

海洋链霉菌 L211 次生代谢产物分离和结构鉴定

郭书举^{1,2}, 苏 华³, 李宪瑾¹, 史大永¹, 朱校斌¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 海洋研究所 海洋科学与技术研究中心, 江苏 南通 226006; 3. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101)

摘要: 利用硅胶柱、凝胶柱及制备薄层色谱等色谱方法对海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. L211 发酵液的乙酸乙酯相浸膏进行了分离, 通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR、EIMS 等方法鉴定了 10 个化合物: Kalamycin (1), Medermycin (2), Menoxymycin-B (3), spatozoate (4), 邻氨基苯甲酸(5), 3-吡啶乙醇(6), 1-乙酰基吡啶(7), 对羟基苯基乙醇(8), 吡啶-3-乙酸(9), 吡啶-3-甲酸(10)。

关键词: 海洋链霉菌; 次生代谢产物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R931.77 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)09-0075-04
doi: 10.11759/hyxx20130903003

海洋放线菌是一类重要的海洋微生物, 可以产生多种多样的代谢产物, 如含氮杂环类、多肽类、萜类、糖苷类及大环内酯类化合物^[1-2], 链霉菌作为放线菌的重要组成, 也是新结构化合物的重要来源。本研究以海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. L211 为研究对象, 对其发酵液的乙酸乙酯相提取物进行了分离, 先期分离了 15 个化合物, 并通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR 等方法对其中的 10 个进行了结构鉴定, 分别为: Kalamycin (1), Medermycin (2), Menoxymycin-B (3), spatozoate (4), 邻氨基苯甲酸(5), 3-吡啶乙醇(6), 1-乙酰基吡啶(7), 对羟基苯基乙醇(8), 吡啶-3-乙酸(9), 吡啶-3-甲酸(10)。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

BRUKER AVANCE-500 型核磁共振仪; 三氯甲烷、二氯甲烷、四氯化碳、石油醚、乙酸乙酯、冰乙酸、三氟乙酸酐、溴素、香草醛、N-溴代丁二酰亚胺、乙醇钠、乙醇均为分析纯; 柱色谱硅胶 (160~200 目) 和薄层色谱硅胶 GF254(60 型) 为青岛海洋化工厂产品。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养

取适量菌种接种到固体培养基(麦芽提取物 10 g/L, 酵母提取物 4 g/L, 葡萄糖 4 g/L, 琼脂粉 15 g/L, 海水, pH 7.8)的平板上, 28 °C 培养 48 h 后, 作为种子接种到液体培养基(麦芽提取物 10 g/L, 酵母提取物 4 g/L,

葡萄糖 4 g/L, 海水, pH 7.8)中, 共接种 20 L, 28 °C, 110 r/min 于摇床培养 4 d。

1.2.2 提取分离

发酵物离心将菌体和发酵液分离, 发酵液用同体积的乙酸乙酯萃取 3 次后, 减压蒸干; 菌体在丙酮中超声破碎提取 3 次后, 减压蒸干; 将两部分粗提物 TLC 对比, 发现成分相似, 合并后得到 7.50g 浸膏。浸膏经硅胶柱色谱分离(石油醚: 乙酸乙酯, 氯仿: 甲醇梯度洗脱), 得到 8 个组分, 各组再经过凝胶柱、硅胶柱及制备薄层色谱分离后, 得到 15 个化合物, 利用核磁共振波谱和质谱, 鉴定了其中的 10 个化合物, 见图 1。

2 波谱数据与结果鉴定

化合物(1), 黄色固体, C₁₆H₁₂O₆。 ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ: 11.8 (s, 9-OH), 7.30 (dd, 7.5, 2.1 Hz, H-8), 7.73-7.65 (overlapping, H-6, 7), 5.27 (d, 3.0 Hz, H-4), 5.09 (q, 6.9 Hz, H-1), 4.70 (dd, 5.1, 3.0 Hz, H-5), 2.97 (dd, 17.7, 5.2 Hz, H-13β), 2.71 (d, 17.7, H-13α), 1.57 (d, 6.9 Hz, 1-CH₃)。 以上数据与 Kalamycin 波谱数据一致^[3]。

