

## 基于 OSMAC 策略与 GNPS 分子网络技术的缬草内生真菌 *Chaetomium elatum* FH-3 中抗真菌次生代谢产物研究

苏晶晶, 滕银涵, 尹柏雪, 王峰林, 李荣杰, 李玉泽, 王 薇, 宋小妹, 张东东, 樊 浩\*  
陕西中医药大学药学院, 陕西省太白七药研究与应用重点实验室, 陕西 咸阳 712046

**摘要:** 目的 研究缬草内生真菌 *Chaetomium elatum* FH-3 大米发酵产物中的抗真菌次生代谢产物。方法 采用一株多化合物(one strain many compounds, OSMAC)策略及全球天然产物社会分子网络(global natural product social molecular networking, GNPS)分子网络技术导向分离, 运用色谱学和波谱学方法鉴定结构。通过菌丝生长速率法测定化合物对木瓜炭疽杆菌的抑制活性。结果 从 *Chaetomium elatum* FH-3 的醋酸乙酯提取物中靶向分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为 4''-methoxy-asperianas A (1)、(3*S*,4*S*)-4-羟基-6-甲氧基蜂蜜曲菌素 (2a)、(3*R*,4*R*)-4-羟基-6-甲氧基蜂蜜曲菌素 (2b)、顺式-4,6-二羟基蜂蜜曲菌素 (3)、顺式-4-羟基蜂蜜曲菌素 (4)、6-甲氧基蜂蜜曲菌素 (5)、6,8-二羟基-3-甲基-3,4-二氢异香豆素 (6)、3-甲基-6-羟基-8-甲氧基-3,4-二氢异香豆素 (7)、xenofuranone B (8)、黄嘌呤 B (9)、对羟基苯甲醛 (10) 和对羟基苯甲酸甲酯 (11)。抗菌实验表明, 化合物 1~4 对木瓜炭疽杆菌的抑制活性显著优于阳性药多菌灵, 其半数有效浓度 (half-maximal effective concentration, EC<sub>50</sub>) 分别为 15.02、25.31、37.89、47.86 μg/mL。结论 化合物 1 和 2a 为新的丁烯内酯类和二氢异香豆素类化合物, 分别命名为曲霉丁烯内酯 A (butenolide A) 和缬草二氢异香豆素 C (dihydroisocoumarin C); 化合物 8~9 首次从该菌株中分离得到。化合物 1~9 对木瓜炭疽杆菌有抑制作用。

**关键词:** 缬草; *Chaetomium elatum* FH-3; OSMAC 策略; GNPS 分子网络; 结构鉴定; 抗真菌

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)12-4528-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.003

## Antifungal secondary metabolites from *Chaetomium elatum* FH-3 of *Valeriana officinalis* endophytic fungus based on OSMAC strategy and GNPS molecular networking

SU Jingjing, TENG Yinhan, YIN Baixue, WANG Fenglin, LI Rongjie, LI Yuze, WANG Wei, SONG Xiaomei, ZHANG Dongdong, FAN Hao

Shaanxi Key Laboratory of Research and Application of "Taibai Qi Yao", College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

**Abstract: Objective** To investigate the antifungal secondary metabolites from the rice fermentation products of the *Valeriana officinalis* endophytic fungus *Chaetomium elatum* FH-3. **Methods** The one strain many compounds OSMAC (OSMAC) strategy and global natural products social molecular networking (GNPS) molecular networking technology were employed for targeted separation. Chromatographic and spectroscopic methods were used for structural identification. The antifungal activity of the compounds against *Colletotrichum gloeosporioides* was evaluated using the mycelial growth rate method. **Results** A total of 12 compounds were targeted and isolated from the ethyl acetate extract of *Chaetomium elatum* FH-3. These compounds were identified as 4''-methoxy-asperianas A (1), (3*S*,4*S*)-4-hydroxy-6-methoxymellein (2a), (3*R*,4*R*)-4-hydroxy-6-methoxymellein (2b), *cis*-4,6-dihydroxymellein (3), *cis*-4-hydroxymellein (4), 6-methoxymellein (5), 6,8-dihydroxy-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarin (6), 3-methyl-6-hydroxy-8-methoxy-3,4-dihydroisocoumarin (7), xenofuranone B (8), flavipessin B (9), *p*-hydroxybenzaldehyde (10), and *p*-hydroxybenzoic acid methyl ester

收稿日期: 2026-03-16

基金项目: 陕西省教育厅科学研究项目 (25JK0430); 陕西省“三秦英才”引进计划; 国家中医药管理局重点学科项目 (zyyzdxk-2023202); 太白七药功效物质发现与应用创新团队; 大学生创新训练计划项目 (S202610716001)

作者简介: 苏晶晶, 硕士研究生, 主要研究方向为中草药药效物质基础研究。E-mail: 18009182510@163.com

\*通信作者: 樊 浩, 博士, 实验师, 主要从事中草药药效物质基础研究。E-mail: fanhao@sntcm.edu.cn

(11). Antifungal testing showed that compounds 1—4 exhibited significantly stronger inhibitory activity against *C. gloeosporioides* than the positive control carbendazim, with half-maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) values of 15.02, 25.31, 37.89, and 47.86 μg/mL, respectively. **Conclusion** Compounds 1 and 2a are new butenolide and dihydroisocoumarin derivatives, named butenolide A and dihydroisocoumarin C respectively, and compounds 8 and 9 are reported for the first time from this strain. Compounds 1—9 demonstrate significant inhibitory activity against *C. gloeosporioides*.

