

赤芝子实体中三萜酸类成分及其抗人乳腺癌 SKBR3 细胞增殖活性

董虹玲^{1,2}, 赵娜夏¹, 商倩¹, 夏广萍¹, 白秀秀^{1,2}, 邵泽艳^{1,2}, 韩英梅^{1*}

1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 研究赤芝 *Ganoderma lucidum* 子实体中三萜酸类成分及其抗肿瘤活性。方法 用硅胶柱色谱、反相 ODS 柱色谱、反相 HPLC 等方法分离得到 13 个化合物, 利用波谱学方法鉴定它们的化学结构, 并进一步确定各化合物对乳腺癌 SKBR3 细胞的生物活性。结果 分离得到 13 个三萜酸类的化合物, 分别鉴定为灵芝烯酸 C (1)、灵芝酸 C₂ (2)、灵赤酸 A (3)、灵芝酸 G (4)、灵芝烯酸 B (5)、灵芝酸 B (6)、灵芝酸 H (7)、灵芝烯酸 A (8)、灵芝酸 I (9)、灵芝酸 A (10)、灵芝烯酸 K (11)、灵芝烯酸 D (12)、灵芝酸 D (13)。化合物 6 在 20 μmol/L 浓度下对人乳腺癌细胞 SK-BR-3 的抑制率为 40.3%。结论 化合物 11 是首次从该植物中分离得到的, 化合物 6 对人乳腺癌细胞 SK-BR-3 显示了一定的抑制活性, 其他化合物在该浓度下未显示活性。

关键词: 赤芝; 子实体; 三萜酸; 乳腺癌

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)02-0132-06

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.008

Triterpenoid acids from sporophore of *Ganoderma lucidum* and their inhibition on proliferatin of SKBR3 human breast cancer cells

DONG Hong-ling^{1,2}, ZHAO Na-xia¹, SHANG Qian¹, XIA Guang-ping¹, BAI Xiu-xiu^{1,2}, SHAO Ze-yan^{1,2}, HAN Ying-mei¹

1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the triterpenoid acids in sporophore of *Ganoderma lucidum* and their antitumor activities. **Methods** The compounds were isolated by the silica gel, ODS column chromatography and HPLC techniques, then their structures were identified by their physicochemical characteristics and spectral features. The inhibitory activity of all compounds against SKBR3 human breast cancer cells was assessed. **Results** Thirteen compounds were isolated and identified as ganoderenic acid C (1), ganoderic acid C₂ (2), ganolucid acid A (3), ganoderic acid G (4), ganoderenic acid B (5), ganoderic acid B (6), ganoderic acid H (7), ganoderenic acid A (8), ganoderic acid I (9), ganoderic acid A (10), ganoderenic acid K (11), ganoderenic acid D (12), and ganoderic acid D (13). Compound 6 (20 μmol/L) exhibited an inhibitory rate of 40.3% against SKBR3 human breast cancer cells. **Conclusions** Compound 11 is isolated from this plant for the first time. Compound 6 exhibits the inhibition against SKBR3 human breast cancer cells at 20 μmol/L, but other compounds have no activities at the same concentration.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; sporophore; triterpenoid acids; breast cancer

赤芝是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 的干燥子实体, 为《中国药典》2010 年版一部规定灵芝药材的来源植物之一^[1]。三萜类化合物是赤芝的主要活性

物质, 属于高度氧化的羊毛甾烷型衍生物, 具有广泛的药理活性, 如抗肿瘤、抗 HIV-1 型病毒、护肝、解毒和改善记忆力等功能^[2-4]。为深入评价赤芝中三萜类化合物的抗肿瘤活性, 本实验对赤芝子实体进

收稿日期: 2013-01-21

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2011ZX09-401-009)

作者简介: 董虹玲 (1987—), 女, 硕士, 中药学专业。E-mail: 57198450@163.com

*通信作者 韩英梅, 研究员。Tel: (022)23006959 E-mail: hanyingmei@163.com

行了提取分离和鉴定,共得到 13 个化合物,分别鉴定为灵芝烯酸 C(1)、灵芝酸 C2(2)、灵芝酸 A(3)、灵芝酸 G(4)、灵芝烯酸 B(5)、灵芝酸 B(6)、灵芝酸 H(7)、灵芝烯酸 A(8)、灵芝酸 I(9)、灵芝酸 A(10)、灵芝烯酸 K(11)、灵芝烯酸 D(12)、灵芝酸 D(13),其中化合物 11 是首次从该植物中分离得到。并对这 13 个三萜类化合物的抗人乳腺癌 SKBR3 细胞的增殖作用进行了初步评价,其中化合物 6 显示了抑制活性。

