

[成分分析]

臭常山内生真菌次级代谢产物及其 α -糖苷酶抑制活性研究

周培凤¹, 卢永仲², 汪小杰³, 李 焱^{1*}, 张 振^{4*}

(1. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州理工学院食品与药品制造工程学院, 贵州 贵阳 550003;
3. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州省分析测试研究院, 贵州 贵阳 550000)

摘要: 目的 鉴定臭常山内生真菌 G- (JK) -2, 并对次级代谢产物及其 α -糖苷酶抑制活性进行研究。方法 通过 ITS 序列建立系统进化树, 鉴定内生真菌 G- (JK) -2; 对其 45 d 大米固体培养基发酵物进行甲醇提取、乙酸乙酯萃取, 硅胶、Sephadex LH-20 凝胶和半制备 HPLC 分离纯化后进行结构鉴定, 采用 PNPG 法评价 α -糖苷酶抑制活性。结果 鉴定臭常山内生真菌 G- (JK) -2 为镰刀属内生真菌 *Fusarium nematophilum*; 分离得到 13 个化合物, 分别鉴定为 *p*-hydroxybenzaldehyde (G1)、4-hydroxyacetophenone (G2)、anhydromevalonolactone (G3)、flazine (G4)、salicylic acid (G5)、*p*-hydroxybenzoic acid (G6)、di- (2-ethylhexyl) -phthalate (G7)、terephthalic acid bis (2-ethyl-hexyl) ester (G8)、thymine (G9)、uridine (G10)、adenosine (G11)、2'-deoxyuridine (G12)、nicotinic acid (G13)。各化合物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用依次为 G4>G11>G10>G13>G12。结论 所有化合物均首次从臭常山的内生真菌中分离得到, G10、G11、G13 首次从镰刀属内生真菌中分离得到, G4 和 G11 有较弱的 α -葡萄糖苷酶抑制作用。

关键词: 臭常山; 内生真菌; 化学成分; 分离鉴定; α -糖苷酶抑制活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2024)02-0478-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.021

Secondary metabolites and their α -glucosidase inhibitory activity of endophyte fungi from *Orixa japonica*

ZHOU Pei-feng¹, LU Yong-zhong², WANG Xiao-jie³, LI Yan^{1*}, ZHANG Zhen^{4*}

(1. College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Food and Pharmaceutical Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China; 3. College of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 4. Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550000, China)

ABSTRACT: AIM To identify the endophytic fungus G- (JK) -2 from *Orixa japonica* Thunb. and to study its secondary metabolites and their α -glucosidase inhibitory activities. METHODS Through the ITS sequence, the evolutionary tree that identifies the endophytic fungus G- (JK) -2 was established. Then 45 days rice solid medium of endophytic fungus G- (JK) -2 was extracted by methanol, and then by ethyl acetate. The ethyl acetate extract was separated and purified by silica gel chromatography, Sephadex LH-20, and semi-preparative HPLC. The structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. Their α -glucosidase inhibitory activities were evaluated by PNPG method. RESULTS The endophytic fungus G- (JK) -2 from *O. japonica* was identified as *Fusarium nematophilum*. Thirteen compounds were isolated and identified as *p*-hydroxybenzaldehyde (G1), 4-hydroxyacetophenone (G2), anhydromevalonolactone (G3), flazine (G4), salicylic acid (G5), *p*-hydroxybenzoic acid (G6), di- (2-ethylhexyl) -phthalate (G7), terephthalic acid bis (2-ethyl-hexyl) ester (G8), thymine (G9), uridine (G10), adenosine (G11), 2'-deoxyuridine (G12),

收稿日期: 2023-01-17

基金项目: 中央引导地方科技发展项目 (黔科中引地 [2021] 4046 号); 特殊医学用途配方食品技术研发创新平台建设项目 (黔科合服企 [2019] 4001 号)

