

海绵共附生真菌 *Aspergillus giganteus* MA 46-5 吲哚喹唑啉类生物碱成分*

周逢国, 蒋伟欣, 卢欢, 陈乐怡, 林昕历, 何璐萍, 何细新, 张翠仙

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 对 1 株富产吲哚喹唑啉类生物碱(IQAs)的海绵共附生真菌 *Aspergillus giganteus* MA 46-5 的 IQAs 类成分进行了研究。根据 IQAs 的结构特征, 在 TLC、LC-MS 和 GNPS(global natural products social molecular networking)技术的共同指导下, 从大米培养基的乙酸乙酯部位分离得到 10 个 IQAs 类生物碱。通过 NMR、HR-ESI-MS、OR 和 CD 等方法并结合文献比对鉴定其分别为: tryptoquivaline(1)、nortryptoquivaline(2)、deoxytryptoquivaline(3)、deoxynortryptoquivaline(4)、asptoryadin C(5)、asptoryadin G(6)、quinadoline A(7)、fiscalin E(8)、quinadoline B(9)和 prelapatin B(10)。8 和 10 为首次从 *Aspergillus* 属中得到, 2、4-7 为首次从 *Aspergillus giganteus* 中分离得到。

关键词: 海绵共附生真菌; *Aspergillus giganteus* MA 46-5; 吲哚喹唑啉类生物碱

中图分类号: R931.77; O629.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2023)04-0083-10

The indole quinazoline alkaloids from the sponge-associated fungus *Aspergillus giganteus* MA 46-5

ZHOU Fengguo, JIANG Weixin, LU Huan, CHEN Leyi, LIN Xinli, HE Luping, HE Xixin, ZHANG Cuixian

School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: According to the structure feature of indole quinazoline alkaloids (IQAs), under the guidance of TLC, LC-MS and GNPS(global natural products social molecular networking), IQAs from sponge-associated fungus *Aspergillus giganteus* MA 46-5 were studied and ten IQAs were isolated from rice medium of MA 46-5. Based on NMR, HR-ESI-MS, OR, CD and comparison with the literature, their structures were determined as tryptoquivaline (1), nortryptoquivaline (2), deoxytryptoquivaline (3), deoxynortryptoquivaline (4), asptoryadin C (5), asptoryadin G (6), quinadoline A (7), fiscalin E (8), quinadoline B (9) and prelapatin B (10). 8 and 10 were isolated from *Aspergillus* for the first time, and 2, 4-7 were firstly obtained from *Aspergillus giganteus*.

Key words: sponge-associated fungus; *Aspergillus giganteus* MA 46-5; indole quinazoline alkaloids (IQAs)

* 收稿日期: 2022-10-21

录用日期: 2023-01-12

网络首发日期: 2023-04-23

基金项目: 广东省自然资源厅海洋经济发展(海洋六大产业)专项(GDNRC[2021]048, GDNRC[2020]039);
国家自然科学基金(82273845, 81741160); 广东省大学生创新创业项目(S202010572122);
广东省科技创新战略专项(pdjh2023b0126)

作者简介: 周逢国(1999年生), 女; 研究方向: 药物化学; E-mail: 20201110534@stu.gzucm.edu.cn

通信作者: 何细新(1972年生), 男; 研究方向: 天然药物化学; E-mail: mark07@gzucm.edu.cn

张翠仙(1975年生), 女; 研究方向: 天然药物化学; E-mail: zhangcuixian@gzucm.edu.cn
(何细新、张翠仙为共同通信作者)

吲哚喹啉类生物碱(IQAs)是由邻氨基苯甲酸、色氨酸和其他氨基酸缩合而成的三肽吲哚生物碱(Clardy et al., 1975; Resende et al., 2019), 其结构类型主要有 fumiquinazoline (FQ) 和 tryptoquivaline (TQ) 两个系列(图 1), 主要来源于陆地和海洋真菌。总结文献, 目前天然来源的 IQAs 共有 162 个被报道, 其中 90 个来自曲霉属(*Aspergillus*), 来源种属有 *A. fumigatus*、*A. versicolor*、*A. clavatus*、*A. nidulans* 和 *A. fischeri*, 但仅有 1 篇报道来自 *A. gigan-*

teus (Chen et al., 2020)。此类成分的生理活性主要涉及抗菌、抗病毒和抗肿瘤。FQ 类的基本骨架由吡嗪喹啉酮环与吲哚环相连构成, 目前共有 102 个 FQ 类天然产物被报道(Qian et al., 2019; Resende et al., 2019; Li et al., 2020); 而 TQ 类基本骨架的特征为吡嗪环水解, 喹啉酮环与二氢吲哚羰基咪唑环通过螺五元内酯环连接, 共有 60 个 TQ 类天然产物被报道(Clardy et al., 1975; Yamazaki et al., 1978; Fujimoto et al., 1996; Kong et al., 2019)。

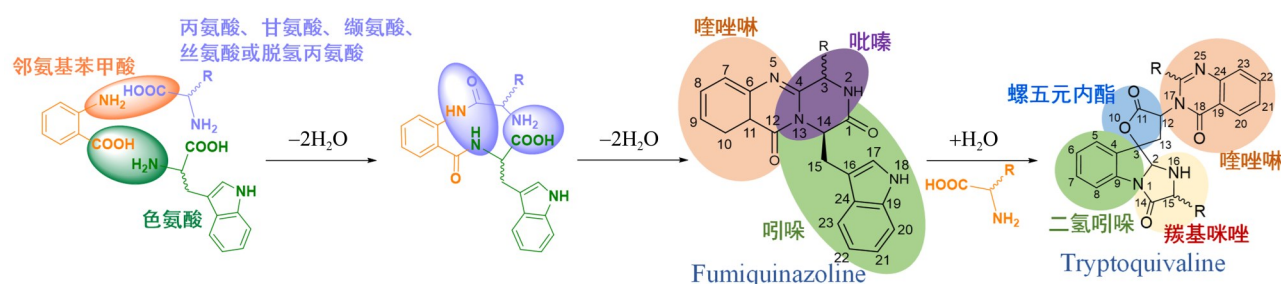


图 1 IQAs 的两种基本骨架

Fig. 1 Two basic skeletons of IQAs

在 OSMAC (one strain many compounds) 策略指导下确定海绵共附生真菌 *Aspergillus giganteus* MA 46-5 富产生物碱类成分, 其 UV 在 λ_{\max} 204、227、249、265、276、303 和 316 nm 处有特征紫外吸收, 相对分子质量集中在 340~600 之间; ^1H 和 ^{13}C NMR 呈现芳香环、羰基、酰胺等官能团信息。基于上述骨架信息, 在“TLC-LC-MS-GNPS-NMR”技术指导下, 对 MA 46-5 大米培养基的乙酸乙酯提取物进行靶向分离, 并对其结构进行鉴定, 获得 10 个 IQAs 类生物碱(图 2): tryptoquivaline (1)、nortryptoquivaline (2)、deoxytryptoquivaline (3)、deoxynortryptoquivaline (4)、aspertoryadin C (5)、aspertoryadin G (6)、quinadoline A (7)、fiscalin E (8)、quinadoline B (9) 和 prelapatin B (10)。化合物 1~6 为 TQ 类生物碱, 7~10 属于 FQ 类生物碱。

