

锡尾矿链霉菌 AE21985 代谢产物的分离与鉴定

程 举^{1,2}, 李铭刚¹, 丁章贵¹, 文孟良¹, 赵江源^{1,3*}¹ 云南大学云南省微生物研究所, 昆明 650091; ² 西南医科大学基础医学院, 泸州 646000;³ 自然资源药物化学教育部重点实验室 云南大学, 昆明 650091

摘要: 采用硅胶柱、凝胶柱层析、高效液相制备等方法从分离自云南锡尾矿土壤的链霉菌 AE21985 发酵液中分离到 19 个化合物, 通过波谱学方法鉴定为 11 个环二肽类化合物: 3-(4-羟基苄基)-6-(1H-吡啶-3-基甲基)哌嗪-2,5-二酮(1)、(3S,6S)-3-((R)-仲-丁基)-6-甲基哌嗪-2,5-二酮(2)、(3S)-3-苄基哌嗪-2,5-二酮(3)、(3S,6S)-3-(2-甲基丙基)-6-(丙-2-基)哌嗪-2,5-二酮(4)、3-异丁基六吡咯并[1,2- α]吡嗪-1,4-二酮(5)、(3S,6S)-3-((R)-仲-丁基)-6-甲基哌嗪-2,5-二酮(6)、(3S,6S)-3-异丙基-6-甲基哌嗪-2,5-二酮(7)、(3S,7R,9S)-7-羟基-3-异丁基六吡咯并[1,2- α]吡嗪-1,4-二酮(8)、3-(1H-吡啶-3-基甲基)-6-(丙-2-基)哌嗪-2,5-二酮(9)、(3S,8aS)-3-(丙-2-基)六氢吡咯并[1,2- α]吡嗪-1,4-二酮(10)及(3S,6S)-3-苄基-6-甲基哌嗪-2,5-二酮(11); 5 个酰胺类化合物: (2E)-3-苄基丙-2-烯酰胺(12)、3-苄基丙酰胺(13)、2-苄基乙酰胺(14)、苯甲酰胺(15)及 3-(1H-吡啶-3-基)丙酰胺(16); 1 个生物碱类物质: 1H-吡啶-5-甲醛(17); 2 个核苷类物质: 尿苷(18)及胸腺嘧啶(19)。这些化合物均为首次从该菌株中发现。

关键词: 链霉菌; TLC 筛选; 分离纯化; 结构鉴定

中图分类号: R379.1; Q58

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.002

Secondary Metabolites of Tin Tailings *Streptomyces* AE21985CHENG Ju^{1,2}, LI Ming-gang¹, DING Zhang-gui¹, WEN Meng-liang¹, ZHAO Jiang-yuan^{1,3,*}¹ Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China; ² College Of Preclinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; ³ Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource, Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: 19 Compounds were isolated from liquid fermentation of *Streptomyces* AE21985 with ordinary silica gel chromatography, gel column chromatography and preparative HPLC. With the spectroscopic methods, they were identified as eleven cyclic dipeptide compounds: 3-(4-hydroxybenzyl)-6-(1H-indol-3-ylmethyl) piperazine-2,5-dione (1), (3S,6S)-3-((R)-*sec*-butyl)-6-methylpiperazine-2,5-dione (2), (3S)-3-benzylpiperazine-2,5-dione (3), (3S,6S)-3-(2-methylpropyl)-6-(propan-2-yl)piperazine-2,5-dione (4), 3-Isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (5), (3S,6S)-3-((R)-*sec*-butyl)-6-methylpiperazine-2,5-dione (6), (3S,6S)-3-isopropyl-6-methylpiperazine-2,5-dione (7), (3S,7R,9S)-7-hydroxy-3-isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione (8), 3-(1H-indol-3-ylmethyl)-6-(propan-2-yl)piperazine-2,5-dione (9), (3S,8aS)-3-(propan-2-yl) hexahydropyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione (10) and (3S,6S)-3-benzyl-6-methylpiperazine-2,5-dione (11); five lactam compounds: (2E)-3-phenylprop-2-enamide (12), 3-phenylpropanamide (13), 2-phenylacetamide (14), benzamide (15) and 3-(1H-indol-3-yl) propanamide (16); an alkaloid compound: 1H-indole-5-carbaldehyde (17) and two nucleoside compounds: uridine (18) and thymine (19). All the compounds were discovered from this strain for the first time.

