

假蜜环菌的研究

II. 假蜜环菌素的分离及化学结构的测定

江苏省“亮菌”科研协作组化学小组*

(南 京)

从假蜜环菌培养物的乙醇提取物中分离得四种成分,其中之一为新的香豆素,定名为假蜜环菌甲素(Armillarisin A),为治疗胆囊炎的一种活性成分。分子式 $C_{12}H_{10}O_5$, 熔点 $245-246^{\circ}C$, 用紫外、红外光谱,质谱,核磁共振确定假蜜环菌甲素为 3-乙酰基-5-羟甲基-7-羟基香豆素。另一成分定名为假蜜环菌乙素,熔点 $162-163.5^{\circ}C$, 分子式 $C_9H_{10}N_2O_3$, 用同样的方法初步测定了它的结构。

本文所用的假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)^[1], 经临床验证,对胆囊炎,急性传染性肝炎均有一定的疗效。据此,我们进行了有效成分的化学研究。

有效成分提取系用面包粉培养的湿菌丝体^[1],以乙醇提取后转溶至乙酸乙酯,浓缩后通过碱性氧化铝柱层析,葡聚糖凝胶 G-25 以及制备性纸层析分离,得到假蜜环菌甲素(Armillarisin A)(简称甲素)、假蜜环菌乙素(简称乙素)、假蜜环菌丙素(简称丙素);另从玉米粉培养的干菌丝体中分离得一种白色结晶,经鉴定为甘露醇。

假蜜环菌甲素

甲素系一种新的香豆素类化合物,得量百万分之 3—7。淡黄色长方形板状结晶,如图 1。熔点 $245-246^{\circ}C$ (分解,未校正,下同),在稀氨水中呈蓝色荧光。本品与 2,4-二硝基苯肼反应呈红棕色,表明有羰基;与重氮盐试剂反应呈紫红色。本品甲醚化后与重氮盐试剂反应不显色,表明有酚羟基。与亚硝酰铁氰化钠反应呈红色,并具有碘仿反应,表明含有甲基酮;与

间二硝基苯及盐酸羟胺反应均呈红色,表明可能为内酯类化合物。

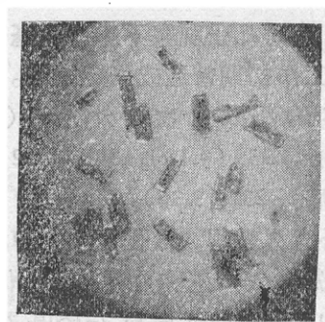


图 1 假蜜环菌甲素结晶

质谱测定甲素的分子量为 234。元素分析表明,分子式为 $C_{12}H_{10}O_5$ 。

甲素的紫外光谱(图 2), $\lambda_{\max}^{50\%EtOH}(\log \epsilon)$ 254 (3.90), 283 (3.65), 368 (4.23), 427 (4.21)。 $\lambda_{\max}^{50\%EtOH(H^+)}(\log \epsilon)$ 254 (3.95), 370 (4.38)。 $\lambda_{\max}^{50\%EtOH(OH^-)}(\log \epsilon)$ 284 (3.97), 427 (4.70)。

* 本小组由江苏新医学院、南京大学、南京林产工业学院、镇江制药厂、南京兽医生物制品厂、南京药物研究所、中国药科学院药物研究所组成。
本文 1973 年 12 月 24 日收到。

