

霍山石斛内生真菌 *Fusarium lactis* 次生代谢产物研究

梁益敏, 郁 阳, 王国凯, 刘劲松, 张培良, 马宗慧, 刘海涛, 王 刚*

安徽中医药大学药学院, 现代中药安徽省重点实验室, 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 研究霍山石斛内生真菌 *Fusarium lactis* 的次生代谢产物。方法 利用硅胶、Sephadex LH-20、反相、中压、高效液相制备等多种色谱法分离纯化, 根据波谱方法对化合物进行结构鉴定。结果 从霍山石斛内生真菌 *Fusarium lactis* 中分离得到 21 个化合物, 分别鉴定为 *N*-苯乙基乙酰胺 (1)、1*H*-indole-3-carbaldehyde (2)、胸腺嘧啶 (3)、尿嘧啶 (4)、lignoren (5)、尿嘧啶核苷 (6)、己六醇 (7)、腺嘌呤核苷 (8)、环-甘氨酸-(*L*)-脯氨酸 (9)、环 (*D*)-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸 (10)、环 (*L*)-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸 (11)、2-pyrrolidinone (12)、*N*-methyl-2-pyrrolidinone (13)、环 (*L*)-4-羟基-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸 (14)、brevianamide F (15)、3-甲基哌嗪-2,5-二酮 (16)、7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (17)、环 (*L*)-酪氨酸-(*L*)-苯丙氨酸 (18)、啤酒甾醇 (19)、大豆黄素 (20)、赤藓糖醇 (21)。结论 所有化合物均为首次从霍山石斛内生真菌 *Fusarium lactis* 中分离得到。

关键词: 霍山石斛; *Fusarium lactis*; 内生真菌; 次生代谢产物; 环-甘氨酸-(*L*)-脯氨酸; 赤藓糖醇

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)22-4608-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.003

Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium lactis* from *Dendrobium huoshanense*

LIANG Yi-min, YU Yang, WANG Guo-kai, LIU Jin-song, ZHANG Pei-liang, MA Zong-hui, LIU Hai-tao, WANG Gang

School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine & Anhui Key Laboratory for Modern Chinese Materia Medica & Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei 230012, China

Abstract: **Objective** To study the secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium lactis* in *Dendrobium huoshanense*. **Methods** Compounds were isolated from the EtOAc extract by chromatography technology and their structures were elucidated on the basis of comprehensive spectroscopic analysis. **Results** Twenty-one compounds were isolated and identified as *N*-phenethylacetamide (1), 1*H*-indole-3-carbaldehyde (2), thymidine (3), uracil (4), lignoren (5), uridine (6), hexahydrate (7), adenosine (8), cyclo-glycine-(*L*)-proline (9), cyclo (*D*)-proline-(*L*)-phenylalanine (10), cyclo (*L*)-proline-(*L*)-phenylalanine (11), 2-pyrrolidinone (12), *N*-methyl-2-pyrrolidinone (13), cyclo-(*L*)-4-OH-proline-(*L*)-phenylalanine (14), brevianamide F (15), 3-methyl-piperazine-2,5-dione (16), 7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4 (1*H*,3*H*)-dione (17), cyclo (*L*)-tyrosine-(*L*)-phenylalanine (18), beer sterols (19), daidzein (20), and erythritol (21). **Conclusion** All compounds are isolated from *Fusarium lactis* for the first time.

Key words: *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng; *Fusarium lactis*; endophytic fungi; secondary metabolites; cyclo-glycine-(*L*)-proline; erythritol

长久以来, 植物是筛选天然药物作为先导化合物的主要原料, 但药用植物的过度使用, 致使许多药用植物濒临灭绝, 而内生真菌作为植物内环境

真菌的生物多样性, 不同种的内生真菌次生代谢产物必然存在着化学多样性, 是一种高效便捷获取目标化合物的替代途径, 尤其是对那些濒临灭绝的药用植物保护和资源可持续发展具有重要意义^[1]。

近年来, 内生真菌的次生代谢产物研究备受关

收稿日期: 2017-07-18

基金项目: 国家中医药管理局“中药化学”重点学科建设项目; 安徽省高校自然科学基金重点项目 (KJ2016A856)

作者简介: 梁益敏 (1961—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为药用植物组织栽培与化学。Tel: (0551)68129167