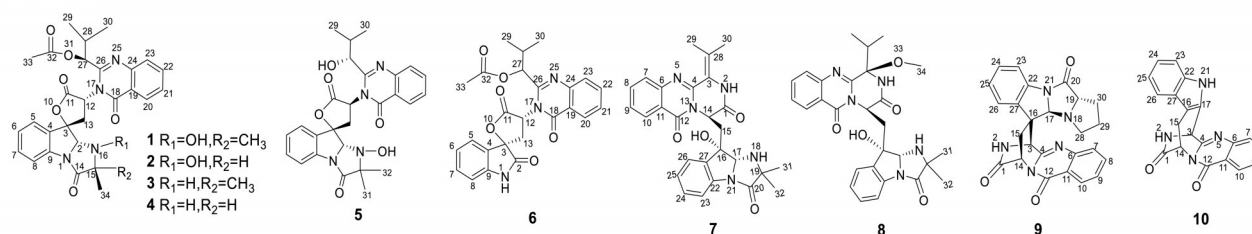


图 2 菌株 *Aspergillus giganteus* MA 46-5 中分离得到的化合物 1~10

Fig. 2 Compounds 1-10 from *Aspergillus giganteus* MA 46-5

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和材料

实验过程中所涉及的仪器及试剂信息见表 1。PDB 培养基: 土豆 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、 $w=3.3\%$ 海盐, pH 自然。加入琼脂 20 g/L 则可制成 PDB 固体培养基。大米培养基: 大米 100 g/瓶 (1 L 培养瓶)、 $w=3.3\%$ 海水 115 mL/瓶, pH 自然。

实验用菌株 MA 46-5 为 2020 年分离自中国北部湾海域海绵的共附生真菌。对菌株 MA 46-5 进行 DNA 提取, 通过 PCR 扩增真菌核糖体 ITS 基因区段, 将扩序结果与 NCBI 网站的 GenBank 数据库中已知序列进行比对, 菌种鉴定结果为 *Aspergillus giganteus* (序列号 MT529399, 同源度 100%)。菌株保存于广州中医药大学中药学院海洋天然药物实验室(编号 MA 46-5)。

表1 实验中使用仪器和试剂信息

Table 1 Information of instruments and reagents in the experiment

仪器/试剂	型号/规格	品牌
核磁共振波谱仪	400 MHz AVANCE III型	德国 Bruker公司
高分辨液质联用仪	Triple TOF™ 5600 ⁺	美国 AB SCIEX公司
高效液相色谱	QuikSep半制备型	北京慧德易科技有限公司
紫外透射反射仪	WFH-201B	上海精科实业有限公司
显微熔点测定仪	X-5	广州予华公司
自动旋光仪	MCP 500	安东帕公司
圆二色光谱仪	Applied Photophysics Chirascan	英国应用光物理公司
旋转蒸发器	XHRE-2000A	上海霄汉实业发展有限公司
低温冷却液循环泵	DLSB-5/20	上海霄汉实业发展有限公司
单人单面超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州净化设备厂
立式压力蒸汽灭菌器	LS-100H	江阴滨江医疗设备有限公司
恒温振荡器	DZ-900	太仓市实验设备厂
色谱柱1: Kromasil C18制备柱	21 mm × 250 mm, 10 μm	瑞典 Akzo Nobel公司
色谱柱2: Kromasil C18半制备柱	10 mm × 250 mm, 5 μm	瑞典 Akzo Nobel公司
色谱柱3: H&E C18半制备柱	10 mm × 250 mm, 5 μm	北京慧德易科技有限公司
色谱柱4: ACE-C18-PFP半制备柱	10 mm × 250 mm, 10 μm	英国 ACE公司
色谱柱5: Luna分析柱	4.6 mm × 100 mm, 5 μm	美国 Phenomenex公司
常规柱层析硅胶	200~300目、300~400目	青岛海洋化工厂
Sephadex LH-20	YILIMART 500 G	瑞典 cytiva公司
C-18反相色谱填料	YMC*GEL ODS-A-HG	日本 YMC公司
乙酸乙酯、甲醇、乙腈等常规试剂	分析纯	广东光华科技股份有限公司
氘代氯仿、DMSO- <i>d</i> ₆	25 G	美国剑桥 CIT公司
葡萄糖	分析纯	天津致远化学试剂有限公司
技术琼脂粉	分析纯	广东环凯微生物科技有限公司
海盐、大米、土豆		市场采购

1.2 菌株 MA 46-5 规模培养

用无菌接种环蘸取菌株 MA 46-5, 接种至无菌 PDB 固体培养基, 待培养基上长出单菌落, 挑取单菌落接种到 PDB 液体培养基 (1 L 培养瓶、400 mL/瓶)。恒温摇床上 (28 °C、165 r/min) 培养 2~3 d, 即可获得菌株种子液。将 MA 46-5 种子液接种至大米培养基 (1 L 培养瓶、10 mL/瓶), 于 28 °C 静置培养 30 d。共培养 500 瓶。

