

白芍中一种内生真菌 *Penicillium mariae-crucis* 的次生代谢产物研究

王举涛^a 马宗慧^a 王国凯^a 许凤清^a 郁阳^{b,c}
王刚^a 刘劲松^{*a}

(^a安徽中医药大学药学院 现代中药安徽省重点实验室 合肥 230012)

(^b中国科学院大学 北京 100049)

(^c中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室 昆明 650201)

摘要 综合运用多种现代色谱学分离方法对白芍中内生真菌 *Penicillium mariae-crucis* 的次生代谢产物进行了研究, 从其发酵液的乙酸乙酯萃取部位中分离得到了 10 个化合物, 采用多种现代波谱技术确定了这些化合物的化学结构, 分别鉴定为: penicmariae-crucis A (**1**)、penicmariae-crucis B (**2**)、penicmariae-crucis C (**3**)、penicmariae-crucis D (**4**)、(E)-2-甲基己-3-烯二酸(**5**)、2-乙酰基-3-羟基-5-甲氧基苯乙酸(**6**)、2-乙酰基-3-羟基-5-甲氧基苯乙酸甲酯(**7**)、2-乙酰基-3,5-二羟基苯乙酸甲酯(**8**)、 β -谷甾醇(**9**)、过氧化麦角甾醇(**10**); 其中化合物 **1~4** 为新化合物, 化合物 **5** 为新天然产物, 所有化合物均为首次从内生真菌 *P. mariae-crucis* 中分离得到。

关键词 白芍; *P. mariae-crucis*; 内生真菌; 化学成分

Secondary Metabolites of Endophytic Fungus *Penicillium mariae-crucis* from *Paeonia lactiflora* Pall.

Wang, Jutao^a Ma, Zonghui^a Wang, Guokai^a Xu, Fengqing^a Yu, Yang
Wang, Gang^a Liu, Jinsong^{*a}

(^a Anhui Key Laboratory for Modern Chinese Material Medical, School of Pharmacy,
Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012)

(^b University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

(^c State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resource in West China, Kunming Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201)

Abstract Four new compounds, penicmariae-crucis A (**1**), penicmariae-crucis B (**2**), penicmariae-crucis C (**3**), penicmariae-crucis D (**4**), and a new natural product, (E)-2-methylhex-3-enedioic acid (**5**), together with five known compounds, *O*-methylcurvulinic acid (**6**), methyl 2-acetyl-3-hydroxy-5-methoxyphenylacetate (**7**), methyl 2-acetyl-3,5-dihydroxyphenylacetate (**8**), β -sitosterol (**9**) and ergosterol peroxide (**10**), were isolated from the ethyl acetate extract of endophytic fungus *Penicillium mariae-crucis* in *Paeonia lactiflora* Pall. Their structures were established on the basis of extensive spectral analyses. All known compounds were isolated from *P. mariae-crucis* for the first time.

Keywords *P. lactiflora* Pall; *P. mariae-crucis*; endophytic fungus; chemical constituent

白芍为芍药科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)的根^[1], 包含多种生物活性物质, 主要有苷类、萜类、黄酮类、酚类和糖类等化合物^[2]。植物内生菌(endophyte)是

指一类存活于健康植物组织内部, 不引起宿主植物表现出明显病症的微生物^[3]。包括内生真菌和内生细菌, 而内生真菌在植物体内广泛存在于植物的根、茎、叶、种

* Corresponding author. E-mail: jinsongliu@ahcm.edu.cn

Received November 21, 2018; revised January 4, 2019; published online January 31, 2019.

Project supported by the Special Guide for Local Science and Technology Development Guided by the Central Committee of Anhui Province (No. 2017070702D173), the Anhui University of Chinese Medicine (Nos. 2017HXTS31, 2017HXTS2) and the State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China (No. P2017-KF03).