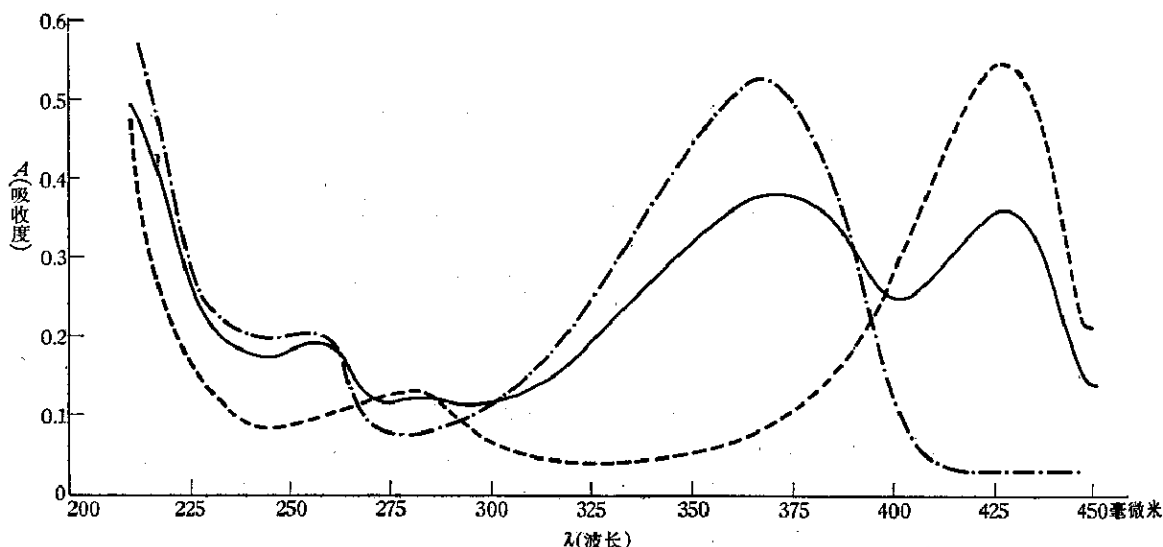


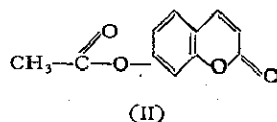
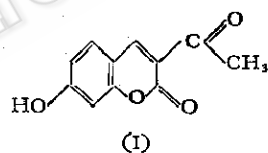
图2 甲素的紫外光谱

- 50% 乙醇作溶剂(每毫升含 0.005 毫克甲素)
 ----50% 碱性乙醇 (0.001 N NaOH, 每毫升含 0.0025 毫克甲素)
 - · - · -50% 酸性乙醇 (0.05 N HCl, 每毫升含 0.005 毫克甲素)

溶剂 pH 变化对甲素紫外光谱影响很大(见图 2)。因此在“中性”乙醇中的重现性较差,有时几乎观察不出 368 毫微米处的峰,在工作初期曾造成一定困难。

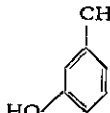
甲素的乙酰化物紫外光谱(图 3), $\lambda_{\text{maxnm}}^{\text{EtOH}}(\log \epsilon)$ 339 (4.18), 308 (4.12), 247 (3.68) (肩), 232 (3.36) (肩)。

紫外光谱表明,该化合物在醇溶液中与 3-乙酰基-7-羟基香豆素 (I) 近似^[2],乙酰化物的紫外吸收光谱与 7-羟基香豆素的乙酰化物 (II) 近似^[3]。



因此,甲素具有 (I) 的骨架。

质谱(图 4)测定分子离子峰在 m/e (质荷比,下同) 234 处, m/e 219 为分子离子失去甲基的裂片离子, m/e 206 系失去一氧化碳, m/e 191 系失去一个乙酰基,或先失去甲基而后失去一氧化碳, m/e 163 和 135 系由 m/e 191 分别失去 1 分子和 2 分子一氧化碳的裂片离子, m/e 122 可能为杂环

