

# 异色瓢虫共生真菌木贼镰刀菌次生代谢产物研究

高文彬<sup>a</sup>, 田颖超<sup>a</sup>, 董乾<sup>a</sup>, 马一博<sup>a</sup>, 霍瑞云<sup>a</sup>, 刘莎莎<sup>a</sup>, 罗都强<sup>a,b</sup>

(河北大学 a.生命科学学院;b.药物化学与分子诊断教育部重点实验室,河北保定 071002)

**摘要:**对异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)共生真菌木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)的次生代谢产物研究.通过硅胶、凝胶(Sephadex LH-20)、反相硅胶-C<sub>18</sub>(ODS-C<sub>18</sub>)柱层析法对甲醇提取部分的成分进行分离,采用质谱和核磁共振等手段鉴定结构.从木贼镰刀菌的甲醇提取物中分离鉴定了 5 个化合物.

**关键词:**异色瓢虫;共生真菌;木贼镰刀菌;醌类化合物;降甾醇;结构鉴定

**中图分类号:**Q936;O629

**文献标志码:**A

异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)是鞘翅目(Coleoptera),瓢虫科(Coccinellidae)最重要的天敌昆虫之一<sup>[1]</sup>.昆虫体内的共生微生物,对昆虫生长发育、生殖、营养代谢以及免疫等方面均起着重要作用<sup>[2]</sup>.共生真菌是产生新结构与具有活性的天然产物的重要生物类群<sup>[3]</sup>,其种类繁多,在自然界中分布较广,在维持生态环境平衡、促进生态系统物质转化、循环和能量传递流动等方面具有重要的意义<sup>[4-5]</sup>.共生真菌在长期与寄主共同进化的过程中,其生理生化特点鲜明,次生代谢产物类型丰富,作为新的活性天然产物的重要来源<sup>[6-7]</sup>.

选择异色瓢虫体内分离得到的共生真菌木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)为研究对象,从其中分离得到 5 个化合物 Equiseti A(1),ZSU-H85A(2),4-hydroxy-17R-methylincisterol(3),啤酒甾醇(4),麦角甾醇过氧化物(5).其中化合物 1 是新化合物,(2)和(3)为首次在该属真菌中分离得到.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、试剂与仪器

菌株从河北省保定市莲池区采集的异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)中分离得到,筛选出的真菌经河北大学侯力峰博士鉴定为木贼镰刀菌.真菌标本保存于河北大学生命科学学院教育部药物化学与分子诊断重点实验室,该菌株的菌株编号为 LGWB-10.所用试剂均为分析纯.

Bruker AM-600 型核磁共振仪,Bruker apex-ultra 7.0T 型质谱仪;柱层析材料和薄层层析材料分别为硅胶(80-300 目)和硅胶 GF<sub>254</sub>(青岛海洋化工厂),Sephadex LH-20 (GE Healthcare Co. Ltd. Sweden).

### 1.2 实验方法

**1.2.1 真菌培养** 真菌发酵培养基:大米(100 g /瓶) + 纯净水(100 mL /瓶).共发酵 80 瓶,室温下培养 40 d.

**1.2.2 提取和分离** 将发酵物用甲醇提取 3 次(每次 20 L),甲醇提取液真空浓缩,得到黄色油状提取物(262.0 g).将该提取物置于硅胶柱上,用石油醚-乙酸乙酯[100:0, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90, 0:100(V(石油醚)/V(乙酸乙酯))]梯度洗脱,得到 7 个馏分 Frs. 1-7. 组分 Fr.3(1.2 g),硅胶柱[V(二氯甲烷):V(甲醇)=25:1],以及 Sephadex-LH-20 [甲醇,V(二氯甲烷):V(甲醇)=1:1],反复纯化,得到化合物 1(1.6 mg),2(6.2 mg),3(7.2 mg),4(5.8 mg),5(14.2 mg),6(112.5 mg).

收稿日期:2019-01-05;修回日期:2019-06-10.

基金项目:国家自然科学基金(55201701)

作者简介:高文彬(1981-),男,黑龙江鸡西人,河北大学博士研究生,研究方向为天然药物化学,E-mail:wenbinxing@yeah.net.

