and analgesic activities of cupressuflavone from *Cupressus macrocarpa*: impact on pro-inflammatory mediators [J]. *Drug Dev Res*, 2018, 79(1): 22-28.

[20] 王 刚, 才 谦, 李三华, 等. 石上柏双黄酮类和酚酸类成分体外抗氧化和抗肿瘤活性研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 5-8.

新疆阿魏内生菌 *Alternaria* sp. TA26-16 化学成分的研究

蒋瑞娟^{1,2}, 宋 骏¹, 何 权^{1,2}, 徐建国¹, 朱 军^{1,2}, 斯建勇³, 李晓瑾^{1,2*}

(1. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 国家中医药管理局新疆中药民族药资源重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830002; 2. 新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 3. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193)

摘要: 目的 研究新疆阿魏内生菌 *Alternaria* sp. TA26-16 的化学成分。方法 该真菌固体发酵物的甲醇提取物采用硅胶、凝胶和制备高效液相进行分离纯化, 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 10 个化合物, 分别鉴定为麦角甾-4, 6, 8 (14), 22E-四烯-3-酮 (1)、邻苯二甲酸二异丁酯 (2)、油酸 (3)、对甲基苯甲醛 (4)、 β -谷甾醇 (5)、亚油酸 (6)、2-oxabicyclo [3, 2, 2] nona-5, 7, 8-triene (7)、2-(4-羟基苯基) 乙酸乙酯 (8)、alternariol (9)、alternariol-4-methyl ether (10)。结论 所有化合物均为首次从该内生菌中分离得到。

关键词: 新疆阿魏; 内生真菌; 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)09-2135-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.024

Chemical constituents of endophytic fungi *Alternaria* sp. TA26-16 from *Ferula sinkiangensis*

JIANG Rui-juan^{1,2}, SONG Jun¹, HE Quan^{1,2}, XU Jian-guo¹, ZHU Jun^{1,2}, SI Jian-yong³, LI Xiao-jin^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Resources, Testing Center of Xinjiang Entry Exit Inspection and Quarantine Porta, Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnical Materia State Administration of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830002, China; 2. Agricultural College, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 3. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: AIM To study the chemical constituents of endophytic fungi *Alternaria* sp. TA26-16 from *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen. **METHODS** The methanol extract from the solid fermentation of *Alternaria* sp. TA26-16 was isolated and purified by silica gel, gel and preparative HPLC, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. **RESULTS** Ten compounds were isolated and identified as ergosta-4, 6, 8 (14), 22E-tetraen-3-one (1), diisobutyl phthalate (2), oleic acid (3), *p*-methyl benzaldehyde (4), β -sitosterol (5), linoleic acid (6), 4-oxabicyclo [3.2.2] nona-1 (7), 5, 8-triene (7), 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (8), alternariol (9), alternariol-4-methyl ether (10). **CONCLUSION** All the compounds are isolated from endophytic fungi *Alternaria* sp. TA26-16 for the first time.

KEY WORDS: *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen.; endophytic fungi; chemical constituents; isolation and identification

收稿日期: 2019-01-26

基金项目: 国家自然科学基金 (S1460556)

作者简介: 蒋瑞娟 (1993—), 女, 硕士生, 研究方向为药用植物栽培。Tel: 17699679150, E-mail: RuiJuanJ@163.com

* 通信作者: 李晓瑾 (1962—), 女, 硕士, 研究员, 从事中药学研究。Tel: 13095038998, E-mail: xlxj@126.com

植物内生真菌是指在生活史的某一阶段或全部阶段生活在健康植物组织内又不对植物组织造成明显病害症状的菌株。它不仅可以促进植物生长,提高植物有效成分含量,优化生态环境,还可以产生一些与宿主植物相似或相同的生物活性成分,因此极具新药开发前景^[1-2]。

新疆阿魏 *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen 是伞形科阿魏属植物^[3], 全国仅在新疆伊犁地区有少量分布^[4], 树脂为其药用部位, 具有消积、化痰、散痞、杀虫等作用^[5]。由于生长环境恶劣、花后结实即死等生理缺陷以及采胶方式错误、过度放牧等人为因素, 新疆阿魏已被《中国珍稀濒危保护植物名录》纳入三级重点保护濒危植物。利用现代技术手段, 研究濒危药用植物内生真菌的化学成分对于缓解濒危植物压力、保护生态环境具有重大意义。

目前, 课题组从新疆阿魏中分离得到内生菌 337 株, 经过筛选, 内生菌株 *Alternaria* sp. TA26-16 具有较好的抗肿瘤活性。本研究对新疆阿魏内生菌株 *Alternaria* sp. TA26-16 固体发酵产物的甲醇提取物进行化学成分研究, 从中分离得到 10 个化合物, 且所有化合物均为首次从该菌中分离得到。

