

# 深海放线菌 *Actinomadura cremea* 中的 生物碱类化合物\*

陈传兵<sup>1</sup>, 胡金珊<sup>1</sup>, 于鑫<sup>1</sup>, 章卫民<sup>2</sup>, 张琪<sup>1</sup>, 张翠仙<sup>1</sup>

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006
2. 广东省微生物研究所 / 华南应用微生物国家重点实验室 / 广东省菌种保藏与应用重点实验室 / 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070

**摘要:** 为寻找结构新颖的海洋微生物次生代谢产物, 对深海放线菌 *Actinomadura cremea* 的次级代谢产物进行了研究, 经多种色谱技术从其 A1 培养基的乙酸乙酯部位分离得到 13 个生物碱类化合物, 通过波谱学方法并结合文献数据比对鉴定其结构分别为: 9H-吡啶并[3, 4-b]吲哚(1)、N-乙酰基色胺(2)、N-(2-(1H-吲哚-3-基)乙基)丙酰胺(3)、N-(4-羟基苯乙基)丙酰胺(4)、N-乙酰酪胺(5)、N-苯乙基乙酰胺(6)、戊内酰胺(7)、环(苯丙-缬)二肽(8)、环(脯-缬)二肽(9)、环(亮-缬)二肽(10)、环(丙-缬)二肽(11)、环(亮-异亮)二肽(12)和环(丙-异亮)二肽(13)。化合物 1、3、4、7-13 首次从 *Actinomadura* 属中发现, 所有化合物均首次从深海放线菌 *Actinomadura cremea* 中得到, 丰富了该菌种的次生代谢产物研究工作。

**关键词:** *Actinomadura cremea*; 深海放线菌; 生物碱; 结构鉴定

**中图分类号:** R931.77 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2022)03-0028-07

## The alkaloids from deep sea actinomycete *Actinomadura cremea*

CHEN Chuanbing<sup>1</sup>, HU Jinshan<sup>1</sup>, YU Xin<sup>1</sup>, ZHANG Weimin<sup>2</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>, ZHANG Cuixian<sup>1</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
2. Guangdong Institute of Microbiology / State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China / Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application / Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China

**Abstract:** In order to discover the novel and bioactive secondary metabolites, 13 alkaloids were isolated from EtOAc layer of deep sea actinomycete *Actinomadura cremea* on the A1 media using different kinds of chromatographic columns with SiO<sub>2</sub>, ODS, Sephadex LH-20, etc. and HPLC. Their structures were analyzed by NMR, LC-MS, ORD, and compared with the literatures. They were identified as Harmane (1), N-acetyltryptamine (2), N-(2-(1H-indol-3-yl) ethyl) propionamide (3), N-(4-hydroxyphenethyl) propionamide (4), N-acetyltyramine (5), N-phenethylacetamide (6), Valerolactam (7), cyclo-(L-Phe-L-Val) (8), cyclo-(L-Pro-L-Val) (9), cyclo-(L-Leu-L-Val) (10), Cyclo-(L-Ala-L-Val)

\* 收稿日期: 2020-10-29 录用日期: 2021-02-02 网络首发日期: 2021-06-08

**基金项目:** 广东省自然资源厅专项资金(粤自然资合[2020]039); 国家自然科学基金(81741160); 广东省科技计划(2017A020217008, 2015A020216017); 广东省自然科学基金(2016A030312014, 2014A030313411); 广州中医药大学“薪火计划”重点项目(XH20170110); 海南大学南海海洋资源利用国家重点实验室开放课题(2016003); 广东省中药药效物质基础和創新药物研究重点实验室开放课题资助(001)

**作者简介:** 陈传兵(1977年生), 男; 研究方向: 天然药物化学; E-mail: henchuanbing@gzucm.edu.cn

**通信作者:** 张翠仙(1975年生), 女; 研究方向: 天然药物化学; E-mail: zhangcuixian@gzucm.edu.cn

(11), cyclo-(L-Ile-L-Leu) (12) and cyclo-(L-Ala-L-Ile) (13). Compounds 1, 3, 4, 7-13 were firstly obtained from genus *Actinomadura*, and all of them were isolated from *Actinomadura cremea* for the first time. The results enriched the types of chemical structures from *Actinomadura cremea*.

**Key words:** *Actinomadura cremea*; deep sea actinomycete; alkaloids; identification

海洋放线菌是海洋微生物活性天然产物的重要来源<sup>[1-3]</sup>, 主要包括链霉菌属 *Streptomyces*、微球菌属 *Micrococcus*、马杜拉放线菌属 *Actinomyces*、小单孢菌属 *Micromonospora* 和节杆菌属 *Arthrobacter* 等<sup>[4]</sup>。*Actinomyces* 属放线菌多分布于热带和亚热带, 但目前此属次生代谢产物的报道主要来源于陆地放线菌属<sup>[5]</sup>, 其结构类型主要有生物碱类、聚酮类、萜类、甾醇类和环二肽类等<sup>[6-7]</sup>, 药理活性主要为抗肿瘤和抗菌活性。如从 *A. alkaliterrae* sp. nov. 中分离得到的蒽环类洋红霉素, 临床用于治疗肿瘤等疾病<sup>[8]</sup>, 其同系物吡柔比星目前临床上对急性粒细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、神经母细胞瘤和横纹肌肉瘤等治疗使用的化疗药物<sup>[9]</sup>。Müller 等<sup>[10]</sup> 从海绵来源海洋放线菌 *Actinomadura* sp. SBMs009 中分离得到甾醇类化合物, 对小鼠成

