

。有效成分。

波谱和 X-衍射分析鉴定赤芝子实体三萜类化合物的结构

罗 俊,林志彬*

(北京大学医学部基础医学院 药理学系,北京 100083)

摘要:目的 对赤芝子实体的化学成分进行研究。方法 利用各种色谱技术进行分离,主要采用一维、二维核磁共振及 X 衍射分析进行结构鉴定。结果 从赤芝子实体中分离得到 4 个化合物,其结构经波谱和 X 衍射分析鉴定为: β -氧-甲酰基- β , 1 β -二羟基-4, 4, 14 α -三甲基-5 α -胆甾-11, 15-二酮-8-烯(*E*)-24-酸(β -oxo-formyl- β , 1 β -dihydroxy-4, 4, 14 α -trimethyl-5 α -chol-11, 15-dioxo-8-ene(*E*)-24-oic acid, VI); β -氧-甲酰基- β , 1 β -二羟基-5 α -羊毛甾-11, 15, 23-三酮-8-烯(*E*)-26-酸(β -oxo-formyl- β , 1 β -dihydroxy-5 α -lanost-11, 15, 23-trioxo-8-en(*E*)-26-oic acid, VII); 麦角甾醇(ergosterol, VIII); 麦角甾-7, 22-二烯- β -醇(ergosta-7, 22-dien- β -ol, IX)。结论 化合物 VI 和 VII 为新化合物。

关键词: 赤芝;子实体;三萜;核磁谱;X 衍射分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)03-0197-04

Structure identification of triterpenes from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* by NMR spectra and X-ray diffraction analysis

LUO Jun, LIN Zhi-bin

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract **Object** To study the chemical constituents from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.. **Methods** Individual constituent was isolated and repeatedly purified on silica gel column and structurally elucidated by the NMR spectra and X-ray diffraction analysis. **Results** Four compounds were obtained from the alcohol extract and identified as β -oxo-formyl- β , 1 β -dihydroxy-4, 4, 14 α -trimethyl-5 α -chol-11, 15-dioxo-8-en (*E*)-24-oic acid (VI); β -oxo-formyl- β , 1 β -dihydroxy-5 α -lanost-11, 15, 23-trioxo-8-en (*E*)-26-oic acid (VII); ergosterol (VIII) and ergosta-7, 22-dien- β -ol (IX), respectively. **Conclusion** Compound VI and VII are new triterpenes.

Key words *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; fruiting body; triterpenes; NMR spectra; X-ray diffraction analysis

赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 系担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌,为名贵滋补类药材,具有扶正固本、延年益寿之功效。国内外学者对灵芝的药理作用和化学成分进行了广泛的研究,从赤芝醇提物中分离得到多种三萜类化合物。体外实验表明,部分三萜类化合物具有抗 HIV-1 病毒及抗 HIV-1 蛋白酶活性^[1,2],抑制 ACE 活性^[3]和抑制肿瘤细胞增殖^[4]等作用。我室从赤芝醇提物中提取分离得到粗总三萜,经体内、外动物实验证实其具有显著的保肝作用^[5,6];从赤芝子实体醇提物中分离得到 5 个灵芝三萜类化合物^[7]。近来又从赤芝子实

体醇提物中经反复硅胶柱层析和薄层制备得到化合物 VI~IX,根据理化常数测定、波谱以及 X 单晶衍射分析,分别将其鉴定为 β -氧-甲酰基- β , 1 β -二羟基-4, 4, 14 α -三甲基-5 α -胆甾-11, 15-二酮-8-烯(*E*)-24-酸(β -oxo-formyl- β , 1 β -dihydroxy-4, 4, 14 α -trimethyl-5 α -chol-11, 15-dioxo-8-en (*E*)-24-oic acid, VI); β -氧-甲酰基- β , 1 β -二羟基-5 α -羊毛甾-11, 15, 23-三酮-8-烯(*E*)-26-酸(β -oxo-formyl- β , 1 β -dihydroxy-5 α -lanost-11, 15, 23-trioxo-8-en (*E*)-26-oic acid, VII); 麦角甾醇(ergosterol, VIII); 麦角甾-7, 22-二烯- β -醇(ergosta-7, 22-dien- β -ol,

