

1 株渤海来源真菌 *Pleosporales* sp. 中 azaphilones 类化合物及其生物活性^{△*}

曹飞, 张冰洋, 李婉, 朱华结*

(河北大学, 河北省药物质量分析控制重点实验室, 药学院, 河北 保定 071002)

摘要:目的 对 1 株渤海来源真菌 *Pleosporales* sp. 中 azaphilones 类化合物进行分离鉴定, 并评价其生物活性。方法 利用硅胶柱层析和高效液相色谱等分离手段对化合物进行分离和纯化; 运用 NMR 和 MS 等现代波谱方法, 并结合相关文献, 对化合物的结构进行鉴定; 运用抗真菌活性模型对化合物的生物活性进行评价。结果 从该真菌中分离获得了 6 个 azaphilones 类化合物, 分别为: isochromophilone I, VI, IX(1~3), (+)-sclerotiorin(4), 5-chloroisorotiorin(5) 和 hypocrellone A (6)。化合物 1~6 对 3 株农业致病真菌 *Thielaviopsis paradoxa*, *Pestalotia calabae*, 和 *Glorosporium musarum* 均显示出中等强度的抑制活性。结论 化合物 1~6 均为首次从 *Pleosporales* 属真菌中分离得到, 具有作为抗农业致病真菌药的研究价值。

关键词: *Pleosporales*; azaphilone; 抗真菌活性

中图分类号: R931 文献标志码: A 文章编号: 1002-3461(2016)03-006-05

Bioactive azaphilones from a marine-derived *Pleosporales* sp. fungus collected from the Bohai Sea

CAO Fei, ZHANG Bing-yang, LI Wan, ZHU Hua-jie*

(Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China.)

Abstract: Objective To investigate azaphilones from a marine-derived *Pleosporales* sp. fungus collected from the Bohai Sea. **Methods** Azaphilones were separated and purified by column chromatography on Silica gel and ODS, and semi-preparative HPLC. Their structures were elucidated by extensive NMR and MS spectroscopic data, and by comparison with the data of literature. Antifungal activities of these compounds were also evaluated. **Results** Six azaphilones, isochromophilone I, VI, IX(1-3), (+)-sclerotiorin(4), 5-chloroisorotiorin (5), hypocrellone A (6), were obtained from the fungus *Pleosporales* sp. Compounds 1-6 showed moderate antifungal activities against three plant pathogenic fungi, *Thielaviopsis paradoxa*, *Pestalotia calabae*, and *Glorosporium musarum*. **Conclusion** All of the isolated compounds were obtained from the fungus of the genus *Pleosporales* for the first time. Azaphilones showed research value potential as antifungal agents.

Key words: *Pleosporales*; azaphilone; antifungal activity

* △基金项目: 河北省教育厅资助科研项目(QN2016177); 保定市科技支撑项目(15ZN020); 河北大学人才引进计划项目资助

作者简介: 曹飞(1988-), 男, 博士, 讲师。

* 通讯作者: 朱华结, 男, 教授。E-mail: hjzhu@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2016-01-10

Azaphilones 类天然产物通常具有结构新颖和生物活性多样的特点,近年来受到药物研发、化学分类、化学生态和化学合成等领域专家的关注^[1]。海洋高盐、高压、低温、寡营养、低光照等特殊生存条件,使得海洋来源的真菌微生物形成了独特的代谢机制,海洋来源真菌已经成为 azaphilones 类化合物的重要来源^[2-4]。

近年来,本课题组开展了从海洋真菌物中寻找活性次级代谢产物的研究^[5,6]。本研究从渤海

来源沉淀物中分离获得 1 株真菌 *Pleosporales* sp. (CF09-10),其发酵液的乙酸乙酯粗提物对农业致病真菌 *Thielaviopsis paradoxa* 显示出了一定的抑制活性。对该菌株进行活性次级代谢产物的追踪分离,从中获得了 6 个 azaphilones 类化合物 isochromophilones I^[7], VI^[8], IX^[8] (**1~3**), (+)-sclerotiorin (**4**)^[9], 5-chloroisorotiorin (**5**)^[10]和 hypocrellone A (**6**)^[11](见图 1)。本研究还对化合物的抗农业致病真菌活性进行了测试。

