

狭叶十大功劳内生真菌 *Colletotrichum fioriniae* F18 的次级代谢产物研究

王航航¹, 李刚¹, 彭晓婷¹, 娄红祥^{1, 2*}

(1. 青岛大学药学院天然药物与生药学系, 山东 青岛 266021; 2. 山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要: 对分离自狭叶十大功劳茎中的一株内生真菌 *Colletotrichum fioriniae* F18 进行化学成分研究, 从其大米发酵产物中分离得到 1 个新吲哚生物碱 makomotindoline B (**1**) 和 2 个已知吲哚衍生物: 3-indoleacetic acid methyl ester (**2**) 和 *N*-acetyltryptamine (**3**), 以及 6 个芳香化合物: 对羟基苯乙酸 (**4**)、对羟基苯乙醇 (**5**)、对甲氧基苯乙酸 (**6**)、4-hydroxyphenethyl 2-(4-hydroxyphenyl)acetate (**7**)、regiolone (**8**) 和 *N*-苯乙基乙酰胺 (**9**)。通过质谱和核磁共振等技术确定了上述化合物的结构, 并通过圆二色谱 ECD 量子化学计算确定了化合物 **1** 的绝对构型。抗菌活性测试结果表明, 化合物 **1**~**9** 对 *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 无明显抑制作用, 对基因缺陷型紫色杆菌 *Chromobacterium violaceum* 也无群体感应抑制活性。

关键词: 狭叶十大功劳; 内生真菌; 次级代谢产物; 吲哚并四氢呋喃; 抗菌活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 11-1862-06

Secondary metabolites from *Colletotrichum fioriniae* F18, an endophytic fungus isolated from the medicinal plant *Mahonia fortunei*

WANG Hang-hang¹, LI Gang¹, PENG Xiao-ping¹, LOU Hong-xiang^{1, 2*}

(1. Department of Natural Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2. School of Pharmacy, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

Abstract: Chemical investigation on the rice culture of an endophytic fungus *Colletotrichum fioriniae* F18, inhabiting in the stems of the medicinal plant *Mahonia fortunei*, led to the isolation of nine compounds. They included a new indole alkaloid, makomotindoline B (**1**), and two known indole derivatives, 3-indoleacetic acid methyl ester (**2**) and *N*-acetyltryptamine (**3**), together with six known aromatic compounds, 2-(4-hydroxyphenyl)acetic acid (**4**), 4-(2-hydroxyethyl)phenol (**5**), 2-(4-methoxyphenyl)acetic acid (**6**), 4-hydroxyphenethyl 2-(4-hydroxyphenyl)acetate (**7**), regiolone (**8**) and *N*-phenethylacetamide (**9**). The structures of these compounds were elucidated based on the analysis of spectroscopic data including MS and NMR. The absolute configuration of compound **1** was determined by electronic circular dichroism (ECD) calculation. Antibacterial activity assay indicated that compounds **1**–**9** had no antibacterial activities against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, as well as no quorum sensing inhibitory (QSI) activity for *Chromobacterium violaceum*.

Key words: *Mahonia fortunei*; endophytic fungus; secondary metabolites; indolo[*b*]tetrahydrofuran; antibacterial activity

收稿日期: 2018-09-14; 修回日期: 2018-10-19.

基金项目: 青岛大学科研启动经费项目 (29016010007010).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-531-8838-2012, E-mail: louhongxiang@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0838

植物内生菌 (endophyte) 是一定阶段或全部阶段生活在健康植物的组织内部而不引起明显负面影响的微生物, 主要包括真菌和细菌^[1,2]。植物内生菌之间, 内生菌和宿主植物之间, 以及内生菌和外界环境之间存在着长期、稳定且复杂的相互作用^[3]。这些互作特点促使内生菌具有较强的生物合成能力, 可以产生结构新颖、类型多样、活性广泛的次级代谢产物^[4]。内生菌已成为药物先导化合物发现的重要源泉。

