

Purification and Identification of Chemical Constituents of Basidiomycete *Daedaleopsis tricolor* Collected from Mazandaran Province, Iran

Atefeh Arab Firozjae¹,
Mohammad Azadbakht²,
Emran Habibi³

¹ PhD Student in Pharmacology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran

(Received January 20, 2020 Accepted Jan 18, 2022)

Abstract

Background and purpose: Mushrooms are natural sources that have antitumoral effects, immunomodulatory and anti-oxidant effects. One of the fungus which remained intact is *Daedaleopsis tricolor* that belongs to the family of Polyporaceae. There are limited phytochemical investigations on other species of this genus, so, we aimed at performing a phytochemical analysis of this fungus.

Materials and methods: Fungal components were extracted by hexane using maceration method. Then, the extract was concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator. The concentration extract was subjected to silica gel column chromatography through mobile phases consisting of hexane: ethyl acetate. Three fractions of hexane purified extract were called F3, F2, and F1. They were analyzed by ¹H-NMR and ¹³C-NMR Spectroscopy and DEPT 90 and DEPT 135 experiments.

Results: After analysis and receiving the spectrum results and comparing them with other studies, we identified ergosterol derived compounds, ergosterol peroxide, ergosta-7, 22-dien-3 β -ol, and linoleic acid.

Conclusion: The three compounds, including ergosterol peroxide, ergosta-7, 22-dien-3 β -ol, and linoleic acid were reported for the first time in this fungus.

Keywords: *daedaleopsis tricolor*, polyporaceae, phytochemistry

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (205): 89-94 (Persian).

* Corresponding Author: Emran Habibi - Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran (E-mail: emrapharm@yahoo.com)

خالص سازی و شناسایی ترکیبات شیمیایی حاصل از قارچ جمع آوری شده از استان مازندران *Daedaleopsis tricolor*

عاطفه عرب فیروزجایی¹

محمد ازادبخت²

عمران حبیبی³

چکیده

سابقه و هدف: قارچ‌ها از جمله منابع طبیعی هستند که دارای اثرات ضد سرطان، تعدیل کنندگی سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدان می‌باشند. قارچ *Daedaleopsis tricolor* متعلق به تیره Polyporaceae می‌باشد. با توجه به مطالعات فیتوشیمیایی محدود انجام شده روی سایر گونه‌های این جنس، این آزمایش با هدف بررسی فیتوشیمیایی این قارچ انجام شد.

مواد و روش‌ها: اجزای قارچ به روش خیساندن با هگزان عصاره گیری شد. عصاره هگزانی با دستگاه روتاری تغليظ شد. عصاره تغليظ شده در ستون‌های کروماتوگرافی حاوی سيليكائzel بارگذاري شد و با فاز متحرک حاوی هگزان و اتيل استات با نسبت‌های مختلف شستشو داده شد. سه فراکسيون F1، F2 و F3 از عصاره هگزانی تحت آناليز ¹H-NMR و DEPT₉₀، ¹³C-NMR و DEPT₁₃₅ مورد بررسی قرار گرفتند.

يافته‌ها: پس از بررسی و دریافت نتایج حاصل از طیف و مقایسه با مقالات به ترتیب ترکیبات مشتق ارگوسترون شامل ارگوسترون پروکساید، ارگوسترا 7 و 22 دی ان 3 بتا اول و لینولئیک اسید شناسایی شد.

استنتاج: 3 ترکیب جدا شده مشتق ارگوسترون شامل ارگوسترون پروکساید، ارگوسترا 7 و 22 دی ان 3 بتا اول و لینولئیک اسید برای اولین بار در این قارچ شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: Polyporaceae, *Daedaleopsis tricolor*, فیتوشیمی

مقدمه

این قارچ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد (5). با توجه به اهمیت روز افزون قارچ‌ها در صنایع داروسازی و غذایی، امروزه توجه ویژه‌ای به این منابع طبیعی شده است. در مطالعه پیش رو فرایند شناسایی و خالص‌سازی *Daedaleopsis tricolor* ترکیبات شیمیایی قارچ انجام شد.