安徽省中央引导地方科技发展专项(No. 2017070702D173)、安徽中医药大学校级探索性科研项目(Nos. 2017HXTS31, 2017HXTS2)和植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室(No. P2017-KF03)资助项目。

子等器官组织内^[4]。内生真菌(endophytic fungi)包括潜伏性病原菌、菌根菌和腐生菌等，内生真菌与宿主植物在长期的共生演化过程中形成了互利共生关系，宿主植物为内生真菌提供稳定的生活环境及生长必需的物质基础，而内生真菌能产生具有促进植物生长、增强植物的抗性和适应不良环境等作用的次生代谢产物^[5]。除此之外，内生真菌还可产生与寄主植物相同或相似的次生代谢产物^[6]。文献[7]报道从毫芍的内生真菌中发现一株细脚棒束孢种菌种，能产生毫芍的主要成分芍药苷。因此本课题组一直致力于寻找能够产生与白芍相同或相似化学成分的内生真菌，扩大天然产物探索途径。本实验在前期研究中从白芍中分离筛选出一个优势菌株 *Penicillium mariae-crucis*，利用多种色谱分离手段，从该菌株发酵液的乙酸乙酯萃取物中分离得到 10 个化合物，分别鉴定为 penicmariae-crucis A (1)、penicmariae-crucis B (2)、penicmariae-crucis C (3)、penicmariae-crucis D (4)、(E)-2-甲基己-3-烯二酸(5)、2-乙酰基-3-羟基-5-甲氧基苯乙酸(6)、2-乙酰基-3-羟基-5-甲氧基苯乙酸甲酯(7)、2-乙酰基-3,5-二羟基苯乙酸甲酯(8)、 β -谷甾醇(9)、过氧化麦角甾醇(10)；其中化合物 1~4 为新化合物，化合物 5 为新天然产物，所有化合物均为首次从内生真菌 *P. mariae-crucis* 中分离得到，并对所有化合物进行体外细胞毒活性试验。结果表明，所有化合物对 A549、MDA-MB-231、KB、KB-VINMCF-7 等 5 种肿瘤细胞株的最小抑制浓度均大于 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1 结果与讨论

1.1 化合物 1 的结构鉴定

化合物 1 为白色片状结晶(甲醇)，HR-ESI-MS 给出化合物分子式为 $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_4$ (*m/z* 179.0311 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, calcd 179.0315)，不饱和度为 4。在 IR 光谱中，1756 和 1717 cm^{-1} 处的吸收峰表明化合物存在羰基。¹³C NMR 低场区

给出的两个季碳信号 δ 170.1 和 165.8 表明分子有两个酯羰基。¹H NMR 高场区中一个单峰信号 δ 3.80 (s, 3H)，且 HMBC 谱中显示 δ 3.80 (s, 3H) 与 165.8 相关，确定分子中存在一个与酯羰基相连的甲氧基。低场区的氢信号 δ 6.77 (t, *J*=3.2 Hz, CH) 和 ¹³C NMR 中的 δ 141.5, 124.1 碳信号表明分子中存在一个双键。化合物 1 的 ¹³C NMR 及 DEPT 谱提示，化合物 1 结构中有 7 个碳原子，其中 3 个季碳原子、1 个次甲基碳原子、2 个亚甲基碳原子、1 个甲基碳原子。表明分子中只存在 1 个与酯羰基相连的端基碳，其余五个碳原子以不饱和内酯环的形式存在。结合 HMBC 谱， δ 6.77 (t, *J*=3.2 Hz, CH) 与 δ 170.1, 165.8 相关，表明双键的位置与羰基相邻，环外酯羰基与双键的另一个碳(δ 141.5)相连。COSY 谱中 δ 3.36~3.39 (m, CH₂) 与 4.47 (t, *J*=7.1 Hz, CH₂) 相关，说明两个亚甲基彼此相邻，同时 HMBC 谱中两个亚甲基与双键碳 δ 124.1 (C-2), 141.5 (C-3), 羰基碳 165.8 (C-6) 相关，验证了不饱和内酯环的存在。所以确定该化合物为 6-氧代-3,6-二氢-2H-吡喃-4-羧酸甲酯(图 1)，命名为 penicmariae-crucis A，其 ¹H NMR、¹³C NMR 数据见表 1。

