

放线菌 *Streptomycesnojiriensis* SCSIO m34-1 吩嗪生物碱类次级代谢产物的研究

李宇^{1,2#}, 赖珍珠^{3#}, 李佳岭⁴, 黄洪波¹, 谢运昌¹, 李文均⁴, 陶移文³, 鞠建华^{1,2*}

¹中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东省海洋药物重点实验室 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301; ²中国科学院大学, 北京 100039; ³广州医科大学药学院, 广州 511436; ⁴中山大学生命科学学院, 广州 510275

摘要: 从我国黑龙江漠河泥土中分离得到一株放线菌, 通过 16S rRNA 基因测序分析, 鉴定该菌株为 *Streptomycesnojiriensis* SCSIO m34-1。采用摇瓶发酵方法对该菌株进行发酵, 发酵产物经硅胶柱色谱及半制备高效液相分离得到 7 个化合物, 利用 HR-MS, 1D 和 2D NMR 波谱数据分析, 鉴定其结构分别为 izuminoside D(1)、izuminoside A(2)、solphenazine E(3)、solphenazine D(4)、solphenazine A(5)、6-羟基吩嗪-1-羧酸甲酯(methyl 6-hydroxyphenazine-1-carboxylate, 6) 和 diastaphenazine(7), 其中 izuminoside D(1) 是新化合物。抗真菌活性测试结果表明 izuminoside D(1) 在浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对苹果腐烂病菌(*Valsa mali*) 和小麦赤霉病菌(*Gibberella sanbinetti*) 有微弱抑制活性。

关键词: 链霉菌; 次级代谢产物; 生物碱; 吩嗪

中图分类号: Q939.13; R914.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.10.001

Phenazine Alkaloid Secondary Metabolites from Actinomycete *Streptomycesnojiriensis* SCSIO m34-1

LI Yu^{1,2#}, LAI Zhen-zhu^{3#}, LI Jia-ling⁴, HUANG Hong-bo¹, XIE Yun-chang¹,
LI Wen-jun⁴, TAO Yi-wen³, JU Jian-hua^{1,2*}

¹CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China;

³School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

⁴School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510275, China

Abstract: An actinomycetes strain SCSIO m34-1 was isolated from soil sample collected from Mohe, Heilongjiang province, China. The strain was identified as *Streptomycesnojiriensis* SCSIO m34-1 by analysis of its 16S rRNA gene sequence. The strain SCSIO m34-1 was fermented on rotary shakers. Seven compounds were purified from the organic extract using silica gel column chromatography and semi-preparative HPLC. Their structures were identified to be izuminoside D(1), izuminoside A(2), solphenazine E(3), solphenazine D(4), solphenazine A(5), methyl 6-hydroxy phenazine-1-carboxylate(6) and diastaphenazine(7) based on analyses of their HR-MS, 1D and 2D NMR data. Izuminoside D(1) was found to be a new compound. Izuminoside D(1) showed weak antifungal activity against *Valsa mali* and *Gibberella sanbinetti* at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words: *Streptomyces*; secondary metabolite; alkaloid; phenazine

吩嗪生物碱是一类含氮杂环化合物的总称, 其

母核结构是 1,4-二氮杂苯^[1,2]。天然的吩嗪化合物主要源自假单胞菌、链霉菌及古甲烷菌的次级代谢产物, 其中假单胞菌属多产结构简单的吩嗪, 而来源于链霉菌属的吩嗪结构则更为多样, 包括卤化修饰、糖基化修饰(糖苷)、异戊烯基取代及复杂的二聚化产物。自 Fordos 从绿脓假单胞菌中发现绿脓菌素

收稿日期: 2018-04-11 接受日期: 2018-06-05

基金项目: 国家杰出青年科学基金(81425022); 国家自然科学基金-广东联合基金重点项目(U1501223); 广东省自然科学基金团队项目(2016A030312014)

* 通信作者 Tel: 86-20-89023028; E-mail: jju@scsio.ac.cn

共同第一作者

(Pyocyanin)以来,文献累计报道了190多个吩嗪类生物碱^[3]。吩嗪化合物具有抗菌、杀虫、抗肿瘤、抗炎等生物活性^[4-6],在药物及生物农药领域有较多的应用,如氯苯吩嗪是抗麻风杆菌感染的药物,申嗪霉素是抗植物病原真菌的生物农药^[7,8]。

