齿贝栓菌的化学成分

何其伟[1,2],刘吉开[2],杜子伟[1,2],王 刚[1]

(1.安徽中医学院药学院 现代中药安徽省重点实验室,安徽 合肥 230031;
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,云南 昆明 650204)

[摘要]目的 研究齿贝栓菌(*Trametes cervina* (Schw.) Bres)发酵液的化学成分。**方法** 齿贝栓菌发酵液的乙酸乙酯部位经硅胶、Rp-18、Sephadex LH-20等多种材料进行分离,波谱学鉴定化合物的化学结构。**结果** 分离鉴定了10个化合物,分别为二甲异咯嗪(1)、麦角甾-7,22-二烯-3β,5α,6β-三醇(2)、*N*-乙酰酪胺(3)、对羟基苯乙醇(4)、2,3-丁二醇(5)、对羟基苯甲酸(6)、对羟基苯乙酸(7)、对羟基苯丙酸(8)、尿嘧啶(9)和二氢尿嘧啶(10)。**结论** 以上化合物均为首次从该种真菌中分得,其中化合物3、8、10首次从该属真菌中发现。

[关键词]齿贝栓菌;化学成分;二甲异咯嗪;*N*-乙酰酪胺;二氢尿嘧啶

[中图分类号]R284 **[文献标志码]**A [DOI]10.3969/j.issn.1000-2219.2011.02.027

齿贝栓菌(*Trametes cervina* (Schw.) Bres),属多孔菌科栓菌属高等真菌,主要分布于四川和河北[1]。目前未见该菌化学成分的文献报道。为了从真菌中寻找具有生物活性的次生代谢产物,笔者对齿贝栓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10个已知化合物,经波谱解析分别鉴定为:二甲异咯嗪(1),麦角甾-7,22-二烯-3β,5α,6β-三醇(2),*N*-乙酰酪胺(3),对羟基苯乙醇(4),2,3-丁二醇(5),对羟基苯甲酸(6),对羟基苯乙酸(7),对羟基苯丙酸(8),尿嘧啶(9),二氢尿嘧啶(10)。

1 仪器与材料

熔点由四川大学科学仪器厂生产的XRC-1型显微熔点仪测定,温度计未校正;质谱由VG AutoSpec-3000质谱仪测定;核磁共振由Bruker AV-400和DRX-500测定,其中^{1}H NMR在400 MHz和500 MHz下测定,^{13}C NMR在100 MHz和125 MHz下测定;柱层析硅胶和GF254TLC预制板均为山东省青岛海洋化工厂生产;Sephadex LH-20为瑞典Amersham Biosciences公司产品;显色方法为荧光灯下波长254 nm和365 nm处观察荧光,10%硫酸乙醇溶液和硫酸香草醛处理后加热显色及碘蒸气显色。

齿贝栓菌于2009年8月份采集于云南哀牢山,由昆明植物所杨祝良研究员鉴定,标本存于昆明植物研究所标本馆。

2 发酵与培养

对该菌种采用斜面转摇瓶液体培养的方法进行发酵培养。培养条件和规模: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%,160~165 r/min,25 ℃摇床发酵24 d,装液量为350 ml,发酵液总量为21 L。

3 提取与分离

齿贝栓菌发酵液(21 L)用乙酸乙酯萃取3次,合并减压蒸干得2.8 g粗提物,经硅胶柱层析,以氯仿-甲醇梯度洗脱得6个流分(A、B、C、D、E、F)。流分A(氯仿-甲醇95∶5洗脱部分)经硅胶柱层析,以石油醚-丙酮(10∶1)脱得2个亚组分,其中流分A1再经硅胶柱层析,以石油醚-丙酮(12∶1)洗脱得到化合物1(7.1 mg),流分A2经重结晶得到化合物2(4.1 mg)。流分B(氯仿-甲醇90∶10洗脱部分)经硅胶柱层析,以氯仿-丙酮(15∶1)洗脱得2个亚组分,流分B1再经硅胶柱层析,以石油醚-丙酮(5∶1)洗脱得到化合物3(7.0 mg),流分B2经Sephadex LH-20柱层析,以氯仿-甲醇(1∶1)洗脱后,进一步柱

作者简介:何其伟(1985-),男,硕士研究生

通信作者:王刚,0551-5169227,kunhong_8@163.com

temperature of inclusion was 50 ℃, the inclusion time was 2 h. The main compositions of volatile oils in the inclusion compound did not change significantly. The difference between the inclusion and physical mixtures in the curve was significant. **Conclusion** The optimized process is simple and reasonable. A stable inclusion compound of volatile oils and β-CD is formed.

