

黄草乌内生真菌接骨木镰孢菌 B10.2 次生代谢产物研究

罗萍,舒燕,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,昆明 650091

摘要:本文对分离自黄草乌(*Aconitum vilmorinianum* Kom.)的一株接骨木镰孢菌(*Fusarium sambucinum* B10.2)的次生代谢产物进行了研究,从中分离鉴定了10个化合物:cyclonerodiol(1)、trichoderol A(2)、T-2 tetraol(3)、sambacide(4)、 12β -acetoxy-4,4-dimethyl-24-methylene-5 α -cholesta-8,14-diene-3 β ,11 α -diol(5)、bisphenol A(6)、 β -谷甾醇(7)、木兰脂素(8)、吲唑(9)、尿嘧啶(10),1~3和5~10均是首次从接骨木镰孢菌中分离得到,其中6首次从天然产物中发现。活性研究表明6和9对金黄色葡萄球菌具有较强的抑制活性,其最小抑菌浓度(MIC)与阳性对照相同,为64 μ g/mL;4对大肠杆菌的生长具有一定的抑制作用,最小抑菌浓度(MIC)为32 μ g/mL;2、3和4具有中等强度的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

关键词:接骨木镰孢菌;黄草乌;次生代谢产物;抑菌活性;乙酰胆碱酯酶抑制活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)6-1000-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.013

Secondary metabolites of *Fusarium sambucinum* B10.2 from *Aconitum vilmorinianum* Kom.

LUO Ping, SHU Yan, 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: Ten compounds were obtained from *Fusarium sambucinum* B10.2, which was isolated from *Aconitum vilmorinianum* Kom. Their structures were identified as:cyclonerodiol (1), trichoderol A (2), T-2 tetraol (3), sambacide (4), 12β -acetoxy-4,4-dimethyl-24-methylene-5 α -cholesta-8,14-diene-3 β ,11 α -diol (5), bisphenol A (6), β -sitosterol (7), magnolin (8), indazole (9), uracil (10). Compounds 1-3,5-10 were isolated from this fungus for the first time, and 6 was first obtained from nature. The results of bioactivity assays showed that compound 4 could inhibit the growth of *Escherichia coli* with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 32 μ g/mL. Compounds 6 and 9 showed strong inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, and the MIC was 64 μ g/mL, which was at the same grade as positive control. Compounds 2,3 and 4 exhibited moderate acetylcholinesterase (AChE) inhibitory effects.

Key words: *Fusarium sambucinum*; *Aconitum vilmorinianum*; secondary metabolites; antibacterial activity; acetylcholinesterase inhibitory activity

镰孢菌属(*Fusarium* spp.)真菌是常见的植物病原菌,通常存在于植物有机体内或土壤中^[1]。接骨木镰孢菌(*Fusarium sambucinum*)是镰孢菌属大家庭中的一员,可引起马铃薯干腐病。1984年,Mohr

等^[2]从接骨木镰孢菌的代谢产物中分离鉴定了2个C₁₅-trichothecene单端孢霉烯族化合物和2个接骨木镰菌素 sambucinol、sambucoin。1989年,Desjardins等^[3]对接骨木镰孢菌的代谢产物进行了研究,报道了4个单端孢霉烯族类化合物和一个二乙氧基环烯醇。2002年,Sanson等^[4]对接骨木镰孢菌的次生代谢产物进行了报道,发现了6个单端孢霉烯族化合物,5个双乙酸基草镰刀菌醇类化合物,1个

bisaboline 类化合物, 1 个新茄镰孢菌醇。2016 年, 本课题组研究了从黄草乌 (*Aconitum vilmorinianum* Kom.) 中分离获得的一株接骨木镰孢菌 (*F. sambucinum* B10.2) 的次生代谢产物, 发现了一个含硫的四环三萜类化合物^[5], 且该化合物具有抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的活性。本文进一步对接骨木镰孢菌的次生代谢产物进行研究, 并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研究。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

