

海南红树红榄李内生真菌 *Penicillium sclerotiorum* HLL113 次级代谢产物研究

杨静雨^{a,b} 唐敏敏^{a,b} 陈 丽^{a,b} 赖心怡^{a,b}
卓 欣^{a,b} 周学明^{*,a,b} 陈光英^{*,a,b}

(^a 海南师范大学化学与化工学院 热带药用资源化学教育部重点实验室 海口 571158)

(^b 海南师范大学化学与化工学院 热带药用植物化学海南省重点实验室 海口 571158)

摘要 从红树红榄李来源内生真菌 *Penicillium sclerotiorum* HLL113 中分离纯化得到两个新的呋喃衍生物(2*S*,3*S*,5*S*)-2-(2-hydroxyethyl)-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran (**1**), (2*S*,3*S*,5*S*)-2-allyl-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran (**2**)和 6 个已知的甾体化合物, 其中 6,9-epoxy-ergosta-7,22-dien-3-ol (**5**)为首次从青霉菌属中分离得到, 它们的结构经多种现代波谱技术确定. 对所有化合物进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性测试, 活性测试结果表明(22*E*,4*R*)-ergosta-7,9(11),22-triene-3 β ,5 α ,6 β -triol (**7**)和 derrisisoflavone K (**8**)对 α -葡萄糖苷酶具有显著的抑制活性.

关键词 红榄李; *Penicillium sclerotiorum*; 次级代谢产物; 呋喃衍生物; α -葡萄糖苷酶抑制活性

Study on the Secondary Metabolites of Endophytic *Penicillium sclerotiorum* HLL113

Yang, Jing-Yu^{a,b} Tang, Min-Min^{a,b} Chen, Li^{a,b} Lai, Xin-Yi^{a,b}
Zhuo, Xin^{a,b} Zhou, Xue-Ming^{*,a,b} Chen, Guang-Ying^{*,a,b}

(^a Key Laboratory of Tropical Medicinal Resource Chemistry of Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158)

(^b Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Hainan Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158)

Abstract Two new furan derivatives, (2*S*,3*S*,5*S*)-2-(2-hydroxyethyl)-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran (**1**) and (2*S*,3*S*,5*S*)-2-allyl-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran (**2**), together with six known steroid compounds were isolated from *Penicillium sclerotiorum* HLL113. 6,9-Epoxy-ergosta-7,22-dien-3-ol (**5**) was isolated from the genus *Penicillium* for the first time. Their structures were elucidated on the basis of extensive spectroscopic methods. The test results of α -glucosidase inhibitory activity showed that (22*E*,4*R*)-ergosta-7,9(11),22-triene-3 β ,5 α ,6 β -triol (**7**) and derrisisoflavone K (**8**) have significant inhibitory activity.

Keywords *Lumnitzera littorea*; *Penicillium sclerotiorum*; secondary metabolite; furan derivative; inhibitory activity against α -glucosidase

众所周知, 海洋来源的真菌是活性先导化合物的资源宝库, 能够代谢出结构新颖活性显著的次级代谢产物^[1-3]. 红榄李 [*Lumnitzera littorea* (Jack) Voigt] 为榄李属红树植物, 主要分布在印度尼西亚、马来西亚、菲律宾

和泰国等东南亚的海岸上^[4]以及中国海南、福建等南部沿海地区^[5], 为濒危物种. 在传统医学中, 该植物可用于腹泻及扭伤的治疗^[6]. 栖息在红树林生态系统中的微生物有着独特的生长环境, 如高盐度、低氧、养分限制、

* Corresponding authors. E-mail: chgying123@163.com; xueming2009211@126.com

Received September 15, 2021; revised October 23, 2021; published online November 9, 2021.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41866005, 22177023), the Key Science and Technology Program of Hainan Province (No. ZDKJ202008) and the Innovative Research Projects of Postgraduates in Hainan Universities (No. Hys2020-307).

国家自然科学基金(Nos. 41866005, 22177023)、海南省重大科技计划(No. ZDKJ202008)和海南省研究生创新研究(No. Hys2020-307)资助项目.

