

南海海洋真菌 1924 号代谢产物的研究*

朱 峰¹, 刘晓红¹, 温 露¹, 林永成¹, 周世宁², VRIJMOED L L P³

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

3. 香港城市大学生物学和化学系, 香港)

摘 要: 海洋真菌 1924 号分离自香港江口红树林植物 *Kandelia candel* 的落枝, 种属未定。首次研究了该菌的代谢产物, 从菌丝体分离得到 5 个代谢产物, 它们的结构通过解析波谱数据分别鉴定为 2 个鞘氨醇类化合物 *N*-2'-hydroxypalmitoyl-1-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-9-methyl-4*E*,8*E*-sphingadiene (**A**)、*N*-palmitoyldihydrosphingosine 和 3 个甾醇类化合物麦角甾醇、5 α ,8 α -表二氧麦角甾醇-6,22-二烯-3 β -醇和啤酒甾醇。初步生理活性试验表明, 化合物 **A** 不显示 hTOP I 酶抑制活性, 其 IC₅₀ 值 > 100 μ g/mL。

关键词: 海洋真菌; 代谢产物; 鞘脂类化合物; 甾族化合物

中图分类号: O629 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 04-0066-04

海洋微生物代谢产物的研究已成为世界研究的热点之一。由于海洋特殊的生活环境, 使得生长其中的海洋微生物可以产生许多结构新奇的有强生理活性的化合物^[1]。我们研究组自 20 世纪 90 年代初开始研究南海海洋微生物代谢产物以来, 已经发现了许多结构奇特和有强生理活性的化合物^[1], 并不断有新的发现。

海洋真菌 1924 号分离自香港江口红树林植物 *Kandelia candel* 的落枝, 种属未定, 由广东肇庆星湖生物科技股份有限公司通过工业发酵进行培养。本文首次研究了该菌的代谢产物, 从菌丝体分离得到 5 个代谢产物, 通过解析波谱数据或与标准品对照分别鉴定为鞘糖脂 *N*-2'-hydroxypalmitoyl-1-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-9-methyl-4*E*,8*E*-sphingadiene (**A**)、神经酰胺 *N*-palmitoyldihydrosphingosine (**B**)、麦角甾醇 (**C**)、5 α ,8 α -表二氧麦角甾醇-6,22-二烯-3 β -醇 (**D**) 和啤酒甾醇 (**E**)。对人的拓扑异构酶 (hTOP I) 的抑制活性筛选实验表明, 化合物 **A** 不显示抑制活性, 其 IC₅₀ 值 > 100 μ g/mL。

1 结果与讨论

化合物 **A** 的 FABMS 给出其准分子离子峰 m/e 750 $[M + Na]^+$, 结合元素分析推出分子式为 C₄₁H₇₀NO₆, 计算不饱和度为 4。IR 谱提示存在酰胺官能

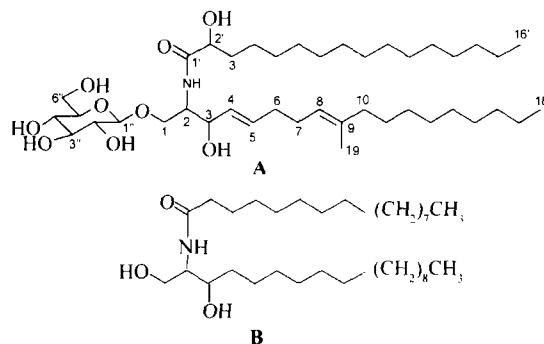


图 1 化合物 **A** 和 **B** 的结构

Fig.1 Structures of compounds **A** and **B**

团 (ν 1 641 cm^{-1}), 并由碳谱和氢谱得到证实 [δ_c 173.6(s), δ_H 7.34(d, 9.5 Hz, NH)], 解释了 1 个不饱和度。氢谱和碳谱均显示存在 2 个双键 [δ_c 134.8 (s), 130.9(d, 2 $\times$ CH) 和 123.4(d), 对应 δ_H 为 5.59 (m, 1H), 5.40(dd, 15, 6.5 Hz, 1H), 5.10(m, 1H)], 解释了另 2 个不饱和度。还余 1 个不饱和度说明存在 1 个环。