纤维细胞株 (L929) 显示出较强的细胞毒活性。Wyche 等<sup>[11]</sup> 从海洋放线菌 *Actinomadura* sp. 中分离得到对产生毒素的艰难梭菌 NAP1/B1/027 等有极强抑菌作用的 ecteinamycin, 其 MIC 值为 59.0 ng/μL。文献调研发现海洋来源马杜拉属放线菌的研究报道较少, 为进一步获得结构新颖的海洋微生物次生代谢产物<sup>[12-14]</sup>, 本课题组对一株深海来源乳脂色马杜拉放线菌 *Actinomadura cremea* 的次生代谢产物进行研究。在 A1 培养基的培养条件下, 从其菌丝体与菌液的乙酸乙酯部位中, 共分离得到 13 个生物碱类化合物 (图 1): 3 个色氨生物碱 (1~3)、4 个 (芳香) 酰胺类生物碱 (4~7) 和 6 个二酮哌嗪类生物碱 (8~13)。其中 10 个生物碱 (1、3、4、7~13) 首次从马杜拉放线菌属中发现, 所有化合物均首次从放线菌 *Actinomadura cremea* 中得到。

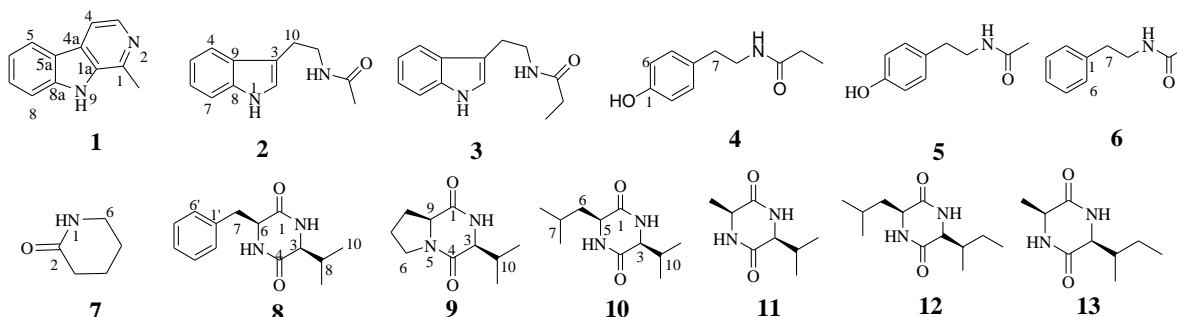


图1 来源于 *Actinomadura cremea* 化合物 1~13

Fig. 1 Compounds 1-13 from *Actinomadura cremea*

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

实验中微生物活化、发酵及次生代谢产物提取、分离和结构鉴定的仪器同文献 [15] 的 1.1 中仪器部分。本文中的次生代谢产物分离材料色谱柱仅用一种: 色谱柱 1 (日本 YMC 公司): YMC-Pack ODS-A/S 5 μm/12 nm, 250 mm×10.0 mm; 其他分离材料及试剂同文献 [15] 的 1.1 中材料与试剂部分。

### 1.2 菌种材料

马杜拉放线菌 *Actinomadura cremea* 于 2008 年分离自中国南海北部沉积泥中 (E 117°32.357', N 19°59.304'), 水深 2 346 m。菌株乳脂色马杜拉

放线菌 *Actinomadura cremea* 由广东省微生物研究所馈赠, 样本编号: 线-章-SS7。

### 1.3 微生物的发酵培养

**1.3.1 菌种活化** 放线菌线-章-SS7 采用 A1 培养基进行种子液活化。将纯化菌种接种于装有 300 mL A1 培养基的培养瓶 (1 L) 中, 密封。置于 28 °C 恒温摇床上培养 48 h (165 r/min)。

**1.3.2 规模发酵** 放线菌线-章-SS7 规模发酵在 A1 培养基上进行, 方法同文献 [15] 1.3.2 部分, 共培养 66 L。

### 1.4 次生代谢产物的提取、分离及纯化

生长 7 d 的菌株采用 XAD-7 树脂吸附、过滤分为菌体和菌液两部分, 次生代谢产物的提取过程见图 2; 采用硅胶、ODS、Sephadex LH-20 柱色谱

