

火把花内生真菌 *Trichoderma atroviride* B7 生物碱类成分研究

李文渊^{1,2}, 王莹¹, 匡策¹, 郭凯³, 刘燕^{1,3}, 黎胜红^{1,3*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明 650201; 2. 郑州工业应用技术学院, 河南省水环境与健康工程技术研究中心, 河南郑州 451150; 3. 成都中医药大学, 省部共建西南特色中药资源国家重点实验室/中医药创新研究院, 四川成都 611137)

摘要: 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和高效液相色谱等方法从火把花内生真菌 *Trichoderma atroviride* B7 固体发酵提取物中分离得到 9 个生物碱类化合物。利用核磁共振谱、高分辨质谱等方法将其分别鉴定为: atroviridanol (1)、3-oxo-3-[(2-phenylethyl) amino]-propanoic acid (2)、*N*-(2'-phenylethyl)-acetamide (3)、neoechinulin A (4)、echinulin (5)、gancidin W (6)、*N*-isobutyl-3-methylbutanamide (7)、5-acetamido-1-pentanol (8) 和 *N*-2-methylpropyl-2-methylbutenamide (9)。其中, 化合物 1 为新化合物, 化合物 2~9 首次从木霉属真菌中分离得到。

关键词: 火把花; 内生真菌; *Trichoderma atroviride*; atroviridanol; 生物碱

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-0963-04

Study on alkaloids of endophytic *Trichoderma atroviride* B7 from *Colquhounia coccinea* var. *mollis*

LI Wen-yuan^{1,2}, WANG Ying¹, KUANG Ce¹, GUO Kai³, LIU Yan^{1,3}, LI Sheng-hong^{1,3*}

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; 2. Henan Engineering Research Center of Water Environment and Health, Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451150, China; 3. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, and Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract: Nine compounds were isolated from the crude extract of the solid culture of endophyte *Trichoderma atroviride* B7 of *Colquhounia coccinea* var. *mollis* by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, and HPLC. They were identified as atroviridanol (1), 3-oxo-3-[(2-phenylethyl) amino]-propanoic acid (2), *N*-(2'-phenylethyl)-acetamide (3), neoechinulin A (4), echinulin (5), gancidin W (6), *N*-isobutyl-3-methylbutanamide (7), 5-acetamido-1-pentanol (8), and *N*-2-methylpropyl-2-methylbutenamide (9) by NMR, HR-MS, and so on. Among them, compound 1 is a new compound, and compounds 2-9 are firstly isolated from *Trichoderma* spp.

Key words: *Colquhounia coccinea* var. *mollis*; endophytic fungus; *Trichoderma atroviride*; atroviridanol; alkaloids

木霉属 (*Trichoderma*) 为丝孢纲丝孢目丛梗孢科真菌, 广泛分布在植物、植物腐质和土壤中。木霉菌通

常作为生物防治因子被人们所熟知, 它能够分泌产生次生代谢产物促进植物生长、拮抗病原微生物, 具有保护植物的能力^[1,2]。目前, 从木霉菌中已发现萜类、聚酮、生物碱、脂肪酸等多种结构类型的代谢产物, 这些化合物具有抗微生物、抗病毒、抗炎等丰富的生物活性^[3,4]。近年来, 木霉菌因其结构新颖、活性独特的次

收稿日期: 2022-10-11; 修回日期: 2022-11-03.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31570362).

*通讯作者 Tel: 86-28-61800015, E-mail: shli@cdutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1104

生代谢产物,已成为微生物领域和天然产物领域研究的热点^[5]。

Trichoderma atroviride B7是从唇形科植物火把花(*Colquhounia coccinea* var. *mollis*)的花中分离得到的一株内生深绿木霉真菌。前期,在其液体发酵提取物中发现了一系列具有生物活性的哈茨木霉烷型二萜^[6]。本实验对其固体发酵物进行了化学成分研究,共分离得到9个生物碱类化学成分(图1),其中atroviridanol(**1**)是一个新化合物,其他化合物分别为3-oxo-3-[(2-phenylethyl) amino]-propanoic acid^[7](**2**)、*N*-(2'-phenylethyl)-acetamide^[8](**3**)、neoechinulin A^[9](**4**)、echinulin^[10](**5**)、gancidin W^[11](**6**)、*N*-isobutyl-3-methylbutanamide^[12](**7**)、5-acetamido-1-pentanol^[13](**8**)、*N*-2-methylpropyl-2-methylbutenamide^[14](**9**)。这些生物碱成分均为在木霉属真菌中首次发现,本文对新化合物atroviridanol(**1**)的结构进行了解析。

