

大白口蘑子实体化学成分研究

严敏², 汤洪敏^{*}, 胡德禹

(1. 贵州大学精细化工研究开发中心, 贵州贵阳550025; 2. 贵州民族学院化学与环境科学学院, 贵州贵阳550025)

摘要 从担子菌大白口蘑 (*Ticholoma giganteum* Massee) 新鲜子实体提取物中首次分离得到5个化合物, 它们的结构经各种波谱数据分别鉴定为(22E,24R)-麦角甾5,7,22-三烯3-醇; 5,8-桥氧(22E,24R)-麦角6,22-二烯3-醇; (2S,3S,4R,2'R)-2-(2'-羟基二十一碳酰胺基)-三十烷基-1,3,4-三醇; 腺嘌呤核苷和烟酸。

关键词 子实体; 担子菌; 化学成分; 神经酰胺; 麦角甾醇类

中图分类号 S646.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14614-03

Study on the Chemical Constituent of *Ticholoma giganteum* Massee

YAN Min et al. (Center for Research and Development of Fine Chemicals of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract Four known compounds were extracted from the fresh fruiting bodies of *Ticholoma giganteum* Massee. Their structure identified and isolated by means of spectral and chemical methods were (22E,24R)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol; 5,8-epidoxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3-ol; (2S,3S,4R,2'R)-2-(2'-hydroxytetracosyl)-30-alkyl-1,3,4-triol; adenosine and nicotinic acid, respectively. All the compounds were isolated from *T. giganteum* for the first time.

Key words Fruiting bodies; Basidiomycete; Chemical constituent; Ceramide; Ergosteroids

大白口蘑 (*Ticholoma giganteum* Massee) 隶属菌物界、真菌门、担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、口蘑科(白蘑科), 口蘑属, 又名洛巴口蘑、巨大口蘑, 是一种大型丛生的大型食、药用真菌^[1-4], 是世界上新近推出的珍稀栽培菌种。在亚洲, 由于大白口蘑具有许多药用特性, 作为民间药物长期被利用^[5]。笔者研究了大白口蘑化学成分, 以期为进一步研究该真菌的营养、保健和药理作用和开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 大白口蘑新鲜子实体采自云南思茅、红河地区, 由昆明植物所鉴定, 凭证标本现存放于昆明植物所。

1.2 仪器与试剂 熔点用四川大学科仪厂生产的XRC-1型显微熔点仪测定, 未校正; NMR由Bruker DRX-500核磁共振仪测定, TMS为内标; MS由VG Auto Spec-3000质谱仪测定; 柱层析硅胶100~200, 200~300目及TLC硅胶板均为青岛海洋化工厂产品; Sephadex硅胶为Merk进口分装产品。显色方法分别为254, 365 nm的荧光, 10% H₂SO₄乙醇加热显色和I₂蒸气显色。分离提取所用试剂为工业纯重蒸试剂。

1.3 方法

1.3.1 提取与分离。 将上述烘干粉碎后的大白口蘑(干重1.02 kg)分别用丙酮、氯仿/甲醇(1/1)提取3次, 浓缩合并提取液后, 将浓缩物93 g用水溶解, 分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取。乙酸乙酯部分回收溶剂, 得浸膏38 g。然后用柱层析方法在石油醚/乙酸乙酯和氯仿/甲醇的系统下对乙酸乙酯部分进行梯度洗脱、分离。柱层析直接拿到纯化合物1, 用Sephadex LH20柱层析的方法进行纯化, 部分组分使用了RP-18柱层析方法纯化。化合物2来自石油醚/乙酸乙酯(8/2)组分; 化合物3来自石油醚/乙酸乙酯(6/4)组分; 化合物4来自氯仿/甲醇(9/1)组分; 化合物5来自氯仿/甲醇(8/1)组分。

