竹红菌中乙素及脂肪酸的分离鉴定

张曼华 陈 申 安静仪 蒋丽金*

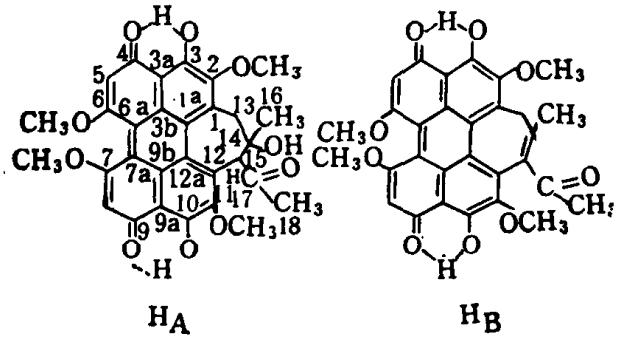
（中国科学院感光化学研究所，北京）

从竹红菌的丙酮抽提液中，用薄层层析、气相色谱，气-质联用等手段，分离、鉴定了竹红菌中含有的各种脂肪酸，和脂肪酸甘油酯，其中以十八碳烯酸和十六碳酸含量较多.

竹红菌是盛产于我国云南省的一种寄生真菌. 云南省微生物所和省第一人民医院首先将其配合可见光治疗妇女外阴白色病变和疤痕疙瘩取得了显著的疗效[1]. 1980 年云南省微生物所万象义等从竹红菌中分离得到含量最多的光敏色素，并鉴定了其结构[2](图 1)，但未对其他组分进行鉴定.

一、竹红菌乙素的分离和鉴定

竹红菌的乙醇抽提液，经重结晶后得到红色晶体(粗品)，用 1% 柠檬酸调制的硅胶薄层板. 以石油醚：乙酸乙酯：乙醇(4:2:1)为溶剂系统分离得 R_f 值为 0.63 和 0.68 二个色带，R_f 为 0.63 的色带经洗脱精制后得乙素 (HB) (图 1)，测得其光谱数据如下：



H_A H_B

图 1

质谱 (m/e)：528 (M^+，分子离子峰)，497(M^+—OCH_3) 485 (M^+—$COCH_3$)、43(C—$COCH_3$、基峰).

红外光谱 (KBr 压片) cm^{-1}:3500(OH)，1680(C ═ O)，1590—1575(C ═ C).

可见光谱：$\lambda_{max}^{CHCl_3}$，461nm，535nm (肩)，584 (低肩).

核磁共振：如表 1 所示.

比较 HA 和 HB 的质谱，HB 的分子离子峰为 528，正好较 HA 的分子离子峰 546 少 18，这说明 HB 比 HA 少了一个水分子. HA 分子中碳 14 位上的羟基是叔羟基，比较容易脱水. 设想 HA 与 HB 之间的差别就在七员脂环上. HA 中碳 14 位羟基和 15 位上氢被消去形成了双键，

本文 1986 年 8 月 25 日收到. 1987 年 11 月 17 日收到修改稿.

