

文章编号:1001-6880(2014)9-1389-05

苦竹内生真菌 *Phomopsis* sp. KY-12 化学成份及其海虾致死活性研究

郭 芳¹, 杨胜祥^{1,2*}, 刘 力^{1,2*}, 王 勇²¹亚热带森林培育国家重点实验室; ²浙江省生物质化学利用重点实验室,临安 311300

摘要:利用柱色谱技术从苦竹内生真菌中分离得到13个化合物,包括九个杜松烷型倍半萜、一个azaphilone类化合物和三个甾体类化合物,经波谱鉴定为3,12-dihydroxycalamenene(**1**),3,9,12-trihydroxycalamenene(**2**),indicumolide C(**3**),agripilol C(**4**),2,15-tihydroxycalamenene(**5**),dysodensiol D(**6**),bombamalones D(**7**),8-formyl-7-hydroxyl-5-isopropyl-2-methoxy-1,4-naphthoquinone(**8**),strobilol A(**9**),Pyrenocine J(**10**), $3\beta,5\alpha$ -Dihydroxy- 6β -methoxyergosta-7,22-dien(**11**),麦角甾醇(**12**)和麦角甾醇过氧化物(**13**)。其中,化合物**3-9**为首次从该属真菌中分离得到。化合物**1~8**显示中等程度的细胞毒活性,化合物**9**显示显著的细胞毒活性。

关键词:内生真菌;杜松烷型倍半萜;苦竹;细胞毒活性;*Phomopsis* sp.

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Chemical Constituents and Their Toxic Activity from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. KY-12, Isolated from *Pleioblastus amarus*

GUO Fang¹, YANG Sheng-xiang^{1,2*}, LIU Li^{1,2*}, WANG Yong²¹The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture; ²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Chemical Utilization of Forestry Biomass, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, China

Abstract: To study the chemical constituents and their toxic activity from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. KY-12, isolated from *Pleioblastus amarus*. The compounds were isolated and purified by means of chromatographic techniques and their structures were identified on the basis of spectral features. Cytotoxic activity was performed by the brine shrimp (*Artemiasalina*) larvae bioassay. 13 known compounds including 9 Cadinanesesquiterpenoids, **1** azaphilone and **3** sterols, named 3,12-dihydroxycalamenene (**1**), 3,9,12-trihydroxycalamenene (**2**), indicumolide C (**3**), agripilol C (**4**), 2,15-tihydroxycalamenene (**5**), dysodensiol D (**6**), bombamalones D (**7**), 8-formyl-7-hydroxyl-5-isopropyl-2-methoxy-1,4-naphthoquinone (**8**), strobilol A (**9**), Pyrenocine J (**10**), $3\beta,5\alpha$ -Dihydroxy- 6β -methoxyergosta-7,22-dien (**11**), ergosterol (**12**), and ergosterol peroxide (**13**), were isolated from the organic extract of fermentation broths of the endophytic fungus, *Phomopsis* sp. KY-12. Compounds **3-9** were first isolated from the *Phomopsis* genus. Compounds **1-8** showed moderate active against the brine shrimp larvae, compound **9** indicated significant growth inhibitory activity against the brine shrimp (*Artemias alina*) larvae.

Key words: Endophytic fungus; *Phomopsis* sp. KY-12; Cadinane sesquiterpenoids; toxic activity; *Pleioblastus amarus*

植物内生菌是指在整个生活史或是生活史的某一阶段能够定殖入宿主植物健康细胞之间或者细胞内,却不对其宿主产生明显的疾病症状的微生物(包括细菌和真菌^[1,2])。内生菌入侵植物组织通常是为了获取营养和得到宿主的保护,它们也会为宿

收稿日期:2013-09-30 接受日期:2013-12-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31200262;31270619);浙江省重中之重林学一级学科开放基金项目(KF201302);浙江农林大学人才基金项目(2012FR041)

* 通讯作者 Tel:86-571-63732775; E-mail: shengxiangyang2000@163.com; Liuli582003@163.com

主产生重要的具有生物活性的次生代谢产物来提高宿主植物的适应性。因此,内生菌成为了发现新的活性化合物和先导化合物的重要来源^[1,2]。苦竹(*Pleioblastus amarus* Keng f.)是一种野生竹种,属禾本科苦竹属,在我国南方省区都有分布,具有清热除烦、除湿、利水的功效,主治热病烦渴、湿热黄疸、小便不利、脚气。目前,关于苦竹内生真菌的相关研究尚未见报道。本实验,对苦竹内生真菌 *Phomopsis* sp. KY-12 的化学成分及其生物活性进行了研究,从该菌的发酵产物中分离得到13个化合物,包括9个杜

