

# 云南美登木内生真菌 *Phomopsis* sp Lz42的化学成分

袁琳<sup>1,2</sup>, 马娟<sup>1</sup>, 王婷<sup>3</sup>, 李国红<sup>1</sup>, 沈月毛<sup>1</sup>, 赵沛基<sup>1</sup>

(1. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204;  
2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 贵阳医学院药学院, 贵阳 550004)

**摘要** 从云南美登木内生真菌 *Phomopsis* species Lz42的琼脂平板发酵物中分离得到 2个倍半萜和 5个麦角甾醇类化合物 (1~7), 其中化合物 1和 2为新化合物。应用波谱技术确定其结构为 4-Deacetyl-10-oxo-di-hydrobotrydial(1)和麦角甾-6,22二烯-5,8 环二氧-3甲酸酯 (2)。

**关键词** 倍半萜; 麦角甾醇类; *Phomopsis* sp. Lz42; 内生真菌; 云南美登木

中图分类号 O629.2; O629.6

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)01-0078-04

植物内生菌是指在整个生活史或是生活史的某一阶段能够定殖入宿主植物健康细胞之间或者细胞内, 却不对其宿主产生明显的疾病症状的微生物(包括细菌和真菌)。内生菌入侵植物组织通常是为了获取营养和得到宿主的保护, 作为回报, 它们会为宿主产生重要的具有生物活性的次生代谢产物来提高宿主植物的适应性。因此, 内生菌成为了发现新的活性化合物和先导化合物的重要来源<sup>[1~3]</sup>。我们曾对云南美登木 (*M. hookeri*)的部分内生菌进行了化学成分的分离, 并得到一系列的新化合物, 包括具有很强的抗肿瘤和抗菌活性的

## Dimeric dianactin<sup>[4~6]</sup>.

作为云南美登木内生菌系列研究的一部分, 本文报道了从云南美登木内生真菌 *Phomopsis* species Lz42发酵物中分离得到 7个化合物, 其中化合物 1和 2为新化合物。化合物 1~4 的结构见图 1。

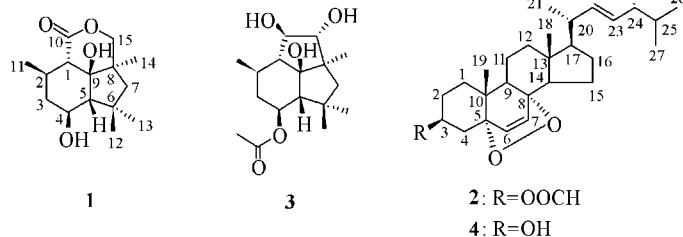


Fig 1 Structures of compounds 1—4

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

X-4型显微熔点测定仪; Jasco D IP-370型数字化旋光仪; Bio-Rad FTS-135型红外光谱仪, KB r压片; Shimadzu 2401PC型紫外光谱仪; Finnigan LCQ-Advantage型质谱仪; VG Auto-Spec-3000型高分辨质谱仪; Bruker AM-400型核磁共振仪; DRX-500型核磁共振仪。

柱层析硅胶 (200~300目或 10~40 μm)均为青岛海洋化工厂生产; 柱层析凝胶 (Sephadex LH-20)购自 Amersham Pharmacia公司; 反相硅胶 (Reverse-phase C<sub>18</sub>, 40~63 μm)购自 Merck公司。

### 1.2 实验过程

1.2.1 材料及发酵 从云南西双版纳的美登木属植物云南美登木 (*M. hookeri*)的枝条<sup>[5]</sup>中分离真菌 Lz42, 并保存于中国科学院昆明植物研究所。经 ITS技术 (ITS1和 ITS2)及 5.8S rDNA序列实验, 并比对基因库已知序列, 鉴定该菌为 *Phomopsis*属真菌 (真菌 Lz42的 GenBank序列号为 EU395772, 参比菌

收稿日期: 2008-04-07.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 30430020)和中国科学院基金 (批准号: KSCX2-SW-313)资助。

联系人简介: 赵沛基, 男, 副研究员, 主要从事天然产物化学及生物合成研究. E-mail: plenty@mail.kib.ac.cn

的序列号为 DQ780461)。该菌经琼脂平板发酵,采用 10 L 的土豆 葡萄糖培养基 (Potato-dextrose-agar, PDA) 在 28 ℃ 下培养 10 d。

