

东海微生物中 6 种环二肽类天然活性物质的分离和鉴定

艾 峰, 许强芝, 杨 妤, 刘小宇, 施晓琼, 宋志刚, 焦炳华*

(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 从海洋微生物中寻找天然活性物质。方法: 利用稻瘟霉作为菌株筛选模型, 对筛选出来的活性菌株 F8712 发酵液的醋酸乙酯提取物进行化合物分离; 通过¹H NMR、¹³C NMR 和 ESI-MS 对化合物进行结构鉴定。结果和讨论: 鉴定了 6 个环二肽类化合物, 它们分别为环[Ala-Leu](I), 环[Ala-Ile](II), 环[Val-Pro](III), 环[Leu-Pro](IV), 环[Ile-Pro](V) 和环[Leu-Val](VI)。这些环二肽都没有抗稻瘟霉活性, 化合物 V 对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)具有较强的抑制能力, 其 MIC 为 0.07 μg/ml。

[关键词] 环二肽; 海洋生物学; 稻瘟霉; 鳃弧菌

[中图分类号] R 282.77 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)01-0022-03

Bioactive cyclodipeptides extracted from marine microbes in East China Sea

AI Feng, XU Qiang-zhi, YANG Yu, LIU Xiao-yu, SHI Xiao-qiong, SONG Zhi-gang, JIAO Bing-hua* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Objective: To search for bioactive compounds from marine microbes. Methods: *Pyricularia oryzae* was used to screen microbes. Compounds extracted with EtOAc from the fermentation broth of F8712 strain (an active microbe screened out) were separated. The chemical structures of the separated compounds were identified by ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-MS techniques. Results: Six cyclic dipeptides, cyclo(Ala-Leu), cyclo(Ala-Ile), cyclo(Ile-Pro), cyclo(Val-Pro), cyclo(Leu-Pro) and cyclo(Leu-Val), were obtained. Conclusion: None of the 6 cyclodipeptides has any anti-*Pyricularia oryzae* activities. Compound V has potent inhibitory effects on *Vibrio anguillarum* with a minimum inhibitory concentration of 0.07 μg/ml.

[KEY WORDS] cyclodipeptide; marine biology; *Pyricularia Oryzae*; *Vibrio anguillarum*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1): 22-24]

在陆地资源日益贫乏的今天, 海洋资源越来越受到人们的关注。海洋也以其低温、高压、寡营养、高盐等独特的环境使得生活于其中的微生物产生出结构新颖多样、活性独特的天然产物。每年都有大量的海洋微生物代谢产物被分离出来, 其中许多有较好的生物学活性, 尤以抗肿瘤及抗菌活性为多。日本学者岩崎成夫利用稻瘟霉的分生孢子或菌丝生长异常(卷曲、末端膨大、抑制等)作为指标, 成功筛选了多个抗真菌、抗肿瘤的化合物, 其中 rhizoxin 已被成功开发为新药^[1,2]。

本研究利用这一模型, 对从中国东海海水中分离得到的海洋微生物单菌培养液进行活性筛选, 对其中 1 株具有较强活性的细菌 F8712 模拟海洋环境进行了大规模发酵, 发现该发酵液对稻瘟霉分生孢子有很强的抑制和诱导变形作用, 其最小诱导变形浓度为 1/256 倍。对该发酵液代谢产物进行分离, 先期得到了 8 个化合物。利用 ¹H NMR、¹³C NMR、ESI-MS 等方法鉴定了其中 6 个化合物的结构, 它们均为环二肽, 并对这 6 个化合物进行了稻瘟霉和鳃弧菌活性测定。

化合物 I ~ VI 的结构如图 1。

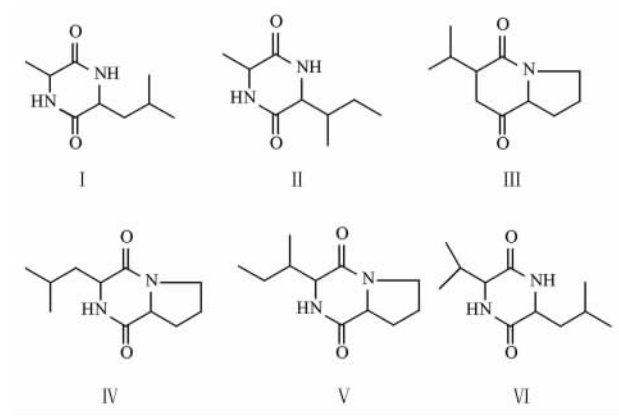


图 1 化合物 I ~ VI 的结构

Fig 1 Structures of compound I - VI

I: 3-isobutyl-6-methylpiperazine-2, 5-dione; II: 3-sec-butyl-6-methylpiperazine-2, 5-dione; III: 3-isopropyl-hexahydropyrrolo[1, 2-α] pyrazine-1, 4-dione; IV: 3-isobutyl-hexahydropyrrolo[1, 2-α] pyrazine-1, 4-dione; V: 3-sec-butyl-hexahydropyrrolo[1, 2-α] pyrazine-1, 4-dione; VI: 3-isobutyl-6-isopropylpiperazine-2, 5-dione

[基金项目] 上海市优秀学科带头人计划(05XD1423). Supported by Shanghai Outstanding Field Leaders Program(05XD1423).

