

黄海棠内生真菌 *Phomopsis prunorum* 次级代谢产物及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

夏桂汝¹, 宋文敏¹, 张植焱¹, 杨天荷¹, 郭志勇^{1,2}, 张雪晴^{1,2*}

¹三峡大学生物与制药学院 天然产物研究与利用湖北省重点实验室;

²三峡大学生物与制药学院 中国轻工业功能酵母重点实验室, 宜昌 443002

摘要:本研究采用多种色谱技术从黄海棠内生真菌 *Phomopsis prunorum* (F4-3) 大米发酵产物中获得 6 个次级代谢产物, 经核磁、质谱等波谱学方法对这些化合物进行了结构鉴定, 分别为 α -吡喃酮类化合物 phomopyrones B、C (**1**、**2**)、二苯并 α -吡喃酮类化合物 alternariol 和 alternariol 9-methyl ether (**3**、**4**)、异香豆素类化合物 (+)-orthosporin (**5**) 和生物碱类化合物 3-(2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl)-5,6-dihydropyridin-2(1H)-one (**6**)。化合物 **1** 和 **2** 为新化合物, 化合物 **4**~**6** 为首次从该属真菌中分离获得。药理活性评价显示, 化合物 **3** 显示中等的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 其 IC_{50} 值为 43.4 μ M; 而化合物 **1**、**2** 和 **4**~**6** 均未见明显的 α -葡萄糖苷酶抑制及抗菌活性。

关键词:黄海棠; 内生真菌; *Phomopsis prunorum*; 次级代谢产物; α -葡萄糖苷酶抑制活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)10-1707-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.010

Study on the secondary metabolites and their inhibitory activity against α -glucosidase from the endophytic fungus *Phomopsis prunorum* isolated from *Hypericum ascyron* L.

XIA Gui-ru¹, SONG Wen-min¹, ZHANG Zhi-yan¹, YANG Tian-he¹, GUO Zhi-yong^{1,2}, ZHANG Xue-qing^{1,2*}

¹Hubei Key Laboratory of Natural Product Research and Development, College of Biological and

Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University; ²Key Laboratory of Functional Yeast, China National

Light Industry, College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: Six secondary metabolites were obtained from the rice fermentation extract of endophytic fungus *Phomopsis prunorum* isolated from *Hypericum ascyron* L. by various chromatographic techniques. Their structures were elucidated by the analysis of NMR and MS data, including α -pyrone compounds phomopyrones B and C (**1** and **2**), dibenzo- α -pyrone compounds alternariol (**3**) and alternariol 9-methyl ether (**4**), isocoumarin compound (+)-orthosporin (**5**), and alkaloid compound 3-(2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl)-5,6-dihydropyridin-2(1H)-one (**6**). Compounds **1** and **2** were new compounds, and compounds **4**~**6** were isolated from the genus *Phomopsis* for the first time. The biological activity results showed that compound **3** exhibited moderate α -glucosidase inhibitory activity with an IC_{50} value of 43.4 μ M. However, compounds **1**, **2** and **4**~**6** showed no α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities.

Key words: *Hypericum ascyron* L.; endophytic fungus; *Phomopsis prunorum*; secondary metabolites; α -glucosidase inhibitory activity

拟茎点霉属 (*Phomopsis*) 真菌是一类常见的植物病原菌, 可引起多种作物的严重病害; 同时, 该属中部分种也是重要的植物内生真菌, 广泛存在于自

然界大部分植物体内。 *Phomopsis* 属真菌作为植物内生真菌能够产生结构多样的活性次级代谢产物, 包括 α -吡喃酮类^[1]、萜类^[2]、生物碱类^[3] 和细胞松弛素^[4] 等, 这些化合物不仅可以发挥抗真菌^[5]、抗肿瘤^[6]、神经保护^[7] 和 α -葡萄糖苷酶抑制^[8] 等药理活性, 还可用于细胞生长调节剂^[9] 等, 在医药和农

