

土壤真菌 *Aspergillus fumigatus* 固体发酵产物的化学成分及抗氧化活性研究

赵江源^{1#}, 范箫艺^{2#}, 邹雪峰³, 杨佩文⁴, 唐蜀昆¹, 李铭刚^{1*}, 刘世巍², 丁建海^{2*}

¹云南大学生命科学学院, 昆明 650091; ²宁夏师范学院化学化工学院, 固原 756000;

³云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201; ⁴云南省农业科学院农业环境资源研究所, 昆明 650205

摘要:为研究来源于哀牢山国家级自然保护区河谷的土壤真菌 *Aspergillus fumigatus* 固体发酵产物的化学成分及抗氧化活性研究, 采用正相硅胶柱层析、反相硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 分离纯化, 借助核磁共振波谱等方法鉴定化合物结构, 从中共得到 13 个化合物, 分别鉴定为 rubrofusarin B (**1**)、rubrofusarin A (**2**)、carbonarone A (**3**)、aspernigrin A (**4**)、flavasperone (**5**)、(22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -过氧麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇 (**6**)、(22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -过氧麦角甾-6, 9 (11), 22-三烯-3 β -醇 (**7**)、ourosperone A (**8**)、(22*E*, 24*R*)-麦角甾-5, 7, 22-三烯-3 β -醇 (**9**)、stigmast-1, 5-dien-3 β -ol (**10**)、fonsecinones A (**11**)、asperpyrone C (**12**)、asperpyrones B (**13**)。其中, 化合物 **1**~**5** 和 **7**~**13** 为从该菌种中首次分离。抗氧化活性结果显示, 化合物 **8** 对 DPPH (IC₅₀ = 3.453 mg/mL)、ABTS⁺ (IC₅₀ = 0.155 mg/mL)、OH (IC₅₀ = 0.019 mg/mL) 自由基都有一定的清除效果。

关键词:烟曲霉; 化学成分; 结构鉴定; 固体发酵; 抗氧化活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)1-0070-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.1.010

Study on chemical composition and antioxidant activity of solid fermented product of soil fungus *Aspergillus fumigatus*

ZHAO Jiang-yuan^{1#}, FAN Xiao-yi^{2#}, ZOU Xue-feng³,

YANG Pei-wen⁴, TANG Shu-kun¹, LI Ming-gang^{1*}, LIU Shi-wei², DING Jian-hai^{2*}

¹School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China;

²College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia Normal University, Guyuan 756000, China;

³College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

⁴Institute of Agricultural Environment and Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China

Abstract: To study the chemical constituents of the fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from a soil sample collected from the Ailao Mountain area. Thirteen compounds, rubrofusarin B (**1**), rubrofusarin A (**2**), carbonarone A (**3**), aspernigrin A (**4**), flavasperone (**5**), (22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -epidioxy-ergosta-6, 22-dien-3 β -ol (**6**), (22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -epidioxy-ergosta-6, 9 (11), 22-dien-3 β -ol (**7**), ourosperone A (**8**), ergosta-5, 7, 22-trien-3 β -ol (**9**), stigmast-1, 5-dien-3 β -ol (**10**), fonsecinones A (**11**), asperpyrone C (**12**), asperpyrones B (**13**) were isolated from the fungus with the help of the silica gel, Rp-18 and Sephadex LH-20 column chromatography. Their structures were elucidated by the spectral analysis. Compounds **1-5**, **7-13** are isolated from this species for the first time. Compound **8** showed antioxidant activity with a certain scavenging effect on DPPH (IC₅₀ 3.453 mg/mL), ABTS⁺ (IC₅₀ 0.155 mg/mL), and OH (IC₅₀ 0.019 mg/mL) radicals.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; chemical constituent; structure identification; solid fermentation; antioxidant activity

收稿日期: 2021-06-04

接受日期: 2021-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(31760019); 云南省基础研究面上项目(202001BB050025); 云南省重大科技专项-生物资源数字化开发应用(202002AA100007); 宁夏自然科学基金项目(2021AAC03244)

