

黑果小檗内生真菌假丝酵母菌次生代谢产物研究

郭铭焯^{1,2}, 麻淑芳¹, 王世苗¹, 冯亚萍¹, 欧阳 艳¹, 庞克坚¹, 焦子伟¹,
木古丽·木哈西^{1*}, 杨新洲^{1,2*}

(1. 伊犁师范大学, 新疆 伊宁 835000; 2. 中南民族大学药学院, 湖北 武汉 430074)

摘要: **目的** 研究黑果小檗内生真菌假丝酵母菌 *Candida* sp. 的次生代谢产物。**方法** 假丝酵母菌发酵提取物次级代谢产物的乙酸乙酯部位、石油醚部位采用硅胶、Sephadex LH-20、制备液相色谱进行分离纯化, 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 18 个化合物, 分别鉴定为 1-苯基-1, 2-乙二醇 (**1**)、4-羟基苯乙醇 (**2**)、4-羟基苯甲酸 (**3**)、对羟基苯乙酸 (**4**)、间羟基苯乙酸 (**5**)、3-甲基亚砷基丙酸 (**6**)、苯乙酸 (**7**)、(S) -N-nitroso -1-amino-*p*-hydroxy phenylethanol (**8**)、2-苯乙酰胺 (**9**)、对羟基苯甲醛 (**10**)、2- (4-羟苯基) -乙酸乙酯 (**11**)、邻苯二甲酸二丁酯 (**12**)、5, 5'-dimethoxybiphenyl-2, 2'-diol (**13**)、3-吡啶甲醛 (**14**)、N-乙酰-L-苯丙氨酸 (**15**)、9-hydroxy-10*E*, 12*Z*-octadecadienoic acid (**16**)、9-hydroxy-10*E*, 12*E*-octadecadienoic acid (**17**)、(6*E*) -5-methylene-6-tetradecenoic acid (**18**)。**结论** 化合物 **1**、**3**~**8**、**10**~**18** 为首次从假丝酵母菌真菌中分离得到。

关键词: 黑果小檗; 假丝酵母菌; 内生真菌; 次生代谢产物; 分离鉴定

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2024)09-3000-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.025

Secondary metabolites from endophytic fungi *Candida* sp. of *Berberis atrocarpa*

GUO Ming-zhuo^{1,2}, MA Shu-fang¹, WANG Shi-miao¹, FENG Ya-ping¹, OUYANG Yan¹,
PANG Ke-jian¹, JIAO Zi-wei¹, MUHAXI Mu-gu-li^{1*}, YANG Xin-zhou^{1,2*}

(1. Yili Normal University, Yining, Yining 835000, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the secondary metabolites from the endophytic fungi *Candida* sp. of *Berberis atrocarpa* Schneid. **METHODS** The ethyl acetate fraction and petroleum ether fraction from the secondary metabolites of *Candida* sp. fermentation extract were separated and purified by silica gel, Sephadex LH-20 and preparative liquid chromatography, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. **RESULTS** Eighteen compounds were isolated and identified as 1-phenyl-1, 2-ethanediol (**1**), 4-hydroxyphenethyl alcohol (**2**), 4-hydroxybenzoic acid (**3**), 4-hydroxyphenylacetic acid (**4**), 3-hydroxyphenylacetic acid (**5**), 3-methylsulfinyl propionic acid (**6**), phenylacetic acid (**7**), (S) -N-nitroso-1-amino-*p*-hydroxy phenylethanol (**8**), 2-phenylacetamide (**9**), *p*-hydroxybenzaldehyde (**10**), ethyl 2- (4-hydroxyphenyl) acetate (**11**), dibutyl phthalate (**12**), 5, 5'-dimethoxybiphenyl-2, 2'-diol (**13**), 3-indolealdehyde (**14**), N-acetyl-L-phenylalanine (**15**), 9-hydroxy-10*E*, 12*Z*-octadecadienoic acid (**16**), 9-hydroxy-10*E*, 12*E*-octadecadienoic acid (**17**), (6*E*) -5-methylene-6-tetradecenoic acid (**18**). **CONCLUSION** Compounds **1**, **3**~**8** and **10**~**18** are isolated from *Candida* sp for the first time.

