

杜仲内生青霉菌 GZWMJZ-068 次生代谢产物研究

龚倩玉^{1,4}, 许言超^{1,4}, 左明星^{1,2}, 饶青^{1,2}, 周彦伶^{1,4}, 朱伟明^{1,3}, 林昌虎^{1,4*}, 王立平^{1,2*}¹省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室 贵州医科大学; ²贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室 贵阳 550014;³中国海洋大学医药学院, 青岛 266003; ⁴贵州医科大学药学院, 贵阳 550025

摘要:为获得活性微生物代谢产物,从贵阳杜仲的叶片中分离得到内生真菌 GZWMJZ-068,发酵产物用乙酸乙酯提取,经硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和半制备高效液相色谱等进行分离纯化,得到 15 个单体化合物。运用核磁、质谱和比旋光度等方法鉴定了 15 个化合物的结构,即 isochromophilones IV (**1**)、epi-isochromophilone III (**2**)、(2*R*,3*S*)-1-(4-羟基苯基)-2,3-丁二醇 (**3**)、(2*S*,3*S*)-1-(4-羟基苯基)-2,3-丁二醇 (**4**)、6-[1-羟基-(1*S*)-戊基]-4-甲氧基-(6*S*)-2*H*,5*H*-2-吡喃酮 (**5**)、6-(1-羟戊基)-4-甲氧基-2-酮 (**6**)、quinolactacins A1 (**7a**)、quinolactacins A2 (**7b**)、dihydrocitronone (**8**)、dihydrocitronin (**9**)、原儿茶酸 (**10**)、儿茶酸 (**11**)、5-甲基尿嘧啶 (**12**)、尿嘧啶 (**13**)、citral A (**14**)。对 15 个化合物进行了抑菌活性评价,化合物 **1** 和 **2** 对光滑念珠菌和金黄色葡萄球菌具有中等的抑制作用(MIC₁₆₋₃₂ μg/mL)。

关键词:杜仲;内生真菌;代谢产物;抑菌活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.10.010

Secondary Metabolites of Endophytic *Penicillium mallochii* GZWMJZ-068 from *Eucommia ulmoides*

GONG Qian-yu^{1,4}, XU Yan-chao^{1,4}, ZUO Ming-xing^{1,2}, RAO Qing^{1,2}, ZHOU Yan-ling^{1,4},
ZHU Wei-ming^{1,3}, LIN Chang-hu^{1,4*}, WANG Li-ping^{1,2*}¹State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University;²Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy ofSciences, Guiyang 550014, China; ³School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China,Qingdao 266003, China; ⁴Department of Pharmacology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Abstract: In order to investigate bioactive metabolites from endophytic fungi, a fungal GZWMJZ-068 was isolated and identified as *Penicillium mallochii* from the leaf of *Eucommia ulmoides* in Guiyang Guizhou, China. The extract of the fermentation was purified by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC. The structures were identified by means of NMR, MS and ORD. As a result, 15 compounds, isochromophilones IV (**1**)、epi-isochromophilone III (**2**)、(2*R*,3*S*)-1-(4-Hydroxyphenyl)-butane-2,3-diol (**3**)、(2*S*,3*S*)-1-(4-Hydroxyphenyl)butane-2,3-diol (**4**)、6-[1-Hydroxy-(1*S*)-pentyl]-4-methoxy-(6*S*)-2*H*,5*H*-2-pyranone (**5**)、6-(1-hydroxypentyl)-4-methoxy-pyran-2-one (**6**)、quinolactacins A1 (**7a**)、quinolactacins A2 (**7b**)、dihydrocitronone (**8**)、dihydrocitronin (**9**)、protocatechuic acid (**10**)、pyrocatechuic acid (**11**)、5-Methyluracil (**12**)、uracil (**13**)、citral A (**14**)。The antibacterial activities of 1-14 against 9 pathogenic microorganisms were tested by two-fold dilution method. Compounds **1** and **2** were active against *Staphylococcus aureus* and *Candida glabrata* with the minimum inhibitory concentration (MIC) values from 16 μg/mL to 32 μg/mL, respectively.

