

文章编号: 1674-7054(2018)04-0445-07

## 木蹄层孔菌子实体的化学成分分析

李冉<sup>1,2</sup>, 马青云<sup>2</sup>, 孔凡栋<sup>2</sup>, 谢晴宜<sup>2</sup>, 丁琼<sup>1</sup>, 赵友兴<sup>2</sup>

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/  
农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口 571101)

**摘要:** 采用硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱、半制备高效液相等色谱方法对木蹄层孔菌子实体中的化合物进行分离纯化, 并通过核磁共振波谱数据结合理化性质鉴定化合物结构, 采用 Ellman 法测定化合物抑制乙酰胆碱酯酶活性、PNPG 法测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性、DPPH 法清除 DPPH 自由基抗氧化活性和 96 孔板微量法测定抑菌活性。从木蹄层孔菌子实体乙酸乙酯萃取部分分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为: 3-*A*-二羟基苯甲酸乙酯 (1)、3-*A*-二羟基苯甲醛 (2)、4-(3-*A*-二羟基苯基)-3E-丁烯-2-酮 (3)、2-*A*-二羟基-3,5-二甲基苯乙酮 (4)、对羟基苯甲醛 (5)、4-羟基苯乙酮 (6)、麦角甾-7,22-二烯-3 $\beta$ -醇 (7)、麦角甾-7,22-二烯-3-酮 (8)、4-(4-羟基苯基)-3E-丁烯-2-酮 (9)、1,5-2-(3-*A*-二羟基苯基)-1-*A*-戊二烯-3-酮 (10)、3-*A*-二羟基苯乙酮 (11)。活性测试结果表明: 化合物 2,10,11 具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, 化合物 3,4,9,10,11 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, 化合物 1~11 均有 DPPH 自由基清除活性, 化合物 10 具有抑菌活性。

**关键词:** 木蹄层孔菌; 化学成分; 生物活性

中图分类号: R 284.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.04.013

木蹄层孔菌 (*Fomes fomentarius*) 又名火域层孔菌, 属于担子菌纲 (Basidiomycetes) 多孔菌目 (Polyporales) 多孔菌科 (Polyporaceae) 层孔菌属 (*Fomes*)<sup>[1]</sup>。我国真菌资源丰富, 至少有 10 万余种, 具有药效的超过 540 种, 这些真菌大多数为担子菌亚门和子囊菌亚门<sup>[2]</sup>。木蹄层孔菌是一种常长于桦树上的大型真菌, 其药用部位为子实体, 民间常用其治疗食道癌、子宫癌等病症<sup>[3]</sup>。研究发现, 木蹄层孔菌中化学成分主要有木脂素类化合物、脂肪族化合物、小分子芳香族化合物和甾类化合物<sup>[4-6]</sup>。为深入研究木蹄层孔菌化学成分, 更好地开发和利用该大型药用真菌资源, 笔者采用多种柱色谱技术和半制备高效液相色谱对木蹄层孔菌子实体中的化学成分进行了分离, 并测定了化合物抑制乙酰胆碱酯酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、清除 DPPH 自由基和抑菌的活性, 以期发现其生物活性成分, 为木蹄层孔菌资源高值化开发利用和药物先导化合物的发现提供参考。

### 1 材料与方法

**1.1 样品材料** 木蹄层孔菌子实体于 2015 年 6 月采自广西省百色市靖西县, 经海南医学院曾念开教授鉴定为多孔菌科层孔菌属木蹄层孔菌 (*Fomes fomentarius*) , 凭证标本 (No. 2015ZCK01) 存放于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

**1.2 仪器与实验材料** AVANCE-500 核磁共振光谱仪 (德国 Bruker) , 质谱仪 (Micromass Autospec-Uiti-

收稿日期: 2018-09-05

修回日期: 2018-09-26

基金项目: 国家自然科学基金 (81741157); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-21); 农业农村部财政专项 (NFZX2018); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项 (17CXTD-15; 1630052016008)

作者简介: 李冉 (1993-), 女, 海南大学热带农林学院 2016 级硕士研究生. E-mail: 1274450724@qq.com

通信作者: 丁琼 (1974-), 女, 博士, 副教授. 研究方向: 真菌群落生态学. E-mail: dingqiong@hainu.edu.cn;

