海洋真菌 *Aspergillus terreus* GXIMD00546 中的一个环四肽及其抗污损活性

于 芹[1,2], 戚梦凡[2], 王玲芝[2], 李 思[2], 刘 锴[2], 罗小卫[2], 高程海[2], 刘永宏[1,2], 徐新亚[2*]

(1. 沈阳药科大学无涯创新学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 广西中医药大学海洋药物研究院, 广西海洋药物重点实验室, 广西 南宁 530200)

摘要: 为了阐明抗污损活性菌株 *Aspergillus terreus* GXIMD00546 的活性成分, 采用硅胶柱色谱、高效液相色谱 (HPLC) 等色谱技术对菌株 *Aspergillus terreus* GXIMD00546 大米培养基的发酵产物进行分离纯化, 并通过核磁共振波谱、高分辨质谱和结构衍生化等方法鉴定为 1 个新化合物 asperterrestide C (**1**) 和 12 个已知化合物 territrem B (**2**)、methyl-3,4,5-trimethoxy-2-(2-(nicotinamido) benzamido) benzoate (**3**)、butyrolactone I (**4**)、terrien (**5**)、(1*R*,2*S*)-2-hydroxy-5-oxo-3-((*E*)-prop-1-en-1-yl) cyclopent-3-en-1-yl acetate (**6**)、(1*S*,5*R*)-5-hydroxy-4-oxo-2-((*E*)-prop-1-en-1-yl) cyclopent-2-en-1-yl acetate (**7**)、4-hydroxykigelin (**8**)、monacolin K (**9**)、methyl ester of lactone ring-opened monacolin K (**10**)、butyrolactone VII (**11**)、aspernolide A (**12**)、*epi*-aszonalenin C (**13**)。新化合物 asperterrestide C (**1**) 为环肽类成分, 具有少见的氨基甲基化修饰。化合物 **1**～**3**、**6**、**7**、**9**、**11**、**12** 具有明确的抗海洋污损生物藤壶附着活性, 抑制纹藤壶金星幼虫附着半数有效浓度 (EC_{50}) 为 0.12～12.5 μg·mL^{-1}, 且毒性较小。化合物 **1**、**2**、**4**、**9**～**12** 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, EC_{50} 为 17.16～55.77 μg·mL^{-1}。化合物 **4** 和 **11** 具有广谱抑菌活性, 对测试的人类致病菌和污损细菌均有明显抑制作用。

关键词: 海洋真菌; *Aspergillus terreus*; 环四肽; 抗污损; 酶抑制

中图分类号: R284 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)07-2254-09

A new antifouling tetrapeptide from marine fungus *Aspergillus terreus* GXIMD00546

YU Qin[1,2], QI Meng-fan[2], WANG Ling-zhi[2], LI Si[2], LIU Kai[2], LUO Xiao-wei[2], GAO Cheng-hai[2], LIU Yong-hong[1,2], XU Xin-ya[2*]

(*1. Wuya College of Innovation, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Drugs, Institute of Marine Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China*)

Abstract: In order to clarify the anti-fouling active components of the marine-derived fungal strain *Aspergillus terreus* GXIMD00546, its fermentation products of the rice medium were isolated by silica gel column chromatography and purified using HPLC. One new compound asperterrestide C (**1**) and 12 known compounds territrem B (**2**), methyl-3,4,5-trimethoxy-2-(2-(nicotinamido)benzamido)benzoate (**3**), butyrolactone I (**4**), terrien (**5**), (1*R*,2*S*)-2-hydroxy-5-oxo-3-((*E*)-prop-1-en-1-yl)cyclopent-3-en-1-yl acetate (**6**), (1*S*,5*R*)-5-hydroxy-4-oxo-2-((*E*)-prop-1-en-1-yl)cyclopent-2-en-1-yl acetate (**7**), 4-hydroxykigelin (**8**), monacolin K (**9**), methyl ester of lactone ring-opened monacolin K (**10**), butyrolactone VII (**11**), aspernolide A (**12**), and *epi*-aszonalenin C (**13**) were

收稿日期: 2025-01-15; 修回日期: 2025-03-25.

基金项目: 国家自然科学基金 (42066006); 广西自然科学基金 (2024GXNSFAA010403).

*通讯作者 Tel: 86-771-4733826, E-mail: xuxy@gxtcmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0051

identified by the detailed data analysis of NMR sepectra, high-resolution mass spectrometry spectra and the comparison with literatures. The new compound asperterrestide C (**1**) is a cyclopeptide with rare aminomethylation modifications. Compounds **1**－**3**, **6**, **7**, **9**, **11**, **12** showed clear anti-fouling activities against the attachment of barnacle larvae in the EC_{50} ranges of 0.12−12.5 μg·mL^{-1} with low toxicity. Compounds **1**, **2**, **4**, **9**−**12** also exhibited acetylcholinesterase inhibitory effects with EC_{50} range of 17.16−55.77 μg·mL^{-1}. Compounds **4** and **11** have broad spectrum antibacterial activity against human pathogenic bacterium methicillin-resistant *Streptococcus aureus* (MRSA), and fouling bacteria *Methanococcus janaschii* (MJ), *Vibrio pelagius* (VP), and *V. Rotiferianus* (VR).

Key words: marine fungus; *Aspergillus terreus*; cyclotetrapeptide; antifouling; acetylcholinesterase inhibition

海洋微生物长期生存在高压、高盐、寡营养等特殊的生态环境下, 通常具有独特的代谢途径和次生代谢产物。曲霉属海洋真菌是新天然产物最重要的来源之一, 可以产生多种类型的次级代谢产物, 包括聚酮类、生物碱、丁烯内酯、多肽等, 并且通常具有较好的生物活性, 如细胞毒性、抗菌活性等[1,2]。北海竹林盐场是广西最大的天然海水结晶盐生产基地, 具有丰富的极端嗜盐微生物资源。作者前期从中分离得到16株真菌, 分属6科6属12种, 部分菌株发酵提取物具有显著的抗菌活性[3]。从其中一株镰刀菌属真菌GXIMD00527中分离得到表伊快霉素, 能够有效抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的毒力因子和生物被膜的形成, 从而降低其致病性和耐药性[4]。

海洋生物污损是指海洋污损生物的附着、侵袭造成的水下设施的损害, 如增加舰船航行阻力, 加大燃油消耗, 增加温室气体排放; 堵塞管道和线缆, 加速金属老化和腐蚀, 危害海上作业平台的安全; 堵塞海上渔业网具和养殖网箱, 造成养殖产量减少; 并且污损生物附着在舰船上, 还造成外来生物入侵。海洋生物污损每年造成15～30亿美元的直接经济损失[5]。藤壶是我国最常见的污损生物之一。乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 是生物神经传导中的一种关键性酶, 该酶能降解乙酰胆碱, 终止神经递质对突触后膜的兴奋作用, 保证神经信号在生物体内的正常传递。乙酰胆碱酯酶和藤壶附着密切相关, 是抗藤壶附着的关键靶点之一[6,7]。在海洋真菌活性次生代谢产物的研究过程中, 作者发现一株来自北海竹林盐场的土曲霉 *Aspergillus terreus* GXIMD00546, 其发酵提取物具有明显的抗海洋生物污损活性, 能够抑制污损生物藤壶幼虫附着, 但活性成分不明确。进一步的化学成分研究从其发酵产物中分离得到1个环四肽类化合物 (**1**) 和12个已知化合物 (**2**～**13**, 图1), 部分化合物具有抗生物污损、抗乙酰胆碱酯酶和抗菌活性。本文将详细介绍了这些化合物的分离纯化、结构鉴定及其活性测定。