* 收稿日期: 2001-05-15

作者简介: 罗 俊 (1963-),男,贵州省贵阳市人,贵阳医学院药理学教研室副教授,在读博士生。E-mail: luojungy@sina.com

* 联系人 Tel/Fax: 010-62091686 E-mail: linzb@public3.bta.net.cn

IX)。化合物VI和VII为新化合物。

化合物VI: 白色针状结晶, mp 130℃~ 131℃。

Lieberman-Burchard反应阳性 UV显示有 α,β 不饱和酮基($\lambda_{\max}=252\text{ nm}$)吸收。IR显示有羟基($3\,438\text{ cm}^{-1}$)、六元环酮($1\,706\text{ cm}^{-1}$)和 α,β 不饱和酮($1\,661\text{ cm}^{-1}$)存在。EIMS 504(M^+), 486($M^+ - H_2O$), 468($M^+ - 2H_2O$), 458($M^+ - OCHO-H$), 334(基峰), 304, 141 推测其分子式为 $C_{28}H_{44}O_8$ 氢谱显示有 6 个角甲基, 3 个连氧碳上的氢信号: $\delta_H 4.80$ (1H, t, $J=8.0\text{ Hz}$), $\delta_H 4.62$ (1H, dd, $J=7.0, 10.5\text{ Hz}$), $\delta_H 4.39$ (1H, s) 和 1 个甲酰基上的氢信号 $\delta_H 8.12$ (1H, s) 碳谱和 DEPT 谱提示分子中存在 2 个羰基 ($\delta_C 217.12, 199.45$), 1 个羧基 ($\delta_C 177.84$), 2 个烯碳 ($\delta_C 157.43, 141.57$), 3 个连氧碳 ($\delta_C 79.89, 78.16, 66.09$) 和一个甲酰基 ($\delta_C 161.01$) (表 1)。从上述核磁谱数据推测其为四环三萜化合物。与已知化合物赤芝酸 B^[8] 的氢谱和碳谱进行比较, 化合物VI的氢谱多 2 个质子信号 $\delta_H 8.12$ (1H, s) 和 4.62 (1H, dd, $J=7.0, 10.5\text{ Hz}$), 碳谱多一个 $\delta_C 160.01$ 的甲酰基信号和 $\delta_C 79.89$ 的连氧碳信号, 而缺少 $\delta_C 215.71$ 的羰基信号。DEPT 和 HMQC 谱提示 $\delta_H 8.12$ (1H, s) 与 C-31 ($\delta_C 160.01$) 相关, $\delta_H 4.62$ 与 $\delta_C 79.89$ (C-3) 相关, HMBC 谱显示 $\delta_H 8.12$ 只与 C-3 有远程相关, 同时 $\delta_H 4.62$ 与 $\delta_C 160.01$ (C-31) 和 C-28 C-29 有远程相关, 由此确定 C-3 连有一个氧甲酰基。由于 C-3 的羰基被氧甲酰基取代, 使得 A 环的 C-1 至 C-4 和 C-28 C-29 的化学位移与 lucidenic acid B 有所不同, 而与 C-3 位为羟基或乙酰基取代的同类化合物^[8] 相似, 除此之外其余信号则与 lucidenic acid B 一致。HMQC 谱提示 $\delta_H 4.39$ 和 4.80 分别与 $\delta_C 78.16$ (C-12) 和 $\delta_C 66.09$ (C-7) 有相关, HMBC 谱表明 $\delta_H 4.39$ (12-H) 和 $\delta_H 1.44$ (30-CH₃) 分别与 $\delta_C 199.45$ 和 $\delta_C 217.12$ 有远程相关, 由此证实了母核上各取代基的定位。由于质谱给出的分子离子峰弱, 碳谱中 C-4 和 C-10 信号重叠, 以及 DEPT 谱 C-31 ($\delta_C 160.01$) 的叔碳信号弱, 这给化合物结构的最终确定增添了困难。