赵友兴 (1974-), 男, 博士, 研究员. 研究方向: 活性天然产物化学. E-mail: zhaoyouxing@itbb.org.cn

ma-TOF) 旋转蒸发仪(EYELA 公司) ,安捷伦 1260 分析型高效液相色谱仪(美国安捷伦) ,超净工作台(苏州净化有限公司) ,Thermo 酶标仪(美国赛默飞世尔) ;万分之一电子天平(美国丹佛仪器公司) ,半制备高效液相色谱仪(戴安 SUMMITP680A 美国) ;COSMOSIL 色谱柱(C18 250 mm × 4.6 mm ,ID ,日本 Nacalai Tesque 公司) 。反向材料 C-18 (型号 MB100-40/75 ,日本 FU-JI 公司) 柱色谱用硅胶(200 ~ 300 目 ,60 ~ 80 目 ,青岛海洋化工厂) ,GF-254 薄层色谱硅胶板(青岛海洋化工厂) ,Sephadex LH-20 凝胶(德国 Merck 公司) 。

1.3 试剂 乙酰胆碱酯酶、碘化硫代乙酰胆碱、二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)、他克林(Sigma 公司) , $\alpha$ -葡萄糖苷酶(Solarbio 公司) ,阿卡波糖(北京百灵威科技有限公司) 。

1.4 提取与分离 将采集的木蹄层孔菌子实体晒干粉碎 ,用  $\varphi = 95\%$  的乙醇回流提取 3 次 ,所得提取液经减压浓缩得到粗浸膏 ,加温水混溶并依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取 ,所得萃取液减压浓缩得到石油醚浸膏 25.7 g、乙酸乙酯浸膏 50.2 g、正丁醇浸膏 23.4 g。将乙酸乙酯浸膏使用减压硅胶柱色谱 ,以石油醚 : 乙酸乙酯(10 : 1 → 0 : 1) 梯度洗脱 ,分段收集 ,用薄层硅胶板检测 ,合并得到 10 个馏分(Fr1 ~ Fr10) 。Fr1(4.6 g) 经甲醇与水(70 : 30) 反相 ODS 色谱柱洗脱后 ,通过 Sephadex LH-20 凝胶柱( $V_{\text{石油醚}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{甲醇}} = 2 : 1 : 1$ ) 洗脱后 ,通过半制备高效液相色谱仪(C18 色谱柱 ,流速  $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ,检测波长 200 296 nm ,流动相  $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 75 : 25$  恒梯度洗脱) 得到 Fr4(3.0 mg ,保留时间 4.9 min) 。Fr4(3.6 g) 采用 Sephadex LH-20 凝胶柱( $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{甲醇}} = 1 : 1$ ) 洗脱后 ,通过半制备高效液相色谱仪(C18 色谱柱 ,流速  $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ,检测波长 290 320 nm , $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 35 : 65$  恒梯度洗脱) 得到 Fr5(16.1 mg ,保留时间 8.3 min) 和 Fr6(1.6 mg ,保留时间 9.8 min) 。Fr5(4.8 g) 经甲醇与水( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 60 : 40$ ) 反相 ODS 色谱柱洗脱后 ,经硅胶柱色谱( $V_{\text{石油醚}} : V_{\text{乙酸乙酯}} = 10 : 1$ ) 分离得到 Fr9(10.1 mg) 。Fr6(2.4 g) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇) 后 ,以石油醚 - 乙酸乙酯( $V_{\text{石油醚}} : V_{\text{乙酸乙酯}} = 2 : 1$ ) 硅胶柱色谱分离得到 Fr7(3.7 mg) 和 Fr8(1.6 mg) 。Fr7(2.8 g) 采用硅胶柱色谱( $V_{\text{石油醚}} : V_{\text{乙酸乙酯}} = 3 : 2$ ) 分离得到 Fr1(9.8 mg) 。Fr8(3.8 g) 通过经甲醇 - 水( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 30 : 70$ ) 反相 ODS 色谱柱洗脱后 ,通过半制备高效液相色谱仪(C18 色谱柱 ,流速  $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ,检测波长 220 274 nm , $V_{\text{乙醇}} : V_{\text{水}} = 20 : 80$  恒梯度洗脱) 得到 Fr2(15 mg ,保留时间 12.5 min) 。Fr9(2.1 g) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱( $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{甲醇}} = 1 : 1$ ) 后 ,经半制备高效液相色谱仪(C18 色谱柱 ,流速  $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ; 检测波长 200 276 nm , $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 30 : 70$  恒梯度洗脱) 得到 Fr10(2.0 mg ,保留时间 8.6 min) 和 Fr11(2.4 mg ,保留时间 8.7 min) 。Fr10(4.5 g) 通过甲醇与水( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 40 : 60$ ) 反相 ODS 色谱柱洗脱后 ,经 Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇) 分离得到 Fr3(8.3 mg) 。