KEY WORDS: *Berberis atrocarpa* Schneid.; *Candida* sp.; endophytic fungi; secondary metabolites; isolation and identification

收稿日期: 2024-02-21

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划 (XJEDU20181018)

作者简介: 郭铭焯 (1997—), 男, 硕士生, 从事天然药物化学研究。Tel: 15222321804, E-mail: 1036833039@qq.com

* 通信作者: 杨新洲 (1976—), 男, 教授, 硕士生导师, 从事天然药物化学研究。Tel: 18040528328, E-mail: xzyang@mail.

scuec.edu.cn

药用植物黑果小檗 *Berberis atrocarpa* Schneid. 为小檗科小檗属植物。小檗属植物全球约五百种^[1], 分布于我国新疆阿尔泰山、天山、巴鲁克山以及蒙古、哈萨克斯坦等地区^[2]。内生真菌寄生于植物组织内, 与宿主共同成长, 会产生结构多样和生物活性良好的次生代谢产物。因此, 筛选药用植物内生真菌, 使其成为具有药用价值的菌种资源, 已成为药用领域的研究热点^[3-5]。

目前, 从植物内生真菌的发酵物中已成功分离出多种次级代谢产物, 其结构类型丰富, 涵盖了聚酮、萜类、肽类和生物碱等关键成分。这些化合物具有较好的抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等生物活性, 展现出较强的药用潜力^[6]。虽然药用植物次级代谢产物具有广泛的应用前景, 但其天然产量十分有限, 无法满足当前医药领域日益增长的需求。为了克服这一挑战, 有必要深入挖掘药用植物内生真菌的化学结构, 进一步探究这些真菌与其宿主植物之间的化学成分关联^[7-8]。本研究对黑果小檗内生真菌假丝酵母菌 *Candida* sp. 的次生代谢产物进行分离鉴定, 以期丰富其化学成分提供参考依据。

1 材料

BrukerAvance III 600 MHz 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Finnigan MAT-95 质谱仪 (德国 Finnigan 公司); Waters 2535 半制备高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); UH5300 分光光度计 (英国应用光物理公司); 进口旋转蒸发仪 (东京理化器械株式会社); 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海申安医疗器械厂); 超净工作台 (济南鑫贝西生物技术有限公司); 摇床 (上海一恒科学仪器有限公司); 冰箱 (海信冰箱有限公司); 电子分析天平 (万分之一, 德国赛多利斯公司)。Silgreen C₁₈ 色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm, 北京绿白草科技发展有限公司); COSMOSIL 5PFP 色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm, 日本 Nacalai Tesque 公司); COSMOSIL Cholester 色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm, 日本 COSMOSIL 公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 板、柱色谱硅胶 (烟台江友硅胶开发有限公司); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (美国 Amersham 公司); 葡萄糖 (成都市科隆化学品有限公司); 蛋白胨 (北京奥博星生物技术有限公司)。石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、正丁醇均为分析纯, 甲醇、乙腈均为色谱纯, 购自美国 TEDIA 公司。

黑果小檗原植物采自新疆伊犁巩留县喀拉布拉

镇 X737, 由伊犁师范大学刘伟副教授鉴定为小檗科小檗属植物黑果小檗 *Berberis atrocarpa* Schneid.。

2 方法

2.1 真菌分离纯化 将平面培养基植物组织边缘长出的菌落, 根据菌落颜色、菌落形态、基质形态及生长速度的不同, 用接种环分别在不同菌丝顶端挑取少量菌丝接种到新的新鲜培养基中, 相同条件培养。为获得单一菌落, 进行多次纯化操作。根据显微镜中菌丝状态和 PDA 培养基中菌落外部形态, 确定单一菌落。

2.2 菌种鉴定 将得到的单个菌株接种到无污染的 PDA 培养基中, 28 ℃ 恒温培养 7 d 左右, 每天观察并记录菌落形态特征, 分离出内生真菌基质及菌落, 菌落气生菌丝为白色, 表面、质地和边缘均为绒状, 见图 1。从活化的菌种中提取特异性 DNA, 纯化后测序, 将测序得到的菌株 ITS 序列在 NCBI 数据库中进行对比分析, 在 GenBank 数据库中进行检索, 同源性最高的物种为样品的种属。

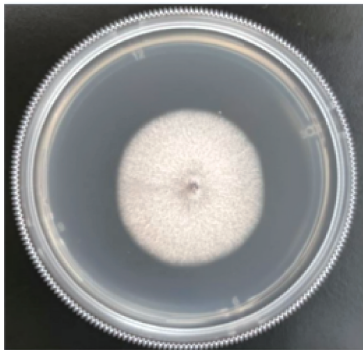


图 1 假丝酵母菌形态
Fig. 1 Morphology of *Candida* sp.

