

桦褐孔菌抗病毒活性成分的分离及结构鉴定

黄纪国^{1,2}, 吕静², 余雄涛^{1,2,3}, 韩园园¹, 谢意珍^{1,2}, 潘鸿辉^{1,2}

(1. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东广州 510070) (2. 广东粤微食用菌技术有限公司, 广东广州 510663) (3. 呼吸疾病国家重点实验室, 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东广州 510663)

摘要: 本文研究了桦褐孔菌乙酸乙酯提取物的化学成分、结构鉴定及其抗病毒活性。桦褐孔菌为一种食药型真菌, 对人体毒性小, 并且含有丰富的、结构复杂多样的和广泛的生物活性的次生代谢产物。桦褐孔菌子实体经干燥、粉碎, 依次采用乙酸乙酯、甲醇、水进行常温浸提; 采用各种分离手段, 从桦褐孔菌乙酸乙酯提取物中分离出 10 个化合物单体; 通过现代各种波谱分析方法及结合文献, 最终确定: 白桦醇(1)、桦褐孔菌醇(2)、3-羟基羊毛甾-8,24-二烯-21-醛(3)、3 β -羟基甘遂酸(4)、过氧麦角甾醇(5)、3 β -羟基-5,8-环氧麦角甾醇-6,9,22-三烯(6)、邻苯二甲酸二正丁酯(7)、5-脱氢麦角甾醇(8)、二十五烷酸(9)、二十四烷酸(10), 其中化合物 6 和化合物 7 首次从桦褐孔菌中分离得到。对化合物 1-8 分别进行了细胞毒性和抗 HSV-1 病毒活性研究, 其中化合物 3 的抗 HSV-1 病毒活性最强, 其 IC₅₀ 值为 98 μ M; 化合物 7 的细胞毒性最强, 其 CC₅₀ 为 24 μ M, 为后期桦褐孔菌开发成抗疱疹病毒药物提供科学依据。

关键词: 桦褐孔菌; 化学成分; 结构鉴定; 抗疱疹病毒

文章编号: 1673-9078(2015)4-175-180

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.028

Isolation and Identification of the Antiviral Active Ingredients of *Inonotus obliquus*

HUANG Ji-guo^{1,2}, LV Jing², YU Xiong-tao^{1,2,3}, HAN Yuan-yuan¹, XIE Yi-zhen^{1,2}, PAN Hong-hui^{1,2}

(1. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry Province Joint Development) Guangzhou 510070, China) (2. Guangdong Yuwei Edible Fungi Technology Co. Ltd, Guangzhou 510663, China) (3. State Key Laboratory of Respiratory Diseases, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, South China United Vaccine Institute, Guangzhou 510663, China)

Abstract: The chemical composition, structure, and antiviral activity of ethyl acetate extracts of *Inonotus obliquus* was identified and analyzed. *Inonotus obliquus* is an edible and medical fungus with diverse and complex structures and a wide range of biological activities; in addition, this fungus has a low toxicity to humans and is rich in secondary metabolites. *Inonotus obliquus* fruit bodies were dried, ground, and sequentially extracted at room temperature using ethyl acetate, methanol, and water. Ten compounds were isolated from the ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus* using various chromatographic techniques. Various modern spectroscopic methods of analysis and the data available in literature were used to identify the following compounds: betulin (1), inotodiol (2), 3-hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al (3), 3 β -hydroxytunicic acid (4), ergosterol-5,8-peroxide (5), 3 β -hydroxy-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,9,22-triene (6), di(*n*-butyl) phthalate (7), 5-dehydroergosterol (8), pentacosanoic acid (9), and lignoceric acid (10). Among these, compounds 6 and 7 were isolated from *Inonotus obliquus* for the first time. Furthermore, the cytotoxicity and anti-HSV-1 activity of the isolated compounds 1-8 were also investigated. Compound 3 showed the strongest anti-HSV-1 activity, with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 98 μ M; on the other hand, compound 7 exhibited the strongest cytotoxicity, with a 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of 24 μ M. This study provides a scientific basis for the future development of anti-HSV drugs from *Inonotus obliquus*.