作者简介: 周培凤 (1997—), 女, 硕士, 从事天然产物研究。E-mail: 1904113112@qq.com

* 通信作者: 李 焱 (1974—), 女, 教授, 从事靶向纳米载药体系构建研究。E-mail: yanli@gzu.edu.cn

张 振 (1973—), 女, 教授, 从事天然产物研究。E-mail: zhangzhen@gzata.cn

nicotinic acid (**G13**). The inhibitory effect of each compound on α -glucosidase was in sequence of **G4**>**G11**>**G10**>**G13**>**G12**. **CONCLUSION** All compounds are first isolated from the endophytic fungi of the *O. japonica*, and **G10**, **G11**, **G13** are first isolated from the endophytic fungi of *Fusarium*. **G4** and **G11** have mild inhibition to α -glucosidase.

KEY WORDS: *Orixa japonica* Thunb.; endophyte fungi; chemical constituents; isolation and identification; α -glucosidase inhibitory activities

臭常山 (*Orixa japonica* Thunb.) 为芸香科臭常山属落叶灌木植物, 全株高约 1~3 m, 根、茎、叶均有特殊性气味, 主要分布于韩国、日本及我国贵州、云南、四川等地^[1]。臭常山味苦、辛, 性凉, 具有疏风清热、行气活血、解毒除湿、截疟、止痛等功效^[2], 主要化学成分为喹啉类生物碱和香豆素类化合物。目前尚未出现关于臭常山内生真菌的报道, 本研究在前期臭常山化学及活性研究基础上, 进一步探索其内生真菌次级代谢产物, 对臭常山植物保护及内生真菌开发应用具有重要意义。

1 材料

LRH-500A 型生化培养箱 (广东泰宏君科学仪器股份有限公司); 核磁共振波谱仪 (400 Hz、600 Hz, 美国布鲁克公司); KT-CJ-1FD 超净工作台 (无锡市科泰净化科技有限公司); SDP-16 半制备液相色谱 (日本岛津公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 提取分离用乙酸乙酯、甲醇、二氯甲烷等均为分析纯, 液相色谱所用甲醇、乙腈等试剂均为色谱纯。

臭常山内生真菌分离于贵州省清镇市九龙坡烂泥沟采集的臭常山根中 (海拔 1 262 m, 东经 106°30'7", 北纬 26°40'36''), 经形态学及基因序列比对 (Gen Bank accession No. MW376535.1), 此菌株被鉴定为 *Fusarium nematophilum*。

2 方法

2.1 菌种发酵 将臭常山根中分离出的内生真菌 G- (JK) -2 菌种活化, 制备成种子液 (种子液配方为麦芽糖 20.0 g、谷氨酸钠 10.0 g、KH₂PO₄ 0.50 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.30 g、葡萄糖 10.0 g、酵母膏 3 g、甘露醇 20 g、去离子水 1 L), 将制备好的种子液接种于含有大米 50 g、去离子水 50 mL 的发酵袋中, 发酵规模为 500 袋, 25~29 °C 环境下培养 45 d。

2.2 菌株分子鉴定 利用真菌 rDNA-ITS 序列通用引物 ITS1 (5'-TCCGATGGTGAACCTGCGC-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增, 利用 MEGA. 7 软件构建系统进化树。

