

苦皮藤内生真菌层出镰刀菌中 杀菌成分的结构鉴定*

姬志勤¹, 吴文君¹, 王明安², 顾爱国¹

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农业大学 理学院, 北京 100094)

[摘 要] 采用红外、质谱、核磁共振氢谱和¹³C 核磁共振谱技术, 对苦皮藤韧皮中分离出的 1L 内生真菌代谢物 1L-3, 1L-6 及 1L-8 进行了结构鉴定。结果表明, 化合物 1L-3 为 enniatin B, 化合物 1L-6 为 enniatin B1, 化合物 1L-8 为 enniatin A1。

[关键词] 苦皮藤; 内生真菌; 杀菌成分; 结构鉴定

[中图分类号] O 656 22

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)05-0061-04

植物内生真菌 (plant endophytic fungi) 是在寄主植物中度过全部或近乎全部生活周期而寄主不表现任何症状的一类真菌。内生真菌在长期的进化过程中与寄主植物建立了互惠共生关系, 参与了植物次生代谢产物的合成, 而且许多植物内生真菌的代谢产物具有多种生物活性, 因此, 植物内生真菌成为天然产物农药研究与开发的宝贵资源^[1]。兰琪等^[2]从杀虫植物苦皮藤韧皮中分离出 1L, 2B 和 5J 3 株内生真菌, 其代谢产物对多种农业病原真菌有明显的杀菌活性。作者鉴定 1L 菌株为层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*), 并从中分离出化合物 1L-3, 1L-6 及 1L-8。本研究进一步报道这 3 个杀菌活性化合物的结构鉴定结果。

1 实验仪器

X4 型显微熔点测定仪 (温度未校正); IR435 型红外光谱仪, KBr 压片法测定; JASCO 500C 旋光仪; Bruker APEX II 质谱仪; Bruker RPX300, Bruker RPX500 核磁共振仪, 以 CDCl₃ 作溶剂, TMS 作内标。

2 结构鉴定

2.1 化合物 1L-3

该化合物为无色片状结晶, m. p. 185~186 °C,

$[\alpha]_D^{20} - 88.30$ (c 0.45, CHCl₃)。MS m/z : 640 [M + H]⁺, 662 [M + Na]⁺ 和 678 [M + K]⁺, 说明其分子质量为 639。HRMS m/z : 640.4117, 给出分子式 C₃₃H₅₈N₃O₉, 计算值为 640.4127, 应该为 [M + H]⁺, 因此 1L-3 的分子式为 C₃₃H₅₇N₃O₉, 化合物的不饱和度为 7。1L-3 的红外光谱显示有下列特征吸收峰: 羰基: 1731.8 cm⁻¹, 1651.4 cm⁻¹; 饱和碳氢: 2965.7 cm⁻¹, 2876.7 cm⁻¹。

在化合物 1L-3 的 ¹H-NMR 谱中, 仅观测到 δ 5.14 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.52 (d, J = 9.6 Hz, 3H), 3.16 (s, 9H), 2.28 (m, 3H), 2.26 (m, 3H), 1.06 (d, J = 6.4 Hz, 9H), 0.98 (d, J = 6.8 Hz, 9H), 0.96 (d, J = 6.8 Hz, 9H) 和 0.89 (d, J = 6.4 Hz, 9H) 9 组峰, 共 19 个质子; ¹³C NMR 谱、DEPT 谱给出了 δ 170.2 (C), 169.3 (C), 75.6 (CH), 63.2 (CH), 33.2 (CH₃), 29.9 (CH), 27.9 (CH), 20.4 (CH₃), 19.3 (CH₃), 18.6 (CH₃) 和 18.5 (CH₃) 共 11 个碳原子, 详见表 1。由于分子质量为奇数, 该化合物分子中可能至少有 1 个 N 原子, 分子中有 2 个羰基和 1 个与氧相连的碳原子, 所以上述结果提供了一个 C₁₁H₁₉NO₃ 的结构片段。此片段结构分子质量为 213, 1L-3 的分子质量为 639, 恰好为该片段分子质量的 3 倍。推测 1L-3 是一个有 C₃ 对称性的分子, 只要确定 C₁₁H₁₉NO₃ 片断的结构, 1L-3 的分子结构就可确定。

