

人参红皮病菌 *Rhexocercosporidium panacis* 的化学成分

刘鹏^{1,2}, 李琦², 杨健³, 孙迪安², 况焱¹, 丁刚²

(1. 浙江农林大学 化学与材料工程学院, 浙江 杭州 311300; 2. 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; 3. 中国中医科学院 国家中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

摘要: 【目的】对人参 *Panax ginseng* 红皮病菌 *Rhexocercosporidium panacis* 次级代谢产物进行研究, 以期发现活性化合物, 并为后期人参红皮病致病机理的研究提供化学物质基础。【方法】通过大米固体发酵方式获得人参红皮病菌粗提物, 对粗提物采用硅胶柱层析、反向硅胶柱层析 (ODS)、凝胶柱层析 (Sephadex LH-20)、半制备液相等多种方法进行分离纯化获得单体化合物, 再基于质谱、核磁共振谱方法, 并结合文献数据比对鉴定单体化合物结构。最后采用 1,1-二苯基-2-苦肼基 (DPPH) 自由基清除法评价 9 种单体化合物的抗氧化活性, 并对其中的 6 种化合物进行初步的植物毒活性评价。【结果】从人参红皮病菌粗提物乙酸乙酯部位分离得到 9 种化合物, 其中 3 种甾醇类: 化合物 1 为麦角甾醇 (ergosterol)、化合物 2 为过氧化麦角甾醇 (5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,9,22E-tien-3 β -ol)、化合物 3 为 5,8-表二氧麦角甾醇-6,9(11),22-三烯-3-醇 (5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol); 6 种聚酮类: 化合物 4 为核桃酮 (regiolone)、化合物 5 为 4,6,8-三羟基-3,4-二氢-1(2H)-萘酮 (4,6,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one)、化合物 6 为 2,5-二甲基-7-羟基色酮 (2,5-dimethyl-7-hydroxychromone)、化合物 7 为 2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮 (2-methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromone)、化合物 8 为 (+)-citreisocoumarin、化合物 9 为 de-O-methyladiaphorin。活性试验结果表明: 化合物 1~9 无抗氧化活性, 化合物 4~9 对人参根部未表现出致病性。【结论】化合物 1~9 为首次从人参红皮病菌中分离得到, 丰富了该菌种的次级代谢产物数据库。其中化合物 4~9 表现出多种生物活性, 但在植物毒活性评价中未能使离体人参根部致病。图 4 表 1 参 29
关键词: 人参; 人参红皮病菌; 甾醇; 聚酮; 生物活性

中图分类号: Q939.11 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)06-1215-09

Chemical components of *Rhexocercosporidium panacis* from *Panax ginseng*

LIU Peng^{1,2}, LI Qi², YANG Jian³, SUN Di'an², KUANG Yi¹, DING Gang²

(1. College of Chemical and Materials Engineering, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. 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 and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 3. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: [Objective] The aim is to study the secondary metabolites of *Rhexocercosporidium panacis*, so as to discover new active compounds and to provide a chemical basis for later research on the pathogenesis of *R. panacis*. [Method] The crude extracts of *R. panacis* were obtained through solid fermentation of rice, and purified by silica gel column chromatography, reversed silica gel column chromatography (ODS), Sephadex LH-20, and semi-preparative liquid chromatography to gain monomeric compounds. The structure of monomeric compounds was identified based on mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy,

收稿日期: 2023-02-14; 修回日期: 2023-05-11

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302-2101-18)

作者简介: 刘鹏 (ORCID: 0009-0008-1510-8416), 从事真菌次级代谢产物研究。E-mail: Alun_0220@163.com。通信作者: 丁刚 (ORCID: 0000-0002-7297-116X), 研究员, 博士, 从事天然产物研究。E-mail: gding@implad.ac.cn

and literature data comparison. The antioxidant activities of 9 compounds were tested by DPPH radical scavenging method and the preliminary phytotoxic activity of compounds 4–9 was evaluated. [Result] 9 compounds were isolated from *R. panacis*, including three sterols: ergosterol (1), 5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,9,22E-tien-3 β -ol (2), and 5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol (3), and six polyketides: regiolone (4), 4,6,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphthalene-1(2H)-one (5), 2,5-dimethyl-7-hydroxychromone(6), 2-methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromone (7), (+)-citreisocoumarin (8), and de-O-methyldiaporthin (9). Compounds 1–9 exhibited no antioxidant activity and 4–9 did not display phytotoxic effects on ginseng roots. [Conclusion] Compounds 1–9 are isolated for the first time from *R. panacis*, enriching the database of secondary metabolites of this strain. Among them, compounds 4–9 exhibit various biological activities, but do not cause lesions in the isolated ginseng roots in the evaluation of phytotoxic activity. [Ch, 4 fig. 1 tab. 29 ref.]

Key words: *Panax ginseng*; *Rhexocercosporidium panacis*; sterol; polyketides; biological activities

真菌是天然产物的重要来源之一，目前已从中挖掘了包括抗菌药物青霉素在内的大量药源分子。随着大规模化学筛选的开展，从普通真菌资源中发现结构新颖与活性显著的次级代谢产物的概率逐渐变低。因此，独特生境来源的真菌资源成为新活性化合物研究的热点^[1]。

植物病原真菌是一种潜在的植物内生真菌，一方面需抵御植物自身防御机制，另一方面需应对外界复杂环境及其他竞争者，是一类特殊生境的真菌类群，因而具有产生结构新颖化合物的潜力^[2-4]。LIU等^[5]从小麦 *Triticum aestivum* 病原真菌平脐蠕孢属真菌 *Bipolaris* sp. TJ403-B1 中分离得到一系列新骨架的蛇孢假壳素 (ophiobolin) 类似物 (bipolarolides A~G); KUMARIHAMY等^[6]从植物病原菌 *Septoria pistaciarum* 中分离得到具有抗疟、抑菌活性的化合物; LI等^[7]和 WANG等^[8]从小麦病原真菌小麦根腐离蠕孢 *Bipolaris sorokiniana* 中分离得到具有显著植物促生长活性和植物毒活性的倍半萜类化合物，进一步印证了植物病原真菌的代谢潜力。

