

海鞘内生真菌棒曲霉 *Aspergillus clavatus* AS-107 的化学成分研究

宋琦^{1,2}, 李晓明¹, 胡雪怡¹, 杨遂群¹, 王斌贵^{1,3}

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 对海鞘内生真菌棒曲霉 *Aspergillus clavatus* AS-107 的次级代谢产物进行了化学研究。利用反相和正相硅胶柱层析、制备薄层层析(pTLC)以及葡聚糖凝胶柱层析等色谱方法从其发酵产物中分离得到 7 个喹唑啉酮生物碱类单体化合物, 并综合其理化性质和波谱数据鉴定了它们的化学结构, 分别是 norquinadoline A (1)、quinadoline A (2)、*epi*-fiscalin D (3)、fiscalin B (4)、quinadoline B (5)、prelapatin B (6)和 tryptoquivalines L (7)。对所有化合物进行了抗水产致病茵实验, 测试结果表明化合物 2 对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)具有一定的抑制作用, 其 MIC 值为 16 $\mu\text{g/mL}$; 化合物 6 对副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)有一定的抑制活性, 其 MIC 值分别为 16、32 和 32 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 海鞘; 内生真菌; 次级代谢产物; 生物碱; 抗菌活性

中图分类号: O629 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)02-0012-06
DOI: 10.11759/hyhx20190321005

近年来, 海洋微生物来源的天然产物因结构新颖多样、生物活性显著而受到化学家、生物学家和药物学家的关注^[1]。海鞘、海绵等海洋无脊椎动物分布广泛, 属于发现天然产物最多的海洋动物, 然而越来越多的证据表明, 许多从海洋无脊椎动物中分离得到具有生物活性的天然产物其真正生产者并不是动物本身, 而是它体内的微生物^[2]。海鞘为滤食性底栖海洋生物, 因而体内聚集了较多的微生物, 通过分离海鞘体内的微生物并获取天然产物是丰富天然产物研究内容的重要途径^[3-4]。

本文报道分离自海鞘新鲜组织中的棒曲霉 *A. clavatus* AS-107 的代谢产物。该菌株在 PDA 培养基上呈青绿色菌丝体和孢子。对其进行大米固体培养基静置培养发酵的方式并提取得到其次级代谢产物粗提物, 后借助多种色谱分离方法获得 7 个单体化合物, 运用核磁共振技术鉴定结构(图 1), 分别是 norquinadoline A (1)^[5]、quinadoline A (2)^[5]、*epi*-fiscalin D (3)^[6]、fiscalin B (4)^[7-8]、quinadoline B (5)^[9]、prelapatin B (6)^[5, 10-11]和 tryptoquivalines L (7)^[12]。对所有化合物进行了抗菌活性测试。

1 材料与方法

1.1 仪器、耗材和试剂

本实验所用仪器、耗材和试剂如表 1 所示。

1.2 菌株发酵

(1) 菌株: 菌株 AS-107 分离自 2016 年 10 月采集于印度尼西亚海域的海鞘。通过形态学观察法和 ITS 序列系统发育分析法^[13], 将该菌鉴定为棒曲霉 *Aspergillus clavatus*, 现存放于中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室。

(2) 菌株培养: 菌种保存在含有 20%甘油-水的保菌管中, 并于-80℃下冷藏。按照我们之前报道的发酵方法^[14], 选用大米固体培养基作为发酵培养基,

收稿日期: 2018-08-05; 修回日期: 2018-12-11

基金项目: 国家自然科学基金委员会-山东省海洋科学研究中心联合基金(U1606403)

[Foundation: NSFC-Shandong Joint Fund for Marine Science Research Centers, No. U1606403]

作者简介: 宋琦(1993-), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事海洋天然产物研究, 电话: 0532-82898890, Email: 1175817184@qq.com; 王斌贵, 通信作者, 电话: 0532-82898553, E-mail: wangbg@ms.qdio.ac.cn

