

海洋来源真菌 *Penicillium janthinellum* F12 次级代谢产物研究吴寿远^{1,2}, 曾玲^{1,2}, 孙玉林³, 陈子明^{1,2*}¹岭南师范学院化学化工学院; ²岭南师范学院粤西特色生物医药工程技术研究中心;³岭南师范学院生命科学与技术学院, 湛江 524048

摘要: 利用单菌多次级代谢产物 (OSMAC) 策略对采自南海北部-35 m 深的沉积物海洋真菌 *Penicillium janthinellum* F12 进行化学成分研究。运用反复硅胶柱层析、葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20) 柱层析、反向中压柱层析 (ODS) 等色谱学方法对发酵产物进行化学分离, 利用 NMR、MS 等波谱学技术并结合文献鉴定化合物结构, 并对化合物进行了初步的抗植物病原菌活性测试。从菌株 *Penicillium janthinellum* F12 的液体发酵提取物中分离得到 1 个大环内酯类化合物 brefeldin A (**1**), 从其大米固体发酵提取物中, 分离到 4 个生物碱类化合物 paspalinine (**2**)、13-desoxypaxilline (**3**)、paspaline (**4**) 和 verruculogen (**5**)。在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, 化合物 **1** 对荔枝炭疽病菌和链格孢菌的抑制率分别为 40.5% 和 33.0%。研究表明, 通过改变培养方式, 能激活 *Penicillium janthinellum* F12 沉默基因的表达, 产生完全不同类型的次生代谢产物。

关键词: 海洋真菌; 次级代谢产物; 抗植物病原菌活性; 单菌多次级代谢产物

中图分类号: R914.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022) Suppl-0048-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.S.007

Study on secondary metabolites of fungus *Penicillium janthinellum* F12 from the South China Sea

WU Shou-yuan^{1,2}, ZENG Ling^{1,2}, SUN Yu-lin³, CHEN Zi-ming^{1,2*}

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Lingnan Normal University;

²Western Guangdong Characteristic Biology and Medicine Engineering and Research Center, Lingnan Normal University;

³College of Life Science and Technology, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China

Abstract: Using one strain many compounds (OSMAC) strategy to study the chemical diversity of *Penicillium janthinellum* F12 collected from a sedimentary environment at a water depth of 35 m in the South China Sea. The compounds were purified by repeated silica gel column, Sephadex LH-20 and reversed medium pressure column chromatography. The structures of compounds were identified by spectroscopic analysis (NMR and MS) as well as comparison with published researches. The anti-phytopathogenic activities were assayed by plate method. A macrolide, brefeldin A (**1**), was isolated from the liquid fermentation extract of *Penicillium janthinellum* F12, and four alkaloids, paspalinine (**2**), 13-desoxypaxilline (**3**), paspaline (**4**) and verruculogen (**5**), were isolated from the solid fermentation extract of *Penicillium janthinellum* F12. At the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, compound **1** showed anti-phytopathogenic activities against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria alternata* with the inhibition rates at 40.5% and 33.0%. By changing the culture conditions, the silenced genes of *Penicillium janthinellum* F12 could be activated and different types of secondary metabolites could be produced.

Key words: marine-derived fungi; secondary metabolite; anti-phytopathogenic activity; OSMAC

收稿日期: 2021-06-24 接受日期: 2021-11-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31902373); 广东省自然科学基金 (2018A0303070005); 广东省普通高校特色创新类项目 (2016KTSCX083); 岭南师范大学自然科学人才专项 (ZL1903, ZL1403); 粤西特色生物医药工程技术研究中心开放课题 (2022-K04)