Key words: *Eucommia ulmoides*; endophytic fungi; secondary metabolites; antibacterial activities

植物内生菌是其生活史或生活史中的某一个或

几个时期寄生在植物组织内,但对植物组织没有明显伤害的微生物。在长期的协同进化过程中,内生菌与宿主植物之间逐渐形成了一种互惠互利的关系,国内外的研究陆续发现内生真菌是一类筛选新药的重要微生物资源^[1]。杜仲(*Eucommia ulmoides*

收稿日期:2018-01-26 接受日期:2018-04-25

基金项目:贵州省“百人领军人才”计划;黔科合院士站([2015]4009号);黔科合体(Z字[2014]4007号)

*通信作者 Tel:86-851-83809439; E-mail:lipingw2006@163.com, linchanghu79@sina.com

Oliv) 是我国特有的经济树种,是仅存于我国的第三纪子遗植物,起源古老,且为单属、单种,国家二类保护植物。药理研究表明杜仲的次生代谢产物如绿原酸、桃叶珊瑚甙、京尼平甙等具有抗菌、抗肿瘤等活性^[2]。目前,杜仲内生真菌的研究重点集中在两个方面,一是分离筛选能够代谢产生杜仲活性成分绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷等的菌株^[3,4];另一方面是研究内生真菌的抗菌活性。杨秀芳等人从陕西杜仲中分离得到一株青霉菌 EL09,从其发酵产物中分离得到一个对黄瓜枯萎病菌有抑制作用的 5-Hydroxymethylfuran-3-carboxylic acid^[5]。Hongchi Zhang 等人从陕西杜仲中分离得到一株内生曲霉菌 ER15,从其发酵产物中分离到两个有较强抑菌活性的 5-Hydroxymethylfuran-3-carboxylic acid 和 5-Methoxymethylfuran-3-carboxylic acid^[6]。Yang-Min Ma 等人从一株杜仲内生镰刀霉菌中分离到两个有较强抑菌活性的 Fumitremorgin B-C^[7]。这些研究表明杜仲内生菌具有代谢产生抗菌物质的潜力。我们从贵阳药用植物园的杜仲样品中分离得到一株内生青霉菌 GZWMJZ-068,其代谢提取物具有抗菌活性,对其进行了规模发酵、次生代谢产物的分离鉴定,共得到 15 个化合物,活性评价发现 2 个 Azaphilones 类化合物具有一定的抗菌活性,对光滑念珠菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 在 16 ~ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1 仪器、材料与方法

1.1 实验材料

内生真菌 GZWMJZ-068 从杜仲的叶中分离得到,杜仲采自贵州省贵阳市药用植物园。该菌株现在保藏于贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室。抑菌活性实验所用的 9 种致病菌为:大肠埃希菌 *Escherichia coli* (ATCC11775)、产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC10145)、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC6538)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC43300)、白色念珠菌 *Candida albicans* (ATCC10231)、光滑念珠菌 *Candida glabrata* (ATCC2001)。

1.2 仪器与试剂

核磁共振仪为 INOVA-400MHz 超导核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司,TMS 为内标物);质谱仪

(美国 Thermo Finnigan 公司,Waters 2695 LCQ-MS);分析用高效液相色谱仪(日本日立公司,Primaide);制备用高效液相色谱仪(日本日立公司,Primaide);自动旋光仪(美国鲁道夫公司,AUTOPOL1);柱层析及薄层层析用硅胶 H(青岛海洋化工集团公司,10 ~ 40 μm);葡聚糖凝胶(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB ,Sephadex LH-20);层析柱(北京欣维尔玻璃仪器公司);电子分析天平(上海天平仪器厂,FA1104 型);三用紫外线分析仪(上海嘉鹏科技有限公司,ZF-6 型);洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,Air Tech)、高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂,LDZX-75KBS)、恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司,ZWY-2112B)。提取分离用甲醇、乙酸乙酯、石油醚、二氯甲烷等均均为工业用化学纯产品,液相色谱甲醇为色谱纯(天津市四友精细化学制品有限公司)。

1.3 菌株分子鉴定

对菌株的 ITS 序列进行测序,利用 Blast 软件从 Genbank 数据库中搜索相似菌属的 ITS 基因序列,用 MEGA 6 软件 Clustal X 方法进行系统发育分析,采用邻接法对内生真菌构建系统发育树。

1.4 真菌发酵

将保藏于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的菌株接到 PDA 固体培养基(葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g,马铃薯浸提液 1 000 mL)平板上,在恒温培养箱,28 摄氏度下培养 3 天。然后从平板上挑取单菌落接种到装有 150 mL 真菌二号培养基(麦芽糖 20 g,味精 10 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g,葡萄糖 10 g,酵母膏 3 g,玉米浆 1 g,甘露醇 20 g,自来水 1 000 mL)的 500 mL 锥形瓶中,在 28 摄氏度的恒温震荡培养器中(180 rpm)培养 4 天。然后超声破碎,使得菌体在溶液中均匀分散,作为种子液使用。后将种子液分别接种到大米固体培养基(100 g 大米,150 mL 水,1 000 mL 锥形瓶),发酵量为 10 kg,28 摄氏度下静置发酵 30 天。

