

文章编号:1001-6880(2014)10-1593-04

海洋真菌 *Penicillium sclerotiorum* FS50 的化学成分研究

陶美华¹,李乐军²,陈玉婵¹,霍光华²,章卫民^{1*}

¹省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室
广东省微生物研究所,广州 510070;²江西农业大学生物科学与工程学院,南昌 330045

摘要:采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备 HPLC 等方法从海洋真菌菌核青霉 *Penicillium sclerotiorum* FS50 中分离纯化了 9 个化学成分,通过化合物波谱学数据及理化性质确定它们的结构分别为 penilazaphilone B(1)、sclerotioramine(2)、紫檀醇(3)、亚油酸甘油酯(4)、($3\beta,5\alpha,6\beta,22E$)-6-methoxyergosta-7,22-diene-3,5-diol(5)、啤酒甾醇(6)、对羟基苯乙酮(7)、酪醇(8)、邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(9)。其中化合物 3 为首次从青霉属中分离得到,化合物 2,4,5,6,8,9 为首次从菌核青霉中分离得到。

关键词:海洋真菌;菌核青霉;化学成分;结构鉴定

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

Chemical Constituents of Marine Fungus *Penicillium sclerotiorum* FS50

TAO Mei-hua¹, LI Le-jun², CHEN Yu-chan¹, HUO Guang-hua², ZHANG Wei-min^{1*}

¹State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China;²College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: Nine chemical constituents were separated and purified from marine-derived fungus *Penicillium sclerotiorum* FS50 by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and semi-preparative HPLC. On the basis of spectral data and physicochemical properties, their structures were determined as penilazaphilone B (1), sclerotioramine (2), pterocarpol (3), glycerol monolinoleate (4), ($3\beta,5\alpha,6\beta,22E$)-6-methoxyergosta-7,22-diene-3,5-diol (5), cerevisterol (6), 4-hydroxyacetophenone (7), tyrosol (8) and di-(2-ethyl)-hexylphthalate (9). Compound 3 was isolated from the genus *Penicillium* for the first time, compounds 2,4,5,6,8,9 were isolated from the species for the first time.

Key words: marine fungus; *Penicillium sclerotiorum*; chemical constituent; structural identification

海洋微生物长期生活在海洋环境中,具有应对高盐、弱碱性、低营养、缺氧等恶劣环境的能力,在其生长过程中能够产生有别于陆生微生物的次级代谢产物,其中海洋真菌因其生长速度快、易于培养、可通过大规模发酵实现工业化生产等优势受到人们的广泛关注。海洋真菌的次生代谢产物结构类型多样,主要包括聚酮类、萜类、甾体、生物碱、肽类及其它含氮化合物等^[1],其中不乏活性显著、结构新颖的化合物^[2]。海洋真菌已成为继海洋放线菌之后的又一研究热点。

为了从海洋真菌中寻找结构新颖的活性代谢产

物,本课题组对分离自南海沉积物的海洋真菌进行了抗肿瘤、抗菌活性筛选,发现菌核青霉 *Penicillium sclerotiorum* FS50 对肿瘤细胞 MCF-7 的抑制率为 97.6%,对金黄色葡萄球菌的抑制率为 72.8%^[3]。本研究在此基础上对菌株 FS50 的次级代谢产物进行深入研究,从该菌株的液体发酵产物中共分离得到 9 个化合物,分别鉴定为 penilazaphilone B(1)、sclerotioramine(2)、紫檀醇(3)、亚油酸甘油酯(4)、($3\beta,5\alpha,6\beta,22E$)-6-methoxyergosta-7,22-diene-3,5-diol(5)、啤酒甾醇(6)、对羟基苯乙酮(7)、酪醇(8)、邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(9)(图 1)。其中化合物 3 为首次从青霉属中分离得到,化合物 2,4,5,6,8,9 为首次从菌核青霉中分离得到。化合物 3 同时存在于发酵液及菌丝体中,化合物 1,7 为从发酵液中获得,化合物 2,4,5,6,8,9 为从菌丝体中获得。

收稿日期:2014-01-13 接受日期:2014-05-13

基金项目:国家自然科学基金项目(31272087);广东省科技计划项目(2011B031200003);广东省自然科学基金项目(S2013010014557);广州市科技计划项目(2013J4100067)

