

铁皮石斛内生真菌 *Verticillium* sp. KY-18 的化学成分研究

任慧慧^{1,2}, 许 蕾^{1,2}, 杨胜祥^{1,2*}, 桂仁意²

1. 浙江农林大学 浙江省林业生物质化学利用重点实验室, 浙江 临安 311300

2. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 临安 311300

摘要: 目的 研究铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 内生真菌 *Verticillium* sp. KY-18 中氧杂环类化合物。方法 采用色谱分离技术进行分离和纯化, 并根据谱学数据鉴定化合物的结构。结果 从 *Verticillium* sp. KY-18 的发酵产物中分离得到 13 个氧杂环类化合物, 分别鉴定为 2, 6-dihydroxy-2-methyl-7-(prop-1E-enyl)-1-benzofuran-3(2H)-one (1)、nigrosporapyrone D (2)、oosponol (3)、2-甲基-4-吡喃酮 (4)、6-甲基-5-[(1E)-丁烯基]-2-吡喃酮 (5)、penicisochroman D (6)、verrucosapyrone B (7)、(1S, 3S)-1, 8-dimethoxy-3, 5-dimethyl-6-hydroxyisochroman (8)、phomopsinone A (9)、pseudohalonectrin A (10)、dictafofin-A (11)、2, 3-dihydro-5, 7-dihydroxy-2, 6, 8-trimethyl-4H-1-benzopyran-4-one (12)、2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid (13)。结论 化合物 2~10 为首次从该属真菌中分离得到; 化合物 11~13 为首次从该真菌中分离得到。

关键词: 铁皮石斛; 内生真菌; 氧杂环; nigrosporapyrone D; 2-甲基-4-吡喃酮; 6-甲基-5-[(1E)-丁烯基]-2-吡喃酮

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)16-2312-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.006

Chemical constituents in endophytic fungus *Verticillium* sp. KY-18 isolated from *Dendrobium officinale*

REN Hui-hui^{1,2}, XU Lei^{1,2}, YANG Sheng-xiang^{1,2}, GUI Ren-yi²

1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Chemical Utilization of Forestry Biomass, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, China

2. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in the endophytic fungus *Verticillium* sp. KY-18, isolated from *Dendrobium candidum*. **Methods** The compounds were isolated and purified by means of chromatographic techniques and their structures were identified on the basis of spectral features. **Results** Thirteen known compounds belong to oxygen heterocyclic compounds, named 2, 6-dihydroxy-2-methyl-7-(prop-1E-enyl)-1-benzofuran-3(2H)-one (1), nigrosporapyrone D (2), oosponol (3), 2-methyl-4-pyrone (4), 5-(1E-butenyl)-6-methylpyran-2-one (5), penicisochroman D (6), verrucosapyrone B (7), (1S, 3S)-1, 8-dimethoxy-3, 5-dimethyl-6-hydroxyisochroman (8), phomopsinone A (9), pseudohalonectrin A (10), dictafofin-A (11), 2, 3-dihydro-5, 7-dihydroxy-2, 6, 8-trimethyl-4H-1-benzopyran-4-one (12), and 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid (13). **Conclusion** Compounds 2—10 are first isolated from the plants of *Verticillium* genus, and compounds 11—13 are first obtained from fungi.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.; endophytic fungus; oxygen heterocycles; nigrosporapyrone D; 2-methyl-4-pyrone; 5-(1E-butenyl)-6-methylpyran-2-one

植物内生真菌是指那些生活史的一定阶段或全部阶段生活在健康植物的各种组织或器官内部的真菌。研究发现内生真菌能产生许多活性次生代谢产物, 从而能够增强植物的抗逆性, 表现在非生物胁迫(如抗高温、抗干旱等)和生物胁迫(如阻抑昆虫和食草动物的采食、抵抗病虫害等)方面。通过