Key words: *Streptomyces*; TLC screening; isolation; structural elucidation

近年来的理论研究和实践表明,天然代谢产物仍是医药先导化合物的最好来源^[1,2]。尤其是在

抗菌、抗病毒、抗肿瘤药物方面,天然产物来源的药物仍占主导^[3,4]。云南大学云南省微生物研究所对云南个旧锡尾矿微生物次生代谢产物进行初步研究,并从中发现诸多新奇结构代谢产物,其中不乏特殊活性产物,如 NapHthospirozone A^[5]、Phenazinolins A-E^[6]、Griseusins F-G^[7]、Griseusin D^[8]等。

收稿日期: 2016-06-29 接受日期: 2016-08-09

基金项目: 国家自然科学基金(81203001, 31260012, 21402169); 云南省人才项目(2011CI001)

* 通讯作者 E-mail: jyzhao@ynu.edu.cn

而近五年链霉菌来源新次生代谢产物的统计分析表明链霉菌这一传统先导化合物研究材料依然具备重要的研究价值^[9]。因此,本文以 40 株分离自云南锡尾矿土壤的链霉菌为初步研究对象,进行发酵提取物 TLC 化学多样性筛选,最终将化学多样性最为丰富的菌株 AE21985 确定为研究菌株,对其液体发酵提取物进行化学成分研究,从中共分离得到 19 个化合物,结构类型主要有环二肽、酰胺类、生物碱和核苷类。

1 仪器与材料

1.1 仪器及试剂

真空旋转蒸发仪(BUCHI,瑞士);低温冷却循环泵(DLSB-5/20 郑州长城科工贸有限公司);超声波仪(KS-600D,宁波可胜仪器厂);自动部分收集器(BS-100A,上海沪西分析仪器厂);分析型高效液相色谱仪(Waters515-2996,美国);制备型高效液相色谱仪(LC-8A,日本岛津公司);TLC 成像系统(CAMAG,瑞士);紫外分析仪(CAMAG,瑞士);高分辨质谱仪(Agilent LC-MSD TOF);核磁共振仪(400 MHz,Bruker 公司);核磁共振仪(500 MHz,Bruker 公司);薄层层析硅胶板 GF₂₅₄(青岛海洋化工);柱层析正相硅胶 G(200~300 目)(青岛海洋化学工业制品厂);柱层析凝胶:凝胶 Sephadex LH-20(Amersham,英国);试管,各种型号三角瓶,各种型号旋蒸瓶,各种玻璃柱(成都红星玻璃仪器厂),其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基

斜面培养基(改良高氏 1 号培养基):酵母膏 4 g,牛肉膏 4 g,葡萄糖 4 g, KNO₃ 2 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g, MgSO₄ · H₂O 0.05 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, CaCl₂, 琼脂 20 g, 水 1 L, pH 7.5。

发酵培养基(改良 PDA 培养基):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,牛肉膏 3 g,酵母膏 3 g,水 1 L, pH 8。

1.3 菌株

菌株 AE21985 分离自云南锡尾矿土壤,保存于云南大学云南省微生物研究所。

2 实验方法

2.1 菌株鉴定

2.1.1 16S rRNA 基因的扩增与测序

菌株 AE21985 在高氏 1 号平板培养基上 28 ℃ 培养 13 d,然后挑取适量的菌体于微量离心管中,基因组 DNA 的提取按照参考文献^[10]进行。16S rRNA

基因的扩增与测序:16S rRNA 基因由两个引物(27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG GCG CTC AG-3'; 1541R:5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CAG-3')来扩增。扩增体系含有 DNA 模板(大约 20~100 ng DNA)1 μL;10 × PCR 缓冲溶液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3;500 mmol/L KCl;15 mmol/L MgCl₂)5 μL, dNTPs 混合物(每个 dNTPs 浓度为 2.5 mmol/L, TaKaRa)4 μL, 1.25 U *Taq* 酶(TaKaRa), 两个引物(终浓度为 0.4 μmol/L)各 1 μL, 补足无菌去离子水 50 μL。PCR 扩增仪器为 GeneAmp PCR system(美国 PE 公司),扩增程序为:95 ℃ 4 min;94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,然后用手术刀切出 1 500 bp 大小的片段,用胶回收试剂盒(WATSON Gel Extraction Mini Kit)回收并纯化目的片段。然后用 ABIPRISM 377-96 sequencer 直接测定序列, BigDye(Perkin Elmer)作为终止剂,测序引物为 27F 和 1541R。测序反应体系:纯化后的扩增产物约 1 μL(约 30 ng), BigDye 2.5 μL, 引物 1 μL(约 3.2 pmol/L), 用水补足 10 μL。扩增程序为:95 ℃ 1 min, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环;72 ℃, 5 min;4 ℃ 保存。

2.1.2 系统发育树的构建

测得的 DNA 序列经 NCBI(National Center for Biotechnology Information)BLAST 引擎搜索后获取相关种属的 16S rRNA 基因序列,用 ClustalX 1.8 软件进行排列。系统发育分析时排除碱基缺失位点,用邻接法(Neighbor-joining analysis)构建系统发育树。距离矩阵按照 Kimura's 双参数模型进行计算^[11], Bootstrap 检验进行 1 000 次取样。

2.2 发酵培养

菌株 AE21985 采用改良 PDA 培养基做种子瓶发酵液。用接种环直接从斜面刮取孢子到液体 PDA 培养基中,每个菌株接种 150 瓶,摇瓶装样量为 200 mL,然后置入摇床培养 3 d(转速 180 rpm, 温度 28 ℃)。然后选取长势较好的 90 瓶作为种子瓶。