松烷型倍半萜、一个 azaphilone 和三个甾体类化合物。分别鉴定为 3,12-dihydroxycalamenene (**1**) , 3,9,12-trihydroxycalamenene (**2**) , indicumolide C (**3**) , agripilol C (**4**) , 2,15-tihydroxycalamenene (**5**) , dysodensiol D (**6**) , bombamalones D (**7**) , 8-formyl-7-hydroxyl-5-isopropyl-2-methoxy-1,4-naphthoquinone (**8**) , strobilol A (**9**) , Pyrenocine J (**10**) , $3\beta,5\alpha$ -Dihydroxy- 6β -methoxyergosta-7,22-dien (**11**) , 麦角甾醇 (**12**) 和麦角甾醇过氧化物(**13**)。其中化合物 **3~9** 为首次从该属真菌中分离得到, 化合物 **1~8** 显示中等程度的细胞毒活性, 化合物 **9** 显示显著的细胞毒活性。

1 仪器与材料

熔点仪为 XRC-1 型显微熔点仪, 温度计未校正, 四川大学科仪厂出品。NMR 用 Bruker AM-400 和 Bruker DRX-500 型核磁共振仪测定 (500 MHz, TMS 为内标); 质谱用 VG AUTO spec-3000 质谱仪上测定; 制备 HPLC 用 ODS-2 MAG 柱。柱色谱用硅胶(300~400 目)和薄层色谱用硅胶 G 均由青岛海洋化工厂生产。反相用材料 RP-18 为 Merck 公司产品。大孔吸附树脂为天津化工厂生产的 D101 聚苯乙烯型大孔吸附树脂。显色为 254 nm、365 nm 荧光, 10% 硫酸乙醇溶液加热显色。其余试剂均为分析纯。

本实验所用的苦竹内生真菌由浙江农林大天然产物化学研究室提供(编号为 KY-12), 是从苦竹 (*Pleioblastus amarus*) 的新鲜枝和叶中分离得到的, 形态鉴定法确定该菌种为拟茎点霉属 (*Phomopsis* sp.)。

2 液体发酵

发酵培养基(氯化钙 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.1 g, 氯化钾 0.05 g, 硫酸镁 0.1 g, 葡萄糖 20.0 g, 蛋白胨 15.0 g, 1000 mL 水, PH6.0)。在 1000 mL 的三角瓶中加入 200 mL 液体培养基, 灭菌。无菌条件下取 8~10 mm² 大小的菌苔 2~3 块接入液体培养基中, 先在 28 °C 的摇床上静置培养 1 d, 然后 120 rpm 旋转震荡培养 6 d, 共发酵 20 L, 经过滤后分别获得菌丝体和发酵液。

3 提取分离

将发酵产物过滤后分别得到发酵液和菌丝体, 滤液用乙酸乙酯萃取, 发酵液用乙酸乙酯超声萃取,

经过 TLC 对照, 二者成分基本相同, 故将它们合并起来。合并后的提取物, 加水悬浮后, 用环己烷脱脂后再用乙酸乙酯萃取得到浸膏 7.8 g。乙酸乙酯部分硅粗胶拌样后进行硅胶层析, 氯仿: 甲醇(10:0→0:10) 梯度洗脱, 通过薄层层析检测合并相同的部分, 得到 5 个组分(Fr. 1-Fr. 5)。所得组分经过反复的硅胶柱层析、RP-18、制备 HPLC、Sephadex LH-20 进行分离纯化。其中化合物 **10,11,12** 和 **13** 从 Fr. 1 得到, 化合物 **3,4,7** 和 **6** 从 Fr. 2 得到, 化合物 **1,2,8,9** 和 **5** 从 Fr. 3 得到。

