

校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720091152102

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

灰黄霉素衍生物的合成及其生物学效应的  
研究

The research on synthesis and biological activity of  
griseofulvin analogues

于晓杰

指导教师姓名：石艳 副教授

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2012 年 04 月 24 日

论文答辩时间：2012 年 06 月 02 日

学位授予日期：2012 年 月 日

答辩委员会主席：陈清西 教授

评 阅 人： \_\_\_\_\_

2012 年 06 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（陈清西教授酶学）课题（组）的研究成果，获得（陈清西教授酶学）课题（组）经费或实验室的资助，在（陈清西教授酶学）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：于晓杰

2012年 4 月 11 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：于晓杰

2012年4月11日

## 目 录

中文摘要 .....	1
英文摘要 .....	3
<b>1 前 言</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 灰黄霉素</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 灰黄霉素概述.....	5
1.1.2 灰黄霉素的发酵和提取.....	5
1.1.3 灰黄霉素的作用.....	7
1.1.3.1 传统临床应用.....	7
1.1.3.2 灰黄霉素在农业上的应用.....	7
1.1.3.3 灰黄霉素在抗肿瘤方面的研究.....	8
1.1.4 灰黄霉素的溶解度.....	10
1.1.5 灰黄霉素的结构改造.....	11
<b>1.2 酪氨酸酶</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 酪氨酸酶概述.....	12
1.2.2 酪氨酸酶抑制剂.....	14
1.2.2.1 酚羟基类化合物.....	14
1.2.2.2 苯甲醛、苯甲酸类化合物.....	16
1.2.2.3 氢醌.....	17
1.2.2.4 天然活性物质.....	18
1.2.3 酪氨酸酶抑制剂的应用.....	19
<b>1.3 本研究的内容和意义</b> .....	<b>19</b>
<b>2 实验材料与方法</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 材料与仪器</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 实验试剂.....	21
2.1.2 真菌.....	21
2.1.3 主要仪器.....	22
<b>2.2 实验方法</b> .....	<b>24</b>

2.2.1 灰黄霉素衍生物的合成.....	24
2.2.1.1 灰黄霉素酸的合成.....	24
2.2.1.2 环氧灰黄霉素的合成.....	24
2.2.1.3 5-硝基灰黄霉素的合成.....	25
2.2.1.4 灰黄霉素缩氨基硫脲的合成.....	25
2.2.1.5 灰黄霉素缩羟胺的合成.....	26
2.2.1.6 4'-羟基灰黄霉素的合成.....	26
2.2.2 抑真菌实验.....	27
2.2.2.1 真菌孢子悬液的制备.....	27
2.2.2.2 抑菌圈实验.....	27
2.2.2.3 菌落生长实验.....	27
2.2.2.4 药品对真菌菌丝的效应实验.....	28
2.2.3 药品对酪氨酸酶抑制机理的研究.....	28
2.2.3.1 药品对酪氨酸酶活力的影响.....	28
2.2.3.2 药品对酪氨酸酶抑制类型和抑制常数的测定.....	28
2.2.4 饱和法比较溶解度.....	29
<b>3 实验结果 .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 灰黄霉素衍生物的合成 .....</b>	<b>30</b>
3.1.1 灰黄霉素酸 (b) 的合成.....	30
3.1.2 环氧灰黄霉素 (c) 的合成.....	31
3.1.3 5-硝基灰黄霉素 (d) 的合成.....	33
3.1.4 灰黄霉素缩氨基硫脲 (e) 的合成.....	34
3.1.5 灰黄霉素缩羟胺 (f) 的合成.....	36
3.1.6 4'-羟基灰黄霉素的合成 (g) .....	37
<b>3.2 灰黄霉素对农业病害真菌尖孢镰刀菌的作用机理 .....</b>	<b>38</b>
3.2.1 灰黄霉素对尖孢镰刀菌的抑制作用.....	38
3.2.2 灰黄霉素对尖孢镰刀菌菌丝生长的影响.....	39
3.2.3 灰黄霉素对尖孢镰刀菌菌丝形态的影响.....	41
<b>3.3 灰黄霉素衍生物的抗真菌活性研究及其构效关系 .....</b>	<b>43</b>

