

南海红树林内生真菌 *Penicillium aurantiogriseum* 299 次级代谢产物研究方平¹, 钟毅昇², 薛艳钰², 陆勇军³, 林永成², 李静^{1*}, 刘岚^{1*}

1. 中山大学海洋学院, 广东 广州 510275

2. 中山大学化学化工学院, 广东 广州 510275

3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

摘要: 目的 对南海红树林内生真菌黄灰青霉菌 *Penicillium aurantiogriseum* 299 的次级代谢产物进行研究。方法 采用色谱技术对 *Penicillium aurantiogriseum* 299 的次级代谢产物进行分离纯化, 根据化合物的理化性质、波谱分析数据以及与文献谱图对照的方法确定化合物的结构。结果 从南海红树林内生真菌 *Penicillium aurantiogriseum* 299 的次级代谢产物中分离得到了 4 个化合物, 分别鉴定为 aurantiogrisidinol a/b (**1a/1b**)、4-(2'-羟基-丁炔氧基) 苯甲酸 (**2**)、(S)-penipratynolene (**3**)、aurantiamine (**4**)。结论 化合物 **1a/1b** 为新化合物, 化合物 **2** 是首次从青霉菌属真菌中分离得到。

关键词: 红树林; 内生真菌; 次级代谢产物; 黄灰青霉菌; aurantiogrisidinol a/b

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)18-2593-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.003

Secondary metabolites of mangrove endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* 299 from South China SeaFANG Ping¹, ZHONG Yi-sheng², XUE Yan-yu², LU Yong-jun³, LIN Yong-cheng², LI Jing¹, 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 Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of *Penicillium aurantiogriseum* 299 from South China Sea. **Methods** The metabolites of *P. aurantiogriseum* 299 were isolated by chromatographic techniques; The structures of compounds were eventually identified and confirmed on the basis of physicochemical properties, spectral data, and spectra of literatures published. **Results** Four compounds were isolated from the mangrove endophytic fungus *P. aurantiogriseum* 299, and their structures were identified as aurantiogrisidinol a/b (**1a/1b**), 4-(2'-hydroxybutynoxy) benzoic acid (**2**), (S)-penipratynolene (**3**), and aurantiamine (**4**). **Conclusion** Compound **1** is a new compound. Compound **2** is isolated from *P. aurantiogriseum* for the first time.

Key words: mangrove; endophytic fungus; secondary metabolites; *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx; aurantiogrisidinol a/b

红树林生态系统是一种分布在热带、亚热带潮间带具有海洋环境特有森林类型的木本植物群落, 以其为主体, 包括海洋微生物、无脊椎动物、鸟类、哺乳动物等共同形成了一个具有显著生态价值的高产出的生态系统^[1]。海洋真菌是海洋微生物的一个重要成员, 特别是南海红树林来源的内生真菌, 在过去几十年的真菌次级代谢产物的相关研究中已显

示出能够产生多种多样的新颖的活性代谢产物的能力, 一系列结构新颖的或药理活性良好的化合物从中被发现^[2-4]。海洋真菌的活性代谢产物也因此而成为重要的新型药物来源之一, 成为了又一个天然药物资源的巨大宝库。由于红树林中的一些药用植物与内生真菌之间存在着互利共生的关系, 通过研究一些植物中具有很好药理活性的化学成分, 发现这

收稿日期: 2014-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (2127876); 中国博士后科学基金资助项目 (2013M531886); 海洋公益性行业科研专项经费项目 (210305017); 海洋生物天然产物化合物库基金资助项目 (4109041)

作者简介: 方平 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为有机天然产物化学。Tel: 15920387693 E-mail: klyfangping@163.com

*通信作者 刘岚 Tel: (020)84114834 E-mail: cesllan@mail.sysu.edu.cn

李静 Tel: 15820278582 E-mail: zsulijing@163.com

些化学成分其实就是与其共生的内生真菌的代谢产物。基于这种思路,为了寻找结构新颖且具有药理活性的天然产物,本研究对一株采自于海口的老鼠簕内生真菌黄灰青霉菌 *Penicillium aurantiogriseum* 299 及其代谢产物进行了研究。老鼠簕 *Acanthus ilicifolius* L. 是爵床科老鼠簕属的植物,主要分布在潮间带、海滨和海岸地带,是红树林的一种重要药用植物,其本身味淡、性寒,根和全株可入药,具有凉血清热、散瘀积、解毒止痛的功效^[5],现代关于老鼠簕的药理研究,还发现其具有保肝和抗氧化、抗肿瘤的作用^[6-7]。

