

山茶花内生真菌次生代谢产物化学成分及降糖活性分析

冼小雅^a, 赵苗^a, 梁琳^a, 闫梦麒^a, 周先丽^b, 梁成钦^a

(桂林医学院 a.药学院, b.智能医学与生物技术学院, 桂林 541199)

摘要 目的 探索山茶花内生真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 次生代谢产物化学成分及降糖作用。方法 使用硅胶柱色谱、薄层色谱(TLC)及高效液相色谱(HPLC)等分离纯化真菌发酵后的乙酸乙酯部位提取物,根据波谱方法与文献数据对比进行结构表征。采用 pNPG 法对分离得到的化合物进行降糖活性筛选,并用分子对接的手段进一步研究化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。结果 从真菌发酵后的乙酸乙酯部位提取物中分离得到 11 个已知化合物,并检测了降糖活性。化合物 6 对 α -葡萄糖苷酶有抑制活性, IC_{50} 为 (15.48 ± 11.82) 。分子对接表明,化合物 6 结合能为 -6.5 kJ/mol。结论 化合物 1~5、7~11 为首次从真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 中分离得到,其中化合物 6 对 α -葡萄糖苷酶有较强的抑制作用。

关键词: 山茶花内生真菌;次生代谢产物;降糖活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)03-0054-09

Chemical constituents and hypoglycemic activities analysis of secondary metabolites of the endophytic fungus from *camellia* sp.

XIAN Xiaoya^a, ZHAO Miao^a, LIANG Lin^a, YAN Mengqi^a, ZHOU Xianli^b, LIANG Chengqin^a

(a. College of Pharmacy, b. College of Intelligent Medicine & Biotechnology,

Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract Objective To study the chemical composition of the endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense* from *camellia* sp. and their hypoglycemic effects. **Methods** The ethyl acetate extracts were separated and purified by silica gel column chromatography, thin layer chromatography (TLC), and high performance liquid chromatography (HPLC). The structures of the obtained compounds were characterized according to spectroscopic methods or by comparison with relevant literature data. The hypoglycemic activity of the isolated compounds was screened by pNPG method, and the inhibitory mechanism of α -

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860621)。

第一作者: 冼小雅, 硕士研究生, 研究方向为药物研发与转化。

通信作者: 梁成钦, cqliang@glmc.edu.cn。

glucosidase was further studied by molecular docking method. **Results** Eleven known compounds were isolated from the ethyl acetate extract after fungal fermentation. The glucose-lowering activity assay indicated that compound 6 had an inhibitory activity on α -glucosidase with IC_{50} value of (15.48 ± 11.82) . Molecular docking assay showed that the binding energy of compound 6 was -6.5 kJ/mol. **Conclusion** Compounds 1 ~ 5, 7 ~ 11 are isolated for the first time from the fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. Compound 6 shows a moderate inhibitory effect on α -glucosidase.

Keywords: *Paraconiothyrium Brasiliense*; fungus; secondary metabolites; hypoglycemic activity

在研究与开发新药方面,天然产物有非常重要的作用,许多应用于临床的药物大多数都来自于自然界中的天然代谢产物或基于原先结构发展的衍生物^[1]。传统的从植物中提取分离获得活性化合物的方法耗时长、成本高,发现新颖化合物的速度在不断下降^[2]。因此,从植物内生真菌中发掘并筛选具有药理活性或结构新颖的先导化合物成为一个新的研究热点。目前,从植物内生真菌中分离和鉴定出一系列具有抗菌、细胞毒性、抗病毒、抗炎、降糖作用等潜在药用活性的天然产物,其活性成分不仅骨架复杂,而且种类多样,是新型前药分子和模式药物的重要来源^[3-5]。CAI 等^[6]从植物秦艽内生真菌中 *Subplenodorus* sp. CPC 401465 中分离得到 10 个新的氧杂蒽酮二聚体,并对革兰氏阳性菌有显著的抑制活性。GONG 等^[7]在孩儿参内生真菌 *Talaromyces primulinus* WZ-883 中发现 6 个 Azaphilones 类化合物,并首次阐述了化合物 PP-R 对结肠癌细胞的抑制活性和机制。LI 等^[8]在忍冬的内生真菌 *Aspergillus* sp. 中发现 6 个新的细胞松弛素,能抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞中 NO 的产生,而表现出抗炎活性。王晓洋等^[9]在杜仲内生真菌 *Penicillium* sp. GZWMJZ-042 中分离到 9 个生物碱类化合物,大多对 α -葡萄糖苷酶具有抑制活性。WANG 等^[10]从植物内生真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* HDN15-135 分离到 5 个倍半萜类衍生物 brasilterpenes A ~ E,其中 brasilterpenes C 的降糖活性与抗糖尿病阳性与对照药罗格列酮相当。因此,内生真菌及其次生代谢产物具有重要的研究价值和应用前景。

山茶花,属于山茶科山茶属植物,具有清热、消痛、止血和凉血等作用,还可以用于治疗烫伤^[11],其提取物具有抑制血糖升高、保护胃黏膜及止血作用^[12]。

目前,国内外对山茶花的研究主要集中于植物的化学成分,对其内生真菌的研究报道较少。鉴于此,本研究旨在分析山茶花内生真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 次生代谢产物化学成分及降糖活性。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

