

拟鹿角灵芝子实体的化学成分研究

董观海¹, 马青云², 杨理², 谢晴宜², 戴好富³, 吴友根^{1*}, 赵友兴^{2*}

1. 海南大学园艺学院, 海南 海口 570228

2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口市热带天然产物研究与利用重点实验室, 海南 海口 571101

3. 中国热带农业科学院海南热带农业资源研究院, 海南 海口 571101

摘要: 目的 为研究拟鹿角灵芝 *Ganoderma amboinense* 中的化学成分及其生理活性。方法 采用各种柱色谱与高效液相色谱相结合的方法进行分离纯化, 通过光谱分析 (UV、IR、HR-ESI-MS 及 1D、2D-NMR) 鉴定了它们的结构; 采用四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 法及 4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, PNPG) 法测定化合物的体外抗肿瘤活性以及 α -糖苷酶抑制活性。结果 从拟鹿角灵芝子实体的乙醇提取物中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为 lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24-methoxy-25,26-dihydroxy (1)、赤芝萜醇 B (2)、灵芝萜酮二醇 (3)、11-oxo-赤芝二醇 (4)、lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24,26-dihydroxy-25-methoxy (5)、灵芝醇 B (6)、灵芝醇 A (7)、3 α -acetyloxy-15 α -hydroxylanosta-7,9(11),24E-trien-26-oic acid (8)、(24S,25R)-25-methoxylanosta-7,9(11)-dien-3 β ,24,26-triol (9)、灵芝醇 F (10)。化合物 1~5 对 α -糖苷酶的抑制率分别为 86.0%、50.8%、52.8%、76.9% 和 88.0%; 化合物 7 对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制率分别为 57.9%, 化合物 5 对人胃癌 SGC-7901 细胞抑制率为 67.2%。结论 所分离鉴定的化合物均为灵芝三萜类结构, 所有化合物均为首次从拟鹿角灵芝种中分离得到, 其中化合物 1 为新化合物, 命名为拟鹿角灵芝醇 A。化合物 1~5 对 α -糖苷酶有一定抑制活性, 化合物 7 和 5 有较弱的肿瘤细胞毒活性。

关键词: 拟鹿角灵芝; 三萜; 抗肿瘤活性; α -糖苷酶抑制活性; 赤芝萜醇 B; 灵芝醇 A; 拟鹿角灵芝醇 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)02-0334-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.002

Chemical constituents from fruiting bodies of *Ganoderma amboinense*

DONG Guan-hai¹, MA Qing-yun², YANG Li², XIE Qing-yi², DAI Hao-fu³, WU You-gen¹, ZHAO You-xing²

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

2. Haikou Key Laboratory for Research and Utilization of Tropical Natural Products, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

3. Hainan Academy of Tropical Agricultural Resource, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents and physiological activities of *Ganoderma amboinense*. **Methods** Various methods of column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) were used for separation and purification, and their structures were identified by spectral analysis (UV, IR, HRESIMS, 1D, 2DNMR). The *in vitro* antitumor activity and α -glycosidase inhibitory activity of the compounds were determined by MTT assay and PNPG assay, respectively. **Results** Ten compounds were isolated from the ethanol extract of *G. amboinense* fruiting body, which were identified as lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24-methoxy-25,26-dihydroxy (1), lucidumol B (2), ganodermanondiol (3), 11-oxo-lucidadiol (4), lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24,26-dihydroxy-25-methoxy (5), ganoderiol B (6), ganoderiol A (7), 3 α -acetyloxy-15 α -hydroxylanosta-7,9(11),24E-trien-26-oic acid (8), (24S,25R)-25-methoxylanosta-7,9(11)-dien-3 β ,24,26-triol (9), ganoderiol F (10). Compounds 1—5 had inhibitory activities on α -glucosidase with inhibitory rates of 86.0%, 50.8%, 52.8%, 76.9% and 88.0%.

收稿日期: 2021-08-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973568); 海南省自然科学基金资助项目 (219MS078); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-21); 农业农村部财政专项项目 (NFZX2021)

作者简介: 董观海 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。Tel: 17889980573 E-mail: 19095131210095@hainanu.edu.cn

***通信作者:** 赵友兴, 男, 博士, 研究员。Tel: (0898) 66989095 E-mail: zhaoyx1011@163.com

吴友根, 男, 博士, 教授。Tel: 13637640969 E-mail: wygeng2003@163.com

respectively. Compound 7 had inhibitory effect on human cervical cancer HeLa cells with inhibitory rate of 57.9% and compound 5 showed inhibitory rate of 67.2% on human gastric cancer SGC-7901 cells. **Conclusion** All isolates were ganoderma triterpenoids and were isolated from *G. amboinense* for the first time. Compound 1 is a new compound named amboinenol A. Five compounds (1—5) have definite inhibitory activities on α -glucosidase and two compounds (7 and 5) showed weak cytotoxicities.