2.3 产物的提取分离

2.3.1 分离物制备 采用甲醇对菌株 *Fusarium nematophilum* 发酵培养物提取 3 次, 乙酸乙酯萃取, 得乙酸乙酯萃取物 40 g。

2.3.2 化合物的分离 乙酸乙酯萃取物经硅胶柱色谱分离, 以甲醇-二氯甲烷 (0 : 1~1 : 0) 梯度洗脱, 获得 7 个亚组分 Fr. 1~Fr. 6。Fr. 1 (3.88 g) 先以石油醚-乙酸乙酯体系 (15 : 1~1 : 1) 洗脱后, 再用二氯甲烷-甲醇体系 (5 : 1~0 : 1) 进行二次硅胶柱层析, 得到 Fr. 1.1 (2.32 g)、Fr. 1.2 (0.20 g)、Fr. 1.3 (0.80 g)。Fr. 1.2 经半制备液相色谱纯化, 25% 乙腈洗脱 (体积流量 3 mL/min, 检测波长 254 nm), 得化合物 **G1** (5.0 mg, *t_R* = 11.829 min) 和化合物 **G2** (2.0 mg, *t_R* = 12.654 min); Fr. 1.3 经 pTLC 纯化, 以二氯甲烷-甲醇 (5 : 1) 展开, 得化合物 **G3** (350.0 mg)。Fr. 2 (4.21 g) 底部出现不溶于甲醇的粉末状物质, 滤纸过滤使固液分离, 粉末状物质用甲醇重复冲洗后得到化合物 **G4** (8.0 mg); 滤液浓缩后经半制备液相色谱纯化, 20% 乙腈洗脱 (体积流量 3 mL/min, 检测波长 254 nm), 得化合物 **G5** (10.0 mg, *t_R* = 10.522 min) 和化合物 **G6** (8.0 mg, *t_R* = 15.312 min)。

Fr. 3 (7.28 g) 以石油醚-乙酸乙酯体系 (15 : 1~1 : 1) 洗脱后再用二氯甲烷-甲醇体系 (5 : 1~0 : 1) 进行二次硅胶柱层析后得到 Fr. 3.1 (0.20 g)、Fr. 3.2 (2.0 g)、Fr. 3.4 (1.5 g)。Fr. 3.2 经 pTLC 纯化, 以二氯甲烷-甲醇 (10 : 1) 展开, 得化合物 **G7** (736.0 mg) 和化合物 **G8** (130.0 mg)。

Fr. 4 (1.14 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化, 以二氯甲烷-甲醇 (1 : 1) 洗脱, 得 Fr. 4.1 (132.8 mg)、Fr. 4.2 (79.0 mg)、Fr. 4.3 (40.0 mg), Fr. 4.1 经半制备液相色谱纯化, 以 10% 甲醇洗脱 (体积流量 3 mL/min, 检测波长 254 nm), 得化合物 **G9** (6.8 mg, *t_R* = 6.733 min)。

Fr. 5 (1.00 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱纯

化，以二氯甲烷-甲醇（1：1）洗脱，得 Fr. 5.1（105.6 mg）、Fr. 5.2（213.4 mg）、Fr. 5.3（565.0 mg）。Fr. 5.3 经 pTLC 纯化，以二氯甲烷-甲醇（10：1）展开，得化合物 **G10**（5.0 mg）。

Fr. 6（1.29 g）经 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化，以甲醇洗脱，得 Fr. 6.1（200.0 mg）、Fr. 6.2（246.6 mg）、Fr. 6.3（186.8 mg）、Fr. 6.4（237.8 mg）。Fr. 6.1 经半制备液相色谱纯化，以 5% 乙腈洗脱（体积流量 3 mL/min，检测波长 254 nm、210 nm），得化合物 **G11**（9.0 mg， t_R = 7.363 min）、

化合物 **G12**（17.8 mg， t_R = 23.43 min）。Fr. 6.2 经半制备液相纯化，以 10% 甲醇洗脱（体积流量 3 mL/min，检测波长 254 nm、210 nm），得化合物 **G13**（11.0 mg， t_R = 10.585 min）。

2.4 α -糖苷酶抑制活性测试 将化合物质量浓度设为 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 mg/mL， α -糖苷酶浓度为 280 U/mL。加入 α -糖苷酶及对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷（PNPG）后的反应条件均为 37 ℃、15 min。反应结束后于 405 nm 波长下检测吸光度。反应体系及加样顺序见表 1。

表 1 α -糖苷酶抑制活性测试反应体系

Tab. 1 Reaction system of α -glycosidic enzyme inhibition activity test						
组别	PBS/ μ L	5% DMSO/ μ L	化合物/ μ L	α -糖苷酶/ μ L	PNPG/ μ L	Na ₂ CO ₃ / μ L
A	70	10	—	20	20	80
B	90	10	—	—	20	80
C	70	—	10	20	20	80
D	90	—	10	—	20	80

