

## 海绵共附生真菌 *Alternaria* sp. F49 抗氧化次级代谢产物研究

陈雨实, 冷佳荣, 林舒婷, 汪少芸, 田永奇\*

(福州大学生物科学与工程学院, 福建 福州 350108)

**摘要:** 利用硅胶柱色谱、凝胶柱、反向柱色谱和高效液相等手段对海绵共附生真菌 *Alternaria* sp. F49 在 PDB 培养基中的代谢产物进行分离纯化, 从中分离得到了 7 个化合物。通过理化性质、波谱分析方法结合文献对照, 鉴定了化合物的结构分别为: (8*R*)-5-*O*-methyl-orcinotriol (**1**)、orcinotriol (**2**)、 $\alpha$ -acetyl-orcinol (**3**)、3'-hydroxyalternariol 5-*O*-methyl ether (**4**)、altenusiol (**5**)、altenusin (**6**) 和 5'-methoxy-6-methyl-biphenyl-3,4,3'-triol (**7**), 其中 (8*R*)-5-*O*-methyl-orcinotriol (**1**) 是一个未见报道的新苯酚类化合物。体外抗氧化活性测定结果表明, 化合物 **4**~**7** 具有强的 DPPH 自由基清除活性; 化合物 **1**~**7** 具有强的 ABTS 自由基清除活性。

**关键词:** 海绵共附生真菌; *Alternaria* sp. F49; 次生代谢产物; DPPH 自由基清除能力; ABTS 自由基清除能力

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)07-2120-06

## Research on the antioxidant activity of metabolites from a sponge-derived fungus *Alternaria* sp. F49

CHEN Yu-shi, LENG Jia-rong, LIN Shu-ting, WANG Shao-yun, TIAN Yong-qi\*

(College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract:** To study the chemical constituents from the the deep-sea fungus *Alternaria* sp. F49. Seven compounds were isolated from the EtOAc extract by using silica gel, Sephadex LH-20, ODS and HPLC methods. Based on the spectroscopic analysis, their structures were identified as (8*R*)-5-*O*-methyl-orcinotriol (**1**), orcinotriol (**2**),  $\alpha$ -acetyl-orcinol (**3**), 3'-hydroxyalternariol 5-*O*-methyl ether (**4**), altenusiol (**5**), altenusin (**6**), and 5'-methoxy-6-methyl-biphenyl-3,4,3'-triol (**7**). (8*R*)-5-*O*-Methyl-orcinotriol (**1**) is a new phenolic compound which has never been reported in the literature. Compounds **4**–**7** showed strong DPPH free radical scavenging activity; whereas compounds **1**–**7** showed strong ABTS free radical scavenging activity.

**Key words:** sponge-derived fungus; *Alternaria* sp. F49; secondary metabolite; DPPH free radical scavenging activity; ABTS free radical scavenging activity

氧气是人类生存不可缺少的气体, 氧气进入机体后一般以氧分子的形式存在。但当机体发生病理反应时, 氧被还原成超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基, 这些活性氧簇 (ROS) 诱发机体的氧化应激状态后, 破坏机体内的氧化还原平衡, 使得过量的 ROS 堆积而引起体内的脂质、DNA 等细胞成分的损伤, 导致神经退

行性疾病例如阿尔茨海默症, 或是由内分泌紊乱引起的 2 型糖尿病, 以及骨密度、骨质量下降引发的骨质疏松症等疾病<sup>[1-4]</sup>。而持续的氧化应激状态还将造成细胞内信息转导的紊乱进而导致细胞凋亡, 使得机体趋老化、趋弱化<sup>[5-8]</sup>。因此, 开发出新天然抗氧化药物十分重要。

海洋真菌种类繁多, 由于其自身代谢生长途径独特、遗传背景复杂, 其代谢产生的化合物类型多、活性强<sup>[9]</sup>, 其结构类型包括聚酮、生物碱、环肽、大环内酯、萜类等, 大多具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化等<sup>[10-12]</sup>

收稿日期: 2021-12-31; 修回日期: 2022-01-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (42006094).