超净工作台 SW-CJ-1FD(购自苏州安泰空气技术有限公司),恒温振荡培养箱 ZWY-2112D(购自上海智诚分析仪器有限公司),纯水仪 Arium 61215(购自德国赛多利斯公司),高压灭菌锅(购自北京金鑫压力容器制造有限公司),LC-MS8030 液相色谱-四级杆质谱联用仪(购自日本岛津公司),超导核磁共振 Bruker AM-400 MHz、超导核磁共振仪 AVANCE III-600 MHz(购自瑞士 Bruker 公司),半制备型、分析型高效液相色谱仪 Agilent 1260、反相色谱柱 ZORBAX SB-C18(购自美国 Agilent 公司);旋转蒸发器 RE-52A(购自上海亚荣生化仪器厂),电子天平 BS400S(购自德国赛多利斯公司);D-(+)-葡萄糖(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司);薄层析硅胶、柱层析硅胶(购自青岛海洋化工厂);反相硅胶 RP-18(购自美国 Merk 公司);色谱纯甲醇(购自美国 Fisher 公司);分析纯甲醇、石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇(购自西陇化工股份有限公司); α -葡萄糖苷酶(购自美国 sigma 公司);4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)[购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司],阿卡波糖、Agar Powder(购自北京索莱宝科技有限公司)。

真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 分离自植物山茶花,该株真菌鉴定结果 GenBank 号为 FJ375137.1,该株真菌保存在桂林医学院药学院。

1.2 真菌发酵

将从山茶花茎中分离得到的真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 首先转接至马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA 培养基) 上, 放置菌种至 28 ℃, 恒温培养箱中培养 3 d。真菌活化以后接种到含有 200 mL 培养液 (土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 纯化水 1 L) 的 500 mL 三角锥形瓶中, 在 28 ℃ 下, 转速为 150 r/min 的摇床中培养 3 d 作为种子液。然后在超净工作台中将培养好的种子液分别接种到 40 瓶灭菌后的大米培养基 (大米 100 g, 纯化水 100 mL) 中静置培养 30 d。

1.3 提取分离

发酵完成后先用乙酸乙酯将真菌浸泡、灭活, 将大米培养基捣碎、浸泡 3 d, 用乙酸乙酯反复提取 3 次, 最后真空浓缩后得到乙酸乙酯部位的总浸膏 107 g。

首先将得到的乙酸乙酯总浸膏溶解后, 加入硅胶 (100~200 目) 拌样, 使用硅胶柱层析进行初步分离。以石油醚-乙酸乙酯 (9:1, 8:2, 2:1, 1:1, 0:1) 梯度洗脱, 结合 TLC 检测, 将相同组分合并, 获得 5 个组分 Fr.1~Fr.5。取组分 Fr.1 用石油醚-乙酸乙酯 (9:1, 8:2, 2:1, 1:1, 0:1) 梯度洗脱, 得到 5 个子组分 Fr.1.1~Fr.1.5。组分 Fr.1.1 使用反相

C_{18} 柱进行分离, 10%~100% 甲醇作为洗脱剂, 经 TLC 检测合并相同组分, 得到 7 个组分 Fr.1.1.1~Fr.1.1.7。组分 Fr.1.1.3 通过 HPLC 进行分离纯化, 以 MeOH- H_2O (63:37) 洗脱, 得到化合物 9 (8.6 mg)。组分 Fr.1.1.6 经过 HPLC 进行分离纯化, 以 MeOH- H_2O (90:10) 洗脱, 得到化合物 10 (13.6 mg)、化合物 11 (103.6 mg)。组分 Fr.1.1.7 通过 HPLC 分离纯化, 以 MeOH- H_2O (94:6) 洗脱, 得到化合物 5 (6.3 mg)。组分 Fr.2 通过反相 C_{18} 柱进行梯度分离, 以 10%~100% 甲醇作为洗脱剂, 经过 HPLC 检测合并相同组分, 获得 7 个组分 Fr.2.1~Fr.2.7, 取组分 Fr.2.6 通过 HPLC 进行分离纯化, 以 MeOH- H_2O (92:8) 洗脱, 得到化合物 1 (14.6 mg)、化合物 2 (45.6 mg)、化合物 3 (20.3 mg) 和化合物 4 (19.7 mg)。组分 Fr.3 通过 TLC 检测, 将相同组分合并, 得到 4 个子组分 Fr.3.1~Fr.3.4。取组分 Fr.3.3 经 HPLC 分离纯化, 以 MeOH- H_2O (33:67) 洗脱, 得到化合物 7 (7.7 mg) 和化合物 8 (11.3 mg)。组分 Fr.3.4 经 HPLC 进行分离纯化, 以 MeOH- H_2O (28:72) 洗脱, 得到化合物 6 (10.2 mg)。化合物 1~11 结构如图 1 所示。

