

南海红树林内生真菌 *Fusarium solani* 387[#] 次级代谢产物研究^{*}

宋 双¹, 薛艳钰², 陆勇军³, 李 静¹, 廖宝林⁴, 刘 岚¹

(1. 中山大学海洋学院, 广东 广州 510275;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

3. 中山大学生命科学大学院, 广东 广州 510275;

4. 广东省徐闻珊瑚礁国家级自然保护区管理局, 广东 湛江 524100)

摘 要: 采用色谱技术对 *Fusarium solani* 387[#] 的次级代谢产物进行分离纯化, 根据化合物的理化性质、波谱数据以及与文献谱图、数据对照的方法确定化合物的结构。从南海红树林内生真菌 *Fusarium solani* 387[#] 的次级代谢产物中分离得到了 9 个镰孢菌素类化合物, 分别鉴定为 5 (*R*)-deoxyfusarubin (**1**)、5 (*S*)-deoxyfusarubin (**2**)、3-methyl ether fusarubin (**3**)、Fusarubin (**4**)、Anhydrofusarubin (**5**)、Anhydro-5-deoxyfusarubin (**6**)、2-acetyl-3-methyl-7-methoxy-naphthazarin (**7**)、Javanicin (**8**)、2-acetyl-3-methyl-5-hydrogen-7-methoxy-naphthazarin (**9**)。通过 X-射线单晶衍射首次确定了化合物 **1** 和 **2** 的绝对构型及存在形式。

关键词: 红树林; 内生真菌; 次级代谢产物; 腐皮镰刀菌

中图分类号: P734.5 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2015) 05-0067-05

The Secondary Metabolites of the Mangrove Endophytic Fungus *Fusarium solani* 387[#]

SONG Shuang¹, XUE Yanyu², LU Yongjun³, LI Jing¹, LIAO Baoling⁴, LIU Lan¹

(1. School of Marine Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

4. Guangdong Xuwen Coral Reef National Reserve Administration, Zhanjiang 524100, China)

Abstract: The secondary metabolites of *Fusarium solani* 387[#] from the South China Sea were studied. The structures of compounds were analyzed based on physical and chemical properties, and in comparison with the spectroscopic data with literatures published. Nine Fusarbin compounds were isolated from the mangrove endophytic fungus *Fusarium solani* 387[#] from the South China Sea, and their structures were identified as 5 (*R*)-deoxyfusarubin (**1**), 5 (*S*)-deoxyfusarubin (**2**), 3-methyl ether fusarubin (**3**), Fusarubin (**4**), Anhydrofusarubin (**5**), Anhydro-5-deoxyfusarubin (**6**), 2-acetyl-3-methyl-7-methoxy-naphthazarin (**7**), Javanicin (**8**) and 2-acetyl-3-methyl-5-hydrogen-7-methoxy-naphthazarin (**9**). The absolute configurations as well as the existing form of compound **1** and **2** were determined by the X-ray crystallography for the first time.

Key words: mangrove; endophytic fungus; secondary metabolites; *Fusarium solani*

* 收稿日期: 2015-07-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21272286); 中山大学青年教师起步计划资助项目

作者简介: 宋双 (1985 年生), 男; 研究方向: 有机天然产物化学; 通信作者: 李静, 廖宝林; E-mail: lijing356@mail.sysu.edu.cn, 13590010881@163.com

红树林作为自然生长在热带、亚热带河口潮间带的一种特殊木本植物群落,一直处于频繁的潮汐、高盐、强风、强紫外辐射和缺氧的污泥特殊环境中^[1],为寄生在植物体内的内生真菌提供了独特的生活环境,使其能够产生类型多样、结构新颖,且具有抗氧化、抗肿瘤、细胞毒等不同生理活性的次级代谢产物。对红树林内生真菌生物活性物质的研究已成为海洋微生物资源开发利用、寻找天然药物先导化合物的重要途径。

