

# 海洋放线菌 *Streptomyces novaecaesareae* 次生代谢产物<sup>\*</sup>

于鑫<sup>1</sup>, 韦霞<sup>1</sup>, 冯婵<sup>1</sup>, 范倩<sup>1</sup>, 王思玉<sup>1</sup>, 章卫民<sup>2</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. 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//广东省微生物研究所, 广东 广州 510070)

**摘 要:** 对南海来源链霉菌 *Streptomyces novaecaesareae* 的次级代谢产物进行研究, 经多种柱色谱技术分离得到 10 个化合物, 通过波谱学方法并结合文献数据比对鉴定其结构分别为: 环(4-羟基-L-脯-D-苯丙)二肽(1)、环(4-羟基-L-脯-L-苯丙)二肽(2)、环(4-羟基-L-脯-D-脯)二肽(3)、环(4-羟基-L-脯-L-亮)二肽(4)、环(L-脯-L-苯丙)二肽(5)、环(L-亮-L-脯)二肽(6)、环(D-脯-L-亮)二肽(7)、环(8-羟基-L-脯-D-异亮)二肽(8)、N-(4-氧代戊基)-乙酰胺(9)和邻苯二甲酸二丁酯(10)。化合物 1-9 为叶立德类化合物, 且 1、3 和 7 含有自然界中不常见的 D 构型氨基酸。所有化合物均首次从 *Streptomyces novaecaesareae* 中分离得。

**关键词:** *Streptomyces novaecaesareae*; 叶立德类化合物; D 构型氨基酸

中图分类号: 0629.72 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2019)03-0063-08

## Secondary metabolites from the marine actinomycete *Streptomyces novaecaesareae*

YU Xin<sup>1</sup>, WEI Xia<sup>1</sup>, FENG Chan<sup>1</sup>, FAN Qian<sup>1</sup>, WANG Siyu<sup>1</sup>, ZHANG Weimin<sup>2</sup>, ZHANG Cuixian<sup>1</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510006, China;

2. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China//Guangdong Provincial

Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application//Guangdong Open

Laboratory of Applied Microbiology//Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** By using various sorts of column chromatography, ten compounds were isolated from *Streptomyces novaecaesareae* which was isolated from the South China Sea. Based on the spectrum of NMR, MS and comparing the data with references, their structures were identified as cyclo-(L4-Hydroxy-D-phe) (1), cyclo-(4-hydroxy-L-pro-L-phe) (2), cyclo (L-Pro-D-trans-Hyp) (3), cyclo (4-hydroxy-L-pro-L-leu) (4), cyclo-(L-Pro-L-Phe) (5), cyclo-(L-leu-L-pro) (6), cyclo (D-Pro-L-Leu) (7), callyspongidi peptide A (8), N-(4-oxopentyl)-acetamide (9) and dibutylphthalate (10). Compounds 1-9 were Ylide compounds which were composed of naturally rare D-configured amino acids. All Compounds were isolated from *S. novaecaesareae* for the first time.

**Key words:** *Streptomyces novaecaesareae*; Ylide compounds; D-amino acid

\* 收稿日期: 2018-11-06

基金项目: 国家自然科学基金(81741160); 广东省科技计划项目(2015A020216017, 2017A020217008); 广州中医药大学“薪火计划”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); 广东省自然科学基金(2014A030313411); 广东省自然科学基金(2016A030312014)

作者简介: 于鑫(1990年生), 男; 研究方向: 海洋生物活性次生代谢产物; E-mail: 1227825336@qq.com

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

海洋放线菌由于其独特的生理和代谢功能成为海洋微生物活性天然产物的重要来源。海洋放线菌中链霉菌属研究最广泛, 结构类型涉及生物碱、聚酮、萜类、甾体和卤代物聚醚等, 生理活性涉及抗肿瘤、抗菌、抗疟及寄生虫等<sup>[1-7]</sup>。为了继续寻找新的克服肿瘤耐药活性次生代谢产物<sup>[8-10]</sup>, 本课题对分离自南海沉积物中的新凯撒链霉菌 *Streptomyces novaecaesareae* 次生代谢产物进行分离, 共得到 10 个化合物, 其结构依次为环(4-羟基-*L*-脯-*D*-苯丙)二肽(1)、环(4-羟基-*L*-脯-*L*-苯丙)二肽

(2)、环(4-羟基-*L*-脯-*D*-脯)二肽(3)、环(4-羟基-*L*-脯-*L*-亮)二肽(4)、环(*L*-脯-*L*-苯丙)二肽(5)、环(*L*-亮-*L*-脯)二肽(6)、环(*D*-脯-*L*-亮)二肽(7)、环(8-羟基-*L*-脯-*D*-异亮)二肽(8)、*N*-(4-氧代戊基)-乙酰胺(9)和邻苯二甲酸二丁酯(10)(图1)。化合物1-9为叶立德类化合物, 且1、3和7含有自然界中不常见的*D*构型氨基酸。所有化合物均首次从 *Streptomyces novaecaesareae* 中分离得。

