

## 结香内生真菌芬芳镰刀菌化学成分的研究

武玉卓<sup>1</sup>, 李 瑞<sup>1</sup>, 邱博琳<sup>1</sup>, 张景芳<sup>1</sup>, 王玲燕<sup>1</sup>, 戴均贵<sup>1</sup>,  
王素娟<sup>1</sup>, 章华伟<sup>2\*</sup>, 林 生<sup>1\*</sup>

(1. 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014)

**摘要:** 运用 Sephadex LH-20、MCI 树脂、反相半制备 HPLC 等多种色谱分离技术, 从瑞香科结香属植物结香 *Edgeworthia chrysantha* 的内生真菌芬芳镰刀菌 *Fusarium redolens* 的大米固体发酵物的乙酸乙酯提取部位分离得到 10 个化合物, 经 MS、UV、CD、旋光、IR 和 NMR 等波谱技术分别鉴定为 (+)-7S-4-脱氧-9-羟基茎点菌吡喃酮 C [(+)-7S-4-deoxy-9-hydroxyphomapyrone C] (**1**)、尿嘧啶 (**2**)、尿苷 (**3**)、2'-去氧尿苷 (**4**)、腺苷 (**5**)、2'-去氧腺苷 (**6**)、cordysin B (**7**)、麦角甾醇 (**8**)、麦角甾-5 $\alpha$ , 8 $\beta$ -环二氧-6, 22-二烯-3 $\beta$ -醇 (**9**) 和 (22E, 24S)-3 $\alpha$ -羟基-24-甲基胆甾-5, 8, 22-三烯-7-酮 (**10**)。其中化合物 **1** 为新化合物。

**关键词:** 结香; 植物内生真菌; 芬芳镰刀菌; 化学成分; (+)-7S-4-脱氧-9-羟基茎点菌吡喃酮 C

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0598-05

## Chemical constituents from *Fusarium redolens*, the endophytic fungus from *Edgeworthia chrysantha*

WU Yu-zhuo<sup>1</sup>, LI Rui<sup>1</sup>, QIU Bo-lin<sup>1</sup>, ZHANG Jing-fang<sup>1</sup>, WANG Ling-yan<sup>1</sup>,  
DAI Jun-gui<sup>1</sup>, WANG Su-juan<sup>1</sup>, ZHANG Hua-wei<sup>2\*</sup>, LIN Sheng<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

**Abstract:** A new phomapyrone derivative (**1**), and 9 known compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of solid fermentation of *Fusarium redolens*, the endophytic fungus from *Edgeworthia chrysantha*, by using various isolation techniques such as Sephadex LH-20, MCI GEL and Semi pre-HPLC, etc. Their structures were identified by spectroscopic analysis, including MS, UV, CD, specific rotation, IR, 1D and 2D NMR, as (+)-7S-4-deoxy-9-hydroxyphomapyrone C (**1**), uracil (**2**), uridine (**3**), 2'-deoxyuridine (**4**), adenosine (**5**), 2'-deoxyadenosine (**6**), cordysin B (**7**), ergosterol (**8**), ergosta-5 $\alpha$ , 8 $\beta$ -epidioxy-6, 22-dien-3 $\beta$ -ol (**9**), and (22E, 24S)-3 $\alpha$ -hydroxy-24-methylcholesta-5, 8, 22-trien-7-one (**10**).

**Key words:** *Edgeworthia chrysantha*; endophytic fungus; *Fusarium redolens*; chemical constituent; (+)-7S-deoxy-9-hydroxyphomapyrone C

收稿日期: 2017-01-05; 修回日期: 2017-01-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81522050); 天然药物活性物质与功能国家重点实验室优秀青年基金资助项目 (GTZB201202); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY16H300007).

