

霸王鞭内生真菌烟曲霉中 1 个新的生物碱类化合物

陈彦君, 祝丽君, 于红梅, 侯雨婷, 陈毅坚, 杜 刚, 周 敏, 叶艳青*, 董 淼*

云南民族大学化学与环境学院, 云南民族大学民族药资源化学国家民委教育部重点实验室, 云南 昆明 650500

摘 要: 目的 研究霸王鞭 *Euphorbia royleana* 内生真菌烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 的次生代谢产物。方法 运用多种色谱方法对菌株发酵液醋酸乙酯萃取部分进行分离纯化, 采用波谱分析方法对化合物的结构进行鉴定。结果 从烟曲霉次生代谢产物中分离得到 3 个化合物, 分别鉴定为 (*R*)-2-丙基己基-2*H*-1,2,3-三唑-4-羧酸酯 (**1**)、decumbenone A (**2**) 和圆弧菌醇 (**3**)。结论 化合物 **1** 为新化合物, 命名为烟曲霉三唑酯 A。

关键词: 霸王鞭; 烟曲霉; 内生真菌; 次生代谢产物; (*R*)-2-丙基己基-2*H*-1,2,3-三唑-4-羧酸酯; 烟曲霉三唑酯 A; 圆弧菌醇
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5400-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.003

A new alkaloid from endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* of *Euphorbia royleana*

CHEN Yan-jun, ZHU Li-jun, YU Hong-mei, HOU Yu-ting, CHEN Yi-jian, DU Gang, ZHOU Min, YE Yan-qing, DONG Miao

Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, School of Chemistry and Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from *Euphorbia royleana*.

Methods The fermentation liquor of the fungal strain *A. fumigatus* was isolated and purified using various chromatographic methods. The structures of the compounds were identified by spectroscopic analysis. **Results** Three compounds were isolated and their structures were identified as (*R*)-2-propylhexyl-2*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**1**), decumbenone A (**2**), and (+)-cyclopentol (**3**).

Conclusion Compound **1** is a new compound isolated from this fungus, which is identified as aspergillus triazolate A.

Key words: *Euphorbia royleana* Boiss.; *Aspergillus fumigatus*; endophytic fungus; secondary metabolites; (*R*)-2-propylhexyl-2*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate; aspergillus triazolate A; (+)-cyclopentol

植物内生菌是一种新型的微生物资源, 是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生存于健康植物的各种组织和器官内部的微生物^[1]。其独特的生存环境造就了它们独特的代谢机制, 从而决定了其次生代谢产物具有化学结构和生物活性的多样性。近年来, 从植物内生真菌中寻找药物的先导化合物成为创新药物研究最活跃的领域之一^[2-3]。霸王鞭 *Euphorbia royleana* Boiss. 是大戟科大戟属肉质灌木, 具丰富的乳汁。在我国主要分布于广西、四川和云南。该种全株及乳汁入药, 具祛风、消炎、解

毒之效, 目前已有文献报道从霸王鞭中分离得到具有活性的二萜、三萜、酚类和甾醇类化合物^[4-6], 但未见关于其植物内生真菌的次生代谢产物的研究报告。因此, 从霸王鞭中分离内生真菌, 再发酵分离其次级代谢产物, 并从中寻找新型活性化合物具有科学意义。

烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 为丛梗孢科 (Moniliaceae) 曲霉属 *Aspergillus* 真菌, 目前已经从海洋、土壤和植物中分离得到该菌株, 其代谢产物烟曲霉震颤素 A、B、C, 生物碱类, 硫代二酮哌嗪

收稿日期: 2019-06-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31560099); 国家自然科学基金资助项目 (31860099); 云南省高校科技创新团队支持计划

作者简介: 陈彦君 (1996—), 女, 硕士在读, 主要从事中药及天然药物活性成分研究

*通信作者 叶艳青, 女, 教授, 硕士生导师。Tel: 18087555237 E-mail: yey-qing@163.com

董 淼, 女, 博士, 主要从事中药及天然药物活性成分研究。Tel: 18184837677 E-mail: dmmiao@foxmail.com

类化合物具有较好的抗肿瘤活性和细胞毒活性^[7-10]。本实验从烟曲霉的次生代谢产物中分离出 2 个生物碱类化合物和 1 个酚类化合物, 分别鉴定为 (*R*)-2-丙基己基-2*H*-1,2,3-三唑-4-羧酸酯 [(*R*)-2-propylhexyl-2*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate, **1**]、decumbenone **A** (**2**) 和圆弧菌醇 [(+)-cyclophenol, **3**]。其中化合物 **1** 为新的三唑类生物碱, 命名为烟曲霉三唑酯 **A**。

