

云南红豆杉内生真菌 *Talaromyces* sp. T1BF 的化学成分研究

李良群^{1,2}, 杨艳光³, 曾英¹, 邹澄², 赵沛基^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所植物化学和西部资源可持续利用国家重点实验室, 昆明 650204; 2. 昆明医学院药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500; 3. 贵阳医学院, 贵阳 550004)

摘要: 采用色谱技术从云南红豆杉内生真菌 *Talaromyces* sp. T1BF 的 PDA 平板发酵物中分离得到 4 个化合物。经波谱数据分析及与文献对照, 分别鉴定为 5 α , 6 α -环氧-24(R)-甲基胆甾-7, 22-二烯-3 β -醇(1)、甾萜素(2)、苔色酸(3)和间甲基苯酚(4)。化合物 1 为首次从该属真菌中分离获得。

关键词: 云南红豆杉; 内生真菌; 平板发酵

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)05-0699-03

Chemical constituents of endophyte *Talaromyces* sp. T1BF from *Taxus yunnanensis*

LI Liang-Qun^{1,2}, YANG Yan-Guang³, ZENG Ying¹,
ZOU Cheng², ZHAO Pei-Ji^{1*}

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 3. Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract: Four compounds were isolated from PDA plate cultures of *Talaromyces* sp. T1BF, an endophyte from *Taxus yunnanensis* by chromatography techniques. They were identified as 5 α , 6 α -epoxy-24(R)-methylcholesta-7, 22-dien-3 β -ol(1), skyrin(2), orsellinic acid(3) and m-cresol(4) on the basis of spectroscopic data analyses and comparison with literature values. Compound 1 was obtained from the genus of *Talaromyces* for the first time.

Key words: *Taxus yunnanensis*; endophyte; solid cultures

云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)又名紫杉、赤柏松, 属红豆杉科乔木, 产于云南西北部及西部、四川西南部与西藏东部, 生长于海拔 2 000~3 500 m 高山地带, 在不丹、缅甸北部也有分布(中国科学院中国植物会编辑委员会, 2004), 由于其具有独特抗肿瘤活性化合物紫杉醇, 一直处于研究的热点(李丽琴等, 2008; 余龙江等, 2002)。

近年来, 传统药用植物以及特殊生境中植物的

内生真菌研究是一个新兴的研究热点(Tan & Zou, 2001)。内生真菌长期与药用植物共同相互共生, 有可能产生与宿主相同或相似生理活性的化学成分(Gunatilaka, 2006)。云南红豆杉是含有抗癌药物紫杉醇的濒临灭绝的珍稀药用植物。在进一步寻找新型的天然产物及活性物质的过程中, 我们从具较好活性的植物中分离纯化内生微生物, 并分离鉴定这些内生微生物的化学成分(袁琳等, 2009; Zhao

收稿日期: 2010-12-24 修回日期: 2011-04-29

基金项目: 云南省应用基础研究计划面上项目(2007C096M); 云南省后备人才培养项目(2009CI071)[Supported by the Natural Science Foundation of Yunnan Province(2007C096M); Grants from the Young Academic and Technical Leader Raising Foundation of Yunnan Province(2009CI071)]

作者简介: 李良群(1985-), 男, 江西余干人, 硕士研究生, 药物化学专业, (E-mail)Liliangqun@mail.kib.ac.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zhaopeiji@mail.kib.ac.cn)

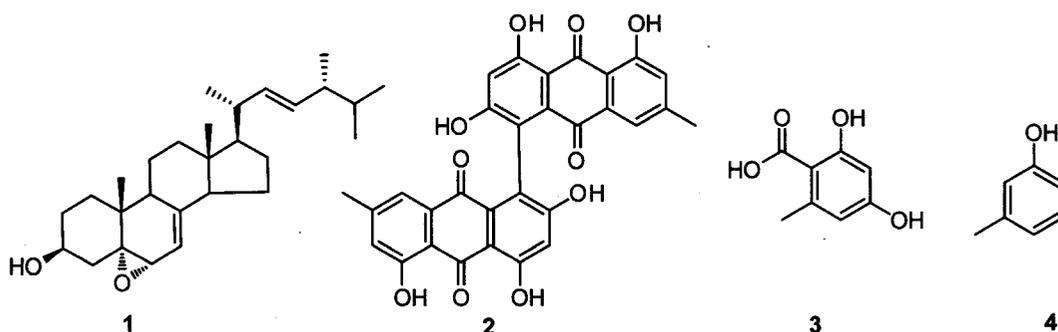


图1 化合物1~4的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-4

等,2005)。本文首次报道云南红豆杉内生真菌 *Talaromyces* sp. T1BF 的化学成分。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

DRX-500 型核磁共振仪; Finnigan LCQ-Advantage 型质谱仪; 薄层层析用硅胶 G 板和柱层析硅胶 200-300 目(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(Amersham 生科公司)。

