



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105503780 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201510955816. 4

A01P 1/00(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 17

(71) 申请人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650000 云南省昆明市盘龙区黑龙潭蓝
黑路 132 号

(72) 发明人 赵沛基 李靖 谢津

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350
代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

C07D 303/38(2006. 01)

C07D 307/79(2006. 01)

C07D 493/04(2006. 01)

C07C 59/90(2006. 01)

C07C 59/56(2006. 01)

A01N 43/90(2006. 01)

A01N 37/42(2006. 01)

A01N 37/38(2006. 01)

A01N 43/20(2006. 01)

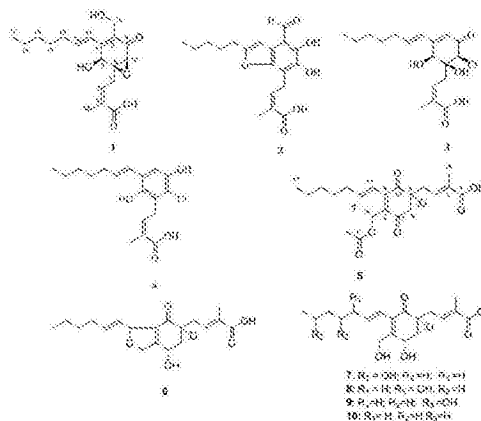
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

具有抗细菌活性的 Pestalotic acid 化合物
及其应用

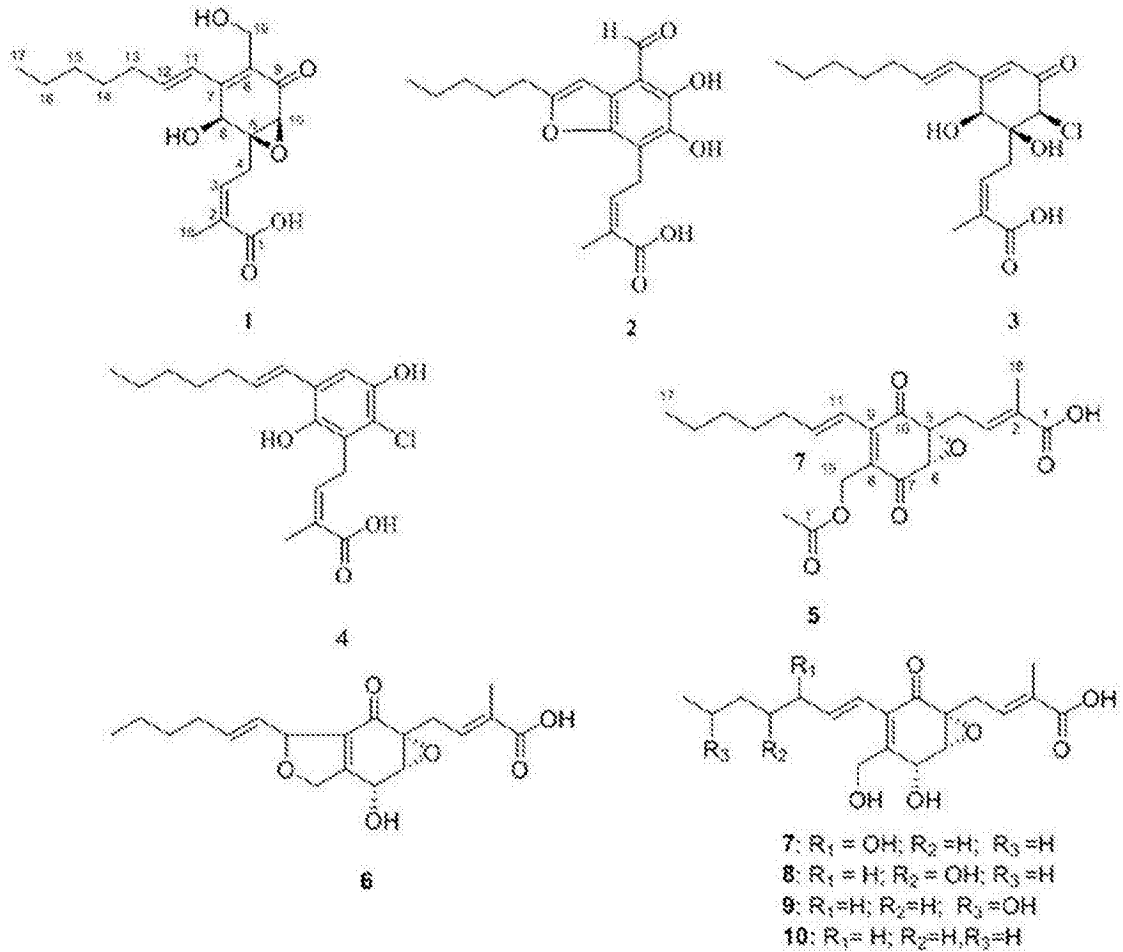
(57) 摘要

本发明提供了一类具有抗细菌活性的 Pestalotic acid 化合物,是将重寄生拟盘多毛孢菌株发酵培养后,再经提取与分离后得到的化合物,本发明的 pestalotic acid 化合物获取简单,具有抗细菌活性,抗细菌活性高,能够作为抗细菌剂用于防治植物青枯病,为研制抗细菌剂,防治植物病害提供了新的途径。



1. 具有抗菌活性的Pestalotic acid化合物,是将重寄生拟盘多毛孢菌株发酵培养后,再经提取与分离后得到的化合物。

2. 如权利要求1所述具有抗菌活性的Pestalotic acid化合物,其特征在于,结构式如下:



3. 如权利要求2所述具有抗菌活性的Pestalotic acid化合物的抗菌活性应用。

具有抗细菌活性的Pestalotic acid化合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,具体涉及一类具有抗细菌活性的Pestalotic acid化合物及其应用。