1 材料与仪器

UV-2401A 紫外光谱仪 (日本岛津公司); Agilent-1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Ultimate XB-phenyl 半制备色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm, 天津博纳艾尔科技有限公司); DLSB-5 L/25 低温冷却液循环泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); Hei-VAP Value Digital 型旋转蒸发器、Rotavac Valve Control 型循环水式真空泵 (德国 heidolph 公司); DRX-400 型核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司), VG AutoSPE-3000 光谱仪 (德国斯派克分析仪器公司)。MCI-gel CHP-20P 材料 (日本三菱公司); 硅胶 (100~200、200~300 目)、GF₂₅₄ 硅胶板 (100 mm×100 mm), 青岛海洋化工有限公司; 5% H₂SO₄ 乙醇溶液 (天津天泰精细化学品有限公司) 作为薄层色谱显色剂; AR 级甲醇、丙酮 (天津天泰精细化学品有限公司); 工业级乙醇、醋酸乙酯、二氯甲烷、甲醇 (瑞祥化玻教仪研发有限公司)。

霸王鞭采集于云南省宣威市, 经云南民族大学陈毅坚教授鉴定为大戟科大戟属植物霸王鞭 *Euphorbia royleana* Boiss., 菌株从新鲜的大戟科植物霸王鞭的根部分离, 由陈毅坚教授进行分子鉴定, 经显微镜观察, 并对比资料后鉴定为曲霉属真菌烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*, 现保存于云南民族大学民族药资源化学重点实验室。

2 发酵、提取与分离

2.1 菌株的发酵

将保存在斜面马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基中的烟曲霉接种至液体 PDA 培养基中, 液体培养基装 150~250 mL 锥形瓶中, 封口高温灭菌 20 min, 冷却至室温, 接种后放置在全温振荡培养箱中, 160 r/min、28 °C 进行培养, 10 d 后取出。将发酵液以 1:10 的比例分别加入已灭菌的大米培养基中 (50 罐 500 mL 发酵罐), 25 °C 培养 60 d。待菌丝长满大米培养基后捣碎, 用乙醇浸泡提取 3 次, 每次 2 d, 旋干后用水与醋酸乙酯 (1:1) 萃取 5 次, 合并醋酸

乙酯相蒸干得到浸膏 40 g。

2.2 提取与分离

浸膏经硅胶柱色谱用二氯甲烷-甲醇 (100:0、80:1、50:1、30:1、20:1、10:1、1:1、0:100) 梯度洗脱得到 13 个组分 Fr. A~M。将 B 段经硅胶柱色谱, 石油醚-二氯甲烷 (10:1、5:1、2:1、1:2、0:100) 梯度洗脱得到 4 个组分 (Fr. B-1~B-4)。Fr. B-1 通过 Agilent-1260 型高效液相色谱仪进行 HPLC 分离, 样品用甲醇溶解, 以 98% 甲醇水作为流动相, 用 Ultimate XB-phenyl 半制备色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm) 分离, 体积流量 3 mL/min, 得到化合物 **1** (*t_R* = 5.6 min, 20.0 mg)、**2** (*t_R* = 7.8 min, 35.7 mg)、**3** (*t_R* = 13.2 min, 14.3 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色油状化合物, $[\alpha]_D^{25} -6.15^\circ$ (*c* 0.001, MeOH); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 256 (3.89), 203 (3.77); ESI-MS *m/z*: 240 [*M*-H]⁻, HR-ESI-MS *m/z*: 240.310 7 [*M*-H]⁻, 结合其 ¹³C- 和 ¹H-NMR 谱确定分子式为 C₁₂H₂₁N₃O₂, 不饱和度为 4, 化合物的 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 DEPT 数据 (表 1) 显示了 12 个碳信号和 12 个氢信号。从 ¹H-NMR 谱观察到三唑环上的 C-H 以及 N-H 重叠的信号 δ_H 8.31 (2H, s), 1 个次甲基信号 δ_H 1.69 (1H, hept, *J* = 6.1 Hz), 5 个亚甲基信号 δ_H 1.41 (2H, m), 1.35 (2H, m), 1.32 (2H,

