

红树林植物木榄根际土壤真菌 *Penicillium* sp. MA-37 的化学成分研究

张一^{1,2}, 李晓明¹, 尚卓¹, 李春顺¹, 王斌贵¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 对采自海南文昌红树林根际土壤样品中分离到的真菌 *Penicillium* sp. MA-37 的次生代谢产物的化学成分进行了研究。利用硅胶柱层析、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析、制备薄层层析以及重结晶等分离方法并通过现代波谱技术共分离、鉴定了 8 个天然产物, 分别为: 氮-(2-甲氧基-4-羟基苯)-丙酰胺酸(1), 氮-(2,4-二甲氧基苯)-丙酰胺酸(2), 氮-(2,4-二甲氧基苯)-丙酰胺酸甲酯(3), (22E,24R)-麦角甾-5,7,22-三烯-3β-醇(4), (22E,24R)-麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮(5), (22E,24R)-5α,8α-环二氧麦角甾-6,22-双烯-3β-醇(6), asperamide B (7), cis-4-hydroxy-6-deoxyscytalone (8); 其中化合物 1 为新化合物, 化合物 2 和 3 为新天然产物。

关键词: 红树林; 根际土壤; 新化合物; 次生代谢产物

中图分类号: Q58 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)02-0007-05

红树林是生长于热带和亚热带海岸及河口潮间带的植物群落, 是处于“海洋—陆地”界面潮间带的湿地生态系统, 蕴藏着丰富并具特色的微生物资源^[1]。红树林根际土壤真菌是指那些处于红树林植物根际区域内、受植物根系活动影响的真菌微生物。它们同红树林植物、其根系分泌物以及土壤中的营养物质紧密联系, 广泛参与红树林生态系统中营养物质的吸收、保存和循环, 具有独特的代谢途径, 因而具有产生结构新颖、生物活性显著的次生代谢产物的能力^[2]。

菌株 *Penicillium* sp. MA-37 分离自红树林植物木榄根际土壤, 在 PDA 培养基上生长时菌体由白色逐渐变成墨绿色, 培养基变成红色。对该菌株进行静置发酵并提取代谢产物粗提物后, 通过多种化学分离方法, 经过一维、二维核磁共振技术鉴定了 8 个化合物的结构(图 1), 其中化合物 1 为新化合物, 化合物 2 和 3 作为天然产物被首次分离得到。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 菌种: 菌株 *Penicillium* sp. MA-37 分离自海南文昌采集的红树林植物木榄根际土壤样品。

(2) 菌种培养: 菌种以 Franka 培养基, 4° 保存。

发酵培养基为麦芽糖 20 g/L, 甘露醇 20 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 味精 10 g/L, 酵母浸出物 3 g/L, 玉米粉 1 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, MgSO₄•7H₂O 0.3 g/L, 海水配置, pH 6.5~7.0。1000 mL 三角烧瓶, 内装液体培养基 300 mL, 116 高温灭菌 30 min 后冷却接种。共接种 9 L, 28 静置培养 30 d, 过滤, 分别收集菌丝体和发酵液。

1.2 仪器与试剂

Waters Q-Tof Ultima Global GAA076-LC 质谱仪; Bruker Avance 500 MHz 核磁共振仪, TMS 内标; 上海棱光 Gold Spectrumlab 54 紫外可见光谱仪; 凝胶柱层析填料 Sephadex LH-20 为美国 Pharmacia 公司产品; 薄层层析硅胶板、薄层层析硅胶 GF₂₅₄ 和柱层析硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂产品; 显色剂为茴香醛硫酸溶液和碘; 有机溶剂为重蒸的工业级溶剂。

1.3 提取分离

发酵产物过滤, 分别收集发酵液和菌丝体。发酵

收稿日期: 2012-03-12; 修回日期: 2012-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(30910103914)项目; 科技部“973 计划”项目(2010CB833802)

作者简介: 张一(1987 -), 男, 硕士, 山东淄博人, 主要从事海洋天然产物研究; 王斌贵, 通信作者, 电话: 0532-82898553, E-mail: wangbg@ms.qdio.ac.cn

