

南海珊瑚共附生真菌 NG-15-3 中蒽醌和含氮类次生代谢产物研究*

李秀婷¹, 刘炳新¹, 胡谷平², 汪玉梅¹, 张翠仙¹

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 为了研究南海珊瑚共附生真菌 NG-15-3 次生代谢产物, 采用硅胶柱层析和 HPLC 等分离手段从乙酸乙酯提取部位分离得到单体化合物, 结合现代波谱技术、物理常数对照对单体化合物的结构进行结构鉴定。从其分离得到 4 个蒽醌类: emodin (2)、1-*O*-methyl emodin (3)、physcion (4)、carviolin (5) 和 6 个含氮类次生代谢产物: preechinulin (1)、cyclo-(Phe-Gly) (6)、cyclo-(Gly-Pro) (7)、3H-imidazole-4-carboxylic acid (8)、2-methyl-3H-imidazole-4-carboxylic acid (9) 和 1H-pyrrole-2-carboxylic acid (10)。所有化合物均为首次从该真菌中分离得到, 且化合物 1 为单去氢 2, 5-二酮哌嗪类化合物的前体物质, 具有丰富的生理活性。

关键词: 珊瑚共附生真菌; NG-15-3; 蒽醌; 含氮类化合物; 结构鉴定

中图分类号: O629.7; R93 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2016) 01-0096-06

Anthraquinones and nitrogen secondary metabolites from the coral-derived symbiotic fungi NG-15-3 of South China Sea

LI Xiuting¹, LIU Bingxin¹, HU Guping², WANG Yumei¹, ZHANG Cuixian¹

(1. School of Chinese Material Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

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

Abstract: In order to study the secondary metabolites from the coral-derived symbiotic fungi NG-15-3 of South China Sea, the compounds were isolated by silica gel column chromatography and HPLC. Their structures were identified on the basis of spectral data and physical constant comparison. Four anthraquinones and six nitrogen compounds were isolated as preechinulin (1), emodin (2), 1-*O*-methyl emodin (3), physcion (4), carviolin (5), cyclo-(Phe-Gly) (6), cyclo-(Gly-Pro) (7), 3H-imidazole-4-carboxylic acid (8), 2-methyl-3H-imidazole-4-carboxylic acid (9) and 1H-pyrrole-2-carboxylic acid (10). All the secondary metabolites were firstly acquired from the coral-derived symbiotic fungi NG-15-3 of South China Sea and compound 1 was a precursors of the monodehydro-2, 5-diketopiperazines, which showed varied biological activity.

Key words: coral-derived symbiotic fungi; NG-15-3; anthraquinones; nitrogen compounds; structural identification

* 收稿日期: 2015-09-05

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2014A030313411); 国家自然科学基金资助项目 (81001370); 广东省科技计划资助项目 (2015A020216017); 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室联合基金资助项目 (LMB101002); 2015 年广东省大学生科技创新培育专项资金资助项目 (粤财教 [2015] 219 号)

作者简介: 李秀婷 (1993 年生), 女; 研究方向: 天然药物化学; 通讯作者: 张翠仙; E-mail: zhangcuixian@aliyun.com

由于海洋具有高压、高盐、低光照等特殊的物理化学环境,使得生存其中的微生物有异于陆生微生物的独特生物合成代谢途径^[1],并产生结构丰富、活性多样的次生代谢产物,是创新药物及其先导结构的重要来源^[2-3]。前期实验研究表明,OSMAC策略对南海珊瑚共附生真菌 NG - 15 - 3 次生代谢产物产生明显影响,并采用 TLC 及 HPLC 方法对其建立指纹图谱,筛选出最佳培养条件。本文对真菌 NG - 15 - 3 在最佳 GPY 培养基(发酵液和菌丝体)乙酸乙酯提取部位进行次生代谢产物研

究,通过柱层析(硅胶、ODS 和 Sephadex LH - 20 等)及 HPLC 分离纯化,共分离得到 10 个单体化合物,经过 NMR 和 MS 及物理常数对照确定结构为 preechinulin (1)、emodin (2)、1-*O*-methyl emodin (3)、physcion (4)、carviolin (5)、cyclo-(Phe-Gly) (6)、cyclo-(Gly-Pro) (7)、3H-imidazole-4-carboxylic acid (8)、2-methyl-3H-imidazole-4-carboxylic acid (9) 和 1H-pyrrole-2-carboxylic acid (10)。所有化合物均为首次从该真菌中分离得到。

