

旱生卷柏内生真菌 *Aspergillus ochraceus* SX-C7 次生代谢产物研究

罗萍, 邵刚, 张升琪, 朱丽, 丁中涛, 蔡乐*

云南大学 云南省高校功能分子分析与生物转化重点实验室, 教育部自然资源药物化学重点实验室, 化学科学与工程学院, 云南 昆明 650091

摘要: 目的 研究旱生卷柏 *Selaginella stauntoniana* 内生真菌赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus* SX-C7) 的次生代谢产物。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20、C-18 反相色谱等进行分离和提纯, 运用 MS、NMR 等波谱技术鉴定化合物的结构。采用二倍稀释法和 Ellman 法对分离得到的部分化合物进行抑菌活性和乙酰胆碱酯酶抑制活性测定。结果 从赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus* SX-C7) 的次生代谢产物中分离鉴定了 10 个化合物, 分别为 semivioxanthin(1)、6-hydroxy-*p*-menth-4(5)-en-3-one (2)、黄曲霉素 (3)、木兰脂素 (4)、preussin B (5)、circumdatins D (6)、异岩藻甾醇 (7)、sclerotiamide (8)、3 β -hydroxyergosta-8,24(28)-dien-7-one (9)、3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl stigmasta-5(6),24(28)-diene (10)。结论 化合物 1、2、4、7、10 首次从赭曲霉中分离得到。活性研究表明化合物 10 对枯草芽孢杆菌具有很强的抑制活性, 最小抑菌浓度 (MIC) 值为 2 μ g/mL, 抑制效果和阳性对照相当, 化合物 1 对乙酰胆碱酯酶具有较强的抑制作用, 抑制率为 62.3% (终浓度为 50 μ mol/L)。

关键词: 旱生卷柏; 赭曲霉; 次生代谢产物; 抑菌活性; 乙酰胆碱酯酶抑制活性; semivioxanthin; 木兰脂素; 异岩藻甾醇
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)15-3856-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.15.003

Secondary metabolites of endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* SX-C7 from *Selaginella stauntoniana*

LUO Ping, SHAO Gang, ZHANG Sheng-qi, ZHU Li, DING Zhong-tao, CAI Le

Functional Molecules Analysis and Biotransformation Key Laboratory of Universities in Yunnan Province, Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource, Ministry of Education, School of Chemical Science and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* SX-C7 from *Setaginella stauntoniana*. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, C-18 reversed phase column chromatography, and their structures were identified by MS and NMR analyses. Antibacterial activity and inhibitory activity against acetylcholinesterase were studied by doubling dilution and Ellman methods. **Results** Ten known compounds were isolated from the secondary metabolites of *A. ochraceus* SX-C7, and identified as: semivioxanthin (1), 6-hydroxy-*p*-menth-4(5)-en-3-one (2), flavacol (3), magnolin (4), preussin B (5), circumdatins D (6), isofucosterol (7), sclerotiamide (8), 3 β -hydroxyergosta-8,24(28)-dien-7-one (9), and 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl stigmasta-5(6),24(28)-diene (10). **Conclusion** Compounds 1, 2, 4, 7, and 10 were isolated from *A. ochraceus* SX-C7 for the first time. The results of the bioactivity assay showed that compound 10 possessed obvious inhibitory activity against *Bacillus subtilis* with a MIC value of 2 μ g/mL, which was at the same grade with positive control. Compound 1 exhibited potent inhibitory activity against acetylcholinesterase with an inhibitory rate of 62.3% (the final concentration was 50 μ mol/L).

Key words: *Setaginella stauntoniana* Spring; *Aspergillus ochraceus*; secondary metabolites; antibacterial activity; acetylcholinesterase inhibitory activity; semivioxanthin; magnolin; isofucosterol

收稿日期: 2019-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660719); 长江学者和创新团队发展计划 (IRT_17R94); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才 (2018HB036); 云南大学大学生创新实验项目 (201804042)

作者简介: 罗萍, 硕士, 助理实验师, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: 739157026@qq.com

