

文章编号: 1674-7054(2017)03-0248-07

海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCS-KFD03 的化学成分分析

张宇^{1,2}, 孔凡栋², 马青云², 谢晴宜², 黄圣卓²,
周丽曼², 戴好富², 邓世明¹, 赵友兴²

(1. 海南大学海洋学院/热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228; 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, 海口 571101)

摘要: 为了研究海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCS-KFD03 次级代谢产物的活性成分, 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从其发酵液中分离得到 7 个化合物, 运用各种波谱方法鉴定为 3β , 5α -dihydroxy-($22E$, $24R$)-ergosta-7, 22 -dien-6-one (1); 3β , 4α -dihydroxy-26-methoxyergosta-7, 24 (28)-dien-6-one (2); 麦角甾醇($22E$, $24R$)-ergosta-5, 7 , 22 -trien- 3β -ol (3); leporin B (4); astellolide G (5); astellolide B (6) 和 astellolide A (7), 并测定化合物的抗氧化活性、乙酰胆碱酯酶和 α -糖苷酶抑制活性。结果表明: 化合物 2, 3, 5 和 6 具有一定的抗氧化活性, 化合物 2 具有较弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 化合物 4 具有强于阳性药阿卡波糖的 α -糖苷酶抑制活性。

关键词: 海洋真菌; 曲霉属; 化学成分; 生物活性

中图分类号: R 284.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.03.002

海洋约占地球表面积的 71%, 是现存最完整、资源最丰富、生物多样性最显著天然生物资源宝库^[1]。海洋真菌作为海洋微生物的重要组成部分, 虽然对其次级代谢产物的研究起步较晚, 但发展的势头迅猛。1945 年, Giuseppe Brotzu 从 1 株海洋来源真菌 *Acremonium chrysogenum* 中分离得到了具有抗菌活性的化合物 cephalosporin C, 真正标志着海洋真菌次级代谢产物研究的开始^[2], 这一研究成果被认为是海洋药物开发最早的成功实例^[3]。自 1991 年起, 海洋真菌次级代谢产物的研究开始活跃起来, 截止到 2005 年共发现 400 多个新天然产物, 化合物的类型涉及到聚酮、糖苷、生物碱、肽类、萜类和甾体等, 且很多化合物表现出良好的抗肿瘤、抑菌和抗病毒等生物活性^[4-5]。随着海洋微生物次级代谢产物研究的深入, 近年来, 从中发现的活性次级代谢产物的种类和数量迅速增加, 其大多具有结构新颖、生物活性多样的特点, 如从海洋沉积物中分离出的 1 株青霉属真菌 *Penicillium terrestre* 中, 发现了具有良好的乙酰胆碱酯酶抑制活性的化合物 sorbiterrin A^[6]; 从海藻样品中分离的曲霉属真菌 *Aspergillus* sp. 中, 发现了具有强自由基清除活性的化合物 JBIR-81 和 JBIR-82^[7]等。以上研究结果表明, 海洋天然产物具有海洋药物开发的巨大潜力, 因此, 笔者开展了对海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCS-KFD03 化学成分的研究, 并评价其生物酶抑制以及抗氧化等生物活性, 旨在发现海洋活性成分, 为海洋药物开发和药物先导化合物的发现提供参考。

收稿日期: 2017-03-30

修回日期: 2017-04-20

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303117); 国家自然科学基金青年科学基金项目(41606088); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项-中国热带农业科学院院级创新团队项目(17CXTD-15); 天津大学-海南大学协同创新基金资助

作者简介: 张宇(1992-), 男, 海南大学海洋学院 2014 级硕士研究生, E-mail: stzhangyu92@163.com

通信作者: 邓世明(1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 海洋药物, E-mail: dsm701@126.com;

赵友兴(1974-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 活性天然产物化学, E-mail: zhaoyouxing@itbb.org.cn