4 结构鉴定

化合物 1 白色粉末(氯仿)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.98 (s, H-5), 6.61 (s, H-2), 3.73 (dd, *J* = 10.5, 6.5 Hz, H-12β), 3.61 (dd, *J* = 10.5, 6.5 Hz, H-12α), 2.83 (m, H-10), 2.26 (m, H-11), 2.22 (s, H₃-15), 1.27 (d, *J* = 7.0 Hz, H₃-14), 0.81 (d, *J* = 7.0 Hz, H₃-13); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 151.6 (C-3), 142.2 (C-1), 130.5 (C-5), 125.9 (C-6), 121.0 (C-4), 114.7 (C-2), 66.8 (C-12), 39.4 (C-11), 38.0 (C-7), 32.5 (C-10), 28.6 (C-9), 23.2 (C-14), 20.0 (C-8), 15.5 (C-15), 12.6 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[3], 故鉴定化合物 **1** 为 3,12-dihydroxycalamenene。

化合物 2 白色粉末(氯仿)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.88 (s, H-5), 6.42 (s, H-2), 3.76 (m, H-9), 3.36 (dd, *J* = 10.5, 6.5 Hz, H-12β), 3.31 (dd, *J* = 10.5, 6.5 Hz, H-12α), 2.71 (m, H-11), 2.30 (m, H-10), 2.05 (s, H₃-15), 1.05 (d, *J* = 7.0 Hz, H₃-14), 0.52 (d, *J* = 7.0 Hz, H₃-13); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 152.9 (C-3), 141.2 (C-1), 121.8 (C-4), 128.2 (C-5), 127.4 (C-6), 114.7 (C-2), 67.9 (C-9), 64.2 (C-12), 40.0 (C-10), 38.4 (C-11), 36.7 (C-7), 24.6 (C-8), 16.8 (C-14), 15.9 (C-15), 10.9 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[3], 故鉴定化合物 **2** 为 3,9,12-trihydroxycalamenene。

化合物 3 白色粉末(氯仿)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.56 (s, H-5), 3.75 (m, H-3), 2.73 (m, H-11), 1.69 (m, H-6), 1.66 (s, H₃-15), 1.40 (m, H-1), 1.21 (m, H-7), 1.02 (d, *J* = 7.0 Hz, H₃-13), 0.89 (s, H₃-14); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 176.3 (C-12), 135.7 (C-4), 125.2 (C-5), 69.7

(C-9), 66.1 (C-3), 44.6 (C-7), 43.0 (C-1), 41.8 (C-9), 40.0 (C-6), 38.7 (C-11), 31.5 (C-2), 25.3 (C-8), 21.3 (C-15), 20.7 (C-14), 14.3 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物3为 indicumolide C。

化合物4 白色粉末(氯仿)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.79 (m, H-5), 3.95 (d, J = 14.5 Hz, H-15α), 3.91 (d, J = 14.5 Hz, H-15α), 3.45 (dd, J = 10.5, 6.5 Hz, H-12β), 3.43 (dd, J = 10.5, 6.5 Hz, H-12α), 2.20 (m, H-11), 1.83 (m, H-6), 1.40 (m, H-7), 1.09 (s, H₃-14), 0.80 (d, J = 7.0, H₃-13); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 140.1 (C-4), 124.5 (C-5), 73.2 (C-10), 67.7 (C-15), 67.3 (C-12), 51.6 (C-1), 43.3 (C-7), 43.0 (C-9), 40.7 (C-6), 35.8 (C-11), 37.8 (C-3), 23.9 (C-2), 23.6 (C-8), 20.7 (C-14), 11.0 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物4为 agripilol C。

化合物5 无色油状物(氯仿)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.70 (d, J = 1.2 Hz, H-5), 6.64 (d, J = 14.5 Hz, H-3), 4.56 (s, H-15), 3.09 (m, H-10), 2.48 (m, H-7), 1.98 (m, H-11), 1.17 (d, J = 7.0, H₃-14), 0.96 (d, J = 7.0, H₃-13), 0.89 (d, J = 7.0, H₃-12); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 153.8 (C-2), 141.9 (C-8), 138.0 (C-4), 129.0 (C-1), 120.8 (C-5), 111.2 (C-3), 65.5 (C-15), 43.3 (C-7), 33.4 (C-11), 27.2 (C-9), 26.8 (C-10), 22.3 (C-14), 21.2 (C-12), 19.8 (C-13), 19.1 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物5为 2, 15-tihydroxycalamenene。