背景技术

[0002] 植物内生真菌(fungal endophyte)是指生活史的一定阶段或全部阶段生活与健康植物各组织合格器官内的真菌。它们与宿主植物通过相互作用形成了紧密的共生关系,可以促进植物的生长,提供植物应对胁迫的适应能力,有的植物内生真菌还具有药用价值。从植物内生真菌中寻找和发现活性化合物已成为国内外研究的又一热点,如中国专利文献CN201310194836.5公开了一株龙胆中分离得到的内生真菌(Metarrhizium)LD421,可用于防治龙胆叶枯病;专利申请CN201210067829.4则公开了从银杏根、茎、叶等组织中分离得到的内生真菌腐皮镰孢菌T-7,对辣椒疫霉病菌、番茄枯萎病菌、苹果腐烂病菌等具有很好的抑制作用。

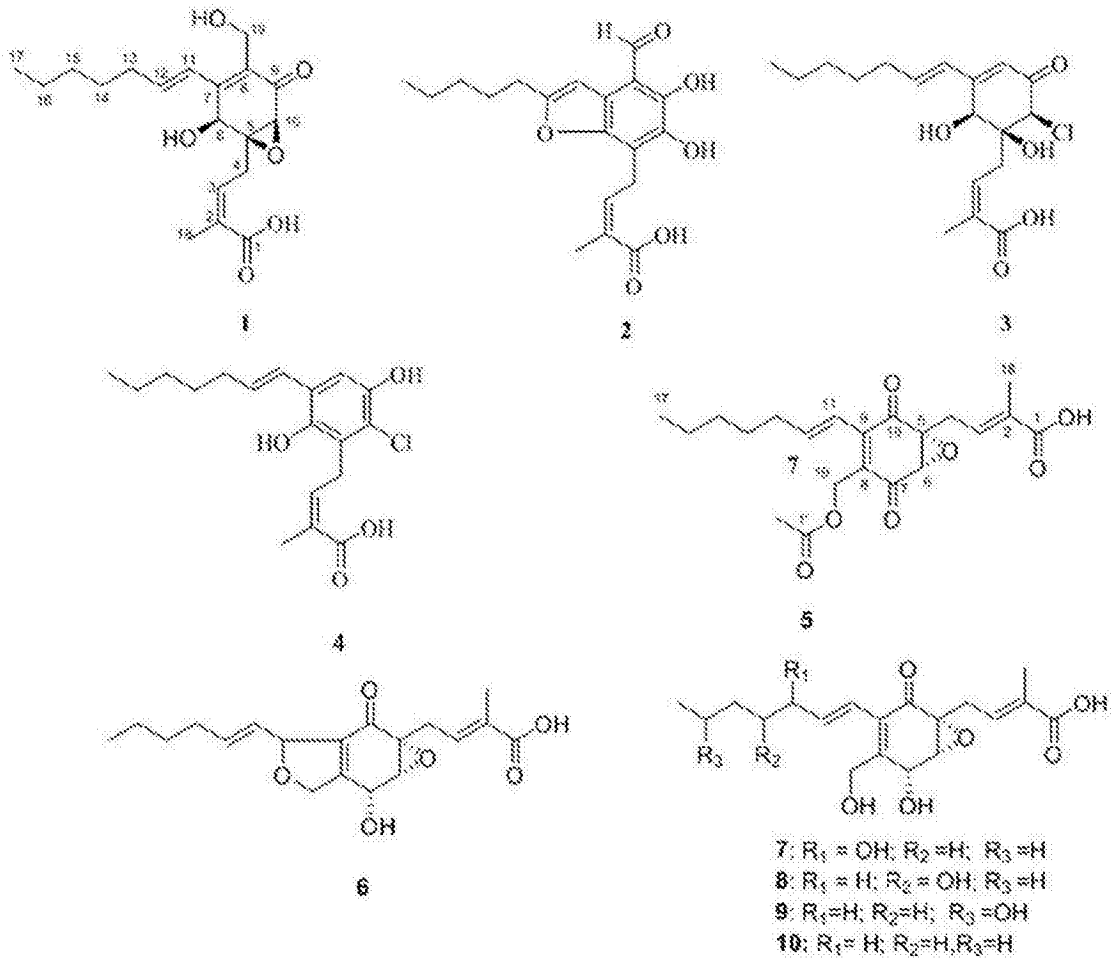
[0003] 目前在农业生产过程中控制农作物病虫害的主要手段是化学农药防治,其对减轻病虫害,保证农作物丰产丰收起到积极的作用,但是由于自然界生物之间的相互制约相互依存,现在已不建议过分依赖化学农药在进行病害的处理;因此,对植物内生真菌的研究,利用植物内生真菌与宿主植物生物活性共生的关系,来筛选具有高生物活性的内生真菌,进一步获得活性产物,是近年来研究的一大热点。

发明内容

[0004] 本发明的目的旨在提供一类具有抗细菌活性的Pestalotic acid化合物及其抗细菌活性应用。

[0005] 本发明的具有抗细菌活性的Pestalotic acid化合物,是将重寄生拟盘多毛孢菌株发酵培养后,再经提取与分离后得到的化合物,结构式如下:

[0006]



[0007] 本发明的具有抗菌活性的Pestalotic acid化合物的制备方法,包括以下工艺步骤:

[0008] 步骤①:将重寄生拟盘多毛孢菌株用培养基室温下培养10-30天;

[0009] 步骤②:将所述步骤①中培养基连同其上的菌落一同切为块状,然后使用混合溶剂浸泡提取3次;将3次提取物合并浓缩后,用萃取剂萃取至颜色不再改变,然后用旋转蒸发仪40-50℃减压浓缩至干得浸膏;

[0010] 步骤③:将所述步骤②中的浸膏用溶剂溶解后再用硅胶拌样,经正相柱层析,然后用石油醚-乙酸乙酯、氯仿-甲醇系统梯度洗脱,最后经过TLC层析检测,将含有相同R_f值和显色情况的化合物组分合并在一起,分别减压浓缩至干,得到10个组分Fr.1至Fr.10;

[0011] 步骤④:将所述步骤③中的化合物组分Fr.1至Fr.10分别用常规分离或洗脱方法中的一种或多种组合进行反复分离、洗脱后得到具有抗菌活性的Pestalotic acid化合物,所述常规分离或洗脱方法为以下所列方法:

[0012] (1)Sephadex LH-20分离;

[0013] (2)NP7000型-高效液相色谱仪分离;