Key words: *Ganoderma amboinense* (Lam. : Fr.); triterpenoids; antitumor activity; α -glucosidase inhibitory activity; lucidumol B; ganoderiol A; amboinenol A

灵芝是我国常见的药食两用的真菌，迄今已有上千年的用药历史^[1]，诸多研究报道显示灵芝的代谢产物主要有三萜、多糖、脂肪酸、生物碱、甾体及氨基酸等^[2-4]，具有抗肿瘤、抗炎、降血压、护肝、抗结核、肾脏保护、免疫调节、抗氧化、神经保护、抗纤维化及抗肥胖^[5-13]等多种药理活性功能。

拟鹿角灵芝 *Ganoderma amboinense* (Lam. : Fr.) 为灵芝科 (Ganodermataceae) 灵芝属 *Ganoderma* P. Karst 大型真菌，其子实体 1 年生，有柄，木栓质，菌盖近匙形、半圆形或不规则形，往往不形成菌盖，其表面紫褐色、黑紫色或黑色，有似漆样光泽或较弱，常生于阔叶林中地下腐木下，国内主要分布于海南、贵州、云南等省份，国外分布于日本、印度尼西亚、菲律宾等地^[14]。有关拟鹿角灵芝的报道较少，已有研究发现，拟鹿角灵芝中的多糖 GAP 具有良好的抗氧化和使细胞伤口愈合的能力^[15-16]，并能够预防对乙酰氨基酚引起的急性肝损伤，同时降

低体质量、肝脏质量和血脂水平^[17-18]；拟鹿角灵芝中灵芝三萜 (ganoderiol F、ganoderic acid X) 具有诱导肝癌细胞衰老凋亡的效果^[19-20]。本研究中拟鹿角灵芝是海南省主要野生灵芝种类之一，在民间已被广泛使用，为深入认识该热区灵芝种类的化学成分，发现更为广泛的药理活性诠释其药用价值，本研究利用乙醇提取拟鹿角灵芝中的化合物，运用硅胶柱、反相柱等多种色谱分离技术结合半制备高效液相色谱方法从提取物中分离得到 10 个化合物，通过 NMR 等光谱分析技术将化合物的结构 (图 1) 分别鉴定为 lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24-methoxy-25,26-dihydroxy (1)、赤芝萜醇 B (lucidumol B, 2)、灵芝萜酮二醇 (ganodermanondiol, 3)、11-oxo-赤芝二醇 (11-oxo-lucidadiol, 4)、lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24,26-dihydroxy-25-methoxy (5)、灵芝醇 B (ganoderiol B, 6)、灵芝醇 A (ganoderiol A, 7)、3 α -acetyloxy-15 α -hydroxylanosta-7,9(11),24E-

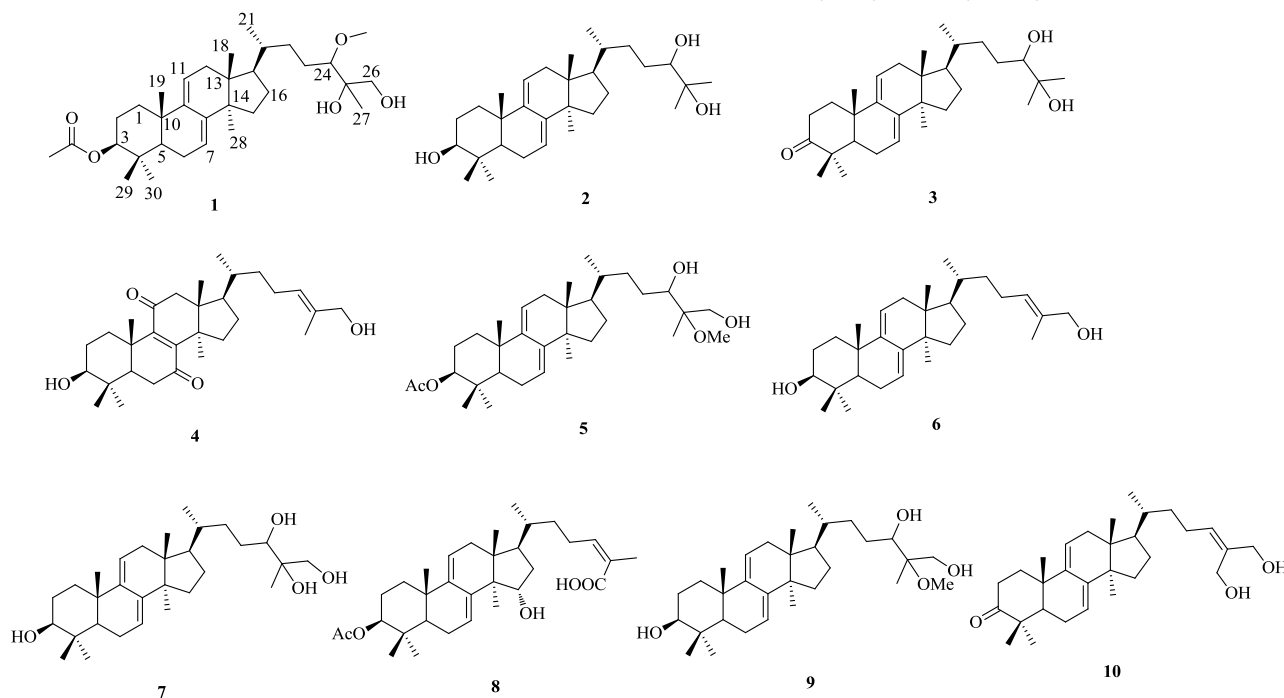


图 1 化合物 1~10 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—10

trien-26-oic acid (8)、(24S,25R)-25-methoxylanosta-7,9(11)-dien-3 β ,24,26-triol (9)、灵芝醇 F (ganoderiol F, 10), 其中化合物 1 为新化合物, 命名为拟鹿角灵芝醇 A。对所有化合物进行抗肿瘤以及 α -糖苷酶抑制活性的测试, 结果显示化合物 1~5 对 α -糖苷酶有一定抑制活性, 化合物 7 和 5 具有较弱的肿瘤细胞毒活性。

