

毛地黄中两株共附生真菌 *Pestalotiopsis* sp 的代谢成分研究*

瞿添添^{1,2}, 闫小梅^{1,2}, 唐相琴², 张厚润², 姜瑞金²,
尹子丽¹, 朱常成³, 何江波^{2**}

(1. 云南中医药大学 中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 昆明学院 医学院, 云南 昆明 650214;
3. 云南自由贸易试验区睿之成医药科技有限公司, 云南 昆明 65000)

[摘要] 研究毛地黄来源共附生真菌 *Pestalotiopsis* sp 的代谢成分. 大米固体发酵后, 使用现代色谱学分离方法对发酵提取物进行分离, 并采用核磁、质谱及参考文献对比的方法鉴定结构, 最后采用微板法测定化合物的抗菌活性. 从 *Pestalotiopsis* sp (MDH-3) 的大米发酵物中分离得到 6 个化合物, 分别为: pestalotiopyrone G (1), pestalol A (2), gamahorin (3), 尿嘧啶 (4), (22E, 24S)-5 α , 8 α -过氧化麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇 (5), 5 α , 8 α -环氧-(22E, 24R) 麦角甾-6, 9, 22-三烯-3 β -醇 (6), 其中化合物 2 和 3 首次从该物种中分离得到. 从 *Pestalotiopsis* sp (MDH-6) 的大米发酵物中分离得到 4 个化合物, 分别为: 4, 8-dihydroxy-3, 4-dihydronaphthalen-1 (2H)-one (7), pestalone (8), pestalotiopsins B (9), pestaloporinate F (10), 活性测试结果表明, 化合物 8 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 抑制活性半数抑制浓度为 (IC_{50}) 11.0 μ mol/L. 研究结果拓展了对 *Pestalotiopsis* sp 的代谢成分及药理活性认知, 并为后续的深入研究奠定了基础.

[关键词] 毛地黄; 拟盘多毛孢; 化学成分; 结构鉴定

[中图分类号] R915 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5639(2026)03-0120-07

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2026.03.015

毛地黄 (*Digitalis purpurea* L), 又称洋地黄, 为玄参科毛地黄属植物, 原产欧洲, 含有地高辛、洋地黄毒苷等强心苷, 具有治疗充血性心力衰竭的作用^[1]. 毛地黄因具有较好的药用和园艺观赏价值, 在全国范围均有种植^[2]. 毛地黄的主要病害为叶斑病、根腐病等, 对其种植的危害较大. 近期, 课题组从毛地黄的花蕾部位分离得到一种病原真菌拟盘多毛孢菌 (*Pestalotiopsis* sp), 该菌因与宿主共生造成植物叶斑病而备受关注. 拟盘多毛孢菌为分布广泛的内生真菌, 可以产生大量化学结构独特、生理活性显著且具有较大开发价值的活性次级代谢产物^[3]. 上世纪 90 年代, Strobel 等^[4,5]发现了可以产生紫杉醇的小孢拟盘多毛孢菌 (*Pestalotiopsis microspora*) 和拟盘多毛孢菌 (*Pestalotiopsis guepinii*), 引起全世界范围的关注. 2011 年国内学者张鹏等^[6]从云南红豆杉中分离得到一株产紫杉醇的拟盘多毛孢菌 YN6, 其产量为 120 ~ 140 μ g/L, 为目前已报道的紫杉醇高产菌株之一. 因此, 拟盘多毛孢菌的代谢成分具有较大的研究价值, 可以丰富拟盘多毛孢属次级代谢产物的类群, 并为后期深入研究该菌的药理活性奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌株

菌株从毛地黄 (*Digitalis purpurea* L) 花蕾中分离得到, 采用 ITS 测序鉴定, 结果表明与拟盘多毛孢属相似度最高, 为 99.9%, 因此鉴定为 *Pestalotiopsis* sp. 菌种目前保存于昆明学院医学院菌种库 (两个菌株编号分别为: MDH-3 和 MDH-6).

* [收稿日期] 2025-08-27

[作者简介] 瞿添添, 女, 彝族, 贵州盘州人, 云南中医药大学在读硕士研究生, 研究方向为天然药物化学.

** [通信作者] 何江波, 男, 四川三台人, 昆明学院教授, 研究方向为天然药物化学, E-mail: 147976602@qq.com.

[基金项目] 云南省科技厅基础研究计划面上项目 (202401AT070029); 云南省兴滇英才项目 (20220472).

