

桦褐孔菌子实体三萜单体的分离及鉴定

陈 程, 徐向群

(浙江理工大学理学院, 杭州 310018)

摘 要: 利用超声破壁处理, 氯仿为溶剂对桦褐孔菌子实体中三萜单体进行提取。通过薄层层析色谱(TLC)检测, 用1%香草醛-浓硫酸试剂作为显色剂, 反复用硅胶柱色谱对氯仿提取物进行梯度洗脱, 得到两种羊毛脂烷型的三萜化合物, 即化合物1(121 mg)和化合物2(67 mg)。采用HPLC的方法在206 nm处分析其纯度, 同时红外光谱(IR)分析两种化合物的特征, 以及核磁共振(^1H -NMR和 ^{13}C -NMR)技术对两种羊毛脂烷型的三萜化合物进行结构鉴定。对比已知标准谱图, 最终确定其结构为羊毛甾醇(Lanosterol)和栓菌酸(Trametenolic acid)。

关键词: 桦褐孔菌; 硅胶柱色谱法; 三萜化合物; 羊毛甾醇; 栓菌酸

中图分类号: O629

文献标志码: A

0 引 言

桦褐孔菌在中国被称为“桦树中的褐色灵芝”, 具有许多类似于灵芝的功效。16世纪以来, 这种担子类白腐真菌广泛被俄罗斯和西伯利亚西部地区的人们当作民间用药, 用于治疗各种疑难杂症, 如胃癌、肝癌、肠癌等及消化系统疾病^[1]。随着对桦褐孔菌认识得深入, 食品及药品行业对其需求也在不断增加, 桦褐孔菌被誉为我国最有发展前景的23种药用真菌之一^[2]。不少国内外学者对桦褐孔菌的有效成分及其药理活性进行研究。结果显示从桦褐孔菌中分离得到多种具有药用价值的有效成分, 主要包括多糖(polysaccharides)、多酚(polyphenols)、三萜类成分(triterpenoids)、类固醇(steroids)、黑色素(melain)等^[3], 还有报道称已经分离出单宁化合物、生物碱、木质素类化合物^[4]、鞘氨脂类似物及甘露醇等化学物质, 这些成分对治疗许多疾病有良好的效果^[5]。三萜化合物作为桦褐孔菌的重要成分之一, 一直是天然药物化学研究的重要领域, 也是寻找和发现天然药物活性成分的来源, 其中四环三萜类具有抗炎、抗菌、抗癌以及抗血小板聚集等心血管方面

的生物活性^[6]。近年来, 不少国内外学者从桦褐孔菌中分离得到具有生物活性的三萜化合物, 大多以四环或五环三萜化合物为主。本研究在此基础上利用硅胶柱色谱法和TLC法对桦褐孔菌子实体中的羊毛脂烷型三萜化合物进行提取、分离及纯化, 通过红外、核磁(^1H 和 ^{13}C -NMR)确定其三萜化合物的结构。

1 试 验

1.1 实验材料

1.1.1 实验原料

桦褐孔菌子实体购于杭州胡庆余堂。

1.1.2 主要试剂

CDCl_3 (色谱纯, 阿拉丁试剂公司); 氘代二甲基亚砜(色谱纯, 阿拉丁试剂公司); 硅胶(青岛海洋化工分厂); 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 桦褐孔菌子实体的提取

桦褐孔菌子实体粉碎, 过60目筛, 在75℃的干燥箱中干燥6 h。精确称取桦褐孔菌子实体粉末180 g, 加入适量氯仿, 分3批在冰水浴中超声破壁

收稿日期: 2014-03-17

基金项目: 浙江省科技厅科技计划项目(2012C23075)

作者简介: 陈 程(1988-), 女, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 主要从事生物技术与生物化工方面的研究。

通信作者: 徐向群, E-mail: xuxiangqun@zstu.edu.cn

(破壁 1 h, 间歇 4 s)。合并提取物。在 50℃ 水浴下浸泡 7 d^[7], 之后加热回流 3 次, 每次回流 8 h。合并提取液, 减压浓缩得氯仿提取物为 1.61 g。