* 通讯作者 E-mail:wmzhang58@qq.com

1 仪器与试剂

AVANCE III 型 500 MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司; PZ1000B 旋转式大容量普通摇床, 武汉瑞华仪器设备有限公司; RE-2000 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 超净工作台, 上海恒益科技有限公司; LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; 柱层析硅胶(100~200 目、200~300 目), 青岛海洋化工厂; 高效薄层硅胶板 Silica gel 60 F₂₅₄, Merck 公司; C₁₈ 反相硅胶(40~75 μm), Fuji Silysia Chemical Ltd.; 凝胶 Sephadex LH-20(18~110 μm), Amersham Biosciences; 溶剂及试剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

2 菌种与发酵培养

菌株 FS50 于 2009 年 12 月分离自南海(21°30'.736'N, 116°54.842'E)336 米深处的沉积物, 经鉴定为菌核青霉(*Penicillium sclerotiorum*)^[3]。发酵培养基为马铃薯葡萄糖(PD)液体培养基: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgSO₄ 1.5 g/L, 海盐 15 g/L, 维生素 B₁ 10 mg/L, pH 自然。用接种针挑取适量活化好的菌体接种到装有 250 mL PD 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中, 在 28 °C、130 rpm 条件下摇床培养 3 d, 获得种子液。将种子液按照 5% 的接种量接种到装有 250 mL PD 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中, 培养条件与种子液相同, 培养时间为 7 d, 共发酵 100 L。

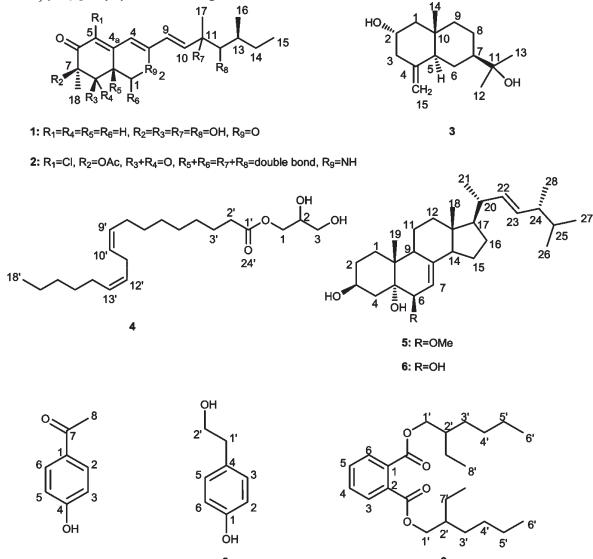


图 1 化合物 1~9 的结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1~9

3 提取与分离

发酵产物经过滤得发酵液和菌丝体, 发酵液用乙酸乙酯按 1:1 比例萃取 4 次, 40 °C 下减压浓缩得浸膏 28 g; 菌丝体置于 50 °C 烘箱中烘干后粉碎, 甲醇浸泡并用超声波破碎细胞壁, 共浸提 4 次, 收集甲醇提取液浓缩至无醇味, 加适量水悬浮, 再用乙酸乙酯萃取 5 次, 40 °C 减压浓缩得浸膏 98 g。发酵液提取物浸膏过正相硅胶柱, 以石油醚/乙酸乙酯(50:1→1:2)及氯仿/甲醇(15:1→1:1)梯度洗脱, 得到组分 F-A~F-C。石油醚/乙酸乙酯(5:1)洗脱得到的 F-B 组分经凝胶柱二氯甲烷/甲醇(1:1)洗脱得到组分 F-B-1, 再经半制备 HPLC 甲醇/水(50:50→70:30)梯度洗脱, 分别得到化合物 7(15.5 mg) 和 3(2.3 mg)。氯仿/甲醇(10:1)洗脱下来的组分 F-C 用甲醇/水(70:30)洗脱得到化合物 1(17.3 mg)。菌丝体提取物浸膏过正相硅胶柱得到 6 个组分 J-A~J-F。石油醚/乙酸乙酯(8:1)洗脱得到组分 J-A 经凝胶柱二氯甲烷/甲醇(1:1)洗脱得到化合物 3(30.0 mg)。石油醚/乙酸乙酯(3:1)洗脱得到组分 J-B 以甲醇/水(50:50)为洗脱剂经 C₁₈ 反相柱洗脱得到组分 J-B-3, 再以二氯甲烷/甲醇(1:1)为洗脱剂的凝胶柱纯化得到油状无色化合物 4(11.3 mg)。石油醚/乙酸乙酯(3:1)洗脱得到的组分 J-C 以二氯甲烷/甲醇(1:1)为洗脱剂经凝胶柱得到组分 J-C-1, 组分 J-C-1 再经石油醚/乙酸乙酯(3:1→1:1)正相柱梯度洗脱得到组分 J-C-1-1 和白色粉末状化合物 8(43.3 mg), 组分 J-C-1-1 再经甲醇/水溶液(80:20)过 C₁₈ 反相柱得到油状化合物 9(35.4 mg)。石油醚/乙酸乙酯(1:1)洗脱下来的组分 J-D 以半制备 HPLC 甲醇/水溶液(50:50)洗脱得到无色晶状化合物 5(15.6 mg)。氯仿/甲醇(15:1)洗脱得到的组分 J-E 和 J-F 分别经凝胶柱二氯甲烷/甲醇(1:1)纯化得到白色粉末状化合物 6(10.0 mg)和红色粉末状化合物 2(34.3 mg)。

