

松杉暗孔菌发酵液的化学成分研究

郭 华¹, 冯 涛², 李正辉², 刘吉开^{2*}¹鞍山师范学院化学与生命科学学院, 鞍山 114005;²中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201

摘要: 采用硅胶、RP-18、Sephadex LH-20 等多种材料进行分离纯化, 通过理化方法和波谱分析进行结构鉴定, 从松杉暗孔菌(*Phaeolus schweinitzii*) 发酵液的乙酸乙酯提取部位分离并鉴定了 11 个化合物, 它们分别为: (6Z)-5-hydroxy-6-dodecene-2,10-dione (1)、2,2-二甲基-1-苯并吡喃-6-醇(2)、亚油酸(3)、邻苯二甲酸二甲酯(4)、麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇(5)、eulatinol(6)、对羟基苯乙醇(7)、siccayne(8)、5-羟甲基糠醛(9)、对苯二酚(10)、5-羟甲基糠醛(11)。其中 1 为新的链状类化合物, 其余化合物均首次从该种真菌中分离得到。

关键词: 松杉暗孔菌; 化学成分; 分离; 结构鉴定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Chemical Constituents of the Fermentation Broth of *Phaeolus schweinitzii*GUO Hua¹, FENG Tao², LI Zheng-hui², LIU Ji-kai^{2*}¹School of Chemistry and Life Science, Anshan Normal University, Liaoning Anshan 114005, China;²State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Yunnan Kunming 650201, China

Abstract: Eleven compounds were separated and purified from the ethyl acetate extracts of the fermentation broth of *Phaeolus schweinitzii* by silica gel, RP-18, Sephadex LH-20 column chromatography, respectively. Their structures were identified as (6Z)-5-hydroxy-6-dodecene-2,10-dione (1), 2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-ol (2), linoleic acid (3), dimethyl phthalate (4), ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (5), eulatinol (6), 4-hydroxyphenethyl alcohol (7), siccayne (8), 5-hydroxymethylfuroic acid (9), hydroquinone (10), 5-hydroxymethylfurfural (11). 1 was a new chain-structure compound. Other compounds were isolated from *Phaeolus schweinitzii* for the first time.

Key words: *Phaeolus schweinitzii*; chemical constituent; isolation; structural identification

松杉暗孔菌(*Phaeolus schweinitzii*), 属于多孔菌科(Polyporaceae) 暗孔菌属(*Phaeolus*) 的一种木栖寄生高等真菌, 菌盖直径一般在 8~24 cm 之间, 厚度约为 2 cm。在我国主要分布于黑龙江、吉林、河北、新疆、四川、云南、广东、台湾等低中海拔的林区, 可作药用, 煮后可食用, 但生吃有毒^[1]。文献报道从该菌子实体中已分离得到具有 β -分泌酶抑制活性的化合物 hispidin^[2]。为了进一步从松杉暗孔菌中寻找具有生物活性的次生代谢产物, 我们对该菌发酵液进行了系统的化学成分研究, 从其乙酸乙酯提取物中分离得到 11 个已知化合物, 其中 1 为新的链状化合物。

1 仪器与材料

比旋光度值由 Horiba SEPA-300 旋光仪测定; UV 由 UV-210A 型分光光度计测定; IR 由 Bruker Tensor27 型红外光谱仪测定(KBr 压片); ESI⁺-MS 由 VG AutoSpec-3000 质谱仪测定, 高分辨质谱 HR-TOF-MS 由 API QSTAR 飞行时间质谱仪测定; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 由 Bruker AM-400 和 DRX 500 测定, 内标为 TMS; 柱层析硅胶(80~100 目和 200~300 目) 和薄层层析材料均为青岛海洋化工厂生产; 分析型和制备型 HPLC 为 Agilent 1100 HPLC, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m) 和 YMC(9.4 mm × 150 mm, 5 μ m) 柱; Sephadex LH-20 为 Amersham Biosciences 公司产品; RP-18(40~63 μ m) 为德国 Merck 公司产品。显色方法为 254、365 nm 荧光, 10% 硫酸乙醇溶液和硫酸香草醛