人参 *Panax ginseng* 红皮病菌 *Rhexocercosporidium panacis* 是导致人参红皮病的病原真菌，病害主要发生在人参根部，会形成大小不一、形状不规则的红色病斑，影响人参的产量及品质，造成严重的经济损失^[9-10]。目前尚未有关于人参红皮病菌次级代谢产物研究的相关报道。为探明该菌株代谢潜力，本研究选择人参红皮病菌作为研究材料，对其大米发酵产物乙酸乙酯提取部位进行化学成分研究，首次从中分离得到了9种单体化合物，并对其抗氧化活性与植物毒活性进行初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 人参红皮病菌菌株购买自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (菌种保藏编号 CGMCC3.17260)。

1.1.2 仪器与试剂 核磁共振仪: Bruker AM 600 (布鲁克科技有限公司, 德国), 制备型色谱柱: YMC ODS-A (250 mm×10 mm, 5 μ m, 岛津实验器材有限公司, 日本), 高效液相色谱仪 Agilent 1200 (安捷伦科技有限公司, 美国), 半制备液相色谱仪: LC-52 (赛谱锐思科技有限公司, 中国), TG16-WS 高速离心机 (湘潭湘仪仪器有限公司, 中国), KQ-500E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 中国), 鼓风式干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司, 中国), 暗箱式紫外分析仪 (上海市宝山顾村电光仪器厂, 中国)。色谱甲醇 (赛默飞世尔科技, 美国), 石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、乙醇、丙酮等其他试剂 (北京化学试剂公司, 中国), 制备薄层层析硅胶 (上海彭腾精细化工有限公司, 中国), Sephadex LH-20 (法玛西亚公司, 瑞典)。

1.1.3 培养基 PDA 培养基配方: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 去离子水 1 000 mL; 大米固体培养基配方: 每 60 g 大米加入 80 mL 去离子水置于 500 mL 锥形瓶中。

1.2 方法

1.2.1 菌株发酵 人参红皮病菌菌种接种在 PDA 培养基上，20 ℃ 条件下静置培养 10 d，再用接种针将其转接种于含大米培养基的 500 mL 锥形瓶中 (121 ℃，30 min 高压灭菌锅灭菌)，25 ℃ 静置培养 2 周。共发酵 80 瓶。

1.2.2 化合物的提取分离 菌株发酵结束后，向锥形瓶中加 300 mL 乙酸乙酯进行萃取，合并乙酸乙酯相，此操作重复 3 次，减压浓缩得到乙酸乙酯部位总膏 (30 g)。乙酸乙酯粗提物 (30 g) 经正相硅胶柱粗分阶段，以石油醚:丙酮 (体积比为 1:0~0:1) 梯度洗脱，依据薄层色谱法检测合并得到 8 个组分 (Fr.1~Fr.8)。Fr.2 (500 mg) 经重结晶得到化合物 1 (5 mg)。Fr.3 (2.3 g) 经正相硅胶柱层析，以石油醚:丙酮 (体积比为 80:1~3:1) 继续分离得到 4 个组分 (Fr.3.1~Fr.3.4)。Fr.3.2 经 Sephadex LH-20 (甲醇为洗脱剂) 分离得 5 个组分 Fr.3.2.1~Fr.3.2.5，其中 Fr.3.2.5 经半制备液相色谱 (甲醇/水，体积分数为 51% 甲醇，流速 2 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 4 [3.5 mg，保留时间 (t_R) 为 20 min]。Fr.3.3 以丙酮为洗脱剂经凝胶柱 (Sephadex LH-20) 分离得到 7 个组分 Fr.3.3.1~Fr.3.3.7，其中 Fr.3.3.3 有结晶析出，通过重结晶及半制备液相 (甲醇/水，体积分数为 98% 甲醇，流速 2 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 2 (2.4 mg， t_R =19 min) 和化合物 3 (9.3 mg， t_R =23 min)。Fr.3.3.7 经半制备液相 (甲醇/水，0~5 min，体积分数为 40% 甲醇；5~35 min，体积分数为 40%~80% 甲醇，流速 2 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 6 (2.5 mg， t_R =31 min)。Fr.5 (1.3 g) 经正相硅胶柱层析，以二氯甲烷:甲醇 (体积比为 50:1~0:1) 梯度洗脱得 Fr.5.1~Fr.5.6，其中 Fr.5.3 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷:甲醇体积比为 1:1) 分离得到 Fr.5.3.1~Fr.5.3.6。Fr.5.3.5 经过 Sephadex LH-20 (二氯甲烷:甲醇体积比为 1:1) 分离得 Fr.5.3.5.1~Fr.5.3.5.4，其中 Fr.5.3.5.3 经半制备液相 (甲醇/水，0~5 min，体积分数为 50% 甲醇；5~35 min，体积分数为 50%~64% 甲醇，流速 2 mL·min⁻¹) 纯化得化合物 8 (2.4 mg， t_R =19 min)，Fr.5.3.5.4 经半制备液相 (甲醇/水，0~5 min，体积分数为 20% 甲醇；5~30 min，体积分数 20%~55% 甲醇；30~50 min，体积分数为 55%~70% 甲醇，流速 2 mL·min⁻¹) 纯化得化合物 9 (2.4 mg， t_R =32 min)、化合物 5 (2.4 mg， t_R =44 min)。Fr.6 经 Sephadex LH-20 (甲醇为洗脱剂) 分离得到 4 个组分 Fr.6.1~Fr.6.4，其中 Fr.6.3 经半制备液相处理 (甲醇/水，0~5 min，体积分数为 40% 甲醇；5~30 min，体积分数为 40%~60% 甲醇，流速 2 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 7 (2.0 mg， t_R =23 min)。

