

## 海洋真菌 *Talaromyces* sp. HK1-18 的嗜氮酮类化合物化学多样性研究

薛嘉诚<sup>1</sup>, 李中辉<sup>1,3</sup>, 郝宝聪<sup>1</sup>, 郑瑶瑶<sup>3</sup>, 朱夏濠<sup>1</sup>, 陈智鑫<sup>1</sup>, 陈敏<sup>1,2\*</sup>

(1. 扬州大学环境科学与工程学院, 海洋科学与技术研究所, 江苏扬州 225127; 2. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏连云港 222005; 3. 中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东青岛 266003)

**摘要:** 基于 GNPS 的质谱-分子网络策略是快速识别已知天然产物和发现新颖化合物的有效方法。本文利用分子网络技术研究了海洋真菌 *Talaromyces* sp. HK1-18 发酵产物中的嗜氮酮类化合物的化学多样性。综合采用硅胶柱色谱和高效液相色谱等色谱分离技术以及核磁共振和高分辨质谱等波谱解析技术从真菌 HK1-18 发酵产物中分离并鉴定了 3 个线型三环嗜氮酮化合物 sequoiamonacins A~C (**2a**、**2b**、**1**); 继而以其质谱为指导, 从该真菌的全分子网络中提取了 sequoiamonacin 类嗜氮酮化合物的分子聚簇; 通过解析该聚簇中各母离子的 MS/MS (二级质谱) 碎片, 成功预测了 7 个嗜氮酮化合物的化学结构 (**3**~**9**), 其中 sequoiamonacins E~J (**4**~**9**) 为新化合物, 并揭示了该类化合物的 MS/MS 裂解规律。化合物 **1** 具有一定的抗炎活性, 其能抑制脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中白细胞介素 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 的产生, 质量浓度为 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 抑制率达 29%。

**关键词:** 海洋真菌; 嗜氮酮; 分子网络; 结构预测; sequoiamonacin

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1478-06

## Chemical diversity of azaphilones from the marine-derived fungus *Talaromyces* sp. HK1-18

XUE Jia-cheng<sup>1</sup>, LI Zhong-hui<sup>1,3</sup>, HAO Bao-cong<sup>1</sup>, ZHENG Yao-yao<sup>3</sup>, ZHU Xia-hao<sup>1</sup>,  
CHEN Zhi-xin<sup>1</sup>, CHEN Min<sup>1,2\*</sup>

(1. Marine Science & Technology Institute, College of Environmental Science & Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 3. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education of China, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** GNPS-based mass spectrum-molecular networks is an effective strategy for rapidly identifying known natural products and discovering novel structures. The chemical diversity of azaphilones from the fermentation extracts of *Talaromyces* sp. HK1-18 was studied by molecular network technique. Three linear tricyclic azaphilones, sequoiamonacins A–C (**2a**, **2b**, **1**), were isolated by silica gel column chromatography and high performance liquid chromatography from the extracts of the fungal strain of HK1-18, and their structures were identified by nuclear magnetic resonance and high-resolution mass spectrometry. Guided by the mass spectra of sequoiamonacins A–C (**2a**, **2b**, **1**), the cluster of sequoiamonacinoid analogues was discovered from the full molecular networking of HK1-18. By analyzing the MS/MS fragments of each parent ion in this cluster, 7 azaphilones (**3**–**9**) included 6 new ones (**4**–**9**) were predicted successfully. Then the MS/MS cracking regularity of this type of azaphilones was revealed. Compound **1** showed anti-inflammatory activity, which can inhibit the

收稿日期: 2023-09-21; 修回日期: 2024-01-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703411); 江苏海洋大学江苏省海洋生物资源与环境重点实验室开放课题基金 (SH20231201) 资助.