液约 9 L, 用乙酸乙酯萃取。菌丝体晾干、粉碎后用丙酮 : 水(4 : 1)浸泡, 将浸出液中丙酮蒸出, 水相用

乙酸乙酯萃取。提取物浓缩合并称重, 共得到粗提物 16.0 g。

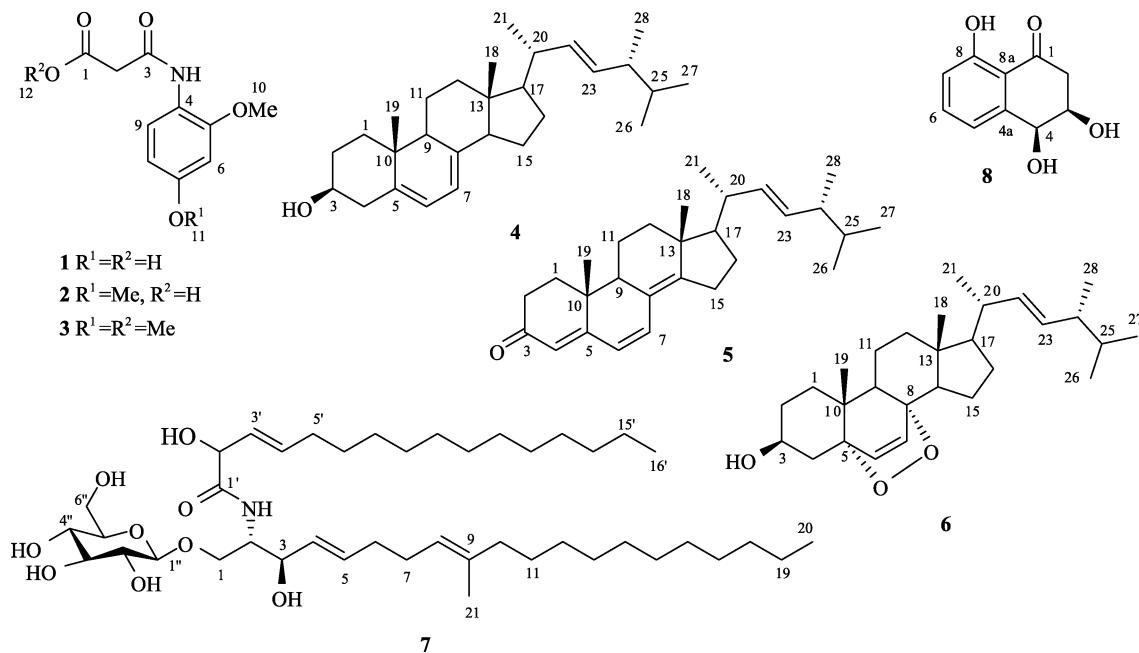


图 1 化合物 1~8 的结构
Fig. 1 Structures of compounds 1~8

粗提物进行硅胶柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯、氯仿-甲醇体系梯度洗脱, 经 TLC 检测合并为 6 个组分⁻。组分⁻经 Sephadex LH-20(石油醚 : 氯仿 : 甲醇 5 : 5 : 1)凝胶柱层析、正相硅胶柱层析和重结晶等方法分离得到化合物 4(30.4 mg)、化合物 5(15.6 mg)和化合物 6(17.7 mg); 组分⁻经反相硅胶柱层析分为 5 个亚组分, 亚组分 2 经正相硅胶柱层析得到化合物 8(10.0 mg), 亚组分 3 利用 Sephadex LH-20(甲醇)凝胶柱层析分离得到化合物 3(9.5 mg); 组分⁻经 Sephadex LH-20(氯仿 : 甲醇 1 : 1)凝胶柱层析分为 4 个亚组分, 亚组分 1 经正相硅胶柱层析得到化合物 7(180.5 mg), 亚组分 3 利用制备薄层层析得到化合物 1(4.3 mg)和化合物 2(14.4 mg)。

