



桦褐孔菌三萜对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性及其有效成分鉴定

黄盼盼, 陈程, 徐向群

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

摘要: 为探索桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)三萜是否能作为 α -葡萄糖苷酶/ α -淀粉酶天然抑制剂, 采用硅胶柱色谱洗脱桦褐孔菌提取物, 通过薄层色谱检测进行分离、纯化, 结合液质联用色谱和核磁共振波谱对桦褐孔菌中的生物活性物质进行鉴定。结果表明: 从桦褐孔菌发酵菌丝体中发现了桦褐孔菌萜 D、lawsaritol 和白桦脂酸, 并从子实体中得到羊毛甾醇、桦褐孔菌醇和栓菌酸; 桦褐孔菌子实体中的桦褐孔菌醇对 α -葡萄糖苷酶具有最强抑制活性, 液体深层发酵产物桦褐孔菌萜 D 对 α -淀粉酶具有最强抑制活性, 其 IC_{50} 值均低于阳性对照的阿卡波糖; 酶抑制动力学结果表明, 桦褐孔菌醇对 α -葡萄糖糖苷酶作用机制为竞争性抑制, 桦褐孔菌萜 D 对 α -淀粉酶的抑制类型为非竞争性抑制与竞争性抑制混合。

关键词: 桦褐孔菌; 三萜; 分离; 鉴定; α -葡萄糖苷酶; α -淀粉酶

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2020)05-0678-06

Inhibitory activity of triterpenoids from *Inonotus obliquus* on α -glucosidase and α -amylase and identification of their effective compounds

HUANG Panpan, CHEN Cheng, XU Xiangqun

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This study aims to explore whether triterpenoids of *Inonotus obliquus* are able to be used as natural inhibitors of α -glucosidase/ α -amylase. The extract of *Inonotus obliquus* was separated and purified by silica gel column chromatography gradient elution and thin layer chromatography, and the bioactive substance of *Inonotus obliquus* was identified by HPLC and NMR. The results showed that, inoterpene D, lawsaritol, and betulinic acid were found from the fermented mycelium and lanosterol, inotodiol and trametenolic acid were obtained from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. Among them, inotodiol from the sclerotia had the strongest inhibitory activity on α -glucosidase, and inoterpene D from the submerged fermentation product had the strongest inhibitory activity on α -amylase and their IC_{50} value was lower than that of positive control acarbose. The results of enzyme inhibition kinetics indicated the action mechanism of inotodiol on α -glucosidase was competitive inhibition, and the inhibition type of inoterpene D on α -amylase was mixed non-competitive and competitive inhibition.

Key words: *Inonotus obliquus*; triterpenoids; separation; identification; α -glucosidase; α -amylase

收稿日期: 2020-05-08 网络出版日期: 2020-07-09

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY16B020013)

作者简介: 黄盼盼(1995-), 女, 浙江台州人, 硕士研究生, 主要从事天然产物提取方面的研究。

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

0 引言

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)为锈革菌科纤维孔菌属药用真菌。早在 16 世纪,民间就有“白桦茸”(桦褐孔菌)作为药物广泛用于预防治疗糖尿病、癌症等疑难杂症的记载^[1-3]。桦褐孔菌是一种木腐菌,寄生于白桦、银桦、赤杨等树的树皮或枯干上,主要生长寒冷地区,在波兰、芬兰、俄罗斯以及中国吉林、黑龙江一带均有分布^[4]。已有研究表明,桦褐孔菌提取物及其单体成分具有降血糖、抗菌、抗炎、抗肿瘤和抗氧化等药理作用^[5-6]。桦褐孔菌中的主要活性成分包括三萜类化合物、多糖以及多酚,还包括类固醇、生物碱类化合物、黑色素及木质素等化学物质^[7-9]。桦褐孔菌中的三萜类化合物被认为是最具生物活性的成分和潜在的抗糖尿病药, Lu 等^[10]研究发现,桦褐孔菌乙酸乙酯组分对高血糖小鼠具有显著影响,其主要成分鉴定为羊毛甾醇、 3β -羟基-羊毛甾醇-8, 24 二烯-21 醛、白桦脂醇、麦角固醇和栓菌酸。

糖尿病是近年来具有高发病率的高血糖水平的慢性疾病。1 型糖尿病是一种基因缺陷疾病,患者自身无法分泌产生足够的胰岛素来降低血糖水平,只能通过依赖外界注射胰岛素来控制^[11]。2 型糖尿病患者可以正常分泌胰岛素,但后天出现的胰岛素抵抗导致受体无法正常工作,通过适当口服降糖药物,如二甲双胍、罗格列酮等药物,可以降低餐后血糖水平^[12]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂和 α -淀粉酶抑制剂是新型有效药物,如阿卡波糖和伏格列波糖,可以有效抑制人体消化道中糖的吸收,并降低餐后血糖^[13]。但目前临床上使用降糖药为化学合成的酶抑制剂,给药量大,同时会造成严重的肝功能损伤、胃胀、腹泻等副作用,从天然产物中发现新的 α -葡萄糖苷酶抑制剂和 α -淀粉酶抑制剂是显著胰岛素抵抗的 2 型糖尿病研究的热点^[14-16]。郭秀春等^[17]发现,药用植物锦鸡儿中所含的齐墩果酸、熊果酸和羽扇豆醇等三萜类化合物对 α -葡萄糖苷酶体外抑制活性较好。Ying 等^[18]从桦褐孔菌氯仿提取物分离得到桦褐孔菌内酯 A、B、C, 3β , 22-羟基肉桂酸酯-7, 9 (11), 24-三烯和 3β -羟基肉桂酸酯等物质,其中桦褐孔菌内酯 A、B 对 α -葡萄糖苷酶有显著抑制作用。

