

大青山灵芝的化学成分研究

兰宁宁^{1,2}, 马青云², 黄圣卓², 孔凡栋², 杨宁宁², 戴好富², 吴友根^{1*}, 赵友兴^{2*}

1. 海南大学园艺园林学院, 海南 海口 570228

2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 海口 571101

摘要: 目的 研究大青山灵芝 *Ganoderma daiqingshanense* 的化学成分。方法 采用硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等技术进行分离纯化, 运用各种波谱方法对化合物进行结构鉴定, 并测定部分化合物对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的抑制活性。结果 从大青山灵芝中分离鉴定了 12 个化合物, 经鉴定为 3 β ,21 β -山芝烯二醇-3-乙酰基 (1)、3 β ,21 α -山芝烯二醇-3-乙酰基 (2)、3-*O*-乙酰基千层塔三醇 (3)、20(29)-羽扇烯-3-醇 (4)、赤芝醛 A (5)、灵芝酸 Y (6)、麦角甾-7,22*E*-二烯-3-酮 (7)、麦角甾-4,6,8(14),22*E*-四烯-3-酮 (8)、麦角甾-7,22*E*-二烯-3 β -醇 (9)、5 α ,8 α -过氧麦角甾-6,22*E*-二烯-3 β -醇 (10)、甲龙胆酸 (11)、大戟因子 L3 (12)。化合物 5、11 和 12 对乙酰胆碱酯酶的抑制率分别为 17.70%、22.89% 和 21.22%。结论 所有化合物均为首次从大青山灵芝中分离得到, 其中 serratene 型三萜 (化合物 1~3) 为首次从灵芝科真菌中发现, 化合物 5、11 和 12 对 AChE 具有一定的抑制活性。

关键词: 大青山灵芝; 灵芝科; 3 β ,21 β -山芝烯二醇-3-乙酰基; 3 β ,21 α -山芝烯二醇-3-乙酰基; 3-*O*-乙酰基千层塔三醇; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)03-0437-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.004

Chemical constituents from fruiting bodies of *Ganoderma daiqingshanense*

LAN Ning-ning^{1,2}, MA Qing-yun², HUANG Sheng-zhuo², KONG Fan-dong², YANG Ning-ning², DAI Hao-fu², WU You-gen¹, ZHAO You-xing²

1. College of Horticulture, Hainan University, Haikou 570228, China

2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of the fruiting bodies of *Ganoderma daiqingshanense*. **Methods** The constituents were separated by Silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography, their structures were elucidated by spectral data analyses, and the acetylcholinesterase inhibitory activity was detected. **Results** Twelve compounds were isolated from the fruiting bodies of *G. daiqingshanense* and identified as 3 β ,21 β -serratenediol-3-acetate (1), 3 β ,21 α -serratenediol-3-acetate (2), 3-*O*-acetyltohenol (3), 20 (29)-lupen-3 β -ol (4), lucialdehyde A (5), ganoderic acid Y (6), ergosta-7,22*E*-diene-3-one (7), ergosta-4,6,8 (14),22-tetraene-3-one (8), ergosta-7,22*E*-diene-3 β -ol (9), 5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22*E*-diene-3 β -ol (10), ankylosaurus acid (11), and euphorbia factor L3 (12). Compounds 5, 11, and 12 showed moderate activities against acetylcholinesterase with inhibitory rates of 17.70%, 22.89%, and 21.22%, respectively. **Conclusion** All the compounds are obtained from *G. daiqingshanense* for the first time and serratene triterpenes (compounds 1—3) are found from family Ganodermataceae for the first time. Compounds 5, 11, and 12 have certain inhibitory activities on acetylcholinesterase.

