

红树林真菌 E33 代谢产物的分离及衍生物制备^{*}

李春远¹, 余志刚², 林永成², 周世宁³

(1. 华南农业大学理学院应化系, 广东 广州 510642;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

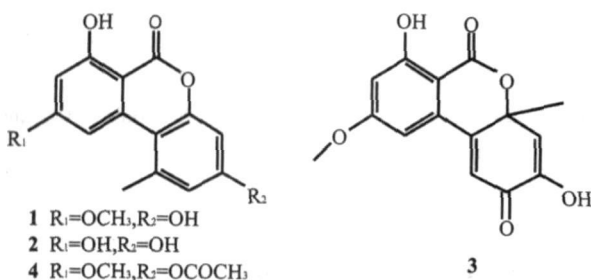
3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 从南海红树林麒麟菜内生真菌 E33 中分离到 6 个化合物, 其中 altemariolmonomethyl ether (1), altemariol (2), dehydroaltenusin (3) 为首次从海洋红树林真菌里得到, 通过酯化反应制备了化合物 1 的新衍生物 7-hydroxy-9-methoxy-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[*q*]chromen-3-yl acetate (4), 这 4 个化合物对 HePG2 细胞显示了微弱的细胞毒性。

关键词: altemariol dehydroaltenusin 酯化; 新衍生物; 红树林真菌

中图分类号: O656.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 06-0052-03

自 1995 年起, 本研究组对中国南海海洋真菌的代谢产物进行了系统研究, 从中发现大量结构新颖或有生物活性的化合物。最近在对南海红树林麒麟菜内生真菌 E33 代谢产物的研究中, 分离到了 altemariolmonomethyl ether (1), altemariol (2), dehydroaltenusin (3), 麦角甾醇、过氧化麦角甾醇及尿嘧啶 6 个化合物。化合物 1、2、3 为首次从海洋真菌里获得。对于化合物 1 制备了其新衍生物 7-hydroxy-9-methoxy-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[*q*]chromen-3-yl acetate (4)。体外活性测试表明化合物 1、2、3、4 对 HePG2 细胞显示了微弱的细胞毒性。



1 结果与讨论

化合物 1 的 FAB/MS 给出准分子离子峰 273 ($M+1$), 元素分析 (w%) C65.71%, H4.63%, N

0 与理论值 C66.18%, H4.12%, N0 对比并结合碳谱, 推出分子式 $C_{15}H_{12}O_3$ 。¹H NMR 中 δ 6.55 (d 2.1 Hz, 1H) 和 δ 6.68 (d 2.1 Hz, 1H) 以及 δ 6.78 (d 1.8 Hz, 1H) 和 δ 7.27 (d 1.8 Hz, 1H) 各是一组苯环未被取代的间位 H。

¹H NMR 中 δ 2.80 (s, 3H), ¹³C NMR 中 δ 27.6 和 δ 58.0 分别对应于取代在苯环上的一甲基和一甲氧基。¹H NMR 中 δ 11.97 的高尖峰, 是和羰基形成氢键的 $-OH$ 结合。¹³C NMR δ 168 左右的峰, 判断为酯羰基。¹H NMR 中 δ 9.34 的一个低的宽峰是活泼 H 可能是取代在苯环上的 $-OH$ 。根据以上分析和分子式计算的不饱和度, 推出可能结构, 对照文献 [1, 2] 数据, 确定 1 为 altemariolmonomethyl ether。

化合物 2 的 LC/MS 给出了分子离子峰 257 ($M-1$), 比化合物 1 少 14。¹³C NMR 比化合物 1 少了一连氧的甲基。¹H NMR 中 δ 3.32 处比化合物 1 多出一个活泼 H 其他 ¹³C NMR 及 ¹H NMR 及 ¹³C NMR 与化合物 1 相比峰形类似, 数值也变化不大。由此可判断出化合物 2 是 1 的类似物, 有可能是后者中的一个 $-OCH_3$ 转化为了前者的一个羟基。查阅文献 [2], 对照波谱数据, 证明了化合物 2 为 altemariol。

化合物 3 为黄色针状晶体, LC/MS 给出分子离子峰 287 ($M-H$)。¹H NMR 在 δ 6.23 6.67 6.85 7.05 的共轭双键区也有两组苯环的 H 两个是间位

* 收稿日期: 2007-07-05

基金项目: 国家“863”科技攻关计划资助项目 (2006AA09Z422); 广东省重大科技专项资助项目 (2003A3040501); 广东省自然科学基金资助项目 (021732); 华南农业大学新学科技扶持基金资助项目 (2006X013); 华南农业大学大型仪器使用基金资助项目 (2007Y006)