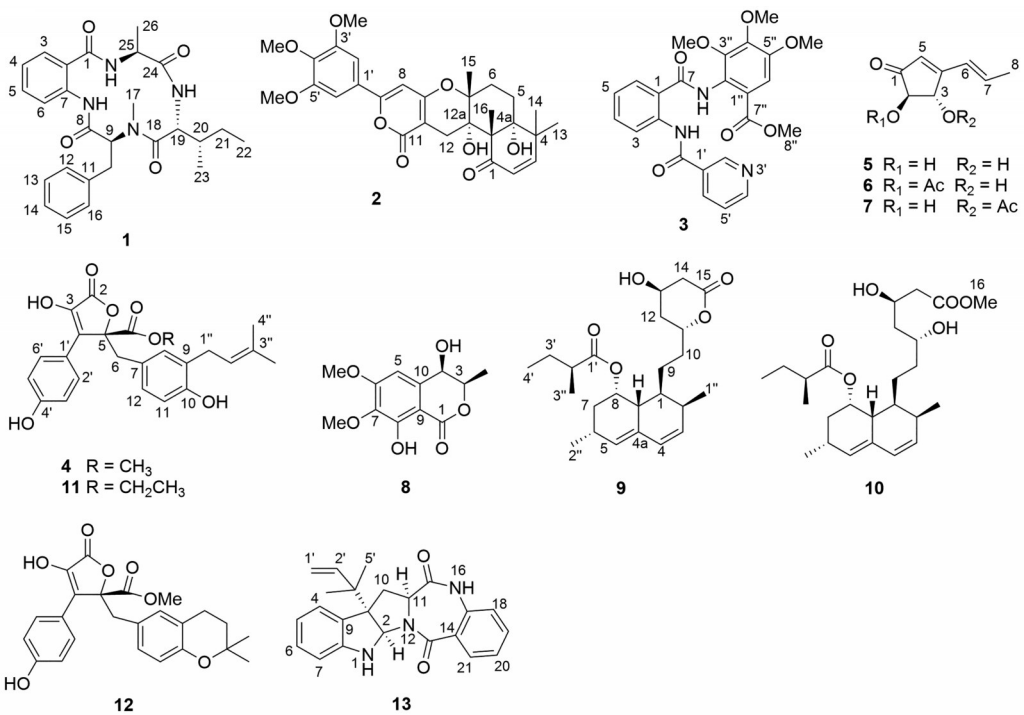


Figure 1　The chemical structures of compounds **1**−**13**

结果与讨论

1 菌株的来源及鉴定

菌株分离纯化自广西北海盐田, 利用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增技术对菌株的内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列进行扩增测序 (武汉擎科生物科技股份有限公司), 通过Blast检索分析发现其ITS序列与菌株 *Aspergillus terreus* 1:1-546 (accession No.OW986430) 的相似度100%, 综合形态学特征将该真菌鉴定为土曲霉 (GenBank Accession No. PV104274)。菌种保存于广西中医药大学海洋药物研究院海洋微生物资源库中, 保存编号为GXIMD00546。

2 化合物结构鉴定

化合物**1**为淡黄色粉末。根据高分辨电喷雾电离质谱 (HR-ESI-MS) 显示其准分子离子峰 *m/z* 465.250 6和487.232 7 (计算值 $[M+H]^+$ 465.249 6, $[M+Na]^+$ 487.231 6), 确定化合物**1**的分子式为$C_{26}H_{32}N_4O_4$。根据^{1}H、^{13}C NMR和HSQC数据 (表1) 推测化合物含有4个甲基: [δ_H 2.85 (s, N-CH_3-17), δ_C 30.4 (CH_3-17)], [δ_H 0.62 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-22), δ_C 11.0 (CH_3-22)], [δ_H 0.85 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-23), δ_C 14.7 (CH_3-23)], [δ_H 1.42 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-26), δ_C 15.0 (CH_3-26)]; 2个亚甲基 [δ_H 3.28 (1H, dd, *J* = 15.0, 5.4 Hz, H-10a), 3.05 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.4 Hz, H-10b), δ_C 32.7 (CH_2-10)], [δ_H 0.51 (2H, m, H-21), δ_C 25.0 (CH_2-21)]。13个次甲基包括9个芳香环次甲基信号: [δ_H 7.33 (1H, dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, H-3), δ_C 125.6 (CH-3)], [δ_H 7.13 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-4), δ_C 124.3 (CH-4)], [δ_H 7.45 (1H, td, *J* = 7.9, 1.6 Hz, H-5), δ_C 131.6 (CH-5)], [δ_H 8.10 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-6), δ_C 123.7 (CH-6)], [δ_H 7.23 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-12/16), δ_C 129.1 (CH-12/16)], [δ_H 7.26 (2H, overlapped, H-13/15), δ_C 128.6 (CH-13/15)], [δ_H 7.19 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-14), δ_C 126.8 (CH-14)] 和4个其他次甲基: [δ_H 5.89 (1H, dd, *J* = 11.3, 5.4 Hz, H-9), δ_C 56.9 (CH-9)], [δ_H 4.44 (1H, t, *J* = 10.2 Hz, H-19), δ_C 54.4 (CH-19)], [δ_H 1.81 (1H, overlapped, H-20), δ_C 36.4 (CH-20)], [δ_H 4.50 (1H, q, *J* = 6.9 Hz, H-25), δ_C 50.0 (CH-25)]。4个羰基碳信号 [δ_C 170.4 (C-1), 168.5 (C-8), 173.1 (C-18), 171.4 (C-24)] 和3个芳香环季碳信号 [δ_C 126.8 (C-2), 135.4 (C-7), 136.6 (C-11)]。这些数据均与环四肽化合物asperterrestide A极为相似[8], 唯一的差异是H-10/C-10位的核磁数据从asperterrestide A [δ_H 5.15 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-10), δ_C 71.4 (CH-10)] 在化合物**1**中向高场位移 [δ_H 3.28 (dd, *J* = 15.0, 5.4 Hz, H-10a), 3.05 (dd, *J* = 15.0, 11.4 Hz, H-10b), δ_C 32.7 (CH-10)], 表明化合物**1**中C-10位的羟基可能缺失。二维核磁数据也证实了该推测: ^{1}H-^{1}H COSY相关信号H-13与H-12, 14相关, H-15与H-14, 16相关, H-9与H-10相关, HMBC谱图H-12与C-10, 11, 16相关, H-9与C-8, 10, 11相关, H-17与C-9相关, 表明存在*N*-甲基苯丙氨酸 (*N*-Me-Phe) (图2)。从而确定该化合物由*N*-甲基苯丙氨酸 (*N*-Me-Phe)、邻氨基苯甲酸 (2-aminobenzoic acid, Aba)、异亮氨酸/别异亮氨酸 (Ile/allo-Ile) 和丙氨酸 (Ala) 构成。HMBC谱图邻氨基苯甲酸氨基氢 [δ_H 9.00 (1H, s)] 与C-8相关, N-CH_3-17 [δ_H 2.85 (s)] 与C-18相关, 异亮氨酸/别异亮氨酸氨基氢 [δ_H 7.24 (1H, overlapped)] 与C-24相关, 丙氨酸氨基氢 [δ_H 6.25 (1H, s)] 与C-1相关, 以及ROESY谱图相关信号: 邻氨基苯甲酸氨基氢与H-9相关, *N*-甲基苯丙氨酸甲基氢与H-19相关, 表明环四肽的平面结构为环-(邻氨基苯甲酸-*N*-甲基苯丙氨酸−异亮氨酸/别异亮氨酸−丙氨酸)。氨基酸的构型通过比对氨基酸标准品确定: 将化合物**1**与*L/D*构型*N*-甲基苯丙氨酸、异亮氨酸/别异亮氨酸、丙氨酸标准品分别进行Marfey水解衍生化反应, 产物进行LC-MS分子离子峰和保留时间比对 (图3), 确定为*N*-甲基*L*-苯丙氨酸、*L*-丙氨酸以及*D*-异亮氨酸/别异亮氨酸。*D*-异亮氨酸和*D*-别异亮氨酸无法通过LC-MS区分, 采用HPLC手性分析柱 (Phenomenex Lux i-Amylose-1, 广州飞诺美), 正己烷/异丙醇 (含0.1%甲酸) 3%～10%梯度分析, 根据保留时间差异确定为*D*-别异亮氨酸 (图4)。从而确定化合物**1**为环-(邻氨基苯甲酸-*N*-甲基*L*-苯丙氨酸-*D*-别异亮氨酸-*L*-丙氨酸), 与化合物asperterrestide A和asperterrestide B[8,9]结构相似, 因此命名为asperterrestide C。

