

一株红树内生真菌 *Penicillium* sp. (ZZF29#) 次级代谢产物的分离与鉴定

李尚德^{a*} 魏美燕^a 李志华^a 余志刚^b 林永成^b

(^a广东医学院药学院 东莞 523808; ^b中山大学化学与化学工程学院 广州 510275)

摘要 研究了一株药用红树内生真菌 *Penicillium* sp. (ZZF29#) 的次级代谢产物。用硅胶柱层析、制备薄层层析和重结晶等方法,从该菌发酵液的乙酸乙酯相中分离获得 8 种单体化合物,运用现代波谱技术与文献数据对照,鉴定其结构分别为:环(苯丙-丙)二肽(**1**)、环(苯丙-甘)二肽(**2**)、环(苯丙-苯丙)二肽(**3**)、环(苯丙-酪)二肽(**4**)、大黄素(**5**)、大黄素甲醚(**6**)、麦角甾醇(**7**)和过氧化麦角甾醇(**8**)。

关键词 红树内生真菌, *Penicillium* sp. (ZZF29#), 次级代谢产物, 分离鉴别, 环二肽, 蒽醌, 甾醇

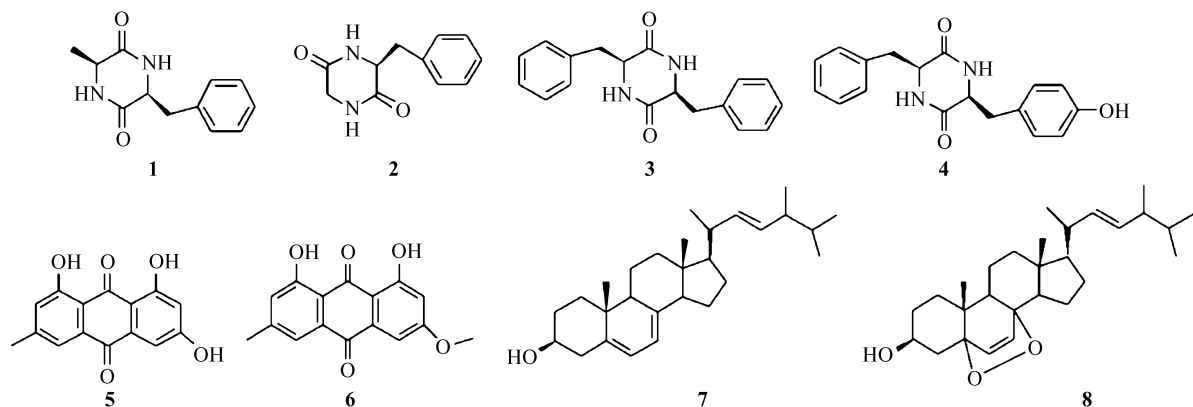
中图分类号: O629

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2012)06-0727-03

DOI: 10. 3724/SP. J. 1095. 2012. 00438

研究报道,多种海洋真菌新颖次级代谢物具有生物活性^[1]。作者也从中国南海海洋真菌次级代谢产物中发现了一系列结构新颖或药理活性显著的化合物^[2-3]。对红树内生真菌 *Penicillium* sp. (ZZF29#) 发酵液的乙酸乙酯萃取相经硅胶柱层析、制备薄层层析和重结晶法分离,获得 8 种单体化合物 (Scheme 1)。通过波谱解析及文献对照,确定结构为环(苯丙-丙)二肽(**1**)、环(苯丙-甘)二肽(**2**)、环(苯丙-苯丙)二肽(**3**)、环(苯丙-酪)二肽(**4**)、大黄素(**5**)、大黄素甲醚(**6**)、麦角甾醇(**7**)和过氧化麦角甾醇(**8**)。



Scheme 1 Structures of compounds **1** ~ **8**

提纯后得到化合物 **1** (14.6 mg)、化合物 **2** (65.8 mg)、化合物 **3** (112.6 mg)、化合物 **4** (15.5 mg)、化合物 **5** (24.6 mg)、化合物 **6** (14.8 mg)、化合物 **7** (46.3 mg) 和化合物 **8** (36.4 mg)。8 种化合物的波谱数据和结构鉴定如下所述:

化合物 **1**: 白色粉末; FABMS (m/z): 219 [$M + H$]⁺; ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ : 8.09 (1H, brs), 8.00 (1H, brs), 7.17 ~ 7.29 (5H, m), 4.18 (1H, m), 3.61 (1H, m), 3.08 (1H, dd, $J = 13.5, 4.5$ Hz), 3.19 (1H, dd, $J = 13.5, 4.5$ Hz), 0.77 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)。其中 δ 8.09 (1H, brs) 和 δ 8.00 (1H, brs) 处的 2 个活泼氢信号, 以及 δ 4.18 (1H, m) 和 δ 3.61 (1H, m) 处的氢信号, 显示为一环肽化合物; δ 7.17 ~ 7.29 (5H, m) 一组峰说明化合物中含有一个单取代苯环, δ 3.08 (1H, dd, $J = 13.5, 4.5$ Hz) 和 δ 3.19 (1H, dd, $J = 13.5, 4.5$ Hz) 为同一个 CH₂ 中的 2 个氢, δ 0.77 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) 为 1 个甲基氢信号。以上数据与文献^[4]数据基本吻合, 确定化合物 **1** 为环(苯丙-丙)二肽。

2011-09-28 收稿, 2012-03-06 修回

湛江市科技攻关计划项目 (2009C3106011); 广东医学院面上基金资助项目 (M2010002)

通讯联系人: 李尚德, 副教授; Tel/Fax: 0769-22896567; E-mail: lishangde@gdmc.edu.cn; 研究方向: 天然产物化学

化合物**2**:无色针状晶体;FABMS(m/z):205 $[M+H]^+$; 1H NMR(300 MHz, DMSO- d_6), δ :7.82(1H, brs), 7.62(1H, brs), 7.26(5H, m), 4.15(1H, m), 3.43(1H, dd, $J=17.5, 2.5$ Hz), 3.17(1H, dd, $J=13.0, 5.5$ Hz), 3.03(1H, dd, $J=13.0, 5.0$ Hz), 2.85(1H, d, $J=17.5$ Hz); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , TMS), δ :166.9(C), 165.4(C), 135.0(C), 129.5(CH), 127.7(CH), 126.3(CH), 55.5(CH), 43.5(CH₂), 39.1(CH₂)。

氢谱(300 MHz, DMSO- d_6)中 δ 7.82(1H, brs)和 δ 7.62(1H, brs)表明分子中存在2个活泼氢,结合碳谱(DMSO- d_6 , TMS)中 δ 166.9和 δ 165.4的羰基碳峰,说明可能有2个酰胺基团。 δ 7.26(5H, m)与碳谱中 δ 135.0, 129.5, 127.7, 126.3 4个烯碳信号说明化合物中含有1个单取代苯环。除此之外,碳谱中 δ 55.5有1个CH碳信号,对应于氢谱中 δ 4.15(1H, m)也有1个CH氢信号;碳谱中 δ 43.5和 δ 39.1处有2个CH₂碳信号,而氢谱中 δ 3.43(1H, dd, $J=17.5, 2.5$ Hz)和 δ 2.85(1H, d, $J=17.5$ Hz)为1个CH₂上的2个氢信号; δ 3.17(1H, dd, $J=13.0, 5.5$ Hz)和 δ 3.03(1H, dd, $J=13.0, 5.0$ Hz)为另1个CH₂上的2个氢信号;确定为环(苯丙-甘)二肽^[5]。

化合物**3**:无色针状晶体;mp > 290 °C, FABMS(m/z):295 $[M+H]^+$; 1H NMR(300 MHz, DMSO- d_6), δ :7.31(2H, t, $J=7.5$ Hz), 7.23(1H, t, $J=7.5$ Hz), 7.11(2H, d, $J=7.5$ Hz), 7.04(1H, brs), 4.05(1H, m), 2.92(1H, dd, $J=13.5, 4.5$ Hz), 2.23(1H, dd, $J=13.5, 7.5$ Hz);确定为环(苯丙-苯丙)二肽^[6]。

化合物**4**:白色固体;mp > 290 °C, FABMS(m/z):311 $[M+H]^+$; 1H NMR(300 MHz, DMSO- d_6), δ :9.04(1H, s), 7.65(2H, brs), 7.26(2H, t, $J=7.5$ Hz), 7.18(1H, t, $J=7.5$ Hz), 7.07(2H, d, $J=7.0$ Hz), 6.85(2H, d, $J=8.5$ Hz), 6.66(2H, d, $J=8.5$ Hz), 3.95(1H, m), 3.89(1H, m), 2.63(1H, dd, $J=14.0, 7.0$ Hz), 2.24(1H, dd, $J=14.0, 7.0$ Hz);确定为环(苯丙-酪)二肽^[4]。

