

(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-8), 7.96(2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.86(2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3', 5'), 5.28(1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1''), 3.00~3.39(9H, H-2''~6'', H-2'''~5'''), 3.65(1H, br d, $J=10.0$ Hz, H-6'a), 4.35(1H, d, $J=1.0$ Hz, H-1'''), 0.95(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-6'''); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 157.2 (C-2), 133.9(C-3), 178.0(C-4), 161.5(C-5), 99.3(C-6), 164.6(C-7), 94.5(C-8), 157.6(C-9), 104.6(C-10), 121.6(C-1'), 131.6(C-2'), 115.7(C-3'), 160.3(C-4'), 115.7(C-5'), 131.6(C-6'), 101.9(C-1''), 74.7(C-2''), 76.8(C-3''), 70.4(C-4''), 76.3(C-5''), 67.6(C-6''), 101.4(C-1'''), 70.9(C-2'''), 71.1(C-3'''), 72.3(C-4'''), 68.9(C-5'''), 18.3(C-6''').

槲皮素-3-氧-葡萄糖苷^[6]: 黄色固体, $^1\text{H-NMR}$ 谱数据, 以及与本实验室的对照品两种条件(氯仿-甲醇 4:1, 甲醇-水 4:1)共聚酰胺 TLC, 三氯化铝显色, Rf 值、荧光和显色行为均相同。

芦丁^[6]: 黄色固体, $^1\text{H-NMR}$ 谱数据, 以及与本实验室的对照品两种条件(氯仿-甲醇 3:1, 甲醇-水 3:1)共聚酰胺 TLC, 三氯化铝显色, Rf 值、荧光和显色行为均相同。

References:

[1] Fang Y Y, Zheng C Z. A study on the genus *Indigofera* Linn. from China [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1989, 27(3): 161-177.
 [2] Su Y F, Zhang X X, Yang J, et al. Studies on chemical constituents of *Indigofera carlesii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 34(6): 608-611.
 [3] Su Y F, Li C Z, Gao Y, et al. Acryloylated glucose 3-nitropropanoates from *Indigofera kirilowii* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(12): 1785-1786.
 [4] Majak W, Benn M, McEwan D, et al. Three nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera linnaei* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(7): 2393-2395.
 [5] Markham K R, Ternai B, Stanley R, et al. Carbon-13 NMR studies of flavonoids - III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives [J]. *Tetrahedron*, 1978, 34(9): 1389-1397.
 [6] Su Y F, Liu J S, Guo D A, et al. Flavonoids from aerial parts of *Conyza blinii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(6): 496-497.

桦褐孔菌的抗突变活性成分研究

赵芬琴¹, 朴惠善^{2*}

(1. 河南大学天然产物研究所, 河南 开封 475001; 2. 延边大学长白山天然资源与功能分子省部共建教育部重点实验室, 吉林 延吉 133000)

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Pers. -Fr.) Pilát 或 *Fuscoportia obliqua* 为多孔菌科褐卧孔菌属的药用真菌, 主要分布于北半球 45°~50° 的地区, 在我国主要分布于黑龙江省、吉林省(长白山)等地。在民间广泛应用桦褐孔菌防治胃癌、肝癌、肠癌等各种癌症^[1]。由于所有化学致癌物质的诱变能力是他们致癌性的基础, 抗突变剂是从基因水平上预防疾病, 加强保健, 为人类健康长寿作出贡献, 因此其开发和利用前景十分广泛, 受到各国的普遍重视。为了探索桦褐孔菌的抗突变活性成分, 本实验采用 Ames 试验测试抗突变活性, 以抑制率为活性指标对桦褐孔菌中的抗突变有效部位和活性成分进行了较为系统地分离研究, 从有效部位中分离得到了 5 个化合物, 分别鉴定为: 羊毛甾醇(lanosterol, I)、inotodiol(II)、uvariol(III)、trametenolic acid(IV)、3 β , 22, 25-trihy-

droxy-lanosta-8-ene(V)。其中化合物 I 和 II 具有显著的抗突变活性。

1 仪器与材料

布鲁克核磁共振仪 AV-300($^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz); HP-1100MSD 质谱仪, 美国惠普; X-5 精密显微熔点测定仪, 温度计未校正, 北京桂光仪器公司; Silica gel 60 F₂₅₄ TLC aluminium sheets, Merck Japan Limited; 柱色谱用硅胶 200~300 目, 青岛海洋化工厂; 本实验所用的化学试剂均为分析纯。

