

文章编号:1001-6880(2018)6-0974-05

# 赤水丹霞土壤链霉菌 CSDX 001 来源的新苯邻二甲酰亚胺的分离及结构鉴定

钱声艳<sup>1,2</sup>, 吴明松<sup>2</sup>, 王倩<sup>1</sup>, 李彩玉<sup>2</sup>, 耿娜娜<sup>1,2</sup>, 刘建国<sup>2\*</sup><sup>1</sup>遵义医学院医学与生物学研究中心 贵州省普通高等学校微生物资源及药物开发特色重点实验室;<sup>2</sup>遵义医学院医学与生物学研究中心 贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室, 遵义 563000

**摘要:**利用改良的 GYM 培养基对从赤水丹霞山土壤样品中分离的链霉菌分离菌株 *Streptomyces* sp. CSDX 001 进行固体发酵, 发酵产物利用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩、富集获得其粗提取物。利用反复硅胶柱层析对粗提物中的次级代谢产物进行分离纯化, 通过质谱、核磁共振等波谱方法对分离产物进行结构鉴定。从链霉菌 *Streptomyces* sp. CSDX 001 中分离得到 2 个化合物, 分别为苯邻二甲酰亚胺 4-羟基-N,7-二甲基苯邻酰亚胺(**1**)和 2-甲基-2,5-莰二醇(**2**), 其中化合物**1**为新化合物。

**关键词:**链霉菌 *Streptomyces* sp. CSDX001; 次级代谢产物; 苯邻二甲酰亚胺; 2-甲基-2,5-莰二醇

中图分类号:R961; Q936

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.010

## A New Phthalimide Derivative of Isolation and Structural Identification from *Streptomyces* sp. CSDX 001 in Chishuidanxia Mountain

QIAN Sheng-yan<sup>1,2</sup>, WU Ming-song<sup>2</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>, LI Cai-yu<sup>2</sup>, GENG Na-na<sup>1,2</sup>, LIU Jian-guo<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Special Key Laboratory of Characteristic Microbial Research and Drug Development, Higher Education Institution in Guizhou Province, Center for Medical and Biological Research, Zunyi Medical University;<sup>2</sup>Special Key Laboratory of Oral Disease Research, Higher Education Institution in Guizhou Province, Center for Medical and Biological Research, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China;

**Abstract:** The *Streptomyces* sp. CSDX 001 which was isolated from chishuidanxia mountain soil samples was fermented by using improved GYM culture medium. Fermentation products were extracted by employing ethyl acetate and enrichment of reduced pressure concentration obtained crude extracts. The crude extracts were isolated and identified by means of repeated silica gel and its structure was identified on the basis of their mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) methods. As a result, a new phthalimide derivative named 4-hydroxyl-N,7-dimethyl phthalimide and a known compound 2-methyl-2,5-bornanndiol were isolated from *Streptomyces* sp. CSDX 001.

**Key words:** *Streptomyces* sp. CSDX001; secondary metabolites; phthalimide; 2-methyl-2,5-bornanndiol

微生物来源天然产物由于其具有“结构复杂新颖”“活性独特”等特点, 已成为寻找药物先导物、新药开发和寻找活性物质的重要领域。链霉菌更是活性天然产物的主要来源, 其产物结构复杂, 活性多样如具有抗肿瘤活性<sup>[1,2]</sup>、抗菌活性<sup>[3-5]</sup>、治疗肥胖症<sup>[6]</sup>等作用。近年来, 随着大量微生物次级代谢产物的发现, 从普通环境中发现活性新天然产物的概率

越来越低, 反而随着如沙漠<sup>[7]</sup>、海洋<sup>[8]</sup>、植物内生菌<sup>[9]</sup>等特殊生境中发现许多结构新颖的活性天然产物。人们开始把目光转向封闭环境和典型生境, 希望从这些环境中分离到具有开发价值的新菌株或产生新的活性物质。