[0014] (3)用硅胶拌样,洗脱柱填装为GF254硅胶,用石油醚-丙酮系统进行等度洗脱。

[0015] 所述步骤①中培养基的组成(改良M-1-D培养基):NaH₂PO₄·H₂O 20mg,FeCl₃ 2.0mg,MgSO₄ 360mg,KCl 60mg,Ca(NO₃)₂ 2280mg,KNO₃ 80mg,蔗糖30g,酒石酸铵5g,酵母浸膏0.5g,MnSO₄ 5.0mg,ZnSO₄·7H₂O 2.5mg,H₃BO₄ 1.4mg,KI 0.7mg,蒸馏水1000mL,琼脂15-

20g, pH自然;所述步骤①中培养基的体积为30L。

[0016] 所述步骤①中的重寄生拟盘多毛孢菌株为重寄生拟盘多毛孢菌株cr014。

[0017] 所述步骤②中混合溶剂为乙酸乙酯:甲醇:乙酸=80:15:5(V/V/V), 萃取剂为乙酸乙酯。

[0018] 所述用于拌样的硅胶为100-200目, 所述步骤③中正相柱层析所用硅胶为200-300目, 石油醚-乙酸乙酯、氯仿-甲醇系统梯度洗脱中石油醚:乙酸乙酯 为10:1→6:4, 氯仿:甲醇为20:1→0:100。

[0019] 所述步骤④中Sephadex LH-20分离时所用的洗脱剂为氯仿:甲醇=1:1、甲醇、丙酮中的一种;所述步骤④中用石油醚-丙酮系统进行等度洗脱时石油醚:丙酮为8:2-7:3。

[0020] 本发明所述化合物分子结构式(1)到(10)分别对应化合物1到10:

[0021] 化合物1:褐色油状, 结合¹³C NMR和DEPT谱, 高分辨质谱HR-ESI-MS([M-H]⁻m/z 349.1658)确定其分子式为C₁₉H₂₆O₆, 从¹³C NMR谱和DEPT谱上可以看出化合物7中含有6个季碳信号(δ_c 197.1、171.4、151.4、133.0、130.3和64.6), 5个次甲基(δ_c 143.3、136.1、127.3、66.4和59.2), 6个亚甲基(δ_c 55.1、35.2、32.8、31.0、29.8和23.7)和2个甲基(δ_c 14.5和13.0)。

[0022] 根据¹H-NMR数据显示:由于具有一个单峰甲基(δ_H 1.89, s)和一个三重峰甲基(δ_H 0.94, t, J=7.0Hz), 表明化合物1的平面结构与ambuic acid的类似物相似。由COSY谱中的数据可以看出该化合物的关键相关点(H-3/H-4; H-11/H-12/H-13/H-14/H-15/H-16/H-17), 由此可以推导出该化合物具有-C-3-C-4-和-C-11-C-12-C-13-C-14-C-15-C-16-C-17-2个片段。该化合物详细的结构由2D-NMR确定, 根据HMBC上的数据显示:3位烯基的质子 δ_H 6.84(H-3)与 δ_c 171.4(C-1), 133.0(C-2), 31.0(C-4), 64.6(C-5)和13.0(C-18)相关, 18位甲基上的质子 δ_H 1.89(H-18)与 δ_c 171.4(C-1), 133.0(C-2)和136.1(C-3)相关;4位亚甲基上的质子 δ_H 3.18和2.74(H-4)与 δ_c 133.0(C-2), 136.1(C-3), 64.6(C-5)和59.2(C-10)相关;6位的质子 δ_H 4.85(H-6)与 δ_c 151.4(C-7), 130.3(C-8), 127.3(C-11)和31.0(C-4)相关;19位的质子 δ_H 4.49和4.28(H-19)与 δ_c 197.1(C-9), 151.4(C-7)和130.3(C-4)相关。通过结合其他相关点, 可以推断出该化合物的平面结构。

[0023] 化合物1的相对构型由NOESY实验确定, NOE数据显示:H-4、H-6和H-10相关确定了对应C-5、C-6和C-10构型, 并且从¹H-NMR计算出H-11和H-12的耦合常数为15.9Hz, 揭示了位于C-11的双键是E构型, 由此得出了化合物1的相对构型, 并将其命名为pestalotic acid A。

[0024] 化合物2:褐色油状, 结合¹³C NMR和DEPT谱, 高分辨质谱HR-ESI-MS([M-H]⁻m/z 349.1658; calc. 345.1338)确定其分子式为C₁₉H₂₂O₆, 从¹³C NMR谱和DEPT谱上可以看出化合物2中含有9个季碳信号(δ_c 169.1、162.1、148.5、148.1、140.8、129.7、122.6、119.2和110.7), 3个次甲基(δ_c 195.0、138.5和100.4), 5个亚甲基(δ_c 32.1、29.1、28.2、24.9和23.1)和2个甲基(δ_c 14.3和12.7)。

[0025] 表1 化合物1-9的碳谱数据

[0026]

Position	1 ^a	2 ^b	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a
1	171.4	169.1	171.8	172.0	171.1	171.2	171.2	171.2	172.0
2	133.0	129.7	132.0	129.1	132.8	132.0	131.9	131.8	132.7

3	136.1	138.5	137.6	141.3	135.5	136.3	136.6	136.6	135.6
4	31.0	24.9	36.9	28.8	28.0	28.3	28.75	28.8	28.7
5	64.6	119.2	79.7	128.6	62.7	62.3	61.3	61.3	61.2
6	66.4	148.1	69.9	146.3	59.7	61.6	61.1	61.1	61.0
7	151.4	122.6	156.1	127.9	193.3	64.5	65.9	65.9	65.8
8	130.3	110.7	124.5	112.0	144.6	157.0	151.7	151.1	150.8
9	197.1	148.5	193.0	148.3	134.2	132.0	131.3	131.9	131.9
10	59.2	140.8	70.0	121.1	194.8	190.2	195.8	196.0	196.1
11	127.3	100.4	130.5	125.4	122.6	86.8	122.2	124.9	123.0
12	143.3	162.1	143.0	133.2	148.0	129.4	142.0	136.5	139.9
13	35.2	29.1	34.7	34.6	35.5	134.2	73.5	42.6	34.5
14	29.8	28.2	29.7	30.5	29.6	32.9	38.0	71.8	26.4
15	32.8	32.1	32.8	32.9	32.7	32.3	28.79	40.2	39.6
16	23.7	23.1	23.7	23.8	23.7	23.1	23.7	19.9	68.4
17	14.5	14.3	14.5	14.6	14.5	14.3	14.4	14.5	23.5
18	13.0	12.7	13.2	12.9	13.0	12.8	12.8	12.8	13.0
19	55.1	195.0	-	-	58.7	75.1	60.1	60.3	60.3
1'	-	-	-	-	172.2	-	-	-	-
2'	-	-	-	-	20.7	-	-	-	-