1.5 化合物的提取分离

发酵结束后,在每瓶大米培养基中加入少量的乙酸乙酯,将菌株灭活。然后用 3 倍体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液并浓缩,得发酵提取物 219.65 g。将提取物通过正相硅胶柱,用 V(CH_2Cl_2):V(MeOH) [100:1,50:1,20:1,10:1,5:1,2:1,1:1] 梯度洗脱,得到 13 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 13)。Fr. 2(2.26 g)通过 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析[V(CH_2Cl_2):V(MeOH) = 1:1] 洗脱,得到

5 个组分(Fr. 2-1 ~ Fr. 2-5)。Fr. 2-5 通过反相硅胶柱,用 V(MeOH):V(H₂O) [20:80,40:60,60:40,80:20,100:0] 梯度洗脱,得到 5 个组分(Fr. 2-5-1 ~ Fr. 2-5-5)。Fr. 2-5-1 经 HPLC(ODS-C₁₈ 柱,检测波长 210 nm,V(MeOH):V(H₂O) = 80:20,4 mL/min) 得到化合物 **1** ($t_R = 22.0$ min,12.8 mg) 和化合物 **2** ($t_R = 16.0$ min,7.3 mg)。Fr. 2-5-2 经 HPLC(ODS-C₁₈ 柱,检测波长 210 nm,V(MeOH):V(H₂O) = 55:45,4 mL/min) 得到化合物 **5** ($t_R = 8.5$ min,7.9 mg) 和化合物 **6** ($t_R = 9.5$ min,11.4 mg)。Fr. 2-5-5 经 HPLC(ODS-C₁₈ 柱,检测波长 210 nm,V(MeOH):V(H₂O) = 60:40,4 mL/min) 得到化合物 **14** ($t_R = 10.5$ min,10.5 mg)。Fr. 8 (10.85 g) 通过 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析[V(CH₂Cl₂):V(MeOH) = 1:1] 洗脱,得到 7 个组分(Fr. 8-1 ~ Fr. 8-7)。Fr. 8-6 析出结晶,得到化合物 **12** (68.6 mg)。Fr. 8-3 经 HPLC(ODS-C₁₈ 柱,检测波长 210 nm,V(MeOH):V(H₂O) = 25:75,4 mL/min) 得到化合物 **3** ($t_R = 10.5$ min,17.2 mg) 和化合物 **4** ($t_R = 13$ min,30.6 mg)。Fr. 8-7 经 HPLC(ODS-C₁₈ 柱,检测波长 210 nm,V(甲醇):V(1.5%三氟乙酸水溶液) = 25:75,4 mL/min) 得到化合物 **13** ($t_R = 3.0$ min,12.6 mg)、化合物 **10** ($t_R = 7.0$ min,89.2 mg) 和化合物 **11** ($t_R = 24.0$ min,20.1 mg)。Fr. 11 (2.40 g) 通过 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析[V(CH₂Cl₂):V(MeOH) = 1:1] 洗脱,得到 6 个组分(Fr. 11-1 ~ Fr. 11-6)。Fr. 11-4 经 HPLC(ODS-C₁₈ 柱,检测波长 210 nm,V(MeOH):V(H₂O) = 50:50,4 mL/min) 得到化合物 **7a** 和化合物 **7b** ($t_R = 4.0$ min,40.2 mg) (化合物 **7a** 和化合物 **7b** 为混合物)。Fr. 12 (2.55 g) 通过 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析[V(CH₂Cl₂):V(MeOH) = 1:1] 洗脱,得到 4 个组分(Fr. 12-1 ~ Fr. 12-4)。Fr. 12-2 经 HPLC(ODS-C₁₈ 柱,检测波长 210 nm,V(MeOH):V(H₂O) = 40:60,4 mL/min) 得到化合物 **9** ($t_R = 7.0$ min,218.4 mg)。Fr. 12-3 通过反相硅胶柱,用 V(MeOH):V(H₂O) [20:80,40:60,60:40,80:20,100:0] 梯度洗脱,得到 2 个组分(Fr. 12-3-1 ~ Fr. 12-3-12)。Fr. 12-3-2 经 HPLC(ODS-C₁₈ 柱,检测波长 210 nm,V(MeOH):V(H₂O) = 40:60,4 mL/min) 得到化合物 **8** ($t_R = 6.0$ min,17.5 mg)。