*通信作者 王 刚, 教授, 硕士生导师。Tel: (0551)68129167 E-mail: kunhong_8@163.com

注,其结构多样性,必然蕴藏着生物活性的多样性,尤其是在农业和医药业中具有重要的潜力。目前从内生真菌中发现的次生代谢产物种类涵盖了萜类、醌类、生物碱类、异香豆素类、苯并呋喃类、甾体和多肽、酚类化合物等。近年来,利用植物内生真菌生产抗癌药物、杀虫剂、抑菌剂、植物激素、抗病毒剂、抗氧化剂、免疫抑制剂等均有研究报道^[2-7]。

霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng 又称米斛,石斛中最名贵的品种,也是最具代表性的品种,是安徽省地道药材,具有抗肿瘤、抗氧化、保肝、预防白内障等现代药理作用^[7];多糖、生物碱、微量元素以及氨基酸等是其主要活性物质成分^[8]。

本实验在前期研究霍山石斛内生真菌多样性的基础上选取其中一株优势菌株——*Fusarium lactis* 进行次生代谢产物研究,探索内生真菌与宿主植物相同或相似活性成分生源代谢途径,揭示内生真菌与宿主植物共生关系机制,也为进一步从内生真菌中寻找结构新颖和生物活性高的先导化合物,扩大天然产物探索途径奠定基础。本研究采用经典次生代谢产物分离法,从该菌株发酵物的醋酸乙酯萃取物中分离得到 21 个化合物,分别鉴定为 *N*-苯乙酰胺 (*N*-phenethylacetamide, **1**)、1*H*-indole-3-carbaldehyde (**2**)、胸腺嘧啶 (thymidine, **3**)、尿嘧啶 (uracil, **4**)、lignoren (**5**)、尿嘧啶核苷 (uridine, **6**)、己六醇 (hexahydrate, **7**)、腺嘌呤核苷 (adenosine, **8**)、环-甘氨酸-(*L*)-脯氨酸 [cyclo-glycine-(*L*)-proline, **9**]、环(*D*)-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸 [cyclo(*D*)-proline-(*L*)-phenylalanine, **10**]、环(*L*)-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸[cyclo(*L*)-proline-(*L*)-phenylalanine, **11**]、2-pyrrolidinone (**12**)、*N*-methyl-2-pyrrolidinone (**13**)、环(*L*)-4-羟基-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸 [cyclo-(*L*)-4-OH-proline-(*L*)-phenylalanine, **14**]、brevianamide F (**15**)、3-甲基哌嗪-2,5-二酮 (3-methyl-piperazine-2,5-dione, **16**)、7,8-dimethylbenzo [g] pteridine-2,4 (1*H*,3*H*)-dione (**17**)、环(*L*)-酪氨酸-(*L*)-苯丙氨酸 [cyclo(*L*)-tyrosine-(*L*)-phenylalanine, **18**]、啤酒甾醇 (beer sterols, **19**)、大豆黄素 (daidzein, **20**)、赤藓糖醇 (erythritol, **21**)。所有化合物均首次从内生真菌 *Fusarium lactis* 中分离得到。

1 仪器与材料

霍山石斛购于安徽省六安市霍山县黑石渡镇彭

泽生物科技有限公司(北纬 31°25′18.46″、东经 116°16′15.98″),经亳州技术学院方成武教授鉴定为霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng。内生真菌分子鉴定由上海生工生物工程有限公司完成。*Fusarium lactis* 菌株从新鲜霍山石斛茎中分离得到,利用 PCR 技术扩增其 18 S DNA,经过基因测序比对后鉴定 *Fusarium lactis* (Genbank: U61681),活化好后放入 4 °C 冰箱,菌种保存于安徽中医药大学天然药物化学研究室。

质谱由 Waters Auto Premier P776 质谱仪、Agilent G6230AA TOF LC/MS 质谱仪或者 Agilent UPLC/Q-TOF 质谱仪测定;分析型 HPLC 为 Agilent 1100 型 (Extend-C₁₈, 150 mm×4.6 mm, 5 μm);制备型 HPLC 为 Agilent 1260 型 (Zorbax SB-C₁₈, 150 mm×9.4 mm, 5 μm, 体积流量 8 mL/min; Zorbax SB-C₁₈, 150 mm×21.2 mm, 体积流量 16 mL/min);MPLC 为瑞士 BÜCHI 实验室技术服务有限公司 Sepacore System (配备泵控制系统 C-615, 泵模块 C-605, 自动接收器 C-600, 填料 RP₁₈, 45~70 μm, 4.5~50 cm);正相柱色谱硅胶 (200~300 目) 由青岛海洋化工厂生产;反相柱色谱硅胶使用日本富士化工有限公司的 RP₁₈ (45~70 μm);Sephadex LH-20 由瑞典 Amersham Biosciences 公司生产;核磁共振由 Bruker AM-400、DRX 500 测定和 AVANCE III-600、AVANCE800 核磁仪测定;所用试剂均为分析纯。

