

炭角菌 *Xylaria* sp. 290 代谢产物中两个新的海松烷型二萜徐培培^a 尤怀成^b 胡志钰^b 李瑶瑶^c 沈月毛^{*,a,c}^(a) 山东大学生命科学院 济南 250100)^(b) 厦门大学生命科学院 厦门 361005)^(c) 山东大学药学院 济南 250012)

摘要 从炭角菌属真菌 290 中分离得到两个新的海松烷型二萜 xylarianes A (1)和 B (2), 以及一个已知的该类二萜 16-hydroxy isopimar-7-en-19-oic acid (3). 通过一维和二维 NMR 数据解析及高分辨率质谱分析确定了化合物 1~3 的化学结构. 化合物 1~3 在抗肿瘤活性测定中均未显示出活性.

关键词 海松烷; 二萜; 炭角菌属

Two New Pimarane-Type Diterpenes from the Metabolites of *Xylaria* sp. 290Xu, Peipei^a You, Huaicheng^b Hu, Zhiyu^b Li, Yaoyao^c Shen, Yuemao^{*,a,c}^(a) School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100)^(b) School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)^(c) School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012)

Abstract Two new pimarane-type diterpenes, xylarianes A (1) and B (2), were isolated from the crude extract of the fungus *Xylaria* sp. 290 along with one known compound of 16-hydroxy-isopimar-7-en-19-oic acid (3). The chemical structures of 1~3 were elucidated by spectroscopic methods including 1D-NMR and 2D-NMR experiments and HR-ESIMS. The antitumor assay of compounds 1~3 showed that they have no activities.

Keywords pimarane; diterpene; *Xylaria* sp.

炭角菌(*Xylaria*)属于子囊菌纲(Ascomycetes)球壳目(Sphaeriales)的炭棒科(Xylariaceae), 在自然界中广泛分布, 可生长于枯木、白蚁巢或寄生于木本植物中. 前期研究显示, 炭角菌属真菌能够代谢产生结构类型丰富、生物活性广泛的天然产物, 是寻找新活性天然产物的重要资源. 其中, 分离自 *Xylaria* sp. 的 eremophilane 型倍半萜 integric acid 具有抑制 HIV-1 整合酶活性^[1]; 分离自 *Xylaria multiplex* 的十元内酯类化合物 multiplolides A 和 B, 以及 *Xylaria polymorpha* 的 polypropionates 类化合物 xylarinic acids A 和 B 均具有较强的抗真菌活性^[2,3]; 分离自 *Xylaria* sp. 的环五肽类化合物具有与酮康唑协同抗白色假丝酵母活性^[4]; 分离自 *Xylaria polymorpha* 海松烷型二萜糖苷能够诱导肿瘤细胞凋亡^[5]; 分离自 *Xylaria* sp. 2508 的 Xyloketal A 具有抑制乙酰胆碱酯酶活性^[6];

分离自内生 *Xylaria* sp. 的蕙醌类化合物具有抗疟疾活性^[7]. 前期, 本课题组从多株炭角菌属真菌中分离得到了多种结构类型的新化合物, 其中部分化合物显示了较好的抗肿瘤和抗菌活性^[8~12]. 为了继续发掘炭角菌属真菌的次生代谢潜力, 我们对分离自贵州的炭角菌 290 进行了系统的化学成分分离. 通过对菌株 290 的 rDNA-ITS (ITS4-5.8S-ITS5)序列进行测定和 BLAST 比对, 发现其与 *Xylaria* sp. 4038 (登录号: AM922201.1)的序列同源率为 100%, 鉴定其为炭角菌属. 本研究采用 Potato Dextrose Agar (PDA)液体静置培养的方式对菌株 290 进行了 25 L 大规模发酵. 通过对胞外发酵产物的柱层析分离和结构测定, 获得两个新的海松烷型二萜 xylarianes A (1)和 B(2), 以及一个已知的该类二萜 16-hydroxyisopimar-7-en-19-oic acid (3)^[4]. 化合物 1~3(图 1)在浓度为

* E-mail: yshen@sdu.edu.cn

Received June 20, 2013; revised July 9, 2013; published online August 13, 2013.

Project supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program, No. 2010CB833802).

国家重点基础研究发展计划(973 计划, No. 2010CB833802)资助项目.