*通信作者 蔡乐, 教授, 主要从事天然药物化学研究。Tel/Fax: (0871)65033718 E-mail: caile@ynu.edu.cn

曲霉属真菌具有代谢产物种类繁多、活性强等特点,是发现结构新颖化合物和活性药物先导化合物的重要来源。曲霉属真菌次生代谢产物的类型主要包括生物碱、甾体、黄酮、萜类等,这些代谢物在抗肿瘤、抗菌、抗氧化等方面具有较强的生物活性^[1]。近年来一些科学工作者对赭曲霉次生代谢产物进行了研究,Wen 等^[2]从赭曲霉中分离出 10 种吲哚二酮哌嗪类生物碱,发现部分吲哚二酮哌嗪类生物碱具有抗炎活性。Dai 等^[3]从该种菌的代谢物中分离出了 3 个新生物碱,具有良好的化学分类标记作用^[4-5]。Cui 等^[6]从一株海洋来源的赭曲霉 EN-31 中分离出 3 个甾体化合物,具有不同程度的细胞毒活性。本研究从早生卷柏 *Setaginella stauntoniana* Spring 中分离出 1 株赭曲霉真菌 (*Aspergillus ochraceus* SX-C7),以土豆作为培养基,进行固体发酵,对发酵提取物进行提取分离和鉴定,共得到 10 个化合物,分别为 semivioxanthin (1)、6-hydroxy-p-menth-4(5)-en-3-one (2)、黄曲毒素 (flavacol, 3)、木兰脂素 (magnolol, 4)、preussin B (5)、circumdatins D (6)、异岩藻甾醇 (isofucoesterol, 7)、sclerotiamide (8)、3 β -hydroxyergosta-8,24(28)-dien-7-one (9)、3-O- β -D-glucopyranosyl stigmasta-5(6),24(28)-diene

(10),化合物结构见图 1。对所得化合物的抑菌活性和乙酰胆碱酯酶抑制活性进行了测定,发现化合物 10 对枯草芽孢杆菌具有很强的抑制活性,最小抑菌浓度 (MIC) 值为 2 μ g/mL,抑制效果和阳性对照相当,化合物 1 对乙酰胆碱酯酶具有较强的抑制作用,抑制率为 62.3%。

1 仪器与材料

1.1 仪器

400 兆核磁共振波谱仪 (Bruker Avance 400 MHz, 德国 Bruker 公司); 500 兆核磁共振波谱仪 (Bruker DRX-500 MHz, 德国 Bruker 公司); 600 兆核磁共振波谱仪 (Bruker AVANCE III 600 MHz, 德国 Bruker 公司); Agilent G3250AA LC/MSD TOF 质谱仪 (美国 Agilent 公司); YXQ-L31-400 立式高压灭菌锅 (上海涵今仪器仪表有限公司); DHP-9272 恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司); SW-CJ-2FD 紫外无菌操作台 (苏州净化设备有限公司); BS-4G 恒温摇床 (常州中捷实验仪器制造公司)。

1.2 材料

薄层色谱硅胶板 (G 型、GF₂₅₄ 型)、柱色谱硅胶 (200~300、300~400 目),青岛海洋化工有限公司;葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 美国 Amersham

