

[9] 池建伟, 李 阳, 张 虹, 等. β -谷甾醇与 γ -谷维素键合特征的红外光谱分析[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(8): 97-101, 106.

[10] 张 旭, 兰 洲, 董小萍, 等. 甘松有效成分研究[J]. 中药材, 2007, 30(1): 38-41.

[11] Tsukamoto H, Hisada S, Nishide S. Lignans from bark of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* and *F. japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(11): 4482-4489.

[12] Deyama T, Ikawa T, Kitagawa S, *et al.* The constituents of *Eucommia ulmoides* OLIV. III. isolation and structure of a new lignan glycoside[J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(2): 523-527.

[13] 彭德乾, 高 娟, 郭秀梅, 等. 蒙古蒲公英根化学成分研究 [J]. 中成药, 2014, 36(7): 1462-1466.

[14] Gubiani J R, Habeck T R, Chapla V M, *et al.* One strain-many compounds (OSMAC) method for production of phenolic compounds using *camarops* sp. an endophytic fungus from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) [J]. *Quim Nova*, 2017, 39(10): 1221-1224.

[15] Bagchi A, Oshima Y, Hikino H. Kanshones D and E, sesquiterpenoids of *Nardostachys chinensis* roots [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(11): 3667-3669.

[16] Bagchi A, Oshima Y, Hikino H. Kanshones A and B, sesquiterpenoids of *Nardostachys chinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(4): 1199-1201.

[17] Vasconcelos J M J, Silva A M S, Cavaleiro J A S. Cheminform abstract; chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1421-1424.

[18] Ibrahim A R, Galal A M, Ahmed M S, *et al.* *O*-demethylation and sulfation of 7-methoxylated flavanones by cuninghamella elegans [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(2): 203-206.

麻口皮子药内生真菌及其次生代谢产物的研究

吕珍珍^{1,2}, 彭 帅^{1,3}, 赵碧清^{1,2}, 周小江^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208; 3. 广西国际壮医医院, 广西 南宁 530201)

摘要: **目的** 研究麻口皮子药内生真菌及其次生代谢产物。**方法** 采用组织切块培养法和划线分离法培养分离麻口皮子药中内生真菌, 并通过形态和分子鉴定的方法鉴定菌种。内生真菌的发酵物采用硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。**结果** 从中分离得到 7 个化合物, 分别鉴定为 3, 4-二羟基苯甲酸甲酯 (**1**)、3, 4-二甲氧基苯乙醇 (**2**)、(2*E*) - (2*R*) -2, 3-dihydroxypropyl-3- (4-methoxy-2-oxo-2*H*-pyran-6-yl) -2-butenic acid ester (**3**)、对羟基苯乙醇 (**4**)、(6*S*) -6- [(1*S*) -1-羟基戊基] -4-甲氧基-5, 6-二氢吡喃-2-酮 (**5**)、 β -谷甾醇 (**6**)、豆甾-4-烯-3-酮 (**7**)。**结论** 所有化合物均为首次从该内生真菌中分离得到。

关键词: 麻口皮子药; 内生真菌; 次生代谢产物; 化学成分; 分离鉴定

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)07-1601-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2019. 07. 023

Chemical constituents of the endophytic fungi and their secondary metabolites from *Zanthoxylum simulans*

LÜ Zhen-zhen^{1,2}, PENG Shuai^{1,3}, ZHAO Bi-qing^{1,2}, ZHOU Xiao-jiang^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. The Standardized and Functional Engineering Technology Research Center of Traditional Chinese Medicines Prepared in Ready-to-us Forms in Hunan Province, Changsha 410208, China; 3. Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning 530201, China)

收稿日期: 2018-05-01
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31170336, 31670362); 国家中医药管理局中药饮片标准化建设项目 (ZYBZH-Y-HUN-24); 湖南省重点研发计划项目 (2017NK2261)
作者简介: 吕珍珍 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为中药有效成分与品质评价。E-mail: 545734359@ qq.com
*** 通信作者:** 周小江 (1968—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药有效成分与品质评价。E-mail: gale9888@ 163.com

