



紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究

丁允章, 孔黎春, 张奕嘉, 蒋冬花*

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

丁允章, 孔黎春, 张奕嘉, 蒋冬花. 紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究. 微生物学报, 2022, 62(1): 103–118.

Ding Yunzhang, Kong Lichun, Zhang Yijia, Jiang Donghua. Antioxidation and inhibition of α -glucosidase activity of secondary metabolites of *Monascus purpureus* Mp-21. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 103–118.

摘要:【目的】紫色红曲霉(*Monascus purpureus*) Mp-21 次级代谢产物的分离纯化与生物活性研究。【方法】综合运用硅胶柱、反相 C₁₈ 柱和 Sephadex LH-20 凝胶柱等柱色谱分离技术对紫色红曲霉 Mp-21 的次级代谢产物进行分离纯化, 运用波谱学技术(核磁共振和高分辨质谱技术)鉴定化合物的结构。对鉴定的化合物进行抗氧化与降血糖相关酶抑制活性的测定。【结果】从紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物中鉴定出 10 个活性化合物, 分别为 FMOC-ALLO-THR(TBU)-OH (1)、quercetin (2)、hesperetin (3)、monascin (4)、monasphilone A (5)、oleanolic acid (6)、 β -sitosterol (7)、ergosterol (8)、indole-3-carboxylic acid (9)、chlorogenic acid (10)。其中化合物 1 为新天然产物, 补充了该化合物在自然界中的信息和有机波谱信息, 化合物 2、6、9、10 首次在红曲菌科中发现。在体外清除 O^{2•-}、DPPH 和 OH⁻ 自由基的抗氧化活性试验中, 化合物 2 (IC₅₀ 分别为 5.07、4.84 和 27.39 μ g/mL) 表现出较强的抗氧化能力。通过电子顺磁共振技术验证了化合物 2 对 DPPH 和 OH⁻ 自由基具有较强的清除能力。化合物 6 对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用, IC₅₀ 为 22.87 μ g/mL。【结论】紫色红曲霉 Mp-21 是极具开发性能的优质种质资源, 具有开发成抗氧化、降血糖等功能性食品的潜力。

关键词: 紫色红曲霉; 新天然产物; 抗氧化; 降血糖

基金项目: 国家自然科学基金(31570013)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570013)

*Corresponding author. E-mail: jdh@zjnu.cn

Received: 24 February 2021; Revised: 7 May 2021; Published online: 26 May 2021

Antioxidation and inhibition of α -glucosidase activity of secondary metabolites of *Monascus purpureus* Mp-21

DING Yunzhang, KONG Lichun, ZHANG Yijia, JIANG Donghua*

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To study the separation, purification and biological activity of secondary metabolites from *Monascus purpureus* Mp-21. [Methods] The secondary metabolites of *Monascus purpureus* Mp-21 were isolated and purified using silica gel column, RPC₁₈ column and Sephadex LH-20 gel column and other column chromatographic separation techniques, and the structure of the compound was identified by spectroscopy technique (NMR and HR-ESI-MS). The anti-oxidation and hypoglycemic-related enzyme inhibitory activities of the identified compounds were determined. [Results] Ten active compounds were identified from the secondary metabolites of *Monascus purpureus* Mp-21, namely FMOC-ALLO-THR(TBU)-OH (1), quercetin (2), hesperetin (3), monascin (4), monasphilone A (5), oleanolic acid (6), β -sitosterol (7), ergosterol (8), indole-3-carboxylic acid (9) and chlorogenic acid (10). Among them, compound 1 is a new natural product, which complements the information of the compound in nature and the information of the organic spectrum. Compounds 2, 6, 9 and 10 are discovered from the *Monascus* for the first time. In the *in vitro* antioxidant activity tests of O²⁻, DPPH and OH⁻ free radicals, compound 2 (*IC*₅₀ of 5.07, 4.84 and 27.39 μ g/mL, respectively) showed strong antioxidant capacity. Electron paramagnetic resonance (EPR) showed that compound 2 had strong scavenging ability on DPPH and OH⁻. Compound 6 had strong inhibitory activity on α -glucosidase with *IC*₅₀ of 22.87 μ g/mL. [Conclusion] *Monascus purpureus* Mp-21 is a high-quality germplasm resource with high development performance, and has the potential to be developed into functional food such as antioxidant and hypoglycemic.

Keywords: *Monascus purpureus*; new natural products; antioxidant; hypoglycemic

糖尿病是危害全球人类身体健康的慢性内分泌疾病之一，在临床表现上，约 90% 的糖尿病患者被诊断为 II 型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病)^[1]。其特征是由于胰腺 β 细胞的胰岛素分泌异常或外周胰岛素抵抗或两者兼具引起的持续性高血糖^[2]。众所周知，由碳水化合物、蛋白质和脂肪代谢紊乱引起的血糖升高往往会致导致包括眼睛、肾脏、神经和血管等多个器官和组织功能性异常的糖尿病并发症^[3]。迄今运用各种现代药理学方法通过不同的作用机制来改善糖尿病，如刺激胰岛素释放、抑制糖异生、

增加葡萄糖转运蛋白的数量和减少肠内葡萄糖吸收等^[4]。控制糖尿病的有效方法之一是阻止碳水化合物的消化吸收，降低葡萄糖的吸收速率，进而控制餐后血糖的升高^[5]。在碳水化合物消化过程中 α -葡萄糖苷酶起着关键的作用，研究发现 α -葡萄糖苷酶抑制剂会延迟碳水化合物的消化并延长碳水化合物消化的总时间，从而导致葡萄糖吸收速率的降低^[6]。目前，在糖尿病药物治疗市场中主要以人工合成的阿卡波糖(acarbose)或伏格列波糖(voglibose)等特异性抑制 α -葡萄糖苷酶的抑制剂为主，但这些治疗

药物容易引起胃肠道问题和腹部绞痛等副作用, 因而使它们作为糖尿病治疗药物的吸引力逐渐降低。因此, 以 α -葡萄糖苷酶作为降血糖药物的靶标, 开发新型的 α -葡萄糖苷酶抑制剂越来越受到关注同时也是目前研究的热点^[7]。

除此之外, 现在越来越多的实验和临床研究证据表明, 糖尿病的发病机制中氧化应激也是其主要的发病机制之一^[8]。氧化应激是由活性氧(ROS)生成与消除超氧化物阴离子自由基和其他自由基之间的抗氧化剂防御机制不平衡引起的^[9], 在许多糖尿病及并发症发作之前氧化应激会主动导致 β 细胞损伤和胰岛素抵抗^[10], 通过抗氧化剂来逆转氧化应激可能也是抑制糖尿病及其并发症行之有效的策略^[11]。因此, 以 α -葡萄糖苷酶和 ROS 为降血糖药物的双重靶标用以筛选天然的降血糖药物是一种前瞻性策略。

红曲霉属于真菌界(Eumycetes)、真菌门(Eumycophyta)、子囊菌亚门(Ascomycotina)、不整囊菌纲(Plectomycetes)、散囊菌目(Eurotiales)、红曲菌科(Monascaceae)、红曲霉属(Monascus)^[12]。红曲霉(Monascus)作为中国传统的药食同源性真菌, 人们将红曲霉接种于煮熟的大米上, 利用固态发酵制作红曲米, 《本草纲目》中记载“甘, 温, 无毒。主治消食活血、健脾燥胃; 治赤白痢、下水谷; 治妇女血气痛及产后恶血不尽。”现代研究表明其自身可以产生多种有益的天然次级代谢产物, 如红曲色素(Monascus pigments, MPs)^[13]、莫纳克林 K(monacolin K)^[14]、 γ -氨基丁酸(GABA)^[15]等。总结分析已发表的研究报道, 红曲霉目前的研究主要集中在 MPs 的功效、功能基因的鉴定以及提取物生物活性的测定等方面。如 Li 等^[16]发现红曲米提取物对肺癌 A549 细胞表现出明显细胞毒性; Hsu 等^[17]报道 MPs 可以提高胰岛素的敏感性, 具有预防和治疗糖尿病的潜力; Nozaki

