

黄河三角洲耐盐真菌 *Penicillium chrysogenum* HK14-01 的次生代谢产物

曲鹏, 刘培培, 付鹏, 王义, 朱伟明*

海洋药物教育部重点实验室, 中国海洋大学医药学院, 青岛 266003

摘要: 【目的】从黄河三角洲耐盐微生物的代谢产物中寻找具有抗菌和抗肿瘤活性的化合物。【方法】应用化学与生物活性相集成的筛选方法, 从耐盐微生物中筛选获得代谢产物丰富并具有生物活性的目标菌株; 通过高盐胁迫目标菌株, 利用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和高效液相色谱等方法对发酵产物进行分离、纯化, 运用波谱解析、钼靶 X-射线单晶衍射分析、圆二色散谱 (CD) 和密度泛函理论 (DFT)-ECD 的计算鉴定化合物的结构。【结果】从采自黄河三角洲的泥土样品中得到一株耐盐真菌 HK14-01, 鉴定为产黄青霉 *Penicillium chrysogenum*; 从其发酵产物中分离鉴定了 8 个化合物: (2*S*, 3*R*)-oxaline (1, 主产物)、(3*R*, 4*R*)-3, 4, 8-trihydroxy-3, 4-dihydronaphthalen-1 (2*H*)-one (2)、(Z)-*N*-(4-hydroxystyryl) formamide (3)、(E)-*N*-(4-hydroxystyryl) formamide (4)、emodin (5)、4-(2-hydroxyethyl) benzene-1, 2-diol (6)、methyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (7) 和 2-(4-hydroxyphenyl) acetonitrile (8); 化合物 1、3 和 4 对大肠杆菌以及化合物 1 和 5 对金黄色葡萄球菌表现出抑菌活性, 化合物 5 对 P388 细胞表现出微弱的细胞增殖抑制活性。【结论】首次确定了化合物 2 的绝对构型、首次报道了化合物 1 和 2 的 CD 数据; 从黄河三角洲的耐盐微生物的次生代谢产物中可以得到活性化合物, 这一区域的耐盐微生物资源值得深入研究。

关键词: 黄河三角洲, 耐盐真菌, 产黄青霉, 次生代谢, 抗菌活性

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2012)09-1103-10

耐盐微生物是一类能够在含盐介质中正常生长的微生物^[1], 广泛存在于高盐、高压、寡营养的海洋环境中。普通微生物在这种特殊甚至可以说是极端的环境中也许是不能生存的, 但正是这种高渗环境可能激活了耐盐微生物的某些沉默基因, 进而诱导出独特的生物代谢途径^[2-3]。另一方面, 与菌株次生代谢相关的诱导酶的表达及活力受制于外界环境的改变, 而盐是其中重要的因素之一^[4-5]。因此, 培养基中盐度的改变能引起微生物次生代谢产物的变

化, 高渗环境培养可以诱导微生物产生不同于无盐和低盐条件下的化合物。如本课题组的王文良博士从 1 株来自吉兰泰盐场的耐盐菌株的代谢产物中分离得到了 3 个新骨架化合物 varicoloritides A-C^[6], 被 *Nat. Prod. Rep.* 杂志评为 2007 年的热点化合物之一^[7]。黄河三角洲滨海湿地是中国暖温带面积最大、自然性和原生性保持最好也是最年轻的滨海湿地生态系统。由于这一区域共有黄河等 10 多条河流入海, 营养物质充足, 存在丰富的生物多样

基金项目: 国家“973 项目”(2010CB833800); 国家自然科学基金(21172204); 山东省自然科学基金(ZR2009CQ030)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-532-82031268; E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn

作者简介: 曲鹏(1985-), 山东威海人, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋天然产物。E-mail: qpatqd@163.com

收稿日期: 2012-04-09; **修回日期:** 2012-05-14

性^[8]。同时,这一区域土壤盐渍化严重,很多地方土壤含盐量高,再加上受到海陆共同作用的影响,形成了独特的生态环境,所以我们有理由相信这里存在着独特的耐盐碱微生物资源,而且这些微生物资源有可能是结构新颖的活性化合物的重要来源,但是关于这一区域微生物次生代谢产物的研究却相对较少。本课题组近年来开展了黄河三角洲微生物的次生代谢产物研究,从一株放线菌 *Nocardioopsis dassonvillei* 的发酵产物中分离得到了3个新的具有抑菌活性的 α -吡喃酮类化合物 nocapyrones E-G 和4个新的生物碱类化合物^[9]。为了进一步研究黄河三角洲的耐盐碱微生物资源,作者对采自此区域的样品中的耐盐碱微生物进行了分离纯化,获得一株产生物碱类化合物的耐盐真菌——产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) HK14-01。对这株真菌在

高盐(10%盐度)条件下进行发酵培养,发酵产物经过各种色谱分离,共得到8个化合物,通过波谱学方法、钼靶 X-射线单晶衍射、CD 谱和密度泛函数(DFT)-ECD 计算等方法,将其结构依次鉴定为(2*S*, 3*R*)-oxaline (**1**, 主产物)^[10,11]、(3*R*, 4*R*)-3, 4, 8-trihydroxy-3, 4-dihydro naphthalen-1 (2*H*)-one (**2**)^[12]、(Z)-*N*-(4-hydroxystyryl) formamide (**3**)^[13]、(E)-*N*-(4-hydroxystyryl) formamide (**4**)^[13]、emodin (**5**)^[14]、4-(2-hydroxyethyl) benzene-1,2-diol (**6**)^[15]、methyl 2-(4-hydroxy phenyl) acetate (**7**)^[16] 和 2-(4-hydroxyphenyl) acetonitrile (**8**)^[17]。其中化合物**2**的绝对构型为首次确定,并通过钼靶 X-射线单晶衍射、比旋光和 Cotton 效应再次验证了(2*S*, 3*R*)-oxaline 的绝对构型^[11]。

