

## 薄盖灵芝化学成分的研究\*

## IV. 灵芝碱甲、灵芝碱乙和灵芝嘌呤的化学结构

余竞光 陈若芸 姚志熙 翟云凤 杨士林 马君莉

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

**提要** 自薄盖灵芝 *Ganoderma capense*(Lloyd) Teng 发酵的菌丝体中得到三个新的生物碱, 分别为灵芝碱甲(ganoine, I)、灵芝碱乙(ganodine, II)和灵芝嘌呤(ganoderpurine, III), 并根据它们的理化性质和光谱数据确定了其结构。

**关键词** 薄盖灵芝; 灵芝碱甲; 灵芝碱乙; 灵芝嘌呤。

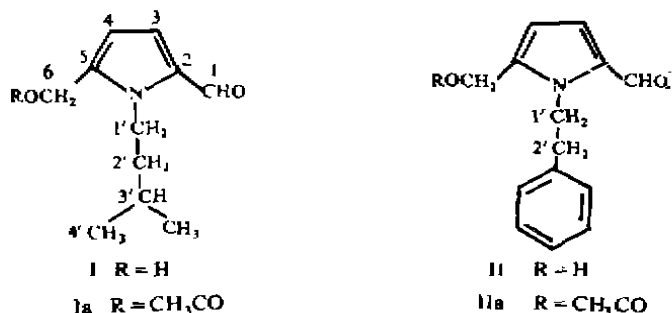
薄盖灵芝 *Ganoderma capense* (Lloyd) Teng 为药用真菌灵芝中的一种, 又是名贵的“扶正固本”中药。我们先后从发酵的菌丝体中得到四种核苷、菸酸和二十多种已知化学成分<sup>(1-3)</sup>。本文继续报告两个新的吡咯生物碱, 即灵芝碱甲(ganoine, I)和灵芝碱乙(ganodine, II), 以及一个新的嘌呤碱——灵芝嘌呤(ganoderpurine, III)的结构鉴定。

灵芝碱甲(I) 油状液体, HRMS 确定分子式为  $C_{11}H_{17}O_2N$   $m/z$  195.1268(计算值 195.1258)。IR 谱显示羟基( $3360, 1020\text{ cm}^{-1}$ ), 共轭羰基( $1640\text{ cm}^{-1}$ ), 芳香环系( $1515\text{ cm}^{-1}$ ), 甲基和亚甲基( $1460, 1398, 1360\text{ cm}^{-1}$ )等吸收峰。<sup>1</sup>HNMR 谱中, 在  $\delta$  6.21 和 6.86 处是一组 AB 四重峰( $J=4\text{ Hz}$ ),  $\delta$  9.47 为醛基单峰,  $\delta$  4.67(2H, s) 和 2.34(bs) 则为羟甲基( $-\text{CH}_2\text{OH}$ )的信号, 后者能被  $\text{D}_2\text{O}$  交换而消失。<sup>1</sup>HNMR 谱的峰形与从同一真菌中得到的 5-羟甲基咪喃甲醛(I)<sup>(3)</sup>很近似。但碱甲(IV) 分子内含氮原子, 故可能为咪喃环中的氧被氮所代替, 即可能为 5-羟甲基吡咯甲醛的衍生物。碱甲乙酸酯(Ia) MS  $m/z$  237 ( $M^+60$ ), 恰是碱甲( $M^+$ , 195)接上一个乙酰基。原来的羟甲基中羟基质子信号  $\delta$  2.34 峰消失,  $-\text{CH}_2-\text{OH}$  的质子化学位移从  $\delta$  4.67 移至  $\delta$  5.12( $\text{CH}_2-\text{OAc}$ )。碱甲(I) 的 <sup>13</sup>CNMR 谱中出现六个低场信号 179.3(d), 141.7(s), 124.8(d), 110.3(d), 132.1(s) 和 56.4(t) 为相应地 5-羟甲基吡咯甲醛的六个碳(见表 I)。进一步说明碱甲(I) 为 5-羟甲基吡咯甲醛的衍生物。