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 薄层层析硅胶板、柱层析用硅胶(200~300目)和硅胶H均产自青岛海洋化工厂;Sephadex LH-20凝胶为GE公司生产;反向材料C-18为FUJII公司生产;NMR采用Bruker AV-500型超导核磁共振波谱仪,TMS为内标;MS采用Autospec-3000质谱仪;高效液相色谱仪采用Waters1525,Waters C18半制备柱(250 mm×10 mm,5 μm)。乙酰胆碱酯酶购自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(DNTB)、α-糖苷酶(酵母来源)、阿卡波糖和他克林等均购自Sigma公司;ELX-800酶标仪购自美国宝特公司,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DP-PH)购自aladdin公司,抗坏血酸购自西陇化工公司。

1.2 样品材料 海洋动物样品方格星虫(*Sipunculus nudus*)2015年8月采集自海口湾,从中分离得到真菌菌株SCS-KFD03,经ITS序列分析鉴定为曲霉属(*Aspergillus* sp.)真菌。

1.3 菌株发酵 将菌株接种于斜面培养基(马铃薯葡萄糖琼脂,PDA),在28℃下培养3~5 d。配制60 L真菌2号培养基(麦芽糖20 g,味精10 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g,葡萄糖10 g,酵母膏3 g,玉米浆1 g,甘露醇20 g,pH 6.5,自来水1 L),并分装于1 000 mL三角瓶中(装至300 mL处),经高压灭菌锅121℃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。

1.4 分离纯化 发酵结束后用纱布将菌株的发酵液和菌丝体过滤分离。发酵液部分加入2倍体积的乙酸乙酯萃取3次后,合并萃取液减压浓缩得到浸膏18.5 g。菌丝体加入80%丙酮水溶液浸泡24 h并用组织破碎仪机械破碎处理,提取3次后,合并提取液,减压浓缩蒸干丙酮,再用3倍体积乙酸乙酯萃取3次,合并乙酸乙酯萃取液,减压浓缩蒸干乙酸乙酯,得到菌丝体的萃取物23 g。分别对发酵液和菌丝体浸膏做HPLC指纹图谱分析,经过高效液相指纹图谱分析后,发酵液和菌丝体的主要代谢产物基本一致,合并得到41.5 g浸膏。粗浸膏(41.5 g)经减压硅胶柱(石油醚和乙酸乙酯体系)以10:1~1:2的梯度洗脱得到5个组分(Fr.1~Fr.5)。Fr.2(3 g)经过反相硅胶柱色谱(甲醇/水系统,35%~100%,体积分数)梯度洗脱后,经过凝胶柱Sephadex LH-20(100%甲醇)纯化得到化合物1(1.6 mg)和7(9.4 mg),结合半制备HPLC(C_{18} 半制备柱,60%甲醇/水系统,体积分数)纯化得到化合物4(t_R 12.5 min; 2.6 mg)和5(t_R 15.0 min; 2.0 mg)。Fr.3(2 g)经过反相硅胶柱色谱(甲醇/水系统,40%~100%,体积分数)梯度洗脱后,经过凝胶柱Sephadex LH-20(100%甲醇)纯化得到化合物2(2.0 mg),并在甲醇溶液中的重结晶得到化合物3(5.0 mg)。Fr.4(1.5 g)经过凝胶柱Sephadex LH-20(氯仿:甲醇=1:1)分离得到化合物5(4.4 mg)。

1.5 活性测试方法

1.5.1 DPPH自由基清除活性测定 取1 mg待测化合物,加入20 μL的二甲基亚砜(DMSO),充分溶解后,取10 μL该溶液加至90 μL的无水乙醇中,配制成待测化合物溶液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。按照此方法配制阳性对照药抗坏血酸的待测液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。精密称定DPPH试剂0.0256 g,用无水乙醇定容到100 mL,配制成DPPH自由基标准溶液,于4℃下冷藏备用,使用前再加入10倍无水乙醇使用。实验组加入20 μL待测样品溶液和180 μL DPPH溶液(A);阴性对照组加入20 μL 10%的DMSO-乙醇溶液和180 μL DPPH溶液(B);阳性对照加入20 μL(相同条件下配制)的抗坏血酸溶液和180 μL DPPH溶液;空白对照加入20 μL待测样品溶液和180 μL无水乙醇(A_0)。反应的总体积为200 μL。将各溶液于96孔酶标板内混匀,在25℃下避光保温反应30 min后,置于酶标仪中在515 nm波长下测量每孔的OD值并计算化合物对DPPH自由基清除率。按照以下公式计算化合物对DPPH自由基的清除率。

