

## 真菌 *Pleosporales* sp. 中的萘醌和羧酸类衍生物

戚思远<sup>#</sup>, 张丽花<sup>#</sup>, 郝轶男, 胡友财, 柏 健\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 运用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、硅胶柱色谱、反相 HPLC、手性色谱等多种色谱方法, 从真菌 *Pleosporales* sp. 大米发酵物的乙酸乙酯提取物中分离得到 3 个新化合物, 包括 1 个萘醌类化合物、1 个萘醌还原型的萘醌类化合物和 1 个三羧酸类化合物, 以及 5 个已知的萘醌类衍生物。利用质谱、核磁共振、比旋光等多种波谱学方法, 以及计算 ECD 的方法, 确定了这 8 个化合物的结构。新化合物分别命名为 pleospathone A (**1**)、pleospathone B (**2**) 和 pleosporalic acid A (**3**)。已知化合物分别鉴定为 (3*S*,4*R*)-3,4,8-trihydroxy-6-methyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one (**4**)、(4*R*)-3,4-dihydro-4,6,8-trihydroxy-1(2*H*)-naphthalenone (**5**)、(-)-scytalone (**6**)、(3*S*,4*S*)-3,4-dihydro-3,4,6,8-tetrahydroxy-1(2*H*)-naphthalenone (**7**) 和 *cis*-4-hydroxyscytalone (**8**)。其中, 化合物 **4**~**8** 均为首次从 *Pleosporales* 属真菌中分离得到。化合物 **1** 对人宫颈癌细胞 HeLa 和小鼠白血病细胞 P388 有弱的细胞毒活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 78.93 和 98.80 μmol·L<sup>-1</sup>。

**关键词:** *Pleosporales* 属真菌; 次级代谢产物; 萘醌; 萘醌; 三羧酸类化合物; 细胞毒活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)05-1327-07

## Naphthoquinone and carboxylic acid derivatives from the fungus *Pleosporales* sp.

QI Si-yuan<sup>#</sup>, ZHANG Li-hua<sup>#</sup>, HAO Yi-nan, HU You-cai, BAI Jian\*

(Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Three new compounds, including a naphthoquinone, a reduced naphthoquinone derivative naphthalenone, and a tricarboxylic acid, along with five known naphthalenone derivatives were isolated from ethyl acetate extract of rice fermentation products of the fungus *Pleosporales* sp. by multiple column chromatographic methods, including Sephadex LH-20 gel column chromatography, silica gel column chromatography, reversed-phase HPLC, and chiral chromatography. Their structures were elucidated by MS, NMR, and specific rotation spectroscopic analyses as well as ECD calculations. Three novel compounds were named as pleospathone A (**1**), pleospathone B (**2**), and pleosporalic acid A (**3**). Five known compounds were separately identified as (3*S*,4*R*)-3,4,8-trihydroxy-6-methyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one (**4**), (4*R*)-3,4-dihydro-4,6,8-trihydroxy-1(2*H*)-naphthalenone (**5**), (-)-scytalone (**6**), (3*S*,4*S*)-3,4-dihydro-3,4,6,8-tetrahydroxy-1(2*H*)-naphthalenone (**7**), and *cis*-4-hydroxyscytalone (**8**). Compounds **4**–**8** were isolated from the *Pleosporales* fungi for the first time. Compound **1** shows inhibitory activities against human cervical carcinoma cell line HeLa and murine leukemia cell line P388 with the IC<sub>50</sub> values of 78.93 and 98.80 μmol·L<sup>-1</sup>, respectively.

**Key words:** *Pleosporales* fungus; secondary metabolite; naphthoquinone; naphthalenone; tricarboxylic acid; cytotoxic activity

收稿日期: 2023-11-10; 修回日期: 2023-12-15.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-029).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-10-50927167, E-mail: baijian@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1269

萘醌类化合物广泛存在于自然界中的细菌、真菌和高等植物中,具有广泛的药理活性和丰富的生态特性<sup>[1,2]</sup>,如抗菌<sup>[3]</sup>、抗结核<sup>[4]</sup>、杀虫<sup>[5]</sup>、抗肥胖、抗肿瘤<sup>[6]</sup>等作用。这类化合物通常具有鲜艳的颜色,如黄色、红棕色等。从古代就开始将含有大量萘醌类化合物的植物汁液进行染发以及丝绸和羊毛的染色,现如今人们也将萘醌类化合物用于化妆品和服装行业<sup>[7]</sup>。人体内必不可少的维生素K族化合物,如维生素K<sub>1</sub>和K<sub>2</sub>,就是属于萘醌类化合物。它们具有促进凝血的作用,可用于多种凝血障碍的疾病治疗<sup>[8]</sup>。萘醌具有良好的化学反应特性,醌环的结构中与羰基共轭的双键使醌环很容易发生还原、氧化和加成反应,是上市药物分子中重要的骨架片段。目前含有萘醌骨架的上市药物种类繁多,用途广泛,如抗凝血药甲萘醌、抗疟药阿托伐醌、抗炎药双醋瑞因,抗癌药阿霉素、米托蒽醌等<sup>[9]</sup>。*Pleosporales*属真菌可以产生具有抗癌活性的萘醌类衍生物<sup>[10]</sup>。本课题组前期从*Pleosporales* sp.中发现了具有抗癌活性的马来酸酐二聚体类化合物phomoidrides E-G和具有6/6/7/6四环结构的新颖聚萘醌pleosporalesones A-B<sup>[11,12]</sup>。基于此,本研究继续探索*Pleosporales* sp.在大米培养基中产生的活性次级代谢产物,从其乙酸乙酯提取物中分离鉴定了8个化合物(图1),包括1个萘醌类化合物(1),6个萘醌还原型的萘醌类化合物(2、4~8)和1个三羧酸类化合物(3),其中化合物1~3为新化合物,化合物4~8为首次从该菌属中分离得到。对化合物1进行了肿瘤细胞毒活性评价,发现化合物1对人宫颈癌细胞HeLa和小鼠白血病细胞P388有弱的细胞毒活性。