及制备 HPLC 等进行分离、纯化, 得到纯化化合物, 次生代谢产物的分离及纯化见图 3。

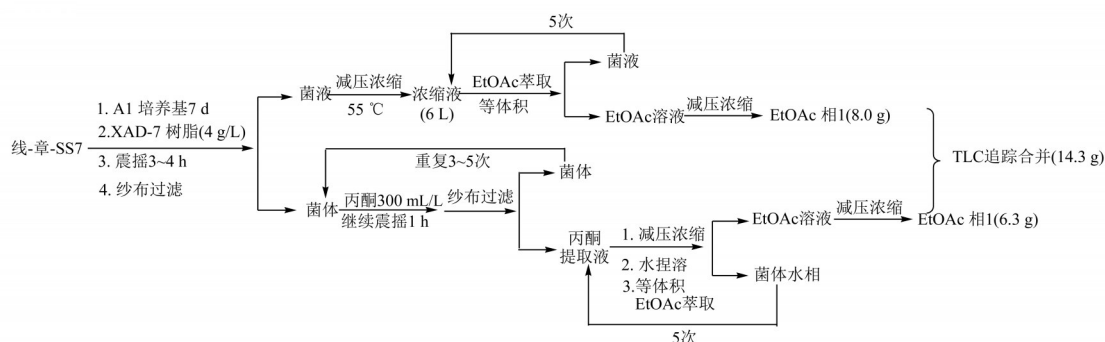


图 2 放线菌 *Actinomadura cremea* 后处理及乙酸乙酯相的获得

Fig. 2 EtOAc layer from *Actinomadura cremea* on the A1 medium

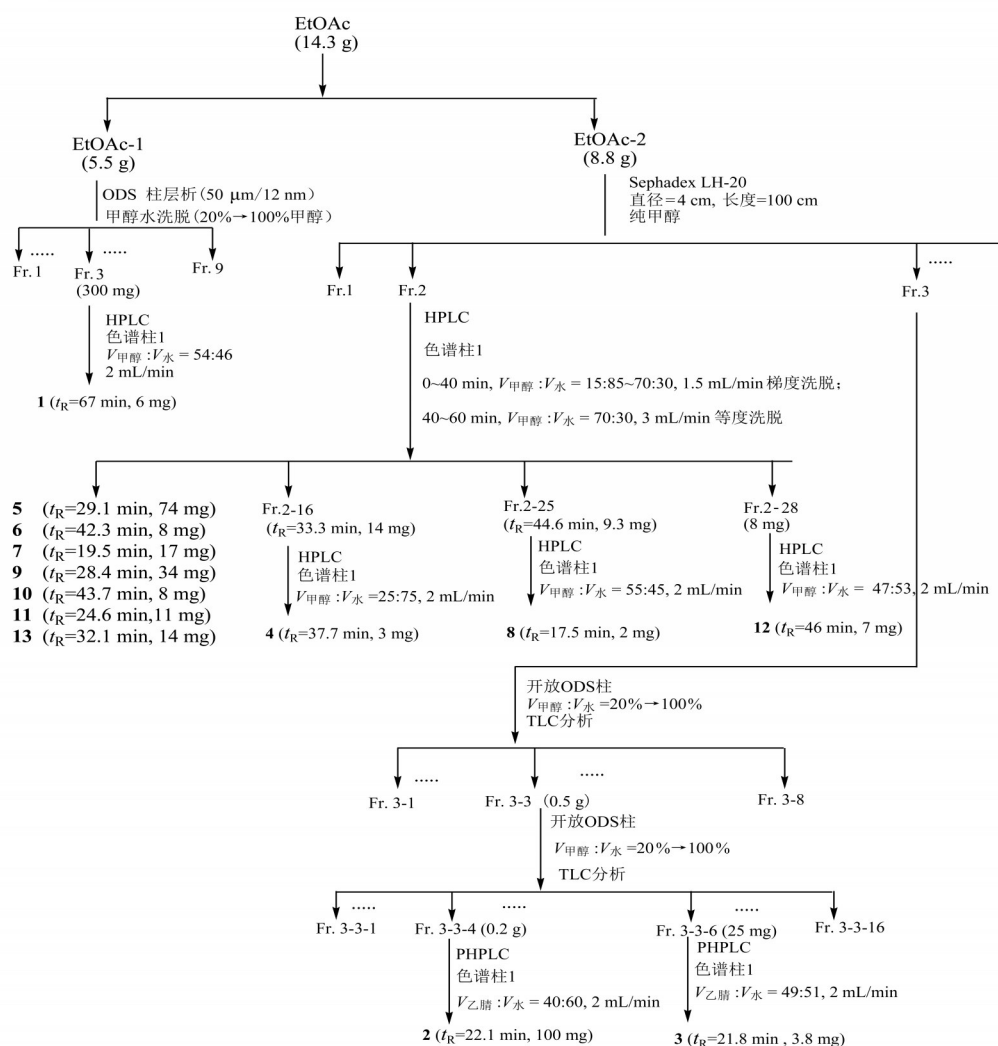


图 3 化合物 1~13 分离流程图

Fig. 3 The separation flowing chart of 1-13

## 2 结果与分析

化合物 1: 黄色固体(MeOH); UV 254 nm 下观察为暗斑。ESI-MS:  $m/z$  183  $[M+H]^+$ , 确定其相对

分子质量为 182, 分子式为  $C_{12}H_{10}N_2$ 。 $^1H$  NMR (400 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_{H}$ : 8.51 (1H, brs, H-9), 8.12~8.14 (2H, m, H-3, 5), 7.93 (1H, d,  $J=5.6$  Hz, H-4),