1.2 试剂

葡萄糖 (西陇科学股份有限公司, 分析纯); 柱层析用硅胶 (青岛海洋化工厂有限公司, 规格: 200 ~ 300 目)、薄层层析用硅胶 (青岛海洋化工厂有限公司, 规格: GF254); Sephadex LH-20 (美国 GE 公司); RP-18 (日本 YMC 产品, 40 ~ 60 μm); 色谱纯甲醇、乙腈 (上海星可高纯度试剂公司); 石油醚、二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯、甲醇等有机溶剂均为工业纯度经重蒸后使用. 显色剂为乙醇 (H_2SO_4 , 10%) 溶液, 氨苄西林 (福州飞净生物科技有限公司, 规格 10 mL, 含量 50 mg/mL).

1.3 培养基

大米培养基: 大米 (70 g), 自来水 120 mL.

马铃薯液体培养基 (PDB) 1 L: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 自来水 1 L.

1.4 仪器

液相色谱质谱仪 (美国 Thermo TSQ ACCESS MAX); 核磁共振波谱仪 (Avance 600, 瑞士); 高效液相色谱 (HPLC, 美国安捷伦公司, 安捷伦 1260); 制备液相色谱仪 (江苏汉邦, Hanbon-NP 7000C); N-1100 旋转蒸发仪 (东京理化公司); 半制备柱 (YMC-Triart C_{18} , 250 \times 10.0 mm, 5 μm); 分析柱 (Xbridge C_{18} , 4.6 \times 150 mm, 5 μm); 智诚恒温培养振荡器 (上海智城仪器制造有限公司, 型号: ZWY-2102); 高压蒸汽灭菌锅 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司, 型号: YXQ-LB-75 S II); SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); SPS-500B 型恒温恒湿培养箱 (北京亚泰科隆仪器技术有限公司); 恒温恒湿培养箱 (山东博科科学仪器有限公司, 型号: BJPX-11-400).

1.5 菌株分离与发酵

1.5.1 菌株分离

首先在无菌台中采用灭菌水冲洗毛地黄花蕾表面, 然后采用 75% 酒精浸泡 1 min; 继续用无菌水冲洗 3 ~ 4 次, 接着采用 5% 次氯酸钠浸泡 30 s, 再用无菌水冲洗 3 次, 最后用无菌滤纸吸干水分备用. 采用组织匀浆稀释法, 取 1 g 无菌花蕾, 加入 4 mL 无菌水进行研磨, 研磨后静置 15 min, 吸取上清液 1 mL 与 9 mL 无菌水混合进行梯度稀释, 以此方法得到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 四个浓度的稀释液. 分别从 10^{-2} 、 10^{-3} 梯度的试管中取 100 μL 涂布到低糖和正常糖 PDA 培养基上, 封口膜密封后于 28 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温恒湿培养箱中培养 5 ~ 7 d. 然后, 分别从各分离培养基的混合菌落中蘸取单菌落到培养基中进行多次纯化, 纯化三次后, 得到单菌株. 最终从毛地黄中分离了 7 个菌株 (编号 MDH 1 ~ 7), 并采集菌丝进行 ITS 测序, 鉴定菌株. 此外, 课题组对 7 株菌株进行了 PDB 发酵, 并采用高效液相色谱法 (HPLC) 分析了发酵液次生代谢产物 (图 1).

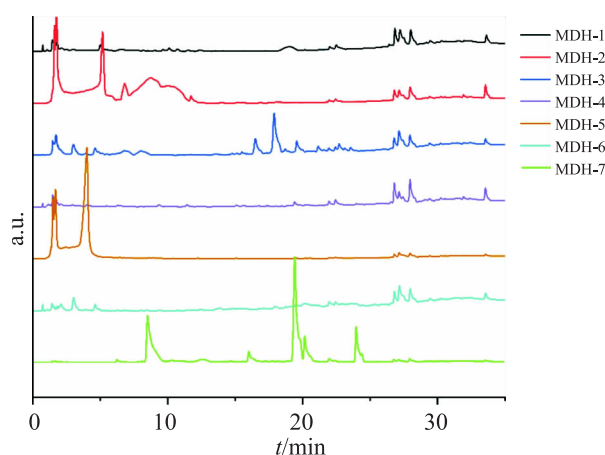


图 1 7 株真菌的发酵代谢产物色谱分析

1.5.2 菌株发酵与化合物分离

根据 HPLC 和薄层色谱对次级代谢产物的筛选, 发现 MDH-3 和 MDH-6 菌株次级代谢产物较为丰富.