等^[18]提取的 MPs 对枯草芽孢杆菌具有较强的抑制能力; 王嘉琦等^[19]从紫色红曲霉中克隆了 1 个 MPs 产生相关 *PigE* 基因, 并对其功能进行了鉴定。但对红曲霉次级代谢产物的化学组成、抗氧化活性以及 α -葡萄糖苷酶抑制活性的研究却鲜有报道。因此本研究以紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物中的化学成分降血糖为目的, 以期获得特殊的以红曲霉为来源的药用活性成分或潜在的药用先导化合物, 丰富红曲霉中药用活性化学成分的类别, 为将来的开发与应用提供科学的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

紫色红曲霉(*M. purpureus*) Mp-21 菌株, 实验室自主筛选保藏。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基): 称取马铃薯粉 6 g、葡萄糖 20 g 和琼脂粉 20 g 加热溶解于 1 L 去离子水中, 分装, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用; 马铃薯葡萄糖液体培养基(PD 液体培养基): 称取马铃薯粉 6 g 和葡萄糖 20 g 加热溶解于 1 L 去离子水中, 用乳酸将 pH 调至 4.5 左右, 分装, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。

1.1.3 主要仪器

液-质联用仪 ZQ400 (美国 Waters 公司)、紫外分光光度计 TU-1810 (北京普析通用仪器)、酶标仪 1510-Z0024 C (Thermo Fisher)、核磁共振波谱仪(NMR)Avance 600 (德国 Bruker 公司)、电子顺磁共振波谱仪(Electron Paramagnetic Resonance, EPR) A300 (德国 Bruker 公司)。

1.1.4 主要试剂

2,2-二氮-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺

酸)(ABTS)、还原型辅酶 I 二钠盐(NADH)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)等采购于上海麦克林试剂有限公司;吩嗪硫酸甲酯(PMS)采购于北京伊诺凯科技有限公司;4-硝基苯基- α -D 吡喃葡萄糖苷(pNPG)、阿卡波糖(acarbose)、 α -葡萄糖苷酶、5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(DMPO)等采购于上海源叶生物科技有限公司;Sephadex LH-20 凝胶采购于美国 GE 公司;反相 C₁₈ 采购于日本大曹工业株式会社。

1.2 紫色红曲霉 Mp-21 的发酵培养

将-80 °C 保藏的紫色红曲霉 Mp-21 菌株置于室温解冻,在超净工作台上用接种环挑取菌丝于 PDA 平板上活化培养,30 °C 培养 7 d。用菌饼打孔器取种转接至装有 75 mL PD 培养液的培养瓶中,于恒温培养箱中 30 °C、180 r/min 摇床培养 4 d 收获种子液。取种子液 30 mL 接种于装有 1 L PD 培养液的发酵培养瓶中,于振荡培养箱中 30 °C、180 r/min 培养 7 d 收获发酵液。

1.3 紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物的提取

用脱脂棉纱布过滤红曲霉发酵液 120 L,收集菌液弃除菌体,菌液和乙酸乙酯等比例混合,用磁力搅拌器搅拌 15 min 后静置,待出现明显分层后取上清萃取液,萃取液用旋转蒸发器减压浓缩获得红曲霉次级代谢产物乙酸乙酯浸膏。用乙酸乙酯反复萃取 5 次,最终获得粗浸膏 49.4 g。

1.4 紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物的分离纯化与鉴定

首先将硅胶(200–300 目)高温烘干脱水 2 h,冷却后将硅胶(1 000 g, 200–300 目)装入空玻璃层析柱内,用有机试剂冲洗压实。将乙酸乙酯粗浸膏用有机试剂溶解,将溶解后的乙酸乙酯

粗浸膏溶液与适量硅胶(200–300 目)充分混匀后装入硅胶柱层析中分离,以石油醚:乙酸乙酯(10:1–1:100)、乙酸乙酯:甲醇(20:1–4:1)梯度洗脱,通过薄层层析板进行组分分析以及用真空旋转浓缩仪进行组分的浓缩,共得到 8 个组分 Fr.1–8。Fr.1(5.2 g)、Fr.2(3.5 g)、Fr.3(4.4 g)、Fr.4(5.6 g)、Fr.5(10.2 g)、Fr.6(7.6 g)、Fr.7(7.1 g)、Fr.8(5.8 g)。用硅胶(300–400 目)柱将 Fr.1 组分继续分离,用石油醚:乙酸乙酯(10:1–1:100)梯度洗脱分离获得组分 Fr.1.1–3,用葡聚糖 Sephadex LH-20 凝胶柱将 Fr.1.1 和 Fr.1.2 组分进行分离,以甲醇:二氯甲烷(2:1)进行洗脱获得化合物 5 (115.6 mg)和化合物 4 (84.7 mg);用硅胶(300–400 目)柱将 Fr.2 组分继续分离,以石油醚:乙酸乙酯(10:1–1:100)分离得到了化合物 8 (63.7 mg)和组分 Fr.2.1–3,再用重结晶的方法将组分 Fr.2.3 提纯最终获得化合物 7 (56.4 mg);用硅胶(300–400 目)柱将 Fr.4 继续分离,以石油醚:乙酸乙酯(10:1–1:10)梯度洗脱,获得组分 Fr.4.1–4,继续用反相 C₁₈ 柱将 Fr.4.1 组分以甲醇:水进行梯度洗脱分离到化合物 6 (46.9 mg)。用硅胶(300–400 目)柱将 Fr.5 继续分离,以石油醚:乙酸乙酯(5:1–1:100)梯度洗脱,获得组分 Fr.5.1–3,葡聚糖 Sephadex LH-20 凝胶柱将组分 Fr.5.1 和 Fr.5.3 继续以甲醇进行洗脱分离到化合物 1 (52.9 mg)和 9 (37.4 mg);用硅胶(300–400 目)柱将 Fr.6 继续分离,以石油醚:乙酸乙酯(1:1–1:100)梯度洗脱,分离到化合物 2 (55.2 mg)和组分 Fr.6.1–2,用重结晶的方法将组分 Fr.6.2 分离得到化合物 3 (41.8 mg);用葡聚糖 Sephadex LH-20 凝胶柱将 Fr.8 以甲醇进行洗脱分离到化合物 10 (58.2 mg)。乙酸乙酯提取物的分离纯化见图 1。以仪器测定的化合物波谱数据(¹H-NMR、¹³C-NMR、HR-ESI-MS 等谱图)和文献来鉴定化合物的结构。

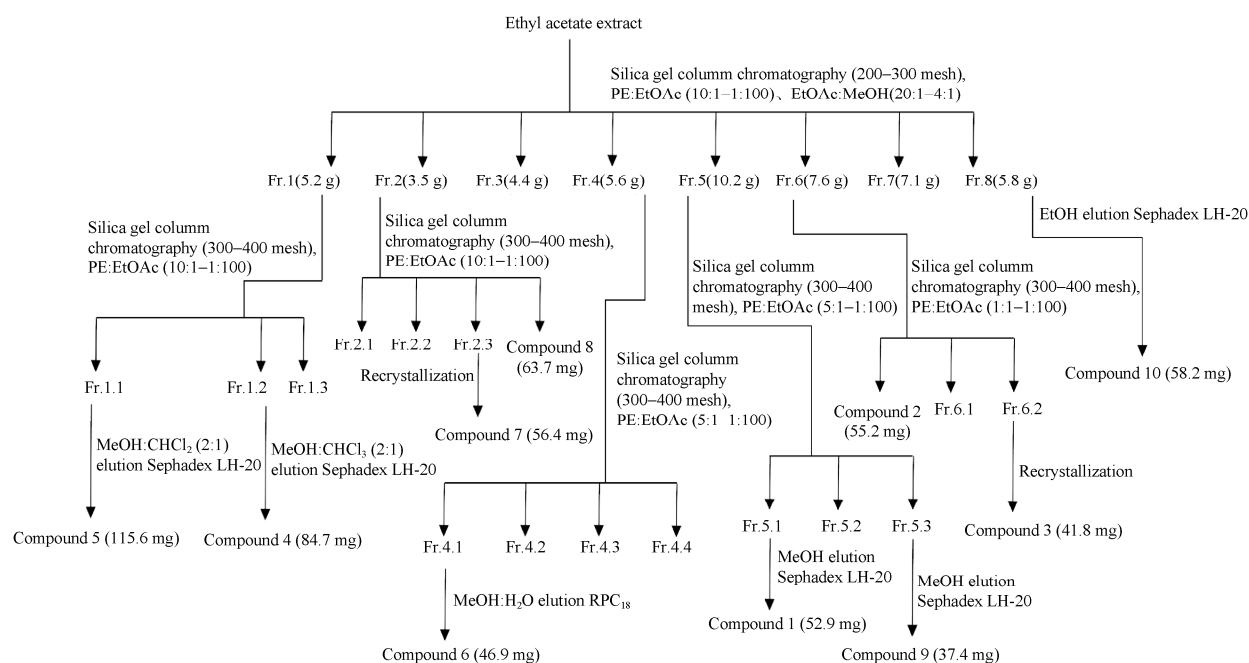


图 1 乙酸乙酯提取物的分离纯化

Figure 1 Isolation and purification of ethyl acetate extract.

