红树林耐酸真菌 *Aspergillus* sp. OUCMDZ-1914 次生代谢产物研究林亚伟^a 王立平^b 王义^{*,a} 王伟^a 郝杰杰^a 朱伟明^{*,a}^(a) 中国海洋大学医药学院 海洋药物教育部重点实验室 青岛 266003^(b) 贵州省及中国科学院天然产物化学重点实验室 贵阳 550002

摘要 为获得活性微生物代谢产物,从海南文昌红树林根泥样品中分离筛选到耐酸真菌 *Aspergillus* sp. OUCMDZ-1914,通过酸性条件发酵培养,发酵产物经过硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和半制备高效液相色谱进行分离纯化,运用 NMR、MS、UV、IR、X 射线单晶衍射等手段鉴定了 9 个化合物的化学结构,即: (2Z,3E,5E,7E,9E)-4,10-二甲基-11-[3-(2,5-二氧亚基四氢吡咯)基]-2-(2-羟基乙亚基)-11-氧亚基-3,5,7,9-十一碳四烯酸甲酯(1)、RKB-3384A (2)、JBIR-74 (3)、JBIR-75 (4)、secalonic acid D (5)、oxaline (6)、meleagrins (7)、okaramine H (8)、citreorosein (9),其中 1 为新化合物。活性测试表明化合物 2 对甲型流感病毒 H1N1 的抑制活性与阳性药利巴韦林相当,IC₅₀ 为 116.2 μmol/L; 化合物 5 对 A549、MCF-7 和 K562 细胞株表现出较好的抑制活性,IC₅₀ 分别 0.23、4.45 和 3.68 μmol/L; 化合物 6 具有 α-糖苷酶抑制活性,IC₅₀ 为 0.84 mmol/L,与阳性药阿卡波糖相当。

关键词 红树林真菌; 天然产物; 生物活性

Bioactive Natural Products of *Aspergillus* sp. OUCMDZ-1914, an Aciduric Fungus from the Mangrove SoilsLin, Yawei^a Wang, Liping^b Wang, Yi^{*,a} Wang, Wei^a Hao, Jiejie^a Zhu, Weiming^{*,a}^(a) Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003^(b) Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002

Abstract In order to investigate bioactive metabolites from aciduric fungi, *Aspergillus* sp. OUCMDZ-1914 was isolated from the mangrove soil in Wenchang Hainan, China. The strain was fermented under low pH and the products were extracted and the extract was purified by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC. The structures were identified by means of NMR, MS, UV, IR and X-ray single crystal diffraction. As a results, a new compound, methyl (2Z,3E,5E,7E,9E)-4,10-dimethyl-11-(2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-2-(2-hydroxyethylidene)-11-oxoundeca-3,5,7,9-tetraenoate (1), along with eight known ones, RKB-3384A (2), JBIR-74 (3), JBIR-75 (4), secalonic acid D (5), oxaline (6), meleagrins (7), okaramine H (8) and citreorosein (9), was obtained. Compound 2 showed H1N1 influenza virus inhibition with an IC₅₀ value of 116.2 μmol/L. Compound 5 showed cytotoxicities against A549, MCF-7 and K562 cell lines with the IC₅₀ values of 0.23, 4.45 and 3.68 μmol/L respectively. Compound 6 showed α-glucosidase inhibition with an IC₅₀ value of 0.84 mmol/L.

Keywords mangrove fungi; natural products; bioactivities

红树林是分布于热带亚热带海岸潮间带的木本植物群落^[1]。红树林根部长期遭受潮水周期性浸淹,其土壤具有盐渍化、沼泽化、强酸性、有机质含量高等主要

特征^[2],根部的缺氧环境使根部土壤中富含特殊的共附微生物,代谢产生不同于一般环境下的结构新颖、富有活性、复杂多样的次生代谢产物^[3,4]。然而对于红树林

* E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn, wangyi0213@ouc.edu.cn

Received April 7, 2015; revised May 6, 2015; published online May 14, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81373298 & 21172204), the National High-Tech R&D Program of China (Nos. 2013AA092901 & 2012AA092104), and the NSFC-Shandong Joint Fund for Marine Science Research Centers (No. U1406402).

