

骨碎补内生菌 *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 中 3 个新 3-氢化萘特特拉姆酸衍生物

陈旭丽^{1,2,3}, 王立平^{1,2,3}, 吴 耽^{1,3}, 何文文^{1,3}, 左明星^{1,3}, 王冬阳^{1,3*}, 朱伟明^{1*}

1. 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550014
2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025
3. 贵州省天然产物研究中心, 贵州 贵阳 550014

摘要: 目的 研究骨碎补内生蜡蚧菌 *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 的次级代谢产物和抑菌活性。方法 采用大米培养基对菌株 *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 发酵; 采用凝胶柱色谱、正反相硅胶色谱等方法对化合物进行分离纯化; 采用核磁共振谱、质谱、NMR 计算等方法确定化合物的化学结构; 采用营养肉汤稀释法测试化合物对病原细菌及酵母菌的抑菌活性、平板法测试化合物对病原霉菌的抑菌活性。结果 从菌株的发酵产物中分离鉴定了 3 个新的和 3 个已知的 3-氢化萘特特拉姆酸衍生物, 包括蜡蚧特特拉姆酸 A (1)、蜡蚧特特拉姆酸 B (2)、蜡蚧特特拉姆酸 C (3)、Sch 210971 (4)、Sch 210972 (5)、Sch 213766 (6)。化合物 1 和 4~6 对 4 株人体革兰阳性病原菌和 1 株植物革兰阴性病原菌具有抑制作用, 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 7.8~125 $\mu\text{mol/L}$ 。化合物 6 对油菜菌核病菌和小麦赤霉病菌表现出一定的抑制作用, 半数抑制浓度分别为 (22.05 $\pm$ 0.62)、(55.54 $\pm$ 1.72) $\mu\text{g/mL}$ 。结论 蜡蚧特特拉姆酸 A~C (1~3) 为新的 3-氢化萘特特拉姆酸衍生物, 骨碎补内生菌 *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 产生的 3-氢化萘特特拉姆酸对人体病原菌和植物病原菌可表现出抑制作用。

关键词: 骨碎补; 蜡蚧菌; 次级代谢产物; 吡咯烷-2,4-二酮; 抑菌活性; 蜡蚧特特拉姆酸 A; 蜡蚧特特拉姆酸 B; 蜡蚧特特拉姆酸 C

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4096-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.002

Three new 3-decalinoyltetramic acids produced by endophyte *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 from *Drynariae Rhizoma*

CHEN Xu-li^{1,2,3}, WANG Li-ping^{1,2,3}, WU Dan^{1,3}, HE Wen-wen^{1,3}, ZUO Ming-xing^{1,3}, WANG Dong-yang^{1,3}, ZHU Wei-ming¹

1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China
2. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China
3. Natural Product Research Center of Guizhou Province, Guiyang 550014, China

Abstract: Objective To investigate the secondary metabolites and its anti-microbial activities of the endophytic fungus *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 from Gusuibu (*Drynariae Rhizoma*). **Methods** *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 was cultured on the rice medium and its secondary metabolites were isolated and purified by Sephadex LH-20, silica gel column chromatography. Their structures were identified by the mass spectroscopic analysis and NMR calculation. The activities of isolated compounds against pathogenic bacteria and yeast were assayed by nutrient broth dilution method, and that against pathogenic moulds were tested by plate method. **Results** Three new 3-decalinoyltetramic acids, *lecanitetramic* acids A—C (1—3), along with three known analogs including Sch 210971 (4), Sch 210972 (5) and Sch 213766 (6) were obtained. Compounds 1 and 4—6 showed antimicrobial activity against four human Gram-positive and one plant Gram-negative bacteria with the MIC values ranging from 7.81 to 125.00 $\mu\text{mol/L}$.

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1812403); 贵州省科技计划项目 (黔科中引地[2022]4015); 贵州省“百人领军人才”计划 (朱伟明); 博士引进启动基金 (天产自 J 字 [2022] 02 号)

作者简介: 陈旭丽, 女, 硕士研究生在读, 研究方向为微生物药物化学。E-mail: 1964181047@qq.com

*通信作者: 王冬阳, 男, 博士, 研究方向为微生物药物化学。E-mail: wangdongyang@gmc.edu.cn

朱伟明, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为微生物药物化学。E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn

Compound **6** showed anti-phytopathogenic fungi activities against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium graminearum* with IC₅₀ values of (22.05 ± 0.62) and (55.54 ± 1.72) µg/mL. **Conclusion** Lecanitetramic acids A—C (**1**—**3**) are new 3-decalinoyltetramic acids. *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 from *Drynariae Rhizoma* can produce antimicrobial 3-decalinoyltetramic acids against human- and plant-derived pathogenic microbes.

Key words: *Drynariae Rhizoma*; *Lecanicillium* sp.; secondary metabolite; pyrrolidine-2,4-dione; anti-microbial activity; lecanitetramic acid A; lecanitetramic acid B; lecanitetramic acid C

