

桶状海绵共生真菌 *Penicillium rolfsii* 8196# 次级代谢产物*

郑娜妹¹, 刘洪亮¹, 唐凤婷¹, 李锦俊¹, 张轩¹, 杜志云¹, 黄华容¹, 刘岚²

1. 广东工业大学生物医药学院, 广东 广州 510006
2. 中山大学海洋科学学院, 广东 珠海 519082

摘要: 对桶状海绵共生真菌 *Penicillium rolfsii* 8196# 的次级代谢产物进行了研究, 通过大米固体发酵培养、多种色谱技术分离纯化以及核磁共振、质谱等波谱数据分析, 鉴定了9个化合物 3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-4-methyl-benzoic acid methyl ester (1)、methyl asterrate (2)、penicillither (3)、methyl dichloroasterrate (4)、2,4-dichloroasterric acid (5)、asterric acid (6)、5-hydroxymethylasterric acid (7)、sulochrin (8)、hydroxysulochrin (9), 其中化合物 1、2、7 首次从青霉属真菌中分离得到。MTT 法测试细胞毒活性, 表明化合物 6 对 T-24 细胞有细胞毒性, IC₅₀ 值为 16.60 μmol/L; 二倍稀释法抗菌活性测试显示, 化合物 4、5 对沙门氏菌有弱抗菌活性, 其 MIC 值均为 50 μmol/L; ABTS 自由基清除实验中发现化合物 8 和 9 在浓度为 10 μmol/L 时具有强抗氧化活性, 自由基清除率分别达到了 79.81%、70.84%。

关键词: 海绵共附生真菌; 青霉属; 次级代谢产物

中图分类号: O629.9 文献标志码: A 文章编号: 2097-0137(2025)03-0012-07

The secondary metabolites of the marine-derived fungus *Penicillium rolfsii* 8196 isolate from sponge *Xestospongia* sp.

ZHENG Namei¹, LIU Hongliang¹, TANG Fengting¹, LI Jinjun¹,
ZHANG Xuan¹, DU Zhiyun¹, HUANG Huarong¹, LIU Lan²

1. School of Biomedicine, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China
2. School of Marine Science, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519082, China

Abstract: Nine known aromatic compounds (1–9) were isolated from the ethyl acetate extracts of the solid cultures of marine-derived fungus *Penicillium rolfsii* 8196#, isolated from sponge *xestospongia* sp.. Their structures were elucidated by spectroscopic analysis and comparative investigation with references. These compounds were evaluated for their cytotoxic, antibacterial and antioxidant activities. Among them, Compound 6 showed cytotoxicity against human bladder cancer T-24 cells with the IC₅₀ values of 16.60 μmol/L, compounds 4 and 5 exhibited weak inhibitory effects against *Salmonella* with MIC values of 50 μmol/L, and compounds 8 and 9 showed the free radical scavenging rate 79.81% and 70.84% at the concentration of 10 μmol/L, respectively.

Key words: marine-derived fungus; *Penicillium* sp.; secondary metabolites

* 收稿日期: 2024-11-15 录用日期: 2025-01-03 网络首发日期: 2025-01-20

基金项目: 教育部省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室开放基金
(CMEMR2022-B03)

作者简介: 郑娜妹(2001年生), 女; 研究方向: 天然药物化学; E-mail: 2112312016@mail2.gdut.edu.cn
通信作者: 黄华容(1978年生), 女; 研究方向: 海洋天然药物化学; E-mail: hrhuang@gdut.edu.cn

全文阅读



ZR20240327

海洋环境具有高盐、高压、低氧、极端温度等特征。特殊环境使得许多海洋生物演化出独特的代谢途径, 能够产生具有良好生物活性、结构新颖的化合物(金黎明等, 2016)。海洋海绵是天然产物的重要来源之一。海绵本身的防御能力弱, 但与海绵共生的微生物往往能产生具有良好生物活性的次级代谢产物保护宿主, 抵抗外界入侵者。已有研究报道从海绵共生真菌中发现具有抗菌、抗炎、抗氧化等活性的多种类型化合物(Pang et al., 2018; Sun et al., 2020; Lu et al., 2024)。为了寻找结构新颖, 具有良好生物活性的海洋天然化合物, 课题组对1株源于桶状海绵共生的海洋真菌 *Penicillium rolfsii* 8196# 的次级代谢产物进行研究, 分离鉴定了9个化合物(图1), 其中化合物1为卤代芳香化合物, 化合物2-7为二苯醚类化合物, 化合物8-9为二苯甲酮类化合物, 对其抗肿瘤、抗菌以及抗氧化等生物活性进行测试, 以挖掘具有作为药物先导物价值的化合物。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及材料

Bruker-Advance 400 MHz 核磁共振波谱仪(瑞

士 Bruker 公司), MAT95XP 高分辨质谱仪(美国 Thermofisher 公司), LC-6AD 半制备型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), LCQ 型低分辨质谱仪, X 射线晶体衍射仪(Bruker D8 VENTURE MetalJet 和日本理学 SuperNova 双微焦斑), 液相色谱柱(日本 Shimadzu 公司), Varioskan LUX 多功能酶标仪(广州联波生物科技有限公司), 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(美国 Pharmacia 公司), SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州净化设备有限公司), 柱层析硅胶(200~300 目)(青岛海洋化工公司), HPLC 用甲醇(安耐吉), 乙腈(安耐吉)为色谱纯, 其他试剂则为分析纯。