注：A 为空白组，B 为空白对照组，C 为实验组，D 为实验对照组。

计算 α -糖苷酶抑制率，公式为抑制率 = $\{[(A_A - A_B) - (A_C - A_D)] / (A_A - A_B)\} \times 100\%$ ，其中 $A_A \sim A_D$ 分别为 A~D 组吸光度。

3 结果与分析

3.1 菌株鉴定结果 内生真菌 G-（JK）-2 rDNA 的 ITS 经 PCR 扩增，产物序列长度 563 bp，测序数据 GGAGGGGGGATCCTACCTGATCCGAGGTCACA TTCAGAAAAGTTGGGGGGTTTAACGGCTTGGCCGCG CCGCGTTCCAGTTGCGAGGTGTTAGCTACTACGCAA TGGAGGCTGCAGCGAGACCGCCACTAGATTTAGGGG CCGGCGCGTCCTCTGGCGAGGCCGTTGTGCCGATCC CCAACACCAAGCCCCGGGGGCTTGAGGGTTGAAATGA CGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGG GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCCGATGATTCACTGA ATTCTGCAATTACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCG TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT GAAAGTTTTGATTTATTTATAGTGCTACTCAGAAGAT ACAAAATTAAGACAGGGTTTTGGGTCTCTGGCGGGC CGTCCCCTTTTACGGGGCGCGGTGATCCGCCGAGGC AACAGTATGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGT AAACCTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACG GAGACCTTGTTACGACTTTTACTT。

从菌株形态上看，菌株培养一段时间后菌丝呈白色，棉花状，菌落规则且孢子形态与 *Fusarium nematophilum* 基本一致，见图 1，推测 G-（JK）-2 可能为 *Fusarium nematophilum*^[3]。从分子学角度上分析，首先将获取的序列在 NCBI 中进行 BLAST，

数据显示前 20 条序列均为 *Fusarium sp.*，相似度 93%~97%。利用 MEGA 7.0 软件构建进化树，方法为最大似然法（maximum likelihood，ML），执行参数 Bootstra 设为 1 000 次重复，其余参数设置为默认值，见图 2，结果表明 G-（JK）-2 为 *Fusarium nematophilum*。

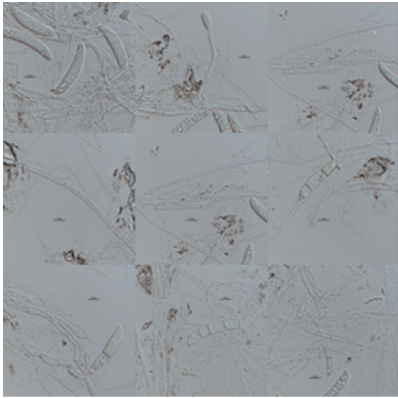


图 1 G-（JK）-2 孢子形态

Fig. 1 Spore morphology of 2 G-（JK）-2

3.2 化合物结构鉴定 化合物 **G1**：白色粉末，分子式 C₇H₆O₂，ESI-MS m/z ：123.1 [M + H]⁺。¹H-NMR（600 MHz，CD₃OD） δ ：9.74（1H，s，H-7），7.76（1H，d， J = 8.7 Hz，H-2，6），6.90（2H，d， J = 8.6 Hz，H-3，5）；¹³C-NMR（150 MHz，CD₃OD） δ ：192.9（C-7），166.0（C-4），133.5（C-2，6），129.9（C-1），117.1（C-3，5）。以上数据与文献 [4] 报道基本一致，故鉴定为 *p*-hydroxybenzaldehyde。

