

# 南海海洋真菌 *Penicillium* sp. (386#) 次级代谢产物再研究\*

魏美燕<sup>1</sup>, 邵长伦<sup>2,3</sup>, 谭倪<sup>4</sup>, 胡谷平<sup>3</sup>,  
王长云<sup>2</sup>, 余志刚<sup>3</sup>, 林永成<sup>3</sup>  
(1. 广东医学院药学院, 广东 东莞 523808  
2. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003  
3. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275  
4. 南华大学化学化工学院, 湖南 衡阳 421001)

**摘要:** 重新研究南海海洋真菌 *Penicillium* sp. 386 的次级代谢产物, 运用硅胶柱层析、制备薄层层析和重结晶等方法, 从中分离鉴定了9个单体化合物, 包括3个神经酰胺类化合物(1, 2, 3), 3个环二肽类化合物(4, 5, 6), 2个甾醇类(7, 8)和1个结构新颖的生物碱化合物(9)。其中化合物1的结构是通过乙酰化, 水解等化学方法以及NMR、GC-MS等技术得以确定。化合物9的结构主要通过波谱方法得以确定的, 尤其是2D NMR, 最后有单晶X射线测定得以证实。

**关键词:** 海洋真菌; *Penicillium* sp.; 神经酰胺; 化学反应; penicillazine; X射线; 结构鉴定

**中图分类号:** O656 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2010)04-0077-04

## Reinvestigation on the Secondary Metabolites of Marine Fungus *Penicillium* sp. from the South China Sea

WEI Meiyun<sup>1</sup>, SHAO Changlun<sup>2,3</sup>, TAN Ni<sup>4</sup>, HU Guping<sup>3</sup>,  
WANG Changyun<sup>2</sup>, SHE Zhigang<sup>3</sup>, LIN Yongcheng<sup>3</sup>

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;

2. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

4. School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China, Hengyang 421001, China)

**Abstract:** The secondary metabolites of the marine fungus *Penicillium* sp. from the South China Sea was investigated using silica gel column chromatography, preparative thin-layer chromatography and recrystallization, resulting in isolation of nine pure compounds, including three ceramides (1, 2, 3), three cyclodipeptides (4, 5, 6), two sterols (7, 8) and one structurally unique alkaloid (9). The structure of 1 was characterized by acetylation, hydrolysis reaction, NMR and GC-MS and the structure of 9 was analyzed by comprehensive spectroscopic methods, 2D NMR, and X-ray analysis.

**Key words:** marine fungus; ceramides; chemical reaction; penicillazine; X-ray; structure elucidation

本研究组已经对中国南海红树林内生真菌进行了系统的研究, 并从中得到了一系列结构新颖的或药理活性显著的化合物<sup>[1-5]</sup>。海洋真菌386号分离自香港附近海域的海底沙中, 鉴定为 *Penicillium*

\* 收稿日期: 2009-10-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40976077, 30901879, 40776073); 湛江市科技攻关资助项目(2009C3106011); 中国海洋大学海洋药物教育部重点实验室开放基金资助项目(KLMD(OUC)2008-1)

作者简介: 魏美燕(1977年生), 女, 讲师; 通讯作者: 邵长伦; E-mail: shaochanglun@163.com

sp.。初步药理活性显示, 该菌发酵液乙酸乙酯提取物具有强的抗金色葡萄球菌的活性, 实验室人工大规模发酵后, 已从中分离鉴定了2个结构新颖的化合物<sup>[6-8]</sup>。本文在前期工作基础上, 继续研究该海洋真菌386#的次级代谢产物, 又从中分离鉴定了9个单体化合物(图1), 包括3个神经酰胺类化合物(1, 2, 3), 3个环二肽类化合物(4, 5, 6), 2个甾醇类(7, 8)和1个结构新颖的生物碱化合物(9)。3个神经酰胺类化合物(1, 2, 3)均为首次从青霉菌 *Penicillium* sp. 中分离得到。