作者简介: 李春远 (1978 年生), 男, 博士; 通讯联系人: 余志刚, 林永成; E-mail: ceshzhg@mail.sysu.edu.cn

耦合, 另两个无裂分, 可能是苯环互为对位的 H 在 $\delta 11.32$ 高尖峰容易判断也是与酯羰基形成氢键的羟基, $\delta 8.04$ 和 $\delta 3.99$ 分别是取代在苯环上的 $-\text{OH}$ 和 $-\text{OCH}_3$, $\delta 1.76$ 处的甲基从位移看不应连在苯环上, 可能和脂肪季碳连接。 ^{13}C NMR 中 $\delta 79.5$ 是一季碳, 并连氧, 推测 $\delta 1.76$ 处的甲基正是连在其上。另外 ^{13}C NMR 中 $\delta 180.8$ 的羰基碳从位移上看应与双键等共轭。由于化合物 **3** 和化合物 **1** 有很多相似的结构片段, 结合上述分析在化合物 **1** 的基础上可以方便地改写得到符合要求的结构, 查阅文献, 对照熔点以及波谱数据^[3], 确定化合物 **3** 为 *dehydroalbenusin*。

化合物 **4** 的 FAB/MS 显示其准相对分子质量为 315 ($M+1$), 表明发生的是单乙酰化反应。与化合物 **1** 相比, 其碳谱在 $\delta 166.7$ 处多出一个酯羰基 C, 氢谱在 $\delta 2.34$ 处多出一个积分为 3 的单峰 (对应于碳谱 $\delta 21.50$ 的 CH_3) 而少了一个未形成氢键的 $-\text{OH}$ 活泼 H, 显然原料化合物 **1** 正是该位置的 $-\text{OH}$ 发生了乙酰化, 至此化合物 **4** 被确定为 7-hydroxy-9-methoxy-1-methyl-6-oxo-6H-benzo [c] chromen-3-yl acetate 为未见文献报道的新化合物。

麦角甾醇、过氧化麦角甾醇及尿嘧啶通过与标准品进行熔点及薄层对照得到确认。

对化合物 **1** **2** **3** **4** 做了抗肿瘤活性测试, 结果显示它们对 hEP-G2 细胞抑制的 IC_{50} 分别为 87.113 76 及 $130 \mu\text{g/mL}$ 。

2 实验部分

2.1 试剂与实验仪器

葡萄糖 (CP)、蛋白胨、酵母膏 (BR)、乙酸乙酯、石油醚、甲醇、吡啶、醋酸酐、四氯化碳 (AR) 等为市售。结构测定仪器: Varian Inova500NB 核磁共振仪, VG-2 ABB-MS 质谱仪, 北京 X4 型显微熔点仪, Bruker EQUINOX55-A590P3 E 红外光谱仪。细胞毒实验: Bio Rad 550 酶标仪, REMI1640 培养基为 Gibco 公司生产, 灭活胎牛血清为杭州四季青生物工程公司生产。

2.2 菌种及细胞

真菌 E33 为南海红树林麒麟菜中分离出的真菌, 种属未定保藏在中山大学化学与化学工程学院和生命科学学院。Hep-G2 细胞株引自中山大学生命科学学院。

2.3 菌种发酵培养

菌种发酵培养基的配比及发酵方法同文献 [4], 共培养 120 L。

2.4 分离

发酵液过滤, 滤液在 50°C 下浓缩到 5 L, 乙酸乙酯提取多次, 合并浓缩乙酸乙酯提取液得提取物 **5 g**。提取物经硅胶柱层析, 石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱, 在石油醚的体积百分比数为 15% ~ 20% 的梯度下得化合物 **1** (50 mg) 和 **3** (2 mg), 石油醚的体积百分比数为 25% ~ 30% 的梯度下得化合物 **2** (5 mg)。麦角甾醇、过氧化麦角甾醇及尿嘧啶为从菌丝体的甲醇提取液中分离得到。

2.5 合成

化合物 **4** 取 10 mg 样品 **1** 置于干燥的 10 mL 圆底烧瓶中, 加 5 mL 丙酮溶解, 再加 3 滴醋酐及 1 滴吡啶, 常温下搅拌约 30 min, 薄层显示反应完全, 再往反应液中加 1 滴水, 有固体沉淀析出, 过滤, 重结晶即得到产物, 产率 95%。

2.6 细胞毒活性实验

采用 MTT 法^[5]测定了化合物 **1** **2** **3** **4** 对 hEP-G2 细胞毒的活性。结果显示它们对 hEP-G2 细胞抑制的 IC_{50} 分别为 87.113 76 及 $130 \mu\text{g/mL}$ 。

2.7 化合物的物理和波谱数据

化合物 **1**: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$, 无色针状晶体, 20 mg , θ_{mp} (CHCl_3) $266 \sim 268^\circ\text{C}$, LC/MS 273 ($M+1$), 元素分析 (w%), C 65.71, H 4.63, N 0. ^1H NMR (300 MHz, CD_3COCD_3) δ : 2.81 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.55 (d, 2.1 Hz, 1H), 6.68 (d, 2.1 Hz, 1H), 6.78 (d, 1.8 Hz, 1H), 7.27 (d, 1.8 Hz, 1H), 11.97 (1H, s), 9.34 (1H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3COCD_3) δ : 119.4, 105.6, 103.6, 100.9, 168.3, 166.8, 166.7, 160.2, 154.9, 99.3, 57.2, 26.6。

化合物 **2**: $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_3$, θ_{mp} (CH_3OH) 350°C , MS (FAB pos) (m/z) (%): 259 (17, M^+)。IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3447, 3187, 2974, 2557, 2382, 1663, 1613, 1581, 1515, 1462, 1422, 1354, 1286, 1263, 1250, 1204, 1165, 1127, 1107, 1056, 1031, 992, 968, 937, 851, 796, 749, 709, 660, 638; ^{13}C NMR (125.0 MHz, CD_3OD) δ : 24.39 (Me), 97.70 (Ar-C), 100.57 (Ar-CH), 101.35 (Ar-CH), 104.08 (Ar-CH), 109.54 (Ar-C), 117.13 (Ar-CH), 138.40 (Ar-C), 138.65 (Ar-C), 153.07, 158.45, 164.79, 165.47, 165.53 (CO); ^1H NMR (300 MHz, CD_3COCD_3) δ : 11.92 (1H, s), 9.45 (1H, s), 7.34 (1H, d, 2.4 Hz), 6.77 (1H, d, 2.1 Hz), 6.69 (1H, d, 2.4 Hz), 6.44 (1H, 2.1 Hz), 3.32 (3H, s)。

化合物 **3**: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_6$, 黄色针状晶体, θ_{mp} $189 \sim 190^\circ\text{C}$, UV: 217 (ϵ 3900), 249 (ϵ 2600), 300 (ϵ 600) (MeOH)。IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3383, 3124,

2 978 1 674 1 643 1 624 1 392 1 296 1 261 1 227
1 196 1 161 1 076 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ :
1.73(3H, s), 3.91(3H, s), 6.28(1H, s), 6.41(1H
s), 6.63(1H, d, 2.4 Hz), 8.04(1H, s), 6.73(1H
d, 2.4 Hz), 11.29(1H, s); ^{13}C NMR(75 MHz,
 CDCl_3) δ : 29.6 56.0 79.1 99.8 103.6 104.3
116.1 120.7 134.9 145.9, 152.9 164.5 166.2
167.2 180.6

化合物 4: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$, ^1H NMR(CDCl_3 , TMS) δ :
11.86(1H, s), 7.29(1H, d, 1.5 Hz), 7.10(1H, d,
2.1 Hz), 6.93(1H, d, 1.8 Hz), 6.58(1H, d, 2.1
Hz), 3.92(1H, s), 2.82(1H, s), 2.34(1H, s); ^{13}C
NMR(CDCl_3 , TMS) δ : 21.5 26.0 56.1 99.9
100.1 105.9 109.6 122.8 137.2 138.4 150.7
152.3 165.1, 165.4 166.5 166.7 168.9 FAB/MS
(m/z) $\%$: 315[$M+1$].

麦角甾醇、过氧化麦角甾醇及尿嘧啶数据略。

参考文献:

[1] RAISTRICK H, STICKINGS C E, THOMAS R. The bio-

chemistry of micro-organisms. XC. Alternariol
and alternariol monomethyl ether metabolic products of
Alternaria tenuis J. Biochemical J 1953 55: 421—
433

[2] KOCH K, PODLECH J, PFEIFFER E et al. Total synthe-
sis of alternariol J. Org Chem 2005 70(8): 3275—
3276

[3] KAMISUKI S, TAKAHASHI S, MIZUSHINA Y et al. To-
tal synthesis of dehydroaltenusin J. Tetrahedron 2004
60(27): 5695—5700

[4] 李春远, 杨瑞云, 林永成, 等. 海洋真菌 K38号代谢产
物的研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007 46
(1): 67—70

[5] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular
growth and survival: application to proliferation and cyto-
toxicity assays J. J Immunol Methods 1983 65(1—
2): 55—63

Isolation of Mangrove Endophytic Fungus E33 and Preparation of Its Derivatives

LI Chun-yuan¹, SHE Zhi-gang², LIN Yong-cheng², ZHOU Shi-ning²

(1. Department of Applied Chemistry College of Science

South China Agricultural University Guangzhou 510642 China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering Sun Yat-sen University Guangzhou 510275 China;

3. College of Life Sciences Sun Yat-sen University Guangzhou 510275 China)

Abstract: Six compounds were isolated from the mangrove fungus E33 from the South China Sea. Among them, alternariol monomethyl ether (**1**), alternariol (**2**) and dehydroaltenusin (**3**) were first found from endophytic fungus in mangrove. A new derivative of **1** named 7-hydroxy-9-methoxy-1-methyl-6-oxo-6H-benzo[*g*]chromen-3-yl acetate (**4**) was prepared through esterification. All the four compounds exhibited little inhibitory activities to hep-G2 cells.

Key words: alternariol, dehydroaltenusin, esterification, new derivative, mangrove fungus