[0027] ^a核磁数据在CD₃OD中获得。

[0028] ^b核磁数据在CD₃COCD₃获得

[0029] 由¹H-NMR、¹³C NMR和DEPT谱数据可以看出化合物2是ambuic acid的类似物,区别在于ambuic acid中的6元环在该化合物中变为了苯环。由COSY谱中的数据可以看出该化合物的关键相关点(H-3/H-4;H-13/H-14/H-15/H-16/H-17),由此可以推导出该化合物具有-C-3-C-4-和-C-13-C-14-C-15-C-16-C-17-2个片段。该化合物的细微结构由2D-NMR确定,根据HMBC谱的数据可以看出苯环上连接有3个羟基、1个醛基和1个异戊烯基基团;3位烯基的质子 δ_{H} 6.96(H-3)与 δ_{C} 169.1(C-1),129.7(C-2),24.9(C-4),119.2(C-5)(w)和12.7(C-18)相关,18位甲基上的质子 δ_{H} 2.06(H-18)与 δ_{C} 169.1(C-1),129.7(C-2)和138.5.0(C-3)相关;4位亚甲基上的质子 δ_{H} 3.87(H-4)与 δ_{C} 169.1(C-1),129.7(C-2),138.5(C-3),119.2(C-5),148.1(C-6)和140.8(C-10)相关;11位烯基的质子 δ_{H} 6.97(H-11)与 δ_{C} 148.1(C-6),122.6(C-7),162.1(12)和29.1(C-13)相关;13位的质子 δ_{H} 2.84(H-13)与 δ_{C} 100.4(C-11),162.1(C-12),28.2(C-14)和32.1(C-15)相关;19位醛基上的质子 δ_{H} 10.34(H-19)与 δ_{C} 148.1(C-6),122.6(C-7),110.7(C-8),148.5(C-9)和140.8(C-10)相关。

[0030] 最后用化合物的总不饱和度除了双键、两个酮基以及苯环的不饱和度外,还有一个不饱和度,暗示了还有一个额外的环状结构在该化合物的骨架上:该环是C-6和C-12通过氧桥连接形成的。基于上述数据可以推断出化合物2的结构,最后将其命名为pestalotic acid B。

[0031] 化合物3:褐色油状,结合¹³C NMR和DEPT谱,高分辨质谱HR-ESI-MS([M+Na]⁺m/z 379.1284)确定其分子式为C₁₈H₂₅³⁵ClO₅,并从化合物3的ESI-MS的实验数据中可以观察到化合物3的分子量中有一个为m/z 381[M+2+Na]⁺同位素峰,其丰度为另一个同位素峰m/z 379 [M+Na]⁺的三分之一,因此可以判定化合物3中含有一个Cl原子取代基。

[0032] 化合物3在HMBC和COSY谱上的关键相关点和化合物1的几乎一样,除了化合物3中少了一个化学位移为 δ_{C} 55.1的碳,以及在6元环上多了一个Cl原子取代基。在化合物3中,6

位的质子 δ_{H} 4.43(H-6)与 δ_{C} 156.1(C-7), 130.5(C-11), 124.5(C-8), 79.7(C-5), 70.0(C-10)和36.9(C-4)相关, 18位烯基上的质子 δ_{H} 1.91(H-18)与 δ_{C} 171.8(C-1), 132.0(C-2), 137.6(C-3)和36.9(C-4)相关; 10位次甲基上的质子 δ_{H} 5.02(H-10)与 δ_{C} 193.0(C-9)和79.7(C-5)相关。为了确定Cl原子取代基的位置, 测定了化合物3在氘代丙酮中的核磁数据。结果显示: 一个羟基信号(δ_{H} 5.19)位于C-6上, 另一个羟基信号(δ_{H} 4.69)位于C-5上, 并且羟基质子 δ_{H} 5.19与C-7, C-5和C-6相关, 羟基质子 δ_{H} 4.69与C-4, C-5, C-6和C-10相关。

[0033] 由NOESY实验结果可以看出: H-4与H-6和H-10相关确定了对应C-5、C-6和C-10构型, 并且从 $^1\text{H-NMR}$ 计算出H-11和H-12的耦合常数为15.3Hz, 揭示了位于C-11的双键是E构型, 基于上述实验结果, 由此得出了化合物3的相对构型, 并将其命名为pestalotic acid C。

[0034] 化合物4: 褐色油状, 结合 ^{13}C NMR和DEPT谱, 高分辨质谱HR-EI-MS($[\text{M}]^+m/z$ 338.1285)确定其分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{23}^{35}\text{ClO}_4$, 化合物4的与化合物3的不同之处在于化合物9中的6元环在化合物4中变为了苯环。

[0035] 基于以下的HMBC谱的相关数据, 可以看出化合物4中的2个羟基和1个Cl原子取代基分别位于C-6, C-9和C-10上: 3位烯基上的质子 δ_{H} 6.72(H-3)与 δ_{C} 172.0(C-1), 128.6(w)(C-5), 28.8(C-4)和12.9(C-18)相关, 4位的质子 δ_{H} 3.70(H-4)与 δ_{C} 172.0(w)(C-1), 146.3(C-6), 141.3(C-3), 129.1(C-2), 128.6(C-5)和121.1(C-10)相关; 8位芳环上的质子 δ_{H} 6.88(H-8)与 δ_{C} 148.3(C-9), 146.3(C-6), 125.4(C-11)和121.1(C-10)相关; 11位烯基上的质子 δ_{H} 6.64(H-11)与 δ_{C} 146.3(C-6), 127.9(C-7), 112.0(C-8)和34.6(C-13)相关。