1.5  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定 采用 4-硝基苯基 -  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG) 法<sup>[7-8]</sup> 对化合物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性进行评价。使用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠(pH6.8) 缓冲液作为反应溶液 , $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性实验采用阿卡波糖溶液(反应终质量浓度  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为阳性对照 ,由于阿卡波糖相对分子质量大、活性较低 ,因此 ,当待测化合物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制率接近或高于阿卡波糖时 ,则认为有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。阴性对照 B( $10 \mu\text{L}$  10% 的 DMSO - PBS 溶液 +  $70 \mu\text{L}$  PBS 溶液 +  $20 \mu\text{L}$  PBS 溶液溶解的  $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$   $\alpha$ -糖苷酶溶液) ,阳性对照为  $10 \mu\text{L}$  的阿卡波糖溶液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) +  $70 \mu\text{L}$  PBS 溶液 +  $20 \mu\text{L}$  PBS 溶液溶解的  $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$   $\alpha$ -糖苷酶溶液 ,化合物均溶于 DMSO 样品反应终质量浓度为  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ,设置背景对照 A0( $10 \mu\text{L}$  待测样品溶液 +  $90 \mu\text{L}$  PBS 溶液) ,实验组 A( $10 \mu\text{L}$  待测样品溶液 +  $70 \mu\text{L}$  PBS 溶液 +  $20 \mu\text{L}$  PBS 溶液溶解的  $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$   $\alpha$ -糖苷酶溶液) ,空白对照 B0( $10 \mu\text{L}$  10% 的 DMSO - PBS 溶液 +  $90 \mu\text{L}$  的 PBS 溶液) 。将以上各溶液混匀于 96 孔酶标板中 ,将 96 孔板于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  放置 15 min 后 ,各组均加入  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 4-硝基苯基 -  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG) 溶液  $20 \mu\text{L}$  ; 将 96 孔板于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  放置 30 min 后 ,加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止液  $80 \mu\text{L}$  ,用酶标仪于 405 nm 波长下测量每孔的 OD 值吸光度并计算化合物对  $\alpha$ -糖苷酶的抑制活性。计算公式如下:

$$\text{抑制率} = [(B - B_0) - (A - A_0)] / (B - B_0) \times 100\% ,$$

式中: A 为待测样品的平均 OD 值; B 为阴性对照的平均 OD 值;  $A_0$  为背景对照的平均 OD 值;  $B_0$  为空白对照的平均 OD 值。

1.6 乙酰胆碱酯酶抑制活性测定 采用 Ellman 法<sup>[9-10]</sup>测定化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性。化合物均溶于 DMSO 取 110  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液(0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠的缓冲液, pH8.0)、10  $\mu\text{L}$  待测化合物溶液 样品反应终质量浓度为 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ,阴性对照 B(10  $\mu\text{L}$  2% 的 DMSO-PBS 溶液 + 110  $\mu\text{L}$  PBS 溶液 + 40  $\mu\text{L}$  PBS 溶液溶解的 0.1 U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 乙酰胆碱酯酶溶液) ,阳性对照(6.66  $\mu\text{mol}$  的他克林 10  $\mu\text{L}$  + 110  $\mu\text{L}$  PBS 溶液 + 40  $\mu\text{L}$  PBS 溶液溶解的 0.1 U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 乙酰胆碱酯酶溶液) ,设置背景对照 A0 (10  $\mu\text{L}$  待测样品溶液 + 150  $\mu\text{L}$  PBS 溶液) 实验组 A (10  $\mu\text{L}$  待测样品溶液 + 110  $\mu\text{L}$  PBS 溶液 + 40  $\mu\text{L}$  PBS 溶液溶解的 0.1 U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 乙酰胆碱酯酶溶液) ,空白对照 B0(10  $\mu\text{L}$  2% 的 DMSO - PBS 溶液 + 150  $\mu\text{L}$  的 PBS 溶液) 。将以下各溶液混匀于 96 孔板中 将 96 孔板于 30  $^{\circ}\text{C}$  放置 20 min 后 再加入 DTNB(2.48 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 和碘化硫代乙酰胆碱(1.81 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 等体积混合液 40  $\mu\text{L}$  。将 96 孔板于 30  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min 后 用酶标仪于 405 nm 波长下测量每孔的 OD 值并计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制活性 实验重复 3 次。计算公式如下:

$$\text{抑制率} = [(B - B_0) - (A - A_0)] / (B - B_0) \times 100\%$$

1.7 抗氧化活性 采用 DPPH 法测定化合物的抗氧化活性<sup>[11-12]</sup>。将 1 mg 的化合物溶于 DMSO 后 取 10  $\mu\text{L}$  加入无水乙醇中 配制成 5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的待测化合物溶液 相同条件下配制成 5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 抗坏血酸溶液 ,将以下各溶液混匀于 96 孔酶标板后置于酶标仪中: 阴性对照 B(20  $\mu\text{L}$  10% 的 DMSO - 乙醇溶液 + 180  $\mu\text{L}$  DPPH 溶液) ,阳性对照(20  $\mu\text{L}$  抗坏血酸溶液 + 180  $\mu\text{L}$  DPPH 溶液) ,实验组 A(20  $\mu\text{L}$  待测样品溶液 + 180  $\mu\text{L}$  DPPH 溶液) ,空白对照 A0(20  $\mu\text{L}$  待测样品溶液 + 180  $\mu\text{L}$  无水乙醇) 。25  $^{\circ}\text{C}$  避光保温显色 30 min ,于酶标仪 515 nm 波长下测量每孔的 OD 值并计算化合物对 DPPH 自由基清除率。计算公式如下:

$$\text{自由基清除率} = [1 - (A - A_0) / B] \times 100\%$$

式中: A 为待测样品的平均 OD 值; B 为阴性对照的平均 OD 值; A<sub>0</sub> 为空白对照的平均 OD 值。

1.8 抑菌活性 参考文献[13]研究化合物 1~11 对 4 种常见的致病菌(枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* ,金黄色葡萄球菌 *Sarcina lutea* ,大肠杆菌 *Escherichia coli* ,李斯特菌 *Listeria monocytogenes*) 的抑菌活性 测定化合物的最小抑菌浓度(MIC) 。将配置好的培养基、移液枪枪头和其他仪器提前灭菌。选取供试细菌在营养琼脂斜面培养基上传代培养 1 次后 再将其接种到牛肉膏蛋白胨培养基中培养 6 h(37  $^{\circ}\text{C}$ ) ,置冰箱备用(4  $^{\circ}\text{C}$ ) 。将待测化合物用 DMSO 溶剂配制成 20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ,放置在灭菌的小离心管中 ,阳性对照药为抗菌药氨苄青霉素 阴性对照为添加 DMSO 的菌悬液抗菌化合物。在超净工作台内 将液体培养的细菌菌种用培养液稀释为 1 : 1 000 或 1 : 500。用无菌的移液枪取 198  $\mu\text{L}$  病原菌菌液于 96 孔板中 ,加入 2  $\mu\text{L}$  待测化合物溶液(DMSO 溶解 终质量浓度为 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 。以 200  $\mu\text{L}$  病原菌菌液作为空白对照 ,实验重复 3 次。振荡混合后 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 18~22 h ,用酶标仪(630 nm) 测吸光度。每个样品设 3 个平行孔。对能完全抑制细菌生长的样品进行最小抑菌浓度的测试。最小抑菌浓度: 将液体培养的细菌菌种用培养液进行稀释 稀释度为 1 : 1 000。在 96 孔板里第 1 行加入 4  $\mu\text{L}$  待测化合物溶液 使其终质量浓度为 64 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ,混匀后利用 2 倍稀释法使 2~7 孔终质量浓度为 32 ,16 ,8 ,4 ,2 ,1 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 20 h 后观察 能完全抑制细菌生长(培养孔中的液体不浑浊) 的浓度 即为药物的最小抑菌浓度(MIC) 。

## 2 结果与分析

2.1 结构鉴定 化合物 1: 淡黄色粉末 ,ESI MS  $m/z$ : 205  $[M + Na]^+$  ,分子式 C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz , CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.42 (2H , m , H-2  $\beta$ ) ,6.80 (1H , d ,  $J = 8.0$  Hz , H-5) ,4.29 (2H , q ,  $J = 7.1$  Hz , H-8) ,1.35 (3H , t ,  $J = 7.1$  Hz , H-9) ; <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz , CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 168.4 (C-7) ,151.7 (C-3) ,146.2 (C-4) ,123.5 (C-6) ,122.9 (C-1) ,117.4 (C-2) ,115.8 (C-5) ,61.7 (C-8) ,14.7 (C-9) 。以上数据与文献[14]报道基本一致 化合物 1 为 3-*A*-二羟基苯甲酸乙酯。

化合物 2: 白色固体 ,ESI-MS  $m/z$ : 161  $[M + Na]^+$  ,分子式 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz , CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.61 (1H , s , H-CHO) ,7.24 (2H , m , H-2  $\beta$ ) ,6.83 (1H , d ,  $J = 8.0$  Hz , H-5) ; <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz , CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 193.1 (C-CHO) ,153.7 (C-4) ,147.2 (C-3) ,130.8 (C-1) ,126.4 (C-6) ,116.2 (C-5) ,115.3 (C-2) 。以上数据与文献[15]报道基本一致 鉴定化合物 2 为 3-*A*-二羟基苯甲醛。

化合物3: 黄色针型(甲醇), ESI-MS  $m/z$ : 201  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_{10}H_{10}O_3$ 。 $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 2.30 (3H, s, H-10), 6.51 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-8), 6.75 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5), 6.96 (1H, dd,  $J = 8.2, 2.0$  Hz, H-6), 7.04 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 7.49 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-7);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 27.0 (C-10), 115.3 (C-2), 116.5 (C-5), 123.5 (C-6), 124.7 (C-8), 127.7 (C-1), 146.9 (C-3), 146.9 (C-7), 150.0 (C-4), 201.6 (C-9)。以上数据与文献[4]报道基本一致 鉴定化合物3 为的4-(3- $\beta$ -二羟苯基)-3E-丁烯-2-酮。