## 1 结果与讨论

化合物1为白色粉末, 难溶于丙酮和氯仿中, 微溶于热的甲醇和DMSO中, 常温下能微溶于吡啶中。<sup>1</sup>H NMR (pyridine-d<sub>5</sub>) 谱中显示出明显的神经酰胺类化合物的结构特点: 8.56 (d, NH, 9.0) 处的酰胺NH信号; 7.60 (s, OH), 6.67 (s, OH), 6.17 (s, OH), 4.94 (s, OH) 处的4个可交换的活泼羟基信号; 5.08 (NCH, m) 为连氮CH信号; 4.61 (OCH, dd, 8.0, 4.0), 4.49 (OCH, dd, 10.5, 4.5), 4.42 (OCH, dd, 10.5, 4.8), 4.33 (OCH, dd, 6.3, 3.9), 4.26 (OCH, m) 为5个连氧CH信号; 1.22~1.27 处的多质子信号峰为长链脂肪亚甲基信号; 0.83 (6H, t, 6.0) 处为两个末端甲基信号。通过上述分析, 可初步确定化合物1为一个含有4个羟基的神经酰胺类化合物。LC-MS

显示  $[M + H]^+ 684$ ,  $[2M + Na]^+ 1389$  的准分子离子峰, 可知该化合物的相对分子质量为683。

由于化合物1的溶解性很差, 难以测试其质谱。为增加其脂溶性, 对其进行酯化反应, 制备其乙酰化产物。化合物与乙酸酐在吡啶中反应后得到化合物1a。1a的LC-MS显示其  $[M + Na]^+ 874$ , 确定其相对分子质量为851, 比化合物1的相对分子质量多168, 确定1a为四乙酰化产物, 进一步证实化合物1中含有4个羟基。该四乙酰化产物1a易溶于氘代氯仿中, 其<sup>13</sup>C NMR和DEPT谱中在 $\delta$  74.1 (CH), 72.7 (CH), 72.2 (CH), 62.5 (CH<sub>2</sub>) 含有四个连氧的碳信号,  $\delta$  48.0 处为连有氮原子的碳信号。由以上信息可知化合物1的分子式为C<sub>42</sub>H<sub>85</sub>NO<sub>5</sub>, 其四乙酰化产物1a的分子式为C<sub>50</sub>H<sub>93</sub>NO<sub>9</sub>。

神经酰胺类化合物的结构解析的关键是分别确定鞘氨醇和脂肪酸两部分。根据ESI-MS中出现的强碎片峰383可以解释为酰胺键断裂后的脂肪酸部分, 对应的分子式为C<sub>24</sub>H<sub>47</sub>O<sub>3</sub>, 说明该部分含有其中的一个羟基, 那么另外3个羟基在鞘氨醇部分。化合物1溶解在甲醇中, 在6 mol/L的盐酸溶液, 加热回流24 h后, 得到化合物1b, 由FAB-MS确定其相对分子质量为398, 这一相对分子质量正好为ESI-MS碎片峰383对应的羧酸甲基化产物。最后1b的结构由GC-MS确定为2-羟基二十四碳酸甲酯。根据前面的分析可知, 鞘氨醇部分的结构含有

