

南海红树林内生真菌 2508 代谢物研究^{*}吴雄宇¹, 李曼玲¹, 胡谷平¹, 林永成¹, VRIJMOED L. L. P.²

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 香港城市大学生物和化学系, 香港)

摘 要: 报道了从红树林内生真菌 *Xylaria* sp. 2508 中分离到的 piliformic 酸、甘油单棕榈酸酯 (α 型)、对羟基苯甲酸、3, 4-二羟基苯甲酸甲酯、2-甲氧基-4-甲基-乙酰苯、麦角甾醇和三羟基麦角甾醇 8 个已知化合物。通过现代波谱方法进行了鉴定。

关键词: 红树林; 内生真菌; 代谢物

中图分类号: O629.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 03-0034-04

在已发现的天然物中许多均来自陆生的高等植物、动物和陆生微生物, 但在过去的 10 年中海洋有机体成为天然产物研究开发的核心。特别是在海洋无脊椎动物中发现了许多结构奇特和生理活性好的化合物, 而进一步的研究却发现许多这些化合物的真正产生者却是与它们共生或寄生的微生物如真菌等, 所以海洋真菌特别是红树林内生真菌近年来受到人们的重视。

红树林处于海洋与陆地的交界地带, 沉积着许多动植物的尸体, 由于这里食物丰富, 所以大部分的海洋真菌都可以在红树林里找到。对红树林真菌的研究多数集中在生物学方面, 在我国我们小组首次开展了红树林内生真菌的代谢物研究工作。在真菌 1403、2533 等发现了许多具有抗菌、抗癌活性的化合物^[1,2]。而在红树林内生真菌 *Xylaria* sp. 2508 发现的代谢物却更多, 已经从中发现了一系列新的聚酮类化合物和结构奇特的连烯类化合物^[3,4]。本文继续报道其它代谢物的研究。

1 结果与讨论

化合物 1 在硅胶板上为一彗星状斑点, 显示其为酸性或碱性化合物, 测得其 pH 值为 5 左右, 是酸性化合物。由 FABMS 分子离峰 215 ($M+1$)⁺ 和 ¹³C NMR、DEPT 谱可以推断其分子式为 C₁₁H₁₈O₄, 不饱和度为 3; δ_c 174.3 和 167.3 对应于 δ_H 12.03 (2 个氢), 为 2 个羧基, 其中 167.3 位移值较低, 结合 δ_c 142.2 (CH, δ_H 6.66) 和 133.3 可知分子中有 1 个三取代双键, 而且应该与 167.3 的

羧基共轭。 δ_H 1.18 甲基为两重峰, 与分子中惟一的叔碳 δ_c 36.8, δ_H 3.52 (四重峰) 相连, 这叔碳氢位移值高, 应该还与双键和羧基相连才会处于较低场; 并且可以从其裂分情况知道该氢与双键上的氢偶合常数很小, 而相反, 位移值较高的 δ_H 2.24 ~ 2.10 的 CH₂ 也与双键相连, 为多重峰, 它与双键氢的偶合常数就相对较大, 为 7.5 Hz, 所以可以推测该 CH₂ 与双键氢连在同一个碳上, 剩余的—CH₂CH₂CH₂CH₃ 则与 δ_H 2.24 ~ 2.10 相连, 综上所述可以推断化合物 1 的结构, 经查证为 piliformic 酸。piliformic 酸为二元酸, 是酸性较强的有机酸, 在培养过程中, 培养液的 pH 值由 7.15 下降到 5.77 可能就是因为生成较大量的 piliformic 酸的缘故。

化合物 2 的 δ_H 1.29 有多个氢及 δ_H 0.88 为三重峰的甲基显示 2 为长链化合物; δ_H 3.5 ~ 4.1 有多个连氧碳的氢, 其数目刚好与单取代甘油相合, 也没有酰胺氢和羧基氢信号, 而且一般神经酰胺特别是多羟基神经酰胺的溶解性能较差, 在大部分溶剂中都是加热溶解, 冷却析出, 化合物 2 易溶于乙酸乙酯和丙酮, 所以该化合物为甘油单碳酸酯, 从氢谱还可以看到 δ_H 3.5 ~ 4.1 化学环境各不同, 所以脂肪酸部分应与 CH₂O 的氧相连; 常见脂肪酸为十六或十八酸, 经查 2 与十六碳酸单甘油酯 (α 型) 熔点吻合, 故推断它的结构如图 1。