在 1 L 三角瓶中加入大米 70 g、蛋白胨 0.3 g、玉米粉 0.1 g、天然过滤海水 100 mL。培养基经高温高压

灭菌后接入菌种，于 28℃ 恒温、自然光条件下静置培养 30d。

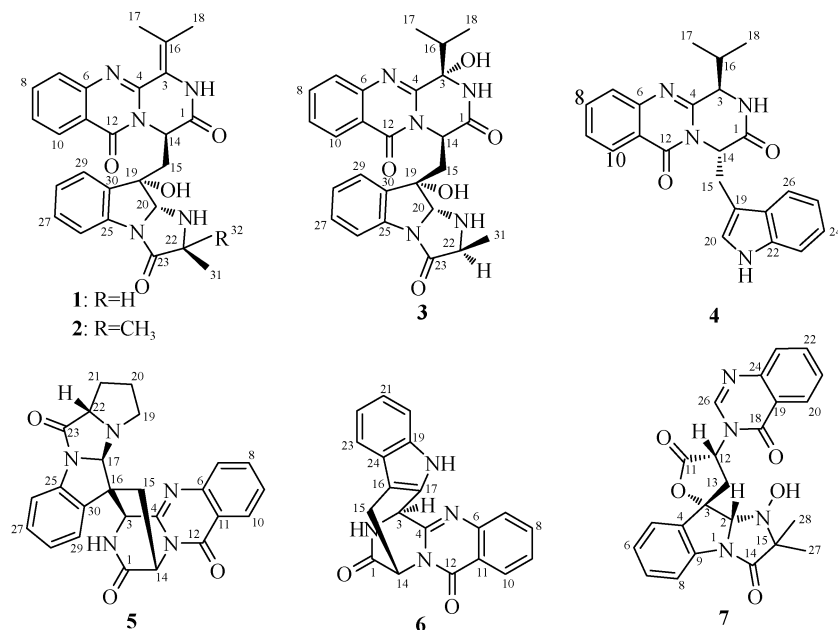


图 1 分离获得的化合物 1-7 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of the isolated compounds 1-7

表 1 实验仪器、耗材及试剂

Tab. 1 Instruments, consumables and reagents for experiments

仪器/试剂名称	型号/规格	生产厂家
自动旋光仪	Optical Activity Limited AA-55	英国 Optical Activity 公司
核磁共振仪	Bruker-Avance 500	瑞士 Bruker 公司
紫外-可见光谱仪	Gold Spectrumlab 54	上海棱光技术有限公司
薄层色谱硅胶	GF254	青岛海洋化工厂分厂
正相硅胶	100~200 目、200~300 目	青岛海洋化工厂分厂
葡聚糖凝胶	Sephadex LH-20(18~110 mm)	美国 Pharmacia 公司
96 孔板	REF3599	康宁生命科学有限公司
有机溶剂	工业级, 使用前经重新蒸馏	青岛新宇田化工有限公司

1.3 菌株次级代谢产物的提取与分离

规模发酵 100 瓶, 用乙酸乙酯对发酵产物进行萃取, 静置沉降后, 取上层有机相经减压浓缩得到粗提物 115.7 g。对其进行硅胶真空柱层析, 用有机溶剂(PE-EtOAc、CH₂Cl₂-MeOH)作为洗脱剂, 极性由小到大进行梯度洗脱。对粗分离后的样品进行 TLC 和 HPLC 检测分析, 合并得到 9 个组分(Fr.1~9)。

Fr. 5 (PE-EtOAc 1 : 1, 12.3 g)经反相硅胶柱层析、正相硅胶柱层析(CH₂Cl₂ : EtOAc=100 : 1~10 : 1)、葡聚糖凝胶 SephadexLH-20(MeOH)柱层析分离得到化合物 4 (8.8 mg)、5 (35.2 mg); Fr. 6 (CH₂Cl₂-MeOH

40: 1, 14.5 g)经反相硅胶柱层析、pTLC、葡聚糖凝胶 SephadexLH-20(MeOH)分离得到化合物 2 (18.9 mg)、7 (8.8 mg); Fr. 7 (CH₂Cl₂-MeOH 20 : 1, 30.4 g)经硅胶真空柱层析(CH₂Cl₂ : CH₃COCH₃= 20 : 1~1 : 1)、反相硅胶柱层析、正相硅胶柱层析(CH₂Cl₂ : MeOH= 200 : 1~10 : 1)、葡聚糖凝胶 SephadexLH-20(MeOH)柱层析和 pTLC 分离得到化合物 6 (5.6 mg)、1 (18.4 mg)、3 (10.8 mg)。