由于结构中含有长的共轭体系,吩嗪通常呈现出较深的颜色,其紫外吸收光谱含两个最大吸收峰且至少一个在可见光范围内^[9],因此在HPLC-DAD筛选时具有很高的分辨率。本课题组最近从黑龙江省漠河的土壤样本中分离获得了一批放线菌菌株,

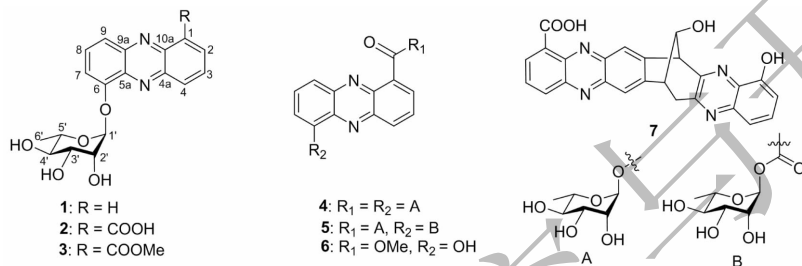


图1 化合物1~7的结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-7

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Bruker maXis 高分辨飞行时间质谱仪; Bruker AV700 超导核磁共振波谱仪(700/175 MHz, TMS 为内标); Agilent 1260 高效液相色谱仪(配 DAD 检测器), Phenomenex 色谱柱(50 mm × 4.6 mm, ODS 5 μm); 艾杰尔 Cheetah 200 中压制备色谱仪, Hitachi Primaide 高效液相色谱仪, YMC-Pack ODS-A 色谱柱(250 mm × 10 mm, 5 μm); 应用光物理公司 Chirascan 圆二色光谱仪; HS-GF254 硅胶薄层板; J&K 色谱纯乙腈, 其它试剂均为国产分析纯。

菌株 SCSIO m34-1 是从黑龙江省漠河土壤样品中分离纯化获得的, 通过 16S rRNA 基因序列比对, 鉴定为 *Streptomycesnojiriensis*, 菌种保存于中国科学院南海海洋研究所。

M13 琼脂培养基: 可溶性淀粉 0.5 g/L, 葡萄糖 0.5 g/L, 酵母提取物 0.5 g/L, 细菌学蛋白胨 0.5 g/L, 酪蛋白胨 0.5 g/L, NaCl 0.3 g/L, K₂HPO₄ 0.3 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 5 g/L, 琼脂 15 g/L, pH7.2 ~ 7.4, 115 °C 灭菌 30 min。

ISP-2 培养基: 酵母提取物 4 g/L, 麦芽提取物 10 g/L, 葡萄糖 4 g/L, pH7.2 ~ 7.4, 115 °C 灭菌 30

并对其发酵产物进行了基于 HPLC-DAD 分析的化学筛选, 结果发现编号为 SCSIO m34-1 菌株可能生产一系列吩嗪化合物。随后, 我们采用 ISP-2 培养基对该菌株进行了 28 L 的摇床发酵, 采用柱色谱及半制备 HPLC 手段, 分离到了 5 个糖基化修饰的吩嗪单体(1~5)、6-羟基吩嗪-1-羧酸甲酯(6)和吩嗪二聚体(7), 其中化合物 1 为新化合物, 命名为 izuminoside D(图 1)。本文报道该菌株分子生物学鉴定、发酵产物的提取分离、结构鉴定和抗真菌活性测试。

min。

1.2 实验方法

1.2.1 放线菌 SCSIO m34-1 的分子生物学鉴定

以放线菌 SCSIO m34-1 基因组 DNA 为模板, 用 16S rRNA 基因通用引物(F: 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG, R: GCTTACCTTGTACGACTT), fastpfu 高保真聚合酶 PCR 扩增, 反应体系为: dNTP 2 μL, 二甲亚砜 2.5 μL, 上下游引物各 1.25 μL, DNA 模板 1 μL, fastpfu 高保真聚合酶 1 μL, fastpfu buffer 10 μL, ddH₂O 30 μL。PCR 条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 57 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温。用凝胶回收试剂盒(Axygen)纯化 PCR 产物, 再连接到 pGEM-T 载体(Promega)中。16S rDNA 序列由广州艾基生物技术有限公司测定。将测出的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 分析, 利用 MEGA5.0 软件进行序列系统发育分析, 采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树。

