

南中国海红树林海洋真菌 2492 号次级代谢产物研究^{*}

王 军¹, 余志刚², 姜广策², 林永成², L. L. P. Vrijmoed³

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510080;
2. 中山大学化学和化学工程学院, 广东 广州 510275;
3. 香港城市大学生物学和化学系, 香港)

摘 要: 研究了来自香港海红树林 *Phragmites australi* 的海洋真菌 2492 号的次级代谢产物。用乙酸乙酯对该菌的培养液进行了液-液萃取, 用硅胶柱层析法对提取物进行分离纯化, 并用 IR, MS, UV NMR 波谱法推导确定了单离到化合物的结构。结果在发酵液中分离纯化得到 4 个有生物活性的生物胺, 分别是 Hypoxylin A (2), Hypoxylin B (1), N-乙酰酪胺 (3) 和 2492-1 (4)。

关键词: 海洋真菌; 代谢产物; 生物胺

中图分类号: O629.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 02-0132-03

海洋微生物是寻找药物先导的一个新的源泉, 人类已从海洋微生物的次级代谢产物中发现了许多有生物活性的结构新颖的化合物^[1]。但由于陆地环境和海洋环境之间存在极大的差异, 人们对海洋微生物的培养和分离条件仍然了解得很少, 极需进一步的研究^[2,3]。近几年, 对来自南中国海红树林的海洋真菌的次级代谢产物进行了系统的研究, 从中发现了大量的有生物活性的化合物, 揭示了海洋真菌具有极大的药用开发前景。

本文报导了首次对采自南中国海海洋真菌 2492 号的次级代谢产物的初步化学研究工作。2492 号海洋真菌从香港红树林 *Phragmites australi* 中分离得到, 菌体为白色, 种属未定; 采用了悬浮培养的方式, 对它进行了发酵, 从培养液的乙酸乙酯提取物中分离得到了 4 个化合物, 根据¹³C NMR, ¹H NMR, DEPT 谱等波谱数据推导确定它们的结构为非肽类含氮化合物, 分别是 Hypoxylin A (2), Hypoxylin B (1), N-乙酰酪胺 (3) 和 2492-1 (4)。

1 实验部分

1.1 试剂与实验仪器 葡萄糖 (CP), 蛋白胨 (BR), 酵母膏 (BR), 牛肉浸膏 (BR), 乙酸乙酯 (AR), 石油醚 (AR), 氯仿 (AR), 甲醇 (AR) 等试剂为市售, 海水采自汕尾市碣门海域。结构测定中所用仪器: Varian Inova 500NB 核磁共振仪, VG-2ABB-HS 质谱仪, 北京 X4 型显微熔点仪, Bruker EQUINOX55-A590/3E 红外光谱仪, PERKIN ELMER-241 旋光仪。

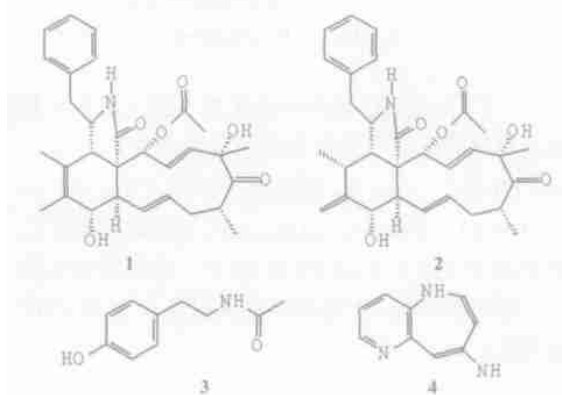


图 1 化合物 1, 2, 3, 4 的结构图

Fig 1 The structures of the compounds 1, 2, 3, 4

1.2 菌种 海洋真菌 2492 号从自香港红树林植物 *Phragmites australi* 分离得到, 菌种由香港城市大学 E. B. G. Jones 和 L. L. P. Vrijmoed 提供, 保存在 4 °C 下的玉米海水琼脂培养基之中 (香港城市大学和中山大学)。

