

南海红树林内生真菌 1893 代谢产物研究^{*}

陈光英¹, 刘晓红¹, 温露¹, 林永成¹, 周世宁², VRIJMOED L. L. P.³

(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. 香港城市大学生物和化学系, 香港)

摘要: 对采自香港的红树林内生真菌(1893号)的代谢产物进行了研究, 共分离得到10个化合物。其中5-对羟基苯乙基-2,4-咪唑烷二酮和尿囊素是首次从海洋真菌中分离得到。它们的结构通过IR, FABMS, NMR及2D-NMR得到确定。

关键词: 内生真菌; 代谢产物; 环二肽

中图分类号: O629.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2003)01-0049-04

红树林是海洋微生物的良好栖息地, 大部分海洋微生物都可在红树林中找到, 但国内外对红树林微生物特别是内生真菌的代谢产物研究报道极少。近年来, 本研究小组率先开展了这方面的工作, 已分离出一批骨架新颖, 生物活性较好的化合物^[1-3]。

1893号菌是从南海红树林 *Kandelia candel* 中获得的一种内生真菌, 以GYT为培养基, 在实验室发酵培养200 L。目前, 从培养液中分离得到5个化合物1—5, 从菌体中分到5个化合物6—10。其中化合物6是嘌呤的代谢产物之一, 广泛分布在生物体系中, 从许多植物中分离出来。对大多数哺乳动物而言, 尿中的尿囊素能作为嘌呤代谢的指示剂。有人提出尿囊素能作为微蛋白流向小肠的指示剂^[4]。因此对尿囊素的定量分析引起了广泛兴趣, 尤其是在食物、营养和农业领域。化合物1和6均含有2,4-二酮咪唑烷, 它们均未见报道在微生物中得到, 为首次从海洋真菌中分离得到。

1 结果与讨论

化合物1, 从氢谱中可以看出分子中有一个二取代苯环, 从峰形及偶合常数[6.95(dd, 2, 6.5 Hz), 6.64(dd, 2, 6.5 Hz)]可知为一个对位二取代苯环。分子中除连有1个CH和CH₂外, 还有3个活泼氢 δ 0.35(s, 1H), 9.19(s, 1H), 7.82(s, 1H)。¹³C

NMR显示除苯环、CH和CH₂外, 还有2个酰胺碳, 由此推定(1)的结构为5-对羟基苯乙基-2,4-二酮咪唑烷。2,4-二酮咪唑烷俗称海因, 由于海因含有活性脲部分而具有很多生物活性, 比如抗心律不齐, 抗高血压, 抗菌, 抗肿瘤, 抗惊厥等等。Marton等^[5]合成了一系列5-R-2,4-二酮咪唑烷(包括1), 并进行了抑菌实验, 结果发现1没有杀菌活性。1的其它药理活性正在进行中。

化合物2, 从氢谱6.70(dd, 2, 8.5 Hz)和7.00(dd, 2, 8.5 Hz)可知分子中含有1个对位二取代苯环。2个甲基0.74(d, 6Hz)提示存在异丙基结构。从IR(KBr) ν_{max} 1670 cm⁻¹和 δ 167.3, 166.2可知分子中存在2个酰胺键。苯环中其中一个季碳位移值高达156.3, 应是酚羟基碳。在甲醇作溶剂的氢谱中, 酚羟基及酰胺氢等活泼氢均未出峰。根据化合物2的IR、¹H NMR和¹³C NMR确定化合物2为环(酪-亮)二肽, 其熔点和氢谱与文献值^[6]一致。

化合物3, 白色颗粒晶, FABMS表明其分子离子峰为205 (M+1)⁺, 结合¹³C NMR和¹H NMR推出分子式为C₁₁H₁₂N₂O₂。¹H NMR在 δ 7.21~7.30有5个烯氢, 结合¹³C NMR在 δ 136.4(C), 131.4(2CH), 129.6(2CH), 128.4(CH)的6个烯碳, 说明分子中有1个一取代苯环。

¹³C NMR中 δ 170.0和168.6的位移说明分子中含有2个羰基, ¹H NMR在 δ 7.63和7.82的2个

* 收稿日期: 2002-08-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20072058); 广东省自然科学基金资助项目(980371); 国家863资助项目(2001AA624010)

作者简介: 陈光英(1971年生), 女, 博士研究生, 海南师范学院讲师; 通讯联系人: 林永成;

