



# 1株南美蟛蜞菊内生真菌 *Aspergillus* sp. PQJ-1 次级代谢产物及其抗菌活性研究

李文杏<sup>1,2</sup>, 王一诺<sup>1,2</sup>, 马涛<sup>1,2</sup>, 张荣浚<sup>1,2</sup>, 惠阳<sup>1,2</sup>, 陈文豪<sup>1,2\*</sup>

(1. 热带药用资源化学教育部重点实验室/海南师范大学 化学与化工学院, 海南 海口 571158;  
2. 热带药用植物化学海南省重点实验室/海南师范大学 化学与化工学院, 海南 海口 571158)

**摘要:**采用硅胶、Sephadex LH-20、半制备 HPLC 等柱色谱方法,对南美蟛蜞菊内生真菌 *Aspergillus* sp. PQJ-1 发酵产物的乙酸乙酯提取物进行分离纯化,得到6个单体化合物。利用 NMR、MS 等波谱方法以及与参考文献对照,鉴定它们的结构分别为:cyclo-D-Trp-L-Pro (1), 1H-indole-3-carboxaldehyde (2), isoeugenin (3), flufaran (4), aflatoxinB1 (5), sterigmatocystin (6)。对所有化合物进行抗菌活性测试,结果表明,化合物 1、2、4~6 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、白色念珠菌显示出抗菌活性。

**关键词:**南美蟛蜞菊;内生真菌;次级代谢产物;结构鉴定

中图分类号:R284.1

文献标志码:A

文章编号:1674-4942(2022)02-0141-05

## Studies on Secondary Metabolites from *Sphagneticola trilobata* Fungus *Aspergillus* sp. PQJ-1 and Their Antibacterial Activities

LI Wenxing<sup>1,2</sup>, WANG Yinuo<sup>1,2</sup>, MA Tao<sup>1,2</sup>, ZHANG Rongjun<sup>1,2</sup>,  
HUI Yang<sup>1,2</sup>, CHEN Wenhao<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical Medicinal Resource Chemistry of Ministry of Education / College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158, China;  
2. Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Hainan Province / College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

**Abstract:** Six compounds were isolated from the EtOAc extract of the fermentation product of the fungus *Aspergillus* sp. PQJ-1 from *Sphagneticola trilobata* using silica gel, Sephadex LH-20, and semi-preparative HPLC column chromatography methods. Their structures were identified as cyclo-D-Trp-L-Pro (1), 1H-indole-3-carboxaldehyde (2), isoeugenin (3), flufaran (4), aflatoxinB1 (5), sterigmatocystin (6) by using NMR、MS spectroscopic analysis and comparison with the references. All compounds were tested for their antibacterial activities, and the results showed that compounds 1, 2, 4~6 exhibited antibacterial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

**Keywords:** *Sphagneticola trilobata*; endophytic fungus; secondary metabolites; structure identification

植物内生真菌资源丰富,其次生代谢产物种类繁多,具有促进植物生长、提高植物抗逆性、抑制病原菌、

收稿日期:2022-02-24

基金项目:海南省重点研发项目(ZDYF2021SHFZ221);海南省自然科学基金(221RC541);海南省高等学校科学研究项目(Hnky2021ZD-10);大学生创新训练项目(S202111658008)

第一作者:李文杏(1996—),海南万宁人,硕士研究生,研究方向为天然有机化学。E-mail:1452982612@qq.com

\*通信作者:陈文豪(1980—),海南文昌人,教授,研究方向为天然有机化学。E-mail:chenwh04@163.com

抗癌、降解环境污染物等功效,被广泛应用于医学、农业和环保方面,前景广阔<sup>[1-2]</sup>。

曲霉属(*Aspergillus*)真菌次级代谢产物已被广泛研究。其能够产生多种结构类型和丰富生物活性的次级代谢产物,为活性天然产物的重要来源之一<sup>[3]</sup>。例如具有抗肿瘤活性的 malformin A、 $3\beta, 15\beta$ -二羟基-( $22E, 24R$ )-麦角甾-5,8(14),22-三烯-7-酮<sup>[4]</sup>;抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的丁内酯<sup>[5]</sup>;具有抗菌活性的 clavatone 和 clavatol;具有抗植物病原菌的聚酮类、萜类、肽类<sup>[6]</sup>。以上研究结果显示,曲霉属真菌次级代谢产物具有药用先导化合物研究开发的重要前景。

