

南海红树林内生真菌 Gx-3a 代谢产物研究*

Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus Gx-3a from the South China Sea

杨建香^{1,2}, 邱声祥¹, 余志刚³, 林永成³

YANG Jian-xiang^{1,2}, QIU Sheng-xiang¹, SHE Zhi-gang³, LIN Yong-cheng³

(1. 桂林师范高等专科学校, 广西桂林 541001; 2. 中国科学院华南植物园植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广东广州 510650; 3. 中山大学化学与化学工程学院, 广东广州 510275)
(1. Department of Chemistry and Engineering, Guilin Normal College, Guilin, Guangxi, 541001, China; 2. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, 510650, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510275, China)

摘要:采用反复硅胶柱色谱法和 Sephadex LH-20 凝胶色谱法分离纯化南海红树林内生真菌 Gx-3a 的代谢产物, 并通过理化常数测定和光谱分析鉴定其化学结构。结果从南海红树林内生真菌 Gx-3a 的菌体中分离得到 4 个代谢产物: ditryptophenaline(**1**), 3-hydroxy-4-(2,6,6-trimethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)benzoic acid(**2**), (E)-4,5-dihydroxy-3-(prop-1-enyl)cyclopent-2-enone(**3**), 3,6-di-sec-butyl-1,4-dihydroxypiperazine-2,5-dione(**4**)。化合物**1** 对口腔癌细胞 KB, KBv200 的抗肿瘤活性值分别为 8.0 和 12.0 $\mu\text{mol/ml}$ 。**4** 个化合物均首次从南海红树林内生真菌 Gx-3a 中分离得到。

关键词:代谢产物 内生真菌 红树林

中图分类号: O629 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)02-0168-03

Abstract: Secondary metabolites were studied from mangrove endophytic fungus No. Gx-3a in the south china sea. The compounds were isolated by column chromatography, and identified on the basis of physico-chemical constants, and spectral analysis. Four metabolites were obtained and elucidated as ditryptophenaline(**1**), 3-hydroxy-4-(2,6,6-trimethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)benzoic acid(**2**), (E)-4,5-dihydroxy-3-(prop-1-enyl)cyclopent-2-enone(**3**), 3,6-di-sec-butyl-1,4-dihydroxypiperazine-2,5-dione(**4**). In the preliminary bioassay, ditryptophenaline shows strong inhibitory activity on the KB, KBv200 with LD_{50} values of 8.0 μMol and 12.0 μMol , respectively. The four metabolites were obtained from endophytic fungus No. Gx-3a for the first time.

Key words: metabolites, endophytic fungus, mangrove

海洋微生物是寻找海洋药物先导化合物的一个新的源泉。人们已经从海洋微生物的次级代谢产物

中分离得到了很多结构新颖或强药理活性的化合物^[1]。Lin Y C 等^[2~5]在对中国南海红树林内生真菌的研究中,发现了大量的生物活性化合物,揭示出我国南海海洋真菌具有极大的药用开发前景。本文对南海红树林内生真菌 Gx-3a 代谢产物进行研究,从培养液中分离得到 4 个化合物:分别为: ditryptophenaline(**1**), 3-hydroxy-4-(2,6,6-trimethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)Benzoic acid(**2**), (E)-4,5-dihydroxy-3-(prop-1-enyl)cyclopent-2-enone (**3**), 3,6-

收稿日期: 2013-01-26

修回日期: 2013-03-27

作者简介: 杨建香(1979-), 女, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学研究。

* 国家自然科学基金项目(30973635), 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-R-217), 广西教育厅科研项目(201204LX497)资助。

di-sec-butyl-1,4-dihydroxypiperazine-2,5-dione (**4**), 初步药理活性显示化合物**1**对口腔癌细胞 KB, KBv200 的抗肿瘤活性值分别为 8.0 和 12.0 μMol 。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

美国 Varian 公司 INOVA-500NB 超导核磁共振谱仪和 INOVA-300NB 核磁共振仪; VG ZAB-HS 双聚焦质谱仪, Thermo DSQ 电子轰击电离质谱仪, Thermo MAT95XP 高分辨质谱仪; 北京泰克仪器有限公司的 X-4 数字显示显微熔点测定仪。所用试剂均为广州化学试剂厂生产, 化学纯, 溶剂经重蒸后使用。柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 200~300 目硅胶, 硅胶 H, 薄层硅胶 GF254。

1.2 菌种培养

红树林内生真菌 Gx-3a 采自中国湛江, 经鉴定为拟茎点霉菌 (*Phomopsis* sp.), 保存于中山大学化学与化学工程学院。发酵培养基为葡萄糖 10g/L, 蛋白胨 2g/L, 酵母膏 1g/L, 粗海盐 2g/L, pH 值 7.0。500ml 三角瓶内装培养基 300ml, 1.25×10^5 Pa 灭菌 30 min 后接种 120L, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下静置培养 30 天。分别收集发酵液和菌体。