1.2.2 提取和分离 发酵物连同琼脂块一起切碎,用提取液 [V(乙酸乙酯) V(甲醇) V(乙酸) = 80 : 15 : 5] 冷浸<sup>[7]</sup>,滤液经浓缩得浸膏 15 g; 浸膏以水溶解后经乙酸乙酯萃取,得乙酸乙酯相粗提物 2.7 g 粗提物经 145 g RP-18 柱分别以水及体积分数分别为 30%, 50%, 70% 及 100% 的甲醇溶液梯度洗脱(各梯度洗脱 2 L),得 ~ 5 个组分。经反复的硅胶柱层析及凝胶柱层析后,从组分 (66 mg) 中得到化合物 1(3 mg) 和 3(2 mg); 从组分 (149 mg) 中得到化合物 7(2 mg); 从组分 (2.17 g) 中得化合物 2(18 mg), 4(6 mg), 5(9 mg) 及 6(4 mg)。化合物 1 为白色粉末; m.p. 229 ~ 231 ℃;  $[\eta]_D^{20} = -21.5 \text{ } (\text{c } 0.19, \text{ MeOH})$ ; UV (MeOH),  $\lambda/\text{nm}$  (lg): 200.4 (2.99); IR (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3418, 3357, 2950, 2872, 1700, 1020;  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据见表 1; ESI-MS,  $m/z$ : 269 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>; 高分辨 HR-ESI-MS,  $m/z$ : 291.1574 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> (计算值为 291.1572)。

Table 1  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) data of compound 1 (TM S)

Position	$\text{H}^a$	$\text{H}^b$	$\text{C}^a$	$\text{C}^b$	HMBC <sup>c</sup>
1	2.27 (d, $J = 11.5 \text{ Hz}$ )	2.23 (d, $J = 11.6 \text{ Hz}$ )	59.0	57.2	C2, 8, 9, 10, 11
2	1.86 (m)	1.73 (m)	32.8	30.9	C4, 10, 11
3	1.18 (m)	1.03 (m)	46.1	45.0	C1, 2, 4, 5, 11
	1.87 (m)	1.74 (m)			C1, 2, 5, 11
4	3.89 (m)	3.69 (m)	70.3	68.0	C2, 5, 6
5	1.65 (d, $J = 10.0 \text{ Hz}$ )	1.60 (d, $J = 10.1 \text{ Hz}$ )	65.7	64.1	C4, 6, 7, 8, 9, 12
6			41.9	40.5	
7	1.25 (d, $J = 12.0 \text{ Hz}$ )	1.12 (d, $J = 11.8 \text{ Hz}$ )	50.8	49.4	C5, 6, 8, 9, 13, 14
	1.90 (d, $J = 11.5 \text{ Hz}$ )	1.75 (d, $J = 11.6 \text{ Hz}$ )			C6, 8, 12, 13, 14, 15
8			45.2	43.5	
9			84.6	82.7	
10			174.8	171.1	
11	1.20 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$ )	1.08 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$ )	22.3	21.9	C1, 2, 3
12	1.28 (s)	1.14 (s)	36.7	36.3	C5, 6, 7, 13
13	1.33 (s)	1.21 (s)	27.7	27.1	C5, 6, 7, 12
14	1.19 (s)	1.05 (s)	23.5	22.6	C7, 8, 9, 15
15	3.88 (d, $J = 9.5 \text{ Hz}$ )	3.79 (d, $J = 9.4 \text{ Hz}$ )	78.6	76.3	C8, 9, 10, 14
	4.68 (d, $J = 9.5 \text{ Hz}$ )	4.52 (d, $J = 9.5 \text{ Hz}$ )			C7, 8, 9, 14
HO—C9		4.95 (s)			
HO—C4		4.49 (d, $J = 5.0 \text{ Hz}$ )			

<sup>a</sup> Measured in CD<sub>3</sub>OD; <sup>b</sup> measured in DMSO-d<sub>6</sub>;