1.2 化合物 2 的结构鉴定

化合物 2 为白色片状结晶(甲醇)，HR-ESI-MS 给出化合物分子式为 $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ (*m/z* 141.0198 [$\text{M}-\text{H}$]⁻, calcd 141.0193)，不饱和度为 4。通过氢谱和碳谱可以发现，化合物 2 与化合物 1 的结构极其相似，化合物 2 仅比化合物 1 少一个甲氧基信号。IR 光谱中 2880~3094 cm^{-1} 强而宽的峰提示化合物存在羧基，结合化合物 1 的结构，推测化合物 2 为化合物 1 甲氧基被羟基取代后形成的羧酸。HMBC 谱图中的相关信号验证了上述推测，所以确定化合物 2 为 6-氧代-3,6-二氢-2H-吡喃-4-羧酸，命名为 penicmariae-crucis B。

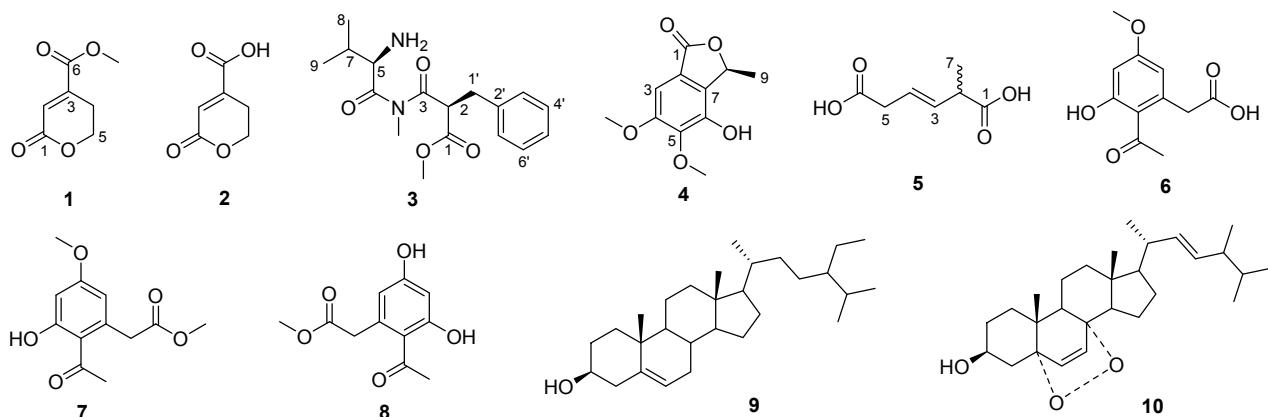


图 1 化合物 1~10 的结构
Figure 1 Structures of compounds 1~10

表 1 化合物 **1** (400/125 MHz, CDCl₃)、**2** (400/125 MHz, CD₃OD) 和 **5** (500 /125 MHz, CD₃OD) 的 NMR 数据
Table 1 NMR data of compounds **1** (400/125 MHz, CDCl₃), **2** (400/125 MHz, CD₃OD) and **5** (500/125 MHz, CD₃OD)

No.	1		2		5	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	—	170.1	—	168.2	—	177.0
2	6.77 (t, 3.2)	124.1	6.61 (t, 3.2)	125.2	3.38 (q, 14.7, 8.2)	46.0
3	—	141.5	—	143.3	5.62~5.71 (m)	129.6
4	3.36~3.39 (m)	27.8	3.34 (dt, 7.2, 3.2)	28.8	5.45~5.51 (m)	128.8
5	4.47 (t, 7.1)	66.4	4.45 (t, 7.0)	68.1	2.47 (dd, 16.7, 5.7)	37.3
6	—	165.8	—	172.4	—	175.2
7	—	—	—	—	1.69 (d, 6.4)	18.1
OCH ₃	3.80 (s)	52.2	—	—	—	—