收稿日期: 2021-01-13 接受日期: 2021-05-24

基金项目: 国家自然科学基金 (82003621)

* 通信作者 Tel: 86-717-6397478; E-mail: happy.xueqing@163.com

业领域都具有非常广阔的应用前景。

黄海棠 (*Hypericum ascyron* L.) 是藤黄科金丝桃属植物, 全草药用, 具有止血镇痛、抗菌消炎^[10] 等功效。对黄海棠化学成分的研究已有陆续报道, 主要为黄酮类^[11]、萜类^[12] 和多环多异戊烯基取代的间苯三酚类^[13] 等。但是有关黄海棠内生真菌次级代谢产物的研究还鲜有报道。本课题组在前期从神农架地区黄海棠植物叶片中获得一株内生真菌 *Phomopsis prunorum* (F4-3), 经小规模发酵培养, 发现其大米发酵产物结构类型丰富。前期研究从该真菌 *P. prunorum* (F4-3) 中发现了新的没药烷型倍半萜类及异香豆素类化合物, 显示较好的抗农业致病菌活性^[14]。本研究进一步对该真菌 *P. prunorum* (F4-3) 的大米发酵产物展开研究, 并对分离获得的次级代谢产物进行生物活性评价, 以期发现结构类型新颖、药理活性显著的化合物。

1 仪器和材料

1.1 仪器与试剂

Bruker Ultrashield™ 400 MHz Plus 核磁共振谱仪; Dionex Ultimate 3 000 型高效液相色谱仪; Waters 1525 型半制备型高效液相色谱仪; JASCO P-1020 全自动旋光仪; 紫外光谱仪 (上海谱元仪器有限公司); Nicolet Auatar-FT360 红外光谱仪; Q-TOF 高分辨质谱仪; Tecan 酶标仪; 96 孔板 (sigma-Aldrich); 薄层色谱硅胶和正相柱色谱硅胶 (青岛海洋化工有限公司); 反相柱色谱硅胶 (Unicorn; 45 ~ 60 μm); Sephadex LH-20 凝胶; ACE C₁₈ 色谱柱 (10 mm × 250 mm); 提取分离所用试剂均为分析纯试剂; 高效液相所用试剂均为色谱纯试剂; α-葡萄糖苷酶购买于 sigma-Aldrich 公司; 对硝基-α-D-葡萄糖苷、阿卡波糖、1-脱氧野尻霉素、环丙沙星和链霉素购买于上海安耐吉有限公司。

1.2 菌种与培养基

真菌 *P. prunorum* (F4-3) 分离自黄海棠植物叶片, 该植物于 2017 年 5 月采自中国湖北省神农架地区, 经三峡大学生物与制药学院王玉兵教授鉴定为植物 *Hypericum ascyron* L. 叶片 (标本编号 GZY201705), 真菌菌株经形态学及分子生物学鉴定, 确定为 *Phomopsis prunorum* (Genbank 登录号: MN959460), 植物标本及菌株保藏在三峡大学生物与制药学院天然产物研究与利用湖北省重点实验室。

PDA 培养基: 菌株保藏和活化均采用 PDA 固体

培养基, 培养基配方为: 土豆 200 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 琼脂 2.0%, pH7.2, 灭菌后冷却备用。

大米培养基: 1 000 mL 锥形瓶中内装 80 g 大米, 120 mL 蒸馏水, 经 121 °C, 0.1 MPa 高温灭菌 20 min 后冷却备用。

2 实验方法

2.1 菌株发酵

真菌在 PDA 固体培养基中活化后, 接种到 5 瓶装有 150 mL PDA 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中, 置于 28 °C, 200 rpm 的摇床上培养 2 ~ 3 天获得发酵种子液。将种子液以 5% 的接种量接到大米培养基中, 发酵 50 瓶, 在 25 ~ 28 °C 室内条件下静置培养 40 天。