采用 5 kg 大米固体发酵 *Pestalotiopsis* sp (MDH-3), 25 °C 条件下, 发酵 20 d; 发酵物采用工业甲醇浸泡提取三次, 每次 48 h, 减压回收溶剂, 得浸膏, 用乙酸乙酯萃取得 48 g. 采用凝胶柱色谱进行脱糖后, 采用反相柱色谱 (甲醇:水, 10%~100% (V/V), 梯度洗脱) 进行分离获得 18 个组分 Fr. NP-A~R. 组分 Fr. NP-J 采用正相硅胶柱色谱 (有机溶剂, 石油醚:丙酮, 9:1~5:1) 梯度洗脱, 得到化合物 **1** (2.4 mg); Fr. NP-P 采用反相柱色谱获得 Fr1~4, 组分 Fr-3 采用硅胶柱色谱 (二氯甲烷:甲醇, 50:1~10:1) 洗脱得到化合物 **7** (7.6 mg), Fr-4 采用 (二氯甲烷:甲醇, 100:1~80:1) 梯度洗脱得到化合物 **2** (5.3 mg); Fr. NP-H 采用硅胶柱色谱 (石油醚:丙酮, 20:1~12:1) 梯度洗脱, 得到化合物 **3** (30.9 mg); Fr. NP-S 采用反相柱色谱获得三个组分 Fr1~3, 其中 Fr2 采用半制备液相 (YMC-Triart C₁₈, 250 × 10.0 mm, 5 μm), 10% 甲醇等度洗脱获得化合物 **4** (4.6 mg); Fr-3 采用半制备液相色谱 (YMC-Triart C₁₈, 250 × 10.0 mm, 5 μm), 100% 等梯度洗脱, 得到化合物 **5** (27 mg) 和 **6** (7.1 mg).

Pestalotiopsis sp (MDH-6) 采用与 MDH-3 一样的发酵条件. 发酵物用乙酸乙酯萃取, 得到乙酸乙酯萃取层, 得到 23.56 g, 用 Sephadex LH-20 进行凝胶柱色谱脱糖后, 采用反相柱色谱进行分离获得 11 个组分 Fr-NP-A~K. 其中 Fr-NP-F (1.6344 g) 采用凝胶色谱进行分离, 得到三个组分 1~3, Fr-NP-F-2 (33 mg) 采用硅胶色谱梯度洗脱 (石油醚:丙酮, 6:1~3:1) 分离得到化合物 **7** (2.3 mg). Fr-NP-I (458.3 mg), 采用硅胶色谱梯度洗脱 (石油醚:丙酮 5:1~2:1) 分离得到化合物 **8** (5.5 mg). Fr-NP-E (5.31 g) 采用凝胶色谱进行分离得到 2 个组分, 其中 Fr-NP-E-1 (4.14g) 采用反相柱色谱进行分离获得 4 个组分, Fr-NP-E-2 (346.4 mg) 采用硅胶色谱梯度洗脱 (二氯甲烷:甲醇, 60:1~15:1) 分离得到混合物 30 mg, 用半制备液相色谱 (YMC-Triart C₁₈, 250 × 10.0 mm, 5 μm) 进行纯化, 59% 甲醇等度洗脱分离得到化合物 **9** (18 mg). Fr-NP-C (1.3612 g) 采用凝胶色谱进行分离得到 5 个组分 1~5, 其中 Fr-NP-C-1 (1.1296 g) 采用反相柱色谱进行分离得到 5 个组分, Fr-C-1-3 (20.2 mg) 采用半制备液相色谱 (YMC-Triart C₁₈, 250 × 10.0 mm, 5 μm), 49% 甲醇等度洗脱分离得到化合物 **10** (2.2 mg).

1.5.3 体外抗菌活性测试

采用微板观察法检测靶标化合物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)、铜绿假单胞菌 (PA) 和枯草芽孢杆菌 (Bs) 的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC 值). MIC 的测定根据临床和实验标准学的微量肉汤稀释法在平底 96 孔微量滴度板中完成, 具体步骤如下: a) 将化合物溶解在二甲亚砜 (DMSO) 中, 配制成浓度为 0.33, 1.1, 3.3, 10 mmol/L, 保存于 4 °C 备用; b) 取活化好的菌株, 用麦氏比浊仪将菌体浓度调整至 1×10^5 CFU/mL; c) 将配制好的菌液接种在 96 孔板中, 每个孔加 100 μL; d) 在 96 孔板的最外圈添加磷酸缓冲盐水 (PBS), 防止菌液的蒸发影响实验误差; e) 在 96 孔板中分别加入 1 μL 配制好的化合物, 使终浓度为 3.3, 11, 33, 100 μmol/L, 阴性对照中加入 1 μL 的 DMSO, 阳性对照则分别加入 1 μL 浓度 0.33 mmol/L 和 1.1 mmol/L 氨苄青霉素, 终浓度为 3.3 μmol/L 和 11 μmol/L. 每组设置三个平行; f) 将 96 孔板根据不同的菌株, 放入相对应的培养箱中进行培养; g) 将培养好的菌液通过 OD_{600} 来测定菌体浓度.