7.57 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-8), 7.53 (1H, dt,  $J=6.8, 0.8$  Hz, H-7), 7.53 (1H, m, H-6), 2.81 (3H, s, H-1');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{c}}$ : 142.9 (s, C-1), 142.7 (s, C-8a), 137.4 (d, C-3), 136.2 (s, C-1a), 130.0 (s, C-4a), 129.6 (d, C-7), 122.7 (d, C-5), 122.6 (s, C-5a), 120.9 (d, C-6), 114.2 (d, C-4), 112.9 (d, C-8), 19.5 (q, C-1')。以上数据与文献[16-17]报道基本一致, 故确定 1 为 9H-吡啶并[3, 4-*b*]吲哚, 即 Harmane。

化合物 2: 黄色固体 (MeOH); TLC 中 UV 254 nm 下观察为暗斑, 365 nm 下检测为橙黄色斑点。ESI-MS:  $m/z$  203  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 确定其相对分子质量为 202, 分子式为  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.51 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-4), 7.30 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-6), 7.05 (1H, dt,  $J=1.2, 8.0$  Hz, H-5), 6.99 (1H, s, H-2), 6.96 (1H, dt,  $J=1.2, 8.0$  Hz, H-6), 3.40 (2H, brt,  $J=7.2$  Hz, H-11), 2.87 (2H, brt,  $J=7.2$  Hz, H-10), 1.84 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{c}}$ : 173.2 (s, C-13), 138.0 (s, C-8), 128.7 (s, C-9), 123.3 (d, C-2), 119.6 (d, C-5), 119.2 (d, C-4), 113.2 (s, C-3), 112.2 (d, C-7), 41.4 (t, C-11), 26.1 (t, C-10), 22.6 (q, C-14)。以上数据与文献 [18-19] 报道基本一致, 故确定 2 为 *N*-乙酰基色胺。

化合物 3: 黄色固体 (MeOH); TLC 中 UV 254 nm 下观察为暗斑, 365 nm 下检测为橙黄色斑点。ESI-MS:  $m/z$  217  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 确定其相对分子质量为 216, 分子式为  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.55 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-4), 7.31 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-7), 7.08 (1H, dt,  $J=0.8, 7.2$  Hz, H-5), 7.05 (1H, s, H-2), 7.00 (1H, dt,  $J=0.8, 7.2$  Hz, H-6), 3.46 (2H, brt,  $J=7.2$  Hz, H-11), 2.93 (2H, brt,  $J=7.2$  Hz, H-10), 2.16 (2H, q,  $J=7.6$  Hz, H-14), 1.09 (3H, t,  $J=7.6$  Hz, H-15);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{c}}$ : 177.0 (s, C-13), 138.2 (s, C-8), 128.8 (s, C-9), 123.4 (d, C-6), 122.3 (d, C-2), 119.5 (t, C-5), 119.4 (d, C-4), 113.3 (s, C-3), 112.2 (d, C-7), 41.4 (t, C-11), 30.3 (t, C-14), 26.3 (t, C-10), 10.5 (q, C-15)。以上数据与文献 [19] 报道基本一致, 故确定 3 为 *N*-(2-(1*H*-吲哚-3-基)乙基)丙酰胺。

化合物 4: 淡红色固体 (MeOH), TLC 中 UV

254 nm 下观察为暗斑, 浓硫酸-香草醛显蓝灰色。ESI-MS:  $m/z$  194  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合 NMR 信息确定其相对分子质量为 193, 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ , 不饱和度为 5。 $^1\text{H}$  NMR (400 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.00 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-3, 5), 6.68 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2, 6), 3.32 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-8), 2.66 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-7), 2.14 (2H, q,  $J=7.6$  Hz, H-11), 1.07 (3H, t,  $J=7.6$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{c}}$ : 177.0 (s, C-10), 156.9 (s, C-1), 131.3 (s, C-4), 130.7 (d, C-3, 5), 116.2 (d, C-2, 6), 42.3 (t, C-8), 35.6 (t, C-7), 30.2 (t, C-11), 10.6 (q, C-12)。以上数据与文献 *N*-(4-hydroxyphenethyl)propionamide<sup>[20]</sup> 对比基本一致, 故确定 4 为 *N*-(4-羟基苯乙基)丙酰胺。

化合物 5: 无色固体 (MeOH), TLC 中 UV 254 nm 下观察为暗斑, 浓硫酸-香草醛显蓝灰色。ESI-MS:  $m/z$  180  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合 NMR 谱数据可推断其分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ , 不饱和度为 5。与化合物 4 对比发现二者十分相似仅是乙酰基变成了乙酰基。 $^1\text{H}$  NMR (400 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.00 (2H, d,  $J=7.2$  Hz, H-3, 5), 6.69 (2H, d,  $J=7.2$  Hz, H-2, 6), 3.30 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-8), 2.66 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-7), 1.88 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{c}}$ : 173.2 (s, C-9), 156.9 (s, C-1), 131.2 (s, C-4), 130.7 (d, C-3, 5), 116.2 (d, C-2, 6), 42.4 (t, C-8), 35.6 (t, C-7), 22.5 (s, C-10)。以上 NMR 数据与文献 *N*-acetyltyramine<sup>[21-22]</sup> 基本一致, 故确定 5 为 *N*-乙酰酪胺。

