

# 红树植物海杧果内生真菌 *Penicillium* sp. 中的 抗菌活性成分

韩 壮<sup>1,2</sup>, 梅文莉<sup>2</sup>, 崔海滨<sup>1,2</sup>, 曾艳波<sup>2</sup>, 林海鹏<sup>2</sup>, 洪 葵<sup>2</sup>, 戴好富<sup>2</sup>

(1. 汕头大学海洋生物研究所, 汕头 515063; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

**摘要** 对红树植物海杧果内生真菌 *Penicillium* sp. 发酵液的乙酸乙酯提取物进行了柱层析分离, 得到 3 个化合物, 经 MS, NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC 和 HMBC 等鉴定, 分别为 4-(3-hydroxybutan-2-yl)-3,6-dimethylbenzene-1,2-diol (**1**), 4-(3-hydroxybutan-2-yl)-3-methyl-6-acetylbenzene-1,2-diol (**2**) 和 3,4,5-trimethyl-1,2-benzenediol(**3**). 其中化合物 **1** 和 **2** 为新化合物, 化合物 **3** 为新的天然产物. 抗菌活性测试结果表明, 化合物 **1** 和 **3** 均具有抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的活性, 化合物 **2** 则未显示此活性.

**关键词** 红树林植物; 内生真菌; *Penicillium* sp.; 抗菌活性; 化学成分

中图分类号 O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)04-0749-04

红树林(Mangrove)是生长在热带和亚热带海岸潮间带的木本植物群落,是陆地向海洋过度的特殊生态系统.近年来生长在特殊环境中的红树植物及其内生真菌已成为寻找具有生物活性成分的重要资源<sup>[1~4]</sup>.长期以来,由于抗生素的广泛使用甚至滥用,导致耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, MRSA)等耐药菌株的出现. MRSA 对临床上广泛使用的多种抗生素产生耐药性,由其所造成的感染治疗困难,病死率高,已成为全世界范围内抗感染中的难题<sup>[5]</sup>,因而解决 MRSA 耐药性问题已经成为当今医药领域中的重要任务.

我们研究组在对红树植物共附生微生物的培养物进行生物活性筛选过程中,发现红树植物海杧果(*Cerbera manghas* Linn)内生真菌 *Penicillium* sp. (093701)的发酵液显示出抗 MRSA 活性,并从该发酵液的乙酸乙酯提取物中分离得到 3 个化合物,经 MS, NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC 和 HMBC 等鉴定,分别为 4-(3-Hydroxybutan-2-yl)-3,6-dimethylbenzene-1,2-diol (**1**), 4-(3-Hydroxybutan-2-yl)-3-methyl-6-acetylbenzene-1,2-diol(**2**)和 3,4,5-Trimethyl-1,2-benzene-diol(**3**).其中化合物 **1** 和 **2** 为新化合物,化合物 **3** 为新的天然产物.对上述化合物进行抗菌活性测试的结果表明,化合物 **1** 和 **3** 均具有抗 MRSA 的活性,化合物 **2** 对 MRSA 无抑制活性.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

北京泰克仪器有限公司 X-5 型显微熔点仪; Heidolph Laborota-20L 旋转蒸发仪; Perkin Elmer-343 型自动旋光仪; Bio-Rad FTS IR 光谱仪, KBr 压片; VG Autospec-3000 型质谱仪; Bruker AV-400 核磁共振波谱仪, TMS 为内标; GJ-100BE 发酵罐(上海联环公司).

薄层层析硅胶和柱层析硅胶均为青岛海洋化工厂产品; Sephadex LH-20 为 Merck 公司产品; DA-201 为上海亚东核级树脂有限公司产品; 其它试剂均为分析纯.

### 1.2 菌 株

真菌 093701 分离自海南省文昌市清澜港红树林保护站的海杧果(*Cerbera manghas* Linn)的果实,

收稿日期: 2007-08-20.

基金项目: 国家“九七三”计划前期研究专项基金(批准号: 2007CB116306)和科研院所社会公益研究专项基金(批准号: 2004DIB3J702)资助.