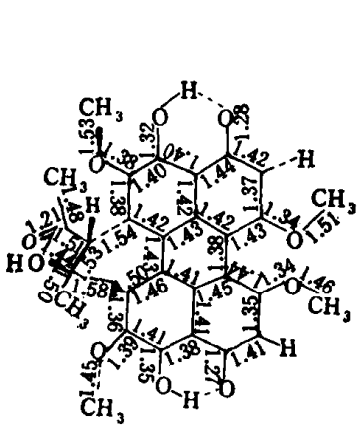
表1 H_A 与 H_B 的 ^{13}C 和 ^1H 核磁共振数据

位置	HA		HB	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	133.1		134.1	
1a	128.4		124.1	
2	150.8		146.7	
3	180.2		186.0	
3a	106.7		108.8	
3b	167.4		163.4	
4	179.8		186.0	
5	101.9	6.52	103.1	6.42
6	171.7		168.3	
6a	124.9		123.2	
7	171.7		168.0	
7a	124.9		123.2	
9b	167.4		164.8	
8	102.0	6.56	103.1	6.44
9	180.2		185.9	
9a	106.7		108.5	
10	179.8		186.0	
11	150.6		149.5	
12	133.9		134.4	
12a	127.5		124.1	
13	41.8	3.53(HA) 2.64(HB) $J_{AB}=12$	34.7	4.04(HA) 2.94(HB) $J_{AB}=11$
14	78.7		144.8	
15	61.4	3.74s	134.3	
16	26.9	1.71s	20.7	1.84
17	207.3		200.1	
18	30.1	1.90s	29.7	2.38
2-OCH_3	62.0	4.12s	61.3	4.15
6-OCH_3	56.5	4.07s	56.4	4.05
7-OCH_3	56.4	4.07s	56.3	4.05
11-OCH_3	60.7	4.08s	61.1	4.09

HA 与 HB的数据均为作者在同一仪器上所测定.

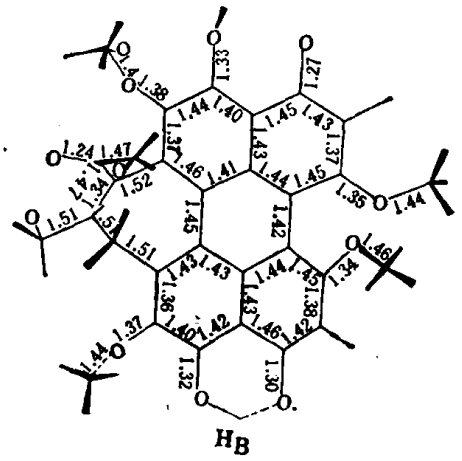
并与碳 17 上的羰基共轭形成了 HB 分子(图 1). 因此在 HB 中的羰基的红外吸收出现在 1680 cm^{-1}, 较 HA 中的 1720cm^{-1} 移向长波方向. 比较 HB 与 HA 的 ^1H NMR 谱、在烷基氢区, HB 比 HA 少了一个峰,说明碳 15 位上的氢消失了. 碳 16 位和碳 18 位上的氢以及碳 13 位上的二个互成 AB 系统的氢也都较 HA 中的相应氢移向低场,这些都是由于碳 14 和碳 15 间形成了双键而引起的. 碳 13 位上的二个互成 AB 系统的氢,其中氢 A 的峰与分子中甲氧基的峰重叠. 当以氢 A 峰的 4.04ppm 作去偶时, δ 为 2.94 处的双峰变为单峰,这说明了碳 13 位的确存在二个互成 AB 系统的氢. HB 中苊醌环上的羟基仍出现在 16ppm 处, 用重水交换,除 16ppm 处的峰消失外,其它各峰均未发生变化,说明分子中没有其它羟基,这也符合我们设想中的 HB 分子.比较 HB 与 HA 的 ^{13}C NMR 谱最明显的是,由于碳 14 与碳 15 间形成了双键,其化学位移从 HA 中的 78.7 和 61.4ppm 移向低场,在 HB 中分别为 144.8 和 134.3ppm, 这二个氢都进

入了烯碳区域. 碳 13 的 δ 值也因碳 14 位上羟基消失而从 41.8 移向 34.7ppm，碳 16 从 26.9 移向 20.7ppm，从上述这些光谱数据的比较已初步说明我们提出的 HB 分子是合理的，由生物物理所梁丽[3]等人从氯仿溶液中培养 HB 的单晶，并作了X光衍射测定，如图 2 所示，再次证明了我们提出的 HB 结构是正确的.



H_A

(a) $P2.2.2$
$a = 13.245(2)$Å; $b = 17.064(9)$Å;
$c = 23.971(4)$Å; $d_c = 1.41 gcm^{-3}$



H_B

(b) $P21/C$
$a = 10.234(5)$Å; $b = 15.607(5)$Å; $c = 15.447(5)$Å;
$\beta = 100.05°(3)$; $d_c = 1.445 gcm^{-3}$

图 2　HA (a 代表竹红菌甲素)与 HB (b 代表竹红菌乙素)简单比较

R_f 为 0.68 的色带，经光谱初步鉴定为含有 HA 的混合物 (HA 的 R_f 也为 0.68)，在 ^1H NMR 谱中包括 HA 的所有化学位移值. 同时也混杂一些其它峰值. 可以断定它的结构具有 HA 的母核但侧链又不完全相同. 因量少未能提纯，无法确定其结构.