国家自然科学基金(Nos. 81373298 & 21172204)、高科技发展计划(Nos. 2013AA092901 & 2012AA092104)以及国家自然科学基金-山东联合资助海洋研究中心(No. U1406402)资助项目。

耐酸微生物代谢产物的研究却罕有报道. 在前期研究中, 我们对该环境下的微生物进行分离筛选, 并采用酸性条件进行胁迫发酵培养, 分离得到了结构新颖的活性代谢产物^[5]. 为进一步研究耐酸微生物的活性代谢产物, 作者从海南文昌红树林根泥样品中分离筛选到一株耐酸真菌 OUCMDZ-1914, 该真菌酸性条件下小试发酵的提取物对甲型 H1N1 流感病毒表现出较强的抑制活性, 并且酸性培养物较中性培养物显示出更加丰富的化学多样性. 通过缓冲盐(磷酸氢二钠-柠檬酸)进行 pH 调节, 在 pH 3.0 条件下对真菌进行规模发酵, 对代谢产物采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和半制备高效液相色谱等进行分离纯化, 共得到 9 个化合物, 其中化合物 **1** 为新化合物. 活性评价结果表明, 化合物 **2** 具有抑制甲型流感病毒 H1N1 活性、IC₅₀ 为 116.2 $\mu\text{mol/L}$ (阳性药利巴韦林, IC₅₀ 138.1 $\mu\text{mol/L}$); 化合物 **5** 表现出肿瘤细胞毒活性, 对 A549、MCF-7 和 K562 细胞的 IC₅₀ 分别 0.23、4.45 和 3.68 $\mu\text{mol/L}$; 化合物 **6** 具有 α -糖苷酶抑制活性, 其 IC₅₀ 为 0.84 mmol/L(阳性药阿卡波糖, IC₅₀ 0.95 mmol/L).

1 结果与讨论

1.1 化合物 1 的结构鉴定

化合物 **1** 的高分辨质谱(HRESIMS)给出其准分子离子峰 m/z 374.1602 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 提示分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_6$, 不饱和度为 10. IR 显示分子中存在烯键(1672 cm^{-1})和羰基(1711 cm^{-1}); 紫外光谱于 λ_{max} 360 nm 有强吸收, 与 RKB-3384A (**2**)相近, 提示其可能为多不饱和脂肪酸酯和酰胺亚胺类化合物^[6]. 化合物 **1** 的 ^1H NMR 谱(TMS 作内标)在低场区给出一个酰胺氢信号 δ 11.35 (s, 1H)和 7 个烯氢质子信号 δ 7.44 (d, $J=11.2\text{ Hz}$, 1H), 6.87 (dd, $J=$

