

道^[9]数据基本一致,¹³C-NMR数据见表 1,故鉴定为槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖。

4 结果与讨论

通过研究发现,马桑叶中黄酮醇及其苷类的量比较大,种类比较多,主要集中在水相中,其基本骨架为山柰酚和槲皮素。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.
- [2] Zhao A H, Zhao Q S, Lin Z W, et al. Chemical studies on *Polygonum aviculare* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14(5): 29-32.
- [3] Yang X F, Fu H Z, Lei H M, et al. Chemical constituents from the leaves of *Koeleruteria panichlata* Laxm [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1999, 34(6): 457-462.
- [4] Ouyang M A. Studies on lignans and flavonoid glycosides of *Ligustrum sinense* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(3): 196-198.
- [5] Qian S H, Yang N Y, Duan J A, et al. Study on the flavonoids of *Eupatorium lindleyanum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(1): 50-52.
- [6] Kong L Y, Min Z D. Studies on chemical constituents of roots of *Euphorbia pekinensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1996, 31(7): 524-529.
- [7] Liu Y Z, Wang C F, Zhang Z Z, et al. Studies on chemical constituents of *Chamaenerion angustifolium* L. Flavonoids from *Chamaenerion angustifolium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(4): 289-291.
- [8] Zhang P C, Xu S X. Chemical constituents from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var *major* N. E. Br [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2001, 36(10): 754-757.
- [9] Su Y F, Liu J S, Guo D A, et al. Seven flavonoids from aerial parts of *Conyza blinii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(6): 496-497.

黄花夹竹桃内生真菌产细胞松弛素的研究

彭小伟^{1,2}, 杨丽源¹, 李绍兰¹, 周 斌¹, 李治滢¹, 陈有为^{1*}

(1. 云南大学 云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091; 2. 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

植物内生真菌是指生活在植物体内或生活史的一定阶段处于植物体内的真菌,其涵盖面相当广,包括菌根真菌和植物病原菌^[1,2]。也有人认为内生真菌是指存在于健康植物的茎叶中,不形成明显病症的真菌^[1,2]。在内生菌-植物宿主-食草动物生态系统中,植物内生菌扮演重要生态学作用,发挥这些作用的物质基础是内生菌产生的丰富多样的次生代谢产物,它们具有多种生物活性,在农业和(或)医药业中具有重要的应用潜力^[3]。黄花夹竹桃 *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. 是夹竹桃科植物,剧毒,它是一种药用植物,全株各部位都含有药用成分黄夹苷,果仁中质量分数最高,有强心、利尿、祛痰、发汗、催吐等作用。YM38338 菌株分离自黄花夹竹桃植物茎韧皮部,在筛选过程中,其发酵提取物经薄层色谱分离,发现它能产生一种次生代谢产物,对该菌株进行扩大发酵,用乙醇萃取发酵物,经硅胶柱色谱分离纯化,首次分离到两个化合物。通过波谱方法鉴定化合物结构:细胞松弛素 H(I) 和细胞松弛素 O(II)。

1 材料

1.1 菌种:菌株 YM38338 分离自黄花夹竹桃植物茎韧皮部,菌种保藏在云南省微生物研究所真菌资源与菌种保藏室。

1.2 培养基:PDA 液体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值自然。

1.3 试剂与仪器

醋酸乙酯、氯仿、甲醇、丙酮、石油醚,均为分析纯;硅胶 GF₂₅₄ 薄层色谱板(青岛海洋硅胶厂);柱色谱用 200~300 目硅胶(Silica G)(青岛海洋硅胶厂);核磁共振谱用 Burker AM500 核磁共振仪测定;质谱用 Autospec VG-3000 质谱仪测定。

2 方法

2.1 发酵和提取:配 10 L 液体 PDA 培养基,分装于 100 个三角瓶(规格 500 mL),取活化 72~96 h 的 YM38338 菌种,接种于装有液体 PDA 培养基的三角瓶中,置于 25~28 ℃,300 r/min 摇床发酵 5 d。