1.3 菌种发酵培养 采用悬浮培养方式, 其发酵液成份: 葡萄糖 5 g/L, 蛋白胨 1 g/L, 酵母浸膏 0.5 g/L, 牛肉浸膏 0.5 g/L, 天然海水 50 mL/L; 发酵液配制后置于 500 mL 三角烧瓶中 (300 mL/瓶), 经 121 °C (0.1 MPa) 高温灭菌 25 min, 在无菌工桌上接种, 25 °C 下静态培养 25 d; 发酵总体积为 100 L。

1.4 分离 发酵液过滤, 除去菌体, 滤液在 50

^{*} 收稿日期: 2005-02-12

基金项目: 国家 863 基金资助项目 (2003AA624010); 广东省自然科学基金资助项目 (200308031527)

作者简介: 王军 (1962 年生), 女, 博士, 硕士生导师, 通讯联系人: 林永成; E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn

℃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到提取物 3 g。

提取物经硅胶柱层析, 石油醚—乙酸乙酯梯度洗脱, 在 50%~60% 的梯度下洗脱出化合物 1, 2, 重结晶之后产量各为 50 mg, 60%~70% 的梯度下洗脱出化合物 4, 产量约 15 mg, 70%~80% 的梯度下洗脱出化合物 3, 产量约 15 mg。

2 结果与讨论

化合物 1, 2, 3, 4 的波谱数据及物理常数如下。

化合物 1, 白色丝状结晶, θ_{mp} 213 °C; $[\alpha]_D^{25} = -68.67$ (c 0.268 mol/L, $CHCl_3$);

MS (FAB) m/z : 508 ($M+1$), 490, 479, 460, 448, 430, 412, 348, 320, 289, 279, 219, 165, 136, 120, 107, 91, 77, 65, 51;

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3 416, 3 189, 3 121, 2 973, 2 924, 2 853, 1 743, 1 700, 1 461, 1 377, 1 236, 1 046, 1 011, 962;

UV ($CHCl_3$) λ_{max}/nm : 238 (ϵ 6 457), 281 (ϵ 2 660), 301 (ϵ 1 875), 328 (ϵ 1 640);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, TMS) δ : 13.8 (CH_3), 17.1 (CH_3), 19.4 (CH_3), 20.8 (CH_3), 24.4 (CH_3), 42.4 (CH), 44.8 (CH_2), 49.8 (CH), 37.6 (CH), 50.65 (CH_2), 52.6 (C), 68.1 (CH), 75.1 (CH), 60.3 (CH), 77.9 (C), 126.3 (C), 127.0 (CH), 128.9 (CH), 128.9 (CH), 129.1 (CH), 129.1 (CH), 128.4 (CH), 132.0 (CH), 131.0 (CH), 134.1 (CH), 131.4 (C), 137.6 (C), 174.4 (C), 169.2 (C), 210.0 (C);

1H NMR ($CDCl_3$, TMS) δ : 1.28 (d, 8 Hz, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.65 (brs, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.01 (dd, 5.5, 1.3 Hz, 1H), 2.40 (dd, 10, 10.5 Hz, 1H), 2.47 (ddd, 10.5, 12.5, 13 Hz, 1H), 2.47 (d, 10 Hz, 1H), 2.70 (dq, 7, 12.5 Hz, 1H), 2.89 (dd, 6.5, 14 Hz, 1H), 3.00 (dd, 7.5, 14 Hz, 1H), 3.32 (dd, 6.5, 7.5 Hz, 1H), 3.71 (d, 10 Hz, 1H), 5.70 (brs), 5.95 (dd, 10.5, 15.5 Hz, 1H), 5.20 (dd, 2, 15.5 Hz, 1H), 5.25 (ddd, 5.5, 10.5, 15.5 Hz, 1H), 5.95 (dd, 2, 15.5 Hz, 1H), 5.85 (t, 2.2 Hz, 1H), 7.21 (d, 7 Hz, 1H), 7.32 (t, 7 Hz, 1H), 7.23 (t, 7.7 Hz, 1H), 7.32 (t, 7.7 Hz, 1H), 7.21 (d, 7 Hz, 1H)。