4 结构鉴定

化合物 1 黄色粉末状物质 ESI-MS *m/z*: 353 [M + H]⁺, 351 [M-H]⁻, 分子式为 C₁₉H₂₈O₆; ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ: 4.77 (1H, dd, *J* = 10.7, 5.4 Hz, H_a-1), 3.78 (1H, dd, *J* = 13.5, 10.7 Hz, H_b-1), 5.75 (1H, s, H-4), 5.69 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 3.06 (1H, m, H_a-8), 3.39 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H_b-8), 6.19 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-9), 6.67 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-10), 3.41 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-

12), 1.71 (1H, m, H-13), 1.43 (1H, m, H_a-14), 1.29 (1H, m, H_b-14), 0.91 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-15), 0.87 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-16), 1.32 (3H, s, H-17), 1.38 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ : 69.6 (C-1), 161.8 (C-3), 104.5 (C-4), 154.1 (C-4_a), 116.4 (C-5), 198.9 (C-6), 75.2 (C-7), 75.4 (C-8), 36.8 (C-8_a), 122.1 (C-9), 143.1 (C-10), 76.2 (C-11), 80.4 (C-12), 35.8 (C-13), 29.5 (C-14), 11.7 (C-15), 13.8 (C-16), 25.8 (C-17), 19.0 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 故鉴定化合物**1**为penicilazaphilone B。

化合物2 红色粉末状物质 EI-MS *m/z*: 389 [M]⁺, 分子式为 C₂₁H₂₄ClNO₄; ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ : 8.16 (1H, s, H-1), 7.17 (1H, s, H-4), 6.86 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-9), 7.03 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-10), 5.73 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, H-12), 2.53 (1H, m, H-13), 1.46 (1H, m, H_a-14), 1.34 (1H, m, H_b-14), 0.90 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-15), 1.03 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-16), 1.92 (3H, s, H-17), 1.52 (3H, s, H-18), 2.14 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ : 145.1 (C-1), 152.9 (C-3), 111.5 (C-4), 148.0 (C-4_a), 100.7 (C-5), 184.8 (C-6), 85.8 (C-7), 194.9 (C-8), 115.7 (C-8_a), 118.3 (C-9), 145.7 (C-10), 133.8 (C-11), 147.7 (C-12), 35.7 (C-13), 30.7 (C-14), 11.9 (C-15), 19.8 (C-16), 12.4 (C-17), 23.4 (C-18), 171.3 (C-19), 20.2 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物**2**为sclerotioramine。

化合物3 白色粉末状物质 ESI-MS *m/z*: 238 [M]⁺, 261 [M + Na]⁺, 分子式为 C₁₅H₂₆O₂; ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ : 3.78 (1H, m, H-2), 1.96 (1H, t, *J* = 11.7 Hz, H-5), 1.17 (3H, s, H-12), 1.17 (3H, s, H-13), 0.71 (3H, s, H-14), 4.82 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H_a-15), 4.57 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H_b-15); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ : 51.2 (C-1), 68.0 (C-2), 46.7 (C-3), 149.2 (C-4), 50.0 (C-5), 41.5 (C-6), 49.9 (C-7), 25.3 (C-8), 22.6 (C-9), 35.5 (C-10), 72.8 (C-11), 26.8 (C-12), 26.3 (C-13), 17.0 (C-14), 107.6 (C-15)。以上数据与文献报道的基本一致^[6], 故鉴定化合物**3**为紫檀醇。