1 仪器与材料

Autospec 3000 质谱仪和 Bruker AV-500/600 核磁共振仪 (Bruker 公司); Agilent Technologies 1260 安捷伦分析型高效液相色谱仪 (美国 Agilent Technologies); SUMMIT p680A 戴安半制备型高效液相色谱仪 (美国 DIONEX 公司); ELX-800 酶标仪 (美国宝特公司); HH.CP-01w-II 二氧化碳培养箱 (上海慧泰仪器制造有限公司); 反相硅胶 C₁₈ (Fuji Silysia Chemical Co., Ltd.); 薄层色谱硅胶板 GF₂₅₄ (青岛海洋化工公司); Sephadext LH-20 (General Electric Co.); 硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工); 4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG) 和 α -糖苷酶 (Sigma Chemical 公司); RPMI 1640 培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS) 和四甲基偶氮唑盐 (MTT), 北京欣经科公司; 人慢性髓系白血病 K562 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞和人胃癌 SGC-7901 细胞 (中国科学院上海生命科学研究院); 人肺癌 A549 细胞和人宫颈癌 HeLa 细胞 (中南大学实验动物中心细胞库); 金雀异黄酮 (批号 RO16939, 上海易恩化学技术有限公司); 顺铂 (批号 S31072, 上海源叶生物科技有限公司)。

拟鹿角灵芝于 2019 年 6 月采自海南岛五指山自然保护区, 经海南医学院曾念开教授鉴定为灵芝科灵芝属拟鹿角灵芝 *G. amboinense* (Lam.: Fr.), 凭证标本 (2019NLJLZ01) 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

取拟鹿角灵芝干样 6 kg 并将样品粉碎, 用 95% 乙醇 (10 L) 于 100 °C 沸水中回流提取 3 次, 每次 3 h。将 3 次所得的浸提液合并后用旋转薄膜蒸发器, 最终得到拟鹿角灵芝粗浸膏约 150 g。粗浸膏经硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (10:1 $\rightarrow$ 0:1) 为洗脱剂进行梯度洗脱, 并分段收集, 通过薄层色谱以及高效液相色谱仪检测分析, 合并得到 13 个组分 Fr. 1~13。Fr. 5 (5.6 g) 经 ODS 色谱柱, 以甲醇 (30%~90%) 为洗脱剂进行梯度洗脱, 结合半制备