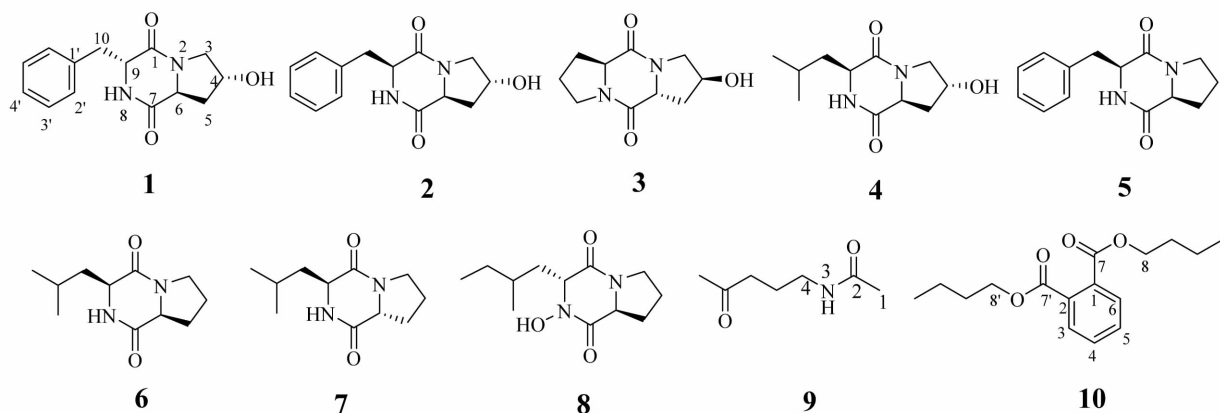


图1 来源于 *Streptomyces novaecaesareae* 化合物1-10

Fig. 1 Compounds 1-10 from *Streptomyces novaecaesareae*

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 菌株** 放线菌 *Streptomyces novaecaesareae* 由广东省微生物研究所馈赠, 分离自中国南海北部(E 111°10.442'、N 18°52.730')海底沉积物。菌种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: 线-章-SS9)。

**仪器:** Bruker AVANCE III HD 400 型核磁共振仪器(德国 Bruker 公司); AB SCIEX TripleTOFTM 5600 + 四极杆-飞行时间串联质谱(美国 AB SCI-EX 公司); 轨道阱高分辨液-质联用仪(美国 Thermo Fisher 公司); 半制备高效液相色谱(HPLC)仪器(北京慧得易科技有限公司); MCP 200 数字式旋光仪(奥地利 AntonPaar 公司)。LX-B75L 型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅(合肥华泰医疗设备有限公司); 超净工作台(单人)(苏州净化设备厂); HYG-A 全温摇瓶柜(太仓市试验设备厂); DZ-900 振荡器(太仓市强乐试验设备厂); 恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公

司); WFH-201B 紫外透射反射仪(上海精科实业有限公司); ER-120A 电子分析天平(日本 A&D 公司)。

**1.1.2 材料与试剂** 色谱柱 1: Luna (5  $\mu\text{m}$  C18 100  $\text{\AA}$ , 4.6 mm  $\times$  100 mm (美国 Phenomenex 公司)、色谱柱 2: Kromasil 100-5-C18 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm  $\times$  250 mm (瑞典 AKZO NOBEL 公司) 和色谱柱 3: YMC-Pack ODS-A/S 5  $\mu\text{m}$ /12 nm, 250 mm  $\times$  10.0 mm (日本 YMC 公司); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(GE 医疗集团); ODS-A-HG 填料(50  $\mu\text{m}$ 、日本 YMC 公司); Amberlite (XAD-7 树脂(20 ~ 60 目, 美国 Sigma 公司); 乙醇、甲醇、乙酸乙酯、氯仿和正丁醇(AR, 天津市富宇精细化工有限公司); 甲醇和乙腈(色谱纯, 康科德公司); 酵母膏和蛋白胨(BR, 广东环凯微生物科技有限公司); 琼脂粉(AR, 广东环凯微生物科技有限公司); 可溶性淀粉(AR, 天津市大茂化学试剂厂); 速溶海水结晶海盐(佛山市海富生物科技有限公司); TLC 预制板和硅胶(200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂)。

**1.1.3 A1培养基 (1 L)** 可溶性淀粉  $w = 1\%$ , 酵母浸膏  $w = 0.4\%$ , 蛋白胨  $w = 0.2\%$ , 海盐  $w = 2.48\%$ ,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 25 min, 冷却后备用。

## 1.2 微生物的发酵培养

**1.2.1 菌种活化** 放线菌 *Streptomyces novaecaesareae* 种子活化培养基采用 A1 培养基。将适量纯化菌种接种于培养瓶 (30 mL A1/100 mL), 置于摇床上培养 24 h ( $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、165 r/min)。

**1.2.2 规模发酵** 按一定接种量 (2%/L 培养基) 接种于培养瓶中 (1 L A1 培养基/3 L 培养瓶), 摇瓶培养 7 d ( $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、165 r/min)。共发酵培养 36 L。

## 1.3 微生物的提取与分离

生长 7 d 后的微生物加入 XAD-7 树脂 (4 g/L), 继续振摇 3 ~ 4 h 后纱布过滤, 分别得到菌体 (含 XAD-7 树脂) 和发酵液。

**1.3.1 菌体部分** 将菌体部分 (XAD-7 树脂) 加丙酮振摇 1 h/次 (1 L 丙酮/次, 3 次), 纱布过滤得丙酮液。丙酮液减压浓缩至无丙酮味, 加水成水悬液, 等体积 EtOAc 萃取 3 次, 萃取液减压浓缩得菌体 EtOAc 相 (5.0 g)。