与寄主植物的长期“协同进化”, 某些内生真菌具有了产生与宿主植物相同或相似的生物活性物质的能力。自从 1993 年, 美国蒙大拿州立大学的 Strobel 小组在短叶红豆杉内生真菌 *Taxomyces andreanae* Andrea Stierle 中发现紫杉醇, 国内外掀起对药用植物和濒危植物内生真菌的研究热潮, 很多新颖结构

收稿日期: 2014-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31200262); 浙江省重中之重林学一级学科开放基金(KF201302); 浙江农林大学人才启动基金(2012FR041)

*通信作者 杨胜祥, 男, 博士, 主要从事微生物活性次生代谢产物的研究。Tel: (0571)63732775 E-mail: shengxiangyang2000@163.com

的成分被发现,这些次级代谢产物具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、提高免疫力、调节植物生长和杀虫等生物活性^[1-2]。铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. 为兰科石斛属多年生附生草本植物的全草,为名贵中药西枫斗的原植物,是国家重点保护药物,有除痹下气、补五脏虚劳羸瘦、强阴之功,久服厚肠胃轻身延年之效^[1]。目前,关于铁皮石斛内生真菌化学成分的研究较少。本实验对铁皮石斛内生真菌 *Verticillium* sp. KY-18 的化学成分进行了研究,从该菌的发酵产物中分离得到 13 个化合物,分别鉴定为 2, 6-dihydroxy-2-methyl-7-(prop-1E-enyl)-1-benzofuran-3(2H)-one (**1**)、nigrosporapyrone D (**2**)、oosponol (**3**)、2-甲基-4-吡喃酮 (2-methyl-4-pyrone, **4**)、6-甲基-5-[(1E)-丁烯基]-2-吡喃酮 [5-(1E-butenyl)-6-methylpyran-2-one, **5**]、penicisochroman D (**6**)、verrucosapyrone B (**7**)、(1S, 3S)-1, 8-dimethoxy-3, 5-dimethyl-6-hydroxylisochroman (**8**)、phomopsinone A (**9**)、pseudohaloelectrin A (**10**)、dictafofin-A (**11**)、2, 3-dihydro-5, 7-dihydroxy-2, 6, 8-trimethyl-4H-1-benzopyran-4-one (**12**)、2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid (**13**)。其中化合物 **2**~**10** 为首次从该属真菌中分离得到,化合物 **11**~**13** 为首次从该真菌中分离得到。

1 仪器与材料

XRC—1 型显微熔点仪 (四川大学科仪厂); Bruker DRX—500 型核磁共振仪 (Bruker 公司); VG AUTO Spec—3000 质谱仪 (VG 仪器公司)。柱色谱用硅胶 (100~200 目和 200~300 目) 和薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄ 均由青岛海洋化工厂生产。反相用材料 RP₁₈ 为 Merck 公司产品。其余试剂均为分析纯。

本实验所用的铁皮石斛内生真菌由浙江农林大学天然产物化学研究室提供 (编号为 KY-18), 是从铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. 的新鲜枝中分离得到的, 形态鉴定法确定该菌种为轮枝菌属 *Verticillium* sp.。铁皮石斛和内生真菌由浙江农林大学毛凤胜高级实验师鉴定。

2 液体发酵

发酵培养基 (氯化钙 0.5 g、磷酸二氢钾 0.1 g、氯化钾 0.05 g、硫酸镁 0.1 g、葡萄糖 20.0 g、蛋白胨 15.0 g、1 000 mL 水、pH 6.0)。在 1 000 mL 的三角瓶中加入 200 mL 液体培养基, 灭菌。无菌条件下取 8~10 mm² 大小的菌苔 2~3 块接入液体培养基中, 先在 28 °C 的摇床上静置培养 1 d, 然后 120 r/min 旋转震荡培养 6 d, 共发酵 30 L, 经滤过后分