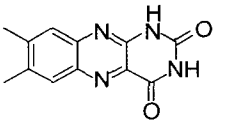
[Key words]Qibai Pingfei Capsules; volatile oils; β-cyclodextrin; inclusion compound

层析(石油醚/丙酮,6∶1～4∶1)得化合物4(18.0 mg)、化合物5(11.0 mg)、化合物6(7.4 mg)。流分D(氯仿-甲醇1∶1洗脱部分)经Sephadex LH-20柱层析,以氯仿-甲醇(1∶1)洗脱得3个亚组分(流分D1、D2、D3)。流分D1经硅胶柱层析,以石油醚-丙酮(3∶1)洗脱得到化合物7(17.1 mg)。流分D2经进一步的硅胶柱层析,以氯仿-甲醇(8∶1)洗脱得到化合物8(11.2 mg)。流分D3经制备高压液相分别得到化合物9(10.4 mg)和化合物10(3.7 mg)。

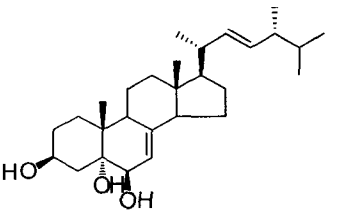
4 化学结构及鉴定

化合物1:二甲异咯嗪,$C_{12}H_{10}N_4O_2$,黄色粉末;EI-MS m/z(%):242 $[M]^+$(100),227(2),199(12),171(71),170(38),156(60);^{1}H-NMR(C_5D_5N,500 MHz)δ:14.16(1H,br.s,H-3),13.93(1H,br.s,H-1),8.03(1H,s,H-6),7.86(1H,s,H-9),2.30(3H,s,8-CH_3),2.24(3H,s,7-CH_3);^{13}C-NMR(C_5D_5N,125 MHz)δ:162.1(s,C-4),151.8(s,C-2),147.7(s,C-10a),144.9(s,C-9a),139.8(s,C-5a),139.1(s,C-8),131.0(s,C-4a),129.8(d,C-6),127.2(d,C-9),20.4(q,7-CH_3),19.8(q,8-CH_3)。以上数据与文献[2]数据报道一致,确定该化合物为二甲异咯嗪。

化合物2:麦角甾-7,22-二烯-3β,5α,6β-三醇,$C_{28}H_{46}O_3$,白色无定型粉末;熔点253～255 ℃;EI-MS m/z(%):430$[M]^+$,412$[M-H_2O]^+$(35),394$[M-2H_2O]^+$(37),379(65),376$[M-3H_2O]^+$(15),269(33),251(62),69(100);^{1}H-NMR(C_5D_5N,400 MHz)δ:0.54(3H,s,H-18),0.84(3H,d,J=6.7,H-26),0.85(3H,d,J=6.7,H-27),0.94(3H,d,J=6.4 Hz,H-28),1.07(3H,d,J=6.4,H-21),1.53(3H,s,H-19),4.32(1H,br.d,J=4.8,H-6),4.84(1H,m,H-3),5.16(1H,dd,J=15.3,J=8.3,H-22),5.24(1H,dd,J=15.3,J=7.4,H-23),5.74(1H,m,H-7);^{13}C-NMR(C_5D_5N,100 MHz)δ:32.6(t,C-1),33.8(t,C-2),67.6(d,C-3),42.0(t,C-4),76.1(s,C-5),74.3(d,C-6),120.4(d,C-7),141.6(s,C-8),43.8(d,C-9),38.1(s,C-10),22.4(t,C-11),40.1(t,C-12),43.9(s,C-13),55.2(d,C-14),23.5(t,C-15),28.2(t,C-16),56.5(d,C-17),12.3(q,C-18),18.8(q,C-19),40.4(d,C-20),21.3(q,C-21),135.2(d,C-22),132.5(d,C-23),42.8(d,C-24),33.1(d,C-25),19.9(q,C-26),20.1(q,C-27),17.6(q,C-28)。以上数据与文献[3]数据报道一致,确定该化合物为麦角甾-7,22-二烯-3β,5α,6β-三醇。