继续采用改良 PDA 培养基(pH 8)进行液体发酵。直接用种子瓶接种,共计 200 L,分三批次完成,摇瓶装样量为 200 mL,置入摇床培养 4 d(转速 180 rpm, 温度 28 ℃)。

2.3 提取与分离

将 200 L 发酵液过滤,分别处理上清液和菌丝体部分。上清液用乙酸乙酯萃取 3 次;菌丝体用丙酮浸泡超声提取(3 次,30 min/次),过滤,上清液合

并,蒸去丙酮后,用乙酸乙酯萃取3次;合并上清液和菌丝体的乙酸乙酯萃取部分,减压浓缩后得到141.6 g 发酵液提取物。

发酵提取物141.6 g 经正相硅胶柱层析,采用石油醚:乙酸乙酯=10:1,石油醚:乙酸乙酯=1:1,乙酸乙酯,乙酸乙酯:甲醇=10:1,乙酸乙酯:甲醇=1:1(V/V)溶剂系统梯度洗脱,得到5个组分(S1-S5)。

S2段经正相硅胶柱层析,采用氯仿-甲醇(40:1,20:1,9:1,5:1,1:1,V/V)梯度洗脱,得到15个子段(S2S1-S2S15)。S2S2经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱,得到化合物17(12 mg),S2S3经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱,得到化合物13(9 mg),S2S4通过HPLC制备,甲醇-水(20:80)洗脱得到化合物14(8 mg)和15(7 mg)。S2S5经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱,得到化合物10(9 mg)和12(11 mg)。

S3段经正相硅胶柱层析,用氯仿-甲醇系统(60:1,40:1,30:1,20:1,9:1,5:1,1:1,V/V)梯度洗脱,得到17个子段(S3S1~S3S17)。S3S1经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱,得到化合物5(16 mg),S3S2经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗

脱,再通过HPLC制备,用甲醇-水(15:85)洗脱得到化合物4(11 mg)和11(8 mg)。S3S3经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱得到化合物2(14 mg)、9(12 mg),S3S4经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱得到化合物3(15 mg),剩余组分经硅胶柱层析,用氯仿-甲醇(9:1)洗脱得到6(8 mg)、7(6 mg)。S3S5经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱得到化合物8(9 mg),S3S6经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱得到化合物16(11 mg),S3S8经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱得到化合物19(12 mg),S3S10经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱得到化合物1(10 mg)。S3S13经凝胶Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱,再经HPLC制备,用甲醇-水(20:80)洗脱,得到化合物18(7 mg)。

3 实验结果

3.1 菌株鉴定

通过酶法提取16S rRNA基因测序结果与EzTaxon server 2.1数据库^[12]中46个典型链霉菌比较分析,构建锡尾矿链霉菌AE21985发育树如图1所示:

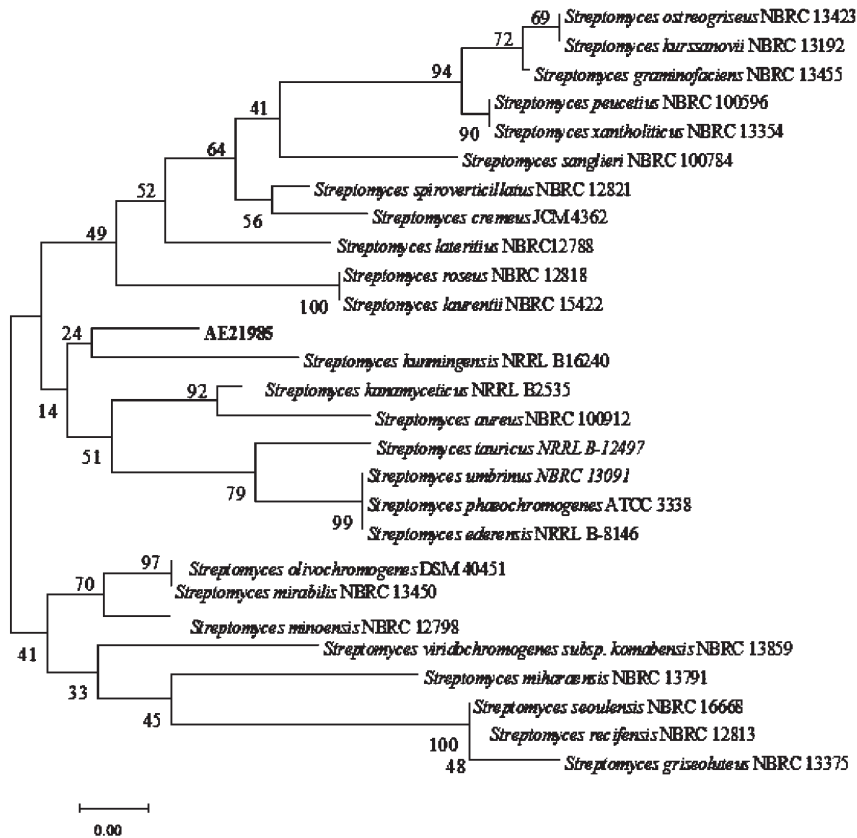


图1 链霉菌AE21985发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Streptomyces* AE21985