目前,关于桦褐孔菌三萜对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性抑制的研究较少。为了明确桦褐孔菌子实体和发酵菌丝体三萜的抑酶活性,本文对子实体和发酵菌丝体的次级代谢产物中的三萜类成分进行了色谱分离、抑酶活性分析和有效成分 HPLC/MS-MS 和 NMR 分析鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌种

野生桦褐孔菌子实体购于杭州胡庆余堂,桦褐孔菌原始菌种(CBS314.39)购于荷兰菌种保藏中心。

1.1.2 试剂

分析纯试剂香草醛、冰醋酸、高氯酸、氯仿、异丙醇、石油醚、丙酮、甲醇、可溶性淀粉等为杭州高晶精细化工有限公司生产,柱色谱硅胶(200~300 目)和薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 购自青岛海洋化工厂,白桦脂醇标准品、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、 α -葡萄糖苷酶(来源于酿酒酵母)、 α -淀粉酶(来源于猪胰腺)购自美国 Sigma 公司,卡博平(阿卡波糖片)购自中美华东制药有限公司,色谱纯试剂如甲醇、乙腈、氘代氯仿、氘代二甲基亚砜(色谱纯)购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器

HZ-2010 K 型恒温摇床(太仓市华利达实验设备有限公司)、Scientz-II D 型超声波破碎仪(浙江宁波新芝生物科技股份有限公司)、RE-201B 型旋转蒸发仪(杭州大卫科技仪器有限公司)、UV-2501PC 型紫外分光光度计(日本岛津公司)、ELx800 型酶标仪(美国 BioTeK 公司)、Agilent 1100 型液质联用仪(美国 Agilent 公司)和 Bruker AVANCE 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 桦褐孔菌的发酵培养

发酵培养基成分:玉米粉(水解)35.00 g/L,蛋白胨 2.30 g/L,酵母粉 1.20 g/L, CaCl₂ 0.48 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.02 g/L, KH₂PO₄ 1.00 g/L, MgSO₄ 0.20 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.01 g/L, K₂HPO₄ 0.50 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.05 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.02 g/L, MnCl₂·4H₂O 0.09 g/L; pH 值为 6.0。具体配置方法参考文献^[19]。接种 2 mL 桦褐孔菌菌种于液体发酵培养基中,置于 28 °C、150 r/min 条件下培养 10 d,测定生物量、三萜含量、pH 值和还原糖变化。

1.2.2 三萜化合物的分离鉴定

取发酵 9 d 的桦褐孔菌菌丝体粉末,加入异丙醇进行超声提取,通过硅胶柱色谱进行分离,以石油醚、丙酮体积比分别为 50:1、40:1、30:1、25:1、20:1、15:1、9:1、5:1 和 1:1 进行梯度洗脱,以 2 倍柱体积过柱,最后甲醇冲柱,获得 10 个分段物组分。得

到10个粗分物分段,并且香草醛冰醋酸法测定各分段物三萜含量,冻干保存。

液相检测方法参考文献[20-21]。将上述分段物分别溶于甲醇,用0.22 μm 的微孔滤器过滤,在HPLC-MS上进行梯度洗脱分离。色谱柱是反相TC-C₁₈ 5 μm 4.6 mm \times 150 mm (Agilent, Santa Clara, CA, USA),波长为206 nm;流动相为乙腈-水,梯度洗脱:0~10 min, 90%~97%乙腈;10~15 min, 97%乙腈,流速为1 mL/min,进样量为20 μL ,柱温为30 $^{\circ}\text{C}$ 。利用液质及理化性质对分段物进行鉴定。

取梓褐孔菌子实体粉末(过60目筛)180.00 g,加入一定量氯仿超声提取1 h,间歇4 s,合并提取物,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴浸泡7 d,具体方法参考文献[22]。过滤,减压蒸干,获得提取物1.61 g。提取物通过硅胶柱色谱进行分离,石油醚:丙酮(50:1 \rightarrow 1:1)梯度洗脱,将所收集的流分用薄层进行检测,1%香草醛-浓硫酸试剂作为显色剂,加热后合并相同流分,得到3个样品。以石油醚:丙酮(30:1)为流动相,甲醇重结晶得到化合物1(121 mg),以石油醚:丙酮(20:1)为流动相,石油醚:丙酮6:1薄层分离,氯仿重结晶得到化合物2(62 mg),以石油醚:丙酮(9:1)为流动相,氯仿重结晶得到化合物3(67 mg)。

核磁鉴定方法参考文献[23-24],将上述3种三萜单体通过¹H NMR(400 MHz)和¹³C NMR(100 MHz)光谱采用标准的脉冲序列来进行结构鉴定,化合物1和2以CDCl₃作为溶剂,化合物3不溶于CDCl₃,以DMSO作为溶剂,TMS作为内标。