2.2 提取、分离与鉴定

真菌 *P. prunorum* (F4-3) 在大米培养基上发酵结束后, 分别采用乙酸乙酯和氯仿/甲醇 1:1 的混合溶液进行浸泡, 将有机相进行合并, 经减压浓缩获得粗浸膏 24.7 g。粗浸膏经减压硅胶柱层析 (流动性采用石油醚-乙酸乙酯, 极性从小到大) 分成了不同极性的 5 个组分 Fr. 1 ~ Fr. 5, 分别为 90% 石油醚-乙酸乙酯组分, 70% 石油醚-乙酸乙酯组分, 50% 石油醚-乙酸乙酯组分, 30% 石油醚-乙酸乙酯组分, 纯乙酸乙酯组分。对组分 Fr. 2 进行正相硅胶柱色谱分离 (石油醚/乙酸乙酯 = 3:1) 和凝胶柱色谱分离, 获得化合物 **3** (5.7 mg) 和 **4** (6.5 mg)。对组分 Fr. 3 进行分离, 经过反复的正相硅胶柱色谱和凝胶柱色谱分离, 最后通过半制备 HPLC (甲醇/水 = 45%) 获得化合物 **1** ($t_R = 11.8$ min, 2.5 mg) 和 **2** ($t_R = 12.6$ min, 1.8 mg)。对组分 Fr. 4 经反相硅胶柱梯度洗脱 (甲醇/水 = 30% → 80%) 获得 5 个亚组分 Fr. 4-1 ~ Fr. 4-5, 进一步对组分 Fr. 4-2 和 Fr. 4-3 经半制备 HPLC 分离获得化合物 **5** (乙腈/水 = 25%, $t_R = 8.5$ min, 2.7 mg) 和 **6** (乙腈/水 = 40%, $t_R = 21.5$ min, 3.1 mg)。化合物结构采用一维、二维核磁 (NMR) 以及质谱 (MS) 等波谱学方法并结合文献数据比对进行了鉴定。

2.3 α-葡萄糖苷酶抑制活性测试

α-葡萄糖苷酶抑制活性在 PBS 缓冲液 (0.1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄, pH 6.8) 中进行, 选择对硝基-α-D-葡萄糖苷 (PNPG) 为反应底物^[15]。将 2 μL 待测样品溶液 (DMSO 溶解), 58 μL PBS 缓冲液, 30 μL 用 0.01 M PBS 稀释后的 α-葡萄糖苷酶 (0.2 U/mL), 以及 30 μL PNPG (1.25 mM) 加入到 96 孔板, 反应

15 min,用酶标仪测试在 405 nm 下的吸光度。阳性药选用阿卡波糖和 1-脱氧野尻霉素,阴性对照选用 DMSO。

2.4 抗菌活性测试

抗菌活性采用微量稀释法^[16]进行测试。测试菌株包括植物病原菌丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 和柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (由中国农业科学院烟草研究所提供),金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*, 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 和海洋病原菌副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 和鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* (由河北大学药学院提供)。细菌在 LB 培养基中于 37 °C 下培养 8 h,然后将菌液稀释至 10⁶CFU/mL 待用。将待测化合物,稀释后的菌液加入 96 孔板,37 °C 下恒温培养 12 h,使用酶标仪测试在 630 nm 波长下的吸光度,计算化合物的最小抑菌浓度 MIC 值。阳性药选用环丙沙星和链霉素,阴性对照选用 DMSO。