ITS 测序结果:

GTAACAAGGTCTCCGTTGCTGAACCAGCGGAG
GGATCATTAACGAGTTTCGTACTCCAAACCCTATGT
GAACATACCTGTTTTCGTTGCTTCGGCAGGTGAAGG
CGGAGGGCCTCCGGGCCCCGAAGCCGCCGCCGGGTG
CCCCGCGAGGGGCCGCCGGGTGGGCCTGCCGGAGG
GCACAGACTCTGTATTACAAACGTACCTCTCTGAGT
TTATTTTACAAACAAGTAAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCGCCGCCAGT
ATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAGGCCCTGGTTGCCTGGTGTGGGGCGCCGC
GCACCTCTGCGGGCGCGGGCCCCGAAAGTCAGTG
GCGGGCTCGCCAGGACTCCGAGCGCAGTAATTTTCT

CTCGCTGTGGAGCGCCTGGTGGGTTACCAGCCGTAA
AACACCCCAAATTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGG
TAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC。

分子鉴定结果：此菌株与假丝酵母菌序列相似
度达到 99%，菌落形态为绒状、白色、平展，基
质形态为白色、菌落有绒纹，与假丝酵母菌菌落形
态特征相似。综合菌落形态学特征与分子鉴定结
果，此菌株被鉴定为假丝酵母菌。

2.3 提取与分离 在无菌环境下，向灭菌的 500
mL 锥形瓶中加入 250 mL PDB 培养基，用接种环
挑取少量菌丝接种至含有 PDB 培养基的锥形瓶中
(重复 4 次)，放置在 180 r/min 的摇床上 28 ℃ 培
养 3~7 d，获得待测菌株种子液。无菌条件下，用
胶头滴管转移约 8 mL 种子液至大米培养基，用无
菌透气膜封口，室温通风环境中培养 30 d，待有菌
落长出，每天观察并记录菌落生长情况。待发酵完
成后，用 95% 乙醇提取，提取液合并，减压浓缩
至无乙醇气味，得浸膏 230.42 g。水浴锅加热，使
浸膏分散均匀，再依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁
醇进行萃取，得到黑果小檗石油醚部位 100 g、乙
酸乙酯部位 20 g、正丁醇部位 10 g。乙酸乙酯部位
(20 g) 经硅胶柱 (300~400 目) 分离，以二氯甲
烷-甲醇 (100 : 1~0 : 1) 梯度洗脱，经 TLC 检识
后得到 Fr. A1~Fr. A5。石油醚部位 (100 g) 经硅
胶柱 (300~400 目) 分离，以石油醚-乙酸乙酯
(200 : 1~0 : 1) 梯度洗脱，经 TLC 检识后得到
Fr. B1~Fr. B6。

乙酸乙酯部位：Fr. A2 经 C₁₈ 色谱柱分离，以
水-乙腈 (70 : 30~20 : 80) 梯度洗脱，得到 2 个
组分 (Fr. A2.1~Fr. A2.2)，Fr. A2.2、Fr. A2.1 经
半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈 (90 : 10~30 : 70)
梯度洗脱，得到化合物 **1** (*t_R*=23 min, 2.4 mg)、**2**
(*t_R*=19 min, 4.6 mg)。Fr. A3 经 C₁₈ 色谱柱分离，
以水-乙腈 (75 : 25~30 : 70) 梯度洗脱，得到 4
个组分 (Fr. A3.1~Fr. A3.4)，Fr. A3.2、Fr. A3.4
经半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈 (85 : 15~
30 : 70) 梯度洗脱，得到化合物 **3** (*t_R*=15 min,
11.9 mg)、**4** (*t_R*=12 min, 22.9 mg)、**5** (*t_R*=13
min, 8.8 mg)。Fr. A5 经 C₁₈ 色谱柱分离，以水-乙
腈 (60 : 40~30 : 70) 梯度洗脱，得到 7 个组分
(Fr. A5.1~Fr. A5.7)，Fr. A5.2、Fr. A5.7、Fr. A5.4
经半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈 (90 : 10~
40 : 60) 梯度洗脱，得化合物 **6** (*t_R*=16 min, 5.0
mg)、**7** (*t_R*=17 min, 20.7 mg)、**8** (*t_R*=16 min,