1.2.3 三萜化合物的含量测定

总三萜含量测定采用香草醛-冰醋酸-高氯酸法,具体方法参考文献[20]。称取白桦脂醇标准品10 mg,用无水乙醇溶解定容至50.00 mL配制0.2 mg/mL的白桦脂醇标准液。分别取0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL和0.60 mL标准液于试管中,加热挥发去溶剂后加入配制的5%香草醛-冰醋酸溶液0.20 mL和高氯酸0.80 mL,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热反应15 min后取出冷却至室温,加入4 mL乙酸乙酯后摇匀,于紫外可见分光光度计波长551 nm处测定吸光度值,记录数据,绘制标准曲线。

1.2.4 α -葡萄糖苷酶活性抑制试验

α -葡萄糖苷酶活性抑制测定参照文献的方法[15, 25],以对硝基苯- α -葡萄糖苷(PNPG)为底物,在0.10 mol/L pH 6.8磷酸钾缓冲液(PBS)的酶活力测定系统中进行。以阿卡波糖为阳性对照,三萜类化合

物溶于0.2% DMSO磷酸钾缓冲液中。在96孔板中加入0.10 mL 0.20 U/mL的 α -葡萄糖苷酶溶液以及0.10 mL不同浓度的待测样品,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min后,加入0.05 mL 2.50 mmol/L PNPG溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min后于405 nm波长下测定体系吸光度,按以下公式计算化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率:

$$A/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100,$$

其中:A为抑制率, A_0 为加缓冲液试验吸光度值, A_1 为不同浓度三萜试验吸光度值。

用SPSS软件计算化合物对 α -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度(IC_{50})值。使用Lineweaver-Burk双倒数作图法评估活性最好的物质对酶的抑制类型。选取两个不同浓度的化合物作为样品,在每个浓度下,通过改变PNPG的浓度来测定 α -淀粉酶活性,以PNPG溶液摩尔浓度的倒数作为横坐标, α -葡萄糖苷酶反应速率的倒数作为纵坐标,制作动力学图。

1.2.5 α -淀粉酶活性抑制试验

对 α -淀粉酶的抑制活力的测定方法参考文献[14, 26],采用碘-淀粉比色法测定淀粉酶活性抑制效果,实验在0.10 mol/L pH值7.0磷酸钾缓冲液的酶活力测定系统中进行。在试管中加入0.05 mL不同浓度的待测样品以及1 mL 0.4 g/L的淀粉溶液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 温育5 min后加入0.05 mL 0.01 mg/mL α -淀粉酶。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应7.5 min后,加入1.00 mL 0.01 mol/L碘液进行检测,在紫外分光光度计660 nm处测定吸光度。按以下公式计算化合物对 α -淀粉酶的抑制率:

$$B/\% = \frac{B_0 - B_1}{B_0},$$

其中:B为抑制率, B_0 为加缓冲液试验吸光度值, B_1 为不同浓度三萜试验吸光度值。

用SPSS软件计算化合物对 α -淀粉酶的 IC_{50} 值。对 α -淀粉酶抑制效果最好的物质采用双倒数做图法评估其抑制类型,选择两个不同浓度的化合物作为样品,在每个浓度下,通过改变淀粉溶液的浓度来测定 α -淀粉酶活性,以淀粉溶液摩尔浓度的倒数作为横坐标, α -淀粉反应速率的倒数作为纵坐标,制作动力学图。

1.2.6 统计学方法

所有结果数据都设立至少3个平行组,并加入标准差,用 $\pm SD$ 表示,采用SPSS计算 IC_{50} ,单向方差分析(ANOVA)和图基(Tukey)检验 $p < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 桦褐孔菌液体发酵及三萜产生

微生物发酵一般呈 S 型生长,依次经历适应期、对数生长期、平衡期和衰亡期 4 个阶段^[27]。桦褐孔菌的液体发酵生长曲线如图 1 所示。由图 1 可知,桦褐孔菌在发酵初期处于适应期,菌丝体由种子培养基接种到发酵基础培养基中需要适应新的营养环境,但由于种子培养基和发酵基础培养基的组成成分相近,因此之后很快进入对数生长期;在 2~5 d,菌丝体适应新环境后,开始大量快速繁殖,呈现出对数生长状态;发酵 5 d 以后菌丝体生长速度下降,达

到平衡期;随着发酵液中还原糖的消耗、代谢产物积累,菌丝体量与第 9 d 开始出现下降趋势,进入衰亡期;在前 8 d 的液体深层发酵中,发酵液的 pH 值随着发酵的进行而急剧下降之后有所回升,其原因可能是发酵后期代谢产物积累及菌体衰亡导致;发酵 9 d 以后发酵液中葡萄糖浓度下降到 3.6 mg/mL,菌体基本停止生长;发酵 9 d 对桦褐孔菌生物量积累是最佳周期,生物量为 9.3 g/L;三萜化合物属于桦褐孔菌的次级代谢产物,从第 1~9 d,桦褐孔菌菌丝体总三萜产量随着培养时间的增加而上升,且在第 3~5 d 快速积累,第 6 d 开始菌丝体总三萜产量增加缓慢,到达第 9 d 三萜产量达到最大,为 628.4 mg/L。

