

海绵真菌中一个新的聚酮类化合物

田永奇^{1*}, 林舒婷¹, 刘永宏^{2*}

(1. 福州大学生物科学与工程学院, 福建 福州 350108;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要: 利用硅胶柱色谱、凝胶柱、反向柱色谱和高效液相等手段对海绵来源的真菌 *Alternaria* sp. F49 在大米培养基中的代谢产物进行分离纯化, 从中分离得到一个新的聚酮类化合物: 3*R*,5*R*-(-)-talaroflavone (**2**) 和 15 个已知化合物。I 及 II 是两个消旋体, 通过手性柱分别将它们进行拆分得到 **1** 和 **2**、**3** 和 **4** 两对对应异构体; 通过核磁、质谱和文献比对确定了这些化合物的结构, 运用 X-单晶衍射及圆二色谱等手段确定了化合物 **1**、**2** 的绝对构型; 化合物 **6**、**8**~**10** 首次从该属真菌 (*Alternaria*) 中分离出来; 化合物 **16** 展示出中等的 COX-2 酶抑制活性, 其 IC₅₀ 为 7.3 μmol·L⁻¹。

关键词: 海绵共附生真菌; *Alternaria* sp. F49; 次生代谢产物; 波谱分析

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1134-05

A new polyketide from a sponge-derived fungus

TIAN Yong-qi^{1*}, LIN Shu-ting¹, LIU Yong-hong^{2*}

(1. College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

2. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: A new polyketide: 3*R*, 5*R*-(-)-talaroflavone (**2**), along with 15 known compounds were isolated from a EtOAc extract of a sponge-derived fungus *Alternaria* sp. F49. Compounds **1**–**2** and **3**–**4** were separated as two pairs of enantiomers by chiral HPLC from I and II. The structures of compounds **1**–**16** were elucidated by means of NMR and MS. Furthermore, the absolute configurations of compounds **1**–**2** were determined by single crystal X-ray diffraction experiment and CD analyses. Compounds **6**, **8**–**10** were isolated from this genus (*Alternaria* sp.) for the first time. Compound **16** showed moderate COX-2 enzyme inhibitory activity with IC₅₀ of 7.3 μmol·L⁻¹.

Key words: sponge-derived fungus; *Alternaria* sp. F49; spectroscopic analysis; secondary metabolites

海洋真菌遗传背景复杂、代谢产物种类多、产量高, 目前已成为新天然产物的主要来源, 研究最多的真菌是曲霉 (*Aspergillus*) 和青霉 (*Penicillium*),

而来源主要有海底泥、海绵、藻类、珊瑚等^[1]。链格孢属 (*Alternaria*) 是分布很广泛的一类子囊菌, 因其能产生毒素, 通常被人们称作植物病原菌。然而, 并非所有的链格孢属物种都是病原体, 他们中有些已经显示出作为生物防治剂对抗入侵物种的前景, 有些菌种也被报道产生了多种生物活性代谢物^[2]。本课题组从海绵中分离到一株链格孢属真菌, 在活性测试实验中, 发现其粗提物有较强的抗菌活性和卤虫致死活性。为了寻找结构新颖的活性分子, 对这株

收稿日期: 2018-05-15; 修回日期: 2018-05-21.

基金项目: 福州大学科研启动基金 (XRC-1672); 福州市科技局项目 (2017-N-39); 福建省教育厅项目 (JAT170077); 广东省海洋药物重点实验室 (LMM) 2018 年度开放课题 (2018011009).

*通讯作者 Tel: 86-20-89023244.