\*通讯作者 Tel: 86-10-60212110, Fax: 86-10-63017757, E-mail: lsznn@imm.ac.cn; hwzhang@zjut.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0016

植物内生真菌是指生活在活体植物组织中, 并对宿主植物体产生无害或有益作用的真菌。内生真菌往往与药用植物存在“协同进化”的关系, 因此, 某些内生真菌也具有了产生与宿主药用植物相同或相似的次生代谢产物<sup>[1]</sup>。从 1904 年 Freeman 从毒麦中分离得到第一批植物内生真菌至今, 一大批结构新颖独特的生物活性成分被相继报道。植物内生真菌已成为天然抗菌活性成分的重要来源宝库<sup>[2]</sup>。随着近几年多重耐药菌数量的增加, 寻找新型抗菌药物尤为急迫。

瑞香科结香属植物结香 *Edgeworthia chrysantha*, 全株入药能消肿止痛, 可治跌打损伤、风湿疼痛; 其花蕾有养阴安神的功效, 主治目赤肿痛、多泪、目翳、梦遗、白带等症<sup>[3, 4]</sup>。近年来, 对其抗菌活性的研究逐渐深入<sup>[5, 6]</sup>。Zhang 等<sup>[7]</sup>在对结香的内生真菌分离的过程中, 发现了多株具有抗菌活性的内生真菌, 其中芬芳镰刀菌 *Fusarium redolens* 为丛赤壳科镰刀菌属, 别名: *F. oxysporum* var. *redolens*, 是常见的药用植物内生真菌之一。形态上为白色菌落, 菌落生长后期发红或发紫, 子囊中孢子分裂成 2 个近圆形的细胞<sup>[8]</sup>。其在形态学上与镰刀菌属的其他菌种较难辨别, 而用分子生物学的方式进行鉴定具有较高的灵敏度和准确性<sup>[9-11]</sup>。现有研究报道, 芬芳镰刀菌的多种次生代谢产物都表现出较好的抗菌活性<sup>[12-16]</sup>, 但对其固体发酵产物的化学成分缺少系统性研究。为了从药用植物内生真菌中寻找结构多样性的活性天然产物, 本研究对结香内生真菌芬芳镰刀菌的大米固体发酵产物的乙酸乙酯部位的化学成分进行研究, 并通过多种色谱技术和波谱学方法, 对单体化合物进行结构鉴定。

## 结果与讨论

本研究从结香内生真菌芬芳镰刀菌的大米固体发酵产物的乙酸乙酯部位, 分离鉴定了 10 个化合物, 分别为 (+)-7S-4-脱氧-9-羟基茎点菌吡喃酮 C [(+)-7S-4-deoxy-9-hydroxyphomapyrone C] (**1**)、尿嘧啶 (**2**)、尿苷 (**3**)、2'-去氧尿苷 (**4**)、腺苷 (**5**)、2'-去氧腺苷 (**6**)、cordysin B (**7**)、麦角甾醇 (**8**)、麦角甾-5 $\alpha$ , 8 $\beta$ -环二氧-6, 22-二烯-3 $\beta$ -醇 (**9**) 和 (22E, 24S)-3 $\alpha$ -羟基-24-甲基甾-5, 8, 22-三烯-7-酮 (**10**), 其中化合物 **1** 为新化合物。

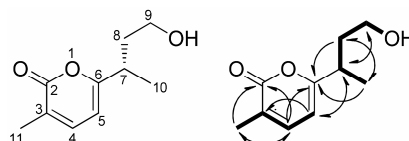
化合物 **1** 黄色油状物,  $[\alpha]_D^{20} +5.05$  ( $c$  0.184, MeOH); HR-ESI-MS,  $[M+H]^+$   $m/z$  183.101 20 (计算值 183.101 57), 确定其分子式为  $C_{10}H_{15}O_3$ , 不饱和度为 4; IR ( $\nu_{max}$ ) 3 394, 3 187, 2 919, 2 850, 1 646, 1 468,

1 420, 1 261, 1 105, 1 033, 802, 721, 648, 548  $cm^{-1}$ , 表示结构中存在羟基、碳基和双键基团。UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) 202 (3.53), 220 (3.40), 299 (3.66) nm, 为典型的  $\alpha$ -吡喃酮母核吸收特征<sup>[17]</sup>。