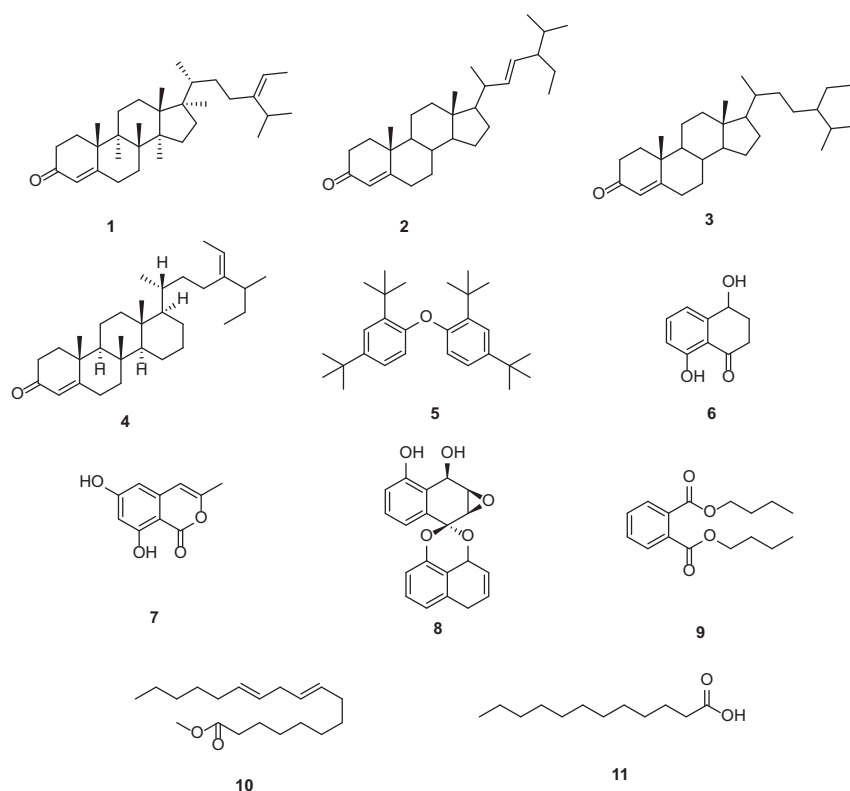


图1 化合物1~11的结构

2 结果

2.1 真菌鉴定结果

DNA 碱基序列测试结果如下:

GATGCTACTGCGGAGGATCATTATCTATTCCATG
AGGTGCGGTGCGGGCCCTCGGCGGGAGCAACAGCTG
CCGTGCGGCGGTAGAGGTAACACTTTCACGCGCCGC
ATGTCTGAATCCTTTTTTTACGAGCACCTTTCGTTCTC
CTTCGGCGGGGCAACCTGCCGTTGGAACCTATCAAA
ACCTTTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACA
AACAATCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGC
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGG
CATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCT
GCTTGGTGTGGGCGTCTGTCCCGCCTCTGCGCGCGG
ACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCCTTGCCTCC
TCTCGCGCAGCACATTGCGCTTCTCGAGGGGCGCGG
CCCCGCTCCACGAAGCAACATTACCGTCTTTGACCTC
GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGATAAA
AAAGGGGGGGGGGGGAGAAAATGGTTAAA

2.2 结构鉴定

化合物 1: 白色固体。ESI-MS (m/z): 489 [M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} 5.73 (1H, s, H-4), 5.10 (1H, q, J = 6.8 Hz, H-28), 2.35 (1H, m, H-25), 1.59 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-29), 1.18 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, s, H-27), 0.97 (6H, d, J = 7.0 Hz, H-26), 0.94 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-27), 0.71 (3H, s, H-18)。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} 199.8 (C-3), 171.8 (C-5), 145.8 (C-24), 123.7 (C-4), 116.5 (C-28), 55.9 (C-14), 55.8 (C-17), 53.8 (C-9), 42.4 (C-13), 39.6 (C-12), 38.6 (C-10), 36.1 (C-20), 35.8 (C-8), 35.4 (C-22), 34.0 (C-2), 33.0 (C-6), 32.0 (C-7), 28.2 (C-16), 24.2 (C-15), 21.0 (C-11), 18.7 (C-21), 17.4 (C-19), 12.7 (C-29), 12.1 (C-18)。通过以上的数据和文献^[13]对比, 化合物数据基本一致, 故化合物鉴定为 24-ethylcholesta-4,24(28)Z-lien-3-one。

化合物 2: 白色固体。ESI-MS (m/z): 433 [M+Na]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} 5.75~5.67 (1H, m, H-3), 5.15 (1H, dd, J = 15.2, 8.6 Hz, H-19), 5.07~

4.97 (1H, m, H-20), 2.44 (2H, dd, J = 16.9, 5.0 Hz, H-1), 2.37 (3H, dd, J = 14.1, 4.3 Hz, H-6, 10), 2.03 (6H, dt, J = 13.2, 4.6, 2.8 Hz, H-7, 8, 13), 1.71~1.68 (1H, m, H-17), 1.60 (1H, dd, J = 3.9, 1.5 Hz, H-18), 1.56~1.52 (1H, m, H-21), 1.51 (1H, dd, J = 4.6, 1.9 Hz, H-22), 1.25 (3H, t, H-28), 1.18 (7H, d, H-14, 15, 16, 20), 1.01 (2H, d, J = 3.4 Hz, H-9, 11), 0.87~0.82 (6H, t, H-26, 27), 0.79 (3H, q, J = 1.6 Hz, H-25), 0.75~0.67 (6H, m, H-29, 24)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} 199.7 (C-2), 171.8 (C-4), 138.1 (C-19), 129.4 (C-20), 123.7 (C-3), 56.1 (C-11), 55.9 (C-17), 53.8 (C-10), 51.2 (C-21), 42.4 (C-12), 40.5 (C-18), 39.5 (C-13), 36.2 (C-9), 35.7 (C-6), 34.0 (C-1), 33.0 (C-7), 32.0 (C-8), 31.9 (C-16), 28.9 (C-15), 25.4 (C-23), 21.2 (C-14), 21.0 (C-26, 27), 20.2 (C-28), 12.3 (C-29, 25)。通过以上的数据和文献^[14]对比, 化合物数据基本一致, 故化合物鉴定为 stigmasterol-3-O-glucopyranoside。