1.1.1 实验仪器

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

1.1.2 实验试剂

Pyridine-*d*₅、dimethyl sulfoxide-*d*₆、CD₃OD、CDCl₃ (Sigma-Aldrich 公司); 乙酰胆碱酯酶 (Sigma-Aldrich 公司); 碘化硫代乙酰胆碱 (Sigma-Aldrich 公司); 他克林 (Sigma-Aldrich 公司); 制霉素 ($\geq 4,400$ USP units/mg, 阿拉丁试剂有限公司); 硫酸卡那霉素 (北京百灵威科技有限公司); 甲醇 (MeOH)、氯仿 (CHCl₃)、石油醚 (PE)、丙酮 (acetone) 和乙酸乙酯 (EA) 均为分析纯。

1.1.3 实验材料

柱层析硅胶 (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 公司); C-18 烷基键合硅胶填料 (RP-18, 德国默克); 薄层层析硅胶板 (G 型, 青岛海洋化工有限公司)。

1.1.4 菌株材料

接骨木镰孢菌 (*F. sambucinum* B10.2) 分离自黄草乌 (*A. vilmorinianum* Kom.), 其 ITS 序列已提交至 GenBank (accession number: KU987439)。黄草乌采于云南省昆明市双哨乡, 由遵义医科大学珠海校区陈阳教授鉴定。

白色念珠菌 (*Candida albicans*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和金黄

色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 四种病原菌均由云南省微生物研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养

将接骨木镰孢菌在 PDA 培养基上进行活化和扩大, 在 28 ℃ 培养箱中培养 7 天后备用。称取去皮洗净切碎的土豆块 3.6 kg, 分别装入 60 个组培瓶, 每瓶 60 g 土豆, 于 121 ℃ 下灭菌 30 min 后冷却备用。在紫外无菌操作台中, 将活化后的接骨木镰孢菌菌丝接种到冷却的土豆块上, 于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 30 天。

1.2.2 发酵物的提取分离

固体发酵完成后, 往发酵物中加入适量甲醇, 利用超声重复提取三次后蒸干, 得到总浸膏 54.2 g。将得到的粗提物利用硅胶柱色谱进行初步分离, 洗脱剂为 CHCl₃-MeOH (100:0→1:1)。粗分得到 Fr. 1 (CHCl₃: MeOH = 100:0)、Fr. 2 (CHCl₃: MeOH = 100:1)、Fr. 3 (CHCl₃: MeOH = 50:1)、Fr. 4 (CHCl₃: MeOH = 10:1)、Fr. 5 (CHCl₃: MeOH = 5:1)、Fr. 6 (CHCl₃: MeOH = 1:1) 六部分。利用硅胶柱色谱 (PE-EA) 和凝胶柱色谱 (MeOH) 将 Fr. 2 段进行分离和纯化后得到 7 (6.0 mg); Fr. 3 段经过反复硅胶柱色谱 (PE-acetone) 分离和凝胶柱色谱 (MeOH) 纯化得到 5 (3.2 mg)、6 (4.0 mg)、1 (6.0 mg); Fr. 4 段经过硅胶柱色谱 (CHCl₃-MeOH) 得到 Fr. 4a、Fr. 4b、Fr. 4c 和 Fr. 4d 四段, Fr. 4a 经过反相柱色谱 (MeOH-H₂O) 得到 3 (20.2 mg), Fr. 4b 经过反复硅胶柱色谱和凝胶柱色谱得到 2 (5.0 mg) 和 10 (10.3 mg), Fr. 4c 经过反相柱色谱 (MeOH-H₂O) 进行分离后, 再通过凝胶柱色谱 (MeOH) 纯化得到 8 (3.4 mg); Fr. 5 经过硅胶柱色谱 (CHCl₃-MeOH) 得到了 Fr. 5a、Fr. 5b 和 Fr. 5c 三部分, Fr. 5b 经过硅胶柱色谱 (CHCl₃-MeOH) 洗脱分离得到两部分, 将这两部分分别通过凝胶柱色谱纯化得到 4 (40.5 mg) 和 9 (4.2 mg)。分离实验中使用的显色剂为碘单质和 10% H₂SO₄-EtOH 溶液。