本文研究了1株南美蟛蜞菊(*Sphagneticola trilobata*)来源内生真菌 *Aspergillus* sp. PQJ-1 的次级代谢产物,综合运用 HPLC 等色谱分离手段,从中分离得到6个化合物,通过核磁共振(NMR)、质谱(MS)等方法分别鉴定为 cyclo-D-Trp-L-Pro (1), 1*H*-indole-3-carboxaldehyde(2), isoeugenin(3), flufaran (4), aflatoxinB1(5), sterigmatocystin (6)。化合物 1~6 的化学结构式如下:

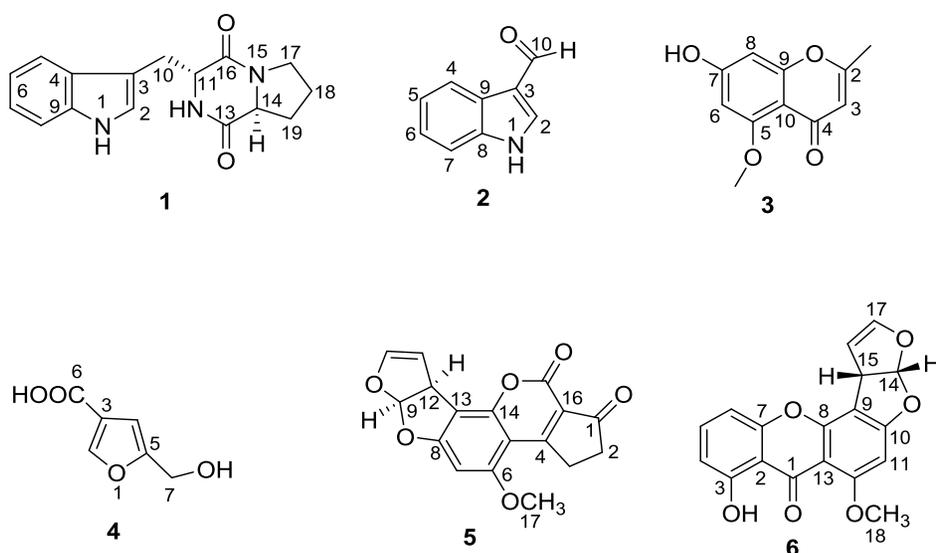


图1 化合物 1~6 的化学结构

Figure 1 Chemical structures of compounds 1~6

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

MAT-95-MS 质谱仪,德国 Finnigan 公司;Bruker AV-400MHz 超导核磁共振仪,瑞士 Bruker 公司;Agilent1260 分析型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;EYELAN-100 旋转蒸发仪,日本东京理化有限公司;YOKO-ZK 紫外分析暗箱,武汉药科新技术开发有限公司;Sephadex LH-20 凝胶,安法玛西亚技术上海有限公司;柱色谱硅胶,青岛海洋化工厂;气代试剂,艾览化工科技有限公司;其他常用溶剂,西陇化工股份有限公司。

### 1.2 菌株的分离及培养

#### 1.2.1 菌株来源

真菌 *Aspergillus* sp. PQJ-1 来源于南美蟛蜞菊,南美蟛蜞菊于 2020 年 7 月采自海南师范大学桂林洋校区,经海南师范大学生命科学院关亚丽教授鉴定为南美蟛蜞菊(*Sphagneticola trilobata*)。根据菌株 *Aspergillus* sp. PQJ-1 形态特征和 18S rRNA 基因序列(GenBank 登录号 NO.OM269036)进行鉴定,菌种存放于海南师范大学热带药用资源化学教育部重点实验室。菌株以 PDA 为培养基,4 °C 保存。

