

树灵芝中三萜类成分及其保肝作用研究

刘莉莹¹, 王洪庆¹, 刘超¹, 陈若芸^{1*}, 王永会², 姚一建²

¹ 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050; ² 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 研究树灵芝 *Ganoderma sessile* 中三萜类成分及其保肝作用。树灵芝乙醇提取物经凝胶色谱、硅胶色谱、硅胶薄层色谱、C₁₈ 反相硅胶色谱、高效液相色谱和反相制备色谱等色谱技术分离纯化, 通过各种波谱学方法鉴定化合物的结构。从树灵芝中分离得到 16 个三萜类化合物, 分别为灵芝酸 LM₂ (1)、灵芝孢子酸 A (2)、灵芝酸 J (3)、灵芝酸 C (4)、灵芝酸 A (5)、灵芝酸 B (6)、灵芝酸 M (7)、灵芝酸 C₆ (8)、灵芝酸 AM₁ (9)、灵芝酸 G (10)、灵芝酸 I (11)、灵芝赤芝酸 A (12)、灵芝酸 ε (13)、灵芝酸 H (14)、灵芝赤芝酸 E (15) 和灵芝酸 D (16)。化合物 1~16 均为首次从该种植物中分离得到。其中化合物 2、5、6、11、15 和 16 对人肝 HL-7702 细胞的成活率分别为 60%、45%、56%、44%、47% 和 47%, 均高于双环醇 42% 的成活率, 具有肝保护的作用。

关键词: 灵芝属; 树灵芝; 三萜类; 保肝活性

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.009

Triterpenoids of *Ganoderma sessile* and Their Hepatoprotective Activities

LIU Li-ying¹, WANG Hong-qing¹, LIU Chao¹, CHEN Ruo-yun^{1*}, WANG Yong-hui², YAO Yi-jian²

¹ State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of

Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Sixteen lanostane triterpenoids were isolated from the ethanol extract of *Ganoderma sessile* by means of preparative HPLC, column chromatography over sephadex LH-20, silica gel, ODS and were identified as ganoderic acid LM₂ (1), ganosporeric acid A (2), ganoderic acid J (3), ganoderic acid C (4), ganoderic acid A (5), ganoderic acid B (6), ganoderic acid M (7), ganoderic acid C₆ (8), ganoderic acid AM₁ (9), ganoderic acid G (10), ganoderic acid I (11), ganolucidic acid A (12), ganoderic acid ε (13), ganoderic acid H (14), ganolucidic acid E (15), ganoderic acid D (16). Compounds 1-16 were isolated from this Species for the first time. Compounds 2, 5, 6, 11, 15 and 16 exhibited hepatoprotective activities. The survival rate were 60%, 45%, 56%, 44%, 47% and 47% in HL-7702 cells respectively, all higher than 42% of bicyclol.

Key words: *Ganoderma*; *Ganoderma sessile*; triterpenoids; hepatoprotective activity

《中国药典》2015 版记载灵芝为赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 或紫芝 *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体。树灵芝 *Ganoderma sessile* 为灵芝科灵芝属真菌, 主要产于广东。现代科学研究证明, 灵芝属真菌主要化学成分为多糖类、三萜类、甾体类、生物碱类、腺苷类、氨基酸类化合物^[1] 等, 具有抗肿瘤、保肝护肝、抗氧化、抗衰老、心脏保护、改善记忆、抗病毒、抑制细菌等作用。灵芝三萜类化合物有保肝^[2], 抑制组胺释放、

抗 HIV-1 蛋白酶活性^[2]、抑制肿瘤细胞生长^[3] 等作用。

本文报道了从树灵芝乙醇提取物氯仿部位分离鉴定化合物的研究, 从中分离得到了 16 个三萜类化合物, 分别鉴定为灵芝酸 LM₂ (1)、灵芝孢子酸 A (2)、灵芝酸 J (3)、灵芝酸 C (4)、灵芝酸 A (5)、灵芝酸 B (6)、灵芝酸 M (7)、灵芝酸 C₆ (8)、灵芝酸 AM₁ (9)、灵芝酸 G (10)、灵芝酸 I (11)、灵芝赤芝酸 A (12)、灵芝酸 ε (13)、灵芝酸 H (14)、灵芝赤芝酸 E (15) 和灵芝酸 D (16)。化合物 1~16 均为首次从该种真菌中分离得到。其中化合物 2、5、6、11、15 和 16 对人肝 HL-7702 细胞的成活率分别为 60%、

45%、56%、44%、47%和47%，均高于双环醇42%的成活率，具有肝保护的作用。

1 仪器与材料

Agilent 1100 系列 LC/MSD Trap-SL 型液质联用仪测定 ESI-MS; VNS-600, BrukerAV500 和 Bruker-AV400 核磁共振仪测定 NMR 谱; Agilent 高效液相色谱仪, YMC C-18 (20 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; LC 3000 型中压色谱仪; YMC 公司反相色谱硅胶 RP-18 (50 μm); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 及柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目) 为青岛海洋化工厂生产; 葡聚糖凝胶 Sephadex-LH 20 为 GE Pharmacia 公司生产; 所用试剂均为分析纯或色谱纯。