收稿日期: 2014-06-20

接受日期: 2014-07-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973) 项目(2009CD522300)

* 通讯作者 Tel: 86-871-65216327; E-mail: jklu@mail.kib.ac.cn

处理后加热及碘蒸气显色。

松杉暗孔菌(*Phaeolus schweinitzii*) 于 2010 年采自于昆明植物园,由中国科学院昆明植物研究所杨祝良研究员鉴定。

2 培养与发酵

由昆明植物研究所李正辉工程师采用斜面转瓶液体培养的方法对该菌种进行发酵培养^[9]。培养基:葡萄糖 5%,猪肉蛋白胨 0.15%,酵母粉 0.5%, KH_2PO_4 和 MgSO_4 各 0.05%,150 rpm,24 °C 摇床发酵 25 d,发酵液总量为 20 L。

3 提取与分离

松杉暗孔菌发酵液(20 L)除去菌丝体后,用乙酸乙酯萃取三次,提取液合并,减压蒸干得浸膏 10.0 g,上硅胶柱色谱粗分,石油醚-丙酮(100:0→0:100)梯度洗脱给出组分 A~H。组分 C(石油醚-丙酮,30:1)先上正相硅胶柱,用石油醚-丙酮 20:1 分离,后经 RP-18 反相硅胶柱色谱,用甲醇-水(90%甲醇)系统洗脱,再用 Sephadex LH-20(氯仿-甲醇,1:1)柱层析,得到化合物 3(5.0 mg)、5(8.5 mg)、8(4.0 mg)、9(3.0 mg)。组分 E(石油醚-丙酮,10:1)组分经正相硅胶柱色谱,用石油醚-乙酸乙酯 8:1 溶剂系统分离,后用 Sephadex LH-20(氯仿-甲醇,1:1)柱层析,再经制备型 HPLC,用乙腈/水 20:80→50:50 梯度洗脱,纯化得到化合物 1(3.0 mg)、2(5.5 mg)、7(6.5 mg)。组分 F(石油醚-丙酮,5:1)经正相硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇溶剂系统梯度洗脱(100:1→20:1)和 Sephadex LH-20(氯仿-甲醇,1:1)柱层析分离,再经制备型 HPLC,用乙腈/水 40:60 梯度洗脱,纯化得到化合物 4(3.0 mg)、6(5.5 mg)、10(12.0 mg)、11(15.0 mg)。

4 结构鉴定

化合物 1 白色粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -9.8$ (c 0.23, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 270 (1.8), 231 (1.7) nm; IR (KBr) ν_{max} 3436, 2974, 2939, 1715 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) 及 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) 数据见表 1; ESI-MS (positive) m/z 235 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HR-TOF-MS m/z 235.1314 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Na}$, 235.1310)。

化合物 1 的分子式由其 HR-TOF-MS (m/z

235.1314 $[\text{M} + \text{Na}]^+$) 确定为 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_3$, 有 3 个不饱和度。其 IR 谱在 3436 cm^{-1} 与 1715 cm^{-1} 处的吸收峰暗示该化合物的结构中应该含有羟基和双键或羰基。在其 ^{13}C NMR (DEPT) 中,该化合物显示 1 个双键,1 个含氧 CH, 2 个 CO, 2 个 CH_3 和 5 个 CH_2 信号。由以上数据可认为化合物 1 为链状烯烃,同时包含两个羰基和一个羟基,这些官能团的位置可由 HMBC 谱确定:由 H-1 (δ_{H} 2.15, 3H, s) 与 C-2 (δ_{C} 208.0, s)、C-3 (δ_{C} 42.9, t) 和 H-12 (δ_{H} 1.06, 3H, t, $J = 4.0$ Hz) 与 C-11 (δ_{C} 35.9, t)、C-10 (δ_{C} 210.7, s) 的 HMBC 相关表明两个羰基在 2、10 位;由 H-6 (δ_{H} 5.47, 1H, dd, $J = 6.4, 6.0$ Hz) 与 C-7 (δ_{C} 130.0, d)、C-8 (δ_{C} 26.2, t) 及 C-9 (δ_{C} 41.5, t) 的 HMBC 相关表明化合物 1 为 6-dodecene;另 H-3 (δ_{H} 2.53, 2H, m)、H-6 和 C-5 (δ_{C} 71.8, d) 的 HMBC 相关说明 C-5 位为羟基取代。此外,从 H-6 的耦合常数(6.4, 6.0 Hz)判定该化合物为顺式烯烃,而 C-5 位的绝对构型由于化合物量较少没有确定。由此化合物 1 被确定为 (6Z)-5-hydroxy-6-dodecene-2, 10-dione。