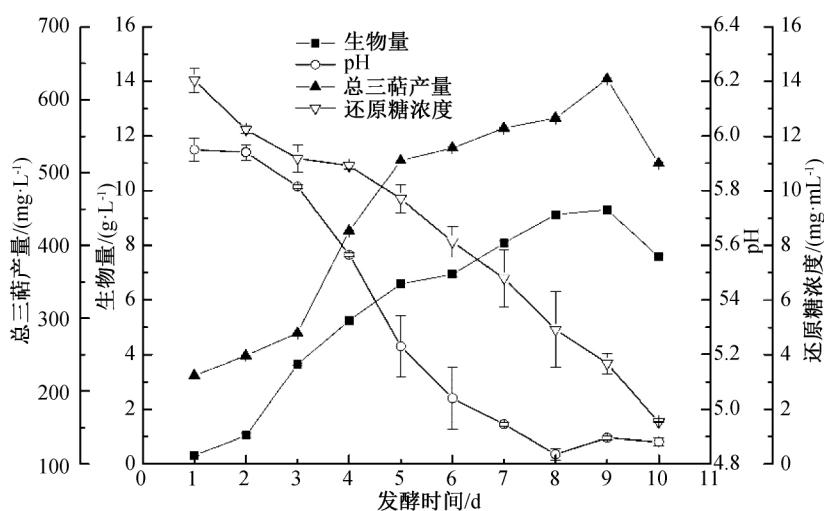


图 1 桦褐孔菌液体发酵生长模型

2.2 菌丝体分段物抑酶活性

桦褐孔菌菌丝体异丙醇提取物经氯仿萃取后,少量极性物质被除去,弱极性三萜类化合物富集在氯仿层。氯仿层经过硅胶柱后粗分成 10 个分段物,其得率、三萜含量以及对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性如表 1 所示。由表 1 可知,分段物 1 得率较大,但三萜含量最低,其对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用弱,三萜类化合物含量在分段物 4~10 之间含量高达 50.5%~82.1%之间。

分段物 4、7 和 8 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制率(图 2)表明:随着分段物质量浓度升高,其对酶的抑制作用增强。阿卡波糖抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 0.37 mg/mL,分段物 8 的 IC_{50} 为 0.26 mg/mL,显著低于阿卡波糖说明其对 α -葡萄糖苷酶活性有显著抑制活性;分段物 4 和 8 对 α -淀粉酶的活性抑制 IC_{50} 分别为 7.86 mg/mL 和 8.88 mg/mL,低于阳性对照药阿卡波糖(IC_{50} 为 10.51 mg/mL);分段物 7 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶均有弱抑制作用, IC_{50}

表 1 分段物的得率、三萜含量及对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的活性抑制

分段物	得率/%	三萜含量/%	α -葡萄糖苷酶 IC_{50} / (mg·mL ⁻¹)	α -淀粉酶 IC_{50} / (mg·mL ⁻¹)
分段物 1	28.87	31.6	34.12±2.63 ^e	>100
分段物 2	19.50	39.9	>100	>100
分段物 3	4.08	34.1	>100	>100
分段物 4	9.40	78.8	1.33±0.02 ^c	7.86±1.55 ^a
分段物 5	3.88	82.1	9.61±0.06 ^f	>100
分段物 6	1.94	73.9	36.49±3.68 ^g	>100
分段物 7	2.29	62.2	1.52±0.03 ^d	15.59±2.64 ^b
分段物 8	4.02	76.5	0.26±0.02 ^a	8.88±0.86 ^a
分段物 9	8.75	50.5	3.32±0.03 ^e	>100
分段物 10	8.00	70.2	>100	>100
阿卡波糖	—	—	0.37±0.01 ^b	10.51±0.72 ^a

注:同列不同小写字母表示 α -葡萄糖苷酶抑制活性存在显著差异, $p < 0.05$ 。

值高于阿卡波糖。分段物 2、3 和 10 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶均没有抑制作用, IC_{50} 值大于 100 mg/mL。

以上结果显示,分段物4、7和8对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制效果较好。

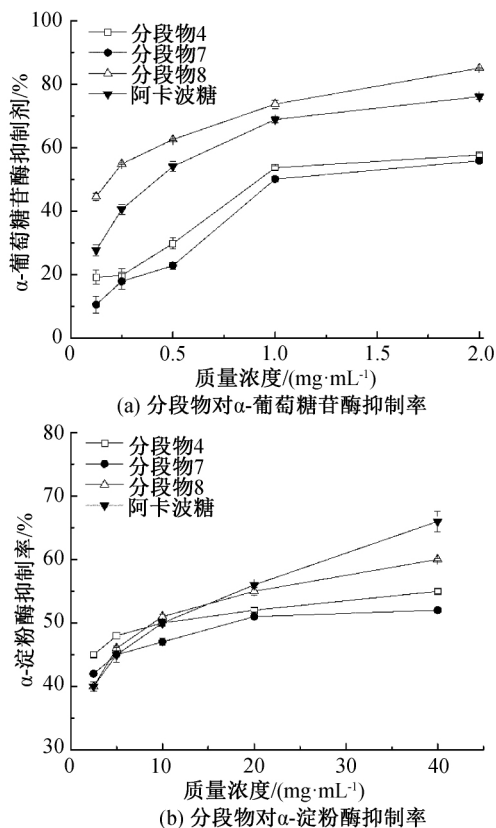


图2 不同分段物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的活性抑制***曲线

2.3 子实体三萜单体抑酶活性

通过与不加抑制剂对比,化合物1、2和3都对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶有一定抑制作用,其抑制率如图3所示。图3显示,随着样品浓度的增加,样品对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制率也随之增加,呈剂量依赖性。