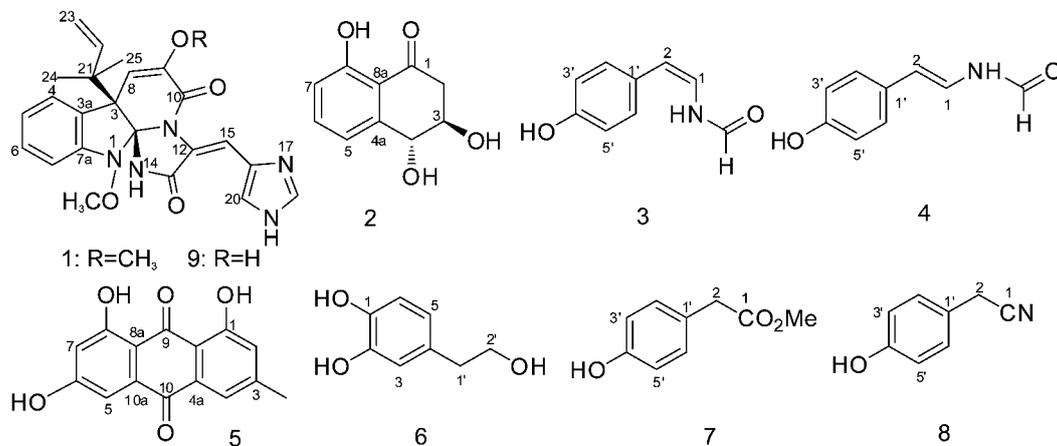


图 1 化合物 1-8 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-8.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株与肿瘤细胞:产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) HK14-01 分离自山东东营黄河三角洲的盐碱泥土样品,菌种保藏于本实验室 -80℃ 冰箱中。抑菌活性实验所用的 5 种致病菌(武汉大学提供)依次为:产气杆菌 *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13408)、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)、大肠杆菌 *Escherichia coli* (ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC 51650) 和白色念珠菌 *Candida albicans*

(ATCC 10231)。细胞毒活性实验所用的肿瘤细胞株 A549 (CCL-185)、K-562 (CCL-243)、Hela (CCL-2) 和 P388 为中国海洋大学医药学院药理学室提供。

1.1.2 试剂与仪器:质谱:Mariner API-TOF 型质谱仪;核磁共振谱:日本 JEOL 公司 JNM-ECP600 型核磁共振仪;X 射线衍射用 Bruker APEX-II CCD 型衍射仪;分析用高效液相色谱仪:日本岛津公司产品 [LC-6AD 泵, SPD-M20 AVP 检测器, SCL-10AV 型系统控制器, Capcell Park C18 柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)];半制备用高效液相色谱仪:Waters 公司产品 [Waters 1575 泵, Waters 2487 二极管阵列检测器, Millennium32 工作站, Capcell Park C18 柱 (5 μm, 20 mm × 250 mm)]。二氧化碳培养箱:

SANYO 公司 MCO175 型; 酶标仪: 美国 Molecular 公司 SPECTRAMAXplus 型酶标仪。胎牛血清 (FBS) 为 Hyclone 公司产品 (Cat. No. STF721); RPMI-1640 细胞培养基为 GIBCOBRL 公司产品; 丽丝胺罗丹明 B (SRB) 为 Sigma 公司产品; 柱色谱及薄层色谱用硅胶 H (10-40 μ m, 青岛海洋化工集团公司) 和 Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司)。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种发酵

按培养微生物的常规方法, 先将菌株接种到固体 PDA 平板培养基上, 在 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 4 d。用接种针挑取适量孢子和菌体, 接种于 200 个内装 300 mL 液体 YMDP 培养基 (酵母浸膏 3 g/L、麦芽浸粉 1.5 g/L、葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 5 g/L、海水素 100 g/L) 的 1000 mL 三角瓶中, 发酵量共 60 L, 静置发酵培养 35 d。

1.3 菌株提取物的制备

将菌株的发酵培养液经布氏漏斗和绢布过滤, 分为发酵液和菌丝体。发酵液直接用等量乙酸乙酯萃取 3 次, 将萃取液减压浓缩至干, 得到发酵液的乙酸乙酯浸膏 (I)。菌丝体用 80% 的丙酮水溶液超声破碎提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩至不含丙酮后, 用等量乙酸乙酯萃取 3 次, 将萃取液减压浓缩得到菌丝体的乙酸乙酯浸膏 (II)。合并浸膏 I 和 II 得到菌株的乙酸乙酯萃取物 39 g。

1.4 化合物的提取分离

乙酸乙酯提取物 39 g, 拌入硅胶后装硅胶减压柱, 以二氯甲烷-石油醚 (50% - 100%, V/V)、甲醇-二氯甲烷 (0 - 100%, V/V) 梯度洗脱, 经过 TLC 点板合样之后得到 12 个组分, Fr. 1-Fr. 12。首先对具有生物碱显色的 Fr. 9 组分进行分离, 经 RP-18 反相减压柱, 以甲醇-水 (60% - 100%, V/V) 为洗脱溶剂梯度洗脱得到 6 个组分 Fr. 9. 1-Fr. 9. 6, Fr. 9. 3 经二氯甲烷-甲醇 (1:1) 凝胶柱分离后得到组分 Fr. 9. 3. 1-Fr. 9. 3. 7。Fr. 9. 3. 5 经甲醇凝胶柱分离后得到有生物碱显色的化合物 **1** (145.0 mg)。Fr. 9. 3. 3 经甲醇凝胶柱后所得组分 Fr. 9. 3. 3. 3 再经 HPLC (80% 甲醇 + 0.5% 三氟乙酸) 分离, 制备得化合物 **5** (10.8 mg, $t_R = 7.98$ min)。Fr. 8 经丙酮-石油醚 (10 - 100%, V/V) 加压柱洗脱后的组分 Fr. 8. 3, 经过甲醇凝胶柱分离得到组分 Fr. 8. 3. 3, 经过二氯甲烷-甲醇 (1:1) 凝胶柱分离后所得组分 Fr. 8. 3. 3. 2 再

经 HPLC (20% 甲醇) 制备分别得到化合物 **2** (8.7 mg, $t_R = 11.98$ min)、**3** (7.2 mg, $t_R = 14.66$ min) 和 **4** (9.2 mg, $t_R = 23.82$ min)。Fr. 3 经过二氯甲烷-甲醇 (1:1) 凝胶柱分离所得组分 Fr. 3. 2 和 Fr. 3. 5, 再分别过甲醇凝胶柱分离后、用 HPLC (40% 甲醇) 制备得到化合物 **6** (3.3 mg, $t_R = 7.13$ min) 和 **7** (11.3 mg, $t_R = 10.76$ min)。Fr. 4 经过甲醇凝胶柱分离得到组分 Fr. 4. 5, 经过二氯甲烷-甲醇 (1:1) 凝胶柱纯化得到组分 Fr. 4. 5. 5, 再经 HPLC (85% 甲醇) 制备得到化合物 **8** (2.8 mg, $t_R = 6.53$ min)。

