

凤丹内生真菌 *Fusarium oxysporum* 次生代谢产物的研究

王举涛, 张培良, 王 刚, 王国凯, 刘劲松, 许凤清, 刘海涛, 吴培云*

安徽中医药大学药学院, 现代中药安徽省工程技术研究中心, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 研究凤丹内生真菌 *Fusarium oxysporum* 的次生代谢产物。方法 运用多种色谱法对菌株 *F. oxysporum* 发酵液的醋酸乙酯萃取部位进行分离纯化, 采用波谱分析对化合物的结构进行鉴定。结果 从菌株 *F. oxysporum* 发酵液的醋酸乙酯萃取部位中共分离得到 23 个化合物, 分别鉴定为 (2*S*)-脯氨酸 (1)、(22*E*,24*R*)-7,22-二烯-3 β ,5 α ,6 β -麦角三醇 (2)、环-(*S*-脯氨酸-*S*-亮氨酸) (3)、环-(*L*-丙氨酸-*L*-脯氨酸) (4)、环-(缬氨酸-脯氨酸) (5)、环-(*R*-脯氨酸-*S*-苯丙氨酸) (6)、环-(*D*-顺-4-羟脯氨酸-*L*-苯丙氨酸) (7)、环-(*L*-反-4-羟基脯氨酸-*L*-苯丙氨酸) (8)、环-(谷氨酸-酪氨酸) (9)、环-(*L*-4-反-羟基脯氨酸-*L*-亮氨酸) (10)、环-(*L*-色氨酸-*L*-脯氨酸) (11)、环-(*L*-亮氨酸-甘氨酸) (12)、*N*-(3-(1*H*-吡啶-3-基)丙基) 乙酰胺 (13)、吡啶-3-乙酸 (14)、2-哌啶酮 (15)、2-吡咯烷酮 (16)、胸腺嘧啶 (17)、(5*S*)-5-((4-羟基苯基)甲基)-2,4-咪唑烷二酮 (18)、(3*S*,6*S*)-3-(2-丁基)-6-(1-羟乙基)-2,5-咪唑二酮 (19)、环-(丙氨酸-亮氨酸) (20)、环-(*S*-脯氨酸-*S*-苯丙氨酸) (21)、环-(酪氨酸-脯氨酸) (22)、环-(*L*-苯丙氨酸-*L*-酪氨酸) (23)。结论 除化合物 2、6、14 外, 其余化合物均为首次从该菌株发酵液中分离得到。

关键词: 凤丹; 内生真菌; *Fusarium oxysporum* Schlecht.; 次生代谢产物; (2*S*)-脯氨酸; 环-(*S*-脯氨酸-*S*-苯丙氨酸)

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)22-5247-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.005

Secondary metabolites from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Paeonia ostii*

WANG Ju-tao, ZHANG Pei-liang, WANG Gang, WANG Guo-kai, LIU Jin-song, XU Feng-qing, LIU Hai-tao, WU Pei-yun

Anhui Engineering Research Center of Modernized Chinese Material, School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Heifei 230012, China

Abstract: **Objective** To study the secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium oxysporum* from *Paeonia ostii*. **Methods** The fermentation liquor of the fungal strain *F. oxysporum* were isolated and purified using various chromatographic methods. The structures of the compounds were identified by spectrum analysis. **Results** Twenty-three compounds were isolated from the fungal and their structures were identified as (2*S*)-proline (1), (22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol (2), cyclo-(*S*-Pro-*S*-Leu) (3), cyclo-(*L*-Ala-*L*-Pro) (4), cyclo-(Val-Pro) (5), cyclo-(*R*-Pro-*S*-Phe) (6), cyclo-(*D*-cis-Hyp-*L*-Phe) (7), cyclo-(*trans*-4-hydroxy-*L*-Pro-*L*-Phe) (8), cyclo-(Gla-Tyr) (9), cyclo-(*trans*-4-hydroxy-*L*-Pro-*L*-Leu) (10), *L,L*-cyclo-(Trp-Pro) (11), cyclo-(*L*-Leu-Gly) (12), *N*-(3-(1*H*-indol-3-yl)propyl)acetamide (13), indole-3-acetic acid (14), 2-piperidone (15), 2-pyrrolidinone (16), thymidine (17), (5*S*)-5-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2,4-imidazolidinedione (18), (3*S*,6*S*)-3-(butan-2-yl)-6-(1-hydroxyethyl) piperazine-2,5-dione (19), cyclo-(Ala-Leu) (20), cyclo-(*S*-Pro-*S*-Phe) (21), cyclo-(Tyr-Pro) (22), and cyclo-(*L*-Phe-*L*-Tyr) (23). **Conclusion** With the exception of compounds 2, 6, and 14, the other compounds are isolated from the fermentation liquor of the fungal strain *F. oxysporum* for the first time.