灵芝碱乙(II) 含量较少, 且难与碱甲分开, 故将其制成乙酸酯(IIa), 然后分得碱乙乙酸酯(IIa) mp 55~6°C, HRMS 测得 IIa 分子式为  $C_{16}H_{17}O_3N$ ,  $m/z$  271.1210 (计算值 271.1209)。IIa <sup>1</sup>HNMR 谱在低场区出现单取代苯环氢  $\delta$  7.20(5H, m), 而高场区则没有甲基信号, 其他的峰均与碱甲(I)相似。IIa <sup>13</sup>CNMR 亦存在六个 5-羟甲基吡咯甲醛的信号。碱甲和碱乙酯化以后, Ia, IIa 在 <sup>1</sup>HNMR 谱中不再存在  $\text{D}_2\text{O}$  可交换的 OH 或 NH 基, 因此这两个化合物的侧链只能连接在吡咯环的氮原子上。一般说吡咯环上 <sup>1</sup>HNMR 偶合常数  $J$  值以  $J_{\beta\beta}$  最大( $\sim 3.5\text{ Hz}$ ),  $J_{\alpha\beta}$  次之( $\sim 2.6\text{ Hz}$ ), 而 I 和 IIa 中吡咯环上仅存的两上质子  $J=4\text{ Hz}$ ,

\* 本文于 1989 年

应占据  $\beta$  和  $\beta'$  位(即  $C_3$  和  $C_4$ )；羟甲基和醛基必占据  $\alpha$  和  $\alpha'$  位( $C_5$ ,  $C_2$ )。碱甲和碱乙  $^1\text{H}$ NMR 均存在类似的两组多重峰— $\text{CH}_2$ — $\text{CH}_2$ —侧链结构，根据质谱和氢谱确定碱甲连有异丙基，碱乙连有苯环，因此二者分别用以下两式表示：



为了证明侧链结构和归属各个质子的化学位移，对碱甲 (I) 进行了  $^1\text{H}$ NMR 去偶实验，发现照射  $\text{CH}_3$ (0.98)时，1.60(m)信号简化；而照射 1.60(m)时，甲基(0.98 d)由双峰变为单峰 (出现在 0.93 s 处)，4.36(m)由多重峰变为单峰 (出现在 4.43 s)。照射 4.36 时 1.60(m)由多重峰变为双峰 (出现在 1.65 d)。因此 1 式是合理的。并且碱甲 (I) 和碱乙乙酸酯(IIa)的质谱裂解碎片基本上符合吡咯环系的裂解方式<sup>[4]</sup>，见图 1。

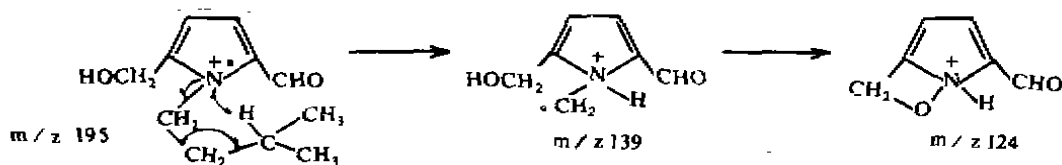


Fig 1. Fragmentation pattern of ganoine.

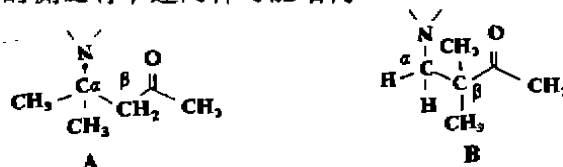
碱甲(I)和碱乙乙酸酯(IIa) $^{13}\text{C}$ NMR(见表 1)数据亦与以上两个结构式相符。碱甲(I)应为 N-异戊基-5-羟甲基吡咯甲醛(N-isopentyl-5-hydroxymethyl-pyrrole aldehyde)，碱乙(II)为 N-苯乙基-5-羟甲基吡咯甲醛(N-phenylethyl-5-hydroxymethyl-pyrrole aldehyde)。

