



## 宁前胡内生真菌*Fusarium tricinctum*固体发酵代谢产物研究

王国凯, 刘海涛, 刘丛彬, 杨家欣, 王刚, 刘劲松

### 引用本文:

王国凯, 刘海涛, 刘丛彬, 等. 宁前胡内生真菌*Fusarium tricinctum*固体发酵代谢产物研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(2): 203–208.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4135>

---

### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 人工诱导海南龙血竭的化学成分研究

Chemical Constituents from Artificially Induced Dragon's Blood of *Dracaena cambodiana*

热带亚热带植物学报. 2019, 27(2): 219–224 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3974>

#### 升振山姜茎的黄酮类成分

Flavonoids from the Stems of *Alpinia hainanensis* 'Shengzhen'

热带亚热带植物学报. 2017, 25(5): 517–522 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3736>

#### 甜杨桃鲜果的化学成分研究

Chemical Constituents from Fresh Sweet Star Fruit

热带亚热带植物学报. 2017, 25(3): 309–314 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3709>

#### 国产人工打洞沉香的化学成分研究

Chemical Constituents of Chinese Agarwood Induced by Artificial Holing

热带亚热带植物学报. 2016, 24(3): 342–347 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.013>

#### 海南石斛化学成分研究

Chemical Constituents from *Dendrobium hainanense* (Orchidaceae) in Hainan

热带亚热带植物学报. 2015(3): 317–322 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2015.03.013>

# 宁前胡内生真菌 *Fusarium tricinctum* 固体发酵代谢产物研究

王国凯<sup>1\*</sup>, 刘海涛<sup>1</sup>, 刘丛彬<sup>1</sup>, 杨家欣<sup>2</sup>, 王刚<sup>1</sup>, 刘劲松<sup>1\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 现代中药安徽省工程技术中心, 合肥 230012; 2. 中国医药大学附属医院医学研究部, 中国台湾, 台中 40447)

**摘要:** 为了解宁前胡内生真菌 *Fusarium tricinctum* 固体发酵代谢产物的化学成分, 采用硅胶色谱、中压以及制备液相等方法对其进行分离鉴定和抗肿瘤活性研究。结果表明, 从其中分离得到 14 个化合物, 结构鉴定分别为 fungerin (**1**)、fusagerins F (**2**)、6-[(3*R*)-3-hydroxybutan-2-yl]-5-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2H-pyran-2-one (**3**)、6-[(3*S*)-3-hydroxybutan-2-yl]-5-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2H-pyran-2-one (**4**)、6 $\alpha$ -chlamydospore (**5**)、6 $\beta$ -chlamydospore (**6**)、(3*R*,4*R*)-(-)-4-hydroxymellein (**7**)、(3*R*)-(-)-8-hydroxymellein (**8**)、enniatin B (**9**)、enniatin B1 (**10**)、enniatin A1 (**11**)、enniatin A (**12**)、enniatin B3 (**13**)和 enniatin B2 (**14**)。所有化合物均为首次从宁前胡内生真菌中分离得到。体外抗肿瘤活性试验表明化合物均无显著的细胞毒活性。

**关键词:** 宁前胡; 内生真菌; 代谢产物; 抗肿瘤活性

doi: 10.11926/jtsb.4135

## Metabolites of *Fusarium tricinctum*, An Endophytic Fungus Isolated from Ningguo *Peucedanum praeruptorum* on Solid Fermentation

WANG Guo-kai<sup>1\*</sup>, LIU Hai-tao<sup>1</sup>, LIU Cong-bin<sup>1</sup>, YANG Jia-sing<sup>2</sup>, WANG Gang<sup>1</sup>, LIU Jin-song<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine & Anhui Engineering Research Center of Modernized Chinese Material, Hefei 230012, China;  
2. Department of Medical Research, China Medical University Hospital, China Medical University, Taichung 40441, Taiwan, China)

**Abstract:** To investigate the chemical metabolites from *Fusarium tricinctum*, an endophytic fungus isolated from Ningguo *Peucedanum praeruptorum*, 14 compounds were isolated from solid fermentation and purified by silica gel column chromatography, MPLC, and preparative liquid chromatography. Based on data of MS and NMR, their structures were identified as fungerin (**1**), fusagerins F (**2**), 6-[(3*R*)-3-hydroxybutan-2-yl]-5-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2H-pyran-2-one (**3**), 6-[(3*S*)-3-hydroxybutan-2-yl]-5-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2H-pyran-2-one (**4**), 6 $\alpha$ -chlamydospore (**5**), 6 $\beta$ -chlamydospore (**6**), (3*R*,4*R*)-(-)-4-hydroxymellein (**7**), (3*R*)-(-)-8-hydroxymellein (**8**), enniatin B (**9**), enniatin B1 (**10**), enniatin A1 (**11**), enniatin A (**12**), enniatin B3 (**13**), enniatin B2 (**14**). All these compounds are isolated from this endophytic fungus for the first time. The cytotoxicity assay of all compounds did not show anti-tumor activities.