1.5 细胞毒活性测试

SRB 法^[18]: 取对数期生长的肿瘤细胞 (P388、K-562、A549、Hela), 与不同浓度的测试样品共同培养一定时间, 加入 50 μ L 预冷的 80% 三氯醋酸 TCA 固定, 放置一定时间后用去离子水冲洗 5 次, 甩干。然后每孔加入 150 μ L 的 SRB 进行染色, 染色之后使用 1% 醋酸洗掉未结合的 SRB。加 Tris 非缓冲液 100 μ L, 酶标仪 515 nm 测 OD 值, 计算抑制率, 评价化合物对细胞增殖的抑制作用。

1.6 抑菌活性测试

抑菌活性的测定采用药敏纸片法和二倍稀释法^[19]。按照文献方法, 使用涂布棒将产气杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均匀涂布到 LB 培养基 (酵母浸膏 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、琼脂 20 g/L) 上, 将白色念珠菌涂布到 YPD 培养基 (酵母浸膏 10 g/L、葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、琼脂 20 g/L) 上。用打孔器将滤纸制成直径为 6 mm 的无菌小圆纸片, 用移液枪吸取 10 μ L 待测化合物的甲醇溶液滴加在滤纸片上, 待甲醇挥发干后, 将其贴于准备好的含菌固体培养基中, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 - 48 h, 观察是否产生抑菌圈。重复 2 次, 同时以环丙沙星作为细菌的阳性对照, 酮康唑作为真菌的阳性对照, 甲醇溶剂为阴性对照。首次测试时配制化合物浓度为 1.0、0.1 mg/mL, 之后将有活性的浓度依次稀释 2 倍, 滤纸片周围存在抑菌圈的最小浓度, 即为最小抑制浓度 (MIC)。

1.7 单晶培养及衍射实验

取化合物 **1** 适量放入小玻璃瓶中, 加入石油醚/丙酮体积比为 1:1 的混合溶剂, 于室温下缓慢挥发至长成晶体。晶体呈无色透明块状, 分子式为 $C_{24}H_{25}N_5O_4$, 空间群为 $P2_12_12_1$, 属正交晶系, 晶胞参数: $a = 8.9097(7)$ \AA , $b = 16.0329(18)$ \AA , $c = 16.7015$

(16) Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, 晶胞体积 $V = 2385.8(4)$ Å³, 晶胞内不对称单位数 $Z = 4$, 计算晶体密度 $1.332\text{g}/\text{cm}^3$, 衍射实验用晶体大小为 $0.38 \times 0.21 \times 0.10$ mm。使用 Bruker SMART 平面检测衍射仪收集衍射强度数据, Mo-K α 辐射 ($\lambda = 0.71073$ Å), 采用直接法 (Shelxs-97) 解析晶体结构^[20]。收集总衍射点数为 8803 个, 独立衍射点数为 2404 个, 可观察点数 ($|F|^2 \geq 2\sigma|F|^2$) 为 1495 个。最终可靠因子 $R_1 = 0.0480$, $wR_2 = 0.092$ ($w = 1/\sigma|F|^2$)。化合物 1 的晶体学数据已经收录在剑桥晶体数据中心, CCDC 编号为 869933 (e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)。

2 结果和讨论

2.1 菌株鉴定

采用核糖体基因转录间隔区 (ITS) 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增菌株 HK14-01 的 ITS 序列。以所提的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 纯化测序后, 菌株 HK14-01 的 ITS 序列 DNA 长度为 572bp (基因登录号为 JQ861220)。比对 ITS 序列, 比较基因序列的同源性, 发现测试结果与 *Penicillium chrysogenum* 序列 100% 吻合, 因此鉴定菌株 HK14-01 为产黄青霉 *P. chrysogenum*。

2.2 菌株发酵条件的确定

比较了不同盐度 (0%、3.3% 和 10% 海水素)、不同的基础培养基和不同培养方式 (摇床、静置) 培养时菌株次生代谢产物的产量、化学多样性及其对 P388 的细胞毒活性。发现在高盐条件下 (盐度 10%) 的 YMDP 培养基中静置发酵时, 菌株 *P. chrysogenum* HK14-01 发酵产物的乙酸乙酯提取物的产量最高 (600 mg/L)、对 P388 的细胞毒活性最强 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下的抑制率为 25%); 对 Dragendorff 显色剂显橘黄色, 提示可能含有生物碱类化合物, 并且此化合物在 HPLC 指纹图谱上经紫外检测器检测, 显示在 330nm 处有最大吸收峰, 提示可能具有较大且新颖的共轭基团, 于是决定对菌株 *P. chrysogenum* HK14-01 在此条件下进行大量发酵。

2.3 化合物 1 的单晶衍射结果

通过 X-Ray 单晶衍射后确定了化合物 1 为 oxaline, 其结构如图 2 所示。

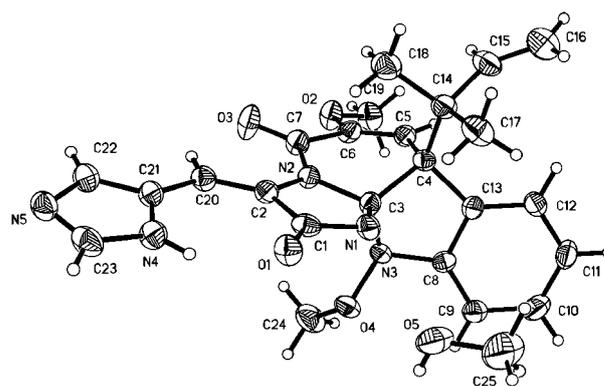


图 2 化合物 1 的晶体结构

Fig. 2 X-ray crystal structure of compound 1.

