

滇重楼内生真菌米曲霉中2个新的 α -吡喃酮类化合物

于红梅¹, 侯雨婷¹, 祝丽君¹, 陈彦君¹, 陈毅坚², 董淼², 周敏², 沈迪¹, 陈名红^{3*}, 叶艳青^{1*}

1. 云南民族大学化学与环境学院, 云南 昆明 650500

2. 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

3. 云南民族大学生物材料绿色制备技术国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 研究滇重楼内生真菌米曲霉 *Aspergillus oryzae* 次生代谢产物的化学成分及结构。方法 将米曲霉采用液体发酵方式发酵, 萃取后运用多种色谱方法进行分离纯化, 并根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构。结果 从滇重楼内生真菌米曲霉发酵产物中分离鉴定了4个化合物, 分别鉴定为4-羟基-6-[(2*S*,3*S*)-3-羟基丁烷-2-基]-3-甲基-2*H*-吡喃-2-酮(1)、(*R*)-4-羟基-6-(1-羟基-2-甲基丙基)-3-甲基-2*H*-吡喃-2-酮(2)、flufuran(3)、flufuran methyl ester(4)。结论 化合物1、2为新的 α -吡喃酮类化合物, 命名为米曲霉 α -吡喃酮A和米曲霉 α -吡喃酮B。

关键词: 滇重楼; 内生真菌; 米曲霉; 次生代谢产物; α -吡喃酮; 米曲霉 α -吡喃酮A; 米曲霉 α -吡喃酮B

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-4891-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.006

Two new α -pyronoids from endophytic fungus *Aspergillus oryzae* derived from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

YU Hong-mei¹, HOU Yu-ting¹, ZHU Li-jun¹, CHEN Yan-jun¹, CHEN Yi-jian², DONG Miao², ZHOU Min², SHEN Di¹, CHEN Ming-hong³, YE Yan-qing¹

1. School of Chemistry and Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

2. National and Local Joint Engineering Research Center for Green Preparation Technology of Bio-based Materials, Kunming 650500, China

3. Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, Kunming 650500, China

Abstract: **Objective** To study the chemical composition and structure of the secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus oryzae* from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Methods** *A. oryzae* was fermented by liquid fermentation. After extraction, it was separated and purified by various chromatography methods. The structure of the compounds was identified according to the physical and chemical properties and spectral data. **Results** Four compounds were isolated and their structures were identified as 4-hydroxy-6-[(2*S*,3*S*)-3-hydroxybutan-2-yl]-3-methyl-2*H*-pyran-2-one (1), (*R*)-4-hydroxy-6-(1-hydroxy-2-methylpropyl)-3-methyl-2*H*-pyran-2-one (2), flufuran (3) and flufuran methyl ester (4). **Conclusion** Compounds 1 and 2 are new α -pyronoids named asper- α -pyranone A and asper- α -pyranone B.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.; endophytic fungi; *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn; secondary metabolites; α -pyronoids; asper- α -pyranone A; asper- α -pyranone B

植物内生真菌是指一定周期或部分周期生活于植物体内, 被认为与其寄主互利共生, 寄主植物提供养分给内生真菌, 而内生真菌又能产生生物活性物

收稿日期: 2020-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560099); 国家自然科学基金项目(31860099); 云南民族大学大学生创新创业训练项目; 云南民族大学化学学科博士点培育项目(BSD-HX-2019-20)

作者简介: 于红梅, 硕士在读, 主要从事中药及天然药物活性成分研究。E-mail: 2450272711@qq.com

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

陈名红, 副教授, 硕士生导师。Tel: 13577002056 E-mail: cmhkm99@163.com

质,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,成为近年来发现新天然产物的重要来源^[1-4]。

滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 为百合科重楼属植物,具有消炎抑菌、抗肿瘤、止血等作用,其活性物质主要为薯蓣皂苷和偏诺皂苷等甾体皂苷类成分,是云南白药、季德胜蛇药、热毒清、宫血宁等多种中成药的主要原料,用途非常广泛^[5-6]。当前,重楼的发展面临野生资源消耗过快、人工种植种苗繁育技术难度大、生长周期长等难题。这些特性使得重楼成为当前药用植物内生菌的研究热点植物之一,重楼内生菌的研究对于其资源保护和开发利用具有非常重要的意义^[7]。