人类历史上多数临床抗菌药物均来源于结构多样的天然产物，特别是微生物天然产物^[1]。从微生物天然产物中寻找抑菌活性化合物仍是一个热点领域^[2]。吡咯烷-2,4-二酮，又称特特拉姆酸（tetramic acid），是一种广泛存在于天然产物中的结构片段，该片段可结合不同取代基从而形成多种结构类型^[3-5]。其中 3-氢化萘特特拉姆酸（3-decalinoyltetramic acids, 3-DTAs）主要由微生物代谢产生，并且多数具有一定的抑菌活性^[3]。分离自 *Fusarium equiseti* NRRL 5537 的 (-)-equisetin 是首个报道的此类化合物^[6-7]，具有抗菌、抗 HIV 病毒等多种生物活性。此后有多种具有抑菌活性的 3-氢化萘特特拉姆酸陆续从陆地或海洋真菌中分离出来，如具有抑菌活性的 zopfiellamides A-B^[8]、neopestalotin B^[9]、lydicamycin^[10]等。课题组前期对骨碎补 *Rhizoma Drynaria Nakaike* 活性成分分离得到了 liglaurates A~E 等具有细胞毒活性的化合物^[11]，同时得到了多株骨碎补内生真菌。菌株筛选过程中发现蜡蚧菌 *Lecanicillium* sp. GZWMJZ-847 的次级代谢产物的液相分析图谱中显示出丰富的紫外吸收峰。对该菌株的代谢产物进行分离得到了 6 个 3-氢化萘特特拉姆酸类化合物，包括蜡蚧特特拉姆酸 A（lecanitetramic acid A, **1**）、蜡蚧特特拉姆酸 B（lecanitetramic acid B, **2**）、蜡蚧特特拉姆酸 C（lecanitetramic acid C, **3**）及其 3 个已知同系物，Sch 210971 (**4**)^[12]、Sch 210972 (**5**)^[12]、Sch 213766 (**6**)^[13]。抑菌活性筛选发现化合物 **1** 和 **4**~**6** 对 4 株人体革兰氏阳性病原菌和 1 株植物革兰氏阴性病原菌表现出抑制作用，化合物 **6** 对 2 株植物病原霉菌也表现出一定的抑制作用。化合物的结构见图 1。

1 仪器与材料

Ascend 600 型超导核磁共振波谱仪（美国 Bruker 公司），2695 LCQ-MS 质谱仪（美国 Waters 公司），Primaide 分析及半制备型高效液相色谱仪（1430 二极管阵列检测器及 1110 四元高压泵，日本 Hitachi 公司），柱色谱及薄层色/制备键合型色谱柱（250 mm×10 mm，5 µm，日本 COSMOSIL 公

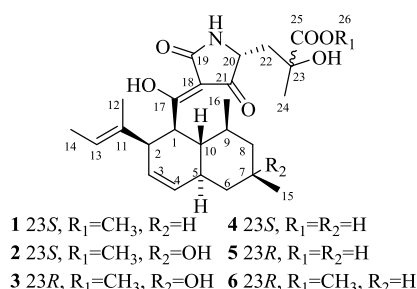


图 1 化合物 1~6 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—6

司), AUTOPOL I 自动旋光仪(美国 Rudolph 公司), LDZX-75KBS 高压灭菌机(上海申安医疗器械厂), SPX-280 恒温培养箱(宁波江南仪器厂)。提取分离用醋酸乙酯、甲醇、丙酮、二氯甲烷、石油醚等均为分析纯(上海沃化化工有限公司),液相用甲醇为色谱纯(上海星可高纯溶剂有限公司)。抗菌用阳性对照环丙沙星盐酸盐[萨恩化学技术(上海)有限公司,批号 DF290114]、酮康唑[萨恩化学技术(上海)有限公司,批号 BG070130]、多菌灵(北京百灵威科技有限公司,批号 L850049)。

内生菌 GZWMJZ-847 分离自骨碎补的新鲜根茎，并保藏于贵州省天然产物研究中心；经 ITS 序列 blast 分析鉴定为蜡蚧属真菌 *Lecanicillium* sp., GenBank 登录号为 No. OP999665。抑菌活性实验所用的 3 种植物病原菌由贵州医科大学黄烈军研究员提供，包括油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、烟草黑胫病菌 *Phytophthora nicotianae*，植物致病细菌青枯菌 *Ralstonia solanacearum* 由贵州医科大学李龔研究员提供。其它病原微生物购买自中国普通微生物菌种保藏管理中心：枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* ATCC6051、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145、产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens* ATCC13124、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC6538、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC43300、大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC11775、白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC10231、光滑念

珠菌 *Candida glabrata* ATCC2001。

2 方法

2.1 菌株发酵

将-80℃冻存的 GZWMJZ-847 菌液融化后接种于 PDA 固体培养皿上,置于 28℃培养箱中培养 3 d,连续传代 3 次得纯培养菌落。挑取单菌落接种到含 150 mL PDB 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中,放置于 28℃温度下 180 r/min 振荡培养 3 d 制备种子液。吸取 9 mL 种子液接种于经 121℃高压蒸汽灭菌 25 min 的大米固体培养基中,每袋含 50 g 大米和 50 mL 水,共发酵 100 袋,静置于常温环境中培养 30 d。

2.2 活性产物的提取分离

将发酵后的培养基合并,每次加入 5 L 的醋酸乙酯和甲醇的混合物液(10:1)提取代谢产物,共提取 3 次;将 3 次提取液合并后减压浓缩得到粗提物 30.9 g。粗提物首先采用减压正相硅胶柱色谱分离,依次用石油醚-醋酸乙酯(100:1~1:1)、二氯甲烷-甲醇(5:1~2:1)梯度洗脱,经 TLC 检测合样后得到 12 个组分(Fr. 1~12)。Fr. 7 (1.6 g)在半制备型 C₁₈ 色谱柱上分离得到 Fr. 7.1 (t_R =9.6 min, 135.9 mg)和 Fr. 7.2 (t_R =11.6 min, 70.8 mg),流动相为 90%的甲醇-水(含 0.15%三氟乙酸),体积流量 4 mL/min。Fr. 7.1 和 Fr. 7.2 先后采用半制备萘键合型色谱柱进行纯化分别得到化合物 1 (t_R =24.0 min, 17.2 mg)、6 (t_R =26.0 min, 12.0 mg)和 4 (t_R =20.0 min, 10.0 mg)、5 (t_R =22.0 min, 17.0 mg),洗脱剂均为 83%的甲醇-水(含 0.05%三氟乙酸),体积流量 4 mL/min。

