

云南美登木内生真菌 *Alternaria* sp. Ly81 中的混合萜类化合物的研究

袁琳¹, 黄文忠¹, 赵沛基² (1. 昆明学院化学科学与技术系 昆明, 650204; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要: 目的 研究云南美登木内生真菌 *Alternaria* sp. Ly81 的次生代谢产物, 并对所得的单体化合物进行抗肿瘤活性筛选。方法 采用 RP-18, Sephadex LH-20, 硅胶等材料进行色谱柱色谱分离化合物, 用现代波谱技术鉴定化合物的结构, 用 MTT 法测试单体化合物活性。结果 从 4 L 固体发酵提取物中分离得到 9 个混合萜类化合物, 分别鉴定为 tricycloalternarene 2a(1)、tricycloalternarene 1a(2)、tricycloalternarene 1b(3)、tricycloalternarene 2b(4)、tricycloalternarene 3b(5)、tricycloalternarene 4b(6)、tricycloalternarene 5b(7)、tricycloalternarene-H(8) 和 tricycloalternarene F(9)。结论 化合物 1~9 均为首次从该菌株中分离得到, 且首次用 Mosher 酯反应确定了化合物 1 的绝对构型。活性筛选结果显示化合物 3 对 Lewis 肺癌细胞 3LL 有强抑制活性。

关键词: 云南美登木; 内生真菌; *Alternaria* sp.; 混合萜; 抗肿瘤活性

doi: 10.11669/cpj.2013.21.011 中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2013)21-1823-04

Mixed Terpenoids from an Endophyte *Alternaria* sp. Ly81 Cultivated on *Maytenus hookeri*

YUAN Lin¹, HUANG Wen-zhong¹, ZHAO Pei-ji² (1. Chemical Science and Technology Department, Kunming University, Kunming 650214, China; 2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the secondary metabolites and their cytotoxic activities of an endophytic fungus *Alternaria* sp. Ly81 cultivated on *Maytenus hookeri*. **METHODS** Column chromatography by RP-18, Sephadex LH-20 and silica gel was used to isolate and purify the chemical constituents, and their structures were identified by spectroscopic analysis. Cytotoxic activities were evaluated by MTT method. **RESULTS** Nine compounds were isolated and identified as tricycloalternarene 2a(1), tricycloalternarene 1a(2), tricycloalternarene 1b(3), tricycloalternarene 2b(4), tricycloalternarene 3b(5), tricycloalternarene 4b(6), tricycloalternarene 5b(7), tricycloalternarene-H(8) and tricycloalternarene F(9). **CONCLUSION** Compounds 1-9 were isolated from the *Alternaria* sp. Ly81 for the first time. The absolute configuration of compound 1 is elucidated by Mosher's method. Compound 3 shows strong inhibitory activity against Lewis lung carcinoma cells 3LL.

KEY WORDS: *Maytenus hookeri*; endophytic fungus; *Alternaria* sp.; mixed terpenoids; cytotoxic activities

链格孢属(*Alternaria*) 真菌是分布广泛的一类分生孢子菌, 兼有寄生和腐生性, 能够兼性寄生于不同种植物, 因此常以内生真菌的形式从不同植物中分离出来。链格孢属真菌是有应用潜力的生物资源, 可产生多种结构类型的次级代谢产物, 如: 混合萜、环肽、perylene、内酯和 tetramic acid 等。其中一些次生代谢物具有杀虫、抗菌、抑制肿瘤细胞生长的生物活性^[1-2]。Tricycloalternarenes(TCAs, 曾被命名为 ACTG-toxins) 是链格孢属真菌次生代谢产物的主要类型。TCAs 由萜类结构单元(类异戊二烯侧链、A 和 B 环) 和非萜类结构单元(C 环) 组成(图 1)。生物合成研究表明, TCAs 的结构中萜类结构单元是由甲羟戊酸途径合成, 而非萜结构单元可能是由

shikimate pathway 合成。因此 TCAs 也被称为混合萜(mixed terpenoids)^[3-4]。TCAs 的生物活性报道较少, 这类化合物被认为是非寄主特异性的植物毒素, 它们在植物叶片穿刺实验中会引起植物叶片褐色病变和坏死^[5]。

我们从云南美登木中分离到多株链格孢属(*Alternaria*) 真菌, 为进一步研究该属真菌的次生代谢产物和生物活性, 我们对其中一株 *Alternaria* sp. Ly81 进行系统的化学成分研究, 从中分离得到 9 个混合萜类化合物, 分别鉴定为 tricycloalternarene 2a(1)、tricycloalternarene 1a(2)、tricycloalternarene 1b(3)、tricycloalternarene 2b(4)、tricycloalternarene 3b(5)、tricycloalternarene 4b(6)、tricycloalternarene

