

土壤来源链霉菌 KIB-H91 次级代谢产物的分离鉴定

喻明明^{1,2}, 苏 灿², 马亚团², 颜一军², 黄胜雄^{2*}, 薛大权^{1*}¹湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065;²中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201

摘要: 利用硅胶柱层析和制备型高效液相色谱等方法从来自土壤的一株链霉菌 *Streptomyces* sp. KIB-H91 的发酵液中分离得到 4 种醌类化合物, 通过分析其理化性质和波谱数据, 分别鉴定为 endocrocin (1)、laccic acid D (2)、sarubicin A (3) 和 sarubicin B (4), 其中 sarubicin B (4) 的 ¹³C 和 HMBC 核磁数据为本文首次报道。抗菌敏感性试验发现化合物 3 对大肠杆菌 ATCC 8099 的最小抑制浓度 (MIC) 为 25 μg/mL, 化合物 4 对枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 的最小抑制浓度为 12.5 μg/mL。

关键词: 链霉菌; 次级代谢产物; 抗生素; 醌类

中图分类号: R914.4; R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.06.011

Isolation and Identification of the Secondary Metabolites from a Soil-derived *Streptomyces* sp. KIB-H91YU Ming-ming^{1,2}, SU Can², MA Ya-tuan², YAN Yi-jun², HUANG Sheng-xiong^{2*}, XUE Da-quan^{1*}¹Hubei University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Chinese Medical Resources & Compound Prescription, Wuhan 430065, China; ²State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant

Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: Four quinone natural products endocrocin (1), laccic acid D (2) and sarubicins A and B (3 and 4) were isolated from the soil-derived actinomycete *Streptomyces* sp. KIB-H91. Their structures were elucidated on the basis of spectroscopic evidence and comparison with literature reports. Among them, the ¹³C NMR and HMBC data of compound 4 was reported for the first time in this paper. Sarubicins A and B were the main antimicrobial components with MIC values of 25 μg/mL for 3 against *Escherichia coli* ATCC 8099 and of 12.5 μg/mL for 4 against *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Key words: *Streptomyces*; secondary metabolites; antibiotics; quinones

微生物次级代谢产物是天然产物研究的重要组成部分, 不仅因为其庞大的数量和结构的多样性, 更因为其中许多化合物都具有一定的生物活性。据统计, 天然产物总量一半左右来源于微生物, 且抗生素中约 70% 的化合物由放线菌产生^[1]。虽然近年来由于抗生素耐受问题的出现, 抗生素药物的研发趋向于停滞, 但是市场对于新颖抗菌药物尤其是抑制革兰氏阴性菌药物的需求仍然极为迫切^[2]。天然产物家族中, 醌类化合物大多具有抗氧化和抗肿瘤活性。迄今为止, 已经上市的醌类药物有丝裂霉素、艾地苯醌、塞曲司特等。其中丝裂霉素就是一种由头状链霉菌分泌的抗生素, 一直以来被用于胃癌、肝

癌、胰腺癌等癌症的治疗^[3]。

本研究从云南昆明植物园采集的土壤样本中分离得到一株链霉菌, 命名为 *Streptomyces* sp. KIB-H91。在前期的发酵液活性筛选实验中, 我们发现其发酵液提取物有明显的抑菌活性。因此, 我们选取该菌株进行大量发酵并对发酵液中的次级代谢产物进行提取分离, 最终得到了 4 个主要化合物。通过分析其理化性质和波谱数据, 分别将其鉴定为 endocrocin (1)、laccic acid D (2)、sarubicin A (3) 和 sarubicin B (4) (见图 1), 其中化合物 3 和 4 显示较好的抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Bruker AvanceIII-600 MHz 型核磁共振仪; Bruker