$$\text{自由基清除率} = [1 - (A - A_0)] / B \times 100\%$$

式中: A 为待测样品的平均 OD 值; B 为阴性对照的平均 OD 值; A_0 为空白对照的平均 OD 值。

1.5.2 乙酰胆碱酯酶抑制活性测定 所测化合物均用 DMSO 进行溶解, 制成待测样品溶液 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。取 $110 \mu\text{L}$ 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 8.0$)、 $10 \mu\text{L}$ 待测样品和 $40 \mu\text{L}$ 乙酰胆碱酯酶 ($0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 于 96 孔板中, 在 30°C 下温育 20 min 后, 依次加入 DTNB ($2.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和碘化硫代丁酰胆碱 ($1.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $40 \mu\text{L}$, 反应总体积为 $200 \mu\text{L}$ 。充分混匀 30 min 后, 于 405 nm 检测波长用酶标仪进行检测。以他克林 (反应终浓度为 $0.33 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为阳性对照, DMSO (反应终浓度为 0.1%) 为阴性对照, 实验重复 3 次。按照以下公式计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制率。

$$\text{抑制率} = (E - S) / E \times 100\%$$

式中: E 为阴性对照平均吸光值; S 为待测样品的平均吸光值。

1.5.3 α -糖苷酶抑制活性测定 所测化合物均用 DMSO 进行溶解, 制成待测样品溶液 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。取浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 ($\text{pH } 6.8$) $70 \mu\text{L}$ 于 96 孔板中, 再分别加入 $20 \mu\text{L}$ $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 α -糖苷酶溶液和 $10 \mu\text{L}$ 待测样品, 在 37°C 下温育 15 min 后加入浓度为 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PNPG 溶液 $20 \mu\text{L}$, 在 37°C 下反应 15 min 后加入 $80 \mu\text{L}$ $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 终止液终止反应, 反应总体积为 $200 \mu\text{L}$ 。充分混匀后于 400 nm 处酶标仪进行检测。以阿卡波糖 (反应终浓度为 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为阳性对照, DMSO (反应终浓度为 0.5%) 为阴性对照, 实验重复 3 次。按照以下公式计算化合物对 α -糖苷酶的抑制率。