### 1.2.2 菌株的培养

菌株 *Aspergillus* sp. PQJ-1 用 PDA 液体培养基恒温 28 °C 静置培养 35 d, 1 000 mL 三角锥形瓶每瓶加入 300 mL 培养液, 120 °C 的高温灭菌锅灭菌 20 min, 待培养基冷却后接种, 共发酵 300 瓶。

### 1.3 提取与分离

采用乙酸乙酯萃取发酵液, 萃取 3 次, 减压浓缩得到乙酸乙酯提取物总浸膏 (150 g), 将总浸膏用正相硅胶柱色谱进行分离, 用三氯甲烷-丙酮 (体积比 10:1~0:10) 体系进行梯度洗脱, 得到 7 个组份 (Fr.1-Fr7)。其中 Fr.1 (13.0 g) 经反复正相硅胶柱色谱梯度洗脱分离, 得到化合物 4 (1.2 g), 最后经半制备 HPLC 以乙腈-水 (体积比 55:45, 流速 3 mL/min) 制备得到化合物 1 (10.2 mg)。Fr.2 (18.5 g) 经反复正向硅胶柱色谱梯度洗脱分离, 再经半制备 HPLC 以乙腈:水 (体积比 33:67, 流速 3 mL/min) 制备得到化合物 2 (6.3 mg)、化合物 3 (5.7 mg)、化合物 5 (7.2 mg)、化合物 6 (7.5 mg)。

### 1.4 生物活性测试

#### 1.4.1 抗菌活性

采用 96 孔板微量稀释法, 测定所有化合物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* subsp)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的抗菌活性, 环丙沙星为阳性对照, 二甲基亚砜 (DMSO) 为阴性对照, 在细胞培养箱中培养 24 h 后, 观察从上到下不长菌的澄清的孔即为该测试样品的最小抑菌浓度 MIC<sup>[7]</sup>。

## 2 实验结果

### 2.1 化合物结构鉴定

化合物 1: 黄色粉末, 分子式:  $C_{16}H_{17}N_3O_2$ ; ESI-MS  $m/z$ : 284.3[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.59 (H, dd,  $J = 0.4, 5.2$  Hz, H-5), 7.40 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-8), 7.24 (1H, m, H-7), 7.14 (1H, m, H-6), 7.12 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-2), 4.36 (1H, dd,  $J = 2.4, 8.0$  Hz, H-11), 4.07 (1H, t,  $J = 4.8$  Hz, H-14), 3.77 (1H, ddd,  $J = 0.4, 2.4, 10.0$  Hz, H-10b), 3.64 (1H, m, H-17a), 3.58 (1H, m, H-17b), 2.97 (1H, dd,  $J = 7.2, 10.0$  Hz, H-10a), 2.32 (1H, m, H-19a), 2.02 (1H, m, H-19b), 2.01 (1H, m, H-18a), 1.91 (1H, m, H-18b)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  169.8 (C-13), 166.0 (C-16), 137.1 (C-9), 127.2 (C-4), 123.7 (C-2), 123.3 (C-7), 120.5 (C-6), 119.0 (C-5), 112.0 (C-8), 110.5 (C-30), 59.7 (C-14), 55.0 (C-11), 45.9 (C-17), 28.8 (C-19), 27.3 (C-10), 23.1 (C-18)。以上数据与参考文献<sup>[8]</sup>数据一致, 因此确定化合物 1 为 cyclo-D-Trp-L-Pro。