1.6 抑菌活性测试

使用微量肉汤稀释法对化合物的抑菌活性进行

评价,获得待测菌的最小抑菌浓度(MIC)。将待测样品溶液配制成 10 mg/mL 的溶液(1 mg 化合物溶解于 100 μ L 二甲基亚砷中),置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。无菌 96 孔板的第 1 列加入 197.44 μ L 灭菌的 MH 肉汤,第 2 ~ 12 列加入 100 μ L,第 1 列加入 2.56 μ L 待测化合物,依次倍比稀释至 11 列,第 11 列不加菌作为阴性对照,第 12 列不加药作为空白对照。采用直接菌落悬液制备标准接种物,得到 0.5 麦氏的菌悬液,此时菌量约为 $1 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL,经 MH 肉汤按 1:1 000 稀释后,取 100 μ L 加入上述制备好的无菌 96 孔板的第 1 ~ 10 列及第 12 列。此时,第 1 ~ 10 孔药物浓度分别为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ g/mL。置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 18 ~ 22 h 观察结果,以在小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。

2 实验结果

2.1 菌株鉴定

测序结果显示,GZWMJZ-068 的 ITS 序列长度为 556bp (GenBank accession NO. KY038607),通过 Blast 比对,GZWMJZ-068 的 ITS 序列和 *Penicillium mallochii* 的同源性为 99%。通过系统发育树的构建,见图 1,菌株 GZWMJZ-068 与 *Penicillium mallochii* (Accession No. KX421469.1) 聚在一支,菌株 GZWMJZ-068 初步鉴定为 *Penicillium mallochii* (青霉菌)。

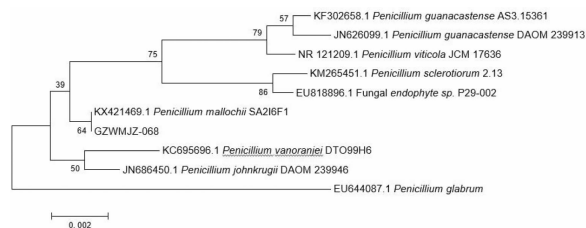


图 1 基于 ITS 序列的菌株 GZWMJZ-068 系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of GZWMJZ-068 generated by ITS sequences analyses

2.2 结构鉴定

化合物 **1** 黄色固体; $[\alpha]_D^{20} - 269.2$ (c 1.04, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.98 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-10), 6.14 (1H, s, H-4), 6.00 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-9), 5.62 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-12), 5.01 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-8), 4.38 (1H, dd, $J = 4.9, 10.8$ Hz, H-1 β), 3.83 (1H, dd, $J = 10.8,$

13.9 Hz, H-1 α), 3.50 (1H, m, H-8a), 2.47 (1H, m, H-13), 2.25 (3H, s, 8-Ac), 1.84 (3H, s, H-17), 1.44 (3H, s, 7-Me), 1.28-1.35 (2H, m, H-14), 1.01 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-16), 0.86 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 187.3 (C-6), 170.5 (8-COCH₃), 163.4 (C-3), 147.3 (C-12), 145.8 (C-4a), 142.0 (C-10), 132.2 (C-11), 118.9 (C-9), 118.5 (C-5), 101.6 (C-4), 74.8 (C-7), 73.2 (C-8), 67.7 (C-1), 35.6 (C-8a), 35.0 (C-13), 30.1 (C-14), 20.7 (C-7-Me), 20.5 (8-COCH₃), 20.3 (C-16), 12.4 (C-17), 12.0 (C-15); ESI-MS: m/z 417.4 [M + Na]⁺. 以上数据与文献^[8]对照基本一致, 确定化合物结构为 Isochromophilones IV。

化合物 2 黄色固体; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 193.5$ (c 0.31, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.01 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-10), 6.08 (1H, s, H-4), 6.00 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-9), 5.60 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-12), 4.50 (1H, dd, $J = 4.8, 12.7$ Hz, H-1 β), 4.26 (1H, dd, $J = 10.2, 12.7$ Hz, H-1 α), 4.12 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-8), 3.07 (1H, m, H-8a), 2.47 (1H, m, H-13), 1.80 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, H-17), 1.39 ~ 1.44 (1H, m, H-14 β), 1.37 (3H, s, H-18), 1.24-1.32 (1H, m, H-14 α), 0.98 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-16), 0.84 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 192.8 (C-6), 162.9 (C-3), 147.2 (C-12), 145.6 (C-4a), 141.9 (C-10), 132.2 (C-11), 118.9 (C-9), 115.3 (C-5), 102.2 (C-4), 77.3 (C-7), 73.6 (C-8), 68.2 (C-1), 36.9 (C-8a), 34.9 (C-13), 30.1 (C-14), 23.4 (C-18), 20.3 (C-16), 12.4 (C-17), 11.9 (C-15); ESI-MS: m/z 375.4 [M + Na]⁺. 以上数据与文献^[9]对照基本一致, 确定化合物结构为 Epi-isochromophilone III。