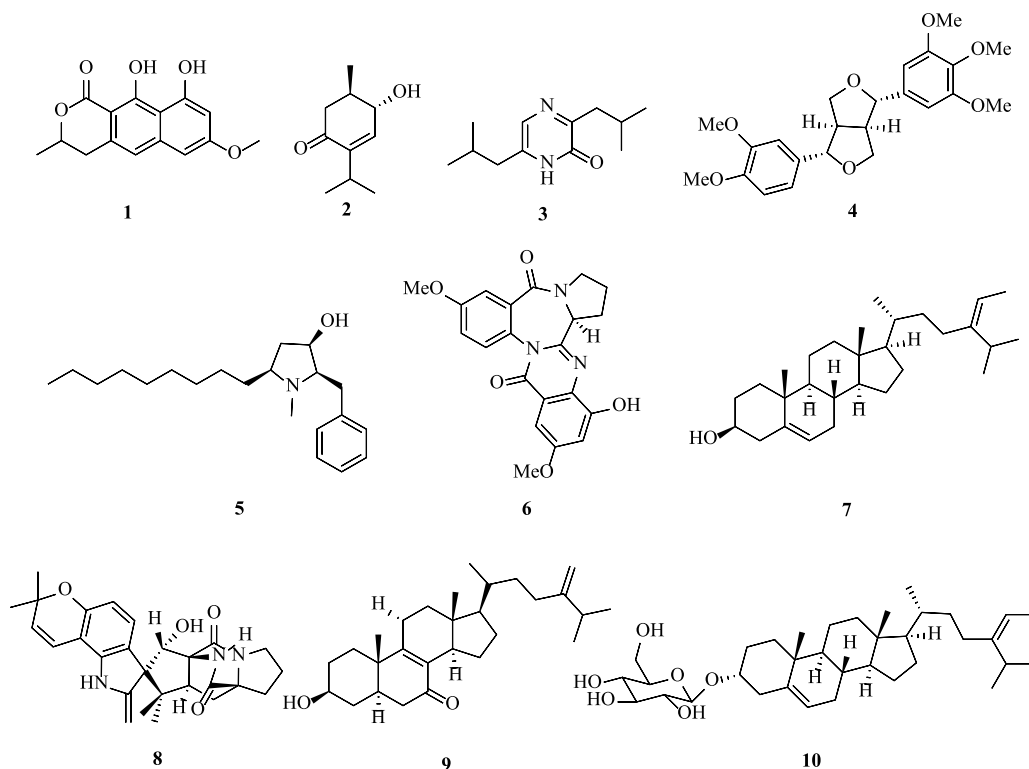


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—10

公司); 反相填料 (RP-18, 德国默克集团)。

甲醇、氯仿 (分析纯, 西陇化工有限公司); 石油醚、丙酮 (分析纯, 天津风船有限公司); 乙酰胆碱酯酶 (质量分数 99%, Sigma-Aldrich 公司, 产品编号 C3389); 碘化硫代乙酰胆碱 (质量分数 99%, 阿拉丁试剂有限公司, 产品编号 A100869); 他克林 (质量分数 99%, 阿拉丁试剂有限公司, 产品编号 A135769); 制霉素 ($\geq 4\ 400$ USP units/mg, 阿拉丁试剂有限公司, 产品编号 N141226); 硫酸卡那霉素 (N/A, 北京百灵威科技有限公司, 产品编号 357211)。

1.3 菌株材料

赭曲霉菌 (*Aspergillus ochraceus* SX-C7) 分离自旱生卷柏 *Selaginella stauntoniana* Spring, 由云南大学赵立兴研究员鉴定, 由昆明硕擎科技有限公司进行 ITS 序列测定。实验所用的病原菌为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) 和白色念珠菌 (*Candida albicans* ATCC 10231), 4 种病原菌均由云南省微生物研究所提供。

2 方法

2.1 固体发酵

将冰箱中冷藏保存的赭曲霉菌 (*Aspergillus ochraceus* SX-C7) 活化后, 接种至切好的土豆块上 (新鲜土豆块共 6.2 kg), 然后置于恒温箱中进行发酵培养, 28 °C 培养 30 d。

2.2 提取与分离

发酵完成后, 向发酵物中加入一定体积的甲醇, 浸泡 24 h 后超声提取 3 次。将得到的粗提物蒸干得到总浸膏 120.4 g, 加水进行分散后, 用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取 3 次, 最终得到石油醚部分 18.2 g、醋酸乙酯部分 43.5 g、正丁醇部分 48.6 g。将醋酸乙酯段进行拌样, 利用硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇体系) 进行划段, 分别得到 5 部分, Fr. 1 (氯仿段)、Fr. 2 (氯仿-甲醇 100 : 1)、Fr. 3 (氯仿-甲醇 50 : 1)、Fr. 4 (氯仿-甲醇 10 : 1)、Fr. 5 (氯仿-甲醇 3 : 1)。Fr. 5 经过硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 30 : 1) 分离和凝胶柱色谱 (甲醇) 纯化得到化合物 1 (12.4 mg); Fr. 4 段经过正相柱色谱 (石油醚-丙酮 50 : 1、10 : 1、1 : 1) 梯度洗脱得到 3 个部分 Fr. 4a~4c, Fr. 4a 经过正相柱色谱 (石油醚-丙酮 3 : 1) 分离得到化合物 2 (6.0 mg), Fr. 4b 经凝胶柱色谱 (甲醇) 分

离纯化得到化合物 3 (4.2 mg), Fr. 4c 部分经正相硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 2 : 1) 分离, 然后再通过凝胶柱色谱纯化 (氯仿-甲醇 1 : 1) 得到化合物 4 (6.8 mg); Fr. 3 同样通过硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 100 : 1、50 : 1、10 : 1) 梯度洗脱, 得到 3 部分 Fr. 3a~3c。Fr. 3a 通过硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 50 : 1) 分离得到 6 (5.8 mg), Fr. 3b 经过硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 30 : 1) 分离后得到化合物 8 (5.4 mg), Fr. 3c 通过凝胶柱色谱 (氯仿-甲醇 1 : 1) 分离得到化合物 5 (3.6 mg); Fr. 2 通过正相柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 10 : 1、3 : 1) 洗脱得到化合物 9 (15.6 mg) 和 10 (6.0 mg)。Fr. 1 通过正相硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 20 : 1) 洗脱后, 洗脱液析出无色晶体, 为化合物 7 (20.5 mg)。

2.3 抑菌活性测定

化合物的抑菌活性测定采用二倍稀释法^[7]在 96 孔板上进行。本抑菌实验所用的病原菌为枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、大肠杆菌 *E. coli*、金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 和白色念珠菌 *C. albicans*。抑制细菌和真菌活性测定的阳性对照分别为卡那霉素和制霉素。

