

剑叶龙血树内生真菌 *Colletotrichum* sp. B-152 次生代谢产物研究

张科涛, 黄之锴, 赵玉瑛, 张冰, 许小蓉, 许玉潇, 赵庆, 张晓梅*

云南中医药大学基础医学院 & 中药学院, 昆明 650500

摘要: 采用色谱技术和波谱学分析从剑叶龙血树内生真菌 *Colletotrichum* sp. B-152 的培养液和菌丝中, 鉴定出了 9 个化合物: 2-hydroxy-4-methyl-1-phenyl-3-pentanone (1)、4-methyl-1-phenyl-2,3-pentanediol (2)、胸腺嘧啶核苷 (3)、腺嘌呤核苷 (4)、(22*E*, 24*R*)-ergosta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol (5)、(4*E*, 8*E*)-*N*-*D*-2'-hydroxypalmitoyl-1-*O*- β -*D*-glycopyranosyl-9-methyl-4, 8-sphingadienine (6)、tuberosider (7)、(22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol (8)、十七烷酸 (9), 其中化合物 1 作为天然产物首次报道, 化合物 2~4, 6, 7, 9 首次从刺盘孢属 *Colletotrichum* 真菌中分离得到。采用滤纸片扩散法对单体化合物的抑菌活性进行测定, 9 个化合物对至少一种指示菌表现出不同程度的抑制作用, 其中化合物 7 和 8 表现出较为广谱的抑菌活性。

关键词: 剑叶龙血树; 内生真菌; 刺盘孢属; 次级代谢产物; 抑菌活性

中图分类号: R284. 2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)12-2056-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.12.009

Study on secondary metabolites of *Colletotrichum* sp. B-152 derived from *Dracaena cochinchinensis*

ZHANG Ke-tao, HUANG Zhi-pu, ZHAO Yu-ying, ZHANG Bing, XU Xiao-rong, XU Yu-xiao, ZHAO Qing, ZHANG Xiao-mei*

College of Basic Medicine & College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Nine compounds were isolated and identified from the fermentation of *Colletotrichum* sp. B-152, which derived from *Dracaena cochinchinensis*, by chromatographic and spectroscopic analysis. They are 2-hydroxy-4-methyl-1-phenyl-3-pentanone (1), 4-methyl-1-phenyl-2,3-pentanediol (2), thymidine (3), adenosine (4), (22*E*, 24*R*)-ergosta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol (5), (4*E*, 8*E*)-*N*-*D*-2'-hydroxypalmitoyl-1-*O*- β -*D*-glycopyranosyl-9-methyl-4, 8-sphingadienine (6), tuberosider (7), (22*E*)-5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol (8), daturic acid (9). Among which, 2-hydroxy-4-methyl-1-phenyl-3-pentanone (1) was reported as natural product for the first time, compounds 2, 4, 6, 7 and 9 were isolated from genus *Colletotrichum* for the first time. The antimicrobial activities of isolated compounds were determined by paper diffusion method. These 9 compounds showed inhibition abilities against more than one pathogens, compounds 7 and 8 showed broad-spectrum antimicrobial activities.

Key words: *Dracaena cochinchinensis*; endophytic; *Colletotrichum* sp.; secondary metabolites; antimicrobial activities

植物内生菌 (endophyte) 是指一类生活在健康植物组织体内但不引起宿主感染病害的微生物, 广泛存在于健康植物组织中, 不仅蕴含丰富的次生代谢产物合成基因簇, 能产生多种活性成分, 还能提高

植物的耐盐、耐旱、耐寒、抗虫等抗逆性^[1,2]。由于内生菌具有多种生物活性, 因此被认为是潜在的药物候选者^[3], 刺盘孢属 (*Colletotrichum*) 含有许多植物内生真菌^[4,5], 刺盘孢属因其丰富的生物合成基因簇而成为多种代谢产物的重要来源, 如环磷酸肽、蒽醌、间苯二甲酸内酯和吡喃酮等^[6,7], 多样性的刺盘孢属的提取物和次生代谢产物已被报道具有抑菌

收稿日期: 2022-03-01 接受日期: 2022-06-15

基金项目: 国家自然科学基金 (21662048); 云南省万人计划“青年拔尖人才”专项 (YNWR-QNBJ-2019-161)

* 通信作者 E-mail: meimeizhang.net@163.com

活性^[8]。

课题组前期发现从百合科(Liliaceae)龙血树属植物(*Dracaena* Vand. ex L.)剑叶龙血树(*Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen)叶片组织中分离到的内生真菌 *Colletotrichum* sp. B-152 具有广谱抑菌活性,故对其进行次生代谢产物的分离纯化,并选取 18 株病原指示菌为靶标,对所获单体化合物进行抑菌活性测试,以期发现具有潜在抑菌活性的化合物。这不但可以为发现新型天然活性化合物提供参考,还对丰富刺盘孢属次生代谢产物及其功能多样性具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株材料