Key words: *Ganoderma daiqingshanense* J. D. Zhao; Ganodermataceae; 3 β ,21 β -serratenediol-3-acetate; 3 β ,21 α -serratenediol-3-acetate; 3-*O*-acetyltohenol; acetylcholinesterase inhibitory activities

收稿日期: 2016-08-22

基金项目: 海南省自然科学基金(20152035); 公益性行业(农业)科研专项(201303117); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ITBB2017)

作者简介: 兰宁宁 (1990—), 女, 山东泰安人, 硕士, 从事天然产物化学研究。E-mail: lajulia@126.com

*通信作者 吴友根, 男, 博士, 教授, 主要从事药用植物资源研究。Tel: 13637640969 E-mail: wygeng2003@163.com

赵友兴, 男, 博士, 研究员, 主要从事天然产物化学研究。Tel: (0898) 66989095 E-mail: zhaoyx1011@163.com

灵芝是担子菌纲灵芝科 *Ganodermataceae* 灵芝属 *Ganoderma* Karst. 真菌的总称^[1], 具有补中益气、滋补强壮、扶正固本、延年益寿等功效, 是一种珍贵的中药材, 享有“仙草”之美誉。灵芝的主要化学成分分为三萜类、甾体类、多糖类、生物碱类等^[2-5], 其生物活性主要包括降血压、降血糖、抗肝炎、抗肿瘤、抗艾滋病等^[3,6-7]。《中国药典》2015 年版^[8]记载灵芝“补气安神、止咳平喘。用于心神不宁、失眠心悸、肺虚咳嗽、虚劳短气、不思饮食”, 显示其具有作用于神经系统的功效, 可考虑用于神经退行性疾病如阿尔茨海默病 (AD) 与帕金森病 (PD) 的药物研发。研究表明 AD 和 PD 的发病与大脑内乙酰胆碱的缺失有关, 药物治疗可以通过抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 来提高患者体内乙酰胆碱水平^[9], 开发 AChE 抑制剂类药物已成为一种治疗手段。全世界报道的灵芝有 200 余种, 中国有 103 种^[10], 其中药用灵芝有 23 种^[11]。海南灵芝资源生物多样性显著, 目前已发现有 78 种^[10], 大青山灵芝 *Ganoderma daiqingshanense* J. D. Zhao 属于灵芝属 *Ganoderma* Karst., 生于热带雨林中腐木桩上, 主要分布于海南岛坝王岭和五指山自然保护区以及广西十万大山自然保护区等地^[9], 是海南主要野生灵芝资源之一。近年灵芝科真菌的化学成分及药理研究一直深受关注, 从一系列灵芝资源中发现了多种结构新颖的活性成分^[12-15]。大青山灵芝子实体中化学成分和药理作用的研究未见报道, 为了深入研究大青山灵芝中的化学成分, 发现其神经保护活性成分, 更好地开发和利用大青山灵芝资源, 本实验采用了硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等方法, 从中分离出 12 个化合物, 分别鉴定为 3 β ,21 β -山芝烯二醇-3-乙酰基 (3 β ,21 β -serratenediol-3-acetate, **1**)、3 β ,21 α -山芝烯二醇-3-乙酰基 (3 β ,21 α -serratenediol-3-acetate, **2**)、3-*O*-乙酰基千层塔三醇 (3-*O*-acetyltohenol, **3**)、20(29)-羽扇烯-3-醇 [20(29)-lupen-3 β -ol, **4**]、赤芝醛 A (lucialdehyde A, **5**)、灵芝酸 Y (ganoderic acid Y, **6**)、麦角甾-7,22 E -二烯-3-酮 (ergosta-7,22 E -diene-3-one, **7**)、麦角甾-4,6,8(14),22 E -四烯-3-酮 [ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one, **8**]、麦角甾-7,22 E -二烯-3 β -醇 (ergosta-7,22 E -diene-3 β -ol, **9**)、5 α ,8 α -过氧麦角甾-6,22 E -二烯-3 β -醇 (5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22 E -diene-3 β -ol, **10**)、甲龙胆酸 (ankylosaurus acid, **11**)、大戟因子 L3 (euphorbia factor L3, **12**)。所有化合物均为首次从大青山灵芝中分离得到, 其中

serratene 型三萜 (化合物 **1**~**3**) 为首次从灵芝科真菌中发现, 化合物 **5**、**11** 和 **12** 对 AChE 具有一定的抑制活性, 抑制率分别为 17.70%、22.89% 和 21.22%。