11.2, 16.7 Hz, 1H), 6.53 (dd, $J=11.0, 16.7\text{ Hz}$, 1H), 6.75 (t, $J=7.2\text{ Hz}$, 1H), 6.70 (d, $J=18.7\text{ Hz}$, 1H), 6.60 (dd, $J=11.0, 18.7\text{ Hz}$, 1H), 6.24 (s, 1H), 在高场区 δ 4.90 (dd, $J=5.0, 10.1\text{ Hz}$, 1H)处给出次甲基氢信号、 δ 3.95 (d, $J=7.2\text{ Hz}$, 2H)给出连氧亚甲基氢信号、 δ 3.67 (s, 3H)给出甲氧基信号、 δ 2.81 (dd, $J=10.0, 21.5\text{ Hz}$, 1H)和 2.74 (dd, $J=5.0, 21.7\text{ Hz}$, 1H)给出亚甲基的两个氢信号、 δ 1.86 (s, 3H)和 1.61 (s, 3H)处给出两个甲基氢信号. 其 ^{13}C NMR 谱(TMS 作内标)给出 20 个碳信号, 其中在低场区出现 4 个羰基信号(δ_{C} 195.6、178.4、176.0、167.0); 结合 DEPT 谱分析, 确定分子中还存在 3 个 CH_3 信号(δ_{C} 12.1、14.4、52.4)、2 个 CH_2 信号(δ_{C} 59.2、34.2)、8 个 CH 信号(δ_{C} 144.8、143.5、142.6、141.1、129.8、129.5、127.4、48.7)、3 个季 C 信号(δ_{C} 139.0、134.6、128.3). 这些氢谱与碳谱数据与化合物 **2** 很相似, 其差别表现在一个羟甲基信号($\delta_{\text{H/C}}$ 3.95/59.2, 表 1)取代了甲基信号($\delta_{\text{H/C}}$ 1.97/16.0), ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关信号(图 2)进一步确定羟基化发生在 18-位, 即化合物 **1** 的构造为 4,10-二甲基-11-[3-(2,5-二氧亚基四氢吡咯)基]-2-(2-羟基乙亚基)-11-氧亚基-3,5,7,9-十一碳四烯酸甲酯. 化合物 **1** 的相对构型通过偶合常数以及 NOESY 谱确定($J_{\text{H5-H6}}=18.7\text{ Hz}$, $J_{\text{H7-H8}}=16.7\text{ Hz}$)确定了 5,7-两个双键($\Delta^{5,7}$)的构型均为 *E*-型; NOESY 谱中 H-3 和 H-17 的 NOE 相关确定 $\Delta^{2(18)}$ -双键的构型为 *Z*-型, OCH_3 与 H-19、H-8 与 H-20 和 H-9 与 H-12 的 NOE 相关确定二个双键 $\Delta^{3,9}$ -的构型均为 *E*-型. 考虑到化合物 **1** 的比旋光值很小, 怀疑其为外消旋体, 故对其进行了 HPLC 手性分析与拆分. 结果表明确有两个面积约为 1:1 的吸收峰, 进一步将其拆分为 **1a** 和 **1b**, 拆分后的两个化合物在相同的条件下分别进行手性分析, 结果发现拆分后的 **1a** 变成 **1a** 和 **1b**, **1b** 同样变成 **1a**

图 1 化合物 1~9 的结构
Figure 1 Structures of compounds 1~9

表1 化合物1的¹H和¹³C NMR数据(600, 150 MHz, DMSO-*d*₆, TMS)
Table 1 ¹H and ¹³C NMR data of compound 1 (600, 150 MHz, DMSO-*d*₆, TMS)

Position	δ _C	δ _H (J in Hz)	Position	δ _C	δ _H (J in Hz)
1	167.0, qC		12	48.7, CH	4.90 (dd, 5.0, 10.1 Hz)
2	128.3, qC		13	176.0, qC	
3	127.4, CH	6.24 (s)	14 (NH)		11.35 (s)
4	139.0, qC		15	178.4, qC	
5	141.1, CH	6.70 (d, 18.7 Hz)	16	34.2, CH ₂	2.81 (dd, 10.0, 21.5 Hz), 2.74 (dd, 5.0, 21.7 Hz)
6	129.8, CH	6.60 (dd, 11.0, 18.7 Hz)	17	144.8, CH	6.75 (t, 7.2 Hz)
7	142.6, CH	6.53 (dd, 11.0, 16.7 Hz)	18	59.2, CH ₂	3.95 (d, 7.2 Hz)
8	129.5, CH	6.87 (dd, 11.2, 16.7 Hz)	19	14.4, CH ₃	1.61 (s)
9	143.5, CH	7.44 (d, 11.2 Hz)	20	12.1, CH ₃	1.86 (s)
10	134.6, qC		OCH ₃	52.4, CH ₃	3.67 (s)
11	195.6, qC

图2 化合物1的¹H-¹H COSY、HMBC和主要的NOESY相关以及互变消旋化

Figure 2 ¹H-¹H COSY, key HMBC and NOESY correlations and the possible racemic pathway of compound 1

和1b, 1a和1b的峰面积同样接近1:1, 证实化合物1为外消旋体。原因可能是12-次甲基与两个吸电子的羰基相连, 极易发生11,12-位酮式-烯醇互变而消旋化(图2)。故化合物1鉴定为外消旋体: (2Z,3E,5E,7E,9E)-4,10-二甲基-11-[3-(2,5-二氧亚基四氢吡咯)基]-2-(2-羟基乙亚基)-11-氧亚基-3,5,7,9-十一碳四烯酸甲酯。

