

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01234

## 海洋芽孢杆菌次生代谢产物的分离、鉴定及生物学活性的初步研究

韩文菊, 卢小玲, 许强芝, 刘小宇, 焦炳华\*

第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

**[摘要]** 目的: 开发药用海洋微生物资源, 从微生物代谢产物中获取活性物质。方法: 利用硅胶柱、凝胶柱、高效液相等色谱技术对抗菌模型筛选到的活性菌株 F81612 发酵液的乙酸乙酯浸膏进行分离, 通过<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 MS 对化合物进行结构鉴定, 利用纸片法和四甲基偶氮唑盐比色法对单体化合物进行生物学活性评价。结果和结论: 分离鉴定了 11 个化合物, 它们分别为: macrolactin A (1), 3-羟基乙酰基吲哚 (2), 3-吲哚乙醇 (3), 环(色-脯)二肽 (4), 环(异亮-色)二肽 (5), 环(亮-脯)二肽 (6), 环(亮-缬)二肽 (7), 环(异亮-脯)二肽 (8), 环(苯丙-缬)二肽 (9), N-苯乙酰乙酰胺 (10), 对羟基苯甲醛 (11)。化合物 1 为主要活性成分, 对稻瘟霉、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 值分别为 3.6、0.45 和 6.3 μg/ml, 对肿瘤细胞株 HeLa 及 HepG<sub>2</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 2.0 和 1.8 μg/ml。

**[关键词]** 海洋芽孢杆菌; 次生代谢产物; 生物学活性

**[中图分类号]** R 931.77

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2008)10-1234-05

### Isolation, identification and biological characterization of secondary metabolites produced by a marine *Bacillus subtilis*

HAN Wen-ju, LU Xiao-ling, XU Qiang-zhi, LIU Xiao-yu, JIAO Bing-hua\*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To exploit marine microorganisms and study their secondary metabolites for new drugs. **Methods:** An antibacterial model was used to screen for active strains. The ethyl acetate (EtOAc) extract was separated by silica chromatography, gel filtration chromatography, and high-performance liquid chromatography. The structures of the compounds were elucidated by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and MS technologies; Kirby-Bauer Disc Diffusion method and MTT method were employed to detect the biological activities of the separated compounds. **Results:** Eleven compounds were separated and identified as macrolactin A (1), 3-Hydroxyl acetyl-indole (2), 3-indolethanol (3), cyclo-(Try-Pro) (4), cyclo-(Ile-Try) (5), cyclo-(Leu-Pro) (6), cyclo-(Leu-Val) (7), cyclo-(Ile-Pro) (8), cyclo-(Phe-Val) (9), N-phenethylacetamide (10), P-hydroxy benzaldehyde (PHB) (11). **Conclusion:** Compound 1 shows strong inhibitory activities against *Pyricularia oryzae*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (with MIC values being 3.6, 0.45 and 6.3 μg/ml, respectively), and tumor cell lines HeLa and HepG<sub>2</sub> (with the IC<sub>50</sub> values being 2.0 and 1.8 μg/ml, respectively).

**[KEY WORDS]** marine *Bacillus sp.*; secondary metabolites; biological activities

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1234-1238]

人类对于微生物活性代谢产物的开发利用已有几十年的历史, 芽孢杆菌是其中一种重要的活性物质产生菌, 可以产生多种多样的活性物质, 如多肽、环肽、脂肽、蛋白酶类、大环内酯类及香豆素类化合物, 这些活性物质已广泛应用于工农业及医药

业<sup>[1-3]</sup>。

海洋芽孢杆菌因生长在特殊的环境而可能产生一些独特的物质, 所以本研究以东海芽孢杆菌为研究对象, 利用抗菌(大肠杆菌)模型筛选到芽孢杆菌菌株 F81612, 该菌株的发酵液能强烈抑制大肠杆菌

**[收稿日期]** 2008-02-22 **[接受日期]** 2008-04-14

**[基金项目]** 国家高技术研究发展(“863”)计划(2006AA09Z416, 2006AA09Z425). Supported by National Hi-tech R&D Program (2006AA09Z416, 2006AA09Z425).

