

蛇足石杉内生真菌 FS4 次级代谢产物的研究

童志武^{1#},梁海林^{2#},张志斌¹,汪 涯²,颜日明^{1*},朱 笃^{1,2}¹江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室,南昌 330022;²江西科技师范大学生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室,南昌 330013

摘要:以蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.) 茎部来源的一株内生真菌 FS4 为研究对象,分别进行了分离鉴定,抑制乙酰胆碱酯酶活性试验和次级代谢产物研究。通过形态观察和 18S rRNA 基因序列分析,菌株 FS4 初步确定为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)。抑制乙酰胆碱酯酶试验结果表明,菌株 FS4 菌体的提取物具有很强抑制乙酰胆碱酯酶生物活性,在样品浓度为 2 mg/mL 时,抑制率为 84.6%。通过对菌株 FS4 次级代谢产物的研究,共得到 5 个单体化合物(1~5),采用 LC-MS、NMR 等现代波谱学技术鉴定出化合物的结构分别为:麦角甾醇(1),邻苯二甲酸二辛酯(2),1'-9-12-亚油酸-2'-3'-二羟基丙酯(3),Microsphaerone C(4),烟曲霉酸(5)。其中化合物 3,4 和 5 为首次发现具有乙酰胆碱酯酶抑制活性,在 0.2 mg/mL 的浓度下,其乙酰胆碱酯酶抑制率分别为 73.5%,84.1% 和 77.6%,IC₅₀ 值为分别为 0.057,0.038,0.05 mg/mL。

关键词:蛇足石杉;烟曲霉;乙酰胆碱酯酶;抑制率

中图分类号:R9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.8.014

Secondary Metabolites of An Endophytic Fungus FS4 Obtained from *Huperzia serrata*

TONG Zhi-wu^{1#}, LIANG Hai-lin^{2#}, ZHANG Zhi-bin¹, WANG Ya², YAN Ri-ming^{1*}, ZHU Du^{1,2}¹Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province,Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; ²Key Lab of Bioprocess Engineering

of Jiangxi Province, College of life sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China

Abstract: In this study, we identified an endophytic fungus FS4 which was isolated from the stem of *Huperzia serrata* and investigated the inhibitory activity on acetylcholinesterase of its main metabolites. On the basis of morphological character and 18S rRNA gene sequences analysis, strain FS4 was classified as *Aspergillus fumigatus* and its extract showed significant inhibitory activity of acetylcholinesterase with inhibition rate of 84.6% at the concentration of 2 mg/mL. Furthermore, we isolated and identified five compounds which were Ergosterin (1), dioctyl phthalate (2), 1'-9-12 linoleic acid-2'-3'-dihydroxy propyl ester (3), microsphaerone C (4) and helvolic acid (5) respectively by employing silica column chromatography, LC-MS and NMR methods. Compounds 3, 4 and 5 showed inhibitory activity of acetylcholinesterase, the inhibition rates were 73.5%, 84.1% and 77.6% respectively and the IC₅₀ values were 0.057, 0.038 and 0.05 mg/mL correspondently.

Key words: *Huperzia serrata*; *Aspergillus fumigatus*; acetylcholinesterase; inhibition

内生真菌是指在生活在健康的植物组织内部而对宿主没有造成明显病害症状,不易引起宿主病害并完成了生活周期的真菌^[1,2]。植物内生真菌的次级代谢产物极其丰富,具有多样的生物活性,包括促

进植物生长,抗菌,抑制肿瘤细胞,杀虫,抗氧化,抑制乙酰胆碱酯酶等活性化合物。蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.) 又称千层塔、蛇足草,是我国传统的中药材,具有生肌止血、散瘀消肿和清热解毒的功效,现代医学发现在治疗老年痴呆疾病有其独特功效^[3]。在前期的研究中,本课题组发现蛇足石杉内生真菌具有丰富的生物多样性^[4,5],且部分蛇足石杉内生真菌产功能性活性次级代谢产物已被报道^[6]。本文以蛇足石杉内生真菌 FS4 为研究对