[0036] 从 $^1\text{H-NMR}$ 计算出H-11和H-12的耦合常数为15.6Hz, 揭示了位于C-11的双键是E构型, 基于上述实验结果, 由此得出了化合物4的相对构型, 并将其命名为pestalotic acid D。

[0037] 化合物5: 褐色油状, 结合 ^{13}C NMR和DEPT谱, 高分辨质谱HR-ESI-MS($[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ 413.2665; calc. 413.2668)确定其分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_7$, 根据 ^1H -、 ^{13}C -NMR和DEPT谱数据可以判断出化合物5是ambuic acid的类似物^[9, 13]。

[0038] 通过与ambuic acid进行比较后发现, 6位甲基上的质子 δ_{H} 3.82(H-6)与 δ_{C} 193.3(C-7), 134.2(C-9)和62.7(C-5)相关, 19位含氧亚甲基的质子 δ_{H} 4.79和5.08(H-19)与 δ_{C} 193.3(C-7), 172.1(C-1), 144.6(C-8)和134.2(C-9)相关, 以上的相关说明了9-OH被氧化为酮基, 一个乙酰基与19-OH相连接。

[0039] 由NOESY实验结果可以看出: H-4和H-10相关确定了对应C-5和C-10构型, 并且从 $^1\text{H-NMR}$ 计算出H-11和H-12的耦合常数为15.8Hz, 揭示了位于C-11的双键是E构型, 基于上述实验结果, 由此得出了化合物5的相对构型, 并将其命名为pestalotic acid E。

[0040] 化合物6: 褐色油状, 结合 ^{13}C NMR和DEPT谱, 高分辨质谱HR-ESI-MS($[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ 371.1464; calc. 371.1471)确定其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$, 根据 ^1H -谱、 ^{13}C -谱和DEPT谱数据可以判断出化合物6是ambuic acid的类似物。

[0041] 表2 化合物1-9的氢谱数据

Position	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^c	5 ^c	6 ^c	7 ^c	8 ^c	9 ^c
3	6.84, td (7.5, 1.3)	6.96, td (7.7, 1.4)	7.08, td (7.7, 1.3)	6.72, td (7.1, 1.1)	6.71, td (7.2, 1.3)	6.70, m	6.72, td (7.2, 1.1)	6.72, t (7.2)	6.67, td (7.9, 1.4)
4	3.18, dd (15.6, 7.5)	2.87, d (7.2)	2.92, dd (14.9, 7.8)	3.70, d (7.2)	3.04, dd (7.0, 15.9)	2.91, dd (15.7, 8.0)	2.81, m	2.86, m	2.82, dd (7.9, 13.6)
	2.74, dd (15.6, 7.3)		2.86, dd (15.8, 6.0)		2.91, dd (7.7, 15.8)				2.70, ddd (13.7, 6.9, 0.9)
6	4.85, s	-	4.43, s	-	3.81, s	3.72, d (3.0)	3.78, d (2.8)	3.77, d (2.8)	3.77, d (2.8)
7	-	-	-	-	-	4.87, m	4.84, brs	4.82, brs	4.81, brs
8	-	-	5.97, s	6.89, s	-	-	-	-	-
10	3.37, d (0.8)	-	5.82, s	-	-	-	-	-	-
11	6.68, d (15.7)	6.97, s	6.29, d (15.3)	6.64, d (15.6)	6.40, d (15.8)	3.29, m	6.13, d (16.0)	6.23, d (15.9)	6.18, d (15.5)
12	6.56, dt (13.7, 7.0)	-	6.51, dt (15.3, 7.1)	6.15, dt (15.6, 7.0)	6.37, dt (15.8, 7.0)	5.52, dd (18.1, 9.6, 1.0)	5.92, dd (6.3, 16.0)	5.94, m	5.89, dt (15.5, 6.9)
13	2.31, dd (14.8, 7.8)	2.84, t (7.5)	2.26, q (7.1)	2.25, td (8.1, 1.2)	2.28, q (7.3)	5.79, dd (18.3, 8.3, 1.0)	4.14, q (6.2)	2.35, m	2.20, m
14	1.54, dt (14.6, 7.3)	1.80, m	1.53, m	1.52, m	1.51, m	2.66, dt (8.1, 8.3)	1.58, m	3.67, m	1.50, m; 1.59, m
15	3.37, m	1.41, m	1.37, m	1.39, m	1.38, m	1.40, m	1.43, m	1.52, m	1.50, m
16	3.37, m	1.38, m	1.37, m	1.39, m	1.38, m	1.40, m	1.43, m	1.52, m; 1.43, m	3.73, dt (5.7, 6.1)
17	0.94, t (7.0)	0.92, t (7.1)	0.93, t (7.0)	0.94, t (6.9)	0.93, t (6.9)	0.92, t (7.2)	0.94, t (7.0)	0.95, t (6.7)	1.16, d (6.1)
18	1.89, s	2.06 (overlap)	1.91, s	1.98, s	1.89, s	1.88, s	1.87, s	1.86, s	1.87, s
19	4.49, d (11.7)	10.34, s	-	-	5.08, d (11.8)	4.87, m	4.57, d (12.9)	4.58, d (13.0)	4.54, d (12.9)
	4.26, d (11.7)				4.79, d (11.8)				4.44, d (13.0)
2'	-	-	-	-	2.03, s	-	-	-	-

[0042]

[0043] ^a核磁数据在CD₃OD中获得。[0044] ^b核磁数据在CD₃COCD₃获得

[0045] 通过与ambuic acid进行比较后发现,由HMBC的相关发现一个位于C-11/C-12 的双键移动到了C-12/C-13,而C-11上则通过氧桥连接上了一个亚甲基(C-19):19位亚甲基上的一个质子 δ_{H} 4.79(H-19)与 δ_{C} 190.2(C-10),157.0(C-8),132.0(C-9),129.4(C-12)和86.8(C-11)相关,11位含氧次甲基的质子 δ_{H} 5.29(H-11)与 δ_{C} 157.0(C-8)和134.2(C-13)相关。