根据 16S rRNA 基因有效序列分析构建的系统进化树。所有分支均采用最小二乘法 (*least-squares*)^[13] 和极大似然 (*maximum-likelihood*)^[14] 构树算法进行过计算和验证。分支节点上的数字表示经过 1000 次自举 (*bootstrap*) 分析所支持的结果。该结果表明所有菌株在进化树上的位置可靠 (*Bootstrap* 值 > 70)。线段标尺 (0.002) 表示 0.2% 序列差异的分支长度。由系统进化树可以得知菌株 AE21985 与 *Streptomyces kunmingensis* 的序列最大相似性达到 99.08%, 故可推断 AE21985 属于链霉菌属菌株, 且与 *Streptomyces kunmingensis* 相似性较高。

3.2 结构鉴定

化合物 1 黄色粉末; 分子式: $C_{20}H_{19}N_3O_3$; ESI-MS m/z : 372 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.86 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, 1-NH), 3.77 (1H, m, H-3), 7.67 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, 4-NH), 3.93 (1H, dt, $J = 5.9, 3.2$ Hz, H-6), 2.40-1.78 (2H, dd, $J = 13.6, 7.2$ Hz, H-7), 6.50 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-9, 13), 6.58 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-10, 12), 9.48 (1H, br s, 11-OH), 2.78 ~ 2.44 (2H, dd, $J = 14.5, 4.3$ Hz, H-14), 6.97 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-16), 10.95 (1H, br s, 17-NH), 7.47 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-18), 6.98 (1H, m, H-19), 7.06 (1H, m, H-20), 7.31 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-21); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 166.4 (C-2), 56.0 (C-3), 166.9 (C-5), 55.3 (C-6), 39.1 (C-7), 126.4 (C-8), 130.8 (C-9, 13), 115.0 (C-10, 12), 156.2 (C-11), 30.0 (C-14), 108.9 (C-15), 124.5 (C-16), 136.2 (C-17), 118.8 (C-18), 118.5 (C-19), 121.0 (C-20), 111.5 (C-21), 127.6 (C-22)。以上数据与文献^[15]一致, 确定化合物 1 为 3-(4-羟基苄基)-6-(1H-吡啶-3-基甲基)哌嗪-2,5-二酮, 即环(D)-色氨酸-(D)-酪氨酸。

化合物 2 白色针状晶体 (甲醇); 分子式: $C_9H_{16}N_2O_2$; ESI-MS m/z : 207 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 8.15 (1H, br s, 1-NH), 3.76 (1H, dt, $J = 5.1, 2.8$ Hz, H-3), 8.13 (1H, br s, 4-NH), 3.86 (1H, m, H-6), 1.60 ~ 1.46 (2H, m, H-7), 1.81 (1H, m, H-8), 0.85 (3H, m, H-9), 0.86 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-10), 1.26 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 168.5 (C-2), 52.7 (C-3), 169.0 (C-5), 50.0 (C-6), 42.7 (C-7), 23.7 (C-8), 21.9 (C-9), 23.1 (C-10), 19.7

(C-11)。以上数据与文献^[16]一致, 确定化合物 2 为 (3S,6S)-3-异丁基-6-甲基-2,5-哌嗪二酮, 即环(L)-丙氨酸-(L)-亮氨酸。

化合物 3 白色针状晶体 (甲醇); 分子式: $C_{11}H_{12}N_2O_2$; ESI-MS m/z : 227 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 8.18 (1H, br s, 1-NH), 4.06 (1H, m, H-3), 8.13 (1H, br s, 4-NH), 3.34 ~ 2.73 (2H, dd, $J = 17.5, 2.7$ Hz, H-6), 3.09-2.87 (2H, dd, $J = 13.4, 4.5$ Hz, H-7), 7.26 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-9, 13), 7.16 (2H, dd, $J = 7.3, 1.9$ Hz, H-10, 12), 7.28 (1H, m, H-11); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 165.8 (C-2), 55.6 (C-3), 167.3 (C-5), 43.7 (C-6), 38.9 (C-7), 136.0 (C-8), 130.1 (C-9, 13), 128.2 (C-10, 12), 126.9 (C-11)。以上数据与文献报道^[17]一致, 确定化合物 3 为 (3S)-3-苄基哌嗪-2,5-二酮, 即环甘氨酸-(L)-苯丙氨酸。

化合物 4 白色针状晶体 (甲醇); 分子式: $C_{11}H_{20}N_2O_2$; ESI-MS m/z : 235 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.98 (1H, br s, 1-NH), 4.01 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-3), 8.13 (1H, br s, 4-NH), 3.75 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 1.60 ~ 1.44 (2H, ddd, $J = 13.5, 8.5, 5.0$ Hz, H-7), 1.80 (1H, m, H-8), 0.86 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-9), 0.92 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-10), 2.07 (1H, m, H-11), 0.83 (3H, d, $J = 2.5$ Hz, H-12), 0.84 (3H, d, $J = 2.5$ Hz, H-13); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 167.1 (C-2), 52.4 (C-3), 168.7 (C-5), 59.6 (C-6), 44.1 (C-7), 23.6 (C-8), 21.6 (C-9), 23.0 (C-10), 31.7 (C-11), 17.3 (C-12), 18.8 (C-13)。以上数据与文献^[18]一致, 确定化合物 4 为 (3S,6S)-3-(2-甲基丙基)-6-(丙-2-基)哌嗪-2,5-二酮, 即环(L)-亮氨酸-(L)-缬氨酸。