1 仪器和材料

Bruker AV-400 MHz 型核磁共振仪; Waters Model 510 型制备型高效液相色谱仪, SP100 型紫外检测器, Vision HT C₁₈ 半制备柱 (200 mm×20 mm, 5 μm); 英国 VG 公司 ZAB-HS 有机磁式质谱仪; R-220 型旋转蒸发仪; SHZ-D (III) 循环水式真空泵。

G 型薄层色谱用硅胶、柱色谱用硅胶(200~300 目)(青岛海洋化工厂); 反相 YWG-C₁₈ 填料(20~30 μm)(天津博瑞键合色谱技术有限公司)。试剂为药用级或分析级,水为蒸馏水。

赤芝子实体购自河北安国药材市场,经本院韩英梅研究员鉴定为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 的干燥子实体,标本存放于天津药物研究院新药设计与发现重点实验室。

2 提取与分离

取粉碎、烘干赤芝子实体 10 kg,用 70%乙醇溶液回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至无醇味,以少量水分散,加 3 倍体积丙酮搅拌,静置,上清液减压浓缩得流浸膏约 206 g,取 120 g 经硅胶柱色谱分离,CH₂Cl₂-MeOH 系统(100:0~3:1)梯度洗脱,每 500 mL 收集为一个流分。流分经 TLC 法检测合并,共得 21 个组分。

组分 13、14 经硅胶柱色谱[石油醚-丙酮(100:20~1:1)洗脱]、半制备型 HPLC[甲醇-水(48:52, 0.1%甲酸)洗脱]分离,得化合物 1(32 mg)、2(77.6 mg)。

组分 10、11 经硅胶柱色谱[石油醚-丙酮(100:20~1:1)洗脱]、ODS 开放柱色谱分离,半制备型 HPLC 纯化,以甲醇-水(55:45, 0.5%冰乙酸)洗脱得化合物 3(7.1 mg),以乙腈-水(30:70, 0.1%甲酸)洗脱得化合物 4(55 mg)、5(12.1 mg)、7(29 mg),以乙腈-水(24:76, 0.1%甲酸)洗脱得化合物 6(14.5 mg),以乙腈-水(30:70,

0.1%甲酸)洗脱得化合物 11(16 mg)。

组分 12 经半制备型 HPLC[乙腈-水(30:70, 0.1%甲酸)洗脱]精制,得化合物 8(54.3 mg)、9(22.7 mg)、10(88.4 mg)。

组分 7 经半制备型 HPLC[乙腈-水(31:69, 0.1%甲酸)洗脱]纯化,得化合物 12(28.3 mg)、13(25 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末(甲醇)。HR EI-MS m/z : 517.315 5 [M+H]⁺ (计算值为 517.316 0), 确定其分子式为 C₃₀H₄₄O₇。¹H-NMR(400 MHz, C₅D₅N) δ: 0.99(3H, s, H-18), 1.09(3H, s, H-31), 1.27(3H, s, H-30), 1.37(3H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 1.49(3H, s, H-19), 1.58(3H, s, H-32), 2.22(3H, s, H-21), 3.50(1H, dd, $J=4.8$ 、11.2 Hz, H-3), 5.0(1H, dd, $J=8.0$ 、9.2 Hz, H-7), 5.39(1H, dd, $J=8.0$ 、8.8 Hz, H-15), 6.38(1H, brs, H-22)。¹³C-NMR(100 MHz, C₅D₅N) δ: 199.4(C-11), 199.1(C-23), 178.7(C-26), 160.2(C-8), 156.6(C-20), 141.9(C-9), 124.9(C-22), 77.6(C-3) 72.7(C-15), 69.4(C-7), 54.2(C-14), 52.8(C-17), 51.5(C-12), 50.0(C-5), 48.9(C-13), 48.5(C-24), 39.4(C-10), 39.2(C-4), 36.1(C-25), 35.5(C-1), 32.8(C-16), 29.1(C-30), 28.8(C-2), 28.8(C-6), 21.4(C-21), 20.6(C-19), 19.8(C-32), 19.2(C-18), 17.8(C-27), 16.7(C-31)。以上数据与文献报道^[5]一致,故鉴定化合物 1 为灵芝烯酸 C(ganoderenic acid C)。