\*通讯作者 E-mail: dieying0719@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1091

production of interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) in lipopolysaccharide (LPS)-induced mouse macrophage RAW264.7, with an inhibitory rate of 29% at the concentration of 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

**Key words:** marine-derived fungus; azaphilone; molecular network; structure prediction; sequoiamonacin

海洋天然产物由于其结构多样性和强生物活性受到广泛关注, 是发现新型药物分子的重要来源之一; 在过去的几十年里, 从海洋天然产物中已发现了大量的药物先导物<sup>[1-4]</sup>。然而, 随着已知化合物的重复分离率逐年增加, 结构新颖的活性天然产物的高效发掘变得极具挑战性<sup>[5]</sup>。基于全球天然产物社会分子网络 (global natural products social molecular networking, GNPS) 的分子网络技术是实现天然产物去重复和新型化合物快速发现的一种有效策略<sup>[6-9]</sup>。由于结构相似的分子具有相似的 MS/MS (二级质谱) 碎片模式, GNPS-分子网络通过计算 MS/MS 碎片的相似性, 从而实现相似分子的聚类 and 可视化。如果分子聚簇中一个节点的化学结构被阐明, 那么其他节点可以基于质量差和特征离子碎片解析进行结构预测, 从而实现新型化合物的高效发掘。

嗜氮酮 (azaphilone) 是一类以高度氧化的吡喃-醌双环骨架为核心的聚酮类真菌色素, 具有多种生物活性, 如抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎等; 多由子囊菌和担子菌纲的真菌产生, 包括曲霉属 (*Aspergillus*)、青霉属 (*Penicillium*)、毛壳菌属 (*Chaetomium*)、蓝状菌属 (*Talaromyces*) 等, 是国内外天然药物化学研究的热点<sup>[10]</sup>。本课题组长期从事特殊生境微生物活性次级代谢产物研究, 也发现了一系列具有显著抗 MRSA (耐甲氧西林金葡萄菌) 活性的新型嗜氮酮化合物<sup>[11,12]</sup>。本文对一株海洋真菌 *Talaromyces* sp. HK1-18 的次级代谢产物展开研究, 又分离获得了一类具有线型三环骨架的嗜氮酮类化合物 sequoiamonacins A~C (**2a**、**2b**、**1**), 并利用基于 GNPS 的分子网络技术对三环嗜氮酮类化合物的化学多样性进行挖掘, 从嗜氮酮分子簇中成功预测了 7 个化合物的化学结构 (**3**~**9**), 其中 **4**~**9** 是新化合物。下文对上述嗜氮酮类化合物的分离、结构鉴定、抗炎活性、分子网络以及 MS/MS 裂解途径进行详细报道。

## 结果与讨论

### 1 结构鉴定

化合物 **1** 是黄色油状物。其核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>H NMR) 中, 出现了一组反式烯氢信号  $\delta_{\text{H}}$  7.06 (d,  $J = 15.6$  Hz), 6.24 (d,  $J = 15.6$  Hz), 一个烯氢信号  $\delta_{\text{H}}$  6.12 (s), 两个化学不等价的连氧亚甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  4.90 (d,  $J = 13.2$  Hz),

4.81 (d,  $J = 13.2$  Hz), 两个甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  1.34 (s), 0.87 (t,  $J = 6.6$  Hz); 其碳谱 (<sup>13</sup>C NMR) 中显示有三个羰基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  191.4, 173.8, 170.2, 六个烯族碳信号  $\delta_{\text{C}}$  156.6, 150.2, 135.1, 124.1, 118.3, 111.1, 三个连氧碳信号  $\delta_{\text{C}}$  82.2, 67.1, 63.3, 两个甲基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  16.9, 14.0。该化合物的以上氢谱、碳谱特征与文献<sup>[13]</sup>报道极为相似, 因此鉴定化合物 **1** 为具有线型三环结构的嗜氮酮化合物 sequoiamonacin C, 是一种天然黄色色素<sup>[14]</sup>。化合物 **1** 的 NMR 和 MS 数据如下: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.06 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-3), 6.24 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-2), 6.12 (1H, s, H-5), 4.90 (1H, d,  $J = 13.2$  Hz, Ha-14), 4.81 (1H, d,  $J = 13.2$  Hz, Hb-14), 3.71 (1H, brd,  $J = 9.0$  Hz, H-15), 3.04 (1H, m, H-9), 2.80 (1H, td,  $J = 10.8, 3.6$  Hz, H-8), 2.67 (1H, dd,  $J = 18.0, 4.2$  Hz, Ha-7), 2.61 (1H, dd,  $J = 18.0, 11.4$  Hz, Hb-7), 1.74 (1H, m, Ha-16), 1.44 (3H, m, Hb-16, H-17), 1.34 (3H, s, H-23), 1.26 (8H, brs, H-18~H-21), 0.87 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-22); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  191.4 (C, C-12), 173.8 (C, C-10), 170.2 (C, C-1), 156.6 (C, C-4), 150.2 (C, C-6), 135.1 (CH, C-3), 124.1 (CH, C-2), 118.3 (C, C-13), 111.1 (CH, C-5), 82.2 (C, C-11), 67.1 (CH, C-15), 63.3 (CH<sub>2</sub>, C-14), 47.5 (CH, C-9), 42.6 (CH, C-8), 33.2 (CH<sub>2</sub>, C-16), 31.3 (CH<sub>2</sub>, C-20), 28.9 (CH<sub>2</sub>, C-7), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C-19), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C-18), 25.9 (CH<sub>2</sub>, C-17), 22.1 (CH<sub>2</sub>, C-21), 16.9 (CH<sub>3</sub>, C-23), 14.0 (CH<sub>3</sub>, C-22); HRESIMS  $m/z$  417.194 4 ([M-H]<sup>-</sup>, calcd for C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub> 417.191 9)。