## 结果与讨论

### 1 结构鉴定

化合物1为橘红色无定型粉末,易溶于甲醇。高分辨质谱HR-ESI-MS显示准分子离子峰  $m/z$  251.054 4  $[M+H]^+$  (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>, 计算值 251.055 0),提示其分子式为C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>,不饱和度为8。化合物1的<sup>13</sup>C NMR谱(表1)

显示出10个sp<sup>2</sup>碳信号(包含2个酮羰基碳信号)和2个sp<sup>3</sup>碳信号。结合<sup>1</sup>H NMR谱(表1)中的两个芳香氢信号 $\delta_H$  7.16 (1H, d,  $J$  = 1.6 Hz, H-7)、7.44 (1H, d,  $J$  = 1.6 Hz, H-5),推测存在一个苯环片段。<sup>1</sup>H NMR和<sup>13</sup>C NMR谱提示,还存在一个羟甲基 [ $\delta_C$  62.1 (C-11),  $\delta_H$  4.56 (2H, s, H<sub>2</sub>-11)] 和一个甲氧基 [ $\delta_C$  60.1 (C-1'),  $\delta_H$  3.87 (3H, s, H<sub>3</sub>-1')]。HMBC谱(图2)中,羟甲基的氢信号H<sub>2</sub>-11与C-5、C-6、C-7和C-10相关,H-7与C-1、C-5、C-11、C-8和C-9相关,羟基氢信号8-OH与C-7、C-8和C-9相关,H-5与C-11、C-9和C-4相关,表明存在一个四取代的苯环,并且C-6位连接羟甲基,C-8位连接羟基,C-9位和C-10位分别连接酮羰基C-1和C-4。根据分子式,分子中还有一个双键片段(2个sp<sup>2</sup>碳)未连接。甲氧基氢信号H<sub>3</sub>-1'与双键碳 $\delta_C$  141.7有HMBC相关,提示甲氧基连接在该双键碳上。结合分子式、不饱和度以及碳信号的化学位移,并与文献<sup>[13]</sup>报道的3,5-dihydroxy-2-methoxy-1,4-naphthalenedione的碳谱数据进行比对,确定双键的C-2和C-3应分别与两个酮羰基C-1和C-4相连,并且C-2连接羟基,C-3连接甲氧基,最终形成萘醌结构(图1)。综上,确定化合物1的结构为2,8-dihydroxy-6-hydroxymethyl-3-methoxy-1,4-naphthalenedione,为新化合物,命名为pleospathone A。

化合物2为淡黄色无定型粉末,易溶于甲醇。高分辨质谱HR-ESI-MS显示准分子离子峰  $m/z$  209.080 8  $[M+H]^+$  (C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>, 计算值 209.073 6),提示其分子式为C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>,不饱和度为6。化合物2的<sup>13</sup>C NMR谱(表1)显示出7个sp<sup>2</sup>碳信号(包含1个酮羰基碳信号)和4个sp<sup>3</sup>碳信号。结合<sup>1</sup>H NMR谱(表1)中 $\delta_H$  6.44 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-5)、6.19 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-7),提示存在一个苯环片段;同时还提示存在一个连氧次甲基 [ $\delta_C$  71.8 (C-4),  $\delta_H$  4.60 (1H, d,  $J$  = 3.0 Hz, H-4)]、一个亚甲基 [ $\delta_C$  41.8 (C-2),  $\delta_H$  2.66 (1H, dd,  $J$  = 17.5, 9.9 Hz, H-2a)、2.50 (1H, dd,  $J$  = 17.5, 4.5 Hz, H-2b)]、一个次甲基 [ $\delta_C$  36.0 (C-3),  $\delta_H$  2.33 (1H, m, H-3)] 和一个甲基 [ $\delta_C$  16.0 (C-11),  $\delta_H$  1.08 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H<sub>3</sub>-11)]。HMBC

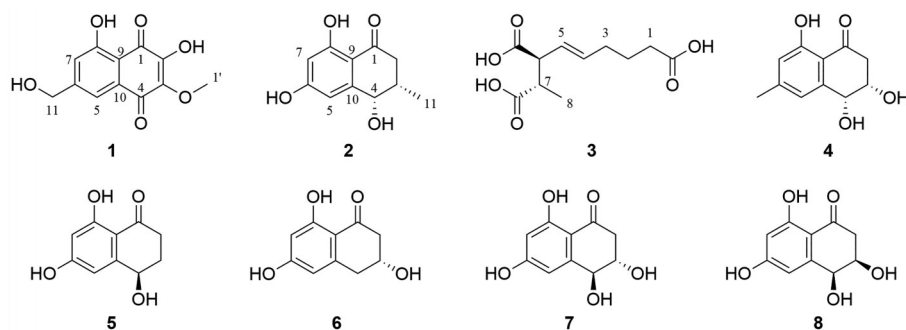
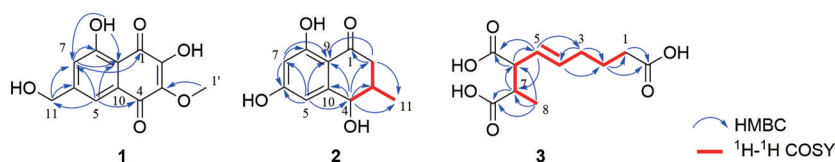