**1.3.2 发酵液部分** 菌液恒温水浴锅浓缩至 6 L, 等体积 EtOAc 萃取 3 ~ 5 次, EtOAc 相合并减压浓缩得菌液 EtOAc 提取物 (3.0 g)。

菌体 EtOAc 相 (5.0 g) 采用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析 (柱长: 1 m, 直径: 4 cm) 纯甲醇洗脱, 运用 TLC 薄层色谱进行合并, 共得 7 个流份 Fr1-7。Fr2 (2.24 g) 经过 ODS 层析柱 ( $50\text{ }\mu\text{m}/12\text{ nm}$ ), 采用甲醇水 (甲醇: 水 = 56:44 ~ 100:0, V/V) 梯度洗脱, 经过 TLC 追踪合并为 8 个子流份 Fr2-1 - Fr2-8。Fr2-1 (580 mg) 经半制备 HPLC (色谱柱 3, 0 ~ 40 min, 乙腈: 水 = 20:80 ~ 100:0, V/V, 流速 1 mL/min) 梯度洗脱, 分离纯化得 Fr2-1-1 - Fr2-1-19。Fr2-1-15 ( $t_R = 28.2\text{ min}$ , 28 mg) 为化合物 **6**、Fr2-1-17 ( $t_R = 29.8\text{ min}$ , 14 mg) 为化合物 **5**。Fr2-1-4 (29 mg) 再次经半制备 HPLC 纯化 (色谱柱 2, 0 ~ 25 min, 甲醇: 水 = 20:80 ~ 70:30, V/V, 流速 1 mL/min) 梯度洗脱, 得到化合物 **9** ( $t_R = 22\text{ min}$ , 4.5 mg)。Fr2-1-9 (44 mg) 经 HPLC (色谱柱 2, 甲醇: 水 = 40:60, V/V, 流速 1 mL/min) 等度洗脱, 纯化得到化合物 **4** ( $t_R = 36\text{ min}$ , 27 mg) 和 **1** ( $t_R = 38\text{ min}$ , 3.2 mg)。Fr2-1-11 (28 mg) 经半制备 HPLC (色谱柱 2, 甲醇: 水 = 44:56, V/V, 流速 1 mL/min) 等度洗脱, 纯化得到化合物 **2** ( $t_R = 29\text{ min}$ , 5 mg)。Fr2-1-13 (23 mg) 经半制备 HPLC (色谱柱 2, 甲醇: 水 = 33:67, V/V,

流速 1 mL/min) 等度洗脱, 得到 Fr2-1-13-3 (9 mg), 再纯化得到 (色谱柱 2, 乙腈: 水 = 31:69, V/V, 流速 1 mL/min) 得到化合物 **7** ( $t_R = 17.9\text{ min}$ , 3.2 mg) 和 **8** ( $t_R = 19\text{ min}$ , 2.3 mg)。Fr2-1-2 (145 mg) 经半制备 HPLC 纯化 (色谱柱 2, 甲醇: 水 = 23:77, V/V, 流速 1 mL/min) 等度洗脱, 得到化合物 **3** ( $t_R = 17\text{ min}$ , 3 mg)。对 Fr2-8 (545 mg) 经半制备 HPLC (色谱柱 2, 乙腈: 水 = 80:20, V/V, 流速 1 mL/min) 等度洗脱, 纯化得到化合物 **10** ( $t_R = 48.8\text{ min}$ , 4 mg)。

## 1.4 物理常数与波谱数据

化合物 **1**: 淡黄色固体 (甲醇),  $[\alpha]_D^{20} + 41.17^{\circ}$  ( $c = 0.08$ , MeOH), ESI-MS:  $m/z$  261  $[M + H]^+$ , 分子式为  $C_{14}H_{16}N_2O_3$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 4.21 (2H, brs, H-4/6), 7.19 (2H, m, H-2'), 7.29 (3H, m, H-3', H-4'), 3.18 (1H, dd,  $J = 13.6, 5.2\text{ Hz}$ , H-10a), 2.99 (1H, dd,  $J = 13.6, 4.4\text{ Hz}$ , H-10b), 2.22 (1H, m, H-5a), 1.89 (1H, m, H-5b), 3.59 (1H, m, H-3a)、3.27 ~ 3.24 (1H, m, H-3b);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 167.7 (C-1), 54.0 (C-3), 68.5 (C-4), 38.0 (C-5), 59.6 (C-6), 171.0 (C-7), 57.2 (C-9), 40.9 (C-10), 136.8 (C-1'), 129.7 (C-2'), 131.2 (C-3'), 128.5 (C-4')。

化合物 **2**: 淡黄色固体 (甲醇),  $[\alpha]_D^{20} - 78.90^{\circ}$  ( $c = 0.1$ , MeOH), ESI-MS:  $m/z$  261  $[M + H]^+$ , 分子式为  $C_{14}H_{16}N_2O_3$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 4.48 (1H, brt,  $J = 4.4\text{ Hz}$ , H-9), 4.36 (1H, dd,  $J = 11.6, 5.6\text{ Hz}$ , H-6), 2.06 (1H, dd,  $J = 12.8, 6.0\text{ Hz}$ , H-5a), 1.34 (1H, dt,  $J = 12.8, 4.8\text{ Hz}$ , H-5b), 4.27 (1H, t,  $J = 5.2\text{ Hz}$ , H-4), 3.70 (1H, dd,  $J = 13.2, 4.8\text{ Hz}$ , H-3a), 3.30 (1H, m, H-3b), 3.17 (2H, m, H-10), 7.21 ~ 7.29 (5H, m, H-2', H-3', H-4');  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 167.1 (C-1), 55.2 (C-3), 68.5 (C-4), 38.0 (C-5), 58.3 (C-6), 171.2 (C-7), 57.6 (C-9), 38.8 (C-10), 137.4 (C-1'), 129.5 (C-2'), 131.0 (C-3'), 128.1 (C-4')。