3 结果与分析

3.1 化合物结构鉴定

化合物 1 无色油状(CH₃OH); $[\alpha]_D^{25} + 17.14$ (c 0.06, MeOH); UV (CH₃OH) λ_{max} 206、298 nm; IR (KBr) ν_{max} 3 381、2 960、1 684、1 564 cm⁻¹; 高分辨质谱显示[M + H]⁺峰为 257.137 9 (calcd for C₁₃H₂₁O₅, 257.138 4), 结合化合物的¹H NMR 数据,推测其分子式为 C₁₃H₂₀O₅, 不饱和度为 4。化合物 1 的¹H NMR 中,显示 1 个烯氢质子信号 δ_H 6.72 (s), 1 个甲氧基信号 δ_H 3.97 (s), 1 个连氧氢质子信号 δ_H 3.74 (dd, $J = 10.0, 2.3$ Hz) 和 3 个甲基信号 δ_H 1.87 (s)、 δ_H 1.41 (s) 和 δ_H 0.96 (t, $J = 7.2$ Hz)。化合物 1 的¹³C NMR 和 DEPT 中,显示 5 个 sp² 杂化的碳信号 δ_C 170.2 (C)、169.1 (C)、167.9 (C)、101.1 (C) 和 95.0 (CH), 1 个连氧的季碳信号 δ_C 77.3 (C), 1 个连氧的叔碳信号 δ_C 76.0 (CH), 2 个仲碳信号 δ_C 33.5 (CH₂) 和 20.5 (CH₂) 以及 4 个伯碳信号 δ_C 57.2 (-OCH₃)、23.2 (CH₃)、14.3 (CH₃) 和 8.4 (CH₃) (表 1 所示)。分析化合物 1 的上述数据,发现该化合物与文献报道的化合物 scopupyrone^[17] 有类似的 3-甲基-4-甲氧基- α -吡喃酮骨架,其结构上的明显不同在于 C-6 位侧链结构部分。化合物 1 的¹H-¹H COSY 谱中, H-8/H-9、H-9/H-10、H-10/H-11 的相关信号,表明 C-8/C-9/C-10/C-11 的连接关

系(见图 2)。化合物 1 的 HMBC 谱中, H-5 (δ_H 6.72) 与 C-3 和 C-4 相关, H₃-12 与 C-2、C-3 和 C-4 相关, H₃-14 与 C-4 相关证实了上述 α -吡喃酮结构部分;此外, H-5 与 C-7 相关, H₃-13 与 C-6、C-7 和 C-8 相关,表明 α -吡喃酮结构与侧链连接在 C-6 和 C-7 位,在 C-7 和 C-8 位还存在一个邻二醇结构片段。综上所述,化合物 1 的平面结构得以确定(见图 1)。化合物 1 含有 2 个手性中心,其邻二醇的绝对构型研究是一个巨大的挑战,在 NOESY 谱中,显示 H-8 和 H₃-13 相关,表明其处于同一平面,初步确定了其相对构型,由于该化合物的产率较低,本研究还未能确定其绝对构型。

化合物 2 无色油状(CH₃OH); $[\alpha]_D^{25} + 13.80$ (c 0.06, MeOH); UV (CH₃OH) λ_{max} 207、299 nm; IR (KBr) ν_{max} 3 432、2 938、1 667、1 539 cm⁻¹; 高分辨质谱显示[M + H]⁺峰为 271.154 4 (calcd for C₁₄H₂₃O₅, 271.154 0), 结合化合物的¹H NMR 和¹³C NMR 数据,推测其分子式为 C₁₄H₂₂O₅, 不饱和度为 4。对比化合物 2 和 1 的 1D NMR 数据,发现其结构非常类似,其差异性主要在于化合物 2 比化合物 1 多 1 个连氧甲基信号 δ_C 51.7 (-OCH₃) (见表 1)。化合物 2 的¹³C NMR 谱中, C-13 (δ_C 15.3) 化学位移较化合物 1 的 δ_C 23.2 向高场迁移了 7.9 ppm, C-7 (δ_C 83.0) 化学位移较化合物 1 的 δ_C 77.3 向低场迁移了 5.7 ppm (见表 1); 在 HMBC 谱中, H₃-13 和 H₃-15 与 C-7 相关, H₃-13 与 C-6、C-7 和 C-8 相关,表明化合物 2 为化合物 1 侧链 C-7 位上的羟基发生甲基化的产物。化合物 2 的¹H-¹H COSY 谱中, H-8/H-9、H-9/H-10、H-10/H-11 的相关信号,表明 C-8/C-9/C-10/C-11 的连接关系(见图 2)。化合物 2 的 HMBC 谱中, H-5 和 H₃-13 和 C-6 相关,表明 α -吡喃酮结构与侧链连接在 C-6 和 C-7 位。综合上述信息,确定了