化合物 2: 白色粉末(甲醇)。EI-MS m/z : 518 [M]⁺, 500.2, 389.1, 350.1, 261.1, 230.1, 139.0, 69.0, 确定其分子式为 C₃₀H₄₆O₇。¹H-NMR(400 MHz, C₅D₅N) δ: 0.97(3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 1.09(6H, s, H-18、30), 1.27(3H, s, H-32), 1.34(3H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 1.50(3H, s, H-19), 1.52(3H, s, H-31), 3.49(1H, dd, $J=4.8$ 、11.2 Hz, H-3), 4.96(1H, t, $J=7.2$ Hz, H-7), 5.23(1H, m, H-15)。¹³C-NMR(100 MHz, C₅D₅N) δ: 209.1(C-23), 199.9(C-11), 178.3(C-26), 160.4(C-8), 141.9(C-9), 77.6(C-3), 72.4(C-15), 69.5(C-7), 54.8(C-14), 52.8(C-12), 50.5(C-22), 49.9(C-5), 48.7(C-17), 47.6(C-13), 47.1(C-24), 39.4(C-10), 39.1(C-4), 36.1(C-25), 35.6(C-16), 35.5(C-1), 33.2(C-20), 29.2(C-2), 28.8(C-6, 30), 20.3

(C-21), 19.9 (C-32), 19.8 (C-19), 17.7 (C-27), 17.5 (C-18), 16.7 (C-31)。以上数据与文献报道^[6-7]一致, 故鉴定化合物 **2** 为灵芝酸 C₂ (ganoderic acid C₂)。

化合物 **3**: 白色粉末 (甲醇)。EI-MS m/z : 500 [M]⁺, 472.1, 403.1, 287.1, 175.0, 135.0, 69.0, 确定其分子式为 C₃₀H₄₄O₆。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.84 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-21), 0.89 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-31), 1.09 (3H, s, H-30), 1.10 (3H, s, H-29), 1.16 (3H, s, H-32), 1.20 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 4.37 (1H, dd, $J=5.2, 9.6$ Hz, H-15)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 218.2 (C-3), 209.0 (C-23), 198.3 (C-11), 180.3 (C-26), 163.5 (C-8), 138.5 (C-9), 72.9 (C-15), 53.5 (C-14), 51.7 (C-5), 51.6 (C-12), 49.5 (C-22), 48.5 (C-17), 46.9 (C-4), 46.7 (C-13), 46.5 (C-24), 38.5 (C-16), 37.1 (C-10), 35.1 (C-1), 34.6 (C-25), 34.2 (C-2), 32.5 (C-6, 20), 29.6 (C-7), 27.7 (C-30), 20.6 (C-21), 19.0 (C-19), 18.6 (C-6), 17.1 (C-18), 16.9 (C-27)。以上数据与文献报道^[8]一致, 故鉴定化合物 **3** 为灵赤酸 A (ganolucid acid A)。

化合物 **4**: 无色片状结晶 (甲醇)。EI-MS m/z : 532 [M]⁺, 468.1, 403.1, 329.1, 261.1, 167.0, 139.0, 69.0, 43.0, 确定其分子式为 C₃₀H₄₄O₈。¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 1.08 (3H, s, H-18), 1.15 (3H, s, H-31), 1.25 (3H, s, H-30), 1.35 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-21), 1.38 (3H, d, $J=8.8$ Hz, H-27), 1.49 (3H, s, H-19), 1.49 (3H, s, H-32), 3.45 (1H, dd, $J=4.8, 11.6$ Hz, H-3), 4.72 (1H, brs, H-12), 5.14 (1H, t, $J=8.4$ Hz, H-7)。¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 216.8 (C-15), 209.1 (C-23), 200.8 (C-11), 178.3 (C-26), 158.8 (C-8), 142.5 (C-9), 79.2 (C-3), 77.6 (C-12), 66.4 (C-7), 60.1 (C-14), 52.2 (C-13), 49.8 (C-5), 49.0 (C-22), 46.9 (C-24), 46.8 (C-17), 39.3 (C-4), 38.9 (C-16), 38.8 (C-10), 35.7 (C-25), 35.1 (C-1), 29.0 (C-20), 28.7 (C-30), 28.5 (C-2), 28.1 (C-6), 23.7 (C-32), 22.0 (C-21), 19.1 (C-19), 17.7 (C-27), 16.4 (C-31), 12.8 (C-18)。以上数据与文献报道^[9]一致, 故鉴定化合物 **4** 为灵芝酸 G (ganoderic acid G)。