供试菌株:B-152 是课题组从前期采自云南省西双版纳勐腊县勐仑镇的剑叶龙血树叶片组织中分离获得的一株内生真菌。根据分子系统学分析鉴定为刺盘孢 *Colletotrichum* sp.。菌种在斜面培养基上活化好后放入 4 ℃ 冰箱,保存于云南中医药大学天然产物转化与研究实验室。

病原指示菌:大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae* BNCC 338425)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* 1037)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* PA01)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883)、流感嗜血菌(*Hemophilus influenza* ATCC 10211);7 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA 1450、2024、1957、28299、I-20、28300、1591);1 株白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 10231)和 2 株耐氟康唑白色念珠菌临床分离株(drug-resistant *Candida albicans* 63#、1725#)。以上菌株中标准株购于菌种保藏中心,耐药株由云南省曲靖市第一人民医院李宏伟博士提供。

1.1.2 培养基

抑菌测试培养基:指示细菌培养基 LB:胰蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂 15 g/L,pH 7.2 ~ 7.6;真菌培养基:沙氏培养基 50 g/L,琼脂 15 g/L,pH 6.0。

目标菌株发酵培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 L,pH 自然;马铃薯葡萄糖培养基(PDB):马铃薯

200 g,葡萄糖 20 g,水 1 L,pH 自然;发酵培养基:蔗糖 30.0 g,NaNO₃ 2.0 g,K₂HPO₄ 1.0 g,MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g,KCl 0.5 g,FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g,水 1 L,pH 自然。

1.1.3 仪器与试剂

GR-200 电子分析天平(广州艾欣科学仪器有限公司);ES-315 高压蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司);LRH-250 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司);SW-CJ-2FD 洁净工作台(Airtech 公司);N-1100 旋转蒸发仪(东京理化器械独资工厂);低温冷却水循环泵(郑州长盛实验仪器有限公司);AM-400、DRX-500 核磁共振波谱仪(Bruker 公司);G6230 型高分辨质谱仪(Agilent 公司);GF₂₅₄ 薄层析硅胶板、正相柱层析硅胶、反相柱层析 ODS(青岛海洋化工厂);TLC Silica gel 60 F254(德国 MERCK 公司);培养基所用材料(Thermo Fisher Oxoid 公司);无机化学试剂(天津致远化学仪器有限公司);有机化学试剂(天津富宇精细化工有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 真菌的活化及发酵

将保藏于 4 ℃ 的菌株 B-152 接种到 PDA 上置于 28 ℃ 培养箱中活化培养 7 天,再接种到含有 40 mL PDB 的 100 mL 三角瓶中培养 3 天(28 ℃、200 r/min)后得到种子培养液,将种子培养液按 10% 接种量接种到扩大发酵的液体培养基中,振荡培养 7 d(28 ℃、200 r/min),共发酵 60 L。

1.2.2 发酵产物的提取与分离

用四层纱布过滤发酵液,分别得到菌液和菌丝,菌液中加入等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,菌丝中加入丙酮超声浸提,直至提取液用 TLC 检测无明显斑点,合并提取液,减压浓缩回收有机溶剂,得到粗提物,粗提物经 95% MeOH-PE 分配法脱脂,得到石油醚相(18.9 g)和甲醇相(17.5 g)。

粗提物甲醇相经 MCI 色谱柱,以蒸馏水、30%、50%、70%、100% 含水甲醇梯度洗脱,不同馏分经 TLC 检测,在 254、365 nm 下观察,以及碘、硫酸乙醇、碘化铍钾显色,合并得到 7 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 7)。Fr. 1(5.79 g)经 MCI 色谱柱以蒸馏水、30%、50%、70% 含水甲醇梯度洗脱得到 11 个组分(Fr. 1.1 ~ Fr. 1.11),Fr. 1.3(892.3 mg)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(甲醇)洗脱得到 5 个组分(Fr. 1.3.1 ~ Fr. 1.3.5),Fr. 1.3.5(392.9 mg)经 Sephadex LH-