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

课题组对毛地黄中分离得到的 2 株拟盘多毛孢菌 (MDH-3 和 MDH-6) 进行大米发酵, 采用现代分离分析方法研究其代谢产物, 共分离并鉴定 10 个化合物, 分别鉴定为 pestalotiopyrone G (**1**), pestalol A (**2**), gamahorin (**3**), 尿嘧啶 (**4**), (22E, 24S)-5 α , 8 α -过氧化麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇 (**5**), 5 α , 8 α -环氧-(22E, 24R) 麦角甾-6, 9, 22-三烯-3 β -醇 (**6**), 4, 8-dihydroxy-3, 4-dihydronaphthalen-1 (2H) -one (**7**), pestalone (**8**), pestalotiopsins B (**9**), pestaloporinate F (**10**), 其化学结构式如图 2.

化合物 **1**: 白色晶体, 易溶于氯仿, 甲醇. ESI-MS: m/z 181 [M + H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H 6.69 (1H, q, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 5.90 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-5), 5.45 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3), 3.81 (3H, s, 4-OCH₃), 1.84 (3H, s, 2'-CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C 171.7 (C-4), 164.6 (C-2), 161.5 (C-6), 130.4 (C-2'), 126.8 (C-1'), 97.4 (C-5), 88.2 (C-3),

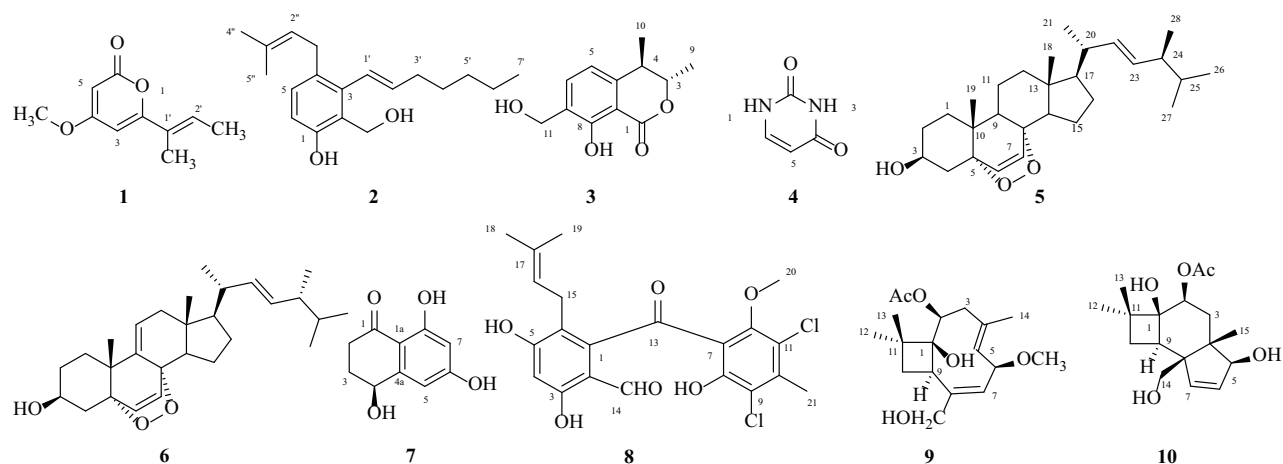


图2 化合物1~10的结构式

56.1 (4-OCH₃), 14.4 (2'-CH₃), 12.3 (1'-CH₃). 以上波谱数据与文献 [7] 报道一致, 确定化合物 1 为 pestalotiopyrone G.