1.3 次生代谢产物的提取分离

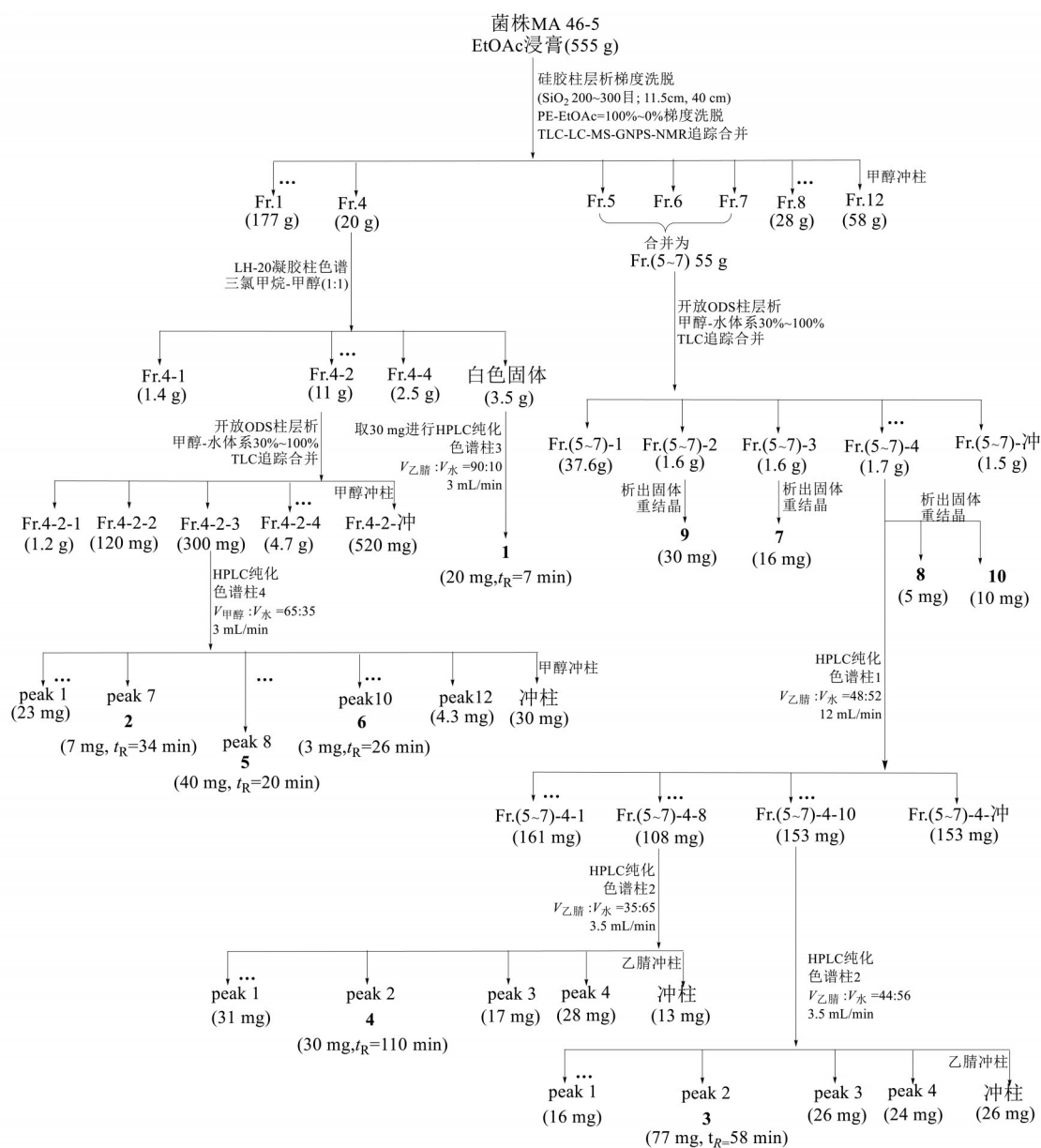
菌株 MA 46-5 大米培养基规模培养后, 依次采用乙酸乙酯 (EtOAc、300 mL/瓶/次, 2 次)、甲醇 (300 mL/瓶/次, 1 次) 浸提, EtOAc 提取液合并、减压浓缩得到 EtOAc-1 浸膏 (540 g)。甲醇提取液减压浓缩, 水捏溶后依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取, 减压浓缩 EtOAc 提取液, 得 EtOAc-2 浸膏 (15 g)。

TLC、LC-MS 和 NMR 分析 EtOAc-1 和 EtOAc-2, 将二者合并为 EtOAc 浸膏 (555 g)。

对 EtOAc 浸膏 (555 g) 进行硅胶柱层析, 经 TLC 薄层板追踪合并得 12 个流份, 并综合 LC-MS 和 GNPS 分析, 确定 Fr.4~Fr.7 为富含生物碱部位, 并将 Fr.5、Fr.6 和 Fr.7 合并为 Fr.(5~7) 继续展开分离, 1~10 的详细分离过程见图 3。

1.4 物理常数和波谱数据

化合物 1: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 157~161 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25}$ +145.6 (*c* 0.1, CHCl₃); HR-ESI-MS: *m/z* 547.215 9 [M+H]⁺, 分子式 C₂₉H₃₀N₄O₇ (Calcd. for C₂₉H₃₁N₄O₇⁺: 547.219 3)。CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 200 (-12.5), 212 (+13.13), 232 (-7.69), 298 (-0.47) nm。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_C 见表 2。

图3 菌株 *Aspergillus giganteus* MA 46-5 大米培养基化合物 1~10 分离流程图Fig. 3 The flowing chart of 1-10 from *Aspergillus giganteus* MA 46-5 on the rice medium

化合物 2: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 227~229 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} +121.5$ (c 0.1, CHCl₃); HR-ESI-MS: m/z 533.202 9 [M+H]⁺, 分子式 C₂₈H₂₈N₄O₇ (Calcd. for C₂₈H₂₉N₄O₇⁺: 533.203 6)。CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 206 (-7.61), 222 (+12.35), 250 (-4.56), 308 (+1.14) nm。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_C 见表 2。

化合物 3: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 150~152 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} +48.8$ (c 0.1, CHCl₃); HR-ESI-MS: m/z 531.219 6 [M+H]⁺, 分子式 C₂₉H₃₀N₄O₆ (Calcd. for C₂₉H₃₁N₄O₆⁺: 531.224 4)。CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 218 (+9.53), 240 (-0.20), 306 (+1.37) nm。¹H NMR

(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_H 和 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ_C 见表 2。

化合物 4: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 192~193 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} +54.1$ (c 0.1, CHCl₃); HR-ESI-MS: m/z 517.205 8 [M+H]⁺, 分子式 C₂₈H₂₈N₄O₆ (Calcd. for C₂₈H₂₉N₄O₆⁺: 517.208 7)。CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 202 (-16.12), 218 (+21.19), 238 (-2.04), 308 (+1.02) nm。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_H 和 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ_C 见表 2。

化合物 5: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 195~199 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} -23.5$ (c 0.1, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 505.205 9 [M+H]⁺, 分子式 C₂₇H₂₈N₄O₆ (Calcd.