**Key words:** *Valeriana officinalis* L.; *Chaetomium elatum* FH-3; OSMAC strategy; GNPS molecular networking; structural identification; antifungal

植物病原真菌引发的病害严重威胁农作物产量,成为农业生产中的一大隐患。尽管现有的化学杀菌剂在防治病害中起到了关键作用,但长期使用已导致病原菌抗药性增强,并带来生态环境污染和农产品安全隐患等问题<sup>[1-4]</sup>。因此,开发新型、结构独特且具有多重作用机制的天然抗真菌活性物质成为当今农药研究的一个重要方向。植物内生真菌作为长期与宿主植物共生的特殊微生物类群,其代谢产物种类丰富且具有显著的生物活性,已成为发现新型抗真菌化合物的潜在资源<sup>[5-10]</sup>。尤其是药用植物相关的内生真菌,其代谢物质具有独特的活性和结构,值得深入挖掘。

缬草 *Valeriana officinalis* L. 作为传统药用植物,具有广泛的药理活性,其内生真菌的次生代谢产物研究仍相对较少,尤其是在抗植物病原真菌的活性物质方面。本研究采用 OSMAC (one strain many compounds) 策略,通过调节培养基组成来诱导缬草内生真菌 *Chaetomium elatum* FH-3 产生不同的代谢谱,并结合全球天然产物社会分子网络 (global natural product social molecular networking, GNPS) 技术对其发酵提取物进行分析和靶向分离。通过这一方法从醋酸乙酯提取物中分离得到 11 个化合物,分别鉴定为 4''-methoxy-asperianas A (1)、

(3*S*,4*S*)-4-羟基-6-甲氧基蜂蜜曲菌素 [(3*S*,4*S*)-4-hydroxy-6-methoxymellein, 2a]、(3*R*,4*R*)-4-羟基-6-甲氧基蜂蜜曲菌素 ((3*R*,4*R*)-4-hydroxy-6-methoxymellein, 2b)、顺式-4,6-二羟基蜂蜜曲菌素 (*cis*-4,6-dihydroxymellein, 3)、顺式-4-羟基蜂蜜曲菌素 (*cis*-4-hydroxymellein, 4)、6-甲氧基蜂蜜曲菌素 (6-methoxymellein, 5)、6,8-二羟基-3-甲基-3,4-二氢异香豆素 (6,8-dihydroxy-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarin, 6)、3-甲基-6-羟基-8-甲氧基-3,4-二氢异香豆素 (3-methyl-6-hydroxy-8-methoxy-3,4-dihydroisocoumarin, 7)、xenofuranone B (8)、黄嘌呤 B (flavipessin B, 9)、对羟基苯甲醛 (*p*-hydroxybenzaldehyde, 10) 和对羟基苯甲酸甲酯 (*p*-hydroxybenzoic acid methyl ester, 11), 结构如图 1 所示。其中化合物 1 和 2a 为新化合物,命名为曲霉丁烯内酯 A (butenolide A) 和缬草二氢异香豆素 C (dihydroisocoumarin C); 化合物 8~9 首次从该菌株中分离得到。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

LC-6AD 半制备液相色谱(日本岛津公司,SPD-20A 检测器); AVANCE NMR 波谱仪(德国 Bruker 公司); Triple TOF™ 5600+ 质谱仪 (AB SCIEX);

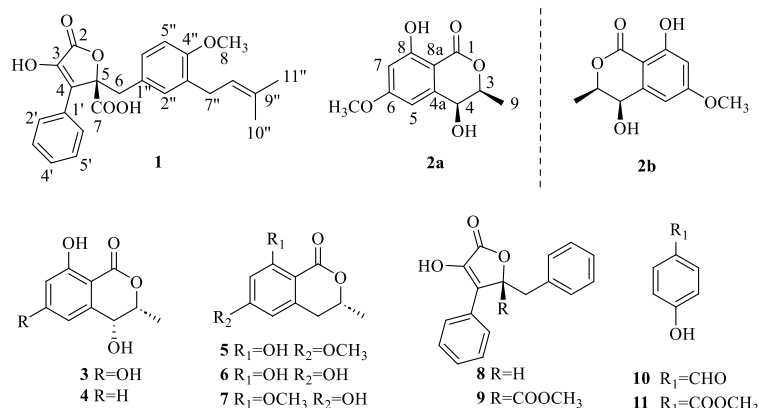


图 1 化合物 1~11 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—11

圆二色谱仪 (Applied PhotoPhysics); Welch Ultimate XB-C<sub>18</sub>柱 (250 mm×10 mm, 5 μm); RV10 旋蒸仪 (德国 IKA 公司)。柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂)。色谱甲醇 (天津市科密欧化学试剂有限公司), 分析级试剂 (天津市天力化学试剂有限公司)。木瓜炭疽杆菌 (广东省农业科学院果树研究所)。多菌灵 (陕西宝来生生物科技有限公司, 批号 S202510202)。大米、土豆等购于市场。

## 1.2 药材与菌株来源

菌株 FH-3 分离自陕西秦岭太白山缬草 *V. officinalis* L. 新鲜根茎, 经陕西中医药大学王薇教授鉴定为败酱科缬草属植物缬草 (标本号 SZY-XC20250610)。ITS 序列 (GenBank 号 OK093306.1) 比对鉴定为 *Chaetomium elatum*。菌种保藏于陕西中医药大学药学院太白七药研究与应用重点实验室。

## 2 方法

### 2.1 OSMAC 策略及优势培养基筛选

大米培养基 (1 号培养基): 大米 100 g/瓶、水 115 mL/瓶、盐度 6.5%。

麦麸培养基 (2 号培养基): 麦麸 100 g/瓶、水 115 mL/瓶、盐度 6.5%。

黄豆培养基 (3 号培养基): 黄豆 100 g/瓶、水 115 mL/瓶、盐度 6.5%。

真 1 培养基 (4 号培养基): 4% 麦芽糖、5% 山梨醇、1.3% 酵母膏、1.0% 味精、0.05% 色氨酸、0.03% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、盐度 6.5% (pH 6.5~7.0)。