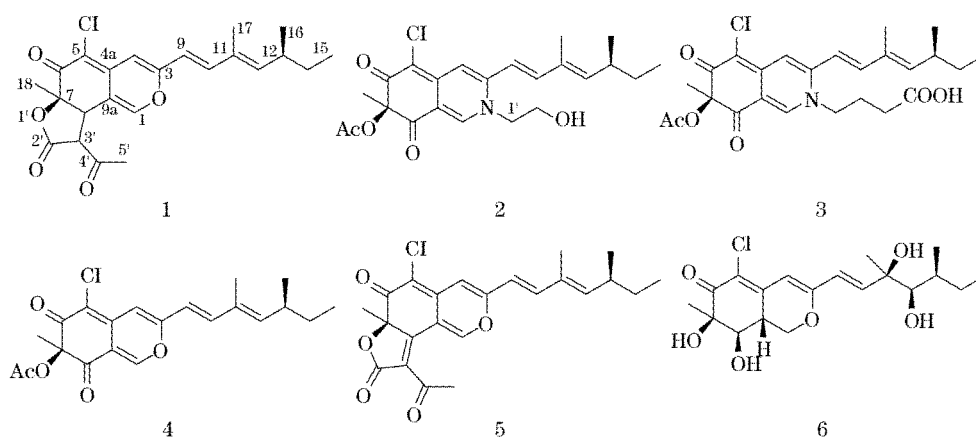


图 1 化合物 1~6 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1~6

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

核磁共振波谱仪 Bruker Avance III-600 (瑞士 Bruker 公司);质谱仪 Bruker Apex-Ultra 7.0 T (德国 Bruker 公司);高效液相色谱仪 Waters1525 (Waters 公司);Waters C₁₈ 半制备柱 (250 mm×10 mm, 5 μm);凝胶 Sephadex LH-20 (Amersham 公司);200~300 目柱层析硅胶(青岛海洋化工有限公司);所用试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种来源

海底沉淀物于 2015 年 6 月采自河北沧州黄骅港海域,从中分离获得 1 株真菌。结合形态特征及分子学手段,鉴定为真菌 *Pleosporales* sp. 菌株保藏在河北大学药物化学与分子诊断教育部重点实验室(CF09-10)。

1.3 发酵与提取

经发酵条件考察确定真菌发酵条件为静置,大米培养基,50 瓶,室温发酵,发酵 35 d。保藏菌株经活化后从平板转接到装有大米培养基(100 g

大米,100 mL 蒸馏水)的三角瓶(1000 mL)中。按上述发酵条件进行培养,用甲醇浸泡菌丝体,减压浓缩得粗浸膏(110 g)。粗浸膏用乙酸乙酯萃取 3 次得乙酸乙酯提取物(36.0 g)。乙酸乙酯提取物经 200~300 目硅胶柱层析,石油醚/乙酸乙酯,氯仿/甲醇梯度洗脱,分为 5 个组分(Fr. 1~5)。反复用硅胶柱层析(200~300 目)、Sephadex LH-20 凝胶柱层析和半制备 HPLC 分离纯化,分别从 Fr. 3 得到化合物 **1** (6.3 mg), **4** (5.4 mg) 和 **5** (6.6 mg),从 Fr. 4 得到化合物 **2** (3.2 mg), **3** (2.9 mg)和 **6** (4.0 mg)。

1.4 生物活性测定

采用常用的微量稀释方法^[12],测试化合物对 3 株农业致病真菌的抑制活性,包括:甘蔗凤梨菌 *Thielaviopsis paradoxa*, 芒果叶枯菌 *Pestalotia calabae*, 和香蕉炭疽菌 *Glorosporium musarum* 的抑制活性。DMSO 作为阴性对照,多菌灵作为阳性对照药物。