氢谱显示多个连杂原子的亚甲基或次甲基质子信号, 碳谱也显示多个连杂原子 CH 和 CH₂ 碳信号, 特别是缩醛碳信号 [δ_c 103.4(d), δ_H 4.12(d, 7.5 Hz, 1H)] 的出现, 说明可能存在吡喃糖环。这由 FABMS 谱中脱去一个吡喃葡萄糖后的碎片离子峰

* 收稿日期: 2004-11-15

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2001AA624010); 广东省自然科学基金资助项目 (04300674); 广东省科技计划项目 (2004B30101017)

作者简介: 朱峰 (1971 年生), 男, 佛山科学技术学院副教授;

通讯联系人: 林永成; E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn

m/e 548 $[M - H_2O - 163 + 2H]^+$ 得到证实。碳谱显示存在 3 个甲基信号, 其中 δ_c 15.6 (q) 对应氢谱中 δ_H 1.54 (s, 3H) 单峰信号, 表明该甲基连在双键碳上。另外 2 个甲基信号完全重叠 [δ_c 13.8(q), δ_H 0.85(t, 6.5 Hz, 6H)], 而且氢谱和碳谱均显示存

在长碳链亚甲基, 提示存在两条长碳链。
根据以上信息可以初步推断这是一个神经鞘糖脂。
由 HMQC 对所有碳氢进行归属 (见表 1), 通过 COSY 和 HMBC 确定了碳链的连接次序 (见图 2)。

表 1 化合物 A 的 NMR 数据 (DMSO- d_6 , 500 MHz, TMS)
Tab.1 NMR data of compound A

位置	^{13}C NMR	1H NMR	$^1H-^1H$ COSY	HMBC
1	68.6(t)	3.91(dd, 10.5, 5.5 Hz, 1H); 3.53(dd, 10.5, 4.0 Hz, 1H)	H - 1, 2	H - 1'', 2
2	52.8(d)	3.81(m, 1H)	H - 1, 3; NH	H - 1, 3; NH; 3 - OH
3	70.5(d)	4.00(dd, 12.5, 6.5 Hz, 1H)	H - 2, 4; 3 - OH	H - 2, 4; 3 - OH
4	130.9(d)	5.40(dd, 15.5, 6.5 Hz, 1H)	H - 3, 5	H - 3, 5; 3 - OH
5	130.9(d)	5.59(t, 15.5, 6.5 Hz, 1H)	H - 4, 6	H - 4, 6
6	27.3(t)	1.99(m, 2H)	H - 5, 7	H - 5, 7
7	31.2(t)	1.99(m, 2H)	H - 6, 8	H - 6, 8
8	123.4(d)	5.10(m, 1H)	H - 7	H - 7, 10, 19
9	134.8(s)			H - 8, 10, 19
10	38.9(t)	1.92(t, 7.5 Hz, 2H)	H - 11	H - 11, 19
11 ~ 17	34.4 ~ 22.0(t)	1.60 ~ 1.24(m)		
18	13.8(q)	0.85(t, 6.5 Hz, 3H)	H - 17	H - 17
19	15.6(q)	1.54(s, 3H)		H - 7, 9
1'	173.6(s)			NH; 2' - OH
2'	71.0(d)	3.81(m, 1H)	H - 3'; 2' - OH	3' - H; 2' - OH
3' ~ 15'	34.4 ~ 22.0(t)	1.60 ~ 1.24(m)		
16'	13.8(q)	0.85(t, 6.5 Hz, 3H)	H - 15'	H - 15'
1''	103.4(d)	4.11(d, 7.5 Hz, 1H)	H - 2''	H - 1, 2''
2''	73.3(d)	2.96(m, 1H)	H - 1'', 3''; 2'' - OH	H - 1'', 3''; 2'' - OH
3''	76.5(d)	3.13(m, 1H)	H - 2'', 4''; 3'' - OH	H - 2'', 4''; 3'' - OH
4''	70.0(d)	3.23(m, 1H)	H - 3'', 5''; 4'' - OH	H - 3'', 5''; 4'' - OH
5''	76.8(d)	3.09(m, 1H)	H - 4'', 6''	H - 4'', 6''
6''	61.0(t)	3.66(m, 1H); 3.43(m, 1H)	H - 5'', 6''	H - 5''; 6'' - OH
3 - OH		4.87(d, 5.5 Hz, 1H)	H - 3	
2' - OH		5.43(d, 5.5 Hz, 1H)	H - 2'	
2'' - OH		4.87(d, 4.0 Hz, 1H)	H - 2''	
3'' - OH		4.81(dd, 5.0, 2.0 Hz, 1H)	H - 3''	
4'' - OH		4.81(dd, 5.0, 2.0 Hz, 1H)	H - 4''	
6'' - OH		4.43(t, 6.5 Hz, 1H)	H - 6''	
NH		7.34(d, 9.5 Hz, 1H)	H - 2	