化合物 6: 白色固体 (MeOH), TLC 中 UV 254 nm 下观察为暗斑, 浓硫酸-香草醛显蓝灰色。ESI-MS:  $m/z$  164  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合 NMR 谱数据可推断其分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$ , 不饱和度为 5。化合物 6 和 5 结构十分相似, 只是芳香环上比 5 少了一个羟基取代。 $^1\text{H}$  NMR (400 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.24~7.29 (2H, m, H-2, 6), 7.14~7.23 (3H, m, H-3, 4, 5), 3.36 (2H, m, H-8), 2.76 (2H, m, H-7), 1.88 (3H, s, H-11);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 M,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{c}}$ : 173.2 (s, C-10), 140.5 (s, C-1), 129.8 (d, C-3, 5), 129.5 (d, C-2, 6), 127.3 (d, C-4), 42.1 (t, C-8), 36.5 (t, C-7), 22.5 (q, C-11)。上述 NMR 数据与文献 *N*-phenethylacetamide<sup>[22-23]</sup> 对比基本一致, 故确定 6 为 *N*-苯乙基乙酰胺。

化合物 7: 白色固体 (MeOH), ESI-MS:  $m/z$  100  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合 NMR 谱数据可推断其分子式为

$C_5H_9NO$ , 不饱和度为 2。 $^1H$  NMR(400 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 4.61 (1H, brs, H-1), 3.25 (2H, m, H-6), 2.28 (2H, m, H-3), 1.76 (4H, m, H-4, H-5);  $^{13}C$  NMR(100 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 175.0(s, C-2), 43.0 (t, C-6), 32.0(t, C-3), 23.0(t, C-5), 21.7(t, C-4)。以上 NMR 数据与文献戊内酰胺<sup>[24]</sup>对比基本一致,故确定 7 为戊内酰胺。

化合物 8: 白色固体(MeOH),  $[\alpha]_D^{28} -58.83^\circ$  ( $c=0.02$ , MeOH)。ESI-MS:  $m/z$  247  $[M+H]^+$ , 确定其相对分子质量为 246, 分子式为  $C_{14}H_{18}N_2O_2$ 。 $^1H$  NMR(400 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 7.20~7.29 (5H, m, H-2'~6'), 4.31 (1H, td,  $J=1.2, 4.9$  Hz, H-6), 3.64 (1H, dd,  $J=0.8, 4.6$  Hz, H-3), 3.23 (1H, dd,  $J=5.2, 13.6$  Hz, H-7a), 3.03 (1H, dd,  $J=4.8, 13.6$  Hz, H-7b), 1.64 (1H, m, H-8), 0.80 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, H-9/10), 0.43 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-10/9);  $^{13}C$  NMR(100 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 169.4 (s, C-1), 169.4 (s, C-4), 137.1 (s, C-1'), 131.5 (s, C-3', 5'), 129.6 (d, C-2', 6'), 128.2 (d, C-4'), 61.2 (d, C-3), 57.3 (d, C-6), 40.1 (t, C-7), 33.3 (d, C-8), 19.1 (q, C-9/10), 17.1 (q, C-9/10)。以上数据与文献<sup>[25-26]</sup>报道基本一致,故确定 8 为环(苯丙-缬)二肽。

化合物 9: 白色固体(MeOH),  $[\alpha]_D^{28} -119.34^\circ$  ( $c=0.1$ , MeOH)。ESI-MS:  $m/z$  197  $[M+H]^+$ , 确定其相对分子质量为 196, 分子式为  $C_{10}H_{16}N_2O_2$ 。 $^1H$  NMR(400 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 4.20 (1H, m, H-3), 4.03 (1H, m, H-9), 3.54 (1H, m, H-6a), 3.51 (1H, m, H-6b), 2.48 (1H, m, H-10), 2.32 (1H, m, H-9), 3.54 (1H, m, H-6a), 3.51 (1H, m, H-6b), 2.48 (1H, m, H-10), 2.32 (1H, m, H-8a), 2.01 (1H, m, H-8b), 1.95 (1H, m, H-7a), 1.90 (1H, m, H-7b), 1.09 (3H, d,  $J=7.2$  Hz, H-11/12), 0.93 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-11/12);  $^{13}C$  NMR(100 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 172.6 (s, C-4), 167.6 (s, C-4), 61.5 (d, C-9), 60.0 (d, C-3), 46.2 (t, C-6), 29.9 (d, C-10), 29.5 (t, C-8), 23.3 (t, C-7), 18.8 (q, C-11/12), 16.7 (q, C-11/12)。以上数据与文献<sup>[27-28]</sup>报道基本一致,故确定 9 为环(脯-缬)二肽。