化合物 **3**: 白色无定形固体 (甲醇),  $[\alpha]_D^{20} - 24.22^{\circ}$  ( $c = 0.06$ ,  $H_2O$ ), ESI-MS:  $m/z$  249  $[M + K]^+$ , 分子式为  $C_{10}H_{14}N_2O_3$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 4.49 (1H, t,  $J = 4.0\text{ Hz}$ , H-9), 4.61 (1H, dd,  $J = 11.2, 5.6\text{ Hz}$ , H-6), 4.39

(1H, brt,  $J=6.8$  Hz, H-4), 3.63 (1H, dd,  $J=12.8, 3.2$  Hz, H-3a), 3.45 (1H, d,  $J=12.8$  Hz, H-3b), 3.51 (2H, m, H-12), 2.29 (1H, m, H-5a), 2.02 (1H, m, H-5b), 2.26 (1H, m, H-10a), 2.14 (1H, m, H-10b), 2.06 (1H, m, H-11a), 1.96 (1H, m, H-11b);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 168.7 (C-1), 54.8 (C-3), 69.6 (C-4), 37.7 (C-5), 60.2 (C-6), 168.8 (C-7), 46.2 (C-9), 24.2 (C-10), 28.7 (C-11), 61.7 (C-12)。

化合物 4: 白色粉末 (甲醇),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -117.6^\circ$  ( $c=0.48$ , MeOH), ESI-MS:  $m/z$  227  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 0.96 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-12), 0.97 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-13), 1.52 (1H, m, H-10b), 1.92 (2H, m, H-10a 和 H-11), 2.09 (1H, ddd,  $J=13.6, 11.6, 4.0$  Hz, H-5b), 2.28 (1H, dd,  $J=13.2, 6.0$  Hz, H-5a), 3.44 (1H, d,  $J=12.8$  Hz, H-3a), 3.66 (1H, dd,  $J=12.4, 2.0$  Hz, H-3b), 4.18 (1H, m, H-9), 4.47 (1H, t,  $J=4.0$  Hz, H-4), 4.53 (1H, dd,  $J=8.8, 7.2$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 169.0 (C-1), 54.6 (C-3), 69.1 (C-4), 38.1 (C-5), 58.7 (C-6), 173.0 (C-7), 55.1 (C-9), 39.3 (C-10), 25.7 (C-11), 23.3 (C-12), 22.2 (C-13)。

化合物 5: 白色粉末 (甲醇),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -49.9^\circ$  ( $c=0.24$ , MeOH), ESI-MS:  $m/z$  283  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.26 (5H, m, H-2', H-3', H-4'), 4.44 (1H, t,  $J=4.0$  Hz, H-9), 4.06 (1H, dd,  $J=10, 6.8$  Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3a), 3.37 (1H, m, H-3b), 3.16 (2H, d,  $J=4.4$  Hz, H-10), 2.27 (1H, m, H-5a), 1.21 (1H, m, H-5b), 2.09 (1H, m, H-4a), 1.82 (1H, m, H-4b);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 166.9 (C-1), 46.0 (C-3), 22.8 (C-4), 29.4 (C-5), 60.1 (C-6), 170.9 (C-7), 57.7 (C-9), 38.2 (C-10), 137.3 (C-1'), 131.0 (C-2'), 129.4 (C-3'), 128.1 (C-4')。

化合物 6: 白色粉末 (甲醇),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -102.97^\circ$  ( $c=0.10$ , EtOH), ESI-MS:  $m/z$  211  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 4.26 (1H, t,  $J=7.2$  Hz, H-6), 4.12 (1H, t,  $J=5.6$  Hz, H-9), 3.50 (2H,

t,  $J=6.4$  Hz, H-3), 2.29 (1H, m, H-5a), 2.01 (2H, m, H-5b, H-10a), 1.91 (2H, m, H-4), 1.51 (1H, m, H-10b), 1.35 (1H, m, H-11), 0.96 (3H, s, H-12), 0.94 (3H, s, H-13);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta_{\text{C}}$ : 172.8 (C-1), 46.4 (C-3), 23.6 (C-4), 29.1 (C-5), 60.3 (C-6), 168.9 (C-7), 54.6 (C-9), 39.4 (C-10), 25.7 (C-11), 23.3 (C-12), 22.2 (C-13)。