收稿日期:2017-11-23 接受日期:2018-03-21

基金项目:国家自然科学基金(81760649,31300051);江西省自然科学基金(20171BAB204009);江西省教育厅科技项目(GJJ161624)

* 通信作者 Tel:86-791-88121934; E-mail: yanriming@jxnu.edu.cn
共同第一作者

象,通过分类鉴定、次级代谢产物研究和抑制乙酰胆碱酯酶生物活性检测,研究结果表明:化合物 1'-9-12 linoleic acid-2'-3'-two Hydroxy Propyl ester、Microsphaerone C 和烟曲霉酸具有较强的抑制乙酰胆碱酯酶生物活性,为今后治疗老年痴呆药物的研发提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 仪器及主要试剂

Bruker AV400-400MHZ 的核磁共振波谱仪(布鲁克光谱仪器公司);WD-9403F 紫外检测分析仪(北京六一厂);SZ-97A 三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);SG2200H 超声波清洗仪(上海冠特超声仪器有限公司);ZHWHY211B 型摇床(上海智城分析仪器制造有限公司);ODS-C₁₈ 分析色谱柱(日本 YMC 公司);LC-MS-2020 液质联用仪(日本岛津公司);超高效液相色谱(沃特世科技有限公司);Beipackteile 和 PURIFLASH450 中压层析系统(瑞士 BUCHI 和 Interchim 公司);半制备高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司);GF₂₅₄ 高效薄层硅胶板(青岛海洋化工厂);乙酰胆碱酯酶和石杉碱甲(Sigma 公司);反相 C₁₈ 薄层层析板(德国默克公司);柱色谱硅胶(100~200 目,200~300 目,青岛海洋化工厂);其他的试剂均为分析纯,购自天津市永大化学试剂开发中心。

1.2 发酵提取和抑制乙酰胆碱酯酶生物活性检测

采用改进的 Ellman 法^[7]来检测内生真菌抑制乙酰胆碱酯酶生物活性,具体操作如下:将 FS4 菌株接入到 PDA(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 L,pH7)培养基中,进行活化培养,再将活化后的内生真菌 FS4 接种到 PDB(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1 L,pH7)液体中,连续发酵 12 天后收集菌体及发酵液,菌体采用 85% 乙醇萃取 3 次,浓缩至无乙醇后,采用乙酸乙酯萃取并浓缩,再利用改进的 Ellman 法进行抑制乙酰胆碱酯酶活性检测。

在 96 孔板中加入化合物样品 20 μ L, AChE 30 μ L, DTNB 80 μ L, PBS 缓冲液补平体系至终体积为 165 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下水浴保温 20 min, 然后加入 35 μ L 底物 ACTI, 37 $^{\circ}$ C 下水浴保温 30 min 后使用酶标仪在 405 nm 处读取每孔吸光度。每个样品溶液平行做三个重复,取其平均值。

1.3 菌株鉴定及培养

供试内生真菌 *Aspergillus fumigatus* FS4 分离自江西省庐山植物园药用植物蛇足石杉的茎部。通过 CTAB 法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后采用 18S rRNA 法测序鉴定,实验结果与曲霉属的烟曲霉(*Aspergillus fumigatus* KJ531960)的序列相似度为 100%,并结合形态学的观察,确定菌株 FS4 为烟曲霉真菌,菌株样品现保存于江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室。

将 FS4 菌株接入到 PDA 培养基中,进行活化培养,在 28 $^{\circ}$ C 条件下,培养 7 天,活化后,取小块活化后 FS4 菌株接入到 PDB 种子培养基中,在 28 $^{\circ}$ C, 150 rpm 的条件下,培养 5 天后得到种子液,再将种子液接入到装有 130 mL PDB 培养基的 500 mL 的三角瓶中进行大规模液体发酵在 28 $^{\circ}$ C, 150 rpm 的条件下,培养 12 天。采用 16 层纱布和大型布氏漏斗抽滤,分离菌体与发酵液,并收集菌体。