化合物4: 白色针状, ESI-MS  $m/z$ : 203  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_{10}H_{12}O_3$ 。 $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 12.85 (1H, s, OH-2'), 7.33 (1H, s, H-6'), 2.52 (3H, s, H-1), 2.17 (3H, s, Me-5'), 2.10 (3H, s, Me-3');  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 202.9 (C-2), 161.4 (C-4'), 158.9 (C-), 130.0 (C-6'), 114.6 (C-5'), 113.5 (C-3'), 110.3 (C-1'), 26.5 (C-1), 15.7 (Me-5'), 7.6 (Me-3')。以上数据与文献[16]报道基本一致 鉴定化合物4 为2- $\beta$ -二羟基-3-5-二甲基苯乙酮。

化合物5: 白色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 145  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_7H_6O_2$ 。 $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 9.69 (1H, s, CHO), 7.71 (2H, m, H-2, 6), 6.85 (2H, m, H-3, 5);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 192.8 (CHO), 165.3 (C-4), 133.4 (C-1), 130.2 (C-2, 6), 116.9 (C-3, 5)。以上数据与文献[17]报道基本一致 鉴定化合物5 为对羟基苯甲醛。

化合物6: 白色针晶, ESI-MS  $m/z$ : 159  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_8H_8O_2$ 。 $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.92 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2, 6), 6.93 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3, 5), 2.57 (3H, s, H-Me);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 197.5 (C-7), 160.5 (C-1), 131.2 (C-2, 6), 130.4 (C-4), 115.5 (C-3, 5), 26.5 (C-8)。以上数据与文献[18]报道基本一致, 鉴定化合物6 为4-羟基苯乙酮。

化合物7: 白色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 421  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_{28}H_{46}O$ 。 $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.53 (3H, s, Me-18), 0.79 (3H, s, Me-19), 0.80 (3H, d,  $J = 8.1$  Hz, Me-27), 0.83 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, Me-26), 0.91 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, Me-28), 1.01 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, Me-21), 3.60 (1H, m, H-3), 5.13-5.24 (3H, m, H-22, 23, 7);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.2 (C-3), 38.1 (C-4), 40.4 (C-5), 29.9 (C-6), 117.6 (C-7), 139.7 (C-8), 49.6 (C-9), 34.4 (C-10), 21.7 (C-11), 39.6 (C-12), 43.5 (C-13), 55.3 (C-14), 23.1 (C-15), 28.3 (C-16), 56.1 (C-17), 12.2 (C-18), 13.2 (C-19), 40.6 (C-20), 19.8 (C-21), 132.0 (C-22), 135.8 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 21.3 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献[19]报道基本一致 鉴定化合物7 为麦角甾-7, 22-二烯-3 $\beta$ -醇。

化合物8: 白色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 419  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_{28}H_{44}O$ 。 $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.57 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-26), 0.84 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-27), 0.91 (3H,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 1.01 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, d,  $J = 4.7$  Hz, H-21), 5.18 (3H, m, H-7, 22, 23);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 38.9 (C-1), 38.3 (C-2), 212.2 (C-3), 44.4 (C-5), 43.0 (C-5), 30.2 (C-6), 117.1 (C-7), 139.7 (C-8), 49.0 (C-9), 34.6 (C-10), 21.8 (C-11), 39.5 (C-12), 43.4 (C-13), 56.1 (C-14), 23.1 (C-15), 28.3 (C-16), 55.2 (C-17), 12.3 (C-18), 12.6 (C-19), 40.6 (C-20), 19.8 (C-21), 135.7 (C-22), 132.1 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 21.3 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献[20]报道基本一致 鉴定化合物8 为麦角甾-7, 22-二烯-3-酮。

化合物9: 白色粉末, ESI-MS  $m/z$ : 185  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_{10}H_{10}O_2$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.51 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-1), 7.44 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-3', 5'), 6.60 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-2), 2.39 (3H, s, H-4);  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 145.1 (C-1), 124.4 (C-2), 200.3 (C-3), 27.3 (C-4), 126.5 (C-1'), 130.6 (C-2', 6'), 116.3 (C-3', 5'), 159.2 (C-4')。以上氢碳谱数据与文献[21]报道一致 鉴定化合物9 为4-(4-羟基苯基)-3E-丁-烯-2-酮。

化合物10: 橙黄色油状, ESI-MS  $m/z$ : 321  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_{17}H_{14}O_5$ 。 $^1H$ -NMR (500 MHz,

$CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.64 (2H, d,  $J = 15.8$  Hz, H-1', 5'), 7.15 (2H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2', 2''), 7.08 (2H, dd,  $J = 8.2, 2.0$  Hz, H-6', 6''), 6.99 (2H, d,  $J = 15.8$  Hz, H-2, 4), 6.81 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5', 5'');  $^{13}C-NMR$  (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 115.6 (C-2', 2''), 116.6 (C-5', 5''), 123.4 (C-6', 6''), 123.6 (C-2, 4), 128.3 (C-1', 1''), 145.6 (C-1, 5), 146.9 (C-4', 4''), 150.0 (C-3', 3''), 191.6 (C-3)。以上数据与文献[22]报道基本一致, 鉴定化合物 10 为 1,5-二(3,4-二羟基苯基)-1,4-戊二烯-3-酮。

化合物 11: 白色针状, ESI-MS  $m/z$ : 175  $[M + Na]^+$ , 分子式  $C_8H_8O_3$ 。 $^1H-NMR$  (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 2.47 (3H, s, H-8), 6.79 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5), 7.40 (2H, m, Ar-H, H-2, 6);  $^{13}C-NMR$  (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 130.7 (C-1), 116.0 (C-2), 146.4 (C-3), 152.3 (C-4), 123.5 (C-6), 115.8 (C-5), 199.7 (C-7), 26.3 (C-8)。以上数据与文献[23]报道基本一致, 鉴定化合物 11 为 3,4-二羟基苯乙酮。