化合物 7: 白色粉末 (甲醇),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +27.1^\circ$  ( $c=0.05$ , EtOH), ESI-MS:  $m/z$  211  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 3.58 (1H, m, H-3a), 3.50 (1H, m, H-3b), 2.03 (1H, m, H-4a), 2.35 (1H, m, H-4b), 1.95 (2H, m, H-5), 3.85 (1H, m, H-9), 4.28 (1H, t,  $J=13.6$  Hz, H-6), 1.78 (1H, m, H-10a), 1.69 (1H, m, H-10b), 1.60 (1H, m, H-11), 1.01 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-12), 0.98 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-13);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta_{\text{C}}$ : 171.6 (C-1), 43.6 (C-3), 23.1 (C-4), 29.9 (C-5), 59.3 (C-6), 169.1 (C-7), 57.1 (C-9), 46.7 (C-10), 25.5 (C-11), 22.9 (C-12), 23.3 (C-13)。

化合物 8: 无色晶体 (甲醇),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -43.08^\circ$  ( $c=0.04$ , MeOH), ESI-MS:  $m/z$  227  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 4.22 (1H, t,  $J=6.8$  Hz, H-9), 4.08 (1H, s, H-6), 3.56 (1H, m, H-3a), 3.52 (1H, m, H-3b), 2.36 ~ 2.31 (1H, m, H-5a), 2.19 ~ 2.16 (1H, m, H-10), 2.07 ~ 2.02 (1H, m, H-4a), 1.98 ~ 1.90 (1H, m, H-4b), 2.00 ~ 1.93 (1H, m, H-5b), 1.45 (1H, m, H-11a), 1.38 (1H, m, H-11b), 1.08 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-13), 0.95 (3H, d,  $J=7.2$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 172.4 (C-1), 46.2 (C-3), 23.2 (C-4), 29.5 (C-5), 61.3 (C-6), 167.6 (C-7), 60.0 (C-9), 37.1 (C-10), 25.4 (C-11), 12.6 (C-12), 15.5 (C-13)。

化合物 9: 无色固体 (甲醇), ESI-MS:  $m/z$  144  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 分子式为  $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 3.14 (2H, t,  $J=6.8$  Hz, H-4), 2.52 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-6), 2.13 (3H, s, H-8), 1.92 (3H, s, H-1), 1.72 (2H, m, H-5);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 22.3

(C-1), 173.3 (C-2), 39.7 (C-4), 24.5 (C-5), 41.3 (C-6), 211.0 (C-7), 29.8 (C-8)。

化合物 **10**: 白色固体 (甲醇), ESI-MS:  $m/z$  279  $[M + H]^+$ , 分子式为  $C_{16}H_{22}O_4$ 。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_H$ : 7.73 (2H, dd,  $J = 3.2, 5.2$  Hz, H-3, 6), 7.63 (2H, dd,  $J = 3.2, 5.2$  Hz, H-4, 5), 4.30 (4H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-8, 8'), 1.73 (4H, m, H-9, 9'), 1.47 (4H, m, H-10, 10'), 0.99 (6H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-11, 11');  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta_C$ : 133.6 (C-1, 2), 129.9 (C-3, 6), 132.4 (C-4, 5), 169.3 (C-7, 7'), 66.7 (C-8, 8'), 31.7 (C-9, 9'), 25.3 (C-10, 10'), 14.1 (C-11, 11')。

## 2 结果与讨论

化合物 **1** 淡黄色固体 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 260 ( $m/z$  261  $[M + H]^+$ ), 结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{14}H_{16}N_2O_3$ , 不饱和度为 8。 $^1H$  NMR 中  $\delta_H$  7.19 (2H, m)、7.29 (3H, m) 推测其苯环位置为单取代, 结合  $\delta_H$  3.18 (1H, m, H-10a)、2.99 (1H, m, H-10b) 显示有苯丙氨酸片段;  $\delta_H$  4.21 (2H, brs, H-4/6)、3.59 (1H, m, H-3a)、3.27 ~ 3.24 (1H, m, H-3b) 显示有羧脯氨酸片段, 同时  $^{13}C$  NMR 中  $\delta_C$  167.7 (C-1) 和 171.0 (C-7) 为两个酰胺碳信号, 提示 **1** 为可能为叶立德类化合物, 结合其旋光值  $[\alpha]_D^{20} + 41.17^\circ$  ( $c = 0.08$ , MeOH), 以上数据与文献环 (4-羟基-*L*-脯-*D*-苯丙) 二肽<sup>[11]</sup>对照基本一致, 故确定 **1** 为环 (4-羟基-*L*-脯-*D*-苯丙) 二肽。

化合物 **2** 淡黄色固体 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 260 ( $m/z$  261  $[M + H]^+$ ), 结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{14}H_{16}N_2O_3$ , 不饱和度为 8。与化合物 **1** 的 NMR 其数据对比, 发现与 **1** 十分相似, 仅在  $\delta_C$  55.2 (C-3), 38.8 (C-10) 有差异。且 **2** 的比旋光度值  $[\alpha]_D^{20} - 78.90^\circ$  ( $c = 0.1$ , MeOH) 与 **1** 完全不同, 以上数据与文献 (4-羟基-*L*-脯-*L*-苯丙) 二肽<sup>[11-12]</sup>对照基本一致, 故确定其为环 (4-羟基-*L*-脯-*L*-苯丙) 二肽。

化合物 **3** 白色无定形固体 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 210 ( $m/z$  249  $[M + K]^+$ )。结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{10}H_{14}N_2O_3$ , 不饱和度为 5。与化合物 **1** 的 NMR 对比, 其中不同之处  $\delta_H$  4.49 (1H, t,  $J = 4.0$  Hz, H-9), 3.51 (2H, m, H-12), 2.26 (1H, m, H-10a), 2.14