1.2.2 菌株发酵

将菌株 SCSIO m34-1 单克隆接种到 M13 琼脂培养基平板上, 置 28 °C 恒温培养箱培养 5 天至孢子成熟变灰色。收集孢子接种于装有 50 mL ISP-2 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 置摇床于 28 °C、200

rpm 振荡培养 1 天,然后转接至装有 200 mL ISP-2 液体培养基(添加 4% XAD-16 大孔吸附树脂)的 1 000 mL 三角瓶中,置摇床 28 °C、200 rpm 振荡培养 8 天。

1.2.3 发酵产物的提取分离

从发酵液中收集大孔树脂,用 95% 乙醇洗脱至近无色,减压浓缩得到发酵提取物浸膏(30 g)。浸膏用硅胶柱进行分离,以氯仿/甲醇体系(100:0、98:2、96:4、94:6、92:8、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50, v/v)洗脱,得到 10 个组分 Fr. A1-Fr. A10。根据 HPLC 和 TLC 分析结果,将 Fr. A2 和 Fr. A3 合并,经中压制备色谱、ODS 自装色谱柱(10 × 3 cm, 40 ~ 60 μm)进行分离,用 CH₃CN/H₂O(0:100 至 100:0, v/v)体系线性梯度洗脱 60 min,流速为 10 mL/min,共收集 10 个组分 Fr. B1-Fr. B10。根据 HPLC 分析,合并 Fr. B5 和 Fr. B6,经半制备 HPLC、ODS 色谱柱(250 × 10 mm, 5 μm)分离,以 CH₃CN/H₂O(20:80 至 80:20, v/v)体系洗脱 30 min,流速为 2.5 mL/min,得到化合物 6(*t_R* 20.3 min, 10 mg)和 7(*t_R* 24.0 min, 8 mg)。组分 Fr. A4-Fr. A5 合并,经正相硅胶柱、用乙酸乙酯/甲醇体系(100:0、98:2、96:4、94:6、92:8、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50, v/v)洗脱,得到 10 个组分 Fr. C1 ~ Fr. C10。组分 Fr. C5 和 Fr. C6 合并,经半制备 HPLC、ODS 色谱柱分离,以 CH₃CN/H₂O(20:80 至 60:40, v/v)体系洗脱 30

min,流速为 2.5 mL/min,得到化合物 2(*t_R* 14.0 min, 13 mg)、1(*t_R* 16.5 min, 20 mg)和 3(*t_R* 18.5 min, 12 mg)。组分 Fr. A6 经半制备 HPLC、ODS 色谱柱分离,以 CH₃CN/H₂O(10:90 至 50:50, v/v)体系洗脱 25 min,流速为 2.5 mL/min,得到化合物 4(*t_R* 13.5 min, 10 mg)和 5(*t_R* 17.3 min, 11 mg)。

1.2.4 抗真菌活性测试

采用琼脂法(Agar medium assay)测试化合物对菌株苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella sanbinetti*)、苦瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. momordicae)、玉米赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers) 5 种病原真菌的生长抑制作用^[10]。将纯化得到的化合物用丙酮稀释成不同浓度的药液,分别与灭菌后的 ME 液体培养基完全混合。待液体培养基在平板上凝固后,将植物病原真菌的菌丝置于平板的中心,同时另设丙酮和放线菌酮分别为空白对照组和阳性对照组。

2 实验结果与讨论

2.1 菌株鉴定

基因序列分析显示菌株 SCSIO m34-1 与放线菌 *S. nojiriensis* NR042303 的 16S rRNA 基因序列相似度极高,结合形态学分析,鉴定该菌株为 *S. nojiriensis* SCSIO m34-1,其系统发育树如图 2。