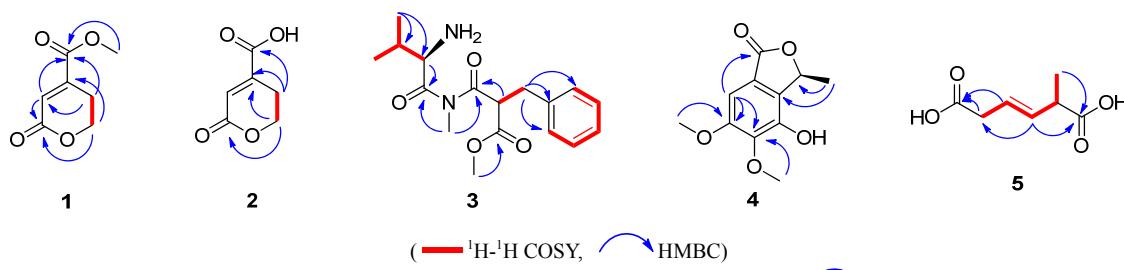


图 2 化合物 **1**~**5** 主要的 ^1H - ^1H COSY(—)和 HMBC(—)相关
Figure 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC relevant of compounds **1**~**5**

1.3 化合物 3 的结构鉴定

HR-ESI-MS 给出化合物分子式为 C₁₇H₂₄N₂O₄ (*m/z* 343.1627 [M+Na]⁺, calcd 343.1628), 不饱和度为 7. IR 信号显示分子中含有氨基(3439 cm⁻¹), 羰基(1734、1632 cm⁻¹). ^1H NMR 低场区 δ 7.19~7.29 (m) 的 5 个氢信号, 提示分子结构中存在一个单取代苯环, ^{13}C NMR 低场区 δ 173.2, 173.2, 173.6 的三个季碳信号提示分子中存在 3 个羰基, 因此 7 个不饱和度分别由苯环和羰基分配, 剩下的片段应以链状形式存在. COSY 谱中 δ 0.72 (CH₃, s)/1.85~1.87 (m, CH), 0.74 (CH₃, s)/1.85~1.87 (m, CH), 1.85~1.87 (m, CH)/4.17 (d, *J*=6.8 Hz, CH) 的相关, HMBC 谱中 δ 4.17 (m, CH)/173.6 (s) 的相关提示化合物含有缬氨酸片段. 同时 HMBC 谱显示 δ 1.96 (s, CH₃)/173.2 (s), 173.6 (s) 相关, 表明该甲基周围有两个羰基碳, 且单峰甲基的化学位移偏向低场, 所以该甲基应连在氮原子上; 一个亚甲基 δ 38.2 (t) 上的两个氢信号 δ 3.16 (dd, *J*=14.0, 5.1 Hz, CH), 2.96 (dd, *J*=13.9, 9.7 Hz, CH) 分别与苯环上的两个碳信号 δ 138.2 (s), 130.2 (d) 相关, 表明该亚甲基 δ 38.2 (t) 应与苯环相连; COSY 谱中 δ 4.69 (dd, *J*=9.8, 5.1 Hz, CH) 与 3.16 (dd, *J*=14.0, 5.1 Hz, CH), 2.96 (dd, *J*=13.9, 9.7 Hz, CH) 相关, 表示 C-1' (δ 38.2) 与 C-2 (δ 55.1) 相邻, 经查阅文献发现上述数据与化合物 teretrione D^[8]相似. 不同的是化合物 **3** 的 HMBC 谱中 δ 4.17 (m, CH) 仅与一个羰基 δ 173.6 (C-5) 相关, 同时 ^1H NMR 中多了一个甲氧基 δ 3.69 (s, CH₃), 且与 δ 173.2 (C-1) 有相关; 因此推断化合物 **3** 的结构可由

teretrione D 酰胺键断裂得到, 而两者的旋光值也较为接近, 均为左旋, 说明化合物 teretrione D 在开环时构型并未发生改变, 所以化合物 **3** 的构型应与 teretrione D 保持一致, 因此化合物 **3** 的结构确定为(*R*)-3-((*R*)-2-氨基-N,3-二甲基丁酰胺基)-2-苄基-3-氧代丙酸甲酯, 命名为 penicmariae-crucis C.