1 仪器与材料

薄层色谱硅胶板、柱色谱用硅胶 (200~300 目) 和硅胶 H 均产自青岛海洋化工厂; Sephadex LH-20 凝胶为 GE 公司生产; MB100-40/75 C₈ 反相色谱柱 (直径 40~75 μ m, FU-JI 公司, 日本); AVANCE-500 核磁共振光谱仪, TMS 为内标 (Bruker 公司, 德国); Autospec-3000 质谱仪 (Waters 公司, 美国); HP6890/5975C GC-MS 联用仪 (安捷伦公司, 美国)。AChE 购自北京 Solarbio 公司, 碘化硫代乙酰胆碱 (质量分数 $\geq$ 99%)、二硫代二硝基苯甲酸 (DNTB, 质量分数 $\geq$ 98%)、他克林 (质量分数 $\geq$ 99%) 等均购自北京 Sigma 公司; ELX-800 酶标仪购自美国宝特公司。

大青山灵芝 2015 年 6 月采自海南省陵水县吊罗山, 经海南大学吴兴亮教授鉴定为灵芝科 (*Ganodermataceae*) 大青山灵芝 *Ganoderma daiqingshanense* J. D. Zhao, 凭证标本 (2015LZ07) 存放于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

2 提取与分离

将采集的大青山灵芝子实体 4.47 kg 晒干粉碎, 于室温下用 95% 乙醇浸提 3 次, 所得滤液经减压浓缩后得到粗浸膏, 加水得到悬浊液, 依次用醋酸乙酯和正丁醇萃取, 萃取液分别减压浓缩至干, 得到醋酸乙酯部分 159.6 g 和正丁醇部分 80 g。醋酸乙酯部分经硅胶柱色谱以石油醚-醋酸乙酯 (10:1 $\rightarrow$ 1:1) 梯度洗脱, 分段收集, 通过薄层色谱检测, 合并相同的部分, 得到 16 个组分 Fr. 1~16。Fr. 1 (5 g) 采用反相硅胶柱色谱, 以甲醇-水 (75%~90%) 梯度洗脱得到化合物 **7** (5.7 mg)。Fr. 4 (4 g) 采用硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (8:1 $\rightarrow$ 5:1) 梯度洗脱和 Sephadex LH-20 色谱 (氯仿-甲醇 1:1) 分离得到化合物 **1** (4 mg)、**4** (27.9 mg)、**8** (4.9 mg)。Fr. 5 (5 g) 采用硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (6:1 $\rightarrow$ 3:1) 梯度洗脱和 Sephadex LH-20 色谱 (甲醇) 分离得到化合物 **2** (5 mg)。Fr. 6 (6 g) 采用硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (6:1 $\rightarrow$ 3:1) 梯度洗脱和 Sephadex LH-20 色谱 (氯仿-甲醇 1:1) 分离得到化合物 **3** (188.5 mg)、**5** (10 mg)、**12** (2 mg)。Fr. 7 (10 g) 采用硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (5:1 $\rightarrow$ 2:1) 梯度洗脱和 Sephadex LH-20 色谱 (甲