化合物 2: 浅黄色粉末, 分子式:  $C_9H_7NO$ ; ESI-MS  $m/z$ : 146.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.93 (1H, s, H-10), 8.28 (1H, s, H-2), 8.10 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-4), 7.52 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-7), 7.26 (2H, m, H-5 and H-6)。<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  185.0 (C-10), 138.5 (C-2), 137.1 (C-8), 124.2 (C-9), 123.5 (C-6), 122.1 (C-5), 120.8 (C-4), 118.2 (C-3), 112.5 (C-7)。数据与参考文献<sup>[9]</sup>一致, 因此确定化合物 2 为 1H-Indole-3-carboxaldehyde。

化合物 3: 淡黄色油状物, 分子式:  $C_{11}H_{10}O_4$ , ESI-MS  $m/z$ : 205.0[M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  6.56 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 6.51 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-6), 5.57 (1H, s, H-3), 3.91 (1H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.52 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  169.4 (C-4), 161.8 (C-5), 160.9 (C-7), 156.2 (C-9), 138.1 (C-2), 116.2 (C-8), 105.8 (C-10), 100.5 (C-6), 86.5 (C-3), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 23.0 (CH<sub>3</sub>)。以上数据与参考文献<sup>[10]</sup>一致, 因此确定化合物 3 为 isoeugenin。

化合物 4: 无色针状晶体, 分子式:  $C_6H_6O_4$ , ESI-MS  $m/z$ : 143.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.96 (1H, s, H-2), 6.43 (1H, s, H-4), 4.44 (2H, s, H-7)。<sup>13</sup>C-NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  174.6

(C-6), 169.7 (C-5), 146.8 (C-3), 138.5 (C-2), 109.7 (C-4), 61.1 (C-7)。以上数据与参考文献<sup>[11]</sup>一致,因此确定化合物4为 flufaran。

化合物5:浅黄色粉末,分子式: $C_{17}H_{12}O_6$ , ESI-MS  $m/z$ : 313.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  6.93 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-11), 6.75 (1H, s, H-9), 6.73 (1H, s, H-10), 5.40 (1H, t,  $J$  = 2.4 Hz, H-7), 4.75 (1H, dd,  $J$  = 6.8, 2.0 Hz, H-12), 3.93 (3H, s, H-17), 3.25 (2H, t,  $J$  = 4.0 Hz, H-3), 2.47 (2H, t,  $J$  = 5.2 Hz, H-2)。<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  200.9 (C-1), 177.4 (C-15), 164.9 (C-4), 161.3 (C-8), 154.3 (C-6), 152.0 (C-14), 145.7 (C-10), 116.4 (C-16), 113.4 (C-11), 107.1 (C-13), 103.3 (C-5), 102.4 (C-7), 91.3 (C-9), 57.0 (C-17), 46.9 (C-12), 34.8 (C-2), 28.7 (C-3)。以上数据与参考文献<sup>[12]</sup>一致,因此确定化合物5为 aflatoxin B1。

化合物6:浅黄色粉末,分子式: $C_{18}H_{12}O_6$ , ESI-MS  $m/z$ : 325.1[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  13.22 (1H, s, OH-3), 7.50 (1H, t,  $J$  = 8.4 Hz, H-5), 6.84 (2H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-6, 14), 6.76 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-4), 6.50 (1H, t,  $J$  = 2.4 Hz, H-15), 6.44 (1H, s, H-11), 5.45 (1H, t,  $J$  = 2.8 Hz, H-16), 4.82 (1H, dt,  $J$  = 2.0, 7.2 Hz, H-17), 4.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18)。<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  181.6(C-1), 164.8 (C-10), 163.5 (C-12), 162.4 (C-3), 155.1 (C-7), 154.2 (C-8), 145.5 (C-17), 135.9 (C-5), 113.4 (C-14), 111.4 (C-4), 109.1 (C-2), 106.7 (C-6), 106.1 (C-9), 106.0 (C-13), 102.6 (C-16), 90.6 (C-11), 56.9 (C-18), 48.2 (C-15)。以上数据与参考文献<sup>[13]</sup>一致,因此确定化合物6为 sterigmatocystin。