1.3.2 长链碱基乙酰化。 按文献[6-7]方法进行。

基金项目 贵州教育厅自然科学研究项目(2007100)。

作者简介 严敏(1973-), 女, 贵州印江人, 高级实验师, 从事植物化学研究。*通讯作者, E-mail: thm@gznc.edu.cn。

收稿日期 2008-10-21

2 结果与分析

2.1 化合物1 化合物1为无色针晶(石油醚/氯仿); m.p. 154~156; EI-MS (rel. int.) m/z: 396 ([M]⁺, 94), 378 ([M-H₂O]⁺, 8), 363(100), 337(51), 271(34), 253(49), 211(26), 157(28), 119(16), 91(15), 81(19), 69(37), 55(23)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 显示有 5.60(1H, brs), 5.42(1H, brs), 5.24(2H, brs, H_{22,23}), 3.67(1H, brs, H₃), 1.08(3H, brs, Me-24), 0.98(3H, s, H₁₉), 0.96(3H, brs, H₂₁), 0.87(6H, brs, H_{26,27}) 和 0.67(3H, s, H₁₈); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 142.2(s, C₈), 140.7(s, C₅), 136.5(d, C₂₂), 132.9(d, C₂₃), 120.5(d, C₆), 117.2(d, C₇), 71.4(d, C₃), 56.7(d, C₁₇), 55.5(d, C₁₄), 47.2(d, C₉), 43.8(d, C₂₄), 43.8(s, C₁₃), 41.7(t, C₄), 41.3(d, C₂₀), 40.0(t, C₁₂), 39.3(t, C₁), 38.0(s, C₁₀), 34.0(d, C₂₅), 32.9(t, C₂), 29.2(t, C₁₆), 23.9(t, C₁₅), 22.0(t, C₁₁), 22.5(q, C₂₁), 20.8(q, C₂₈), 20.5(q, C₂₇), 18.5(q, C₂₆), 17.2(q, C₁₉) 和 12.9(q, C₁₈)。NMR数据与文献[8]对照一致。故推定化合物1为(22E,24R)-麦角甾5,7,22-三烯3-醇(22E,24R)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol, 简称(ES)。结构如图1所示。

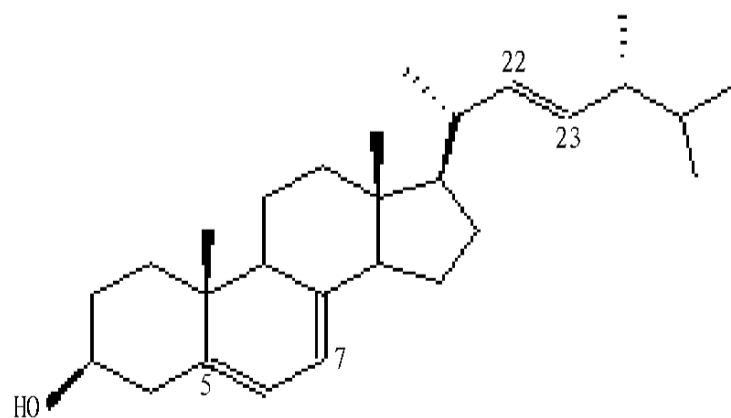


图1 化合物1的化学结构

Fig.1 The chemical structure of compound 1

2.2 化合物2 化合物2为无色针晶(乙酸乙酯); m.p. 177~179.5; EI-MS (rel. int.) m/z: 428 ([M]⁺, 13), 410 ([M-H₂O]⁺, 34), 396 ([M-O₂]⁺, 88), 363(31), 303(18), 251(48), 152(53), 95(37), 81(56), 69(100), 55(66)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 出现两对邻位烯质子在 6.54 (J = 8.5, H₇) 和 6.28 (J = 8.5, H₆), 5.25(1H, dd, 7.5, 15.1, H₂₃) 和 5.18(1H, dd, 7.5,

15.1, H22), 一个连氧碳质子 4.01(1H, m, H3), 6 个甲基 0.94(3H, d, 6.8, H21), 0.92(3H, s, H18), 1.04(3H, s, H19), 0.85(3H, d, 5.0, H27), 0.87(3H, d, 5.0, H26) 和 0.92(3H, d, 5.3, H28); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) 显示有6 个甲基, 7 个亚甲基, 11 个次甲基和4 个季碳, 分别是: 136.3(d, C6), 136.1(d, C22), 133.2(d, C23), 131.7(d, C7), 83.0(s, C5), 80.3(s, C8), 67.4(d, C3), 57.2(d, C17), 52.6(d, C14), 52.1(d, C9), 45.5(s, C13), 43.7(d, C24), 40.6(d, C20), 40.3(t, C12), 37.9(t, C4, s, C10), 35.6(t, C1), 34.0(d, C25), 31.1(t, C2), 29.5(t, C16), 24.3(t, C11), 21.8(q, C21), 21.5(t, C15), 20.8(q, C26), 20.5(q, C27), 19.1(q, C19), 18.5(q, C28), 13.8(q, C18)。NMR 数据与文献[9] 对照一致, 故推定化合物2 为 5, 8-桥氧(22E, 24R)-麦角6, 22-二烯3-醇[5, 8-epidioxy(22E, 24R)-ergosta-6, 22-dien-3-d], 简称(EPO), 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$, 结构如图2 所示。