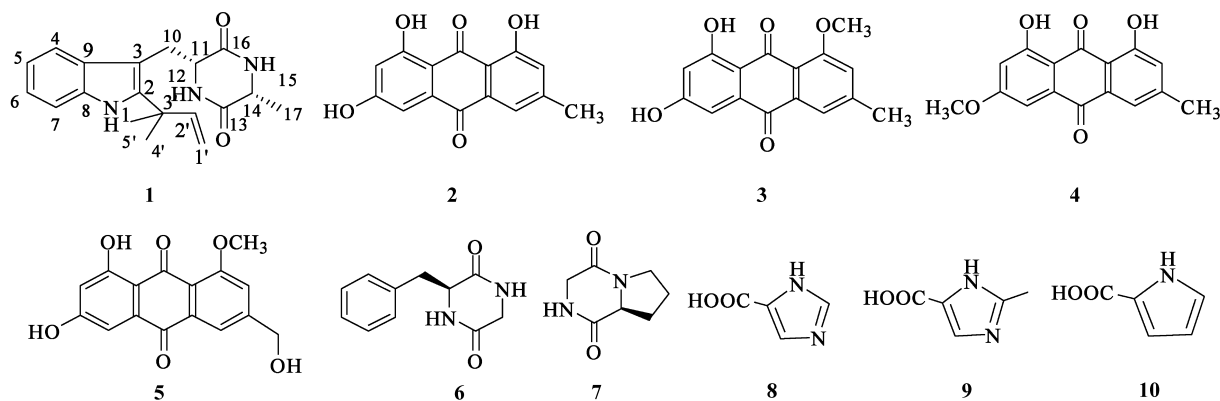


图 1 南海珊瑚共附生真菌 NG - 15 - 3 中蒽醌(2, 3, 4, 5)和含氮类化合物(1, 6, 7, 8, 9, 10)

Fig. 1 Compounds 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 from the coral-derived symbiotic fungi NG-15 - 3 of South China Sea

文献调研表明:叶立德类化合物大多来自真菌,主要有抗氧化、抗菌和免疫调节活性^[4]。朱伟明研究小组^[5]研究了该类化合物的抗肿瘤与抗氧化活性,结果表明 C - 10/C - 11 双键的存在可以大大加强此类化合物的抗氧化活性。化合物 1 为单去氢 2, 5 - 二酮哌嗪类化合物的前体物质,这类化合物有多种官能团,是进行结构修饰或改造的较好的前体物质,可以通过化学方法或生物转化的方法提高该类化合物的活性,得到能够成药高活性的先导化合物。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:(单人)超净工作台(苏州净化设备厂);LX-B75L 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器(合肥华泰医疗设备有限公司);HYG-A 全温摇瓶柜(常州市三盛仪器制造有限公司);RE - 2010 恒温水油浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);ER - 120A 电子天平(日本 A&D 公司);VANCE AV400 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);VG ZABHS 质谱仪(美国 Finnigan 公司);LCQDE-

CAXP 高效液相色谱 - 质谱联用仪(美国 Finnigan 公司);QuikSep 高效液相色谱仪(北京慧德易科技有限责任公司)。

试剂:蛋白胨、酵母膏(生物试剂,广东环凯微生物科技有限公司);葡萄糖(AR,天津市大茂化学试剂厂);海盐(微生物养殖用);马铃薯(市场购买);石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、正丁醇、甲醇(AR,天津市富宇精细化工有限公司);Sephadex LH - 20 葡聚糖凝胶(GE 医疗集团),GF₂₅₄薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂),柱层析硅胶(200 ~ 300 目,青岛海洋化工厂)。

PDA 培养基:马铃薯 200 g/L、葡萄糖 $w = 2.0\%$ 、土豆汁用陈海水作溶剂配制, pH 自然。

GPY 培养基(w):葡萄糖 1.0%、海盐 0.25%、酵母膏 0.2%、蛋白胨 0.1%, pH = 7.0 ~ 7.5。

1.2 实验材料

实验菌株 NG - 15 - 3 于 2012 年采自中国南海东锣鼓附近海域珊瑚的共附生真菌,种属未鉴定,菌种(No. NG - 15 - 3)保存在广州中医药大学中药学院海洋天然药物实验室。

1.3 共附生真菌 NG15-3 活化与发酵

1.3.1 活化 用接种环从 NG-15-3 菌种保存管中取适量的种子,接种到装有 40 mL PDA 培养基的 100 mL 三角瓶中,在 28 ℃ 的摇床中 165 r/min 培养 2 d,获得 NG-15-3 的种子培养液。

1.3.2 发酵 吸取该种子液 5 mL 加入装有 500 mL GPY 培养基的 1 L 三角烧瓶中,在 28 ℃ 下静置培养 60 d,与空白培养基对比观察是否有明显的菌株生长,成长完便停止发酵(共发酵菌液 208 L)。