Fusarium solani 387[#]为深圳红树林植物白骨壤 (*Avicennia marina*) 内生真菌,经指纹图谱及薄层色谱法分析,发现 *Fusarium solani* 387[#]的次级代谢

产物非常丰富。对该菌株大规模发酵培养后采用正相柱层析、葡聚糖凝胶柱层析、高效液相色谱等多种色谱分离手段,综合运用现代波谱技术 (MS、NMR、XRD 等) 以及用文献数据比对的方法,从 *Fusarium solani* 387[#]静置培养的大米培养基中分离并鉴定了 9 个镰红菌素类化合物 (图 1): 5 (*R*)-deoxyfusarubin (**1**)、5 (*S*)-deoxyfusarubin (**2**)、3-methyl ether fusarubin (**3**)、Fusarubin (**4**)、Anhydrofusarubin (**5**)、Anhydro-5-deoxyfusarubin (**6**)、2-acetonil-3-methyl-7-methoxy-naphthazarin (**7**)、javanicin (**8**)、2-acetonil-3-methyl-5-hydrogen-7-methoxy-naphthazarin (**9**), 其中化合物 **1** 和 **2** 的绝对构型为首次报道。

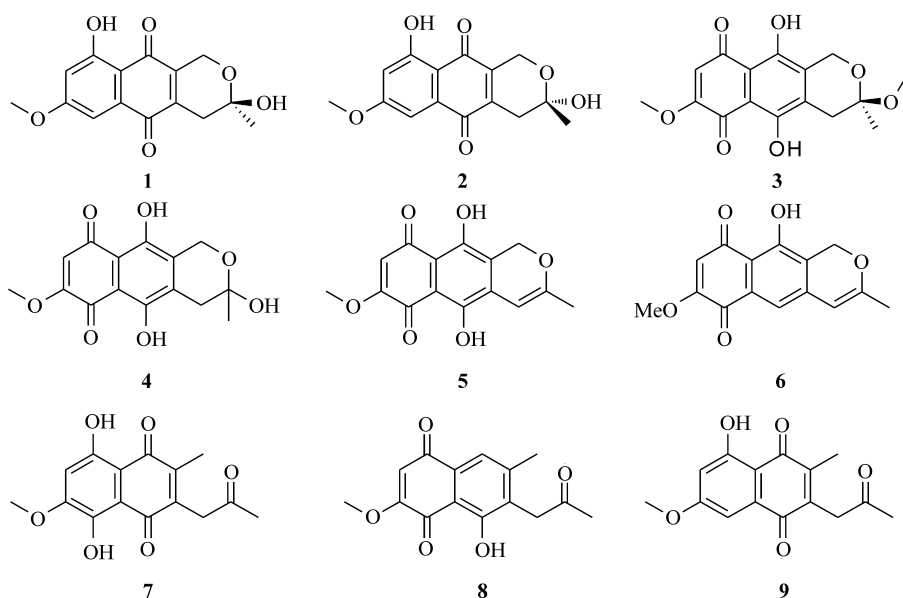


图 1 化合物 **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** 结构图

Fig. 1 Structure of compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**

1 仪器与材料

Bruker AVANCE 600 MHz/500 MHz/400 MHz 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); LC1620 型高效液相色谱仪 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); Oxford Diffraction Xcalibur Nova 晶体衍射仪; MAT95XP 型高分辨质谱仪 (美国 Thermo 公司); ZAB-HS 型双聚焦磁质谱仪 (FAB, 英国 VG 公司); Schmidt-Haensch, Polaptronic HNQW5 型旋光仪 (日本岛津公司)。薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂有限公司); Sephadex LH-20 凝胶 (GE healthcare); 高效液相色谱柱: Ultimate XB-C18 制备柱 (21.2 mm × 250 mm, 5 μm, Welch 公司); 常规试剂均为分析纯。

