

# 白木香内生真菌 *Botryosphaeria rhodina* A13 固体发酵产物的分离鉴定

张 瑶<sup>1,2</sup>, 陶美华<sup>2</sup>, 陈玉婵<sup>2</sup>, 郁建平<sup>1\*</sup>, 章卫民<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>贵州大学, 贵阳 550025; <sup>2</sup>广东省微生物研究所 省部共建华南应用微生物国家重点实验室  
广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070

**摘要:** 运用硅胶柱、反相硅胶柱、凝胶柱、HPLC 和薄层制备等色谱技术及重结晶从白木香内生真菌 *Botryosphaeria rhodina* A13 的固体发酵产物中分离纯化了 10 个化学成分, 通过化合物波谱数据及理化性质鉴定它们的结构分别为豆甾-4-烯-3-酮(1)、豆甾-5-烯-3 $\beta$ -醇-7-酮(2)、豆甾-4-烯-3,6-二酮(3)、(22E, 24S)-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -环氧基-24-甲基胆甾-8(14), 22-二烯-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -二醇(4)、5, 4'-二羟-7-甲氧基黄酮(5)、香草酸(6)、对甲氧基苯甲酸(7)、尿嘧啶(8)、2-甲氧基对苯二酚(9)、2-甲基-3,5-羟基色酮(10)。其中化合物 1~10 均为首次从该属真菌中分离得到, 化合物 4 具有细胞毒活性。

**关键词:** *Botryosphaeria rhodina*; 内生真菌; 次级代谢产物; 白木香; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.009

## Isolation and Identification of Secondary Metabolites from the Solid Culture of Endophytic Fungal Strain *Botryosphaeria rhodina* A13 from *Aquilaria sinensis*

ZHANG Yao<sup>1,2</sup>, TAO Mei-hua<sup>2</sup>, CHEN Yu-chan<sup>2</sup>, YU Jian-ping<sup>1\*</sup>, ZHANG Wei-min<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Guizhou University, Guiyang 550025, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

**Abstract:** Ten chemical constituents were isolated and purified from the solid culture of endophytic fungal strain *Botryosphaeria rhodina* A13 isolated from *Aquilaria sinensis* by silica gel column chromatography, reverse silica gel column chromatography, Sephadex-LH20 column chromatography, HPLC, preparative TLC and recrystallization. On the basis of spectral data and physicochemical properties, their structures were identified as 3-oxo- $\Delta^{4,5}$ -sitosterone (1), (24R)-3 $\beta$ -hydroxy-ethylcholest-5-en-7-one (2), stigmast-4-ene-3, 6-dione (3), (22E, 24S)-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxy-24-methylcholesta-8(14), 22-diene-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -diol (4), genkwanin (5), benzoic acid (6), 4-methoxybenzoic acid (7), pyrimidine-2,4(1H, 3H)-dione (8), 2-methoxyhydroquinone (9), (-)-gynuraone (10). All the compounds were isolated from the genus *Botryosphaeria* for the first time. Compound 4 showed cytotoxic activities against MCF-7 and NCI-H460 cell lines.

**Key words:** *Botryosphaeria rhodina*; endophytic fungus; secondary metabolite; *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; cytotoxicity

内生真菌(endophytic fungi)通常是指生长在健康植物体根、茎、叶等组织细胞间隙或者细胞内对植物体没有明显病害的真菌,是植物微生态系统的重要组成部分<sup>[1]</sup>。近年来研究表明,植物内生真菌能够产生多种结构类型的活性代谢产物<sup>[2]</sup>。来源于

药用植物的内生真菌能够产生和宿主植株相同或者相似的生物活性物质,因此药用植物内生真菌是发现天然活性物质的重要资源。

据报道,葡萄座腔菌属真菌 *Botryosphaeria rhodina* 能产生结构新颖的抗菌和抗肿瘤活性代谢产物<sup>[3,4]</sup>。本研究前期从药用植物白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg.] 中分离获得一株内生真菌 *Botryosphaeria rhodina* A13<sup>[5]</sup>, 经离体实验表明,该菌株能诱导离体白木香树枝产生沉香倍半萜组分 5,9-二甲基-2-(1-甲基亚乙基)-环癸醇<sup>[6]</sup>。为了研