1.2.3 抑菌活性

本次抑菌活性实验所使用的真菌为白色念珠菌 (*C. albicans*), 三种细菌为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)。该实验采用二倍稀释法^[6]于 96 孔板上进行测试, 真菌阳性对照为制霉素, 细菌阳性对照为硫酸卡那霉素。

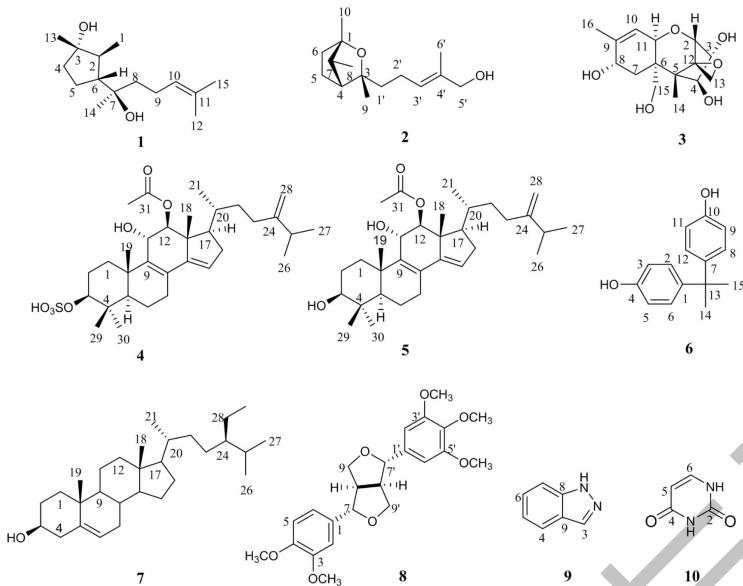


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-10

1.2.4 乙酰胆碱酯酶抑制活性

乙酰胆碱酯酶抑制活性的测定方法采用文献^[7]中的 Ellman 法, 阳性对照为他克林。实验步骤如下。

1.2.4.1 溶液的配制

PB(0.1 M 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 M NaH₂PO₄ 溶液和 94.7 mL 0.1 M Na₂HPO₄ 溶液, 调节其 pH 值至 8.0。待测化合物用 DMSO 溶解, 配成 10 mM 的溶液, 再用 PB 稀释成 1 mM 的溶液。他克林用 PB 配制成 6.66 μM 的溶液; DMSO 用 PB 稀释成 10% 的溶液。ATCI 和 DTNB 均用 PB 配成 6.25 mM 的工作液, 乙酰胆碱酯酶用 PB 稀释成 0.1 U/mL 的溶液。

1.2.4.2 铺板

乙酰胆碱酯酶活性测定在 96 孔板上进行。样品组加入 110 μL PB、10 μL 待测化合物(1 mM)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 μM)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)。

1.2.4.3 酶标仪检测

将 96 孔板于 37 °C 下放置 20 min, 然后用 Tecan Infinite M200 Pro 酶标仪在 412 nm 处读取三次背景

值。读取背景值后取出 96 孔板, 在每个孔中加入 40 μL ATCI(6.25 mM) 和 DTNB(6.25 mM) 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 μM, 他克林终浓度为 0.333 μM。最后测定其在 412 nm 处的吸光值, 每隔 30 s 采集一次数据, 当阴性对照组吸光值超过 1 时, 停止采集。

1.2.4.4 数据处理

选择阴性对照组吸光值最接近 1 的那一组数据来计算乙酰胆碱酯酶抑制率 I。I = [(A_E-A_B)-(A_S-A_B)]/(A_E-A_B) × 100%, 其中 A_S 为样品组吸光值, A_E 为阴性对照组吸光值, A_B 为背景值。

2 结果与讨论

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 白色晶体; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.12 (1H, m, H-10), 2.05 (2H, m, H-9), 1.68 (3H, s, CH₃-15), 1.62 (3H, s, CH₃-12), 1.25 (3H, s, CH₃-13), 1.16 (3H, s, CH₃-14), 1.04 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH₃-1); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 14.5 (q, C-1), 44.2 (d, C-2), 81.3 (s, C-3), 40.4 (t, C-4), 24.3 (t, C-5), 54.3 (d, C-6), 74.9 (s, C-7), 40.4 (t, C-8), 22.7 (t, C-9), 124.5 (d, C-10), 131.7 (s, C-11), 25.7 (q, C-12), 26.1 (q, C-13), 25.1 (q, C-14), 17.7 (q, C-15)。以上数据与文献^[8]中报道的数据一致, 故鉴定该化合物为 cyclonerodiol。

