

赤芝中 1 个新的三萜类化合物

于璐^{1,2}, 姚铁², 王萌², 陈丽霞², 邱峰^{2*}, 王东^{1*}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 研究赤芝 *Ganoderma lucidum* 子实体的化学成分。方法 利用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、制备液相色谱等方法进行分离、纯化, 根据化合物的理化性质和波谱数据鉴定其结构。结果 从赤芝子实体 80%乙醇提取物醋酸乙酯萃取部位分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为赤芝酸 B 甲酯 (1)、赤芝酸 K 甲酯 (2)、赤芝酸 A 甲酯 (3)、赤芝酸 F 甲酯 (4)、2, 4, 5-三羟基苯甲醛 (5)、2, 5-二羟基苯甲酸 (6)。结论 化合物 1 为新的三萜类化合物, 化合物 5 为首次从灵芝属中分离得到, 化合物 6 为首次从赤芝中分离得到。

关键词: 赤芝; 三萜; 赤芝酸 B 甲酯; 赤芝酸 K 甲酯; 赤芝酸 A 甲酯; 赤芝酸 F 甲酯

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)10-1363-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.003

One new triterpenoid from fruiting body of *Ganoderma lucidum*

YU Lu^{1,2}, YAO Tie², WANG Meng², CHEN Li-xia², QIU Feng², WANG Dong¹

1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents in the dried fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Methods** The constituents were separated and purified by silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography, and preparative HPLC. The structures were identified by physicochemical properties and spectral analyses. **Results** Six compounds were obtained from the ethyl acetate fraction of 80% ethanol extract of *G. lucidum* and identified as methyl lucidentate B (1), methyl lucidentate K (2), methyl lucidentate A (3), methyl lucidentate F (4), 2, 4, 5-trihydroxybenzaldehyde (5), and 2, 5-dihydroxybenzoic acid (6). **Conclusion** Compound 1 is a new compound, compound 6 is found from the fruiting body of *G. lucidum* for the first time, and compound 5 is first found from the genus *Ganoderma* Karst.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; triterpenoids; methyl lucidentate B; methyl lucidentate K; methyl lucidentate A; methyl lucidentate F

赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 为多孔菌科真菌的干燥子实体^[1], 始载于《神农本草经》, 列为上品, 具有补中益气、扶正固本、延年益寿等功效。临床上主要用于治疗心神不宁、失眠心悸、肺虚咳喘、虚劳短气等疾病。目前, 从赤芝中分离得到的化合物类型主要为三萜、甾体、多糖、黄酮等成分^[2]。本研究对赤芝子实体 80%乙醇提取物醋酸乙酯萃取部位的化学成分进行了研究, 从中得到了 6 个化合物, 分别鉴定为赤芝酸 B 甲酯 (methyl lucidentate B, 1)、赤芝酸 K 甲酯 (methyl lucidentate K,

2)、赤芝酸 A 甲酯 (methyl lucidentate A, 3)、赤芝酸 F 甲酯 (methyl lucidentate F, 4)、2, 4, 5-三羟基苯甲醛 (2, 4, 5-trihydroxybenzaldehyde, 5)、2, 5-二羟基苯甲酸 (2, 5-dihydroxybenzoic acid, 6)。其中, 化合物 1 为新的三萜类化合物, 化合物 5 为首次从灵芝属中分离得到, 化合物 6 为首次从赤芝中分离得到。

1 仪器与材料

Bruker ARX—600 型核磁共振谱仪 (德国 Bruker 公司); Aglient 6520 Q-TOF-MS 高分辨质谱

收稿日期: 2013-12-31

作者简介: 于璐 (1988—), 女, 中药学专业硕士研究生, 研究方向为天然药物活性成分研究。E-mail: yulu_1988@sina.com

*通信作者 邱峰 (1967—), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然药物活性成分研究。E-mail: fengqiu20070118@163.com

王东 (1967—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药质量标准研究。E-mail: wdtcm@163.com

仪(美国 Aglient 公司); Waters 600 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); YMC 制备型色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm)。柱色谱用硅胶(200~300、100~200 目)及薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂); 液相色谱用试剂为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