2.3 mg)。Fr. A1 经凝胶柱分离，以甲醇洗脱，得
到 7 个组分 (Fr. A1.1~Fr. A1.7)，Fr. A1.2 经 C₁₈
色谱柱分离，以水-乙腈 (60 : 40~25 : 75) 梯度
洗脱，得 6 个组分 (Fr. A1.2.1~Fr. A1.2.6)，
Fr. A1.2.2 经半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈
(90 : 10~30 : 70) 梯度洗脱，得化合物 **9** (*t_R*=16
min, 4.5 mg)。Fr. A1.2.3 经 C₁₈ 色谱柱分离，以
水-乙腈 (60 : 40~23 : 77) 梯度洗脱，得到 3 个组
分 (Fr. A1.2.3.1~Fr. A1.2.3.3)，Fr. A1.2.3.1、
Fr. A1.2.3.3 经半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈
(90 : 10~20 : 80) 梯度洗脱，得到化合物 **10**
(*t_R*=20 min, 15.4 mg)、**11** (*t_R*=19 min, 10.2
mg)。Fr. A1.6 经半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈
(90 : 10~15 : 85) 梯度洗脱，得化合物 **12** (*t_R*=
21 min, 6.5 mg)。Fr. A1.4 经 C₁₈ 色谱柱分离，以
水-乙腈 (25 : 75~50 : 50) 梯度洗脱，得 3 个组
分 (Fr. A1.4.1~Fr. A1.4.3)，Fr. A1.4.2、
Fr. A1.4.3 经半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈
(85 : 15~15 : 85) 洗脱，得到化合物 **13** (*t_R*=21
min, 7.0 mg)、**14** (*t_R*=22 min, 2.2 mg)。Fr. A4
经凝胶柱分离，以甲醇洗脱，得到 3 个组分
(Fr. A4.1~Fr. A4.3)，Fr. A4.2 经 C₁₈ 色谱柱分离，
以水-乙腈 (65 : 35~25 : 75) 梯度洗脱，得到 6
个组分 (Fr. A4.2.1~Fr. A4.2.6)，Fr. A4.2.3 经
半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈 (70 : 30~20 : 80)
梯度洗脱，得到化合物 **15** (*t_R*=22 min, 6.9 mg)。

石油醚部位：Fr. B6 经 C₁₈ 色谱柱分离，以水-
乙腈 (80 : 20~20 : 80) 梯度洗脱，得到 4 个组分
(Fr. B6.1~Fr. B6.4)，Fr. B6.1、Fr. B6.2、
Fr. B6.3 经半制备 HPLC 纯化，以水-乙腈
(60 : 40~5 : 95) 梯度洗脱，得到化合物 **16** (*t_R*=
25 min, 8.9 mg)、**17** (*t_R*=26 min, 11.9 mg)、**18**
(*t_R*=22 min, 3.7 mg)。半制备 HPLC 条件均为体
积流量 4 mL/min，检测波长 254 nm。

3 结构鉴定

化合物 **1**：无色粉末，EI-MS *m/z*: 138.369 9
[*M*]⁺。¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ: 7.23 (1H, t,
J=7.2 Hz, H-2), 7.30 (2H, t, *J*=7.6 Hz, H-3~4),
7.35 (2H, t, *J*=7.3 Hz, H-5~6), 4.65 (1H, dd,
J=7.1, 4.9 Hz, H-1'), 3.29 (2H, m, H-2'); ¹³C-
NMR (150 MHz, MeOD) δ: 143.3 (C-1), 129.2 (C-
3, 5), 128.5 (C-4), 127.4 (C-2, 6), 75.9 (C-1'),
68.7 (C-2')。以上数据与文献 [9] 报道基本一致，
故鉴定为 1-苯基-1, 2-乙二醇。

化合物 **2**: 无色粉末, ESI-MS m/z : 139.274 5 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.00 (2H, d, $J=8.3$ Hz, H-2, 6), 6.67 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, 5), 3.65 (2H, t, H-8), 2.69 (2H, t, H-7); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 156.7 (C-4), 130.9 (C-1), 130.8 (C-2, 6), 116.1 (C-3, 5), 64.6 (C-8), 39.4 (C-7)。以上数据与文献 [10] 报道基本一致, 故鉴定为 4-羟基苯乙醇。

化合物 **3**: 无色粉末, ESI-MS m/z : 137.630 2 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 9.17 (1H, s, -OH), 7.82 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, 6), 6.98 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, 5); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 170.1 (-COOH), 163.3 (C-4), 132.9 (C-2), 131.3 (C-6), 122.8 (C-1), 116.1 (C-3), 116.0 (C-5)。以上数据与文献 [11] 报道基本一致, 故鉴定为 4-羟基苯甲酸。