小檗科植物狭叶十大功劳 (*Mahonia fortunei*) 作为传统的中国药用植物, 具有清热解毒、消肿、止痢疾等功效^[5]。基于内生菌和宿主植物的互作机制, 药用植物十大功劳在功能内生菌发现方面有一定的优势^[6]。本课题组前期研究发现, 采自上海的一株十大功劳内生真菌 *Diaporthe* sp. LG23 可以产生一个结构新颖且具有芳香 B 环的四环三萜类化合物, 此化合物对测试的细菌具有明显的抑制活性^[7]; 采自广州的一株十大功劳内生真菌 *Fusarium decemcellulare* LG53 可以生物合成 3 个新环五肽类化合物^[8]。基于以上研究背景, 继续对植物十大功劳内生真菌进行化学研究, 以期发现结构新颖且活性良好的次级代谢产物。本工作对采自青岛的一株十大功劳内生真菌 *Colletotrichum fioriniae* F18 进行大规模发酵, 分离纯化得到了 3 个吲哚衍生物 (1~3) 和 6 个芳香化合物 (4~9) (图 1), 其中化合物 1 为新化合物。

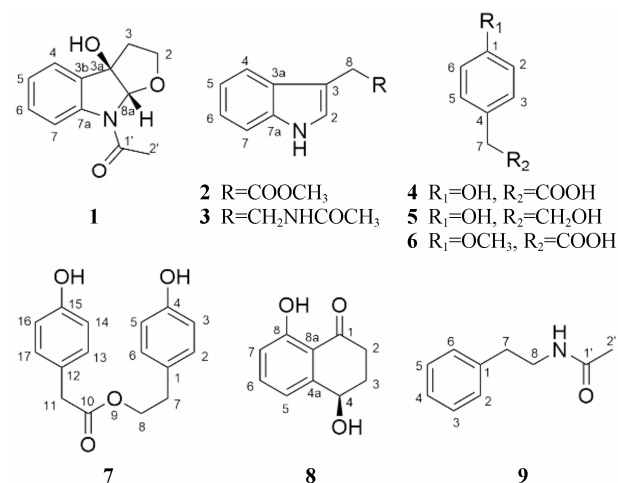


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-9

化合物 1 为淡黄色粉末, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 220.097 0 ($[M+H]^+$, C₁₂H₁₄NO₃⁺; Calcd. 220.096 8) 和 242.079 1 ($[M+Na]^+$, C₁₂H₁₃NO₃Na⁺; Calcd. 242.078 8), 推测分子式为 C₁₂H₁₃NO₃, 不饱和度为 7。¹H NMR 谱图显示化合物含有 4 个芳香氢信

号: 7.12 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5)、7.32 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-6)、7.47 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-4) 和 8.11 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 说明化合物 1 结构中含有一个邻位二取代的苯环。¹³C NMR 谱图显示化合物含有 12 个碳信号, 包括 3 个连氧碳信号 (δ_C 69.0、88.0 和 100.8) 和一个羰基碳信号 (δ_C 172.8)。¹H 和 ¹³C NMR 数据结合 2D NMR 谱图分析确定了化合物含有 1 个单峰甲基、2 个亚甲基 (1 个氧化)、1 个氮杂缩酮碳信号、1 个连氧季碳、6 个芳香碳和 1 个羰基碳。

¹H-¹H COSY NMR 谱证实了化合物中 C-2/C-3 以及 C-4/C-5/C-6/C-7 两个片段。通过 H-4/C-6、H-4/C-7a、H-5/C-3b、H-5/C-7、H-6/C-4、H-6/C-7a、H-7/C-5 和 H-7/C-3b 的一系列 HMBC 相关确定了化合物在 C-3b 和 C-7a 处双取代的苯环结构片段。在 HMBC 谱中, H₂-2 与 C-3a 和 C-8a、H₂-3 与 C-3a 和 C-8a 以及 H-8a 与 C-2 和 C-3a 存在远程相关, 同时考虑到 C-2 (δ_C 69.0) 和 C-8a (δ_C 100.8) 的化学位移, 故而确定了一个在 C-3a 和 C-8a 处取代的四氢吡喃的结构片段。进一步分析 HMBC 谱图, H-8a 与 C-3b 和 C-7a 以及 H₂-3 与 C-3b 存在远程相关, 同时考虑到 C-7a (δ_C 144.2) 和 C-8a 的化学位移, 确定了 C-3a-C-3b 和 C-7a-N-C-8a 的连接。H₃-2'/C-1' 的 HMBC 相关以及 C-1' (δ_C 172.8)、H₃-2' (δ_H 2.34) 和 C-2' (δ_C 23.5) 的化学位移确定了一个乙酰基团连接在氮原子上。一个羟基基团连接在 C-3a 位置, 符合 C-3a (δ_C 88.0) 化学位移以及质谱分子量的要求。因此, 如图 2 所示, 化合物 1 的平面结构被确定。