化合物 **2a/2b** 为黄色粉末, 是 C-4 构型相反的一对差向异构体。采用多种色谱分离方法对 **2a/2b** 进行分离, 结果均难以拆分。其氢谱和碳谱中呈现出两套强度接近的核磁信号, 大部分信号完全重叠, 只有少数靠近 C-4 位置的信号有细微差异。同时也与化合物 **1** 的氢谱和碳谱数据相似, 与化合物 **1** 显著不同之处在于, 化合物 **2a/2b** 的氢谱中均呈现出一组顺式烯氢信号  $\delta_{\text{H}}$  7.69 (d,  $J = 5.4$  Hz), 6.46 (d,  $J = 5.4$  Hz), 同时少了一个单峰烯族氢信号而多出一组亚甲基信号。基于以上信号特征, 进一步结合文献<sup>[13,15]</sup>鉴定化合物 **2a/2b** 为 sequoiamonacins A/B。化合物 **2a/2b** 谱图的其中一组 NMR 数据归属如下: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.69 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-3), 6.46 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-2), 4.45 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, Ha-14), 4.27 (1H, d,  $J =$

15.6 Hz, Hb-14), 3.70 (1H, m, H-15), 3.02 (1H, m, H-9), 3.01 (1H, m, Ha-5), 2.82 (1H, m, H-8), 2.55~2.65 (3H, m, H-7, Hb-5), 1.74 (1H, m, Ha-16), 1.44 (3H, m, Hb-16, H-17), 1.38 (3H, s, H-23), 1.26 (8H, brs, H-18~H-21), 0.87 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-22);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  191.8 (C, C-12), 173.6 (C, C-10), 169.8 (C, C-1), 154.5 (CH, C-3), 150.3 (C, C-6), 123.4 (CH, C-2), 125.8 (C, C-13), 82.2 (C, C-11), 67.1 (CH, C-15), 60.4 (CH<sub>2</sub>, C-14), 47.2 (CH, C-9), 42.5 (CH, C-8), 33.2 (CH<sub>2</sub>, C-16), 31.3 (CH<sub>2</sub>, C-7), 31.2 (CH<sub>2</sub>, C-20), 28.9 (CH<sub>2</sub>, C-19), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C-18), 25.9 (CH<sub>2</sub>, C-17), 22.1 (CH<sub>2</sub>, C-21), 16.5 (CH<sub>3</sub>, C-23), 14.0 (CH<sub>3</sub>, C-22)。

## 2 抗炎活性评价

Sequoiamonacins A~C 具有对卤虫 (brine shrimp) 的致死作用<sup>[13]</sup>。本研究采用联科生物 Mouse IL-1 $\alpha$  ELISA Kit 检测试剂盒 (酶联免疫吸附法) 测定了化合物的抗炎活性, 选用的细胞种类是小鼠巨噬细胞 RAW264.7。结果表明 (表 1), sequoiamonacin C (**1**) 表现出一定的抗炎活性, 其能抑制脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中白细胞介素 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 的产生, 当质量浓度为 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 抑制率达 29%, 而阳性对照药地塞米松 (DEX) 的抑制率为 35%。

