



海洋来源杂色曲霉次级代谢产物及其抗植物病原细菌活性

付兵^{1,2}, 王美¹, 刘建阳², 林伟², 张成省¹, 赵栋霖¹

(¹中国农业科学院烟草研究所海洋农业研究中心, 山东青岛 266101; ²福建省烟草公司南平市公司, 福建南平 353000)

摘要:【目的】针对植物细菌病害日趋严重, 并缺少有效防治药剂的问题, 从前期筛选获得的具有抗菌活性且次级代谢产物丰富的海洋杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) D5 发酵提取物中分离纯化单体化合物, 分析鉴定其化学结构, 并进行抗菌活性评价, 阐明目标真菌的抗菌活性成分, 为新颖结构抗菌生物农药的研发提供先导化合物。【方法】综合运用正/反相硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析和半制备高效液相色谱 (HPLC) 等方法分离纯化单体化合物, 采用核磁、质谱等现代波谱分析方法对单体化合物进行结构鉴定; 采用微量稀释法对化合物进行抗 6 种植物病原细菌燕麦食酸菌 (*Acidovorax avenae*)、胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*)、密执安棒形杆菌 (*Clavibacter michiganensis*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 活性评价, 获得活性化合物的最小抑菌浓度 (MIC)。【结果】从海洋杂色曲霉 D5 马铃薯葡萄糖液体发酵培养基乙酸乙酯提取物中分离鉴定了 12 个化合物, 包括 4 个 2-羰基-4-苯基喹啉生物碱, viridicatin (1)、3-*O*-methylviridicatin (2)、3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) 和 3-*O*-methylviridicatol (4); 2 个双氧代哌嗪生物碱, (+)-cyclophenol (5) 和 (-)-cyclophenol (6); 3 个喹啉 fumiquinazolines 生物碱及其衍生物, versicoloid A (7)、chrysopiperazine C (8) 和 cottoquinazoline A (9); 以及 3 个蒽醌类化合物, versiconol (10)、averufin (11) 和 noraverufanin (12)。抗菌活性结果表明, 2-羰基-4-苯基喹啉生物碱 3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) 具有显著的抗植物病原细菌活性, 对青枯雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌的 MIC 分别为 50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。初步的构效关系分析表明, C-6 位置的甲氧基可能是该类化合物发挥抗植物病原细菌作用的关键基团。【结论】海洋杂色曲霉 D5 代谢产物丰富, 能够产生结构多样的生物碱和蒽醌类化合物。从其发酵产物中分离鉴定了 9 个生物碱类化合物和 3 个蒽醌类化合物, 其中 3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) 对青枯雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌具有显著的抗菌活性, 有开发成为抗菌生物农药的潜力。

关键词: 海洋真菌; 杂色曲霉; 生物碱; 蒽醌; 结构鉴定; 植物病原细菌

Secondary Metabolites from a Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor* and Their Anti-Phytopathogenic Bacterial Activity

FU Bing^{1,2}, WANG Mei¹, LIU JianYang², LIN Wei², ZHANG ChengSheng¹, ZHAO DongLin¹

(¹Marine Agriculture Research Center, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong; ²Nanping Branch, Fujian Tobacco Company, Nanping 353000, Fujian)

Abstract: 【Objective】 Plant bacterial diseases are becoming more and more serious, and lack of control pesticides. The objective of this study is to isolate bioactive compounds from the previously obtained marine-derived fungus *Aspergillus*

收稿日期: 2020-02-29; 接受日期: 2020-05-08

基金项目: 国家自然科学基金 (41806194)、山东省农业重大应用技术创新项目 (SD2019ZZ002)、福建省农业科技项目 (201735070024072, 201735000024112)

联系方式: 付兵, E-mail: fb1501@163.com. 通信作者赵栋霖, E-mail: zhaodonglin@caas.cn

versicolor D5 with antibacterial activity and abundant secondary metabolites, identify their chemical structures, evaluate their anti-phytopathogenic bacterial activity, so that to clarify the antibacterial components of the target fungus. This research will provide lead compounds for the discovery of new antibacterial pesticides. 【Method】 The compounds were isolated by silica gel column chromatography (CC), octadecylsilyl silica gel CC, Sephadex LH-20 CC, and semipreparative HPLC, and were identified by modern spectral analysis methods including NMR and MS spectra. In addition, the antibacterial activity of the isolated compounds towards six phytopathogenic bacteria, including *Acidovorax avenae*, *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris*, was evaluated by double dilution method to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC). 【Result】 Twelve compounds were isolated and identified from the ethyl acetate extract of the marine-derived fungus *A. versicolor* D5 fermented by potato dextrose water media, including four 4-aryl-quinolin-2-one alkaloids, viridicatin (1), 3-*O*-methylviridicatin (2), 3,6-*O*-dimethylviridicatin (3), and 3-*O*-methylviridicatinol (4), two dioxopiperazine alkaloids, (+)-cyclophenol (5) and (-)-cyclophenol (6), three fumiquinazolines alkaloids and their derivatives, versicoloid A (7), chrysopiperazine C (8), and cottoquinazoline A (9), and three anthraquinone derivatives, versiconol (10), averufin (11), and noraverufanin (12). Among them, a 4-aryl-quinolin-2-one alkaloid, 3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) exhibited an obvious antibacterial activity against *R. solanacearum* and *X. campestris* with MIC values of 50 and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The structure activity relationship analysis revealed that the methoxy group at C-6 might play an important role in anti-phytopathogenic bacterial activity. 【Conclusion】 The metabolites of *A. versicolor* D5 are abundant, which can produce alkaloids and anthraquinones with various structures. Among them, nine alkaloids and three anthraquinones were obtained from cultures of D5. 3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) exhibited clear antibacterial activities towards *R. solanacearum* and *X. campestris*.

Key words: marine-derived fungus; *Aspergillus versicolor*; alkaloid; anthraquinone; structural identification; phytopathogenic bacteria

0 引言

【研究意义】随着世界人口数量的不断增长, 避免饥饿、保障粮食安全显得尤为重要, 因此, 需要控制植物病害的发生, 增加和保证粮食的产量^[1-2]。植物病原细菌在世界农业生产历史上曾经多次造成重大影响, 作物细菌病害是导致农作物减产、人口数量下降和社会动荡的客观因素之一^[3]。已知的植物病原细菌有 200 多个属, 其中最重要的包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、雷尔氏菌属 (*Ralstonia*)、农杆菌属 (*Agrobacterium*)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、木质部小菌属 (*Xylella*) 和果胶杆菌属 (*Pectobacterium*)^[4-6]。目前防治植物细菌病害的方法主要是采用抗病品种、加强田间管理和轮作等方式, 但效果有限^[4]; 防治的药剂主要为化学农药, 容易造成环境污染、食品安全和病原抗性等一系列问题^[4,7]。一直以来, 农用硫酸链霉素都是我国农作物细菌病害防治的主力军, 而随着我国停止使用农用硫酸链霉素, 植物细菌病害的防治面临巨大挑战。随着国家大力推行发展绿色农业, 更加注重环境友好, 研发新型高效低毒的抗菌生物农药迫在眉睫。【前人研究进展】众所周知, 海洋真菌由于生活在高盐、高压、低温、低氧、少光和寡营养的海洋环境中, 拥有独特的生存策略, 经过长期的进化演变形成了不同