用SPSS软件计算3个化合物对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值如表2所示。由表2可知,在3个三萜单体中,对 α -葡萄糖苷酶活性抑制 IC_{50} 值大小依次为化合物1、化合物2和化合物3,化合物2的 IC_{50} 值显著低于阳性对照阿卡波糖(IC_{50} 为0.37 mg/mL),具有强抑制活性,化合物1对 α -淀粉酶活性抑制的 IC_{50} 为9.51 mg/mL,低于阿卡波糖(IC_{50} 为10.51 mg/mL)。

2.4 酶抑制类型

在桦褐孔菌菌丝体提取分段物和子实体提取单体中,化合物2对 α -葡萄糖苷酶具有最强抑制效果,分段物4对 α -淀粉酶的抑制效果最好。在不同浓度

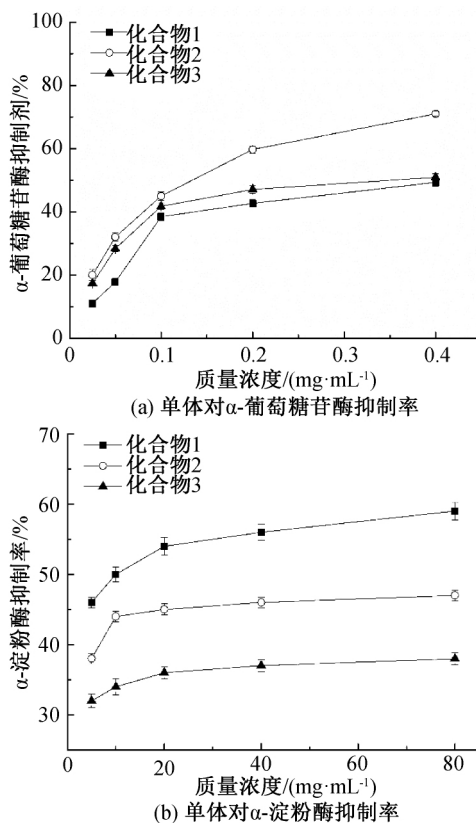


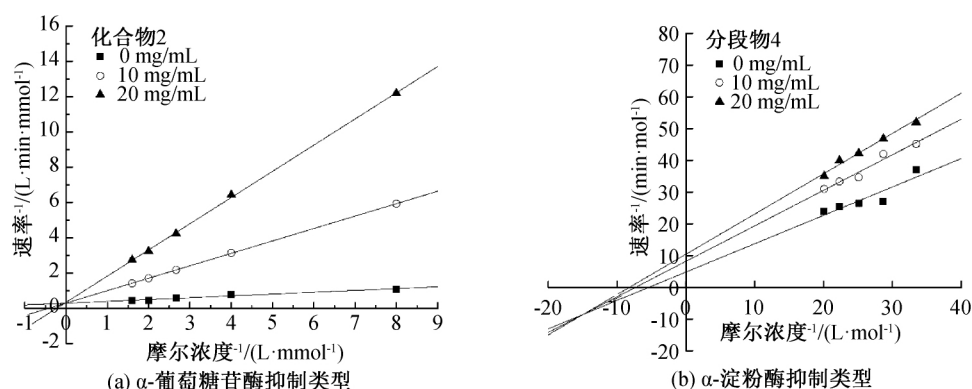
图3 三萜单体对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的活性抑制曲线

表2 子实体中3个化合物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的活性抑制

化合物	α -葡萄糖苷酶 IC_{50} / (mg·mL ⁻¹)	α -淀粉酶 IC_{50} / (mg·mL ⁻¹)
化合物1	0.60±0.01 ^d	9.51±0.74 ^a
化合物2	0.15±0.02 ^a	14.31±0.71 ^b
化合物3	0.43±0.09 ^c	>100
阿卡波糖	0.37±0.01 ^b	10.51±0.72 ^a

注:同列不同小写字母表示 α -淀粉酶抑制活性存在显著差异, $p<0.05$ 。

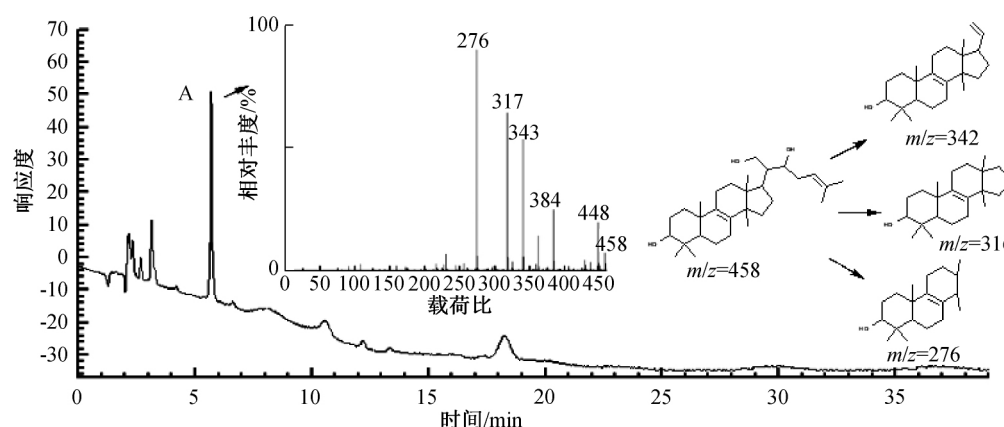
化合物2作用下酶动力学图如图4(a)所示。由图4(a)可知,随着化合物2的质量浓度的增大,双倒数直线与横坐标的交点变大,与纵坐标的交点不变,表明米氏常数 K_m 增大,反应最大速率 V_{max} 不变。表明化合物2对 α -葡萄糖苷酶的抑制方式属于竞争性抑制。图4(b)表明,采用双倒数法确定分段物4对 α -淀粉酶的抑制方式属于非竞争性抑制,与目前市售 α -葡萄糖糖苷酶/ α -淀粉酶主要抑制剂阿卡波糖类似,对 α -葡萄糖糖苷酶作用机制为竞争性抑制,对胰 α -淀粉酶的抑制类型为非竞争性抑制与竞争性抑制混合类型^[28-29]。