真菌 8196# 分离于广东珠海庙湾岛附近海域采集的桶状海绵(采集时间 20180710)。利用 PCR 技术扩增该真菌核糖体 ITS 基因区段(GenBank 号 PQ578635), 与 NCBI 菌株数据库对比, 鉴定出真菌 8196# 为 *Penicillium rolfsii*。目前该菌株保存在广东工业大学天然药物实验室。抗菌试验选用菌株: 沙门氏菌(*Salmonella* ATCC 14028), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* 29213), 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* 47085) 引自南洋理工大学并保存于广东工业大学天然药物实验室。

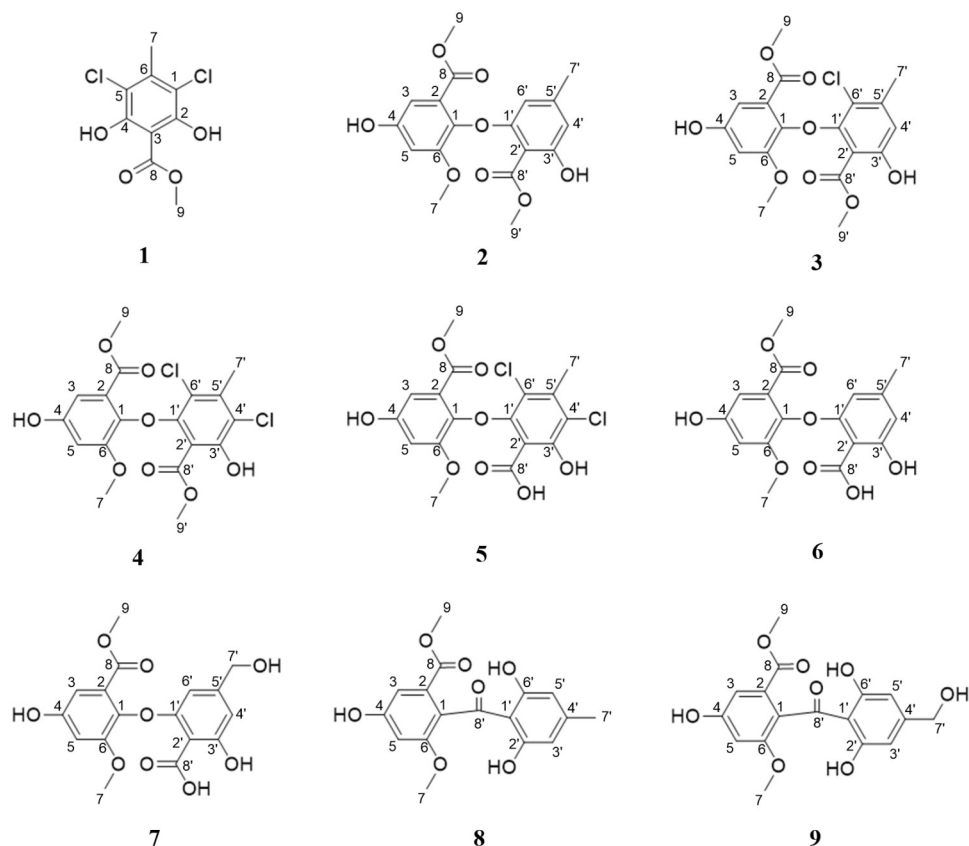


图1 化合物1~9的结构

Fig. 1 The structures of compounds 1-9

1.2 菌株培养发酵

采用丁唯嘉等(2021)相似的方法培养菌液后,大米培养基(550 mL带盖圆口瓶,每瓶25 g大米,40 mL质量分数为3%的海盐水)高压灭菌后,倒入菌液,室温培养30 d,共发酵80瓶。

1.3 提取与分离

发酵物用甲醇浸泡提取3次,浓缩完的甲醇提取物用等体积的水-乙酸乙酯萃取3次,收集乙酸乙酯相进行浓缩处理,最终得到10.2 g的粗提取物浸膏。粗提取物采用正相硅胶柱(200~300目)进行粗分离,以EtOAc-PE为洗脱剂进行梯度洗脱EtOAc:PE(3:7,1:1,7:3,1:0,体积比,下同)分段为4个部分Fr.1~4。

组份Fr.1(900 mg)采用硅胶柱层析[5 cm × 70 cm, 300~400目,EtOAc:PE(1:9,3:7,1:1)进行分离纯化,得到3个部分Fr.1-1~Fr.1-3,其中Fr.1-1(220 mg)继续使用硅胶柱进行分离[4 cm × 70 cm, 300~400目,DCM:MeOH(30:1),体积比,下同]得到化合物1(21 mg)。