E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn

活泼氢, 说明含有 2 个酰胺键。除此以外还有 2 个 CH 和 1 个 CH₂, 根据 ¹H COSY 可知 δ 7.63(NH) 与 δ 4.21(CH) 相关, δ 7.82(NH) 与 δ 3.42 和 2.66(CH₂) 相关, δ 4.21(CH) 与 δ 3.24 和 3.00(CH₂) 相关, 因此可以推出化合物 3 的结构为环(甘-苯丙)二肽, 其 ¹H NMR 与文献 [7] 一致。

化合物 4 的熔点、氢谱均与文献 [8] 中的胸腺嘧啶相符, 化合物 5 的熔点、氢谱则与文献 [8] 中的尿嘧啶一致。

化合物 6, ¹³C NMR δ 156.6, 157.3, 173.4 和 IR(KBr) ν_{max} 1 790, 1 720, 1 640 cm⁻¹ 表明分子中存在 3 个酰胺键, 分子中只有 1 个 CH(δ 62.4, η_H 5.25) 和 5 个 NH, 这与已知物尿囊素的波谱数据相符合^[9], 确定化合物 6 为尿囊素。尿囊素存在于尿囊酸中, 是嘌呤的代谢产物之一, 它能促进伤口愈合, 具有抗炎、抗溃疡的功效。正是由于其良好的抗感染和促进皮肤生长的功能, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 已经将尿囊素划分为 I 类安全有效的皮肤保护剂。因此目前尿囊素被广泛用在化妆品、肥皂、牙膏和漱口水等各类生活用品中。同时 FDA 还同意它在药物方面的应用, 比如小的刀伤、擦伤、烧伤、太阳晒伤、皮肤或嘴唇的皲裂和发热性疱疹等。由于尿囊素在真菌 1893 号的菌体中含量较高, 因此将在这方面的开发具有很大的潜力。

化合物 7 为白色晶体, 它与麦角甾醇标准品进行 TLC 展开, 二者的 R_f 值一致, 混合熔点不变, 确定为麦角甾醇。

从这个菌种的菌体中还得到了大量的甘露醇 (8, 约 2 g), 目前工业所用甘露醇主要是通过葡萄糖氢化制备, 如果能通过红树林真菌菌种发酵制备甘露醇, 也为降低生产甘露醇的成本提供了一条新的可能途径。化合物 9 和 10 的氢谱表明它们分别是饱和四羟基神经鞘胺醇和不饱和神经鞘胺醇糖甙, 更进一步的结构研究还在进行之中。

2 实验部分

2.1 试剂和仪器

所用试剂均为市售 AR 试剂, 所用仪器为 VG ZAB HS 质谱仪, Elementar Vario EL 元素分析仪, Bruker EQUINOX55 A590 bE 红外光谱仪, INOVA 500 核磁共振仪, 北京 X4 型显微熔点仪。

2.2 菌种和菌种培养

(1) 菌种: 1893 号菌株是采自中国南海红树林 *Kandelia candel* 的内生真菌, 由香港城市大学 Vrijmoed 和 Jones 教授提供, 菌种分别保存在香港城市

大学和中山大学内。

(2) 菌种培养: 菌种以 PDA 为培养基, 4 °C 保存。发酵培养基为葡萄糖 (ρ=0.5%), 蛋白胨 (ρ=0.1%), 酵母膏 (ρ=0.05%), 粗海盐 (ρ=0.2%), pH 7.0。500 mL 三角瓶, 内装培养液 300 mL, 8 Pa 灭菌 15 min 后接种。共接种 200 L, 25 °C 静置培养 40 d, 过滤, 收集发酵液。

2.3 提取和分离

收集发酵液约 200 L, 浓缩至 5 L, 乙酸乙酯提取, 菌体用甲醇浸泡。提取浓缩物分别拌硅胶过柱, 以石油醚/乙酸乙酯/甲醇梯度淋洗。收集各组分再经反复柱层析, 制备薄层层析, 重结晶纯化。从培养液中得到化合物 (1) 25 mg, (2) 50 mg, (3) 30 mg, (4) 18 mg 和 (5) 20 mg, 菌体中得化合物 (6) 300 mg, (7) 200 mg, (8) 2 g, (9) 50 mg, (10) 45 mg。

2.4 化合物的物理常数与波谱数据

化合物 1, 白色细针晶, θ_{mp} 226~227 °C。

¹H NMR(DMSO) δ: 10.35(s, 1H), 9.19(s, 1H), 7.82(s, 1H), 6.95(dd, 2, 6.5 Hz, 2H), 6.64(dd, 2, 6.5 Hz, 2H), 4.22(d, 1.0 Hz, 1H), 2.80(dd, 2.5, 5 Hz, 2H)。

