

大蓟内生真菌 *Coniothyrium* sp. DJ-1 抗 SARS-CoV-2 M^{pro} 活性的化学成分研究

曾洁醇¹, 杨润¹, 黄金¹, 李艳平², 高路¹, 汪伟光^{1*}

1. 云南民族大学 国家民委民族药内生菌天然产物合成生物学重点实验室, 民族医药学院, 云南 昆明 650031

2. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 研究大蓟 *Cirsium japonicum* 内生真菌 *Coniothyrium* sp. DJ-1 中抑制新型冠状病毒主蛋白酶 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 main protease, SARS-CoV-2 M^{pro}) 活性的化学成分。方法 运用新型冠状病毒 M^{pro}/3CL^{pro} 抑制剂筛选模型从 30 株菌株中筛选具有抑制活性的菌株和化学成分。采用正相硅胶、反相 RP-18 柱色谱和 HPLC 等技术对抑制率高的菌株的次生代谢产物进行分离纯化, 通过 NMR、质谱等谱学技术解析化合物结构, 利用荧光共振能量转移法测定化合物对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的抑制活性。结果 在 30 株菌株中发现抑制活性良好的菌株 *Coniothyrium* sp. DJ-1, 并从该菌的大米发酵提取物中分离到 17 个化合物, 分别鉴定为德加隆内酯 (1)、5'-表细链格孢烯 (2)、细链格孢烯 (3)、4'-表细链格孢烯 (4)、3-表-二氢细链格孢烯 A (5)、瓶霉酚 (6)、1-脱氧红藻内酯 (7)、6-羟基-8-甲氧基-3a-甲基-3a,9b-二氢-3H-呋喃并[3,2-c]异色烯-2,5-二酮 (8)、黄色篮状菌酮 (9)、链格孢毒素 II (10)、二氢链格孢孢醇 (11)、2-(2'-羟基丙基)-5-甲基-7-羟基色酮 (12)、7-羟基-2-羟甲基-5-甲基-4H-色烯-4-酮 (13)、三环链格孢霉烯 6b (14)、三环链格孢霉烯 D (15)、苯乙醇 (16) 和对羟基苯甲醛 (17)。化合物 5、9、11 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 分别为 42.77、25.85 和 24.26 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 化合物 1~15 和 17 均为首次从 *Coniothyrium* sp. 属中分离得到, 化合物 5、9、11 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 有较好的抑制作用。通过筛选活性菌株的策略, 快速从真菌天然产物中挖掘抗新冠病毒活性的化合物, 为抗新冠病毒药物的研发提供了参考。

关键词: 大蓟; 盾壳霉属; 内生真菌; 次生代谢产物; 抗病毒活性; 新型冠状病毒主蛋白酶; 3-表-二氢细链格孢烯 A; 黄色篮状菌酮; 二氢链格孢孢醇

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)10-3071-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.004

Chemical constituents with potential anti-SARS-CoV-2 M^{pro} activity from endophytic fungus *Coniothyrium* sp. DJ-1 of *Cirsium japonicum*

ZENG Jie-chun¹, YANG Run¹, HUANG Jin¹, LI Yan-ping², GAO Lu¹, WANG Wei-guang¹

1. Key Laboratory of Natural Products Synthetic Biology of Ethnic Medicinal Endophytes, State Ethnic Affairs Commission, School of Ethnic Medicine, Yunnan Minzu University, Kunming 650031, China

2. College of Traditional of Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 main protease (SARS-CoV-2 M^{pro}) inhibitory activity from *Coniothyrium* sp. DJ-1, an endophytic fungus isolated from *Cirsium japonicum*. **Methods** The strains and chemical constituents both with inhibitory activity were screened from thirty endophytic fungi by using 2019-nCoV M^{pro}/3CL^{pro} inhibitor screening model. The secondary metabolites of the strain with high inhibition rate were separated and purified by normal phase silica gel column chromatography, reversed-phase RP-18 column chromatography, and HPLC. Their structures were identified by NMR, MS, and optical rotation data. And the compounds' anti-SARS-CoV-2 M^{pro} activities were determined by fluorescence resonance energy transfer method. **Results** The *Coniothyrium* sp. DJ-1 strain with good inhibitory activity was screened from thirty endophytic fungi. Seventeen compounds were isolated from the rice fermentation extract of

收稿日期: 2023-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960095); 国家自然科学基金项目 (82160670); 云南省应用基础项目 (202101AS070022, 202201AT070228); 云南省万人计划-青年拔尖人才 (W.-G. Wang)

作者简介: 曾洁醇 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: mzengjiechun@163.com

*通信作者: 汪伟光 (1984—), 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为天然药物化学。E-mail: ww@live.cn

Coniothyrium sp. DJ-1, and identified as djalonensone (1), 5'-epialtenuene (2), altenuene (3), 4'-epialtenuene (4), 3-*epi*-dihydroaltenuene A (5), phialophoriol (6), 1-deoxyrubralactone (7), 6-hydroxy-8-methoxy-3a-methyl-3a,9b-dihydro-3*H*-furo[3,2-*c*]isochromene-2,5-dione (8), talaroflavone (9), altertoxin II (10), dihydroalterperyleneol (11), 2-(2'-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone (12), 7-hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-4*H*-chromen-4-one (13), tricycloalternarene 6b (14), tricycloalternarene D (15), 2-phenylethan-1-ol (16) and 4-hydroxybenzaldehyde (17). Compounds 5, 9 and 11 exhibited potent inhibitory effects on SARS-CoV-2 M^{pro} with IC₅₀ values of 42.77, 25.85 and 24.26 μmol/L, respectively. **Conclusion** Compounds 1—15 and 17 have been isolated from the extracts of *Coniothyrium* sp. genus for the first time. Compounds 5, 9 and 11 exhibit potent inhibitory effects on SARS-CoV-2 M^{pro}. The research concludes that the method of screening active strains is helpful for us to quickly excavate active compounds from natural fungal products, moreover provides a basis for the research and development of drugs for COVID-19.