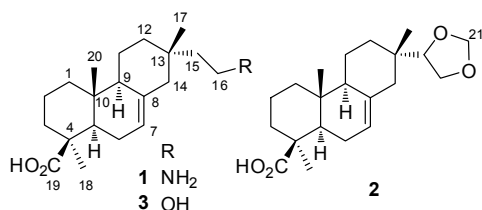


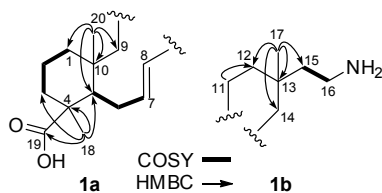
图1 化合物1~3的化学结构

Figure 1 The chemical structures of compounds 1~3

20 $\mu\text{g/mL}$ 时均未显示出抗肿瘤活性。

1 结果与讨论

化合物 **1** 为无色油状物, 易溶于氯仿和丙酮。高分辨质谱(HR-ESIMS)测得化合物 **1** 的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_2$ (m/z 342.2478 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_2\text{Na}^+$, 342.2404). ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 波谱数据(表1)显示化合物 **1** 中含有 3 个单峰甲基, 分别为 δ_{H} 0.79 和 δ_{C} 21.2 [Me(17)], δ_{H} 1.21 和 δ_{C} 29.4 [Me(18)], δ_{H} 0.80 和 δ_{C} 13.8 [Me(20)]; 9 个仲碳, 其中 1 个与杂原子相连 δ_{H} 3.64 和 δ_{C} 58.0 [C(16)]; 3 个叔碳, 其中 1 个为双键碳 δ_{H} 5.37~5.34 和 δ_{C} 121.0 [C(7)]; 以及 5 个季碳, 其中包括 1 个双键碳 δ_{C} 135.1 [C(8)] 和 1 个羧基碳 δ_{C} 178.0 [C(18)]. 通过与 hymatocin C 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 波谱数据对比, 发现化合物 **1** 与 hymatocin C 具有同样的 pimarane 型二萜骨架^[13]. 通过对化合物 **1** 的 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 数据解析最终确定其化学结构. 其中, HMBC 数据显示 Me(18) 与 C(3), C(4), C(5) 和 C(19) 相关; Me(20) 与 C(1), C(5), C(9) 和 C(10) 相关; ^1H - ^1H COSY 数据显示 H—C(1), H—C(2), H—C(3) 相关和 H—C(5), H—C(6), H—C(7) 相关, 从而得到结构片段 **1a**(图2). HMBC 相关信号表明 Me(17) 与 C(12), C(13), C(14) 和 C(15) 相关; H—C(11) 与 C(12) 相关; ^1H - ^1H COSY 数据显示; H—C(15), H—C(16) 相关, 由此得到结构片段 **1b**(图2). 此外, 根据 HMBC 信号中 H—C(14) 与 C(7), C(8) 和 C(9) 相关; H—C(12) 与 C(9) 相关将结构片段 **1a** 和 **1b** 连接. 同时, 由于化合物 **1** 中 δ_{C} 58.0 [C(16)] 的化学位移值比化合物 **3** 中 δ_{C} 62.9 [C(16)] 的化学位移偏高场, 并根据化合物 **1** 的分子量确定其所连杂原子为 N, 从而得到化合物 **1** 的平面结构(图2).

图2 化合物1的 ^1H - ^1H COSY 和关键的 HMBC 相关Figure 2 The ^1H - ^1H COSY and key HMBC correlations of 1

化合物 **1** 的相对构型通过 ROESY 谱确定 其中 H_α —C(6), Me(18), H—C(5), H—C(9), H_2 —C(15) 相关, H_β —C(6), Me(20) 相关, 说明 H—C(5), H—C(9) 和 Me(18) 在 α 位, Me(17), C(19) 和 Me(20) 在 β 位(图3). 至此, 确定化合物 **1** 的结构为 16-amino-isopimar-7-en-19-oic acid, 命名为 xylariane A.

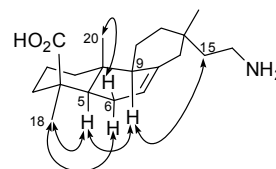


图3 化合物1的关键 NOE 相关

Figure 3 The key NOESY correlations of 1

化合物 **2** 为无色油状物, 易溶于氯仿和丙酮。高分辨质谱(HR-ESIMS)测得化合物 **2** 的分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$ (m/z 371.2201 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Na}^+$, 371.2193). 化合物 **2** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 波谱数据与化合物 **1** 十分相似, 区别仅在于 ^{13}C 谱中多出一个仲碳 δ_{C} 99.5 [C(21)], 以及 C(15) 的化学位移向低场移动到 δ_{H} 3.67 和 δ_{C} 84.4, 表明 C(15) 与杂原子相连. 此外, HMBC 数据显示 H—C(21) 与 C(15) 和 C(16) 相关, 结合化合物的 **2** 的分子式, 确定 C(15), C(16) 和 C(21) 形成了五元环氧结构. 化合物 **2** 的相对构型通过与 **1** 相同的 ROESY 信号确定. 由此, 化合物 **2** 的结构确定为 15,16-methylenedioxy-isopimar-7-en-19-oic acid, 命名为 xylariane B.

