

***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 *Daedaleopsis tricolor* جمع آوری شده از استان مازندران

عاطفه عرب فیروزجایی¹

محمد ازادبخت²

عمران حبیبی³

چکیده

سابقه و هدف: قارچ‌ها از جمله منابع طبیعی هستند که دارای اثرات ضد سرطان، تعدیل‌کنندگی 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 عصاره‌گیری شد. عصاره هگزانی با دستگاه روتاری تغلیظ شد. عصاره تغلیظ شده در ستون‌های کروماتوگرافی حاوی سیلیکاژل بارگذاری شد و با فاز متحرک حاوی هگزان و اتیل استات با نسبت‌های مختلف شستشو داده شد. سه فراکسیون F1، F2 و F3 از عصاره هگزانی تحت آنالیز ¹H-NMR، ¹³C-NMR، DEPT₉₀ و DEPT₁₃₅ مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: پس از بررسی و دریافت نتایج حاصل از طیف و مقایسه با مقالات به ترتیب ترکیبات مشتق ارگوسترول شامل ارگوسترول پروکساید، ارگوستا 7 و 22 دی ان 3 بتا اول و لینولئیک اسید شناسایی شد. **استنتاج:** 3 ترکیب جدا شده مشتق ارگوسترول شامل ارگوسترول پروکساید، ارگوستا 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 آنتی‌اکسیدان 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 ترکیبات شیمیایی قارچ *Daedaleopsis tricolor* 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 (1، 2). عصاره این قارچ دارای اثرات آنتی‌میکروبیال و ضد قارچی می‌باشد (2-4). ترکیبات استخراج شده از پیکره میوه‌ای

E-mail: emrapharm@yahoo.com

مؤلف مسئول: عمران حبیبی - ساری: جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، مرکز تحقیقات علوم دارویی

1. دانشجوی دکتری تخصصی فارماکولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استادیار، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1398/10/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/11/2 تاریخ تصویب: 1400/10/28

مواد و روش ها

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 تطابق داده شد. نمونه‌های پودر شده قارچی به وزن تقریبی 500 گرم توسط حلال هگزان و در دمای آزمایشگاهی به روش خیساندن عصاره‌گیری شد. عصاره‌گیری 3 مرتبه و هر بار به مدت حداقل 48 ساعت انجام شد. عصاره‌ی حاصل توسط دستگاه روتاری در خلا در دمای 37-40 درجه تغلیظ شد. وزن کلی عصاره جدا شده برابر با 3/8 گرم بود.

مواد و دستگاه ها

معرف آنیز آلدهید شرکت Merck آلمان، اتیل استات، ان-هگزان شرکت ASD و متانول شرکت آراین سینا، سیلیکا ژل مش درشت شرکت Merck با اندازه 0/5-0/2 میلی‌متر، سیلیکا ژل مش ریز شرکت Merck با اندازه 0/06-0/04 میلی‌متر، روتاری heidolph آلمان، پرکولاتور با حجم 3 لیتری، کاغذ کروماتوگرافی شرکت Merck، H₁-NMR-125 MHz، C₁₃-NMR-400MHz شرکت Bruker.

پس از گرفتن TLC اولیه از عصاره هگزانی، فرایند بارگذاری عصاره در ستون کروماتوگرافی به ابعاد 5×20 سانتی‌متر که با سیلیکاژل پر شده بود آغاز شد. ستون طی چند مرحله با فاز متحرک هگزان: اتیل استات به نسبت‌های 19:1، 8:2، 18:2، 7:3، 6:4 و در نهایت با متانول شستشو داده شد بعد از TLC گذاری و بررسی مشخصات لکه‌ها ابتدا در زیر نور UV254-365 nm و سپس با استفاده از معرف آنیز آلدهید فراکسیون‌های مشابه جداسازی شدند. سپس فراکسیون‌ها در ستون کروماتوگرافی با ابعاد 2×40 سانتی‌متر بارگذاری شد و با فاز متحرک هگزان: اتیل استات با نسبت‌های 9:1، 25، 75:2، 17، 8:2 و 7:3 شستشو داده شد. طی

این مرحله، پس از ادغام کردن نمونه‌های مشابه ترکیب F2 به وزن 20 میلی‌گرم و دارای لکه بارزی به رنگ صورتی پررنگ مایل به قرمز که واجد جذب 254 ولی فاقد جذب 365 نانومتر بود جداسازی شد. فراکسیون دیگر در ستون کروماتوگرافی با ابعاد 2×40 سانتی‌متر بارگذاری و پس از TLC گذاری فاز متحرک با نسبت هگزان: اتیل استات شامل 17:3، 16:4 عبور داده شد. پس از ادغام فراکسیون‌هایی که الگوی TLC مشابه داشتند نمونه حاوی ماده خالص کریستالی سفید رنگ به وزن 40 میلی‌گرم که به صورت لکه سیاه رنگ بارز با Rf خیلی کم که فقط در 254 nm جذب داشت به دست آمد. این ماده خالص نمونه F3 نامیده شد. یکی از فراکسیون‌ها که لکه صورتی کمرنگ با Rf بیش تر نسبت به فراکسیون F2 به همراه مقداری ناخالصی بود در بورت به طول 25 سانتی‌متر و عرض 1 سانتی‌متر که با سیلیکاژل مش ریز (0/06-0/04 میلی‌متر) پر شده بود با فاز متحرک هگزان به اتیل استات 9:1، 8:2 شستشو داده و در نهایت ماده خالص F1 با وزن 19 میلی‌گرم با لکه TLC رنگ صورتی کمرنگ و جذب 254 نانومتر جدا شد.