Key words: *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.; *Coniothyrium* sp.; endophytic fungus; secondary metabolites; antiviral activity; SARS-CoV-2 M^{pro}; 3-*epi*-dihydroaltenuene A; talaroflavone; dihydroalterperyleneol

新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 是一种由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引起的急性呼吸道传染病, 其传播速度快和致病率高, 对全球卫生和人口安全造成了严重的威胁。尽管一些抗病毒的药, 如瑞德西韦、法匹拉韦、莫那匹拉韦等被各国批准用于作为 COVID-19 的治疗药物^[1-5], 但由于 SARS-CoV-2 的高突变性, 这些治疗药物对于变异毒株的有效性面临巨大的挑战。因此, 寻找和开发抗 COVID-19 有效药物仍迫在眉睫。

研究表明, 针对冠状病毒中保守的靶点, 研发抗冠状病毒活性的抑制剂, 可以提高药物的有效性^[6]。主蛋白酶 (main protease, M^{pro}) 是冠状病毒的 1 个关键酶, 在病毒复制和转录中发挥重要作用, 且保守性高, 在人体内没有同源蛋白, 所以 M^{pro} 是药物设计和开发的理想靶点^[7-8]。目前, 已有文献报道一些小分子药物如奈玛特韦、依布罗、tideglusib、disulfiram、carmofur、PX-12 和紫草素等对 SARS-CoV-2 M^{pro} 有很好的抑制作用^[8-10], 同时在细胞检测中也显示了良好的抗病毒活性, 这表明以 SARS-CoV-2 M^{pro} 作为靶点来筛选药物是一种有效的策略。不仅如此, 中药在治疗 COVID-19 方面发挥了巨大的作用, 挽救了大量人民群众的生命^[11]。许多来源于传统中药的天然产物 (银杏酚酸、胡桃醌及其衍生物、4'-*O*-甲基黄芩素、新刺孢曲霉素 A 和甘草酸苷等) 也纷纷被报道对 SARS-CoV-2 M^{pro} 有很强抑制作用, 均被认为是潜在的抗 SARS-CoV-2 药物^[12-18]。由此可见, 从天然产物中发现具有抗 SARS-CoV-2 M^{pro} 活性的化合物, 是获得抗新冠病毒先导化合物的一种有效途径。

真菌来源的天然产物结构多样, 生物活性显著, 是药物先导化合物的重要源泉^[19-23]。目前有学者针

对性地从真菌天然产物中寻找抗新冠病毒活性的化合物, 如 Pang 等^[24]从 1 株青霉属菌株 *Penicillium* sp. SCSIO06868 中发现了 1 个 tetramic acid 衍生物对新冠病毒有抑制作用。本课题组在 1 株真菌 *Cladosporium* sp. 中发现了化合物曲霉扁枝衣酮 D、M 和 R 对 SARS-CoV-2 有抑制活性, 且能减少 SARS-CoV-2 引起的炎症反应^[25]。为了从真菌天然产物中寻找更多活性较好的抗 SARS-CoV-2 药物先导化合物, 本课题组对 30 株植物内生真菌的大米发酵提取物进行了活性筛选, 发现有多株菌株对 SARS-CoV-2 M^{pro} 有明显的抑制作用。其中 1 株大蓟 *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC. 内生真菌 *Coniothyrium* sp. DJ-1 的组分在 40 μg/mL 质量浓度下对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的抑制率达 75.0%, 提示该菌株代谢物中极有可能存在抗 COVID-19 活性较好的化合物。为了挖掘该菌株抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} 活性的化学成分, 进一步对 *Coniothyrium* sp. DJ-1 进行扩大发酵。综合运用现代色谱和光谱技术, 从 *Coniothyrium* sp. DJ-1 的大米发酵粗提物中分离鉴定了 17 个单体化合物, 分别为德加隆内酯 (djalonensone, 1)、5'-表细链格孢烯 (5'-epialtenuene, 2)、细链格孢烯 (altenuene, 3)、4'-表细链格孢烯 (4'-epialtenuene, 4)、3-表-二氢细链格孢烯 A (3-*epi*-dihydroaltenuene A, 5)、瓶霉酚 (phialophoriol, 6)、1-脱氧红藻内酯 (1-deoxyrubralactone, 7)、6-羟基-8-甲氧基-3a-甲基-3a,9b-二氢-3*H*-呋喃并[3,2-*c*]异色烯-2,5-二酮 (6-hydroxy-8-methoxy-3a-methyl-3a,9b-dihydro-3*H*-furo[3,2-*c*]isochromene-2,5-dione, 8)、黄色篮状菌酮 (talaroflavone, 9)、链格孢毒素 II (altertoxin II, 10)、二氢链格孢花醇 (dihydroalterperyleneol, 11)、2-(2'-羟基丙基)-5-甲基-7-羟基色酮 [2-(2'-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxy-

chromone, 12]、7-羟基-2-羟甲基-5-甲基-4*H*-色烯-4-酮 (7-hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-4*H*-chromen-4-one, 13)、三环链格孢霉烯 6b (tricycloalternarene 6b, 14)、三环链格孢霉烯 D (tricycloalternarene D, 15)、苯乙醇 (2-phenylethan-1-ol, 16) 和对羟基苯甲醛 (4-hydroxybenzaldehyde, 17)。活性测定发现, 化合物 5、9 和 11 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 有较好的抑制作用, 其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 分别为 42.77、25.85 和 24.26 μmol/L。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Avance III HD 600 MHz 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司), Acquity UPLC I-Class plus Xevo G2-XS Qtof 高分辨液质联用仪 (美国 Waters 公司), AUTOPOL V plus 高精度旋光仪 (美国鲁道夫公司), SpectraMax i3x 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司), Aglient 1100 高效液相色谱仪 (美国 Aglient 公司), Venusil MP-C₁₈ 柱 (250 mm×10 mm, 5 μm; 美国 Aglient 公司), LDZX-40B 型立式自动电热蒸汽灭菌锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), SW-CJ-ZFD 型无菌操作台 (苏净集团安泰公司), DHP-9082 型电热恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司), ZWY-2112B 型恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.2 材料

正相色谱柱硅胶 (200~300 目, 青岛谱科公司)、2019-nCoV M^{pro}/3CL^{pro} 抑制剂筛选试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)、依布硒 (Ebselen, 上海碧云天生物技术有限公司)、大米 (秋田小町)、马铃薯、葡萄糖、琼脂、娃哈哈纯净水、乙腈 (色谱纯)、二甲基亚砜 (DMSO)、二氯甲烷、甲醇、石油醚、醋酸乙酯 (均为分析纯)。

大蓟植株采自云南省昆明市呈贡区, 经云南民族大学熊勇副教授鉴定为菊科蓟属植物蓟 *C. japonicum* Fisch. ex DC.。本实验所用菌株从新鲜的大蓟茎部分离得到, 根据其菌落形态特征和 ITS rDNA 序列比对鉴定为盾壳霉属 *Coniothyrium* sp., 登录号 (MH205926.1)。菌株培养在斜面并保存于云南民族大学国家民委民族药内生菌天然产物合成生物学重点实验室。