化合物 **5**: 白色粉末 (甲醇)。EI-MS m/z : 514 [M]⁺, 496.1, 356.1, 262.1, 192.0, 135.0, 84.0, 56.0, 确定其分子式为 C₃₀H₄₂O₇。¹H-NMR (400

MHz, C₅D₅N) δ : 1.08 (3H, s, H-18), 1.09 (3H, s, H-31), 1.25 (3H, s, H-30), 1.39 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 1.41 (3H, s, H-19), 1.46 (3H, s, H-32), 2.26 (3H, s, H-21), 3.48 (1H, dd, $J=5.2, 11.2$ Hz, H-3), 5.23 (1H, t, $J=8.8$ Hz, H-7), 6.32 (1H, brs, H-22)。¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 215.1 (C-15), 199.0 (C-11), 197.9 (C-23), 178.3 (C-26), 158.9 (C-8), 154.0 (C-20), 142.7 (C-9), 125.3 (C-22), 77.6 (C-3), 66.6 (C-7), 58.2 (C-14), 50.1 (C-17), 49.9 (C-5), 49.8 (C-12), 48.4 (C-24), 46.6 (C-13), 39.4 (C-10), 39.3 (C-4), 38.6 (C-16), 35.9 (C-25), 35.4 (C-1), 28.8 (C-30), 28.6 (C-2), 28.3 (C-6), 25.2 (C-32), 21.0 (C-21), 19.2 (C-18), 18.7 (C-19), 17.7 (C-27), 16.4 (C-31)。以上数据与文献报道^[5]一致, 故鉴定化合物 **5** 为灵芝烯酸 B (ganoderenic acid B)。

化合物 **6**: 白色粉末 (甲醇)。EI-MS m/z : 516 [M]⁺, 498.2, 358.1, 275.1, 246.0, 167.0, 69.0, 43.0, 确定其分子式为 C₃₀H₄₄O₇。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.82 (3H, s, H-31), 0.97 (6H, brs, H-21, 18), 1.00 (3H, s, H-30), 1.20 (6H, brs, H-19, 27), 1.31 (3H, s, H-32), 3.18 (1H, dd, $J=5.6, 10.4$ Hz, H-3), 4.76 (1H, t, $J=8.8$ Hz, H-7)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 217.6 (C-15), 208.1 (C-23), 197.9 (C-11), 171.2 (C-26), 156.9 (C-8), 142.7 (C-9), 78.3 (C-3), 66.9 (C-7), 59.3 (C-14), 50.3 (C-12), 49.1 (C-22, 5), 46.8 (C-24), 45.7 (C-17), 45.3 (C-13), 40.9 (C-16), 38.8 (C-10), 38.7 (C-4), 34.8 (C-25), 34.7 (C-1), 31.6 (C-20), 28.1 (C-30), 27.6 (C-2), 26.6 (C-6), 24.4 (C-32), 19.7 (C-21), 18.4 (C-19), 17.4 (C-18, 27), 15.4 (C-31)。以上数据与文献报道^[10]一致, 故鉴定化合物 **6** 为灵芝酸 B (ganoderic acid B)。

