

研究报告

海洋真菌 *Aspergillus niger* XJJ-3 中萆并吡喃酮类化合物结构及生物活性

姜薇^{1,3} 蒋航成¹ 韦歆¹ 徐家俊¹ 单体壮¹ 潘英^{2*}

(1. 扬州大学环境科学与工程学院 江苏 扬州 225127)

(2. 江苏省肿瘤医院 江苏省肿瘤防治研究所 南京医科大学附属肿瘤医院 江苏 南京 210009)

(3. 温州医科大学药学院 浙江 温州 325035)

摘要: 【背景】萆并吡喃酮类化合物生物活性多样, 是真菌 *Aspergillus niger* 中特征次生代谢产物。【目的】研究分离自海洋滩涂土壤的真菌 *Aspergillus niger* XJJ-3 中萆并吡喃酮类化合物结构及其抗菌和卤虫致死活性。【方法】以 TLC 分析为导向, 综合运用多种色谱和光谱方法分离和鉴定萆并吡喃酮类化合物。采用微量稀释法测试化合物的抗菌和卤虫致死活性。【结果】从真菌 *A. niger* 大米发酵产物中共分离得到 6 个萆并吡喃酮类化合物, 鉴定为 Rubrofusarin B (1)、Flavasperone (2)、Aurasperone A (3)、Asperpyrones C (4)、Asperpyrones B (5) 和 Fonsecinone A (6)。抗菌活性实验结果表明, 化合物 1–6 对致病菌 *S. aureus* ATCC33591、29213、*E. faecium* ATCC35667 和 *V. parahemolyticus* 表现出不同程度的抑制活性, 其中化合物 2 和 4 对 *S. aureus* ATCC33591 表现出较强抑制活性(MIC 分别为 43.7 $\mu\text{mol/L}$ 和 21.9 $\mu\text{mol/L}$), 化合物 3 对 *E. faecium* ATCC35667 抑制活性较强(MIC 为 21.9 $\mu\text{mol/L}$)。卤虫致死活性实验结果表明, 化合物 1–6 均表现出一定的卤虫致死活性, 其中化合物 2 和 3 活性显著(LD₅₀ 分别为 35.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 8.8 $\mu\text{mol/L}$)。【结论】菌株 XJJ-3 可产生结构丰富的萆并吡喃酮类化合物, 化合物 1–6 存在不同程度的抗菌和卤虫致死活性, 该研究可为抗菌和细胞毒类药物的研发提供参考。

关键词: 海洋真菌, 黑曲霉, 萆并吡喃酮, 抗菌活性, 卤虫致死活性

Foundation items: Natural Science Foundation for College and University of Jiangsu Province (15KJB170020); Opening Project of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Pharmaceutical Sciences (201707); Yangzhou University Incubation Foundation (2017CXJ050)

***Corresponding author:** Tel: 86-25-83283476; E-mail: 13914719026@163.com

Received: February 27, 2018; **Accepted:** June 15, 2018; **Published online** (www.cnki.net): August 02, 2018

基金项目: 江苏省高校自然科学基金(15KJB170020); 浙江省药学重中之重一级学科开放基金(201707); 扬州大学培育基金(2017CXJ050)

***通信作者:** Tel: 86-25-83283476; E-mail: 13914719026@163.com

收稿日期: 2018-02-27; 接受日期: 2018-06-15; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-08-02

Structures and activities of naphthopyrones from marine fungus *Aspergillus niger* XJJ-3

JIANG Wei^{1,3} JIANG Hang-Cheng¹ WEI Xin¹ XU Jia-Jun¹
SHAN Ti-Zhuang¹ PAN Ying^{2*}

(1. School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

(2. Jiangsu Cancer Hospital, Jiangsu Institute of Cancer Research, The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(3. School of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