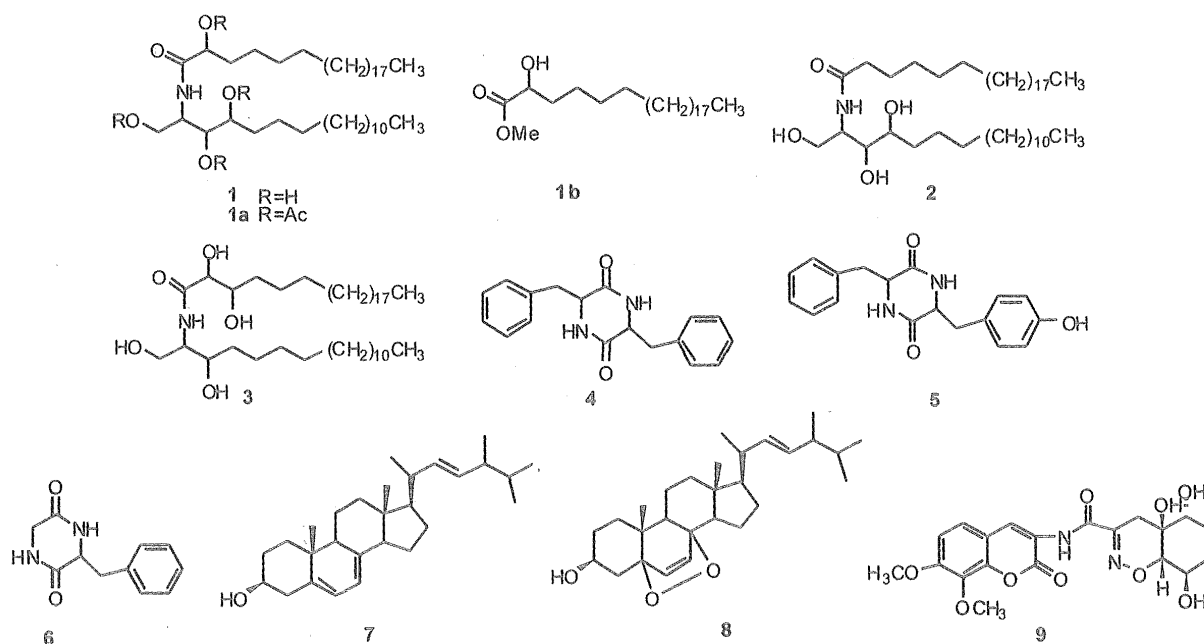


图1 化合物1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 1a和1b的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 1a and 1b

18 个碳原子, 3 个羟基, 1 个氨基。由 1a 的  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 谱及  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY 可以确定鞘氨醇为 2-氨基-3, 4-二羟基十八醇。根据以上信息可以确定化合物 1 的结构为 2-(2'-hydroxytetracosanoylamino) octadecane-1, 3, 4-triol。

化合物 9 为淡黄色晶体, FAB-MS 显示其分子离子峰为 432, 结合核磁信息确定其分子式为  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_9$ 。 $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ ) 中,  $\delta$  9.37 (NH, s), 4.65 (1H, 8' -OH, d, 5.4) 和 4.47 (2H, 5' -OH, 10' -OH, s) 均为可被交换掉的活泼氢外; 7.38 (1H, H-5, d, 9.0) 和 7.09 (1H, H-6, d, 9.0) 处为苯环邻位的 2 个氢质子; 8.57 (1H, H-4, s) 处为 1 单峰烯氢质子; 5.56 (2H, H-6', H-7', m) 为顺式双键的 2 个氢信号; 4.21 (1H, H-8', m) 和 4.13 (1H, H-9', dd, 7.8, 2.1) 处为 2 个连氧氢信号; 3.96 (3H, s), 3.90 (3H, s) 处为 2 个甲氧基信号; 2.70 (1H, H-4', dd, 19.5, 2.4) 和 2.25 (1H, H-4', d, 19.5) 是 1 个亚甲基信号。 $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, acetone- $d_6$ ) 中显示 2 个羰基信号 (162.9, 159.8), 11 个双键碳信号 (155.8, 151.7, 145.4, 137.5, 131.1, 128.8, 125.7, 123.9, 122.4, 115.5, 111.4), 4 个连氧碳原子 (85.2, 75.2, 69.4, 68.4), 2 个甲氧基 (61.8, 57.1) 和 1 个亚甲基 (24.5)。通过上述分析基本确定化合物为 Penicillazine。该化合物的所有氢、碳的归属以及结构中含有内酯而不是内酰胺均由二维核磁得以确认。最后该化合物的结构由 X 射线测定得以证实 (图 2)。