化合物 2: 黄色油状, 易溶于氯仿, 甲醇. ESI-MS: m/z 287 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H 7.01 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.74 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-6), 6.31 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-1'), 5.51 (1H, dt, J = 16.1, 7.0 Hz, H-2'), 5.18 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-2''), 4.97 (2H, s, H-7), 3.22 (2H, d, J = 7.1 Hz, H-2''), 2.22 (2H, m, H-3'), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.68 (3H, s, H-5''), 1.34 (4H, m, H-5', H-6'), 1.47 (2H, t, J = 7.1 Hz, H-4'), 0.91 (3H, m, H-7'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C 155.0 (C-1), 137.7 (C-2'), 137.6 (C-3), 131.9 (C-4), 131.8 (C-3''), 129.4 (C-5), 126.2 (C-1'), 123.7 (C-2''), 122.8 (C-2), 115.2 (C-6), 62.0 (C-7), 33.5 (C-3'), 32.1 (C-5'), 31.7 (C-1''), 29.2 (C-4'), 26.0 (C-4''), 22.8 (C-6'), 18.1 (C-5''), 14.3 (C-7'). 以上波谱数据与文献 [8] 报道一致, 确定化合物 2 为 pestalol A.

化合物 3: 无色油状, 易溶于氯仿, 甲醇. ESI-MS: m/z 221 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H 11.50 (1H, s, OH-8), 7.51 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-5), 4.72 (2H, s, H-11), 4.50 (1H, m, H-3), 2.88 (1H, m, H-4), 2.69 (1H, s, OH-11), 1.47 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 1.35 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-10); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C 169.7 (C-1), 160.2 (C-8), 143.4 (C-4a), 135.5 (C-6), 127.9 (C-7), 116.6 (C-5), 107.5 (C-8a), 81.4 (C-3), 61.1 (C-11), 37.5 (C-4), 19.9 (C-9), 17.5 (C-10). 以上波谱数据与文献 [9] 报道一致, 确定化合物 3 为 gamahorin.

化合物 4: 白色粉末, 易溶于 DMSO, 吡啶. ESI-MS: m/z 113 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 10.94 (2H, brs, 1-NH, 3-NH), 7.39 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-6), 5.45 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-5); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 164.4 (C-4), 151.6 (C-2), 142.2 (C-6), 100.2 (C-5). 以上波谱数据与文献 [10] 报道一致, 确定化合物 4 为尿嘧啶.

化合物 5: 白色针状结晶, 易溶于氯仿, 甲醇. ESI-MS: m/z 429 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H 6.51 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-7), 6.25 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 5.23 (1H, dd, J = 15.3, 7.7 Hz, H-23), 5.15 (1H, dd, J = 15.3, 8.3 Hz, H-22), 3.97 (1H, m, H-3), 0.92 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-21), 0.89 (3H, s, H-19), 0.83 (9H, m, H-18, H-26, H-27); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C 135.6 (C-6), 135.4 (C-22), 132.5 (C-23), 130.9 (C-7), 82.4 (C-5), 79.7 (C-8), 66.6 (C-3), 56.4 (C-17), 51.9 (C-14), 51.3 (C-9), 44.8 (C-13), 43.0 (C-24), 40.0 (C-20), 39.5 (C-12), 37.2 (C-10), 37.1 (C-4), 34.9 (C-1), 33.3 (C-25), 30.3 (C-2), 28.9 (C-16), 23.6 (C-11), 21.1 (C-21), 20.8 (C-15), 20.2 (C-27), 19.9 (C-26), 18.4 (C-19), 17.8 (C-28), 13.1 (C-18). 以上波谱数据与文献 [11] 报道一致, 确定化合物 5 为 (22*E*, 24*S*)-5α, 8α-过氧化麦角

甾-6, 22-二烯-3 β -醇.

化合物**6**: 白色针状结晶, 易溶于氯仿, 甲醇. ESI-MS: m/z 427 $[M + H]^+$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.60 (1H d, $J=8.6$ Hz, H-6), 6.30 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7), 5.43 (1H, dd, $J=6.1$, 2.0 Hz, H-11), 5.24 (1H, dd, $J=15.3$, 7.7 Hz, H-23), 5.16 (1H, dd, $J=15.4$, 8.6 Hz, H-22), 4.02 (1H, m, H-3), 2.27 (1H, dd, $J=16.9$, 6.1 Hz, H-12a), 2.08 (1H, m, H-12b), 1.10 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.92 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-28), 0.83 (6H, dd, $J=9.8$, 6.7 Hz, H-26, H-27), 0.74 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 142.7 (C-9), 135.7 (C-6), 135.3 (C-22), 132.6 (C-23), 131.0 (C-7), 120.0 (C-11), 82.9 (C-5), 78.6 (C-8), 66.6 (C-3), 56.1 (C-17), 48.4 (C-14), 43.8 (C-13), 43.0 (C-24), 41.4 (C-12), 40.1 (C-20), 38.2 (C-10), 36.3 (C-4), 33.3 (C-25), 32.8 (C-1), 30.8 (C-2), 28.9 (C-16), 25.8 (C-19), 21.1 (C-15), 20.9 (C-21), 20.2 (C-26), 19.9 (C-27), 17.8 (C-28), 13.2 (C-18). 以上波谱数据与文献 [12] 报道一致, 确定化合物**6**为5 α , 8 α -环氧-(22*E*, 24*R*) 麦角甾-6, 9, 22-三烯-3 β -醇.