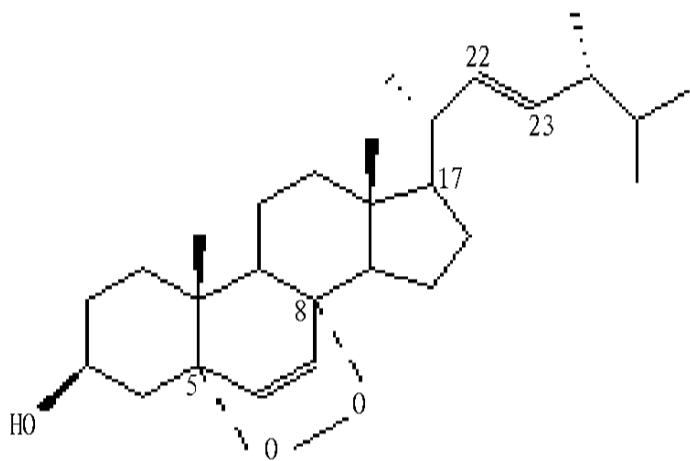


图2 化合物2 的化学结构

Fig.2 The chemical structure of compound 2

2.3 化合物3 化合物3 为白色无定形粉末(氯仿-甲醇); m.p.140~142; IR 谱显示羟基或氨基(3334, 3210/ cm^{-1}), 仲酰胺(1621, 1542/ cm^{-1}) 和长脂肪链(2919, 2850 和 725/ cm^{-1}) 吸收带。 ^1H NMR 谱中, 出现多个亚甲基强宽质子峰信号(1.26-1.31) 和2 个末端甲基质子信号 0.87(t, $J=7.0$ Hz, 6H), 推测分子中有2 个脂肪烷基链。 ^1H NMR 谱于低场区(8.59) 出现1 个质子的宽二重峰信号(1H, bd, $J=8.9$ Hz), 为杂原子上相连的活泼质子, 归属于仲酰胺(-CHNHCO) 上质子。除了低场区1 个与氮原子相连接的次甲基质子多重峰信号 5.12(1H, m, H2) 外, 还有5 个与羟基相连的偕质子特征信号 4.29(m), 4.35(m), 4.42(m), 4.52(m) 和 4.62(m), 显示有酰胺键和4 个羟基存在。 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱给出酰胺羰基碳 176.1(CONH, C1); 4 个连接杂原子的叔碳 77.7(CHOH, C3), 73.9(CHOH, C4), 73.3(CHOH, C2) 和 53.9(CHNH, C2), 以及1 个连接氧原子的仲碳 62.9(CH_2OH , C1)。此外, 在 15.1 处观察到正常的甲基信号, 推测属于直链型的长脂肪烃。以上数据表明该化合物为神经酰胺类化合物^[10]。

为了证实2 条脂肪链的长度, 采用0.9 mol/L 盐酸(82% 甲醇水溶液) 水解切断酰胺键的方法。水解生成脂肪酸甲酯和一长链碱基。前者乙酰化产物 H-MS(rel.int.) m/z 给出分子离子峰 M^+ 398, 推定结构中 $n=11$ 。其 ^1H NMR 谱中出现的信号 0.88(3H, t, 6.5, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$), 1.26(brs, 多个氢), 2.15(3H, s, CH_3COO), 3.75(3H, s, OCH_3), 4.99(1H, t, 6.5, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCOCH}_3)-\text{COOMe}$) 和 ^{13}C NMR 谱中信号 171.3,