Abstract: [Background] Naphthopyrones possess various bioactivities that are characteristic secondary metabolites of the fungus *Aspergillus niger*. [Objective] To illuminate the structures and activities of naphthopyrones from fungus *A. niger* isolated from mud flat. [Methods] Guided by TLC analysis, we used combined chromatographic and spectrographic techniques to identify naphthopyrones. The activities against pathogen bacteria and *Artemia salina* were tested by micro-dilution method. [Results] Six naphthopyrones: Rubrofusarin B (1), Flavasperone (2), Aurasperone A (3), Asperpyrones C (4), Asperpyrones B (5) and Fonsecinone A (6) were isolated from *A. niger*. In bioassays, compounds 1 through 6 showed different levels of antibacterial activities against pathogen bacteria. Flavasperone (2) and Asperpyrones C (4) showed potent antibacterial activities against *S. aureus* ATCC33591 with MIC values 43.7 and 21.9 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Aurasperone A (3) exhibited significant activities against *E. faecium* ATCC35667 with MIC values 21.9 $\mu\text{mol/L}$. Compounds 1 through 6 displayed toxicity on brine shrimps larvae, the LD₅₀ values of Flavasperone (2) and Aurasperone A (3) were 35.0 and 8.8 $\mu\text{mol/L}$, respectively. [Conclusion] Diverse naphthopyrones were produced by strain XJJ-3. Compounds 1 through 6 showed different levels of activities against pathogen bacteria and *Artemia salina*. This study may provide reference for the development of antibacterial and cytotoxic drugs.

Keywords: Marine fungus, *Aspergillus niger*, Naphthopyrones, Antibacterial activity, Brine shrimp lethality

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是曲霉属真菌中的常见种,分布广泛,是食品工业中重要的发酵菌种。关于黑曲霉次生代谢产物研究方面,主要发现有生物碱^[1-3]、聚酮^[1]、混源萜^[4]和萘并吡喃酮类化合物^[3,5-7],其中萘并吡喃酮类化合物研究报道较多,是黑曲霉特征性代谢产物。萘并吡喃酮类化合物在陆源和海源的植物和微生物中均有发现,其中真菌来源较多,是一类真菌毒素^[8]。该类化合物呈黄色粉末样,由1个萘环和1个吡喃酮环构成,根据3个环是否在一条直线上分为线型和角型,吡喃酮中酮羰基与氧原子相对位置的不同可分为 α 型(邻位)、 β 型(间位)和 γ 型(对位),母核经还原、氧化、环化以及聚合可形成一系列衍生物。萘并吡喃酮类化合物生物活性多样,具有抗菌^[9-11]、

抗肿瘤^[6,12-14]、抗氧化活性^[13],对 *Taq* DNA 聚合酶^[5]、酪氨酸酶和 α -葡萄糖苷酶等多种酶也具有抑制活性^[14]。

卤虫致死试验是一种测定杀死实验室培养的丰年虾幼虫能力的实验,用于测定真菌毒素、藻类毒素、植物毒素、重金属、杀虫剂和牙科材料的毒性,是初步评估毒性大小的有效手段^[15]。本课题组对江苏如东近海滩涂未受生活垃圾污染的新鲜泥样进行了真菌分离,从中筛选出一株次生代谢产物丰富的海洋真菌 *A. niger* XJJ-3,发现系列萘并吡喃酮单体和其二聚体化合物,其中有些化合物具有抗菌和抗卤虫活性。本文对该菌株的发酵、化合物提取分离、结构鉴定及生物活性测试等工作进行报道。

1 材料与方法

1.1 菌株

海洋真菌 XJJ-3 分离自江苏如东近海新鲜滩涂泥样(采样时间为 2015 年 10 月),经缪莉鉴定为黑曲霉 *Aspergillus niger*,标本现存放于扬州大学海洋科学与技术研究所。

1.2 主要试剂和仪器

分析级和色谱级的甲醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、氯仿、石油醚,国药集团化学试剂有限公司。硅胶 200–300 目,阿拉丁公司;ODS 50 μm , YMC 公司。核磁共振仪, Bruker 公司;液相色谱仪,日立公司;Apollo RP-18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), Alltech 公司;高效液相色谱仪,北京莱伯泰科仪器股份有限公司;半制备色谱柱 Kromasil RP-18 (10 mm \times 250 mm), AkzoNobel 公司;318-MC 高速双波长酶标仪,上海新科公司。