**[作者简介]** 韩文菊, 硕士生. E-mail: byxhan@tom.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070303, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

生长,且活性物质主要分布在乙酸乙酯提取物中,利用硅胶柱、凝胶柱、高效液相等色谱分离技术,先期分离得到了 16 个化合物。利用<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、EI-MS 和 ESI-MS 等方法鉴定了其中 11 个化合物的结构,并对它们进行了抗菌/真菌、抗肿瘤活性测定。

## 1 材料和方法

1.1 仪器和材料 Agilent 1100 高效液相仪, Bruke-600 核磁共振仪, HP5989A 质谱仪。Sephadex LH20 凝胶(Pharmacia 公司),反相硅胶 C<sub>18</sub>(Merck 公司),柱层析硅胶(200~300 目)、薄层层析硅胶(40 μm)为烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂产品。

1.2 菌株及其培养条件 实验菌株 F81612 分离自东海海泥样品,鉴定为海洋芽孢杆菌,其发酵培养基为(g/L):葡萄糖 10、酵母粉 10、蛋白胨 4、牛肉膏 0.4,pH 6。培养条件为 28℃,130 r/min,7 d。指示菌稻瘟霉(*Pyricularia oryzae*)培养条件:葡萄糖土豆(PDA)培养基,27℃ 7 d;大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)培养条件:牛肉膏蛋白胨(BPA)培养基,37℃ 18 h。

1.3 菌株次生代谢产物的分离鉴定 菌株 F81612 大批发酵 60 L,6 000 r/min( $r=10$  cm)离心 10 min 除去菌体,上清用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,减压蒸干得 20 g 乙酸乙酯浸膏。粗提物首先以氯仿:甲醇(2:1,体积比)为流动相经 Sephadex LH20 凝胶柱层析分成 4 部分,其中第 3 部分为主要成分,再上 ODS C<sub>18</sub>反相硅胶柱层析,水:甲醇(100:0,80:20,60:40,40:60,20:80,0:100)逐步洗脱,得到 8 个粗分段,再通过 HPLC 进一步纯化,先期得到 16 个化合物,利用磁共振和质谱技术鉴定出其中 11 个化合物。HPLC 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm),甲醇-水洗脱系统,1 ml/min 流速,218 nm 检测波长。

1.4 抗菌/真菌活性测定 采用纸片扩散法测定样品对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小,稻瘟霉抑制活性采用 96 孔板法,抗菌活性以青霉素为阳性对照,抗真菌活性以酮康唑为阳性对照。

1.5 肿瘤细胞生长抑制活性测定 样品用 10% DMSO 溶解,使浓度为 1 mg/ml。MTT 法测定各单体化合物对 HeLa 细胞株和肝癌 HepG<sub>2</sub>细胞株的