Key words: *Inonotus obliquus*; chemical constituents; structure identification; anti-herpes simplex virus

收稿日期: 2014-07-18

基金项目: 广东省产学研省部合作专项基金项目(2012B090600050); 广东省工程技术研究开发中心建设项目(2010B080100068)

作者简介: 黄纪国(1986-), 男, 硕士, 研究助理, 从事食药真菌研究及开发工作

通讯作者: 潘鸿辉(1979-), 女, 博士, 副研究员, 从事食药真菌研究及开发工作

单纯疱疹病毒 (*Herpes simplex virus*, HSV) 属于疱疹病毒科 (*Herpetoviridae*) 中 α 病毒亚科, 为 DNA 病毒, 病毒质粒大小约 180 纳米。HSV 病毒的核衣壳为 20 面体结构, 内有线性双链 DNA 结构。核衣壳外有包膜, 病毒的糖蛋白突起于包膜的表面。包膜与核衣壳之间的无定形物质为病毒的结构蛋白与调节蛋白。单纯疱疹病毒 HSV 分为两种, 即 HSV-1 和 HSV-2。其中 HSV-1 主要是通过呼吸道、皮肤和黏膜密切接触传播, 感染腰以上部位皮肤黏膜和器官, 引起龈口炎、唇疱疹、角膜结膜炎、脑炎及甲沟炎等^[1]。

据研究表明, HSV 在侵入机体后, 一般先引起局部感染, 然后增殖、潜伏, 待机体免疫功能降低时复发^[2]。病毒囊膜上含有的大部分或全部的病毒糖蛋白组成病毒颗粒表面的棘突, 在病毒吸附和侵入宿主细胞中起重要作用。病毒吸附宿主细胞后, 很快注入 DNA 到细胞内, 并以之为模板合成早期蛋白, 特别是病毒 DNA 聚合酶, 抑制宿主细胞 RNA 转录酶。在 DNA 聚合酶作用下, 以 DNA 为模板合成晚期蛋白, 装配成完整的子代病毒。因此药物可通过改变病毒囊膜蛋白的结构或者改变宿主细胞膜表面的受体, 阻止病毒的复制。药物只要能抑制其中某一步骤, 就能产生抗病毒作用^[3]。

据调查, 人是其唯一的自然宿主, 最常见的感染部位是口腔和唇, 感染后可以造成皮肤、口腔和生殖器等部位的原发/复发性疱疹、出现皮肤溃疡、丘疹、炎症等现象。美国每年有生殖器疱疹 5 万多例, 70 多万孕妇为预防胎儿经产道感染 HSV 而被迫施行剖宫产分娩。近年来, HSV 感染发病率急剧增高, 已成为最流行的性传播疾病之一, 严重威胁人类公共卫生健康^[4]。因此, 对于抗疱疹病毒药物的研发迫在眉睫。

桦褐孔菌 (*Inonotus obliquus*) 隶属于真菌门、担子菌亚门、层菌纲的食药两用型的真菌, 主要分布于寒冷地区, 例如中国的黑龙江和吉林地区^[5]。在民间存在广泛的应用基础, 用于防治各种癌症, 心脏病, 糖尿病, 并能抑制病毒等。通过查阅文献, 目前从中分离出许多活性成分, 主要是多种三萜类和甾醇类化合物^[6]。为进一步寻找出治疗诊断疱疹病毒的活性成分, 本实验组通过前期试验发现, 桦褐孔菌水提物通过作用于病毒蛋白, 阻止细胞膜融合从而有效的阻止 HSV-1 进入细胞, 对其具有非常好的抗病毒活性^[7-8], 为全面了解桦褐孔菌的活性成分, 本文对其乙酸乙酯部分进行分离, 从中分离出 10 个化合物, 并运用波谱等方法确定其结构, 发现其中化合物 6 和 7 首次从桦褐孔菌中分离得到, 并对化合物 1~8 进行细胞毒性和抗 HSV-1 病毒活性研究, 为后期研究提供依据。

1 材料与设备

X-4 型显微熔点仪测定, 上海精密科学仪器有限公司; 安捷伦 1200 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; 岛津 LC-20A 色谱仪, 日本岛津科技有限公司; DRX-500M 核磁共振仪, 瑞士布鲁克公司; BRUKER HCT 电喷雾电离质谱, 美国布鲁克道尔顿公司; 傅立叶变换红外分析仪, 美国 Nicolet 公司; RE-3000 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; BS210S BL610 电子天平, 德国赛多利斯公司; SK8200H 超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; DLSB-5/20 型低温冷却液循环泵, SHB-S 循环水式多用真空泵; 高效硅胶薄层板、柱层析硅胶, 青岛海洋化工分厂; 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20, 上海安玛西亚生物技术有限公司; 乙醇、甲醇、石油醚 (PE)、正丁醇、乙酸乙酯 (EA)、三氯甲烷均为分析纯, 广州化学试剂二厂; 氘代氯仿, 北京伊诺凯科技有限公司。