1.4 提取与分离

菌液用纱布过滤,收集菌丝体和发酵液。培养液在 75 ℃ 水浴条件下浓缩至 10 L,所得浓缩液依次用等体积的乙酸乙酯(EtOAc)、正丁醇(*n*-BuOH)进行分配萃取 3~5 次,分别减压回收溶剂后得到发酵液的 EtOAc 浸膏 44 g 及 *n*-BuOH 浸膏 76 g。菌丝体用甲醇浸泡提取 3 次(1 次/d),所得提取液减压浓缩共得到甲醇浸膏 56.5 g,该浸膏用水溶解,依次用等量的 EtOAc 和 *n*-BuOH 进行分配萃取,分别萃取 3 次,得到菌丝体的 EtOAc 浸膏 0.5 g 和 *n*-BuOH 部位浸膏 5 g。经 TLC 追踪显示,发酵液与菌丝体的 EtOAc 相成分相似,故合并二者 EtOAc 相(共 44.5 g)。

取 EtOAc 部位浸膏(44.5 g)经硅胶柱分离,以 PE/EtOAc 体系梯度洗脱,TLC 薄层跟踪并合并流份得到 10 个不同极性的组分(标记为 Fr1-10)。从 Fr1 流份中抽滤并重结晶得到化合物 4(9 mg)。Fr2 流份经硅胶柱层析(PE/EtOAc 洗脱)得到 9 个不同极性组分(Fr2-1~2-9),Fr2-5 经 HPLC 纯化($\varphi=35\%$ MeOH-H₂O)得到化合物 2(5 mg)。Fr4 流份经硅胶柱层析(PE/EtOAc 洗脱)得到 8 个不同极性组分(Fr4-1~4-8),Fr4-3 经 HPLC 纯化($\varphi=75\%$ MeOH-H₂O)得到化合物 3(15 mg)。Fr5 流份经硅胶柱层析(PE/EtOAc 洗脱)得到 6 个不同极性组分(Fr5-1~5-5),Fr5-2 经 HPLC 纯化($\varphi=25\%$ MeOH-H₂O)得到化合物 10(8 mg)。从 Fr6 流份中抽滤并重结晶得到化合物 5(90 mg)。Fr7 流份经硅胶柱层析,经 PE/EtOAc 洗脱,得到化合物 8(30 mg)和化合物 9(10 mg)。Fr8 流份经硅胶柱层析(PE/EtOAc 洗脱)并经 HPLC 纯化($\varphi=25\%$ MeOH-H₂O)得到化合物 1(14 mg)。Fr9 流份经硅胶柱层析(PE/EtOAc 洗脱)得到化合物 6(5 mg)。从 Fr10 流份中重结晶得到化合物 7(5 mg)。

1.5 物理常数与波谱数据

化合物 1,分子式为 C₁₉H₂₃N₃O₂,白色固体(甲

醇), θ_{mp} 为 210~214 ℃,碘蒸气显色。ESI-MS m/z : 324[M-H]⁻。¹H NMR(500 MHz, Pyr-*d*₅) δ_H : 11.30(1H,s), 9.38(1H,s), 7.98(1H,dd, 6.0, 3.0 Hz), 7.43~7.34(1H,m), 7.23(2H,m), 6.34(1H,dd, 17.4, 10.5 Hz), 5.20(1H,dd, 17.4, 1.1 Hz), 5.14(1H,dd, 10.5, 1.2 Hz), 4.81~4.76(1H,m), 4.39(1H,dd, 7.0, 2.5 Hz), 4.10(1H,dd, 14.4, 3.1 Hz), 3.65(1H,dd, 14.4, 11.1 Hz), 1.75(3H,d, 7.1 Hz), 1.63(6H,d, 15.5 Hz); ¹³C NMR(100 MHz, Pyr-*d*₅) δ_C : 168.3(C), 168.1(C), 146.5(CH), 142.1(C), 135.3(C), 129.5(C), 121.0(CH), 118.9(CH), 118.4(CH), 111.0(C), 110.9(CH), 105.6(CH₂), 56.4(CH), 51.2(CH), 39.1(C), 31.9(CH₂), 28.1(CH₃), 28.0(CH₃), 21.2(CH₃)。