1.4 化合物 4 的结构鉴定

HR-ESI-MS 给出化合物分子式为 C₁₁H₁₂O₅ (*m/z* 247.0585 [M+Na]⁺, calcd 247.0577), 不饱和度为 6. 由 IR 信号确定含有羟基(3420 cm⁻¹), 羰基(1740 cm⁻¹). ^{13}C NMR 显示有 11 个碳信号, 6 个季碳原子, 2 个次甲基碳原子, 3 个甲基碳原子. ^1H NMR 中显示含有两个甲氧基 δ 3.89 (s, CH₃), 3.85 (s, CH₃), 一个甲基 δ 1.60 (d, *J*=6.6 Hz, CH₃), 一个烯氢 δ 6.92 (s, CH). 除去 3 个甲基碳原子, 该化合物是由 8 个碳原子组成不饱和度为 6 的骨架分子, 其中一个 C 原子为羰基, 因此推测该化合物的骨架是苯并五元内酯环. δ 6.92 (s, CH) 为苯环上的烯质子氢, HMBC 谱中 δ 6.92 (s, CH) 与羰基 δ 173.0 (s) 相关, 表明该质子氢与羰基同侧且相近; 此外两个甲氧基 δ 3.89 (s, CH₃), 3.85 (s, CH₃) 分别与苯环上两个碳 δ 156.4 (s), 143.0 (s) 相关, 表明两个甲氧基连在苯环上, 同时烯质子氢 δ 6.92 (s, CH) 也与 δ 143.0 (s), 156.4 (s) 相关, 鉴于该烯质子氢与环外羰基(δ 173.0)相近, 所以苯环上与甲氧基相连的两个碳应在烯质子氢的同一侧, 彼此相邻. 甲基 δ 1.60 (d, *J*=6.6 Hz, CH₃) 与 δ 78.2 (d) 相关, 表

表 2 化合物 3 和 4 (400/125 MHz, CD₃OD) 的 NMR 数据
Table 2 NMR data of compounds 3 and 4 (400/125 MHz, CD₃OD)

Position	3		4	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	—	173.2	—	173.0
2	4.69 (dd, 9.8, 5.1)	55.1	—	121.9
3	—	173.2	6.92 (s)	99.6
4	—	—	—	156.4
5	—	173.6	—	143.0
6	4.17 (d, 6.8)	59.9	—	146.7
7	1.85~1.87 (m)	31.9	—	133.5
8	0.74 (s)	19.6	5.52 (q, 13.1, 6.5)	78.2
9	0.72 (s)	18.1	1.60 (d, 6.6)	19.5
1'	3.16 (dd, 14.0, 5.1); 2.96 (dd, 13.9, 9.7)	38.2	—	—
2'	—	138.2	—	—
3'	7.25~7.29 (m)	130.2	—	—
4'	7.19~7.21 (m)	129.5	—	—
5'	7.19~7.21 (m)	127.9	—	—
6'	7.19~7.21 (m)	129.5	—	—
7'	7.25~7.29 (m)	130.2	—	—
1-OCH ₃	3.69 (s)	52.7	—	—
4-OCH ₃	—	—	3.89 (s)	61.2, q
5-OCH ₃	—	—	3.85 (s)	56.7, q
NCH ₃	1.96 (s)	22.4	—	—

明其在五元内酯环上。通过查阅文献[9]发现，化合物 4 的结构与化合物(S)-3-Ethyl-5,6,7-trimethoxyphthalide 非常相似，只是 6 位羟基与甲氧基取代的不同，8 位甲基与乙基取代的不同。通过两者的数据比对再次确定化合物 4 的结构，同时通过比较两者的旋光值，均为左旋，推断化合物 4 的 8 位构型为 S 构型。综上所述，确定化合物 4 为(S)-4-羟基-5,6-二甲氧基-3-甲基异苯并呋喃-1(3H)-酮，命名为 penicmariae-crucis D。