Fr. 12 (2.9 g)通过 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶色谱柱分离得到 10 个组分(Fr. 12.1~12.10),洗脱剂为甲醇-二氯甲烷(1:1)。Fr. 12.5 (913 mg)采用快速制备液相色谱仪在 C₁₈ 色谱柱上进行初步分离,5%~100%的甲醇-水(含 0.05%三氟乙酸)变梯度洗脱得到 3 个组分(Fr. 12.5.1~12.5.3)。Fr. 12.5.2 (479 mg)在半制备型 C₁₈ 色谱柱上分离得到 Fr. 12.5.2.1 (t_R =10.0 min, 331 mg)和 Fr. 12.5.2.2 (t_R =12.8 min, 68.8 mg),流动相为 80%的甲醇-水(含 0.05%三氟乙酸),体积流量 4 mL/min。Fr. 12.5.2.2 (68.8 mg)在半制备萘键合型色谱柱进行纯化得到化合物 2 (t_R =22.0 min, 6.4 mg)和 3 (t_R =24.0 min, 17.8 mg),洗脱条件为 60%甲醇-水(含 0.05%三氟乙酸),体积流量 4 mL/min。

2.3 化合物 1 的水解

称取 2 mg 的化合物 1 溶解于 0.5 mL 乙醇中,加入 0.5 mL 的氢氧化钠水溶液(4 mol/L),在 78℃条件下搅拌 4 h。冷却后在冰浴条件下用 2 mol/L 的盐酸将反应液的 pH 调节至 3。将溶剂减压蒸干后加入 2 mL 醋酸乙酯,并用水洗涤 3 次,每次 1 mL。将醋酸乙酯溶液减压蒸干,剩余物质用半制备 HPLC 纯化得到化合物 1a (t_R =10.0 min, 1.2 mg),纯化条件为:半制备 C₁₈ 色谱柱,含 0.05%三氟乙酸的 90%甲醇水洗脱剂洗脱,体积流量 4 mL/min。

2.4 抗菌及酵母菌活性评价

采用营养肉汤稀释法^[14]测试化合物对 7 株细菌(枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、青枯菌)和 2 株酵母菌(白色念珠菌、光滑念珠菌)的抑制活性。相同浓度的 DMSO 作为空白对照、环丙沙星盐酸盐作为细菌的阳性对照、酮康唑作为真菌的阳性对照。

2.5 抗霉菌活性评价

按照本课题组之前报道的平板法^[15],测试了化合物对油菜菌核病菌、小麦赤霉病菌和烟草黑胫病菌的抑制活性。具体步骤如下:准确量取 6 mL 融化状态的 PDA 固体培养基装入 50 mL 锥形瓶中,在 121℃下高压蒸汽灭菌 30 min,待冷却至约 50℃时加入 6 μ L 化合物的 DMSO 溶液,获得一系列 2 倍浓度梯度的培养基,最大浓度为 50 μ g/mL。混匀后倒入直径 60 mm 的无菌培养皿中,冷却凝固后待用。在各培养皿中心贴入直径 6 mm 的待测真菌菌饼,置于 28℃恒温培养箱中培养。待空白对照组菌落长满平板后,采用十字交叉法测量各平板中的菌落直径(Φ),根据菌落直径大小按公式计算化合物的抑制率。含相同浓度 DMSO 的平板作为空白对照,多菌灵作为阳性对照。以不同浓度对应的抑制率计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

$$\text{抑制率} = (\Phi_{\text{空白}} - \Phi_{\text{测试}}) / \Phi_{\text{空白}}$$

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 1:橙色粉末;高分辨质谱 m/z 482.249 60 [$M+Na$]⁺(计算值 C₂₆H₃₇NO₆Na, 482.251 31)确定化合物分子式为 C₂₆H₃₇NO₆。[α]_D²⁵+51.9 (c 0.1, acetone); ECD(0.001 mol/L, MeOH): 218(+5.14)、286(+0.68) nm;紫外-可见光谱 λ_{max} (log ϵ) 显示

化合物在 218 (3.10)、286 (3.22) nm 处有吸收；红外光谱 (KBr, $\nu_{\max}$) 显示化合物在 3299、2951、2912、1737、1604、1456、1376、1205、1125 cm^{-1} 等波数下有红外吸收, 说明化合物中存在羟基、酯基、共轭羰基和酰胺基团等官能团。分析其 ^1H 、 ^{13}C 和 HSQC 谱确定化合物含 6 个甲基 (δ_{C} 13.7、15.9、21.4、22.6、25.7、52.8)、3 个 sp^3 亚甲基 (δ_{C} 42.2、42.6、46.7)、7 个 sp^3 次甲基 (δ_{C} 33.3、39.9、41.3、46.6、46.9、48.6、59.5)、1 个 sp^3 季碳 (δ_{C} 74.2)、3 个 sp^2 次甲基 (δ_{C} 122.3、129.3、134.4)、6 个 sp^2 季碳 (δ_{C} 101.4、136.2、176.6、176.9、193.8、195.7) (表 1)。其核磁数据与化合物 sch 213766 (**6**) 非常接近, 仅在 C-20、C-23 和 C-24 位置表现出大于 1.0 的化学位移差值; 进一步分析其二维 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 信号 (图 2) 可确定化合物 **1** 与 **6** 具有相同的平面结构, 初步确定化合物 **1** 是化合物 **6** 的差向异构体。