裂解后形成的  离子, m/e 105

可能为 m/e 122 失去羟基的离子。本品的质谱裂解与香豆素近似^[4]。

红外光谱(图 5)表明,甲素有羟基(3.0)、

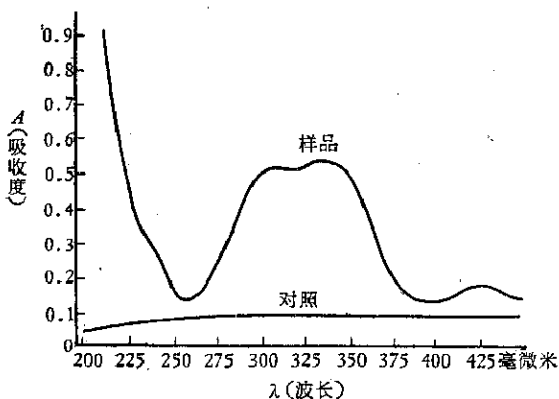


图3 甲素乙酰化物紫外光谱

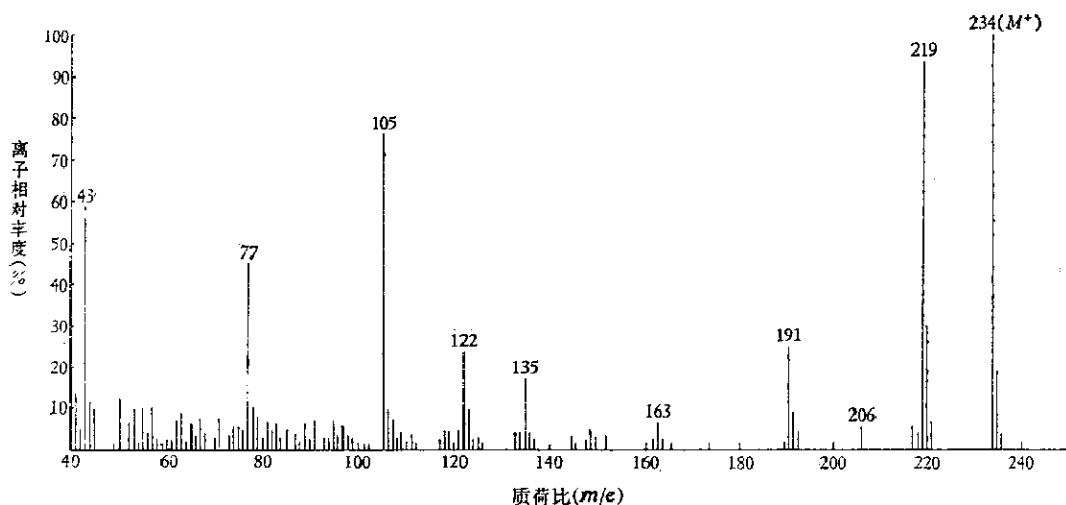


图4 甲素质谱

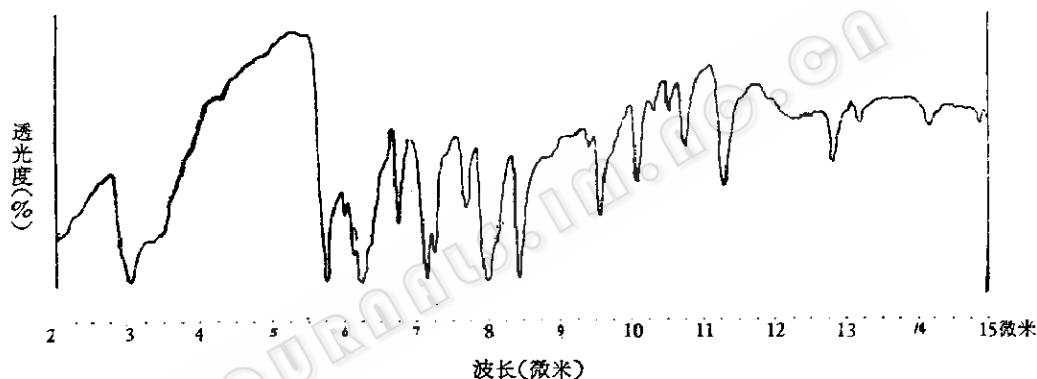


图5 甲素红外光谱(KBr 压片)