化合物(2), 黄色固体, C₂₄H₂₇NO₈。 ¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz) δ: 7.91(1H, d, J=7.8), 7.71(1H, d,

收稿日期: 2013-09-03; 修回日期: 2014-06-02

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2011395); 国家海洋局公益性行业科研专项项目(201205025-5)

作者简介: 郭书举(1981-), 男, 山东聊城人, 助理研究员, 研究方向为海洋天然产物, E-mail: guoshuju@qdio.ac.cn

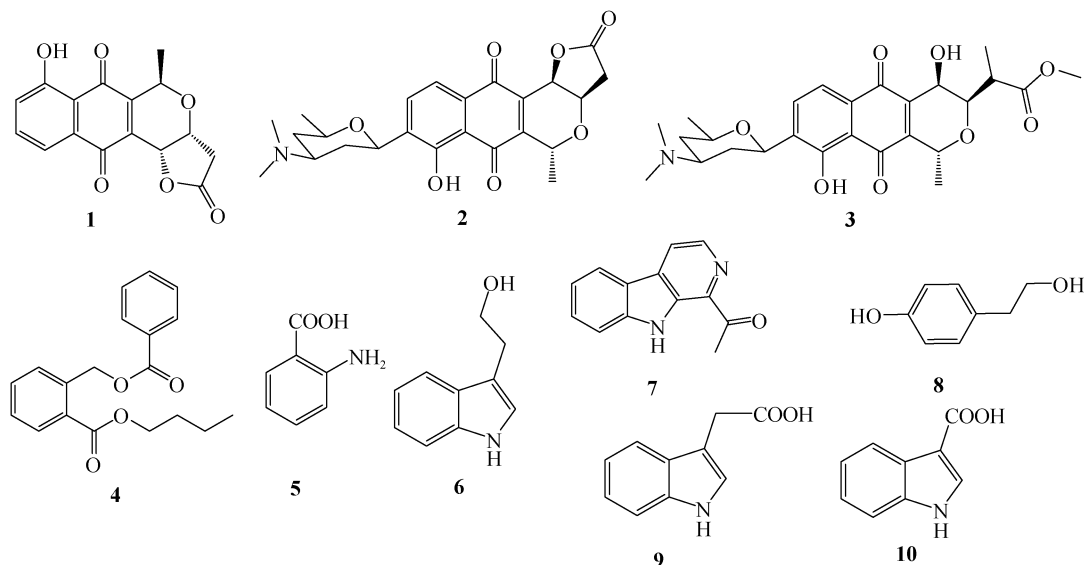


图 1 化合物 1-10 的结构
Fig. 1 Structure of the Compounds 1-10

$J=7.8$), 5.25(1H, d, $J=2.9$), 5.08(1H, q, $J=7.0$), 4.87(1H, dd, $J=10.9$, 2.0), 4.69(1H, dd, $J=5.1$, 2.9), 3.53(1H, dp, $J=8.9$, 6.2), 3.2(1H, dd, $J=9.5$, 8.9), 2.97(1H, dd, $J=17.6$, 5.1), 2.78(1H, ddd, $J=12.5$, 9.5, 3.8), 2.69(1H, d, $J=17.6$), 2.34(6H, s), 2.26(1H, ddd, $J=12.4$, 3.8, 2.0), 1.57(3H, d, $J=7.0$), 1.43(3H, d, $J=6.2$), 1.30(1H, ddd, $J=12.5$, 12.4, 10.9); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 187.8, 180.8, 173.5, 157.6, 149.1, 138.5, 134.8, 133.5, 129.6, 119.5, 117.1, 77.5, 72.1, 71.3, 68.6, 67.1, 66.4, 66.2, 40.2, 36.9, 28.1, 18.9, 18.8。FAB-MS m/z : 458 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。以上数据与 Medermycin 波谱数据一致^[4]。