红树林内生真菌 *Fusarium solani* 387[#]菌种从深圳市福田区红树林保护区的白骨壤中分离得到,由中山大学生命科学学院陆勇军教授提供并鉴定为腐皮镰刀菌,保存于中山大学海洋学院海洋天然产物研究室。

2 提取与分离

菌种用大米培养基 (500 mL 三角烧瓶 64 瓶, 每瓶含大米 80 g, $w = 3\%$ 人工海水 100 mL) 静置培养 30 d 后, 甲醇浸泡 3 次, 减压浓缩水相再用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并甲醇相和乙酸乙酯相减压浓缩得到总浸膏 63 g。以石油醚、乙酸乙酯、甲醇为洗脱剂用快速柱色谱进行极性分段, 得石油醚相 (15 g)、乙酸乙酯相 (28 g) 和甲醇相 (20 g)。

乙酸乙酯相用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) 为 100:0→0:100), 得到 5 个组分 Fr. A~F, Fr. B 经过硅胶柱色谱、Sephadex LH 20 和半制备 HPLC 分离得到化合物 **5** (20 mg)、**6** (5 mg) 和化合物 **9** (5 mg)。Fr. C 和 Fr. E 经酸处理硅胶柱色谱, 用石油醚-乙酸乙酯洗脱, 得到化合物 **3** (20 mg)、化合物 **7** (2 mg) 和化合物 **4** (30 mg)。Fr. D 经过硅胶柱色谱和半制备 HPLC 分离得到化合物 **8** (5 mg)、**1** 和 **2** (4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 和 **2**: 橙黄色晶体, ESI-MS m/z : 289.1 ($[M-H]^-$, $[2M+Na]^+$ m/z : 601.6)。结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 确定该化合物的分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$, 不饱和度为 9。 1H NMR 表明分子结构中含有一个酚羟基 (δ_H 12.16, s), 两个苯环上的间位氢原子 (δ_H 7.1, d, 2.4 Hz; δ_H 6.7, d, 2.4 Hz), 一个甲氧基 (δ_H 3.97, s), 两个亚甲基 (δ_H 4.62, m; 2.48~2.74, m), 1 个甲基 (δ_H 1.54, s), 共 14 个 H。ESI-MS 只显示一个分子离子峰, 而通过 ^{13}C NMR 能看到谱图中有化学位移及强度非常接近的 9 对碳信号峰, 推测化合物 **1** 和 **2** 为一对对映异构体, 根据 HMBC 信息能确定氢分别归属于对应的一对碳 (见表 1)。

尝试纤维素衍生化手性色谱柱对 **1**, **2** 混合物

进行拆分未成功, 因化合物量仅 4 mg, 对化合物 **1**, **2** 混合物进行单晶培养, 获得单晶, 以验证是否为一对对映体。选择丙酮为溶剂, 用溶剂挥发法对化合物 **1**, **2** 的混合物进行单晶培养, 顺利得到了单晶, 通过 X-射线单晶衍射, 确证单晶为一对对映体形成的混晶。并进一步确定化合物 **1** 和 **2** 分别为 5 (*R*)-deoxyfusarubin 和 5 (*S*)-deoxyfusarubin, 首次确定了 5 (*R*)-deoxyfusarubin 和 (*S*)-deoxyfusarubin 的绝对构型, 晶体结构见图 2。Devys 等^[2] 从 *Fusarium solani* Nectria haematococca 中首次分离得到了 5-deoxyfusarubin, 但未报道化合物构型。