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-8

谱(图2)中, H-5与C-4、C-6、C-7和C-9相关, H-7与C-5、C-6、C-8和C-9相关, 连氧次甲基的氢信号H-4与C-10、C-5和C-9相关, 表明存在一个四取代苯环, 并且C-6和C-8位各连接一个羟基, C-10位与C-4位的连氧次甲基相连, C-9位可能连接酮羰基。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY谱(图2)显示H-3与H-4、H<sub>2</sub>-2、甲基氢信号H<sub>3</sub>-11相关, 提示C-3位分别连接C-4、C-2和C-11。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY谱(图2)显示H-3与H-4、H<sub>2</sub>-2、甲基氢信号H<sub>3</sub>-11相关, 提示C-3位分别连接C-4、C-2和C-11。HMBC谱(图2)中, H-4与C-3、C-2和C-11相关, H<sub>2</sub>-2与C-1和C-9相关, 证明C-4和C-3相连, C-1分别与C-9和C-2相连, 最终形成萘醌结构, 从而确定了化合物**2**的平面结构(图1)。<sup>1</sup>H NMR谱(表1)显示, H-2a( $\delta_{\text{H}}$  2.66)与H-3之间的大耦合常数( $J=9.9$  Hz)表明H-2a和H-3均处于直立键; H-3与H-4之间的小耦合常数( $J=3.0$  Hz)则表明H-4处于平伏键。结合ROESY谱显示, H-3和H-4有相关, 从而确定H-3与H-4在环己酮环的同侧。经数据库检索和文献<sup>[14]</sup>数据比对, 化合物**2**与teratosphaerone B平面结构相似, 区别仅在于teratosphaerone B的C-6取代为甲氧基。由于化合物**2**的相对构型与teratosphaerone B相同, 并且旋光数据( $[\alpha]_{\text{D}}^{25}-10.4$ )和teratosphaerone B的旋光数据( $[\alpha]_{\text{D}}^{25}+16.3$ )符号相反, 故确定化合物**2**的绝对构型为3*S*,4*S*。因此, 确定化合物**2**的结构为(3*S*,4*S*)-4,6,8-trihydroxy-3-

methyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one, 为新化合物, 命名为pleospathone B。

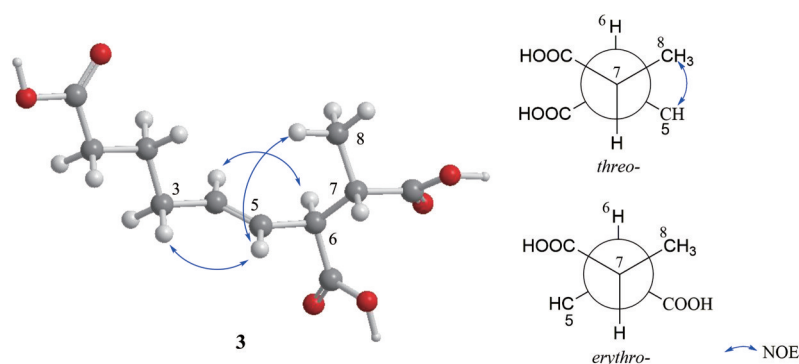
化合物**3**为透明油状物, 易溶于乙腈。高分辨质谱HR-ESI-MS显示准分子离子峰 $m/z$  267.083 9  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{Na}$ , 计算值 267.083 9), 提示其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , 不饱和度为4。<sup>13</sup>C NMR谱(表1)显示出5个 $\text{sp}^2$ 信号(包含3个羰基碳信号)和6个 $\text{sp}^3$ 信号。<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR(表1)和HSQC谱显示, 存在4个次甲基(含2个不饱和碳) [ $\delta_{\text{C}}$  134.2 (C-4),  $\delta_{\text{H}}$  5.58 (1H, dt,  $J=15.2, 6.8$  Hz, H-4);  $\delta_{\text{C}}$  126.2 (C-5),  $\delta_{\text{H}}$  5.29 (1H, dd,  $J=15.2, 9.3$  Hz, H-5);  $\delta_{\text{C}}$  51.5 (C-6),  $\delta_{\text{H}}$  3.01 (1H, t,  $J=9.3$  Hz, H-6);  $\delta_{\text{C}}$  40.6 (C-7),  $\delta_{\text{H}}$  2.59 (1H, m, H-7)], 3个亚甲基 [ $\delta_{\text{C}}$  32.8 (C-1),  $\delta_{\text{H}}$  2.18 (2H, t,  $J=7.4$  Hz, H<sub>2</sub>-1);  $\delta_{\text{C}}$  24.0 (C-2),  $\delta_{\text{H}}$  1.55 (2H, m, H<sub>2</sub>-2);  $\delta_{\text{C}}$  31.2 (C-3),  $\delta_{\text{H}}$  2.00 (2H, dt,  $J=7.5, 6.8$  Hz, H<sub>2</sub>-3)] 和1个甲基 [ $\delta_{\text{C}}$  14.7 (C-8),  $\delta_{\text{H}}$  1.02 (3H, d,  $J=7.3$  Hz, H<sub>3</sub>-8)]。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY(图2)谱显示了H<sub>2</sub>-1/H<sub>2</sub>-2/H<sub>2</sub>-3/H-4/H-5/H-6/H-7/H<sub>3</sub>-8相关; 结合HMBC谱(图2)中, H-7、H<sub>3</sub>-8与羰基碳 $\delta_{\text{C}}$  176.2相关, H-5、H-6与羰基碳 $\delta_{\text{C}}$  174.3相关, H<sub>2</sub>-1、H<sub>2</sub>-2与羰基碳 $\delta_{\text{C}}$  174.2相关, 表明存在一个1,6,7-三取代的辛-4-烯结构片段, 并且C-1、C-6、C-7分别连接一个羰基。结合分子式和羰基的化学位移, 提示 $\delta_{\text{C}}$  176.2、174.3和174.2为3个羧酸的羰基碳信号, 因此确定了化合物**3**的平面结构(图1)。