20 葡聚糖凝胶柱(氯仿:甲醇=1:1)洗脱得到10个组分(Fr. 1. 3. 5. 1 ~ Fr. 1. 3. 5. 10), Fr. 1. 3. 5. 5 (66.2 mg)经正相硅胶柱(氯仿:甲醇=20:1)洗脱得到化合物**3**(3.0 mg); Fr. 1. 3. 5. 9(97.9 mg)经正相硅胶柱(氯仿:甲醇=20:1)洗脱得到化合物**4**(2.2 mg)。Fr. 3(1.01 g)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(甲醇)洗脱得到8个组分(Fr. 3. 1 ~ Fr. 3. 8), Fr. 3. 2(501.9 mg)经正相硅胶柱(石油醚:丙酮=20:1)洗脱得到化合物**2**(10 mg); Fr. 3. 3(407.4 mg)经正相硅胶柱(石油醚:丙酮=10:1)洗脱得到化合物**1**(4 mg)。Fr. 4(4.40 g)经正相硅胶柱(氯仿:甲醇=100:1, 50:1, 30:1, 20:1, 10:1, 8:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1)梯度洗脱得到21个组分(Fr. 4. 1 ~ Fr. 4. 21); Fr. 4. 11(221.4 mg)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(氯仿:甲醇=1:1)洗脱得到5个组分(Fr. 4. 11. 1 ~ Fr. 4. 11. 5), Fr. 4. 11. 2(111.7 mg)经正相硅胶柱(氯仿:甲醇=100:1, 50:1, 20:1)梯度洗脱得到5个组分(Fr. 4. 11. 2. 1 ~ Fr. 4. 11. 2. 5), Fr. 4. 11. 2. 2(19 mg)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(氯仿:甲醇=1:1)洗脱得到化合物**5**(11.6 mg); Fr. 4. 14(51.7 mg)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(甲醇)洗脱得到4个组分(Fr. 4. 14. 1 ~ Fr. 4. 14. 4), Fr. 4. 14. 4(234 mg)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(甲醇)洗脱得到5个组分(Fr. 4. 14. 4. 1 ~ Fr. 4. 14. 4. 5), Fr. 4. 14. 4. 4(44 mg)经正相硅胶柱(氯仿:甲醇=15:1)洗脱得到化合物**6**(20.1 mg); Fr. 4. 16(94.2 mg)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(甲醇)洗脱得到6个组分(Fr. 4. 16. 1 ~ Fr. 4. 16. 6), Fr. 4. 16. 5(44 mg)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(甲醇)洗脱得到4个组分(Fr. 4. 16. 5. 1 ~ Fr. 4. 16. 5. 4), Fr. 4. 16. 5. 3(13.2 mg)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱(甲醇)洗脱得到化合物**7**(6.0 mg)。Fr. 5(1.15 g)经 RP-C-18 反相以70%、80%、90%、100%含水甲醇梯度洗脱得到6个组分(Fr. 5. 1 ~ Fr. 5. 6), Fr. 5. 4(386.2 mg)经正相硅胶柱(氯仿:甲醇=100:1, 50:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1)梯度洗脱得到15个组分(Fr. 5. 4. 1 ~ Fr. 5. 4. 15), Fr. 5. 4. 5(55.5 mg)经正相硅胶柱(石油醚:丙酮=20:1, 10:1, 5:1, 2:1)梯度洗脱得到5个组分(Fr. 5. 4. 5. 1 ~ Fr. 5. 4. 5. 5), 其中 Fr. 5. 4. 5. 3 为化合物**8**(10.6 mg); Fr. 5. 4. 5. 2(17.4 mg)经正相硅胶柱(石油醚:乙酸乙酯=30:1)洗脱得到化合物**9**(3.0 mg)。

1.2.3 抑菌活性测试

指示细菌接种至液体 LB 培养基, 37 °C、180 r/min 黑暗培养 12 h, 白色念珠菌接种至液体沙氏培养基 28 °C、180 r/min 黑暗培养 24 h, 用液体培养基将各菌液分别稀释为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU/mL 的菌悬液, 备用。