2 发酵、提取与分离

将冰箱保存的菌株 *Fusarium lactis* 接种到经高压灭菌的 PDA 平板培养基上,于 28 °C 培养箱活化培养 7 d。用灭菌后的 6 mm 打孔器打孔取其菌饼置装有 400 mL PDB 培养基的 1 000 mL 锥形瓶中,共 125 瓶,放入振荡培养箱中,于 28 °C、135 r/min 振荡培养 15 d,总发酵体积 50 L。将发酵液 (50 L) 用醋酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液减压浓缩得到黄色油状浸膏 4.2 g,经中压色谱以甲醇-水 (0:100→100:0) 梯度洗脱得到 4 个组分 (A~F)。

组分 A 硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇 3:1 洗脱得到亚组分 A1 和 A2, A1 和 A2 反复重结晶得化合物 **7** (68.3 mg) 和 **21** (23.6 mg)。

组分 B 经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇 5:1 洗脱,再经高效液相色谱 (乙腈-水 3:97→13:87, 20 min) 制备得化合物 **6** (*t_R*=3.8 min, 2.1 mg) 和 **8** (*t_R*=4.9 min, 1.9 mg)。

组分C经硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮(2:1)洗脱,再经Sephadex LH-20柱甲醇洗脱得到2个亚组分C1和C2,对C1组分经高效液相色谱法(乙腈-水 10:92→30:70, 20 min)制备得化合物**3**(t_R =8.1 min, 0.8 mg)和**4**(t_R =8.6 min, 2.1 mg);对C2组分进高效液相色谱法(乙腈-水 12:88→37:65, 25 min)制备得化合物**9**(t_R =7.5 min, 1.3 mg)和**16**(t_R =8.2 min, 2.2 mg)。

组分D经硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮(3:1)洗脱得3个亚组分D1、D2和D3,对D1组分高效液相色谱(乙腈-水 15:85→40:60, 25 min)制备得化合物**10**(t_R =10.2 min, 4.5 mg)和**11**(t_R =10.3 min, 5.3 mg)。对组分D2经Sephadex LH-20柱甲醇洗脱,再经高效液相色谱(乙腈-水 15:85→40:60, 20 min)制备得化合物**1**(t_R =9.7 min, 3.6 mg)和**2**(t_R =11.9 min, 1.1 mg)。对组分D3高效液相色谱(乙腈-水 18:82→43:57, 25 min)制备得化合物**5**(t_R =10.5 min, 19.8 mg)。

组分E经硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮4:1洗脱得2个亚组分E1和E2,对组分E1经高效液相色谱法(乙腈-水 20:80→40:80, 25 min)制备得到化合物**12**(6.6 min)(8.7 mg)和**13**(6.9 min)(3.4 mg)。对组分E2经Sephadex LH-20柱丙酮洗脱,再经高效液相色谱法(乙腈-水 20:80→40:80, 20 min)制备化合物**14**(t_R =11.3 min, 2.0 mg)、**15**(t_R =12.5 min, 1.6 mg)和**18**(t_R =13.8 min, 0.9 mg)。

组分F经Sephadex LH-20柱,氯仿-甲醇(1:1)洗脱,再经高效液相色谱(乙腈-水 25:75→50:50, 25 min)制备得到化合物**17**(t_R =8.7 min, 1.3 mg)、**19**(t_R =12.4 min, 0.8 mg)和**20**(t_R =9.1 min, 1.1 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 186 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.26~7.29 (2H, m, H-2', 6'), 7.17~7.21 (3H, m, H-3', 4', 5'), 3.38 (2H, m, H-4), 2.78 (2H, m, H-5), 1.90 (3H, s, CH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 22.6 (C-1), 173.4 (C-2), 42.2 (C-4), 36.6 (C-5), 140.6 (C-1'), 129.6 (C-2', 6'), 129.9 (C-3', 5'), 127.5 (C-4')。以上数据与文献报道一致^[9],故鉴定化合物**1**为*N*-苯乙基乙酰胺。