$$\text{抑制率} = (E - S) / E \times 100\%$$

式中: E 为阴性对照平均吸光值; S 为待测样品平均吸光值。

2. 结果与分析

2.1 结构鉴定 从该真菌中一共分离了 7 个化合物, 根据 ^1H 、 ^{13}C -NMR 和 MS 数据鉴定了化合物 1~7 的结构 (图 1)。

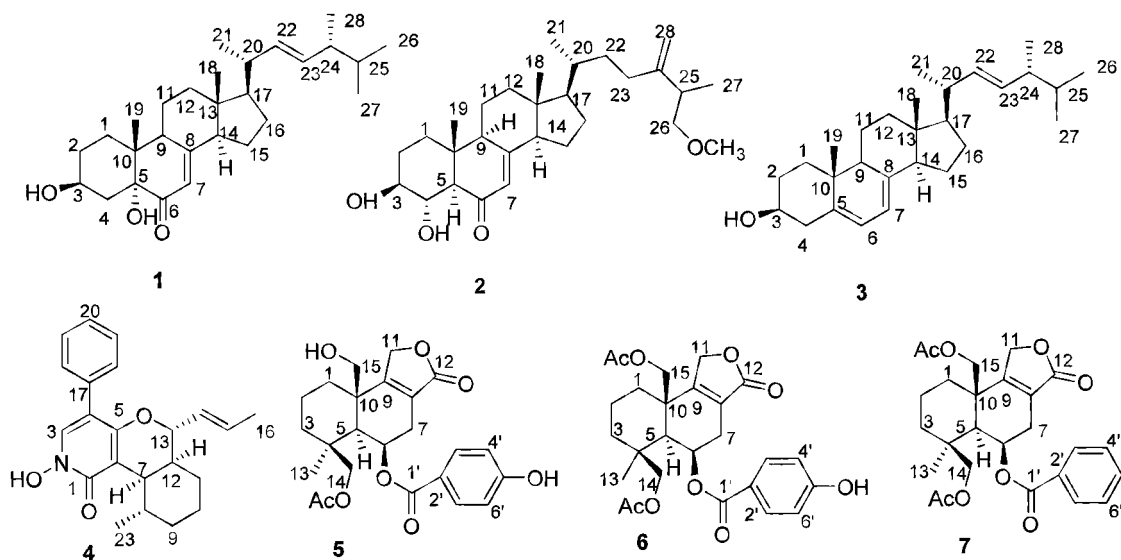


图 1 化合物 1~7 的结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-7

化合物 1 为白色晶体, ESI-MS 给出相对分子质量为 428 (m/z : 451 $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 结合 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱信息确定分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$, 不饱和度为 7。 ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} : 4.04 (1H, m, H-3), 5.66 (1H, s, H-7), 5.35 (1H, dd, $J = 15.2, 7.4 \text{ Hz}$, H-23), 5.20 (1H, dd, $J = 15.2, 7.9 \text{ Hz}$, H-22), 1.07 (3H, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, H-21), 0.96 (3H, s, H-49), 0.92 (3H, d, $J = 6.8 \text{ Hz}$, H-28), 0.84

(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27) δ_c : 201.5 (C-6), 167.1 (C-8), 136.7 (C-22), 133.6 (C-23), 120.5 (C-7), 78.2 (C-5), 68.1 (C-3), 57.3 (C-17), 56.9 (C-14), 45.8 (C-13), 45.4 (C-10), 44.4 (C-9), 41.2 (C-20), 41.7 (C-24), 39.8 (C-4), 34.3 (C-12), 34.0 (C-25), 31.5 (C-2), 31.1 (C-11), 29.1 (C-16), 22.6 (C-1), 21.6 (C-15), 20.5 (C-21), 20.1 (C-19), 18.2 (C-26), 16.7 (C-27), 14.4 (C-28), 13.1 (C-18)。其波谱数据与文献[8]报道基本一致, 故鉴定化合物为 3β - 5α -dihydroxy-(22E, 24R)-ergosta-7, 22-dien-6-one。

化合物2为无色晶体, ESI-MS 给出相对分子质量为 458 (m/z : 481 $[M + Na]^+$), 结合 1H -NMR, ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱信息确定分子式为 $C_{29}H_{46}O_4$, 不饱和度为 7。 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_H : 5.76 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 4.80 (1H, d, $J = 1.3$, H-28b), 4.78 (1H, br s, H-28a), 3.94 (1H, dd, $J = 7.8$, 9.0 Hz, H-4), 3.53 (1H, m, H-3), 3.40 (1H, dd, $J = 9.3$, 6.3, H-26b), 3.35 (3H, s, H-OCH₃), 3.25 (1H, dd, $J = 9.3$, 7.3, H-26a), 2.40 (1H, sext, $J = 6.9$ Hz, H-25), 2.23 (1H, m, H-9), 2.16 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-5), 2.14 (1H, m, H-23b), 2.09 (1H, m, H-14), 1.88 (1H, m, H-23a), 1.80 (1H, m, H-22b), 1.45 (1H, m, H-20), 1.42 (1H, m, H-22a), 1.35 (1H, m, H-17), 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.98 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.96 (3H, s, H-19), 0.61 (3H, s, H-18)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_C : 202.2 (C-6), 166.3 (C-8), 152.7 (C-24), 123.3 (C-7), 108.7 (C-28), 77.0 (C-26), 74.1 (C-3), 72.3 (C-4), 59.0 (C-OCH₃), 58.7 (C-5), 56.3 (C-17), 55.9 (C-14), 50.1 (C-9), 45.0 (C-13), 40.2 (C-10), 40.0 (C-25), 38.8 (C-12), 36.0 (C-20), 35.8 (C-22), 34.4 (C-1), 31.5 (C-23), 27.7 (C-16), 26.9 (C-2), 22.7 (C-15), 21.5 (C-11), 18.9 (C-21), 17.4 (C-27), 14.6 (C-19), 12.6 (C-18)。其波谱数据与文献[9]报道基本一致, 故鉴定化合物为 3β - 4α -dihydroxy-26-methoxyergosta-7, 24(28)-dien-6-one。