本研究从海口采样得到老鼠簕样本,对与其共生的内生真菌进行分离纯化,得到 *P. aurantiogriseum* 299,真菌经放大培养后的初提物经高效液相色谱指纹图谱及 TLC 分析发现 *P. aurantiogriseum* 299 的次级代谢产物非常丰富,采用正反相硅胶、凝胶柱色谱法和高效液相色谱法对其次级代谢产物进行了分离纯化,最终得到了4个化合物,经波谱技术确定分子结构,分别为 aurantioigrisidinol a/b (**1a/1b**)、4-(2'-羟基-丁炔氧基)苯甲酸 [4-(2'-hydroxybutynoxy)-benzoic acid, **2**]、(S)-penipratynolene (**3**) 和 aurantiamine (**4**)。其中化合物 **1a/1b** 为新化合物,化合物 **2** 为首次从青霉菌中分离得到。

1 仪器与材料

Bruker AVANCE 400 和 Bruker AVANCE 500 型核磁共振波谱仪(瑞士 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),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),旋光仪为 ADP440 型(英国 B+S 公司)。

薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶为青岛海洋化工厂产品;Sephadex LH-20 凝胶(GE healthcare);所用试剂均为分析纯,广州化学试剂厂。

2 菌种来源和菌种的发酵培养

红树林内生真菌 *P. aurantiogriseum* 299 菌种采自海口老鼠簕,由中山大学生命科学学院提供。该真菌菌种由中山大学生命科学学院陆勇军教授提供并鉴定为黄灰青霉菌。菌种在 4 ℃ 条件下保存于中山大学化学化工学院。菌种放大培养时采用 GYT 培养基进行摇种,发酵培养基采用大米固体培养基:1 000 mL 三角瓶,60 mL 大米,60 mL 培养液(粗海盐 30 g/L,水溶液 pH 7.0),经 120 ℃ (0.1 MPa)

高温灭菌制得。

3 提取与分离

大米培养基经 120 ℃ (0.1 MPa) 高温灭菌 25 min 后接种,每瓶接种 5 mL 菌种培养液,共接种 60 瓶。接种后的大米培养基在 28 ℃ 室温条件下静置培养 28 d 后,用甲醇进行 3 次浸泡,滤过收集甲醇相,经减压浓缩后,用醋酸乙酯反复萃取 3 次,收集醋酸乙酯相,减压浓缩得到粗提物。醋酸乙酯相粗提物采用柱色谱方法用石油醚-醋酸乙酯体系、醋酸乙酯-甲醇体系进行梯度洗脱,收集各极性段组分,再进一步通过正反相硅胶、凝胶柱色谱、HPLC 法和重结晶等方法对其进行纯化,得到化合物 **1a/1b** (2.5 mg)、**2** (24.5 mg)、**3** (3.4 mg)、**4** (23.2 mg)。

4 结构鉴定

化合物 **1a/1b**: 淡黄色油状液体,HR-ESI-MS m/z : 421.223 48 $[M+H]^+$, ($C_{23}H_{33}O_7$, 计算值为 421.222 08), 确定其分子式为 $C_{23}H_{32}O_7$ 。结合 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) 和 ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) 谱图数据中可以看出,化合物 **1a/1b** 中明显包含 2 个化合物。由于 HR-ESI-MS 只有一个相对分子质量结果, 1H -和 ^{13}C -NMR 谱中又能看到化学位移非常接近的两两相交重叠的信号峰,故推测化合物 **1a/1b** 中存在含有手性碳或不饱和碳的 2 个同分异构体,因为手性碳或不饱和碳的构型不同造成 2 个同分异构体化合物的氢和碳在 1H -和 ^{13}C -NMR 谱中的化学位移存在细微差异。 ^{13}C -NMR 谱中完全重叠的信号峰有 δ 166.6 (C-1), 164.6 (C-5), 88.7 (C-2), 78.3 (C-6), 57.5 (C-23), 22.1 (C-20), 13.9 (C-18), 13.2 (C-19), 10.3 (C-16); 1H -NMR 谱中 δ 5.71 (H-11), 5.67 (H-2), 4.26 (H-7), 1.45 (H-18) 的信号峰均完全重叠。 1H -和 ^{13}C -NMR 谱中不能完全重叠的信号峰在表 1 中已分别列出。 1H -NMR 谱中高场区存在 7 组甲基信号峰,1 组是双峰 δ 1.16 (3H, d, $J=6.8$ Hz),其余组均为单峰 [δ (2.08, 2.07), 1.73, (1.67, 1.66), 1.45, (1.38, 1.37), 1.35], 结合碳、氢谱中的化学位移(表 1)可以看出化合物 **1a/1b** 中存在 6 个甲基和 1 个甲氧基。 ^{13}C -NMR 谱中 δ 166.6 (C-1), 137.8/137.7 (C-8), 133.9/133.6 (C-9), 139.7/139.6 (C-10), 130.2/129.8 (C-11) 说明化合物 **1a/1b** 中存在一个酯羰基碳和 4 个共轭双键碳; δ 75.3/75.2 (C-6), 81.7/81.6 (C-12), 68.6 (C-14), 78.3 (C-15) 为季碳。