170.9(酯 $\text{C}=\text{O}$), 72.7(OCH) 和 52.5(OCHB)], 说明水解生成的脂肪酸甲酯的结构为图3 所示。

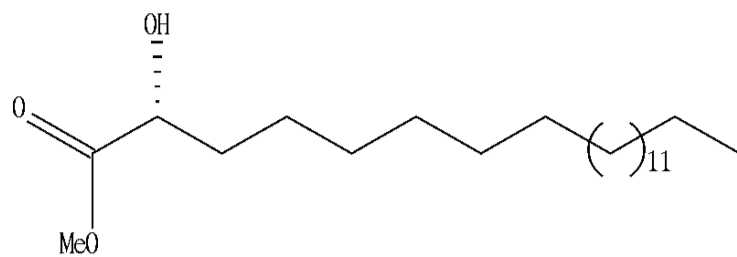


图3 化合物脂肪酸甲酯的化学结构

Fig.3 The chemical structure of the compound fatty acid methyl ester

化合物3 的 FAB MS 显示 m/z 903 [$M^+ H^+ Gy + H$]²⁺, 表明分子量为 809。据此计算, 长链碱基部分 $m=20$ 。由上述数据推定化合物3 的结构为(2S, 3S, 4R, 2'R)-2-(2'-羟基二十一碳酰胺基)-三十烷基 1, 3, 4-三醇, 分子式为 $\text{C}_{51}\text{H}_{103}\text{O}_5\text{N}$, 结构如图4 所示。

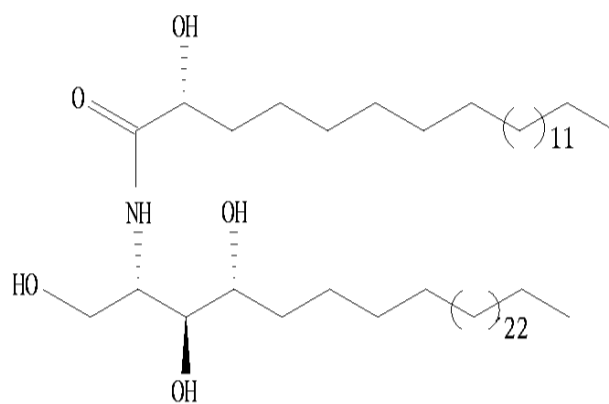


图4 化合物3 的化学结构

Fig.4 The chemical structure of compound 3

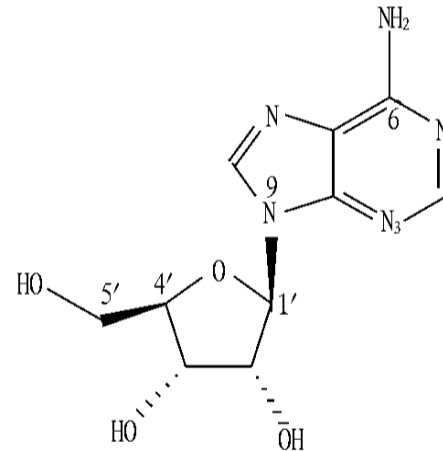


图5 化合物4 的化学结构

Fig.5 The chemical structure of compound 4

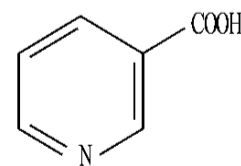


图6 化合物5 的化学结构

Fig.6 The chemical structure of compound 5

2.4 化合物 化合物4 为白色无定型粉末(氯仿-甲醇), 熔点 233~235; [α]_D²⁵ - 57.8(c 0.6, H_2O); Positive FAB MS m/z (%) : 268 [$M^+ H$]⁺, 136 [Mriboseyl + H]⁺, 推定化合物4 的分子量为 267, 分子中含有奇数氮。 ^1H NMR(500 MHz, MeOD) 显示有2 个芳香质子 8.21(1H, s, H2), 8.31(1H, s, H8), 糖的端基氢 5.99(1H, d, 6.4, H1) 及5 个糖上的质子 [4.36(2H, dd, 5.0, 2.8, H4, H3), 4.19(1H, d, 2.8, H2), 3.90(1H, dd, 12.6, 2.4, H5), 3.78(1H, dd, 12.5, 2.8, H5)], ^{13}C NMR(100 MHz, MeOD) 显示出1 个亚甲基, 6 个次甲基。其中1 个亚甲基接氧 63.9(C5), 6 个次甲基中有4 个为接氧碳