2.4 化合物的结构鉴定及数据

化合物 1, 无色正交晶体, $[\alpha]_D^{25} -35.0$ (c 0.1, CHCl_3), CD (MeOH, c 0.05) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 345 (-12.4)、275 (+20.7)、259 (+18.3)、247 (+22.1) 和 224 (-52.3) nm。阳离子 ESI-MS 在 m/z 448.1 处给出分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 结合 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 DEPT 谱推测分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_4$ 。氢谱中给出典型的 1,2-二取代苯环的特征吸收、二个甲氧基信号, 数据库检索表明化合物 1 的核磁数据与 oxaline 相符^[10], 故鉴定化合物 1 为 oxaline, 其 NMR 数据如下: ¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.57 (d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H, H-4), 7.08 (t, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H, H-5), 7.26 (t, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H, H-6), 6.95 (d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H, H-7), 11.98 (br s, 1H, NH-14), 8.31 (s, 1H, H-15), 12.05 (br s, 1H, NH-17), 7.43 (s, 1H, H-18), 6.08 (br s, 1H, H-22), 5.08 (br d, $J = 14.0\text{Hz}$, 1H, H-23a), 5.12 (br d, $J = 18.3\text{Hz}$, 1H, H-23b), 1.25 (s, 3H, H-24), 1.29 (s, 3H, H-25), 3.70 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.62 (s, 3H, 9-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} 101.7 (qC, C-2), 52.6 (qC, C-3), 146.6 (qC, C-3a), 124.9 (CH, C-4), 123.5 (CH, C-5), 128.7 (CH, C-6), 112.1 (CH, C-7), 146.8 (qC, C-7a), 107.0 (CH, C-8), 126.1 (qC, C-9), 157.6 (qC, C-10), 123.2 (qC, C-12), 166.3 (qC, C-13), 110.0 (CH, C-15), 126.3 (qC, C-16), 136.7 (CH, C-18), 134.1 (CH, C-20), 42.5 (qC, C-21), 142.8 (CH, C-22), 114.2 (CH₂, C-23), 24.1 (CH₃, C-24), 23.7 (CH₃, C-25), 55.8 (CH₃, 1-OCH₃), 65.4 (CH₃, 9-OCH₃)。化合物 1

的相对构型是通过钼靶 (Mo-K α) X-ray 单晶衍射确定的, 其异戊烯基和酰胺基处于吡啶吡啶酮环的同侧, 即为顺式构型 (图 2)。其相对构型与文献报道的 meleagrinsin (9) 的一致^[21], 其差别仅在于 9-位上的取代基不同, oxaline 可视作 meleagrinsin 的 9-O-甲基的衍生物。又由于 meleagrinsin 的绝对构型已通过重原子单晶衍射确定^[21-22], 故通过比对二者的旋光和 CD 谱中的 Cotton 效应, 可确定化合物 1 的绝对构型。化合物 1 与 meleagrinsin 的比旋光均为左旋 (-35 vs -116)、具有相同的 Cotton 效应 (meleagrinsin 在 342、275、257、247 和 224 nm 的 Cotton 效应依次为 +、+、+ 和 -)^[21], 表明其具有相同的绝对构型, 即 (2*S*, 3*R*)-。这与通过铜靶 (Cu-K α) 单晶衍射确定的绝对构型相一致^[11]。

化合物 2, 褐色油状物, $[\alpha]_D^{25} + 61.0$ (*c* 0.48, CH₃OH), CD (MeOH, *c* 0.05) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 258 (-3.0) 和 213 (+4.9) nm。阳离子 ESI-MS 在 *m/z* 195.1 处给出分子离子峰 $[M + H]^+$, 结合¹H-NMR、¹³C-NMR 和 DEPT 谱推测分子式为 C₁₀H₁₀O₄。对氢谱进行分析, 显示出一个 1,2,3-三取代苯环的信号 [δ_H 7.56 (1H, t, *J* = 8.2 Hz)、7.06 (1H, d, *J* = 7.1 Hz)、6.87 (1H, d, *J* = 8.2 Hz)]、1 个酚羟基信号 δ_H 12.27 (1H, s)、两个连氧次甲基信号 [δ_H 3.98 (1H, ddd)、4.49 (1H, d, *J* = 6.1 Hz)] 及一个亚甲基信号, 碳谱显示一个羰基信号 δ_C 204.6 (qC), 表明分子中存在 3,4-二羟基-1-丁酰基 (-CH-CH-CH₂-CO-) 片段。其核磁数据如下:¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 2.67 (dd, *J* = 7.1, 17.0 Hz, 1H, H-2 β), 3.02 (dd, *J* = 3.9, 17.0 Hz, 1H, H-2 α), 3.98 (ddd, *J* = 3.9, 6.1, 6.9 Hz, 1H, H-3), 4.49 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-4), 7.06 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-5), 7.56 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7), 5.81 (s, 1H, 3-OH), 5.44 (s, 1H, 4-OH), 12.27 (s, 1H, 8-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 204.6 (qC, C-1), 43.8 (CH₂, C-2), 71.5 (CH, C-3), 70.3 (CH, C-4), 146.1 (qC, C-4a), 137.5 (CH, C-5), 115.9 (CH, C-6), 116.6 (CH, C-7), 161.6 (qC, C-8), 120.0 (qC, C-8a)。这些数据报道的 3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one 相符^[12]。文献显示: 此类化合物的 C-3 和 C-4 位的两个羟基位于环的异侧时 *J*_{3,4} = 7.0 Hz、同侧时 *J*_{3,4}

= 2.8 Hz^[12], 而化合物 2 的 *J*_{3,4} = 6.1 Hz, 表明化合物 2 中两个羟基的相对构型为反式。化合物 2 的绝对构型是通过密度泛函 (DFT)-ECD 的计算来确定的。先利用 HyperChem 7.5 软件对化合物进行稳定构象搜索, 将最稳定构象在 B3LYP/6-31G(d) 水平下进行构象优化; 再将优化后的最优构象利用 TDDFT^[23-25] 的方法在 B3LYP/6-31G(d) 水平下进行电子激发能和转动强度的计算, 此计算利用 SCRF/PCM^[26-27] 的方法考虑甲醇的溶剂效应。结果如图 3 所示, 曲线 I 为化合物 2 的 CD 实测曲线, 曲线 II 为我们通过计算得到的 (3*S*, 4*S*)-构型的 ECD 曲线, 曲线 III 为 (3*R*, 4*R*)-的 ECD 曲线, 可以看出曲线 III 与实测的曲线 I 基本吻合, 因此确定化合物 2 的绝对构型为 (3*R*, 4*R*)-, 即化合物 2 为结构确定为 (3*R*, 4*R*)-3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one。这是首次确定该化合物的绝对构型。

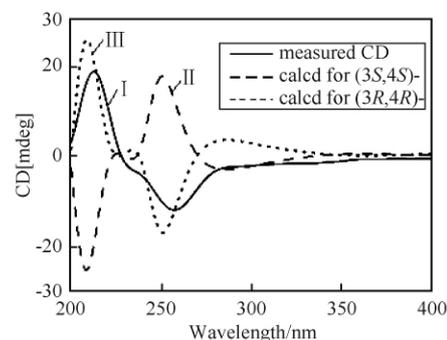


图 3 化合物 2 的实验 CD 与计算 CD

Fig. 3 The measured CD and calculated ECD spectra of compound 2.