化合物 2 为白色粉末; m.p. 205 ~ 206 ℃;  $[\eta]_D^{20} = -17.9 \text{ } (\text{c } 1.84, \text{ CHCl}_3)$ ; UV (CHCl<sub>3</sub>),  $\lambda/\text{nm}$  (lg): 194 (2.96), 208 (2.76), 240 (2.63); IR (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 2965, 2949, 2868, 2874, 1719, 1173.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta/\text{ppm}$ : 8.00 (1H, s, 3-OOCH), 6.49 (1H, d,  $J = 8.5 \text{ Hz}$ , H7), 6.22 (1H, d,  $J = 8.5 \text{ Hz}$ , H6), 5.21 (1H, dd,  $J = 7.5, 15.2 \text{ Hz}$ , H22), 5.12 (1H, dd,  $J = 7.9, 15.2 \text{ Hz}$ , H23), 5.08 (1H, m, H3), 2.15 (1H, dd,  $J = 5.1, 13.8 \text{ Hz}$ , H4), 2.06 (1H, d,  $J = 13.7 \text{ Hz}$ , H4), 1.84 (1H, m, H24), 0.97 (3H, d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , Me-21), 0.89 (3H, d,  $J = 5.1 \text{ Hz}$ , Me-28), 0.87 (3H, s, Me-19), 0.80 (3H, d,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , Me-27), 0.79 (3H, s, Me-18), 0.79 (3H, d,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , Me-26).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta/\text{ppm}$ : 160.2 (3-OOCH), 135.1 (C6), 134.8 (C22), 132.2 (C23), 130.9 (C7), 81.6 (C5), 79.3 (C8), 69.5 (C3), 56.0 (C17), 51.5 (C14), 50.9 (C9), 44.4 (C13), 42.6 (C24), 39.6 (C20), 39.1 (C12), 36.8 (C10), 34.1 (C1), 33.0 (C4), 32.9 (C25), 28.5 (C16), 26.2 (C2), 23.3 (C11), 20.8 (C21), 20.5 (C15), 19.8 (C26), 19.5 (C27), 18.0 (C19), 17.5 (C28), 12.8 (C18). ESI-MS,  $m/z$ : 457 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>; 高分辨 HR-ESI-MS,  $m/z$ : 479.3141 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> (计算值为 479.3137)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化合物 1的结构鉴定

化合物 1的  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR 和主要的 HMBC 远程相关数据见表 1。主要的 ROESY 和 COSY 相关见图 2。根据化合物 1 的高分辨 HR-ESI-MS 给出的  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  峰值 291.1574 确定其分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4$  (计算值为 291.1572)。其 IR 光谱中出现 2 个羟基 ( $3418, 3357 \text{ cm}^{-1}$ ) 和 1 个羰基 ( $1700 \text{ cm}^{-1}$ ) 的特征吸收峰。 $^{13}\text{C}$  NMR 和  $^1\text{H}$  NMR 谱 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 显示, 分子中存在 4 个季碳 ( $\text{c} 41.9, 45.2, 84.6, 174.8$ )、4 个次甲基 ( $\text{c} 32.8, 59.0, 65.7, 70.3$ )、3 个亚甲基 ( $\text{c} 46.1, 50.8, 78.6$ ) 和 4 个甲基 ( $\text{c} 22.3, 23.5, 27.7, 36.7$  和  $\text{h} 1.20, 1.19, 1.33, 1.28$ )，结合不饱和度，显示化合物 1 是三环倍半萜。从 HMBC 远程相关发现氧取代亚甲基信号  $\text{c} 78.6$  (C15) 的 2 个质子  $\text{h} 4.68$  (d,  $J = 9.5 \text{ Hz}$ ) 和  $\text{h} 3.88$  (d,  $J = 9.5 \text{ Hz}$ ) 中，质子信号  $\text{h} 3.88$  与  $\text{c} 174.8$  (C10) 相关，说明化合物 1 的 3 个环中有一个为内酯环。根据以上数据，并参照从 *Botrytis cinerea* 发酵物分离得到的已知化合物 10-Oxo-dihydrobotrydial<sup>[8, 9]</sup> 的 NMR 数据，推断该化合物也具有 Botrydiane 骨架，且化合物 1 和 10-Oxo-dihydrobotrydial 结构相似，前者仅比后者少了一个乙酰氨基，而多了一个羟基 (图 1)。由于 10-Oxo-dihydrobotrydial 中的唯一一个乙酰氨基连接在 C4 上，因此推测化合物 1 的 C4 上连接了一个羟基。 $^1\text{H}$  NMR 中显示出  $\text{h} 3.89$  (H4)，结合 HSQC 谱将  $\text{c} 70.3$  归属为 C4。C4 和 H4 的化学位移证实了 C4 上连接了一个羟基。