1.2.2 流动相的确定

通过薄层层析色谱检测, 以 1% 的香草醛-浓硫酸试剂为显色剂, 确定最佳流动相为石油醚: 丙酮, 根据以下公式,

$$R_f = \frac{\text{原点至斑点中心的距离}}{\text{原点至展开剂前沿的距离}} \quad (1)$$

经验值 $R_f = 0.25$ 为上柱的流动相比比例, 结果确定石油醚: 丙酮为 30:1 是第一个三萜组分的最佳比例, 其他组分以此类推。

1.2.3 三萜单体的分离及纯化

如图 1 所示, 氯仿提取物经反复地硅胶柱色谱进行湿法上柱, 通过流动相为石油醚: 丙酮(50:1→1:1)进行梯度洗脱, 每 50 mL 收集 1 次。当石油醚: 丙酮为 30:1 时, 每 10 mL 收集 1 次。1% 的香草醛-浓硫酸作为显色剂, 将所收集的溶液用 TLC 检测。根据 R_f 值合并相同的流分, 单一组分 A 用甲醇对其重结晶, 得白色针状结晶, 过滤、干燥得化合物 1 (121 mg); 同样对单一组分 B 用氯仿进行重结晶, 白色晶体析出, 最终获得化合物 2 (67 mg)。

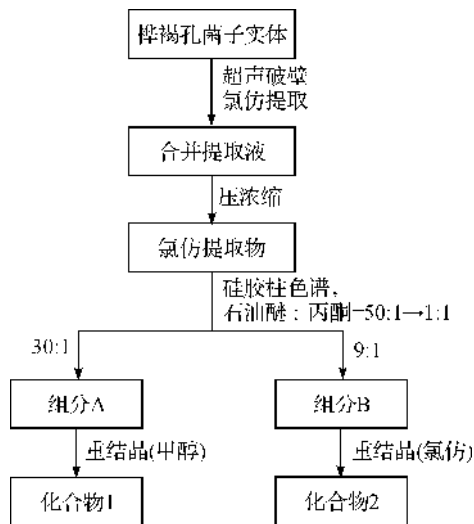


图1 桦褐孔菌子实体中三萜单体的分离流程

1.2.4 三萜单体的 HPLC 分析方法

分离得到的化合物 1 和化合物 2, 分别配制成 1.0 mg/mL 标准溶液, 用 0.22 μm 的微孔滤器过滤后, 在 Agilent 1100 的高效液相色谱(HPLC)上进行梯度洗脱, 波长为 206 nm^[8]。色谱柱是反相 TC-C₁₈ 5 μm 4.6×150 mm (Agilent, Santa Clara, CA, USA), 流动相是乙腈: 水(90:10, 0 min; 97:3, 10 min), 进样量为 20 μL , 柱温为 30℃。

1.2.5 三萜单体的结构鉴定

分离得到的化合物采用红外(IR)、¹H 和 ¹³C NMR 光谱进行结构鉴定^[9-10]。¹H NMR(400 MHz) 和 ¹³C NMR(100 MHz) 光谱采用标准的脉冲序列, CDCl₃ 作为化合物 1 的溶剂, 而化合物 2 不溶于 CDCl₃, 选择 DMSO 作为溶剂, TMS 作为内标。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 的纯度分析

化合物 1 和化合物 2 的产率分别为 0.067% 和 0.037%, 根据 1.2.4 的流动相比比例进行 HPLC 分析, 结果如图 2 所示。由图 2(a) 可知, 化合物 1 的保留时间为 41.637 min 处, 仅出现一个主峰; 图 2(b) 中发现化合物 2 的保留时间 7.488 min, 仅有一个主峰。同时, 经 HPLC 分析其纯度均达 98% 以上。

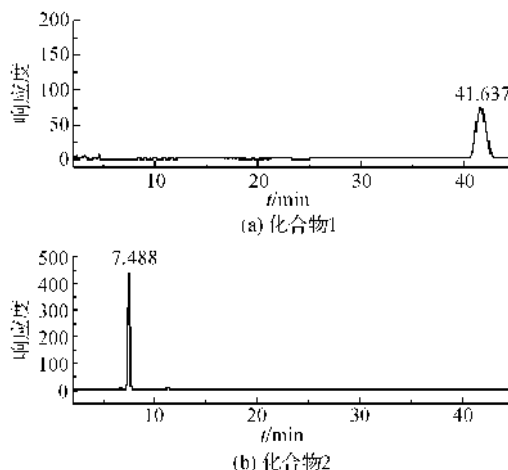
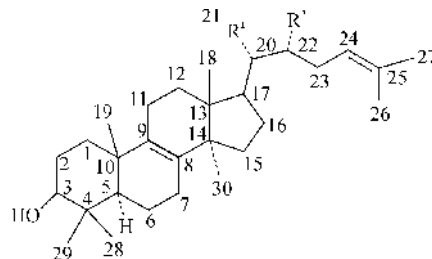