Key words: *Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang; endophytic fungus; *Fusarium oxysporum* Schlecht.; secondary metabolites; (2*S*)-proline; cyclo-(*S*-Pro-*S*-Phe)

收稿日期: 2018-06-19

基金项目: 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室 (P2017-KF03); 安徽省高等学校自然科学基金重点项目 (KJ2017A294, KJ2016A853); 安徽省中央引导地方科技发展专项 (2017070702D173)

作者简介: 王举涛 (1977—), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事天然药物化学研究。Tel: (0551)68129167 E-mail: wjt591@163.com

*通信作者 吴培云 (1965—), 女, 教授, 主要从事药物分析及天然药物化学研究。Tel: 15655190006 E-mail: peiyunwu@sina.com

近年来有关研究表明^[1-5], 内生真菌的次生代谢产物中普遍存在多种活性物质, 因此从资源十分丰富的植物内生真菌次生代谢产物中寻找新型活性化合物, 已经成为1个新的研究热点。凤丹 *Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang 主产于安徽铜陵、南陵等地, 种植历史悠久, 应用广泛, 其根皮又称凤丹皮, 在传统中药中与安徽所产的木瓜(宣木瓜)、菊花(贡菊、滁菊和亳菊)、白芍(亳芍)并称为安徽省四大道地药材^[6]。

本实验在前期凤丹内生真菌多样性研究的基础上选取其中1株优势内生真菌 *Fusarium oxysporum* Schlecht., 对其进行次生代谢产物研究, 从该菌株发酵液的醋酸乙酯萃取部位中分离得到23个单体化合物, 分别鉴定为(2*S*)-脯氨酸 [(2*S*)-proline, **1**]、(22*E*,24*R*)-7,22-二烯-3 β ,5 α ,6 β -麦角三醇 [(22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol, **2**]、环-(*S*-脯氨酸-*S*-亮氨酸) [cyclo-(*S*-Pro-*S*-Leu), **3**]、环-(*L*-丙氨酸-*L*-脯氨酸) [cyclo-(*L*-Ala-*L*-Pro), **4**]、环-(缬氨酸-脯氨酸) [cyclo-(Val-Pro), **5**]、环-(*R*-脯氨酸-*S*-苯丙氨酸) [cyclo-(*R*-Pro-*S*-Phe), **6**]、环-(*D*-顺-4-羟基脯氨酸-*L*-苯丙氨酸) [cyclo-(*D*-cis-Hyp-*L*-Phe), **7**]、环-(*L*-反-4-羟基脯氨酸-*L*-苯丙氨酸) [cyclo-(*trans*-4-hydroxy-*L*-Pro-*L*-Phe), **8**]、环-(谷氨酸-酪氨酸) [cyclo-(Gla-Tyr), **9**]、环-(*L*-4-反-羟基脯氨酸-*L*-亮氨酸) [cyclo-(*trans*-4-hydroxy-*L*-Pro-*L*-Leu), **10**]、环-(*L*-色氨酸-*L*-脯氨酸) [*L,L*-cyclo-(Trp-Pro), **11**]、环-(*L*-亮氨酸-甘氨酸) [cyclo-(*L*-Leu-Gly), **12**]、*N*-(3-(1*H*-吡啶-3-基)丙基)乙酰胺 [*N*-(3-(1*H*-indol-3-yl)propyl)acetamide, **13**]、吡啶-3-乙酸(indole-3-acetic acid, **14**)、2-哌啶酮(2-piperidone, **15**)、2-吡咯烷酮(2-pyrrolidinone, **16**)、胸腺嘧啶(thymidine, **17**)、(5*S*)-5-[(4-羟基苯基)甲基]-2,4-咪唑烷二酮((5*S*)-5-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2,4-imidazolidinedione, **18**)、(3*S*,6*S*)-3-(2-丁基)-6-(1-羟乙基)-2,5-哌嗪二酮[(3*S*,6*S*)-3-(butan-2-yl)-6-(1-hydroxyethyl) piperazine-2,5-dione, **19**]、环-(丙氨酸-亮氨酸) [cyclo-(Ala-Leu), **20**]、环-(*S*-脯氨酸-*S*-苯丙氨酸) [cyclo-(*S*-Pro-*S*-Phe), **21**]、环-(酪氨酸-脯氨酸) [cyclo-(Tyr-Pro), **22**]、环-(*L*-苯丙氨酸-*L*-酪氨酸) [cyclo-(*L*-Phe-*L*-Tyr), **23**]。除化合物**2**、**6**、**14**外, 其余化合物均为首次从该菌株发酵液中分离得到。