化合物 2,分子式为 C₁₅H₁₀O₅,橙红色针状结晶(甲醇), θ_{mp} 为 262~265 ℃,紫外灯 365 nm 下呈红色荧光。ESI-MS m/z : 269[M-1]⁻。¹H NMR(400 MHz, Pyr-*d*₅) δ_H : 12.43(2H,s), 7.71(1H,s), 7.70(1H,d, 4.0 Hz), 7.13(1H,s), 7.0(1H,d, 4.0 Hz); ¹³C NMR(100 MHz, Pyr-*d*₅) δ_C : 190.17(C), 181.67(C), 166.96(C), 165.40(C), 162.12(C), 147.85(C), 133.25(C), 124.03(CH), 120.59(CH), 113.68(C), 109.61(CH), 109.17(C), 108.34(CH), 29.44(C), 21.18(CH₃)。

化合物 3,分子式为 C₁₆H₁₂O₅,砖红色片状结晶(甲醇), θ_{mp} 为 265~267 ℃,紫外灯 365 nm 下呈红色荧光。ESI-MS m/z : 283[M-1]⁻。¹H NMR(400 MHz, Pyr-*d*₅) δ_H : 13.9(1H,s), 7.80(1H,d, 2.3 Hz), 7.67(1H,d, 1.1 Hz), 7.14(1H,s), 7.06(1H,d, 2.3 Hz), 3.90(3H,s), 2.22(3H,s); ¹³C NMR(100 MHz, Pyr-*d*₅) δ_C : 186.9(C), 182.7(C), 165.5(C), 163.7(C), 162.4(C), 146.1(C), 137.5(C), 132.5(C), 124.1(CH), 119.2(CH), 114.9(C), 113.3(C), 107.5(CH), 105.1(CH), 55.8(OCH₃), 21.1(CH₃)。

化合物 4,分子式为 C₁₆H₁₂O₅,橙黄色针状结晶(甲醇), θ_{mp} 为 203~207 ℃,紫外灯 365 nm 下呈红色荧光。ESI-MS m/z : 283[M-1]⁻。¹H NMR(400 MHz, Pyr-*d*₅) δ_H : 13.00(1H,s), 12.29(1H,s), 7.69(1H,s), 7.50(1H,s), 7.13(1H,s), 6.90(1H,s), 3.78(3H,s), 2.25(3H,s); ¹³C NMR(100 MHz, Pyr-*d*₅) δ_C : 190.4(C), 181.3(C), 166.4(C), 165.04(C), 162.17(C), 148.2(C), 135.0(C), 133.1(C), 124.1(CH), 120.8(CH), 113.6(C), 110.1(C), 108.0(CH), 106.4(CH), 55.6

(OCH₃), 21.2 (CH₃)。

化合物 **5**, 分子式为 C₁₆H₁₂O₆, 橙黄色针状结晶 (甲醇), θ_{mp} 为 284 ~ 286 °C, 紫外灯 365 nm 下呈红色荧光。ESI-MS m/z : 299 [M - 1]⁻。¹H NMR (400 MHz, Pyr - d₅) δ_H : 13.99 (1H, s), 8.11 (1H, s), 7.80 (1H, d, 2.2 Hz), 7.67 (1H, s), 7.06 (1H, d, 2.2 Hz), 4.98 (2H, s), 3.91 (3H, s); ¹³C NMR (100 MHz, Pyr - d₅) δ_C : 187.0 (C), 182.7 (C), 165.6 (C), 163.8 (C), 162.8 (C), 151.6 (C), 137.6 (C), 132.8 (C), 121.1 (C), 116.0 (CH), 115.7 (CH), 113.4 (C), 107.5 (CH), 105.2 (CH), 62.8 (CH₂OH), 55.8 (OCH₃)。

化合物 **6**, 分子式为 C₁₁H₁₂N₂O₂, 白色粉末 (甲醇), θ_{mp} 为 266 ~ 268 °C, 碘蒸气显色。ESI-MS m/z : 203 [M - H]⁻。¹H NMR (400 MHz, Pyr - d₅) δ_H : 9.29 (1H, s), 9.01 (1H, s), 7.24 ~ 7.45 (2H, m), 7.26 ~ 7.19 (3H, m), 4.59 (1H, m), 3.96 (1H, dd, 17.2, 3.2 Hz), 3.50 (1H, d, 17.2 Hz), 3.45 (1H, dd, 13.2, 5.6 Hz), 3.29 (1H, dd, 13.2, 4.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, Pyr - d₅) δ_C : 168.4 (C), 166.7 (C), 136.9 (C), 130.7 (2CH), 128.7 (CH), 127.2 (2CH), 57.3 (CH), 45.0 (CH₂), 40.8 (CH₂)。