**Key words:** Ningguo *Peucedanum praeruptorum*; Endophytic fungus; Metabolite; Anti-tumor activity

植物内生真菌是指其全部或部分的生长发育过程在健康植物的茎干或叶片等组织中, 而不引起明显病害症状的一类真菌<sup>[1]</sup>。研究表明植物内

生真菌的次生代谢产物在抗肿瘤、促进宿主植物生长等多方面具有良好的作用<sup>[2-3]</sup>, 内生真菌次生代谢产物会表现出与宿主植物相同或者相似的生

收稿日期: 2019-08-19 接受日期: 2019-09-24

基金项目: 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2019035); 安徽高校自然科学基金重点项目(KJ2019A0477)资助

This work was supported by the Project for College Excellent Young Talents in Anhui (Grant No. gxyqZD2019035), and the Key Project in Natural Science Research of Colleges in Anhui (Grant No. KJ2019A0477).

作者简介: 王国凯(1981~), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然药物化学。

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wanggk@ahtcm.edu.cn; jinsongliu@ahtcm.edu.cn

物活性。内生真菌和寄主植物之间的相互作用类型, 受其共生体基因和外在环境调节的控制, 其相互作用往往具有生长快速、抗逆境、抗病害等益处, 比未感染植株更具生存竞争力<sup>[4]</sup>。在内生真菌-植物宿主-食草动物生态系统中, 植物内生真菌扮演着前所未有的重要生态学作用。发挥这些作用的物质基础是内生真菌产生的丰富多样的次生代谢产物, 它们具有多种生物活性。这些植物内生真菌与宿主之间特殊的共生关系及其自身独特的生物学特性为阐释药材道地性的形成带来了新的启发, 同时也为从植物内生真菌次生代谢产物的研究中寻找新型的天然活性先导物质带来了新的方向。

前胡为伞形科(Umbelliferae)白花前胡(*Peucedanum praeruptorum*)的干燥根, 具有降气化痰、散风清热之功效。安徽宁国市是前胡道地产区之一, 所产前胡称为宁前胡<sup>[5]</sup>。前期从宁前胡中分离鉴定了一系列内生真菌<sup>[6]</sup>, 其中 *Fusarium tricinctum* 为宁前胡内生真菌中的优势菌株。不同发酵方式对内生真菌次级代谢产物产量、成分类别具有显著影响<sup>[7]</sup>。为探讨不同发酵方式对内生真菌优势菌株代谢产物的影响, 分别对 *F. tricinctum* 采用固体和液体发酵法进行发酵, 从液体发酵液中分离了 13 个单体化合物<sup>[8]</sup>, 本研究继续对其固体发酵的次生代谢产物进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

AM-400、DRX 500 和 AVANCE III-600 核磁共振(Bruker 公司); Auto Premier P776 质谱仪(Waters 公司); 制备液相(Agilent 公司); 中压制备(BÜCHI 公司); 柱色谱硅胶及薄层色谱硅胶板(青岛海洋化工厂); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (GE 公司)。

宁前胡采自安徽宁国(标本编号 QHX34)。菌株从白花前胡(*Peucedanum praeruptorum*)新鲜根中分离得到, 经形态及 ITS rDNA 鉴定为镰刀属 *Fusarium tricinctum* (菌株编号 LH10), 菌株保存于安徽中医药大学药学院。

### 1.2 内生真菌的固体发酵培养

500 mL 锥形瓶中加入 80 g 蒸馏水清洗晾干大米, 20 mL 无机盐水溶液, 100 mL 蒸馏水。其中无机盐水溶液为: 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.25% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、

0.1% MgSO<sub>4</sub>、0.1% NaCl。锥形瓶扎口, 121℃灭菌 30 min, 按照 10%的接种量接种于灭菌后的大米培养基中, 28℃静置培养 30 d。乙酸乙酯萃取, 合并浓缩至蒸干得到固体发酵产物。