潮汐梯度、高温、过度强光和干旱^[7], 这些微生物是多样化和结构独特的生物活性天然产物的丰富来源。因其独特的生态系统, 从中发现了许多结构新颖的化合物, 红树真菌也引起了学者们的广泛关注^[8]。青霉属(*Penicillium*)真菌为红树真菌的一大类群, 从中发现的代谢产物已有 1300 多个, 如生物碱、聚酮化合物、萜类化合物、类固醇和环肽, 其中大多代谢产物表现出抗菌、抗虫、抗病毒、抗肿瘤或者抗心血管疾病等活性^[9-15]。呋喃衍生物是一类重要的含氧杂环化合物, 这类化合物具有广泛的生物活性, 如杀菌、除草和抗氧化^[16]。然而, 很少有来自青霉属内生真菌培养物的呋喃衍生物的研究报道^[17]。红榄李作为濒危物种, 以微生物资源开发利用的方式来对海南红树红榄李内生真菌次级代谢产物进行研究, 从中寻找活性化合物, 不仅对红树资源可持续发展具有重大意义, 而且对红树微生物资源开发也具有重要意义。经过对海南红树红榄李内生真菌次级代谢产物的系统研究, 我们首次从红榄李根的内生真菌 *P. sclerotiorum* 中分离得到 2 个新的呋喃衍生物(2*S*,3*S*,5*S*)-2-(2-hydroxyethyl)-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran (**1**)和(2*S*,3*S*,5*S*)-2-allyl-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran (**2**), 以及 6 个甾醇类化合物(**3**~**8**)。对化合物 **1**~**8** 进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性与抗炎活性评价, 结果表明化合物 **7** 和 **8** 具有显著的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 其 IC₅₀ 值均强于阳性对照药阿卡波糖, 然而化合物 **1**~**8** 均不显示抗炎活性。

1 结果与讨论

化合物 **1** 为黄色油状物, 易溶于甲醇和氯仿, HR-ESI-MS 给出化合物的准分子离子峰为 m/z 205.1431 $[M+H]^+$ (计算值为 205.1434), 推出分子式为 C₁₀H₂₀O₄, 不饱和度为 1。IR 光谱显示该化合物有四氢呋喃骨架结

构的特征吸收信号(3441, 1645, 1548, 1564, 1511, 1462 和 1425 cm⁻¹)。化合物 **1** 的 ¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄)谱中在 δ_H 1.18 (s, 3H, H-8), 1.21 (s, 3H, H-11), 1.12 (s, 3H, H-10)处有 3 个甲基氢信号, 在 δ_H 3.61 (dd, $J=10.0$, 2.0 Hz, 1H, H-3), 3.78 (dd, $J=6.0$, 9.2 Hz, 1H, H-5)处有 2 个次甲基氢信号; 在 δ_H 1.20~1.26 (m, 1H, H-4a), 1.81~1.89 (m, 1H, H-4b), 1.66~1.72 (m, 1H, H-6a), 2.01~2.09 (m, 1H, H-6b), 3.44 (dd, $J=11.2$, 9.6 Hz, 1H, H-7a), 3.86 (dd, $J=11.2$, 1.6 Hz, 1H, H-7b)处有 3 个亚甲基氢信号。化合物 **1** 的 ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)谱及 135 DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer)谱中揭示有 10 个碳信号, 其中包括 3 个甲基碳信号 δ_C 24.2, 22.5 和 27.7, 3 个亚甲基碳信号 δ_C 47.2, 34.8 和 26.4, 2 个连氧次甲基碳信号 δ_C 87.4 和 77.6, 以及 2 个季碳信号 δ_C 84.5 和 70.7(表 1)。上述数据可推测出化合物 **1** 为多羟基醚类化合物。化合物 **1** 的 ¹H-¹H COSY 谱中显示 H-6 与 H-7 相关, H-3 与 H-4, H-4 与 H-5 分别相关(图 2); 结合 HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation)谱中 H-8 与 C-2/3/6, H-5 与 C-2 分别相关, 可以确定 C-2 和 C-7 的连接方式, 8-Me 连在 C-2 位, C-5 与 C-2 通过氧原子相连。此外, 化合物 **1** 的 HMBC 谱中 H-11 与 C-5/9 相关, 说明 2-羟基丙基是连在 C-5 位。至此, 化合物 **1** 的平面结构可以确定如图 2 所示。化合物 **1** 的 NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy)谱中 H-8 与 H-3/5 相关, 说明 H-3/5/8 这 3 个氢在五元环的同侧(图 3)。化合物 **1** 的绝对构型是通过 Mosher's 酯化法来确定的^[18]。通过计算(*S*)-和(*R*)-MTPA 酯之间的 ¹H NMR 化学位移差异 ($\Delta\delta=\delta_S-\delta_R$, 图 4), 可以确定 C-3 的构型为 *S* 型。因此, 结合确定的相对构型, 化合物 **1** 的绝对构型可以被确定为(2*S*,3*S*,5*S*)。因此, 化合物 **1** 被确定为新的呋喃衍生物, 命名为(2*S*,3*S*,5*S*)-2-(2-hydroxyethyl)-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran。

