

濒危肉叶金腰内生真菌 *Cladosporium* sp. J6 次级代谢产物研究*

马廷红¹, 蒋思萍², 徐爱国², 普布多吉², 陈彬², 王军¹

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;

2. 西藏自治区高原生物研究所, 西藏 拉萨 850001)

摘要: 研究濒危藏药肉叶金腰内生真菌 *Cladosporium* sp. J6 次级代谢产物。采用硅胶、LH-20 凝胶、C-18 反相硅胶及 HPLC 等柱色谱技术对 *Cladosporium* sp. J6 的次级代谢产物进行研究; 采用波谱分析及与文献比对等方法进行化合物结构鉴定; 结果从肉叶金腰内生真菌 *Cladosporium* sp. J6 的发酵提取物中分离得到 5 个化合物, 分别鉴定为 alternariol (1)、alternariol 5-O-methyl ether (2)、 β -咔啉 (3)、尿嘧啶 (4) 和尿嘧啶核苷 (5)。关于金腰属植物内生真菌次级代谢产物研究是首次报道。

关键词: 肉叶金腰; 内生真菌; 分离鉴定; 化学成份

中图分类号: O629.9 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2015) 04-0084-03

Secondary Metabolites of Endophytic *Cladosporium* sp. J6 from Endangered *Chrysosplenium carnosum*

MA Yanhong¹, JIANG Siping², XU Aiguo², PUBU Duoji², CHEN Bin², WANG Jun¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. Tibet Plateau Institute of Biology, Lhasa 850001, China)

Abstract: To study the secondary metabolites of endophytic *Cladosporium* sp. J6 from endangered *Chrysosplenium carnosum* from Tibet. The chemical constituents were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, ODS-18 column chromatography, and HPLC; their structures were identified by NMR and MS analysis, or comparison with literatures. Five compounds were isolated from the fermentation products of *Cladosporium* sp. J6; their structures were identified as alternariol (1), alternariol 5-O-methyl ether (2), β -carboline (3), uracil (4), and uridine (5). This report was about secondary metabolites of endophytic fungus from *Chrysosplenium* Tourn. ex L. for the first time.

Key words: *Chrysosplenium carnosum*; endophytic fungus; isolation; secondary metabolites

肉叶金腰 (*Chrysosplenium carnosum*) 为多年生虎耳草科金腰属植物, 是藏药中常用的一味植物药, 全草入药, 用于治疗胆囊疾患、急性黄疸型肝炎、急性肝坏死及传染病引起的高烧等症^[1]; 其主要成份为三萜、黄酮及苷类等化合物^[2]。肉叶金腰自然生长环境独特, 只长在海拔 4 400 ~ 4 700 m 的高山灌丛、草甸和石隙, 目前已被列为

一级濒危藏药资源^[3]。为了研究内生真菌在濒危植物保护中的生态学意义, 探讨内生真菌次级代谢产物对濒危藏药的保护及对藏药次级代谢生物合成的相互关系, 课题组前期对濒危肉叶金腰内生真菌进行了系统分离研究, 从中共分离得到内生真菌 13 株, 并对分离到的内生菌进行了初步抗菌活性筛选及微生物学研究^[4]。在前期工作的基础上,

* 收稿日期: 2015-05-13

基金项目: 西藏自治区科技计划重资助项目“毛瓣绿绒蒿等濒危藏药材内生菌次级代谢及其与宿主互惠共存关系研究”(2011); 国家自然科学基金地方科学基金资助项目(21262033)

作者简介: 马廷红(1989年生), 女; 研究方向: 天然产物化学; 通讯作者: 王军, 陈彬; E-mail: wjun@mail.sysu.edu.cn, chen-yishan@126.com

本文对具有较好抗菌活性的内生枝孢霉 *Cladosporium* sp. J6 进行了初步的次级代谢产物研究, 从其发酵提取物中分离得到了 5 个化合物 (图 1), 经核磁共振、质谱等技术及与文献比对的方法, 分别鉴定为: alternariol (**1**)、alternariol 5-O-methyl ether (**2**)、 β -咔啉 (**3**)、尿嘧啶 (**4**), 尿嘧啶核苷 (**5**)。这是首次关于金腰属植物内生真菌次级代谢产物研究的报道; 内生枝孢霉 *Cladosporium* sp. J6 的主要次级代谢产物为化合物 **1**、**2**, 这两个化合物具有显著抑制光合作用中电子传递活性^[5], 它们对濒危藏药肉叶金腰的生长特性是否有生态学保护意义, 有待进一步深入研究。