于陆地真菌的特殊代谢机制, 能够产生种类繁多、结构新颖、生物活性显著的次级代谢产物, 因而近年来成为研究的热点^[8]。许多海洋真菌次级代谢产物具有明显的抗菌活性, 显示出了作为新型抗菌农药的巨大开发潜力^[9]。然而, 对于这些化合物的抗菌活性研究大多集中在人类医学领域, 关于农业领域的研究和应用还很少, 但仅有的少量研究展现了极其可观的研究价值和前景。UCHIDA 等^[10]从一株未鉴定的海洋真菌发酵粗提物中分离获得了两个聚酮类化合物 chlorogentisylquinone 和 gentisylquinone, 它们在 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ 的浓度下对水稻黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae*) 的抑菌圈分别为 9 和 10 mm, 表现出了较强的抑菌活性; SWATHI 等^[11]对海洋来源的一株曲霉 (*Aspergillus* sp.) 发酵提取物进行抗菌活性研究, 发现其对野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 具有较强的抑菌活性, 在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下抑菌圈达到 12 mm, 有望从中发现强活性抗菌化合物; SILBER 等从一株海水来源的真菌 *Calcarisporium* sp. KF525 发酵液中分离获得了一个二十四元大环内酯类化合物 calcaride A, 其对野油菜黄单胞菌显示了中等强度的抑菌活性, 最小抑菌浓度 (MIC) 为 5.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[12]; 随后, 该小组发现分离自波罗的海和南极海域的两株 Lindgomycetaceae 所产聚酮类化合物 lindgomycin 和 ascosetin, 对野油菜黄单胞菌的 IC_{50} 分别为 17.8 和 14.8

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]^[13]; HENRIQUEZ 等^[14]从南极海域采集的海绵中分离获得了 101 株真菌,发现其中 11 株真菌的发酵提取物对密执安棒形杆菌 (*Clavibacter michiganensis*) 具有抑菌活性,22 株真菌的提取物对野油菜黄单胞菌表现出了明显的抑菌活性;NIU 等^[15]对分离自深海来源真菌 *Spiromastix* sp. MCCC 3A00308 的多酚类化合物进行研究,发现 spiromastols A 和 C 表现出极强的抗植物病原细菌活性,对野油菜黄单胞菌、假单胞菌 (*Pseudomonas lachrymans*)、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 的 MIC 达到 $0.25\text{--}0.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,活性强于阳性药氯霉素,具有开发成为抗细菌农药的潜力;WANG 等^[16]对一株海胆来源的亮白曲霉 (*Aspergillus candidus*) HDf2 进行研究,从中获得了两个具有抗菌活性的刺孢青霉酸类化合物 spiculisporic acid F 和 G,它们对青枯雷尔氏菌显示了中等强度的抑菌活性;CHEN 等^[17]对一株海藻来源的格孢腔菌 (*Pleosporales* sp.) 所产混源菇类次级代谢产物进行研究,发现 pleosporallins D 和 E 对密执安棒形杆菌显示了中等活性的抑菌活性, MIC 为 $9.48\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。【本研究切入点】笔者课题组在前期研究中,从山东沿海和海南海洋特殊红树林生境中分离纯化了 200 余株海洋真菌,通过初步的形态学排重后,对其进行了种属鉴定。对其中近 80 株真菌进行小规模发酵,测试其发酵产物乙酸乙酯提取物的抗植物病原细菌活性,筛选得到多株抗菌活性显著的海洋真菌^[18-19]。其中,一株海藻来源的杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) D5,其发酵提取物对青枯雷尔氏菌等植物病原细菌表现出了明显的抗菌活性。HPLC 指纹图谱分析发现,D5 次级代谢产物丰富,结构类型多样,产量较大,有望从中发现抗菌活性化合物。【拟解决的关键问题】从杂色曲霉 D5 发酵产物中分离、纯化单体化合物,并采用多种谱学方法对其进行结构鉴定,进而对单体化合物进行抗植物病原细菌活性测试并分析构效关系,阐明目标菌株的活性成分及活性化合物的关键作用基团,为海洋真菌来源高效低毒生物农药的研发提供化合物基础。

1 材料与方法

试验于 2017—2019 年在中国农业科学院烟草研究所海洋农业研究中心/滩涂生物资源保护利用创新团队完成。

1.1 仪器与试剂

核磁共振波谱仪 Agilent DD2 500 (美国安捷伦公司);质谱仪 ESI-MS Q-TOF Ultima Global GAA076 (美国 Waters 公司)和 Q-TOF maXis (美国 Bruker 公司);高效液相色谱仪 (日本日立公司);C18 柱: ($5\mu\text{m}$, $10\text{mm}\times 250\text{mm}$, 美国 Waters 公司);旋转蒸发仪 Hei-VAP Industrial-glassware set R (德国 Heidoph 公司);LRH-250 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司);正相柱层析硅胶 100—200、200—300 目 (青岛海洋化工厂);凝胶 Sephadex LH-20 (美国 GE 公司);正相 TLC 预制板 (烟台汇有硅胶开发有限公司);马铃薯葡萄糖水培养基 (青岛海博生物技术有限公司);马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (青岛海博生物技术有限公司);HPLC 用甲醇和乙腈为色谱纯 (国药集团),其他试剂均为分析纯。

1.2 菌株发酵与培养

1.2.1 菌株来源 海洋真菌分离自山东青岛沿海一种未鉴定的海藻,通过形态学及分子生物学鉴定方法确定为杂色曲霉 D5。菌种于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为 CGMCC NO. 15386。

1.2.2 菌株发酵与培养 500 mL 的发酵瓶中倒入 250 mL 马铃薯葡萄糖水 (PDW) 培养基,灭菌。挑取生长于马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上的目标菌株加入其中,共发酵 10 瓶。摇床 (180r/min , 28°C) 振荡培养 72 h,获得种子液。将 400 mL PDW 培养基加入容量为 1 L 的发酵瓶中,加入粗海盐使其浓度为 3%,灭菌,共发酵 80 L。取种子液 5 mL 分别加入 400 mL PDW 培养基中,于 28°C 静置培养 30 d。

发酵结束后,用纱布将菌体和发酵液过滤分开,发酵液采用乙酸乙酯萃取两遍,浓缩至干;菌体采用乙酸乙酯浸泡菌体一次,后采用二氯甲烷:甲醇=1:1 浸泡一遍,浓缩后,将未干的溶液用乙酸乙酯萃取 3 遍,浓缩至干,与菌液提取物合并,得到发酵提取物 26.8 g。