1.4 抑菌活性 MIC 测试

(1) 病原指示菌: 选用了 5 株水产致病细菌, 分别为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)、副溶血

性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。以上菌株均来自于中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室。

(2) 指示菌悬液制备: 将指示菌接种在 LB 培养基表面, 在 37°C 环境中静置培养 24 h, 后取适量的无菌 0.85% 氯化钠溶液洗涤培养基表面的菌落, 用无菌刮刀将其轻轻刮下。吸取适量指示菌悬液至无菌玻璃试管中, 并用 0.85% 氯化钠溶液将菌悬液稀释至 0.5 麦氏浊度(相当于 1.5×10^8 CFU/mL), 密封好备用。

(3) 样品的配制: 称取适量样品, 配置得到 6 组浓度依次减半的样品溶液(1280, 640, 320, 160, 80, 40 $\mu\text{g/mL}$)。阳性对照为氯霉素, 配制浓度梯度为 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

(4) 抑菌活性 MIC 测试: 活性实验参照我们实验室之前的研究方法^[15, 16]。进行无菌操作, 使用移液枪将提前配制好的麦氏浊度为 0.5 的指示菌悬液依次加入到无菌的 96 孔聚苯乙烯板中, 每孔 95 μL 。再以相同方式将梯度浓度的样品溶液和阳性对照分别加入到 96 孔板中, 每孔 5 μL 。将 96 孔板密封好, 并轻轻震荡混匀, 置于 37°C 恒温培养箱中, 24 h 后检测实验结果。利用酶标仪(波长为 600 nm)测定每孔的吸光值, 有效 MIC 值为该样品完全抑制指示菌生长时的最低浓度。

2 单体化合物结构鉴定和抗细菌活性结果

2.1 单体化合物结构鉴定

化合物 1: 白色固体, ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 166.8 (C, C-1), 121.4 (C, C-3), 146.8 (C, C-4), 146.8 (C, C-6), 127.2 (CH, C-7), 134.6 (CH, C-8), 126.9 (CH, C-9), 126.3 (CH, C-10), 119.6 (C, C-11), 159.7 (C, C-12), 52.0 (CH, C-14), 37.9 (CH₂, C-15), 131.2 (C, C-16), 21.1 (CH₃, C-17), 21.4 (CH₃, C-18), 75.1 (C, C-19), 81.3 (CH, C-20), 60.0 (CH, C-22), 174.6 (C, C-23), 137.8 (C, C-25), 114.9 (CH, C-26), 129.4 (CH, C-27), 124.5 (CH, C-28), 124.5 (CH, C-29), 137.9 (C, C-30), 18.1 (CH₃, C-31); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 10.13 (1H, s, NH-2), 7.67 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.85 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-8), 7.55 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-9), 8.17 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-10), 5.50 (1H, dd, $J = 7.9, 5.4$ Hz, H-14), 3.80 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-22), 2.53 (1H, m, H-15), 2.36 (1H, m, H-15), 1.97 (3H, s, H-17), 2.33 (3H, s, H-18), 5.30 (1H, s, H-20), 7.34 (1H, m, H-26), 7.34 (1H, m, H-27), 7.11 (1H, dd,

$J = 7.1, 1.9$ Hz, H-28), 7.34 (1H, m, H-29), 1.29 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-31); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 209 (4.55), 222 (4.39), 348 (3.99) nm。其波谱数据和紫外吸收与 norquinadoline A^[5]的文献报道一致。且化合物 1 的比旋光度为 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -4.1$ (c 0.10, MeOH)与文献报道的 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -2.7$ (c 0.10, MeOH)接近, 说明两者的绝对构型也相同, 由此将化合物 1 的结构鉴定为 norquinadoline A。