化合物 **4**: 无色针晶, ESI-MS m/z : 175.632 1 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.09 (2H, d, $J=8.3$ Hz, H-2', 6'), 6.73 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3', 5'), 3.48 (2H, s, H-2); ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOD) δ : 176.2 (C-1), 157.3 (C-4'), 131.3 (C-2', 6'), 126.7 (C-1'), 116.1 (C-3', 5'), 41.0 (C-2)。以上数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定为对羟基苯乙酸。

化合物 **5**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 175.645 7 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.08 (2H, m, H-2, 5), 6.76 (2H, dd, $J=11.1, 4.4$ Hz, H-4, 6), 3.48 (2H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOD) δ : 176.3 (C-8), 156.7 (C-3), 132.0 (C-5), 129.2 (C-6), 122.8 (C-1), 120.4 (C-2), 115.8 (C-4), 36.6 (C-7)。以上数据与文献 [13] 报道基本一致, 故鉴定为间羟基苯乙酸。

化合物 **6**: 无色油状物, EI-MS m/z : 136.312 4 $[M]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 3.15 (1H, dt, $J=13.5, 7.7$ Hz, H-3), 2.96 (1H, dt, $J=13.4, 6.7$ Hz, H-3), 2.77 (2H, dd, $J=16.4, 9.0$ Hz, H-2), 2.66 (3H, s, H-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 174.4 (C-1), 49.6 (C-3), 38.2 (C-5), 27.5 (C-2)。以上数据与文献 [14] 报道基本一致, 故鉴定为 3-甲基亚砷基丙酸。

化合物 **7**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 136.210 7 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.21 (5H, m, H-1~5), 4.33 (1H, dd, $J=7.4, 3.9$ Hz, H-6), 3.10 (1H, dd, $J=13.8, 3.7$ Hz, H-7),

2.89 (1H, m, H-8); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 177.3 (-COOH), 138.9 (C-1), 130.5 (C-2), 129.2 (C-3), 127.4 (C-4), 72.8 (C-5), 41.6 (C-6)。以上数据与文献 [15] 报道基本一致, 故鉴定为苯乙酸。

化合物 **8**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 181.068 4 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.08 (2H, d, $J=8.3$ Hz, H-2', 6'), 6.69 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-3', 5'), 4.25 (1H, s, H-1), 2.87 (2H, m, H-2); ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOD) δ : 157.0 (C-4'), 131.5 (C-2'), 131.2 (C-6'), 129.7 (C-1'), 116.1 (C-3'), 115.9 (C-5'), 73.2 (C-1), 40.8 (C-2)。以上数据与文献 [16] 报道基本一致, 故鉴定为 (*S*)-*N*-nitroso-1-amino-*p*-hydroxy phenylethanol。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 158.256 7 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.30 (5H, m, H-2~6), 3.51 (1H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOD) δ : 177.0 (C-8), 136.9 (C-1), 130.1 (C-2, 6), 129.5 (C-3, 5), 127.9 (C-4), 43.4 (C-7)。以上数据与文献 [17] 报道基本一致, 故鉴定为 2-苯乙酰胺。

化合物 **10**: 无色针状结晶, EI-MS m/z : 122.342 0 $[M]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 9.76 (1H, s, -COH), 7.77 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2, 6), 6.91 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3, 5); ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOD) δ : 192.8 (-COH), 165.1 (C-4), 133.4 (C-2, 6), 130.2 (C-1), 116.8 (C-3, 5)。以上数据与文献 [18] 报道基本一致, 故鉴定为对羟基苯甲醛。

化合物 **11**: 无色油状物, EI-MS m/z : 180.473 6 $[M]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.04 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-8), 6.71 (2H, dd, $J=8.5$ Hz, H-7), 4.19 (2H, t, $J=7.1$ Hz, H-1), 2.81 (2H, t, $J=7.1$ Hz, H-2), 2.00 (3H, s, -CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOD) δ : 172.9 (-COO), 157.0 (C-6), 130.8 (C-4, 8), 129.9 (C-3), 116.2 (C-5, 7), 66.6 (C-1), 35.1 (C-2), 20.8 (-CH₃)。以上数据与文献 [19] 报道基本一致, 故鉴定为 2-(4-羟基苯基)-乙酸乙酯。