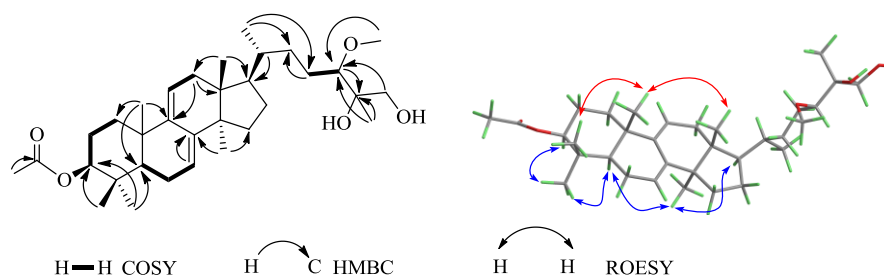
高效液相色谱仪, 以 90% 甲醇为流动相, 得到化合物 6 (22.1 mg)。Fr. 8 (9.2 g) 经 ODS 柱 (20%~80% 乙腈-水梯度洗脱), 液相分析后合并得到 5 个组分: Fr. 8-2 以 70% 乙腈-酸水 (0.1% 甲酸水溶液) 为流动相, 经半制备高效液相色谱仪分离得到化合物 1 (10.5 mg); Fr. 8-3 经高效液相分析后以 75% 乙腈-酸水 (0.1% 甲酸溶液) 为洗脱剂, 使用半制备高效液相色谱仪分离得到化合物 2 (9.6 mg) 和 3 (5.4 mg); Fr. 8-5 经半制备高效液相色谱仪 (75% 乙腈) 分离得到化合物 7 (1.5 mg)。Fr. 9 (22.1 g) 采用正相硅胶色谱柱, 以石油醚-醋酸乙酯 (6:1 $\rightarrow$ 4:1) 梯度洗脱, 薄层色谱分析后合并, 得到 9 个组分: Fr. 9-2 通过高效液相分析, 以 85% 甲醇为流动相, 制备得到化合物 4 (3 mg); Fr. 9-4 采用半制备高效液相色谱分离 (80% 乙腈), 得到化合物 5 (105.7 mg); Fr. 9-8 经半制备高效液相色谱仪分离 (80%、70% 乙腈), 得到化合物 8 (5.5 mg)。Fr. 10 (15.5 g) 经 ODS 柱洗脱 (30%~90% 甲醇), 采用薄层色谱技术进行合并, 得到的 Fr. 10-D 经高效液相分析后, 使用半制备高效液相色谱仪 (65% 乙腈为流动相) 分离得到化合物 9 (4.9 mg) 和 10 (2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, $[\alpha]_D^{25} + 62.999^\circ$ (c 0.1, MeOH), HR-ESI-MS m/z 在 575.395 7 (理论值 575.395 3) 处给出 $[M+HCOO]^-$, 提示分子式为 C₃₃H₅₄O₅, 不饱和度为 7。UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 191 (1.03), 201 (2.55), 245 (3.17); ECD (0.655 mmol/L, MeOH) λ_{max} : 196 (-1.65), 198 (-0.89), 200 (-1.15), 244 (+5.90), 267 (-0.08) nm。红外光谱显示, 化合物 1 含有羟基 (3414 cm⁻¹)、酯基 (1716 cm⁻¹) 与双键 (1646 cm⁻¹)。13C-NMR、DEPT (表 1) 和 HSQC 谱图表明该化合物具有羊毛甾烷型三萜骨架。13C-NMR 谱图显示了 33 个碳信号, 含有 1 个乙酰基 (δ_C 171.2、21.5)、1 个甲氧基 (δ_C 61.3)、9 个 sp³ 亚甲基 (1 个连羟基)、7 个次甲基 (2 个双键, 1 个连乙酰基)、7 个季碳 (2 个双键, 1 个碳氧双键) 以及 7 个甲基。化合物 1 的 NMR 数据与文献报道^[21]的化合物 lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24,25,26-trihydroxy 非常相似, 区别仅在于文献中化合物的 C-24 位上羟基信号在化合物 1 中被甲氧基 (δ_{CH} 61.3/3.51) 所取代。1H-1H COSY 谱 (图 2) 中相关点 H-23/H-24 以及 HMBC 谱 (图 2) 中 H-OMe 与 C-24 相关表明化合物 1 的甲氧基连在 C-24 位。化合物 1 中四环

表 1 化合物 1 的 ^1H -和 ^{13}C -NMR (600/150 MHz, CDCl_3) 数据Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR data for compound 1 (600/150 MHz, CDCl_3)

碳位	δ_{H}	δ_{C} (DEPT)	碳位	δ_{H}	δ_{C} (DEPT)
1a	1.98 (m)	35.5 (t)	16b	1.39 (m)	
1b	1.52 (m)		17	1.58 (m)	51.1 (d)
2a	1.72 (m)	24.4 (t)	18	0.56 (s)	15.8 (q)
2b			19	1.00 (s)	23.0 (q)
3	4.51 (dd, $J = 11.6, 4.4$ Hz)	80.9 (d)	20	1.41 (m)	36.6 (d)
4		37.7 (s)	21	0.90 (d, $J = 6.4$ Hz)	18.4 (q)
5	1.18 (dd, $J = 10.6, 5.0$ Hz)	49.3 (d)	22a	1.20 (m)	33.6 (t)
6a	2.08 (m)	22.9 (t)	22b	1.51 (m)	
6b			23a	1.53 (m)	28.2 (t)
7	5.46 (m)	120.1 (d)	23b	1.30 (m)	
8		142.7 (s)	24	3.14 (m)	89.1 (d)
9		145.7 (s)	25		74.5 (s)
10		37.3 (s)	26	3.78 (d, $J = 11.2$ Hz)	67.7 (t)
11	5.31 (d, $J = 6.3$ Hz)	116.6 (d)	26	3.36 (d, $J = 11.1$ Hz)	
12a	2.21 (d, $J = 17.6$ Hz)	37.9 (t)	27	1.09 (s)	21.0 (q)
12b	2.11 (m)		28	0.89 (s)	25.6 (q)
13		43.8 (s)	29	0.95 (s)	17.1 (q)
14		50.4 (s)	30	0.88 (s)	28.2 (q)
15a	1.61 (m)	31.5 (t)	OMe	3.51 (s)	61.3 (q)
15b	1.40 (m)		OAc	2.06 (s)	171.2 (s)
16a	2.01 (m)	28.1 (t)			21.5 (q)

图 2 化合物 1 的 ^1H - ^1H COSY、HMBC 和 ROESY 关键相关信号Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY, HMBC and ROESY correlations of compound 1

三萜骨架具有与 lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24,25,26-trihydroxy 相同的相对构型, ROESY 谱图中 (图 2) 关键相关点 H_3 -29/ H_3 -19/ H_3 -18、 H -5/ H_3 -30/ H -3、 H_3 -28/ H -17 确定了其相对构型。基于以上分析, 化合物 1 被鉴定为 1 个新的三萜类化合物 lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24-methoxy-25,26-dihydroxy, 命名为拟鹿角灵芝醇 A。

化合物 2: 白色粉末。ESI-MS m/z : 459.3 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3)