قارچ *Daedaleopsis tricolor* از خانواده Polyporaceae می‌باشد سطح کلاهک آن به صورت نیم دایره همراه با مناطق رنگی مختلف است این قارچ دارای بافت چوبی می‌باشد و روی تنه مرده درختان برگریز رشد می‌کند (2,1). عصاره این قارچ دارای اثرات آنتی‌میکروبیال و ضد قارچی می‌باشد (2-4). ترکیبات استخراج شده از پیکره میوه‌ای

مؤلف مسئول: عمران حبیبی - ساری: جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پامبر اعظم (ص)، مرکز تحقیقات علوم دارویی
1. دانشجویی ذکرای تحصصی فارماکولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استاد، گروه فارماکوگنوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استادیار، گروه فارماکوگنوژی و بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
* تاریخ دریافت: 1398/10/30 تاریخ ارجاع چهت اصلاحات: 1398/11/28 تاریخ تصویب: 1400/10/28

مواد و روش‌ها

نمونه‌های قارچی در بخش هزارجریب شهرستان نکا و ارتفاع 470 متری از سطح دریا جمع آوری شدند که پس از بررسی با نمونه هرباریومی دانشکده داروسازی ساری به شماره MAZ-B4-0101-001 تطبیق داده شد. نمونه‌های پودر شده قارچی به وزن تقریبی 500 گرم توسط حلال هگزان و در دمای آزمایشگاهی به روش خیساندن عصاره گیری شد. عصاره گیری 3 مرتبه و هر بار به مدت حداقل 48 ساعت انجام شد. عصاره حاصل توسط دستگاه روتاری در خلا در دمای 37-40 درجه تغليظ شد. وزن کلی عصاره حاصله برابر با 3/8 گرم بود.

مواد و دستگاه‌ها

معرف آنیز آلدھید شرکت Merck آلمان، اتيل استات، ان-هگزان شرکت ASD و متابول شرکت آرین سینا، سیلیکا ژل مش درشت شرکت Merck با اندازه 0/5-0/04 میلی‌متر، سیلیکا ژل مش ریز شرکت Merck با اندازه 0/04-0/06 میلی‌متر، روتاری heidolph آلمان، پرکولاتور با حجم 3 لیتری، کاغذ کروماتوگرافی شرکت Merck H₁-NMR-125 MHz، Bruker C₁₃-NMR-400MHz.

پس از گرفتن TLC اولیه از عصاره هگزانی، فرایند بارگذاری عصاره در ستون کروماتوگرافی به ابعاد 20×5 سانتی‌متر که با سیلیکا ژل پر شده بود آغاز شد. ستون طی چند مرحله با فاز متخرک هگزان: اتيل استات به نسبت‌های 19:1، 7:3، 18:2، 8:2، 6:4 و در نهایت با متابول شستشو داده شد بعد از TLC گذاری و بررسی مشخصات لکه‌ها ابتدا در زیر نور UV 254-365 nm و سپس با استفاده از معرف آنیز آلدھید فراکسیون‌های مشابه جداسازی شدند. سپس فراکسیون‌ها در ستون کروماتوگرافی با ابعاد 2×40 سانتی‌متر بارگذاری شد و با فاز متخرک هگزان: اتيل استات با نسبت‌های 9:1، 7:3، 8:2، 17، 75:2، 25، 18:2 و 7:2 شستشو داده شد. طی

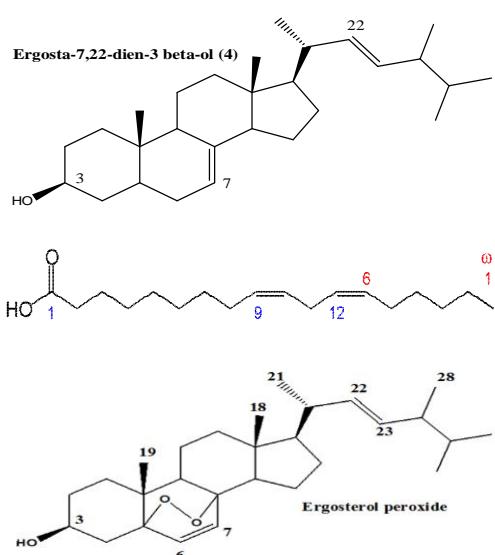
یافته‌ها و بحث

سه فراکسیون F1، F2 و F3 از عصاره هگزانی تحت آنالیز ¹H-NMR، ¹³C-NMR و DEPT₉₀ و DEPT₁₃₅ قرار گرفتند که پس از بررسی طیف‌ها و مقایسه با مقالات به ترتیب ترکیبات مشتق ارگوسترون شامل ارگوسترونول پروکساید، ارگوسترا-7 و 22 دی‌ان 3 بتا اول ولینولئیک اسید شناسایی شدند.⁽⁶⁾ طیف پروتون ترکیبات F1، F2 و f3 در کلرفرم دوتره (CDCl₃) تهیه شد. در طیف کربن نمونه‌های F2، F3 تعداد 28 کربن و ترکیب F1 DEPT 90 18 کربن ثبت شد (جدول شماره 1) در طیف DEPT₁₃₅ کربن هایی که به صورت CH₃ می‌باشند دیده شد. در طیف DEPT₁₃₅ گروه‌های CH₂ به صورت منفی و گروه‌های CH₃ و CH به صورت مثبت ظاهر می‌شود.

