

广东红冬蛇菰及其内生真菌 *Penicillium coprophilum* Mzz9 的化学成分研究

范 升, 陆盛胜, 吴秋艺, 李芳芳, 何 坚*

南方医科大学药学院多肽与天然药物研究室, 广州 510515

摘要:本文研究了广东梅州地区产名贵中药材红冬蛇菰及其内生真菌 *Penicillium coprophilum* Mzz9 的化学成分。通过多种色谱技术和波谱学分析共分离鉴定了 11 个化合物。从红冬蛇菰的二氯甲烷萃取物中分离得到 5 个化合物:羽扇豆醇(1)、 β -香树脂醇(2)、鄂桐甾醇(3)、乙酸蛇麻脂醇酯(4)和亚油酸甘油酯(5);从其内生真菌 *P. coprophilum* Mzz9 的发酵液中分离得到 6 个化合物:去氯灰黄霉素(6)、灰黄霉素(7)、脱氢灰黄霉素(8)、oxaline(9)、4-megastigmen-3,9-dione(10)、对羟基苯乙酮(11)。其中化合物 1 和 5 为首次从红冬蛇菰中分离得到, 化合物 6~11 为首次从红冬蛇菰的内生真菌中分离得到。

关键词:红冬蛇菰; 内生真菌; *Penicillium coprophilum* Mzz9; 次生代谢产物; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)9-1539-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.9.012

Studies on the chemical constituents of *Balanophora harlandii* and its endophytic fungus *Penicillium coprophilum* Mzz9

FAN Sheng, LU Sheng-sheng, WU Qiu-yi, LI Fang-fang, HE Jian*

School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: This paper investigated the chemical constituents from a valuable traditional Chinese medicine, *Balanophora harlandii*, collected in Meizhou, Guangdong Province, as well as the secondary metabolites from the culture broth of its endophytic fungus *Penicillium coprophilum* Mzz9. As a result, eleven compounds were isolated and identified by combining various chromatographic and spectroscopic techniques. Among them, five compounds including lupeol (1), β -amyrin (2), clearosterol (3), lupeol acetate (4) and glycerin linoleate (5) were isolated from the dichloromethane extracts of *Balanophora harlandii*, while the other six compounds, including dechlorinated griseofulvin (6), griseofulvin (7), dehydrogriseofulvin (8), oxaline (9), 4-megastigmen-3,9-dione (10), and *p*-hydroxyacetophenone (11), were purified and identified from the culture broth of *P. coprophilum* Mzz9. Compounds 1 and 5 were isolated from *B. harlandii* for the first time, while compounds 6-11 were identified for the first time from the endophytic fungus of *B. harlandii*.

Key words: *Balanophora harlandii*; endophytic fungi; *Penicillium coprophilum* Mzz9; secondary metabolites; chemical constituents

红冬蛇菰为蛇菰科植物红冬蛇菰 *Balanophora harlandii* Hook. f. [*Balania harlandii* (Hook. f.) van Tiegh.] 的全草, 又名葛蕈、红冬菰、列当等, 生于海拔 600~2 100 m 的荫蔽林下较湿润的腐殖土壤处, 广泛分布于广东、广西、云南等地, 其药味苦、涩, 性

寒, 归肺、大肠经, 具有凉血止血, 清热解毒的功效, 主治咳嗽、梅毒、疔疮^[1]。

自 1919 年到目前, 从蛇菰属植物中分离得到的化合物有 140 多个, 主要包括三萜、甾体、苯丙素、环烯醚萜、黄酮、有机酸及鞣质等^[2], 其相关的药理活性有抗炎镇痛、醒酒保肝、抗衰老、抗氧化、抗肿瘤活性、降血糖、抑菌、壮阳、降尿酸等作用^[3]。然而红冬蛇菰的研究报道较少且不够深入, 目前仅从红冬蛇菰中报道了 29 个化合物^[4], 其中部分具有抗氧化

收稿日期: 2020-03-14 接受日期: 2020-08-19

基金项目: 国家自然科学基金(81773556); 广东省科技厅项目(2015A020211010)