根据波谱数据结合文献分析, 已知化合物结构鉴定为territrem B[10](**2**)、methyl-3,4,5-trimethoxy-2-(2-(nicotinamido)benzamido)benzoate[11] (**3**)、butyrolactone I[12] (**4**)、terrien[13] (**5**)、(1*R*, 2*S*) -2-hydroxy-5-oxo-3- ((*E*) -prop-1-en-1-yl)cyclopent-3-en-1-yl acetate[13,14](**6**)、(1*S*,5*R*)-5-hydroxy-4-oxo-2- ((*E*) -prop-1-en-1-yl)cyclopent-2-en-1-yl acetate[14](**7**)、4-hydroxykigelin[15](**8**)、monacolin K[16] (**9**)、methyl ester of lactone ring-opened monacolin K[17] (**10**)、butyrolactone VII[18] (**11**)、aspernolide A[19] (**12**)、*epi*-aszonalenin C[20](**13**)。

3 生物活性测定

3.1 抗污损活性 测试了13个化合物抗海洋污损生物纹藤壶金星幼虫的附着活性, 从表2可以看出化合物**1**～**3**、**6**、**7**、**9**、**11**、**12**均显示活性, EC_{50}为0.12～12.5 μg·mL^{-1}, 均显示出良好的抗污损活性。化合物asperterrestide C (**1**) 显示中等抗污损活性, 同类型化合物asperterrestides A、B未检测出抗藤壶幼虫活性[9], 可

Table 1　^{1}H (500 MHz), ^{13}C NMR (125 MHz) and HMBC data of compound **1** in $CDCl_3$

Unit	Position	δ_C	δ_H	HMBC
Aba	1	170.4		
	2	126.8		
	3	125.6	7.33 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz)	1, 5, 7
	4	124.3	7.13 (t, *J* = 7.5 Hz)	2, 6
	5	131.6	7.45 (td, *J* = 7.9, 1.6 Hz)	3, 7
	6	123.7	8.10 (d, *J* = 8.2 Hz)	2, 4, 7
	7	135.4		
	NH		9.00 (s)	2, 6, 8
N-Me-Phe	8	168.5		
	9	56.9	5.89 (dd, *J* = 11.3, 5.4 Hz)	8, 10, 11, 17, 18
	10	32.7	3.28 (dd, *J* = 15.0, 5.4 Hz) 3.05 (dd, *J* = 15.0, 11.4 Hz)	8, 9, 11, 12, 16
	11	136.6		
	12/16	129.1	7.23 (d, *J* = 7.0 Hz)	10, 13, 14, 15
	13/15	128.6	7.26, overlapped	11, 12, 16
	14	126.8	7.19 (t, *J* = 7.0 Hz)	
	17	30.4	2.85 (s)	9, 18
Ile	18	173.1		
	19	54.4	4.44 (t, *J* = 10.2 Hz)	18, 20, 21, 23, 24
	20	36.4	1.81, overlapped	
	21	25.0	0.51 (m)	19, 20, 22, 23
	22	11.0	0.62 (t, *J* = 7.2 Hz)	20, 21
	23	14.7	0.85 (d, *J* = 6.7 Hz)	19, 20, 21
	NH		7.24, overlapped	24
Ala	24	171.4		
	25	50.0	4.50 (q, *J* = 6.9 Hz)	24, 26
	26	15.0	1.42 (d, *J* = 6.9 Hz)	24, 25
	NH		6.25 (d, *J* = 8.2 Hz)	1, 25, 26