收稿日期: 2015-02-12 接受日期: 2015-05-07

* 通讯作者 Tel: 86-27-68890113; E-mail: hxr111@126.com; sxhuang@mail.kib.ac.cn

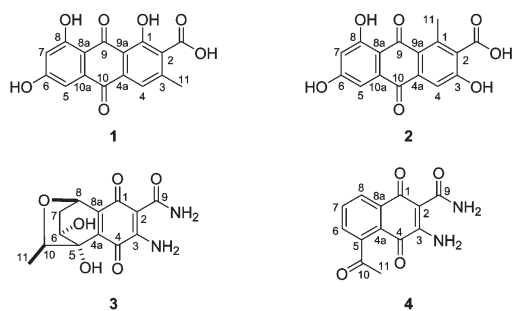


图1 化合物1~4的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-4

AV-400 型核磁共振仪; Waters Xevo TQ-S 型超高压液相三重四极杆联用质谱仪; XRC-1 型熔点仪(四川大学科学仪器厂生产); LC3000 型高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司生产); Hitachi Chromaster 5430 型高效液相色谱仪; YMC-Triat C18 型液相色谱柱(250 × 10 mm I. D.); 柱层析硅胶 G, 200 ~ 300 目(青岛海洋化工厂生产); 柱层析硅胶 RP18, 230 ~ 400 目(德国 EMD 化学试剂公司生产); 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 发酵菌株

发酵菌株 *Streptomyces* sp. KIB-H91 为从昆明植物园(东经 102°45', 北纬 25°9') 采集的土壤样本中分离得到, 通过 16S RNA 测序分析, 确定其为链霉菌属(经比对与已知链霉菌 *Streptomyces lienomycinii* HBUM174506 相似性为 100%)。菌株保存在昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室。

1.3 培养基及培养条件

固体培养基: 为 MS 培养基, 配方为大豆粉 20 g/L(煮沸过滤取滤液), 甘露醇 20 g/L, 技术琼脂粉 20 g/L, pH = 7.0。

种子培养基: 为 TSB 培养基, 配方为胰蛋白胨 17 g/L, 大豆蛋白胨 3 g/L, 氯化钠 5 g/L, 磷酸氢二钾 2.5 g/L, 右旋葡萄糖 2.5 g/L, pH = 7.3 ± 0.2。

发酵培养基: 大豆蛋白胨 6 g/L, 右旋葡萄糖 5 g/L, 可溶性淀粉 20 g/L, 碳酸钙 2 g/L, pH = 7.0。

将在 MS 平板上活化好的菌株接种到 20 只装有 50 mL 种子液的 250 mL 三角瓶中, 置于 27 °C, 250 rpm 摇床上培养 2 d。

将种子液按 10% 接种量转接到 40 只盛有 250 mL 发酵培养基的 1 L 三角瓶中, 置于 27 °C, 250 rpm 摇床上培养 5 d。

1.4 提取与分离

将发酵液收集, 于 6000 rpm 转速下离心 20 min。上清液用等体积的乙酸乙酯萃取三次; 菌丝体用 500 mL 丙酮浸泡过夜后过滤。合并乙酸乙酯与丙酮相, 用无水硫酸钠干燥, 有机相减压浓缩, 得到 3.1 g 粗提物。粗提物经硅胶柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯(100:0, 50:50, 0:100) 及乙酸乙酯-甲醇(50:50) 梯度洗脱, 共得到 4 个组分(F1 ~ F4)。用 HPLC 分析极性段 F2 的成分(见图 2), 分析方法为: 10% ~ 100% 甲醇-水梯度洗脱 20 min, 第 21 ~ 25 min 再用 100% 甲醇等度洗脱, 之后用 10% 甲醇-水等度洗脱 3 min 结束; 柱温箱恒定在 28 °C, 检测器为 DAD 检测器。F2 经反相硅胶柱层析, 用甲醇-水(20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0) 梯度洗脱, 得到 5 个极性段(F2-1 ~ F2-5)。其中 F2-3 经高效液相色谱制备, 用 18% 甲醇-水等度洗脱, 得到两个化合物, 分别是 1(6.1 mg) 和 3(11.8 mg)。F2-4 也用 HPLC 制备, 以 30% 甲醇-水为流动相, 洗脱得到化合物 2(4.9 mg) 和 4(5.5 mg)。

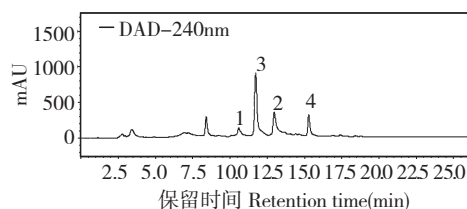


图2 极性段 F2 的高效液相色谱分析结果

Fig. 2 HPLC chromatogram of F2 fraction

1.5 抗菌敏感性试验

按照美国临床与实验室标准研究所(CLSI)出版的有关规程操作^[4], 采用微量稀释法测定化合物 1~4 对大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 8099)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 6633) 和斜卧青霉(*Penicillium decumbens* ATCC 10436) 四种病原菌的最小抑制浓度(MIC)。试验中, 每个化合物分别配制成 800、400、200、100、50、25、12.5、6.25 (μg/mL) 八个稀释浓度, 并以制霉菌素为阳性对照, 加入等体积 50% DMSO-无菌水的孔为阴性对照, 不接菌悬液的孔为空白对照。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 黄色粉末; 分子式为 C₁₆H₁₀O₇; ESI-