ABSTRACT: AIM To study the endophytic fungi of *Zanthoxylum simulans* Hance and their secondary metabolites. **METHODS** The endophytic fungi were cultured and isolated by tissue culture and scribing method, and their species were identified by the morphological characteristics and rDNA ITS1-5. 8S-ITS2 sequences. The fermentation extract of endophytic fungi was isolated and purified by silica and Sephadex LH-20, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. **RESULTS** Seven compounds were isolated and identified as methyl 3, 4-dihydroxybenzoate (**1**), 3, 4-dimethoxyphenethyl alcohol (**2**), (2*E*) - (2*R*) -2, 3-dihydroxypropyl-3- (4-methoxy-2-oxo-2*H*-pyran-6-yl) -2-butenic acid ester (**3**), 4-hydroxyphenethyl alcohol (**4**), pestalotin (**5**), β -sitosterol (**6**) and stigmast-4-ene-3, 6-dione (**7**). **CONCLUSION** All the compounds are isolated from this endophytic fungi for the first time. **KEY WORDS:** *Zanthoxylum simulans* Hance; endophytic fungi; secondary metabolites; chemical constituents; isolation and identification

内生真菌是指那些在其生活史的某一段时期生活在植物组织内, 对植物组织没有引起明显病害症状的真菌^[1]。研究表明, 几乎所有被研究过的植物均发现了内生真菌, 目前自然界至少有 100 多万种内生真菌^[2-3], 产生了萜类、生物碱类、苯丙素类、黄酮类、甾体类、醌类、糖类、有机酸类、肽类等多种结构类型次生代谢产物, 并且具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化、抗病毒、抗炎、杀虫等活性^[4-5]。因此, 植物内生真菌成为了寻找活性物质的良好资源。

花椒属植物属于芸香科, 我国约有 39 种 14 变种^[6], 其中野花椒 *Zanthoxylum simulans* Hance 为该属药食两用品种之一, 其果实常作为调味品使用^[7], 而其干皮及枝皮为湖南省有名的祛风湿中药, 叫麻口皮子药或皮子药, 用于治疗风寒湿痹、腹痛泄泻、咽喉疼痛等病^[8]。关于野花椒的化学成分及其抗类风湿关节炎活性已有研究报道, 基本揭示了麻口皮子药抗类风湿关节炎的物质基础^[9-12], 并且对其中抗类风湿关节炎的内生真菌进行了筛选, 得到 4 株活性菌株^[13]。为了更广泛地寻找抗类风湿关节炎的活性物质, 本实验继续对麻口皮子药内生真菌及其次生代谢产物进行研究, 从中分离鉴定了一株优势内生真菌 *Pestalotiopsis oxanthi*, 并从其发酵物中分离得到了 7 个次生代谢产物, 均为首次从该内生真菌中分离得到。

1 材料

DRP-600 MHz 核磁共振波谱仪 (TMS 为内标, 德国 Bruker 公司); Xevo G2-XS QToF 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); N-1001 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司)。培养基采用 PDA 固体培养基、种子培养液和大米培养基 (实验室

配制)。Sephadex LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶 (美国 Amersham Biosciences 公司); Rp-18 反相硅胶 (40~63 μm , 日本 Daiso 公司); MCI gel CHP-20P (日本三菱化学株式会社); ReproSil 100-C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm , 德国迈克公司); 柱色谱硅胶 (200~300 目)、硅胶 H、薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); 其他试剂均为分析纯。

麻口皮子药于 2016 年 10 月采自湖南省浏阳市大围山, 封存于保鲜袋中, 经湖南中医药大学药学院周小江教授鉴定为芸香科花椒属植物野花椒 *Zanthoxylum simulans* Hance 的新鲜干皮。

2 方法

2.1 内生真菌分离与纯化 取新鲜麻口皮子药干皮, 用蒸馏水冲洗数次直至干净, 剪成边长约 2 cm 的方块, 依次用 75% 酒精、无菌水、5% 次氯酸钠溶液、无菌水进行漂洗, 时间分别为 1 min、30 s、3 min、45 s, 将消毒后的干皮于无菌操作台中剪切成边长 1 cm 的小块, 置 PDA-抗生素平板培养基上培养, 对照组为消毒后边长 2 cm 的方块, 于培养箱中恒温 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 左右, 将干皮剪切边缘长出的菌丝接种至 PDA 平板培养基中继续培养, 采用平板划线法进行反复分离纯化, 直至培养基中的菌落为单一菌株。其中, 菌株 MK-24 为优势菌株, 将优势菌株保存于斜面培养基中, 以 5~7 $^{\circ}\text{C}$ 的温度保种备用。