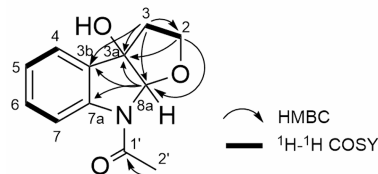


Figure 2 Key COSY (bold line) and HMBC (arrows) correlations of compound 1

化合物 1 的绝对构型是通过圆二色谱 ECD 计算确定的。化合物具有两个手性中心, 存在 4 种可能的绝对构型 (3aR, 8aR; 3aR, 8aS; 3aS, 8aR; 3aS, 8aS), 这 4 种构型分别进行 ECD 计算, 计算结果与实验 ECD 进行比对。采用 Frog2 (2.14 在线版本) 搜索化合物可能存在的构象, 然后使用高斯 09 进行化合物构象几何优化、频率计算、和 ECD 计算^[9,10]。计算基组采用 6-31G(d), 泛函为杂化泛函 B3LYP, 溶剂化模式为极化连续模型 PCM。如图 3 所示, 构型为 (3aR, 8aS) 的

ECD 数据和实验所测得的 ECD 曲线最为接近。最终化合物 **1** 的结构被确定, 并命名为 makomotindoline B。经文献检索发现化合物 **1** 与天然产物 makomotindoline 以及 madindolines A 和 B 具有相同的吲哚并四氢咪喃母核^[11–13]。

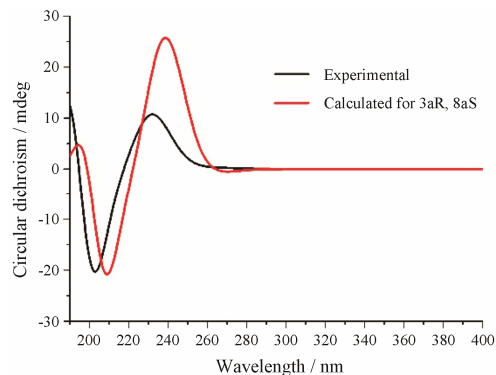


Figure 3 Experimental and calculated ECD spectra of compound **1**

实验部分

Broker Avance DRX-600 型核磁共振波谱仪 (布鲁克公司); LTQ-Orbitrap 高分辨质谱仪 (赛默飞世尔科技公司); Thermo Scientific Nicolet iS5 FT-IR 光谱仪 (赛默飞世尔科技公司); JASCO-815 圆二色谱仪 (日本 JASCO 公司); JASCO P-1020 旋光仪 (日本 JASCO 公司); 超净台 (上海智城分析仪器制造有限公司); 培养箱 (上海申贤恒温设备厂); 中低压反相色谱仪 (天津博纳艾杰尔科技有限公司); 中低压反相色谱仪配备一个 C18 色谱柱 (20~5 μm , 100 \AA , 80 g); 中压柱反相色谱仪 (天津博纳艾杰尔科技有限公司); 中压反相色谱仪配备一个 C18 色谱柱 (10 mm \times 250 mm, 10 μm); 柱色谱硅胶 (200~300 目) (青岛海洋化工厂); 薄层色谱硅胶 (GF254) (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (25~100 μm ; Pharmacia Biotech, 丹麦); 氘代甲醇; 其他试剂为分析纯。

菌株 F18 分离自狭叶十大功劳的茎, 植物材料于 2016 年 10 月采自山东青岛中山公园。内生菌分离方法采用之前报道的方法^[14, 15]。内生真菌采用 ITS 序列分析并鉴定为 *Colletotrichum fioriniae*, 序列信息保存在 GenBank (序列号为 MH256139)。内生真菌编号为 F18, 目前保存于青岛大学药学院天然药物与生药学系。

1 发酵产物的分离纯化

1.1 菌株发酵 菌株在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)