化合物**7**: 黄色粉末, 易溶于甲醇. ESI-MS: m/z 195.01 $[M + H]^+$; 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_H 6.54 (1H, d, $J=2.3$ Hz, 8-OH), 6.17 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-7), 4.72 (1H, dd, $J=8.7$, 3.9 Hz, H-4), 2.77 (1H, ddd, $J=17.7$, 6.7, 4.6 Hz, H-2 β), 2.60 (1H, m, H-2 α), 2.24 (1H, m, H-3 β), 2.03 (1H, m, H-3 α); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_C 203.8 (C-1), 167.0 (C-6), 166.9 (C-8), 151.2 (C-4a), 107.5 (C-5), 102.6 (C-7), 68.6 (C-4), 35.9 (C-2), 32.8 (C-3). 以上波谱数据与文献 [13] 报道一致, 故鉴定化合物**7**为4, 8-dihydroxy-3, 4-dihydronaphthalen-1 (2H)-one.

化合物**8**: 黄色晶体, 易溶于甲醇、二氯甲烷. ESI-MS: m/z 439 $[M + H]^+$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 13.13 (1H, s, 12-OH), 11.82 (1H, s, 3-OH), 9.57 (1H, s, 14-CHO), 6.45 (1H, s, H-4), 5.08 (1H, t, $J=6.9$ Hz, H-16), 3.36 (3H, s, H-20), 3.10 (2H, m, H-15), 2.58 (3H, s, H-21), 1.66 (3H, d, $J=1.5$ Hz, H-19), 1.61 (3H, d, $J=1.3$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 201.0 (C-13), 192.2 (C-14), 163.0 (C-3), 162.5 (C-5), 157.7 (C-12), 156.0 (C-8), 146.7 (C-1), 146.6 (C-10), 136.4 (C-17), 120.5 (C-16), 119.6 (C-11), 116.0 (C-7), 115.7 (C-6), 112.3 (C-2), 104.0 (C-4), 61.6 (C-20), 26.5 (C-15), 25.9 (C-19), 19.5 (C-21), 17.9 (C-18). 以上波谱数据与文献 [14] 报道一致, 故鉴定化合物**8**为 pestalone.

化合物**9**: 无色油状, 易溶于二氯甲烷、甲醇. ESI-MS: m/z 325 $[M + H]^+$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.98 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-7), 5.74 (1H, d, $J=7.4$ Hz, H-5), 5.31 (s, 1H), 5.25 (1H, m, H-2), 4.49 (1H, d, $J=10.2$ Hz, H-6), 4.31 (1H, d, $J=10.7$ Hz, H-14), 3.15 (1H, dd, $J=10.5$, 7.9 Hz, H-9), 2.63 (1H, t, $J=11.1$ Hz, H β -3), 2.38 (1H, dd, $J=10.7$, 4.3 Hz, H α -3), 2.06 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H β -10), 1.96 (3H, s, H-15), 1.67 (1H, dd, $J=12.6$, 10.6 Hz, H α -10), 1.13 (d, $J=11.3$ Hz, H-13), 1.06 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 170.2 (CO), 140.4 (C-7), 136.9 (C-8), 133.0 (C-4), 129.9 (C-5), 81.5 (C-1), 79.3 (C-2), 76.1 (C-6), 67.2 (C-4), 56.0 (OMe), 55.7 (OMe), 41.7 (C-11), 41.0 (C-9), 40.4 (C-3), 33.8 (C-10), 24.3 (C-13), 23.7 (C-12), 21.6, 21.5 (COCH₃), 17.6 (C-15). 以上波谱数据与文献 [15] 报道一致, 故鉴定化合物**9**为 pestalotiopsins B.