1.3 培养基

PDB 培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0, 海盐 30.0。PDA 培养基(g/L): PDB 培养基基础上加琼脂粉 18.0。

LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 18.0。

1.4 菌株培养与规模化发酵

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中取出保种的菌株,放置至室温,夹出含有菌丝的菌块贴放于 PDA 培养基上, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 3–5 d 获得纯菌落。250 mL 锥形瓶中装入 100 mL 的 PDB 液体培养基, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 接种适量复苏好的菌落, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 振荡培养 3 d 获得种子液。1 000 mL 锥形瓶中装入 40 g 大米和 3%人工海水溶液 80 mL, 1×10^5 Pa 高压灭菌后,每瓶接 8 mL 种子液,接种 100 瓶, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养 40 d。

1.5 化合物的提取分离

用含有 5%丙酮的乙酸乙酯液浸泡提取 3 次,过滤,收集乙酸乙酯,减压浓缩得粗提物 40 g。浸膏经硅胶减压柱色谱,石油醚/乙酸乙酯系统梯度

洗脱,得到 8 个组分(Fr.A–H),其中石油醚:乙酸乙酯为 8:1 (体积比)洗脱下的 Fr.B (5.3 g)经 ODS 减压柱,甲醇/水系统梯度洗脱,得到 5 个组分(Fr.B1–5),其中甲醇:水为 85:15 (体积比)洗脱下来的 Fr.B5 (1.8 g)经半制备 HPLC 纯化(流速 1.5 mL/min, 检测波长 210 nm),流动相为甲醇:水为 85:15 (体积比)时得到化合物 **1** (JHC-1, 100.0 mg, $R_t=17'$)和 **2** (JHC-2, 100.0 mg, $R_t=20'$),流动相为甲醇:水为 80:20 (体积比)时得到化合物 **3** (JHC-3, 10.0 mg, $R_t=26'$)、**4** (JHC-4, 7.0 mg, $R_t=34'$)、**5** (JHC-5, 5.0 mg, $R_t=30'$)和 **6** (JHC-9, 7.0 mg, $R_t=28'$)。

1.6 抗菌活性测试

测试菌种为 *Staphylococcus aureus* ATCC43300、*S. aureus* ATCC33591、*S. aureus* ATCC25923、*S. aureus* ATCC29213、*Enterococcus faecalis* ATCC51299、*E. faecium* ATCC35667、*Escherichia coli* ATCC25922、*Bacillus subtilis* ATCC6633 和 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802。抗菌活性分析按微量稀释法进行^[16]。将备好的细菌种子培养液(LB 培养基)稀释为原来浓度的 1/800。用 DMSO 将待测样品配成浓度 8 mg/mL 备用。取 96 孔板,在第 1 列的每孔中加 195 μL 菌液后加 5 μL 样品,其他孔加 100 μL 菌液,吸取 100 μL 第 1 列中混匀液加入第 2 列再混匀,依次往下加,作二倍递减浓度稀释至第 7 列,最后每个孔补齐 200 μL ,使样品的浓度从 100 $\mu\text{g/mL}$ 梯度稀释至 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 。每个浓度设 3 个平行。设氨苄青霉素钠和万古霉素阳性对照,培养基空白对照组以及 DMSO 阴性对照,置 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h,用酶标仪测 600 nm 吸光度,获得抑制率和最小抑菌浓度(MIC)。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组 OD} - \text{空白组 OD}}{\text{阴性组 OD} - \text{空白组 OD}} \right) \times 100。$$

1.7 卤虫致死活性测试

测试方法采用海水稀释法^[17–18],取 100 mg 卤虫(*Artemia salina*)虫卵置 500 mL 烧杯中,加入 400 mL 人工海水, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 人工光照,充氧气孵化