Tab 1.  $^1\text{H}$ NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR data of ganoine (I), its acetate (Ia), ganodine acetate (IIa) and 5-hydroxymethylfurfuraldehyde (IV) (solvent:  $\text{CDCl}_3$ )

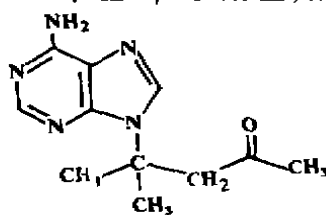
C / H	$^1\text{H}$ NMR				$^{13}\text{C}$ NMR*	
	I	Ia	IIa	IV <sup>(3)</sup>	I	IIa**
1	9.47s	9.57s	9.64s	9.50s	179.3d	180.1d
2	—	—	—	—	141.7s	139.0s
3	6.86d(4)	6.90d(4)	6.97d(4)	7.26d(3.6)	124.8d	124.5d
4	6.21d(4)	6.30d(4)	6.30d(4)	6.57d(3.6)	110.3d	112.4d
5	—	—	—	—	132.1s	132.8s
6	4.67s	5.12s	4.79s	4.69	56.4t	57.1t
OH	2.34	—	—	—	—	—
OAc	—	2.10s	2.08s	—	—	20.5q, 170.5s
1'	4.36m	4.32m	4.54m	—	44.5t	47.8t
2'	1.60m	1.60m	3.02m	—	40.3t	38.1t
3'	1.60m	1.60m	—m	—	26.9d	—
4', 5'	0.98d(6)	0.96d(6)	—m	—	22.5q	—
1''	—	—	7.20m	—	—	137.3s
2'', 6''	—	—	7.20m	—	—	129.5d
3'', 5''	—	—	7.20m	—	—	129.1d
4''	—	—	7.20in	—	—	127.2d

$^{13}\text{C}$ NMR 25MHz Solvent: acetone- $d_6$

灵芝嘌呤(III)-mp 151~2℃, HRMS 测得分子式为  $C_{11}H_{15}ON_5$ ,  $m/z$  233.1246 (计算值 233.1276), EI-MS 的碎片离子峰出现腺嘌呤及其核苷的特征峰<sup>(1)</sup>,  $m/z$  135(100), 108(135-HCN, 25), 81(135-2×HCN, 4), 54(135-3×HCN, 7)。IR 谱显示氨基(3280, 3120  $cm^{-1}$ ), 嘌呤环的骨架振动峰(1660, 1597, 1554  $cm^{-1}$ )。<sup>1</sup>HNMR 低场区  $\delta$  7.93(s), 8.32(s)及<sup>13</sup>CNMR 的 152.0(d), 139(d)分别是嘌呤环的 2-H, 8-H, C<sub>2</sub> 和 C<sub>8</sub> 信号。 $\delta$  5.64 信号可被 D<sub>2</sub>O 交换而消失, 应为-NH<sub>2</sub> 信号。UV 谱:  $\lambda_{max}^{EtOH}$  260nm, 表明-NH<sub>2</sub> 处于 C<sub>6</sub> 而不是 C<sub>2</sub> 或 C<sub>8</sub> (前者为 236, 305 nm, 后者为 241, 238 nm<sup>(5)</sup>), 因此确定 III 是 6-氨基嘌呤, 即腺嘌呤的衍生物。IR 还显示羰基 1700  $cm^{-1}$ 。EI-MS 存在 M<sup>+</sup>-43( $m/z$  190.1100) 和 43(-COCH<sub>3</sub>)的碎片峰, 说明羰基可能以甲基酮的形式存在于侧链上。<sup>1</sup>HNMR 中有二个处于较低场的甲基单峰, 即  $\delta$  1.85(6H, s)和 1.96(3H, s), 后者为甲基酮中的甲基信号。<sup>13</sup>CNMR 相应存在 205.57(s), 31.05(q)信号。 $\delta$  1.85(6H, s)可能为连接于双键上的两个甲基, 从展开的分子式  $C_5H_4N_5 \cdot C_6H_{11}O$  看, 侧链-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O 只有一个不饱和因素, 既然已有一个羰基, 就不可能存在双键。那么  $\delta$  1.85(s)和 27.56(q)所代表的两个甲基就不可能是烯甲基, 根据上述分析, 灵芝嘌呤的侧链有下述两种可能结构