* 通信作者 Tel: 86-759-3182455; E-mail: chenzm818@163.com

随着现代基因组学研究的不断深入, 微生物中存在大量常规培养条件下未被表达的沉默途径已成为共识, 如何将这些沉默途径激活, 利于挖掘微生物新的次生代谢产物, 已成为天然产物研究的热点之一。2002年, Bode等^[1]在前人的基础上归纳提出了单菌株多次级代谢产物 (one strain-many com-

pounds, OSMAC) 策略, 即 OSMAC 策略, 通过改变培养基成分、培养条件和添加酶抑制剂等干扰因素来刺激微生物, 激活不同的合成基因簇, 挖掘其产生不同次级代谢产物的能力, 从而提高先导化合物的发现几率。而其中改变微生物培养方式挖掘其化学多样是最有效的方法之一。如 Zheng 等^[2,3] 对曲霉 *Aspergillus sclerotiorum* PT06-1 的研究获得结构新颖的环六肽 sclerotides A 和 B, 对该菌富营养高盐胁迫产生 11 个结构新颖的棕曲菌素类的环三肽 sclerototides A-K; Wei 等^[4] 对曲丽穗霉 *Spicaria elegans* KLA03 添加酶抑制剂、改变培养基成分等, 获得了大量结构新颖的细胞松弛素类化合物; Oh 等^[5] 将海洋真菌同海洋放线菌混合培养获得抗菌活性肽类化合物 emericellamides A 和 B。在前期的生物活性筛选中, 海洋真菌 *Penicillium janthinellum* F12 发酵粗浸膏具有显著的抗植物病原菌活性。因此, 课题组利用 OSMAC 策略对该株真菌的代谢产物进行分离纯化, 结合体外活性筛选, 期望能够获得具有抗菌活性的代谢产物。

1 仪器与材料

1.1 实验仪器

Bruker AV-500 核磁共振仪 (美国 Bruker 公司); Varian ProStar 高效液相色谱仪 (DAD 检测器); N-1100D-W 直立式旋转蒸发器 (日本东京理化公司); Finnigan-MAT-95-MS 质谱仪 (德国 Finnigan 公司); Agilent 1260 分析型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Sephadex LH-20 凝胶 (瑞典 Amersham 公司); ODS 柱色谱材料 (美国 Merck 公司); 中压层析制备系统 (利穗科技 (苏州) 有限公司); 柱层析硅胶及薄层色谱用硅胶 H (青岛海洋化工厂); 其它化学试剂皆为国产分析纯。

1.2 实验材料

海洋真菌 *Penicillium janthinellum* F12 是从中国南海北部 (经度 113°30.368'; 纬 21°29.604')-35 m 深沉积土中分离纯化得到, 菌株委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 ITS 测序, NCBI 数据库 blast 分析发现与 *Penicillium janthinellum* strain KCG4 (GenBank: KM268707) 相似度为 99.8%。菌种保存于岭南师范学院微生物天然药物实验室。抑菌活性实验所用的 2 种植物病原菌为荔枝炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和链格孢菌 *Alternaria alternata*, 菌株由岭南师范学院章武副研究员提供。

1.3 培养基及培养条件

PD 液体培养基: 土豆 (去皮) 200 g, 葡萄糖 20 g, 海盐 30 g, 加水定容到 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

大米固体发酵培养基: 大米 100 g, 水 100 mL, 海盐 3 g, 装入 500 mL 三角瓶, 121 °C, 灭菌 20 min。

液体发酵: 取 4 °C 保存的斜面菌株, 进行 PDA 固体平板活化, 培养温度 25 °C, 7 天。然后从平板上挑取少许菌丝体接种到 250 mL 三角瓶, 装 PDA (添加 3% 的海盐) 培养基 50 mL, 共 8 瓶, 进行摇床振荡培养, 于 28 °C、200 r/min 振荡培养 9 天。

大米固体发酵: 吸取 5 mL 种子发酵液加到 500 mL 发酵三角瓶中的大米固体培养基于 25 °C 静置培养 21 天。

1.4 提取与分离

液体发酵结束后, 加入约 2 倍体积的丁酮, 萃取 3 次, 低温悬蒸干丁酮提取物, 得初浸膏约 0.79 g。粗浸膏经硅胶柱层析, 用氯仿-甲醇系统梯度洗脱, 分成 5 个组分 (Fr. 1 ~ Fr. 5)。Fr. 2 (0.23 g) 具明显的抑菌活性, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、ODS 中压反相, 得到化合物 1 (10.7 mg)。