2.2 内生真菌鉴定

2.2.1 形态鉴定^[13] 将 MK-24 于 PDA 平板上 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 7 d 左右, 观察菌落生长情况, 记录菌株培养特性, 采用插片法对菌株进行显微摄影, 观察其显微形态特征, 依据萨卡图和休斯塔巴基-巴伦真菌分类系统进行初步鉴定和分类。

2.2.2 分子鉴定 对优势内生真菌 MK-24 进行分

子鉴定, DNA 提取采用 CTAB 法^[15], 通用引物 ITS1/ITS4 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 1、5.8S 和 ITS2 的全序列, PCR 反应体系与 PCR 循环体系见表 1~2, 将 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序。将所测得真菌的 ITS 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 搜索同源序列, 将序列相似性大于 95% 的 rDNA ITS 序列通过 MEGA7.0 软件使用 Clustal W 进行多重比对, 构建系统进化树进行分析。

表 1 PCR 反应体系

Tab. 1 Reaction systems of PCR

试剂	体积/ μ L
Template(基因组 DNA 20~50 ng/ μ L)	0.5
10 $\times$ Buffer(Mg^{2+})	2.5
dNTP(各 2.5 mmol/L)	1.0
Dream Taq-TM DNA Polymerase	0.2
ITS1 引物(10 μ mol/L)	0.5
ITS4 引物(10 μ mol/L)	0.5
加双蒸 H ₂ O	19.8

表 2 PCR 循环体系

Tab. 2 Circulation systems of PCR

温度/ $^{\circ}$ C	时间	程序
94	4 min	预变性
94	45 s	30 个循环
55	45 s	
72	1 min	
72	10 min	修复延伸
4	∞	终止反应

2.3 发酵培养 将保存于 PDA 斜面培养基的菌株 MK-24 接种到 PDA 平板培养基上于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 7 d 后, 接种到麦芽种子培养液中进行摇床活化, 条件为 28 $^{\circ}$ C、180 r/min。将活化后的菌株接种至大米培养基中进行发酵, 常温下静置 40 d。

2.4 提取与分离 菌株发酵结束后, 往瓶中加入丙酮没过菌丝体, 静置 12 h 以杀死真菌, 然后将大米捣碎, 4 层纱布过滤得发酵液, 将发酵液减压浓缩至 3 L 以下, 用乙酸乙酯超声提取 2 次, 每次 20 min, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙酸乙酯, 得浸膏 92 g。浸膏过硅胶柱, 以石油醚-乙酸乙酯(5:1、3.5:1、2:1、1:1、1:4) 梯度洗脱, 收集洗脱液, 每份约 500 mL, 薄层色谱检识, 合并为 4 部分 (Fr. 1~Fr. 4)。Fr. 3 (12.5 g) 过 MCI 柱, 以甲醇-水 (30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、甲醇) 梯度洗脱,

检识, 合并成 3 个部分 (Fr. 3-1~Fr. 3-3), Fr. 3-1 (3.7 g) 经反相硅胶以甲醇-水 (30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、甲醇) 梯度洗脱, Sephadex LH-20 柱甲醇洗脱纯化, 得化合物 **1** (1.3 mg)、**4** (78.4 mg), Fr. 3-1-3 (2.3 g) 先过反相硅胶, 以甲醇-水 (30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、甲醇) 梯度洗脱, Sephadex LH-20 柱甲醇洗脱纯化, 再经制备 HPLC 色谱 (甲醇:水=34:66) 纯化, 得化合物 **2** (1.6 mg)、**3** (1.9 mg), Fr. 3-1-2 (0.8 g) 经 Sephadex LH-20 柱甲醇洗脱纯化, 得化合物 **5** (6.1 mg); Fr. 1 (20.6 g) 先过正相硅胶柱, 以石油醚-乙酸乙酯 (20:1、15:1、10:1、8:1、6:1、5:1) 梯度洗脱, 再经反相硅胶柱, 以甲醇-水 (30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、甲醇) 梯度洗脱, 制备薄层 (展开剂为三氯甲烷-乙酸乙酯, 10:1), Sephadex LH-20 柱 (三氯甲烷-甲醇, 6:4) 洗脱纯化, 得化合物 **6** (8.7 mg)、**7** (2.3 mg)。