化合物 3: 白色固体。ESI-MS (m/z): 411 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} 5.72 (1H, s, H-4), 2.43~2.28 (1H, m, H-2), 2.02 (1H, dd J = 13.2, 3.2 Hz, H-2), 1.28 (2H, m, H-28), 1.18 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.85 (3H, d, J = 7.4 Hz, H-29), 0.82 (6H, d, J = 6.8 Hz, H-26, 27), 0.71 (3H, s, H-18)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} 199.7 (C-3), 171.8 (C-5), 123.7 (C-4), 56.0 (C-14), 55.9 (C-17), 53.8 (C-9), 45.8 (C-24), 42.4 (C-13), 39.6 (C-10), 38.6 (C-12), 36.1 (C-7), 35.7 (C-20), 34.0 (C-1), 33.0 (C-22), 29.1 (C-25), 28.2 (C-16), 26.0 (C-23), 24.2 (C-15), 23.1 (C-28), 21.0 (C-11), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 18.7 (C-21), 17.4 (C-19), 12.0 (C-18)。通过以上的数据和文献^[15]对比, 化合物数据基本一致, 故化合物鉴定为 stigmast-4-ene-3-one。

化合物 4: 白色固体。ESI-MS (m/z): 453 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_{H} 5.66 (1H, s, H-4), 5.05 (1H, q, J = 6.8 Hz, H-28), 1.44 (3H, d, J = 6.9 Hz, Me-29), 0.84 (3H, s, Me-19), 0.83 (3H, d, J = 1.8 Hz, Me-27), 0.81 (3H, s, Me-26), 0.79 (3H, d, J =

6.5 Hz, Me-21), 0.46 (3H, s, Me-18)。¹³C-NMR (150 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_c 198.4 (C-3), 170.7 (C-5), 145.8 (C-24), 124.0 (C-4), 117.1 (C-28), 56.1 (C-14), 55.9 (C-17), 53.8 (C-9), 42.5 (C-13), 39.8 (C-12), 38.6 (C-10), 36.3 (C-20), 36.3 (C-1), 35.8 (C-8), 35.5 (C-22), 34.4 (C-2), 32.8 (C-6), 32.2 (C-7), 28.9 (C-25), 28.4 (C-23), 28.3 (C-16), 24.3 (C-15), 21.1 (C-11), 21.1 (C-26), 21.1 (C-27), 18.9 (C-21), 17.1 (C-19), 12.9 (C-29), 12.0 (C-18)。通过以上的数据和文献^[16]结果对比,波谱数据基本一致,故化合物鉴定为 stigmas-4,24(28)-diene-3-one。

化合物 5: 白色固体。ESI-MS (*m/z*): 395 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.53 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6, 6'), 7.36 (2H, t, *J* = 2.2 Hz, H-3, 3'), 7.13 (2H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, H-5, 5'), 1.33 (18H, s, H-8, 9, 10, 8', 9', 10'), 1.28 (18H, s, H-12, 13, 14, 12', 13', 14')。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_c 147.7 (C-1), 147.6 (C-1'), 147.1 (C-4, 4'), 138.5 (C-2, 2'), 124.5 (C-3, 3'), 124.0 (C-5, 5'), 119.1 (C-6, 6'), 34.9 (C-7, 7'), 34.5 (C-11, 11'), 31.4 (C-12, 13, 14, 12', 13', 14'), 30.2 (C-8, 9, 10, 8', 9', 10')。通过以上的数据和文献^[17]对比,化合物数据基本一致,故化合物鉴定为 1,1'-Oxybis(2,4-di-tert-butylbenzene)。

化合物 6: 红棕色固体。ESI-MS (*m/z*): 201 [M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_H 7.55 (1H, m, H-6), 7.19 (2H, d, *J* = 9.9 Hz, H-5), 7.00 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-7), 2.77-2.24 (2H, m, H-2), 2.28~2.10 (1H, m, H-3), 1.28 (1H, m, H-9)。¹³C-NMR (150 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_c 205.2 (C-1), 162.8 (C-8), 136.9 (C-6), 135.2 (C-4a), 117.7 (C-5), 116.5 (C-7), 115.2 (C-8a), 67.0 (C-4), 35.7 (C-2), 32.3 (C-3)。通过以上的数据和文献^[18]对比,化合物数据基本一致,故化合物鉴定为 3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-2H-naphthalen-1-one。

化合物 7: 淡黄色油状物。ESI-MS (*m/z*): 191 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_H 6.45 (1H, s, H-4), 6.30 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 6.27 (1H, *J* = 2.1 Hz, H-7)。¹³C-NMR (150 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_c 166.4 (C-6), 165.9 (C-1), 163.1 (C-8), 154.5 (C-3),

140.1 (C-4a), 104.6 (C-5), 102.9 (C-7), 101.8 (C-4), 98.2 (C-8a), 19.3 (3-Me)。通过以上的数据和文献^[19]对比,化合物的数据基本一致,故化合物鉴定为 saccharonol A。