\*通讯作者 E-mail: tianyongqi@fzu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1868

活性, 是近年来潜力巨大的新型资源, 成为了人们寻找高效低毒药物前体的新来源。链格孢属 (*Alternaria* sp. F49) 是世界经济上最重要的真菌之一, 它在自然界分布广泛, 是多种活性物质的产生菌, 是紫杉烷类、麦角甾酮等天然产物的重要来源, 并且链格孢菌系的天然产物还具有抗癌、抗肿瘤、阻断病毒入侵细胞等<sup>[13,14]</sup>活性, 具有较高的研究价值和潜在的开发应用前景。

本课题组前期实验已从 *Alternaria* sp. F49 的大米发酵产物中分离得到 14 个化合物, 其中 2 个新化合物<sup>[15]</sup>。随后进一步对该菌的 PDB 次级代谢产物进行了提取纯化, 从中分离得到 1 个新苯酚类化合物和 6 个已知化合物 (图 1)。

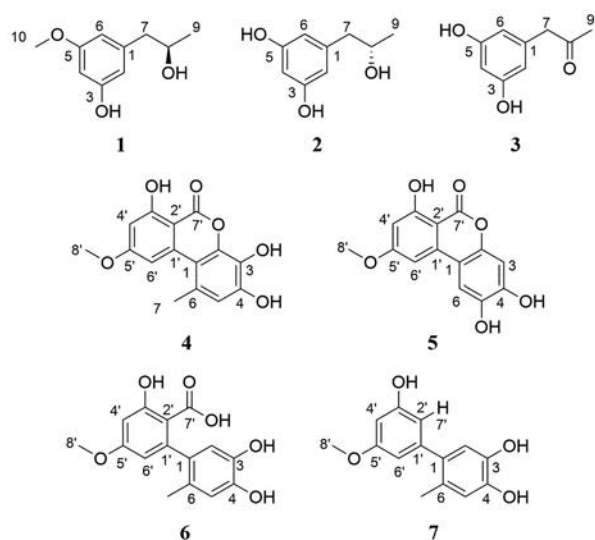


Figure 1 The chemical structures of compounds 1-7

## 结果与讨论

### 1 结构鉴定

**化合物 1** 无色透明油状物, 由高分辨质谱 HR-ESI-MS 得到准分子量为  $m/z$  181.086 6 [M-H]<sup>-</sup>, 并结合核磁谱推测得出该化合物分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, 以此计算出其不饱和度为 4。紫外最大吸收波长  $\lambda_{\max}$  (log $\epsilon$ ) 分别为 204 (4.92)、275 (3.62)、281 (3.66) nm。氢谱显示 9 个信号: 2 个活泼氢信号  $\delta_{\text{H}}$  4.51 (d,  $J = 5.0$  Hz, 8-OH)、9.23 (s, 3-OH), 3 个芳香氢信号  $\delta_{\text{H}}$  6.14 (t,  $J = 2.0$  Hz, H-4)、

6.19 (t,  $J = 2.0$  Hz, H<sub>2</sub>-2,6), 1 个连氧的次甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  3.76 (m, H-8), 1 个亚甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  2.39 (dd,  $J = 13.5, 6.5$  Hz, H-7a)、2.58 (dd,  $J = 13.5, 6.5$  Hz, H-7b), 1 个甲氧基信号  $\delta_{\text{H}}$  3.65 (s, H<sub>3</sub>-10), 1 个甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  1.01 (d,  $J = 6.0$  Hz, H<sub>3</sub>-9)。碳谱显示 10 个信号: 1 个甲基信号  $\delta_{\text{C}}$  23.1 (CH<sub>3</sub>, C-9), 1 个甲氧基信号  $\delta_{\text{C}}$  54.7 (CH<sub>3</sub>, C-10), 1 个亚甲基信号  $\delta_{\text{C}}$  45.7 (CH<sub>2</sub>, C-7), 1 个连氧的次甲基信号  $\delta_{\text{C}}$  67.1 (CH, C-8), 3 个 sp<sup>2</sup> 杂化的次甲基信号  $\delta_{\text{C}}$  98.7 (CH, C-4)、105.8 (CH, C-6)、108.8 (CH, C-2), 3 个 sp<sup>2</sup> 杂化的季碳信号  $\delta_{\text{C}}$  141.6 (C, C-1)、158.1 (C, C-3)、160.1 (C, C-5)。这些数据 (表 1) 都与已知化合物 orcinotriol 基本一致<sup>[16]</sup>, 唯一不同的是化合物 1 (图 2) C-5 上是一个甲氧基。并且通过比对化合物 1 与 orcinotriol 中各自 C-8 位上的旋光性, 发现 orcinotriol 的旋光度值为  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +6.0$  (c 1.1, MeOH), 而化合物 1 则出现相反的旋光度值  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -7.1$  (c 0.22, MeOH), 以此确定化合物 1 中 C-8 的绝对构型为 *R*。因此, 化合物 1 被解析并命名为 (8*R*)-5-*O*-methyl-orcinotriol。

