

一株白粉寄生菌的酚类代谢产物

张慧晔^{1,2}, 谢海辉¹, 林立东¹, 魏孝义^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 从得自鼎湖山自然保护区的一株白粉寄生菌(*Ampelomyces* sp.) SC0307 固体发酵物中分离得到 7 个酚类化合物。通过波谱分析, 分别鉴定为 2,5-二羟基苯甲醇(1)、对羟基苯甲酸(2)、2,5-二羟基苯甲酸(3)、3,4-二羟基苯甲酸(4)、苯乙酸(5)、3,4-二甲氧基肉桂酸(6)、3,4,5-三甲氧基肉桂酸(7)。7 个化合物均为从白粉寄生菌属真菌中首次分离获得。

关键词: 白粉寄生菌; 酚类

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)01-0077-03

Phenolic Metabolites of An *Ampelomyces* Fungus

ZHANG Hui-ye^{1,2}, XIE Hai-hui¹, LIN Li-dong¹, WEI Xiao-yi^{1*}

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Seven phenolic metabolites were isolated from the solid culture of *Ampelomyces* SC0307, obtained from Dinghu Mountain. On the basis of their spectral data analysis, they were identified as 2,5-dihydroxybenzyl alcohol (1), *p*-hydroxybenzoic acid (2), 2,5-dihydroxybenzoic acid (3), 3,4-dihydroxybenzoic acid (4), phenylacetic acid (5), 3,4-dimethoxycinnamic acid (6), and 3,4,5-trimethoxycinnamic acid (7). All compounds were isolated from this fungus for the first time.

Key words: *Ampelomyces* sp.; Phenolic

真菌种类众多, 代谢产物结构新颖、多样, 为生物活性化合物的重要来源^[1-3]。白粉寄生菌属(*Ampelomyces*) 为子囊菌真菌。其中, 白粉寄生孢(*Ampelomyces quisqualis* Ces.) 是一种白粉病的重寄生真菌^[5]。在该属真菌的生物活性代谢产物研究方面, Kwong 等最近对一株白粉寄生菌属海洋真菌(*Ampelomyces* sp. UST040128-009) 进行了研究, 获得了一个具有显著抗菌和抗污损(antifouling) 活性化合物^[4]。我们在对采自鼎湖山的丝状真菌进行抗菌活性筛选时, 发现一株陆生白粉寄生菌(*Ampelomyces* sp. SC0307) 的固体发酵物对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) 有显著抑菌活性。为了寻找新的抗菌活性成分, 我们对该菌株的代谢产物进行了实验研究。本文报道该菌株的简单酚类代谢产物。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

菌种 SC0307 于 2002 年 1 月 22 日采自广东省肇庆市鼎湖山国家自然保护区, 由广东省微生物研究所鉴定为子囊菌白粉寄生菌(*Ampelomyces* sp.), 是子囊菌的无性型(Anamorphic Ascomycetes)。菌种保存于中国科学院华南植物园植物化学实验室菌种库内。

1.2 培养基及发酵培养

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基: 马铃薯汁 1 000 ml (200 g 马铃薯煮沸 20 min 后过滤的滤液), 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g; 酵母麦芽汁葡萄糖(YMG)液体培养基: 葡萄糖 4 g, 麦芽提取物 10 g, 酵母提取物 4 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 5.5 ± 0.2; YMG-小麦固体培养基: YMG 液体培养基 1 000 ml, 小麦 550 g。

收稿日期: 2008-04-02 接受日期: 2008-06-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(20672114)资助

* 通讯作者 Corresponding author

无菌操作环境下,菌种经 PDA 培养基活化后,转入 YMG 液体培养基中,150 r min⁻¹,25℃,黑暗摇床培养 3~4 d,种子液再按照体积的 10% 扩大 1 次,培养好的二级种子液转入装有 YMG-小麦固体培养基的发酵瓶中,28℃ 黑暗条件下静置培养 6 d 收获菌丝体。

1.3 仪器

核磁共振谱用 Bruker DRX-400 核磁共振仪测定,以四甲基硅烷(TMS)为内标。电喷雾质谱(ESIMS)用 MDS SCIEX API 2000 LC/MS/MS 仪,以甲醇为溶剂,直接进样测定。紫外光谱用 Perkin Elmer Lambda 25 紫外分光光度计测定。半制备高效液相色谱用 LC-6AD/RID-10A(日本 SHIMADZU 公司)。