当氘代甲醇为溶剂时，在 ROESY 相关图谱中无法检测到羟基的质子信号，而更换氘代 DMSO 为溶剂时检测到了化合物 1 中 2 个羟基的质子信号  $\text{HO}-\text{C9}$  ( $\text{h} 4.95$ , s) 和  $\text{HO}-\text{C4}$  ( $\text{h} 4.49$ , d,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ )。化合物 1 相对构型是根据 ROESY 相关图谱中以下质子 NOE 效应确定： $\text{HO}-\text{C9}/\text{H5}/\text{H1}, \text{H5}/\text{Me-12}$  及  $\text{H4}/\text{Me-13}$ ，3 组相关表明  $\text{HO}-\text{C9}, \text{H5}, \text{H1}$  和 Me-12 在 1 位，而 H4 和 Me-13 在 2 位；H1 与 Me-11 的相关说明 Me-11 是 3 位，这与 H1 和 H2 之间比较大的偶合常数 ( $J = 11.5 \text{ Hz}$ ) 是一致的；最后，H2 和 H4 均与 Me-14 相关，说明 Me-14 在 4 位。该相对构型与 10-Oxo-dihydrobotrydial 的晶体衍射结果一致。综上分析，化合物 1 被鉴定为 4-Deacetyl-10-oxo-dihydrobotrydial。

### 2.2 化合物 2的结构鉴定

化合物 2 的高分辨 HR-ESI-MS 给出了  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  峰：479.3141，确定其分子式为  $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_4$  (计算值为 479.3137)。其  $^{13}\text{C}$  NMR 显示 29 个碳信号，包括 4 个季碳 (其中 2 个氧取代碳)、12 个次甲基、7 个亚甲基和 6 个甲基； $^1\text{H}$  NMR 显示 4 个烯氢信号 ( $\text{h} 6.49, 6.22, 5.21, 5.12$ ) 及 6 个甲基信号 ( $\text{h} 0.97, 0.89, 0.87, 0.80, 0.79, 0.79$ )。以上数据显示出典型的麦角甾醇类化合物的骨架特征，且化合物 2 和化合物 22E, 24R-5, 8-Epidioxy-ergosta-6, 22-dien-3-ol (4)<sup>[10~12]</sup> 有相似的 NMR 数据。不同之处在于化合物 2 比 4 多了一个甲酸酯基 ( $\text{c} 160.2$  和  $\text{h} 8.00$ ) (图 1)。 $\text{h} 8.00$  与 C3 ( $\text{c} 69.5$ ) 的 HMBC 相关说明该甲酸酯基与 C3 相连，这与化合物 2 的 IR 光谱中未检测到羟基的特征吸收峰，而检测到了羰基 ( $1719 \text{ cm}^{-1}$ ) 特征吸收峰的结果一致。经过进一步对 HMBC 谱图分析 (图 2)，并与化合物 4 的波谱和旋光数据 (文献报道  $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ ) 的对比确定了化合物 2 的结构为麦角甾-6, 22-二烯-5, 8-环二氧-3-甲酸酯。由于提取及分离的过程中均未使用过有机溶剂甲酸，化合物 2 是真菌的次生代谢产物，而不是实验过程中的人工产物。

化合物 3~7 经结构鉴定分别为已知化合物：4-Acetoxy-9, 10, 15-trihydroxypbotrydial (3)<sup>[8]</sup>，油状， $[\alpha]_D^{20} = +91.6^\circ$  ( $c 0.20, \text{MeOH}$ )；麦角甾-6, 22-二烯-5, 8-环二氧-3-醇 (4)<sup>[10~12]</sup>，m. p. 169~170  $^\circ$ ， $[\alpha]_D^{28} = -14.9^\circ$  ( $c 0.145, \text{CHCl}_3$ )；麦角甾醇 (5)<sup>[13]</sup>，m. p. 151~152  $^\circ$ ， $[\alpha]_D^{28} = -96.7^\circ$ 。

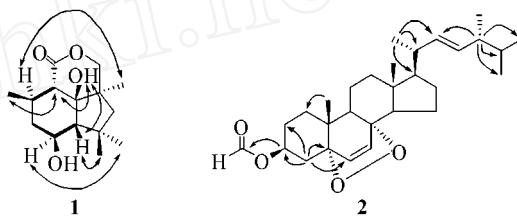


Fig 2 Key COSY (—) and ROESY (—) correlations for compound 1 and part HMBC (—) correlations for compound 2

(c 0.10,  $\text{CHCl}_3$ ); 麦角甾-7, 22-二烯-3, 5, 6-三醇 (**6**)<sup>[14]</sup>, m. p. 248~250,  $[\alpha]_D^{26} = -61.5^\circ$  (c 0.065,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ); 以及麦角甾-7, 22-二烯-3, 5, 6, 9-四醇 (**7**)<sup>[11]</sup>, m. p. 218~220,  $[\alpha]_D^{28} = -109.0^\circ$  (c 0.13,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ).