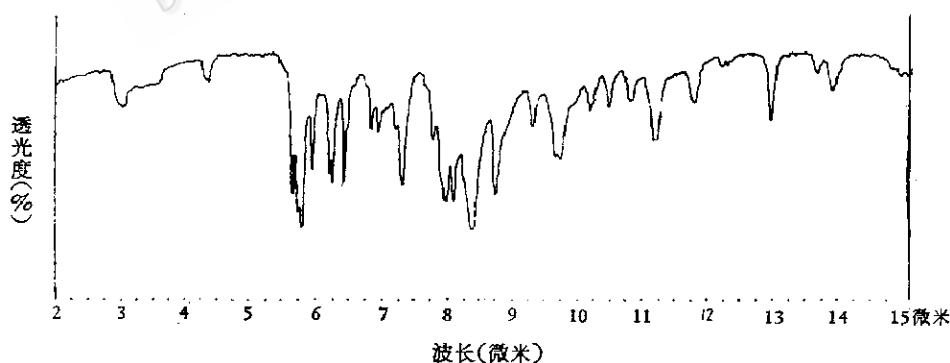


图6 甲素乙酰化物红外光谱(KBr 压片)

羰基 (5.90 肩*)、 δ 内酯 (5.77)^[5]、芳环 (6.75)、醚键 (8.0)。

甲素乙酰化物红外吸收光谱(图6)表明,分子中有酚羟基 乙酸酯 (5.63)、醇羟基乙酸酯 (5.70) 及分子中原有 羰基

(5.93)、 δ 内酯 (5.77)、醚键 (8.08)。

核磁共振光谱 (3%, 叔丁胺溶剂)(图7)测定表明,该分子中有一个乙酰基,其

* 在 5.5—6.5 μ 处拉长记录宽度(另图,未附)在 5.90 μ 处发现一肩。

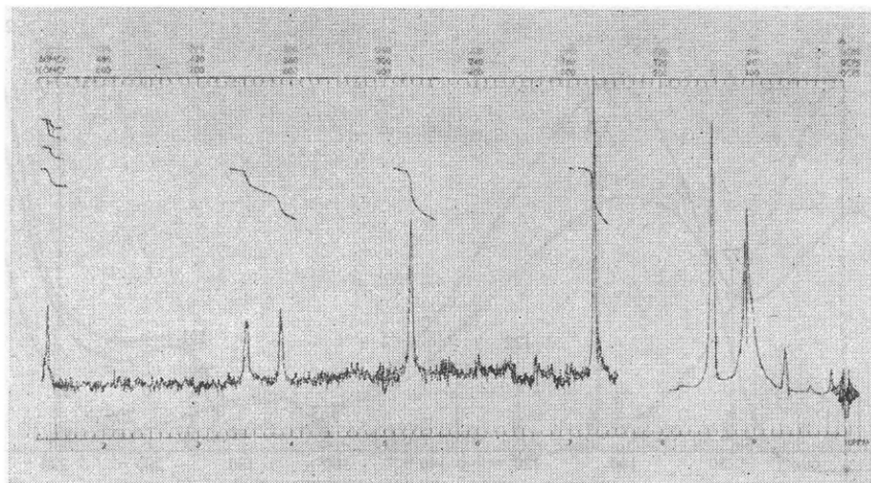
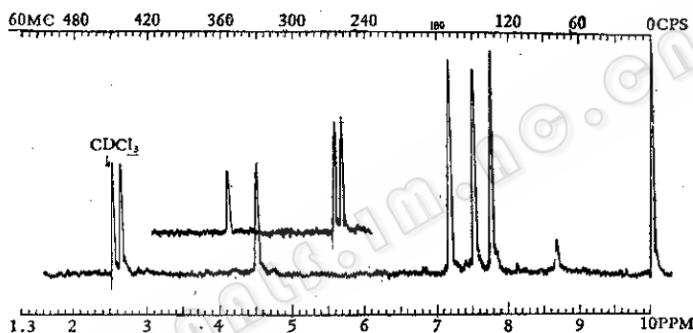