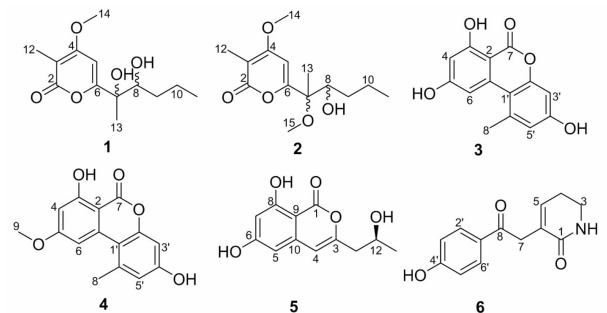


图 1 化合物 1~6 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-6

表1 化合物1和2的¹H NMR(400 MHz)和¹³C NMR(100 MHz)数据(CD₃OD)
Table 1 ¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) data of 1 and 2 (CD₃OD)

No.	1		2	
	¹ H NMR	¹³ C(DEPT)	¹ H NMR	¹³ C(DEPT)
2	-	167.9(C)	-	167.8(C)
3	-	101.1(C)	-	102.3(C)
4	-	169.1(C)	-	168.4(C)
5	6.72(s,1H)	95.0(CH)	6.58(s,1H)	97.6(CH)
6	-	170.2(C)	-	165.3(C)
7	-	77.3(C)	-	83.0(C)
8	3.74(dd, <i>J</i> = 10.0,2.3 Hz,1H)	76.0(CH)	3.66(m,1H)	77.5(CH)
9	1.53(m,1H),1.45(m,1H)	33.5(CH ₂)	1.32(m,2H)	34.2(CH ₂)
10	1.60(m,1H),1.37(m,1H)	20.5(CH ₂)	1.56(m,1H),1.31(m,1H)	20.6(CH ₂)
11	0.96(t, <i>J</i> = 7.2 Hz,3H)	14.3(CH ₃)	0.90(t, <i>J</i> = 7.4 Hz,3H)	14.2(CH ₃)
12	1.87(s,3H)	8.40(CH ₃)	1.88(s,3H)	8.5(CH ₃)
13	1.41(s,3H)	23.2(CH ₃)	1.47(s,3H)	15.3(CH ₃)
14	3.97(s,3H)	57.2(CH ₃)	3.98(s,3H)	57.4(CH ₃)
15	-	-	3.24(s,3H)	51.7(CH ₃)

化合物2的平面结构(见图1)。化合物2也含有2个手性中心,在NOESY谱中,显示H-8和H₃-13相关,表明其处于同一平面,初步确定了化合物2的相对构型。化合物1和2的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载(www.trcw.ac.cn)。

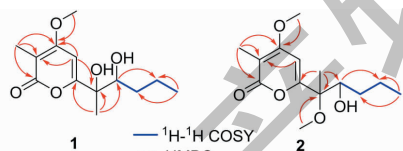


图2 化合物1和2的¹H-¹H COSY和HMBC相关
Fig. 2 The ¹H-¹H COSY and HMBC correlations for compounds 1 and 2

化合物3 无色针状(CH₃OH);ESI-MS:*m/z* 259.06 [M + H]⁺;分子式为C₁₄H₁₀O₅; ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ: 7.24(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.69(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-5'), 6.60(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-3'), 6.34(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4), 2.76(3H, s, H-8); ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD) δ: 167.8(C-7), 166.9(C-5), 166.2(C-3), 159.9(C-4'), 154.5(C-2'), 140.0(C-6'), 139.8(C-1), 118.6(C-5'), 111.0(C-1'), 105.9(C-6), 102.8(C-3'), 102.2(C-4), 98.8(C-2), 25.8(C-8)。以上数据与文献^[18]报道基本一致,确定化合物3为 alternariol。