通信作者:罗都强,E-mail:duqiangluo@yeah.net.

## 2 结 果

化合物 **1**(见图 1),为黄色固体状,高分辨电喷雾质谱 HR-ESI-MS 给出伪分子离子峰  $m/z$  275.055 1[M+H]<sup>+</sup>, (计算值为 274.047 7), 结合 NMR 推出分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 该化合物有 10 个不饱和度。<sup>1</sup>H NMR 谱表明存在一个甲基[ $\delta$ H 1.59(3H, d,  $J = 6.0$ )], 一个次甲基[ $\delta$ H 5.49(1H, q,  $J = 6.0$ )], 和 3 个烯烃/芳香族化质子[ $\delta$ H 6.53(1H, d,  $J = 2.4$ ),  $\delta$ H 7.16(1H, d,  $J = 2.4$ ),  $\delta$ H 8.27(1H, s)]. <sup>13</sup>C NMR 谱表明该化合物包括两个羰基碳信号( $\delta$ C 180.77, 185.15), 7 个季碳信号( $\delta$ C 112.45, 117.35, 124.49, 139.19, 165.28, 166.75 和 167.33), 3 个烯烃/芳香族化合物碳信号( $\delta$ C 108.78, 109.72 和 145.67), 一个次甲基( $\delta$ C 63.45)和一个甲基( $\delta$ C 21.18)。以上结构片段共占据 7 个不饱和度, 剩下的 3 个不饱和度显示结构中存在 3 个环, 碳谱数据与文献相似, 仅比文献少一个碳信号(56.2, O-CH<sub>3</sub>)<sup>[8]</sup>, HMBC 谱显示: H-11 与 C-10 和 C-3 相关; H-1 与 C-9a, C-3a 和 C-3 相关; H-5 与 C-4, C-4a, C-8a, C-6 和 C-7 相关; H-7 与 C-5, C-6, C-8 相关。结合 HMQC 和 H-H COSY 谱和文献确定化合物的平面结构, 命名为 Equiseti A。

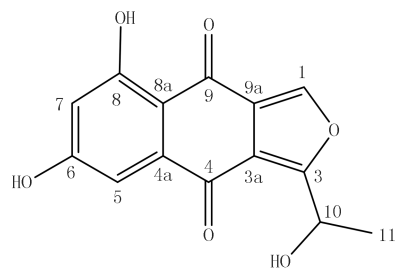


图 1 化合物 1 结构

Fig.1 Chemical structures of compound 1

化合物 **2**, 黄色固体, <sup>1</sup>H-NMR(MeOD, 600 MHz)  $\delta$ H:  $\delta$ H: 1.48(3H, d,  $J = 6$  Hz, H-12), 5.20(1H, m,  $J = 6$  Hz, H-11), 6.48(1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-3), 7.07(1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-1), 7.43(1H, s, H-8), 8.27(1H, s, H-5); <sup>13</sup>C-NMR(MeOD, 125 MHz)  $\delta$ C: 23.66(C-16), 65.96(C-15), 108.90(C-3), 109.22(C-1), 110.90(C-12), 113.51(C-8), 126.46(C-5), 126.99(C-14), 135.36(C-13), 136.74(C-11), 140.90(C-6), 160.96(C-7), 166.03(C-4), 166.35(C-2), 183.76(C-9), 187.39(C-10)。以上 NMR 数据与参考文献[9]一致, 故确定该化合物为 ZSU-H85A。