桦褐孔菌购自广东粤微食用菌技术有限公司, 并经广东省微生物研究所食用菌研究发展中心鉴定。其化合物单体抗疱疹病毒活性及细胞毒性实验由中国科学院广州生物医药与健康研究院呼吸疾病国家重点实验室提供

2 分离流程

取干燥, 粉碎的桦褐孔菌子实体 5 kg, 采用常温浸提的方法, 每次 20 L 溶剂浸泡 5 h, 每种溶剂浸提 3 次, 溶剂依次为乙酸乙酯, 甲醇, 水。收集浸提液并采用真空浓缩, 得到乙酸乙酯, 甲醇, 水提取物。取其中乙酸乙酯提取物 111.71 g, 正相硅胶柱层析, 采用氯仿与甲醇为洗脱剂, 梯度洗脱, TLC 分析, 合并出 9 个组分 (Fr 1~9)。组分 Fr 2 采用正相硅胶柱色谱层析, 采用 EA:PE 梯度洗脱 (0~100%), TLC 分析, 合并出 5 个组分 (Fr 2-1~2-5), 同时得到化合物 1 (6 mg) 和 2 (7.5 mg); 进一步对 Fr 2-1 进行分离, 采用葡聚糖凝胶柱色谱分离, 采用甲醇洗脱, 得到三个组分 (Fr 2-1-1~2-1-3), 同时得到单体 5 (12 mg); 对组分 Fr 2-1-2 正相硅胶柱色谱层析, 洗脱剂为 EA:PE (0~100%), 得到单体 7 (4 mg); 组分 Fr 2-2-1 过葡聚糖凝胶柱, 采用甲醇洗脱, 从 Fr 2-2-1 中得到单体 4 (6 mg); 组分 Fr 3 采用正相硅胶柱色谱层析, 用 PE:EA 梯度洗脱 (0~100%), TLC 分析, 分离, 合并得到 5 个组分 (Fr 3-1~3-5), 并得到一个化合物单体 3 (5 mg); 组分 Fr 4 采用正相硅胶柱色谱层析, 采用氯仿:丙酮梯度洗脱 (0~100%), TLC 分析, 合并得到 10 个组分 Fr (4-1~4-10), 并得到了 9 (7 mg) 和 10 (5 mg); 组分 Fr 5

过 HPLC, 采用甲醇为流动相, 流速为 1 min/mL, 目前已经分离出 2 个单体, 分别为 6 (7 mg) 和 8 (6 mg)。化合物结构式如下:

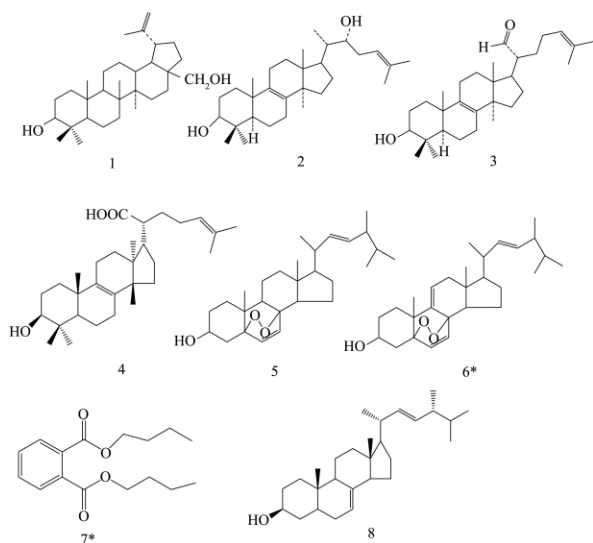


图 1 化合物 1~8 的结构式

Fig.1 Structures of compounds 1-8

注: 图中右上标*表示该化合物首次从桦褐孔菌中首次分离得到。

3 细胞毒性测定

参考文献^[8]中培养非洲绿猴肾细胞(Vero)的方法, Vero 细胞经胰酶消化后, 制成浓度为 1.5×10^4 cells/mL 的细胞悬浮液, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中 24 h。待其长成单层, 弃去培养液。用培养液将不同化合物单体制成系列不同浓度的药液, 加入到培养板中, 每孔 100 μ L, 每个浓度设 3 个复孔, 同时设正常细胞对照组、阳性对照组, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中 72 h; 吸弃样品培养液, 每孔加入 100 μ L 的含有 2% 胎牛血清和 10% Alamar Blue 检测试剂, 培养 1.5~2 h, 随后用荧光仪进行检测 (激发波长 530 nm; 发射波长 590 nm)。根据公式计算每个浓度样品的抑制率:

抑制率 = (阴性对照孔荧光测量值 - 样品孔荧光测量值) / 阴性对照孔荧光测量值 \times 100%

4 抗 HSV-1 病毒活性实验

参考文献^[8]中培养非洲绿猴肾细胞(Vero)的方法, Vero 细胞经胰酶消化后, 制成浓度为 1.5×10^4 cells/mL 的细胞悬浮液, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中 24 h。待其长成单层, 弃去培养液。用培养液将不同化合物单体制成系列不同浓度的药液, 加入到培养板中, 每孔 100 μ L, 每个浓度设 3 个复孔, 同时设正常细胞对照组、阳性对照组, 置

37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中 24 h。吸弃样品与病毒的混合液, 每孔加入 100 μ L 1% NP40 细胞裂解液, 放置 5~10 min, 中途十字振荡三次, 每孔吸取 50 μ L 裂解物加到 96 孔酶标板 (或 96 孔细胞培养板) 上, 随后加入 50 μ L 的 β -Gal 活性检测底物缓冲液, 轻轻振荡混匀。随后超级酶标仪上进行 570 nm 动态光吸收的测定。测定条件为 37 $^{\circ}$ C, 测 570 nm 光吸收值, 每 2 min 读数一次, 连续 25 次读数, 中途振荡。结果单位为 milli-optical density units per/min (mOD/min)。根据公式计算每个浓度样品对病毒抑制率:

抑制率 = (阴性对照孔测量值 - 样品孔测量值) / 阴性对照孔测量值 \times 100%

5 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, mp. 255 $^{\circ}$ C, 5% 硫酸-乙醇溶液加热显桔红色, 显示该化合物为甾体类化合物。

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 0.76 (3H, s, H-24), 0.83 (3H, s, H-25), 0.97 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, s, H-26), 1.03 (3H, s, H-27), 4.68 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-29), 4.58 (1H, d, J = 1.5, H-29), 3.80 (2H, dd, J = 1.47 1.51 Hz, H-28), 3.34 (1H, d, 10.8, H-3); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 38.97 (t, C-1), 27.57 (t, C-2), 79.08 (d, C-3), 38.94 (s, C-4), 55.57 (d, C-5), 18.44 (t, C-6), 34.49 (t, C-7), 41.16 (s, C-8), 50.67 (d, C-9), 37.57 (s, C-10), 21.02 (t, C-11), 25.51 (t, C-12), 37.36 (d, C-13), 42.90 (s, C-14), 27.28 (t, C-15), 29.44 (t, C-16), 47.93 (s, C-17), 47.93 (d, C-18), 49.07 (d, C-19), 150.48 (s, C-20), 30.05 (t, C-21), 34.08 (t, C-22), 28.07 (q, C-23), 15.35 (q, C-24), 16.11 (q, C-25), 16.11 (q, C-26), 14.86 (q, C-27), 60.76 (t, C-28), 109.60 (t, C-29), 19.18 (q, C-30)。通过核对文献, 发现其与已经报道过的白桦醇数据一致^[9], 最终确定化合物 1 为白桦醇。

化合物 2: 白色针状晶体, mp. 191 $^{\circ}$ C, ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 0.72 (3H, s), 0.81 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.98 (3H, s), 1.00 (3H, s) 五个甲基尖峰, 属于典型的四环三萜类化合物的结构特征; 5.18 (1H, t, J = 7.16 Hz, H-24); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 35.61 (t, C-1), 27.86 (t, C-2), 78.99 (d, C-3), 38.90 (s, C-4), 50.43 (d, C-5), 19.13 (t, C-6), 29.17 (t, C-7), 134.62 (s, C-8), 134.23 (s, C-9), 37.06 (s, C-10), 21.01 (t, C-11), 26.53 (t, C-12), 44.89 (s, C-13), 49.43 (s, C-14), 30.99 (t, C-15), 30.96 (t, C-16), 47.30 (d, C-17), 15.69 (q, C-18), 18.26 (q, C-19), 41.74 (d, C-20), 12.60 (q, C-21), 73.41 (d, C-22), 27.26 (t, C-23), 121.38 (d, C-24), 135.08 (d, C-25), 25.95 (q, C-26), 17.96 (q, C-27), 15.40 (q, C-28),

27.97 (q, C-29), 24.30 (q, C-30)。查阅文献, 发现其波谱数据与文献报道的桦褐孔菌醇数据一致^[10], 因此确定化合物为桦褐孔菌醇。