抑制活性。

## 2 结果

2.1 化合物结构鉴定 化合物 1:分子式为 C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>,白色无定形粉末。ESI/MS: $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> 425.3;<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 7.2 (1H, dd,  $J=15$  Hz, H-4), 6.55 (1H, dd,  $J=11.4$  Hz, H-3), 6.51 (1H, dd,  $J=15$  Hz, H-9), 6.2 (1H, dd,  $J=15$  Hz, H-18), 6.1 (1H, dd,  $J=15$  Hz, H-5), 6.1 (1H, dd,  $J=11.2$  Hz, H-10), 6.1 (1H, dd,  $J=15.2$  Hz, H-17), 5.76 (1H, dd,  $J=15$  Hz, H-8), 5.63 (1H, m,  $J=15$  Hz, H-19), 5.6 (1H, dd,  $J=11.4$  Hz, H-2), 5.6 (1H, dd,  $J=15.2$  Hz, H-16), 5.49 (1H, dd,  $J=11.2$  Hz, H-11), 5.0 (1H, m, H-23), 4.5 (1H, dd, H-15), 4.3 (1H, dd, H-7), 4.0 (1H, dd, H-13), 2.4 (1H, m, H-12), 2.5 (2H, m, H-12), 2.2 (1H, m, H-20), 2.1 (1H, m, H-20), 1.6 (2H, m, H-22), 1.5 (2H, m, H-14), 1.5 (2H, m, H-21), 1.2 (3H, d, H-24);<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz, δ): 166.3 (C-1), 142.72 (C-3), 139.45 (C-5), 136.01 (C-8), 136.01 (C-16), 134.94 (C-19), 132.88 (C-18), 130.31 (C-4), 129.93 (C-17), 129.76 (C-10), 127.53 (C-11), 124.87 (C-9), 118.03 (C-2), 71.21 (C-7), 70.92 (C-23), 70.27 (C-15), 69.56 (C-13), 41.53 (C-6), 40.82 (C-14), 35.44 (C-22), 35.40 (C-12), 31.99 (C-20), 24.39 (C-21), 19.89 (C-24)。经与文献<sup>[4]</sup>数据比对,确定化合物 1 为 macrolactin A。

化合物 2:分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>,淡黄色针状结晶,易溶于甲醇。EI/MS: $m/z$ (%) [M]<sup>+</sup> 175(20), 144(100), 116(21), 89(13);<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 8.22(1H, m, H-2), 8.19(1H, s, H-4), 7.45(1H, m, H-7), 7.22(2H, m, H-5,6), 4.73(2H, s, H-9);<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 196.0(C-8), 138.2(C-7a), 134.0(C-2), 126.9(C-3a), 124.4(C-5), 123.3(C-6), 122.7(C-4), 114.9(C-3), 112.9(C-7), 66.3(C-9)。经文献数据对比<sup>[5]</sup>,确定化合物 2 为 3-羟基乙酰基吲哚。

化合物 3:分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO,淡黄色粉末,易溶于甲醇。EI/MS: $m/z$ (%) [M]<sup>+</sup> 161(25), 130(100), 103(8), 77(8);<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 7.52(1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-4), 7.31(1H, d,  $J=$

7.8 Hz, H-7), 7.06 (2H, m, H-2, 6), 6.98 (1H, t,  $J=7.2$  Hz, H-5), 3.80 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-9), 2.96 (2H, t,  $J=7.8$  Hz, H-8);  $^{13}\text{C}$ NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 136.4 (C-7a), 128.0 (C-3a), 123.5 (C-2), 122.2 (C-6), 119.5 (C-5), 119.2 (C-4), 112.2 (C-7), 110.0 (C-3), 63.7 (C-9), 29.8 (C-8)。经文献数据<sup>[6]</sup>对比, 确定化合物 **3** 为 3-咪唑乙醇。