发酵结束后,用纱布滤过,使菌体与发酵液分开,菌体用氯仿浸泡,浸泡 24 h 后用滤纸滤过,滤液减压浓缩,再用新鲜氯仿浸泡菌体,重复 3 次,发酵液用醋酸乙酯萃取 3 次,减压浓缩萃取液,分别得浓

收稿日期:2005-05-31

作者简介:彭小伟(1975-),男,江西人,博士生,主要从事微生物资源与应用研究。 E-mail:xiaowpp@hotmail.com

* 通讯作者 陈有为 Tel:(0871)5033539 E-mail:ywchen@ynu.edu.cn

缩物 3.8 g 和 2.1 g。

2.2 分离纯化:合并菌体和发酵液的提取物共 5.9 g,上硅胶柱,用氯仿-甲醇(95:5)和氯仿-甲醇(95:10)梯度洗脱,40~60 mL 收集组分,对各组分进行薄层色谱分离,合并主产物相同的组分,组分 10~13 合并后依次以石油醚-丙酮(6:4)和氯仿-丙酮(7:3)为洗脱剂进行硅胶柱色谱分离后,得化合物 I (1 480 mg);组分 14~16 依次以石油醚-丙酮(6:4),氯仿-甲醇(95:5),醋酸乙酯-甲醇(100:1)为洗脱剂进行硅胶柱色谱分离后,得化合物 II (15 mg)。

3 结构鉴定

化合物 I:白色晶体(氯仿),FAB-MS: 494 (M+1);¹³C-NMR 谱和 DEPT 谱数据见表 1; ¹H-NMR 谱部分数据:7.30~7.10(5H,m,H-2',3',4',5',6'),5.82(1H,dd,J=14.3,3.2 Hz,H-20),5.48(1H,dd,J=14.3,2.8 Hz,H-19),5.69(1H,dd,J=15.2,8.8 Hz,H-13),5.37(1H,dd,J=15.2,9.7 Hz,H-14),5.36(1H,s,H-12),5.07(1H,s,H-12),3.79(1H,d,J=10.5 Hz,H-7),3.22(1H,br.s,H-3),2.90(1H,t,H-8),2.81(1H,dd,J=13.2,4.7 Hz,H-10a),2.64(1H,dd,J=13.2,9.4 Hz,H-10b),1.31(3H,s,H-23),1.01(3H,d,J=4.9 Hz,H-22),0.94(3H,d,J=6.2 Hz,H-11)。结合¹³C-NMR 谱、DEPT 谱和¹H-NMR 谱推导其分子式为C₃₀H₃₅O₅N。

该化合物各种波谱数据与文献报道^[4,5]化合物细胞松弛素 H 的相一致。基于上述分析,鉴定该化合物为细胞松弛素 H,其结构式见图 1。

表 1 化合物 I 和 II 的碳谱数据(500 MHz,CDCl₃)

Table 1 ¹³C-NMR Spectral data for compounds I and II (500 MHz, CDCl₃)

碳位	1	2	碳位	1	2
1	174.2 s	175.9 s	17	53.6 t	53.7 t
3	53.7 d	53.8 d	18	74.2 s	74.5 s
4	50.3 d	50.1 d	19	138.0 d	137.5 d
5	32.7 d	32.9 d	20	125.8 d	127.0 d
6	147.8 s	148.4 d	21	77.4 d	77.3 d
7	69.7 d	69.9 d	22	26.4 q	26.5 q
8	47.0 d	45.8 d	23	31.0 q	31.0 q
9	51.7 s	52.9 s	24	174.2 s	
10	45.5 t	45.5 t	25	20.8 q	
11	14.0 q	14.0 q	1'	137.3 s	137.0 s
12	114.1 t	113.8 t	2'	129.0 d	129.1 d
13	127.0 d	127.7 d	3'	128.8 d	129.1 d
14	138.6 d	137.8 d	4'	138.0 d	137.8 d
15	42.7 t	42.7 t	5'	128.8 d	129.1 d
16	28.3 d	28.4 d	6'	129.0 d	129.1 d