固体培养物结束后, 然后加入等体积的丁酮萃取 3 次, 丁酮提取液低压悬蒸得到粗浸膏 15.6 g。粗浸膏经硅胶柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯系统梯度洗脱, 得到 8 个组分 (Fr. 1 ~ Fr. 8)。Fr. 2 (1.1 g), 经正相硅胶柱层析、ODS 中压反相, 得到化合物 2 (25.3 mg)。Fr. 3 (1.02 g) 具明显的卤虫致死活性, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (氯仿-甲醇 = 1:1), 得到 3 个亚组分 (Fr. 3.1 ~ Fr. 3.3)。Fr. 3.1, 经 ODS 中压反相, 得到化合物 3 (15.1 mg); Fr. 3.2, 经 ODS 中压反相, 得到化合物 4 (16.8 mg)。Fr. 4 (0.61 g), 经硅胶柱层析、ODS 中压反相, 得到化合物 5 (20.4 mg)。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色晶体; ESI-MS: m/z 303.4 [M + Na]⁺, 分子式为 C₁₆H₂₄O₄。¹H NMR (500 MHz, DM-SO-*d*₆) δ : 7.33 (1H, dd, J = 15.6, 2.9 Hz, H-3), 5.70 (1H, dd, J = 15.6, 1.5 Hz, H-2), 5.65 (1H, ddd, J = 15.0, 9.0, 3.0 Hz, H-11), 5.19 (1H, dd, J = 15.1, 9.7 Hz, H-10), 5.11 (1H, br s, 4-OH), 4.69 (1H, m, H-15), 4.51 (1H, br s, 7-OH), 4.04 (1H, m, H-7), 3.92 (1H, br d, J = 9.0 Hz, H-4), 2.30 (1H,

m, H-9), 1.95 (1H, m, H-8a), 1.91 (1H, m, H-12a), 1.82 (1H, m, H-6a), 1.79 (1H, m, H-13a), 1.76 (1H, m, H-12b), 1.71 (1H, m, H-14a), 1.69 (1H, m, H-5), 1.65 (1H, m, H-6b), 1.48 (1H, m, H-14b), 1.29 (1H, m, H-8b), 1.18 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-16), 0.74 (1H, m, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.7 (C-1), 116.3 (C-2), 154.4 (C-3), 74.5 (C-4), 51.9 (C-5), 41.0 (C-6), 70.7 (C-7), 43.1 (C-8), 43.4 (C-9), 137.2 (C-10), 129.2 (C-11), 31.5 (C-12), 26.5 (C-13), 33.4 (C-14), 70.9 (C-15), 20.7 (C-16)。以上数据与文献^[6]报道基本一致, 确定化合物 **1** 为 brefeldin A。

化合物 2 白色粉末; ESI-MS: m/z 432.4 [M - H]⁻, 分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{NO}_4$ 。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 11.51 (1H, s, NH), 7.75 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-20), 7.53 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-23), 7.28 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, H-22), 7.23 (1H, m, H-21), 6.07 (1H, s, H-11), 4.60 (1H, s, H-9), 3.25 (1H, m, H-6a), 3.07 (1H, m, H-16), 2.92 (H, m, H-5a), 2.89 (1H, dd, $J = 12.9, 6.3$ Hz, H-17b), 2.63 (1H, dd, $J = 12.9, 10.9$ Hz, H-17a), 2.32 (1H, m, H-15b), 2.25 (1H, m, H-14b), 2.23 (H, m, H-5b), 2.16 (1H, m, H-6b), 2.00 (1H, m, H-14a), 1.79 (1H, m, H-15a), 1.78 (3H, s, H-25), 1.58 (3H, s, H-26), 1.38 (3H, s, H-28), 1.22 (3H, s, H-29); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 154.2 (C-2), 52.6 (C-3), 40.7 (C-4), 27.8 (C-5), 29.4 (C-6), 105.7 (C-7), 88.7 (C-9), 197.7 (C-10), 118.0 (C-11), 171.0 (C-12), 77.4 (C-13), 33.9 (C-14), 22.1 (C-15), 49.7 (C-16), 28.4 (C-17), 117.0 (C-18), 126.6 (C-19), 119.2 (C-20), 120.7 (C-21), 119.9 (C-22), 112.8 (C-23), 142.0 (C-24), 17.5 (C-25), 23. (C-26), 79.0 (C-27), 29.2 (C-28), 23.6 (C-29)。以上数据与文献^[7]报道基本一致, 确定化合物 **2** 为 paspalinine。