桦褐孔菌子实体采自吉林省长白山地区, 由延边大学农学院傅伟杰教授鉴定为担子菌亚门、多孔菌科桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Pers. -Fr.) Pilát。

2 提取与分离

取桦褐孔菌干燥子实体的粗粉 1 280 g, 用 95%

收稿日期: 2006-04-23

作者简介: 赵芬琴(1977-), 女, 河南开封人, 硕士, 河南大学药学院天然药物化学教研室, 主要从事天然药物化学的教学、科研工作。
 Tel: 13937861025 E-mail: zhaofenqin2005@yahoo.com.cn

* 通讯作者 朴惠善 Tel: (0433)2660604 E-mail: phshan50@yahoo.com.cn

乙醇回流提取,提取液合并后减压回收溶剂,得乙醇提取物 57 g。药渣另水煎煮,水提取液浓缩至 1 400 mL,加乙醇至含醇量达 80%,静置过夜,抽滤,得粗多糖 180 g。取粗多糖 65 g,进行反复的醇沉后,沉淀用丙酮洗涤 3 次,得多糖 62 g。将乙醇提取物混悬于水中,依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取,分别减压回收溶剂,得石油醚萃取物 3 g,醋酸乙酯萃取物 30 g,正丁醇萃取物 7 g。

将桦褐孔菌抗突变有效部位石油醚萃取物和醋酸乙酯萃取物分别进行化学成分的分离。取石油醚萃取物 2.9 g 进行硅胶柱色谱分离,用石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱(100:1→10:1),30:1 洗脱部分重结晶得化合物 I (460 mg)。取醋酸乙酯萃取物 10.0 g 进行硅胶柱色谱,用氯仿-甲醇(100:1→10:1)、石油醚-醋酸乙酯(30:1→1:2)反复进行梯度洗脱,石油醚-醋酸乙酯为 8:1 时洗脱得到化合物 II (710 mg),为 2:1 时洗脱分别得化合物 III (30 mg)、IV (220 mg)、V (16 mg)。

3 结构鉴定

化合物 I:白色针晶(MeOH),mp 137.2~137.8 °C。¹H-NMR(CDCl₃):在高场区可见 δ 0.70 (3H,s),0.83 (3H,s),0.89 (3H,s),1.00 (3H,s) 和 1.02 (3H,s) 5 个角甲基的尖峰,这是四环三萜类化合物的典型特征。0.93 (3H,d,*J*=6.2 Hz) 为 20-CH₃ 峰,1.62 (3H,brs) 和 1.70 (3H,brs) 为 26-CH₃ 和 27-CH₃ 两个烯丙位的甲基峰。另外可见 3.25 (1H,dd,*J*=11.3,4.6 Hz,H-3) 和 5.16 (1H,t,*J*=6.9 Hz,H-24)。¹³C-NMR(CDCl₃)δ:78.98 为 C-3 信号,125.25,130.8,134.42 和 134.43 存在四个烯碳信号,其¹³C-NMR 数据与文献报道的羊毛甾醇(lanosterol)对照一致^[2],并且可见 APCI-MS *m/z*: 426[M⁺](5),408[M-H₂O]⁺(100)。故鉴定化合物 I 为羊毛甾醇。