**Figure 2** <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and key HMBC of compounds **1-3**

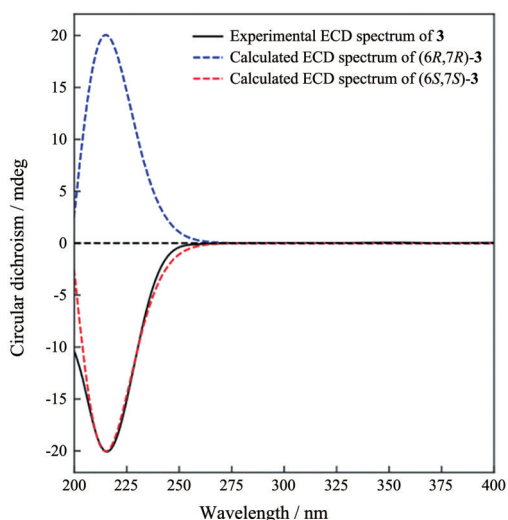
**Table 1** NMR spectroscopic data of compounds **1-3**. <sup>a</sup>: 600 MHz for <sup>1</sup>H NMR and 150 MHz for <sup>13</sup>C NMR in DMSO-*d*<sub>6</sub>; <sup>b</sup>: 700 MHz for <sup>1</sup>H NMR and 175 MHz for <sup>13</sup>C NMR in CD<sub>3</sub>OD. *J* in Hz

No.	<b>1</b> <sup>a</sup>		<b>2</b> <sup>b</sup>		<b>3</b> <sup>a</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	185.9		204.0		32.8	2.18, t (7.4)
2	147.6		41.8	2.66, dd (17.5, 9.9) 2.50, dd (17.5, 4.5)	24.0	1.55, m
3	141.7		36.0	2.33, m	31.2	2.00, dt (7.5, 6.8)
4	180.0		71.8	4.60, d (3.0)	134.2	5.58, dt (15.2, 6.8)
5	116.2	7.44, d (1.6)	109.0	6.44, d (2.2)	126.2	5.29, dd (15.2, 9.3)
6	152.6		166.9		51.5	3.01, t (9.3)
7	119.5	7.16, d (1.6)	102.7	6.19, d (2.2)	40.6	2.59, m
8	160.1		166.6		14.7	1.02, d (7.3)
9	111.5		109.9			
10	131.1		149.6			
11	62.1	4.56, s	16.0	1.08, d (6.8)		
1'	60.1	3.87, s				
8-OH		11.5, s				
1-COOH					174.2	
6-COOH					174.3	
7-COOH					176.2	



**Figure 3** Key NOE correlations and the Newman projection of compound **3**

$^1\text{H}$  NMR 谱显示双键上 H-4 和 H-5 之间的偶合常数是 15.2 Hz, 确定 C-4 位双键的构型为 *E* 型。H-6 和 H-7 之间的大耦合常数 ( $J = 9.3$  Hz) 表明两者处于反式构型, 提示它们的相对构型有两种, 其纽曼投影式如图 3 所示。NOESY 谱 (图 3) 显示, H-5 和 H<sub>3</sub>-8 有相关, 因此确定 C-6 和 C-7 的相对构型为苏式, 即  $6S^*, 7S^*$ 。化合物 **3** 的绝对构型是通过理论计算的 ECD 谱与实测 CD 谱对比来确定的。结果如图 4 所示, ( $6S, 7S$ )-**3** 的 ECD 曲线与化合物 **3** 的实验测试曲线吻合良好, 从而确定了化合物 **3** 的绝对构型。综上所述, 确定化合物 **3** 的结构为 ( $6S, 7S, E$ )-oct-4-ene-1, 6, 7-tricarboxylic acid, 为新化合物, 命名为 pleosporalic acid A。