采用噻唑蓝比色法(MTT)法测定了化合物 **1**~**3** 对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制活性, 结果表明 3 个化合物在浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时均未表现出抗肿瘤活性。

2 结论

本文通过对炭角菌属真菌 290 的 PDB 液体静置发酵产物的分离纯化和结构解析, 获得了 3 个海松烷型二萜. 其中, 化合物 **1** 和 **2** 为新结构, 化合物 **3** 为该类型已知化合物 16-hydroxy-isopimar-7-en-19-oic acid. 化合物 **1**~**3** 在浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时对宫颈癌细胞 HeLa 均未表现出抑制活性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

NMR 由 Bruker DRX-600 核磁共振仪测定; 质谱由 Bruker 的 BioESI-Q-TOF 测定; 薄层硅胶 GF254 和柱色谱硅胶 200~300 目购买自青岛海洋化工厂; 反相硅胶 RP18 购买自 Merck 公司; 凝胶 Sephadex LH-20 购买自 GE Healthcare 公司; 各种溶剂均为分析纯。

表 1 化合物 1 和 2 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据(600/150 MHz)
Table 1 ^1H NMR and ^{13}C NMR data for compounds 1 and 2 (600/150 MHz)

Position	1 $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$		2 (CDCl_3)	
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR
1	1.07~1.12 (m) 1.86~1.91 (m)	39.7 (t)	1.03~1.07 (m) 1.87~1.90 (m)	39.8 (t)
2	1.41~1.46 (m) 1.99 (dt, $J=13.6, 3.3$ Hz)	19.6 (t)	1.46~1.49 (m) 1.86~1.89 (m)	19.6 (t)
3	1.05~1.11 (m) 2.11~2.17 (m)	38.2 (t)	1.05~1.09 (m) 2.16~2.19 (m)	38.1 (t)
4	—	43.2 (s)	—	43.7 (s)
5	1.35 (dd, $J=12.1, 4.2$ Hz)	51.3 (d)	1.36~1.41 (m)	51.6 (d)
6	2.48 (t, $J=17.9$ Hz) 2.14~2.17 (m)	24.3 (t)	2.44 (t, $J=16.2$ Hz) 2.14~2.18 (m)	24.3 (t)
7	5.34~5.37 (m)	121.0 (d)	5.39~5.42 (m)	121.9 (d)
8	—	135.1 (s)	—	134.0 (s)
9	1.66~1.71 (m)	51.6 (d)	1.65~1.70 (m)	51.5 (d)
10	—	35.6 (s)	—	35.9 (s)
11	1.26~1.30 (m) 1.55~1.58 (m)	20.8 (t)	1.29~1.33 (m) 1.56~1.60 (m)	20.4 (t)
12	1.51~1.54 (m) 1.22~1.28 (m)	37.1 (t)	1.30~1.35 (m)	33.3 (t)
13	—	32.8 (s)	—	36.6 (s)
14	1.90 (br s)	47.3 (t)	1.94 (br. d, $J=11.7$ Hz) 2.05 (dd, $J=11.7, 2.4$ Hz)	42.7 (t)
15	1.46 (t, $J=7.7$ Hz)	47.7 (t)	3.67 (t, $J=7.8$ Hz)	84.4 (d)
16	3.64 (t, $J=8.4$ Hz)	58.0 (t)	3.84 (t, $J=7.8$ Hz) 3.73 (t, $J=7.8$ Hz)	65.2 (t)
17	0.79 (s)	21.2 (q)	0.77 (s)	17.3 (q)
18	1.21 (s)	29.4 (q)	1.27 (s)	29.1 (q)
19	—	178.0 (s)	—	178.0 (s)
20	0.80 (s)	13.8 (q)	0.77 (s)	14.3 (q)
21	—	—	5.05 (s) 4.81 (s)	95.5 (t)

3.2 实验方法

采用 PDA 平板(马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 15 g/L, 自然 pH)活化菌株 290 后, 取末端菌丝转接到 300 mL PDB 液体培养基 28 °C 160 转活化 5 d. 取活化后的种子液 5% 转接到 PDB 发酵培养基中(25 L) 28 °C 静置发酵 4 个月. 25 L 发酵液单层纱布过滤后 45 °C 减压浓缩至约 2 L, 加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相 45 °C 减压浓缩得.