基金项目: 云南省应用基础上项目(2009ZC139M); 国家自然科学基金资助项目(31260073)

作者简介: 袁琳, 女, 副教授 研究方向: 天然药物开发与研究

Tel/Fax: (0871) 65098482/(0871) 65098474

E-mail: sunrainyl@gmail.com

5b(7)^[5-6]、tricycloalternarene-H(8)^[7]和 tricycloalternarene F(10)^[8]。首次用 Mosher 酯反应确定了化合物 1 的绝对构型。并对化合物 1~8 进行了抑制 Lewis 肺癌细胞 3LL 和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 活性筛选。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Bruker AM-400 型核磁共振仪, VG Auto-Spec-3000 质谱仪。薄层色谱用硅胶(青岛海洋化工厂); 柱色谱材料: 硅胶(200~300 目, 青岛海洋化工厂)、Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司) 和反相硅胶 RP-18 (Merck 公司)。Mosher 试剂: MTPA-Cl (Alfa Aesar 公司)。

1.2 菌株

Alternaria sp. Ly81 的 GenBank 系列号为 KC702823, 分离自云南美登木(*Maytenus hookeri*) 的叶片, 现保存于中国科学院昆明植物研究所。

2 方法

2.1 发酵

将活化的 Ly81 菌株接入 MS 固体培养基(Murashige-Skoog 添加 $13\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8) 中, 28℃ 培养 7 d 后, 取少量菌丝体接种到已经灭菌的 MS 固体培养基(4 L) 28℃ 培养 10 d。

2.2 提取与分离

将菌丝体连同琼脂一起切成小块, 用乙酸乙酯-甲醇-冰醋酸(80:15:5) 浸提 3 次。提取液减压浓缩后用乙酸乙酯萃取, 回收溶剂后得浸膏 3.78 g。该浸膏用 RP-18 柱色谱, 分别用水、体积分数 30%、50%、70% 和 100% 丙酮梯度洗脱, 用 TLC 检测分为 8 个组分 A~H。

组分 C(966 mg) 经硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮梯度洗脱(由 10:1 到 7:3), TLC 检测合并得到 4 个亚组分 C1~4。C1 经反复硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯) 得到化合物 8(3 mg) 和 9(2 mg)。C2 经柱色谱, 三氯甲烷-丙酮洗脱后, 再用 Sephadex LH-20 (丙酮) 纯化得到化合物 3(2 mg) 和 4(10 mg)。化合物 1(7 mg) 和 2(1 mg) 是以石油醚-丙酮为洗脱剂, 对 C3 进行反复柱色谱得到的。组分 D 先用 Sephadex LH-20 (甲醇) 分段, 后用硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮洗脱得到化合物 5(3 mg)、6(4 mg) 和 7(2 mg)。

2.3 化合物 1 的 Mosher 酯制备

将化合物 1(6 mg) 分为 2 部分, 用无水吡啶溶

解后分别加入 (S)-或 (R)-MTPA [MTPA = α -methoxy- α -(trifluoromethyl) phenylacetyl chloride] (10 μL) 在 30℃ 搅拌 12 h, 待反应完全后将有机溶剂蒸干, 产物用丙酮凝胶柱 Sephadex LH-20 纯化, 得到的纯化化合物用相同溶剂(CD_3OD) 分别做 NMR 和 HSQC 来确定仲醇羟基的 β 、 γ 和 δ 位的各个质子的化学位移变化, 计算出 $\Delta\delta(\delta(S) - \delta(R))$, 据此确定 C-15 的绝对构型^[9]。

2.4 细胞毒活性测试方法

用 MTT 法^[10], 以顺铂为阳性对照, 测试化合物 1~8 对 Lewis 肺癌细胞 3LL 和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 的体外抗肿瘤活性。将化合物溶解于 DMSO 中, 取指数生长期的细胞悬液接种于 96 孔板上, 置于 CO_2 培养箱中, 37℃ 恒温培养 24 h 后, 加入不同浓度的化合物(浓度分别为 0.625、1.25、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 每个浓度均为 3 个复孔。培养 36 h 后, 将 MTT 加入 96 孔板中, 继续培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 在酶标仪上波长为 570 nm 处测定每孔的吸光度, 计算细胞抑制率。

