

## 南海红树林内生真菌 B2 次级代谢产物研究<sup>\*</sup>

张 奕, 杨 昌, 许 芳, 刘 岚, 林永成  
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 在对红树林真菌 B2 次级代谢产物的研究过程中, 从培养液中分离得到 3 个化合物, 通过波谱解析以及文献对照, 分别鉴定为 fusaric acid、对苯二甲酸甲酯和 4-butoxy-benzeneacetic acid。其中 fusaric acid 单晶为首次从海洋真菌中分离得到, 并通过 X 射线衍射分析了它的晶体结构。

**关键词:** 红树林内生真菌; 次级代谢产物; X 射线结构分析

**中图分类号:** O629 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 03-0136-03

## Secondary Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus B2 in the South China Sea

ZHANG Yi, YANG Chang, XU Fang, LIU Lan, LIN Yongcheng

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The fungus B2 were first separated from the seed of the mangrove sample *Kandelia candel* in Zhanjiang. Three compounds were isolated from the mycelium of this strain. Their structures were identified by comprehensive spectroscopic methods as fusaric acid (A), dimethyl terephthalate (B) and 4-butoxy-benzeneacetic acid. It was the first time to find the crystal structure of fusaric acid in marine metabolites. Its molecular structure was confirmed by spectra data and the crystal structure was founded using X-ray diffraction analysis.

**Key words:** mangrove endophytic fungus; secondary metabolites; X-ray diffraction analysis

红树林主要生长在热带亚热带海岸潮间带, 长期受周期性潮水浸淹。以其为主体, 包括微生物、无脊椎动物、鸟类、哺乳动物等共同形成了潮滩湿地木本生物群落, 构成一个特殊的生态环境。在这种环境中, 红树植物的源性微生物, 常被发现能够代谢出丰富的特殊化学结构的代谢产物。

我们研究组已经对中国南海红树林内生真菌进行了大量系统性的研究, 已得到了一系列结构新颖的或药理活性良好的化合物<sup>[1-4]</sup>。

红树林真菌 B2 是一株采自湛江红树 *Kandelia candel* 种子的内生真菌, 该菌的种属尚未鉴定。本文首次对该菌的次级代谢产物进行研究, 从培养液

中分离得到 3 个化合物, 通过波谱解析以及文献对照理论, 分别鉴定为 fusaric acid、对苯二甲酸甲酯和 4-butoxy-benzeneacetic acid。其中 fusaric acid 是生物碱 2-甲酸吡啶的一种, 具有非常重要的生物活性<sup>[5-6]</sup>。其单晶首次通过 X-ray 方法测定了 fusaric acid 的晶体结构。

### 1 结果与讨论

化合物 A 为透明晶体。LC-MS 表明其的相对分子质量为 179, 结合化合物氢谱和碳谱可以确定其分子式为  $C_{10}H_{13}NO_2$ 。根据 X 射线单晶衍射数据, 该化合物晶体属单斜晶系, 空间群为  $P2_1$ , 化学式为  $C_{10}H_{13}NO_2$ 。Mr = 179.21。晶胞参数为: a =

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2008-03-25

基金项目: 国家“863”科技攻关计划资助项目 (2006AA09Z422, 2006AA09Z419); 国家自然科学基金资助项目 (40776073, 20572136); 国家教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-05-0600); 国家教育部科技创新工程重大项目培养资金资助项目 (706038); 中国海洋大学博士启动基金资助项目 (1404-82421036)

作者简介: 张奕 (1980 年生), 女, 博士研究生; 通讯作者: 林永成; E-mail: ceslyc@mail.sysu.edu.cn

1.195 9 (2) nm,  $b = 1.034\ 5\ (18)\ \text{nm}$ ,  $c = 1.687\ 7\ (3)\ \text{nm}$ ,  $\beta = 108.960\ (3)^\circ$ ,  $V = 1.974\ 6\ (6)\ \text{nm}^3$ ,  $Z = 8$ ,  $D_c = 1.206\ \text{Mg/m}^3$ ,  $F(000) = 768$ ,  $\mu = 0.084\ \text{mm}^{-1}$ 。结构由直接法解出, 用全矩阵最小二乘法修正, 最终偏离因子  $R = 0.066\ 5$ ,  $\omega R = 0.181\ 0$ 。分析化合物 A 结构为 fusaric acid。通过文献对照<sup>[7]</sup>, 光谱数据和物理性质与报道的相一致, 最终确定化合物 A 结构。

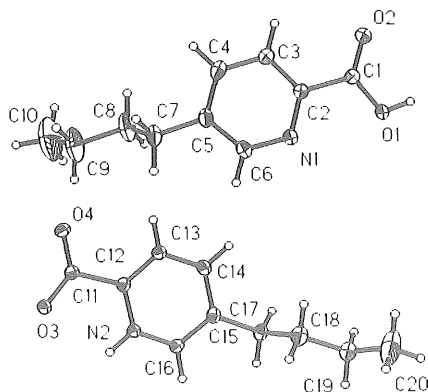


图 1 化合物 A 单晶结构

Fig. 1 Crystal structure of compound A

C2, C3, C4, C5, C6, N1 采用椅式构象构成了一个六元环, C - C, C - O, C - N 的键长与正常值<sup>[8]</sup>相一致。

