

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00988

· 论 著 ·

## 中国南海黑乳海参共附生真菌 *Phialemonium* sp. 次生代谢产物的鉴定

王旭东<sup>1</sup>, 孙 鹏<sup>2</sup>, 许东啸<sup>2</sup>, 汤 华<sup>2</sup>, 刘宝姝<sup>2</sup>, 张 文<sup>2\*</sup>

1. 解放军第 425 医院药械科, 三亚 572000

2. 第二军医大学药学院海洋药物研究中心, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 对中国南海黑乳海参的共附生单胞瓶霉属真菌(*Phialemonium* sp.)的次生代谢产物进行研究。**方法** 运用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相色谱等分离手段对真菌 *Phialemonium* sp. 的乙酸乙酯提取物进行分离纯化, 利用现代波谱技术并结合文献报道进行结构鉴定。**结果** 分离得到 2 个缩酚酸环醚化合物 emeguisin A 和 aspergillusidone C。**结论** 作为黑乳海参共附生真菌 *Phialemonium* sp. 次生代谢产物, 2 个化合物均为首次从该真菌中分离得到。

**[关键词]** 黑乳海参; 海参共附生真菌; 单胞瓶霉属; 缩酚酸环醚

**[中图分类号]** R 731.77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)09-0988-04

### Identification of secondary metabolites of the fungus *Phialemonium* sp. associated with the South China Sea cucumber *Holothuria nobilis* Selenka

WANG Xu-dong<sup>1</sup>, SUN Peng<sup>2</sup>, XU Dong-xiao<sup>2</sup>, TANG Hua<sup>2</sup>, LIU Bao-shu<sup>2</sup>, ZHANG Wen<sup>2\*</sup>

1. Drug and Equipment Section, No. 425 Hospital of PLA, Sanya 572000, Hainan, China

2. Research Center for Marine Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the secondary metabolites of the fungus *Phialemonium* sp. associated with the South China Sea cucumber *Holothuria nobilis* Selenka. **Methods** The EtOAc extract of *Phialemonium* sp. was purified by repeated column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, and high-performance liquid chromatography (HPLC). Structural determination of the isolated compounds was achieved by spectroscopic analysis and by comparison with previously reported data. **Results** Two depsidones were isolated and their structures were determined as: emeguisin A and aspergillusidone C. **Conclusion** This is the first report on the secondary metabolites of *Phialemonium* sp. associated with the sea cucumber *H. nobilis* Selenka, and the two depsidones are reported for the first time from the fungus strain *Phialemonium* sp.

**[Key words]** *Holothuria nobilis* Selenka; sea cucumber associated fungus; *Phialemonium* sp.; depsidone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(9): 988-991]

海洋无脊椎动物的共附生微生物是海洋生物生态体系的组成部分, 其次生代谢产物结构多样、活性丰富, 受到天然产物化学家的重视。对共附生微生物的次生代谢产物的研究不仅能获得药源性活性物质, 还可考察共附生微生物与宿主之间的生态关系, 探讨其在海洋化学防御中可能扮演的角色。

海参是棘皮动物门海参纲动物的总称, 全世界约有 1 000 多种, 在我国分布有 140 多种, 主要营海洋底栖生活<sup>[1]</sup>。有人从日本海海参表皮真菌 *Acre-*

*monium striatisporum* 中分离得到具有中等细胞毒活性的二萜皂苷<sup>[2-4]</sup>, 从青岛海域海参 *Stichopus japonicus* 共附生真菌 *Aspergillus fumigatus* 中分离得到 19 个吡啶二酮哌嗪类生物碱<sup>[5]</sup> 以及 pseurotin A 和它的 2 个非对映异构体 pseurotin A1 和 A2<sup>[6]</sup>。

黑乳海参 (*Holothuria nobilis* Selenka) 在我国东海、南海海域均有分布<sup>[1]</sup>。前期已对黑乳海参体内的海参皂苷类成分及其生物活性进行了系统研究<sup>[8-10]</sup>。本课题组已从黑乳海参的一株共附生真菌

**[收稿日期]** 2014-07-01 **[接受日期]** 2014-09-11

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30873200, 41176125, 81202453); 上海浦江人才计划(PJ2008); 海南省自然科学基金(811223); 三亚市医疗卫生科技创新项目(YW1228)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30873200, 41176125, 81202453), Shanghai Pujiang Talent Program (PJ2008), Natural Science Foundation of Hainan (811223) and Medical Science Innovative Project of Sanya (YW1228)。

**[作者简介]** 王旭东, 博士, 副主任药师。E-mail: kaliwang2@sina.com.cn

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871257, E-mail: wenzhangl968@163.com