化合物 **1** 的  $^1H$ NMR 谱中 ( $CD_3OD$ , 600 MHz) 显示出 2 个相互耦合的烯烃质子信号  $\delta_H$  7.28 (1H, dq,  $J=6.6, 1.2$  Hz, H-4)、6.13 (1H, d,  $J=6.6$  Hz, H-5), 结合  $^{13}C$ NMR 中 166.3 (C-2)、123.4 (C-3)、142.4 (C-4)、103.8 (C-5)、168.0 (C-6), 以及紫外吸收特征, 提示结构中含有共轭的  $\alpha$ -吡喃酮结构<sup>[17]</sup>。此外,  $^1H$ NMR 谱中还显示出 2 个甲基质子信号  $\delta_H$  1.25 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H<sub>3</sub>-10) 和 2.03 (3H,  $J=1.2$  Hz, H<sub>3</sub>-11), 2 个亚甲基信号  $\delta_H$  1.90, 1.70 (各 1H, m, H<sub>2</sub>-8) 和 3.54 (2H, m, H<sub>2</sub>-9), 以及一个次甲基质子信号  $\delta_H$  2.70 (1H, m, H-7)。通过 HMQC 对化合物 **1** 的  $^1H$  和  $^{13}C$  NMR 进行准确归属后 (表 1), 其结构通过  $^1H$ - $^1H$  COSY 和 HMBC 进行确证 (图 1)。在化合物 **1** 的  $^1H$ - $^1H$  COSY 谱中, 除了显示出 H-4 与 H-5 的相关信号外, 还显示出 H<sub>3</sub>-11 与 H-4 的远程相关和 H<sub>3</sub>-10/H-7/H<sub>2</sub>-8/H<sub>2</sub>-9 的耦合片段, 结合 HMBC 谱中 H<sub>3</sub>-11 与 C-2、C-4 的相关, H-4 与 C-2、C-6、C-11 的相关, H-5 与 C-3、C-7 的相关, H-7 与 C-5、C-9 的相关, H<sub>2</sub>-8 与 C-6、C-10 的相关, H<sub>2</sub>-9 与 C-7 的相关, H<sub>3</sub>-10 与 C-6、C-8 的相关, 结合这些质子与碳的化学位移以及分子组成, 确定化合物 **1** 结构为 6-(3-正丁醇基)-二氢-吡喃-2-酮 [6-

**Table 1**  $^1H$  (600 MHz) and  $^{13}C$  (150 MHz) NMR data of compound **1** ( $CD_3OD$ )

No.	$\delta_C$	$\delta_H$ mult ( $J$ in Hz)
2	166.3	
3	123.4	
4	142.4	7.28, dq (6.6, 1.2)
5	103.8	6.13, d (6.6)
6	168.0	
7	35.8	2.70, m
8	38.3	1.90, m, H-8a 1.70, m, H-8b
9	60.3	3.54, m
10	18.8	1.25, d (6.6)
11	16.4	2.03, d (1.2)



**Figure 1** The structure (left) and key COSY (right, bold lines) and HMBC (right, arrows) correlations of compound **1**

(3-butanol)-2*H*-pyran-2-one], 为 4-deoxyphomapyrone C 的 9-羟基衍生物<sup>[18]</sup>。

化合物 **1** 显示出正的旋光值 $[\alpha]_D^{20} +5.05$  ( $c$  0.184, MeOH), 其 CD [CD (MeOH) 233 ( $\Delta\epsilon +0.058$ ), 291 ( $\Delta\epsilon +0.112$ )] 谱在 291 nm 处呈正的 Cotton 效应, 通过与 4-deoxyphomapyrone C 对比, 确定化合物 **1** C-7 的绝对构型为 7*S* 构型<sup>[18]</sup>。因此, 最后确定化合物 **1** 的结构为 (+)-7*S*-4-脱氧-9-羟基茎点菌吡喃酮 C [(+)-7*S*-4-deoxy-9-hydroxyphomapyrone C], 为一新化合物。