1 材料与仪器

1.1 材料

菌株分离于新鲜的凤丹根皮, 由上海生工生物

工程有限公司进行分子鉴定, 经基因测序对比后鉴定为 *Fusarium oxysporum* (GenBank: KT271765.1), 现保存于安徽中医药大学天然药物化学研究室。

1.2 仪器

NMR 由 Bruker AV III-600、DRX-500 或者 AV-400 型核磁共振仪测定, 四甲基硅烷(TMS)为内标, 化学位移以 δ 表示并以相应的残余溶剂峰作为参照; 质谱由 Waters Auto Premier P776 质谱仪、Agilent G 6230AA TOF LC/MS 质谱仪或者 Agilent UPLC/Q-TOF 质谱仪测定; 分析型 HPLC Agilent 1100 型(包括 G1322A 在线脱气机、G1311A 四元泵、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315ADAD 检测器), 分析型色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 制备型 HPLC 为 Agilent 1260 型(包括 G1322A 在线脱气机、G1311C 四元泵、G1329B 自动进样器、G1314F 检测器), 制备型色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 9.4 mm, 5 μ m); 硅胶 G(200~300 目)和 GF254TLV 预制硅胶板由青岛海洋化工厂生产; Sephadex LH-20 由瑞典 Amersham Biosciences 公司生产。试剂为色谱纯和分析纯。

2 方法

2.1 菌株的发酵

2.1.1 菌种的准备 将保存于斜面培养基中的内生真菌接种至新的平板 PDA 培养基中, 待其长满整个平板时, 在其菌落边缘用 6 mm 打孔器打孔, 备用。

2.1.2 次生代谢产物的制备 称取一定量培养基粉末, 加蒸馏水至 50 L, 混匀, 分装至 500 mL 玻璃盐水瓶中, 封口, 灭菌 20 min。冷却至室温, 接种后放置在全温振荡培养箱中, 150 r/min、28 $^{\circ}$ C 培养。15 d 后取出, 分离菌丝体和发酵液。菌丝体用 95% 乙醇超声提取 30 min, 提取液浓缩至无醇味, 合并至发酵液中, 加醋酸乙酯萃取, 减压回收溶剂得浸膏(26 g)。

2.2 提取与分离

取浸膏 26 g, 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮梯度洗脱(20:1 $\rightarrow$ 1:1)得7个流分 Fr. A~G。Fr. C 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 得到 Fr. C₁ 和 C₂, Fr. C₂ 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮(8:1)洗脱得到3个 Fr. C₂₋₁~C₂₋₃, Fr. C₂₋₂ 经制备液相色谱, 乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(15%~35% A, 30 min, 2 mL/min)得到化合物**13**(7.1 mg)和**14**(1.6 mg)。Fr. C₂₋₃ 经制备液相色谱, 乙腈(A)~水(B)梯度洗脱(10%~

30% A, 30 min, 2 mL/min) 得到化合物 **6** (6.6 mg)。

Fr. D 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (4:1) 洗脱得到 3 个流分 Fr. D₁~D₃, Fr. D₂ 经制备液相色谱, 乙腈 (A) -水 (B) 梯度洗脱 (5%~25% A, 30 min, 2 mL/min) 得到化合物 **17** (5.6 mg)、**9** (6.3 mg) 和 **11** (5.8 mg)。Fr. D₃ 经制备液相乙腈 (A) -水 (B) 梯度洗脱 (5%~25% A, 30 min, 2 mL/min) 得到化合物 **21** (8.5 mg)、**22** (4.0 mg)、**7** (5.8 mg) 和 **8** (15.5 mg)。

Fr. F 经制备液相色谱, 乙腈 (A) -水 (B) 梯度洗脱 (5%~25% A, 30 min, 2 mL/min) 得到化合物 **15** (16.4 mg)、**16** (6.4 mg)、**1** (4.6 mg)、**4** (38.3 mg) 和 **10** (13.3 mg)。