**Figure 4** Experimental and calculated ECD spectra of compound **3**

通过波谱数据分析, 结合与文献报道数据比较, 5 个已知的萘醌类衍生物分别鉴定为 ( $3S, 4R$ )-3, 4, 8-trihydroxy-6-methyl-3, 4-dihydronaphthalen-1( $2H$ )-one (**4**)<sup>[15]</sup>、( $4R$ )-3, 4-dihydro-4, 6, 8-trihydroxy-1( $2H$ )-naphthalenone (**5**)<sup>[16]</sup>、(-)-scytalone (**6**)<sup>[17]</sup>、( $3S, 4S$ )-3, 4-dihydro-3, 4, 6, 8-tetrahydroxy-1( $2H$ )-naphthalenone (**7**)<sup>[18]</sup>和 *cis*-4-hydroxys-

cytalone (**8**)<sup>[19]</sup>。这 5 个萘醌类衍生物均为首次从 *Pleosporales* 属真菌中分离得到。

## 2 化合物活性检测

利用 MTT 法<sup>[20]</sup>对化合物 **1** 的细胞毒活性进行评价, 测试肿瘤细胞为人宫颈癌细胞 HeLa 和小鼠白血病细胞 P388, 阳性对照药为盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride)。结果 (表 2) 显示化合物 **1** 对人宫颈癌细胞 HeLa 和小鼠白血病细胞 P388 均具有弱的细胞毒活性,  $\text{IC}_{50}$  值分别为 78.93 和 98.80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**Table 2** Cytotoxic activity of compound **1**

Compound	Cytotoxicity ( $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
	HeLa	p388
<b>1</b>	78.93	98.80
Doxorubicin hydrochloride	0.25	0.37

## 实验部分

AUTOPOL IV 旋光仪 (美国鲁道夫公司); JASCO V-650 紫外-可见光谱仪、JASCO J-815 圆二色谱仪 (日本 Jasco 分光公司); Bruker AV-III-500、Bruker AV-III-700 HD 型核磁共振光谱仪 (德国布鲁克公司); BUCHI 中高压 Reveleris@Prep 纯化系统 (瑞士步琦公司); SSI 半制备高效液相色谱仪 (DAD 检测器, 美国科学系统公司); Waters ACQUITY H-Class QDA UPLC-MS (1.7  $\mu\text{m}$ , 50 mm  $\times$  2.1 mm, C18 column, 美国沃特世有限公司); Silgreen C18 色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  20 mm; 北京绿百草科技发展有限公司); YMC-Pack ODS-A 半制备色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ , 10 mm  $\times$  250 mm, 日本 YMC 公司); CHIRALPAK AD-H 手性色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  10 mm; 大赛璐药物手性技术有限公司); 羟丙基葡聚糖 Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司); CombiFlash Rf 中低压色谱系统 (Teledyne Isco, USA); GF<sub>254</sub> 硅胶 TLC 板 (青岛海洋化工厂)。水 (LC-MS 级)、乙腈 (LC-MS 级、HPLC 级和 AR 级)、甲醇 (HPLC 级和 AR 级)、乙酸乙酯 (AR 级)、正己烷 (AR

级)、乙醇 (AR 级), 其中 LC-MS 级和 HPLC 级试剂均来自于 Fisher 公司, AR 级试剂均来自于北京化工厂。甲酸 (HPLC 级, 上海麦克林生化科技股份有限公司)、氘代甲醇和氘代 DMSO (美国 CIL 公司)。马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA 培养基)、马铃薯葡萄糖肉汤培养基 (PDB 培养基) (美国 BD 公司), 大米培养基为福临门水晶米 (中粮集团有限公司) 与水以 8:11 的比例混合后在 115 °C 下高压蒸汽灭菌 20 min 而得。生物材料是从美国模式培养物集存库购买的编号为 ATCC 74256 的真菌, 通过对 18S 核糖体 RNA 的核苷酸序列分析鉴定为 *Pleosporales* sp.。

### 1 真菌培养

将真菌 *Pleosporales* sp. (ATCC 74256) 接种于 PDA 培养基上, 于 28 °C 培养箱中培养 8 天进行活化。将活化后的菌株接种至 900 mL 的 PDB 培养基中, 于 28 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 5 天, 作为种子液。取 10 mL 种子液接种于 500 mL 锥形瓶中的大米培养基 (包含 80 g 大米和 110 mL 水) 中, 共接种 50 瓶, 在室温下静置培养 25 天。

### 2 提取分离

用 8 L 乙酸乙酯超声提取大米发酵物 3 次, 每次 1 h。将乙酸乙酯提取液加入等量的蒸馏水, 进行萃取, 乙酸乙酯层减压浓缩得到粗膏 (97 g)。将粗膏溶于适量乙腈中进行分散, 加入等量的正己烷萃取 (除脂)。得到的乙腈萃取物 (76 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (90% 甲醇-水, v/v) 后, 得到 4 个组分 Fr.1~Fr.4。Fr.1 (21 g) 和 Fr.2 (12 g) 分别经 Sephadex LH-20 柱色谱 (95% 乙腈-水, v/v) 分离后, 两根色谱柱的所有流分在 TLC 监测下合并为 4 个组分 F1~F4, TLC 监测采用 90% 硫酸-乙醇试剂显色。之后将 F1 (23 g) 经硅胶柱色谱 (石油醚-乙酸乙酯, 1:0~0:1, v/v, 0.01% 甲酸) 后分离, 得到 9 个组分 F1-1~F1-9。F1-9 (3.2 g) 经中压液相色谱 (甲醇-水, 20%~80%, v/v) 分离, 得到 5 个组分 F1-9-1~F1-9-5。F1-9-3 (335.2 mg) 经半制备 HPLC (45% 乙腈-水, v/v, 0.01% 三氟乙酸, YMC-C18 柱, 10 mm × 250 mm) 分离, 得到化合物 1 (4.2 mg,  $t_R = 30$  min) 和 3 (2.1 mg,  $t_R = 64$  min)。

