

## 怀山药内生真菌厚孢镰刀菌的次生代谢产物研究

王晓龙, 李守婷, 文春南, 周 艳, 李 文, 阮 元, 麻兵继\*

河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002

**摘 要:** 目的 研究怀山药内生真菌厚孢镰刀菌 *Fusarium chlamydosporum* 的次生代谢产物。方法 利用硅胶、凝胶等色谱技术进行分离纯化, 通过波谱技术分析鉴定化合物结构。结果 从厚孢镰刀菌的甲醇提取物中分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为过氧麦角甾醇 (1)、麦角甾-4,22-二烯-3-酮 (2)、邻苯二甲酸二丁酯 (3)、邻苯二甲酸二异丁酯 (4)、烟酸 (5)、琥珀酸 (6)、戊二酸 (7) 和  $N_6$ -乙酰基色胺 (8)。结论 所有化合物均为厚孢镰刀菌中首次分离得到。

**关键词:** 怀山药; 厚孢镰刀菌; 内生真菌; 次生代谢产物; 过氧麦角甾醇; 麦角甾-4,22-二烯-3-酮

中图分类号: R248.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)07-0966-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.006

## Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium chlamydosporum* from *Dioscorea opposite*

WANG Xiao-long, LI Shou-ting, WEN Chun-nan, ZHOU Yan, LI Wen, RUAN Yuan, MA Bing-ji

College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract: Objective** This study focused on the secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium chlamydosporum* in *Dioscorea opposite*. **Methods** Compounds were isolated from the MeOH extract by chromatography technology and their structures were elucidated on the basis of comprehensive spectroscopic analysis. **Results** Eight compounds were isolated and their structures were identified as: ergosterol-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroside (1), ergosta-4,22-dien-3-one (2), di-*n*-butyl phthalate (3), di-isobutyl phthalate (4), 3-pyridinecarboxylic acid (5), amber acid (6), pentanedioic acid (7), and  $N_6$ -acetyltryptamine (8). **Conclusion** All these compounds are isolated from *F. chlamydosporum* for the first time.

**Key words:** *Dioscorea opposite* Thunb; *Fusarium chlamydosporum* Wollen; endophytic fungi; secondary metabolites; ergosterol-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroside; ergosta-4,22-dien-3-one

自 1993 年 Stierle 等首次报道了从太平洋紫杉树中分离出一种可产生紫杉醇的内生真菌后, 植物内生菌成为国内外微生物研究的热点<sup>[1]</sup>。内生菌不仅能够参与植物次生成分的合成或对植物次生代谢产物进行转化, 而且还能够独立产生丰富的次生代谢产物, 是天然产物的重要来源之一<sup>[2-3]</sup>。内生真菌是指那些在其生活史中某一段时期生活在活的植物组织内, 对植物组织不引起明显病害症状的真菌。药用植物内生真菌可产生具有抗肿瘤、抑菌、植物生长调节、免疫抑制、除草、抗结核、抗疟、降解纤维素、保鲜等多种生物活性物质<sup>[4]</sup>, 是近年来研究的热点。

怀山药 *Dioscorea opposite* Thunb. 为“四大怀药”之一, 是我国著名的药食同源植物。本课题组前期对河南省焦作市温县一带怀山药内生菌的类群分布进行了初步研究, 发现经分离纯化得到的怀山药内生菌中镰刀菌属真菌较为丰富。虽然中药材内生菌和药材质量之间存在密切联系, 相关研究文献也较多<sup>[5]</sup>, 但怀山药内生菌与药材品质之间的关联性还缺乏研究, 目前尚未见文献报道。为进一步阐明内生真菌与怀山药道地性的关联, 本实验挑选了其中的一株优势菌株——厚孢镰刀菌 *Fusarium chlamydosporum* Wollen 进行次生代谢产物研究。本研究采用经典次生代谢产物分离法, 对厚孢镰刀菌

收稿日期: 2014-11-13

基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (14A360006)

作者简介: 王晓龙 (1988—), 男, 河南巩义人, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: wang\_xl333@126.com

\*通信作者 麻兵继 (1975—), 男, 安徽当涂人, 博士, 教授, 从事中药化学及生物学研究。E-mail: mbj123@sina.com

液体发酵菌丝的甲醇提取物进行分离研究,共得到8个化合物,经波谱学技术鉴定为过氧麦角甾醇(ergosterol-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxide, **1**)、麦角甾-4,22-二烯-3-酮(ergosta-4,22-dien-3-one, **2**)、邻苯二甲酸二丁酯(di-*n*-butyl phthalate, **3**)、邻苯二甲酸二异丁酯(di-isobutyl phthalate, **4**)、烟酸(3-pyridinecarboxylic acid, **5**)、琥珀酸(amber acid, **6**)、戊二酸(pentanedioic acid, **7**)和 $N_b$ -乙酰基色胺( $N_b$ -acetyltryptamine, **8**)。所有化合物均为首次从厚孢镰刀菌中分离得到。