1.3 化合物分离纯化

将发酵提取物进行减压硅胶柱层析,以乙酸乙酯-石油醚 (0—100%)、甲醇-乙酸乙酯 (0—100%) 为流动相进行梯度洗脱,分为 7 个组分 (Fr.1—Fr.7)。Fr.2 (1.6 g) 经 ODS 反相硅胶柱层析梯度洗脱 (甲醇-水, 60%—100%), 后经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (二氯甲烷-甲醇, 1/1) 得到 Fr.2-1—Fr.2-5。Fr.2-5 经反相 HPLC (70% 乙腈-水加 0.1% 三氟乙酸, $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 纯化制备后得到 11 (28.1 mg) 和 12 (11.5

mg)。Fr.3 (4.5 g) 经正相硅胶柱层析(乙酸乙酯-石油醚, 5%—100%)分离, 后经过 ODS 反相硅胶柱层析梯度洗脱, 流动相采用 30%—100%甲醇-水, 得到 Fr.3-1—Fr.3-6。Fr.3-2 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(二氯甲烷-甲醇, 1/1), 得到 6 (236.3 mg)。Fr.3-4 经过与 Fr.3-2 相同的分离步骤后, 得到 1 (38.1 mg)。Fr.3-5 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(二氯甲烷-甲醇, 1/1), 后经过 100 : 1 二氯甲烷/甲醇正相硅胶柱层析纯化, 得到 Fr.3-5-1—Fr.3-5-3。Fr.3-5-1 经 HPLC (60%甲醇-水, $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 分离纯化后得到 7 (46.7 mg)。Fr.3-5-2 和 Fr.3-5-3 分别在二氯甲烷-甲醇=1/1 溶液中重结晶, 得到 2 (13.6 mg) 和 3 (5.4 mg)。Fr.3-6 经过反复的正相硅胶柱层析, 最后通过 HPLC 制备, 流动相为 75%甲醇-水, 得到 8 (14.0 mg)。Fr.4 (3.3 g) 经过 30%—90%甲醇-水 ODS 反相硅胶柱层析梯度洗脱, 后经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(二氯甲烷-甲醇, 1/1) 纯化, 得到 Fr.4-1—Fr.4-4。Fr.4-2 在二氯甲烷-甲醇混合液中重结晶, 得到 5 (118.4 mg)。Fr.4-3 经过 HPLC 纯化, 流动相为 45%甲醇-(水+0.1%三氟乙酸), 得到 4 (5.1 mg)。Fr.4-3 经 HPLC 50%甲醇-水制备, 得到 10 (35.8 mg)。Fr.5 (2.4 g) 经过 ODS 反相硅胶柱层析梯度洗脱(甲醇-水, 30%—90%), 然后通过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(二氯甲烷-甲醇, 1/1) 分离, 最后经反相 HPLC (55%甲醇-水, $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 制备, 得到 9 (48.0 mg)。

1.4 抗菌活性测定

病原细菌: 燕麦食酸菌 (*Acidovorax avenae*)、胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*)、密执安棒形杆菌、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、青枯雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌。

采用微量稀释法, 测试化合物对几种植物病原细菌的 MIC^[20]。病原菌振荡培养至对数期, 并稀释至 10^6 cfu/mL 。将待测化合物用 DMSO 配成 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 母液。每种病原菌采用单独的 96 孔板进行测试。在 96 孔板第 1 列的第 1 孔加 198 μL 菌液, 余下 2—8 孔各加 100 μL 菌液。吸取 2 μL 化合物母液加入第 1 孔, 混合均匀。采用二倍稀释法将 1—8 孔依次稀释, 即从第一孔中吸取 100 μL 含药菌液加入第 2 孔混匀后, 从第 2 孔吸取 100 μL 含药菌液加入第 3 孔, 并混匀, 以此类推。到第 8 孔混匀后, 移除 100 μL 含药菌液, 使每孔都含有 100 μL 含药菌液, 后再每孔加入 100 μL 菌液, 使每孔体积达到 200 μL 。每个化合物重复 3 列。用无菌培养基作空白对照, 并设立未加化合物的菌液

对照, DMSO 作阴性对照, 空白对照和阴性对照分别做 3 个孔, 硫酸链霉素做阳性对照, 测试方法与化合物相同。将 96 孔板放入生物培养箱中, 37°C 培养 24 h, 酶标仪 600 nm 波长下测量吸光度, 并结合肉眼观察, 以吸光度出现大幅度变化, 且最后一个澄清的孔对应的浓度, 作为化合物 MIC 值。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 为白色晶体, 质谱 ESIMS 给出分子离子峰 $m/z\ 254.1\ [M+H]^+$, 结合其氢谱和碳谱, 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3$, 不饱和度为 11。在 $^1\text{H}\text{NMR}$ 中给出了 8 个芳香氢信号, 提示分子中存在 2 个苯环。在 $^{13}\text{C}\text{NMR}$ 中, 低场区给出了 14 个芳香碳和烯碳信号以及 1 个酰胺碳信号 $\delta_{\text{C}}\ 160.5$, 其中包括 2 个连氧的 sp^2 杂化碳信号 $\delta_{\text{C}}\ 158.7$ 和 143.0 , 结合其分子式, 提示分子中存在 2 个羟基。以上数据与文献报道的化合物 viridicatol 数据一致^[21], 故鉴定化合物 1 为 viridicatol (图 1)。

核磁共振谱数据: $^1\text{H}\text{-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta_{\text{H}}\ 7.34$ (2H, m, H-7, H-8), 7.31 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$, H-15), 7.24 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$, H-6), 7.11 (1H, m, H-5), 6.87 (1H, m, H-14), $6.80\text{—}6.82$ (2H, m, H-12, H-16); $^{13}\text{C}\text{-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): $\delta_{\text{C}}\ 160.5$ (C-2), 158.7 (C-13), 143.0 (C-3), 136.1 (C-4), 134.3 (C-9), 130.6 (C-11), 128.0 (C-15), 127.3 (C-7), 126.3 (C-5), 123.8 (C-6), 123.0 (C-10), 122.1 (C-16), 117.9 (C-12), 116.5 (C-8), 116.0 (C-14); ESIMS: $m/z\ 254.1\ [M+H]^+$ 。

化合物 2 为白色晶体, ESIMS: $m/z\ 252.1\ [M+H]^+$, 结合其氢谱和碳谱, 推测分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_2$, 不饱和度为 11。 $^1\text{H}\text{NMR}$ 谱 $\delta_{\text{H}}\ 12.66$ 处给出 1 个酰胺氢特征信号, 低场区给出了 9 个芳香氢信号, 以上信息结合 TLC 特征, 推测 2 与 1 为同系列化合物。在 $^{13}\text{C}\text{-NMR}$ 中, $\delta_{\text{C}}\ 161.1$ 提示酰胺碳的存在; 在低场区给出了 14 个碳信号, 包括 5 个季碳和 9 个叔碳; $\delta_{\text{C}}\ 60.4$ 处的信号提示分子中存在 1 个甲氧基。以上数据经过与文献对比, 确定化合物 2 为 3-O-methylviridicatin^[22] (图 1)。

核磁共振谱数据: $^1\text{H}\text{-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}}\ 12.66$ (1H, s, NH-1), 7.53 (2H, t, $J=7.5\text{ Hz}$, H-13, H-15), 7.49 (1H, d, $J=7.5\text{ Hz}$, H-14), 7.45 (1H, t, $J=7.5\text{ Hz}$, H-7), 7.38 (2H, d, $J=7.5\text{ Hz}$,

H-12, H-16), 7.23 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-5), 7.12 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-6), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_c 161.1 (C-2), 145.2 (C-3), 139.4 (C-4), 135.5 (C-9), 133.5 (C-11), 129.4 (C-12, C-16), 128.8 (C-14), 128.4 (C-13, C-15), 128.2 (C-7), 126.4 (C-5), 122.6 (C-6), 120.9 (C-10), 116.0 (C-8), 60.4 (3-OCH₃); ESIMS: m/z 252.1 [M + H]⁺.