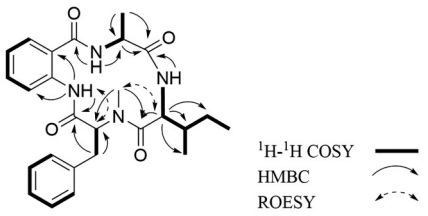


Figure 2　Key ^{1}H-^{1}H COSY, HMBC and ROESY correlations of compound **1**

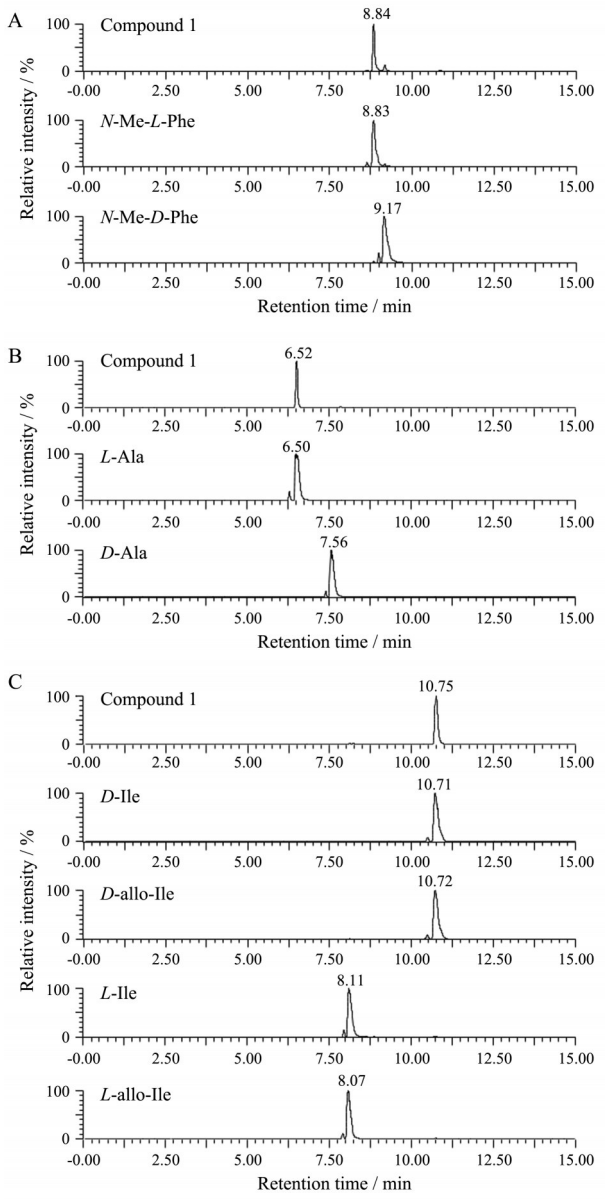


Figure 3　LC-MS extracted ion chromatogram (EIC) spectral comparisons of Marfey′s reaction derivatives of compound **1** and standard amino acids. A: *N*-Me-*D*/*L*-Phe, B: *D*/*L*-Ala, C: *D*/*L*-Ile/allo-Ile

能是由于氨基酸构型不同以及C-10位羟基取代的缺失造成活性差异。化合物**2**、**3**、**7**的EC_{50}值分别为0.12、0.19、1.23 μg·mL^{-1}, 且半数致死浓度LD_{50}均大于50 μg·mL^{-1}, 毒性较小, 有望作为抗附着先导化合物开展进一步研究。

3.2　抑制乙酰胆碱酯酶活性　在乙酰胆碱酯酶抑制活性筛选试验中, 化合物**1**、**2**、**4**、**9**～**12**显示中等抑制活性, EC_{50}分别为31.24 ± 2.68、28.96 ± 1.89、17.16 ± 0.40、55.77 ± 2.95、40.59 ± 2.95、29.76 ± 1.52、33.99 ± 2.32 μg·mL^{-1}, 阳性对照石杉碱甲为EC_{50}为0.01 ± 0.003 μg·mL^{-1}。实验结果表明化合物**1**、**2**、**9**、**11**、**12**的抗藤壶幼虫附着的作用靶点可能是乙酰胆碱酯酶, 有待进一步验证。

3.3　抑菌活性　化合物**4**和**11**对一种人类致病菌和三种污损细菌均显示明显抑制作用, 显示出广谱抗菌活性, 最小抑菌浓度 (MIC) 见表3。化合物**4**对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、甲烷球菌 (*Methanococcus janaschii*, MJ)、佩拉吉弧菌 (*Vibrio pelagius*, VP) 和罗氏弧菌 (*V. rotiferianus*, VR) 的MIC值分别是53.06、

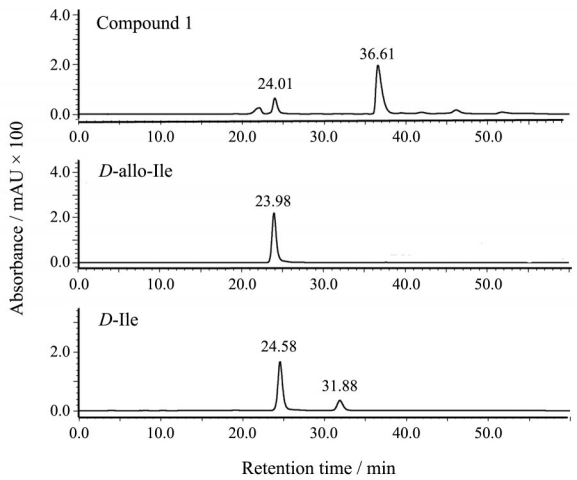


Figure 4 Chiral HPLC spectral comparisons of Marfey's reaction derivatives of compound **1**, *D*-allo-Ile and *D*-Ile derivatives

Table 2 Anti-barnacle larval attachment activities of compounds **1**−**13**. EC_{50}: Median effect concentration; LC_{50}: Lethal concentration 50%. a: Compounds **4**, **5**, **8**, **10** and **13** no activity (EC_{50} > 50 μg·mL^{-1})

Compound[a]	EC_{50}/μg·mL^{-1}	LC_{50}/μg·mL^{-1}
1	9.75 ± 0.28	> 50
2	0.12 ± 0.28	> 50
3	0.19 ± 0.12	> 50
6	5.66 ± 0.07	> 50
7	1.23 ± 0.08	> 50
9	4.93 ± 0.08	> 50
11	12.52 ± 0.08	> 50
12	2.94 ± 0.07	> 50
SeaNine-211	1.94 ± 0.41	33.93 ± 2.06

13.26、26.53、13.26 μg·mL^{-1}。化合物 **11** 对 MRSA、*M. jannaschii*、*V. Pelagius*、*V. rotiferianus* 的MIC分别是54.81、27.41、27.41、13.70 μg·mL^{-1}。

Table 3 Anti-bacterial activities of compounds **1**−**13**. MIC: Minimal inhibit concentration; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MJ: *Methanococcus janaschii*; VP: *Vibrio pelagius*; VR: *V. rotiferianus*. a: Compounds **1**−**3**, **5**−**10**, **12** no anti-bacterial activity

Compound[a]	MIC /μg·mL^{-1}			
	MRSA	MJ	VP	VR
4	53.06	13.26	26.53	13.26
11	54.81	27.41	27.41	13.70
Chloramphenicol	12.50	6.25	12.50	12.50
Penicillin	25.00	6.25	12.50	12.50

实验部分

Eyela-1100V-W 型旋转蒸发仪 (日本东京理化株式会社); ZYJ-S 型超净工作台 (苏州净化设备公司); Bruker AVANCE-500 MHz超导核磁共振仪 (瑞士布鲁克公司); MLS-3781L-PC 型高压灭菌锅 (普和希健康医疗器械上海有限公司); UPH-II-20TN 型纯水仪 (成都优普仪器设备有限公司); 中压制备色谱仪 (北京赛普瑞思液相色谱仪); Prominnence LC-2030 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Xevo G2 QTof型高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); J-1500 型圆二色谱仪 (日本 JASCO 公司); SYNERGY H1 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); 薄层色谱及柱色谱用硅胶 (烟台江友硅胶有限公司)。

1 菌株的发酵与培养

在无菌环境下, 将真菌接种于含有海盐的PDA培养基上 (马铃薯粉 6 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g、人工海水 1 L), 在 28 ℃的培养箱中培养 3～4 天进行活化。将活化好的真菌菌丝转移到液体 PDB 培养基 (马铃薯粉 6 g, 葡萄糖 20 g, 人工海水 1 L) 中, 在 28 ℃和 1 800 r·min^{-1} 的摇床中培养 3～4 天, 获得真菌的种子液。将种子液转移到含有大米培养基的 1 L 三角瓶中 (80 g 大米、0.4 g 酵母提取物、0.4 g 葡萄糖、人工海水 120 mL), 发酵 200 瓶, 静置培养 30 天。