化合物**2**: 淡黄色针状结晶(氯仿-甲醇)。ESI-MS m/z : 144 $[M-H]^-$; 1H -NMR (600 MHz,

CD_3OD) δ : 9.88 (1H, s, -CHO), 8.10 (1H, s, H-2), 8.15 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-4), 7.47 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-7), 7.22~7.29 (2H, m, H-5, 6); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 139.9 (C-2), 123.7 (C-5), 122.5 (C-6), 113.2 (C-7), 125.1 (C-8), 187.5 (CHO)。以上数据与文献报道一致^[10-11],故鉴定化合物**2**为1*H*-indole-3-carbaldehyde。

化合物**3**: 白色粉末。EI-MS m/z : 125 $[M-H]^-$; 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.22 (1H, s, H-6), 1.85 (3H, m, CH_3)。以上数据与文献报道一致^[12-13],故鉴定化合物**3**为胸腺嘧啶。

化合物**4**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 135 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.02 (1H, brs, NH), 10.82 (1H, brs, NH), 7.39 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-5), 5.44 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 151.5 (C-2), 164.4 (C-4), 100.2 (C-5), 142.3 (C-6)。以上数据与文献报道一致^[14],故鉴定化合物**4**为尿嘧啶。

化合物**5**: 透明油状物。ESI-MS m/z : 245 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.11 (1H, q, H-3'), 2.04 (2H, m, H-2'), 1.82/1.53 (2H, m, H-4), 1.80 (1H, m, H-3), 1.67 (3H, s, H-6'), 1.65/1.55 (2H, m, H-5), 1.60 (3H, s, H-5'), 1.47 (2H, m, H-1'), 1.22 (3H, s, H-9), 1.13 (3H, s, H-7'), 1.02 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-8); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 75.6 (C-2), 55.48 (C-3), 25.2 (C-4), 42.2 (C-5), 82.1 (C-6), 45.6 (C-7), 15.5 (C-8), 26.0 (C-9), 41.5 (C-1'), 23.8 (C-2'), 126.0 (C-3'), 132.1 (C-4'), 17.8 (C-5'), 26.2 (C-6'), 24.8 (C-7')。以上数据与文献报道一致^[15-16],故鉴定化合物**5**为lignoren。

化合物**6**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 267 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.00 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-6), 5.69 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 5.90 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-1'), 4.14 (1H, m, H-2'), 4.00 (1H, m, H-3'), 3.84 (1H, m, H-4'), 3.74 (1H, m, H-5'a), 3.72 (1H, m, H-5'b); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 152.6 (C-2), 166.4 (C-4), 102.8 (C-5), 142.8 (C-6), 90.7 (C-1'), 71.4 (C-2'), 75.8 (C-3'), 86.4 (C-4'), 62.3 (C-5')。以上数据与文献报道一致^[17-18],故鉴定化合物**6**为尿嘧啶核苷。

化合物**7**: 无色结晶(甲醇)。ESI-MS m/z : 205 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 4.40 (1H, d, J = 5.5 Hz, 1-OH), 3.32 (1H, t, J = 5.5 Hz,

2-OH), 4.13 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, 3-OH), 3.33~3.60 (4H, m, H-1~3); $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 63.9 (C-1, 6), 69.7 (C-2, 5), 71.3 (C-3, 4)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **7** 为己六醇。

化合物 **8**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 291 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.33 (1H, s, H-2), 8.11 (1H, s, H-8), 7.33 (2H, s, NH_2), 5.86 (1H, d, $J = 6.25$ Hz, H-1'), 5.44 (2H, m, 2', 5'-OH), 5.18 (1H, m, 3'-OH), 4.60 (1H, q, $J = 5.9$ Hz, H-2'), 4.12 (1H, q, $J = 3.1$ Hz, H-3'), 3.95 (1H, q, $J = 3.2$ Hz, H-4'), 3.65 (1H, m, H-5'a), 3.55 (1H, m, H-5'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 152.40 (C-2), 149.0 (C-4), 119.3 (C-5), 156.1 (C-6), 139.9 (C-8), 87.9 (C-1'), 73.4 (C-2'), 70.6 (C-3'), 85.9 (C-4'), 61.7 (C-5')。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **8** 为腺嘌呤核苷。