组份Fr.3(1.4 g)采用硅胶柱进行梯度分离[8 cm × 70 cm, 300~400目,EtOAc:PE(3:7,1:1,6:4,7:3)]进行分离纯化,得Fr.3-1~Fr.3-4。Fr.3-1(199 mg)经硅胶柱层析分离[3.5 cm × 80 cm, 300~400目,DCM:MeOH(15:1)]得到化合物3(7 mg),Fr.3-2(330.2 mg)经高效液相色谱分离[C₁₈柱, Shimadzu 20 mm × 250 mm, 5 μm, 10.0 mL/min, 0~45 min, MeOH:H₂O(11:9), 体积比,下同],分离得到化合物2(590.9 mg, $t_R = 25$ min)和化合物3(5.1 mg, $t_R = 40$ min); Fr.3-3(90.3 mg)通过高效液相色谱分离[C₁₈柱, Shimadzu 20 mm × 250 mm, 5 μm, 10.0 mL/min, 0~60 min, MeOH:H₂O(7:13)],最终得到化合物4(30.1 mg, $t_R = 50$ min)和化合物9(16.3 mg, $t_R = 30$ min)。Fr.3-4(467.2 mg)经制备液相色谱分离[C₁₈柱, Shimadzu 20 mm × 250 mm, 5 μm, 10.0 mL/min, 0~35 min, ACN:H₂O(7:13)],得到化合物8(26.1 mg, $t_R = 10$ min)和化合物6(6.3 mg, $t_R = 25$ min)。

组份Fr.4(3.0 g)采用反相硅胶柱[6.0 cm × 60 cm, ODS-A-HG, MeOH:H₂O(3:7,1:1,7:3,1:0)]梯度洗脱,得到Fr.4-1~Fr.4-3。Fr.4-1(81 mg)经硅胶柱层析分离[3.5 cm × 80 cm, 300~400目,DCM:MeOH(10:1)]得到化合物5(9 mg),Fr.4-2(500 mg)使用葡聚糖凝胶Sephadex LH-20进行分离[1.0 cm × 80 cm, MeOH:H₂O(1:1)],最终得到化合物7(3.8 mg)。

1.4 活性测试

1.4.1 抑菌活性 采用二倍稀释法(卢平等, 2023),对化合物1~9体外对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),沙门氏菌(*Salmonella*)的最低抑菌浓度(MIC)进行测试,阳性对照为环丙沙星。将待测化合物溶解,配制为浓度256 μmol/L的溶液。在96孔板中加入吸光度 A_{600nm} 为0.01的菌液100 μL,再分别加入100 μL的待测化合物溶液,使化合物终浓度依次为128、64、32、16、8、4 μmol/L。放置于37 °C培养箱中12~24 h后于酶标仪600 nm处测量 A 值。通过肉眼观察澄清孔处以及吸光度值变化不大的孔处化合物浓度即为最小抑菌浓度(MIC)。实验结果表明,化合物4、5对沙门氏菌有弱抗菌活性,其MIC值均为50 μmol/L(表1)。

表1 化合物最小抑菌浓度试验结果

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) test of

化合物	compounds		
	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	沙门氏菌
1	> 128	> 128	> 128
2	> 128	> 128	> 128
3	> 128	> 128	> 128
4	> 128	> 128	50
5	> 128	> 128	50
6	> 128	> 128	> 128
7	> 128	> 128	> 128
8	> 128	> 128	> 128
9	> 128	> 128	> 128
环丙沙星	0.76	2.11	5.98

1.4.2 肿瘤细胞增殖的影响 以吉西他滨为阳性对照,通过MTT法(Ezzat et al., 2022)分析化合物1~9抑制人膀胱癌T-24细胞株的细胞增殖影响。二倍稀释法使每孔化合物终浓度为51.2、25.6、12.8、6.4、3.2和1.6 μmol/L。平行3个复孔,加药培养72 h后,吸去96孔板内的液体,每孔再加入适量DMSO,震荡使其充分溶解,于酶标仪490 nm处测量 A 值,平行3次实验。化合物6的IC₅₀值为16.60 μmol/L,其他化合物的IC₅₀值均大于51.2 μmol/L。细胞增殖抑制率

$$I = [(1 - A_{\text{样品组}}) / A_{\text{对照组}}] \times 100\%$$

1.4.3 抗氧化活性 通过测定化合物1~9对ABTS自由基的清除效果评估其抗氧化能力(Nan et al., 2024),维生素C(V_C)作为阳性对照组。将待测样

品配制为浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 取 100 μL 样品溶液与 100 μL 配置好的 ABTS 工作液一同加入到 96 孔板中, 平行 3 个复孔, 放置于黑暗处反应 10~20 min 后, 于波长 734 nm 下测定样品吸光值。平行 3 次实验。最终结果显示化合物 **8**、**9** 在浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 时具有强抗氧化活性, 自由基清除率 (R) 分别为 79.81%、70.84% (表 2)。

$$R = [(A_{\text{ABTS 溶液}} - A_{\text{样品组}}) / A_{\text{ABTS 溶液}}] \times 100\%$$

表 2 化合物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的抗氧化活性

Table 2 Antioxidant activity for compounds with concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ %

化合物	自由基清除率	化合物	自由基清除率
1	51.86	6	60.46
2	65.25	7	57.04
3	53.12	8	79.81
4	63.39	9	70.84
5	64.32	V _c	95.14