化合物 **7**, 分子式为 C₇H₁₀N₂O₂, 无色透明固体 (甲醇), θ_{mp} 为 220 ~ 223 °C, 紫外灯 254 nm 下有暗斑。ESI-MS m/z : 153 [M - H]⁻。¹H NMR (400 MHz, MeOD - d₄) δ_H : 4.26 ~ 4.15 (1H, m), 4.09 (1H, ddd, 16.8, 2.0, 1.0 Hz), 3.73 (1H, d, 16.8 Hz), 3.53 (2H, ddd, 17.3, 11.9, 6.0 Hz), 2.39 ~ 2.24 (1H, m), 2.06 ~ 1.86 (3H, m); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD - d₄) δ_C : 171.31 (C), 165.64 (C), 60.18 (CH), 48.24 (CH₂), 46.58 (CH₂), 30.09 (CH₂), 23.89 (CH₂)。

化合物 **8**, 分子式为 C₄H₄N₂O₂, 白色粉末 (甲醇), θ_{mp} 为 212 ~ 214 °C, 碘蒸气显色, 紫外灯 254 nm 下有深暗斑。ESI-MS m/z : 111 [M - H]⁻。¹H NMR (400 MHz, Pyr - d₅) δ_H : 7.52 (1H, s), 5.82 (1H, d, 7.6 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, Pyr - d₅) δ_C : 167.0 (C), 154.5 (C), 143.3 (CH), 102.5 (CH)。

化合物 **9**, 分子式为 C₅H₆N₂O₂, 白色粉末 (甲醇), θ_{mp} 为 248 ~ 252 °C, 碘蒸气显色, 紫外灯 254 nm 下有深暗斑。ESI-MS m/z : 125 [M - H]⁻。¹H NMR (400 MHz, Pyr - d₅) δ_H : 7.26 (1H, s), 1.92 (3H, s); ¹³C NMR (100 MHz, Pyr - d₅) δ_C : 170.3 (C), 166.2 (C), 153.2 (C), 137.9 (CH), 19.2

(CH₃)。

化合物 **10**, 分子式为 C₅H₅NO₂, 棕色柱状固体 (甲醇), θ_{mp} 为 204 ~ 208 °C, 硫酸/香草醛显砖红色, ESI-MS m/z : 110 [M - H]⁻。¹H NMR (400 MHz, Pyr - d₅) δ_H : 13.05 (1H, s), 7.42 (1H, ddd, 3.7, 2.3, 1.6 Hz), 7.32 (1H, td, 2.7, 1.6 Hz), 6.48 (1H, dt, 3.6, 2.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, Pyr - d₅) δ_C : 163.8 (COOH), 125.1 (C), 123.3 (C), 115.3 (C), 109.9 (C)。

2 结果分析与讨论

化合物 **1**, 白色固体 (甲醇), 碘蒸气显色, ESI-MS m/z : 324 [M - H]⁻ 结合 NMR 推断其分子式为 C₁₉H₂₃N₃O₂, 不饱和度为 10。¹H NMR (400 MHz, Pyr - d₅) δ_H : 11.30 (1H, s), 9.38 (1H, s) 提示有氮上活泼氢的存在, δ_H 7.98 (1H, dd, 6.0, 3.0 Hz), 7.43 ~ 7.34 (1H, m), 7.23 (2H, m) 则显示化合物 **1** 的芳香区有 1,2-二取代的苯环上 4 个芳氢, 氢谱上还出现了一个反异戊烯基信号 δ_H 6.34 (1H, dd, 17.4, 10.5 Hz), 5.20 (1H, dd, 17.4, 1.1 Hz), 5.14 (1H dd, 10.5, 1.2 Hz), 1.63 (6H, d, 15.5 Hz) 和丙氨酸信号 δ_H 3.65 (1H, dd, 14.4, 11.1 Hz), 1.75 (3H, d, 7.1 Hz), 一个亚甲基 δ_H 4.39 (1H, dd, 7.0, 2.5 Hz), 4.10 (1H, dd, 14.4, 3.1 Hz) 和一个次甲基信号 4.81 ~ 4.76 (1H, m)。结合氢谱和碳谱中显示的亚甲基、脂肪族仲碳和叔碳信号, 这些结果说明 **1** 中通过亚甲基将吡啶环和二酮哌嗪连接起来。将 **1** 的 NMR 数据与文献 preechinulin^[6] 数据对照, 基本一致。故确定 **1** 为 preechinulin。