化合物**10**: 无色油状, 易溶于二氯甲烷. ESI-MS: m/z 333 $[M + Na]^+$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.75 (1H, dd, $J=6.0$, 2.7 Hz, H-7a), 5.72 (1H, d, $J=5.9$ Hz, H-6), 5.35 (1H, dd, $J=10.4$, 5.7 Hz, H-2), 4.18 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H-5), 3.47 (1H, d, $J=11.8$ Hz, H-14a), 2.56 (1H, dd, $J=12.8$, 8.0 Hz, H-9), 2.13 (1H, dd, $J=12.8$, 9.2 Hz, H-10b), 2.08 (1H, dd, $J=6.5$, 4.0 Hz, H-3b), 2.05 (3H, s, 2-OAc), 1.80 (1H, dd, $J=13.6$, 10.4 Hz, H-3a), 1.62 (1H, m, H-10a), 1.16 (3H, s, H-12), 1.10 (6H, d, $J=6.9$ Hz, H-13, 15); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 170.1 (2-OAc), 141.9 (C-7a), 130.1 (C-6), 87.4 (C-5), 80.3 (C-3), 72.2 (C-2), 62.1

(C-14), 55.2 (C-4), 55.0 (C-8), 46.9 (C-9), 42.5 (C-11), 36.4 (C-3a), 35.0 (C-10a), 23.4 (C-15), 23.2 (C-12), 23.2 (C-13), 21.3 (2-OAc). 以上波谱数据与文献 [16] 报道一致, 故鉴定化合物 **10** 为 pestaloporinate F.

2.2 抗菌活性研究

采用微板观察法检测 10 个靶标化合物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)、铜绿假单胞菌 (PA) 和枯草芽孢杆菌 (Bs) 的最小抑菌浓度, 其中化合物 **8** 显示出较强的体外抑菌活性, 其 IC_{50} 值为 $11.0 \mu\text{mol/L}$, 其余化合物的 IC_{50} 值均大于 $50 \mu\text{mol/L}$, 阳性药物氨苄青霉素为 $3.3 \mu\text{mol/L}$.

3 讨论与结论

3.1 讨论

毛地黄的共附生真菌呈现多样性, 其共附生的拟盘多毛孢菌对宿主具有致病性, 因此研究拟盘多毛孢菌的代谢产物有一定的科学价值. 因拟盘多毛孢菌的广泛分布与致病性, 还可以深入挖掘其生物学意义. 本论文旨在对两株菌的代谢产物进行研究, 得到多种类型的化合物, 包括内酯类、Ambuic acid 等. 化合物 **1~3** 为拟盘多毛孢属中的特征类型化合物, 其中化合物 **1** 被报道具有较好的蛋白酶抑制活性; 化合物 **2** 为 Ambuic acid 类似物, 作为植物毒素; 化合物 **3** 属于苯环衍生物成分, 报道较少; 化合物 **4~7** 比较常见; 化合物 **8** 属于含卤素的二苯甲酮类化合物; 化合物 **9** 和 **10** 属于一类结构较为复杂的倍半萜成分. 以上化学成分呈现出多样性, 但是也符合该菌的代谢特点, 再次证明该菌的代谢呈现稳定性, 在不同的培养基中均能产生该类成分.

3.2 结论

本文从 2 株拟盘多毛孢菌的大米发酵物中分离并鉴定了 10 个化合物, 通过体外抑菌实验发现化合物 **8** 具有较好的抑菌活性, 对 MRSA 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值 $11.0 \mu\text{mol/L}$. 本研究结果表明, 以植物共附生真菌为资源开发新型抑菌剂是一个具有潜力的研究方向.

[参考文献]