<sup>13</sup>CNMR 中, III 的羰基为  $\delta$  205.57, 与丙酮羰基 205.2 一致, 而  $\alpha$ -多取代酮的  $\delta$  偏大如 3-甲基丁酮(二取代丙酮)  $\delta$  210.7<sup>(6)</sup>, 比较 A, B 和几种取代丙酮的  $\delta$  值, A 式较 B 式合理。EI-MS  $m/z$  176.0962( $C_5H_4N_5 \cdot C_3H_6$ )是 M<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub> 的碎片。B 式中  $\beta$ -位 2-CH<sub>3</sub> 的  $\delta$  值很难出现在较低场 1.86 处, 而 A 式的  $\alpha$  位 2-CH<sub>3</sub> 和 -CH<sub>2</sub>-(3.50, 2H, s)同处于大致相当的位置, 可能由于均受嘌呤环去屏蔽效应的影响, 使三者的化学位移均向低场偏移。事实上 N<sup>9</sup>-(1, 1-dimethyl-2-propenyl), N<sup>6</sup>-benzoyl-adenine<sup>(7)</sup>的  $\alpha$ -位也有类似的两个偕甲基, 其化学位移为  $\delta$  1.94。因此确定 III 的侧链为 A 式。从理论上推论, A 侧链可以接在腺嘌呤环上五个不同的氮原子上, 即 N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>7</sup>, N<sup>9</sup> 和 C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>。以上光谱数据说明取代基连接在 N<sup>9</sup>-位可能性最大。N.J.Leonard<sup>(8)</sup>总结了五种取代不同 N-位置的甲基腺嘌呤的 UV 光谱规律, 又合成了七种不同侧链, 或接在不同位置的化合物, N<sup>9</sup>-取代化合物为 260 nm 左右, 并且不受溶剂 pH 值影响。其他位置常出现在 270 nm。灵芝嘌呤 UV:  $\lambda_{max}^{EtOH}$  260 nm, 溶剂的 pH 对吸收峰位移影响不大, 说明 A-侧链接在 N<sup>9</sup> 上。综上所述, 灵芝嘌呤(III)应为 N<sup>9</sup>-( $\alpha$ ,  $\alpha$ -二甲基- $\gamma$ -丁酮基)腺嘌呤 [N<sup>9</sup>-( $\alpha$ ,  $\alpha$ -dimethyl- $\gamma$ -oxobutyl)adenine]。



III

## 实 验 部 分

熔点用 Kofler 熔点测定器测定, 未校正。红外光谱用 Perkin-Elmer 399B 型光谱仪测定, 固体样品用 KBr 压片, 液体样品用 film 法测定。紫外光谱用岛津-240 型仪测定。核磁共振谱用 FX-Q 90 和 FX-100 仪测定,  $\text{CDCl}_3$  为溶剂, TMS 为内标。质谱用 JMS-O2SB 质谱仪测定。薄层用 silica gel G, 柱层析用 silica gel(140~160 目), 均为青岛海洋化工厂产品。