1.2 其它化合物的结构鉴定

经过波谱数据(MS、NMR)分析、比旋光值[2: [α]_D²⁵ - 0.12 (*c* 0.20, CH₃OH)、3: [α]_D²⁵ + 75.20 (*c* 0.20, CHCl₃)、4: [α]_D²⁵ + 83.00 (*c* 0.20, CHCl₃)、5: [α]_D²⁵ + 50.00 (*c* 0.20, CHCl₃)、6: [α]_D²⁵ - 37.00 (*c* 0.50, CHCl₃)、7: [α]_D²⁵ - 35.16 (*c* 0.24, CH₃OH)、8: [α]_D²⁵ + 500.00 (*c* 0.20, MeOH)], 结合文献调查, 已知化合物2~9的结构依次鉴定为: 外消旋的RKB-3384A (2)^[6], JBIR-74 (3)^[7], JBIR-75 (4)^[7], secalononic acid D (5)^[8], oxaline (6)^[9,10], meleagrin (7)^[11], okaramine H (8)^[12]和 citreorosein (9)^[13]。此外, 化合物5的结构还用铜靶X射线单晶衍射证实(图3), 其为淡黄色针状晶体; 分子式为C₃₂H₃₀O₁₄; 相对分

子质量 M_r =638; m.p. 219~220 °C; 晶系为单斜晶系; 晶胞参数为 $a=17.6386$ (11) Å、 $b=7.1496$ (5) Å、 $c=13.1496$ (8) Å, $\alpha=90^\circ$ 、 $\beta=93.6380$ (10)°、 $\gamma=90^\circ$ 、 $V=1654.94$ (18) Å³; $D_c=1.410$ mg/m³; $Z=2$; $F(000)=740$, 铜靶X射线、 $\mu=0.960$ mm⁻¹, 采用SHELXS-97方法; 空间群为C2, 最终偏离因子 $R_1=0.0413$, $wR_2=0.1115$ [$I>2\sigma(I)$], 晶体数据已提交到剑桥晶体数据库, 其CCDC号为1022724。

图3 化合物5的晶体结构

Figure 3 Crystal structure of compound 5

1.3 耐酸微生物代谢产物的生物活性

采用抗病毒 MTT 法^[5]测试了化合物 **1**~**9** 的抗甲型流感 H1N1 病毒活性(表 2). 值得注意的是, 为了降低假阳性活性化合物的筛出率, 本实验增加了感染狗肾上皮细胞(MDCK)的 H1N1 病毒载量(MOI), 由通常的 MOI 0.001^[14]提高到 0.01. 结果表明化合物 **2** 对流感病毒 H1N1 具有较强抑制活性(IC_{50} 为 116.20 $\mu\text{mol/L}$), 其活性略强于阳性药利巴韦林(IC_{50} 为 138.1 $\mu\text{mol/L}$), 而具有 18-位羟基的化合物 **1** 没有活性, 可能是羟基与酯羰基形成分子内氢键而减弱了其活性. 采用 MTT 法^[15]和 CCK-8 法^[16]对化合物 **1**~**9** 进行了细胞毒活性测试, 实验采用三种肿瘤细胞株 A549、MCF-7 和 K562, 其中 A549 和 MCF-7 细胞株采用 MTT 法, K562 细胞株采用 CCK-8 法. 结果(表 3)表明只有化合物 **5** 对三种细胞均具有较好的抑制活性, IC_{50} 分别 0.23、4.45 和 3.68 $\mu\text{mol/L}$, 该化合物对 MCF-7 细胞株活性为首次报道. 对化合物 **1**~**9** 进行了 α -糖苷酶抑制活性检测^[17], 结果(表 4)表明, 吡啶生物碱 **6**~**8** 具有 α -糖苷酶抑制活性, 其中化合物 **6** (IC_{50} 为 0.84 mmol/L)活性最强, 与阳性药阿卡波糖相当 (IC_{50} 为 0.95 mmol/L), 这也是首次报导该化合物的 α -糖苷酶抑制活性.