表2 化合物1-6的NMR数据(1-2测试溶剂为CDCl₃, 3-6测试溶剂为DMSO-d₆)
Table 2 NMR data of 1-6 (1-2 in CDCl₃ and 3-6 in DMSO-d₆)

No.	1		2		3		4		5		6	
	δ_c -type	δ_H -mult./Hz	δ_c -type	δ_H -mult./Hz	δ_c -type	δ_H -mult./Hz	δ_c -type	δ_H -mult./Hz	δ_c -type	δ_H -mult./Hz	δ_c -type	δ_H -mult./Hz
2	87.9, d	5.00, s	90.2, d	5.21, s	80.9, d	5.47, d, 7.3	83.4, d	5.47, d, 6.8	86.5, d	5.19, s	175.6, s	
3	84.4, s		84.4, s		84.4, s		85.3, s		83.0, s		80.9, s	
4	133.9, s		133.8, s		134.7, s		134.6, s		133.2, s		126.3, s	
5	124.1, d	7.39, brd, 7.8	124.0, d	7.41, brd, 7.6	126.3, d	8.01, d, 7.6	126.1, d	8.01, d, 7.6	126.2, d	7.83, d, 7.6	125.3, d	7.68, d, 7.6
6	125.6, d	7.23, td, 7.8, 1.2	125.6, d	7.26, td, 7.6, 1.2	125.2, d	7.34, td, 7.6, 1.5	125.6, d	7.37, t, 7.4	125.3, d	7.35, td, 7.5, 1.2	123.0, d	7.16, td, 7.6, 1.0
7	131.9, d	7.45, td, 7.8, 1.2	132.0, d	7.48, td, 7.6, 1.2	131.4, d	7.53, td, 7.6, 1.2	131.4, d	7.54, t, 7.4	131.7, d	7.55, td, 7.5, 1.2	131.6, d	7.40, td, 7.8, 1.0
8	116.2, d	7.60, brd, 7.8	116.1, d	7.63, brd, 7.6	114.9, d	7.50, dd, 7.9, 1.2	115.8, d	7.48, d, 7.6	114.6, d	7.48, d, 7.6	110.7, d	6.95, d, 7.6
9	138.1, s		137.8, s		138.0, s		138.7, s		138.1, s		142.9, s	
11	169.7, s		169.4, s		170.7, s		170.6, s		171.1, s		171.5, s	
12	55.0, d	5.67, t, 10.1	54.9, d	5.69, t, 9.9	54.3, d	5.77, d, 9.0	54.5, d	5.79, d, 8.7	54.8, d	6.07, t, 10.0	53.9, d	5.94, t, 9.7
13a	34.0, t	3.06, dd, 13.9, 9.5	33.6, t	3.04, dd, 13.9, 9.3	34.1, t	3.21, dd, 13.8, 10.5	32.5, t	3.18, dd, 13.8, 10.5	34.8, t	3.41, overlap	33.3, t	3.00, dd, 9.9, 13.6
13b		3.17, dd, 13.9, 10.6		3.21, dd, 13.9, 10.5		2.83, dd, 14.0, 8.4		2.83, dd, 14.0, 8.8		2.94, dd, 13.0, 9.5		2.95, dd, 9.9, 13.6
14	171.1, s		169.3, s		174.9, s		174.9, s		171.0, s			
15	71.7, s		68.1, d	4.37, q, 7.1	64.6, s		59.6, d	3.98, m	68.9, s			
16			7.10, s	7.29, s			3.16, d, 7.4	3.64, t, 6.3		8.79, s		
18	161.6, s		161.6, s		160.3, s		160.3, s		161.4, s		160.7, s	
19	120.4, s		120.2, s		119.7, s		119.8, s		119.9, s		120.0, s	
20	126.9, d	8.24, dd, 7.9, 1.2	126.8, d	8.23, dd, 7.7, 1.3	126.4, d	8.21, dd, 7.9, 1.3	126.4, d	8.19, d, 8.0	126.2, d	8.23, dd, 8.0, 1.2	126.4, d	8.23, dd, 8.0, 1.3
21	128.3, d	7.53, td, 8.1, 1.6	128.2, d	7.55, td, 7.7, 1.3	127.9, d	7.62, td, 7.2, 1.2	127.9, d	7.63, t, 8.0	127.5, d	7.62, td, 7.5, 1.2	128.1, d	7.64, td, 7.6, 1.0
22	135.6, d	7.82, td, 8.1, 1.6	135.3, d	7.84, td, 7.7, 1.3	135.5, d	7.91, td, 7.6, 1.5	135.6, d	7.91, t, 8.0	135.3, d	7.91, td, 7.5, 1.5	135.6, d	7.93, td, 7.6, 1.5
23	128.0, d	7.78, dd, 7.8, 1.0	127.9, d	7.79, brd, 7.7	127.4, d	7.74, d, 8.0	127.4, d	7.74, d, 8.0	127.2, d	7.74, d, 7.6	127.5, d	7.75, d, 8.0
24	146.7, s		146.6, s		146.2, s		146.2, s		146.2, s		146.1, s	
26	152.7, s		152.6, s		155.0, s		155.1, s		157.0, s		153.7, s	
27	77.3, d	5.58, d, 9.2	77.2, d	5.57, d, 9.1	75.8, d	6.15, q, 9.0	75.8, d	6.15, t, 9.8	80.6, d	4.39, dd, 9.5, 4.7	78.3, d	5.52, d, 9.2
28	32.0, d	2.65, m	31.9, d	2.66, m	31.9, d	2.46, m	32.0, d	2.46, m	32.3, d	2.25, m	31.5, d	2.36, m
29	18.8, q	1.05, d, 6.4	18.8, q	1.05, d, 6.9	18.2, q	0.95, d, 6.8	18.2, q	0.94, d, 6.8	20.2, q	1.05, d, 6.5	18.7, q	1.12, d, 6.5
30	19.0, q	1.18, d, 6.8	18.7, q	1.20, d, 6.9	17.7, q	1.15, d, 6.8	17.6, q	1.15, d, 6.8	19.2, q	0.82, d, 6.5	18.0, q	0.93, d, 6.7
32	171.2, s		171.2, s		170.7, s		170.9, s		170.9, s		170.2, s	
33	20.9, q	2.18, s	20.7, q	2.19, s	20.4, q	2.10, s	20.4, q	2.10, s	16.2, q	1.33, s	20.4, q	2.07, s
34	17.2, q	1.48, s	11.2, q	1.60, d, 7.1	24.9, q	1.44, s	18.5, q	1.41, d, 7.0	16.2, q	1.33, s		
35	22.9, q	1.51, s	25.6, q	1.36, s					22.8, q	1.25, s		
27-OH											6.38, d, 4.8	

for $C_{27}H_{29}N_4O_6^+$: 505.208 7)。 CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 210 (+63.01), 228 (-47.86), 298 (-3.68) nm。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_H 和 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_C 见表 2。

化合物 6: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 196~203 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} +101$ (c 0.07, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 462.163 1 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{25}H_{23}N_3O_6$ (Calcd. for $C_{25}H_{24}N_3O_6^+$: 462.166 5)。 CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 214 (-23.55), 228 (+23.23), 250 (+1.90), 264 (+6.06), 288 (+2.09), 306 (+4.06) nm。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_H 和 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_C 见表 2。