(1H, m, H-10b), 2.06 (1H, m, H-11a), 1.96 (1H, m, H-11b) 为脯氨酸片段, 结合其比旋光度值为  $[\alpha]_D^{20} - 24.22^\circ$  ( $c = 0.06$ ,  $H_2O$ ), 以上数据与文献环 (4-羟基-*L*-脯-*D*-脯) 二肽<sup>[11,13]</sup>对照基本一致, 故确定其为环 (4-羟基-*L*-脯-*D*-脯) 二肽。

化合物 **4** 白色粉末 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 226 ( $m/z$  227  $[M + H]^+$ )。结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{11}H_{18}N_2O_3$ , 不饱和度为 4。与化合物 **1** 的 NMR 对比, 主要差异在  $^1H$  NMR 中  $\delta_H$  0.96 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-12)、0.97 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-13)、1.52 (1H, m, H-10b)、1.92 (2H, m, H-10a 和 H-11)、4.18 (1H, m, H-9) 为亮氨酸片段, 其他信号基本相同, 结合比旋光度值  $[\alpha]_D^{20} - 117.6^\circ$  ( $c = 0.48$ , MeOH) 与文献报道环 (4-羟基-*L*-脯-*L*-亮) 二肽<sup>[12,14]</sup>对照基本一致, 故确定其为环 (4-羟基-*L*-脯-*L*-亮) 二肽。

化合物 **5** 白色粉末 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 244 ( $m/z$  283  $[M + K]^+$ ), 结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{14}H_{16}N_2O_2$ , 不饱和度为 8。其 NMR 数据与化合物 **2** 和 **3** 对比, 其中化合物 **2** 中  $\delta_H$ : 4.27 (1H, t,  $J = 5.2$  Hz, H-4) 为 4 位连羟基碳上氢信号, 而在化合物 **5** 中  $\delta_H$ : 2.27 (1H, m, H-5a), 1.21 (1H, m, H-5b) 为脯氨酸 4 位亚甲基信号, 对比其他信号发现其有苯丙氨酸片段与脯氨酸片段, 以上数据与文献环 (*L*-脯-*L*-苯丙) 二肽<sup>[15-16]</sup>对照基本一致, 故确定其为环 (*L*-脯-*L*-苯丙) 二肽。

化合物 **6** 白色粉末 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 210 ( $m/z$  211  $[M + H]^+$ ), 结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{11}H_{18}N_2O_2$ , 不饱和度为 4, 其相对分子质量与化合物 **4** 差 16, 可能为少一个氧原子, 且不饱和度不变, 其 NMR 数据与化合物 **4** 比较, 其中  $\delta_H$  1.91 (2H, m, H-4) 为脯氨酸 4 位没有连羟基的亚甲基, 所以为脯氨酸片段, 结合其比旋光度值  $[\alpha]_D^{20} - 102.97^\circ$  ( $c = 0.10$ , EtOH), 与文献环 (*L*-亮-*L*-脯) 二肽<sup>[17]</sup>对照基本一致, 故确定 **6** 为环 (*L*-亮-*L*-脯) 二肽。

化合物 **7** 白色粉末 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 210 ( $m/z$  211  $[M + H]^+$ ), 结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{11}H_{18}N_2O_2$ , 不饱和度为 4。 $^1H$  NMR 中  $\delta_H$  1.95 (2H, m, H-5) 比化合物 **6** 中 5 位信号稍小,  $\delta_H$  4.28 (1H, t,  $J = 13.6$  Hz, H-6) 偶合常数比化合物 **6** 中  $\delta_H$  4.26

(1H, t,  $J=7.2$  Hz, H-6) 中偶合常数小, 其余信号与化合物 **6** 基本一致, 推测 **7** 与化合物 **6** 为一对手性化合物, 且比旋光度值  $[\alpha]_D^{20} + 27.1^\circ$  ( $c=0.05$ , EtOH) 与化合物 **6** 相反, 以上数据与文献环(*D*-脯-*L*-亮)二肽<sup>[18]</sup>对照基本一致, 故确定 **7** 为环(*D*-脯-*L*-亮)二肽。

化合物 **8** 无色晶体 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 226 ( $m/z$  227  $[M+H]^+$ ), 结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{11}H_{18}N_2O_3$ , 不饱和度为 4。其相对分子质量与化合物 **4** 一致, 且不饱和度也一致, 推测其与化合物 **4** 是羟基连接位置不同, 其 MNR 中  $\delta_H$  4.22 (1H, t,  $J=6.8$  Hz, H-9), 2.19 ~ 2.16 (1H, m, H-10)、1.45 (1H, m, H-11a), 1.38 (1H, m, H-11b), 1.08 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-13), 0.95 (3H, d,  $J=7.2$  Hz, H-12) 为异亮氨酸片段, 与化合物 **4** 对比其脯氨酸上未连有羟基, 推测羟基可能连接在 7 位氮上, 以上数据与文献环(8-羟基-*L*-脯-*D*-异亮)二肽<sup>[19]</sup>对照基本一致。故确定 **8** 为环(8-羟基-*L*-脯-*D*-异亮)二肽。