化合物 **7**: 黄色粉末 (甲醇)。EI-MS m/z : 554 [M-H₂O], 512.2, 466.2, 382.2, 373.2, 304.2, 223.1, 167.1, 139.1, 69.0, 43.0, 确定其分子式为 C₃₂H₄₄O₉。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.78 (3H, s, H-18), 0.84 (6H, s, H-31), 0.94 (3H, d, $J=5.2$ Hz, H-21), 0.98 (3H, s, H-30), 1.17 (3H, d, $J=5.6$ Hz, H-27), 1.29 (3H, s, H-19), 1.68 (3H, s, H-32), 2.20 (3H, s, OAc), 3.23 (1H, dd, $J=5.2, 10.8$ Hz, H-3), 5.59 (1H, s, H-12)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 208.1 (C-23), 205.9 (C-15),

198.9 (C-7), 193.9 (C-11), 170.2 (C-26), 151.7 (C-8), 145.7 (C-9), 79.2 (C-12), 77.4 (C-3), 58.4 (C-14), 51.3 (C-5), 48.3 (C-22), 47.9 (C-13), 46.4 (C-24), 44.6 (C-17), 40.4 (C-10), 39.0 (C-4), 37.8 (C-16), 36.6 (C-6), 34.4 (C-25), 33.2 (C-1), 29.3 (C-20), 27.8 (C-30), 27.2 (C-2), 21.6 (C-21), 21.2 (C-32), 20.8 (C-OAc), 17.9 (C-19), 17.0 (C-27), 15.5 (C-31), 12.1 (C-18)。以上数据与文献报道^[11]一致, 故鉴定化合物 7 为灵芝酸 H (ganoderic acid H)。

化合物 8: 白色粉末 (甲醇)。EI-MS m/z : 514 $[M]^+$, 496.3, 382.2, 381.2, 262.1, 234.1, 147.1, 115.0, 43.0, 确定其分子式 $C_{30}H_{42}O_7$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.73 (3H, s, H-18), 0.99 (3H, s, H-31), 1.01 (3H, s, H-30), 1.14 (3H, s, H-27), 1.19 (3H, s, H-19), 1.28 (3H, s, H-32), 2.03 (3H, s, H-21), 4.60 (1H, m, H-7), 4.84 (1H, m, H-15), 6.08 (1H, brs, H-22)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 217.6 (C-3), 199.2 (C-11, 23), 180.1 (C-26), 159.3 (C-8), 157.1 (C-20), 140.1 (C-9), 124.2 (C-22), 72.5 (C-15), 68.7 (C-7), 53.4 (C-14), 52.1 (C-17), 50.4 (C-12), 48.6 (C-5), 48.0 (C-13), 47.9 (C-23), 46.6 (C-4), 37.9 (C-10), 35.4 (C-25, 1), 34.2 (C-2), 31.7 (C-16), 28.8 (C-6), 27.4 (C-30), 21.3 (C-21), 20.6 (C-31), 19.8 (C-19), 19.3 (C-32), 19.0 (C-18), 17.2 (C-27)。以上数据与文献报道^[5]一致, 故鉴定化合物 8 为灵芝烯酸 A (ganoderenic acid A)。

化合物 9: 白色粉末 (甲醇)。EI-MS m/z : 514 $[M-H_2O]$, 496.1, 402.1, 374.1, 262.1, 202.1, 137.0, 69.0, 43.0, 确定其分子式 $C_{30}H_{44}O_8$ 。 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 1.09 (3H, s, H-31), 1.24 (3H, s, H-30), 1.32 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 1.44 (3H, s, H-18), 1.46 (3H, s, H-19), 1.55 (3H, s, H-32), 1.70 (3H, s, H-21), 3.46 (1H, dd, $J=4.4, 10.8$ Hz, H-3), 5.15 (1H, t, $J=8.4$ Hz, H-7)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 217.7 (C-15), 209.5 (C-23), 198.6 (C-11), 178.4 (C-26), 158.2 (C-8), 142.7 (C-9), 77.6 (C-3), 72.8 (C-20), 67.0 (C-7), 59.9 (C-14), 55.8 (C-22), 51.5 (C-12), 49.7 (C-5), 48.5 (C-17), 48.4 (C-24), 46.4 (C-13), 39.3 (C-10, 4), 37.1 (C-16), 35.7 (C-25), 35.6 (C-1), 28.8 (C-21), 28.7 (C-32), 28.0 (C-2),