药材由辽宁省食品药品检验所提供, 经辽宁省食品药品检验所中药室王维宁教授鉴定为赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst 的干燥子实体。

2 提取与分离

赤芝干燥子实体约 9 kg, 切片后用 10 倍量 80% 乙醇回流提取 2 h, 滤过, 减压浓缩至无醇味, 得粗提物 240 g。用适量蒸馏水混匀粗提物, 依次用环己烷、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 减压回收溶剂, 得醋酸乙酯萃取物 130 g。醋酸乙酯萃取物(130 g)经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇(100:0→0:100)梯度洗脱。二氯甲烷-甲醇(50:1)洗脱流分(30 g)经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯(100:0→0:100)梯度洗脱。石油醚-醋酸乙酯(5:1)洗脱部分经制备液相色谱(乙腈-水 50:50)分离得到化合物 **1**(5 mg)、**2**(5 mg)、**3**(30 mg)、**4**(50 mg)。二氯甲烷-甲醇(40:1)洗脱流分(25 g)经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯(100:0→0:100)梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20、制备液相色谱(甲醇-水 35:65)分离得到化合物 **5**(21 mg)、**6**(11 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末(二氯甲烷), $[\alpha]_D^{20} + 140.83^\circ$ (c 0.08, CHCl₃); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 233 (2.34); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 358, 2 964, 2 921, 2 851, 1 731, 1 715, 1 679。HR-ESI-MS m/z : 487.270 6 [M-H]⁻ (计算值 487.270 1, C₂₈H₃₉O₇)。结合 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) 和 ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) 谱, 推测其分子式为 C₂₈H₄₀O₇。化合物 **1** 的 NMR 图谱与化合物赤芝酸 B^[3] 的相似, 不同之处在于化合物 **1** 的 ¹H-NMR 中多出 δ_H 3.65 (s) 甲氧基质子信号, 在 ¹³C-NMR 中多出 δ_C 51.9 甲氧基碳信号。提示赤芝酸 B 的 24 位的羧基可能发生甲酯化。在 HMBC 谱中这个推测得到了确证, δ_H 3.65 (-OCH₃) 和 δ_C 174.3 (C-24) 有远程相关, 证明甲氧基链接在 24 位。NOESY 谱(图 1)中, 可见 δ_H 4.80 (1H, ddd, $J = 8.6, 8.6, 4.1$ Hz, H-7) 与 δ_H 1.45 (1H, dd, $J = 13.7, 1.7$ Hz, H-5) 相关, 证明 7-OH 为 β 构型。同时可见 δ_H 4.34 (1H, s, H-12) 与 δ_H 2.44 (1H, td, $J = 9.8, 5.5$ Hz,

H-17) 相关, 证明 12-OH 为 β 构型。灵芝中的三萜类化合物多为羊毛脂烷型四环三萜, 属于羊毛脂烷高度氧化的衍生物, 其 10、13、14 位的甲基分别为 β 、 β 、 α 构型, C-20 为 R 构型, A/B、B/C、C/D 环均为反式。

通过上述光谱学手段及羊毛脂烷四环三萜的生源特点, 确定化合物 **1** 的结构为 methyl 20 (R) 7 β , 12 β -dihydroxy-4, 4, 14 α -trimethyl-3, 11, 15-trioxo-5 α -chol-8-en-24-oate, 命名为赤芝酸 B 甲酯, 见图 2。化合物 **1** 的数据归属见表 1。