化合物**5**:黄色粉末;FABMS(m/z):271 $[M+H]^+$; 1H NMR(300 MHz, Acetone- d_6), δ :7.56(1H, s, H-5), 7.25(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-4), 7.13(1H, s, H-7), 6.67(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-2), 2.46(3H, s, CH₃); ^{13}C NMR(75 MHz, Acetone- d_6), δ :190.8(—C, C-9), 181.4(—C, C-10), 165.8(—C, C-3), 165.2(—C, C-1), 162.2(—C, C-8), 148.7(—C, C-6), 135.7(—C, C-4a), 133.4(—C, C-10a), 124.1(CH, C-7), 120.7(CH, C-5), 113.6(—C, C-9a), 109.5(—C, C-8a), 109.0(CH, C-2), 108.0(CH, C-4), 21.2(CH₃, C—CH₃);确定为大黄素^[7]。

化合物**6**:黄色粉末;EI-MS: $[M]^+$ 284; 1H NMR(300 MHz, Acetone- d_6), δ :7.63(1H, s, H-5), 7.36(1H, s, H-4), 7.11(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-7), 6.65(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-2), 4.00(3H, s, OCH₃), 2.47(3H, s, CH₃);确定为大黄素甲醚^[8]。

化合物**7**:针状晶体;FABMS(m/z):397 $[M+H]^+$; 1H NMR(300 MHz, CDCl₃), δ :0.63(3H, s), 0.83(3H, d, $J=6.0$ Hz), 0.84(3H, d, $J=6.0$ Hz), 0.92(3H, s), 1.03(3H, d, $J=6.5$ Hz), 3.64(1H, m), 5.19(1H, dd, $J=15.5, 8.0$ Hz), 5.22(1H, dd, $J=15.0, 7.0$ Hz), 5.38(1H, d, $J=6.0$ Hz), 5.57(1H, d, $J=4.0$ Hz)。该化合物的氢谱为典型的甾醇特点,确定为麦角甾醇^[9]。

化合物**8**:针状晶体;FABMS(m/z):429 $[M+H]^+$; 1H NMR(300 MHz, CDCl₃), δ :0.82(3H, s), 0.83(3H, s), 0.84(3H, d, $J=7.0$ Hz), 0.88(3H, s), 0.91(3H, d, $J=7.0$ Hz), 1.05(3H, d), 1.23(m), 1.41(m), 1.58(m), 1.70(1H, dt, $J=13.5, 3.5$ Hz), 1.76(m), 1.89(m), 2.11(m), 3.97(1H, m), 5.20(2H, m), 6.24(1H, d, $J=8.5$ Hz), 6.50(1H, d, $J=8.5$ Hz);确定为过氧化麦角甾醇^[9]。

从红树内生真菌 *Penicillium sp.* (ZZF29#) 发酵液乙酸乙酯提取相中分离鉴别了8种已知化合物,环二肽类、蒽醌类和甾醇类化合物因环二肽类和蒽醌类化合物大多具有抗菌、抗肿瘤等药理活性。为红树内生微生物中提取药物以及药物先导化合物的发现提供了有益信息。

实验部分

美国 Varian Mercury-Plus 300 型核磁共振仪;美国 Thermo LCQ DECA XP 型液质联用仪;英国 VG ZAB-HS 型质谱仪;北京泰克仪器公司的 X4 型显微熔点仪,温度计未校正;葡萄糖,化学纯试剂;蛋白胨和酵母膏为生物试剂;粗海盐(微生物养殖用);其它均为分析纯试剂。红树内生真菌 *Penicillium sp.* (ZZF29#) 采自南海红树(菌种由香港城市大学 Jones 教授提供,保存在中山大学化学与化学工程学院)。发酵培养液为葡萄糖 1.0%,蛋白胨 0.2%,酵母膏 0.1%,粗海盐水 0.25%, pH = 7.0。500 mL 三角瓶,内装培养液 300 mL,经 121 °C(0.1 MPa)高温灭菌 25 min 后,在超净工作台上接种。共接种 200 瓶,28

℃静置培养4周后。过滤,分别收集发酵液和菌体。

发酵液浓缩后用乙酸乙酯充分萃取,乙酸乙酯相减压浓缩得浓缩物(约12 g),浓缩物用甲醇溶解后用48~75 μm 硅胶拌样(100 g),并进行硅胶柱层析分离纯化,以 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})$ 为100:0~0:10和 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇})$ 为100:0~0:100 加压梯度洗脱,共得10个组分F1~F10。F5组分首先通过重结晶的方法除掉部分色素后,对无色固体继续由硅胶柱层析分离纯化, $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=8:2$ 组分中分别获得化合物7和8;F6和F7组分经TLC分析后合并,继续用硅胶柱层析分离纯化, $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=7:3$ 组分中分别获得化合物5、6和7;组分F8按照上述方法继续用硅胶柱层析分离纯化, $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=5:5$ 组分中分别获得化合物1、2以及化合物3、4的混合组分;对化合物3和4的组分运用硅胶制备薄层层析方法,用 $V(\text{甲醇}):V(\text{氯仿})=1:9$ 的展开剂将上述2种化合物制备分离。