化合物3: 白色晶体, mp. 145 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.68 (3H, s), 0.80 (3H, s), 0.82 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.99 (3H, s)五个甲基尖峰, 属于典型的四环三萜类化合物的特征; 5.04 (1H, t, *J*=7.3 Hz, H-24), 9.46 (1H, d, *J*=7 Hz, H-21); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 35.58 (t, C-1), 27.81 (t, C-2), 78.90 (d, C-3), 38.87 (s, C-4), 50.38 (d, C-5), 19.11 (t, C-6), 29.19 (t, C-7), 134.76 (s, C-8), 133.93 (s, C-9), 37.07 (s, C-10), 20.75 (t, C-11), 26.43 (t, C-12), 44.31 (s, C-13), 49.47 (s, C-14), 30.60 (t, C-15), 29.66 (t, C-16), 45.35 (d, C-17), 16.82 (q, C-18), 18.18 (q, C-19), 55.43 (d, C-20), 206.09 (d, C-21), 26.81 (s, C-22), 25.75 (t, C-23), 123.54 (d, C-24), 132.41 (s, C-25), 25.63 (q, C-26), 17.68 (q, C-27), 15.38 (q, C-28), 27.95 (q, C-29), 24.17 (q, C-30)。通过查阅文献, 发现其与文献报道的3-hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al波谱数据一致^[10], 因此最终确定为3-羟基羊毛甾-8,24-二烯-21-醛。

化合物4: 白色针状晶体, mp. 259 °C; EI/MS *m/z* (rel.int.):456。 ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.76 (3H, s, H-19), 0.81 (3H, s, H-28), 0.89 (3H, s, H-30), 0.97 (3H, s, H-18), 1 (3H, s, H-29)存在5个角甲基尖峰, 这是四环三萜类化合物的典型特征。5.09 (1H, t, *J*=6.9 Hz, H-24), 3.22 (1H, dd, *J*=4 3.5 Hz, H-3); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 25.9 (t, C-1), 27.2 (t, C-2), 79.0 (d, C-3), 39.0 (s, C-4), 50.7 (d, C-5), 18.3 (d, C-6), 29.7 (d, C-7), 134.8 (s, C-8), 132.2 (s, C-9), 37.3 (s, C-10), 26.0 (t, C-11), 32.6 (t, C-12), 44.5 (s, C-13), 49.7 (s, C-14), 30.5 (t, C-15), 28.0 (t, C-16), 47.3 (d, C-17), 19.2 (q, C-18), 15.4 (q, C-19), 47.3 (d, C-20), 182.7 (s, C-21), 20.9 (t, C-22), 26.6 (t, C-23), 123.7 (d, C-24), 134.3 (s, C-25), 24.4 (q, C-26), 17.6 (q, C-27), 28.1 (q, C-28), 16.0 (q, C-29), 25.8 (q, C-30)。通过查阅文献^[11], 发现该化合物与已经报道的3β-hydroxytirucallic acid一致, 因此最终确定化合物3β-羟基甘遂酸

化合物5: 白色晶体, mp. 186 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.80 (3H, s, H-18), 0.824 (3H, d, *J*=1.5 Hz, H-26), 0.84 (3H, d, *J*=5.1 Hz, H-27), 0.882 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, *J*=6.7 Hz, H-28), 0.99 (3H, d, *J*=6.5 Hz, H-21), 6.5 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-7), 6.23 (1H, d, *J*=8.5, H-6), 5.22 (1H, dd, *J*=15.5 7.5 Hz, H-22), 5.15 (1H, dd, *J*=15.5 7.5 Hz, H-23), 3.97 (1H, *m*, H-3); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 36.96 (t, C-1), 30.11 (t, C-2), 66.43

(d, C-3), 51.12 (t, C-4), 79.41 (s, C-5), 130.72 (d, C-6), 135.19 (d, C-7), 82.14 (s, C-8), 51.68 (d, C-9), 34.70 (s, C-10), 20.86 (t, C-11), 39.35 (t, C-12), 44.56 (s, C-13), 36.93 (d, C-14), 23.39 (t, C-15), 28.60 (t, C-16), 56.22 (d, C-17), 12.86 (q, C-18), 18.15 (q, C-19), 39.68 (d, C-20), 19.62 (q, C-21), 135.41 (d, C-22), 132.31 (d, C-23), 42.77 (d, C-24), 33.05 (q, C-25), 20.62 (d, C-26), 19.92 (q, C-27), 17.54 (q, C-28)。通过查阅文献^[12], 发现该化合物与已经报道的过氧麦角甾醇化合物一致。因此确定化合物为过氧麦角甾醇化合物。