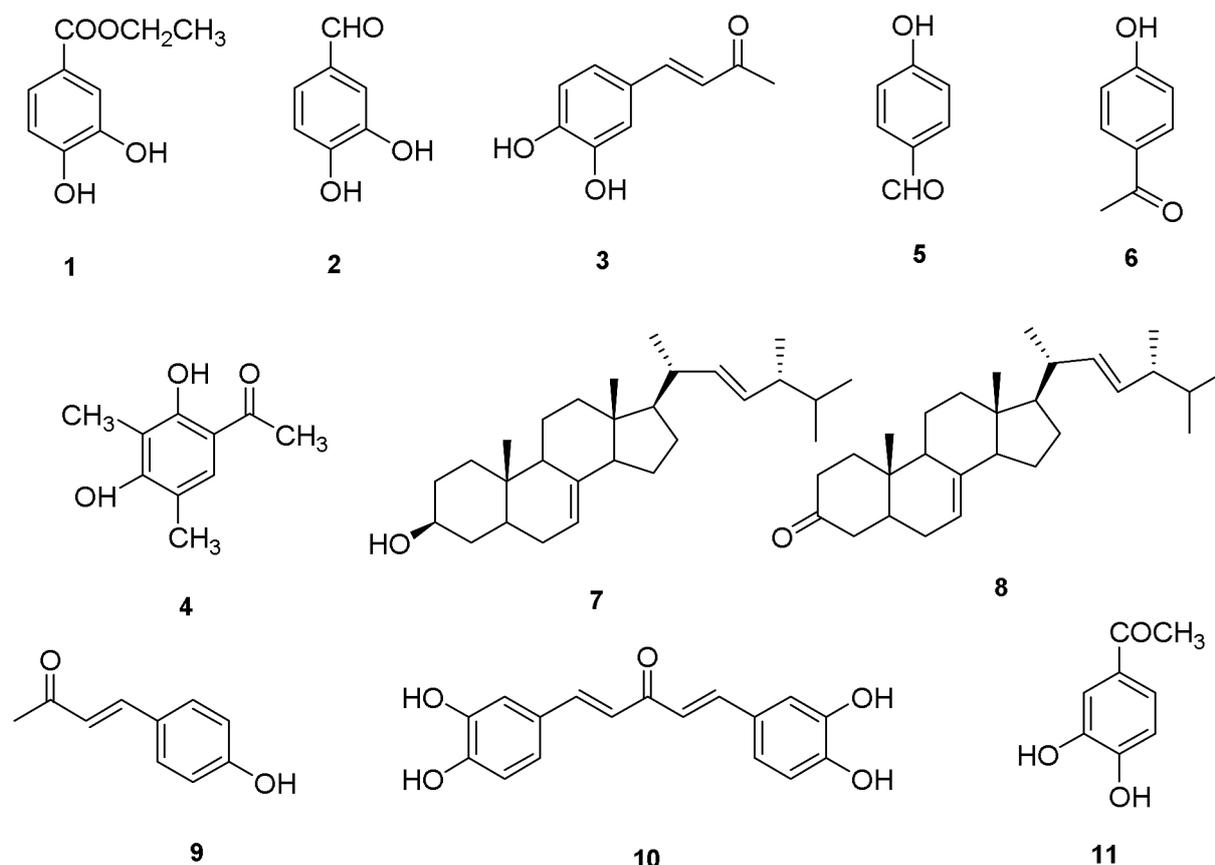


图1 木蹄层孔菌中 11 个化合物的结构

Fig. 1 Structures of 11 compounds from *Fomes fomentarius*

2.2 活性测试结果 为评价木蹄层孔菌资源的药用价值, 笔者对分离得到的 11 个化合物进行生物活性测试, 从表 1 可知, 使用 PNPG 法对化合物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性进行评价, 发现化合物 2, 10, 11 有一定的抑制活性。乙酰胆碱酯酶抑制活性结果表明, 化合物 3, 4, 9~11 有较弱的抑制活性。DPPH 自由基清除活性结果表明, 化合物 1~11 对 DPPH 自由基均有一定的清除活性。此外, 抑菌活性测试发现, 化合物 10 具有抑制枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的活性, 其 MIC 值分别为 128 和 64  $mg \cdot L^{-1}$ 。

表 1 化合物 1~7 的生物活性评价  
Tab.1 Evaluation of bioactivities of compounds

样品编号 Sample code	$\alpha$ -糖苷酶抑制活性 / % $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity	乙酰胆碱酯酶抑制率 / % Acetyl cholinesterase inhibition rate	自由基清除率 / % Scavenging rate of free radical
1	<39	<10	26.87 $\pm$ 3.14
2	62.57 $\pm$ 2.08	—	58.05 $\pm$ 2.88
3	—	19.41 $\pm$ 0.84	51.46 $\pm$ 2.88
4	<39	18.07 $\pm$ 1.70	39.29 $\pm$ 0.90
5	<39	<10	15.84 $\pm$ 3.60
6	<39	<10	43.09 $\pm$ 2.64
7	<39	<10	25.22 $\pm$ 2.07
8	<39	<10	31.56 $\pm$ 2.34
9	—	18.56 $\pm$ 2.30	52.72 $\pm$ 0.65
10	84.63 $\pm$ 1.87	24.64 $\pm$ 0.64	49.56 $\pm$ 2.78
11	75.68 $\pm$ 0.54	11.21 $\pm$ 1.01	71.99 $\pm$ 2.20
阿卡波糖 Acarbose	39.14 $\pm$ 0.90		
他克林 Tacrine		86.30 $\pm$ 0.04	
抗坏血酸 Ascorbic acid			84.92 $\pm$ 0.36

### 3 讨 论

木蹄层孔菌是一种具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫等多种功效的药用真菌<sup>[4-5,24]</sup>,为探讨其药用价值,笔者利用色谱分离手段分离鉴定得到 11 个化合物(2 个甾体和 9 个酚性成分)。化合物 10 为首次从该种中分离得到,属于姜黄素多酚类似物,具有酪氨酸酶抑制活性<sup>[25]</sup>。生物活性测定发现,化合物 2,10,11 有一定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性;化合物 3,4,9~11 有较弱乙酰胆碱酯酶抑制活性;化合物 1~11 对 DPPH 自由基均有一定的清除能力;化合物 10 除了以上 3 种活性外,还具有抑制枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的效果。李旭阳和陆勇芹等发现,木蹄层孔菌子实体的不同部位的提取物具有抑制烟草赤星病原真菌 *Altermaria longipes*、马铃薯病原真菌 *Fusarium solani* 和清除 DPPH 自由基的活性<sup>[6,26]</sup>,但其单体化合物对乙酰胆碱酯酶与  $\alpha$ -糖苷酶的抑制活性及自由基清除能力鲜见报道。本研究结果对木蹄层孔菌资源活性成分的挖掘和进一步开发利用具有一定的参考价值。

### 参考文献:

- [1] 赵继鼎. 中国真菌志 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 124.
- [2] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 等. 中国食用菌名录 [J]. 菌物学报, 2010, 2(1): 1-3.
- [3] 卯晓岚, 蒋长坪, 欧珠次旺. 西藏大型经济真菌 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1993: 464.
- [4] 冯薇, 杨峻山. 木蹄层孔菌化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(20): 1528-1530.
- [5] 冯薇, 杨峻山. 木蹄层孔菌化学成分研究(II) [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(13): 1090-1092.
- [6] 李旭阳. 木蹄层孔菌的化学成分和生物活性的研究与开发 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2013.
- [7] SUKANYA D, THANET P, CHATCHAI W. Alpha-glucosidase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Borassus flabellifer* Linn [J]. Academic Journals, 2017, 11(3): 47-52.
- [8] JONG A N, BHANDARI M R, KAWABATA J.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*) [J]. Food Chem, 2007, 103(4): 1319-1323.
- [9] LI W, CAI C H, GUO Z K, et al. Five new eudesmane-type sesquiterpenoids from Chinese agarwood induced by artificial ho-ling [J]. Fitoterapia, 2015, 100(3): 44-49.
- [10] PERRY N S, HOUGHTON P J, THEOLAD A, et al. In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes [J]. J. Pharm Pharmacol, 2000, 52(7): 895-902.
- [11] BRANDWILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J].