化合物(3), 黄色固体, $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NO}_9$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ : 7.87(1H, d, $J=7.7$), 7.67(1H, d, $J=7.7$), 5.02(1H, q, $J=6.9$), 4.86(1H, dd, $J=10.9$, 2.07), 4.66(1H, d, $J=2.5$), 4.35(1H, dt, $J=6.5$, 2.5), 3.75(3H, s), 3.52(1H, dp, $J=9.0$, 6.0), 3.18(2H, dd, $J=9.0$, 9.0), 2.82(2H, d, $J=6.5$), 2.73(1H, ddd, $J=12.4$, 9.0, 3.5), 2.32(6H, s), 2.25(1H, ddd, $J=12.4$, 3.5, 2.0), 1.56(3H, d, $J=6.9$), 1.42(3H, d, $J=6.0$), 1.28(1H, ddd, $J=12.4$, 12.4, 10.7)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 189.3, 182.7, 171.8, 157.4, 146.5, 141.2, 138.1, 133.1, 130.1, 119.2, 114.1, 77.3, 72.0, 71.3, 67.7, 67.1, 66.7, 59.2, 51.8, 40.0, 35.5, 28.3, 17.6, 17.5。FAB-MS m/z : 490 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。以上数据与 Menoxymycin-B 波谱数据一致^[4]。

化合物(4), 无色油状, $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300MHz) δ : 7.21 (1H, m, H-2), 7.63~7.70 (3H, m, H-3, H-4, H-5), 4.23 (2H, m, H₂-8), 1.43~1.63 (4H, m, H₂-9, H₂-10), 0.97 (3H, m, H₃-11), 5.55 (2H, s, H₂-12), 8.03 (1H, m, H-15), 7.44 (2H, m, H-16, H-18), 7.51 (1H, m, H-17), 7.95 (1H, m, H-19); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ : 138.0 (s, C-1), 121.7(d, C-2), 129.1(d, C-3), 126.5(d,

C-4), 130.0(d, C-5), 132.4(s, C-6), 166.2 (s, C-7), 66.1(t, C-8), 31.3 (t, C-9), 19.0(t, C-10), 13.0(q, C-11), 63.0(t, C-12), 167.3(s, C-13), 127.0(s, C-14), 129.9(d, C-15), 128.0(d, C-16), 131.1(d, C-17), 128.0(d, C-18), 129.9(d, C-19); EIMS m/z : 312.0 $[\text{M}]^+$ 。以上数据与 Spatozoate 波谱数据一致^[5]。

化合物(5), 黄色粉末, $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ : 7.33(1H, dd, $J=5.9$, 6.9Hz, H-3), 6.65(2H, m, H-4, H-5), 7.91(1H, d, $J=5.9$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ : 170.3(s, CO), 110.8(s, C-1), 152.6(s, C-2), 134.7(d, C-), 132.3(d, C-), 117.2(d, C-), 115.8(d, C-); EIMS: m/z (%) 137.0(65), 119.1(100), 93.0(4), 92.1(50), 71.1(3), 66.0(2), 65.0(11), 58.0(5), 43.0(7), 41.0(3)。以上数据与邻氨基苯甲酸波谱数据一致^[6]。

化合物(6), 无色油状物, $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ : 8.05 (1H, br s, NH), 7.11(1H, s, H-2), 7.66(1H, d, $J=8.2$ Hz, H-4), 7.15(1H, dd, $J=8.2$, 1.5 Hz, H-5), 7.23 (1H, dd, $J=8.2$, 1.5 Hz, H-6), 7.40(1H, d, $J=8.2$ Hz, H-7), 3.00(2H, t, $J=6.6$ Hz, H₂-8), 3.90(2H, t, $J=6.6$ Hz, H₂-9); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ : 123.1(d, C-2), 112.0(s, C-3), 127.2 (s, C-3a), 121.0(d, C-4), 123.2 (d, C-5), 124.5(d, C-6), 1120.1 (d, C-7), 133.0(s, C-7a), 28.6 (t, C-8), 66.6(t, C-9)。EIMS m/z : 161.1 $[\text{M}]^+$ 。以上数据与 3-吲哚乙醇波谱数据一致^[7]。