*通信作者 Tel: 86-20-61648717; E-mail: jianhe@smu.edu.cn

活性^[5]。此外,植物内生菌是指在一定阶段或全部阶段生活于健康植物内且不会对宿主植物产生任何不良症状的一类微生物,大量研究表明内生菌可产生丰富多样的具有生物活性的次生代谢产物^[6]。因此本文进一步研究了广东红冬蛇菰的化学成分,并首次分离了该植物的内生真菌,分离鉴定了其中一株真菌的次生代谢产物,以期丰富关于广东产红冬蛇菰化学成分的研究并发现新的生物活性物质,为充分开发利用该名贵药材打下基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Shimadzu SPD-M20A 型高效液相分析仪(日本岛津公司);Bruker AVANCE III 400 MHz 型核磁共振波谱仪(美国 Bruker 公司);Waters HPLC/ZQ4000 型液质联用仪(美国 Waters 公司);EYELA N-1100 型旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社);日本理学 supernova X 射线衍射仪 CuK α (日本理学器械株式会社);WZZ-2S 数字式自动旋光仪(上海申光仪器仪表有限公司)。柱层析硅胶(200~300 目、300~400 目)及 GF254 薄层硅胶(安徽良臣硅源材料有限公司);C-18 反相硅胶(德国 Merck 公司);Sephadex LH-20(英国 Amersham Pharmacia 生物技术公司);分析纯甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚(天津市津东天正精细化学试剂厂)。

1.2 培养基

(1) 马铃薯葡萄糖培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 L,自然 pH;(2) 改良马丁培养基:蛋白胨 5 g,酵母浸出粉 2 g,葡萄糖 20 g,磷酸氢二钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,蒸馏水 1 L, pH 调至 6.2~6.6。

1.3 药材与菌株

红冬蛇菰全草于 2014 年采自广东省梅州市地区,经南方医科大学中医药学院晁志教授鉴定。将红冬蛇菰洗净室温干燥后用 75% 乙醇进行表面灭菌。无菌环境下取少量切成小块置于培养基上,于 28 °C 恒温培养箱中培养 3~15 天。平板划线分离单个菌落,纯化后用甘油保藏。经化学筛选得到一株茎部内生菌 Mzz9,该菌在培养基中培养 3 天后菌落呈不规则圆形,表面干粉粒状,中心有小突起颜色较边缘区域深,气生菌丝为灰黄白色,基内菌丝为深棕色,经广州擎科生物科技有限公司获得 ITS 基因序列,通过比对鉴定该菌为嗜粪青霉菌 *P. coprophilum*,序列已上传 GeneBank,登录号为 MT410465。

药材与菌株均保存于南方医科大学药学院多肽与天然产物研究室。

2 提取与分离

2.1 红冬蛇菰化学成分的提取与分离

将红冬蛇菰(2.0 kg)洗净室温干燥处理后用 95% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h。提取液减压浓缩合并得总浸膏(8.4 g)。将总浸膏用蒸馏水充分溶解,接着分别用石油醚,二氯甲烷,乙酸乙酯萃取,减压浓缩得三个部位。取二氯甲烷部位(1.7 g)经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯 1:0→0:1)洗脱得 8 个组分 Fr. 1~8。Fr. 3~5 均经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(甲醇)分离;Fr. 3-1 主要馏分经硅胶柱(石油醚-二氯甲烷 5:1)后得到化合物 1(17.1 mg,石油醚-乙酸乙酯 5:1 层析后 R_f 值在 0.3),化合物 3(7.0 mg,石油醚-乙酸乙酯 5:1 层析后 R_f 值在 0.2);Fr. 4-1 主要馏分经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯 5:1)得化合物 2(8.0 mg,石油醚-乙酸乙酯 5:1 层析后 R_f 值在 0.4),化合物 4(14.7 mg,石油醚-乙酸乙酯 5:1 层析后 R_f 值在 0.8);Fr. 5-1 主要馏分经反相硅胶柱(甲醇-水 90:10)得化合物 5(50.1 mg,二氯甲烷-甲醇 10:1 层析后拖尾 R_f 值在 0.5)。