### 1 材料与仪器

X-4 型熔点仪(上海金鹏分析仪器有限公司); Bruker AM-400/500 核磁共振仪(Bruker 公司); Bruker HCT/Esquire 质谱仪(Bruker 公司)。柱色谱硅胶(200~300 目)和硅胶 GF<sub>254</sub> 由青岛海洋化工厂生产,凝胶 Sephadex LH-20 为 Merck 公司产品。实验所用试剂均为分析纯。

怀山药采自河南省焦作市温县,由河南农业大学高致明教授鉴定为怀山药 *Dioscorea opposita* Thunb.。厚孢镰刀菌由本课题组从怀山药的新鲜根部组织中分离得到,由河南农业大学申进文教授经形态学鉴定为镰刀菌属真菌。本课题组提取该真菌基因组,利用 PCR 技术扩增其 18 S DNA,经过基因测序比对后鉴定为厚孢镰刀菌 *Fusarium chlamydosporum* Wollen.。厚孢镰刀菌菌株接种到 PDA 培养基中,活化好后放入 4℃ 冰箱,保存于河南农业大学中药化学实验室。

### 2 提取与分离

将冰箱保存的菌株接种到经高压灭菌的 PDA 平板培养基上,于 28℃ 培养箱活化培养 5 d。挑取菌丝体适量接种到装有 1 200 mL PD 培养基的 3 000 mL 锥形瓶中,共 18 瓶,放入振荡培养箱中,于 28℃、130 r/min 振荡培养 7 d,总发酵体积 21.6 L。用纱布、滤纸抽滤,分离菌丝和菌液,菌丝用蒸馏水洗净、烘干,得到的厚孢镰刀菌菌丝体干质量约 63.5 g。粉碎后用甲醇 2 000 mL (2×1 000 mL) 提取,每次先超声 30 min,再室温浸提 24 h,滤过。合并甲醇提取液,在 40℃ 下减压浓缩共得到约 9.9 g 浸膏。将浸膏经硅胶柱色谱分离,先用石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱,后用醋酸乙酯-甲醇梯度洗脱。石油醚-醋酸乙酯(9:1)部分经反复柱色谱及凝胶 Sephadex LH-20 纯化得到化合物 **1** (47.4 mg);石油醚-醋酸乙酯(8:2)部分经反复柱色谱得到化合

物 **2** (6.6 mg);醋酸乙酯部分经凝胶 Sephadex LH-20 纯化得到化合物 **3** (13.7 mg) 和 **4** (6.4 mg);醋酸乙酯-甲醇(9:1)部分经反复柱色谱及凝胶 Sephadex LH-20 纯化、甲醇重结晶得到化合物 **5** (5.2 mg)、**6** (9.2 mg)、**7** (6.8 mg) 和 **8** (4.6 mg)。

### 3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色针状结晶(氯仿), mp 176~179℃; 分子式 C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>; EI-MS  $m/z$ : 428 [M]<sup>+</sup>, 410, 378, 363, 271, 253, 197, 183, 157, 115。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.49 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-7), 6.23 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-6), 5.22 (1H, dd,  $J$  = 15.2, 7.6 Hz, H-23), 5.14 (1H, dd,  $J$  = 15.2, 7.6 Hz, H-22), 3.96 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-28), 0.98 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-21), 0.91 (3H, d,  $J$  = 6.5 Hz, H-27), 0.90 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-26), 0.83 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 34.8 (C-1), 31.5 (C-2), 66.4 (C-3), 37.0 (C-4), 79.4 (C-5), 135.4 (C-6), 130.7 (C-7), 82.1 (C-8), 51.1 (C-9), 36.9 (C-10), 20.9 (C-11), 39.4 (C-12), 44.6 (C-13), 51.7 (C-14), 28.6 (C-15), 23.4 (C-16), 56.2 (C-17), 12.8 (C-18), 17.5 (C-19), 39.7 (C-20), 19.7 (C-21), 132.4 (C-22), 135.2 (C-23), 42.8 (C-24), 33.0 (C-25), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.5 (C-28)。参考文献报道的波谱数据<sup>[6]</sup>, 鉴定化合物 **1** 为过氧麦角甾醇。

