

江西青霉的次生代谢产物研究

陈超^{1,2}, 潘卫东^{2*}, 肖建辉³, 梁光义^{2,4}¹贵州大学, 贵阳 550025; ²贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002;³遵义医学院 贵州省细胞工程重点实验室, 遵义 563003; ⁴贵阳中医学院, 贵阳 550002

摘要:江西青霉是药用江西虫草的无性型, 本文对江西青霉发酵菌丝体甲醇提取物的正丁醇萃取部位运用反相色谱层析进行了系统的分离纯化, 得到了 6 个化合物。经波谱解析, 并结合理化鉴定, 确定这 6 个化合物结构为尿嘧啶(1)、2'-脱氧尿嘧啶核苷(2)、腺嘌呤(3)、腺苷(4)、L-焦谷氨酸甲酯(5)和 2'-甲氧基腺苷(6)。其中化合物 2、5 和 6 为首次从虫草属中分离获得的化合物。

关键词:江西青霉; 次生代谢产物; 分离纯化; 结构鉴定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Secondary Metabolites of *Penicillium jiangxiense*CHEN Chao^{1,2}, PAN Wei-dong^{2*}, XIAO Jian-hui³, LIANG Guang-yi^{2,4}

¹Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; ³Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Zunyi Medicinal College, Zunyi 563003, China; ⁴Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

Abstract: The chemical constituents of the n-butanol extractive of the mycelium of *Penicillium jiangxiense* (the anamorph of medicinal *Cordyceps jiangxiensis*) were separated and purified by various chromatographic techniques. Six compounds were obtained and their structures were elucidated on the basis of spectral analysis as uracil (1), 2'-deoxyuridine (2), adenine (3), adenosine (4), methyl L-pyroglutamate (5), 2'-O-methyladenosine (6), of which compounds 2, 5 and 6 were isolated from *Cordyceps* species for the first time.

Key words: *Penicillium jiangxiense*; secondary metabolites; purification; Structural identification

江西虫草 (*Cordyceps jiangxiensis*) 是一种具有自主知识产权特征的药用新源, 系我国知名真菌学专家梁宗琦先生首次报道^[1]。随后进一步分离和确证了其无性型是青霉属新种——江西青霉 *Penicillium jiangxiense*^[1]。本项目组在抗肿瘤药物筛选过程, 发现江西青霉菌丝体的提取物有显著的抗肿瘤效应, 具有较大的抗肿瘤药物的研发潜力^[2]。为此, 对江西青霉甲醇提取物进行了系统的化学分离。从江西青霉菌丝体甲醇提取物的正丁醇萃取部位中分离获得 6 个化合物, 分别鉴定为尿嘧啶(1)、2'-脱氧尿嘧啶核苷(2)、腺嘌呤(3)、腺苷(4)、L-焦谷氨酸甲酯(5)和 2'-甲氧基腺苷(6), 其中化合物 2、5

和 6 为首次从虫草属中分离获得的化合物。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

XT-2 型双目显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司); Autopol V 旋光仪(Rudolph Research Analytical 美国); HP-5973 型质谱仪(HP, 美国); HP1100 MSD 型质谱仪(HP, 美国); INOVA-400 核磁共振仪(Varian, 美国); 半制备高效液相色谱仪(Waters-600, 美国), 色谱柱为 C-18 反相硅胶柱。柱层析用硅胶(40~80 目、200~300、300~400, 硅胶 H)、薄层层析用硅胶(GF₂₅₄)及 GF₂₅₄ 薄层层析板(青岛海洋化工厂分厂); 反相材料 RP-18(40~63 μm)及 RP-18 薄层板(德国 Merck 公司); Sephadex LH-20(25~100 μm, 瑞典 Amersham Biosciences 公司)。

1.2 菌种来源

收稿日期: 2010-05-28 接受日期: 2010-07-08

基金项目: 国家自然科学基金(20762017), 贵州省优秀青年科技人才培养支持计划(黔科人字[2007]10 号), 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2007]2149 号)

* 通讯作者 Tel: 86-851-3805348; E-mail: wdpan@163.com

江西青霉 JXPJ 0109 菌株保藏在遵义医学院贵州省细胞工程重点实验室和贵州大学真菌资源研究所。

1.3 培养基^[3]

种子培养基: 葡萄糖 3%、蛋白胨 0.5%、酵母膏 0.5%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、琼脂 1.8%、初始 pH 7.0。