化合物 5 白色针状晶体 (甲醇); 分子式: $C_{11}H_{18}N_2O_2$; ESI-MS m/z : 223 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 4.0 (1H, m, H-3), 3.34 (2H, m, H-6), 1.84 (2H, m, H-7), 2.11-1.91 (2H, m, H-8), 4.18 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-9), 1.73-1.34 (2H, m, H-10), 1.77 (1H, m, H-11), 0.85 (3H, d, $J = 3.5$ Hz, H-12), 0.86 (3H, d, $J = 3.5$ Hz, H-13), 8.03 (1H, br s, 2-NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 166.6 (C-1), 52.7 (C-3), 170.5 (C-4), 45.0 (C-6), 22.6 (C-7), 27.5 (C-8), 58.6 (C-9), 37.8 (C-10), 24.1 (C-11), 22.0 (C-12), 22.9 (C-

13)。以上数据与文献^[19]一致,确定化合物**5**为3-异丁基六氢吡咯并[1,2-*a*]吡嗪-1,4-二酮,即环(D)-脯氨酸-(D)-亮氨酸。

化合物6 白色针状晶体(甲醇);分子式 $C_9H_{16}N_2O_2$;ESI-MS m/z :207 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 8.14 (1H, br s, 1-NH), 3.74 (H, m, H-3), 8.00 (1H, br s, 4-NH), 3.88 (1H, m, $J = 6.9$ Hz, H-6), 1.84 (1H, m, H-7), 1.38 ~ 1.17 (2H, m, H-8), 0.84 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, H-9), 0.91 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-10), 1.26 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 166.7 (C-2), 58.9 (C-3), 168.7 (C-5), 49.7 (C-6), 38.1 (C-7), 24.2 (C-8), 12.0 (C-9), 15.1 (C-10), 20.0 (C-11)。以上数据与文献^[16]一致,确定化合物**6**为(3*S*,6*S*)-3-((*R*)-仲丁基)-6-甲基哌嗪-2,5-二酮,即环(L)-丙氨酸-(L)-异亮氨酸。

化合物7 灰褐色针状晶体(甲醇);分子式 $C_8H_{14}N_2O_2$;ESI-MS m/z :193 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 8.13 (1H, br s, 1-NH), 3.66 (H, m, H-3), 8.00 (1H, br s, 4-NH), 3.86 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-6), 2.13 (1H, m, H-7), 0.92 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-8), 0.81 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-9), 1.25 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 166.7 (C-2), 59.4 (C-3), 168.8 (C-5), 49.7 (C-6), 31.1 (C-7), 18.5 (C-8), 16.9 (C-9), 20.1 (C-10)。以上数据与文献^[16]一致,确定化合物**7**为(3*S*,6*S*)-3-异丙基-6-甲基哌嗪-2,5-二酮,即环(L)-缬氨酸-(L)-丙氨酸。

化合物8 黄色粉末;分子式 $C_{11}H_{18}N_2O_3$;ESI-MS m/z :249 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 8.03 (1H, br s, 2-NH), 4.05 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3), 3.22 (2H, d, $J = 12.3$ Hz, H-6), 4.28 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-7), 5.17 (1H, br s, 7-OH), 2.04 ~ 1.93 (2H, m, H-8), 4.39 (1H, dd, $J = 10.5, 6.8$ Hz, H-9), 1.86-1.33 (2H, m, H-10), 1.75 (1H, m, H-11), 0.85 (3H, d, $J = 2.9$ Hz, H-12), 0.86 (3H, d, $J = 2.9$ Hz, H-13); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 170.9 (C-1), 57.2 (C-3), 166.8 (C-4), 53.8 (C-6), 67.2 (C-7), 37.9 (C-8), 52.6 (C-9), 36.8 (C-10), 24.2 (C-11), 22.0 (C-12), 22.9 (C-13)。以上数据与文献^[20]一致,确定化合物**8**为(3*S*,7*R*,9*S*)-7-羟基-3-异丁基六氢吡咯并[1,2-*a*]吡嗪-1,4-二酮,即环[L-(4-羟脯氨酸)-D-亮氨