化合物 3, 无色固体。阳离子 ESI-MS 在 *m/z* 164 处给出准分子离子峰 $[M + H]^+$ 峰, 提示该化合物含奇数个 N 原子; 结合¹H-NMR 和¹³C-NMR 确定该分子组成为 C₉H₉NO₂。氢谱于 δ_H 7.19 (2H, d, *J* = 8.3 Hz) 和 6.78 (2H, d, *J* = 8.3 Hz) 的吸收信号提示分子中存在 1,4-二取代的苯环, 而在 δ_H 6.64 (1H, d, *J* = 9.8 Hz) 和 δ_H 5.61 (1H, d, *J* = 9.8 Hz) 的吸收信号则表明分子中存在一个顺式构型的乙烯基片段。氢谱和碳谱的吸收信号还表明分子中存在一个甲酰基 [$\delta_{C/H}$ 169.5 (qC) / 8.10 (s)]。其波谱数据与文献报道的 (*Z*)-*N*-(4-羟基苯乙烯基)甲酰胺 [(*Z*)-*N*-(4-hydroxy styryl) formamide]^[13] 相符, 确定了此化合物结构, 其核磁数据如下:¹H-NMR

(600 MHz, DMSO- d_6) δ_H 6.64 (d, $J=9.8$ Hz, 1H, H-1), 5.60 (d, $J=9.8$ Hz, 1H, H-2), 7.19 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, H-2'/6'), 6.77 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, H-3'/5'), 8.10 (s, 1H, -CHO), 9.83 (brs, 1H, NH); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C 118.2 (CH, C-1), 111.3 (CH, C-2), 126.5 (qC, C-1'), 130.1 (CH, C-2'/6'), 116.0 (CH, C-3'/5'), 156.8 (qC, C-4'), 160.5 (CH, -CHO)。

化合物 4, 无色固体。阳离子 ESI-MS 在 m/z 164 处给出分子离子峰 $[M+H]^+$, 提示该化合物含奇数个 N; 结合 1H NMR 和 ^{13}C NMR 确定该分子组成为 $C_9H_9NO_2$, 表明其为化合物 3 的异构体。其 1H NMR 信号与化合物 3 相似, 区别在于 4 中烯双键的 2 个氢其偶合常数为 14.3Hz, 与反式烯质子相符, 故确定为 (*E*)-*N*-(4-羟基苯乙烯基)甲酰胺 [(*E*)-*N*-(4-hydroxystyryl)formamide] [13]。其核磁数据如下: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H 7.21 (dd, $J=14.3, 9.3$ Hz, 1H, H-1), 6.14 (d, $J=14.3$ Hz, 1H, H-2), 7.15 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, H-2'/6'), 6.69 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, H-3'/5'), 8.06 (s, 1H, -CHO), 10.17 (d, $J=9.3$ Hz, 1H, NH); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C 119.5 (CH, C-1), 113.7 (CH, C-2), 127.4 (qC, C-1'), 127.1 (CH, C-2'/6'), 116.1 (CH, C-3'/5'), 156.9 (qC, C-4'), 159.2 (CH, -CHO)。

化合物 5, 黄色粉末。阴离子 ESI-MS 在 m/z 269.1 处给出 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, 提示分子量为 270, 结合氢谱和碳谱推测分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$ 。紫外光谱中在 440nm 处出现最大吸收, 提示可能为蒽醌衍生物。氢谱给出了 3 个酚羟基 [δ_H 12.05 (1H, br s)、11.98 (1H, br s)、11.39 (1H, br s)]、4 个芳氢质子 [δ_H 7.44 (1H, s)、7.12 (1H, s)、7.08 (1H, s)、6.57 (1H, s)] 以及 1 个甲基 [δ_H 2.39 (3H, s)], 表明存在 2 个 1,3-未取代的苯环, 可能为蒽醌类化合物。其核磁数据与文献报道的大黄素 (emodin) 相符 [14]: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H 7.12 (s, 1H, H-2), 2.39 (s, 3H, 3-Me), 7.44 (s, 1H, H-4), 7.08 (s, 1H, H-5), 6.57 (s, 1H, H-7), 12.05 (br s, 1H, 1-OH), 11.39 (br s, 1H, 6-OH), 11.98 (br s, 1H, 8-OH); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C 162.0 (qC, C-1), 124.6 (CH, C-2), 148.8 (qC, C-3), 22.1 (CH₃, 3-Me),

121.0 (CH, C-4), 133.3 (qC, C-4a), 109.3 (CH, C-5), 165.0 (qC, C-6), 108.4 (CH, C-7), 166.1 (qC, C-8), 109.4 (qC, C-8a), 190.2 (qC, C-9), 113.9 (qC, C-9a), 181.8 (qC, C-10), 135.6 (qC, C-10a)。故化合物 5 的结构鉴定为大黄素。

化合物 6, 褐色油状。正离子 ESI-MS 在 m/z 155.1 处给出 $[M+H]^+$ 峰, 结合碳谱氢谱确定分子式为 $C_8H_{10}O_3$ 。其 1H -NMR 在芳香质子区 δ_H 6.57 (1H, s)、 δ_H 6.42 (1H, d, $J=8.2$ Hz) 和 δ_H 6.60 (1H, d, $J=8.2$ Hz) 显示有 1 个 1,2,4-三取代苯环的信号, 在高场区 δ_H 2.52 (2H, t, $J=6.8$ Hz) 和 3.50 (2H, t, $J=6.8$ Hz) 显示有 1 个羟乙基 (CH₂CH₂OH) 的吸收信号; 碳谱和 DEPT 谱也提示 1 个三取代苯环和 1 个 CH₂CH₂OH 的存在。推测化合物 6 的结构为 4-(2-羟乙基)-1,2-苯二酚 [4-(2-hydroxyethyl)benzene-1,2-diol], 其波谱数据与文献值相符 [15]: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H 6.57 (s, 1H, H-3), 6.42 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-5), 6.60 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-6), 2.52 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, H-1'), 3.50 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, H-2'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C 143.9 (qC, C-1), 145.4 (qC, C-2), 116.8 (CH, C-3), 130.7 (qC, C-4), 120.0 (CH, C-5), 115.9 (CH, C-6), 39.1 (CH₂, C-1'), 63.2 (CH₂, C-2')。