## 2.2 抗菌活性实验结果

对化合物1~6进行了抗菌活性测试,发现化合物1、5、6对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌显示微弱抗菌活性, MIC值分别为25、25和12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阳性对照环丙沙星(Ciprofloxacin)的MIC值为1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;化合物1、2、4~6对白色念珠菌活性与阳性对照效果相当。

表1 化合物1~6抗菌活性  
Table 1 Antibacterial activity of compounds 1~6 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

化合物	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	白色念珠菌
1	25	>100	50
2	100	100	50
3	>100	>100	100
4	100	100	50
5	25	>100	50
6	12.5	100	50
环丙沙星	1.56	3.12	50

## 3 结论

本文运用色谱、波谱等技术,从1株南美蟛蜞菊来源内生真菌 *Aspergillus* sp. PQJ-1 中分离鉴定了6个化合物,包括1个二酮哌嗪类化合物(1),1个吡啶类化合物(2),2个甾体囊素类化合物(5、6),2个其他类化合物(3、4),并对所有化合物进行抗菌活性筛选,化合物1、2、4~6对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、白色念珠菌显示一定抗菌活性。本研究首次对南美蟛蜞菊内生真菌次级代谢产物进行研究,为充分开发利用该入侵植物内生真菌的次级代谢产物提供了科学依据。

## 参考文献:

- [1] 宋双,许佳怡.海洋来源的曲霉属真菌次级代谢产物及其活性研究进展[J].中山大学研究生学刊(自然科学与医学版),2015(3):20-32.

- [2] 黄燕,曾东强,唐文伟,等. 植物内生真菌生物活性成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2020,32(8):1419-1437.
- [3] 李昕阳. 海洋曲霉属真菌次级代谢产物及其生物合成基因簇异源表达研究[D]. 杭州:浙江大学,2019.
- [4] 关丽萍,周婷婷,李达翔,等. 海洋真菌黑曲霉2HL-M-8次级代谢产物的分离鉴定及抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志,2016,26(1):49-55.
- [5] 刘冰,唐祉娟,陈宁,等. 海洋来源曲霉丁内酯类次级代谢产物研究进展[J]. 中国海洋药物,2021,40(5):59-70.
- [6] 黄瑞环,韩小斌,刘京,等. 海洋曲霉和海洋木霉抗植物病原菌活性次级代谢产物研究进展[J]. 江苏农业学报,2020,36(5):1332-1341.
- [7] PIERCE C G, UPPULURI P, TRISTAN A R, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing[J]. Nature Protocols,2008,3(9):1494-1500.
- [8] ASIRI I A M, BADR J M, YOUSSEF D T A. Penicillivincine, antimigratory diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Penicillium vinaceum*[J]. Phytochemistry Letters,2015,13:53-58.
- [9] ZHOU H F, JIAN R J, KANG J, et al. Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(24):12717-12721.
- [10] AN H J, NUGROHO A, SONG B M, et al. Isoeugenin, a novel nitric oxide synthase inhibitor isolated from the rhizomes of *Imperata cylindrica*[J]. Molecules (Basel, Switzerland),2015,20(12):21336-21345.
- [11] EVIDENTE A, CRISTINZIO G, PUNZO B, et al. Flufuran, an antifungal 3, 5-disubstituted furan produced by *Aspergillus flavus link*[J]. Chemistry & Biodiversity,2009,6(3):328-334.
- [12] SSUN K L, LI Y, GUO L, et al. Indole diterpenoids and isocoumarin from the fungus, *Aspergillus flavus*, isolated from the prawn, *Penaeus vannamei*[J]. Marine Drugs,2014,12(7):3970-3981.
- [13] 邵长伦,谭倪,杨瑞云,等. 南海红树林内生真菌 ZSUH 36 次级代谢物的分离鉴定[J]. 应用化学,2009,26(1):7-10.

(责任编辑:刘 红)