

附子内生真菌 *Trichoderma* sp. FZ-31 的化学成分研究

陈小晶, 朱丽君, 段礼新, 刘中秋, 崔 辉*, 赵钟祥*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究生附子 *Aconitum carmichaelii* 内生真菌 *Trichoderma* sp. FZ-31 的化学成分。方法 内生真菌发酵物采用正相硅胶柱色谱、反相硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱及制备型高效液相色谱等方法进行分离纯化, 再通过核磁共振、质谱以及圆二色谱等方法鉴定单体化合物结构。结果 从 *Trichoderma* sp. FZ-31 发酵产物的醋酸乙酯部位得到 11 个化合物, 分别鉴定为 (-)-蜂蜜曲菌素 (1)、(R)-7-羟基蜂蜜曲菌素 (2)、4-羟基蜂蜜曲菌素 (3)、赤霉菌吡喃酮 D (4)、阿魏酸甲酯 (5)、吲哚-3-乙酸 (6)、吲哚-3-甲醛 (7)、苯甲酰胺 (8)、(3R,6R)-4-甲基-6-(1-甲基乙基)-3-苯甲基全氢-1,4-噁嗪-2,5-二酮 (9)、酒渣碱 (10)、腐皮壳素 A (11)。结论 除化合物 5、7 外, 其余化合物均为首次从木霉菌 *Trichoderma* sp. 中分离得到, 本研究为附子及其内生菌的开发利用提供了一定的研究基础。

关键词: 附子; 内生真菌; 木霉菌; 次生代谢产物; (-)-蜂蜜曲菌素; 赤霉菌吡喃酮 D; 酒渣碱; 腐皮壳素 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)04-0931-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.004

Chemical constituents of endophytic fungi *Trichoderma* sp. FZ-31 from *Aconitum carmichaelii*

CHEN Xiao-jing, ZHU Li-jun, DUAN Li-xin, LIU Zhong-qiu, CUI Hui, ZHAO Zhong-xiang

School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of endophytic fungi *Trichoderma* sp. FZ-31 from *Aconitum carmichaelii*. **Methods** The fermentation of *Trichoderma* sp. FZ-31 was isolated and purified through silica gel, Sephadex LH-20 as well as preparative HPLC, and the structures of obtained compounds were identified by NMR, MS, and circular dichroism. **Results** Eleven compounds were isolated and identified as (-)-mellein (1), (R)-7-hydroxymellein (2), 4-hydroxymellein (3), gibepyrone D (4), methyl ferulate (5), indole-3-acetic acid (6), indol-3-carbaldehyde (7), benzamide (8), (3R,6R)-4-methyl-6-(1-methylethyl)-3-phenylmethylperhydro-1,4-oxazine-2,5-dione (9), flazine (10), and diaporthin A (11). **Conclusion** Except compounds 5 and 7, the remain compounds are isolated from *Trichoderma* sp. for the first time. This study provides a certain study basis for *A. carmichaelii* and its endophytic fungi.

Key words: *Aconitum carmichaelii* Debx.; endophytic fungus; *Trichoderma* sp.; secondary metabolites; (-)-mellein; gibepyrone D; flazine; diaporthin A

附子为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 子根的加工品, 具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效^[1]。现代药理研究发现, 附子具有明显的强心、保护心肌、抗心律失常、抗炎、镇痛、增强免疫、抗肿瘤等功效^[2]。

内生菌生活在健康的植物组织或细胞内, 且不

会引发宿主明显的感染症状。某些内生菌能产生和宿主相同或相似的化合物, 或利用宿主的有效成分代谢出新的活性物质^[3]。目前, 乌头属植物内生菌的相关研究正在展开。艾嫦等^[4]综述了从滇南黄草乌、川乌及乌头中分离鉴定了 262 株内生菌, 且证实了大部分乌头内生菌具有抗菌活性。由此可见,

收稿日期: 2020-11-02

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFE0119900); 国家自然科学基金面上项目 (81874343)

作者简介: 陈小晶, 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 1960243389@qq.com