[作者简介] 艾 峰, 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: jiaobh@mail.uninet.com.cn

1 材料和方法

1.1 仪器和材料 Agilent 1100 高效液相仪, STUART SMP11 熔点测定仪, Bruke-300 核磁共振仪, Micro-Mass Q-TOF 质谱仪。稻瘟霉由日本东京大学分子生物学研究所提供。选择性培养基: 葡萄糖 10 g, 酵母膏 10 g, 牛肉膏 0.4 g, 蛋白胨 4 g, pH 6.0, 海水 1 000 ml, 固体平板含 2% 琼脂。

1.2 目的菌株的筛选分离 采自中国东海离岸 65 km 范围海域的海水样品逐步稀释涂布选择性培养基平板, 然后反复挑选单菌落, 纯化后的菌落培养于同样配方的人工海水液体培养基中进行活性筛选, 得到目的菌株 F8712。

1.3 目的菌株的发酵 将培养 4 d 的发酵液(100 ml 摇瓶, 20 ml 发酵液) 5 000 r/min 离心 10 min, 过滤除去菌体, 对滤液进行稻瘟霉模型检测, 选取最小抑制(变形)稀释倍数在 100 倍以上的作为研究对象。利用该方法, 将最小活性浓度为 1/256 的 F8712 确定为活性成分分离对象。扩大摇瓶(2 000 ml 摇瓶, 400 ml 发酵液)发酵后的 F8712 发酵液同样进行稻瘟霉活性跟踪, 发现大批发酵后仍能保证活性。

1.4 目的菌株化合物的分离和鉴定 将大批发酵后得到的 30 L F8712 发酵液) 5 000 r/min 离心 10 min, 上清依次用等体积乙酸乙酯、正丁醇分别萃取 3 次, 减压蒸干回收, 分别得到乙酸乙酯浸膏 10.3 g 和正丁醇浸膏 48.2 g。对乙酸乙酯浸膏经反复硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇梯度洗脱, 然后通过 HPLC ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 20\% \sim 40\%$, Agilent ZORBAX Extend C18 柱, 4.6 mm $\times$ 250 mm) 纯化制备, 先期得到了 8 个化合物。利用核磁共振和质谱等技术, 结合物理及化学方法, 鉴定出了其中 6 个化合物的结构, 并对这 6 个化合物进行了稻瘟霉和鳗弧菌活性测定。

2 结 果

2.1 化合物 I ~ VI 的结构鉴定 化合物(I): 白色粉末, m. p. 231~233 $^{\circ}\text{C}$, ESI(m/z): 185(M+H), 207(M+Na), 确定相对分子质量为 184。 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD , δ) 4.0(1H, q, $J=1.2$ Hz), 3.98(1H, dd, $J=5.8, 7.0$ Hz), 1.73(2H, m), 1.45(3H, d, $J=7.3$ Hz), 1.63(1H, m), 0.98(3H, d, $J=5.5$ Hz), 0.96(3H, d, $J=5.1$ Hz)。DEPT ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD , δ) 171.5(s), 170.9(s), 54.8(d), 52.1(d), 45.3(t), 25.4(q), 24.0(d), 22.4(q), 21.5(q)。从 DEPT 谱 δ 171.5(s), 170.9(s) 看有 2 个酰

胺羰基, 综合氢谱和碳谱, 推测分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$, 氮原子上的活泼氢信号可能因为溶剂被掩盖, 从而不难推断该化合物为环[Ala-Leu]。经文献查阅, 核磁共振图谱与文献^[3,4]基本一致, 故该化合物鉴定为 3-isobutyl-6-methylpiperazine-2, 5-dione。