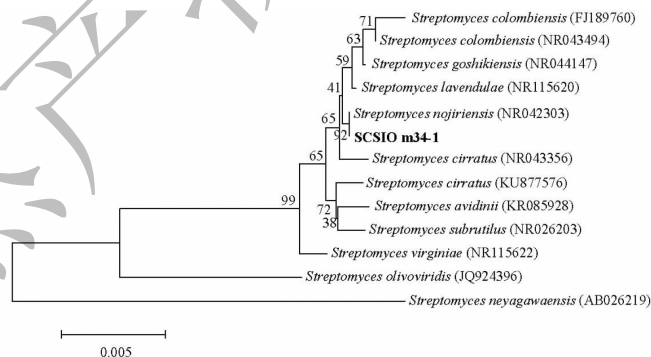


图 2 基于 16S rRNA 序列构建 SCSIO m34-1 与其它链霉菌菌种 NJ 分子系统进化树

Fig. 2 Neighbour-joining tree based on 16S rRNA sequences showing relationships between strain SCSIO m34-1 and closely related members of genus *Streptomyces*

2.2 结构鉴定

化合物 1 黄色无定型粉末; $[\alpha]_D^{25} = -9.6$ (c 0.23, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 208 (4.51), 259.8 (4.68), 365.8 (3.96) nm; IR (Film) ν_{\max} 2 924, 1 635, 741, 667, 602 cm^{-1} ; (-)HR-ESI-MS 呈现

$[M + Cl]^-$ (m/z 377.090 8) 峰及 $[2M + Cl]^-$ (m/z 719.212 3) 峰,表明其分子式为 C₁₈H₁₈N₂O₅, 不饱和度为 11。化合物 1 的 UV 吸收光谱在 260 nm 和 366 nm 处显示两个最大吸收波长,提示可能为吩嗪类结构^[11]。¹H NMR 谱表明该化合物含 7 个芳香质子

($\delta_{\text{H}} 8.30 \sim \delta_{\text{H}} 7.90$), 4 个连氧次甲基质子 ($\delta_{\text{H}} 4.13$, $\delta_{\text{H}} 3.96$, $\delta_{\text{H}} 3.68$, $\delta_{\text{H}} 3.39$), 1 个糖基端基质子 ($\delta_{\text{H}} 5.75$, d, $J = 0.9$ Hz, H-1'), 1 个双峰甲基质子 ($\delta_{\text{H}} 1.12$, d, $J = 6.2$ Hz)。 ^{13}C NMR 谱给出 12 个芳碳信号 ($\delta_{\text{C}} 113\text{--}\delta_{\text{C}} 152$), 其中 $\delta_{\text{C}} 151.4$ (C-6) 是连氧芳碳信号, 另有 4 个连氧次甲基碳信号 ($\delta_{\text{C}} 71.8$, $\delta_{\text{C}} 70.5$, $\delta_{\text{C}} 70.3$, $\delta_{\text{C}} 70.0$)、1 个糖基端基碳信号 ($\delta_{\text{C}} 99.6$)、1 个甲基碳信号 ($\delta_{\text{C}} 17.9$)。结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 信息, 推测化合物 **1** 是含有吩嗪母核及一个六碳糖的糖苷类结构。 $^1\text{H}\text{--}^1\text{H}$ COSY 谱给出 H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H₃-6' 耦合体系, 结合 HMQC 谱, 证实糖基片段 CH-1'/CH-2'/CH-3'/CH-4'/CH-5'/CH₃-6' 的存在 (图 3)。在 HMBC 谱中观察到 H-1'/C-5' 及 H-5'/C-1' 相关, 从而推断出六碳糖基的平面结构。HMBC 谱还显示了 H-1'/C-6 相关, 证明糖基连接在吩嗪母核的 C-6 位上。

化合物 **1** 的糖基的 ^1H 和 ^{13}C NMR 化学位移值与文献报道的 α -鼠李糖十分相近, 其端基质子与 H-

2' 有着较小的耦合常数 ($J = 0.9$ Hz), 其它糖基质子的耦合常数与文献报道类似^[12], 推断该六碳糖为 α -鼠李糖。化合物 **1** 经水解, 其水溶性部分的 CD 谱与 L-鼠李糖的 CD 谱具有相同的负 Cotton 效应曲线, 证实化合物 **1** 含有 α -L-鼠李糖^[13]。化合物 **1** 与 izuminoside A(2) 的结构十分相似, 仅缺少了 C-1 位的羧基。经检索, 化合物 **1** 为新化合物, 命名为 Izuminoside D。

化合物 **1** 的核磁及其它相关详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 (www.trcw.ac.cn)。

