

红树共附生棘孢曲霉 CGD12 的次级代谢产物及其抑菌活性

李英新¹, 焦伟华², 周兴春¹, 张俊¹, 叶波平^{1*}

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; 2. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200438)

[摘要] 目的: 分离一株红树来源的棘孢曲霉 CGD12 的次级代谢产物并检测它们的抑菌活性。方法: 采用正相硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备高效液相色谱等方法对菌株发酵产物的乙酸乙酯萃取部分进行分离和纯化, 利用 NMR, MS 等波谱分析方法确定化合物的结构; 利用微量肉汤稀释法进行抑菌活性评价。结果: 从菌株发酵液乙酸乙酯提取物中分离鉴定了 7 个化合物, 分别为: versiol (1)、JBIR74 (2)、JBIR75 (3)、环(L-脯氨酸-L-酪氨酸) (4)、环(L-脯氨酸-L-缬氨酸) (5)、环(L-脯氨酸-L-异亮氨酸) (6)、环(L-脯氨酸-L-亮氨酸) (7), 其中化合物 4, 7 对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 和表面葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 的生长显示出一定的抑制活性, 而化合物 3 对绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 具有较弱的抑菌活性。结论: 从棘孢曲霉菌株 CGD12 中分离到 7 个已知的化合物, 其中化合物 3, 4 和 7 分别具有一定的抑菌活性。

[关键词] 红树; 棘孢曲霉; 代谢产物; 抑菌活性

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0071-06

[doi] 10.11653/syfy2013190071

Secondary Metabolites of *Aspergillus aculeatus* CGD12 Isolated from Mangrove and Their Antibacterial Activities

LI Ying-xin¹, JIAO Wei-hua², ZHOU Xing-chun¹, ZHANG Jun¹, YE Bo-ping^{1*}

(1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** The secondary metabolites of marine fungus *Aspergillus aculeatus* CGD12 and their antibacterial activities were investigated. **Method:** Column chromatography on silica gel, ODS, Sephadex LH-20 and semipreparative HPLC were used to isolate and purify the compounds from EtOAc extract of the fermentation broth. Their structures were elucidated by NMR, MS spectroscopics data analyses and compared with the data of reported literatures. In order to evaluate the antibacterial activities of these compounds, microdilution broth method was adopted. **Result:** Seven compounds were isolated from the fermentation broth of *A. aculeatus* CGD12 and identified as versiol (1), JBIR74 (2), JBIR75 (3), cyclo-(L-Pro-L-Tyr) (4), cyclo-(L-Pro-L-Val) (5), cyclo-(L-Pro-L-Ile) (6), cyclo-(L-Ala-L-Leu) (7). **Conclusion:** Compounds 4 and 7 show antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*. The weak antibacterial activities which against *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* of compound 3 are reported for the first time.

[Key words] mangrove; *Aspergillus aculeatus*; metabolites; antibacterial

海洋真菌次级代谢产物具有结构新颖, 富含抗癌、抗菌、抗炎及抗病毒等多种生物活性, 成为天然

[收稿日期] 20130329(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072571)

[第一作者] 李英新, 在读硕士, 从事微生物次级代谢产物化学成分研究, Tel:13651645593, E-mail:liyixinhappy@163.com

[通讯作者] *叶波平, 博士, 副教授, 研究生导师, 从事海洋药用生物资源研究, Tel:025-83271016, E-mail:yebp2001@yahoo.com.cn

产物化学研究领域的一个宝库,吸引了众多生物医药研究人员的关注^[1]。然而迄今为止,已报道的真菌仅占海洋真菌总数的一小部分,开展海洋真菌天然活性产物的分离纯化和活性筛选工作具有巨大的潜力。在有关海洋真菌代谢产物的研究中,海洋植物,尤其是红树植物共附生真菌及其代谢产物的研究是近年来研究的热点之一。不完全统计资料显示:已报道的 20% 的海洋真菌天然产物来自于海洋植物,其中大多数又是来自于红树植物共附生真菌^[2-4]。