图7 甲素核磁共振光谱, 100 兆周(含 3% 叔丁胺溶剂)

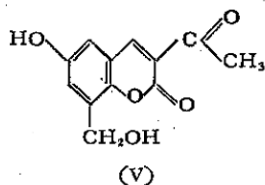
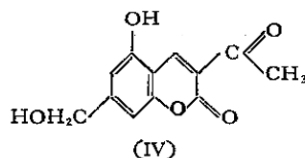
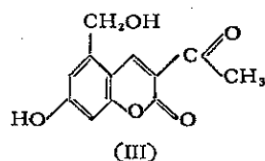
图8 甲素乙酰化物核磁共振光谱, 60 兆周, 含 4.5% CDCl_3 溶剂

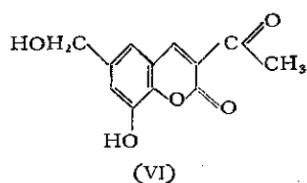
化学位移 τ 值 7.27; 有连接芳环的羟甲基 $-\text{CH}_2\text{OH}$ (OH 未观察到), 化学位移 τ 值 5.30。另有三个氢, 其化学位移 τ 值分别为 1.42, 3.52, 3.88。甲素乙酰化物的核磁共振光谱(图 8)表明, 有 3 个乙酰基, 其化学位移 τ 值分别为 7.17, 7.47, 7.75, 表明原分子中有二个羟基。

从核磁共振光谱分析可知, 3 位上应

为 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$, 4 位上应为 H, 因 α, β 不饱和酮的 β 位上的氢其化学位移 τ 值 1.42, 与资料报道相符^[6]。否则, 化学位移数值相差较大^[7]。如果 4 位上不是 H, 而是 OH 或 CH_2OH , 则另一环上只有一个取代基, 从而须有相邻的两个芳氢。但所测结果, 二个芳氢的位置是在间位, 因核磁共振峰

稍有裂分, 且不甚明显, 因而 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基应在 5 位上。甲素的化学结构式虽有下列几种可能:

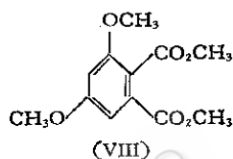
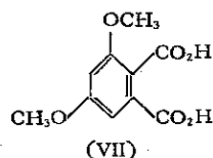




但依据紫外光谱及核磁共振光谱的推测, (III) 的可能性较大。将 (I) 式的合成品*所作的紫外光谱及其乙酰化物的核磁共振光谱测定, 分别与甲素及其乙酰化物的上述两种光谱进行对照比较, 结果甚为近似, 证明甲素应具有 (I) 的骨架, 从而排除了 (IV)、(V)、(VI) 三式的可能性, 其结构应为 (III)。

为了证明甲素的化学结构, 进行了化学降解。在碱性溶液中先将酚羟基 (包括内酯环开环后的酚羟基) 甲醚化, 然后进行氧化, 推断应得 3,5-二甲氧基邻苯二甲酸 (VII), 再将 (VII) 进行甲基化, 得 3,5-

二甲氧基邻苯二甲酸酯 (VIII), 所得产物 (VIII), 由于量少, 仅作了质谱测定, 其分子离子峰为 254, 符合 (VIII) 的分子量, 其质荷比 223 的强峰为 (VIII) 脱去甲氧基的裂片离子^[8]。由此证明甲素的结构为 (III), 从而也排除了异香豆素的可能。



