

314 °C, 茛三酮反应阳性, 三氯化铁反应阳性。¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.08 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.78 (2H, d, *J* = 8.4 Hz) 为对位取代苯环上的 4 个氢信号, 3.81 (1H, m) 为氨基酸的 α 位 CH 氢信号, 3.08 (1H, m), 2.93 (1H, m) 为 β 位 CH₂ 氢信号, 推测该化合物可能为酪氨酸, 与文献数据^[12]对照一致, 与酪氨酸对照品同薄层色谱展开, R_f 值一致, 故鉴定该化合物为酪氨酸。

化合物 11: 白色无定形粉末 (水), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.81 (1H, m) 为氨基酸的 α 位 CH 氢信号, 1.80 (1H, m), 1.58 (2H, m) 分别为次甲基和亚甲基氢信号, 0.86 (6H, m) 为 2 个甲基氢信号。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175.6 (C-1), 53.8 (C-2), 40.1 (C-3), 24.4 (C-4), 22.2 (C-5), 21.2 (C-6)。以上数据与文献报道^[13-14]一致, 与亮氨酸对照品同薄层色谱展开, R_f 值一致, 故鉴定该化合物为亮氨酸。

化合物 12: 白色无定形粉末 (水), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.74 (1H, m) 为氨基酸的 α 位 CH 氢信号, 0.99 (3H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.08 (3H, d, *J* = 6.9 Hz) 为两个甲基信号, 1.25 (1H, m) 和 1.47 (1H, m) 为一个亚甲基信号, 1.76 (1H, m) 为一个次甲基信号。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 176.5 (C-1), 59.8 (C-2), 36.1 (C-3), 24.7 (C-4),

14.9 (C-5), 11.2 (C-6)。以上数据与文献数据^[13, 15]对照一致, 与异亮氨酸对照品同薄层色谱展开, R_f 值一致, 故鉴定该化合物为异亮氨酸。

参考文献:

- [1] 钟惠宏, 郑向红, 李振山. 秋葵属的种及其资源的搜集研究和利用 [J]. 中国蔬菜, 1996(2): 49-51.
- [2] Savhlo P A, Martins F, Hull W. Nutrition composition of okra seed meals [J]. *J Agric Food Chem*, 1980, 28(6): 1163-1166.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [4] 吴燕春, 谢金鲜. 黄秋葵的研究进展 [J]. 中医药学刊, 2005, 23(10): 1898-1899.
- [5] 苏国琛, 张 德, 漆淑华. 黑角珊瑚的化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1606-1609.
- [6] 叶 冠, 范明松, 黄成钢, 等. 抱茎苦蕒菜化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(21): 1613-1615.
- [7] 郇皆秀. 冬虫夏草化学成分的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学中国医学科学院, 2002.
- [8] Liu Y F, Yang X W, Wu B. Chemical constituents of the flower buds of *Tussilago farfara* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2007, 16: 288-293.
- [9] 吕子明, 姜永涛, 吴立军, 等. 人工蛹虫草子实体化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(24): 2914-2917.
- [10] 褚如朋, 付宏征, 张礼和, 等. 绿海葵中的核苷类成分 [J]. 中草药, 2001, 32(4): 289-291.
- [11] 李云磊. 几种氨基酸的合成研究 [J]. 医药化工, 2007, 12: 20-23.
- [12] 王 莉, 肖红斌, 梁鑫淼. 天麻化学成分研究(III) [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1186-1189.
- [13] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册 [M]. 第 7 分册. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [14] 孙 奕, 吕阿丽, 魏 岚, 等. 石莼的化学成分研究(II) [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(2): 135-141.
- [15] 黄胜阳, 胡世林, 石建功, 等. 酸橙花化学成分研究 [J]. 中药材, 2001, 24(12): 865-867.

潜在抗 HIV 活性内生真菌 *Epulorhiza* sp. 的化学成分研究

郭文娟^{1,2}, 郭顺星^{2*}

(1. 天津工业大学 环境与化学工程学院, 天津 300160; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所, 北京 100094)

摘 要: 目的 探讨内生真菌 *Epulorhiza* sp. 中抗 HIV 活性成分。方法 应用微生物培养的方法获得内生真菌菌丝体, 再用溶剂提取, 各种柱色谱和重结晶的方法分离内生真菌中的化学成分, 通过理化常数测定及波谱学方法鉴定化合物的结构。结果 从内生真菌的醋酸乙酯部位分离得到 11 个单体化合物, 分别为吡咯嗪(1, 2a)-3, 6-二酮六氢吡嗪(1)、(3*R*, 8*aR*)-hexahydro-3-(2-methylpropyl)-pyrrolo (1, 2a)-pyrazine 1, 4-dione (2)、核黄素(3)、3-羧基吡啶(4)、2-羟基-4-氧-3, 4, 5, 6-四氢嘧啶(5)、腺苷(6)、胸腺嘧啶(7)、尿嘧啶核苷(8)、鸟嘌呤核苷(9)、4, 4-二甲基-1, 7-庚二酸(10)、α-棕榈精(11)。结论 所有化合物皆为首次从该属真菌中分得, 其中 3-羧基吡啶据文献报道有抗 HIV 活性。