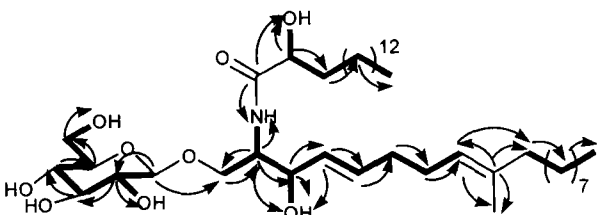


图 2 化合物 A 的主要 HMBC (→) 和 COSY (—) 相关示意图
Fig.2 Key HMBC (→) and COSY (—) correlations of compound A

还剩下两条长碳链的长短问题, 这可通过计算 FABMS 谱中的碎片离子得到确认 (见图 3)。
综合解析图谱推出化合物 A 结构如图 1 (A) 所示。进一步与文献 [2] 中神经鞘糖脂 cerebroside B 的相关数据对比得到确证。文献中 cerebroside B 的熔点为 180 ~ 190 $^{\circ}C$ [2], 化合物 A 的熔点为 184 ~ 186 $^{\circ}C$ 。据报道 [2], cerebroside B 具有抑菌活性。接下来要解决的是化合物 A 的立体构型问题。化合物 A 中, H - 4 与 H - 5 之间大的邻烯质子偶合常数 ($J = 15.5$ Hz) 决定 C - 4/C - 5 双键的构型为