3 结构鉴定

化合物 1: 无色油状(三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 347 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。¹H-NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.30 (1H, m, H-8), 5.21 (1H, m, H-3), 4.33 (1H, m, H-15), 3.97 (2H, brs, H-1), 1.61 (3H, s, Me-2'), 1.49 (3H, s, Me-10'), 0.96 (3H, d, $J = 6.8\text{ Hz}$, Me-6')。¹³C-NMR(CDCl_3 , 100 MHz) δ : 68.7 (C-1), 135.4 (C-2), 13.7 (C-2'), 124.9 (C-3), 24.9 (C-4), 34.6 (C-5), 30.7 (C-6), 19.7 (C-6'), 150.4 (C-7), 119.6 (C-8), 45.1 (C-9), 89.6 (C-10), 23.6 (C-10'), 47.0 (C-11), 14.8 (C-12), 107.7 (C-13), 169.9 (C-14), 66.4 (C-15), 28.7 (C-16), 33.6 (C-17), 197.2 (C-18)。以上光谱数据与文献[5-6]报道的 tricycloalternarene 2a 一致。

化合物 1 曾被命名为 ACTG E。1986 年文献报道^[5], ACTG E 的 di-*p*-bromobenzoate dibenzoate 衍生物的 CD 谱在 260 ($\Delta\epsilon = +20.0$) 和 230 nm ($\Delta\epsilon = -18.1$) 显示出 cotton 效应, 可推断该化合物的 15 位羟基的绝对构型 R。但本实验用 Mosher 酯反应证实, 化合物 1 的 15 位羟基为 S 构型。 $\Delta\delta(\delta(S) - \delta(R))$ 结果见图 1。该结果与混合萜系列化合物中同样在 C-15 位有羟基取代的 tricycloalternarene F 的 CD 谱结果[8]一致。tricycloalternarene F 在本实验

中也分离得到。

化合物 2: 无色油状(三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 349 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.27 (1H, brs, H-8), 4.33 (1H, m, H-15), 3.42 (2H, m, H-1), 1.46 (3H, s, Me-10'), 0.92 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, Me-6'), 0.85 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, Me-2')。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 68.2 (C-1), 35.5 (C-2), 16.5 (C-2'), 33.0 (C-3), 24.7 (C-4), 34.9 (C-5), 32.4 (C-6), 20.1 (C-6'), 150.3 (C-7), 119.6 (C-8), 44.9 (C-9), 88.8 (C-10), 23.6 (C-10'), 46.6 (C-11), 15.2 (C-12), 107.7 (C-13), 169.9 (C-14), 66.4 (C-15), 28.9 (C-16), 33.6 (C-17), 196.9 (C-18)。以上光谱数据与文献[6]报道的 tricycloalternarene 1a 一致。

化合物 3: 无色油状(三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 349 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.29 (1H, brs, H-8), 4.08 (1H, dd, $J = 5.2, 12.7$ Hz, H-17), 3.43 (2H, m, H-1), 1.41 (3H, s, Me-10'), 0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-6'), 0.86 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, Me-2')。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 68.3 (C-1), 35.4 (C-2), 16.5 (C-2'), 33.0 (C-3), 24.6 (C-4), 35.0 (C-5), 32.4 (C-6), 20.2 (C-6'), 150.3 (C-7), 119.7 (C-8), 44.9 (C-9), 88.3 (C-10), 23.3 (C-10'), 46.3 (C-11), 15.3 (C-12), 105.2 (C-13), 172.4 (C-14), 27.7 (C-15), 29.5 (C-16), 71.0 (C-17), 197.7 (C-18)。以上光谱数据与文献[6]报道的 tricycloalternarene 1b 一致。

化合物 4: 无色油状(三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 347 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.30 (1H, brs, H-8), 5.24 (1H, brs, H-3), 4.02 (1H, dd, $J = 5.2, 12.8$ Hz, H-17), 3.96 (2H, s, H-1), 1.58 (3H, s, Me-2'), 1.44 (3H, s, Me-10'), 0.95 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-6')。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 68.5 (C-1), 135.2 (C-2), 13.7 (C-2'), 125.4 (C-3), 24.9 (C-4), 34.7 (C-5), 31.2 (C-6), 20.1 (C-6'), 150.0 (C-7), 119.9 (C-8), 45.0 (C-9), 88.7 (C-10),

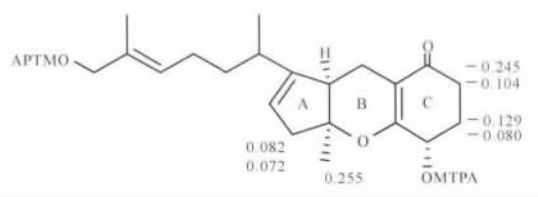


图 1 化合物 1 的 Mosher 酯反应结果

Fig. 1 Results of the modified Mosher method of 1. $\Delta\delta(\delta(S) - \delta(R))$