最后又进行了化学合成, 合成品的纸层析 Rf 值及红外光谱 (图 9) 与天然提取品均一致, 混合熔点不下降, 从而进一步确证甲素的化学结构为 (III)。

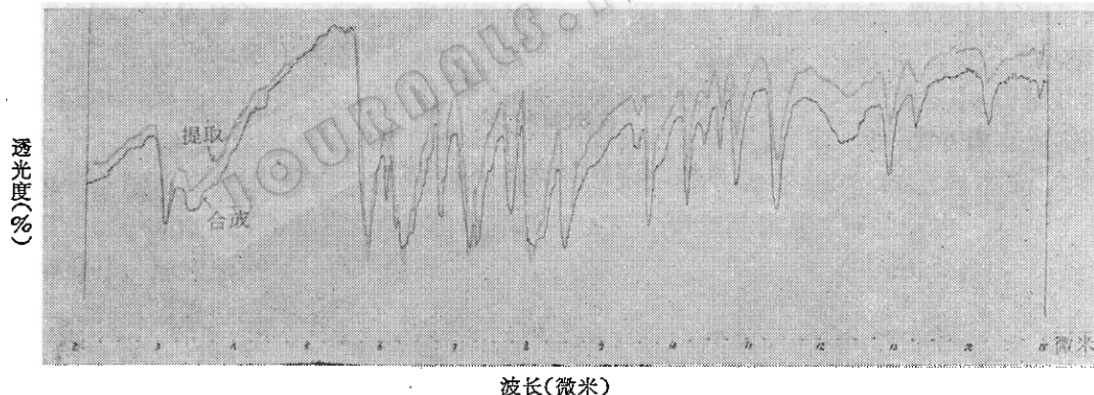


图 9 甲素提取品和合成品的红外光谱 (KBr 压片)

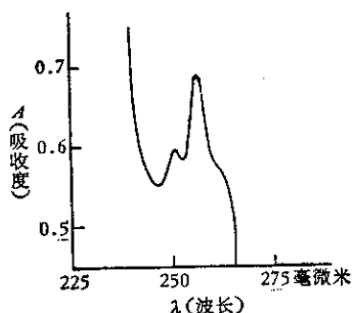


图 10 乙素的紫外光谱

假蜜环菌乙素

乙素系羽毛状白色结晶体, 熔点 162—163.5℃ 得量为十万分之 2—2.7, 质谱测定分子量 194。分子式为 $C_9H_{10}N_2O_3$ 。本化合物酰胺反应为阳性, 表明为酰胺类化合物。

紫外光谱 (图 10) $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ ($\log \epsilon$) 250.5

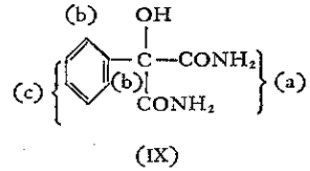
* 中国医学科学院药物研究所合成品。

(2.35), 256.5 (2.43), 263 (2.38)。从紫外光谱分析, 本化合物的骨架为单取代苯环^[9]。

红外光谱(图 11)表明有: 胺基(3436)、羟基(3352)、酰胺(1680)、叔醇(1127)、苯环(1580, 1452)、苯环单取代(763, 692)。

核磁共振光谱(二氧六环 15%) (图 12), τ 值 2.35(a) 为 4 个氢, 分别为二个酰胺中的二个氢的化学位移, τ 值 2.90(b) 为苯环上邻近取代基的二个氢的化学位移, τ 值 2.70 (c) 为苯环上另外三个氢的化学位移。

根据以上光谱分析初步确定乙素的化学结构为 (IX)。



假蜜环菌丙素

丙素在稀氨水中显绿色萤光, 得量为百万分之 0.3—0.6, 熔点 190—196°C, 质谱测定分子量 242。由于量少, 仅作了紫外, 红外光谱测定。尚待进一步研究。