### 1.3 提取和分离

乙酸乙酯物浸膏 55 g 经硅胶柱层析, 以石油醚-丙酮系统梯度洗脱(1:0~0:1, V/V)得 7 个组分 A~G。组分 C 经中压色谱以甲醇-水(10:100~100:0)梯度洗脱得到 6 个组分, 组分 C-5 经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇)洗脱得到 3 个组分, C-5-1 再经制备液相(乙腈/水, 70:30→100:0)制备得化合物 **11** (14.2 mg, 36.3 min)和 **10** (15.4 mg, 37.5 min)。组分 C-5-3 经制备液相(乙腈/水, 70:30→100:0)制备得化合物 **9** (34 mg, 38.2 min)和 **12** (6.2 mg, 39.6 min)。将 C-6 经 Sephadex LH-20 (氯仿/甲醇)柱洗脱得到组分 C-6-1, 将 C-6-1 再经制备液相(乙腈/水, 70:30→100:0)制备得化合物 **14** (9.5 mg, 33.2 min)和 **13** (10.3 mg, 32.0 min)。组分 D 经硅胶柱层析, 以石油醚-丙酮(15:1~5:1)洗脱得到 3 个组分, 组分 D-2 经中压色谱以甲醇-水(10:100~100:0)梯度洗脱得到 5 个组分, 组分 D-2-2 经 Sephadex LH-20 用纯甲醇洗脱, 再经制备液相(乙腈/水, 10%~25%)得到化合物 **1** (19.5 mg, 28.5 min)和 **2** (7.5 mg, 26.4 min)。部位 E 经中压色谱以甲醇-水(10:100~100:0)梯度洗脱得到 6 个组分, 组分 E-1 经 Sephadex LH-20 (甲醇)柱洗脱, 组分 E-1-3 再经制备液相(乙腈/水, 10:90→25:75)制备得化合物 **5** (6.5 mg, 26.6 min)和 **6** (4.4 mg, 27.5 min)。组分 E-2 经 Sephadex LH-20 用纯甲醇洗脱, E-2-2 再经制备液相(乙腈/水, 10:90→25:75)制备得化合物 **3** (8.5 mg, 25.6 min)和 **4** (7.4 mg, 23.3 min)。组分 F 经中压色谱以甲醇-水(10:100~100:0)梯度洗脱得到 4 个组分, 组分 F-2 经 Sephadex LH-20 (甲醇)柱洗脱, 再将组分 F-2-2 经制备液相(乙腈/水, 10%~25%)得化合物 **7** (4.3 mg, 33.4 min)和 **8** (3.5 mg, 27.2 min)。

### 1.4 结构鉴定

**化合物 1** 针状结晶。ES I-MS *m/z*: 235 [M + H]<sup>+</sup>, 易溶于甲醇。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz): δ 7.40 (1H, s, H-6), 7.38 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-3), 6.18 (1H, d, *J* = 15.2 Hz, H-2), 4.88 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-10), 3.53 (3H, s, H-15), 3.39 (3H, s, H-14), 3.27 (2H,