化合物 2 无色油状;¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.40 (1H, td, J = 7.1, 1.1 Hz, H-3'), 3.92 (2H, s, H-5'), 2.11 (2H, m, H-2'), 1.22 (3H, s, CH₃-10), 1.14 (3H, s, CH₃-9), 1.02 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-8); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 82.0 (s, C-1), 75.5 (s, C-3), 55.5 (d, C-4), 25.2 (t, C-5), 41.4 (t, C-6), 45.5 (d, C-7), 15.4 (q, C-8), 25.2 (q, C-9), 26.1 (q, C-10), 41.7 (t, C-1'), 23.3 (t, C-2'), 127.1 (d, C-3'), 135.8 (s, C-4'), 69.0 (t, C-5'), 13.7 (q, C-6')。以上数据与文献^[9]中报道的数据一致, 故鉴定该化合物为 trichoderiol A。

化合物 3 白色粉末;¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.54 (1H, d, J = 5.0 Hz, H-10), 4.13 (1H, d, H-2, J = 3.4 Hz), 4.10 (1H, m, H-3), 4.01 (1H, d, J = 4.7 Hz, H-11), 3.81 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-8), 3.73 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-15b), 3.41 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-15a), 3.39 (1H, d, J = 4.8 Hz, H-4), 2.91 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13a), 2.77 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13b), 1.83 (3H, s, H-16), 0.84 (3H, s, H-14); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 82.2 (d, C-2), 80.7 (d, C-3), 80.4 (d, C-4), 50.3 (s, C-5), 49.8 (s, C-6), 29.8 (t, C-7), 69.9 (d, C-8), 140.9 (s, C-9), 122.6 (d, C-10), 66.8 (d, C-11), 65.8 (s, C-12), 47.2 (t, C-13), 7.3 (q, C-14), 63.0 (t, C-15), 20.8 (q, C-16)。以上数据与文献^[10]中报道的数据一致, 故鉴定该化合物为 T-2 tetraol。

化合物 4 白色粉末;¹H NMR (400 MHz, Pyridine-*d*₅) δ : 5.68 (1H, s, H-15), 5.64 (1H, s, H-12), 4.82 (2H, d, J = 10.4 Hz, H-28), 4.71 (1H, s, H-11), 4.41 (1H, m, H-3), 2.12 (3H, s, H-32), 1.53 (3H, s, H-19), 1.44 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-30), 1.01 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-21); ¹³C NMR (100 MHz, Pyridine-*d*₅) δ : 34.6 (t, C-1), 25.0 (t, C-2), 84.8 (d, C-3), 38.9 (s, C-4), 50.7 (d, C-5), 18.2 (t, C-6), 27.2 (t, C-7), 125.0 (s, C-8), 140.3 (s, C-9), 37.5 (s, C-10), 68.6 (d, C-11), 79.2 (d, C-12), 47.3 (s, C-13), 148.0 (s, C-14), 120.4 (d, C-15), 35.5 (t, C-16), 49.5 (d, C-17), 17.1 (q, C-18), 22.4 (q, C-19), 33.6 (d, C-20), 18.2 (q, C-21), 34.8 (t, C-22), 31.1 (t, C-23), 156.3 (s, C-24), 33.8 (d, C-25), 21.9 (q, C-26), 21.8 (q, C-27), 106.5 (t, C-28), 16.7 (q, C-29), 28.3 (q, C-30), 170.4 (s, C-31), 21.1 (q, C-