23.2 (C-10'), 46.4 (C-11), 15.0 (C-12), 105.0 (C-13), 172.8 (C-14), 27.8 (C-15), 29.4 (C-16), 71.0 (C-17), 197.7 (C-18)。以上光谱数据与文献[5-6]报道的 tricycloalternarene 2b 一致。

化合物 5: 无色油状(三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 331 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.32 (1H, brs, H-8), 5.04 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, dd, $J = 5.1, 12.6$ Hz, H-17), 1.66 (3H, s, H-1), 1.55 (3H, s, Me-2'), 1.43 (3H, s, Me-10'), 0.96 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, Me-6')。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 25.6 (C-1), 131.2 (C-2), 17.5 (C-2'), 124.3 (C-3), 25.7 (C-4), 34.8 (C-5), 32.1 (C-6), 20.0 (C-6'), 150.1 (C-7), 119.7 (C-8), 44.7 (C-9), 88.2 (C-10), 23.2 (C-10'), 46.0 (C-11), 15.2 (C-12), 105.0 (C-13), 172.2 (C-14), 27.6 (C-15), 29.3 (C-16), 70.8 (C-17), 197.5 (C-18)。以上光谱数据与文献[6]报道的 tricycloalternarene 3b 一致。

化合物 6: 无色油状(三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 345 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.22 (1H, brs, H-8), 5.00 (1H, m, H-3), 3.58 (1H, m, H-17), 3.43 (3H, s, MeO-17), 1.59 (3H, s, H-1), 1.49 (3H, s, Me-2'), 1.35 (3H, s, Me-10'), 0.88 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, Me-6')。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 25.6 (C-1), 131.2 (C-2), 17.6 (C-2'), 124.6 (C-3), 26.0 (C-4), 34.9 (C-5), 32.6 (C-6), 20.0 (C-6'), 150.5 (C-7), 119.7 (C-8), 44.9 (C-9), 87.9 (C-10), 23.7 (C-10'), 46.5 (C-11), 15.6 (C-12), 106.7 (C-13), 170.9 (C-14), 26.9 (C-15), 27.1 (C-16), 79.5 (C-17), 58.0 (MeO-17), 195.5 (s, C-18)。以上光谱数据与文献[6]报道的 tricycloalternarene 4b 一致。

化合物 7: 无色油状(三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 345 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.22 (1H, m, H-5), 4.98 (1H, m, H-3), 3.65 (1H, m, H-17), 3.50 (3H, s, MeO-17), 1.64 (3H, s, H-1), 1.61 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-6'), 1.54 (3H, s, Me-2'), 1.26 (3H, s, Me-10')。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 25.6 (C-1), 131.3 (C-2), 17.6 (C-2'), 123.1 (C-3), 26.4 (C-4), 127.1 (C-5), 133.9 (C-6), 18.3 (C-6'), 41.5 (C-7), 25.3 (C-8), 37.9 (C-9), 86.9 (C-10), 22.6 (C-10'), 46.2 (C-11), 15.9 (C-12), 106.3 (C-13), 168.3 (C-14), 27.2 (C-15), 27.0 (C-16), 79.6 (C-17), 58.0 (MeO-17), 196.2 (C-18)。以上光谱数据与文献[6]报道的 tricycloalternarene 5b 一致。

化合物 8: 无色油状(甲醇) 。ESI-MS m/z : 345 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 9.32 (1H, s, H-1), 6.55 (1H, m, H-3), 5.41 (1H, brs, H-8), 4.05 (1H, dd, $J = 5.2, 12.5$ Hz, H-17), 1.66 (3H, s, Me-2'), 1.44 (3H, s, Me-10'), 1.03 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, Me-6')。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 197.2 (C-1), 140.4 (C-2), 9.1 (C-2'), 156.6 (C-3), 28.0 (C-4), 34.6 (C-5), 33.6 (C-6), 20.6 (C-6'), 150.6 (C-7), 121.9 (C-8), 45.9 (C-9), 89.8 (C-10), 23.2 (C-10'), 47.5 (C-11), 15.9 (C-12), 106.6 (C-13), 174.0 (C-14), 28.7 (C-15), 30.9 (C-16), 72.1 (C-17), 199.5 (C-18)。以上光谱数据与文献[7]报道的 tricycloalternarene -H 一致。

