

扩展青霉 *Penicillium expansum* GY618 的次生代谢产物及抑制酪氨酸酶活性研究

尹飞宇¹, 梁盛², 朱前恒³, 袁丰华², 黄浩³, 温慧玲^{3*}

(1. 赣南医科大学康复学院, 江西 赣州 341000; 2. 赣南医科大学基础医学院, 江西 赣州 341000; 3. 赣南医科大学药学院, 江西 赣州 341000)

摘要: 采用硅胶柱层析、凝胶柱层析、反相硅胶柱层析和半制备高效液相等多种分离技术对扩展青霉 *Penicillium expansum* GY618 的大米固体发酵物进行分离纯化得到 12 个化合物。经高分辨质谱(HR-ESI-MS)、核磁共振波谱等技术, 结合与文献数据对比等方法, 鉴定为: 11-hydroxyl-penicitrinone F (**1**)、penicitrinone F (**2**)、白桦脂醇(**3**)、高根二醇(**4**)、麦角甾-5,7,22E-三烯-3 β -醇(**5**)、(22E)-5 α ,8 α -表二氧麦角甾-6,22-二烯-3 β -醇(**6**)、(22E)-5 α ,8 α -表二氧麦角甾-6,9,22-三烯-3 β -醇(**7**)、(22E,24R)-5 α ,8 α -过氧化麦角甾-23-甲基-6,22-二烯-3 β -醇(**8**)、(22E,24R)-5 α ,8 α -过氧化麦角甾-23-甲基-6,9,22-三烯-3 β -醇(**9**)、dankasterone A (**10**)、(17R)-4-hydroxy-17-methylincisterol (**11**) 和麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮(**12**)。化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2**~**4**、**6**~**12** 均首次从扩展青霉中分离得到。在酪氨酸酶抑制活性评价中, 化合物 **1**、**3**、**12** 具有一定的抑制酪氨酸酶活性。化合物 **1** 的 IC₅₀ 值为 75 ± 9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 化合物 **3** 和 **12** 的 IC₅₀ 值分别为 69 ± 8 和 64 ± 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其他化合物的 IC₅₀ 值均 > 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。曲酸作为阳性对照 IC₅₀ 值为 46 ± 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 扩展青霉; 大米固体发酵; 次生代谢产物; 结构鉴定; 酪氨酸酶抑制活性

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0427-07

Study on secondary metabolites of *Penicillium expansum* GY618 and their tyrosinase inhibitory activities

YIN Fei-yu¹, LIANG Sheng², ZHU Qian-heng³, YUAN Feng-hua², HUANG Hao³, WEN Hui-ling^{3*}

(1. School of Rehabilitation, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China; 2. School of Basic Medicine, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China; 3. School of Pharmacy, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

Abstract: Twelve compounds were isolated from the rice fermentation extracts of *Penicillium expansum* GY618 by silica column chromatography, Sephadex gel column chromatography, ODS column chromatography and semi preparative HPLC methods. They were determined as 11-hydroxyl-penicitrinone F (**1**), penicitrinone F (**2**), betulin (**3**), erythrodiol (**4**), ergosterol (**5**), ergost-5 α ,8 α -epidioxy-6,22-dien-3 β -ol (**6**), (5 α ,8 α -epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol) (**7**), 5 α ,8 α -epidioxy-(22E,24R)-23-methylergosta-6,22-dien-3 β -ol (**8**), 5 α ,8 α -epidioxy-23,24(R)-dimethylcholesta-6,9(11),22-trien-3 β -ol (**9**), dankasterone A (**10**), (17R)-4-hydroxy-17-methylincisterol (**11**) and ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (**12**), through mass spectrometer, nuclear magnetic resonance (NMR) and comparison with the literature. Compound **1** was a new compound and compounds **2**–**4**, **6**–**12** were isolated from *Penicillium expansum* fungus for the first time. The tyrosinase inhibitory activity experiment showed that

收稿日期: 2024-08-30; 修回日期: 2024-12-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82260685); 江西省科技厅资助项目 (20232BAB206181).

*通讯作者 E-mail: wenhuiling1984_wlh@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0845

compounds **1**, **3** and **12** showed certain inhibitory activity against tyrosinase with IC_{50} values of (75 ± 9) , (69 ± 8) and $(64 \pm 2) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The IC_{50} of other compounds were all greater than $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, while IC_{50} of the positive control kojic acid was $(46 \pm 4) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: *Penicillium expansum*; rice fermentation; secondary metabolite; structural identification; tyrosinase inhibitory activity

扩展青霉广泛存在于自然界中, 容易使植物致病, 污染采后水果蔬菜, 导致水果腐烂等, 关于扩展青霉的研究大部分为有关生物防治的研究^[1-3]。近年来, 对扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 的化学成分也开展了一些研究。结果表明扩展青霉的主要代谢产物有球毛壳菌素^[4]、生物碱^[5-8]、聚酮^[9]、倍半萜^[10]和杂萜^[9]等, 代谢产物丰富多样而且具有较好的活性, 引起化学、药学、生物学等相关研究领域的热切关注。

酪氨酸酶又称多酚氧化酶, 是一种含铜酶, 是黑色素合成过程中的关键限速酶, 参与黑色素合成, 与色素沉着障碍、癌症和神经退行性疾病密切相关^[11]。当酪氨酸酶过量表达, 能促进黑色素生成的量过多, 引起人体皮肤色素沉着性疾病^[12]。因此, 抑制酪氨酸酶活性, 可阻断黑色素合成反应链, 减少黑色素合成, 则达到美白肌肤的效果。基于此, 酪氨酸酶抑制剂也被用于护肤美白及色素沉着性疾病的治疗。同时, 酪氨酸酶能有效地将某些酚类物质氧化为醌类物质, 导致水果和蔬菜的切面褐变。因此, 酪氨酸酶抑制剂在医药、化妆品、食品工业等领域应用广泛。但是已知的酪氨酸酶抑制剂具有许多不良反应, 因此从天然产物中筛选开发无毒、长期稳定的新型酪氨酸酶抑制剂尤为重要。

本研究从扩展青霉的大米固体发酵物中分离鉴定得到12个化合物, 结构见图1。其中化合物**1**为新化合物, 化合物**2**~**4**、**6**~**12**均首次从该菌株中分离得到。本研究对分离所得的12个化合物进行酪氨酸酶抑制活性的筛选, 化合物**1**、**3**、**12**表现出一定的抑制酪氨酸酶活性, 其 IC_{50} 值分别为 75 ± 9 、 69 ± 8 、 $64 \pm 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其他化合物的 IC_{50} 值均大于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 未表现出明显抑制酪氨酸酶的活性。

结果与讨论

1 新化合物结构鉴定

化合物**1**, 常温下为黄色油状。 $[\alpha]_D^{24} -5.6$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log\epsilon$) 245 (3.66) nm; 高分辨质谱给出准分子离子峰 $[M-H]^-$ 223.095 7 (计算值为 223.097 0), 可推测出其分子式为 $C_{12}H_{16}O_4$, 表明不饱和度为5。化合物**1**的¹H NMR谱图显示, 化合物中含有明显的4个甲基 (δ_H 2.11、1.92、1.25、1.20), 见表1。化合物**1**的氢谱与化合物**2**的氢谱高度相似, 差异只是化合物**1**的氢谱中少了一个化学位移为7.58的单峰。通过¹³C NMR、DEPT和HSQC谱图可以知道化合物**1**共存在12个碳信号, 分别为4个甲基、2个次甲基、6个不

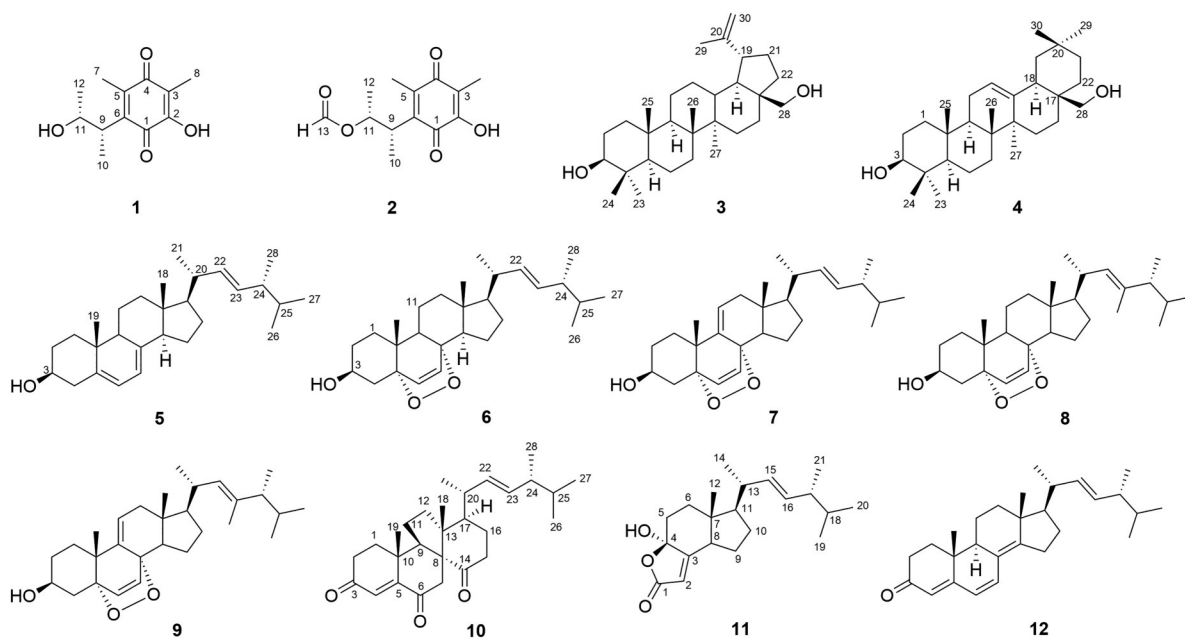


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-12

饱和碳 (其中 δ_c 184.0、187.7 为羰基碳, δ_c 151.0、145.4、141.7、116.8)。这与化合物 **2** 的碳谱信号相比, 差异是化合物 **1** 少了一个化学位移为 160.4 的碳信号。推测化合物 **2** 为化合物 **1** 的甲酸酯。通过数据库检索化合物 **1** 为新化合物。为了确证化合物 **1** 的结构, 采集了化合物 **1** 的系列二维谱图。从 ^1H - ^1H COSY 谱 (图 2), 显示存在 C-9/C-10/C-11/C-12 片段。HMBC 谱 (图 2) 显示了 H_3 -7 与 C-4、C-6 相关, H_3 -8 与 C-2、C-4 相关, H-9 与 C-1、C-5 相关, H_3 -10 与 C-6 相关, H-11 与 C-6、C-10 相关。因此确证了化合物 **1** 的平面结构。

该化合物含有 2 个手性中心 C-9 和 C-11。通过和具有相应手性中心的 citrinin 类似物 citrinin H1、citrinin H2、citraquinone A 及 7-methyl-citrinin H1 的偶合常数 ($^3J_{\text{H-9,H-11}}$ 偶合常数 = 10 Hz) 的对比, 可以推测化合物 **1** 中的 H-9 和 H-11 与类似化合物具有相同的相对构型。由于化合物 **1** 与 7-methyl-citrinin H1 以及化合物 **2** (penicitrinone F) 均分离自 *Penicillium expansum* GY618, 从生源途径考虑具有相同的绝对构型, 即 C-9、C-11 的绝对构型分别为 9*S*, 11*R*^[9,13-15]。最终将化合物 **1** 命名为 11-hydroxyl-penicitrinone F。

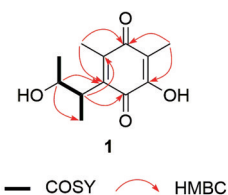


Figure 2 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound **1**

Table 1 The ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR data of compound **1** in CDCl_3

No.	1	
	δ_{H}	δ_{C}
1		184.0
2		151.0
3		116.8
4		187.7
5		145.4
6		141.7
7	2.11 (3H, s)	12.9
8	1.92 (3H, s)	8.4
9	2.90 (1H, qd, $J = 7.2, 10.0$ Hz)	42.7
10	1.20 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	16.2
11	4.20 (1H, qd, $J = 6.1, 10.0$ Hz)	70.2
12	1.24 (3H, d, $J = 6.1$ Hz)	22.8

2 酪氨酸酶抑制活性结果

12 个化合物的酪氨酸酶抑制活性结果表明, 化合物 **1**、**3**、**12** 表现出一定的抑制酪氨酸酶活性, 其 IC_{50} 值分别为 75 ± 9 、 69 ± 8 、 $64 \pm 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其他化合物的 IC_{50}

值均大于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 未表现出明显抑制酪氨酸酶的活性。曲酸作为阳性对照 IC_{50} 值为 $46 \pm 4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

讨论

本研究从扩展青霉的大米固体发酵物中分离鉴定得到 12 个化合物, 其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2**~**4**、**6**~**12** 均首次从该菌种中分离得到, 除化合物 **1** 和 **2** 为苯醌类化合物, 化合物 **3**、**4** 为三萜类化合物, 其他化合物为甾体类化合物。甾体化合物是一类广泛存在于动植物体内的天然化合物, 这些化合物通常在细胞毒性、抗炎、抗菌抑菌活性、抑制乙酰胆碱酯酶活性等方面表现突出。本研究对分离所得的 12 个化合物进行酪氨酸酶抑制活性的筛选, 发现化合物 **1** 的 IC_{50} 值为 $75 \pm 9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而化合物 **2** 的 IC_{50} 值为 $> 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **1** 和 **2** 同为苯醌类化合物, 化合物 **2** 是化合物 **1** 的甲酸酯, 提示化合物 **1** 侧链上的羟基对抑制酪氨酸酶有正向作用。化合物 **3**~**12** 中的大部分化合物的 IC_{50} 值 $> 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而化合物 **3** 和 **12** 的 IC_{50} 值分别为 69 ± 8 和 $64 \pm 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **1**、**3**、**12** 具有一定的酪氨酸酶抑制剂的活性。本研究丰富了扩展青霉次生代谢产物结构的多样性。

实验部分

AVANCE NEO 400 MHz 核磁共振 (瑞士布鲁克公司); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); BSA224S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); DW-HL768 超低温冷冻储存箱 (中科美菱低温科技股份有限公司); Perkinelmer victor nivo 酶标仪 (珀金埃尔默仪器有限公司)。PDA 培养基购自北京陆桥技术股份有限公司; 大米培养基: 使用 1 000 mL 三角瓶, 装 250 g 市售食用大米, 160 mL 纯净水, 121 °C 高温灭菌 30 min。酪氨酸酶 (规格 100 KU, 上海源叶生物科技有限公司); L-酪氨酸 (上海泰坦科技股份有限公司); 曲酸 (上海泰坦科技股份有限公司); 色谱甲醇和乙腈 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 柱色谱硅胶 GF₂₅₄ (100~200 和 200~300 目, 安徽良臣硅源材料有限公司); 其他提取分离所用试剂级别均为分析纯。

菌株是本课题组从北京百欧博伟生物有限公司购买的扩展青霉, 根据菌株形态特征与 ITS 测序鉴定为 *Penicillium expansum*, 并且命名为 *Penicillium expansum* GY618, 随后在进化树中添加了 *Penicillium expansum* GY618 数据, 在 G-BANK 注册编号为 OL598580。菌种在斜面培养基上活化好后放入 4 °C 冰箱, 保存于赣南医科大学江西省天然产物研究实验室。

1 真菌发酵

将菌株 *Penicillium expansum* GY618 接种至 PDA 平板, 放在 28 °C 恒温培养箱中培养 3 天, 使菌株活化。在 1 L 锥形瓶中加入 250 g 大米和 160 mL 水, 随后放到立式压力蒸汽灭菌锅中以 121 °C 灭菌 30 min, 拿出放置在洁净工作台冷却, 冷却至室温后接入活化的 3 方块 (大小约 0.5 cm × 0.5 cm) 扩展青霉 (*Penicillium expansum* GY618) 菌饼接种到锥形瓶中并放置于 28 °C 的恒温环境下培养三周。

2 提取与分离

将扩展青霉的发酵产物 (50 kg 大米) 在室温下用乙醇浸泡, 浸提液减压浓缩, 反复提取 5 次后得到总浸膏。然后使用乙酸乙酯萃取 7 次, 得到乙酸乙酯部位浸膏 100 g。对乙酸乙酯部位用质量比 1:2 与 80~120 目硅胶拌样, 用石油醚-乙酸乙酯体系为洗脱液 (100:1→1:1) 进行梯度洗脱, 得到 8 个部分 (A~H)。首先对 G 部分使用反相硅胶柱用甲醇水体系梯度洗脱分离得到 GA~GD 四个部分。GB 部分用正相硅胶柱分离得到 4 个馏分 GB₁~GB₄, 之后 GB₂ 使用 Sephadex LH-20 柱分离, 以甲醇-二氯甲烷 (1:1) 洗脱得到两个子馏分 GB₂₁~GB₂₂, 再用半制备型高效液相色谱对 GB₂₁ 纯化后得到 **1** (1.0 mg) 和 **2** (2.6 mg)。GC 部分用正相硅胶柱分离得到 5 个馏分 GC₁~GC₅, GC₂ 部分使用 Sephadex LH-20 柱分离, 以甲醇-二氯甲烷 (1:1) 洗脱得到两个子馏分 GC₂₁~GC₂₂, 对 GC₂₁ 使用半制备型高效液相色谱纯化后得到 **3** (4.6 mg) 和 **4** (3.5 mg)。GC₄ 部分使用 Sephadex LH-20 柱分离, 以甲醇-二氯甲烷 (1:1) 洗脱得到两个子馏分 GC₄₁~GC₄₂, 对 GC₄₁ 使用半制备型高效液相色谱纯化后得到 **5** (7.6 mg)、**6** (2.5 mg)、**7** (3.6 mg)、**8** (4.5 mg)、**9** (1.6 mg) 和 **10** (0.5 mg)。对 GC₅ 使用半制备型高效液相色谱纯化后得到 **11** (0.8 mg) 和 **12** (1.2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**, 常温下为黄色油状。[α]_D²⁴ -5.6 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 245 (3.66) nm; HRESI-MS m/z : 223.095 7 [M-H]⁻ (计算值为 223.097 0); IR (MeOH) ν_{\max} 2 947, 2 363, 1 014; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 和 ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表 1。

化合物 **2**, 常温下为黄色油状。[α]_D²⁴ -10.6 (c 0.1, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.48 (1H, dq, $J = 12.1, 6.3$ Hz, H-11), 3.05 (1H, m, H-9), 2.09 (3H, s, H-7), 1.91 (3H, s, H-8), 1.36 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-12), 1.25 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-10); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 183.0 (C-1), 151.0 (C-2), 116.6 (C-3), 187.6 (C-4), 144.9 (C-5), 140.3 (C-6), 12.7 (C-7), 8.4 (C-8), 40.2 (C-9), 15.6 (C-10), 73.0 (C-11), 19.2 (C-12), 160.4

(C-13)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 且旋光值与文献报道的 [α]_D²⁰ -16.3 (c 2.0, CHCl₃)^[16]接近, 因此鉴定化合物 **2** 为 penicitrinone F。

化合物 **3**, 白色固体, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 4.68 (1H, br s, H-29a), 4.58 (1H, br s, H-29b), 3.79 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-28a), 3.32 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-28b), 3.17 (1H, dd, $J = 11.0, 5.1$ Hz, H-3), 2.37 (1H, m, H-19), 1.67 (3H, s, H-30), 1.01 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 38.8 (C-1), 27.5 (C-2), 79.1 (C-3), 39.0 (C-4), 55.4 (C-5), 18.4 (C-6), 34.4 (C-7), 41.0 (C-8), 50.5 (C-9), 37.3 (C-10), 21.0 (C-11), 25.3 (C-12), 37.4 (C-13), 42.9 (C-14), 27.2 (C-15), 29.3 (C-16), 47.9 (C-17, C-19), 48.9 (C-18), 150.6 (C-20), 29.9 (C-21), 34.1 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 16.2 (C-25), 16.1 (C-26), 14.9 (C-27), 60.7 (C-28), 109.8 (C-29), 19.2 (C-30)。以上数据与文献^[17-20]报道基本一致, 鉴定化合物 **3** 为白桦脂醇。

化合物 **4**, 白色固体, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.19 (1H, t, $J = 3.7$ Hz), 3.55 (1H, d, $J = 10.9$ Hz), 3.22 (1H, m), 3.20 (1H, m), 1.16 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.79 (3H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 79.2 (C-3), 38.9 (C-4), 55.3 (C-5), 18.5 (C-6), 32.7 (C-7), 39.9 (C-8), 47.7 (C-9), 37.1 (C-10), 23.7 (C-11), 122.5 (C-12), 144.2 (C-13), 41.9 (C-14), 25.7 (C-15), 22.1 (C-16), 37.1 (C-17), 42.5 (C-18), 46.6 (C-19), 31.1 (C-20), 34.29 (C-21), 31.2 (C-22), 28.2 (C-23), 15.7 (C-24), 15.7 (C-25), 16.9 (C-26), 26.1 (C-27), 69.9 (C-28), 33.3 (C-29), 23.9 (C-30)。以上数据与文献^[21-24]报道基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为高根二醇。

化合物 **5**, 白色固体, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.56 (1H, dd, $J = 5.7, 2.5$ Hz, H-6), 5.38 (1H, m, H-7), 5.19 (2H, m, H-22, H-23), 3.63 (1H, m, H-3), 2.46 (1H, m, H-4a), 2.28 (1H, m, H-4b), 1.03 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 0.94 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-28), 0.83 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.81 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-26), 0.62 (3H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 38.5 (C-1), 32.1 (C-2), 70.6 (C-3), 40.9 (C-4), 139.9 (C-5), 119.7 (C-6), 116.4 (C-7), 141.5 (C-8), 46.4 (C-9), 37.2 (C-10), 21.2 (C-11), 39.2 (C-12), 43.0 (C-13), 54.7 (C-14), 23.1 (C-15), 28.4 (C-16), 55.8 (C-17), 12.2 (C-18), 16.4 (C-19), 40.6 (C-

20), 21.2 (C-21), 132.1 (C-22), 135.7 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献^[25-27]报道的麦角甾-5,7,22E-三烯-3 β -醇数据基本一致, 故鉴定化合物**5**为麦角甾-5,7,22E-三烯-3 β -醇。

化合物**6**, 白色固体, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.50 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.24 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 5.24 (1H, dd, $J = 15.2, 7.6$ Hz, H-22), 5.13 (1H, dd, $J = 15.1, 8.0$ Hz, H-23), 3.96 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.90 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.82 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 34.8 (C-1), 30.2 (C-2), 66.5 (C-3), 37.0 (C-4), 82.3 (C-5), 135.5 (C-6), 130.8 (C-7), 79.6 (C-8), 51.2 (C-9), 37.1 (C-10), 20.7 (C-11), 39.4 (C-12), 44.7 (C-13), 51.8 (C-14), 23.5 (C-15), 28.8 (C-16), 56.3 (C-17), 13.0 (C-18), 18.3 (C-19), 39.9 (C-20), 19.8 (C-21), 132.4 (C-22), 135.3 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 21.0 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献^[28]报道基本一致, 故鉴定化合物**6**为 (22E)-5 $\alpha,8\alpha$ -表二氧麦角甾-6,22-二烯-3 β -醇。

化合物**7**, 白色固体, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.59 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.28 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 5.43 (1H, dd, $J = 6.1, 2.0$ Hz, H-11), 5.24 (1H, dd, $J = 15.2, 7.6$ Hz, H-22), 5.13 (1H, dd, $J = 15.1, 8.0$ Hz, H-23), 4.01 (1H, m, H-3), 1.09 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.82 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.73 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 32.7 (C-1), 30.7 (C-2), 66.5 (C-3), 36.2 (C-4), 82.8 (C-5), 135.6 (C-6), 130.9 (C-7), 78.5 (C-8), 142.6 (C-9), 38.1 (C-10), 119.9 (C-11), 41.3 (C-12), 43.7 (C-13), 48.3 (C-14), 21.0 (C-15), 28.8 (C-16), 56.0 (C-17), 13.1 (C-18), 25.7 (C-19), 40.0 (C-20), 20.8 (C-21), 132.6 (C-22), 135.2 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献^[28]报道基本一致, 故鉴定化合物**7**为 (22E)-5 $\alpha,8\alpha$ -表二氧麦角甾-6,9,22-三烯-3 β -醇。

化合物**8**, 白色固体, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.51 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.25 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 4.88 (1H, dd, $J = 9.6, 1.6$ Hz, H-22), 3.97 (1H, m, H-3), 1.50 (3H, d, $J = 1.3$ Hz, H-29), 0.93 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28), 0.92 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.89 (3H, s, H-19), 0.84 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.78 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27);

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 34.8 (C-1), 30.2 (C-2), 66.6 (C-3), 37.0 (C-4), 82.3 (C-5), 135.6 (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), 23.5 (C-15), 28.1 (C-16), 57.1 (C-17), 13.1 (C-18), 18.3 (C-19), 34.2 (C-20), 20.7 (C-21), 131.2 (C-22), 135.9 (C-23), 50.3 (C-24), 30.9 (C-25), 20.2 (C-26), 21.9 (C-27), 17.1 (C-28), 13.3 (C-29)。以上数据与文献^[29,30]报道基本一致, 故鉴定化合物**8**为 (22E,24R)-5 $\alpha,8\alpha$ -过氧化麦角甾-23-甲基-6,22-二烯-3 β -醇。

化合物**9**, 白色固体, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.59 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.29 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 5.43 (1H, dd, $J = 6.0, 2.0$ Hz, H-11), 4.89 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-22), 4.01 (1H, m, H-3), 1.51 (3H, d, $J = 1.3$ Hz, H-29), 1.08 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28), 0.91 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.83 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.78 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.76 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 32.7 (C-1), 30.7 (C-2), 66.5 (C-3), 36.2 (C-4), 82.8 (C-5), 135.6 (C-6), 130.9 (C-7), 78.5 (C-8), 142.6 (C-9), 38.1 (C-10), 119.9 (C-11), 41.3 (C-12), 43.7 (C-13), 50.3 (C-14), 21.0 (C-15), 28.1 (C-16), 56.8 (C-17), 13.2 (C-18), 25.7 (C-19), 34.4 (C-20), 20.5 (C-21), 131.1 (C-22), 136.1 (C-23), 48.3 (C-24), 30.9 (C-25), 20.2 (C-26), 21.9 (C-27), 17.1 (C-28), 13.4 (C-29)。以上数据与文献^[31,32]报道基本一致, 故鉴定**9**为 (22E,24R)-5 $\alpha,8\alpha$ -过氧化麦角甾-23-甲基-6,9,22-三烯-3 β -醇。

化合物**10**, 白色固体, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.36 (1H, s, H-4), 5.26 (2H, m, H-22, 23), 1.26 (3H, s, H-19), 1.08 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 0.97 (3H, s, H-18), 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.82 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.80 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 39.0 (C-1), 34.5 (C-2), 199.3 (C-3), 126.6 (C-4), 156.2 (C-5), 200.2 (C-6), 40.9 (C-7), 62.3 (C-8), 49.5 (C-9), 36.1 (C-10), 25.2 (C-11), 38.4 (C-12), 54.2 (C-13), 215.0 (C-14), 38.1 (C-15), 23.3 (C-16), 49.4 (C-17), 17.2 (C-18), 24.1 (C-19), 37.3 (C-20), 23.8 (C-21), 132.4 (C-22), 135.2 (C-23), 43.4 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.2 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献^[33]报道基本一致, 故鉴定化合物**10**为 dankasterone A。

化合物**11**, 无色油状, 易溶于二氯甲烷; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.62 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 5.25 (1H, d, $J = 7.3, 15.1$ Hz, H-15), 5.17 (1H, d, $J = 8.3, 15.3$ Hz, H-16), 1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-14), 0.92

(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-20), 0.82 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-19), 0.60 (3H, s, H-12); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 171.4 (C-1), 112.4 (C-2), 170.8 (C-3), 105.3 (C-4), 35.4 (C-5), 35.2 (C-6), 49.0 (C-7), 50.5 (C-8), 21.5 (C-9), 29.0 (C-10), 55.4 (C-11), 11.9 (C-12), 40.3 (C-13), 21.2 (C-14), 134.8 (C-15), 133.0 (C-16), 43.0 (C-17), 33.2 (C-18), 19.8 (C-19), 20.1 (C-20), 17.7 (C-21)。以上数据与文献^[34]报道基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 (17*R*)-4-hydroxy-17-methylincisterol。

化合物 **12**, 黄色的粉末, 易溶于二氯甲烷; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 6.60 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-7), 6.03 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-6), 5.73 (1H, s, H-4), 5.23 (2H, dd, $J = 10.2, 7.3$ Hz, H-22, 23), 1.05 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.82 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 34.3 (C-1), 34.3 (C-2), 199.7 (C-3), 123.1 (C-4), 124.6 (C-5), 124.6 (C-6), 134.2 (C-7), 164.5 (C-8), 44.5 (C-9), 36.9 (C-10), 19.1 (C-11), 35.7 (C-12), 44.1 (C-13), 156.2 (C-14), 25.5 (C-15), 27.9 (C-16), 55.8 (C-17), 19.1 (C-18), 16.8 (C-19), 39.4 (C-20), 21.4 (C-21), 135.2 (C-22), 132.7 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献^[35,36]报道基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为麦角甙-4,6,8(14),22-四烯-3-酮。

4 抑制酪氨酸酶的活性测定

以曲酸为阳性对照, 参照 Mikayoulou 等^[37]的方法并结合 Chen^[38]的方法测定化合物抑制酪氨酸酶的活性。将 *L*-酪氨酸用 PBS 缓冲溶液配制成浓度为 $552 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。将酪氨酸酶用 PBS 缓冲液配制成 $100 \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。用乙醇将化合物和曲酸配制成初始浓度为 $1\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 倍比稀释成一系列浓度, 分别为 $500, 250, 125, 62.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。试验分为样品溶液组和空白溶液组。在 96 孔板中总体积为 $200 \mu\text{L}$, 其中 $20 \mu\text{L}$ 样品溶液, $40 \mu\text{L}$ *L*-酪氨酸、 $40 \mu\text{L}$ 酪氨酸酶溶液和 $100 \mu\text{L}$ PBS 缓冲溶液。样品溶液组分别加入 $40 \mu\text{L}$ *L*-酪氨酸、 $20 \mu\text{L}$ 样品溶液、 $100 \mu\text{L}$ PBS 缓冲溶液和 $40 \mu\text{L}$ 酪氨酸酶溶液。空白溶液组则用 PBS 替代样品溶液的加入。按照上述顺序加完后, 在 492nm 下测定孵育前的吸光度值; 37°C 恒温箱中孵育 25min , 在 492nm 下测定孵育后的吸光度值。抑制率 (%) = $[(A-B)-(C-D)]/(A-B)\times 100$ 。其中 *A* 为空白溶液孵育后的吸光度, *B* 为空白溶液孵育前的吸光度, *C* 为样品溶液孵育后的吸光度, *D* 为样品溶液孵育前的吸光度。

5 统计学分析

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 所有实验数据以三个独立实验的平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间数据的比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Dunnett 比较检验进行差异分析, 当 $P < 0.05$ 时, 差异具有统计显著性。

作者贡献: 尹飞宇是本文第一作者, 负责酪氨酸酶抑制活性的测试及稿件的撰写; 梁盛负责酪氨酸酶抑制活性的测试; 朱前恒负责真菌的发酵、化合物的分离纯化; 袁丰华负责酪氨酸酶抑制活性测试的指导; 黄浩负责结构解析的指导; 温慧玲是本文的通讯作者, 负责实验设计及把关, 提供本文思路, 参与稿件修改等工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Wang KL, Ngea GLN, Godana EA, et al. Recent advances in *Penicillium expansum* infection mechanisms and current methods in controlling *P. expansum* in postharvest apples [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63: 2598-2611.
- [2] Chen Y, Zhang YC, Xu DY, et al. PeAP1-mediated oxidative stress response plays an important role in the growth and pathogenicity of *Penicillium expansum* [J]. Microbiol Spectr, 2023, 11: e0380822.
- [3] Wang YR, Yang QY, Godana EA, et al. Ultrastructural observation and transcriptome analysis provide insights into mechanisms of *Penicillium expansum* invading apple wounds [J]. Food Chem, 2023, 414: 135633.
- [4] Andersen B, Smedsgaard J, Frisvad JC. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 2421-2428.
- [5] Yao S, Zhang RG, Wang JP, et al. A new diketopiperazine-type alkaloid from the endophytic fungus *Penicillium expansum* [J]. Nat Prod Res, 2023, 37: 3716-3721.
- [6] Li CZ, Zhang FM, Gan D, et al. Secondary metabolites isolated from *Penicillium expansum* and their chemotaxonomic value [J]. Biochem Syst Ecol, 2023, 107: 104584.
- [7] Lin HC, Chiou G, Chooi YH, et al. Elucidation of the concise biosynthetic pathway of the communesin indole alkaloids [J]. Angew Chem Int Edit, 2015, 54: 3004-3007.
- [8] Fan YQ, Li PH, Chao YX, et al. Alkaloids with cardiovascular effects from the marine-derived fungus *Penicillium expansum* Y32 [J]. Mar Drugs, 2015, 13: 6489-6504.
- [9] Zhu QH, Zang Y, Luo JJ, et al. A new meroterpenoid and a new polyketide from *Penicillium expansum* GY618 fungus [J]. Phytochem Lett, 2022, 51: 57-62.
- [10] Massias M, Rebuffat S, Molho L, et al. Expansolides A and B: tetracyclic sesquiterpene lactones from *Penicillium expansum*

- [J]. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 8112-8115.
- [11] Ma ZY, Lu Y. Melanin synthesis and regulation in vivo and commonly used melanin inhibitors from natural products and traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 5898-5916.
- [12] Benito-Martínez S, Salavessa L, Raposo G, et al. Melanin transfer and fate within keratinocytes in human skin pigmentation [J]. *Integr Comp Biol*, 2021, 61: 1546-1555.
- [13] Vinitha Ranji PK, Chandrani Wijeyaratne S, Hector Jayawardana K, et al. Citriquinones A and B, new benzoquinones from *Penicillium citrinum* [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8: 1431-1434.
- [14] Trivedi AB, Hirota M, Doi E, et al. Formation of new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water [J]. *J Chem Soc Perkin 1*, 1993, 18: 2167-2171.
- [15] Hirota M, Mehta A, Yoneyama K, et al. A major decomposition product, citrinin H2, from citrinin on heating with moisture [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66: 206-210.
- [16] Yang JK, Zhang B, Gao T, et al. A pair of enantiomeric 5-oxabicyclic[4.3.0] lactam derivatives and one new polyketide from the marine-derived fungus *Penicillium griseofulvum* [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32: 2366-2369.
- [17] Jin WY, Cai XF, Na M, et al. Triterpenoids and diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit HIF-1 in AGS cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30: 412-418.
- [18] Xia LZ, Zhou M, Xiao YH, et al. Chemical constituents from *Helwingia japonica* [J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8: 16-20.
- [19] Kim DK, Nam IY, Kim JW, et al. Pentacyclic triterpenoids from *Ilex macropoda* [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25: 617-620.
- [20] Mochammad S, Kazuo Y, Ryoji K, et al. ¹³C nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulin and berulinic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28: 1006-1008.
- [21] Dong ZQ, Wang W, Xu WQ. Pentacyclic triterpenoids from *Spiraea pubescens* (II) [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志)*, 2014, 20: 93-97.
- [22] Kagawa M, Minami H, Nakahara M, et al. Oleanane-type triterpenes from *Viburnum awabuki* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47: 1337-1341.
- [23] Lee CK, Chang MH. The chemical constituents from the heartwood of *Eucalyptus citriodora* [J]. *J Chin Chem Soc*, 2000, 47: 555-560.
- [24] Li BQ, Song QS. Study on the chemical constituents of the branches and leaves of *Kopsia officinalis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2008, 39: 1299-1301.
- [25] Zhang QH, Tian L, Yan ZQ, et al. Chemical constituents of a marine fungus *Nigrospora sphaerica* [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2014, 49: 26-29.
- [26] Li JT, Chen QQ, Zeng Y, et al. A new phenol compound from endophytic *Phomopsis* sp. DC01 [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26: 2008-2012.
- [27] Kwon HC, Zee SD, Cho SY, et al. Cytotoxic ergosterols from *Paecilomyces* sp. J300 [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25: 851-855.
- [28] Jiang B, Zhao QS, Peng LY, et al. Constituents from *Thamnia vermicularis* [J]. *Acta Bot Yunnanica (云南植物研究)*, 2002, 24: 525-530.
- [29] Cheng CL, Gong KK, Li PL, et al. Studies on chemical constituents of *Sonneratia paracaseolaris* [J]. *Chin J Mar Drugs (中国海洋药物)*, 2014, 33: 53-57.
- [30] Xin ZH, Tian L, Zhu TJ, et al. Isocoumarin derivatives from the sea squirt-derived fungus *Penicillium stoloniferum* QY2-10 and the halotolerant fungus *Penicillium notatum* B-52 [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30: 816-819.
- [31] Yaoita Y, Amemiya K, Ohnuma H, et al. Sterol constituents from five edible mushrooms [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46: 944-950.
- [32] Wang FZ, Fang YC, Zhang M, et al. Six new ergosterols from the marine-derived fungus *Rhizopus* sp. [J]. *Steroids*, 2008, 73: 19-26.
- [33] Amagata T, Tanaka M, Yamada T, et al. Variation in cytostatic constituents of a sponge-derived *Gymnascella dankaliensis* by manipulating the carbon source [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70: 1731-1740.
- [34] Togashi H, Mizushima Y, Takemura M, et al. 4-Hydroxy-17-methylcisterol, an inhibitor of DNA polymerase activity and the growth of human cancer cells *in vitro* [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 56: 583-590.
- [35] Wang YY, Zheng SN, Tian T, et al. Bioassay-guided isolation of cytotoxic steroids from *Neosartorya fischeri* [J]. *Chem Nat Compd*, 2020, 56: 173-176.
- [36] Fujimoto H, Nakamura E, Okuyama E, et al. Six immunosuppressive features from an ascomycete, *Zopfifella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52: 1005-1008.
- [37] Mikayoulou M, Mayr F, Temml V, et al. Anti-tyrosinase activity of South African Aloe species and isolated compounds plicataloside and aloesin [J]. *Fitoterapia*, 2021, 150: 104828.
- [38] Chen LJ. Screening and Determining Activity of a Class of Tyrosinase Inhibitors (新型酪氨酸酶抑制剂筛选及其活性测试) [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2012.