醇)分离得到化合物**9**(5.5 mg)。Fr. 8(10 g)采用硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(4:1→2:1)梯度洗脱和 Sephadex LH-20 色谱(氯仿-甲醇 1:1)分离得到化合物**10**(3.4 mg)、**11**(16 mg)。Fr. 10(10 g)采用硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(3:1)洗脱和 Sephadex LH-20 色谱(氯仿-甲醇 1:1)分离得到化合物**6**(6 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**: 无色针状结晶(氯仿), ESI-MS m/z : 507 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{32}H_{52}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.42 (1H, dd, $J = 5.0, 11.5$ Hz, H-3), 5.29 (1H, m, H-15), 3.41 (1H, dd, $J = 7.5, 4.3$ Hz, H-21), 0.80 (3H, s, H-23), 0.77 (3H, s, H-24), 0.79 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-26), 0.65 (3H, s, H-28), 0.89 (3H, s, H-29), 0.89 (3H, s, H-30), 2.00 (3H, s, -COCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.0 (C-1), 24.0 (C-2), 81.0 (C-3), 38.2 (C-4), 56.3 (C-5), 18.9 (C-6), 45.2 (C-7), 38.4 (C-8), 57.0 (C-9), 36.1 (C-10), 25.3 (C-11), 27.9 (C-12), 62.9 (C-13), 138.6 (C-14), 122.3 (C-15), 24.2 (C-16), 43.5 (C-17), 37.6 (C-18), 28.2 (C-19), 25.6 (C-20), 76.4 (C-21), 37.3 (C-22), 31.4 (C-23), 16.7 (C-24), 16.0 (C-25), 19.9 (C-26), 56.0 (C-27), 13.4 (C-28), 27.3 (C-29), 21.9 (C-30), OAC: 171.2, 21.5。以上数据与文献报道^[16]基本一致,故鉴定化合物**1**为3 β ,21 β -山芝烯二醇-3-乙酰基。

化合物**2**: 无色块晶(氯仿), ESI-MS m/z : 507 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{32}H_{52}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.42 (1H, dd, $J = 4.9, 11.5$ Hz, H-3), 5.33 (1H, m, H-15), 3.19 (1H, dd, $J = 5.6, 11.5$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-23), 0.80 (3H, s, H-24), 0.79 (3H, s, H-25), 0.81 (3H, s, H-26), 0.68 (3H, s, H-28), 0.81 (3H, s, H-29), 0.83 (3H, s, H-30), 2.00 (3H, s, -COCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.2 (C-1), 27.3 (C-2), 80.9 (C-3), 37.3 (C-4), 57.3 (C-5), 18.9 (C-6), 45.1 (C-7), 39.0 (C-8), 62.8 (C-9), 38.2 (C-10), 23.9 (C-11), 27.7 (C-12), 55.9 (C-13), 138.3 (C-14), 122.3 (C-15), 24.2 (C-16), 49.6 (C-17), 38.0 (C-18), 36.2 (C-19), 25.4 (C-20), 79.3 (C-21), 38.4 (C-22), 27.8 (C-23), 14.7 (C-24), 15.9 (C-25), 19.9 (C-26), 56.1 (C-27), 13.5 (C-28), 16.7 (C-29), 28.2 (C-30), OAC: 171.2, 21.5。以上数据与文献报道^[17]基本一致,故鉴定化合物**2**为3 β ,21 α -山芝烯二醇-3-乙酰基。

化合物**3**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 525 $[M+$

$Na]^+$, 分子式 $C_{32}H_{54}O_4$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.42 (1H, dd, $J = 5.1, 11.5$ Hz, H-3), 3.36 (1H, brs, H-21), 0.90 (3H, s, H-23), 0.79 (3H, s, H-24), 0.79 (3H, s, H-25), 0.90 (3H, s, H-26), 0.90 (3H, s, H-28), 0.79 (3H, s, H-29), 0.81 (3H, s, H-30), 2.00 (3H, s, -COCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.2 (C-1), 23.8 (C-2), 81.0 (C-3), 37.8 (C-4), 55.7 (C-5), 18.8 (C-6), 44.7 (C-7), 37.8 (C-8), 59.2 (C-9), 38.0 (C-10), 22.2 (C-11), 25.3 (C-12), 60.8 (C-13), 76.1 (C-14), 44.9 (C-15), 25.2 (C-16), 49.0 (C-17), 38.2 (C-18), 38.3 (C-19), 28.1 (C-20), 76.2 (C-21), 38.6 (C-22), 25.7 (C-23), 16.4 (C-24), 16.6 (C-25), 22.5 (C-26), 61.7 (C-27), 15.7 (C-28), 18.6 (C-29), 28.4 (C-30), OAC: 171.2, 21.5。以上数据与文献报道^[18]基本一致,故鉴定化合物**3**为3-*O*-乙酰基千层塔三醇。