E 培养基 (5 号培养基): 4% 葡萄糖、土豆水 400 g/L、盐度 15% (自然 pH)。

PDB 培养基 (6 号培养基): 2% 葡萄糖、土豆水 200 g/L、盐度 6.5% (自然 pH)。

为充分挖掘 *Chaetomium elatum* FH-3 菌株的代谢潜能, 在 6 种培养基中进行发酵培养并分析代谢产物差异, 以确定最优培养基<sup>[9]</sup>。发酵产物经 LC-MS 分析, UPLC 条件为 0~2.5 min, 10%~30% 乙腈, 2.5~15 min, 30%~90% 乙腈, 体积流量 0.7 mL/min。

### 2.2 发酵、提取与靶向分离

取种子液 10 mL 接种至含 100 g 大米培养基的 1 L 培养瓶中, 共发酵 100 L (25 °C、30 d)。发酵物以醋酸乙酯浸泡提取, 减压浓缩得浸膏 65 g。浸膏经硅胶柱 (二氯甲烷-甲醇 80:1→1:1) 梯度洗脱, 得 6 个流分 (F. 1~F. 6)。F. 3 (14.5 g) 经 ODS

柱 (甲醇-水 20:80→100:0) 分离得 F. 3-1~F. 3-5。结合 GNPS 分子网络靶向追踪, 对各亚流分进行半制备 HPLC 分离: F. 3-1 (1.2 g) 经半制备 (甲醇-水 35:65) 得化合物 11 ( $t_R=17.0$  min, 11.0 mg)、10 ( $t_R=23.5$  min, 8.5 mg)。F. 3-2 (2.8 g) 经半制备 (甲醇-水 40:60) 得化合物 2 ( $t_R=25.0$  min, 4.0 mg)、3 ( $t_R=32.0$  min, 9.0 mg)、4 ( $t_R=38.2$  min, 12.0 mg)、7 ( $t_R=39.2$  min, 6.0 mg)。F. 3-3 (1.5 g) 经半制备 (甲醇-水 45:55) 得化合物 5 ( $t_R=15.5$  min, 6.0 mg)、6 ( $t_R=21.0$  min, 12.0 mg)。F. 3-4 (2.5 g) 经半制备 (甲醇-水 65:35) 得化合物 1 ( $t_R=10.0$  min, 6.0 mg)、8 ( $t_R=19.0$  min, 13.5 mg)、9 ( $t_R=31.5$  min, 5.0 mg)。

### 2.3 GNPS 分子网络分析

将二级流分的 LC-MS/MS 数据上传至 GNPS 平台 (<http://gnps.ucsd.edu>) 构建分子网络。参数设置: 母离子质量容差 0.02, 碎片离子容差 0.02, 余弦阈值 >0.7, 最少匹配峰数 >6。网络图在 Cytoscape 3.7.2 中可视化<sup>[11]</sup>。

### 2.4 抗真菌活性测定

采用菌丝生长速率法<sup>[11]</sup>。将化合物与 PDA 培养基混合, 配制成终质量浓度为 100、50、25、12.5、6.25 μg/mL 的含药平板。接种直径为 5 mm 的菌饼, 28 °C 培养 3 d, 十字交叉法测量菌落直径, 计算抑制率及半数有效浓度 (half-maximal effective concentration, EC<sub>50</sub>) 值。以无菌水为空白对照, 多菌灵为阳性对照, 每浓度设 3 组平行。

## 3 结果

### 3.1 OSMAC 策略下优势培养基考察

基于 OSMAC 策略在 6 种培养基中对 *Chaetomium elatum* FH-3 菌株的次生代谢产物进行调控, 筛选优势培养基。结果显示, 不同培养基显著影响该菌株次级代谢产物的组成 (图 2)。实验表明, *Chaetomium elatum* FH-3 菌株在 1 号培养基中的次级代谢产物经 LC-MS 分析表现出多样化的保留时间和丰富的色谱峰, 因此选定其为该菌株的优势培养基。

### 3.2 GNPS 靶向分离

为靶向识别二氢异香豆素富集部位, 以已知化合物 4-hydroxykigelin 为探针与 *Chaetomium elatum* FH-3 大米培养基醋酸乙酯提取物部位的二级流分 F. 3-1~F. 3-5 共建 GNPS 分子网络 (图 3)。结果表明, 在 Cluster-3 簇 F. 3-1~F. 3-4 流分中提示存在大

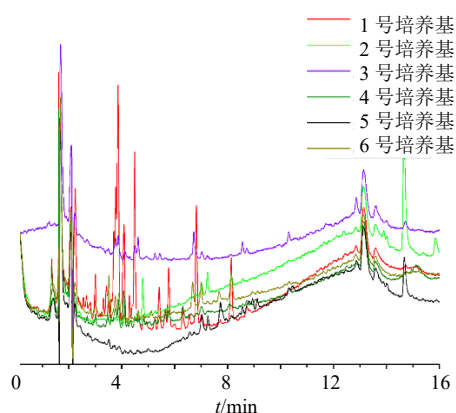


图2 *Chaetomium elatum* FH-3 菌株在6种培养基中代谢产物的LC-MS对比图

Fig. 2 Comparison chart of LC-MS of *Chaetomium elatum* FH-3 cultured in six different media

量二氢异香豆素类化合物。

### 3.3 结构鉴定

化合物 1: 淡黄色油状物, HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰  $m/z$ : 407.149 9  $[M-H]^-$  (计算值 407.149 5), 结合 1D NMR 确定其分子式为  $C_{24}H_{24}O_6$ , 不饱和度为 13。 $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ) 谱图显示, 单取代苯环信号位于  $\delta_H$  7.70 (2H, m, H-2', 6'), 7.43 (2H, m, H-3', 5'), 7.35 (1H, m, H-4'); 另有 1 个 1,3,4-三取代苯环信号  $\delta_H$  6.42 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2''), 6.52 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5''), 6.52 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-6''); 以及 1 个烯烃质子信号  $\delta_H$  5.07 (1H, s, H-8'')。  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ) 谱图显示 24 个碳信号, 归类为 3 个甲基信号、2 个亚甲基信号、9 个亚甲基信号和 10 个非质子化碳原子信号。HSQC 给出化合物 1 的碳氢归