表 1 化合物 **1** 的核磁共振数据 (400/100 MHz, C₅D₅N)
Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound **1** (400/100MHz, C₅D₅N)

碳位	δ_C	δ_H
NH		8.31 (s)
4	135.2 s	
5	130.4 d	8.31 (s)
6	166.3 s	
1'	68.3 t	4.35 (m)
2'	39.6 d	1.69 (hept, <i>J</i> = 6.2 Hz)
3'	30.4 t	1.32 (m)
4'	29.6 t	1.27 (m)
5'	23.6 t	0.87 (m)
		1.26 (m)
6'	14.6 q	0.86 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz)
1''	31.2 t	1.35 (m)
2''	24.6 t	0.91 (m), 1.41 (m)
3''	11.6 q	0.91 (t, <i>J</i> = 5.2 Hz)

m), 1.27 (2H, m), 1.26 (2H, m)。观察其 ^{13}C -NMR 谱显示 1 个羰基信号 (δ_{C} 166.3)、2 个烯碳信号 (δ_{C} 135.2, 130.4)、1 个连氧的 CH_2 信号 (δ_{C} 68.3)、1 个次甲基信号 (δ_{C} 39.6)、5 个亚甲基信号 (δ_{C} 31.2, 30.4, 29.6, 24.6, 23.6)、2 个甲基信号 (δ_{C} 14.6, 11.6)。这些特征信号与文献报道^[11]的化合物 (*R*)-2-ethylhexyl-2*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate 非常相似, 不同之处是在已知化合物的基础上化合物 **1** 的侧链多了 1 个亚甲基, 这一推测通过 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关得到确认 (图 1)。从 HMBC 谱中观测到 H-2'' (δ_{H} 1.41) 与 C-3'' (δ_{C} 11.6)、C-1'' (δ_{C} 31.2) 和 C-2' (δ_{C} 39.6) 相关, H-1' (δ_{H} 4.35) 与 C-1'' (δ_{C} 31.21) 有相关, 从而确定了多出来亚甲基是 C-1'' 位。从 COSY 谱中观察到 H-1'/H-2'/H-1''/H-2''/H-3'' 的相关, 从而佐证了多出来的亚甲基是连在 C-2' 位的。H-2' 的相对构型可根据其氢谱偶合常数 [δ_{H} 1.69 (1H, hept, $J = 6.1$ Hz)] 与已知化合物 (δ_{H} 1.73 hept, $J = 6.2$ Hz) 的相比相同, 从而确定 H-2' 的相对构型也为 β 构型。根据其旋光数据为负, 判断其为左旋^[11]。至此, 化合物 **1** 的结构得以确认, 为 (*R*)-2-丙基己基-2*H*-1,2,3-三唑-4-羧酸酯, 为 1 个新化合物, 命名为烟曲霉三唑酯 A。

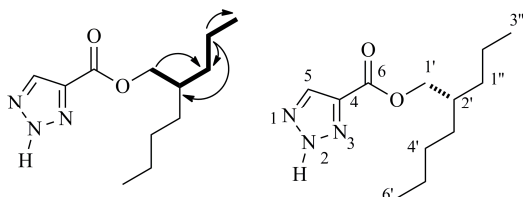


图 1 化合物 **1** 的结构及主要 HMBC (箭头) 和 ^1H - ^1H COSY (实线) 相关

Fig. 1 Structure and key HMBC (solid arrows) and ^1H - ^1H COSY (bold lines) correlations of compound **1**

化合物 **2**: 无色油状液体, ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.95 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-11), 5.61 (1H, s, H-9), 5.37 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-12), 4.25 (1H, m, H-6), 3.85 (2H, m, H-1), 3.07 (1H, ddd, $J = 17.3, 7.0, 5.8$ Hz, H-2), 2.95 (1H, dt, $J = 2.9, 3.4$, H-5), 2.87 (1H, ddd, $J = 17.3, 7.0, 5.8$ Hz, H-2), 2.55 (1H, m, H-8), 1.88 (1H, ddt, $J = 13.6, 1.3, 4.3$ Hz, H-7), 1.48 (3H, s, H-15), 1.26 (1H, ddd, $J = 13.3, 11.3, 4.5$ Hz, H-7), 1.14 (3H, s, H-14), 1.04 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-16); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 216.0 (C-3), 134.9 (C-12), 134.2 (C-9), 132.7 (C-10), 129.6 (C-11),