91.7(G1)、88.6(G4)、75.9(G3)和73.0(G2)。另外,还有2个次甲基碳为153.9(G2)、142.4(G8),及3个季碳[150.5(s,G4)、120.5(s,G5)和158.0(s,G6)]。以上数据与文献报道的腺嘌呤核苷一致^[11-12],由此鉴定化合物4分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$ 。结构如图5所示。

2.5 化合物5 化合物5为白色针晶(氯仿-甲醇),m.p. 234~237; ¹³C NMR(100MHz, MeOD)给出6个碳信号:170.3(-COOH)、153.3(d,G6)、149.9(d,G2)、137.7(d,G4)、131.8(s,G3)和125.5(d,G5); ¹H NMR(500MHz, MeOD)给出4个芳香质子8.92(1H,s,H2)、8.58(1H,d,5.0,H6)、8.18(1H,dd,7.3,1.5,H4)和7.44(1H,dd,7.7,3.9,H5),以上数据与文献报道的数据基本一致^[13]。进一步与标准品共薄层,R_f值一致,故鉴定化合物5为烟酸,分子式为 $C_6H_5NO_2$,结构如图6所示。

3 小结

该试验对大白口蘑化学成分进行了分离纯化,并鉴定了其中的5个化合物。这些化合物均首次从大白口蘑中分离得到,都具有重要的生理活性,如化合物ES能明显抑制由TPA诱发的小鼠皮肤肿瘤的形成,化合物EPO体外对人体肝癌PLC/PRE/5和KB细胞有强的抑制活性^[14]、对L1210细胞株有极强的抗癌活性^[15],能抑制MCF7人乳腺癌和Walker256肉瘤细胞株的生长^[16],有望成为肿瘤化疗辅助药物^[17]。化合物烟酸是人体和动物中不可缺少的营养成分,具有促进细胞新陈代谢和扩张血管的功能,能促进人体和动物的生长发育^[18]。该试验为进一步开发利用大白口蘑的营养保健和药用价值提供了理论依据。

参考文献

- [1] CHANG S T, MAO X L. *Hong Kong Mushrooms* [M]. Hong Kong: The Chinese University of Hong Kong Press, 1995: 79-80.
- [2] MAU J L, LIN H C, SONG S F. Antioxidant properties of several specially mushrooms [J]. *Food Research International*, 2002, 35: 519-526.

(上接第14613页)

浓度0.6 ml/L的KCl为渗透压稳定剂,在28℃、pH值5.91、1%纤维素酶+0.5%蜗牛酶条件下,对培养9d的菌丝体酶解3h,原生质体产量最大。该法获得的原生质体再生率问题正在研究。