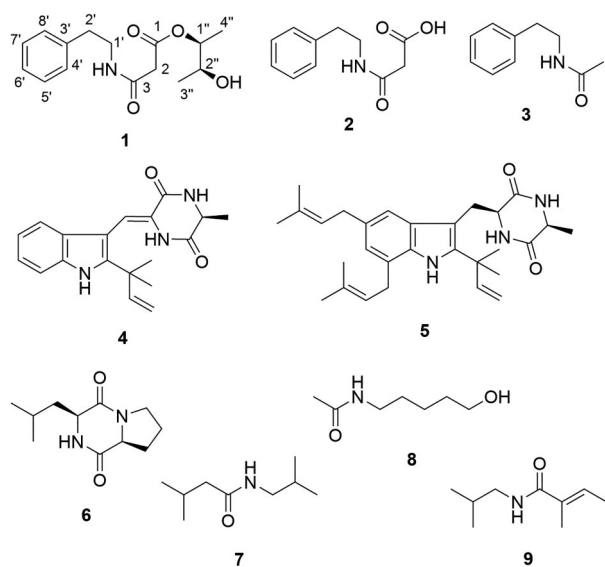


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-9

结果与讨论

化合物**1**为无色油状物。由高分辨质谱HR-ESI-MS (m/z 302.136 3 $[M+Na]^+$, 计算值302.136 8) 确定其分子式为 $C_{15}H_{21}NO_4$ 。IR数据的指纹图谱可以初步确定该化合物中有羰基(1 735、1 657 cm^{-1})及单取代苯环(749、701 cm^{-1})结构。 1H NMR(表1)谱显示低场部分有5个芳环质子 [δ_H 7.20 (2H, m)、 δ_H 7.24 (1H, m)、 δ_H 7.31 (2H, m)],提示化合物中含有一个单取代的苯环。还有两个氧原子取代质子 [δ_H 4.93 (1H, qd, $J = 6.5, 3.2$ Hz)、 δ_H 3.89 (1H, qd, $J = 6.5, 3.2$ Hz)]及两个氮原子取代的质子 [δ_H 3.55 (2H, m)]。此外,高场部分有两个双峰甲基 [δ_H 1.21 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)、 δ_H 1.15 (3H,

d, $J = 6.5$ Hz)]。 ^{13}C NMR (DEPT) 谱中可以观察到该化合物共有15个碳信号,包括3个季碳 (δ_C 168.5、165.1、138.7),7个次甲基碳(分别为5个芳环次甲基碳 δ_C 128.8×2、128.6×2、126.5及2个氧取代次甲基碳 δ_C 75.5、68.9),3个亚甲基碳 (δ_C 42.0、40.9、35.5),及2个甲基碳 (δ_C 17.6、13.9)。该化合物的NMR数据与化合物3-oxo-3-[(2-phenylethyl) amino]-propanoic acid(**2**)相似,仔细对比发现,C-1至C-3,C-1'至C-8'的NMR数据与后者基本一致,表明该化合物包含有C-1至C-8'的片段结构。而不同的是,在化合物**1**中多了2个氧取代次甲基 δ_C 75.5、68.9和2个甲基 δ_C 17.6、13.9,相对应的氢化学位移依次为 δ_H 4.93 (H-1''),3.89 (H-2''),1.15 (Me-3''),1.21 (Me-4'')。 1H - 1H COSY 图谱中的相关能够得到 Me-4''/H-1''/H-2''/Me-3'' 的结构片段,结合 Me-3''与C-1'',C-2'',Me-4''与C-1'',C-2''之间的HMBC相关(图2),进一步确定新增基团为2,3-丁二醇基片段。初步推测该化合物应为化合物**2**末端羧基与2,3-丁二醇中的一个羟基酯化的衍生物。结合H-1''与C-1 (δ_C 168.5)有HMBC远程相关,以及C-1'' (δ_C 75.5)的化学位移,进一步确定了该化合物中C-1、C-1''酯化后通过氧连接。此外,结合H-1''和H-2''的偶合常数 ($J = 3.2$ Hz),可确定C-1和C-2上的邻位氧取代基团为赤式^[15]。至此,该化合物的结构得以确定,并命名为atroviridanol。