1.5 体外抗氧化活性实验

1.5.1 参照文献[20]的 ABTS⁺自由基清除能力的测定方法并稍作修改

配制终浓度为 7.0 mmol/L 的 ABTS⁺溶液和终浓度为 2.5 mmol/L 的过硫酸钾溶液。按照 1:1 (V:V)的比例将 ABTS⁺溶液和过硫酸钾溶液进行混合,用棕色试剂瓶在室温避光的条件下放置过夜,形成 ABTS⁺储备液。用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4)将 ABTS⁺储备液进行稀释,使其在 734 nm 波长下的 OD 值为 0.7±0.05。将 0.2 mL 待测样品溶液与 ABTS⁺工作液 3 mL 混合均匀,避光反应 10 min,用紫外分光光度计检测在 734 nm 波长范围下的 OD 值,每个待测样品均做 3 次平行重复。用 Vc 作为阳性对照;ABTS⁺自由基清除能力(%)按公式(1)计算;抗氧化能力以 IC₅₀ 值来表示,IC₅₀ 值表示抑制一半自由基时抗氧化剂的浓度(μg/mL)。

$$\text{自由基清除能力}\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A₀ 为空白孔的吸光度值; A₁ 为测定孔的吸光度值。

1.5.2 参考文献[21]的超氧阴离子(O²⁻)自由基清除能力的测定方法并稍作修改

在反应中加入 2 mL 的 Tris-HCl 缓冲液 (16 mmol/L, pH 8.0), 1 mL 的 NADH (78 μmol/L) 溶液, 1 mL 的 NBT (50 μmol/L) 溶液, 1 mL 待测样品溶液, 1 mL 的 PMS (10 μmol/L) 溶液, 混合均匀, 在避光的条件下反应 5 min, 用紫外分光光度计检测在 560 nm 波长范围下的 OD 值, 每个待测样品均做 3 次平行重复。用 Vc 作为阳性对照; O²⁻自由基清除能力(%)按公式(2)计算; 抗氧化能力以 IC₅₀ 值来表示, IC₅₀ 值表示抑制一半自由基时抗氧化剂的浓度(μg/mL)。

$$\text{超氧阴离子自由基清除能力}\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A₀ 为空白孔的吸光度值; A₁ 为测定孔的吸光度值。

1.5.3 参考文献[22]的 DPPH 自由基清除能力的测定方法并稍作修改

DPPH 乙醇溶液(0.15 mmol/L)和待测样品溶液按照 1:1 (V:V)的比例混合均匀,在避光的条件下反应 30 min,用紫外分光光度计检测在 517 nm 波长范围下的 OD 值,每个待测样品均做 3 次平行重复。同时用 Vc 作为阳性对照。DPPH 自由基清除能力(%)按公式(3)计算;抗氧化能力以 IC_{50} 值来表示, IC_{50} 值表示抑制一半自由基时抗氧化剂的浓度($\mu\text{g/mL}$)。

$$\text{DPPH 自由基清除能力}\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_0 为空白孔的吸光度值; A_1 为测定孔的吸光度值。

1.5.4 参考文献[23]的羟基(OH^\cdot)自由基清除能力的测定方法并稍作修改

移取 2 mL 样品溶液、6 mmol/L 的 FeSO_4 溶液 2 mL 和 6 mmol/L 的水杨酸溶液 2 mL 于 10 mL 的离心管中,涡旋均匀,再加入 6 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 2 mL,在室温下反应 30 min,用紫外分光光度计检测在 510 nm 波长下的 OD 值,每个浓度的溶液均做 3 次平行重复。同时用 Vc 作为阳性对照。羟基自由基清除能力(%)按公式(4)计算;抗氧化能力以 IC_{50} 值来表示, IC_{50} 值表示抑制一半自由基时抗氧化剂的浓度($\mu\text{g/mL}$)。

$$\text{羟基自由基清除能力}\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

式中: A_0 为空白孔的吸光度值; A_1 为测定孔的吸光度值。

1.6 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

参考文献[24]的 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定方法并稍作修改。将 α -葡萄糖苷酶制成 5 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液,4-硝基苯基- α -D 吡喃葡萄糖苷(pNPG)配制成 1 mg/mL 的 pNPG 溶液,用 PBS 溶液(0.01 mol/L, pH 6.8)配制,

现用现配。在 96 孔板中加入 50 μL 的 PBS 缓冲液、50 μL 的 α -葡萄糖苷酶溶液和 50 μL 的待测样品溶液,并吹打混合均匀,在 37 $^\circ\text{C}$ 的恒温水浴锅中孵育 10 min,再加入 50 μL 的 pNPG 溶液,充分混合,在 37 $^\circ\text{C}$ 的恒温水浴锅中继续孵育 30 min。最后用排枪快速加入 50 μL 的碳酸钠缓冲液(2 mol/L)终止反应,在酶标仪 405 nm 的检测波长下测定 OD 值,每个待测样品溶液均做 3 次平行重复。同时用阿卡波糖作阳性对照。 α -葡萄糖苷酶抑制能力(%)按公式(5)计算;酶活性抑制能力以 IC_{50} 值来表示, IC_{50} 值表示抑制一半酶活力时抑制剂的浓度($\mu\text{g/mL}$)。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制能力}\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

式中: A_0 为对照组的吸光度值; A_1 为样品组吸光度值。

1.7 Electron Paramagnetic Resonance (EPR) 技术检测 DPPH 自由基清除能力

1.7.1 参考文献[25]的 EPR 技术检测 DPPH 自由基清除能力的方法并稍作修改

DPPH 乙醇溶液(0.15 mmol/L)和待测样品溶液按照 1:1 (V:V)的比例混合均匀,在避光的条件下反应 30 min 获得反应液。用 Teflon 毛细管虹吸反应液,然后用石蜡封口插入顺磁石英样品管中,最后将样品管插入谐振腔中进行 EPR 常温检测。DPPH 自由基清除能力(%)按公式(6)计算。实验参数:中心磁场强度,3 513 G;扫场宽度,150 G;调制频率,100 kHz;调制幅度,1.5 G;微波功率,2.010 MW。

$$\text{DPPH 自由基清除能力}\% = \frac{H_0 - H}{H_0} \times 100 \quad (6)$$

式中: H_0 为空白对照样特征峰的峰高; H 为样品特征峰的峰高。

1.7.2 参考文献[25]的 EPR 技术检测 OH^\cdot 自由基清除能力的方法并稍作修改

在反应体系中加入 200 μL 待测样品溶液、

200 μL 的 6 mmol/L FeSO_4 溶液、200 μL 的去离子水和 200 μL 的 0.1 mol/L DMPO 溶液, 充分混匀后加入 200 μL 的 0.1% H_2O_2 溶液进行反应, 用 Teflon 毛细管虹吸反应液, 然后用石蜡封口插入顺磁石英样品管中, 最后将样品管插入谐振腔中进行 EPR 常温检测。羟基自由基清除能力 (%) 按公式(7)计算。实验参数: 中心磁场强度, 3 510 G; 扫场宽度, 100 G; 调制频率, 100 kHz; 调制幅度, 1 G; 微波功率, 2.017 mW。

$$\text{羟基自由基清除能力}\% = \frac{H_0 - H}{H_0} \times 100 \quad (7)$$

式中: H_0 为空白对照样特征峰的峰高; H 为样品特征峰的峰高。

1.8 数据分析

实验结果以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)来表示。用 Origin 2020b 进行绘图和数据处理, 用