MS m/z : 313 $[M-H]^-$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 13.12 (1H, s, 1-OH), 11.12 (1H, brs, COOH), 7.56 (1H, s, H-4), 7.03 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.55 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 2.56 (3H, s, ArCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 188.9 (C-9), 182.1 (C-10), 168.3 (COOH), 165.6 (C-6), 165.2 (C-8), 158.2 (C-1), 143.1 (C-3), 135.1 (C-4a), 133.1 (C-10a), 130.4 (C-2), 121.5 (C-4), 113.2 (C-9a), 110.3 (C-8a), 109.4 (C-5), 108.2 (C-7), 19.8 (ArCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 确定化合物 **1** 为 endocrocin。

化合物 **2** 红褐色粘稠固体; 分子式为 C₁₆H₁₀O₇; ESI-MS m/z : 313 $[M-H]^-$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 13.57 (1H, s, 8-OH), 10.95 (1H, brs, COOH), 7.26 (1H, s, H-4), 7.12 (1H, brs, 6-OH), 7.01 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.56 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 3.01 (3H, s, ArCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 188.1 (C-9), 183.0 (C-10), 169.6 (COOH), 169.5 (C-3), 164.4 (C-6), 163.5 (C-8), 148.3 (C-1), 136.2 (C-10a), 134.2 (C-4a), 125.3 (C-2), 119.6 (C-9a), 114.9 (C-4), 110.9 (C-8a), 108.5 (C-7), 106.4 (C-5), 20.5 (ArCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[6], 确定化合物 **2** 为 laccic acid D。

化合物 **3** 红色针晶 (CH₃OH); mp. 196 ~ 199

°C; 分子式为 C₁₃H₁₄N₂O₆; ESI-MS m/z : 293 $[M-H]^-$; 1H NMR (methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 4.93 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-8), 3.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 3.63 (1H, q, $J = 6.4$ Hz, H-10), 2.60 and 1.34 (each 1H, m, H₂-7), 0.96 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 204.1 (C-10), 180.4 (C-1 and C-4), 170.3 (C-9), 155.1 (C-3), 142.8 (C-5), 135.7 (C-7), 133.9 (C-8a), 129.3 (C-6), 127.2 (C-8), 126.3 (C-4a), 99.7 (C-2), 30.6 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 确定化合物 **3** 为 sarubicin A。

化合物 **4** 黄色针晶 (CH₃OH); mp. 284 ~ 285 °C; 分子式为 C₁₃H₁₀N₂O₄; ESI-MS m/z : 257 $[M-H]^-$; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.82 (1H, s, 3-NH_a), 9.08 (1H, s, CONH_a), 8.31 (1H, s, 3-NH_b), 8.16 (1H, dd, $J = 4.2$ Hz, H-8), 7.93 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-7), 7.56 (1H, overlapped, H-5), 7.56 (1H, overlapped, CONH_b), 2.44 (3H, s, H₃-11); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 182.6 (C-1), 180.2 (C-4), 172.3 (C-9), 155.3 (C-3), 149.2 (C-4a), 135.6 (C-8a), 99.0 (C-2), 79.8 (C-5), 73.6 (C-10), 72.2 (C-6), 63.5 (C-8), 37.6 (C-7), 17.1 (C-11)。其 1H 核磁数据与文献报道基本一致^[8], 且 HMBC 相关信号 (见表 1) 也验证了化合物 **4** 的结构为 sarubicin B。