共同第一作者

* 通信作者 E-mail: mgli727@ynu.edu.cn, dingjh_nx@126.com

近年来, 土壤真菌多样性的研究受到了广泛关注, 土壤中含有丰富的微生物资源, 是地球上最复杂的微生态系统之一^[1]。由于真菌和土壤、植物的根系联系紧密, 共同参与营养物质的吸收、保存和循环, 具有独特的代谢途径, 因此产生结构新颖、生物

活性显著的代谢产物。土壤真菌烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 化学成分及活性已有报道, Mohamed 等^[2] 从土壤真菌 *Aspergillus fumigatus* 3T-EGY 次生代谢产物中分离鉴定得到 8 个化合物, 其中化合物 juglanthraquinone A-5-O-D-rhodosamine (4'→1'') -2-deoxy-D-glucose (4''→1''') -cinerulose B 对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌具有中等体外抗菌活性。Liu 等^[3] 从沿海盐渍土壤真菌烟曲霉中分离出一种新的倍半萜类衍生物, 命名为 aspergiketone, 该化合物对 HL-60 和 A549 具有细胞毒性, IC₅₀ 值分别为 12.4 和 22.1 μM。Liang 等^[4] 发现土壤真菌烟曲霉是个高活性铁载体菌株, 该菌株无抑制植物病原菌活性, 但其发酵提取物可明显促进土壤生物活性。本研究前期对来源于哀牢山国家级自然保护区河谷的土壤真菌烟曲霉进行固体发酵培养, 发现其粗体物对 DPPH (IC₅₀ = 3.3 mg/mL)、ABTS⁺ (IC₅₀ = 0.094 mg/mL)、OH 自由基 (IC₅₀ = 1.8 mg/mL) 具有清除效果, 因此本研究对土壤真菌的乙酸乙酯层的发酵提取物进行化学成分研究和抗氧化活性测试, 为后续该菌种的活性成分的开发与利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Bruker DRX-500 MHz 核磁共振仪测定 (TMS 为内标, Bruker 公司); AutoSpec Premier P776 三扇型双聚焦磁质谱仪 (美国 Waters 公司); ZF-20D 暗箱式紫外分析仪 (上海光豪分析仪器有限公司); 柱层析硅胶和 GF₂₅₄ TLC 预制板 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (瑞典 Amersham Biosciences 公司); 反相硅胶 (德国 Merck 公司); DPPH (C11753365)、ABTS (C12193480)、抗坏血酸 (C12455241)、过硫酸钾 (C11974937)、硫酸亚铁 (C12175404)、水杨酸 (C12173991)、磷酸氢二钠 (C12113745) 和磷酸二氢钠 (C10095240) (分析纯, 麦克林生化试剂有限公司)。

1.2 菌株来源

菌株来源于云南省哀牢山国家级自然保护区河谷土壤样本, 并通过 DNA 提取、ITS 序列扩增以及序列比对, 供试菌种被鉴定为 *Aspergillus fumigatus*^[4]。

1.3 菌株培养基及发酵条件

1.3.1 培养基

菌株斜面培养基 (PDA): 马铃薯 200 g (煮 20

min 后过滤); 葡萄糖 20 g; 琼脂 20 g; pH 自然; 蒸馏水 1 000 mL。121 °C 灭菌 15 min 后, 摆斜面备用。

液体种子培养基: 硝酸钠 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 蔗糖 30 g, 蒸馏水 1 000 mL。500 mL 三角瓶分装 (100 mL/500 mL), 121 °C 灭菌 15 min 后备用。

固体发酵培养基: 10 g 珍珠岩, 30 g 大米 (提前用液体种子培养液浸泡 20 min), 50 mL 液体种子培养液。混匀后分装到罐头瓶中 (瓶口用 12 层纱布包口)。121 °C 灭菌 15 min 后备用。