1.2.3 抗氧化活性评价 采用 1,1-二苯基-2-苦基基 (DPPH) 自由基清除试验评价化合物 1~9 的抗氧化活性^[11]。将待测化合物及阳性对照 (维生素 E, VE) 配置成质量浓度梯度 (200、100、80、60、40、20、10、5 mg·L⁻¹)，在 96 孔板中加入 60 μL 不同质量浓度的样品或 VE，然后加入 60 μL 的 0.1 mmol·L⁻¹ DPPH 甲醇溶液，振荡均匀，在黑暗中孵育 2 h 后，用酶标仪测定在 517 nm 处的吸光度，空白对照为 60 μL DPPH 加上 60 μL 甲醇。抑制率= $\{[D(517)_{\text{blank}} - D(517)_{\text{sample}}]/D(517)_{\text{blank}}\} \times 100\%$ 。其中： $D(517)_{\text{blank}}$ 为对照组 60 μL 甲醇与 60 μL DPPH 混合溶液吸光度， $D(517)_{\text{sample}}$ 为 60 μL 样品与 60 μL DPPH 混合溶液吸光度。试验重复 3 次，以半清除率 (IC₅₀, DPPH 自由基清除率为 50% 时的样品浓度) 为评价指标。

1.2.4 植物毒活性评价 参考文献 [12] 方法测定单体化合物 4~9 对离体人参根部的致病性。具体步骤如下：采集新鲜人参根，先用自来水清洗，去除泥土并摒弃有瑕疵的根，接着用体积分数为 75% 乙醇对根部进行消毒，再用打孔器在根部中心位置制作 3 个孔洞后，将其放置在装有滤纸片的培养皿中 (滤纸片已提前用无菌水浸润)。化合物用体积分数为 75% 乙醇配置成质量浓度为 1 g·L⁻¹ 的标准溶液。最后用移液枪分别吸取 10 μL 待测化合物标准溶液加入到人参 3 个孔洞中，封口膜密封后，在黑暗条件下，20 ℃ 孵育。体积分数为 75% 乙醇处理的人参根作为对照组，3 d 后观察结果。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

运用多种分离技术从人参红皮病菌粗提物的乙酸乙酯部位纯化得到 9 种单体化合物 (图 1)，利用质谱及核磁共振波谱技术并结合文献数据比对，化合物结构鉴定结果如下：化合物 1 为麦角甾醇 (ergosterol)、化合物 2 为过氧化麦角甾醇 (5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,9,22E-tien-3 β -ol)、化合物 3 为 5,8-表二氧麦角甾醇-6,9(11),22-三烯-3-醇 (5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol)、化合物 4 为核桃酮

(regiolone)、化合物 5 为 4,6,8-三羟基-3,4-二氢-1(2*H*)-萘酮 (4,6,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one)、化合物 6 为 2,5-二甲基-7-羟基色酮 (2,5-dimethyl-7-hydroxychromone)、化合物 7 为 2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮 (2-methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromone)、化合物 8 为 (+)-citreisocoumarin 和化合物 9 为 de-*O*-methyladiaporthin。化学结构式如图 1 所示。