1.4 提取与分离

菌株采用上述方法发酵得到菌体 300 g,采用粉碎机粉碎后,加入浓度为 85% 的酒精进行提取,共浸提 3 次,用旋转蒸发仪在 40 $^{\circ}$ C 下减压旋蒸除去酒精得到析出沉淀相 4.8 g 和水相。其中水相采用乙酸乙酯(1:1)进行萃取,共萃取 3 次,合并乙酸乙酯相后,在 40 $^{\circ}$ C 下减压旋蒸,得到乙酸乙酯相浸膏 2.4 g。将获得的析出沉淀相粗提物 4.8 g,经硅胶柱色谱分离(石油醚/乙酸乙酯 100:0~0:100)得到 A-G 这 7 个馏分。石油醚/乙酸乙酯(5:1)洗脱条件下得到的 C 馏分,再经半制备 HPLC 甲醇/水(97:3),流速为 3 mL/min 等度洗脱,得到化合物 1(25 mg, t_R = 25 min)。石油醚/乙酸乙酯(2:1)洗脱条件下得到的 E 馏分,再经半制备 HPLC 甲醇/水(92:8),流速为 3 mL/min 等度洗脱,得到化合物 2(5 mg, t_R = 23 min)。石油醚/乙酸乙酯(0:100)洗脱条件下得到的 G 馏分,再经半制备 HPLC 甲醇/水(9:1)流速为 2 mL/min 等度洗脱,得到化合物 3(8 mg, t_R = 12 min)。将乙酸乙酯相粗提物 2.4 g 经过 ODS 反向硅胶,在甲醇/水(3:7~100:0)梯度洗脱下,得到馏分 A-H。甲醇/水(1:1)洗脱得到的 A 馏分,经过 Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇)洗脱得到化合物 4(15 mg)。甲醇/水(3:2)洗脱得到的 B 馏分,通过半制备 HPLC 甲醇/水(11:9),流速 2 mL/min 等度洗脱得到化合物 5(6 mg, t_R = 19 min),结构见图 1。

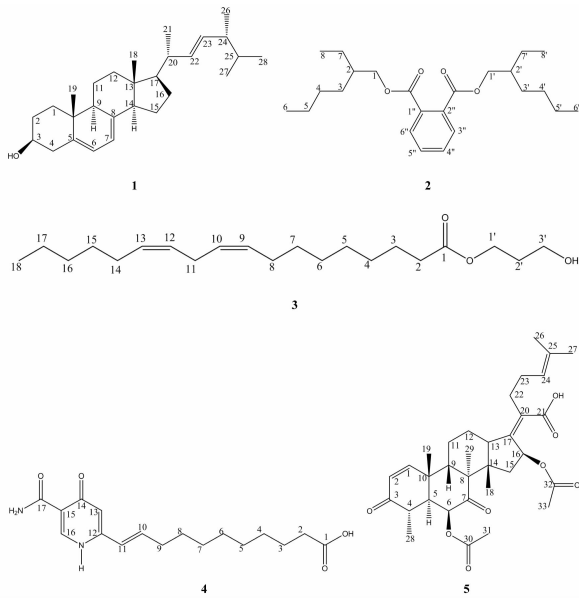


图1 化合物1~5的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-5

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 无色针状晶体;溶于甲醇,分子式为 $C_{28}H_{44}O$ 。HRESI-MS m/z : 397. 3042 $[M + H]^+$ 。 1H NMR (400 MHz; CD_3OD) δ_H : 5. 44 (1H, dd, $J = 5. 6, 24$ Hz, H-6), 5. 28 (1H, m, H-7), 5. 14 (2H, m, H-22, H-23), 3. 41 (1H, m, H-3), 3. 21 (6H, dt, $J = 3. 3, 1. 6$ Hz, H-1, H-2, H-4), 1. 12 (3H, d, $J = 6. 6$ Hz, C_{21} -Me), 0. 96 (3H, s, C_{19} -Me), 0. 85 (3H, d, $J = 6. 9$ Hz, C_{28} -Me), 0. 83 (3H, s, C_{26} -Me), 0. 78 (3H, d, $J = 8. 4$ Hz, C_{27} -Me), 0. 56 (3H, s, C_{18} -Me); ^{13}C NMR (100 MHz; CD_3OD) δ_C : 38. 2 (C-1), 31. 27 (C-2), 69. 66 (C-3), 40. 40 (C-4), 139. 96 (C-5), 119. 27 (C-6), 116. 27 (C-7), 140. 65 (C-8), 46. 27 (C-9), 36. 83 (C-10), 20. 75 (C-11), 39. 01 (C-12), 42. 95 (C-13), 54. 31 (C-14), 23. 64 (C-15), 28. 04 (C-16), 55. 7 (C-17), 11. 09 (C-18), 15. 26 (C-19), 40. 1 (C-20), 20. 24 (C-21), 135. 64 (C-22), 131. 84 (C-23), 42. 55 (C-24), 32. 98 (C-25), 19. 05 (C-26), 18. 67 (C-27), 16. 79 (C-28)。以上波谱数据与文献^[8]一致,因此鉴定化合物 1 为麦角甾醇。

化合物 2 白色粉末;溶于甲醇,分子式为 $C_{24}H_{38}O_4$ 。HRESI-MS m/z : 391. 2718 $[M + H]^+$, m/z : 413. 2528 $[M + Na]^+$ 。 1H NMR (400 MHz; CD_3OD)

δ_H : 7. 61 (2H, dd, $J = 5. 7, 3. 4$ Hz, H-3'', H-6''), 7. 53 (2H, dd, $J = 5. 7, 3. 3$ Hz, H-4'', H-5''), 4. 12 (4H, d, $J = 4. 2$ Hz, H-1, H-1'), 3. 21 (2H, dt, $J = 3. 1, 1. 5$ Hz, H-2, H-2'), 1. 29 (16H, m, H-3, H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6, H-6'), 0. 79 (6H, t, $J = 4. 0$ Hz, C_6 -Me, C_6' -Me), 0. 93 (6H, t, $J = 4. 0$ Hz, C_8 -Me, C_8' -Me); ^{13}C NMR (100 MHz; CD_3OD) δ_C : 67. 73 (C-1, 1'), 38. 80 (C-2, 2'), 30. 24 (C-3, 3'), 28. 74 (C-4, 4'), 22. 62 (C-5, 5'), 10. 00 (C-6, 6'), 23. 57 (C-7, 7'), 12. 98 (C-8, 8'), 132. 21 (C-1''), 132. 21 (C-2''), 128. 46 (C-3''), 128. 46 (C-6''), 130. 99 (C-4''), 130. 99 (C-5''), 167. 93 (C=O)。以上波谱数据与文献^[9]一致,因此鉴定化合物 2 为邻苯二甲酸二辛酯。

化合物 3 淡黄色油状;溶于氯仿,分子式为 $C_{21}H_{38}O_4$ 。HRESI-MS m/z : 377. 2514 $[M + Na]^+$ 。 1H NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ_H : 3. 60 (1H, dd, $J = 11. 5, 5. 9$ Hz, H-3'a), 3. 69 (1H, m, H-3'b), 4. 17 (2H, qd, $J = 11. 6, 5. 4$ Hz, H-1'a, H-1'b), 3. 93 (1H, dt, $J = 5. 9, 5. 4$ Hz, H-2'), 0. 89 (3H, t, $J = 6. 9$ Hz, H-18), 1. 63 (2H, m, H-3), 2. 05 (4H, dd, $J = 13. 5, 6. 7$ Hz, H-8, H-14), 2. 35 (2H, t, $J = 7. 6$ Hz, H-2), 2. 77 (2H, t, $J = 6. 5$ Hz, H-11), 5. 35 (4H, m, H-9, H-10, H-12, H-13), 1. 31 (16H, m, H-5, H-6, H-7, H-15, H-16, H-17, C_2 -OH, C_3 -OH); ^{13}C NMR (100 MHz; $CDCl_3$) δ_C : 174. 34 (C-1), 34. 16 (C-2), 24. 91 (C-3), 22. 58 (C-4), 25. 65 (C-5), 29. 11 (C-6), 29. 16 (C-7), 27. 20 (C-8), 127. 92 (C-9), 128. 11 (C-10), 25. 65 (C-11), 130. 03 (C-12), 130. 26 (C-13), 27. 22 (C-14), 29. 36 (C-15), 29. 60 (C-16), 31. 54 (C-17), 14. 07 (C-18), 65. 18 (C-1'), 70. 31 (C-2'), 63. 39 (C-3')。以上波谱数据与文献^[6]一致,因此鉴定化合物 3 为 1'-9-12-亚油酸-2'-3'-二羟基丙酯。

化合物 4 淡黄色粉末;溶于二甲基亚砜,分子式为 $C_{17}H_{24}N_2O_4$ 。HRESI-MS m/z : 321. 1803 $[M + H]^+$ 。 1H NMR (400 MHz; DMSO) δ_H : 2. 20 (4H, dd, $J = 14. 6, 7. 2$ Hz, H-2, H-9), 1. 44 (4H, dt, $J = 35. 6, 17. 8$ Hz, H-3, H-8), 1. 27 (8H, s, H-4, H-5, H-6, H-7), 6. 26 (1H, d, $J = 16. 0$ Hz, H-11), 6. 41 (1H, s, H-13), 6. 64 (1H, m, H-10), 8. 28 (1H, d, $J = 4. 7$ Hz, H-16), 7. 41 (1H, s, NH_2), 9. 54 (1H, s, NH_2), 12. 01 (2H, d, $J = 21. 7$ Hz, NH , COOH); ^{13}C NMR (100 MHz; DMSO) δ_C : 174. 96 (C-1), 34. 12 (C-2), 24. 95

(C-3), 28.54 (C-4), 28.96 (C-5), 29.00 (C-6), 29.14 (C-7), 29.18 (C-8), 32.74 (C-9), 138.98 (C-10), 122.99 (C-11), 146.19 (C-12), 117.95 (C-13), 178.20 (C-14), 116.48 (C-15), 141.97 (C-16), 165.90 (C-17)。以上波谱数据与文献^[10]一致,因此鉴定化合物 **4** 为 Microsphaerone C。

化合物 5 白色粉末;溶于氯仿,分子式为 $C_{33}H_{44}O_8$ 。HRESI-MS m/z : 567.2970 $[M-H]^-$ 。¹H NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ H: 7.30 (1H, m, H-1), 5.87 (2H, m, H-2, H-16), 2.78 (1H, dq, $J = 13.8, 6.8$ Hz, H-4), 2.27 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-5), 5.24 (1H, s, H-6), 2.10 (3H, d, $J = 11.4$ Hz, C6-OCOCH₃), 2.61 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-9), 1.60, (1H, d, $J = 12.9$ Hz, H-11) 1.99 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-11), 1.82 (1H, m, H-12), 2.43 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-12), 2.57 (1H, s, H-13), 1.90 (1H, s, H-15), 2.26 (1H, s, H-15), 1.96 (3H, m, C16-OCOCH₃), 0.93 (3H, s, H-18), 1.45 (3H, s, H-19), 2.49 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-22), 2.10 (2H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23), 5.11 (1H, s, H-24), 1.61 (3H, s, H-26), 1.69 (3H, s, H-27), 1.27 (3H, m, H-28), 1.18 (3H, s, H-29); ¹³C NMR (100

MHz; $CDCl_3$) δ C: 157.21 (C-1), 127.86 (C-2), 201.35 (C-3), 40.41 (C-4), 47.22 (C-5), 73.79 (C-6), 208.74 (C-7), 52.67 (C-8), 41.73 (C-9), 38.17 (C-10), 23.93 (C-11), 25.94 (C-12), 49.46 (C-13), 46.58 (C-14), 40.67 (C-15), 73.46 (C-16), 147.87 (C-17), 17.95 (C-18), 27.54 (C-19), 130.24 (C-20), 173.76 (C-21), 28.59 (C-22), 28.35 (C-23), 122.76 (C-24), 132.95 (C-25), 17.77 (C-26), 25.74 (C-27), 13.11 (C-28), 18.34 (C-29), 168.89 (C6-OCOCH₃), 20.74 (C6-OCOCH₃), 170.12 (C16-OCOCH₃), 20.51 (C16-OCOCH₃)。以上波谱数据与文献^[11,12]一致,因此鉴定化合物 **5** 为烟曲霉酸。

2.2 抑制乙酰胆碱酯酶生物活性测定

抑制乙酰胆碱酯酶生物活性检测实验结果(如图2)所示,在阳性对照石杉碱甲浓度为 0.2 mg/mL,抑制率为 86.3% 的条件下,化合物 **1~5** 与阳性对照同等浓度下,抑制率分别为 43.5%、38.4%、73.5%、84.1% 和 77.6%。IC₅₀ 值分别为 0.261、0.314、0.057、0.038、0.05 mg/mL(见表1)。化合物 **4** 具有较强的抑制乙酰胆碱酯酶生物学活性,可进一步研究,具有一定的利用价值。

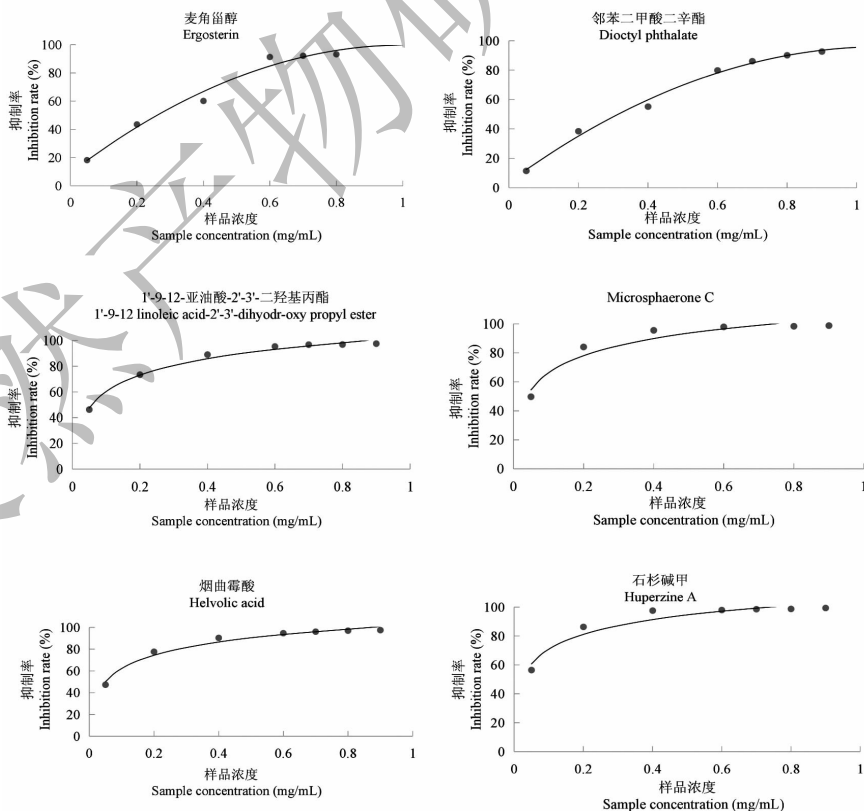


图2 化合物 **1~5** 对乙酰胆碱酯酶的抑制活性

Fig. 2 AChE inhibiting activity of compounds **1-5**

表 1 化合物 1~5 对乙酰胆碱酯酶半数抑制浓度 (IC₅₀)
Table 1 The IC₅₀ values for AChE inhibitions of compounds 1-5 (IC₅₀)

化合物 Compounds	回归方程 Regression equation	IC ₅₀ (mg/mL)
麦角甾醇 Ergosterin	$y = -88.565x^2 + 179.17x + 9.299$	0.261
邻苯二甲酸二辛酯 Dioctyl phthalate	$y = -79.896x^2 + 171.41x + 4.022$	0.314
1'-9-12-亚油酸-2'-3'-二羟基丙酯 1'-9-12 linoleic acid-2'-3'-dihydroxy-propyl ester	$y = 18.394\ln(x) + 102.79$	0.057
Microsphaerone C	$y = 17.007\ln(x) + 105.47$	0.038
烟曲霉酸 Helvolic acid	$y = 17.511\ln(x) + 102.59$	0.050
石杉碱甲 Huperzine A	$y = 14.7\ln(x) + 104.82$	0.024

3 讨论

从药用植物蛇足石杉茎部分离到内生真菌 *Aspergillus fumigatus* FS4 的菌体中分离出 5 个单体化合物, 化合物 3~5 对乙酰胆碱酯酶具有很强的抑制活性。除此之外, 化合物 4 具有较强的细胞毒活性^[13]。化合物 5 还具有很强的抗菌活性和抗肿瘤活性^[14]。化合物 3~5 是首次发现具有较强的抑制乙酰胆碱酯酶生物活性, 并为研发治疗 AD 新药提供了有用的先导化合物。

参考文献

- Hyde K D, Soyong K. The fungal endophyte dilemma [J]. *Fungal Divers*, 2008, 33: 163-173.
- Pan F (潘峰), Chen AM (陈艾萌), Zhu XQ (朱小庆), et al. Antioxidant activity of secondary metabolites derived from the fungal endophytic *Fusarium* sp. A14 isolated from *Fritillaria unibracteata* Hsiao et KC Hsia [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 376-381.
- Zhang JC (张君诚), Xing JH (邢建宏), Song YH (宋育红) et al. Recent advances in studies on herb biological of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev [J]. *Chinese Wild Plant Resources* (中国野生植物资源), 2008, 27(2): 1-5.
- Wang Y (汪涯). Isolation and characterization of endophytic Huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata* [D]. Jiangxi Normal University (江西师范大学), 2011.
- Wang Y (汪涯), Zeng QG (曾庆桂), Zhang ZB (张志斌) et al. Isolation of endophytic fungi from *Huperzia serrata* and their acetylcholinesterase inhibitory activity [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36: 734-740.
- Yan RM (颜日明), Li XQ (李希茜), Wang Y (汪涯), et

- al. Chemical constituents of endophytic fungi *Shiraia* sp. Sfl14 from *Huperzia serrata* and their antibacterial activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1393-1397.
- Zou L (邹磊), Quan MH (全明海). Research progress on acetylcholinesterase inhibitors [J]. *Food Sci* (食品科学), 2005, 26(S): 105-108.
- Wu W, Dai H, Bao L, et al. Isolation and structural elucidation of proline-containing cyclopentapeptides from an endolithic *Xylaria* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74: 1303-1308.
- Nayak JN, Aralaguppi MI, Aminabhavi TM. Density, viscosity, refractive index, and speed of sound in the binary mixtures of 1,4-dioxane + ethyl acetoacetate, + diethyl oxalate, + diethyl phthalate, or + dioctyl phthalate at 298.15, 303.15, and 308.15 K [J]. *J Chem Eng Data*, 2003, 48: 1489-1494.
- Kuwana T, Miyazaki M, Kato H, et al. Himeic acids E-G, New 4-pyridone derivatives from a culture of *Aspergillus* sp. [J]. *Chem Pharm Bull*, 2013, 61: 105-107.
- Chain E, Florey HW, Jennings MA, et al. Helvolic acid, an antibiotic produced by *Aspergillus fumigatus*, mut. *helvola* Yuill [J]. *Br J Exp Pathol*, 1943, 24: 108.
- Okuda S, Iwasaki S, Tsuda K, et al. The structure of helvolic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1964, 12: 121-124.
- Sowemimo AA, Edrada-Ebel R, Ebel R, et al. Major constituents of the predominant endophytic fungi from the Nigerian plants *Bryophyllum pinnatum*, *Morinda lucida* and *Jathropa gossypifolia* [J]. *Nat Prod Commun*, 2008, 30: 1217-1222.
- Xu F (徐帆), Zhu YX (朱一翔), Lu YH (卢艳花). Optimization of fermentation medium for helvolic acid production and reactor scale-up study [J]. *Chn Brw* (中国酿造), 2017, 36: 131-136.