Fr. G 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 柱得到 4 个流分 Fr. G₁~G₄, Fr. G₂ 经制备液相色谱, 乙腈 (A) -水 (B) 梯度洗脱 (5%~25% A, 30 min, 2 mL/min) 得到化合物 **2** (4.8 mg)、**18** (2.6 mg)、**19** (1.1 mg)、**20** (1.1 mg) 和 **23** (2.3 mg)。Fr. G₃ 经制备液相乙腈 (A) -水 (B) 梯度洗脱 (5%~25% A, 30 min, 2 mL/min) 得到化合物 **3** (1.6 mg)、**5** (7.9 mg) 和 **12** (2.7 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 116 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 4.34 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-2), 3.50 (2H, dt, J = 9.6, 5.2 Hz, H-5), 2.29 (1H, m, H-3a), 2.13~2.03 (1H, m, H-3b), 2.03~1.90 (2H, m, H-4); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 168.6 (C-1), 61.7 (C-2), 46.2 (C-5), 28.7 (C-3), 24.2 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为 (2*S*)-脯氨酸。

化合物 **2**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 453 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.27 (1H, m, H-7), 5.19 (2H, m, H-22, 23), 3.97 (1H, m, H-3), 3.54 (1H, m, H-6), 1.05 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.91 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-26), 0.84 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.82 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.62 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 143.7 (C-8), 136.7 (C-22), 132.9 (C-23), 118.7 (C-7), 76.8 (C-5), 73.9 (C-6), 68.2 (C-3), 57.1 (C-17), 55.7 (C-14), 44.5 (C-13), 44.0 (C-9), 44.0 (C-24), 41.5 (C-20), 40.4 (C-13), 40.1 (C-12), 37.9 (C-10), 34.1 (C-25), 33.7 (C-2), 31.4 (C-1), 29.0 (C-16), 23.8 (C-15), 22.8 (C-11), 21.7 (C-21), 20.5 (C-27), 20.1

(C-26), 18.9 (C-19), 18.2 (C-28), 12.8 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为 (2*E*,24*R*)-7,22-二烯-3 β ,5 α ,6 β -麦角三醇。

化合物 **3**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 233 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 4.10 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-6), 4.23 (1H, m, H-9), 3.48 (2H, m, H-3), 2.27 (1H, m, H-5a), 1.98 (1H, m, H-5b), 1.96 (2H, m, H-4a, 10a), 1.86 (2H, m, H-4b, 10b), 1.50 (1H, m, H-11), 0.92 (6H, m, H-12, 13); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 172.9 (C-1), 168.9 (C-7), 60.3 (C-6), 54.6 (C-9), 46.5 (C-3), 39.3 (C-10), 29.0 (C-5), 25.7 (C-11), 23.6 (C-12), 23.3 (C-4), 22.2 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为环-(*S*)-脯氨酸-*S*-亮氨酸。

化合物 **4**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 169 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 4.26 (1H, m, H-6), 4.19 (1H, m, H-3), 3.52 (2H, dd, J = 8.2, 4.1 Hz, H-9), 2.30 (1H, m, H-7b), 2.12~1.68 (3H, m, H-7a, 8), 1.38 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-10); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 172.7 (C-5), 169.1 (C-2), 60.5 (C-6), 52.3 (C-3), 46.5 (C-9), 29.3 (C-7), 23.7 (C-8), 15.8 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为环-(*L*)-丙氨酸-*L*-脯氨酸。

化合物 **5**: 白色粉末。EI-MS m/z : 196 $[M]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.86 (1H, brs, H-8), 4.08 (1H, dd, J = 10.0, 6.4 Hz, H-6), 3.83~3.61 (2H, m, H-5), 3.51 (1H, m, H-9), 2.50~2.14 (2H, m, H-3), 2.12~1.69 (2H, m, H-4), 1.03 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-11), 0.98 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-12); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 169.7 (C-1), 165.5 (C-7), 63.6 (C-9), 58.4 (C-6), 45.7 (C-3), 33.3 (C-10), 29.5 (C-5), 22.1 (C-4), 19.1 (C-11), 17.7 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为环-(*R*)-脯氨酸-*S*-苯丙氨酸。

化合物 **6**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 267 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.38~7.14 (5H, m, H-2'~6'), 6.46 (1H, s, H-8), 4.22 (1H, m, H-9), 3.76~3.26 (2H, m, H-3), 3.23~3.03 (2H, m, H-10), 2.93 (1H, dd, J = 10.5, 6.5 Hz, H-6), 2.26~1.89 (2H, m, H-4), 1.86~1.60 (2H, m, H-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 169.4 (C-7), 164.9 (C-1), 135.3 (C-1'), 130.0 (C-2'), 128.8 (C-3'), 127.6 (C-4'), 59.1 (C-9), 57.8 (C-6), 45.2 (C-3), 40.6 (C-10), 29.0 (C-5),