化合物 II:白色针晶(MeOH),mp 182.1~182.9 °C。¹H-NMR(CDCl₃):在高场区可见 δ:0.75 (3H,s),0.82 (3H,s),0.88 (3H,s),0.99 (3H,s) 和 1.01 (3H,s) 5 个角甲基尖峰,这是四环三萜类化合物的典型特征。0.95 (3H,d,*J*=6.6 Hz) 为 20-CH₃ 峰。1.66 (3H,brs) 和 1.76 (3H,brs) 为 26-CH₃ 和 27-CH₃ 两个烯丙位的甲基峰。另外可见 3.24 (1H,dd,*J*=11.3,4.6 Hz,H-3),3.67 (1H,dt,*J*=6.3,3.3 Hz,H-22) 和 5.19 (1H,t,*J*=7.2 Hz,H-24)。¹³C-NMR(CDCl₃)δ:78.94 和 73.38 为 C-3 和 C-22 信号。121.39,134.21,134.62 和 134.97 存在 4 个

烯碳信号,其¹³C-NMR 数据与文献报道的 inotodiol 一致^[3],并且可见 APCI-MS *m/z*: 442[M⁻](2.5), 424[M-H₂O]⁺, 406[M-2H₂O]⁺(7)。故鉴定化合物 II 为 inotodiol。

化合物 III:白色针晶(甲醇-石油醚),mp 193.7~194.5 °C。¹H-NMR[(CD₃)₂CO]:在高场区可见 δ 0.77 (3H,s),0.82 (3H,s),0.92 (3H,s),1.00 (3H,s) 和 1.05 (3H,s) 5 个角甲基尖峰,这是四环三萜类化合物的典型特征。1.61 (3H,brs) 和 1.66 (3H,brs) 为 26-CH₃ 和 27-CH₃ 两个烯丙位的甲基峰。3.56 (1H,m) 和 3.72 (1H,m) 是 C₂₁ 位连接-OH 的碳上两个磁不等价质子信号。另外可见 3.24 (1H,dd,*J*=11.3,4.6 Hz,H-3) 和 5.14 (1H,m,H-24)。¹³C-NMR(DMSO-d₆)δ:61.6 和 77.24 分别为 C-21 和 C-3 信号。125.74,130.49,134.03 和 134.83 存在 4 个烯碳信号。其¹³C-NMR 数据与文献报道的 uvariol 一致^[4],并且可见 APCI-MS *m/z*: 442[M⁺](9)。故鉴定化合物 III 为 uvariol。

化合物 IV:白色针晶(甲醇-石油醚),mp 244.8~246.7 °C。¹H-NMR(DMSO-d₆):在高场区可见 δ 0.68 (3H,s),0.69 (3H,s),0.82 (3H,s),0.89 (3H,s),0.90 (3H,s) 5 个角甲基尖峰,这是四环三萜类化合物的典型特征。1.52 (3H,brs) 和 1.63 (3H,brs) 为 26-CH₃ 和 27-CH₃ 两个烯丙位的甲基峰。另外可见 2.97 (1H,m,H-3),5.07 (1H,t,*J*=7.1 Hz,H-24) 和 12.02 (1H,s,-COOH)。¹³C-NMR(DMSO-d₆)δ:77.24 为 C-3 信号,124.30,131.58,133.85 和 134.77 处存在 4 个烯碳信号,此外可见 177.46 的羧基碳信号。其¹³C-NMR 数据与文献报道的 trametenolic acid 一致^[3],并且可见 APCI-MS *m/z* (%): 456[M⁺](2.5)。故鉴定化合物 IV 为 trametenolic acid。

化合物 V:白色粉末(甲醇-石油醚)。¹H-NMR(DMSO-d₆):在高场区可见 δ 0.63 (3H,s),0.70 (3H,s),0.75 (3H,s),0.90 (3H,s) 和 0.92 (3H,s) 5 个角甲基尖峰,这是四环三萜类化合物的典型特征。1.07 (3H,s) 和 1.27 (3H,s) 为 26-CH₃ 和 27-CH₃ 两个烯丙位的甲基峰,另外可见 3.00 (1H,t,*J*=6.7 Hz,H-3) 和 3.33 (1H,m,H-22)。¹³C-NMR(DMSO-d₆)δ:77.22 为 C-3 信号,71.67 和 74.03 分别为 C-25 和 C-22 信号。另外,134.17 和 134.72 存在两个烯碳信号。其¹³C-NMR 数据与文献报道的 3β,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene 一致^[5]。故鉴定化合物 V 为 3β,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene。