化合物 8: 黄棕色固体。ESI-MS (*m/z*): 333 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 7.66 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-7'), 7.63 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-2'), 7.57 (1H, t, *J* = 8.3 Hz, H-6'), 7.50 (1H, t, *J* = 8.3 Hz, H-3'), 7.26 (1H, t, *J* = 7.9 Hz, H-6), 7.17 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-7), 7.15 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-5), 6.97 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4'), 6.93 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 5.43 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-1), 3.73 (1H, d, *J* = 4.5 Hz, H-3), 3.66 (1H, dd, *J* = 4.5, 2.3 Hz, H-2)。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_c 156.8 (C-8), 147.6 (C-8'), 147.4 (C-1'), 134.2 (C-10'), 132.7 (C-10), 129.5 (C-6), 128.4 (C-6'), 128.3 (C-3'), 121.4 (C-9), 121.2 (C-5), 120.3 (C-7), 118.2 (C-7'), 118.03 (C-2'), 112.8 (C-9'), 109.9 (C-5'), 109.4 (C-4'), 97.8 (C-4), 54.1 (C-1), 51.4 (C-2), 49.1 (C-3)。通过以上的数据和文献^[20]对比,化合物数据基本一致,故化合物鉴定为 sch 53823。

化合物 9: 黄色油状物。ESI-MS (*m/z*): 301 [M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H 7.72~7.71 (2H, m, H-2, 5), 7.56~7.54 (2H, m, H-3, 4), 4.30 (4H, t, *J* = 6.7 Hz, H-8, 8'), 1.73 (4H, m, H-9, 9'), 1.44 (4H, m, H-10, 10'), 0.97 (6H, t, *J* = 7.2 Hz, H-11, 11')。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_c 167.7 (C=O), 132.2 (C-1, 6), 130.9 (C-2, 5), 128.8 (C-3, 4), 65.5 (C-8, 8'), 30.5 (C-9, 9'), 19.1 (C-10, 10'), 13.7 (C-11, 11')。通过以上的数据和文献^[21]对比,化合物数据基本一致,故化合物鉴定为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 10: 无色油状物。ESI-MS (*m/z*): 217 [M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_H 5.50 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 3.65 (3H, s, -OCH₃), 2.93 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-11), 2.34 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2), 2.05 (4H, m, H-8, 14), 1.64 (2H, m, H-3), 1.40~1.27 (14H, m, H-4~H-7, H-15~H-17), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18)。¹³C-NMR (150 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_c 174.4 (C-1), 130.9 (C-9), 130.9 (C-10), 128.9 (C-

12), 128.9 (C-13), 51.7 (C-OCH₃), 34.6 (C-2), 32.2 (C-8), 30.3 (C-14), 29.9 ~ 23.3 (C-3 ~ C-7, C-15 ~ C-17), 14.7 (C-18)。通过以上的数据和文献^[22]对比, 化合物数据基本一致, 故化合物鉴定为亚油酸亚酯。

化合物 11: 油状物。ESI-MS (*m/z*): 201 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_H 0.85 (3H, m, H-12)。¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) δ_C 175.7 (C-1), 34.7 (C-2), 31.9 (C-10), 29.7 (C-9), 29.7 (C-8), 29.7 (C-7), 29.6 (C-6), 29.5 (C-5), 29.4 (C-4), 25.4 (C-3), 22.7 (C-11), 14.0 (C-12)。通过以上的数据和文献^[23]对比, 化合物数据基本一致, 故化合物鉴定为 dodecanoic acid。

3 α-葡萄糖苷酶活性研究

采用文献^[24]中的方法对化合物进行 α-葡萄糖苷酶抑制活性测试, 阿卡波糖为阳性对照药。将化合物制成含 1% DMSO 的原液, 接着用缓冲液 (磷酸盐缓冲液, pH = 6.8) 将化合物和阿卡波糖稀释成不同浓度的溶液备用。在 96 孔板中加入 50 μL 不同浓度的化合物 (1、10、50、100、200 和 500 μmol/L), 阿卡波糖所设浓度与化合物的浓度保持一致, 然后依次加入 50 μL 缓冲液和 100 μL 0.2 U/mL 的 α-葡萄糖苷酶, 在 37 ℃ 下孵育 15 min, 再加入 5 μmol/L 的 PNPG 溶液 50 μL, 并在 37 ℃ 下再相互作用。在 405 nm 处检测其吸光度值。α-葡萄糖苷酶抑制率