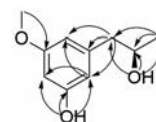


Figure 2 Selected HMBC correlations of compound 1

**化合物 2** 浅黄色油状物, 分子式 C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, HR-ESI-MS  $m/z$  167.078 7 [M-H]<sup>-</sup>, 不饱和度为 4; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  9.01 (1H, s, 3-OH), 6.03 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 6.03 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 6.01 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz, H-4), 4.49 (1H, d,  $J = 4.5$  Hz, 8-OH), 3.72 (1H, m, H-8), 2.52 (2H, dd,  $J = 13.5, 6.5$  Hz, H-7b), 2.29 (2H, dd,  $J = 13.5, 6.5$  Hz, H-7a), 0.99 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-9); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz):  $\delta_{\text{C}}$  158.0 (C, C-3), 158.0 (C, C-5), 141.3 (C, C-1), 107.3 (CH, C-2), 107.2 (CH, C-6), 100.1 (CH, C-4), 67.2 (CH, C-8), 45.7 (CH<sub>2</sub>, C-7), 23.0 (CH<sub>3</sub>, C-9)。这些数据都与文献数据<sup>[16]</sup>基本一致, 因此将该化合物 2 的结构定为 orcinotriol。

**化合物 3** 无色透明油状物, 分子式 C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>, ESI-MS  $m/z$ : 167.07 [M+H]<sup>+</sup>, 不饱和度为 5; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-

Table 1 The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for compound 1 (500/125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $J$  in Hz)

Position	$\delta_{\text{H}}$ , mult	$\delta_{\text{C}}$ , type	Position	$\delta_{\text{H}}$ , mult	$\delta_{\text{C}}$ , type
1		141.6, C	7	2.39, dd (13.5, 6.5) 2.58, dd (13.5, 6.5)	45.7, CH <sub>2</sub>
2	6.19, t (2.0)	108.8, CH	8	3.76, m	67.1, CH
3		158.1, C	9	1.01, d (6.0)	23.1, CH <sub>3</sub>
4	6.14, t (2.0)	98.7, CH	10	3.65, s	54.7, CH <sub>3</sub>
5		160.1, C	3-OH	9.23, s	
6	6.19, t (2.0)	105.8, CH	8-OH	4.51, d (5.0)	

$d_6$ , 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  9.17 (1H, s, 3-OH), 6.09 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz, H-4), 6.04 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 6.04 (1H, t,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 3.50 (2H, s, H-7), 2.06 (3H, s, H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta_{\text{C}}$  206.1 (C, C-8), 158.4 (C, C-3), 158.4 (C, C-5), 136.5 (C, C-1), 107.5 (CH, C-2), 107.5 (CH, C-6), 100.9 (CH, C-4), 51.1 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 29.1 ( $\text{CH}_3$ , C-9)。这些数据都与文献数据<sup>[16,17]</sup>基本一致,因此将该化合物**3**的结构定为 $\alpha$ -acetylorcinol。