化合物6 白色粉末(氯仿)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.70 (d, J = 1.2 Hz, H-5), 6.64 (d, J = 14.5 Hz, H-3), 4.56 (s, H-15), 3.09 (m, H-10), 2.48 (m, H-7), 1.98 (m, H-11), 1.17 (d, J = 7.0, H₃-14), 0.96 (d, J = 7.0, H₃-13), 0.89 (d, J = 7.0, H₃-12); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 172.5 (C-15), 142.8 (C-5), 130.3 (C-4), 72.4 (C-4), 49.0 (C-1), 45.8 (C-7), 42.0 (C-9), 40.8 (C-6), 26.2 (C-11), 24.8 (C-3), 22.2 (C-8), 21.9 (C-2), 21.3 (C-13), 20.5 (C-14), 15.2 (C-12)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物6为 dysodensiol D。

化合物7 黄色粉末(甲醇)。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.23 (s, H-6), 4.62 (m, H-12),

3.90 (s, H-OMe), 1.98 (s, H₃-15), 1.16 (d, J = 6.8 Hz, H₃-13 和 H₃-14); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 191.4 (C-4), 185.1 (C-1), 177.7 (C-11), 159.2 (C-7), 158.6 (C-2), 156.9 (C-5), 137.6 (C-3), 132.2 (C-9), 129.4 (C-8), 121.4 (C-6), 63.4 (C-OMe), 31.5 (C-12), 25.2 (C-13, 14), 11.9 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物7为 bombamalones D。

化合物8 黄色针状结晶(甲醇)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 10.46 (H-11), 7.24 (s, H-6), 4.16 (m, H-12), 4.01 (s, H-OMe), 2.05 (s, H₃-15), 1.26 (d, J = 6.8 Hz, H₃-13 和 H₃-14); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 197.1 (C-11), 186.1 (C-4), 183.1 (C-1), 165.3 (C-7), 159.2 (C-5), 156.9 (C-2), 135.1.6 (C-9), 131.6 (C-3), 124.1 (C-10), 121.3 (C-6), 117.1 (C-8), 60.1 (C-OMe), 30.1 (C-12), 23.9 (C-13, 14), 9.1 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物8为 8-formyl-7-hydroxyl-5-isopropyl-2-methoxy-1, 4-naphthoquinone。

化合物9 无色油状物(甲醇)。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.15 ~ 5.52 (m, H₂-12), 4.60 (d, J = 10.8, H-4), 4.13 ~ 4.51 (m, H₂-13), 3.07 (t, J = 5.0 Hz, H-2), 1.38 (s, H₃-15), 0.88 (d, J = 6.4 Hz, H₃-14); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 150.8 (C-11), 110.8 (C-12), 106.6 (C-7), 80.5 (C-6), 73.9 (C-4), 69.5 (C-13), 63.8 (C-3), 62.8 (C-2), 45.6 (C-5), 41.9 (C-8), 40.3 (C-10), 31.3 (C-1), 20.4 (C-15), 20.1 (C-14)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物9为 strobilol A。

化合物10 无色粉末(甲醇)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.45 (s, H-3), 3.80 (s, H-4-OMe), 3.51 (m, H-7), 1.61 (m, H-9α), 1.51 (m, H-9β), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 168.3 (C-4), 163.9 (C-2), 156.2 (C-8a), 107.4 (C-4a), 88.1 (C-3), 74.7 (C-7), 62.0 (C-5), 50.1 (C-4-OMe), 28.9 (C-8), 25.4 (C-9), 9.7 (C-10)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物10为 Pyrenocine J。

化合物11 白色粉末(氯仿)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.41 (m, H-7), 5.20 (dd, J = 15.4, 8.1 Hz, H-23), 5.18 (dd, J = 15.4, 7.2 Hz, H-22), 4.06 (m, H-3), 3.38 (s, 6-OCH₃); 3.17 (m, H-6),

1.02 (d, $J = 6.6$ Hz, H₃-21), 1.00 (s, H₃-19), 0.91 (d, $J = 7.0$ Hz, H₃-28), 0.83 (d, $J = 7.4$ Hz, H₃-27), 0.82 (d, $J = 7.2$ Hz, H₃-26), 0.60 (s, H₃-18); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 143.8 (C-8), 135.6 (C-22), 132.1 (C-23), 115.0 (C-7), 82.6 (C-6), 76.5 (C-5), 67.8 (C-3), 56.2 (C-17), 58.1 (6-OCH₃), 55.0 (C-14), 44.0 (C-9), 43.9 (C-13), 42.9 (C-24), 40.4 (C-20), 39.8 (C-4), 39.4 (C-12), 37.4 (C-10), 33.2 (C-25), 32.8 (C-2), 30.9 (C-1), 27.9 (C-16), 22.9 (C-11), 22.2 (C-15), 21.2 (C-21), 19.9 (C-27), 19.6 (C-26), 18.4 (C-19), 17.7 (C-28), 12.4 (C-18)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 11 为 3 β , 5 α -Dihydroxy-6 β -methoxyergosta-7, 22-dien。