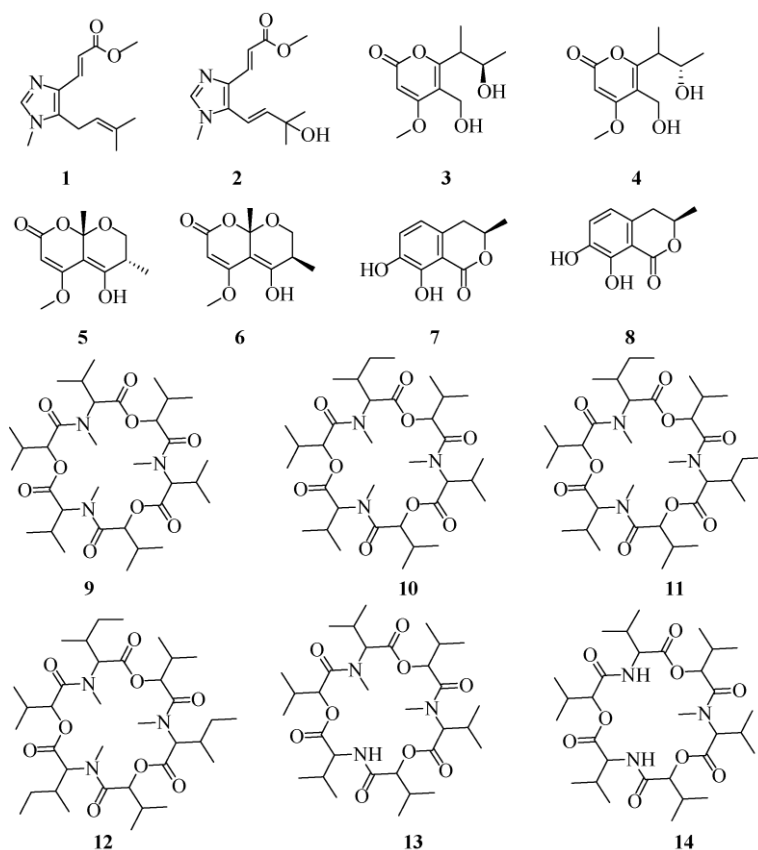


图1 化合物1~14的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-14

dd,  $J = 6.8, 13.6$  Hz, H-9), 1.58 (3H, s, H-12), 1.52 (3H, s, H-13);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz):  $\delta$  169.9 (C-1), 140.4 (C-6), 136.4 (C-3), 135.6 (C-8), 134.2 (C-4), 120.3 (C-10), 114.6 (C-2), 51.9 (C-15), 32.1 (C-14), 25.7 (C-12), 23.0 (C-9), 18.0 (C-13)。根据文献[9-10]报道, 确定化合物1为 *fungerin*。

**化合物2** 针状结晶。ES I-MS  $m/z$ : 273 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , 易溶于甲醇。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  7.70 (1H, d,  $J = 15.3$  Hz, H-3), 7.66 (1H, s, H-6), 6.60 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-9), 6.51 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-2), 6.27 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz, H-10), 3.77 (3H, s, H-15), 3.70 (3H, s, H-14), 1.43 (3H, s, H-12), 1.41 (3H, s, H-13);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz):  $\delta$  169.8 (C-1), 147.3 (C-10), 141.0 (C-6), 136.6 (C-3), 135.2 (C-4), 134.4 (C-8), 115.8 (C-2), 112.5 (C-9), 71.9 (C-11), 52.0 (C-15), 32.8 (C-14), 29.8 (C-12), 29.8 (C-13)。根据文献[9-10]报道, 确定化合物2为 *fusagerins F*。

**化合物3** 白色粉末。ES I-MS  $m/z$ : 251 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , 易溶于甲醇。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  5.58 (1H, s, H-3), 4.45 (2H, s, H-5a), 3.92 (3H, s,

OCH<sub>3</sub>), 3.65 (1H, m, H-8), 3.02 (1H, m, H-7), 1.27 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-8a), 1.19 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-7a);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz):  $\delta$  172.6 (C-4), 167.6 (C-2), 166.9 (C-6), 113.7 (C-5), 88.4 (C-3), 70.2 (C-8), 57.2 (OCH<sub>3</sub>), 54.0 (C-5a), 44.0 (C-7), 21.5 (C-8a), 15.2 (C-7a)。根据文献[11]报道, 确定化合物3为 6-[(3*R*)-3-hydroxybutan-2-yl]-5-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2H-pyran-2-one

**化合物4** 白色粉末。ESI-MS  $m/z$ : 251 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , 易溶于甲醇。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  5.58 (1H, s, H-3), 4.45 (2H, s, H-5a), 3.92 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.53 (1H, m, H-8), 3.02 (1H, m, H-7), 1.27 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-8a), 1.19 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-7a);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz):  $\delta$  172.6 (C-4), 167.6 (C-2), 166.9 (C-6), 113.7 (C-5), 88.4 (C-3), 68.7 (C-8), 57.2 (OCH<sub>3</sub>), 54.1 (C-5a), 43.5 (C-7), 21.2 (C-8a), 15.6 (C-7a)。根据文献[11]报道, 确定化合物4为 6-[(3*S*)-3-hydroxybutan-2-yl]-5-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2H-pyran-2-one。

**化合物5** 白色粉末。ES I-MS  $m/z$ : 249 [ $\text{M} +$

Na<sup>+</sup>，易溶于甲醇。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta$  5.59 (1H, s, H-3), 4.51 (1H, dd,  $J = 3.2, 11.6$  Hz, H-7a), 4.40 (1H, dd,  $J = 5.2, 8.0$  Hz, H-7b), 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.80 (1H, m, H-6), 1.46 (3H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-8), 1.26 (3H, s, H-9); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz):  $\delta$  170.8 (C-2), 167.2 (C-5), 160.9 (C-4), 107.3 (C-4a), 97.8 (C-8a), 88.1 (C-3), 56.9 (C-7), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 41.7 (C-6), 26.5 (C-8), 15.9 (C-9)。根据文献[12]报道, 确定化合物 **5** 为 6 $\alpha$ -chlamydosporol。