1.5 化合物的波谱数据

化合物 **1**: $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_4$, 白色针状晶体, ESI-MS m/z 252.01 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 252.01:254.01:256.01 离子峰强度之比约为 9:6:1, θ_{mp} 210~212 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 10.14 (1H, s, OH-2), 10.14 (1H, s, OH-4), 2.54 (3H, s, H-7), 4.13 (3H, s, H-9); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 169.4 (C-8, C), 154.4 (C-1, C), 154.4 (C-5, C), 144.2 (C-2, C), 144.2 (C-4, C), 113.8 (C-3, C), 99.2 (C-6, C), 53.8 (C-9, CH_3), 19.0 (C-7, CH_3)。

化合物 **2**: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_8$, 无色晶体, ESI-MS m/z 385.09 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, θ_{mp} 170~175 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 6.75 (1H, s, H-3), 6.75 (1H, s, H-5), 6.31 (1H, s, H-4'), 5.63 (1H, s, H-6'), 3.76 (3H, s, H-9'), 3.69 (3H, s, H-7), 3.62 (3H, s, H-9), 2.06 (3H, s, H-7'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 167.1 (C-8', C), 165.3 (C-8, C), 157.1 (C-1', C), 156.5 (C-3', C), 155.1 (C-1, C), 153.5 (C-6, C), 141.3 (C-5', C), 133.8 (C-4, C), 125.7 (C-2, C), 109.5 (C-4', CH), 107.5 (C-3, CH), 107.3 (C-2', C), 104.8 (C-5, CH), 104.4 (C-6', CH), 56.1 (OCH_3 -7, CH_3), 52.1 (OCH_3 -9, CH_3), 51.9 (OCH_3 -9', CH_3), 21.4 (C-7', CH_3)。

化合物 **3**: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClO}_8$, 淡黄色晶体, ESI-MS m/z 397.06 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 397.06:399.06 离子峰强度之比约为 3:1, θ_{mp} 170~175 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 9.97 (1H, brs, 3'-OH), 6.73 (1H, d, 2.8 Hz, H-3), 6.64 (1H, d, 2.9, H-5), 6.48 (1H, s, H-4'), 3.22 (3H, s, H-7), 3.61 (3H, s, H-9), 3.60 (3H, s, H-9'), 2.26 (3H, s,

H-7'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 164.7 (C-8', C), 164.7 (C-8, C), 154.6 (C-1', C), 154.1 (C-3', C), 153.0 (C-4, C), 150.7 (C-6, C), 137.8 (C-5', C), 135.5 (C-1, C), 124.4 (C-2, C), 113.0 (C-6', C), 111.1 (C-4', CH), 110.7 (C-3, CH), 107.4 (C-2', C), 104.7 (C-5, CH), 56.1 (OCH_3 -7, CH_3), 51.8 (OCH_3 -9', CH_3), 51.6 (OCH_3 -9, CH_3), 20.2 (C-7', CH_3)。

化合物 **4**: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_8$, 淡黄色固体, HRESI-MS m/z 429.015 41 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 429.015 41:431.012 39:433.009 28 离子峰强度之比约为 9:6:1, θ_{mp} 147~150 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 6.86 (1H, d, 2.9 Hz, H-3), 6.55 (1H, d, 2.9 Hz, H-5), 3.8 (3H, s, H-7), 3.74 (3H, s, H-9), 3.51 (3H, s, H-9'), 2.49 (3H, s, H-7'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 170.1 (C-8', C), 166.8 (C-8, C), 155.4 (C-1', C), 152.5 (C-6, C), 151.5 (C-4, C), 151.1 (C-3', C), 141.6 (C-5', C), 139.2 (C-1, C), 123.3 (C-2, C), 118.4 (C-4', C), 117.9 (C-6', C), 108.6 (C-3, CH), 106.7 (C-2', C), 105.3 (C-5, CH), 56.7 (OCH_3 -7, CH_3), 53.1 (OCH_3 -9, CH_3), 52.6 (OCH_3 -9', CH_3), 18.8 (OCH_3 -7', CH_3)。

化合物 **5**: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_8$, 棕色固体, HR ESI-MS m/z 414.999 71 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 414.999 71:416.996 66:418.993 59 离子峰强度之比约为 9:6:1, θ_{mp} 231~234 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 9.37 (1H, s, 4-OH), 6.52 (1H, s, H-3), 6.52 (1H, s, H-5), 3.54 (3H, s, H-9), 3.45 (3H, s, H-7), 2.35 (3H, s, H-7'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 167.2 (C-8', C), 166.2 (C-8, C), 159.9 (C-1', C), 152.8 (C-2', C), 151.6 (C-4, C), 150.9 (C-6, C), 139.3 (C-1, C), 135.4 (C-5', C), 122.4 (C-2, C), 116.6 (C-4', C), 113.3 (C-6', C), 110.9 (C-3', C), 107.2 (C-3, CH), 105.1 (C-5, CH), 56.6 (OCH_3 -7, CH_3), 51.6 (OCH_3 -9, CH_3), 18.1 (C-7', CH_3)。