化合物 7: 无色晶体 (MeOH), θ_{mp} 205~211 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} -21$ (c 0.1, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 486.207 4 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{27}H_{27}N_5O_4$ (Calcd. for $C_{27}H_{28}N_5O_4^+$: 486.214 1)。 CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 226 (-14.48), 250 (+2.94), 268 (+0.45), 288 (+1.92), 320 (-3.23) nm。 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H 和 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ_C 见表 3。

化合物 8: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 201~205 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} -177.7$ (c 0.1, $CHCl_3$); HR-ESI-MS: m/z 518.232 1 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{28}H_{31}N_5O_5$ (Calcd. for $C_{28}H_{32}N_5O_5^+$: 518.240 3)。 CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 204 (+2.04), 212 (+9.21), 234 (-9.79), 286 (-0.36), 306 (-0.98) nm。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_H 和 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_C 见表 3。

化合物 9: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 187~193 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} -82.2$ (c 0.1, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 440.169 1 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{25}H_{21}N_5O_3$ (Calcd. for $C_{25}H_{22}N_5O_3^+$: 440.172 3)。 CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 210 (-34.33), 224 (+9.96), 240 (-30.42), 302 (+5.13) nm。 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H 和 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ_C 见表 3。

化合物 10: 白色固体 (MeOH), θ_{mp} 281~284 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} +74.7$ (c 0.1, EtOAc); HR-ESI-MS: m/z 343.115 0 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{20}H_{14}N_4O_2$ (Calcd. for $C_{20}H_{15}N_4O_2^+$: 343.119 5)。 CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 214 (-24.90), 232 (+10.66), 266 (+14.37), 292 (-5.95), 320 (+2.77) nm。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_H 和 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ_C 见表 3。

1.5 LC-MS 分析及 GNPS 建立

粗流份样品质量浓度为 2.0 mg/mL, 单体样品质量浓度为 0.1 mg/mL, 甲醇配制。UPLC 流动相为乙腈水 (0~2.5 min 10%~30% ACN- H_2O 、2.5~11.5

min 30%~90% ACN- H_2O 、11.5~16 min 100% ACN- H_2O), 流速 0.7 mL/min, 进样量 5 μ L, 柱温 30 °C。色谱柱 5, 测试仪器为 Triple TOF™ 5600+ 质谱系统。质谱条件和 GNPS 的建立方法参考蔡金旋等 (2022)。

2 结果与分析

2.1 结构解析

化合物 1 HR-ESI-MS m/z 547.215 9 $[M+H]^+$, 结合 ^{13}C NMR 和 DEPT 分析 (29 个碳: 11 个 C、12 个 CH、1 个 CH_2 以及 5 个 CH_3), 确定 1 分子式为 $C_{29}H_{30}N_4O_7$, 不饱和度为 17。NMR 显示 1 含有 2 组芳香环信号 [δ_C 133.9 (s, C-4)、124.1 (d, C-5)、125.6 (d, C-6)、131.9 (d, C-7)、116.2 (d, C-8)、138.1 (s, C-9)、120.4 (s, C-19)、126.9 (d, C-20)、128.3 (d, C-21)、135.6 (d, C-22)、128.0 (d, C-23)、146.7 (s, C-24)]; δ_H 7.39 (1H, brd, $J=7.8$ Hz, H-5)、7.23 (1H, td, $J=7.8, 1.2$ Hz, H-6)、7.45 (1H, td, $J=7.8, 1.2$ Hz, H-7)、7.60 (1H, brd, $J=7.8$ Hz, H-8)、8.24 (1H, dd, $J=7.9, 1.2$ Hz, H-20)、7.53 (1H, td, $J=8.1, 1.6$ Hz, H-21)、7.82 (1H, td, $J=8.1, 1.6$ Hz, H-22)、7.78 (1H, dd, $J=7.8, 1.0$ Hz, H-23)]、3 个羰基信号 [δ_C 169.7 (s, C-11)、171.1 (s, C-14)、161.6 (s, C-18)] 和 1 个亚甲基 [δ_C 34.0 (t, C-13); 3.06 (1H, dd, $J=13.9, 9.5$ Hz, H-13a)、3.17 (1H, dd, $J=13.9, 10.6$ Hz, H-13b)], 以上信号符合 IQAs 类生物碱结构特征, 提示 1 可能为此类生物碱 (Clardy et al., 1975)。将 1 的 NMR 数据 (见表 2) 进行归属, 并与 tryptoquivaline (Clardy et al., 1975; Fujimoto et al., 1996) 进行比较, 二者的 NMR 数据基本一致, 确定 1 的平面结构与 tryptoquivaline 相同, 相同平面结构还有 27-*epi*-tryptoquivaline ($[\alpha]_D^{25} +138$, $CHCl_3$)。对比三者的 NMR 数据和旋光数值发现 1 ($[\alpha]_D^{25} +145.6$, $CHCl_3$) 的比旋光值和 NMR 与 tryptoquivaline ($[\alpha]_D^{25} +142$, $CHCl_3$) 一致, 故此确定 1 为 tryptoquivaline。Clardy et al. (1975) 通过对 Tryptoquivaline 的溴苯基聚氨酯衍生物的单晶进行 X 射线单晶衍射 (Cu $K\alpha$), 确定其绝对构型为 2*R*, 3*R*, 12*S*, 27*R*; Springer (1979) 对 TQ 系列未衍生化的 nortryptoquivaline (2) 进行 X 射线单晶衍射实验, 将 TQ 系列的绝对立体构型修正为 2*S*, 3*S*, 12*R*, 27*S*; 2013 年李德海课题组 (Peng et al., 2013) 同样采用 XRD (Cu $K\alpha$) 方法对未衍生化的 tryptoquivaline 进行测试, 确定其绝对构型为 2*S*, 3*S*, 12*R*, 27*S*, 与 Springer 确定的同系列衍生物的绝对构型一致。将 1 的 CD 数据 [CD (MeOH)

$\lambda_{\max}(\Delta\epsilon)$ 200 (-12.5), 212 (+13.13), 232 (-7.69), 298 (-0.47) nm]与 tryptoquivaline[CD (CHCl₃) $\lambda_{\max}(\Delta\epsilon)$ 203 (-11.35), 219.4 (+21.84), 254.8 (-6.20), 308.3 (+1.42) nm](Peng et al., 2013)对比, 发现二者 CD 数据趋势一致, 故确定 **1** 的绝对构型为 2*S*、3*S*、12*R*、27*S*。