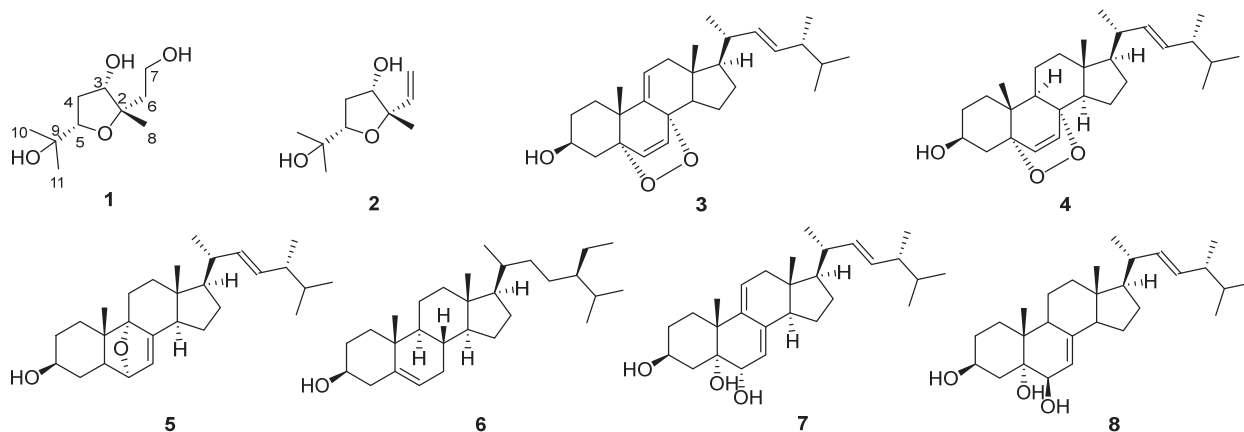


图 1 化合物 **1**~**8** 的化学结构
Figure 1 Chemical structures of compounds **1**~**8**

表 1 化合物 1 和 2 的 ^1H NMR (400 MHz) 和 ^{13}C NMR (100 MHz) 数据
Table 1 ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data (δ) for compounds 1 and 2

Position	1		2	
	δ_{H} (MeOH- d_4)	δ_{C} (CDCl ₃)	δ_{H} (MeOH- d_4)	δ_{C} (CDCl ₃)
2	—	84.5 (C)	—	87.6 (C)
3	3.61 (dd, $J=10.0, 2.0$ Hz)	77.6 (CH)	3.83 (dd, $J=8.4, 5.6$ Hz)	75.5 (CH)
4	1.20~1.26 (m), 1.81~1.89 (m)	26.4 (CH ₂)	1.84~1.90 (m), 2.18~2.25 (m)	34.7 (CH ₂)
5	3.78 (dd, $J=9.2, 6.0$ Hz)	87.4 (CH)	3.92 (dd, $J=5.6, 3.2$ Hz)	83.4 (CH)
6	1.66~1.72 (m), 2.01~2.09 (m)	34.8 (CH ₂)	5.88 (dd, $J=17.2, 10.8$ Hz)	142.1 (CH)
7	3.44 (dd, $J=11.2, 9.6$ Hz) 3.86 (dd, $J=11.2, 1.6$ Hz)	47.2 (CH ₂)	5.04 (dd, $J=10.8, 1.6$ Hz) 5.24 (dd, $J=17.2, 1.6$ Hz)	112.9 (CH ₂)
8	1.12 (s)	24.2 (CH ₃)	1.24 (s)	21.1 (CH ₃)
9	—	70.7 (C)	—	71.8 (C)
10	1.18 (s)	22.5 (CH ₃)	1.14 (s)	26.2 (CH ₃)
11	1.21 (s)	27.7 (CH ₃)	1.26 (s)	27.7 (CH ₃)