采用滤纸片扩散法^[9]对单体化合物进行抑菌实验。取菌悬液 300 μ L 均匀涂布于固体平板培养基(细菌涂布于固体 LB 培养基, 真菌涂布于固体沙氏培养基), 用丙酮、甲醇或 DMSO 溶解化合物至质量浓度为 5 μ g/ μ L, 分别取待测化合物 10 μ L 用微量进样器加到滤纸片(直径为 6 mm)上, 待溶剂挥发后贴于已涂供试菌悬液的琼脂培养基上进行活性检测, 以等量的抗生素做阳性对照(枯草芽孢杆菌的阳性对照为 10 μ g)。在实验中, 以卡那霉素(kanamycin sulfate, Kan)作为革兰氏阴性菌的阳性对照, 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)作为革兰氏阳性菌的阳性对照, 以万古霉素(vancomycin, Van)作为 MRSA 的阳性对照, 以两性霉素 B(amphotericin B, AmB)作为白色念珠菌临床耐药株的阳性对照, 白色念珠菌 28 °C 培养, 指示细菌于 37 °C 培养, 恒温培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物**1** 白色固体, 易溶于丙酮等有机溶剂; ESI-MS: m/z 215 [$M + Na$]⁺; 推测分子式为 $C_{12}H_{16}O_2$; ¹H NMR 谱中呈现了5个苯环氢信号(δ_H 7.28 ~ 7.17, 5 H, m); 2个次甲基信号: δ_H 3.04(1H, m), 4.48(1H, m); 1个亚甲基信号: δ_H 3.10(1H, dd, $J = 13.9, 6.9$ Hz), 2.79(1H, dd, $J = 14.0, 8.1$ Hz); 2个甲基信号: δ_H 1.10(3 H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.0(3 H, d, $J = 6.7$ Hz)。¹³C NMR 谱中显示该化合物共有12个碳原子, 其中包括6个苯环碳信号 δ_C 127.1(d), 129.0(d), 129.0(d), 130.4(d), 130.4(d), 139.1(s); 2个次甲基碳信号 δ_C 77.1(d), 36.7(d); 1个亚甲基碳信号 δ_C 40.8(t); 2个甲基碳信号 δ_C 18.1(q), 19.1(q), 1个羰基碳信号 δ_C 216.1(s)。经文献查阅, 仔细对比¹H 和¹³C NMR 数据发现化合物**1**的结构与已知化合物 4-methyl-1-phenyl-2,3-pentandiol(**2**)的结构最为相似^[10], 二者差别在于化合物**1**中的羰基碳信号(δ_C 216.1, s)对应于 4-methyl-1-phenyl-2,3-pentandiol(**2**)中为一个羟基碳信号。结合 HSQC、HMBC 和¹H-¹H COSY 谱图对其

碳氢数据进行进一步归属和验证。HMBC 谱中亚甲基质子 H-1 与 C-2、C-1', 2', 6' 有相关信号, 甲基质子 H-5、H-6 与 C-4 有相关信号(见图 1); 综合上述信息, 鉴定化合物 **1** 为 2-hydroxy-4-methyl-1-phenyl-3-pentanone(结构见图 2); 化合物 **1** 的结构已有报道^[11], 但完整的核磁数据未见报道, 本文报道其 NMR 数据如下: ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 7.28 ~ 7.17 (5H, m), 4.48 (1H, m, H-2), 3.10 (1H,

dd, $J = 13.9, 6.9$ Hz, H-1), 3.04 (1H, m, H-4), 2.79 (1H, dd, $J = 14.0, 8.1$ Hz, H-1), 1.10 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-5), 1.0 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 40.8 (t, C-1), 77.1 (d, C-2), 216.1 (s, C-3), 36.7 (d, C-4), 18.1 (q, C-5), 19.1 (q, C-6), 139.1 (s, C-1'), 129.0 (d, C-2', C-6'), 130.4 (d, C-3', C-5'), 127.1 (d, C-4')。