2 d 得卤虫幼体备用。用 DMSO 将待测样品配成浓度 8 mg/mL 备用。取 96 孔板,第 1 列的每孔中加入人工海水 195 μ L, 剩余列的每孔中加入人工海水 100 μ L。在第 1 列的每孔中加入待测样品 5 μ L, 混匀, 吸取 100 μ L 到第 2 列, 混匀, 依次往下加, 作二倍递减浓度稀释至第 8 列, 最后一列取 100 μ L 弃去。取 100 μ L 含 18–22 个卤虫的人工海水加入到每孔中, 使样品的浓度从 100 μ g/mL 梯度稀释至 0.78 μ g/mL。每组设 3 个平行。设 DMSO 空白对照组。室温培养 18 h, 显微镜下计数卤虫死亡数目, 计算校正死亡率和 LC_{50} 。

校正死亡率(%) =

$$\left(\frac{\text{空白对照组存活数} - \text{实验组存活数}}{\text{空白对照组存活数}} \right) \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 化合物理化性质及结构鉴定

化合物 1 为淡黄色粉末, 甲醇可溶, 氯仿易溶。HR-ESI-MS 给出准分子离子 m/z 309.0751 $[M+Na]^+$ (计算值为 309.073 9), 确定其分子式为 $C_{16}H_{14}O_5$, 不饱和度为 10。化合物 1 的 1H NMR 谱有 3 组甲基信号, 其中 2 组 δ_H 4.00 (3H, s) 和 δ_H 3.93 (3H, s) 为甲氧基上的甲基, δ_H 2.37 (3H, s) 是连在烯碳上的甲基; 低场区 δ_H 14.96 (1H, s) 提示结构中可能存在着受到去屏蔽作用的羟基; 芳香区偶合常数为 2.2 Hz 的 2 个质子 δ_H 6.40 (1H, d, $J=2.2$ Hz) 和 δ_H 6.59 (1H, d, $J=2.2$ Hz), 提示结构中可能存在间位偶合的苯环。 ^{13}C NMR 谱中 δ_C 95–170 有 12 个叔碳和季碳, δ_C 184.3 (s) 是酮羰基碳, 结合芳质子数, 说明结构中至少含有 2 个苯环。前期文献调研发现蔡并吡喃酮是黑曲霉的特征代谢产物。核磁数据符合蔡并吡喃酮骨架特征, 通过比对文献[10], 确定化合物 1 为 Rubrofusarin B (图 1)。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ_H 14.96 (1H, s, 5-OH), 6.97 (1H, s, H-10), 6.59 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-9), 6.40 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-7), 6.00 (1H, s, H-3), 4.00 (3H, s, 6-OCH₃), 3.93 (3H, s, 8-OCH₃), 2.37 (3H, s, 2-CH₃); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$):

δ_C 184.3 (s, C-4), 167.4 (s, C-2), 162.7 (s, C-5), 161.5 (s, C-8), 160.7 (s, C-6), 153.3 (s, C-10a), 141.1 (s, C-9a), 108.4 (s, C-5a), 107.4 (d, C-3), 104.4 (s, C-4a), 101.1 (d, C-10), 97.8 (d, C-9), 97.3 (d, C-7), 56.1 (q, 6-OCH₃), 55.4 (q, 8-OCH₃), 20.7 (q, 2-CH₃)。

化合物 2 为淡黄色粉末, 甲醇可溶, 氯仿易溶。HR-ESI-MS 给出与化合物 1 相同的分子式 $C_{16}H_{14}O_5$ 。化合物 2 和 1 的 1H 和 ^{13}C NMR 谱图非常相似, 仅部分氢和碳的化学位移发生微小偏移, 考虑化合物 2 可能是 1 的结构异构体。通过查阅文献[5], 确定化合物 2 为 Flavasperone (图 1)。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ_H 12.80 (1H, s, 5-OH), 6.87 (1H, s, H-6), 6.59 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-9), 6.40 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-7), 6.28 (1H, s, H-3), 3.97 (3H, s, 10-OCH₃), 3.93 (3H, s, 8-OCH₃), 2.50 (3H, s, 2-CH₃), ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ_C 182.9 (s, C-4), 166.6 (s, C-2), 161.4 (s, C-5), 159.0 (s, C-8), 156.6 (s, C-10), 155.8 (s, C-1a), 141.2 (s, C-6a), 110.4 (d, C-3), 108.8 (s, C-10a), 105.8 (d, C-6), 104.9 (s, C-4a), 97.9 (d, C-9), 97.0 (d, C-7), 55.9 (q, 10-OCH₃), 55.5 (q, 8-OCH₃), 20.5 (q, 2-CH₃)。