化合物 **2**: 白色固体, mp 129~131℃; 分子式 C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O; EI-MS  $m/z$ : 396 [M]<sup>+</sup>, 381, 353, 257, 203, 147, 55。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.73 (1H, d,  $J$  = 5.8 Hz, H-4), 5.17 (1H, dd,  $J$  = 4.2, 10.1 Hz, H-22), 5.10 (1H, dd,  $J$  = 5.6, 10.1 Hz, H-23), 1.20 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, d,  $J$  = 7.2 Hz, H-27), 0.96 (3H, d,  $J$  = 7.0 Hz, H-26), 0.93 (3H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-28), 0.76 (3H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-21), 0.74 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 35.1 (C-1), 34.7 (C-2), 198.6 (C-3), 124.5 (C-4), 170.4 (C-5), 33.6 (C-6), 32.5 (C-7), 36.1 (C-8), 54.3 (C-9), 39.3 (C-10), 21.0 (C-11), 40.1 (C-12), 42.9 (C-13), 56.3 (C-14), 24.3 (C-15), 28.7 (C-16), 56.4 (C-17), 12.6 (C-18), 17.7 (C-19), 36.8 (C-20), 21.6 (C-21), 132.4 (C-22), 135.1 (C-23), 32.0 (C-24), 32.1 (C-25), 20.0 (C-26), 19.7 (C-27), 19.6 (C-28)。参考文献报道的波谱数据<sup>[7]</sup>, 鉴定化合物 **2** 为麦角甾-4,22-二烯-3-酮。

化合物 **3**: 淡黄色油状物, 分子式 C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>;

EI-MS  $m/z$ : 278  $[M]^+$ , 223, 205, 150, 149, 31。  
 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.72 (2H, d,  $J = 3.5$  Hz, H-3, 6), 7.50 (2H, d,  $J = 3.5$  Hz, H-4, 5), 4.31 (4H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-8, 8'), 1.73 (4H, m, H-9, 9'), 1.43 (4H, m, H-10, 10'), 0.91 (6H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-11, 11');  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 133.6 (C-1, 2), 129.9 (C-3, 6), 132.4 (C-4, 5), 169.3 (C-7, 7'), 65.6 (C-8, 8'), 31.7 (C-9, 9'), 19.9 (C-10, 10'), 14.1 (C-11, 11')。参考文献报道的波谱数据<sup>[8]</sup>, 鉴定化合物 **3** 为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 **4**: 淡黄色油状物, 分子式  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ ;  
 EI-MS  $m/z$ : 278  $[M]^+$ , 223, 205, 149, 76, 57。 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.70 (2H, d,  $J = 3.5$  Hz, H-3, 6), 7.54 (2H, m, H-4, 5), 4.33 (4H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-8, 8'), 2.01 (4H, m, H-9, 9'), 1.02 (12H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-10, 10', 11, 11');  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 132.3 (C-1, 2), 128.8 (C-3, 6), 130.9 (C-4, 5), 167.7 (C-7, 7'), 71.7 (C-8, 8'), 27.6 (C-9, 9'), 19.1 (C-10, 10'), 19.1 (C-11, 11')。参考文献报道的波谱数据<sup>[9]</sup>, 鉴定化合物 **4** 为邻苯二甲酸二异丁酯。

化合物 **5**: 白色粉末, mp 236~239 °C; 分子式  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ ; ESI-MS  $m/z$ : 124  $[M-H]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 9.11 (1H, s, H-2), 8.74 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-6), 8.40 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-4), 7.52 (1H, dd,  $J = 7.8, 4.2$  Hz, H-5);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 166.2 (C=O), 150.2 (C-2), 126.5 (C-3), 136.8 (C-4), 123.7 (C-5), 153.2 (C-6)。参考文献报道的波谱数据<sup>[10]</sup>, 鉴定化合物 **5** 为烟酸。

化合物 **6**: 白色粉末, mp 185~188 °C; 分子式  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ ; ESI-MS  $m/z$ : 117  $[M-H]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 2.55 (4H, s,  $2 \times -\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 176.2 (-COOH), 29.9 (-CH<sub>2</sub>)。参考文献报道的波谱数据<sup>[11]</sup>, 鉴定化合物 **6** 为琥珀酸。

化合物 **7**: 白色粉末, mp 95~98 °C; 分子式  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ ; ESI-MS  $m/z$ : 131  $[M-H]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 2.35 (4H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-2, 4), 1.87 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 177.1 (-COOH), 33.9 (C-2), 21.4 (C-3)。参考文献报道的波谱数据<sup>[12]</sup>, 鉴定化合物 **7** 为戊二酸。

化合物 **8**: 浅黄色油状物, 分子式  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ ;  
 EI-MS  $m/z$ : 202  $[M]^+$ , 154, 143, 130, 86, 70。 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.54 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-4), 7.31 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-7), 7.09 (2H, dd,  $J = 8.1, 7.8$  Hz, H-6), 7.04 (2H, dd,  $J = 7.8, 8.0$  Hz, H-5), 6.99