E-mail: tian.yongqi@163.com; yonghongliu@scsio.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0448

真菌的大米发酵产物进行了提取分离, 并从中得到 1 个新化合物 (**2**) 和 15 个已知化合物。通过核磁共振、质谱等方法并结合文献数据鉴定了这些化合物的结构 (图 1), 分别为: 3*S*,5*S*-(+)-talaroflavone (**1**)^[3-5]、3*R*,5*R*-(-)-talaroflavone (**2**)、*S*-(-)-isochracinic acid (**3**)^[6]、*R*-(+)-isochracinic acid (**4**)^[6]、2,5-dimethyl-7-hydroxy-chromone (**5**)^[7]、5 α ,8 α -epidioxy-(22*E*,24*R*)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol (**6**)^[8]、tenuissimasatin (**7**)^[9]、tyrosol (**8**)^[10]、methyl phydroxybenzeneacetate (**9**)^[11]、tyrosol acetate (**10**)^[12]、stemphyperlenol (**11**)^[13]、altenuene (**12**)^[14]、2-(2'*S*-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxy-chromone (**13**)^[15]、rubralactone (**14**)^[16]、alternariol (**15**)^[17]和 altenuisol (**16**)^[18]。通过 X-单晶衍射、圆二色谱等手段确定了化合物 **1**、**2** 的绝对构型; 化合物 **6**、**8**~**10** 首次从该属真菌 (*Alternaria*) 中分离出来; 化合物 **16** 展示出中等的 COX-2 酶抑制活性, 其 IC₅₀ 为 7.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

结果与讨论

化合物 I 无定形固体, 氢谱给出 10 个信号: 2 个苯环氢信号、1 个双键氢信号、1 个连氧的次甲基氢信号、3 个甲氧基信号和 3 个甲基氢信号。碳谱给出 14 个信号: 2 个羰基信号、1 个苯环、1 个双键、1 个连氧的季碳、1 个连氧的次甲基、1 个甲氧基和 1 个甲基。这些数据 (表 1) 都与 talaroflavone 的数据完全一致, 但之前的文献只报道了该化合物的平面结构和正的旋光数据^[3-5]。为了确定该化合物的构型, 本研究培养了单晶 (DMSO-MeOH = 1 : 9), 经晶体

Table 1 The ¹H and ¹³C NMR data for **1-2**(500/125 MHz, respectively in DMSO-*d*₆)

Position	δ_{H} mult (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	Position	δ_{H} mult (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1		169.2, C	7a		105.5, C
3		92.3, C	8	1.77 s	13.5, CH ₃
3a		150.3, C	9	3.76 s	56.3, CH ₃
4	6.47 d (1.5)	102.6, CH	2'		166.1, C
5		167.2, C	3'	6.40 s	130.9, CH
6	5.94 d (1.5)	99.7, CH	4'		200.6, C
7		158.8, C	5'	4.64 s	78.7, CH

学检测及旋光数据分析: 该化合物为外消旋体。根据单晶数据 (CCDC 1502322) 确定其消旋体构型为 3*R**, 5'*R** (图 2)。用手性柱将该化合物拆分, 得到一对对应异构体 (**1**、**2**)。化合物 **1**、**2** 的 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 分别为 +143.5 (*c* 0.19 MeOH) 和 -144.0 (*c* 0.05, MeOH)。为了确定 **1**、**2** 的绝对构型, 采用 spartan 程序, 对化合物的各个构型进行构象分析, 采用 MMFF94 力场计算构象能量, 采用 Gaussian 09 在 B3LYP/6-311G (d,p) 水平下在甲醇溶剂中进行能量优化, 最后采用 TD-DFT 方法 B3LYP/6-311G (d,p) 水平下计算。通过对比实测 ECD 和计算 ECD 曲线, 将 **1** 确定为 3*S*,5*S*-(+)-talaroflavone; 将 **2** 确定为 3*R*,5*R*-(-)-talaroflavone (图 3), 化合物 **2** 为新化合物。

化合物 II (**3**、**4**) 黄色油状物, HR-ESI-MS 给出相对分子质量为 *m/z* 209.0439 [M + H]⁺, 推测分子式为 C₁₀H₉O₅。氢谱、碳谱并结合 HSQC 谱给出 1 个苯环、2 个酯羰基、1 个连氧的次甲基和 1 个亚甲基信号。这些数据与化合物 isochracinic acid 的数据完全一致^[6]。文献报道 isochracinic acid 是以外消旋体存