27.4 (C-6), 25.3 (C-31), 19.7 (C-18), 18.8 (C-19), 17.6 (C-27), 16.5 (C-30)。以上数据与文献报道^[6]一致, 故鉴定化合物 9 为灵芝酸 I (ganoderic acid I)。

化合物 10: 白色晶体 (甲醇)。EI-MS m/z : 516 $[M]^+$, 498.2, 403.1, 366.2, 259.1, 230.1, 139.0, 69.0, 43.0, 确定其分子式 $C_{30}H_{44}O_7$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.87 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.94 (3H, s, H-18), 1.07 (3H, s, H-31), 1.09 (3H, s, H-30), 1.19 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 1.22 (3H, s, H-19), 1.25 (3H, s, H-32), 4.60 (1H, dd, $J=6, 9.6$ Hz, H-7), 4.77 (1H, dd, $J=7.6, 8.4$ Hz, H-15)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 217.3 (C-3), 209.0 (C-23), 199.8 (C-11), 180.0 (C-26), 159.3 (C-8), 140.2 (C-9), 72.4 (C-15), 68.9 (C-7), 53.9 (C-14), 51.7 (C-12), 49.5 (C-22), 48.8 (C-5), 47.9 (C-17), 46.7 (C-24), 46.7 (C-13), 46.5 (C-4), 38.0 (C-10), 35.9 (C-16), 35.3 (C-1), 34.7 (C-25), 34.3 (C-2), 32.6 (C-20), 28.8 (C-6), 27.3 (C-30), 20.7 (C-31), 19.7 (C-32), 19.5 (C-21), 19.3 (C-23), 17.2 (C-18), 16.9 (C-27)。以上数据与文献报道^[10]一致, 故鉴定化合物 10 为灵芝酸 A (ganoderic acid A)。

化合物 11: 无定形粉末 (甲醇)。EI-MS 显示 $[M]^+$ 为 572, 结合 1H 、 ^{13}C -NMR, 确定化合物的分子式为 $C_{32}H_{44}O_9$ 。 1H -NMR 谱显示了 7 个单峰甲基信号 δ : 0.83, 0.96, 1.01, 1.20, 1.23, 1.50, 2.12; 1 个烯氢信号 δ 6.10; 3 个连氧碳上的氢信号 δ : 3.19 (1H, dd, $J=5.6, 9.6$ Hz), 4.80 (1H, t, $J=8.8$ Hz), 5.65 (1H, s)。 ^{13}C -NMR 谱中显示 32 个碳信号, 包括 1 个羧基信号 δ 180.5, 3 个羰基信号 δ : 215.0, 197.8, 191.6, 3 个连氧碳信号 δ : 78.7, 78.2, 66.3, 4 个双键碳信号 δ : 155.8, 143.1, 154.1, 126.2 以及 7 个甲基碳信号 δ : 26.7, 23.8, 20.6, 20.4, 19.5, 17.0, 14.2, 符合高度氧化的灵芝三萜酸类化合物的结构特征^[12]。 δ : 155.8、143.1 处的一对环内双键碳信号表明 $\Delta^{8(9)}$ 结构存在, 1H -NMR 谱中 δ 2.12 处的连双键甲基质子信号和 δ 6.10 处的烯氢信号结合 ^{13}C -NMR 谱中 δ 154.1、126.2 的一对双键碳信号可推断存在 $\Delta^{20(22)}$ 双键^[13]。 ^{13}C -NMR 谱中两个连氧碳信号 δ : 78.2, 66.3, 分别为 C_3 、 C_7 信号, 1H -NMR 谱中 δ 2.07 处的乙酰基甲基质子信号和 δ 5.65 处的次甲基信号, 结合 ^{13}C -NMR 谱中 δ 20.6、170.6、78.7 说明结构中 C_{12} 位羟基被乙酰化^[13]。3 个羰基信号 δ :

215.0, 197.8, 191.6 分别归属为 C₁₅、C₂₃、C₁₁^[12]。综上确定化合物 **11** 的结构为 12 β -acetoxo-3,7 β -hydroxy-11,15,23-tetraoxo-5 α -lanosta-8,20-dien-26-oic acid, 并鉴定该化合物为灵芝烯酸 K(ganoderenic acid K)。曾有文献报道采用液质联用法^[14]和多级串联质谱法^[15]指认该化合物, 而本实验首次从赤芝子实体中分离得到, 并报道其核磁共振数据。