化合物**4**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 449 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{30}H_{50}O$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.16 (1H, dd, $J = 4.8, 11.3$ Hz, H-3), 0.94 (3H, s, H-23), 1.03 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 1.03 (3H, s, H-26), 0.78 (3H, s, H-27), 1.03 (3H, s, H-28), 4.65 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-29a), 4.56 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-29b), 1.68 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.8 (C-1), 27.6 (C-2), 79.2 (C-3), 39.0 (C-4), 55.4 (C-5), 18.5 (C-6), 34.4 (C-7), 40.1 (C-8), 50.6 (C-9), 37.3 (C-10), 22.8 (C-11), 25.3 (C-12), 38.2 (C-13), 43.0 (C-14), 27.6 (C-15), 35.7 (C-16), 43.1 (C-17), 48.1 (C-18), 48.4 (C-19), 151.1 (C-20), 30.0 (C-21), 41.0 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 16.3 (C-25), 16.1 (C-26), 14.7 (C-27), 18.1 (C-28), 109.5 (C-29), 21.1 (C-30)。以上数据与文献报道^[19]基本一致,故鉴定化合物**4**为20(29)-羽扇烯-3-醇。

化合物**5**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 461 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{30}H_{46}O_2$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.24 (1H, dd, $J = 4.4, 11.5$ Hz, H-3), 5.47 (1H, brd, $J = 5.8$ Hz, H-7), 5.31 (1H, brd, $J = 6.4$ Hz, H-11), 0.87 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 6.49 (1H, t, $J = 6.9$ Hz, H-24), 9.39 (1H, s, H-26), 1.71 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-28), 0.57 (3H, s, H-29), 0.87 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 35.8 (C-1), 28.1 (C-2), 79.1 (C-3), 38.8 (C-4), 49.2 (C-5), 23.1 (C-6), 120.5 (C-7), 142.6 (C-8), 146.1 (C-9), 37.5 (C-10), 116.3 (C-11), 37.9 (C-12), 44.0 (C-13), 50.4 (C-14), 31.6 (C-15), 27.9

(C-16), 51.0 (C-17), 15.8 (C-18), 22.9 (C-19), 36.3 (C-20), 18.4 (C-21), 34.9 (C-22), 26.2 (C-23), 155.7 (C-24), 139.2 (C-25), 195.6 (C-26), 9.3 (C-27), 28.3 (C-28), 15.9 (C-29), 25.7 (C-30)。以上数据与文献报道^[20]基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为赤芝醛 A。

化合物 **6**: 针状结晶 (氯仿), ESI-MS m/z : 477 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{30}H_{46}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, Pyr- d_5) δ : 3.51 (1H, dd, $J = 5.9, 9.7$ Hz, H-3), 5.61 (1H, brd, $J = 5.7$ Hz, H-7), 5.45 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-11), 0.70 (3H, s, H-18), 0.70 (3H, s, H-19), 1.17 (3H, d, $J = 5.7$ Hz, H-21), 7.26 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-24), 2.16 (3H, s, H-27), 1.25 (3H, s, H-28), 1.17 (3H, s, H-29), 1.04 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (125 MHz, Pyr- d_5) δ : 36.7 (C-1), 29.1 (C-2), 78.5 (C-3), 39.7 (C-4), 50.2 (C-5), 23.9 (C-6), 121.5 (C-7), 142.8 (C-8), 147.0 (C-9), 38.2 (C-10), 116.9 (C-11), 38.4 (C-12), 44.5 (C-13), 51.1 (C-14), 32.3 (C-15), 28.5 (C-16), 51.5 (C-17), 16.4 (C-18), 23.5 (C-19), 36.8 (C-20), 18.9 (C-21), 35.8 (C-22), 26.4 (C-23), 143.3 (C-24), 129.4 (C-25), 171.0 (C-26), 13.3 (C-27), 29.2 (C-28), 17.0 (C-29), 26.2 (C-30)。以上数据与文献报道^[21]基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为灵芝酸 Y。