Aspergillus aculeatus CGD12 是本实验室从中国海南东寨港红树林保护区的红海榄根际土壤中分离并鉴定的一株共附生曲霉属真菌。在前期实验中,笔者发现该真菌的发酵产物丰富,并具有明显的抑菌活性。在大规模发酵制备其发酵液浸膏的基础上,本研究从其发酵液乙酸乙酯提取物中分离到 7 个化合物,利用实验室抑菌活性筛选模型,检测了这些化合物的抑菌活性。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Bruker-600 型核磁共振仪 (Bruker 公司,瑞士),Q-TOF-micro 型质谱仪 (ESI-MS) (安捷伦公司,美国),HPLC (Waters1525 泵,PDA2996 检测器,Waters 公司,美国),YMC Pack ODS(10 mm×250 mm,5 μm),EYELAN-1000 型旋转蒸发仪,色谱用硅胶(200~300 目)和高效薄层色谱板 (HPTLC) 为烟台江友硅胶开发有限公司产品,葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司生产,HPLC 用色谱纯甲醇和乙腈为 Merck 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株来源与培养

1.2.1 菌株来源 该菌株于 2007 年分离自中国海南东寨港红树林保护区的红海榄根际土壤,菌株编号 CGD12。根据其形态学和生理生化特征,结合 ITS 序列分析,鉴定为棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus*。鉴定后的菌种 4℃ 于沙式固体斜面培养基 (SDA) 上保藏,由本实验室保存。

1.2.2 菌株发酵 菌株 CGD12 经琼脂斜面复苏后,转接到装有 200 mL 沙式液体培养基的 500 mL 三角瓶中,160 r·min⁻¹,28℃ 培养 48 h,获得种子培养液。取种子培养液 5 mL 分别加入到装有 400 mL 发酵培养基 (葡萄糖 1%,蛋白胨 0.5%,酵母膏 0.3%,麦芽提取物 0.3%,氯化钠 3%,调 pH 到 6.8) 的 1 000 mL 三角瓶中 (150 个,共 60 L),25℃ 静置培养 30 d,纱布过滤,收集发酵液。

1.3 发酵液的提取与分离 发酵液浓缩至原来的 1/3,加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次,得乙酸乙酯萃取浸膏 14 g。总浸膏经减压硅胶柱色谱 (200~300 目),以混合溶剂石油醚-乙酸乙酯、二氯甲烷-甲醇分别梯度洗脱,得到 7 个组分 (Fr. 1~7)。Fr. 4 (228 mg) 经凝胶 Sephadex LH-20、半制备 HPLC 分离纯化得化合物 **1** (18 mg); Fr. 5 (1.52 g) 经凝胶 Sephadex LH-20、反相硅胶、半制备 HPLC 得化合物 **5** (30.5 mg),**6** (5 mg),**7** (41.3 mg); Fr. 6 (9.6 g) 经凝胶 Sephadex LH-20 得到 5 个组分 (Fr. 6-1~5),其中 Fr. 6-2 经硅胶柱色谱、半制备 HPLC 分离得到化合物 **2** (1.52 g),**4** (20 mg),Fr. 6-3 经硅胶柱色谱、半制备 HPLC 分离得到化合物 **3** (400 mg)。

1.4 抑菌活性检测 抑菌实验参照文献报道的微量肉汤稀释法^[5]。取分离得到的化合物分别用 MH 肉汤对倍稀释成一系列质量浓度,将其分别加入用化学法灭菌后的 96 孔聚苯乙烯 U 型微孔板中 (事先每排标记好待测菌和拟测化合物编号),每孔 100 μL 稀释好的化合物。用生理盐水将事先摇好的菌液校正到 0.5 麦氏比浊标准,再用 MH 肉汤稀释 1:100 (含菌量约 10⁶ CFU·mL⁻¹),然后每孔接种 100 μL。这样使最终每个化合物的稀释质量浓度为 128,64,32,16,8 μg·L⁻¹,而最终接种量约 5×10⁵ CFU·mL⁻¹ 或每孔 5×10⁴ 个菌,将微孔板置微型振荡器上振荡 1 min,使各孔内溶液混匀,微孔板加盖并用胶纸密封以减少孵育过程中的蒸发并置培养箱内,37℃ 孵育 16~20 h。在黑暗背景的光源下对照孔中待测菌的生长状况呈现混浊状,孔底出现沉淀,无菌生长孔所含最低抗菌药物浓度即为 MIC。本实验对 7 株致病菌表面葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) 进行了测定。上述测试菌株均由本实验室保存。