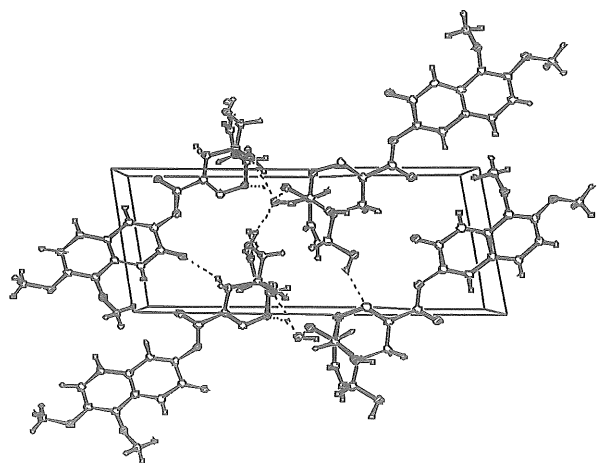


图 2 化合物 9 的晶体堆积图

Fig. 2 Crystal packing diagram of compound 9

化合物 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的结构主要是通过波谱分析以及与本实验室前期分离到的标准品在多种展开系统中进行  $R_f$  值对照而得以确定。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂与实验仪器

美国 Varian 公司 INOVA 300NB 超导核磁共振仪; VG ZAB-HS 质谱仪; Bruker EQUINOX55 - A590P3E 红外光谱仪; 北京泰克仪器公司的 X-4 数字显示显微熔点测试仪。

所用试剂均为广州化学试剂厂生产, 化学纯, 溶剂经重蒸后使用。柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 200 ~ 300 目硅胶, 硅胶 H, 薄层硅胶 GF<sub>254</sub>。

### 2.2 菌种及其发酵培养

海洋真菌 386 分离自红树林附近的泥沙中, 菌种由香港城市大学关利平教授提供, 保存在 4 °C 下的玉米海水琼脂培养基中。菌种培养发酵条件见文献 [6]。

### 2.3 提取分离

发酵液用纱布过滤, 菌体和培养液分别收集, 培养液浓缩, 80 L 浓缩至 3 L, 乙酸乙酯提取。提取浓缩物分别拌硅胶过柱, 以石油醚—乙酸乙酯—甲醇梯度淋洗, 再经反复柱层析, 制备薄层层析和重结晶纯化后得到化合物 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9。

### 2.4 化合物的物理和波谱数据

化合物 1,  $\text{C}_{42}\text{H}_{85}\text{NO}_5$ , 白色粉末。 $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 8.56 (d, NH, 9.0), 7.60 (OH), 6.67 (OH), 6.17 (OH), 4.94 (OH), 5.08 (NCH, m), 4.61 (OCH, dd, 8.0, 4.0), 4.49 (OCH, dd, 10.5, 4.5), 4.42 (OCH, dd, 10.5, 4.8), 4.33 (OCH, dd, 6.3, 3.9), 4.26 (OCH, m), 2.22 ( $\text{CH}_2$ ), 2.01 ( $\text{CH}_2$ ), 1.90 ( $\text{CH}_2$ ), 1.69 ( $\text{CH}_2$ ), 1.22 ~ 1.27 ( $\text{CH}_2$ ), 0.83 ( $\text{CH}_3$ , t, 6.0)。ESI-MS:  $[\text{M} + \text{H}]^+$  684,  $[\text{2M} + \text{Na}]^+$  1389。

化合物 1a,  $\text{C}_{50}\text{H}_{93}\text{NO}_9$ , 白色粉末。 $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.56 (1H, d, 8.7), 5.08 (2H, m), 4.93 (1H, m), 4.42 (1H, m), 4.31 (1H, dd, 11.7, 6.6), 3.98 (1H, dd, 11.7, 3.0), 2.12 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.80 (2H, m), 1.63 (2H, m), 1.24 (56H, brs), 0.84 (6H, d, 6.9)。 $^{13}\text{C}$  NMR (75

MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171.1 ( $-\text{N}-\text{C}=\text{O}$ ), 170.7 ( $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ ), 169.8 ( $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ ), 169.8 ( $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ ), 169.8 ( $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ ), 74.0 (OCH), 72.7 (OCH), 72.2 (OCH), 62.4 ( $\text{OCH}_2$ ), 47.9 (NCH), 32.0 ( $\text{CH}_2$ ), 31.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.8~29.3 ( $27\text{CH}_2$ ), 28.6 ( $\text{CH}_2$ ), 26.5 ( $\text{CH}_2$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2$ ), 25.0 ( $\text{CH}_2$ ), 23.5 ( $\text{CH}_2$ ), 22.8 ( $\text{CH}_2$ ), 21.1 ( $\text{CH}_3$ ), 21.0 ( $\text{CH}_3$ ), 20.9 ( $\text{CH}_3$ ), 20.8 ( $\text{CH}_3$ ), 14.7 ( $\text{CH}_3$ )。ESI-MS:  $[\text{M} + \text{Na}]^+ 874$ 。