将 HA 在 5*N* 硫酸的乙醇溶液中回流，同样可以得到 R_f 为 0.63 和 0.68 二个色带，经 ^1H NMR 和 IR 光谱鉴定 0.63 的带即为 HB，而 R_f 为 0.68 的色带由于含量小只得少量纯的样品，作了 ^1H NMR 测定，除了芳氢区峰值为 6.50ppm 与 HB 中的 6.42ppm 稍有区别外，其它峰值都一样，估计是 HB 的异构体，但由于分离提纯困难，未能作全面的光谱鉴定.

HA 在酸中加热能转化为 HB，HB 较 HA 稳定，它不能再转化为 HA，HB 的颜色较深，在氯仿、丙酮等有机溶剂中溶解度也较差. HA 在酸性介质中能转化为 HB 也进一步说明了我们推测的 HB 是合理的.

HB 也能通过自敏光氧化反应转化为 HBO_2，用钠灯照射 HB 的氯仿溶液，经薄层层析纯化后测得光谱数据如下：

质谱：(m/e) 560 (M^+ 分子离子峰)，517 (M^+—$COCH_3$).

红外光谱：(KBr 压片) cm^{-1} 3500(OH) 1670(C = O) 1620，1600 (芳烃).

^1H NMR：如表 2 所示.

从质谱分子离子峰确认 HB 自敏光氧化反应的产物为 HBO_2，它的红外光谱中羰基吸收也比相应的 HAO_2 的 1690cm^{-1} 向长波方向移动. ^1H NMR 图中也未找到碳 15 位上的氢，由于分子中增加了氧分子. 碳 2，11，6，7 上的甲氧基和碳 5，8 位上的芳烃氢的化学位移都相应地有了改变，这与 HA 氧化生成 HAO_2 后发生的变化相似，由于还未得到足够量的 HBO_2 其 C^{13} NMR 和X光衍射谱都未能测得，其结构还不能最后确定.

表 2　HAO_2 与 HBO_2 的 ^{1}HNMR 数据

位　置	HAO_2	HBO_2
5	6.05s	6.00s
8	6.06s	6.03s
13	3.17(HA)	2.69(HA)
	1.96(HB)	3.66(HB)
	$J_{AB}=12.5$	$J_{AB}=12$
15	3.05s	
16	1.33s	2.02s
18	2.11s	2.20s
2-OCH_3	4.10s*	4.16s
6-OCH_3	3.81s*	3.81s
7-OCH_3	3.81s*	3.81s
11-OCH_3	3.92s*	3.96s

注：HAO_2 的数据引自参考文献[2]，但有*处与文献报道次序略有调整.

二、竹红菌中脂肪酸和脂肪酸甘油酯的分离和鉴定

将竹红菌的石油醚抽提液通过旋转薄层层析粗分离，在紫外灯下能检出二个主要的荧光带，红色色素留在圆心，将此二带，经薄层层析再次纯化(二次层析展开剂均为石油醚：乙酸乙酯：冰醋酸 = 10:1:0.5) 得 R_f 为 0.50 和 R_f 为 0.66 二个主要组份 F_1(R_f = 0.50) 和 F_2(R_f = 0.66).

根据 F_1 质谱分子离子峰为 282，以及红外光谱和 ^{1}H NMR 谱与已知标准图谱对照，断定 F_1 为十八碳烯酸，F_1 的 ^{13}C NMR 谱 δppm($CDCl_3$)：179.11，128.76，128.44，126.89，126.71，32.89 ～ 128.9 有十一条峰. 文献[5]报道了双键在不同位置的十八碳烯酸中烯碳的化学位移，F_1 与 6Δ-十八碳烯酸的数据最为接近，但其红外光谱与 6Δ-十八碳烯酸的标准红外光谱还有微小差异[6]故 F_1 中的双键位置还不能确定.