化合物 **6**: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_8$, 白色固体, EI-MS m/z 348 $[\text{M}]^+$, θ_{mp} 176~180 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 11.18 (1H, brs, 3'-OH), 9.90 (1H, s, 4-OH), 6.77 (1H, s, H-3), 6.77 (1H, s, H-5), 6.32 (1H, s, H-6'), 5.65 (1H, s, H-4'), 3.69 (3H, s, H-7), 3.61 (3H, s, H-9), 2.07 (3H, s, H-7'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 170.3 (C-8', C), 165.1 (C-8, C), 159.8 (C-3', C), 158.5 (C-1', C), 155.1 (C-4, C), 153.4 (C-6, C), 143.3 (C-5', C), 134.0 (C-1, C), 125.4 (C-2, C), 109.9 (C-4', CH), 107.6 (C-3, CH), 105.0 (C-6', CH), 104.7 (C-5, CH), 104.2 (C-2', C), 56.1 (OCH_3 -7, CH_3), 52.1 (OCH_3 -9, CH_3), 21.5 (C-7', CH_3)。

化合物 **7**: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_9$, 淡黄色粉末, ESI-MS m/z

387.07 $[M+Na]^+$, θ_{mp} 155~160 °C; 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ_H 12.24 (1H, brs, 8'-OH), 9.87 (1H, s, 4-OH), 6.77 (1H, s, H-3), 6.77 (1H, s, H-5), 6.42 (1H, d, 1.3 Hz, H-6'), 5.81 (1H, d, 1.3 Hz, H-4'), 5.12 (1H, t, 10.0 Hz, OH-7'), 4.25 (2H, d, 4.8 Hz, H-7'), 3.68 (3H, s, H-7), 3.61 (3H, s, H-9); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ_C 169.9 (C-8', C), 165.1 (C-8, C), 160.8 (C-1', C), 158.4 (C-3', C), 154.9 (C-4, C), 153.4 (C-6, C), 147.5 (C-5', C), 135.3 (C-1, C), 125.4 (C-2, C), 107.5 (C-3, CH), 106.6 (C-6', CH), 104.9 (C-5, CH), 105.8 (C-2', C), 101.1 (C-4', CH), 62.2 (C-7', CH₂), 56.1 (OCH₃-7, CH₃), 52.0 (OCH₃-9, CH₃).

化合物 8: C₁₇H₁₆O₇, 淡黄色粉末, ESI-MS m/z 333.09 $[M+H]^+$, θ_{mp} 147~148 °C; 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ_H 6.88 (1H, d, 2.0 Hz, H-3), 6.66 (1H, d, 2.1 Hz, H-5), 5.96 (1H, s, H-3'), 5.75 (1H, s, H-5'), 3.62 (3H, s, H-7), 3.61 (3H, s, H-9), 2.12 (3H, s, H-7'); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ_C 199.6 (C-8', C), 165.7 (C-8, C), 162.8 (C-2', C), 162.8 (C-6', C), 158.2 (C-4, C), 156.7 (C-6, C), 147.1 (C-4', C), 127.7 (C-2, C), 126.4 (C-1, C), 109.5 (C-1', C), 107.3 (C-3', CH), 107.3 (C-5', CH), 106.7 (C-3, CH), 103.5 (C-5, CH), 55.9 (OCH₃-7, CH₃), 51.9 (OCH₃-9, CH₃), 21.6 (C-7', CH₃).

化合物 9: C₁₇H₁₆O₈, 淡黄色固体, ESI-MS m/z 371.08 $[M+Na]^+$, θ_{mp} 212~213 °C; 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ_H 6.90 (1H, d, 2.1 Hz, H-3), 6.68 (1H, d, 2.1 Hz, H-5), 6.23 (1H, s, H-3'), 6.23 (1H, s, H-5'), 4.35 (2H, s, H-7'), 3.64 (3H, s, H-7), 3.63 (3H, s, H-9); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ_C 199.8 (C-8', C), 165.7 (C-8, C), 161.7 (C-2', C), 161.7 (C-6', C), 158.1 (C-4, C), 156.8 (C-6, C), 152.2 (C-4', C), 127.9 (C-2, C), 126.2 (C-1, C), 109.8 (C-1', C), 107.2 (C-3', CH), 107.2 (C-5', CH), 104.1 (C-3, CH), 103.4 (C-5, CH), 62.4 (C-7', CH₂), 56.0 (OCH₃-7, CH₃), 52.1 (OCH₃-9, CH₃).

1.6 化合物 1、2 和 3 晶体结构

化合物 1 的单晶衍射数据由 Bruker D8 Venture MetalJet X 射线单晶衍射仪, 以 Ga- $K\alpha$ 为辐射源测试得到; 化合物 2 和 3 的单晶衍射数据由日本理学 SuperNova 双微焦斑 X 射线单晶衍射仪, 以 Cu- $K\alpha$ 为辐射源测试得到。晶体结构图用 Diamond 4.0 绘制。化合物 1、2 和 3 晶体结构的 CCDC 号为 2402560-2402562。

