



文章编号: 1000-4025(2002)02-0391-05

耳状网褶菌的化学成分

高锦明^{1,2*}, 张鞍灵¹, 王晨英¹, 刘吉开¹

(1 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨陵 712100; 2 中国科学院昆明植物研究所植物化学开放实验室, 昆明 650204)

摘要: 从野生真菌耳状网褶菌(*Paxillus panuoides* Fr.) 子实体中分得 4 个化合物, 经光谱和化学方法分别鉴定为 (2*S*, 3*S*, 4*R*, 2'*R*)-2-(2'-羟基二十四碳酰氨基) 十八碳-1, 3, 4-三醇 (1), 5*α*, 8*α*-表二氧-(22*E*, 24*R*)-麦角甾-6, 22-二烯-3*β*-醇 [5*α*, 8*α*-epidioxy-(22*E*, 24*R*)-ergosta-6, 22-dien-3*β*-ol, 2], (22*E*, 24*R*)-麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮 [(22*E*, 24*R*)-ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one, 3] 和对羟基苯甲酸乙酯 (ethyl 4-hydroxybenzoate, 4)。其中化合物 4 作为天然产物属首次报道。化合物 1~4 为本科真菌中首次分得。

关键词: 耳状网褶菌; 子实体; 担子菌; 神经酰胺; 麦角甾醇类

中图分类号: Q946.8 **文献标识码:** A

Constituents from the basidiomycetes *Paxillus panuoides*

GAO Jin-ming^{1,2*}, ZHANG An-ling¹, WANG Chen-ying¹, LIU Ji-kai¹

(1 College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Laboratory of Phytochemistry, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: From the fresh fruiting bodies of *Paxillus panuoides* Fr., four known compounds, (2*S*, 3*S*, 4*R*, 2'*R*)-2-(2'-hydroxytetracosanoylamino) octadecane-1, 3, 4-triol (1), 5*α*, 8*α*-epidioxy-(22*E*, 24*R*)-ergosta-6, 22-dien-3*β*-ol (2), (22*E*, 24*R*)-ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (3), ethyl 4-hydroxybenzoate (4) have been isolated and their structures were determined by means of spectral and chemical methods. This is the first report on the isolation of compound 4 as a natural product.

Key words: *Paxillus panuoides*; fruiting bodies; basidiomycetes; ceramide; ergosteroides

收稿日期: 2000-11-29

基金项目: 云南省应用基础研究资助项目 (2000B0066M)

作者简介: 高锦明 (1963-), 副教授, 植物化学专业博士。

* 通讯联系人。Correspondence to: GAO Jin-ming.

耳状网褶菌(*Paxillus panuoides* Fr.)又名耳状桩菇,属担子菌纲(Basidiomycetes)伞菌目网褶菌科(Paxillaceae)网褶菌属真菌,分布于黑龙江、吉林、河北、山西、广东、广西、云南等地,记载有毒^[1]。德国学者 Besl 等曾于 1989 年报道其子实体中含有 Terphenylquinone 型色素:flavomentins 和 spiromentins^[2]。在系统研究云南高等真菌化学成分过程中,我们对其化学成分进行了研究。从其子实体中首次分离鉴定了 4 个化合物,经光谱和化学方法分别鉴定为(2*S*,3*S*,4*R*,2'*R*)-2-(2'-羟基二十四碳酰氨基)十八碳-1,3,4-三醇(1)、5*α*,8*α*-表二氧-(22*E*,24*R*)-麦角甾-6,22-二烯-3 β -醇(2)、(22*E*,24*R*)-麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮(3)和对羟基苯甲酸乙酯(4)。据文献报道^[3~5],化合物 2 体外对 L-1210 细胞株有极强的抗癌活性和抑制 MCF-7 人乳腺癌和 Walker 256 肉瘤细胞株生长,并对人体肝癌 PLC/PRF/5 和 KB 细胞表现抑制活性;能选择性地增强亚油酸对 DNA 聚合酶 β 活性的抑制作用;此外,还具有抗炎、抗补体、免疫抑制和促进血小板凝聚以及抗流感病毒等作用。化合物 4 作为天然产物系首次从自然界获得,现为化妆品和食品广泛应用的防腐剂和抗真菌剂。