化合物 10: 白色固体(MeOH),  $[\alpha]_D^{28} -28.54^\circ$  ( $c=0.16$ , MeOH)。ESI-MS:  $m/z$  213  $[M+H]^+$ , 确定其相对分子质量为 212, 分子式为  $C_{11}H_{20}N_2O_2$ 。 $^1H$  NMR(400 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 3.94 (1H, m, H-3),

3.76 (1H, m, H-3), 2.22 (1H, m, H-11), 1.87 (1H, m, H-8), 1.75 (1H, m, H-7a), 1.60 (1H, m, H-7b), 1.03 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-12/13), 0.93~0.98 (9H, m, H-12/13, 9, 10);  $^{13}C$  NMR(100 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 171.3 (s, C-1), 169.7 (s, C-4), 61.5 (d, C-3), 54.3 (d, C-6), 46.0 (t, C-7), 33.7 (d, C-11), 25.3 (d, C-8), 23.6 (q, C-9/10), 21.8 (q, C-9/10), 19.3 (q, C-12/13), 17.8 (q, C-12/13)。以上数据与文献<sup>[29]</sup>报道基本一致,故确定 10 为环(亮-缬)二肽。

化合物 11: 白色固体(MeOH),  $[\alpha]_D^{28} -24.56^\circ$  ( $c=0.2$ , MeOH)。ESI-MS:  $m/z$  171  $[M+H]^+$ , 确定其相对分子质量为 170, 分子式为  $C_8H_{14}N_2O_2$ 。 $^1H$  NMR(400 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 4.03 (1H, m, H-6), 3.83 (1H, m, H-3), 2.26 (1H, m, H-8), 1.44 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-7), 1.04 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-9, 可与 H-10 交换), 0.94 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-10, 可与 H-9 交换);  $^{13}C$  NMR(100 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 171.4 (s, C-1), 169.3 (s, C-4), 61.4 (d, C-3), 51.7 (d, C-6), 33.3 (d, C-8), 21.1 (q, C-7), 19.1 (q, C-9/10), 17.2 (q, C-9/10)。以上数据与文献<sup>[30]</sup>报道基本一致,故确定 11 为环(丙-缬)二肽。

化合物 12: 白色固体(MeOH),  $[\alpha]_D^{28} -32.26^\circ$  ( $c=0.025$ , MeOH)。ESI-MS:  $m/z$  227  $[M+H]^+$ , 确定其相对分子质量为 226, 分子式为  $C_{12}H_{22}N_2O_2$ 。 $^1H$  NMR(400 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 3.95 (1H, ddd,  $J=1.2, 4.8, 9.2$  Hz, H-3), 3.85 (1H, dd,  $J=1.2, 4.0$  Hz, H-6), 1.93 (1H, m, H-12a), 1.25 (1H, m, H-12b), 1.02 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-14), 0.93 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-13), 0.93~0.96 (6H, m, H-9/10);  $^{13}C$  NMR(100 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 171.2 (s, C-1), 169.6 (s, C-4), 60.9 (s, C-3), 54.3 (d, C-6), 45.8 (d, C-7), 40.5 (t, C-11), 25.9 (t, C-12), 25.3 (t, C-8), 23.6 (q, C-9/10), 21.8 (t, C-9/10), 15.7 (t, C-14), 12.1 (q, C-13)。以上数据与文献<sup>[31]</sup>报道基本一致,故确定 12 为环(亮-异亮)二肽。

化合物 13: 白色固体(MeOH),  $[\alpha]_D^{28} -26.70^\circ$  ( $c=0.28$ , MeOH)。ESI-MS:  $m/z$  185  $[M+H]^+$ , 确定其相对分子质量为 184, 分子式为  $C_9H_{16}N_2O_2$ 。 $^1H$  NMR(400 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 4.03 (1H, m, H-6), 3.90 (1H, m, H-3), 1.96 (1H, m, H-8), 1.51 (1H, m, H-10a), 1.26 (1H, m, H-10b), 1.43 (3H, m, H-7), 1.01 (3H, m, H-9), 0.95 (3H, m, H-11);  $^{13}C$  NMR(100 M,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 171.3 (s, C-1), 169.2 (s, C-4), 60.9 (d, C-3), 51.6 (d, C-6),

40.2 (d, C-8), 25.6 (t, C-10), 20.9 (q, C-7), 15.6 (q, C-9), 12.2 (q, C-11)。以上数据与文献[32]报道基本一致, 故确定 **13** 为环(丙-异亮)二肽。

### 3 结论

本课题组对一株深海来源乳脂色马杜拉放线菌 *Actinomadura cremea* 的次生代谢产物进行了研究。从其 A1 培养基的菌丝体与菌液的乙酸乙酯部位中, 共分离得到 13 个生物碱类化合物(图 1), 结构类型涉及 3 个色氨酸类生物碱(1~3)、4 个(芳香)酰胺类生物碱(4~7)和 6 个二酮哌嗪类生物碱(8~13)。化合物 1、3、4、7~13 首次从 *Actinomadura* 属中发现, 所有化合物均首次从海洋放线菌 *Actinomadura cremea* 中得到, 说明此菌富含丰富的生物碱类次生代谢产物。