关键词: 金钱莲; 内生真菌; 抗 HIV

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1773-03

①收稿日期: 2010-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30325047)

作者简介: 郭文娟(1980-), 女, 吉林人, 博士, 现为天津工业大学讲师, 从事天然产物化学的教学与科研工作。

Tel: (022) 24528055 E-mail: guowenjuan@yahoo.cn

* 通讯作者 郭顺星

近年来,艾滋病感染人数急剧增加,已成为人类的第四大死亡原因。然而,现有的抗 HIV 化学药物存在不良反应大、口服利用度低、成本高等缺点,因此寻找新的高效低毒的抗 HIV 药物是当务之急^[1]。本实验室从兰科开唇兰属珍稀濒危药用植物金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 中分离筛选到一种具有抗 HIV 活性的内生真菌 *Epulorhiza* sp., 其发酵提取物在 MT/HIV-1SF₃₃ 培养体系中对细胞显示出保护作用,选择指数>3。为了进一步探索该真菌中抗 HIV 活性成分,本实验进行了该真菌的发酵培养和化学成分研究,分离得到 11 个单体化合物,分别为吡咯嗪(1, 2a)-3, 6-二酮六氢吡嗪(1)、(3*R*, 8*aR*)-hexahydro-3-(2-methylpropyl)-pyrrolo (1, 2a)-pyrazine-1, 4-dione (2)、核黄素(3)、3-羧基吡啶(4)、2-羟基-4-氧-3, 4, 5, 6-四氢嘧啶(5)、腺苷(6)、胸腺嘧啶(7)、尿嘧啶核苷(8)、鸟嘌呤核苷(9)、4, 4-二甲基-1, 7-庚二酸(10)、 α -棕榈精(11)。所有化合物皆为首次从该属真菌中分得,其中 3-羧基吡啶据文献报道有抗 HIV 活性。

1 材料与仪器

1.1 菌种:瘤菌根菌属 *Epulorhiza* sp. 真菌,由郭顺星研究员鉴定,由本实验室提供,保存在麦麸斜面培养基上。

1.2 培养基:麦麸液体培养基:麦麸 3%(煮 30 min 取汁),葡萄糖 2%, KH₂PO₄ 0.3%, MgSO₄ 0.15%。

麦麸固体培养基:上述麦麸液体培养基加琼脂 0.8%~1.0%。

1.3 仪器与试剂:X-4 型熔点仪;VARIAN INOVA 600/500 型核磁共振仪;Micromass Zabspec 质谱仪;TCQ-250 超声波清洗器;Heidolph wb2000 型旋转浓缩仪;SHZ-3 型循环水式真空泵。

100~200 目粗孔硅胶(青岛海洋化工厂),200~300 目粗孔硅胶(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20 凝胶(Pharmacia 公司);石油醚、氯仿、醋酸乙酯、丙酮、甲醇、正丁醇均为北京化工厂产品;显色剂:香草醛、浓硫酸、碘、10% 磷钼酸等;所用试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 发酵工艺流程:试管斜面菌种→平板菌种→三角瓶液体种子→300 L 种子罐培养。

2 000 L 发酵罐培养(板框过滤)→发酵液→浓缩→菌丝体→干燥

2.2 提取与分离:菌丝体 11 kg 用 95% 乙醇提取 3 次,每次 3 h,滤过,合并提取液,减压浓缩得菌丝体乙醇提取物 1.8 kg。水分散后,以等体积石油醚、

醋酸乙酯、正丁醇分别萃取,依次得 4 个极性部位:菌丝体乙醇提取物的石油醚部位 900 g、醋酸乙酯部位 160 g、正丁醇部位 150 g、水部位 560 g。醋酸乙酯部位分别用硅胶、聚酰胺、Sephadex LH-20 凝胶色谱分离,得化合物 1~11。

3 结构鉴定

化合物 1:白色晶体(16 mg), mp 216~218 °C。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ 4.13(1H, s, H-2), 3.93(1H, dd, J = 17.5, 4.5 Hz, H-5a), 4.12(1H, d, J = 4.5 Hz, H-5b), 2.42(1H, m, H-7a), 2.10(1H, m, H-7b), 1.98(1H, m, H-8a), 2.06(1H, m, H-8b), 3.67(1H, m, H-9a), 3.58(1H, m, H-9b); ¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃) δ 58.5(C-2), 169.8(C-3), 46.6(C-5), 163.4(C-6), 28.4(C-7), 22.4(C-8), 45.3(C-9)。以上数据与文献报道的吡咯嗪(1, 2a)-3, 6-二酮六氢吡嗪的数据^[2]一致,推定该化合物为吡咯嗪(1, 2a)-3, 6-二酮六氢吡嗪。