**Table 1** Anti-inflammatory activity of compound **1**. LPS: Lipopolysaccharide; DEX: Dexamethasone.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs **1**

Compound	IL-1 $\alpha$ /pg·mL <sup>-1</sup>	Inhibition rate/%
<b>1</b>	109.35 $\pm$ 0.94	29%
LPS	154.43 $\pm$ 3.74***	-
DEX	100.65 $\pm$ 2.23***	35%

## 3 质谱-分子网络解析

从蓝状菌属真菌 HK1-18 中分离发现的 sequoiamonacins A~C (**2a**、**2b**、**1**) 是一类较为少见的具有线型三环骨架的嗜氮酮化合物<sup>[16]</sup>, 结构相似的化合物还包括从其他蓝状菌属真菌中发现的 talaromyacins A~C<sup>[15]</sup> 以及具有抗结肠癌活性的 talaroilones A、B<sup>[17]</sup>。该类线型三环嗜氮酮化合物的化学多样性值得进一步挖掘。本文采用分子网络技术对真菌 HK1-18 发酵产物中的 sequoiamonacins A~C 类似物进行了结构预测。

真菌 HK1-18 发酵产物所形成的全分子网络如图 1A 所示。该分子网络中共含有 300 个节点, 节点数  $\geq 3$  个的分子簇有 18 个。经与 GNPS 数据库检索匹配, 可知部分分子簇包含甾醇、脂肪酸、联苯醚、吡喃酮及生物碱等化合物, 未发现嗜氮酮化合物的单独分子簇。Sequoiamonacins A~C 的低分辨质谱均为  $m/z$  419  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 而分子网络中有两个直接相连的节点均显示

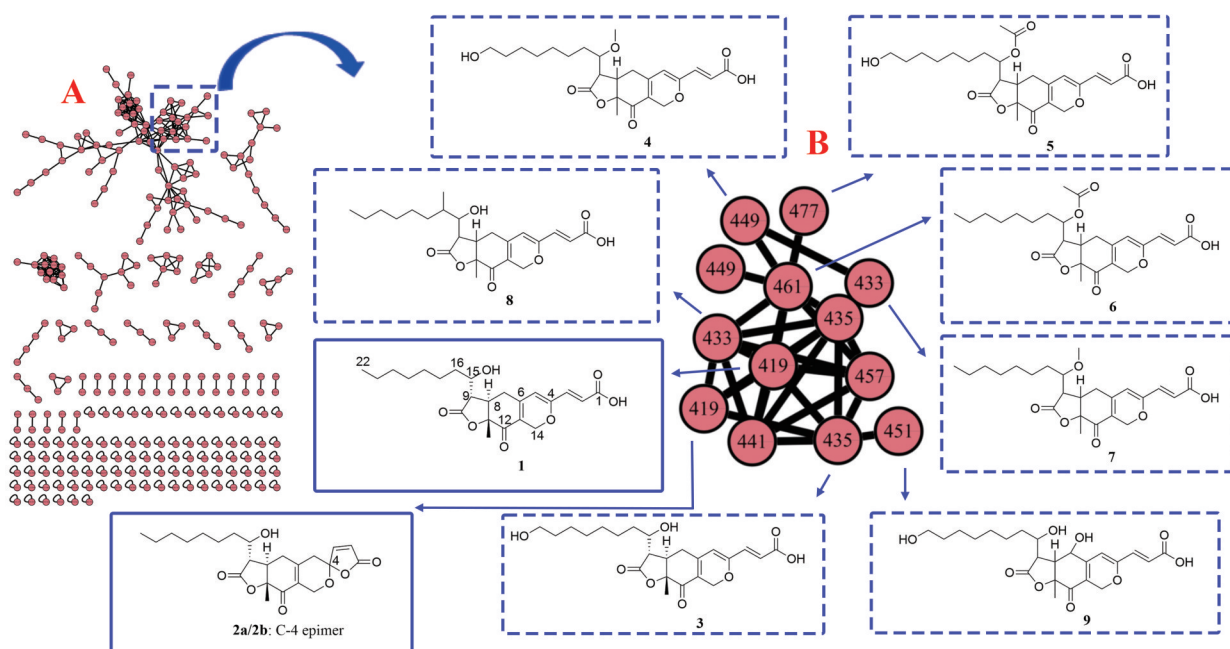
为  $m/z$  419; 分别提取其 MS/MS 图, 发现两者谱图高度相似, 主要特征信号均为  $m/z$  401, 375, 357, 对应于 sequoiamonacins A~C 分子的脱水、脱羧等裂解过程, 表明这两个节点分别代表 C-4 侧链开环的化合物 **1** 和 C-4 侧链成环的化合物 **2a/2b**, 但无法明确指定。