1.3.2 培养条件

斜面培养: 将菌株转移到斜面培养基上, 30 °C, 7 天进行培养。待有明显孢子生成即可用于液体种子培养。

液体种子培养: 将 1 支斜面孢子转接到 1 瓶液体培养三角瓶内。将三角瓶置于恒温摇床上, 120 rpm, 30 °C 培养 5 天。待有明显颗粒状菌丝球出现即可用于固体发酵接种。

固体发酵: 将液体种子接入固体培养基内 (1 瓶液体种子可以接种 5 瓶固体培养基。接种量为 20 mL 液体种子/固体培养瓶)。搅拌均匀后, 置于 30 °C 恒温恒湿培养箱内培养 20 天。待培养基被孢子完全覆盖, 培养基颜色及质地发生明显变化后即可停止发酵。

1.4 提取与分离

发酵物用二氯甲烷和甲醇等体积混合作为提取溶剂, 连续提取 5 次, 减压浓缩, 得到提取物浸膏, 将提取物浸膏与水混悬后, 用乙酸乙酯萃取 5 次, 萃取液合并减压浓缩得浸膏 50.0 g。浸膏用 80~100 目的硅胶拌样, 经正相硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇, 1:0→0:1) 梯度洗脱得到 7 个极性依次增大的片段。由二氯甲烷/甲醇 (80:1) 洗脱得到片段 3, 在 80:1 段析出白色粉末, 通过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱 (二氯甲烷/甲醇, 1:1) 纯化, 得到化合物 **1**、**2** 的混合物, 继续正相硅胶柱层析纯化得到化合物 **1** (15 mg)、**2** (2 mg)。由二氯甲烷/甲醇 (60:1) 洗脱得到片段 4, 在该段析出白色晶体, 通过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱纯化, 得到化合物 **3** (7.4 mg)。由二氯甲烷/甲醇 (40:1) 洗脱得到片段 5, 通过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离纯化, 得到化合物 **4** (20.7 mg)。由二氯甲烷/甲醇 (20:1) 洗脱得到片段 6, 通过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱和反相硅胶柱层析 (甲醇/水 3:2) 分离纯化, 得到化合物的 **5** (10.7

mg)。由二氯甲烷/甲醇(20:1)洗脱得到片段6,通过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离纯化,得到化合物 **6**、**7**(共 4.5 mg)的混合物,继续正相硅胶柱层析纯化得到化合物 **6**(3 mg)。在片段4通过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱纯化得到化合物 **8**(1.8 mg)、**11**(3.5 mg)、**12**(2.9 mg)、**13**(2.3 mg)。由二氯甲烷/甲醇(80:1)洗脱得到片段3,在 80:1 段析出白色粉末,得到化合物通过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱,在经过反相硅胶柱层析(甲醇/水,7:3)分离纯化,得到化合物 **9**(2.3 mg)、**10**(2.3 mg)。

1.5 DPPH 自由基清除实验

将化合物分别配置成一定浓度梯度的乙醇溶液,作为实验组,同时配制一定浓度的抗坏血酸作为阳性对照组。将不同浓度的样品溶液和 DPPH(0.5 mmol/L)同体积混合,避光保存 30 min,在 517 nm 最大吸收波长下测定其吸光度(A_1);同时测定不加 DPPH 的样品空白吸光度(A_2)和加 DPPH 不加样品的吸光度(A_0),实验重复 3 次,阳性对照与待测样品一致,根据公式计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

1.6 ABTS⁺ 自由基清除实验

将化合物分别配置成一定浓度梯度的乙醇溶液,作为实验组,同时配制一定浓度的抗坏血酸作为阳性对照组。将过硫酸钾(2.6 mmol/L)和 ABTS(7.4 mmol/L)混合反应 12 h,用无水乙醇稀释 30 倍,在 734 nm 波长下测定吸光度。将不同浓度的样品溶液和 ABTS 溶液按照体积比 1:10 混合,避光保存 6 min,在 734 nm 最大吸收波长下测定其吸光度(A_1);同时测定不加 ABTS 的样品空白吸光度(A_2)和加 ABTS 不加样品的吸光度(A_0),实验重复 3 次,阳性对照与待测样品一致,根据公式计算 ABTS⁺ 自由基清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