δ : 3.25 (1H, dd, $J = 11.6, 4.3$ Hz, H-3), 5.47 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-7), 5.31 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-11), 0.56 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 3.29 (1H, dd, $J = 10.2, 2.0$ Hz, H-24), 1.16 (3H, s, H-26), 1.22 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-28), 0.88 (6H, s, H-30, 29); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 35.8 (C-1), 28.0 (C-2), 79.1 (C-3), 38.8 (C-4), 49.2 (C-5), 23.1 (C-6), 120.4 (C-7), 142.7 (C-8), 146.0 (C-9), 37.5 (C-10), 116.4 (C-11), 37.9 (C-12), 43.9

(C-13), 50.4 (C-14), 31.6 (C-15), 27.9 (C-16), 51.1 (C-17), 15.8 (C-18), 22.9 (C-19), 36.7 (C-20), 18.8 (C-21), 33.6 (C-22), 28.8 (C-23), 79.7 (C-24), 73.4 (C-25), 23.3 (C-26), 26.7 (C-27), 25.7 (C-28), 15.9 (C-29), 28.3 (C-30)。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 **2** 为赤芝萜醇 B。

化合物 **3**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 457.2 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.38 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-7), 5.50 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-11), 0.59 (3H, s, H-18), 1.08 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 3.30 (1H, dd, $J = 10.2, 2.0$ Hz, H-24), 1.17 (3H, s, H-26), 1.20 (3H, s, H-27), 0.87 (3H, s, H-28), 1.13 (3H, s, H-29), 1.22 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 36.7 (C-1), 35.0 (C-2), 217.1 (C-3), 47.6 (C-4), 50.4 (C-5), 23.8 (C-6), 120.1 (C-7), 143.0 (C-8), 144.6 (C-9), 37.9 (C-10), 117.4 (C-11), 37.3 (C-12), 43.9 (C-13), 50.8 (C-14), 28.8 (C-15), 28.0 (C-16), 51.1 (C-17), 15.9 (C-18), 22.6 (C-19), 36.7 (C-20), 18.8 (C-21), 31.6 (C-22), 33.6 (C-23), 79.7 (C-24), 73.4 (C-25), 25.6 (C-26), 25.5 (C-27), 23.3 (C-28), 22.2 (C-29), 26.7 (C-30)。以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 **3** 为灵芝萜酮二醇。

化合物 **4**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 471.3 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{46}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.27 (1H, dd, $J = 11.4, 4.7$ Hz, H-3), 0.80 (3H, s, H-18), 1.30 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 5.44 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-24), 4.45 (2H, s, H-26), 1.65 (3H, s, H-27), 1.02 (3H, s, H-28), 0.88 (3H, s, H-29), 1.17 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 34.1 (C-1), 27.7 (C-2), 77.7 (C-3), 38.9 (C-4), 50.2 (C-5), 36.5 (C-6), 202.2 (C-7), 150.7 (C-8), 151.8 (C-9), 39.8 (C-10), 202.5 (C-11), 51.7 (C-12), 48.9 (C-13), 47.4 (C-14), 32.2 (C-15), 27.4 (C-16), 49.1 (C-17), 16.8 (C-18), 17.58 (C-19), 35.9 (C-20), 18.5 (C-21), 36.1 (C-22), 24.8 (C-23), 124.8 (C-24), 131.3 (C-25), 70.47 (C-26), 14.11 (C-27), 25.9 (C-28), 15.5 (C-29), 27.9 (C-30); 以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **4** 为 11-oxo-lucidadiol。

化合物 **5**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 531.4 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{33}H_{54}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.50 (1H, dd, $J = 11.6, 4.4$ Hz, H-3), 5.31 (1H, d,

$J = 6.3$ Hz, H-7), 5.45 (1H, dd, $J = 5.4, 2.9$ Hz, H-11), 0.56 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 3.57 (1H, dd, $J = 10.6, 1.9$ Hz, H-24), 3.71 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-26a), 3.61 (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H-26b), 1.03 (3H, s, H-27), 0.88 (3H, s, H-28), 0.94 (3H, s, H-29), 0.87 (3H, s, H-30), 2.05 (3H, s, OAc), 3.31 (3H, s, OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 35.6 (C-1), 24.4 (C-2), 81.0 (C-3), 37.8 (C-4), 49.4 (C-5), 23.0 (C-6), 120.1 (C-7), 142.9 (C-8), 145.8 (C-9), 37.4 (C-10), 116.7 (C-11), 38.0 (C-12), 43.9 (C-13), 50.5 (C-14), 31.6 (C-15), 28.0 (C-16), 51.2 (C-17), 15.8 (C-18), 22.9 (C-19), 36.7 (C-20), 18.8 (C-21), 33.8 (C-22), 28.4 (C-23), 77.1 (C-24), 78.6 (C-25), 64.5 (C-26), 16.0 (C-27), 25.7 (C-28), 17.1 (C-29), 28.2 (C-30), 21.5 (CH₃-OAc), 171.1 (CO-OAc), 49.5 (CH₃-OMe)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **5** 为 lanosta-7,9(11)-dien-3 β -acetyloxy-24,26-dihydroxy-25-methoxy。