32)。以上数据与文献^[5]中报道的数据一致, 故鉴定该化合物为 sambacide。

化合物 5 分子式为 C₃₂H₅₀O₄, 白色晶体; HR-ESI-MS: *m/z* 521.359 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₂H₅₀O₄Na 521.360 7); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 5.60 (1H, s, H-15), 5.07 (1H, m, H-12), 4.73 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-28), 4.25 (1H, s, H-11), 3.20 (1H, m, H-3), 2.02 (3H, s, H-32), 1.28 (3H, s, H-26), 1.24 (3H, s, H-27), 1.10 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, m, H-19), 1.02 (3H, s, H-30), 0.94 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), 0.87 (3H, s, H-29); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 35.7 (t, C-1), 28.3 (t, C-2), 80.1 (d, C-3), 40.2 (s, C-4), 51.9 (d, C-5), 19.3 (t, C-6), 28.2 (t, C-7), 126.8 (s, C-8), 14.3 (s, C-9), 38.5 (s, C-10), 69.3 (d, C-11), 79.6 (d, C-12), 48.0 (s, C-13), 148.7 (s, C-14), 121.6 (d, C-15), 36.3 (t, C-16), 50.4 (d, C-17), 17.1 (q, C-18), 22.3 (q, C-19), 36.2 (d, C-20), 18.7 (q, C-21), 34.9 (t, C-22), 32.0 (t, C-23), 157.6 (s, C-24), 34.5 (d, C-25), 22.5 (q, C-26), 22.6 (q, C-27), 107.0 (t, C-28), 16.2 (q, C-29), 28.8 (q, C-30), 172.3 (s, C-31), 21.1 (q, C-32)。以上数据与文献^[11]中报道的数据一致, 故鉴定该化合物为 12 β -acetoxy-4,4-dimethyl-24-methylene-5 α -cholesta-8,14-diene-3 β ,11 α -diol。

化合物 6 分子式为 C₁₅H₁₆O₂, 无色油状; HR-ESI-MS: *m/z* 227.108 [M-H]⁻ (calcd for C₁₅H₁₅O₂ 227.107 2); ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.02 (4H, dd, J = 2.0, 6.5 Hz, H-2, 6, 8, 12), 6.66 (4H, dd, J = 2.0, 6.5 Hz, H-3, 5, 9, 11), 1.57 (6H, s, H-14, 15); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 143.5 (s, C-1), 128.7 (d, C-2, 6, 8, 12), 115.6 (d, C-3, 5, 9, 11), 155.9 (s, C-4, 10), 143.5 (s, C-7), 42.5 (s, C-13), 31.7 (q, C-14, 15)。以上数据与文献^[12]中报道的数据一致, 故鉴定该化合物为 bisphenol A。

化合物 7 无色针晶; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.35 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-21), 0.95 ~ 0.80 (9H, overlapped, H-26, 27, 29), 0.68 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 37.5 (t, C-1), 31.9 (t, C-2), 72.0 (d, C-3), 42.5 (t, C-4), 140.9 (s, C-5), 121.9 (d, C-6), 32.1 (t, C-7), 31.9 (d, C-8), 50.4 (d, C-9), 36.3 (s, C-10), 21.3 (t, C-11), 28.4 (t, C-12), 40.0 (s, C-13), 57.0

(d, C-14), 24.5(t, C-15), 40.0(t, C-16), 56.2(d, C-17), 12.2(q, C-18), 19.6(q, C-19), 36.7(d, C-20), 19.6(q, C-21), 34.2(t, C-22), 26.3(t, C-23), 46.1(d, C-24), 28.8(d, C-25), 19.0(q, C-26), 20.0(q, C-27), 23.3(t, C-28), 12.0(q, C-29)。以上数据与文献^[13]中报道的数据一致,故鉴定该化合物为 β -谷甾醇。