培养基上培养 5 天 (28 $^{\circ}\text{C}$), 然后用接种环挑取菌落接入到 20 个 500 mL 锥形瓶 (每瓶含有 80 g 大米、120 mL 水和 0.3% 蛋白胨), 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置培养 30 天。

1.2 提取与分离 待发酵结束后, 向每瓶培养基加入 200 mL 乙酸乙酯, 超声提取 3 次, 合并有机溶剂提取液并减压浓缩后得到粗提物 31.34 g。对所得粗提物水混悬后, 使用环己烷和乙酸乙酯萃取, 分别得到对应有机相提取物 15.51 g 和 6.40 g。对乙酸乙酯相萃取物进行硅胶柱色谱分离, 用石油醚/乙酸乙酯 (100:0~0:100, v/v) 系统梯度洗脱共得到 19 个组分 (Fr.1-19)。

Fr.9 (53.7 mg) 通过中低压反相色谱仪 (40% 甲醇-水, 15 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 得到化合物 **8** (10.9 mg)。采用类似的方法, 3 个组分 (Fr.10、Fr.17 和 Fr.19) 分别通过中低压反相色谱仪进行分离, 分别得到相应的子馏分。来自于 Fr.10 的子馏分 Fr.10-2 (68.0 mg) 进一步经中压反相色谱 (40% 甲醇-水, 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 纯化得到化合物 **4** (t_{R} 28.8 min; 39.7 mg)。来自于 Fr.17 的子馏分 Fr.17-3 (18.4 mg) 和 Fr.17-4 (49.8 mg) 采用 Fr.10-2 类似的纯化方法分别得到化合物 **9** (40% 甲醇-水, 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; t_{R} 15.4 min; 8.5 mg) 和 **10** (60% 甲醇-水, 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; t_{R} 12.5 min; 21.4 mg)。通过中压反相色谱仪纯化 Fr.19-3 (21.0 mg, Fr.19 的子馏分) 得到化合物 **3** (40% 甲醇-水, 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; t_{R} 20.0 min; 4.6 mg)。

Fr.11 (640 mg) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 凝胶柱色谱洗脱得到 2 个馏分 Fr.11-2 (210 mg) 和 Fr.11-3 (21.4 mg)。Fr.11-2 经中低压反相色谱洗脱 (20% 甲醇-水 20 min; 40% 甲醇-水 20 min, 15 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 得到 2 个子馏分 Fr.11-2-1 (113.9 mg) 和 Fr.11-2-2 (32.6 mg)。通过中压反相色谱洗脱 (30% 甲醇-水 20 min; 40% 甲醇-水 20 min; 60% 甲醇-水 20 min, 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 进一步纯化 Fr.11-2-1 得到化合物 **5** (t_{R} 18.7 min; 17.6 mg)、**6** (t_{R} 37.1 min; 23.2 mg) 和 **7** (t_{R} 55.4 min; 16.6 mg)。Fr.11-2-2 经中压反相色谱纯化 (40% 甲醇-水, 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 得到化合物 **1** (t_{R} 29.3 min; 1.9 mg)。最后, 馏分 Fr.11-3 经中压反相色谱仪纯化 (60% 甲醇-水, 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 得到化合物 **2** (t_{R} 17.8 min; 2.0 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色粉末。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 220.097 0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_3^+$; Calcd. 220.096 8) 和 242.079 1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{Na}^+$;

Calcd. 242.078 8); $[\alpha]_D^{24} = +5.05$ (c 0.1, MeOH); UV λ_{\max} (MeOH)/nm: 206、246; IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3415、2926、2855、1653、1602、1481、1465、1398、1288、1121、1052 等。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) 和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。

Table 1 ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR data of **1** in CD_3OD

Position	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	COSY	HMBC
2	69.0 CH_2	4.10 dt (1.2, 7.2) 3.56 m	3	3a, 8a
3	42.2 CH_2	2.50 dt (7.6, 12.0) 2.38 ddd (0.8, 4.8, 12.0)	2	2, 3a, 3b 2, 3a, 3b, 8a
3a	88.0 C			
3b	134.3 C			
4	125.4 CH	7.47 d (7.2)	5	6, 7a
5	125.9 CH	7.12 t (7.2)	4	3b, 7
6	130.9 CH	7.32 t (7.2)	7	4, 7a
7	117.4 CH	8.11 d (8.0)	6	3b, 5
7a	144.2 C			
8a	100.8 CH	5.75 s		2, 3a, 3b, 7a
1'	172.8 C			
2'	23.5 CH_3	2.34 s		1'