化合物 **4**: 分子式为  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ , 白色粉末, 易溶于甲醇氯仿。EI/MS:  $m/z$  (%)  $[\text{M}]^+$  283 (10), 154 (10), 130 (100), 91 (9);  $^1\text{H}$ NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8.29 (1H, bs, Try-N-H), 7.60 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Try-4'-H), 7.40 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Try-7'-H), 7.22~7.26 (1H, m, Try-2'-H), 7.13~7.16 (1H, m, Try-6'-H), 7.11 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, Try-5'-H), 5.77 (1H, bs, N-H), 4.37~4.39 (1H, dd,  $J=2.4$  Hz,  $\alpha$ -H), 4.06~4.09 (1H, t,  $J=7.8$  Hz,  $\alpha$ -H), 3.74~3.78 (1H, m, Pro- $\delta$ -H), 3.64~3.68 (1H, m, Pro- $\delta$ -H), 3.57~3.61 (1H, m, Try- $\beta$ -H), 2.95~3.00 (1H, m, Try- $\beta$ -H), 2.32~2.34 (1H, m, Pro- $\beta$ -H), 1.98~2.04 (2H, m, Pro- $\beta$ -H, Pro- $\gamma$ -H), 1.91 (1H, t,  $J=1.2$  Hz, Pro- $\gamma$ -H);  $^{13}\text{C}$ NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 169.3 (CO), 165.5 (CO), 136.7 (Try-7a'-C), 126.7 (Try-3a'-C), 123.3 (Try-2'-C), 122.8 (Try-5'-C), 120.0 (Try-6'-C), 118.5 (Try-4'-C), 111.6 (Try-7'-C), 110.0 (Try-3'-C), 59.2 ( $\alpha$ -C), 54.6 ( $\alpha$ -C), 45.4 (Pro- $\delta$ -C), 28.3 (Try- $\beta$ -C), 26.8 (Pro- $\beta$ -C), 22.6 (Pro- $\gamma$ -C)。经文献<sup>[7]</sup>对比, 确定化合物 **4** 为环(色-脯)二肽。

化合物 **5**: 分子式为  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ , 白色粉末, 易溶于甲醇。EI/MS:  $m/z$  (%)  $[\text{M}]^+$  299 (6), 130 (100);  $^1\text{H}$ NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 7.59 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Try-4'), 7.31 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Try-7'), 7.06 (2H, m,  $J=7.8, 7.2$  Hz, Try-2', Try-6'), 6.99 (1H, t,  $J=6.6, 7.8$  Hz, Try-5'), 4.41 (1H, t,  $J=0.6, 1.8$  Hz,  $\alpha$ -H), 4.26~4.28 (1H, m,  $\alpha$ -H), 3.64~3.65 (1H, m, Ile- $\beta$ -H), 3.31~3.35 (1H, m, Try- $\beta$ -H), 3.24~3.27 (1H, m, Try- $\beta$ -H), 1.31~1.35 (1H, m, Ile- $\gamma$ -H), 1.26 (1H, d,  $J=6.6$  Hz, Ile- $\gamma$ -H), 0.66 (3H, d,  $J=7.2$  Hz, Ile- $\beta$ - $\text{CH}_3$ ), 0.57 (3H, t,  $J=3.0$  Hz, Ile- $\delta$ -H);  $^{13}\text{C}$ NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 169.6 (CO), 168.7 (CO),

137.6 (Try-7a'-C), 128.7 (Try-3a'-C), 125.3 (Try-2'-C), 122.2 (Try-5'-C), 119.8 (Try-6'-C), 119.4 (Try-4'-C), 112.0 (Try-7'-C), 109.4 (Try-3'-C), 60.6 ( $\alpha$ -C), 56.8 ( $\alpha$ -C), 39.6 (Ile- $\beta$ -C), 30.4 (Try- $\beta$ -C), 24.2 (Ile- $\gamma$ -C), 15.1 (Ile- $\beta$ - $\text{CH}_3$ ), 11.7 (Ile- $\delta$ -C)。经文献<sup>[8]</sup>对比, 确定化合物 **5** 为环(异亮-色)二肽。