化合物 9(tricycloalternarene F): 无色油状(三氯甲烷) 。ESI-MS m/z : 353 $[M + Na]^+$ 。 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.23 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-5), 4.93 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-3), 4.38 (1H, m, H-15), 1.63 (3H, s, Me-1), 1.60 (3H, brs, Me-6'), 1.52 (3H, s, Me-2'), 1.31 (3H, s, Me-10')。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 25.5 (C-1), 131.3 (C-2), 17.5 (C-2'), 123.1 (C-3), 26.4 (C-4), 127.1 (C-5), 133.7 (C-6), 18.2 (C-6'), 41.6 (C-7), 25.3 (C-8), 37.7 (C-9), 87.5 (C-10), 22.7 (C-10'), 43.2 (C-11), 15.8 (C-12), 107.6 (C-13), 167.1 (C-14), 66.1 (C-15), 28.9 (C-16), 33.3 (C-17), 197.3 (C-18)。以上光谱数据与文献[8]报道的 tricycloalternarene F 一致。

4 细胞毒活性测试结果

用 MTT 法测试了化合物 1~8 对 Lewis 肺癌细胞 3LL 和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 的体外抗肿瘤活性, 实验选用顺铂(DDP) 为阳性对照化合物, 以 IC_{50} 值评价化合物的抗肿瘤活性。结果见表 1。实验结果显示, 化合物 3 对 3LL 有强抑制活性, 对 SH-SY5Y 有中等抑制活性; 化合物 1 和 8 对 3LL 也有中等抑制活性。

5 讨 论

本实验中分离出来的一系列混合萜类化合物, 结构多样, 主要变化在类异戊二烯侧链上的双键和取代基, 以及 C 环上的羟基或甲氧基的取代位置。

表 1 云南美登术内生真菌中混合萜类化合物 1~8 抑制两株肿瘤细胞株的 IC_{50} 值

Tab. 1 $IC_{50}/\mu mol \cdot L^{-1}$ of compounds 1~8 in two cell lines of *Maytenus hooteri*

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	DDP
SH-SY5Y	23.75	>40	7.72	16.96	13.40	>40	12.52	>40	17.23
3LL	7.52	32.45	1.10	21.25	>40	11.82	>40	6.62	14.53

迄今为止, 已经报道过 30 余个混合萜类化合物, 但生物活性报道较少, 没有引起重视。本实验报道的混合萜类化合物具有抗肿瘤活性的潜质。但从目前的实验数据, 无法推测混合萜类化合物抗肿瘤活性与结构之间的关系。因此, 值得通过改变培养基等方法, 分离更多混合萜, 建立混合萜类化合物库, 进一步研究这类化合物的抗肿瘤活性和构效关系。

REFERENCES

- [1] GARDNER J M, KONO Y, CHANDLER J L. Bioassay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1986, 29(1): 293-304.
- [2] STIERLE A C, CADDLINA J H, STROBEL G A. Phytotoxins from *Alternaria alternata*, a pathogen of spotted knapweed [J]. *J Nat Prod*, 1989, 52(1): 42-47.
- [3] NUSSBAUM R P, GÜNTHER W, HEINZE S, et al. New tricycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(4): 593-599.
- [4] LIEBERMANN B, NUSSBAUM R P, GÜNTHER W, et al. Biosynthesis of the bicycloalternarenes, mixed terpenoids of *Alternaria alternata* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56(4): 551-557.
- [5] KONO Y, GARDNER J M, SUZUKI Y, et al. Studies on host-selective toxins produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins [J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(6): 1597-1606.
- [6] LIEBERMANN B, ELLINGER R, GÜNTHER W, et al. Tricycloalternarenes produced by *Alternaria alternata* related to ACTG-toxins [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(3): 297-303.
- [7] KONO Y, GARDNER J M, SUZUKI Y, et al. New minor components of host-selective ACTG-toxin and a novel sesquiterpene produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins [J]. *J Pestic Sci*, 1989, 14(1): 224-228.
- [8] WANG Q X, BAO L, YANG X L, et al. Tricycloalternarenes F-H: Three new mixed terpenoids produced by an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. using OSMAC method [J]. *Fitoterapia*, 2013, 85(1): 8-13.
- [9] OHTANI I, KUSUMI T, KASHMAN Y, et al. High-field FT-NMR application of mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids [J]. *J A Chem Soc*, 1991, 113(11): 4092-4096.
- [10] LUO M L, HUANG S, WANG J, et al. Determination of anti-tumor activity of compound preparation Xiancidan *in vitro* by MTT method [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2010, 45(23): 1816-1818.

(收稿日期: 2013-04-09)