1.4 提取和分离

发酵菌丝体以 95% 乙醇提取 3 次,减压浓缩后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,浓缩后得到各萃取部位。氯仿萃取部位(28.0 g)经硅胶柱层析(100~200 目),石油醚-丙酮(95:5~60:40)梯度洗脱;流份 12~14 经葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析,甲醇洗脱,再经薄层制备,氯仿-甲醇(98:2)展开, $R_f=0.55$,得到化合物 6 (6 mg);流份 19~23 经反向硅胶柱层析(75 目),甲醇-水(60:40)洗脱;次流份 7 经葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析,甲醇洗脱,再经 HPLC 制备,甲醇-水(30:70)洗脱,得到化合物 5 (8 mg);次流份 9~12 经薄层制备,氯仿-甲醇(98:2)展开, $R_f=0.95$,得到化合物 7 (7 mg)。乙酸乙酯萃取部位(36.0 g)经硅胶柱层析(100~200 目),氯仿-甲醇(100:0~60:40)洗脱;流份 48~52 经硅胶柱层析(200~300 目),氯仿-甲醇(95:5~60:40)洗脱;次流份 3~4 经葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析,甲醇洗脱,得到化合物 2 (6 mg);流份 91~98 经硅胶柱层析(100~200 目),石油醚:丙酮(60:40~40:60)洗脱得;次流份 3~4 经 HPLC 制备,甲醇-水(20:80)洗脱,得到化合物 1 (15 mg);次流份 18~24 经葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析,甲醇洗脱,得到化合物 4 (10 mg);正丁醇部分(50.0 g)经大孔树脂柱层析,依次用水和 95% 乙醇洗脱,减压浓缩后得乙醇洗脱物。乙醇洗脱物(11.0 g)经硅胶柱层析(100~200 目),氯仿-甲醇(100:0~70:30)洗脱;流份 22~25 再经葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析,甲醇洗脱,得到化合物 3 (16 mg)。

1.4 结构鉴定

化合物 1 褐色固体;分子式为 C₇H₈O₃;负离子 ESIMS m/z : 139 [M-H]⁻, 175 [M+Cl]⁻, 279 [2M-H];UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 218 (3.95), 295 (3.67);¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅): δ 10.71 (2H, s, Ar-OH), 7.77 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 7.15 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 7.11 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-4), 5.36 (2H, s, H₂-7)。¹³C NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅): δ 151.9 (C-5), 148.9 (C-2), 131.1 (C-1), 116.6 (C-3), 115.8 (C-6), 115.0 (C-4), 61.0 (C-7)。数据与文献[6]报道的 2,5-二羟基苯甲醇(2,5-dihydroxybenzyl alcohol)一致。

化合物 2 白色针状结晶;mp.210~211℃;分子式为 C₇H₆O₃;UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 222 (4.05), 290 (3.97), 310 (3.89);负离子 ESIMS m/z : 137 [M-H]⁻, 173 [M+Cl]⁻, 275 [2M-H];¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.43 (1H, s, COOH), 10.22 (1H, s, OH), 7.77 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2 和 H-6), 6.80 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3 和 H-5)。数据与文献[7]报道的对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid)一致。

化合物 3 褐色针状结晶;mp.204~205℃;分子式为 C₇H₆O₄;UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 213 (3.40), 237 (3.52), 256 (3.11), 262 (2.97);负离子 ESIMS m/z : 153 [M-H]⁻, 307 [2M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅): δ : 8.10 (1H, dd, $J = 2.4$ Hz, H-6), 7.38 (1H, dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, H-4), 7.18 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3);¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.8 (COOH), 113.7 (C-1), 154.1 (C-2), 117.4 (C-3), 123.0 (C-4), 149.1 (C-5), 114.7 (C-6)。数据与文献[8]报道的 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid)一致。

化合物 4 白色针状结晶;mp.197~198℃;分子式为 C₇H₆O₄;UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 217 (4.33), 258 (4.06), 294 (3.79);负离子 ESIMS m/z : 153 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.47 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 6.09 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.05 (1H, s, H-2);¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.4 (COOH), 121.7 (C-1), 116.6 (C-2), 144.9 (C-3), 150.0 (C-4), 115.2 (C-5), 121.9 (C-6)。数据与文献[8]报道的 3,4-二羟基苯甲酸(3,4-dihydroxybenzoic acid)一致。

化合物 5 淡黄色固体;分子式为 C₃H₈O₂;UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 208 (4.10), 262 (2.73),

268 (2.67); 负离子 ESIMS m/z : 135 $[M-H]^-$, 271 $[2 M-H]^-$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.25 ~ 7.32 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5 和 H-6), 3.62 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 178.5 (COOH), 133.5 (C-1), 129.4 (C-2 和 C-6), 128.6 (C-3 和 C-5), 127.3 (C-4), 41.2 (C-7)。数据与文献[9]报道的为苯乙酸(phenylacetic acid)一致。