2 发酵产物的提取与分离

发酵产物用乙酸乙酯萃取 3 次, 旋转蒸发仪减压蒸馏, 得到提取物 245.2 g。提取物进行硅胶柱色谱分离, 采用二氯甲烷/甲醇体系 (梯度 100∶0～0∶100) 进行梯度洗脱, 经 TLC 检测合并之后得到 17 个馏分 (Fr.1～Fr.17)。Fr.6 (52.7 g) 经过中压反相 ODS 柱分离, 水/乙腈体系 (梯度 95∶5～10∶90) 梯度分离得到 28 个亚组分 (sFr.6.1～sFr.6.28)。sFr.6.6 经半制备柱 (45% 乙腈/水) 分离纯化得到化合物 **13** (t_R = 26.8 min, 3.3 mg)。sFr.6.8 经半制备柱 (20% 乙腈/水) 分离纯化得到化合物 **5** (t_R = 11.1 min, 8.9 mg)、化合物 **6** (t_R = 16.4 min, 12.2 mg)、化合物 **7** (t_R = 17.0 min, 19.9 mg)。sFr.6.9 经半制备柱 (44% 乙腈/水) 纯化, 得到化合物 **8** (t_R = 17.9 min, 46.8 mg)。sFr. 6.26 (1.4 g) 经过中压反相 ODS 柱分离, 采用水/乙腈体系 (梯度 95∶5～10∶90) 梯度分离得到 13 个亚组分 (sFr. 6.26.1～sFr. 6.26.13), sFr.6.26.8 经半制备柱 (45% 乙腈/水) 纯化, 得到化合物 **2** (t_R = 29.5 min, 20.1 mg)、化合物 **11** (t_R = 29.0 min, 9.8 mg) 和化合物 **12** (t_R = 29.8 min, 4.5 mg)。sFr.6.26.9 经半制备柱 (46% 乙腈/水) 纯化得到化合物 **1** (t_R = 30.3 min, 10.8 mg)。sFr.6.26.11 经半制备 HPLC 柱 (65% 乙腈/水) 纯化得到化合物 **9** (t_R = 35.6 min, 8.9 mg) 和化合物 **10** (t_R = 36.2 min; 22.0 mg)。Fr7 (21.6 g) 使用减压柱色谱分离, 采用石油醚/乙酸乙酯 (100∶0～0∶100) 体系, 经 TLC 分析合并之后得到 11 个亚组分 (sFr7.1～sFr7.11)。sFr.7.1 经过中压反相 ODS 柱分离,

水/乙腈体系 (梯度 95∶5～10∶90) 梯度分离得到 22 个亚组分 (sFr.7.1.1～sFr.7.1.22)。sFr.7.1.4 经半制备柱 (50% 乙腈/水) 分离纯化得到化合物 **4** (t_R = 27.8 min, 236.7 mg)。sFr.7.1.10 经半制备柱 (45% 乙腈/水) 分离纯化得到化合物 **3** (t_R = 26.1 min, 19.7 mg)。

3　化合物理化数据

化合物 **1** (asperterrestide C): 淡黄色固体, 易溶于甲醇; $[\alpha]_D^{21}$ = +14.4 (*c* 0.16, MeOH); CD (MeOH) λ_{max} (log ε) 211 (−10.5), 229 (+8.19), 2.49 (−3.20) nm; UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 348 (2.11) nm; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 和 ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) 见表 1, HR-ESI-MS: *m*/*z* 465.250 6 $[M+H]^+$, 487.232 7 $[M+Na]^+$。

化合物 **2** (territrem B): 白色粉末, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 6.99 (2H, s, H-2′/6′), 6.39 (1H, s, H-8), 6.31 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-3), 5.83 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-2), 3.90 (6H, s, 3′/5′-OCH_3), 3.89 (3H, s, 4′-OCH_3), 3.39 (1H, d, *J* = 17.7 Hz, H_α-12), 2.85 (1H, d, *J* = 17.7 Hz, H_β-12), 2.46 (1H, td, *J* = 13.1, 4.8 Hz, H_α-6), 1.91 (2H, m, H-5), 1.81 (1H, m, H_β-6), 1.52 (3H, s, H-15), 1.46 (3H, s, H-16), 1.27 (3H, s, H-13), 1.18 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 204.9 (C, C-1), 164.5 (C, C-11), 163.0 (C, C-7a), 158.7 (C, C-9), 153.6 (CH, C-3), 153.4 (C, C-3′/5′), 140.3 (C, C-4′), 126.9 (C, C-1′), 123.4 (CH, C-2), 102.8 (CH, C-2′/6′), 97.7 (CH, C-8), 97.4 (C, C-11a), 80.1 (C, C-6a), 79.2 (C, C-4a), 77.3 (C, C-12a), 61.1 (CH_3, 4′-OCH_3), 56.4 (CH_3, C-16), 56.4 (CH_3, 3′/5′-OCH_3), 42.8 (C, C-4), 28.6 (CH_2, C-6), 28.1 (CH_2, C-12), 25.9 (CH_2, C-5), 25.6 (CH_3, C-13), 24.0 (CH_3, C-14), 23.9 (CH_3, C-15), 22.0 (CH_3, C-16)。

化合物 **3** (methyl-3, 4, 5-trimethoxy-2-(2-(nicotinamido)benzamido)benzoate): 淡黄色粉末, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 12.27 (s, 1H, 2-NH), 9.27 (s, 1H, H-2′), 9.23 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, 2″-NH), 8.83 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, H-3), 8.72 (1H, dd, *J* = 5.0, 1.6 Hz, H-4′), 8.26 (1H, ddd, *J* = 8.0, 2.4, 1.6 Hz, H-6′), 7.91 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, H-6), 7.62 (1H, m, H-5′), 7.38 (1H, dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, H-4), 7.29 (1H, s, H-6″), 7.24 (1H, td, *J* = 7.6, 1.1 Hz, H-5), 3.99 (3H, s, 4″-OCH_3), 3.91 (6H, s, 3″/5″-OCH_3), 3.83 (3H, s, 7″-OCH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 168.2 (C, C-7″), 167.1 (C, C-7), 163.9 (C, C-7′), 152.5 (CH, C-4′), 151.4 (C, C-5″), 149.1 (CH, C-4″), 148.8 (CH, C-2′), 146.8 (C, C-3″), 140.3 (C, C-2), 135.2 (CH, C-6′), 133.6 (CH, C-4), 130.6 (C, C-1′), 127.9 (CH, C-6), 125.7 (C, C-5″), 123.7 (CH, C-5), 123.6 (CH, C-5′), 121.7 (CH, C-3), 120.3 (CH, C-1″), 118.9 (CH, C-1), 108.6 (CH, C-6″), 61.2 (CH_3, 3″/4″-OCH_3), 56.4 (CH_3, 5″-OCH_3), 52.6 (CH_3, 7″-OCH_3)。