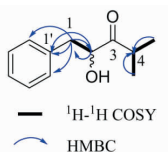


图 1 化合物 **1** 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 信号

Fig. 1 The key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound **1**

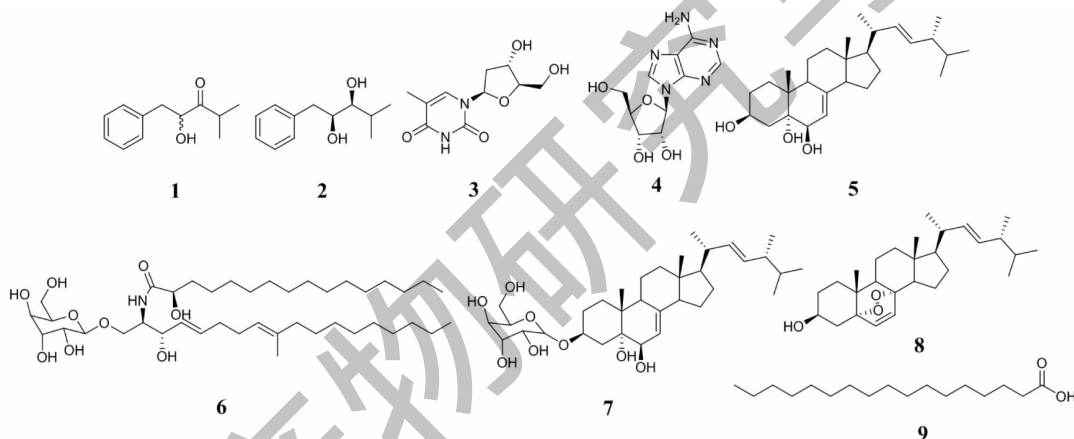


图 2 化合物 **1** ~ **9** 的结构式

Fig. 2 Chemical structures of compounds **1-9**

化合物 2 无色针状结晶, 易溶于氯仿和丙酮等有机溶剂; ESI-MS: m/z 217 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_2$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.26 ~ 7.31 (5H, m), 3.87 (1H, m, H-2), 3.40 (1H, m, H-3), 2.93 (1H, dd, $J = 13.5, 5.5$ Hz, H-1), 2.73 (1H, dd, $J = 13.5, 8.0$ Hz, H-1), 1.87 (1H, m, H-4), 1.03 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-5), 0.96 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 37.2 (t, C-1), 73.2 (d, C-2), 79.1 (d, C-3), 29.7 (d, C-4), 18.3 (q, C-5), 19.0 (q, C-6), 138.5 (s, C-1'), 128.7 (d, C-2', C-6'), 129.4 (d, C-3', C-5'), 126.6 (d, C-4')。以上数据与文献^[10] 比对, 鉴定化合物 **2** 为 4-methyl-1-phenyl-2,3-pentanediol。

化合物 3 白色粉末, 易溶于甲醇等有机溶剂;

ESI-MS: m/z 243 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.80 (1H, s, H-6), 6.27 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 4.39 (1H, m, H-3'), 3.89 (1H, dd, $J = 6.5, 3.0$ Hz, H-4'), 3.78 (1H, m, H-5'a), 3.72 (1H, m, H-5'b), 2.23 (2H, m, H-2'), 1.87 (3H, s, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 152.3 (s, C-2), 166.4 (s, C-4), 111.5 (s, C-5), 138.1 (d, C-6), 86.2 (d, C-1'), 41.1 (t, C-2'), 72.2 (d, C-3'), 88.8 (d, C-4'), 62.8 (t, C-5'), 12.6 (q, CH_3)。以上数据与文献^[12] 比对, 鉴定化合物 **3** 为胸腺嘧啶核苷。

化合物 4 白色粉末, 易溶于水微溶于甲醇; ESI-MS: m/z 268 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.31 (1H, s, H-

9), 8.17 (1H, s, H-4), 5.95 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 4.73 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, H-2'), 4.31 (1H, dd, $J = 12.5, 2.5$ Hz, H-3'), 4.16 (1H, dd, $J = 5.1, 1.9$ Hz, H-4'), 3.87 (1H, dd, $J = 12.6, 2.6$ Hz, H-5'a), 3.73 (1H, dd, $J = 12.5, 2.7$ Hz, H-5'b); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 150.0 (s, C-2), 153.4 (d, C-4), 157.6 (s, C-6), 121.0 (s, C-7), 142.0 (d, C-9), 91.2 (d, C-1'), 75.5 (d, C-2'), 72.7 (d, C-3'), 88.2 (d, C-4'), 63.5 (t, C-5')。以上数据与文献^[12] 比对, 鉴定化合物 **4** 为腺嘌呤核苷。

化合物 5 无色针状结晶, 易溶于氯仿和甲醇等有机溶剂; ESI-MS: m/z 453 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 5.27 (1H, dd, $J = 5.0, 2.4$ Hz, H-7), 5.24 (1H, dd, $J = 15.2, 7.4$ Hz, H-23), 5.22 (1H, dd, $J = 15.2, 8.1$ Hz, H-22), 3.98 (1H, m, H-3), 3.56 (1H, s, H-6), 1.07 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.94 (3H, d, $J = 3.9$ Hz, H-28), 0.88 (3H, d, $J = 4.5$ Hz, H-26), 0.87 (3H, d, $J = 4.5$ Hz, H-27), 0.66 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 31.8 (t, C-1), 34.0 (t, C-2), 68.4 (d, C-3), 40.7 (t, C-4), 77.0 (s, C-5), 74.2 (d, C-6), 119.1 (d, C-7), 143.8 (d, C-8), 44.4 (d, C-9), 38.2 (s, C-10), 23.0 (t, C-11), 40.5 (t, C-12), 44.7 (s, C-13), 55.9 (d, C-14), 24.0 (t, C-15), 29.2 (t, C-16), 57.4 (d, C-17), 12.8 (q, C-18), 18.9 (q, C-19), 41.8 (d, C-20), 21.7 (q, C-21), 137.0 (d, C-22), 133.2 (d, C-23), 44.4 (d, C-24), 34.4 (d, C-25), 20.1 (q, C-26), 20.4 (q, C-27), 18.2 (q, C-28)。以上数据与文献^[13,14] 比对, 鉴定化合物 **5** 为 (22*E*, 24*R*)-ergosta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol。