别获得菌丝体和发酵液。

3 提取与分离

将发酵产物滤过后分别得到发酵液和菌丝体, 菌丝体用甲醇超声提取 3 次后, 合并提取液, 减压浓缩得到甲醇浸膏。甲醇浸膏加水悬浮, 用环己烷脱脂后再用醋酸乙酯萃取得到浸膏 9.5 g。醋酸乙酯部分经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 通过薄层色谱检测合并相同的部分, 得到 7 个组分 Fr. 1~7。Fr. 2 经硅胶 (200~300 目) 柱色谱, 石油醚-丙酮 (20:1→1:1) 梯度洗脱后, 合并得到 5 个组分 Fr. 2A~2E。Fr. 2B 经过 Sephadex LH-20 (甲醇) 分离后得到化合物 **1** (7.2 mg) 和 **2** (5.9 mg); Fr. 2D 经过 Sephadex LH-20 (甲醇) 分离后, 再通过 PTLC (石油醚-丙酮 5:1) 制备得到化合物 **3** (6.3 mg)。Fr. 3 通过 RP₁₈ 色谱, 甲醇-水 (20:80→0:100) 梯度洗脱, 合并得到 5 个组分 Fr. 3A~3E。Fr. 3B 经过 2 次 PTLC (二氯甲烷-甲醇 15:1) 得到化合物 **4** (8.0 mg)、**5** (7.8 mg) 和 **6** (10.1 mg); Fr. 3C 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 分离后, 再用甲醇重结晶得到化合物 **7** (6.6 mg) 和 **8** (10.2 mg)。Fr. 4 通过 RP₁₈ 色谱, 甲醇-水 (20:80→0:100) 梯度洗脱, 合并得到 3 个组分 (Fr. 4A~4C)。Fr. 4B 经过 Sephadex LH-20 (甲醇) 分离后, 再通过 RP₁₈ 分离得到化合物 **9** (5.9 mg) 和 **10** (9.2 mg); Fr. 4C 经过 Sephadex LH-20 (甲醇) 分离后, 再通过 RP₁₈ 分离和 PTLC 制备 (二氯甲烷-甲醇 9:1) 得到化合物 **11** (8.2 mg)、**12** (5.2 mg) 和 **13** (6.9 mg)。

4 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色粉末。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.18 (1H, dd, J = 16.0, 1.5 Hz, H-1'), 7.08 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4), 7.03 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.37 (1H, dd, J = 16.0, 7.0 Hz, H-2'), 1.86 (3H, dd, J = 7.0, 1.5 Hz, H-3'), 1.53 (3H, s, 2-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 202.7 (C-3), 160.3 (C-6), 143.5 (C-3a), 131.6 (C-7), 129.4 (C-2'), 126.9 (C-1'), 125.6 (C-5), 119.3 (C-4), 116.9 (C-7a), 105.1 (C-2), 22.6 (2-CH₃), 19.1 (C-3'). 以上数据与文献报道一致^[2], 故鉴定化合物 **1** 为 2, 6-dihydroxy-2-methyl-7-(prop-1E-enyl)-1-benzofuran-3(2H)-one。

化合物 **2**: 无色粉末。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.68 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 5.72 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-3), 3.88 (3H, s, H-9), 2.53 (3H, s, H-8);

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 192.1 (C-7), 169.9 (C-4), 161.6 (C-2), 154.5 (C-6), 103.9 (C-5), 93.3 (C-2), 56.1 (C-9), 26.0 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[3], 故鉴定化合物 **2** 为 nigrosporapyrone D。

化合物 **3**: 无色针状结晶。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.09 (1H, dd, $J = 8.0, 0.8$ Hz, H-5), 7.91 (1H, s, H-10), 7.75 (1H, dd, $J = 8.0, 0.8$ Hz, H-6), 7.14 (1H, dd, $J = 8.0, 0.8$ Hz, H-7), 4.67 (2H, s, H-12); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 196.2 (C-11), 164.1 (C-2), 162.0 (C-4), 150.6 (C-10), 138.7 (C-6), 134.3 (C-8), 117.6 (C-5), 116.1 (C-7), 115.9 (C-9), 106.0 (C-3), 65.6 (C-12)。以上数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **3** 为 oosponol。