化合物 **6**: 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ , 白色粉末, 易溶于氯仿。EI/MS:  $m/z$  (%)  $[\text{M}]^+$  210 (1), 154 (100), 86 (18), 70 (42);  $^1\text{H}$ NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 5.98 (1H, bs, N-H), 4.12 (1H, m,  $\alpha$ -H), 4.02 (1H, m,  $\alpha$ -H), 3.58~3.62 (1H, m, Pro- $\delta$ -H), 3.54~3.56 (1H, m, Pro- $\delta$ -H), 2.34~2.37 (1H, m, Pro- $\beta$ -H), 2.01~2.14 (3H, m, Pro- $\beta$ -H, Pro- $\gamma$ -H), 1.90~1.93 (1H, m, Leu- $\gamma$ -H), 1.75~1.80 (1H, m, Leu- $\beta$ -H), 1.53 (1H, m, Leu- $\beta$ -H), 1.01 (3H, d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0.96 (3H, d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$ NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 170.2 (CO), 166.2 (CO), 59.0 ( $\alpha$ -C), 53.4 ( $\alpha$ -C), 45.5 (Pro- $\delta$ -C), 38.6 (Leu- $\beta$ -C), 28.1 (Pro- $\beta$ -C), 24.7 (Leu- $\gamma$ -C), 23.3 ( $\text{CH}_3$ ), 22.7 (Pro- $\gamma$ -C), 21.2 ( $\text{CH}_3$ )。经文献<sup>[9-10]</sup>对比, 确定化合物 **6** 为环(亮-脯)二肽。

化合物 **7**: 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ , 白色粉末, 易溶于甲醇。EI/MS:  $m/z$  (%)  $[\text{M}]^+$  212 (1), 170 (33), 156 (100), 113 (40), 86 (20), 72 (21);  $^1\text{H}$ NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 3.93~3.95 (1H, m,  $\alpha$ -H), 3.78~3.79 (1H, m,  $\alpha$ -H), 2.31 (1H, m, Val- $\beta$ -H), 1.79~1.83 (1H, m, Leu- $\gamma$ -H), 1.72~1.77 (1H, m, Leu- $\beta$ -H), 1.63~1.67 (1H, m, Leu- $\beta$ -H), 1.02 (3H, d,  $J=7.2$  Hz, Val- $\gamma$ -H), 0.92~0.94 (9H, m,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$ NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 170.8 (CO), 169.5 (CO), 60.8 ( $\alpha$ -C), 53.5 ( $\alpha$ -C), 42.8 (Leu- $\beta$ -C), 32.9 (Val- $\beta$ -C), 24.6 (Leu- $\gamma$ -C), 23.3 (Leu- $\text{CH}_3$ ), 22.1 (Leu- $\text{CH}_3$ ), 18.7 (Val- $\text{CH}_3$ ), 16.8 (Val- $\text{CH}_3$ )。经文献<sup>[11]</sup>对比, 确定化合物 **7** 为环(亮-缬)二肽。

化合物 **8**: 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ , 白色粉末, 易溶于氯仿。EI/MS:  $m/z$  (%)  $[\text{M}]^+$  210 (4), 154 (100), 86 (38), 73 (42);  $^1\text{H}$ NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 6.33 (1H, bs, N-H), 4.07 (1H, m,  $\alpha$ -H), 3.97 (1H, s,  $\alpha$ -H), 3.61~3.66 (1H, m, Pro- $\delta$ -H), 3.52~3.56 (1H, m, Pro- $\delta$ -H), 2.35~2.39 (1H, m, Ile- $\beta$ -

H), 2.29 ~ 2.33 (1H, m, Pro- $\beta$ -H), 2.01 ~ 2.06 (2H, m, Pro- $\beta$ -H, Pro- $\gamma$ -H), 1.88 ~ 1.92 (1H, m, Pro- $\gamma$ -H), 1.41 ~ 1.45 (1H, m, Ile- $\gamma$ -H), 1.17 ~ 1.22 (1H, m, Ile- $\gamma$ -H), 1.06 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, Ile- $\beta$ -CH<sub>3</sub>), 0.92 ~ 0.95 (3H, m, Ile- $\gamma$ -CH<sub>3</sub>); <sup>1</sup>CNMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 170.0 (CO), 165.0 (CO), 60.5 ( $\alpha$ -C), 58.7 ( $\alpha$ -C), 45.1 (Pro- $\delta$ -C), 35.3 (Ile- $\beta$ -C), 28.5 (Pro- $\beta$ -C), 24.0 (Ile- $\gamma$ -C), 22.3 (Pro- $\gamma$ -C), 15.8 (Ile- $\beta$ -CH<sub>3</sub>), 12.0 (Ile- $\gamma$ -CH<sub>3</sub>)。经文献<sup>[9]</sup>对比, 确定化合物 **8** 为环(异亮-脯)二肽。