由质谱和 NMR 可推出 4 的分子式为 C₁₁H₁₀O₅, 不饱和度为 7; 该化合物的不饱和度很高, 含有多個烯碳, 只有 2 个 CH, 可能分子中有 1 个四

* 收稿日期: 2001-09-21

基金项目: 国家 863 资助项目 (AA624010); 广东省自然科学基金资助项目 (980317)

作者简介: 吴雄宇 (1972-), 男, 博士, 讲师; 通讯联系人: 林永成; E-mail: ceslye@zsu.edu.cn

取代苯环; 在 TLC 时为一彗星状的兰色荧光斑点 (254 nm 检测), 所以氢谱 δ 12.95 的宽单峰可能是羧基氢信号, 而 δ 11.67 的峰很尖锐, 可能是与羰基形成氢键的酚羟基氢信号; 2 个苯环质子偶合常数为 9.0 Hz, 所以 2 个质子处在相邻位置, 大于 δ 163 有 3 个碳, 其中 1 个为羧基, 1 个为连氧芳碳, 还有 1 个可能是酯基; 只有 1 个 δ 75 的连氧 CH, 应该与酯基相连, 同时还与甲基和亚甲基相连, 亚甲基位移值较高应直接连在苯环上, 综上所述, 该化合物 4 为异香豆素类化合物。

化合物 3—6 均为单个芳香环的化合物, 而有趣的是所分离到的其它含芳环的代谢物都是苯的衍生物, 而不是稠环芳香化合物^{3,4}。在代谢过程中这些小分子的化合物也许是最先产生的。已经知道 3 的酯有防腐和杀真菌的作用, 5 有抗微生物性能; 它们的结构虽然简单, 仍然值得生物学家和药理学家对其在生物代谢过程中的作用进行深入的研究。

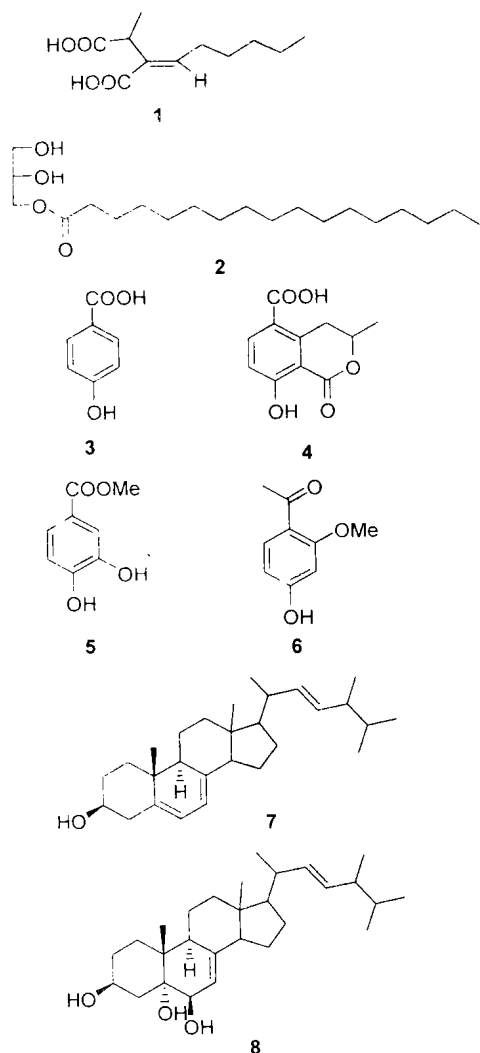


图 1 1—8 的化学结构图

Fig. 1 The chemical structures of 1—8

2 材料与方法

2.1 试剂与实验仪器

所用试剂均为市售并重蒸后使用, 所用仪器为 VG ZAB—HS 质谱仪, INOVA 500 核磁共振仪, VECTOR22 富里叶变换红外光谱仪。

2.2 菌种和菌种培养

真菌 No. 2508 是由香港城市大学 L. L. P. Vrijmoed 和 E. B. G. Jones 教授提供, 采自香港 Maipo 红树林 *Angiosperm* 树的种子里, 为鹿角属, 种没有定, 可能是新种。菌种分别保存在香港城市大学和广州中山大学内。

