

39.72(C-20), 20.86(C-21), 135.39(C-22), 132.28(C-23), 42.75(C-24), 33.04(C-25), 19.62(C-26), 19.93(C-27), 17.54(C-28)。参考文献数据^[5]鉴定化合物 XI 为(22*E*, 20*S*, 24*R*)-5 α , 8 α -桥二氧-麦角甾烷-6, 22-二烯-3 β -醇。

化合物 XI: 白色无定形粉末(吡啶)。mp 281~283 °C。¹H-NMR(600 MHz, C₅D₅N) δ : 0.68(3H, s, C₁₈-CH₃), 0.90(3H, s, C₁₉-CH₃), 1.00(3H, d, *J* = 6.63 Hz, C₂₁-CH₃), 2.49(2H, t, H₂-2), 2.76(2H, m, H₂-4), 3.97~4.59(7H, m, H-3 及 C2'~6'-H), 5.07(3H, s, H₃-23), 5.10(1H, d, *J* = 7.64 Hz, C1'-H), 5.20(1H, m, H-22), 5.36(1H, s, br, H-6)。¹³C-NMR(150 MHz, C₅D₅N) δ : 38.14(C-1), 30.87(C-2), 77.44(C-3), 38.78(C-4), 139.94(C-5), 120.72(C-6), 30.99(C-7), 33.03(C-8), 50.24(C-9), 36.30(C-10), 22.20(C-11), 39.60(C-12), 41.30(C-13), 55.75(C-14), 24.52(C-15), 29.09(C-16), 55.07(C-17), 11.35(C-18), 20.12(C-19),

41.17(C-20), 22.22(C-21), 137.65(C-22), 128.29(C-23), 50.24(C-24), 33.03(C-25), 18.80(C-26), 20.12(C-27), 24.52(C-28), 10.98(C-29), 101.40(C₁'), 74.17(C₂'), 77.30(C₃'), 70.52(C₄'), 76.91(C₅'), 61.67(C₆')。参考文献数据^[8]鉴定化合物 XI 为豆甾醇-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

参考文献:

- [1] 喻阳, 刘吉开. 二权狗牙花的化学成分[J]. 云南植物研究, 1999, 21(2): 260-264.
- [2] 浮光苗, 余伯阳, 朱丹妮. 月腺大戟化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(4): 377-379.
- [3] 秦波, 鲁润华, 王汉卿, 等. 地涌金莲化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(2): 41-44.
- [4] 潘勤, 杨培金, 陈桂红, 等. 藏药“生等”的化学成分[J]. 华西药学杂志, 1997, 12(3): 153-155.
- [5] 何立文, 孟正木. 空心苣化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 1995, 25(6): 263-267.
- [6] 刘世旺, 付宏征, 林文翰. 糙苏的化学成分研究(I)[J]. 中草药, 1999, 30(3): 161-164.
- [7] 屠鹏飞, 罗青, 郑俊华. 荔枝核的化学成分研究[J]. 中草药, 2002, 33(4): 300-303.
- [8] 杨培明, 罗思齐, 李惠庭. 金腰箭化学成分的研究[J]. 中国医药工业杂志, 1994, 25(6): 252-255.

红树林真菌泡盛酒曲霉中的环二肽和核苷类成分

高昊^{1,3}, 唐金山¹, 洪葵², 庄令², 张志华², 王乃利³, 姚新生^{1,3*}

(1. 暨南大学 中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632; 2. 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101;

3. 深圳清华大学研究院 深圳市创新药物研究重点实验室, 广东 深圳 518055)

摘要:目的 研究一株红树林真菌泡盛酒曲霉菌丝体的化学成分。方法 采用硅胶柱色谱法、反相柱色谱法以及高效液相色谱法进行分离和纯化, 并根据光谱分析进行结构鉴定。结果 分离得到4个环二肽类成分和3个核苷类成分, 分别鉴定为环(异亮-缬)二肽(I)、环(亮-缬)二肽(II)、环(亮-异亮)二肽(III)、环(亮-亮)二肽(IV)、尿嘧啶脱氧核糖核苷(V)、腺嘌呤(VI)、胸腺嘧啶脱氧核糖核苷(VII)。结论 4个环二肽类成分为该属首次分离得到。