以两个  $m/z$  419 节点为中心, 截取了与之形成聚簇的  $m/z > 400$  的局部分子网络 (图 1B), 共获得 13 个节点, 其中包括直接相连的 MS/MS 谱图高度相似的两个  $m/z$  435 节点以及通过  $m/z$  461 间接相连的 MS/MS 谱图相似的两个  $m/z$  449 节点。这两对节点均为 C-4 侧链开环和成环分别形成的两对化合物。而相距较远的两个  $m/z$  433 节点的 MS/MS 谱图有显著差异, 推测两者结构差异较大。此外, 节点  $m/z$  441 为  $[\text{418}+\text{Na}]^+$  信号, 而  $m/z$  457 则为  $[\text{434}+\text{Na}]^+$  信号。因此, 以 sequoiamonacins A~C 结构为指导, 通过仔细分析图 1 中各节点的 MS/MS 谱图, 以及参考相似的嗜氮酮类化合物结构及其生物合成途径报道<sup>[10]</sup>, 从分子簇 B 中共预测了如图所示的 7 个嗜氮酮结构, 除化合物 **3** 为已报道的 talaroilone A<sup>[17]</sup>, 其余 (**4**~**9**) 均为新化合物, 被依次命名为 sequoiamonacins E~J。值得注意的是, 化合物 **3**~**9** 也可能为 C-4 侧链成环结构, 本文统一以开链结构作为代表。

仔细剖析化合物 **1**~**9** 的 MS/MS 特征碎片离子 (表 2), 发现该类嗜氮酮化合物的破碎途径呈现出规律性: 首先均从羧基端开始脱水  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 、脱羧  $[\text{M}-\text{CO}_2+\text{H}]^+$ , 对应于质谱损失 18 Da 或 44 Da; 然后 C-15-OH 发生脱氢或脱水; 最后连接于 C-4 和 C-9 的两个侧链分别氧化断裂, 形成三环嗜氮酮母核碎片。图 2 推测了化合物 **3** 的 MS/MS 裂解途径, 代表了此类化合物的裂解规律。此外, 化合物 **5** 和 **6** 均出现了特有的脱乙酰基碎片峰 (分别对应于  $m/z$  433 和  $m/z$  417)。化合物 **7** 和 **8** 虽然分子量相同, MS/MS 中也同时出现了  $m/z$  415 和  $m/z$  389 信号, 但是化合物 **7** 还出现了特有的“脱水+脱甲基”信号 ( $m/z$  401) 以及“脱羧+脱水”信号 ( $m/z$  357), 表明化合物 **7** 的 C-15-OH 被甲基化; 而化合物 **8** 则出现了特有的“脱水+脱氢”信号 ( $m/z$  413) 以及“脱羧+脱水”信号 ( $m/z$  371), 结合嗜氮酮类化合物 C-9 侧链结构特征<sup>[10,13]</sup>, 推测化合物 **8** 的 C-16 位连接了一个甲基。化合物 **9** 的 MS/MS 中出现了多出一个氧的三环母核信号 ( $m/z$  267), 表明其母核上多出一个羟基, 并且最有可能连接于 C-7<sup>[10]</sup>。这些化合物的 MS/MS 碎片特征为化合物结构预测提供了依据。