培养基: ρ (葡萄糖) 1.0%, ρ (酵母膏) 0.1%, ρ (蛋白胨) 0.2%, ρ (NaCl) 3%, pH 为 7.14; 种子在 500 mL 的锥形瓶中培养, 然后在无菌条件下转入 300 L 的发酵罐(ρ (葡萄糖) 为 1.2%) 中于 30 °C 培养 86 h, 此时葡萄糖基本消耗完。

2.3 代谢物提取与分离

培养液共约 170 L 浓缩至约 3.5 L, 用乙酸乙酯 3.5×6 L 提取, 萃取液浓缩后柱层析, 乙酸乙酯—石油醚梯度洗脱, φ (乙酸乙酯) = 45% 洗脱先后得到 4 和 1 以及它们与 3, 5, 6 的混合物。由于化合物 1 的量, 影响其它化合物的分离纯化, 将部分混合物的乙酸乙酯溶液用适量 NaHCO_3 水溶液, 水 (2 次) 进行洗涤, 将洗涤后的乙酸乙酯层浓缩, 再用 φ (乙酸乙酯) = 20%~50% 乙酸乙酯—石油醚梯度洗脱并重结晶分别得 6, 3 和 5; 菌体的甲醇提取物浓缩后有较大量的针状固体析出, 对照标准麦角甾醇, 其 R_f 值和熔点都吻合; 其余部分用乙酸乙酯—石油醚梯度洗脱, φ (乙酸乙酯) = 35% 乙酸乙酯—石油醚洗脱得 2; φ (乙酸乙酯) = 80% 乙酸乙酯—石油醚洗脱得 8。

2.4 化合物的物理和波谱数据

化合物 1: 无色方形晶体, θ_{mp} : 158 ~ 159 °C^[5]; ^1H NMR(d_6 -DMSO, 500 MHz, TMS) δ 12.03(brs, 2H), 6.66(t, 7.5 Hz, 1H), 3.52(q, 7.0 Hz, 1H), 2.24~2.10(m, 2H), 1.39(dt, 7.0, 7.0 Hz), 1.34~1.20(m, 4H), 1.18(d, 7.0 Hz, 3H), 0.86(t, 7.0 Hz, 3H); ^{13}C NMR(d_6 -DMSO, 125 MHz, TMS) δ 174.3(C), 167.3(C), 142.2(CH), 133.0(C), 39.0(CH₂), 36.8(CH), 30.7(CH₂), 27.6(CH₂), 27.5(CH₂), 21.7(CH₂), 15.7(CH₃), 13.6(CH₃); FABMS: 215($M+1$)⁺, 197, 169, 154, 137, 136, 123, 107。

化合物 2: 片状晶体, θ_{mp} : 71 ~ 72 °C(文献值: 71 ~ 72 °C)^[6]; ^1H NMR(d_6 -Acce., 500 MHz, TMS)

δ 4.09 (AM, 2H), 3.94 (d, 5.0 Hz, 1H), 3.82 (brdt, 5.5, 5.5 Hz, 1H), 3.67 (t, 6.0 Hz, 1H), 3.55 (dd, 10, 5.5 Hz), 2.31 (t, 7.0 Hz, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.29 (brs, 12H), 0.88 (t, 7.0 Hz, 3H)。

化合物 3: 白色晶体, θ_{mp} : 215 ~ 217 $^{\circ}\text{C}$ (文献值: 213 ~ 214 $^{\circ}\text{C}$)^[7]; ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-Ace.}$, 500 MHz, TMS) δ 10.75 (brs, 1H), 9.10 (brs, 1H), 7.91 (d, 9.0 Hz, 2H), 6.92 (d, 9.0 Hz, 2H)。

化合物 4: 白色固体, 溶液有蓝色荧光, θ_{mp} : 190 ~ 220 $^{\circ}\text{C}$ 升华; ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, 500 MHz, TMS) δ 12.95 (brs, 1H), 11.67 (s, 1H), 8.07 (d, 9.0 Hz, 1H), 6.96 (d, 9.0 Hz, 1H), 4.76 (m, 1H), 3.80 (dd, 18.0, 3.5 Hz, 1H), 3.01 (dd, 18.0, 12.0 Hz, 1H), 1.44 (d, 6.5 Hz, 3H)。

