

红树林内生真菌 2524 号中分离的新神经酰胺^{*}

李厚金¹, 姚骏骅², 陈意光¹, 林永成¹, L. L. P. Vrijmoed³

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 中山大学测试中心, 广东 广州 510275;

3. 香港城市大学生物和化学系, 香港)

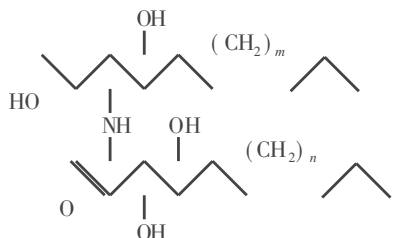
摘要: 红树林内生真菌 2524 号, 采自香港红树 *Avicennia marina* 的种子中。从该菌的培养液提取物中分离得到两个新的神经酰胺: [2', 3'-dihydroxytetracosanolyamino]-1, 3-dihydroxy octadecane 和 [2', 3'-dihydroxydocosanoylamino]-1, 3-dihydroxy octadecane。化合物的结构通过 IR, 1D 和 2D NMR, FAB-MS, ESI-MSⁿ 等实验确定。这两个化合物对肿瘤细胞系 Bel-7402, NCI-4460 和人体正常细胞系 L-02 不显示有意义的细胞毒性。

关键词: 内生真菌; 代谢产物; 神经酰胺; [2', 3'-dihydroxytetracosanolyamino]-1, 3-dihydroxy octadecane; [2', 3'-dihydroxydocosanoylamino]-1, 3-dihydroxy octadecane

中图分类号: O629.6 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2003) 06-0132-02

红树林栖息地是海洋真菌新种属的丰富来源。近年来, 我们开展了南海红树林内生真菌的化学研究, 分离发现了一批有意义的新活性物质, 显示了广阔的理论研究及应用前景。

内生真菌 2524 号, 是从香港红树林植物 *Avicennia marina* 的种子中分离得到, 由于它不产孢子, 种属暂时还未鉴定。以 GPY (1.0% 葡萄糖, 0.5% 蛋白胨, 0.5% 酵母膏, 20% 海水, pH 7.5) 为培养基, 在 28 °C 摇瓶 (120 r/min) 培养 20 d, 共培养 100 L, 培养液浓缩后用乙酸乙酯提取, 提取液减压浓缩得到 28 g 提取物。提取物经反复硅胶柱层析, 以石油醚—EtOAc—MeOH 梯度洗脱, 再以一定比例的氯仿/甲醇配比做重结晶, 最后纯化得到两个新的神经酰胺类化合物: [2', 3'-dihydroxy tetracosanolyamino]-1, 3-dihydroxy octadecane (**1**) 和 [2', 3'-dihydroxy docosanoylamino]-1, 3-dihydroxy octadecane (**2**), 共 62 mg, 化合物的结构通过综合波谱解析确定。



1 $m=12, n=18$; **2** $m=12, n=16$

1 和 **2**, 是白色粉末状固体, 它们作为同系物的混合物而分离, 它们在酰基支链上相差两个亚甲基, 这通过质谱, 尤其是 ESI-MSⁿ 得到鉴定。**1** 和 **2** 的分子式通过 FAB-MS, ESI-MSⁿ, 元素分析和 NMR 数据确定为 C₄₀H₈₁NO₅ 和 C₄₂H₈₅NO₅。元素分析实验值: C 73.68, H 12.36, N 2.10; 计算值: C₄₂H₈₅NO₅, $M_w = 683$, C 73.79, H 12.45, N 2.05;

C₄₀H₈₁NO₅, $M_w = 655$, C 73.28, H 12.37, N 2.14。IR ν/cm^{-1} (KBr): 3 338, 3 217, 2 919, 2 850, 1 620, 1 542, 1 467, 1 358, 1 277, 1 109, 1 070, 1 024, 875, 723。¹H NMR 和 ¹³C NMR 显示其为典型的神经酰胺类化合物, 包括一个羰基 (δ 173.2) (表 1), 一个酰胺质子 (δ 7.30), 并含有 4 个羟基 (δ 4.17, 4.49, 4.49 和 5.37), 经重水交换, 它们可以减弱至消失。红外光谱中 3 423, 3 217, 1 620 和 1 542 cm^{-1} 也确证了羟基和酰胺基的存在。6 个质子信号 δ 3.84 (1H, m), 3.38 (2H, m), 3.52 (1H, dd, 11.0, 5.0), 3.57 (dd, 1H, 11.0, 5.0) 和 3.90 (1H, dddd, 9.5, 5.0, 5.0, 5.0) 分别是 3 个连氧的次甲基, 1 个连氧亚甲基和 1 个连氮的次甲基质子。¹H NMR 在 δ 1.26 有宽的亚甲基峰, 在 δ 0.86 (t, 6.5 Hz) 有 2 个末端甲基信号, 表明了分子中含有长的烷基链。

FAB-MS: 684 [M+1], 656 [M'+1]。ESI-MSⁿ (负离子方式): 初级离子为 682 [M-1], 654 [M'-1], 这是失去酰胺氮上的氢得到的负离子; 选择分子离子 682 执行 MS² 实验, 得到碎片离子 650, 601, 426, 383, 316, 284。优化实验条件能够得到单一的产生离子 383, 并且该碎片进行 MS³ 实验, 能得到碎片 365 和 337。同样, 选择 654, MS² 碎片为 622, 398, 355, 284; 选择 355, MS³ 碎片为 337, 309。**1** 和 **2** 分别得到主要的产生离子 m/z 383 和 355, 这是分子酰胺键断裂丢失一个长链碱基而得到的酰基部分^[1]。 m/z 383 的 MSⁿ 碎片谱和 m/z 355 的相似, 在质量上相差 28, 这说明 **1** 与 **2** 相比在酰基链部分多了 2 个亚甲基。由 ESI-MSⁿ 实验结果可以确定神经酰胺 **1** 中鞘胺醇和脂肪酸部分分别为 C₂₄ 和 C₁₈。由此, 可以确定神经酰胺 **1** 和 **2** 分别