**化合物4** 淡橘黄色粉末,分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ , ESI-MS  $m/z$ : 273.07  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 不饱和度为10;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  7.30 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6'), 6.82 (1H, s, H-5), 6.63 (3H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-4'), 3.99 (13H, s, H-8'), 2.74 (3H, s, H-7);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta_{\text{C}}$  167.3 (C, C-5'), 165.8 (C, C-7'), 165.4 (C, C-3'), 148.2 (C, C-4), 142.3 (C, C-2), 139.5 (C, C-1'), 132.4 (C, C-3), 127.3 (C, C-6), 117.7 (CH, C-5), 110.1 (C, C-1), 104.2 (CH, C-6'), 99.7 (CH, C-4'), 99.2 (C, C-2'), 56.3 ( $\text{CH}_3$ , C-8'), 24.9 ( $\text{CH}_3$ , C-7)。这些数据都与文献数据<sup>[18]</sup>基本一致,因此将该化合物**4**的结构定为3'-hydroxyalternariol 5-O-methyl ether。

**化合物5** 橘黄色粉末,分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_6$ , ESI-MS  $m/z$ : 275.05  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 不饱和度为10;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  11.50 (1H, s, 3'-OH), 7.51 (1H, s, H-6), 7.02 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-6'), 6.79 (1H, s, H-3), 6.54 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-4'), 3.92 (3H, s, 5'-OMe);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  166.4 (C, C-5'), 164.6 (C, C-7'), 163.3 (C, C-3'), 148.8 (C, C-2), 143.8 (C, C-4), 143.6 (C, C-5), 130.2 (C, C-1'), 108.7 (CH, C-6), 108.6 (C, C-1), 103.2 (CH, C-3), 99.8 (CH, C-4'), 98.5 (CH, C-2'), 97.8 (CH, C-6'), 55.9 ( $\text{CH}_3$ , 5'-OMe)。这些数据都与文献数据<sup>[19]</sup>基本一致,因此将该化合物**5**的结构定为altenusiol。

**化合物6** 淡黄色固体,分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ , ESI-MS  $m/z$ : 291.08  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 不饱和度为9;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  9.33 (1H, br s, 3'-OH), 8.70 (1H, br s, 4-OH), 8.65 (1H, br s, 3-OH), 6.52 (1H, s, H-5), 6.43 (1H, s, H-2), 6.37 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-4'), 6.11 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-6'), 3.80 (3H, s, 5'-OCH<sub>3</sub>), 1.90 (3H, s, 6-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  175.0 (C, 2'-COOH), 165.9 (C, C-3'), 165.0 (C, C-5'), 148.0 (C, C-1'), 145.0 (C, C-3), 143.0 (C, C-4), 135.5 (C, C-1), 127.5 (C, C-6), 118.0 (CH, C-5), 117.0 (CH, C-2), 111.0 (CH, C-6'), 107.0 (C, C-2'), 101.0 (CH, C-4'), 56.0 ( $\text{CH}_3$ , 5'-OCH<sub>3</sub>), 19.5 ( $\text{CH}_3$ , 6-CH<sub>3</sub>)。这些数据都与文献数据<sup>[20]</sup>基本一致,因此将该化合物**6**的结构定为altenusin。

**化合物7** 浅黄色油状物,分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$ , ESI-MS

$m/z$ : 247.09  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 不饱和度为8;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  9.42 (1H, br s, 3'-OH), 8.78 (1H, br s, 4-OH), 8.72 (1H, br s, 3-OH), 6.60 (1H, s, H-5), 6.54 (1H, s, H-2), 6.25 (1H, br s, H-4'), 6.21 (1H, br s, H-2'), 6.20 (1H, br s, H-6'), 3.69 (3H, s, 5'-OCH<sub>3</sub>), 2.05 (3H, s, 6-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  160.4 (C, C-5'), 158.5 (C, C-3'), 144.8 (C, C-1'), 144.5 (C, C-3), 143.5 (C, C-4), 132.7 (C, C-1), 125.3 (C, C-6), 118.0 (CH, C-5), 117.1 (CH, C-2), 109.3 (CH, C-2'), 106.2 (CH, C-6'), 99.7 (CH, C-4'), 55.4 ( $\text{CH}_3$ , 5'-OCH<sub>3</sub>), 19.8 ( $\text{CH}_3$ , 6-CH<sub>3</sub>)。这些数据都与文献数据<sup>[21]</sup>基本一致,因此将该化合物**7**的结构定为5'-methoxy-6-methyl-biphenyl-3,4,3'-triol。