*通信作者: 崔 辉, 男, 博士, 研究员, 研究方向为天然药物化学。E-mail: cuihui@gzucm.edu.cn

赵钟祥, 男, 博士, 教授, 研究方向为天然药物化学。E-mail: zzx37@163.com

筛选出能够产生活性代谢产物的菌种对于乌头属植物药用资源的开发具有重要意义。本研究对新鲜附子中的内生真菌进行分离,得到一株内生真菌并鉴定为木霉菌 *Trichoderma* sp., 命名 *Trichoderma* sp. FZ-31 (菌种编号: MT889737)。木霉菌来源于半知菌亚门丝孢纲丝孢目,目前已鉴定出 250 余种^[5]。大部分木霉菌可促进植物生长,提高植物的抗逆性和抗病性,是一类重要的生防微生物资源^[6]。本实验从 *Trichoderma* sp. FZ-31 发酵产物的醋酸乙酯部位分离得到 11 个化合物(图 1),分别鉴定为 (-)-蜂蜜曲菌素 [(-)-mellein, **1**]、(R)-7-羟基蜂蜜曲菌素

素 [(R)-7-hydroxymellein, **2**]、4-羟基蜂蜜曲菌素 (4-hydroxymellein, **3**)、赤霉甙吡喃酮 D (gibepyrone D, **4**)、阿魏酸甲酯 (methyl ferulate, **5**)、吲哚-3-乙酸 (indole-3-acetic acid, **6**)、吲哚-3-甲醛 (indol-3-carbaldehyde, **7**)、苯甲酰胺 (benzamide, **8**)、(3R,6R)-4-甲基-6-(1-甲基乙基)-3-苯甲基全氢-1,4-噁嗪-2,5-二酮[(3R,6R)-4-methyl-6-(1-methylethyl)-3-phenylmethylperhydro-1,4-oxazine-2,5-dione, **9**]、酒渣碱 (flazine, **10**)、腐皮壳素 A (diaporthein A, **11**)。除化合物 **5**、**7** 外,其余化合物均为首次从木霉菌 *Trichoderma* sp. 中分离得到。