2 结论

红树林环境是处于热带和亚热带气候的一种特殊

环境的植物群落, 对红树林真菌的研究表明, 其次生代谢产物能产生萜类、色酮类、香豆素类、聚酮类、生物碱类以及多肽类等多系列的结构新颖化合物. 但其耐酸微生物及其次生代谢产物的研究却尚处起步阶段. 本文从红树林耐酸真菌 OUCMDZ-1914 的酸性(pH=3.0)发酵产物中分离鉴定了 9 个单体化合物 **1**~**9**, 其中 **1** 为新化合物; 化合物 **2** 对流感病毒 H1N1 抑制活性与阳性药物利巴韦林相当, 并首次报道了化合物 **5** 对 MCF-7 的细胞毒活性以及化合物 **6** 的 α -糖苷酶抑制活性. 结果表明, 红树林土壤微生物独特的酸性环境, 使得其遗传与生理特性跟其它环境中的微生物不同, 值得深入研究.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

JEOL JNM-ECP 600 型核磁共振仪(日本 JEOL 公司); Mariner API-TO 型质谱仪以及 Q-TOF ULTIMA GLOBAL GAA076 LC 高分辨质谱仪; Nicolet NEXUS 470 型红外分光光度计(KBr 压片); Beckman DU 640 型紫外分光光度计; JASCO P-1020 型旋光分析仪; 分析用高效液相色谱仪(日本岛津公司产品 LC-6AD 泵, SPD-M20 AVP 检测器, SCL-10AV 型系统控制器; Waters 1525 泵, Waters 2996 二极管阵列检测器, Impower III 工作站; Capcell Pak C18 柱: 5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm); 半制备用高效液相色谱仪(Waters 1575 泵, Waters 2487

表 2 化合物 **1**~**9** 对 H1N1 的抑制率(浓度 50 $\mu\text{g/mL}$)及其 IC_{50}
Table 2 The inhibition against H1N1 influenza virus of compounds **1**~**9** (50 $\mu\text{g/mL}$) and IC_{50}

化合物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	阳性药
抑制率/%	32.6	61.1	17.6	4.4	3.0	7.8	23.7	2.0	8.6	58.3
$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	>150	116.2	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	138.1

表 3 化合物 **1**~**9** 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50}
Table 3 The IC_{50} against α -glucosidase of compounds **1**~**9**

化合物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	阳性药
$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	>5	>5	>5	>5	>5	0.84	1.5	3.4	>5	0.95

表 4 化合物 **1**~**9** 对 A549、MCF-7 和 K562 细胞株的抑制率(浓度 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及其 IC_{50}
Table 4 The inhibition of compounds **1**~**9** (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on A549, MCF-7 and K562 cell lines and IC_{50}

化合物	A549		MCF-7		K562	
	抑制率/%	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	抑制率/%	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	抑制率/%	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
1	—27.9	>10	33.9	>10	29.5	>10
2	—15.4	>10	21.4	>10	23.3	>10
3	11.0	>10	3.2	>10	13.2	>10
4	8.2	>10	6.6	>10	6.7	>10
5	88.1	0.2	79.5	4.4	76.4	3.7
6	12.6	>10	9.6	>10	15.1	>10
7	11.8	>10	7.8	>10	21.5	>10
8	2.8	>10	17.8	>10	33.2	>10
9	15.2	>10	25.3	>10	34.9	>10
阳性药	69.0	0.82	66.1	1.0	79.8	1.6

二极管阵列检测器, Millennium 32 工作站, 美国 Waters 公司), Capcell Park C₁₈ 柱(5 μ m, 20 mm $\times$ 250 mm), 流速 4 mL/min; 手性拆分柱 CHIRALPAK IA (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 258 mm), 流速 1 mL/min; 高效薄层层析 GF 254 板(10~40 μ m, 青岛海洋化工厂); 凝胶 Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); MCO175 型二氧化碳培养箱(SANYO 公司); SPECTRAMAXplus 型酶标仪(美国 Molecular 公司).

常规萃取提取分离用乙酸乙酯、丙酮、石油醚、二氯甲烷、甲醇均为工业用化学纯试剂, 高效液相色谱用甲醇、乙腈等均为市售色谱纯试剂.