**化合物 6** 白色粉末。ES I-MS  $m/z$ : 249 [M + Na]<sup>+</sup>, 易溶于甲醇。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5.59 (1H, s, H-3), 4.51 (1H, dd,  $J = 3.2, 11.6$  Hz, H-7a), 4.40 (1H, dd,  $J = 5.2, 8.0$  Hz, H-7b), 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.80 (1H, m, H-6), 1.46 (3H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-8), 1.26 (3H, s, H-9); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  170.8 (C-2), 166.8 (C-5), 159.5 (C-4), 108.1 (C-4a), 98.2 (C-8a), 88.4 (C-3), 57.1 (C-7), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 41.5 (C-6), 25.6 (C-8), 11.4 (C-9)。根据文献[12]报道, 确定化合物 **6** 为 6 $\beta$ -chlamydosporol。

**化合物 7** 白色粉末。ES I-MS  $m/z$ : 217 [M + Na]<sup>+</sup>, 易溶于甲醇氯仿。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.0 (1H, s, H-9a), 7.54 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-7), 7.03 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6), 6.93 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-8), 4.84 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-4), 4.7 (1H, m, H-3), 1.59 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-3a); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  169.2 (C-1), 162.0 (C-9), 140.5 (C-5), 136.7 (C-7), 118.5 (C-6), 118.4 (C-8), 118.3 (C-10), 78.2 (C-3), 67.2 (C-4), 16.0 (C-3a)。根据文献[13]报道, 确定化合物 **7** 为 (3R,4R)-(-)-4-hydroxymellein。

**化合物 8** 白色粉末。ESI-MS  $m/z$ : 217 [M + Na]<sup>+</sup>, 易溶于甲醇、氯仿。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  10.58 (1H, s, H-8), 7.01 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-7), 6.78 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-6), 5.12 (1H, m, H-3), 3.17~3.12 (1H, dd,  $J = 3.2, 13.6$  Hz, H-4a), 2.71~2.64 (1H, m, H-4b), 1.38 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-11); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.1 (C-1), 156.4 (C-9), 143.9 (C-8), 124.6 (C-5), 124.2 (C-6), 116.2 (C-7), 108.5 (C-10), 76.2 (C-3), 28.7 (C-4), 21.1 (C-11)。根据文献[14]报道, 确定化合物 **8** 为 (3R)-(-)-8-hydroxymellein。

**化合物 9** 白色粉末。ES I-MS  $m/z$ : 662 [M + Na]<sup>+</sup>, 易溶于氯仿。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5.21 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-6), 4.72 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-3), 3.26 (3H, s, H-4a), 2.35~2.29 (1H, m, H-10),

2.23~2.16 (1H, m, H-7), 1.11 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-11, H-12), 1.05 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-8, H-9); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  172.8 (C-3), 172.2 (C-5), 76.9 (C-6), 63.7 (C-3), 33.1 (C-4a), 31.6 (C-7), 29.5 (C-10), 20.8 (C-11), 20.7 (C-12), 19.1 (C-8), 18.7 (C-9)。根据文献[15]报道, 确定化合物 **9** 为 enniatin B。

**化合物 10** 白色结晶。ES I-MS  $m/z$ : 676 [M + Na]<sup>+</sup>, 易溶于氯仿。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5.28 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-5, H-11), 4.70 (1H, t,  $J = 8.4$  Hz, H-2, H-8), 3.23 (3H, s, H-1a, H-7a), 3.10~3.06 (1H, m, H-23), 2.35~2.27 (1H, m, H-16), 2.21~2.10 (1H, m, H-13, H-20), 1.60~1.48 (2H, m, H-18), 1.12 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-17), 1.05 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-19), 0.96 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-24, H-25), 0.90 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-21, H-22), 0.88 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-14, H-15); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  172.8 (C-3), 172.7 (C-9), 172.2 (C-6), 172.1 (C-12), 76.9 (C-5), 76.7 (C-11), 63.7 (C-2), 61.8 (C-8), 35.6 (C-16), 33.0 (C-1a, 7a), 31.6 (C-13, 20), 29.5 (C-23), 27.4 (C-18), 20.8 (C-24, 25), 19.0 (C-21, 22), 18.7 (C-14, 15), 16.8 (C-17), 11.3 (C-19)。根据文献[15]报道, 确定化合物 **10** 为 enniatin B1。