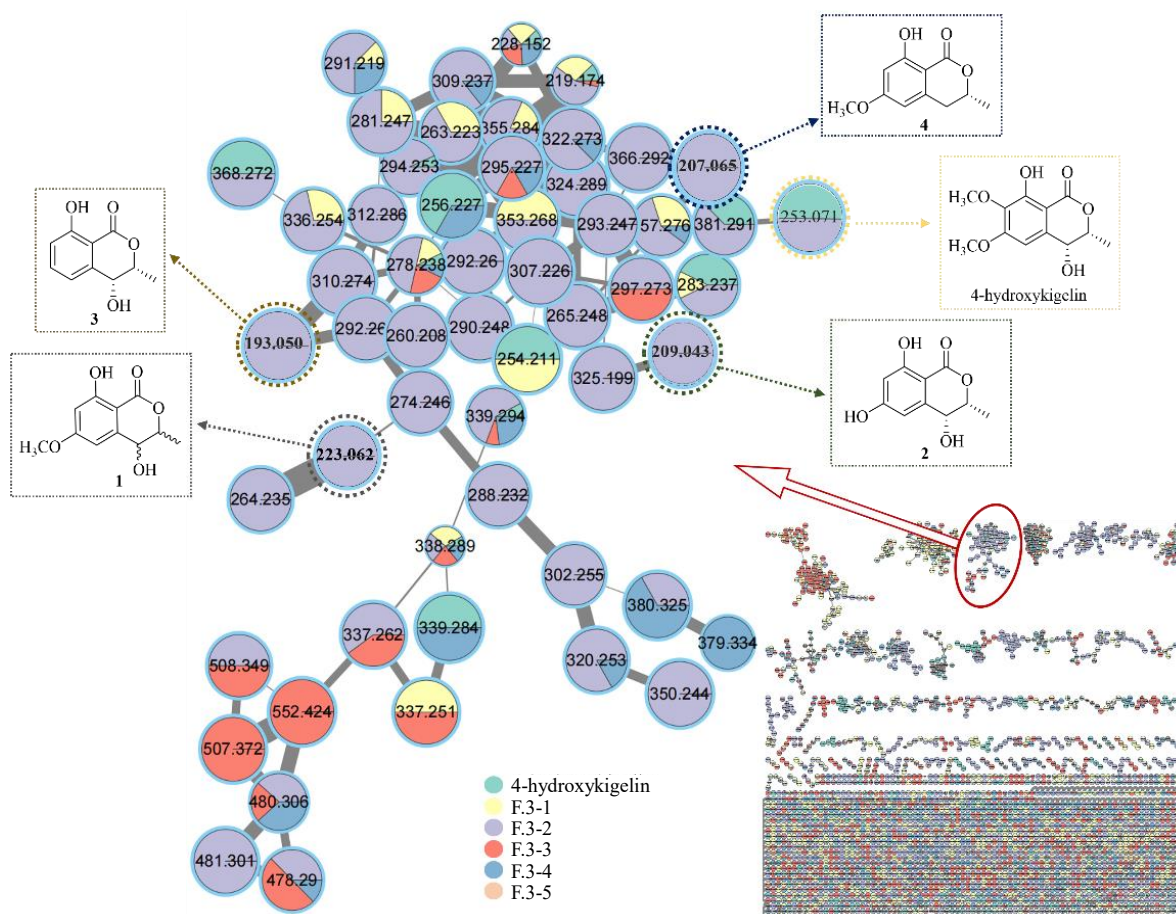


图3 GNPS 分子网络靶向分离图

Fig. 3 GNPS molecular network targeted isolation map

属 (表 1)。 $^1H$ - $^1H$ COSY 谱图 (图 4) 提示: H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'、H-5''/H-6''、H-7''/H-8''。HMBC 谱

图 (图 4) 中 H-6 与 C-5、C-7、C-1''、C-2''和 C-6'' 相关; H-8 与 C-4''相关; H-5''与 C-1''及 C-3''相关;

表 1 化合物 1 的  $^1\text{H}$ -和  $^{13}\text{C}$ -NMR 数据 (400/100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  
Table 1  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for compound 1 (400/100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

碳位	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$ , type	碳位	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$ , type
2		169.4, C	1''		131.2, C
3		141.2, C	2''	6.42 (d, $J = 1.6$ Hz)	132.4, CH
4		128.0, C	3''		124.4, C
5		86.4, C	4''		154.5, C
6	3.45 (s)	39.0, $\text{CH}_2$	5''	6.52 (d, $J = 8.2$ Hz)	114.6, CH
7		170.9, C	6''	6.52 (d, $J = 8.2$ Hz)	129.3, CH
8	3.74 (s)	53.5, $\text{CH}_3$	7''	3.08 (dd, $J = 7.8, 3.9$ Hz)	28.3, $\text{CH}_2$
1'		127.6, C	8''	5.07 (s)	123.1, CH
2', 6'	7.70 (m)	128.1, CH	9''		131.9, C
3', 5'	7.43 (m)	129.3, CH	10''	1.64 (s)	25.5, $\text{CH}_3$
4'	7.35 (m)	129.3, CH	11''	1.55 (d, $J = 1.4$ Hz)	17.4, $\text{CH}_3$

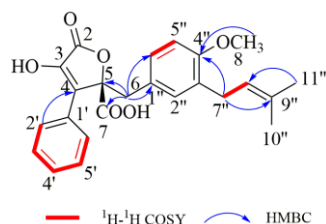


图 4 化合物 1 的结构及主要的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 和 HMBC 相关信号