将 F4 和 Fr.3 合并 (共 14.0 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (95% 乙腈-水, v/v) 分离后, 在 TLC 监测下合并为 4 个组分 F4a~F4d。F4b (1.5 g) 经中压液相色谱 (甲醇-水, 20%~100%, v/v) 分离, 得到 12 个组分 F4b-1~F4b-12。F4b-9 (306.2 mg) 经硅胶柱色谱 (甲醇-二氯甲烷, 1%~20%, v/v) 分离, 得到 5 个组分 F4b-9a~F4b-9e。F4b-9c (145.0 mg) 经 ODS 柱色谱 (甲醇-水, 30%~40%~50%, v/v) 分离, 得到 8 个组分 F4b-9c-1~F4b-9c-8。

F4b-9c-2 (23.9 mg) 经半制备 HPLC (甲醇-水, 37:63, v/v, 0.1% 甲酸, Silgreen 柱, 10 mm × 250 mm) 纯化, 得到化合物 4 (5.0 mg,  $t_R = 21$  min)。

Fr.4 (6.2 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (95% 乙腈-水, v/v) 分离后, 在 TLC 监测下合并为 3 个组分 F5~F7。将 F5 (2.7 g) 经中压液相色谱 (甲醇-水, 10%~99%, v/v) 分离, 得到 10 个组分 F5-1~F5-10。将其中 5 个组分 F5-1~F5-5 (共 1.2 g) 合并, 经中压液相色谱 (甲醇-水, 20%~40%, v/v) 分离, 得到 3 个组分 F5-1a (115.2 mg)、F5-1b (80.0 mg) 和 F5-1c (994.1 mg)。将 F5-1c 经中压液相色谱 (甲醇-水, 4%~20%, v/v) 分离, 得到 5 个组分 F5-1c-1~F5-1c-5。F5-1c-3 (86.2 mg) 经半制备 HPLC (甲醇-水, 34:66, v/v, 0.1% 甲酸, Silgreen 柱, 10 mm × 250 mm) 分离, 得到化合物 2 (2.2 mg,  $t_R = 34$  min)、5 (2.4 mg,  $t_R = 15$  min) 和 6 (2.3 mg,  $t_R = 17$  min)。

将 F7 (777.2 mg) 经中压液相色谱 (甲醇-水, 20%~80%, v/v) 分离, 得到 7 个组分 F7-1~F7-7。F7-3 (43.1 mg) 经 ODS 柱色谱 (12% 甲醇-水, v/v) 分离, 得到 2 个组分 F7-3a (30.2 mg) 和 F7-3b (10.2 mg)。将 F7-3a 经半制备 HPLC (甲醇-水, 21%~37%, v/v, 0.1% 甲酸, Silgreen 柱, 10 mm × 250 mm) 分离, 得到 4 个组分 F7-3a-1~F7-3a-4。将 F7-3a-2 (5.8 mg) 经手性半制备 HPLC (20% 正己烷-异丙醇, v/v, 0.1% 甲酸, CHIRALPAK AD-H 柱, 10 mm × 250 mm) 拆分后, 得化合物 7 (3.0 mg,  $t_R = 12$  min) 和 8 (1.6 mg,  $t_R = 17$  min)。

### 3 结构鉴定

化合物 1 橘红色无定型粉末; UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 204.8 (4.07), 230.4 (3.84), 280.2 (3.79), 398.4 (3.35) nm; HR-ESI-MS  $m/z$  251.054 4 [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>, 计算值 251.055 0); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 和 <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 数据见表 1; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$ : 7.53 (1H,  $J = 3.0$  Hz, H-5), 7.17 (1H,  $J = 3.0$  Hz, H-7), 4.64 (2H, s, H-11), 4.01 (3H, s, H-1'); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$ : 187.6 (C-1), 148.6 (C-2), 143.1 (C-3), 182.1 (C-4), 117.9 (C-5), 153.3 (C-6), 121.3 (C-7), 162.4 (C-8), 112.9 (C-9), 132.8 (C-10), 64.1 (C-11), 61.0 (C-1')。

化合物 2 淡黄色无定型粉末;  $[\alpha]_D^{25} -10.4$  (c 0.22, MeOH); UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 207.4 (3.97), 281.4 (3.74), 321.4 (3.53) nm; HR-ESI-MS  $m/z$  209.080 8 [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>, 计算值 209.073 6); <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 和 <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 数据见表 1。

化合物 3 透明油状物;  $[\alpha]_D^{20} -59.5$  (c 0.21, MeOH); UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 203.4 (4.00) nm; HR-ESI-MS  $m/z$  267.083 9 [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>Na, 计算值 267.083 9);

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) 和  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) 数据见表1。

化合物4 棕色无定型粉末;  $[\alpha]_D^{22}$  -18.2 ( $c$  0.28, MeOH); ESI-MS  $m/z$  209.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 189.15  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.94 (1H, s, H-5), 6.69 (1H, s, H-7), 4.80 (1H, d,  $J$  = 2.8 Hz, H-4), 4.25 (1H, m, H-3), 2.94 (1H, dd,  $J$  = 17.3, 7.4 Hz, H-2a), 2.82 (1H, m, H-2b), 2.35 (3H, s, H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 204 (C-1), 43.7 (C-2), 70.5 (C-3), 71.3 (C-4), 121.3 (C-5), 149.9 (C-6), 117.9 (C-7), 163.5 (C-8), 114.5 (C-9), 145.4 (C-10), 22.2 (C-11)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道的 (3*S*, 4*R*)-3, 4, 8-trihydroxy-6-methyl-3, 4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one 的数据基本一致。