化合物 **9**: 分子式 C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 白色粉末, 易溶于吡啶。EI/MS:  $m/z$  (%) [M]<sup>+</sup> 246 (88), 204 (18), 155 (30), 127 (52), 113 (22), 91 (100), 85 (26); <sup>1</sup>HNMR (600 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N,  $\delta$ ): 9.12 (1H, bs, N-H), 9.02 (1H, bs, N-H), 7.53 ~ 7.57 (2H, m, Ar<sub>3,5</sub>-H), 7.40 (2H, m, Ar<sub>2,6</sub>-H), 7.22 (1H, m, Ar<sub>4</sub>-H), 4.58 (1H, m,  $\alpha$ -H), 4.03 (1H, s,  $\alpha$ -H), 3.46 ~ 3.49 (1H, m, Phe- $\beta$ -H), 3.37 ~ 3.41 (1H, m, Phe- $\beta$ -H), 2.31 ~ 2.34 (1H, m, Val- $\beta$ -H), 1.05 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0.83 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>1</sup>CNMR (150 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N,  $\delta$ ): 167.9 (CO), 167.6 (CO), 137.5 (Ar<sub>1</sub>-C), 130.6 (Ar<sub>3,5</sub>-C), 128.8 (Ar<sub>2,6</sub>-C), 127.1 (Ar<sub>4</sub>-C), 60.9 ( $\alpha$ -C), 57.1 ( $\alpha$ -C), 41.0 (Phe- $\beta$ -C), 32.6 (Val- $\beta$ -C), 19.2 (CH<sub>3</sub>), 17.1 (CH<sub>3</sub>)。经文献对比<sup>[10]</sup>, 确定化合物 **9** 为环(苯丙-缬)二肽。

化合物 **10**: 分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO, 白色粉末, 易溶于甲醇。EI/MS:  $m/z$  (%) [M]<sup>+</sup> 163 (22), 104 (100), 91 (20), 72 (18); <sup>1</sup>HNMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ): 7.24 ~ 7.26 (2H, m, Ar<sub>2,6</sub>-H), 7.16 ~ 7.19 (3H, m, Ar<sub>3,4,5</sub>-H), 3.37 (2H, m,  $\alpha$ -H), 2.77 (2H, m,  $\beta$ -H), 1.89 (3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>1</sup>CNMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ): 172.9 (CO), 140.1 (Ar<sub>1</sub>-C), 129.5 (Ar<sub>3,5</sub>-C), 129.2 (Ar<sub>2,6</sub>-C), 127.1 (Ar<sub>4</sub>-C), 41.8 ( $\alpha$ -C), 36.3 ( $\beta$ -C), 22.6 (CH<sub>3</sub>)。经文献<sup>[12]</sup>对比, 确定化合物 **10** 为 N-苯乙基乙酰胺。

化合物 **11**: 分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, 白色粉末, 易溶于氯仿。EI/MS:  $m/z$  (%) [M]<sup>+</sup> 112 (89), 121 (100), 93 (39), 65 (23); <sup>1</sup>HNMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 9.87 (1H, bs, OH), 7.81 (2H, dd,  $J = 1.8, 4.8$  Hz, Ar<sub>2,6</sub>-H), 6.96 (2H, m, Ar<sub>3,5</sub>-H); <sup>1</sup>CNMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 190.9 (CHO), 161.4 (Ar<sub>4</sub>-C), 132.4 (Ar<sub>3,5</sub>-C), 130.0 (Ar<sub>1</sub>-C), 115.9 (Ar<sub>2,6</sub>-C)。