米曲霉 *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn 属半知菌亚门丝孢纲丝孢目从梗孢科,是曲霉属真菌中的一个常见种。其在我国以及整个亚洲地区的发酵食品中都有着非常广泛的应用,从其发酵产物中分离得到的化合物有百余种,有真菌毒素,也有生物碱类等化学成分^[8-12]。本研究对来自云南大理的滇重楼进行内生真菌培养,分离培养得到的米曲霉次生代谢产物,前期得到 1 个新的聚酮类化合物米曲霉聚酮 A^[13]。此次培养得到的米曲霉次生代谢产物中分离得到 4 个化合物,分别鉴定为 4-羟基-6-[(2*S*,3*S*)-3-羟基丁烷-2-基]-3-甲基-2*H*-吡喃-2-酮 (4-hydroxy-6-[(2*S*,3*S*)-3-hydroxybutan-2-yl]-3-methyl-2*H*-pyran-2-one, **1**)、(*R*)-4-羟基-6-(1-羟基-2-甲基丙基)-3-甲基-2*H*-吡喃-2-酮[(*R*)-4-hydroxy-6-(1-hydroxy-2-methylpropyl)-3-methyl-2*H*-pyran-2-one, **2**]、flufuran (**3**)、flufuran methyl ester (**4**),其中化合物 **1**、**2** 为新化合物,命名为米曲霉 α -吡喃酮 A 和米曲霉 α -吡喃酮 B。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Agilent-1200 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 μ m; 天津博纳艾杰尔科技有限公司); Bruker AV III-400 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Autospec-3000 型质谱仪 (英国 VG 公司); Autopol V 型旋光测定仪 (美国鲁道夫公司); UV-2401A 型紫外分光光度计 (日本岛津股份有限公司); DLSB-5 L/25 型低温冷却液循环泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); Hei-VAP Value Digital 型

旋转蒸发仪、Rotavac Value Control 型循环水式真空泵 (德国 Heidolph 公司); 柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目) 和 GF₂₅₄ (100 mm×100 mm) 硅胶板均为青岛海洋化工厂生产; D 101 型大孔树脂 (天津普拉德生物科技有限公司); 工业用乙醇、醋酸乙酯、甲醇、二氯甲烷 (呈贡祥化玻璃仪器厂); AR 级甲醇 (天津天泰精细化学品有限公司); 薄层色谱显色剂为 10% H₂SO₄ 乙醇溶液; BR 级 *D*-色氨酸 (上海圻明生物科技有限公司); 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 发酵所用水为灭菌后的自来水。

1.2 药材

本实验所用菌株是于 2012 年从产自云南大理的滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的根茎中分离所得,由云南民族大学陈毅坚教授鉴定为滇重楼内生真菌米曲霉 *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn, 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、提取和分离

2.1 菌株的发酵

通过前期多种发酵的结果对比分析,选择采用液体发酵 (察氏培养基+*D*-色氨酸, *D*-色氨酸含量为 0.2 g/L) 方式进行米曲霉菌株的扩大发酵。发酵前,在 250 mL 锥形瓶中配制察氏液体培养基来做母瓶发酵,每瓶 100 mL。液体扩大发酵时将发酵所需的液体培养基扩大比例倒入发酵罐中,1 次发酵 30 L,然后将发酵罐高温灭菌,冷却到室温后,将母瓶倒入发酵罐中,在 28 $^{\circ}$ C、121 r/min 下有氧发酵 5~7 d,照此方法发酵 4 罐。

每罐发酵完成后,发酵液装入 50 L 的塑料桶中,滤过使菌液和菌丝体分开。菌液用 D101 型大孔树脂吸附,再用 95% 工业乙醇洗脱,浓缩得到菌液浸膏;菌丝体用 95% 工业乙醇提取,再用醋酸乙酯溶液萃取,浓缩后得到菌丝体浸膏。4 罐菌液和菌丝体都用此方法,最后将菌液浸膏和菌丝体浸膏合并,得到总浸膏 145 g。