化合物 **9**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 177 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 4.24 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-9), 4.12 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-3a), 3.75 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-3b), 2.34 (1H, m, H-7a), 2.04 (1H, m, H-7b), 1.98 (2H, m, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 172.1 (C-1), 29.5 (C-3), 23.4 (C-4), 47.1 (C-5), 60.0 (C-6), 166.6 (C-7), 48.7 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **9** 为环-甘氨酸-(*L*)-脯氨酸。

化合物 **10**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 267 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.17~7.31 (5H, m, H-2'~6'), 4.56 (1H, brs, H-8), 4.20 (1H, m, H-9), 3.51~3.55 (1H, m, H-3b), 3.36~3.41 (1H, m, H-3a), 3.20 (1H, dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, H-10b), 3.18 (1H, dd, $J = 4.8, 13.8$ Hz, H-10a), 2.97~3.00 (1H, dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, H-6), 2.01~2.05 (1H, m, H-5b), 1.88~1.91 (1H, m, H-4b), 1.59~1.68 (1H, m, H-4a), 1.59~1.68 (1H, m, H-5a); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.5 (C-1), 46.2 (C-3), 22.6 (C-4), 29.9 (C-5), 59.8 (C-6), 171.4 (C-7), 59.2 (C-9), 41.1 (C-10), 136.8 (C-1'), 131.4 (C-2', 6'), 129.8 (C-3', 5'), 128.6 (C-4')。以上数据与文献报道一致^[22-23], 故鉴定化合物 **10** 为环 (*D*)-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸。

化合物 **11**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 267 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.20~7.29 (5H, m, H-2'~6'), 4.56 (1H, brs, H-8), 4.44 (1H, ddd, $J = 5.0, 4.8, 1.0$ Hz, H-9), 4.05 (1H, ddd, $J = 10.8, 1.7,$

6.3 Hz, H-6), 3.48~3.56 (1H, m, H-3a), 3.33~3.39 (1H, m, H-3b), 3.18 (1H, dd, $J = 15.0, 4.8$ Hz, H-10b), 3.14 (1H, dd, $J = 14.4, 5.0$ Hz, H-10a), 1.76~1.82 (2H, m, H-4), 1.20~1.24 (1H, m, H-5a), 2.06~2.11 (1H, m, H-5b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.0 (C-1), 46.0 (C-3), 22.9 (C-4), 29.5 (C-5), 60.1 (C-6), 171.0 (C-7), 57.8 (C-9), 38.3 (C-10), 137.4 (C-1'), 131.2 (C-2', 6'), 129.5 (C-3', 5'), 128.1 (C-4')。以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 **11** 为环 (*L*)-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸。

化合物 **12**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 108 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.39 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5), 2.29 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3), 2.12 (1H, m, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 181.7 (C-2), 31.3 (C-3), 21.8 (C-4), 43.7 (C-5)。以上数据与文献报道一致^[24], 故鉴定化合物 **12** 为 2-pyrrolidinone。

化合物 **13**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 122 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.45 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5), 2.82 (1H, s, N- CH_3), 2.36 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3), 2.04 (1H, m, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ : 177.8 (C-2), 31.8 (C-3), 18.7 (C-4), 50.9 (C-5), 29.9 (CH_3)。以上数据与文献报道一致^[25], 故鉴定化合物 **13** 为 *N*-methyl-2-pyrrolidinone。

化合物 **14**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 283 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.20~7.29 (5H, m, H-2'~6'), 4.56 (1H, brs, H-8), 4.48 (1H, ddd, $J = 5.3, 4.8, 2.0$ Hz, H-9), 4.36 (1H, ddd, $J = 10.8, 4.8, 1.8$ Hz, H-6), 4.27 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-4), 3.70 (1H, dd, $J = 13.2, 4.8$ Hz, H-3b), 3.27 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-3a), 3.15 (1H, dd, $J = 5.4, 14.4$ Hz, H-10a), 3.19 (1H, dd, $J = 4.8, 15$ Hz, H-10b), 2.05 (1H, ddd, $J = 12.6, 5.4, 1.0$ Hz, H-5a), 1.35 (1H, ddd, $J = 12.0, 10.8, 4.8$ Hz, H-5b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.2 (C-1), 55.3 (C-3), 68.6 (C-4), 39.0 (C-5), 58.4 (C-6), 171.3 (C-7), 57.7 (C-9), 38.1 (C-10), 137.5 (C-1'), 131.1 (C-2', 6'), 129.6 (C-3', 5'), 128.2 (C-4')。以上数据与文献报道一致^[26], 故鉴定化合物 **14** 为环(*L*)-4-羟基-脯氨酸-(*L*)-苯丙氨酸。