2 化合物结构鉴定及实验数据

化合物 1: 白色粉末状固体。高分辨 ESI-MS 确定分子式为 $C_{10}H_{11}NO_5$, 不饱和度为 6。综合分析其 NMR 数据判断该化合物中存在以下基团: 一个 1,2,4-三取代的苯环, 一个亚甲基, 一个甲氧基和两个羰基。根据 H₂-2(δ_H 3.35)到 C-1(δ_C 169.8)和 C-3(δ_C 164.3)以及 NH 活泼质子(δ_H 9.42)到 C-3 的 HMBC 相关连出丙酰胺酸片段。NH 活泼质子到 C-4(δ_C 118.8)的 HMBC 相关确

定氮原子与苯环 C-4 位相连。根据苯环上碳原子的化学位移及质子的 HMBC 相关确定 C-5(δ_C 150.8)及 C-7(δ_C 154.6)是连有氧原子的季碳原子。根据甲氧基 H₃-10(δ_H 3.75)与 C-5 的 HMBC 三键相关确定甲氧基的位置。综合 NMR 等波谱数据将化合物 1 确定为氮-(2-甲氧基-4-羟基苯)-丙酰胺酸。该化合物为新化合物, 其 ¹H 和 ¹³C NMR 数据见表 1; UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$) 203 (4.39), 253 (3.91), 287 (3.54) nm; HRESIMS m/z 226.0713 [M + H]⁺ (calcd for $C_{10}H_{12}NO_5$, 226.0715)。

化合物 2: 白色粉末状固体。综合分析 NMR 数据判断其与化合物 1 为同类型化合物, 所不同之处是谱图中多一个甲氧基(δ_H 3.79, H₃-11; δ_C 55.2, C-11), 且其质子信号 H₃-11 与 C-7(δ_C 155.5)存在 HMBC 相关。综合 NMR 等波谱数据, 化合物 2 确定为氮-(2,4-二甲氧基苯)-丙酰胺酸^[3]。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H : 3.01 (2H, s, H-2), 6.58 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 6.44 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, H-8), 8.09 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-9), 3.72 (3H, s, H-10), 3.79 (3H, s, H-11), 9.40 (1H, s, NH); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C : 171.4 (C-1, C), 45.0 (C-2, CH₂), 166.8 (C-3, C), 121.6 (C-4, C), 149.7 (C-5, C), 98.7 (C-6, CH), 155.5 (C-7, C), 103.9 (C-8, CH), 120.4 (C-9, CH), 55.7 (C-10, CH₃), 55.2 (C-11, CH₃); UV (MeOH) λ_{max}

($\log \varepsilon$) 204 (4.30), 252 (3.95), 287 (3.55) nm。该化合物曾于 1974 年在化合物 halfordamine 的合成中作为

中间化合物报道^[3], 本文首次作为天然产物分离得到该化合物。

表 1 化合物 1 的 NMR 数据(溶剂: DMSO- d_6)
Tab. 1 NMR data of compound 1 (in DMSO- d_6)

编号	δ_C (type)	δ_H (mult., J in Hz)	1H - 1H COSY	HMBC (H to C)
1	169.8, C			
2	43.1, CH ₂	3.35 (s)		C-1, C-3
3	164.3, C			
4	118.8, C			
5	150.8, C			
6	99.3, CH	6.44 (d, 2.3)		C-4, C-5, C-7, C-8
7	154.6, C			
8	106.1, CH	6.29 (dd, 2.3, 8.6)	H-9	C-4, C-6, C-7
9	122.8, CH	7.66 (d, 8.6)	H-8	C-4, C-5, C-7
10	55.4, CH ₃	3.75 (s)		C-5
NH		9.42 (s)		C-3, C-4