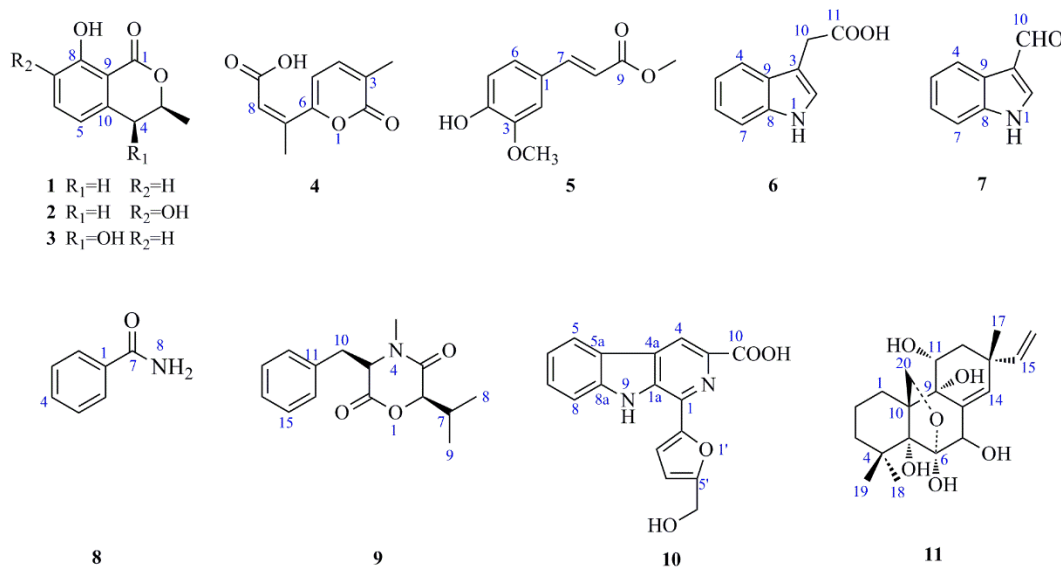


图 1 化合物 1~11 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—11

1 仪器与材料

HZP-250 恒温培养摇床(上海精宏实验设备有限公司); SW-CJ-2F 单人单面超净台(南京贝登电子商务有限公司); SQ5 10C 高压灭菌锅(深圳市塞亚泰克仪器设备公司); AB SCIEX Triple TOFTM 5600+四级杆-飞行时间串联质谱(美国 AB 质谱公司); Bruker AV 超导核磁共振仪(400 MHz, 瑞士布鲁克公司); Chirascan 圆二色谱仪(英国 Applied Photophysics 公司); POLARTRONIC HH W5 旋光仪(德国 SCHMIDT + HAENSCH 公司); SHIMADZU AU12 电子分析天平(岛津仪器公司); LC-100 半制备液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司)。

柱色谱硅胶(100~200、200~300 目, 青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(日本 GE 医疗集团); RP-C₁₈ 硅胶(Fuji, 40~75 mm, 日本

春日井富士硅业有限公司); TLC 分析硅胶板(GF₂₅₄, 德国默克公司)。甲醇(色谱级, 北京迈瑞达科技有限公司); 石油醚、醋酸乙酯、三氯甲烷、甲醇(分析纯, 天津致远试剂公司)。孟加拉红培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯葡萄糖水培养基(PDB), 广东环凯微生物科技有限公司。

2 方法

2.1 植物材料来源

生附子于 2018 年 12 月采集于四川省大凉山布拖县好医生附子种植基地, 由广州中医药大学段礼新研究员鉴定为乌头属植物乌头 *A. carmichaeli* Debx. 的子根, 药材标本(FZ-201812)储存于广州中医药大学药学院中药化学教研室。

2.2 菌株的分离纯化

用清水洗净附子表面, 在超净台中依次用 0.5% 次氯酸钠溶液和 75% 乙醇水进行表面消毒 30 s, 然

后用无菌水冲洗,表面消毒完毕用灭菌小刀将药材切成厚度约 2 mm 的薄片,薄片接种于孟加拉红培养基中。培养基于室温下培养,待生长出菌落后于 PDA 培养基中进行纯化及保存。

2.3 菌种的鉴定

纯化后的菌株进行基因测序,将其 18S rRNA 基因序列提交至 NCBI 的 GenBank 基因库,进行 BLAST 比对,结果显示,该菌株与木霉菌 *Trichoderma* sp. 相似度达到 99.94%,故鉴定该菌为木霉菌,命名为 *Trichoderma* sp. FZ-31 (菌种编号: MT889737)。该菌种现保存于广州中医药大学中药学院微生物库。

2.4 菌株发酵

用接种环挑取适量菌丝接种至装有 200 mL PDB 的三角瓶中,在恒温培养摇床中培养 3 d (28 °C, 130 r/min),得到菌株种子液。将等量种子液 (2 mL/瓶) 接种至无菌大米培养基 (60 g/瓶) 中,共培养 60 瓶,室温下发酵培养 30 d,得到固体发酵物。

2.5 发酵物分离纯化

发酵物用甲醇渗漉提取 3 次,渗漉液合并浓缩得到粗提物,粗提物用适量超纯水分散后用醋酸乙酯萃取 3 次 (3×4 L),减压除去溶剂得浸膏 46.2 g。浸膏经硅胶柱色谱,石油醚-醋酸乙酯 (100:1~0:1) 梯度洗脱,根据薄层色谱 (TLC) 检测后合并,共得到 10 个组分 (Fr. 1~10)。Fr. 8 (1.8 g) 析出黄色粉末,经二氯甲烷-甲醇重结晶得化合物 10 (33.9 mg)。Fr. 1 (0.2 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1),根据 TLC 检测后合并,得到 Fr. 1-1 和 Fr. 1-2, Fr. 1-2 (88.4 mg) 中析出白色片状结晶,得化合物 1 (29.8 mg)。Fr. 3 (0.2 g) 采用制备型 HPLC 进一步分离 [甲醇-水 (50:50), 1.5 mL/min], 得化合物 4 (31.9 mg)。Fr. 4 (0.8 g) 采用制备型 HPLC 分离 [甲醇-水 (40:60), 1.5 mL/min], 得化合物 2 (12.3 mg) 和 3 (15.2 mg)。Fr. 5 (2.2 g) 经 ODS 柱色谱,甲醇-水 (40:60~100:0) 梯度洗脱,根据 TLC 检测后合并,得 Fr. 5-1~5-4。Fr. 5-3 经 Sephadex LH-20 [二氯甲烷-甲醇 (1:1)] 进一步纯化,得到化合物 5 (23.0 mg)。Fr. 5-4 采用制备型 HPLC 进一步分离 [甲醇-水 (80:20), 1.5 mL/min], 得化合物 6 (10.4 mg) 和 7 (13.9 mg)。Fr. 6 (19.6 g) 经硅胶柱色谱,石油醚-醋酸乙酯 (5:1~0:1) 梯度洗脱,根据 TLC 检测后合并,