化合物 **15**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 306 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.56 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.32 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8'), 7.10 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-2'), 7.08 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7'),

6.99 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-6'), 4.56 (1H, brs, H-8), 4.41 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-9), 4.01 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, H-6), 3.33 (1H, m, H-3a), 3.26 (1H, m, H-3b), 3.27 (1H, dd, $J = 3.6, 12.0$ Hz, H-10b), 3.24 (1H, dd, $J = 3.6, 12.0$ Hz, H-10a), 1.97 (1H, m, H-4a), 1.67 (1H, m, H-4b), 1.67 (1H, m, H-5b), 1.32 (1H, m, H-5a); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.0 (C-1), 46.0 (C-3), 22.9 (C-4), 29.3 (C-5), 60.2 (C-6), 170.8 (C-7), 57.3 (C-9), 29.2 (C-10), 125.7 (C-2'), 109.6 (C-3'), 128.8 (C-4'), 120.0 (C-5'), 119.9 (C-6'), 122.7 (C-7'), 112.4 (C-8'), 138.1 (C-9')。以上数据与文献报道一致^[27-29], 故鉴定化合物 **15** 为 brevianamide F。

化合物 **16**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 151 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.15 (1H, brs, NH), 7.97 (1H, brs, NH), 3.75 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, CH_2), 3.69 (1H, dd, $J = 1.8, 17.4$ Hz, H-3), 3.82 (1H, q, $J = 7.2$ Hz, H-6), 1.24 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 168.8 (C-1), 49.7 (C-3), 166.3 (C-4), 44.5 (C-6), 18.6 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[30], 故鉴定化合物 **16** 为 3-甲基哌嗪-2,5-二酮。

化合物 **17**: 黄色粉末。EI-MS m/z : 243 $[\text{M} - \text{H}]^-$; ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.71 (1H, brs, 3-NH), 11.62 (1H, brs, 1-NH), 7.87 (1H, s, H-6), 7.66 (1H, s, H-9), 2.45 (3H, s, 8- CH_3), 2.44 (3H, s, 7- CH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 151.8 (C-2), 161.5 (C-4), 130.5 (C-4a), 142.0 (C-5a), 128.6 (C-6), 138.1 (C-7), 20.2 (7- CH_3), 138.3 (C-8), 19.6 (8- CH_3), 125.8 (C-9), 144.3 (C-9a), 146.7 (C-10a)。以上数据与文献报道一致^[31-32], 故鉴定化合物 **17** 为 7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4 (1H,3H)-dione。

化合物 **18**: 白色无定形粉末。EI-MS m/z : 310 $[\text{M}]^+$ (3), 204 (45), 113 (42), 107 (100), 91 (55), 85 (16), 77 (23), 65 (13), 57 (10); ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.24 (1H, s, 4'-OH), 7.87 (2H, brs, 1, 4-NH), 7.28 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3'', 5''), 7.20 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4''), 7.03 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2'', 6''), 6.82 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.67 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 3.94 (1H, m, H-6), 3.89 (1H, m, H-3), 2.55 (2H, m, H-6a), 2.22 (2H, m, H-3a); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.4 (C-2 or 5), 166.2 (C-2 or 5), 55.9 (C-3 or 6), 55.4 (C-3 or 6), 38.5 (C-3a or 6a), 128.2 (C-2', 6'), 115.0 (C-3', 5'), 156.1 (C-4'),

136.6 (C-1''), 130.8 (C-2'', 6''), 129.7 (C-3'', 5'')。以上数据与文献报道一致^[33-34], 故鉴定化合物 **18** 为环(L)-酪氨酸-(L)-苯丙氨酸。