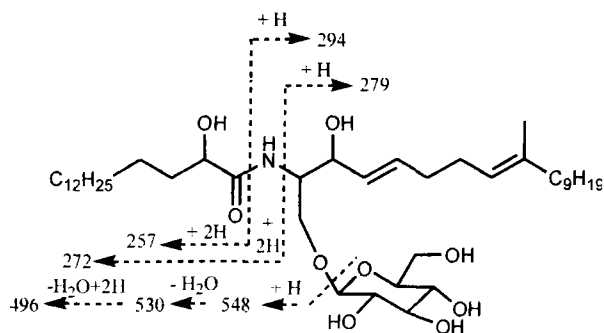


图3 化合物A的主要FABMS断裂

Fig.3 Main break modes of FABMS for compound A

trans 式; C-8/C-9 之间的双键推断为 *E*-型是由于 C-19 甲基典型的高场位移^[3]; 吡喃糖的 β -构型由异头碳质子的化学位移 (δ_{H} 4.11) 及其大的偶合常数 ($J = 7.5 \text{ Hz}$) 决定。化合物 B 的 FABMS 给出分子离子峰为 m/z 540 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 结合 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT 谱推出分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{69}\text{NO}_3$, 计算不饱和度为 1。氢谱和碳谱均给出酰胺官能团信号 [δ_{C} 171.8(s), δ_{H} 7.40(d, 9.0 Hz, NH)], 解释了所有不饱和度。氢谱和碳谱均显示不存在不饱和质子和不饱和碳信号, 并提示存在 2 条饱和长碳链 [δ_{C} 35.3~21.7(t), δ_{H} 1.45~1.24(m)], 其中 2 个链端甲基在 δ_{C} 13.5(q), δ_{H} 0.85(t, 7.0 Hz, 6H)。据此可以初步认定这是一个饱和神经酰胺。碳谱 [δ_{C} 70.1(d), 60.9(t), 54.9(d)] 和氢谱 [δ_{H} 3.59(m, 1H), 3.48(m, 2H), 3.39(m, 1H)] 均显示 3 个连杂原子饱和碳, 同时氢谱还提示存在 2 个羟基质子信号 [δ_{H} 4.45(d, 6.5 Hz, 1H), 4.38(t, 6.0 Hz, 1H)], 说明这是一个饱和二羟基神经酰胺。

氢谱在 δ 2.04(m) 出现 2 个质子, 这是羰基 α -CH₂ 的 2 个质子信号, 说明神经酰胺酸链 α -碳不连 OH。最终其结构通过 FABMS 的碎片离子峰确定为 *N*-palmitoyldihydrosphingosine^[4] (见图 4)。

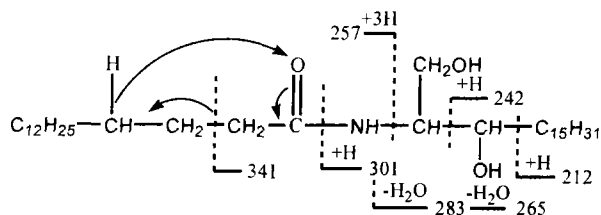


图4 化合物B的主要FABMS断裂方式

Fig.4 Main break modes of FABMS for compound B

化合物 C、D 和 E 通过与标准品进行熔度、TLC 对照并与文献 [5] 波谱数据对比分别鉴定为麦角甾醇 (C)、5 α , 8 α -表二氧麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇 (D) 和啤酒甾醇 (E), 结构见文献 [5]。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

仪器: 德国 Bruker 公司 VECTOR 22 型富立叶变换红外光谱仪 (FT-IR spectrometer); 美国 Varian 公司 INOVA 500NB 超导核磁共振谱仪; 英国 VG 公司 ZAB-HS 双聚焦磁质谱仪; 德国 Elementar 公司 Vario EL CHNS-O 元素分析仪。

试剂: 葡萄糖 CR, 蛋白胨 BR, 酵母膏 BR, 粗海盐 (微生物养殖用), 其它均为市售 AR 试剂。

2.2 菌种

海洋内生真菌 1924 号分离自香港江口红树林植物 *Kandelia candel* 的落枝, 种属未定。菌种由香港城市大学 Vrijmoed L I P 和 Jones E B G 教授提供。菌种分别保存在中山大学和香港城市大学。

2.3 菌种培养

海洋真菌 1924 号由广东肇庆星湖生物科技股份有限公司通过工业发酵进行培养, 共培养 300 L。GYT 培养基 (w): 葡萄糖 1.2%, 酵母膏 0.1%, 蛋白胨 0.2%, pH 7.0。

2.4 提取与分离

300 L 发酵总物纱布过滤, 得白色菌丝体, 挤压去水后风干, 质量约 1.55 kg, 甲醇浸泡提取 (6 L $\times$ 5), 甲醇提取液合并浓缩得粗提物约 60 g。粗提物拌硅胶 H 过柱, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 梯度 10%, 洗脱各组分再反复硅胶柱层析, 重结晶纯化分别得到化合物 A (0.2 g)、B (30 mg)、C (0.2 g)、D (20 mg) 和 E (50 mg)。