1.5 化合物 5 的结构鉴定

HR-ESI-MS 给出化合物分子式为 C₇H₁₀O₄ (m/z 181.0470 [M+Na]⁺, calcd 181.0471)，不饱和度为 3。由 IR 谱显示结构中含有羟基(3422 cm⁻¹)、羰基(1712 cm⁻¹)。¹³C NMR 及 DEPT 显示 7 个碳信号，其中 2 个季碳原子，3 个次甲基碳原子，1 个亚甲基碳原子，1 个甲基碳原子。¹H NMR 中显示含有一个甲基 δ 1.69 (m, CH₃)，两个烯氢 δ 5.66 (m, CH), 5.48 (m, CH)。HMBC 相关谱中 1.69 (m, CH₃)/177.0 (s), 5.66 (m, CH)/177.0 (s), 37.3 (t), 5.48 (m, CH)/175.2 (s), 2.47 (dd, 16.7, 5.7)/175.2 (s) 相关，COSY 谱中 1.69 (d, J =6.4 Hz, CH₃)/3.38 (q, CH, 14.7, 8.2), 3.38 (q, J =14.7, 8.2 Hz, CH)/5.66 (m, CH), 5.48 (m, CH)/2.47 (dd, J =16.7, 5.7 Hz, CH₂) 相关，结合烯质子氢的偶合常数为 15.4 Hz，确定化合物中双键为反式。根据上述数据确定化合物 5 为(E)-2-甲基己-3-烯二酸。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

正相柱层析硅胶(200~300 目，由青岛海洋化工厂)，反相柱层析硅胶[RP-18 (45~70 μm)，日本富士化工有限公司]，Sephadex LH-20(GE)，MCI 柱层析硅胶[MCI gel CHP-20P(75~150 μm)日本三菱化工]；制备型 HPLC(型号：Agilent 1260 型；色谱柱：Zorbax SB-C18, 5 μm , 9.4 mm×150 mm, 流速 8 mL/min; 21.2 mm×150 mm, 流速 16 mL/min)；MPLC Sepacore System (配备泵控制系统 C-615，泵模块 C-605，自动接收器 C-600，填料 RP-18, 45~70 μm , 4.5~50 cm；瑞士 BÜCHI 实验室技术服务有限公司)；NMR 谱由 Bruker AVIII-600、DRX-500 或者 AV-400 型核磁共振波谱仪在室温下测定(内标：TMS)；质谱由 Waters Auto Premier P776 质谱仪、Agilent G6230AA TOF LC/MS 质谱仪或者 Agilent UPLC/Q-TOF 质谱质谱仪测定；比旋光度是由 Jasco P-1020 自动数字旋光仪测定；红外光谱由 Bruker tensor-27 傅里叶变换红外光谱仪测定，KBr 压片。

2.2 植物材料

白芍植株采集于安徽省亳州市谯城区谯东镇崔柳行村农户毫芍种植园(北纬 33°51'12.74, 东经 115°53'24.06)，经安徽中医药大学方成武教授鉴定为芍药科芍药属芍药(*P. lactiflora* Pall), *P. mariae-crucis* 菌株从新鲜

白芍中分离得到，内生真菌分子鉴定由上海生工生物工程有限公司完成。菌株活化好后放入4℃冰箱，菌种保存于安徽中医药大学天然药物化学研究室。

2.3 提取与分离

取保存在斜面试管中的 *P. mariae-crucis* 菌株进行活化，将活化3代后的菌株用灭菌后的打孔器打取菌饼置于装有1L PDB(称取马铃薯粉5g加入葡萄糖15g，蛋白胨10g以及5g氯化钠，然后加蒸馏水定容至1L)培养基的锥形瓶中，放入恒温振荡培养箱中，于28℃、135r/min振荡培养7d。将发酵液以10%的比例分别加入已灭菌的大米培养基中置于28℃恒温培养箱共培养，待菌丝长满大米培养基后取出用乙酸乙酯提取，得发酵提取物，提取物减压浓缩得到待分离浸膏。