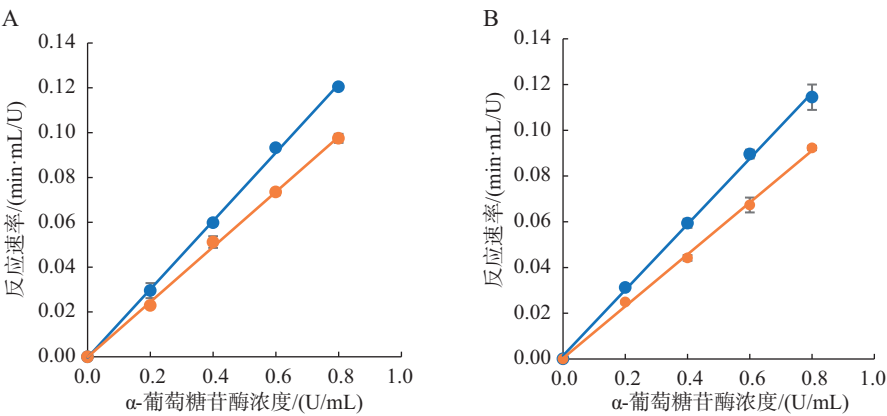
(%) = [Ac - (As - Ab)/Ac] × 100%。(Ac 为不含样品对照组的吸光度; Ab 为不含 PNPG 对照组的吸光度; As 为待测样品的吸光度)。所有实验重复 3 次, 使用 IBM SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 并计算 IC₅₀。酶动力学测定: 在 4 种不同 IC₅₀ 浓度的受试化合物的情况下, 增加底物 PNPG 的浓度。使用 Lineweaver Burk 作图法绘制各化合物的酶动力学曲线, 观察化合物的抑制作用类型。

实验结果显示, 只有化合物 6 对 α-葡萄糖苷酶具有抑制作用, 且抑制作用较强, 结果如表 1 所示。

表 1 化合物 1~11 对 α-葡萄糖苷酶抑制活性			
化合物	IC ₅₀ /(μmol/L)	化合物	IC ₅₀ /(μmol/L)
1	>100	6	15.48 ± 11.82 *
2	>100	7	>100
3	>100	8	>100
4	>100	9	>100
5	>100	10	>100
阿卡波糖组	63.80 ± 8.27	11	>100

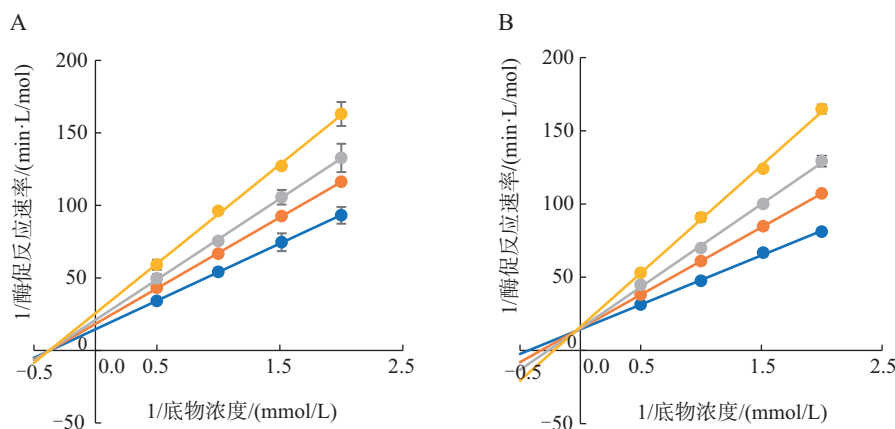
注: 与阿卡波糖组比较, * P<0.05。

基于 Lineweaver-Burk 图分析和 Michaelis-Menten 动力学进一步分析探讨化合物 6 的酶动力学, 结果如图 2、3 所示。化合物 6 对 α-葡萄糖苷酶为可逆性、非竞争性抑制。



注: A 中蓝色点代表化合物 6 浓度为 0 μmol/L, 橙色点代表化合物 6 浓度为 500 μmol/L; B 中蓝色点代表阿卡波糖浓度为 0 μmol/L, 橙色点代表阿卡波糖浓度为 500 μmol/L。

图 2 化合物 6 和阿卡波糖的 α-葡萄糖苷酶量-反应速率曲线



注:A 中蓝色点代表化合物 6 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$, 橙色点代表化合物 6 浓度为 7.74 $\mu\text{mol/L}$, 灰色点代表化合物 6 浓度为 15.48 $\mu\text{mol/L}$, 黄色点代表化合物 6 浓度为 30.96 $\mu\text{mol/L}$; B 中蓝色点代表阿卡波糖浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$, 橙色点代表阿卡波糖浓度为 31.90 $\mu\text{mol/L}$, 灰色点代表阿卡波糖浓度为 63.80 $\mu\text{mol/L}$, 黄色点代表阿卡波糖浓度为 127.60 $\mu\text{mol/L}$ 。