收稿日期: 2014-12-11 接受日期: 2015-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(81203006); 973 前期专项(2014CB460613); 广东省科技计划(2012A03010001); 广东省科学院野外工作平台基金(Sytz201204)

\* 通讯作者 E-mail: wmzhang58@qq.com; yujp666666@163.com

究该株内生真菌的活性代谢产物,本研究以白木香木屑为培养基对菌株 A13 进行固体发酵培养,并对其发酵产物进行分离纯化和结构鉴定,从中分离得到 10 个化合物,分别鉴定为:豆甾-4-烯-3-酮(1)、豆甾-5-烯-3 $\beta$ -醇-7-酮(2)、豆甾-4-烯-3,6-二酮(3)、(22*E*,24*S*)-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -环氧基-24-甲基胆甾-8(14),22-二烯-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -二醇(4)、5,4'-二羟-7-甲氧基黄酮(5)、香草酸(6)、对甲氧基苯甲酸(7)、尿嘧啶(8)、2-甲氧基对苯二酚(9)、2-甲基-3,5-羟基色酮(10)。所有化合物均为首次从该属真菌中分离得到。

## 1 材料与仪器

### 1.1 菌株和细胞株

内生真菌 *B. rhodina* A13 分离自 30 年生的白木香<sup>[5]</sup>,供试肿瘤细胞株为乳腺癌细胞 MCF-7 和大细胞肺癌细胞 NCI-H460,均保藏于广东省微生物菌种保藏中心。

### 1.2 试剂

柱色谱硅胶(100~200 目、200~300 目,青岛海洋化工厂)、GF<sub>254</sub> 高效薄层硅胶板(Merck 公司)、C<sub>18</sub> 反相硅胶(40~75  $\mu$ m, Fuji Silysia Chemical Ltd.), 凝胶 Sephadex LH-20(18~110  $\mu$ m, Amersham Biosciences Ltd.), 其余试剂均为分析纯,购自广州化学试剂厂。

### 1.3 仪器

LRH-100 生化培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司), AVANCE III 型 500 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker 公司), API 2000 LC/MS/MS 质谱仪(MDS SCIEX 公司), DSQII 型电子轰击电离质谱仪(美国 Thermo 公司), LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), ZF-6 型三用紫外线分析仪(上海嘉鹏科技有限公司), Hangping FA2004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司), RE-2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), 超净工作台(上海恒益科技有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 发酵培养

在白木香木屑中加入适量水拌匀,使含水量达 60% 左右,分装至聚丙烯食用菌袋,每袋约装 100 g 木屑,共 100 袋,121  $^{\circ}$ C 灭菌 30 min,冷却后挑取适量 *B. rhodina* A13 菌丝体接种于菌袋中,在黑暗条件下 27  $^{\circ}$ C 培养 38 d。

### 2.2 发酵产物的提取与分离

将固体发酵产物用 95% 乙醇浸提 3 次,浓缩得发酵物提取物,加入适量水悬浮,先用石油醚萃取 5 次,至上层液澄清,40  $^{\circ}$ C 下减压浓缩,得浸膏 26.7 g,再用乙酸乙酯萃取 5 次,至上层液澄清,40  $^{\circ}$ C 下减压浓缩,得浸膏 71.1 g。两种浸膏分别过硅胶柱,以石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱,用薄层色谱(TLC)检测(显色剂为茴香醛-浓硫酸试剂),合并相似组分,石油醚萃取部分得到 39 个组分(P1~P39),乙酸乙酯部分得到 39 个组分(E1~E39)。P11 组分用甲醇反复重结晶得到化合物 1(18.0 mg)。重结晶后 P11 剩余组分经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,正相硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯 4:1),制备薄层色谱得化合物 2(1.6 mg)。P14 组分经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,用甲醇反复重结晶得到化合物 3(2.0 mg)。P30 组分经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,反相硅胶柱层析(甲醇-水 70:30),正相硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯 2:1~1:2 和乙酸乙酯),制备薄层色谱得化合物 4(20.0 mg)。E23 组分经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱得到亚组分 E23-3~E23-4, E23-3 组分用甲醇反复重结晶得化合物 5(1.0 mg), E23-4 组分经反相硅胶柱层析(甲醇-水 40:60)得化合物 6(5.5 mg)。E15 组分经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,反相硅胶柱层析(甲醇-水 30:70),用甲醇反复重结晶得化合物 7(1.3 mg)。E34 组分经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,用甲醇反复重结晶得化合物 8(1.5 mg)。E25 组分经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,反相硅胶柱层析(甲醇-水 20:80),制备薄层色谱得化合物 9(2.0 mg)。E21 组分经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,反相硅胶柱层析(甲醇-水 20:80),用甲醇反复重结晶,制备薄层色谱得化合物 10(5.2 mg)。