本课题组对贵州特殊生境来源土壤进行菌株分离鉴定、次级代谢产物纯化分离及活性筛选, 发现了具有抗耐药金黄色葡萄球菌活性天然产物 zunyimycin A<sup>[10]</sup>、zunyimycin B<sup>[11]</sup>、zunyimycin C<sup>[11]</sup> 及 Pseurotin A<sup>[12]</sup>。在此基础上, 对来源于赤水丹霞链霉菌 *Streptomyces* sp. CSDX 001<sup>[13]</sup> 进行菌株活化、扩大培养及代谢产物分离鉴定, 从该菌株中发现了一

收稿日期:2018-03-06 接受日期:2018-05-23

基金项目:遵义医学院硕士启动基金(F-757);遵义市科技局市校联合基金(E-215);遵义医学院贵州省普通高等学校微生物资源与药物开发特色重点实验室开放课题(GZMRD-2015-001)

\*通信作者 E-mail:13087891001@163.com

个新的邻苯二甲酰亚胺化合物和一个已知的莰醇类化合物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 发酵菌株

链霉菌 *Streptomyces* sp. CSDX001 从贵州赤水丹霞山次生林地 10~20 cm 深的表层土壤分离得到, 通过对分析菌株 16s rRNA 序列鉴定该菌株为链霉菌属<sup>[13]</sup>。目前该菌株保藏在武汉大学中国典型培养物保藏中心, 菌保号为:M2014237。

#### 1.1.2 发酵培养基

GYD 固体培养基(甘露醇 2 g, 燕麦粉 1 g, 大豆粉 1 g, 麦芽抽提物 10 g, 酵母抽提物 0.4 g, NaCl 0.4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g, MgSO<sub>4</sub> 0.1 g, 琼脂粉 15 g, 加去离子水定容 1 L), 培养基原料来自于碧迪(上海)生物公司。

#### 1.1.3 微量元素配制方法

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2 g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2 g, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>·4H<sub>2</sub>O 2 g, 用双蒸水定容至 1 L。所有配制微量元素的原料均在北京索莱宝公司购买。

#### 1.1.4 硅胶

薄层层析硅胶 GF<sub>254</sub> 板及柱层析 200~300 目硅胶(青岛谱科分离材料有限公司)。

#### 1.1.5 普通化学试剂

甲醇、氯仿、乙酸乙酯、丙酮等溶剂等均为分析纯(成都科龙化工试剂厂,中国)。

### 1.2 仪器与设备

AVANCE III Bruker-500 MHz NMR 核磁共振波谱仪(Bruker 公司,德国); HD-21-2 紫外检测仪(上海予腾生物科技有限公司,中国); R-210 旋转蒸发仪(步琦有限公司,瑞士); BSP-400 培养箱(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司,中国); E002092 超级洁净工作台(苏州市金净净化设备科技有限公司,中国); JA2003 电子天平(上海越平科学仪器有限公司,中国); ZF-1 三用紫外分析仪(杭州齐威仪器有限公司,中国); DZ-900 英培摇床(太仓市实验设备厂,中国); Master-E 超纯水机(上海和泰仪器有限公司,中国)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株 *Streptomyces* sp. CSDX001 活化与发酵

从-80 ℃冰箱中取出甘油斜面保存的菌种, 以

无菌接种环挖取 1 环菌株 *Streptomyces* sp. CSDX001 的孢子, 十字划线接种于直径 11 cm 的 GYD 培养基平板, 28 ℃ 静置培养 3 天, 挑取单菌落传代至第三代后可作为种子菌种。

#### 1.3.2 菌株发酵产物提取

配制 75 L 固体 GYD 培养基, 按每瓶 200 mL 分装至 500 mL 的三角瓶中灭菌, 室温静置挥发干表面水分, 备用。以无菌接种环挖取 1 环种子菌种 *Streptomyces* sp. CSDX001 的孢子, 划线接种于装有培养基三角瓶中, 28 ℃ 静置培养 8 天, 无菌条件将培养基捣碎继续培养 7 天, 加入乙酸乙酯放在摇床在 130 rpm 振荡提取两次, 合并提取液, 利用旋转蒸发仪在 40 ℃, 减压到压力为 110 mBar, 转速为 46 rpm 回收乙酸乙酯溶剂, 最后得发酵产物 18.1 g。