胞外提取物(13.5 g)经行反相硅胶柱层析(RP-18 145 g, 丙酮-水梯度洗脱), 得到组分 1~14. 组分 3 (4.39 g) 经凝胶柱层析(Sephadex LH-20 140 g, 甲醇洗脱), 得到组分 3A~3H. 组分 3A (250 mg) 经凝胶柱层析(Sephadex LH-20 140 g, 甲醇洗脱)和正相硅胶柱层析[200 mg, $V(\text{石油醚}):V(\text{丙酮})=50:1$]得化合物 1 (3 mg). 组分 3B (2.71 g) 经凝胶柱层析(Sephadex LH-20 140 g, 甲醇洗脱), 反相硅胶柱层析(RP-18 30 g, 24% 丙

酮-水洗脱)和正相硅胶柱层析[100 mg, $V(\text{石油醚}):V(\text{丙酮})=100:1$]得化合物 2 (1 mg). 组分 4 (2.51 g) 经凝胶柱层析(Sephadex LH-20 140 g, 甲醇洗脱)和反相硅胶柱层析(RP-18 30 g, 30% 丙酮-水洗脱) 得化合物 3 (1 mg).

采用 MTT 法测定化合物的抗肿瘤活性. 将宫颈癌细胞 Hela 制成单细胞悬液, 用血细胞板计数并稀释至细胞浓度为 $6 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个/mL. 在 96 孔板中接种细胞, 每孔 80 μL ; 另设 2 个无细胞仅含 80 μL 培养液的空白对照孔用于仪器调零. 将接种后的 96 孔板置于 5% CO_2 的培养箱中 37 °C 培养 24 h, 再加入 20 μL 用培养液稀释好的样品. 同时, 阳性对照孔中加入 20 μL 顺铂 (100 $\mu\text{g/mL}$), 阴性对照孔和空白对照孔各加 20 μL 培养液. 继续培养 72 h 后, 每孔加 10 μL 的 5 mg/mL MTT, 37 °C 反应 3 h 后再每孔加 100 μL 的 10% SDS-0.01 mol/L HCl 溶解过夜. 酶标仪比色测定(测定波长 595 nm).

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **1~3** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY 和 ROESY 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Singh, S. B.; Zink, D.; Polishook, J.; Valentino, D.; Shafiee, A.; Silverman, K.; Felock, P.; Teran, A.; Vilella, D.; Hazuda, D. J.; Lingham, R. B. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8775.
- [2] Jang, Y. W.; Lee, I. K.; Kim, Y. S.; Lee, S.; Lee, H. J.; Yu, S. H.; Yun, B. S. *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 696.
- [3] Boonphong, S.; Kittakoo, P.; Isaka, M.; Pittayakhajonwut, D.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 965.
- [4] Wu, W.; Dai, H.; Bao, L.; Ren, B.; Lu, J.; Luo, Y.; Guo, L.; Zhang, L.; Liu, H. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1303.
- [5] Shiono, Y.; Motoki, S.; Koseki, T.; Murayama, T.; Tojima, M.; Kimura, K. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 935.
- [6] Lin, Y.; Wu, X.; Feng, S.; Jiang, G.; Luo, J.; Zhou, S.; Vrijmoed, L. L.; Jones, E. B.; Krohn, K.; Steingrover, K.; Zsila, F. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6252.
- [7] Tansuwan, S.; Pornpakakul, S.; Roengsumran, S.; Petsom, A.; Muangsin, N.; Sihanonta, P.; Chaichit, N. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1620.
- [8] Li, Y.; Lu, C.; Huang, Y.; Li, Y.; Shen, Y. *Rec. Nat. Prod.* **2012**, *6*, 121.
- [9] Li, Y.; Hu, Z.; Shen, Y. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 1843.
- [10] Hu, Z.; Li, Y.; Lu, C.; Lin, T.; Hu, P.; Shen, Y. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 925.
- [11] Li, Y.; Hu, Z.; Lu, C.; Shen, Y. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 796.
- [12] Hu, Z.; Li, Y.; Huang, Y.; Su, W.; Shen, Y. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 46.
- [13] Borgschulte, K.; Rebuffat, S.; Trowitzsch-Kienast, W.; Schomburg, D.; Pinon, J.; Bodo, B. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8351.

(Lu, Y.)