得 2 个组分 Fr. 6-1 和 Fr. 6-2。Fr. 6-2 (15.1 g) 经 ODS 柱色谱,甲醇-水 (30:70~100:0) 梯度洗脱,根据 TLC 检测后合并,得 Fr. 6-2-1 (6.8 g) 和 Fr. 6-2-2 (7.2 g)。Fr. 6-2-2 中析出白色结晶,经二氯甲烷-甲醇重结晶得化合物 11 (22.6 mg)。Fr. 6-2-1 采用制备型 HPLC 进一步分离 [甲醇-水 (75:25), 1.5 mL/min], 得化合物 8 (12.1 mg) 和 9 (17.3 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$; HR-ESI-MS m/z : 179.070 0 $[M+H]^+$ ($C_{10}H_{11}O_3$, 计算值 179.070 3); 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.02 (1H, brs, 8-OH), 7.40 (1H, m, H-6), 6.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 6.88 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5), 2.92 (2H, m, H-4), 4.7 (1H, m, H-3), 1.53 (3H, s, 3-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.1 (C-1), 162.3 (C-8), 139.5 (C-10), 136.1 (C-6), 118.0 (C-7), 116.3 (C-5), 108.4 (C-9), 76.2 (C-3), 34.7 (C-4), 20.9 (3-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 1 为 (-)-蜂蜜曲菌素。

化合物 2: 白色粉末, 分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 348 (3.414), 251 (3.461); ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 289 (+28.552), 259 (-0.007), 219 (+0.028) nm; HR-ESI-MS m/z : 193.050 64 $[M-H]^-$ ($C_{10}H_9O_4$, 计算值 193.050 6); 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.04 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 6.70 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 4.70 (1H, m, H-3), 3.20 (1H, m, H-4a), 2.66 (1H, m, H-4b), 1.52 (3H, s, 3-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 171.7 (C-1), 156.4 (C-8), 147.0 (C-7), 125.9 (C-6), 125.1 (C-5), 116.5 (C-10), 109.3 (C-9), 77.7 (C-3), 29.4 (C-4), 21.1 (3-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 2 为 (R)-7-羟基蜂蜜曲菌素。

化合物 3: 白色粉末, 分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 312 (3.372), 244 (3.452); ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 309 (+0.034), 255 (-0.005), 219 (+0.028) nm; HR-ESI-MS m/z : 193.050 7 $[M-H]^-$ ($C_{10}H_9O_4$, 计算值 193.050 6); 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 10.96 (1H, brs, 8-OH), 7.53 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-6), 6.99 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.92 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7), 4.60 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-3), 4.55 (1H, s, H-4), 1.56 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 3-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.4 (C-1), 162.1 (C-8), 140.6 (C-10), 136.9 (C-6), 118.6 (C-5), 118.5

(C-7), 106.9 (C-9), 78.4 (C-3), 67.3 (C-4), 16.1 (3-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为 4-羟基蜂蜜曲菌素。

化合物 **4**: 白色结晶(甲醇), 分子式为 C₁₀H₁₀O₄; HR-ESI-MS *m/z*: 195.064 7 [M+H]⁺ (C₁₀H₁₁O₄, 计算值 195.065 2); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.37 (1H, m, H-4), 6.67 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-5), 6.59 (1H, s, H-8), 2.08 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, 7-CH₃), 2.34 (3H, d, *J* = 1.3 Hz, 3-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 164.2 (C-2), 128.1 (C-3), 141.2 (C-4), 107.3 (C-5), 158.5 (C-6), 143.7 (C-7), 120.0 (C-8), 169.3 (9-COOH), 16.7 (7-CH₃), 13.5 (2-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为赤霉菌吡喃酮 D。