2.2 红冬蛇菰内生真菌 *P. coprophilum* Mzz9 化学成分的提取与分离

复苏活化后的 Mzz9 接种到 50 mL 改良马丁培养基摇床(28 °C,200 rpm)培养 3 天作为种子液,接着转到 500 mL 土豆培养基中 28 °C 静置培养 27 天,累计收集发酵液 33 L。发酵液经 8 层纱布过滤后离心(8 000 rpm,5 min),滤液经 D101 型大孔树脂柱用 95% 乙醇洗下减压回收得乙醇浸膏(16.4 g)。乙醇浸膏用纯水溶解后分别用二氯甲烷和乙酸乙酯萃取 3 次,得二氯甲烷部位(4.3 g)和乙酸乙酯部位(1.0 g)。二氯甲烷部位经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯 1:0→0:1)梯度洗脱,得 6 个组分 Fr. 1~6。其中 Fr. 2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇)得馏分经正相硅胶柱(二氯甲烷-甲醇 20:1)得化合物 10(28.8 mg,石油醚-乙酸乙酯 1:1 层析后 R_f 值在 0.7),Fr. 2-3 经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯 1:1)得化合物 11(20.9 mg,石油醚-乙酸乙酯 1:1 层析后 R_f 值在 0.8);Fr. 3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇)得 Fr. 3-1 经反相硅胶(甲醇-水 45:55)得化合物 8(2.3 mg,石油醚-乙酸乙酯 1:1 层析后 R_f 值在 0.6);Fr. 4 经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯 1:1)得馏分 Fr. 4-1,经反复重结晶得化合物 6(27.7 mg,石油醚-乙酸乙酯

1:2 层析后 R_f 值在 0.5), Fr. 4-2 经反相硅胶柱(甲醇-水 60:40)得到化合物 7(17 mg, 石油醚-乙酸乙酯 1:2 层析后 R_f 值在 0.4); Fr. 5 经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯 1:1)后再经反相硅胶(甲醇-水 70:30)进一步纯化后, 反复重结晶得到化合物 9(19.4 mg, 石油醚-乙酸乙酯 1:2 层析后 R_f 值在 0.3)。