2 结果与讨论

化合物 1: ESI-MS m/z 252.01 $[M+H]^+$. 1H NMR

谱图显示 2 个活泼氢信号 δ_H 10.14 (1H, s, OH-2), 10.14 (1H, s, OH-4) 以及 2 个甲基氢信号 δ_H 2.54 (3H, s, H-7), 4.13 (3H, s, H-9); 其 ^{13}C NMR 谱图显示化合物 1 包含 1 个酯羰基碳信号 δ_C 169.4, 1 个连氧甲基碳信号 δ_C 53.8, 以及 1 个甲基碳信号 δ_C 19.0。检索 ^{13}C -微谱数据库, 发现化合物 1 与 Lightowler et al. (1963) 报道的 3, 5-dichloro-2, 6-dihydroxy-4-methyl-benzoic acid methyl ester 的波谱数据基本一致, 结构中有 2 个氯原子。化合物 1 的 ESIMS 谱图显示 m/z 252.01 $[M+1]^+$: 254.01 $[M+3]^+$: 256.01 $[M+5]^+$ 离子峰强度之比约为 9:6:1, 推测 1 的结构中也含有 2 个氯原子。在室温下, 采用溶剂挥发法(二氯甲烷:甲醇, 体积比约为 1:2)得到化合物 1 的晶体, 分析 X-ray 衍射(Cu 靶)数据, 其晶胞为 $P21/c$ 中心空间群(图 2)。化合物 1 鉴定为 3, 5-dichloro-2, 6-dihydroxy-4-methyl-benzoic acid methyl ester。

化合物 2: ESI-MS m/z 385.09 $[M+Na]^+$, 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据分析其分子式为 C₁₈H₁₈O₈, 计算不饱和度 $\Omega=10$ 。 1H NMR 谱图中明显有 4 个苯环上氢信号 δ_H 6.31 (1H, s, H-4'), 5.63 (1H, s, H-6'), 6.75 (1H, s, H-3), 6.75 (1H, s, H-5), 3 个甲氧基氢信号 δ_H 3.76 (3H, s, H-9'), 3.69 (3H, s, H-7), 3.62 (3H, s, H-9), 1 个甲基氢信号 δ_H 2.06 (3H, s, H-7')。 ^{13}C NMR 谱图呈现出 18 个碳信号, 其中包含 2 个酯羰基碳信号 δ_C 167.1, 165.3, 12 个苯环骨架碳信号 δ_C 157.1, 156.5, 155.1, 153.5, 141.3, 133.8, 125.7, 109.5, 107.5, 107.3, 104.8, 104.4, 3 个连氧碳信号 δ_C 56.1, 52.1, 51.9, 1 个甲基碳信号 δ_C 21.4。化合物 2 结构中包含 2 个苯环、2 个酯基、1 个甲氧基以及 1 个甲基。放置温度约为 4 °C 的低温环境, 甲醇溶剂挥发法得到化合物 2 的晶体, 数据解析后得到其单晶衍射图(图 2)。与 Lee et al. (2002) 报道的化合物 methyl asterrate 波谱数据比对, 鉴定化合物 2 为 methyl asterrate。

化合物 3: 化合物 3 与 2 的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱相似度非常高, 明显不同的是 1H NMR 中, 化合物 3 比化合物 2 少 1 个苯环氢质子。 ^{13}C NMR 谱图中, 化合物 3 的 C-6' 化学位移 (δ_C 113.0) 相比于化合物 2 (δ_C 104.4) 向低场移动, C-5' 化学位移 (δ_C 137.8) 相比于化合物 2 (δ_C 141.3) 向高场移动; 推测化合物 2 的 C-6' 上的氢被吸电子基团取代。在 ESI-MS 质谱分析中, 观察到 m/z 397.06 $[M+1]^+$: 399.06 $[M+3]^+$ 离子峰强度比值接近 3:1, 据此推测 3 的结构存在 1 个氯原子。与 Rukachaisirikul et al. (2014) 的波谱数据进行对比, 基本一致。低温溶剂挥发法(二氯甲烷/甲醇)得到化合物 3 的晶体, 进一步鉴定化合

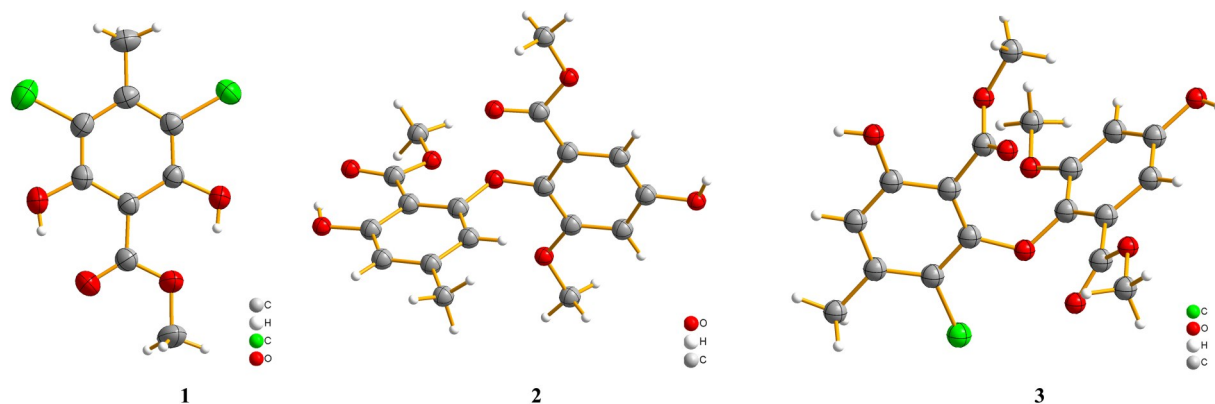


图2 化合物1~3的单晶衍射图

Fig. 2 X-ray diffraction structure of compounds 1-3

物3为penicillither, 其单晶衍射图如图2所示。

化合物4: 化合物4的核磁谱图与化合物3的相似度高, ^1H NMR谱图中化合物4比化合物3少1个芳香氢信号; ^{13}C NMR中, 4的C-4'化学位移相比化合物3向低场移动, C-3'和C-5'化学位移相比化合物3向高场移动, 推测有强吸电子基团取代了C-4'的苯环上的氢原子。HR ESI-MS谱图中, 429.015 41 $[\text{M}-1]^-$: 431.012 39 $[\text{M}+1]^-$: 433.009 28 $[\text{M}+3]^-$ 离子峰强度比值接近9:6:1, 推测4的结构中有2个氯原子。与Hargreaves et al.(2002)核磁波谱数据对照, 基本一致, 化合物4鉴定为methyl dichloroasterrate。