2 方法

2.1 菌株筛选

将 30 株内生真菌用 PDA 培养基活化后分别接

种到 PDB 培养基中, 在 28 ℃、200 r/min 的条件下培养 3 d; 将种子液以 10% 的接种量接种到大米培养基中, 在 28 ℃组培室静置培养 30 d 后, 在无菌条件下, 分别取出 20 g 大米发酵物, 用醋酸乙酯超声萃取 2 次, 每次用 100 mL 醋酸乙酯, 将 2 次萃取的醋酸乙酯减压浓缩得到粗提组分。将此粗提组分溶解于 DMSO 中, 终质量浓度为 40 μg/mL; 利用 2019-nCoV M^{pro}/3CL^{pro} 抑制剂筛选试剂盒进行 SARS-CoV-2 M^{pro} 活性实验, 通过酶标仪读取相应的荧光值, 计算分析抑制效果, 以此筛选出对 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制效果最好的活性菌株。

2.2 扩大发酵

菌株 *Coniothyrium* sp. DJ-1 用 PDA 平板活化, 将长满菌落的平板切成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块, 以 5% 的接种量加入到 10 瓶 PDB 培养基中, 每瓶体积为 200 mL, 在 28 ℃、200 r/min 条件下培养 3 d, 此 10 瓶作为大量发酵的种子液。配制 100 瓶大米培养基 (大米 80 g、珍珠岩 10 g、100 mL 纯净水), 高温灭菌备用。将 10 瓶种子液以 10% 的接种量加入到 100 瓶大米培养基中, 于 28 ℃组培室静置培养 30 d。

2.3 提取与分离

采用醋酸乙酯对菌株 *Coniothyrium* sp. DJ-1 的大米发酵物超声提取, 每次 20 L, 提取 4 次。将提取液减压浓缩, 得到 78 g 总浸膏; 经正相硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (1:0→1:1) 梯度洗脱, 合并相同流分得到 9 个组分 (Fr. 1~9)。Fr. 2 (7.5 g) 经正相硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯 (30:1→0:1) 洗脱, 得到 5 个亚组分 (Fr. 2-1~2-5)。Fr. 2-3 经半制备 HPLC (乙腈-水 47:53) 得到化合物 16 (3.1 mg); Fr. 2-5 经半制备 HPLC (乙腈-水 58:42) 得到化合物 7 (6.1 mg) 和 8 (33 mg)。Fr. 4 (6.0 g) 经正相硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯 (10:1→1:1) 洗脱, 得到 7 个亚组分, 其中 Fr. 4-2 经半制备 HPLC (乙腈-水 38:62) 得到化合物 17 (14.2 mg); Fr. 4-5 经半制备 HPLC (乙腈-水 67:33) 得到化合物 1 (26.1 mg)、6 (3.4 mg)、10 (31.0 mg) 和 15 (10.5 mg)。Fr. 6 (5.8 g) 经正相硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯 (5:1→0:1) 洗脱, 得到 6 个亚组分, 其中 Fr. 6-4 经半制备 HPLC (乙腈-水 52:48) 得到化合物 11 (6.0 mg); Fr. 6-5 经半制备 HPLC (乙腈-水 45:55) 得到化合物 2 (3.3 mg)、3 (30.3 mg) 和 9 (4.2 mg)。Fr. 7 (1.1 g) 经 RP-18 柱色谱并结合半制备 HPLC 纯化, 得到化合物 4 (7.4 mg)、5

(4.0 mg)、12 (7.6 mg)、13 (2.0 mg) 和 14 (2.5 mg)。

2.4 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制活性测定

在荧光共振能量转移的基础上，通过 2019-nCoV M^{pro}/3CL^{pro} 抑制剂筛选试剂盒（增强型）对 SARS-CoV-2 M^{pro} 进行抑制实验。将所有待测化合物溶解于 DMSO 中，备用。设空白组、100%酶活性组、阳性对照组和给药组。在黑色的 96 孔板中，各组分别加入 90 μ L 的 Assay Buffer，100%酶活性组、阳性对照组和给药组加入 1 μ L SARS-CoV-2 M^{pro}、空白组补加 1 μ L Assay Buffer，空白组和 100%酶活性组各加入 5 μ L DMSO，阳性对照组和给药组分别加入 5 μ L 的阳性药物依布硒（Ebselen）和待

测化合物溶液，混匀。在 37 $^{\circ}$ C 恒温避光孵育 30 min 后，转移至冰上冷却 10 min，再快速加入 4 μ L 底物，混匀。然后，在 SpectraMax i3x 多功能酶标仪上读取相对荧光单元（relative fluorescence unit, RFU），激发波长为 325 nm，发射波长为 393 nm。按照公式计算各化合物对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{RFU}_{100\% \text{酶活性}} - \text{RFU}_{\text{样品}}) / (\text{RFU}_{100\% \text{酶活性}} - \text{RFU}_{\text{空白}})$$

3 结果与分析

3.1 菌株筛选结果

采用 2019-nCoV-M^{pro}/3CL^{pro} 抑制剂筛选模型对 30 株菌株的大米发酵组分进行活性筛选，结果见表 1。根据结果可以判断出在这 30 株菌株中，有 9 株菌的

表 1 30 株内生真菌的来源和 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制活性

Table 1 Sources and SARS-CoV-2 M^{pro} inhibition activities of thirty endophytic fungi

菌株名称	来源	抑制率/%
<i>Diaporthe</i> sp. WLM-Y-1	乌菰莓 <i>Cayratia japonica</i> (Thunb.) Gagnep.	68.8
<i>Didymella</i> sp. WLM-Y-3		—
<i>Diaporthe</i> sp. WLM-Y-2		61.8
<i>Coniothyrium</i> sp. DJ-1	大蓟 <i>Cirsium japonicum</i> Fisch. ex DC.	75.0
<i>Penicillium</i> sp. DJ-X		38.5
<i>Fusarium</i> sp. QYYZH-5	滇重楼 <i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> (Franch.) Hand.-Mzt.	32.6
<i>Fusarium</i> sp. QYYZH-3		—
<i>Fusarium</i> sp. QYYZH-1		41.0
<i>Minutisphaera</i> sp. LZC-P1	空心莲子草 <i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.) Griseb.	65.6
<i>Phyllosticta</i> sp. LZC-7		56.6
<i>Staphylotrichum</i> sp. LZC-31		—
<i>Trichoderma</i> sp. LZC-2		34.9
<i>Ascochyta</i> sp. LZC-32		20.0
<i>Fusarium</i> sp. LZC-C1		25.9
<i>Diaporthe</i> sp. RG-Y4	肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i> (L.) D. Don	33.9
<i>Phialophora</i> sp. RG-G4		41.0
<i>Pleosporales</i> sp. RG-G2		53.5
<i>Colletotrichum</i> sp. RG-Y6		61.6
<i>Paraphaeosphaeria</i> sp. XB-J1	小檗 <i>Berberis julianae</i> Schneid.	20.8
<i>Tremateia</i> sp. XB-Y2		48.1
<i>Alternaria</i> sp. XB-Y1		67.8
<i>Fusarium</i> sp. XB-J2		60.4
<i>Cytospora</i> sp. PS-J1	朴树 <i>Celtis sinensis</i> Pers.	43.8
<i>Chaetomium</i> sp. HT	核桃 <i>Juglans regia</i> L.	33.2
<i>Colletotrichum</i> sp. CCT-J1	常春藤 <i>Hedera nepalensis</i> var. <i>sinensis</i> (Tobler) Rehder	34.0
<i>Colletotrichum</i> sp. CCT-Y3		36.1
<i>Nakaseomyces</i> sp. JM-J6	决明 <i>Cassia tora</i> (L.) Roxb.	33.0
<i>Fusarium</i> sp. JM-G5		37.5
<i>Fusarium</i> sp. JM-J2		66.2
<i>Cercospora</i> sp. YJT-1	羊角藤 <i>Morinda umbellata</i> subsp. <i>obovata</i> Y. Z. Ruan	65.7