化合物 8 分子式为 $C_{23}H_{28}O_7$,无色固体;HR-ESI-MS: m/z 855.3583 [2M + Na]⁺ (calcd for $C_{46}H_{56}O_{14}$ Na 855.3568);¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.92 ~ 6.94 (3H, m, H-2, 5, 6), 6.68 (2H, s, H-2', 6'), 4.75 (2H, m, H-7/H-7'), 4.26, 3.89 (each 2H, m, H-9/H-9'), 3.84 (6H, s, OCH₃-3', 5'), 3.82 (6H, s, OCH₃-3, 4), 3.74 (3H, s, OCH₃-4'), 3.14 (2H, m, H-8/H-8');¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 135.4 (s, C-1'), 104.4 (d, C-2', 6'), 154.7 (s, C-3', 5'), 138.8 (s, C-4'), 87.3 (d, C-7'), 55.4 (d, C-8'), 72.8 (t, C-9'), 135.4 (s, C-1), 111.4 (d, C-2), 148.7 (s, C-3), 150.2 (s, C-4), 111.4 (d, C-5), 119.8 (d, C-6), 87.2 (d, C-7), 55.4 (d, C-8), 72.7 (d, C-9), 56.5 (OCH₃-3, 4), 56.7 (OCH₃-3', 5'), 61.1 (OCH₃-4')。以上数

据与文献^[14]中报道的数据一致,故鉴定该化合物为木兰脂素。

化合物 9 白色无定型粉末;¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 8.07 (1H, dd, J = 1.6, 7.4 Hz, H-4), 7.94 (1H, s, H-3), 7.44 (1H, dd, J = 1.1, 7.3 Hz, H-7), 7.20 (1H, m, H-6), 7.18 (1H, m, H-5);¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 133.4 (d, C-3), 122.4 (d, C-4), 122.0 (d, C-5), 127.6 (d, C-6), 112.9 (d, C-7), 138.2 (s, C-8), 123.6 (s, C-9)。以上数据与文献^[15]中报道的数据一致,故鉴定该化合物为吲唑。

化合物 10 白色粉末;¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.38 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-6), 5.44 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-5);¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 151.6 (s, C-2), 164.4 (s, C-4), 100.2 (d, C-5), 142.3 (d, C-6)。以上数据与文献^[16]中报道的数据一致,故鉴定该化合物为尿嘧啶。

2.2 抑菌活性

对化合物 1 ~ 7 和 9 进行白色念珠菌 (*C. albicans*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 抑制活性的测定,实验结果见表 1。

表 1 部分化合物最小抑菌浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of some compounds (μ g/mL)

化合物 Compound	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
1	>512	256	512	256
2	>512	512	512	512
3	512	>512	>512	>512
4	>512	128	32	128
5	>512	>512	>512	>512
6	512	64	128	64
7	>512	128	256	256
9	>512	512	512	64
制霉素 Nystatin	32	-	-	-
硫酸卡那霉素 Kanamycin sulfate	-	2	2	64

抑菌实验结果表明,所测化合物对白色念珠菌均没有明显的抑菌活性,3 和 6 的最小抑菌浓度 (MIC) 为 512 μ g/mL,其余化合物的 MIC 值均大于 512 μ g/mL。于枯草芽孢杆菌而言,4、6 与 7 对枯草芽孢杆菌具有一定的抑制活性,4 和 7 的 MIC 值为 128 μ g/mL,6 的 MIC 值为 64 μ g/mL。于大肠杆菌而言,发现 4 的 MIC 值为 32 μ g/mL,其具有一定的抑制活性,6 的 MIC 值为 128 μ g/mL,其余化合物无明显的抑制活性。于金黄色葡萄球菌而言,6 和 9 的 MIC 值与阳性对照所测相同,均为 64 μ g/mL,说明 6 和 9 具有较强的金黄色葡萄球菌抑制活性,4 的 MIC 值 128 μ g/mL,1 和 7 的 MIC 值 256 μ g/mL,

而而言,发现 4 的 MIC 值为 32 μ g/mL,其具有一定的抑制活性,6 的 MIC 值为 128 μ g/mL,其余化合物无明显的抑制活性。于金黄色葡萄球菌而言,6 和 9 的 MIC 值与阳性对照所测相同,均为 64 μ g/mL,说明 6 和 9 具有较强的金黄色葡萄球菌抑制活性,4 的 MIC 值 128 μ g/mL,1 和 7 的 MIC 值 256 μ g/mL,

其余化合物无明显的抑制活性。

2.3 乙酰胆碱酯酶抑制活性

对化合物(1~5 和 7)进行乙酰胆碱酯酶抑制活性测定,待测化合物终浓度为 50 μM,他克林终浓度为 0.333 μM。实验结果表明,1、5 与 7 基本无抑制作用(抑制率 < 10%);2、3 与 4 具有一定的抑制活性,其中 4 的抑制率为 47.13%,2 和 3 的抑制率分别为 18.21% 和 29.83%;阳性对照他克林的抑制率为 61.19%。