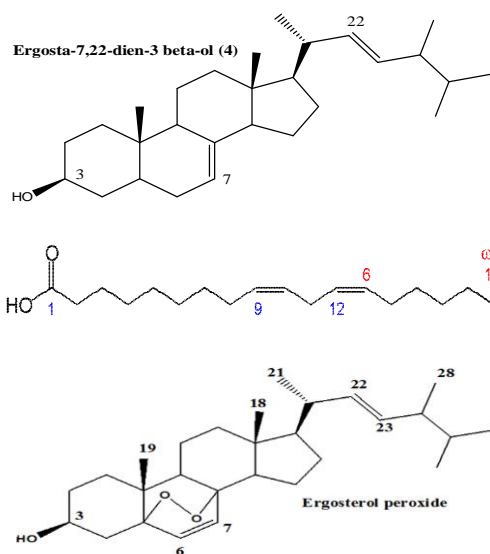
یافته ها و بحث

سه فراکسیون F1، F2 و F3 از عصاره هگزانی تحت آنالیز ¹H-NMR، ¹³C-NMR، DEPT₉₀ و DEPT₁₃₅ قرار گرفتند که پس از بررسی طیف‌ها و مقایسه با مقالات به ترتیب ترکیبات مشتق ارگوسترول شامل ارگوسترول پروکساید، ارگوستا 7 و 22 دی ان 3 بتا اول ولینولتیک 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، 18 کربن ثبت شد (جدول شماره 1) در طیف DEPT 90 کربن‌هایی که به صورت CH می‌باشند دیده شد. در طیف DEPT₁₃₅. گروه‌های CH₂ به صورت منفی و گروه‌های CH₃ و CH به صورت مثبت ظاهر می‌شود.

جدول شماره 1: مشخصات طیف NMR ترکیبات F1, F2, F3

δ_c (in ppm)			δ_H (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, 1 H	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 7 و 22 دی ان 3 بتا اول برای F2 و ارگوسترول پروکساید برای F3 پیشنهاد می شود (تصویر شماره 1) (11-6).



تصویر شماره 1: ساختار شیمیایی ترکیبات

گروه های 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 7 و 22 دی ان 3 بتا اول (فراکسیون F2) پیک های $\delta = 139/54$ ppm و $\delta = 177/44$ ppm به ترتیب مربوط به باند دو گانه میان کربن های 8 و 7 و همچنین پیک های $135/65$ ppm و $131/85$ ppm به ترتیب مربوط به باند دو گانه میان کربن های 22 و 23 نیز در ناحیه اتیلنی مشاهده شد. کربن 3 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 شد (6). در طیف DEPT 90 ترکیب F1 (لینولئیک اسید) کربن هایی که به صورت CH در DEPT₁₃₅ پیک کربن ها همه به صورت وارون هستند پس همگی CH_2 می باشند. با توجه به نتایج حاصل از طیف ها و مقایسه با مطالعات گذشته

Daedaleopsis tricolor دارای اثرات آنتی‌میکروبیال، ضد قارچی و هم‌چنین آنتی‌اکسیدان می‌باشد (5-2). بنابراین پیشنهاد می‌شود مطالعات آزمایشگاهی و بالینی بیشتری روی ترکیبات جدا شده از عصاره این قارچ انجام گیرد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل پایان‌نامه دوره ی دکترای عمومی داروسازی خانم عاطفه عرب فیروزجایی با کد طرح تحقیقاتی به شماره 2154 می‌باشد.

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

References

1. 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.
2. Yang XY, Feng T, Ding JH, Li ZH, Li Y, Fan QY, et al. Two new drimane sesquiterpenoids from cultures of the basidiomycete *Trichaptum bifforme*. *Natural Products and Bioprospecting* 2013; 3(4): 154-157.
3. 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.
4. un-Bin X, ZHANG LE-WDG, Zhi-He X-QY. The antifungal components from *Daedaleopsis tricolor*. *Mycosystema* 2007; 26(4):565-569.
5. Čilerdžić 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.
6. 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.
7. 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.
8. Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R. Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*. *Planta Med* 1989; 55(4): 389-390.
9. 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.
10. 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- κ B 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 steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum*(Pers.)Pat.(Aphyllphoromycetidae) 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.