[0046] 由NOESY实验结果可以看出:H-4与H-6和H-10相关确定了对应C-5、C-6与C-10构型,并且从¹H-NMR计算出H-12和H-13的耦合常数为18.3Hz,揭示了位于C-12的双键是E构

型,基于上述实验结果,由此得出了化合物6的相对构型,并将其命名为pestalotic acid F。

[0047] 化合物7:褐色油状,结合 ^{13}C 谱和DEPT谱,高分辨质谱HR-ESI-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 389.1575;calc.389.1576)确定其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_7$ 。

[0048] 通过与ambuic acid进行比较后,并通过HMBC发现,C-13被氧化,连了一个羟基位于C-13上:12位烯基上的质子 δ_{H} 5.92(H-12)与 δ_{C} 131.3(C-9),122.2(C-11),73.5(C-13)和38.0(C-14)相关,13位含氧次甲基的质子4.14(H-13)与 δ_{C} 142.0(C-12),122.2(C-13),38.0(C-14)和28.79(C-15)相关。

[0049] 由NOESY实验结果可以看出:H-4与H-6和H-10相关确定了对应C-5、C-6与C-10构型,并且从 ^1H -NMR计算出H-12和H-13的耦合常数为16.0Hz,揭示了位于C-12的双键是E构型,基于上述实验结果,由此得出了化合物7的相对构型,并将其命名为pestalotic acid G。

[0050] 化合物8:褐色油状,结合 ^{13}C 谱和DEPT谱,高分辨质谱HR-ESI-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 389.1573;calc.389.1576)确定其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_7$ 。

[0051] 通过与ambuic acid进行比较后,并通过HMBC发现,C-14被氧化,并且一个羟基位于C-14上:11位烯基上的质子 δ_{H} 6.23(H-11)与 δ_{C} 196.0(C-10),151.1(C-8),136.5(C-12),131.9(C-9),71.8(C-14)和42.6(C-13)相关;13位亚甲基上的质子 δ_{H} 2.35(H-13)与 δ_{C} 136.5(C-12),124.9(C-11),71.8(C-14)和40.2(C-15)相关;14位含氧次甲基上的质子 δ_{H} 3.67(H-14)与 δ_{C} 136.5(C-12),40.2(C-15)和19.9(C-16)相关。

[0052] 由NOESY实验结果可以看出:H-4与H-6和H-10相关确定了对应C-5、C-6与C-10构型,并且从 ^1H -NMR计算出H-11和H-12的耦合常数为15.9Hz,揭示了位于C-11的双键是E构型,基于上述实验结果,由此得出了化合物8的相对构型,并将其命名为pestalotic acid H。

[0053] 化合物9:褐色油状,结合 ^{13}C 谱和DEPT谱,高分辨质谱HR-ESI-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 389.1573;calc.389.1576)确定其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_7$ 。

[0054] 通过与ambuic acid进行比较后,并通过HMBC发现,C-16被氧化,并且一个羟基位于C-16上:17位甲基上的质子 δ_{H} 1.16(H-17)与 δ_{C} 68.4(C-16)和39.6(C-15)相关;16位含氧次甲基上的质子 δ_{H} 3.75(H-16)与 δ_{C} 39.6(C-15),26.4(C-14)和23.5(C-17)相关。

[0055] 由NOESY实验结果可以看出:H-4与H-6和H-10相关确定了对应C-5、C-6与C-10构型,并且从 ^1H -NMR计算出H-11和H-12的耦合常数为15.5Hz,揭示了位于C-11的双键是E构型,基于上述实验结果,由此得出了化合物9的相对构型,并将其命名为pestalotic acid I。

[0056] 本发明的具有抗细菌活性的Pestalotic acid化合物的抗细菌活性应用。

[0057] 本发明相对于现有技术具有以下优点:

[0058] 1、本发明的pestalotic acid化合物获取简单,具有抗细菌活性,可以作为抗细菌剂用于防治植物青枯病。

[0059] 2、本发明的pestalotic acid化合物为研制抗细菌剂,防治植物病害提供了新的途径。

[0060] 3、本发明的pestalotic acid化合物抗细菌活性高,能够作为抗细菌剂用于防治

植物青枯病。

附图说明

[0061] 图1为本发明的pestalotic acid化合物的结构式。

具体实施方式

[0062] 以下通过实施例对本发明做进一步详细描述,但本发明并不限于下述的实施例。

[0063] 实施例1:

[0064] pestalotic acid化合物的分离制备:

[0065] a)培养基和培养条件

[0066] 改良M-1-D培养基:NaH₂PO₄·H₂O 20mg,FeCl₃ 2.0mg,MgSO₄ 360mg,KCl 60mg,Ca(NO₃)₂ 2280mg,KNO₃ 80mg,蔗糖30g,酒石酸铵5g,酵母浸膏0.5g,MnSO₄ 5.0mg,ZnSO₄·7H₂O 2.5mg,H₃BO₄ 1.4mg,KI 0.7mg,蒸馏水1000mL,琼脂15-20g,pH自然。

[0067] 培养条件:菌株cr014用改良M-1-D培养基发酵30L,室温下培养20d。

[0068] b)发酵产物的提取与分离

[0069] 将已发酵20d的改良Fries培养基连同其上的菌落一同切为细小块状,用乙酸乙酯:甲醇:乙酸=80:15:5(V/V/V)混合溶剂浸泡提取3次,将3次提取物合并浓缩后,再用乙酸乙酯萃取至颜色不再改变,最后用旋转蒸发仪45℃减压浓缩至干得浸膏(37.337g)。

[0070] 将乙酸乙酯萃取后所得的浸膏(37.337g)用适量的溶剂溶解后,用硅胶(100-200目)拌样,经正相柱层析(200-300目),用石油醚:乙酸乙酯=(10:1→6:4),氯仿:甲醇=(20:1→0:100)系统梯度洗脱,经TLC层析检测,将含有相同Rf值和显色情况化合物的组分合并在一起,分别减压浓缩至干,共分为10个组分:Fr.1-Fr.10。