2007 年 Kimoto 等^[7] 从一株真菌 *Eurotium rubrum* Hiji025 代谢产物中分离得到一新的 echinulin 类化合物 neoechinulin A, 由于结构中存在 C-10/C-11 双键, 该化合物具有保护来源于 SIN-1 的过氧亚硝酸引发的神经元细胞 PC12 死亡的作用以及抗氧化和抗硝化活性。C-10/C-11 为双键时, 一个完整二酮哌嗪基团的是反硝化活性必不可少的, 但反氧化剂或细胞保护活性不需要^[4], 但 Preechinulin 的 C-10/C-11 位只存在单键, 所以其抗氧化活性比较弱。Preechinulin 这类化合物有多种官能团, 是进行结构修饰或改造的较好的前体物质, 可以通过化学方法或生物转化的方法提高该类化合物的活性, 得到能够成药高活性的先导化合物。

化合物 **2**, 橙红色针状结晶 (甲醇), 紫外灯 365 nm 下呈红色荧光, KOH 显色呈粉红色, 提示

为蒽醌类物质。ESI-MS m/z : 269 $[M-1]^-$, 结合 NMR 推断其分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$, 不饱和度为 11。 ^{13}C NMR 中 δ_c 190.17 (C) 和 181.67 (C) 出现两个羰基信号; 同时 ^1H NMR 谱中显示在 δ_H 12.43 (2H, s) 出现 2 个与羰基形成分子内氢键的酚羟基信号; 在 7.71 (1H, s), 7.70 (1H, d, 4, 0 Hz), 7.13 (1H, s), 7.0 (1H, d, 4.0 Hz) 出现了苯环上的 4 个取代的氢信号; 另外还有 1 个与芳香环相连的甲基信号 2.24 (3H, s)。将 **2** 的 NMR 数据与文献 emodin^[8] 数据对照, 基本一致。故确定 **2** 为 emodin。

化合物 **3**, 砖红色片状结晶 (甲醇), KOH 显色呈红色, 提示为蒽醌类物质, 紫外灯 365 nm 下呈红色荧光。ESI-MS m/z : 283 $[M-1]^-$, 结合 NMR 推断其分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$, 不饱和度为 11。 δ_c 186.9 (C) 和 182.7 (C) 出现两个羰基信号, δ_H 13.90 (1H, s) 为分子内氢键的酚羟基信号, 同时 δ_H 7.80 (1H, d, 2.3 Hz) 和 7.06 (1H, d, 2.3 Hz), 7.67 (1H, d, 1.1 Hz), 7.14 (1H, s) 又可推断有 4 个芳香氢取代并且间位耦合, 3.90 (3H, s) 和 2.22 (3H, s) 分别显示有甲氧基和甲基基团。将 **3** 的 NMR 数据与文献 1-O-methyl emodin^[8-9] 数据对照, 基本一致。故确定 **3** 为 1-O-methyl emodin。

化合物 **4**, 橙黄色针状结晶 (甲醇), 紫外灯 365 nm 下呈红色荧光, KOH 显色呈红色, 提示为蒽醌类物质。ESI-MS m/z : 283 $[M-1]^-$, 结合 NMR 推断其分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$, 不饱和度为 11。 ^1H NMR 谱中显示在 δ_H 13.00 (1H, s), 12.29 (1H, s) 出现 2 个与羰基形成分子内氢键的酚羟基信号, 在 δ_H 7.69 (1H, s), 7.50 (1H, s), 7.13 (1H, s), 6.90 (1H, s) 出现了苯环上的 4 个取代的氢信号, 另外还有 2 个单峰甲基信号 δ_H 3.78 (3H, s) 和 2.25 (3H, s)。将 **4** 的 NMR 数据与文献 physcion^[8] 数据对照, 基本一致。故确定 **4** 为 physcion。

化合物 **5**, 橙黄色针状结晶 (甲醇), 紫外灯 365 nm 下呈红色荧光, KOH 显色呈红色, 提示为蒽醌类物质。ESI-MS m/z : 299 $[M-1]^-$, 结合 NMR 推断其分子式为 $C_{16}H_{12}O_6$, 不饱和度为 11。 δ_c 186.9 (C), 182.7 (C) 出现两个羰基信号, δ_H 13.99 (1H, s) 为分子内氢键的酚羟基信号, 同时 δ_H 8.11 (1H, s) 和 7.67 (1H, s)、7.80 (1H, d, 2.2 Hz) 和 7.06 (1H, d, 2.2 Hz) 又可推断有 4 个芳香氢取代并且间位耦合, 4.98

(2H, s) 显示有亚甲基存在, 3.91 (3H, s) 则是甲氧基信号。将 **5** 的 NMR 数据与文献 carviolin^[9] 数据对照, 基本一致。故确定 **5** 为 carviolin。