2.2 提取与分离

对液体发酵总浸膏 145 g 进行化学成分分离。首先用甲醇溶解,用 100~200 目的硅胶进行硅胶柱色谱粗分,以二氯甲烷-甲醇 (30:1、20:1、10:1、6:1、4:1、2:1、1:1、0:1) 梯度洗脱,根据薄层色谱检视结果,合并相同组分,得到 9 个流分 (Fr. A~I)。Fr. C (20:1 部分,13 g) 用二氯甲

烷-甲醇 (35 : 1、25 : 1、15 : 1、10 : 1、5 : 1) 梯度洗脱, 得到 5 个组分 Fr. C1~C5。Fr. C2 (25 : 1 部分) 进行 HPLC 分离, 样品用甲醇溶解, 以 75% 甲醇水作为流动相, 用 Ultimate XB-phenyl 半制备色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μ m) 分离, 体积流量 3 mL/min, 收集 3.2 min 的色谱峰得到化合物 **1** (12.3 mg), 收集 4.8 min 的色谱峰得到化合物 **2** (10.6 mg), 收集 8.6 min 的色谱峰得到化合物 **3** (20.2 mg), 收集 9.0 min 的色谱峰得到化合物 **4** (32.7 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 浅黄色油状物, $[\alpha]_D^{25}$ 16.7 (*c* 0.001, MeOH); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 283 (2.99), 204 (2.66); ESI-MS *m/z*: 197 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 以及高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z*: 197.082 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 结合 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱确定分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$, 不饱和度为 4。观察化合物的 ^1H -NMR, 有 1 个双键质子信号 (δ_{H} 6.00, s), 2 个次甲基信号 (包括 1 个连氧次甲基 δ_{H} 3.91, m) 以及 3 个甲基信号 (包括 1 个单峰甲基信号 δ_{H} 1.84, s)。 ^{13}C -NMR 和 DEPT 数据 (表 1) 显示了 10 个碳信号, 包括 4 个季碳信号 (1 个羰基信号和 3 个 sp^2 杂化的季碳)、3 个次甲基信号 (1 个 sp^2 杂化、1 个连氧的和 1 个 sp^3 杂化的次甲基) 以及 3 个甲基信号。根据以上信号及分子式判断化合物有 2 个双键和 1 个酯羰基, 再结合不饱和度, 化合物应该具有 1 个环, 是 1 个吡喃酮类化合物, 与已知化合物 3,4-dimethyl-2-pyrone^[14]相似。不同之处在于化合物 **1** 的 C-4 位取代基变为羟基, 且 C-6 位

多了 1 个 3-羟基丁烷基取代。此变化可通过 HMBC 谱中观察到的 H-11 与 C-3、C-4、C-2 的相关, H-7 与 C-6、C-10、C-8 的相关以及 H-9 与 C-8、C-7 的相关得到证实。此支链还通过 H-9/H-8/H-7/H-10 的 ^1H - ^1H COSY 相关得到确认 (图 1)。至此, 化合物 **1** 的平面结构得以确定。关于 C-7 和 C-8 的绝对构型的确定是通过与已知化合物 (–)-pyrenocine E^[15] 对比, 两者 H-8 的化学位移值均为 (δ_{H} 3.75~3.92, m), 因此 C-8 为 S 构型。最终鉴定化合物 **1** 为 4-羟基-6-[(2*S*,3*S*)-3-羟基丁烷-2-基]-3-甲基-2*H*-吡喃-2-酮, 结构见图 2, 命名为米曲霉 α -吡喃酮 A。

化合物 **2**: 浅黄色油状物, $[\alpha]_D^{25}$ 8.3 (*c* 0.001, MeOH); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 286 (2.91), 205 (2.51) nm; ESI-MS *m/z*: 197 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 以及高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z*: 197.0824 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 结合 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱确定分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$, 不饱和度为 4。观察化合物的 ^1H -NMR, 有 1 个双键质子信号 (δ_{H} 5.99, s), 2 个次甲基信号 (包括 1 个连氧次甲基 δ_{H} 3.92, m) 以及 1 对双峰甲基信号 [δ_{H} (1.18, d, *J* = 6.7 Hz), (1.18, d, *J* = 6.7 Hz)] 和 1 个单峰甲基信号 δ_{H} (1.84, s)。 ^{13}C -NMR 和 DEPT 数据 (表 1) 显示了 10 个碳信号, 包括 4 个季碳信号 (1 个羰基信号和 3 个 sp^2 杂化的季碳), 3 个次甲基信号 (1 个 sp^2 杂化, 1 个连氧的和 1 个 sp^3 杂化的次甲基) 以及 3 个甲基信号。根据以上信号及分子式判断化合物有 2 个双键和 1 个酯羰基, 再结合不饱和度, 化合物应该具有 1 个环, 是 1 个吡喃酮类化合物, 与已知