联系人简介: 戴好富, 男, 博士, 研究员, 从事天然产物化学研究. E-mail: hfdai2001@yahoo.com.cn

植物样品由中国热带农业科学院热带生物技术研究所代正福副研究员鉴定为海杧果, 真菌 093701 由本课题组鉴定为青霉属 (*Penicillium* sp.).

真菌 093701 与供试菌株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 9551 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) 均由中国热带农业科学院热带生物技术研究所保藏.

### 1.3 培养基及培养条件

马丁琼脂培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 琼脂 15 ~ 20 g, 用体积分数为 50% 的陈海水定容至 1 L,  $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$ , 在  $1 \times 10^5$  Pa 下灭菌 25 min.

黄豆粉培养基: 可溶性淀粉 20 g, 黄豆粉 15 g, 酵母粉 5 g, 蛋白胨 2 g,  $\text{CaCO}_3$  4 g,  $\text{NaCl}$  4 g, 50% 陈海水定容至 1 L,  $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$ , 在  $1 \times 10^5$  Pa 下灭菌 25 min.

真菌 093701 经马丁琼脂培养基斜面活化, 接种于黄豆粉培养基中, 于 28 °C, 以 180 r/min 的速度振荡培养 4 d, 按 5% 接种量接种到 70 L 黄豆粉培养基上, 于 28 °C 培养 7 d, 得菌液 70 L.

### 1.4 样品分离和纯化

将真菌 093701 的菌液用纱布过滤, 得菌丝体和发酵液, 将发酵液于 45 °C 下减压浓缩至 5 L, 用乙酸乙酯萃取, 经浓缩后得到乙酸乙酯提取物 (14.0 g). 将剩余水部分过滤后, 经大孔树脂 DA-201 (600 mm  $\times$  100 mm) 柱层析, 依次用水和甲醇洗脱, 减压浓缩甲醇洗脱液得甲醇提取物 (67.0 g). 乙酸乙酯提取物 (14.0 g) 经减压硅胶柱层析, 以石油醚-丙酮梯度洗脱, 得到 Fr. 1 ~ Fr. 9 共 9 个组分. Fr. 7 (2.3 mg) 经硅胶 [洗脱液  $V(\text{氯仿}): V(\text{甲醇}) = 16: 1$ ] 柱层析, 得到 9 个流分 (Fr. 7-1 ~ Fr. 7-9), 其中 Fr. 7-2 (187.0 mg) 经硅胶 [洗脱液  $V(\text{氯仿}): V(\text{丙酮}) = 8: 1$ ] 柱层析, 得到化合物 **1** (23.5 mg). Fr. 7-4 (92.9 mg) 经硅胶 [洗脱液  $V(\text{氯仿}): V(\text{丙酮}) = 5: 1$ ] 柱层析, 得到化合物 **2** (16.7 mg). Fr. 5 (614.0 mg) 依次经 Sephadex LH-20 凝胶 [体积分数为 95% 的乙醇] 柱层析和硅胶 [洗脱液  $V(\text{石油醚}): V(\text{丙酮}) = 8: 1$ ] 柱层析, 得到化合物 **3** (19.0 mg).

化合物 **1** ~ **3** 的结构见图 1.

### 1.5 结构鉴定

化合物 **1** 为淡黄色油状物, 其体积分数为 10% 的硫酸溶液显黄绿色.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.0$  ( $c$  1.0, MeOH), ESI-MS (positive),  $m/z$ : 211  $[M + H]^+$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$ : 6.35 (1H, s, H5), 3.84 (1H, m, H3'), 3.05 (1H, m, H2'), 2.12 (3H, s, H6-Me), 2.05 (3H, s, H3-Me), 1.14 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H1'), 1.10 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H4').  $^{13}\text{C NMR}$  (DEPT) 数据见表 1.