化合物VI的结构经 X 衍射分析而最终得到确定 (图 2)。X 衍射分析得到化合物VI的分子式为 $C_{28}H_{44}O_8$, 相对分子质量: 504.62 其分子骨架由六元环 A (椅式)、六元环 B (半椅式)、六元环 C (半椅式)、五元环 D (信封式) 稠合而成, 其中 A/B 环与 C/D 环均呈反式并环。在一个不对称单位中存在 2 个相同构型的分子, 分子内和分子间存在氢键联系:

$O_2 \cdots O_5$ 2.709 Å, $O_2 \cdots O_5$: 2.693 Å。晶态下分子以氢键和范德华力维系其稳定排列。

结合 $^1H-^1HCO\text{SY}$ DEPT HMQC 和 HMBC 谱归属了化合物VI的 1H , ^{13}C NMR 信号, 确定其结构为 β -氧-甲酰基- β , 1 β -二羟基-4, 4, 14 α -三甲基- Δ^5 -胆甾-11, 15-二酮-8-烯 (E)-24 酸。

化合物VII: 白色针状结晶, mp 196℃~ 197℃。

Lieberman-Burchard 反应阳性 UV 显示有 α,β 不饱和酮基 ($\lambda_{\max}=252\text{ nm}$) 吸收 IR 显示有羟基 ($3\,336\text{ cm}^{-1}$)、六元环酮 ($1\,708\text{ cm}^{-1}$) 和 α,β 不饱和酮 ($1\,673\text{ cm}^{-1}$) 存在。EIMS 560(M^+), 542($M^+ - H_2O$), 406 [M -side chain] $^+$, 524($M^+ - 2H_2O$), 496 ($M^+ - OCHO - H_2O - H$), 478 ($M^+ - OCHO - H_2O - H$), 435, 403, 348, 334 (基峰), 285, 157 [C_{17} side chain] $^+$ 。HR-EIMS 未能测出分子离子峰, 推测分子式为 $C_{31}H_{44}O_9$ 氢谱显示有 7 个甲基, 比化合物VI多 1 个双峰甲基信号 $\delta_H 1.22$ (3H, dd, $J=7.5\text{ Hz}$), 低场部分氢信号则与 VI 一致。碳谱给出 31 个碳信号, 分子中存在 3 个羰基 ($\delta_C 216.88, 208.10, 199.31$), 一个羧基 ($\delta_C 180.45$), 2 个烯碳 ($\delta_C 157.39, 141.61$), 3 个连氧碳 ($\delta_C 79.89, 77.85, 66.08$) 和一个甲酰基 ($\delta_C 160.98$) (表 1)。HMBC 和 HMBC 谱证实 C-3 连有 1 个氧甲酰基, 2 个羟基分别连在 C-7 和 C-12 位。上述核磁谱数据表明化合物VII与VI具有相同的母核和 C-3 位侧链。化合物VII的 C-17 侧链部分碳谱数据则与已知化合物 methyl ganoderate G^[9] 的侧链 (除甲酯信号以外) 一致。此外, HMBC 谱显示 $\delta_C 208.10$ 只与 22-2H ($\delta_H 2.54, 2.29$) 和 24-H ($\delta_H 2.84$) 有远程相关, 而与 C-21 和 C-27 的甲基无相关, 由此确定侧链上的羰基位于 C-23 位。据上述结果确定化合物VII的结构为 β -氧-甲酰基- β , 1 β -二羟基- Δ^5 -羊毛甾-11, 15, 23-三酮-8-烯 (E)-26 酸。

1 仪器和材料

熔点用 X₃ 型显微熔点仪测定, 温度计校正。比旋光度用 AA-10R Automatic Polarimeter 测定。UV 光谱用 Beckman DV-7 紫外光谱仪测定。IR 光谱用 Perkin-Elmer 983 分光光度仪测定, KBr 压片。EIMS 测定用质谱仪: AEIMS-50 型, ZAB-HS 型 NMR 用 INOVA-300 型和 INOVA-500 型核磁共振仪测定, TMS 为内标, CDCl₃ 为溶剂。柱色谱和薄层色谱所用硅胶均为青岛海洋化工厂产品。