化合物(II): 白色粉末, m. p. 233~234 $^{\circ}\text{C}$, ESI(m/z): 185(M+H), 207(M+Na), 确定相对分子质量为 184, 可能为化合物 I 的异构体, 分子式 $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD , δ) 4.03(1H, q, $J=1.4$ Hz), 3.91(1H, dd, $J=2.0, 4.7$ Hz), 1.96(1H, m), 1.54(1H, m), 1.25(1H, m), 1.42(3H, d, $J=6.9$ Hz), 1.02(3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.96(3H, t, $J=7.5$ Hz)。DEPT ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD , δ) 171.6(s), 169.6(s), 61.3(d), 52.1(d), 40.6(d), 26.0(t), 21.5(q), 16.0(q), 12.7(q)。有了第一个化合物鉴定的经验, 容易确定化合物 II 为环[Ala-Ile]。经文献查阅, 核磁共振图谱与文献^[4]基本一致, 故该化合物鉴定为 3-sec-butyl-6-methylpiperazine-2, 5-dione。

化合物(III): 白色粉末, m. p. 185~187 $^{\circ}\text{C}$, ESI(m/z): 197(M+H), 219(M+Na), 确定相对分子质量为 196。 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD , δ) 4.2(1H, m), 4.04(1H, m), 1.98(1H, m), 3.51(2H, m), 1.97(1H, m), 2.5(1H, m), 2.35(1H, m), 1.95(2H, m), 1.1(3H, d, $J=7$ Hz), 0.94(3H, d, $J=6.9$ Hz)。DEPT ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD , δ) 173.1(s), 168.0(s), 61.9(d), 60.5(d), 50.3(d), 46.6(t), 30.3(d), 29.99(t), 23.7(t), 19.3(q), 17.1(q)。核磁共振图谱与前面化合物类似, 推测该化合物分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$, 较化合物 I 和 II 多一不饱和度, 不难推断其结构为环[Val-Pro]。经文献查阅, 核磁共振图谱与文献^[5~9]基本一致, 故该化合物鉴定为 3-isopropyl-hexahydropyrrolo [1, 2- α] piperazine-1, 4-dione。

化合物(IV): 白色粉末, m. p. 158~160 $^{\circ}\text{C}$, ESI(m/z): 211(M+H), 233(M+Na), 确定相对分子质量为 210。 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD , δ) 4.25(1H, m), 4.12(1H, m), 3.51(2H, m), 2.0(2H, m), 2.1(1H, m), 2.35(1H, m), 1.95(2H, m), 0.96(3H, d, $J=2$ Hz), 1.5(1H, m), 2.0(1H, m), 0.94(3H, d, $J=1.5$ Hz)。DEPT ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD , δ) 172.2(s), 168.3(s), 60.2(d), 54.5(d), 46.5(t), 39.3(t), 29.0(t), 25.6(t), 23.8(q), 23.7(t), 22.4(q)。核磁共振图谱与化合物 III 类似, 相对分子质量较之多 14, 刚好是一个 CH_2 , 推测该化合物分子式

为 $C_{11}H_{18}N_2O_2$, 鉴定其结构为环[Leu-Pro]。经文献查阅,核磁共振图谱与文献^[5]基本一致,故该化合物鉴定为 3-isobutyl-hexahydropyrrolo [1, 2- α] pyrazine-1,4-dione。

化合物(V): 白色粉末, m. p. 161~163℃, ESI (m/z): 211(M+H), 233(M+Na), 确定相对分子质量为 210, 可能为化合物IV的异构体。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 6.28 (1H, br, s), 4.06 (1H, m), 3.95 (1H, m), 3.5 (2H, m), 2.3 (2H, m), 2.05 (2H, m), 1.9 (1H, m), 1.41 (1H, m), 1.16 (1H, m), 1.05 (3H, d, $J = 7$ Hz), 0.91 (3H, d, $J = 2.6$ Hz)。DEPT ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ) 170.1 (s), 165.1 (s), 60.5 (d), 58.8 (d), 45.0 (t), 35.3 (d), 28.5 (t), 24.0 (t), 22.3 (t), 15.7 (q), 12.1 (q)。核磁共振图谱与化合物IV类似, 分子式为 $C_{11}H_{18}N_2O_2$, 鉴定其结构为环[Ile-Pro]。经文献查阅,核磁共振图谱与文献^[6]完全一致,均为 D 构型的氨基酸组成,即环[D-Ile-D-Pro], 故该化合物鉴定为 3-sec-butyl-hexahydropyrrolo [1, 2- α] pyrazine-1,4-dione。