采用平板纸片法, 以耻垢分枝杆菌为检测菌对化合物 **1**~**10** 的抗菌活性进行初步筛选。待测样品均未产生明显的抑菌斑。待测样品对其他真菌、细菌和病毒的相关活性还有待进一步研究。

## 实验部分

Nicolet 5700 型傅里叶变换红外光谱仪, Perkin-Elmer 343 型旋光仪, AV-III-500 型、Inova-500 型和 Inova-600 型核磁共振光谱仪, Agilent 1000 Series LC-MSD-Trap-SL 型质谱仪, JASCO J-815 型圆二色散光谱仪, Agilent HP1100 型高效液相色谱仪, LC-UV 100 PLUS 紫外检测器 (上海伍丰科学仪器有限公司), LC-3000 高压输液泵 (创新通恒公司), Rp C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 250 mm $\times$ 10 mm) (美国 ES 公司), Alltima Silica 10  $\mu$ m (GRACE 公司), Ultimate XB-CN (5  $\mu$ m, 250 mm $\times$ 10 mm), Büchi Gradient Former B-687 中压液相色谱仪, Rp C<sub>18</sub>, 43~60  $\mu$ m (Pharmacia 公司), CombiFlash Rp C<sub>18</sub> (40~60  $\mu$ m Micron Silicag Gel) 组合闪式色谱仪 (Isco 公司), 羟丙基葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (瑞典 Amersham Biosciences 公司生产), CHP20/P120 MCI GEL, 硅胶柱色谱: 硅胶 (200~300 目) 和薄层色谱用硅胶 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工厂生产)。所用试剂和溶剂若无特别说明均购自北京化工厂, 级别为分析纯或色谱纯, 未经处理直接使用。

健康结香的采集鉴定以及芬芳镰刀菌纯菌种的分离由浙江工业大学章华伟教授完成<sup>[7]</sup>, 菌种采用液氮保藏法保藏。

### 1 菌种的分子生物学鉴定

菌种的鉴定采用 ITS 4 通用引物, 用 MEGA 4 构建分子进化树, 采用 Neighbor Joining 法的 Complete Deletion 模式建树, Bootstrap 进行检验, 并重复 1000 次。由北京三博远志生物技术有限公司提供技术支持。

### 2 菌种的固体发酵

**2.1 液体种子制备** 培养液配方为马铃薯 200 g、酵母膏 10 g、蛋白胨 6 g、葡萄糖 30 g、KHP<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 2 g、

MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, 定容至 1 L, 调 pH 6.8。分装至 500 mL 三角瓶, 每瓶约装 150 mL, 115  $^{\circ}$ C、68 kPa 灭菌 30 min。接种后于 28  $^{\circ}$ C、155 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 培养 3 天。培养液稀释 100 倍后做种子液备用。