## 4 小结

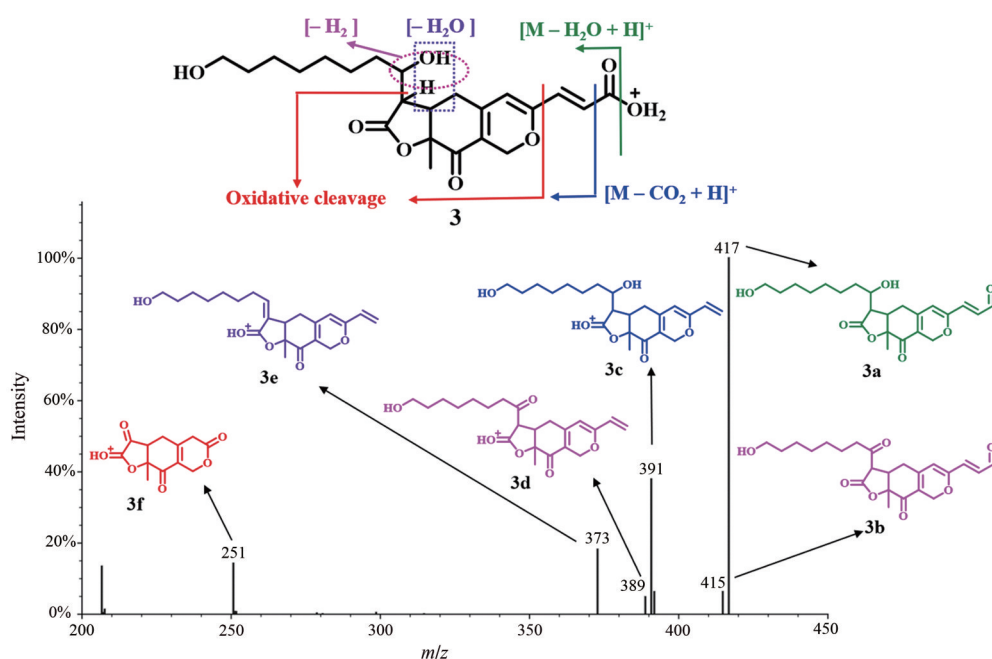
本文将分子网络策略成功应用于真菌的新颖次级代谢产物挖掘, 从海洋真菌 *Talaromyces* sp. HK1-18 发



**Figure 1** Full molecular networking of the fungal extracts from *Talaromyces* sp. HK1-18 (A) and analysis of the azaphilone cluster (B)

**Table 2** Observed MS/MS fragmentation ions of azaphilones

Compound	Molecular formula	MS ( $m/z$ ) $[M+H]^+$	MS/MS fragmentation ions ( $m/z$ )
Sequoiamonacin C (1)	$C_{23}H_{30}O_7$	419	401, 375, 357
Sequoiamonacin A/B (2a/2b)	$C_{23}H_{30}O_7$	419	401, 375, 357
Talaroilone A (3)	$C_{23}H_{30}O_8$	435	417, 415, 391, 389, 373, 251
Sequoiamonacin E (4)	$C_{23}H_{30}O_7$	449	431, 417, 405, 389, 373
Sequoiamonacin F (5)	$C_{25}H_{32}O_9$	477	459, 433, 417, 399, 373, 355
Sequoiamonacin G (6)	$C_{25}H_{32}O_8$	461	443, 417, 401, 399
Sequoiamonacin H (7)	$C_{24}H_{32}O_7$	433	415, 401, 389, 357
Sequoiamonacin I (8)	$C_{24}H_{32}O_7$	433	415, 413, 389, 371
Sequoiamonacin J (9)	$C_{23}H_{30}O_9$	451	433, 431, 407, 405, 389, 267



**Figure 2** MS/MS cleavage pathway of talaroilone A (3)

醇产物所形成的分子网络中提取了线型三环嗜氮酮 sequoiamonacin 类似物的分子聚簇, 并以分离鉴定的 sequoiamonacins A~C 结构为基础, 从该分子簇中成功预测了7个嗜氮酮化合物的结构(3~9), 其中4~9为新化合物。该类化合物的MS/MS裂解呈现出规律性, 均出现脱水、脱羧、脱氢、氧化断链等特征碎片, 最终保留三环嗜氮酮母核。Sequoiamonacin C (1) 具有抗炎活性。本文为新颖嗜氮酮化合物的高效发掘提供参考, 为后续新化合物的靶向分离提供依据。真菌 HK1-18 的 PDB 培养基发酵产物中的嗜氮酮类化合物产量较低, 虽然已成功分离获得了 sequoiamonacins A~C, 但新化合物4~9由于产量太低无法分离。本课题组将继续优化真菌 HK1-18 的培养条件, 提高嗜氮酮类化合物的产量, 以期成功分离获得其中的新化合物, 为该类化合物的抗炎活性评价以及构效关系研究提供基础。