3 结果

3.1 内生真菌鉴定 MK-24 在 PDA 培养基上菌落呈白色绒毛状并出现轮纹, 中部淡黄褐色见图 1a, 7 d 后长满直径 10 cm 的培养基, 菌丝生长较迅速, 14 d 后菌落上出现孢子堆, 有油滴, 培养基背面为桔黄色且有皱褶见图 1b。显微观察发现, 菌丝无色, 有分枝, 具隔膜见图 1c, 分生孢子纺锤形, (14.0~26.0) μ m $\times$ (6.0~8.0) μ m, 可见 3 个深色细胞, 见图 1d。ITS 序列分析表明, 内生真菌 MK-24 与 *Pestalotiopsis oxyanthi* (最大相似度 99%, 覆盖度 100%, 登录号 KT716303.1) 非常接近, 其系统发育树见图 2。结合其菌丝与分生孢子特征, 初步将菌株 MK-24 鉴定为 *P. oxyanthi*。

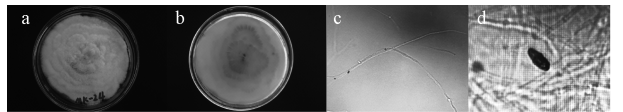


图 1 MK-24 菌株形态与显微结构特征

Fig. 1 Colony morphology and microscopic characteristic of MK-24 strain

3.2 结构鉴定

化合物 **1**: 浅粉色粉末。分子式 C₈H₈O₄。HR-ESI-Q-TOF-MS *m/z*: 167.038 7 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.42 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 7.41 (1H, dd, *J*=8.6, 2.0 Hz, H-6), 6.80

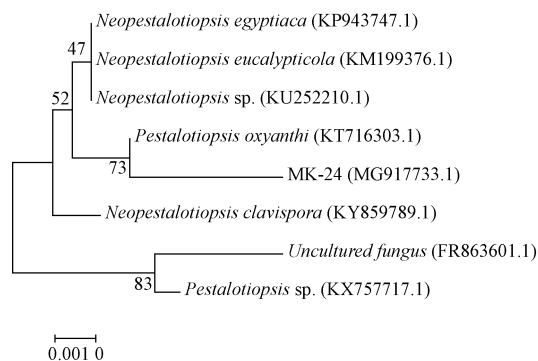


图2 MK-24菌株基于ITS序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of MK-24 strain generated from the ITS sequences

(1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 3.83 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 168.8 (C-7), 151.7 (C-4), 146.2 (C-3), 123.6 (C-6), 122.5 (C-1), 117.4 (C-5), 115.8 (C-2), 52.2 (7-OCH₃)。以上数据与文献 [14] 基本一致, 故鉴定为 3, 4-二羟基苯甲酸甲酯。

化合物 2: 白色粉末。分子式 C₁₀H₁₄O₃。HR-ESI-Q-TOF-MS m/z : 181.088 0 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.87 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.84 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.76 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$ Hz, H-6), 3.82 (3H, s, 4-OCH₃), 3.79 (3H, s, 3-OCH₃), 3.72 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-8), 2.76 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-7); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 150.5 (C-3), 148.9 (C-4), 133.3 (C-1), 122.3 (C-6), 114.0 (C-2), 113.1 (C-5), 64.4 (C-8), 56.5 (3-OCH₃), 56.4 (4-OCH₃), 39.8 (C-7)。以上数据与文献 [15] 基本一致, 故鉴定为 3, 4-二甲氧基苯乙醇。