* [收稿日期] 2004-08-31

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目 (2002AA245121); 教育部博士点基金项目 (20020712011)

[作者简介] 姬志勤 (1971-), 男, 山西永济人, 助理研究员, 硕士, 主要从事农药化学研究。

[通讯作者] 吴文君 (1945-), 男, 四川洪雅人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药化学和农药毒理学研究。

表 1 化合物 1L-3 的NMR 数据

Table 1 NMR data of compound 1L-3

编号 No.	δ_{H}	δ_{C}	H-HCO SY	HMBC
1, 1', 1''		170.2		
2, 2', 2''	5.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H)	75.6	5-H	1-C, 5-C, 11-C
3, 3', 3''		169.3		
4, 4', 4''	4.52 (d, $J = 9.6$ Hz, 3H)	63.2	9-H	3-C, 8-C
5, 5', 5''	2.28 (m, 3H)	29.9	2-H, 11-H	2-C
6, 6', 6''	0.96 (d, $J = 6.8$ Hz, 9H)	18.5		
7, 7', 7''	0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 9H)	18.6		
8, 8', 8''	3.16 (s, 9H)	33.2		2-C, 3-C, 4-C
9, 9', 9''	2.26 (m, 3H)	27.9	4-H, 10-H	4-C
10, 10', 10''	0.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 9H)	19.3	9-H	
11, 11', 11''	1.06 (d, $J = 6.4$ Hz, 9H)	20.4	5-H	

在 1L-3 的 HMBC 谱中, 可观测到 $\delta_{\text{H}} 170.2$ 和 169.3 的 2 个羰基均与 $\delta_{\text{C}} 14$ 和 4.52 的 2 个叔碳质子相关, 而 $\delta_{\text{H}} 69.3$ 的羰基还与 $\delta_{\text{C}} 16$ 的 N-CH₃ 质子相关, 因此, $\delta_{\text{H}} 170.2$ 是一个酯羰基, 而 169.3 是一个酰胺羰基。上述 HMBC 结果提示, 整个分子必须是由 3 个相同结构片段构成一个大环结构以占据另一个不饱和度, 该化合物的结构如图 1 所示。

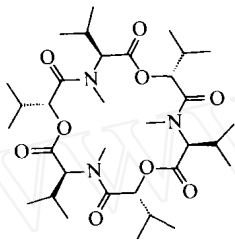


图 1 化合物 1L-3 的结构式

Fig 1 Structure of 1L-3

2.2 化合物 1L-6

该化合物为白色粉末状, m. p. 78~82, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 94.0$ (c 0.84, CHCl₃)。MS m/z : 654 [M + H]⁺, 676 [M + Na]⁺ 和 692 [M + K]⁺, 说明其分子质量为 653。HRMS m/z : 654.4221, 分子式为 C₃₄H₅₉N₃O₉H, 计算值为 654.4329, 应该为 [M + H]⁺, 说明其分子式为 C₃₄H₅₉N₃O₉, 不饱和度为 7。化合物的 IR 光谱显示有下列特征吸收峰: 羰基: 1739.1 cm⁻¹, 1666.7 cm⁻¹; 饱和碳氢: 2966.6 cm⁻¹, 2876.5 cm⁻¹。

化合物 1L-6 与 1L-3 相比, 其分子质量多 14 个单位, 即 1 个 -CH₂-基团, 说明 1L-6 为 1L-3 的同系物, 由 1L-6 和 1L-3 具有相似的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱, 更证实了这一推测 (表 2)。根据 COSY, HMQC 和 HMBC 谱对 ¹H 和 ¹³C 信号进行了指认。