化合物6: 白色晶体, mp. 165 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.73 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, d, *J*=6.5 Hz, H-27), 0.83 (3H, d, *J*=7 Hz, H-26), 0.91 (3H, d, *J*=7 Hz, H-28), 1.0 (3H, d, *J*=6.5 Hz, H-21), 1.0 (3H, s, H-19)存在5个甲基峰, 暗示该化合物有可能是甾体或者三萜类化合物, 6.59 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-7), 6.28 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6), 5.22 (1H, dd, *J*=15.5 7.5 Hz, H-23), 5.15 (1H, dd, *J*=15.5 7.5 Hz, H-22), 5.42 (1H, dd, *J*=1.5 2 Hz, H-11), 4.3 (1H, *m*, H-3); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 33.05 (t, C-1), 30.60 (t, C-2), 66.31 (s, C-3), 36.08 (t, C-4), 82.69 (s, C-5), 135.46 (d, C-6), 130.73 (d, C-7), 78.34 (s, C-8), 142.60 (s, C-9), 37.97 (s, C-10), 119.68 (d, C-11), 41.19 (t, C-12), 43.61 (s, C-13), 48.17 (d, C-14), 20.88 (t, C-15), 28.59 (t, C-16), 55.88 (d, C-17), 12.95 (q, C-18), 25.53 (q, C-19), 39.85 (d, C-20), 19.91 (q, C-21), 135.10 (d, C-22), 132.43 (d, C-23), 42.76 (d, C-24), 32.58 (q, C-25), 20.69 (d, C-26), 19.62 (q, C-27), 17.53 (q, C-28), 所以通过查阅文献^[13], 发现其与报道的3β-hydroxy-5α,8α-epidioxyergosta-6,9,22-triene一致。最终确定化合物为3β-羟基-5,8-环氧麦角甾醇-6,9,22-三烯。

化合物7: 黄色油状物, ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.71 (2H, dd, *J*=9 2.5 Hz, H-3/6), 7.52 (2H, dd, *J*=9 2.5 Hz, H-4/5), 4.30 (4H, t, *J*=7 Hz, H-8/8'), 1.72 (4H, tt, *J*=7 9.5 Hz, H-9/9'), 1.44 (4H, qt, *J*=15.5 7.5 Hz, H-10/10'), 0.96 (6H, t, *J*=7.5 Hz, H-11/11'); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 132.35 (d, C-1/2), 128.84 (d, C-3/6), 130.89 (s, C-4/5), 167.70 (s, C-7/7'), 65.56 (t, C-8/8'), 30.69 (t, C-9/9'), 19.18 (t, C-10/10'), 13.70 (q, C-11/11'), 通过查阅文献, 其与发现的化合物邻苯二甲酸二丁酯波谱数据一致^[14], 最终确定化合物为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物8: 白色结晶, mp. 174 °C, Libermann-Burchard反应和Salkowski反应均呈阳性, 显示此化合物可能为三萜或甾类成分。 ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.54 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, d, *J*=5.6

Hz, H-26), 0.84(3H, d, $J=6.1$ Hz, H-27), 0.92(3H, d, $J=7$ Hz, H-28), 1.0(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 3.61(1H, m , H-3), 5.21(2H, m , H-22/23)。 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 30.72(t, C-1), 31.50(t, C-2), 71.08(d, C-3), 38.03(t, C-4), 40.29(d, C-5), 29.67(t, C-6), 117.43(d, C-7), 139.7(s, C-8), 49.49(d, C-9), 34.23(s, C-10), 21.56(t, C-11), 39.58(t, C-12), 43.40(s, C-13), 43.40(d, C-14), 55.05(t, C-15), 22.97(t, C-16), 56.05(d, C-17), 11.84(q, C-18), 13.02(q, C-19), 40.29(d, C-20), 21.56(q, C-21), 136.1(d, C-22), 130.8(d, C-23), 43.40(d, C-24), 33.69(d, C-25), 20.50(q, C-26), 19.02(q, C-27), 17.61(q, C-28)。通过查阅文献^[15], 其与发现的化合物 5-dehydroergosterol 波谱数据一致, 最终确定化合物为 5-脱氢麦角甾醇(8)。