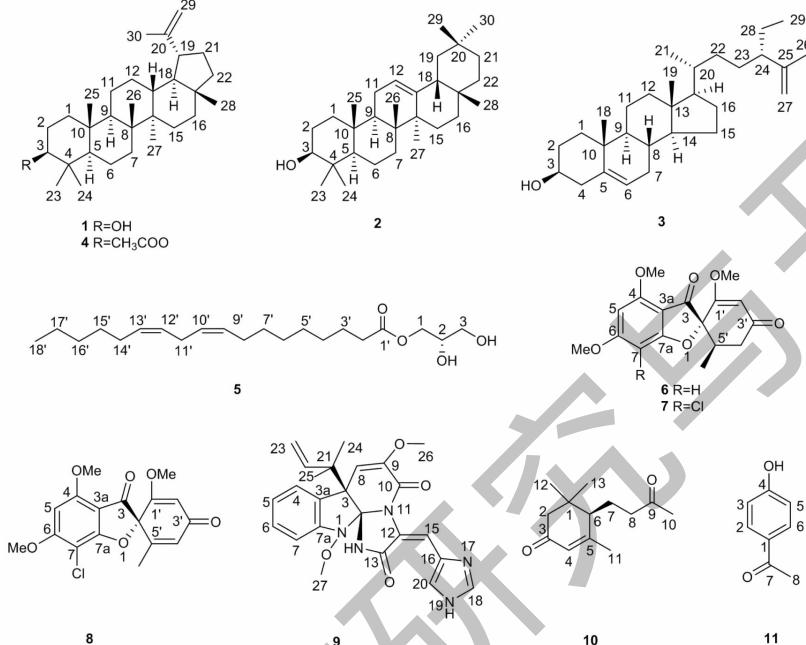


图 1 化合物 1~11 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-11

3 结构鉴定

3.1 红冬蛇菰化学成分鉴定

化合物 1 白色固体(CH_2Cl_2); $[\alpha]_D^{20} + 40.4^\circ$ ($c 0.08, \text{CH}_2\text{Cl}_2$); ESI-MS: m/z 449.1 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺; 分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$ ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.69 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 3.19 (1H, dd, $J = 11.0, 4.8$ Hz, H-3), 2.38 (1H, m, H-19), 1.92 (1H, m, H-21a), 1.67 (3H, s, CH_3 -30), 1.03 (3H, s, CH_3 -26), 0.97 (3H, s, CH_3 -23), 0.95 (3H, s, CH_3 -27), 0.83 (3H, s, CH_3 -25), 0.79 (3H, s, CH_3 -28), 0.76 (3H, s, CH_3 -24); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 150.9 (C-20), 109.3 (C-29), 79.0 (C-3), 55.3 (C-5), 50.4 (C-9), 48.3 (C-18), 48.0 (C-19), 43.0 (C-17), 42.8 (C-14), 40.8 (C-8), 40.0 (C-22), 38.9 (C-4), 38.7 (C-1), 38.0 (C-13), 37.2 (C-10), 35.6 (C-16), 34.3 (C-7), 29.8 (C-21), 28.0 (C-2), 27.4 (C-23), 27.4 (C-15), 25.1 (C-12), 20.9 (C-11), 19.3 (C-30), 18.3 (C-6), 18.0 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9

所有化合物均通过薄层色谱以及高压液相色谱分析检查纯度后采集核磁与质谱等波谱信息, 并根据质谱、核磁波谱数据分析以及与文献对照的方法鉴定了它们的结构, 化合物 6 和 9 进一步采用 X 射线单晶衍射验证了化合物的结构, 化合物结构见图 1。

(C-26), 15.3 (C-24), 14.5 (C-27)。以上数据与文献^[7]对照基本一致, 鉴定该化合物为羽扇豆醇。

化合物 2 白色固体(CH_2Cl_2); $[\alpha]_D^{20} + 321.8^\circ$ ($c 0.02, \text{CH}_2\text{Cl}_2$); ESI-MS: m/z 427.5 [$\text{M} + \text{H}$]⁺; 分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$ ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.19 (1H, t, $J = 3.4$ Hz, H-12), 3.24 (1H, m, H-3), 1.14 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), 0.97 (3H, s, CH_3), 0.94 (3H, s, CH_3), 0.88 (3H, s, CH_3), 0.84 (3H, s, CH_3), 0.80 (3H, s, CH_3), 0.75 (3H, s, CH_3); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 145.4 (C-13), 121.9 (C-12), 79.2 (C-3), 55.4 (C-5), 47.9 (C-9), 47.4 (C-18), 47.0 (C-19), 41.9 (C-14), 40.0 (C-8), 38.9 (C-4), 38.8 (C-1), 37.3 (C-10), 37.2 (C-22), 34.9 (C-21), 33.6 (C-7), 32.9 (C-17), 32.7 (C-29), 31.3 (C-20), 28.6 (C-23), 28.3 (C-28), 27.4 (C-2), 27.2 (C-15), 26.4 (C-16), 26.2 (C-27), 23.9 (C-30), 23.7 (C-11), 18.6 (C-6), 17.0 (C-26), 15.8 (C-24), 15.7 (C-25)。以上数据与文献^[5]对照基本一致, 鉴定该

化合物为 β -香树脂醇。

化合物3 白色固体(CH_2Cl_2) ; $[\alpha]_D^{20} -31.8^\circ$ (*c* 0.2, CH_2Cl_2) ; ESI-MS: *m/z* 413.4 [$\text{M} + \text{H}]^+$; 分子式 $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.35 (1H, s, H-6), 4.73 (1H, dd, *J* = 1.4, 2.5 Hz, H-27a), 4.64 (1H, dd, *J* = 1.4, 2.5 Hz, H-27b), 3.52 (1H, m, H-3), 2.27 (2H, m, H-4a, H-24), 1.99 (2H, m, H-4b, H-7a), 1.84 (4H, m, H-7b, H-15a, H-16a, H-20), 1.57 (3H, s, H-26), 1.49 (6H, m, H-8, H-9, H-11a, H-17, H-28), 0.91 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.80 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-29), 0.67 (3H, s, H-19); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 147.8 (C-25), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 111.6 (C-27), 72.0 (C-3), 56.9 (C-14), 56.2 (C-17), 50.3 (C-9), 49.7 (C-24), 42.5 (C-13), 42.5 (C-4), 40.0 (C-12), 37.5 (C-1), 36.7 (C-10), 35.7 (C-20), 33.9 (C-22), 32.1 (C-8), 31.9 (C-7), 29.6 (C-23), 28.4 (C-16), 26.7 (C-28), 24.5 (C-15), 21.3 (C-11), 19.6 (C-19), 18.9 (C-21), 18.0 (C-26), 12.2 (C-29), 12.0 (C-18)。以上数据与文献^[8]对照基本一致, 鉴定该化合物为酇桐甾醇。