化合物 6 白色固体, 易溶于甲醇等有机溶剂; ESI-MS: m/z 727 $[\text{M}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{NO}_9$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.74 (1H, dt, $J = 15.4, 5.4$ Hz, H-5), 5.51 (1H, dd, $J = 15.4, 6.8$ Hz, H-4), 5.16 (1H, bt, $J = 7.0$ Hz, H-8), 4.28 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.15 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-3), 4.11 (1H, dd, $J = 10.2, 5.6$ Hz, H-1a), 4.00 (1H, m, H-2'), 3.74 (1H, dd, $J = 10.2, 3.6$ Hz, H-1b), 3.66 (1H, m, H-6''a), 3.21 (1H, dd, $J = 9.0, 7.8$ Hz, H-6''b), 3.33 ~ 3.29 (4H, m, H-2'', 3'', 4'', 5''), 2.09 (4H, m, H-10, H-7), 1.99 (2H, m, H-6), 1.61 (3H, s, H-19), 1.41 (2H, m, H-3'), 1.35 ~ 1.25

(38H, s, $\text{CH}_2 \times 19$, H11 ~ 17, H4' ~ 15'), 0.93 (6H, t, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_3 \times 2$, H-18, H-16'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 69.7 (t, C-1), 54.6 (d, C-2), 72.9 (d, C-3), 134.6 (d, C-4), 131.1 (d, C-5), 33.0 (t, C-6), 33.7 (t, C-7), 124.8 (d, C-8), 136.7 (s, C-9), 40.7 (t, C-10), 14.4 (q, C-18), 16.1 (q, C-19), 177.1 (s, C-1'), 73.1 (d, C-2'), 35.8 (t, C-3'), 14.4 (q, C-16'), 104.7 (d, C-1''), 74.9 (d, C-2''), 77.9 (d, C-3''), 71.5 (d, C-4''), 77.9 (d, C-5''), 62.6 (t, C-6''), 30.8 ~ 23.7 (t, C-11 ~ 17, C-4' ~ 15')。以上数据与文献^[15] 比对, 鉴定化合物 **6** 为 (4*E*, 8*E*)-*N*-*D*-2'-hydroxypalmitoyl-1-*O*- β -*D*-glycopyranosyl-9-methyl-4, 8-sphingadienine。

化合物 7 白色粉末, 易溶于甲醇、氯仿等有机溶剂; ESI-MS: m/z 591 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_8$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.31 (1H, t, $J = 2.7$ Hz, H-7), 5.25 (2H, m, H-22, 23), 4.59 (1H, br s, H-6'a), 4.44 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'b), 4.16 (2H, m, H-4'), 3.88 (2H, br d, $J = 8.0$ Hz, H-2'), 3.69 (2H, dd, $J = 9.4, 4.5$ Hz, H-5'), 1.10 (3H, s, H-19), 1.07 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28), 0.98 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.86 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.68 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 34.0 (t, C-1), 30.0 (t, C-2), 76.3 (d, C-3), 38.3 (t, C-4), 76.9 (s, C-5), 74.4 (d, C-6), 119.0 (d, C-7), 143.8 (s, C-8), 44.4 (d, C-9), 37.3 (s, C-10), 23.0 (t, C-11), 40.7 (t, C-12), 44.7 (s, C-13), 55.9 (d, C-14), 24.0 (t, C-15), 29.1 (t, C-16), 57.4 (d, C-17), 12.8 (q, C-18), 20.1 (q, C-19), 41.8 (d, C-20), 21.7 (q, C-21), 137.0 (d, C-22), 133.3 (d, C-23), 44.4 (d, C-24), 34.4 (d, C-25), 20.5 (q, C-26), 18.8 (q, C-27), 18.2 (q, C-28), 102.4 (d, C-1'), 75.1 (d, C-2'), 78.2 (d, C-3'), 71.7 (d, C-4'), 78.0 (d, C-5'), 62.9 (t, C-6')。以上数据与文献^[16] 比对, 鉴定化合物 **7** 为 tuberosid-er。

化合物 8 白色固体, 易溶于丙酮等有机溶剂; ESI-MS: m/z 429 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.51 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.25 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 5.21 (1H, dd, $J = 15.2, 7.4$ Hz, H-23), 5.14 (1H, dd, $J = 15.3, 7.8$ Hz, H-22), 3.97 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.90 (3H, d, $J = 6.4$