化合物 **2** HR-ESI-MS (m/z 533.202 9 [M+H]⁺) 显示其分子式为 C₂₈H₂₈N₄O₇, 不饱和度为 17。对比 **2** 和 **1** 的 NMR 数据发现, 二者十分相似。与 **1** 相比, **2** 仅缺少一个甲基(**1**: δ_{C} 22.9, q, C-35; δ_{H} 1.51, 3H, s, H₃-35) 和一个季碳(**1**: δ_{C} 71.7, s, C-15), 增加了一个次甲基(δ_{C} 68.1, d, C-15; δ_{H} 4.37, 1H, q, $J=7.1$ Hz, H₃-15), 提示 **2** 的 C-15 位由原来的偕二甲基变为单甲基取代。将 **2** 的 NMR 数据进行归属, 确定 **2** 的平面结构与 nortryptoquivaline ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}+115$, CHCl₃) 一致(Yamazaki et al., 1977; Springer et al., 1979), 经 SciFinder 检索相同平面结构还有 27-*epi*-nortryptoquivaline ($[\alpha]_{\text{D}}^{18}+196$, CHCl₃)。经 NMR、OR 和 CD 比对, 确定 **2** ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}+121.5$, CHCl₃) 为 nortryptoquivaline。

化合物 **3** HR-ESI-MS (m/z 531.219 6 [M+H]⁺) 显示其分子式为 C₂₉H₃₀N₄O₆, 不饱和度为 17。与 **1** 的 NMR 数据对比发现, **3** 缺少与 N-16 相连的羟基信号(**1**: δ_{H} 7.10, 1H, s, 16-OH) 而增加了一个氢信号 δ_{H} 3.16 (1H, d, $J=7.4$ Hz, H-16)。且其 C-2 和 C-15 位的碳谱数值(**1**: δ_{C} 87.9, d, C-2 和 71.7, s, C-15) 明显向高场移动(**3**: δ_{C} 80.9, d, C-2 和 64.6, s, C-15), 同时 H-2 的峰型由原来的单峰(**1**: δ_{H} 5.00, 1H, s, H-2) 裂分为双峰(δ_{H} 5.47, 1H, d, $J=7.3$ Hz, H-2), 说明 N-16 羟基的缺失。将 **3** 的 NMR、OR 和 CD 与 deoxytryptoquivaline (Buchi et al., 1977; Gao et al., 2011) 对照, 二者基本一致, 故确定 **3** 为 deoxytryptoquivaline。化合物 **4** HR-ESI-MS: m/z 517.205 8 [M+H]⁺, 分子式为 C₂₈H₂₈N₄O₆, 其不饱和度为 17。**4** 的 NMR 与 **3** 非常相似, 唯一不同的是 C-15 位偕二甲基取代变为单甲基取代。将 **4** 的 NMR、OR 和 CD 与 deoxynortryptoquivaline (Peng et al., 2013) 对照, 二者数据基本一致, 确定 **4** 为 deoxynortryptoquivaline。

化合物 **5** HR-ESI-MS (m/z 505.205 9 [M+H]⁺, 分子式为 C₂₇H₂₈N₄O₆, 不饱和度为 16。NMR 数据显示 **5** 比 **1** 仅少了乙酰基信息(**1**: δ_{C} 171.2, s, C-32 和 20.9, q, C-33; δ_{H} 2.18, 3H, s, H₃-33), 而增加了一个活泼氢信号 δ_{H} 6.38 (1H, d, $J=4.8$ Hz, 27-OH)。同时 27 位的碳谱数据(**1**: δ_{C} 77.3, d, C-27) 向低场移动 δ_{C} 80.6 (d, C-27), 暗示其 27 位乙酰基消失。将 **5**

的 NMR 数据进行归属, 确定 **5** 的平面结构与 aspertoryadin C ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}-20$, MeOH) 一致(Kong et al., 2019), 相同的平面结构还有 aspertoryadin B ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}+14$, MeOH)。经 NMR、OR 以及 CD 比对, 确定 **5** ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}-23.5$, MeOH) 为 aspertoryadin C。

化合物 **6** HR-ESI-MS m/z 462.163 1 [M+H]⁺ 提示其分子式为 C₂₅H₂₃N₃O₆, 不饱和度 16。将 **6** 的 NMR 与 **1** 比较发现 **6** 缺少羰基咪唑环信号(**1**: δ_{C} 87.9, d, C-2、171.1, s, C-14 和 71.7, s, C-15; δ_{H} 5.00, 1H, s, H-2 和 7.10, 1H, s, OH-16), 而增加一个羰基(δ_{C} 175.6, s, C-2), 同时根据质谱的 N 规则也可得出 **6** 含有奇数个 N 元素, 因此 **6** 缺失羰基咪唑环且二氢吡啶环 C-2 位被氧化为羰基。将 **6** 的 NMR 数据与 aspertoryadin G ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}+93$, MeOH) 对比(Kong et al., 2019), 发现二者基本一致, 相同平面结构还有 aspertoryadin F ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}-76$, MeOH)。经 NMR、OR 及 CD 比对, 确定 **6** ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}+101$, MeOH) 为 aspertoryadin G。

化合物 **7** 结合 ¹³C NMR 和 DEPT (27 个碳: 12 个 C、10 个 CH、1 个 CH₂ 以及 4 个 CH₃) 及 HR-ESI-MS (m/z 486.207 4 [M+H]⁺) 显示其分子式为 C₂₇H₂₇N₅O₄, 不饱和度为 17。与 **1** 比较, **7** 增加了酰胺羰基 (δ_{C} 168.3, s, C-1) 和活泼氢 (δ_{H} 7.98, 1H, brs, H-2), 且与 N 相连的叔碳 (**1**: δ_{C} 55.0, d, C-12) 向高场移动 (δ_{C} 51.3, d, C-14), 提示 **7** 存在六元吡嗪环与喹啉酮环稠和而五元内酯环消失, 故 **7** 为 FQ 类结构(Qian et al., 2019; Resende et al., 2019; Li et al., 2020)。同时 δ_{C} 120.9 (s, C-3) 和 132.7 (s, C-28) 为一组特殊的双键信号, 在 IQAs 类生物碱中较少见。将 **7** 的 NMR 数据进行归属, 确定 **7** 的平面结构与 quinadoline A ($[\alpha]_{\text{D}}^{22}-19.56$, MeOH) 一致(Peng et al., 2013; Huang et al., 2017), 相同的平面结构还有 scequinadoline F ($[\alpha]_{\text{D}}^{22}-54.8$, MeOH)。将三者的数据进行比较, **7** ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}-21$, MeOH) 的 NMR、OR 以及 CD 与 quinadoline A 基本一致, 故确定 **7** 为 quinadoline A。