SPSS 16.0 计算 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 活性代谢产物的结构鉴定

运用多种色谱方法, 从紫色红曲霉 Mp-21 乙酸乙酯的粗提物中分离纯化得到 10 个活性代谢产物, 其中化合物 **1** (FMOC-ALLO-THR (TBU)-OH) 经文献查阅以及 Reaxys 和 SciFinder 数据库查证为新天然产物; 通过对波谱数据的分析与查阅相关的文献报道, 将分离纯化得到的余下 9 个活性代谢产物确定为 quercetin (**2**)、hesperetin (**3**) monascin (**4**)、monasphilone A (**5**)、oleanolic acid (**6**)、 β -sitosterol (**7**)、ergosterol (**8**)、indole-3-carboxylic acid (**9**)、chlorogenic acid (**10**) (图 2)。

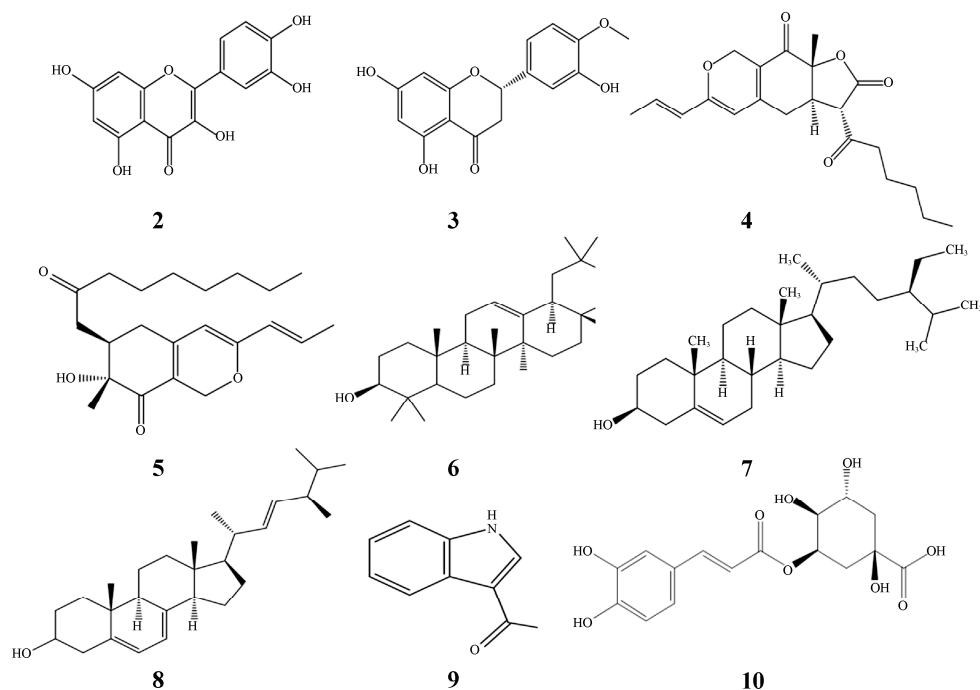


图 2 化合物 2-10 的结构图

Figure 2 Structures of compounds 2-10.

化合物 **1** (52.9 mg): 红色粉末, 溶于甲醇。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M+H]^+$ 398.196 6, Exact Mass 值为 398.196 7; $[M+Na]^+$ 420.178 6, Exact Mass 值为 420.178 7。因此推测该化合物分子式为 $C_{23}H_{27}NO_5$ 。从 1H NMR(表 1)可以明显看出 Fmoc 保护基特征的 4 组烯氢信号[7.70 (d,

$J = 7.5$ Hz, 2H)、7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H)、7.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H)和 7.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H)]、1 个亚甲基氢信号 4.37 – 4.32 (m, 2H)和 1 个次甲基氢信号 4.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1 个苏氨酸特征的 2 个次甲基氢信号[4.64 – 4.38 (m, 1H)和 4.16 – 4.08 (m, 1H)]和 1 个甲基氢信号 1.18 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 和 1 个三取代末端的 3 个甲基氢信号 1.22 (s, 9H)。 ^{13}C NMR 结合 DEPT 谱(表 1)可以看出有 15 个碳信号, 其中包括 7 个次甲基碳信号、2 个甲基碳信号、1 个亚甲基碳信号和 4 个季碳信号(包括 1 个连氧碳和 1 个双键碳)以及 1 个羰基碳信号。化合物 **1** 的 1H - 1H COSY 谱显示 H-9/H-10/H-11/H-12、H-15/H-16/H-17/H-18、H-6/H-7、H-2/H-3/H-4 的相关信号(图 3)。化合物 **1** 的 HMBC 谱显示 H-7 与 C8/C13/C14/C19 相关, 且 H-7 与 C-6 相关、H₂-6 与 C-5 相关、H-3 与 C-20 相关, 由此可以推断出 C7/8/13/14/19 构成的五元环与一个含有氨基酸的侧链相连; H-15 与 C14/19/16/17 相关、H-18 与 C16/17/19/14 相关, 揭示五元环与苯环相连, 因此最终确定化合物的结构为 2-(((9H-fluoren-9-yl) methoxy) carbonyl)amino)-3-(tert-butoxy)butanoic acid, 命名为 Fmoc-ALLO-THR(TBU)-OH。

表 1 化合物 **1** 的 1H -NMR (600 MHz, MeOD)和 ^{13}C -NMR 数据(150 MHz, MeOD)

Table 1 1H -NMR (600 MHz, MeOD) and ^{13}C -NMR data (150 MHz, MeOD) of compound **1**

C	δ_H	δ_C
1		172.56, C
2	4.64 – 4.38 (m, 1H)	59.76, CH
3	4.16 – 4.08 (m, 1H)	67.45, CH
4	1.18 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H)	17.88, CH ₃
5		157.31, C
6	4.37 – 4.32 (m, 2H)	66.70, CH ₂
7	4.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H)	46.98, CH
8,19		143.88, C
9,18	7.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H)	119.50, CH
10,17	7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H)	124.91, CH
11,16	7.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H)	127.37, CH
12,15	7.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H)	126.77, CH
13,14		141.17, C
20		74.23, C
21,22,23	1.22 (s, 9H)	27.14, CH ₃

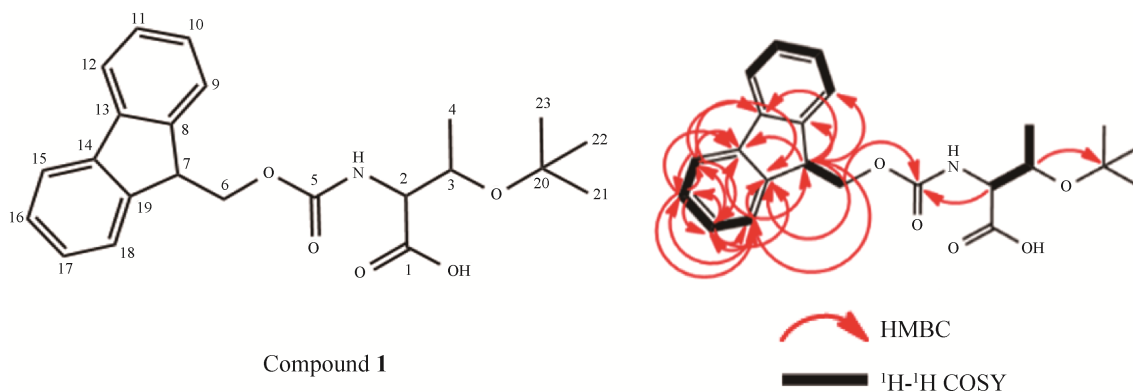


图 3 化合物 **1** 的结构及主要的 1H - 1H COSY 和 HMBC 信号

Figure 3 Structure and key correlations of 1H - 1H COSY and HMBC of compound **1**.