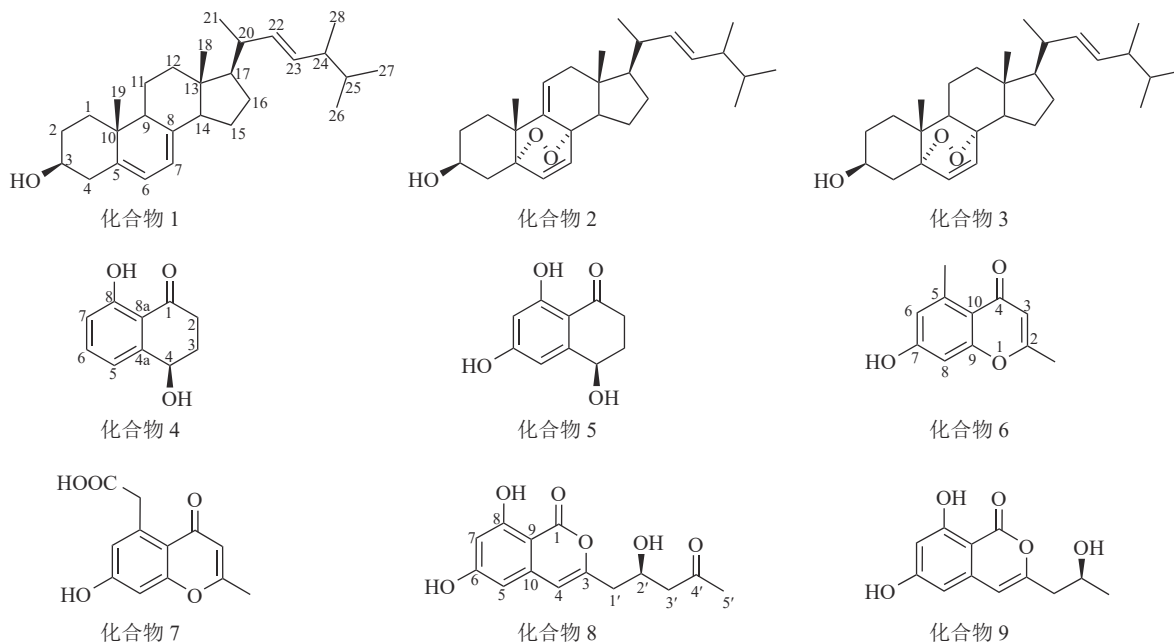


图 1 化合物 1~9 的化学结构
Figure 1 Chemical structures of compounds 1-9

化合物 1: 无色晶体, 基于¹H-NMR 图谱分析, 高场区氢化学位移 (δ_{H}) 在 1.20~2.50 间有复杂重叠的烷基氢信号, 并存在 6 个甲基信号, 其中 2 个单峰甲基氢信号 ($\delta_{\text{H}}=0.63$ 和 0.95), 4 个双峰甲基氢信号 ($\delta_{\text{H}}=1.04$ 、0.92、0.83、0.81), 另在低场区化学位移 $\delta_{\text{H}}=3.64$ 处有个积分为 1 的多重峰氢信号, 推测此处连接 1 个羟基; 低场区存在 2 对烯烃质子信号, 其中 1 对 $\delta_{\text{H}}=5.21$ 和 5.19 间的耦合常数为 15.6, 推测为环外侧链反式双键, 基于以上特征推测化合物 1 为麦角甾醇类化合物。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ_{H} 5.57 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-7), 5.38 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6), 5.21 (1H, dd, $J=15.6$, 7.2 Hz, H-23), 5.19 (1H, dd, $J=15.6$, 7.2 Hz, H-22), 3.64 (1H, tt, $J=11.4$, 4.2 Hz, H-3), 1.04 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-28), 0.83 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-27), 0.81 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-26), 0.63 (3H, s, H-18)。以上氢谱数据与文献 [13] 对比后确认此化合物为麦角甾醇。

化合物 2: 无色晶体, 其¹H-NMR 图谱发现与麦角甾醇相似。通过与文献 [14] 比对, 确认该化合物为过氧化麦角甾醇。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ_{H} 6.58 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), 6.27 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7), 5.41 (1H, d, $J=6.0$, 1.8 Hz, H-11), 5.22 (1H, dd, $J=15.6$, 7.8 Hz, H-23), 5.14 (1H, dd, $J=15.6$, 8.4 Hz, H-22), 4.00 (1H, m, H-3), 1.08 (3H, s, 19-Me), 0.99 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 21-Me), 0.90 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 28-Me), 0.82 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 26-Me), 0.81 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 27-Me), 0.72 (3H, s, 18-Me)。

化合物 3: 无色晶体, 其¹H-NMR 谱图与过氧化麦角甾醇高度相似, 主要区别在化学位移 $\delta_{\text{H}}=5.41$ 处的氢信号消失, 推测双键被还原。通过与文献 [14] 比对, 确认此化合物为 5,8-表二氧麦角甾醇-6,9(11),22-三烯-3-醇。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ_{H} 6.50 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), 6.24 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7), 5.22 (1H, dd, $J=15.6$, 7.8 Hz, H-23), 5.14 (1H, dd, $J=15.6$, 8.4 Hz, H-22), 3.96 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 21-Me), 0.90 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 28-Me), 0.88 (3H, s, 19-Me), 0.83 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 26-Me), 0.81 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 27-Me), 0.81 (3H, s, 18-Me)。

化合物 4: 黄色粉末, 低分辨质谱数据质荷比 (m/z) 为 179.07, $[M+H]^+$ 。¹H-NMR 谱图 (图 2) 显示在低场区有 3 个氢质子信号, $\delta_{\text{H}}=7.50$ (1H, t, $J=7.8$ Hz), 7.02 (1H, dd, $J=7.8$, 1.2 Hz), 6.93 (1H, dd,

$J=7.8, 1.2$ Hz), 推测化合物含苯环结构; 低场区化学位移 $\delta_{\text{H}}=12.89$ 处的尖单峰结合 ^{13}C -NMR 谱图 (图 3) 中碳化学位移 ($\delta_{\text{C}}=204.4$, 推测为与羰基形成分子内氢键的活泼氢信号; 化学位移 $\delta_{\text{H}}=4.92$ 的 1 个双峰氢信号暗示此处可能连接 1 个羟基。另外, 高场区有 2 对相互耦合的亚甲基信号 ($\delta_{\text{H}}=3.00, 2.65$ 和 $\delta_{\text{H}}=2.35, 2.20$), 基于以上数据推测化合物 4 为芳香类化合物。 ^1H -NMR ($\text{CDCl}_3, 600$ MHz): δ_{H} 12.89 (1H, 8-OH, s), 7.50 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-6), 7.02 (1H, dd, $J=7.8, 1.2$ Hz, H-5), 6.93 (1H, dd, $J=7.8, 1.2$ Hz, H-7), 4.92 (1H, dd, $J=7.8, 3.6$ Hz, H-4), 3.00 (1H, ddd, $J=18.0, 8.4, 4.8$ Hz, H-2a), 2.65 (1H, ddd, $J=18.0, 8.4, 4.8$ Hz, H-2b), 2.35 (1H, m, H-3a), 2.20 (1H, m, H-3b)。 ^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3, 150$ MHz): δ_{C} 204.4 (C-1), 34.7 (C-2), 31.4 (C-3), 67.9 (C-4), 146.0 (C-4a), 117.9 (C-5), 137.1 (C-6), 117.5 (C-7), 162.9 (C-8), 115.4 (C-8a)。以上核磁数据与文献 [15] 中的核桃酮基本一致。