化合物 **5**: 白色粉末, 分子式为 C₁₁H₁₂O₄; HR-ESI-MS *m/z*: 207.066 3 [M-H]⁻ (C₁₁H₁₁O₄, 计算值 207.066 3); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 9.61 (1H, brs, 4-OH), 7.55 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7), 7.30 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 7.12 (1H, dd, *J* = 2.0, 1.6 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.47 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-8), 3.70 (3H, s, 9-OCH₃), 3.80 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 167.2 (C-9), 149.5 (C-3), 148.0 (C-4), 145.2 (C-7), 125.6 (C-1), 123.2 (C-6), 115.6 (C-5), 114.3 (C-8), 111.4 (C-2), 55.8 (3-OCH₃), 51.3 (9-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为阿魏酸甲酯。

化合物 **6**: 棕色粉末, 分子式为 C₁₀H₉NO₂; HR-ESI-MS *m/z*: 174.056 2 [M-H]⁻ (C₁₀H₈NO₂, 计算值 174.056 1); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.2 (1H, brs, H-11), 10.93 (1H, s, H-1), 7.55 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-4), 7.40 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 7.27 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2), 7.12 (1H, m, H-6), 7.03 (1H, m, H-5), 3.70 (2H, s, H-10); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 173.4 (C-11), 136.3 (C-8), 127.4 (C-9), 124.1 (C-2), 121.4 (C-6), 118.7 (C-5), 118.5 (C-4), 111.5 (C-7), 107.8 (C-3), 31.2 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **6** 为吡啶-3-乙酸。

化合物 **7**: 淡黄色粉末, 分子式为 C₉H₇NO; HR-ESI-MS *m/z*: 144.045 6 [M-H]⁻ (C₉H₆NO, 计算值 144.045 5); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 10.07 (1H, s, H-10), 8.93 (1H, brs, H-1), 8.33 (1H, m, H-4), 7.86 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-2), 7.45 (1H, m, H-7), 7.32~7.34 (2H, m, H-5, 6); ¹³C-NMR (100 MHz,

CDCl₃) δ: 185.2 (C-10), 136.8 (C-9), 135.3 (C-2), 124.4 (C-5), 123.1 (C-6), 122.0 (C-3), 122.0 (C-4), 119.7 (C-8), 111.5 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **7** 为吡啶-3-甲酰胺。

化合物 **8**: 白色粉末, 分子式为 C₇H₇NO; HR-ESI-MS *m/z*: 122.060 4 [M+H]⁺ (C₇H₈NO, 计算值 122.060 0); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.80~7.82 (2H, m, H-2, 6), 7.54 (1H, m, H-4), 7.43~7.47 (2H, m, H-3, 5), 6.12 (1H, brs, H-8a), 5.83 (1H, brs, H-8b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 169.6 (C-7), 133.4 (C-1), 133.2 (C-4), 128.8 (C-3), 128.8 (C-5), 127.5 (C-2), 127.5 (C-6)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **8** 为苯甲酰胺。

化合物 **9**: 白色粉末, 分子式为 C₁₅H₁₉NO₃; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 205 (3.656); ECD (MeOH) λ_{max} (Δε) 257 (+0.062), 227 (-0.002), 208 (-0.004), 197 (-0.003) nm; HR-ESI-MS *m/z*: 262.143 4 [M+H]⁺ (C₁₅H₂₀NO₃, 计算值 262.143 7); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.20~7.30 (5H, m, H-12~16), 5.49 (1H, m, H-3), 4.95 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6), 3.38 (2H, dd, *J* = 5.0, 14.5 Hz, H-10), 3.02 (3H, s, N-CH₃), 2.07 (1H, m, H-7), 0.83 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 9-CH₃), 0.44 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, 8-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.0 (C-2), 169.3 (C-5), 136.7 (C-11), 128.9 (C-12), 128.9 (C-16), 128.5 (C-13), 128.5 (C-15), 126.8 (C-14), 76.4 (C-6), 57.4 (C-3), 34.8 (C-10), 32.4 (N-CH₃), 29.7 (C-7), 18.3 (C-9), 17.5 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **9** 为(3*R*,6*R*)-4-甲基-6-(1-甲基乙基)-3-苯甲基全氢-1,4-噁嗪-2,5-二酮。