化合物的抑菌活性测定采用二倍稀释法在 96 孔板上进行。将待测样品用 DMSO 配成 10.24 mg/mL 的溶液, 卡那霉素 (细菌阳性对照) 和制霉素 (真菌阳性对照) 用 DMSO 配成 2.56 mg/mL。养好后的真菌和细菌分别取 200 μ L, 分别用马铃薯葡萄糖肉汤 (PDB) 液体培养基 (真菌) 和 LB 液体培养基 (细菌) 稀释至 1 mL, 制成菌悬液。在 96 孔板中的前 2 孔加入 5 μ L 待测化合物样品溶液和阳性对照品溶液, 每孔加入 10 μ L 上述稀释过后的菌液, 使每个孔保持终体积为 100 μ L, 采用 2 倍连续稀释法 (利用液体培养基进行稀释) 保证 96 孔板上每孔的样品最终质量浓度为 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 μ g/mL。将真菌置于 28 °C 恒温箱中放置 72 h, 细菌置于 37 °C 恒温箱中放置 16~18 h, 观察这几种病原菌在 96 孔板上的生长状况。刚好没有病原菌生长的样品浓度即作为所测样品的 MIC, 每个样品测试 2 组。阳性对照 (卡那霉素和制霉素)、阴性对照 (DMSO) 与待测样品的操作方法一样。

2.4 乙酰胆碱酯酶抑制活性测定

根据文献报道^[8]中的 Ellman 法来测定乙酰胆碱酯酶抑制活性, 他克林作为阳性对照, 溶剂 DMSO 为阴性对照。

PB (0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH=8.0) 的配制: 100 mL 磷酸缓冲溶液中含 5.3 mL 0.1 mol/L NaH_2PO_4 溶液和 94.7 mL 0.1 mol/L Na_2HPO_4 溶液, 调节其 pH 值至 8.0。待测化合物用 DMSO 溶解, 配成 10 mmol/L 的溶液, 再用 PB 稀释成 1 mmol/L 的溶液; 他克林用 PB 配制成 6.66 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液; DMSO 用 PB 稀释成 10% 的溶液; ATCI 和 DTNB 均用 PB 配成 6.25 mmol/L 的工作液, 乙酰胆碱酯酶用 PB 稀释成 0.1 U/mL 的溶液。配制好溶液后, 在 96 孔板上进行乙酰胆碱酯酶活性测定实验。样品组加入 110 μL PB、10 μL 待测化合物 (1 mmol/L) 和 40 μL 乙酰胆碱酯酶溶液 (0.1 U/mL); 阳性对照组加入 110 μL PB、10 μL 他克林 (6.66 $\mu\text{mol/L}$) 和 40 μL 乙酰胆碱酯酶溶液 (0.1 U/mL); 阴性对照组加入 110 μL PB、10 μL 10% DMSO 和 40 μL 乙酰胆碱酯酶溶液 (0.1 U/mL)。将加好样的 96 孔板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 20 min, 然后用 Tecan Infinite M200 Pro 酶标仪在 412 nm 处读取 3 次背景值。读取背景值后取出 96 孔板, 在每个孔中加入 40 μL ATCI (6.25 mmol/L) 和 DTNB (6.25 mmol/L) 的等体积混合液, 应保证板中每个孔溶液终体积为 200 μL , 待测化合物终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 他克林终浓度为 0.333 $\mu\text{mol/L}$ 。最后测定其在 412 nm 处的吸光度 (A) 值, 每隔 30 s 采集一次数据, 当阴性对照组 A 值超过 1 时, 停止采集。实验结束后, 选择阴性对照组 A 值最接近 1 的那组数据来计算乙酰胆碱酯酶抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{[(\text{AE} - \text{AB}) - (\text{AS} - \text{AB})]}{(\text{AE} - \text{AB})}$$

AS 为样品组 A 值, AE 为阴性对照组 A 值, AB 为背景值

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 1: 淡黄色晶体 (氯仿), 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 4.74 (1H, m, H-3), 2.95 (1H, m, H-4a), 2.99 (1H, dd, $J = 3.6, 15.9$ Hz, H-4b), 6.87 (1H, s, H-6), 6.52 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.56 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-10), 3.88 (3H, s, 9-OCH₃), 1.54 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, 3-CH₃), 9.46 (1H, s, 11-OH), 13.76 (1H, s, 13-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 171.6 (C-1), 76.6 (C-3), 34.9 (C-4), 133.3 (C-5), 116.1 (C-6), 140.7 (C-7), 101.7 (C-8), 162.9 (C-9), 99.7 (C-10), 163.1 (C-11), 99.4 (C-12), 158.7 (C-13), 108.5 (C-14), 55.6 (9-OCH₃), 20.9 (3-CH₃)。以上 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 1 为 semivioxanthin。

化合物 2: 黄色油状物, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ 。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) δ : 0.88 (6H, m, 9, 10-CH₃), 0.96 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 7-CH₃), 2.00 (1H, m, H-8), 1.97~2.06 (2H, overlapped, H-1, 2), 2.53 (1H, m, H-2), 4.32 (1H, m, H-6), 6.77 (1H, m, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD) δ : 35.1 (C-1), 38.1 (C-2), 162.1 (C-3), 148.9 (C-4), 101.4 (C-5), 74.2 (C-6), 22.6 (C-7), 9.9 (C-8), 19.3 (C-9), 218.6 (C-10)。以上 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 2 为 6-hydroxy-p-menth-4(5)-en-3-one。