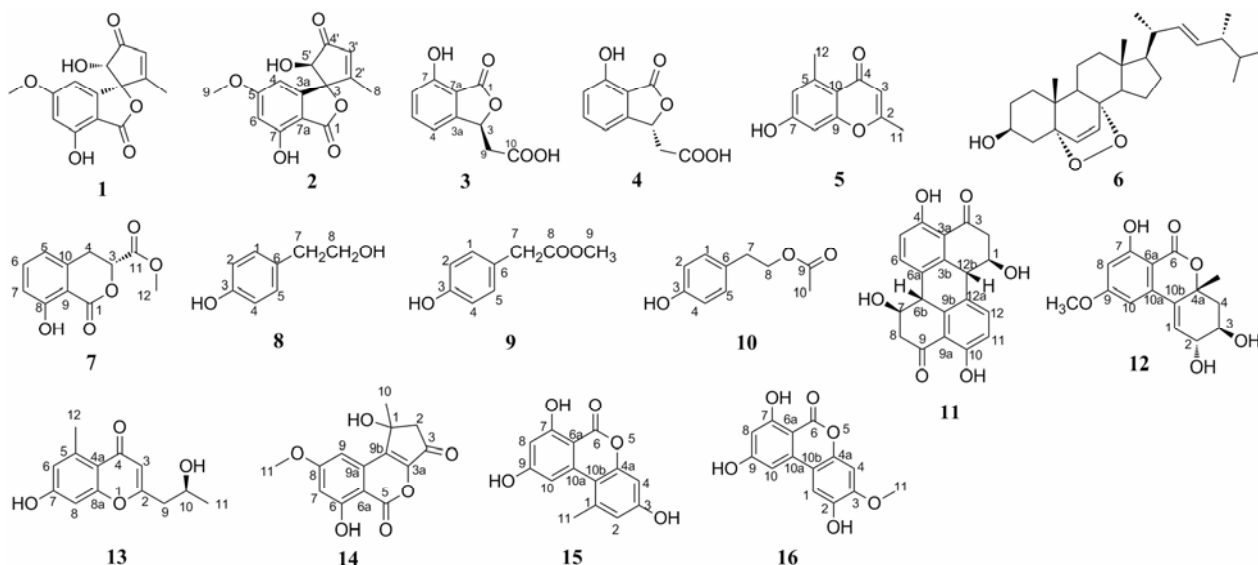


Figure 1 The chemical structures of compounds **1-16**

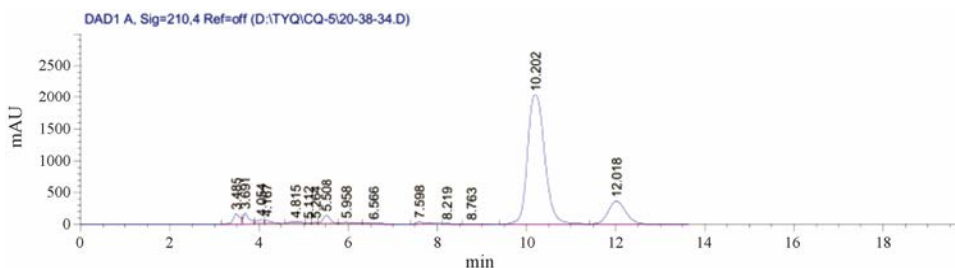


Figure 2 HPLC spectrum of compounds 1 and 2 on a chiral phase

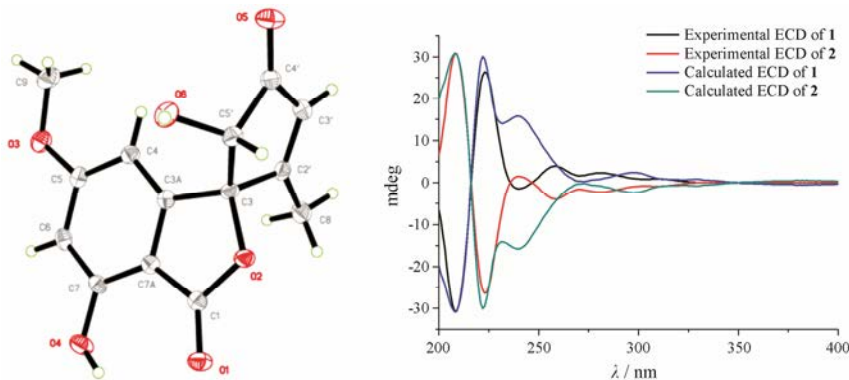


Figure 3 X-ray crystal structure and CD spectra of 1

的，而所测得该化合物的旋光确实为 0，为了进一步研究该化合物的立体结构，将其进行了手性拆分，得到了 1 : 1 的对映异构体 (3 和 4) (图 4)，3 和 4 的 $[\alpha]_D^{25}$ 分别为: -11.0 (c 0.329 MeOH) 和 $+11.0$ (c 0.317 MeOH)。将旋光数据与文献比对确定了 2 个化合物各自的构型^[6]。最后将化合物 3 定为 *S*-(-)-isochracinic acid，化合物 4 定为 *R*-(+)-isochracinic acid。

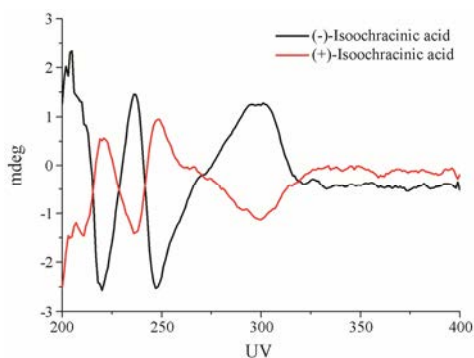


Figure 4 CD spectra of 2

实验部分

核磁共振波谱仪: BrukerAvance DRX500 型 (500/125 MHz, TMS 为内标)。高分辨质谱: Bruker micro TOF-QII mass spectrometer (Bruker, Fällanden, Switzerland)。X-单晶衍射仪 (Smart 1000 CCD)。高效液相色谱仪: Agilent 1200 (泵型号: G1212C, 紫外