### 2.3 细胞毒活性测定

采用 SRB 法<sup>[7]</sup>测定化合物 4 的细胞毒活性。取对数生长期的乳腺癌细胞 MCF-7 和大细胞肺癌细胞 NCI-H460,用胰酶消化,台盼蓝染色计数,台盼蓝排斥实验检测细胞活力大于 95% 后,用新鲜培养基调整细胞浓度为  $3 \times 10^4$  个/mL,细胞接种于 96 孔板,每孔加入 180  $\mu$ L 的细胞悬液,并设 3 个空白孔调零,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。待细胞贴壁后,每孔加入 20  $\mu$ L 待测样品,空白(阴性)对

照加 20  $\mu\text{L}$  培养基,以顺铂作阳性对照。置  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 72 h 后,加入 50  $\mu\text{L}$  50% 冷三氯醋酸固定细胞,4  $^\circ\text{C}$  放置 1 h 后用蒸馏水洗涤 5 次,空气中自然干燥。然后每孔加入由 1% 冰醋酸配制的浓度为 4 mg/mL 的 SRB 溶液 100  $\mu\text{L}$ ,室温中染色 30 min,去上清,用 1% 冰醋酸洗涤 5 次,空气干燥。最后每孔加入浓度为 10 mmol/mL 的 Tris 溶液 200  $\mu\text{L}$ ,用酶标仪测定 570 nm 处的吸光值(A),用以下公式计算样品对细胞生长的抑制率,采用 SigmaPlot 10.0 软件计算  $\text{IC}_{50}$  值。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = \frac{\text{OD空白对照组} - \text{OD样品组}}{\text{OD空白对照组}} \times 100\%$$

## 3 实验结果

### 3.1 结构鉴定

**化合物 1** 白色晶体;ESI-MS  $m/z$ :413  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,分子式为  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ 。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :5.72 (1H, s, H-4),1.18 (3H, s, H-19),0.92 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-21),0.86 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-29),0.84 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-27),0.82 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26),0.71 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :200.6 (C-3),172.6 (C-5),124.6 (C-4),56.9 (C-14),56.8 (C-17),54.7 (C-9),46.7 (C-24),43.3 (C-13),40.5 (C-12),39.5 (C-10),37.0 (C-20),36.6 (C-1),36.5 (C-8),34.9 (C-22),34.8 (C-7),33.9 (C-6),33.0 (C-23),30.0 (C-2),29.1 (C-25),26.9 (C-16),25.1 (C-15),24.0 (C-28),21.9 (C-11),20.7 (C-27),19.9 (C-19),19.6 (C-21),18.3 (C-26),12.9 (C-18),12.9 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[8]</sup>,确定其结构为豆甾-4-烯-3-酮。

**化合物 2** 白色粉末;EI-MS  $m/z$ :428  $[\text{M}]^+$ ,分子式为  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOD)  $\delta$ :6.14 (1H, s, H-6),4.33 (1H, m, H-3),1.30 (2H, m, H-28),1.23 (3H, s, H-19),0.97 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21),0.89 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-29),0.88 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-27),0.85 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26),0.77 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, MeOD)  $\delta$ :202.0 (C-7),175.4 (C-5),119.7 (C-6),68.6 (C-3),56.9 (C-14),56.5 (C-17),54.8 (C-9),46.8 (C-24),43.1 (C-13),41.9 (C-4),40.4 (C-12),39.8 (C-10),36.9 (C-1),36.9

(C-20),34.9 (C-8),34.5 (C-22),34.0 (C-2),29.7 (C-25),28.8 (C-16),26.6 (C-23),24.7 (C-15),23.6 (C-28),21.6 (C-11),19.7 (C-26),18.9 (C-27),18.7 (C-21),18.0 (C-19),11.8 (C-29),11.8 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[9]</sup>,确定其结构为豆甾-5-烯-3 $\beta$ -醇-7-酮。