化合物4 白色固体(CH₃OH);ESI-MS:*m/z* 273.08 [M + H]⁺;分子式为C₁₅H₁₂O₅; ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ: 7.28(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.70(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-5'), 6.61(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-3'), 6.55(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4), 3.92(3H, s, H-9), 2.77(3H, s, H-8); ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD) δ: 168.2(C-5), 166.9(C-7), 166.3(C-3), 160.0(C-4'), 154.5(C-2'), 139.9(C-6'), 139.7(C-1), 118.7(C-5'), 110.8(C-1'), 104.9(C-6), 102.8(C-3'), 101.4(C-4), 100.0(C-2), 56.3(C-9), 25.7(C-8)。以上数据与文献^[19]基本一致,确定化合物4为 alternariol 9-methyl ether。

化合物5 无色针状(CH₃OH);[α]_D²⁵ + 54.82 (*c* 0.1, MeOH);ESI-MS:*m/z* 237.08 [M + H]⁺;分子式为C₁₂H₁₂O₅; ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ: 6.35(1H, s, H-4), 6.27(2H, s, H-5, 7), 4.15(1H, m, H-12), 2.58(2H, dd, *J* = 14.3, 7.4 Hz, H-11), 1.25(1H, d, *J* = 6.2 Hz, H-13); ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD) δ: 168.9(C-1), 167.9(C-6), 164.9(C-8), 155.9(C-3), 141.1(C-10), 107.1(C-4), 104.2(C-5), 103.1(C-7), 99.2(C-9), 66.2(C-12), 43.8(C-11), 23.3(C-13)。以上数据与文献^[20]报道基本一致,因此鉴定化合物5为(+)-orthosporin。

化合物 6 白色固体 (CH₃OH); ESI-MS: m/z 232.10 [M + H]⁺; 分子式为 C₁₃H₁₃NO₃; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.94 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.87 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.60 (1H, t, J = 4.3 Hz, H-5), 3.93 (2H, br s, H-3), 3.45 (2H, t, J = 7.3 Hz, H-4), 2.43 (2H, dd, J = 11.5, 7.2 Hz, H-7); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 198.5 (C-8), 168.4 (C-1), 164.0 (C-4'), 141.0 (C-5), 132.0 (C-3', 5'), 131.1 (C-6), 129.7 (C-1'), 116.3 (C-2', 6'), 40.5 (C-3), 40.4 (C-7), 25.2 (C-4)。以上数据与文献^[21]报道基本一致, 因此鉴定化合物 **6** 为 3-(2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl)-5,6-dihydropyridin-2(1H)-one。

3.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性测试结果

对化合物 **1~6** 进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性评价, 发现仅化合物 **3** 表现出中等的抑制活性 (见表 2), 其 IC₅₀ 为 43.4 μ M, 强于阳性药 1-脱氧野尻霉素 (IC₅₀ = 158.0 μ M) 和阿卡波糖 (IC₅₀ = 528.9 μ M) 的抑制活性。其他化合物均未见明显的抑制活性。

表 2 化合物 **3** 对 α -葡萄糖苷酶抑制活性结果 ($n = 3$)

Table 2 The inhibitory activity of **3** against α -glucosidase ($n = 3$)

化合物浓度 Compound concentration (μ g/mL)	抑制率 Inhibition rate (%)	IC ₅₀ (μ M)
40	85.68	
20	65.16	
15	54.76	43.4 \pm 1.35
10	42.72	
5	30.78	

