

申 丽, 李晓雯, 朱 力. 狗牙根内生黑曲霉(*Aspergillus niger*)的化学成分研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 422–423.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.129

狗牙根内生黑曲霉(*Aspergillus niger*)的化学成分研究

申 丽, 李晓雯, 朱 力
(扬州大学医学院, 江苏扬州 225001)

摘要:对狗牙根内生黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌株 IFB-E003 固体发酵产物的化学成分进行了研究。采用硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 凝胶柱层析对 *A. niger* IFB-E003 固体发酵产物浸膏的化学成分进行分离纯化, 并利用质谱、核磁共振氢谱及文献比对的方法进行化合物结构鉴定。从 IFB-E003 中分离获得 5 个化合物, 分别鉴定为 7-demethyl siderin(1)、desmethylokatanin(2)、orlandin(3)、aspernigrin A(4) 和环-(丙-亮)二肽(5)。内生菌 *A. niger* IFB-E003 能产生结构丰富的化学成分, 值得深入研究。

关键词:狗牙根; 内生菌; 黑曲霉; 化学成分

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0422-02

植物内生菌作为一种新的微生物资源, 在自然界中广泛存在, 从植物内生菌中寻找新药先导化合物是新药研发的一个重要策略。黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌株 IFB-E003 是从黄海滩涂盐生植物狗牙根(*Cynodon dactylon*)的健康叶片中分离得到的 1 株内生真菌, 前期试验中, 已从该菌株固体发酵产物中分离得到 1 个新的具有强细胞毒活性的喹啉生物碱 aspernigrin^[1], 4 个具有抗菌、抗肿瘤和显著抑制黄嘌呤氧化酶活性的茚并吡喃酮化合物 rubrofusarin B、fonsecinone A、asperpyrone B 和 aurasperone A^[2], 二聚香豆素化合物 katanin^[3], 麦角甾醇^[3]和烟酸^[3]。本研究继续对 IFB-E003 固体发酵产物的化学成分进行分离纯化, 结果又分离得到 3 个香豆素化合物 7-demethyl siderin(1)、desmethylokatanin(2)、orlandin(3) 和 2 个生物碱 aspernigrin A(4)、环-(丙-亮)二肽(5)(图 1)。

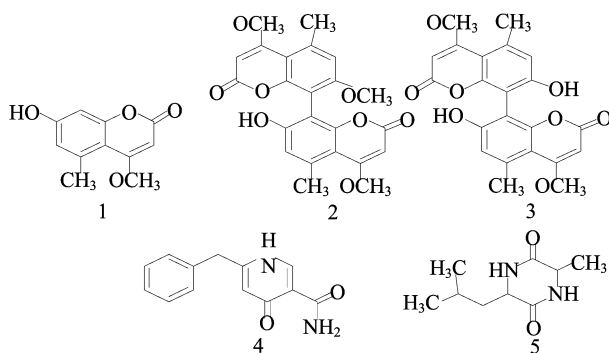


图1 化合物 1~5 的结构

1 仪器与材料

Bruker DRX500 核磁共振仪; Mariner Mass 5304 质谱仪; 柱层析硅胶(200~300 目)和薄层层析硅胶(GF₂₅₄)为青岛海洋化工厂出品; Sephadex LH-20 由瑞典 Pharmacia Biotech 制造; 其他试剂均为分析纯。

内生菌 IFB-E003 是从 2001 年 11 月采自江苏盐城黄海滩涂的盐生植物狗牙根健康叶片中分离而得, 根据其形态特征, 经宋勇春副教授鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[2]。该

收稿日期: 2015-09-20

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 21372191)。

作者简介: 申 丽(1972—), 女, 江苏扬州人, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学方面研究。E-mail: shenli@yzu.edu.cn。

充分, 对农村面源污染治理契约体系研究更是处于零状态。希望学界能够展开充分调研, 开展更加深入的实证研究。

参考文献:

- [1] 肖 萍, 朱国华. 农村环境污染治理模式的选择与治理体系的构建[J]. 南昌大学学报: 人文社会科学版, 2014(4): 73–79.
- [2] 蔡常青. 村务契约化管理: 中国乡村治理模式的重大创新——以阿鲁科尔沁旗村务契约化管理探索为例[J]. 南方论丛, 2010(1): 60–66.
- [3] 黄 滔. 以合同环境服务创新推动农村畜禽养殖面源污染治理[J]. 环境保护, 2013, 41(21): 46–47.
- [4] 江苏省农业环境监测与保护站. 国内土壤污染修复的案例[EB/OL]. (2012-06-11) [2014-10-10]. <http://www.js12316.com/folder7/2012/06/2012-06-112165.html>.