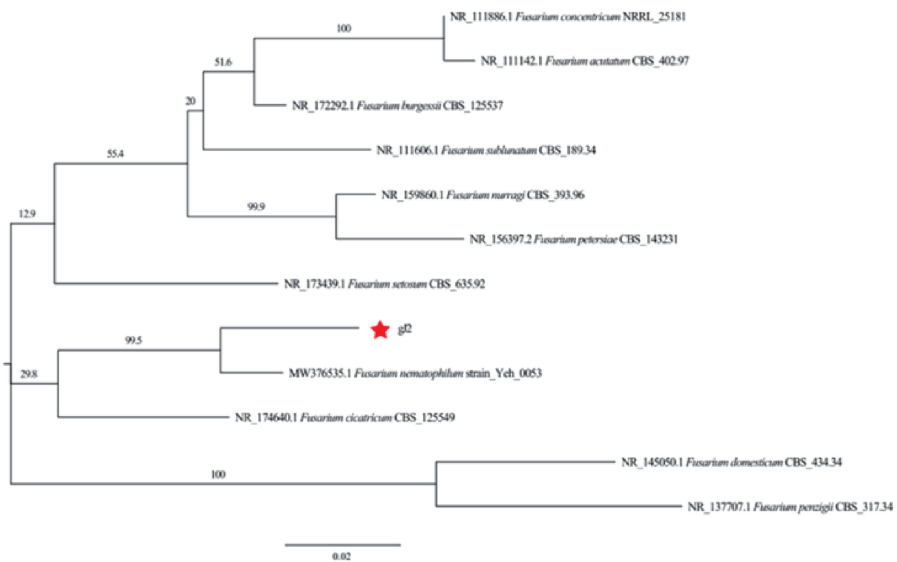


图 2 G- (JK) -2 系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of G- (JK) -2

化合物 **G2**: 白色粉末, 分子式 $C_8H_8O_2$, ESI-MS m/z : 137.1 $[M + H]^+$. 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.88 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2, 6), 6.83 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3, 5), 2.52 (3H, s, H-8); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 199.5 (C-7), 164.3 (C-4), 132.1 (C-3, 5), 130.0 (C-1), 116.3 (C-3, 5), 26.3 (C-8)。以上数据与文献 [5] 报道基本一致, 故鉴定为 4-hydroxyacetophenone。

化合物 **G3**: 黄色油状, 分子式 $C_6H_8O_2$, ESI-MS m/z : 113.1 $[M + H]^+$. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.82 (1H, m, H-6), 4.39 (2H, t, J = 6.3 Hz, H-3), 2.39 (2H, m, H-4), 2.01 (3H, m, H-7); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 164.7 (C-1), 158.0 (C-5), 116.7 (C-6), 65.9 (C-3), 29.2 (C-4), 23.1 (C-7)。以上数据与文献 [6] 报道一致, 故鉴定为 anhydromevalonolactone。

化合物 **G4**: 黄色粉末, 分子式 $C_{17}H_{12}N_2O_4$, ESI-MS m/z : 307.1 $[M-H]^-$. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.61 (1H, s, H-9), 8.85 (1H, s, H-4), 8.42 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-5), 7.82 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-8), 7.65 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-7), 7.42 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-3'), 7.35 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-6), 6.63 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-4'), 4.68 (2H, s, H-6'); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 166.6 (C-10), 157.3 (C-5'), 150.3 (C-2'), 141.4 (C-8a), 132.5

(C-9a), 131.9 (C-1), 129.9 (C-4a), 129.0 (C-7), 122.1 (C-5), 121.0 (C-5a), 120.6 (C-6), 115.8 (C-4), 112.9 (C-8), 111.1 (C-3'), 109.3 (C-4'), 56.0 (C-6')。以上数据与文献 [7] 报道基本一致, 故鉴定为 flazine。

化合物 **G5**: 无色针晶, 分子式 $C_7H_6O_3$, ESI-MS m/z : 139.3 $[M + H]^+$. 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.79 (1H, dd, J = 7.9, 1.8 Hz, H-6), 7.51 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-4), 6.93 (2H, m, H-3, 5); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 171.9 (C-7), 161.1 (C-2), 135.7 (C-4), 130.3 (C-6), 119.2 (C-5), 117.1 (C-3), 112.9 (C-1)。以上数据与文献 [8] 报道基本一致, 故鉴定为 salicylic acid。