1.7 OH 自由基清除实验

将化合物分别配置成一定浓度梯度的乙醇溶液,作为实验组,同时配制一定浓度的抗坏血酸作为阳性对照组。首先加入样品,依次加入硫酸亚铁(5 mmol/L)、水杨酸(2.5 mmol/L)各 1 mL,最后加入过氧化氢(1%)1 mL 启动反应,40 °C 水浴 30 min,在 510 nm 最大吸收波长下测定其吸光度(A_1);同时测定不加过氧化氢的样品空白吸光度(A_2)和加样品的吸光度(A_0),实验重复 3 次,阳性对照与待测样品一致,根据公式计算 OH 自由基清除率。

$$\text{OH 自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

2 实验结果与讨论

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 白色粉末;分子式: $C_{16}H_{14}O_5$; HR-ESI-MS: m/z 287.092 6 [$M + H$]⁺; ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.96 (1H, s, 5-OH), 6.97 (1H, s, H-10), 6.58 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9), 6.39 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 6.00 (1H, s, H-3), 4.00 (3H, s, 6-OCH₃), 3.92 (3H, s, 8-OCH₃), 2.36 (3H, s, 2-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.4 (C-2), 107.2 (C-3), 184.2 (C-4), 153.4 (C-5), 160.7 (C-6), 97.2 (C-7), 161.4 (C-8), 97.7 (C-9), 101.1 (C-10), 110.1 (C-11), 108.3 (C-12), 141.1 (C-13), 162.7 (C-14), 20.7 (C-15), 55.5 (6-OCH₃), 56.1 (8-OCH₃)。以上数据与文献^[5]报道基本一致,故鉴定化合物 **1** 为 rubrofusarin B。

化合物 2 白色粉末;分子式: $C_{15}H_{12}O_5$; ¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.96 (1H, s, 5-OH), 12.79 (1H, s, 6-OH), 6.96 (1H, s, H-10), 6.60 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9), 6.40 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 5.98 (1H, s, H-3), 3.96 (3H, s, 8-OCH₃), 2.49 (3H, s, 2-CH₃)。以上数据与文献^[5]报道基本一致,故鉴定化合物 **2** 为 rubrofusarin A。

化合物 3 针状晶体;分子式: $C_{13}H_{11}NO_3$; HR-ESI-MS: m/z 229.096 6 [M]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.40 (1H, s, H-2), 7.24 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-9), 7.32 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-11), 7.23 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13), 7.30 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11), 7.33 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-12), 6.32 (1H, s, H-5), 3.94 (2H, s, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 178.4 (C-4), 168.7 (C-6), 168.7 (C-14), 164.7 (C-2), 137.4 (C-8), 130.5 (C-9), 130.5 (C-10), 128.3 (C-11), 130.5 (C-12), 130.5 (C-13), 118.3 (C-5), 119.5 (C-3), 39.6 (C-7)。以上数据与文献^[6]报道基本一致,故鉴定化合物 **3** 为 carbonarone A。

化合物 4 针状晶体;分子式: $C_{13}H_{12}N_2O_2$; HR-ESI-MS: m/z 229.097 3 [$M + H$]⁺; ¹H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.14 (1H, br s, 1-NH), 9.51 (1H, br s, 14-NH₂), 8.31 (1H, s, H-2), 7.33 (1H, s, H-10), 7.33 (1H, s, H-12), 7.29 (1H, s, H-9), 7.29 (1H, s, H-13), 7.28 (1H, s, H-11), 6.21 (1H, s, H-