化合物 **3**: 红色粉末状固体, ESI-MS m/z : 319 $[M-H]^-$; 结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 可知其分子式为 $C_{16}H_{16}O_7$ 。 1H NMR (500 Hz, $CDCl_3$) δ_H 12.93 (1H, s), 12.65 (1H, s), 6.15 (1H, s), 4.86 (1H, d, 17.55 Hz), 4.55 (1H, d, 17.55 Hz), 3.9 (3H, s), 3.3 (3H, s), 3.0 (1H, d, 18.3 Hz), 2.66 (1H, d, 18.3 Hz), 1.58 (3H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 184.6 (C), 178.1 (C), 160.9 (OH-C), 160.7 (C), 57.4 (OH-C), 137.2 (C), 132.9 (C), 109.7 (CH), 109.6 (C), 107.6 (C), 96.9 (C), 58.7 (CH₂), 56.7 (OCH₃), 48.9 (OCH₃), 33.0 (CH₂), 22.8 (CH₃)。通过对比文献^[3], 确定该化合物为 3-methyl ether fusarubin。

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 NMR 数据¹⁾

Table 1 NMR chemical shifts and assignments of compound **1** and compound **2**

编号	碳类型	δ_C	δ_H	HMBC (H → C)
1	CH ₂	57.85	4.62 (m)	C-10a
3	C	141.66		
4	CH ₂	33.40/33.44	2.72~2.76 (m), 2.46~2.50 (m)	C-3, 4a
4a	C	94.50/94.58		
5	C	183.36		
5a	C	134.61/134.62		
6	CH	108.37/108.41	7.1 (d, 2.4 Hz)	C-5, 8, 9a
7	C	164.26/164.98		
8	CH	106.25/106.30	6.72 (d, 2.4 Hz)	C-6, 7, 9
9	C	164.98/165.26		
10	C	187.79/187.84		
10a	C	142.68		
3-CH ₃		28.91/28.97	1.54 (s)	C-3, 4, 4a
7-OCH ₃		56.70	3.97 (s)	C-7
9-OH			12.16 (s)	C-8, 9, 9a

1) Acetone-d₆, 1H NMR 500 MHz, ^{13}C NMR 126 MHz

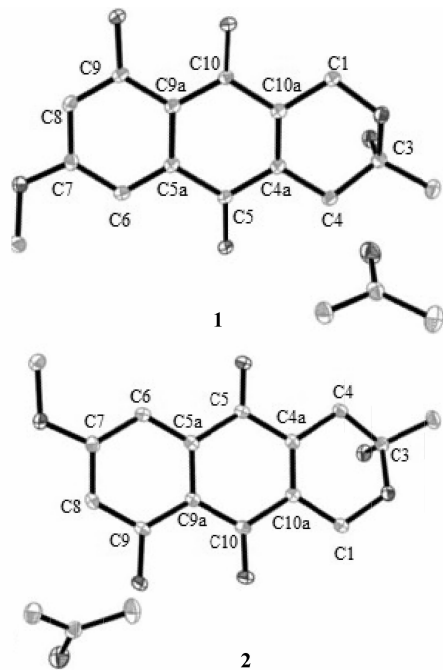


图 2 化合物 1 和 2 的单晶结构图

Fig. 2 Single crystal structures of compound 1 and compound 2

化合物 4: 红色粉末状固体, ESI-MS m/z : 307.2 $[M-H]^-$, 结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 可知其分子式为 $C_{15}H_{14}O_7$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 2.97 (1H, s), 12.70 (1H, s), 6.22 (1H, s), 4.92 (2H, m), 3.97 (3H, s), 2.75 (2H, m), 1.68 (3H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ : 84.7 (C), 178.2 (C), 160.9 (C), 160.7 (C), 157.4 (C), 137.2 (C), 132.9 (C), 109.7 (CH), 109.7 (C), 107.6 (C), 94.3 (C), 58.6 (CH₂), 56.7 (OCH₃), 32.2 (CH₂), 29.4 (CH₃)。通过查阅文献 [4], 确定该化合物为 Fusarubin。