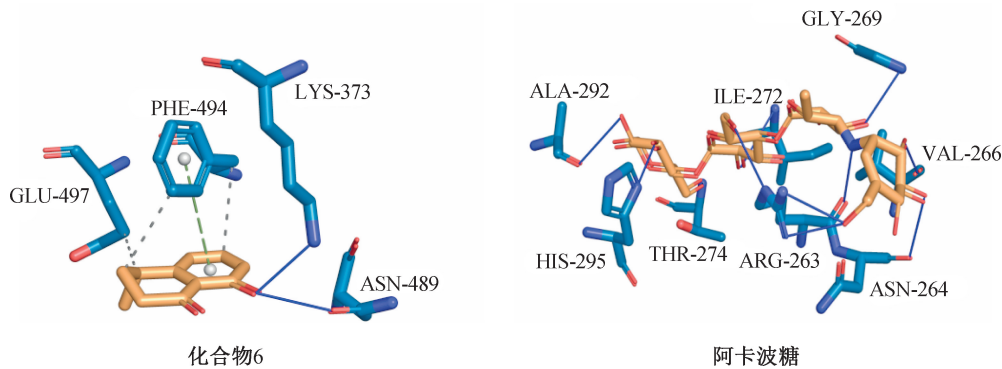
图 3 化合物 6 和阿卡波糖的 α -葡萄糖苷酶抑制动力学曲线

4 分子对接

为了进一步研究化合物 6 抑制 α -葡萄糖苷酶的机制,使用 AutoDock Vina 套件进行对接模拟。化合物 6 与 Lys-373、Asn-489 形成氢键作用,其他疏水残基如 Phe-494、Glu-497,可以和配体形成堆积作用,有利于其结合,与残基 Phe-494 形成 π 键作用,表明化合物 6 主要通过氢键、疏水键与酶相互作用,并结合在活性位点。化合物 6 结合能为 -6.5 kJ/mol ,结合能 $<-5.0\text{ kJ/mol}$,说明化合物 6 与 α -葡萄糖苷酶蛋

白具有良好的结合性。化合物 6 结合能对接结果如表 2 所示。 α -葡萄糖苷酶与化合物 6 和阿卡波糖的相互作用如图 4 所示。

表 2 化合物结合能对接结果	
化合物	结合自由能/(kJ/mol)
化合物 6	-6.5
阿卡波糖	-8.4



注:蓝色线条代表氢键作用,灰色虚线代表疏水键作用,绿色虚线代表 π 键作用。

图 4 α -葡萄糖苷酶与化合物 6 和阿卡波糖的相互作用

5 讨论

糖尿病是一种以高血糖为症状的慢性代谢病,主要可以分为1型糖尿病和2型糖尿病,其中2型糖尿病为我国糖尿病主要发病类型^[25]。 α -糖苷酶抑制剂为一类有效的口服降糖药,能降低餐后血糖而不引起低血糖,常用来治疗2型糖尿病。 α -糖苷酶抑制剂可以可逆性地抑制并降低小肠内 α -葡萄糖苷酶分解生成葡萄糖的速度,延缓或抑制小肠吸收葡萄糖从而达到降低人体内血糖的目的^[26]。而常见的 α -葡萄糖苷酶抑制剂如阿卡波糖、伏格列波糖会引起胀气、腹泻、腹痛等不良反应。因此,发现 α -葡萄糖苷酶抑制剂并进行药物开发具有重要意义。

本研究通过对山茶花内生真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 次生代谢产物中分离得到的11个单体化合物进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究,发现化合物6对酶抑制活性 IC_{50} 为 $(15.48 \pm 11.82) \mu\text{mol/L}$,说明化合物6有较强抑制 α -葡萄糖苷酶的活性。化合物6为萜酮类化合物,相关研究^[27-29]结果表明,该类化合物有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用。酶动力学是研究酶结合底物能力和催化反应速率的科学,基于Lineweaver-Burk图分析和Michaelis-Menten动力学分析,探讨化合物6与酶结合后的酶动力学。本研究结果表明,化合物6以非竞争可逆性抑制 α -葡萄糖苷酶与底物结合,即不影响底物与 α -葡萄糖苷酶的结合,抑制程度取决于抑制剂的浓度,无论多少底物都能降低 α -葡萄糖苷酶的催化生成葡萄糖的效率。分子对接显示化合物6是通过氢键和疏水键与 α -葡萄糖苷酶蛋白相互作用,结合能为 $-6.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明化合物6可以牢固地与酶蛋白结合,抑制 α -葡萄糖苷酶的活性。

6 结论

本研究对山茶花内生真菌的次生代谢产物进行研究。从 *Paraconiothyrium brasiliense* 中分离得到:24-ethylcholesta-4,24(28)Z-lien-3-one(1)、stigmastrol-3-O-glucopyranoside(2)、stigmast-4-ene-3-one(3)、stigmast-4,24(28)-diene-3-one(4)、1,1'-oxybis(2,4-di-tert-butylbenzene)(5)、3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-2H-naphthalen-1-one(6)、saccharonol A(7)、sch 53823

(8)、邻苯二甲酸二丁酯(9)、亚油酸亚酯(10)、dodecanoic acid(11),共11个单体化合物。其中化合物6抑制 α -葡萄糖苷酶的作用强于阿卡波糖,说明化合物6对 α -葡萄糖苷酶具有潜在的抑制作用,这为进一步研究内生真菌次生代谢产物提供一定的实验依据。