化合物 3: 针状结晶 (甲醇)。分子式 C₁₃H₁₆O₇。HR-ESI-Q-TOF-MS m/z : 285.096 9 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.71 (1H, d, $J = 1.1$ Hz, H-2'), 6.57 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 5.75 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3), 4.26 (1H, dd, $J = 4.2, 11.4$ Hz, H-1''a), 4.16 (1H, dd, $J = 6.4, 11.4$ Hz, H-1''b), 3.90 (3H, s, 4-OCH₃), 3.88 (1H, m, H-2''), 3.59 (2H, dd, $J = 1.2, 5.5$ Hz, H-3''), 2.39 (3H, d, $J = 1.1$ Hz, 1'-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 172.9 (C-4), 167.3 (C-3'), 165.6 (C-2), 160.3 (C-6), 144.1 (C-1'), 121.0 (C-2'), 104.1 (C-5), 91.3 (C-3), 71.1 (C-2''), 66.7 (C-1''), 64.0 (C-3''), 57.2 (4-

OCH₃), 13.6 (1'-CH₃)。以上数据与文献 [16] 基本一致, 故鉴定为 (2E) - (2R) -2, 3-dihydroxypropyl-3- (4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl) -2-butenic acid ester。

化合物 4: 针状结晶 (甲醇)。分子式 C₈H₁₀O₂。HR-ESI-Q-TOF-MS m/z : 137.060 1 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 6.72 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 3.69 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8), 2.71 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 156.6 (C-4), 130.9 (C-1), 130.8 (C-2, 6), 116.1 (C-3, 5), 64.5 (C-8), 39.3 (C-7)。以上数据与文献 [17] 基本一致, 故鉴定为对羟基苯乙醇。

化合物 5: 白色粉末。分子式 C₁₁H₁₈O₄。HR-ESI-Q-TOF-MS m/z : 213.112 1 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.18 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-3), 4.36 (1H, m, H-6), 3.81 (3H, s, 4-OCH₃), 3.60 (1H, m, H-1'), 2.84 (1H, m, H-5b), 2.31 (1H, dd, $J = 3.8, 17.2$ Hz, H-5a), 1.61 (2H, m, H-2'), 1.51 (2H, m, H-3'), 1.37 (2H, m, H-4'), 0.94 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-5'); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 176.5 (C-2), 170.3 (C-4), 90.0 (C-3), 80.2 (C-1'), 72.6 (C-6), 57.3 (4-OCH₃), 33.3 (C-5), 30.2 (C-2'), 29.1 (C-3'), 23.7 (C-4'), 14.4 (C-5')。以上数据与文献 [18] 基本一致, 故鉴定为 (6S) -6- [(1S) -1-羟基戊基] -4-甲氧基-5, 6-二氢吡喃-2-酮。

化合物 6: 白色粉末。分子式 C₂₉H₅₀O。HR-ESI-Q-TOF-MS m/z : 415.211 9 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.35 (1H, t, $J = 2.3$ Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-19), 0.84 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-24), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.68 (3H, s, H-28); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 72.0 (C-3), 56.9 (C-14), 56.2 (C-17), 50.2 (C-9), 45.9 (C-22), 42.4 (C-13), 42.4 (C-4), 39.9 (C-12), 37.4 (C-1), 36.6 (C-10), 36.3 (C-18), 34.0 (C-20), 32.0 (C-7), 32.0 (C-8), 31.8 (C-2), 29.2 (C-25), 28.4 (C-16), 26.1 (C-15), 24.4 (C-21), 23.2 (C-23), 21.2 (C-11), 19.9 (C-26), 19.5 (C-

27), 19.2 (C-19), 18.9 (C-28), 12.1 (C-24), 12.0 (C-29)。以上数据与文献 [19] 基本一致, 故鉴定为 β -谷甾醇。