化合物 **1b**,  $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_3$ , 白色粉末。 $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.21 (1H, dd,  $J=5.4, 8.4$  Hz), 3.80 (3H, s), 2.70 (OH, d,  $J=5.4$  Hz), 1.78 (1H, m), 1.69 (1H, m), 1.10~1.28 (40H, m), 0.89 (3H, t,  $J=6.0$  Hz)。 $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 175.7 ( $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ ), 70.5 (OCH), 52.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 34.5 ( $\text{CH}_2$ ), 32.0 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4~29.8 ( $17\text{CH}_2$ ), 24.8 ( $\text{CH}_2$ ), 22.8 ( $\text{CH}_2$ ), 14.2 ( $\text{CH}_3$ )。FAB-MS:  $[\text{M}]^+ 398$ 。

化合物 **9**,  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_9$ , 淡黄色晶体。 $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 9.37 (NH, s), 8.57 (1H, H-4, s), 7.38 (1H, H-5, d, 9.0), 7.09 (1H, H-6, d, 9.0), 5.56 (2H, H-6', H-7', m), 4.65 (1H, 8' - OH, d, 5.4), 4.47 (2H, 5' - OH, 10' - OH, s), 4.21 (1H, H-8', m), 4.13 (1H, H-9', dd, 7.8, 2.1), 3.96 (3H, s), 3.90 (3H, s), 2.70 (1H, H-4', dd, 19.5, 2.4), 2.25 (1H, H-4', d, 19.5)。 $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 162.9 (C-2), 159.8 (NHC=O), 155.8 (C-7), 151.7 (C-3'), 145.4 (C-9), 137.5 (C-8), 131.1 (C-6'), 128.8 (C-7'), 125.7 (C-4), 123.9 (C-5), 122.4 (C

-3), 115.5 (C-10), 111.4 (C-6), 85.2 (C-9'), 75.2 (C-5'), 69.4 (C-10'), 68.4 (C-8''), 61.8 (8 -  $\text{OCH}_3$ ), 57.1 (7 -  $\text{OCH}_3$ ), 24.5 (C-4')。FAB-MS:  $[\text{M}]^+ 432$ 。

#### 参考文献:

- [1] XU F, ZHANG Y, WANG J J, et al. Benzofuran derivatives from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. (# 2508) [J]. J Nat Prod, 2008, 71: 1251.
- [2] SHAO C L, SHE Z G, GUO Z Y, et al.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments for two anthraquinones and two xanthonones from the mangrove fungus (ZSUH-36) [J]. Magn Reson Chem, 2007, 45: 434.
- [3] SHAO C L, GUO Z Y, SHE Z G, et al. A new isoprenyl phenyl ether compound from mangrove fungus [J]. Chem Nat Comp, 2007, 43: 377.
- [4] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. Five Unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea coast [J]. J Org Chem, 2001, 66: 6252.
- [5] 魏美燕, 胡谷平, 郑彩娟, 等. 中国南海红树内生真菌 *Microsphaeropsis* sp. 二氢异香豆素类化合物研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2010, 49(2): 68-71.
- [6] LIN Y C, SHAO Z Y, JIANG G C, et al. Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5,6-dihydro-1,2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (strain #386) from the South China Sea [J]. Tetrahedron, 2000, 56(49): 9607.
- [7] 邵志宇, 林永成, 姜广策. 南海海洋真菌 *Penicillium* sp. 中的一个新化合物 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(5): 131.
- [8] SHAO C L, WANG C Y, GU Y C, et al. Revised structure of penicillazine and preparation, bioactivities of penicillazine derivatives [J]. Lett Org Chem, 2009, 6: 387.