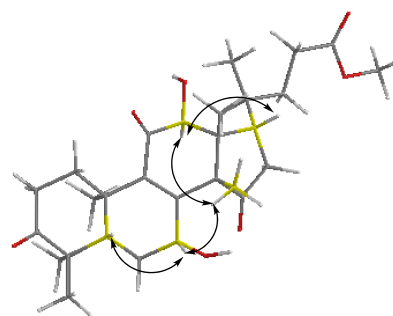


图 1 化合物 **1** NOESY 相关图

Fig. 1 Key NOESY correlations of compound **1**

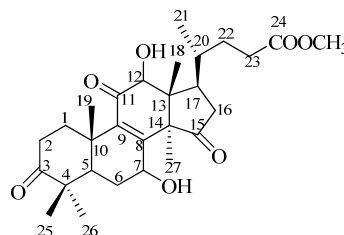


图 2 化合物 **1** 结构

Fig. 2 Structure of compound **1**

化合物 **2**: 白色粉末(二氯甲烷), ESI-MS m/z : 485 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.66 (3H, s, H-18), 1.36 (3H, s, H-19), 1.10 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-21), 1.11 (3H, s, H-25), 1.12 (3H, s, H-26), 1.73 (3H, s, H-27), 3.64 (3H, s, 24-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) 数据见表 1。以上数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **2** 为赤芝酸 K 甲酯。

化合物 **3**: 白色粉末(二氯甲烷), ESI-MS m/z : 471 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.98 (3H, s, H-18), 1.24 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.10 (3H, s, H-25), 1.08 (3H, s, H-26), 1.32 (3H, s, H-27), 3.66 (3H, s, 24-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) 数据见表 1。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 **3** 为赤芝酸 A 甲酯。

表1 化合物1~4和赤芝酸B的¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) 和¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) 数据
Table 1 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) data of compound 1—4 and lucidate B

碳位	1		δ_{C}			
	δ_{C}	δ_{H}	赤芝酸 B	2	3	4
1	35.4	α -1.32 (1H, m) β -2.77 (1H, ddd, $J = 13.2, 7.0, 4.1$ Hz)	35.1	37.5	35.9	34.8
2	34.5	α -2.38 (1H, ddd, $J = 15.2, 6.5, 4.1$ Hz) β -2.61 (1H, ddd, $J = 15.9, 11.1, 7.0$ Hz)	34.3	34.2	34.5	34.0
3	219.5		215.7	215.0	216.9	215.6
4	47.2		46.9	47.1	47.0	47.2
5	49.7	1.45 (1H, dd, $J = 13.7, 1.7$ Hz)	49.4	51.2	49.1	51.1
6	28.0	α -2.15 (1H, ddd, $J = 13.4, 8.2, 1.6$ Hz) β -1.76 (1H, td, $J = 13.6, 9.1$ Hz)	27.7	33.9	27.9	37.5
7	66.0	4.80 (1H, ddd, $J = 8.6, 8.6, 4.1$ Hz)	65.8	198.8	66.5	199.7
8	158.6		158.1	148.9	158.1	149.9
9	140.6		140.1	147.7	141.4	147.1
10	38.1		37.8	39.4	38.5	39.5
11	199.9		199.6	202.0	197.9	199.7
12	78.6	4.34 (1H, s)	78.3	78.0	50.4	49.1
13	51.8		51.6	49.5	45.1	44.0
14	60.4		60.2	58.1	59.5	57.3
15	217.5		217.1	206.7	218.2	207.6
16	37.8	α -2.65 (1H, dd, $J = 19.4, 8.6$ Hz) β -2.28 (1H, dd, $J = 19.3, 9.4$ Hz)	37.6	37.7	41.3	40.1
17	46.8	2.44 (1H, td, $J = 9.8, 5.5$ Hz)	46.6	45.9	46.5	45.3
18	12.3	0.81 (3H, s)	12.1	10.9	17.9	16.2
19	18.5	1.41 (3H, s)	18.3	18.8	18.4	18.8
20	31.8	1.92 (1H, m)	31.5	30.4	35.4	35.6
21	20.8	1.11 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)	20.5	20.2	18.2	18.5
22	29.9	α -1.26 (1H, m) β -1.83 (1H, m)	29.5	32.0	30.9	30.9
23	32.2	α -2.29 (1H, m) β -2.39 (1H, m)	31.8	32.8	31.1	31.2
24	174.3		178.7	174.3	174.1	174.1
25	26.5	1.10 (3H, s)	26.3	27.7	27.2	27.8
26	21.4	1.10 (3H, s)	21.2	20.7	21.0	20.5
27	23.5	1.42 (3H, s)	23.3	20.1	24.9	21.1
OCH ₃	51.9	3.65 (3H, s)		51.8	51.9	51.9