化合物 **7**: 白色粉末。分子式 $C_{29}H_{48}O$ 。HR-ESI-Q-TOF-MS m/z : 413.378 2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.73 (1H, s, H-4), 1.18 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, J = 6.5 Hz, H-21), 0.84 (3H, m, H-29), 0.83 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.81 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.71 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 199.9 (C-3), 172.0 (C-5), 123.9 (C-4), 56.1 (C-17), 56.0 (C-14), 53.9 (C-9), 45.4 (C-24), 42.4 (C-13), 39.7 (C-12), 38.7 (C-10), 36.3 (C-20), 35.8 (C-1), 35.7 (C-8), 34.2 (C-22), 34.0 (C-2), 33.1 (C-6), 32.2 (C-7), 29.2 (C-25), 28.3 (C-16), 26.1 (C-23), 24.3 (C-15), 23.2 (C-28), 21.2 (C-11), 20.0 (C-26), 19.1 (C-27), 18.8 (C-21), 17.5 (C-19), 12.1 (C-29), 12.1 (C-18)。以上数据与文献 [20] 基本一致, 故鉴定为豆甾-4-烯-3-酮。

4 讨论

P. oxyanthi 为拟盘多毛孢属内生真菌, 这是首次从麻口皮子药中分离得到的, 而文献 [21] 报道拟盘多毛孢属内生真菌能产生抗宫颈癌及结肠癌的活性成分。因此, 本研究对此内生真菌的次生代谢产物研究具有重要的意义。

目前, 从 *P. oxyanthi* 次生代谢产物中所分离的化合物均为首次得到, 但仅为此内生真菌次生代谢产物的一部分, 目前还未见抗类风湿关节炎的报道。其中的 3, 4-二羟基苯甲酸甲酯为酚酸类化合物, 文献 [22] 报道它具有抗炎、抗菌、抗癌等药理作用。

优势菌株是指在 1 个生态环境中占主导地位的菌种, 在分离麻口皮子药内生真菌过程中, *P. oxyanthi* 是生长最快、数量最多的菌种, 而植物内生真菌是寻找活性物质的良好来源, 因此选择其进行次生代谢产物研究。同时, 抗类风湿关节炎活性成分的筛选是下一步研究目标。

参考文献:

[1] Dominique L, Afra K, Ietidal M, *et al.* A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8(9): 701-704.

[2] Zhao J, Shan T, Mou Y, *et al.* Plant-derived bioactive com-

pounds produced by endophytic fungi[J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2011, 11(2): 159-168.

[3] 谭小明, 周雅琴, 陈 娟, 等. 药用植物内生真菌多样性研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(18): 1563-1580.

[4] Chen L, Zhang Q Y, Jia M, *et al.* Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2016, 42(3): 454-473.

[5] 牛丽丽, 袁肖寒, 顾成波, 等. 内生真菌产植物次生代谢产物研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(11): 12-16.

[6] 袁海梅, 邱 露, 谢贞建, 等. 花椒属植物生物碱类成分及其药理活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(23): 4573-4584.

[7] 王 福, 闫珂巍, 梅国荣, 等. DNA 条形码序列对药食两用品花椒的品种鉴定[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(1): 138-141.

[8] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准[S]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2009: 217.

[9] Wang J F, Deng Y F, Yang S H, *et al.* Characterization and biological evaluation of six new dimeric lignans with an unusual α , β -unsaturated ketone motif from *Zanthoxylum simulans*[J]. *Bioorganic*, 2014, 24(19): 4667-4671.

[10] Peng C Y, Liu Y Q, Deng Y H, *et al.* Lignans from the bark of *Zanthoxylum Simulans*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(3): 232-238.

[11] Yang S H, Liu Y Q, Wang J F, *et al.* Isoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum simulans* and their biological evaluation[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2015, 68(4): 289-292.

[12] Zhou X J, Chen X L, Li X S, *et al.* Two dimeric lignans with an unusual α , β -unsaturated ketone motif from *Zanthoxylum podocarpum* and their inhibitory effects on nitric oxide production[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(1): 373-376.

[13] 吕珍珍, 刘年珍, 钱群刚, 等. 麻口皮子药内生真菌的分离及活性菌株的筛选[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(7): 1434-1440.

[14] 李奕星, 左文健, 王 辉, 等. 异叶三宝木枝条的化学成分研究[J]. *中国药物化学杂志*, 2012, 22(2): 120-123.

[15] 李艳草, 李 春, 王智民, 等. 藏药甘青乌头化学成分研究(Ⅲ)[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(7): 1163-1167.

[16] R nsberga D, Debbaba A, M ndi A, *et al.* Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*[J]. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54(25): 3256-3259.