#### 1.3.3 目标代谢产物分离纯化

8% 硫酸-乙醇溶液显色: 将硅胶板置于 8% 硫酸乙醇溶液中, 迅速取出后用吹风机热风吹数分钟, 使其缓慢显色。

装柱及拌样: 用氯仿:丙酮 = 1:1 的溶剂溶解 18.1 g 的粗提物, 与硅胶按质量比约 1:1.5(即 18.1 g 粗提物中加 100~200 目硅胶粉 27.2 g) 混合均匀, 待溶剂挥发后得到河沙状样品, 该样品作为上柱的样品; 称取 100~200 目硅胶粉 600 g 与氯仿-丙酮 = 15:1 混合均匀(在此过程中不能产生气泡)装入长为 875 mm, 内径为 70 mm 分离柱中, 让硅胶粉缓缓下沉直至不再下沉时加入上柱样品; 用氯仿:丙酮 (15:1、10:1、5:1、2:1、1:1) 洗脱溶剂洗脱, 每个洗脱溶剂比例洗脱 4 个柱体积(约 5 L 溶剂), 每 250 mL 为一份进行收集, 共收集 100 份, 每份经旋转蒸发仪减压回收后, 加入 10 mL 丙酮溶解后移到规格为 20 mL 西林瓶中, 薄层层析(TLC)点板, 用石油醚:丙酮 = 4:1、氯仿:丙酮 = 6:1 或氯仿:甲醇 = 10:1 展开剂展开, 在紫外分析仪下观察是否具 254 nm 或 365 nm 荧光, 再用 8% 硫酸乙醇显色的颜色剂显色, 记录并计算迁移值( $R_f$ ), 合并  $R_f$  相同的组分, 共得到 20 个粗组分, 且编号为 F1-20。

薄层层析(thin-layer-chromatography, TLC): 样品用合适的溶剂溶解后, 将含有样品溶液的毛细管点到 GF<sub>254</sub> 薄层板上, 样品点距硅胶板底端 5 mm 左右。待溶剂挥发完全后, 将硅胶板放入被展开剂饱和的合适层析缸中, 采用上行方式展开。当展开剂上行到距硅胶板顶端 5 mm 左右时, 取出硅胶板, 用吹风机吹干溶剂后, 先后用紫外灯显色及 8% 硫酸

乙醇溶液显色。

F8(200 mg)用丙酮溶解,按质量比与1:1.5混合均匀,溶剂挥发后作为上样的样品;称取100~200目硅胶粉30 g与石油醚:丙酮=6:1混合均匀(在此过程中不能产生气泡)装入长为457 mm,内径为20 mm分离柱中,让硅胶粉缓缓下沉直至不再下沉时加入上柱样品;用石油醚-丙酮=6:1洗脱6个柱体积,每20 mL为一份收集,共收集18份;石油醚-丙酮=4:1洗脱5柱体积,共收集15瓶,TCL点板,用石油醚:丙酮=2:1、氯仿:丙酮=6:1展开剂展开,在紫外分析仪下观察是否具254 nm或360 nm荧光,再用8%硫酸乙醇显色的颜色剂显色,记录并计算迁移值( $R_f$ ),合并第22~24 $R_f$ 相同的组分,得到化合物**1**。

F6(200 mg)用上述相同方法装柱及拌样,洗脱溶剂石油醚:丙酮=4:1到2:1洗脱,TCL点板,石油醚:丙酮=3:1展开,合并 $R_f$ 在0.5的组分,得到化合物**2**。

#### 1.3.4 代谢产物结构鉴定

核磁共振谱(nuclear magnetic resonance):分别称取化合物各5 mg,氘代氯仿溶剂溶解转移到核磁管(最好不要超过核磁管1.5 cm),放到核磁共振仪中进行测试(在此过程中先开电源,使核磁管悬浮在均匀磁场中)。测试包括:1D-NMR、2D-NMR和DEPT。

采用电喷雾质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)测定:样品加热气化,进入离子化室,随后电离,得到化合物的分子离子峰及其他离子碎片峰。

#### 1.3.5 抗菌活性筛选

测试菌株:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)