EI-MS m/z : 572 [M]⁺, 514.3, 496.4, 403.3, 320.2, 306.2, 192.1, 165.1, 69.0, 43.0, 确定其分子式 C₃₀H₄₄O₉。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.83 (3H, s, H-31), 0.96 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-30), 1.20 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-27), 1.23 (3H, s, H-19), 1.50 (3H, s, H-32), 2.07 (3H, s, H-OAc), 2.12 (3H, s, H-21), 3.19 (1H, dd, $J=5.6, 9.6$ Hz, H-3), 4.80 (1H, t, $J=8.8$ Hz, H-7), 5.65 (1H, s, H-12), 6.10 (1H, s, H-22)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 215.0 (C-15), 197.8 (C-23), 191.6 (C-11), 180.5 (C-26), 170.6 (C-OAc), 155.8 (C-8), 154.1 (C-20), 143.1 (C-9), 126.2 (C-22), 78.7 (C-12), 78.2 (C-3), 66.3 (C-7), 59.9 (C-14), 47.5 (C-24), 50.1 (C-13), 49.2 (C-5, 17), 38.7 (C-6), 38.6 (C-4), 38.5 (C-16, 10), 34.6 (C-25), 34.5 (C-1), 27.4 (C-2), 26.7 (C-32), 23.8 (C-31), 20.6 (C-30), 20.6 (C-OAc), 20.4 (C-21), 19.5 (C-19), 17.0 (C-27), 14.2 (C-18)。

化合物 **12**: 白色粉末 (甲醇)。EI-MS m/z : 512 [M]⁺, 494.2, 382.1, 374.1, 260.1, 192.0, 64.1, 69.0, 43.0, 确定其分子式为 C₃₀H₄₀O₇。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.86 (3H, s, H-18), 1.08 (3H, s, H-31), 1.10 (3H, s, H-30), 1.21 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 1.22 (3H, s, H-19), 1.38 (3H, s, H-32), 2.14 (3H, s, H-21), 4.86 (1H, t, $J=8.8$ Hz, H-7), 6.02 (1H, brs, H-22)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 216.6 (C-3), 216.6 (C-15), 197.9 (C-11), 197.0 (C-23), 180.3 (C-26), 157.4 (C-8), 153.7 (C-20), 141.3 (C-9), 124.7 (C-22), 66.3 (C-7), 58.6 (C-14), 49.7 (C-17), 48.8 (C-5, 12), 47.5 (C-24), 46.7 (C-4), 45.9 (C-13), 38.3 (C-10), 37.8 (C-16), 35.6 (C-1), 34.7 (C-25), 34.2 (C-2), 27.6 (C-6), 27.0 (C-30), 24.7 (C-32), 20.9 (C-21), 20.7 (C-31), 19.0 (C-18), 18.1 (C-19), 17.0 (C-27)。以上数据与文献报道^[5]一致, 故鉴定化合物 **12** 为灵芝烯酸 D (ganoderenic acid D)。

化合物 **13**: 白色粉末 (甲醇)。EI-MS: EI-MS m/z : 514 [M]⁺, 496.3, 356.2, 273.2, 246.1, 167.1, 69.0, 43.0, 确定其分子式为 C₃₀H₄₂O₇。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.96 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-21), 1.00 (3H, s, H-18), 1.07 (3H, s, H-31), 1.09 (3H, s, H-30), 1.20 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 1.22 (3H, s, H-19), 1.31 (3H, s, H-32), 4.87 (1H, t, $J=8.8$ Hz, H-7)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 217.6 (C-3), 216.7 (C-15), 207.6 (C-23), 197.6 (C-11), 180.6 (C-26), 157.8 (C-8), 141.2 (C-9), 66.3 (C-7), 59.3 (C-14), 50.1 (C-12), 49.0 (C-5), 48.8 (C-22), 46.7 (C-4), 46.5 (C-24), 45.6 (C-17), 45.0 (C-13), 41.0 (C-16), 38.2 (C-10), 35.6 (C-1), 34.5 (C-25), 34.2 (C-2), 32.0 (C-20), 27.6 (C-6), 27.0 (C-30), 24.7 (C-32), 20.7 (C-31), 19.6 (C-21), 18.1 (C-19), 17.7 (C-18), 16.9 (C-27)。以上数据与文献报道^[16]一致, 故鉴定化合物 **13** 为灵芝酸 D (ganoderic acid D)。