化合物 2:白色针晶(6 mg), mp 146~148 °C。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ 4.14(1H, s, H-2), 4.02(1H, dd, J = 9.5, 3 Hz, H-5), 2.35(1H, m, H-7a), 2.13(1H, m, H-7b), 1.91(1H, m, H-8a), 2.03(1H, m, H-8b), 3.61(1H, m, H-9a), 3.55(1H, m, H-9b), 1.55(1H, m, H-10a), 2.05(1H, m, H-10b), 1.91(1H, m, H-11), 1.01(3H, d, J = 6.5 Hz, H-12), 0.96(3H, d, J = 6.5 Hz, H-13); ¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃) δ 58.9(C-2), 170.3(C-3), 53.4(C-5), 166.2(C-6), 28.0(C-7), 22.7(C-8), 45.4(C-9), 38.5(C-10), 24.6(C-11), 23.3(C-12), 21.2(C-13)。以上数据与文献报道的(3*R*, 8*aR*)-hexahydro-3-(2-methylpropyl)-pyrrolo (1, 2a)-pyrazine-1, 4-dione 的数据^[3]一致,故推定该化合物为(3*R*, 8*aR*)-hexahydro-3-(2-methylpropyl)-pyrrolo (1, 2a)-pyrazine-1, 4-dione。

化合物 3:黄色粉末(5 mg), mp 257~259 °C, 分子式为 C₁₇H₂₀N₄O₆; EIMS m/z : 376[M]⁺, 360, 315, 285, 256, 242, 213, 171; ¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.33(1H, s, H-3), 7.92(1H, s, H-6), 7.89(1H, s, H-9), 2.40(3H, s, CH₃-7), 2.48(3H, s, CH₃-8), 4.94(1H, m, H-1'a), 4.63(1H, m, H-1'b), 3.63(1H, m, H-2'), 4.26(1H, m, H-3'), 3.64(1H, m, H-4'), 3.62(1H, m, H-5'); ¹³C-NMR(150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.4(C-2), 159.9(C-4), 130.6(C-6), 132.0(C-7), 135.6(C-8), 117.4(C-9), 133.9(C-11), 145.9(C-12), 150.8(C-13), 136.7(C-

14), 20.7 (CH₃-7), 18.7 (CH₃-8), 47.2 (C-1'), 68.7 (C-2'), 73.5 (C-3'), 72.7 (C-4'), 63.3 (C-5')。以上数据与文献报道的核黄素光谱数据^[4]一致, 推定该化合物为核黄素。

化合物 4: 黄绿色结晶 (28 mg), mp 232~234 °C; 分子式为 C₉H₇NO₂; EIMS m/z : 161 ([M]⁺, 100%), 其他碎片离子还有 144, 132, 116; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.97 (1H, ddd, J = 8.4, 2.4, 0.6 Hz, H-5), 7.84 (1H, s, H-2), 7.33 (1H, ddd, J = 8.4, 2.4, 0.6 Hz, H-8), 7.08 (2H, m, H-6, 7)。¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 169.5 (C-10), 139.2 (C-9), 133.3 (C-2), 127.8 (C-3), 123.5 (C-5), 122.4 (C-7), 122.0 (C-6), 112.8 (C-8), 108.8 (C-4), 波谱数据与 3-羧基吡啶标准谱图^[56]完全一致, 推知为 3-羧基吡啶。

化合物 5: 无色晶体 (5 mg), mp 274~276 °C。EIMS m/z : 114 [M]⁺, 分子式为 C₄H₆N₂O₂。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.68 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-5), 3.45 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-6), 以上数据与 2-羟基-4-氧-3,4,5,6-四氢嘧啶标准谱图^[56]对照完全一致, 推定该化合物为 2-羟基-4-氧-3,4,5,6-四氢嘧啶。

化合物 6: 黄色晶性粉末 (53 mg), mp 235~237 °C, 分子式为 C₁₀H₁₃N₅O₄。EIMS m/z : 267 [M]⁺, 237 [M - CH₂O]⁺, 178, 148, 135, 108。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 8.25 (1H, s, H-6), 8.46 (1H, s, H-2); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 152.4 (C-2), 149.1 (C-4), 119.4 (C-5), 156.2 (C-6), 140.0 (C-8), 88.0 (C-1'), 73.5 (C-2'), 70.7 (C-3'), 86.0 (C-4'), 61.7 (C-5')。以上数据与文献报道的腺苷波谱数据^[7]一致, 推定该化合物为腺苷。