2 结 果

2.1 化合物结构鉴定 化合物 **1** 相对浅黄色固体,ESI-MS;*m/z* 285 [M+Na]⁺,提示相对分子质量为 262。¹³C-NMR 以及 DEPT 谱中可观察到分子中含有 3 个甲基信号 (δ 13.1, C-15; δ 20.7, C-14 和 δ 21.0, C-16),3 个 sp³ 杂化的亚甲基信号 (δ 38.6, C-2; δ 39.2, C-7 和 δ 60.0, C-1),3 个 sp³ 杂化的次甲基信号 (δ 25.3, C-8; δ 41.7, C-5 和 δ 66.9, C-

6), 3 个 sp^2 杂化的次甲基信号 (δ 128.2, C-12; δ 132.2, C-11 和 δ 135.5, C-9), 另外还有 4 个季碳信号, 其中包括: 1 个酮羰基碳信号 δ 212.8 (C-3), 1 个 SP^2 杂化 (δ 129.9, C-10) 和 2 个 SP^3 杂化 (δ 57.0, C-4 和 δ 78.7, C-13) 的季碳信号。 1H -NMR 谱显示在 δ 1.04 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H₃-16), δ 1.12 (3H, s, H₃-15) 和 δ 1.28 (3H, s, H₃-14) 有 3 个甲基信号; δ 1.77 处宽单峰羟基信号; δ 5.43 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-12), δ 5.79 (1H, brs, H-9) 和 δ 6.20 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-11) 处为 3 个双键氢信号。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.97 (1H, m, H-1), 4.11 (1H, dd, $J = 8.7, 11.9$ Hz, H-1), 2.36 (1H, dd, $J = 3.1, 15.1$ Hz, H-2), 2.87 (1H, m, H-2), 3.32 (1H, m, H-5), 3.96 (1H, m, H-6), 1.77 (1H, d, $J = 4.6$ Hz, H-6-OH), 1.28 (1H, m, H-7), 1.95 (1H, m, H-7), 2.62 (1H, m, H-8), 5.44 (1H, brs, H-9), 6.21 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-11), 1.28 (3H, s, H-14), 1.11 (3H, s, H-15), 1.04 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, H-16); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 60.0 (CH₂, C-1), 38.6 (CH₂, C-2), 212.8 (C, C-3), 56.9 (C, C-4), 41.7 (CH, C-5), 67.0 (CH, C-6), 39.2 (CH₂, C-7), 25.3 (CH, C-8), 135.5 (CH, C-9), 129.9 (C, C-10), 132.2 (CH, C-11), 128.2 (CH, C-12), 78.6 (C, C-13), 20.7 (CH₃, C-14), 13.1 (CH₃, C-15), 21.0 (CH₃, C-16)。经以上分析并与文献[6-8]所报道数据比对, 确定化合物 1 为 versiol。

化合物 2 白色粉末, $[\alpha]^{21}D + 64.5^\circ$ (c 0.3, EtOH), ESI-MS: m/z 271 $[M + Na]^+$, 提示相对分子质量为 248。 ^{13}C -NMR 以及 DEPT 谱中可观察到 2 个甲基信号 (δ 12.2, C-5; δ 14.0, Me-4), 1 个 sp^3 杂化的亚甲基信号 (δ 26.5, C-4); 2 个 sp^3 杂化的次甲基信号 (δ 60.4, C-2; δ 41.8, C-3) 以及 3 个 sp^2 杂化的次甲基信号 (107.0, C-3'; 119.8, C-5'; 137.3, C-6'); 另外, δ 167.9, 162.6 处存在 2 个酰胺季碳信号, 提示该化合物可能是二肽类化合物。 1H -NMR 谱数据显示在 δ 0.90 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5) 和 0.98 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, Me-4) 有 2 个甲基信号; 在 δ 4.17 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-2) 处有 1 个连氮氢信号; δ 6.70 (1H, s, H-3'), 7.35 (1H, s, H-5') 和 7.79 (1H, s, H-6') 为 3 个双键质子信号。 1H -NMR (600 MHz, CD_3CD) δ : 4.17 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-2), 2.05 (1H, m, H-3), 1.50 (1H,