## 2 化合物自由基清除活性

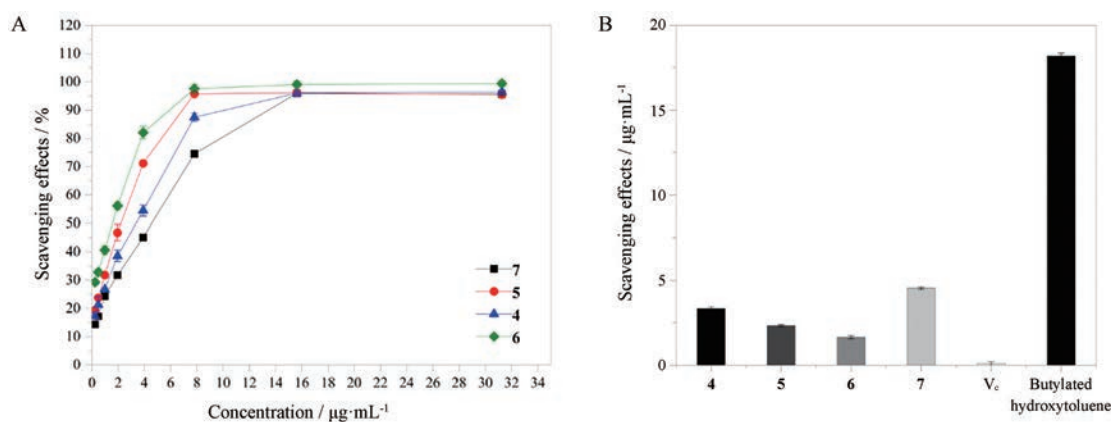
采用DPPH自由基清除能力以及ABTS自由基清除能力的方法对化合物的抗氧化活性进行评估,结果表明(图3)化合物**4~7**都显示出非常强的DPPH自由基清除活性,并且 $\text{IC}_{50}$ 值明显低于阳性对照二丁基羟基甲苯(BHT) ( $\text{IC}_{50} = 18.20 \pm 0.16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 高于抗坏血酸 $\text{V}_c$  ( $\text{IC}_{50} = 0.08 \pm 0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 其 $\text{IC}_{50}$ 值分别为 $3.34 \pm 0.10$ 、 $2.33 \pm 0.06$ 、 $1.64 \pm 0.10$ 和 $4.54 \pm 0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 化合物**1~7**都显示出非常强的ABTS自由基清除活性(图4),  $\text{IC}_{50}$ 值分别为 $1.60 \pm 0.04$ 、 $0.74 \pm 0.03$ 、 $0.29$ 、 $1.71 \pm 0.07$ 、 $1.38 \pm 0.07$ 、 $1.89 \pm 0.07$ 和 $1.41 \pm 0.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 都显著低于BHT ( $\text{IC}_{50} = 6.56 \pm 0.21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 低于 $\text{V}_c$  ( $\text{IC}_{50} = 2.13 \pm 0.16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

## 3 小结

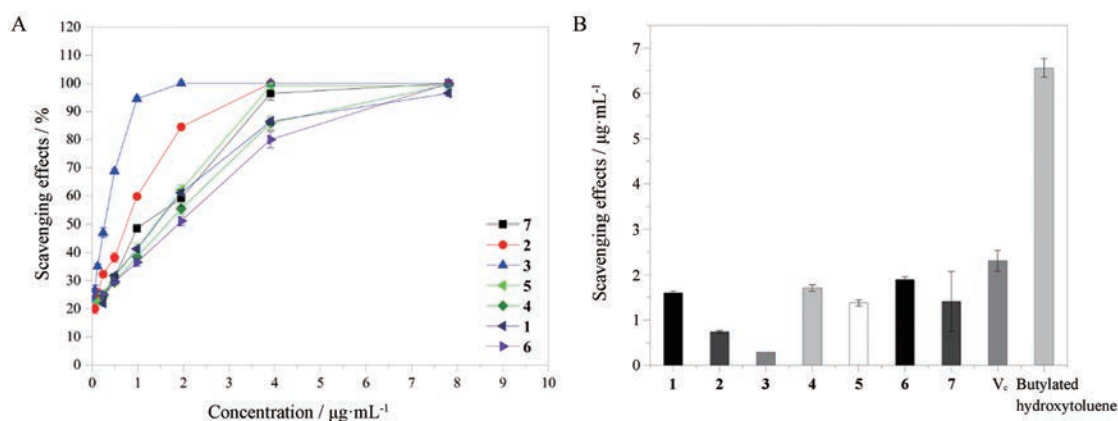
本文对海绵共附生真菌*Alternaria* sp. F49次级代谢产物进行了系统的化学成分研究,共分离出7个单体化合物,其中化合物**1**为首次分离得到的新化合物。采用DPPH、ABTS法,以BHT及 $\text{V}_c$ 为阳性对照,对化合物抗氧化活性进行评价,结果表明,化合物**4~7**对DPPH以及ABTS均有非常强的自由基清除能力;化合物**1~3**有非常强的ABTS自由基清除能力。