化合物 **4** (butyrolactone I): 无色油状液体, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 7.63 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2′/6′), 6.91 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3′/5′), 6.59 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, H-12), 6.51 (1H, s, H-8), 6.52 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-11), 5.08 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2″), 3.76 (3H, s, 6″-OCH_3), 3.55 (1H, d, *J* = 14.7 Hz, H_α-6), 3.50 (1H, d, *J* = 14.7 Hz, H_β-6), 3.13 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1″), 1.65 (3H, s, H-4″), 1.60 (3H, s, H-5″); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 170.1 (C, C-6″), 169.9 (C, C-2), 156.9 (C, C-4′), 153.1 (C, C-10), 137.6 (C, C-3), 134.2 (C, C-3″), 131.9 (CH, C-8), 129.7 (CH, C-2′/6′), 129.2 (CH, C-12), 128.8 (C, C-4), 126.7 (C, C-9), 124.7 (C, C-7), 122.2 (C, C-1′), 121.6 (C, C-2″), 116.2 (CH, C-3′/5′), 115.2 (CH, C-11), 86.4 (C, C-5), 53.6 (CH_3, 6″-OCH_3), 38.7 (CH_2, C-6), 28.9 (CH_2, C-1″), 25.8 (CH_3, C-5″), 17.8 (CH_3, C-4″)。

化合物 **5** (terrien): 淡黄色粉末, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 6.82 (1H, dq, *J* = 14.0, 6.8 Hz, H-7), 6.38 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-6), 5.99 (1H, s, H-5), 4.88 (1H, br s, H-2), 4.32 (1H, br s, H-3), 1.94 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-8); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 203.4 (C, C-1), 169.0 (C, C-4), 142.0 (CH, C-5), 125.2 (CH, C-6), 125.0 (CH, C-7), 81.9 (CH, C-2/3), 19.8 (CH_3, C-8)。

化合物 **6** ((1*R*,2*S*)-2-hydroxy-5-oxo-3-((*E*)-prop-1-en-1-yl)cyclopent-3-en-1-yl acetate): 黄褐色油状液体, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 6.85 (1H, m, H-7), 6.42 (1H, d, *J* = 16.3 Hz, H-6), 6.05 (1H, s, H-5), 4.88 (1H, br s, H-2), 4.84 (1H, br s, H-3), 2.22 (3H, s, H-2′), 1.96 (3H, dd, *J* = 6.9, 1.2 Hz, H-8); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 197.1 (C, C-1), 173.2 (C, C-1′), 168.5 (C, C-4), 142.5 (CH, C-5), 126.8 (CH, C-6), 125.2 (CH, C-7), 83.4 (CH, C-2), 75.9 (CH, C-3), 20.8 (CH_3, C-2′), 19.8 (CH_3, C-8)。

化合物 **7** ((1*S*,5*R*)-5-hydroxy-4-oxo-2-((*E*)-prop-1-en-1-yl)cyclopent-2-en-1-yl acetate): 黄褐色油状液体, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 6.43 (1H, dq, *J* = 16.0, 6.7 Hz, H-7), 6.32 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-6), 6.14 (1H, s, H-5), 5.71 (1H, s, H-3), 4.23 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2), 2.17 (3H, s, H-2′), 1.93 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-8); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 200.9 (C, C-1), 171.6 (C, C-1′), 164.9 (C, C-4), 140.3 (CH, C-5), 127.6 (CH, C-6), 124.7 (CH, C-7), 79.0 (CH, C-3), 79.0 (CH,

C-2), 21.0 (CH_3, C-2′), 19.6 (CH_3, C-8)。

化合物**8** (4-hydroxykigelin): 白色粉末, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ_H 6.72 (1H, s, H-5), 4.68 (1H, dd, J = 6.5, 2.1 Hz, H-3), 4.44 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-4), 3.89 (3H, s, 7-OCH_3), 3.71 (3H, s, 6-OCH_3), 1.38 (3H, d, J = 6.6 Hz, 3-CH_3); ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ_C 169.0 (C, C-1), 158.1 (C, C-6), 154.6 (C, C-8), 138.3 (C, C-10), 135.4 (C, C-7), 103.2 (CH, C-5), 101.5 (C, C-9), 78.1 (CH, C-3), 65.26 (CH, C-4), 59.8 (CH_3, 6-OCH_3), 56.1 (CH_3, 7-OCH_3), 15.7 (CH_3, 3-CH_3)。

化合物**9** (monacolin K): 无色油状, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ_H 5.95 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-4), 5.78 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 5.50 (1H, t, J = 3.5 Hz, H-5), 5.23 (1H, m, H-8), 4.46 (1H, ddt, J = 11.4, 7.2, 3.5 Hz, H-11), 4.09 (1H, m, H-13), 2.62 (1H, dd, J = 17.3, 4.5 Hz, H_α-14), 2.39 (1H, m, H_β-14), 2.35 (2H, m, H-2/H-6), 2.30 (2H, m, H-8a/H-2′), 1.93 (1H, ddd, J = 14.8, 8.0, 2.3 Hz, H_α-7), 1.82 (1H, dd, J = 15.0, 3.8 Hz, H-1), 1.75 (1H, dq, J = 13.5, 3.2, 2.8 Hz, H_α-12), 1.69 (1H, m, H_α-10), 1.60 (2H, m, H_β-7/H_β-12), 1.54 (1H, m, H_α-3′), 1.39 (1H, dd, J = 13.8, 7.0 Hz, H_α-9), 1.34 (1H, dd, J = 11.9, 5.1 Hz, H_β-3′), 1.29 (1H, dd, J = 11.6, 3.4 Hz, H_β-9), 1.25 (1H, dd, J = 12.5, 4.2 Hz, H_β-10), 1.02 (3H, d, J = 3.2 Hz, H-3″), 1.01 (3H, d, J = 3.8 Hz, H-2″), 0.86 (6H, m, H-1″/4′); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ_C 175.6 (C, C-1′), 170.2 (C, C-15), 133.1 (CH, C-3), 131.6 (C, C-4a), 129.2 (CH, C-5), 128.3 (CH, C-4), 75.8 (CH, C-11), 67.4 (CH, C-8), 61.3 (CH, C-13), 40.7 (CH, C-2′), 38.6 (CH_2, C-14), 36.4 (CH, C-8a), 36.0 (CH, C-1), 35.2 (CH_2, C-12), 32.4 (CH_2, C-10), 31.9 (CH_2, C-7), 30.1 (CH, C-2), 26.9 (CH, C-6), 26.4 (CH_2, C-3′), 23.7 (CH_2, C-9), 22.6 (CH_3, C-2″), 16.1 (CH_3, C-3″), 13.7 (CH_3, C-1″), 11.4 (CH_3, C-4′)。