根据 HSQC 结果确定化合物 **1a/1b** 中与碳直接相连的质子,见表 1。 1H - 1H COSY 可以看出 δ 5.91

表1 化合物 1a/1b 的核磁数据
Table 1 NMR data of compound 1a/1b

碳位	δ_C	δ_H
1	166.6	
2	88.7	5.67 (1H, s)
3	174.2	
4	110.9, 110.8	
5	164.6	
6	75.3, 75.2	
7	82.5, 82.4	4.26 (1H, s)
8	137.8, 137.7	
9	133.9, 133.6	5.91, 5.90 (1H, m)
10	139.7, 139.6	
11	130.2, 129.8	5.71 (1H, s)
12	81.7, 81.6	
13	68.8	3.57 (1H, s)
14	68.6	
15	78.3	4.05 (1H, m)
16	10.3	2.08, 2.07 (3H, s)
17	28.0, 27.9	1.67, 1.66 (3H, s)
18	13.9	1.45 (3H, s)
19	13.2	1.38, 1.37 (3H, s)
20	22.1	1.35 (3H, s)
21	14.8, 14.4	1.73 (3H, s)
22	19.4	1.16 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)
23	57.5	3.92 (3H, s)

(H-9) 与 δ 1.37 (H-19) 耦合, δ 5.71 (H-11) 与 δ 1.73 (H-21) 耦合, δ 4.05 (H-15) 与 δ 1.16 (H-22) 耦合。HMBC 显示 δ 3.92 (H-23) 与 δ 174.2 (C-3) 相关, δ 5.67 (H-2) 与 δ 174.2 (C-3), 166.6 (C-1) 相关, δ 2.08 (H-16) 与 δ 174.2 (C-3), 110.9 (C-4), 164.6 (C-5) 相关, 再结合 H、C 的化学位移值, 推断化合物 1a/1b 有 1 个具有共轭双烯结构的六元内酯环 A, 甲氧基在 3 位取代, 4 位有 1 个甲基取代。 δ 3.57 (H-13) 与 δ 81.7 (C-12), 68.6 (C-14) 相关, δ 1.45 (H-18) 与 δ 68.6 (C-14), 78.3 (C-15) 相关, δ 1.16 (H-22) 与 δ 78.3 (C-15) 相关, δ 4.05 (H-15) 与 δ 81.7 (C-12)、68.8 (C-13), 68.6 (C-14) 相关, 结合 H、C 的化学位移值分析出化合物 1a/1b 具有 1 个含氧的五元环 B, 且有 2 个甲基在 14、15 位取代。再根据 HMBC 测试结果分析其他位的 C、H 相关关系 (图 1), 结合化学位移值, 并参考文献报道^[8], 可以推测出化合物 1a/1b 是与 verrucosidinol 具有相似结构的同分异构体混合物, 通过数据对比发现化合物 1a/1b 与所报道的化合物不同点在于, δ 5.67 (1H, s) 多出 1 个

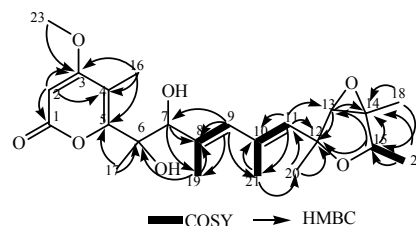


图1 化合物 1a/1b 主要的 HMBC 和 COSY 相关性

Fig. 1 Key HMBC and COSY correlations of compound 1a/1b

双键 CH 信号峰, 在 δ 10.2 少了 1 个甲基信号峰, 2 位碳上的季碳信号峰消失, 多出 1 个 δ 88.7 (C-2) 的双键 CH 信号峰。最终鉴定化合物 1a/1b 的平面结构与 2 位去甲基的 verrucosidinol 平面结构一致, 是新化合物, 命名为 aurantiogrisidinol a/b。

化合物 2: 白色粉末, EI-MS m/z : 206 $[M]^+$, 分子式为 $C_{11}H_{10}O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.98 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2, 6), 7.03 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-3, 5), 4.70 (1H, m, H-2'), 4.20~4.07 (2H, m, H-1'), 2.92 (1H, s, H-4'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 169.9 (C-7), 164.0 (C-4), 133.0 (C-2), 133.0 (C-6), 124.7 (C-1), 115.5 (C-3), 115, 5 (C-5), 83.0 (C-3'), 75.2 (C-4'), 73.1 (C-1'), 61.7 (C-2')。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 2 为 4-(2'-羟基-丁炔氧基) 苯甲酸。化合物 2 对枯草芽孢杆菌 (ATCC 6051) 生长表现出一定的抑制活性^[9]。