1 材料与方法

1.1 材料

耳状网褶菌(*Paxillus panuoides* Fr.)新鲜子实体于 1998 年采于云南哀牢山,标本由昆明植物研究所分类室刘培贵教授鉴定。

薄层层析硅胶和柱层析硅胶均为青岛海洋化工厂产品。

1.2 方法

1.2.1 提取与分离 将新鲜耳状网褶菌子实体用工业酒精浸提一次,残渣干后(50 g)继续用酒精提取 3 次,再用 CHCl₃-MeOH(1:1)提取 3 次,将所有提取液减压浓缩合并,加水悬浮,用 CHCl₃ 萃取后减压浓缩得浸膏 6.1 g,经硅胶柱层析,石油醚-丙酮梯度洗脱,9:1 洗脱部分经石油醚-丙酮重结晶得到无色块状结晶 4(21 mg);9:1 另一洗脱部分经制备薄层层析(氯仿-石油醚-乙酸乙酯,7:3:0.5)得到淡黄色固体 3(4.4 mg);8:2 洗脱部分经制备薄层层析(氯仿-甲醇,30:1)得到无色结晶 2(23 mg);6:4 洗脱部分经石油醚-丙酮反复重结晶得到白色无定形粉末 1(26 mg)。

1.2.2 化合物 1 乙酰化 取化合物 1 7.0 mg,按常规方法用醋酐-吡啶(1:1)室温下乙酰化 24 h 后,得到 8.2 mg 四乙酰化物后进行 MS, ¹H NMR 分析测定。

1.2.3 化合物 1 甲醇-盐酸水解 取化合物 1 15 mg,加 2.2 mL 0.9 mL/L 盐酸-82% 甲醇溶液,于 80℃ 水浴加热回流 16 h 后,反应混合物用正己烷萃取,正己烷层经浓缩,硅胶柱层析分离得到脂肪酸甲酯,进行 GC-MS, ¹H NMR 和 $[\alpha]_D$ 分析测定。

1.2.4 长链碱基乙酰化 正己烷萃取后的甲醇相用饱和 Na₂CO₃ 中和,浓缩至干,然后与醋酐-吡啶(1:1)于 70℃ 反应 1.5 h。反应混合物用少量水稀释,乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯层经无水 Na₂SO₄ 干燥,浓缩,硅胶柱层析(正己烷-乙酸乙酯,9:1~8:2),得到四乙酰化的长链碱基后进行 $[\alpha]_D$, MS 和 ¹H NMR 分析测定。