化合物 **6**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 441.3 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{48}O_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.25 (1H, dd, $J = 11.6, 4.3$ Hz, H-3), 5.47 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11), 5.31 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7), 0.56 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 5.40 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-24), 4.00 (2H, s, H-26), 1.67 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-29), 0.88 (6H, s, H-28, 30); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 35.8 (C-1), 28.3 (C-2), 79.1 (C-3), 38.8 (C-4), 50.4 (C-5), 23.1 (C-6), 120.4 (C-7), 142.8 (C-8), 146.0 (C-9), 37.5 (C-10), 116.4 (C-11), 37.9 (C-12), 43.9 (C-13), 49.2 (C-14), 31.6 (C-15), 28.1 (C-16), 51.0 (C-17), 15.8 (C-18), 22.9 (C-19), 36.2 (C-20), 18.5 (C-21), 36.1 (C-22), 24.7 (C-23), 127.2 (C-24), 134.5 (C-25), 69.3 (C-26), 13.8 (C-27), 25.7 (C-28), 15.9 (C-29), 27.9 (C-30)。以上数据与文献报道一致^[24], 故鉴定化合物 **6** 为灵芝醇 B。

化合物 **7**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 475.1 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{50}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.25 (1H, dd, $J = 11.5, 4.3$ Hz, H-3), 5.48 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7), 5.31 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11), 0.57 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-21), 3.50 (1H, m, H-24), 3.89 (2H, d, $J = 11.2$ Hz, H-26), 1.24 (3H, s, H-27), 0.88 (6H, s, H-28, 30), 0.98 (3H, s, H-29); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ :

35.9 (C-1), 23.2 (C-2), 79.1 (C-3), 38.9 (C-4), 49.3 (C-5), 28.1 (C-6), 120.4 (C-7), 142.8 (C-8), 146.1 (C-9), 37.5 (C-10), 116.4 (C-11), 38.0 (C-12), 43.9 (C-13), 50.5 (C-14), 31.6 (C-15), 28.0 (C-16), 51.1 (C-17), 16.0 (C-18), 22.9 (C-19), 35.7 (C-20), 18.5 (C-21), 33.9 (C-22), 28.7 (C-23), 67.5 (C-24), 75.1 (C-25), 67.8 (C-26), 19.1 (C-27), 25.7 (C-28), 15.8 (C-29), 28.3 (C-30)。以上数据与文献报道一致^[25], 故鉴定化合物 **7** 为灵芝醇 A。

化合物 **8**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 513.3 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{32}H_{48}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.51 (1H, dd, $J = 11.7, 4.3$ Hz, H-3), 5.85 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-7), 5.31 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-11), 4.28 (1H, dd, $J = 9.7, 5.8$ Hz, H-15), 0.61 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 6.87 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-24), 1.84 (3H, s, H-27), 0.95 (3H, s, H-28), 0.93 (3H, s, H-29), 0.88 (3H, s, H-30), 2.06 (3H, s, OAc); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 35.6 (C-1), 24.4 (C-2), 80.9 (C-3), 37.7 (C-4), 49.2 (C-5), 22.9 (C-6), 121.3 (C-7), 140.9 (C-8), 146.0 (C-9), 37.4 (C-10), 116.3 (C-11), 38.6 (C-12), 52.1 (C-13), 44.5 (C-14), 74.8 (C-15), 40.2 (C-16), 48.9 (C-17), 16.1 (C-18), 23.1 (C-19), 36.1 (C-20), 18.4 (C-21), 34.9 (C-22), 26.0 (C-23), 145.2 (C-24), 127.1 (C-25), 172.6 (C-26), 12.2 (C-27), 17.3 (C-28), 17.1 (C-29), 28.2 (C-30) 171.2 (CO-OAc), 21.5 (CH_3 -OAc)。以上数据与文献报道一致^[26], 故鉴定化合物 **8** 为 3α -acetyloxy- 15α -hydroxy lanosta-7,9(11), 24E-trien-26-oic acid。

化合物 **9**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 489.3 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{31}H_{52}O_4$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.25 (1H, m, H-3), 5.47 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-7), 5.31 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11), 0.57 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 3.57 (1H, m, H-24), 3.72 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-26a), 3.62 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-26b), 1.03 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-28), 0.88 (6H, s, H-29, 30), 3.32 (3H, s, OMe); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 35.9 (C-1), 28.4 (C-2), 79.1 (C-3), 38.9 (C-4), 49.3 (C-5), 23.2 (C-6), 120.4 (C-7), 142.8 (C-8), 146.1 (C-9), 37.5 (C-10), 116.4 (C-11), 38.0 (C-12), 43.9 (C-13), 50.5 (C-14), 31.6 (C-15), 28.0 (C-16), 51.2 (C-17), 15.8 (C-18), 22.9 (C-19), 36.7 (C-20), 18.8 (C-21), 33.8

(C-22), 28.0 (C-23), 77.0 (C-24), 78.6 (C-25), 64.5 (C-26), 16.0 (C-27), 25.7 (C-28), 16.1 (C-29), 28.3 (C-30), 49.5 (OMe); 以上数据与文献报道一致^[27], 鉴定化合物 **9** 为 (24S,25R)-25-methoxy lanosta-7,9(11)-dien-3 β ,24,26-triol。