化合物 2, 白色丝状结晶, θ_{mp} 226.7 °C; $[\alpha]_D^{25} = -24.32$ (c 0.292 mol/L, $CHCl_3$); MS (FAB MS) m/z : 508 ($M+1$), 490, 479, 448, 430, 412, 402, 388, 357, 348, 289, 265, 254, 172, 165, 91, 77;

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3 416, 3 233, 3 128, 3 029, 2 973, 2 924, 2 860, 1 743, 1 693, 1 454, 1 370, 1 271, 1 229, 1 046, 1 011, 962, 908, 779, 744, 702;

UV ($CHCl_3$) λ_{max}/nm : 238 (ϵ 12 926), 260 (ϵ 11 451), 281 (ϵ 755);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, TMS) δ : 13.7 (CH_3), 19.4 (CH_3), 20.8 (CH_3), 24.2 (CH_3), 32.7 (CH), 37.8 (CH), 42.4 (CH), 45.3 (CH_2), 47.0 (CH), 50.0 (CH_2), 53.3 (CH), 53.6 (CH), 69.8 (CH), 77.1 (C), 114.4 (CH_2), 127.1 (CH), 127.7 (CH), 129.0 (CH), 129.1 (CH), 130.6 (CH), 132.3 (CH), 134.1 (CH), 137.2 (C), 147.6 (C), 169.6 (C), 173.7 (C), 210.2 (C), 128.9 (CH), 129.1 (CH);

1H NMR ($CDCl_3$, TMS) δ : 2.47 (dd, 3.5, 5 Hz, 1H), 2.72 (dd, 3.5 Hz, 1H), 3.79 (d, 10 Hz, 1H), 2.87 (t, 10 Hz, 1H), 5.67 (dd, 10, 15.5 Hz, 1H), 5.32 (ddd, 5, 10.5, 15.5 Hz, 1H), 2.02 (dd, 5, 1.3 Hz, 1H), 2.50 (ddd, 10.5, 12.5, 13 Hz, 1H), 2.76 (dq, 7, 12.5 Hz, 1H), 5.12 (dd, 2, 15.5 Hz, 1H), 6.11 (dd, 2, 15.5 Hz, 1H), 5.69 (t, 2.2 Hz, 1H), 3.24 (ddd, 5, 5, 9.5 Hz, 1H), 2.69 (dd, 9.5, 13.5 Hz, 1H), 2.84 (dd, 5, 13.5 Hz, 1H), 7.15 (d, 8 Hz, 1H), 7.31 (t, 8.8 Hz, 1H), 7.23 (t, 8.8 Hz, 1H), 7.30 (t, 8.8 Hz, 1H), 7.13 (d, 8 Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.2 (d, 7 Hz, 6H), 1.52 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 5.51 (brs), 1.56 (brs)。

化合物 3, 白色固体, θ_{mp} 132.5 °C; FAB MS m/z : 180 ($M+1$), 136, 121;

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3 335, 3 102, 3 014, 2 934, 1 635, 1 513, 1 462, 1 247, 1 104, 812, 602;

1H NMR (CD_3OD , TMS) δ : 1.89 (s, 3H), 2.68 (dd, 7.5 Hz, 2H), 3.32 (t, 7.5 Hz, 2H), 6.70 (d, 8 Hz, 2H), 7.02 (d, 8 Hz, 2H);

^{13}C NMR (CD_3OD , TMS) δ : 22.5 (CH_3), 35.6 (CH_2), 42.4 (CH_2), 116.2 ($2 \times CH$), 130.7 ($2 \times CH$), 131.2 (C), 156.9 (C), 173.2 (C)。

化合物 4, 白色结晶; 1H NMR (CD_3OD , TMS) δ : 8.98 (brs, 1H), 8.32 (d, 5.5 Hz, 1H), 8.11 (d, 8.1 Hz, 1H), 7.81 (d, 5.5 Hz, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.25 (m, 1H);

^{13}C NMR (CD_3OD , TMS) δ : 141.0 (C), 140.5 (C), 138.0 (CH), 134.5 (C), 128.4 (CH), 121.8 (CH), 120.1 (CH), 112.9 (CH), 111.7 (CH)。