酸]。

化合物9 灰褐色粉末;分子式 $C_{16}H_{19}N_3O_2$;ESI-MS m/z :308 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.89 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, 1-NH), 4.13 (1H, m, H-3), 8.01 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 4-NH), 3.48 (1H, dd, $J = 5.6, 1.9$ Hz, H-6), 3.21-3.05 (2H, dd, $J = 14.3, 4.9$ Hz, H-7), 7.06 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-9), 10.86 (1H, br s, 10-NH), 7.28 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-11), 7.01 (1H, m, H-12), 6.92 (1H, m, H-13), 7.59 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-14), 1.63 (1H, m, H-15), 0.58 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-16), 0.14 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-17); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 167.5 (C-2), 55.3 (C-3), 166.4 (C-5), 59.4 (C-6), 28.7 (C-7), 108.9 (C-8), 124.6 (C-9), 136.1 (C-10a), 111.1 (C-11), 120.8 (C-12), 118.3 (C-13), 119.0 (C-14), 128.0 (C-14a), 31.2 (C-15), 18.4 (C-16), 16.1 (C-17)。以上数据与文献^[21]一致,确定化合物**9**为3-(1*H*-吡啶-3-基甲基)-6-(丙-2-基)哌嗪-2,5-二酮,即环(D)-色氨酸-(D)-缬氨酸。

化合物10 白色针状晶体(甲醇);分子式: $C_{10}H_{16}N_2O_2$;ESI-MS m/z :219 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.99 (1H, br s, 2-NH), 3.91 (1H, m, H-3), 3.34 (2H, m, H-6), 1.82 (2H, m, H-7), 2.33-2.13 (2H, m, H-8), 4.11 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-9), 1.78 (1H, m, H-10), 1.00 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-11), 0.83 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 170.4 (C-1), 58.4 (C-3), 165.4 (C-4), 44.7 (C-6), 22.2 (C-7), 28.0 (C-8), 59.6 (C-9), 27.8 (C-10), 18.4 (C-11), 16.5 (C-12)。以上数据与刘超等^[22]在紫芝中分离得到D-氨基酸同结构物质一致,确定化合物**10**为(3*R*,8*aS*)-3-异丙基-六氢吡咯并[1,2-*a*]吡嗪-1,4-二酮,即环(D)-脯氨酸-(D)-缬氨酸。

化合物11 白色针状晶体(甲醇);分子式 $C_{12}H_{14}N_2O_2$;ESI-MS m/z :241 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 8.10 (1H, br s, 1-NH), 4.08 (1H, m, H-3), 8.04 (1H, br s, 4-NH), 3.49 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-6), 3.10-2.87 (2H, dd, $J = 13.5, 4.5$ Hz, H-7), 7.25 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-9, 13), 7.16 (2H, dd, $J = 7.3, 1.9$ Hz, H-10, 12), 7.27 (1H, m, H-11), 1.06 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 167.5 (C-

2), 56.0 (C-3), 168.6 (C-5), 48.7 (C-6), 38.8 (C-7), 136.0 (C-8), 130.1 (C-9, C-13), 128.2 (C-10, C-12), 126.9 (C-11), 18.4 (C-14)。以上数据与文献^[23]一致, 确定化合物 **11** 为(3*S*, 6*S*)-3-苄基-6-甲基哌嗪-2, 5-二酮, 即环-(L)-苯丙氨酸-(L)-丙氨酸。

化合物 12 黄褐色粉末; 分子式 C_9H_9NO ; ESI-MS m/z : 170 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.60-7.15 (2H, br s, 1-NH₂), 6.62 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-2), 7.43 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-3), 7.56 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-2', 6'), 7.37 (2H, dd, $J = 6.8, 7.8$ Hz, H-3', 5'), 7.41 (1H, m, H-4'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 166.9 (C-1), 122.3 (C-2), 139.3 (C-3), 134.9 (C-1'), 129.0 (C-2', C-6'), 127.7 (C-3', C-5'), 129.6 (C-4')。以上数据与文献^[24]一致, 确定化合物 **12** 为(2*E*)-3-苯基丙-2-烯酰胺。

化合物 13 透明针状晶体(甲醇); 分子式 $C_9H_{11}NO$; ESI-MS m/z : 172 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.36-6.83 (2H, br s, 1-NH₂), 2.80 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-2), 2.36 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-3), 7.20 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-2', 6'), 7.26 (2H, m, H-3', 5'), 7.17 (1H, m, H-4'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 173.7 (C-1), 36.8 (C-2), 31.0 (C-3), 141.6 (C-1'), 128.4 (C-2', C-6'), 128.3 (C-3', C-5'), 125.9 (C-4')。以上数据与文献^[25]一致, 确定化合物 **13** 为 3-苯基丙酰胺。

化合物 14 黄褐色粉末; 分子式 C_8H_9NO ; ESI-MS m/z : 158 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.50-6.89 (2H, br s, 1-NH₂), 3.36 (2H, s, H-2), 7.27 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H-2', H-6'), 7.21 (2H, m, H-3', H-5'), 7.30 (1H, m, H-4'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 172.4 (C-1), 42.3 (C-2), 136.6 (C-1'), 129.1 (C-2', C-6'), 128.2 (C-3', C-5'), 126.4 (C-4')。以上数据与文献^[26]一致, 确定化合物 **14** 为 2-苯基乙酰胺。