4 MTT 法测定赤芝三萜酸类成分对人乳腺癌细胞 SK-BR-3 的抑制率

精密称取各化合物样品, 溶于一定量 DMSO, 配制 20 mmol/L 的溶液。精确吸取上述样品液 10 μ L, 加入 90 μ L DMSO、900 μ L 无血清培养基, 稀释成 200 μ mol/L, 备用。取对数生长期细胞悬浮于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 用玻璃滴管轻轻吹打成单细胞悬液, 显微镜下血细胞计数板计数活细胞。96 孔板每孔接种细胞悬液 180 μ L (细胞浓度为 10 000 个细胞/孔), 在 37 $^{\circ}$ C、100%相对湿度、含 5% CO₂ 的培养箱预培养 24 h 后, 每孔加 20 μ L 样品溶液 (终浓度设为 20 μ mol/L)。并设空白对照 (等浓度 DMSO) 及空白本底 (不加细胞), 各组均设 3 个复孔。再连续培养 48 h, 用 MTT 法测定。每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4 h 后, 仔细吸去上清液。每孔加入 100 μ L DMSO, 置微量振荡器振荡 5 min 使结晶完全溶解, 于酶标仪 492 nm 单波长比色, 测定吸光度值, 计算抑制率 [抑制率 = (A_空 - A_药) / A_空, 其中 A_空: 空白对照吸光度, A_药: 加样组吸光度]。结果化合物 **6** 在 20 μ mol/L 浓度下对人乳腺癌细胞 SK-BR-3 的抑制率为 40.3%, 显示了一定的抑制活性, 其他化合物在该浓度下未显示活性。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 174.

- [2] 罗俊, 林志彬. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展 [J]. 药学学报, 2002, 37(7): 574-578.
- [3] 张劲松, 贾薇, 邢增涛, 等. 灵芝子实体和菌丝体的提取物及其各纯化组份生物活性的比较 [J]. 菌物学报, 2004, 23(1): 85-92.
- [4] 林志彬. 灵芝的抗肿瘤作用机制 [J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 7-9.
- [5] Komoda Y, Nakamura H, Ishihara S, *et al.* Structures of new terpenoid constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst (Polyporaceae) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11): 4829-4835.
- [6] Kikuchi T, Kanomi S, Kadota S, *et al.* Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. I. Structures of ganoderic acids C₂, E, I, and K, lucidenic acid F and related compounds [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(9): 3695-3712.
- [7] 张晓琦, 殷志琦, 叶文才, 等. 赤芝子实体化学成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1601-1603.
- [8] Kikuchi T, Murai Y, Kadota S, *et al.* Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. III. Structures of ganolucidic acids A and B, new lanostane-type triterpenoids [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(10): 4030-4036.
- [9] Kikuchi T, Kanomi S, Murai Y, *et al.* Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. II. Structures of ganoderic acids F, G, and H, lucidenic acids D₂ and E₂, and related compounds [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(10): 4018-4029.
- [10] Kubota T, Asaka Y, Miura I, *et al.* Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst [J]. *Hel Chim Acta*, 1982, 65(2): 611-619.
- [11] Kikuchi T, Matsuda S, Kadota S, *et al.* Ganoderic acid D, E, F, and H and lucidenic acid D, E, and F, new triterpenoids from *Ganoderma lucidum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(6): 2624-2627.
- [12] 陈若芸, 于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展 [J]. 药学学报, 1990, 25(12): 940-953.
- [13] Cheng C R, Yue Q X, Wu Z Y, *et al.* Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(13): 1579-1585.
- [14] Yang M, Wang X, Guan S, *et al.* Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18(5): 927-939.
- [15] Cheng C R, Yang M, Wu Z Y, *et al.* Fragmentation pathways of oxygenated tetracyclic triterpenoids and their application in the qualitative analysis of *Ganoderma lucidum* by multistage tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(9): 1323-1335.
- [16] Kohda H, Tokumoto W, Sakamoto K, *et al.* The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(4): 1367-1374.