化合物4 无色油状物质 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 4.21 (1H, dd, *J* = 4.6, 11.6 Hz, H_a-1), 4.16 (1H, dd, *J* = 6.2, 11.6 Hz, H_b-1), 3.94 (1H, m, H-2), 3.70 (1H, m, H_a-3), 3.61 (1H, m, H_b-3), 2.36 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2'), 1.63 (2H, m, H-3'),

5.36 (4H, m, H-9', H-10', H-12', H-13'), 2.78 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-11'); 2.06 (4H, m, H-8', H-14'); 0.90 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, H-18'); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 66.0, 64.2 (C-1, C-3), 71.1 (C-2), 35.0, 32.4, 30.4, 30.2, 30.0, 29.9, 28.1, 28.0, 26.5, 25.8, 23.4 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-8', C-11', C-14', C-15', C-16', C-17'), 131.1, 130.9, 128.9, 128.8 (C-9', C-10', C-12', C-13'), 14.9 (C-18'), 175.2 (C = O)。以上数据与文献报道的基本一致^[7], 故鉴定化合物**4**为亚油酸甘油酯。

化合物5 白色粉末状物质 EI-MS *m/z*: 444 [M]⁺, 分子式为 C₂₉H₄₈O₃; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.56 (4H, br m, H-1, H-11), 1.87 (4H, br m, H_a-2, H-9, H-14, H-24), 1.47 (4H, br m, H_b-2, H-15, H-25), 4.06 (1H, m, H-3), 2.14 (1H, m, H_a-4), 1.76 (2H, br m, H_b-4, H_a-16), 3.18 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, H-6), 5.41 (1H, m, H-7), 2.04 (2H, br m, H_a-12, H-20), 1.30 (3H, m, H_b-12, H_b-16, H-17), 0.61 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 5.17 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.7 Hz, H-22), 5.20 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.7 Hz, H-23), 0.84 (6H, d, *J* = 6.4 Hz, H-26, H-27), 0.93 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 3.40 (3H, s, -OCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 33.6 (C-1), 31.8 (C-2), 68.7 (C-3), 40.5 (C-4), 77.2 (C-5), 83.3 (C-6), 115.8 (C-7), 144.5 (C-8), 44.7 (C-9), 38.1 (C-10), 23.0 (C-11), 40.2 (C-12), 44.7 (C-13), 55.8 (C-14), 23.7 (C-15), 28.8 (C-16), 56.8 (C-17), 13.2 (C-18), 19.2 (C-19), 41.3 (C-20), 22.0 (C-21), 136.3 (C-22), 133.0 (C-23), 43.7 (C-24), 33.9 (C-25), 20.8 (C-26), 20.5 (C-27), 18.5 (C-28), 59.2 (OCH₃-6)。以上数据与文献报道的一致^[8], 故鉴定化合物**5**为(3 β , 5 α , 6 β , 22E)-6-methoxyergosta-7, 22-diene-3, 5-diol。

化合物6 白色粉末状物质 TLC 分析显示该化合物具有甾醇类化合物的特征斑点, 与实验室啤酒甾醇标准品进行 TLC 分析, 采用二氯甲烷: 甲醇、石油醚: 乙酸乙酯、甲醇: 水 3 种不同的展开体系展板, 其 R_f 值均一致, 混合点不分离, 故确定为啤酒甾醇。

化合物7 白色粉末状物质 ESI-MS *m/z*: 135 [M-H]⁻, 137 [M + H]⁺, 分子式为 C₈H₈O₂; ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ : 7.88 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2, H-6), 6.84 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3, H-5), 2.52 (3H, s, H-8); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ : 129.6 (C-1), 131.6 (C-2, C-6), 115.7 (C-3, C-5), 163.5

(C-4), 199.1 (C-7), 25.7 (C-8)。以上数据与文献报道的基本一致^[9], 故鉴定化合物7为对羟基苯乙酮。

化合物8 白色粉末状物 ESI-MS m/z :137 [M-H]⁺, 分子式为 $C_8H_{10}O_2$ 。¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ : 6.72 (2H, m, H-2, H-6), 7.03 (2H, m, H-3, H-5), 2.72 (2H, t, J =7.2 Hz, H-1'), 3.69 (2H, t, J =7.2 Hz, H-2'); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ : 156.2 (C-1), 115.6 (C-2, C-6), 130.4 (C-3, C-5), 130.5 (C-4), 38.9 (C-1'), 64.1 (C-2')。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物8为酪醇。