3.3 体外抗菌活性测试

对化合物 **1~6** 还进行了抗菌活性评价, 选取 7 株菌株, 包括 2 株革兰氏阳性菌: 金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 和蜡状芽孢杆菌 *B. cereus*, 以及 5 株革兰氏阴性菌: 丁香假单胞菌 *P. syringae* pv. *lachrymans*, 柑橘溃疡病菌 *X. citri* subsp. *citri*, 大肠杆菌 *E. coli*, 副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus* 和鳃弧菌 *V. anguillarum*, 以上化合物均没有表明出明显的抗菌活性, MIC 值均大于 50 μ M。

4 结论

本研究采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和半制备 HPLC 等现代色谱分离技术从药用植物黄海藻内生真菌 *P. prunorum* (F4-3) 中分离获得 6 个次级代谢

产物, 包括 2 个新的 α -吡喃酮类化合物和已知的 2 个二苯并 α -吡喃酮类化合物、1 个异香豆素类化合物和 1 个生物碱类化合物。 α -吡喃酮类化合物 **1** 和 **2** 其侧链结构均含有邻二羟基片段, 化合物 **4~6** 为首次从该属真菌中分离获得。药理活性评价显示, 仅化合物 **3** 具有中等的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 化合物 **1~6** 均未见明显的抗菌活性。据文献报道, 化合物 **3** 还具有一定的细胞毒活性和 DPPH 自由基清除活性 (IC₅₀ 为 46.5 μ M)^[22], 化合物 **3** 对多种植物病原菌有弱的抗菌活性^[23]。本研究并未分离到与黄海藻化学成分结构相近的化合物, 可能是由于在实验室普通培养条件下, 许多与次级代谢产物合成途径有关的基因簇处于沉默状态^[24], 后续还将尝试通过改变培养基种类或在培养基中添加化学表观遗传修饰剂等诱导菌株相关沉默基因的表达, 增加次级代谢产物结构多样性, 提高发现结构新颖、活性显著化合物的概率。

参考文献

- Cai RL, Chen SH, Liu ZM, et al. A new alpha-pyrone from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. HNY29-2B [J]. Nat Prod Res, 2017, 31: 124-130.
- Xie SS, Wu Y, Qiao YB, et al. Protoilludane, illudalane, and botryane sesquiterpenoids from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. TJ507A [J]. J Nat Prod, 2018, 81: 1311-1320.
- Chen SC, Liu ZM, Tan HB, et al. Tersone A-G, new pyridone alkaloids from the deep-sea fungus *Phomopsis tersa* [J]. Mar Drugs, 2019, 17: 394-407.
- Yan BC, Wang WG, Hu DB, et al. Phomopchalasins A and B, two cytochalasins with polycyclic-fused skeletons from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. shj2 [J]. Org Lett, 2016, 18: 1108-1111.
- Hussain H, Ahmed I, Schulz B, et al. Pyrenocines J-M: four new pyrenocines from the endophytic fungus, *Phomopsis* sp [J]. Fitoterapia, 2012, 83: 523-526.
- Pavao GB, Venancio VP, de Oliveira AL, et al. Differential genotoxicity and cytotoxicity of phomoxanthone A isolated from the fungus *Phomopsis longicolla* in HL60 cells and peripheral blood lymphocytes [J]. Toxicol In Vitro, 2016, 37: 211-217.
- Li WS, Hu HB, Huang ZH, et al. Phomopsols A and B from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. xy21: structures, neuroprotective effects, and biogenetic relationships [J]. Org Lett, 2019, 21: 7919-7922.
- Huang R, Jiang BG, Li XN, et al. Polyoxygenated cyclohexe-