表 1 化合物 **3** 和 **4** 的核磁信号归属

Table 1 1H and ^{13}C NMR data of compounds **3** and **4**

原子编号 Position	3 ^a		4 ^b		
	δ_C	δ_H mult J in Hz	δ_C	δ_H mult J in Hz	HMBC
1	182.6		180.4		
2	98.1		99.7		
3	155.3		155.1		
4	180.2		180.4		
4a	149.2		126.3		
5	79.8		142.8		
6	72.2	3.82, 1H, d, 8.0	129.3	7.56, 1H, overlapped	4a, 5, 8, 10
7	37.6	1.34, 1H, d, 14.8, 2.60, 1H, m	135.7	7.93, 1H, t, 6.0	5, 6, 8a
8	63.5	4.93, 1H, t, 3.6	127.2	8.16, 1H, dd, 4.2, 6.0	1, 4a, 6
8a	135.6		133.9		
9	172.3		170.3		
10	73.6	3.63, 1H, q, 6.4	204.1		
11	17.1	0.96, 3H, d, 6.4	30.6	2.44, 3H, s	5, 10

Exchangeable protons	7.56 overlapped CONH _a
	9.08 s CONH _b
	8.31 s NH _a
	10.82 s NH _b

^aData were measured in methanol-*d*₄; ^bData were measured in DMSO-*d*₆.

2.2 化合物抗菌活性

抗菌敏感性试验结果显示 4 个化合物均对金黄色葡萄球菌和斜卧青霉没有抑制作用; 化合物 3

对大肠杆菌 ATCC 8099 的 MIC 值为 25 μg/mL ,化合物 4 对枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 的 MIC 值为 12.5 μg/mL ,表现出很好的抑菌效果(见表 2)。

表 2 化合物 1~4 的抗菌活性

Table 2 The antimicrobial activities of compounds 1-4

化合物 Compounds	Minimum Inhibitory Concentration (μg/mL)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium decumbens</i>
1	>800	>800	>800	>800
2	>800	>800	>800	>800
3	25	>800	>800	>800
4	>800	>800	12.5	>800
Nystatin	6.25	6.25	6.25	6.25

3 讨论

本文分离得到的 4 个代谢产物中 ,化合物 2 是最初从紫梗原虫胶中分离的一种色素^[9] ,其后在植物及真菌中均有发现 ,但其正确核磁数据直到 2006 年才由 Usama 等人给出^[6]。我们对其 HSQC 和 HMBC 解析的结果 ,也与 Usama 等人报道的结构一致。化合物 4 由 Eckardt 等人在 1982 年首次分离 ,但一直未有碳谱和二维核磁数据的报道^[10]。通过初步的抗菌敏感性试验 ,我们发现化合物 3 和 4 是链霉菌 *Streptomyces* sp. KIB-H91 次级代谢产物中的主要活性物质。这两个化合物都具有一个 3-氨基-1,4-苯醌-2-甲酰胺单元 ,在天然抗生素中结构十分独特。从生源途径看 ,可以认为 sarubicin B(4) 是由 sarubicin A(3) 脱去两分子水得来。我们首次从同一株链霉菌中分离得到这两个化合物 ,也从侧面验证了它们在生物合成上的联系。

参考文献

1 Bérdy J. Bioactive microbial metabolites ,a personal view. *J Antibiot* 2005 58: 1-26.
2 Mark SB ,Mark AB ,Matthew AC. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot* 2013 66: 571-591.
3 Huang JQ (黄健强) ,Mao YQ (毛应清) ,Yang YL (杨蕴

刘) . Research and perspective on mitomycin. *World Notes on Antibiotics* (国外医药抗生素分册) ,1999 20: 37-42.
4 Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. Wayne ,PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012 32: 2.
5 Chiang YM ,Szewczyk E ,Davidson AD *et al.* Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenonegene cluster. *Appl Environ Microbiol* 2010 76: 2067-2074.
6 Usama WH ,Mohamed AE ,Hartmut L. A new α-methylanthraquinoneglucoside from *Emex spinosus*. *Nat Prod Res* , 2006 20: 742-747.
7 Tresselt D ,Eckardt K ,Jhn W *et al.* Antibiotics from actinomycetes chemical constitution of antibiotic sarubicin A. *Tetrahedron* ,1981 37: 1961-1965.
8 Tresselt D ,Eckardt K ,Jhn W *et al.* The chemical structure of antibiotic sarubicin B. *Zeitschrift für Chemie* ,1983 23: 217-218.
9 Mehendale AR ,Rama AV ,Shaikh IN *et al.* Desoxyerythro-laccin and laccic acid D. *Tetrahedron Lett* ,1968 9: 2231-2234.
10 Eckardt K ,Tresselt D ,Jhn W *et al.* Sarubicin B ,a new quinoneantibiotic isolated from the fermentation broth of a *Streptomyces* strain. *J Antibiot* ,1982 35: 1638-1640.