培养基:哥伦比亚血琼脂培养基、葡萄糖美兰培养基(真菌培养基)及Mueller-Hinton琼脂培养基

方法:用接种环分别挑取鲍曼不动杆菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌的单菌落,划线接种至哥伦比亚血琼脂培养基,36 °C、5% CO<sub>2</sub>培养12 h。用接种环挑取白色念珠菌的单菌落,划线接种至葡萄糖美兰培养基,28 °C、5% CO<sub>2</sub>培养12 h。

采用滤纸扩散法测定抗菌活性。将滤纸片打孔(孔直径为4 mm),121 °C、30 min高压灭菌;分别

称取质量为3 mg的化合物**1**、**2**溶于1 mL甲醇中,将滤纸片浸泡其中,取出纸片溶剂挥发干后备用。

纯化好的测试菌用一次性拭子(已灭菌)沾取单菌落,置于含5 mL生理盐水的玻璃试管中,润湿拭子头部轻轻在管壁上涂抹均匀,直至菌悬液比浊度0.44~0.56 MCF;用棉签蘸取菌悬液并靠壁旋转,十字交叉再均匀划线涂抹在Mueller-Hinton琼脂培养基上,待平板稍干后将制作好的滤纸片贴于培养基表面,每个滤纸片中心距离>24 mm,每个平板4个滤纸片,做好标记倒置于微生物培养箱36 °C培养17 h观察,测量抑菌圈直径。

## 2 结果

### 2.1 结构鉴定

**化合物1** 白色晶体,易溶于氯仿、丙酮、甲醇、二甲亚砜等有机溶剂。高分辨电喷雾质谱(high resolution electrospray ionization mass spectrometry, HR-ESI-MS)  $m/z$ : 190.0658 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式: C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>, 计算不饱和度为7;化合物**1**的红外光谱在3399 cm<sup>-1</sup>, 1661 cm<sup>-1</sup>, 1629 cm<sup>-1</sup>, and 1524 cm<sup>-1</sup>有吸收,推断出该化合物具有苯环、羟基、羰基等基团。在<sup>13</sup>C NMR结合DEPT谱图及HSQC得出该化合物由10个碳原子组成。6个季碳原子[ $\delta_c$  173.4, 173.3, 150.2, 134.4, 128.9, 123.4](两个羰基碳原子和四个芳香族碳原子信号),2个芳香次甲基信号[ $\delta_c$  128.3, 121.0]和2个单甲基信号[ $\delta_c$  24.9, 18.0]。在<sup>1</sup>H NMR谱图中,2个芳香氢信号[ $\delta_h$  7.26 (d,  $J$ =7.8 Hz, 1H) 和 7.05 (d,  $J$ =7.8 Hz, 1H)],结合碳谱数据推断出化合物**1**含有1,2,3,4-四取代苯环结构片段(见图1)。

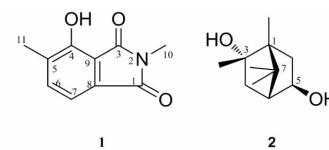


图1 化合物**1**~**2**化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds **1**~**2**

在HMBC谱图(图2)中,甲基 $\delta_h$  2.25 (s, 3H)与 $\delta_c$  170.3 (s, C-1), 173.4 (s, C-3)相关可以推断出化合物**1**含有内酰胺结构片段,结合质谱、不饱和度和1,2,3,4-四取代苯环结构片段确定化合物**1**具有苯邻二甲酰胺结构骨架,与苯邻二甲酰胺结构骨架比较,化合物**1**多了羟基基团信号[10.24 (s, -OH)]

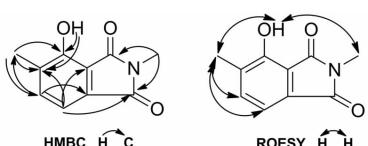


图 2 化合物 1 主要 HMBC 和 ROESY 相关

Fig. 2 Key HMBC and ROESY correlations of compound 1

和甲基信号 [2.24 (s, 3H)]。HMBC 谱图上, 氢信号  $\delta_H$  7.26 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz) 与  $\delta_C$  173.3 (s, C-1), 128.9 (s, C-9) 和 134.4 (s, C-5) 相关, 推断氢信号  $\delta_H$  7.26 连接在化合物 1 的 C-7 位上, 另一个芳香氢信号 7.05 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H) 连接在化合物 1 的 C-6 位上根据耦合常数。在 ROESY 谱图上, 关键相关点, 10.24 与 2.24 和 10.24 与 2.25 相关, 再结合 HMBC 谱图碳氢远程相关, 可以推断羟基基团连接在化合物 1 的 C-4 位, 而甲基基团连接在 C-5 上。综合所有波谱数据, 最终确定化合物 1 为 4-羟基-N, 7-二甲基苯邻酰亚胺, 相关数据归属详见表 1。

表 1 化合物 1 在丙酮(氘代)中的氢和碳谱数据

Table 1  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data of compound 1 in Acetone- $d_6$  (in ppm).