赤芝子实体由福建省食用菌总公司惠赠, 中国科学院微生物研究所邱晓岚教授鉴定, 样品保存于本室。

2 提取和分离

赤芝子实体 13.1 kg,切成小块,8倍量 95%乙醇热回流提取,回流液经薄膜浓缩和旋转蒸发得褐色浸膏(580 g) 将其悬浮于水,依次用石油醚 乙酸乙酯萃取。所得乙酸乙酯部分浸膏(320 g)重溶于乙酸乙酯,用 2% NaOH 碱化^[10]后(pH 9~ 10)再水洗至中性,回收有机层得乙酸乙酯中性部分浸膏(120 g);余下碱化水层用 1% HCl 中和至 pH 2~ 3,乙酸乙酯萃取得酸性部分(180 g) 该酸性部分经硅胶柱层析,氯仿-甲醇(100∶ 0~ 60∶ 40)梯度洗脱,得 6 个组份(Fr-A~ F)。Fr-E 经反复硅胶柱层析,氯仿-甲醇(100∶ 0~ 60∶ 40)梯度洗脱,纯化部分经薄层制备得化合物 VI(20 mg)和 VII(25 mg);Fr-A 经反

复硅胶柱层析,石油醚-乙酸乙酯(10∶ 0~ 10∶ 10)梯度洗脱,得化合物 VIII 和 IX(210 mg)。

3 结构鉴定

化合物 VI: 白色针状结晶,mp 185℃~ 186℃(丙酮), $[\alpha]_D^{25}+96^{\circ}(c\ 0.01, Me_2CO)$ Lieberman-Burchard 反应阳性。UV: $\lambda_{max}(MeOH)$ 252 nm, $IR_{max}^{KBr}(cm^{-1})$: 3 438, 2 964, 1 706, 1 661, 1 048 $EIMS\ m/z(\%)$: 504(M^+), 486($M^+ - H_2O, 11$), 468($M^+ - 2H_2O, 1.5$), 458($M^+ - OCHO - H, 3.7$), 334(100), 304(20), 141(13) $^1HNMR(CDCl_3, 500\ M\ Hz, INOVA-500$ 型核磁仪)和 $^{13}CNMR(CDCl_3, 125\ M\ Hz, INOVA-500$ 型核磁仪数据及归属见表 1

X-单晶衍射分析: 白色针状结晶(丙酮),属三

表 1 化合物 VI、VII、赤芝酸 B 和灵芝酸 G 甲酯的核磁谱数据(CDCl₃)

No.	lucidenic acid B δ_C	methyl ganoderate G δ_C	compound VI				compound VII			
			δ_C	δ_H		J(Hz)	δ_C	δ_H		J(Hz)
1	35.1(2)	34.6	34.18	α -H	2.64	m	34.45	α -H	2.64	ddd 5.0, 8.0, 13.0
				β -H	1.03	m		β -H	1.01	m
2	34.3(2)	27.6	23.90	2-H	1.74	m	23.92	2-H	1.73	m
3	215.7(0)	78.4	79.89	α -H	4.62	dd	79.89	α -H	4.61	dd 6.5, 10.5
4	46.9(1)	38.6	37.49				38.04*			
5	49.4(1)	49.2	49.20	α -H	1.00	m	49.20	α -H	0.99	m
6	27.7(2)	26.9	26.59	α -H	2.24	m	26.62	α -H	2.26	m
				β -H	1.70	m		β -H	1.68	m
7	65.8(1)	66.2	66.09	α -H	4.80	t	66.08	α -H	4.80	t 8.0
8	158.1(0)	157.4	157.43				157.39			
9	140.1(0)	141.9	141.57				141.61			
10	37.8(0)	38.4	37.49				37.46*			
11	199.6(0)	199.6	199.45				199.31			
12	78.3(1)	77.9	78.16	α -H	4.39	s	77.85	α -H	4.39	s
13	51.6(0)	51.9	51.85				51.87			
14	60.2(0)	60.3	60.15				60.28			
15	217.1(0)	216.8	217.12				216.76			
16	37.6(2)	38.4	38.02	α -H	2.65	m	38.28	α -H	2.15	dd 9.5, 19.0
				β -H	2.30	m		β -H	2.66	m
17	46.6(1)	45.8	46.52	1-H	2.68	m	45.70	1-H	2.58	m
18	12.1(3)	12.0	11.97	3-H	0.80	s	11.97	3-H	0.80	s
19	18.3(3)	18.8	18.80	3-H	1.34	s	18.80	3-H	1.34	s
20	31.5(1)	28.7	31.65	1-H	1.96	m	28.69	1-H	2.47	m
21	20.5(3)	21.4	20.54	3-H	1.14	d	21.33	3-H	1.14	d 7.0
22	29.5(2)	48.4	29.44	1-H	1.86	m	48.32	1-H	2.54	m
				1-H	1.29	m		1-H	2.99	dd 8.0, 15.5
23	31.8(2)	208.1	31.53	1-H	2.34	m	208.10			
				1-H	2.46	m				
24	178.7(0)	46.4	177.84				46.13	1-H	2.84	dd 8.5, 16.5
								1-H	2.49	dd 5.0, 16.5
25		34.6					34.18	1-H	2.98	m
26		176.1					180.45			
27		17.1					16.88	3-H	1.22	d 7.5
28	26.3(3)	28.1	27.93	3-H	0.94	s	27.93	3-H	0.94	s
29	21.2(3)	15.4	16.44	3-H	0.96	s	16.42	3-H	0.96	s
30	23.3(3)	23.1	23.07	3-H	1.44	s	23.00	3-H	1.45	s
31			161.01	1-H	8.12	s	160.98	1-H	8.12	s
OCH ₃		51.9								