1 材料

Bruker AV III 600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); EYEL4 旋转蒸发仪 (广州爱浪仪器设备有限公司); SA-1500-1 超净工作台 (上海上净净化设备有限公司); 柱层层析硅胶 (青岛海洋化工厂); 薄层色谱硅胶板 GF₂₅₄ (烟台市化学工业研究所)。

内生真菌分离自新疆阿魏 *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen, 由中国医学科学院药用植物研究所陈娟研究员鉴定为 *Alternaria* sp. TA26-16, 菌种保藏于新疆中药民族药研究所微生物实验室, 编号 6626。

土豆培养基, 土豆去皮, 切成约 2 cm³ 的小块, 加 1 000 mL 蒸馏水煮沸 20 min, 玻棒搅拌, 双层纱布过滤, 取滤液加 20 g 葡萄糖、16 g 琼脂, 补足滤液至 1 000 mL, 自然 pH。

大米培养基, 取 60 g 大米放于锥形瓶中, 倒入 80 mL 蒸馏水, 自然 pH, 高压灭菌 20 min。

菌株发酵产物, 菌株 *Alternaria* sp. TA26-16 接种于土豆培养基 25 °C 下培养 5 d, 再接种至大米培养基上 25 °C 恒温发酵培养 30 d。

2 提取与分离

用等量甲醇萃取菌株发酵产物 3 次, 每次 24 h, 得甲醇提取物 42 g, 再用 300 g 硅藻土拌样, 依次以石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯洗脱, 分别得相应部位 10.6、9.4、8.7 g。

石油醚部位经硅胶柱分离, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱 (100 : 1 ~ 1 : 1), 得 14 个组分 (Fr. 2-1~14), Fr. 2-3 经硅胶柱分离, 石油醚-乙酸乙酯 (20 : 1 ~ 1 : 1) 梯度洗脱, 得化合物 **1** (6.4 mg)、**2** (7.9 mg)。取馏分 Fr. 2-7 凝胶柱分离, 甲醇洗脱, 得化合物 **3** (5.3 mg)。取馏分 Fr. 2-14 硅胶柱分离, 石油醚-乙酸乙酯 (20 : 1) 洗脱, 得化合物 **4** (6.2 mg)。

二氯甲烷部位经硅胶柱分离, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱 (100 : 0 ~ 0 : 100), 得 17 个组分 (Fr. 3-1~17), Fr. 3-3 经硅胶柱分离, 石油醚-乙酸乙酯 (60 : 40) 洗脱, 得化合物 **5** (9.2 mg)、**6** (7.4 mg)。Fr. 3-15 经硅胶柱分离, 氯仿-甲醇 (30 : 1) 洗脱得化合物 **7** (6.3 mg)。

乙酸乙酯部位经硅胶柱分离, 氯仿-甲醇梯度洗脱 (100 : 0 ~ 0 : 100), 最后用甲醇洗脱。得 19 个组分 (Fr. 4-1~19), Fr. 4-5 经硅胶柱分离, 氯仿-甲醇 (20 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱, 得化合物 **8** (6.1 mg)。Fr. 3-15 经硅胶柱分离, 氯仿-甲醇 (30 : 1) 洗脱, 得化合物 **9** (10.8 mg)。Fr. 4-13 利用半制备液相分离, 甲醇-水 (75 : 25), 得化合物 **10** (6.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色针晶 (甲醇)。ESI-MS m/z : 415 [M + Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.03 (1H, d, $J=9.4$ Hz, H-6), 5.73 (1H, s, H-4), 5.26 (1H, dd, $J=8.0, 15.2$ Hz, H-23), 5.20 (1H, dd, $J=8.0, 15.2$ Hz, H-22), 1.05 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, $J=6.89$ Hz, H-28), 0.84 (3H, d, $J=7.1$ Hz, H-27), 0.82 (3H, d, $J=8.1$ Hz, H-26); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 34.3 (C-1), 34.4 (C-2), 199.7 (C-3), 123.1 (C-4), 164.6 (C-5), 124.6 (C-6), 134.2 (C-7), 124.6 (C-8), 44.4 (C-9), 36.9 (C-10), 19.1 (C-11), 35.7 (C-12), 44.1 (C-13), 156.3 (C-14), 25.5 (C-15), 27.9 (C-16), 55.8 (C-17), 19.1 (C-18), 16.8 (C-19), 39.4 (C-20), 21.4 (C-21), 135.1 (C-22), 132.7 (C-23), 43.0 (C-24),

