₁₉H₂₆O₃; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.72 (1H, s, 2-OH), 10.09 (1H, s, 1-CHO), 7.01 (1H, s, H-4), 6.48 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-1'), 5.98 (1H, dt, $J = 16.2, 6.8$ Hz, H-2'), 5.29 (1H, m, H-2''), 4.98 (1H, s, 5-OH), 3.31 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 2.32 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-3'), 1.75 (3H, s, H-5''), 1.69 (3H, s, H-4''), 1.51 (2H, quintet, $J = 7.2$ Hz, H-4'), 1.35 (4H, m, H-5', 6'), 0.91 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, H-7'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 196.5 (C, 1-CHO), 155.2 (C, C-2), 145.0 (C, C-5), 142.8 (CH, C-2'), 134.0 (C, C-3''), 130.4 (C, C-3), 125.2 (CH, C-4), 124.2 (C, C-6), 121.1 (CH, C-2''), 120.2 (CH, C-1'), 117.3 (C, C-1), 33.6 (CH₂, C-3'), 31.6 (CH₂, C-5'), 28.9 (CH₂, C-4'), 27.4 (CH₂, C-1''), 25.9 (CH₃, C-5''), 22.6 (CH₂, C-6'), 17.9 (CH₃, C-4''), 14.1 (CH₃, C-7')。

以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为四氢金色灰绿曲霉素。

化合物 **6**: 棕黄色固体; ESI-MS m/z 327.3 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₉H₂₈O₃; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.92 (1H, s, 2-OH), 10.25 (1H, s, 1-CHO), 6.89 (1H, s, H-4), 5.28 (1H, m, H-2''), 4.44 (1H, m, 5-OH), 3.29 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 2.88 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 1.76 (3H, s, H-5''), 1.70 (3H, s, H-4''), 1.57 (2H, m, H-2'), 1.39 (2H, m, H-3'), 1.30 (2H, m, H-4'), 1.28 (4H, m, H-5', 6'), 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-7'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 196.5 (C, 1-CHO), 155.2 (C, C-2), 145.0 (C, C-5), 134.0 (CH, C-3''), 130.4 (C, C-3, 6), 125.2 (CH, C-4), 121.1 (CH, C-2''), 117.3 (C, C-1), 33.6 (CH₂, C-2'), 31.6 (CH₂, C-5'), 29.8 (CH₂, C-3'), 28.9 (CH₂, C-4'), 27.4 (CH₂, C-1''), 25.9 (CH₃, C-5''), 24.1 (CH₂, C-1'), 22.6 (CH₂, C-6'), 17.9 (CH₂, C-4''), 14.1 (CH₃, C-7')。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **6** 为灰绿曲霉黄色素。

化合物 **7**: 白色粉末; ESI-MS m/z 414.3 [M+H]⁺, 分子式 C₂₉H₅₀O; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.35 (1H, brd, $J = 5.5$ Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3) , 1.01 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, m, H-21), 0.86 (3H, m, H-29), 0.84 (3H, m, H-26), 0.82 (3H, m, H-27), 0.68 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 140.9 (C, C-5), 121.9 (CH, C-6), 72.0 (CH, C-3), 56.9 (CH, C-14), 56.2 (CH, C-17), 50.3 (CH, C-9), 46.0 (CH, C-24), 42.5 (CH₂, C-4), 42.5 (C, C-13), 39.9 (CH₂, C-12), 37.4 (CH₂, C-1), 36.7 (C, C-10), 36.3 (CH, C-20), 34.1 (CH₂, C-22), 32.1 (CH₂, C-7), 31.8 (CH, C-8), 31.8 (CH₂, C-2), 29.3 (CH, C-25), 28.4 (CH₂, C-23), 26.2 (CH₂, C-16), 24.5 (CH₂, C-15), 22.8 (CH₂, C-28), 21.2 (CH₂, C-11), 20.0 (CH₃, C-19), 19.5 (CH₃, C-27), 19.2 (CH₃, C-26), 18.9 (CH₃, C-21), 12.1 (CH₃, C-29), 12.0 (CH₃, C-18)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **7** 为 β -谷甾醇。

化合物 **8**: 白色粉末; ESI-MS m/z 409.3 [M+Na]⁺, 分子式 C₂₇H₄₆O; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.35 (1H, m, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, m, H-21), 0.86 (3H, m, H-29), 0.84 (3H, m, H-26), 0.82 (3H, m, H-27), 0.68 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 140.8 (C, C-5), 121.8 (CH, C-6), 71.9 (CH, C-3), 56.9 (CH, C-14), 56.2 (CH, C-17), 50.3 (CH, C-9), 46.0 (C, C-13), 42.3