Table 1  $^{13}\text{C NMR}$  and DEPT data of compounds **1** and **2** (100 MHz in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Position	1		2		Position	1		2	
	$\delta_{\text{C}}$	DEPT	$\delta_{\text{C}}$	DEPT		$\delta_{\text{C}}$	DEPT	$\delta_{\text{C}}$	DEPT
1	154.6	C	154.5	C	2'	42.9	CH	42.9	CH
2	154.4	C	152.7	C	3'	72.2	CH	72.1	CH
3	116.0	C	117.0	C	4'	19.4	$\text{CH}_3$	19.7	$\text{CH}_3$
4	141.6	C	143.3	C	3-Me	11.6	$\text{CH}_3$	11.6	$\text{CH}_3$
5	106.5	CH	106.1	CH	6-Me	8.9	$\text{CH}_3$		
6	110.6	C	112.8	C	6-COMe			30.6	$\text{CH}_3$
1'	16.3	$\text{CH}_3$	16.5	$\text{CH}_3$	6-COMe			210.1	C

化合物 **2** 为淡黄色油状物, 其体积分数为 10% 的硫酸溶液显棕色.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -16.0$  ( $c$  1.0, MeOH). ESI-MS (positive),  $m/z$ : 239  $[M + H]^+$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$ : 6.40 (1H, s, H5), 3.84 (1H, m, H3'), 3.04 (1H, m, H2'), 2.14 (3H, s, H6-COMe), 2.12 (3H, s, H3-Me), 1.14 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H1'), 1.09 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H4').  $^{13}\text{C NMR}$  (DEPT) 数据见表 1.

化合物 **3** 为无色针状结晶 (甲醇), 其体积分数为 10% 的硫酸溶液显蓝色. m. p. 112 ~ 114 °C,

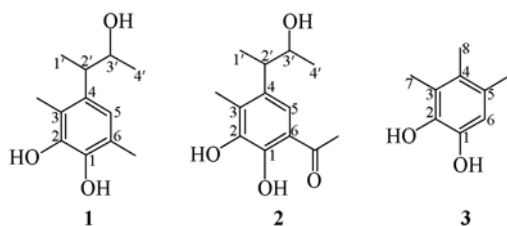


Fig. 1 Structures of compounds **1**—**3**

ESI-MS (positive),  $m/z$ : 153  $[M + H]^+$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ),  $\delta$ : 6.25 (1H, s, H6), 2.06 (3H, s, H7), 2.05 (3H, s, H8), 2.13 (3H, s, H9);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 154.4 (C1), 153.9 (C2), 135.4 (C3), 115.8 (C4), 110.3 (C5), 109.9 (C6), 11.9 (C7), 9.1 (C8), 20.3 (C9).  $^1H$  NMR 数据与文献[6]的数据基本一致.

## 1.6 抗菌实验

利用文献[7,8]中的方法, 采用滤纸片琼脂扩散法测定化合物的抗菌活性. 将化合物 **1**, **2** 和 **3** 配成质量浓度为 10 mg/mL 的样品溶液, 选用直径为 6 mm 的灭菌滤纸片, 分别加样品溶液 10, 20, 30  $\mu$ L, 每个加样品溶液的来菌滤纸以梯度重复 3 次. 待溶剂挥干后, 将已点样的滤纸片贴于已涂供试菌悬浮液 100  $\mu$ L (菌液浓度  $10^5 \sim 10^7$  cfu/mL) 的牛肉膏蛋白胨培养基上, 放置 20 min 后, 再放入培养箱中于 37  $^\circ$ C 无光照培养, 24 h 后测其抑菌圈大小.

## 2 结果与讨论

### 2.1 结构解析

化合物 **1**: ESI-MS (positive),  $m/z$ : 211  $[M + H]^+$ , 结合  $^{13}C$  NMR 和 DEPT 确定其分子式为  $C_{12}H_{18}O_3$ , 该分子式已得到高分辨质谱的确证: HR-ESI-MS (positive),  $m/z$ : 211.1332  $[M + H]^+$  ( $C_{12}H_{18}O_3$ , 计算值 211.1334).