化合物 **G6**: 无色针晶, 分子式 $C_7H_6O_3$, ESI-MS m/z : 137.1 $[M-H]^-$, 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.41 (1H, s, OH), 10.21 (1H, s, OH), 7.79 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3, 5), 6.82 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2, 6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 167.2 (C-7), 161.6 (C-4), 131.5 (C-2, 6), 121.4 (C-1), 115.1 (C-3, 5)。以上数据与文献 [9] 报道基本一致, 故鉴定为 *p*-hydroxybenzoic acid。

化合物 **G7**: 无色油状, 分子式 $C_{24}H_{38}O_4$, HR-ESI-MS m/z : 413.265 77 $[M + Na]^+$. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.71 (1H, dd, J = 5.7, 3.3 Hz, H-2), 7.54 (2H, dd, J = 5.7, 3.3 Hz,

H-3), 4.21 (2H, m, H-6), 1.68 (1H, m, H-7), 1.36 (8H, m, H-8, 9, 10, 12), 0.91 (6H, m, H-11, 13); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 167.9 (C-4), 132.5 (C-1), 131.0 (C-3), 128.9 (C-2), 68.3 (C-6), 38.9 (C-7), 30.5 (C-8), 29.1 (C-9), 23.9 (C-12), 23.1 (C-10), 14.2 (C-11), 11.1 (C-13)。以上数据与文献 [10] 报道基本一致, 故鉴定为 di-(2-ethylhexyl)-phthalate。

化合物 **G8**: 黄色油状, 分子式 C₂₄H₃₈O₄, HR-ESI-MS *m/z*: 413.266 2 [M+Na]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.10 (s, 4H, H-2, 2', H-3, 3'), 4.25 (m, 2H, H-6), 1.73 (m, 1H, H-7), 1.39 (m, 8H, H-8, 9, 10, 12), 0.92 (6H, m, H-11, 13); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.1 (C-4), 134.4 (C-1), 129.6 (C-2), 67.9 (C-6), 39.0 (C-7), 30.7 (C-8), 29.1 (C-9), 24.1 (C-10), 23.1 (C-11), 14.2 (C-12), 11.2 (C-13)。以上数据与文献 [11] 报道一致, 故鉴定为 terephthalic acid bis (2-ethylhexyl) ester。

化合物 **G9**: 白色粉末, 分子式 C₅H₆N₂O₂, ESI-MS *m/z*: 127.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.99 (1H, s, H-3), 10.57 (1H, s, H-1), 7.24 (1H, d, *J*=5.6 Hz, H-6), 1.73 (3H, s, H-7); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.9 (C-4), 150.5 (C-2), 137.7 (C-6), 107.7 (C-5), 11.8 (C-7)。以上数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定为 thymine。

化合物 **G10**: 白色无定形粉末, C₉H₁₃N₂O₆, ESI-MS *m/z*: 244.2 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.32 (1H, s, NH), 7.89 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-6), 5.78 (1H, d, *J*=5.5 Hz, H-1'), 5.65 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5), 5.39 (1H, brs, OH), 5.10 (1H, brs, OH), 4.02 (H, t, *J*=5.3 Hz, 1H-2'), 3.96 (1H, m, H-3'), 3.84 (1H, q, *J*=3.4 Hz, H-4'), 3.62 (1H, d, *J*=3.3 Hz, H-5'a), 3.55 (1H, d, *J*=3.3 Hz, H-5'b); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 163.3 (C-4), 150.9 (C-2), 140.9 (C-6), 100.9 (C-5), 87.8 (C-1'), 84.9 (C-4'), 73.6 (C-2'), 70.0 (C-2'), 60.9 (C-3')。以上数据与文献 [13] 基本一致, 故鉴定为 uridine。