(CH₂, C-4), 39.9 (CH₂, C-12), 39.8 (CH₂, C-24), 37.4 (CH₂, C-1), 36.6 (C, C-10), 36.3 (CH₂, C-22), 35.9 (CH, C-20), 34.1 (CH, C-8), 32.0 (CH₂, C-2), 31.6 (CH₂, C-7), 29.3 (CH, C-25), 28.4 (CH₂, C-16), 24.4 (CH₂, C-15), 23.2 (CH₂, C-23), 22.8 (CH₃, C-27), 22.7 (CH₃, C-26), 21.2 (CH₂, C-11), 19.2 (CH₃, C-21), 18.9 (CH₃, C-19), 12.0 (CH₃, C-18)。以上数据与文献报道一致^[12-14], 故鉴定化合物 **8** 为胆固醇。

化合物 **9**: 橙红色粉末; ESI-MS m/z 309.2 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₅H₁₀O₆; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.13 (1H, s, 4-OH), 12.15 (2H, s, 1, 8-OH), 11.41 (1H, s, 6-OH), 7.11 (1H, brs, H-2), 7.00 (1H, d, $J = 2.24$ Hz, H-5), 6.41 (1H, d, $J = 2.18$ Hz, H-7); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 186.7 (C, C-9), 186.3 (C, C-10), 167.7 (C, C-6), 164.7 (C, C-8), 156.6 (C, C-1), 155.9 (CH, C-4), 153.6 (C, C-3), 134.4 (C, C-11), 129.0 (C, C-14), 111.5 (CH, C-2), 110.2 (C, C-13), 109.7 (C, C-12), 108.2 (C, C-5), 107.9 (CH, C-7), 15.8 (CH₃, C-11)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **9** 为链蠕孢素。

化合物 **10**: 白色固体; ESI-MS m/z 492.3 [M+Na]⁺, 分子式 C₂₉H₃₇N₃O₂, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.38 (1H, brs, NH-1), 7.53 (1H, brs, NH-14), 7.19 (1H, m, H-8), 6.98 (1H, brs, H-4), 6.90 (1H, brs, H-6), 6.05 (1H, dd, $J = 17.4, 10.6$ Hz, H-16), 5.50 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-26), 5.41 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-21), 5.28 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-17a), 5.25 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-17b), 4.37 (1H, dq, $J = 7.1, 1.9$ Hz, H-12), 3.62 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-25), 3.46 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-20), 1.94 (3H, s, H-29), 1.87 (3H, s, H-28), 1.80 (3H, s, H-23), 1.79 (3H, s, H-24), 1.68 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-30), 1.57 (6H, s, H-18, 19); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 165.8 (C, C-13), 160.4 (C, C-10), 144.6 (CH, C-16), 143.4 (C, C-2), 135.0 (C, C-5), 133.3 (C, C-27), 132.3 (C, C-7a), 132.0 (C, C-22), 126.6 (C, C-3a), 124.4 (C, C-9), 124.3 (CH, C-21), 123.9 (C, C-7), 123.3 (CH, C-6), 122.9 (CH, C-26), 116.0 (CH, C-4), 113.2 (CH₂, C-17), 112.3 (CH, C-8), 103.0 (C, C-3), 51.8 (CH, C-12), 39.3 (C, C-15), 34.6 (CH₂, C-20), 31.4 (CH₂, C-25), 27.5 (CH₃, C-18), 27.4 (CH₃, C-19), 25.9 (CH₃, C-23), 25.8 (CH₃, C-28), 21.0 (CH₃, C-30), 18.1 (CH₃, C-29), 17.9 (CH₃, C-24)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **10** 为脱

氢海胆灵。

化合物 **11**: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 346.2 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₉H₂₁N₃O₂; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.42 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-7), 7.24 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4), 7.21 (1H, s, H-8), 7.12 (1H, m, H-6), 7.06 (1H, m, H-5), 6.11 (1H, dd, $J = 17.3, 10.8$ Hz, H-17), 5.11 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-18a), 5.09 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-18b), 4.22 (1H, q, $J = 7.1$ Hz, H-12), 1.55 (3H, s, H-19), 1.54 (3H, s, H-20), 1.53 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-15); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 168.7 (C, C-13), 162.2 (C, C-10), 146.2 (CH, C-17), 146.0 (C, C-2), 136.8 (C, C-3a), 127.3 (C, C-7a), 124.7 (C, C-3), 122.6 (CH, C-6), 121.2 (CH, C-5), 119.8 (CH, C-7), 114.4 (CH₂, C-18), 112.7 (CH, C-8), 112.6 (CH, C-4), 104.3 (C, C-9), 52.6 (CH, C-12), 40.4 (C, C-16), 28.2 (CH₃, C-20), 28.1 (CH₃, C-19), 20.7 (CH₃, C-15)。以上数据与文献报道一致^[17-18], 故鉴定化合物 **11** 为新海胆灵 A。