化合物 **1** 的 NOESY 谱中显示 H-5 (δ_{H} 1.82) 与 H-1 (δ_{H} 3.95)/H-2 (δ_{H} 3.01)/H-9 (δ_{H} 1.39)、H-16 (δ_{H} 0.84)与 H-10 (δ_{H} 1.39)/H-15 (δ_{H} 0.91)、H-12 (δ_{H} 1.56) 与 H-14 (δ_{H} 1.47) 等 3 组相关信号 (图 3) 证明化合物 **1** 在氢化萘片段与 **6** 有相同的相对构型; 另外, 化合物 **1** 与 **6** 具有极为相似的 ECD 谱图 (图 4), 特别是 286 nm 附近相同的正 Cotton 效应, 预示着化合物 **1** 中氢化萘上及 C-20 位的手性中心与化合物 **6** 中对应位置具有相同的立体构型; 而 C-23 手性碳离发色团较远且通过可旋转键与母核相连, 通过核磁及 ECD 谱图无法确定该位置的构型。为了最终确定 C-23 立体构型, 在氢氧化钠溶液中得到了化合物 **1** 在 23-位酯基水解的产物 **1a**, 结果发现 **1a** 与化合物 Sch 210971 (**4**)^[12]显示出相同的 ^1H -NMR 数据和相近的比旋光数据 (**1a**: +97.0, **4**: +80.0), 说明化合物 **1a** 的立体构型与化合物 **4** 相同, 进而

表 1 化合物 1~3 的 NMR 数据 (600/150 MHz, acetone- d_6)
Table 1 NMR data of compounds 1—3 (600/150 MHz, acetone- d_6)

碳位	1		2		3	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	46.9, CH	3.95 (brs)	46.8, CH	3.91~4.10 (m)	46.7, CH	3.96, (t, $J = 8.3$ Hz)
2	48.6, CH	3.01 (dd, $J = 14.6, 6.3$ Hz)	48.7, CH	2.98~3.06 (m)	48.6, CH	2.98~3.05 (m)
3	129.3, CH	5.66 (overlapped)	129.3, CH	5.61 (overlapped)	129.4, CH	5.64 (overlapped)
4	134.4, CH	5.66 (overlapped)	134.2, CH	5.61 (overlapped)	134.3, CH	5.63 (overlapped)
5	41.3, CH	1.82~1.8 (m)	36.5, CH	2.29~2.36 (m)	36.4, CH	2.30~2.37 (m)
6	42.2, CH ₂	0.95 (t, $J = 12.1$ Hz) 1.88~1.92 (m)	46.5, CH ₂	1.33 (t, $J = 13.0$ Hz) 1.82 (d, $J = 13.1$ Hz)	46.4, CH ₂	1.34 (t, $J = 13.2$ Hz) 1.83 (dt, $J = 13.2, 2.8$ Hz)
7	33.3, CH	1.63 (overlapped)	69.2, C		69.2, C	
8	46.7, CH ₂	0.81 (overlapped) 1.65 (overlapped)	50.3, CH ₂	1.22 (overlapped) 1.60 (overlapped)	50.3, CH ₂	1.19 (overlapped) 1.59 (dt, $J = 13.6, 3.0$ Hz)
9	39.9, CH	1.39 (overlapped)	35.4, CH	1.88~1.92 (m)	35.4, CH	1.75~1.79 (m)
10	46.6, CH	1.39 (overlapped)	46.1, CH	1.37 (overlapped)	46.3, CH	1.39 (d, $J = 10.1$ Hz)
11	136.2, C		136.4, C		136.3, C	
12	15.9, CH ₃	1.56 (s)	15.9, CH ₃	1.56 (s)	16.0, CH ₃	1.57, brs
13	122.3, CH	5.14~5.21 (m)	122.3, CH	5.16 (brs)	122.3, CH	5.18 (dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz)
14	13.7, CH ₃	1.47 (d, $J = 6.6$ Hz)	13.7, CH ₃	1.47 (d, $J = 6.5$ Hz)	13.8, CH ₃	1.50 (d, $J = 6.5$ Hz)
15	22.6, CH ₃	0.91 (d, $J = 6.3$ Hz)	31.6, CH ₃	1.19 (s)	31.6, CH ₃	1.19 (s)
16	21.4, CH ₃	0.84 (d, $J = 5.4$ Hz)	21.2, CH ₃	0.80 (d, $J = 5.5$ Hz)	21.2, CH ₃	0.81 (d, $J = 6.7$ Hz)
17	193.8, C		193.5, C		193.0, C	
18	101.4, C		101.5, C		101.4, C	
19	176.6, C		176.6, C		176.6, C	
20	59.5, CH	4.05 (brs)	59.3, CH	3.76 (brs)	60.5, CH	3.73 (brs)
21	195.7, C		195.8, C		194.9, C	
22	42.6, CH ₂	1.72 (dd, $J = 14.4, 10.3$ Hz) 2.45 (dd, $J = 14.4, 2.5$ Hz)	42.2, CH ₂	1.70~1.78 (m) 2.45 (d, $J = 14.6$ Hz)	42.7	1.72 (dd, $J = 14.4, 10.3$ Hz) 2.45 (dd, $J = 14.4, 2.7$ Hz)
23	74.2, C		74.2, C		75.4, C	
24	25.7, CH ₃	1.45 (s)	25.7, CH ₃	1.45 (s)	27.9, CH ₃	1.45 (s)
25	176.9, C		177.0, C		176.9, C	
26	52.8, CH ₃	3.73 (s)	52.8, CH ₃	3.73 (s)	52.9, CH ₃	3.76 (s)