化合物4 白色固体(CH_2Cl_2) ; $[\alpha]_D^{20} +112.4^\circ$ (*c* 0.2, CH_2Cl_2) ; ESI-MS: *m/z* 491.8 [$\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.68 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 4.45 (1H, m, H-3), 2.04 (3H, s, CH_3COO), 1.69 (3H, s), 1.03 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.86 (3H, s), 0.84 (3H, s), 0.77 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 171.2 (CH_3CO), 151.2 (C-20), 109.6 (C-30), 81.2 (C-3), 55.6 (C-5), 50.6 (C-9), 48.5 (C-18), 48.2 (C-19), 42.2 (C-17), 42.0 (C-14), 41.1 (C-8), 40.2 (C-22), 38.6 (C-1), 38.3 (C-13), 38.0 (C-4), 37.3 (C-10), 35.8 (C-16), 34.4 (C-7), 30.1 (C-21), 28.2 (C-23), 27.6 (C-15), 25.3 (C-12), 23.9 (C-2), 21.5 (CH_3CO), 21.2 (C-11), 19.5 (C-29), 18.4 (C-6), 18.3 (C-28), 16.7 (C-24), 16.4 (C-25), 16.2 (C-26), 14.7 (C-27)。以上数据与文献^[9]对照基本一致, 鉴定该化合物为乙酸蛇麻脂醇酯。

化合物5 无色油状物 (MeOH) ; $[\alpha]_D^{20} +147.2^\circ$ (*c* 0.03, MeOH) ; ESI-MS: *m/z* 377.7 [$\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_4$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.38 ~ 5.35 (4H, m, H-9', 10', 12', 13'), 4.21 (1H, dd, *J* = 11.6, 4.6 Hz, H-1b), 4.15 (1H, dd, *J* = 11.7, 6.0 Hz, H-1b), 3.91 ~ 3.96 (1H, m, H-2),

3.68 ~ 3.72 (1H, dd, *J* = 11.8, 5.3 Hz, H-3b), 3.58 ~ 3.62 (1H, dd, *J* = 11.8, 5.8 Hz, H-3a), 2.77 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, H-11'), 2.34 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, H-2'), 2.05 (4H, m, H-8', 14'), 1.62 ~ 1.65 (2H, m, H-3'), 1.37 ~ 1.30 (14H, m, H-4', 5', 6', 7', 15', 16', 17'), 0.87 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-18'); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.5 (C-1'), 130.4 (C-9' or 13'), 130.2 (C-13' or 9'), 128.3 (C-12' or 10'), 127.9 (C-10' or 12'), 70.5 (C-2), 65.4 (C-1), 63.5 (C-3), 34.4 (C-2'), 31.7 (C-16'), 29.8, 29.6, 29.4, 29.3 ($\times 2$) (C-4', 5', 6', 7', 15'), 27.4 (C-8' or 14'), 27.4 (C-14' or 8'), 25.8 (C-11'), 25.1 (C-3'), 22.8 (C-17'), 14.3 (C-18')。以上数据与文献对照基本一致^[10], 鉴定该化合物为亚油酸甘油酯。