树灵芝于 2015 年 11 月购于广东开平, 由中国科学院微生物研究所姚一建研究员鉴定, 标本 (No. S-2613) 保存于中国医学科学院药物研究所标本室。

2 提取与分离

30 kg 树灵芝子实体粉碎后, 用 95% 乙醇加热回流提取, 减压浓缩至干, 得到浸膏 3.5 kg。浸膏经石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取后得到氯仿部位 680 g。氯仿部位通过硅胶柱色谱分离, 采用石油醚-丙酮梯度洗脱, 得到 Fr. A-F 共 6 个部分。其中 Fr. A 部分 (55 g) 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮梯度 (9:1 ~ 1:1) 洗脱, 得到 5 个流分, 分别为: Fr. A1-A5。Fr. A2 经硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇等度 (30:1) 洗脱, 得到化合物 **1** (11 mg)、**5** (9 mg), Fr. 3 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度 (7:3) 洗脱, 得到化合物 **6** (10 mg), Fr. A4 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度 (6:4) 洗脱, 得到化合物 **7** (11 mg)。Fr. B 部分 (81 g) 经硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇梯度 (50:1 ~ 1:1) 洗脱, 得到 9 个流分, 分别为: Fr. B1-B9。Fr. B1 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度

(9:1) 洗脱, 得到化合物 **4** (11 mg), Fr. B3 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度 (8:2) 洗脱, 得到化合物 **8** (4 mg), Fr. B7 经硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇等度 (20:1) 洗脱, 得到化合物 **9** (6 mg)、**14** (6 mg), Fr. B-9 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度 (1:1) 洗脱, 得到化合物 **16** (6 mg)。Fr. C 部分 (32 g) 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮梯度 (10:1 ~ 1:1) 洗脱, 得到 6 流分, 分别为: Fr. C1-C6。Fr. C3 经凝胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇等度 (1:1) 洗脱, 得到化合物 **2** (4 mg), Fr. C4 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度 (1:1) 洗脱, 得到化合物 **3** (11 mg)。Fr. D 部分 (237 g) 经硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇梯度 (100:1 ~ 1:1) 洗脱, 得到 6 流分, 分别为: Fr. C1-C6。得到 13 个流分, 分别为: Fr. D1-D13。Fr. D2 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度 (10:1) 洗脱, 得到化合物 **10** (13 mg), Fr. D5 经凝胶柱色谱, 用甲醇洗脱, 得到化合物 **11** (12 mg), Fr. D7 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度 (9:1) 洗脱, 得到化合物 **12** (11 mg)、**13** (21 mg), Fr. D11 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮等度 (7:3) 洗脱, 得到化合物 **15** (4 mg)。

3 结构鉴定

灵芝酸 LM2 (ganoderic acid LM2, 1) ESI-MS m/z : 515. 2 [M + H]⁺, ¹H NMR (C₅D₅N, 400MHz): δ 1. 10 (3H, s, H-29), 1. 10 (3H, s, H-18), 1. 13 (3H, s, H-28), 1. 60 (3H, d, $J = 5. 2$ Hz, H-21), 1. 33 (3H, s, H-30), 1. 38 (3H, s, H-19), 2. 15 (3H, s, H-27), 5. 01 (1H, dd, $J = 5. 6, 12. 8$ Hz, H-23), 5. 12 (1H, dd, $J = 6. 8, 7. 6$ Hz, H-7), 7. 38 (1H, d, $J = 8. 5$ Hz, H-24); ¹³C NMR (C₅D₅N, 150 MHz) 见表 1。以上数据与文献^[4]报道的 7β, 23β-dihydroxy-3, 11, 15-trioxo-5α-lanosta-8, 24-dien-26-oic acid (ganoderic acid LM2) 一致。

表 1 化合物 1~8 的 ¹³C NMR 数据
Table 1 ¹³C NMR data for compounds 1-8

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
1	36.2	37.4	36.2	36.0	36.0	35.8	35.6	35.1
2	34.7	34.1	34.0	34.4	34.6	28.8	29.2	34.0
3	216.0	214.9	215.0	216.7	217.1	77.7	216.7	215.0
4	47.2	46.9	46.7	46.7	46.8	39.0	39.3	46.6
5	48.9	50.9	49.2	48.8	48.9	49.8	49.4	49.2
6	29.0	33.7	27.4	29.0	29.2	26.6	26.7	36.9
7	66.2	198.6	201.0	66.3	68.9	66.5	65.8	204.6
8	159.8	149.9	152.5	157.8	159.1	156.8	160.0	152.5