*Dendrodochium* sp. 中分离得到 13 个十二元环内酯化合物,其中包含 4 对手性异构体<sup>[7]</sup>。本研究运用正、反相硅胶柱色谱、凝胶柱色谱以及高效液相色谱(HPLC)等分离纯化技术,对分离自黑乳海参的共附生真菌 *Phialemonium* sp. 的次生代谢产物进行研究,结果分离纯化得到 2 个缩酚酸环醚类化合物,并运用现代波谱技术结合文献报道进行了结构鉴定。

## 1 材料和方法

1.1 样品 实验所用菌株由德国布伦瑞克理工大学(Technische Universit Braunschweig)微生物研究所 Barbara Schulz 教授从中国南海黑乳海参中分离得到,并鉴定为 *Phialemonium* sp.。现保存在第二军医大学药学院海洋药物研究中心,编号 10082。将菌株接种到培养基上(50 g 生物麦芽糖,15 g 琼脂,800 mL 人工海水,pH 5.6),培养箱温度 26℃,固体培养 28 d,共培养 300 块。

1.2 仪器与试剂 HZQ-F280 型全温振荡培养箱;LDZH-200KBS 型立式压力蒸汽灭菌器;Bruker Varian Inova-600、Avance-500 核磁共振仪;Agilent 1100 高效液相色谱仪配有 RID 检测器和 Zorbax 300-C<sub>18</sub>柱(250 mm×9.4 mm,5 μm);Sephadex LH-20 凝胶由 Amersham Pharmacia Biotech 生产;TLC 薄层板和柱色谱硅胶均由烟台黄务硅胶开发实验厂提供;开放柱色谱所用溶剂为分析纯,HPLC 所用试剂为色谱纯,购自国药集团上海化学试剂公司。

1.3 提取与分离 共附生真菌 *Phialemonium* sp. 菌株用含 5% 生物麦芽提取物的 Biomalt 固体琼脂培养基室温发酵 28 d,培养基用乙酸乙酯提取(1.0 L×5 次),合并提取液,浓缩得总浸膏 4.2 g。将总浸膏进行正相硅胶柱色谱法分离,依次用石油醚/丙酮(10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1)和二氯甲烷/甲醇(10:1, 5:1, 2:1, 0:1)系统作为洗脱剂进行梯度洗脱,TLC 点板合并共得到 Fr. A~Fr. K 16 个部分。对 Fr. E 进行 Sephadex LH-20 凝胶柱(CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 2:1)、ODS 柱分离和半制备 HPLC 纯化,得到单体化合物 1 (4.3 mg)和 2 (1.7 mg)。

## 2 结果

2.1 化合物 1 的结构鉴定 白色粉末,ESI-MS-显

示准分子离子峰( $m/z$ ): 413 [M-H]<sup>-</sup>和 415 [M+2-H]<sup>-</sup>(比例约为 3:1),提示分子中含有 1 个 Cl 原子,结合<sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR 和 DEPT 谱推测其分子式为 C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>ClO<sub>5</sub>,计算其不饱和度为 12。<sup>13</sup>CNMR 谱和<sup>1</sup>HNMR 谱低场区 110~160 范围内的芳香碳信号和芳香氢信号[6.52(s, 1H, H-2)],提示分子中分别存在 1 个五取代苯环(A)和 1 个六取代苯环(B)。<sup>1</sup>HNMR 谱的高场区存在两组甲基氢信号[1.67(d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-3''),1.82(d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-3'),1.86(s, 3H, H-4''),1.94(s, 3H, H-4')]和低场区存在的两组烯氢信号[5.46(q,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, H-2''),5.47(q,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, H-2')]提示分子中存在 2 个“1-甲基丙基-1-烯基”单元,这个结构单元进一步被 COSY 谱中 H-2''/H-3''和 H-2'/H-3'相关信号证实。根据<sup>13</sup>CNMR 谱上烯甲基碳的化学位移[17.7(C-4''),17.5(C-4')],“1-甲基丙基-1-烯基”的烯键被确定为 E 构型。HMBC 谱中,H-4''与 C-1'',C-2'',C-1 的相关信号以及 H-4'与 C-1',C-2',C-6 的相关信号,确定两个“(E)-1-甲基丙基-1-烯基”单元分别连接在 A 环的 C-1 位和 B 环的 C-6 位上。H<sub>3</sub>-4Me 与 C-3、C-4 和 C-4a,H<sub>3</sub>-9Me 与 C-8、C-9 和 C-9a,以及 H-2 与 C-1、C-2 和 C-3 分别确定了 A、B 苯环上甲基、羟基和氯原子的取代位置。<sup>13</sup>CNMR 谱中的酯羰基信号(164.7,C-11)提示 A、B 环通过 1 个酯键和 1 个醚键环合形成 C 环。经与文献[11]中数据比对,鉴定化合物 1 为缩酚酸环醚类化合物 emeguisin A(图 1A)。化合物 1 的核磁数据见表 1。