化合物 3: 白色粉末状固体。综合分析 NMR 数据判断其与化合物 1 和 2 为同类型化合物, 与化合物 2 比较其谱图中多一个甲氧基(δ_H 3.64, H₃-12; δ_C 51.7, C-12), 根据其质子信号 H₃-12 与 C-1(δ_C 168.5)的 HMBC 相关确定其为甲酯基。综合 NMR 等波谱数据, 化合物 3 确定为氮-(2,4-二甲氧基苯)-丙酰胺酸甲酯^[3]。¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 3.54 (2H, s, H-2), 6.62 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-6), 6.48 (1H, dd, J = 8.8, 2.6 Hz, H-8), 7.77 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-9), 3.82 (3H, s, H-10), 3.74 (3H, s, H-11), 3.64 (3H, s, H-12), 9.36 (1H, s, NH); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 168.5 (C-1, C), 42.7 (C-2, CH₂), 163.7 (C-3, C), 120.2 (C-4, C), 150.9 (C-5, C), 98.8 (C-6, CH), 156.7 (C-7, C), 104.1 (C-8, CH), 122.8 (C-9, CH), 55.7 (C-10, CH₃), 55.2 (C-11, CH₃), 51.7 (C-12, CH₃); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$) 204 (4.44), 252 (4.01), 287 (3.64) nm。该化合物曾于 1974 年在化合物 halfordamine 的合成中作为中间化合物报道^[3], 本文首次作为天然产物分离得到该化合物。

化合物 4: 无色针状晶体, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H : 3.64 (1H, m, H-3), 2.47 (1H, m, H-4a), 2.28 (1H, m, H-4b), 5.57 (1H, dd, J = 5.6, 2.4 Hz, H-6), 5.38 (1H, m, H-7), 0.95 (3H, s, H-18), 0.63 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-21), 5.23 (1H, dd, J = 15.2, 7.7 Hz, H-22), 5.17 (1H, dd, J = 15.2, 7.2 Hz, H-23), 0.82 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-26), 0.84 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-27), 0.92 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-28); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C : 38.4 (C-1, CH₂), 32.0 (C-2, CH₂), 70.5 (C-3, CH), 40.8 (C-4, CH₂), 139.8 (C-5, C), 119.6 (C-6, CH), 116.3 (C-7, CH), 141.3 (C-8, C), 46.3 (C-9, CH), 37.1 (C-10, C), 21.1 (C-11, CH₂),

39.1 (C-12, CH₂), 42.8 (C-13, C), 54.6 (C-14, CH), 23.0 (C-15, CH₂), 28.3 (C-16, CH₂), 55.8 (C-17, CH), 12.1 (C-18, CH₃), 16.3 (C-19, CH₃), 40.4 (C-20, CH), 21.1 (C-21, CH₃), 135.6 (C-22, CH), 132.0 (C-23, CH), 42.8 (C-24, CH), 33.1 (C-25, CH), 19.9 (C-26, CH₃), 19.6 (C-27, CH₃), 17.6 (C-28, CH₃)。其波谱数据与麦角甾醇(22E,24R)-麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇的文献报道值^[4]基本一致。

化合物 5: 淡黄色固体, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H : 5.73 (1H, s, H-4), 6.03 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-6), 6.61 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-7), 0.96 (3H, s, H-18), 0.99 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-21), 5.20 (1H, dd, J = 15.2, 8.2 Hz, H-22), 5.25 (1H, dd, J = 15.2, 7.2 Hz, H-23), 0.85 (3H, d, J = 7.1 Hz, H-26), 0.84 (3H, d, J = 7.1 Hz, H-27), 0.93 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C : 34.1 (C-1, CH₂), 34.2 (C-2, CH₂), 199.3 (C-3, C), 123.1 (C-4, CH), 164.3 (C-5, C), 124.5 (C-6, CH), 134.0 (C-7, CH), 124.6 (C-8, C), 44.6 (C-9, CH), 36.8 (C-10, C), 19.0 (C-11, CH₂), 35.7 (C-12, CH₂), 44.0 (C-13, C), 156.0 (C-14, C), 25.4 (C-15, CH₂), 27.7 (C-16, CH₂), 55.8 (C-17, CH), 19.0 (C-18, CH₃), 16.7 (C-19, CH₃), 39.2 (C-20, CH), 21.2 (C-21, CH₃), 135.0 (C-22, CH), 132.6 (C-23, CH), 42.9 (C-24, CH), 33.1 (C-25, CH), 20.0 (C-26, CH₃), 19.7 (C-27, CH₃), 17.6 (C-28, CH₃)。其波谱数据与荧光甾酮(22E,24R)-麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮的文献报道值^[5]基本一致。