Fig. 4 Chemical structures and key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of compound 1

H-2''与C-4''及C-6''相关; H-7''与C-2''及C-4''相关; H-8''与C-10''及C-11''相关; H-11''与C-10''相关; H-10''与C-8''及C-9''相关。与文献报道<sup>[12]</sup>对比, 化合物 1 与已知化合物 butyrolactones I 结构类似, 分析两者的核磁共振数据, 发现化合物 1 的氢谱中于  $\delta_{\text{H}}$  7.35 (1H, m) 处出现 1 个额外的芳环质子信号, 归属为 H-4', 同时碳谱中 C-4' 化学位移 ( $\delta_{\text{C}}$  129.3) 较 butyrolactones I 中对应酚羟基取代的 C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  158.8) 明显向高场位移, 表明化合物 1 的 4' 位为芳氢而非酚羟基。此外, 化合物 1 的 C-5 位呈羧基特征, 而非 butyrolactones I 中的甲酯基; C-4'' 位为甲氧基取代, 由 HMBC 谱中 H-8 与 C-4'' 的相关信号证实。因此, 化合物 1 的平面结构确定。根据其生物合成来源<sup>[9]</sup>, 将化合物 1 的绝对构型确定为 5*R*, 并通过 ECD 计算得到验证 (图 5)。经 Scifinder 检索, 1 为未见文献报道的新化合物, 命名为曲霉丁烯内酯 A。

化合物 2: 淡黄色油状胶体, HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰  $m/z$ : 223.061 1 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  (计算值

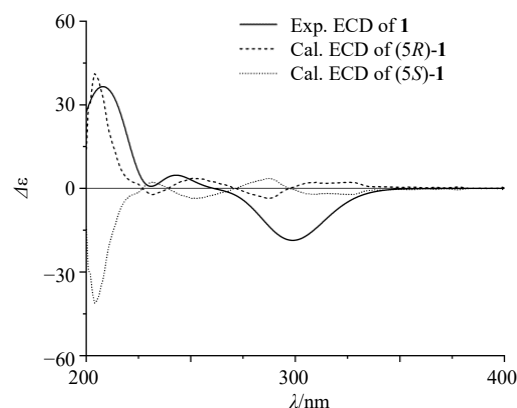


图 5 化合物 1 的实验和计算 ECD 谱图

Fig. 5 Experimental and calculated ECD spectra of compound 1

223.060 6), 结合 1D NMR 确定其分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$ , 不饱和度为 6。  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 谱提示存在 2 个苯环氢信号  $\delta_{\text{H}}$  6.55 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz), 6.48 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz)。  $\delta_{\text{H}}$  4.65 (1H, dd,  $J = 6.6, 2.0$  Hz), 4.51 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz) 为 2 个连氧次甲基质子信号,  $\delta_{\text{H}}$  3.86 (3H, s) 为 1 组甲氧基质子信号,  $\delta_{\text{H}}$  1.48 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz) 为 1 组甲基质子信号。  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 谱显示存在 11 个碳信号, 包括 1 个酯基碳信号、6 个芳香碳信号、2 个连氧次甲基碳信号、1 个甲氧基碳信号和 1 个甲基碳信号。 HSQC 给出化合物 2 的碳氢归属 (表 2)。  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱图 (图 6) 显示存在 1 组自旋偶合系统: H<sub>3</sub>-9 ( $\delta_{\text{H}}$  1.48, d,  $J = 6.6$  Hz)/H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4.65, dd,  $J = 6.6, 2.0$  Hz)/H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  4.51, d,  $J = 2.0$  Hz)。 HMBC 谱图 (图 6) 中 6-OMe ( $\delta_{\text{H}}$  3.86, s) 与 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$

表2 化合物2的<sup>1</sup>H-和<sup>13</sup>C-NMR数据(400/100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Table 2 <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data for compound 2 (400/100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

碳位	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub> , type
1		171.0, C
3	4.65 (dd, <i>J</i> = 6.6, 2.0 Hz)	79.5, CH
4	4.51 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	67.8, CH
4a		144.8, C
5	6.55 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz)	107.5, CH
6		167.7, C
7	6.48 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz)	101.8, CH
8		165.3, C
8a		101.4, C
9	1.48 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	16.2, CH <sub>3</sub>
6-OMe	3.86 (s)	56.3, -OCH <sub>3</sub>

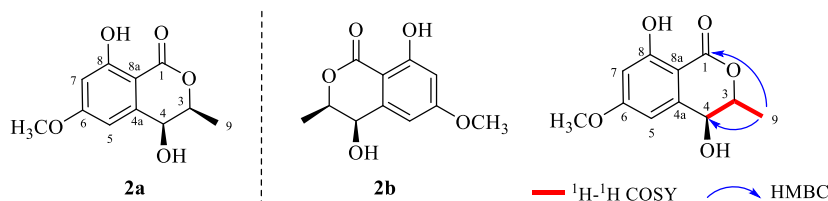


图6 化合物2a和2b的结构及主要的<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY和HMBC相关信号

Fig. 6 Chemical structures and key <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and HMBC correlations of compounds 2a and 2b

消旋混合物。通过手性柱在制备液相上分析, 发现有2个峰面积约为1:1的峰, 进一步证实了该化合物为外消旋体。通过半制备手性柱分离得到2个光学纯化合物2a和2b, 测得其比旋光度为 $[\alpha]_D^{25} +39.1$  (*c* 0.10, MeOH)、 $[\alpha]_D^{25} -35.9$  (*c* 0.10, MeOH)。再测定出2个光学纯化合物2a和2b的CD图谱(图7), 它们的Cotton效应曲线正好呈现镜像关系。进一步采用ECD计算确定2a和2b的绝对构型分别为3*S*,4*S*和3*R*,4*R*。经Scifinder检索, 2a为未见文献报道的新化合物, 命名为缬草二氢异香豆素C。