在  $^1H$  NMR 谱上,  $\delta$  6.35 (1H, s) 为一个芳香氢信号,  $\delta$  3.05 (1H, m) 和  $\delta$  3.84 (1H, m) 为两个与甲基相连的次甲基氢信号. 另外, 高场区显示 4 个甲基氢信号 [ $\delta$  2.12 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.14 (3H, d,  $J=7.0$  Hz), 1.10 (3H, d,  $J=6.3$  Hz)], 其中后 2 个甲基分别与次甲基相连. 在  $^{13}C$  NMR 谱的芳香区显示有 6 个碳信号 [ $\delta$  154.6 (C), 154.4 (C), 141.6 (C), 116.0 (C), 110.6 (C), 106.5 (CH)], 提示该分子中有 1 个 5 取代的苯环, 其中化学位移较大的 2 个碳为羟基所取代.  $\delta$  72.2 和 42.9 为 2 个次甲基信号, 其中前者为羟基所取代. 高场区为 4 个甲基碳信号 ( $\delta$  8.9, 11.6, 16.3, 19.4). 根据以上信号初步推定化合物 **1** 为一个多取代的苯二酚.

通过 2D NMR ( $^1H$ - $^1H$  COSY, HMQC 和 HMBC) 实验, 可对化合物 **1** 的所有碳和氢的化学位移进行全归属 (表 1). 在  $^1H$ - $^1H$  COSY 谱中, 可观察到以下氢之间的相关信号:  $\delta$  1.14 (H1')/ $\delta$  3.05 (H2')/ $\delta$  3.84 (H3')/ $\delta$  1.10 (H4'), 说明化合物 **1** 中存在一个 2-(3-羟基-丁基) 的取代基团.

在 HMBC 谱 (图 2) 中,  $\delta$  141.6 (C4) 与 1.14 (H1'), 3.05 (H2'), 3.84 (H3') 之间的碳氢远程相关信号说明 2-(3-羟基-丁基) 应连在苯环的 4 位, 即 C2' 与 C4 相连.  $\delta$  2.05 处的甲基氢与  $\delta$  154.4 (C2), 116.0 (C3), 141.6 (C4) 之间的碳氢远程相关信号说明该甲基与苯环的 3 位相连; 同时  $\delta$  2.12 处的甲基氢与  $\delta$  154.6 (C1), 106.5 (C5), 110.6 (C6) 之间的碳氢远程相关信号说明该甲基与苯环的 6 位相连; 苯环的 1 位和 2 位碳的化学位移较大说明 1, 2 位均为羟基所取代.

综上所述, 可将化合物 **1** 的结构推定为 4-(3-Hydroxybutan-2-yl)-3,6-dimethylbenzene-1,2-diol. 化合物 **1** 中存在 2 个手性碳, 由于缺少模型化合物, 未对其构型作进一步确定.

化合物 **2**: ESI-MS (positive),  $m/z$ : 239  $[M + H]^+$ , 结合  $^{13}C$  NMR 和 DEPT 谱确定其分子式为  $C_{13}H_{18}O_4$ , 该分子式已得到高分辨质谱的确证: HR-ESI-MS (positive),  $m/z$ : 239.1282  $[M + H]^+$  ( $C_{13}H_{18}O_4$ , 计算值 239.1283).

化合物 **2** 的  $^1H$  NMR 谱与化合物 **1** 的  $^1H$  NMR 谱极为相似, 但比较二者的  $^{13}C$  NMR 谱后发现, 化合物 **2** 比化合物 **1** 多了一个酮羰基的碳信号 ( $\delta$  210.1), 且其中的一个甲基碳信号向低场位移至  $\delta$  30.6, 说明化合物 **1** 苯环上的一个甲基可能在化合物 **2** 中变为乙酰基. 化合物 **2** 的所有碳和氢的化学位移通过 2D NMR ( $^1H$ - $^1H$  COSY, HMQC 和 HMBC) 实验得到全归属 (表 1). 在化合物 **2** 的 HMBC 谱

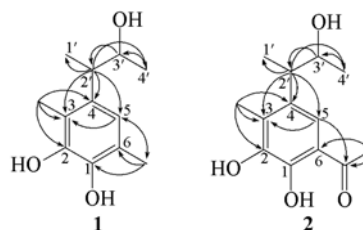


Fig. 2 Key HMBC correlations of compounds **1** and **2**

(图2)上,  $\delta$  2.14 处的甲基氢与 C6 ( $\delta$  112.8), H5 ( $\delta$  6.40) 与酮羰基碳 ( $\delta$  210.1) 之间的碳氢远程相关信号说明苯环的 6 位被一个乙酰基所取代; 其余的碳氢远程相关信号与化合物 **1** 基本一致。

综合上述信息, 可将化合物 **2** 的结构推定为 4-(3-Hydroxybutan-2-yl)-3-methyl-6-acetylbenzene-1,2-diol.