化合物 **7**: 无定形粉末, ESI-MS m/z : 419 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{28}H_{44}O$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.16 (1H, m, H-7), 0.57 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 1.05 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 5.20 (1H, m, H-22), 5.24 (1H, m, H-23) 0.80 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26), 0.83 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 0.90 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-28); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.9 (C-1), 38.3 (C-2), 212.2 (C-3), 44.4 (C-4), 43.0 (C-5), 30.2 (C-6), 117.1 (C-7), 139.7 (C-8), 49.0 (C-9), 34.6 (C-10), 21.9 (C-11), 39.5 (C-12), 43.4 (C-13), 55.2 (C-14), 23.1 (C-15), 28.2 (C-16), 56.1 (C-17), 12.3 (C-18), 12.6 (C-19), 40.6 (C-20), 21.3 (C-21), 135.7 (C-22), 132.1 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献报道^[22]基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为麦角甾-7,22E-二烯-3-酮。

化合物 **8**: 橙黄色油状物, ESI-MS m/z : 415 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{28}H_{40}O$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.69 (1H, s, H-4), 5.99 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-6), 6.56 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-7), 0.81 (3H, s, H-18), 0.95 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-21), 5.19 (1H, dd, $J = 7.3, 15.3$ Hz, H-22), 5.21 (1H, dd,

$J = 8.1, 15.3$ Hz, H-23), 1.02 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 1.02 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 34.3 (C-1), 33.2 (C-2), 199.7 (C-3), 123.1 (C-4), 164.6 (C-5), 124.6 (C-6), 134.2 (C-7), 124.6 (C-8), 44.5 (C-9), 36.9 (C-10), 19.1 (C-11), 35.7 (C-12), 44.1 (C-13), 156.3 (C-14), 25.5 (C-15), 27.9 (C-16), 55.8 (C-17), 19.1 (C-18), 16.8 (C-19), 39.4 (C-20), 21.4 (C-21), 135.1 (C-22), 132.7 (C-23), 33.2 (C-24), 43.0 (C-25), 19.8 (C-27), 20.1 (C-26), 17.8 (C-28)。以上数据与文献报道^[23]基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为麦角甾-4,6,8(14),22E-四烯-3-酮。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 421 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{28}H_{46}O$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.55 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, m, H-7), 0.50 (3H, s, H-18), 0.75 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 5.16 (1H, overlap, H-22), 5.16 (1H, overlap, H-23), 0.87 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.78 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27), 0.97 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.2 (C-3), 38.1 (C-4), 40.4 (C-5), 29.8 (C-6), 117.6 (C-7), 139.7 (C-8), 49.6 (C-9), 34.4 (C-10), 21.7 (C-11), 39.6 (C-12), 43.4 (C-13), 55.2 (C-14), 23.1 (C-15), 28.2 (C-16), 56.1 (C-17), 12.2 (C-18), 13.2 (C-19), 40.6 (C-20), 21.3 (C-21), 135.8 (C-22), 132.0 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献报道^[24]基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为麦角甾-7,22E-二烯-3 β -醇。

化合物 **10**: 无色粉末, ESI-MS m/z : 451 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{28}H_{44}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.97 (1H, m, H-3), 6.24 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-6), 6.51 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-7), 0.81 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 5.16 (1H, dd, $J = 7.4, 15.3$ Hz, H-22), 5.20 (1H, dd, $J = 7.5, 15.3$ Hz, H-23), 0.82 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-26), 1.00 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-27), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 34.8 (C-1), 30.3 (C-2), 66.6 (C-3), 37.1 (C-4), 82.3 (C-5), 135.6 (C-6), 130.9 (C-7), 79.6 (C-8), 51.2 (C-9), 37.1 (C-10), 23.5 (C-11), 39.5 (C-12), 44.7 (C-13), 51.8 (C-14), 20.8 (C-15), 28.8 (C-16), 56.3 (C-17), 13.0 (C-18), 18.3 (C-19), 39.9 (C-20), 21.0 (C-21), 135.3 (C-22), 132.5 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8