m, H-4), 1.33 (1H, m, Me-4), 0.90 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5), 0.98 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, Me-4), 6.70 (1H, s, H-3'), 7.35 (1H, s, H-5'), 7.79 (1H, s, H-6'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3CD) δ : 167.9 (C, C-1), 60.4 (CH, C-2), 41.8 (CH, C-3), 26.5 (CH₂, C-4), 12.2 (CH₃, C-5), 14.0 (CH₃, Me-4), 162.6 (C, C-1'), 125.2 (C, C-2'), 107.0 (CH, C-3'), 138.2 (C, C-4'), 119.8 (CH, C-5'), 137.3 (CH, C-6')。经以上分析并与文献[9]数据比较, 确定化合物 2 为 JBR-74。

化合物 3 棕色油状, $[\alpha]^{21}D + 72.6^\circ$ (c 0.3, EtOH), ESI-MS: m/z 257 $[M + Na]^+$, 提示相对分子质量为 234, 化合物 3 的 1D -NMR 谱与化合物 2 相似, 只是分子结构中少了 1 个 4 位甲基信号, 且 4 位由原来的次甲基信号 δ 26.5 (CH₂, C-4) 变为甲基信号 δ 19.0 (CH₃, C-4), 同时由于相对分子质量少了 14, 可以推测化合物 3 为化合物 2 的 4 位去甲基的类似物。 1H -MHz (600 MHz, CD_3CD) δ : 4.02 (1H, m, H-2), 2.28 (1H, m, H-3), 1.04 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-4), 0.94 (3H, d, $J = 7.0$, H-5), 6.69 (1H, s, H-3'), 7.34 (1H, s, H-5'), 7.77 (1H, s, H-6'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3CD) δ : 167.8 (C, C-1), 62.4 (CH, C-2), 35.5 (CH, C-3), 19.0 (CH₃, C-4), 17.0 (CH₃, C-5), 162.9 (C, C-1'), 125.5 (C, C-2'), 107.3 (CH, C-3'), 138.5 (C, C-4'), 120.1 (CH, C-5'), 137.6 (CH, C-6')。通过以上分析, 结合波谱数据与相关文献[9]数据对照, 确定该化合物为 JBR-75。

化合物 4 浅黄色粉末, $[\alpha]^{21}D - 90.8^\circ$ (0.3, EtOH), ESI-MS: m/z 283 $[M + Na]^+$ 提示相对分子质量为 260。 ^{13}C -NMR 谱中 δ 171.1, 167.2 处的 2 个酰胺季碳信号; δ 60.3 (CH), δ 58.2 (CH) 处 2 个连氮次甲基信号以及 1H -NMR 谱中的 δ 4.10 (m) 和 4.39 (m) 处的 2 个次甲基氢信号为二酮哌嗪类化合物的特征信号, 提示该化合物可能为环二肽。 1H -NMR 谱中 δ 6.75 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.08 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 并结合 ^{13}C -NMR 谱中低场区 (δ 127.9, C; δ 132.4, CH \times 2; δ 116.5, CH \times 2; δ 157.9, C) 推测分子中存在 1 个对位二取代苯环, 参照氨基酸的基本结构可知其分子中可能含有 1 个酪氨酸片段。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 4.10 ~ 4.07 (1H, m, Pro- α H), 1.32 ~ 1.28 (1H, m, Pro- β H), 2.16 ~ 2.11 (1H, m, Pro- β H), 1.87 ~ 1.82 (2H, m, Pro- γ H), 3.41 ~ 3.37 (1H, m,