表 2 化合物 1L-6 的NMR 数据

Table 2 NMR data of compound 1L-6

编号 No.	δ_{H}	δ_{C}	H-HCO SY	HMBC
1, 1', 1''		170.3		
2, 2'	5.16 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H)	75.8, 76.7	5-H	1-C
2''	5.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)	75.4		1-C
3, 3', 3''		169.2		
4, 4'	4.50 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H)	63.6, 63.4	9-H	3-C
4''	4.71 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H)	61.5	9'-H	3-C
5, 5', 5''	2.29 (m, 3H)	29.9	2-H, 6-H, 7-H	
6, 6', 6''	0.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 9H)	18.5	5-H	
7, 7', 7''	0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 9H)	18.7		
8, 8'	3.13 (s, 6H)	33.5		3-C
8''	3.11 (s, 3H)	32.8		3-C
9, 9'	2.29 (m, 2H)	28.0	4-H, 10-H, 11-H	
9''	2.06 (m, 2H)	33.9	4'-H	
10, 10'	0.86 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H)	19.3	9-H	
10''	0.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H)	16.2		
11, 11'	1.06 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H)	20.5	9-H	
11''	1.42, 1.04 (m, 2H)	25.3		
12''	0.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)	10.9		

1L-6 与 1L-3 相比, 在其¹H NMR 谱中, δ₁₅ (m, 3H) 化学位移与 1L-3 的 δ₁₄ 相似, 而 δ₄₈ (m, 2H) 与 1L-3 的 δ₅₂ 相近, 但多出 1 个 δ₇₁ 的质子信号, δ₁₃ 的 6 个质子与 1L-3 的 δ₁₆ 相当, 又多出 1 个 δ₁₁ 的甲基质子信号, 这说明 1L-6 与 1L-3 相比, 在与 N 相连的-CH= 基团上的一个异丙基结构发生了改变。在¹³C NMR 谱中, 1L-6 比 1L-3 多出 1 个 δ₅₃ 的-CH₂- 碳原子, 同时存在 1 个向低场移动的 δ₃₉ 的叔碳原子和 2 个向高场移动的甲基(δ_{16.2}, 10.9), 其余变化不大。由此说明, 与 N 相连的 CH 基团上的 1 个异丙基变成了 2-丁基, 其余结构不变。因此, 1L-6 的结构应如图 2 所示。

2.3 化合物 1L-8

该化合物为白色粉末状, m. p. 101~105, [α]_D²⁰-157 (c 0.14, CHCl₃)。MS *m/z*: 668 [M +

H]⁺, 690 [M + Na]⁺ 和 706 [M + K]⁺, 说明其分子质量为 667; HRMS *m/z*: 668.4368, 说明其分子式为 C₃₅H₆₁N₃O₉H, 计算值为 668.4486, 应该为 [M + H]⁺, 说明其分子式为 C₃₅H₆₀N₃O₉, 不饱和度为 7。化合物 1L-8 的 IR 谱显示有下列特征吸收峰: 羰基: 1742.4 cm⁻¹, 1661.5 cm⁻¹; 饱和碳氢: 2966.6 cm⁻¹, 2934.4 cm⁻¹, 2876.8 cm⁻¹。

1L-8 与 1L-6 和 1L-3 的¹H NMR、¹³C NMR 谱基本相似, 但分子质量比 1L-3 多出 28 个质量单位, 由¹³C 的 DEPT 谱可知为 2 个重叠的-CH₂-基团。由 1L-8 的 COSY、HMQC 和 HMBC 谱对¹H、¹³C-NMR 信号进行了指认(表 3), 1L-8 与 1L-3 相比较, 在结构上 1L-3 的 2 个与 N 相连的-CH= 基团上的异丙基变成了 2-丁基, 其余结构不变。因此, 1L-8 的结构如图 3 所示。