化合物 3: 无色针晶 (甲醇), 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) δ : 7.13 (1H, s, H-5), 2.58 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-7), 2.15 (1H, m, H-8), 0.95 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, 8-CH₃), 2.37 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-9), 1.95 (1H, m, H-10), 0.93 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, 10-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD) δ : 158.8 (C-2), 157.9 (C-3), 123.3 (C-5), 140.3 (C-6), 42.4 (C-7), 29.4 (C-8), 22.9 (8-CH₃), 40.0 (C-9), 28.1 (C-10), 22.4 (10-CH₃)。以上 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 3 为黄曲霉素。

化合物 4: 无色固体, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$ 。HR-ESI-MS m/z : 855.358 3 $[\text{2M} + \text{Na}]^+$ (计算值 855.356 8, $\text{C}_{46}\text{H}_{56}\text{O}_{14}\text{Na}$); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 3.09 (2H, m, H-8, 8'), 3.91, 4.27 (各 2H, m, H-9, 9'), 4.74 (2H, m, H-7, 7'), 3.82, 3.86, 3.88 (15H, s, 5 \times -OCH₃), 6.56 (2H, s, H-2', 6'), 6.82~6.90 (3H, m, H-2, 5, 6); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 136.9 (C-1'), 102.9 (C-2'), 153.5 (C-3'), 137.5 (C-4'), 153.5 (C-5'), 102.9 (C-6'), 133.5 (C-1), 109.3 (C-2), 148.7 (C-3), 149.3 (C-4), 111.1 (C-5), 118.3 (C-6), 86.1 (C-7'), 85.8 (C-7), 54.5 (C-8'), 54.2 (C-8), 72.0 (C-9'), 71.8 (C-9), 55.9 (3-OCH₃), 56.0 (4-OCH₃), 56.2 (3', 5'-OCH₃), 60.9 (4'-OCH₃)。以上 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 4 为木兰脂素。

化合物 5: 黄色油状物, 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{NO}$ 。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 0.85 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, 1-CH₃), 1.20~1.33 (10H, m, H-2~6), 1.70 (1H, m, H-7a), 1.20~1.33 (1H, m, H-7b), 2.08 (1H, m, H-8), 2.19 (1H, m, H-9a), 1.39 (1H, dd, $J = 6.6, 13.8$ Hz, H-9b), 3.79 (1H, brt, $J = 4.3$ Hz, H-10), 2.25 (1H, m, H-11), 2.88 (1H, dd, $J = 10.9, 13.1$ Hz, H-12a), 2.80 (1H, dd, $J = 3.9, 13.1$ Hz, H-12b), 7.26 (2H, m,

H-14, 18), 7.25 (2H, m, H-15, 17), 7.23 (1H, m, H-16), 2.30 (3H, s, 19-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 14.2 (C-1), 22.8 (C-2), 32.0 (C-3), 29.4 (C-4), 29.7 (C-5), 26.5 (C-6), 34.9 (C-7), 66.1 (C-8), 39.6 (C-9), 70.4 (C-10), 73.8 (C-11), 33.7 (C-12), 139.6 (C-13), 129.5 (C-14, 18), 128.5 (C-15, 17), 126.2 (C-16), 38.8 (C-19)。以上 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **5** 为 preussin B。

化合物 **6**: 淡黄色固体, 分子式为 C₂₁H₁₉N₃O₅。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.45 (1H, m, H-4), 7.19 (1H, dd, *J* = 5.7, 2.6 Hz, H-6), 7.56 (1H, m, H-7), 7.10 (1H, dd, *J* = 2.9, 8.8 Hz, H-12), 6.92 (1H, dd, *J* = 2.6, 6.1 Hz, H-14), 4.57 (1H, dd, *J* = 7.8, 12.5 Hz, H-19), 3.90 (3H, s, H-24), 3.88 (3H, s, H-23), 3.79 (1H, m, H-22a), 3.61 (1H, m, H-22b), 2.27 (1H, m, H-21a), 2.09 (1H, m, H-21b), 3.07 (1H, m, H-20a), 2.19 (1H, m, H-20b); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 164.5 (C-2), 133.6 (C-3), 113.2 (C-4), 160.2 (C-5), 118.1 (C-6), 131.0 (C-7), 128.6 (C-8), 161.4 (C-10), 99.0 (C-12), 159.5 (C-13), 107.5 (C-14), 155.8 (C-15), 130.1 (C-16), 151.7 (C-18), 58.8 (C-19), 27.3 (C-20), 23.9 (C-21), 46.8 (C-22), 56.0 (C-23), 56.0 (C-24)。以上 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **6** 为 circumdatins D。