**化合物 3** 白色固体;EI-MS  $m/z$ :426  $[\text{M}]^+$ ,分子式为  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :6.18 (1H, d,  $J = 0.86$  Hz, H-4),1.17 (3H, s, H-19),0.95 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-21),0.87 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-29),0.85 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-27),0.85 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26),0.73 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :203.3 (C-6),200.5 (C-3),162.0 (C-5),126.4 (C-4),57.5 (C-17),56.8 (C-14),51.9 (C-8),47.7 (C-7),46.7 (C-24),43.4 (C-13),40.7 (C-10),40.0 (C-12),36.9 (C-20),36.4 (C-1),35.1 (C-8),34.9 (C-2),34.7 (C-22),30.0 (C-25),28.9 (C-16),26.9 (C-23),24.9 (C-15),24.0 (C-28),21.8 (C-11),20.7 (C-26),19.9 (C-27),19.6 (C-21),18.4 (C-19),12.9 (C-29),12.8 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[10]</sup>,确定其结构为豆甾-4-烯-3,6-二酮。

**化合物 4** 白色固体;ESI-MS  $m/z$ :451  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ,分子式为  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :5.23 (1H, m, H-23),5.21 (1H, m, H-22),4.43 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-7),3.96 (1H, m, H-3),3.15 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-6),2.36 (1H, m, H-9),2.12 (1H, m, H-20),1.87 (1H, m, H-24),1.03 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-21),0.93 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-24'),0.88 (3H, s, H-18),0.87 (3H, s, H-19),0.85 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-27),0.83 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-26); $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :153.5 (C-14),136.2 (C-22),133.2 (C-23),126.1 (C-8),69.6 (C-3),68.7 (C-5),66.0 (C-7),62.2 (C-6),57.7 (C-17),43.9 (C-24),43.7 (C-13),40.5 (C-20),40.2 (C-9),39.6 (C-4),37.5 (C-12),36.7 (C-10),34.0 (C-25),33.1 (C-1),32.0 (C-2),28.1 (C-16),25.9 (C-15),22.1 (C-21),20.9 (C-24'),20.6 (C-26),19.9 (C-27),19.0 (C-11),18.5 (C-18),17.4 (C-19)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[11]</sup>,确定其结构为(22*E*,24*S*)-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -环氧基-24-甲基胆甾-8(14),22-二烯-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -二醇。

**化合物 5** 黄色固体;ESI-MS  $m/z$ :285 [M + H]<sup>+</sup>,分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$ :12.96 (1H, s, 5-OH), 10.39 (1H, s, 4'-OH), 7.96 (2H, m, H-2', 6'), 6.93 (2H, m, H-3', 5'), 6.85 (1H, s, H-3), 6.77 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-8), 6.37 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-6), 3.86 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$ :183.3 (C-4), 166.5 (C-7), 165.4 (C-2), 162.7 (C-4'), 162.6 (C-5), 158.6 (C-8a), 129.9 (C-2', 6'), 122.4 (C-1'), 117.3 (C-3', 5'), 106.0 (C-4a), 104.4 (C-3), 99.3 (C-6), 94.1 (C-8), 57.4 (7-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[12]</sup>,确定其结构为 5,4'-二羟基-7-甲氧基黄酮。

**化合物 6** 白色粉末;EI-MS  $m/z$ :168 [M]<sup>+</sup>,分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$ :7.45 (1H, s, H-2), 7.41 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-6), 6.79 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-5), 3.77 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$ :151.5 (C-4), 148.3 (C-3), 124.5 (C-6), 116.1 (C-2), 114.3 (C-5), 56.8 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[13]</sup>,确定其结构为香草酸。

**化合物 7** 白色粉末;ESI-MS  $m/z$ :151 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD)  $\delta$ :7.97 (2H, d,  $J$  = 8.9 Hz, H-2, 6), 6.94 (2H, d,  $J$  = 8.9 Hz, H-3, 5), 3.85 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>,确定其结构为对甲氧基苯甲酸。

**化合物 8** 黄色固体;ESI-MS  $m/z$ :113 [M + H]<sup>+</sup>, 111 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$ :11.01 (1H, br s), 10.82 (1H, br s), 7.38 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-6), 5.44 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-5);<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$ :165.7 (C-1), 152.9 (C-3), 143.6 (C-5), 101.6 (C-6)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[15]</sup>,确定其结构为尿嘧啶。