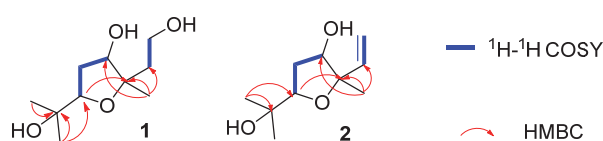


图 2 化合物 1 和 2 关键的 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关
Figure 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compounds 1 and 2

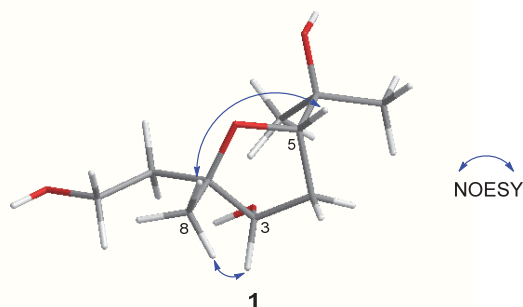


图 3 化合物 1 NOESY 的相关
Figure 3 Key NOESY correlations of compound 1

化合物 2 为黄色油状物, 易溶于甲醇和氯仿, HR-ESI-MS 给出化合物的准分子离子峰为 m/z 187.1326 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值为 187.1329), 推出分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$, 不饱和度为 2. 化合物 2 的 ^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4) 谱中, 在 δ_{H} 1.24 (s, 3H, H-8), 1.26 (s, 3H, H-11), 1.14 (s, 3H, H-10) 处有 3 个甲基 H 信号, 在 δ_{H} 5.24 (dd, $J=17.2, 1.6$ Hz, 1H, H-7a), 5.04 (dd, $J=10.8, 1.6$ Hz, 1H, H-7b), 5.88 (dd, $J=17.2, 10.8$ Hz, 1H, H-6) 有 3 个烯氢信号, 在 δ_{H} 2.18~2.25 (m, 1H, H-4a), 1.84~1.90 (m, 1H, H-4b) 有 1 个次甲基 H 信号, 在 δ_{H} 3.83 (dd, $J=8.4, 5.6$ Hz, 1H, H-3), 3.92 (dd, $J=5.6, 3.2$ Hz, 1H, H-5) 有 2 个亚甲基 H 信号. 根据 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) 谱图可知: 1 位至 10 位碳的化学位移值分别为: δ_{C} 112.9 (C-7), 142.1 (C-6), 87.6 (C-2), 75.5 (C-3), 34.7 (C-4), 83.4 (C-5), 71.8 (C-9), 21.1 (C-8), 26.2 (C-10), 27.7 (C-11). 综上可知化

合物 2 与化合物 1 具有相似的结构, 对比化合物 1 的氢谱数据表明, 在化合物 2 中多出两个双键信号, δ_{H} 5.24 (dd, $J=17.2, 1.6$ Hz, 1H, H-7a), 5.04 (dd, $J=10.8, 1.6$ Hz, 1H, H-7b) 和 5.88 (dd, $J=17.2, 10.8$ Hz, 1H, H-6), 而少了一个羟甲基以及一个亚甲基信号 δ_{H} 3.44 (dd, $J=11.2, 9.6$ Hz, 1H, H-7a), 3.86 (dd, $J=11.2, 1.6$ Hz, 1H, H-7b) 和 1.66~1.72 (m, 1H, H-6a), 这说明化合物 1 中的 C-7 的羟甲基以及 C-6 位亚甲基在化合物 2 中变为了双键. 详细分析化合物 2 的 2DNM (包括 HSQC、HMBC、 ^1H - ^1H COSY), 确证了化合物 2 的其余部分结构均与化合物 1 一致. 化合物 2 的 NOESY 谱中 H-8 与 H-3/5 相关表明, H-3/5/8 这 3 个氢在五元环的同侧, 因此化合物 2 与 1 具有相同的相对构型. 此外, 化合物 2 的旋光值 ($[\alpha]_{\text{D}}^{24} - 32.99$) 与化合物 1 的旋光值 ($[\alpha]_{\text{D}}^{24} - 38.23$) 较为接近, 说明化合物 2 与 1 具有相同的绝对构型, 这与生源途径推导的结论是一致的. 因此, 化合物 2 的绝对构型同样被确认为 (2*S*, 3*S*, 5*S*)-2-allyl-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran.