## 实验部分

核磁共振波谱仪(德国Bruker公司): Bruker Avance DRX500型(500/125 MHz, TMS为内标)。HR-ESI-MS(德国Bruker公司): Bruker micro TOF-QII mass spectrometer (Bruker, Fällanden, Switzerland)。EYELAN-1000型旋转蒸发器(日本Eyela公司)。高效液相色谱仪(美国Agilent公司): Agilent 1200(泵型号: G1212C, 紫外检测器型号: G1315D), YMC-Pack (C8 250 mm × 10 mm I.D. S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm)。TLC: 高效薄层色谱板(HPTLC)为德国Merck公司产品 and 烟台江友硅胶开发



**Figure 3** A: DPPH free radical scavenging rate of different compounds (BHT used as positive control); B: The IC<sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging assay



**Figure 4** A: ABTS free radical scavenging rate of different compounds (BHT used as positive control); B: The IC<sub>50</sub> value of ABTS radical scavenging assay

有限公司产品。显色剂: 10% 硫酸香兰素溶液。常用有机试剂均为上海阿拉丁的分析纯产品。

## 1 发酵培养与提取分离

海绵共附生真菌 *Alternaria* sp. F49 在 25 °C 的 PDA 培养基上培养 7 天。将其接种到液体 PDB 培养基中 (马铃薯: 200 g, 海盐: 2.5 g, 蒸馏水: 1 000 mL, pH 7.4~7.8), 并在 25 °C 的摇床中摇 72 h (170 r·min<sup>-1</sup>)。将 1 mL 种子悬浮液接种到 300 mL 的 PDB 培养基中, 培养 30 天, 进行放大发酵。

## 2 提取分离

发酵物用丙酮浸泡, 然后用乙酸乙酯提取 3 次。之后分别用石油醚进行萃取 (去除油脂) 得到粗浸膏。粗浸膏用硅胶柱、LH-20 凝胶柱和高效液相得到化合物 1~7。具体过程为: 发酵物捣碎, 浸泡到丙酮中超声提取 20 min 后过滤蒸干 (A), 滤渣用乙酸乙酯提取 3 次 (B)。将 A、B 合并后分别用石油醚、乙酸乙酯萃取, 最后得到乙酸乙酯相 (16.43 g)。粗浸膏首先用中压硅胶柱进行分离, 流动相为石油醚 (petroleum ether)/乙酸