21.8 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **6** 为环-(*R*-脯氨酸-*S*-苯丙氨酸)。

化合物 **7**: 白色粉末。EI-MS m/z : 260 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.30~7.19 (5H, m, H-12~16), 4.23 (2H, m, H-3, 8), 3.60 (1H, dd, $J = 12.4, 3.9$ Hz, H-9a), 3.27 (1H, m, H-9b), 3.19 (1H, dd, $J = 13.7, 5.1$ Hz, H-10a), 3.00 (1H, dd, $J = 13.7, 4.7$ Hz, H-10b), 2.79 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H-6), 2.23 (1H, m, H-7a), 1.91 (1H, m, H-7b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 171.1 (C-5), 167.8 (C-2), 136.9 (C-11), 131.3 (C-12, 16), 129.8 (C-13, 15), 128.6 (C-14), 68.6 (C-8), 59.7 (C-3), 57.3 (C-6), 54.1 (C-9), 41.0 (C-10), 38.1 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **7** 为环-(*D*-顺-羟脯氨酸-*L*-苯丙氨酸)。

化合物 **8**: 白色粉末。EI-MS m/z : 260 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.29~7.23 (5H, m, H-2'~6'), 4.49 (1H, m, H-2), 4.37 (1H, m, H-8), 4.28 (1H, t, $J = 4.9$ Hz, H-4), 3.71 (1H, dd, $J = 13.0, 5.1$ Hz, H-3b), 3.28 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-3a), 3.17 (2H, dd, $J = 3.3, 5.2$ Hz, H-10), 2.07 (1H, dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz, H-5a), 1.37 (1H, m, H-5b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 171.3 (C-1), 167.2 (C-7), 137.5 (C-1'), 131.1 (C-2', 6'), 129.6 (C-3', 5'), 128.2 (C-4'), 68.6 (C-4), 58.4 (C-2), 57.7 (C-8), 55.3 (C-5), 39.0 (C-10), 38.1 (C-3)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **8** 为环-(*L*-反-4-羟基脯氨酸-*L*-苯丙氨酸)。

化合物 **9**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 243 $[M + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.72 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 4.16 (1H, t, $J = 4.2$ Hz, H-6), 3.42~3.15 (2H, m, H-7), 2.88~2.66 (2H, m, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.4 (C-4), 165.7 (C-1), 156.3 (C-4'), 131.1 (C-2', 6'), 125.7 (C-1'), 115.0 (C-3', 5'), 55.8 (C-6), 43.7 (C-3), 38.2 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **9** 为环-(谷氨酸-酪氨酸)。

化合物 **10**: 白色粉末。EI-MS m/z : 226 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.52 (2H, m, H-6, 8), 4.26~4.04 (1H, m, H-3), 3.66 (1H, dd, $J = 12.8, 4.7$ Hz, H-9a), 3.44 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-9b), 2.28 (1H, dd, $J = 13.3, 6.5$ Hz, H-7a), 2.09 (1H, m, H-7b), 1.95~1.77 (2H, m, H-10), 1.65~1.33 (1H, m, H-11), 0.96 (6H, m, H-12, 13); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz,

CD_3OD) δ : 173.2 (C-2), 169.1 (C-5), 69.2 (C-6), 58.8 (C-3), 55.3 (C-9), 54.7 (C-8), 39.4 (C-10), 38.2 (C-7), 25.9 (C-11), 23.4 (C-12), 22.3 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **10** 为环-(*L*-4-反-羟基脯氨酸-*L*-亮氨酸)。

化合物 **11**: 无色油状物。ESI-MS m/z : 306 $[M + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.34 (1H, s, H-1), 7.59 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 7.39 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8), 7.23 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2), 7.14 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 7.09 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 5.77 (1H, s, H-12), 4.37 (1H, dd, $J = 11.1, 3.7$ Hz, H-11), 4.07 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-14), 3.76 (1H, dd, $J = 15.1, 3.8$ Hz, H-10), 3.70~3.54 (2H, m, H-17), 2.97 (1H, dd, $J = 15.1, 10.8$ Hz, H-10), 2.32 (1H, dt, $J = 12.6, 7.1$ Hz, H-19a), 2.08~1.96 (2H, m, H-18), 1.91 (1H, ddd, $J = 12.6, 8.8, 4.6$ Hz, H-19b); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 169.5 (C-16), 165.7 (C-13), 136.8 (C-9), 126.8 (C-4), 123.5 (C-2), 122.8 (C-7), 120.1 (C-6), 118.6 (C-5), 111.7 (C-8), 110.0 (C-3), 59.4 (C-14), 54.7 (C-11), 45.6 (C-17), 28.4 (C-10), 27.0 (C-19), 22.7 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **11** 为环-(*L*-色氨酸-*L*-脯氨酸)。