化合物 9: 白色晶体, mp. 83.2~83.9 °C。ESI-MS m/z : 383.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。点样于滤纸, 用溴酚蓝进行显色, 显黄色斑点, 说明化合物为脂肪酸类化合物。IR 谱图分析: 2955、2917、2849、1734、1541、1473、1463、1176、726、710 cm^{-1} 。2955、2917、2849 cm^{-1} 处存在吸收, 说明化合物存在甲基和亚甲基; 其中 2917、2849 cm^{-1} 处的吸收峰非常强, 说明化合物中亚甲基的数目远多于甲基的数目, 1473、1463、726、710 cm^{-1} 处有强的吸收峰, 说明化合物中存在大于四个以上的亚甲基连在一起的结构片段, 这个化合物具有一个正构的长碳链; 在 1705 cm^{-1} 处存在吸收峰, 可推测出该化合物含有羰基结构。通过计算机检索红外数据库, 该化合物 IR 谱图与二十五烷酸的 IR 谱图匹配度为 95%, 再结合文献的熔点数据, 最终确定该化合物为二十五烷酸。

化合物 10: 白色晶体, mp. 80.5-82 °C。ESI-MS m/z : 367.14 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。点样于滤纸, 用溴酚蓝进行显色, 显黄色斑点, 说明化合物为脂肪酸类化合物。IR 谱图分析: 2955、2917、2849、1734、1541、1473、1463、1176、726、710 cm^{-1} 。2955、2917、2849 cm^{-1} 处存在吸收, 说明化合物存在甲基和亚甲基; 其中 2917、2849 cm^{-1} 处的吸收峰非常强, 说明化合物中亚甲基的数目远多于甲基的数目, 1473、1463、726、710 cm^{-1} 处有强的吸收峰, 说明化合物中存在大于四个以上的亚甲基连在一起的结构片段, 这个化合物具有一个正构的长碳链; 在 1705 cm^{-1} 处存在吸收峰, 可推测出该化合物含有羰基结构。通过计算机检索红外数据库, 该化合物 IR 谱图与二十四烷酸的 IR 谱图匹配度为 92%, 最终确定该化合物为二十四烷酸。

6 抗疱疹病毒活性及细胞毒性实验

根据活性测试结果, 采用 EXCEL 中的 FORECAST(x, known-y's, known-xs) 命令计算样品对 HSV 的 IC_{50} 及 CC_{50} 。

表 1 不同桦褐孔菌化合物单体的抗 HSV-1 病毒活性及细胞毒性

Table 1 Anti-HSV-1 and cytotoxicity activities of compounds 1-8

extracted from <i>Inonotus obliquus</i>		
名称	$\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$	$\text{CC}_{50}/\mu\text{M}$
化合物 1	>200	>200
化合物 2	129	180
化合物 3	98	135
化合物 4	>200	>200
化合物 5	>150	>200
化合物 6	>150	>200
化合物 7	190	24
化合物 8	135	196

7 结论

本文在前期试验的基础上, 采用各种分离手段, 从桦褐孔菌子实体乙酸乙酯萃取物中分离出 10 个已知化合物单体, 通过查阅文献发现, 其中化合物 6 和 7 首次从桦褐孔菌中分离得到。对化合物 1~8 进行了细胞毒性和抗 HSV-1 病毒活性研究, 化合物 2、3、7、8 对 HSV-1 都表现出一定的活性作用, 其中化合物 3 的抗 HSV-1 病毒活性最强, 其 IC_{50} 值为 98 μM ; 化合物 7 的细胞毒性最强, 其 CC_{50} 为 24 μM , 化合物 7 作为塑化剂的一种, 其对环境和人体的影响一直是研究热点, 近年也有学者研究塑化剂的生物活性, 发现其影响生物体内激素的正常分泌, 导致人体或者生物体生殖器官发育异常, 甚至诱发癌症等一些疾病^[16-17]。通过对桦褐孔菌抗病毒活性成分的分离、结构鉴定及其抗病毒活性研究, 为全面了解桦褐孔菌抑制疱疹病毒机理提供科学依据。

参考文献

- [1] 郑秀峰, 韩金祥. 单纯疱疹病毒研究现状[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2008, 24(5): 370-373
ZHENG Xiu-feng, HAN Jin-xiang. Research review on herpes simplex virus [J]. China Journal of Leprosy and Skin Diseases, 2008, 24(5): 370-373
- [2] Kusne S, Schwartz M, Breinig MK, et al. Herpes simplex virus hepatitis after solid organ transplantation in adults [J]. J Infect Dis, 1991, 163: 10012-10071
- [3] 张玉洁. 余甘子枝叶部位化学成分及抗 HSV-1 生物活性研究[D]. 广州, 暨南大学, 2013
ZHANG Yu-jie. Chemical constituents and anti-HSV-1