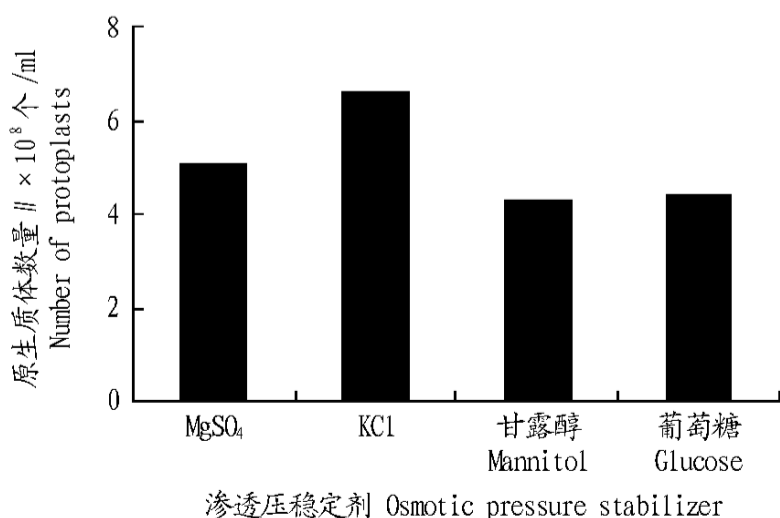


图5 渗透压稳定剂对原生质体制备的影响

Fig. 5 Effects of osmotic pressure stabilizer on the formation of protoplasts

- [3] OOI V E C. Pharmacological studies on certain mushrooms from China [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2001, 3(4): 341-354.
- [4] WANG H X, NG T B. Purification of a novel low molecular mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tichodroma giganteum* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315(2): 450-454.
- [5] LEE D H, KIM J H, PARK J S, et al. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tichodroma giganteum* [J]. *Peptides*, 2004, 25: 621-627.
- [6] MURAKAMI T, SHIMIZU T, TAGUCHI K. Synthesis of spirocyclic-type glucocerebrosides [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56: 533-545.
- [7] 高锦明, 董泽军, 杨雪, 等. 紫丁香蘑的化学成分 [J]. *中草药*, 2002, 33(5): 398-401.
- [8] MISHRA P D, WAHDULLA S, SOUZA L D, et al. Lipid constituents of marine sponge *Suberites carnosus* [J]. *Indian Journal of Chemistry*, 1996, 35: 806-809.
- [9] 高锦明, 董泽军, 刘吉开. 蓝黄红菇的化学成分 [J]. *云南植物研究*, 2000, 22(1): 85-89.
- [10] INAGAKI M, ISOBE R, KAWANO Y, et al. Isolation and structure of three new ceramides from the starfish *Acanaster planci* [J]. *Eur J Org Chem*, 1998, 1: 129-131.
- [11] SICA D, BONFORI L, GIACOMO G D. Sterols of *Candaria tropicidis* grown on *Nalkares* [J]. *Phytochem*, 1982, 21(1): 234-236.
- [12] 陈若芸, 王雅泓, 于德泉. 赤芝孢子化学成分研究 [J]. *植物学报*, 1991, 33(1): 65-68.
- [13] MALLAVADHAN U V, SUDHAKAR A V S, SATYANARAYANA K V S, et al. Chemical and analytical screening of some edible mushrooms [J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(1): 58-64.
- [14] LIN C N, TOME W P. Novel cytotoxic principles of formosan *Canoderma lucidum* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(4): 998-1002.
- [15] MAISUEDA S, KAISUKURA Y. Antitumor-active photochemical oxidation products of provitamin D₂ [J]. *Chem Ind*, 1985, 1: 411-412.
- [16] KAHLOS K, KANGAS L, HILTUNEN R, et al. Ergosterol peroxide, an active compound from *Ironutus radatus* [J]. *Harta Med*, 1989, 55(4): 389-390.
- [17] MIZUSHA Y, WATANABE I, SAKAGUCHI K. An ergosterol peroxide, a natural product that selectively enhances the inhibitory effect of lindelic acid on DNA polymerase [J]. *Bd Pharm Bull*, 1998, 21(5): 444-448.
- [18] 熊晓云, 邹永, 刘毅. 系列烟酸前体药物的合成 [J]. *中国药物化学杂志*, 2002, 12(2): 86-91.
- [19] ZHOU J S, XIONG H Y, YANG C J, et al. Chemical compositions of volatile oil from fruiting body of *A. nillaria luteo-virens* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(2): 90-92.
- [20] 刘云派. 梨菇的化学成分分析 [J]. *中国食用菌*, 2003, 22(4): 45-46.

(2) 试验采用纤维素酶和蜗牛酶的复合酶系统来制备蛹虫草原生质体,代替了食用菌原生质体制备中普遍采用的溶壁酶,使原生质体制备成本大大降低,原生质体的制备率却有所提高。

(3) 试验采用玻璃纸培养的蛹虫草菌丝体不带培养基,纯净,易于取材,酶解过程中释放出的原生质体可以均匀地分散在酶解液中,因而获得的原生质体不仅量多,而且纯净,有利于原生质体的纯化和计数,以及原生质体的再生和融合研究。

参考文献

- [1] 韦会平,肖波,胡开始. 蛹虫草药用价值考 [J]. *中药材*, 2004, 27(3): 215-217.
- [2] 王洪. 虫草研究开发中几个问题的探讨 [J]. *农牧产品开发*, 1999, 6(1): 21-22.
- [3] 柴建萍,白兴荣,谢道燕. 蛹虫草主要有效成分及其药理功效 [J]. *云南农业科技*, 2008(4): 22-23.
- [4] 郭随章. 中药多糖的抗癌研究与临床应用进展 [J]. *医药导报*, 2004, 23(11): 847.
- [5] 杨新美. 食用菌研究法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 200-216.
- [6] 李东屏,张志光,陈作红. 丝状真菌原生质体技术研究 [J]. *湖南师范大学学报版自然科学*, 1997, 20(2): 82-86.