化合物 **10**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 455.2 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{46}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.55 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-24), 5.50 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-7), 5.38 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-11), 4.33 (2H, s, H-27), 4.22 (2H, s, H-26), 1.20 (3H, s, H-19), 1.12 (3H, s, H-28), 1.08 (3H, s, H-29), 0.91 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.87 (3H, s, H-30), 0.59 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 36.2 (C-1), 35.0 (C-2), 217.0 (C-3), 47.6 (C-4), 50.9 (C-5), 23.8 (C-6), 120.1 (C-7), 143.0 (C-8), 144.7 (C-9), 37.4 (C-10), 117.4 (C-11), 38.0 (C-12), 43.9 (C-13), 50.5 (C-14), 31.6 (C-15), 28.1 (C-16), 51.0 (C-17), 15.9 (C-18), 22.6 (C-19), 36.2 (C-20), 18.5 (C-21), 36.8 (C-22), 24.5 (C-23), 131.9 (C-24), 136.9 (C-25), 67.9 (C-26), 60.3 (C-27), 25.6 (C-28), 22.2 (C-29), 25.5 (C-30); 以上数据与文献报道一致^[28], 鉴定化合物 **10** 为灵芝醇 F。

4 活性测试

4.1 细胞毒活性测定

使用 MTT 法^[29]测定化合物 **1~10** 的 5 种抗肿瘤细胞株活性 (K562 细胞、BEL-7402 细胞、SGC-7901 细胞、A549 细胞及 HeLa 细胞)。将待测化合物溶于 DMSO 中, 并配制成质量浓度为 20 mg/mL 的待测溶液。取 1 mL 细胞液加入到 10 mL 培养基中复苏培养, 用含 10% 胎小牛血清的培养液配制为单个细胞悬液, 将混匀的各细胞悬液接种至无菌 96 孔板, 每孔接种 100 μ L, 在 37 $^{\circ}C$ 、5.0% CO_2 条件下培养。将待测溶液稀释至 2 mg/mL, 加入至 96 孔板中进行活性测试, 每个处理设 3 个复孔, 阳性对照组为顺铂, 并设空白组 (培养基 + 10% DMSO)、阴性对照组 (细胞液 + 10% DMSO)。37 $^{\circ}C$ 培养 48 h 后, 每孔加入 20 μ L (pH 7.4) 的 MTT 溶液, 继续孵育 4 h 后, 终止培养, 小心吸取摒弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μ L 的 DMSO。在 490 nm 下测定每个孔吸光度 (A), 根据公式 [抑制率 = $(A_{\text{阴性}} - A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}})$] 计算化合物的抑制率。结果显示, 在终浓度 200 μ mol/L, 化合物 **7** 对 HeLa 细胞的抑制率为 57.9% (阳性对照

顺铂在终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率为 98.2%), 化合物 5 对 SGC-7901 细胞抑制率为 67.2% (阳性对照顺铂在终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率为 97.8%), 其他化合物没有明显的肿瘤细胞毒活性。

4.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

采用 PNPG 法对化合物 1~10 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行测定^[31]。阴性对照为 DMSO 溶液, 阳性对照为金雀异黄酮溶液。实验前配制 pH 6.8 的 0.1 mol/L PBS 溶液作为反应溶液, 用 0.1 mol/L 的 PBS 溶液配制 0.2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液、2.5 mmol/L 的 PNPG 溶液。将实验组 (10 μL 2 mg/mL 待测样品溶液+100 μL PBS 溶液溶解的 0.2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液)、阴性对照组 (10 μL DMSO+100 μL PBS 溶液溶解的 0.2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液)、阳性对照组 (10 μL 金雀异黄酮溶液+100 μL PBS 溶液溶解的 0.2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液) 和空白对照 (10 μL DMSO+100 μL PBS 溶液溶解的 0.2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液) 各组所需溶液混匀于 96 孔板后, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱放置 15 min, 各组加入 PNPG 溶液 40 μL (空白对照加入 40 μL PBS 溶液), 再将 96 孔板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱放置 15 min, 实验重复 3 次。用酶标仪在 405 nm 波长下测量各孔 A 值, 根据公式 [抑制率=($A_{\text{阴性}}-A_{\text{样品}}$)/($A_{\text{阴性}}-A_{\text{空白}}$)] 计算化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率。结果显示化合物 1~5 对 α -糖苷酶有一定抑制活性, 在终浓度为 265 $\mu\text{mol/L}$ 抑制率分别为 86.0%、50.8%、52.8%、76.9% 和 88.0% (阳性对照金雀异黄酮在终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率为 85%)。