参 考 文 献

- [1] Blunt J W, Copp B R, Munro M H G, *et al.* Marine Natural Products[J]. *Nat Prod Rep*, 2006, **23**:26-78.
- [2] Shao C L, Wang C Y, Wei M Y, *et al.* Structural and Spectral Assignments of Six Anthraquinone Derivatives from the Mangrove Fungus(ZSUH-36)[J]. *Magn Reson Chem*, 2008, **46**(9):886-889.
- [3] Wei M Y, Zhang X L, Li S D, *et al.* A New Dihydroisocoumarin with an Isoprenyl Group from the Endophytic Fungus *Cephalosporium* sp. [J]. *Chem Nat Compd*, 2010, **46**(3):340-342.
- [4] WANG Shuangming, TAN Ninghua, YANG Yabin, *et al.* Cyclodipeptides from the Roots of *Panax Notoginseng*[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2004, **16**(5):383-386(in Chinese).
王双明, 谭宁华, 杨亚滨, 等. 三七环二肽成分[J]. 天然产物研究与开发, 2004, **16**(5):383-386.
- [5] WU Xiongyu, LIN Yongcheng, FENG Shuang, *et al.* Studies on the Secondary Metabolite of Mangrove Endophytic Fungus No. 1356 from the South China Sea[J]. *J Trop Oceanogr*, 2001, **20**(4):80-86(in Chinese).
吴雄宇, 林永成, 冯爽, 等. 南海红树林内生真菌1356#代谢产物的研究[J]. 热带海洋学报, 2001, **20**(4):80-86.
- [6] ZHU Feng, LIN Yongcheng, ZHOU Shining, *et al.* Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus No. 2534 from the South China Sea[J]. *Acta Sci Nat Sun Yatsen*, 2003, **42**(1):52-54(in Chinese).
朱峰, 林永成, 周世宁, 等. 南海红树林内生真菌2534号代谢产物的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, **42**(1):52-54.
- [7] SHAO Changlun, HU Guping, YANG Ruiyun, *et al.* Secondary Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus B77 in the South China Sea[J]. *Acta Sci Nat Sun Yatsen*, 2008, **47**(1):56-58(in Chinese).
邵长伦, 胡谷平, 杨瑞云, 等. 南海红树林内生真菌B77次级代谢产物研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2008, **47**(1):56-58.
- [8] Aly A H, Edrada-Ebel R, Wray V, *et al.* Bioactive Metabolites from the Endophytic Fungus *Ampelomyces* sp. Isolated from the Medicinal Plant *Urospermum Picroides*[J]. *Phytochemistry*, 2008, **69**(8):1716-1725.
- [9] ZHU Feng, CHEN Guangying, LIN Yongcheng, *et al.* Metabolites Produced by Mangrove Endophytic Fungi(No. 2526 and No. 1850) from the South China Sea[J]. *J Liaoning Normal Univ*, 2005, **28**(3):313-316(in Chinese).
朱峰, 陈光英, 林永成, 等. 南海红树林内生真菌编号2526和编号1850代谢产物的研究[J]. 辽宁师范大学学报, 2005, **28**(3):313-316.

Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from Mangrove Endophytic Fungus *Penicillium* sp. (ZZF29#)

LI Shangde^{a*}, WEI Meiyang^a, LI Zhihua^a, SHE Zhigang^b, LIN Yongcheng^b

(^aSchool of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;

^bSchool of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract The secondary metabolites of the medicinal mangrove endophytic fungus *Penicillium* sp. (ZZF29#) were firstly studied. Eight compounds were isolated from the ethyl acetate extract of the fermentation using silica gel column chromatography, preparative thin-layer chromatography and recrystallization. The structures of the compounds were identified as cyclo-(Phe-Ala)(1), cyclo-(Phe-Gly)(2), cyclo-(Phe-Phe)(3), cyclo-(Phe-Tyr)(4), emodin(5), physcion(6), ergosterol(7) and peroxide ergosterol(8), by comprehensive spectroscopic characterizations as well as comparison with reported data.

Keywords mangrove endophytic fungus, *Penicillium* sp. (ZZF29#), secondary metabolites, isolation and elucidation, cyclodipeptides, anthraquinones, sterols