5), 3.89 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 141.9 (C-2), 117.4 (C-3), 177.3 (C-4), 118.3 (C-5), 150.8 (C-6), 37.6 (C-7), 137.1 (C-8), 128.7 (C-9), 128.9 (C-10), 126.9 (C-11), 128.9 (C-12), 128.7 (C-13), 165.5 (C-14)。以上数据与文献^[7]报道基本一致,故鉴定化合物 **4** 为 aspernigrin A。

化合物 5 针状晶体;分子式: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$; HR-ESI-MS: m/z 287.090 7 [M + H] $^+$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 12.78 (1H, s, 5-OH), 6.87 (1H, s, H-6), 6.59 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 6.40 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9), 6.28 (1H, s, H-3), 3.97 (3H, s, 10-OCH $_3$), 3.92 (3H, s, 8-OCH $_3$), 2.50 (3H, s, 2-CH $_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.5 (C-2), 110.3 (C-3), 182.8 (C-4), 156.8 (C-5), 105.8 (C-6), 97.9 (C-7), 161.4 (C-8), 96.9 (C-9), 159.1 (C-10), 155.7 (C-11), 104.9 (C-12), 141.1 (C-13), 108.7 (C-14), 20.5 (C-2), 55.4 (10-OCH $_3$), 55.9 (8-OCH $_3$)。以上数据与文献^[8]报道基本一致,故鉴定化合物 **5** 为 flavasperone。

化合物 6 白色粉末;分子式: $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.54 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.27 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 5.30 (1H, dd, $J = 15.3, 7.5$ Hz, H-23), 5.15 (1H, dd, $J = 15.3, 7.5$ Hz, H-22), 3.78 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.95 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-28), 0.92 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 0.85 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 137.0 (C-6), 133.7 (C-22), 132.0 (C-23), 131.9 (C-7), 83.7 (C-5), 80.9 (C-8), 67.2 (C-3), 57.8 (C-17), 53.3 (C-14), 53.0 (C-9), 44.5 (C-13), 41.3 (C-24), 40.9 (C-20), 40.6 (C-12), 38.0 (C-10), 36.1 (C-4), 34.6 (C-1), 32.9 (C-25), 30.0 (C-2), 29.4 (C-16), 24.6 (C-15), 20.7 (C-11), 20.3 (C-21), 19.5 (C-27), 18.8 (C-26), 18.2 (C-19), 16.10 (C-28), 13.2 (C-18)。以上数据与文献^[9]报道基本一致,故鉴定化合物 **6** 为 (22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -过氧麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇。

化合物 7 白色晶体;分子式: $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.66 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-7), 6.31 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 5.49 (1H, dd, $J = 7.0, 1.5$ Hz, H-11), 5.43 (1H, dd, $J = 6.0, 1.9$ Hz, H-23), 5.24 (1H, m, H-22), 3.94 (1H, m, H-3),

1.07 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.86 (3H, d, $J = 3.5$ Hz, H-27), 0.84 (3H, d, $J = 3.5$ Hz, H-26), 0.82 (3H, s, H-18)。以上数据与文献^[9]报道基本一致,故鉴定化合物 **7** 为 (22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -过氧麦角甾-6, 9(11), 22-三烯-3 β -醇。