发酵培养基: 糖蜜或蔗糖 + 甘油 (m/v = 2:1) 4%、甘油 1%、花生或黄豆 0.5%、酵母膏 0.6%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 ZnCl_2 0.05%、初始 pH 6.0。

2 提取与分离

江西虫草发酵菌质粉用 90% 的甲醇-水进行提取 经减压浓缩得到的浸膏用温水重悬后 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取。本研究对其正丁醇萃取部位(400 g)进行了系统分离纯化,首先采用硅胶 G(200~300 目)层析柱,以氯仿-甲醇(50:1~0:1)进行梯度洗脱,得到 8 个组份,组份 IV(6 g)再通过硅胶 G(300~400 目,180 g)柱层析,以氯仿-甲醇(15:1~0:1)进行梯度洗脱,得到 63 个流份,经 TLC 检测,合并相同组份:将 Fr. 32-40 合并为 A,Fr. 21~31 合并为 B。A(600 mg)经过凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱,析晶得到化合物 1(13 mg),B(600 mg)经过反复凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱和制备 TLC 得到化合物 6(5 mg)。组分 VII(8 g)首先采用反相 RP-18 柱层析,以水-甲醇(9:1~0:1)进行梯度洗脱,得到 15 个流份。Fr. 1 首先经过凝胶 Sephadex LH-20 分离,再通过硅胶柱色谱(300~400 目)并先后以丙酮-甲醇(50:1),氯仿-甲醇(15:1)为洗脱液进行等度洗脱,分离得到化合物 3(20 mg)。Fr. 2 经反复重结晶得到化合物 2(19 mg),Fr. 3 采用硅胶柱色谱氯仿-甲醇(20:1)进行等度洗脱得到化合物 5(70 mg),Fr. 9 经反复重结晶得到化合物 4(100 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 无色针状结晶,mp. 335~337 °C; EI-MS m/z 113 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 7.34(1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-5), 5.60(1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 166.5(C-4), 153.2(C-2), 144.6(C-5), 102.1(C-6)。以上数据与文献^[4,5]基本一致,故将该化合物鉴定为尿嘧啶

(uracil)。

化合物 2 白色粉末, EI-MS m/z 228 $[\text{M}]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 7.66(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.09(1H, m, H-1'), 5.69(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 4.27(1H, m, H-3'), 3.86(1H, m, H-4'), 3.66(2H, m, H-5'), 2.21(1H, m, H-2'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 166.4(C-4), 151.7(C-2), 142.1(C-6), 102.2(C-5), 86.8(C-4'), 85.5(C-1'), 70.6(C-3'), 61.3(C-5'), 38.8(C-2')。以上数据与文献^[4,6]基本一致,故将该化合物鉴定为 2'-脱氧尿苷(2'-deoxyuridine)。

化合物 3 无色针状晶体, mp. 360~364 °C; EI-MS m/z 135 $[\text{M}]^+$, 108 δ 1; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 12.85(1H, s, H-9), 8.10(H, s, H-2), 8.08(H, s, H-8), 7.09(2H, s, NH_2)。以上数据与文献^[7]基本一致,故将该化合物鉴定为腺嘌呤(adenine)。

化合物 4 无色针状结晶, mp. 231~234 °C; ESI-MS m/z 268 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.17(1H, s, H-2), 8.07(1H, s, H-8), 5.90(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 5.87(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 5.45(1H, m, 2'-OH), 5.42(1H, m, 5'-OH), 5.19(1H, d, $J = 4.4$ Hz, 3'-OH), 4.60(1H, dd, $J = 6.0$, 6.0 Hz, H-2'), 4.13(1H, m, H-3'), 3.95(1H, m, H-4'), 3.66(1H, m, H-5'), 3.56(1H, m, H-5'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 157.2(C-6), 152.6(C-2), 148.1(C-4), 139.4(C-8), 118.2(C-5), 87.5(C-1), 85.6(C-4), 73.7(C-2), 71.7(C-3), 62.5(C-5)。以上数据与文献^[8]基本一致,故将该化合物鉴定为腺苷(adenosine)。

化合物 5 无色油状物, EI-MS m/z 287 $[2\text{M} + 1]^+$, 144 $[\text{M} + 1]^+$, 56; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 9.27(1H, H-1), 4.29(1H, dd, $J = 9.2$, 4.8 Hz, H-5), 3.75(3H, s, H-7), 2.28(2H, m, H-3), 2.14(2H, m, H-4); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 181.1(C-6), 174.5(C-2), 57.0(C-5), 52.1(C-7), 30.3(C-3), 25.8(C-4)。以上数据与文献^[8]基本一致,故将该化合物鉴定为 L-焦谷氨酸甲酯(methyl L-pyroglutamate)。