TLC 上 R<sub>f</sub> 值与对羟基苯甲醛标准品一致, 故鉴定化合物 **11** 为对羟基苯甲醛。化合物 **1** ~ **11** 的结构见图 1。

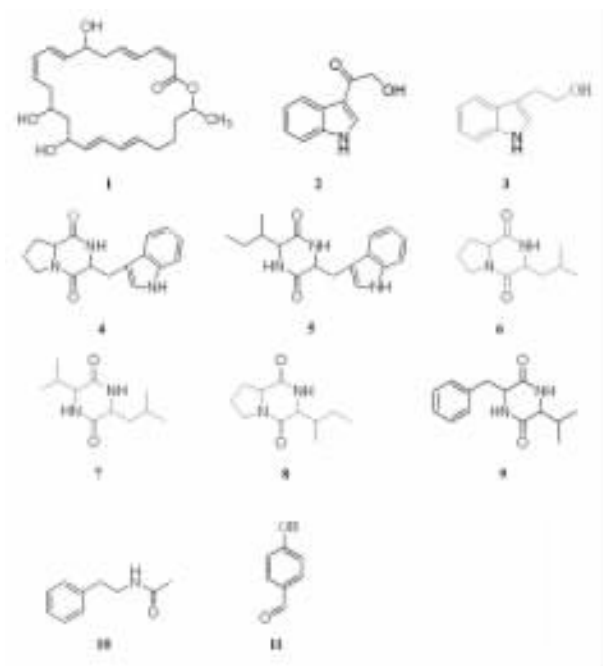


图 1 化合物 1~11 的结构

Fig 1 Structures of compounds 1-11

2.2 化合物活性筛选结果 化合物 **1** 为主要的活性物质, 它能抑制稻瘟霉生长, 使孢子不萌发, MIC 值 3.6  $\mu\text{g/ml}$ , 也能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, MIC 值分别为 0.45 和 6.3  $\mu\text{g/ml}$ , 对肿瘤细胞株 HeLa 及 HepG<sub>2</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 2.0  $\mu\text{g/ml}$  和 1.8  $\mu\text{g/ml}$ 。化合物 **4** 对大肠杆菌的 MIC 值为 6.0  $\mu\text{g/ml}$ , 化合物 **8** 对稻瘟霉的 MIC 值为 4.8  $\mu\text{g/ml}$ , 对两株肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 值均为 5.5  $\mu\text{g/ml}$ , 其余化合物活性不明显。

### 3 讨论

传统抗生素的耐药情况日益严重, 在这样的研究背景下, 本课题以寻找新型药用先导化合物为目的, 选择了对大肠杆菌有较强抑制活性的海洋芽孢杆菌菌株 F81612 作为研究对象, 从其次级代谢产物中分离并鉴定了 11 个化合物, 其中 macrolactin A 表现出较强的抗菌活性, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 值分别是 0.45 和 6.3  $\mu\text{g/ml}$ , 而阳性对照青霉素的 MIC 值分别是 6.25 和 1.562  $\mu\text{g/ml}$ <sup>[13]</sup>, 可见其对某些病菌的抗性较现今常用的药物强, 并且今后还可以通过结构修饰提高其活性。它

于1989年首次分离自一株深海细菌,除本文报道的生物学活性以外还具有多种生物学活性,比如对小鼠B16-F10黑素瘤细胞、HIV病毒、单纯疱疹病毒等都有活性<sup>[4]</sup>,在临床上有很好的应用前景,它的发现已经有近20年的历史,国外也有关于其全合成的报道<sup>[14]</sup>,但至今没查到有关其生物学活性的深入报道,我们从东海分离到的这株芽孢杆菌能稳定地产生 macrolactin A,为深入研究其活性及作用机制带来了新的契机,目前为了提高产量,其发酵条件的优化工作正在进行中。