H_z, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.83 ~ 0.80 (9H, m, CH₃ × 3, H-18, 26, 27); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 34.8 (t, C-1), 30.2 (t, C-2), 66.5 (d, C-3), 37.1 (t, C-4), 82.3 (s, C-5), 135.5 (d, C-6), 135.3 (d, C-7), 79.5 (s, C-8), 51.2 (d, C-9), 37.1 (t, C-10), 23.5 (t, C-11), 39.5 (t, C-12), 44.7 (d, C-13), 51.8 (d, C-14), 20.7 (t, C-15), 28.7 (t, C-16), 56.3 (d, C-17), 13.0 (q, C-18), 18.3 (q, C-19), 39.8 (d, C-20), 21.0 (q, C-21), 130.8 (d, C-22), 132.4 (d, C-23), 42.9 (d, C-24), 33.2 (d, C-25), 19.7 (q, C-26), 19.6 (q, C-27), 17.7 (q, C-28)。以上数据与文献^[14,17]比对, 鉴定化合物 **8** 为 (22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol。

化合物 9 白色固体, 易溶于丙酮等有机溶剂; ESI-MS: *m/z* 270 [M]⁺, 分子式为 C₁₇H₃₄O₂; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.27 (2H, m, H-16), 1.56 (2H, m, H-15), 1.19 (26H, s, CH₂ × 13, H₂ ~ 14), 0.81 (3H, m, H-1); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 14.1 (q, C-1), 22.7 (t, C-2), 31.9 (t, C-3), 24.7 (t, C-15), 29.1、29.2、29.3、29.4、29.6、29.6、29.6、29.7、29.7、30.9、30.9 (t, C₄ ~ 14), 33.7 (t, C-16), 177.3 (s, C-17)。以上数据与文献^[18]比对, 鉴定化合物 **9** 为十七烷酸。

2.2 抑菌活性检测

在选取的 18 种指示菌进行的抑菌活性实验中, 化合物 **1** ~ **9** 以及对照品的抑菌圈大小见表 1。化合物 **2**、**3**、**4**、**5** 仅对其中一种指示菌显示出有抑菌活性; 化合物 **1** 对枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 和鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 有微弱的抑制作用, 化合物 **6** 对白色念珠菌 ATCC 10231 和耐氟康唑白色念珠菌临床分离株 1725# 具有抑制作用, 化合物 **9** 对大肠杆菌 ATCC 25922 和耐氟康唑白色念珠菌临床分离株 63# 有抑制作用; 化合物 **7** 对 5 株指示菌 (大肠杆菌 ATCC 25922、鲍曼不动杆菌 ATCC 19606、流感嗜血菌 ATCC 10211、MRSA 28299 和白色念珠菌 ATCC 10231) 有抑制作用; 化合物 **8** 的抑菌比较广谱, 对 11 株指示菌都显示出抑菌活性, 包括 3 株革兰氏阳性菌 (枯草芽孢杆菌 ATCC 6633、肺炎链球菌 BNCC 338425 和耻垢分枝杆菌 1037)、3 株革兰氏阴性菌 (大肠杆菌 ATCC 25922、鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 和肺炎克雷伯菌 BNCC 338425)、4 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA 2024、1957、28299、28300) 和 1 株指示真菌 (白色念珠菌 ATCC 10231) 均有不同程度的抑制作用, 其中对鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 的抑菌活性最好, 抑菌圈达到 12.00 mm。

表 1 *Colletotrichum* sp. B-152 代谢产物的抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* sp. B-152

指示菌 Pathogen	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Amp	Kan	Van	AmB
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	6.50	-	-	-	-	-	-	7.00	-	35.00	#	#	#
<i>S. pneumoniae</i> BNCC 338425	-	-	-	-	-	-	-	6.50	-	15.00	#	#	#
<i>M. smegmatis</i> 1037	-	-	-	-	-	-	-	7.00	-	24.00	#	#	#
<i>P. aeruginosa</i> PA01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	7.00	#	#
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	7.00	8.00	6.50	#	19.00	#	#
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	7.00	12.00	-	-	-	-	6.50	12.00	-	#	23.00	#	#
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-	-	-	-	-	9.00	-	#	26.00	#	#
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	-	-	-	-	-	-	7.00	-	-	#	19.00	#	#
MRSA 1450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	27.00	#
MRSA 2024	-	-	-	-	-	-	-	8.00	-	#	#	21.00	#
MRSA 1957	-	-	-	-	6.50	-	-	7.00	-	#	#	23.00	#
MRSA 28299	-	-	7.00	8.00	-	-	6.50	6.50	-	#	#	25.00	#
MRSA I-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	25.00	#
MRSA 28300	-	-	-	-	-	-	-	8.00	-	#	#	28.00	#
MRSA 1591	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	30.00	#

续表 1 (Continued Tab. 1)

指示菌 Pathogen	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Amp	Kan	Van	AmB
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	8.00	7.00	6.50	-	#	#	#	17.00
Drug-resistant <i>C. albicans</i> 63#	-	-	-	-	-	-	-	-	6.50	#	#	#	10.00
Drug-resistant <i>C. albicans</i> 1725#	-	-	-	-	-	7.00	-	-	-	#	#	#	16.00

注:抑菌圈直径包含滤纸片直径(滤纸片直径 6.00mm);“-”代表在给药剂量下无抑菌活性;“#”表示未进行该项测试。

Note: The diameter of bacteriostatic zone includes the diameter of filter paper (filter paper diameter is 6.00 mm);“-” represents no antibacterial activity at the dose given;“#” represents this test was not performed.