2 结果与讨论

2.1 化合物的结构鉴定

化合物 **1**, 黄色粉末。ESI-MS m/z : $[M+H]^+$ 417/419, 结合 1H NMR, ^{13}C NMR 和 DEPT 谱信息, 确定分子式为 $C_{23}H_{25}O_5Cl$, 不饱和度为 11。 1H NMR 谱在高场区给出了 5 个特征的 azaphilones 骨架上甲基质子信号 δ_H 2.43 (3H, s), 1.82 (3H, d, $J=1.5$ Hz), 1.61 (3H, s), 1.07 (3H, d, $J=6.0$ Hz) 和 0.88 (3H, t, $J=7.8$ Hz), 提示化合物 **1** 可能为 azaphilones 类衍生物。波谱数据与文献[7]一致, 最终确定化合物 **1** 结构为 isochromophilones I。波谱数据: 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ_H 7.42 (1H, s, H-1), 7.06 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-10), 6.45 (1H, s, H-4), 6.12 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-9), 5.73 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-12), 3.94 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-8), 3.84 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-3'), 2.43 (3H, s, H-5'), 2.45 (1H, m, H-13), 1.82 (3H, d, $J=1.5$ Hz, H-17), 1.61 (3H, s, H-18), 1.30 (2H, m, H-14), 1.07 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-16), 0.88 (3H, t, $J=7.8$ Hz, H-15); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): δ_C 199.1 (C, C-4'), 183.7 (C, C-6), 168.2 (C, C-2'), 158.4 (C, C-3), 148.2 (CH, C-12), 146.6 (CH, C-1), 142.6 (CH, C-10), 140.8 (C, C-8a), 131.5 (C, C-11), 116.2 (CH, C-9), 113.5 (C, C-4a), 109.5 (C, C-5), 105.2 (CH, C-4), 83.5 (C, C-7), 57.6 (CH, C-3'), 42.5 (CH, C-8), 35.6 (CH, C-13), 30.3 (CH_3 , C-5'), 30.0 (CH_2 , C-14), 23.6 (CH_3 , C-18), 20.4 (CH_3 , C-16), 12.2 (CH_3 , C-17), 11.7 (CH_3 , C-15)。

化合物 **2**, 黄色粉末。ESI-MS m/z : $[M+H]^+$ 434/436, 结合 1H NMR, ^{13}C NMR 和 DEPT 谱信息, 确定分子式为 $C_{23}H_{28}NO_5Cl$, 不饱和度为 9。化合物 **2** 与 **1** 的 1H NMR 很类似, 主要的差别在于化合物 **1** 中的 H-5' 甲基信号消失, 而在化合物 **2** 中多出 4 个连氧/氮的碳上的氢信号: δ_H 4.13 (1H, ddd, $J=15.0, 5.5, 5.5$ Hz), 4.06 (1H, ddd, $J=15.0, 5.5, 5.5$ Hz), 3.95 (1H, ddd, $J=12.8, 4.0, 4.0$ Hz), 4.02 (1H, ddd, $J=12.8, 4.0, 4.0$ Hz), 提示化合物 **1** 中的五元内酯环消失, 而在化合物 **2** 中多出 1 个连氧/氮的侧

链。核磁数据与文献[8]对照基本一致, 确定化合物 **2** 结构为 isochromophilone VI。波谱数据: 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ_H 7.89 (1H, s, H-1), 7.03 (1H, s, H-4), 7.01 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-10), 6.35 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-9), 5.80 (1H, brd, $J=9.5$ Hz, H-12), 4.13 (1H, ddd, $J=15.0, 5.5, 5.5$ Hz, H-1 α), 4.06 (1H, ddd, $J=15.0, 5.5, 5.5$ Hz, H-1 β), 3.95 (1H, ddd, $J=12.8, 4.0, 4.0$ Hz, H-2 α), 4.02 (1H, ddd, $J=12.8, 4.0, 4.0$ Hz, H-2 β), 2.52 (1H, m, H-13), 2.16 (3H, s, H-OAc), 1.85 (3H, s, H-17), 1.56 (3H, s, H-18), 1.44 (1H, ddq, $J=14.0, 7.5, 6.8$ Hz, H-14 α), 1.34 (1H, ddq, $J=14.0, 7.5, 5.4$ Hz, H-14 β), 1.05 (3H, d, $J=5.5$ Hz, H-16), 0.92 (3H, dd, $J=7.0, 7.0$ Hz, H-15); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): δ_C 195.0 (C, C-8), 185.1 (C, C-6), 171.2 (C, H-OAc), 149.4 (C, C-4a), 148.9 (CH, C-12), 145.7 (C, C-3), 145.5 (CH, C-10), 142.8 (CH, C-1), 132.5 (C, C-11), 116.0 (CH, C-9), 115.3 (C, C-8a), 112.6 (CH, C-4), 103.1 (C, C-5), 85.6 (C, C-7), 61.3 (CH_2 , C-2'), 56.2 (CH_2 , C-1'), 35.1 (CH, C-13), 30.9 (CH_2 , C-14), 23.8 (CH_3 , C-18), 21.1 (CH_3 , -OAc), 20.7 (CH_3 , C-16), 13.3 (CH_3 , C-17), 12.4 (CH_3 , C-15)。