## 实验部分

高分辨质谱仪 Micromass Q-TOF (美国 Waters 公司); 离子阱液质联用仪 Bruker amazon SL 和核磁共振仪 AVANCE 600/400 (德国 BRUKER 公司); WTF-203B 暗箱式紫外分析仪 (上海精科实业有限公司); QYC-2112B 双层摇床 (上海沪粤明科学仪器有限公司); L-2000 高效液相色谱仪 HPLC 采用 C<sub>18</sub> 柱 (Kromasil, 250 mm × 10 mm, 5 μm) (日本 Hitachi 公司); R-210 旋转蒸发仪 (日本 Buchi 公司); 硅胶薄层色谱板 (烟台江友硅胶开发有限公司); 柱色谱硅胶 200~300 目 (青岛化工厂); 凝胶 Sephadex LH-20 (美国 Amersham Biosciences 公司); 反相硅胶 ODS (美国 Unicorn 公司); 液相所用色谱级甲醇 (天津四友精细化学品有限公司, 生产批号: B2309201); 提取和分离所用甲醇 (生产批号: P2774893)、乙酸乙酯 (生产批号: P2387644)、二氯甲烷 (生产批号: P2387644)、石油醚 (生产批号: P2152622) 等均为分析纯产品 (国药集团化学试剂有限公司)。

### 1 菌株来源

海洋真菌 HK1-18 分离于海南东寨港红树林自然保护区的海桑根际土壤样品, 经分子生物学及形态学鉴定为 *Talaromyces* sp., 其 ITS-rDNA 序列已经提交至 Gen-Bank, 登录号为 OP626088。该菌株现保存于扬州大学环境科学与工程学院海洋科学与技术研究所。

### 2 发酵、提取与分离

发酵: 采用 PDB 培养基 (每 1 L 人工海水中加入 20 g 葡萄糖, 200 g 土豆浸出液) 进行发酵, 每 1 L 锥形瓶中加 400 mL 培养基, 共发酵 10 L, 室温静置培养

30 天后结束发酵。

提取: 利用纱布将菌体和发酵液分离, 其中发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取 5 次, 减压浓缩后得到粗浸膏 14.2 g。

分离: 上述提取物采用减压硅胶柱色谱, 以 EtOAc-石油醚 (0~100%)、MeOH-EtOAc (0~100%) 为溶剂进行梯度洗脱, 分为 11 个组分 (Fr.1~Fr.11), 其中 Fr.4 经 TLC 分析显示主要包含亮黄色斑点, 经正相硅胶柱梯度洗脱 (EtOAc-石油醚, 20%~100%) 分离获得 Fr.4-1 和 Fr.4-2。Fr.4-1 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:1) 以及 HPLC (60% MeOH-H<sub>2</sub>O) 分离获得化合物 1 (5.6 mg, *t<sub>R</sub>* = 28.5 min)。Fr.4-2 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:1) 以及 ODS 柱色谱 (50% MeOH-H<sub>2</sub>O) 分离得到 2a/2b (10.3 mg), 化合物 2a/2b 经 HPLC 分析 (55% MeOH-H<sub>2</sub>O) 为单一色谱峰 (*t<sub>R</sub>* = 45.0 min)。

### 3 抗炎活性测试

首先通过细胞活力评价确定化合物的抗炎活性测试质量浓度为 12.5 μg·mL<sup>-1</sup>。然后采用联科生物 Mouse IL-1α ELISA Kit 检测试剂盒 (酶联免疫吸附法) 测定化合物的抗炎活性, 选用的细胞是小鼠巨噬细胞 RAW264.7, DMSO 作为空白对照, 脂多糖作为阴性对照, 地塞米松作为阳性对照, 每组设三个平行实验, 经过孵育、洗涤、显色后, 用酶标仪测试在 450 nm 处的吸光度, 获得化合物的炎症因子 IL-1α 浓度。各处理方法均包含三组平行实验, 所获得的数据使用 IBM SPSS Statistics 19 软件分析。利用最小显著差数法 (least significant difference, LSD) 对于方差显著的因素进行多重比较。当 *P* < 0.01 时表明各分析指标有差异显著性。抗炎抑制率计算公式为抑制率 = (1 - 化合物 IL-1α 浓度 / 脂多糖 IL-1α 浓度) × 100%。