图2 化合物 1 和化合物 2 的 HPLC 图
(浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$)

2.2 三萜单体的红外光谱分析

通过反复的硅胶柱色谱分离得到两种羊毛脂烷型的三萜化合物即化合物 1 和 2, 其结构如图 3 所示, 产率分别为 0.067% 和 0.037%。这两种化合物进行 IR 分析, 如图 4 所示。



Compound 1: Lanosterol; R¹=CH₃, R²=H
Compound 2: Triterpeneol; R¹=COOH, R²=H

图3 从野生 *I. obliquus* 中分离得到的化合物
1 和 2 的结构式

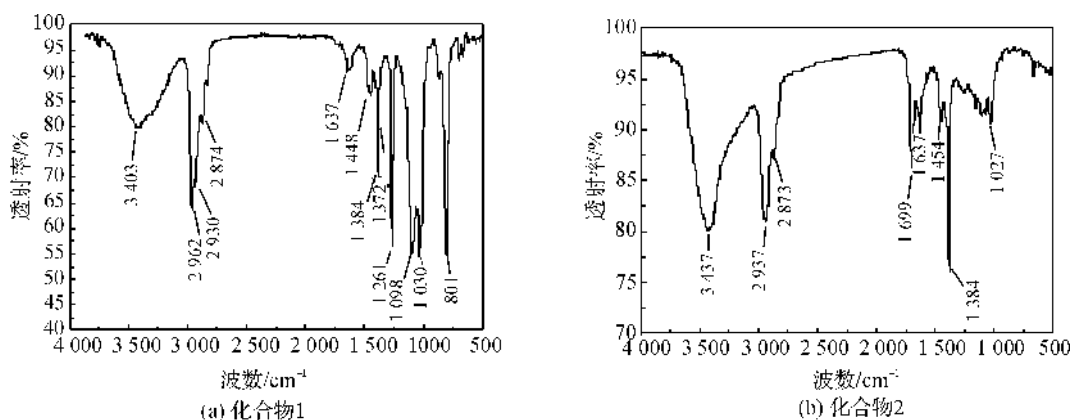


图4 化合物的IR光谱

由图4(a)看出,在 3403 cm^{-1} 呈现一个比较宽的羟基特征峰,在 $2962, 2930, 2874, 1448, 1384\text{ cm}^{-1}$ 处存在 $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$ 的不对称和对称伸缩振动,在 1637 cm^{-1} 存在 $\text{C}=\text{C}$ 的弱峰,同时在 801 cm^{-1} 处存在 $=\text{C}-\text{H}$ 的面外弯曲振动;

由图4(b)可知,在 3437 cm^{-1} 处存在一个较宽的宽峰,在 1699 cm^{-1} 处存在羰基的特征峰,在 1027 cm^{-1} 存在游离羧基上的 $\text{O}-\text{H}$ 弯曲振动的特征峰,同时在 $2938, 2874, 1384, 1455\text{ cm}^{-1}$ 和 1699 cm^{-1} 处有 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-$ 的特征峰,在 1637 cm^{-1} 处有一个比较弱的碳碳双键的峰。