3.3 抗氧化活性测试

对化合物进行抗氧化活性测试^[19], 样品浓度为 20 μ mol/L 下化合物 **1**、**5** 和 **6** 显示出较强的抗氧化活性; DPPH 自由基清除率分别为 61.9%、88.0% 和 91.9%。阳性对照维生素 C 的 DPPH 自由基清除率为 76.1%。

3.4 抑菌和肿瘤细胞毒活性测试

对化合物进行抗菌活性测试^[20], 结果显示化合物对金黄色葡萄球菌、MRSA、白色念珠菌和香蕉枯萎病菌没有活性。对化合物进行肿瘤细胞株 HepG2 和 A549 细胞毒活性测试, 结果未显示细胞毒活性。

4 讨论

本实验对海洋真菌 *Aspergillus ruber* TX-M4-1 的次级代谢产物进行了研究, 该菌在大米培养基条件下代谢产生 11 个化合物 (**1**~**11**), 其中化合物 **1** 为新化合物。化合物 **1**、**5** 和 **6** 的 DPPH 自由基清除率分别为 61.9%、88.0% 和 91.9%, 具有一定生物活性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 朱伟明, 王俊峰. 海洋真菌生物活性物质研究之管见 [J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 218-228.
- [2] 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.

- [3] 马丽丽, 田新朋, 李桂菊, 等. 海洋天然产物的高效发现与成药性研究 [J]. 热带海洋学报, 2021, 40(5): 134-146.
- [4] 周荣丽, 穆军, 张翼, 等. 海洋真菌活性代谢产物最新研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 741-747.
- [5] 程思佳, 李顺祥. 生物转化技术在中药和天然药物开发中的应用进展 [J]. 世界中医药, 2021, 16(13): 2051-2057.
- [6] 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.
- [7] Nies J, Li S M. Prenylation and dehydrogenation of a C₂-reversely prenylated diketopiperazine as a branching point in the biosynthesis of echinulin family alkaloids in *Aspergillus ruber* [J]. *ACS Chem Biol*, 2021, 16(1): 185-192.
- [8] Kim K S, Cui X, Lee D S, *et al.* Inhibitory effects of benzaldehyde derivatives from the marine fungus *Eurotium* sp. SF-5989 on inflammatory mediators via the induction of heme oxygenase-1 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 23749-23765.
- [9] Li D L, Li X M, Li T G, *et al.* Benzaldehyde derivatives from *Eurotium rubrum*, an endophytic fungus derived from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2008, 56(9): 1282-1285.
- [10] Miyake Y, Ito C, Itoigawa M, *et al.* Antioxidants produced by *Eurotium herbariorum* of filamentous fungi used for the manufacture of karebushi, dried bonito (Katsuobushi) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(6): 1323-1327.
- [11] 陈嘉颖, 马钢华, 钱菲, 等. 广藿香中非挥发性化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1240-1251.
- [12] Fristiohady A, Yodha A W M, Sadarun B, *et al.* Isolation and identification of secondary metabolite from marine sponge *Callyspongia* sp. and its antibacterial potency [J]. *Biointerface Res Appl Chem*, 2020, 11(3): 10082-10088.
- [13] 陈显强, 高程海, 邢楠楠, 等. 侧扁软柳珊瑚中倍半萜和甾烷类化学成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5683-5689.
- [14] 刘瑞, 张弘弛, 安志鹏, 等. 一株黄芪内生真菌甾醇类代谢产物的分离和鉴定 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 120-124, 130.
- [15] 吴希, 夏厚林, 黄立华, 等. 香附化学成分研究 [J]. 中药材, 2008, 31(7): 990-992.
- [16] 于洪佳, 薛雅馨, 洪葵, 等. 一株红树林曲霉菌 *Aspergillus* sp. WHUF0343 的次级代谢产物研究 [J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2658-2670.
- [17] 王巍, 陈超, 杨君, 等. 植物内生真菌代谢物吡啶生物碱 Neoechinulin A [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(1): 48-50.
- [18] 范翠梅, 俞桂新, 朱恩圆. 野百合的化学成分研究 [J]. 药学报, 2016, 51(5): 775-779.
- [19] Liu P P, Wang C, Lu Z Y, *et al.* New isochromane derivatives from the mangrove fungus *Aspergillus ustus* 094102 [J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(12): 2123-2126.
- [20] 陈默, 王志伟, 胡长鹰, 等. 酶标仪法快速评价香兰素的抑菌活性 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 63-66.

[责任编辑 王文倩]