化合物 **10**: 黄色粉末, 分子式为 C₁₇H₁₂N₂O₄; HR-ESI-MS *m/z*: 309.086 7 [M+H]⁺ (C₁₇H₁₃N₂O₄, 计算值 309.087 0); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.61 (1H, s, H-9), 8.84 (1H, s, H-4), 8.42 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-5), 7.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-8), 7.65 (1H, t, *J* = 7.1 Hz, H-7), 7.43 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-3'), 7.34 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-6), 6.63 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H-4'), 5.53 (1H, brs, 6'-OH), 4.69 (2H, s, H-6'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.5 (C-10), 157.3 (C-5'), 151.3 (C-2'), 141.4 (C-8a), 137.0 (C-3), 132.5 (C-1a), 132.0 (C-1), 129.9 (C-4a), 129.0 (C-7), 122.1 (C-5), 121.0 (C-5a), 120.6 (C-6), 115.8 (C-4), 112.9 (C-8), 111.3 (C-3'), 109.3 (C-4'), 56.0 (C-6')。以

上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **10** 为酒渣碱。

化合物 **11**: 白色粉末, 分子式为 $C_{20}H_{30}O_6$; HR-ESI-MS m/z : 365.196 1 $[M-H]^-$ ($C_{20}H_{29}O_6$, 计算值 365.197 0); 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.96 (1H, s, H-14), 5.81 (1H, dd, $J = 10.9, 18.0$ Hz, H-15), 5.00 (2H, m, H-16), 4.33 (1H, s, H-7), 3.92 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-20a), 3.83 (1H, m, H-11), 3.32 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-20b), 1.87 (1H, m, H-12a), 1.85 (1H, m, H-12b), 1.82 (1H, m, H-1a), 1.77 (1H, m, H-3a), 1.70 (1H, m, H-1b), 1.68 (1H, m, H-2a), 1.60 (1H, m, H-2b), 1.40 (3H, s, 19- CH_3), 1.22 (3H, s, 18- CH_3), 1.18 (1H, m, H-3b), 1.12 (3H, s, 17- CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 146.5 (C-15), 136.8 (C-8), 133.3 (C-14), 111.6 (C-16), 106.1 (C-6), 81.4 (C-5), 77.2 (C-9), 73.4 (C-7), 68.5 (C-20), 67.4 (C-11), 50.2 (C-10), 40.5 (C-12), 38.5 (C-13), 38.1 (C-4), 37.9 (C-3), 27.8 (C-18), 25.4 (C-17), 24.9 (C-1), 24.4 (C-19), 18.2 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **11** 为腐皮壳素 A。

4 讨论

本研究从新鲜附子中分离得到一株内生真菌, 通过 18 S 测序比对鉴定为木霉菌 *Trichoderma* sp.。采取一系列化学手段对其固体发酵产物进行提取分离纯化, 共鉴定出 11 个化合物, 其中化合物 **1**~**3** 为异香豆素, 3 者的区别在于官能团的不同; 化合物 **4**、**5** 均为酯类化合物; 化合物 **6**、**7** 为简单吡啶生物碱, 是由吡啶母核的 3 位分别连接乙酰基和甲醛基而成; 化合物 **8** 为简单酰胺类生物碱; 化合物 **10** 为简单- β -卡波林碱类生物碱; 化合物 **11** 为二萜类化合物。除化合物 **5**、**7** 外, 其余化合物均为首次从木霉菌中分离得到。经查阅文献发现, 化合物 **2** 和 **3** 均有较强的抗真菌及乙酰胆碱酯酶抑制活性^[5-6]; 化合物 **6** 对细菌生长具有抑制作用^[18]; 化合物 **8** 能有效抑制乙酰胆碱酯酶活性^[19]; 化合物 **9** 能有效诱导人白血病细胞凋亡^[12]; 化合物 **10** 能够显著抑制 HIV-1 的活性^[16]; 化合物 **11** 对金黄色葡萄球菌和石膏样小孢子菌均显示出抗菌活性^[17]。本研究不仅丰富了木霉菌次生代谢产物的种类, 为木霉菌的活性物质研究提供了一定的参考, 也为开发附子内生菌的次生代谢产物提供了一定的研究基础。据报道, 本研究所得化合物大部分具有较好的药理活性, 表明附子内生菌的次生代谢产物具有一定药