1.2 菌种来源和发酵

内生真菌 T1BF 分离自云南红豆杉树皮的韧皮部。云南红豆杉韧皮采自中国科学院昆明植物所的植物园。经云南农业大学植保系刘云龙教授鉴定为 *Talaromyces* 属, 菌种保存于本实验组 -78 °C 冰箱。

将 T1BF 在 PDA(马铃薯 200 g, 去皮煮沸 0.5 h 取滤液; 葡萄糖 20 g; 琼脂粉 15 g; 自来水 1 000 mL, pH 自然)平板上活化培养 3~5 代后, 用竹签挑取小块带菌培养基接至新鲜 PDA 固体培养基上, 共发酵培养 10 L, 28 °C, 黑暗条件下培养 14 d。

2 提取与分离

将发酵物连同琼脂块划成小块, 用混合提取溶剂(乙酸乙酯/甲醇/冰醋酸 80 : 15 : 5, v/v/v)浸泡提取三次得到浸膏。将粗浸膏水溶, 用乙酸乙酯萃取, 乙酸乙酯萃取液减压浓缩后得到灰黄色浸膏 39 g。将此浸膏经 200~300 目的硅胶柱层析, 以石油醚/丙酮(10 : 1~7 : 3)和氯仿/甲醇(100 : 5~8 : 2)梯度洗脱, 得到 A(136 mg), B(215 mg), C(190 mg)三部分洗脱物。洗脱物 A 通过硅胶柱色谱(石

油醚/丙酮 100 : 3, 100 : 5, 100 : 9), 再经 Sephadex LH-20(丙酮洗脱)分离, 得到化合物 4(3 mg)。洗脱物 B(215 mg), 经 Sephadex LH-20(甲醇洗脱), 再经硅胶柱色谱(石油醚/乙酸乙酯=8 : 1)洗脱, 得到化合物 2(22 mg)。洗脱物 C 经反复硅胶柱层析及 Sephadex LH-20 分离, 得到化合物 1(5 mg)和化合物 3(2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 纯白色晶体, 分子式 $C_{28}H_{44}O_2$, EI-MS(70 eV) m/z (%): 412 (M^+ , 80), 394 ($M-H_2O$, 50), 379 (100)。 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ 4.36(1H, m, H-3), 3.95(1H, brs, H-6), 5.68(1H, brs, H-7), 1.00(3H, s, H-18), 1.42(3H, s, H-19), 1.28(3H, d, $J=6.5$, H-21), 5.63(1H, m, H-22), 5.54(1H, m, H-23), 1.30(3H, d, $J=6.8$, H-26), 1.22(3H, d, $J=5.9$, H-27), 1.43(3H, d, $J=1.3$, H-28); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125MHz): δ 32.6(t, C-1), 30.3(t, C-2), 67.6(d, C-3), 40.8(t, C-4), 76.3(s, C-5), 73.5(d, C-6), 117.9(d, C-7), 143.5(s, C-8), 43.5(d, C-9), 55.1(d, C-10), 22.3(t, C-11), 33.1(t, C-12), 44.1(q, C-13), 55.1(d, C-14), 23.3(t, C-15), 28.5(t, C-16), 56.4(d, C-17), 12.5(q, C-18), 18.8(q, C-19), 40.8(d, C-20), 21.4(q, C-21), 135.5(d, C-22), 132.4(d, C-23), 43.2(d, C-24), 33.1(d, C-25), 20.2(q, C-26), 19.8(q, C-27), 17.8(q, C-28)。上述数据与 Bok 等(1999)的报道一致, 故鉴定该化合物为 $5\alpha, 6\alpha$ -环氧-24(R)-甲基胆甾-7, 22-二烯-3 β -醇($5\alpha, 6\alpha$ -epoxy-24(R)-methylcholesta-7, 22-dien-3 β -ol)。

化合物 2 红色固体, 分子式 $C_{30}H_{18}O_{10}$, ESI-MS m/z : 537 [M-H]⁻. ¹H-NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 6.71(s, 1H, H-3), 7.24(s, 1H, H-6), 2.28(s, 3H, 7-CH₃), 6.71(s, 1H, H-3), 7.09(s, 1H, H-8); ¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 123.6(s, C-1), 164.4(s, C-2), 107.2(d, C-3), 164.4(s, C-4), 109.0(s, C-4a), 161.1(s, C-5), 123.6(d, C-6), 148.3(s, C-7), 21.5(s, 7-CH₃), 120.5(d, C-8), 133.2(s, C-8a), 182.1(s, C-9), 113.1(s, C-9a), 189.7(s, C-10), 131.2(s, C-10a)。上述数据与夏雪奎等(2009)的报道一致, 故鉴定该化合物为醌茜素(skyrin)。