Pro- δ H), 3.62 ~ 3.56 (1H, m, Pro- δ H), 4.39 (1H, m, Tyr- α H), 3.16 ~ 3.06 (2H, m, Tyr- β H), 6.75 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Tyr-2',6' H), 7.08 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Tyr-3',5' H)。¹³C-NMR 及 DEPT135 (150 MHz, CD₃OD) δ : 167.2 (C, Pro-CO), 60.3 (CH, Pro- α C), 29.6 (CH₂, Pro- β C), 23.0 (CH₂, Pro- γ C), 46.2 (CH₂, Pro- δ C), 171.1 (C, Try-CO), 127.9 (C, Tyr-1'C), 132.4 (CH, Tyr-2',6' C), 116.5 (CH, Tyr-3',5' C), 157.9 (C, Tyr-4' C), 58.2 (CH, Tyr- α C), 37.9 (CH₂, Tyr- β C)。通过以上分析,并参照文献[10-12]报道的核磁数据,确定该化合物为环(脯氨酸-酪氨酸)。其氨基酸构型的确定通过文献[13]报道的经验可知含脯氨酸的环二肽类化合物其旋光方向和大小可用来判断该环二肽的构型,化合物 4 与文献[12]所报道的环(L-脯氨酸-L-酪氨酸)旋光方向一致,数值大小接近,最终确定该化合物的立体结构为环(L-脯氨酸-L-酪氨酸) [cyclo-(L-Pro-L-Tyr)]。

化合物 5 白色针状结晶, $[\alpha]^{21}_D -143.7^\circ$ (0.3, EtOH), ESI-MS: m/z 219 [M + Na]⁺, 提示相对分子质量为 196。¹³C-NMR 谱中 δ 170.4, 165.1 处的 2 个酰胺季碳信号; δ 58.9 (CH, Pro- α C) 和 δ 60.5 (CH, Val- α C) 2 个连氮次甲基信号以及 ¹H-NMR 谱中的 δ 4.03 (m) 和 3.89 (m) 处的 2 个次甲基氢信号提示该化合物同样含二酮哌嗪母核结构。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 4.03 (1H, m, Pro- α H), 2.60 ~ 2.55 (1H, m, Pro- β H), 1.98 ~ 1.96 (1H, m, Pro- β H), 2.03 ~ 1.98 (1H, m, Pro- γ H), 1.90-1.83 (1H, m, Pro- γ H), 3.60 (1H, m, Pro- δ H), 3.51 ~ 3.47 (1H, m, Pro- δ H), 6.76 (1H, brs, Val-NH), 3.89 (1H, s, Val- α H), 2.34 ~ 2.30 (1H, m, Val- β H), 1.05 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, Val- γ H), 0.87 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, Val- γ H)。¹³C-NMR 以及 DEPT135 (150 MHz, CDCl₃) δ : 165.1 (Pro-CO), 58.9 (CH, Pro- α C), 28.6 (CH₂, Pro- β C), 22.4 (CH₂, Pro- γ C), 45.2 (CH₂, Pro- δ C), 170.4 (Val-CO), 60.5 (CH, Val- α C), 28.5 (CH, Val- β C), 19.1 (CH₃, Val- γ_1 C), 16.1 (CH₃, Val- γ_2 C)。该化合物核磁数据与文献[10-11]所报道数据基本一致,故确定该化合物结构为环(脯氨酸-缬氨酸)。其构型的确定根据文献[13]所报道的经验,化合物 5 的旋光度与文献[10-11]中所报道环(L-脯氨酸-L-缬氨酸)旋光大小相近、方向一致,故确定该化合物为环(L-脯氨酸-L-缬氨酸) [cyclo-