[0071] Fr.4(8.423g)经Sephadex LH-20(氯仿:甲醇=1:1)分离后得到4个组分(Fr.4.1-Fr.4.4);其中Fr.4.2(635mg)经Sephadex LH-20(甲醇)分离后,再经NP7000型-高效液相色谱仪分离得到化合物5(1.2mg)和化合物4(3.9mg);Fr.4.4(63mg)经Sephadex LH-20(氯仿:甲醇=1:1)分离后得到化合物2(12.2mg)。

[0072] Fr.5(2.377g)经Sephadex LH-20(甲醇)分离后得到5个组分(Fr.5.1-Fr.5.5);其中Fr.5.4(329mg)经Sephadex LH-20(甲醇)分离后,再用硅胶(100-200目)拌样,洗脱柱填装为GF254硅胶,用石油醚:丙酮=(8:2)系统进行等度洗脱,得到化合物3(9.8mg)。

[0073] Fr.6(213mg)经Sephadex LH-20(氯仿:甲醇=1:1)分离后得到4个组分(Fr.6.1-Fr.6.4);其中Fr.6.2用硅胶(100-200目)拌样,洗脱柱填装为GF254硅胶,用石油醚:丙酮=(8:2)系统进行等度洗脱,得到化合物10(9.8mg);Fr.6.3经Sephadex LH-20(氯仿:甲醇=1:1)分离后得到Fr.6.3.1;Fr.6.3.1用硅胶(100-200目)拌样,洗脱柱填装为GF254硅胶,用含有0.3%甲酸的石油醚:丙酮=(7:2)系统进行等度洗脱后,再经Sephadex LH-20(甲醇)纯化后得到化合物1(1.1mg)。

[0074] Fr.8(386mg)经Sephadex LH-20(丙酮)分离后得到3个组分(Fr.8.1-Fr.8.3);其中Fr.8.1经NP7000型-高效液相色谱仪分离得到3个亚组分(Fr.8.1.1-Fr.8.1.3);Fr.8.1.1用硅胶(100-200目)拌样,洗脱柱填装为GF254硅胶,用含有0.3%甲酸的石油醚:丙酮=(7:3)系统进行等度洗脱后,得到化合物9(4.5mg);Fr.8.1.3经NP7000型-高效液相

色谱仪分离得到4个亚组分(Fr.8.1.3.1-Fr.8.1.3.4);Fr.8.1.3.3用硅胶(100-200目)拌样,洗脱柱填装为GF254硅胶,用含有0.3%甲酸的石油醚:丙酮=(7:3)系统进行等度洗脱后,得到化合物8(14.0mg)。Fr.8.1.3.4用硅胶(100-200目)拌样,洗脱柱填装为GF254硅胶,用含有0.3%甲酸的石油醚:丙酮=(7:3)系统进行等度洗脱后,得到化合物7(17.4mg)和化合物6(1.0mg)。

[0075] 实施例2:

[0076] pestalotic acid化合物活性研究:

[0077] a)供试化合物及试剂

[0078] 供试化合物:化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物7、化合物8、化合物9;

[0079] 阳性对照:Cefotaxime;

[0080] 供试菌种:Ralstoniasolanacearum,Salmonella typhi,Escherichia coli,Staphylococcus aureus。

[0081] b)检测原理与方法

[0082] 细菌的MICs值采用改良的微生物稀释法测定。4株病原细菌于25℃下在营养琼脂培养基上培养18至24h,然后用无菌的接种环收集病原细菌菌体,于装有10mL无菌的生理盐水的离心管中培养。细菌悬浮液的浓度在630nm光学密度为0.10的标准条件下调整为108CFU/mL。该浓度的细菌悬浮液在使用前稀释100倍,最终浓度为106CFU/mL。所有被测试的化合物均溶解于DMSO中,最终配成浓度为4μg/μL的溶液。测定活性时采用倍比稀释法,将不同浓度的待测化合物和含有细菌悬浮液的肉汤添加到96孔版中,最终反应体积定在200μL(DMSO的最终浓度等于或少于5%)。以DMSO作为阴性对照,未加入化合物和DMSO的细菌悬浮液作为空白对照,以加入Cefotaxime作为阳性对照。最后将96孔板置于37℃下培养24h。24h后,通过测定吸光(OD)值确定细菌增长量,细菌增长量几乎为0时的化合物浓度即为MIC值。每个处理均设置3次重复。

[0083] 研究测定了化合物2-5和化合物7-9抗4种病原细菌(R.solanacearum,Salmonella typhi,E.coli,Staphylococcus aureus)的活性。所有被测定的化合物均有抗细菌活性,结果见表3。从结果中可以看出化合物2、化合物3、化合物7和化合物8抑制R.Solanacearum生长的能力与阳性对照Cefotaxime一样强,因此这几种化合物可以作为抗细菌剂用于防治植物青枯病。

[0084] 表3 化合物抗细菌活性(μg/mL)

Compounds	<i>R.</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus</i>
	<i>solanacearum</i>	<i>typhi</i>		<i>aureus</i>
2	0.78	0.78	100	50
3	0.78	12.5	100	100
4	-	50	100	100
5	100	100	-	-
7	0.78	50	-	-
8	0.78	50	-	-
9	-	100	100	-
Cefotaxime	0.19	1.56	0.19	0.19

[0085]

[0086] 注：“-”表示MIC>100μg/mL时无活性。

[0087] 实施例3:

[0088] pestalotic acid化合物理化常数和波谱数据:

[0089] Pestalotic acidA(1):褐色油状, $[\alpha]_D^{23} = -47.0$ ($c = 0.33$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 292(4.10), 206(4.25); NMR data see Tables 1 and 2; ESI-MS: 349 $[M-H]^-$; HR-ESI-MS: 349.1658(349 $[M-H]^-$, calc. 349.1651)。

[0090] Pestalotic acidB(2):褐色油状, $[\alpha]_D^{18} = -7.33$ ($c = 0.10$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 318(4.16), 232(4.30), 207(4.40); ESI-MS: 345 $[M-H]^-$; HR-ESI-MS: 345.1338($[M-H]^-$, calc. 345.1338)。