“—” 表示无抑制作用

“—” means no inhibition activity

抑制率 $\geq 60.0\%$ ，其中菌株 *Coniothyrium* sp. DJ-1 的抑制效果是最好的，抑制率为 75.0%。

3.2 结构鉴定

化合物 **1**：白色粉末。HR-ESI-MS m/z 273.075 8 $[M+H]^+$ (计算值 $C_{15}H_{13}O_5$, 273.075 7)，确定分子式为 $C_{15}H_{12}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3COCD_3) δ : 11.98 (1H, s, 3-OH), 9.27 (1H, s, 4'-OH), 7.31 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 6.80 (1H, m, H-5'), 6.71 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-3'), 6.58 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-4), 3.98 (3H, s, 5-OCH₃), 2.80 (3H, s, 6'-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3COCD_3) δ : 167.6 (C-5), 166.1 (C-7), 166.0 (C-3), 159.4 (C-4'), 154.1 (C-2'), 139.7 (C-6'), 139.1 (C-1), 118.4 (C-5'), 110.6 (C-1'), 104.6 (C-6), 102.7 (C-3'), 99.9 (C-4), 99.8 (C-2), 56.3 (5-OMe), 25.6 (6'-Me)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[26]，故鉴定化合物 **1** 为德加隆内酯。

化合物 **2**：黄色粉末。 $[\alpha]_D^{21} + 4$ (c 0.05, MeOH)。HR-ESI-MS m/z 293.102 1 $[M+H]^+$ (计算值 $C_{15}H_{17}O_6$, 293.101 9)，确定它的分子式为 $C_{15}H_{16}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.35 (1H, s, 3-OH), 6.56 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.45 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4), 6.10 (1H, dd, $J = 3.1, 1.3$ Hz, H-6'), 4.49 (1H, t, $J = 3.8$ Hz, H-5'), 4.29 (1H, m, H-4'), 3.86 (3H, s, 5-OCH₃), 2.51 (1H, dd, $J = 14.2, 5.5$ Hz, H-3' α), 2.27 (1H, dd, $J = 14.2, 2.7$ Hz, H-3' β), 1.67 (3H, s, 2'-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 168.6 (C-7), 166.2 (C-5), 164.2 (C-3), 138.4 (C-1), 135.0 (C-1'), 127.2 (C-6'), 103.0 (C-4), 101.2 (C-2), 101.0 (C-6), 80.9 (C-2'), 67.6 (C-5'), 67.3 (C-4'), 55.8 (5-OCH₃), 39.9 (C-3'), 28.0 (CH₃-2')。以上数据与文献报道基本一致^[27]，故鉴定化合物 **2** 为 5'-表细链格孢烯。

化合物 **3**：黄色粉末。 $[\alpha]_D^{21} - 18$ (c 0.1, MeOH)。HR-ESI-MS m/z 293.102 4 $[M+H]^+$ (计算值 $C_{15}H_{17}O_6$, 293.101 9)，确定它的分子式为 $C_{15}H_{16}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.22 (1H, s, 3-OH), 6.50 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 6.41 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4), 6.11 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6'), 4.17 (1H, m, H-5'), 3.85 (3H, s, 5-OCH₃), 3.83 (1H, m, H-4') 3.02 (1H, s, 4'-OH), 2.56 (1H, dd, $J = 14.8, 4.3$ Hz, H-3' α), 1.86 (1H, dd, $J = 14.8, 11.3$ Hz, H-3' β), 1.48 (3H, d, $J = 2.4$ Hz, 2'-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.2 (C-7), 166.3 (C-5), 164.2 (C-3), 139.1 (C-1), 133.8 (C-1'), 130.3 (C-6'), 103.2 (C-6), 100.9 (C-4),

100.6 (C-2), 81.3 (C-2'), 73.0 (C-5'), 70.3 (C-4'), 55.8 (5-OCH₃), 40.8 (C-3'), 28.1 (CH₃-2')。以上数据与文献报道基本一致^[27]，故鉴定化合物 **3** 为细链格孢烯。

化合物 **4**：白色粉末。 $[\alpha]_D^{21} - 7.3$ (c 0.15, MeOH)。HR-ESI-MS m/z 293.101 9 $[M+H]^+$ (计算值 $C_{15}H_{17}O_6$, 293.101 9)，确定它的分子式为 $C_{15}H_{16}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.63 (1H, s, H-6), 6.47 (1H, s, H-4), 6.18 (1H, s, H-6'), 4.21 (1H, dd, $J = 8.1, 2.5$ Hz, H-5'), 3.86 (3H, s, 5-OCH₃), 3.74 (1H, ddd, $J = 12.2, 8.0, 3.7$ Hz, H-4'), 2.26 (1H, dd, $J = 12.2, 3.7$ Hz, H-3' α), 2.16 (1H, t, $J = 12.5$ Hz, H-3' β), 1.55 (3H, s, 2'-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 169.8 (C-7), 168.1 (C-5), 165.7 (C-3), 139.2 (C-1), 134.4 (C-1'), 130.5 (C-6'), 103.8 (C-6), 102.3 (C-4), 101.4 (C-2), 83.6 (C-2'), 74.4 (C-5'), 72.3 (C-4'), 56.5 (5-OCH₃), 44.8 (C-3'), 26.8 (CH₃-2')。以上数据与文献报道基本一致^[28]，故鉴定化合物 **4** 为 4'-表细链格孢烯。