化合物**10** (methyl ester of lactone ring-opened monacolin K): 淡黄色油状, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 5.97 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-4), 5.77 (1H, dd, J = 9.7, 6.1 Hz, H-3), 5.50 (1H, t, J = 3.3 Hz, H-5), 5.39 (1H, q, J = 3.2 Hz, H-8), 4.26 (1H, m, H-13), 3.78 (1H, m, H-11), 3.70 (3H, s, H-16), 2.49 (2H, d, J = 6.1 Hz, H_α-14/H_β-14), 2.44 (1H, m, H-6), 2.38 (1H, m, H-2), 2.34 (1H, d, J = 6.9 Hz, H-8a), 2.25 (1H, dd, J = 12.9, 2.7 Hz, H-2′), 1.92 (2H, m, H_α-7/H-1), 1.65 (2H, m, H_α-12/H_α-3′), 1.60 (1H, m, H_β-12), 1.56 (2H, m, H_β-7/H_α-10), 1.50 (1H, m, H_β-3′), 1.43 (1H, dt, J = 13.8, 7.0 Hz, H_α-9), 1.43 (1H, dt, J = 13.8, 7.0 Hz, H_β-3′), 1.26 (1H, m, H_β-9), 1.17 (1H, m, H_β-10), 1.11 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-3″), 1.08 (3H, d, J = 7.4 Hz, H-2″), 0.88 (6H, dt, J = 7.5, 4.0 Hz, H-1″/4′); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 177.0 (C, C-1′), 173.0 (C, C-15), 133.4 (CH, C-3), 131.8 (C, C-4a), 129.6 (CH, C-5), 128.3 (CH, C-4), 72.5 (CH, C-11), 69.2 (CH, C-8), 68.1 (CH, C-13), 52.0 (CH_3, C-16), 42.4 (CH_2, C-14), 41.6 (CH_2, C-12), 41.5 (CH, C-2′), 37.6 (CH, C-8a), 36.4 (CH, C-1), 34.9 (CH_2, C-10), 32.9 (CH_2, C-7), 30.7 (CH, C-2), 27.6 (CH, C-6), 26.9 (CH_2, C-3′), 24.3 (CH_2, C-9), 23.0 (CH_3, C-2″), 16.4 (CH_3, C-3″), 14.0 (CH_3, C-1″), 11.8 (CH_3, C-4′)。

化合物**11** (butyrolactone VII): 淡黄色粉末, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 7.63 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2′/6′), 6.91 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3′/5′), 6.60 (1H, dd, J = 8.2, 2.2 Hz, H-12), 6.54 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-11), 6.52 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 5.11 (1H, m, H-2″), 4.26 (2H, qt, J = 7.1, 3.3 Hz, H-7″), 3.53 (2H, m, H-6), 3.15 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-1″), 1.70 (3H, d, J = 1.5 Hz, H-5″), 1.66 (3H, s, H-4″), 1.22 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-8″); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 169.4 (C, C-6″), 169.3 (C, C-2), 156.6 (C, C-4′), 153.4 (C, C-10), 137.3 (C, C-3), 134.7 (C, C-3″), 132.0 (CH, C-8), 129.8 (CH, C-2′/6′), 129.4 (CH, C-12), 128.1 (C, C-4), 126.7 (C, C-9), 124.9 (C, C-7), 122.5 (C, C-1′), 121.6 (CH, C-2″), 116.1 (CH, C-3′/5′), 115.3 (CH, C-11), 86.3 (C, C-5), 63.1 (CH_2, C-7″), 38.7 (CH_2, C-6), 29.4 (CH_2, C-1″), 25.9 (CH_3, C-5″), 17.9 (CH_3, C-4″), 14.1 (CH_3, C-8″)。

化合物**12** (aspernolide A): 淡黄色粉末, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 7.61 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2′/6′), 6.92 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3′/5′), 6.56 (1H, s, H-8), 6.51 (2H, d, J = 1.3 Hz, H-11/12), 3.78 (3H, s, 6″-OCH_3), 3.49 (2H, m, H-6), 2.57 (2H, m, H-1″), 1.72 (2H, t, J = 6.8 Hz, H-2″), 1.27 (6H, s, H-4″/5″); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 169.9 (C, C-6″), 169.1 (C, C-2), 156.5 (C, C-4′), 153.3 (C, C-10), 137.16 (C, C-3), 131.7 (CH, C-8), 129.8 (CH, C-2′/6′), 129.3 (CH, C-12), 127.7 (C, C-4), 123.8 (C, C-7), 122.6 (C, C-1′), 120.5 (C, C-9), 116.8 (C, C-11), 116.1 (CH, C-3′/5′), 86.2 (C, C-5), 74.3 (C, C-3″), 53.7 (C, 6″-OCH_3), 38.8 (CH_2, C-6), 32.8 (CH_2, C-2″), 27.0 (CH_3, C-4″/5″), 22.4 (CH_2, C-1″)。

化合物**13** (*epi*-aszonalenin C): 白色油状液体, 易溶于甲醇; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 8.04 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-21), 7.46 (2H, m, H-4/19), 7.40 (1H, br s, H-16), 7.25 (1H, overlapped, H-20), 7.10 (1H, t, J =

8.0 Hz, H-6), 6.79 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-5/18), 6.12 (1H, s, H-2), 5.89 (1H, dd, J = 17.2, 10.8 Hz, H-2′), 5.16 (1H, d, J = 10.4 Hz, H_{α}-1′), 5.13 (1H, s, H_{β}-1′), 4.11 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-11), 3.14 (1H, d, J = 13.3 Hz, H_{α}-10), 2.58 (1H, dd, J = 13.3, 9.6 Hz, H_{β}-10), 1.20 (3H, s, H-5′), 0.96 (3H, s, H-4′); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C 170.5 (C, C-17), 166.7 (C, C-13), 146.3 (C, C-15), 143.4 (CH, C-2′), 135.9 (C, C-8), 133.4 (CH, C-19), 131.6 (CH, C-21), 128.7 (CH, C-6), 128.7 (C, C-9), 126.9 (CH, C-4), 124.9 (C, C-14), 124.9 (CH, C-20), 120.7 (CH, C-18), 119.6 (CH, C-5), 114.7 (CH_2, C-1′), 81.3 (CH, C-2′), 61.4 (C, C-3), 57.2 (CH, C-11), 41.0 (C, C-3′), 29.7 (CH_2, C-10), 23.2 (CH_3, C-4′), 22.3 (CH_3, C-5′)。

4　Marfey 水解衍生化反应

Marfey 水解反应参考相关文献[21], 在耐压反应瓶中加入 160 μg 的化合物 **1** 以及 6 mol·L^{-1} 的盐酸 250 μL, 在 110 ℃条件下, 电磁搅拌 24 h 之后在 N_2 环境下置换出残留的盐酸。将水解产物溶解在 20 μL 1 mol·L^{-1} 的碳酸氢钠溶液中, 调节 pH 为 7～8, 之后加入 80 μL 的 Marfey 试剂 (1-氟-2,4-二硝基苯-5-*L*-亮氨酰胺, *L*-FDLA; 1% 丙酮溶液), 40 ℃环境下搅拌衍生化反应 1 h, 反应结束后加入 20 μL 1 mol·L^{-1} 的盐酸中和, 用乙腈 (400 μL) 稀释并过滤 (0.22 μm PTFE), 然后进行 HPLC 分析。标准氨基酸 *L*/*D*-Ala、*N*-CH_3-*L*/*D*-Phe、*L*/*D*-Ile 采用同样的方法与 Marfey 试剂衍生化, 并在相同的色谱条件下进行 HPLC 和 LC-MS 分析。

5　抗藤壶幼虫附着活性

藤壶幼虫的养殖方式参照相关文献[9], 在 24 孔板中加入 995 μL 海水 (含有 10～15 个藤壶金星幼虫) 海水及 5 μL DMSO 溶解的样品并吹打均匀, 在室温光照条件下静置培养 24 h。设置浓度为 50 μg·mL^{-1} 的样品进行活性初筛, 再根据初筛结果进行梯度实验, 得到样品抗藤壶金星幼虫附着的 EC_{50} 值。以 DMSO 为阴性对照、seaNine-211 为阳性对照, 每个样品设置 3 个平行。