化合物3: 淡黄色油状胶体,  $[\alpha]_D^{25} -26.1$  (*c* 0.10, MeOH), HR-ESI-MS给出的准分子离子峰 *m/z*: 209.043 9  $[M-H]^-$  (计算值 209.045 0), 结合1D NMR确定其分子式为C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.46 (1H, s, H-5), 6.36 (1H, s, H-7), 4.66 (1H, dd, *J* = 6.6, 1.9 Hz, H-3), 4.28 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-4), 1.44 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 3-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 170.9 (C-1), 167.1 (C-6), 166.9 (C-8), 145.0 (C-4a), 109.8 (C-5), 103.9 (C-7), 99.9 (C-8a), 79.2 (C-3), 68.4 (C-4), 15.9 (3-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物3为顺式-4,6-二羟基蜂蜜曲菌素。

167.7, C) 相关确定甲氧基连接在C-6上; H-4 (δ<sub>H</sub> 4.51, d, *J* = 2.0 Hz) 与C-5 (δ<sub>C</sub> 107.5, CH) 相关, 提示羟基连接在C-5上。结合H<sub>3</sub>-9与C-1 (δ<sub>C</sub> 171.0, C)/C-3 (δ<sub>C</sub> 79.5, CH)/C-4 (δ<sub>C</sub> 67.8, CH) 相关, H-3 (δ<sub>H</sub> 4.65, dd) 与C-1/C-4a (δ<sub>C</sub> 144.8, C) 相关, 确定C-3位置有甲基取代, 且A环通过C-4a-C-8a与B环骈并。因此, 化合物2的平面结构确定<sup>[13]</sup>。

通过比较化合物2的*J*<sub>3,4</sub> = 2.0 Hz与顺式-4,6-二羟基蜂蜜曲菌素(3) (*J*<sub>3,4</sub> = 1.9 Hz)<sup>[13]</sup>和顺式-4-羟基蜂蜜曲菌素(4) (*J*<sub>3,4</sub> = 1.8 Hz)<sup>[14]</sup>的*J*<sub>3,4</sub>值进行对比, 确定C-3和C-4的相对构型为顺式。由于化合物2比旋光度为 $[\alpha]_D^{25} +0.10$  (*c* 0.10, MeOH) 接近于0且ECD上无明显Cotton效应, 推测其为外

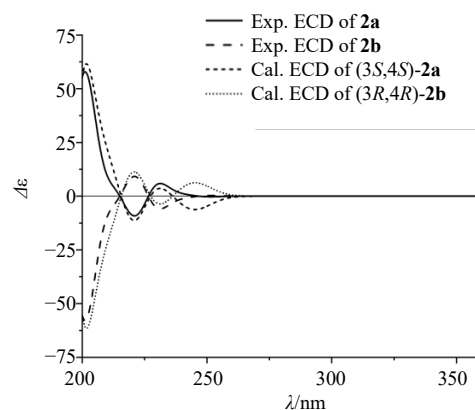


图7 化合物2a和2b的实验和计算ECD谱图

Fig. 7 Experimental and calculated ECD spectra of compounds 2a and 2b

化合物4: 淡黄色油状胶体,  $[\alpha]_D^{25} -43.1$  (*c* 0.10, MeOH), HR-ESI-MS给出的准分子离子峰 *m/z*: 193.050 9  $[M-H]^-$  (计算值 193.050 1), 结合1D NMR确定其分子式为C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.45 (1H, m, H-6), 6.96 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-7), 6.93 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 4.69 (1H, dd, *J* = 6.5, 1.8 Hz, H-3), 4.45 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-4), 1.49 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 3-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,

CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 170.3 (C-1), 170.3 (C-8), 142.8 (C-10), 142.0 (C-5), 137.9 (C-6), 119.9 (C-7), 108.4 (C-9), 79.9 (C-3), 68.1 (C-4), 16.4 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 **4** 为顺式-4-羟基蜂蜜曲菌素。

化合物 **5**: 淡黄色油状胶体,  $[\alpha]_D^{25}$ -35.6 (*c* 0.10, MeOH), HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰 *m/z*: 207.065 0 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 207.065 7), 结合 1D NMR 确定其分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.37 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-5), 6.22 (1H, dd, *J* = 2.0, 1.0 Hz, H-7), 3.86 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.36 (1H, m, H-3), 1.89 (1H, m, H-4), 1.42 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 3-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 169.2 (C-1), 167.6 (C-8), 166.7 (C-6), 145.2 (C-4a), 107.9 (C-5), 103.6 (C-8a), 100.1 (C-7), 75.6 (C-3), 57.8 (C-4), 37.8 (C-10), 21.0 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物 **5** 为 6-甲氧基蜂蜜曲菌素。

化合物 **6**: 淡黄色油状胶体,  $[\alpha]_D^{25}$ -29.9 (*c* 0.10, MeOH), HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰 *m/z*: 193.050 3 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 193.050 1), 结合 1D NMR 确定其分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.38 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-5), 6.18 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-7), 4.66 (1H, m, H-3), 2.82 (1H, dd, *J* = 16.0, 4.5 Hz, H-4b), 2.77 (1H, dd, *J* = 16.0, 11.2 Hz, H-4a), 1.42 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, 3-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 170.1 (C-1), 165.9 (C-8), 145.5 (C-4a), 108.9 (C-5), 101.2 (C-7), 100.8 (C-8a), 78.2 (C-3), 67.1 (C-6), 35.4 (C-4), 19.9 (3-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物 **6** 为 6,8-二羟基-3-甲基-3,4-二氢异香豆素。