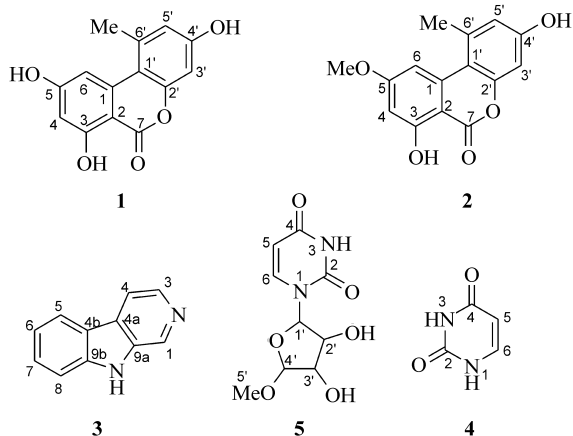


图 1 肉叶金腰内生真菌 *Cladosporium* sp. J6 次级代谢产物

Fig. 1 Chemical structures of compounds

1, **2**, **3**, **4**, **5** from endophytic *Cladosporium* sp. J6 from *Chrysosplenium carnosum*

1 仪器与试剂

Bruker AVANCE 400 型核磁共振谱仪 (Bruker Biospin, Rheinstetten, German), LCQ-DECA-XP 型液相色谱-质谱联用仪 (Thermo), Essentia SPD-16 型高效液相色谱仪 (HPLC) (Shimadzu); TLC 硅胶 (GF₂₅₄)、柱层析硅胶 (200~300 m) 均为青岛海洋化工有限公司产品, Sephadex LH-20 凝胶为美国 GE Healthcare 产品, 反相硅胶 ODS-A 为日本 Daiso 公司产品; 色谱纯甲醇为 Merck 产品, 其他试剂均为分析纯, 为广州化学试剂厂产品。

肉叶金腰草活株于 2010 年 7 月 20 日采自西藏自治区山南地区扎囊县达夏村山坡 (E: 91°18'54.05', N: 29°18'11.92"), 连土带根挖起放入洁净的花盆中带回实验室, 次日进行活植株内生真菌分离; 该样本经西藏自治区高原生物研究所李晖研究员鉴定为肉叶金腰 *Chrysosplenium carnosum*。

2 方法与结果

2.1 内生真菌分离

采用 $\varphi = 0.2\%$ 升汞进行植物表面消毒, 培养基为 PDA 培养基^[6]; 共分离得到内生真菌 13 株。其中编号为 J6 的菌株经分子生物学鉴定为枝孢霉菌属 (*Cladosporium* sp.), 命名为 *Cladosporium* sp. J6, GenBank 登录号为 KR492688。

2.2 发酵与提取

将菌种种子接种到盛有大米培养基的 1 L 三角瓶中^[7], 常温发酵培养 28 d; 共接种 100 瓶。发酵物采用甲醇-氯仿-乙酸乙酯混合溶液 (V/V/V = 1:1:1) 提取浸泡, 300 mL/瓶, 过滤, 减压蒸出滤液中有有机溶剂, 剩余的水相用乙酸乙酯等体积萃取 3 次, 浓缩乙酸乙酯萃取液, 得浸膏 99 g。