编号 No.	$\delta_H$	$\delta_C$
1		173.3, C
3		173.4, C
4		150.2, C
5		134.4, C
6	7.05 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H)	128.3, CH
7	7.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H)	121.0, CH
8		123.4, C
9		128.9, C
10	2.25 (s, 3H)	24.9, $\text{CH}_3$
11	2.24 (s, 3H)	18.0, $\text{CH}_3$
-OH	10.24 (s, 1H)	

化合物 2 白色粉末, 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_2$ ,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz),  $\delta$ : 4.38 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-5), 2.15 (1H, d,  $J = 13.5$  Hz,  $\text{H}_\beta$ -3), 1.90 (1H, t,  $J = 11.5$  Hz,  $\text{H}_\alpha$ -6), 1.88 (1H, d,  $J = 14.1$  Hz,  $\text{H}_\alpha$ -3), 1.84 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-4), 1.34 (s, Me-2'), 1.30 (1H, dd,  $J = 14.3, 2.5$ ,  $\text{H}_\beta$ -6), 1.14 (s, Me-7''), 0.89 (s, Me-7'), 0.81 (s, Me-1');  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz), 53.4 (C-1), 79.4

(C-2), 37.1 (C-3), 51.3 (C-4), 70.3 (C-5), 41.5 (C-6), 50.2 (C-7), 10.1 (C-1'), 26.1 (C-2'), 22.1 (C-7'), 22.0 (C-7'')。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 2 为 2-甲基-2,5-二醇。

## 2.2 抗菌活性结果

采用滤纸扩散法测定抗菌活性, 以鲍曼不动杆菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌为测试菌, 结果表明化合物 1 和化合物 2 测试菌株均无抗菌活性。

## 3 结论

对赤水丹霞土壤来源的菌株次级代谢产物的发酵、分离纯化及结构解析, 发现了一个新的邻苯二甲酰亚胺化合物和一个已知的二醇类化合物。对分离得到的化合物采用滤纸扩散法测定抗菌活性筛选, 结果显示化合物均对鲍曼不动杆菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌没有活性。

## 参考文献

- 1 Jiang QL(蒋秋龙), Yang ZJ(杨志钧), Rao M(饶敏), et al. Antitumor compounds from a *Streptomyces* sp. strain [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 26:1-5.
- 2 Sajid I, Shaaban KA, Hasnain S. Antitumour compounds from a saline soil isolate, *Streptomyces griseoincarnatus* CTF15 [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25:549-559.
- 3 Wang J, Soisson SM, Young K, et al. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties [J]. *Nature*, 2006, 441:358-361.
- 4 Wang J, Kodali S, Lee SH, et al. Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with *in vivo* antibiotic properties [J]. *PNAS*, 2007, 104:7612-7616.
- 5 Huang R, Ding ZG, Long YF, et al. A new isoflavone derivative from *Streptomyces* sp. YIM GS3536 [J]. *Chem Nat Comp*, 2013, 48:966-969.
- 6 Paululat T, Kulik A, Hausmann H, et al. Grecocyclines: New angucyclines from *Streptomyces* sp. Acta 1362 [J]. *Eur J Org Chem*, 2010, 2010:2344-2350.
- 7 Jiang ZK, Guo L, Chen C, et al. Xiakemycin A, a novel pyranonaphthoquinone antibiotic by the *Streptomyces* sp. CC8-201 from the soil of a karst cave [J]. *J Antibiotic*, 2015, 68:771-774.
- 8 Manam RR, Teisan S, White DJ, et al. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro-beta-lactone-gamma-lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68:240-243.

(下转第 982 页)