**化合物 9** 黄色粉末;ESI-MS  $m/z$ :304 [2M + Na + H]<sup>+</sup>, 320 [2M + K + H]<sup>+</sup>,分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD)  $\delta$ :7.58 (1H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-3), 7.50 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H-6), 6.77 (1H, dd,  $J$  = 8.2, 1.2 Hz, H-5), 3.89 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOD)  $\delta$ :150.0 (C-4), 147.7 (C-2), 128.6 (C-1), 123.9 (C-6), 114.8 (C-5), 113.5 (C-3), 55.8 (-OCH<sub>3</sub>)。以

上数据与文献报道基本一致<sup>[16]</sup>,确定其结构为 2-甲氧基对苯二酚。

**化合物 10** 无色油状液体;ESI-MS  $m/z$ :193 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ :7.58 (1H, dd,  $J$  = 7.5, 8.4 Hz, H-7), 7.08 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-8), 6.94 (1H, dd,  $J$  = 8.3, 0.8 Hz, H-6), 4.56 (2H, m, H-2, H-3), 1.47 (3H, d,  $J$  = 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>-2);<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ :169.7 (C-4), 162.4 (C-5), 143.6 (C-8a), 137.3 (C-7), 117.3 (C-6), 117.2 (C-8), 107.5 (C-4a), 81.1 (C-2), 69.0 (C-3), 17.7 (C-2a)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[17]</sup>,确定其结构为 2-甲基-3,5-羟基色酮。

### 3.2 细胞毒活性

细胞毒活性测试结果表明,化合物 4 对肿瘤细胞株 MCF-7 和 NIC-H460 的 IC<sub>50</sub> 分别为 34.22  $\mu$ g/mL 和 37.97  $\mu$ g/mL (表 1)。

表 1 化合物 4 对 2 种肿瘤细胞株的 IC<sub>50</sub> 值

Table 1 IC<sub>50</sub> values of compound 4 against two tumor cell lines

化合物 Compound	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	
	MCF-7	NCI-H460
4	34.22	37.97
顺铂 Cisplatin	1.21	1.30

## 4 讨论

葡萄座腔菌属 (*Botryosphaeria*) 真菌是农业上重要的病原菌、内生真菌或潜在的致病菌,能产生具有细胞毒活性、抗菌活性等次级代谢产物<sup>[3,4]</sup>。如黄玖利从海南粗榧内生真菌葡萄座腔菌 S15 的发酵产物中分离得到具有抑制人慢性髓原白血病细胞 K562 活性的化合物<sup>[18]</sup>。本研究从药用植物白木香内生真菌 *B. rhodina* A13 的固体发酵产物中分离鉴定了 10 个化合物,它们均为首次从该属真菌中分离得到。化合物 5 为黄酮类化合物,具有抗口腔表皮样癌细胞 KB 作用,此化合物的多个衍生物具有显著的抗 KB 细胞和抑制 DNA 拓扑异构酶 I 活性<sup>[12]</sup>。化合物 1~4 是甾体类化合物,活性测试结果表明化合物 4 有细胞毒活性。

### 参考文献

- 1 Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, 2001, 18: 448-459.
- 2 Sun JQ (孙剑秋), Guo LD (郭良栋), et al. Research ad-