化合物 12 白色针状结晶(氯仿)。mp. 165 ~ 168 ℃; 通过 TLC 对照, 其 R_f 值与实验室麦角甾醇标准品完全一致, 故鉴定化合物 12 为 (22E)-Ergosta-5, 7, 22-trien-3 β -ol。

化合物 13 白色针状结晶(氯仿)。mp. 177 ~ 178 ℃; 通过 TLC 对照, 其 R_f 值与实验室麦角甾醇过氧化物标准品完全一致, 故鉴定化合物 13 为 5 α , 8 α -epidioxy-22E-ergosta-6, 22-dien-3 β -ol。

表 1 化合物 1 ~ 9 的细胞毒活性

Table 1 Toxicity of compounds 1~9 with mortality rates (%)

Sample	Toxicity 毒性									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sannastatin
Mortality	47.6	49.2	58.3	42.5	45.7 46.3	50.1	47.2	70.2	89.8	

参考文献

- Yuan L (袁琳), Ma J (马娟), Wang T (王婷), et al. Chemical constituents from Endophytic *Phomopsis* sp. Lz42 of *Maytenus hookeri* (云南美登木内生真菌 *Phomopsis* sp. Lz42 的化学成分). *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2009, 30:78.
- Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod*, 2004, 67:257-268.
- Silva GH, Teles HL, Zanardi LM, et al. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). *Phytochem*, 2006, 67:1964-1969.
- Feng Z M, Song S, Xia P F, et al. Three new sesquiterpenoids from *Chrysanthemum indicum* L. *Helv Chim Acta*, 2009, 92: 1823-1828.
- Shan WG, Chen XX, Ying YM, et al. Sesquiterpenoids from *Fusarium sp.*, an endophytic fungus in *Agrimonia pilosa*. *Helv Chim Acta*, 2011, 94:1254-1259.
- Raharivelomanana P, Bianchini JP, Ramanoelina ARP, et al. Structures of cadinane- and guaiane-type sesquiterpenoids from *Enterospermum madagascariensis* (Baill.) Homolle. *Magn Reson Chem*, 2005, 43:1049-1052.
- Xie BJ, Yang SP, Yue JM. Terpenoids from *Dysoxylum densiflorum*. *Phytochem*, 2008, 69:2993-2997.
- Zhang XH, Zhu HL, Zhang SW, et al. Sesquiterpenoids from *Bombax malabaricum*. *J Nat Prod*, 2007, 70:1526-1528.
- Vijaya BRM, Kesava RM, Gunasekar D, et al. A new sesquiterpene lactone from *Bombax malabaricum*. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51:458-459.
- Hiramatsu F, Murayama T, Koseki T, et al. Strobilols A-D: four cadinane-type sesquiterpenes from the edible mushroom *Strobilurus ohshima*. *Phytochem*, 2007, 68:1267-1271.

5 海虾致死活性筛选

5.1 活性测定

海虾致死活性是目前科学家们最为信赖的细胞毒活性测试方法之一。在直径 1.8 cm, 深 2 cm 的每个培养孔中装入 0.2 mL 的人造海水, 每个孔中放入人工孵化的游动的丰年虾 (*Artemiasalina*) 幼体 25 ~ 30 个。将化合物 1 ~ 9 分别用 DMSO 溶解, 稀释到 10 μ g/mL 加入到每个培养孔中, 对照只加 DMSO, 此外, 以化合物 sannastatin 作为阳性对照^[13], 每一处理重复三次。在室温下黑暗培养 24 h 后, 在显微镜下计算每个槽中死亡的海虾个数, 最后用以下公式计算致死率(M)。其中: M = 24 h 后的致死率; A = 24 h 后的死亡总数; B = 24 h 后对照槽中的死亡总数; N = 在加入药剂之前的死亡数; G = 挑选用于测试的小虾总数 (图 1)。

$$M = \left\{ \frac{(A - B - N)}{(G - N)} \right\} \times 100$$

5.2 测定结果

化合物 1~9 的细胞毒活性测试结果如表 1 所示, 化合物 1~8 显示中等抑制活性, 化合物 9 显示显著致死活性, 而对照显示强抑制活性。