2.5 化合物的实验数据

化合物 A: 白色丝状固体, θ_{mp} 184~186 $^{\circ}\text{C}$ 。元素分析 (w/%, $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{NO}_9 \cdot 1.2\text{H}_2\text{O}$): C 65.62, H 10.54, N 1.869。FABMS m/e : 750 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 710 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ 。NMR 数据见表 1。

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3 401 (br), 2 921, 2 852, 1 641, 1 542, 1 466, 1 382, 1 081, 962, 900, 720, 612。

化合物 B: 白色颗粒状固体, θ_{mp} 96~100 $^{\circ}\text{C}$ 。FABMS m/e : 540 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 7.40(d, 9.0 Hz, 1H), 4.45(d, 6.5 Hz, 1H), 4.38(t, 6.0 Hz, 1H), 3.59(m, 1H), 3.48(m, 2H), 3.39(m, 1H), 2.04(m, 2H), 1.39(m), 1.24(s), 0.85(t, 6.5 Hz, 6H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 171.8(s), 70.1(d), 60.9(t), 54.9(d), 35.3(t), 33.2(t), 30.9(t), 28.9~28.3(t), 25.1(t), 24.8(t), 21.7(t), 13.5(q)。化合物 C,

D, E 的实验数据略。

参考文献:

- [1] 林永成. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] SITRIN R D, CHAN G, DINGERDISSEN J, et al. Isolation and structure determination of *Pachybasium cerebrosides* which potentiate the antifungal activity of aculeacin[J]. J Antibiot, 1988, 41(4): 469 - 480.
- [3] JENKINS K M, JENSEN P R, FENICAL W. Thraustochy-trosides A - C: new glycosphingolipids from a unique marine protist, *Thraustochyrium globosum* [J]. Tetrahedron, 1999, 40: 7637 - 7640.
- [4] BERTELLO L E, ANDREWS N W, de LEDERKREWS R M. Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 79 (2): 143 - 151.
- [5] 朱峰, 林永成, 周世宁, 等. 南海红树林内源真菌 2534 号代谢产物的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(1): 52 - 54.

Metabolites of Marine Fungus No.1924 from the South China Sea

ZHU Feng¹, LIU Xiao-hong¹, WEN Lu¹, LIN Yong-cheng¹, ZHOU Shi-ning², VRIJMOED L L P³

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

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

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

Abstract: Unidentified marine fungus No.1924 was isolated from a dropper of *Kandelia candel* from an estuarine mangrove in HongKong. Five Compounds (A, B, C, D, E) were isolated from the mycelium of this strain. Their structures were elucidated by comprehensive spectrometric methods as *N*-2'-hydroxypalmitoyl-1-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-9-methyl-4*E*,8*E*-sphingadiene (A), *N*-palmitoyldihydrosphingosine (B), ergosterol (C), 3 β -hydroxy-5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-diene (D), and cerevisterol (E), respectively. In the primary bioassay, compound A did not exhibit inhibitory activity to DNA topoisomerase (hTOP I) with IC₅₀ value of > 100 μ g/mL.

Key words: marine fungus; metabolites; sphingolipids; steroids

(上接第 65 页)

A Blue Pigment Isolated from Marine Bacteria *Pseudomonas* sp.

WEN Lu¹, YUAN Bao-hong², LI Hou-jin¹, LIN Yong-cheng¹, CHAN W L³, ZHOU Shi-ning²

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

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. Hong Kong Polytechnic University Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong, China)

Abstract: *Pseudomonas* sp. is a new marine bacteria isolated from the South China Sea. By changing the culture media, it could produce different secondary metabolites. A blue compound Blue-1 has been first isolated from the ester extract of *Pseudomonas* sp. Its structure is the same of the known violacein as indicated by NMR, 2D-NMR, FABMS and element analysis. It has been found that Blue-1 is of strongly antitumour activities.

Key words: marine bacteria; *Pseudomonas* sp.; Blue-1; violacein