化合物 3 为白色晶体, ESIMS 质谱中在 m/z 282.1 [M + H]⁺ 处给出分子离子峰, 结合氢谱和碳谱, 推测分子式为 C₁₇H₁₅NO₃, 不饱和度为 11。仔细分析其 ¹H-NMR 和 ¹³C NMR 数据, 发现 3 的核磁数据与 2 十分相似。与 2 相比, 3 少了 1 个芳香氢信号, 同时增加了 1 个甲氧基信号 δ_H 3.67, δ_c 55.5, 提示该分子中的 1 个芳香氢被甲氧基取代。经过与文献数据比对, 确定化合物 3 为 3,6-*O*-dimethylviridicatin^[23] (图 1)。

核磁波谱数据: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H 12.11 (1H, s, NH-1), 7.53 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-13, H-15), 7.47 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-14), 7.41 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-8), 7.37 (2H, m, H-12, H-16), 7.07 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz, H-7), 6.65 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-5), 3.83 (3H, s, 3-OCH₃), 3.67 (3H, s, 6-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_c 160.3 (C-2), 155.2 (C-6), 145.7 (C-3), 138.9 (C-4), 133.5 (C-11), 129.9 (C-9), 129.3 (C-12, C-16), 128.5 (C-13, C-15), 128.3 (C-14), 121.7 (C-10), 117.5 (C-7), 117.0 (C-8), 108.6 (C-5), 60.3 (3-OCH₃), 55.5 (6-OCH₃); ESIMS: m/z 282.1 [M + H]⁺.

化合物 4 为白色粉末, ESIMS: m/z 268.1 [M + H]⁺, 结合氢谱和碳谱, 推测其分子式为 C₁₆H₁₃NO₃。¹H-NMR 中 δ_H 12.07 和 9.64 处给出 2 个活泼氢信号, 分别对应酰胺氢和羟基氢; 低场区给出 8 个芳香氢信号; δ_H 3.69 信号提示分子中存在 1 个甲氧基。¹³C-NMR 中 δ_c 158.5 和 157.3 证明了酰胺碳和连氧芳香碳的存在; δ_c 59.5 证明了甲氧基的存在。化合物 4 与 2 十分相似, 不同之处在于多了 1 个苯环上的羟基。经过与文献数据比对, 确定化合物 4 为 3-*O*-methylviridicatin^[23] (图 1)。

核磁波谱数据: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 12.07 (1H, s, NH-1), 9.64 (1H, s, 15-OH), 7.41 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-7), 7.34 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-8), 7.30 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-13), 7.09 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-6), 7.04 (1H, d, $J=7.5$ Hz,

H-5), 6.85 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-14), 6.71 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-12), 6.68 (1H, s, H-16), 3.69 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ_c 158.5 (C-2), 157.3 (C-15), 144.9 (C-3), 137.6 (C-4), 135.7 (C-9), 134.7 (C-11), 129.5 (C-13), 128.6 (C-7), 125.8 (C-5), 121.9 (C-6), 119.9 (C-10), 119.7 (C-12), 116.0 (C-16), 115.1 (C-8), 115.0 (C-14), 59.5 (3-OCH₃); ESIMS: m/z 268.1 [M + H]⁺.

化合物 5 为白色晶体, ESIMS: m/z 311.1 [M + H]⁺, 结合化合物 ¹H 和 ¹³C NMR, 推断分子式为 C₁₇H₁₄N₂O₄, 不饱和度为 12。¹H-NMR 中给出了 8 个芳香氢信号, 1 个连氧次甲基 δ_H 4.07 和 1 个氮甲基信号 δ_H 3.19; ¹³C-NMR 中给出 12 个芳香碳信号包括 1 个连氧芳香碳信号, 提示分子中存在 2 个苯环; 另外还给出 2 个酰胺碳信号 δ_c 168.6 和 168.4 以及 1 个氮甲基碳信号 δ_c 31.7。以上数据表明化合物 5 为 dioxopiperazine 类衍生物, 经过与文献进行比对, 确定化合物 5 为 (+)-cyclophenol^[24] (图 1)。

核磁波谱数据: ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_H 7.55 (1H, m, H-8), 7.15 (3H, m, H-6, H-7, H-9), 7.01 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-17), 6.71 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-16), 6.12 (2H, m, H-14, H-18), 5.48 (1H, s, 15-OH), 4.07 (1H, s, H-10), 3.19 (3H, s, H-19); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_c 168.6 (C-2), 168.4 (C-5), 158.4 (C-15), 136.4 (C-11), 134.0 (C-8), 133.5 (C-13), 132.2 (C-6), 130.2 (C-17), 128.0 (C-12), 126.1 (C-7), 122.3 (C-9), 118.5 (C-18), 117.0 (C-16), 113.9 (C-14), 71.6 (C-3), 65.9 (C-10), 31.7 (C-19); ESIMS: m/z 311.1 [M + H]⁺.

化合物 6 为白色晶体, HRESIMS: m/z 311.1028 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₇H₁₄N₂O₄, 不饱和度为 12。¹H NMR 中 δ_H 7.52 (1H, dt, $J=8.0, 1.5$ Hz), 7.14 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.09 (1H, dt, $J=8.0, 1.0$ Hz), 7.01 (1H, dd, $J=8.0, 1.0$ Hz) 提示分子中存在 1,2-二取代苯环; δ_H 6.97 (1H, t, $J=8.0$ Hz), 6.66 (1H, dd, $J=8.0, 1.5$ Hz), 6.11 (1H, m), 6.00 (1H, d, $J=8.0$ Hz) 提示分子中存在 1,3-二取代苯环; ¹³C NMR 中给出 2 个酰胺碳信号 δ_c 166.0 和 165.4, 1 个氮甲基信号即与氢谱对应的芳香碳信号。以上数据与化合物 5 极为相似, 且分子量相同, 仔细与文献比对其核磁数据, 确定化合物 6 为 (-)-cyclophenol^[23] (图 1)。

核磁波谱数据: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{H} 7.52 (1H, dt, $J=8.0, 1.5$ Hz, H-8), 7.14 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-9), 7.09 (1H, dt, $J=8.0, 1.0$ Hz, H-7), 7.01 (1H, dd, $J=8.0, 1.0$ Hz, H-6), 6.97 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-17), 6.66 (1H, dd, $J=8.0, 1.5$ Hz, H-16), 6.11 (1H, m, H-14), 6.00 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-18), 4.23 (1H, s, H-10), 3.06 (3H, s, H-19); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{C} 166.0 (C-2), 165.4 (C-5), 156.9 (C-15), 135.1 (C-11), 132.4 (C-8), 132.3 (C-13), 130.5 (C-6), 128.9 (C-17), 126.5 (C-12), 124.3 (C-7), 121.1 (C-9), 117.0 (C-18), 115.7 (C-16), 112.8 (C-14), 70.1 (C-3), 63.8 (C-10), 30.9 (C-19); HRESIMS: m/z 311.1028 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 333.0849 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。

化合物 7 为黄色粉末, 结合其 ESIMS、 ^1H 和 ^{13}C NMR, 判断分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$, 不饱和度为 9。 ^1H NMR 中 δ_{H} 7.54 (1H, s) 给出 1 个 NH 信号, 6.16 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-8), 5.77 (1H, s, H-11), 5.49 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-9), 给出 3 个芳香氢信号; δ_{H} 5.10 给出 1 个连氮氢信号; δ_{H} 3.69 给出 1 个甲氧基氢信号; δ_{H} 1.13、1.11、0.98 和 0.84 处给出 4 个甲基信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ 给出 2 个酰胺碳信号 δ_{C} 167.3 和 161.4, 4 个季碳信号, 7 个次甲基碳信号, 1 个亚甲基碳信号, 1 个甲氧基碳信号和 4 个甲基碳信号。以上数据与文献报道的 versicoloid A 极为相似, 仔细对比核磁数据, 确定化合物 7 为 versicoloid A^[23] (图 1)。