جدول شماره ۱: مشخصات طیف NMR ترکیبات

δC (in ppm)			δH (in ppm), (J in Hz)			position
F3	F2	F1	F3	F2	F1	
34/70	37/11	180	-	-	-	1
30/08	31/44	34/9	-	-	2/357 , t, 1H	2
66/44	71/06	24/9	4,m	3/61 , m,1H	-	3
36/97	37/96	29/2	-	-	1/321 , m,14 H	4
82/18	40/22	29	-	-	-	5
135/44	29/61	29	6/25 , d, 8/4	-	-	6
130/73	117/44	29	6/5 ,d,8/4	5/2 , m, 1H	-	7
79/44	139/54	28/7	-	-	-	8
51/09	49/4	129/9	-	-	5/368 ,m,4 H	9
36/97	34/18	128/6	-	-	5/368 ,m,4 H	10
23/41	21/52	25/8	-	-	-	11
39/35	39/42	128/6	-	-	5/368 ,m,4 H	12
44/57	43/27	129/9	-	-	5/368 ,m,4 H	13
51/68	55/91	28/7	-	-	-	14
20/64	22/91	29	-	-	-	15
28/66	28/1	31/6	-	-	-	16
56/20	55/07	22/6	-	-	-	17
12/97	12/07	14	0/87 , s	0/55 , s, 3H	0.9 , t,3H	18
18/77	13/03	-	0/8 , s	0/80 , s,3H	-	19
39/75	40/49	-	-	-	-	20
20/89	19/63	-	6/8 ,d, 1/00	1/02, d, J = 6/5 , 3H	-	21
135/21	131/85	-	5/2 ,m	5/2 ,m,1H	-	22
132/31	135/65	-	5/2 ,m	5/2 ,m,1H	-	23
42/78	42/78	-	-	-	-	24
33/07	33/06	-	-	-	-	25
19/96	19/93	-	0/85 ,d, 6/4	0/84 , d, J = 7 , 3H	-	26
19/65	21/08	-	0/83 ,d, 6/4	0/82 , d, J = 7 , 3H	-	27
17/57	17/58	-	0/93 ,d, 6/8	0/91 , d, J = 7 , 3H	-	28

ساختمان لینولئیک اسید برای F1، ترکیب ارگوستا ۷ و ۲۲ دی ان ۳ بتا اول برای F2 و ارگوسترون پروکساید برای F3 پیشنهاد می شود (تصویر شماره ۱) (6-11).



تصویر شماره ۱: ساختار شیمیایی ترکیبات

گروههای CH_3 را نیز می توان در این طیف با توجه به طیف DEPT₉₀ شناسایی کرد. کربن های نوع چهار نیز در طیف C به صورت پیک های ضعیفی ظاهر می گردند که در DEPT₁₃₅ قابل شناسایی نیستند. در طیف کربن ترکیب ارگوستا ۷ و ۲۲ دی ان ۳ بتا اول (فراکسیون F2) پیک های $\delta=139/54$ ppm و $\delta=177/44$ ppm به ترتیب مربوط به باند دوگانه میان کربن های ۸ و ۷ و همچنین پیک های $\delta=131/85$ ppm و $\delta=135/65$ ppm به ترتیب مربوط به باند دوگانه میان کربن های ۲۲ و ۲۳ نیز در ناحیه اتیلنی مشاهده شد. کربن ۳ که محل اتصال گروه هیدروکسیل به ساختمان می باشد و دانسیته الکترونی آن کاهش یافته و در میدان ضعیف تری دیده می شود، سبب ظاهر شدن پیک در ناحیه $\delta=71/06$ ppm در طیف DEPT 90 (6). در طیف F1 (لینولئیک اسید) کربن هایی که به صورت CH می باشند دیده شد. در DEPT₁₃₅ پیک کربن های همه به صورت وارون هستند پس همگی CH_2 می باشند. با توجه به نتایج حاصل از طیف ها و مقایسه با مطالعات گذشته

دارای اثرات آنتی میکروبیال، ضد قارچی و همچنین آنتی اکسیدان می باشد (5-2). بنابراین پیشنهاد می شود مطالعات آزمایشگاهی و بالینی بیشتری روی ترکیبات جدا شده از عصاره این قارچ انجام گیرد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل پایان نامه دوره‌ی دکترای عمومی داروسازی خانم عاطفه عرب فیروزجایی با کد طرح تحقیقاتی به شماره 2154 می باشد.