表 1 化合物 1、2 的核磁共振数据 (500/125 MHz, CD₃OD)
Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data (500/125 MHz, CD₃OD) of compound 1 and 2

碳位	1				2			
	δ_{C}	δ_{H}	HMBC	COSY	δ_{C}	δ_{H}	HMBC	COSY
2	169.5 s				170.3 s			
3	98.9 s				98.7 s			
4	169.2 s				169.5 s			
5	102.4 d	6.00 (1H, s)	C-6、C-4		103.0 d	5.99 (1H, s)	C-6、C-4	
6	166.1 s				165.9 s			
7	46.9 d	2.48 (1H, m)		H-8/H-10	70.1 d	3.92 (1H, m)		H-8
8	70.0 d	3.91 (1H, m)		H-9/H-7	47.1 d	2.53 (1H, m)		H-9/H-10/H-7
9	21.4 q	1.14 (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz)		H-8	20.5 q	1.18 (3H, d, <i>J</i> = 6.7 Hz)		H-8
10	13.9 q	1.24 (3H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz)		H-7	14.5 q	1.18 (3H, d, <i>J</i> = 6.7 Hz)		H-8
11	8.3 q	1.84 (3H, s)	C-3、C-2、C-4		8.3 q	1.84 (3H, s)	C-3、C-2、C-4	

化合物 3,4-dimethyl-2-pyrone^[14]相似。不同之处在于化合物 2 的 C-4 位取代基变为羟基,且 C-6 位多了 1 个 2-羟基丁烷基取代。此变化可通过 HMBC 谱中观察到的 H-11 与 C-3、C-4、C-2 的相关, H-7 与 C-6、C-10 和 C-8 的相关以及 H-9 与 C-8、C-7 的相关得到证实。此支链还通过 H-7/H-8、H-8/H-9、H-8/H-10 的 ¹H-¹H COSY 相关得到确认(图 1)。化合物 2 中 H-7 绝对构型的确立是通过与化合物 1 的 H-8 的化学位移值对比均为 (δ_{H} 3.90, m) 左右,因此 C-7 为 *S* 构型, C-8 为 *R* 构型。最终鉴定化合物 2 为 (*R*)-4-羟基-6-(1-羟基-2-甲基丙基)-3-甲基-2H-吡喃-2-酮,结构见图 2,命名为米曲霉 α -吡喃酮 B。

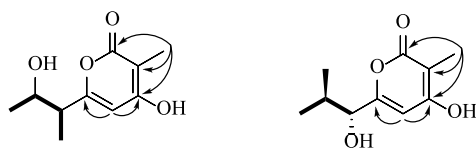


图 1 化合物 1 和 2 的主要 HMBC (箭头) 和 ¹H-¹H COSY (实线) 相关

Fig.1 Key HMBC (solid arrows) and ¹H-¹H COSY (bold lines) correlations of compound 1 and 2

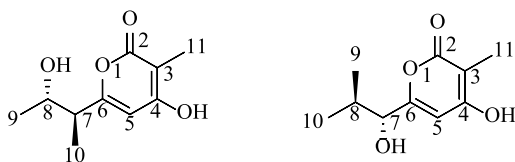


图 2 化合物 1 和 2 的结构

Fig. 2 Structures of compound 1 and 2

化合物 3: 橙色晶体(甲醇), 分子式为 C₆H₆O₄, ESI-MS m/z : 143 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 7.98 (1H, s, H-2), 6.53 (1H, s, H-4), 4.43 (2H, s, H-7); ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 175.7 (C-6), 169.4 (C-5), 148.1 (C-3), 139.7 (C-2), 110.8 (C-4), 60.9 (C-7)。波谱数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物为 flufuran。