核磁波谱数据: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7.54 (1H, s, NH-2), 6.16 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-8), 5.77 (1H, s, H-11), 5.49 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-9), 5.10 (1H, d, $J=5.5$ Hz, H-15), 4.46 (1H, s, H-3), 3.69 (3H, s, H-20), 2.62 (1H, m, H-16), 2.26 (1H, m, H-21), 1.20 (2H, m, H-17), 1.13 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-19), 1.11 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-23), 0.98 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-22), 0.84 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 167.3 (C-1), 161.4 (C-13), 159.6 (C-6), 156.8 (C-10), 152.9 (C-4), 144.3 (C-8), 115.5 (C-9), 109.3 (C-12), 94.8 (C-11), 60.6 (C-15), 59.2 (C-3), 55.1 (C-20), 36.9 (C-16), 32.4 (C-21), 23.0 (C-17), 20.0 (C-22), 17.8 (C-23), 15.8 (C-19), 12.0 (C-18); ESIMS: m/z 360.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

化合物 8 为白色粉末, 根据 HRESIMS 数据, 判断分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ 。化合物 8 的核磁数据与 7 很

相似, 主要的区别在于 2 个化合物的 1,2,4-三取代芳香环 (8: $\delta_{\text{C/H}}$ C/H-7, C/H-8, C/H-10, 129.6/7.65, 125.1/7.38, 106.4/7.65 vs 7: C/H-8, C/H-9, C/H-11, 144.3/6.16, 115.5/5.49, 94.8/5.77)。同时, 化合物 8 中多了 1 个甲氧基信号 $\delta_{\text{C/H}}$ C/H-7, 51.1/3.92。进一步仔细分析其核磁数据, 并与文献进行比对, 确定化合物 8 为 chrysopiperazine C^[25] (图 1)。

核磁波谱数据: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7.65 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-7, H-10), 7.38 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-8), 6.99 (1H, s, NH-2), 5.23 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-14), 3.92 (3H, s, H-22), 3.27 (3H, s, H-23), 2.96 (1H, m, H-18), 2.53 (1H, m, H-15), 1.27 (1H, m, H-20b), 1.23 (3H, m, H-17), 1.10 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-19), 1.04 (1H, m, H-20a), 0.95 (6H, m, H-16, H-21); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 170.3 (C-1), 161.5 (C-12), 159.2 (C-9), 144.9 (C-4), 140.6 (C-6), 129.6 (C-7), 125.1 (C-8), 121.5 (C-11), 106.4 (C-10), 88.7 (C-3), 60.9 (C-14), 56.0 (C-22), 51.1 (C-23), 36.4 (C-18), 33.6 (C-15), 25.3 (C-20), 20.2 (C-17), 19.8 (C-16), 12.6 (C-21), 11.1 (C-19)。HRESIMS: m/z 374.2078 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 396.1897 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。

化合物 9 为淡黄色粉末, ESIMS: m/z 430.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 结合其 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据, 推断其分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 在 δ_{H} 8.10 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.83 (1H, t, $J=7.5$ Hz), 7.72 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.52 (1H, t, $J=7.0$ Hz) 给出信号, 以及 7.39 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 7.27 (2H, m), 7.07 (1H, dd, $J=7.0, 4.5$ Hz) 给出信号, 提示分子中存在 2 个 1,2-二取代苯环。 $^{13}\text{C-NMR}$ 中 δ_{C} 167.8、165.6 和 159.4 给出 3 个酰胺碳信号; 低场区给出 13 个芳香碳信号; 此外还给出了 4 个次甲基信号, 1 个亚甲基信号和 1 个甲基信号。以上数据经过与文献进行比对, 确定化合物 9 为 cottoquinazoline A^[26] (图 1)。

核磁波谱数据: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{H} 9.05 (1H, d, $J=4.0$ Hz, NH-2), 8.10 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-10), 7.83 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-8), 7.72 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 7.52 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-9), 7.39 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-27), 7.27 (2H, m, H-24, H-25), 7.07 (1H, dd, $J=7.0, 4.5$ Hz, H-26), 5.57 (1H, s, 17-OH), 5.24 (2H, m, H-3, H-14), 4.85 (1H, s, H-18), 4.07 (1H, q, $J=6.5$ Hz, H-20), 3.05 (1H, dd, $J=15.0, 5.0$ Hz,

H-15b), 2.40 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-15a), 1.47 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-29); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{C} 167.8 (C-1), 165.6 (C-21), 159.4 (C-12), 147.5 (C-4), 146.7 (C-6), 139.8 (C-28), 136.0 (C-23), 134.5 (C-8), 129.3 (C-25, C-26), 127.3 (C-7), 127.2 (C-9), 126.2 (C-10), 124.4 (C-27), 120.7 (C-11), 113.8 (C-24), 79.8 (C-18), 74.1 (C-17), 65.5 (C-3), 63.4 (C-20), 53.9 (C-14), 36.1 (C-15a), 14.8 (C-29); ESIMS: m/z 430.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

化合物 10 为橘红色粉末, 质谱中在 m/z 361.1 处给出 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 分子离子峰, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据, 推断其分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$, 不饱和度为 11。其 HPLC 吸收与 TLC 特征提示该 10 为蒽醌类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ 中低场区给出 3 个芳香氢信号, 高场区给出 1 个亚甲基、1 个次甲基信号和 1 个甲基信号, 同时给出 2 个连氧亚甲基信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ 中给出 2 个羰基碳信号, 12 个芳香碳信号, 2 个连氧碳信号。以上数据经过与文献进行比对, 确定化合物 10 为 versiconol^[27] (图 1)。

核磁波谱数据: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{H} 12.74 (1H, s, 1-OH), 12.09 (1H, s, 8-OH), 11.17 (2H, s, 3-OH, 6-OH), 7.14 (1H, s, H-5), 7.02 (1H, s, H-4), 6.50 (1H, s, H-7), 3.67 (2H, m, H-1'), 3.45 (1H, m, H-2'), 3.28 (2H, m, H-4'), 1.90 (2H, s, H-3'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{C} 189.0 (C-9), 181.3 (C-10), 165.0 (C-6), 164.2 (C-8), 163.5 (C-3), 163.1 (C-1), 135.0 (C-11), 132.2 (C-14), 122.9 (C-2), 108.8 (C-4), 108.6 (C-5, C-8a), 108.2 (C-9a), 108.1 (C-7), 62.8 (C-1'), 60.1 (C-4'), 35.3 (C-2'), 32.6 (C-3'); ESIMS: m/z 361.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

化合物 11 为橘红色粉末, 通过 HRESIMS: m/z 367.0819 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 判断分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_7$, 不饱和度为 13。其 HPLC 吸收提示 11 与 10 为同系列蒽醌化合物, 但不饱和度和碳个数均多了 2。 $^1\text{H-}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 显示 2 个化合物蒽醌骨架一致, 区别仅在于 11 的分子中多了 2 个环结构 (δ_{C} 101.1 (C-5'), 66.1 (C-1'), 35.2 (C-2'), 27.4 (C-4'), 26.9 (C-6'), 15.4 (C-3') δ_{H} 5.15 (H-1'), 1.40—1.92 (H-2', 3', 4'), 1.50 (H-6'))。仔细分析其核磁数据, 确定化合物 11 为 averufin^[27] (图 1)。

核磁波谱数据: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{H} 12.29 (1H, s, 1-OH), 11.92 (1H, s, 8-OH), 11.30 (1H, s, 6-OH), 6.95 (1H, s, H-5), 6.83