化合物 6 淡黄色固体; 分子式为 $C_{11}H_{12}O_4$; 正离子 ESIMS m/z : 209 $[M+H]^+$, 231 $[M+Na]^+$, 439 $[2M+Na]^+$; 负离子 ESIMS m/z : 207 $[M-H]^-$, 243 $[M+Cl]^-$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.05 (1H, dd, $J = 6.4, 2.0$ Hz, H-5), 7.01 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3), 6.90 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.27 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 3.91 和 3.88 ($2 \times 3H$, s, OCH_3 -3 和 OCH_3 -4); 数据与文献[10]报道的 3,4-二甲氧基肉桂酸(3,4-dimethoxycinnamic acid)一致。

化合物 7 淡黄色固体; 分子式为 $C_{12}H_{14}O_5$; 正离子 ESIMS m/z : 239 $[M+H]^+$, 261 $[M+Na]^+$, 499 $[2M+Na]^+$; 负离子 ESIMS m/z : 237 $[M-H]^-$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.58 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.75 (2H, s, H-2 和 H-6), 6.28 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 3.90 (6H, s, OCH_3 -3 和 OCH_3 -5), 3.78 (3H, s, OCH_3 -4); 数据与文献[10-11]报道的 3,4,5-三甲氧基肉桂酸(3,4,5-trimethoxycinnamic acid)一致。

2 结果和讨论

本研究从陆生白粉寄生菌 *Ampelomyces* sp. SC0307 固体发酵物中分离得到 7 个酚酸类化合物: 2,5-二羟基苯甲醇(1)、对羟基苯甲酸(2)、2,5-二羟基苯甲酸(3)、3,4-二羟基苯甲酸(4)、苯乙酸(5)、3,4-二甲氧基肉桂酸(6)、3,4,5-三甲氧基肉桂酸(7)。7 个代谢产物均系在白粉寄生菌属真菌中首次报道。其中, 据文献报道化合物 2^[7]、4^[12] 和 5^[13-14] 均有一定抗菌或抗真菌活性。

参考文献

[1] Knight V, Sanglier J J, Ditullio D, et al. Diversifying microbial natural

products for drug discovery [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2003, 62: 446-458.

[2] Demain A. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52: 455-463.

[3] Baker D D, Alvi K A. Small-molecule natural products: New structures, new activities [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15: 576-583.

[4] Kwong T F N, Miao L, Li X C, et al. Novel antifouling and antimicrobial compound from a marine-derived fungus *Ampelomyces* sp. [J]. *Mar Biotechnol*, 2006, 8: 634-640.

[5] Liang C (梁晨), Lü G Z (吕国忠), Li B D (李宝笃). Research advance of hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* [J]. *J Laiyang Agri Coll (Nat Sci)* (莱阳农学院学报: 自然科学版), 2006, 23(4): 317-322. (in Chinese)

[6] Chen L, Fang Y C, Zhu T J. Gentsyl alcohol derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 66-70.

[7] Cao Y L (曹亚玲). A discussion on the synthesis of ethyl *p*-hydroxybenzoate with different catalysts [J]. *J Changshu Coll (常熟高专学报)*, 2002, 16(2): 25-27. (in Chinese)

[8] Scott K N. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. I. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives [J]. *J Amer Chem Soc*, 1972, 94: 8564-8568.

[9] Deng S Z (邓松之), Li F Y (李凤英), Peng S S (彭胜石). Chemical constituents of marine sponge *Gelliodes spinosella* in the South China Sea [J]. *Chin J Mar Drugs (中国海洋药物)*, 1998(3): 31-32. (in Chinese)

[10] Peterson J R, Russell M E, Surjasmita I B. Synthesis and experimental ionization energies of certain (*E*)-3-arylpropenoic acid and their methyl esters [J]. *J Chem Eng Data*, 1988, 33: 534-537.

[11] Zhang G G (张广贵), Zhang Y P (张应鹏), Gou G J (苟国俊), et al. Preparation of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2007, 38(11): 761-762. (in Chinese)

[12] Wang D D (王丹丹), Liu S Q (刘盛泉), Lu J Y (陆杰英), et al. Studies on the active constituents of *Syringe oblate* Lindl. [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 1982, 17(12): 951-954. (in Chinese)

[13] Xu L X (徐良雄), Feng N (冯娜), Xue J H (薛璟花), et al. Phenolic acid metabolites from *Metarhizium* sp. SC0924 and their antifungal activity against *Peronophythora lichii* [J]. *J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报)*, 2008, 16(2): 140-143. (in Chinese)

[14] Tan J J (谈家金), Feng Z X (冯志新). Activity determination of benzoic acid and phenylacetic acid against *bursaphelenchus xylophilus* and bacteria [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)* (南京林业大学学报: 自然科学版), 2003, 27(6): 59-62. (in Chinese)