化合物3为无色粉末, ESI-MS 给出相对分子质量为 396 (m/z : 419 $[M + Na]^+$), 结合 1H -NMR, ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱信息确定分子式为 $C_{28}H_{44}O$, 不饱和度为 7。 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_H : 5.57 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-6), 5.38 (1H, dt, $J = 5.3$, 2.6 Hz, H-7), 5.22 (1H, dd, $J = 15.3$, 7.2 Hz, H-22), 5.17 (1H, dd, $J = 15.3$, 7.7 Hz, H-23), 3.64 (1H, m, H-3), 2.47 (1H, m, H-4a), 2.28 (1H, m, H-4b), 1.03 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.84 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27), 0.82 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-26), 0.63 (3H, s, H-19)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_C : 141.5 (C-8), 139.9 (C-5), 135.7 (C-22), 132.1 (C-23), 119.7 (C-6), 116.4 (C-7), 70.6 (C-3), 55.9 (C-17), 54.7 (C-14), 46.4 (C-9), 43.0 (C-24), 42.9 (C-13), 41.0 (C-4), 40.6 (C-20), 39.2 (C-12), 38.5 (C-1), 37.2 (C-10), 43.0 (C-24), 33.3 (C-25), 32.2 (C-2), 28.5 (C-16), 23.2 (C-15), 21.3 (C-21), 21.2 (C-11), 20.0 (C-27), 19.8 (C-26), 17.8 (C-28), 16.4 (C-19), 12.2 (C-18)。其波谱数据与文献[10]报道基本一致, 故鉴定化合物为麦角甾醇(22E, 24R)-ergosta-5, 7, 22-trien-3 β -ol。

化合物4为白色粉末, ESI-MS 给出相对分子质量为 352 (m/z : 375 $[M + Na]^+$), 结合 1H -NMR, ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱信息确定分子式为 $C_{22}H_{26}NO_3$, 不饱和度为 11。 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 7.61 (1H, s, H-3), 7.41 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-18/H-22), 7.37 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-19/H-21), 7.29 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-20), 5.73 (1H, dq, $J = 16$, 7 Hz, H-15), 5.37 (1H, ddq, $J = 15$, 8.6, 2 Hz, H-14), 4.82 (1H, dd, $J = 11$, 9 Hz, H-13), 2.78 (1H, dd, $J = 10$, 3.5 Hz, H-7), 1.77 (1H, m, H-8), 1.76 (1H, m, H-11a), 1.73 (1H, m, H-12), 1.71 (3H, dd, $J = 7$, 2 Hz, H-16), 1.60 (2H, m, H-9a/H-9b), 1.60 (1H, m, H-11b), 1.52 (1H, m, H-10a), 1.39 (1H, m, H-10b), 0.86 (3H, d, $J = 7$ Hz, H-23)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C : 158.5 (C-1), 157.8 (C-5), 133.8 (C-17), 131.2 (C-15), 129.8 (C-14), 129.4 (C-3), 129.4 (C-18), 129.4 (C-22), 128.4 (C-21), 128.4 (C-19), 127.5 (C-20), 113.6 (C-6), 111.2 (C-4), 78.2 (C-13), 38.1 (C-7), 35.9 (C-8), 35.8 (C-9), 35.2 (C-12), 26.5 (C-

11) 20.9 (C-10) 20.5 (C-23) 18.0 (C-16)。其波谱数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定化合物为 leporin B。

化合物 5 为白色无定型粉末,ESI-MS 给出相对分子质量为 444 (m/z : 467 $[M + Na]^+$),结合 1H -NMR, ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱信息确定分子式为 $C_{24}H_{28}O_8$,不饱和度为 11。