化合物 **3**, 黄色粉末。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : $[M+H]^+$ 476/478。化合物 **3** 和 **2** 的 1H NMR 谱十分相似, 主要的差别在于化合物 **2** 中的连氧碳上的 H-2' 信号消失, 而在化合物 **3** 中多出连羰基碳上的信号: δ_H 2.54 (2H, t, $J=6.0$ Hz), 提示化合物 **3** 与 **2** 的不同之处位于侧链。核磁数据与文献[8]对照基本一致, 确定化合物 **2** 结构为 isochromophilone IX。波谱数据: 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ_H 7.77 (1H, s, H-1), 7.12 (1H, s, H-4), 6.94 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-10), 6.29 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-9), 5.68 (1H, brd, $J=9.0$ Hz, H-12), 3.99 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-1'), 2.54 (2H, t, $J=6.0$ Hz, H-3'), 2.52 (1H, m, H-13), 2.23 (3H, s, H-OAc), 2.09 (2H, m, H-2'), 1.87 (3H, s, H-17), 1.50 (3H, s, H-18), 1.42 (1H, ddq, $J=$

13.5, 8.0, 6.8 Hz, H-14 α), 1.33 (1H, ddq, $J=13.5, 8.0, 6.8$ Hz, H-14 β), 1.06 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-16), 0.94 (3H, dd, $J=7.5, 7.5$ Hz, H-15)。

化合物 **4**, 黄色粉末。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : $[M+H]^+$ 391/393。 ^1H NMR 谱在高场区给出也给出了 5 个特征的甲基质子信号 δ_{H} 2.24 (3H, s, H-20), 1.87 (3H, s, H-17), 1.62 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-16), 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-15), 表明化合物 **4** 也为 azaphilones 类衍生物。波谱数据与文献[9]一致, 最终确定化合物 **4** 结构为 (+)-sclerotiorin。波谱数据: ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ_{H} 7.96 (1H, s, H-1), 7.02 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-10), 6.56 (1H, s, H-4), 6.12 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-9), 5.74 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-12), 2.53 (1H, m, H-13), 2.24 (3H, s, H-20), 1.87 (3H, s, H-17), 1.62 (3H, s, H-18), 1.48 (1H, m, H-14 β), 1.36 (1H, m, H-14 α), 1.01 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-16), 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-15)。

化合物 **5**, 黄色粉末。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : $[M+H]^+$ 415/417, 比化合物 **1** 少出 2, 提示化合物 **5** 中可能多出 1 个双键。波谱数据与文献[10]一致, 最终确定化合物 **5** 结构为 5-chloroisorotiorin。波谱数据: ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ_{H} 8.86 (1H, s, H-1), 7.15 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-10), 6.66 (1H, s, H-4), 6.13 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-9), 5.76 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-12), 2.62 (3H, s, H-4'), 2.52 (1H, m, H-13), 1.89 (3H, d, $J=2.0$ Hz, H-16),

1.74 (3H, s, H-18), 1.48 (1H, m, H-14 α), 1.39 (1H, m, H-14 β), 1.06 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-17), 0.89 (3H, t, $J=4.5$ Hz, H-15)。

化合物 **6**, 黄色蜡状。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : $[M+H]^+$ 387/389。核磁信号提示, 化合物 **6** 的结构为 azaphilones 类衍生物。波谱数据与文献[11]一致, 最终确定化合物 **6** 结构为 hypocrellone A。波谱数据: ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ_{H} 6.49 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-10), 6.32 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-9), 6.14 (1H, s, H-4), 4.93 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-8), 4.39 (1H, dd, $J=12.8, 6.5$ Hz, H-1 α), 3.86 (1H, dd, $J=13.2, 12.8$ Hz, H-1 β), 3.53 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-12), 3.47 (1H, ddd, $J=14.2, 9.0, 5.5$ Hz, H-8a), 2.26 (3H, s, H-OAc), 1.73 (1H, m, H-13), 1.48 (1H, m, H-14 α), 1.46 (3H, s, H-16), 1.36 (1H, m, H-14 β), 1.31 (3H, s, H-17), 0.95 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-18), 0.87 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-15)。