¹³C NMR(DMSO) δ: 175.2(C), 157.1(C), 156.0(C), 130.5(CH), 125.5(C), 114.8(CH), 58.6(CH), 35.6(CH₂)。

化合物 2, 白色针晶, θ_{mp} 242~243 °C。

IR(KBr) ν_{max}/cm⁻¹: 3 441, 3 214, 2 984, 1 670, 1 540, 1 515, 1 468, 1 380, 1 105, 850。

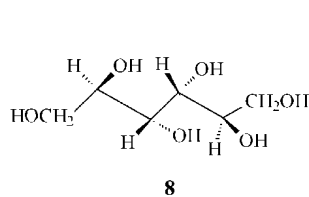
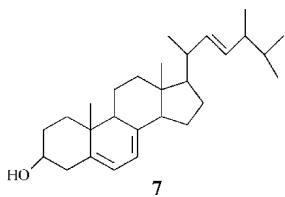
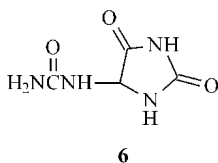
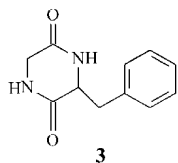
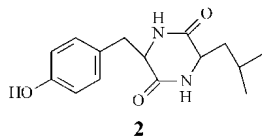
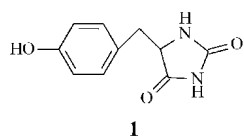
¹H NMR(CD₃OD) δ: 0.14(ddd, 13.5, 9, 4.5 Hz, 1H), 0.74(d, 6 Hz, 6H), 0.89(ddd, 14, 9.5, 4.5 Hz, 1H), 1.43(m, 1H), 2.82(dd, 4.5, 14 Hz, 1H), 3.20(dd, 3.5, 14 Hz, 1H), 3.63(dd, 3.5, 10 Hz, 1H), 4.21(m, 1H), 6.70(dd, 2, 8.5 Hz, 2H), 7.00(dd, 2, 8.5 Hz, 2H)。

¹³C NMR(CD₃OD) δ: 167.3(C), 166.2(C), 156.3(C), 131.1(CH), 125.8(C), 114.8(CH), 55.6(CH), 52.2(CH), 43.6(CH₂), 37.5(CH₂), 22.9(CH), 22.7(CH₃), 21.3(CH₃)。

化合物 3, 白色颗粒晶, θ_{mp} 170 °C(升华)。

FABMS *m/z*: 205(M+1)⁺。

¹H NMR(DMSO) δ: 7.82(brs, NH), 7.63(brs, NH), 7.30(m, 3H), 7.21(m, 2H), 4.21(t, 4.5 Hz, 1H), 3.42(d, 17.5 Hz, 1H), 3.24(dd, 4.5, 14 Hz, 1H), 3.00(dd, 4.5, 14 Hz, 1H), 2.66(d, 17.5 Hz, 1H)。



^{13}C NMR(DMSO) δ : 170.0(C), 168.6(C), 136.4(C), 131.4(C), 129.6(C), 128.4(C), 57.5(C), 44.7(C), 40.87(C).

化合物4, 黄色固体, θ_{mp} 233 ~ 234 $^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR(DMSO) δ 1.72(d, 7 Hz, 3H), 7.20(d, 2 Hz, 1H), 10.49(s, 1H), 10.90(s, 1H).

化合物5, 黄色针晶, $\theta_{\text{mp}} > 260$ $^{\circ}\text{C}$ (升华).

^1H NMR(DMSO) δ 5.42(d, 7.5 Hz, 1H), 7.35(d, 7.5 Hz, 1H), 10.72(s, 1H), 10.91(s, 1H).

化合物6, 棕色针晶, θ_{mp} 226 ~ 229 $^{\circ}\text{C}$.

元素分析($w\%$, $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_9$): C 30.46, H 4.08, N 34.98.

FABMS m/z : 369(M+1) $^{+}$.

IR(KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3 450, 3 320, 2 940, 1 790, 1 720, 1 640, 1 610, 1 520, 1 470, 1 370, 1 320, 1 280, 1 190, 1 010, 810, 780, 760, 710.

^1H NMR(DMSO) δ 5.25(dd, 1.5, 8.5 Hz, 1H), 5.72(s, 2H), 6.85(d, 8.5 Hz, 1H), 7.99(s, 1H), 10.48(s, 1H).

^{13}C NMR(DMSO) δ : 62.36(CH), 156.65(C), 157.29(C), 173.43(C).

化合物7, 白色针晶, θ_{mp} 155 ~ 157 $^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR(CDCl_3) δ 0.63(s, 3H), 0.83(d, 6.0 Hz, 3H), 0.84(d, 6.0 Hz, 3H), 0.92(s, 3H), 1.03(d, 6.5 Hz, 3H), 3.64(m, 1H), 5.19(dd, 15.5, 8 Hz, 1H), 5.22(dd, 15, 7 Hz, 1H), 5.38(d, 6.0 Hz, 1H), 5.57(d, 4.0 Hz, 1H).