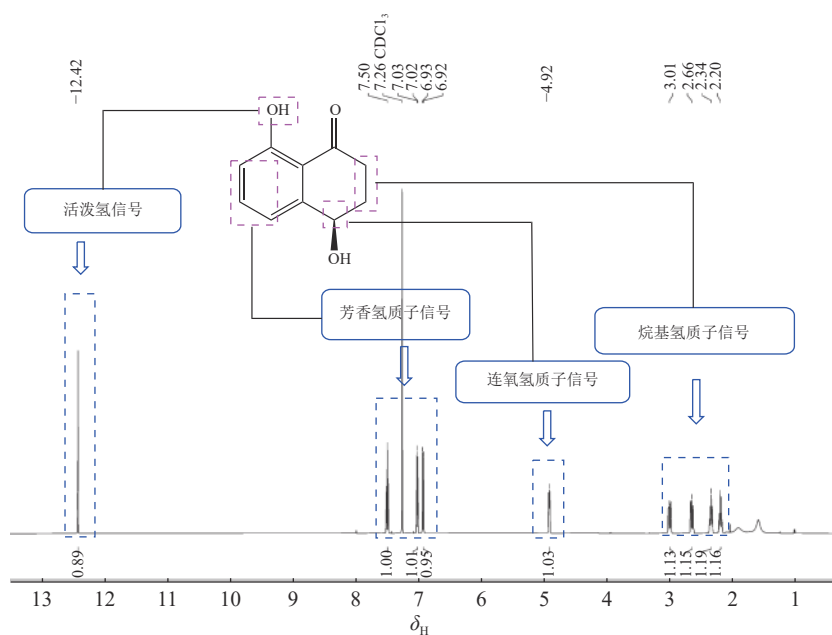


图 2 化合物 4 的 ^1H -NMR 谱图 (600 MHz, CDCl_3)

Figure 2 ^1H -NMR spectrum (600 MHz) of 4 in CDCl_3

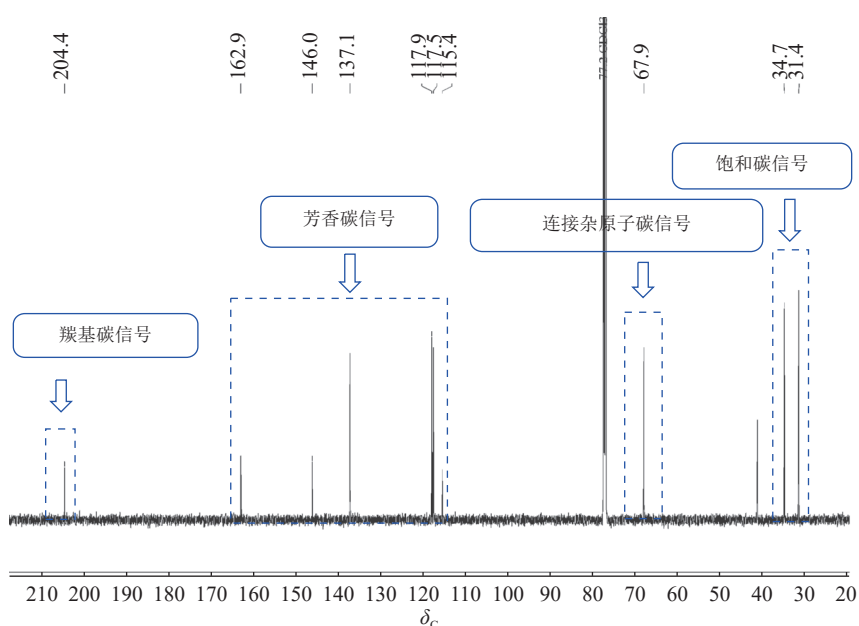


图 3 化合物 4 的 ^{13}C -NMR 谱图 (150 MHz, CDCl_3)

Figure 3 ^{13}C -NMR spectrum (150 MHz) of 4 in CDCl_3

化合物 5: 黄色粉末, 低分辨质谱数据 $m/z = 195.09$, $[M+H]^+$ 。化合物 5 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图与化合物 4 高度相似, 主要区别在化学位移 $\delta_{\text{H}} = 6.00 \sim 8.00$ 范围内少 1 个芳香氢信号, 且剩下 2 个芳香氢 $\delta_{\text{H}} = 6.64$ 和 6.22 之间耦合常数为 1.8 , 判断这 2 个氢在苯环上处于间位。对比化合物 4, 化合物 5 的芳香氢化学位移向高场移动, 结合碳谱数据分析, 发现化合物 5 比化合物 4 多了 1 个 δ_{C} 在 166.5 处的碳信号, 推测为双键连氧的碳信号, 即苯环上新增的取代基为羟基。 $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , 600 MHz): δ_{H} 12.89 (1H, s, 8-OH), 6.64 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5), 6.22 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-7), 4.78 (1H, dd, $J = 9.0, 4.2$ Hz, H-4), 2.75 (1H, m, $J = 17.4, 6.0, 4.8$ Hz, H-2a), 2.61 (1H, m, H-2b), 2.26 (1H, m, H-3a), 2.03 (1H, m, H-3b)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , 150 MHz): δ_{C} 203.1 (C-1), 166.5 (C-6), 166.1 (C-8), 151.5 (C-4a), 109.9 (C-8a), 106.9 (C-5), 102.1 (C-7), 68.0 (C-4), 35.6 (C-2), 32.7 (C-3)。以上核磁共振数据与文献 [16] 中的 4,6,8-三羟基-3,4-二氢-1(2H)-萘酮基本一致。

化合物 6: 黄色粉末, 低分辨质谱数据 $m/z = 191.10$, $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 谱图显示在低场区 $\delta_{\text{H}} = 6.68$ 和 6.67 处有 2 个互相耦合的氢信号, 结合耦合常数 2.4 可知为苯环上处于间位的氢, 表明化合物 6 存在被 4 个取代基取代的苯环结构; 化学位移 $\delta_{\text{H}} = 5.92$ 推测为单峰烯烃质子信号, 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图中 $\delta_{\text{C}} = 179.3$ 、 164.5 和 117.5 等 3 处的碳化学位移推测化合物含 α, β -不饱和酮结构; 高场区存在 2 个单峰甲基氢信号 ($\delta_{\text{H}} = 2.70$ 和 2.28), 根据化学位移值推测这 2 个甲基分别连接在苯环和双键上。基于以上数据推测化合物 6 为色酮类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , 600 MHz): δ_{H} 9.37 (7-OH, s), 6.68 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.67 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 5.92 (1H, s, H-3), 2.70 (3H, s, 5- CH_3), 2.28 (3H, s, 2- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , 150 MHz): δ_{C} 179.3 (C-4), 164.5 (C-2), 161.5 (C-7), 158.4 (C-9), 142.4 (C-5), 117.5 (C-3), 115.0 (C-10), 111.8 (C-6), 101.5 (C-8), 22.8 (5- CH_3), 19.7 (2- CH_3)。以上核磁共振数据与文献 [17] 中的 2,5-二甲基-7-羟基色酮基本一致。