**化合物 11** 白色结晶。ES I-MS  $m/z$ : 690 [M + Na]<sup>+</sup>, 易溶于氯仿。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5.22 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-5, H-11), 4.70 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-2, H-8), 3.23 (3H, s, H-1a, H-7a), 3.11~3.06 (1H, m, H-23), 2.35~2.27 (1H, m, H-16), 2.22~2.10 (1H, m, H-13, H-20), 1.60~1.48 (2H, m, H-18), 1.12 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-17), 1.05 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-19), 0.96 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-24, H-25), 0.90 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-21, H-22), 0.88 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-14, H-15); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  172.8 (C-3), 172.7 (C-9), 172.2 (C-6), 172.1 (C-12), 76.9 (C-5), 76.7 (C-11), 63.7 (C-2), 61.8 (C-8), 35.6 (C-16), 33.0 (C-1a, 7a), 31.6 (C-13, 20), 29.5 (C-23), 27.4 (C-18), 20.8 (C-24, 25), 19.0 (C-21, 22), 18.7 (C-14, 15), 16.8 (C-17), 11.3 (C-19)。根据文献[15]报道, 确定化合物 **11** 为 enniatin A1。

**化合物 12** 白色粉末。ESI-MS  $m/z$ : 704 [M + Na]<sup>+</sup>, 易溶于氯仿。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5.23 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-6), 4.74 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3), 3.23 (3H, s, H-4a), 2.34~2.30 (1H, m, H-10), 2.26~2.19 (1H, m, H-7), 1.10 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-11),

1.04 (3H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-13), 0.94 (3H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-8, H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.0 (C-2), 171.7 (C-5), 76.5 (C-6), 61.9 (C-3), 33.2 (C-4a), 31.4 (C-10), 29.4 (C-7), 27.0 (C-12), 20.6 (C-8, 9), 16.6 (C-11), 11.0 (C-13)。根据文献[16]报道, 确定化合物 **12** 为 enniatin A。

**化合物 13** 白色结晶。ES I-MS  $m/z$ : 634  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 易溶于氯仿。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.10 (1H, s, H-1), 5.14 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-5), 4.62 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2), 4.43 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-8), 3.16 (3H, s, H-7a), 2.98 (1H, m, H-9), 2.58~2.47 (1H, m, H-12), 2.22~2.04 (1H, m, H-15), 1.03 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-16, H-17), 0.88 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-10, H-11), 0.85 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-13, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.5 (C-3), 172.2 (C-6), 77.0 (C-5), 76.6 (C-8), 64.2 (C-2), 32.5 (C-7a), 31.6 (C-15), 29.4 (C-12), 29.0 (C-9), 21.5 (C-10, 11), 20.6 (C-16, 17), 18.8 (C-13, 14)。根据文献[17]报道, 确定化合物 **13** 为 enniatin B3。

**化合物 14** 白色结晶。ESI-MS  $m/z$ : 648  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 易溶于氯仿。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.21 (1H, s, H-1), 5.18 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-5), 4.56 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2), 4.39 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-8), 3.18 (3H, s, H-7a), 3.02 (1H, m, H-9), 2.61~2.52 (1H, m, H-12), 2.22~2.04 (1H, m, H-15), 1.01 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-16, H-17), 0.94 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-10, H-11), 0.88 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-13, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.7 (C-3), 172.1 (C-6), 76.9 (C-5), 76.3 (C-8), 63.9 (C-2), 32.3 (C-7a), 29.6 (C-15), 29.4 (C-12), 29.0 (C-9), 21.5 (C-10, 11), 20.4 (C-16, 17), 18.6 (C-13, 14)。根据文献[17]报道, 确定化合物 **14** 为 enniatin B2。

### 1.5 抗肿瘤活性结果

将化合物对5种口腔癌细胞株CAR、CAL27、SCC-4、SCC-9、HSC-3进行抗肿瘤活性筛选, 结果表明, 化合物均无显著活性。

## 2 结果和讨论

前期研究从宁前胡中分离鉴定了一系列内生真菌, *Fusarium tricinctum* 为宁前胡内生真菌中的优势菌株, 其隶属于瘤座孢科(Discellaceae)镰刀属<sup>[18]</sup>,

是一类全世界广泛分布的真菌, *Fusarium tricinctum* 作为一类重要的真菌资源, 表现出多样的价值, 越来越受到重视。其次生代谢产物往往具有良好的生理活性。Zhang 等从 *F. tricinctum* 中分离得到了1个独特骨架的新的倍半萜类化合物 fusartricin, 对 *Enterobacter aerogenes*、*Micrococcus tetragenu* 和 *Candida albicans* 具有显著的抗菌活性<sup>[19]</sup>。Sun 等从 *F. tricinctum* SYPF 7082 中分离得到2个新的生物碱, 其中  $[-(\alpha\text{-oxyisohexanoyl-}N\text{-methyl-leucyl})_2]$  对小鼠巨噬细胞产生一氧化氮有显著的抑制作用<sup>[20]</sup>。