化合物 6: 白色固体, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H : 3.96 (1H, m, H-3), 6.50 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 6.24 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7), 0.81 (3H, s, H-18), 0.88 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 5.14 (1H, dd, J = 15.3, 8.3 Hz, H-22), 5.22 (1H, dd, J = 15.3, 7.6

Hz, H-23), 0.81 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.83 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.90 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-28); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 34.7 (C-1, CH_2), 30.1 (C-2, CH_2), 66.4 (C-3, CH), 39.4 (C-4, CH_2), 82.1 (C-5, C), 135.2 (C-6, CH), 130.7 (C-7, CH), 79.4 (C-8, C), 51.1 (C-9, CH), 37.0 (C-10, C), 20.6 (C-11, CH_2), 36.9 (C-12, CH_2), 44.6 (C-13, C), 51.7 (C-14, CH), 23.4 (C-15, CH_2), 28.6 (C-16, CH_2), 56.2 (C-17, CH), 12.9 (C-18, CH_3), 18.1 (C-19, CH_3), 39.7 (C-20, CH), 20.9 (C-21, CH_3), 135.4 (C-22, CH), 132.3 (C-23, CH), 42.8 (C-24, CH), 33.1 (C-25, CH), 19.6 (C-26, CH_3), 19.9 (C-27, CH_3), 17.5 (C-28, CH_3)。其波谱数据与 $(22E,24R)-5\alpha,8\alpha$ -环二氧麦角甾-6,22-双烯-3 β -醇的文献报道值^[6]基本一致。

化合物 7: 白色粉末状固体, ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 4.14 (1H, dd, $J = 10.2, 5.4$ Hz, H-1a), 3.72 (1H, dd, $J = 10.2, 3.2$ Hz, H-1b), 3.98 (1H, m, H-2), 4.13 (1H, dd, $J = 7.1, 5.5$ Hz, H-3), 5.48 (1H, dd, $J = 15.3, 7.4$ Hz, H-4), 5.73 (1H, dt, $J = 15.3, 6.6$ Hz, H-5), 2.08 (2H, m, H-6), 2.05 (2H, m, H-7), 5.16 (1H, t, $J = 5.7$ Hz, H-8), 1.98 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-10), 1.41 (2H, m, H-11), 1.36~1.31 (16H, m, H-12~H-19), 0.91 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-20), 1.60 (3H, s, H-21), 4.43 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-2'), 5.48 (1H, dd, $J = 15.3, 6.0$, H-3'), 5.85 (1H, dd, $J = 15.3, 7.7$ Hz, H-4'), 2.03 (2H, m, H-5'), 1.42 (2H, m, H-6'), 1.36~1.31 (18H, m, H-7'~H-15'), 0.93 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-16'), 4.28 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1''), 3.20 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-2''), 3.36 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-3''), 3.31 (1H, m, H-4''), 3.31 (1H, m, H-5''), 3.89 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-6''a), 3.71 (1H, dd, $J = 11.7, 4.3$ Hz, H-6''b); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 69.7 (C-1, CH_2), 54.7 (C-2, CH), 72.9 (C-3, CH), 131.0 (C-4, CH), 134.5 (C-5, CH), 34.0 (C-6, CH_2), 28.8 (C-7, CH_2), 124.9 (C-8, CH), 136.8 (C-9, C), 40.8 (C-10, CH_2), 29.1 (C-11, CH_2), 30.2~30.8 (C-12~C-17, CH_2), 33.1 (C-18, CH_2), 23.7 (C-19, CH_2), 14.4 (C-20, CH_3), 16.2 (C-21, CH_3), 175.5 (C-1', C), 74.1 (C-2', CH), 129.1 (C-3', CH), 134.8 (C-4', CH), 33.4 (C-5', CH_2), 30.2~30.8 (C-6'~C-13', CH_2), 33.1 (C-14', CH_2), 23.7 (C-15', CH_2), 14.4 (C-16', CH_3), 104.7 (C-1'', CH), 75.0 (C-2'', CH), 77.9 (C-3'', CH), 71.6 (C-4'', CH), 78.0 (C-5'', CH), 62.7 (C-6'', CH_2)。其波谱数据与 asperamide B