化合物 7: 黄色粉末, 低分辨质谱数据 $m/z = 235.09$, $[M+H]^+$ 。化合物 7 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图与化合物 6 的相似, 主要区别在于苯环上取代的甲基信号 ($\delta_{\text{H}} = 2.70$) 消失, 多了 1 个单峰亚甲基信号 ($\delta_{\text{H}} = 4.10$), 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图新出现的信号 $\delta_{\text{C}} = 175.9$, 推测此处由甲基取代变为羧甲基取代。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz): δ_{H} 6.75 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.69 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.01 (1H, s, H-3), 4.10 (2H, s, 5- CH_2), 2.34 (3H, s, 2- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz): δ_{C} 167.5 (C-2), 119.3 (C-3), 181.5 (C-4), 115.2 (C-4a), 139.6 (C-5), 175.9 (-COOH), 111.7 (C-6), 163.7 (C-7), 102.8 (C-8), 160.7 (C-8a), 21.1 (2- CH_3), 42.3 (5- CH_2)。以上核磁共振数据与文献 [18] 中的 2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮基本一致。

化合物 8: 无色晶体, 低分辨质谱数据 $m/z = 279.13$, $[M+H]^+$ 。基于 $^1\text{H-NMR}$ 谱图分析, 低场区 ($\delta_{\text{H}} = 6.41$ 和 6.37) 处有 2 个互相耦合的氢信号, 耦合常数为 2.4 , 推测为苯环上间位取代的氢。化学位移 ($\delta_{\text{H}} = 11.14$) 处存在 1 个积分为 1 的氢信号, 推测为形成分子内氢键的活泼氢信号, $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图 ($\delta_{\text{C}} = 167.1$) 处的碳信号可能为酯羰基信号, 结合烯烃单峰质子信号 ($\delta_{\text{H}} = 6.41$) 推测化合物 8 为异香豆素类结构。 $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , 600 MHz): δ_{H} 11.14 (1H, s, 8-OH), 6.43 (1H, s, H-4), 6.41 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.37 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 4.47 (1H, tt, $J = 7.8, 4.8$ Hz, H-2'), 2.70 (1 H, m, H-3'a, overlapped), 2.70 (1H, m, H-1'a, overlapped), 2.68 (1H, m, H-3'b), 2.60 (1H, dd, $J = 14.4, 8.4$ Hz, H-1'b), 2.15 (3H, s, 5'- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$:(Acetone- d_6 , 150 MHz): δ_{C} 167.1 (C-1), 155.7 (C-3), 106.8 (C-4), 103.6 (C-5), 167.1 (C-6, overlapped), 102.5 (C-7), 164.5 (C-8), 99.6 (C-9), 140.8 (C-10), 41.9 (C-1'), 66.1 (C-2'), 50.7 (C-3'), 207.5 (C-4'), 30.6 (C-5')。以上核磁共振数据与文献 [19] 中的 (+)-citreisocoumarin 基本一致。

化合物 9: 无色晶体, 低分辨质谱数据 $m/z = 237.11$, $[M+H]^+$ 。化合物 9 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图与化合物 8 高度相似, 表明为同类型化合物, 主要区别在化合物 9 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图中少了 1 个单峰甲基信号 ($\delta_{\text{H}} = 2.15$), 多了 1 个双峰甲基信号, 结合碳谱数据对比发现化合物 9 比化合物 8 少了 2 个碳信号, 其中包括 1 个羰基碳信号 ($\delta_{\text{C}} = 207.5$), 推测化合物 9 比化合物 8 少了侧链上的乙酰基。 $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , 600 MHz): δ_{H} 11.16 (1H, s, 8-OH), 6.43(1H, s, H-4), 6.41(d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-5), 6.37(1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-7), 4.17(1H, m, H-2'), 2.61(1H, dd, $J = 14.4, 4.8$ Hz, H-1'a), 2.56(1H, dd, $J = 14.4, 7.8$ Hz, H-1'b), 1.23(3H, d, $J = 6.0$ Hz, 3'- CH_3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , 150 MHz): δ_{C} 167.1 (C-1), 156.5 (C-3), 106.4 (C-4), 103.4 (C-5),

166.5 (C-6), 102.3 (C-7), 164.5 (C-8), 99.8 (C-9), 140.9 (C-10), 43.9 (C-1'), 65.5 (C-2'), 23.7 (C-3')。以上核磁共振数据与文献 [20] 中的 de-*O*-methyladiaporthin 基本一致。

2.2 活性结果

抗氧化实验结果表明：与对照组 VE 相比，化合物 1~9 的 DPPH 自由基清除效果不显著，无抗氧化活性 (表 1)。人参根部植物毒活性实验结果发现：化合物 4~9 处理的人参根部与对照组 (体积分数为 75% 乙醇) 对比无明显差异 (图 4)，表面均无病斑出现，表明化合物 4~9 对人参根部无植物毒活性。

表 1 化合物 1~9 的抗氧化活性

化合物	IC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	化合物	IC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)
1	≥100	6	≥100
2	≥100	7	≥100
3	≥100	8	≥100
4	≥100	9	≥100
5	≥100	VE	9.072