化合物 4: 黄色晶体 (甲醇), ESI-MS m/z : 469 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.83 (3H, s, H-18), 1.25 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.09 (3H, s, H-25), 1.11 (3H, s, H-26), 1.62 (3H, s, H-27), 3.65 (3H, s, 24-OCH₃); ¹³C-NMR (150

MHz, CDCl₃) 数据见表 1。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 4 为赤芝酸 F 甲酯。

化合物 5: 白色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 153 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.33 (1H, s, H-2), 6.35 (1H, s, H-3), 8.86 (1H, s, H-4),

10.26 (1H, s, H-5), 6.97 (1H, s, H-6), 9.88 (1H, s, -CHO); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 114.0 (C-1), 139.1 (C-2), 103.3 (C-3), 156.9 (C-4), 154.6 (C-5), 114.2 (C-6), 190.1 (-CHO)。以上数据与文献报道一致^[6], 确定化合物 **5** 为 2, 4, 5-三羟基苯甲醛。

化合物 **6**: 白色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 153 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.76 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3), 6.94 (1H, dd, $J = 8.8, 3.0$ Hz, H-4), 7.15 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 113.0 (C-1), 149.3 (C-2), 114.6 (C-3), 123.4 (C-4), 154.1 (C-5), 117.6 (C-6), 171.7 (-COOH)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **6** 为 2, 5-二羟基苯甲酸。

4 讨论

三萜类成分是灵芝中主要有效成分之一, 目前从灵芝中分离得到的三萜类化合物有灵芝酸、灵芝醛、灵芝酮及甲酯化的灵芝酸类化合物等, 例如 methyl ganoderate I、methyl 8 β , 9 α -dihydroganoderate J^[8]、灵芝酸 B 甲酯、赤芝酸 C 甲酯、赤芝酸 A 甲酯^[9]等。而对于甲酯化的灵芝酸类化合物, 对其是否是人工产物少有探讨。

本实验采用二氯甲烷为提取溶剂, 采用超声提取的方法对原药材进行了提取, 在与化合物 **1** 同样色谱条件下对其进行了 HPLC 分析, 但分析结果尚不理想, 考虑可能是化合物 **1** (5 mg) 在原药材 (9 kg) 中的量较低, 其信号太弱未被检测到。

但是有文献报道^[10]在对不同产地赤芝的 HPLC 指纹图谱评价研究中, 采用三氯甲烷为提取溶剂, 在得到的 HPLC 图谱中, 25 min 前为灵芝酸类, 25 min 后为甲基化的灵芝酸类物质; Fatmawati 等^[11]亦在赤芝的三氯甲烷提取物中分离得到 methyl

ganoderate A 和 methyl ganoderate A, 证明这些甲基化的灵芝酸类物质是赤芝中的天然产物。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 陈若芸, 于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展 [J]. 药学报, 1990, 25(12): 940-953.
- [3] 罗俊, 林志彬. 波谱和 X-衍射分析鉴定赤芝子实体三萜类化合物的结构 [J]. 中草药, 2002, 33(3): 197-200.
- [4] Nishitoba T, Stato H, Sakamura S. Triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* [J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(5): 1547-1549.
- [5] 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.
- [6] Tseng T H, Tsheng Y M, Lee Y J. Cytotoxicity effects of di- and tri-hydroxybenzaldehydes as a chemopreventive potential agent on tumor cells [J]. *Toxicology*, 2001, 161: 179-187.
- [7] El-Mousallamy A M D, Hussein S A M, Mahmoud I M, *et al.* Unusual phenolic glycosides from *Cotoneaster orbicularis* [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53: 699-704.
- [8] Ma J Y, Ye Q, Hua Y J, *et al.* New lanostanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65: 72-75.
- [9] 普琼惠, 陈虹, 陈若云. 松杉灵芝的化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 502-504.
- [10] 郭晓蕾, 翟旭峰, 王怀豫, 等. 不同产地灵芝 (赤芝) 的 HPLC 指纹图谱评价 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(12): 2782-2784.
- [11] Fatmawati S, Shimizu K, Kondo R, *et al.* Inhibition of aldose reductase in vitro by constituents of *Ganoderma lucidum* [J]. *Planta Med*, 2010, 76: 1691-1693.