3.3.1 灰黄霉素衍生物对植物病害真菌的抑制.....	43
3.3.2 灰黄霉素衍生物对真菌菌丝形态的影响.....	45
<b>3.4 对蘑菇酪氨酸酶的作用 .....</b>	<b>48</b>
3.4.1 灰黄霉素缩氨基硫脲对蘑菇酪氨酸酶活力的影响.....	50
3.4.2 灰黄霉素缩氨基硫脲对酪氨酸酶的抑制机理.....	51
3.4.3 灰黄霉素缩氨基硫脲对酪氨酸酶的抑制类型.....	52
<b>3.5 饱和法比较溶解度 .....</b>	<b>53</b>
<b>4 讨 论.....</b>	<b>55</b>
4.1 灰黄霉素衍生物的合成 .....	55
4.2 灰黄霉素对农业病害真菌尖孢镰刀菌的作用机理 .....	55
4.3 灰黄霉素衍生物的抗真菌活性研究及其构效关系 .....	56
4.4 灰黄霉素缩氨基硫脲对蘑菇酪氨酸酶的作用 .....	57
4.5 溶解度的比较 .....	57
<b>5 展 望.....</b>	<b>58</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>59</b>
<b>缩略语中英文对照表 .....</b>	<b>68</b>
<b>硕士期间发表的文章 .....</b>	<b>69</b>
<b>已投稿文章 .....</b>	<b>69</b>
<b>致谢.....</b>	<b>70</b>

## Contents

<b>Chinese abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>English abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Griseofulvin</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 The introduction of griseofulvin .....	5
1.1.2 The fermentation and extraction of griseofulvin .....	5
1.1.3 The function of griseofulvin .....	7
1.1.3.1 Clinical application of griseofulvin .....	7
1.1.3.2 Application in agriculture .....	7
1.1.3.3 Anticancer activity of griseofulvin.....	8
1.1.4 The solubility of griseofulvin .....	10
1.1.5 Modifications on griseofulvin structure.....	11
<b>1.2 Tyrosinase</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 The introduction of tyrosinase .....	12
1.2.2 Inhibitors of tyrosinase .....	14
1.2.2.1 Phenolic hydroxyl derivatives.....	14
1.2.2.2 Benzaldehyde and benzoic acid derivatives .....	16
1.2.2.3 Quinol .....	17
1.2.2.4 Natural inhibitors .....	18
1.2.3 The application of tyrosinase inhibitors.....	19
<b>1.3 The significance and contents of this research</b> .....	<b>19</b>
<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Materials and instruments</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 Main reagents.....	21
2.1.2 Fungi .....	21
2.1.3 Main instruments .....	22
<b>2.2 Methods</b> .....	<b>24</b>



2.2.1 The synthesis of griseofulvin analogues .....	24
2.2.1.1 The synthesis of griseofulvin acid .....	24
2.2.1.2 The synthesis of epoxygriseofulvin .....	24
2.2.1.3 The synthesis of 5-nitrylgriseofulvin .....	25
2.2.1.4 The synthesis of 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin .....	25
2.2.1.5 The synthesis of 4'-hydroxylaminegriseofulvin .....	26
2.2.1.6 The synthesis of 4'-hydroxylgriseofulvin .....	26
2.2.2 Fungi inhibition assay .....	27
2.2.2.1 Conidial suspension preparation .....	27
2.2.2.2 Well diffusion assay .....	27
2.2.2.3 Mycelial growth assay .....	27
2.2.2.4 The effects of compounds on hyphal growth of fungi .....	28
2.2.3 Study of the inhibitory effects of 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin on tyrosinase .....	28
2.2.3.1 Study of inhibition activity .....	28
2.2.3.2 Determination of inhibition mechanism .....	28
2.2.4 Compare solubility by saturation method .....	29
<b>3 Results .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 The synthesis of griseofulvin analogues .....</b>	<b>30</b>
3.1.1 The synthesis of griseofulvin acid (b) .....	30
3.1.2 The synthesis of epoxygriseofulvin (c) .....	31
3.1.3 The synthesis of 5-nitrylgriseofulvin (d) .....	33
3.1.4 The synthesis of 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin (e) .....	34
3.1.5 The synthesis of 4'-hydroxylaminegriseofulvin (f) .....	36
3.1.6 The synthesis of 4'-hydroxylgriseofulvin (g) .....	37
<b>3.2 The inhibition mechanism of griseofulvin on <i>Fusarium oxysporum</i> .....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Inhibition activity of griseofulvi on <i>F. oxysporum</i> .....	38
3.2.2 The inhibition of griseofulvin on <i>F. oxysporum</i> .....	39
3.2.3 The effects of griseofulvin on hyphal growth of <i>F. oxysporum</i> .....	41

<b>3.3 The antifungal activity of griseofulvin analogues and the correlation of structure and activity</b> .....	<b>43</b>
3.3.1 The inhibition of analogues on fungi .....	43
3.3.2 The effects of analogues on hyphal growth of fungi .....	45
<b>3.4 The effects of griseofulvin analogues on tyrosinase</b> .....	<b>48</b>
3.4.1 The effects of 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin on tyrosinase.....	50
3.4.2 The inhibition mechanism of 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin on tyrosinase .....	51
3.4.3 The inhibition type of 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin on tyrosinase .....	52
<b>3.5 Compare solubility by saturation method</b> .....	<b>53</b>
<b>4 Discussion</b> .....	<b>55</b>
4.1 The synthesis of griseofulvin analogue.....	55
4.2 The inhibition mechanism of griseofulvin on <i>F. oxysporum</i> .....	55
4.3 The antifungal activity of griseofulvin analogues and the correlation of structure and activity.....	56
4.4 The effects of 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin on tyrosinase.....	57
4.5 Solubility comparison .....	57
<b>5 Out look</b> .....	<b>58</b>
<b>References</b> .....	<b>59</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>68</b>
<b>Publications</b> .....	<b>69</b>
<b>Articles submitted</b> .....	<b>69</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>70</b>

## 摘 要

灰黄霉素是一种非多烯类的抗真菌抗生素,在传统临床上主要是用于治疗皮肤癣菌属引起的感染。灰黄霉素可以强烈地抑制真菌细胞的有丝分裂,而对哺乳动物却只是产生影响纺锤体微管的功能这样轻微的作用。灰黄霉素通过抑制肿瘤细胞系的中心体联合、有丝分裂捕获及随后的细胞死亡来诱导产生多极纺锤体。服用灰黄霉素引起的副作用一般都比较小,也不会引起较严重的后果,它常被建议作为其他抗癌药物的佐剂来使用。近年来对灰黄霉素的研究仍然主要集中在临床皮肤病感染的治疗和对癌症的抑制。

本论文从灰黄霉素的结构特点出发,对其特定的位点进行化学修饰,合成了一系列的灰黄霉素衍生物(灰黄霉素酸,环氧灰黄霉素,5-硝基灰黄霉素,4'-灰黄霉素缩氨基硫脲,灰黄霉素缩羟胺,4'-羟基灰黄霉素),并研究了它们对几种植物病害真菌(串珠镰刀菌、茄形镰刀菌、尖孢镰刀菌和炭疽菌)和酪氨酸酶的抑制效应和抑制机理,同时也研究了灰黄霉素的结构与抑菌效果之间的构效关系。

通过抑菌圈及菌落生长速率实验发现,尽管采自甜瓜、黄瓜、西瓜、苦瓜、辣椒和西红柿的不同专业化型的10株致病性尖孢镰刀菌对灰黄霉素的敏感程度不同,但是灰黄霉素对它们表现出很好的抑制效果,并且灰黄霉素对尖孢镰刀菌菌丝具有很显著的致畸作用。而通过菌落生长速率实验发现,合成灰黄霉素衍生物中,灰黄霉素酸、5-硝基灰黄霉素和4'-羟基灰黄霉素三种完全没有抑菌活性;而另外三种有活性的物质,环氧灰黄霉素、4'-灰黄霉素缩氨基硫脲和灰黄霉素缩羟胺,与灰黄霉素相比,则对不同的真菌表现出不同的抑制活性。

根据灰黄霉素衍生物的抑菌活性可以总结出灰黄霉素各个位点对抑菌作用的构效关系:4'-羟基灰黄霉素对四种供试菌均没有抑菌作用,说明灰黄霉素4'-位的C=O对灰黄霉素的抑菌作用十分重要,结合4'-灰黄霉素缩氨基硫脲和灰黄霉素缩羟胺的实验结果,说明4'-位的双键对抑菌效果有重要的作用,且C=N较C=O更有利于抑菌作用的提高;5-硝基灰黄霉素对四种供试菌均没有抑菌作用,说明5位的改造对抑菌能力的提高贡献不大;而将2'和3'位的双键改造成环氧化合物,其抑菌效果有一定的提高;灰黄霉素酸的抑菌实验结果表明,2'位甲氧基对灰黄

霉素的抑菌效果也起着重要的作用。

至于对酪氨酸酶的抑制作用，合成的六种衍生物中，只有灰黄霉素缩氨基硫脲表现出良好的抑制效果。它对酪氨酸酶的 $IC_{50}$ 为 $37.8 \mu\text{mol/L}$ ，抑制作用属于可逆过程，而抑制类型则为非竞争性抑制。灰黄霉素缩氨基硫脲对酶-底物络合物的抑制常数 $K_{IS}=38.42 \mu\text{mol/L}$ 。

**关键字：**灰黄霉素衍生物；有机合成；生物活性

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Griseofulvin was a classic antifungal agent against many pathogenic filamentous fungi and had been used clinically for the treatment of dermatomycoses. Griseofulvin could intensely inhibit the mitosis of fungi, but it just had a little effect on the microtubule of mammalian cells. Griseofulvin induced multipolar spindle by inhibiting centrosome joint of cancer cell lines, mitosis capture and consequent cell death. Griseofulvin is often recommended as the adjuvant of some other powerful drugs for cancer because of its slight side effects. Recently, griseofulvin has become the object of increased interest again thanks to its anticancer potential.

Based on the properties of its chemical structure, we synthesized several kinds of griseofulvin analogues including griseofulvin acid, epoxygriseofulvin, 5-nitrylgriseofulvin, 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin, 4'-hydroxylaminegriseofulvin and 4'-hydroxylgriseofulvin. Then their antifungal activity against *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum truncatum* was investigated. At the same time, the correlation of structure and activity was studied. The antityrosinase activity and inhibition mechanism of the analogues was also studied.

Through the well diffusion assay and mycelial growth assay, we found that griseofulvin could exhibit excellent antifungal activity even though the ten isolates of *F. Oxysporum* showed different susceptibility. Besides, griseofulvin could cause morphogenetic disturbances in fungi. Of the six synthesized compounds, three (2'-hydroxylgriseofulvin, 5-nitrylgriseofulvin and 4'-hydroxylgriseofulvin) were totally inactive and the others (epoxygriseofulvin, 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin and 4'-hydroxylaminegriseofulvin) performed differently against various fungi compared to griseofulvin.

Take the analogues as a whole, introduction of a nitro at the 5 position resulted in no activity, indicating that modification at this position was not tolerated. The 2'

position and 2'-3' double bond were altered leading to the synthesis of and, the activities of which were quite different even against the same fungus. 2'-hydroxylgriseofulvin showed no activity and this indicated that the alkoxy at the 2' position played an important role in inhibiting fungi. The 4' position was significant for the antifungal activity and should keep its double bond form.

As to the antityrosinase activity, only 4'-thiosemicarbazonegriseofulvin showed obvious inhibitory effect. Its  $IC_{50}$  to tyrosinase was 37.8  $\mu\text{mol/L}$ . The inhibition was reversible and the inhibition type was noncompetitive inhibition. The equilibrium constant ( $K_{IS}$ ) was 38.42  $\mu\text{mol/L}$

**Key words:** Griseofulvin analogues; synthesis; biological activity

# 1 前言

## 1.1 灰黄霉素

### 1.1.1 灰黄霉素概述

灰黄霉素 (Griseofulvin) 是由Oxford等从灰黄青霉 (*Penicillium griseofulvum* Dierckx) 培养液中分离得到的一种含氯代谢产物, 分子式为 $C_{17}H_{17}ClO_6$ <sup>[1]</sup>, 结构见图1, 为白色或类白色结晶性粉末, 无臭, 味微苦, 可溶于丙酮、无水乙醇和二甲基甲酰胺, 但在水中极微溶解<sup>[2]</sup>。它是一种非多烯类的物质, 作为抗真菌抗生素, 在临床上主要是用于治疗皮肤癣菌属等引起的各种疾病。其作用机理一般, 灰黄霉素的化学结构与鸟嘌呤相似, 因此能竞争性抑制鸟嘌呤进入DNA分子, 从而便干扰了真菌DNA的合成而达到抑制真菌生长的目的; 另外它能与微管蛋白相结合, 从而阻止真菌细胞分裂。灰黄霉素作为一种抗生素, 不仅能普遍应用于临床治疗皮肤和角质层真菌感染, 其在农业植物保护方面也有着潜在应用价值。

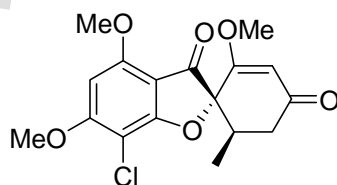


图 1 灰黄霉素化学结构

Fig. 1 The chemical structure of griseofulvin

### 1.1.2 灰黄霉素的发酵和提取

灰黄霉素作为一种有效的抗生素, 可以从多种青霉中发酵获得。在我国, 1960年中国医学科学院抗生素研究所研究试制灰黄霉素成功。1973年, 福建师范大学生物工程研究所的吴松刚教授从厦门土壤中分离获得灰黄霉素产生菌 (*Penicillium patulum*) 野生菌株, 经18代人工定向诱变成功获得耐前体 (Cl<sup>-</sup>) 高产变株, 并通过在发酵培养基中提高氯化物浓度, 提高含氯灰黄霉素的发酵效

价达到34.5%，大大降低生产成本，现今我国已成为世界上最大、唯一的灰黄霉素出口国<sup>[3]</sup>。我国目前投产的灰黄霉素产生菌耐前体变株D-756，发酵单位已达世界领先水平，而且使用原料简单，产品成本低，在国际市场上有很强的竞争力，但在发酵过程中，由于灰黄霉素的前体物氯离子受该菌种耐氯性能的限制，约10%罐批出现无氯灰黄霉素偏高，导致熔点下降，影响产品质量<sup>[4]</sup>。林琳等以D-756为出发菌株，通过紫外线与氯化锂复合诱变获得了高度耐氯变株F-208，其孢子在含氯化物的固体培养基上仍正常萌发和生长，摇瓶发酵培养基氯化物浓度提高到2.0%时，其发酵单位较出发菌株提高12.5%，同时该菌株仍保持着出发株所具备的优良发酵特性<sup>[4]</sup>。灰黄青霉F-208是在野生型*P. griseofulvin* 3.5190菌株的基础上经多代诱变育种获得的灰黄霉素高产突变株，与出发菌株3.5190相比，突变菌株F-208不仅灰黄霉素产量高，而且孢子呈现白色而不是绿色<sup>[5]</sup>。此外，姜广策等发<sup>[6]</sup>现一种海洋红树内生真菌1403，它与灰黄青霉菌并没有亲缘关系，但是对其培养，发现该菌能发酵产生大量的灰黄霉素，可以作为灰黄霉素新的产生菌。由于灰黄霉素中含有氯元素，因此培养基中氯化物无机盐对该化合物的代谢有较重要的影响。于广成等<sup>[8]</sup>在灰黄霉素发酵培养基中，分别用单加NaCl、单加KCl和同时加入NaCl、KCl等3种方法提供灰黄霉素生物合成中所必需的Cl<sup>-</sup>，当提供的Cl<sup>-</sup>浓度为0.214 mol/L，单用KCl时灰黄霉素的发酵单位最高，而单用NaCl时，发酵液中的去氯灰黄霉素含量明显低于其它两种方法<sup>[7]</sup>。沈育芬和吴松刚<sup>[8]</sup>把发酵培养基中的氯化物浓度提高到2.0%（质量比），大米粉量提高到18%时，灰黄霉素耐前体变株F-1012发酵单位得到提高。

而对灰黄霉素的提取目前工业上采用溶剂连续浸泡干菌体的方法，溶剂大多为丙酮<sup>[9-11]</sup>。但由于常规提取所需时间较长，提取率较低，溶剂用量较大，有研究采用超声波技术进行提取<sup>[12]</sup>。王宁强等<sup>[13]</sup>利用超声波的空化作用、热效应、机械作用破坏菌体细胞壁，使溶剂易于渗透至细胞内，有效成分更多地转移到溶剂中，达到缩短提取时间，提高提取率的目的，最终确定了超声波提取灰黄霉素的优化工艺条件为：10倍量的丙酮为提取溶剂，功率300 W，单次辐射时间3 s，提取时间40 min；而验证实验所得提取率为85.158%，超声波循环放大提取实验所得提取率为87.165%，表明了该优化工艺条件应用于灰黄霉素的提取是可行的。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库