4 抗突变试验

4.1 试验材料及方法:抗突变试验采用 Ames B. N. 1975 年建立的鼠伤寒沙门氏菌突变试验(又名 Ames 试验),采用平板掺入法^[6]。鼠伤寒沙门氏菌组氨酸依赖型菌株 TA100 和 TA98 由吉林省疾病预防控制中心提供,经延边大学医学院中药毒理研究室鉴定菌株特性符合实验要求。苯并(a)芘[B(a)P]为 Sigma 产品,叠氮钠(NaN_3)为浙江城关化工厂生产。大鼠肝 S9 由延边大学医学院中药毒理研究室制备。

试验中设试验、空白对照组和试验对照组,各受试样品和致突变剂均用二甲基亚砷(DMSO)溶解。空白对照组用 DMSO,试验对照组用致突变剂,实验组为受试样品加致突变剂。萃取物和多糖实验组分别设 3 个剂量组,试验对照组用直接致突变剂 NaN_3 。单体化合物分别设 2 个剂量组,试验对照组用间接致突变剂 B(a)P 和大鼠肝 S9。每个剂量组均设 3 个平行平皿,重复实验 2 次。结果以回变菌落数表示,按下式计算抑制率,判断抗突变效果^[7]。

$$\text{抑制率(PI)} = \frac{G-H}{G-N} \times 100\%$$

G-试验对照组回变菌落数 H-试验组回变菌落数 N-空白对照组回变菌落数

4.2 试验结果

4.2.1 各萃取物和多糖的 Ames 试验结果:石油醚萃取物和醋酸乙酯萃取物在 0.5 mg/皿时对 NaN_3 诱发的 TA100 菌株回变的抑制率分别为 82.26% 和 59.43% ($P < 0.01$),均表现出强的抗突变活性,并且都显示了剂量-效应关系。但正丁醇萃取物和多糖的 3 个剂量组的抑制率都很小,在本次实验剂量范围内无抗突变活性。所以石油醚萃取物和醋酸乙酯萃取物为抗突变有效部位。

4.2.2 单体化合物的 Ames 试验结果:化合物 I 在 2 mg/皿时对 B(a)P 诱发的 TA98 菌株回变的抑制率为 36.56%,提示有弱的抗突变活性,但是经过统计学处理,与试验对照组之间的差异没有统计学意义 ($P > 0.05$),因此,用 TA100 菌株进一步检测其抗突变活性。实验结果表明,化合物 I 在 0.5 mg/皿时对 NaN_3 诱发的 TA100 菌株回变的抑制率为 54.25% ($P < 0.05$),表现出明显的抗突变活性,并且存在剂量-效应关系。

化合物 II 在 1、2 mg/皿时对 B(a)P 所诱发的 TA98 菌株回变抑制率分别为 55.91%、72.18% ($P < 0.05$ 、0.01),表明化合物 II 有很强的抗突变活性。化合物 IV 的抑制率为 0,没有抗突变活性。

5 讨论

Ames 试验是国际上公认并被广泛应用的致突变初步筛选实验,具有灵敏可靠又快速易行的特点,因而广泛用于化学物质致基因突变的分析。试验结果显示,石油醚萃取物和醋酸乙酯萃取物均很强烈地抑制 NaN_3 诱发的 TA100 菌株回变,而正丁醇萃取物和多糖却没有抑制作用,所以石油醚萃取物和醋酸乙酯萃取物为抗突变有效部位。