前期从宁前胡内生菌 *F. tricinctum* 液体发酵液中分离鉴定了13个化合物, 分别为 cyclo-(L-pro-L-pro)-cyclo-(S-pro-S-leu)、cyclo-(L-phe-L-phe)、cyclo-(D-pro-L-phe)、cyclo-(L-pro-L-phe)、cyclo-(D-pro-L-leu)、cyclo-(S-pro-S-leu)、cyclo-[D-(4-hydroxyprolinyl)]-(L)-leucine、cyclo-[L-(4-hydroxyprolinyl)]-(L)-leucine、cyclo-(*trans*-4-hydroxy-L-prolyl-L-phenylalanine)、cyclo-(D-*cis*-hyp-L-phe)、苯甲酸苄酯和苯乙酸。体外抗肿瘤活性试验表明3个化合物对 CAR、CAL27、SCC-4、SCC-9 和 HSC-3 等5种口腔癌肿瘤细胞有一定的细胞毒活性。为比较不同发酵方式对内生真菌优势菌株代谢产物的影响, 分别对宁前胡内生真菌 *F. tricinctum* 进行固体和液体发酵法比较研究, 结果表明不同发酵方式的宁前胡优势菌株发酵产物完全不同。本研究在该菌株液体发酵次生代谢产物研究基础上, 从 *F. tricinctum* 固体发酵液中分离并鉴定了14个单体化合物。所有化合物均为首次从宁前胡内生真菌中分离得到, 且同菌株不同发酵方式的发酵液中没有结构相同的次生代谢产物, 尤其在固体发酵代谢产物中分离的环肽类化合物在液体发酵中并未分离到, 说明发酵方式对代谢产物结构有重要影响。已有报道的化合物 Enniatins A1、B 和 B1 能够产生抗癌活性<sup>[21]</sup>, 但本研究的所有化合物对5种口腔癌肿瘤细胞均无显著的细胞毒活性。目前国内外对宁前胡内生菌的次生代谢产物研究无相关报道, 本研究进一步丰富了宁前胡内生真菌 *F. tricinctum* 次生代谢产物结构多样性。

### 参考文献

- [1] RODRIGUEZ R J, WHITE J F Jr, ARNOLD A E, et al. Fungal endophytes: Diversity and functional roles [J]. *New Phytol*, 2009, 182(2): 314-330. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- [2] UZMA F, MOHAN C D, HASHEM A, et al. Endophytic fungi-alter-