乙酯 (EtOAc)、梯度洗脱 (V/V, 50:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1, 0:1), 再用乙酸乙酯 (EtOAc)/甲醇 (methanol) 梯度洗脱 (V/V, 20:1, 10:1, 0:1)。洗脱下来的流分用 TLC 检测并合并为 12 个流分。利用高效液相色谱 (HPLC) 法对粗组分 Fraction 6~Fraction 10 做进一步分离纯化。Fraction 6 (0.485 6 g) 经 HPLC 分离 (5%~100% MeOH/H<sub>2</sub>O) 出 6 个流分 (Fr.6.1~Fr.6.6); Fr.6.1 流分经 HPLC 纯化 (30% MeOH/H<sub>2</sub>O) 得到化合物 3 (6.7 mg); Fr.6.2 流分经 HPLC 纯化 (40% MeOH/H<sub>2</sub>O) 得到化合物 1 (3.7 mg); Fraction 7 (0.240 4 g) 经 HPLC 分离 (5%~100% MeOH/H<sub>2</sub>O) 出 5 个流分 (Fr.7.1~Fr.7.5); Fr.7.1 流分经 HPLC 纯化 (25% MeOH/H<sub>2</sub>O) 得到 2 (4.5 mg); Fr.7.3 流分经 HPLC (55% MeOH/H<sub>2</sub>O) 分离出 2 个流分 (Fr.7.3.1 和 Fr.7.3.2); Fr.7.3.1 流分经 HPLC 纯化 (35% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) 得到化合物 6 (1.0 mg)、7 (1.6 mg)。Fraction 10 (0.536 9 g) 经 HPLC 分离 (5%~100% MeOH/H<sub>2</sub>O) 出 4 个流分 (Fr.10.1~Fr.10.4); Fr.10.4 流分经 HPLC 纯化 (80% MeOH/H<sub>2</sub>O) 得到化合物 5 (10.8 mg)、

4 (6.4 mg)。

### 3 体外抗氧化活性测定

**3.1 清除 DPPH 自由基活力测定** 参考文献<sup>[22]</sup>的方法, 首先, 选择最大样品终浓度 (250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 对化合物进行体外抗氧化初筛, 表明只有化合物 4~7 清除 DPPH 自由基活力较好, 因此针对这 4 个样品进行浓度细筛。其次, 用甲醇溶剂将待测样品按二倍稀释法配成一系列不同样品浓度, 取不同浓度的样品溶液 100  $\mu\text{L}$  和 DPPH 自由基溶液 (0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 无水乙醇配制) 100  $\mu\text{L}$  于 96 孔板中, 每个浓度设定 3 个重复。样品加入后于快速混匀机上充分振荡混匀, 25  $^{\circ}\text{C}$  避光静置反应 30 min, 用酶标仪在 517 nm 处测定所得吸光度值为  $A_1$ 。同时用 100  $\mu\text{L}$  无水乙醇代替 100  $\mu\text{L}$  DPPH 自由基溶液, 作为样品参比组, 其测定所得吸光度值为  $A_2$ ; 用样品 100  $\mu\text{L}$  甲醇代替 100  $\mu\text{L}$  不同浓度样液, 作为空白组, 其测定所得吸光度值为  $A_0$ 。用甲醇进行校正调零, 阳性对照为 BHT。按公式 (1) 计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

**3.2 清除 ABTS 自由基活力测定** 参照文献<sup>[23]</sup>的方法, 配制 ABTS 贮存母液 (7  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 蒸馏水配制) 和过硫酸钾水溶液 (2.45  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 临用之前按 1:1 比例进行混合, 室温避光静置反应 16 h 后, 用甲醇进行稀释, 使得 734 nm 处所测的吸光值为  $0.70 \pm 0.02$ , 即 ABTS 自由基溶液。用甲醇溶剂将待测样品按二倍稀释法配成一系列不同样品浓度。取不同浓度样液 100  $\mu\text{L}$  和 ABTS 自由基溶液 100  $\mu\text{L}$  于 96 孔板中, 每个浓度设定 3 个重复。样品加入后于快速混匀机上充分振荡混匀, 25  $^{\circ}\text{C}$  避光反应 10 min, 734 nm 处测定吸光度值  $A_p$ 。同时用 100  $\mu\text{L}$  甲醇代替 100  $\mu\text{L}$  ABTS 自由基溶液, 作为样品参比组, 其测定所得吸光度值为  $A_c$ ; 用样品 100  $\mu\text{L}$  甲醇代替 100  $\mu\text{L}$  不同浓度样液, 作为空白组, 其测定所得吸光度值为  $A_{\text{max}}$ 。用甲醇进行校正调零, 阳性对照为 BHT。按公式 (2) 计算:

$$\text{ABTS 自由基清除率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_p - A_c}{A_{\text{max}}}\right) \times 100 \quad (2)$$

**作者贡献:** 林舒婷进行实验研究并分析数据; 陈雨实、冷佳荣负责数据补充、论文撰写及排版; 田永奇对整篇文章进行设计并做了主要修改; 汪少芸对文章进行了审查和指导。

**利益冲突:** 本研究内容无任何冲突。

### References

[1] Burgos E, Abad J, Maranon A, et al. Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues [J]. *J Clin Med*, 2019, 8: 22.