化合物9 无色油状物质 ESI-MS m/z :391 [M + H]⁺, 分子式为 $C_{24}H_{38}O_4$ 。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.71 (2H, dd, J =5.7, 3.3 Hz, H-3, H-6), 7.54 (2H, dd, J =5.7, 3.3 Hz, H-4, H-5), 4.23 (4H, m, H-1'), 1.69 (2H, m, H-2'); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 133.3 (C-1, C-2), 131.7 (C-3, C-6), 129.7 (C-4, C-5), 69.0 (C-1'), 31.2 (C-2'), 39.6 (C-3'), 29.8 (C-4'), 23.8 (C-5'), 14.9 (C-6'), 24.6 (C-7'), 11.8 (C-8'), 168.6 (-COO-)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物9为邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯。

5 讨论

从菌核青霉 FS50 的发酵产物中共分离鉴定出9个化合物。化合物3为首次从青霉属中分离得到, 化合物2、4、5、6、8、9为首次从菌核青霉中分离得到。化合物1和2为嗜氮酮类化合物, 这类化合物具有广泛的生物活性, 包括抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗氧化、细胞毒、杀线虫和抗炎等^[12]。化合物3为倍半萜类化合物, 具有抗肿瘤作用, 在25 μg/mL时对MCF-7、SF-268、NCI-H460、HCT-116和AGS肿瘤细胞株有抑制作用^[13], 此外还有抗真菌, 昆虫拒食活性^[14,15]。化合物5和6为甾醇类化合物, 文献报道化合物5对细胞株A549、SK-OV-3、SK-MEL-2、XF498和HCT15具有较好的细胞毒活性^[16]。

参考文献

- Saleem M, Ali MS, Hussain S, et al. Marine natural products of fungal origin. *Nat Prod Rep*, 2007, 24: 1142-1152.
- Bugni TS, Ireland CM. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep*, 2004, 21: 143-163.
- Zhang L(张玲), Zhang QB(张庆波), Chen YC(陈玉婵), et al. Preliminary identification of 18 marine fungal strains from the South China Sea and screening of their fermentation products for cytotoxic and antibacterial activities. *J Trop Oceanogr*(热带海洋学报), 2013, 32: 49-53.
- Arunpanichlert J, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, et al. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58: 1033-1036.
- Wang X, SenaFilho JG, Hoover AR, et al. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *Nat Prod Rep*, 2010, 73: 942-948.
- Nasini G, Piozzi F. Pterocarpanoids triterpenes from *Daemonorops draco*. *Phytochemistry*, 1981, 20: 514-516.
- Okuyama E, Hasegawa T, Matsushita T, et al. Analgesic components of *Saposhnikovia* root (*Saposhnikovia divaricata*). *Chem Pharm Bull*, 2001, 49: 154-160.
- Gao H, Hong K, Zhang X, et al. New steryl esters of fatty acids from the mangrove fungus *Aspergillus awamori*. *Helv Chim Acta*, 2007, 90: 1165-1178.
- Ding HY, Lin HC, Teng CM, et al. Phytochemical and pharmacological studies on Chinese *Paeonia* species. *J Chin Chem Soc*, 2000, 47: 381-388.
- Capasso R, Cristinzio G, Evidente A, et al. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry*, 1992, 31: 4125-4128.
- Rao GN, Kumar PM, Dhandapani VS, et al. Constituents of *Cassia auriculata*. *Fitoterapia*, 2000, 71: 82-83.
- Osmanova N, Schultze W, Ayoub N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochem Rev*, 2010, 9, 315-342.
- Liu YB, Mulabagal V, Forbes CSB, et al. Inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzyme and human tumor cell proliferation by compounds in herbal water. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53: 1177-1186.
- Morimoto M, Fukumoto H, Hiratani M, et al. Insect antifeedants, pterocarpans and pterocarpol, in heartwood of *Pterocarpus macrocarpus* Kruz. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70: 1864-1868.
- Kusuma IW, Azuma M, Darma T, et al. Isolation and identification of antifungal compounds from amboyna wood. *Holzforschung*, 2005, 59: 170-172.
- Kwon HC, Zee SD, Cho SY, et al. Cytotoxic ergosterols from *Paecilomyces* sp. J300. *Arch Pharm Res*, 2002, 25: 851-855.