33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献 [6] 基本一致, 故鉴定为麦角甾-4, 6, 8 (14), 22E-四烯-3-酮。

化合物 2: 无色油状物。ESI-MS m/z : 301 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.96 (2H, m, H-3, 6), 7.77 (2H, m, H-4, 5), 4.56 (4H, t, $J=6.0$ Hz, H-8, 8'), 1.96 (4H, m, H-9, 9'), 1.68 (4H, m, H-10, 10'), 1.21 (6H, t, $J=6.0$ Hz, H-11, 11'); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 134.4 (C-1, 2), 130.9 (C-3, 8), 133.0 (C-4, 5), 170.4 (C-7, 7'), 67.6 (C-8, 8'), 32.8 (C-9, 9'), 21.3 (C-10, 10'), 15.8 (C-11, 11')。以上数据与文献 [7] 基本一致, 故鉴定为邻苯二甲酸二异丁酯。

化合物 3: 白色粉末。ESI-MS m/z : 282 $[M]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.37 (2H, m, H-9, 10), 2.37 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2), 2.07 (4H, m, H-8, 11), 1.65 (2H, m, H-9, 10), 1.33~1.27 (20H, m, H-4-7, 12-17), 0.91 (3H, m, H-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 180.1 (C-1), 34.8 (C-2), 25.2 (C-3), 30.3-29.9 (C-4-7), 28.0 (C-8, 11), 130.5 (C-9), 130.8 (C-10), 29.8~29.4 (C-12-15), 32.7 (C-16), 23.2 (C-17), 14.8 (C-18)。以上数据与文献 [8] 基本一致, 故鉴定为油酸。

化合物 4: 白色固体。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.93 (2H, d, $J=2.2$ Hz, H-2, 6), 6.91 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-3, 5), 2.58 (3H, s, 4-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 197.3 (1-CHO), 130.3 (C-1), 131.0 (C-2, 6), 115.3 (C-3, 5), 160.3 (C-4), 26.3 (4-CH₃)。以上数据与文献 [9] 基本一致, 故鉴定为对甲基苯甲醛。

化合物 5: 白色晶体 (甲醇)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.63 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-26), 0.85 (3H, s, H-29), 0.91 (3H, s, H-21), 1.02 (3H, s, H-19), 3.53 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, brs, H-6); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 37.3 (C-1), 31.7 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 50.2 (C-9), 36.5 (C-10), 21.1 (C-11), 39.8 (C-12), 42.4 (C-13), 56.8 (C-14), 24.3 (C-15), 29.8 (C-16), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 19.1 (C-19), 19.8 (C-20), 18.8 (C-21), 36.0 (C-22), 26.2

(C-23), 45.9 (C-24), 29.5 (C-25), 19.3 (C-26), 19.8 (C-27), 23.1 (C-28), 12.0 (C-29)。以上数据和文献 [10] 基本一致, 故鉴定为 β -谷甾醇。

化合物 6: 淡黄色油状液。ESI-MS m/z : 280 $[M]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.34 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 2.80 (2H, m, H-11), 2.33 (2H, t, $J=7.6$ Hz, H-2), 2.05 (4H, m, H-8, 14), 1.63 (2H, m, H-3), 1.25~1.31 (14H, m, H-4-7, H-13-16), 0.97 (3H, t, H-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 179.9 (C-1), 34.1 (C-2), 24.7 (C-3), 29.0~29.7 (C-4-7), 27.2 (C-8), 130.0 (C-9), 128.1 (C-10), 27.5 (C-11), 130.2 (C-12), 128.1 (C-13), 27.2 (C-14), 29.8 (C-15), 32.0 (C-16), 22.7 (C-17), 14.1 (C-18)。以上数据与文献 [11] 基本一致, 故鉴定为亚油酸。

化合物 7: 白色固体。ESI-MS m/z : 121.06 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.02 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-7, 8), 6.69 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-6, 9); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 130.94 (C-1), 156.70 (C-5), 116.08 (C-6, 9), 130.85 (C-7, 8)。以上数据与与文献 [12] 基本一致, 故鉴定为 2-oxabicyclo [3, 2, 2] nona-5, 7, 8-triene。

化合物 8: 淡黄色油状物。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.04 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, 6), 6.78 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, 5), 2.84 (2H, t, $J=7.1$ Hz, H-7), 4.24 (2H, t, $J=7.1$ Hz, H-8), 2.03 (3H, s, H-9); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 129.3 (C-1), 130.0 (C-2, C-6), 115.4 (C-3, C-5), 154.7 (C-4), 34.1 (C-7), 65.6 (C-8), 21.1 (C-9), 172.1 (C-10)。以上数据与文献 [9] 基本一致, 故鉴定为 2-(4-羟基苯基) 乙酸乙酯。