图 4 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用双倒数图

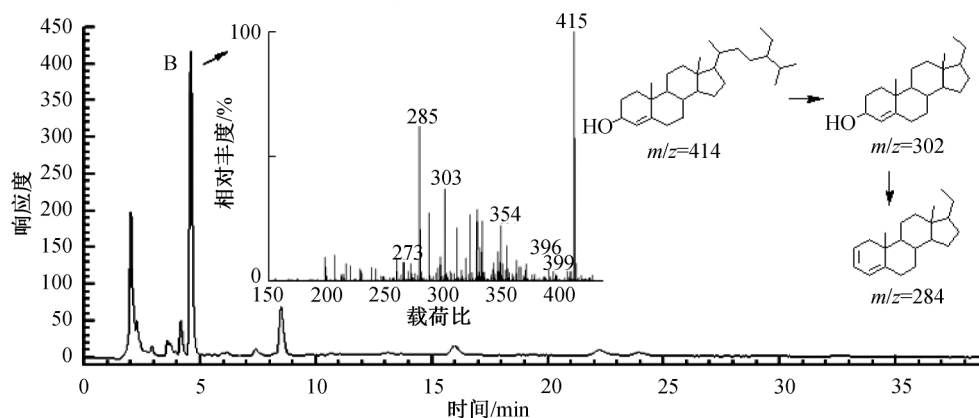
2.5 结构鉴定

桦褐孔菌发酵菌丝体总三萜提取物及分段物液质色谱联用结果如图 5 所示。图 5 表明: 在 206 nm 下, 分段物具有不同保留时间, 为不同的三萜化合物, 纯度较高; 化合物 A、B、C 三种物质分别为分段物 4、7 和 8 的主要物质, 根据质谱数据, 判断化合物 A、B、C 分别为桦褐孔菌三萜 D, lawsaritol 和白桦脂酸; 化合物 A 分子量为 458, 片段分子量有 448、

384、343、317 和 276, 片段与四环三萜类化合物桦褐孔菌三萜 D 可能的断裂方式匹配, 故判断化合物 A 为桦褐孔菌三萜 D。化合物 B 的最高吸收为 415 $[M+H]^+$, 产生的断裂分子量有 273、285、303、354、396、399 等, 与 Alam 等^[30] 报道相一致, 故判断为 lawsaritol。化合物 C 的片段分子量有 178、190、266、361、419、438、456 等, 判断化合物 C 为白桦脂酸。



(a) 分段物4液质鉴定图



(b) 分段物7液质鉴定图

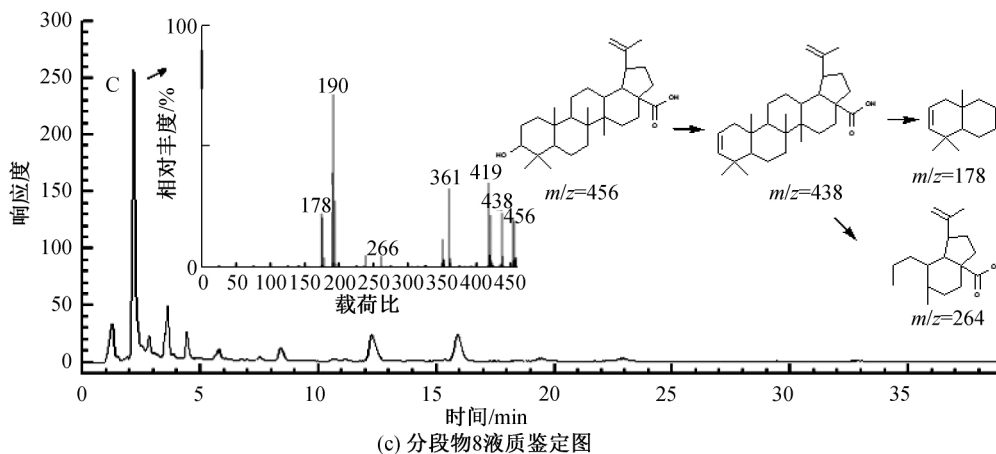


图5 分段物4、7和8的液质联用色谱图及结构推断

桦褐孔菌子实体经提取、分离、重结晶得到三个三萜单体,经 HPLC 验证其纯度均达到 98% 以上,根据核磁结果,确定 3 个化合物分别为羊毛甾醇、桦褐孔菌醇和栓菌酸。