3.2 耐酸真菌的分离鉴定

红树林根泥于 2011 年 6 月采自海南文昌红树林, 从中分离得到一株耐酸真菌 OUCMDZ-1914. 结合菌株生长形态以及菌株 ITS 序列比对(GenBank accession No. KP668958), 鉴定该菌株为曲霉真菌属 *Aspergillus* sp., 菌株保藏于本课题组-80 $^{\circ}$ C 菌种库中.

3.3 耐酸真菌的发酵萃取

将培养好的菌株接种于灭菌后的真菌培养基中, 发酵培养基为真菌 2 号培养基(甘露醇 2%、麦芽糖 2%、葡萄糖 1%、味精 1%、酵母浸膏 0.3%、玉米粉 0.05%、KH₂PO₄ 0.05%、MgSO₄ 0.03%、天然海水、磷酸氢二钠-柠檬酸调节 pH 3.0), 装于 1000 mL 三角瓶(每瓶 300 mL)、共 84 L, 22~26 $^{\circ}$ C 静置发酵 45 d. 菌株发酵后产物分为菌丝体和发酵液, 将菌丝体和发酵液分开处理, 发酵液用等体积乙酸乙酯在 100 L 萃取罐中萃取三次, 得到浸膏 107.4 g. 菌丝体用 80%丙酮-水浸泡破碎, 在超声振荡仪中振荡 1 h, 抽滤, 同样方法萃取三次, 得到萃取液, 减压蒸去其中的丙酮, 水相用等体积的乙酸乙酯萃取三次, 萃取液蒸干得到浸膏 33.2 g.

3.4 耐酸真菌代谢产物的分离纯化

对活性组分的菌丝体浸膏 33.2 g 运用减压硅胶柱色谱(石油醚/二氯甲烷/甲醇)极性递增梯度洗脱, 分成 12 个组分 Fr.1~Fr.12. 组分 Fr.9 (2.3 g)经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析[$V(\text{CH}_2\text{Cl}_2):V(\text{MeOH})=1:1$ 洗脱], 后再过 Sephadex LH-20 凝胶(MeOH 洗脱), 在半制备 HPLC 上[$V(\text{MeCN}):V(\text{H}_2\text{O})=25:75$, 4 mL/min]制备得到化合物 **1** ($t_{\text{R}}=14.0$ min, 5 mg)和 **2** ($t_{\text{R}}=10.5$ min, 10 mg). 组分 Fr.7 (3.5 g)经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(MeOH 洗脱), 在半制备 HPLC 上[$V(\text{MeOH}):V(\text{水})=30:70$, 4 mL/min]制备得到化合物 **4** ($t_{\text{R}}=12.1$ min, 3 mg)和 **3** ($t_{\text{R}}=18.5$ min, 51 mg). 组分 Fr.4 (2.0 g)经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析[$V(\text{CH}_2\text{Cl}_2):V(\text{MeOH})=1:1$ 洗脱], 后经过加压硅胶柱层析、半制备 HPLC

[$V(\text{MeOH}):V(\text{H}_2\text{O})=70:30$, 4 mL/min]制备得到化合物 **5** ($t_{\text{R}}=23.2$ min, 7 mg)和 **8** ($t_{\text{R}}=19.1$ min, 10 mg). 组分 Fr.8 (3.5 g) 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(MeOH 洗脱)得到 Fr.8-1 (2.3 g)和 Fr.8-2 (0.8 g). 组分 Fr.8-1 (2.3 g)经过加压硅胶柱色谱(MeOH-CH₂Cl₂ 梯度洗脱), 组分经过 Sephadex LH-20 凝胶(MeOH 洗脱)后得到化合物 **6** ($t_{\text{R}}=8.9$ min, 200 mg)和 **7** ($t_{\text{R}}=7.0$ min, 20 mg). 组分 Fr.8-2 (0.8 g)经过 Sephadex LH-20 凝胶(MeOH 洗脱)得到化合物 **9** (5 mg). 对化合物 **1** 的手性拆分, 正己烷-无水乙醇体系[$V(n\text{-C}_6\text{H}_{14}):V(\text{EtOH})=20:80$, 1 mL/min]洗脱. 将化合物拆分成 **1a** ($t_{\text{R}}=11.4$ min, 2 mg)和 **1b** ($t_{\text{R}}=15.9$ min, 1 mg).