化合物 2 黄色油状, ESI-MS 显示 m/z 190.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 207.11 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_{H} : 3.68 (3H, s, OCH_3 -9), 3.77 (2H, s, H-8), 7.01 (1H, bt, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.10 (1H, bt, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.16 (1H, s, H-2), 7.34 (1H, bd, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.51 (1H, bd, $J = 8.0$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_{C} : 31.8 (C-8, CH_2), 52.3 (9- OCH_3), 108.5 (C-3, C), 112.2 (C-7, CH), 119.3 (C-4, CH), 119.8 (C-5, CH), 122.4 (C-6, CH), 124.6 (C-2, CH), 128.5 (C-3a, C), 138.0 (C-7a, C), 174.8 (C-9, C)。上述波谱数据与文献报道^[16]基本一致, 因此化合物 **2** 被鉴定为 3-indoleacetic acid methyl ester。

化合物 3 黄色油状, ESI-MS 显示 m/z 203.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 225.10 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 405.23 $[\text{2M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_{H} : 1.91 (3H, s, H-2'), 2.93 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-9), 3.46 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 6.99 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6), 7.06 (1H, s, H-2), 7.08 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.32 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.55 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_{C} : 22.5 (C-2', CH_3), 26.2 (C-8, CH_2), 41.5 (C-9, CH_2), 112.2 (C-7, CH), 113.2 (C-3, C), 119.2 (C-4, CH), 119.5 (C-5, CH), 122.2 (C-6, CH), 123.3 (C-2, CH), 128.8 (C-3a, C), 138 (C-7a, C), 173.2 (C-1', C)。上述波谱数据与文献报道^[17]基本一致, 因此化合物 **3** 被鉴定为 *N*-acetyltryptamine。

化合物 4 无色结晶, ESI-MS 显示 m/z 151.04 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 187.02 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 303.09 $[\text{2M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_{H} : 3.48 (2H, s, H-7), 6.73 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, H-6), 7.09 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, H-5); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_{C} : 41.4 (C-7, CH_2), 116.1 (C-2,6, CH), 126.7 (C-4, C), 131.3 (C-3,5, CH), 157.3 (C-1, C), 176.6 (C-8, C)。上述波谱数据与文献报道^[18]基本一致, 因此化合物 **4** 被鉴定为对羟基苯乙酸。

化合物 5 无色结晶, ESI-MS 显示 m/z 137.06 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 173.04 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 275.13 $[\text{2M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_{H} : 2.71 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-7), 3.68 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-8), 6.70 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, H-6), 7.03 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, H-5); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_{C} : 39.3 (C-7, CH_2), 63.2 (C-8, CH_2), 116.1 (C-2,6, CH), 130.8 (C-3,5, CH), 131.0 (C-4, C), 156.7 (C-1, C)。上述波谱数据与文献报道^[19]基本一致, 因此化合物 **5** 被鉴定为对羟基苯乙醇。

化合物 6 黄色油状, ESI-MS 显示 m/z 165.06 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 201.03 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 331.12 $[\text{2M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_{H} : 3.52 (2H, s, H-7), 3.65 (3H, s, OCH_3 -1), 6.72 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, H-6), 7.07 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, H-5); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_{C} : 40.8 (C-7, CH_2), 52.3 (1- OCH_3), 116.2 (C-2,6, CH), 126.3 (C-4, C), 131.2 (C-3,5, CH), 157.5 (C-1, C), 174.5 (C-8, C)。上述波谱数据与文献报道^[20]基本一致, 因此化合物 **6** 被鉴定为对甲氧基苯乙酸。

化合物 7 黄色油状, ESI-MS 显示 m/z 271.10 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 307.07 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 543.20 $[\text{2M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_{H} : 2.78 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-7), 3.48 (2H, s, H-11), 4.20 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-8), 6.68 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-14, H-16), 6.71 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, H-5), 6.96 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-13, H-17), 7.02 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, H-6); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_{C} : 35.1 (C-7, CH_2), 41.2 (C-11, CH_2), 66.8 (C-8, CH_2), 116.2 (C-3,5,14,16, CH), 126.3 (C-12, C), 129.9 (C-1, C), 130.9 (C-2,6, CH), 131.3 (C-13,17, CH), 157.0 (C-4, C), 157.5 (C-15, C), 174.0 (C-10, C)。上述波谱数据与文献报道^[21]基本一致, 因此化合物 **7** 被鉴定为 4-hydroxyphenethyl 2-(4-hydroxyphenyl)acetate。