化合物 3 淡黄色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 14.0$ (c 1.71, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.07 (1H, s, 4'-OH), 6.98 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', H-6'), 6.63 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', H-5'), 4.43 (1H, s, 3-OH), 4.32 (1H, s, 2-OH), 3.37 (1H, m, H-3), 3.32 (1H, m, H-2), 2.72 (1H, dd, $J = 14.0, 3.8$ Hz, H-1 α), 2.37 (1H, m, H-1 β), 1.05 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 155.2 (C-4'), 130.2 (C-1'), 130.1 (C-2', C-6'), 114.7 (C-3', C-5), 76.2 (C-2), 69.3 (C-3), 38.4

(C-1), 19.0 (C-4); ESI-MS: m/z 181.1 [M-H]⁻. 以上数据与文献^[10]对照基本一致, 确定化合物结构为 (2*R*,3*S*)-1-(4-Hydroxyphenyl)butane-2,3-diol。

化合物 4 淡黄色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 19.8$ (c 3.63, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.08 (1H, s, 4'-OH), 7.00 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.64 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5'), 4.36 (1H, brs, 3-OH), 4.30 (1H, brs, 2-OH), 3.46 (1H, s, H-3), 3.33 (1H, s, H-2), 2.65 (1H, dd, $J = 13.7, 4.1$ Hz, H-1 α), 2.39 (1H, dd, $J = 13.7, 8.4$ Hz, H-1 β), 1.02 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 155.7 (C-4'), 130.7 (C-1'), 130.6 (C-2', C-6'), 115.2 (C-3', C-5'), 76.2 (C-2), 68.9 (C-3), 38.0 (C-1), 19.3 (C-4); ESI-MS: m/z 181.1 [M-H]⁻. 以上数据与文献^[10]对照基本一致, 确定化合物结构为 (2*S*,3*S*)-1-(4-Hydroxyphenyl)butane-2,3-diol。

化合物 5 棕色固体; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 80$ (c 0.35, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.12 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3), 4.88 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, 1'-OH), 4.23 (1H, m, H-6), 3.79 (3H, s, 4-OCH₃), 3.45 (1H, m, H-1'), 2.69 (1H, m, H-5 α), 2.24 (1H, d, $J = 3.8, 16.9$ Hz, H-5 β), 1.25-1.44 (6H, m, H-2', H-3', H-4'), 0.88 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-5'); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 173.6 (C-4), 166.4 (C-2), 89.7 (C-3), 78.0 (C-6), 70.2 (C-1'), 56.3 (4-OCH₃), 31.8 (C-2'), 28.6 (C-3'), 27.7 (C-5), 22.2 (C-4'), 14.1 (C-5'); ESI-MS: m/z 237.1 [M + Na]⁺. 以上数据与文献^[11]对照基本一致, 确定化合物结构为 6-[1-Hydroxy-(1*S*)-pentyl]-4-methoxy-(6*S*)-2*H*,5*H*-2-pyranone。

化合物 6 棕色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 59.7$ (c 0.67, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.10 (1H, dd, $J = 2.3, 0.6$ Hz, H-5), 5.58 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, 1'-OH), 5.54 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-3), 4.22 (1H, m, H-1'), 3.79 (3H, s, 4-OCH₃), 1.65 (1H, m, H-2' α), 1.53 (1H, m, H-2' β), 1.27 (4H, m, H-3', H-4'), 0.84 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H-5'); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 171.0 (C-4), 167.8 (C-6), 163.3 (C-2), 97.8 (C-5), 87.6 (C-3), 68.9 (C-1'), 56.4 (C-4-OCH₃), 34.3 (C-2'), 26.8 (C-3'), 22.0 (C-4'), 13.9 (C-5'); ESI-MS: m/z 235.1 [M + Na]⁺. 以上数据与文献^[12]对照基本一致, 确定化合