化合物 3 白色粉末; ESI-MS: m/z 442.2 [M + Na]⁺, 分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_3$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.86 (1H, br s, NH), 7.47 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-23), 7.32 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-20), 7.09 (2H, dq, $J = 7.8, 1.4$ Hz, H-21/22), 5.90 (1H, s, H-11), 3.98 (1H, m, H-7), 3.57 (1H, d, $J = 1.85$ Hz, H-9), 2.63 (1H, m, H-16), 2.58 (1H, dd, $J = 13.4, 6.2$ Hz, H-17), 2.29 (1H, t, $J = 11.3$ Hz, H-17), 2.16 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-13), 2.01 (1H, m,

H-6b), 1.96 (1H, m, H-5a), 1.95 (1H, m, H-6a), 1.79 (1H, m, H-5b), 1.68 (1H, m, H-14), 1.59 (1H, m, H-14), 1.53 (1H, m, H-15), 1.43 (1H, m, H-15), 1.32 (3H, s, H-29), 1.31 (3H, s, H-28), 1.08 (3H, s, H-25), 1.00 (3H, s, H-26); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 149.3 (C-2), 50.6 (C-3), 42.7 (C-4), 25.6 (C-5), 27.4 (C-6), 74.9 (C-7), 82.6 (C-9), 198.4 (C-10), 121.9 (C-11), 168.4 (C-12), 42.7 (C-13), 32.9 (C-14), 24.2 (C-15), 49.0 (C-16), 30.1 (C-17), 118.6 (C-18), 125.1 (C-19), 118.7 (C-20), 119.9 (C-21), 120.9 (C-22), 111.7 (C-23), 140.1 (C-24), 14.7 (C-25), 16.4 (C-26), 72.6 (C-27), 24.3 (C-28), 26.8 (C-29)。以上数据与文献^[8]报道基本一致, 确定化合物 **3** 为 13-desoxypaxilline。

化合物 4 白色无定型粉末; ESI-MS: m/z 444.3 [M + Na]⁺, 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{NO}_2$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.81 (1H, br s, NH), 7.43 (1H, m, H-20), 7.30 (1H, m, H-23), 7.08 (2H, m, H-21/H-22), 3.23 (1H, dd, $J = 11.9, 3.1$ Hz, H-9), 3.04 (1H, dd, $J = 11.4, 4.0$ Hz, H-7 α), 2.76 (1H, m, H-16), 2.68 (1H, dd, $J = 13.0, 6.4$ Hz, H-17 β), 2.34 (1H, dd, $J = 13.0, 10.4$ Hz, H-17 α), 1.96 (1H, m, H-5a), 1.82 (1H, m, H-6b), 1.79 (1H, m, H-15b), 1.72 (1H, m, H-6a), 1.69 (1H, m, H-14b), 1.63 (1H, m, H-5b), 1.61 (1H, m, H-15a), 1.50 (1H, m, H-13), 1.46 (1H, m, H-14a), 1.21 (3H, s, H-29), 1.14 (3H, s, H-26), 1.19 (3H, s, H-28), 1.03 (3H, s, H-25), 0.88 (3H, s, H-30); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 151.0 (C-2), 53.1 (C-3), 40.1 (C-4), 34.0 (C-5), 24.8 (C-6), 85.9 (C-7), 84.8 (C-9), 22.1 (C-10), 37.8 (C-11), 36.7 (C-12), 46.5 (C-13), 22.1 (C-14), 25.4 (C-15), 48.9 (C-16), 27.6 (C-17), 118.3 (C-18), 125.2 (C-19), 118.5 (C-20), 119.6 (C-21), 120.5 (C-22), 111.6 (C-23), 140.1 (C-24), 14.7 (C-25), 20.1 (C-26), 72.1 (C-27), 23.8 (C-28), 26.2 (C-29), 12.8 (C-30)。以上数据与文献^[8]报道基本一致, 确定化合物 **4** 为 paspaline。

化合物 5 淡黄色粉末; ESI-MS: m/z 534.1 [M + Na]⁺, 分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.90 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-16), 6.05 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3), 4.48 (1H, m, H-6), 6.83 (1H, dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, H-17), 6.64 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-21), 6.59 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-19),