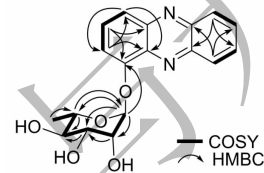


图 3 化合物 **1** 的 COSY 及 HMBC 相关示意图

Fig. 3 The key COSY and HMBC correlations of compound **1**

表 1 化合物 **1~3** 的 ^1H (700 MHz) 和 ^{13}C (175 MHz) NMR 数据

Table 1 Summary of ^1H (700 MHz) and ^{13}C (175 MHz) NMR data for compounds **1-3**

No.	1 ^a		2 ^a		3 ^b	
	δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)
1	129.8	8.29, dd (8.1, 1.7) °	130.2		130.6	
2	131.1	8.00, overlapped	133.8	8.49, d (8.2)	132.6	8.45, dd (8.7, 1.4)
3	130.9	8.00, overlapped	130.2	8.07, t (8.2)	132.7	7.96, overlapped
4	129.1	8.26, dd (8.2, 1.7)	132.9	8.49, d (8.2)	134.3	8.27, dd (6.9, 1.4)
4a	142.7		141.5		142.9	
5a	136.8		137.1		138.3	
6	151.4		151.5		153.0	
7	113.2	7.54, dd (6.5, 2.1)	113.5	7.61, dd (6.1, 2.4)	114.7	7.60, dd (7.6, 0.8)
8	131.3	7.90, overlapped	133.5	7.99, overlapped	133.6	7.88, dd (8.8, 7.6)
9	122.4	7.90, overlapped	121.6	8.01, overlapped	124.3	7.96, overlapped
9a	143.6		141.5		145.5	
10a	141.8		139.6		141.9	
COO			166.8		168.7	
OMe					53.2	4.08, s, 3H
1'	99.6	5.75, d (0.9)	99.6	5.79, br s	101.3	5.82, d (1.6)
2'	70.3	4.13, br s	70.1	4.15, dd (2.7, 1.6)	72.0	4.37, dd (3.5, 1.6)
3'	70.5	3.96, dd (9.4, 3.2)	70.2	3.97, dd (9.4, 3.4)	72.3	4.21, dd (9.5, 3.5)
4'	71.8	3.39, t (9.4)	71.8	3.40, t (9.4)	73.8	3.56, t (9.5)

续表 1

No.	1 ^a		2 ^a		3 ^b	
	δ_C	δ_H , multi. (J in Hz)	δ_C	δ_H , multi. (J in Hz)	δ_C	δ_H , multi. (J in Hz)
5'	70.0	3.68, dq (9.4, 6.2)	70.5	3.66, dq (9.4, 6.2)	71.3	3.82, dq (9.5, 6.2)
6'	17.9	1.12, d (6.2), 3H	17.9	1.13, d (6.2), 3H	18.1	1.25, d (6.2), 3H

注:^a以 DMSO-*d*₆ 为测试溶剂;^b以 CD₃OD 为测试溶剂;^c未标示的氢原子数目均为 1。

Note:^a Measured in DMSO-*d*₆; ^b Measured in CD₃OD; ^cThe integration of every ¹H NMR signal was 1H except those indicated as 3H.

化合物 2 黄色无定型粉末; (-)HR-ESI-MS 分析显示其在 m/z 421.079 7 出现 $[M + Cl]^-$ 峰, 在 m/z 807.190 9 出现 $[2M + Cl]^-$ 峰, 推测其可能的分子式为 C₁₉H₁₈N₂O₇, 较化合物 1 多出 CO₂ 单元。化合物 2 的 ¹H 及 ¹³C NMR 数据与化合物 1 数据十分相似(表 1), 说明 2 是吩嗪类化合物。与化合物 1 相比, 化合物 2 在低场处多出一个羰基碳信号 δ_C 166.8, 而缺失了一个苯环氢信号(δ_H 8.29), 结合其分子式, 说明苯环上存在 1 个羧基取代。以上数据与文献^[12]报道基本一致, 鉴定化合物 2 为 Izuminoside A。

化合物 3 黄色无定型粉末; 高分辨质谱分析显示其可能的分子式为 C₂₀H₂₀N₂O₇, 较化合物 2 多出 CH₂ 单元。对比发现, 化合物 3 的 ¹H 和 ¹³C NMR 数据(表 1)与化合物 1 及 2 的数据相类似, 除了羰基碳信号 δ_C 168.7 之外, 化合物 3 还多出一组甲氧基信号(δ_H 4.08, δ_C 53.2, OCH₃), 推测 C-11 位为羧酸甲酯取代, 以上数据与文献^[13]报道基本一致, 因此确认化合物 3 为 Solphenazine E。