物结构为 6-(1-Hydroxypentyl)-4-methoxy-pyran-2-one。

化合物 7a、7b 棕色油状物; $[\alpha]_D^{20} + 18.7$ (c 1.07, MeOH); **7a**: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.23 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 7.80 (1H, m, H-6), 7.47 (1H, m, H-5), 7.45 (2H, m, H-7, 2-NH), 4.89 (1H, s, H-3), 3.81 (3H, s, 4-Me), 2.15 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 1.58 (1H, m, H-2' α), 1.41 (1H, m, H-2' β), 1.11 (3H, t, 6.8 Hz, H-3'), 0.43 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.6 (C-9), 168.9 (C-1), 164.6 (C-3a), 141.3 (C-4a), 132.6 (C-6), 128.0 (C-8a), 125.9 (C-8), 124.4 (C-7), 117.2 (C-5), 110.3 (C-9a), 56.9 (C-3), 36.1 (C-1'), 35.7 (C-4), 27.3 (C-2'), 12.0 (CH₃-1'), 11.6 (C-3'); **7b**: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.24 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-8), 7.81 (1H, m, H-6), 7.47 (1H, m, H-5), 7.45 (2H, m, H-7, 2-NH), 4.81 (1H, s, H-3), 3.83 (3H, s, 4-Me), 2.16 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 1.00 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 0.84 (1H, m, H-2' α), 0.81 (1H, m, H-2' β), 0.62 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-3'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.6 (C-9), 168.6 (C-1), 164.3 (C-3a), 141.3 (C-4a), 132.6 (C-6), 128.0 (C-8), 125.9 (C-8a), 124.4 (C-7), 117.2 (C-5), 110.4 (C-9a), 59.0 (C-3), 36.2 (C-1'), 35.9 (C-4), 20.9 (C-2'), 17.6 (CH₃-1'), 11.6 (C-3'); ESI-MS: m/z 293.1 [M + Na]⁺。以上数据与文献^[13]对照基本一致, 确定化合物结构为 Quinolactacins A1、A2。

化合物 8 棕色油状物; $[\alpha]_D^{20} + 80.6$ (c 0.94, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.30 (1H, s, 8-OH), 16.04 (1H, s, 6-OH), 4.43 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, 3-H), 2.95 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, H-4), 1.98 (3H, s, H-11), 1.17 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-12), 1.15 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.4 (C-14), 166.0 (C-6), 164.2 (C-8), 160.7 (C-1), 145.8 (C-10), 110.8 (C-5), 102.0 (C-7), 99.9 (C-9), 76.4 (C-3), 34.5 (C-4), 19.7 (C-12), 18.7 (C-13), 9.6 (C-11); ESI-MS: m/z 265.1 [M-H]⁻。以上数据与文献^[14]对照基本一致, 确定化合物结构为 Dihydrocitronone。

化合物 9 棕色油状物; $[\alpha]_D^{20} - 8.5$ (c 2.35, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.43

(1H, s, 8-OH), 14.29 (1H, s, 6-OH), 4.41 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-1 α), 4.39 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-1 β), 3.82 (1H, m, H-3), 2.59 (1H, m, H-4), 1.90 (3H, s, H-11), 1.09 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-10), 1.08 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-9); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 176.1 (C-14), 158.4 (C-6), 155.3 (C-8), 140.3 (C-12), 110.3 (C-5), 108.9 (C-13), 101.6 (C-7), 73.8 (C-3), 58.9 (C-1), 35.1 (C-4), 20.5 (C-9), 18.1 (C-10), 10.1 (C-11); ESI-MS: m/z 251.1 [M-H]⁻。以上数据与文献^[15]对照基本一致, 确定化合物结构为 Dihydrocitronin。

化合物 10 白色固体; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.33 (1H, s, 7-COOH), 9.68 (1H, s, 3-OH), 9.30 (1H, s, 4-OH), 7.32 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 7.26 (1H, dd, $J = 2.1, 8.2$ Hz, H-6), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.4 (7-COOH), 150.1 (C-4), 144.9 (C-3), 122.0 (C-6), 121.7 (C-1), 116.6 (C-2), 115.2 (C-5); ESI-MS: m/z 153.1 [M-H]⁻。以上数据与文献^[16]对照基本一致, 确定化合物结构为 3,4-二羟基苯甲酸, 即原儿茶酸。

化合物 11 棕色油状物; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.31 (1H, s, 3-OH), 7.23 (1H, dd, $J = 1.5, 8.2$ Hz, H-6), 7.00 (1H, dd, $J = 1.8, 8.2$ Hz, H-4), 6.70 (1H, t, $J = 8.2$ Hz, H-5); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.6 (7-COOH), 150.5 (C-2), 146.0 (C-3), 120.6 (C-4), 120.0 (C-6), 118.6 (C-5), 113.2 (C-1); ESI-MS: m/z 153.1 [M-H]⁻。以上数据与文献^[17]对照基本一致, 确定化合物结构为儿茶酸。