(1H, s, H-4), 6.46 (1H, s, H-7), 5.15 (1H, s, H-1'), 1.40—1.92 (6H, m, H-2', 3', 4'), 1.50 (3H, s, H-6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{C} 188.6 (C-9), 180.5 (C-10), 165.2 (C-8), 164.2 (C-1), 159.8 (C-6), 158.1 (C-3), 134.6 (C-4a), 132.9 (C-10a), 115.9 (C-2), 108.9 (C-5), 108.4 (C-9a), 108.2 (C-8a), 107.9 (C-7), 107.1 (C-4), 101.1 (C-5'), 66.1 (C-1'), 35.2 (C-2'), 27.4 (C-4'), 26.9 (C-6'), 15.4 (C-3')。HRESIMS: m/z 367.0819 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

化合物 12 为橘红色粉末, 通过高分辨质谱, 推断其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_7$, 不饱和度为 12。仔细分析 12 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据, 发现其也是一个蒽醌类化合物, 比 10 多了 1 个不饱和度, 碳个数比 10 多了 2 个, 提示 10 比 12 多了 1 个环结构。化合物 12 蒽醌骨架的核磁数据与 10 十分相似, 不同之处在于两个化合物的高场区。经过与文献进行比对, 确定化合物 12 为 noraverufanin^[28] (图 1)。

核磁波谱数据: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{H} 12.78 (1H, s, 1-OH), 12.10 (1H, s, 8-OH), 11.27 (1H, s, 6-OH), 10.72 (1H, s, 3-OH), 7.11 (1H, s, H-5), 7.09 (1H, s, H-4), 6.58 (1H, s, H-7), 4.96 (1H, d, $J=14.0$ Hz, H-1'), 3.61 (1H, m, H-5'), 1.30—1.97 (6H, m, H-2', 3', 4'), 1.16 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{C} 188.8 (C-9), 181.1 (C-10), 165.1 (C-6), 164.2 (C-8), 162.7 (C-3), 161.6 (C-1), 134.9 (C-10a), 133.3 (C-4a), 120.0 (C-2), 108.8 (C-5), 108.7 (C-9a), 108.7 (C-8a), 108.4 (C-4), 108.1 (C-7), 74.6 (C-1'), 73.0 (C-5'), 32.4 (C-2'), 28.2 (C-4'), 23.4 (C-3'), 21.9 (C-6')。HRESIMS: m/z 369.0987 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

2.2 抗菌活性

对化合物 1—12 进行抗燕麦食酸菌、胡萝卜软腐欧文氏菌、密执安棒形杆菌、丁香假单胞菌、青枯雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌活性测试, 发现在初筛浓度为 200 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下, 仅 3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) 对青枯雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌表现出了显著的抗植物病原细菌活性。进一步测试其 MIC, 化合物 3 对青枯雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌的 MIC 分别为 50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (表 1), 阳性药硫酸链霉素的 MIC 为 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) 对其余 4 种植物病原细菌没有明显的抑菌活性。

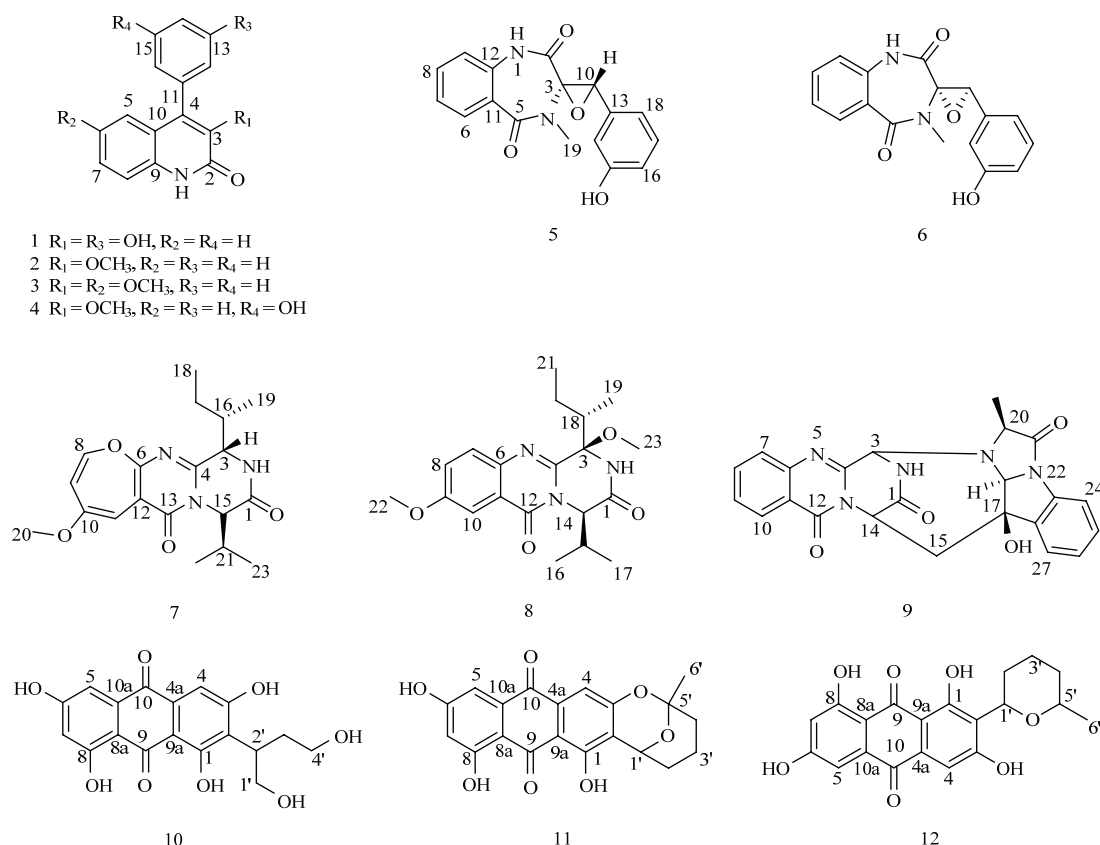


图1 化合物1—12的化学结构图

Fig. 1 The chemical structure of compounds 1-12

3 讨论

本研究从一株海洋杂色曲霉 D5 发酵提取物中分离鉴定了 12 个化合物, 包括 4 个 2-羰基-4-苯基喹啉生物碱(1—4)、2 个双氧代哌嗪生物碱(5—6)、3 个喹啉 fumiquinazolines 生物碱及其衍生物(7—9)和 3 个蒽醌类化合物(10—12)。曲霉是重要的海洋真菌类群, 在海洋真菌中占有很大比例, 天然产物研究最多的海洋真菌是海洋曲霉。海洋曲霉源天然产物的研究始于 1992 年, NUMATA 等^[29]报道了首例海洋曲霉来源的新天然产物 fumiquinazolines A-C, 至 2014 年 8 月, 已报道 512 个海洋曲霉来源的新天然产物。此后, 越来越多的化合物从海洋曲霉中分离出来。2015—2018 年, 共报道了 389 个海洋曲霉来源新化合物, 这包括红树林来源的海洋曲霉, 这些化合物结构类型多样, 包括聚酮、生物碱、萜类、甾体、肽类等, 且有多种生物活性, 包括抗菌、细胞毒、抗氧化等^[8,30-32]。本文所获得的 4 种结构类型化合物在海洋