化合物 **12**: 黄色油状物, EI-MS m/z : 278.372 1 $[M]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.72 (2H, $J=5.7, 3.3$ Hz, dd, H-2, 5), 7.62 (2H, dd, $J=5.7, 3.3$ Hz, H-3~4), 4.29 (4H, t, $J=6.6$ Hz,

H-1', 1''), 1.72 (4H, m, H-2', 2''), 1.46 (4H, dd, $J=15.1, 7.5$ Hz, H-3', 3''), 0.98 (6H, t, $J=7.4$ Hz, H-4', 4''); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ : 169.3 (C-7, 8), 133.5 (C-3, 4), 132.3 (C-2, 5), 129.8 (C-1, 6), 66.6 (C-1', 1''), 31.7 (C-2', 2''), 20.7 (C-3', 3''), 14.0 (C-4', 4'')。以上数据与文献 [20] 报道基本一致, 故鉴定为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 **13**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 269.384 4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) δ : 7.06 (2H, m, H-6, 6'), 6.81 (2H, d, $J=8.2$ Hz, H-4, 4'), 6.32 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-3, 3'), 3.89 (6H, s, 5, 5' -OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ : 150.3 (C-2, 2'), 149.3 (C-5, 5'), 127.8 (C-1, 1'), 123.9 (C-4, 4'), 116.4 (C-3, 3'), 111.6 (C-6, 6'), 56.4 (5, 5' -OCH₃)。以上数据与文献 [21] 报道基本一致, 故鉴定为 5, 5'-dimethoxybiphenyl-2, 2'-diol。

化合物 **14**: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 144.653 1 $[\text{M-H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) δ : 9.89 (1H, s, CHO), 8.16 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-4), 8.10 (1H, s, H-2), 7.48 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-7), 7.28 (1H, m, H-6), 7.24 (1H, td, $J=7.6, 1.1$ Hz, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ : 187.1 (-CH, -CHO), 139.4 (C-2, -CH), 124.7 (C-5, -CH), 123.3 (C-6, -CH), 122.1 (C-4, -CH), 112.8 (C-7, -CH)。以上数据与文献 [22] 报道基本一致, 故鉴定为 3-吡啶甲醛。

化合物 **15**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 207.413 7 $[\text{M-H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) δ : 7.27 (2H, m, H-1~2), 7.22 (3H, m, $J=7.4, 3.9$ Hz, H-3~5), 4.64 (1H, dd, $J=9.1, 5.1$ Hz, H-6), 3.20 (1H, dd, $J=13.9, 5.0$ Hz, H-7), 2.93 (1H, dd, $J=13.9, 9.1$ Hz, H-8), 1.91 (3H, s, -CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD) δ : 174.8 (C-1), 173.1 (C-2), 138.5 (C-3), 130.2 (C-5), 129.4 (C-6), 127.7 (C-7), 55.4 (C-8), 38.4 (-CH₂), 22.2 (-CH₃)。以上数据与文献 [23] 报道基本一致, 故鉴定为 *N*-乙酰-*L*-苯丙氨酸。

化合物 **16**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 195.563 2 $[\text{M-H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) δ : 6.51 (2H, dd, $J=15.3, 7.0$ Hz, H-11), 5.98 (1H, dd, $J=11.8, 11.0$ Hz, H-12), 5.64 (1H, dd, $J=15.4, 6.9$ Hz, H-10), 5.45 (1H, dt, $J=$

11.0, 7.6 Hz, H-13), 4.15 (1H, m, H-9), 2.30 (2H, t, H-2), 2.16 (2H, m, H-14), 1.70~1.20 (18H, m, $9\times\text{CH}_2$), 0.97 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD) δ : 174.2 (C-1), 135.8 (C-2), 133.0 (C-3), 127.8 (C-4), 125.8 (C-5), 72.8 (C-6), 51.3 (C-7), 37.7 (C-8), 34.1 (C-9), 31.4 (C-10), 30.3 (C-11), 30.0 (C-12), 29.1 (C-13), 28.9 (C-14), 27.7 (C-15), 25.1 (C-16), 22.5 (C-17), 13.9 (C-18)。以上数据与文献 [24] 报道基本一致, 故鉴定为 9-hydroxy-10*E*, 12*Z*-octadecadienoic acid。