用纸片扩散法<sup>[15]</sup>检测了化合物 **1~7**的抗细菌和抗真菌活性, 测试菌株包括金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)和榛色青霉 (*Penicillium avellaneum* UC-4376); 阳性对照为利福霉素 (Rifampicin)和制霉菌素 (Nystatin). 结果表明, 所有化合物在 50  $\mu\text{g}/\text{disc}$  剂量下对上述菌株均未显示抗菌活性.

## 参 考 文 献

- [1] Zhang H. W., Song Y. C., Tan R. X. *Nat Prod Rep.* [J], 2006, **23**: 753—771
- [2] Strobel G., Daisy B., Castillo U., et al. *J. Nat Prod.* [J], 2004, **67**(2): 257—268
- [3] Piel J. *Nat Prod Rep.* [J], 2004, **21**: 519—538
- [4] Zhao P. J., Fan L. M., Li G. H., et al. *Arch Pharm Res.* [J], 2005, **28**(11): 1228—1232
- [5] Dai H. Q., Kang Q. J., Li G. H., et al. *Helv Chim Acta* [J], 2006, **89**: 527—531
- [6] Zhao P. J., Wang H. X., Li G. H., et al. *Chem Biodivers.* [J], 2007, **4**: 899—904
- [7] Yu T. W., Shen Y. M., Robert M. D., et al. *J. Am Chem Soc.* [J], 1998, **120**: 7749—7759
- [8] Collado I. G., Hernandez-Galan R., Duran-Patron R., et al. *Phytochemistry* [J], 1995, **38**(3): 647—650
- [9] Lindner H. J., Gross B. V. *Chem Ber.* [J], 1974, **107**: 3332—3336
- [10] Gunatilaka A. A. L., Gopichand Y., Schmitz F. J., et al. *J. Org Chem.* [J], 1981, **46**: 3860—3866
- [11] Yue J. M., Chen S. N., Lin Z. W., et al. *Phytochemistry* [J], 2001, **56**: 801—806
- [12] Gauvin A., Smadja J., Aknin M., et al. *Can J. Chem.* [J], 2000, **78**: 986—992
- [13] Wright J. L. C., McInnes A. G., Shimizu S., et al. *Can J. Chem.* [J], 1978, **56**: 1898—1903
- [14] Cafieri F., Fattorusso E., Gavagnin M., et al. *J. Nat Prod.* [J], 1985, **48**(5): 944—947
- [15] Espinel-Ingroff A., White T., Pfaffer M. A. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edn [M], Washington DC: American Society for Microbiology, 1999: 1640—1652

## Chemical Constituents from Endophytic *Phomopsis* sp. Lz42 of *Maytenus hookeri*

YUAN Lin<sup>1,2</sup>, MA Juan<sup>1</sup>, WANG Ting<sup>3</sup>, LI Guo-Hong<sup>1</sup>, SHEN Yue-Mao<sup>1</sup>, ZHAO Pei-Ji<sup>\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

**Abstract** Endophytes, commonly present in higher plants, are important sources of natural products with pharmaceutical potential. A new sesquiterpenoid, 4-deacetyl-10-oxo-dihydro-botrydial(**1**), and a new sterol, 22E, 24R-5, 8-epidioxyergosta-6, 22-dien-3-formate(**2**), were isolated from solid cultures of an endophytic fungal strain *Phomopsis* species Lz42, cultivated on *Maytenus hookeri*, together with five related known compounds, 4-acetoxy-9, 10, 15-trihydroxypbotrydial(**3**), 22E, 24R-5, 8-epidioxyergosta-6, 22-dien-3-ol(**4**), ergosterol(**5**), 22E, 24R-ergosta-7, 22-diene-3, 5, 6-triol(**6**) and 22E, 24R-ergosta-7, 22-diene-3, 5, 6, 9-tetraol(**7**). Their structures were identified by extensive spectroscopic experiments especially 2D-NMR.

**Keywords** Sesquiterpenoid; Sterol; *Phomopsis* sp. Lz42; Endophyte; *Maytenus hookeri*

(Ed : H, J, Z)