5. 65 (1H, br s, H-13), 5. 04 (1H, d, $J = 8. 0$ Hz, H-22), 4. 77 (1H, br s, 13-OH), 4. 08 (1H, br s, 12-OH), 3. 84 (3H, s, 18-OCH₃), 3. 64 (2H, dd, $J = 8. 5, 3. 5$ Hz, H-9), 2. 50 (1H, m, H-7b), 2. 10 (1H, m, H-8b), 2. 00 (3H, s, H-24), 2. 01 (1H, overlap), 2. 09 (1H, m, H-7a), 1. 97 (1H, m, H-8a), 1. 74 (3H, d, $J = 1. 2$ Hz, H-25), 1. 72 (3H, s, H-29), 1. 68 (1H, t, $J = 11. 8$ Hz, H-26a), 1. 01 (3H, s, H-28);¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 131. 7 (C-2), 49. 0 (C-3), 170. 8 (C-5), 58. 8 (C-6), 29. 2 (C-7), 22. 7 (C-

8), 45. 4 (C-9), 166. 3 (C-11), 82. 7 (C-12), 68. 8 (C-13), 105. 7 (C-14), 121. 1 (C-15), 121. 8 (C-16), 109. 5 (C-17), 156. 5 (C-18), 94. 0 (C-19), 136. 3 (C-20), 85. 9 (C-21), 118. 6 (C-22), 143. 3 (C-23), 18. 9 (C-24), 25. 8 (C-25), 51. 3 (C-26), 82. 2 (C-27), 27. 2 (C-28), 24. 3 (C-29), 55. 9 (18-OCH₃)。以上数据与文献^[9]报道基本一致,确定化合物**5**为 verruculogen。

化合物**1**~**5**的结构见图1。

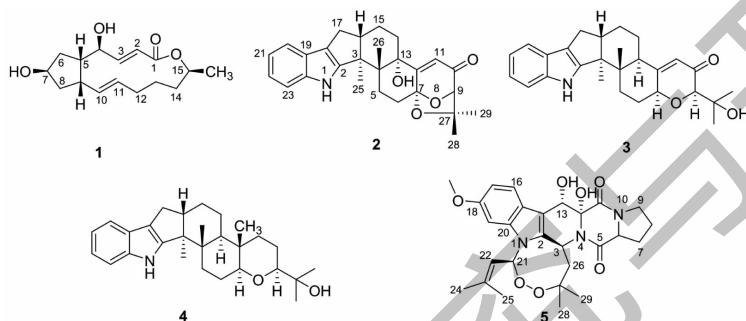


图1 化合物**1**~**5**的结构

Fig. 1 Structures of compounds **1-5**

2.2 抑菌活性测试结果

对化合物**1**~**5**进行了2种植物致病真菌的抑制活性测试,当待测化合物终浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 时,化合物**1**对荔枝炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和链格孢菌 *Alternaria alternata* 的抑制率分别为40.5%、33.0%,化合物**2**~**5**对所选测试真菌均没有表现出明显的抑制活性。

3 讨论与结论

本文从海洋真菌 *Penicillium janthinellum* F12 的液体发酵物中分离得到 brefeldin A (**1**),该化合物一种天然的大环内酯类抗生素,最早由 Singleton 等^[10]从 *Penicillium decumben* 发酵液中分离得到, brefeldin A 具有抗真菌、抗病毒、抗有丝分裂、抗肿瘤等生物学活性^[11]。从其固体大米发酵提取物中分离得到4个生物碱类化合物 paspalinine (**2**)、13-desoxypaxilline (**3**)、paspaline (**4**) 和 verruculogen (**5**),其中化合物**2**~**4**为吲哚二萜(Indole-diterpenes, IDTs),该类天然产物最初在真菌 *Claviceps paspali* 中发现^[12],此后在一系列子囊菌包括 *Aspergillus*、*Penicillium*、*Emericella*、*Eupenicillium*、*Neotyphodium*、*Periglandula*、*Tolypocladium* 等中有发现,至今已分离鉴定80多个该类天然产物, IDTs 具有丰富的生物活

性,比如抑制 K⁺ 通道、杀虫活性、抑制细胞有丝分裂等^[12-14];生物碱 verruculogen (**5**),主要由青霉和曲霉产生的真菌毒素,该化合物抑制 Ca²⁺ 激活的 K⁺ 通道使动物引起严重震颤^[15]。