化合物 **5**：无色固体。 $[\alpha]_D^{21} - 82$ (c 0.05, MeOH)。HR-ESI-MS m/z 295.117 7 $[M+H]^+$ (计算值 $C_{15}H_{19}O_6$, 295.117 6)，确定分子式为 $C_{15}H_{18}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.25 (1H, s, 7-OH), 6.37 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.25 (1H, m, H-10), 3.83 (3H, s, 9-OCH₃), 3.68 (2H, dddd, $J = 25.0, 15.9, 9.1, 4.8$ Hz, H-2, 3), 3.14 (1H, dd, $J = 12.7, 3.7$ Hz, H-10b), 2.63 (1H, s, 3-OH), 2.53 (1H, m, H-4 α), 2.37 (1H, dd, $J = 12.3, 4.6$ Hz, H-4 β), 1.97 (1H, t, $J = 11.9$ Hz, H-1 α), 1.46 (1H, td, $J = 13.0, 11.0$ Hz, H-1 β), 1.26 (3H, s, H-11); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 168.8 (C-6), 166.5 (C-9), 165.0 (C-7), 141.9 (C-10a), 104.5 (C-8), 101.3 (C-6a), 99.2 (C-10), 82.9 (C-4a), 75.2 (C-2), 72.5 (C-3), 55.8 (9-OCH₃), 44.1 (C-4), 41.9 (C-10b), 30.1 (C-1), 19.4 (C-11)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[29]，故鉴定化合物 **5** 为 3-表-二氢细链格孢烯 A。

化合物 **6**：白色粉末。 $[\alpha]_D^{21} + 80$ (c 0.05, MeOH)。HR-ESI-MS m/z 263.090 6 $[M+H]^+$ (计算值 $C_{14}H_{15}O_5$, 263.091 4)，确定它的分子式为 $C_{14}H_{14}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.35 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, 3-OH), 6.51 (1H, t, $J = 2.0$ Hz, H-4), 6.37 (1H, t, $J = 1.9$ Hz, H-6), 5.20 (1H, dt, $J = 7.4, 4.9$ Hz, H-10), 3.89 (3H, d, $J = 1.6$ Hz, 5-OCH₃), 3.33 (1H, m, H-12), 2.35 (1H, m, 10-OH), 2.21 (2H, m, H-11), 1.27 (3H, dd, $J = 6.9, 1.6$ Hz, H-13); ^{13}C -NMR (150 MHz,

CDCl_3) δ : 167.2 (C-5), 167.1 (C-1), 165.1 (C-3), 154.1 (C-9), 137.0 (C-7), 121.0 (C-8), 101.0 (C-4), 100.4 (C-6), 100.1 (C-2), 71.9 (C-10), 56.0 (5-OCH₃), 40.6 (C-11), 32.5 (C-12), 21.3 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[30], 故鉴定化合物 **6** 为瓶霉酚。

化合物 **7**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z 261.075 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_5$, 261.075 7), 确定它的分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 11.32 (1H, s, 6-OH), 6.68 (2H, t, $J = 1.7$ Hz, H-7, 9), 3.93 (3H, s, 8-OCH₃), 3.43 (1H, td, $J = 6.8, 1.3$ Hz, H-1), 2.94 (1H, dd, $J = 19.0, 6.5$ Hz, H-2 α), 2.30 (1H, dd, $J = 18.9, 1.3$ Hz, H-2 β), 1.45 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 1-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 195.4 (C-3), 167.0 (C-8), 165.4 (C-6), 165.0 (C-5), 148.3 (C-3a), 144.8 (C-10a), 134.6 (C-9a), 103.4 (C-7), 103.2 (C-9), 100.9 (C-5a), 56.2 (8-OCH₃), 42.9 (C-2), 28.5 (C-1), 21.1 (CH₃-1)。以上数据与文献报道基本一致^[31], 故鉴定化合物 **7** 为 1-脱氧红藻内酯。

化合物 **8**: 白色粉末。 $[\alpha]_{\text{D}}^{19} -1.4$ (c 0.07, CH_3CN)。HR-ESI-MS m/z 265.070 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_6$, 265.070 6), 确定它的分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3COCD_3) δ : 11.25 (1H, s, 6-OH), 6.77 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-9), 6.65 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 5.51 (1H, s, H-9b), 3.94 (3H, s, 8-OCH₃), 3.25 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-3 α), 2.97 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-3 β), 1.65 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3COCD_3) δ : 173.4 (C-2), 167.6 (C-5), 167.5 (C-8), 165.5 (C-6), 134.4 (C-9a), 111.1 (C-9), 103.4 (C-7), 100.1 (C-6a), 87.0 (C-3a), 78.3 (C-9b), 56.5 (8-OCH₃), 43.2 (C-3), 20.6 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[32], 故鉴定化合物 **8** 为 6-羟基-8-甲氧基-3a-甲基-3a,9b-二氢-3*H*-呋喃并[3,2-*c*]异色烯-2,5-二酮。

化合物 **9**: 黄色固体。HR-ESI-MS m/z 277.071 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_6$, 277.070 6), 确定它的分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.49 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4), 6.33 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 6.07 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3'), 4.82 (1H, s, H-5'), 3.82 (3H, s, 5-OCH₃), 1.92 (3H, d, $J = 1.5$ Hz, 2'-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 199.9 (C-4'), 170.6 (C-2'), 170.4 (C-1), 167.8 (C-5), 158.2 (C-7), 147.1 (C-3a), 130.0 (C-3'), 104.5 (C-7a), 102.2 (C-4), 101.4 (C-6), 93.7 (C-3), 78.7 (C-5'), 56.3 (5-OCH₃),

13.9 (2'-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[31], 因此鉴定化合物 **9** 为黄色篮状菌酮。

化合物 **10**: 黄色粉末。 $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +52$ (c 0.1, MeOH)。HR-ESI-MS m/z 351.086 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_6$, 351.086 3), 确定它的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 12.72 (1H, s, 3-OH), 12.12 (1H, s, 10-OH), 7.91 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-1), 7.85 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-12), 7.11 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2), 7.06 (1H, dd, $J = 8.8, 0.9$ Hz, H-11), 4.23 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-7), 3.71 (1H, dd, $J = 3.6, 0.9$ Hz, H-8), 3.54 (1H, s, H-6b), 3.25 (1H, ddd, $J = 17.5, 14.1, 5.0$ Hz, H-5ax), 2.89 (1H, ddd, $J = 13.3, 5.0, 2.5$ Hz, H-6eq), 2.83 (1H, ddd, $J = 17.6, 4.0, 2.5$ Hz, H-5eq), 2.41 (1H, tdd, $J = 13.7, 4.1, 1.9$ Hz, H-6ax); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 204.3 (C-4), 196.8 (C-9), 163.5 (C-3), 162.8 (C-10), 138.9 (C-9b), 133.7 (C-12c), 133.1 (C-1), 132.7 (C-12), 124.0 (C-12a), 122.6 (C-12b), 120.0 (C-2), 118.2 (C-11), 114.7 (C-9a), 113.7 (C-3a), 68.4 (C-6a), 55.9 (C-7), 52.9 (C-8), 45.2 (C-6b), 33.4 (C-6), 32.3 (C-5)。以上数据与文献报道基本一致^[33], 故鉴定化合物 **10** 为链格孢毒素 II。