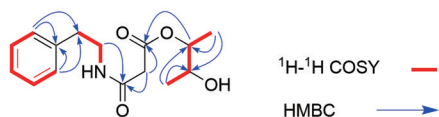


Figure 2 Key 1H - 1H COSY and HMBC correlations of compound 1

Table 1 1H NMR (800 MHz) and ^{13}C NMR (200 MHz) spectral data of compound 1

Position	δ_H	δ_C
1	-	168.5
2	3.29 (2H, m)	42.0
3	-	165.1
1''	4.93 (1H, qd, $J = 6.5, 3.2$ Hz)	75.5
2''	3.89 (1H, qd, $J = 6.5, 3.2$ Hz)	68.9
3''	1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	17.6
4''	1.21 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	13.9
1'	3.55 (2H, m)	40.9
2'	2.84 (2H, t, $J = 7.1$ Hz)	35.5
3'	-	138.7
4'	7.20 (1H, m)	128.8
5'	7.31 (1H, m)	128.6
6'	7.24 (1H, m)	126.5
7'	7.31 (1H, m)	128.6
8'	7.20 (1H, m)	128.8
NH	6.78 (1H, brs)	-

实验部分

Bruker AVANCE 800 核磁共振波谱仪、Bruker UHR-TOF-Maxis 超高分辨飞行时间质谱仪、Bruker-Tensor-27 红外光谱仪 (德国 Bruker 公司); Waters Auto-Spec Premier P776 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); Jasco J-1020 数字旋光仪 (日本分光公司); Shimadzu UV-1800 分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪、液相色谱柱 Agilent Zorbax SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Agilent Zorbax SB-C18 (9.4 mm × 250 mm, 5 μm) (美国 Agilent 公司); 组合式光照振荡培养箱 ZQZY-CG (上海知楚仪器公司); Bio-Tek SYNERGY 2 多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 紫外灯 ZF-1S (上海恩谊公司) 等。柱色谱硅胶 (200~300 目) 及薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ (10~40 μm) (青岛海洋化工有限责任公司); Sephadex LH-20 (美国 GE 公司); 分析纯石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮和甲醇 (天津科密欧试剂公司); 色谱甲醇和色谱乙腈 (德国 Merck 公司)。

1 提取与分离

菌株 B7 是从云南昆明植物园新鲜火把花的花部组织中分离得到的一株内生真菌, 根据形态学特征及与 18S rDNA 序列比较, 鉴定其为深绿木霉菌 (*Trichoderma atroviride*) (GenBank 登录号 MG856903), 该菌株保存在昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室。 *Trichoderma atroviride* B7 采用大米培养基进行固体发酵, 发酵物经乙酸乙酯萃取 3 次、减压蒸馏去除溶剂后得粗浸膏 150 g。

粗浸膏经硅胶柱色谱粗分离, 石油醚-丙酮体系梯度洗脱 (v/v 10:0→0:10), 得到 9 段组分 Fr.1~Fr.9。Fr.3 经进一步硅胶柱色谱分离得到 Fr.3-1、Fr.3-2, Fr.3-2 经 HPLC (RP-18 半制备柱, 9.2 mm × 250 mm, 5 μm, 乙腈 25%, 3 mL·min⁻¹) 分离纯化得到化合物 **8** (2.1 mg, $t_R = 20$ min)。Fr.7 进一步经硅胶柱色谱分离得到 Fr.7-1~Fr.7-3, Fr.7-1 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离得到化合物 **5** (10.6 mg), 再经 HPLC (RP-18 半制备柱, 9.2 mm × 250 mm, 5 μm; 乙腈 40%, 3 mL·min⁻¹) 分离纯化得到化合物 **2** (8.0 mg, $t_R = 20$ min)、**3** (5.1 mg, $t_R = 15$ min) 和 **4** (3.9 mg, $t_R = 15$ min)。Fr.7-2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 再经 HPLC (RP-18 半制备柱, 9.2 mm × 250 mm, 5 μm; 乙腈 22%, 3 mL·min⁻¹) 分离纯化得到化合物 **1** (1.5 mg, $t_R = 14.5$ min) 和 **6** (5.5 mg, $t_R = 8$ min); Fr.7-3 经 HPLC (RP-18 半制备柱, 9.2 mm × 250 mm, 5 μm; 乙腈 10%, 3 mL·min⁻¹) 分离纯化得到化合物 **7** (6.2 mg, $t_R = 17$ min) 和 **9** (4.1 mg, $t_R = 7$ min)。

2 结构与鉴定

Atroviridanol (**1**) 无色油状物。 $[\alpha]_D^{25} -4.88$ (c 0.15,

MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 206 (3.59) nm; IR (KBr) ν_{max} 3 409, 2 957, 2 920, 2 851, 1 735, 1 657, 1 633, 1 584, 1 414, 1 260, 1 198, 1 122, 1 087, 1 044, 749, 701, 621, 521 cm⁻¹; ¹H 和 ¹³C NMR 数据见表 1; HR-ESI-MS m/z 302.136 3 [M+Na]⁺ (C₁₅H₂₁NO₄Na 计算值: 302.136 8)。