本研究成功采用了 OSMAC 策略,通过改变菌株的培养方式,对海洋真菌 *Penicillium janthinellum* F12 沉默基因进行了激活,分离鉴定得到5个化合物,并进行初步的抗植物病原真菌活性的评价,研究进一步拓展了该菌次级代谢产物的化学多样性,丰富了海洋天然产物库。

参考文献

- 1 Bode HB, Bethe B, Hofs R, et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity[J]. ChemBioChem, 2002, 3: 619-627.
- 2 Zheng JK, Zhu HJ, Hong K, et al. Novel cyclic hexapeptides from marine-derived fungus, *Aspergillus sclerotiorum* PT06-1 [J]. Org Lett, 2009, 11: 5262-5265.
- 3 Zheng JK, Xu ZH, Wang Y, et al. Cyclic tripeptides from the halotolerant fungus *Aspergillus sclerotiorum* PT06-1 [J]. J Nat Prod, 2010, 73: 1133-1137.
- 4 Wei HJ, Lin ZJ, Li DH, et al. OSMAC (One Strain Many Compounds) approach in the research of microbial metabo-

- lites[J]. Acta Microbiol Sin(微生物学报), 2010, 50: 701-709.
- 5 Oh DC, Kauffman CA, Jensen PR, et al. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture[J]. J Nat Prod, 2007, 70: 515-520.
 - 6 Wang FW, Jiao RH, Cheng AB, et al. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2006, 23(1): 79-83.
 - 7 Munday-Finch SC, Wilkins AL, Miles CO. Isolation of paspaline B, an indole-diterpenoid from *Penicillium paxilli* [J]. Phytochemistry, 1996, 41: 327-332.
 - 8 Nozawa K, Nakajima S, Kawai KI, et al. Isolation and structures of indoloditerpenes, possible biosynthetic intermediates to the tremorgenic mycotoxin, paxilline, from *Emericella striata*[J]. J Chem Soc Perkin Trans 1, 1988(9): 2607-2610.
 - 9 Afiyatullov SS, Kalinovskii AI, Pivkin MV, et al. Fumitremorgins from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Chem Nat Compd, 2004, 40: 615-617.
 - 10 Singleton VL, Bohonos N, Ullstrup AJ. Decumbin, a new compound from a species of penicillium[J]. Nature, 1958, 181: 1072-1073.
 - 11 Chardin P, McCormick F, Brefeldin A; the advantage of being uncompetitive[J]. Cell, 1999, 97: 153-155.
 - 12 Gallagher RT, Finer J, Jon C, et al. Paspalinine, a tremorgenic metabolite from *Claviceps paspali* Stevens et Hall [J]. Tetrahedron Lett, 1980, 21: 235-238.
 - 13 Staub GM, Gloer KB, Gloer JB, et al. New paspalinine derivatives with antiinsectan activity from the sclerotia of *Aspergillus nomius* [J]. Tetrahedron Lett, 1993, 34: 2569-2572.
 - 14 Kozák L, Szilágyi Z, Tóth L, et al. Tremorgenic and neurotoxic paspaline-derived indole-diterpenes: biosynthetic diversity, threats and applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103: 1599-1616.
 - 15 Knaus HG, McManus OB, Lee SH, et al. Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels [J]. Biochemistry, 1994, 33: 5819-5828.

(上接第 86 页)

- 15 Yang L, Feng X, Wu ZF, et al. Effects of different concentrations of azone on *in vitro* transdermal absorption of ferulic acid in compound *Tripterygium wilfordii* patches [J]. Hunan J Nor Univ: Med (湖南师范大学学报: 医学版), 2005(1): 15-17.
- 16 Han F, Li MQ, Xu M, et al. Orthogonal test method to optimize the formulation of Zushima gel ointment and its *in vitro* transdermal properties [J]. Mod Med Clin (现代药物与临床), 2021, 36: 447-452.
- 17 Llewelyn VK, Berger L, Glass BD. Correction to: predicting *in vivo* absorption of chloramphenicol in frogs using *in vitro* percutaneous absorption data [J]. BMC Veter Res, 2021, 17(1): 161-161.