化合物 7: 无色粉末 (20 mg), mp 308~310 °C, 分子式为 C₅H₆N₂O₂; EIMS m/z : 126 [M]⁺, 112, 83, 55, 43。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.3 (C-4), 153.3 (C-2), 142.8 (C-6), 109.5 (C-5), 13.5 (5-CH₃)。以上数据与文献报道胸腺嘧啶波谱数据^[8]一致, 推定该化合物为胸腺嘧啶。

化合物 8: 白色结晶性粉末 (50 mg), mp 164~166 °C, 分子式为 C₉H₁₂N₂O₆; EIMS m/z : 112 (苷元), 73, 69, 57。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 5.67 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5), 7.98 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-6), 11.34 (1H, s, NH), 5.81 (1H, d, J = 5.43 Hz, H-1'), 4.07 (1H, m, H-2'), 3.96 (1H, m, H-3'), 3.91 (1H, m, H-4'), 3.55 (1H, m, H-5'a),

3.62 (1H, m, H-5'b)。以上数据与文献报道的尿嘧啶核苷光谱数据^[9]一致, 确定该化合物为尿嘧啶核苷。

化合物 9: 白色粉末 (55 mg), mp 240~242 °C, 分子式为 C₁₀H₁₃N₅O₅; EIMS m/z : 283 [M]⁺, 207, 185, 152; ¹³C-NMR (150 MHz, D₂O) δ: 153.6 (C-2), 151.2 (C-4), 116.6 (C-5), 156.6 (C-6), 135.5 (C-8), 86.3 (C-1'), 70.3 (C-2'), 73.6 (C-3'), 85.1 (C-4'), 61.3 (C-5')。以上数据与文献报道鸟嘌呤核苷波谱数据^[9]一致, 推定该化合物为鸟嘌呤核苷。

化合物 10: 白色晶体 (28 mg), mp 104~107 °C; 分子式为 C₉H₁₆O₄; EIMS m/z : 171 (M - OH), 152 (M - 2H₂O, 100%); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 2.18 (2 × 2H, t, J = 7.2 Hz, 2, 6-CH₂), 1.51 (2 × 2H, t, J = 7.2 Hz, 3, 5-CH₂), 1.25 (2 × 3H, br s, 2 × CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 26.0 (C-8, 9, 4), 30.0 (C-3, 5), 34.9 (C-2, 6), 177.7 (C-1, 7)。TLC 检测结果, R_f 值与 4,4-二甲基-7-庚二酸相同, 故推断该化合物为 4,4-二甲基-7-庚二酸。

化合物 11: 白色粉末 (30 mg), mp 69~71 °C; 氢谱和碳谱数据与文献报道 α-棕榈精波谱数据^[10]一致, 推测该化合物为 α-棕榈精。

4 结语

从金线莲的内生真菌 *Epulorhiza* sp. 中分离得到 11 个单体化合物, 所有化合物皆为首次从该属真菌中分得。其中 3-羧基吡啶具有明确的抗 HIV 病毒的活性^[11]; 吡咯嗪 (1, 2a)-3, 6-二酮六氢吡嗪具有抗心律失常的作用^[4], 还有多种核苷及其的类似物, 其活性有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王 鹏, 徐 洁, 黄文龙. 抗 HIV 药物研究进展及发展趋势 [J]. 海峡药学, 2008, 20(1): 1-5
- [2] 秦文娟, 孔庆芬, 范志同, 等. 掌叶半夏化学成分的研究 [J]. 中草药, 1984, 15(11): 10-12
- [3] Adamczeski M, Reed A R, Crews P. New and known dike topiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx* CF. *podactypa* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(2): 201-208
- [4] 田宝泉, 杨益平, 何值升, 等. 苦瓜水溶性部位化学成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 657-658
- [5] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册 [M]. 第 7 分册. 第 2 版, 北京: 化学工业出版社, 2000
- [6] 丛浦珠, 苏克曼. 分析化学手册 [M]. 第 9 分册. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2000
- [7] 崔东滨, 严铭铭, 王叔琴, 等. 平贝母茎叶化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(5): 298
- [8] 邹峥嵘, 易杨华, 姚新生, 等. 海地瓜化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 348-350
- [9] 杨学东, 徐丽珍, 杨世林. 蝉翼藤化学成分研究 [J]. 药学报, 2002, 37(5): 348-351
- [10] 何 萍, 李 帅, 王素娟, 等. 半夏化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 671-674
- [11] Buschi C A, Pomilio A B, Gros E G. 5, 6, 7-T risubstituted flavones from *Gomphrena martiana* [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(5): 1178-1179