(L-Pro-L-Val)]。

化合物 6 白色固体, $[\alpha]^{21}_D -211.53$ (0.3, EtOH)。ESI-MS: m/z 233 [M + Na]⁺, 提示相对分子质量为 210。核磁波谱数据显示与化合物 5 相比其分子结构只少了 1 个次甲基,¹³C-NMR 与 DEPT135 显示其分子结构中保留了脯氨酸的核磁波谱数据: δ 165.2 (C, Pro-CO), δ 58.8 (CH, Pro- α C), δ 28.6 (CH₂, Pro- β C), δ 22.4 (CH₂, Pro- γ C), δ 45.2 (CH₂, Pro- δ C), 表明该化合物为含脯氨酸的环二肽。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 4.01 (1H, m, Pro- α H), 2.33 ~ 2.29 (1H, m, Pro- β H), 2.00 ~ 1.97 (1H, m, Pro- β H), 1.97 ~ 1.93 (1H, m, Pro- γ H), 1.88 ~ 1.82 (1H, m, Pro- γ H), 3.60 ~ 3.56 (1H, m, Pro- δ H), 3.46 ~ 3.50 (1H, m, Pro- δ H), 6.85 (1H, brs, Ile-NH), 3.91 (1H, brs, Ile- α H), 2.27 ~ 2.23 (1H, m, Ile- β H), 1.20 ~ 1.14 (1H, m, Ile- γ H), 0.89 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, Ile- δ H), 1.41 ~ 1.34 (1H, m, Ile- ϵ H), 1.02 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, Ile- ϵ H)。¹³C-NMR 及 DEPT135 (150 MHz, CDCl₃) δ : 165.2 (C, Pro-CO), 58.8 (CH, Pro- α C), 28.6 (CH₂, Pro- β C), 22.4 (CH₂, Pro- γ C), 45.2 (CH₂, Pro- δ C), 170.4 (C, Ile-CO), 60.6 (CH, Ile- α C), 35.5 (CH, Ile- β C), 24.1 (CH₂, Ile- γ C), 15.8 (CH₃, Ile- δ C), 12.2 (CH₃, Ile- ϵ C)。以上¹H,¹³C-NMR 数据与文献[11]所报道环(脯氨酸-异亮氨酸)数据基本一致,并结合文献[10,13]所报道的旋光数据确定该化合物的立体结构为环(L-脯氨酸-L-异亮氨酸) [cyclo-(L-Pro-L-Ile)]。

化合物 7 白色粉末, $[\alpha]^{21}_D -69.2^\circ$ (0.3, EtOH), ESI-MS: m/z 233 [M + Na]⁺ 提示相对分子质量为 210。相对分子质量及核磁波谱数据表明化合物 7 为化合物 6 的同分异构体,且¹³C-NMR 谱中 δ 170.4, 166.4 处的 2 个酰胺季碳信号、 δ 59.2 (CH) 和 δ 53.6 (CH) 2 个连氮次甲基信号以及¹H-NMR 谱中的 δ 4.03 (m) 和 3.89 (m) 处的 2 个次甲基氢信号表明其同为二酮哌嗪类化合物,根据氨基酸的结构,推测该化合物可能为环(脯氨酸-亮氨酸)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 4.05 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, Pro- α H), 2.32 ~ 2.26 (1H, m, Pro- β H), 2.10 ~ 2.05 (1H, m, Pro- β H), 2.03 ~ 1.98 (1H, m, Pro- γ H), 1.88 ~ 1.80 (1H, m, Pro- γ H), 3.56 ~ 3.45 (2H, m, Pro- δ H), 5.92 (1H, brs, Leu-NH), 3.95 (1H, dd, $J = 6.0, 3.6$ Hz, Leu-

α H), 1.98 ~ 1.93 (1H, m, Leu- β H), 1.49 ~ 1.44 (1H, m, Leu- β H), 1.72 ~ 1.66 (1H, m, Leu- γ H), 0.94 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, Leu- δ H), 0.89 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, Leu- δ H)。 ^{13}C -NMR 及 DEPT135 (150 MHz, CDCl_3) δ : 166.4 (C, Pro-CO), 59.2 (CH, Pro- α C), 28.3 (CH_2 , Pro- β C), 22.9 (CH_2 , Pro- γ C), 45.7 (CH_2 , Pro- δ C), 170.4 (C, Leu-CO), 53.6 (CH, Leu- β C), 38.8 (CH_2 , Leu- β C), 24.9 (CH, Leu- γ C), 23.5 (CH_3 , Leu- δ C), 21.4 (CH_3 , Leu- δ C)。以上 ^1H , ^{13}C -NMR 数据与[10-11,14]所报道环(脯氨酸-亮氨酸)数据一致,同时根据文献[13]所报道的方法,与上述文献