- [5] 吴江市老区开发促进会. 坚持种养结合 实现良性循环——吴江市东之田木农业生态园的调查[J]. 上海农村经济, 2008(5): 43–44.
- [6] 敖 坤, 杨金运, 党朝峰, 等. 治理海南农村垃圾围村要打组合拳[N]. 南国都市报, 2014-03-20.
- [7] 柏乃宝, 周雷森. 有了村规, 郭集叠塘村群众自觉维护环境卫生——“村规民约”塑乡村新貌[N]. 扬州日报, 2012-11-06.
- [8] 陈华英, 郑大中. 自立村规民约保护生态环境——石人村民签名宣誓建设生态家园[N]. 上饶日报, 2010-05-11.
- [9] 裴庆力, 魏海峰. 博兴投入亿元推进乡村环境连片综合整治[N]. 滨州日报, 2014-11-18.
- [10] 农村环境污染治理更需要智慧[EB/OL]. (2014-09-22) [2014-10-10]. <http://www.21use.com/news/201409/22/4479.html>.

菌株现保存于南京大学功能生物分子研究所。

2 方法与结果

2.1 提取与分离

A. niger IFB-E003 采用固体发酵法^[2]。固体发酵产物粉碎晒干,然后用 $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ (体积比 1:1) 混合溶剂常温提取 3 次,减压去除溶剂,再经除盐、除蜡后得粗浸膏 100 g^[2]。粗浸膏经硅胶柱分离, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ 梯度洗脱 (体积比 100:0 → 0:100), 得到 8 个组分 Fr. 1 ~ Fr. 8。组分 Fr. 3 (11.4 g) 经硅胶柱分离得到 Fr. 3-2 和 Fr. 3-3, Fr. 3-2 经硅胶柱分离、再经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (洗脱液为体积比 1:1 的 $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$) 分离得到化合物 1 (20 mg) 和化合物 2 (3 mg)。Fr. 3-3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离 (洗脱液为体积比 1:1 的 $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$) 得到化合物 5 (2 mg)。组分 Fr. 4 (3.0 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (洗脱液为体积比 1:1 的 $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$) 得到 Fr. 4-1 和 Fr. 4-2, Fr. 4-1 经过滤得到化合物 4 (25 mg), Fr. 4-2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (洗脱液为体积比 1:1 的 $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$) 得到化合物 3 (3 mg)。

2.2 结构鉴定

化合物 1: 黄色粉末; ESI-MS m/z 207 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和 m/z 229 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H} - \text{NMR}$ ($\text{DMSO} - d_6$, 500 MHz) δ : 10.44 (1H, s, 7-OH), 6.57 (1H, s, H-8), 6.53 (1H, s, H-6), 5.59 (1H, s, H-3), 3.92 (3H, s, 4-OCH₃), 2.53 (3H, s, 5-CH₃)。以上数据与文献[4]报道基本一致, 故鉴定化合物 1 为 7-demethyl siderin (即 7-hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin)。

化合物 2: 白色粉末; ESI-MS m/z 425 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和 m/z 447 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H} - \text{NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 6.76 (1H, s, H-6), 6.70 (1H, s, H-6'), 5.54 (1H, s, H-3'), 5.51 (1H, s, H-3), 3.95 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.93 (3H, s, 4-OCH₃), 3.82 (3H, s, 7-OCH₃), 2.72 (3H, s, 5-CH₃), 2.52 (3H, s, 5'-CH₃)。以上数据与文献[5]报道基本一致, 故鉴定化合物 2 为 desmethylkotanin (即 7-hydroxy-4,4',7'-trimethoxy-5,5'-dimethyl-[8,8'-Bi-2H-1-benzo-pyran]-2,2'-dione)。

化合物 3: 白色粉末; ESI-MS m/z 411 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和 m/z 433 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H} - \text{NMR}$ ($\text{DMSO} - d_6$, 500 MHz) δ : 10.20 (2H, s, 7-OH, 7'-OH), 6.72 (2H, s, H-6, H-6'), 5.58 (2H, s, H-3, H-3'), 3.94 (6H, s, 4-OCH₃, 4'-OCH₃), 2.60 (6H, s, 5'-CH₃, 5-CH₃)。以上数据与文献[6]报道基本一致, 故鉴定化合物 3 为 orlandin (即 bis[8,8'-(7-hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin)])。