化合物 **11**: 红色粉末。HR-ESI-MS m/z 351.088 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_6$, 351.087 4), 确定它的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.70 (1H, s, 3-OH), 12.29 (1H, s, 10-OH), 8.03 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-1), 7.97 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-12), 7.01 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2), 6.91 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-11), 5.36 (1H, s, 7-OH), 5.26 (1H, s, 6a-OH), 4.54~4.43 (1H, m, H-7), 3.05 (1H, dd, $J = 17.3, 14.4$ Hz, H-6b), 3.02 (1H, m, H-5ax), 2.98 (1H, m, H-5eq), 2.92 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-8ax) 2.83 (1H, dd, $J = 15.8, 4.6$ Hz, H-8eq), 2.59~2.50 (1H, m, H-6ax), 2.27 (1H, td, $J = 14.3, 3.9$ Hz, H-6eq); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 206.1 (C-4), 204.2 (C-9), 161.0 (C-3), 160.4 (C-10), 140.7 (C-9b), 138.4 (C-12c), 132.9 (C-1), 132.6 (C-12), 124.8 (C-12a), 123.5 (C-12b), 117.9 (C-2), 116.5 (C-9a), 115.6 (C-11), 113.8 (C-3a), 68.0 (C-6a), 64.7 (C-7), 51.4 (C-6b), 47.5 (C-8), 34.8 (C-6), 33.5 (C-5)。以上数据与文献报道基本一致^[34], 故鉴定化合物 **11** 为二氢链格孢花醇。

化合物 **12**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z 235.096 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_4$, 235.096 4), 确定它的分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ :

6.62 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-6), 6.60 (1H, dd, $J = 2.4$, 1.1 Hz, H-8), 6.03 (1H, s, H-3), 4.16 (1H, m, H-2'), 2.68 (3H, s, 5-CH₃), 2.63 (2H, m, H-1'), 1.25 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, 2'-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 182.1 (C-4), 167.2 (C-2), 163.7 (C-7), 161.7 (C-9), 143.7 (C-5), 118.4 (C-3), 115.8 (C-10), 112.6 (C-6), 101.9 (C-8), 66.5 (C-2'), 44.4 (C-1'), 23.7 (2'-CH₃), 23.3 (CH₃-5)。以上数据与文献报道基本一致^[35], 故鉴定化合物 **12** 为 2-(2'-羟基丙基)-5-甲基-7-羟基色酮。

化合物 **13**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z 207.065 3 [M+H]⁺ (计算值 C₁₁H₁₁O₄, 207.065 1), 确定它的分子式为 C₁₁H₁₀O₄。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.66~6.62 (2H, m, H-6, 8), 6.22 (1H, d, $J = 1.1$ Hz, H-3), 4.43 (2H, d, $J = 1.0$ Hz, 2-CH₂OH), 2.71 (3H, s, 5-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 182.1 (C-4), 168.7 (C-2), 163.9 (C-7), 161.3 (C-8a), 143.8 (C-5), 118.4 (C-6), 115.8 (C-4a), 109.1 (C-3), 101.8 (C-8), 61.3 (2-CH₂OH), 23.2 (5-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[36], 故鉴定化合物 **13** 为 7-羟基-2-羟甲基-5-甲基-4*H*-色烯-4-酮。

化合物 **14**: 无色固体。[α]_D²¹ +313 (c 0.03, MeOH), HR-ESI-MS m/z 387.214 6 [M+Na]⁺ (计算值 C₂₁H₃₂O₅Na, 387.214 1), 确定它的分子式为 C₂₁H₃₂O₅。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.35 (1H, m, H-8), 4.04 (1H, ddd, $J = 12.8$, 5.4, 2.6 Hz, H-17), 3.31~3.23 (1H, m, H-3), 2.78~2.74 (1H, m, H-10), 2.73~2.66 (1H, m, H-12 β), 2.60 (1H, dt, $J = 16.4$, 3.7 Hz, H-9 β), 2.56~2.42 (2H, m, H-15), 2.39 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-9 α), 2.37~2.27 (1H, m, H-16 α), 2.22 (1H, dtt, $J = 17.2$, 7.4, 3.4 Hz, H-12 α), 2.01 (1H, m, H-6), 1.84~1.70 (1H, m, H-16 β), 1.45 (2H, m, H-5), 1.44 (3H, d, $J = 4.2$ Hz, H-10'), 1.34~1.20 (2H, m, H-4), 1.18 (3H, s, H-1), 1.12 (3H, s, H-2'), 0.98 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-6'); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 198.1 (C-18), 172.7 (C-14), 150.0 (C-7), 120.2 (C-8), 105.3 (C-13), 88.5 (C-10), 78.4 (C-3), 73.2 (C-2), 71.1 (C-17), 46.6 (C-11), 45.1 (C-9), 32.4 (C-6), 32.0 (C-5), 29.6 (C-4), 29.4 (C-16), 27.9 (C-15), 26.6 (C-1), 23.5 (C-10'), 23.4 (C-2'), 20.2 (C-6'), 15.5 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[37], 故鉴定化合物 **14** 为三环链格孢霉烯 6b。

化合物 **15**: 无色固体。[α]_D²¹ +172.7 (c 0.22, MeOH), HR-ESI-MS m/z 391.248 3 [M+H]⁺ (计算