化合物 **G11**: 白色固体, 分子式 C₁₀H₁₃N₅O₄,

ESI-MS *m/z*: 268.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.36 (1H, s, H-2), 8.14 (1H, s, H-8), 7.35 (2H, s, NH₂), 5.89 (1H, d, *J*=6.2 Hz, H-1'), 5.50 (1H, brs, 2'-OH), 5.44 (1H, brs, 5'-OH), 5.26 (1H, brs, 3'-OH), 4.62 (1H, t, *J*=5.6 Hz, H-2'), 4.15 (1H, m, H-3'), 3.97 (1H, q, *J*=3.4 Hz, H-4'), 3.67 (1H, brs, H-5'a), 3.57 (1H, brs, H-5'b); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 156.1 (C-6), 152.4 (C-2), 149.0 (C-4), 139.9 (C-8), 119.3 (C-5), 87.9 (C-1'), 85.9 (C-4'), 73.5 (C-2'), 70.6 (C-3'), 61.7 (C-5')。以上数据与文献 [14] 报道基本一致, 故鉴定为 adenosine。

化合物 **G12**: 黄色粉末, 分子式 C₉H₁₂N₂O₅, HR-ESI-MS *m/z*: 227.067 345 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.30 (1H, s, NH), 7.86 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-6), 6.15 (1H, t, *J*=6.8 Hz, H-1'), 5.64 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5), 5.26 (1H, brs, OH), 5.03 (1H, brs, 10H), 4.23 (1H, m, H-3'), 3.78 (1H, m, H-4'), 3.55 (2H, m, H-5'), 2.10 (2H, m, H-2'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 163.2 (C-4), 150.5 (C-2), 140.5 (C-6), 100.8 (C-5), 87.4 (C-4'), 84.1 (C-1'), 70.4 (C-3'), 61.3 (C-5'), 39.7 (C-2')。以上数据与文献 [15] 报道一致, 故鉴定为 2'-deoxyuridine。

化合物 **G13**: 白色无定形粉末, 分子式 C₆H₅NO₂, HR-ESI-MS *m/z*: 122.024 45 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.08 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-2), 8.80 (1H, dd, *J*=4.9, 1.7 Hz, H-6), 8.29 (1H, dt, *J*=7.9, 1.9 Hz, H-4), 7.56 (1H, dd, *J*=7.6, 4.5 Hz, H-5); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.2 (-COO-), 153.2 (C-6), 150.1 (C-2), 137.1 (C-4), 126.6 (C-3), 123.9 (C-5)。以上数据与文献 [16] 报道基本一致, 故鉴定为 nicotinic acid。

3.3 α-糖苷酶抑制活性测试 在测试质量浓度范围内 (0.1~1.0 mg/mL), α-葡萄糖苷酶的抑制作用随着样品质量浓度增加而增强。质量浓度为 1 mg/mL 时 **G4** 的抑制活性最强, 抑制率可达到 (47.90±0.87)%, 在测试质量浓度范围内各化合物对 α-葡萄糖苷酶抑制作用依次为 **G4>G11>G10>G13>G12**。

表 2 部分化合物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Inhibitory effect of some compounds on α-glucosidase enzyme ($\bar{x}\pm s$)

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	抑制率/%					
	G4	G10	G11	G12	G13	阿卡波糖
1	47.90±0.87 ^a	36.54±0.36 ^a	40.51±0.82 ^a	27.22±0.56 ^a	27.72±0.17 ^a	89.02±0.87 ^a
0.8	34.03±0.88 ^b	26.96±0.21 ^b	32.80±0.73 ^b	23.67±0.62 ^b	24.96±0.59 ^b	86.65±0.63 ^{ab}
0.6	32.55±0.48 ^{bc}	25.23±0.22 ^c	30.54±0.39 ^c	16.57±0.44 ^c	21.20±0.54 ^c	84.86±1.27 ^{bc}
0.4	30.71±0.27 ^{cd}	21.57±0.86 ^d	26.08±0.64 ^d	12.43±0.33 ^{cd}	19.91±0.46 ^c	82.39±0.59 ^c
0.2	30.18±0.78 ^d	19.08±0.16 ^e	20.10±0.62 ^e	9.22±0.03 ^d	16.41±0.30 ^d	78.27±1.1 ^d
0.1	26.12±0.11 ^e	17.50±0.25 ^f	12.82±0.50 ^f	4.14±0.48 ^e	15.02±0.74 ^d	71.30±0.77 ^e