化合物 9: 黄色无定型粉末。¹H-NMR (acetone-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.28 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.71 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-5'), 6.61 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-3'), 6.37 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-4), 2.77 (3H, s); ¹³C-NMR (acetone-*d*₆, 150 MHz) δ : 140.3 (C-1), 166.7 (C-3), 102.19 (C-4), 166.80 (C-5), 166.81 (C-7), 154.92 (C-2'), 160.08 (C-4')。以上数据与文献 [13] 基本一致, 故鉴定为 alternariol。

化合物 10: 浅紫色非晶粉末。ESI-MS m/z :

272[M]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.79 (1H, s, 2-OH), 10.79 (1H, s, 10-OH), 7.18 (1H, brs, H-5), 6.71 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-11), 6.63 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-9), 3.90 (3H, s, H-4OCH₃), 2.72 (1H, s, 8-CH₃);¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 99.3 (C-1), 164.6 (C-2), 98.4 (C-3), 166.2 (C-4), 101.6 (C-5), 137.9 (C-6), 117.1 (C-7), 138.6 (C-8), 103.1 (C-9), 152.1 (C-10), 108.6 (C-11), 158.1 (C-12), 164.1 (C-13)。以上数据与文献 [14] 基本一致, 故鉴定为 alternariol-4-methyl ether。

4 讨论

内生菌在植物中广泛分布, 生物多样性丰富, 参与植物生长过程中的重要环节^[15], 并且参与植物次生代谢成分的转合, 是天然产物的重要来源, 其中大部分为新型生物活性物质, 具有广阔的应用前景^[16]。近年研究发现, 内生菌除产生抗癌物质外, 还可产生具有其他药用价值的活性物质, 如抗生素、植物生长激素等^[17]。现已有学者在药用植物内生菌中成功提取分离得到生物碱类、芳香族、萜类及挥发油类、黄酮类及其苷类、酚类和内酯类^[18-19]。本研究从新疆阿魏内生真菌 *Alternaria* sp. TA26-16 中分离得到 10 个化合物, 所有化合物均为首次分离得到, 以期为今后药用植物内生真菌的研究提供实验基础和科学依据。

参考文献:

[1] 郭顺星. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 1-13.
[2] 邢晓科. 药用植物内生真菌资源——一个亟待开发的宝库[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 14-21.
[3] 孙 丽, 石书兵, 朱 军, 等. 阿魏的传统应用及现代研究概况[J]. 中国现代中药, 2013, 15(7): 620-626.
[4] 谢彩香, 石明辉, 郭宝林, 等. 濒危野生新疆阿魏低空遥

感资源调查[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(11): 2480-2486.
[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 190.
[6] 杨 爽, 马青云, 黄圣卓, 等. 橡胶灵芝化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 1034-1039.
[7] 李 洁, 陈全成, 林 挺, 等. 刺苋的化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(3): 272-276.
[8] 陈 玲, 张海艳, 李坤威, 等. 苦皮藤根皮化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 23-25.
[9] 杨小龙. 六种高等真菌和两种药用植物的化学成分研究[D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2009.
[10] 黄永林, 韦用琼, 何瑞杰, 等. 蛭螭化学成分的研究[J]. 中成药, 2018, 40(11): 2471-2474.
[11] 郭 华, 刁全平, 张 博, 等. 杨树口蘑化学成分的研究[J]. 中成药, 2018, 40(7): 1535-1538.
[12] Zeng L, Jin H, Lu D, et al. Isolation and identification of chemical constituents from the bacterium bacillus sp. and their nematocidal activities[J]. *J Basic Microbiol*, 2015, 55(10): 1239-1244.
[13] 孙建慧, 杨中铎, 东建丽, 等. 五株植物内生真菌分子生物学鉴定及代谢产物化学成分初探[J]. 中国药物化学杂志, 2017, 27(4): 305-311.
[14] Tan N, Tao Y, Pan J, et al. Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus No. 2240[J]. *Chem Nat Compd*, 2008, 44(3): 296-300.
[15] 郝晓娟. 植物内生菌[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.
[16] 徐亚军. 植物内生菌资源多样性研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(24): 149-152.
[17] 陈道金, 刘慧敏, 杨 静, 等. 植物内生菌活性成分研究进展[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1730-1732.
[18] 郑江松, 李继扬. 植物内生菌在药物研究中的应用[J]. 复旦学报(医学版), 2013, 40(5): 610-618.
[19] 张冠庆, 魏文静, 白 雪, 等. 植物内生菌药用研究进展[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2013, 22(2): 60-62.