化合物 **9** 无色固体 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 143 ( $m/z$  144  $[M+H]^+$ ), 结合  $^1H$  及  $^{13}C$  NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_7H_{13}NO_2$ , 不饱和度为 2。 $^1H$  NMR 中  $\delta_H$  3.14 (2H, H-4), 2.52 (2H, H-6), 1.72 (2H, H-5) 为三个相邻的亚甲基,  $\delta_H$  2.13 (3H, H-8), 1.92 (3H, H-1) 为两个甲基信号;  $^{13}C$  NMR 中  $\delta_C$  173.3 (C-2) 为酰胺信号,  $\delta_C$  211.0 (C-7) 为酮羰基信号。以上数据与文献 N-(4-氧代戊基)-乙酰胺<sup>[20]</sup>对照基本一致, 故确定其为 N-(4-氧代戊基)-乙酰胺。

化合物 **10** 白色固体 (甲醇), ESI-MS 提示其相对分子质量为 278 ( $m/z$  279  $[M+H]^+$ ), 结合 NMR 谱数据, 推断其分子式为  $C_{16}H_{22}O_4$ , 不饱和度为 6。 $^1H$  NMR 中低场处  $\delta_H$  7.73 (2H, H-3, 6), 7.63 (2H, H-4, 5) 两个芳香质子信号, 高场处一个甲基信号  $\delta_H$  0.99 (6H, H-11, 11')、两个亚甲基信号  $\delta_H$  1.73 (4H, H-9, 9'), 1.47 (4H, H-10, 10') 和一个连氧的亚甲基信号  $\delta_H$  4.30

(4H, H-8, 8'), 结合  $^{13}C$  NMR 中给出 8 个碳信号以及质谱给出相对分子质量推测该化合物可能为对称分子, 因为有两组芳香质子信号所以为苯环邻位取代对称分子结构, 结合 NMR 数据与文献邻苯二甲酸丁酯<sup>[21]</sup>对照基本一致, 故确定其为邻苯二甲酸丁酯。

化合物 **1-10** 均首次从放线菌 *Streptomyces novaezaesarae* 该种中分离得到, 且 **1**、**3** 首次从海洋放线菌中分离得到。**1**、**3** 和 **7** 含有自然界中不常见的 *D* 构型氨基酸。文献检索表明目前所报道的 *D* 构型氨基酸组成的叶立德类化合物真菌来源的较多, 且有文献报道含有 *D* 构型氨基酸的叶立德类化合物比含有 *L* 构型的同类物质生物活性好<sup>[11,22]</sup>, 化合物 **1** 和 **2** 具有诱导烟草细胞产生  $H_2O_2$  的作用, 且因为 *D*-Phe 构型关系 **1** 的作用明显强于 **2**<sup>[11]</sup>。化合物 **4** 对 RAW264.7 细胞显示出较好的生长抑制活性 ( $IC_{50} = 9.1 \mu\text{mol/L}$ )<sup>[23]</sup>, 且对慢性粒细胞白血病细胞系 K562 也具有较弱的细胞毒性<sup>[24]</sup>。**5** 能够诱导 J774A.1 细胞增加分泌抗炎细胞因子 IL-10, 且还可以促进 IFN- $\gamma$  分泌, IFN- $\gamma$  具有抗病毒、免疫调节和抗肿瘤的特性<sup>[25]</sup>。化合物 **5** 和 **6** 具有良好的抗鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 活性 (MIC 为 0.03 ~ 0.07  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>[26]</sup>。**5** 和 **7** 对枯草芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有抑制作用, 且对大肠杆菌的抑制作用 **7** 与环丙沙星相当<sup>[18]</sup>。**8** 具有抑制人胰腺癌细胞 (PANC-1) 的增殖作用<sup>[27]</sup>。

有文献报道研究表明, 微生物产生的环二肽类多作为胞间传递的信号分子, 例如, 环二肽分子 cyclo (Phe-Pro) 能够刺激高丝氨酸内酯信号传递途径<sup>[28]</sup>, 微生物可感知其浓度的变化, 以调节微生物的群体行为。文献[29]研究发现, 乳酸菌产生的 cyclo (*L*-phe-*L*-pro) 和 cyclo (*L*-tyr-*L*-pro) 可作为信号分子, 调节乳酸菌和葡萄球菌之间细胞间信息交流, 使内源性或益生菌菌株可减弱病原菌产生的毒素因子。可见微生物产生的环二肽作为信号分子在微生物群体行为具有很重要的作用。