化合物 **7**: 无色晶体(氯仿), 分子式为 C₂₉H₄₈O。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 5.34 (1H, m, H-6), 5.09 (1H, q, *J* = 7.2 Hz, H-28), 3.52 (1H, m, H-3), 2.82 (1H, m, H-25), 1.59 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, CH₃-29), 1.00 (3H, s, 19-CH₃), 0.97 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 27-CH₃), 0.96 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 26-CH₃), 0.94 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 21-CH₃), 0.68 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 12.0 (C-18), 12.9 (C-29), 19.0 (C-21), 19.6 (C-19), 21.1 (26-CH₃), 21.2 (C-11), 21.2 (27-CH₃), 24.5 (C-15), 28.1 (C-23), 28.4 (C-16), 28.8 (C-25), 31.8 (C-2), 32.1 (C-7, 8), 36.1 (C-22), 36.3 (C-20), 36.7 (C-10), 37.4 (C-1), 39.9 (C-12), 42.5 (C-4, 13), 50.3 (C-9), 56.2 (C-17), 56.9 (C-14), 72.0 (C-3), 116.6 (C-28), 121.9 (C-6), 140.9 (C-5), 146.0 (C-24)。以上 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **7** 为异岩藻甾醇。

化合物 **8**: 白色粉末, 分子式为 C₂₇H₃₁N₃O₄。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.05 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4), 6.44 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 5.37 (1H, s,

H-10), 3.52 (2H, m, H-14), 2.12 (1H, m, H-15a), 1.97 (1H, m, H-15b), 2.70 (1H, m, H-16a), 1.93 (1H, m, H-16b), 2.05 (1H, dd, *J* = 9.8, 2.8 Hz, H-18a), 1.83 (1H, dd, *J* = 9.2, 3.5 Hz, H-18b), 3.90 (1H, t, *J* = 9.5 Hz, H-19), 0.81 (3H, s, H-23), 0.89 (3H, s, H-24), 6.51 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, H-25), 5.73 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, H-26), 1.41 (3H, s, H-28), 1.40 (3H, s, H-29); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 181.1 (C-2), 71.2 (C-3), 127.0 (C-4), 110.3 (C-5), 154.4 (C-6), 106.6 (C-7), 140.0 (C-8), 122.5 (C-9), 73.8 (C-10), 67.6 (C-11), 171.3 (C-12), 44.9 (C-14), 25.8 (C-15), 30.3 (C-16), 70.8 (C-17), 31.4 (C-18), 57.1 (C-19), 175.6 (C-20), 44.9 (C-22), 23.3 (C-23), 19.9 (C-24), 117.7 (C-25), 131.8 (C-26), 77.1 (C-27), 28.0 (C-28), 28.0 (C-29)。以上 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **8** 为 sclerotiamide。

化合物 **9**: 无色固体, 分子式为 C₂₈H₄₄O₂。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 0.58 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, dd, *J* = 2.6, 6.6 Hz, H-21), 1.00 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-27), 1.01 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 1.14 (1H, m, H-22b), 1.14 (1H, m, H-17), 1.16 (3H, s, H-19), 1.31 (1H, m, H-16b), 1.32 (1H, m, H-15b), 1.34 (1H, m, H-1b), 1.38 (1H, m, H-2b), 1.39 (1H, m, H-12b), 1.39 (1H, m, H-20), 1.43 (1H, m, H-4b), 1.53 (1H, m, H-2a), 1.55 (1H, m, H-22a), 1.67 (1H, m, H-4a), 1.83 (1H, m, H-1a), 1.92 (1H, m, H-5), 1.95 (1H, m, H-15a), 2.03 (1H, m, H-12a), 2.06 (1H, m, H-23), 2.10 (1H, m, H-14), 2.16 (1H, m, H-6b), 2.21 (1H, m, H-25), 2.30 (1H, m, H-11b), 2.38 (1H, m, H-6a), 2.41 (1H, m, H-11a), 2.41 (1H, m, H-16a), 3.63 (1H, m, H-3), 4.64 (1H, s, H-28b), 4.70 (1H, s, H-28a); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 11.5 (C-18), 17.4 (C-19), 18.9 (C-21), 22.0 (C-27), 22.1 (C-26), 24.9 (C-16), 25.5 (C-11), 29.3 (C-15), 31.2 (C-23), 31.3 (C-2), 33.9 (C-25), 34.5 (C-1), 34.7 (C-22), 35.8 (C-12), 36.2 (C-20), 37.5 (C-4), 38.4 (C-10), 41.2 (C-5), 42.6 (C-6), 42.6 (C-13), 48.4 (C-14), 53.5 (C-17), 70.1 (C-3), 106.2 (C-28), 133.3 (C-8), 156.8 (C-24), 165.3 (C-9), 199.1 (C-7)。以上 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **9** 为 3β-hydroxyergosta-8,24(28)-dien-7-one。