由于桦褐孔菌中化学成分复杂,各种成分在其药理作用中究竟扮演什么角色并未明确,因此本实验进一步分离了抗突变有效部位中的化学成分,并将量较高的化合物进行抗突变试验。结果显示,石油醚萃取物中羊毛甾醇(I)量最高,占其萃取物的 15.81%;醋酸乙酯萃取物中 inotodiol(II)和 trametenolic acid(IV)量最高,分别占其萃取物的 7.10% 和 2.20%。在单体化合物的 Ames 试验中, inotodiol(II)表现出很强的抗突变活性;羊毛甾醇(I)在 TA98 菌株的 Ames 试验中只表现出很弱的抗突变活性,而在 TA100 菌株的 Ames 试验中,在 0.5 mg/皿时就有较强的抗突变活性,说明羊毛甾醇(I)对间接致突变剂的抑制作用较弱,而对直接致突变剂有很强的抗突变活性;trametenolic acid(IV)则无抗突变活性。综上所述,羊毛甾醇(I)和 inotodiol(II)在桦褐孔菌中的量高、且活性强,所以为桦褐孔菌的主要抗突变活性成分。

据文献报道,在 Walker 256 癌肉瘤细胞、人 MCF-7 乳腺癌细胞的体外实验和白血病 P388 细胞的体内实验中, inotodiol 均具有很强的抑制肿瘤生长活性^[8],羊毛甾醇显示了弱的肿瘤细胞抑制活性,而 trametenolic acid 则无抑制肿瘤细胞活性。在本实验中, inotodiol、羊毛甾醇和 trametenolic acid 对 B(a)P 诱发的 TA98 菌株回变分别具有很强、弱和无抑制作用。它们的抗肿瘤活性与抗突变活性之间的相对性提示,桦褐孔菌的抗突变活性可能在其抗肿瘤作用的发挥中起到了重要作用。

桦褐孔菌多糖可以抑制小鼠肉瘤的生长^[9]。而在 Ames 试验中桦褐孔菌多糖无抗突变活性,这表明桦褐孔菌多糖的抗肿瘤作用的发挥与抗突变无关,可能是通过增强机体免疫力和诱导细胞凋亡等发挥抗肿瘤作用的。

在化学实验的基础上证实了桦褐孔菌的主要抗突变物质基础为羊毛甾醇(I)和 inotodiol(II)。本实验的研究结果将为今后对桦褐孔菌的研究与开发,提供初步的理论和实验依据。另外,羊毛甾醇

(I) 和 inotodiol (II) 的抗突变机制是由于其在细胞外灭活了诱变剂的诱变活性, 或细胞内阻断诱变剂对靶分子的作用, 或增强 DNA 损伤后的修复功能, 尚待进一步证实。

References:

- [1] Huang N L. Mystical folk medical fungi in Russia—*Inonotus obliquus* [J]. *Edible Fungi China* (中国食用菌), 2002, 21(4): 7-8.
- [2] Lukacs G, Khuong H F. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances lanosterol and dihydrolanosterol [J]. *Tetrahedron Lett*, 1972, (33): 3515-3518.
- [3] Kahlos K, Hiltunen R. 3 β -hydroxy-lanosta-8, 24-dien-21-al, a new triterpene from *Inonotus obliquus* [J]. *Planta Med*, 1984, 50(2): 197-198.

- [4] He J, Feng X Z. Studies on chemical constituents of *Fuscoporia obliqua* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 4-6.
- [5] Shin Y. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* (Pers. Fr.) Pil (Aphyllphoromycetideae) III: A new triterpene, 3 β , 22, 25-trihydroxy-lanosta-8-ene from sclerotia [J]. *Int J Med Mushr*, 2001, 2(3): 201-207.
- [6] Maron D M, Ames B N. Revised methods for the salmonella mutagenicity test [J]. *Mutat Res*, 1983, 113: 173.
- [7] Wu S Y, Cui H B. *Progress of Sanitarian Foods in China* (中国保健食品的进展) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [8] Kahlos K. Antitumor activity of some compounds and fractions from an *n*-hexane extract of *Inonotus obliquus* [J]. *Acta Pharm Fenn*, 1987, 96(1): 33-40.
- [9] Saburo V, Chikao Y. Antitumor polysaccharides produced by *Fuscoporia* [P]. JP: 78 94, 023(C1. A62K35/84), 1978-08-17.