化合物 2: 白色固体, ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 166.9 (C, C-1), 121.5 (C, C-3), 146.8 (C, C-4), 146.9 (C, C-6), 127.1 (CH, C-7), 134.5 (CH, C-8), 126.9 (CH, C-9), 126.2 (CH, C-10), 119.6 (C, C-11), 159.8 (C, C-12), 52.3 (CH, C-14), 38.0 (CH₂, C-15), 130.7 (C, C-16), 21.1 (CH₃, C-17), 21.5 (CH₃, C-18), 74.4 (C, C-19), 78.6 (CH, C-20), 64.5 (C, C-22), 175.2 (C, C-23), 137.8 (C, C-25), 114.4 (CH, C-26), 129.6 (CH, C-27), 124.7 (CH, C-28), 124.4 (CH, C-29), 137.5 (C, C-30), 24.6 (CH₃, C-31), 24.1 (CH₃, C-32); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 10.12 (1H, s, NH-2), 7.66 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.84 (1H, m, H-8), 7.54 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-9), 8.16 (1H, dd, $J = 7.9, 0.9$ Hz, H-10), 5.47 (1H, dd, $J = 8.3, 4.5$ Hz, H-14), 2.60 (1H, dd, $J = 14.5, 4.5$ Hz, H-15), 2.44 (1H, dd, $J = 14.5, 8.4$ Hz, H-15), 1.96 (3H, s, H-17), 2.31 (3H, s, H-18), 5.59 (1H, s, 19-OH), 5.09 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-20), 7.34 (1H, m, H-26), 7.35 (1H, m, H-27), 7.11 (1H, m, H-28), 7.39 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-29), 1.21 (3H, s, H-31), 1.15 (3H, s, H-32); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 209 (4.62), 227 (4.43), 350 (4.00) nm。其波谱数据和紫外吸收与已知化合物 quinadoline A^[5]的相关数据一致。同时化合物 2 的比旋光度为 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -41.4$ (c 0.10, MeOH)与文献报道的 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -32.0$ (c 0.10, MeOH)接近, 故将该化合物鉴定为 quinadoline A。

化合物 3: 白色固体, ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 170.3 (C, C-1), 84.2 (C, C-3), 151.2 (C, C-4), 146.3 (C, C-6), 127.3 (CH, C-7), 134.8 (CH, C-8), 127.3 (CH, C-9), 126.3 (CH, C-10), 120.1 (C, C-11), 160.2 (C, C-12), 52.0 (CH, C-14), 41.1 (CH₂, C-15), 33.6 (CH, C-16), 14.4 (CH₃, C-17), 17.5 (CH₃, C-18), 75.3 (C, C-19), 81.5 (CH, C-20), 59.8 (CH, C-22), 174.8 (C, C-23), 138.4 (C, C-25), 115.0 (CH, C-26), 124.6 (CH, C-27), 124.5 (CH, C-28), 129.2 (CH, C-29), 137.9 (C, C-30), 18.0 (CH₃, C-31); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 7.68 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.84 (1H, dd, $J = 11.9, 4.9$ Hz, H-8), 7.56 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-9), 8.16 (1H, dd, $J = 7.9, 1.1$ Hz, H-10), 5.46 (1H, dd, $J = 8.2, 3.9$ Hz, H-14), 2.77 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-15), 2.69 (1H, m, H-15), 3.00 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-16), 1.11 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-17), 0.9 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-18); 5.36 (1H, s, H-20), 3.77 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-22), 7.30 (1H, m, H-26), 7.08 (1H, td, $J = 7.4, 1.3$ Hz, H-27),

7.38 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-28), 7.30 (1H, m, H-29), 1.27 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-31); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 203 (4.69), 226 (4.54), 304 (3.61), 316 (3.53) nm。其波谱数据和紫外吸收与 *epi-fiscalin D*^[6] 的文献报道一致。且化合物 **3** 的比旋光度为 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -162.5$ (c 0.10, MeOH) 与已知化合物的 $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -175.9$ (c 0.06, MeOH) 接近, 故将该化合物鉴定为 *epi-fiscalin D*。