值 C₂₃H₃₅O₅, 391.247 9), 确定它的分子式为 C₂₃H₃₄O₅。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.29 (1H, m, H-8), 4.01 (1H, ddd, $J = 12.9$, 5.4, 1.3 Hz, H-17), 3.91 (2H, m, H-1, 17-OH), 3.81 (1H, dd, $J = 10.7$, 6.9 Hz, H-1), 2.73 (1H, td, $J = 4.7$, 2.2 Hz, H-11), 2.64 (1H, ddt, $J = 17.0$, 3.4, 1.7 Hz, H-12 α), 2.58 (1H, dt, $J = 16.3$, 2.0 Hz, H-9 α), 2.49 (1H, ddt, $J = 19.3$, 13.7, 3.3 Hz, H-15 β), 2.41 (1H, dq, $J = 16.0$, 1.8 Hz, H-9 β), 2.39~2.34 (1H, m, H-15 α), 2.31 (1H, ddd, $J = 10.4$, 6.1, 2.2 Hz, H-16 β), 2.22 (1H, ddd, $J = 17.1$, 7.0, 2.7 Hz, H-12 β), 2.04 (3H, s, H-1'), 1.99 (1H, q, $J = 7.3$, 6.8 Hz, H-6), 1.70 (2H, m, H-2 β , 16 α), 1.42 (3H, s, H-10'), 1.35~1.28 (1H, m, H-5 β), 1.30~1.25 (1H, m, H-3 α), 1.27~1.23 (1H, m, H-4 α), 1.25~1.19 (1H, m, H-5 α), 1.21~1.12 (1H, m, H-4 β), 1.06 (1H, m, H-3 β), 0.94 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-6'), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-2'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 197.9 (C-18), 172.5 (C-14), 171.5 (MeCO), 150.5 (C-7), 120.0 (C-8), 105.4 (C-13), 88.5 (C-10), 71.2 (C-17), 69.6 (C-1), 46.4 (C-11), 45.1 (C-9), 35.1 (C-5), 33.7 (C-3), 32.9 (C-6), 32.6 (C-2), 29.7 (C-16), 28.0 (C-15), 24.9 (C-4), 23.6 (C-10'), 21.2 (C-1'), 20.3 (C-6'), 17.1 (C-2'), 15.6 (C-12)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[38], 故鉴定化合物 **15** 为三环链格孢霉烯 D。

化合物 **16**: 无色油状物。HR-ESI-MS m/z 145.062 6 [M+Na]⁺ (计算值 C₈H₁₀ONa, 145.062 3), 确定它的分子式为 C₈H₁₀O。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.35~7.29 (2H, m, H-4), 7.24 (3H, m, H-2, 3, 5, 6), 3.87 (2H, td, $J = 6.6$, 1.4 Hz, H-8), 2.88 (2H, dd, $J = 7.2$, 5.9 Hz, H-7); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 138.6 (C-1), 129.2 (C-3, 5), 128.7 (C-2, 6), 126.6 (C-4), 63.9 (C-8), 39.3 (C-7)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[39], 故鉴定化合物 **16** 为苯乙醇。

化合物 **17**: 浅黄色粉末。HR-ESI-MS m/z 123.043 4 [M+H]⁺ (计算值 C₇H₆O₂, 123.044 0), 确定它的分子式为 C₇H₆O₂。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 9.75 (1H, s, H-7), 7.79 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2, 6), 6.93 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 193.0 (C-7), 165.7 (C-4), 133.6 (C-2, 6), 130.3 (C-1), 117.1 (C-3, 5)。以上数据与文献报道的数据基本一致^[40], 故鉴定化合物 **17** 为对羟基苯甲醛。

3.3 化合物对 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制结果

以依布硒 (1 μ mol/L) 为阳性对照, 所有化合

物在 40 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下对 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制活性如图 1 所示。可以发现化合物 1、4、6、13、16 和 17 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 基本无抑制作用（抑制率 < 10%），化合物 2、3、7、8、10、12、14 和 15 有一定抑制作用（抑制率 20%~45%），而化合物 5、9、11 有较好的抑制作用（抑制率 > 48%），对化合物 5、9 和 11 进一步进行浓度梯度测试，得到 IC₅₀ 值分别为 42.77、25.85 和 24.26 $\mu\text{mol/L}$ 。

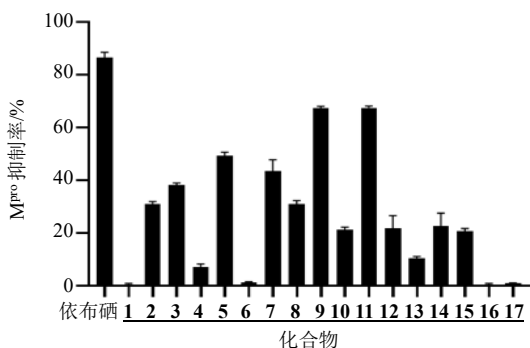


图 1 化合物 1~17 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effects of compounds 1—17 on SARS-CoV-2 M^{pro}

4 讨论

本实验通过聚焦大量内生真菌菌株抗 SARS-CoV-2 活性筛选，导向发现大蓟内生真菌 *Coniothyrium* sp. DJ-1 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 有较好的抑制作用，并进一步对该菌抗 SARS-CoV-2 活性的化学成分进行研究。从 *Coniothyrium* sp. DJ-1 菌株的大米发酵提取物中分离鉴定了 17 个化合物，其中化合物 1~15 和 17 均为首次从 *Coniothyrium* 属菌株中分离得到。通过活性实验发现了该菌次生代谢产物中的主要活性成分是化合物 5、9 和 11，IC₅₀ 值分别为 42.77、25.85 和 24.26 $\mu\text{mol/L}$ 。此外，本研究发现化合物 11 是链格孢毒素类化合物，曾被报道在 2.2 $\mu\text{mol/L}$ 时能完全抑制 HIV-1 的复制^[33]，这意味着化合物 11 可能具有广谱抗病毒活性。本研究表明，通过大量内生真菌菌株的筛选并结合活性跟踪导向分离策略，可以提高抗 COVID-19 活性化合物发现的效率。此外，也为植物内生真菌的应用提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Wang Y M, Zhou F, Zhang D Y, *et al.* Evaluation of the efficacy and safety of intravenous remdesivir in adult patients with severe COVID-19: Study protocol for a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled,

multicentre trial [J]. *Trials*, 2020, 21(1): 422.