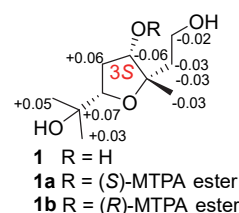


图 4 化合物 1 的 (S)-和 (R)-MTPA 酯之间的 $\Delta\delta=\delta_{\text{S}}-\delta_{\text{R}}$
Figure 4 $\Delta\delta=\delta_{\text{S}}-\delta_{\text{R}}$ values for (S)- and (R)-MTPA esters of 1

经波谱分析, 并与文献中相应化合物的波谱数据进行对照, 化合物 3~8 的结构分别鉴定为 (2*E*, 24*S*)-5 α , 8 α -epidioxy-24-methyl-cholesta-6, 9, (11)22-trien-3 β -ol (3)^[19], (2*E*)-5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol (4)^[20], 6, 9-epoxy-ergosta-7, 22-dien-3-ol (5)^[21], ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (6)^[22], (2*E*, 24*R*)-ergosta-7, 9(11), 22-triene-

3 β ,5 α ,6 β -triol (**7**)^[23]和 derrisoflavone K (**8**)^[24], 其中化合物 **5** 为首次从青霉菌中分离得到。

评价了样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性, 结果表明化合物 **7** 和 **8** 对 α -葡萄糖苷酶具有显著的抑制活性, 其 IC₅₀ 值分别为 861.211 和 940.376 $\mu\text{mol/mL}$; 化合物 **1**~**6** 对 α -葡萄糖苷酶具有抑制活性, IC₅₀ 范围值为 1467.279~2009.566 $\mu\text{mol/mL}$ 。除化合物 **1** 外, 化合物 **2**~**8** 的 IC₅₀ 值均小于阳性对照阿卡波糖(表 2)。

表 2 化合物 **1**~**8** 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

Table 2 Inhibitory activities against α -glucosidase of compounds **1**~**8**

Compound	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	2009.566
2	1851.642
3	1910.011
4	1467.279
5	1791.437
6	1472.091
7	861.211
8	940.376
阿卡波糖	1954.935

通过测试脂多糖(LPS)诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞生成一氧化氮(NO)评价了化合物的抗炎活性, 结果表明所有化合物均会杀死 RAW264.7 细胞, 化合物 **1**~**8** 无抗炎活性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Nicolet 6700 型红外光谱; JASCO DIP-370 型数字旋光仪; Bruker AV-400 型核磁共振波谱仪, 使用 CDCl₃ 或 MeOH-*d*₄ 作为溶剂; Agilent G3250AA LC/MSD TOF 质谱仪; Agilent 1260 LC 半制备高效液相色谱仪, Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱(250 mm $\times$ 9.4 mm, 5 μm); ELISA 酶标仪(Bio Tek ELX800)。葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20[安法玛西亚技术(上海)有限公司]; 反相硅胶(YMC 公司; 12~50 μm); 柱层析硅胶和薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂); 色谱试剂均为分析纯。

2.2 菌株材料

真菌 *Penicillium sclerotiorum* HLL113 是于 2019 年 4 月从海南省三亚铁炉港红树林保护区采集的红树红榄李(*Lumnitzera littorea*)根中分离得到的, 真菌菌株保存于海南师范大学化学与化工学院海南热带药用资源化学教育部重点实验室。

该真菌是根据分子生物学特征来鉴定的, 通过测定真菌 ITS 片段的序列, 与美国国家生物信息中心(NCBI)数据库比对, 鉴定菌株为 *Penicillium sclerotiorum*。

所得序列数据已提交至 GenBank, 其 Accession Number 为 MZ699093, 菌种用加入含体积分数为 30% 甘油的马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)为培养基, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 真菌的发酵、提取和分离