化合物 **4**: 黄色油状液体, ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 169.5 (C, C-1), 58.2 (CH, C-3), 150.4 (C, C-4), 147.2 (C, C-6), 127.1 (CH, C-7), 134.8 (CH, C-8), 127.3 (CH, C-9), 127.0 (CH, C-10), 120.4 (C, C-11), 161.0 (C, C-12), 57.0 (CH, C-14), 27.5 (CH_2 , C-15), 29.6 (CH, C-16), 14.9 (CH_3 , C-17), 19.0 (CH_3 , C-18), 109.6 (CH, C-19), 123.7 (CH, C-20), 136.2 (C, C-22), 111.2 (CH, C-23), 122.7 (CH, C-24), 120.2 (CH, C-25), 118.9 (CH, C-26), 127.4 (C, C-27); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.66 (1H, m, NH-2), 2.63 (1H, m, H-3), 7.54 (1H, dd, $J = 15.6$, 7.6 Hz, H-7), 7.77 (1H, t, $J = 6.9$ Hz, H-8), 7.54 (1H, dd, $J = 15.6$, 7.6 Hz, H-9), 8.37 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-10), 5.66 (1H, m, H-14), 3.74 (1H, dd, $J = 15.0$, 2.3 Hz, H-15), 3.64 (1H, dd, $J = 15.0$, 5.3 Hz, H-15), 2.69 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-16), 0.64 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, H-17), 0.64 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, H-18), 6.60 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-20), 8.11 (1H, s, NH-21), 7.27 (1H, m, H-23), 7.12 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-24), 6.93 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-25), 7.43 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-26); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 219 (4.67), 274 (4.06), 290 (3.91), 305 (3.58), 319 (3.47) nm。其波谱数据和紫外吸收与 *fiscalin B*^[7-8] 文献报道一致。且化合物 **4** 的比旋光度为 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -221.5$ (c 0.10, MeOH) 与已知化合物的 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -248.1$ (c 0.06, CHCl_3) 接近, 故将化合物 **4** 鉴定为 *fiscalin B*。

化合物 **5**: 白色固体, ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 170.8 (C, C-1), 60.0 (CH, C-3), 151.3 (C, C-4), 146.8 (C, C-6), 126.9 (CH, C-7), 135.0 (CH, C-8), 127.7 (CH, C-9), 126.9 (CH, C-10), 120.6 (C, C-11), 159.0 (C, C-12), 53.0 (CH, C-14), 33.6 (CH_2 , C-15), 53.2 (C, C-16), 91.9 (CH, C-17), 56.4 (CH_2 , C-19), 24.7 (CH_2 , C-20), 29.4 (CH_2 , C-21), 69.5 (CH, C-22), 174.2 (C, C-23), 137.1 (C, C-25), 116.5 (CH, C-26), 129.2 (CH, C-27), 126.7 (CH, C-28), 123.9 (CH, C-29), 137.1 (C, C-30); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 4.66 (1H, s, H-3), 7.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.86 (1H, m, H-8), 7.60 (1H, m, H-9), 8.33 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.1 Hz, H-10), 5.71 (1H, dd, $J = 3.7$, 1.6 Hz, H-14), 3.01 (1H, dd, $J = 13.9$, 3.9 Hz, H-15), 1.86 (1H, m, H-15), 5.02 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-17), 2.45 (1H, m, H-19), 1.82 (1H, m, H-19), 1.50 (3H, m, H-20), 1.50 (3H, m, H-20), 1.97 (1H, m, H-21), 1.82 (1H, m, H-21), 3.85 (1H, m, H-22), 7.47 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-26), 7.37 (1H, td, $J = 7.8$, 1.0 Hz, H-27), 7.24 (1H, td, $J = 7.7$, 1.0 Hz, H-28), 7.60 (1H, m, H-29); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 225 (4.56),

266 (4.10), 276 (2.08), 302 (3.64), 314 (3.54) nm。其波谱数据和紫外吸收与已知化合物 *quinadoline B*^[9] 的相关数据一致。且化合物 **5** 的比旋光度为 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -58.8$ (c 0.17, MeOH) 与文献报道的 $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -44.7$ (c 0.01, MeOH) 接近, 故将该化合物鉴定为 *quinadoline B*。