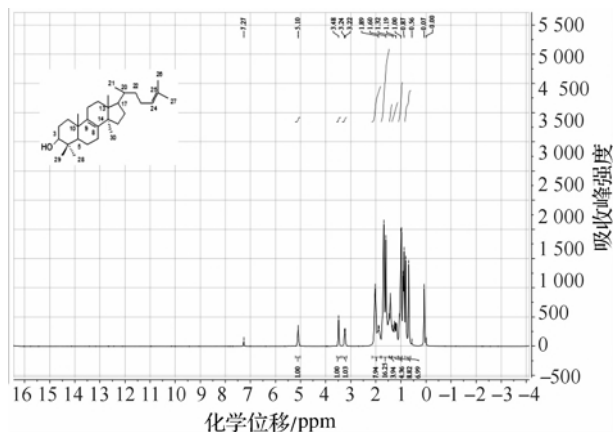
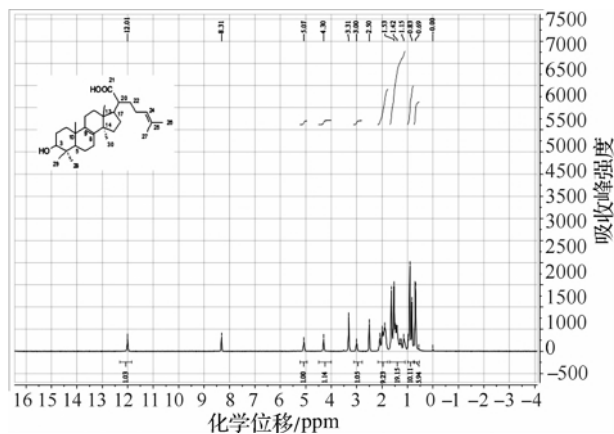
2.3 核磁共振(^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR)的结构鉴定

2.3.1 ^1H -NMR 的结构鉴定

化合物 $\mathbf{1}(\text{CDCl}_3)$:由图5可知,在高场区 $\delta=0.69(\text{s}, 3\text{H}, 18-\text{Me}), 0.98(\text{s}, 3\text{H}, 19-\text{Me}), 1.00(\text{s}, 3\text{H}, 28-\text{Me}), 0.81(\text{s}, 3\text{H}, 29-\text{Me}), 0.87(\text{s}, 3\text{H}, 30-\text{Me})$ 分别为C-28, C-18, C-30, C-19, C-29的质子峰,这是四环三萜类化合物的典型特征; $0.91(\text{d}, 3\text{H}, 21-\text{Me})$ 为C-21上的H与C-20上的H发生偶合而裂分成二重峰; $1.60(\text{s}, 3\text{H}, 26-\text{Me}), 1.68(\text{s}, 3\text{H},$

$27-\text{Me})$ 分别为C-26和C-27烯丙偶合的宽峰; $3.22, 3.24(\text{dd}, 1\text{H}, 3-\text{CHOH}), 1.06(\text{m}, 1\text{H}, 5-\text{H}), 1.42(\text{m}, 1\text{H}, 20-\text{H}), 1.47(\text{m}, 1\text{H}, 17-\text{H}), 5.10(\text{t}, 1\text{H}, 24-\text{H})$ 为24-C上质子峰。

化合物 $\mathbf{2}(\text{DMSO})$:由于化合物 $\mathbf{2}$ 不溶于 CDCl_3 ,故采用DMSO做溶剂用于核磁分析,结果如图6所示: $\delta=0.69(\text{s}, 3\text{H}, 18-\text{Me}), 0.97(\text{s}, 3\text{H}, 19-\text{Me}), 0.70(\text{s}, 3\text{H}, 28-\text{Me}), 0.83(\text{s}, 3\text{H}, 29-\text{Me}), 0.91(\text{s}, 3\text{H}, 30-\text{Me})$ 是在高场区四环三萜的典型特征峰; $1.53(\text{s}, 3\text{H}, 26-\text{Me}), 1.63(\text{s}, 3\text{H}, 27-\text{Me})$ 为烯丙基偶合形成的宽峰, $1.15(\text{m}, 1\text{H}, 5-\text{H}), 1.42(\text{m}, 1\text{H}, 17-\text{H}), 5.07(\text{t}, 3\text{H}, 24-\text{Me}), 12.01(\text{s}, 1\text{H}, 20-\text{COOH})$ 为连接羧基的质子峰信号, $3.21, 3.19(\text{dd}, 1\text{H}, 3-\text{CHOH})$ 。

图5 化合物1的 ^1H -NMR(CDCl_3)分析图6 化合物2 ^1H -NMR(DMSO)分析

2.3.2 ^{13}C -NMR 的结构鉴定

化合物 $\mathbf{1}$ 的谱图见图7,化学位移为 77.95 ppm 为C-3信号,化学位移为 $133.36, 133.36, 124.22, 129.89\text{ ppm}$ 分别是化合物烯碳上(C-8, C-9, C-24, C-25)的信号。其他信号与羊毛甾醇(Lanosterol)均一致^[9-10],详见表1。