* 碳信号重叠; ** 化学位移值可交换

斜晶系,空间群为 $P1$,晶胞参数: $a = 7.079(1)$, $b = 11.894(1)$, $c = 17.394(1)\text{\AA}$, $\alpha = 69.991(4)^\circ$, $\beta = 80.293(3)^\circ$, $\gamma = 90.010(4)^\circ$,晶胞体积 $V = 1353.7(2)\text{\AA}^3$,晶胞内分子数 $Z = 2$,计算晶体密度 $D_c = 1.237\text{ g/cm}^3$ 。用 MAC DIP-2030K面探测器收集衍射强度数据, $\text{MoK}\alpha$ 辐射,石墨单色器, ω 扫描方式,扫描范围 $0^\circ \sim 180^\circ$,独立衍射点为 3599个,可观察点 ($|F| \geq 8|F|$) 为 3589个。在微机上用直接法 (SHELXS-86)解析晶体结构,从 E图上直接获得 58个非氢原子,变迭使用最小二乘法和差值 Fourier法获得其它非氢原子位置,并修正结构参数和判别原子种类,用几何计算法和差值 Fourier法交迭计算获得除 O_7 以外的全部氢原子位置,最终可靠因子 $R = 0.066$, $R_w = 0.063$

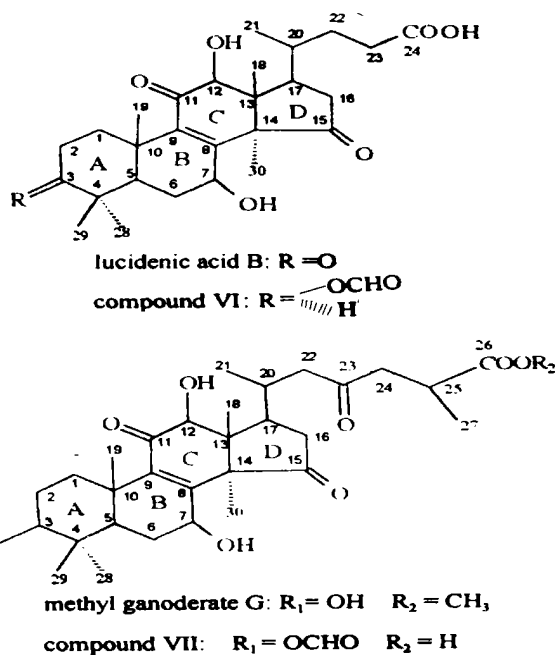


图 1 化合物 VI、VII 及其参照物的化学结构

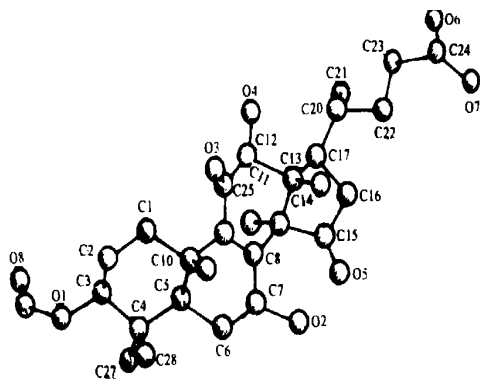


图 2 化合物 VI 立体结构

化合物 VII: 白色针状结晶, mp $196^\circ\text{C} \sim 197^\circ\text{C}$

(丙酮), $[\alpha]_D^{25} + 108^\circ (c 0.01, \text{MeCO})$ Lieberman-Burchard 反应阳性。UV: $\lambda_{\text{max}} (\text{MeOH}) 252\text{ nm}$, $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}} (\text{cm}^{-1}): 2634, 1708, 1673, 1047$ EIMS m/z (%): $506(\text{M}^+)$, $542(\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O})$, $403[\text{M} - \text{side chain}]^+$, $524(\text{M}^+ - 2\text{H}_2\text{O})$, $496(\text{M}^+ - \text{OCHO} - \text{H}_2\text{O} - \text{H})$, $478(\text{M}^+ - \text{OCHO} - 2\text{H}_2\text{O} - \text{H})$, $435, 403, 348, 334$ (基峰), $285, 157[\text{C}_{17} \text{ side chain}]^+$ 。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{ MHz}, \text{INOVA-500 型核磁仪})$ 和 $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3, 125\text{ MHz}, \text{INOVA-500 型核磁仪})$ 数据及归属见表 1