化合物 3: 无色针晶 (甲醇), $[\alpha]_D^{28.4} +47.25^\circ$ (c 0.15, EtOH), EI-MS m/z : 220 $[M]^+$, 分子式为 $C_{12}H_{12}O_4$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 7.96 (2H, m, H-2, 6), 7.07 (2H, m, H-3, 5), 4.92 (1H, brd, $J = 5.8$ Hz, 2'-OH), 4.74 (1H, m, H-2'), 4.20 (1H, dd, $J = 9.9, 8.9$ Hz, H-1'a), 4.18 (1H, dd, $J = 9.8, 11.2$ Hz, H-1'b), 3.84 (3H, s, H-8), 2.97 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-4'); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 166.9 (C-7), 163.5 (C-4), 132.3 (C-2, 6), 123.9 (C-1), 115.4 (C-3, 5), 83.5 (C-3'), 74.8 (C-4'), 72.8 (C-1'), 61.3 (C-2'), 52.1 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 3 为 (*S*)-penipratynolene。化合物 3 对白色念珠菌 *Candida albicans* NCPF3153 和新型细球菌 *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 生长表现出较弱的抑制活性^[11]。

化合物 4: 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 301 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{16}H_{22}N_4O_2$ 。 1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.3 (1H, brs, H-12), 11.86 (1H, s, H-1), 8.25 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2), 7.81 (1H, s, H-6), 6.70

(1H, s, H-9), 6.06 (1H, dd, $J = 17.4, 10.5$ Hz, H-17), 5.07 (2H, m, H-18), 3.91 (1H, t, $J = 2.8$ Hz, H-10), 2.16 (1H, dept, $J = 7.0, 3.0$ Hz, H-13), 1.42 (6H, s, 19, 20-CH₃), 0.94 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 14-CH₃), 0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 15-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.8 (C-11), 159.5 (C-8), 145.7 (C-17), 136.5 (C-5), 134.3 (C-2), 131.6 (C-4), 123.9 (C-7), 111.9 (C-18), 103.3 (C-6), 60.1 (C-10), 37.4 (C-16), 33.3 (C-13), 27.9 (C-19, 20), 18.1 (C-14), 16.6 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **4** 为 aurantiamine。化合物 **4** 对豆炭疽病菌生长表现出一定的抑制活性^[13]。

参考文献

- [1] Hyde K D, Alias S A. Biodiversity and distribution of fungi associated with decomposing *Nypa fruticans* [J]. *Biodiver Conser*, 2000, 9(3): 393-402.
- [2] Lin Y C, Shao Z Y, Jiang G C, *et al.* Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5, 6-dihydro-1, 2-ox-azine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (Strain 386) from the South China Sea [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(49): 9607-9609.
- [3] Huang Z J, Cai X L, Lin Y C, *et al.* Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H 76 [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(7): 1604-1608.
- [4] Chen G Y, Lin Y C, Wen L, *et al.* Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(26): 4907-4909.
- [5] 彭 兴, 龙盛京. 老鼠簕的化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 971-973.
- [6] Babu B H, Shylesh B S, Padikkala J, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius* [J]. *Fitoterapia*, 2001, 72(3): 272-277.
- [7] Babu B H, Shylesh B S, Padikkala J, *et al.* Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthus ilicifolius* in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79(1): 27-33.
- [8] Yu K, Ren B, Wei J L, *et al.* Verrucosidinol and verrucosidinol acetate, two pyrone-type polyketides isolated from a marine derived fungus, *Penicillium aurantiogriseum* [J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(11): 2744-2754.
- [9] Hyuncheol O, Dale C S, James B G, *et al.* New bioactive rosinogenin analogues and aromatic polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *massarina tunicat* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(1): 73-79.
- [10] Jian Y J, Wu Y K. On the structure of penipratynolene and WA [J]. *Tetrahedron*, 2010, 66(3): 637-640.
- [11] Saranyoo K, Vatcharin R, Kwanruthai T, *et al.* Chlorinated chromone and diphenyl ether derivatives from the mangrove-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA69 [J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(10): 2299-2305.
- [12] Thomas O L, Jens C F, Soren R J. Aurantiamine, a diketopiperazine from two varieties of *Penicillium aurantiogriseum* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(5): 1613-1615.
- [13] Brenda V B, Nora I P, Gabriela M C. An Antifungal Tetrapeptide from the culture of *Penicillium canescens* [J]. *Chem Biod*, 2009, 6(8): 1178-1185.