化合物 3–6 均为黄色粉末, 甲醇可溶, 氯仿易溶。HR-ESI-MS 给出相同的分子式 $C_{32}H_{26}O_{10}$, 不饱和度为 20。这几个化合物的 1H NMR 谱图较为相似, 都含有以下信号: δ_H 12.8–15.3 间有 2 个极化程度很高的羟基活泼质子; δ_H 6.0–6.5 间有 4 个烯质子, 其中 2 个质子为单峰, 另外 2 个质子构成苯环间位偶合的 AX 系统; δ_H 3.4–4.0 间有 4 组甲氧基信号; δ_H 2.5 附近有 2 组取代在双键上的甲基信号。将化合物 3–6 的 1H NMR 谱图与化合物 1 和 2 的 1H NMR 谱图进行比较, 发现化合物 3–6 可能是化合物 1 或 2 的二聚体, 此外化合物 3–6 在做 1H NMR 时发现只有化合物的样品量较大时方能采集到比较理想的谱图信号, 预测其分子量相对较大。前期文献查阅获知蔡并吡喃酮二聚体是

A. niger 的特征代谢产物。查阅分离自 *A. niger* 中含 2 个羟基、4 个烯质子、4 个甲氧基和 2 个甲基(位于双键上)的萘并吡喃酮二聚体波谱数据, 通过比对文献, 确定化合物 **3** 为 Aurasperone A^[8], 化合物 **4** 为 Asperpyrones C^[5], 化合物 **5** 为 Asperpyrones B^[5], 化合物 **6** 为 Fonsecinone A^[11], 结构见图 1。

Aurasperone A (**3**), ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_H 15.24 (1H, s, 5'-OH), 14.83 (1H, s, 5-OH), 7.15 (1H, s, H-10), 6.97 (1H, s, H-9), 6.41 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-9'), 6.21 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-7'), 6.05 (1H, s, H-3), 5.98 (1H, s, H-3'), 4.02 (3H, s, 6'-OCH₃), 3.78 (3H, s, 8-OCH₃), 3.62 (3H, s, 8'-OCH₃), 3.46 (3H, s, 6-OCH₃), 2.41 (3H, s, 2-CH₃), 2.12 (3H, s, 2'-CH₃)。

Asperpyrones C (**4**), ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_H 14.75 (1H, s, 5-OH), 13.11 (1H, s, 5'-OH), 7.13 (1H, s, H-10), 6.98 (1H, s, H-9), 6.42 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-9'), 6.32 (1H, s, H-3'), 6.26 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-7'), 6.03 (1H, s, H-3), 4.00 (3H, s, 10'-OCH₃), 3.81 (3H, s, 8-OCH₃), 3.64 (3H, s, 6-OCH₃), 3.61 (3H, s, 8'-OCH₃),

2.54 (3H, s, 2'-CH₃), 2.40 (3H, s, 2-CH₃)。

Asperpyrones B (**5**), ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_H 13.18 (1H, s, 5'-OH), 12.81 (1H, s, 5-OH), 7.04 (1H, s, H-6), 6.98 (1H, s, H-7), 6.44 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-9'), 6.33 (1H, s, H-3'), 6.31 (1H, s, H-3), 6.20 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-7'), 4.00 (3H, s, 10'-OCH₃), 3.80 (3H, s, 8-OCH₃), 3.61 (6H, s, 8'-OCH₃ and 10-OCH₃), 2.55 (3H, s, 2'-CH₃), 2.48 (3H, s, 2-CH₃)。

Fonsecinone A (**6**), ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_H 15.24 (1H, s, 5'-OH), 12.83 (1H, s, 5-OH), 7.06 (1H, s, H-6), 6.97 (1H, s, H-7), 6.42 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-9'), 6.33 (1H, s, H-3), 6.17 (1H, s, H-7'), 6.00 (1H, s, H-3'), 4.03 (3H, s, 6'-OCH₃), 3.78 (3H, s, 8-OCH₃), 3.61 (3H, s, 8'-OCH₃), 3.42 (3H, s, 10-OCH₃), 2.48 (3H, s, 2-CH₃), 2.12 (3H, s, 2'-CH₃)。