表 1 从 *I. obliquus* 中分离得到的四种化合物的¹³C-NMR(100 MHz)

碳	羊毛甾醇 (CDCl ₃)	化合物 1 (CDCl ₃)	栓菌酸 (C ₅ D ₅ N)	化合物 2 (DMSO)
1	35.0	35.24	36.1	36.54
2	27.4	27.18	29.3	28.36
3	78.3	77.95	77.9	79.14
4	38.1	37.86	39.5	38.51
5	49.8	49.82	50.8	50.01
6	20.3	19.98	19.4	18.93
7	27.4	26.81	28.6	28.36
8	133.9	133.36	135.1	134.26
9	133.9	133.36	134.2	133.34
10	36.3	35.98	37.3	36.54
11	17.6	17.61	21.2	20.26
12	25.8	25.47	26.7	26.43
13	43.7	43.44	44.8	43.77
14	49.1	49.36	49.8	50.01
15	30.2	29.96	33.2	32.67
16	30.2	29.82	30.8	32.19
17	49.8	49.82	48.9	48.96
18	15.3	14.72	16.8	17.41
19	18.0	17.61	18.7	18.93
20	35.1	35.24	47.7	47.34
21	18.4	18.12	178.5	176.97
22	35.1	35.33	27.5	27.54
23	24.3	24.72	26.7	26.43
24	124.7	124.22	124.8	123.81
25	130.2	129.89	131.6	131.09
26	24.9	24.72	25.8	25.92
27	16.9	16.62	17.7	17.83
28	23.5	23.23	16.3	15.78
29	27.4	27.18	28.6	28.36
30	14.8	14.72	24.5	24.02

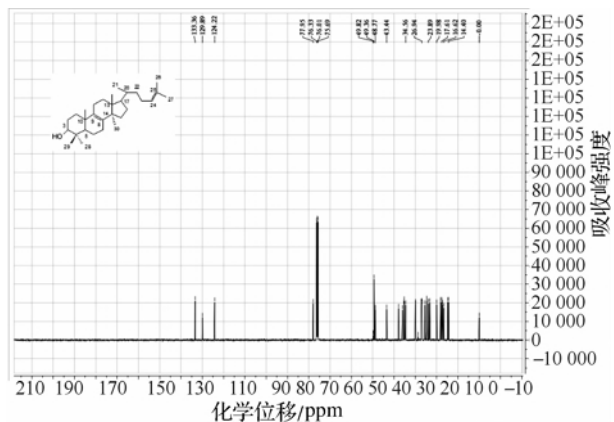


图 7 化合物 1 的¹³C-NMR(CDCl₃)分析

化合物 2 的谱图见图 8,δ79.14 ppm 为 C-3 信号,176.97 ppm 为—COOH 上的信号,134.26、133.34、

123.81、131.09 ppm 分别为烯碳上(C-8,C-9,C-24,C-25)的信号。其他信号与栓菌酸(trametenolic acid)一致^[9-10],详见表 1。