化合物 **3**, 无色结晶, <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ H: 0.60(s, 3H, H-20), 0.82(d,  $J = 7.6$ , 3H, H-19), 0.83(d,  $J = 7.6$ , 3H, H-20), 0.92(d,  $J = 6.7$ , 3H, H-21), 1.04(d,  $J = 6.4$ , 3H, H-14), 5.17(dd,  $J = 15.2$  Hz, 8.5 Hz, 1H), 5.25(dd,  $J = 15.2$ , 7.7 Hz, 1H), 5.60(s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ C: 11.76(C-12), 17.60(C-21), 19.65(C-19), 19.96(C-20), 21.02(C-14), 21.36(C-9), 28.85(C-10), 33.05(C-5), 40.10(C-13), 42.83(C-17), 48.87(C-7), 50.39(C-8), 55.34(C-11), 105.26(C-4), 112.09(C-2), 132.83(C-16), 134.68(C-15), 171.02(C-3), 171.67(C-1)。以上 NMR 数据与参考文献[10]一致, 故确定该化合物为降甾醇(4-hydroxy-17R-methylincisterol)。

化合物 **4**, 无色结晶, <sup>1</sup>H-NMR(MeOD, 600 MHz)  $\delta$ H: 0.66(s, 3H, C-18), 0.87(d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, C-27), 0.88(d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, C-26), 0.96(d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, C-28), 1.06(d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, C-21), 1.08(s, 3H, C-19), 3.57(m, 1H, H-6), 4.00(m, 1H, H-3) 5.29(m, 1H, H-23), 5.24(t,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-23); <sup>13</sup>C-NMR(125 MHz, MeOD)  $\delta$ C: 12.8(C-18), 18.2(C-28), 18.9(C-19), 20.1(C-27), 20.5(C-26), 21.739.69(C-21), 23.1(C-11), 24.0(C-15), 29.2(C-16), 31.8(C-2), 33.9(C-25), 34.4(C-1), 38.2(C-10), 40.5(C-12), 40.7(C-20), 41.8(C-4), 44.4(C-24), 44.4(C-9), 44.7(C-13), 55.9(C-14), 57.4(C-17), 68.4(C-3), 74.3(C-6), 77.0(C-5), 119.1(C-7), 133.3(C-23), 137.0(C-22), 144.02(C-8)。以上 NMR 数据与参考文献[11]一致, 故确定该化合物为啤酒甾醇。

化合物 **5**, 无色晶体, <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ H: 1.85(2H, m, H-1), 1.92(2H, m, H-2), 1.36(1H, m, H-3), 1.21(2H, m, H-4), 1.25(1H, m, H-5), 0.98(1H, d,  $J = 8.51$ , H-6), 0.99(1H, d,  $J = 8.52$ , H-7), 2.11(1H, dd,  $J = 3.43, 13.77$ ), 1.70(1H, m, H-11), 1.75(1H, m, H-11), 1.41(1H, m, H-12), 2.02(1H, m, H-12), 1.52(1H, m, H-14), 1.50(2H, m, H-15), 1.97(1H, m, H-16), 1.61(1H, m, H-16), 1.56(1H, m, H-17), 0.81(3H, s, H-18), 0.82(3H, s, H-19), 2.20(1H, m, H-20), 1.23(3H, m, H-21), 5.14(1H, m, H-22), 5.22(1H, m, H-23), 1.55(1H, m, H-24), 1.46(1H, m, H-25), 0.91(3H, d,  $J = 6.82$ , H-26), 0.88

(3H, d,  $J = 6.88$ ), 0.83 (3H, d,  $J = 6.81$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta\text{C}$ : (32.1, C-1), (28.62, C-2), (79.41, C-3), (29.19, C-4), (82.14, C-5), (135.41, C-6), (130.75, C-7), (66.47, C-8), (51.13, C-9), (39.69, C-10), (20.87, C-11), (34.71, C-12), (44.57, C-13), (167.88, C-14), (51.71, C-15), (36.95, C-16), (56.23, C-17), (19.62, C-18), (18.16, C-19), (39.36, C-20), (23.40, C-21), (135.20, C-22), (132.23, C-23), (42.72, C-24), (33.06, C-25), (19.92, C-26), (20.63, C-27), (17.54, C-28). 以上 NMR 数据与参考文献[12]一致, 故确定该化合物为麦角甾醇过氧化物。