化合物 **17**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 198.356 7 $[\text{M-H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) δ : 6.21 (1H, dd, $J=15.1, 11.0$ Hz, H-11), 5.98 (1H, dd, $J=11.8, 11.0$ Hz, H-12), 5.67 (1H, dd, $J=15.1, 6.9$ Hz, H-13), 5.50 (1H, dt, $J=15.0, 5.0$ Hz, H-10), 4.15 (1H, m, H-9), 2.30 (2H, t, H-2), 2.10 (2H, m, H-14), 1.70~1.20 (18H, m, $9\times\text{CH}_2$), 0.91 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD) δ : 174.2 (C-1), 135.8 (C-2), 133.0 (C-3), 130.8 (C-4), 128.8 (C-5), 72.8 (C-6), 51.3 (C-7), 37.7 (C-8), 34.1 (C-9), 31.4 (C-10), 30.3 (C-11), 29.2 (C-12), 29.1 (C-13), 28.9 (C-14) 25.7 (C-15), 25.1 (C-16), 22.5 (C-17), 13.9 (C-18)。以上数据与文献 [25] 报道基本一致, 故鉴定为 9-hydroxy-10*E*, 12*E*-octadecadienoic acid。

化合物 **18**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 198.645 7 $[\text{M-H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) δ : 6.10 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-11), 5.98 (1H, dt, $J=15.8, 7.0$ Hz, H-12), 4.67 (2H, dd, $J=2.1$ Hz, H-13), 2.30 (2H, t, H-2), 2.25 (2H, t, H-2), 2.10 (2H, m, H-14), 1.70~1.20 (18H, m, $9\times\text{CH}_2$), 0.91 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD) δ : 177.8 (C-1), 147.2 (C-2), 133.4 (C-3), 132.2 (C-4), 114.5 (C-5), 35.2 (C-6), 34.3 (C-7), 33.1 (C-8), 30.9 (C-9), 30.4 (C-10), 25.7 (C-15), 23.1 (C-16), 14.7 (C-18)。以上数据与文献 [26] 报道基本一致, 故鉴定为 (6*E*)-5-methylene-6-tetradecenoic acid。

4 讨论

本实验从假丝酵母菌真菌 *Candida* sp. 中分离得到 **18** 个化合物, 化合物 **1**、**3~8**、**10~18** 为首次从其内生真菌中分离得到。内生真菌数量繁多, 能

够产生结构独特、活性显著的化合物，其中一些已转化为药物，这些真菌与宿主植物长期共生，常常共享相似的次级代谢途径，为新药研发提供了线索^[27]。虽然药用植物内生真菌研究尚处于起步阶段，但其在 新 药 开 发 中 的 潜 力 和 价 值 已 备 受 矚 目^[28]。目前，国内外对黑果小檗化学成分和药理作用的研究表明其极具开发前景，但是对其内生真菌的代谢产物研究较少，至今还未进行系统的科学研究和开发利用。

本实验结果发现，药用黑果小檗内生真菌的次级代谢产物主要为苯环衍生物及少量脂肪酸，可能存在抗炎活性，可为今后黑果小檗的有效开发利用提供一定的科学依据。在后期工作中，将深入研究该植物的药效物质基础、药理活性及作用机制，以期 为 小 檗 属 药 用 植 物 资 源 的 高 效 综 合 利 用 及 新 药 研 发 提供科学依据。

参考文献：

[1] 李 莉, 孙颖平, 李思栋, 等. 黑果小檗总黄酮含量测定及体外抗氧化活性研究[J]. 安徽医药, 2013, 17(6): 934-936.

[2] Zhu H M, Li L, Li S Y, *et al.* Effect of water extract from *Berberis heteropoda* Schrenk roots on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by adjusting intestinal flora [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 237: 182-191.

[3] 纪红燕, 许贤瑞, 赵 瑞, 等. 药用植物雷公藤内生真菌分离及其抑菌活性筛选研究[J]. 中国现代应用药 学, 2023, 40(2): 197-203.

[4] 王 越, 张玉琴, 徐喆菲, 等. 红榄李来源内生真菌 *Penicillium oxalicum* HLLG-13 次级代谢产物与生物活性研究[J]. 海南师范大学学报 (自然科学版), 2023, 36(4): 420-428.

[5] 李 婷, 周永强, 徐 慧, 等. 苗药小花清风藤叶内生真菌 *Guignardia* sp. 次生代谢产物化学成分的分离和结构鉴定[J]. 科学技术创新, 2022(35): 37-40.

[6] 李思瑶, 张 杨, 车永胜. 植物内生真菌 *Talaromyces* sp. 的次级代谢产物研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(9): 913-919.