- noids with promising alpha-glycosidase inhibitory activity produced by *Phomopsis* sp. YE3250, an endophytic fungus derived from *Paeonia delavayi* [J]. *J Agr Food Chem*, 2018, 66:1140-1146.
- 9 Wells JM, Cutler HG, Cole RJ. Toxicity and plant growth regulator effects of cytochalasin H isolated from *Phomopsis* sp [J]. *Can J Microbiol*, 1976, 22:1137-1143.
- 10 Li XM, Luo XG, Wang N, et al. The extract of *Hypericum ascyron* L. induces bacterial cell death through apoptosis pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 166:205-210.
- 11 Li XM, Luo XG, Si CL, et al. Antibacterial active compounds from *Hypericum ascyron* L. induce bacterial cell death through apoptosis pathway [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 96:436-444.
- 12 Niwa K, Tanaka N, Kim SY, et al. Hyperdioxane A, a conjugate of dibenzo-1,4-dioxane and sesquiterpene from *Hypericum ascyron* [J]. *Org Lett*, 2018, 20:5977-5980.
- 13 Niwa K, Tanaka N, Tatano Y, et al. Hypascyrins A-E, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum ascyron* [J]. *J Nat Prod*, 2019, 82:2754-2760.
- 14 Qu HR, Yang WW, Zhang XQ, et al. Antibacterial bisabolane sesquiterpenoids and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Phomopsis prunorum* [J]. *Phytochem Lett*, 2020, 37:1-4.
- 15 Duan YS, Hu Y, Yang WX, et al. Study on chemical constituents and α -glucosidase inhibitory activity of *Cyclocarya paliurus* in Guizhou Province [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:940-945.
- 16 Fromling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, et al. Multicenter evaluation of a broth microdilution antifungal susceptibility test for yeasts [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37:39-45.
- 17 Elnaggar MS, Ebada SS, Ashour ML, et al. Xanthenes and sesquiterpene derivatives from a marine-derived fungus *Scopulariopsis* sp [J]. *Tetrahedron*, 2016, 72:2411-2419.
- 18 Aly AH, Edrada-Ebel R, Indriani ID, et al. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Olygonum senegalense* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71:972-980.
- 19 Shigemori H, Hosoya T, Matsumoto T, Palmariols A and B, two new chlorinated dibenzo- α -pyrones from Discomycete *Lachnum palmae* [J]. *Heterocycles*, 2010, 81:1231-1237.
- 20 Ichihara A, Hashimoto M, Hirai T, et al. Structure, synthesis, and stereochemistry of (+)-orthosporin, a phytotoxic metabolite of *Rhynchosporium orthosporum* [J]. *Chem Lett*, 1989, 18:1495-1498.
- 21 Andrioli WJ, Santos MS, Silva VB, et al. δ -Lactam derivative from thermophilic soil fungus exhibits *in vitro* anti-allergic activity [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26:2168-2175.
- 22 Zhang JC, Chen GY, Li XZ, et al. Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31:2745-2752.
- 23 Lai DW, Wang A, Cao YH, et al. Bioactive dibenzo- α -pyrone derivatives from the endophytic fungus *Rhizopycnis vagum* Nitaf22 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79:2022-2031.
- 24 Wei Q, Bai J, Yan DJ, et al. Genome mining combined metabolic shunting and OSMAC strategy of an endophytic fungus leads to the production of diverse natural products [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11:572-587.

(上接第 1648 页)

- 23 Zhuang H, Zheng Y, Zhou YK, et al. Study on fatty acid compositions and volatile compounds of *Alligator sinensis* oil before and after deodorization by GC-MS [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2018, 41:1899-1903.
- 24 Zheng HH, Ding LH, Hunag B, et al. Extraction and analysis of oil from four kinds of legume seeds [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2020, 41(7):75-79.
- 25 Luan K, Yang ZB, Duan XM, et al. Analysis of the fat-soluble components from *Hydrophilus acuminatus* Motschulsky of edible insect by GC-MS [J]. *Food Ind* (食品工业), 2019, 40(9):174-176.
- 26 Chen YS, Zhao WG. Study on anti-aging activity of muskrat [J]. *Special Wild Econ Anim Plant Res* (特产研究), 2005(2):5-7.
- 27 Xu WY. Study on the mechanism on promoting blood circulation by removing blood stasis of muskrat [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine (长春中医药大学), 2005.