[0091] Pestalotic acidC(3):褐色油状, $[\alpha]_D^{25} = -23.0$ ($c = 0.19$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)_{nm}$: 285(4.31), 204(4.20); ESI-MS: 357 $[M+H]^+$, 359 $[M+2+H]^+$, 379 $[M+Na]^+$, 381 $[M+2+Na]^+$; HR-ESI-MS: 379.1284($[M+Na]^+$, calc. 379.1288)。

[0092] Pestalotic acidD(4):褐色油状, $[\alpha]_D^{25} = -7.7$ ($c = 0.12$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)_{nm}$: 317(3.82), 217(4.52); ESI-MS: 337 $[M-H]^-$, 339 $[M+2-H]^-$; HR-ESI-MS: 338.1285($[M]^+$, calc. 338.1285)。

[0093] Pestalotic acidE(5):褐色油状, $[\alpha]_D^{21} = +20$ ($c = 0.12$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 310(3.47), 208(4.07); ESI-MS: 413 $[M+H]^+$; HR-ESI-MS: 413.2665($[M+H]^+$, calc. 413.2668)。

[0094] Pestalotic acidF(6):褐色油状, $[\alpha]_D^{21} = +10.89$ ($c = 0.07$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 257(3.73), 203(4.26); ESI-MS: 371 $[M+Na]^+$; HR-ESI-MS: 371.1464($[M+Na]^+$, calc. 371.1471)。

[0095] Pestalotic acidG(7):褐色油状, $[\alpha]_D^{21} = +96.98$ ($c = 0.07$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 269(3.81), 211(4.59); ESI-MS: 389 $[M+Na]^+$; HR-ESI-MS: 389.1575($[M+Na]^+$, calc. 389.1576)。

[0096] Pestalotic acidH(8):褐色油状, $[\alpha]_D^{21} = +88.18$ ($c = 0.22$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 274(3.60), 211(4.41); ESI-MS: 389 $[M+Na]^+$; HR-ESI-MS: 389.1573($[M+Na]^+$, calc. 389.1576)。

[0097] Pestalotic acidI(9):褐色油状, $[\alpha]_D^{21} = +76.67$ ($c = 0.20$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$: 273(3.59), 208(4.37); ESI-MS: 389 $[M+Na]^+$; HR-ESI-MS: 389.1573($[M+Na]^+$, calc. 389.1576)。

[0098] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

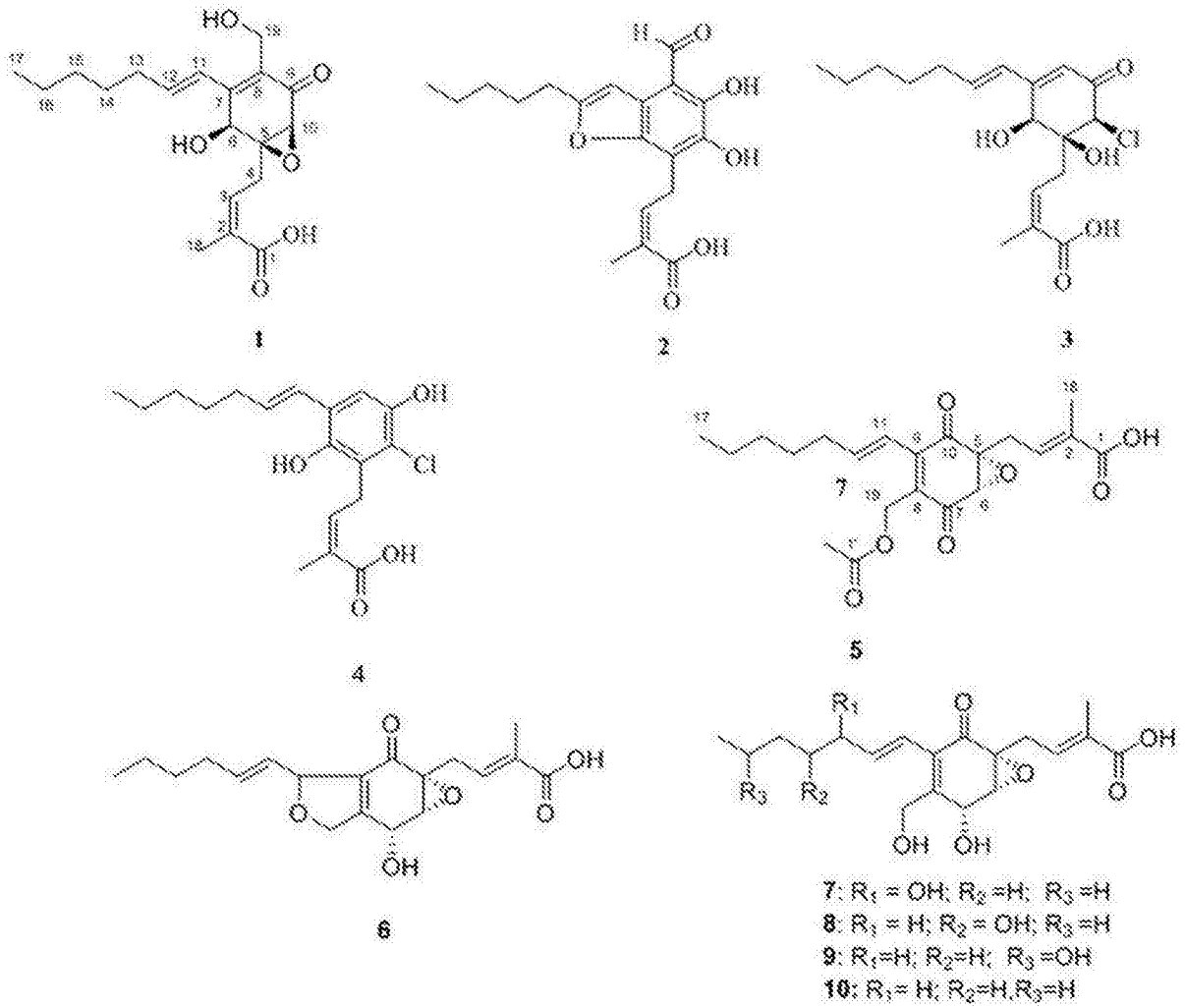


图1