化合物 15 灰褐色粉末; 分子式 C_7H_7NO ; ESI-MS m/z : 144 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.96-7.34 (2H, br s, 1-NH₂), 7.85 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-2', 6'), 7.43 (2H, m, H-3', 5'), 7.51 (1H, m, H-4'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 171.4 (C-1), 134.6 (C-1'), 129.0 (C-2', 6'),

128.5 (C-3', 5'), 132.4 (C-4')。以上数据与文献^[27]一致, 确定化合物 **15** 为苯甲酰胺。

化合物 16 灰褐色粉末; 分子式 $C_{11}H_{12}N_2O$; ESI-MS m/z : 211 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 7.33 (2H, br s, $J = 6.77$ Hz, 1-NH₂), 2.41 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-2), 2.89 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3), 7.09 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-5), 10.77 (1H, br s, 6-NH), 7.32 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-7), 7.05 (1H, m, H-8), 6.96 (1H, m, H-9), 7.52 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 174.3 (C-1), 36.0 (C-2), 20.9 (C-3), 114.0 (C-4), 122.2 (C-5), 136.3 (C-6), 111.4 (C-7), 121.0 (C-8), 118.2 (C-9), 118.4 (C-10), 127.1 (C-10a)。以上数据与文献^[28]一致, 确定化合物 **16** 为 3-(1*H*-吡啶-3-基)丙酰胺。

化合物 17 黄色粉末; 分子式 C_9H_7NO ; ESI-MS m/z : 168 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 8.30 (1H, br s, 1-NH), 7.25 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-2), 7.21 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-3), 8.28 (1H, s, H-4), 8.08 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 7.51 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7), 9.92 (1H, s, H-8); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 138.6 (C-2), 120.8 (C-3), 124.1 (C-3a), 122.2 (C-4), 118.2 (C-5), 123.5 (C-6), 112.5 (C-7), 137.1 (C-7a), 185.1 (C-8)。以上数据与文献^[29]一致, 确定化合物 **17** 为 1*H*-吡啶-5-甲醛。

化合物 18 黄色粉末; 分子式 $C_9H_{12}N_2O_6$; ESI-MS m/z : 267 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 11.33 (1H, br s, 3-NH), 5.64 (1H, d, $J = 8.1$, H-5), 7.88 (1H, d, $J = 8.1$, H-6), 5.77 (1H, m, H-2'), 4.02 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-3'), 3.96 (1H, m, H-4'), 3.84 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-5'), 3.59 (1H, m, H-6'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 150.9 (C-2), 163.4 (C-4), 101.9 (C-5), 140.9 (C-6), 87.8 (C-2'), 73.7 (C-3'), 70.0 (C-4'), 85.0 (C-5'), 61.0 (C-6')。以上数据与文献^[30]一致, 确定化合物 **18** 为尿昔。

化合物 19 黄褐色粉末; 分子式 $C_5H_6N_2O_2$; ESI-MS m/z : 149 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 10.2 (1H, br s, 1-NH), 10.6 (1H, br s, 3-NH), 6.78 (1H, s, H-6), 1.26 (3H, s, H-7); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 151.6 (C-2), 165.0 (C-4), 107.8 (C-5), 137.8 (C-6), 11.9 (C-7)。以

上数据与文献^[31]一致,确定化合物 **19** 为胸腺嘧啶。

4 讨论

锡尾矿地区链霉菌次生代谢产物研究较少, *Streptomyces kunmingensis* 菌株次生代谢产物研究尚无报道。本文中分离得到的 19 个化合物中就有 11 个环二肽类化合物,这与锡尾矿环境拟诺卡氏放线菌代谢产物的结构类型很相似^[16,32]。与此相对,我们在开展相同环境真菌次生代谢产物研究过程中,发现环二肽类化合物就相对很少了。环二肽是自然界中最小的环肽化合物,具有多种生物活性^[33],在锡尾矿这种独特的逆境中,放线菌菌株大量形成环二肽类物质或许并非偶然,可能与菌株适应其特定的生存环境有着重要的关联,其生物学意义有待后续深入调查研究。