3-oxo-3-[(2-Phenylethyl) amino]-propanoic acid (**2**)^[7] 无色油状物, 分子式 C₁₁H₁₃NO₃。

N-(2'-Phenylethyl)-acetamide (**3**)^[8] 无色油状物, 分子式 C₁₀H₁₃NO。

Neoechinulin A (**4**)^[9] 白色固体粉末, 分子式 C₁₉H₂₁N₃O₂。

Echinulin (**5**)^[10] 白色固体粉末, 分子式 C₂₉H₃₉N₃O₂。

Gancidin W (**6**)^[11] 无色晶体, 分子式 C₁₁H₁₈N₂O₂。

N-Isobutyl-3-methylbutanamide (**7**)^[12] 无色油状物, 分子式 C₉H₁₉NO。

5-Acetamido-1-pentanol (**8**)^[13] 无色油状物, 分子式 C₇H₁₅NO₂。

N-2-Methylpropyl-2-methylbutenamide (**9**)^[14] 无色晶体, 分子式 C₉H₁₇NO。

作者贡献: 黎胜红负责实验设计与进程指导; 郭凯负责构建论文框架和整理实验数据; 李文渊负责内生真菌代谢产物的分离、鉴定及论文撰写; 刘燕和匡策负责内生真菌 B7 的分离、鉴定; 王莹负责菌株的固体发酵、提取。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zin NA, Badaluddin NA. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications [J]. Ann Agric Sci, 2020, 65: 168-178.
- [2] Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, et al. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma* [J]. Phytochem Rev, 2008, 7: 89-123.
- [3] Li MF, Li GH, Zhang KQ. Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. [J]. Metabolites, 2019, 9: 58-82.
- [4] Zhang JL, Tang WL, Huang QR, et al. *Trichoderma*: a treasure house of structurally diverse secondary metabolites with medicinal importance [J]. Front Microbiol, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.723828>.
- [5] Li JX, Li YR, Luo J, et al. Highlights of natural products research from China in 2018 [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1333-1347.
- [6] Li WY, Liu Y, Lin YT, et al. Antibacterial harziane diterpenoids from a fungal symbiont *Trichoderma atroviride* isolated from *Colquhounia coccinea* var. *mollis* [J]. Phytochemistry, 2020, 170: 112198.
- [7] Mihoko I, Hiroshi S, Ishii K, et al. Biological activities and structure-activity relationship of substitution compounds of *N*-[2-

- (3-indolyl) ethyl] succinamic acid and *N*-[2-(1-naphthyl) ethyl] succinamic acid, derived from a new category of root-promoting substances, *N*-(phenethyl) succinamic acid analogs [J]. *Plant Soil*, 2003, 255: 67-75.
- [8] Maskey RP, Helmke E, Laatsch H. Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate [J]. *J Antibiot*, 2003, 56: 942-949.
- [9] Kim KS, Cui X, Lee DS, et al. Anti-inflammatory effect of neoechinulin A from the marine fungus *Eurotium* sp. SF-5989 through the suppression of NF- κ B and p38 MAPK pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Molecules*, 2013, 18: 13245-13259.
- [10] Ali M, Mohammed N, Alnaqeeb MA, et al. Toxicity of echinulin from *Aspergillus chevalieri* in rabbits [J]. *Toxicol Lett*, 1989, 48: 235-241.
- [11] Furuya K, Okudaira M, Shindo T, et al. *Corollospora pulchella*, a marine fungus producing antibiotics, melinacidins III, IV and gancidin W [J]. *Annu Rep Sankyo Res Lab*, 1985, 37: 140-142.
- [12] Harig T, Schlawis C, Ziesche L, et al. Nitrogen-containing volatiles from marine *Salinispora pacifica* and *Roseobacter*-group bacteria [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80: 3289-3295.
- [13] Li LL, Jiang RY, Chen JX, et al. One-step synthesis of self-healable hydrogels by the spontaneous phase separation of linear multi-block copolymers during the emulsion copolymerization [J]. *Chin Chem Lett*, 2017, 28: 868-874.
- [14] Ding L, Dahse HM, Hertweck C. Cytotoxic alkaloids from *Fusarium incarnatum* associated with the mangrove tree *Aegiceras corniculatum* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75: 617-621.
- [15] Masi M, Meyer S, Górecki M, et al. Pyriculins A and B, two monosubstituted hex-4-ene-2,3-diols and other phytotoxic metabolites produced by *Pyricularia grisea* isolated from buffel-grass (*Cenchrus ciliaris*) [J]. *Chirality*, 2017, 29: 726-736.