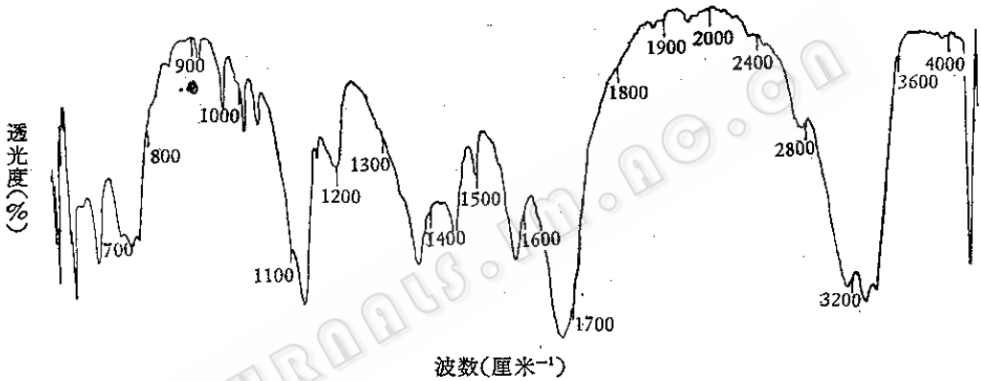


图 11 乙素的红外光谱 (KBr 压片)

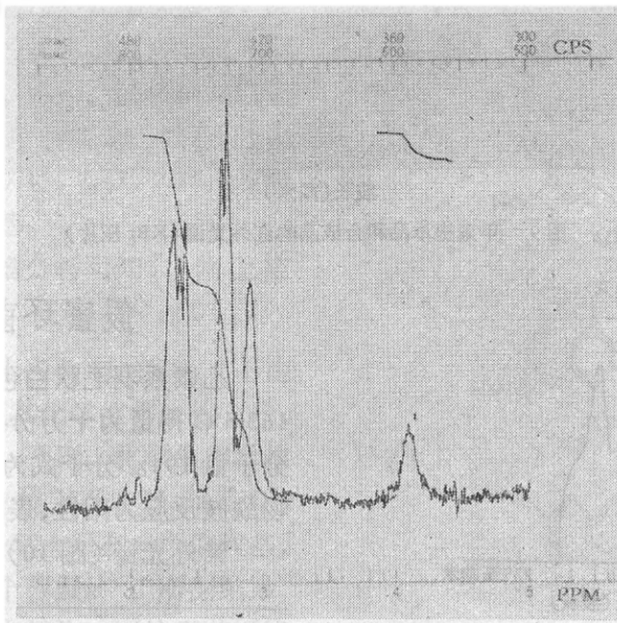


图 12 乙素的核磁共振光谱 100 兆周(含 15% 二氧六环溶剂)

实验部分

一、提取分离

面包粉培养的壮年期菌丝体加乙醇回流提取，薄膜浓缩回收乙醇，冰醋酸酸化至 pH 3—4，以乙酸乙酯振摇提取，薄膜浓缩至小体积，加入少量水，继续减压蒸馏去尽乙酸乙酯。调整 pH 至 5—6，以乙酸乙酯振摇提取并减压浓缩至干。残留物以甲醇溶解，通过碱性氧化铝柱，以甲醇洗脱，收集呈黄色带强蓝色萤光的部分，收集液在氮气流下减压浓缩至近干，以稀氨水溶解，通过葡聚糖凝胶 G-25 柱，以 0.01 N 氨水冲洗，柱上显示黄、蓝、绿、红带，分别收集蓝色及绿色萤光溶液。将蓝萤光液用醋酸酸化，以乙酸乙酯提取，通氮气减压回收溶媒至小体积，即析出羽毛状白色结晶，以少量甲醇洗溶，不溶部分以丙酮重结晶得羽毛状晶体，熔点 162—163.5℃。称假蜜环菌乙素。甲醇溶解部分通过制备性纸层析 [新华滤纸，展开剂：正丁醇：甲醇：氨水 (含 NH_3 计 25—28%)：水 = 8:2:2:0.5:10]。剪集蓝色萤光部分，以甲醇洗脱，在氮气流下常温 (或 40℃ 以下) 减压抽至数毫升，加水半毫升，继续通氮气并抽气则析出板状结晶，离心，吸去母液，以水洗二次，真空干燥，熔点 245—246℃。称假蜜环菌甲素。