化合物 8 黄色粉末;分子式: $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$; HR-ESI-MS: m/z 571.160 7 [M + H] $^+$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 15.25 (1H, s, 5'-OH), 14.84 (1H, s, 5-OH), 7.15 (1H, s, H-10), 6.97 (1H, s, H-9), 6.41 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7'), 6.20 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9'), 6.05 (1H, s, H-3), 5.95 (1H, s, H-3'), 4.02 (3H, s, 6'-OCH $_3$), 3.79 (3H, s, 8-OCH $_3$), 3.60 (3H, s, 8'-OCH $_3$), 3.46 (3H, s, 6-OCH $_3$), 2.41 (3H, s, 2-CH $_3$), 2.12 (3H, s, 2'-CH $_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 167.6 (C-2), 20.8 (2-CH $_3$), 107.4 (C-3), 184.5 (C-4), 104.6 (C-4a), 161.9 (C-5), 111.4 (C-5a), 158.4 (C-6), 61.9 (6-OCH $_3$), 117.6 (C-7), 160.1 (C-8), 55.8 (8-OCH $_3$), 101.3 (C-9), 140.8 (C-9a), 101.2 (C-10), 153.3 (C-10a), 167.5 (C-2'), 20.6 (2'-CH $_3$), 107.2 (C-3'), 184.6 (C-4'), 104.2 (C-4a'), 162.6 (5'-OH), 108.5 (C-5'a), 160.9 (C-6'), 56.2 (6'-OCH $_3$), 96.8 (C-7'), 161.4 (C-8'), 55.1 (8'-OCH $_3$), 96.4 (C-9'), 140.5 (C-9'a), 105.1 (C-10'), 150.7 (C-10'a)。以上数据与文献^[5]报道基本一致,故鉴定化合物 **8** 为 ourosperone A。

化合物 9 白色粉末;分子式: $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$; HR-ESI-MS: m/z 395.329 5 [M-H] $^-$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.57 (1H, m, H-6), 5.34 (1H, m, H-7), 5.14-5.24 (2H, m, H-22, H-23), 3.64 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 0.94 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.83 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27), 0.82 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-26), 0.63 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 38.4 (C-1), 32.0 (C-2), 70.5 (C-3), 40.8 (C-4), 139.9 (C-5), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 141.4 (C-8), 46.2 (C-9), 37.3 (C-10), 21.1 (C-11), 39.1 (C-12), 42.8 (C-13), 54.6 (C-14), 23.0 (C-15), 28.3 (C-16), 56.0 (C-17), 12.0 (C-18), 16.3 (C-19), 40.4 (C-20), 21.1 (C-21), 135.6 (C-22), 132.0 (C-23), 42.8 (C-24), 33.1 (C-25), 19.9 (C-26), 19.7 (C-27), 17.6 (C-28)。以上数据与文献^[9]报道基本

一致,故鉴定化合物 **9** 为(22*E*,24*R*)-麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇。

化合物 10 白色粉末;分子式: $C_{29}H_{48}O$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.35(1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-6), 5.14(1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1), 5.02(1H, dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz, H-2), 3.53(1H, m, H-3), 1.00(3H, brs, H-19), 0.97(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 0.84(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.82(3H, d, $J = 5.3$ Hz, H-27), 0.68(3H, br s, H-18); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ : 139.7(C-1), 129.5(C-2), 71.8(C-3), 42.4(C-4), 140.8(C-5), 121.7(C-6), 29.8(C-7), 31.7(C-8), 50.1(C-9), 36.2(C-10), 21.1(C-11), 37.2(C-12), 39.8(C-13), 56.8(C-14), 24.3(C-15), 28.3(C-16), 56.1(C-17), 11.9(C-18), 19.4(C-19), 34.0(C-20), 18.8(C-21), 31.9(C-22), 26.1(C-23), 45.9(C-24), 29.2(C-25), 19.0(C-26), 19.8(C-27), 23.1(C-28), 12.0(C-29)。以上数据与文献^[10]报道基本一致,故鉴定化合物 **10** 为 stigmast-1,5-dien-3 β -ol。

化合物 11 黄色粉末;分子式: $C_{32}H_{26}O_{10}$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 15.24(1H, s, -OH), 12.82(1H, s, 5-OH), 7.05(1H, s, H-6), 6.97(1H, s, H-7), 6.42(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7'), 6.33(1H, s, H-3), 6.19(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9'), 6.00(1H, s, H-3'), 4.03(3H, s, 6'-OCH₃), 3.78(3H, s, 8-OCH₃), 3.61(3H, s, 8'-OCH₃), 3.48(3H, s, 10-OCH₃), 2.42(3H, s, 2-CH₃), 2.12(3H, s, 2'-CH₃); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.5(C-2), 20.6(2-CH₃), 110.6(C-3), 183.0(C-4), 109.4(C-4a), 156.7(C-5), 106.1(C-6), 140.8(C-6a), 101.6(C-7), 160.0(C-8), 56.0(8-OCH₃), 117.3(C-9), 156.9(C-10), 61.3(10-OCH₃), 108.0(C-10a), 155.1(C-10b), 166.9(C-2'), 20.7(2'-CH₃), 107.4(C-3'), 184.6(C-4'), 104.3(C-4a'), 162.8(5'-OH), 108.6(C-5'