3 讨论与结论

我们从剑叶龙血树分离保存的内生真菌 *Colletotrichum* sp. B-152 的次生代谢产物中共分离出 9 个化合物, 化合物 **2**~**4**、**6**、**7**、**9** 为首次从刺盘孢属真菌中分离得到。其中 2-hydroxy-4-methyl-1-phenyl-3-pentanone (**1**) 作为天然产物首次报道。从抑菌活性结果来看, 化合物 **5**、**7** 和 **8** 的结构为同系列化合物, 但表现出的活性不一样, 其构效关系有待进一步的研究验证; 化合物 **2** 对鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 抑菌活性强于化合物 **1**, 这可能与两个化合物结构在 3 号位的取代基不同有关。此外, 已有研究表明腺嘌呤核苷 (**4**) 具有体外抗流感病毒 (H1N1) 的活性^[19]; (22*E*, 24*R*)-ergosta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol (**5**) 对胃癌 SGC-7901 细胞有较强抑制活性^[20]; (4*E*, 8*E*)-*N*-*D*-2'-hydroxypalmitoyl-1-*O*- β -*D*-glycopyranosyl-9-methyl-4, 8-sphingadienine (**6**) 对单纯疱疹病毒 (HSV-1) 的抑制活性是阳性药利巴韦林的 20 倍, 对肠道病毒 71 (EV71) 的抑制活性是阳性药利巴韦林活性的 5 倍^[21]; tuberosider (**7**) 有较强的抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 和狗肾细胞 MDCK 增殖的活性^[22]; (22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol (**8**) 对小鼠肺腺癌细胞 A-549 有一定的抑制作用^[23]。这些研究表明从刺盘孢 *Colletotrichum* 真菌分离的化合物在抑菌、抗病毒和抗肿瘤方面具有良好的活性, 也为发掘新型抗菌药物及活性天然产物提供了新的依据。

参考文献

- Vasundhara M, Kumar A, Reddy MS, et al. Molecular approaches to screen bioactive compounds from endophytic fungi [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:01774.
- Yan L, Zhu J, Zhao X, et al. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103:3327-3340.
- Nisa H, Kamili AN, Nawchoo IA, et al. Fungal endophytes as

- prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products; a review [J]. *Microb Pathog*, 2015, 82:50-59.
- Zhou SX, Qiao LJ, Ma XY, et al. Diversity and distribution of endophytic *Colletotrichum* in *Nothapodytes pittosporoides* [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2020, 39:1263-1280.
 - Zhang XY, Li SJ, Yan K, et al. Diversity analysis of endophytic fungi isolated from *Gentiana rhodantha* and screening for biocontrol stains [J]. *Mol Breed* (分子植物育种), 2021, 19:4714-4725.
 - Kim JW, Shim SH. The fungus *Colletotrichum* as a source for bioactive secondary metabolites [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42:735-753.
 - Bang S, Lee C, Kim S, et al. Neuroprotective glycosylated cyclic lipodepsipeptides, colletotrichamides A-E, from a halophyte-associated fungus, *Colletotrichum gloeosporioides* JS419 [J]. *The J Org Chem*, 2019, 84:10999-11006.
 - Vieira ML, Hughes AF, Gil VB, et al. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). [J]. *Can J Microbiol*, 2012, 58:54-66.
 - Fan XR, Li GW, Shen P. Experiments in Microbiology: 2nd Edition (微生物学实验: 第二版) [M]. Beijing: Higher Education Press (高等教育出版社), 1989:144-148.
 - Jiang L, Pu H, Qin X, et al. Syn-2, 3-diols and anti-inflammatory indole derivatives from *Streptomyces* sp. CB09001 [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 35:144-151.
 - Kashiyama Y, Yoshikuni Y, Baker D, et al. Recombinant microbial systems for converting polysaccharides into commodity products such as biofuels; American, WO2009046370 [P]. 2009-04-09.
 - Ji YB, Zheng T, Yin JD. Chemical constituents from chinese marine sponge *Cinachyrella* sp. [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2018, 37:7-12.
 - Njue AW, Omolo JO, Cheplogoi PK, et al. Cytotoxic ergostane derivatives from the edible mushroom *Termitomyces microcarpus* (Lyophyllaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2018, 76:12-14.