化合物 7, 无色油状。正离子 ESI-MS 在 m/z 167.1 处给出 $[M+H]^+$ 峰, 结合碳谱氢谱确定分子式为 $C_9H_{10}O_3$ 。氢谱在芳香质子区 δ_H 6.69 (2H, d, $J=8.8$ Hz) 和 δ_H 7.03 (2H, d, $J=8.8$ Hz) 显示有 1 个对位二取代苯环的氢信号, 于高场区 δ_H 3.58 (3H, s) 和 δ_H 3.52 (2H, s) 分别显示 1 个甲氧基和 1 个亚甲基信号, 低场区 δ_H 9.35 (1H, br s) 还出现了 1 个酚羟基。结合碳谱中的酯羰基信号 δ_C 172.6 (qC), 推测化合物 7 为 4-羟基苯乙酸甲酯 [methyl 2-(4-hydroxyphenyl)acetate], 其波谱数据与文献值相符 [16]: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H 3.52 (s, 2H, H-2), 3.58 (s, 3H, -OCH₃), 7.03 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-2'/6'), 6.69 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-3'/5'), 9.35 (br s, 1H, 4'-OH); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C 172.6 (qC, C-1), 40.0 (CH₂, C-2), 52.1 (CH₃, -OCH₃), 125.0 (qC, C-1'), 130.8 (CH, C-2'/6'), 115.7 (CH, C-3'/5'), 156.8 (qC, C-4')。

化合物 **8**, 无色固体。正离子 ESI-MS 在 m/z 134.1 处给出 $[M + H]^+$ 峰, 提示可能含有奇数个 N, 结合碳谱氢谱确定分子式为 C_8H_7NO 。其氢谱在芳香质子区 δ_H 7.12 (2H, d, $J = 8.2$ Hz) 和 7.65 (2H, d, $J = 8.2$ Hz) 显示有 1 个对位二取代苯环的氢信号, 氢谱中还在 δ_H 3.86 (2H, s) 和 δ_H 9.53 (1H, br s) 分别显示 1 个亚甲基和 1 个酚羟基的质子信号。此外, 碳谱在 120.3 ppm 显示 1 个特征的氰基碳信号, 因此推测化合物 **8** 为对羟基苯乙腈 [2-(4-hydroxyphenyl) acetonitrile]。其波谱数据与文献值相符^[17]: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H 3.86 (s, 2H, H-2), 7.12 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3'/5'), 7.65 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2'/6'), 9.53 (br s, 1H, 4'-OH); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C 120.3 (qC, C-1), 22.1 (CH₂, C-2), 121.6 (qC, C-1'), 129.8 (CH, C-2'/6'), 116.2 (CH, C-3'/5'), 157.3 (qC, C-4')。

2.5 细胞毒活性测定结果

测试了化合物 **1-8** 对肿瘤细胞 P388 和 K-562 的细胞毒活性, 结果表明: 只有化合物 **1, 2, 5** 对小鼠白血病细胞 P388 细胞表现出微弱的抑制活性, IC₅₀ 分别为 100、128 和 55 $\mu\text{mol/L}$ (5-氟尿嘧啶为阳性对照, 对 P388 和 K-562 的 IC₅₀ 分别为 5.8 和 5.1 $\mu\text{mol/L}$), 其它化合物没有肿瘤细胞毒活性 (IC₅₀ > 150 $\mu\text{mol/L}$)。还测试了化合物 **3** 和 **4** 对肿瘤细胞 HeLa 和 A549 的细胞毒活性, 但其不显示细胞毒活性 (IC₅₀ > 150 $\mu\text{mol/L}$)。

2.6 抑菌活性测定结果

化合物 **1-8** 对大肠杆菌、产气杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌的抑菌测试结果如表 1 所示。化合物 **1, 3** 和 **4** 对大肠杆菌以及化合物 **1** 和 **5** 对金黄色葡萄球菌表现出弱的抑菌活性, 其最小抑菌浓度 (MIC) 分别为 22.4 $\mu\text{mol/L}$ 、30.7 $\mu\text{mol/L}$ 、61.3 $\mu\text{mol/L}$ 、11.2 $\mu\text{mol/L}$ 和 37.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 讨论

经过近一个世纪对土壤微生物资源的不断研究, 许多菌株被重复开发, 从中发现已知活性物质的重现率升高, 而活性新化合物的出现率降低。从特殊环境微生物资源中发现活性新化合物成为发现新

表 1 化合物 **1-8** 抑菌活性测试结果 (MIC, $\mu\text{mol/L}$)

table 1 Antimicrobial activity of compounds **1-8** (MIC, $\mu\text{mol/L}$)

Compound	<i>E. coli</i>	<i>B. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	22.4	>100	11.2	>100	>100
2	>100	>100	>100	>100	>100
3	30.7	>100	>100	>100	>100
4	61.3	>100	>100	>100	>100
5	>100	>100	37.0	>100	>100
6	>100	>100	>100	>100	>100
7	>100	>100	>100	>100	>100
8	>100	>100	>100	>100	>100
Ciprofloxacin	0.1	3.4	0.4	13.6	—
ketoconazole	—	—	—	—	9.4