a), 161.1(C-6'), 56.3(6'-OCH₃), 161.1(C-6'), 56.3(6'-OCH₃), 97.0(C-7'), 161.1(C-8'), 55.2(8'-OCH₃), 96.3(C-9'), 140.6(C-9'a), 105.0(C-10'), 150.8(C-10'a)。以上数据与文献^[11]报道基本一致,故鉴定化合物 **11** 为 fonsecinones A。

化合物 12 黄色粉末;分子式: $C_{32}H_{26}O_{10}$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.75(1H, s, 5-OH), 13.11(1H, s, 5'-OH), 7.13(1H, s, H-10), 6.98(1H, s, H-9), 6.42(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9'), 6.32(1H, s, H-3'), 6.25(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7'), 6.03(1H, s, H-3), 3.99(3H, s, 10'-OCH₃), 3.81(3H, s, 10-OCH₃), 3.63(3H, s, 6-OCH₃), 3.61(3H, s, 8'-OCH₃), 2.54(3H, s, 2'-CH₃), 2.40(3H, s, 2-CH₃)。以上数据与文献^[11]报道基本一致,故鉴定化合物 **12** 为 asperpyrone C。

化合物 13 黄色粉末;分子式: $C_{32}H_{26}O_{10}$; 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.18(1H, s, 5-OH), 12.80(1H, s, 5'-OH), 7.03(1H, s, H-10), 6.98(1H, s, H-9), 6.41(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9'), 6.33(1H, s, H-3'), 6.31(1H, s, H-3), 6.20(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7'), 4.00(3H, s, 10'-OCH₃), 3.80(3H, s, 10-OCH₃), 3.63(3H, s, 6-OCH₃), 3.61(3H, s, 8'-OCH₃), 2.54(3H, s, 2'-CH₃), 2.47(3H, s, 2-CH₃)。以上数据与文献^[8]报道基本一致,故鉴定化合物 **13** 为 asperpyrones B。

2.2 抗氧化活性测试结果

土壤真菌 *Aspergillus fumigatus* 固体发酵产物分离得到化合物 **1**~**13**,对其中 10 个化合物和阳性对照 Vc 进行了 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 自由基抗氧化活性测试。实验结果(见表 1)显示,聚酮类化合物 **8** 对 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 自由基都有一定的清除自由基效果,而甾体化合物 **6**、**9** 和 **10** 对 DPPH 没有清除效果,但是对 OH 自由基有很强的清除自由基活性,优于阳性对照。

表 1 化合物对 DPPH、ABTS⁺、OH 自由基的清除活性

Table 1 Scavenging activity of compounds on DPPH, ABTS⁺ and OH radicals

化合物 Compound	IC ₅₀ (mg/mL)		
	DPPH	ABTS ⁺	OH
Vc	0.010 ± 0.013	0.014 ± 0.036	0.54 ± 0.42
1	>50	0.105 ± 0.211	>50
3	>50	>50	>50

续表 1 (Continued Tab. 1)

化合物 Compound	IC ₅₀ (mg/mL)		
	DPPH	ABTS ⁺	OH
4	>50	1.221	>50
5	>50	>50	>50
6	>50	9.565	0.005
8	3.453	0.155 ± 0.042	0.019
9	>50	1.259 ± 2.06	0.007
10	>50	>50	0.012
11	4.221	0.195 ± 0.037	>50
12	6.558	0.249 ± 3.538	>50