1.2.5 MP, IR, NMR 和 MS 测定 熔点用四川大学科仪厂生产的 XRC-1 型显微熔点仪测定,未校正。旋光用 JASCO-20 仪测定。IR 谱采用 Bio-Rad FTS 仪测定, KBr 压片。

NMR 谱在 Bruker AM-400 和 Bruker DRX-500 仪上测定;TMS 为内标,MS 在 VG Auto Spec-3000 仪上测定。

2 结果与讨论

耳状网褶菌子实体的酒精和 CHCl_3 -MeOH(1:1) 的 CHCl_3 膏状物,经硅胶柱层析分离得到化合物 1~4。

化合物 1 为白色无定形粉末(石油醚-丙酮),M. P. $140\text{ }^\circ\text{C} \sim 142\text{ }^\circ\text{C}$,遇硫酸铜显黑灰色; $[\alpha]_D^{25} + 9.4$ (c 0.21,吡啶)。用高分辨质谱(HREIMS)确定其分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{85}\text{NO}_5$ ($[M]^-$ 683.6407,计算值 683.6427)。IR 谱显示羟基($3340, 3220\text{ cm}^{-1}$),仲酰胺($1544, 1619\text{ cm}^{-1}$)和长脂肪链($2919, 2850, 723\text{ cm}^{-1}$)吸收带。 ^1H NMR 谱中,出现强质子信号 δ 1.25~1.31 和 2 个末端甲基信号 δ 0.86(t, $J=6.7\text{ Hz}, 6\text{H}$),推测有 2 个脂肪烷基链;信号 δ 8.57(1H, d, $J=8.8\text{ Hz}, \text{NH}$)和 175.4(CONH, C-1'), δ 5.12(1H, m, H-2)和 δ 53.1(CHNH, C-2)及连氧碳信号 δ 62.1, 76.9, 73.1, 72.6 显示有酰胺键和多羟基存在。以上数据表明该化合物为神经酰胺类化合物^[7]。为了确定羟基数目,采用乙酰化法。化合物 1 经醋酐-吡啶乙酰化后生成相应的四乙酰化产物,其 EIMS 显示碎片离子峰 m/z 851 $[M]^+$ 和 611 $[M-4 \times \text{HOAc}]^+$ 和 ^1H NMR 谱分别给出 4 个酯甲基质子信号 δ 2.18, 2.09, 2.06 和 2.03,说明 1 含有 4 个羟基。用 0.9 mol/L 盐酸(82% 甲醇水溶液)水解 1,生成脂肪酸甲酯和长链碱基。该脂肪酸甲酯经 GC-MS 分析鉴定为 2'-羟基二十四碳酸甲酯,其 ^1H NMR 谱和比旋光度($[\alpha]_D^{25} - 4.5^\circ$)与文献值一致^[8],因此, C-2' 位绝对构型为 R。此外,长链碱基,即 C_{18} 植物鞘氨醇有 3 个羟基和 1 个氨基,经醋酐-吡啶于 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 反应到四乙酰基植物鞘氨醇,即 2-乙酰氨基-1,3,4,-三乙酰氧十八烷,其 ^1H NMR 谱和比旋光度($[\alpha]_D^{25} + 10.9^\circ$)和文献^[8]数据一致。C-1, C-3, C-4 和 C-2' 相对立体化学应为 2S, 3S, 4R, 2'R, 因为 H-1, H-2, H-3, H-4 和 H-2' 的化学位移和偶合常数均与合成的化合物(2S, 3S, 4R, 2'R)-2-(2'-羟基二十四碳酰氨基)十六碳烷-1,3,4-三醇的相应数据吻合^[9]。此外,它们均具有正的比旋光值 $[\alpha]_D$ 分别为: $+9.4^\circ$ 和 $+9.1^\circ$ ^[9]。因此,化合物 1 的结构确证为 (2S, 3S, 4R, 2'R)-2-(2'-羟基二十四碳酰氨基)十八碳-1,3,4-三醇,其结构进一步由二维 NMR 技术(^1H - ^1H COSY, HMBC 和 HMQC)(见表 1)证实。

化合物 2 为无色针晶(乙酸乙酯),M. P. $182\text{ }^\circ\text{C} \sim 184\text{ }^\circ\text{C}$;硫酸-香草醛反应显墨绿色。IR 谱显示羟基($3525, 3309\text{ cm}^{-1}$)和双键(1653 cm^{-1})吸收带。 ^{13}C NMR (DEPT)(100 MHz, CDCl_3)谱给出 28 个碳信号,分别为 6 个甲基,7 个亚甲基,11 个次甲基(包括 4 个双键碳 δ 135.4, 130.8, 135.2, 132.4 和 1 个接氧碳 66.5),4 个季碳(含有 2 个接氧碳 δ 82.1, 79.4),结合 EIMS 给出的分子量 428,分子式应为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ 。EI-MS 特征碎片峰 m/z : 410 $[M-\text{H}_2\text{O}]^+$, 396 $[M-\text{O}_2]^-$ (基峰), 303 $[M-\text{C}_9\text{H}_{17}]^+$, 251 $[M-\text{H}_2\text{O}-\text{O}_2-\text{C}_9\text{H}_{17}-\text{H}_2]^+$, 示有 1 个羟基,1 个过氧桥和 1 个单烯侧链 C_9H_{17} ,表明 1 属麦角甾醇过氧化物^[3]。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)谱在 δ 5.11($J=8.0, 15.3\text{ Hz}$)和 δ 5.19($J=7.5, 15.1\text{ Hz}$)处的两组双二重峰及 IR 中 $985, 970\text{ cm}^{-1}$ 中强峰,说明 C-22 立体构型为 E 式;C-28 甲基的 δ 17.6 ± 0.1 是诊断不饱和侧链甾醇 24R 构型的特征值,且甾醇 ABC 环系的结构改变对其侧链碳化学位移几乎不产生影响^[10],其 C-28 的化学位移(δ 17.6)正在此特征范围内,则 24 立