化合物 4: 无色晶体。 $^1\text{H} - \text{NMR}$ ($\text{DMSO} - d_6$, 500 MHz) δ : 12.14 (H, br s, 1-NH), 9.51 (1H, br s, 14-NH₂-a), 8.32 (H, s, H-2), 7.36 (2H, m, H-10, H-12), 7.33 (1H, br s, 14-NH₂-b), 7.28 (2H, m, H-9, H-13), 7.27 (1H, m, H-11), 6.21 (1H, s, H-5), 3.90 (2H, s, H-7)。以上数据与文献[7]报道的 aspernigrin A 基本一致, 且薄层层析显示, 化合物 4 与 aspernigrin A 具有相同 R_f 值, 故鉴定化合物 4 为 aspernigrin A (即 6-benzyl-4-oxo-1,

4-dihydropyridine-3-carboxamide)。

化合物 5: 白色针状晶体; ESI-MS m/z 185 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和 m/z 369 $[2\text{M} + \text{H}]^+$; $^1\text{H} - \text{NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 6.34 (H, br s, 1-NH), 6.31 (1H, br s, 4-NH), 4.10 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-3), 4.00 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-6), 1.86 (1H, m, H-7a), 1.78 (1H, m, H-7b), 1.66 (1H, m, H-8), 1.52 (3H, d, $J=6.9$ Hz, 11-CH₃), 1.00 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 10-CH₃), 0.95 (3H, d, $J=6.4$ Hz, 9-CH₃)。以上数据与文献[8]报道基本一致, 故鉴定化合物 5 为环-(丙-亮)二肽 [即 cyclo-(Ala-Leu)]。

3 结论

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 是一种分布极为广泛的真菌, 在工业上有着广泛的应用, 常用于有机酸和酶的发酵生产, 还常用于天然活性成分的生物转化研究^[9]。此外, 特殊生境 *A. niger* 还是结构丰富、生物活性多样的天然产物的重要来源^[10-11]。狗牙根内生菌 *A. niger* IFB-E003 固体发酵主要产生萘并吡喃酮化合物和香豆素化合物, 其中萘并吡喃酮化合物是 *A. niger* 的特征次生代谢产物, 具有抗菌、抗肿瘤和抑制黄嘌呤氧化酶等活性^[2]。此外, *A. niger* IFB-E003 还产生不同结构类型的生物碱化合物 aspernigerin^[1]、aspernigrin A 和环-(丙-亮)二肽, 其中 aspernigerin 为新化合物。狗牙根内生菌 *A. niger* IFB-E003 的化学成分结构丰富, 值得深入研究。

参考文献:

- [1] Shen L, Ye Y H, Wang X T, et al. Structure and total synthesis of aspernigerin: a novel cytotoxic endophyte metabolite [J]. Chem Eur J, 2006, 12(16): 4393-4396.
- [2] Song Y C, Li H, Ye Y H, et al. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 241(1): 67-72.
- [3] 李海. 植物内生真菌的分离、鉴定、活性筛选及曲霉属内生真菌 CY008 次生代谢产物的研究 [D]. 南京: 南京大学, 2004: 18-21.
- [4] 刘晓秋, 于黎明, 吴立军. 虎杖化学成分研究 (I) [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 47-49.
- [5] Buchi G, Klaubert D H, Shank R C, et al. Structure and synthesis of kotanin and desmethylkotanin, metabolites of *Aspergillus glaucus* [J]. J Org Chem, 1971, 6(8): 1143-1147.
- [6] Cutler H G, Crumley F G, Cox R H, et al. Orlandin: a nontoxic fungal metabolite with plant growth inhibiting properties [J]. J Agric Food Chem, 1979, 27(3): 592-595.
- [7] Ye Y H, Zhu H L, Song Y C, et al. Structural revision of aspernigrin A, reisolated from *Cladosporium herbarum* IFB-E002 [J]. J Nat Prod, 2005, 68(7): 1106-1108.
- [8] 刘俊彦. 三株真菌的次生代谢产物研究 [D]. 南京: 南京大学, 2003: 20.
- [9] 张传会, 陈有为, 郑毅, 等. 黄山药的黑曲霉转化产物化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 585-588.
- [10] Bugni T S, Abbanat D, Bernan V S, et al. Yanuthones: novel metabolites from a marine isolate of *Aspergillus niger* [J]. J Org Chem, 2000, 65(21): 7195-7200.
- [11] 张翼. 两株海藻内生真菌次生代谢产物及其生物活性研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2007: 94-101.