乙酸乙酯提取部位浸膏31g，经硅胶柱色谱分离(石油醚-丙酮, $V:V=20:1$)梯度洗脱, TLC检识，合并相同组分得13个组分(P1~P13)。P2经MPLC(甲醇-水, $V:V=10:90\sim100:0$)梯度洗脱，再经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮, $V:V=20:1$)系统洗脱，经Sephadex LH-20柱(氯仿-甲醇, $V:V=1:1$)纯化得化合物⁹(13mg)和¹⁰(5.0mg)。P3析出沉淀，沉淀经反复重结晶和Sephadex LH-20柱(甲醇, 100%)纯化得化合物⁴(2.6mg)。P4经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮, $V:V=20:1$)系统洗脱，经Sephadex LH-20柱(氯仿-甲醇, $V:V=1:1$)、高效液相色谱($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, $V:V=35:65\rightarrow50:50$, 25min)制备得化合物⁵(3.1mg)。P5经反向中压色谱(甲醇-水, $V:V=10:90\sim100:0$)梯度洗脱，再经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮, $V:V=15:1$)，系统洗脱，析出片状结晶，结晶经反复重结晶得化合物²(5.2mg)。P6经反向中压色谱(甲醇-水, $V:V=20:80\sim100:0$)梯度洗脱，再经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮, $V:V=12:1$)系统洗脱，析出片状结晶，结晶经Sephadex LH-20柱(氯仿-甲醇, $V:V=1:1$)纯化得化合物¹(4.7mg)。P7经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮, $V:V=12:1$)系统洗脱，经高效液相色谱($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, $V:V=5:95\rightarrow30:70$, 36min)制备，再经Sephadex LH-20柱(丙酮, 100%)纯化得化合物⁶(1.1mg),⁷(3.2mg),⁸(5.7mg)。P8经反向中压色谱(甲醇-水, $V:V=30:70\sim100:0$)梯度洗脱，再经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮, $V:V=10:1$)系统洗脱、高效液相色谱($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, $V:V=25:7\rightarrow40:60$, 25min)制备得化合物³(2.2mg)。

2.4 波谱数据

Penicmariae-crucis A (**1**): 白色片状结晶(甲醇)，熔点: 206~208℃。[α]_D^{23,7}-2.7(c 0.92, CHCl_3)；UV(MeOH) λ_{max} [log ε/(L·mol⁻¹·cm⁻¹)]: 241(2.60), 228(3.25), 220(3.26), 202(3.32) nm; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数

据见表1; IR (KBr) ν_{max} : 3411, 1756, 1717, 1231 cm⁻¹。HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_4\text{Na}$ [M+Na]⁺ 179.0315, found 179.0311。

Penicmariae-crucis B (**2**): 白色片状结晶，熔点: 316~318℃。[α]_D^{23,3}-4.4(c 0.12 MeOH); UV (MeOH) λ_{max} [log ε/(L·mol⁻¹·cm⁻¹)]: 224(4.15), 195(2.89) nm; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表1; IR (KBr) ν_{max} : 3423, 3056, 2998, 1763, 1427, 1255 cm⁻¹。HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 141.0193, found 141.0198。

Penicmariae-crucis C (**3**): 白色粉末，熔点: 187~188℃。[α]_D^{25,5}-79.3(c 0.011, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} [log ε/(L·mol⁻¹·cm⁻¹)]: 202(2.98) nm; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表2; IR (KBr) ν_{max} : 3439, 2962, 2927, 1632, 600 cm⁻¹。HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ [M+Na]⁺ 343.1627, found 343.1628。

Penicmariae-crucis D (**4**): 白色粉末，熔点: 234~235℃。[α]_D^{23,7}-20.3(c 0.10, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} [log ε/(L·mol⁻¹·cm⁻¹)]: 215(4.39), 263(3.74), 295(3.36) nm; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表2; IR (KBr) ν_{max} : 3420, 2936, 1740, 1354, 1117 cm⁻¹; HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_4\text{Na}$ [M+Na]⁺ 247.0577, found 247.0585。