5 讨论

本实验通过多种色谱分离技术对拟鹿角灵芝子实体的化学成分进行分离纯化, 得到 10 个灵芝三萜类化合物 (1~10), 其中化合物 1 为新的三萜, 对 10 个化合物进行了肿瘤细胞毒活性以及 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定, 测试结果显示所供试化合物中 5 个化合物 (1~5) 具有一定的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 2 个化合物对人宫颈癌与胃癌细胞显示了较弱的细胞毒活性。灵芝三萜是灵芝属真菌最为重要的一类活性成分, 本研究结果不仅进一步丰富了对拟鹿角灵芝化学成分的认识, 尤其是对灵芝属真菌中灵芝三萜化合物的进一步补充。拟鹿角灵芝中化合物活性测试结果拓展了对该灵芝药用价值的认识, 一些化合物显示了潜在的药物开发价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu J Q, Lian C L, Hu T Y, et al. Two new farnesyl phenolic compounds with anti-inflammatory activities from *Ganoderma duripora* [J]. *Food Chem*, 2018, 263: 155-162.
- [2] Huang S Z, Ma Q Y, Kong F D, et al. Lanostane-type triterpenoids from the fruiting body of *Ganoderma calidophilum* [J]. *Phytochemistry*, 2017, 143: 104-110.
- [3] Zhao Z Z, Chen H P, Feng T, et al. Lucidimine A-D, four new alkaloids from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(12): 1160-1165.
- [4] 兰宁宁, 马青云, 黄圣卓, 等. 大青山灵芝的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(3): 437-442.
- [5] Meng X H, Qin F Y, Jiang X T, et al. ($\pm$)-Ganochlearols J - N, renoprotective meroterpenoids from *Ganoderma cochlear* [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 112: 104950.
- [6] Huang Y J, Wei G, Peng X R, et al. Triterpenoids from functional mushroom *Ganoderma resinaceum* and the novel role of resinacein S in enhancing the activity of brown/beige adipocytes [J]. *Food Res Int*, 2020, 136: 109303.
- [7] Isaka M, Chinthanom P, Sappan M, et al. Antitubercular activity of mycelium-associated *Ganoderma* lanostanoids [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(5): 1361-1369.
- [8] 孙艳辉, 张宏波. 灵芝多糖对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏脂肪沉积及 NLRP3 炎性小体表达的影响 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(6): 842-845.
- [9] Zhang J J, Dong Y, Qin F Y, et al. Australeols A-F, neuroprotective meroterpenoids from *Ganoderma australe* [J]. *Fitoterapia*, 2019, 134: 250-255.
- [10] Fu Y L, Shi L, Ding K. Structure elucidation and anti-tumor activity *in vivo* of a polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 141: 693-699.
- [11] Song X, Cui W, Gao Z, et al. Structural characterization and amelioration of sulfated polysaccharides from *Ganoderma applanatum* residue against CCl_4 -induced hepatotoxicity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107554.
- [12] Si J, Meng G, Wu Y, et al. Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124: 1186-1196.
- [13] Ren L, Zhang J, Zhang T H. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells [J]. *Food Chem*, 2021, 340: 127933.

- [14] 吴兴亮, 戴玉成. 中国灵芝图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 70-71.
- [15] Xu Y, Zhang X, Yan X H, *et al.* Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 135: 706-716.
- [16] Zhao S Z, Lei M, Xu H, *et al.* The normal cell proliferation and wound healing effect of polysaccharides from *Ganoderma amboinense* [J]. *Food Sci Hum Wellness*, 2021, 10(4): 508-513.
- [17] Hsu C C, Lin K Y, Wang Z H, *et al.* Preventive effect of *Ganoderma amboinense* on acetaminophen-induced acute liver injury [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(11): 946-950.
- [18] Ren F, Chen Q P, Meng C, *et al.* Serum metabonomics revealed the mechanism of *Ganoderma amboinense* polysaccharides in preventing non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by high-fat diet [J]. *J Funct Foods*, 2021, 82: 104496.
- [19] Chang U M, Li C H, Lin L I, *et al.* Ganoderiol F, a *Ganoderma* triterpene, induces senescence in hepatoma HepG2 cells [J]. *Life Sci*, 2006, 79(12): 1129-1139.
- [20] Li C H, Chen P Y, Chang U M, *et al.* Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells [J]. *Life Sci*, 2005, 77(3): 252-265.
- [21] 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: 133-139.
- [22] Min B S, Nakamura N, Miyashiro H, *et al.* Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(10): 1607-1612.
- [23] Fujita A, Arisawa M, Saga M, *et al.* Two new lanostanoids from *Ganoderma lucidum* [J]. *J Nat Prod*, 1986, 49(6): 1122-1125.
- [24] Arisawa M, Fujita A, Saga M, *et al.* Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum* [J]. *J Nat Prod*, 1986, 49(4): 621-625.
- [25] Sato H, Nishitoba T, Shirasu S, *et al.* Ganoderiol A and B, new triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (reishi) [J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(11): 2887-2890.
- [26] Nishitoba T, Sato H, Shirasu S, *et al.* Novel triterpenoids from the mycelial mat at the previous stage of fruiting of *Ganoderma lucidum* [J]. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(2): 619-622.
- [27] Su H G, Peng X R, Shi Q Q, *et al.* Lanostane triterpenoids with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytochemistry*, 2020, 173: 112256.
- [28] Nishitoba T, Oda K, Sato H, *et al.* Novel triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* [J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52(2): 367-372.
- [29] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [30] Jong-Anurakkun N, Bhandari M R, Kawabata J. A-Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*) [J]. *Food Chem*, 2007, 103(4): 1319-1323.

[责任编辑 王文倩]