- [2] Nakhilband A, Fakhari A, Azizi H. Interferon-beta offers promising avenues to COVID-19 treatment: A systematic review and meta-analysis of clinical trial studies [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2021, 394(5): 829-838.
- [3] Yildiz Pekoz A, Akbal Dagistan O, Fael H, *et al.* Pulmonary delivery of favipiravir inhalation solution for COVID-19 treatment: *In vitro* characterization, stability, *in vitro* cytotoxicity, and antiviral activity using real time cell analysis [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 2846-2854.
- [4] Zhao J Y, Zhang J N, Jin Y, *et al.* A trial of arbidol hydrochloride in adults with COVID-19 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(13): 1531-1538.
- [5] Pourkarim F, Pourtaghi-Anvarian S, Rezaee H. Molnupiravir: A new candidate for COVID-19 treatment [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2022, 10(1): e00909.
- [6] Zumla A, Chan J F W, Azhar E I, *et al.* Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 327-347.
- [7] Fehr A R, Perlman S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1282: 1-23.
- [8] Jin Z M, Du X Y, Xu Y C, *et al.* Structure of m^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors [J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 289-293.
- [9] Ahmad B, Batool M, Ain Q U, *et al.* Exploring the binding mechanism of PF-07321332 SARS-CoV-2 protease inhibitor through molecular dynamics and binding free energy simulations [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9124.
- [10] Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, *et al.* Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(15): 1397-1408.
- [11] Lee D Y W, Li Q Y, Liu J, *et al.* Traditional Chinese herbal medicine at the forefront battle against COVID-19: Clinical experience and scientific basis [J]. *Phytomedicine*, 2021, 80: 153337.
- [12] Chen Z N, Cui Q H, Cooper L, *et al.* Ginkgolic acid and anacardic acid are specific covalent inhibitors of SARS-CoV-2 cysteine proteases [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 45.
- [13] Alhadrami H A, Burgio G, Thissera B, *et al.* Neoechinulin A as a promising SARS-CoV-2 m^{pro} inhibitor: *In vitro* and *in silico* study showing the ability of simulations in discerning active from inactive enzyme inhibitors [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(3): 163.
- [14] van de Sand L, Bormann M, Alt M, *et al.* Glycyrrhizin effectively inhibits SARS-CoV-2 replication by inhibiting the viral main protease [J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 609.
- [15] Wu Q, Yan S, Wang Y, *et al.* Discovery of 4'-O-methylscutellarein as a potent SARS-CoV-2 main

- protease inhibitor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 604: 76-82.
- [16] Cui J H, Jia J P. Discovery of juglone and its derivatives as potent SARS-CoV-2 main proteinase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 225: 113789.
- [17] Chapman R L, Andurkar S V. A review of natural products, their effects on SARS-CoV-2 and their utility as lead compounds in the discovery of drugs for the treatment of COVID-19 [J]. *Med Chem Res*, 2022, 31(1): 40-51.
- [18] 李乾胜, 曹灿, 李玲玲, 等. 以 C-C 基序趋化因子配体 2 (CCL2) 为受体挖掘治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 潜在中药单体化合物 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(3): 415-425.
- [19] Singh A, Singh D K, Kharwar R N, *et al.* Fungal endophytes as efficient sources of plant-derived bioactive compounds and their prospective applications in natural product drug discovery: Insights, avenues, and challenges [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 197.
- [20] Wang W G, Wang H, Du L Q, *et al.* Molecular basis for the biosynthesis of an unusual chain-fused polyketide, gregatin A [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(18): 8464-8472.
- [21] Wang W G, Du L Q, Sheng S L, *et al.* Genome mining for fungal polyketide-diterpenoid hybrids: Discovery of key terpene cyclases and multifunctional P450s for structural diversification [J]. *Org Chem Front*, 2019, 6(5): 571-578.
- [22] Xiao Z H, Dong J Y, Li A, *et al.* Biocatalytic and chemical derivatization of the fungal meroditerpenoid chevalone E [J]. *Org Chem Front*, 2022, 9(7): 1837-1843.
- [23] 何毅文, 董佳钰, 胡秋芬, 等. 药用价值真菌抗肝纤维化活性成分及其作用机制研究进展 [J]. *云南中医学院学报*, 2022, 45(4): 80-95.
- [24] Pang X Y, Chen W H, Wang X, *et al.* New tetramic acid derivatives from the deep-sea-derived fungus *Penicillium* sp. SCSIO06868 with SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitory activity evaluation [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 730807.
- [25] Liang X X, Zhang X J, Zhao Y X, *et al.* Aspulvins A-H, aspulvinone analogues with SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitory and anti-inflammatory activities from an endophytic *Cladosporium* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(4): 878-887.
- [26] Sun H, Gao S S, Li X M, *et al.* Chemical constituents of marine mangrove-derived endophytic fungus *Alternaria tenuissima* EN-192 [J]. *Chin J Ocean Limnol*, 2013, 31(2): 464-470.
- [27] Jiao P, Gloer J B, Campbell J, *et al.* Altenuene derivatives from an unidentified freshwater fungus in the family Tubeufiaceae [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(4): 612-615.
- [28] Aly A H, Edrada-Ebel R, Indriani I D, *et al.* Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(6): 972-980.
- [29] Tian J, Fu L, Zhang Z, *et al.* Dibenzo- α -pyrones from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01: Isolation, structure elucidation, and their antibacterial and antioxidant activities [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(4): 387-396.
- [30] Ye F, Chen G D, He J W, *et al.* Xinshenglin, the first altenuusin with tetracyclic skeleton core from *Phialophora* spp [J]. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54(34): 4551-4554.
- [31] Naganuma M, Nishida M, Kuramochi K, *et al.* 1-Deoxyrubralactone, a novel specific inhibitor of families X and Y of eukaryotic DNA polymerases from a fungal strain derived from sea algae [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(6): 2939-2944.
- [32] Wang Q X, Bao L, Yang X L, *et al.* Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium* sp [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1): 209-214.
- [33] Bashyal B P, Wellensiek B P, Ramakrishnan R, *et al.* Altetoxins with potent anti-HIV activity from *Alternaria tenuissima* QUE1Se, a fungal endophyte of *Quercus emoryi* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(21): 6112-6116.
- [34] Zhang S Y, Li Z L, Bai J, *et al.* A new perylenequinone from a halotolerant fungus, *Alternaria* sp. M6 [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(1): 68-71.
- [35] Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I. Studies on rhubarb (rhei rhizoma). V. Isolation and characterization of chromone and chromanone derivatives [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(9): 3493-3500.
- [36] Kimura Y, Shiojima K, Nakajima H, *et al.* Structure and biological activity of plant growth regulators produced by *Penicillium* sp. No. 31f [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(7): 1138-1139.
- [37] Wang Q X, Bao L, Yang X L, *et al.* Tricycloalternarenes F-H: Three new mixed terpenoids produced by an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. using OSMAC method [J]. *Fitoterapia*, 2013, 85: 8-13.
- [38] Yuan L, Zhao P J, Ma J, *et al.* Tricycloalternarenes A-E: Five new mixed terpenoids from the endophytic fungal Strain *Alternaria alternata* Ly83 [J]. *Helv Chim Acta*, 2008, 91(8): 1588-1594.
- [39] Balzer H H, Berger S. Intrinsic deuterium isotope effects of deuteriatedtert-butyl groups on the ¹³NMR spectra of aromatic compounds [J]. *Magn Reson Chem*, 1990, 28(5): 437-442.
- [40] 梁会, 赵玉敏, 刘翰飞, 等. 贵州鼠尾草中 1 个新的姜黄素类化合物 [J]. *中草药*, 2022, 53(18): 5593-5599.

[责任编辑 王文倩]