**2.2 固体发酵方法** 每 1 L 三角瓶装大米 150 g、纯净水 180 mL。115  $^{\circ}$ C、68 kPa 灭菌 30 min。每瓶加种子液 20 mL, 室温培养 40 天。

### 3 提取分离

每瓶固体发酵物加 500 mL 乙酸乙酯浸泡后超声 30 min, 重复 3 遍, 得总浸膏 54 g。总浸膏经反相中压柱色谱, 甲醇 (5%~95%) 梯度洗脱得组分 A~D。组分 A 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (30% 甲醇-水) 洗脱, 得组分 A1~A4, 组分 A3 经 HPLC 半制备色谱纯化 (ES-C<sub>18</sub> 色谱柱, 2.5% 甲醇-水, 254 nm), 得化合物 **2** (2.0 mg, 14 min)、**3** (1.5 mg, 25 min) 和 **4** (0.5 mg, 29 min)。组分 B 经 MCI 梯度洗脱 (10%、30%、50%、100% 甲醇-水), 得组分 B1~B4。组分 B2 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (30% 甲醇-水) 洗脱, 得组分 B2A~B2E, 组分 B2E 经 HPLC 半制备色谱纯化 (Ultimate XB-CN, 6.0% 甲醇-水, 254 nm), 得组分 B2E1~B2E5, B2E1~B2E3 分别经 HPLC 再纯化得化合物 **5** (ES-C<sub>18</sub> 色谱柱, 5% 乙腈-水, 18 min, 2.4 mg, 254 nm)、**6** (Ultimate XB-CN, 5  $\mu$ m, 2% 乙腈-水, 19 min, 2.2 mg, 254 nm) 和 **7** (Ultimate XB-CN, 5% 乙腈-水, 22 min, 1.3 mg, 254 nm)。组分 B3 经 Flash 柱色谱 (C<sub>18</sub>, 10%~18% 甲醇-水梯度洗脱), 得组分 B3A~B3D。B3D 经 HPLC 制备色谱纯化 (ES-C<sub>18</sub> 色谱柱, 26% 甲醇-水, 280 nm), 得化合物 **1** (2.3 mg, 35 min)。组分 D 中析出针状结晶, 过滤后用色谱纯甲醇重结晶得化合物 **8** (80 mg)。组分 D 经硅胶柱色谱 (20:1, 10:1, 8:1, 5:1, 3:1 石油醚-丙酮梯度洗脱), 得组分 D1~D11。组分 D9 中析出白色固体, 过滤后用色谱纯甲醇重结晶得化合物 **9** (20 mg)。D9 母液经 HPLC 半制备色谱纯化 (Ultimate XB-CN, 6.0% 甲醇-水, 254 nm), 得化合物 **10** (2.5 mg, 44 min)。

### 4 结构鉴定

化合物 **1** 黄色油状物,  $[\alpha]_D^{20} +5.05$  ( $c$  0.184, MeOH); IR ( $\nu_{\max}$ ) 3 394, 3 187, 2 919, 2 850, 1 646, 1 468, 1 420, 1 261, 1 105, 1 033, 802, 721, 648, 548 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 202 (3.53), 220 (3.40), 299 (3.66) nm; HR-ESI-MS, [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  183.101 20 (计算值 183.101 57); <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 数据见表 1。

化合物 **2** 白色粉末, ESI-MS  $m/z$  113 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 10.89 (2H, br s, H-1,

3), 7.37 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-6), 5.44 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-5)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道的尿嘧啶的数据一致。

**化合物 3** 白色粉末, ESI-MS  $m/z$  225  $[M+H]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 7.89 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6), 5.78 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-1'), 5.64 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 4.02 (1H, m, H-2'), 3.96 (1H, m, H-3'), 3.84 (1H, m, H-4'), 3.62 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.1$  Hz, H-5'a), 3.55 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.1$  Hz, H-5'b)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道的尿苷的数据一致。

**化合物 4** 白色粉末, ESI-MS  $m/z$  229  $[M+H]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 7.85 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6), 6.15 (1H, dd,  $J = 6.0, 8.0$  Hz, H-1'), 5.63 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 4.23 (1H, m, H-3'), 3.78 (1H, m, H-4'), 3.57 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.6$  Hz, H-5'a), 3.53 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.6$  Hz, H-5'b), 2.26 (1H, m, H-2'a), 2.08 (1H, m, H-2'b);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 150.4 (C-2), 163.1 (C-4), 101.8 (C-5), 140.5 (C-6), 84.1 (C-1'), 40.1 (C-2'), 70.4 (C-3'), 87.4 (C-4'), 61.3 (C-5')。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道的2'-去氧尿苷数据一致。

**化合物 5** 黄色粉末, ESI-MS  $m/z$  268  $[M+H]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 8.34 (1H, s, H-2), 8.13 (1H, s, H-8), 5.87 (1H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-1'), 4.59 (1H, m, H-2'), 4.13 (1H, m, H-3'), 3.95 (1H, m, H-4'), 3.66 (1H, dd,  $J = 12.1, 3.6$  Hz, H-5'a), 3.54 (1H, dd,  $J = 12.1, 3.6$  Hz, H-5'b);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 152.4 (C-2), 149.1 (C-4), 119.4 (C-5), 156.2 (C-6), 139.9 (C-8), 87.9 (C-1'), 73.5 (C-2'), 70.6 (C-3'), 85.9 (C-4'), 61.7 (C-5')。以上  $^1\text{H NMR}$  数据与文献<sup>[21]</sup>报道的腺苷数据一致。