(C-26), 20.1 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献报道^[25]基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 5 α , 8 α -过氧麦角甾-6, 22 E -二烯-3 β -醇。

化合物 **11**: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 168 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_8H_8O_4$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.90 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-3), 7.04 (1H, dd, $J = 2.0$, 7.6 Hz, H-4), 7.29 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.95 (3H, s, H-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 112.5 (C-1), 148.2 (C-2), 115.1 (C-3), 118.8 (C-4), 156.0 (C-5), 124.5 (C-6), 170.5 (C-7), 52.7 (C-8)。以上数据与文献报道^[26]基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为甲龙胆酸。

化合物 **12**: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 545 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{31}H_{38}O_7$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.78 (1H, dd, $J = 3.2$, 6.4 Hz, H-3), 6.17 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-5), 6.50 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-12), 0.90 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 4.73 (1H, brs, H-17a), 4.97 (1H, brs, H-17b), 1.21 (3H, s, H-18), 1.13 (3H, s, H-19), 1.68 (3H, s, H-20), 7.98 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-3', 7'), 7.41 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4', 6'), 7.54 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-5'), 1.67 (3H, s, 5-OAc), 2.17 (3H, s, 15-OAc); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 48.7 (C-1), 38.1 (C-2), 81.0 (C-3), 52.3 (C-4), 65.6 (C-5), 144.7 (C-6), 35.1 (C-7), 21.1 (C-8), 35.5 (C-9), 25.5 (C-10), 28.7 (C-11), 146.4 (C-12), 134.3 (C-13), 196.9 (C-14), 92.6 (C-15), 14.3 (C-16), 115.6 (C-17), 29.1 (C-18), 17.0 (C-19), 12.6 (C-20), 170.3, 21.1 (5-OAc), 169.2, 21.8 (OAc-15), 166.3 (C-1'), 129.8 (C-4', 6'), 128.5 (C-3', 7'), 130.2 (C-2'), 133.3 (C-5')。以上数据与文献报道^[27]基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为大戟因子 L3。

4 AChE 抑制活性

参照文献报道^[28]方法测定化合物对 AChE 的抑制活性。化合物 **1**、**2**、**3**、**5**、**6**、**11** 和 **12** 均用 DMSO 溶解, 制成待测样品 (50 $\mu g/mL$)。取 110 μL 磷酸缓冲液 (pH=8.0), 10 μL 待测样品和 40 μL AChE (0.02 $\mu g/mL$) 于 96 孔板中, 30 $^{\circ}C$ 下温育 20 min, 之后加入 DTNB (2.48 g/L) 和碘化硫代丁酰胆碱 (1.81 g/L) 等体积混合液 40 μL , 30 min 后, 405 nm 处酶标仪进行检测。阳性对照为他克林 (反应终浓度为 0.333 $\mu mol/L$), 阴性对照为 DMSO (终浓度为 0.1%), 实验重复 3 次。计算化合物对 AChE 的抑制率 $[(E-S)/E]$, E 为阴性对照平均吸光度值, S 为待测样品平均吸光度值。结果显示化合物 **5**、**11** 和 **12** 对 AChE 的抑制率分别为 17.70%、22.89%和