化合物 12 白色结晶; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.99 (1H, s, 3-NH), 10.57 (1H, s, 1-NH), 7.22 (1H, s, H-6), 1.69 (3H, d, $J = 0.8$ Hz, H-7); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.2 (C-4), 151.7 (C-2), 137.9 (C-6), 107.9 (C-5), 12.0 (C-7); ESI-MS: m/z 149.0 [M + Na]⁺。以上数据与文献^[18]对照基本一致, 确定化合物结构为 5-Methyluracil。

化合物 13 白色固体; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.01 (1H, s, 3-NH), 10.84 (1H, s, 1-NH), 7.39 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6), 5.44 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.8 (C-4), 152.0 (C-2), 142.7 (C-6), 100.7 (C-

5); ESI-MS: m/z 111.1 [M-H]⁻。以上数据与文献^[19]对照基本一致,确定化合物结构为 Uracil。

化合物 14 棕色油状物; $[\alpha]_D^{20} + 13$ (c 0.92, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.07 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, 8-OH), 3.98 (1H, m, H-2), 3.69 (2H, m, H-13, H-14), 3.35 (1H, m, H-7 α), 2.54 (1H, m, H-3), 2.13 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7 β), 1.65 (3H, s, H-12), 1.29 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-10), 1.17 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-11), 1.02 ~ 1.05

(6H, m, H-15, H-16); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 197.5 (C-6), 158.1 (C-4), 128.2 (C-5), 101.4 (C-9), 94.6 (C-8), 80.9 (C-2), 73.9 (C-13), 68.6 (C-14), 44.2 (C-3), 42.6 (C-7), 19.8 (C-10), 17.7 (C-11), 17.3 (C-15), 16.8 (C-16), 10.7 (C-12); ESI-MS: m/z 305.1 [M + Na]⁺。以上数据与文献^[20]对照基本一致,确定化合物结构为 Citrinal A。

化合物 1 ~ 14 结构图见图 2。

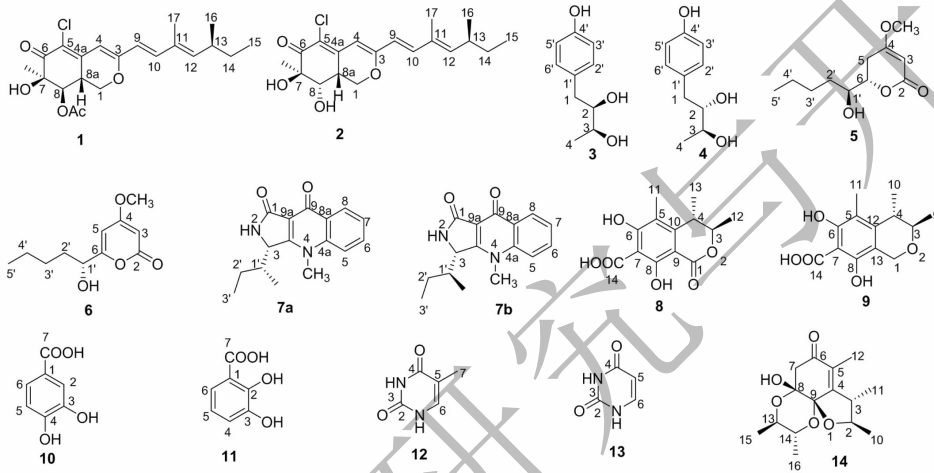


图 2 化合物 1 ~ 14 的结构式

Fig. 2 Structures of compounds 1-14

2.3 抑菌活性

化合物 1 ~ 14 进行了抑菌活性测试,结果发现化合物 1 对光滑念珠菌 (ATCC2001) 有抑制作用,化

合物 2 对光滑念珠菌 (ATCC2001)、金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (ATCC 43300) 具有一定的抑制作用, MIC 见表 1。

表 1 化合物 1 和 2 的 MIC 值

Table 1 The MIC values of compounds 1 and 2

化合物	MIC Values ($\mu\text{g/mL}$)		
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	光滑念珠菌 <i>Candida glabrata</i> (ATCC2001)
1	> 128	> 128	16
2	32	32	16
环丙沙星	0.5	0.5	-
酮康唑	-	-	4

3 结论

杜仲具有一定的抗菌作用,不易被病菌侵染,杜仲的化学成分按照结构类型分为木脂素类、苯丙素

类、环烯醚萜类、黄酮类、甾醇类、三萜类和多糖类^[21]。本研究从一株杜仲内生真菌 GZWMJZ-068 (*Penicillium mallochii*) 的发酵物中分离鉴定了 15 个化合物,结构类型包括聚酮类、吡喃酮类、嘧啶类