- activities of the leaves of *phyllanthus emblica* L [D]. Guangzhou, Jinan University, 2013
- [4] Kaur R, Mittal N, Bhalla P, et al. Risk factors of herpes simplex virus type2 among STD clinic attenders in Delhi, India [J]. *J Commun Dis*, 2006, 38(4): 339-343
- [5] 梁清乐,王秋颖,樊锦海,等.桦褐孔菌的研究概况[J].*中草药*,2005,36(4):623-625
LIANG Qing-le, WANG Qiu-ying, FAN Jin-yan, et al. A survey of *Inonotus obliquus* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2005, 36(4): 623-625
- [6] 李建光,司俊娜,高愿军.桦褐孔菌研究综述[J].*安徽农业科学*,2008,36(2):571-572,582
LI Jian-guang, SI Jun-na, GAO Yuan-jun. Research review on *inonotus obliquus* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(2): 571-572, 582
- [7] 潘鸿辉,余雄涛,李婷,等.桦褐孔菌水提物通过抑制病毒介导的膜融合过程阻止单纯疱疹病毒的入侵[C].湖北省暨武汉微生物学会成立六十年庆祝大会论文集,武汉,2012: 171-175
PAN Hong-hui, YU Xiong-tao, LI Ting, et al. Aqueous extract from *Phaeoporus obliquus* (Pers.:Fr) J. Schroet prevents herpes simplex virus entry through inhibit viral-induced membrane fusion [C]. Hubei province & Wuhan Society for Microbiology Sixty years celebration Conference Proceeding, Wuhan, 2012: 171-175
- [8] Hong-hui Pan, Xiong-tao Yu, Ting Li, et al. Aqueous extract from *Phaeoporus obliquus* (Pers.:Fr) J. Schroet prevents herpes simplex virus entry through inhibit viral-induced membrane fusion [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 15(1): 29-38
- [9] Salimuzzaman Siddiqui, Farrukh Hafeez, Sabira Begum, et al. Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* [J]. *Journal of Natural Products*, 1988, 51(2): 229-233
- [10] Kirsti Kahlos, R Hiltunen, M V Schantz, 3 β -Hydroxylanosta-8,24 -dien-21-al, a New Triterpene from *Inonotus obliquus* [J]. *Planta Medica*, 1984, 50(2): 197-198
- [11] Farid A. Badria, Botros R. Mikhail, Galal T. Maatooq et al. Immunomodulatory triterpenoids from the oleogum resin of *boswellia carterii* birdwood [J]. *Zeitschrift für Naturforschung. C. A journal of biosciences*, 2003, 58(7): 505-516
- [12] 王洪庆,赵芬,李晔,等.硬孔灵芝的化学成分研究[C].第九届全国药用真菌学术会议暨药用真菌专业组织成立三十周年庆典,福建,2009:73-75
WANG Hong-qing, ZHAO Feng, LI Ye, et al. Chemical constituents from the fruiting bodies of *geroderma duropora* lloyd [C]. The 9th National Conference on Medicinal Fungus & the 30th Anniversary of Medicinal Fungi Professional Organization, Fujian, 2009: 73-75
- [13] 马伟光,李兴从,王德祖,等.松橄榄中的麦角甾醇类过氧化物[J].*云南植物研究*,1994,16(2):196-200
MA Wei-guang, LI Xin-cong, WANG De-zu, et al. Ergosterol peroxides from *cryptoporus volvatus* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1994, 16(2): 196-200
- [14] 郑朝辉,刘艳云,范黎,黄芩内生真菌 N.SBA10 代谢产物抗氧化活性及结构鉴定[J].*菌物学报*,2012,31(6):917-923
ZHENG Zhao-Hui, LIU Yan-Yun, FAN Li. Antioxidant activity and structure identification of metabolites of an endophytic fungus *Alternaria* sp. N.SBA10 isolated from *Scutellaria Baicalensis* [J]. *Mycosystema*, 2012, 31(6): 917-923
- [15] Sang Hyun Lee, Sang Hee Shim, Ju Sun, et al. Constituents from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum* and their aldose reductase inhibitory activity [J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(6): 479-483
- [16] Kondo T, Shono T, Suita S. Age-specific effect of phthalate ester on testicular development in rats[J]. *Journal of pediatric surgery*, 2006, 41(7): 1290-1293
- [17] Janjua, Nadeem Rezaq, Mortensen, et al. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans [J]. *Environmental science & technology*, 2007, 41(15): 5564-5570