图 4 化合物 4~9 对人参根部致病性实验结果

Figure 4 Results of pathogenicity of compounds 4-9 on roots of ginseng

3 讨论

本研究对人参红皮病菌次级代谢产物进行了初步研究。通过多种色谱分离技术首次从人参红皮病菌的大米发酵物中分离得到 9 种化合物，并通过质谱分析、核磁共振波谱分析等技术对化合物结构进行了鉴定。其中化合物 1~3 为麦角甾醇类化合物，4~9 为聚酮类化合物。文献报道^[21]：5,8-表二氧麦角甾醇-6,9(11),22-三烯-3-醇对脂多糖 (LPS) 诱导巨噬细胞 RAW264.7 产生一氧化氮 (NO) 具有中等抑制作用，表明该化合物具有一定抗炎活性。核桃酮和 4,6,8-三羟基-3,4-二氢-1(2*H*)-萘酮都属于萘酮类化合物，其中核桃酮对莴苣 *Lactuca sativa*、萝卜 *Raphanus sativus*、黄瓜 *Cucumis sativus*、洋葱 *Allium cepa* 和小麦种子萌发和幼苗生长的植物毒性研究结果表明：在低浓度时会刺激生长，高浓度时具有抑制作用^[22]；而 4,6,8-三羟基-3,4-二氢-1(2*H*)-萘酮从多种真菌的次级代谢产物中分离得到过^[23-26]，该化合物具有一定的抗真菌和抗细菌活性，对白色念珠菌 *Candida albicans* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 有中等抑制作用^[27]。2009 年周永平等^[16]首次报道了萘酮类化合物核桃酮和 4,6,8-三羟基-3,4-二氢-1(2*H*)-萘酮具有杀线虫活性。2,5-二甲基-7-羟基色酮与 2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮属于色酮类化合物，结构中的色酮环常作为关键药效基团应用于药物设计^[27]。2,5-二甲基-7-羟基色酮还具有抑制生物膜形成的能力，对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌有强抑制作用 (抑制率达 70%~80%)，对大肠埃希菌 *Escherichia coli* 和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 等革兰氏阴性菌有中等抑制作用 (抑制率为 40%~60%)^[28]。(+) -citreoisocoumarin 具有抗菌活性，能抑制金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和大肠埃希菌的生长；四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 法) 评价结果表明：(+) -citreoisocoumarin 对 2 株癌细胞系 (MDA-MB-231, HCT 116) 具有中等抑制作用^[29]。本研究也评价了所分离化合物的抗氧化活性和植物毒活性，结果显示：化合物 1~9 未表现出抗氧化活性，所测化合物 4~9 对离体人参根部没有植物毒活性。

4 结论

本研究虽然未从人参红皮病菌发酵物中获得对人参根部有植物毒活性的化合物，但从中分离得到的化合物具有多种生物活性，表明该菌株仍具有发现活性化合物的潜力。未来，可以通过大规模发酵或改

变发酵条件, 进行深入的化学成分分析、分离与结构鉴定, 以挖掘得到更多活性化合物, 丰富该菌的次级代谢产物种类, 也为人参红皮病菌病害致病因子研究提供研究基础。

5 参考文献

- [1] ZHANG Xiaoyan, TAN Xiangmei, LI Yuanyuan, *et al.* Hispidulones A and B, two new phenalenone analogs from desert plant endophytic fungus *Chaetosphaeronema hispidulum* [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2020, **73**(1): 56 – 59.
- [2] EVIDENTE A, ANDOLFI A, CIMMINO A, *et al.* Ophiobolin E and 8-epi-ophiobolin J produced by *Drechslera gigantea*, a potential mycoherbicide of weedy grasses [J]. *Phytochemistry*, 2006, **67**(20): 2281 – 2287.
- [3] MOLITOR D, LIERMANN J C, BERKELMANN-LÖHNERTZ B, *et al.* Phenguignardic acid and guignardic acid, phytotoxic secondary metabolites from *Guignardia bidwellii* [J]. *Journal of Natural Products*, 2012, **75**(7): 1265 – 1269.
- [4] KOBORI H, SEKIYA A, SUZUKI T, *et al.* Bioactive sesquiterpene aryl esters from the culture broth of *Armillaria* sp. [J]. *Journal of Natural Products*, 2015, **78**(1): 163 – 167.
- [5] LIU Mengting, SUN Weiguang, SHEN Ling, *et al.* Bipolarolides A–G: ophiobolin-derived Sesterterpenes with three new carbon skeletons from *Bipolaris* sp. TJ403-B1 [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, **58**(35): 12091 – 12095.
- [6] KUMARIHAMY M, KHAN S I, JACOB M, *et al.* Antiprotozoal and antimicrobial compounds from the plant pathogen *Septoria pistaciarum* [J]. *Journal of Natural Products*, 2012, **75**(5): 883 – 889.
- [7] LI Yuanyuan, TAN Xiangmei, WANG Yanduo, *et al.* Bioactive seco-sativene sesquiterpenoids from an artemisia desertorum endophytic fungus, *Cochliobolus sativus* [J]. *Journal of Natural Products*, 2020, **83**(5): 1488 – 1494.
- [8] WANG Yanduo, YANG Jian, LI Qi, *et al.* UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of seco-sativene sesquiterpenoids to detect new and bioactive analogues from plant pathogen *Bipolaris sorokiniana* [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, **13**: 807014[2023-01-14]. doi: 10.3389/fmicb.2022.807014.
- [9] LIU Xing, YANG Zhenming, GAO Lingling, *et al.* Comparison of the characteristics of artificial ginseng bed soils in relation to the incidence of ginseng red skin disease [J]. *Experimental Agriculture*, 2013, **50**(1): 59 – 71.
- [10] 边兴博. 人参红皮病根际土壤微生态及发生机理研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
BIAN Xingbo. *Study on Rhizosphere Soil Microecology and Mechanism of Ginseng Rusty Root Symptoms* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021.
- [11] AL-SAYED E, SINGAB A, AYOUB N, *et al.* HPLC-PDA-ESI-MS/MS profiling and chemopreventive potential of *Eucalyptus gomphocephala* DC [J]. *Food Chemistry*, 2012, **133**(3): 1017 – 1024.
- [12] LU X H, CHEN A J, ZHANG X S, *et al.* First report of *Rhexocercosporidium panacis* causing rusty root of *Panax ginseng* in northeastern China [J]. *Plant Disease*, 2014, **98**(11): 1580 – 1580.
- [13] 刘继梅. 第一部分 内生真菌 *Periconia* sp. F-31 次级代谢产物研究. 第二部分 *Stachybotrys chartarum* 中杂萜 Stachybocin A 生物合成研究[D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院, 2017.
LIU J M. *Part I: Studies on the Secondary Metabolites from Endophytic Fungus Periconia sp. F-31. Part II: Studies on the Biosynthesis of Meroterpenoid Stachybocin a in Stachybotrys chartarum* [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 2017.
- [14] 姜北, 赵勤实, 彭丽艳, 等. 雪茶化学成分研究[J]. 云南植物研究, 2002, **24**(4): 525 – 530.
JIANG Bei, ZHAO Qinshi, PENG Liyan, *et al.* Constituents from *Thamnia vermicularis* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2002, **24**(4): 525 – 530.
- [15] GULDER T A M, HONG Hanna, CORREA J, *et al.* Isolation, structure elucidation and total synthesis of lajollamide A from the marine fungus *Asteromyces cruciatus* [J]. *Marine Drugs*, 2012, **10**(12): 2912 – 2935.
- [16] 周永平, 申开泽, 董锦艳, 等. 水生真菌 YMF1.01029 毒杀线虫活性代谢产物的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2009, **34**(2): 74 – 78, 89.
ZHOU Yongping, SHEN Kaize, DONG Jinyan, *et al.* Nematicidal metabolites of the aquatic fungus *Coelomycetes* sp. YMF1.01029 [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2009, **34**(2): 74 – 78, 89.
- [17] KASHIWADA Y, NONAKA G, NISHIOKA I. Studies on rhubarb (rhei rhizoma) (V) isolation and characterization of chromone and chromanone derivatives [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1984, **32**(9): 3493 – 3500.