真菌菌株 *P. sclerotiorum* 在马铃薯液体培养基(每 1 L 马铃薯培养液含 30 g 海盐, 每个 1 L 锥形瓶中含有 350 mL 培养液, 共计 3 瓶)中在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养 3 d, 获得种子液, 取种子液 3.5 mL 加入大米培养基(1 L 锥形瓶中含有 100 g 大米, 100 mL 水, 3 g 海盐, 共计 260 瓶)中在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下不振荡培养 4 周。真菌培养物通过粗棉布过滤, 滤液用乙酸乙酯(50 L $\times$ 3, 每次 24 h)萃取, 真空浓缩有机萃取物, 得到油状残留物(82.0 g)。

将提物进行硅胶(100~200 目)柱色谱分离, 用石油醚/乙酸乙酯(梯度 $V:V=100:0\sim0:100$)和乙酸乙酯/甲醇(梯度 $V:V=100:0\sim0:100$)洗脱, 得到 6 个流分(Frs. 1~6)。Fr. 3 (8.1 g)通过硅胶(200~300 目)柱色谱分离, 使用石油醚/乙酸乙酯(梯度 $V:V=100:0\sim0:100$)洗脱并分流, 获得 7 个亚流分(Fr. 3A~Fr. 3G)。Fr. 3B 经反相硅胶柱层析[$V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:9$]纯化后, 经半制备型高效液相色谱制备, 以乙腈/水($V:V=70:30$)为流动相, 得到化合物 **1** (5.3 mg)和化合物 **2** (4.7 mg), 对 Fr. 3B 经反相硅胶柱层析[$V(\text{甲醇}):V(\text{水})=7:3$]纯化得到化合物 **3** (25.1 mg)和 **4** (15.3 mg), Fr. 3E 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱[$V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=1:1$]纯化后, 经半制备型高效液相色谱制备, 以乙腈/水($V:V=70:30$)为流动相, 得到化合物 **5** (14.7 mg), Fr. 3B 经反相硅胶[$V(\text{甲醇}):V(\text{水})=9:1$]纯化后得到化合物 **6** (21.1 mg), Fr. 3F 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱[$V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=1:1$]纯化后, 经半制备型高效液相色谱进行制备, 以乙腈/水($V:V=70:30$)为流动相, 得到化合物 **7** (6.7 mg)和 **8** (7.3 mg)。

(2*S*,3*S*,5*S*)-2-(2-hydroxyethyl)-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran (**1**): 黄色油状物; [α]_D²⁴ -38.23 (*c* 0.1, CH₃OH); IR (KBr) ν_{max} : 3441, 1645, 1548, 1564, 1511, 1462, 1425 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄)和 ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)数据见表 1; HR-ESI-MS calcd for C₁₀H₂₁O₄ [M+H]⁺ 205.1434, found 205.1431。

(2*S*,3*S*,5*S*)-2-allyl-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran (**2**): 黄色油状物; [α]_D²⁴ -32.99 (*c* 0.1, CH₃OH); IR (KBr) ν_{max} : 3442, 1647, 1622, 1563, 1512, 1462, 1423 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄)和 ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)数据见表 1; HR-ESI-MS calcd for C₁₀H₁₉O₃ [M+H]⁺ 187.1329, found 187.1326。

2.4 活性评价

α -葡萄糖苷酶活性测定采用PNPG法^[25]. 在96孔板中加入20 μ L 化合物溶液[2 mg/mL, 溶剂为二甲基亚砜(DMSO)/磷酸缓冲液(PBS), 其中DMSO的体积分数为5%], 10 μ L α -葡萄糖苷酶(2 U/mL), 50 μ L 磷酸缓冲液(PBS)于孔板孔中(每孔体积100 μ L)中, 在室温下静置10 min, 继续添加20 μ L PNPG-对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(2 mg/mL)开始反应, 并在37 $^{\circ}$ C下孵育15 min. 并使用ELISA酶标仪(Bio Tek ELX800)在405 nm处测定吸光度. 以与测试相同的方式通过添加PBS缓冲液代替样品来制备对照, 用同样的方法加入PBS缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶制备空白, 阿卡波糖用作阳性对照.