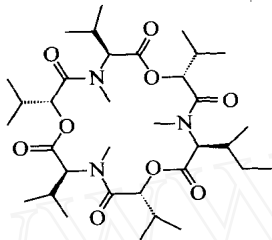


图 2 化合物 1L-6 的结构式
Fig. 2 Structure of 1L-6

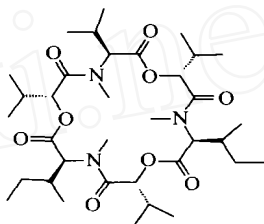


图 3 化合物 1L-8 的结构式
Fig. 3 Structure of 1L-8

表 3 化合物 1L-8 的 NMR 数据
Table 3 NMR data of compound 1L-8

编号 No.	δ _H	δ _C	H-HCOSY	HMBC
1, 1', 1''		170.4		
2	5.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H)	75.9	5-H	1-C
2', 2''	5.10 (d, J = 8.4 Hz, 2H)	75.5	5-H	
3, 3', 3''		169.3		
4	4.48 (d, J = 9.2 Hz, 1H)	63.6	9-H	3-C
4', 4''	4.73 (d, J = 9.2 Hz, 2H)	61.5, 61.4	9'-H	3-C
5, 5', 5''	2.27 (m, 3H)	29.9	2-H, 2'-H	
6, 6', 6''	0.95 (d, J = 6.8 Hz, 9H)	18.4		
7, 7', 7''	0.98 (d, J = 6.8 Hz, 9H)	18.7		
8	3.14 (s, 3H)	33.5		3-C, 4-C
8', 8''	3.12 (s, 6H)	32.8		3-C, 4'-C
9	2.27 (m, 1H)	28.1	4-H	
9', 9''	2.06 (m, 2H)	33.9, 34.0	4'-H	
10	0.87 (d, J = 6.4 Hz, 3H)	19.4		
10', 10''	0.90 (d, J = 6.4 Hz, 6H)	16.2		
11	1.06 (d, J = 6.4 Hz, 3H)	20.5		
11', 11''	1.42, 1.05 (m, 2H)	25.4		
12, 12'	0.85 (t, J = 7.2 Hz, 6H)	10.9		

经与文献比较, 化合物 1L-3, 1L-6 和 1L-8 的波谱数据分别与文献[3~5]报道的恩镰孢菌素 B (enniatin B)、恩镰孢菌素 B1 (enniatin B1) 和恩镰孢菌素 A1 (enniatin A1) 的波谱数据一致。

3 讨 论

已发表的 Enniatins 类环肽化合物大多为植物或昆虫致病性真菌、特别是镰刀菌的代谢产物。近年来有报道称,从海洋微生物代谢产物中分离到该类化合物。本研究首次证明,非致病性内生真菌亦可生物合成 Enniatins 类化合物。

通常情况下,内生真菌产生与寄主植物相同或相似的次生代谢产物,如从红豆杉植物中分离到产紫杉醇的内生真菌,从长春花植物中分离到产长春

花新碱的内生真菌等。但也有一些内生真菌可产生与寄主植物不同的活性成分,如从美登木的老叶中分离到产抗癌活性物质——球毛壳甲素 A、而不是美登木素的内生真菌(球毛壳菌)。本研究的初衷是分离到产生杀虫活性物质苦皮藤素的内生真菌,但却分离到产生杀菌活性物质的内生真菌,而且活性物质不是苦皮藤素类似物。这也充分证明了内生真菌不一定产生与寄主植物相同的活性物质,说明内生真菌与寄主植物关系多种多样,自身的生长受其微环境的影响,其次生代谢产物非常丰富。

[参考文献]

- [1] 郭良栋 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148- 152
- [2] 兰 琪, 姬志勤, 顾爱国, 等. 苦皮藤内生真菌中杀虫杀菌活性物质的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(10): 79- 84
- [3] Audhya T K, Russell D W. Production of enniatins by *Fusarium sambulinum*: selection of high-yield conditions from liquid surface culture[J]. Journal of General Microbiology, 1974, 82: 181- 196
- [4] Blackwell B A, Miller J D, Apsin J W, et al. Isolation and characterization of enniatins from *Fusarium avenaceum* DAOM 196490[J]. Canadian Journal of Chemistry, 1992, 70: 5- 10
- [5] Sauriol F, Hynes R C, Xu X J, et al. Novel Quinaplinones and enniatins from *Fusarium laterium* Nees[J]. Canadian Journal of Chemistry, 1993, 71: 9- 16

Identification of fungicidal compounds from endophytic fungi *Fusarium proliferatum* in *Celastrus angulatus*

J I Zh-i-qin¹, W U W en-jun¹, W A N G M ing-an², G U A i-guo¹

(1 Institute of Pesticide Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Science, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract: Three fungicidal compounds, 1L-3, 1L-6 and 1L-8, isolated from endophytic fungi *Fusarium proliferatum* in *Celastrus angulatus*, were determined by the data of IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The results showed that 1L-3, 1L-6 and 1L-8 were enniatin B, enniatin B1 and enniatin A1 respectively.

Key words: *Celastrus angulatus*; endophytic fungi; fungicidal compounds; structure determined