化合物 **7**: 淡黄色油状胶体,  $[\alpha]_D^{25}$ -32.2 (*c* 0.10, MeOH), HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰 *m/z*: 207.066 0 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 207.065 7), 结合 1D NMR 确定其分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.67 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-7), 6.38 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-5), 4.67 (1H, m, H-3), 3.86 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>), 2.88 (1H, dd, *J* = 16.0, 3.5 Hz, H-4b), 2.79 (1H, dd, *J* = 16.0, 11.2 Hz, H-4a), 1.43 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, 3-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 170.0 (C-1), 165.9 (C-8), 163.5 (C-6), 145.6 (C-4a), 108.8 (C-5), 106.8 (C-8a), 101.2 (C-7), 78.2 (C-3), 37.9 (C-10), 35.5 (C-4), 20.0 (3-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **7** 为 3-甲基-6-羟基-

8-甲氧基-3,4-二氢异香豆素。

化合物 **8**: 淡黄色油状胶体,  $[\alpha]_D^{25}$ +145.6 (*c* 0.10, MeOH), HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰 *m/z*: 265.085 5 [M-H]<sup>-</sup> (计算值: 265.086 5), 结合 1D NMR 确定其分子式为 C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.66 (2H, m, H-2', 6'), 7.56 (2H, m, H-3', 5'), 7.44 (1H, m, H-4'), 7.26 (2H, m, H-4'', 6''), 7.24 (1H, m, H-5''), 7.06 (2H, m, H-3'', 7''), 5.58 (1H, dd, *J* = 6.0, 3.0 Hz, H-4), 3.44 (1H, dd, *J* = 14.0, 3.0 Hz, H-1a''), 2.99 (1H, dd, *J* = 14.0, 6.0 Hz, H-1b''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 170.1 (C-1), 140.2 (C-2), 135.7 (C-2''), 130.5 (C-3', 5'), 130.5 (C-4'), 129.8 (C-1'), 129.6 (C-2', 6'), 129.6 (C-3), 129.3 (C-3'', 7''), 129.2 (C-5''), 128.5 (C-4'', 6''), 80.7 (C-4), 40.2 (C-1'')。以上数据与文献报道基本一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物 **8** 为 xenofuranone B。

化合物 **9**: 淡黄色油状胶体,  $[\alpha]_D^{25}$ +86.9 (*c* 0.10, MeOH), HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰 *m/z*: 323.092 5 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 323.091 9), 结合 1D NMR 确定其分子式为 C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.76 (2H, m, H-2', 6'), 7.57 (2H, m, H-3', 5'), 7.44 (1H, m, H-4'), 7.24 (2H, m, H-4'', 6''), 7.23 (1H, m, H-5''), 6.89 (2H, m, H-3'', 7''), 3.99 (1H, d, *J* = 14.5, Hz, H-1b''), 3.64 (1H, d, *J* = 14.5, Hz, H-1a''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 170.5 (C-1), 170.1 (C-8''), 140.3 (C-2), 133.7 (C-2''), 130.6 (C-3', 5'), 130.6 (C-4'), 130.3 (C-3'', 7''), 129.7 (C-1'), 129.7 (C-2', 6'), 129.5 (C-5''), 128.6 (C-3), 128.6 (C-4'', 6''), 81.0 (C-4), 56.5 (C-9''), 40.3 (C-1'')。以上数据与文献报道基本一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物 **9** 为黄嘌呤 B。

化合物 **10**: 白色粉末, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 *m/z*: 121.028 7 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 121.029 0), 结合 1D NMR 确定其分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.97 (1H, s, H-7), 7.69 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2, 6), 6.87 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3, 5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 190.9 (C-7), 164.4 (C-4), 132.3 (C-2, 6), 127.8 (C-1), 115.9 (C-3, 5)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[18]</sup>, 故鉴定化合物 **10** 为对羟基苯甲醛。

化合物 **11**: 白色粉末, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 *m/z*: 151.048 0 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 151.047 3), 结合 1D NMR 确定其分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.59 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2, 6),

6.67 (2H, d,  $J=8.2$  Hz, H-3, 5), 3.80 (1H, s, H-7);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 162.8 (C-4), 131.3 (C-2, 6), 123.8 (C-1), 115.9 (C-3, 5), 53.7 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物 **11** 为对羟基苯甲酸甲酯。

### 3.4 抗真菌活性

采用菌丝生长速率法测定了化合物 **1~11** 对木瓜炭疽杆菌的抑制活性,  $\text{EC}_{50}$  值见表 3。结果显示, 二氢异香豆素类化合物 (**2~7**) 对该病原菌表现出不同程度的抑制活性,  $\text{EC}_{50}$  值在 25.31~89.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其中, 化合物 **1** ( $\text{EC}_{50}=15.02$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、**2** ( $\text{EC}_{50}=25.31$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、**3** ( $\text{EC}_{50}=37.89$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和 **4** ( $\text{EC}_{50}=47.86$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的  $\text{EC}_{50}$  值低于阳性药多菌灵 ( $\text{EC}_{50}=49.58$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 表明在本实验条件下, 这 3 个化合物的抑制活性优于多菌灵。化合物 **5~7** 的  $\text{EC}_{50}$  值分别为 79.69、89.86、69.98  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 活性弱于多菌灵。丁烯内酯类化合物 **8** 和 **9** 对木瓜炭疽杆菌也表现出一定的抑制活性,  $\text{EC}_{50}$  值分别为 80.54、76.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。酚酸类化合物 **10** 和 **11** 在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下未表现出明显抑制作用 ( $\text{EC}_{50}>100$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

表 3 化合物 **1~11** 对木瓜炭疽杆菌菌丝生长  $\text{EC}_{50}$  值 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3  $\text{EC}_{50}$  values of compounds **1—11** against mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