2.3 分离纯化

将提取物浸膏悬浮于 2 L 水中, 分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等体积萃取 2 次, 分别减压蒸干有机溶剂, 得石油醚部位浸膏 15 g, 乙酸乙酯部位浸膏 25 g, 正丁醇部位浸膏 6 g。正丁醇部位浸膏经 ODS-C18 硅胶柱纯化, 水-甲醇溶液洗脱, 收集水 (100%) 洗脱馏分; 经 LH-20 凝胶柱纯化, 甲醇洗脱, 得到化合物 **4** (12 mg), 化合物 **5** (6 mg); 收集水-甲醇 (V/V = 90:10) 洗脱馏分, 经 LH-20 凝胶柱纯化, 甲醇洗脱, 得到化合物 **3** (2 mg)。乙酸乙酯部位浸膏经硅胶柱纯化, 石油醚-乙酸乙酯溶液 (V/V = 100:0 ~ 0:100) 洗脱, 收集石油醚-乙酸乙酯 (V/V = 80:20 ~ 60:40) 洗脱馏分, 经 HPLC 分离, 水-甲醇 (V/V = 40:60) 溶液洗脱, LH-20 凝胶柱纯化, 甲醇洗脱, 分别得到化合物 **1** (30 mg), 化合物 **2** (55 mg)。

3 结构鉴定

1) 化合物 **1**: 白色针状固体, 难溶于氯仿, 溶于丙酮; ESI-MS m/z : 257.1 $[M-H]^-$; 分子式为 $C_{14}H_{10}O_5$ 。¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ : 6.45 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H-4), 7.35 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.70 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, H-3'), 6.79 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, H-5'), 2.77 (s, 3H, CH₃-6'), 11.94 (s, 1H, OH-3), 9.70 (br, 1H, OH-5), 9.22 (br, 1H, OH-4'); ¹³C NMR (100 MHz, acetone-d₆) δ : 139.5 (s, C-1), 99.2 (s, C-2), 166.0 (s, C-3), 101.9 (d, C-4), 165.9 (s, C-5), 105.2 (d, C-6), 166.1 (s, C-7), 110.7 (s, C-1'), 154.1 (s, C-2'), 102.7 (d, C-3'),

159.3(s, C-4'), 118.4(d, C-5'), 139.6(s, C-6'), 25.7(q, Me-6')。以上数据与文献 [8] 报道对照基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为 alternariol。

2) 化合物 **2**: 白色羽状固体, 难溶于氯仿, 溶于丙酮; ESI-MS m/z : 271.5 [M-H]⁻; 分子式为 C₁₅H₁₂O₅。¹H NMR (400 MHz, aceton-d₆) δ: 6.57 (d, 1H, J=2.0 Hz, H-4), 7.30 (d, 1H, J=2.0 Hz, H-6), 6.70 (d, 1H, J=2.4 Hz, H-3'), 6.81 (d, 1H, J=2.4 Hz, H-5'), 3.97 (s, 3H, OMe-5), 2.81 (s, 3H, Me-6'), 11.98 (s, 1H, OH-3), 9.26 (br, 1H, OH-4'); ¹³C NMR (100 MHz, aceton-d₆) δ: 139.1 (s, C-1), 100 (s, C-2), 166 (s, C-3), 101 (d, C-4), 167.6 (s, C-5), 104.6 (d, C-6), 166.1 (s, C-7), 110.5 (s, C-1'), 154.2 (s, C-2'), 102.8 (d, C-3'), 159.4 (s, C-4'), 118.5 (d, C-5'), 139.7 (s, C-6'), 56.3 (q, OMe-5), 25.6 (q, Me-6')。以上数据与文献 [9] 报道对照基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 alternariol 5-O-methyl ether。

3) 化合物 **3**: 针状结晶, 易溶于氯仿、丙酮; ESI-MS m/z : 169.5 [M+H]⁺; 分子式为 C₁₁H₈N₂。¹H NMR (400 MHz, CD₃Cl) δ: 8.95 (br, 1H, H-1), 8.48 (br, 1H, H-3), 7.99 (d, 1H, J=4.4 Hz, H-4), 8.15 (d, 1H, J=8.0 Hz, H-5), 7.31 (t, 1H, J=7.6 Hz, H-6), 7.55 (t, 1H, J=7.6 Hz, H-7), 7.56 (d, 1H, J=7.6, H-8), 8.78 (br, 1H, N-H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃Cl) δ: 133.7 (d, C-1), 139.1 (d, C-3), 115 (d, C-4), 121.6 (s, C-4a), 129.2 (s, C-4b), 122 (d, C-5), 120.4 (d, C-6), 128.8 (d, C-7), 111.8 (d, C-8), 140.6 (s, C-9a, 9b)。以上数据与文献 [10] 报道对照基本一致, 故化合物 **3** 鉴定为 β-carboline。