化合物 **19**: 白色针状结晶(氯仿)。ESI-MS m/z : 453 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.56 (1H, brs, H-7), 5.22 (1H, dd, $J = 14.9, 7.5$ Hz, H-23), 5.18 (1H, dd, $J = 14.9, 7.5$ Hz, H-24), 4.80 (1H, m, H-3), 4.30 (1H, brs, H-6), 0.99 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.84 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.80 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26), 0.54 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 31.2 (C-1), 31.6 (C-2), 66.0 (C-3), 40.0 (C-4), 74.4 (C-5), 72.1 (C-6), 119.4 (C-7), 139.7 (C-8), 42.2 (C-9), 36.6 (C-10), 21.3 (C-11), 38.4 (C-12), 43.0 (C-13), 54.2 (C-14), 22.6 (C-15), 27.1 (C-16), 55.3 (C-17), 12.1 (C-18), 17.7 (C-19), 39.9 (C-14), 21.0 (C-21), 135.4 (C-22), 131.4 (C-23), 42.2 (C-24), 32.4 (C-25), 19.7 (C-26), 19.5 (C-27), 17.3 (C-28)。以上数据与文献报道一致^[35], 故鉴定化合物 **19** 为啤酒甾醇。

化合物 **20**: 淡黄色针晶(氯仿-甲醇)。ESI-MS m/z : 277 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.13 (1H, s, 2-H), 8.05 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 7.37 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, H-6), 6.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.84 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', 5'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 154.8 (C-2), 118.13 (C-3), 178.3 (C-4), 128.6 (C-5), 116.8 (C-6), 165.3 (C-7), 103.4 (C-8), 160.0 (C-9), 116.8 (C-10), 126.0 (C-1'), 131.5 (C-2', 6'), 116.3 (C-3', 5'), 158.8 (C-4')。以上数据与文献报道一致^[36-37], 故鉴定化合物 **20** 为大豆黄素。

化合物 **21**: 无色方晶(甲醇)。ESI-MS m/z : 145 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.75 (4H, d, $J = 11.0$ Hz, H-1, 4), 3.57~3.61 (2H, m, H-2, 3); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 64.8 (C-1, 4), 73.9 (C-2, 3)。以上数据与文献报道一致^[38], 故鉴定化合物 **21** 为 D-赤藓糖醇。

参考文献

- [1] 王坤腾, 王来友. 中药内生真菌化学多样性的研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(9): 43-46.
- [2] Liu L, Chen X, Li D, et al. Bisabolane sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium*