文献研究表明 **1** 对卤虫有极强的致死活性测试, 其致死率为 94.6%<sup>[17]</sup>。同时研究该化合物的系列衍生物的生物活性<sup>[32]</sup>发现 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-6-methoxy-2-(4-(trifluoromethyl)-bnzyl)-9H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium bromide 具有极强的抗菌活性, 其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的杀菌能力比磷霉素钠和氨苄西林钠等药物

还要强, 最小抑菌浓度为 50 nmol/mL。Stark 等<sup>[25]</sup>报道了剂量/反应函数关系用于测定二酮哌嗪的苦味, 更准确地描述了人类对二酮哌嗪的苦味感知。化合物 **2** 和 **5** 具有较强的清除自由基的能力, 其 IC<sub>50</sub> 分别是 (131.3±1.8) 和 (64.7±0.5) μg/mL<sup>[33]</sup>。Lee 等<sup>[34]</sup>报道 **5** 还具有抑制 ADP-、collagen- 或 u46619- 诱导血小板聚集, 有抗血栓作用。刘海滨等<sup>[35]</sup>研究表明 **9** 和 **12** 在 50 μg/mL 下对肝癌细胞 HepG-2 的抑制率分别为 17%、32%, 对前列腺癌细胞 LNCaP 抑制率分别为 53%、43%, 且化合物 **8**、**9** 和 **12** 具有一定的细胞毒活性。Lee 等<sup>[36]</sup>报道了 **9** 作为一种抗 EPCR 脱落试剂, 对 PMA 介导和 CLP 介导的 EPCR 脱落具有潜在的抑制作用。而 Fdhila 等<sup>[37]</sup>报道了 **9** 具有抗鳗弧菌的作用 (MIC=0.05 μg/mL)。龙聪等<sup>[38]</sup>研究也表明 **8** 和 **12** 对 Hep G2 细胞株均表现出一定的生长抑制活性, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 88 和 105 μg/mL。Xu 等<sup>[39]</sup>研究表明化合物 **10** 有较弱的抗菌活性。韩冰等<sup>[30]</sup>研究表明化合物 **8**、**11** 和 **13** 显示出具有细胞周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期抑制活性, 是首次报道此类化合物具有细胞周期抑制活性。由此可以看出放线菌不仅次生代谢产物结构类型多样, 生理活性也十分丰富。

#### 参考文献:

- [1] CARROLL A R, COPP B R, DAVIS R A, et al. Marine natural products [J]. Natural Products Report, 2020, 37(1): 175-223.
- [2] CARROLL A R, COPP B R, DAVIS R A, et al. Marine natural products [J]. Natural Products Report, 2019, 36(1): 122-173.
- [3] BLUNT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products [J]. Natural Products Report, 2018, 35(1): 8-53.
- [4] MANIVASAGAN P, VENKATESAN J, SIVAKUMA K, et al. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives [J]. Microbiological Research, 2013, 168(6): 311-332.
- [5] HABBECHÉ A, SAOUDI B, JAOUADI B, et al. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117(4): 413-421.
- [6] WYCHE T P, PIOTROWSKI J S, HOU Y, et al. Forazoline A: Marine-derived polyketide with antifungal *in vivo* efficacy [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(43): 11583-11586.
- [7] WYCHE T, STANDIFORD M, HOU Y, et al. Activation of the nuclear factor E2-related factor 2, pathway by novel natural products halomadurones A-D, and a synthetic analogue [J]. Marine Drugs, 2013, 11(12): 5089-5099.
- [8] AY H, NOUIOUI I, MARIA M C, et al. *Actinomadura alkaliterrae* sp. nov. isolated from an alkaline soil [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(6): 787-794.
- [9] CORTES J E, GOLDBERG S L, FELDMAN E J, et al. Phase II, multicenter, randomized trial of CPX-351 (cytarabine: daunorubicin) liposome injection versus intensive salvage therapy in adults with first relapse AML [J]. Cancer, 2015, 121(2): 234-242.
- [10] SIMMONS L, KAUFMANN K, GARCIA R, et al. Bendigoles D-F, bioactive sterols from the marine sponge-derived *Actinomadura* sp. SBMs009 [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011, 19(22): 6570-6575.
- [11] WYCHE T P, ALVARENGA R F R, PIOTROWSKI J S, et al. Chemical genomics, structure elucidation, and *in vivo* studies of the marine-derived Anticlostridial ecteinamycin [J]. ACS Chemical Biology, 2017, 12(9): 2287-2295.
- [12] FENG C, WEI X, HU J S, et al. Researches on the subergane-type sesquiterpenes from the soft coral-derived fungus *Aspergillus* sp. EGF15-0-3 [J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2020, 40(5): 1275-1280.
- [13] WEI X, FENG C, WANG S Y, et al. New indole