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 7.85 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'/7') 6.91 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4'/6') 5.89 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-6) 5.17 (1H, dt, $J = 17.5, 3.0$ Hz, H-1a) 4.83 (1H, m, H-11b) 4.49 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-14a) 4.38 (2H, br s, H-15) 3.86 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-14b), 2.68–2.76 (1H, m, H-7a) 2.48 (1H, d, $J = 19.5$ Hz, H-7b) 2.47–2.52 (1H, m, H-1a) 1.95 (1H, s, H-5) 1.87 (3H, s, H-OAc) 1.83–1.90 (1H, m, H-3a) 1.79–1.85 (1H, m, H-2a) 1.51–1.57 (1H, m, H-2b) 1.31–1.37 (1H, m, H-1b) 1.18–1.25 (1H, m, H-3b) 1.12 (3H, s, H-13)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C : 175.1 (C-12) 171.9 (14-OAc) 170.0 (C-9) 167.3 (C-1') 163.8 (C-5') 133.3 (C-3'/7') 122.8 (C-2') 122.2 (C-8) 116.9 (C-4'/6') 73.5 (C-11) 68.2 (C-15) 68.1 (C-6) 64.8 (C-14) 55.1 (C-5) 44.8 (C-10) 39.4 (C-4) 38.0 (C-3) 32.4 (C-1) 30.5 (C-7) 28.5 (C-13) 21.2 (14-OAc) 19.3 (C-2)。其波谱数据与文献[12]报道基本一致,故鉴定化合物为 astellolide G。

化合物 6 为无色晶体,ESI-MS 给出相对分子质量为 486 (m/z : 509 $[M + Na]^+$),结合 1H -NMR, ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱信息确定分子式为 $C_{26}H_{30}O_9$,不饱和度为 12。 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 7.87 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'/7') 6.87 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4'/6') 5.88 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-6) 5.12 (1H, dt, $J = 17.5, 2.5$ Hz, H-1a) 4.87 (1H, m, H-11b) 4.52 (2H, d, $J = 11.5$ Hz, H-14a) 4.42 (2H, br s, H-15) 3.89 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-14b) 2.70–2.78 (1H, m, H-7a) 2.52 (1H, d, $J = 19.8$ Hz, H-7b) 2.50–2.55 (1H, m, H-1a) 2.00 (3H, s, H-14-OAc) 1.94 (1H, s, H-5) 1.89 (3H, s, H-15-OAc) 1.86–1.91 (1H, m, H-3a) 1.80–1.84 (1H, m, H-2a) 1.52–1.57 (1H, m, H-2b) 1.33–1.39 (1H, m, H-1b) 1.20–1.27 (1H, m, H-3b) 1.14 (3H, s, H-13)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C : 175.5 (C-12) 172.4 (14-OAc) 172.0 (15-OAc) 167.8 (C-9) 167.2 (C-1') 163.4 (C-5') 132.8 (C-3'/7') 123.3 (C-2') 121.3 (C-8) 116.3 (C-4'/6') 72.8 (C-11) 68.2 (C-15) 67.3 (C-6) 67.2 (C-14) 54.5 (C-5) 41.5 (C-10) 38.5 (C-4) 37.7 (C-3) 32.2 (C-1) 29.6 (C-7) 28.0 (C-13) 21.0 (14-OAc) 20.7 (15-OAc) 18.7 (C-2)。其波谱数据与文献[13]报道基本一致,故鉴定化合物为 astellolide B。

化合物 7 为无色晶体,ESI-MS 给出相对分子质量为 470 (m/z : 493 $[M + Na]^+$),结合 1H -NMR, ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱信息确定分子式为 $C_{26}H_{30}O_8$,不饱和度为 12。 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 8.02 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-3'/7') 7.57 (1H, t, $J = 8$ Hz, H-5') 7.47 (2H, t, $J = 8$ Hz, H-4'/6') 5.95 (1H, m, H-6) 5.00 (1H, dt, $J = 17, 2.5$ Hz, H-1a) 4.88 (1H, m, H-11b) 4.43 (2H, brs, H-15) 4.38 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-14a) 3.99 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-14b) 2.70–2.80 (1H, m, H-7a) 2.35 (1H, m, H-7b) 2.50–2.57 (1H, m, H-1a) 2.11 (3H, s, H-14-OAc) 1.97 (1H, s, H-5) 1.90 (3H, s, H-15-OAc) 1.86–1.95 (1H, m, H-3a) 1.80–1.87 (1H, m, H-2a) 1.52–1.58 (1H, m, H-2b) 1.33–1.40 (1H, m, H-1b) 1.20–1.27 (1H, m, H-3b) 1.16 (3H, s, H-13)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C : 175.5 (C-12) 170.9 (14-OAc) 170.3 (15-OAc) 166.3 (C-9) 165.7 (C-1') 133.7 (C-5') 129.7 (C-3'/7') 129.3 (C-2') 128.6 (C-4'/6') 122.8 (C-8) 71.3 (C-11) 67.1 (C-15) 66.9 (C-6) 66.6 (C-14) 54.4 (C-5) 40.7 (C-10) 37.9 (C-4) 37.3 (C-3) 32.0 (C-1) 29.3 (C-7) 28.0 (C-13) 21.2 (14-OAc) 20.8 (15-OAc) 18.1 (C-2)。其波谱数据与文献[13]报道基本一致,故鉴定化合物为 astellolide A。