化合物 **4**: 无色液体。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.67 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 6.27 (1H, dd, $J = 6.0, 2.5$ Hz, H-5), 6.16 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3), 2.26 (3H, s, H-2'); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 179.4 (C-4), 166.8 (C-2), 155.4 (C-6), 116.7 (C-5), 115.5 (C-3), 20.0 (C-2')。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 **4** 为 2-甲基-4-吡喃酮。

化合物 **5**: 无色胶状物。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.50 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 6.18 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 6.14 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-5a), 5.91 (1H, dt, $J = 16.0, 6.5$ Hz, H-5b), 2.29 (3H, s, H-6a), 2.20 (2H, m, H-5c), 1.06 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5d); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 162.2 (C-2), 157.9 (C-6), 142.8 (C-4), 133.3 (C-5b), 120.7 (C-5a), 113.7 (C-3, 5), 26.3 (C-5c), 17.2 (C-6a), 13.8 (C-5d)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **5** 为 6-甲基-5-[(1*E*)-丁烯基]-2-吡喃酮。

化合物 **6**: 无色胶状物。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.12 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3), 6.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2), 6.70 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4), 4.86 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-8a), 4.79 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-8b), 3.91 (1H, m, H-6), 1.24 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 156.3 (C-1), 137.8 (C-4a), 129.1 (C-3), 124.9 (C-8a), 122.6 (C-4), 115.0 (C-2), 69.2 (C-6), 58.6 (C-8), 41.8 (C-5), 23.5 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **6** 为 penicisochroman D。

化合物 **7**: 无色粉末。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.06 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-5), 5.45 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3), 4.17 (1H, dd, $J = 8.0, 4.5$ Hz, H-1'),

3.77 (3H, s, 3-OCH₃), 0.88 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-3'); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 175.8 (C-4), 170.8

(C-6), 169.2 (C-2), 102.0 (C-5), 90.7 (C-3), 74.4 (C-1'), 59.1 (C-3-OMe), 31.0 (C-2'), 11.8 (C-3')。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **7** 为 verrucosapyrone B。

化合物 **8**: 白色针状结晶。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.27 (1H, s, H-7), 5.42 (1H, s, H-1), 4.16 (1H, m, H-3), 3.67 (3H, s, H-13), 3.40 (3H, s, H-14), 1.94 (3H, s, H-12), 1.28 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 157.2 (C-8), 157.0 (C-6), 136.1 (C-10), 114.9 (C-9), 114.5 (C-5), 97.7 (C-7), 97.4 (C-1), 63.9 (C-3), 55.9 (C-13), 55.2 (C-14), 34.7 (C-4), 21.7 (C-11), 10.1 (C-12)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **8** 为 (1*S*, 3*S*)-1, 8-dimethoxy-3, 5-dimethyl-6-hydroxyisochroman。

化合物 **9**: 白色固体。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.44 (1H, s, H-3), 4.58 (1H, d, $J = 14.5$ Hz, H-5a), 4.34 (1H, d, $J = 14.5$ Hz, H-5b), 3.81 (3H, s, 4-OCH₃), 3.66 (1H, m, H-7), 0.96 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 168.6 (C-4), 164.2 (C-2), 156.6 (C-8a), 107.6 (C-4a), 88.0 (C-3), 73.9 (C-7), 56.1 (4-OCH₃), 61.6 (C-5), 37.6 (C-9), 32.6 (C-8), 18.6 (C-10), 13.9 (C-11)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **9** 为 phomopsinone A。

化合物 **10**: 淡黄色无定形粉末。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.30 (1H, s, H-2), 5.34 (1H, s, H-7), 4.45 (1H, s, H-4), 2.19 (3H, s, H-15), 1.86 (3H, s, H-14), 1.62 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-12), 1.14 (3H, s, H-11), 0.86 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-13); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 201.4 (C-6), 154.8 (C-10), 144.8 (C-8), 144.5 (C-2), 120.1 (C-3), 112.2 (C-9), 105.6 (C-7), 74.6 (C-4), 50.5 (C-5), 24.6 (C-12), 18.9 (C-11), 18.4 (C-15), 13.3 (C-14), 9.2 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **10** 为 pseudohalonectrin A。