化合物5 黄色无定型粉末;  $[\alpha]_D^{22}$  +30.0 ( $c$  0.08, MeOH); ESI-MS  $m/z$  195.01  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 193.12  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 12.77 (1H, s, OH-8), 6.54 (1H, dd,  $J$  = 2.3, 1.0 Hz, H-5), 6.17 (1H, d,  $J$  = 2.3 Hz, H-7), 4.72 (1H, dd,  $J$  = 8.8, 3.9 Hz, H-4), 2.77 (1H, ddd,  $J$  = 17.6, 6.7, 4.6 Hz, H-2a), 2.60 (1H, ddd,  $J$  = 17.7, 9.9, 4.9 Hz, H-2b), 2.19~2.27 (1H, m, H-3a), 2.02 (1H, ddd,  $J$  = 13.1, 9.9, 8.7, 4.6 Hz, H-3b);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 203.7 (C-1), 166.8 (C-6), 166.7 (C-8), 151.0 (C-10), 110.1 (C-9), 107.3 (C-5), 102.4 (C-7), 68.5 (C-4), 32.7 (C-3), 35.7 (C-2)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道的 (4*R*)-3, 4-dihydro-4, 6, 8-trihydroxy-1(2*H*)-naphthalenone 的数据基本一致。

化合物6 白色无定型粉末;  $[\alpha]_D^{22}$  -33.3 ( $c$  0.23, MeOH); ESI-MS  $m/z$  195.00  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 193.12  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.22 (1H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-5), 6.10 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-7), 4.25 (1H, tt,  $J$  = 7.7, 3.8 Hz, H-3), 3.08 (1H, dd,  $J$  = 16.0, 3.8 Hz, H-4a), 2.85 (1H, d,  $J$  = 7.2 Hz, H-4b), 2.83 (1H, d,  $J$  = 5.6 Hz, H-2a), 2.61 (1H, dd,  $J$  = 16.9, 7.7 Hz, H-2b);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 202.5 (C-1), 166.6 (C-8), 166.5 (C-6), 146.0 (C-10), 111.7 (C-9), 109.4 (C-5), 101.6 (C-7), 66.9 (C-3), 47.4 (C-2), 39.1 (C-4)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道的 (-)-scytalone 的数据基本一致。

化合物7 淡黄色无定型粉末;  $[\alpha]_D^{22}$  +44.0 ( $c$  0.05, MeOH); ESI-MS  $m/z$  211.01  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 209.11  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.61 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-5), 6.18 (1H, d,  $J$  = 2.3 Hz, H-7), 4.48 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-4), 3.97 (1H, ddd,  $J$  = 8.9, 7.5, 4.3 Hz, H-3), 2.95 (1H, dd,  $J$  = 17.1, 4.3 Hz, H-2a), 2.62 (1H, dd,  $J$  = 17.1, 8.9 Hz, H-2b);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 201.5 (C-1), 167.1 (C-8), 166.4 (C-6), 148.5 (C-10), 110.4 (C-9), 108.3

(C-5), 102.5 (C-7), 71.7 (C-3), 44.3 (C-2), 73.7 (C-4)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道的 (3*S*, 4*S*)-4-hydroxyscytalone 的数据基本一致。

化合物8 淡黄色无定型粉末;  $[\alpha]_D^{22}$  -56.0 ( $c$  0.05, MeOH); ESI-MS  $m/z$  211.02  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 209.11  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.56 (d,  $J$  = 2.4 Hz, H-5), 6.18 (d,  $J$  = 2.3 Hz, H-7), 4.73 (d,  $J$  = 7.5 Hz, H-4), 4.22 (ddd,  $J$  = 8.9, 7.5, 4.3 Hz, H-3), 2.87 (dd,  $J$  = 17.1, 4.3 Hz, H-2a), 2.78 (dd,  $J$  = 17.1, 8.9 Hz, H-2b);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 201.9 (C-1), 166.3 (C-8), 167.0 (C-6), 148.0 (C-10), 110.3 (C-9), 108.9 (C-5), 102.6 (C-7), 70.5 (C-3), 43.5 (C-2), 71.4 (C-4)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道的 *cis*-4-hydroxyscytalone 的数据基本一致。

#### 4 ECD 计算

化合物3 的构象分析是通过殷赋云计算平台 (<https://cloud.yinfotek.com>) 的构象搜索方案来执行的。采用随机算法, 在 MMFF94 分子力场下使用 7 kcal·mol<sup>-1</sup> 的能量窗进行构象搜索。采用 Gaussian 09, 在气相中 PM6、HF/6-31G(d) 和 B3LYP/6-31G(d) 水平上对构象进行连续的几何优化, 选择优势构象, 共 7 个。随后, 采用含时密度泛函理论 (TD-DFT), 在甲醇相中 B3LYP/6-311G(d,p) 水平下对这 7 种优势构象进行激发态计算。利用殷赋云计算平台上的 ECD/UV 分析工具拟合 ECD 图谱, 并与实测 CD 图谱比较。