**化合物 6** 黄色粉末, ESI-MS  $m/z$  250  $[M-H]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 8.32 (1H, s, H-2), 8.18 (1H, s, H-8), 6.43 (1H, dd,  $J = 8.0, 6.0$  Hz, H-1'), 4.58 (1H, m, H-3'), 4.07 (1H, m, H-4'), 3.84 (1H, dd,  $J = 12.3, 3.8$  Hz, H-5'a), 3.74 (1H, dd,  $J = 12.3, 3.8$  Hz, H-5'b), 2.81 (1H, m, H-2'a), 2.41 (1H, m, H-2'b);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 153.5 (C-2), 150.0 (C-4), 120.9 (C-5), 157.5 (C-6), 141.6 (C-8), 89.9 (C-1'), 41.6 (C-2'), 73.1 (C-3'), 87.2 (C-4'), 63.6 (C-5')。以上  $^1\text{H NMR}$  数据与文献<sup>[22]</sup>报道的2'-去氧腺苷数据一致。

**化合物 7** 白色固体, ESI-MS  $m/z$  282  $[M+H]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 8.34 (1H, s, H-2), 8.19 (1H, s, H-8), 6.06 (1H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-1'), 4.49 (1H, m, H-2'), 4.43 (1H, m, H-3'), 4.16 (1H, m, H-4'), 3.89 (1H, dd,  $J = 12.5, 2.8$  Hz, H-5'a), 3.75 (1H, dd,  $J = 12.5, 2.8$  Hz, H-5'b);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 153.7 (C-2), 150.0 (C-4), 121.0 (C-5), 157.6 (C-6), 141.9 (C-8), 89.2 (C-1'), 84.6 (C-2'), 58.8 (C-2' OCH<sub>3</sub>), 70.9 (C-3'), 88.4 (C-4'), 63.2 (C-5')。以上数据与文献<sup>[23]</sup>

报道的 cordysin B 数据一致。

**化合物 8** 无色针晶, EI-MS  $m/z$  397  $[M+H]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 5.52 (1H, m, H-6), 5.36 (1H, m, H-7), 5.25 (1H, m, H-23), 5.21 (1H, m, H-22), 3.50 (1H, m, H-3), 1.05 (6H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21, H-28), 0.94 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-27), 0.83 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26), 0.66 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C NMR}$  (Acetone- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 39.9 (C-1), 32.9 (C-2), 70.3 (C-3), 41.8 (C-4), 141.4 (C-5), 120.0 (C-6), 117.4 (C-7), 141.6 (C-8), 47.2 (C-9), 37.9 (C-10), 21.8 (C-11), 39.3 (C-12), 43.8 (C-13), 55.3 (C-14), 23.7 (C-15), 29.0 (C-16), 56.5 (C-17), 12.4 (C-18), 16.6 (C-19), 41.3 (C-20), 21.6 (C-21), 132.7 (C-22), 136.6 (C-23), 43.6 (C-24), 33.9 (C-25), 20.0 (C-26), 20.3 (C-27), 18.1 (C-28)。以上  $^1\text{H NMR}$  和  $^{13}\text{C NMR}$  数据与文献<sup>[24]</sup>报道的麦角甾醇数据一致。

**化合物 9** 无色针晶, EI-MS  $m/z$  429  $[M+H]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 6.50 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-7), 6.24 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-6), 5.22 (1H, dd,  $J = 15.3, 7.5$  Hz, H-23), 5.14 (1H, dd,  $J = 15.3, 8.3$  Hz, H-22), 3.97 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-28), 0.91 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-21), 0.88 (3H, s, C-19), 0.84 (3H, s, C-18), 0.82 (3H, d,  $J = 4.5$  Hz, H-26), 0.81 (3H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-27);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 37.1 (C-1), 30.3 (C-2), 66.6 (C-3), 34.8 (C-4), 82.3 (C-5), 135.3 (C-6), 130.9 (C-7), 79.6 (C-8), 51.2 (C-9), 37.1 (C-10), 20.8 (C-11), 39.5 (C-12), 44.7 (C-13), 51.8 (C-14), 23.6 (C-15), 28.8 (C-16), 56.3 (C-17), 13.0 (C-18), 18.3 (C-19), 39.9 (C-20), 21.0 (C-21), 135.5 (C-22), 132.4 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.7 (C-28)。以上  $^1\text{H NMR}$  和  $^{13}\text{C NMR}$  数据与文献<sup>[24]</sup>报道的麦角甾-5 $\alpha$ , 8 $\beta$ -环二氧-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇数据一致。