2.2 活性测试结果 对分离得到的 7 个化合物进行 DPPH 自由基清除活性、乙酰胆碱酯酶和 α -糖苷酶抑制活性评价,从表 1 可知,化合物 2 3 5 和 6 具有较弱的 DPPH 自由基清除活性,其自由基清除率分别为

24.7 % ,10.3 % ,17.4 % 和 29.7 % ; 化合物 2 还具有较弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性 ,其抑制率为 14.6 % ; 化合物 4 具有强于阳性药阿卡波糖的 α - 糖苷酶抑制活性 IC_{50} 是 17.0 μ M (阳性药阿卡波糖的 IC_{50} 为 301.4 μ M) 。

表 1 化合物 1 ~ 7 的生物活性评价

Tab. 1 Evaluation of bioactivities of compounds 1 – 7

样品编号 Sample code	自由基清除率 / % (50 mg • L ⁻¹) Scavenging rate of free radical	乙酰胆碱酯酶抑制率 / % (50 mg • L ⁻¹) Acetyl cholinesterase inhibition rate	α - 糖苷酶抑制活性 / (μ mol • L ⁻¹) (IC_{50}) α - glucosidase inhibitory activity
1	< 10	< 10	> 1 000
2	24.7 $\pm$ 2.9	14.6 $\pm$ 1.0	> 1 000
3	10.3 $\pm$ 0.4	< 10	> 1 000
4	< 10	< 10	17.0 $\pm$ 1.5
5	17.4 $\pm$ 1.7	< 10	> 1 000
6	29.7 $\pm$ 1.3	< 10	> 1 000
7	< 10	< 10	> 1 000
抗坏血酸 Ascorbic acid (0.5 g • L ⁻¹)	62.0 $\pm$ 0.4	—	—
他克林 Tacrine (66 μ g • L ⁻¹)	—	76.0 $\pm$ 0.8	—
阿卡波糖 Acarbose (0.25 g • L ⁻¹)	—	—	301.4 $\pm$ 1.2

3 讨 论

海洋真菌是新天然产物的重要来源 ,从海洋真菌次级代谢产物中发现结构新颖与活性显著的天然产物对于新药开发具有现实和战略意义。笔者首次从海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCS-KFD03 中分离得到 7 个化合物(1 ~ 7) ,前人研究发现化合物 2 具有较弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性^[9] ,化合物 3 显示出一定的卤虫 *Artemia salina* 致死活性和强的抗藤壶 *Balanus amphitrite* 附着活性^[14] ,本研究在此基础上 ,对上述化合物生物活性进行进一步的研究 ,并对其部分化合物首次进行了抗氧化活性、乙酰胆碱酯酶抑制活性和 α - 糖苷酶抑制活性的生物活性评价。其中 ,化合物 2 显示出一定的抗氧化活性和乙酰胆碱酯酶抑制活性 ,化合物 3、5 与 6 具有较弱的抗氧化活性 ,化合物 4 表现出强阳性药阿卡波糖的 α - 糖苷酶抑制活性。本研究进一步丰富了海洋真菌天然产物的结构多样性 ,挖掘了部分化合物新的生物活性 ,为进一步从海洋真菌天然产物中发现药源分子或先导化合物奠定了基础。

参考文献:

[1] Newman D J , Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years [J]. J. Nat Prod , 2007 , 70 (3) : 461 – 477.