曲霉中均有过报道。

自然界中的 2-羰基-4-苯基喹啉生物碱只由真菌产生, 生源途径是由邻氨基苯甲酸衍生而来, 目前发现的该类化合物大部分来自于青霉菌, 亚热带、温带、寒带环境的青霉中均发现了该类化合物的存在, 其中也包括海洋青霉^[33]。2-羰基-4-苯基喹啉生物碱的生物活性报道较少, 多数研究没有发现其明显的生物活性, 但该类化合物抗肿瘤活性显著。WEI 等^[21]从一株红树来源的青霉 *Penicillium* sp. 发酵提取物中分离鉴定了一个新的 2-羰基-4-苯基喹啉生物碱 viridicatol, 通过核磁及单晶衍射确定了其结构, 并发现该化合物对人非小细胞肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MCF7、人白血病细胞 K56 具有显著的抑制活性, IC_{50} 在 $16.5\text{--}80.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; HE 等^[34]从一株海水来源的杨奇青霉 (*Penicillium janczewskii*) 中获得了 4 种化合物, 测试了它们对 8 种肿瘤细胞的细胞毒活性, 其中 3*R**,4*R**-dihydroxy-4-(4'-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-2(1*H*)-quinolinone 对人卵巢癌细胞 SKOV-3

表 1 化合物 3 对青桔雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌抑菌数据
Table 1 Antibacterial activity of compound 3 towards *R. solanacearum* and *X. campestris*

化合物浓度 Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加药 Dose 青桔雷尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>		加药 Dose 野油菜黄单胞菌 <i>X. campestris</i>	
	OD ₆₀₀ 值	OD ₆₀₀ value	OD ₆₀₀ 值	OD ₆₀₀ value
200		0.0917		—
		0.0885		—
		0.0835		—
100		0.0902		0.0891
		0.0947		0.0790
		0.0958		0.0788
50		0.1364		1.0253
		0.1504		1.0450
		0.1448		1.0277
25		0.2496		1.0800
		0.2457		1.0953
		0.2458		1.0898
12.5		0.4333		1.0911
		0.4246		1.0891
		0.4340		1.1001
6.25		—		1.1058
		—		1.0913
		—		1.0943

未加药菌液 OD₆₀₀ 分别为 0.4733 (青桔雷尔氏菌)、1.1362 (野油菜黄单胞菌) The OD₆₀₀ of un-treated bacteria solution is 0.4733 (*R. solanacearum*) and 1.1362 (*X. campestris*), respectively; 空白对照 OD₆₀₀ 分别为 0.0711 (青桔雷尔氏菌)、0.0763 (野油菜黄单胞菌) The OD₆₀₀ of blank control is 0.0711 (*R. solanacearum*) and 0.0763 (*X. campestris*), respectively。"—": 未测试 No test

表现出了中等的毒性, quinolinonepeniprequinolone 表现出了强的非选择性细胞毒活性。也有研究报道了 2-羰基-4-苯基喹啉生物碱对革兰氏阳性菌中等的抑制活性, PAN 等^[35]从螃蟹来源的杂色曲霉 XZ-4 发酵物中分离鉴定出 3,6-Odimethylviridicatin 和 9-hydroxy-3-methoxyviridicatin, 发现它们对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 具有中等的抗菌活性, MIC 为 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在本研究中所获得的 4 个 2-羰基-4-苯基喹啉生物碱中, 只有 3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) 表现了显著的抗植物病原细菌活性。分析其结构特征发现, 3 与 1、2、4 结构上的不同之处主要体现在 C-6 多了 1 个甲氧基, 该甲氧基可能是化合物发挥抗植物病原细菌作用的关键基团。同时, 文献中报道了 9-hydroxy-3-methoxyviridicatin 对大肠杆菌的抑菌作用, 表明 8-OH 可能也是该类化合物发挥抗菌作用的重要基团。

喹啉 fumiquinazolines 生物碱是一类结构新颖独特的化合物, 结构特征为包含一个 pyrazino [2,1-*b*]quinazoline-3,6-dione 母核, 并连接一个吡啶。自 1992 年首次发现以来, 目前共发现了 80 多个该类化合物, 主要由陆地和海洋真菌代谢产生, 这类化合物及其前体具有十分显著的生物活性, 包括抗肿瘤、抗菌, 尤其是在化疗药物方面具有显著疗效^[36]。本研究获得了一个喹啉 fumiquinazolines 生物碱 (9) 和两个未连吡啶的喹啉生物碱 (7、8), 据文献报道, 其中 8 和 9 的生物活性显著, 而并未发现 7 明显的生物活性。FREMLIN 等^[26]从澳大利亚海沙来源的杂色曲霉中分离获得化合物 9, 通过核磁及 Marfey 反应确定了它的结构, 活性测试发现了其抗菌作用; WANG 等^[23]从一株深海来源的杂色曲霉发酵液中获得了化合物 8 和 9, 对几种植物病原菌尖孢炭疽菌 (*Colletotrichum acutatum*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 和尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 表现出了显著的抑菌活性, 特别是化合物 8 对尖孢炭疽菌的抑制效果强于阳性药放线菌酮。本研究发现, 所获得的喹啉 fumiquinazoline 生物碱及其衍生物均没有抗植物病原细菌活性, 该类化合物结构复杂, 新颖度高, 且文献报道了它们的抗植物病原真菌活性。因此, 值得继续挖掘该类化合物的结构多样性, 从中发现抗真菌生物农药先导化合物。

4 结论

从一株海藻来源的杂色曲霉 D5 发酵培养基中分离鉴定了 9 个生物碱类化合物 (1—9) 和 3 个萜醌类化合物 (10—12)。其中, 2-羰基-4-苯基喹啉生物碱 3,6-*O*-dimethylviridicatin (3) 对青桔雷尔氏菌和野油菜黄单胞菌等植物病原细菌具有显著的抗菌活性, 6-OCH₃ 可能是该类化合物抗菌作用的关键基团。

References

[1] GODFRAY H C J, BEDDINGTON J R, CRUTE I R, HADDAD L, LAWRENCE D, MUIR J F, PRETTY J, ROBINSON S, THOMAS S M, TOULMIN C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 2010, 327(5967): 812-818.

[2] LAMBERTH C, JEANMART S, LUKSCH T, PLANT A. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. *Science*, 2013, 341(6147): 742-746.