化合物5: 化合物5与4的1D NMR谱图相似, 不同之处在于化合物5的 ^1H NMR比化合物4少1个甲氧基氢信号。 ^{13}C NMR中, 化合物5比化合物4少1个连氧的甲基碳信号, 且羰基C-8'向低场移动, 推测C-8'为羧酸羰基碳信号。另外, HRESI-MS谱图, 414.999 71 $[\text{M}-1]^-$: 416.996 66 $[\text{M}+1]^-$: 418.993 59 $[\text{M}+3]^-$ 离子峰强度比值接近9:6:1, 推断5的结构中也有2个氯原子。与Liu et al.(2015)数据对比, 化合物5确定为2,4-dichloroasterric acid。

化合物6: EI-MS m/z 348 $[\text{M}]^+$, 结合核磁谱图数据推测其分子式是 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_8$, 不饱和度 Ω 为10。化合物6的核磁谱图与化合物2的相似, ^{13}C NMR谱图中, 化合物6比化合物2少了1个连氧甲基碳信号。与Liu et al.(2015)波谱数据对比基本一致, 化合物6鉴定为asterric acid。

化合物7: ESI-MS显示分子离子峰 m/z 为387.07 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 借助核磁共振波谱的数据, 推测它的分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_9$, 计算其 $\Omega=10$ 。波谱数据与化合物6相似, 在 ^1H NMR谱图中, 化合物7相比化合物6多1个活泼氢信号 δ_{H} 5.12(1H, t, 10.0,

$\text{OH}-7'$)和1个亚甲基氢信号 δ_{H} 4.25(2H, d, 4.8, H-7'), 相比化合物6缺少1个甲基氢信号。 ^{13}C NMR图谱中, 化合物7相比化合物6少1个甲基碳信号, 比化合物7多1个亚甲基碳信号 δ_{C} 62.2(C-7'), 所以推断化合物7与化合物6的区别在于C-7'位上的1个甲基氢被羟基取代。与Zhang et al.(2016)的波谱数据对照基本一致, 化合物7鉴定为5-hydroxymethylasterric acid。

化合物8: ESI-MS m/z 333.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 结合一维核磁共振图谱综合分析, 其分子式应该为 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_7$, 不饱和度计算为10。 ^1H NMR谱图中包含4个苯环氢信号 δ_{H} 6.88(1H, d, 2.0, H-3), 6.66(1H, d, 2.1, H-5), 5.96(1H, s, H-3'), 5.75(1H, s, H-5'), 3个甲基氢信号 δ_{H} 3.62(3H, s, H-7), 3.61(3H, s, H-9), 2.12(3H, s, H-7'); ^{13}C NMR谱图显示1个甲基碳信号 δ_{C} 21.6, 2个甲氧基碳信号 δ_{C} 55.9, 51.9, 2个羰基碳信号 δ_{C} 199.6, 165.7, 以及12个苯环碳信号 δ_{C} 162.8, 162.8, 158.2, 156.7, 147.1, 127.7, 126.4, 109.5, 107.3, 107.3, 106.7, 103.5。与Said et al.(2019)波谱数据对照, 鉴定化合物8为sulochrin。

化合物9: ESI-MS m/z 371.08 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 综合 ^1H NMR和 ^{13}C NMR数据推测它的分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_8$, 不饱和度 Ω 为10。化合物9与8的 ^1H NMR和 ^{13}C NMR谱非常相似。两者之间的主要区别是化合物9比化合物8少了1个甲基碳信号, 比化合物8多了1个亚甲基碳信号, 推断化合物9与化合物8的区别在于C-7'位上的1个甲基氢被羟基取代。与Shimada et al.(2003)核磁波谱数据对比基本一致, 鉴定化合物9为hydroxysulochrin。

从桶状海绵共生真菌 *Penicillium rolfsii* 8196#中分离得到上述9个化合物, 其中, 3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-4-methyl-benzoic acid methyl ester(1),

methyl asterrate(2), 5-hydroxymethylasterric acid(7) 为首次从青霉属真菌次级代谢产物中分离得到。已有研究报道了化合物 2 有显著抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 形成的作用(Lee et al., 2002); 化合物 7 显示有抑制 α -葡萄糖苷酶活性(Zhang et al., 2016); 化合物 5 抑制 HL-60(人白血病细胞)、BEL-7402(人肝癌细胞)和 A-549(人肺癌细胞)的细胞增殖活性, 其 IC_{50} 值分别为 21.3、29.2 和 19.3 $\mu\text{mol/L}$ (Liu et al., 2015)。