در مطالعات متعددی اثرات ضد سرطانی، آنتی اکسیدان و مهار آنزیم توپوایزومراز-1 برای مشتقات ارگوستول به اثبات رسیده است (12-16). ترکیب ارگوستا-7 و 22-دی ان-3 بتا - اول دارای اثر ضد باکتری علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد (17،18). لینولیک اسید دارای اثرات ضد آتروسکلروزیس و تقویت سیستم ایمنی و کاهنده چربی می باشد (19). لینولیک اسید جدا شده از قارچ دارای اثر ضد التهابی Agaricus brasiliensis می باشد (20،21). براساس مطالعات گذشته قارچ

References

- Koukol O, Kotlaba F, Pouzar Z. Taxonomic evaluation of the polypore *Daedaleopsis tricolor* based on morphology and molecular data. Czech Mycology 2014; 66(2): 107-119.
- Yang XY, Feng T, Ding JH, Li ZH, Li Y, Fan QY, et al. Two new drimane sesquiterpenoids from cultures of the basidiomycete *Trichaptum biforme*. Natural Products and Bioprospecting 2013; 3(4): 154-157.
- Kim EM, Jeong HR, Min TJ. Purification, Structure Determination and Biological Activities of 20 (29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. Bulletin of the Korean Chemical Society 2001; 22(1): 59-62.
- un-Bin X, ZHANG LE-WDG, Zhi-He X-QY. The antifungal components from *Daedaleopsis tricolor*. Mycosystema 2007; 26(4):565-569.
- Ćilerdžić JL, Stajić MM, Milovanović IN, Galić MM, Vukojević JB. Antioxidative potential of *Daedaleopsis tricolor* basidiocarps and mycelium. Matica Srpska Journal for Natural Sciences 2017; 132: 19-27.
- Habibi E, Sadat-Ebrahimi SE, Mousazadeh SA, Amanzadeh Y. Mycochemical investigation of the turkey tail medicinal mushroom *Trametes versicolor* (higher basidiomycetes): A potential application of the isolated compounds in documented pharmacological studies. Int J Med Mushrooms 2015; 17(3): 255-265.
- Kobori M, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, Takei T, Shinmoto H. 5 α , 8 α -Epidioxy-22E-ergosta-6, 9 (11), 22-trien-3 β -ol from an edible mushroom suppresses growth of HL60 leukemia and HT29 colon adenocarcinoma cells. Biol Pharm Bull 2006; 29(4): 755-759.
- Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R. Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*. Planta Med 1989; 55(4): 389-390.
- Kim DS, Baek NI, Oh SR, Jung KY, Kim JH, Lee HK. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. Arch Pharm Res 1997; 20(3): 201-205.
- Russo A, Cardile V, Piovano M, Caggia S, Espinoza C, Garbarino J. Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22E)-ergosta-7, 22-dien-5 α -hydroxy-3, 6-dione in human prostate cancer cells. Chemico-Biological Interactions 2010; 184(3): 352-358.

11. Takei T, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, Kobori M. Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2005; 69(1): 212-215.
12. Kobori M, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, Shinmoto H. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Pharmacol* 2007; 150(2): 209-219.
13. Akihisa T, Nakamura Y, Tagata M, Tokuda H, Yasukawa K, Uchiyama E, et al. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chem Biodivers* 2007; 4(2): 224--231.
14. Yasukawa K, Akihisa T, Kanno H, Kaminaga T, Izumida M, Sakoh T, et al. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biol Pharm Bull* 1996; 19(4): 573-576.
15. Ma L, Chen H, Dong P, Lu X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chem* 2013; 139(1-4): 503-508.
16. Chao WW, Kuo YH, Lin BF. Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF-κB transactivation inhibition. *J Agric Food Chem* 2010; 58(4): 2505-2512.
17. Keller AC, Maillard MP, Hostettmann K. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry* 1996; 41(4): 1041-1046.
18. Smania Jr A, Monache FD, Smania EdFA, Cuneo RS. Antibacterial activity of steroid compounds isolated from *Ganoderma applanatum*(Pers.)Pat.(Aphyllophoromycetid eae) fruit body. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1999; 1(4): 325-330.
19. Pariza MW, Park Y, Cook M. Mechanisms of Action of Conjugated Linoleic Acid: Evidence and Speculation. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223(1): 8-13.
20. Saiki P, Kawano Y, Van Griensven LJ, Miyazaki K. The anti-inflammatory effect of *Agaricus brasiliensis* is partly due to its linoleic acid content. *Food & Function* 2017; 8(11): 4150-4158.
21. Nicolosi R, Rogers E, Kritchevsky D, Scimeca J, Huth P. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 1997; 22(5): 266-277.