体构型应为 R。通过上述特征分析和与文献^[3]比较,1 的结构推定为 5 α ,8 α -表二氧-(22E,24R)-麦角甾-6,22-二烯-3 β -醇。

表 1 化合物(1)的¹H 和¹³C NMR 谱数据(C₅D₅N)^a

Table 1 ¹H and ¹³C NMR spectral data for compound (1) in pyridine-*d*₅

Atom No.	¹³ C	¹ H(J in Hz) (J in Hz)	¹ H- ¹ H COSY selected	HMQC selected	HMBC selected
1	62.14(t)	4.52(dd,10.6,4.5) 4.43(dd,10.6,5.2)	H-2	H-1	H-2,3
2	53.10(d)	5.12(m)	NH/H ₂ -1/H-3	H-2	H-1',1,3
3	76.89(d)	4.35(dd,6.5-4.0)	H-2/H-4	H-3	H-1,2,4,5
4	73.12(d)	4.28(m)	H-3/H-5	H-4	H-2,3,5,6
5	34.23(t)	1.93(m)		H-5	H-3,4,6
6	26.66(t)	1.70(m)			
7-17	29.63~32.16(t)	1.25~1.41			
18	14.28(q)	0.86(t,6,7)		H-18	
1'	175.37(s)				
2'	72.56(d)	4.62(dd,7.6,4.0)	H-3'	H-2'	H-1',3',4'
3'	35.75(t)	2.24,2.04(m)	H-2'/H-4'	H-3'	H-2',4'
4'	25.86(t)	1.76(m)	H-3'	H-4'	H-2',3'
5'-23'	29.63~32.16(t)	1.25~1.41			
24'	14.28(q)	0.86(t,6,7)		H-24'	
NH		8.57(d,8.8)	H-2		H-1'

注: * ¹H 和¹³C NMR 谱分别在 500 MHz 和 100 MHz 测定。

Note: ¹H and ¹³C NMR spectral analysed at 500 MHz and 100 MHz.

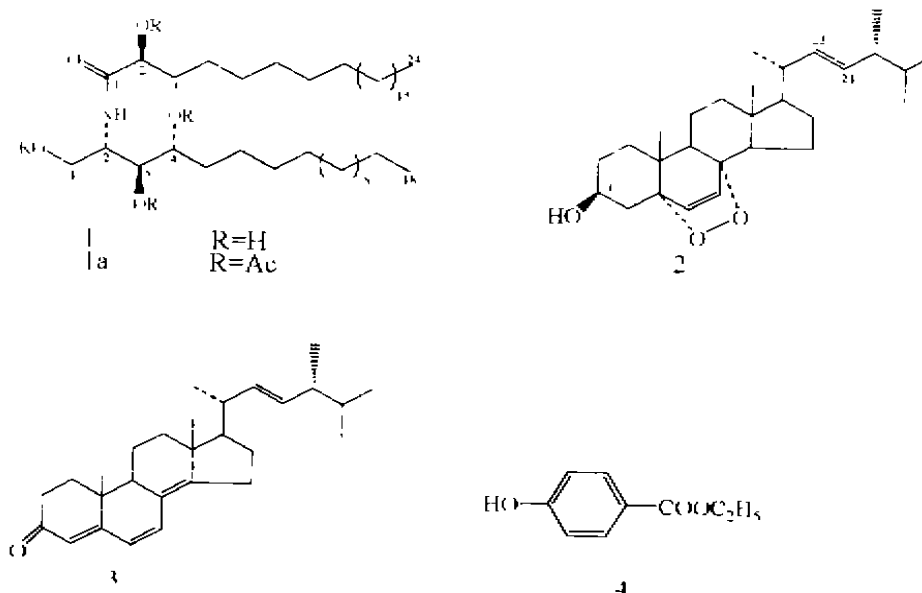


图 1 化合物 1-4 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-4

化合物 3 为淡黄色固体(石油醚),M. P. 113°C~115°C;在 UV(365 nm)紫外灯下显蓝绿色荧光斑点,硫酸-香草醛反应显黄棕色。IR 谱示有羰基(1 675 cm⁻¹)和双键(1 590 cm⁻¹)。 ¹³C NMR(DEPT)(100 MHz,CDCl₃)谱显示 28 个碳信号,分子中含有 10

个次甲基(包括 5 个烯碳 δ 122.9(C-4)、124.4(C-6)、133.9(C-7)、135.2(C-22)、132.4(C-23), 6 个亚甲基, 6 个甲基, 6 个季碳[其中含有 1 个酮羰基和 2 个烯碳即 124.4(C-8)和 164.3(C-5)], 结合 EI-MS 给出的分子离子峰 m/z 392。因此, 分子式为 $C_{28}H_{40}O$ 。EI-MS 显示强特征碎片峰 m/z 268 $[M-C_9H_{17}+1]^+$, 示有 1 个单烯侧链 C_9H_{17} 。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 谱在 δ 5.14~5.26 范围显示 2 个烯质子的多重峰(H-22, H-23), 又在较低场处观察到 2 个烯质子信号[δ 6.00(d, $J=9.5$ Hz, H-6)和 6.57(d, $J=9.5$ Hz, H-7)]; 另外, 在 δ 5.70(H-4)处显示单峰, 同时, 在 δ 3.6 附近未出现 C_7 -HOH 的特征多重峰。 ^{13}C NMR 谱大约在 δ 70.4(C_7 -OH)处未发现次甲基共振信号, 而存有酮羰基(δ 199.2, C-3)信号, 提示 C-3 羰基与双键相连。进一步综合 1H 和 ^{13}C NMR 数据分析, 与文献^[11,12]比较, 此化合物结构被确定为(22*E*, 24*R*)-麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮。