- native sources of cytotoxic compounds: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 26(9): 309. doi: 10.3389/fphar.2018.00309.
- [3] DESHMUKH S K, VEREKAR S A. Fungal endophytes: A potential source of antifungal compounds [J]. *Front Biosci*, 2012, 4: 2045–2070. doi: 10.2741/E524.
- [4] MORICCA S, RAGAZZI A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: A lesson from *Discula quercina* [J]. *Phytopathology*, 2008, 98(4): 380–386. doi: 10.1094/phyto-98-4-0380.
- [5] QIU X X, ZHANG L, YUE J Y, et al. Investigation on the factors affecting the contents of three coumarins in Ningguo *Peucedanum praeruptorum* Dunn. [J]. *J Chin Med Mat*, 2016, 39(4): 713–716. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.04.004.  
邱晓霞, 张玲, 岳婧怡, 等. 宁前胡中 3 种香豆素含量影响因素的考察 [J]. *中药材*, 2016, 39(4): 713–716. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.04.004.
- [6] LIU H T, SHAO J, WANG G, et al. Culture/isolation and identification of endophytic fungi of Ningguo *Peucedanum praeruptorum* Dunn. [J]. *J Anhui Univ Chin Med*, 2018, 37(4): 87–91. doi: 10.3969/j.issn.2095-7246.2018.04.023.  
刘海涛, 邵杰, 王刚, 等. 宁前胡内生真菌的培养分离与鉴定 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2018, 37(4): 87–92. doi: 10.3969/j.issn.2095-7246.2018.04.023.
- [7] LIN S T, LI C F, HU X P, et al. Effects of different fermentation methods on secondary metabolites synthesis by endophytical fungi CH1307c from *Cephalotaxus hainanensis* Li [J]. *Chin J Trop Crops*, 2016, 37(7): 1407–1412. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2016.07.026.  
林淑婷, 李从发, 胡晓苹, 等. 不同发酵方式对海南粗榧内生真菌 CH1307c 合成次级代谢产物的影响 [J]. *热带作物学报*, 2016, 37(7): 1407–1412. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2016.07.026.
- [8] LIU C B, LIU H T, YANG J X, et al. Secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium tricinctum* from Ningguo *Peucedanum praeruptorum* Dunn. [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2019, 31(9): 1580–1584. doi: 10.16333/j.1001-6880.2019.9.014.  
刘丛彬, 刘海涛, 杨家欣, 等. 宁前胡内生真菌 *Fusarium tricinctum* 次生代谢产物研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(9): 1580–1584. doi: 10.16333/j.1001-6880.2019.9.014.
- [9] WEN H, LI Y, LIU X Z, et al. Fusagerins A–F, new alkaloids from the fungus *Fusarium* sp. [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2015, 5(4): 195–203. doi: 10.1007/s13659-015-0067-1.
- [10] PRZYBYLA D, NUBBEMEYER U. 4,5-disubstituted *N*-methylimidazoles as versatile building blocks for defined side-chain introduction [J]. *Eur J Org Chem*, 2017, 2017(3): 695–703. doi: 10.1002/ejoc.201601384.
- [11] SOLFRIZZO M, VISCONTI A, SAVARD M E, et al. Isolation and characterization of new chlamydosporol related metabolites of *Fusarium chlamydosporum* and *F. tricinctum* [J]. *Mycopathologia*, 1994, 127(2): 95–101. doi: 10.1007/BF01103065.
- [12] SAVARD M E, MILLER J D, SALLEH B, et al. Chlamydosporol, a new metabolite from *Fusarium chlamydosporum* [J]. *Mycopathologia*, 1990, 110(3): 177–181. doi: 10.1007/BF00437543.
- [13] TAKESUE T, FUJITA M, SUGIMURA T, et al. A series of two oxidation reactions of ortho-alkenylbenzamide with hypervalent iodine (III): A concise entry into (3*R*,4*R*)-4-hydroxymellein and (3*R*,4*R*)-4-hydroxy-6-methoxymellein [J]. *Org Lett*, 2014, 16(17): 4634–4637. doi: 10.1021/ol502225p.
- [14] DEVYS M, BARBIER M, BOUSQUET J F, et al. Isolation of the (2*R*)-(3*R*)-5-hydroxymellein from the fungus *Septoria nodorum* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(3): 825–826. doi: 10.1016/s0031-9422(00)90617-4.
- [15] JI Z Q, WU W J, WANG M A, et al. Identification of fungicidal compounds from endophytic fungi *Fusarium proliferatum* in *Celastrus angulatus* [J]. *J NW Sci Techn Univ Agric For (Nat Sci)*, 2005, 33(5): 61–64. doi: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2005.05.015.  
姬志勤, 吴文君, 王明安, 等. 苦皮藤内生真菌层出镰刀菌中杀菌成分的结构鉴定 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(5): 61–64. doi: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2005.05.015.
- [16] TSANTRIZOS Y S, XU X J, SAURIOL F, et al. Novel quinazolinones and enniatins from *Fusarium lateritium* Nees [J]. *Can J Chem*, 1993, 71(9): 1362–1367. doi: 10.1139/v93-176.
- [17] VISCONTI A, BLAIS L A, APSIMON J W, et al. Production of enniatins by *Fusarium acuminatum* and *Fusarium compactum* in liquid culture: Isolation and characterization of three new enniatins, B2, B3, and B4 [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(6): 1076–1082. doi: 10.1021/jf00018a034.
- [18] WEI J C. Handbook of Fungal Identification [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979: 609.  
魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 609.
- [19] ZHANG J N, LIU D, WANG H, et al. Fusartricin, a sesquiterpenoid ether produced by an endophytic fungus *Fusarium tricinctum* Salicorn 19 [J]. *Eur Food Res Technol*, 2015, 240(4): 805–814. doi: 10.1007/s00217-014-2386-6.
- [20] SUN W J, ZHU H T, ZHANG T Y, et al. Two new alkaloids from *Fusarium tricinctum* SYPF 7082, an endophyte from the root of *Panax notoginseng* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2018, 8(5): 391–396. doi: 10.1007/s13659-018-0171-0.
- [21] WÄTJEN W, DEBBAB A, HOHLFELD A, et al. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation [J]. *Mol Nutri Food Res*, 2009, 53(4): 431–440. doi: 10.1002/mnfr.200700428.