化合物 3 白色固体, 分子式 $C_8H_8O_4$, ESI-MS m/z : 167 [M-H]⁻; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 6.18(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-5), 6.13(1H, d, $J=1.9$ Hz, H-3), 2.65(3H, s, 6-CH₃); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 105.6(s, C-1), 163.7(s, C-2), 101.6(d, C-3), 167.0(s, C-4), 112.2(d, C-5), 145.3(s, C-6), 175.2(s, C-7), 24.4(q, 6-CH₃)。上述数据与王立东等(2009)报道的台色酸的核磁数据一致, 故鉴定该化合物为台色酸(orsellinic acid)。

化合物 4 淡黄色油状物, 分子式 C_7H_8O , 其¹³C-NMR 数据与 Robert 等(1977)的报道一致, 故鉴定为间甲基苯酚(m-cresol)。

4 讨论

自 Stierle 等(1993)从短叶红豆杉(*Taxomyces andreanae*)的韧皮部分离到 1 株产抗癌药物紫杉醇内生真菌以来, 人们对红豆杉内生真菌的化学成分进行了广泛的研究并取得了一系列的成果, 国内也有一些较好的有关这方面的综述(何颖等, 2006; 赵凯等, 2008)。Bok 等(1999)在活性跟踪下从 *Cordyceps sinensis* 分离得到的 5 α , 6 α -环氧-24(R)-甲基胆甾-7, 22-二烯-3 β -醇具有较好的抗肿瘤活性。我们从红豆杉内生真菌中分离到与宿主植物不同的类型的抗肿瘤成分, 说明内生真菌可以产生与宿主不同的活性成分。

参考文献:

中国科学院中国植物志编辑委员会. 2004. 中国植物志(第 7 卷)[M]. 北京: 科学出版社: 441-442
Bok JW, Lerner L, Chilton J. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*[J]. *Phytochemistry*, **51**: 891-898

Chen SJ(陈淑娟), Liu JJ(刘佳佳), Gong HX(龚汉祥), et al. 2009. Identification and antibacterial activity of secondary metabolites from *Taxus endophytic* fungus(红豆杉内生真菌次生代谢物的分离鉴定及其抗菌活性分析)[J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), **25**(3): 368-374
Gunatilaka AAL. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence[J]. *J Nat Prod*, **69**: 509-526
He Y(何颖), Tan F(谈锋), Xie JP(谢建平). 2006. Studies on endophytic fungus from *Taxus* synthesizing *Taxol*(红豆杉内生真菌产紫杉醇研究进展)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), **18**: 519-523
Li LQ(李丽琴), Fu CH(付春华), Wang S(王圣), et al. 2008. Tetraploid induction of *in vitro* *Taxus chinensis* cell(红豆杉离体细胞四倍体的诱导)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(1): 121-125
Robert AA, Douglas WJ, Edward WH. 1977. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances. 47. Cannabinoid compounds[J]. *J Org Chem*, **42**(3): 490-495
Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, **260**(4): 214
Tan RX, Zou WX. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. *Nat Prod Rep*, **18**: 448-459
Wang LD(王立东), Wu SH(吴少华), Chen YW(陈有为), et al. 2009. Studies on the secondary metabolites of endophytic fungus *Epicoccum* sp. isolated from *Azadirachta indica*(一株印楝植物内生真菌 *Epicoccum* sp. 次生代谢产物的研究)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), **21**(6): 916-918
Xia XK(夏雪奎), Li Q(李庆), Shao CL(邵长伦), et al. 2009. Secondary metabolites of mangrove endophytic fungus (ZZF13) from South China Sea(南海红树林内生真菌 ZZF13 次级代谢产物的研究)[J]. *J Sun Yat-sen Univ*(中山大学学报), **48**(4): 133-136
Yu LJ(余龙江), Cai YJ(蔡永君), Lan WZ(兰文智). 2002. Research on the stability of taxol yield of *Taxus chinensis* suspension cultures(红豆杉细胞培养生产紫杉醇产量稳定性的探讨)[J]. *Guihaia*(广西植物), **22**(1): 85-88
Yuan L(袁琳), Ma J(马娟), Zhao PJ(赵沛基), et al. 2009. Chemical constituents from endophytic *Phomopsis* sp. Lz42 of *Maytenus hookeri*(云南美登木内生真菌 *Phomopsis* sp. Lz42 的化学成分)[J]. *Chem J Chin Univ*(高等学校化学学报), **30**: 78-81
Zhao K(赵凯), Ping WX(平文祥), Zhou DP(周东坡). 2008. Recent advance and prospect on taxol production by endophytic fungus fermentation(内生真菌发酵生产紫杉醇的研究现状与展望)[J]. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), **48**(3): 403-407
Zhao PJ, Fan LM, Li GH, et al. 2005. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. ls9131[J]. *Arch Pharm Res*, **28**: 1 228-1 232