化合物 4 为无色块状结晶(石油醚-丙酮), M. P. 116°C~118°C; EIMS 出现分子离子峰 m/z 166, 结合 ^{13}C NMR (DEPT) 谱确定其分子式为 $C_9H_{10}O_2$, 不饱和度为 5, 提示该化合物可能含有苯环。 ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 在芳香区示有 160.3(s, C-4), 131.9(d, C-3, C-5), 122.8(s, C-1), 115.3(d, C-2, C-6) 3 个吸收峰。其余 3 个峰分别为 1 个酯羰基 δ 166.9, 1 个亚甲基 δ 60.9 和 1 个甲基 δ 14.3。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 表示该化合物属 1, 4-二取代的苯环化合物, 即具 AA'BB' 自旋体系[δ : 6.86(2H, dd, $J=8.6, 2.7$ Hz), 7.93(2H, dd, $J=8.7, 2.7$ Hz)]。此外, 出现 1 个乙基质子信号[4.33(2H, q, $J=7.1$ Hz), 1.36(3H, t, $J=7.1$ Hz)]。根据这些数据推定该化合物应为对羟基苯甲酸乙酯。

参考文献:

- [1] 卯晓岚. 中国经济真菌[M]. 北京, 科学出版社, 1998: 294.
- [2] BESL H, BRESINSKY A, GEIGENMULLER G, *et al.* Flavomentine und spiromentine. neue terphenylchinon-derivate aus *Paxillus atrotomentosus* und *P. panuoides*[J]. *Liebigs Ann. Chem.*, 1998, 8: 803-810.
- [3] 高锦明, 董泽军, 刘吉开. 蓝黄红菇的化学成分[J]. 云南植物研究, 2000, 22(1): 85-89.
- [4] CASTEEL D A. Peroxy natural products[J]. *Nat. Prod. Rep.*, 1999, 16: 55-73.
- [5] YASUKAWA K, AOKI T, TAKIDO M, *et al.* Inhibitory effects of ergosterol isolated from the edible mushroom *Hypsizygus marmoratus* on TPA-induced inflammatory ear oedema and tumor promotion in mice[J]. *Phytother. Res.*, 1994, 8: 10-13.
- [6] FUJIMOTO H, NAKAYAMA M, NAKAYAMA Y, *et al.* Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*[J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 1994, 42(3): 694-698.
- [7] INAGAKI M, ISOBE R, KAWANO Y, *et al.* Isolation and structure of three new ceramides from the starfish *Acanthaster planci*[J]. *Eur. J. Org. Chem.*, 1998: 129-131.
- [8] NATOPRI T, MORITA M, AKIMOTO K, *et al.* Agelasphins, novel antitumor and immunostimulatory cerebro-sides from the marine sponge *Agelus mauritanus*[J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(9): 2771-2784.
- [9] SUGIYAMA S, HONDA M, HIGUCHI R, *et al.* Stereochemistry of the four diastereomers of ceramide and ceramide lactoside[J]. *Liebigs Ann. Chem.*, 1991: 349-356.
- [10] WRIGHT J L C, MCINNES A G, SHIMIZU S, *et al.* Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ^{13}C NMR spectroscopy[J]. *Can. J. Chem.*, 1978, 56: 1898-1903.
- [11] KOBAYASHI M, KRISHNA M M, ISHIDA K, *et al.* Marine sterols. X X I. Occurrence of 3-oxo-4, 6, 8(14)-trunsaturated sterols in the sponge *Dysidea herbacea*[J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 1993, 40: 72-74.
- [12] GONZALEZ A G, BARRERA J B, TOLEDO MARANTE F J. The sterols and fatty acids of the basidiomycete *Scleroderma polyrhizum*[J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(4): 1049-1050.