(E)-2-甲基己-3-烯二酸(**5**): 白色粉末，熔点: 161~163℃。UV (MeOH) λ_{max} [log ε/(L·mol⁻¹·cm⁻¹)]: 542(1.30), 473(1.30), 204(3.20) nm; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表1; IR (KBr) ν_{max} : 3422, 3108, 1712 cm⁻¹。HR-ESI-MS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ [M + Na]⁺ 181.0471, found 181.0470。

2.5 活性筛选

磺酰罗丹明B(SRB)法评价化合物的抗肿瘤活性^[10]。取处于指数增长期细胞进行预培养24 h，使细胞贴壁，去除上清加已配好的药物(初筛药物浓度为40 μmol·L⁻¹，在该浓度对肿瘤细胞抑制率大于50%的化合物进行复筛)进行处理，2 d后先用三氯醋酸(TCA)固定1 h，再用蒸馏水洗5遍，干燥后加SRB染色15 min，然后用醋酸洗5遍干燥后Tris溶解。最后选择490 nm波长下，读取各光吸收值，并记录结果。

辅助材料(Supporting Information) 化合物**1~5**的¹H NMR, ¹³C NMR, UV, IR, HR-ESI-MS, 1D NMR 和 2D NMR 原始谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Zhang, L.; Zhao, B. J.; Yuan, J. R.; Wang, C. F.; Feng, L.; Jia, X. B. *China J. Chin. Mater. Med.* **2016**, 41, 1835 (in Chinese).
(章丽, 赵冰洁, 袁嘉瑞, 汪春飞, 封亮, 贾晓斌, 中国中药杂志,

- 2016, 41, 1835.)
- [2] Shi, Y. *M.S. Thesis*, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an, 2015 (in Chinese).
(石钰, 硕士论文, 陕西科技大学, 西安, 2015.)
- [3] Wang, H. H.; Li, G.; Peng, X. P.; Lou, H. X. *Acta Pharm. Sin.* **2018**, 53, 1 (in Chinese).
(王航航, 李刚, 彭晓娉, 娄红祥, 药学学报, 2018, 53, 1.)
- [4] Chen, X. D. *Microbiology* (Beijing, China) **2012**, 39, 282 (in Chinese).
(陈向东, 微生物学通报, 2012, 39, 282.)
- [5] Hou, X. Q.; Guo, S. X. *China J. Chin. Mater. Med.* **2014**, 39, 3232 (in Chinese).
(侯晓强, 郭顺星, 中国中药杂志, 2014, 39, 3232.)
- [6] Liang, Y. M.; Yu, Y.; Sun, Y. P.; Liu, J. S.; Ma, Z. H.; Liu, H. T.; Wang, G. *Nat. Prod. Res.* **2018**, 30, 783 (in Chinese).
- (梁益敏, 郁阳, 孙云鹏, 刘劲松, 马宗慧, 刘海涛, 王刚, 天然产物研究与开发, 2018, 30, 783.)
- [7] Cheng, X. Z.; Xu, Y.; Ge, Y. B.; Wei, L.; Yan, A. L.; Zhang, Y.; Liu, X. L.; Xu, J.; Guo, H. *J. Anhui Agric. Sci.* **2016**, 44, 162 (in Chinese).
(程孝中, 许勇, 葛永斌, 魏磊, 燕傲蕾, 张宇, 刘西岭, 徐娟, 郭慧, 安徽农业科学, 2016, 44, 162.)
- [8] Shaala, L. A.; Youssef, D. T. *Mar. Drugs* **2015**, 13, 1698.
- [9] Chou, T. H.; Chen, I. S.; Hwang, T. L.; Wang, T. Ch.; Lee, T. H.; Cheng, L. Y.; Chang, Y. C.; Cho, J. Y.; Chen, J. J. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1692.
- [10] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, 82, 1107.

(Li, L.; Fan, Y.)