抗生素的主要途径之一。黄河三角洲由于其独特的地理位置和生态环境, 有着丰富的微生物资源, 靠近黄河入海口又决定这一区域存在着我们需要的耐盐碱微生物, 但研究却较少开展。含氮化合物 oxaline (**1**) 最早是从草酸青霉菌 *P. oxalicum* 次生代谢产物中分离得到的^[28]。这个生物碱在结构上的独特之处在于 N-OMe 的基团、同一个碳上连有 3 个含氮的取代基、以及较罕见的脱氢组氨酸部分, 尽管其晶体结构早已报道, 但晶体数据不全、其绝对构型一直未确定^[30]。我们已通过铜靶单晶衍射确定了其绝对构型^[11], 本文在通过钨靶单晶衍射确定其相对构型的基础上, 通过与 oxaline 的类似物 meleagrins (即 9-O-去甲基 oxaline) 比较 Cotton 效应和比旋光的方法, 再次验证了 oxaline 的绝对构型。从生物活性看, oxaline 是一种微管抑制剂, 可破坏微管的生成并阻止微管蛋白的聚合, 将细胞周期阻滞于 M 期, 从而抑制肿瘤细胞的增殖^[29]。一些天然的抗癌药物, 如紫杉醇和长春新碱^[31], 正是通过影响微管的作用, 在 M 期使肿瘤细胞凋亡。本文在营养不丰富的 YMDP 培养基上高盐胁迫 (静置培养) 耐盐真菌 *P. chrysogenum* HK14-01, oxaline 的产量可以达到 200 mg/L, 通过优化可以成为 oxaline 的高产菌株, 为 oxaline 的后续研究提供药源。另 2 个含氮化合物 **3** 和 **4** 的类似物被发现具有抑菌活性^[32], 但化合物 **1, 3, 4** 的抑菌活性均为首次报道。

除海洋环境外, 盐场、盐湖、盐碱地等含盐环境中也存在大量的耐盐真菌。作者曾从盐场耐盐真菌 *Aspergillus varicolor* B-17^[6, 33] 以及海洋耐盐真菌 *A. sclerotiorum* PT06-1^[34-35]、*A. terreus* PT06-2^[36]、*Alternaria raphani* THW-18^[37] 和 *P. chrysogenum*

PXP-55^[38] 高盐条件下的培养产物中获得了大量的结构新颖的含氮化合物; 结合本文从耐盐真菌 *P. chrysogenum* HK14-01 的发酵产物中获得的 3 个含氮化合物 **1**、**3** 和 **4** (其中化合物 **1** 的产量较高) 的研究结果, 表明: 高盐胁迫所产生的高渗环境有利于某些真菌产生含氮化合物, 这些极性较大的含氮化合物的产生可能有助于缓解盐胁迫造成的高渗透压^[39]。黄河三角洲地区的耐盐碱微生物是获取结构独特且具有生物活性的化合物的重要资源, 值得深入研究。

致谢 感谢生工生物(上海)有限公司协助完成菌株的鉴定工作。

参考文献

- [1] Hasan HAH. Studies on toxicogenic fungi in roasted foodstuff (salted seed) and halotolerant activity of emodin-producing *Aspergillus wentii*. *Folia Microbiologica*, 1998, 43 (4) : 383-391.
- [2] Koch AL. Genetic response of microbes to extreme challenges. *Journal of Theoretical Biology*, 1993, 160 (1) : 1-21.
- [3] Mejanelle L, Lopez JF, Gunde-Cimerman N, Grimalt JO. Ergosterol biosynthesis in novel melanized fungi from hypersaline environments. *Journal of Lipid Research*, 2001, 42 (3) : 352-358.
- [4] Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews*, 2006, 106 (8) : 3468-3496.
- [5] McAlpine JB. Advances in the understanding and use of the genomic base of microbial secondary metabolite biosynthesis for the discovery of new natural products. *Journal of Natural Products*, 2009, 72 (3) : 566-572.
- [6] Wang WL, Zhu TJ, Tao HW, Lu ZY, Fang YC, Gu QQ, Zhu WM. Three novel, structurally unique spirocyclic alkaloids from the halotolerant B-17 fungus strain of *Aspergillus varicolor*. *Chemistry & Biodiversity*, 2007, 4 (12) : 2913-2919.
- [7] Robert AH, Andrew S. Hot off the Press. *Natural Product Reports*, 2008, 25 (1) : 11-14.
- [8] 张绪良, 肖滋民, 徐宗军, 张朝晖. 黄河三角洲滨海湿地的生物多样性特征及保护对策. *湿地科学 (Wetland Science)*, 2011, 9 (2) : 125-132.
- [9] Fu P, Liu PP, Qu HJ, Wang Y, Chen DF, Wang H, Li J, Zhu WM. α -Pyrone and diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Nocardioopsis dassonvillei* HR10-5. *Journal of Natural Products*, 2011, 74 (10) : 2219-2223.
- [10] Nagel DW, Pachler KGR, Steyn PS, Vlegaar R, Wessels PL. The chemistry and ¹³C NMR assignments of oxaline, a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron*, 1976, 32 (21) : 2625-2631.
- [11] Qu P, Wu ZY, Zhu WM. Redetermined structure of oxaline: absolute configuration using Cu K α radiation. *Acta Crystallographica*, 2012, E68 (6) : o1626.
- [12] Fkyerat A, Tabacchi R, Couche E. Stereoselective Synthesis of cis- and trans-3, 4- dihydro-3, 4, 8-trihydroxynaphthalen-1 (2H)-one. *Helvetica Chimica Acta*, 2009, 92 (5) : 903-918.
- [13] 蒋亭, 田黎, 劳彦斌, 李军, 林文翰. 黄海葵附生真菌 *Penicillium* sp. 化学成分的研究 (1). *中国海洋药物 (Chinese Journal of Marine Drugs)*, 2001, (3) : 40-42.
- [14] 许颂, 梁华清. 刺人参的萜醌成分研究. *中草药 (Chinese Herbal Medicines)*, 1998, 29 (4) : 222-223.
- [15] Park CH, Kim KH, Lee IK, Lee SY, Choi SU, Lee JH, Lee KR. Phenolic constituents of *Acorus gramineus*. *Archives of Pharmacal Research*, 2011, 34 (8) : 1289-1296.
- [16] Wiel T, Matthijs KJ, Odermatt S, Schanen P, Seiler P, Diederich F. 1, 3-Diethynylallenes: stable monomers, length-defined oligomers, asymmetric synthesis, and optical resolution. *European Journal of Organic Chemistry*, 2007, (21) : 3449-3462.
- [17] Fleming P, O'Shea DF. Controlled anion migrations with a mixed metal Li/K-TMP amide: General application to benzylic metalations. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133 (6) : 1698-1701.
- [18] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82 (13) : 1107-1112.
- [19] Zaika LL. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 1988, 9 (2) : 97-118.
- [20] Sheldrick GM. Program for crystal structure solution. Göttingen: University of Göttingen, 1997.
- [21] Nozawa K, Nakajima S, Iitaka Y, Kawai KI. Studies on fungal products. VII: the structures of meleagrins and 9-O-p-bromobenzoylmeleagrins. *Chemical & Pharmaceutical*