将 F_1 甲酯化后测其质谱与红外光谱，^{1}H NMR 谱，并与标准谱对照，更确证 F_1 为十八碳烯酸.

将旋转薄层仪中粗分离所得第一荧光带粗品经质谱鉴定，可见除十八碳烯酸外，还有其它脂肪酸的峰，故将此粗品直接甲酯化后，用气相色谱-质谱联用鉴定，结果为表 3 所示.

表 3　竹红菌中脂肪酸鉴定(气-质联用仪)

组份	保留时间	含量	M^+(甲酯分子离子)	脂 肪 酸
1	11.79sec	35%	270	十六碳酸
2	13.27sec	0.3%	284	十七碳酸
3	14.75sec	52.6%	296	十八碳烯酸
4	16.22sec	6.4%	264	十八碳烯醛

各种脂肪酸中以十六碳酸和十八碳烯酸含量最多，但各脂肪酸相对含量往往随菌种的产地、季节而变化.

将旋转薄层层析所得另一深蓝色荧光带，经薄层层析再次纯化，主要得 R_f 为 0.66 的 F_2，其质谱分子离子峰为 832. 测得 ^{1}H NMR 和 IR 光谱参考饱和脂肪酸甘油酯的 IR，^{1}H

NMR 谱. 初步断定为三脂肪酸的甘油酯. 其质谱 (EI)m/e 数据如下: 832 (M^+/e) 576, 551, 313, 264, 262, 239, 57. 根据 MS 中主要碎片, 以及气质联用得出 HA 中主要含有 16 碳和 18 碳烯酸的结果, 推测 F_2 是由二个含有 16 碳酸和一个 18 碳烯酸组成的三脂肪酸甘油酯.

三、实　验

1. 光谱测定　红外光谱 Perkin Elmer 577 型, 紫外可见光谱 Opton DMR-22. 核磁共振: Varian XL-200 型, $CDCl_3$ 中测定. 质谱、气质联用 Finnigan 4021GC/MS 仪. 气相色谱: Shimadzu GC-7A.

2. 化学试剂　HB, HA 混合粗品(由云南省微生物所提供)

硅胶 GF-254 (青岛海洋化工厂).

其它试剂均为 AR 级试剂.

3. 薄层层析　旋转层析仪 (北京青云仪器厂出品) 用的薄层是以硅胶 GF-254 加蒸馏水调制而成.

分离 HA 和 HB 用的薄层是以硅胶 GF-254 用 1% 柠檬酸调制而成, 分离脂肪酸用的薄层是 GF-254 加蒸馏水调制而成.

4. HA → HB 转化　将 HA 精品溶于 5N H_2SO_4 乙醇溶液中, 迴流 4h, 冷却用水稀释. 用 NaOH 溶液中和至中性. 将沉淀过滤, 即得 HB 粗品, 待层析纯化.

5. 脂肪酸的甲酯化(三氟化硼法)　将 200mg 粗品, 溶于 5ml 乙醚中加入 6ml 三氟化硼甲醇溶液 (5.8ml 甲醇 + 0.2ml 35% BF_3—乙醚溶液) 水浴温度 60—64℃, 迴流 10min, 停止加热. 保持温度 25℃, 放置 1h, 加入饱和食盐水 5ml, 以乙醚抽取 3 次, 减压除去溶剂即得酯化粗品, 直接用作气体色谱和气-质联用分析.

致谢: 气-质联用分析由本所康致泉同志测定. 江西南昌市药品检验所刘云清同志提出宝贵意见. 特此致谢.

参　考　文　献

[1] 梁睿媛等, 中华皮肤科杂志, **15**(1982), 2: 88.
[2] Chen Wei-shin et al., *Liebigs Ann. Chem.*, 1981, 1880.
[3] 梁丽等, 科学通报, **32**(1987), 1: 56—59.
[4] 张曼华、安静仪等, 科学通报, **29**(1984), 18: 1117.
[5] Gunstone, F. D., Ismail, I. A., *Chem. Phys. Lipids*, 1(1967), 4: 337.
[6] The Sadtler Standard Spectra, *Prism Standard Infrared Spectra* 23598, Phila., Pa., C, 1962.