[17] 尹 伟, 吴培云, 梁益敏, 等. 炮弹果果肉的化学成分研究[J]. *中成药*, 2012, 34(8): 1523-1528.

[18] Venkatasubbaiah P, Van Dyke C G. Phytotoxins produced by *pestalotiopsis oenotherae*, a pathogen of evening primrose[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(5): 1471-1474.

[19] Chaturvedula V S P, Prakas I. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus* [J]. *Int Current Pharm J*, 2012, 1(9): 239-242.

[20] 开 亮, 蔡 月, 付艳辉, 等. 革叶山姜的化学成分研究

[J]. 中草药, 2016, 47(5): 717-721.

[21] 车永胜, 郭良栋, 刘 玲. 一株拟盘多毛孢属内生真菌及所产生的抗肿瘤活性化合物的发现及应用; 中国, 2009100777279. 7[P]. 2009-09-23.

[22] 马 临, 李俊明, 陈玉青, 等. HPLC 法测定白花蛇舌草注射液中 3, 4-二羟基苯甲酸甲酯的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(11): 907-909.

HPLC 法同时测定桑白皮中 5 种成分

袁 婷, 郑甜碧, 谢鲁灵枫, 成胜荣, 魏 渊, 欧阳 臻*
(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定桑白皮 *Morus alba* L. 中绿原酸、二氢桑色素、氧化白藜芦醇、桑辛素 O、桑根酮 C 的含有量。**方法** 桑白皮甲醇提取物的分析采用 Dimonsiol C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2% 醋酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 340 nm。**结果** 绿原酸、二氢桑色素、氧化白藜芦醇、桑辛素 O、桑根酮 C 分别在 3.25~104.00 μg/mL ($r=0.999\ 6$)、4.81~154.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、5.38~172.00 μg/mL ($r=0.999\ 5$)、1.88~60.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、11.19~358.00 μg/mL ($r=0.999\ 5$) 范围内线性关系良好。平均加样回收率分别为 98.98% (RSD = 1.70%)、100.73% (RSD = 1.35%)、99.71% (RSD = 1.64%)、100.07% (RSD = 1.11%)、99.90% (RSD = 2.16%)。**结论** 该方法准确简便, 重复性好, 可用于桑白皮药材的质量控制。

关键词: 桑白皮; 绿原酸; 二氢桑色素; 氧化白藜芦醇; 桑辛素 O; 桑根酮 C; HPLC

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)07-1606-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.024

Simultaneous determination of five constituents in *Morus alba* by HPLC

YUAN Ting, ZHENG Tian-bi, XIE Lu-ling-feng, CHENG Sheng-rong, WEI Yuan, OUYANG Zhen*
(School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of chlorogenic acid, dihydroquinochrome, oxidized resveratrol, moracin O and sanggenon C in *Morus alba* L.. **METHODS** The analysis of methanol extract of *M. alba* was performed on a 30 ℃ thermostatic Dimonsiol C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.2% acetic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 340 nm. **RESULTS** Chlorogenic acid, dihydroquinochrome, oxidized resveratrol, moracin O, sanggenon C showed good linear relationships within the ranges of 3.25-104.00 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 4.81-154.00 μg/mL($r=0.999\ 7$), 5.38-172.00 μg/mL($r=0.999\ 5$), 1.88-60.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$), 11.19-358.00 μg/mL ($r=0.999\ 5$), whose average recoveries were 98.98% (RSD = 1.70%), 100.73% (RSD = 1.35%), 99.71% (RSD = 1.64%), 100.07% (RSD = 1.11%), 99.90% (RSD = 2.16%), respectively. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *M. alba*.

收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302); 国家自然科学基金 (81573529); 镇江市重点研发计划——产业前瞻与共性关键技术 (GY2015050)

作者简介: 袁 婷 (1992—), 女, 硕士生, 从事中药学研究。Tel: 18260622926, E-mail: 2211515024@stmail. ujs.edu.cn

* 通信作者: 欧阳 臻 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药资源和分子生药学研究。Tel: (0511) 88791564, E-mail: zhenouyang@ ujs.edu.cn