化合物 **8** HR-ESI-MS (m/z 518.232 1 [M+H]⁺)、¹³C NMR 和 DEPT (28 个碳: 11 个 C、11 个 CH、1 个 CH₂ 及 5 个 CH₃) 确定其分子式 C₂₈H₃₁N₅O₅, 不饱和度为 16。**8** 的 NMR 数据与 **7** 非常相似, 仅缺少一组四取代双键信号(**7**: δ_{C} 120.9, s, C-3 和 132.7, s, C-28), 而增加了一个季碳信息 (δ_{C} 88.5, s, C-3) 和一个次甲基 (δ_{C} 31.2, d, C-28; δ_{H} 3.03, 1H, m, H-28), 提示其 3 位双键消失。同时 NMR 还显示其增加了一个甲氧基信息 (δ_{C} 50.3, d, C-34 和 δ_{H} 3.18, 3H, s,

H₃-34)。将 **8** 的 NMR 数据进行归属, 确定其平面结构与 fiscalin E ($[\alpha]_D^{22} -172$, CHCl₃) (Yu et al., 2016) 一致, 经 SciFinder 检索相同的平面结构还有 fiscalin F ($[\alpha]_D^{22} -228$, CHCl₃), 将 **8** ($[\alpha]_D^{25} -177.7$, CHCl₃) 与二者 NMR、OR 以及 CD 数据进行比对, 确定 **8** 为 fiscalin E。

化合物 **9** HR-ESI-MS (m/z 440.169 1 [M+H]⁺)、¹³C NMR 和 DEPT (25 个碳: 9 个 C、12 个 CH 和 4 个 CH₂) 确定其分子式 C₂₅H₂₁N₅O₃, 不饱和度为 18。NMR 信息提示 **9** 除了吡啶喹啉酮环片段和二氢吡啶羰基咪唑环片段外, 还存在 4 个亚甲基信号 [δ_C 33.9 (t, C-15)、56.5 (t, C-28)、25.0 (t, C-29)、29.7 (t, C-30); δ_H 1.82 (1H, m, H-15)、3.03 (1H, dd, $J=14.0, 4.2$ Hz, H-15)、1.82 (2H, m, H-28)、1.47 (2H, m, H-29)、1.92 (1H, dd, $J=14.0, 2.0$ Hz, H-30)、1.98 (1H, m, H-30)], 其中 C-28 ~ C-30 是与羰基咪唑环稠合的五元环上的 3 个亚甲基信号。**9** 的 NMR 和相对分子质量与 quinadoline B (Koyama et al., 2008) 一致, 经 NMR 和 OR 比对, 确定其为 quinadoline B。Quinadoline B 为螺环吡啶喹啉类生物碱, 在 FQ 类基本骨架 (C-14-15-16) 的基础上, C-3 与 C-16 位相连, 且 C-16 螺原子形成独特的螺环结构, 同时在吡啶环上与脯氨酸又形成新的五元羰基咪唑环。

化合物 **10** HR-ESI-MS (m/z 343.115 0 [M+H]⁺)、¹³C NMR 和 DEPT (20 个碳: 9 个 C、10 个 CH、1 个 CH₂) 确定其分子式 C₂₀H₁₄N₄O₂, 不饱和度为 16。NMR 显示除吡啶喹啉酮环片段和吡啶环外, 仅

有一个亚甲基 (δ_C 25.6, t, C-15; δ_H 3.43, 1H, dd, $J=17.4, 3.4$ Hz、3.24, 1H, dd, $J=17.4, 4.4$ Hz), 再无其他取代基信息。将 **10** 的 NMR 数据进行归属, 与 prelapatin B (Peng et al., 2013) 一致, 经 NMR 和 OR 比对, 确定 **10** 为 prelapatin B。**10** 与 **9** 不同之处在其 C-3 不与 C-16 位相连, 而是与 C-17 相连形成桥环, 即吡啶咪唑环与吡啶喹啉酮通过 C-3 和 C-14 位形成桥环结构。

2.2 GNPS 结果分析

全球天然产物分子网络技术 (GNPS, global natural products social molecular networking) 是一种可视化计算策略, 通过计算机算法计算化合物在同一条件下产生的 LC-MS/MS 二级质谱碎片的相似度, 具有相同二级质谱碎片的相对分子质量将聚合成一个分子簇 (Wei et al., 2022)。GNPS 分子网络中分子簇 (cluster) 的每个节点 (node) 的数字代表化合物的母离子峰, 节点的颜色代表化合物的来源, 节点之间连线的粗细代表化合物相似度的大小。GNPS 分析贯穿分离的每个阶段, 前期 GNPS 分子网络分析结果提示, Fr.4~Fr.7 为生物碱富集部位, 并分离得到化合物 **1**~**10**。为进一步排除重复和预测可能的化合物, 将硅胶柱层析得到的亚流份 Fr.1~Fr.12 与化合物 **1**~**10** 建立 GNPS 分子网络 (图 4)。分析图 4 可知, A 分子簇 (**3**, **4**) 和 C 分子簇 (**1**, **5** 和 **6**) 主要为 TQ 类, 可能为此类结构新化合物的相对分子质量 [M+H]⁺ 有: 489、549、559、536 和 553 等。B 分子簇同时存在有 TQ 类 (**2**) 和 FQ 类 (**7**、

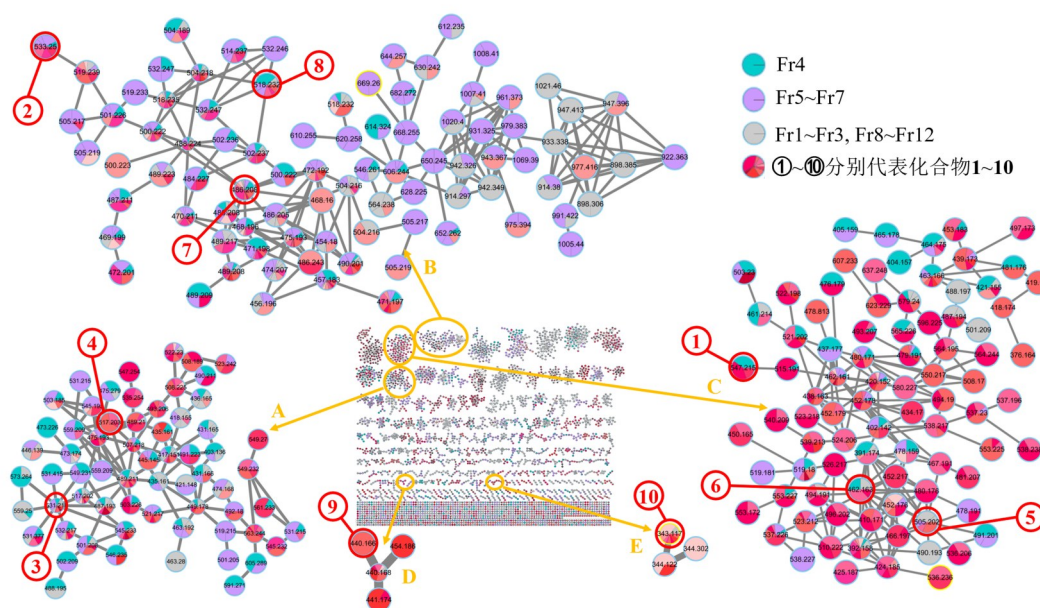


图 4 Fr. 1~Fr. 12 与 **1**~**10** GNPS 分子网络图

Fig. 4 The GNPS molecular network diagram of Fr. 1~Fr. 12 and **1**~**10**

8), 分子笼中相对分子质量信息提示可能为 IQAs 类生物碱新化合物的相对分子质量 $[M+H]^+$ 有 505 和 519 等, 且此分子笼中还有 620、644、668 和 681 等大相对分子质量, 这些相对分子质量可能为 IQAs 生物碱与其他未知类型化合物杂合或有新的环系生成, 以上可能为新化合物的相对分子质量和大相对分子质量化合物将是后续分离的重点。