* 收稿日期: 2003-10-04

基金项目: 国家 863 基金资助项目 (2001AA624010); 中山大学青年教师科研启动基金资助项目 (31110-1131037)

作者简介: 李厚金 (1974 年生), 男, 讲师, 博士; 通讯联系人: 林永成; E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn

为[2', 3' -dihydroxy tetracosanolyamino] -1, 3 -dihydroxy -octadecane (**1**) 和 [2', 3' -dihydroxy docosanoylamino] -1, 3 -dihydroxy octadecane (**2**) 。它们在酰基链部分含有 2 个羟基, 这是两个新的化合物。

神经酰胺是神经鞘脂类化合物的重要代谢产

物, 也是重要的细胞内的第二信使。在初步的药理活性筛选中, 以肿瘤细胞系 Bel-7402, NCI 4460 和人体正常细胞系 L-02 为受试细胞系, 这两个神经酰胺没有显示有效的活性。其它的活性和生物医药用途试验正在准备进行中。

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 NMR 数据 (DMSO-d₆, 500 MHz)
Tab. 1 The NMR data of compounds **1** and **2** in DMSO-d₆, 500 MHz

position	δ_c	δ_H	HMBC	$^1H-^1H$ COSY
1	60.4 (CH ₂)	a 3.57(dd, 11.0, 5.0 Hz) h 3.52(dd, 11.0, 5.0 Hz)	H-3 H-2, 3	H-1b, 2, 1-OH H-1a, 2, 1-OH
2	51.2 (CH)	3.90(dddd, 9.5, 5.0, 5.0, 5.0)	H-1, 3, NH	H-1, 3, NH
3	74.4 (CH)	3.38(m)	H-1, 2, 4	H-2, 4a, 3-OH, H- δ 1.26
4	30.9 (CH ₂)	a 1.56(m) h 1.42 (m)	H-3, δ 1.26 H-3, δ 1.26	H-3, 4b, δ 1.26 H-3, 4a, δ 1.26
1'	173.2 (C)		H-2, 2', NH	
2'	70.9 (CH)	3.38 (与 H-3 重叠)	H-3'	H-3', 4', 2'-OH
3'	70.9 (CH)	3.84 (m)	H-2', 4'	H-2', 4', 3'-OH
4'	34.1 (CH ₂)	a 1.65 (m) h 1.47 (m)	H-3', δ 1.26 H-3', δ 1.26	H-2', 3', δ 1.26 H-2', 3', δ 1.26
5-18 和 5'-22' (24')	31.7 (CH ₂)	1.26 (brs)		
	29.0 (CH ₂)	1.26 (brs)		
	28.9 (CH ₂)	1.26 (brs)		
	28.7 (CH ₂)	1.26 (brs)		
	28.6 (CH ₂)	1.26 (brs)		
	28.3 (CH ₂)	1.26 (brs)		
	25.1 (CH ₂)	a 1.53 (m), h 1.31 (m)		
	24.2 (CH ₂)	1.26 (brs)		
	21.7 (CH ₂)	1.26 (brs)	H- δ 0.86	
	13.5 (CH ₃)	0.86 (t, 6.5 Hz)	H- δ 1.26	
	13.5 (CH ₃)	0.86 (t, 6.5 Hz)	H- δ 1.26	
	1-OH	4.49 (brs)		H-1a, 1b
	3-OH	4.17 (brs)		H-3
	2'-OH	4.49 (brs)		H-2'
	3'-OH	5.37 (brs)		H-3'
	NH	7.30 (d, 9.5 Hz)		H-2

参考文献:

[1] RAITH K, NEUBERT R H H. Liquid chromatography-

electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of ceramides[J] . Analytica Chimica Acta, 2000, 403: 295—303.

The Novel Ceramides from a Mangrove Endophytic Fungus No. 2524

LI Hou jin¹, YAO Jun hua², CHEN Yi guang¹, LIN Yong cheng¹, L. L. P. Vrijmoed³

- (1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275;
2. Instrumental Analysis and Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275;
- 3.Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Hong Kong)

Abstract: Two new ceramides, [2', 3' -dihydroxytetracosanolyamino] -1, 3 -dihydroxy octadecane and [2', 3' -dihydroxydocosanoylamino] -1, 3 -dihydroxy octadecane, were isolated from the culture extract of an unidentified endophytic fungus (strain No. 2524) separated from the seed of mangrove *Avicennia marina* of Hong Kong. Their structures were elucidated by comprehensive spectroscopic methods including IR, 1D and 2D NMR, FABMS, ESI MSⁿ. These ceramides didn't exhibit significant cytotoxicity against the human cancer cell lines Bel-7402, NCI 4460 and the normal human cell lines L-02 in the preliminary cytotoxic activity investigation.

Key words: endophytic fungus; metabolites; ceramides; [2', 3' -dihydroxytetracosanolyamino] -1, 3 -dihydroxy -octadecane; [2', 3' -dihydroxydocosanoylamino] -1, 3 -dihydroxy octadecane