化合物 **6**: 白色固体, ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 169.3 (C, C-1), 51.1 (CH, C-3), 152.2 (C, C-4), 147.0 (C, C-6), 127.0 (CH, C-7), 134.8 (CH, C-8), 127.2 (CH, C-9), 126.4 (CH, C-10), 119.4 (C, C-11), 159.2 (C, C-12), 54.4 (CH, C-14), 25.5 (CH_2 , C-15), 105.0 (C, C-16), 131.5 (C, C-17), 134.8 (C, C-19), 111.7 (CH, C-20), 122.2 (CH, C-21), 120.3 (CH, C-22), 118.2 (CH, C-23), 127.2 (C, C-24); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 9.71 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, NH-2), 5.32 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-3), 7.63 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-7), 7.81 (1H, m, H-8), 7.53 (1H, m, H-9), 8.15 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.2 Hz, H-10), 5.66 (1H, s, H-14), 3.43 (1H, dd, $J = 17.3$, 2.8 Hz, H-15), 3.24 (1H, dd, $J = 17.3$, 4.4 Hz, H-15), 11.53 (1H, s, NH-18), 7.38 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-20), 7.11 (1H, ddd, $J = 8.1$, 7.1, 1.0 Hz, H-21), 6.99 (1H, m, H-22), 7.42 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-23); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 220 (4.69), 269 (4.10), 292 (4.14) nm。其波谱数据和紫外吸收与 *prelapatin B*^[5, 10-11] 的文献报道一致。且化合物 **6** 的比旋光度为 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 182.9$ (c 0.10, MeOH) 与已知化合物的 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 173.5$ (c 0.06, EtOAc) 接近, 故将该化合物鉴定为 *prelapatin B*。

化合物 **7**: 白色固体, ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 186.4 (CH, C-2), 83.5 (C, C-3), 132.5 (C, C-4), 126.0 (CH, C-5), 125.3 (CH, C-6), 131.7 (CH, C-7), 114.7 (CH, C-8), 138.2 (C, C-9), 171.2 (C, C-11), 56.8 (CH, C-12), 34.1 (CH_2 , C-13), 71.3 (C, C-14), 70.5 (C, C-15), 159.7 (C, C-18), 121.4 (C, C-19), 126.1 (CH, C-20), 127.6 (CH, C-21), 135.0 (CH, C-22), 127.3 (CH, C-23), 147.6 (C, C-24), 147.6 (C, C-26), 16.5 (CH_3 , C-27), 22.8 (CH_3 , C-28); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 5.24 (1H, s, H-2), 7.91 (1H, m, H-5), 7.37 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-6), 7.55 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-7), 7.50 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-8), 5.58 (1H, t, $J = 10.1$ Hz, H-12), 3.44 (1H, m, H-13), 3.05 (1H, m, H-13), 9.16 (1H, s, 16-OH), 8.25 (1H, m, H-20), 7.64 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-21), 7.81 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-22), 7.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-23), 8.60 (1H, s, H-26), 1.35 (3H, s, H-27), 1.25 (3H, s, H-28); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 225 (4.49), 254 (4.25), 276 (3.70), 303 (3.26), 313 (3.15) nm。其波谱数据和紫外吸收与 *tryptoquivalines L*^[12] 的文献报道一致。且化合物 **7** 的比旋光度为 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -142.4$ (c 0.10, MeOH) 与文献报道的 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -154.0$ (c 0.12, MeOH) 接近, 说明两者绝对构型也相同, 故将化合物 **7** 鉴定为 *tryptoquivalines L*。

2.2 抗细菌活性结果

实验结果表明化合物 **2** 对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)具有一定的抑制作用, 其 MIC 值为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 化合物 **6** 对副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)和哈氏弧菌(*V. harveyi*)有一定的抑制活性, 其 MIC 值分别为 16、32 和 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 此外化合物 **3** 对鳃弧菌(*V. anguillarum*)具有微弱抑制作用, 其 MIC 值为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据实验结果可知, 对于同类化合物 **1**, **2** 和 **3**, C-3 的羟基和 C-22 的甲基取代均可以提高化合物的抗菌活性。

参考文献:

- [1] Chen G, Wang H F, Pei Y H. Secondary metabolites from marine-derived microorganisms[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2014, 16(1): 105-122.
- [2] Unson M D, Holland N D, Faulkner D J. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue[J]. Marine Biology, 1994, 119(1): 1-11.
- [3] Garo E, Starks C M, Jensen P R, et al. Trichoderma-mides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*[J]. Journal of Natural Products, 2003, 66(3): 423-426.
- [4] Zubía E, Ortega M J, Salvá J. Natural products chemistry in marine ascidians of the genus *Aplidium*[J]. Mini-Reviews in Organic Chemistry, 2005, 2(4): 389-399.
- [5] Peng J X, Lin T, Wang W, et al. Antiviral alkaloids produced by the mangrove-derived fungus *Cladosporium* sp. PJX-41[J]. Journal of Natural Products, 2013, 76(6): 1133-1140.
- [6] Qian S Y, Yang C L, Khan A, et al. New pyrazinoquinazoline alkaloids Isolated from a culture of *Stenotrophomonas maltophilia* QB-77[J]. Natural Product Research, 2019, 33(9): 1387-1391.
- [7] Solida L, Diana I S P R, Anake K, et al. Antitumor activity of quinazolinone alkaloids inspired by marine natural products[J]. Marine Drugs, 2018, 16(8): 261.
- [8] Fujimoto H, Negishi E, Yamaguchi K, et al. Isolation of new tremorgenic metabolites from an ascomycete, *Corynascus setosus*[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1996, 44(10): 1843-1848.
- [9] Koyama N, Inoue Y, Sekine M, et al. Relative and absolute stereochemistry of quinadoline B, an inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages [J]. Organic Letters, 2008, 10(22): 5273-5276.
- [10] Lin T, Tan T, Liu T X, et al. Study on the secondary metabolites and their anti-tumor activity from mangroves fungi PJX-41[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2013, 36(3): 117-123.
- [11] Walker S J, Hart D J. Synthesis of (-)-lapatin B[J]. Tetrahedron Letters, 2007, 48(35): 6214-6216.
- [12] Suradet B, Angsumarn C, Leka M, et al. Sartorymensin, a new indole alkaloid, and new analogues of tryptoquivaline and fiscalins produced by *Neosartorya siamensis* (KUFC 6349)[J]. Tetrahedron, 2012, 68(15): 3253-3262.
- [13] Wang S, Li X M, Teuscher F, et al. Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from marine red alga *Polysiphonia urceolata*[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(11): 1622-1625.
- [14] 李莉, 李晓明, 李洪雷, 等. 海鞘内生真菌焦曲霉 *Aspergillus ustus* TK-5 的化学成分研究[J]. 海洋科学, 2018, 42(5): 130-137.
Li Li, Li Xiaoming, Li Honglei, et al. Chemical constituents of *Aspergillus ustus* TK-5, an endophytic fungus derived from the ascidian *Herdmania momus*[J]. Marine Sciences, 2018, 42(5): 130-137.
- [15] 孙好芬. 两株热带马尾藻内生真菌次生代谢产物研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2010.
Sun Haofen. Study on secondary metabolites of two endophytic fungal strains from tropical *Sargassum species*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010.
- [16] 王佳宁, 李晓明, 张鹏, 等. 日本仙菜来源内生真菌 *Aspergillus versicolor* EN-298 化学成分研究[J]. 海洋科学, 2015, 39(6): 94-98.
Wang Jianing, Li Xiaoming, Zhang Peng, et al. Chemical constituents of *Aspergillus versicolor* EN-298, an endophytic fungus derived from the marine alga *Ceramium japonicum*. [J]. Marine Sciences, 2015, 39(6): 94-98.

Chemical constituents of an endophytic fungus derived from ascidian *Aspergillus clavatus* AS-107

SONG Qi^{1, 2}, LI Xiao-ming¹, HU Xue-yi¹, YANG Sui-qun¹, WANG Bin-gui^{1, 3}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Aug. 5, 2018

Key words: ascidian; endophytic fungus; secondary metabolite; alkaloid; antimicrobial activity

Abstract: Chemical investigation of *Aspergillus clavatus* AS-107, an endophytic fungus derived from ascidian, was performed. Seven alkaloids were obtained from the fermentation products of the strain by preparative TLC, Sephadex LH-20 and column chromatography with silica gel. Structures of the seven compounds were determined by analysis of their physical and chemical properties and spectroscopic data to be norquinadoline A (**1**), quinadoline A (**2**), epi-fiscalin D (**3**), fiscalin B (**4**), quinadoline B (**5**), prelapatin B (**6**), and tryptoquivalines L (**7**). Antimicrobial experiments showed that compound **2** has potent antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophilia* with an MIC value of 16 µg/mL. Compound **6** has a certain inhibitory activity against *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, and *Aeromonas hydrophilia*, with MIC values of 16, 32, and 32 µg/mL.

(本文编辑: 康亦兼)