- [1] 洋地黄 (Digitalis) [J]. 国外医药 (植物药分册), 2006, 21 (5): 226-227.
- [2] 杨艳峰. 毛地黄繁殖与养护 [J]. 中国花卉园艺, 2023 (6): 65-66.
- [3] 陈霏雯, 彭家茵, 陈茵宜, 等. 拟盘多毛孢属活性次级代谢产物的研究进展 [J]. 华西药理学杂志, 2019, 34 (5): 519-525.
- [4] STROBEL G, YANG X, SEARS J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. Microbiology, 1996, 142 (2): 435-440.
- [5] STROBEL G A, HESS W M, LI J Y, et al. *Pestalotiopsis guelpinii*, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, *Wollemia nobilis* [J]. Australian Journal of Botany, 1998, 45 (6): 1073-1082.
- [6] 张鹏, 刘博, 周蓬蓬, 等. 一株产紫杉醇内生真菌 YN6 的分离及鉴定 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27 (10): 961-967.
- [7] 张宏岐, 刘呈雄, 邓张双, 等. 斑茅内生真菌 *Nigrospora* sp. BM-2 次级代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30 (10): 1734-1737, 1768.
- [8] SUN J F, LIN X, ZHOU X F, et al. Pestalols A-E, new producer of alkenyl phenol and benzaldehyde derivatives from endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. AcBC2 isolated from the Chinese mangrove plant *Aegiceras corniculatum* [J]. The Journal of Antibiotics, 2014, 67 (6): 451-457.
- [9] KOSHINO H, YOSHIHARA T, OKUNO M, et al. *Epichloe typhina*, a producer of novel antifungal compounds gamahonolides A, B, and gamahorin, isolated from stromata on *Phleum pratense* [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1992, 56 (7): 1096-1099.
- [10] 马帅, 张金秀, 赵立强, 等. 黄乳牛肝菌化学成分分析 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (8): 1357-1362.
- [11] 刘桃芳, 汤华, 李玲, 等. 中国南海紫柳珊瑚中过氧化甾醇类化学成分的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2011, 32 (5): 469-472.
- [12] 翟晓东, 孙磊, 吴德玲, 等. 凤丹皮内生真菌 *Alternaria arborescens* 发酵产物中甾醇类化合物 [J]. 中南药理学, 2023,

- 21 (5) : 1203-1207.
- [13] DONG J Y, SONG H C, LI J H, et al. Ymf 1029A-E, preussomerin analogues from the fresh-water-derived fungus YMF 1. 01029 [J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71 (6) : 952-956.
- [14] CUETO M, JENSEN P R, KAUFFMAN C, et al. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge [J]. *Journal of Natural Products*, 2001, 64 (11) : 1444-1446.
- [15] TAYONE W C, NISHIYAMA M, TANAKA K, et al. DFT supported structural elucidations of seiridiasteriscane A, unique 15-nor-asteriscane and novel pestalotiopsin congeners from *Seiridium* sp. KT3957 [J]. *Tetrahedron*, 2020, 76 (20) : 131197.
- [16] LIU Y, YANG M H, WANG X B, et al. Caryophyllene sesquiterpenoids from the endophytic fungus, *Pestalotiopsis* sp [J]. *Fitoterapia*, 2016, 109 : 119-124.

Study on Chemical Constituents of Two Epiphytic Fungi *Pestalotiopsis* sp. Isolated from *Digitalis purpurea* L.

QU Tiantian^{1,2}, YAN Xiaomei^{1,2}, TANG Xiangqin², ZHANG Hourun²,
JIANG Ruijin², YIN Zili¹, ZHU Changcheng³, HE Jiangbo²

(1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China;

2. School of Medicine, Kunming University, Kunming 650214, Yunnan, China;

3. Yunnan Pilot Free Trade Zone Rui Zhicheng Pharmaceutical Technology Co., LTD, Kunming 650000, Yunnan, China)

Abstract: To study the chemical constituents of *Pestalotiopsis* sp, a coepiphyte fungus derived from *Digitalis purpurea* L. After the solid-state fermentation of rice, modern chromatographic separation methods are used to extract and separate the fermented products. The structures of monomeric compounds were determined by NMR, MS, and comparison with references. Finally, the microplate method was used to determine the antibacterial activity of the compounds. Six compounds were isolated from the rice fermented product of *Pestalotiopsis* sp. (MDH-3), which are respectively: pestalotiopyrone G (**1**), pestalol A (**2**), gamahorin (**3**), uracil (**4**), (22*E*, 24*S*)-5 α , 8 α -epidioxy-24-methyl-cholesta-6, 22-dien-3 β -ol (**5**), 5 α , 8 α -epidioxyergosta- (22*E*, 24*R*)-6, 9, 22-trien-3 β -ol (**6**). Among them, compounds 2 and 3 were isolated from this species for the first time; Four compounds were isolated from the rice fermentation product of *Pestalotiopsis* sp. (MDH-6), which are respectively: 4, 8-dihydroxy-3, 4-dihydronaphthalen-1 (2*H*)-one (**7**), pestalone (**8**), pestalotiopsins B (**9**), and pestaloporinate F (**10**). The results of the activity test showed that the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of compound **8** for inhibiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was 11.0 μ mol/L. The research results have expanded the understanding of the chemical constituents and pharmacological activities of *Pestalotiopsis* sp., and laid a foundation for further in-depth studies.

Key words: *Digitalis purpurea* L; *Pestalotiopsis* sp; chemical constituents; structure identification

(责任编辑: 陈伟超)