2.2 化合物的生物活性测定

对分离所得化合物 **1~6** 进行了抗农业致病真菌活性测试, 结果如表 1 所示。化合物 **1~6** 对所测试的 3 株农业致病真菌菌株均表现出中等的抗菌活性, 尤其是化合物 **2** 对甘蔗凤梨菌 *T. Paradoxa*, 芒果叶枯菌 *P. Calabae*, 和香蕉炭疽菌 *G. musarum* 均表现出了较强的抑菌活性, MIC 值分别为 1.56, 0.78 和 0.78 $\mu\text{mol/L}$ 。抗农业致病真菌活性结果表明, azaphilones 类衍生物 **1~6** 对农业致病真菌具有较好的抑制作用, 具有进一步研究的价值。

表 1 化合物 **1~6** 的抗真菌活性
Table 1 Antifungal activity of compounds **1~6**

菌株	MIC/ $\mu\text{mol. L}^{-1}$						多菌灵 ^a
	1	2	3	4	5	6	
<i>T. paradoxa</i>	12.5	1.56	3.13	6.25	25.0	12.5	0.10
<i>P. calabae</i>	12.5	0.78	1.56	6.25	12.5	25.0	0.05
<i>G. musarum</i>	6.25	0.78	1.56	3.13	25.0	25.0	0.05

^a多菌灵作为阳性对照。

^aCarbendazim was used as a positive control.

2.3 结论

本研究从 1 株渤海来源真菌 *Pleosporales* sp. 中分离鉴定了 6 个 azaphilones 类化合物,丰富了渤海来源真菌微生物中的活性次级代谢产物。化合物 **2** 表现出较强的抗农业致病真菌活性,具有进一步研究开发的潜力。

参考文献

- [1] Gao J M, Yang S X, Qin J C. Azaphilones; chemistry and biology[J]. *Chem Rev*, 2013, 113(7): 4755-4811.
- [2] Osmanova N, Schultze W, Ayoub N. Azaphilones; a class of fungal metabolites with diverse biological activities[J]. *Phytochem Rev*, 2010, 9(2): 315-342.
- [3] Li J, Yang X, Lin Y, et al. Meroterpenes and azaphilones from marine mangrove endophytic fungus *Penicillium* 303 # [J]. *Fitoterapia*, 2014, 97: 241-246.
- [4] Zhao D L, Shao C L, Zhang Q, et al. Azaphilone and diphenyl ether derivatives from a gorgonian-derived strain of the fungus *Penicillium pinophilum*[J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(9): 2310-2314.
- [5] Cao F, Yang Q, Shao C L, et al. Bioactive 7-oxabicyclic[6.3.0]lactam and 12-membered macrolides from a gorgonian-derived *Cladosporium* sp. fungus[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(7): 4171-4178.
- [6] He P, Tian S S, Xu Y, et al. Three new phenyl ether derivatives from *Aspergillus carneus* HQ889708[J]. *Helv Chim Acta*, 2015, 98(6): 819-822.
- [7] Omura S, Tanaka H, Matsuzaki K, et al. Isochromophilones I and II, novel inhibitors against gp120-CD4 binding from *Penicillium* sp. [J]. *J Antibiot*, 1993, 46(12): 1908-1911.
- [8] Michael A P, Grace E J, Kotiw M, et al. Isochromophilone IX, a novel GABA-containing metabolite isolated from a cultured fungus, *Penicillium* sp. [J]. *Aust J Chem*, 2003, 56(1): 13-15.
- [9] Chidananda C, Sattur A P. Sclerotiorin, a novel inhibitor of lipoxygenase from *Penicillium frequentans*[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(8): 2879-2883.
- [10] Pairet L, Wrigley S K, Chetland I, et al. Azaphilones with endothelin receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*; Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity [J]. *J Antibiot*, 1995, 48(9): 913-923.
- [11] Guo Q, Dong L, Zang X, et al. A new azaphilone from the entomopathogenic fungus *Hypocrella* sp. [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(21): 2000-2006.
- [12] Appendino G, Gibbons S, Giana A, et al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*; a structure-activity study [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(8): 1427-1430.