化合物 **6**, 白色粉末 (甲醇), 碘蒸气显色。ESI-MS m/z : 203 $[M-H]^-$, 结合其 NMR 数据确定分子式为 $C_{11}H_{12}N_2O_2$, 不饱和度为 7。 ^1H NMR (400 MHz, Pyr- d_5) 谱中 δ_H 9.29 (1H, s) 和 9.01 (1H, s) 为 2 个氮上的氢信号, ^{13}C NMR (100 MHz, Pyr- d_5) 谱中 δ_c 168.4 (C), 166.7 (s) 为两个酰胺羰基碳信号, 说明该化合物可能是一环二肽类化合物。7.24 ~ 7.45 (2H, m), 7.26 ~ 7.19 (3H, m) 为典型单取代芳环上的质子信号, 同时 δ_c 168.4 (C), 136.9 (C), 130.7 (2CH), 128.7 (2CH), 127.2 (CH) 碳信号与苯丙氨酸片段的碳信号接近, δ_H 3.45 (1H, dd, 13.2, 5.6 Hz) 及 3.29 (1H, dd, 13.2, 4.4 Hz) 为 1 个亚甲基上的 2 个质子信号且化学环境不同, 结合 δ_H 4.6 (1H, m) 及 δ_c 57.3 (CH), 40.8 (CH₂) 可推断化合物含苯丙氨酸片段; δ_H 3.96 (1H, dd, 17.2, 3.2 Hz), 3.50 (1H, d, 17.2 Hz) 和 δ_c 166.7 (C), 45.0 (CH₂), 提示该化合物含甘氨酸片段。将 **6** 的 NMR 数据与文献 cyclo-(Phe-Gly)^[10-12] 数据对照, 基本一致。故确定 **6** 为 cyclo-(Phe-Gly)。

化合物 **7**, 无色透明固体 (甲醇), 紫外灯 254 nm 下有暗斑。ESI-MS m/z : 153 $[M-H]^-$, 结合 NMR 推断其分子式为 $C_7H_{10}N_2O_2$, 不饱和度为 4。 ^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ_H 4.26 ~ 4.15 (1H, m), 3.53 (2H, ddd, 17.3, 11.9, 6.0 Hz), 2.39 ~ 2.24 (1H, m), 2.06 ~ 1.86 (3H, m) 推断结构中含有脯氨酸片段, δ_H 4.09 (1H, ddd, 16.8, 2.0, 1.0 Hz), 3.73 (1H, d, 16.8 Hz) 的耦合信息提示含有甘氨酸片段。将 **7** 的 NMR 数据与文献 [13-15] 数据对照基本一致。故确定 **7** 为 cyclo-(Gly-Pro)。

化合物 **8**, 白色固体 (甲醇), 紫外灯 254 nm 下有深暗斑。ESI-MS m/z : 111 $[M-H]^-$ 。结合 NMR 数据推测分子中可能含偶数个 N, 进而推断分子式是 $C_4H_4N_2O_2$, 不饱和度为 4。 ^1H NMR (400 MHz, Pyr- d_5) 谱中仅显示两组信号峰: δ_H 7.52 (1H, d, 8.0 Hz) 和 5.82 (1H, d, 7.6 Hz), 均为 N 杂环中的 H 信息。且 ^{13}C NMR (400 MHz, Pyr- d_5) 显示出四个 C 信号: δ_c 167.0 (C) 为羰基 C; δ_c 154.5 (C) 和 143.3 (CH) 推测出一个烯丙基; 另 δ_c 102.5 (CH) 提示可能结构中还有一个双键。除上述不饱和度信息外, 并无其他任何

不饱和和官能团, 因而推测该化合物具有一个环状结构。将 **8** 的 NMR 数据与文献 3H-imidazole-4-carboxylic acid^[16] 数据基本一致。故确定 **8** 为 3H-imidazole-4-carboxylic acid。

化合物 **9**, 为白色固体 (甲醇), 紫外灯 254 nm 下有深暗斑。ESI-MS m/z : 125 $[M-H]^-$ 。结合 NMR 数据推测分子中可能含偶数个 N, 进而推断分子式是 $C_5H_6N_2O_2$, 不饱和度为 4。¹H NMR (400 MHz, Pyr- d_5) 谱中 δ_H 7.26 (1H, s), 1.92 (3H, s) 只有两组峰, 且 ¹³C NMR (400 MHz, Pyr- d_5) δ_C 170.3 (C), 166.2 (C), 153.2 (C), 137.9 (CH), 19.2 (CH₃) 四个碳推测可能含有一环状结构。根据 NMR 数据显示发现其母核信息与化合物 **8** 一致, 推测 **9** 也是一咪唑类化合物; 与 **8** 结构对比, 咪唑环上多出一甲基取代。将 **9** 的 NMR 数据与文献 2-methyl-3H-imidazole-4-carboxylic acid^[16] 数据对照, 基本一致。故确定 **9** 为 2-methyl-3H-imidazole-4-carboxylic acid。