比较旋光方向和大小,最终确定该化合物的立体结构为环(L-脯氨酸-L-亮氨酸) [cyclo-(L-Pro-L-Leu)]。

2.2 化合物的抑菌活性 检测了化合物 1~7 对一些病原菌生长的抑制活性,发现化合物 4,7 对金黄色葡萄球菌显示一定的抑制效果, MIC 分别为 32, 64 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 它们对表皮葡萄球菌的 MIC 值均为 64 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 化合物 1 在较高浓度时对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌有明显抑菌活性, MIC 均为 128 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 化合物 3 对绿脓埃希菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌的 MI 值同为 128 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1)。

表 1 化合物 1~7 的抑菌活性 (MIC)

 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

致病菌	化合物						
	1	2	3	4	5	6	7
表面葡萄球菌 (<i>S. epidermidis</i>)	128	-	-	64	-	-	64
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	128	-	-	32	-	-	64
绿脓杆菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	-	-	128	-	-	-	-
鲍曼不动杆菌 (<i>A. baumannii</i>)	-	-	-	-	-	-	-
肺炎克雷伯菌 (<i>K. pneumonia</i>)	-	-	128	-	-	-	-
大肠埃希菌 (<i>E. coli</i>)	-	-	128	-	-	-	-
白色念珠菌 (<i>C. albicans</i>)	128	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示未表现出抑菌活性 (MIC > 128 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3 讨论

真菌次级代谢产物通常具有广泛药理活性^[15]。本研究从红树植物的共附生真菌 *A. aculeatus* CGD12 中分离到 7 个已知的化合物,其中化合物 2, 3 为该菌的主要代谢产物。作为二酮哌嗪类化合物的化合物 2,3 并不常见,它们最早是从一株海绵来源的共附生曲霉属真菌中分离得到^[9],但该报道并未显示其药理活性,本文首次报道了化合物 3 对绿脓杆菌、肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌具有较弱的抑制活性,其他方面的活性正在筛选中。

从结构上看,化合物 2, 3 可以看成是 Roquefortine 类生物碱的生物合成前体。Roquefortine 类生物碱是由真菌生产的一类结构复杂的化合物,它们来源于组氨酸和色氨酸,具有抗革兰阳性细菌和抗肿瘤活性^[16-17]。

在本研究中共分离到 6 个环二肽类化合物(也称之为二酮哌嗪类化合物,DKPs),它们普遍存在于海洋微生物中,具有包括抗菌和细胞毒等在内的多种生理活性。近年来,在对 DKPs 功能的研究中发现,它们在微生物的群体感应调控机制中充当着信号分子的作用,已成为化学生态学研究的热点^[18]。

[参考文献]

- [1] Bhadury P, Balsam T Mohammad, Phillip C Wright. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33(5):325.
- [2] Blunt J W, Copp B R, Hu W P, et al. Marine natural products [J]. Nat Prod Rep, 2012, 29(2):144.
- [3] Rateb M E, R Ebel. Secondary metabolites of fungi from marine habitats [J]. Nat Prod Rep, 2011, 28(2):290.
- [4] John Paul Schmit, Gregory M Mueller. An estimate of the lower limit of global fungal diversity [J]. Biodiv Conserv, 2006, 16(1):99.
- [5] Giovanni Appendino, Simon Gibbons, Anna Giana, et al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity study [J]. J Nat Prod, 2008, 71:1427.
- [6] Yuzo Fujii, Masahiro Asahara, Masakatsu Ichinoe, et al. Fungal melanin inhibitor and related compounds from *Penicillium decumbens* [J]. Phytochemistry, 2002, 60:703.
- [7] Keiichi Pukuyama, Tomitake Tsukihara, Yukiteru Katsube. Structure of versiol, a new metabolite from *Aspergillus versicolor* [J]. Tetrabedron, 1976, 3:189.