图 1 化合物 1 的结构和主要 HMBC 相关

Fig. 1 Chemical structure and key HMBC correlations of 1

表 1 化合物 1 的 ^1H and ^{13}C 数据(400/125 MHz, CDCl_3)

Table 1 ^1H NMR and ^{13}C NMR data of 1 at 400/125 MHz, respectively, in CDCl_3

Position	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}
1	2.15, s	29.9, CH_3
2		208.0, qC
3	2.53, m	42.9, CH_2
4	1.77, br s	30.8, CH_2
5	4.08, br s	71.8, CH
6	5.47, dd (6.4, 6.0)	133.3, CH
7	5.64, m	130.0, CH
8	2.30, m	26.2, CH_2
9	2.49, m	41.5, CH_2
10		210.7, qC
11	2.30, m	35.9, CH_2
12	1.06, t (4.0)	7.7, CH_3

化合物 2 $C_{11}H_{12}O_2$, 黄色粉末; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6.64 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-8), 6.57 (1H, dd, J = 8.5, 2.9 Hz, H-7), 6.47 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-5), 6.24 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-4), 5.62 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-3), 1.38 (6H, s, $2 \times CH_3$ -2); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 149.5 (s, C-6), 146.9 (s, C-8a), 132.2 (d, C-3), 122.3 (d, C-4), 122.0 (s, C-4a), 117.0 (d, C-8), 115.6 (d, C-7), 112.9 (d, C-5), 75.9 (s, C-2), 27.7 (q, $2 \times CH_3$ -2)。上述数据与文献值^[9]报道一致, 确定该化合物为 2,2-二甲基-1-苯并吡喃-6-醇。

化合物 3 $C_{18}H_{32}O_2$, 无色油状物; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.35 (4H, m, H-9, H-10, H-12, H-13), 2.75 (2H, m, H-11), 2.34 (2H, t, J = 7.6 Hz, H-2), 2.04 (4H, m, H-8, H-14), 1.63 (2H, m, H-3), 1.31 (14H, m, H-4 to H-7 and H-15 to H-17), 0.87 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-18)。上述数据与文献值^[9]报道一致, 与亚油酸对照品共薄层, R_f 值相同, 确定该化合物为亚油酸。

化合物 4 $C_{10}H_{10}O_4$, 无色油状物; 1H NMR (C_5D_5N , 500 MHz) δ : 7.79 (2H, m, H-3, H-6), 7.47 (2H, m, H-4, H-5), 3.83 (6H, s, $2 \times OCH_3$); ^{13}C NMR (C_5D_5N , 100 MHz) δ : 168.1 (s, C-7, C-8), 132.6 (s, C-1, C-2), 131.6 (d, C-3, C-6), 129.3 (d, C-4, C-5), 52.6 (q, $2 \times OCH_3$)。上述数据与文献值^[9]报道一致, 确定该化合物为邻苯二甲酸二甲酯。