75.4 (C-13), 67.2 (C-6), 58.8 (C-1), 58.6 (C-4), 45.2 (C-2), 43.4 (C-5), 40.7 (C-7), 26.8 (C-14), 26.6 (C-8), 21.6 (C-16), 14.8 (C-15)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **2** 为 decumbenone A。

化合物 **3**: 无色片状晶体 (甲醇), ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.56 (1H, m, H-8), 7.17 (1H, m, H-9), 7.16 (1H, m, H-7), 7.15 (1H, m, H-6), 7.01 (1H, dd, $J = 7.7, 7.7$ Hz, H-17), 6.70 (1H, dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, H-16), 6.15 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H-14), 6.11 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-18), 4.08 (1H, s, H-10) 3.19 (3H, s, H-19); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 168.6 (C-2), 168.4 (C-5), 158.4 (C-15), 136.4 (C-11), 134.0 (C-8), 133.5 (C-13), 132.2 (C-6), 130.2 (C-17), 128.0 (C-12), 126.1 (C-7), 122.3 (C-9), 118.5 (C-18), 117.1 (C-16), 113.9 (C-14), 71.7 (C-3), 65.9 (C-10), 31.7 (C-19)。其波谱数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **3** 为圆弧菌醇。

4 讨论

本实验对大戟科植物霸王鞭内生真菌烟曲霉的次生代谢产物的化学成分进行研究, 运用多种分离纯化技术和鉴定技术, 从烟曲霉发酵液的 95%乙醇提取物中发现了 1 个新的生物碱类化合物, 为深入了解大戟科植物内生真菌的次生代谢产物化学成分提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] 靳 锦, 赵 庆, 张晓梅, 等. 植物内生菌活性代谢产物最新研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2018, 38(3): 103-113.
- [2] 王举涛, 张培良, 王 刚, 等. 凤丹内生真菌 *Fusarium oxysporum* 次生代谢产物的研究 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5247-5253.
- [3] 王举涛, 马宗慧, 王国凯, 等. 亳芍内生真菌 *Alternaria alternata* 次生代谢产物的研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1061-1065.
- [4] 王 虹, 赵 明, 张树军. 霸王鞭化学成分的研究 [J]. 齐齐哈尔大学学报: 自然科学版, 2013, 29(1): 73-75.
- [5] 杨大松, 李资磊, 魏建国, 等. 霸王鞭的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2039-2043.
- [6] Banjar M F S, Mohamed G A, Ibrahim A, et al. Cycloschimperols A and B, new cytotoxic cycloartane triterpenoids from *Euphorbia schimperi* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 32(4): 90-95.
- [7] 孔 阳, 马养民, 王佳运, 等. 一株烟曲霉抗植物病原菌活性次生代谢产物的研究 [J]. 东北农业科学, 2019, 44(2): 34-38.

- [8] 李娟, 陈中华, 华梅, 等. 蒜头果中植物内生真菌烟曲霉的抗菌活性研究 [J]. 西部林业科学, 2018, 47(4): 89-94.
- [9] 陈雷, 赵旻, 叶烨, 等. 藏菖蒲烟曲霉的化学成分 [J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(5): 918-923.
- [10] 韩小贤, 许晓妍, 崔承彬, 等. 海洋真菌烟曲霉 H1-04 发酵液中的硫代二酮哌嗪类产物及其抗肿瘤活性 [J]. 中国药物化学杂志, 2007, 17(3): 155-159.
- [11] Nguyen N T, Dang P H, Vu c X T, *et al.* Quinoliniumolate and 2H-1,2,3-triazole derivatives from the stems of *Paramignya trimera* and their α -glucosidaseinhibitory activities: *In vitro* and in silico studies [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(8): 2151-2155.
- [12] Fujii Y, Asahara M, Ichinoe M, *et al.* Fungal melanin inhibitor and related compounds from *Penicillium decumbens* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(7): 703-708.
- [13] Li J, Wang J, Jiang C S, *et al.* (+)-Cyclopenol, a new naturally occurring 7-membered 2,5-dioxopiperazine alkaloid from the fungus *Penicillium sclerotiorum* endogenous with the Chinese mangrove *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(5): 542-548.