对所分离化合物进行进一步活性测试, 表 1~2 的结果表明: 化合物 6 对人膀胱癌 T-24 细胞株具有较强的细胞毒性活性, 其 IC_{50} 值为 16.60 $\mu\text{mol/L}$ (阳性对照, 吉西他滨 IC_{50} 值为 4.75 $\mu\text{mol/L}$); 化合物 4、5 有弱的抑制沙门氏菌的活性, MIC 值均为 50 $\mu\text{mol/L}$ (阳性对照, 环丙沙星 MIC 为 5.98 $\mu\text{mol/L}$); 化合物 8、9 在浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时具有较好的抗氧

化活性, 自由基清除率分别达到了 79.81% 和 70.84% (阳性对照, V_c 自由基清除率达 95.14%)。结合活性测试结果初步分析抗氧化活性可能的构效关系发现: 酚羟基邻、对位没有氯原子取代的二苯醚化合物 2 自由基清除率为 65.25%, 而其他邻、对位有氯原子取代的二苯醚化合物 3~7 的自由基清除率均小于 64.4%, 推测邻/对位极性基团(氯原子)的引入增强了分子的极化作用, 减弱了酚羟基与自由基的相互作用, 从而降低化合物的抗氧化能力; 另外含多个酚羟基的二苯甲酮化合物 8 和 9, 其自由基清除率均高于 70%, 表明酚羟基数目的增多, 能明显提高化合物清除自由基的能力, 增强其抗氧化活性。海绵共生真菌次级代谢产物的结构多样性和丰富的生物活性使其在药物开发和生物技术领域有广阔的应用前景。

参考文献:

- 丁唯嘉, 叶浚韬, 余志刚, 等, 2021. 一株红树林真菌 *Fusarium* sp. R5 固相发酵代谢产物[J]. 中山大学学报(自然科学版), 60(5): 136-140.
- 金黎明, 包艳春, 张丽影, 等, 2016. 海藻来源海洋真菌的活性天然产物研究进展[J]. 大连民族大学学报, 18(5): 457-461.
- 卢平平, 黄焰群, 甘月红, 等, 2023. ω -氨基甲基长叶烯的合成, 表征及其抑菌活性[J]. 林产化学与工业, 43(6): 8-16.
- EZZAT S M, TEBA H E S, SHAHIN I G, et al, 2022. Development of semisynthetic apoptosis-inducing agents based on natural phenolic acids scaffold: Design, synthesis and *in-vitro* biological evaluation[J]. *Molecules*, 27(19): 6724.
- HARGREAVES J, PARK J, GHISALBERTI E L, et al, 2002. New chlorinated diphenyl ethers from an *Aspergillus* species[J]. *J Nat Prod*, 65(1): 7-10.
- LEE H J, LEE J H, HWANG B Y, et al, 2002. Fungal metabolites, asterric acid derivatives inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced tube formation of HUVECs[J]. *J Antibiot*, 55(6): 552-556.
- LIGHTOWLER J E, RYLANCE H J, 1963. Substituted dihydroxybenzoic acids as possible anti-inflammatory agents[J]. *J Pharm Pharmacol*, 15(1): 633-638.
- LIU D, YAN L, MA L, et al, 2015. Diphenyl derivatives from coastal saline soil fungus *Aspergillus iizukae* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 38: 1038-1043.
- LU C J, LIANG L F, ZHANG G S, et al, 2024. Carneusones AF, benzophenone derivatives from sponge-derived fungus *Aspergillus carneus* GXIMD00543 [J]. *Mar Drugs*, 22(2): 63.
- NAN Y, GE C, CHEN S, et al, 2024. Exploring the novel antioxidant peptides in low-salt dry-cured ham: Preparation, purification, identification and molecular docking [J]. *Food Chem*, 446: 138697.
- PANG X, LIN X, YANG J, et al, 2018. Spiro-phthalides and isocoumarins isolated from the marine-sponge-derived fungus *Setosphaeria* sp. SCSIO41009 [J]. *J Nat Prod*, 81(8): 1860-1868.
- RUKACHAISIRIKUL V, SATPRADIT S, KLAIKLAY S, et al, 2014. Polyketide anthraquinone, diphenyl ether, and xanthone derivatives from the soil fungus *Penicillium* sp. PSU-RSPG99 [J]. *Tetrahedron*, 70(34): 5148-5152.
- SAID G, HOU X M, LIU X, et al, 2019. Antimicrobial and cytotoxic activities of secondary metabolites from the soft coral derived fungus *Aspergillus* sp [J]. *Chem Nat Compd*, 55: 531-533.
- SHIMADA A, SHIOKAWA C, KUSANO M, et al, 2003. Hydroxysulochrin, a tea pollen growth inhibitor from the fungus *Aureobasidium* sp [J]. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 67(2): 442-444.
- SUN C, ZHANG Z, REN Z, et al, 2020. Antibacterial cyclic tripeptides from Antarctica-sponge-derived fungus *Aspergillus insulicola* HDN151418 [J]. *Mar Drugs*, 18(11): 532.
- ZHANG L H, FENG B M, ZHAO Y Q, et al, 2016. Polyketide butenolide, diphenyl ether, and benzophenone derivatives from the fungus *Aspergillus flavipes* PJ03-11 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 26(2): 346-350.