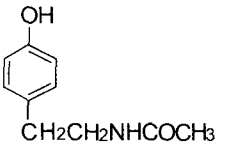
化合物1



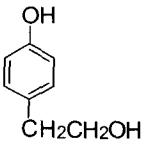
化合物2

化合物3:N-乙酰酪胺,$C_{10}H_{13}NO_2$,无色粉末;ESI-MS m/z:180$[M+H]^+$;^{1}H-NMR(methanol-d_4,500 MHz)δ:6.71(2H,d,J=8.5,H-3/5),7.02(2H,d,J=8.5,H-2/6),3.33(2H,t,J=7.5,H-7),2.69(2H,t,J=7.5,H-8),1.89(3H,s,Me)。以上数据与文献[4]数据报道一致,确定该化合物为N-乙酰酪胺。

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



化合物3

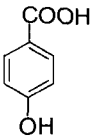


化合物4

化合物5:2,3-丁二醇,$C_4H_{10}O_2$,无色油状物;ESI-MS m/z:113$[M+Na]^+$;^{1}H-NMR($CDCl_3$,500 MHz)δ:1.00(6H,d,J=6.3,H-1/4),3.75(2H,m,H-3/5);^{13}C-NMR($CDCl_3$,125 MHz)δ:16.7(q,C-1/4),70.8(d,C-2/3)。以上数据与文献[6]数据报道一致,确定该化合物为2,3-丁二醇,并与标准对照品一致。

化合物6:对羟基苯甲酸,$C_7H_6O_3$,浅黄色晶体;EI-MS m/z(%):138$[M]^+$(90),121(100);^{1}H-NMR(methanol-d_4,400 MHz)δ:7.86(2H,dd,J=8.7,J=2.1,H-2/6),6.82(2H,dd,J=8.7,J=2.1,H-3/5);^{13}C-NMR(methanol-d_4,100 MHz)δ:122.7(s,C-1),132.9(d,C-2/6),116.0(d,C-3/5),163.4(s,C-4),170.0(s,COOH)。以上数据与文献[7]数据报道一致,确定该化合物为对羟基苯甲酸。

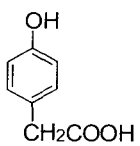
化合物5



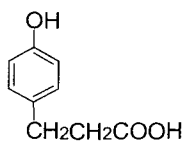
化合物6

化合物7：对羟基苯乙酸，$C_8H_8O_3$，无色油状物；EI-MS m/z(%)：152[M]$^+$(28)，107(100)，77(14)；^{1}H-NNR(methanol-d_4，400 MHz)δ：7.04(2H，dd，J=6.8，J=2.0，H-2′，6′)，6.78(2H，dd，J=6.8，J=2.0，H-3′，5′)，3.51(2H，s，H-2)；^{13}C-NMR(methanol-d_4，100 MHz)δ：176.2(s，C-1)，157.3(s，C-4′)，131.1(d，C-2′/6′)，127.3(s，C-1′)，116.3(d，C-3′/5′)，48.2(s，C-2)。以上数据与文献[8]数据报道一致，确定该化合物为对羟基苯乙酸。

化合物8：对羟基苯丙酸，$C_9H_{10}O_3$，白色结晶；EI-MS m/z(%)：166[M]$^-$(87)，107(100)；^{1}H-NNR(methanol-d_4，400 MHz)δ：7.02(2H，dd，J=8.2，J=2.5，H-2，6)，6.70(2H，dd，J=8.2，J=2.5，H-3/5)，2.81(2H，t，J=7.8，H-8)，2.53(2H，t，J=7.8，H-7)；^{13}C-NMR(methanol-d_4，100 MHz)δ：133.6(s，C-1)，130.2(s，C-2/6)，116.1(s，C-3/5)，156.0(s，C-4)，31.7(t，C-7)，38.6(t，C-8)，179.2(s，C-9)。以上数据与文献[9]数据报道一致，确定该化合物为对羟基苯丙酸。