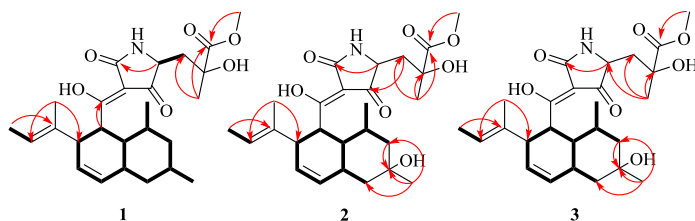
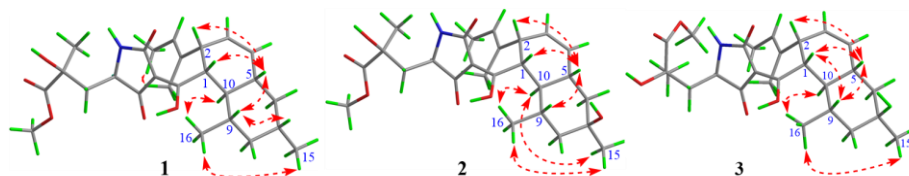
图 2 化合物 1~3 主要的 ^1H - ^1H COSY (黑色粗线)、HMBC (红色箭头) 相关信号Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY (black bold lines) and HMBC (red arrows) correlations of compounds 1—3

图 3 化合物 1~3 主要的 NOESY 相关 (虚线箭头)

Fig. 3 Key NOESY (broken arrows) correlations of compounds 1—3

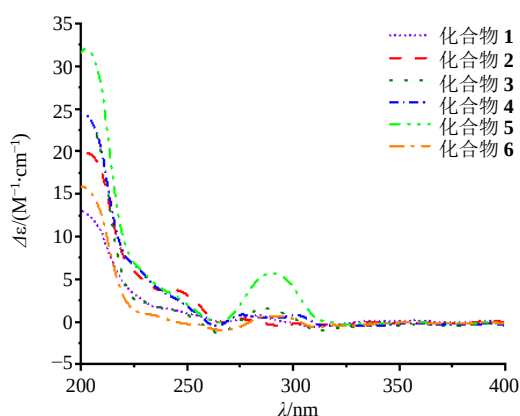


图 4 化合物 1~6 的 ECD 图谱

Fig. 4 ECD curves of compounds 1—6

确定化合物 **1** 中各手性碳的构型与 **4** 中相同, 即 1*S*, 2*R*, 5*S*, 7*R*, 9*S*, 10*R*, 20*R*, 23*S*; 化合物 **1** 是 **6** 在 23-位不同立体构型的新的差向异构体, 经 SciFinder 数据库检索确定为新化合物, 命名为蜡蚧特特拉姆酸 A。

化合物 **1a**: 黄色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +97.0$ (*c* 0.1, acetone); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 218 (3.08), 286 (3.05); ESIMS m/z 468.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. ^1H -NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 5.66 (2H, overlapped, H-3, 4), 5.15~5.22 (1H, m, H-13), 4.09 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-20), 3.93 (1H, t, $J = 8.3, 8.2$ Hz, H-1), 3.00 (1H, dd, $J = 13.1, 6.7$ Hz, H-2), 2.49 (1H, dd, $J = 14.3, 2.1$ Hz, H-22a), 1.90 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-6a), 1.81~1.88 (1H, m, H-5), 1.74 (1H, dd, $J = 14.3, 10.2$ Hz, H-22b), 1.64

(1H, brd, $J = 12.3$ Hz, H-7), 1.59~1.62 (1H, m, H-8a), 1.56 (3H, brs, H-12), 1.50 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14), 1.48 (1H, brs, H-24), 1.39 (2H, overlapped, H-9, 10), 0.95 (1H, t, $J = 12.3$ Hz, H-6b), 0.91 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-15), 0.85 (1H, overlapped, H-8b), 0.83 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-16)。以上数据与化合物 **4** 基本相同。

化合物 **2**: 黄色粉末; m/z 498.244 81 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_7\text{Na}$, 498.246 22) 确定化合物分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_7$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +52.8$ (*c* 0.1, acetone- d_6); ECD (0.001 mol/L, MeOH): 218 (+9.13)、286 (−0.12) nm; 紫外-可见光谱 λ_{max} ($\log \epsilon$) 显示化合物在 215 (3.03)、286 (3.09) nm 处有吸收; 红外光谱 (KBr, ν_{max}) 显示化合物在 3297、2961、2918、2359、2342、1732、1698、1669、1598、1458、1374、1205、1138、1032 cm^{-1} 等波数下有吸收。与化合物 **1** 相近的紫外、红外光谱以及分子式中多出 1 个氧原子预示着化合物 **2** 是 **1** 或 **6** 的 1 个氧化产物。根据 ^1H 、 ^{13}C 和 HSQC 谱确定化合物含 6 个甲基 (δ_{C} 13.7、15.9、21.2、31.6、25.7、52.8)、3 个 sp^3 亚甲基 (δ_{C} 42.2、46.5、50.3)、6 个 sp^3 次甲基 (δ_{C} 35.4、36.5、46.1、46.8、48.7、59.3)、2 个 sp^3 季碳 (δ_{C} 69.2、74.2)、3 个 sp^2 次甲基 (δ_{C} 122.3、129.3、134.2)、6 个 sp^2 季碳 (δ_{C} 101.5、136.4、176.6、177.0、193.5、195.8) (表 1)。化合物 **2** 的分子中比 **1** 多 1 个氧原子, 同时其核磁谱图中比 **1** 多 1 个连氧 sp^3 季碳 (δ_{C} 69.2) 信号、少 1 个 sp^3 次甲基信号。根据 H-15 (δ_{H} 1.19) 与 C-6 (δ_{C}