3.2 红冬蛇菰内生真菌 *P. coprophilum* Mzz9 化学成分鉴定

化合物6 白色固体(CH_2Cl_2) ; $[\alpha]_D^{20} +230.7^\circ$ (*c* 0.04, CH_2Cl_2) ; ESI-MS: *m/z* 341.7 [$\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.22 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-5), 6.03 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-7), 5.52 (1H, s, H-2'), 3.90 (3H, s, 1'- OCH_3), 3.88 (3H, s, 6- OCH_3), 3.61 (3H, s, 4- OCH_3), 3.04 (1H, dd, *J* = 16.6, 3.2 Hz, H-4'a), 2.70 ~ 2.76 (1H, m, H-5'), 2.39 (1H, dd, *J* = 16.7, 4.6 Hz, H-4'b), 0.94 (3H, t, *J* = 6.7 Hz, 5'- CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 197.5 (C-3'), 192.6 (C-3), 176.2 (C-7a), 171.5 (C-6), 170.6 (C-1'), 159.3 (C-4), 104.9 (C-2'), 104.5 (C-3a), 93.5 (C-5), 90.0 (C-2), 88.7 (C-7), 56.8 (4- OCH_3), 56.5 (1'- OCH_3), 56.2 (6- OCH_3), 40.2 (C-4'), 36.7 (C-5'), 14.4 (5'- CH_3)。以上数据和文献^[11,12]报道基本一致, 并经 X 射线单晶衍射分析验证, 测试的晶体为白色针状晶体, 晶体大小为 0.15 mm × 0.12 mm × 0.1 mm, 晶体密度为 1.408 cm³, 晶胞参数: 3 组棱长为 $a = 5.64455(16)$ Å, $b = 32.5525(8)$ Å, $c = 8.1754(2)$ Å, 轴角为 $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 90.598^\circ(3)$, 属单斜晶系, 体积为 1 502.10(7) Å³, 晶体结构见图 2a, 鉴定该化合物为去氯灰黄霉素。

化合物7 白色固体(CH_2Cl_2) ; $[\alpha]_D^{20} +433.6^\circ$ (*c* 0.02, CH_2Cl_2) ; ESI-MS: *m/z* 375.6 [$\text{M} + \text{Na}]^+$; 分子式 $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClO}_6$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.16 (1H, s, H-5), 5.53 (1H, s, H-2'), 4.04 (3H, s,

6-OCH_3) , 4.02 (3H, s, 4-OCH₃) , 3.61 (3H, s, 1'-OCH₃) , 3.03 (1H, dd, $J = 16.4$ Hz, H-4'a) , 2.84 (1H, m, H-5') , 2.40 (1H, dd, $J = 16.5$, 4.6 Hz, H-4'b) , 0.96 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 5'-CH₃) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 197.2 (C-3') , 192.6 (C-3) , 171 (C-1') , 169.9 (C-7a) , 165 (C-6) , 158.4 (C-4) , 105.0 (C-3a) , 104.0 (C-2') , 90 (C-2) , 89.7 (C-5) , 57.3 (4-OCH₃) , 56.8 (6-OCH₃) , 56.6 (1'-OCH₃) , 40.2 (C-4') , 36.6 (C-5') , 14.4 (5'-CH₃) 。以上数据和文献^[11,12]报道基本一致, 鉴定该化合物为灰黄霉素。

化合物 8 白色固体 (CH₂Cl₂) ; $[\alpha]_D^{20} + 69.2^\circ$ ($c 0.01$, CH₂Cl₂) ; ESI-MS: m/z 349.1 [M-H]⁺, 分子式 C₁₇H₁₆ClO₆。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.24 (1H, s, H-4') , 6.12 (1H, s, H-5) , 5.81 (1H, s, H-2') , 3.84 (3H, s, 4-OCH₃) , 3.67 (3H, s, 6-OCH₃) , 3.41 (3H, s, 1'-OCH₃) , 1.26 (3H, s, 5'-CH₃) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 199.9 (C-3') , 199.9 (C-3) , 168.0 (C-6) , 167.0 (C-1') , 163.4 (C-7a) , 157.3 (C-4) , 156.3 (C-5') , 129.7 (C-4') , 108.8 (C-2') , 107.7 (C-3a) , 93.7 (C-5) , 91.2 (C-2) , 75.0 (C-7) , 56.0 (4-OCH₃) , 55.9 (6-OCH₃) , 55.8 (1'-OCH₃) , 19.2 (5'-CH₃) 。以上数据和文献^[13]报道基本一致, 鉴定该化合物为脱氢灰黄霉素。

化合物 9 白色固体 (CH₂Cl₂) ; $[\alpha]_D^{20} - 281.2^\circ$ ($c 0.01$, CH₂Cl₂) ; ESI-MS: m/z 448.4 [M+H]⁺; 分