化合物 6 黄色油状物, ESI-MS m/z 281 $[\text{M}]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.54(1H, s, H-7), 8.18(1H, s, H-2), 6.05(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 4.49(1H, dd, $J = 5.2$, 3.2 Hz, H-3'), 4.42(1H, dd, $J = 6.0$, 4.8 Hz, H-2'), 4.15(1H, m, H-4'), 3.87

(1H, dd, $J = 2.4$ and 12.4 Hz, H-5') 3.74 (1H, dd, $J = 2.4$ and 12.4 Hz, H-5'); ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 153.6 (C-7), 141.9 (C-2), 89.2 (C-1'), 89.5 (C-4'), 84.6 (C-2'), 70.8 (C-3'), 63.2 (C-5'), 58.7 (2'-OCH₃)。以上数据与文献^[9]基本一致,故将该化合物鉴定为 2'-甲氧基腺苷(2'-methoxyadenosine)。

致谢: 本研究的核磁和质谱数据分别由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室的张建新副研究员和王道平老师测定,在此表示衷心的感谢。

参考文献

- Liang ZQ(梁宗琦), Liu AY(刘爱英), Liu ZY(刘作易). Flora Fungorum Sinicorum (Vol. 32) *Cordyceps* (虫草属), Beijing: Science Press 2007. 94-96.
- Xiao JH, Chen DX, Ning F, et al. Growth arrest of human gastric adenocarcinoma cells by bioactive compounds of *Cordyceps jiangxiensis* (CaoMuWang) through induction of apoptosis. *J Food Agric Environ* 2006 4: 66-73.
- Xiao JH(肖建辉), Chen DX(陈代雄), Liu JW(刘金伟). Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth of *Cordyceps jiangxiensis*. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报) 2004, 11: 26-31.
- Xu XL(徐秀丽), Song FX(宋福行), Fan X(范晓), et al. Studies on the chemical constituents of *Ascidian amaroucium* sp. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药) 2008, 19: 2632-2633.
- Shi XF(史雪凤), Tang XL(唐旭利), Li GQ(李国强), et al. Studies on chemical constituents of *Gorgonian muriceides collaris* from the South China Sea. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志) 2009, 28: 18-21.
- Li X(李想), Yao YH(姚燕华), Sun GZ(孙光芝), et al. Chemical constituents from marine-derived fungus of *Penicillium* sp. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2007, 19: 804-806.
- Chen Q(陈泉), Wu LJ(吴立军), Ruan LJ(阮丽军). Chemical studies on the constituents of *Lophatherum gracile* brongn. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2002, 19: 257-259.
- Cheng YX(程永现), Zhou J(周俊), Teng RW(腾荣伟), et al. Nitrogen-containing compounds from *Brachystemma calycinum*. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究) 2001, 23: 527-530.
- Yamada T, Kageyama K, Joh Y, et al. Naturally occurring 2'-O-methylpurine nucleosides with hypotensive properties. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54: 125-128.
- Zhang Y(张颖), Kong LY(孔令义). Studies on the chemical constituent of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* swingle. *Mod Chin Med* (中国现代中药) 2006, 6: 16-17, 23.
- Takasugi M, Anetai M, Masamune T, et al. Broussins A and B, new phytoalexins from diseased paper mulberry. *Chem Lett*, 1980, 3: 339-340.
- Takasugi M, Niino N, Nagao S, et al. Eight minor phytoalexins from diseased paper mulberry. *Chem Lett*, 1984, 5: 689-692.
- Yin ZQ(殷志琦), Chao JF(巢剑非), Zhang HL(张雷红), et al. Chemical constituents from *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 420-422.
- Vilegas W, Pozetti GL, Vilegas JHY. Coumarins from *Brosimum gaudichaudii*. *J Nat Prod*, 1993, 56: 416-417.
- Qin WJ(秦文杰), Wang GL(王钢力), Lin RC(林瑞超). Studies on chemical constituents of *Heterosmilax yunnanensis*. *J Chin Med Mat* (中药材) 2007, 8: 959-961.
- He ZH(何志恒), Luo YG(罗应刚), Li HJ(李洪娟), et al. Chemical study on *Porandra scandens*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2006, 18: 238-242.

(上接第 663 页)