46.5)/C-7 (δ_C 69.2)/C-8 (δ_C 50.3) 的 HMBC 远程相关信号可确定化合物 **2** 是化合物 **1** 的 7-位氢被羟基取代的衍生物, 化合物 **2** 的平面结构确定为 7-羟基蜡蚧特特拉姆酸 A。

化合物 **3**: 黄色粉末; m/z 498.245 09 $[M+Na]^+$ (计算值 $C_{26}H_{37}NO_7Na$, 498.246 22) 确定化合物分子式为 $C_{26}H_{37}NO_7$; $[\alpha]_D^{25} + 31.6$ (c 0.1, acetone); ECD (0.001 mol/L, MeOH): 218 (+6.74)、286 (+1.76) nm; 紫外-可见光谱 λ_{max} ($\log \epsilon$) 显示化合物在 220 (3.03)、284 (3.22) nm 处有吸收; 红外光谱 (KBr, ν_{max}) 显示化合物在 3295、2959、2918、2357、1737、1653、1605、1557、1457、1373、1206、1137、1031、975、917 cm^{-1} 等波数下有吸收。根据 1H 、 ^{13}C -NMR 和 HSQC 谱确定化合物含 6 个甲基 (δ_C 13.8、16.0、21.2、31.6、27.9、52.9)、3 个 sp^3 亚甲基 (δ_C 42.7、46.4、50.3)、6 个 sp^3 次甲基 (δ_C 35.4、36.4、46.3、46.7、48.6、60.5)、2 个 sp^3 季碳 (δ_C 69.2、75.4)、3 个 sp^2 次甲基 (δ_C 122.3、129.4、134.3)、6 个 sp^2 季碳 (δ_C 101.4、136.3、176.6、176.9、193.0、194.9) (表 1)。化合物 **3** 与 **2** 互为同分异构体, 且核磁数据相似, 仅在 C-20/C-23/C-24 处有大于 1.0 的化学位移差值, 分析化合物的 1H - 1H COSY 和 HMBC 谱图 (图 2) 确定 **3** 与 **2** 有相同的平面结构, 推测化合物 **2** 和 **3** 与化合物 **1** 和 **6** 类似, 同样是一对 23-位构型相反的差向异构体。

分析化合物 **2** 和 **3** 的 NOESY 谱图 (图 3), 可确定 2 个化合物中的氢化萘片段的相对构型均为 $1S^*, 2R^*, 5S^*, 7S^*, 9S^*, 10R^*$ 。化合物 **1**~**6** 相似的 ECD 谱图 (图 4) 说明化合物 **2** 和 **3** 结构中的氢化萘上各手性中心以及 C-20 位等离发色团较近的手性碳具有与 **1** 和 **6** 相似的立体构型。同样由于 C-23 与母核发色团较远, 且与母核骨架以可旋转单键连接, 2 个化合物中该位置的立体构型无法通过 ECD 谱图或 NOE 相关信号确定。分析化合物的比旋光可知化合物 **2** (+52.8) 与 **1** (+51.9) 相近, 而 **3** (+31.6) 与 **6** (+31.7) 相近; 同时与化合物 **3** 和 **6** 对比, 化合物 **1** 和 **2** 在 C-20/C-23/C-24 处有相似且较小的化学位移值, 以上数据对比结果预示着化合物 **2** 和 **3** 中 C-20 和 C-23 位之间的相对构型应分别与化合物 **1** 和 **6** 相同, 即化合物 **2** 和 **3** 中 C-20 位构型均为 *R*, C-23 位构型分别为 *S* 和 *R*。在 mpw1pw91/6-311+g (d, p) 水平上计算了氢化萘取代 2,4-吡咯烷二酮母核构型依次为 $1S, 2R, 5S, 7S, 9S, 10R$,

20*R*, 而 23-位分别为 *R* 和 *S* 2 种构型化合物的核磁数据, 采用 $MAE_{\Delta\delta}$ 分析化合物 **2** 和 **3** 与 2 种构型化合物的对应关系^[16]。结果显示 $MAE_{\Delta\delta_calc_SR/exp_23} = 0.376$ 、 $MAE_{\Delta\delta_calc_SR/exp_32} = 0.530$, 从另一方面佐证了化合物 **2** 和 **3** 的 C-23 位立体构型应分别为 *S* 和 *R*。综上, 化合物 **2** 和 **3** 的立体构型分别确定为 $1S, 2R, 5S, 7S, 9S, 10R, 20R, 23S$ 和 $1S, 2R, 5S, 7S, 9S, 10R, 20R, 23R$ 。2 个化合物均经 SciFinder 数据库检索确定为新化合物, 分别命名为蜡蚧特特拉姆酸 B (**2**) 和蜡蚧特特拉姆酸 C (**3**)。