化合物 5: 紫色针状晶体, ESI-MS m/z : 287.2 $[M-H]^-$, 结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 确定其分子式为 $C_{15}H_{12}O_6$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 13.04 (1H, s), 12.65 (1H, s), 6.17 (1H, s), 5.99 (1H, s), 5.21 (2H, d, 0.31 Hz), 3.92 (3H, s), 2.01 (3H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 183.0 (C), 177.9 (C), 161.7 (C), 160.1 (C), 158.1 (OH-C), 158.1 (OH-C), 133.2 (C), 122.9 (C), 111.1 (C), 110.1 (CH), 108.1 (C), 94.9 (CH), 63.1 (O-CH₂), 56.8 (OCH₃), 20.2 (CH₃)。通过与文献 [5] 数据对比, 发现化合物 5 与 Anhydrofusarubin 的光谱数据一致。

化合物 6: 深红色针状晶体, ESI-MS m/z : 271.2 $[M-H]^-$, 结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 确定该化合物的分子式为 $C_{15}H_{12}O_5$, 不饱和度为 10。 1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ_H : 12.62 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.19 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 1.96 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Acetone) δ : 191.4 (C), 179.8 (C), 162.3 (C), 161.0 (C), 157.0 (C), 140.5 (C), 132.2 (C), 119.7 (C), 114.2 (CH), 113.2 (C), 110.2 (CH), 101.5 (CH), 63.6 (CH₂), 57.3 (OCH₃), 19.9 (CH₃)。对比化合物 6 与化合物 5 的 1H NMR 信息, 相对于化合物 4 而言化合物 5 少了一个酚羟基质子 (δ_H 13.4, s) 信号峰, 多了一个芳香质子 (δ_H 7.14, s) 信号峰, 结合分子式推测 6 可能比 5 少了一个酚羟基。进一步结合

^{13}C NMR 和 HMBC 确定了化合物 5 的结构, 通过对比文献 [6] 数据, 确定该化合物为 4-deoxyhydantufusarubin。

化合物 7: 红色针状晶体, ESI-MS m/z : 289 $[M-H]^-$, 结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 可知其分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$ 。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 13.24 (1H, s), 12.85 (1H, s), 6.19 (1H, s), 3.92 (3H, s), 3.89 (2H, s), 2.28 (3H, s), 2.22 (3H, s); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 204.1 (C), 184.7 (C), 178.1 (C), 161.8 (C), 161.0 (C), 160.7 (C), 142.9 (C), 134.5 (C), 110.1 (C), 110.0 (CH), 108.8 (C), 57.1 (OCH₃), 41.6 (CH₂), 30.3 (CH₃), 13.2 (CH₃)。对照文献 [3] 确定该化合物为 2-acetyl-3-methyl-7-methoxy-naphthazarin。

化合物 8: 黄色针状晶体, ESI-MS m/z : 273.2 $[M-H]^-$, 结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 确定其分子式为 $C_{15}H_{14}O_5$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 12.62 (1H, s), 7.43 (1H, s), 6.06 (1H, s), 3.89 (3H, s), 3.83 (2H, s), 2.22 (3H, s), 2.19 (3H, s); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 203.8 (C), 190.7 (C), 179.4 (C), 161.1 (C), 159.9 (C), 140.9 (C), 135.1 (C), 128.3 (C), 121.5 (CH), 112.4 (C), 109.4 (CH), 56.6 (OCH₃), 49.2 (CH₂), 29.8 (CH₃), 12.1 (CH₃)。通过查阅文献 [7], 确定该化合物为 5-hydroxy-3-methoxy-7-methyl-6-(2-oxopropyl)-1, 4-naphthoquinone。