化合物 **2** (55.2 mg): 黄色晶体, 溶于甲醇。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M+H]^+$ 303.052 5, Exact Mass 值为 303.050 5。因此推测该化合物分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.51 (s, 1H, C₅-OH), 9.42 (s, 4H, C_{7,3,3',4'}-OH), 7.69 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, C₂-H), 7.55 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H, C₆-H), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, C₅-H), 6.42 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, C₈-H), 6.19 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, C₆-H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 176.27 (s, C-4), 164.34 (s, C-7), 161.15 (s, C-5), 156.57 (s, C-9), 148.13 (s, C-4'), 147.22 (s, C-2), 145.49 (s, C-3'), 136.18 (s, C-3), 122.40 (s, C-1), 120.43 (s, C-6), 116.05 (s, C-5'), 115.49 (s, C-1'), 103.45 (s, C-10), 98.64 (s, C-6), 93.81 (s, C-8)。该结构的图谱数据与文献[26]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 quercetin。

化合物 **3** (41.8 mg): 淡黄色晶体, 溶于甲醇。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M+H]^+$ 303.086 9, Exact Mass 值为 303.086 3。因此推测该化合物分子式为 $C_{16}H_{14}O_6$ 。 1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 6.95 (d, $J = 20.2$ Hz, 3H, C_{2',5',6'}-H), 5.91 (m, 2H, C_{6,8}-H), 5.31 (dd, $J = 12.7, 2.9$ Hz, 1H, C₂-H), 4.87 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.06 (dd, $J = 17.1, 12.7$ Hz, 1H, H-3a), 2.72 (dd, $J = 17.1, 3.0$ Hz, H-3b)。 ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 196.20 (s, C-4), 166.93 (s, C-7), 164.04 (s, C-5), 163.35 (s, C-9), 147.93 (s, C-4'), 146.36 (s, C-3'), 131.72 (s, C-1'), 117.61 (s, C-6'), 113.14 (s, C-2'), 111.17 (s, C-5'), 101.98 (s, C-10), 95.69 (s, C-6), 94.81 (s, C-8), 78.86 (s, C-2), 55.03 (s, 6-OMe), 42.65 (s, C-3)。该结构的图谱数据与文献[27]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 hesperetin。

化合物 **4** (84.7 mg): 黄色固体, 溶于氯仿。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M+H]^+$ 359.186 0, Exact Mass 为 359.185 8。因此推测该化合物分子式为 $C_{21}H_{27}O_5$ 。 1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.53 (dd, $J = 15.3, 7.1$ Hz, C₁₀-H), 5.93 (dd, $J = 15.4, 1.4$ Hz, 1H, C₉-H), 5.29 (s, 1H, C₄-H), 5.08 (s, 1H, H-1b), 4.75 (s, 1H, H-1a), 3.68 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, C₁₃-H), 3.26 (m, 1H, C₆-H), 3.04 (dt,

$J = 18.0, 7.5$ Hz, 1H, H-5b), 2.70 (dd, $J = 17.5, 4.0$ Hz, 1H, H-15b), 2.63 (dt, $J = 18.0, 7.2$ Hz, 1H, H-5a), 2.46 (dd, $J = 17.5, 11.7$ Hz, 1H, H-15a), 1.89 (m, 3H, C₁₁-H), 1.64 (dd, $J = 14.5, 7.4$ Hz, 2H, C₁₅-H), 1.47 (s, 3H, C₁₂-H), 1.33 (m, 4H, C_{17,18}-H), 0.91 (dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, 3H, C₁₉-H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 202.48 (s, C-14), 189.79 (s, C-8), 169.49 (s, C-13a), 160.49 (s, C-3), 150.34 (s, C-4a), 135.42 (s, C-10), 124.40 (s, C-9), 114.04 (s, C-8a), 103.27 (s, C-4), 83.16 (s, C-7), 63.84 (s, C-1), 54.91 (s, C-13), 42.91 (d, $J = 8.5$ Hz, C-3,15), 31.16 (s, C-5), 29.46 (s, C-17), 22.80 (s, C-16), 22.41 (s, C-18), 18.49 (s, C-11), 17.73 (s, C-12), 13.89 (s, C-19)。该结构的图谱数据与文献[28]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 monascin。

化合物 **5** (115.6 mg): 黄色油脂状固体, 溶于氯仿。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M+H]^+$ 361.237 5, Exact Mass 值为 361.237 9。因此推测该化合物分子式为 $C_{22}H_{32}O_4$ 。 1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.48 (dd, $J = 15.2, 7.2$ Hz, 1H, C₁₀-H), 5.90 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, C₉-H), 5.23 (s, 1H, C₄-H), 5.02 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, C₁-H), 4.76 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, C₁-H), 2.97 (m, 1H, C₁₃-H), 2.61 (s, 1H, C₆-H), 2.45 (dd, $J = 7.3, 4.9$ Hz, 3H, C₁₅-H), 2.40 (s, 1H, C₁₇-H), 2.10 (m, 1H, C₅-H), 1.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, C₁₁-H), 1.58 (m, 2H, C₁₆-H), 1.28 (s, 8H, C_{17,18,19,20}-H), 1.17 (s, 3H, C₁₂-H), 0.89 (s, 3H, C₂₁-H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 210.09 (s, C-14), 197.93 (s, C-8), 160.34 (s, C-3), 152.52 (s, C-4a), 134.65 (s, C-10), 124.68 (s, C-9), 112.93 (s, C-8a), 103.40 (s, C-4), 74.14 (s, C-7), 63.95 (s, C-1), 43.24 (s, C-15), 42.01 (s, C-13), 39.36 (s, C-6), 32.63 (s, C-5), 31.65 (s, C-19), 29.11 (d, $J = 19.2$ Hz, C-17,18), 23.86 (s, C-16), 22.59 (s, C-20), 19.91 (s, C-12), 18.42 (s, C-11), 14.05 (s, C-21)。该结构的图谱数据与文献[29]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 monaphilone A。

化合物 **6** (46.9 mg): 白色粉末, 溶于

DMSO。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M-H]^+$ 455.356 5, Exact Mass 值为 455.352 5。因此推测该化合物分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 5.16 (t, $J = 3.5$ Hz, 1H, C₁₂-H), 3.00 (dd, $J = 10.4, 5.2$ Hz, 1H, C₃-H), 2.74 (dd, $J = 13.8, 4.1$ Hz, 1H, C₁₈-H), 1.10 (s, 3H, C₂₃-H), 0.90 (s, 3H, C₂₄-H), 0.88 (s, 6H, C_{26,25}-H), 0.86 (s, 3H, C₂₇-H), 0.72 (s, 3H, C₂₉-H), 0.68 (s, 3H, C₃₀-H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 179.03 (s, C-28), 144.30 (s, C-13), 121.99 (s, C-12), 77.29 (s, C-3), 55.28 (s, C-5), 47.56 (s, C-9), 46.16 (s, C-17), 45.92 (s, C-19), 41.79 (s, C-14), 41.27 (s, C-18), 39.35 (s, C-8), 38.85 (s, C-4), 38.53 (s, C-1), 37.08 (s, C-10), 33.79 (s, C-21), 33.30 (s, C-7), 32.89 (s, C-22), 32.56 (s, C-29), 30.86 (s, C-20), 28.70 (s, C-15), 27.68 (s, C-12), 27.43 (s, C-23), 26.08 (s, C-27), 23.84 (s, C-30), 23.38 (s, C-16), 23.08 (s, C-11), 18.50 (s, C-6), 17.31 (s, C-26), 16.49 (s, C-24), 15.58 (s, C-25)。该结构的图谱数据与文献[30]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 oleanolic acid。

化合物 7 (56.4 mg): 白色晶状固体, 溶于氯仿。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M+H]^+$ 415.394 6, Exact Mass 值为 415.394 0。因此推测该化合物分子式为 $C_{29}H_{50}O$ 。 1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 5.30 (s, 1H, C₆-H), 3.52 (s, 1H, C₃-H), 1.01 (s, 3H, C₁₉-H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, C₂₁-H), 0.86 – 0.80 (m, 9H, C_{26,27,29}-H), 0.68 (s, 3H, C₁₈-H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 140.77 (s, C-5), 121.72 (s, C-6), 71.81 (s, C-3), 56.78 (s, C-14), 56.08 (s, C-17), 50.15 (s, C-9), 45.85 (s, C-24), 42.32 (d, $J = 4.1$ Hz, C-4,13), 39.79 (s, C-12), 37.27 (s, C-1), 36.51 (s, C-10), 36.16 (s, C-20), 33.96 (s, C-22), 31.92 (s, C-7,8), 31.67 (s, C-2), 29.17 (s, C-25), 28.26 (s, C-16), 26.10 (s, C-23), 24.31 (s, C-15), 23.08 (s, C-28), 21.10 (s, C-11), 19.83 (s, C-26), 19.40 (s, C-24), 19.05 (s, C-27), 18.79 (s, C-21), 11.99 (s, C-29), 11.87 (s, C-18)。该结构的图谱数据与文献[31]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为

