

红树林内源真菌 2524 号的肽类成分 (I) *

李厚金¹, 林永成¹, 刘晓红¹, 周世宁², VRIJMOED 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. 香港城市大学生物学和化学系, 香港)

摘要: 采自香港的红树林内源真菌 (No. 2524) 能产生丰富的肽类代谢产物。从培养液的乙酸乙酯提取物中分离出 5 个环二肽: 环(酪-亮)二肽, 环(苯丙-丙)二肽, 环(丙-缬)二肽, 环(脯-甘)二肽和 5-异丁基-2, 4-二酮咪唑烷。它们的结构通过 IR, FAB/MS, NMR 以及 2D NMR 得到确定。

关键词: 内源真菌; 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 (2002) 01-0110-03

肽类化合物, 尤其是环肽类化合物, 有各种各样的生理活性, 它们可以是抗生素、毒素、免疫抑制剂、离子转移调节器、蛋白粘合抑制剂、酶抑制剂等。海洋生物种类繁多, 从海洋生物中也发现了一批具独特结构及生理活性的先导化合物, 如 Didemnin B, Orbiculanide A, Dolastatin 10, Dolastatin 13 等。其中从海鞘 *Trididemnum solidum* 中分离得到的环肽 Didemnin B 在美国已经作为一种新型抗肿瘤药进入临床试验阶段。但目前分离发现的肽类化合物主要来源于海鞘、海绵、软体动物、绿藻、蓝藻等。对海洋真菌代谢产物的研究, 尤其是内源真菌的研究, 是在的几年才刚刚开始, 因此从海洋真菌中分离发现的肽类化合物极其有限^[1]。

本文报道采自香港的红树林 *Avicennia marina* 种子内源真菌 (编号 2524), 它能产生丰富的肽类化合物。培养液的乙酸乙酯提取物中分离到 5 个环二肽 A, B, C, D, E。其中化合物 A 和 B 以 DMSO-d₆ 为溶剂, 氢谱有异常的化学位移, 异常的化学位移跟它特殊的构象有关, 这时首次报道 A 的碳氢归属。从菌体的甲醇提取物中目前分离到 2 个环五肽, 它们的立体化学和药理性正在研究中, 将以后继续报道。

1 结果与讨论

化合物 A, 从 ¹³C 及 DEPT 可知分子中含有 15 个碳原子, 其中 4 个季碳, 7 个 CH, 2 个 CH₂, 2 个 CH₃。从氢谱 6.90 (d, 8.5 Hz) 和 6.64 (d, 8.5 Hz)

和 ¹³C 可知分子含有 1 个对位二取代苯环。2 个甲基 0.65 (d, 6.0 Hz) 提示存在异丙基结构。从 IR ν/cm^{-1} (KBr): 1 671 以及 δ (DMSO-d₆, TMS) 167.3, 166.2 可知分子存在 2 个酰胺键。有 3 个活泼氢, 其中 2 个为 NH, 另 2 个为 OH。结合 HMQC, HMBC, ¹H-¹H COSY (数据列于表 1) 可知 A 为环(酪-亮)二肽。在 A 的结构中, 亮氨酸支链上的氢化学位移增多不同程度地向高场偏移。2 个甲基移至 0.65, 而 CH₂ 2 个 H 有不同的化学位移, 1 个移至 0.17, 另 1 个为 0.77, 这么明显的位移现象比较罕见。Kenneth 等对环二肽的构象进行过研究, 发现有芳环支链的环二肽可能存在折叠构象。产生折叠的原因有可能是偶极-诱导偶极相互作用和色散力作用。2 个酰胺键提供 2 个偶极, 而苯环提供可极化的 π 体系。折叠构象使亮氨酸支链受苯环的屏蔽影响, 氢化学位移向高场偏移^[2,3]。很多环二肽都有药理作用, 如一些含芳环的环二肽是乙酰辅酶 A (胆甾醇乙酰基转移酶) 抑制剂, 可用来治疗动脉硬化及相关疾病。药效跟其特殊的构象有何关系, 还值得深入研究。

化合物 B, 从氢谱可以看出分子中有 1 个单取代苯环, 1 个甲基, 2 个次甲基, 从峰形及偶合常数可知 3.12 (dd, 13.5, 4.0 Hz, 1H), 2.85 (dd, 13.5, 4.0 Hz, 1H) 为 1 个 CH₂ 上的 2 个氢位移。从 IR ν/cm^{-1} (KBr) 1 669 可知分子中含有酰胺, 2 个活泼氢 8.09 (brs, 1H), 8.00 (brs, 1H) 以及质谱相对分子质

* 收稿日期: 2001-07-30;