4) 化合物 **4**: 白色无定形固体, 不溶于氯仿、丙酮, 微溶于甲醇; ESI-MS m/z : 111.2 [M-H]⁻; 分子式为 C₄H₄N₂O₂; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.63 (d, 1H, J=8.0 Hz, H-5), 7.41 (d, 1H, J=8 Hz, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 153.5 (s, C-2), 167.3 (s, C-4), 101.7 (d, C-5), 143.5 (d, C-6)。以上数据与文献 [11] 报道对照基本一致, 故化合物 **4** 鉴定为尿嘧啶。

5) 化合物 **5**: 白色无定形固体, 不溶于氯仿, 溶于甲醇; ESI-MS m/z : 243.5 [M-H]⁻; 分子式为 C₉H₁₂N₂O₆; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.71 (d, 1H, J=8.0 Hz, H-5), 8.01 (d, 1H, J=8.4

Hz, H-6), 5.91 (d, 1H, J=4.4 Hz, H-1'), 4.15 (t, 1H, J=4.4 Hz, H-2'), 4.18 (t, 1H, J=4.4 Hz, H-3'), 4.01 (m, 1H, H-4'), 3.81 (dd, 1H, J=12.4, 2.8 Hz, H-5(α)), 3.74 (dd, 1H, J=12.4, 2.8 Hz, H-5(β)); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 152.6 (s, C-2), 166.3 (s, C-4), 102.8 (d, C-5), 142.6 (d, C-6), 90.8 (d, C-1'), 71.4 (d, C-2'), 75.8 (d, C-3'), 86.5 (d, C-4'), 62.4 (t, C-5')。以上数据与与文献 [12] 报道对照基本一致, 故化合物 **5** 鉴定为尿嘧啶核苷。

参考文献:

- [1] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志 (第二卷:上册)[M]. 北京:科学出版社,1985: 449.
- [2] LU M Y, LIAO Z X, JI L J, et al. Triterpenoids of *Chrysosplenium carnosum*[J]. Fitoterapia, 2013, 85:119-124.
- [3] 李隆云,占堆,卫莹芳,等. 濒危藏药资源的保护[J]. 中国中药杂志,2002, 27(8):561-564.
- [4] 段双全,许鹏辉,邢顺林. 蔽果金腰叶内寄生链格孢属真菌特性研究[J]. 安徽农业科学,2012, 40(31): 15103-15106.
- [5] DEMUNER A J, BARBOSA L C, MIRANDA A C, et al. The fungal phytotoxin alternariol 9-methyl ether and some of its synthetic analogues inhibit the photosynthetic electron transport chain [J]. J Nat Prod, 2013, 76(12): 2234-2245.
- [6] 王利娟,贺新生. 植物内生真菌的分离培养的研究方法 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26(4):55-60.
- [7] LI J, YANG X, LIN Y, et al. Meroterpenes and azaphilones from marine mangrove endophytic fungus *Penicillium* 303# [J]. Fitoterapia, 2014, 97: 241-246.
- [8] SUN H, GAO S S, LI X M, et al. Chemical constituents of marine mangrove-derived endophytic fungus *Alternaria tenuissima* EN-192 [J]. Chin J Oceanol Limnol, 2013, 31:464-470.
- [9] 杨志钧,殷瑜,王志强,等. 一株马兜铃内生真菌 *colletotrichum* sp. 代谢产物中细胞毒活性成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(3):329-332.
- [10] PARAMESWARAN P S, NAIK C G, HEGDE V R. Secondary metabolites from the mponge *Tedania anhelans*: isolation and characterization of two novel pyrazole acids and other metabolites [J]. J Nat Prod, 1997, 60(8): 802-803.
- [11] 王萍,漆淑华,黄丽思,等. 南海中华小尖柳珊瑚中嘌呤和嘧啶类化合物的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(1): 4-7.
- [12] HU X Y, DOU D Q, PEI Y P, et al. Chemical constituents of roots of *Ranunculus ternatus* Thunb [J]. J Chin Pharm Sci, 2006, 15: 127-129.