(2Z,3E,5E,7E,9E)-4,10-二甲基-11-[3-(2,5-二氧亚基四氢吡咯基)-2-(2-羟基乙亚基)-11-氧亚基-3,5,7,9-十一碳四烯酸甲酯(**1**): 淡黄色无定型粉末, 微溶于氯仿, 易溶于甲醇, [α]_D²⁵ -0.04 (c 0.20, CH₃OH); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆)和 ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆)见表 1; IR (KBr) ν : 2918, 1711, 1672, 1458, 1205, 1135 cm⁻¹; UV (EtOH) λ_{max} [$\log \epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$] 360 (4.37) nm; HRESIMS calcd for C₂₀H₂₄NO₆ [M+H]⁺ 374.1598, found 374.1602.

3.5 化合物活性测试

以人肺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 MCF-7 和人慢性髓性白血病细胞 K562 为模型, 以阿霉素为阳性对照药. 采用 MTT 和 CCK-8 法对化合物进行体外细胞毒性测试.

MTT 法: 取对数生长期的 A549 和 MCF-7 细胞, 将细胞稀释成 3×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 置于 CO₂ 的培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h. 化合物用 DMSO 先配成浓度为 2 mmol/L 的溶液, 再用 RPMI-1640 培养基稀释到浓度为 10 μ mol/L. 阳性药阿霉素先用 DMSO 配成浓度为 200 μ mol/L 的溶液, 再用 RPMI-1640 培养基稀释成浓度为 2 μ mol/L 的溶液, 每组样品设 3 个平行, 同时设阳性和空白对照, 向每孔加入 100 μ L 样品液阳性药对照或 RPMI-1640 培养基(空白液), 继续培养 72 h. 然后每孔加入 20 μ L 0.5 % MTT 溶液, 继续培养 4 h, 小心吸干孔内培养液; 每孔加入 150 μ L DMSO, 低速振荡直至结晶全部溶解(约 10 min), 采用酶标仪测定各孔在 570 nm 下的吸光度(OD 值), 计算细胞增殖抑制率. 若化合物抑制率大于 50%, 再分别设置五个浓度梯度测试化合物的 IC₅₀(阿霉素对 A549 和 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 分别为 0.82 和 1.03 μ mol/L).

CCK-8 法: 取对数生长期的 K562 细胞, 将细胞稀释成 3×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 置于 CO₂ 的培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h. 化合物用 DMSO 先

配成浓度为 2 mmol/L 的溶液,再用 RPMI-1640 培养基稀释到浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。阳性药阿霉素先用 DMSO 配成浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液,再用 RPMI-1640 培养基稀释成浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液,每组样品设 3 个平行,同时设阳性和空白对照,向每孔加入 100 μL 样品液阳性药对照或 RPMI-1640 培养基(空白液),继续培养 72 h。然后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 6 h,采用酶标仪测定各孔在 450 nm 下的吸光度(OD 值),计算细胞增殖抑制率。若化合物抑制率大于 50%,再分别设置五个浓度梯度测试化合物的 IC_{50} (阿霉素对 K562 细胞的 IC_{50} 为 1.55 $\mu\text{mol/L}$)。

抗病毒活性测试采用 MTT 法:流感病毒 H1N1 在无特定病原体鸡胚(SPF 鸡胚)中传代增殖制备病毒原液,将病毒原液梯度稀释后接种于狗肾上皮细胞(MDCK),使病毒载量 MOI 达到 0.1, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,然后移出病毒液加入含 4 $\mu\text{g/mL}$ 胰蛋白酶的培养基 RPMI 1640 及不同浓度的样品溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h 后加入 100 μL 4%甲醛,室温下固定细胞 20 min。移除甲醛后用结晶紫为细胞着色 30 min,然后洗板 5 次、凉干。每孔各加入 100 μL DMSO,在微量振荡器上振荡 15 min,至结晶完全溶解后采用酶标仪测定每孔 570 nm 处的吸光值(OD 值)。以利巴韦林作阳性对照药,以 50 $\mu\text{g/mL}$ 为初筛浓度。若化合物的抑制率大于 50%,再分别设置 5 个浓度梯度测试化合物的 IC_{50} (利巴韦林的 IC_{50} 为 138.1 $\mu\text{mol/L}$)。