21.22%, 具有一定的抑制活性。

参考文献

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究 [M]. 第 3 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2007.
- [2] 刘佳, 王勇. 灵芝多糖的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 629-634.
- [3] Russell R, Paterson M. *Ganoderma*-A therapeutic fungal biofactory [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(50): 1985-2001.
- [4] Aryantha I N P, Adinda A, Kusmaningati S. Occurrence of triterpenoids and polysaccharides on *Ganoderma tropicum* with *Ganoderma lucidum* as reference [J]. *Aust Mycol*, 2002, 20(3): 123-129.
- [5] Yan Y M, Ai J, Zhou L L, et al. Lingzhiols, unprecedented rotary door-shaped meroterpenoids as potent and selective inhibitors of p-Smad3 from *Ganoderma lucidum* [J]. *Org Lett*, 2013, 15(21): 5488-5491.
- [6] Ma J Y, Ye Q, Hua Y J, et al. New lanostanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(1): 72-75.
- [7] 陈静, 夏永辉, 梁玲, 等. 灵芝有效成分生物活性作用的研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(1): 61-62.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [9] Quik M, Wonnacott S. $\alpha 6\beta 2^*$ and $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for Parkinson's disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(4): 938-966.
- [10] 吴兴亮, 戴玉成. 中国灵芝图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [11] 吴兴亮, 卯晓兰, 图力古尔, 等. 中国药用真菌 [M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [12] Ma Q Y, Luo Y, Huang S Z, et al. Lanostane triterpenoids with cytotoxic activities from the fruiting bodies of *Ganoderma hainanense* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(11): 1214-1219.
- [13] Huang S Z, Cheng B H, Ma Q Y, et al. Anti-allergic prenylated hydroquinones and alkaloids from the fruiting body of *Ganoderma calidophilum* [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(25): 21139-21147.
- [14] Peng X R, Liu J Q, Wan L S, et al. Four new polycyclic meroterpenoids from *Ganoderma cochlear* [J]. *Org Lett*, 2014, 16(20): 5262-5265.
- [15] Zhang S S, Ma Q Y, Huang S Z, et al. Lanostanoids with acetylcholinesterase inhibitory activity from the mushroom *Haddowia longipes* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 110(2): 133-139.
- [16] 罗迎春, 李奇激, 杨元凤, 等. 黔产千层塔化学成分研

- 究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3172-3173.
- [17] 李齐激, 王 冲, 李继新, 等. 雷山石杉的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(7): 550-553.
- [18] Tong X T, Tan C H, Zhou H, *et al.* Triterpenoid constituents of *Huperzia miyoshiana* [J]. *Chin J Chem*, 2003, 21(10): 1364-1368.
- [19] Reynolds W F, Mclean S, Poplawski J, *et al.* Total assignment of ^{13}C and ^1H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigations of complex natural products [J]. *Tetrahedron*, 1986, 42(13): 3419-3428.
- [20] Toth J O, Luu B, Ourisson G. Les acides ganoderiques táz: triterpenes cytotoxiques de *Ganoderma lucidum* (Polyporacée) [J]. *Tetrahedr Lett*, 1983, 24(10): 1081-1084.
- [21] Gao J J, Min B S, Ahn E M, *et al.* New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(6): 837-840.
- [22] Zhou W W, Guo S X. Components of the sclerotia of *Polyporus umbellatus* [J]. *Chem Nat Comp*, 2009, 45(1): 124-125.
- [23] 蔡庆秀, 赵金浩, 王佳莹, 等. 辣木内生真菌 LM033 的分离鉴定及其代谢产物抗植物病原菌活性 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(18): 2168-2173.
- [24] Alejandro F, Barrero J, Enrique O, *et al.* Phycomysterols and other sterols from the fungus *Phycomyces blakesleeianus* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(12): 1491-1496.
- [25] Simona H, Jan S, Martin D, *et al.* Chemical constituents of *stereum subtomentosum* and two other birch-associated basidiomycetes: an interspecies comparative study [J]. *Chem Biodiver*, 2008, 5(5): 743-750.
- [26] 杨 爽, 马青云, 黄圣卓, 等. 橡胶灵芝化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 1034-1039.
- [27] Giovanni A, Gian C T, Giancarlo C, *et al.* An expeditious procedure for the isolation of jngenol from the seeds of *Euphorbia lathyris* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(1): 76-79.
- [28] Li W, Cai C H, Guo Z K, *et al.* Five new eudesmane-type sesquiterpenoids from Chinese agarwood induced by artificial holing [J]. *Fitoterapia*, 2015, 100(3): 44-49.