β -sitosterol。

化合物 8 (63.7 mg): 白色晶状固体, 溶于氯仿。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M+H]^+$ 397.346 5, Exact Mass 值为 397.347 0。因此推测该化合物分子式为 $C_{28}H_{44}O$ 。 1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 5.59 (dd, $J = 5.5, 2.3$ Hz, 1H), 5.41 (m, 1H), 5.22 (dd, $J = 15.8, 7.6$ Hz, 2H), 3.66 (s, 1H), 1.06 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.95 (m, 6H), 0.85 (dd, $J = 9.1, 6.8$ Hz, 6H), 0.65 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 141.37 (s), 139.80 (s), 135.58 (s), 131.99 (s), 119.60 (s), 116.30 (s), 70.47 (s), 55.74 (s), 54.57 (s), 46.26 (s), 42.84 (d, $J = 1.7$ Hz), 40.81 (s, C-4), 40.43 (s, C-20), 39.09 (s, C-12), 38.38 (s, C-1), 37.04 (s, C-10), 33.10 (s, C-25), 32.00 (s, C-2), 28.30 (s, C-16), 23.01 (s, C-15), 21.11 (s, C-11,21), 19.96 (s, C-26), 19.66 (s, C-27), 17.62 (s, C-28), 16.29 (s, C-19), 12.06 (s, C-18)。该结构的图谱数据与文献[32]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 ergosterol。

化合物 9 (39.4 mg): 白色固体, 溶于甲醇。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M-H]^+$ 160.039 7, Exact Mass 值为 160.039 9。因此推测该化合物分子式为 $C_9H_7NO_2$ 。 1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.10 (dd, $J = 6.8, 1.7$ Hz, 1H, C₅-H), 7.98 (s, 1H, C₂-H), 7.56 – 7.36 (m, 1H, C₈-H), 7.28 – 7.12 (m, 2H, C_{6,7}-H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 167.88 (s, C-10), 136.80 (s, C-4), 132.03 (s, C-2), 126.16 (s, C-9), 122.21 (s, C-6), 121.01 (s, C-7), 120.63 (s, C-5), 111.50 (s, C-8), 107.31 (s, C-3)。该结构的图谱数据与文献[33]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 indole-3-carboxylic acid。

化合物 10 (58.2 mg): 淡黄色晶体, 溶于丙酮、乙醇和 DMSO。经 HR-ESI-MS 分析可知 m/z : $[M+Na]^+$ 377.086 5, Exact Mass 值为 377.084 9。因此推测该化合物分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.62 (s, 1H, C₄'-H), 9.18 (s, 1H, 1H, 3'-OH), 7.42 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, C₇'-H), 7.04 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, C₂'-H), 6.99 (dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, 1H, C₆'-H), 6.77 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H,

C₅-H), 6.15 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, C₈-H), 5.06 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, C₃-H), 3.93 (s, 1H, C₅-H), 3.57 (s, 1H, C₄-H), 2.15 – 1.67 (m, 4H, C_{2,6}-H)。¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 175.37 (s, C-7), 166.16 (s, C-9'), 148.78 (s, C-4'), 146.00 (s, C-7'), 145.40 (s, C-3'), 126.03 (s, C-1'), 121.82 (s, C-6'), 116.18 (s, C-5'), 115.21 (s, C-8'), 114.71 (s, C-2'), 73.88 (s, C-1), 71.33 (s, C-4), 70.75 (s, C-5), 68.48 (s, C-3), 37.64 (s, C-6), 36.64 (s, C-2)。该结构的图谱数据与文献[34]报道的相一致, 据此将该化合物最终鉴定为 chlorogenic acid。

2.2 单体化合物的抗氧化活性

10 种单体化合物的抗氧化活性如表 2 所示。由表中结果可知, 化合物 2 表现出较好的抗氧化能力, 对 O²⁻、DPPH 和 OH⁻ 自由基具有较强的清除能力, IC₅₀ 值分别为 5.07±0.02、4.84±0.02 和 27.39±0.34 μg/mL, Vc 的 IC₅₀ 值分别为 5.65±0.05、6.72±0.02、37.43±0.13 μg/mL, 较优于对照 Vc 的效果; 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力要低于对照 Trolox 的效果, IC₅₀ 值为 10.76±0.07 μg/mL, Trolox 的 IC₅₀ 值为 2.55±

0.03 μg/mL, 但也表现出了较好的对 O²⁻ 自由基的清除能力; 化合物 10 对 DPPH 和 OH⁻ 自由基的清除能力也优于 Vc 的效果; 2 个甾体类化合物 7 和 8 未表现出抗氧化能力, 萜类化合物 6、生物碱类化合物 9 除未对 DPPH 自由基表现出抑制外对其他 3 种自由基表现出一定的抑制能力; 化合物 3、4 和 5 和新天然产物化合物 1 表现出一定的抗氧化能力。

2.3 单体化合物的酶抑制作用

10 种单体化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制作用如表 3 所示。由表中结果可知, 化合物 2、6 和 10 对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制能力, IC₅₀ 分别为 24.29±0.22 μg/mL、22.87±0.21 μg/mL 和 26.75±0.42 μg/mL, 比阳性对照 Acarbose (IC₅₀ 值为 18.72±0.02 μg/mL) 的效果稍弱; 两个甾体类化合物 7 和 8 以及生物碱类化合物 9 未表现出对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力; 化合物 3、4 和 5 以及新天然产物化合物 1 对 α -葡萄糖苷酶表现出微弱的抑制作用。

表 2 紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物对自由基的清除和抗氧化活性的结果

Table 2 Effects of *Monascus purpureus* Mp-21 secondary metabolites on free radical scavenging and antioxidant activities

<i>In vitro</i> antioxidant activity	ABTS ⁺ scavenging activity (IC ₅₀ , μg/mL)	O ²⁻ scavenging activity (IC ₅₀ , μg/mL)	DPPH scavenging activity (IC ₅₀ , μg/mL)	OH ⁻ scavenging activity (IC ₅₀ , μg/mL)
Compound 1	550.45±2.87	135.86±2.09	650.29±2.79	535.88±1.12
Compound 2	10.76±0.07	5.07±0.02	4.84±0.02	27.39±0.34
Compound 3	32.37±0.26	60.78±0.47	198.87±1.21	95.45±0.78
Compound 4	1 218.29±2.58	110.66±0.89	1 806.65±2.93	70.83±0.45
Compound 5	45.62±0.69	62.67±0.39	661.67±2.02	1 037.81±4.68
Compound 6	626.58±1.09	na	na	522.65±1.36
Compound 7	na	na	na	na
Compound 8	na	na	na	na
Compound 9	958.42±256	260.25±1.89	na	429.38±2.17
Compound 10	11.24±0.18	7.21±0.05	5.65±0.04	30.25±0.43
Trolox	2.55±0.03	nt	nt	nt
Vc	nt	5.65±0.05	6.72±0.02	37.43±0.13

Data derived from three independent experiments were statistically analyzed, and the results are presented as mean±SD ($n=3$). na: not active; nt: not tested.

表 3 紫色红曲霉 Mp-21 次生代谢产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用结果

Table 3 Effects of *Monascus purpureus* Mp-21 secondary metabolites on α -glucosidase inhibition

<i>In vitro</i> enzyme inhibition assay	α -glucosidase inhibition (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)
Compound 1	1 025.97 \pm 4.89
Compound 2	24.29 \pm 0.22
Compound 3	912.79 \pm 3.36
Compound 4	816.27 \pm 2.32
Compound 5	1 175.87 \pm 4.57
Compound 6	22.87 \pm 0.21
Compound 7	na
Compound 8	na
Compound 9	na
Compound 10	26.75 \pm 0.42
Acarbose	18.72 \pm 0.02

Data derived from three independent experiments were statistically analyzed, and the results are presented as mean \pm SD ($n=3$). na: not active.