关键词:红树林真菌; 泡盛酒曲霉; 环二肽; 核苷

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0502-04

在对海洋微生物代谢产物的研究过程中, 发现一株红树林真菌泡盛酒曲霉的胞内产物显示较强的细胞毒活性。从中分离鉴定了一系列多羟基甾醇类成分^[1]。进一步的成分研究, 得到4个环二肽类成分和3个核苷类成分, 根据理化性质和光谱分析, 分别鉴定为环(异亮-缬)二肽(I)、环(亮-缬)二肽(II)、环(亮-异亮)二肽(III)、环(亮-亮)二肽(IV)、尿嘧啶脱氧核糖核苷(V)、腺嘌呤(VI)、胸腺嘧啶脱氧核糖核苷(VII)。4个环二肽类成分为该属首次分离得到。

1 仪器与材料

AV-400 核磁共振仪(TMS 内标, Bruker 公司), Esquire 2000 电喷雾离子阱质谱(Bruker 公司)。LC-10ATVP 分析型高效液相色谱(日本岛津株式会社), LC-8A 制备型高效液相色谱(日本岛津株式会社)。薄层硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂), 反相 ODS 填料(Merck 公司)。分析高效液相色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 柱(250 mm × 4.6 mm), 制备高效液相色谱柱为 Shim-pack PRC-ODS

收稿日期: 2007-09-29

基金项目: 国家自然科学基金委员会-广东省人民政府联合基金(U0633008)

* 通讯作者 姚新生, 中国工程院院士 Tel: (020)85225849 E-mail: yaixinsheng@tom.com

柱(250 mm×20 mm)。

泡盛酒曲霉分离自文昌红树林尖瓣卤蕨土壤,经洪葵教授鉴定为 *Aspergillus awamori* Nakaz.^[2]。采用气流搅拌发酵罐,发酵 70 L。

2 提取与分离

70 L 泡盛酒曲霉发酵液抽滤得菌丝体,甩干,用 5 L 丙酮浸提两次,浓缩提取液得流浸膏 90 g。硅胶开放柱分离,氯仿-甲醇系统梯度洗脱,经薄层检查合并为 18 个馏份(A~R)。馏份 E 分别经过硅胶柱色谱,环己烷-醋酸乙酯系统梯度洗脱;反相 ODS 柱色谱,甲醇-水梯度洗脱;反相 ODS 高效液相色谱,甲醇-水洗脱,得化合物 I~N。馏份 K 分别经过反相 ODS 柱色谱,甲醇-水梯度洗脱;反相 ODS 高效液相色谱,甲醇-水洗脱,得化合物 V~VII。

3 结构鉴定

化合物 I:无色结晶。茚三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茚三酮显色阳性,提示为环肽类成分。正离子电喷雾离子阱一级质谱给出准分子离子峰 m/z 213 $[M+H]^+$ 和 235 $[M+Na]^+$,负离子电喷雾离子阱一级质谱给出 m/z 211 $[M-H]^-$,确定其相对分子质量为 212。氢谱和碳谱显示出环二肽的特征信号。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz)给出两组酰胺质子 δ 7.90(1H,s)和 7.92(1H,s),还给出两组 α 位的质子信号 δ 3.68(1H,m)和 3.74(1H,m);¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz)给出 δ 167.3 和 167.5 的两个酰胺碳信号,提示化合物 I 由两个氨基酸单元组成。通过¹H-¹H COSY和 HMBC 谱,对这两个氨基酸单元侧链碳氢信号的分析,确定这两个氨基酸单元分别为异亮氨酸和缬氨酸。确定化合物 I 结构为环(异亮-缬)二肽。

化合物 II:无色结晶。茚三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茚三酮显色阳性,提示为环肽类成分。正离子电喷雾离子阱一级质谱给出准分子离子峰 m/z 213 $[M+H]^+$ 和 235 $[M+Na]^+$,负离子电喷雾离子阱一级质谱给出 m/z 211 $[M-H]^-$,确定其相对分子质量为 212。氢谱和碳谱显示出环二肽的特征信号。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz)给出两组酰胺质子 δ 8.07(1H,s)和 8.20(1H,s),还给出两组 α 位的质子信号 δ 3.62(1H,m)和 3.75(1H,m);¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz)给出 δ 166.8 和 168.4 的两个酰胺碳信号,提示化合物 II 由两个氨基酸单元组成。通过¹H-¹H COSY和 HMBC 谱,对这两个氨基酸单元侧链碳氢信号的分析,确定这两个氨基酸单元分别为亮氨酸和缬氨酸。确定化合物 II 结构为环