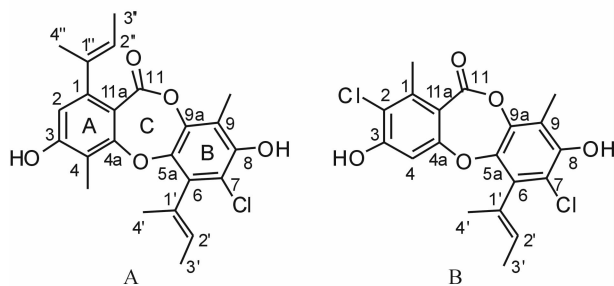


图 1 化合物 emeguisin A (A) 和 aspergillusidone C (B) 的化学结构式

Fig 1 Structures of emeguisin A (A) and aspergillusidone C (B)

2.2 化合物 2 的结构鉴定 白色粉末,ESI-MS-显示准分子离子峰( $m/z$ ): 393 [M-H]<sup>-</sup>,395[M+2-H]<sup>-</sup>和 395[M+4-H]<sup>-</sup>(比例 9:6:1),提示分

子中含有 2 个 Cl 原子,结合<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 DEPT 谱推测其分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>5</sub>,计算其不饱和度为 11。化合物 2 的<sup>13</sup>C NMR 和<sup>1</sup>H NMR 谱与化合物 1 相似,提示也为缩酚酸环醚类化合物。<sup>1</sup>H NMR 谱的高场区的甲基氢信号[1.89(d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-3')和 1.96(s, 3H, H-4')]和低场区的烯氢信号[5.42(q, *J* = 6.8, 1H, H-2')]提示分子中只含有 1 个“(E)-1-甲基丙基-1-烯基”单

元,H-4'与 C-1'、C-2'、C-6 的 HMBC 远程相关信号确定“(E)-1-甲基丙基-1-烯基”连接在 B 环的 C-6 上。HMBC 谱上芳氢[6.59(s, 1H, H-4)]与 C-3、C-4 和 C-4a 的相关信号以及 H<sub>3</sub>-1Me 与 C-1、C-2 和 C-11a,H<sub>3</sub>-9Me 与 C-8、C-9 和 C-9a 的相关信号确定了 A、B 环上的取代基位置。经与文献[12]中数据对比,鉴定化合物 2 为 aspergillusidone C(图 1B),其核磁数据见表 1。

表 1 化合物 emeguisin A 和 aspergillusidone C 的<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 数据

Tab 1 <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data of compounds emeguisin A and aspergillusidone C

Position	Emeguisin A		Aspergillusidone C	
	δ <sub>C</sub> , type	δ <sub>H</sub> ( <i>J</i> in Hz)	δ <sub>C</sub> , type	δ <sub>H</sub> ( <i>J</i> in Hz)
1	135.9, C		115.8, C	
1-Me		18.7, CH <sub>3</sub>	2.53, s	
2	112.4, CH	6.52, s	119.3, C	
3	158.4, C		155.1, C	
4	113.8, C		105.8, CH	6.59, s
4a	162.1, C		161.8, C	
4-Me	8.6, CH <sub>3</sub>	2.17, s		
5a	143.5, C		142.5, C	
6	130.1, C		134.4, C	
7	115.2, C		115.0, C	
8	149.6, C		147.6, C	
9	116.1, C		116.0, C	
9a	142.9, C		141.7, C	
9-Me	9.9, CH <sub>3</sub>	2.28, s	10.1, CH <sub>3</sub>	2.28, s
11	164.7, C		164.6, C	
11a	112.6, C		112.7, C	
1'	134.3, C		129.3, C	
2'	128.1, CH	5.47, q (6.6)	127.5, CH	5.42, q (6.8)
3'	14.0, CH <sub>3</sub>	1.82, d (6.6)	13.8, CH <sub>3</sub>	1.89, d (6.8)
4'	17.5, CH <sub>3</sub>	1.94, d (6.6)	17.3, CH <sub>3</sub>	1.96, s
1''	147.5, C			
2''	125.2, C	5.46, q (6.6)		
3''	14.4, CH <sub>3</sub>	1.67, d (6.6)		
4''	17.7, CH <sub>3</sub>	1.86, d (6.6)		

125 MHz for <sup>13</sup>C NMR and 500 MHz for <sup>1</sup>H NMR in CDCl<sub>3</sub>.

### 3 讨论

本研究首次对南海黑乳海参共附生真菌 *Phialemonium* sp. 次生代谢产物进行分离鉴定,2 个缩酚酸环醚化合物均为首次从该真菌中分离得到。缩酚酸环醚主要存在于低等生物地衣中<sup>[13-14]</sup>,在一些