化合物 **4**: 黄色粉末; $[\alpha]_D^{25} + 80.0$ (c 0.1, acetone); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 218 (3.08), 286 (3.05); ECD (0.001 mol/L, MeOH): 218 (9.14), 286 (0.54) nm; 分子式为 $C_{25}H_{35}NO_6$, ESI-MS m/z 468.4 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 5.66 (2H, overlapped, H-3, 4), 5.16~5.22 (1H, m, H-13), 4.08 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-20), 3.93 (1H, dd, $J = 7.9, 6.7$ Hz, H-1), 3.01 (1H, dd, $J = 13.1, 6.7$ Hz, H-2), 2.49 (1H, dd, $J = 14.3, 2.1$ Hz, H-22a), 1.90 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-6a), 1.82~1.87 (1H, m, H-5), 1.73 (1H, dd, $J = 14.3, 10.1$ Hz, H-22b), 1.64 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-7), 1.59~1.62 (1H, m, H-8a), 1.57 (3H, brs, H-12), 1.50 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-14), 1.48 (3H, s, H-24), 1.40 (2H, overlapped, H-9, 10), 0.95 (1H, t, $J = 12.2$ Hz, H-6b), 0.91 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-15), 0.85 (1H, overlapped, H-8b), 0.83 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-16); ^{13}C -NMR (150 MHz, acetone- d_6) δ : 195.8 (C-17), 193.2 (C-21), 177.3 (C-25), 176.4 (C-19), 136.2 (C-11), 134.4 (C-4), 129.2 (C-3), 122.4 (C-13), 101.4 (C-18), 73.8 (C-23), 59.7 (C-20), 48.6 (C-2), 46.8 (C-1), 46.7 (C-8), 46.6 (C-10), 42.6 (C-22), 42.5 (C-6), 41.2 (C-5), 39.9 (C-9), 33.2 (C-7), 25.7 (C-24), 22.6 (C-15), 21.4 (C-16), 16.0 (C-12), 13.7 (C-14)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 因此鉴定化合物 **4** 为 Sch 210971。

化合物 **5**: 黄色粉末; $[\alpha]_D^{25} + 32.0$ (c 0.1, acetone); UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 218 (3.06), 288 (2.98); ECD (0.001 mol/L, MeOH): 218 (+11.42), 286 (+5.66) nm; 分子式为 $C_{25}H_{35}NO_6$, ESI-MS m/z 468.4 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 5.66 (2H, overlapped, H-3, 4), 5.19 (1H, q, $J = 6.2$ Hz, H-13), 3.94 (1H, dd, $J = 7.7, 7.3$ Hz, H-1), 3.78 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-20), 3.00 (1H, dd, $J = 12.0, 7.3$ Hz, H-2), 2.49 (1H, dd, $J = 14.3, 2.1$ Hz, H-22a), 1.90 (1H, d,

$J = 12.5$ Hz, H-6a), 1.82~1.88 (1H, m, H-5), 1.73 (1H, dd, $J = 14.3, 10.2$ Hz, H-22b), 1.64 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-7), 1.59~1.62 (1H, m, H-8a), 1.56 (3H, brs, H-12), 1.50 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14), 1.48 (3H, brs, H-24), 1.40 (2H, overlapped, H-9, 10), 0.95 (1H, t, $J = 12.5$ Hz, H-6b), 0.91 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-15), 0.84 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-16), 0.82 (1H, overlapped, H-8b); ^{13}C -NMR (150 MHz, acetone- d_6) δ : 195.0 (C-17), 193.0 (C-21), 177.3 (C-25), 176.3 (C-19), 136.2 (C-11), 134.4 (C-4), 129.4 (C-3), 122.2 (C-13), 101.5 (C-18), 75.0 (C-23), 60.8 (C-20), 48.4 (C-2), 46.8 (C-1), 46.7 (C-8), 46.6 (C-10), 42.7 (C-22), 42.5 (C-6), 41.2 (C-5), 39.9 (C-9), 33.2 (C-7), 27.7 (C-24), 22.6 (C-15), 21.4 (C-16), 16.1 (C-12), 13.8 (C-14)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **5** 为 Sch 210972。

化合物 **6**: 橙黄色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 31.9$ (c 0.1, acetone); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 216 (3.05), 282 (2.97); ECD (0.001 mol/L, MeOH): 218 (+4.36), 286 (+0.72)nm; 分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_6$; ESI-MS m/z 458.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H -NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 5.66 (2H, overlapped, H-3, 4), 5.18 (1H, q, $J = 6.5$ Hz, H-13), 3.74 (1H, overlapped, H-20), 3.93 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-1), 3.76 (3H, s, H-26), 2.99 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2), 2.45 (1H, dd, $J = 14.3, 2.6$ Hz, H-22a), 1.90 (1H, dq, $J = 12.5, 2.1$ Hz, H-6a), 1.82~1.88 (1H, m,

H-5), 1.72 (1H, dd, $J = 14.3, 9.9$ Hz, H-22b), 1.64 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-7), 1.59~1.62 (1H, m, H-8a), 1.56 (3H, brs, H-12), 1.50 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-14), 1.45 (3H, s, H-24), 1.38 (2H, overlapped, H-9, 10), 0.95 (1H, t, $J = 12.2$ Hz, H-6b), 0.91 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-15), 0.84 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-16), 0.80 (1H, overlapped, H-8b); ^{13}C -NMR (150 MHz, acetone- d_6) δ : 194.9 (C-17), 193.1 (C-21), 176.5 (C-25), 176.4 (C-19), 136.2 (C-11), 134.4 (C-4), 129.4 (C-3), 122.2 (C-13), 101.4 (C-18), 75.4 (C-23), 60.8 (C-20), 52.9 (C-26), 48.5 (C-2), 46.8 (C-1), 46.6 (C-8), 46.6 (C-10), 42.8 (C-22), 42.5 (C-6), 41.2 (C-5), 39.9 (C-9), 33.2 (C-7), 27.9 (C-24), 22.6 (C-15), 21.4 (C-16), 16.0 (C-12), 13.8 (C-14)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **6** 为 Sch 213766。