检测器型号: G1315D), YMC-Pack (250 mm × 10 mm I.D. S-5 μm, 12 nm), Chiralpak IC (250 mm × 4.6 mm I.D. S-5 μm, 12 nm)。TLC: 高效薄层色谱板 (HPTLC) 为德国 Merck 公司产品和烟台江友硅胶开发有限公司产品。显色剂: 10% 硫酸香兰素溶液。常用有机试剂均为国产的分析纯产品。

真菌 *Alternaria* sp. F49 分离自海绵 *Callyspongia* sp., 由中国科学院南海海洋研究所林秀萍博士鉴定, 菌种保存于福州大学食品与海洋生物资源研究所。

1 发酵培养与提取分离

Alternaria sp.F49 在 25 °C 的 MB 培养基上培养 7 天。将其接种到种子培养基中 (麦芽浸膏 15 g, 海盐 2.5 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.4~7.8), 并在 25 °C 的摇床中摇 72 h (170 r · min⁻¹)。将 10 mL 种子悬浮液接种到 1 L 的大米培养基中 (大米 200 g, 海盐 2.5 g, 蒸馏水 200 mL) 放大发酵, 培养 30 天。

粗浸膏用硅胶柱、LH-20 凝胶柱和高效液相得到化合物 1~16。具体过程为: 发酵物切成小块浸泡到丙酮中 1 天, 然后过滤蒸干 (A), 滤渣用乙酸乙酯提取 3 次 (B)。将 A、B 合并后分别用石油醚、乙酸乙酯萃取, 最后得到乙酸乙酯相 (24.4 g)。粗浸膏首先用中压硅胶柱进行分离, 流动相为石油醚 (petroleum ether)/乙酸乙酯 (EtOAc) 梯度洗脱 (V/V, 50 : 1, 30 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1, 0 : 1)。洗脱下来的馏分用 TLC 检测并合并为 7 个馏分 (Fraction