注：不同小写字母代表不同质量浓度之间存在显著差异 ($P<0.05$)。

4 讨论

本研究对臭常山根中的内生真菌 G- (JK) -2 进行了鉴定，确定其为镰刀属内生真菌 *Fusarium nematophilum*，对其次级代谢产物研究分离得到了 13 个化合物，化合物类型包括酚酸类、生物碱类、酯类。所有化合物均首次从臭常山内生真菌 *Fusarium nematophilum* 中分离得到，其中 **G7**、**G8**、**G10**、**G11**、**G13** 首次从镰刀属内生真菌中分离得到。α-糖苷酶抑制活性筛选结果表明，化合物 **G4** 和 **G11** 在 1 mg/mL 的质量浓度下二者抑制率分别为 (47.90±0.87)% 和 (40.51±0.82)%。本研究丰富了 *Fusarium sp.* 的化学成分数据库，为臭常山内生真菌次级代谢产物的研究提供了参考。

参考文献：

[1] 吕庆银, 赵 伟, 李 岑, 等. 臭常山理化特征及其脂溶性生物碱的提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 279-282.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (上册·4 卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 3774.

[3] 胡丽杰, 闫思远, 孙牧笛, 等. 宁夏枸杞深色有隔内生真菌的侵染特征及多样性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2973-2984.

[4] 张 捷, 刘洪新, 刘昭明, 等. 春砂仁内生真菌 *Letendraea helminthicola* A696 的次级代谢产物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(5): 773-778.

[5] 白 猛, 郑彩娟, 陈光英. 1 株红树内生真菌 *Penicillium sp.* JY246 次级代谢产物及其活性研究[J]. 中国海洋药物, 2020, 39(2): 11-18.

[6] Eduardo V V V, Antônio J D, Luiz C A B, *et al.* Phytotoxic effects of metabolites from *Alternaria euphorbiicola* against its

host plant *Euphorbia heterophylla* [J]. *Química Nova*, 2013, 36 (7): 1004-1007.

[7] 陈小晶, 朱丽君, 段礼新, 等. 附子内生真菌 *Trichoderma sp.* FZ-31 的化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (4): 931-936.

[8] 向 瑶, 曾 奇, 仲伟茂, 等. 南海深海沉积环境来源真菌 *Aspergillus flavus* SCSIO F025 的次生代谢产物及活性研究 [J]. 中国海洋药物, 2019, 38(4): 19-25.

[9] 徐 燕, 田沙沙, 朱华结. 海洋真菌灰黄青霉 *Penicillium griseofulvum* 次级代谢产物中一个新的内酯醛结构 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(4): 559-561.

[10] Yu L, Chen W H, Wen L, *et al.* A new hexanedioic acid analogue from the endophytic fungus *Penicillium sp.* OC-4 of *Orchidantha chinensis* [J]. *Chem Nat Compd+*, 2017, 53(5): 834-838.

[11] Chan C C, Chen Y W, Su C S, *et al.* Green catalysts derived from agricultural and industrial waste products: the preparation of phenols from CsOH and Aryl iodides using CuO on mesoporous silica [J]. *Cheminform*, 2011, 2011 (36): 7288-7293.

[12] 彭 电, 黄 娟, 彭 谷, 等. 水葱根茎化学成分研究 [J]. 中南药学, 2021, 19(5): 870-873.

[13] 陈玉英, 彭 飞, 林 如, 等. 海绵共附生疣孢菌 FIM060022 抑菌活性代谢产物的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(9): 641-645; 664.

[14] 李 博, 王 宇, 潘华奇, 等. 雷公藤内生真菌 *Pestalotiopsis disseminata* 次级代谢产物研究 [J]. 化学与生物工程, 2016, 33(12): 27-30.

[15] 武玉卓, 李 瑞, 邱博琳, 等. 结香内生真菌芬芳镰刀菌化学成分的研究 [J]. 药学报, 2017, 52(4): 598-602.

[16] Nguyen V B, Wang S L. New novel α-glucosidase inhibitors produced by microbial conversion [J]. *Process Biochem*, 2018, 65: 228-232.