化合物 **10**: 白色粉末, 分子式为 C₃₅H₅₈O₆。 ¹H-NMR (600 MHz, C₆D₅N) δ: 1.62 (1H, m, H-1a),

1.25 (1H, m, H-1b), 2.15 (1H, m, H-2a), 1.74 (1H, m, H-2b), 3.77 (1H, m, H-3), 2.73 (1H, brd, $J = 12.0$ Hz, H-4a), 2.48 (1H, t, $J = 12.7$ Hz, H-4b), 5.35 (1H, m, H-6), 1.91 (1H, m, H-7a), 1.37 (1H, m, H-7b), 1.54 (1H, m, H-8), 0.89 (1H, m, H-9), 1.43 (1H, m, H-11a), 1.40 (1H, m, H-11b), 1.96 (1H, m, H-12a), 1.10 (1H, m, H-12b), 0.91 (1H, m, H-14), 1.55 (1H, m, H-15), 1.89 (1H, m, H-16a), 1.27 (1H, m, H-16b), 1.12 (1H, m, H-17), 0.66 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19), 1.41 (1H, m, H-20), 1.00 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.72 (1H, m, H-22a), 0.99 (1H, m, H-22b), 2.13 (2H, m, H-23), 2.87 (1H, m, H-25), 1.04 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-26), 1.04 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-27), 5.26 (1H, dd, $J = 6.5, 13.2$ Hz, H-28), 1.64 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-29), 5.06 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.07 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2'), 4.30 (1H, m, H-3'), 4.30 (1H, m, H-4'), 4.00 (1H, m, H-5'), 4.57 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-6'a), 4.43 (1H, dd, $J = 5.2, 11.6$ Hz, H-6'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) δ : 36.8 (C-1), 30.7 (C-2), 78.6 (C-3), 39.8 (C-4), 141.3 (C-5), 122.3 (C-6), 32.5 (C-7), 32.6 (C-8), 50.8 (C-9), 37.4 (C-10), 21.6 (C-11), 40.4 (C-12), 42.9 (C-13), 57.2 (C-14), 24.9 (C-15), 28.9 (C-16), 56.6 (C-17), 12.4 (C-18), 19.8 (C-19), 36.9 (C-20), 19.4 (C-21), 37.9 (C-22), 28.8 (C-23), 146.3 (C-24), 29.3 (C-25), 21.7 (C-26), 21.6 (C-27), 117.5 (C-28), 13.4 (C-29), 103.0 (C-1'), 75.7 (C-2'), 72.2 (C-3'), 79.0 (C-4'), 78.8 (C-5'), 63.3 (C-6')。以上 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **10** 为 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl stigmasta-5(6), 24(28)-diene。

3.2 抑菌活性

实验结果 (表 1) 表明, 从该株菌中分离的这些化合物对上述 4 种菌具有不同程度的抑制活性。这些化合物基本上对白色念珠菌无明显的抑制活性, 只有 **5** 对其表现出了一定的抑菌活性, 其 MIC 值为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **5**、**6**、**8**、**9** 对枯草芽孢杆菌有较弱的抑制活性, 其中 **5** 和 **6** 的 MIC 值为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **8** 和 **9** 的 MIC 值为 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 **10** 表现很强的抑制活性, MIC 值为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其抑制效果与阳性对照的抑制效果相当; **5** 和 **9** 对大肠杆菌具有微弱的抑制活性, MIC 值分别为 256、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其余化合物均无明显的抑制活性; 而 **8**~**10** 对金色葡萄球菌具有微弱的抑制活性, MIC 值为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **5**

表 1 化合物的 MIC

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of isolated compounds

化合物	MIC/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$			
	白色念珠菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
1	>512	>512	>512	>512
2	>512	>512	>512	>512
3	512	>512	>512	>512
4	>512	512	>512	512
5	64	128	256	64
6	512	128	>512	256
7	>512	512	>512	256
8	>512	256	512	128
9	>512	256	128	128
10	>512	2	512	128
制霉菌素	32	—	—	—
卡那霉素	—	2	2	64

具有一定的抑制效果, MIC 值为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.3 乙酰胆碱酯酶抑制活性

从乙酰胆碱酯酶抑制活性实验结果 (表 2) 可以看出, **4**、**7**、**10** 对乙酰胆碱酯酶基本上无抑制 (抑制率 < 10%); **6**、**8**、**9** 均有微弱的抑制活性, 抑制率在 10%~20%; **2**、**3**、**5** 具有一定的抑制活性, 抑制率在 20%~60%; 而 **1** 具有较强的抑制活性, 抑制率为 62.3%。