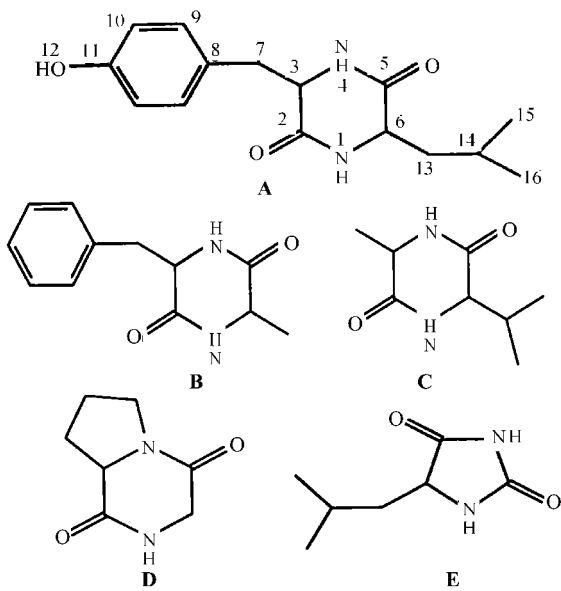
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29672053 和 20072058); 广东省自然科学基金项目 (980371)

作者简介: 李厚金 (1974-), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 林永成; Email: ceslyc@zsu-link.zsu.edu.cn

表 1 化合物 A 的 NMR 数据 (DMSO—d₆, TMS)

Tah 1 NMR data of compound A

位号	¹³ C	DEPT	¹ H	HMBC	H H COSY
1 (NH)			8.02 (d, 3 Hz)		H—6
2	166.2	C(羰基)		H—1, 7a	
3	55.6	CH	4.05 (m)	H—4, 7a	H—4, 7a, 7b
4 (NH)			8.01 (d, 3.5 Hz)		H—3
5	167.3	C(羰基)		H—4	
6	52.2	CH	3.44 (m)	H—1, 13a	H—1, 13a, 13b
7	37.7	CH ₂	a, 2.69 (dd, 13.5, 5 Hz) b, 3.01 (dd, 13.5, 3.5 Hz)	H—9 H—9	H—3, 7b H—3, 7a
8	125.8	C		H—7a, 7b, 10	
9	131.1	CH	6.90 (d, 8.5 Hz)	H—7a, 7b	H—10
10	114.8	CH	6.64 (d, 8.5 Hz)	H—12	H—9
11	156.3	C		H—9, 10, 12	
12 (OH)			9.19 (s)		
13	43.6	CH ₂	a, 0.17 (ddd, 13.5, 9, 4.5 Hz) b, 0.77 (ddd, 13.5, 9, 4.5 Hz)	H—15, 16 H—15, 16	H—6, 13b H—6, 13a, 15, 16
14	22.9	CH	1.43 (m)		H—13a, 13b, 15, 16
15	22.7	CH ₃	0.65 (d, 6.0 Hz)	H—13a	H—14
16	21.3	CH ₃	0.65 (d, 6.0 Hz)	H—13b	H—14



量为 218, 确定分子式为 C₁₂H₁₄N₂O₂, **B** 为环 (苯丙丙) 二肽。其丙氨酸支链甲基位移 0.47 (d, 7 Hz, 3H) 以及次甲基 3.61 (qd, 7.0, 1.0 Hz, 1H) 均向高场偏移。说明分子也存在折叠构象。

化合物 **C**, IR $\nu_{\text{cm}^{-1}}$ (KBr) 1 670 说明分子中含有酰胺键。分子中含有 3 个 CH₃, 3 个 CH, 2 个活泼氢。3 个甲基均为双峰, 说明与 CH 相连。初步确定 **C** 为环 (丙缬) 二肽。

化合物 **D**, IR $\nu_{\text{cm}^{-1}}$ (KBr) 1 679, 1 648 提示分子中含有酰胺键。分子中没有甲基, 有 1 个活泼氢。从 HNMR (DMSO—d₆, TMS): 4.11 (t, 7.0 Hz, 1H), 3.98 (dd, 16.5, 1.0 Hz, 1H), 3.50 (dd, 16.5, 4.5 Hz, 1H) 可推测 **D** 也为环二肽, 根据质谱和氢谱推定 **D** 为环 (脯甘) 二肽。

化合物 **E**, 有 2 个甲基, 0.89 (d, 6.5 Hz, 3H), 0.87 (d, 6.5 Hz, 3H) 且均与 CH1.77 (m, 1H) 相连, 1.49 (ddd, 13.5, 9.5, 4.5 Hz, 1H), 1.38 (ddd, 13.5, 9.5, 4.5 Hz, 1H) 为同一个 CH₂ 上的 2 个氢, 且 CH₂ 与 CH1.77 (m, 1H) 相连。3.99 (ddd, 9.5, 4.5, 1.5 Hz, 1H) 又与 CH₂ 相连, 含有 2 个活泼氢 10.56 (brs, 1H), 7.99 (brs, 1H), 由此初步推定 **E** 的结构为 5 异丁基-2, 4 咪唑烷二酮。**E** 有镇静作用。

2 实验部分

2.1 材料与方法

(1) 试剂与实验仪器 葡萄糖为化学纯, 蛋白胨 BR, 酵母膏 BR, 粗海盐 (微生物养殖用), 其它实验用试剂均为市售 AR 试剂, 所用仪器为 INOVA—500 核磁共振仪, VG ZAB—HS 质谱仪, Bruker EQUINOX55—A590 红外光谱仪, 北京 X4 型显微熔点仪。

(2) 菌种 2524 号菌种是采自香港红树林 *Avicennia marina* 种子的内源真菌, 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。