化合物	$\text{EC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	化合物	$\text{EC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
<b>1</b>	15.02±0.15	<b>7</b>	69.98±0.20
<b>2</b>	25.31±0.24	<b>8</b>	80.54±0.11
<b>3</b>	37.89±0.21	<b>9</b>	76.68±0.17
<b>4</b>	47.86±0.22	<b>10</b>	>100
<b>5</b>	79.69±0.14	<b>11</b>	>100
<b>6</b>	89.86±0.13	多菌灵	49.58±0.10

## 4 讨论

本研究采用 OSMAC 策略和 GNPS 分子网络技术, 成功实现了对缬草内生真菌 *Chaetomium elatum* FH-3 中抗真菌活性成分的高效靶向分离。通过这一方法, 共分离得到 12 个化合物, 其中包括两个新化合物 (化合物 **1**、**2a**)。所分离得到的化合物主要包括二氢异香豆素、丁烯内酯、酚酸等不同类型的次生代谢产物。通过改变培养基组成、调节培养条件, 能够有效影响菌株的代谢途径, 进而获得不同的代谢产物谱。GNPS 分子网络技术的应用对二氢异香豆素类化合物的识别提供了重要参考, 利用 LC-MS/MS 数据的聚类分析, 能够有效减少分离过程中

的盲目性, 为后续化合物的分离提供了明确方向。

抗真菌活性实验表明, 化合物 **1~4** 表现出较强的抗木瓜炭疽杆菌活性, 且活性优于阳性对照药物多菌灵。从结构上分析, 化合物 **2~4** 均含有 C-4 位的羟基, 而 C-4 位未被羟基取代的化合物 **5~7** 表现出较弱的抗真菌活性, 表明 C-4 位羟基是这些化合物抗真菌活性的关键功能基团。本研究为缬草内生真菌次生代谢产物的多样性提供了新的视角, 也为采用 OSMAC 策略挖掘新型抗真菌化合物提供了有力的实验依据, 具有较高的学术价值和应用前景。

志谢: 广州中医药大学张翠仙教授课题组在菌株培养条件和 GNPS 分子网络技术上给予大力支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] de Oliveira Filho J G, da Cruz Silva G, Cipriano L, et al. Control of postharvest fungal diseases in fruits using external application of RNAi [J]. *J Food Sci*, 2021, 86(8): 3341-3348.
- [2] Jian J Y, Fan Y M, Jin J, et al. Isolating antipathogenic fungal coumarins from *Coriaria nepalensis* and determining their primary mechanism *in vitro* [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(12): 6711-6722.
- [3] Zhang J, Yan L T, Yuan E L, et al. Antifungal activity of compounds extracted from cortex pseudolaricis against *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(21): 4905-4910.
- [4] Van Nguyen M, Han J W, LeDang Q A, et al. Clerodane diterpenoids identified from *Polyalthia longifolia* showing antifungal activity against plant pathogens [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(36): 10527-10535.
- [5] 程龙媛, 张国卉, 孙燕, 等. 药用植物-内生菌-根际微生物互作研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(15): 5264-5273.
- [6] 谷荆洲, 任文静, 鲍梦雨, 等. 黄芦木内生真菌 *Talaromyces tiftonensis* SN34 的次生代谢产物研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(21): 6946-6952.
- [7] Iantas J, Savi D C, Ponomareva L V, et al. Paecilins Q and R: Antifungal chromanones produced by the endophytic fungus *Pseudofusicoccum stromaticum* CMRP4328 [J]. *Planta Med*, 2023, 89(12): 1178-1189.
- [8] Fan Y Z, Tian C, Tong S Y, et al. The antifungal properties of terpenoids from the endophytic fungus *Bipolaris eleusines* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2023, 13(1): 43.
- [9] Fan H, Shao X H, Wu P P, et al. Exploring brominated aromatic butenolides from *Aspergillus terreus* EGF7-0-1 with their antifungal activities [J]. *J Agric Food Chem*,

- 2024, 72(36): 19869-19882.
- [10] Fan H, Shao X H, Zhang Z K, *et al.* Penicilloneines a and B, quinolone-citrinin hybrids from a starfish-derived *Penicillium* sp [J]. *J Nat Prod*, 2024, 87(4): 705-712.
- [11] Fan H, Wu P P, Wang X, *et al.* OSMAC-activated and GNPS-guided investigation of alkaloids from an endophytic fungus *Aspergillus* sp. FH-1 of *Valeriana officinalis* L. [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2026, 124: 105151.
- [12] 何悦铭, 赵立凝, 陈欣琪, 等. 海洋本草软珊瑚共附生真菌 *Aspergillus terreus* EGF7-0-1 中  $\gamma$ -芳环丁烯内酯类化合物研究 (I) [J]. *热带海洋学报*, 2025, 44(1): 146-153.
- [13] Tanahashi T, Takenaka Y, Hamada N. Aromatic compounds from cultured lichen mycobionts of three *Graphis* species [J]. *Heterocycles*, 2011, 83(9): 2157.
- [14] 陈勇旭, 刘璇, 赵迪, 等. 真菌土曲霉化学成分的分  
离与鉴定 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(10): 1189-  
1196.
- [15] 项峥, 阎新佳, 温静, 等. 白花败酱草的化学成分研究  
[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(3): 185-187.
- [16] 李思怡, 申淑梅, 王远强, 等. 海洋真菌 *Talaromyces*  
sp. 1116 的次生代谢产物研究 [J]. *工业微生物*, 2024,  
54(3): 35-38.
- [17] Yang H G, Li J J, Chen S M, *et al.* Phenylisotertronic acids  
from the TCM endophytic fungus *Phyllosticta* sp [J].  
*Fitoterapia*, 2018, 124: 86-91.
- [18] 樊浩, 何嘉鸿, 韦霞, 等. 海洋本草软珊瑚共附生真菌  
*Aspergillus* sp. EGF7-0-1 中酚酸类化学成分研究 (II)  
[J]. *热带海洋学报*, 2023, 42(5): 171-177.

[责任编辑 王文倩]