1.3 提取分离与细胞毒活性实验

取 200L 发酵物过滤得菌体和发酵液, 发酵液浓缩后用乙酸乙酯充分萃取, 菌体用甲醇多次浸泡。提取浓缩物分别以体积比 1:2 拌硅胶(200~300 目)进行柱层析, 以石油醚/乙酸乙酯/甲醇进行梯度加压洗脱。收集各组分再经反复柱层析, 制备薄层层析, 重结晶等方法进行纯化。从菌体粗提物(约 40g)分离得到化合物**1**(10mg), **2**(12mg), **3**(8mg), **4**(10mg)。采用 MTT 法^[6]测定化合物**1**对人体口腔癌细胞 KB 及 KBv200 的抗肿瘤活性。

2 结果与分析

化合物**1**: 褐色固体, 易溶于氯仿和 DMSO。¹H NMR (300MHz, CDCl_3) δ : 7.33(1H, brs), 7.14~7.20(4H, m), 7.05(2H, overlap), 6.79(1H, t, 7.6), 6.66(1H, d, 7.4), 5.87(1H, s), 4.94(1H, s), 4.02(1H, m), 3.93(1H, t, 8.8), 3.37(1H, dd, 14.4, 3.6), 3.11(1H, dd, 13.6, 8.8), 2.65(2H, overlap). ¹³C NMR (300MHz, CDCl_3) δ : 168.5(C), 167.3(C), 148.6(C), 135.4(C), 129.8(C), 129.6(CH), 129.0(2CH), 128.8(2CH), 127.3(CH), 124.6(CH), 119.7(CH), 110.0(CH), 79.8(CH), 59.7(C), 56.9(CH), 56.3(CH), 36.6

(CH_2), 36.5(CH_2). EIMS m/z [M^+]: 349, $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ 。化合物分子量为 349, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N}_3$, 有 1 个单取代苯环, 1 个邻位二取代苯环, 1 个酰胺基, 2 个亚甲基, 2 个次甲基和 2 个连氧氮杂原子次甲基, 与文献[7]对照后确定化合物的结构是 ditryptophenaline

化合物**2**: 白色粉末固体, 易溶于常用溶剂。¹H NMR (300MHz, CDCl_3) δ : 9.33(OH, s), 7.56(1H, d, 8.4), 7.55(1H, s), 7.13(1H, d, 8.4), 2.46(1H, m), 1.72(2H, m), 1.69(1H, m), 1.54(2H, m), 1.51(3H, s), 1.30(3H, s), 0.97(3H, s). ¹³C NMR (300MHz, CDCl_3) δ : 171.9(C), 156.9(C), 137.0(C), 129.6(C), 124.5(CH), 121.3(CH), 118.9(CH), 77.7(C), 75.3(C), 37.7(CH_2), 34.8(CH_2), 32.9(CH_3), 32.3(CH_3), 25.8(CH_3), 17.7(CH_2). EIMS m/z [M^+]: 264, $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ 。化合物分子量为 264, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$, 不饱和度为 6, 有 1 个 1,2,5-三取代苯环, 1 个羧基碳, 3 个甲基, 3 个相邻的亚甲基以及 2 个连氧的叔碳, 与文献[8]数据对照后确定化合物的结构为 3-hydroxy-4-(2,6,6-trimethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)benzoic acid。该化合物最早也是在真菌中被分离得到的, 属于 sydowic acid 类化合物^[8]。

化合物**3**: 无色块状晶体, 易溶于常用溶剂。¹H NMR(300 MHz, Acetone- d_6): 6.83(1H, m), 6.45(1H, d, 15.6), 5.96(1H, s), 4.73(1H, s), 4.08(1H, s), 1.91(3H, d, 6.6) EIMS m/z (rel. int.): 154(3.8), 139(100), 135(5.8), 126(5.8), 121(41.8), 111(12.4), 109(13.0), 95(11.6), 79(51.8), 65(21.6). $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$ 。化合物有 3 个烯氢, 2 个连氧的 CH, 1 个甲基, EIMS m/z (rel. int.) 与数据库并与文献[9]对照后, 确定化合物的结构为 (E)-4,5-dihydroxy-3-(prop-1-enyl)cyclopent-2-enone。

化合物**4**: 一个无色晶体, 溶于甲醇。TLC 碘缸显色为泛白拖尾尖头带状。¹H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.90(s, 2H, OH), 4.03(s, 2H), 2.12(m, 2H), 1.59(m, 2H), 1.43(m, 2H), 0.91(brt, 6H), 0.88(s, 6H). ¹³C NMR (125MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 161.5(C), 65.8(CH), 36.3(CH), 25.8(CH_2), 14.9(CH_3), 12.2(CH_3). EIMS: 258 [M^+] for $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2$ 。化合物分子离子峰为 258, 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$, 存在对称结构。与文献[10]对照后, 确定化合物的结构为 3,6-di-sec-butyl-1,4-dihydroxypiperazine-2,5-dione。该化合物也曾在黑曲霉真菌中被分到过^[10]。

4个化合物的结构如图1所示。化合物1对口腔癌细胞 KB,KBv200 的抗肿瘤活性值分别为 8.0 和 12.0 $\mu\text{mol/ml}$ 。

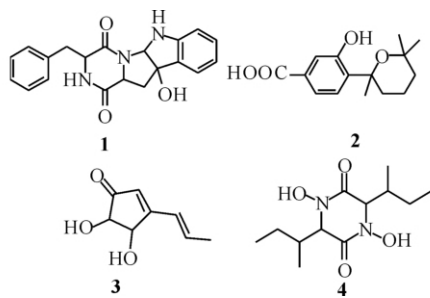


图1 4个化合物的结构

Fig. 1 The structures of four metabolites

3 结论

本次研究从南海红树林内生真菌 Gx-3a 的菌体中分离得到 4 个代谢产物: ditryptophenaline(1), 3-hydroxy-4-(2,6,6-trimethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)benzoic acid(2), (E)-4,5-dihydroxy-3-(prop-1-enyl)cyclopent-2-enone(3), 3,6-di-sec-butyl-1,4-dihydroxypiperazine-2,5-dione(4)。其中, 化合物 1 对口腔癌细胞 KB,KBv200 的抗肿瘤活性值分别为 8.0 和 12.0 $\mu\text{mol/ml}$ 。4 个化合物均首次从南海红树林内生真菌 Gx-3a 中分离得到。

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, 2003:1.
 [2] Lin Y C, Wu X Y, Feng S, et al. Five unique compounds; xyloketal from mangrove fungus xylaria s p1 from the South China Sea coast[J]. J Org Chem, 2001, 66: 6252-

6256.
 [3] Lin Y C, Wu X Y, Deng Z J, et al. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No. 1 2606 from a salt lake in the Bahamas[J]. Phytochem Istry, 2002, 59: 469-471.
 [4] Chen G Y, Lin Y C, Wen L, et al. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China sea coast[J]. Tetrahedron, 2003, 59: 4907-4909.
 [5] Shao C L, She Z G, Guo Z Y, et al. ^1H and ^{13}C NMR assignments for two anthraquinones and two xanthenes from the mangrove fungus(ZSU H-36)[J]. Magn Reson Chem, 2007, 45: 434-438.
 [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.
 [7] Maes C M, Potgieter M, Steyn P S. NMR assignments, conformation, and absolute configuration of ditryptophenaline and model dioxopiperazines [J]. J Chem Soc Perkin Transactions 1, 1986(6): 861-866.
 [8] Hamasaki T, Sato Y, Hatsuda Y, et al. Sydowic acid. New metabolite from *Aspergillus sydowi* [J]. Tetrahedron Lett, 1975(9): 659-660.
 [9] Grove J F. Structure of terrain[J]. J Chem Soc, 1954: 4693-4694.
 [10] Garson M J, Jenkins S M, Staunton J, et al. Isolation of some new 3,6-dialkyl-7,4-dihydroxypiperazine-2,5-diones from *Aspergillus* [J]. J Chem Soc; Trans 1, 1986(6): 901-903.

(责任编辑: 邓大玉)

天文学家找到土星光环成因

土星赤道半径约 6 万千米, 平均密度只有 0.70g/cm³, 是八大行星中密度最小的。土星的大半径和低密度使其表面的重力加速度和地球表面相近。土星在冲日时的亮度可与天空中最亮的恒星相比。土星在很多方面像木星, 如它与木星同属于巨行星, 它的体积是地球的 745 倍, 质量是地球的 95.18 倍。在太阳系八大行星中, 土星的大小和质量仅次于木星, 占第二位, 像木星一样被色彩斑斓的云带所环绕, 并被较多的卫星所拱卫。这颗行星由于快速自转而呈扁球形。

土星堪称太阳系最漂亮的行星之一, 其最大的特征就是拥有美丽的“腰带”(光环)。这条惹人注目的光环使土星看上去像戴着一顶漂亮的大草帽。长期以来, 这条光环是如何形成的, 一直是天文学家努力研究的热点问题。最近, 天文学家研究发现构成光环的物质是碎冰(95%)、岩块、尘埃和颗粒等, 它们排列成一系列的圆环绕着土星运行。这很可能是一颗“冰壳卫星”与土星外围物质相撞, 随后土星吸住“死星”外围冰块, 最终成型了美丽光环。这个光环可以容纳 10 亿个地球, 其平面与土星主光环面成 27 度倾角, 内侧距离土星约 595 万千米, 宽度约 1190 万千米, 直径相当于 300 倍土星的直径。由于土星接受的太阳光线很少, 因此这条“隐身”光环反射出的可见光就更少。虽然组成光环的尘埃温度很低(仅有零下 193℃), 但是却散发出热辐射。天文学家正是通过捕捉到这些热辐射才发现了这个巨大的光环。

(据科学网)