(亮-缬)二肽。

化合物 III:无色结晶。茚三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茚三酮显色阳性,提示为环肽类成分。正离子电喷雾离子阱一级质谱给出准分子离子峰 m/z 227 $[M+H]^+$ 和 249 $[M+Na]^+$,负离子电喷雾离子阱一级质谱给出 m/z 225 $[M-H]^-$,确定其相对分子质量为 226。氢谱和碳谱显示出环二肽的特征信号。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz)给出两组酰胺质子 δ 8.00(1H,s)和 8.12(1H,s),还给出两组 α 位的质子信号 δ 3.67(1H,m)和 3.75(1H,m);¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz)给出 δ 166.8 和 168.3 的两个酰胺碳信号,提示化合物 III 由两个氨基酸单元组成。通过¹H-¹H COSY和 HMBC 谱,对这两个氨基酸单元侧链碳氢信号的分析,确定这两个氨基酸单元分别为亮氨酸和异亮氨酸。确定化合物 III 结构为环(亮-异亮)二肽。

化合物 IV:无色结晶。茚三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茚三酮显色阳性,提示为环肽类成分。正离子电喷雾离子阱一级质谱给出准分子离子峰 m/z 227 $[M+H]^+$ 和 249 $[M+Na]^+$,负离子电喷雾离子阱一级质谱给出 m/z 225 $[M-H]^-$,确定其相对分子质量为 226。但是氢谱和碳谱只显示出一组亮氨酸单元的信号,¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz)给出一个酰胺质子 δ 8.16(1H,s),给出一个 α 位的质子信号 δ 3.72(1H,m);¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz)给出 δ 168.4 的一个酰胺碳信号,结合相对分子质量提示化合物 IV 由两个亮氨酸单元组成,分子呈对称结构。确定化合物 IV 结构为环(亮-亮)二肽。化合物 I~N 的化学结构式见图 1,化合物 I~N 的 NMR 数据见表 1。

化合物 V:白色粉末。254 nm UV 光下明显暗斑(GF₂₅₄薄层板)。正离子电喷雾离子阱一级质谱给出准分子离子峰 m/z 251 $[M+Na]^+$,负离子电喷雾离子阱一级质谱给出 m/z 227 $[M-H]^-$,确定其相对分子质量为 228。正离子二级质谱给出丢失 116 的基峰离子 m/z 135 $[M+Na-116]^+$,116 对应脱氧五碳糖残基的相对分子质量,提示分子中可能含有一分子脱氧五碳糖。¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz)给出一组脱氧五碳糖的信号 δ 84.1, 39.4, 70.3, 87.3, 61.3,端基碳位于 δ 70~80,提示糖单元通过氮苷键与苷元相连。其余的 4 个碳信号 δ 151.2, 164.3, 101.8, 140.2 提示苷元为碱基类结构。与文献对照^[3~5],确定化合物 V 结构为尿嘧啶脱氧核糖核苷。

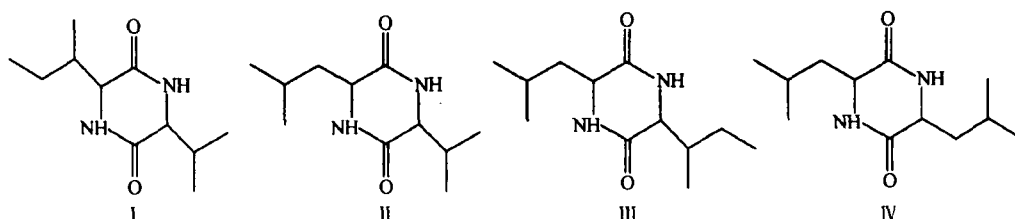


图1 化合物 I ~ IV 的化学结构式

Fig. 1 Structures of compounds I – IV

表1 化合物 I ~ IV 的 NMR 光谱数据(400 MHz, DMSO-d₆)Table 1 NMR Spectroscopic data for compounds I – IV (400 MHz, DMSO-d₆)

编号	I		II		III		IV	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
Ile								
I-1	167.5				166.8			
I-2	58.5	3.74 m			58.8	3.67 m		
I-3	37.8	1.87 m			38.2	1.80 m		
I-4	24.3	1.18 m, 1.43 m			24.3	1.16 m, 1.42 m		
I-5	11.8	0.84 t (7.5)			11.7	0.85 t (7.4)		
I-6	15.0	0.93 d (7.1)			15.1	0.92 d (7.0)		
I-2-NH		7.92 s				8.00 s		
Val								
V-1	167.3		166.8					
V-2	59.0	3.68 m	59.5	3.62 m				
V-3	30.8	2.18 m	31.4	2.10 m				
V-4	17.2	0.84 d (6.8)	17.3	0.84 d (6.8)				
V-5	18.6	0.96 d (7.1)	18.7	0.94 d (7.1)				
V-2-NH		7.90 s		8.07 s				
Leu								
L-1			168.4		168.3		168.4	
L-2			52.4	3.75 m	52.3	3.75 m	52.6	3.72 m
L-3			43.9	1.43 m, 1.61 m	43.6	1.43 m, 1.61 m	43.6	1.45 m, 1.59 m
L-4			23.5	1.84 m	23.5	1.84 m	23.6	1.81 m
L-5			21.7	0.85 d (6.5)	21.7	0.86 d (6.5)	21.7	0.86 d (6.6)
L-6			23.0	0.87 d (6.6)	23.0	0.88 d (6.8)	23.0	0.89 d (6.6)
L-2-NH				8.20 s		8.12 s		8.16 s

化合物 VI: 白色粉末。254 nm UV 光下明显暗斑(GF₂₅₄薄层板)。正离子电喷雾离子阱一级质谱给出准分子离子峰 m/z 136 $[M+H]^+$ 和 158 $[M+Na]^+$, 负离子电喷雾离子阱一级质谱给出 m/z 134 $[M-H]^-$, 确定其相对分子质量为 135, 为含氮类成分。¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz) 给出 5 个碳信号, 经 wiley-interscience 的光谱数据库“SpecInfo on the Internet, Version 4.0”检索, 化合物 VI 的碳谱数据与腺嘌呤的碳谱数据基本一致, 确定化合物 VI 结构为腺嘌呤。

化合物 VII: 白色粉末。254 nm UV 光下明显暗斑(GF₂₅₄薄层板)。正离子电喷雾离子阱一级质谱给出准分子离子峰 m/z 265 $[M+Na]^+$, 负离子电喷雾离子阱一级质谱给出 m/z 241 $[M-H]^-$, 确定其相对分子质量为 242。正离子二级质谱给出丢失 116 的基峰离子 m/z : 149 $[M+Na-116]^+$, 116 对应脱氧五碳糖残基的相对分子质量, 提示分子中可能含有一分子脱氧五碳糖。¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz) 给出一组脱氧五碳糖的信号 δ 83.7, 39.4, 70.3, 87.2, 61.3, 端基碳位于 δ 70~80, 提示糖单元

通过氮苷键与苷元相连。其余的 4 个碳信号 δ 151.0, 164.4, 109.3, 135.9 提示苷元为碱基类结构。与文献对照^[3,6], 确定化合物 VII 结构为胸腺嘧啶脱氧核糖核苷。

致谢: 泡盛酒曲霉菌株的分离由热带生物技术研究王岳坤、许云完成。化合物核磁共振由深圳市创新药物研究重点实验室新三林完成。

参考文献:

- [1] 高 昊, 张 雪, 王乃利, 等. 具有细胞毒活性的红树林真菌泡盛酒曲霉中的甾类成分 [J]. 中草药, 2006, 37(增刊): 193-196.
- [2] 张志华, 洪 葵, 高 昊, 等. 具有细胞毒活性红树林真菌 094811 的鉴定 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26(4): 6-11.
- [3] Kolodziejska R, Draminski M. Selective acetylation of pyrimidine nucleosides catalyzed by lipase goes smoothly in pyridine. Why? [J]. *Pol J Appl Chem*, 2004, 48(3-6): 75-81.
- [4] Sun X F, Wang N, Wu Q, et al. Controllable regioselective enzymatic synthesis of polymerizable 5'-O-vinyl- and 3'-O-vinyl-nucleoside analogs in acetone [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(12): 1019-1022.
- [5] 李莉娅, 邓志威, 李 军, 等. 中国南海海绵 *Cinachyrella australiensis* 化学成分研究 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2004, 36(1): 12-17.
- [6] Kim T W, Kool E T. A Set of nonpolar thymidine nucleoside analogues with gradually increasing size [J]. *Org Lett*, 2004, 6(22): 3949-3952.