或将从葡聚糖凝胶 G-25 柱上收集的蓝萤光液，酸化后以乙酸乙酯提取，浓缩液经过碱性氧化铝柱层析，用无水甲醇洗脱，收集蓝萤光的主峰部分，收集液在氮气流中抽去甲醇，用乙酸乙酯溶解，室温抽去溶媒，也可得甲素。

假蜜环菌丙素的纯化方法同甲素。

甲素分析： $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5$

计算 % C 61.53, H 4.27;

实验 % C 61.11, H 4.36;

乙素分析： $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$

计算 % C 55.66, H 5.15, N 14.43;

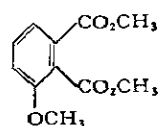
实验 % C 55.59, H 5.08, N 14.33。

二、甲素乙酰化物的制备

24.5 毫克的假蜜环菌素溶于 0.45 毫升吡啶中，加入 0.45 毫升醋酐，放置过夜，加入冷水，使乳白色颗粒状物完全析出，离心，除去母液，稀盐酸水洗两次，继以水洗，真空干燥，熔点 142—145℃。得 19.6 毫克。

三、甲素的降解

12.1 毫克的甲素加 5 毫升 5% 氢氧化钠溶液，放置 10 分钟，水浴加热 15 分钟，碱液由黄色变成棕红色，放冷。分次加入硫酸二甲酯，计 0.3 毫升，放置，振摇，加热片刻，放冷。加 5% 高锰酸钾溶液振摇至紫色不褪为止，加甲醇数毫升，用盐酸酸化，加亚硫酸氢钠约 1—2 克，溶液呈澄明。继以乙醚分次振摇提取，回收溶媒至小体积，通重氮甲烷至显黄色，继加冰醋酸至黄色消褪，减压回收甲醇，除去白色无机物，得棕红色溶液，置真空干燥器中，得桔红色固体约 2 毫克。取 100—200 微克作质谱分析，分子离子峰为 254，与推断产物 3,5-二甲氧基邻苯二甲酸酯的



分子量一样。

参 考 资 料

- [1] 江苏省“亮菌”科研协作组微生物小组：微生物学报，14 (1): 1974.
- [2] Phillips, J. J. et al.: *Org. Electron. Spect. Data*. Vol. 4: p. 322, 1963.
- [3] 山口一孝：植物成分分析法，中卷，第 65 页，第 268 页，南江堂，1950.
- [4] Budzikiewicz, H. et al.: *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, Vol. 2: p. 255—257, 1964.
- [5] The Sadter Standard Spectra-NMR Spectra No. 5663, 1969.

[6] Ibid No. 3220, 87, 1969.

[7] Eight Peak Index of Mass Spectra, p. 156,
1970.

[8] Phillips J. J. et al.: *Org. Electron. Spect.*
Data. Vol. I: p. 76, 1960.

STUDIES ON *ARMILLARIELLA TABESCENS*

II. THE ISOLATION AND DETERMINATION OF THE STRUCTURE OF ARMILLARISINS

CHEMICAL SECTION, "LUMINOUS FUNGUS" COOPERATIVE
RESEARCH GROUP OF KIANGSU*

(Nanking)

From the ethanol extracts of the artificial culture of the title fungus four constituents were isolated. One of these is a new coumarin derivative to which the name Armillarisin A is suggested. Its formula was found to be $C_{12}H_{10}O_5$, mp. 245—246°C, With the aid of UV, IR, MS and NMR, the chemical structure was found to be 3-Acetyl-5-hydroxymethyl-7-hydroxy-coumarin. Another constituent was named Armillarisin B, mp. 162—

163.5°C, formula $C_9H_{10}N_2O_3$, and its structure was preliminarily determined by the same way.

* Kiangsu College of New Medicine; Nanking University; Nanking Engineering Institute of Forest Products; Chin-Kiang Pharmaceutical factory; Nanking Institute of Materia Medica; Nanking Veterinary Factory of Biological Products; Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences.