

两株多孔菌属担子菌菌丝体中的三萜成分

陈志辉, 吴萍, 薛璟花, 魏孝义*

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 用组织分离法从采集于广东鼎湖山的 2 株多孔菌属担子菌子实体中分离得到 2 株菌丝体, 并对菌丝体分别进行固体发酵培养, 培养物经乙醇提取后, 用柱层析分离得到 4 个化合物, 用光谱法鉴定均为羊毛脂烷型三萜, 它们分别是多孔菌酸 C (polyporenic acid C) (1)、茯苓酸 (pachymic acid) (2)、齿孔酸 (eburicoic acid) (3) 和硫磺菌酸 (sulphurenic acid) (4)。其中化合物 2 为首次从多孔菌属中发现。

关键词: 担子菌; 多孔菌属; 羊毛脂烷型三萜

中图分类号: Q949.329.706

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)05-0399-04

Triterpenes from the Mycelial Cultures of Two *Polyporus* Strains

CHEN Zhi-hui, WU Ping, XUE Jing-hua, WEI Xiao-yi*

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Two strains of fungal mycelia, SC0351 and SC0652, were obtained from tissue culture of the fruiting bodies of two *Polyporus* from Basidiomycetes collected at Dinghushan, Guangdong Province, China. From the solid cultures of these fungi, four lanostane-type triterpenes were isolated by using column chromatography. They were identified by spectral analysis as polyporenic acid C (1), pachymic acid (2), eburicoic acid (3) and sulphurenic acid (4). Compound 2 was obtained from *Polyporus* for the first time.

Key words: Basidiomycete; *Polyporus*; Lanostane-type triterpenoids

多孔菌属(*Polyporus*)属于担子菌纲多孔菌目多孔菌科(Polyporaceae), 是一类腐生真菌。它们主要寄生在活立木、立桩上, 有时也生长于腐木上。它们在生长代谢中能产生胞外酶, 能够降解纤维素和木脂素, 常引起一些树木的疾病; 同时, 多孔菌中有许多药用真菌, 如茯苓(*Poria cocos*)、猪苓(*Polyporus umbellatus*)、雷丸(*Omphalia lapidescens*)等。因此, 多孔菌是人们关注的一类具有重要经济价值的真菌。已有研究表明多孔菌能产生多种代谢产物, 如多糖^[1]、生物碱^[2,3]、多肽^[4]、甾类^[5]、三萜^[6]等。其中, 三萜成分是多孔菌常见的次生代谢产物, 有些多孔菌三萜成分被证明具有抗肿瘤活性^[7]和抗炎作用^[8]。我们

在对鼎湖山自然保护区中担子菌菌丝体的抗菌活性筛选中, 发现 2 株多孔菌菌丝体(SC0351 和 SC0652)的培养物对大肠杆菌(*Escherichia coli*)具有较强抑制作用, 为了寻找其抑菌活性成分, 对这 2 株菌丝体的次生代谢产物进行了研究, 并分离、鉴定出 4 个羊毛脂烷型三萜成分, 分别是多孔菌酸 C (polyporenic acid C) (1)、茯苓酸 (pachymic acid) (2)、齿孔酸 (eburicoic acid) (3) 和硫磺菌酸 (sulphurenic acid) (4)。本文报道这 2 株菌丝体的培养和 4 个三萜成分的提取、分离和鉴定, 为进一步深入研究和真菌资源的开发利用提供参考。

收稿日期: 2005-05-16 接受日期: 2005-06-20

基金项目: 广东省科技创新百项工程项目(2KB04201S)资助

* 通讯作者 Corresponding author

1 材料和方法

1.1 实验菌株

2 株担孢子实体 DH0123 和 DH0308 于 2002 年 1 月采自广东省肇庆市鼎湖山国家自然保护区, 标本由中国科学院微生物研究所黄亦存博士鉴定为多孔菌属 (*Polyporus*) 真菌。用组织分离法从子实体 DH0123 分离得到菌丝体 SC0351, 从子实体 DH0308 分离得到菌丝体 SC0652。2 株菌丝体均保存于 10% 甘油水溶液的冷冻管中。

1.2 培养基

麦芽汁琼脂培养基 (MEA): 麦芽汁琼脂提取物 33.6 g, 蒸馏水 1 L, pH 4.7 ± 0.2; 酵母麦芽汁葡萄糖培养基 (YMG): 葡萄糖 4 g, 麦芽提取物 10 g, 酵母提取物 4 g, 蒸馏水 1 L, pH 5.5 ± 0.2; 发酵培养基: YMG 培养基 600 ml, 小麦粒 300 g, pH 5.5 ± 0.2。

1.3 仪器

核磁共振谱用 Bruker DRX-400 (瑞士 Bruker 公司产), 以 TMS 为内标、CDCl₃ 为溶剂测定; 质谱用 MDS SCIEX API 2000 LC/MS/MS (美国 Applied Biosystems 公司生产), 以负离子模式测定; 旋光度测定用 PE-343 旋光仪 (美国 Perkin Elmer 公司生产)。

1.4 菌丝体的分离

采用组织分离法。用接种铲从采集到的子实体的菇盖与菇柄交界处挑出一小块组织, 迅速移接到 MEA 平面培养基上, 置恒温培养箱中 25℃、无光照培养并观察其生长。待组织块长出菌丝后, 从菌落边缘挑取菌丝移入 MEA 平面培养基上, 置恒温培养箱中 25℃、无光照培养 7 d, 获得无污染的纯菌丝体。将纯化后的菌丝体转入装有 10% 甘油水溶液的冷冻管中, -80℃ 保存。

1.5 发酵培养

用接种针挑取一环原保存菌种, 接种到新配制灭菌过的 MEA 平面培养基上, 在 25℃ 下无光照培养 7 d, 以使菌种活化。在 10 个容量为 300 ml 的三角瓶内加入 YMG 培养基 100 ml, 将活化的菌种在无菌条件下接种于三角瓶内, 放入旋转式摇床, 转速为 200 rpm, 25℃ 下无光照培养 5 d, 得到种子培

养液。在 16 个容量为 3 L 的三角瓶中各装入 YMG 培养基 600 ml, 小麦粒 300 g, 按 10% 接种量将 60 ml 种子培养液转入瓶内, 在 25℃ 下无光照静止培养 13 d, 得发酵培养物。

1.6 提取分离

将担子菌 SC0351 菌丝体发酵物在室温下用 95% 乙醇浸提 3 次, 每次 48 h, 将提取液减压浓缩, 抽干乙醇后加水使成混悬液, 依次用石油醚、氯仿和乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯萃取液减压浓缩得到乙酸乙酯提取部分 (20.2 g)。将该提取部分上硅胶柱, 用氯仿-甲醇 (99:1-4:1) 梯度洗脱, 将氯仿-甲醇 (98:2-95:5) 洗脱部分合并后 (10 g) 再经硅胶柱层析, 以石油醚-丙酮 (5:1-4:1) 梯度洗脱得到化合物 1 (50 mg) 和化合物 2 (8 mg)。

用同样的提取方法从担子菌 SC0652 的发酵物中得到氯仿提取部分 (1.5 g) 和乙酸乙酯提取部分 (10.9 g)。将氯仿提取部分过硅胶柱, 用氯仿-甲醇 (98:2-8:1) 梯度洗脱, 将 98:2 洗脱部分 (90 mg) 再经过 Sephadex LH-20 柱 (用甲醇洗脱) 分离和 RP-18 柱 (用 80% 甲醇洗脱) 纯化得到化合物 3 (10 mg)。乙酸乙酯提取部分上硅胶柱, 依次用氯仿-甲醇 98:2、95:5、9:1 和 8:1 洗脱, 98:2 洗脱部分再过 Sephadex LH-20 柱, 用甲醇洗脱得到化合物 4 (50 mg)。

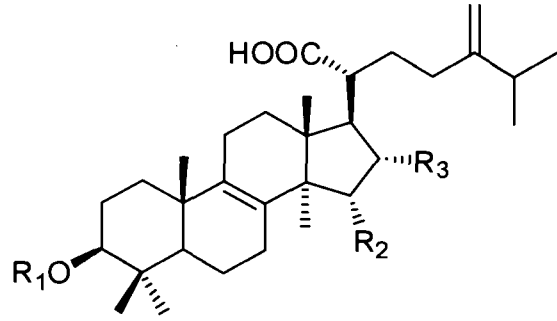
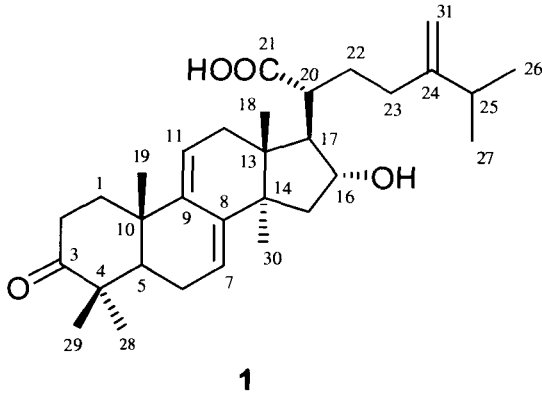
1.7 结构鉴定

化合物 1 白色无定形粉末, 分子式为 C₃₁H₄₆O₄, $[\alpha]_D^{25} + 16.8$ (c 0.15, MeOH); ESIMS *m/z*: 481 [M-H]⁻, 437 [M-COOH]⁻, 419 [M-COOH-H₂O]⁻, 331; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.32 (1H, ddd, *J* = 14.7, 4.6, 3.3 Hz, H-2α), 2.74 (1H, ddd, *J* = 14.7, 14.3, 5.8 Hz, H-2β), 1.52 (1H, dd, *J* = 11.9, 3.7 Hz, H-5), 5.48 (br d, *J* = 6.7 Hz, H-7), 5.33 (1H, br d, *J* = 6.4 Hz, H-11), 1.81 (dd, *J* = 17.4, 6.4 Hz), 2.27 (br d, *J* = 17.4 Hz), 1.47 (br d, *J* = 13.7 Hz), 2.22 (m), 4.11 (dd, *J* = 6.4, 7.9 Hz, H-16), 2.19 (m), 0.62 (3H, s, H-18), 1.15 (3H, s, H-19), 2.48 (ddd, *J* = 11.3, 11.0, 3.4 Hz), 0.99 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-26), 1.01 (3H, d, *J* = 7.4 Hz, H-27), 1.07 (3H, s, H-28), 1.10 (3H, s, H-29), 1.08 (3H, s, H-30), 4.71 (1H, s, H-31α), 4.76 (1H, s, H-31β); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) 光谱数据见表 1。光谱数据与文献[7]报道的 polyporenic acid

C一致。

化合物 2 白色粉末状, 分子式为 $C_{33}H_{52}O_5$, $[\alpha]_D^{25} + 5.7$ (c 0.94, MeOH); ESIMS m/z : 527 [M - H]⁻, 481 [M - H - HCOOH]⁻, 311, 281, 183; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.73 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s,

H-28), 0.86 (3H, s, H-30), 0.96 (3H, s, H-29), 0.99 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-26), 1.00 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.11 (3H, s, H-19), 2.45 (1H, m, H-20), 4.45 (dd, $J = 10.4, 11.2$ Hz, H-3), 4.70 (1H, s, H-31 α), 4.75 (1H, s, H-31 β); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)数据见表 1。光谱数据与文献[8]报道的 pachymic acid 一致。



- 2 R₁ = COCH₃, R₂ = H, R₃ = OH
- 3 R₁ = R₂ = R₃ = H
- 4 R₁ = R₃ = H, R₂ = OH

表 1 化合物 1、2、3 和 4 的 ¹³C NMR 数据
Table 1 ¹³C NMR data of compounds 1, 2, 3 and 4

C	1	2	3	4	C	1	2	3	4
1	36.6	35.3	35.1	36.2	18	17.2	17.4	19.6	16.9
2	34.7	24.1	27.6	28.7	19	22.0	19.1	16.5	19.4
3	216.5	80.7	79.7	78.0	20	46.3	46.4	49.2	49.1
4	47.4	37.8	37.0	39.3	21	180.5	171.0	180.5	178.8
5	48.5	50.5	52.0	50.9	22	30.4	28.9	28.6	31.9
6	23.6	18.0	21.9	18.9	23	32.1	30.5	31.5	32.7
7	120.7	26.4	28.1	27.7	24	154.9	155.0	156.6	155.8
8	141.8	134.1	136.0	135.0	25	33.7	33.7	33.1	34.2
9	144.3	134.4	135.5	135.1	26	21.7	21.9	22.2	21.9
10	37.8	36.9	40.0	37.5	27	21.8	21.7	22.3	22.0
11	116.7	20.5	19.4	21.2	28	22.4	27.9	24.7	28.6
12	35.4	32.1	30.8	30.2	29	25.3	16.5	30.1	16.4
13	44.7	48.2	49.5	45.5	30	26.0	25.2	16.1	18.2
14	48.7	46.0	44.9	52.1	31	107.1	107.0	107.4	107.1
15	43.4	42.7	32.4	72.4	CH ₃ CO	—	21.3	—	—
16	76.7	77.2	28.5	39.3	CH ₃ CO	—	180.0	—	—
17	57.0	56.8	49.4	46.7					

化合物 3 白色粉末状, 分子式为 $C_{31}H_{50}O_3$, $[\alpha]_D^{25} + 29.4$ (c 0.076, MeOH); ESIMS m/z : 469 $[M-H]^-$, 339, 325, 311, 183; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.74 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-28), 0.86 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-29), 0.98 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-26), 1.00 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.23 (3H, s, H-19), 3.22 (1H, dd, $J = 4.4, 11.2$ Hz), 4.66 (1H, s, H-31 α), 4.74 (1H, s, H-31 β); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 数据见表 1。光谱数据与文献[9]报道的 eburicoic acid 一致。

化合物 4 浅黄色粉末状, 分子式为 $C_{31}H_{50}O_4$, $[\alpha]_D^{25} + 90.2$ (c 0.008, MeOH); ESIMS m/z : 485 $[M-H]^-$, 421 $[M-HCOOH-H_2O-H]^-$, 355; 1H NMR (400 MHz, pyridine- d_5): δ 3.44 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3), 1.37 (3H, s, H-19), 1.38 (3H, s, H-30), 1.22 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-29), 1.02 (3H, s, H-28), 0.98 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-26), 0.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27), 4.65 (dd, $J = 8.8$ Hz, H-15), 4.85 (1H, s, H-31 α), 4.89 (1H, s, H-31 β); ^{13}C NMR (100 MHz, pyridine- d_5) 数据见表 1。光谱数据与文献[10]报道的 sulphurenic acid 一致。

1.8 抑菌试验

用滤纸片琼脂扩散法进行。具体方法如文献[11]所述。

2 结果和讨论

应用柱层析法对 2 株担子菌的菌丝体固体发酵物进行分离, 从担子菌 SC0351 乙酸乙酯部分提取物中分离得到化合物 1 和 2; 从 SC0652 氯仿部分提取物和乙酸乙酯部分提取物中分别分离得到化合物 3 和 4。通过对其光谱数据的分析和与文献报道相对比, 证明 4 个化合物均为羊毛脂烷型三萜类成分, 分别为: 多孔菌酸 C (polyporenic acid C) (1)、茯苓酸 (pachymic acid) (2)、齿孔酸 (eburicoic acid) (3) 和硫磺菌酸 (sulphurenic acid) (4)。其中化合物 2 为首次从多孔菌属中发现。据报道, 化合物 2 有抗炎^[12]、抗肿瘤^[7]和增强免

疫力^[13]的作用。经试验, 获得的 4 个化合物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均无抑菌作用, 2 株菌丝体抑菌活性代谢产物有待进一步研究。

参考文献

- [1] Zhang J S(张劲松), Han W W(韩炜炜), Pan Y J(潘迎捷). Studies on chemical structures of polysaccharide from fruit body of *Coriolus versicolor* [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2001, 36 (9): 664-667.(in Chinese)
- [2] Yu J G(余竟光), Chen R Y(陈若芸), Yao Z X(姚志熙), et al. Studies on constituents of *Ganoderma capense*, IV. The chemical structures of ganoine, ganodine and gampderpurine [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1990, 25(8):612-616.(in Chinese)
- [3] Abraham W R, Spassov G. 4-Hydroxymethyl-quinoline from *Polyporus* species [J]. Phytochemistry, 1991, 31(1):371-372.
- [4] Ng T B, Wang H. Adustin, a small translation-inhibiting polypeptide from fruiting bodies of the wild mushroom *Polyporus adusta* [J]. Peptides, 2004, 25(4):689-692.
- [5] Kac D, Barbieri G, Falco M R, et al. The major sterols from three species of Polyporaceae [J]. Phytochemistry, 1984, 23(11):2686-2687.
- [6] Thappa R K, Agarwal S G, Dhar K L, et al. A new triterpenic acid from the wood rotting fungi [J]. Phytochemistry, 1981, 20 (7): 1746-1747.
- [7] Zhao J F(赵吉福), He A M(何爱民), Chen Y J(陈英杰), et al. The anti-tumor constituents from *Poria cocos* [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 1993, 3(2):128-129.(in Chinese)
- [8] Kamo T, Asanoma M, Shibata H, et al. Anti-inflammatory lanostane-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus* [J]. J Nat Prod, 2003, 66(8):1104-1106.
- [9] Kamalov L S, Agzamova M A, Aripova S F, et al. Low-molecular-weight mushroom metabolites. V. Eburicoic acid from *Polyporus ailanthus* [J]. Chem Nat Comp, 2000, 36(1):72-75.
- [10] Yoshikawa K, Matsumoto K, Mine C, et al. Five lanostane triterpenoids and three saponins from the fruit body of *Laetiporus versiporus* [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(10):1418-1428.
- [11] Ma W, Huang Y, Lin L, et al. Two new biologically active illudane sesquiterpenes from the mycelial cultures of *Panaeolus retirugis* [J]. J Antibiot, 2004, 57(11):721-725.
- [12] Culla M J, Giner R M, Recio M C, et al. Two fungal lanostane derivatives as phospholipase A2 inhibitors [J]. J Nat Prod, 1996, 59(10):977-979.
- [13] Li J(李静), Li H(黎红), Xu J(许津), et al. Chemical constituents of CSFs inducer from *Poria cocos* [J]. Chin Pharm J(中国药学报), 1997, 32(7):401-403.(in Chinese)