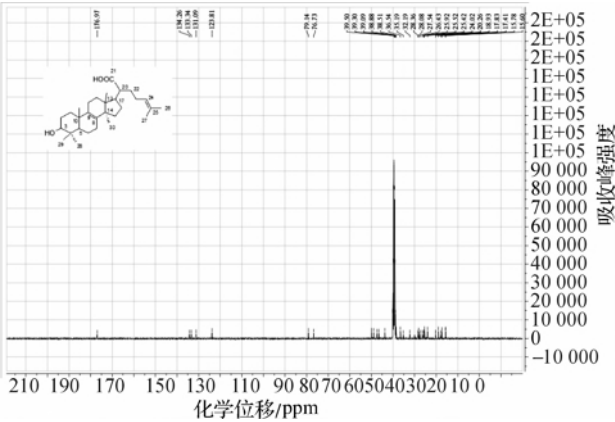


图 8 化合物 2¹³C-NMR(DMSO)分析

3 结 论

三萜化合物是桦褐孔菌子实体中的重要成分之一,其结构复杂多样,进行三萜化合物所有组分的分离是非常困难的,然而三萜化合物具有明显的药理活性,如抗肿瘤、抗突变、抗细胞增殖等^[11-13],因此,从桦褐孔菌子实体中分离出具有生物活性的三萜化合物具有潜在的应用远景。本研究通过硅胶柱色谱和 TLC 技术相结合分离出两种含量较高的化合物,即化合物 1 和化合物 2,分别用甲醇和氯仿进行重结晶,并建立 HPLC 的纯度分析方法,采用乙腈-水体系作为流动相,得到的峰尖锐且无拖尾现象;利用 IR 和核磁共振即¹H-NMR 和¹³C-NMR,与已知化合物的标准谱图对比,确定这两种化合物的结构分别为羊毛甾醇和栓菌酸。反复地硅胶柱色谱技术分离重要的三萜成分,为探索更多具有生物活性的三萜化合物提供依据,为研究桦褐孔菌液体深层发酵产三萜奠定基础,也为药物和保健品领域的开发提供广阔的前景。

参考文献:

[1] 潘学仁,池玉杰. 药用多孔菌新记录种:桦褐孔菌培养特性研究初报[J]. 中国食用菌,1998,17(4): 23-24.
[2] 黄年来. 中国最有开发前景的主要药用真菌[J]. 食用菌,2005,27(1): 3-4.
[3] Zheng W, Zhang M, Zhao Y, et al. Analysis of antioxidant metabolites by solvent extraction from sclerotia of *Inonotus obliquus* (Chaga)[J]. Phytochemical Analysis, 2011, 22(2): 95-102.
[4] Ichimura T, Watanabe O, Maruyama S. Inhibition of

- HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia obliqua* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62 (3): 575-577.
- [5] 黄年来. 俄罗斯神秘的民用药用真菌-桦褐孔菌[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 7-8.
- [6] Zjawiony J K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(2): 300-310.
- [7] Nakata T, Yamada T, Taji S, et al. Structure determination of inotodiol A and B and in vivo anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, 15(1): 257-264.
- [8] Bai Y H, Feng Y Q, Mao D B, et al. Optimization for betulin production from mycelial culture of *Inonotus obliquus* by orthogonal design and evaluation of its antioxidant activity[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2012, 43(5): 663-669.
- [9] Kahlos K, Hiltunen R, v Schantz M. 3 β -Hydroxy-lanosta-8, 24-dien-21-al, a new triterpene from *Inonotus obliquus*[J]. Planta Medica, 1984, 50(2): 197-198.
- [10] Tamai Y, Terazawa M. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* I. A new triterpene, 3 β -hydroxy-8, 24-dien-lanosta-21, 23-lactone from sclerotium [J]. Eurasian Journal of Forest Research, 2000, 1: 43-50.
- [11] Taji S, Yamada T, Wada S, et al. Lanostane-type triterpenoids from the sclerotia of *Inonotus obliquus* possessing anti-tumor promoting activity[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 43(11): 2373-2379.
- [12] Ham S S, Kim S H, Moon S Y, et al. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009, 672 (1): 55-59.
- [13] Nomura M, Takahashi T, Uesugi A, et al. Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis [J]. Anticancer Research, 2008, 28(5A): 2691-2696.

Isolation and Identification of Triterpenoids in *Inonotus Obliquus*

CHEN Cheng, XU Xiang-qun

(School of Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Triterpenoid compounds in *Inonotus obliquus* were extracted by using CHCl₃ as solvent and ultrasonic wall-breaking treatment. The thin-layer chromatography (TLC) was applied. 1% vanillin-sulfuric acid reagent served as the color developing agent. Gradient elution was conducted repeatedly for chloroform extracts with silica gel column chromatography to gain two types of lanostane-type triterpenoids, i. e. compound **1** (121 mg) and compound **2** (67 mg). Moreover, HPLC method was applied to analyze the purity of triterpenoids at 206 nm. IR was used to analyze features of the two compounds. Meanwhile, nuclear magnetic resonance (¹H-NMR and ¹³C-NMR) technology was used to identify the structures of two lanostane-type triterpenoids. Through comparing the known standard spectrum diagram, the structures were finally confirmed as lanosterol and trametenolic acid.

Key words: *Inonotus obliquus*; silica gel column chromatography; triterpenoids; lanosterol; trametenolic acid
(责任编辑: 许惠儿)