化合物 **12**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 171 $[M + \text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.01 (1H, d, $J = 17.8$ Hz, H-6a), 3.90 (1H, m, H-3), 3.83 (1H, d, $J = 17.8$ Hz, H-6b), 1.83 (1H, m, H-8), 1.68 (2H, m, H-7), 0.97 (6H, t, $J = 7.0$ Hz, H-9, 10); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 171.7 (C-2), 169.0 (C-5), 54.9 (C-3), 45.4 (C-6), 43.9 (C-7), 25.4 (C-8), 23.5 (C-9), 22.2 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **12** 为环-(*L*-亮氨酸-甘氨酸)。

化合物 **13**: 无色油状物。ESI-MS m/z : 217 $[M + \text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.04 (1H, s, H-1), 7.61 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-3), 7.39 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 7.22 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4), 7.14 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-5), 7.05 (1H, s, H-9), 5.49 (1H, s, H-13), 3.61 (2H, q, $J = 6.5$ Hz, H-12), 2.98 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-10), 1.92 (3H, s, H-15), 0.86 (2H, m, H-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 170.2 (C-14), 136.3 (C-9), 127.5 (C-4), 122.4 (C-8), 122.1 (C-5), 119.7 (C-7), 118.9 (C-6), 113.2 (C-3), 111.4 (C-2), 39.9 (C-12), 29.9 (C-10), 25.4 (C-11), 23.6 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **13** 为 *N*-(3-(1H-

吡啶-3-基)丙基)乙酰胺。

化合物 **14**: 无色油状物。ESI-MS m/z : 174 $[M-H]^-$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.55 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-4), 7.35 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-7), 7.19 (1H, s, H-2), 7.11 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-6), 7.02 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-5), 3.66 (2H, s, H-10); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 174.5 (C-11), 136.4 (C-8), 127.3 (C-9), 123.3 (C-2), 121.8 (C-6), 120.0 (C-5), 119.1 (C-4), 111.3 (C-7), 107.8 (C-3), 32.1 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **14** 为吡啶-3-乙酸。

化合物 **15**: 无色油状物。EI-MS m/z : 99 $[M]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.82 (1H, brs, H-1), 3.27 (2H, q, J = 4.9, 3.7 Hz, H-6), 2.31 (2H, t, J = 6.3 Hz, H-3), 1.94~1.41 (4H, m, H-4, 5); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.7 (C-2), 42.3 (C-6), 31.6 (C-3), 22.3 (C-5), 20.9 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[20], 故鉴定化合物 **15** 为2-哌啶酮。

化合物 **16**: 无色油状物。ESI-MS m/z : 85 $[M]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.28 (1H, brs, H-1), 3.40 (2H, t, J = 6.9 Hz, H-5), 2.29 (2H, t, J = 8.1 Hz, H-3), 2.20~2.06 (2H, m, H-4); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.3 (C-2), 42.3 (C-5), 30.1 (C-3), 21.0 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定化合物 **16** 为2-吡咯烷酮。

化合物 **17**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 127 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.94 (2H, brs, 1, 3-NH), 7.24 (1H, s, H-6), 1.72 (3H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 165.1 (C-4), 151.3 (C-2), 137.6 (C-6), 107.5 (C-5), 11.6 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **17** 为胸腺嘧啶。

化合物 **18**: 白色粉末。ESI-MS: m/z 207 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.03 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 3'), 6.70 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 2'), 4.29 (1H, t, J = 5.0 Hz, H-6), 2.96 (2H, m, H-5); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 177.6 (C-7), 159.8 (C-4), 157.5 (C-8), 131.9 (C-2, 2'), 127.1 (C-1), 116.2 (C-3, 3'), 61.1 (C-6), 37.2 (C-5)。以上数据与文献报道基本一致^[23], 故鉴定化合物 **18** 为 (5*S*)-5-[(4-羟基苯基)甲基]-2,4-咪唑烷二酮。

化合物 **19**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 237 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.17 (1H, m, H-11), 3.78 (1H, m, H-3), 3.55 (1H, m, H-6), 2.11~