3 结论

本论文通过对土壤真菌烟曲霉进行固体发酵培养,从该菌种中的乙酸乙酯层部位共分离鉴定了 13 个化合物,其中 **1**、**5**、**8**、**11**、**12** 和 **13** 均为聚酮类化合物,化合物 **6**、**7**、**9** 和 **10** 为甾体类,化合物 **3** 和 **4** 为其他类型。其中,除化合物 **6** 以外,其他化合物均从该菌种固体发酵物中首次分离。从该土壤真菌烟曲霉分离鉴定的化合物主要是聚酮和甾体,并对其进行抗氧化活性测试,聚酮类化合物 **8** 对 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 自由基都有一定的清除效果,化合物 **11** 和 **12** 对 DPPH 和 ABTS⁺ 有清除效果,自由基清除活性表明,芳族羟基对清除自由基活性很重要,但是甾体类化合物 **6**、**9** 和 **10** 对 DPPH 没有的清除效果,只对 OH 自由基有较强的清除效果。前人的研究表明甾体类化合物对 DPPH 无清除效果,但是对 OH 自由基的效果较强,聚酮类化合物对 DPPH 具有较强活性,甾体化合物和聚酮化合物都是烟曲霉中主要抗氧化活性成分。聚酮类化合物具有一定的抗氧化作用,因为聚酮和黄酮的取代基类似,基于自由基理论,酚羟基有很强的还原性,聚酮类化合物也大多为多羟基结构,其抗氧化能力较强。本研究丰富了烟曲霉的化学成分,并为今后该菌种的固体发酵培养和开发利用提供了一定的参考价值。

参考文献

- Zhou YX, Lin SY, Zhen Y, et al. Effects of reclamation aquaculture on soil fungi diversity and community structure of typical coastal wetlands in China[J]. Acta Sci Circum(环境科学学报), 2021, 41: 2827-2837.
- Abdel-Aziz MS, Ghareeb MA, Saad AM, et al. Chromato-

graphic isolation and structural elucidation of secondary metabolites from the soil-inhabiting fungus *Aspergillus fumigatus* 3T-EGY[J]. Acta Chromatogr, 2018, 30: 243-249.

- Liu D, Huang Y, Li C, et al. A new sesquiterpenoid derivative from the coastal saline soil fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Rec Nat Prod, 2016, 10: 708-713.
- Liang YP, Zhao JY, Yang PW, et al. Influences of the Ailao Mountain forest environment on the distribution of siderophore-producing ascomycetes[J]. J For Environ(森林与环境学报), 2020, 4: 298-305.
- Priestap HA. New naphthopyrones from *Aspergillus fonsecaeus*[J]. Tetrahedron, 1984, 40: 3617-3624.
- Zhang Y, Zhu T, Fang Y, et al. Carbonarones A and B, new bioactive γ -pyrone and α -pyridone derivatives from the marine-derived fungus *Aspergillus carbonarius*[J]. J Antibiot, 2007, 60: 153-157.
- Ye YH, Zhu HL, Song YS, et al. Structural revision of aspernigrin A, reisolated from *Cladosporium herbarum* IFB-E002[J]. J Nat Prod, 2005, 68: 1106-1108.
- Jiang W, Jiang HC, Wei Y, et al. Structures and activities of naphthopyrones from marine fungus *Aspergillus niger* XJJ-3[J]. Microbiol China(微生物学通报), 2018, 45: 1897-1903.
- Ding JH, Feng T, Li ZH, et al. Chemical constituents from fruiting bodies of the basidiomycete *Postia balsamea*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2016, 39: 1559-1560.
- Dumlu MU, Gurkan E. A new active compound from *Centaurea* species[J]. Z Naturforsch, 2006, 61: 44-46.
- He Y, Tian J, Chen X, et al. Fungal naphtho- γ -pyrones: potent antibiotics for drug-resistant microbial pathogens[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 24291.