连钱草中三萜类化学成分

张前军^{1,2}, 杨小生^{1*}, 朱海燕¹, 姚云¹, 郝小江¹, 宋宝安

(1. 贵州省、中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州大学精细化工中心, 贵州 贵阳 550025)

连钱草为唇形科植物活血丹 *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. 的干燥地上部分, 具有利湿通淋、清热解毒、散瘀消肿的功效, 临床上用于治疗热淋、石淋、湿热黄疸等疾病^[1], 我国除甘肃、青海、新疆及西藏外, 各地均有分布。据文献报道连钱草含有欧亚活血丹呋喃、熊果酸、 β -谷甾醇、棕榈酸、琥珀酸、胆碱及水苏糖等^[2]。在贵州, 连钱草为苗族习用药材, 为了建立该药材及其组方药品的质量标准奠定成分研究基础, 得到 7 个三萜类化合物, 他们分别为白桦脂醇(I)、白桦脂酸(II)、2 α , 3 α , 24-二烯三羟基乌苏-12-烯-28-酸(III)、熊果醇(IV)、20-羟基达玛-24-烯酮(V)、3 β -羟基-20, 24-二烯-达玛烷(VI)和豆甾-4-烯-3, 6-二酮(VII), 所有化合物均为首次从该属植物中分得。

1 仪器与材料

核磁共振波谱仪: INOVO 400 MHz(美国 Varian 公司), 以 TMS 为内标; XT-4 型显微熔点测定仪(温度计未校正, 北京泰克仪器有限公司); 质谱仪: HP MS5973(美国 HP 公司); 傅里叶变换红外光谱仪; Brucker Vector 22(德国 Brucker 公司); 薄层色谱硅胶, 柱色谱硅胶(200~300 目)均为中国青岛海洋化工集团公司产品。植物样品采自贵州省贵阳

地区, 由贵阳中医学院陈德媛教授鉴定。

2 提取与分离

取连钱草干品 10 kg, 切碎, 75%乙醇提取 3 次, 回收溶剂, 得粗提物浸膏 3.7 kg。浸膏用水分散, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得石油醚部分 60 g, 醋酸乙酯部分 260 g。醋酸乙酯部分经硅胶柱色谱分离, 以氯仿-丙酮依次用(50:1~1:1)梯度洗脱, TLC 跟踪, 分离得化合物 I~III、VI。正丁醇部分经硅胶柱反复柱色谱分离得化合物 IV~VI。

3 结构鉴定

化合物 I: 白色粉末。mp 239~240 °C。化合物 I 的 IR、EI-MS、¹H-NMR 光谱均与文献报道白桦脂醇基本一致^[3~5], 确定为白桦脂醇。

化合物 II: 白色粉末。mp 284~286 °C。化合物 II 的 IR、EI-MS、¹H-NMR 光谱均与文献报道白桦脂酸基本一致^[3~5], 确定为白桦脂酸。

化合物 III: 白色针晶(醋酸乙酯)。mp 289~290 °C。EI-MS (*m/z*): 488 [M⁺], 471, 455, 443, 424, 409, 393, 375, 248, 239, 222, 203, 189, 133, 119。¹H-NMR(CD₃OD) δ : 5.22(1H, t, H-12), 3.89(1H, m, H-2), 3.73(1H, s, br, H-3), 3.63, 3.36(2H, -CH₂OH), 2.18(1H, d, H-18), 0.77, 0.87, 0.94,

收稿日期: 2006-03-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30460150); 科技部重大基础研究前期研究专项(2004CCA03800)

作者简介: 张前军(1965—), 黑龙江省同江市人, 贵州省、中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州大学在读博士。

* 通讯作者 杨小生 Tel: (0851)3805459 E-mail: yang_xiaosheng@yahoo.com