2.4 EPR 技术检测部分单体化合物对自由基的抑制作用

DPPH 作为一种稳定的自由基，可直接在室温下检测得到 EPR 信号，且在短时间内不会

发生衰变。利用电子顺磁共振技术研究了不同浓度的化合物 2、10 和阳性对照 Vc 对 DPPH 自由基的清除能力。如图 4 所示，DPPH 自由基 EPR 信号为五重峰，随着化合物 2 浓度的升高而变小，峰型保持不变，只是高度发生了变化。根据公式(5) DPPH 清除率的计算公式，可以得到化合物 2、10 和阳性对照 Vc 对 DPPH 自由基的清除率如表 4，从表 4 的 EPR 检测结果中发现化合物 2、10 对 DPPH 自由基的清除能力优于对照 Vc 的效果，与表 2 中的 DPPH 实验结果相吻合，进一步验证了化合物 2、10 对 DPPH 自由基的强抑制能力。

OH^\cdot 自由基是一种短寿命的自由基，在水溶液中寿命只有 10^{-6} s，在室温下不能直接检测得到 EPR 信号，必须加入自由基捕获剂 DMPO 才能形成较稳定的自由基，即自旋加合物。本文利用 EPR 技术，研究了部分单体化合物对通过 Fenton 反应产生的 OH^\cdot 自由基的清除能力。如图 5 所示，DMPO-OH 的 EPR 信号为四重峰，信号强度比为 1:2:2:1，DMPO-OH 信号强度随着化合

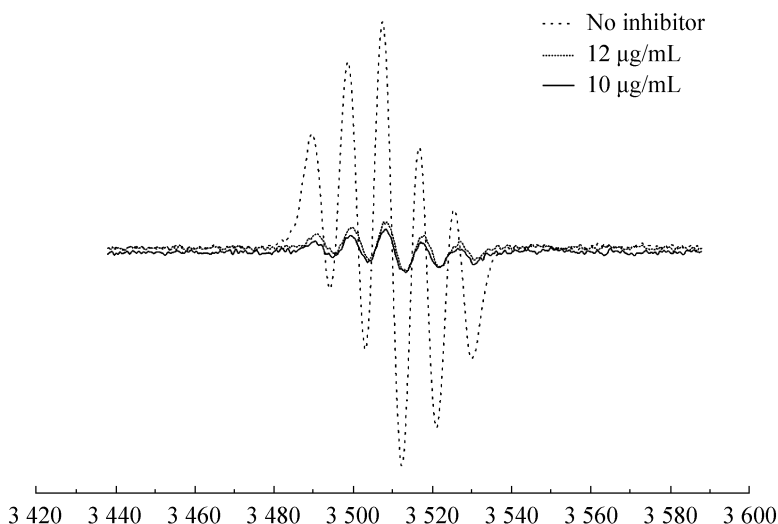


图 4 不同浓度的化合物 2 对 DPPH 的清除作用的 EPR 谱图

Figure 4 EPR spectra of DPPH after adding different concentrations of compound 2.

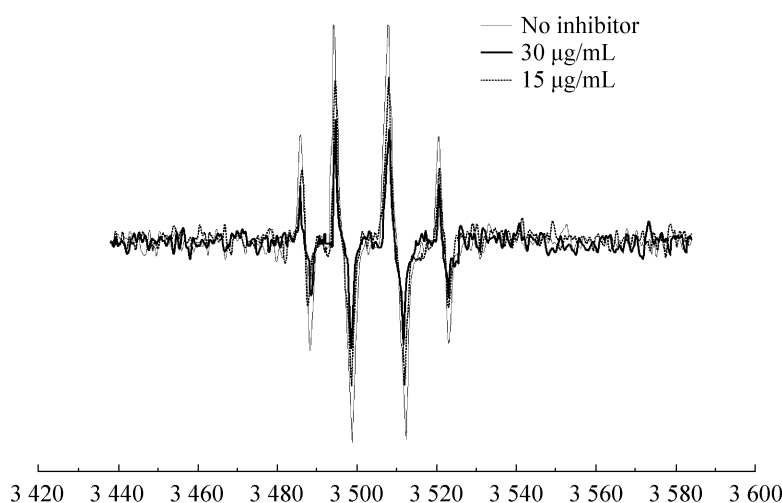


图 5 不同浓度的化合物 2 对 OH^\cdot 清除作用的 EPR 谱图

Figure 5 EPR spectra of OH^\cdot after adding different concentrations of compound 2.

表 4 2 种化合物对 DPPH 的清除率

Table 4 DPPH scavenging rates of two compounds

DPPH scavenging rates/%	Sample concentration ($\mu\text{g/mL}$)						DPPH scavenging activity (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)
	12	10	8	6	5	4	
Compound 2	91.87	85.26	75.16	64.49	54.83	45.24	4.53
Compound 10	84.45	80.95	72.68	47.38	42.17	38.26	5.80
Vc	78.35	65.83	57.84	44.71	38.27	35.58	6.37

表 5 2 种化合物对 OH^\cdot 的清除率

Table 5 OH^\cdot scavenging rates of two compounds

OH^\cdot scavenging rates/%	Sample concentration ($\mu\text{g/mL}$)						OH^\cdot scavenging activity (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)
	35	30	25	20	15	10	
Compound 2	61.62	52.49	45.45	34.26	25.06	18.32	27.88
Compound 10	53.96	48.03	41.57	32.85	24.61	17.13	31.88
Vc	49.57	44.85	35.76	25.34	19.59	14.82	36.33

物 2 浓度的升高而变小, 四重峰的峰形基本保持不变, 只是高度发生了变化。根据公式(6) OH^\cdot 自由基清除率的计算公式, 可以得到化合物 2、10 和阳性对照 Vc 对 OH^\cdot 自由基的清除率如表 5, 从表 5 的 EPR 检测结果中发现化合物 2、10 对 OH^\cdot 自由基的清除能力优于对照 Vc 的效果, 与表 2 中的 OH^\cdot 自由基实验结果相吻合, 进一步验证了化合物 2、10 对 OH^\cdot 自由基的强抑制能力。

3 讨论与结论

本文综合运用硅胶柱层析、反相 C_{18} 柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析等色谱分离方法对紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物进行了药效化学成分分离纯化和鉴定工作, 从乙酸乙酯提取物中分离得到 10 个化合物, 最后通过对化合物的波谱数据 ($^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、

HR-ESI-MS 等谱图)和化合物的理化性质进行分析鉴别,并参考相应文献对单体化合物的结构进行解析鉴定。10 个化合物分别为 FMO-ALLO-THR(TBU)-OH (1)、quercetin (2)、hesperetin (3)、monascin (4)、monasphilone A (5)、oleanolic acid (6)、 β -sitosterol (7)、ergosterol (8)、indole-3-carboxylic acid (9)、chlorogenic acid (10)。其中化合物 1 为新天然产物,补充了该化合物的 ^1H 和 ^{13}C 谱图,化合物 2、6、9、10 为首次从红曲菌科中发现。从鉴定的化合物类型来看,紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物中分离并鉴定的化合物,其中包括 2 个聚酮类化合物,2 个甾体类化合物,1 个萜类化合物,1 个氨基酸衍生物,2 个黄酮类化合物,1 个生物碱类化合物,1 个苯丙素类化合物。苯丙素类化合物是首次从真菌红曲科中分离得到,增加了红曲菌科中化合物的结构类型。在体外抗氧化活性和抑制 α -葡萄糖苷酶活性上发现,紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物中的化学成分具有良好的抗氧化活性和 α -葡萄糖苷酶抑制活性。体外抗氧化活性试验中,对自由基清除能力较强的化合物主要是黄酮类化合物和苯丙素类化合物,并首次采用 EPR 技术对紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物的抗氧化活性进行了验证,与试验结果相吻合;而在抑制 α -葡萄糖苷酶活性上除了化合物 oleanolic acid 表现较好以外,黄酮类化合物和苯丙素类化合物也有较好的抑制活性。我们推测红曲霉中抗氧化和抑制 α -葡萄糖苷酶活性的药效物质基础可能主要是黄酮类化合物和苯丙素类化合物。通过对紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物化学成分的研究,进一步丰富了真菌界的化学成分信息,而且为其药效物质基础的研究提供了参考性依据以及次级代谢产物的生物合成提供了思路。

如今,人们越来越关注天然来源的抗氧化

剂、降血糖药、抗癌药和抗病毒药,因为它们通常被认为比合成药物的毒性更小,副作用更少。紫色红曲霉 Mp-21 是宝贵的微生物种质资源,可以提供很多有益于健康的活性成分,并可作为潜在的抗氧化剂和 α -葡萄糖苷酶抑制剂来源,具有开发成功能性食品和药物补充剂的潜力。因此,也就有必要对紫色红曲霉 Mp-21 生物活性化合物的原理和临床有效性进行进一步研究,促使红曲霉制品标准化并合理使用。