盘龙参的化学成分研究

尹永芹¹, 赵英日², 崔红花^{1*}, 梁生旺¹, 王淑美¹, 陈超¹

(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学国际学院, 广州 510405)

[摘要] 目的: 研究兰科濒危植物盘龙参 *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames 的化学成分。方法: 对盘龙参全草 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分进行色谱分离, 根据光谱数据和理化性质确定各化合物的结构。结果: 从盘龙参中分离得到 5 个化合物, 结构鉴定为 3 β -羟基-乌苏-12-烯-28-酸(1), 5-羟基-3,7,4'-三甲氧基黄酮(2), sinetirucallol(3) β -谷甾醇(4)和胡萝卜苷(5)。结论: 化合物 1 首次从兰科植物中分离得到, 化合物 2 为首次从盘龙参中分离得到。

[关键词] 绶草属; 盘龙参; 化学成分; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0076-03

[doi] 10.11653/syjf2013190076

Study on Chemical Constituents from *Spiranthes sinensis*

YIN Yong-qin¹, ZHAO Ying-ri², CUI Hong-hua^{1*}, LIANG Sheng-wang¹, WANG Shu-mei¹, CHEN Chao¹

(1. Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

[收稿日期] 20130113(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202885, 20905015); 广东高校优秀青年创新人才培育项目(WYM 10036)

[第一作者] 尹永芹, 博士, 副教授, 从事中药及天然药物活性成分和机制研究, Tel: 020-39352179, E-mail: yongqinyin@126.com

[通讯作者] * 崔红花, 博士, 副教授, 从事中药分析和质量标准研究, Tel: 020-39352177, E-mail: honghuacui@163.com

- [8] 计长柱, 孙世伟, 蔡生新, 等. 深海来源曲霉属真菌 CXCTD_06_6a 次级代谢产物中的肿瘤细胞增殖抑制活性成分 [J]. 中国海洋药物杂志, 2011, 30(3): 1.
- [9] Motoki takagi, Kenichino Motohashi, Kazuo Shin-ya. Isolation of 2 new metabolites, JBIR-74 and JBIR-75, from the sponge-derived *Aspergillus* sp. fS14 [J]. J Antibiot, 2010, 63: 393.
- [10] Camini S Jayatilake, Maureen P Thornton, Alan C Leonard, et al. Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Nat Prod, 1996, 59: 293.
- [11] 曾雪荣, 焦伟华, 唐金山, 等. 海洋放线菌 *Streptomyces* sp. (No. 30701) 次生代谢产物研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(4): 298.
- [12] Panarat Arunrattiyakorn, Teruhiko Nitoda, Hiroshi Kanzaki. Enzymatic conversion-based method for screening cyclic dipeptide-producing microbes [J]. Peptides, 2005, 27(4): 633.
- [13] Madeline Adamczeski, Andrea R Reed, Phillip Crews. New and known diketopiperazines from the Caribbean Sponge, *Calyx cf. podatypa* [J]. J Nat Prod, 1995, 58(2): 201.
- [14] Pei-Ji Zhao, H X, Guo-Hong Lib, et al. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces* sp. Lz531 [J]. Chem Biodiversity, 2007, 4: 899.
- [15] 周凤, 张弘驰, 刘瑞, 等. 恒山黄芪内生真菌 *Aspergillus* sp. 代谢产物的分离和生物活性的测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 125.
- [16] Bettina Kopp, H J Rehm. Antimicrobial action of roquefortine [J]. European J Appl Microbiol, 1974, 6: 397.
- [17] Modestas Keblys, Aksel Bernhoft, Constance C Höfer, et al. The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on *in vitro* proliferation of porcine lymphocytes [J]. Mycopathologia, 2004, 158: 317.
- [18] 郭秀春, 郑立, 周文辉, 等. 海洋微生物中二酮哌嗪类化合物的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1596.

[责任编辑 邹晓翠]