- vances in the diversities of endophytic fungi in medicinal plants and their bioactive ingredients. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2006, 26: 1505-1519.
- 3 Li WY (李文英), Zhuang WY (庄文颖). Taxonomy studies on the *Botryosphaeria* from China. *Mycosystema* (菌物学报), 2013, 32: 108-114.
  - 4 Winpahan P, Vatcharin R, et al. A new dihydrobenzofuran derivative from the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55: 1404-1405.
  - 5 Wang L (王磊), Zhang WM (章卫民), et al. Isolation and molecular identification of endophytic fungi from *Aquilaria sinensis*. *J Fung Res* (菌物研究), 2009, 7: 37-42.
  - 6 Tao MH (陶美华), Wang L (王磊), Gao XX (高晓霞), et al. Effects of *Botryosphaeria rhodina* A13 on agarwood formation of *Aquilaria sinensis* excised twig. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1719-1723.
  - 7 Skehan P, Storeng R, Dominic S. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82: 1107-1112.
  - 8 Patricia AO, Dominic AO, Joseph DC, et al. Monoterpene diol, iridoid glucoside and dibenzo- $\alpha$ -pyrone from *Anthocleista djalonensis*. *Phytochemistry*, 1995, 40: 1183-1189.
  - 9 Arai Y, Nakagawa T, et al. Chemical constituents of aquatic fern *Azolla nilotica*. *Phytochemistry*, 1998, 48: 471-474.
  - 10 Shen CC, Syu WJ, et al. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *J Nat Prod*, 2002, 65: 1857-1862.
  - 11 Luo X, Li F, Shinde PB, et al. 26, 27-Cyclosterols and other polyoxygenated sterols from a marine sponge *Topsentia* sp. *J Nat Prod*, 2006, 69: 1760-1768.
  - 12 Zahir A, Jossang A, Bodo B. DNA topoisomerase I inhibitors: cytotoxic flavones from *Lethedon tannaensis*. *J Nat Prod*, 1996, 59: 701-703.
  - 13 Li SH (李胜华), Niu YY (牛友芽). Study on chemical constituents in *Cryptotaenia japonica*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43: 2365-2368.
  - 14 Wang YN (王亚楠), Lin S (林生), et al. Study on chemical constituents from aqueous extract of *Gastrodia elata*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 1775-1781.
  - 15 Huo CH (霍长虹), Zhao YY (赵玉英), et al. Study on chemical constituents in herbs of *Acanthus ilicifolius*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30: 763-765.
  - 16 Wang T (王唐), Jiang Y (姜怡), Jin RX (靳荣线), et al. Studies on secondary metabolites of *Streptomyces* sp. isolated from *Elephas maximus* Feces. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 509-512.
  - 17 Lin WY, Kuo YH, Chang YL, et al. Anti-platelet aggregation and chemical constituents from the rhizome of *Gynura japonica*. *Planta Med*, 2003, 69: 757-764.
  - 18 Huang JL (黄玖利). Chemical constituents from endophytic fungus S15 of *Cephalotaxus hainanensis* Li. Haikou: Hainan University (海南大学), MSc. 2010.

(上接第 841 页)

- 7 Li MQ (李梅青), Kong XL (孔祥淋), Du XM (杜晓妹), et al. Determination of soluble elements in *Paeonia ostii* flowers by ICP-MS with microwave digestion. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1926-1929.
- 8 Yu T (余焘). Determination of inorganic elements in oyster by ICP-OES method with microwave digestion. *J Guangxi Agric* (广西农业科学), 2010, 41: 991-993.
- 9 Michael K, Rafael AS, et al. High resolution ICP-OES analysis of neptunium-237 in samples from pyro chemical treatment of spent nuclear fuel. *Microchem J*, 2014, 117: 225-232.
- 10 Qiao YQ (乔涌起), Cui BS (崔保松), et al. Chemical constituents of n-BuOH extract of *Comastoma pedunculatum*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 16: 2360-2365.
- 11 Tang L (唐丽), Xu DH (徐墩海), et al. Study on the chemical constituents of ethyl acetate extract of *Comastoma pedunculatum* (Rogge et D. Dou) Holub. *J Shandong Coll TCM* (山东中医药大学学报), 2007, 3: 250-251.
- 12 Qiao YQ (乔涌起). Study on the anti-inflammatory chemical constituents of *Comastoma pedunculatum* (Rogge et D. Dou) Holub. Beijing: Peking Union Medical College (北京协和医学院), MSc. 2012.
- 13 Shan ZF (单振芬). Trace elements and health. *Studies Trace Ele Health* (微量元素与健康研究), 2006, 3: 66-67.
- 14 Zhu YL (朱胤龙), Liu JF (刘军锋). Study on trace element and function of Chinese medicine. *J Shanxi TCM* (陕西中医), 2000, 8: 373-374.
- 15 Zhong XQ (钟秀倩), et al. Microelement and healthiness. *Mod Prevent Med* (现代预防医学), 2007, 1: 61-63.
- 16 Wang Q (王勤), Cao JH (曹继华), Li YL (李艳丽). The important role of trace elements in human body. *J Henan Coll TCM* (河南中医学院学报), 2003, 6: 81-83.
- 17 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010.