参考文献

- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 2012, 75:311-335.
- Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830:3670-3695.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 2007, 70:461-477.
- Demain A. Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev*, 2009, 29:821-842.
- Ding ZG, Li MG, Zhao JY, et al. Naphthospirozone a: an unprecedented and highly functionalized polycyclic metabolite from an alkaline mine waste extremophile. *Chemistry*, 2010, 16:3902-3905.
- Ding ZG, Li MG, Zhao JY, et al. Phenazolinols A-E: novel diphenazines from a tin mine tailings-derived *Streptomyces* species. *Org Biomol Chem*, 2011, 9:2771-2776.
- Ding ZG, Zhao JY, Li MG, et al. Griseusins F and G, spiro-naphthoquinones from a Tin mine tailings-derived alkalophilic *Nocardiopsis* species. *J Nat Prod*, 2012, 75:1994-1998.
- Li YQ, Li MG, Zhao JY, et al. Griseusin D, a new pyranonaphthoquinone derivative from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. *J Antibiot (Tokyo)*, 2007, 60:757-761.
- Cheng J(程举), Zhang XL(张孝龙), Zhao JY(赵江源), et al. The recent progress of study on secondary metabolites of *Streptomyces*. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2015, 40:791-800.
- Babu TG, Nithyanand C, Babu NKC, et al. Evaluation of cetyltrimethylammonium bromide as a potential short-term preservative agent for stripped goat skin. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25:901-907.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, 16:111-120.
- <http://www.ezbiocloud.net/>.
- Fitch WM, Margoliash E. Construction of phylogenetic trees. *Science*, 1967, 155:279-284.
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*, 1981, 17:368-376.
- Ivanova V, Laatsch H, Kolarova M, et al. Structure elucidation of a new natural diketopiperazine from a *Microbispora aerata* strain isolated from Livingston Island, Antarctica. *Nat Prod Res*, 2013, 27:164-170.
- Ding ZG, Zhao JY, Wen ML, et al. (1)H and (13)C NMR assignments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia alba* sp. nov (YIM 30243 (T)). *Magn Reson Chem*, 2009, 47:366-370.
- Coursindel T, Restouin A, Dewynter G, et al. Stereoselective ring contraction of 2,5-diketopiperazines: An innovative approach to the synthesis of promising bioactive 5-membered scaffolds. *Bioorg Chem*, 2010, 38:210-207.
- Furukawa T, Akutagawa T, Funatani H, et al. Cyclic dipeptides exhibit potency for scavenging radicals. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20:2002-2009.
- Fdhila F, Vázquez V, Sánchez JL, et al. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J Nat Prod*, 2003, 66:1299-1301.
- Cronan Jr JM, Davidson TR, Singleton FL. Plant growth promoters isolated from a marine bacterium associated with *Palmyra* sp. *Nat Prod Lett*, 1988, 11:271-278.
- Pedras MS, Smith KC, Taylor JL. Production of 2,5-dioxopiperazine by a new isolate type of the blackleg fungus *Phoma lingam*. *Phytochemistry*, 1998, 49:1575-1577.
- Liu C(刘超), Wang HQ(王洪庆), Li BM(李保明). Studies on chemical constituents of *Ganoderma*. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2007, 32:235-237.
- Cho JY, Kang JY, Hong YK, et al. Isolation and structural determination of the antifouling diketopiperazines from marine-derived *Streptomyces praecox* 291-11. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76:1116-1121.
- Chen YC, Chen JJ, Chang YL, et al. A new aristolactam alkaloid and anti-platelet aggregation constituents from *Piper taiwanense*. *Planta Med*, 2004, 70:174-177.

- 25 Iwasa J, Fujita T, Hansch C. Substituent constants for aliphatic functions obtained from partition coefficient. *J Med Chem*, 1965, 8:150-153.
- 26 Hudgins WR, Shack S, Myers CE, *et al.* Cytostatic activity of phenylacetate and derivatives against tumor cells. Correlation with lipophilicity and inhibition of protein prenylation. *Biochem Pharmacol*, 1995, 50:1273-1279.
- 27 Hegan DC, Lu Y, Stachelek GC, *et al.* Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase down-regulates BRCA1 and RAD51 in a pathway mediated by E2F4 and p130. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107:2201-2206.
- 28 Pappolla M, Poeggeler B. Indole-3-propionamide and derivatives thereof; US, 20070105937 A1. 2007-05-10.
- 29 Vougiannopoulou K, Fokialakis N, Aligiannis N, *et al.* Simple indole alkaloids from the neotropical rutaceous tree *Raputia simulans*. *Planta Med*, 2011, 77:1559-1561.
- 30 Agarwal RP, Han T, Fernandez M. Reduced cellular transport and activation of fluoropyrimidine nucleosides and resistance in human lymphocytic cell lines selected for arabinosyl-cytosine resistance. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61 (1) : 39-47.
- 31 Kirsch LE, Notari RE. Pharmacokinetic prodrug modeling; *In vitro* and *in vivo* kinetics and mechanisms of ancitabine bioconversion to cytarabine. *J Pharm Sci*, 1984, 73:728-732.
- 32 Xu W(徐伟), Ding ZG(丁章贵), Li MG(李铭刚), *et al.* Study on secondary metabolites of *Nocardiosis sp.* YIM 90087. *Nat Prot Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:1198-1201.
- 33 Yang ZJ(杨子娟), Xiang L(向兰), Xing J(邢杰), *et al.* Research advances in cyclic dipeptides. *Mod Pharm Clin*(现代药物与临床), 2009, 24(2):73-81.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

丁 克	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
DING Ke	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
伍婉卿	刘相国	孙昊鹏	孙桂波	孙黔云	李芸霞
WU Wanqing	LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	SUN Qianyun	LI Yunxia
李良成	李国友	邱 莉	汪海波	沐万孟	张炳火
LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo
陈益华	林茂祥	林昌俊	欧阳杰	易华西	罗应刚
CHEN Yihua	LIN Maoxiang	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi	LUO Yinggang
周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚	高慧敏	唐金山
ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan
黄胜雄	韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	潘卫东	薛永波
HUANG Shengxiong	HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	PAN Weidong	XUE Yongbo