子式 C₂₄H₂₅N₅O₄。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.58 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-4) , 7.09 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5) , 7.28 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-6) , 6.98 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-7) , 5.12 (1H, s, H-8) , 8.31 (1H, s, H-15) , 7.52 (1H, s, H-18) , 7.25 (1H, s, H-20) , 6.12 (1H, br s, H-22) , 5.10 (1H, br d, $J = 14.0$ Hz, H-23a) , 5.05 (1H, br d, $J = 18.3$ Hz, H-23b) , 12.05 (1H, br s, NH-14) , 7.43 (1H, s, H-18) , 6.08 (1H, br s, H-22) , 1.27 (3H, s, H-24) , 1.33 (3H, s, H-25) , 3.74 (3H, s, 27-OCH₃) , 3.64 (3H, s, 26-OCH₃) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 101.7 (C-2) , 52.6 (C-3) , 146.8 (C-3a) , 123.7 (C-4) , 123.0 (C-5) , 128.8 (C-6) , 112.3 (C-7) , 146.8 (C-7a) , 107.0 (C-8) , 125.0 (C-9) , 157.6 (C-10) , 123.0 (C-12) , 166.2 (C-13) , 110.3 (C-15) , 126.4 (C-16) , 136.9 (C-18) , 134.7 (C-20) , 42.6 (C-21) , 142.9 (C-22) , 114.3 (C-23) , 24.3 (C-24) , 23.9 (C-25) , 55.9 (C-27) , 65.5 (C-26) 。以上数据和文献^[14]报道基本一致, 并经 X 射线单晶衍射分析验证, 测试晶体为白色块状晶体, 晶体密度为 1.327 g/cm³, 空间群为 P212121, 晶胞参数: 3 组棱长为 $a = 10.8041(2)$ Å, $b = 13.2474(2)$ Å, $c = 15.6498(2)$ Å, 轴角 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, 属正交晶系, 体积为 2239.90(6) Å³, 晶体结构见图 2b, 鉴定该化合物为 oxaline。

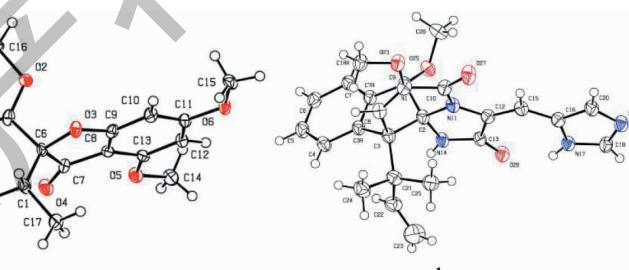


图 2 化合物 6(a) 和 9(b) 的晶体结构

Fig. 2 The X-ray structures of compounds 6 (a) and 9 (b)

化合物 10 淡黄色油状 (CH₂Cl₂) ; $[\alpha]_D^{20} + 161.9^\circ$ ($c 0.07$, MeOH) ; ESI-MS: m/z 230.2 [M+Na]⁺; 分子式 C₁₃H₂₀O₂。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.02 (3H, s, H-11) , 1.06 (3H, s, H-12) , 1.25 (2H, m, H-7) , 1.70 (1H, m, H-6) , 1.99 (3H, s, H-13) , 2.06 (1H, s, H-2a) , 2.38 (1H, s, H-2b) , 2.14 (3H, s, H-10) , 2.53 (2H, m, H-8) , 5.84 (1H, s, H-4) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 36.5 (C-1) , 23.7 (C-2) ,

199.2 (C-3) , 125.8 (C-4) , 164.9 (C-5) , 50.4 (C-6) , 42.7 (C-7) , 47.2 (C-8) , 207.8 (C-9) , 24.8 (C-10) , 27.5 (C-11) , 29.0 (C-12) , 30.3 (C-13) 。以上数据和文献^[15]报道基本一致, 鉴定该化合物为 4-megastigmen-3,9-dione。

化合物 11 黄色油状物 (CH₂Cl₂) ; ESI-MS: m/z 135.1 [M - H]⁻; 分子式 C₈H₈O₂。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.90 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, 2, 6-H) ,

6.92(2H, d, $J = 7.8$ Hz, 3, 5-H), 2.58(3H, s, 8-CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 198.4(C-7), 161.3(C-4), 131.4(C-2, C-6), 130.1(C-1), 115.7(C-3, C-5), 26.5(C-8)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 鉴定该化合物为对羟基苯乙酮。