## 参考文献:

- [1] 王聪,梅显贵,朱伟明. 海洋链霉菌来源的天然产物[J]. 海洋科学集刊,2016, 51:86-124.
- WANG C, MEI X G, ZHU W M. New natural products from the marine-derived *Streptomyces* actinobacteria [J]. *Studia Marina Sinica*, 2016, 51:86-124.
- [2] BLUT J W, CARROLL A R, COPP B R, et al. Marine natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2017, 34:235-294.
- [3] BLUT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2016, 33:382-431.
- [4] BLUT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2015, 32: 116-211.
- [5] BLUT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31: 160-258.
- [6] BLUT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2013, 30: 237-323.
- [7] BLUT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29: 144-222.
- [8] LEI L F, CHEN M F, WANG T, et al. Novel cytotoxic nine-membered macrocyclic polysulfur cembranoid lactones from the soft coral *Sinularia* sp. [J]. *Tetrahedron*, 2015, 46(7): 6851-6858.
- [9] HE X X, CHEN X J, PENG G T, et al. Pelopuradazole, a new imidazole derivative alkaloid from the marine bacteria *Pelomonas puraquae* sp. nov.[J]. *Natural Product Research*, 2014, 28(9): 680-682.
- [10] LIU B X, GUO Q, PENG G T, et al. New cyclic tetrapeptide from the coral-derived endophytic bacteria *Brevibacterium* sp. L-4 collected from the South China Sea [J]. *Natural Product Research*, 2016, 30(1): 7-12.
- [11] CHEN X Q, MOU Y H, LING J H, et al. Cyclic dipeptides produced by fungus *Eupenicillium brefeldianum* HMP-F96 induced extracellular alkalization and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in tobacco cell suspensions[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 31(1): 247-253.
- [12] FURTADO N J C, PUPO M T, CARVALHO I, et al. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain [J]. *Journal of the Brazilian Chemical society*, 2005, 16(6): 1448-1453.
- [13] LEE S, TAMAYO-CASTILLO G, PANG C, et al. Diketopiperazines from costa rican endolichenic fungus *Colpoma* sp. CR1465A. [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(10): 2438-2441.
- [14] CRONAN Jr J M, DAVIDSON T R, SINGLETON F L, et al. Plant growth promoters isolated from a marine bacterium associated with *Palythoa* sp. [J]. *Natural Product Letters*, 1998, 11(4): 271-278.
- [15] DIGN L, YUAN W, PENG Q, et al. Secondary metabolites isolated from the sponge-associated fungus *Nigrospora oryzae*[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2016, 52(5): 1-2.
- [16] LI T, WANG G C, HUANG X J, et al. Whitmanoside A, a new  $\alpha$ -pyrone glycoside from the leech *Whitmania pigra* [J]. *Heterocycles*, 2013, 87(7): 1537-1543.
- [17] LI Z Y, PENG C S, SHEN Y, et al. L,L-diketopiperazines from *Alcaligenes faecalis* A72 associated with South China Sea sponge *Stelletta tenuis*[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2008, 36(3): 230-234.
- [18] KUMAR N, MOHANDAS C, NAMBIAN B, et al. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 29(2): 355-364.
- [19] YANG B, DONG J D, ZHOU X F, et al. Proline-containing dipeptides from a marine sponge of a *Callyspongia* species[J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 92(6): 1112-1117.
- [20] NENAJDENKO V G, ZAKURDAEV E P, PRUSOV E V, et al. Convenient synthesis of melatonin analogues: 2-and 3-substituted-N-acetylindolylalkylamines[J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(51): 11719-11724.
- [21] 曲新颜,顾谦群,崔承彬,等. 海洋来源的放线菌 3295 代谢产物的结构鉴定及抗肿瘤活性(I)[J]. 中国海洋药物, 2004, 23(6): 1-4.
- QU X Y, GU Q Q, CUI C B, et al. Structural identification and antitumor activity of secondary metabolites of marine-derived actinomycete 3295 [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2004, 23(6): 1-4.
- [22] FDHILA F, VAZQUEZ V, SANCHEZ J L, et al. DD-

- diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* is isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus* [J]. *Journal of Natural Products*, 2003, 66(10): 1299 – 1301.
- [23] 彭坤, 苏瑞强, 张改云, 等. 深海放线菌 *Micrococcus* sp. R21 的次生代谢产物研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(12): 2367 – 2371.
- PENG K, SU R Q, ZHANG G Y, et al. Secondary metabolites from a deep-sea-derived actinomycete *Micrococcus* sp. R21 [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(12): 2367 – 2371.
- [24] 孙玉雯, 李长伟, 崔承彬, 等. 海洋来源放线菌无活性野生株的链霉素抗性抗肿瘤活性突变株新产代谢产物研究 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2010, 34(2): 119 – 122.
- SUN Y W, LI C W, CUI C B, et al. Metabolites newly produced by a streptomycin-resistant antitumor mutant obtained from a marine-derived wild-type actinomycete strain without antitumor activity [J]. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2010, 34(2): 119 – 122.
- [25] CHEN J H, LAN X P, LIU Y, et al. The effects of diketopiperazines from *Callyspongia* sp. on release of cytokines and chemokines in cultured J774A.1 macrophages [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22(9): 3177 – 3180.
- [26] 罗小卫, 林秀萍, 雪峰, 等. 中国南海深海真菌 *Penicillium brocae* SCSIO 05793 的次级代谢产物研究 [J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(3): 23 – 28.
- LUO X W, LIN X P, XUE F, et al. Study on the secondary metabolites from South China Sea deep-water-derived fungus *Penicillium brocae* SCSIO 05793 [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2017, 36(3): 23 – 28.
- [27] 王鸿, 冯宇美, 吴祺豪, 等. 海洋真菌 *Mucor circinelloides* MNP12010102 的次级代谢产物研究 [J]. *浙江工业大学学报*, 2014, 42(5): 487 – 490.
- WANG H, FENG Y M, WU Q H, et al. Researches on the secondary metabolites of marine-derived fungus *Mucor circinelloides* MNP 12010102 [J]. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2014, 42(5): 487 – 490.
- [28] KLOSE K E. Increased chatter: cyclic dipeptides as molecules of chemical communication in *Vibrio* spp. [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(6): 2025 – 2026.
- [29] LI J R, WANG W L, XU S X, et al. *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(8): 3360 – 3365.

(责任编辑 张 冰)