化合物8, 白色针晶, θ_{mp} 166 ~ 168 $^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR(CDCl_3) δ 3.37(ddd, 4.5, 11.5 Hz, 1H), 3.45(ddd, 4.5, 9 Hz, 1H), 3.58(t, 7 Hz, 1H), 3.60(ddd, 3.5, 8.5, 10 Hz, 1H), 4.07(d, 7.5 Hz, 1H), 4.24(t, 5 Hz, 1H), 4.33(d, 5.5 Hz, 1H).

化合物9, 白色丝状晶体, θ_{mp} 103 ~ 104 $^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR(CDCl_3) δ 4.12(dd, 3.5, 7 Hz, 2H), 3.92(dd, 3, 11 Hz, 1H), 3.79(dd, 5, 11.5 Hz, 1H), 3.63(t, 9.5, 6 Hz, 2H), 0.89 ~ 1.83(m, 70H), 0.88(t, 7 Hz, 3H).

化合物10, 白色固体, θ_{mp} 170 ~ 172 $^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR(CDCl_3) δ 5.84(br, 1H), 5.72(br, 1H), 5.49(br, 1H), 5.45(br, 1H), 5.08(br, 1H), 4.61(br, 1H), 4.38(br, 1H), 4.13(br, 1H), 4.05(br, 2H), 3.85(br, 3H), 3.55(br, 2H), 3.38(br, 2H), 2.02(br, 5H), 1.94(t, 7.5 Hz, 2H), 1.57(s, 3H), 1.34(br, 4H), 1.25(br, 38H), 0.88(t, 6.5 Hz, 6H).

参考文献:

- [1] LIN Y C, SHAO Z Y, JIANG G C, et al. Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5,6-dihydro-1,2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (#386) from the South China Sea[J]. Tetrahedron, 2000, 56(49): 9607.
- [2] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. A novel N-cinnamoyl-cyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (#2508) from the South China Sea[J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42: 449.
- [3] LIN Y C, WU X Y, DENG Z J, et al. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No. 2606 from a salt lake in the Bahamas[J]. Phytochemistry, 2002, 59: 469.
- [4] BALCELLS J, GUADA J A, CASTRILLO C J. Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum[J]. Agric Sci, 1991, 116: 309.
- [5] MARTON J, ENISZ J, HOSZTAFI S, et al. Preparation and fungicidal activity of 5-substituted hydantoin and their 2-thio analogs[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 148.
- [6] KOPPLE K D, MARR D H. Conformations of cyclopeptides. The folding of cyclic dipeptides containing an aromatic side chain[J]. J Am Chem Soc, 1967, 89(24): 6193.
- [7] Sadtler standard NMR spectra[M]. 34642.
- [8] WONG J L, FUSHS D S. Competitive isomerization and dealkylation of 2,4-dialkoxypyrimidines in aqueous and nonaqueous media[J]. J Org Chem, 1970, 35: 3786.
- [9] COXON B, FATTIADI A J, SNIEGOSKI L T. A new acylative degradation of uric acid carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of uric acid and its degradation products[J]. J Org Chem, 1977, 42: 3132.

(下转第 54 页)

Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus No. 2534 from the South China Sea

ZHU Feng¹ LIN Yong cheng¹, ZHOU Shi ning² VRIMOED L. L. P.³

(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 & Chemistry, City University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract: Eight compounds were isolated from the mangrove endophytic fungus No. 2534 from the South China Sea. Six of them were identified and their structures were elucidated by spectral data. It is the first report that cyclo (Phe Phe) dipeptide was isolated from marine fungus.

Key words: mangrove endophytic fungus; marine fungus; metabolites

(上接第 51 页)

Metabolites of Marine Endophytic Fungus (No. 1893) from An Estuarine Mangrove from the South China Sea

CHEN Guang ying¹, LIU Xiao hong¹, WEN Lu¹, LIN Yong cheng¹, ZHOU Shi ning², VRIMOED L. L. P.³

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

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

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

Abstract: A mangrove endophytic fungus (No. 1893) isolated from a dropper of *Kandelia candel* from an estuarine mangrove from the South China Sea, can produce various compounds. Ten compounds were isolated from the metabolites of this fungus, of which compounds **1** and **6** were first isolated from marine fungus. Their structures were elucidated by IR, FABMS, NMR and 2DNMR.

Key words: endophytic fungus; metabolites; cyclic dipeptides