1.95 (1H, m, H-7), 1.69~1.46 (2H, m, H-8), 1.26 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-12), 1.04 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-10), 0.92 (3H, t, J = 7.4 Hz, H-9); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.3 (C-2), 169.4 (C-5), 68.9 (C-11), 61.9 (C-6), 61.0 (C-3), 40.8 (C-7), 26.0 (C-8), 20.1 (C-12), 15.9 (C-10), 12.0 (C-9)。以上数据与文献报道基本一致^[24], 故确定化合物 **19** 为 (3*S*,6*S*)-3-(2-丁基)-6-(1-羟乙基)-2,5-哌嗪二酮。

化合物 **20**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 185 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.01 (1H, m, H-3), 3.92 (1H, dd, J = 9.5, 3.4 Hz, H-6), 1.78 (2H, m, H-8), 1.59 (1H, t, J = 9.2 Hz, H-9), 1.46 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-7), 0.93 (6H, dd, J = 14.0, 5.9 Hz, H-10, 11); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.4 (C-2), 169.1 (C-5), 53.4 (C-6), 50.8 (C-3), 43.2 (C-8), 24.3 (C-9), 23.3 (C-10), 21.2 (C-11), 20.3 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **20** 为环-(丙氨酸-亮氨酸)。

化合物 **21**: 无色油状物。ESI-MS m/z : 267 $[M+Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.46~7.03 (5H, m, H-2'~6'), 5.73 (1H, s, H-8), 4.27 (1H, dd, J = 10.6, 3.9 Hz, H-9), 4.07 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-6), 3.64~3.57 (2H, m, H-3), 3.71~3.34 (1H, m, H-10a), 2.79 (1H, dd, J = 14.5, 10.4 Hz, H-10b), 2.32 (1H, dt, J = 13.4, 4.6 Hz, H-5a), 2.05~1.97 (1H, m, H-5b), 1.97~1.83 (2H, m, H-4); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.6 (C-7), 165.2 (C-1), 136.0 (C-1'), 130.0 (C-2'), 129.0 (C-3'), 127.7 (C-4'), 59.3 (C-9), 56.3 (C-6), 45.6 (C-3), 36.9 (C-10), 28.5 (C-5), 22.7 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[25], 故鉴定化合物 **21** 为环-(*S*-脯氨酸-*S*-苯丙氨酸)。

化合物 **22**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 283 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.08 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-5', 9'), 6.80 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-6', -8'), 5.66 (1H, s, N-H), 4.21 (1H, dd, J = 10.8, 3.9 Hz, H-2'), 4.08 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-2), 3.60 (2H, t, H-5), 3.55-3.41 (1H, m, H-3'), 2.74 (1H, dd, J = 14.6, 10.4 Hz, H-3'), 2.34 (1H, m, H-3a), 2.07~1.97 (1H, m, H-3b), 1.97~1.85 (2H, m, H-4); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.6 (C-1), 165.3 (C-1'), 155.4 (C-7'), 130.5 (C-5', 9'), 127.6 (C-4'), 116.3 (C-6', 8'), 59.3 (C-2), 56.3 (C-2'), 45.6 (C-5), 36.0 (C-3'), 28.5 (C-3), 22.7 (C-4)。结合相关文献报道^[26], 故鉴定化合物