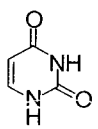


化合物7

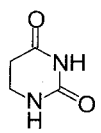


化合物8

化合物9：尿嘧啶，$C_4H_4N_2O_2$，白色无定形粉末；EI-MS m/z(%)：112[M]$^+$(100)，68(60)；^{1}H-NMR(DMSO-d_6，500 MHz)δ：10.80(1H，br.s，H-1)，10.99(1H，brs，H-3)，5.43(1H，d，J=7.6，H-5)，7.37(1H，d，J=7.6，H-6)；^{13}C-NMR(DMSO-d_6，125 MHz)δ：151.6(s，C-2)，164.5(s，C-4)，100.4(d，C-5)，142.3(d，C-6)。以上数据与文献[10]数据报道一致，确定该化合物为尿嘧啶。



化合物9



化合物10

化合物10：二氢尿嘧啶，$C_4H_6N_2O_2$，淡黄色无定形粉末；EI-MS m/z(%)：114[M]+(100)，70(80)；^{1}H-NMR(DMSO-d_6，500 MHz)δ：9.90(1H，br.s，H-1)，7.45(1H，brs，H-3)，2.42(2H，t，J=6.8，H-5)，3.19(2H，t，J=6.8，H-6)；^{13}C-NMR(DMSO-d_6，125 MHz)δ：154.1(s，C-2)，171.3(s，C-4)，30.5(t，C-5)，35.5(t，C-6)。以上数据与文献[11]数据报道一致，确定该化合物为二氢尿嘧啶。

参考文献：

[1] 袁明生，孙佩琼，中国蕈菌原色图集[M]. 成都：四川科学技术出版社，2007：131.

[2] 申丽，史大华，宋勇春，等. 黄花蒿内生菌 IFB-E012 发酵液的化学成分[J]. 中国天然药物，2009，7(5)：354-356.

[3] Iorizzi M，Minale L，Riccio R，et al. Polar Steroids from the marine scallop Patinopecten-yessoensis[J]. Journal of Natural Products 1988，51(6)：1098-1103.

[4] Zhao PJ，Wang HX，Li GH，et al. Secondary metabolites from endophytic Streptomyces sp Lz531[J]. Chem Biodivers，2007，4(5)：899-904.

[5] Kodaira H，Ishikawa M，Komoda Y，et al. Isolation and identification of anti-platelet aggregation principles from the bark of Fraxinus japonica BLUME[J]. Chem Pharm Bull，1983，31(7)：2262-2268.

[6] 牛芸. 毛钉菇等6种高等真菌化学成分研究[D]. 北京：中国科学院，2010：34.

[7] Zhang DW，Dai SJ，Liu WH，et al. Chemical Constituents from the vines of Pueraria lobata[J]. Chinese Journal of Natural Medicines，2010，8(3)：196-198.

[8] 马鸿雁，杨莉，张勉，等. 单麻叶千里光中的一个新化学成分[J]. 药学学报，2008，43(6)：626-629.

[9] Owen RW，Haubner R，Mier W，et al. Isolation，structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes[J]. Food Chem Toxicol，2003，41(5)：703-717.

[10] Cao XT，Wang D，Wang N，et al. Water-soluble constitutions from the skin of Bufo bufo gargarizans Cantor[J]. Chinese Journal of Natural Medicines，2009，7(3)：181-183.

[11] 崔锡强，王洪庆，刘超，等. 蚕沙化学成分的研究[J]. 中草药，2007，38(4)：501-502.

Chemical Constituents of *Trametes Cervina*

HE Qi-wei[1,2]，*LIU Ji-kai*[2]，*DU Zi-wei*[1,2]，*WANG Gang*[1]

(1. *Department of Pharmacy*，*Anhui College of Traditional Chinese Medicine & Anhui Key Laboratory for Modern Chinese Materia Medica*，*Anhui Hefei* 230031，*China*；2. *State Key Laboratory for Phytochemistry and Sustained Utilization of Plant Resources in West China*，*Kunming Institute of Botany*，*Chinese Academy of Sciences*，*Yunnan Kunming* 650204，*China*)