### 一. 提取分离

(一)灵芝碱甲和碱乙 薄盖灵芝干燥菌丝体 40 kg 用 95%EtOH 提取, 得到 EtOH 提取物, 加  $\text{H}_2\text{O}$  适量, 以  $\text{Et}_2\text{O}$  萃取, 得  $\text{Et}_2\text{O}$  提取物 2800 g, 将该提取物搅拌溶于 20%KOH 的 EtOH 溶液中, 加  $\text{H}_2\text{O}$  稀释, 再以  $\text{Et}_2\text{O}$  萃取,  $\text{Et}_2\text{O}$  提取液水洗干燥后浓缩, 得中性脂溶部分 500 g。将该部分以 pet. ether(60~90 $^\circ\text{C}$ )—90%MeOH 进行液液分配提取, 分别减压浓缩得到相应的提取物。取 100 g MeOH 提取物进行 silica gel(500 g)柱层析, pet. ether— $\text{Me}_2\text{CO}$  梯度洗脱, 相同部分合并后再次柱层析分离, 得到主要含 Rf 值 0.3[silica gel, pet. ether— $\text{Me}_2\text{CO}$ (8:2)] 部分 3 g, 制备性 silica gel 薄层纯化: pet. ether—EtOAc(7:3)展开, 得到 Rf 值 0.4 部分 1 g 和 Rf 值 0.28 部分 100 mg, 前者经硅胶柱层析纯化, 得浅黄色油状液体碱甲(I), 冰箱放置可慢慢固化。后者先经常规乙酰化处理, 再进行制备性 silica gel 薄层分离, 以 pet. ether—EtOAc(85:15)展开, 得到碱乙的乙酰化物 (IIa), 以 pet. ether— $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  重结晶, 得白色结晶 IIa 30 mg。

(二)灵芝嘌呤 薄盖灵芝菌丝体的水溶部分<sup>(1)</sup>通过阳离子树脂处理,  $\text{NH}_4\text{OH}$  碱化以后用 EtOH 洗脱。将除去腺嘌呤等成分后的母液进行多次 silica gel 柱层析及制备薄层层析, 从 10 kg 菌丝体得到粗灵芝嘌呤 100 mg, 再经 silica gel 柱层析,  $\text{Me}_2\text{CO}$  洗脱纯化, 最后用  $\text{Me}_2\text{CO}$  重结晶, 得白色结晶 III 18 mg。

### 二. 鉴定

灵芝碱甲(I) 油状液体, 元素分析:  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$  理论值% C67.69, H8.79, N 7.18; 实测值% C 67.62, H, 8.85, N, 7.20。UV:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm(log $\epsilon$ ): 236(sh, 3.92), 294(4.3)。IR(film) $\text{cm}^{-1}$ : 3360, 1640, 1515, 1460, 1398, 1360, 1020, 765。HRMS:  $m/z$  195.1628( $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$ , 计算值 195.1258), 180( $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ , 2), 178( $\text{M}^+ - \text{OH}$ , 7), 166( $\text{M}^+ - \text{CHO}$ , 11), 164( $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$ , 43), 152(13), 148(4), 139(32), 138(6), 124(20), 122(15), 111(20), 110(25), 108(100), 96(20), 80(43)。

灵芝碱甲乙酰化物(Ia) 油状液体, UV:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm(log $\epsilon$ ): 262(sh, 4.01), 298(4.31)。MS  $m/z$ : 237( $\text{M}^+$ , 58), 195(23), 178(42), 166(12), 164(40), 152(45), 148(25), 134(17), 125(16), 122(48), 121(83), 111(20), 110(19), 108(100), 96(8), 93(61), 80(23)。

灵芝碱乙乙酰化物(IIa) 白色结晶, mp 55~6 $^\circ\text{C}$ , 元素分析  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}$  理论值% C 70.85, H 6.32, N 5.17; 实测值% C 69.31, H 6.26, N 5.01。UV:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm: 236(3.94), 291(4.3)。IR(KBr) $\text{cm}^{-1}$ : 1733, 1658, 1240。MS  $m/z$ : 271.1210, ( $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}$  计算值 271.1209), 229(18), 212(33), 180(7), 167(6), 125(160), 120(12), 108(98), 105(57), 104(98), 91(19), 77(25)。I 及 IIa 的  $^1\text{H}$ NMR,  $^{13}\text{C}$ NMR 数据见表 1。