表 1 列出了 fusaric acid 分子中和氢键相关联的键长和键角, 并且与氢键相关联的结构在图 2 也已经列出。

表 1 晶体结构中部分键长及键角数据

Table 1 Selected bond lengths and angles

| D - H...A 键        | $d(\text{D} - \text{H})/\text{nm}$ | $d(\text{H} \dots \text{A})/\text{nm}$ | $d(\text{D} \dots \text{A})/\text{nm}$ | $\angle(\text{DHA})/^\circ$ |
|--------------------|------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------|
| O(1) - H(1)...O(3) | 0.84                               | 1.75                                   | 2.536(3)                               | 156.1                       |
| N(2) - H(2)...O(4) | 0.92(3)                            | 1.91(3)                                | 2.681(3)                               | 141(3)                      |

化合物 C 为一淡黄色油状物。LCMS 显示相对分子质量为 208。<sup>1</sup>H NMR 中存在一个甲基  $\delta\ 0.89\ (3\text{H}, \text{t}, 7.2\ \text{Hz})$ , 4 个亚甲基  $\delta\ 3.50\ (2\text{H}, \text{s})$ ,  $4.03\ (2\text{H}, \text{t}, 6.6\ \text{Hz})$ ,  $1.57\ (2\text{H}, \text{m}, 6.6, 7.2\ \text{Hz})$ ,  $1.35\ (2\text{H}, \text{m}, 6.6, 7.2\ \text{Hz})$ , 2 个不饱和氢  $\delta\ 6.75\ (1\text{H}, \text{d}, 8.4\ \text{Hz})$ ,  $7.08\ (1\text{H}, \text{d}, 8.4\ \text{Hz})$ , 从偶合常数来看, 2 个不饱和氢应该相邻, 分子内还应该含有 1 个连氧正丁基。<sup>13</sup>C NMR (DEPT) 谱反映分子中存在 1 个伯碳  $\delta\ 13.47$ , 4 个仲碳  $\delta\ 19.23, 30.94, 40.28, 64.17$ , 4 个叔碳  $\delta\ 115.34\ (2\text{CH})$ ,

在 fusaric acid 分子中存在着 O(1) - H(1) .....O(3) 和 N(2) - H(2) .....O(4) 氢键。键长和键角的详细数据在表 1 中列出。

经查对, 证实 fusaric acid 单晶首次通过 X-ray 方法测定更多的晶体数据以 CIF 文件形式存放在剑桥晶体数据中心 (No. CCDC 622715)。

化合物 B 为一无色针状晶体, LC-MS 显示其相对分子质量为 194。熔点为  $141 \sim 143\ ^\circ\text{C}$ 。<sup>13</sup>C NMR 谱和 <sup>1</sup>H NMR 谱数据简单, 碳谱中有 4 个碳信号,  $\delta_c\ 166.16$  说明分子中有酯羰基,  $\delta_c\ 52.34$  说明分子中存在甲氧基,  $\delta_c\ 133.80$  和  $129.46$  推测分子中可能存在苯环; 氢谱中只有两个单峰,  $\delta_H\ 8.09$  的单峰推测为苯环上的氢,  $\delta_H\ 3.96$  应是甲氧基上的氢。故可推断该化合物具有一对称结构。由于结构对称, 所以推测分子中有一个对位取代的苯环。综合上述, 最终确定化合物 B 为对苯二甲酸二甲酯, 经文献查阅后判断结构正确<sup>[9]</sup> (图 3)。

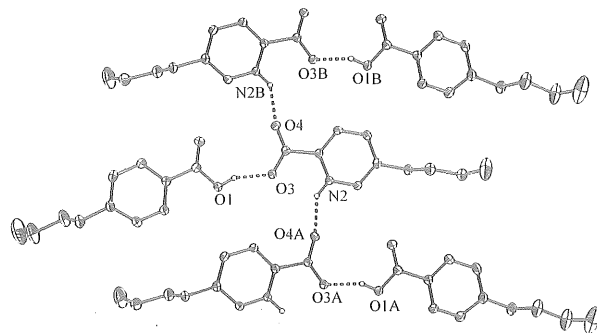


图 2 化合物 A 单晶分子结构

Fig. 2 Molecular crystal structure of compound A

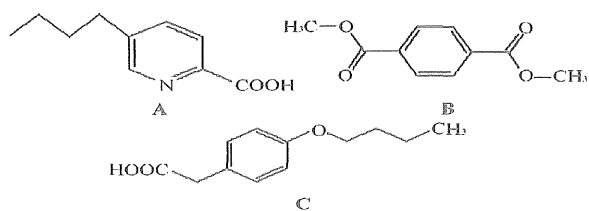


图 3 化合物 A, B, C 结构式

Fig. 3 Structures of compound A, B and C

$130.40\ (2\text{CH})$ , 3 个季碳  $\delta\ 125.62\ 156.46$  和  $171.49$ 。根据上述信息, 最终确定化合物 C 的结

构为 4-butoxy-benzeneacetic acid。

## 2 实验部分

2.1 试剂与仪器 美国 Varian 公司 INOVA 300NB 超导核磁共振仪; VG ZAB-HS 质谱仪; 北京泰克仪器公司的 X-4 数字显示显微熔点测试仪; 德国布鲁克公司 Smart 1000 CCD X 射线单晶衍射仪。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 GF<sub>254</sub>。

2.2 菌种发酵培养 采用悬浮培养方式: 发酵培养基 (*w*) 为葡萄糖 1.0%, 蛋白胨 0.2%, 酵母膏 0.1%, 粗海盐 0.25%, pH 7.0。500 mL 三角瓶, 内装培养液 300 mL, 经 121 °C (0.1 MPa) 高温灭菌 25 min 后在超净工作台上接种。共接种 130 L, 25 °C 静置培养 30 d。

2.3 提取分离 发酵液用纱布过滤, 菌体和培养液分别收集, 培养液浓缩, 130 L 浓缩至 5 L, 乙酸乙酯提取。提取浓缩物分别拌硅胶过柱, 以石油醚/乙酸乙酯/甲醇梯度洗脱。收集各组分再经反复柱层析, 制备薄层层析和重结晶纯化后分别得到化合物 A (3 mg), B (3.5 mg), C (4.3 mg)。化合物 A 单晶在  $\varphi = 30\%$  乙酸乙酯/石油醚条件下, 静置培养, 缓慢析出。

## 2.4 化合物的物理和波谱数据

化合物 A: 透明晶体。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.14 (1H, d, 8.1 Hz), 7.74 (1H, dd, 8.1 Hz), 8.46, (1H, s), 2.74 (2H, t, 7.8 Hz), 1.61~1.71 (2H, m), 1.33~1.45 (2H, m), 0.95 (3H, t, 7.3 Hz)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 165.4, 147.9, 145.1, 143.3, 138.6, 124.7, 33.3, 33.1, 22.6, 14.2。

LCMS (*m/z*): 180 [*M*+1]<sup>+</sup>。

化合物 B, 无色针状晶体。 $\theta_{mp}$  141~143 °C。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 8.09 (4H, s), 3.96 (23H, s)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ : 166.1, 133.8, 129.4, 52.3。FAB-MS *m/z* 195 [*M*+1]<sup>+</sup>。

化合物 C, 淡黄色油状物。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 0.89 (3H, t, 7.2 Hz), 1.35 (2H, m, 6.6, 7.2 Hz), 1.57 (2H, m, 6.6, 7.2 Hz), 3.50 (2H, s), 4.03 (2H, t,

6.6 Hz), 6.75 (1H, d, 8.4 Hz), 7.08 (1H, d, 8.4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 171.4, 156.4, 130.4, 125.6, 115.3, 64.1, 40.2, 30.9, 19.2, 13.4。FAB-MS *m/z* 209 [*M*+1]<sup>+</sup>。

## 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-ox-azine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (Strain 386) from the South China Sea[J]. Tetrahedron, 2000, 56: 9607.
- [2] CHEN G Y, LIN Y C, WEN L, et al. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an marine mangrove on the South China Sea coast[J]. Tetrahedron, 2003, 59: 4907.
- [3] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. Five unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea coast[J]. J Org Chem, 2001, 66: 6252.
- [4] SHAO C L, SHE Z G, GUO Z Y, et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for two anthraquinones and two xanthones from the mangrove fungus (ZSUH-36)[J]. Magn Reson Chem, 2007, 45: 434.
- [5] GROVE J F, JEFFS P W, MULLOLLANG T P C. The relation between gibberellin A<sub>1</sub> and gibberellic acid[J]. J Chem Soc, 1958:1236.
- [6] STEINER K, GRAF U, HARDEGGER E. Wirkstoffe und antibiotika. 39. Mitteilung *Fusarinolsure* Helv[J]. Chim Acta, 1971, 54 (3): 845
- [7] SONG J J, YEE N K. A concise synthesis of fusaric acid and (S)-(+) - fusarinolic acid[J]. J Org Chem, 2001, 66 (2): 605.
- [8] WANG J, LI G W, LIN Y C. 5-(But-3-enyl) pyridinium-2-carboxylate-5-butylpyridine-2-carboxylic acid, a co-crystal from *Fusarium moniliforme*[J]. Acta E: Structure Reports Online, 2005, E61(5): 1515.
- [9] GU J W, LIU L D. Studies of the active compounds on fruits of *Melia azedarach* L[J]. Natural Product Research Development, 1996, 8 (4): 10.
- [10] WANG L S, XU L J, XU O Y, et al. Simultaneous determination of acid dissociation constants and partition coefficients of fourteen substituted phenylacetic acids[J]. Huanjing Huaxue, 1988, 7(5): 1.