体外抗炎活性通过ELISA法测定^[26]. 在含有体积分数为10%胎牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉素和100 μ g/mL 链霉素的RPMI 1640培养基中培养RAW 264.7细胞. 将细胞浓度调整为 5×10^5 个细胞/mL, 96孔板每孔接种200 μ L 细胞悬液. 96孔板每孔接种量为 5×10^4 个细胞. 孵育过夜后, 加入LPS(终浓度1 μ g/mL)处理细胞, 1 h后, 继续加入不同浓度的化合物(10, 20, 30和40 μ mol/L). 培养24 h后, 分别取50 μ L的细胞上清液与50 μ L的Griess试剂溶液(25 g/L)反应10 min后, 用酶标仪在540 nm处对反应产物进行比色定量. 地塞米松用作阳性对照.

2.5 (S)-MTPA酯(1a)和(R)-MTPA酯(1b)的制备

将化合物1 (1.0 mg)、(S)-MPTACl (5.0 μ L)和氘代吡啶(0.5 mL)混合, 在室温下反应24 h, 待反应结束后测定产物(S)-MTPA酯衍生物(1a)的 ^1H NMR数据^[18]. ^1H NMR (Pyridine- d_5 , 400 MHz) δ_{H} : 4.18 (dd, $J=1.0$, 10.8 Hz, 1H, H-7a), 1.86 (m, 1H, H-6a), 2.33 (m, 1H, H-6b), 4.01 (dd, $J=5.7$, 8.3 Hz, 1H, H-3), 2.07 (m, 1H, H-4a), 4.09 (m, 1H, H-5), 1.35 (s, 3H, H-8), 1.32 (s, 3H, H-10), 1.38 (s, 3H, H-11).

用同样的方法, 将化合物1 (1.0 mg)与(R)-MPTACl (5.0 μ L)进行酯化反应, 并测定产物(R)-MTPA酯衍生物(1b)的 ^1H NMR数据^[18]. ^1H NMR (Pyridine- d_5 , 400 MHz) δ_{H} : 4.20 (dd, $J=12.4$, 14 Hz, 1H, H-7a), 1.89 (m, 1H, H-6a), 2.36 (m, 1H, H-6b), 4.07 (dd, $J=1.2$, 7.2 Hz, 1H, H-3), 2.01 (m, 1H, H-4a), 4.02 (m, 1H, H-5), 1.38 (s, 3H, H-8), 1.27 (s, 3H, H-10), 1.35 (s, 3H, H-11).

辅助材料(Supporting Information) 化合物1和2的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT-135、HSQC、HMBC、 ^1H - ^1H COSY和NOESY波谱, HRESIMS谱, IR光谱以及化合物1a和1b的 ^1H NMR谱图. 这些材料可以免费从本刊