化合物 **11**: 无色油状物。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.50 (1H, dd, $J = 8.5, 7.0$ Hz, H-7), 7.05 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-8), 6.88 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-6), 4.51 (1H, m, H-2), 3.87 (3H, s, 3-OCH₃), 1.39 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 186.9 (C-4), 161.3 (C-5), 141.9 (C-9), 134.4 (C-7), 119.9 (C-8), 113.8 (C-10), 110.9 (C-6), 74.1 (C-2),

56.3 (3-OCH₃), 36.1 (C-3), 20.8 (C-11)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **11** 为 dictafofin-A。

化合物 **12**: 淡黄色针状晶体。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 4.53 (1H, m, H-2), 2.00 (6H, s, H-12, 13), 1.48 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-11); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 197.7 (C-4), 163.0 (C-7), 159.6 (C-5), 157.8 (C-9), 103.9 (C-6), 103.0 (C-8), 102.7 (C-10), 74.6 (C-2), 43.7 (C-3), 21.0 (C-11), 8.0 (C-12), 7.5 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **12** 为 2, 3-dihydro-5, 7-dihydroxy-2, 6, 8-trimethyl-4H-1-benzopyran-4-one。

化合物 **13**: 淡黄色油状物。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.45 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-3), 7.08 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 165.1 (C-7); 162.1 (C-8), 161.7 (C-2), 151.3 (C-6), 145.8 (C-4), 122.7 (C-5), 109.8 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **13** 为 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid。

参考文献

- [1] 杨一令, 来平凡, 蒋士鹏. 铁皮石斛的研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(1): 82-85.
- [2] You F, Han T, Wu J Z, et al. Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2009, 37(3): 162-165.
- [3] Trisuwan K, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, et al. Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18 [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(4): 554-557.
- [4] Rasser F, Anke T, Sterner O. Secondary metabolites from a *Gloeophyllum* species [J]. *Phytochemistry*, 2000, 54(5): 511-516.
- [5] Svensson M, Lundgren L N, Woods C, et al. Pyrone and pyridone compounds in the liquid culture of *Physisporinus sanguinolentus* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56(7): 747-751.
- [6] Schlingmann G, Milne L, Carter G T. New α -pyrones produced by fungal culture LL-11G219 function as androgen receptor ligands [J]. *Tetrahedron*, 1998, 54(43): 13013-13022.
- [7] Trisuwan K, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, et al. Furo [3, 2-*h*]isochroman, furo [3, 2-*h*]isoquinoline, isochroman, phenol, pyranone, and pyrone derivatives from the sea fan-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F40 [J]. *Tetrahedron*, 2010, 66(25): 4484-4489.
- [8] Rahbaek L, Sperry S, Frisvad J C, et al. PC 2, LL-P888 gamma and some novel analogue alpha-pyrones from *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum* and *P. olsonii* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, 31(3): 313-317.
- [9] He G, Matsuura H, Takushi T, et al. A new antifungal metabolite from *Penicillium expansum* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(7): 1084-1087.
- [10] Hussain H, Krohn K, Ahmed I, et al. Phomopsinones A-D: Four new pyrenocines from endophytic fungus *Phomopsis* sp. [J]. *Eur J Org Chem*, 2012, 2012(9): 1783-1789.
- [11] Li R, Zhou W, Li L, et al. New nematocidal azaphilones from the aquatic fungus *Pseudohalonestria adversaria* YMF1. 01019 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 264(1): 65-69.
- [12] Wu T S, Li C Y, Leu Y L, et al. Limonoids and alkaloids of the root bark of *Dictamnus angustifolius* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(3): 509-512.
- [13] An T Y, Hu L H, Cheng X F, et al. Benzopyran derivatives from *Mallotus apelta* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(2): 273-278.
- [14] Wilkes S, Glasl H. Isolation, characterization, and systematic significance of 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid in Rosaceae [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(3): 441-449.