### 3 结 论

本文从木贼镰刀菌大米发酵产物的甲醇提取物中分离鉴定了 5 个化合物, 其中化合物 1 为一新的醌类化合物。醌类化合物是指分子内具有不饱和环二酮结构(醌式结构), 即分子中含有对苯醌或邻苯醌结构, 醌类是自然界中类别较大的天然生物活性成分, 大多具有重要的生物活性<sup>[13]</sup>。醌类大多数具有抗肿瘤作用, 其中关于肺癌研究很多, 具有促进凋亡、抑制增殖, 诱导自噬, 抑制血管生成和细胞侵袭迁移等多种作用<sup>[14]</sup>。本研究分离到的新的醌类化合物有望成为抗肿瘤药物的先导化合物。除此之外, 在该菌株中首次分离到了化合物 2 和 3, 丰富了木贼镰刀属真菌的代谢产物库, 在化学分类学上具有一定意义。

### 参 考 文 献

- [1] 赵天璇, 袁明龙. 我国异色瓢虫的生物生态学特性[J]. 草业科学, 2017, 34(3): 614-629.
- [2] 向候君, 蔡普默, 季清娥, 等. 昆虫体内共生菌鉴定方法的研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2018, 49(4): 689-696.
- [3] Bräse S, Encinas A, Keck J, et al. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites[J]. Chem Rev, 2009, 109(9): 3903-3990.
- [4] Keyhani N O. Lipid biology in fungal stress and virulence, entomopathogenic fungi[J]. Fungal Biology, 2018, 122(6): 420-429.
- [5] Suryanarayanan T S. Endophyte research, going beyond isolation and metabolite documentation[J]. Fungal Ecology, 2013, 6(6): 561-568.
- [6] 戈惠明, 谭仁祥. 共生菌—新活性天然产物的重要来源[J]. 化学进展, 2009, 21(1): 30-46.
- [7] Francisco A M, Ceferino C, Galindo J C G. Brevianes Revisited[J]. Chemical Reviews, 2014, 114: 2717-2732.
- [8] Zhou Yanhui, Zhang Ming, Zhu Rongxiu, et al. Heptaketides from an Endolichenic Fungus *Biatrispora* sp. and Their Antifungal Activity[J]. J Nat Prod, 2016, 79: 2149-2157.
- [9] 王军, 马文哲, 汪夕芳, 等. 来自海南红树林内生真菌 ZSU-H85(LK) 的新葱醌[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2010, 49(4): 150-152.
- [10] Tayyab A M, Hong J K, Lee C O, et al. Cytotoxic sterol derivatives from a marine sponge *Homaxinella* sp.[J]. J Nat Prod, 2005, 68: 331-336.
- [11] Li G Y, Wang J H, Li X H. Sterols from the pericarp of *Sphaerophysa salsula* DC[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2005, 7(2): 165-169.
- [12] 马伟光, 李兴从, 王德祖, 等. 松橄榄中的麦角甾醇类过氧化物[J]. 云南植物研究, 1994, 16(2): 196-200.
- [13] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 156.
- [14] 仲海荣, 邹纯朴, 胥孜杭. 天然醌类化合物抗肺癌机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14): 32-44.

## Secondary metabolites of symbiotic fungus from *Harmonia axyridis*

Gao Wenbin<sup>a</sup>, Tian Yingchao<sup>a</sup>, Dong Qian<sup>a</sup>, Ma Yibo<sup>a</sup>, Huo Ruiyun<sup>a</sup>, Liu Shasha<sup>a</sup>, Luo Duqiang<sup>a,b</sup>

(a. College of Life Science; b. Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of Ministry of Education, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** The aim of this research is to study the secondary metabolites of the symbiotic fungus *Fusarium equiseti* from *Harmonia axyridis*. The components of methanol extraction were isolated by column chromatography on silicagel and Sephadex LH-20. The structure of compounds was established on the basis of 1D/2D NMR spectroscopic and HRESIMS data. Five compounds were isolated and identified as Equiseti A (**1**), ZSU-H85A (**2**), 4-hydroxy-17R-methylincisterol (**3**), cerevisterol (**4**), ergosterol peroxide (**5**).

**Keywords:** *Harmonia axyridis*; symbiotic fungus; *Fusarium equiseti*; anthraquinones; norcholesterol; structural identification