化合物 5 $C_{28}H_{44}O$, 白色晶体; mp. 152 ~ 154 $^{\circ}C$; EI-MS m/z (%): 396 [M]⁺ (55), 363 (61), 337 (40), 271 (17), 253 (48), 211 (37), 197 (28), 185 (23), 171 (30), 157 (55), 143 (57), 131 (27), 119 (30), 91 (28), 81 (27), 69 (100), 55 (56); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.56 (1H, m, H-6), 5.41 (1H, m, H-7), 5.12 ~ 5.28 (2H, m, H-22, H-23), 3.59 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-21), 0.94 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.83 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.81 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.60 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 141.1 (s, C-8), 139.6 (s, C-5), 135.7 (d, C-22), 132.2 (d, C-23), 119.5 (d, C-6), 116.2 (d, C-7), 70.4 (d, C-3), 56.0 (d, C-17), 54.8 (d, C-14), 46.2 (d, C-9), 43.1 (s, C-13), 40.7 (d, C-24), 40.7 (t, C-4), 40.6 (d, C-20), 39.1 (t, C-12), 38.5 (t, C-

1), 37.2 (s, C-10), 33.2 (d, C-25), 32.3 (t, C-2), 28.2 (t, C-16), 23.3 (t, C-15), 21.1 (t, C-11), 21.3 (q, C-21), 19.8 (q, C-26), 19.5 (q, C-27), 17.4 (q, C-28), 16.1 (q, C-19), 11.9 (q, C-18)。以上波谱数据与文献^[9]数据报道一致, 确定该化合物为麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇。

化合物 6 $C_{12}H_{12}O_2$, 无色油状物; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6.89 (1H, dd, J = 2.4, 0.8 Hz, H-3), 6.77 (1H, dd, J = 8.8, 2.4 Hz, H-5), 6.74 (1H, dd, J = 8.8, 0.8 Hz, H-6), 5.41 (1H, m, H-4'), 5.29 (1H, m, H-4'), 3.83 (3H, s, OCH_3), 1.94 (3H, dd, J = 1.6, 1.2 Hz, CH_3 -3'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 154.5 (s, C-1), 149.2 (s, C-4), 126.9 (s, C-3'), 122.1 (t, C-4'), 120.1 (d, C-3), 116.5 (d, C-5), 113.3 (s, C-2), 112.4 (d, C-6), 94.9 (s, C-2'), 84.3 (s, C-1'), 56.7 (q, OCH_3), 23.5 (q, CH_3 -3')。上述数据与文献值^[9]报道一致, 确定该化合物为 Eulatinol。

化合物 7 $C_8H_{10}O_2$, 无色结晶; EI-MS m/z (%): 138 [M]⁺ (28), 107 (100), 77 (14); 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 6.94 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, H-6), 6.66 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3, H-5), 3.61 (2H, t, J = 6.8 Hz, H-8), 2.63 (2H, t, J = 6.8 Hz, H-7); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 154.8 (s, C-4), 129.6 (d, C-2, C-6), 129.4 (s, C-1), 115.0 (d, C-3, C-5), 64.2 (t, C-8), 37.8 (t, C-7)。以上波谱数据与文献^[9]报道一致, 确定该化合物为对羟基苯乙醇。

化合物 8 $C_{11}H_{10}O_2$, 无色油状物; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 6.82 (1H, dd, J = 8.8, 0.4 Hz, H-6), 6.81 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-3), 6.74 (1H, dd, J = 8.8, 3.2 Hz, H-5), 5.43 (1H, m, H-4'), 5.36 (1H, m, H-4'), 2.01 (3H, dd, J = 1.6, 1.2 Hz, CH_3 -3'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 150.9 (s, C-1), 148.7 (s, C-4), 126.1 (s, C-3'), 123.1 (t, C-4'), 117.6 (d, C-3), 117.5 (d, C-5), 115.5 (d, C-6), 109.9 (s, C-2), 97.6 (s, C-2'), 81.9 (s, C-1'), 23.5 (q, CH_3 -3')。上述数据与文献值^[9]报道一致, 确定该化合物为 Siccayne。