正交试验法优选通窍活血颗粒剂的提取工艺

常国洁，汪　宁，许凤清，何　群，张亚帆

（安徽中医学院药学院　安徽省中药研究与开发重点实验室，安徽 合肥　230031）

[摘要]目的　优选通窍活血颗粒剂的提取工艺。**方法**　采用正交试验法，以通窍活血颗粒剂中的干膏得率、芍药苷和羟基红花黄色素A含量作为考核指标，优选提取工艺中的加水量、煎煮时间和煎煮次数3个因素。**结果**　优选出的最佳提取工艺为：加8倍量的水，提取2次，第1次1.5 h，第2次1 h。**结论**　该提取工艺稳定、可行。

[关键词]通窍活血颗粒剂；正交试验；提取工艺

[中图分类号]R284.2　**[文献标志码]**A　[DOI]10.3969/j.issn.1000-2219.2011.02.028

通窍活血颗粒剂由赤芍、桃仁、红花、川芎、麝香等组成，具有活血通络、宣通阳气、辛香发散的功效。临床上广泛用于治疗神经系统疾病，如脑梗死、脑出血、脑外伤性昏迷、脑动脉硬化等[1-2]。在前期药效学研究[3-5]的基础上，采用正交试验法对该方进行颗粒剂的提取工艺研究，优选最佳提取工艺，为实际生产提供理论依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器　Agilent 1100高效液相色谱仪：美国安捷伦公司；十万分之一电子分析天平：德国Satrorius BP211D。

1.2　试剂　甲醇、乙腈为色谱纯；磷酸、醋酸为分析纯；水为双蒸水；赤芍、川芎、桃仁、红花等药材均购自合肥市医药公司中药饮片厂；芍药苷对照品（批号110736-200424）：中国药品生物制品检验所；羟基红花黄色素A对照品（批号08-0198）：上海顺勃生物工程技术有限公司。

2　方法与结果

2.1　考察因素确定　选择药材加水量（A），煎煮时间（B），煎煮次数（C）作为考察因素，每个因素设3个水平，见表1。按$L_9(3^4)$正交表安排9组试验，以干膏得率、芍药苷和羟基红花黄色素A含量作为考察指标，设计正交试验。

2.2　药材提取　每次试验按处方比例称取药材32 g，加水充分润湿，按$L_9(3^4)$正交表安排9组试验，煎煮浓缩至糖浆状，减压干燥至干浸膏，计算干膏得率。

2.3　储备液制备　称取干膏3.5 g，加双蒸水10 ml溶解，用等体积的水饱和正丁醇萃取3次，合并萃取液，蒸干。残渣加双蒸水定容至25 ml，作为供试品储备液。

表1　因素水平表

水平	因素			
	A/倍	B/h	C/次	空白
1	8	1.0	1	1
2	10	1.5	2	2
3	12	2.0	3	3

2.4　芍药苷含量测定方法的建立

2.4.1　供试品溶液制备：取供试品储备液1 ml，加甲醇定容至10 ml容量瓶中，摇匀，用0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液作为供试品1溶液。

2.4.2　对照品溶液制备：精密称取芍药苷对照品

基金项目：国家自然科学基金（30973979），安徽省优秀青年科技基金（10040606Y17）

作者简介：常国洁（1986-），男，硕士研究生

通信作者：汪宁，0551-5169232，wangnhf_515@yahoo.com.cn

[**Abstract**]**Objective**　To investigate the chemical constituents from the fermentation broth of *Trametes cervina* (Schw.) Bres. **Methods**　The ethyl acetate extracts of *Trametes cervina* (Schw.) Bres were separated and purified by silica gel, Rp-18, Sephadex LH-20 column chromatography, respectively. Their structures were elucidated using spectroscopic analysis. **Results**　A total of 10 compounds were isolated and identified as lumichrome(1), cerevisterol(2), *N*-acetyltyramine(3), 4-(2-hydroxyethyl)phenol(4), 2,3-butanediol(5), p-hydroxybenzoic acid(6), 4-Hydroxybenzene acetic acid(7), 3-(4-hydroxyphenyl)- propanoic acid(8), uracil(9), and dihydrouracil(10). **Conclusion**　All compounds are isolated from this fungus for the first time. Compound 3,8 and 10 are firstly isolated from this genus.

[**Key words**]*Trametes cervina*; chemical components; Lumichrome; *N*-Acetyltyramine; dihydrouracil