(3) 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 10 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 1 g, 粗海盐 4 g, 自来水 1 L, pH 为 7.0。500 mL 三角瓶, 内装培养液 200 mL, 1.25×10⁵ Pa 灭菌 15 min。共接种培养 200 L。在 25 °C 静置培养 20 d。

2.2 提取和分离 发酵液过滤, 收集培养液, 200 L 浓缩至 5 L, 乙酸乙酯提取。提取浓缩物拌硅胶过柱, 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。分别得到 A 25 mg, B 155 mg, C 30 mg, D 15 mg, E 15 mg。

2.3 化合物的物理常数与波谱数据

化合物 A, θ_{mp} 296~298 °C。FAB MS: 277 [M+1], 170, 154, 136, 120, 107, 77, 51; IR ν/cm^{-1} (KBr): 3 441, 3 214, 2 957, 1 671, 1 540, 1 515, 1 468, 1 381, 1 338, 1 246; NMR 数据见 1。

化合物 B, 270 °C 升华。FAB MS: 219 [M+1], 154, 120, 107, 77, 51; IR ν/cm^{-1} (KBr): 3 189, 3 047, 2 984, 2 899, 1 669, 1 466, 1 339, 1 105, 870, 700; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS) 8.09 (brs, 1H), 8.00 (brs, 1H), 7.27 (ddd, 7.5, 7.5, 1.5 Hz, 2H), 7.22 (dddd, 7.5, 7.5, 1.5, 1.5 Hz, 1H), 7.15 (dd, 7.5, 1.5 Hz, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.61 (q, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 3.12 (dd, 13.5, 4.0 Hz, 1H), 2.85 (dd, 13.5, 4.0 Hz, 2H), 0.47 (d, 7.0 Hz, 3H)。

化合物 C θ_{mp} 238~240 °C。IR ν/cm^{-1} (KBr):

3 193, 3 053, 2 967, 1 670, 1 463, 1 341, 1 139, 865, 701; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS): 8.08 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 3.87 (qd, 7.0, 2.5 Hz, 1H), 3.67 (dd, 3.0, 2.5 Hz, 1H), 2.15 (qqd, 7.0, 7.0, 3.0 Hz, 1H), 1.28 (d, 7 Hz, 3H), 0.95 (d, 7.0 Hz, 3H), 0.84 (d, 7.0 Hz, 3H)。

化合物 D, θ_{mp} 162~164 °C。FAB MS: 155 [M+1, 125], 98, 70; IR ν/cm^{-1} (KBr): 3 205, 3 165, 3 114, 2 988, 2 965, 2 952, 2 890, 1 679, 1 648, 1 458, 1 410, 1 335, 1 298, 1 269, 1 230, 1 197, 1 114, 1 004, 906, 787; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS): 8.05 (s, 1H), 4.11 (t, 7.0 Hz, 1H), 3.98 (dd, 16.5, 1.0 Hz, 1H), 3.50 (dd, 16.5, 4.5 Hz, 1H), 3.41 (dt, 11.0, 7.5 Hz, 1H), 3.33 (dt, 11.0, 4.0 Hz, 1H), 2.13 (m, 1H), 1.85 (m, 2H), 1.79 (m, 1H)。

化合物 E, 188 °C 分解。¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS): 10.56 (brs, 1H), 7.99 (brs, 1H), 3.99 (ddd, 9.5, 4.5, 1.5 Hz, 1H), 1.77 (m, 1H), 1.49 (ddd, 13.5, 9.5, 4.5 Hz, 1H), 1.38 (ddd, 13.5, 9.5, 4.5 Hz, 1H), 0.89 (d, 6.5 Hz, 3H), 0.87 (d, 6.5 Hz, 3H)。

参考文献:

- [1] FAULKNER D J. Marine natural products[J]. Natural Product Reports 2001, 18(1): 1-49.
- [2] KENNETH D K, DAVID H M. Conformations of cyclic peptides The folding of cyclic dipeptides containing an aromatic side chain[J]. J Am Chem Soc, 1967, 89(24): 6193-6200.
- [3] KENNETH D K, MASAKO O. Conformations of cyclic peptides II. Side-chain conformation and ring shape in cyclic dipeptides[J]. J Am Chem Soc, 1969, 91(4): 962-970.

The Peptides from Mangrove Endophytic Fungus No. 2524 (I)

LI Hou-jin¹, LIN Yong-cheng¹, LIU Xiao-hong¹, ZHOU Shi-ning², VRIJMOED L. L. P.³

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering,

Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

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

Abstract: A mangrove endophytic fungus (No. 2524) isolated from a seed of *Avicennia marina* from Hong Kong, can produce various peptides. Five cyclic dipeptides: cyclo-(Tyr-Leu), cyclo-(Phe-Ala), cyclo-(Ala-Val), cyclo-(Pro-Gly) and 5-isobutyl-2, 4-imidazolidinedione were isolated from the EtOAc extracts of the broth culture. Their structures were elucidated by IR, FABMS, NMR and 2D NMR.

Key words: endophytic fungus; metabolites; cyclic dipeptides