化合物 9 $C_6H_6O_4$, 无色片晶; mp. 174 ~ 175 $^{\circ}C$; 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.14 (1H, d, J = 3.4 Hz, H-3), 6.45 (1H, d, J = 3.4 Hz, H-4), 4.56 (2H, s, CH_2); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 160.8 (s, C-1), 159.7 (s, C-2), 144.6 (s, C-5), 118.6 (d,

C-3), 109.2 (d, C-4), 56.5 (t, C-6)。上述数据与文献值^[14]报道一致, 确定该化合物为 5-羟甲基糠酸。

化合物 10 $C_6H_6O_2$, 白色针晶; mp. 170 ~ 171 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 6.51 (4H, s, H-2, H-3, H-5, H-6)。上述数据与文献值^[11]报道一致, 与对苯二酚对照品共薄层, R_f 值相同, 确定该化合物为对苯二酚。

化合物 11 $C_6H_6O_3$, 黄色油状物; EI-MS m/z (%): 126 [M]⁺ (13), 125 (13), 109 (100), 97 (27), 81 (14), 69 (6), 53 (5); 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 9.56 (1H, s, H-1), 7.24 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-4), 6.53 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-3), 4.70 (2H, s, H-6); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 178.0 (s, C-1), 160.7 (s, C-2), 152.6 (s, C-5), 122.6 (d, C-3), 109.5 (d, C-4), 57.5 (t, C-6)。上述数据与文献值^[12]报道一致, 确定该化合物为 5-羟甲基-糠醛。

参考文献

- Mao XL (卯晓岚). The Macrofungi in China (中国大型真菌). Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2000. 356.
- Ueno A, Fukushima S, Saiki Y, et al. Studies on the components of *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat. Chem Pharm Bull, 1964, 12: 376-378.
- Lu YD (陆云德), Guo HY (郭怀宇), Liu JK (刘吉开), et al. Chemical constituents of the fermentation broth of *Tyromyces chioneus*. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1510-1514.
- Li X (李想), Yao YH (姚燕华), Zheng YN (郑毅男), et al. Chemical study on fermentation of endophyte fungus GT6105. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2007, 5: 20-23.
- Lu HM (卢慧明), Xie HH (谢海辉), Yang YF (杨宇峰), et al. Chemical constituents from the macroalga *Gracilaria lemaneiformis*. J Tropic Subtropic Botany (热带亚热带植物学报), 2011, 19: 166-170.
- Geng JL (耿家玲), Geng CA (耿长安), Chen JJ (陈纪军). Chemical constituents of *Swertia cincta*. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 42-46.
- Du ZW (杜子伟), Liu JS (刘劲松), Wu PY (吴培云), et al. Chemical constituents of *Hexagonia speciosa*. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2012, 34: 1305.
- Molyneux RJ, Mahoney N, Bayman P, et al. *Eutypa dieback* in grapevines: differential production of acetylenic phenol metabolites by strains of *Eutypa lata*. J Agric Food Chem, 2002, 50: 1393-1399.
- Yin W (尹伟), Wu PY (吴培云), Liang YM (梁益敏), et al. Chemical constituents of sarcocarp of *Crescentia cu-jete*. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2012, 34: 1523-1528.
- Cai Q (才谦), Liu YQ (刘玉强), Ma Z (马哲). Isolation and identification of chemical constituents from the fruit and calyx of *Physalis alkekengi* L. Var. *franchetii* (Mast.) Makino. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2009, 26: 807-810.
- Gao YJ (高云佳), Zhao QC (赵庆春), Min P (闵鹏), et al. Chemical constituents of *Lasiosphaera fenzlii* Reich. Chin J Med Chem (中国药物化学杂志), 2010, 20: 47-49.
- Yin HQ (尹宏权), Qi XL (齐秀兰), Hua HM (华会明), et al. The chemical constituents from *Saussurea lappa* C. B Clarke. Chin J Med Chem (中国药物化学杂志), 2005, 15: 217-220.