化合物 9: 黄色针状晶体, ESI-MS m/z : 273.2

[M-H]⁻, 结合¹H NMR、¹³C NMR 可知其分子式为 C₁₅H₁₄O₅。 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H: 12.34 (1H, s), 7.16 (1H, d, 2.5 Hz), 6.63 (1H, d, 2.5 Hz), 3.89 (3H, s), 3.76 (2H, m), 2.31 (3H, s), 2.11 (3H, d, 0.6 Hz,); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 203.4 (C), 188.2 (C), 183.5 (C), 166.1 (C), 164.4 (C), 146.4 (C), 141.1 (C), 109.8 (C), 107.9 (CH), 106.2 (CH), 106.2 (C), 56.1 (OCH₃), 41.8 (CH₂), 30.4 (CH₃), 12.9 (CH₃)。对照文献 [8], 确定该化合物为 2-acetyl-3-methyl-5-hydrogen-7-methoxy-naphthazarin。

4 结果与讨论

旋光异构体成对出现导致外消旋或部分外消旋化在天然产物中是一种有趣的现象。方伟等^[9]和 Nawong Boonnak 等^[10]从特境微生物-螳螂的共附生菌 *Daldinia eschscholzii* 及红芽木属植物根部粗提物的代谢产物中均发现了旋光异构体成对出现导致外消旋或部分外消旋的现象, 并对此进行了进一步的研究。镰红菌素类化合物是腐皮镰孢菌次级代谢产生的典型化合物, 此类化合物具有广泛的生物活性, 包括抗菌、抑菌、细胞毒和抗癌活性等^[11]。本课题组从红树林内生真菌 *Fusarium solani* 387[#] 的次级代谢产物乙酸乙酯相中分离得到了9个镰红菌素类化合物, 利用核磁共振和单晶 X 衍射首次确定了化合物 **1** 和 **2** 的绝对构型, 并按照 1:1 比例在该真菌中以外消旋体存在。

参考文献:

- [1] 林鹏. 中国红树林研究进展到[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2001, 40(2): 592 - 603.
- [2] PARISOT D, DEVYS M, BARBIER M. A new deoxyfusarubin produced by the fungus *Nectria haematococca*. Synthesis of the two isomeric deoxyanhydronaphthopyranones from toralactone[J]. *Journal of Antibiotics*, 1992, 45(11): 1799 - 1801.
- [3] TATUM J H, BAKER R A. Naphthoquinones produced by *Fusarium solan* isolated from citrus[J]. *Phytochemistry*, 1983, 22: 543 - 547.
- [4] CHILTON W S. Isolation and structure of norjavanicin [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1968, 33(11): 4299 - 4300.
- [5] SHAO C, WANG C, ZHENG C, et al. A new anthraquinone derivative from the marine endophytic fungus *Fusarium* sp (No. b77)[J]. *Nat Prod Res*, 2010, 24(1): 81 - 85.
- [6] PARISOT D, DEVYS M, BARBIER M. Structure and biosynthesis of 5-deoxyfusarubin and anhydro-5-deoxyfusarubin, naphthaquinone pigments from *Nectria haematococca* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(9): 1977 - 1979.
- [7] KIMURAY, SHIMADA A, NAKAJIMA H, et al. Structures of naphthoquinones produced by the fungus, *Fusarium* sp., and their biological activity toward pollen germination (organic chemistry)[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1988, 52(5): 1253 - 1259.
- [8] YANG Z, DING J, DING K, et al. Phomonaphthalenone A: A novel dihydronaphthalenone with anti-HIV activity from *Phomopsis* sp. HCCB04730 [J]. *Phytochemistry Letters*, 2013, 6(2): 257 - 260.
- [9] FANG W, JI S, JIANG N, et al. Naphtholradical couplings determine structural features and enantiomeric excess of dalesconols in *Daldinia eschscholzii*[J]. *Nat Commun*, 2012(3): 1039.
- [10] NAWONG B, SUCHADA C. Three types of cytotoxic natural caged-scaffolds: pure enantiomers or partial racemates[J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(7): 1562 - 1571.
- [11] TATUM J H, BAKER R A, NEMEC S I R. Antimicrobial activity of naphthoquinones from *Fusaria* [J]. *Mycopathologia*, 1990, 111(9): 9 - 14.