的文献报道值^[7]基本一致。

化合物 8: 白色粉末状固体, ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 2.70 (1H, dd, $J = 17.1, 8.1$ Hz, H-2a), 3.08 (1H, dd, $J = 17.1, 4.0$ Hz, H-2b), 4.07 (1H, m, H-3), 4.61 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-4), 7.13 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5), 7.53 (1H, dd, $J = 7.5, 8.4$ Hz, H-6), 6.86 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 204.3 (C-1, C), 44.3 (C-2, CH_2), 71.7 (C-3, CH), 73.2 (C-4, CH), 117.7 (C-5, CH), 137.9 (C-6, CH), 119.9 (C-7, CH), 163.2 (C-8, C), 145.8 (C-4a, C) 116.7 (C-8a, C)。其波谱数据与 *cis*-4-hydroxy-6-deoxyscytalone 的文献报道值^[8]基本一致。

参考文献:

- [1] 林永成, 周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 徐海, 陈少波, 张素霞, 等. 红树林土壤基本特征及发展前景[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1496-1497.
- [3] Pietro V, Aurora B, Franko P. Synthesis of quinoline alkaloids. VI. Structure and synthesis of halfordamine and related compounds [J]. Gazz Chim Ital, 1974, 104(3-4), 297-307.
- [4] 许向前, 洪文荣, 陈代杰. 黑麦麦角菌产生麦角甾醇的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(6): 379-381.
- [5] Schulte K E, Rücker G, Fachmann H. Ergosta-4,6,8(14), 22-tetraenon-(3) als inhaltsstoff des lärchenschwammes [J]. Tetrahedron Lett, 1968, 9(46): 4763-4764.
- [6] Yue J M, Chen S N, Lin Z W, et al. Sterols from the fungus *Lactarium volemus* [J]. Phytochemistry, 2001, 56(8): 801-806.
- [7] Zhang Y, Wang S, Li X M, et al. New sphingolipids with a previously unreported 9-methyl-C₂₀-sphingosine moiety from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13 [J]. Lipids, 2007, 42(8): 759-764.
- [8] Sankawa U, Shimada H, Sato T, et al. Biosynthesis of scytalone [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(12): 3536-3542.

Chemical constituents of *Penicillium* sp. MA-37, a fungus derived from rhizospheres of mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza*

ZHANG Yi^{1,2}, LI Xiao-ming¹, SHANG Zhuo¹, LI Chun-shun¹, WANG Bin-gui¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Mar., 12, 2012

Key words: Mangrove; rhizosphere; novel compound; secondary metabolites

Abstract: From the fermentation culture of strain *Penicillium* sp. MA-37 derived from mangrove rhizosphere, eight compounds were isolated by separation techniques including column chromatography with silica gel and Sephadex LH-20, preparative TLC and re-crystallization. Structures of all purified compounds were elucidated by analysis of their spectroscopic data to be *N*-(2-methoxy-4-hydroxyphenyl)-malonamic acid (**1**), *N*-(2,4-dimethoxyphenyl)-malonamic acid (**2**), *N*-(2,4-dimethoxyphenyl)-malonamic acid methyl ester (**3**), (22E,24R)-ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (**4**), (22E,24R)-Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (**5**), (22E,24R)-5α,8α-epidioxyergosta-6,22-dien-3β-ol (**6**), asperamide B (**7**), *cis*-4-hydroxy-6-deoxyscytalone (**8**). Compound **1** was a new compound, while compounds **2** and **3** were reported as natural products for the first time.

(本文编辑: 张培新)