1~7)。Fraction 1 (2.2 g) 用 ODS 柱 (MeOH/H₂O) 及常压硅胶柱 (petroleum ether/EtOAc) 进行分离, 得到化合物 **6** (22.1 mg)。Fraction 2 (1.0 g) 用 ODS 柱及 HPLC [SP-RP HPLC, C18 柱 (YMC-Pack, ODS-A, S-5 $\mu\text{m} \times 12 \text{ nm}$ 250 mm \times 20 mm I.D.), 4 mL \cdot min⁻¹; 50% CH₃CN/H₂O+0.1% TFA] 分离得到化合物 **5** (5.3 mg)。Fraction 3 (4.1 g) 用 ODS 柱得到 5 个馏分 (Fr. 3.1~3.5)。Fr.3.1 用 HPLC 纯化 (13% CH₃CN/H₂O) 得到化合物 **8** (17.0 mg)。Fr.3.2 用 HPLC 纯化 (30% CH₃CN/H₂O) 得到化合物 **7** (4.3 mg)、**9** (6.6 mg)。Fr.3.3 用 HPLC 纯化 (20% CH₃CN/H₂O) 得到化合物 **10** (4.7 mg)。Fr.3.5 用 HPLC 纯化 (38% CH₃CN/H₂O+0.1% TFA) 得到化合物 **11** (3.4 mg)。Fraction 5 (2.5 g) 用 Sephadex LH-20 (MeOH) 进行分离得到 4 个馏分 (Fr. 5.1~5.4)。Fr. 5.2 用 HPLC 纯化 (50% CH₃CN/H₂O) 及手性拆分 (90% hexane/isopropanol, 70% hexane/isopropanol) 得到化合物 **1** (3.8 mg)、**2** (1.0 mg) 和化合物 **3** (6.58 mg)、**4** (6.34 mg)。Fr.5.1 用 ODS 柱及 HPLC (90% CH₃CN/H₂O) 得到化合物 **15** (12.1 mg)、**16** (7.2 mg)。Fraction 7 (1.1 g) 用 ODS 柱 (MeOH/H₂O) 进行分离得到 5 个馏分 (Fr. 7.1~7.5)。Fr. 7.2 用 HPLC 纯化 (15% CH₃CN/H₂O+0.1% TFA) 得到化合物 **12** (7.8 mg), Fr. 7.3 用 HPLC 纯化 (30% CH₃CN/H₂O) 得到化合物 **13** (4.5 mg), Fr. 7.4 用 HPLC 纯化 (40% CH₃CN/H₂O) 得到化合物 **14** (9.0 mg)。

2 结构鉴定

化合物 I (**1**、**2**) 无色结晶 (DMSO-MeOH = 1 : 9), CCDC 号: 1502322, 单晶数据: 分子式 C₁₄H₁₂O₆, M = 276.24; 正交晶系: a = 23.768 4 (3) Å (1 Å = 0.1 nm), b = 6.883 36 (9) Å, c = 14.872 22 (19) Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 94.837 1 (11)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; 体积: 2424.53 (5) Å³; 温度: 150 (2) K; 空间群: C2/c; Z = 8; 反射光测量值: 15 692; 独立反射值: 2 144 [R(int) = 0.035]; 最后的 R1 值: 0.034 8 (I > 2 σ (I)); 最后的 wR (F2) 值: 0.038 9 (all data); The goodness of fit on F2: 1.054; 单晶尺寸: 0.410 \times 0.350 \times 0.210 mm³。紫外 UV (MeOH) λ_{max} : 218、258、296 nm。

化合物 II (**3**、**4**) 黄色油状物, 核磁数据如下: ¹H NMR (DMSO, 500 MHz): δ_{H} 7.51 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.02 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-4), 6.89 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 5.68 (1H, dd, $J = 8.1, 4.0$ Hz, H-3), 3.05 (1H, dd, $J = 16.6, 4.1$ Hz, H-8), 2.63 (1H, dd, $J = 16.6, 8.3$ Hz, H-8); ¹³C NMR (DMSO, 125 MHz): δ_{C} 170.9 (C, C-9), 167.7 (C, C-1), 156.7 (C, C-7), 151.4 (C, C-7a), 136.0 (CH, C-5), 115.8 (CH, C-6), 112.4 (CH, C-4),