**化合物 10** 无色晶体, EI-MS  $m/z$  411  $[M+H]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$ : 6.01 (1H, br s, H-6), 5.25 (1H, dd,  $J = 15.4, 7.9$  Hz, H-22), 5.21 (1H, dd,  $J = 15.4, 7.9$  Hz, H-23), 3.55 (1H, m, H-3), 1.38 (3H, s, C-19), 1.08 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.95 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-28), 0.87 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-27), 0.85 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-26), 0.69 (3H, s, C-18);  $^{13}\text{C NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$ : 35.9 (C-1), 31.3 (C-2), 72.7 (C-3), 42.8 (C-4), 166.3 (C-5), 126.6 (C-6), 188.4 (C-7), 134.6 (C-8), 165.3 (C-9), 43.7 (C-10), 25.8 (C-11), 36.7 (C-12), 43.5 (C-13), 49.7 (C-14), 25.9 (C-15), 30.6 (C-16), 54.7 (C-17), 12.3 (C-18), 24.3 (C-19), 41.7 (C-20), 21.6 (C-21), 137.0 (C-22), 133.3 (C-23), 44.4 (C-24), 34.4 (C-25), 20.1 (C-26), 20.5 (C-27), 18.2 (C-28)。以上  $^1\text{H NMR}$  和  $^{13}\text{C NMR}$  数据与文献<sup>[25]</sup>报道

的 (22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ -羟基-24-甲基胆甾-5, 8, 22-三烯-7-酮数据一致。

## 5 抗耻垢分枝杆菌活性的初步筛选

采用平板纸片法 (K-B 法), 将耻垢分枝杆菌按 1.5% 接种于分枝杆菌培养基中, 倒平板。将 10  $\mu$ L (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 待测样品加于灭菌的纸片上, 风机吹干后贴于平板上, 37 °C 培养 24 h 后观测<sup>[26]</sup>, 肉眼可见抑菌圈即为阳性样品。

## References

- [1] Wei BY, Cao L, Li SX, et al. The role of endophytes in medical plants and the effect of endophytes on secondary metabolites [J]. Chin Agric Bull (中国农学通报), 2011, 27: 83–88.
- [2] Sunil KD, Shilpa AV, Sarita VB. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials [J]. Frontiers Microbiol, 2015, 5: 715.
- [3] General Editorial Committee of the Encyclopaedia of China. Encyclopedia of China (中国大百科全书) [M]. Beijing: Encyclopedia of China Publishing House, 1991: 1241.
- [4] General Editorial Committee of the National Assembly of Chinese Herbal Medicine. The National Assembly of Chinese Herbal Medicine (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975: 775.
- [5] Han J, Xu L, Cai ZH, et al. Antibacterial activity of *Edgeworthia chrysantha* Lindl. flowers *in vitro* [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科学), 2012, 21: 10859–10860.
- [6] Shi L, Xie GY, Wang S, et al. Advance in pharmaceutical research of *Buddleia officinalis* Maxim [J]. Chin Wild Plant Res (中国野生植物资源), 2016, 3: 34–40.
- [7] Zhang HW, Ruan CF, Bai XL, et al. Isolation and antimicrobial effects of endophytic fungi from *Edgeworthia chrysantha* [J]. Bangladesh J Pharmacol, 2015, 10: 529–532.
- [8] Li Q, Wang M, Lin ZP, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from different swollen root of *Rehmannia glutinosa* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2010, 35: 1679–1682.
- [9] Wang S, Huang L, Jiang GQ, et al. ITS rDNA sequence analysis and morphological identification of three *Fusarium* spp. in the soil collected from Kuerle region of Xinjiang [J]. Xinjiang Agric Sci (新疆农业科学), 2011, 48: 517–521.
- [10] Hong SY, Kang MR, Cho EJ, et al. Specific PCR detection of four quarantine *Fusarium* species in Korea [J]. Plant Pathol J, 2010, 26: 409–416.
- [11] Bayraktar H, Dolar FS. Molecular identification and genetic diversity of *Fusarium* species associated with onion fields in Turkey [J]. J Phytopathol, 2011, 159: 28–34.
- [12] Xu LJ, Liu YS, Zhou LG, et al. Enhanced beauvericin production with *in situ* adsorption in mycelial liquid culture of *Fusarium redolens* Dzf2 [J]. Proc Biochem, 2009, 44: 1063–1067.
- [13] Xu LJ, Liu YS, Zhou LG, et al. Optimization of a liquid medium for beauvericin production in *Fusarium redolens* Dzf2 mycelial culture [J]. Biotechnol Bioproc Eng, 2010, 15: 460–466.
- [14] Xu LJ, Liu YS, Zhou LG, et al. Modeling of *Fusarium redolens* Dzf2 mycelial growth kinetics and optimal fed-batch fermentation for beauvericin production [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011, 38: 1187–1192.
- [15] Xu LJ, Li PQ, Zhao JL, et al. Two antimicrobial compounds fusaric acid and 9,10-dehydrofusaric acid from endophytic *Fusarium redolens* Dzf2 [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2010, 22: 564–567.
- [16] Li J. Endophytic Fungi and Their Antibacterial Activity Detection from *Rhizoma paridis yunnanensis* and the Analysis of Steroid Compounds (滇重楼内生真菌及其抗菌活性检测和甾体化合物分析) [D]. Sichuan: Sichuan Agriculture University, 2007.
- [17] Alejandro FB, Juan EO. Gibepyrone:  $\alpha$ -pyrones from *Gibberella fujikuroi* [J]. Tetrahedron, 1993, 49: 141–150.
- [18] Zhang HB, Saurav K, Yu ZQ, et al.  $\alpha$ -Pyrones with diverse hydroxy substitutions from three marine derived *Nocardiopsis* strains [J]. J Nat Prod, 2016, 79: 1610–1618.
- [19] Wang CY, Han L, Kang K, et al. Secondary metabolites from green ALGAE *Ulva pertusa* [J]. Chem Nat Compd, 2010, 46: 828–830.
- [20] Diao TAY, Jihan MB, Lamiaa AS, et al. Ehrenasterol and biemnic acid: new bioactive compounds from the Red Sea sponge *Biemnaehrenbergi* [J]. Phytochem Lett, 2015, 12: 296–301.
- [21] Dong PZ, Wang XR. Purification and identification of adenosine and cordycepin from *Cordyceps militaris* [J]. Shanxi Med J (山西医药杂志), 2007, 36: 949–945.
- [22] Yuan Y, Tian JM, Xiao J, et al. Bioactive metabolites isolated from *Penicillium* sp. YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba* [J]. Nat Prod Res, 2014, 28: 278–281.
- [23] Yang ML, Kuo PC, Hwang TL, et al. Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis* [J]. J Nat Prod, 2011, 74: 1996–2000.
- [24] Zhang P, Bao HY, Tolgor. Chemical constituents from sporophore of *Hericium coralloides* (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2012, 43: 2356–2360.
- [25] Luo X, Li FM, Pramod B, et al. 26,27-Cyclosterols and other polyoxygenated sterols from a marine sponge *Topsentia* sp. [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 1760–1768.
- [26] Liang BY, Lu Y, Wang J. Isolation and screening of actinomycetes against *Mycobacterium* in Guangdong intact mangrove [J]. Mar Sci Bull (海洋通报), 2012, 31: 314–319.