3 结 论

本研究从菌株 *Aspergillus giganteus* MA 46-5 大米培养基的乙酸乙酯提取物中共分离并鉴定 10 个 IQAs 类生物碱, 结构类型主要为 FQ 类和 TQ 类。8 和 10 为首次从 *Aspergillus* 属中得到, 2、4~7 为首次

从本菌株中分离得到。而 9 则以 C-16 为螺点形成独特的螺环, 10 则以吡啶的咪唑环与吡嗪啉酮的 C-3 和 C-14 位形成桥环结构。Clardy et al.(1975) 发现 1 是一种细胞震颤毒素, 1~3 具有一定的抗 H1N1 病毒活性 (IC_{50} 分别为 87、85 和 89 $\mu\text{mol/L}$) (Peng et al., 2013); 6 对紫色杆菌 CV026 表现出弱的抑制活性 (MIC 值为 32 $\mu\text{g/孔}$) (Kong et al., 2019); 7 和 9 能抑制小鼠脂滴形成 (Koyama et al., 2008); 10 可以促进血管新生 (Fan et al., 2015)。总之 IQAs 类生物碱结构特征显著, LC-MS、GNPS 和 NMR 皆表明该菌株次生代谢产物中还在此类生物碱新颖骨架、大相对分子质量的新化合物未被挖掘。

参考文献:

- 蔡金旋, 冯冉奇, 韦霞, 等, 2022. 2 株软珊瑚共附生曲霉属真菌 EGF7-0-1 和 EGF15-0-3 共培养中杂萜类成分研究 [J]. 中国海洋药物, 41(4): 19-26.
- BÜCHI G, LUK K C, KOBBE B, et al., 1977. Four new mycotoxins of *Aspergillus clavatus* related to tryptoquivaline [J]. J Org Chem, 42(2): 244-246.
- CHEN J J, WANG S W, CHIANG Y R, et al., 2020. Highly oxygenated constituents from a marine *Alga*-derived fungus *Aspergillus giganteus* NTU967 [J]. Mar Drugs, 18(6): 303.
- CLARDY J, SPRINGER J P, BUCHI G, et al., 1975. Letter: Tryptoquivaline and tryptoquivalone, two tremorgenic metabolites of *Aspergillus clavatus* [J]. J Am Chem Soc, 97(3): 663-665.
- FAN Y Q, LI P H, CHAO Y X, et al., 2015. Alkaloids with cardiovascular effects from the marine-derived fungus *Penicillium expansum* Y32 [J]. Mar Drugs, 13(10): 6489-6504.
- FUJIMOTO H, NEGISHI E, YAMAGUCHI K, et al., 1996. Isolation of new tremorgenic metabolites from an ascomycete, *Corynascus setosus* [J]. Chem Pharm Bull, 44(10): 1843-1848.
- GAO X, CHOOI Y H, AMES B D, et al., 2011. Fungal indole alkaloid biosynthesis: Genetic and biochemical investigation of the tryptoquivaline pathway in *Penicillium aethiopicum* [J]. J Am Chem Soc, 133(8): 2729-2741.
- HUANG L H, XU M Y, LI H J, et al., 2017. Amino acid-directed strategy for inducing the marine-derived fungus *Scedosporium apiospermum* F41-1 to maximize alkaloid diversity [J]. Org Lett, 19(18): 4888-4891.
- KONG F D, ZHANG S L, ZHOU S Q, et al., 2019. Quinazoline-containing indole alkaloids from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. HNMF₁₁₄ [J]. J Nat Prod, 82(12): 3456-3463.
- KOYAMA N, INOUE Y, SEKINE M, et al., 2008. Relative and absolute stereochemistry of quinadoline B, an inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages [J]. Org Lett, 10(22): 5273-5276.
- LI C J, CHEN P N, LI H J, et al., 2020. Potential antidiabetic fumiquinazoline alkaloids from the marine-derived fungus *Scedosporium apiospermum* F41-1 [J]. J Nat Prod, 83(4): 1082-1091.
- PENG J, LIN T, WANG W, et al., 2013. Antiviral alkaloids produced by the mangrove-derived fungus *Cladosporium* sp. PJX-41 [J]. J Nat Prod, 76(6): 1133-1140.
- QIAN S Y, YANG C L, KHAN A, et al., 2019. New pyrazinoquinazoline alkaloids isolated from a culture of *Stenotrophomonas maltophilia* QB-77 [J]. Nat Prod Res, 33(9): 1387-1391.
- RESENDE D I S P, BOONPOTHONG P, SOUSA E, et al., 2019. Chemistry of the fumiquinazolines and structurally related alkaloids [J]. Nat Prod Rep, 36(1): 7-34.
- SPRINGER J P, 1979. The absolute configuration of nortryptoquivaline [J]. Tetrahedron Lett, 20(4): 339-342.
- WEI X, SU J C, HU J S, et al., 2022. Probing indole diketopiperazine-based hybrids as environmental-induced products from *Aspergillus* sp. EGF 15-0-3 [J]. Org Lett, 24(1): 158-163.
- YAMAZAKI M, FUJIMOTO H, OKUYAMA E, 1977. Structure of tryptoquivaline C (FTC) and D (FTD). novel fungal metabolites from *Aspergillus fumigatus* [J]. Chem Pharm Bull, 25(10): 2554-2560.
- YAMAZAKI M, FUJIMOTO H, OKUYAMA E, 1978. Structure determination of six fungal metabolites, tryptoquivaline E, F, G, H, I and J from *Aspergillus fumigatus* [J]. Chem Pharm Bull, 26(1): 111-117.
- YU G, ZHOU G, ZHU M, et al., 2016. Neosartoryadins A and B, fumiquinazoline alkaloids from a mangrove-derived fungus *Neosartorya udagawae* HDN13-313 [J]. Org Lett, 18(2): 244-247.