## 2.2 抗菌活性

通过测量抑菌圈的直径 ( $D$ ) 来确定抗菌活性 (见表 2), 结果表明, 化合物 **1** 和 **3** 具有一定的抗 MRSA 活性, 而化合物 **2** 没有活性。

Table 2 Antibacterial activities of compounds **1** and **3**\*

Bacteria	<b>1</b>			<b>3</b>		
	100 $\mu\text{g}/\text{dis}$	200 $\mu\text{g}/\text{dis}$	300 $\mu\text{g}/\text{dis}$	100 $\mu\text{g}/\text{dis}$	200 $\mu\text{g}/\text{dis}$	300 $\mu\text{g}/\text{dis}$
MRSA	6	7	8	10	15	17

\* Diameter of filter paper was 6 mm.

## 参 考 文 献

- [1] LIN Peng(林鹏). Journal of Xiamen University, Natural Science Edition(厦门大学学报, 自然科学版)[J], 2001, **40**(2): 592—603
- [2] Mari Yotsu, Tomoko Yamazaki, Yuko Meguro, *et al.*. Toxicon[J], 1987, **25**: 225—228
- [3] Huang Y. J., Wang J. F., LI G. L., *et al.*. FEMS Immunology and Medical Microbiology[J], 2001, **31**(2): 163—167
- [4] LIN Peng(林鹏), LIN Yi-Ming(林益明), YANG Zhi-Wei(杨志伟), *et al.*. Marine Sciences(海洋科学)[J], 2005, **29**(9): 76—79
- [5] Georgopapadakou N. H.. Infectious Disease[J], 2002, **5**: 181—191
- [6] Young A. J., Yang M. G., Youn Y. L.. Bulletin of the Korean Chemical Society[J], 1991, **12**(3): 253—254
- [7] XU Shu-Yun(徐叔云), BIAN Ru-Lian(卞如濂), CHEN Xiu(陈修). Methodology in Pharmacological Experiments(药理实验方法学)[M], Beijing: People's Medicine Publishing House, 2003: 1651—1653
- [8] GUO Qun-Qun(郭群群), DU Gui-Cai(杜桂彩), LI Rong-Gui(李荣贵), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(7): 1292—1294

## Antibacterial Constituents from the Endophytic Fungus *Penicillium* sp. of Mangrove Plant *Cerbera manghas*

HAN Zhuang<sup>1,2</sup>, MEI Wen-Li<sup>2</sup>, CUI Hai-Bin<sup>1,2</sup>, ZENG Yan-Bo<sup>2</sup>,  
LIN Hai-Peng<sup>2</sup>, HONG Kui<sup>2</sup>, DAI Hao-Fu<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Marine Biology, Shantou University, Shantou 515063, China;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology,

Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract** To study the anti-bacterial constituents from endophytic fungus 093701 of mangrove plant *Cerbera manghas*, three compounds were isolated by column chromatography from the broth of endophytic fungus *Penicillium* sp. of Mangrove plant *Cerbera manghas*, and their structures were elucidated as 4-(3-hydroxybutan-2-yl)-3,6-dimethylbenzene-1,2-diol (**1**), 4-(3-hydroxybutan-2-yl)-3-acetyl-6-methylbenzene-1,2-diol (**2**), 3,4,5-trimethyl-1,2-benzenediol (**3**) by MS, NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC *etc.*. Among them, compounds **1** and **2** were new compounds, compound **3** was a new natural product. Bioassay results showed that compounds **1** and **3** possessed inhibitory effects on MRSA, while compound **2** had no anti-MRSA activity.

**Keywords** Mangrove plant; Endophytic fungus; *Penicillium* sp.; Antibacterial; Chemical constituent

(Ed.: H, J, Z)