4 讨论

本研究采用固体发酵的方式发酵土豆块, 发酵

表 2 各化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性

Table 2 Acetylcholinesterase inhibitory activities of isolated compounds

化合物	抑制率/%
1	62.3
2	41.6
3	28.8
4	—
5	45.4
6	13.4
7	—
8	14.3
9	13.7
10	—
他克林	61.2

“—” 表示无抑制 (抑制率 < 10%)

“—” means no inhibitory (inhibitory < 10%)

完成后将发酵物进行提取分离和结构鉴定, 并对其进行抑菌活性测试和乙酰胆碱酯酶抑制活性测试。从该株赭曲霉菌中共分离得到了 10 个已知化合物, 包括生物碱类、甾醇类、萘并吡喃酮类、木脂素等。其中分离得到的生物碱有 4 个、甾醇类化合物 3 个、萘并吡喃酮类化合物 1 个、木脂素 1 个、单萜 1 个。**1、2、4、7、10** 是首次从赭曲霉菌中分离得到的化合物。**5** 对白色念珠菌的生长具有一定的抑制作用;**10** 对枯草芽孢杆菌具有很强的抑制活性, **5、6、8、9** 对枯草芽孢杆菌的生长具有微弱的抑制效果;**5** 和 **9** 对大肠杆菌具有微弱的抑制效果;**5** 对金色葡萄球菌具有一定的抑制效果, **6~10** 对金色葡萄球菌具有微弱的抑制活性;**1** 对乙酰胆碱酯酶具有较强的抑制作用, 抑制率为 62.3%。

参考文献

- [1] 王 晶. 黄柄曲霉和烟曲霉次生代谢产物化学成分的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [2] Wen H, Liu X, Zhang Q, *et al.* Three new indole diketopiperazine alkaloids from *Aspergillus ochraceus* [J]. *Chem Biodiver*, 2018, 15(4): 1-9.
- [3] Dai J, Carté B K, Sidebottom P J, *et al.* Circumdatin G, a new alkaloid from the fungus *Aspergillus ochraceus* [J]. *J Nat Prods*, 2001, 64(1): 125.
- [4] Rahbæk L, Jens B. Circumdatins D, E, and F: Further fungal benzodiazepine analogues from *Aspergillus ochraceus* [J]. *J Nat Prods*, 1999, 62(6): 904-905.
- [5] Rahbæk L, Breinholt J, Frisvad J C, *et al.* Circumdatin A, B, and C: Three new benzodiazepine alkaloids isolated from a culture of the fungus *Aspergillus ochraceus* [J]. *J Org Chem*, 1999, 64(5): 1689-1692.
- [6] Cui C M, Li X M, Li M, *et al.* 7-Nor-ergosterolide, a pentalactone-containing norsteroid and related steroids from the marine-derived endophytic *Aspergillus ochraceus* EN-31 [J]. *J Nat Prods*, 2010, 73(11): 1780-1784.
- [7] Fang Y S, Yang M H, Cai L, *et al.* New phenylpropanoids from *Bulbophyllum retusiusculum* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2018, 41(11): 1074-1081.
- [8] Li X J, Dong J W, Cai L, *et al.* Improving the acetylcholinesterase inhibitory effect of *Illigera henryi* by solid-state fermentation with *Clonostachys rogersoniana* [J]. *J Biosci Bioengineer*, 2017, 124(5): 493-497.
- [9] 方玉春, 李凌绪, 朱天骄, 等. 海绵微生物的分离培养及一种活性代谢产物的初步研究 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2009, 39(4): 742-744.
- [10] Mengi N, Garg S N, Agarwal S K, *et al.* The occurrence of β -thujone and a new *p*-menthane derivative in senecio chrysanthemoides leaf oil [J]. *J Essential Oil Res*, 1995, 7(5): 511-514.
- [11] 何仁发, 李明月, 王 娟, 等. 木榄根际土壤来源的曲霉属真菌 F5 及其抗菌活性代谢产物 [J]. 菌物学报, 2010, 29(5): 732-738.
- [12] 郭 群, 方 红, 苏 玮. 望春花中的木脂素类化学成分研究 (英文) [J]. 中草药, 2004, 35(8): 263-267.
- [13] Fukuda T, Sudoh Y, Tsuchiya Y, *et al.* Isolation and biosynthesis of preussin B, a pyrrolidine alkaloid from *Simplicillium lanosoniveum* [J]. *J Nat Prods*, 2014, 77(4): 813-817.
- [14] 李兆春, 陈 重, 李笑然, 等. 锦灯笼根和茎化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1910-1912.
- [15] 宋珊珊, 王乃利, 高 昊, 等. 海洋真菌 96F197 抗癌活性成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2006, 16(2): 93-97.
- [16] Liu L, Han J, Shen Y. Two new defensive constituents from potato tubers (*Solanum tuberosum*) [J]. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 2017, 72(6): 393-396.