- LWT-Food Science and Technology, 1995, 28 (1): 25-30.
- [12] 林诗云, 王炯, 冯桂权, 等. 6种天然药提取物清除自由基和抗氧化活性研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2010, 19(3): 204-206.
- [13] 李丹. 两株海洋共附生真菌的次级代谢产物及其生物活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [14] 张婷婷, 周劲松, 刘英, 等. 抱茎柴胡地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物, 2008, 6(6): 430-434.
- [15] 李云秋, 董光, 胡静, 等. 南海海绵 *Iotrochota* sp. 化学成分研究[J]. 中药材, 2010, 33(4): 545-546.
- [16] ASTUDILLO L, SCHMEDA-HIRSCHMANN G. Acetophenone derivatives from Chilean isolate of *Trichoderma pseudokoningii* Rifai [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16(6): 585-587.
- [17] 张爱莲, 于敏, 徐宏化, 等. 齿瓣石斛的化学成分及其抗氧化活性[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 844-847.
- [18] 徐文秀, 李兰, 杨光宇, 等. 烟草中酚类化合物的研究[J]. 云南农业大学学报, 2015, 30(6): 965-968.
- [19] 姜北, 赵勤实, 彭丽艳, 等. 雪茶化学成分研究[J]. 云南植物研究, 2002, 24(4): 525-530.
- [20] 刘超, 王洪庆, 李保明, 等. 紫芝的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 235-237.
- [21] 刘传水, 太志刚, 刘阳, 等. 棠梨花化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2373-2375.
- [22] WEBER W M, HUNSAKER L A, Roybal C N, et al. Activation of NF $\kappa$ B is inhibited by curcumin and related enones [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14(7): 2450-2461.
- [23] GRUBER G, KERSCHENSTEINER L, Steglich W. Chromapedic acid, pulvinic acids and acetophenone derivatives from the mushroom *Leccinum chromapes* (Boletales) [J]. Zeitschrift Für Naturforschung B, 2014, 69(4): 432-438.
- [24] LEE J S. EFFECT of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Nutr. Res., 2005, 25(2): 187-195.
- [25] 涂增清, 杜志云, 张焜, 等. 姜黄素多酚类似物对酪氨酸酶抑制活性的研究[J]. 日用化学工业, 2011, 41(1): 27-31.
- [26] 陆勇芹, 周文明, 王琦, 等. 木蹄层孔菌化学成分及不同提取物体外抗肿瘤活性研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(4): 131-134.

## Analysis of Chemical Constituents from the Fruiting Bodies of *Fomes fomentarius*

LI Ran<sup>1,2</sup>, MA Qingyun<sup>2</sup>, KONG Fandong<sup>2</sup>, XIE Qingyi<sup>2</sup>, DING Qiong<sup>1</sup>, ZHAO Youxing<sup>2</sup>

( 1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops/ Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

**Abstract:** Compounds were isolated and purified from the fruiting bodies of *Fomes fomentarius* by silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography and preparative HPLC method to analyze their biological activities. The structures of the compounds were identified through the combined analysis of physicochemical properties and spectral data. The acetylcholinesterase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of compounds were evaluated by Ellman colorimetric method and PNPG method, respectively. Similarly, the anti-oxidative ability of the fruiting bodies of *F. fomentarius* were determined by the DPPH method, and 96-well plate microanalysis were used to determine their antibacterial activity. Eleven compounds were isolated from the ethyl acetate extract obtained from the fruiting bodies of *F. fomentarius* and identified as 3-(4-dihydroxybenzoic acid ethyl ester) (1), 3-(4-dihydroxybenzaldehyde) (2), 4-(3-(4-dihydroxyphenyl)-3E-buten-2-one) (3), 2-(4-dihydroxy-3,5-dimethylacetophenone) (4), p-hydroxybenzaldehyde (5), 4-hydroxyacetophenone (6), ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ -ol (7), ergosta-7,22-diene-3-one (8), 4-(4-hydroxyphenyl) but-3-en-2-one (9), 1,5-Bis-(3-(4-dihydroxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one) (10), 3-(4-dihydroxyacetophenone) (11). The compounds 2, 10 and 11 showed  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, the compounds 3, 4, 9-11 showed acetylcholinesterase inhibitory activity, the compounds 1-11 exhibited anti-oxidative ability, and the compound 10 exhibited antimicrobial activity.

**Keywords:** *Fomes fomentarius*; chemical constituents; biological activities

(责任编辑: 潘学峰)