[2] Chrysostomou V, Rezaia F, Trounce I, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13: 12-15.

[3] Hua R, Zhang J, Riquelme M, et al. Connexin gap junctions and hemichannels link oxidative stress to skeletal physiology and pathology [J]. *Curr Osteopor Rep*, 2021, 19: 66-74.

[4] Li M, Zhou Y, Du G, et al. Research progress about the anti-aging effect and mechanism of flavonoids from traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1382-1391.

[5] Kovacic P, Pozos R, Somanathan R, et al. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 2601-2623.

[6] Zhao J. Evaluation of Antioxidative Abilities of *Lactobacillus plantarum* and the Antioxidative Mechanisms (植物乳杆菌抗氧化评价及抗氧化机制研究) [D]. Zhenjiang: Jiangnan University, 2018.

[7] Xie J, Su T, Wei Y, et al. Research progress of antioxidant drugs in myocardial ischemiareperfusion injury [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1845-1855.

[8] Zhuo H. Molecular and Cellular Analysis of the Effects of Cyclohexanol and Cyclohexanone on the Antioxidant System of Earthworm (分子和细胞水平上解析环己醇与环己酮对蚯蚓抗氧化系统的影响及作用机理) [D]. Jinan: Shandong University, 2020.

[9] Newman D, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 629-661.

[10] Ding L, Gu B, Jiao W, et al. New furan and cyclopentenone derivatives from the sponge-associated fungus *Hypocrea koningii* PF04 [J]. *Mar Drugs*, 2015, 13: 5579-5592.

[11] Jeon J, Julianti E, Oh H, et al. Stereochemistry of hydroxy-bearing benzolactones: isolation and structural determination of chrysoarticulins A-C from a marine-derived fungus *Chrysosporium articulatum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54: 3111-3115.

[12] Peng J, Jiao J, Jing L, et al. Pyronepolyene C-glucosides with NF- $\kappa$ B inhibitory and anti-influenza A viral (H1N1) activities from the sponge-associated fungus *Epicoccum* sp. JJY40 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 3188-3190.

[13] Liang X, Gao J, Pan R. Study on isolation of active components of secondary metabolites of a mangrove endophytic fungus by bioassay-guided method [J]. *Chem Bioeng (化学生物工程)*, 2009, 28: 48-52.

[14] Liao Y. Studies on the Secondary Metabolites and Bioactivities an Ocean-derived fungi *Alternaria* sp. 114-1a (一株大洋来源链格孢菌 114-1G 次级代谢产物及生物活性研究) [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020.

[15] Tian Y, Lin S, Liu Y. A new polyketide from a sponge-derived fungus [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1134-1138.

[16] Shigemori H, Tenma M, Shimazaki K, et al. Three new metabo-

- lites from the marine yeast *aureobasidium pullulans* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61: 696-698.
- [17] Nukina M, Marumo S.  $\alpha$ -Acetylorcinol from *Cochliobolus lunata* [J]. *Agric Biol Chem*, 1977, 41: 717-717.
- [18] Aly A, Edradaebel R, Indriani ID, et al. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense* [J]. *Planta Med*, 2007, 71: 972-980.
- [19] Kim N, Sohn M, Koshino H, et al. Verrulactone C with an unprecedented dispiro skeleton, a new inhibitor of *Staphylococcus aureus* enoyl-ACP reductase, from *Penicillium verrucosum* F375 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 83-86.
- [20] Phaopongthai J, Wiyakrutta S, Meksuriyen D, et al. Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin, a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz [J]. *J Microbiol*, 2013, 51: 821-828.
- [21] Wang Q, Li B, Yang X, et al. Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 209-214.
- [22] Chen F, Wu A, Shieh P, et al. Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa* [J]. *Food Chem*, 2006, 94: 14-18.
- [23] Re R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26: 1231-1237.