[7] 张世凯, 徐 清, 刘 林, 等. 白花前胡内生真菌的分离筛选及菌株 bhqh-2 的次级代谢产物研究[J]. 生物学杂志, 2023, 40(5): 29-34.

[8] 曾庆婷, 袁 涛. 藜蒿内生真菌 *Paraconiothyrium* sp. YLHJ01 化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(5): 781-786.

[9] 李小华, 曹钰镁, 金梦莹, 等. 冬虫夏草内生真菌 *Nigrospora oryzae* 的化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 126-131.

[10] 徐志贫, 王彦志, 郭 燕, 等. 牛膝地上部位化学成分 的分离鉴定[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(6): 450-455.

[11] 郑良超, 廖振东, 张 伟, 等. 知母须根化学成分的研究 [J]. 中成药, 2020, 42(8): 2071-2074.

[12] 王立东, 吴少华, 陈有为, 等. 一株印楝植物内生真菌 *Epicoccum* sp. 次生代谢产物的研究[J]. 天然产物研究与开 发, 2009, 21(6): 916-918.

[13] 吕海宁, 陈 辉, 屈 晶, 等. 内生真菌 *Trichoderma harzianum* 次生代谢产物研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(5): 427-430.

[14] 房芯羽, 周 三, 刘 洋, 等. 绿藻孔石莼化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4626-4631.

[15] Kitamura Y, Nishimi S, Miura H, *et al.* Phenyllactic acid in *Duboisia leichhardtii* root cultures B feeding of phenyl [1-14C] alanine[J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(2): 425-427.

[16] Yang X Q, He G G, Zhao L X, *et al.* Two novel phenethylamine alkaloids from *Streptomyces* sp. YIM10049 [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(12): 1579-1580.

[17] 李 孟, 曾梦楠, 张志广, 等. 北葶苈子化学成分的研究 [J]. 中成药, 2019, 41(1): 105-110.

[18] 胡 琳, 丁智慧, 刘吉开. 灰黑拟牛肝菌的化学成分[J]. 云南植物研究, 2002, 24(5): 667-670.

[19] 阙东枚, 戴好富, 曾艳波, 等. 见血封喉内生真菌 *Acremonium* sp. J1 化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2009, 19(3): 200-205.

[20] 戴好富, 梅文莉, Peter Proksch, 等. 南海海绵 *Hyrtios erectus* 的肿瘤细胞毒活性成分研究[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(5): 1-5.

[21] 柴丽华, 宋海龙, 马晓玲, 等. 青龙衣化学成分的分离及 其体外抗肿瘤活性的研究[J]. 中草药, 2021, 52(19): 5822-5826.

[22] 马小妮, 苗 子, 程轩轩, 等. 深海细菌 *Psychrobacter submarinus* 1A01998 的次级代谢产物研究[J]. 广东药学院 学报, 2016, 32(1): 25-28.

[23] Koshti N, Naik S, Parab B. Polymer-bound cationic Rh (I) phosphine catalyst for homogeneous asymmetric hydrogenation [J]. *Indian J Chem B*, 2005, 44B(12): 188.

[24] Li Z, Tran V H, Duke R K, *et al.* Synthesis and biological activity of hydroxylated derivatives of linoleic acid and conjugated linoleic acids [J]. *Chem Phys Lipids*, 2009, 158(1): 39-45.

[25] Henry D Y, Gueritte-Voegelein F, Insel P A, *et al.* Isolation and characterization of 9-hydroxy-10-trans, 12-cis-octadecadienoic acid, a novel regulator of platelet adenylate cyclase from *Glechoma hederacea* L. *Labiatae* [J]. *Eur J Biochem*, 1987, 170(1-2): 389-394.

[26] Pedersen H A, Ndi C, Semple S J, *et al.* PTP1B-Inhibiting branched-chain fatty acid dimers from *Eremophila oppositifolia* subsp. *angustifolia* identified by high-resolution PTP1B inhibition profiling and HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR analysis [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(5): 1598-1610.

[27] 阮清锋, 卢淇平, 陈小晶, 等. 山胡椒内生真菌 *Trichoderma* sp. SHJN1 和 *Perenniporia* sp. SHJG1 的抗肿瘤活 性成分研究[J]. 中国现代应用药 学, 2023, 40(18): 2535-2542.

[28] 谢海伟, 冯嘉琪, 付晓晴, 等. 药用植物内生真菌的研究 进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 1-6.