化合物 II:白色晶体(氯仿),化合物 II 的¹³C-NMR 谱和 DEPT 谱数据(表 1)与化合物 I 的相比较,少 2 个 C,分别为 δ 174.2(s)和 δ 20.8(q)其余数据几乎相同,可推断化合物 II 比化合物 I 少一个乙酰基,比较它们¹H-NMR 数据也可得到印证,化合物 II¹H-NMR 谱中不存在 δ 2.2(s)峰。其波谱数据与文献报道^[4]化合物细胞松弛素 O 相一致,由此鉴定化合物 II 为细胞松弛素 O,其结构见图 1。

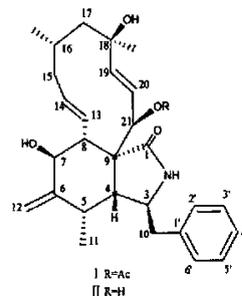


图 1 化合物 I 和 II 的结构

Fig. 1 Structures of compounds I and II

4 讨论

细胞松弛素类化合物是一类广泛分布于真菌的真菌毒素,已从拟茎点霉属(*Phomopsis* (Sacc.) Bub.)、毛壳菌属(*Chaetomium* Kunze ex Schmidt.)、炭团菌属(*Hypoxylon* Bull. ex Fr.)、鹿角菌属(*Xylaria* Hill ex Grev.)、轮层炭壳属(*Daldinia* Ces. et de Not.)等真菌中分离得到,它们具有一些重要的生物学活性,包括抑制哺乳动物细胞在组织培养时的分裂,抑制 HIV-1 蛋白酶的活性,抗菌和抗肿瘤活性等^[6]。细胞松弛素 H 和细胞松弛素 O 最初在禾本科植物雀稗属 *Paspalum scrobiculatum*, *P. commersonii* 种子中寄生的真菌发酵物中分离得到。当时发现某些小米稗的种子能毒害人和牲畜,当地人有时用它来毒老虎,人误食后中毒的主要症状是:失去神智、精神狂乱、肌肉颤抖、呕吐和吞咽困难,后来发现它的毒性与其所感染的真菌有关,并且从被其感染的真菌雀稗拟茎点霉属(*Phomopsis* Sacc.)的发酵物中分离到细胞松弛素 H 和细胞松弛素 O,用狗做细胞松弛素 H 的毒性试验时,其症状与小米稗种子中毒的症状一样^[4],证明了小米稗种子的毒性是由寄生于其中的真菌雀稗拟茎点霉属(*Phomopsis* Sacc.)产生的细胞松弛素 H 所致。

细胞松弛素 H 和细胞松弛素 O 以前是从拟茎点霉属(*Phomopsis* Sacc.)发酵物中分离到的,而菌株 YM38338 经形态学方法鉴定为丝核菌属(*Rhi-*

zoctonia DC.), 即本研究首次从丝核菌属(*Rhizoctonia*) 菌株发酵物中分到细胞松弛素 H 和细胞松弛素 O; 而且菌株 YM38338 产细胞松弛素 H 的量很大(148 mg/L), 因此它具有潜在的生产价值。

植物黄花夹竹桃的毒性, 目前认为是由黄花夹竹桃苷所致, 然而, 经对黄花夹竹桃内生真菌种群多样性研究发现, 丝核菌属(*Rhizoctonia* DC.) 是植物黄花夹竹桃细胞内生真菌的优势种群^[7], 丝核菌属(*Rhizoctonia* DC.) 菌株 YM38338 产细胞松弛素 H 的量如此大, 因此, 植物黄花夹竹桃的毒性可能还与其内生真菌代谢产物细胞松弛素 H 有关。

致谢: 中国科学院昆明植物研究所赵友兴博士在化合物结构解析上的帮助。

References:

- [1] Lu H, Zou W X, Meng J C, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp.: an endophytic fungus in *Artemisia annua*. plant [J]. *Science*, 2000, 151: 67-73.
- [2] Service R F. Hazel trees offer new source of cancer drug [J]. *Science (Biomed)*, 2000, 288(5463): 27-28.
- [3] Zou W X, Tan R X. Recent advance on endophyte research [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2001, 43(9): 881-892.
- [4] Patwardhan S A, Pandey R C, Sukh D. Toxic cytochalasins of *Phomopsis paspalli*, a pathogen of KODO millet [J]. *Phytochemistry*, 1974, 13: 1985-1988.
- [5] Ondeyka J, Hensens O D, Zink D, et al. L-696, 474, A novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease [J]. *J Antibiot*, 1992, 45(5): 679-685.
- [6] Espada A, Rivera-Sagredo A, Fuente J M, et al. New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon* [J]. *Tetrahedron*, 1997, 53(18): 6485-6492.
- [7] Peng X W, Yang L Y, Zou B, et al. Study on the diversity of endophytic fungi from *Thevetia peruviana* [J]. *J Yunnan Univ; Nat Sci (云南大学学报: 自然科学版)*, 2003, 25(Suppl): 28-31.

黑龙骨化学成分的研究

张援虎, 杨亚婷, 陈东林, 王锋鹏*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

黑龙骨 *Periploca forrestii* Schlecht. 又名滇杠柳、黑骨头, 是萝藦科杠柳属植物。该植物全株药用, 可舒筋活络、祛风除湿; 治风湿性关节炎、跌打损伤、胃痛、消化不良、闭经、痢疾等^[1]。目前关于其化学成分有强心甘、C₂₁甾体苷、胡萝卜苷和熊果酸的报道^[2,3]。药理研究表明^[4], 黑龙骨新鲜茎皮中的总皂苷有强心作用, 其强心作用特点类似毒毛旋花子苷 G。近年研究表明, 强心甘和 C₂₁甾体苷具有多种生理活性, 如抗癫痫、抗肿瘤、抗生育等, 且黑龙骨民间用于镇痛, 效果良好, 因此笔者对黑龙骨的化学成分进行了系统研究, 并从中分离鉴定了 11 个已知化合物, 分别为: periplocymarin (I)、杠柳苷元(II)、杠柳苷(III)、(+)-1-羟基松脂酚(IV)、(±)-丁香树脂醇(V)、熊果酸(VI)、23-羟基齐墩果酸(VII)、β-谷甾醇(VIII)、胡萝卜苷(IX)、丙二酸(X)和 2,4-二羟基苯甲酸甲酯(XI)。其中, 化合物 I、IV、V、VII、VIII、X、XI 为首次从黑龙骨中分离得到, 且化合物 IV、V 是首次从杠柳属植物中分离鉴定。另外, 杠柳苷、periplocymarin 具有强心活性, 这与滇杠柳所具有的强心活性相吻合。

1 仪器和材料

熔点用 X4 型显微熔点仪测定; 红外光谱用 Nicolet FT-IR 200SXV 仪测定, KBr 压片; ESI-MS 用 Finnigan LCQ^{DECA} 仪测定, EI-MS 用 VG Auto Spec 3000 仪测定, 电离能量 70 eV; 核磁共振谱用 Bruker AC-E 200 和 Varian Unity INOVA 400/54 仪测定, TMS 为内标; 中压柱色谱仪为 Buchi B-681 型; 高效液相为 Water's 510 泵, 检测器为 Water's 2410 折光检测器, 分析柱为 PR-18 ODS 柱 (200 mm×4.6 mm, 10 μm), 半制备柱为 PR-18 柱 (200 mm×10 mm, 10 μm); 薄层及柱色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂产品, 反相 Rp-18 薄层色谱板及柱色谱用硅胶(45 μm)为德国 Merck 公司生产。

黑龙骨购于云南大理, 经中国科学院植物研究所分类室李振宇研究员鉴定, 为黑龙骨 *P. forrestii* Schlecht. 的全株。

2 提取与分离

20 kg 黑龙骨粉末用醋酸乙酯加热回流 3 次, 每次 4 h, 减压回收溶剂后得浸膏 467 g。467 g 浸膏经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 分为 A

收稿日期: 2005-05-15

作者简介: 张援虎(1967—), 男, 四川大学华西药学院博士后, 主要从事天然产物分离与鉴定工作。 E-mail: zhangyuanhu@263.net

* 通讯作者 王锋鹏 Tel/Fax: (028)85501368 E-mail: wfp@wcums.edu.cn