- diketopiperazine alkaloids from soft coral-associated epiphytic fungus *Aspergillus* sp. EGF 15-0-3 [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2020, 17(5): e2000106.
- [14] WEI X, FENG C, LI X H, et al. New chiral compounds from the starfish-derived symbiotic fungus *Penicillium* sp. GGF16-1-2 [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2019, 16(6): e1900052.
- [15] 于鑫, 韦霞, 冯婵, 等. 海洋放线菌 *Streptomyces novaecaesarea* 次生代谢产物 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2019, 58(3): 63-70.
- [16] SEKI H, HASHIMOTO A, HINO T. The <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectra of Harman. Reinvestigation of the assignments by one- and two dimensional methods [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1993, 41(6): 1169-1172.
- [17] 王宏鹏, 谢泽平, 况焱, 等. 海洋链霉菌 B170167 发酵产物中含氮化合物及其细胞毒活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(10): 1557-1561.
- [18] LI Y, LI X F, KIM D S, et al. Indolyl alkaloid derivatives, *N*-b-acetyltryptamine and oxaline from a marine-derived fungus [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2003, 26(1): 21-23.
- [19] 农旭华, 张晓勇, 陈茵, 等. 柳珊瑚共附生放线菌 *Streptomyces* sp. SCSGAA0009 中生物碱类化合物及其抗菌和抗附着活性 [J]. 微生物学报, 2013, 53(9): 995-1000.
- [20] LIN Z J, LU X M, ZHU T J, et al. GPR12 Selections of the metabolites from an endophytic *Streptomyces* sp. associated with *Cistanches deserticola* [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2008, 31(9): 1108-1114.
- [21] GAO T, CAO F, YU H, et al. Secondary metabolites from the marine fungus *Aspergillus sydowii* [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2017, 53(6): 1204-1207.
- [22] ZHAO P J, WANG H X, LI G H, et al. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces* sp. Lz531 [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2007, 4(5): 899-904.
- [23] 梁益敏, 郁阳, 王国凯, 等. 霍山石斛内生真菌 *Fusarium lactis* 次生代谢产物研究 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4608-4614.
- [24] ABRAHAM R J, BYRNE J J, GRIFFITHS L, et al. <sup>1</sup>H chemical shifts in NMR: Part 23, the effect of dimethyl sulphoxide versus chloroform solvent on <sup>1</sup>H chemical shifts [J]. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2006, 44(5): 491-509.
- [25] STARK T, HOFMANN T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2, 5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(18): 7222-7231.
- [26] FURTADO N A J C, PUPO M T, LOVNO C, et al. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain [J]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, 16(6B): 1448-1453.
- [27] 王沫, 陈玉婵, 孙章华, 等. 广藿香内生真菌 *Diaporthe longicolla* A616 细胞毒活性次级代谢产物研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 2112-2117.
- [28] 合力强, 杨晓艳, 冯涛, 等. 环带小薄孔菌发酵液的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(5): 753-757.
- [29] HONG R, QIAN Q G, CHENG B C, et al. The cytotoxic constituents from marine-derived *Streptomyces* 3320 [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2006, 5(1): 75-81.
- [30] 韩冰, 李文欣, 崔承彬. 黄直丝链霉菌 18522 生产的环二肽类细胞周期抑制剂 [J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(2): 107-110.
- [31] 艾峰, 许强芝, 杨好, 等. 东海微生物中 6 种环二肽类天然活性物质的分离和鉴定 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(1): 22-24.
- [32] DAI J, DAN W, REN S, et al. Design, synthesis and biological evaluations of quaternization harman analogues as potential antibacterial agents [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 160: 23-36.
- [33] HEIDARI B, MOHAMMADIPANAH F. Isolation and identification of two alkaloid structures with radical scavenging activity from *Actinokineospora* sp. UTM 968, a new promising source of alkaloid compounds [J]. *Molecular Biology Reports*, 2018, 45(6): 2325-2332.
- [34] LEE W, KIM M A, PARK I W, et al. Novel direct factor Xa inhibitory compounds from *Tenebrio molitor* with anti-platelet aggregation activity [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 109: 19-27.
- [35] 刘海滨, 高昊, 王乃利, 等. 红树林真菌草酸青霉 (092007) 的环二肽类成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(8): 474-478.
- [36] LEE W, KU S K, CHOI H, et al. Inhibitory effects of three diketopiperazines from marine-derived bacteria on endothelial protein C receptor shedding in human endothelial cells and mice [J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 181-188.
- [37] FDHILA F, VÁZQUEZ V, SÁNCHEZ J L, et al. DD-diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus* [J]. *Journal of Natural Products*, 2003, 66(10): 1299-1301.
- [38] 龙聪, 刘小宇, 卢小玲, 等. 海洋亚硫酸杆菌 M44 的代谢产物研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(4): 254-257.
- [39] XU L X, FENG N, XUE J H, et al. Nitrogen-containing heterocycles from *Metarhizium* sp. SC0924 and their antifungal activities against *Peronophythora lichii* [J]. *Journal of Tropical & Subtropical Botany*, 2010, 18(1): 93-96.