化合物 8 淡黄色粉末, ESI-MS 显示 m/z 177.06 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 194.05 $[\text{M}+\text{NH}_3-\text{H}]^-$, $[\alpha]_D^{16} = 2.28$ (c 0.25, MeOH)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} : 1.69 (1H, brs, OH-4), 2.19 (1H, m, H-3a), 2.35 (1H, m, H-3b), 2.65 (1H, ddd, $J = 17.8, 8.3, 4.8$ Hz, H-2a), 3.01 (1H, ddd, $J = 17.8, 8.3, 4.8$ Hz, H-2b), 4.92 (1H, dd, $J = 7.4, 3.7$ Hz, H-4), 6.93 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.02 (1H, d,

$J = 7.4$ Hz, H-5), 7.45 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6), 12.42 (1H, s, OH-8); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} : 31.2 (C-2, CH_2), 34.5 (C-3, CH_2), 67.7 (C-4, CH), 115.2 (C-8a, C), 117.3 (C-7, CH), 117.7 (C-5, CH), 136.9 (C-6, CH), 145.8 (C-4a, C), 162.7 (C-8, C), 204.2 (C-1, C)。上述波谱数据与文献中化合物 *regiolone*^[22] 基本一致, 化合物 **8** 旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 2.28$ (c 0.05, MeOH) 与化合物 *regiolone* 也基本一致, 因此鉴定化合物 **8** 为 *regiolone*。

化合物**9** 黄色油状, ESI-MS 显示 m/z 164.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 186.09 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 以及 327.21 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_{H} : 1.90 (3H, s, H-2'), 2.78 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7), 3.38 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8), 7.1~7.29 (5H, m, H-2~H-6); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_{C} : 22.5 (C-2', CH_3), 36.4 (C-7, CH_2), 42.1 (C-8, CH_2), 127.3 (C-4, CH), 129.4 (C-2,6, CH), 129.7 (C-3,5, CH), 140.5 (C-1, C), 173.2 (C-1', C)。上述波谱数据与文献报道^[23] 基本一致, 因此化合物 **9** 被鉴定为 *N*-苯乙基乙酰胺。

3 生物活性

采用药敏片扩散法^[24]测定化合物**1~9**的抑菌活性, 测试菌株为 *B. subtilis*、*S. aureus*、*E. coli* 和 *P. aeruginosa*。实验设置 4 个浓度梯度 (0.04、0.08、0.2、0.4 μg 化合物/药敏片), 3 个重复, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h, 以含有甲醇的滤纸片为阴性对照, 以含有等量链霉素的滤纸片为阳性对照。实验结果显示化合物**1~9**均无明显抑制活性。

采用平板琼脂打孔法^[25]测定化合物**1~9**的菌株感应抑制活性, 测试菌株为基因缺陷型紫色杆菌 *C. violaceum*, 以甲醇为阴性对照, 以等量的 CV026 为阳性对照, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h。观察是否有抑制活性。实验设置两个浓度梯度 (每孔 10、20 μg 化合物), 3 个重复。实验结果显示化合物**1~9**均无明显群体感应抑制活性。

小结

本文从采自青岛的一株狭叶十大功劳茎来源的内生真菌 *Colletotrichum fiorinae* F18 中分离得到 9 个化合物, 其中化合物 **1** 为新化合物 (makomotindoline B), 通过质谱和核磁共振等波谱数据确定了化合物**1~9**的结构, 并且通过圆二色谱 ECD 计算确定了化合物 **1** 的绝对构型。对分离得到的 9 个化合物进行了抗菌和群体感应抑制活性测试, 结果显示所有化合物都没有明显的抑制活性。