[2] Newton G G , Abraham E P. Isolation of cephalosporin C , a penicillin – like antibiotic containing D – α – aminoadipic acid [J]. Nature , 1955 , 175 (4456) : 548.

[3] 尚卓. 两株海洋真菌抗菌活性次级代谢产物的研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院海洋研究所 , 2011.

[4] Bugni T S , Ireland C M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms [J]. Nat Prod Rep. 2004 , 21: 143 – 163.

[5] Saleem M , Ali M S , Hussain S , et al. Marine natural products of fungal origin [J]. Nat Prod Rep. , 2007 , 24: 1142 – 1152.

[6] Chen L , Zhu T J , Ding Y Q , et al. Sorbiterrin A , a novel sorbicillin derivative with cholinesterase inhibition activity from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre* [J]. Tetrahedron Lett , 2012 , 53 (3) : 325 – 328.

[7] Izumikawa M , Hashimoto J , Takagi M , et al. Isolation of two new terpeptin analogs-JBIR-81 and JBIR-82-from a seaweed-de-

- rived fungus, *Aspergillus* sp. SpD081030G1fl [J]. J. Antibiot, 2010, 63(7): 389–391.
- [8] Ishizuka T, Yaoita Y, Kikuchi M, et al. Sterol constituents from the fruit bodies of *Grifola frondosa* (Fr.) S F Gray [J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(11): 1756–1760.
- [9] Qiao M F, Ji N Y, Miao F P, et al. Steroids and an oxylin from an algiculous isolate of *Aspergillus flavus* [J]. Magn Reson Chem, 2011, 49(6): 366–369.
- [10] Li J, Chen Q, Zeng Y, et al. A new phenol compound from endophytic *Phomopsis* sp. DC01 [J]. Nat Prod Res., 2012, 26(21): 2008–2012.
- [11] Zhang C, Jin L, Mondie B, et al. Leporin B: a novel hexokinase II gene inducing agent from an unidentified fungus [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13(8): 1433–1435.
- [12] Ren R, Chen C J, Hu S S, et al. Drimane Sesquiterpenoids from the *Aspergillus oryzae* QXPC-4 [J]. Chem Biodivers, 2015, 12(3): 371–379.
- [13] Gould R O, Simpson T J, Walkinshaw M D, et al. Isolation and X-ray crystal structures of astellolides A and B, sesquiterpenoid metabolites of *Aspergillus varicolor* [J]. Tetrahedron Lett, 1981, 22(11): 1047–1050.
- [14] 赵琨, 孙雪萍, 韩磊, 等. 一株海绵共附生真菌 *Pleosporaceae* sp. 中甾体类化合物及其生物活性 [J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(12): 81–85.

Analysis of Chemical Constituents from the Marine-derived Fungus *Aspergillus* sp. SCS-KFD03

ZHANG Yu^{1,2}, KONG Fandong², MA Qingyun², XIE Qingyi², HUANG Shengzhuo²,
ZHOU Liman², DAI Haofu², DENG Shiming¹, ZHAO Youxing²

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources/College of Ocean, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: A strain SCS-KFD03 of *Aspergillus* sp. was isolated from *Sipunculus nudus* collected from Haikou Bay, and fermented. Active constituents were isolated and purified from the fermentation broth and hyphae of the strain SCS-KFD03 by using various chromatographic techniques, including Silica gel, Sephadex LH-20 column and HPLC chromatography. Seven compounds (1–7) were extracted from the secondary metabolites of the strain SCS-KFD03 and identified as 3 β 5 α -dihydroxy-(22E 24R)-ergosta-7 22-dien-6-one (1), 3 β 4 α -dihydroxy-26-methoxyergosta-7 24(28)-dien-6-one (2), (22E 24R)-ergosta-5 7 22-trien-3 β -ol (3), leporin B (4), astellolide G (5), astellolide B (6) and astellolide A (7). The bio-activity evaluation of these compounds showed that compounds 2, 3, 5 and 6 had a certain antioxidant activity towards DPPH free radical. The compound 2 also exhibited a weak inhibitory activity against acetyl cholinesterase, and the compound 4 had a higher inhibitory activity against α -glucosidase than the positive control acarbose.

Keywords: Marine-derived fungus; *Aspergillus* sp.; chemical constituents; bio-activity