灵芝嘌呤(III) mp 151~2 $^\circ\text{C}$ , UV:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm: 260(neutral), 260(+HCl), 262(+NaOH)。IR(KBr) $\text{cm}^{-1}$  3280, 3120, 1700, 1660, 1597, 1554, 1465, 1360, 1240, 993。

HRMS  $m/z$  233.1246( $C_{11}H_{15}N_5O$  计算值 233.1276), 218( $M^+ - CH_3$ , 8), 191( $M^+ - 42$ , 2), 190( $M^+ - 43$ , 15), 176( $M^+ - 57$ , 8), 162( $M^+ - 57 - 15$ , 2), 135(100), 119(2), 108(25), 81(4), 80(3), 66(3), 54(7), 43(48).  $^1H$ NMR:  $\delta$  7.93(1H, s, 2-H), 8.32(1H, s, 8-H), 3.50(2H, s,  $\beta$ -H), 1.96(3H, s,  $\delta$ -H), 1.85(6H, s,  $\beta'$ -H), 5.64(2H, bs,  $-NH_2$ ).  $^{13}C$ NMR(50.3MHz,  $CDCl_3$ ) $\delta$  151.96(d,  $C_2$ ), 150.16(s,  $C_4$ ), 120.94(s,  $C_5$ ), 155.84(s,  $C_6$ ), 138.99(d,  $C_8$ ), 57.58(s,  $C_x$ ), 50.97(t,  $C_\beta$ ), 205.57(s,  $C_\gamma$ ), 31.05(q,  $C_\delta$ ), 27.56(q,  $C_{\beta'}$ ).

**致射**  $^1H$ NMR 及双照射由侯双洲先生代测,  $^{13}C$ NMR 由抗菌素研究所及西德拜耳药厂代测, 其他光谱由本所仪器分析室代测。

### 参 考 文 献

1. 余竞光, 等. 薄盖灵芝化学成分的研究(II). 药学报 1979; 14: 374
2. 余竞光, 等. 薄盖灵芝深层发酵菌丝体化学成分的研究(II). 中草药 1981; 12: 295.
3. 余竞光, 等. 薄盖灵芝深层发酵菌丝体化学成分的研究(III). 同上 1983; 14: 438.
4. Jones RA, et al. *The chemistry of Pyrroles*. 1st ed. London: Academic Press, 1977. 480~486.
5. Brown DJ. *Fused Pyrimidines. Part II Purines* 1st ed New York: John Wiley Sons, 1971. 487~488.
6. Levy GC, et al. *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1980. 137~138.
7. Shimizu B, et al. N-N Alkyl and glycozyl migration of purines and pyrimidines *Chem Pharm Bull* 1970; 18: 570.
8. Leonard NJ, et al. The Chemistry of Triacanthine. *J Am Chem Soc* 1962; 84: 2148

## STUDIES ON CONSTITUENTS OF *GANODERMA CAPENSE* IV. THE CHEMICAL STRUCTURES OF GANOINE, GANODINE AND GANODERPURINE

JG Yu, RY Chen, ZX Yao, YF Zhai, SL Yang and JL Ma

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

**ABSTRACT** Two novel pyrrole alkaloids—ganoine and ganodine and a novel purine alkaloid ganoderpurine have been isolated from the mycelium of *Ganoderma capense* (Lloyd)Teng (Polyporaceae) obtained by submerged fermentation. On the basis of spectroscopic data their structures were elucidated, ganoine is N-isopentyl-5-hydroxymethyl-pyrrol aldehyde. Ganodine is N-phenylethyl-5-hydroxymethyl-pyrrol aldehyde and ganoderpurine is N<sup>9</sup>-( $\alpha$ ,  $\alpha$  dimethyl- $\gamma$ -oxobutyl) adenine.

**Key words** *Ganoderma capense*; Ganoine; Ganodine; Ganoderpurine.