3 结论

本文对接骨木镰孢菌 B10.2 的次生代谢产物进行了研究,并对部分化合物进行了抑菌活性和乙酰胆碱酯酶抑制活性实验。从接骨木镰孢菌 B10.2 的次生代谢产物中共分离鉴定了 10 个已知化合物,其中 6 首次从天然产物中发现。化合物类型主要有萜类(5 个)、甾体(1 个)、取代苯丙素(1 个)、木脂素(1 个)、含氮化合物(2 个)。化合物 6 和 9 对金黄色葡萄球菌具有较强的抑制活性,4 对大肠杆菌具有一定的抑制活性,2、3 和 4 具有中等强度的抑制乙酰胆碱酯酶的活性。本研究为接骨木镰孢菌次生代谢产物的利用提供了科学依据。

参考文献

- Zhang B, Yang XY, Chen ZY. Identification of the pathogenic and dominant *Fusarium* species causing tomato Fusarium wilt [J]. *Acta Phytopathol Sin*(植物病理学报), 2016, 46:561-565.
- Mohr P, Tamm C, Zürcher W, et al. Sambucinol and sambucin, two new metabolites of *Fusarium sambucinum* possessing modified trichothecene structures. 41st Communication on verrucarins and roridins [J]. *Helv Chim Acta*, 1984, 67:406-412.
- Desjardins AE, Plattner RD. Trichothecene toxin production by strains of *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) in liquid culture and in potato tubers [J]. *J Agr Food Chem*, 1989, 37:388-392.
- Sanson DR, Corley DG, Barnes CL, et al. New mycotoxins from *Fusarium sambucinum* [J]. *J Org Chem*, 2002, 54:4313-4318.
- Dong JW, Cai L, Li XJ, et al. Production of a new tetracyclic triterpene sulfate metabolite sambacide by solid-state cultivated *Fusarium sambucinum* B10.2 using potato as substrate [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 21:1266-1270.
- Fang YS, Yang MH, Cai L, et al. New phenylpropanoids from *Bulbophyllum retusiusculum* [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41:1074-1081.
- Li XJ, Dong JW, Cai L, et al. Improving the acetylcholinesterase inhibitory effect of *Illigera henryi* by solid-state fermentation with *Clonostachys rogersiana* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2017, 124:493-497.
- Zhao DQ, Wu ZH, Liu D, et al. Secondary metabolites from marine sponge-associated fungus *Hansfordia* sp. [J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报) 2013, 30:342-345.
- Zheng CJ, Sun PX, Jin GL, et al. Sesquiterpenoids from *Trichoderma atroviride*, an endophytic fungus in *Cephalotaxus fortunei* [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82:1035-1038.
- Ishii K, Pathre SV, Mirocha CJ. Two new trichothecenes produced by *Fusarium roseum* [J]. *J Agr Food Chem*, 1978, 26:649.
- Brill GM, Kati WM, Montgomery D, et al. Novel triterpene sulfates from *Fusarium compactum* using a rhinovirus 3C protease inhibitor screen [J]. *J Antibiot*, 1996, 49:541-546.
- Solakyildirim K, Bulloch DN, Larive CK. ¹H and ¹³C NMR spectral assignments of halogenated transformation products of pharmaceuticals and related environmental contaminants [J]. *Magn Reson Chem*, 2014, 52:310-317.
- Liu YH, Xu J, Li QJ, et al. Chemical constituents of *Hedysarum uncinella* [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2013, 35:556-559.
- Zhu Y, Zhou JF, Zhang Y, et al. Chemical constituents from branches and leaves of *Viburnum sargentii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48:2177-2181.
- Yuan PL, Wang XP, Chen KX, et al. Chemical constituents from the stems of *Solanum torvum* [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2016, 38:104-107.
- Gao JM, Sheng J, Yang X, et al. The constituents of *Russula ochroleuca* basidiomycetes [J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 2001, 23:385-393.