(1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-2), 3.45 (2H, m, H-11), 2.93 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-10), 1.90 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 122.3 (C-2), 113.3 (C-3), 119.2 (C-4), 119.6 (C-5), 123.3 (C-6), 112.2 (C-7), 138.2 (C-8), 128.8 (C-9), 26.2 (C-10), 41.6 (C-11), 173.3 (C-13), 22.6 (C-14)。参考文献报道的波谱数据<sup>[13]</sup>, 鉴定化合物 **8** 为  $N_b$ -乙酰基色胺。

#### 4 讨论

本实验首次对怀山药优势内生真菌——厚孢镰刀菌的次生代谢产物进行了研究, 利用色谱和光谱技术从厚孢镰刀菌液体发酵菌丝的甲醇提取物中分离鉴定出 8 个化合物, 分别属于甾体、生物碱、脂肪酸及脂肪酸酯类成分。文献报道过氧麦角甾醇具有多种生物活性如促进肿瘤细胞凋亡<sup>[14]</sup>、抗炎<sup>[15]</sup>、抗菌等<sup>[16]</sup>。 $N_b$ -乙酰基色胺最早为人工合成产物, 2003 年首次以天然产物的形式从一种海洋真菌的发酵液中被发现<sup>[13]</sup>, 文献报道其为褪黑激素的拮抗剂<sup>[17]</sup>。近年来随着怀山药的大规模人工栽培, 如何保证药材的质量和产量是一个重要且急迫的问题。目前人工栽培怀山药的研究主要集中在药材的外部生长环境, 即气候因子、光照、温度、土壤、水分等, 对药材内环境的研究几乎空白<sup>[18]</sup>。怀山药道地性的形成非常复杂, 其道地性的科学机制阐明必然是一个复杂的系统研究。本实验作为怀山药道地性系统研究的一个开端, 从怀山药优势内生真菌次生代谢产物着手研究怀山药道地药材可能的形成机制。本研究结果为今后进一步研究内生真菌与怀山药道地性之间的关联作用, 如内生菌促进药材生长发育、增强药材抗逆性及促进怀山药药材有效成分积累等研究提供一些参考。

#### 参考文献

- [1] Strobel G, Stierle A, Stierle D, *et al.* Taxomyces andreanae, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. *Mycotaxon*, 1993, 47(1): 71-80.
- [2] Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(6): 535-544.
- [3] 李 强, 刘 军, 周东坡, 等. 植物内生菌的开发与研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2006, 3(1): 33-38.
- [4] Strobel G A, Miller R V, Miller M C, *et al.* Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis quercina* [J]. *Microbiology*, 1999, 145(12): 1919-1926.
- [5] 江 曙, 钱大玮, 段金殿, 等. 植物内生菌与道地药材

- 的相关性研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1268-1272.
- [6] Bok J W, Lerner L, Chilton J, *et al.* Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(7): 891-898.
- [7] Wright J L C, McInnes A G, Shimizu S, *et al.* Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Can J Chem*, 1978, 56(14): 1898-1903.
- [8] McNulty J, Nair J J, Cheekoori S, *et al.* Scope and mechanistic insights into the use of tetradecyl (trihexyl) phosphonium bistriflimide: A remarkably selective ionic liquid solvent for substitution reactions [J]. *Chem Eur J*, 2006, 12(36): 9314-9322.
- [9] Zhang W, Lou H X, Li G Y, *et al.* A new triterpenoid from *Entodon okamurae* Broth [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(3): 189-195.
- [10] 李春远, 丁唯嘉, 余志刚, 等. 海洋放线菌 *Streptomyces* sp. (#195-02) 的代谢产物研究 [J]. 中药材, 2008, 31(5): 645-647.
- [11] Singh S, Verma M, Singh K N. Superoxide ion induced oxidation of  $\gamma$ -lactones to  $\gamma$ -ketocarboxylic acids [J]. *Synth Commun*, 2004, 34(24): 4471-4475.
- [12] Das S, Rani E R, Mahanti M K. Kinetics and mechanism of the oxidative cleavage of ketones by quinolinium dichromate [J]. *Kinet Katal*, 2007, 48(3): 381-389.
- [13] Li Y, Li X F, Kim D S, *et al.* Indolyl alkaloid derivatives,  $N_b$ -acetyltryptamine and oxaline from a marine-derived fungus [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(1): 21-23.
- [14] Takei T, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, *et al.* Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2005, 69(1): 212-215.
- [15] Kobori M, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, *et al.* Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells [J]. *Br J Pharm*, 2007, 150(2): 209-219.
- [16] 麻兵继, 文春南, 吴婷婷, 等. 麦角甾醇过氧化物的抑菌活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33(7): 42-43.
- [17] Dubocovich M L. *N*-Acetyltryptamine antagonizes the melatonin-induced inhibition of [3H] dopamine release from retina [J]. *Eur J Pharmacol*, 1984, 105(1): 193-194.
- [18] 韩锁义, 张新友, 王素霞, 等. 河南省怀山药生产现状 [J]. 河南农业科学, 2011, 40(9): 109-111.