4 讨论

本研究首次分离并鉴定了广东梅州产名贵中药材红冬蛇菰二氯甲烷提取物的化学成分, 并采用组织块分离法首次从该植物中分离纯化得到17株内生真菌, 从中筛选出一株真菌并鉴定了其次生代谢产物的化学结构。共鉴定了11个化合物, 其中从红冬蛇菰二氯甲烷提取物中分离得到的5个化合物, **1, 2, 4**为三萜类, **3**为甾体类, **5**为有机脂肪酸酯类, 且化合物**1**和化合物**5**为首次从红冬蛇菰中分离得到, 丰富了该植物化学成分的研究。通过形态及ITS基因序列鉴定Mzz9为*P. coprophilum*, 并从该株菌的土豆培养发酵液中分离鉴定了6个化合物, 其中**6~8**为灰黄霉素及其类似物, **9**为生物碱, **10**和**11**为酮类, 均为首次从红冬蛇菰内生真菌中分离得到, 未发现有与红冬蛇菰本身相同的物质。灰黄霉素是一种应用于临床治疗浅部真菌感染的非多烯类抗真菌类药物。化合物**9**是一种微管抑制剂, 能够抑制肿瘤细胞的增殖^[14]。经本实验室测试, 化合物**1~11**对MDCK细胞毒性均大于50 μg/mL, 进一步采用细胞病变法^[17]初步筛选其抗甲型流感病毒活性, 镜下观察各化合物在50 μg/mL的浓度范围内未能抑制病毒所致的细胞病变, 表明化合物**1~11**在该浓度范围内没有明显的抗甲型流感病毒作用。这些工作为进一步系统研究红冬蛇菰及其内生菌提供了参考, 并为合理利用开发和保护红冬蛇菰植物资源提供了一定的科学理论依据。

参考文献

- National Administration of traditional Chinese medicine. Chinese materia medica(中华本草)[M]. Shanghai: Shanghai Science Technology Press, 1999, 2:1266.
- Wang YG. Studies on chemical constituents of *Balanophora polyantha* and the gum resin of *Boswellia carterii*[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2013.
- Tao RJ, Xu XT. The progress of *Balanophora* plants on chemical constituents and pharmacological activity [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2017, 26(7):73-78.
- Zhuang YB, Lin DD, Li YX, et al. Research progress of *Balanophora harlandii*[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2017, 26(8):60-62.
- Teng RW, Wang DZ, Yang CR. Chemical constituents of *Balanophora harlandii* [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2000, 22:225-233.
- Sushanto G, Gitshree D, Sen SK, et al. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance [J]. Front Microbiol, 2016, 7:1538-1550.
- Reynolds WF, Mclean S, Poplawski J, et al. Total assignment of ¹³C and ¹H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ¹H chemical shifts in structural investigations of complex natural products[J]. Tetrahedron, 1986, 42:3419-3428.
- Garg V, Nes W. Codisterol and other Δ⁵-sterols in the seeds of *Cucurbita maxima* [J]. Phytochemistry, 1984, 23: 2925-2929.
- Ruan HL, Zhang YH, Pi HF, et al. Chemical constituents of *Balanophora japonica* Makino[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2006, 18:74-75.
- Okuyama E, Hasegawa T, Matsushita T, et al. Analgesic components of *Saposhnikovia* root (*Saposhnikovia divaricata*) [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(2):154-160.
- Shang Z, Li XM, Li CS, et al. Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus *Nigrospora* sp. MA75 on various culture media [J]. Chem Biodivers, 2012, 9: 1338-1348.
- Choi GJ, Lee HB, Kim KM, et al. Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi[J]. J Microbiol Biotechnol, 2005, 15(1):112-117.
- Levine SG, Hicks RE, Gottlieb HE, et al. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances. XXX. Griseofulvin[J]. J Org Chem, 1975, 40:2540-2542.
- Nagel DW, Pachler KGR, Steyn PS, et al. The chemistry and ¹³C NMR assignments of oxaline, a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*[J]. Tetrahedron, 1976, 32:2625-2631.
- DellaGreca M, Marino CD, Zarrelli A, et al. Isolation and phytotoxicity of apocarotenoids from *Chenopodium album* [J]. J Nat Prod, 2004, 67:1492-1495.
- Chen L, Wang Q, Wu B, et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Disporum cantoniense* (II) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49:4803-4806.
- Lin DG, Luo YZ, Yang G, et al. Potent influenza A virus entry inhibitors targeting a conserved region of hemagglutinin[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 144:35-51.