化合物 4: 橙色晶体化合物(甲醇), 分子式为 C₇H₈O₄, ESI-MS m/z : 157 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.03 (1H, s, H-2), 6.53 (1H, s, H-4), 4.46 (2H, s, H-7), 3.81 (3H, s, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 176.7 (C-6), 170.9 (C-5), 149.7 (C-3), 140.5 (C-2), 111.5 (C-4), 61.1 (C-7), 57.0 (C-8)。波谱数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物为 flufuran methyl ester。

4 讨论

本实验对滇重楼内生真菌米曲霉次生代谢产物的化学成分进行研究,运用多种分离纯化和鉴定技术,从米曲霉发酵液的提取物中分离得到 4 个化合物,其中 2 个是新的 α -吡喃酮类化合物,此类化合物多为真菌的次级代谢产物,具有杀虫抗菌等活性^[17]。由此可推测此类化合物可能为滇重楼中内生真菌米曲霉分泌的保护植物的成分,为重楼属植物内生真菌次生代谢产物与宿主植物的关系提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] 李馨蕊, 马川, 郭力, 等. 川芎内生真菌次级代谢产物中 1 个新的内酯化合物 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4859-4862.
- [2] 杨骆杰, 丁婷, 周元, 等. 大头兔儿风内生真菌温特曲霉 *Aspergillus wentii* Y1 的化学成分及其生物活性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2102-2106.
- [3] 张德武, 刘继梅, 陈日道, 等. 植物内生真菌 *Periconia* sp. F-31 中的一个新内酯类化合物 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2349-2351.
- [4] 缪莉, 杨佳凡, 姜薇, 等. 银杏内生真菌 *Aspergillus oryzae* YX-5 抗肿瘤活性物质的分离与鉴定 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 842-849.
- [5] 何秀丽, 丁嫚嫚, 叶方, 等. 重楼植物中内生菌研究进展 [J]. 中国药师, 2016, 19(5): 970-973.
- [6] 黄艳萍, 张杰, 杨敏, 等. 接种时期对丛枝菌根真菌侵染的滇重楼幼苗生长发育及甾体皂苷含量的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4438-4448.
- [7] 鹿璐. 重楼内生菌多样性及其应用研究 [J]. 生物化工, 2019, 5(2): 120-123.
- [8] 周玲. 植物内生真菌米曲霉的次生代谢产物研究 [D]. 昆明: 云南民族大学, 2018.
- [9] 孙莉, 胡文康, 付彬, 等. 米曲霉次生代谢产物真菌毒素研究进展 [J]. 中国调味品, 2019, 44(1): 169-172.
- [10] 霍江涛, 张小乔, 严洁, 等. 米曲霉三种化学成分及其抗阿尔茨海默病活性的研究 [J]. 现代医学, 2015, 43(9): 1120-1123.
- [11] Liu L, Bao L, Wang L, et al. Asperorydines A-M: prenylated tryptophan-derived alkaloids with neurotrophic effects from *Aspergillus oryzae* [J]. *J Org Chem*, 2018, 83(2): 812-822.
- [12] Usov A N, Blanko F F, Ivanova V S, et al. Structure and antitumor activity of polysaccharides from the micelles of *Aspergillus oryzae* [J]. *Bioor Khim*, 1991, 17(1): 121-125.

- [13] 侯雨婷, 于红梅, 陈彦君, 等. 滇重楼内生真菌米曲霉中 1 个新的聚酮类化合物 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4393-4396.
- [14] Barltrop J A, Barrett J C, Carder R W, *et al.* Heterocyclic photochemistry. 1. Phototranspositions in hydroxypyrylium cations. Permutation pattern analysis and mechanistic studies [J]. *J Am Chem Soc*, 1979, 101(25): 7510-7521.
- [15] 樊亚琴, 朱国良, 王 义, 等. 红树林真菌 *Penicillium camemberti* OUCMDZ-1492 产生的细菌群体感应抑制活性的 α -吡喃酮类化合物 [J]. 有机化学, 2018, 38(10): 2798-2804.
- [16] Evidente A, Cristinzio G, Punzo B, *et al.* Flufuran, an antifungal 3, 5-disubstituted furan produced by *Aspergillus flavus* link [J]. *Chem Biodiv*, 2009, 6(3): 328-334.
- [17] 陈 凯, 李纪顺, 杨合同, 等. 0.2% α -吡喃酮 WP 对植物病原真菌的防治效果 [J]. 农药, 2006, 45(9): 632-633.