- Bulletin, 1984, 32 (1) : 94-98.
- [22] Nozawa K, Nakajima S. Isolation of radicicol from *Penicillium luteo-aurantium*, and meleagrins, a new metabolite, from *Penicillium meleagrinum*. *Journal of Natural Products*, 1979, 42 (4) : 374-377.
- [23] Casida ME. Recent advances in density functional methods, part I. Singapore: World Scientific, 1995.
- [24] Gross E, Kohn W. Time-dependent density-functional theory. *Advances in Quantum Chemistry*, 1990, 21 : 255-291.
- [25] Runge E, Gross E. Density-functional theory for Time-dependent systems. *Physical Review Letters*, 1984, 52 (12) : 997-1000.
- [26] Miertus S, Tomasi J. Approximate evaluations of the electrostatic free energy and internal energy changes in solution processes. *Chemical Physics*, 1982, 65 (2) : 239-245.
- [27] Cammi R, Tomasi J. Remarks on the use of the apparent surface charges (ASC) methods in solvation problems: Iterative versus matrix-inversion procedures and the renormalization of the apparent charges. *Journal of Computational Chemistry*, 1995, 16 (12) : 1449-1458.
- [28] Steyn PS. The isolation, structure and absolute configuration of secalonic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron*, 1970, 26 (1) : 51-57.
- [29] Nagel DW, Pachler KGR, Steyn PS, Wessels PL, Gafner G, Kruger GJ. X-ray structure of oxaline: a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1974, (24) : 1021-1022.
- [30] Koizumi Y, Arai M, Tomoda H, Omura S. Oxaline, a fungal alkaloid, arrests the cell cycle in M phase by inhibition of tubulin polymerization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1693 (1) : 47-55.
- [31] Iwasaki S. Antimitotic agents: chemistry and recognition of tubulin molecule. *Medicine Research Review*, 1993, 13 (2) : 183-198.
- [32] Harrison IT, Kurz W, Massey IJ, Unger SH. Antibacterial activity of *N*-(β -styryl) formamides related to tuberin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1978, 21 (6) : 588-591.
- [33] Wang WL, Lu ZY, Tao HW, Zhu TJ, Fang YC, Gu QQ, Zhu WM. Isoechinulin-type alkaloids, varicolorin A-L, from halotolerant *Aspergillus varicolor*. *Journal of Natural Products*, 2007, 70 (10) : 1558-1564.
- [34] Zheng JK, Zhu HJ, Hong K, Wang Y, Liu PP, Wang X, Peng XP, Zhu WM. Novel cyclic hexapeptides from marine-derived fungus, *Aspergillus sclerotiorum* PT06-1. *Organic Letters*, 2009, 11 (22) : 5262-5265.
- [35] Zheng JK, Xu ZH, Wang Y, Hong K, Liu PP, Zhu WM. Cyclic tripeptides from the halotolerant fungus *Aspergillus sclerotiorum* PT06-1. *Journal of Natural Products*, 2010, 73 (6) : 1133-1137.
- [36] Wang Y, Zheng JK, Liu PP, Wang W, Zhu WM. Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium. *Marine Drugs*, 2011, 9 (8) : 1368-1378.
- [37] Wang WL, Wang Y, Tao HW, Peng XP, Liu P, Zhu WM. Cerebrosides of the halotolerant fungus *Alternaria raphani* isolated from a sea salt field. *Journal of Natural Products*, 2009, 72 (9) : 1695-1698.
- [38] Peng XP, Wang Y, Sun KL, Liu PP, Yin X, Zhu WM. Cerebrosides and 2-pyridone alkaloids from the halotolerant fungus *Penicillium chrysogenum* grown in a hypersaline medium. *Journal of Natural Products*, 2011, 74 (5) : 1298-1302.
- [39] 朱伟明, 王俊锋. 海洋真菌生物活性物质研究之管见. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2011, 30 (2) : 218-228.

Secondary metabolites of halotolerant fungus *Penicillium chrysogenum* HK14-01 from the Yellow River Delta area

Peng Qu, Peipei Liu, Peng Fu, Yi Wang, Weiming Zhu*

Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education of China, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: [Objective] To search for structurally novel and biologically active compounds from the secondary metabolites of halotolerant fungi from the Yellow River Delta area. [Methods] We screened halotolerant fungi with rich chemical diversity and antitumor or antimicrobial activity by means of integrated chemical and biological method. We cultured halotolerant fungi under different conditions at first. Then we investigated the chemical diversity and the bioactivity of the EtOAc extracts of the fermentation broth by HPLC and TLC, and cytotoxic assay or antimicrobial assay. We selected *Penicillium chrysogenum* HK14-01 to further study for the large yield, producing alkaloids and cytotoxicity on P388 cells in YMDP culture medium containing 10% NaCl. We fermented *P. chrysogenum* HK14-01 on a large scale; we isolated and purified the compounds by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, and semipreparative HPLC; and we identified the structures by spectroscopic analysis, X-ray diffraction (Mo-K α), CD spectra and the time-dependent density functional theory electronic circular dichroism (TDDFT ECD) calculation. [Results] We isolated and identified a halotolerant fungal strain, *P. chrysogenum* HK14-01, from the sediments collected in the Yellow River Delta area. From the fermentation broth of *P. chrysogenum* HK14-01, we isolated and identified eight compounds, i. e. (2*S*,3*R*)-oxaline (**1**, a major product), (3*R*,4*R*)-3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one (**2**), (*Z*)-*N*-(4-hydroxy styryl) formamide (**3**), (*E*)-*N*-(4-hydroxystyryl) formamide (**4**), emodin (**5**), 4-(2-hydroxyethyl) benzene-1,2-diol (**6**), methyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**7**), and 2-(4-hydroxyphenyl) acetonitrile (**8**). [Conclusion] Bioactive compounds can be obtained from the secondary metabolites of halotolerant microorganisms from the Yellow River Delta area.

Keywords: Yellow River Delta, halotolerant fungus, *Penicillium chrysogenum*, secondary metabolites, antimicrobial activity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Basic Research Program of China (2010CB833800), by the National Natural Science Foundation of China (21172204) and by the Shandong Natural Science Foundation (ZR2009CQ030)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-82031268; E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn

Received: 9 April 2012/Revised: 14 May 2012