化合物(VI): 白色粉末, m. p. 262~264℃, ESI (m/z): 213(M+H), 235(M+Na), 确定相对分子质量为 212。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, δ) 4.0 (1H, m), 3.9 (1H, m), 1.64 (1H, m), 2.41 (1H, m), 1.89 (2H, m), 1.06 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 1 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.96 (3H, d, $J = 6$ Hz), 0.94 (3H, d, $J = 5.6$ Hz), 6.38 (1H, br, s), 6.6 (1H, br, s)。DEPT ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, δ) 168.8 (s), 167.3 (s), 60.2 (d), 53.0 (d), 43.7 (d), 31.5 (t), 24.2 (d), 23.3 (q), 21 (q), 18.8 (q), 16.4 (q)。核磁共振图谱与化合物 I ~ V 类似, 推测该化合物分子式为 $C_{11}H_{20}N_2O_2$, 结构为环[Leu-Val]。经文献查阅,核磁共振图谱与文献^[10~12]基本一致,故该化合物鉴定为 3-isobutyl-6-isopropylpiperazine-2,5-dione。

2.2 活性测定结果 在我们的实验中,尽管 F8712 菌株发酵液总体对稻瘟霉有较高活性,经稻瘟霉检测乙酸乙酯浸膏和正丁醇浸膏的最小活性浓度分别为 7.8 μ g/ml 和 0.98 μ g/ml,但分离得到的这 6 个化合物都没有表现出对稻瘟霉的抑制及引起变形作用。通过对这些化合物进一步的抗菌活性测定,发现化合物 V 对鳗弧菌具有较好的抑制作用,其 MIC 为 0.07 μ g/ml。

3 讨论

本研究首次对中国东海海域海水进行微生物分离,并利用稻瘟霉进行活性菌株筛选,从其中 1 株里

面进行了化合物分离,得到了 6 个环二肽类化合物。环二肽在化学上属于二酮哌嗪类化合物,对环二肽类天然物质的发现最早见诸中草药成分的提取物,近几年在海洋微生物的研究中也屡有发现^[13]。环二肽类化合物在我们分离得到的 8 个化合物中占有相当的比例,推测环二肽对海洋微生物的生命活动一定有着其他更重要的意义。鳗弧菌是水产养殖中危害最大的病原菌之一,化合物 V 对鳗弧菌具有较好的抑制作用,表明此类化合物在水产养殖方面的开发前景值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Takahashi M, Iwasaki S, Kobayashi H, et al. Studies on macrocyclic lactone antibiotics XI antibiotic and anti-tubulin activity of the new antitumor antibiotics, rhizoxins and its homologues [J]. J Antib, 1987, 40: 66-70.
- [2] Kobayashi H, Sunaga R, Furihata K, et al. Isolation and structures of an antifungal antibiotics, fusarielin A, and related compounds produced by a *Fusarium* sp. [J]. J Antib, 1995, 48: 42-45.
- [3] 丁中涛, 周俊, 谭宁华. 金铁锁中的四个环二肽[J]. 中草药, 2000, 31: 803-805.
- [4] 秦文娟, 孔庆芬, 范志同, 等. 掌叶半夏化学成分的研究(III) [J]. 中草药, 1984, 15: 11-15.
- [5] Schmitz FJ, Vanderah DJ, Hollenbeak KH, et al. Metabolites from the marine sponge *tedania ignis*. A new atisanediol and several known diketopiperazines [J]. J Org Chem, 1983, 48: 3941-3945.
- [6] Fdhila F, Vazquez Z, Sanchez JL, et al. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *pectin maximus* [J]. J Nat Prod, 2003, 66: 1299-1301.
- [7] Kwon OS, Park SH, Yun B, et al. Cyclo(D-Pro-L-Val), a specific β -glucosidase inhibitor produced by *Aspergillus* sp. F70609 [J]. J Antib, 2001, 54: 179-181.
- [8] Barrow CJ, Sun HH. Spiroquinazoline, a novel substance inhibitor with a new carbon skeleton, isolated from *aspergillus flavipes* [J]. J Nat Prod, 1994, 57: 471-476.
- [9] Giralt E, Eritja R, Josa J, et al. The use of Nbb resin in cyclic dipeptide ("diketopiperazine") synthesis [J]. Synthesis, 1985: 181-184.
- [10] Pickenhagen W, Dietrich P, Keil B, et al. Identification of the bitter principle of cocoa [J]. Helvetica Chimica Acta, 1975, 58, 1078-1086.
- [11] Suzuki K, Sasaki Y, Endo N, et al. Acetic acid-catalyzed diketopiperazine synthesis [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29: 233-237.
- [12] Nitecki DE, Halpern B, Westley JW. A simple route to sterically pure diketopiperazines [J]. J Org Chem, 1968, 33: 864-866.
- [13] 林永成, 周世宁. 海洋微生物及其代谢产物 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 86.

[收稿日期] 2005-11-02

[修回日期] 2005-12-19

[本文编辑] 尹茶