### 4 LC-MS/MS 测试与分子网络分析

采用液质联用仪对提取物进行检测。色谱柱为 YMC-Park-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相为 MeOH-H<sub>2</sub>O, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 梯度洗脱条件如下: 0~40 min, 10%~90% MeOH-H<sub>2</sub>O; 40~45 min, 90%~100% MeOH-H<sub>2</sub>O; 45~50 min, 100% MeOH-H<sub>2</sub>O。进样量为 8 μL。质谱采用正离子模式, 离子源为 ESI 源, 扫描范围为 100~2 000 Da。

将 mzXML 格式的质谱数据上传至 GNPS 分子网络平台构建分子网络。具体参数设置为: 前体离子质量误差值 1.0 Da, 碎片离子质量误差值 0.3 Da, 匹配的 MS/MS 碎片峰 ≥ 4, 节点之间相关余弦值 ≥ 0.6。最终生成的质谱分子网络图借助 Cytoscape 软件实现可视化。

**作者贡献:** 薛嘉诚完成了分子网络解析和论文初稿撰写; 李中辉完成了化合物分离、鉴定和抗炎活性测试; 郑瑶瑶完成了 LC-MS/MS 测试; 郝宝聪构建了分子网络; 朱夏濠和陈智鑫完成了菌株发酵和提取; 陈敏设计了实验方案并对论文进行修改和指导。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Ancheeva E, Daletos G, Proksch P. Lead compounds from mangrove-associated microorganisms [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16: 319-350.
- [2] Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8: 536-544.
- [3] Ouyang Z, Sun X, Sun H, et al. Research progress on anti-tumor and tumor immunity of marine natural products [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2642-2653.
- [4] Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 4769-4807.
- [5] Lewis K. Platforms for antibiotic discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12: 371-387.
- [6] Mohimani H, Gurevich A, Shlemov A, et al. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 4035.
- [7] Yang JY, Sanchez LM, Rath CM, et al. Molecular networking as a dereplication strategy [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76: 1686-1699.
- [8] Wang M, Carver JJ, Phelan VV, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 828-837.
- [9] Dong X, Yang L, Qin X, et al. Rapid identification of the chemical compounds in the leaves of *Solanum nigrum* L. based on UHPLC-Q exactive MS and molecular network technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1003-1013.
- [10] Gao JM, Yang SX, Qin JC. Azaphilones: chemistry and biology [J]. *Chem Rev*, 2013, 113: 4755-4811.
- [11] Chen M, Shen NX, Chen ZQ, et al. Penicilones A - D, anti-MRSA azaphilones from the marine-derived fungus *Penicillium janthinellum* HK1-6 [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80: 1081-1086.
- [12] Chen M, Zheng YY, Chen ZQ, et al. NaBr-induced production of brominated azaphilones and related tricyclic polyketides by the marine-derived fungus *Penicillium janthinellum* HK1-6 [J]. *J Nat Prod*, 2019, 82: 368-374.
- [13] Stierle DB, Stierle AA, Bugni T. Sequoiamonascins A - D: novel anticancer metabolites isolated from a redwood endophyte [J]. *J Org Chem*, 2003, 68: 4966-4969.
- [14] Mapari SAS, Meyer AS, Thrane U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 6253-6261.
- [15] Cao X, Ge Y, Lan D, et al. Spirocyclic polyketides from the marine fungus *Talaromyces* sp. CX11 [J]. *Fitoterapia*, 2023, 164: 105359.
- [16] Stierle AA, Stierle DB, Girtsman T, et al. Azaphilones from an acid mine extremophile strain of a *Pleurostomophora* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78: 2917-2923.
- [17] Gong YX, Li X, Shi LY, et al. Azaphilones with anti-colon cancer activities from the plant endophytic fungus *Talaromyces primulinus* WZ-883 [J]. *Phytochem Lett*, 2023, 57: 115-125.