化合物 4 黄色无定型粉末; (+)HR-ESI-MS 谱在 m/z 533.179 3 出现 $[M + H]^+$ 峰, 计算其可能的分子式为 C₂₅H₂₈N₂O₁₁。(表 2)与文献报道的 Solphenazine D 的数据相比较为一致^[13], 故推断其为 Solphenazine D。

化合物 5 黄色无定型粉末; (+)HR-ESI-MS 显示其分子式可能为 C₂₆H₂₈N₂O₁₂。化合物 5 的 ¹³C NMR 谱仅显示 13 个碳信号, 提示其可能为对称结构化合物。以上数据与文献^[13]报道基本一致, 推断其为 Solphenazine A。

化合物 6 黄色无定型粉末; (+)HR-ESI-MS 显示其分子式可能为 C₁₄H₁₀N₂O₃, 提示其不含有糖基。化合物 6 的 ¹H NMR 谱显示了 6 个芳氢信号, 以及一个甲氧基氢信号, 其 ¹³C NMR 谱揭示了一个羰基、12 个芳碳(含一个连氧芳碳)、以及一个甲氧基信号(表 1)。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 推断其结构为 6-羟基吩嗪-1-羧酸甲酯。

化合物 7 黄色无定型粉末; 负源电喷雾高分

辨质谱显示其准分子离子峰为 m/z 435.110 6 $[M - H]^-$, 结合 ¹³C NMR 谱数据, 推断其分子式为 C₂₅H₁₆N₄O₄。化合物 7 的核磁数据如下: ¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H : 8.57 (1H, m, H-2), 8.15 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-9), 8.09 (1H, m, H-3), 7.98 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-8), 7.49 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 7.28 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-4'), 7.09 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 5.09 (1H, t, $J = 4.9$ Hz, H-8'), 4.62 (1H, d, $J = 4.6$ Hz, H-9'), 4.40 (1H, t, $J = 4.4$ Hz, H-7'), 3.71 (1H, dd, $J = 18.0, 5.0$ Hz, H-6'), 3.08 (1H, d, $J = 16.9$ Hz, H-6')。 ¹³C NMR (175 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C : 166.2 (COOH), 153.9 (C-5a'), 153.3 (C-1'), 152.0 (C-9a'), 147.2 (C-7), 142.5 (C-4a), 142.3 (C-4a'), 140.6 (C-9a), 140.5 (C-6), 139.8 (C-5a), 139.2 (C-10a), 134.0 (C-2), 133.6 (C-4), 131.1 (C-10a'), 130.6 (C-3), 129.6 (C-3'), 128.8 (2 * C, C-1, C-9), 128.2 (C-8), 117.8 (C-4'), 111.7 (C-2'), 75.0 (C-8'), 55.1 (C-9'), 40.2 (C-7'), 31.9 (C-6')。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 因此确认化合物 7 为 Diastaphenazine。

2.3 抗真菌活性

琼脂法抗真菌测试结果显示化合物 1 在浓度为 50 μ g/mL 时, 对苹果腐烂病菌 (*V. mali*)、小麦赤霉病菌 (*G. sanbinetti*) 有微弱的抑制活性, 本研究未进一步测试其 MIC 值。化合物 1 对苦瓜枯萎病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *momordicae*)、玉米赤霉病菌 (*G. zae*)、番茄灰霉病菌 (*B. cinerea* Pers) 无生长抑制作用。

3 结论

Izuminoside D(1) 是首次报道的吩嗪类新化合物, 其结构与 izuminoside A(2) 及 solphenazine E(3) 较为相似, 但是缺少了 C-1 位的取代基。6-羟基吩嗪-1-羧酸甲酯(6) 虽为已知化合物^[14], 但未见文献报道其 NMR 数据, 我们首次报道了其 ¹H 和 ¹³C NMR

表2 化合物4~6的¹H (700 MHz)和¹³C (175 MHz) NMR数据
Table 2 Summary of ¹H (700 MHz) and ¹³C (175 MHz) NMR data for compounds 4-6