用潜力, 因此可将内生菌作为进一步开发附子药用潜力的切入点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 斯琴巴特尔, 席琳图雅, 青格勒, 等. 附子生物碱类化学成分的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(98): 50-51.
- [2] 唐梅, 赵立春, 徐敏, 等. 附子化学成分和药理作用研究进展 [J]. 广西植物, 2017, 37(12): 1614-1627.
- [3] 杨志军, 邓毅, 曼琼, 等. 内生菌在天然药物研究中的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(5): 593-596.
- [4] 艾嫦, 朱妍妍, 赵长琦. 乌头属植物化学成分、药理作用及其内生菌的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(2): 248-259.
- [5] 秦文韬, 陈凯, 庄文颖. 木霉属 5 个中国新记录种及 2 种木霉在中国的新分布 [J]. 菌物学报, 2016, 35(8): 994-1007.
- [6] Ghisalberti E. Anti-infective agents produced by the hyphomycetes genera *Trichoderma* and *Gliocladium* [J]. *Med Chem Rev - Online*, 2004, 1(4): 395-403.
- [7] Kimura Y, Nakahara S, Fujioka S. Aspyrone, a nematocidal compound isolated from the fungus, *Aspergillus melleus* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(8): 1375-1376.
- [8] Oliveira C M, Regasini L O, Silva G H, et al. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla* [J]. *Phytochem Lett*, 2011, 4(2): 93-96.
- [9] Oliveira C M, Silva G H, Regasini L O, et al. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp. 1 and sp. 2, two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2009, 64(11/12): 824-830.
- [10] Wang Q X, Li S F, Zhao F, et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(5): 777-781.
- [11] Kwon Y S, Kim C M. Antioxidant constituents from the stem of *Sorghum bicolor* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2003, 26(7): 535-539.
- [12] 龚春燕, 张道敬, 魏鸿刚, 等. 多粘类芽孢杆菌 HY96-2 发酵液化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 379-381.
- [13] Asiri I A M, Badr J M, Youssef D T A. Penicillivinacine, antimigratory diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Penicillium vinaceum* [J].

- Phytochem Lett*, 2015, 13: 53-58.
- [14] Dorman D E, Lorenz L J, Occolowitz J L, *et al.* Isolation and structure elucidation of the major degradation products of cefaclor in the solid state [J]. *J Pharm Sci*, 1997, 86(5): 540-549.
- [15] Oh H, Kim T, Oh G S, *et al.* (3*R*, 6*R*)-4-methyl-6-(1-methylethyl)-3-phenylmethyl-perhydro-1,4-oxazine-2,5-dione: An apoptosis-inducer from the fruiting bodies of *Isaria Japonica* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(4): 345-348.
- [16] 董泽军, 王飞, 王睿睿, 等. 点柄乳牛肝菌子实体中抗 HIV-1 活性成分 [J]. *中草药*, 2007, 38(3): 337-339.
- [17] Pongcharoen W, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, *et al.* Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44 [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(5): 856-858.
- [18] Jiang C X, Li J, Zhang J M, *et al.* Isolation, identification, and activity evaluation of chemical constituents from soil fungus *Fusarium avenaceum* SF-1502 and endophytic fungus *Fusarium proliferatum* AF-04 [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(7): 1839-1846.
- [19] Xiu F, Li X T, Zhang W J, *et al.* A new alkaloid from *Portulaca oleracea* L. and its antiacetylcholinesterase activity [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(18): 2583-2590.

[责任编辑 王文倩]