网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, 37, 175.
- [2] Cao, F.; Zhu, H.-J.; Sun, T.-T. *Curr. Med. Chem.* **2021**, 28, 3568.
- [3] Song, C.-G.; Yang, J.; Zhang, M.-Z.; Ding, G.; Jia, C.-G.; Qin, J.-C.; Guo, L.-P. *Chem. Biodiversity* **2021**, 18, e2001020.
- [4] Zhang, Y.; Chen, Y.-K.; Zhou, Y.; Zhang, J.-W.; Bai, H.; Zheng, C.-F. *Front. Genet.* **2020**, 11, 584817.
- [5] Shi, S.-H.; Huang, Y.-L.; Zeng, K.; Tan, F.-X.; He, H.-H.; Huang, J.-Z.; Fu, Y.-X. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2005**, 34, 159.
- [6] Saad, S.; Taher, M.; Susanti, D.; Qaralleh, H.; Rahim, N. A. B. A. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2011**, 7, 523.
- [7] Feller, I. C.; Lovelock, C. E.; Berger, U.; McKee, K. L.; Ball, M. C. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2010**, 2, 395.
- [8] Xu, J. *RSC Adv.* **2015**, 5, 841.
- [9] Luo, Q.; Peng, C.; Ye, B.-P. *Chin. J. Pharm. Biotechnol.* **2016**, 23, 452 (in Chinese). (罗清, 彭程, 叶波平, 药物生物技术, **2016**, 23, 452.)
- [10] Bai, M.; Zheng, C.-J.; Chen, G.-Y. *J. Nat. Prod.* **2021**, 84, 2104.
- [11] Luo, Z.-W.; Tang, M.-M.; Zhou, X.-M.; Song, X.-M.; Yi, J.-L.; Zhang, B.; Yang, J.-Y.; Chen, G.-Y. *Chem. Biodiversity* **2021**, 18, e2100027.
- [12] Bai, M.; Zheng, C.-J.; Nong, X.-H.; Zhou, X.-M.; Luo, Y.-P.; Chen, G.-Y. *Mar. Drugs* **2019**, 17, 649.
- [13] Bai, M.; Huang, G.-L.; Mei, R.-Q.; Wang, B.; Luo, Y.-P.; Nong, X.-H.; Chen, G.-Y.; Zheng, C.-J. *Mar. Drugs* **2019**, 17, 433.
- [14] Zhou, X.-M.; Zheng, C.-J.; Song, X.-M.; Tang, M.-M.; Yang, J.-Y.; Yang, X.; Peng, S.-J.; Cai, J.; Chen, G.-Y. *Fitoterapia* **2019**, 139, 104400.
- [15] Bai, M.; Zheng, C.-J.; Huang, G.-L.; Mei, R.-Q.; Wang, B.; Luo, Y.-P.; Zheng, C.; Niu, Z.-G.; Chen, G.-Y. *J. Nat. Prod.* **2019**, 82, 1155.
- [16] Chen, L.-L.; Wang, P.; Chen, H.-Q.; Guo, Z.-K.; Wang, H.; Dai, H.-F.; Mei, W.-L. *Molecules* **2017**, 22, 261.
- [17] Abdel-lateff, A.; Fisch, K. M.; Wright, A. D.; Koenig, G. M. *Planta Med.* **2003**, 69, 831.
- [18] Zhang, P.-P.; Li, Y.-F.; Jia, C.-X.; Lang, J.-J.; Niaz, S.-I.; Li, J.; Yuan, J.; Yu, J.-C.; Chen, S.-H.; Liu, L. *RSC Adv.* **2017**, 7, 49910.
- [19] Deng, Q.; Li, G.; Sun, M.-Y.; Yang, X.-B.; Xu, J. *Nat. Prod. Res.* **2020**, 34, 1404.
- [20] Shaker, S.; Sun, T.-T.; Wang, L.-Y.; Ma, W.-Z.; Wu, D.-L.; Guo, Y.-W.; Dong, J.; Chen, Y.-X.; Zhu, L.-P.; Yang, D.-P.; Li, H.-J.; Lan, W.-J. *Nat. Prod. Res.* **2021**, 35, 41.
- [21] Tian, M.-Q.; Li, J.-F.; Li, G.-H. *Chem. Bioeng.* **2015**, 32, 29 (in Chinese). (田梦青, 李建芳, 李国红, 化学与生物工程, **2015**, 32, 29.)
- [22] Zhang, X.; Geoffroy, P.; Miesch, M.; Julien-David, D.; Raul, F.; Aoude-Werner, D.; Marchioni, E. *Steroids* **2005**, 70, 886.
- [23] Sun, S.-W.; Fu, J.; Zhou, H.-N.; Zhu, T.-J.; Li, D.-H.; Mao, W.-J.; Gu, Q.-Q. *Chin. J. Mar. Drugs* **2014**, 33, 1 (in Chinese). (孙世伟, 付娟, 周会楠, 朱天娇, 李德海, 毛文君, 顾谦群, 中国海洋药物, **2014**, 33, 1.)
- [24] Zhang, G.-W.; Ma, X.-Q.; Yan, S.-J.; Zeng, L.-M.; Su, J.-Y. *Chem. J. Chin. Univ.* **2005**, 26, 81 (in Chinese). (张广文, 马祥全, 闫素君, 曾陇梅, 苏镜娱, 高等学校化学学报, **2005**, 26, 81.)
- [25] Ma, K.; Han, J.-J.; Bao, L.; Wei, T.-Z.; Liu, H.-W. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 942.
- [26] Jiang, Z.-H.; Chai, L.; Liu, Y.-P.; Qiu, H.-C.; Wang, T.-T.; Feng, X.-Y.; Wang, Y.-T.; Huang, Z.-H.; Liu, B.-M.; Fu, Y.-H. *Phytochem. Lett.* **2017**, 22, 194.

(Zhao, C.)