6　抗乙酰胆碱酯酶活性

参照文献[22]的方法评价化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性。制备所需溶液: 0.1 mol·L^{-1} 磷酸氢二钠–磷酸二氢钠缓冲溶液 (PBS 溶液, pH 8.0)、0.1 U·mL^{-1} 乙酰胆碱酯酶溶液、6.25 mmol·L^{-1} DTNB 溶液和 6.25 mmol·L^{-1} 硫代乙酰胆碱溶液。采用 96 孔板法, 建立实验组、背景对照、阴性对照、空白对照和阳性对照。30 ℃孵育后, 加入 DTNB 和硫代乙酰胆碱等体积混合物。96 孔板于 30 ℃放置 30 min, 在 405 nm 的波长下测量每个孔的吸光度 (OD)。通过计算测定化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制活性。

7　抗菌活性

采用 96 孔板法测定得到的单体化合物对致病菌耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *S. aureus* ATCC43300) 和三株海洋污损细菌詹氏甲烷球菌 (*M. janaschii*)、佩拉吉弧菌 (*V. pelagius*) 和罗氏弧菌 (*V. Rotiferianus*) 的抑制作用[23]。均由华南农业大学张晓勇博士惠赠。单体化合物用 DMSO 溶解初始浓度为 10 mmol·L^{-1} 的样品溶液。活化后的指示菌接入 LB 培养基中 (海洋污损细菌接种到含有 3% 海盐的 LB 培养基中), 30 ℃、180 r·min^{-1} 震荡培养至对数生长期, 调整菌悬液浓度为每毫升含有 10^6 个菌落形成单位 (colony forming units, CFU)。用移液枪吸取 195 μL 菌悬液, 加入 96 孔板, 再加入 5 μL 样品液, 同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照, 青霉素和氯霉素为阳性对照。摇匀密封后, 于 30 ℃培养箱中培养 24 h, 使用酶标仪于 600 nm 条件下测定 OD 值。每个样品设置两个平行, 进行初步抑菌活性的筛选。样品抑菌活性结果用抑制率表示, 抑制率 = (空白值 − 样品值) / 空白值 × 100%。对于有抑菌活性的单体化合物, 采用倍半稀释法继续测定 MIC, 方法同上, 每组设置三个平行。

8　统计学分析

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 所有实验数据以三个独立实验的平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间数据的比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Dunnett 比较检验进行差异分析, 当 $P < 0.05$ 时, 差异具有统计显著性。

作者贡献: 于芹是本文第一作者, 负责化合物分离、结构鉴定和论文撰写; 戚梦凡和王玲芝参与本文的活性测定; 李思参与菌株的发酵和提取; 刘锴参与化合物结构鉴定; 罗小卫、高程海、刘永宏参与实验设计和指导; 徐新亚是本文通讯作者, 负责实验指导、稿件修改工作。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

[1] Zhao CY, Liu HS, Zhu WM. New natural products from marine *Aspergillus* sources [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2016, 56: 331-362.

[2] Liu QQ, Wang R, Cai L, et al. Study on antibacterial secondary metabolites from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. LW152 [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2024, 49: 627-633.

[3] Li HY, Lu CJ, Zhang GS, et al. Diversity and antibacteral activity of extremely halophilie fungi from Beihai zhulin salt field [J]. Guangxi Sci (广西科学), 2023, 30: 478-484.

[4] Lu CJ, Liang LiF, Fu CQ, et al. Effect of 5′-epiequisetin on virulence and biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2023, 48: 1417-

1422.

[5] Fitridge I, Dempster T, Guenther J, et al. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review [J]. Biofouling, 2012, 28: 649-669.

[6] Almeida JR, Freitas M, Cruz S, et al. Acetylcholinesterase in biofouling species: characterization and mode of action of cyanobacteria-derived antifouling agents [J]. Toxins, 2015, 7: 2739-2756.

[7] Faimali M, Falugi C, Gallus L, et al. Involvement of acetyl choline in settlement of *Balanus amphitrite* [J]. Biofouling, 2003, 19 Suppl: 213-220.

[8] He F, Bao J, Zhang XY, et al. Asperterrestide A, a cytotoxic cyclic tetrapeptide from the marine-derived fungus *Aspergillus terreus* SCSGAF0162 [J]. J Nat Prod, 2013, 76: 1182-1186.

[9] Nong XH, Zhang XY, Xu XY, et al. Antifouling compounds from the marine-derived fungus *Aspergillus terreus* SCSGAF0162 [J]. Nat Prod Commun, 2015, 10: 1033-1034.

[10] Peng FC. Structure and anti-acetylcholinesterase activity of 4*α*-(hydroxymethyl)-4*α*-demethylterritrem B [J]. J Nat Prod, 1997, 60: 842-843.

[11] Wang Y, Zheng JK, Liu PP, et al. Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium [J]. Mar Drugs, 2011, 9: 1368-1378.

[12] Cazar ME, Schmeda-Hirschmann G, Astudillo L. Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var terreus [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2005, 21: 1067-1075.

[13] Mitscher LA, Clark GW, Hudson PB. Terrein, an optically active prostaglandin synthon of fungal origin. II, chemical conversion to 4 (*R*)-acetoxy-2-cyclopentenone [J]. Tetrahedron Lett, 1978, 29: 2553-2556.

[14] Veysoglu T, Mitscher L, Swayze JK. A convenient method for the control of selective ozonizations of olefins [J]. Synthesis, 1980, (10): 807-810.

[15] Han N, Yang AM, Ma SY, et al. Chemical constituents and antioxidant and antibacterial activity of a fungal endophyte isolated from *Plantago asiatica* [J]. Chem Nat Compd, 2020, 56: 918-919.

[16] Mi HM, Song HT, Chen L, et al. Studies on the hypocholesterolemic components in hongqu [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1999, 30: 172-174.

[17] Peng B, Peng QY, She JL, et al. Secondary metabolites from the coral-derived fungus *Aspergillus terreus* SCSIO41404 with pancreatic lipase inhibitory activities [J]. Rec Nat Prod, 2022, 16: 639-644.

[18] Haritakun R, Rachtawee P, Chanthaket R, et al. Butyrolactones from the fungus *Aspergillus terreus* BCC 4651 [J]. Chem Pharm Bull, 2010, 58: 1545-1548.

[19] Parvatkar RR, D′Souza C, Tripathi A, et al. Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus* [J]. Phytochemistry, 2009, 70: 128-132.

[20] Yin WB, Cheng J, Li SM. Stereospecific synthesis of aszonalenins by using two recombinant prenyltransferases [J]. Org Biomol Chem, 2009, 7: 2202-2207.

[21] Bunyajetpong S, Yoshida WY, Sitachitta N, et al. Trungapeptins A−C, cyclodepsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscule* [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 1539-1542.

[22] Wang LL, Guan Da, Wang XF, et al. A new isocoumarin from a starfish-associated fungus *Aspergillus* sp. WXF1904 [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 3356-3360.

[23] Lu CJ, Lu ML, Liu XM, et al. Diversity and anti-bacteria activity of the gorgonian derived fungi from Weizhou Island of Guangxi Province [J]. J Trop Oceanogr (热带海洋学报), 2021, 40: 45-52.