111.2 (C, C-3a), 76.0 (CH, C-3), 39.6 (CH₂, C-8)。

3 COX-2 抑制活性

将测试化合物溶于 DMSO 中, 并将终浓度设定为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过与对照孵育比较来计算抑制百分比, 实验流程参照 Blobaum 等^[19]发表的文献。

References

- [1] Zhao CY, Zhu TH, Zhu WM. New marine natural products of microbial origin from 2010 to 2013 [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2013, 33: 1195-1234.
- [2] Liu YY, Wu YN, Zhai R, et al. Altenusin derivatives from mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. SK6YW3L [J]. RSC Adv, 2016, 6: 72127-72132.
- [3] Naganuma M, Nishida M, Kuramochi K, et al. 1-Deoxyruralactone, a novel specific inhibitor of families X and Y of eukaryotic DNA polymerases from a fungal strain derived from sea algae [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16: 2939-2994.
- [4] Orfali RS, Ebrahim W, El-Shafae AM. Secondary metabolites from *Alternaria* sp. a fungal endophyte isolated from the seeds of *Ziziphus jujuba* [J]. Chem Nat Compd, 2017, 53: 1031-1034.
- [5] Ayer WA, Racok JS. The metabolites of *Talaromyces flavus*: Part 1. Metabolites of the organic extracts [J]. Can J Chem, 1990, 68: 2085-2094.
- [6] Ulrich H, And JBG, Wicklow DT. Biologically active polyketide metabolites from an undetermined fungicolous hyphomycete resembling cladosporium [J]. J Nat Prod, 2002, 65: 876-882.
- [7] Liang Y, Tian WX, Ma XF. Chemical constituents of *caulis polygonimultiflori* [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2009, 26: 536-538.
- [8] Ma BJ, Shen JW, Yu H, et al. Chemical composition of the fruiting bodies of *Helvella elastic* [J]. Acta Bot Boreali-Occident Sin (西北植物学报), 2009, 29: 2115-2117.
- [9] Zhen FF, Shi SY, Wan QZ, et al. A new isocoumarin from metabolites of the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wiltshire [J]. Chin Chem Lett, 2012, 23: 317-320.
- [10] Elbandy M, Shinde PB, Dang HT, et al. Furan metabolites from the sponge-derived yeast *Pichia membranifaciens* [J]. J Nat Prod, 2008, 71: 869-872.
- [11] Wu B, Wu LJ, Zhang L, et al. Studies on the antibacterial chemical constituents of *Senecio cannabinifolius* Less (I) [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2004, 21: 341-345.
- [12] Stella C, Photis D, Li HT, et al. Separation and identification

- of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with post column solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR) [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 4667–4679.
- [13] Gao SS, Li XM, Wang BG. Perylene derivatives produced by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Laurencia* species [J]. *Nat Prod Commun*, 2009, 4: 1477–1480.
- [14] He JW, Chen GD, Gao H, et al. Heptaketides with antiviral activity from three endolichenic fungal strains *Nigrospora* sp. *Alternaria* sp. and *Phialophora* sp [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 1087.
- [15] Khamthong N, Rukachaisirikul V, Tadpetch K, et al. Tetrahydroanthraquinone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride*, PSU-F95 [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35: 461–468.
- [16] Wang QX, Bao L, Yang XL, et al. Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium* sp [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 209–214.
- [17] Wang Y, Wang LP, Zhuang YB, et al. Phenolic polyketides from the co-cultivation of marine-derived *Penicillium* sp. WC-29-5 and *Streptomyces fradiae* 007 [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12: 2079–2088.
- [18] Cai QX, Zhao JH, Wang JY, et al. Isolation and identification of endophytic fungus LM033 obtained from *Moringa oleifera* Lam. and biological activity of the metabolites [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2013, 22: 2168–2173.
- [19] Blobaum AL, Uddin MJ, Felts A, et al. The 2'-trifluoromethyl analogue of indomethacin is a potent and selective COX-2 inhibitor [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4: 486–490.

勘误

由于作者疏忽，2018年53卷第2期第256–262页文章“新型含异丁基苯甲酮类化合物的合成及抗炎活性的初步研究”图1中先导化合物LM49结构绘制错误，特此更正。