化合物(7), 无色油状物, $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ : 8.68(1H, d, $J=6.0$ Hz, H-4), 8.23(2H, m, H-8, H-9), 7.29(1H, m, H-6), 7.60(2H, m, H-7, H-5), 2.95(3H, s, H₃-12); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75MHz) δ : 135.4(s, C-2), 123.3(s, C-3), 123.4(s, C-3a),

122.2(d, C-4), 122.1(d, C-5), 121.8 (d, C-6), 111.9(d, C-7), 140.0(sC-7a), 120.5(d, C-8), 137.1(d, C-9), 141.5(s, C-10), 201.1(s, C-11), 26.0(q, C-12)。EIMS m/z : 210.0 $[M]^+$ 。以上数据与 1-乙酰基咪唑波谱数据一致^[8-10]。

化合物(8), 淡黄色油状物, $C_8H_{10}O_2$; 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ : 7.14(2H, $J=8.0$ Hz, H-2, H-6), 6.80(2H, d, $J=8.0$ Hz, H-3, H-5), 2.81(2H, t, $J=6.2$ Hz, H₂-7), 3.80(2H, t, $J=6.2$ Hz, H₂-8); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ : 156.9(s, C-1), 118.0(d, C-2), 129.8(d, C-3), 138.7 (s, C-4), 129.8(d, C-5), 118.0(d, C-6), 39.3(t, C-7), 63.5(t, C-8); EIMS m/z : 138.1 $[M]^+$ 。以上数据与对羟基苯基乙醇波谱数据一致^[11-12]。

化合物(9), 淡黄色油状物, $C_{10}H_9NO_2$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ : 7.30(1H, s, H-2), 7.64(d1H, d, $J=1.8, 7.5$ Hz, H-4), 7.00(1H, m, H-5), 7.17(1H, m, H-6), 7.30(1H, dd, $J=1.8, 7.5$ Hz, H-7), 3.77(1H, s, H-8); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ : 124.9(d, C-2), 109.0 (s, C-3), 128.0(s, C-3a), 120.1 (d, C-4), 120.3(d, C-5), 122.0(d, C-6), 112.3(d, C-7), 137.5(s, C-7a), 32.4(t, C-8), 173.9(s, C-9); EIMS m/z : 175.1 $[M]^+$ 。以上数据与吲哚-3-乙酸波谱数据一致^[13]。

化合物(10), 淡黄色油状物, $C_9H_7NO_2$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ : 8.10(1H, m, H-4), 7.92(1H, s, H-2), 7.41(1H, m, H-7), 7.20(2H, m, H-5, H-6); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 75.5 MHz) δ : 168.3(s, CO), 129.0 (d, C-2), 112.0(s, C-3), 133.2(s, C-3a), 122.0(d, C-4), 123.2(d, C-5), 123.1(d, C-6), 113.7(d, C-7), 137.9 (s, C-7a)。以上数据与吲哚-3-甲酸波谱数据一致^[14-16]。

3 结论

本研究以海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. L211 为研究对象, 先期中分离了 15 个化合物, 并鉴定了其中的 10 个, 研究表明化合物 Kalamycin (1), Medermycin (2), Menoxymycin-B (3)均表现出不同的抗肿瘤活性^[3-4]。目前, 本课题组正在对其他海洋放线菌次生代谢产物进行深入研究, 相信会有更多有活性的代谢产物被发现。

参考文献:

- [1] Amagata T, Xiao J, Chen Y P, et al. Creation of an HDAC-Based Yeast Screening Method for Evaluation of Marine-Derived *Actinomycetes*: Discovery of Streptosetin A[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(12): 2193-2199.
- [2] Sato S, Iwata F, Yamada S, et al. Neomaclafungins A-I: Oligomycin-Class Macrolides from a Marine-Derived *Actinomycete*[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(11): 1974-1982.
- [3] Zhang Y H, Qin M, Li F C, et al. Isolation and identification of metabolites produced by marine *Streptomyces* sp.S007[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2011, 23: 410-414.
- [4] Yoichi H, Ishigami K, Shin-Ya K, et al. Menoxymycins A and B, antitumor antibiotics generating active oxygen in tumor cells[J]. *J Antibiot*, 1994, 47: 1344-1347.
- [5] Atta-ur-Rahman M, Iqbal C, Safdar H, et al. Spatozoate and varnasterol from the brown alga *Spatoglossum variabile*[J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 495-499.
- [6] Sindler-Kulyk M, Neckers D C. Photochemistry of 2-phenylbenzothiazole with ethoxyacetylene and ethoxypropyne. Synthesis of 1, 5-benzothiazepines[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 1982, 47(25): 4914-4919.
- [7] Gordon B B, Arthur C G. Indole Compounds Synthesized by *Diplodia natalensis*[J]. *Plant physiology*, 1962, 37: 439-445.
- [8] Zhang Y, Morikawa T, Nakamura S, et al. Bioactive constituents from chinese natural medicines. XXV. New flavonol bisdesmosides, sarmenosides I, II, III, and IV, with hepatoprotective activity from *Sedum sarmentosum* (Crassulaceae) [J]. *Heterocycles*, 2007, 71(7): 1565-1576.
- [9] Morikawa T, Zhang Y, Nakamura S, et al. Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XXII. Absolute structures of new megastigmane glycosides, sedumosides E1, E2, E3, F1, F2, and G, from *Sedum sarmentosum* (Crassulaceae)[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 55(3): 435-441.
- [10] Ohmoto T, Koike K. Studies on the constituents of *Picrasma quassioides* Bennet. I. On the alkaloidal constituents[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1982, 30(4): 1204-1209.
- [11] Huang Q, Tezuka Y, Hatanaka Y, et al. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. III. new sesquiterpene alcohol from *Trichoderma koningii*[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 43: 1035-1038.
- [12] William A A, Latchezar S T, Phenolic and polyketide

- metabolites of the aspen blue stainfungus *Ophiostoma crassivaginata*[J]. *Phytochemistry*, 1995, 38: 371-372.
- [13] Alejandro F B, Juan E O, Juan A P. Acidic metabolites from *Phycomyces blakesleeanus*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 42: 1427-1433.
- [14] 刘海河, 林文翰, 赵喜, 等. 南海红树内生真菌#HA-094 化学成分的研究[J]. *黑龙江医药*, 2007, 20(6): 564-565.
- [15] Shaaban K A, Shaaban M, Facey P, et al. Electrospray ionization mass spectra of piperazimycins A and B and butyrolactones from a marine-derived *Streptomyces* sp.[J]. *Journal of Antibiotics*, 2008, 61(12): 736-746.
- [16] Eggers M E, Jog P V, Bates D K. Intramolecular sulfoxide electrophilic sulfenylation in 2- and 3-indole-anilides[J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(49): 12185-12194.

Isolation and identification of secondary metabolites produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. L211

GUO Shu-ju^{1, 2}, SU Hua³, LI Xian-cui¹, SHI Da-yong¹, ZHU Xiao-bin¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Nantong Branch, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Nantong 226006, China; 3. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

Received: Sep., 3, 2013

Key words: marine-derived actinomycete.; secondary metabolites; anti-tumor activity

Abstract: Ten compounds including Kalamycin (1), Medermycin (2), Menoxymycin-B (3), spatozoate (4), anthranilic acid(5), 3-indolyethanol(6), 1-acetyl- β -carbolin(7), p-hydroxyphenylethyl alcohol(8), indole-3-acetic acid(9), and indol-3-carboxylic acid(10) were isolated from the ethyl acetate extract of a marine-derived *Streptomyces* sp. L211 by using normal phase silica gel, Sephadex LH-20 chromatography and preparative thin layer chromatography. Their structures were identified by spectroscopic methods including ¹H-NMR, ¹³C-NMR and EIMS.

(本文编辑: 康亦兼)