[3] 钱韦. 《微生物学通报》与中国植物相关细菌研究 40 年. *微生物*

- 学通报, 2014, 41(3): 445-449
- QIAN W. Microbiology China and 40 years study on plant-associated bacteria. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 445-449. (in Chinese)
- [4] SUNDIN G W, CASTIBLANCO L F, YUAN X, ZENG Q, YANG C H. Bacterial disease management: Challenges, experience, innovation and future prospects. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(9): 1506-1518.
- [5] BUTTIMER C, MCAULIFFE O, ROSS R P, HILL C, O'MAHONY J, COFFEY A. Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 34.
- [6] 冯洁. 植物病原细菌分类最新进展. 中国农业科学, 2017, 50(12): 2305-2314.
- FENG J. Recent advances in taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(12): 2305-2314. (in Chinese)
- [7] GUAN A, LIU C, YANG X, DEKEYSER M. Application of the intermediate derivatization approach in agrochemical discovery. *Chemical Reviews*, 2014, 114(14): 7079-7107.
- [8] CARROLL A R, COPP B R, DAVIS R A, KEYZERS R A, PRINSEP M R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2020, 37(2): 175-223.
- [9] WIESE J, IMHOFF J F. Marine bacteria and fungi as promising source for new antibiotics. *Drug Development Research*, 2019, 80(1): 24-27.
- [10] UCHIDA R, TOMODA H, ARAI M, OMURA S. Chlorogentisylquinone, a new neutral sphingomyelinase inhibitor, produced by a marine fungus. *The Journal of Antibiotics*, 2001, 54(11): 882-889.
- [11] SWATHI J, SOWJANYA K M, NARENDRA K, REDDY K V N R, SATYA A K. Isolation, identification & production of bioactive metabolites from marine fungi collected from coastal area of Andhra Pradesh, India. *Journal of Pharmacy Research*, 2013, 6(6): 663-666.
- [12] SILBER J, OHLENDORF B, LABES A, ERHARD A, IMHOFF J F. Calcarides A-E, antibacterial macrocyclic and linear polyesters from a *Calcarisporium* strain. *Marine Drugs*, 2013, 11(9): 3309-3323.
- [13] WU B, WIESE J, LABES A, KRAMER A, SCHMALJOHANN R, IMHOFF J F. Lindgomycin, an unusual antibiotic polyketide from a marine fungus of the Lindgomycetaceae. *Marine Drugs*, 2015, 13(8): 4617-4632.
- [14] HENRIQUEZ M, VERGARA K, NORAMBUENA J, BEIZA A, MAZA F, UBILLA P, ARAYA I, CHAVEZ R, SAN-MARTIN A, DARIAS J, DARIAS M J, VACA I. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(1): 65-76.
- [15] NIU S, LIU D, PROKSCH P, SHAO Z, LIN W. New polyphenols from a deep sea *Spiromastix* sp. fungus, and their antibacterial activities. *Marine Drugs*, 2015, 13(4): 2526-2540.
- [16] WANG R, GUO Z K, LI X M, CHEN F X, ZHAN X F, SHEN M H. Spiculisporic acid analogues of the marine-derived fungus, *Aspergillus candidus* strain HDf2, and their antibacterial activity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 108(1): 215-219.
- [17] CHEN C J, ZHOU Y Q, LIU X X, ZHANG W J, HU S S, LIN L P, HUO G M, JIAO R H, TAN R X, GE H M. Antimicrobial and anti-inflammatory compounds from a marine fungus, *Pleosporeles* sp.. *Tetrahedron Letters*, 2015, 56(45): 6183-6189.
- [18] ZHAO D L, WANG D, TIAN X Y, CAO F, LI Y Q, ZHANG C S. Anti-phytopathogenic and cytotoxic activities of crude extracts and secondary metabolites of marine-derived fungi. *Marine Drugs*, 2018, 16(1): 36.
- [19] HUANG R H, GOU J Y, ZHAO D L, WANG D, LIU J, MA G Y, LI Y Q, ZHANG C S. Phytotoxicity and anti-phytopathogenic activities of marine-derived fungi and their secondary metabolites. *RSC Advances*, 2018, 8(66): 37573-37580.
- [20] OPPONG-DANQUAH E, BUDNICKA P, BLUMEL M, TASDEMIR D, TASDEMIR D. Design of fungal co-cultivation based on comparative metabolomics and bioactivity for discovery of marine fungal agrochemicals. *Marine Drugs*, 2020, 18(2): 73.
- [21] WEI M Y, YANG R Y, SHAO C L, WANG C Y, DENG D S, SHE Z G, LIN Y C. Isolation, structure elucidation, crystal structure, and biological activity of a marine natural alkaloid, viridicatol. *Chemistry of Natural Compounds*, 2011, 47(2): 322-325.
- [22] HODGR R P, HARRIS C M, HARRIS T M. Verrucofortine, a major metabolite of *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, the fungus that produces the mycotoxin verrucosidin. *Journal of Natural Products*, 1988, 51(1): 66-73.
- [23] WANG J, HE W, HUANG X, TIAN X, LIAO S, YANG B, WANG F, ZHOU X, LIU Y. Antifungal new oxepine-containing alkaloids and xanthenes from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor* SCSIO 05879. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(14): 2910-2916.
- [24] LI J, WANG J, JIANG C S, LI G, GUO Y W. (+)-Cyclopamol, a new naturally occurring 7-membered 2,5-dioxopiperazine alkaloid from the fungus *Penicillium sclerotiorum* endogenous with the Chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2014, 16(5): 542-548.
- [25] XU W F, MAO N, XUE X J, QI Y X, WEI M Y, WANG C Y, SHAO C L. Structures and absolute configurations of diketopiperazine

- alkaloids chrysopiperazines A-C from the gorgonian-derived *Penicillium chrysogenum* fungus. *Marine Drugs*, 2019, 17(5): 250.
- [26] FREMLIN L J, PIGGOTT A M, LACEY E, CAPON R J. Cottoquinazoline A and cotteslosins A and B, metabolites from an Australian marine-derived strain of *Aspergillus versicolor*. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(4): 666-670.
- [27] FREDENHAGEN A, HUG P, SAUTER H, PETER H H. Paecilquinones A, B, C, D, E, and F: New potent inhibitors of protein tyrosine kinase produced by *Paecilomyces carneus*. II. Characterization and structure determination. *The Journal of Antibiotics*, 1995, 48(3): 199-204.
- [28] BRAUERS G, EDRADA R A, EBEL R, PROKSCH P, WRAY V, BERG A, GRAEFE U, SCHAECHTELE C, TOTZKE F, FINKENZELLER G, MARME D, KRAUS J, MUENCHBACH M, MICHEL M, BRINGMANN G, SCHAUMANN K. Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: Novel inhibitors of protein kinases. *Journal of Natural Products*, 2000, 63(6): 739-745.
- [29] NUMATA A, TAKAHASHI C, MATSUSHITA T, MIYAMOTO T, KAWAI K, USAMI Y, MATSUMURA E, INOUE M, OHISHI H, SHINGU T. Fumiquinazolines, novel metabolites of a fungus isolated from a saltfish. *Tetrahedron Letters*, 1992, 33(12): 1621-1624.
- [30] CARROLL A R, COPP B R, DAVIS R A, KEYZERS R A, PRINSEP M R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2019, 36(1): 122-173.
- [31] BLUNT J W, CARROLL A R, COPP B R, DAVIS R A, KEYZERS R A, PRINSEP M R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2018, 35(1): 8-53.
- [32] BLUNT J W, COPP B R, KEYZERS R A, MUNRO M H G, PRINSEP M R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2017, 34(3): 235-294.
- [33] MICHAEL J P. Quinoline, quinazoline, and acridone alkaloids. *Natural Product Reports*, 2008, 25(1): 166-187.
- [34] HE J, LION U, SATTLER I, GOLLMICK F A, GRABLEY S, CAI J, MEINERS M, SCHUENKE H, SCHAUMANN K, DECHERT U, KROHN M. Diastereomeric quinolinone alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium janczewskii*. *Journal of Natural Products*, 2005, 68(9): 1397-1399.
- [35] PAN C, SHI Y, CHEN X, CHEN C T A, TAO X, WU B. New compounds from a hydrothermal vent crab-associated fungus *Aspergillus versicolor* XZ-4. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2017, 15(5): 1155-1163.
- [36] RESENDE D I S P, BOONPOTHONG P, SOUSA E, KIJJOA A, PINTO M M M. Chemistry of the fumiquinazolines and structurally related alkaloids. *Natural Product Reports*, 2019, 36(1): 7-34.

(责任编辑 岳梅)