2.2 抗菌活性测定结果

抗菌活性按微量稀释法进行, MIC 数值见表 1。由于化合物 **1-6** 对测试菌 *S. aureus* ATCC43300、25923、*B. subtilis* ATCC6633、*E. coli* ATCC25922

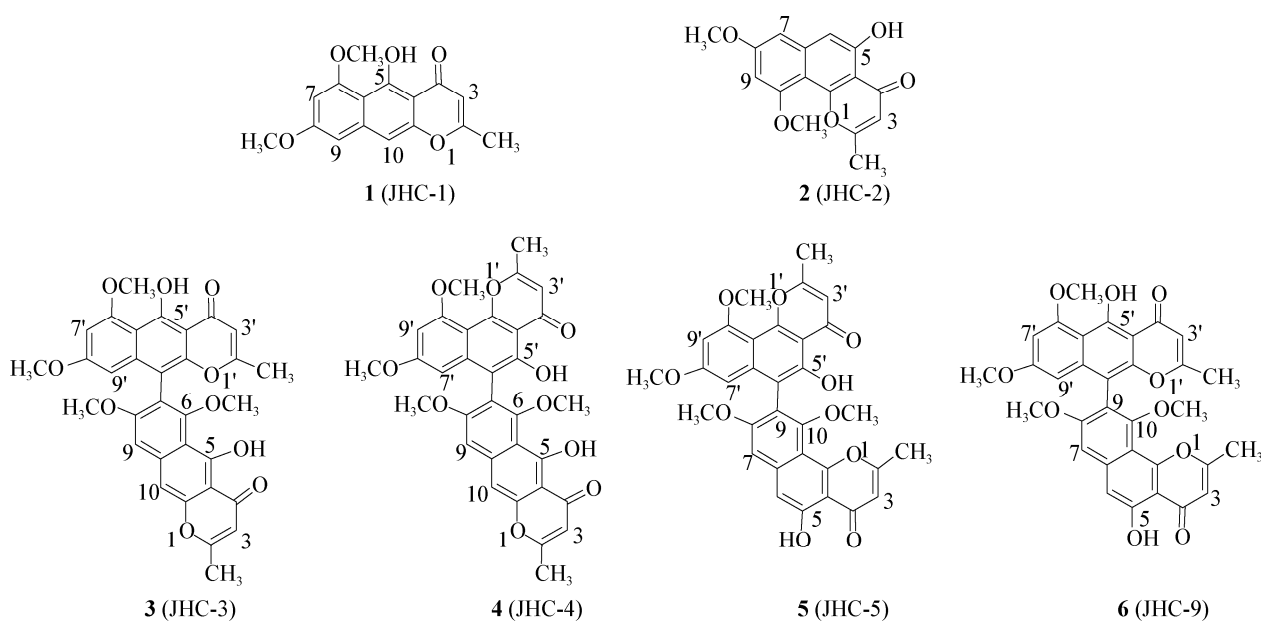


图 1 化合物 **1-6** 的结构

Figure 1 Structures of compounds **1-6**

表 1 化合物 1-6 对病原菌的最小抑菌浓度 MIC ($\mu\text{mol/L}$)和对卤虫的半数致死浓度 LD_{50} ($\mu\text{mol/L}$)

Table 1 MIC and LD_{50} ($\mu\text{mol/L}$) of compounds 1-6 against pathogen bacteria and *Artemia salina*

Compound	MIC				LD_{50}
	SA1	SA2	EF	VP	AS
1	>350	>350	87.4	174.8	244.7
2	43.7	174.8	87.4	174.8	35.0
3	>175.4	>175.4	21.9	>175.4	8.8
4	21.9	43.9	43.9	87.7	87.7
5	87.7	87.7	43.9	>175.4	87.7
6	>175.4	>175.4	43.9	>175.4	122.8
AM	67.3	33.7	<4.0	<4.0	
VM	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	

Note: SA1=*S. aureus* ATCC33591; SA2=*S. aureus* ATCC29213; EF=*E. faecium* ATCC35667; VP=*V. parahemolyticus* ATCC17802; AS=*A. Salina*; AM=Ampicillin sodium; VM=Vancomycin.