3.2 抑菌活性测试结果

化合物 **1** 和 **4~6** 对 4 株人体革兰阳性和 1 株植物革兰阴性病原菌表现出了抑制作用, 最小抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 7.81~125.00 $\mu\text{mol/L}$ (表 2), 对另外 5 株人体病原菌未表现出抑制作用; 化合物 **2** 和 **3** 在最大测试浓度时对所有病原菌均未表现出抑制作用。在测试的病原真菌中, 仅化合物 **6** 对油菜菌核病菌和小麦赤霉病菌表现出弱的抑制作用, IC_{50} 分别为 (22.05 ± 0.62) 、 (55.54 ± 1.72) $\mu\text{g/mL}$, 多菌灵对 2 株菌的 IC_{50} 值分别为 (0.100 ± 0.003) 、 (1.010 ± 0.013) $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 化合物 **1~6** 对病原细菌的抑制活性

Table 2 Antibacterial activities of compounds **1~6**

化合物	MIC/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	产气荚膜梭菌	枯草芽孢杆菌	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	青枯菌
1	31.25	125.00	31.25	125.00	31.25
2	>500	>500	>500	>500	>500
3	>500	>500	>500	>500	>500
4	31.25	31.25	62.50	62.50	15.63
5	62.50	62.50	125.00	62.50	7.81
6	31.25	62.50	31.25	31.25	15.63
环丙沙星	0.05	7.50	0.94	0.47	3.75

4 讨论

在人类历史上微生物天然产物贡献了大部分的抗菌药物, 而随后抗生素时代的来临, 从常规微生物次级代谢产物中发现新型抗生素变得越来越困难。伴随着植物微生物组学的快速发展, 药用植物内生菌活性代谢产物的开发及应用逐渐成为中药领

域研究热点之一, 有望为抗菌药物的开发提供更多的候选分子。本研究从骨碎补内生蜡蚧菌 GZWMJZ-847 的发酵产物中分离得到 3 个新的和 3 个已知的 3-氢化萘特特拉姆酸, 蜡蚧特特拉姆酸 A~C (**1~3**)、Sch 210971 (**4**)、Sch 210972 (**5**)、Sch 213766 (**6**)。新化合物 **1** 和已知化合物 **4~6** 对 4 株

人体革兰阳性和 1 株植物革兰阴性病原细菌表现出中等的抑制活性, 化合物 **6** 对油菜菌核病菌和小麦赤霉病菌表现出了一定的抑制活性, 对比化合物 **1~6** 的活性结果可以看出 7-位氢原子被羟基取代后化合物的抑菌活性完全丧失, 可为此类抑菌活性化合物的结构修饰提供参考。本研究首次对已知化合物 **4~6** 进行抑菌活性的报道, 再次验证了从药用植物内生菌次级代谢产物中寻找抑菌活性分子的可行性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hutchings M I, Truman A W, Wilkinson B. Antibiotics: Past, present and future [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2019, 51: 72-80.
- [2] Rossiter S E, Fletcher M H, Wuest W M. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance [J]. *Chem Rev*, 2017, 117(19): 12415-12474.
- [3] 梁英, 柯少勇, 王开梅, 等. 天然活性吡咯烷-2, 4-二酮类化合物研究进展 [J]. *有机化学*, 2010, 30(12): 1801-1810.
- [4] Royles B J L. Naturally occurring tetramic acids: Structure, isolation, and synthesis [J]. *Chem Rev*, 1995, 95(6): 1981-2001.
- [5] Jiang M H, Chen S H, Li J, et al. The biological and chemical diversity of tetramic acid compounds from marine-derived microorganisms [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(2): 114.
- [6] Burmeister H R, Bennett G A, Vesonder R F, et al. Antibiotic produced by *Fusarium equiseti* NRRL 5537 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1974, 5(6): 634-639.
- [7] Vesonder R F, Tjarks L W, Rohwedder W K, et al. Equisetin, an antibiotic from *Fusarium equiseti* NRRL 5537, identified as a derivative of *N*-methyl-2, 4-pyrrolidone [J]. *J Antibiot*, 1979, 32(7): 759-761.
- [8] Daferner M, Anke T, Sterner O. Zopfiellamides A and B, antimicrobial pyrrolidinone derivatives from the marine fungus *Zopfiella latipes* [J]. *Tetrahedron*, 2002, 58(39): 7781-7784.
- [9] Zhao S S, Chen S X, Wang B, et al. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp [J]. *Fitoterapia*, 2015, 103: 106-112.
- [10] Furumai T, Eto K, Sasaki T, et al. TPU-0037-A, B, C and D, novel lydicamycin congeners with anti-MRSA activity from *Streptomyces platensis* TP-A0598 [J]. *J Antibiot*, 2002, 55(10): 873-880.
- [11] Wufuer H, Xu Y C, Wu D, et al. Liglaurates A-E, cytotoxic bis(lauric acid-12yl)lignanoates from the rhizomes of *Drynaria roosii* nakaike [J]. *Phytochemistry*, 2022, 198: 113143.
- [12] Yang S W, Mierzwa R, Terracciano J, et al. Chemokine receptor CCR-5 inhibitors produced by *Chaetomium globosum* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(7): 1025-1028.
- [13] Yang S W, Mierzwa R, Terracciano J, et al. Sch 213766, A novel chemokine receptor CCR-5 inhibitor from *Chaetomium globosum* [J]. *J Antibiot*, 2007, 60(8): 524-528.
- [14] Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 163-175.
- [15] 刘思成, 许言超, 吴耽, 等. 鱼腥草内生菌 *Aspergillus* sp. GZWMJZ-636 次级代谢产物研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(10): 2863-2868.
- [16] Lauro G, Das P, Riccio R, et al. DFT/NMR Approach for the configuration assignment of groups of stereoisomers by the combination and comparison of experimental and predicted sets of data [J]. *J Org Chem*, 2020, 85(5): 3297-3306.

[责任编辑 王文倩]