References

- [1] Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes [J]. Nat Prod Rep, 2006, 23: 753–771.
- [2] Che YS. Discovery of new bioactive natural products from fungi of unique ecological niches [J]. J Int Pharm Res, 2011, 38: 12–27.
- [3] Li G, Lou HX. Strategies to diversify natural products for drug discovery [J]. Med Res Rev, 2018, 38: 1255–1294.
- [4] Gao H, Li G, Lou HX. Structural diversity and biological activities of novel secondary metabolites from endophytes [J]. Molecules, 2018, 23: 646.
- [5] Li AR, Zhu Y, Li XN, et al. Antimicrobial activity of four species of Berberidaceae [J]. Fitoterapia, 2007, 78: 379–381.
- [6] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67: 491–502.
- [7] Li G, Kusari S, Kusari P, et al. Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid [J]. J Nat Prod, 2015, 78: 2128–2132.
- [8] Li G, Kusari S, Golz C, et al. Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53 [J]. RSC Adv, 2016, 59: 54092–54098.
- [9] Li RJ, Wang S, Li G, et al. Four new kaurane diterpenoids from the Chinese liverwort *Jungermannia comata* Nees [J]. Chem Biodivers, 2016, 13: 1685–1690.
- [10] Li G, Kusari S, Golz C, et al. Epigenetic modulation of endophytic *Eupenicillium* sp. LG41 by a histone deacetylase inhibitor for production of decalin-containing compounds [J]. J Nat Prod, 2017, 80: 983–988.
- [11] Suzuki T, Choi JH, Kawaguchi T, et al. Makomotindoline from Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22: 4246–4248.
- [12] Hayashi M, Kim YP, Takamatsu S, et al. Madindoline, a novel inhibitor of IL-6 activity from *Streptomyces* sp. K93-0711 I. taxonomy, fermentation, isolation and biological activities [J]. J Antibiot, 1996, 49: 1091–1095.
- [13] Takamatsu S, Kim YP, Enomoto A, et al. Madindoline, a novel inhibitor of IL-6 activity from *Streptomyces* sp. K93-0711 II. Physico-chemical properties and structural elucidation [J]. J Antibiot, 1997, 50: 1069–1072.
- [14] Kusari S, Lamshoft M, Zuhlke S, et al. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin [J]. J Nat Prod, 2008, 71: 159–162.
- [15] Li G, Kusari S, Lamshoft M, et al. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Eupenicillium* sp.

- LG41 [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77: 2335–2341.
- [16] Manzo E, Pagano D, Carbone M, et al. Synthesis of phid-ianidine B, a highly cytotoxic 1,2,4-oxadiazole marine metabolite [J]. *Arkivoc*, 2012, 9: 220–228.
- [17] Astolfi P, Panagiotaki M, Rizzoli C, et al. Reactions of indoles with nitrogen dioxide and nitrous acid in an aprotic solvent [J]. *Org Biomol Chem*, 2006, 4: 3282–3290.
- [18] Ma HY, Yang L, Zhang M, et al. A new compound from *Senecio cannabifolius* var *integrilifolius* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 626–629.
- [19] Dong LW, Wang JL, Zhao M, et al. Chemical constituents of the alabastrum of *Syringa oblata* Lindl [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2011, 23: 658–660.
- [20] Shao HJ, Fang LZ, Liu JK. Chemical constituents of culture broth of *Hebeloma westraliense* [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2010, 22: 786–788.
- [21] Wang YN, Tian L, Hua HM, et al. Two new compounds from the broth of the marine fungus *Penicillium griseofulvum* Y19-07 [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11: 912–917.
- [22] Gulder TAM, Hong H, Correa J, et al. Isolation, structure elucidation and total synthesis of lajollamide A from the marine fungus *Asteromyces cruciatus* [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10: 2912–2935.
- [23] Zhou H, Yang YB, Liu Y, et al. Chemical constituents from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. (YIM69228) [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2013, 25: 293–295.
- [24] Loesgen S, Magull J, Schulz B, et al. Isofusidienols: novel chromone-3-oxepines produced by the endophytic fungus *Chalara* sp. [J]. *Eur J Org Chem*, 2008: 698–703.
- [25] Tello E, Castellanos L, Arevalo-Ferro C, et al. Disruption in quorum-sensing systems and bacterial biofilm inhibition by cembranoid diterpenes isolated from the octocoral *Eumicea knighti* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75: 1637–1642.