和 *E. faecalis* ATCC51299 的 MIC 数值均 >350 $\mu\text{mol/L}$, 这 5 株测试菌的结果未列在表 1 中。化合物 2、4 和 5 对金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC33591 的最小抑制浓度分别为 43.7、21.9 和 87.7 $\mu\text{mol/L}$; 对 *S. aureus* ATCC29213 的最小抑制浓度分别为 174.8、43.9 和 87.7 $\mu\text{mol/L}$ 。对于屎肠球菌 *E. faecium* ATCC35667 的最小抑制浓度, 化合物 1 和 2 为 87.4 $\mu\text{mol/L}$, 化合物 3 为 21.9 $\mu\text{mol/L}$, 化合物 4 和 5 均为 43.9 $\mu\text{mol/L}$ 。化合物 1、2 和 4 对副溶血性弧菌 *V. parahemolyticus* ATCC17802 最小抑制浓度分别为 174.8、174.8 和 87.7 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 卤虫致死活性测定结果

卤虫致死活性按海水稀释法进行, LD_{50} 数值见表 1。化合物 1-6 均表现出一定的卤虫致死活性, 其半数致死浓度分别为 244.7、35.0、8.8、87.7、87.7 和 122.8 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 讨论与结论

DAD-HPLC、LC-MS 和 ^1H NMR 均能很好地辨识萘并吡喃酮类化合物, 也均可用于此类化合物的导向分离, 但由于该类化合物在 TLC 可见光下即有点性很好的黄色斑点, 粗样中又不存在类

似斑点的其它类型化合物, 从操作的便捷性和实验成本等方面综合考虑, TLC 是指导分离这类化合物最好的方法。TLC 分析 (流动相为氯仿: 甲醇 = 20:1) $R_f=0.1-0.9$ 处密布黄色可见光斑点, 说明本文中的海洋真菌 *A. niger* 能够代谢结构非常丰富的萘并吡喃酮类化合物, 这与文献[3, 5-14]报道吻合。我们前期从发酵产物的较低极性段中分离出化合物 1-6, 更多的萘并吡喃酮类化合物分离和活性分析工作还在进行中。这类化合物由于母核上存在较多的取代位点, 取代基以及氧化还原程度的不同, 导致其极性分布相对较广, 貌似分离难度不大, 但事实是 TLC 上相近或者同一比移值处却存在多个结构异构的同分异构体 (如本文中的化合物 1 和 2, 化合物 3-6), 分离还存在一定的难度。此外这类化合物二聚体的分子量相对较大, 需要较多的样品量才能采集到理想的核磁信号, 因此许多微量的化合物还有待进一步积累样品量后, 再确定其具体结构。

抗菌活性测试发现化合物 1-6 对测试菌 *S. aureus* ATCC43300、25923、*B. subtilis*、*E. coli* ATCC25922 和 *E. faecalis* ATCC51299 均无抑制活性, 对 *S. aureus* ATCC33591、29213、*E. faecium* ATCC35667 和 *V. parahemolyticus* 表现出不同程度的抑制活性, 其中化合物 2 和 4 对 *S. aureus* ATCC33591 表现出较强抑制活性, 化合物 3 对 *E. faecium* ATCC35667 抑制活性较强。卤虫致死活性发现化合物 1-6 均表现出一定的卤虫致死活性, 其中化合物 2 和 3 活性显著, 提示化合物 1-6 具有不同程度的细胞毒活性。因此设计了体外肿瘤细胞毒试验, 运用 MTT 法考察化合物 1-6 对 HeLa、Hep-2、MGC803、BGC823 和 AGS 这 5 株肿瘤细胞株是否也同样具有细胞毒活性, 但得出的数据不具有可重复性, 具体原因还有待进一步实验和分析。