化合物 1: 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 0.62 (s, 3H, 18-Me), 0.98 (s, 3H, 19-Me), 1.00 (s, 3H, 28-Me), 0.81 (s, 3H, 29-Me), 0.87 (s, 3H, 30-Me), 0.91 (d, 3H, 21-Me), 1.60 (s, 3H, 26-Me), 1.68 (s, 3H, 27-Me), 1.06 (m, 1H, 5-H), 1.42 (m, 1H, 20-H), 1.47 (m, 1H, 17-H), 5.10 (t, 1H, 24-H), 3.22, 3.24 (dd, 1H, 3-CHOH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 35.24 (C-1), 27.18 (C-2), 77.95 (C-3), 37.86 (C-4), 49.82 (C-5), 19.98 (C-6), 26.81 (C-7), 133.36 (C-8), 133.36 (C-9), 35.98 (C-10), 17.16 (C-11), 25.47 (C-12), 43.44 (C-13), 49.36 (C-14), 29.96 (C-15), 29.82 (C-16), 49.82 (C-17), 14.72 (C-18), 17.61 (C-19), 35.24 (C-20), 18.12 (C-21), 35.33 (C-22), 24.72 (C-23), 124.22 (C-24), 129.89 (C-25), 24.72 (C-26), 16.62 (C-27), 23.23 (C-28), 27.18 (C-29), 14.72 (C-30)。以上数据与文献[23-24]报道已知羊毛甾醇的核磁结果相一致,故鉴定化合物 1 为羊毛甾醇。

化合物 2: 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 0.72 (s, 3H, 18-Me), 1.00 (s, 3H, 19-Me), 0.98 (s, 3H, 28-Me), 0.81 (s, 3H, 29-Me), 0.90 (s, 3H, 30-Me), 0.93 (d, 3H, 21-Me), 1.65 (s, 3H, 26-Me), 1.75 (s, 3H, 27-Me), 1.05 (m, 1H, 5-H), 1.58 (m, 1H, 17-H), 5.18 (t, 3H, 24-Me), 3.26, 3.21 (dd, 1H, 3-CHOH), 3.67 (m, 1H, 22-CHOH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 35.56 (C-1), 27.80 (C-2), 78.98 (C-3), 38.89 (C-4), 50.33 (C-5), 19.14 (C-6), 29.08 (C-7), 134.56 (C-8),

133.18 (C-9), 37.02 (C-10), 21.00 (C-11), 26.43 (C-12), 44.85 (C-13), 49.40 (C-14), 30.94 (C-15), 30.61 (C-16), 47.25 (C-17), 15.69 (C-18), 18.24 (C-19), 41.66 (C-20), 12.62 (C-21), 73.36 (C-22), 27.24 (C-23), 121.35 (C-24), 135.24 (C-25), 26.02 (C-26), 18.00 (C-27), 15.43 (C-28), 27.97 (C-29), 24.31 (C-30)。以上数据与文献[23-24]报道已知桦褐孔菌醇核磁数据基本一致,故鉴定化合物 2 为桦褐孔菌醇。

化合物 3: 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ_{H} : 0.69 (s, 3H, 18-Me), 0.97 (s, 3H, 19-Me), 0.70 (s, 3H, 28-Me), 0.83 (s, 3H, 29-Me), 0.91 (s, 3H, 30-Me), 1.53 (s, 3H, 26-Me), 1.63 (s, 3H, 27-Me), 1.15 (m, 1H, 5-H), 1.42 (m, 1H, 17-H), 5.07 (t, 3H, 24-Me), 12.01 (s, 1H, 21-COOH) 3.21, 3.19 (dd, 1H, 3-CHOH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 36.54 (C-1), 28.36 (C-2), 79.14 (C-3), 38.51 (C-4), 50.01 (C-5), 18.93 (C-6), 28.36 (C-7), 134.26 (C-8), 133.34 (C-9), 36.54 (C-10), 20.26 (C-11), 26.43 (C-12), 43.77 (C-13), 50.01 (C-14), 32.67 (C-15), 32.19 (C-16), 48.96 (C-17), 17.41 (C-18), 18.93 (C-19), 47.34 (C-20), 176.97 (C-21), 27.54 (C-22), 26.43 (C-23), 123.81 (C-24), 131.09 (C-25), 35.92 (C-26), 17.83 (C-27), 15.78 (C-28), 28.36 (C-29), 24.02 (C-30)。以上数据与文献[23-24]报道已知栓菌酸核磁数据基本一致,故鉴定化合物 3 为栓菌酸。

3 结论

本文研究了桦褐孔菌发酵及子实体中三萜类化合物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性,对桦褐孔菌发酵产物进行了提取、分离和纯化,并判断其

中的活性物质,主要结论如下:

a) 桦褐孔菌发酵活性产物主要为桦褐孔菌萜 D、lawsaritol 和白桦脂酸,从桦褐孔菌子实体中经过提取、分离、纯化和鉴定,得到了羊毛甾醇、桦褐孔菌醇和栓菌酸。

b) 桦褐孔菌子实体中的羊毛甾醇、桦褐孔菌醇、栓菌酸和菌丝体中的桦褐孔菌萜 D、lawsaritol 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶有一定抑制作用,为桦褐孔菌能作为治疗糖尿病药物的开发提供依据。

本文研究发现,桦褐孔菌三萜对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶具有一定的抑酶活性,为进一步开发桦褐孔菌天然糖苷酶/淀粉酶抑制剂提供理论依据。

参考文献:

- [1] Duru K C, Kovaleva E G, Danilova I G, et al. The pharmacological potential and possible molecular mechanisms of action of *Inonotus obliquus* from preclinical studies[J]. *Phytotherapy Research*, 2019, 33 (8): 1-15.
- [2] Amorim C, Silvério S C, Rodrigues L R. One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma* species[J]. *Food Chemistry*, 2019, 270, 86-94.
- [3] 钟秀宏, 赵丽微, 赵芬琴, 等. 桦褐孔菌醇诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞株凋亡及其分子机制研究[J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(3): 191-194.
- [4] 吴宇锋, 颜美秋. 桦褐孔菌降血糖作用及机制研究进展[J]. *中药材*, 2018, 41(11): 2716-2720.
- [5] 齐亭娟, 周玉柏, 曾毅. 桦褐孔菌活性成分及药理作用的研究进展[J]. *智慧健康*, 2018, 4(24): 50-53.
- [6] 张新宇, 张彦龙. 桦树茸有效成分及生物活性应用现状[J]. *高原农业*, 2018, 2(5): 549-557.
- [7] 王昭润, 刘萍, 荣瑞芬, 等. 基于 α -葡萄糖苷酶抑制率的桦褐孔菌多糖提取工艺优化[J]. *中国酿造*, 2018, 37 (4): 150-154.
- [8] 李东文, 龙凯, 苏明声, 等. 桦褐孔菌菌质活性组分的提取及其体外抗氧化作用[J]. *菌物研究*, 2018, 16(1): 51-56.
- [9] 李艳青, 齐婷娟, 郭婷婷, 等. 桦褐孔菌乙酸乙酯提取物抗食管癌作用的研究[J]. *生物技术通讯*, 2019, 30(1): 15-19.
- [10] Lu X, Chen H, Dong P, et al. Phytochemical characteristics and hypoglycaemic activity of fraction from mushroom *Inonotus obliquus*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(2): 276-280.
- [11] 袁凤易, 王薇, 徐平, 等. 1 型糖尿病患者使用维格列汀联合胰岛素治疗和常规胰岛素治疗对血糖波动影响的观察[J]. *中国糖尿病杂志*, 2019, 9(27): 662-665.
- [12] 郭庆丰, 陈林, 尹震花, 等. 球毛壳菌 H6 次级代谢产物及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性[J]. *菌物学报*, 2019, 38(1): 138-148.
- [13] Xu J, Nie X, Hong Y, et al. Synthesis of water soluble glycosides of pentacyclic dihydroxytriterpene carboxylic acids as inhibitors of α -glucosidase[J]. *Carbohydrate Research*, 2016, 424: 42-53.
- [14] 曹新民, 张华华, 周健. 赤芝中羊毛脂烷型三萜类化合物及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. *中草药*, 2017 (7): 1275-1281..
- [15] Zhu F, Asada T, Sato A, et al. Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62 (4): 885-892.
- [16] Olennikov D, Gornostai T, Penzina T, et al. Lupane triterpenoids and sterols from *Inonotus rheades* mycelium and their anti-glucosidase activity[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2017, 53(5): 988-990.
- [17] 郭秀春, 张志娟, 夏照洋, 等. 锦鸡儿中 4 种三萜类化合物的含量测定及其对糖苷酶的抑制活性[J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(6): 488-493.
- [18] Ying Y M, Zhang L Y, Xia Z, et al. Terpenoids with α -glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus* [J]. *Phytochemistry*, 2014, 108: 171-176.
- [19] 梁家旗, 陈江, 王兰英, 等. 发酵时间对桦褐孔菌主要活性成分的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(10): 93-96.
- [20] 张昕. 液体深层发酵桦褐孔菌三萜类化合物的鉴定和生物合成的促进[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2016: 58-63.
- [21] 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.
- [22] Nakata T, Yamada T, Taji S, et al. Structure determination of inonotsuoxides A and B and in vivo anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus* [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2007, 15(1): 257-264.
- [23] Kahlos K, Hiltunen R, V Schantz M. 3β -Hydroxy-lanosta-8, 24-dien-21-al, a new triterpene from *Inonotus obliquus*[J]. *Planta Medica*, 1984, 50(2): 197-198.

- [24] Shin Y, 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.
- [25] Liu S, Ai Z, Qu F, et al. Effect of steeping temperature on antioxidant and inhibitory activities of green tea extracts against α -amylase, α -glucosidase and intestinal glucose uptake[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 168-173.
- [26] Cheng Q, Cai S, Ni D, et al. In vitro antioxidant and pancreatic α -amylase inhibitory activity of isolated fractions from water extract of Qingzhuan tea [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(2): 928-935.
- [27] 黄丹阳, 曹慧, 徐斐, 等. 凉拌豆制品中单核细胞增生李斯特菌生长模型建立的研究[J]. 工业微生物, 2018, 48(1): 30-36.
- [28] 刘志峰, 李春梅, 李敏, 等. α -糖苷酶抑制剂阿卡波糖的临床药理作用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(9): 965-968.
- [29] 袁向华, 周艳玲, 勾洵, 等. 阿卡波糖对胰 α -淀粉酶的抑制动力学研究[J]. 世界科技研究与发展, 2016, 38(1): 117-121.
- [30] Alam M S, Niwa M, Sakai T, et al. 24 β -Ethylcholest-4-en-3 β -ol from the roots of *Lawsonia inermis* [J]. Phytochemistry, 1992, 31(7): 2558-2560.
- (责任编辑:唐志荣)