化合物 1 和 2 是海洋真菌 2492 号的优势代谢产物, 测试了它们的 ^{13}C NMR, 1H NMR 数据之后, 发

现与本课体组在另一个来自南中国海红树林的海洋真菌 *Halorosellina oceanicum* 323 号的代谢产物中分离得到 Hypoxylin A, Hypoxylin B 极为相似, 经与标准谱图数据对照, 证实了它们的结构, 分别是 Hypoxylin A (2) 和 Hypoxylin B (1)^[4]。这 2 个化合物为复杂的含氮化合物, 结构极为相似, 惟一的差别是化合物 1 有环内双键, 化合物 2 为末端双键; 二者都有很好的生理活性, 可抗肿瘤, 降压, 调整心率失常, 在体外具有清除自由基, 对抗脂质过氧化反应及减轻氧化损伤的作用^[5, 6]。

化合物 3 为 N-乙酰酪胺, 在一些微生物的代谢产物中经常找到, 是生命重要胺化合物中的一员, 具有多种生物活性。据报道化合物 3 对凝血因子“XIII_a”有抑制作用, 还具有一定的胆固醇生物合成酶抑制活性, 在神经系统的信号传导中更起着十分重要的作用^[7, 8]。

化合物 4 的结构由¹³C NMR, ¹H NMR, DEPT 谱推导得出, 碳谱给出分子中只有 9 个不饱和碳, 不含羰基碳, DEPT 谱给出其中 3 个为季碳, 6 个为次甲基碳, 根据氢谱推出分子中含有吡啶杂环和胺, 因此暂定结构为 4, 进一步的结构及药理活性研究在进

行中。

参考文献:

- [1] 林永成. 海洋微生物次级及其代谢产物[M]. 北京: 化工出版社, 2003.
- [2] HYDE K D, POINTING S B. Marine mycology: a practical approach[M]. Hong Kong: Fungal Diversity Research Series I, 2002.
- [3] PAUL J H. Marine microbiology, methods in microbiology[M]. New York: Academic Press 2001, 30.
- [4] 姜广策. 南海海洋真菌次级代谢产物及其发酵生理研究[D]. 广州: 中山大学, 2000.
- [5] 罗景慧, 杨迎暴, 林永成, 等. 海洋真菌 *Halorosellina oceanicum* 323 号代谢产物的体外抗氧化活性研究[J]. 中药材, 2004, 27(3): 188—192.
- [6] 罗景慧, 杨迎暴, 林永成, 等. 海洋真菌 *Halorosellina oceanicum* 323 号的两种代谢产物对离体豚鼠回肠收缩的影响[J]. 药学报, 2004, 39(8): 586—590. (英)
- [7] HERNÁNDEZA I L C, MACEDO A M L, ROBERTO G S. Bedinck[J]. J Braz Chem Soc 2004, 15(3): 441—444.
- [8] 孟晓峰, 彭剑, 龚炳永, 等. 微生物来源的凝血因子 XIII_a 抑制剂 SIPI-94-129-1 的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(4): 271—273.

The Secondary Metabolites of the Marine Fungus No. 2492 from the Mangrove *Phragmites Australi* of the South China Sea

WANG Jun¹, SHE Zhi gang², JIANG Guang ce², LIN Yong cheng², L. L. P. Vrijmoed³

(1. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat sen University, Guangzhou 510080, China;

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

3. Department of Biology and Chemistry, Hong Kong City University, Hong Kong, China)

Abstract: The secondary metabolites of the marine fungus No. 2492 isolated from the mangrove *Phragmites australi* of Hong Kong were studied. The growth media of the marinederived fungus was extracted with ethyl acetate, and the crude extract was isolated by a series of chromatographic steps, which led to the isolation of four known biogenic amines with bioactivating: hypoxylin A (2), hypoxylin B (1), N-acetyltyramine and 2492-1 (4). Their structures were elucidated by spectroscopy including FAB/MS, IR, UV, NMR.

Key words: marine fungus; metabolites; biogenic amines