#### 5 细胞毒活性测试

采用 MTT 比色法<sup>[20]</sup>对化合物1 进行体外细胞毒活性的测试, 以盐酸多柔比星作为阳性对照。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下, 以 DMEM 培养基分别培养人宫颈癌细胞 HeLa 和 小鼠白血病细胞 P388, 随后接种在每孔包含 200 μL 细胞悬浮液 (1×10<sup>4</sup>) 的 96 孔板中。24 h 后, 每孔加入 2 μL 的化合物1 不同浓度的样品溶液, 再孵育 72 h; 而后每孔加入 50 μL MTT 溶液, 继续孵育 3 h 后终止培养, 离心, 弃去上清液; 每孔加入 150 μL DMSO, 经酶标仪测试读取各孔吸光值后, 软件计算出 IC<sub>50</sub> 值。

致谢: 核磁数据由中国医学科学院药物研究所的核磁测试中心的朱承根老师、王亚男老师、许悦同学和朱浩文同学代测; 细胞毒活性的测试得到了中国中医科学院中药研究所孙奕老师的帮助和支持。

作者贡献: 戚思远、张丽花主要负责化合物的分离纯化和结构鉴定; 张丽花负责菌种发酵; 戚思远负责文献调研、整理及文章撰写和修改; 郝轶男参与部分化合物的分离和结构鉴定; 胡友财负责实验设计及数据分析; 柏健负责文章的选题、思路框架的提出, 全程指导了实验设计、结构解析和论文

撰写。

利益冲突: 没有任何利益冲突。

## References

- [1] Collins JA, Osheroff N. 1, 2-Naphthoquinone as a poison of human type II topoisomerases [J]. *Chem Res Toxicol*, 2021, 34: 1082-1090.
- [2] Ribeiro L, Fumagalli F, Mello RB, et al. Structure-activity relationships and mechanism of action of tetragomycin derivatives as inhibitors of *Staphylococcus aureus* staphyloxanthin biosynthesis [J]. *Microb Pathog*, 2020, 144: 104127.
- [3] Thomson RH. Naturally Occurring Quinones [M]. 2nd ed. London: Academic Press, 1971: 198.
- [4] Pullella GA, Wild DA, Nealon GL, et al. What is the structure of the antitubercular natural product eucapsitrione? [J]. *J Org Chem*, 2017, 82: 7287-7299.
- [5] Khambay BP, Batty D, Cahill M, et al. Isolation, characterization, and biological activity of naphthoquinones from *Calceolaria andina* L [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 770-775.
- [6] Cheng M, Tang J, Li S. Recent advances in the research on pharmacological actions and quantitative analyses of naphthoquinones in Chinese medicinal herb "Zicao" [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 2026-2039.
- [7] Jordão AK, Vargas MD, Pinto AC, et al. Lawsone in organic synthesis [J]. *RSC Adv*, 2015, 5: 67909-67943.
- [8] Shearer MJ, Fu X, Booth SL. Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research [J]. *Adv Nutr*, 2012, 3: 182-195.
- [9] Khan J, Rani A, Aslam M, et al. A review on the synthesis and application of naphthoquinone-based drugs [J]. *Results Chem*, 2023, 6: 101138.
- [10] Li G, Xu K, Chen WQ, et al. Heptaketides from the endophytic fungus *Pleosporales* sp. F46 and their antifungal and cytotoxic activities [J]. *RSC Adv*, 2019, 9: 12913-12920.
- [11] Zhang L, Wang Y, Zhang L, et al. Phomoidrides E–G, three dimeric anhydrides from the fungus *Pleosporales* sp. give new insight to the biosynthesis of phomoidrides [J]. *Org Chem Front*, 2021, 8: 5926-5933.
- [12] Zhang L, Bai J, Yan D, et al. Pleosporalesones A–B, two unique polyketides isolated from *Pleosporales* sp [J]. *Tetrahedron Lett*, 2019, 60: 375-377.
- [13] Li Q, Xu W, Fan R, et al. Penithoketone and penithochromones A-L, polyketides from the deep-sea-derived fungus *Penicillium thomii* YPGA3 [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83: 2679-2685.
- [14] Padumadasa C, Xu YM, Wijeratne EMK, et al. Cytotoxic and noncytotoxic metabolites from *Teratosphaeria* sp. FL2137, a fungus associated with *Pinus clausa* [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81: 616-624.
- [15] Li C, Li H, Shao Y, et al. Regulation of secondary metabolites in the endophytic fungus *Penicillium* sp. KMU18029 by the chemical epigenetic modifier 5-azacitidine [J]. *Nat Prod Res*, 2024, 38: 581-588.
- [16] Kim K, Beemelmans C, Murillo C, et al. Naphthalenones and isocoumarins from a costa rican fungus *Xylariaceae* sp. CR1546C [J]. *J Chem Res*, 2014, 38: 722-725.
- [17] Li X, Gao J, Chen H, et al. Toxins from a symbiotic fungus, *Leptographium qinlingensis* associated with *Dendroctonus armandi* and their *in vitro* toxicities to *Pinus armandi* seedlings [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2012, 134: 239-247.
- [18] Pittayakhajonwut P, Sohsomboon P, Dramaev A, et al. Antimicrobial substances from *Phaeosphaeria* sp BCC8292 [J]. *Planta Med*, 2008, 74: 281-286.
- [19] Huang R, Wang T, Xie XS, et al. Secondary metabolites from an endophytic fungus *Nigrospora* sp [J]. *Chem Nat Compd*, 2016, 52: 697-699.
- [20] Ueoka R, Nakao Y, Kawatsu S, et al. Gracilioethers A-C, antimicrobial metabolites from the marine sponge *Agelas gracilis* [J]. *J Org Chem*, 2009, 74: 4203-4207.