和苯的衍生物等,包括 2 个具有抗菌活性的 Azaphilones 类化合物。但是并未分离得到与杜仲化学成分结构相似的化合物,分析其原因可能是在大米固体培养的条件下菌株的代谢基因未被完全激活,在后续的研究中将考虑采用表观遗传修饰等策略激活沉默基因,从而代谢产生与杜仲活性成分结构相似或者其他结构新颖的活性化合物。

参考文献

- 1 Card SD, Faville MJ, Simpson WR, *et al.* Mutualistic fungal endophytes in the triticeae-survey and description[J]. *FEMS Microbio Ecol*, 2014, 88:94-106.
- 2 Li Z(李竹), Yan Y(晏媛), Li Q(李青). Progress in pharmacological activity of *Eucommia ulmoides*[J]. *Chin Pharm Affa*(中国药事), 2004, 18:131-142.
- 3 Li AH(李爱华), Fan MT(樊明涛), Shi JL(师俊玲). Isolation of endophytes from *Eucommia ulmoides* Oliv. and screening for strains with PDG production[J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*(西北植物学报), 2007, 27:616-619.
- 4 Chen XM, Sang XX, Li SH *et al.* Studies on a chlorogenic acid producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37:447-454.
- 5 Yang XF(杨秀芳), Tian CL(田从丽), Zhang HC(张弘驰), *et al.* Secondary metabolites of endophytic fungi EL09 from *Eucommia ulmoides*[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2012, 34:1115-1118.
- 6 Zhang HC, Liu R, Zhou F, *et al.* Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. of *Eucommia ulmoides*[J]. *Chem Nat Compd*, 2014, 50:526-528.
- 7 Ma YM, Zhang HC, Zhao J, *et al.* Secondary anti-fungi metabolites from the endophytic fungus *Fusarium* sp. in *Eucommia ulmoides*[J]. *Chem Nat Compd*, 2012, 48:170-171.
- 8 Arai N, Shiomi K, Tomoda H, *et al.* Isochromophilones III ~ VI, inhibitors of Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium multicolor* FO-3216 [J]. *J Antibiot*, 1955, 48:969-702.
- 9 Hemtasin C, Kanokmedhakul S, Moosophon P, *et al.* Bioactive azaphilones from the fungus *Penicillium multicolor* CM01 [J]. *Phyto Lett*, 2016, 16:56-60.
- 10 Peng XP, Wang Y, Liu PP, *et al.* Aromatic compounds from the halotolerant fungal strain of *Wallemia sebi* PXP-89 in a hypersaline medium [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34:907-912.
- 11 Kumar AS, Bhaket P, Rao BV. Stereoselective synthesis of (-) - pestalotin [J]. *Arkivoc*, 2015, (iii):74-82.
- 12 Evidente A, Zonno MC, Andolfi A, *et al.* Phytotoxic a-pyrones produced by *Pestalotiopsis guelpinii*, the causal agent of hazelnut twig blight [J]. *J Antibiot*, 2012:203-206.
- 13 Kim WG, Song NK, Yoo ID. Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum* [J]. *J Antibiot*, 2011, 54:831-835.
- 14 Xin ZH, Tian L, Zhu TJ, *et al.* Isocoumarin derivatives from the sea squirt-derived fungus *Penicillium stoloniferum* QY2-10 and the halotolerant fungus *Penicillium notatum* B-52 [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30:816-819.
- 15 Deruiter J, Jacyno JM, Davis RA, *et al.* Studies on aldose reductase inhibitors from fungi. I. citrinin and related benzopyran derivatives. *J Enzyme Inhib*, 1992, 6:201-210.
- 16 Chen P(陈屏), Yang SS(杨峻山). Study on chemical composition of limonium seed [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2008, 43:1669-1670.
- 17 Sakushima A, Coskun M, Maoka T. Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis* [J]. *Pergamon*, 1995, 40:257-261.
- 18 Kan S, Chen GY, Han CR, *et al.* Chemical constituents from the roots of *Xanthium sibiricum* [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25:1243-1249.
- 19 Kitajima J, Ishikawa T, Tanaka Y, *et al.* Water-soluble constituents of fennel. IX. Glucides and nucleosides [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47:988-992.
- 20 Wang FQ, Zhu HC, Ma HR, *et al.* Citrinal B, a new secondary metabolite from endophytic fungus *Colletotrichum capsici* and structure revision of citrinal A [J]. *Tetra Lett*, 2016, 57:4250-4253.
- 21 Sun J(孙佳), Lu Y(陆苑), Xiang WY(向文英), *et al.* Simultaneous determination of six components in *Eucommia ulmoides* by UPLC [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28:874-879.