No.	4 ^a		5 ^a		6 ^b	
	δ _C	δ _H , multi. (J in Hz)	δ _C	δ _H , multi. (J in Hz)	δ _C	δ _H , multi. (J in Hz)
1	131.3		131.4		132.6	
2	134.3	8.37, dd (7.0, 1.3) ^c	134.1	8.41, dd (7.0, 1.1)	133.4	8.25, d (7.0)
3	130.2	8.05, dd (8.7, 7.0)	131.3	8.10, dd (8.7, 7.0)	130.1	7.93, dd (8.5, 7.0)
4	132.5	8.49, dd (8.7, 1.3)	134.1	8.55, dd (8.7, 1.1)	134.2	8.48, d (8.5)
4a	141.6		142.7		142.2	
5a	137.2		140.5		137.2	
6	151.8		131.4		154.8	
7	114.1	8.59, dd (7.7, 1.1)	134.1	8.41, dd (7.0, 1.1)	111.7	7.22, dd (7.2, 1.1)
8	133.5	7.96, dd (8.7, 7.6)	131.3	8.10, dd (8.7, 7.0)	133.9	7.80, dd (8.0, 7.2)
9	123.1	8.01, dd (8.7, 1.1)	134.1	8.55, dd (8.7, 1.1)	120.7	7.78, br d (8.0)
9a	144.1		142.7		145.5	
10a	140.4		140.5		142.1	
COO	165.6		165.3		168.9	
OMe					53.2	4.07, s, 3H
1'/1''	96.1/99.7	6.21/5.80, d (1.8)	96.2	6.20, d (1.6)		
2'/2''	70.5/70.0	3.94/4.16, br s	69.9	3.91, br s		
3'/3''	70.9/70.5	3.80/4.08, dd (9.4, 3.4)	70.7	3.78, dd (9.4, 3.1)		
4'/4''	72.1/70.7	3.43/3.42, overlapped	71.9	3.40, t (9.4)		
5'/5''	72.2/71.9	4.08/3.70, m	72.1	4.06, m		
6'/6''	18.5/18.4	1.13/1.27, d (6.2), 3H	18.5	1.25, d (6.2), 6H		

注:^a以 DMSO-d₆ 为测试溶剂;^b以 CD₃OD 为测试溶剂;^c未标示的氢原子数目均为 1。

Note:^a Measured in DMSO-d₆; ^b Measured in CD₃OD; ^c The integration of every ¹H NMR signal was 1H except those indicated as 3H.

数据以供参考。Izuminoside A (**2**) 最初是从放线菌 *Streptomyces* sp. IFM 11260 的发酵产物中分离到^[12], solphenazines E、D、A (**3** ~ **5**) 首次报道于放线菌 *Streptomyces* sp. strain DL-93 的发酵产物, solphenazine A 对人结肠癌细胞 HCT-116 具有中等强度的细胞毒性^[13]。Diastaphenazine (**7**) 是较为复杂的吩嗪二聚体结构, 最初来源于植物内生放线菌 *S. diastaticus* subsp. ardesiacus 的发酵产物, 具有弱的细胞毒活性和微弱的抗菌活性^[15], 目前天然的吩嗪二聚体较为少见^[16]。本研究从黑龙江漠河土壤放线菌 *S.nojiriensis* SCSIO m34-1 中分离到吩嗪类化合物 izuminosides A、D, solphenazines A、D、E、6-羟基吩嗪-1-羧酸甲酯, 以及 diastaphenazine, 为此类化合物的进一步开发利用提供了菌株资源。目前, 吩嗪二聚体的生物合成途径尚未见报道, 我们已经从该菌株中克隆得到了可能为吩嗪化合物的生物合成基因簇, 后续我们将进一步研究吩嗪单体及二聚体的生

物合成过程及其结构模块组装路线。

参考文献

- Laursen JB, Nielsen J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity [J]. *Chem Rev*, 2004, 104: 1663-1686.
- Blankenfeldt W, Parsons JF. The structural biology of phenazine biosynthesis [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, 29: 26-33.
- Guttenberger N, Blankenfeldt W, Breinbauer R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2017, 25: 6149-6166.
- Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics [J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 71-78.
- Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV, et al. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 866-879. (下转第 1705)