### [参考文献]

- [1] He H, Shen B, Korshalla J, Guy T. Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2154 [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57: 1189-1195.
- [2] Yoo J S, Zheng C J, Lee S, Kwak J H, Kim W G. Macrolactin N, a new peptide deformylase inhibitor produced by *Bacillus subtilis* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 4889-4892.
- [3] Pinchuk I V, Bressollier P, Sorokulova I B, Verneuil B, Urdaci M C. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats [J]. *Res Microbiol*, 2002, 153: 269-276.
- [4] Gustafson K, Roman M, Fenical W. The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium [J]. *J Am Chem Soc*, 1989, 111: 7519-7524.
- [5] Dillman R, Cardellina J H. Aromatic secondary metabolites from the sponge *tedania ignis* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54: 1056-1061.
- [6] Ameer R M, Mellouli L, Chabchoub F, Fotso S, Bejar S. Purification and structure elucidation of two biologically active molecules from a new isolated *Streptomyces sp.* US 24 strain [J]. *Chem Nat Com*, 2004, 40: 510-513.
- [7] Birch A J, Russell R A. Studies in relation to biosynthesis-XLIV structural elucidations of brevianamides-B, -C, -D and -F [J]. *Tetrahedron*, 1972, 28: 2999-3008.
- [8] Kimura Y, Sawada A, Kuramata M, Kusano M, Fujioka S, Kawano T, et al. Brevicompanine C, cyclo-(D-Ile-L-Trp), and cyclo-(D-Leu-L-Trp), plant growth regulators from *Penicillium brevis*-compactum [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68: 237-239.
- [9] Adamczeski M, Reed A R, Crews P. New and known diketopiperazines from the caribbean sponge, calyx cf. *podatypa* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58: 201-208.
- [10] Hofmann S. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazine in roasted cocoa nibs (theobroma cacao) [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53: 7222-7231.
- [11] Ulrich H, Engelhardt M G. Identification of new diketopiperazines in roasted coffee [J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213: 8-11.
- [12] Zhao P J, Wang H X, Li G H, Li H D, Liu J, Shen Y M. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces sp.* Lz531 [J]. *Chem Biod*, 2007, 4: 899-904.
- [13] Liu X H, Cui P, Song B A, Bhadury P S, Zhu H L, Wang S F. Synthesis, structure and antibacterial activity of novel 1-(5-substituted-3-substituted-4, 5-dihydropyrazol-1-yl) ethanone oxime ester derivatives [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2008, 16: 4075-4082.
- [14] Barmann H, Prahlad V, Tao C L, Yun Y K, Wang Z, Donaldson W A. Development of organoiron methodology for preparation of the polyene natural product macrolactin A [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56: 2283-2295.

[本文编辑] 李丹阳

## • 书 讯 •

### 《乳腺疾病钼靶 X 线诊断图谱》已出版

本书由韩本谊、陈允硕、赵亚娥、曹伟等主编,第二军医大学出版社出版、发行,ISBN 978-7-81060-823-7,16开,精装,铜版纸印刷,业内著名专家周康荣教授作序,并受上海市杨浦区人才发展专项资金(鼎元资金)资助出版,定价98.00元。

出版背景:近年来,乳腺疾病尤其是乳腺癌的发病率逐渐上升,严重影响女性身心健康。乳腺癌防治最有效的方法是早期诊断和早期治疗。而乳房钼靶 X 线摄片检查不仅安全、简便、廉价,且诊断准确率高,是女性乳腺疾病筛查或常规乳腺体检的最佳选择之一。

全书共分14章,包括钼靶 X 线的基本原理、乳腺的生长发育、各时期正常乳腺的图片特征、各种乳腺疾病的图片特点等内容。资料的收集历时数十年,整理成书耗时2年余。

读者对象:临床放射科、影像诊断科、乳腺外科及全科医师。

通讯地址:上海市翔殷路800号 第二军医大学出版社,邮编:200433

邮购电话:021-25074185;E-mail:gaobiaodoctor@gmail.com

http://www.smmup.com