植物<sup>[15]</sup>和少数真菌<sup>[16]</sup>中也有存在。缩酚酸环醚类化合物具有广泛的生物活性,如抗分枝杆菌、抗革兰阳性细菌、杀线虫、抗炎、抗肿瘤和抗病毒等<sup>[17-18]</sup>。Emeguisin A 最早分离自真菌 *Emericella unguis* Malloch & Cain,在 10<sup>-3</sup> mol/L 浓度下对单胺氧化酶的抑制率为 4.7%,在 50 μg/板浓度下能够抑制

革兰阳性菌 *B. Subtilis* 的生长<sup>[11]</sup>。Aspergillusdone C 最早分离自海洋真菌 *Aspergillus unguis* CRI282-03, 具有芳香酶抑制活性和自由基清除活性<sup>[12]</sup>。黑乳海参共附生真菌 *Phialemonium* sp. 及其缩酚酸环醚类代谢产物在黑乳海参化学防御机制中的可能作用还有待进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 廖玉麟. 中国动物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 611.
- [2] Afiyatullov S S, Kuznetsova T A, Isakov V V, Pivkin M V, Prokof'eva N G, Elyakov G B. New diterpenic altrosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 848-850.
- [3] Afiyatullov S S, Kalinovsky A I, Kuznetsova T A, Isakov V V, Pivkin M V, Dmitrenok P S, et al. New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65: 641-644.
- [4] Afiyatullov S S, Kalinovsky A I, Kuznetsova T A, Pivkin M V, Prokof'eva N G, Dmitrenok P S, et al. New glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67: 1047-1051.
- [5] Wang F Z, Fang Y C, Zhu T J, Zhang M, Lin A Q, Gu Q Q, et al. Seven new prenylated indole diketopiperazine alkaloids from holothurian-derived fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *Tetrahedron*, 2008, 64: 7986-7991.
- [6] Wang F Z, Li D H, Zhu T J, Zhang M, Gu Q Q. Pseurotin A1 and A2, two new 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4, 6-diones from the holothurian-derived fungus *Aspergillus fumigatus* WFZ-25 [J]. *Can J Chem*, 2011, 89: 72-76.
- [7] Sun P, Xu D X, Mándi A, Kurtán T, Li T J, Schulz B, et al. Structure, absolute configuration, and conformational study of 12-membered macrolides from the fungus *Dendrodochium* sp. associated with the sea cucumber *Holothuria nobilis* Selenka [J]. *J Org Chem*, 2013, 78: 7030-7047.
- [8] Wu J, Yi Y H, Tang H F, Wu H M, Zou Z R, Lin H W. Nobilisides A-C, three new triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria nobilis* [J]. *Planta Med*, 2006, 72: 932-935.
- [9] 巫 军, 易杨华, 吴厚铭, 贺全山, 邹峥嵘, 张诗龙. 黑乳海参中两个新的四环三萜化合物[J]. *中国天然药物*, 2005, 3: 276-279.
- [10] 巫 军, 易杨华, 邹峥嵘, 吴厚铭, 汤海峰. 黑乳海参中两个新的三萜皂苷[J]. *中草药*, 2006, 37: 497-500.
- [11] Kawahara N, Nozawa K, Nakajima S, Kawai K, Yamazaki M. Isolation and structures of novel fungal depsidones, emeguisins A, B, and C, from *Emericella unguis* [J]. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1988, 8: 2611-2614.
- [12] Sureram S, Wiyakrutta S, Ngamrojanavanich N, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. Depsidones, aromatase inhibitors and radical scavenging agents from the marine-derived fungus *Aspergillus unguis* CRI282-03 [J]. *Planta Med*, 2012, 78: 582-588.
- [13] Millot M, Tomasi S, Articus K, Rouaud I, Bernard A, Boustie J. Metabolites from the lichen *Ochrolechia parella* growing under two different heliotropic conditions [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70: 316-318.
- [14] Rezanka T, Guschina I A. Brominated depsidones from *Acarospora gobiensis*, a lichen of central Asia [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 1675-1677.
- [15] Xu Y J, Chiang P Y, Lai Y H, Vittal J J, Wu X H, Tan B K, et al. Cytotoxic prenylated depsidones from *Garcinia parvifolia* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1361-1363.
- [16] Pittayakhajonwut P, Dramaee A, Madla S, Lartpornmatulee N, Boonyuen N, Tanticharoen M. Depsidones from the endophytic fungus BCC 8616 [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 1361-1363.
- [17] Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, et al. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43: 1388-1390.
- [18] Neamati N, Hong H X, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus M C, et al. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase; discovery of novel inhibitors through 3D database searching [J]. *J Med Chem*, 1997, 40: 942-951.