22 为环-(酪氨酸-脯氨酸)。

化合物 **23**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 333 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.24~7.15 (3H, m, H-3''~5''), 7.14 (2H, dd, $J = 7.2, 2.4$ Hz, H-2'', 6''), 7.01~6.81 (2H, m, H-2', 6'), 6.73~6.59 (2H, m, H-3', 5'), 3.55~3.37 (1H, m, H-6), 3.05 (1H, m, H-3), 2.85 (2H, dd, $J = 13.9, 4.7$ Hz, H-6a), 2.75 (2H, dd, $J = 14.0, 4.6$ Hz, H-3a); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.0 (C-2), 169.8 (C-5), 158.0 (C-4'), 136.6 (C-1''), 132.5 (C-2'', 6''), 131.1 (C-3'', 5''), 129.6 (C-2', 6'), 126.9 (C-1', 4''), 116.2 (C-3', 5'), 57.0 (C-6), 56.5 (C-3), 39.6 (C-3a), 39.2 (C-6a)。结合相关文献报道^[27], 故鉴定化合物 **23** 为环-(L-苯丙氨酸-L-酪氨酸)。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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]. *Phytochem Lett*, 2016, 18: 95-98.
- [3] Zhu M L, Zhang X M, Feng H M, *et al.* Campyridones AeD, pyridone alkaloids from a mangrove endophytic fungus *Campylocarpon* sp. HDN13-307 [J]. *Tetrahedron*, 2016, 72(37): 5679-5683.
- [4] 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.
- [5] 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, 117: 1-5.
- [6] 杨青山, 周建理. 四大皖药之凤丹 [J]. *生命世界*, 2013(1): 60-65.
- [7] Barraclough P, Dieterich P, Spray C A, *et al.* Two separate and distinct syntheses of stereospecifically deuterated samples of (2S)-proline [J]. *Org Biomol Chem*, 2006, 4(8): 1483-1491.
- [8] 李君竹, 刘海洋, 董 秋, 等. 角果胡椒的化学成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(4): 620-622.
- [9] Pedras M S, Yu Y, Liu J, *et al.* Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*: Isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity [J]. *Zeitschrift Naturforschung C*, 2005, 60(9/10): 717-722.
- [10] Stark T, Hofmann T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2, 5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(18): 7222-7231.
- [11] 丁中涛, 保志娟, 杨雪琼, 等. 金铁锁根中的 3 个环二肽 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(4): 337-339.
- [12] Wang G, Dai S, Chen M, *et al.* Two diketopiperazine cyclo(pro-phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2 [J]. *Chem Nat Comp*, 2010, 46(4): 583-585.
- [13] Shigemori H, Tenma M, Kengo S A, *et al.* Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(5): 696-698.
- [14] De R S, Mitova M, Tommonaro G. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides [J]. *Biomol Eng*, 2003, 20(4): 311-316.
- [15] Lu X, Shen Y, Zhu Y, *et al.* Diketopiperazine constituents of marine *Bacillus subtilis* [J]. *Chem Nat Comp*, 2009, 45(2): 290-292.
- [16] Ivanova V, Graefe U, Schlegel R, *et al.* Isolation and structure elucidation of tyramine and indole alkaloids from antarctic strain *Microbispora Aerata* IMBAS-11A [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2003, 17(2): 128-133.
- [17] Coursindel T, Restouin A, Dewynter G, *et al.* Stereoselective ring contraction of 2, 5-diketopiperazines: An innovative approach to the synthesis of promising bioactive 5-membered scaffolds [J]. *Bioorg Chem*, 2010, 38(5): 210-217.
- [18] Bartolucci S, Mari M, Gregorio G D, *et al.* Observations concerning the synthesis of tryptamine homologues and branched tryptamine derivatives via the borrowing hydrogen process: Synthesis of psilocin, bufotenin, and serotonin [J]. *Tetrahedron*, 2016, 72(18): 2233-2238.
- [19] Chimatadar S A, Basavaraj T, Nandibewoor S T. A study of the kinetics and mechanism of oxidation of L-tryptophan by diperiodatonickelate (IV) in aqueous alkaline medium [J]. *Russian J Phys Chem A*, 2007, 81(7): 1046-1053.
- [20] Burger B V, Smit D, Spies H S C, *et al.* Mammalian exocrine secretions XV. Constituents of secretion of ventral gland of male dwarf hamster, phodopus sungorus sungorus [J]. *J Chem Ecol*, 2001, 27(6): 1259-1276.

- [21] Nordstrøm L U, Vogt H, Madsen R, *et al.* Amide synthesis from alcohols and amines by the extrusion of dihydrogen [J]. *Cheminformation*, 2009, 40(21): 5178-5197.
- [22] Ding Z G, Zhao J Y, Yang P W, *et al.* ^1H and ^{13}C NMR assignments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia alba* sp. nov (YIM 30243T) [J]. *Magnet Res Chem*, 2009, 47(4): 366-370.
- [23] Park J H, Lee G E, Lee S D, *et al.* Discovery of novel 2, 5-dioxoimidazolidine-Based P2X7 receptor antagonists as constrained analogues of KN62 [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(5): 2114-2134.
- [24] 徐 伟, 丁章贵, 李铭刚, 等. 拟诺卡氏放线菌 YIM 90087 的代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(8): 1198-1201.
- [25] Li T, Wang G C, Huang X J. Whitmanoside A, a new α -pyrone glycoside from the leech *Whitmania pigra* [J]. *Heterocycles*, 2013, 87(7): 1537-1543.
- [26] 李 益, 唐金山, 高 昊, 等. 海洋放线菌 *Micromonospora* sp. (No. 69) 抗 MRSA 活性成分研究 [J]. 中国海洋药物杂志, 2010, 29(5): 16-21.
- [27] 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.