化合物 5: 淡粉红色固体, θ_{mp} : 136 ~ 137 $^{\circ}\text{C}$ (文献值: 134.5 $^{\circ}\text{C}$)^[8]; ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-Ace.}$, 500 MHz, TMS) δ 8.44 (brs, 2H), 7.49 (d, 2.0 Hz, 1H), 7.44 (dd, 8.0, 2.0 Hz, 1H), 6.89 (d, 8.0 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H); IR (ν/cm^{-1} , KBr): 3 453, 3 247, 3 150, 1 691 (vs), 1 612, 1 521, 1 307, 1 241, 1 096。

化合物 6: 浅黄色固体, θ_{mp} : 139 ~ 141 $^{\circ}\text{C}$ (文献值: 138 $^{\circ}\text{C}$)^[9]; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, TMS) δ 7.78 (d, 9.5 Hz, 1H), 6.48—6.44 (m, 2H), 6.42 (brs, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.59 (s, 3H); IR (ν/cm^{-1} , KBr): 3 299, 3 150, 2 927, 2 843, 1 650, 1 575, 1 509, 1 466, 1 273, 1 222, 969, 839。

化合物 8: 白色固体, θ_{mp} : 241 ~ 243 $^{\circ}\text{C}$ (文献值: 243 ~ 245 $^{\circ}\text{C}$)^[10]; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, TMS) δ 5.35 (m, 1H), 5.20 (AB, 2H), 4.07 (m, 1H), 3.62 (brs, 1H), 2.14 (dd, 8.0, 6.5 Hz, 1H),

2.10 ~ 2.0 (m, 2H), 2.0 ~ 1.80 (m, 4H), 1.80 ~ 1.70 (m, 2H), 1.70 ~ 1.20 (m, 11H), 1.09 (s, 3H), 1.03 (d, 6.0 Hz, 3H), 0.92 (d, 6.5 Hz, 3H), 0.84 (d, 7.5 Hz, 3H), 0.83 (d, 6.5 Hz, 3H), 0.60 (s, 3H); 对照标准物氢谱可知 8 为 7, 22(*E*)-二烯-3 β , 5 α , 6 β -三羟基麦角甾醇。

参考文献:

- [1] 姜广策, 林永成, 周世宁, 等. 中国南海红树林内生真菌 No. 1403 次级代谢物研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2000, 39(6): 119.
- [2] 王军, 林永成, 吴雄宇, 等. 从红树林内生真菌 No. 2533 分离出新的异香豆素 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2001, 40(1): 127.
- [3] 姜广策. 南海海洋真菌次级代谢物及其发酵生理研究 [D]. 广州: 中山大学, 2000: 28.
- [4] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. A novel N-cinnamoyl-cyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain #2508) from the South China Sea [J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42: 449.
- [5] ANDERSON J R, EDWARDS R L. Metabolites of the higher fungi (22). 2-butyl 3-methyl succinic acid and 2-hexylidene 3-methylsuccinic acid from *Xylariaceae* fungi [J]. J Chem Soc, Perkin Trans 1, 1985: 1481—1485.
- [6] 试剂手册 [M]. 第二版. 上海: 上海科学技术出版社, 647.
- [7] 中国科学院自然科学名词编订室. 汉译海氏有机化合物辞典 (第 II 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1965: 1113.
- [8] 中国科学院自然科学名词编订室. 汉译海氏有机化合物辞典 (第 IV 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1965: 392.
- [9] 中国科学院自然科学名词编订室. 汉译海氏有机化合物辞典 (第 III 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1965: 148.
- [10] GOLDSEIN A S. Synthesis and bioevaluation of Δ^7 -5-desaturase inhibitors, an enzyme late in the biosynthesis of the fungal sterol ergosterol [J]. J Med Chem, 1996, 39: 5092.

The Metabolites of the Endophyte Fungus No. 2508 in the Mangrove Tree from the South China Seacoast

WU Xiong yu¹, LI Man ling¹, HU Gu ping¹, LIN Yong cheng¹, VRIJMOED L. L. P.²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering,

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

2. Department of Biology and Chemistry, City University of Hongkong, Hongkong, China)

Abstract: Eight known compounds: piliformic acid (2-hexylidene-3-methylsuccinic acid), α -glycerol monopalmitate, *p*-hydroxy benzoic acid, protocatechuic acid methyl ester, 4-hydroxy-2-methoxy acetophenone, ergosterol and 7, 22-(*E*)-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol-ergosta were isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. No. 2508 from the mangrove tree from the South China Seacoast. Their structures were identified by the NMR, MS, IR spectroscopic methods and by comparison with the data of authentic compounds.

Key words: mangrove; endophytic fungus; metabolite