- [18] 张承忠, 宋龙, 李冲, 等. 单脉大黄化学成分研究[J]. *中草药*, 2005, **36**(5): 660 – 662.
ZHANG Chengzhong, SONG Long, LI Chong, *et al.* Isolation and structure identification of chemical constituents in *Rheum uninerve* Maxim [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2005, **36**(5): 660 – 662.
- [19] WATANABE A, ONO Y, FUJII I, *et al.* Product identification of polyketide synthase coded by *Aspergillus nidulans wa* gene [J]. *Tetrahedron Letters*, 1998, **39**(42): 7733 – 7736.
- [20] HALLOCK Y F, CLARDY J, KENFIELD D S, *et al.* De-*O*-methyladiaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccas* [J]. *Phytochemistry*, 1988, **27**(10): 3123 – 3125.
- [21] LIU Weiyang, CHEN Senhua, LI Jing, *et al.* A new β -tetralonyl glucoside from the *Santalum album* derived endophytic fungus *Colletotrichum* sp. GDMU-1 [J]. *Natural Product Research*, 2019, **33**(3): 354 – 359.
- [22] YANG Li, MA Xiaoyan, RUAN Xiao, *et al.* Enantioselective separation of 4, 8-dht and phytotoxicity of the enantiomers on various plant species [J/OL]. *Molecules*, 2016, **21**(4): 528 [2023-01-14]. doi: 10.3390/molecules21040528.
- [23] ZHANG Juan, LIANG Jiahao, ZHAO Jianchao, *et al.* Xylarianins A-D from the endophytic fungus *Xylaria* sp. SYPF 8246 as natural inhibitors of human carboxylesterase 2 [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2018, **81**(1): 350 – 355.
- [24] LI Luying, SUN Bingda, ZHANG G S, *et al.* Polyketides with different post-modifications from desert endophytic fungus *Paraphoma* sp. [J]. *Natural Product Research*, 2018, **32**(8): 939 – 943.
- [25] BUNYAPAIBOONSRI T, YOIPROMMARAT S, NITHITHANASILP S, *et al.* Two new farnesyl hydroquinones from *Pestalotiopsis diploclisia* (BCC 35283), the fungus associated with algae [J]. *Natural Product Research*, 2021, **37**(1): 24 – 30.
- [26] KIM K H, BEEMELMANN C, MURILLO C, *et al.* Naphthalenones and isocoumarins from a costa rican fungus *Xylariaceae* sp. CR1546C [J]. *Journal of Chemical Research*, 2014, **38**(12): 722 – 725.
- [27] KINI J H, PAI V K, BODKE Y D. Design and synthesis of some chromone derivatives of biological importance: a greener approach [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2017, **4**(11): 11894 – 11901.
- [28] QADER M M, HAMED A A, SOLDATOU S, *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of the fungal metabolites isolated from the marine endophytes *Epicoccum nigrum* m13 and *Alternaria alternata* 13a [J/OL]. *Marine Drugs*, 2021, **19**(4): 232 [2023-01-14]. doi:10.3390/md19040232.
- [29] YOUSSEF D T A, SHAALA L A, GENTA-JOUVE G. Asperopiperazines A and B: antimicrobial and cytotoxic dipeptides from a tunicate-derived fungus *Aspergillus* sp. DY001 [J/OL]. *Marine Drugs*, 2022, **20**(7): 451 [2023-01-14]. doi: 10.3390/md20070451.