α -糖苷酶抑制活性测试:样品用磷酸钠缓冲溶液(PBS, pH 6.8)溶解配成 3 个浓度。在 96 孔板每孔中加入 10 μL 样品溶液、20 μL 的 PBS 溶液、20 μL 的浓度为 2.5 mmol/L 的葡萄糖苷溶液(在磷酸盐缓冲溶液中溶解),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温箱中培养 5 min。用 0.01 mol/L 的 PBS 溶液将 α -葡萄糖苷酶稀释成 0.2 U/mL,每孔取 10 μL 加入到上述试液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温箱中培养 15 min 后,在 405 nm 下记录吸光度。抑制率(%)的计算公式为 $(1 - \text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}}) \times 100\%$,空白对照为磷酸缓冲盐溶液、阳性对照为阿卡波糖(IC_{50} 0.95 mmol/L)。

辅助材料(Supporting Information) 化合物 1 的谱图和手性分析以及化合物 2~9 的核磁数据,这些可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Lin, P. J. *Xiamen Univ. (Nat. Sci.)* **2001**, 40, 592 (in Chinese). (林鹏, 厦门大学学报(自然科学版), **2001**, 40, 592.)
- [2] Jiang, Y.-X.; Zheng, T.-L.; Tian, Y. *Acta Microbiol. Sin.* **2006**, 46, 848 (in Chinese). (蒋云霞, 郑天凌, 田蕴, 微生物学报, **2006**, 46, 848.)
- [3] Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 237.
- [4] Zhao, C.-Y.; Zhu, T.-H.; Zhu, W.-M. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, 33, 1195 (in Chinese). (赵成英, 朱统汉, 朱伟明, 有机化学, **2013**, 33, 1195.)
- [5] Fan, Y.-Q.; Wang, Y.; Liu, P.-P.; Fu, P.; Zhu, T.-H.; Wang, W.; Zhu, W.-M. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 1328.
- [6] Hiroyuki, N.; Hideaki, K.; Hiroshi, K.; Susumu, K. *JP 2002322149*, **2002** [*Chem. Abstr.* **2002**, 137, 346150].
- [7] Takagi, M.; Motohashi, K.; Shin-ya, K. *J. Antibiot.* **2010**, 63, 393.
- [8] Ren, H.; Tian, L.; Gu, Q.-Q.; Zhu, W.-M. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, 29, 59.
- [9] Qu, P.; Liu, P.-P.; Fu, P.; Wang, Y.; Zhu, W.-M. *Acta Microbiol. Sin.* **2012**, 52, 1103 (in Chinese). (曲鹏, 刘培培, 付鹏, 王义, 朱伟明, 微生物学报, **2012**, 52, 1103.)
- [10] Qu, P.; Wu, Z.-Y.; Zhu, W.-M. *Acta Crystallogr.* **2012**, E68, o1626.
- [11] Zheng, C.-J.; Sohn, M. J.; Lee, S.; Kim, W.-G. *PLoS One* **2013**, 8, e78922.
- [12] Hayashi, H.; Furutsuka, K.; Shiono, Y. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 315.
- [13] Ma, W.-L.; Yan, C.-Y.; Zhu, J.-H.; Duan, G.-Y.; Yu, R.-M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, 160, 1301.
- [14] Kim, M.; Kim, S. Y.; Lee, H. W.; Shin, J. S.; Kim, P.; Jung, Y. S.; Jeong, H. S.; Hyun, J. K.; Lee, C. K. *Antiviral Res.* **2013**, 100, 460.
- [15] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.
- [16] Ding, J.; Huang, S.-L.; Wu, S.-Q.; Zhao, Y.-J.; Liang L.-H.; Yan M.-X.; Ge, C.; Yao, J.; Chen, T.-Y.; Wan, D.-F. *Nat. Cell Biol.* **2010**, 12, 390.
- [17] Nampoothiri, S. V.; Prathapan, A.; Cherian, O. L.; Raghu, K. G.; Venugopalan, V. V.; Sundaresan, A. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, 49, 125.

(Li, L.; Lu, Z.)