本研究从真菌 *A. niger* 中分离得到单体和二聚体的萘并吡喃酮类化合物, 发现该类物质具有不同程度的抗菌和抗卤虫活性。本实验结果可为抗菌和细胞毒类药物的研发提供一定的依据和参考。

REFERENCES

- [1] Hiort J, Maksimenka K, Reichert M, et al. New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(9): 1532-1543
- [2] Varoglu M, Corbett TH, Valeriote FA, et al. Asperazine, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derived culture of *Aspergillus niger*[J]. Journal of Organic Chemistry, 1997, 62(21): 7078-7079
- [3] Talonsi FM, Tatong MDK, Dittich B, et al. Structures and absolute configuration of three α -pyrones from an endophytic fungus *Aspergillus niger*[J]. Tetrahedron, 2013, 69(34): 7147-7151
- [4] Bugni TS, Abbanat D, Bernan VS, et al. Yanuthones: novel metabolites from a marine isolate of *Aspergillus niger*[J]. Journal of Organic Chemistry, 2000, 65(21): 7195-7200
- [5] Akiyama K, Teraguchi S, Hamasaki Y, et al. New dimeric naphthopyrones from *Aspergillus niger*[J]. Journal of Natural Products, 2003, 66(1): 136-139
- [6] Li DH, Han T, Guan LP, et al. New naphthopyrones from marine-derived fungus *Aspergillus niger* 2HL-M-8 and their in vitro antiproliferative activity[J]. Natural Product Research, 2016, 30(10): 1116-1122
- [7] Bouras N, Mathieu F, Coppel Y, et al. Aurasperone F-a new member of the naphtho-gamma-pyrone class isolated from a cultured microfungus, *Aspergillus niger* C-433[J]. Natural Product Research, 2005, 19(7): 653-659
- [8] Campos FR, Barison A, Daolio C, et al. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A, two bis-naphthopyrones produced by *Aspergillus aculeatus*[J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2005, 43(11): 962-965
- [9] Xiao J, Zhang Q, Gao YQ, et al. Antifungal and antibacterial metabolites from an endophytic *Aspergillus* sp. associated with *Melia azedarach*[J]. Natural Product Research, 2014, 28(17): 1388-1392
- [10] Shaaban M, Shaaban KA, Abdel-Aziz MS. Seven naphtho- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Alternaria alternata*: structure elucidation and biological properties[J]. Organic and Medicinal Chemistry Letters, 2012, 2(1): 6
- [11] He Y, Tian J, Chen XT, et al. Fungal naphtho- γ -pyrones: Potent antibiotics for drug-resistant microbial pathogens[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24291
- [12] Huang HB, Xiao ZE, Feng XJ, et al. Cytotoxic naphtho- γ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* (GX1-5E)[J]. Helvetica Chimica Acta, 2011, 94(9): 1732-1740
- [13] Zhang Y, Li XM, Wang BG. Nigerasperones A-C, new monomeric and dimeric Naphtho- γ -pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13[J]. The Journal of Antibiotics, 2007, 60(3): 204-210
- [14] Huang HB, Feng XJ, Liu L, et al. Three dimeric naphtho- γ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Pongamia pinnata*[J]. Planta Medica, 2010, 76(16): 1888-1891
- [15] Guo JJ, Zhang P, Li RJ, et al. Research progress on natural active ingredients by the screening method of brine shrimp lethality test[J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2016, 18(5): 889-893 (in Chinese)
郭晶晶, 张屏, 李瑞娟, 等. 海虾致死试验筛选天然活性成分的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(5): 889-893
- [16] Appendino G, Gibbons S, Giana A, et al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity study[J]. Journal of Natural Products, 2008, 71(8): 1427-1430
- [17] Solis PN, Wright CW, Anderson MM, et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp)[J]. Planta Medica, 1993, 59(3): 250-252
- [18] Wu ZC, Zheng LJ, Chen YL, et al. Isolation and elucidation of phenazine alkaloid antibiotics from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. SCSIO 10428[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2014, 33(1): 45-52 (in Chinese)
吴正超, 郑六眷, 陈耀龙, 等. 海洋源放线菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 10428 中吩嗪生物碱类抗生素的分离鉴定[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(1): 45-52