化合物 **10**, 褐色结晶 (甲醇), 硫酸/香草醛显砖红色。ESI-MS m/z : 110 $[M-H]^-$, 结合其 NMR 数据确定分子式为 $C_5H_5NO_2$, 不饱和度为 4。其 ¹H NMR (400 MHz, Pyr- d_5) δ_H 13.05 (1H, s) 显示羧基氢信号, 11.51 (1H, s) 为氮氢信号, δ_H 7.42 (1H, m)、7.34 (1H, dd)、6.47 (1H, dd) 显示了芳香氢的特征。¹³C NMR (400 MHz, Pyr- d_5) 上显示有 5 个碳信号, δ_C 164.20 (s) 为羧基碳, 推测母核为吡咯类化合物。将 **10** 的 NMR 数据与文献 1H-pyrrole-2-carboxylic acid^[17] 数据对照, 基本一致。故确定 **10** 为 1H-pyrrole-2-carboxylic acid。

致谢: 感谢 2015 年广东省攀登计划专项资金申报平台基金资助及小组成员戴黎蓉、黄素超、胡紫薇、陈美慧、卓丹伦的实验付出; 同时感谢中山大学分析测试中心陈晓红、关山越、李玮、姚俊华、冯小龙老师等在结构鉴定中给予的支持。

参考文献:

- [1] MOSTAFA E R, RAINER E. Secondary metabolites of fungi from marine habitats [J]. Natural Product Reports, 2011, 28: 290-344.
- [2] BLUNT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products [J]. Natural Product Reports, 2014, 31: 160-258.
- [3] BLUNT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products [J]. Natural Product Reports, 2015, 32: 116-211.
- [4] KURAMOCHI K, OHNISHI K, FUJIEDA S, et al. Syn-

thesis and biological activities of neoechinulin A derivatives: new aspects of structure-activity relationships for neoechinulin A [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 2008, 56(12): 1738-1743.

- [5] WANG W L, LU Z Y, TAO H W, et al. Isoechinulin-type alkaloids, variecolorins A-L, from halotolerant *Aspergillus varicolor* [J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(10): 1558-1564.
- [6] YIN S, YU X, WANG Q, et al. Identification of a brevianamide Freverse prenyltransferase BrePT from *Aspergillus versicolor* with a broad substrate specificity towards tryptophan-containing cyclic dipeptides [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(4): 1649-1660.
- [7] KIMOTO K, AOKI T, SHIBATA Y, et al. Structure-activity relationships of neoechinulin A analogues with cytoprotection against peroxynitrite-induced PC12 cell death [J]. Journal of Antibiotics, 2007, 60(10): 614-621.
- [8] GILL M, MORGAN P M. New fungal anthraquinones [J]. Arkivoc, 2001, 7: 145-156.
- [9] FUJIMOTO H, NAKAMURA E, OKUYAMA E, et al. Six immunosuppressive features from an ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2004, 52(8): 1005-1008.
- [10] GERWICK W H, PROTEAU P J, NAGLE D G, et al. Structure of curacin A, a novel antimitotic, antiproliferative and brine shrimp toxic natural product from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* [J]. Journal of Organic Chemistry, 1994, 59(6): 1243-1245.
- [11] 吴雄宇, 林永成, 冯爽, 等. 南海红树林内生真菌 1356 # 代谢产物的研究 [J]. 热带海洋学报, 2001, 20(4): 80-85.
- [12] 王彧博, 郑立, 李文, 等. 海洋细菌 NJ6-3-1 次级代谢产物化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(5): 345-349.
- [13] 高昊, 陈国栋, 唐金山, 等. 海洋细菌 *Bacillus* sp. 次生代谢产物的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 21(7): 69-74.
- [14] 王双明, 谭宁华, 杨亚滨, 等. 三七环二肽成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 383-386.
- [15] MITOVA M, TOMMONARO G, HENTSCHEL U, et al. Exocellular cyclic dipeptides from a *Ruegeria* strain associated with cell cultures of *Suberites domuncula* [J]. Marine Biotechnology, 2004, 6(1): 95-103.
- [16] HE X X, CHEN X J, PENG G T, et al. Pelopuradazole, a new imidazole derivative alkaloid from the marine bacteria *Pelomonas puraquae* sp. nov. [J]. Natural Product Research, 2014, 28(9): 680-682.
- [17] DIETERA A, HAMM A, FIEDLER H P, et al. Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain [J]. Journal of Antibiotics, 2003, 56(7): 639-646.