化合物 VIII 和 IX (混合结晶): 白色针状结晶, mp $161^\circ\text{C} \sim 162^\circ\text{C} (\text{CHCl}_3)$ Lieberman-Burchard 反应呈紫红色。将该碳谱的所有数据与已知化合物麦角甾醇和麦角甾-7,22-二烯- β -醇^[11]的碳谱数据比较,结果完全一致。由此确定化合物 VIII 和 IX 分别为麦角甾醇和麦角甾-7,22-二烯- β -醇。

致谢:日本国株式会社灵芝总合研究所资助课题,并承北京大学医学部药学院植化室赵玉英教授给予指导。中国医学科学院药物研究所吕扬、李兰燕、赵斌、郑启泰老师代测 X-衍射光谱。

参考文献:

- [1] Min B S, Nonio N, Hirotsugu M, *et al.* Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-protease [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 46(10): 1607-1612.
- [2] Sone Y, Okuda R, Wala N, *et al.* Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum* [J]. Agri Bio Chem, 1985, 49(9): 2641-2653.
- [3] Aiko M, Katsuaki K, Yoshinori F, *et al.* Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum* [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(7): 3025-3028.
- [4] Chairul T T, Yoshinori H. Applanoxidic acids A, B, C and D, biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum* [J]. Phytochem, 1991, 30(12): 4105-4109.
- [5] 王明宇,刘 强,车庆明,等. 灵芝三萜类化合物对 3 种小鼠肝损伤模型的影响 [J]. 药学报, 2000, 35(5): 326-329.
- [6] 王明宇,林志彬. 灵芝三萜类成分在体内外对小鼠免疫性肝损伤的影响 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(12): 809-812.
- [7] 罗 俊,林志彬. 赤芝子实体新三萜化合物的结构鉴定 [J]. 药学报, 2001, 36(8): 595-598.
- [8] Tsuyoshi N, Hiroji S, Takanori K, *et al.* New bitter C_{27} terpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi) [J]. Agri Bio Chem, 1985, 49(6): 1793-1798.
- [9] Tohru K, Satoko M, Yoshihiro M, *et al.* Ganoderic acid G and I and ganolucidic acid A and B, new triterpenoids from *Ganoderma lucidum* [J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(6): 2628-2631.
- [10] 陈若芸,于德泉. 用二维核磁共振技术研究赤芝孢子内酯 A 和 B 的结构 [J]. 药学报, 1991, 26(6): 430-436.
- [11] 于德泉,杨峻山. 核磁共振波谱分析 (分析化学手册第 7 分册) [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.