- brasiliense* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(4): 746-753.
- [3] El-Amrani M, Ebada S S, Ga H A, *et al*. Pestalotiopamide E and pestalotiopin B from an endophytic fungus *Aureobasidium pullulans* isolated from *Aloe vera* leaves [J]. *Phytochemistry Lett*, 2016, 18(2): 95-98.
- [4] Zhu M L, Zhang, X. M, Feng H M, *et al*. Campyridones A-D, pyridone alkaloids from a mangrove endophytic fungus *Campylocarpon* sp. HDN13-307 [J]. *Tetrahedron*, 2016, 72(37): 5679-5683.
- [5] Abdul L K, Liaqat A, Javid H, *et al*. Enzyme inhibitory radicicol derivative from endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* LK12, associated with *Rhazya stricta* [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 12198-12207.
- [6] Liu H X, Tan H B, Liu Y M, *et al*. Three new highly-oxygenated metabolites from the endophytic fungus *Cytospora rhizophorae* A761 [J]. *Fitoterapia*, 2017, 17(4): 1-5.
- [7] 吴胡琦, 罗建平. 霍山石斛的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 208-210.
- [8] 童晨曦, 齐 蕾. 霍山石斛的研究进展及可持续发展 [J]. 医学综述, 2015, 21(24): 4512-4514.
- [9] 韩文菊, 卢小玲, 许强芝, 等. 海洋芽孢杆菌次生代谢产物的分离、鉴定及生物学活性的初步研究 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(10): 1234-1238.
- [10] 张怡评, 韩顺风, 方 华, 等. 互花米草化学成分研究 [J]. 中国海洋药物, 2016, 35(1): 55-59.
- [11] 曹国秀, 陈 刚, 徐文峰, 等. 海洋放线菌 KSC2-1 次级代谢产物化学成分分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(12): 943-946.
- [12] 苏国琛, 张 偲, 漆淑华. 黑角珊瑚的化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1606-1609.
- [13] 邹峥嵘, 易杨华, 姚新生. 海地瓜化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2014, 2(6): 348-350.
- [14] 郑 丹, 姜 怡, 韩 力, 等. 一株新种链霉菌菌丝体次生代谢产物的研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(3): 204-205.
- [15] Berg A, Wangun H V K, Nkengfack A E, *et al*. Lignoren, a new sesquiterpenoid metabolite from *Trichoderma lignorum* HKI 0257 [J]. *Schlegel B J Basic Microbiol*, 2004, 44(4): 317-319.
- [16] Zhang P, Bao B Q, Dang H, *et al*. Anti-inflammatory sesquiterpenoids from a sponge-derived fungus *Acremonium* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(2): 270-275.
- [17] 王金兰, 华 准, 赵宝影, 等. 牵牛全草的化学成分研究 (II) [J]. 中成药, 2011, 33(3): 489-491.
- [18] 伍实花, 张国刚, 左甜甜, 等. 射干化学成分分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(10): 796-799.
- [19] 邹小燕, 高慧媛, 吴 斌, 等. 肿节风化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 354-356.
- [20] 杜文鹏, 徐 彭, 刘 波, 等. 毛竹笋化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2015, 46(3): 334-338.
- [21] Chen J H, Lan X P, Liu Y H, *et al*. The effects of diketopiperazines from *Callyspongia* sp. on release of cytokines and chemokines in cultured J774A. 1 macrophages [J]. *Bio Med Chem Lett*, 2012, 22(9): 3177-3180.
- [22] Wang G H, Dai S K, Chen M J, *et al*. Two diketopiperazine cyclo(Pro-Phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2 [J]. *Chem Nat Comm* 2010, 46(4): 583-585.
- [23] 李春远, 黄 松, 余志刚, 等. 两株红树内生真菌共培养正丁醇萃取部位化学成分研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2014, 53(2): 78-82.
- [24] Williamson K L, Roberts J D. Conformational analysis by nuclear magnetic resonance. nitrogen-15 and carbon-13 spectra of lactams [J]. *J Am Chem Soc*, 1976, 98(17): 5082-5086.
- [25] Latipa J, Hartleyb T G, Watermana P G. Lignans and coumarins metabolites from *Melicope hayesii* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(1): 107-110.
- [26] Furtadoa N A J C, Pupoa M T, Carvalho I, *et al*. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain [J]. *J Braz Chem Soc*, 2005, 16(6B): 1448-1453.
- [27] Zhang D H, Noviendri D, Nursid M, *et al*. 12, 13-Dihydroxyfumitremorgin C, fumitremorgin C, and brevianamide F, antibacterial diketopiperazine alkaloids from the marine-derived fungus *Pseudallescheria* sp. [J]. *Nat Prod Sci*, 2007, 13(3): 251-254.
- [28] 龙 聪, 刘小宇, 卢小玲, 等. 海洋亚硫酸杆菌 M44 的代谢产物研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(4): 254-257.
- [29] 汪 蕾, 胡圣璋, 刘呈雄, 等. 共生真菌巴西类壳小圆孢中环二肽类代谢产物研究 [J]. 化学研究与应用, 2014, 26(9): 1478-1482.
- [30] 郑 丹, 姜 怡, 韩 力, 等. 一株新种链霉菌菌丝体次生代谢产物的研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(3): 201-205.
- [31] 于能江, 郭顺星. 灵芝-共生真菌的发酵液化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(3): 24-26.

- [32] 杨建香, 邱声祥, 余志刚, 等. 南海红树林内生真菌 ZH-3 代谢产物研究 [J]. 化工技术与开发, 2014, 43(2): 1-3.
- [33] Cheng Z H, Wu T, Yu B Y. Chemical constituents in the tubers of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Nat Prod Res Deve*, 2005, 17(1): 1-3.
- [34] 付银丹, 李振麟, 濮社班, 等. 多棘蜈蚣化学成分的研究 (I) [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1726-1729.
- [35] 吴少华, 陈有为, 杨丽源, 等. 印度块菌的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1211-1214.
- [36] 刁义平, 束晓云, 唐于平, 等. 槐叶化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 89-92.
- [37] 江红, 程元荣, 郑卫, 等. 海洋碳样小单孢菌产生的大豆黄素和染料木素 [J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(1): 8-12.
- [38] 麻兵继, 徐俊蕾, 文春南, 等. 猴头菌子实体化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(9): 1165-1168.