参考文献

- [1] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. J Nat Prod, 2016, 79(3): 629-661.
- [2] 王丽苹, 罗云孜. 合成生物学在天然产物研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2017, 33(1): 35-47.
- [3] CHI J, XU W J, WEI S S, et al. Chlotrichenes A and B, two lindenane sesquiterpene dimers with highly fused carbon skeletons from *Chloranthus holostegius* [J]. Org Lett, 2019, 21(3): 789-792.
- [4] GU B B, WU W, JIAO F R, et al. Aspersecosteroids A and B, two 11(9 $\rightarrow$ 10)-abeo-5, 10-secosteroids with a dioxatetrahydrocyclic ring system from *Aspergillus flocculosus* 16D-1 [J]. Org Lett, 2018, 20(24): 7957-7960.
- [5] GUI Y H, JIAO W H, ZHOU M, et al. Septosones A-C, *in vivo* anti-inflammatory meroterpenoids with rearranged carbon skeletons from the marine sponge *Dysidea septosa* [J]. Org Lett, 2019, 21(3): 767-770.
- [6] CAI G W, HU X X, ZHANG R, et al. Subplenones A-J: dimeric xanthenes with antibacterial activity from the endophytic fungus *Subplenodomus* sp. CPCC 401465 [J]. J Nat Prod, 2023, 86(11): 2474-2486.
- [7] GONG Y X, LI X, SHI L Y, et al. Azaphilones with anti-colon cancer activities from the plant endophytic fungus *Talaromyces primulinus* WZ-883 [J]. Phytochem Lett, 2023, 57: 115-125.
- [8] LI Y C, YANG J, ZHAO Y Z, et al. Cytochalasans from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. LE2: their structures, antibacterial and NO production inhibitory activities [J]. JoF, 2023, 9(3): 374.
- [9] 王晓洋, 龚倩玉, 许言超, 等. 5-氮杂胞苷诱导内生真菌 *Penicillium* sp. GZWMJZ-042 代谢抗 α -葡萄糖苷酶活性产物研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(10): 1118-1125.
- [10] WANG W X, SHI Y Q, LIU Y Y, et al. Brasilterpenes A-E, bergamotane sesquiterpenoid derivatives with hypogly-

- cemic activity from the deep sea-derived fungus *Paraconiothyrium brasiliense* HDN15-135 [J]. Mar Drugs, 2022, 20(5):338.
- [11] 张艳芳,屈爱桃.山茶花的研究进展[J].中国民族医药杂志,2012,18(10):41-44.
- [12] 松田久司.山茶花的药理作用[J].国外医学(中医中药分册),2002,24(5):316.
- [13] 李彦,周宝萍,张皖晋,等.东北茶藨子化学成分研究[J].中草药,2018,49(4):772-779.
- [14] DOMONDON D L, HE W D, DE KIMPE N, et al. Beta-adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production[J]. Phytochemistry, 2004, 65(2):181-187.
- [15] KUMBOONMA P, SENAWONG T, SAENGLER S, et al. New histone deacetylase inhibitors from the twigs of *Melanorrhoea usitata* [J]. Med Chem Res, 2018,27(8):2004-2015.
- [16] NISHIZAWA M, TAKAHASHI N, SHIMOZAWA K, et al. Cytotoxic constituents in the holdfast of cultivated *Laminaria japonica* [J]. Fisheries Sci, 2003, 69(3):639-643.
- [17] JING S S, QU Z, ZHAO C C, et al. Dihydroisocoumarins and dihydroisoflavones from the rhizomes of *Dioscorea collettii* with cytotoxic activity and structural revision of 2, 2'-oxybis(1, 4-di-tert-butylbenzene) [J]. Molecules, 2021, 26(17):5381.
- [18] LU C H, LIU S S, WANG J Y, et al. Characterization of eight new secondary metabolites from the mutant strain G-444 of *Tubercularia* sp. TF5 [J]. Helv Chim Acta, 2014, 97(3):334-344.
- [19] SINGH B, PARSHAD R, KHAJURIAR K, et al. Saccharonol B, a new cytotoxic methylated isocoumarin from *Saccharomonospora azurea* [J]. Tetrahedron Lett, 2013, 54(49):6695-6699.
- [20] CHU M, PATEL M G, PAI J K, et al. Sch 53823 and Sch 53825, novel fungal metabolites with phospholipase D inhibitory activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1996, 6(5):579-584.
- [21] 林炳锋,陈林,王琦,等.万寿竹化学成分分离与鉴定[J].中国药物化学杂志,2020,30(11):687-695.
- [22] 杜子伟,刘吉开,项晨,等.虎皮小牛肝菌的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(5):618-621.
- [23] QI J, SHI R F, YU J M, et al. Chemical constituents from leaves of *Camellia nitidissima* and their potential cytotoxicity on SGC7901 cells [J]. Chin Herb Med, 2016,8(1):80-84.
- [24] ZHAO M, XIAN X Y, YAN M Q, et al. A new oleanane-type triterpenoid saponin with α -glucosidase inhibitory activity from *Camellia nitidissima* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2023,25(9):890-898.
- [25] 王云鹏,张晓苗,谢卫红,等.天然活性多糖降血糖功能的研究进展[J].食品工业,2023,44(6):238-242.
- [26] 郅丽超,张琳依,梁馨元,等.天然活性成分对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究进展[J].食品安全质量检测学报, 2021,12(6):2276-2282.
- [27] WANG Y, LIU H X, CHEN Y C, et al. Twonew metabolites from the endophytic fungus *Alternaria* sp. A744 derived from *Morinda officinalis* [J]. Molecules, 2017, 22(5):765.
- [28] LIAO H X, ZHENG C J, HUANG G L, et al. Bioactive-polyketide derivatives from the mangrove-derived fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ004 [J]. J Nat Prod, 2019, 82(8):2211-2219.
- [29] WUTTHIWONG N, SUTHIPHASILP V, PINTATUM A, et al. Daldiniaeschone A, arare tricyclic polyketide having a chromone unit fused to a δ -lactone and its symmetrical biphenyl dimer, daldiniaeschone B, from an endophytic fungus *Daldinia eschscholtzii* SDBR-CMUNKC745 [J]. J Fungi, 2021,7(5):358.

[收稿日期:2023-12-08]

[责任编辑:杨建香 英文编辑:周寿红]