参考文献

- [1] Liao ZZ, Zhang JY, Liu B, Yan TX, Xu FX, Xiao F, Wu B, Bi KS, Jia Y. Polysaccharide from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) improves antioxidant capacity via PI3K/AKT pathways and Nrf2 translocation in a type 2 diabetes model. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2019, 24(10): 1906.
- [2] Tofighi Z, Alipour F, Hadavinia H, Abdollahi M, Hadjiakhoondi A, Yassa N. Effective antidiabetic and antioxidant fractions of *Otostegia Persica* extract and their constituents. *Pharmaceutical Biology*, 2014, 52(8): 961–966.
- [3] Harper W, Clement M, Goldenberg R, Hanna A, Main A, Retnakaran R, Sherifali D, Woo V, Yale JF. Pharmacotherapy du diabete de type 2. *Canadian Journal of Diabetes*, 2013, 37(2013): 428–436.
- [4] Chukwujekwu JC, Rengasamy KRR, de Kock CA, Smith PJ, Slavetinska LP, van Staden J. Alpha-glucosidase inhibitory and antiplasmodial properties of terpenoids from the leaves of *Buddleja saligna* Willd. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(1): 63–66.
- [5] Penumala M, Zinka RB, Shaik JB, Mallepalli SKR, Vadde R, Amooru DG. Phytochemical profiling and *in vitro* screening for anticholinesterase, antioxidant, antiglycosidase and neuroprotective effect of three traditional medicinal plants for Alzheimer's disease and diabetes mellitus dual therapy. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 18(1): 77.
- [6] Nyenwe EA, Jerkins TW, Umpierrez GE, Kitabchi AE. Management of type 2 diabetes: evolving strategies for

- the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, 2011, 60(1): 1–23.
- [7] Potipiranun T, Adisakwattana S, Worawalai W, Ramadhan R, Phuwapraisirisan P. Identification of pinocembrin as an anti-glycation agent and alpha-glucosidase inhibitor from fingerroot (*Boesenbergia rotunda*): the tentative structure-activity relationship towards MG-trapping activity. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2018, 23(12): 1–13.
- [8] Natheer H. Diabetes, oxidative stress, antioxidants and saliva: a review. *Oxidative Stress and Diseases*, 2012, 4: 302–310.
- [9] Gawlik K, Naskalski JW, Fedak D, Pawlica-Gosiewska D, Grudzien U, Dumnicka P, Malecki MT, Solnica B. Markers of antioxidant defense in patients with type 2 diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 2352361.
- [10] Luo Y, Peng B, Wei WQ, Tian XF, Wu ZQ. Antioxidant and anti-diabetic activities of polysaccharides from *Guava* leaves. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2019, 24(7): 1343.
- [11] Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, 2005, 4(5): 1–11.
- [12] Shao YC, Xu L, Chen FS. Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers. *Mycoscience*, 2011, 52(4): 224–233.
- [13] Feng YL, Shao YC, Chen FS. *Monascus* pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(6): 1421–1440.
- [14] Huang CH, Shiu SM, Wu MT, Chen WL, Wang SG, Lee HM. Monacolin K affects lipid metabolism through SIRT1/AMPK pathway in HepG2 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 2013, 36(12): 1541–1551.
- [15] Dhakal R, Bajpai VK, Baek K. Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(4): 1230–1241.
- [16] Li JJ, Shang XY, Li LL, Liu MT, Zheng JQ, Jin ZL. New cytotoxic azaphilones from *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice). *Molecules: Basel, Switzerland*, 2010, 15(3): 1958–1966.
- [17] Hsu WH, Lee BH, Chang YY, Hsu YW, Pan TM. A novel natural Nrf2 activator with PPAR gamma-agonist (monascin) attenuates the toxicity of methylglyoxal and hyperglycemia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 272(3): 842–851.
- [18] Nozaki H, Date S, Kondo H, Kiyohara H, Takaoka D, Tada T, Nakayama M. Ankalactone, a new α,β -unsaturated γ -lactone from *Monascus anka*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(3): 899–900.
- [19] 王嘉琦, 张琪, 江北, 吕梦霞, 蒋冬花. 色素生物合成相关 *PigE* 基因的缺失对紫色红曲霉 Mp-21 黄色素种类和产量的影响. *微生物学报*, 2019, 59(8): 1547–1560.
- Wang JQ, Zhang Q, Jiang B, Lv MX, Jiang DH. Deletion of *PigE*, a pigment biosynthesis-related gene, upregulates the varieties and yields of yellow pigments in *Monascus purpureus* Mp-21. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(8): 1547–1560. (in Chinese)
- [20] Kosakowska O, Baczek K, Przybyl JL, Pioro-Jabrucka E, Czupa W, Synowiec A, Gniewosz M, Costa R, Mondello L, Weglarz Z. Antioxidant and antibacterial activity of roseroot (*Rhodiola rosea* L.) dry extracts. *Molecules*, 2018, 23(7): 1767.
- [21] Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, 217(2/3): 213–220.
- [22] Ser HL, Palanisamy UD, Yin WF, Abd Malek SN, Chan KG, Goh BH, Lee LH. Presence of antioxidative agent, pyrrolo[1, 2-a]pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov.. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 854.
- [23] Chen F, Huang GL, Yang ZY, Hou YP. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 673–680.
- [24] Siddharth S, Vittal R. Evaluation of antimicrobial, enzyme inhibitory, antioxidant and cytotoxic activities of partially purified volatile metabolites of *Marine Streptomyces* sp. S2A. *Microorganisms*, 2018, 6(3): 72.
- [25] 周丽芳, 朱翔, 赵红莉, 蓝闽波, 史新梅. 电子顺磁共振对五种中草药抗氧化活性的研究. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(3): 318–323.
- Zhou LF, Zhu X, Zhao HL, Lan MB, Shi XM. Study on antioxidant activities of traditional Chinese

- medicines by electron paramagnetic resonance technique. *Natural Product Research and Development*, 2014, 26(3): 318–323. (in Chinese)
- [26] Chu HW, Wu HT, Lee YJ. Regioselective hydroxylation of 2-hydroxychalcones by dimethyldioxirane towards polymethoxylated flavonoids. *Tetrahedron*, 2004, 60(11): 2647–2655.
- [27] Correia-Da-silva M, Sousa E, Duarte B, Marques F, Carvalho F, Cunha-Ribeiro LM, Pinto MMM. Flavonoids with an oligopolysulfated moiety: a new class of anticoagulant agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54(1): 95–106.
- [28] Lv J, Qian GF, Chen L, Liu H, Xu HX, Xu GR, Zhang BB, Zhang C. Efficient biosynthesis of natural yellow pigments by *Monascus purpureus* in a novel integrated fermentation system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(4): 918–925.
- [29] Hsu YW, Hsu LC, Liang YH, Kuo YH, Pan TM. Monaphilones A-C, three new antiproliferative azaphilone derivatives from *Monascus purpureus* NTU 568. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(14): 8211–8216.
- [30] Wu CJ, Cui X, Yu PF, Yang MS, Zhang YX, Liu XM, Qu GW. Triterpenic acids from *Sorbaria sorbifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2019, 55(3): 580–582.
- [31] Morocho V, Sarango D, Cruz-Eraza C, Cumbicus N, Cartuche L, Suarez AI. Chemical constituents of *Croton thurifer* kunth as α -glucosidase inhibitors. *Records of Natural Products*, 2019, 14(1): 31–41.
- [32] Yang ZD, Li ZJ, Zhao JW, Sun JH, Yang LJ, Shu ZM. Secondary metabolites and PI3K inhibitory activity of *colletotrichum gloeosporioides*, a fungal endophyte of *Uncaria rhynchophylla*. *Current Microbiology*, 2019, 76(7): 904–908.
- [33] 易乾坤, 李波, 刘吉开. 假酸浆中新的醉茄内酯类化合物. *植物分类与资源学报*, 2012, 34(1): 101–106.
Yi QK, Li B, Liu JK. New withanolides from *Nicandra physaloides* (Solanaceae). *Plant Diversity and Resources*, 2012, 34(1): 101–106. (in Chinese)
- [34] Kwon OS, Choi JS, Islam MN, Kim YS, Kim HP. Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and its constituents. *Archives of Pharmacal Research*, 2011, 34(9): 1561–1569.

(本文责编 张晓丽)