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
9	141.1	149.0	150.8	141.2	140.3	142.6	141.0	150.8
10	38.6	39.3	39.2	38.2	38.0	38.8	38.3	39.2
11	198.3	196.0	200.1	197.7	199.7	197.9	201.2	201.0
12	51.1	194.1	51.8	50.0	51.9	52.0	79.4	51.8
13	45.4	58.6	46.6	44.9	46.7	46.8	21.2	47.6
14	59.2	61.0	52.7	59.3	53.9	59.4	60.0	52.7
15	217.1	205.6	72.1	217.6	72.4	217.5	215.4	72.1
16	42.2	39.0	36.9	41.7	36.7	39.4	35.7	36.2
17	47.0	37.8	47.9	45.6	47.8	45.4	49.1	47.9
18	18.0	12.1	17.0	17.7	16.9	17.4	18.5	17.4
19	18.4	18.7	19.4	18.1	19.5	18.4	17.8	17.7
20	34.0	32.2	32.3	31.9	32.6	32.0	32.3	32.3
21	20.0	23.3	20.3	19.6	19.7	19.6	21.2	19.4
22	44.0	48.4	49.3	48.9	49.7	49.1	51.9	49.3
23	66.7	207.5	208.8	207.6	208.8	207.7	209.2	208.2
24	145.1	46.5	47.6	46.5	46.8	47.0	47.0	46.7
25	129.0	34.0	35.1	34.2	35.6	35.2	34.7	34.7
26	170.9	170.2	178.0	180.6	180.3	180.4	178.4	176.1
27	13.6	16.9	17.4	16.9	17.3	16.9	17.0	17.0
28	27.2	27.6	27.3	27.0	27.2	29.1	29.1	27.4
29	21.0	20.9	20.5	20.7	20.7	15.4	22.0	20.4
30	25.3	20.4	17.7	24.7	19.3	23.7	23.7	21.7

灵芝孢子酸 A (ganosporeric acid A, 2) ESI-MS m/z : 527. 1 [M + H]⁺, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ. 85 (3H, s, H-29), 0.99 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 1.12 (3H, s, H-18), 1.14 (3H, s, H-28), 1.23 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27), 1.33 (3H, s, H-30), 1.80 (3H, s, H-19); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) 见表 1。以上数据与文献^[5]报道的 3, 7, 11, 12, 15, 23-hexaexo-5 α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganosporeric acid A) 一致。

灵芝酸 J (ganoderic acid J, 3) ESI-MS m/z : 515. 2 [M + H]⁺, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ. 86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.90 (3H, s, H-18), 1.12 (3H, s, H-28), 1.14 (3H, s, H-29), 1.18 (3H, s, H-19), 1.22 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 1.27 (3H, s, H-30), 4.29 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-15); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) 见表 1。以上数据与文献^[6]报道的 15 α -hydroxy-3, 7, 11, 23-tetraoxo-5 α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid J) 一致。

灵芝酸 C (ganoderic acid C, 4) ESI-MS m/z : 515. 2 [M + H]⁺, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ. 99 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 1.03 (3H, s, H-18), 1.10

(3H, s, H-28), 1.12 (3H, s, H-29), 1.22 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27), 1.25 (3H, s, H-19), 1.33 (3H, s, H-30), 4.84 (1H, dd, $J = 7.6, 9.2$ Hz, H-7); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) 见表 1。以上数据与文献^[6]报道的 7 β -hydroxy-3, 11, 15, 23-tetraoxo-5 α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid C) 一致。

灵芝酸 A (ganoderic acid A, 5) ESI-MS m/z : 517. 3 [M + H]⁺, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ. 90 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.97 (3H, s, H-18), 1.10 (3H, s, H-28), 1.11 (3H, s, H-29), 1.22 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-27), 1.25 (3H, s, H-19), 1.28 (3H, s, H-30), 4.62 (1H, dd, $J = 6.4, 9.6$ Hz, H-15), 4.78 (1H, dd, $J = 7.6, 9.2$ Hz, H-7); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) 见表 1。以上数据与文献^[7]报道的 7 β , 15 α -dihydroxy-3, 11, 23-trioxo-5 α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid A) 一致。

灵芝酸 B (ganoderic acid B, 6) ESI-MS m/z : 517. 2 [M + H]⁺, ¹H NMR (C₅D₅N, 400 MHz): δ. 84 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 1.00 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-28), 1.21 (3H, s, H-19), 1.22 (3H, d, $J = 7.8$ Hz, H-27), 1.34

(3H, s, H-30), 3.21 (1H, dd, $J = 9.9, 3.6$ Hz, H-3), 4.79 (1H, t, $J = 8.7$ Hz, H-7); ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 150 MHz) 见表1。以上数据与文献^[7]报道的 $3\beta, 7\beta$ -dihydroxy-11, 15, 23-trioxo- 5α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid B) 一致。

灵芝酸 M (ganoderic acid M, 7) ESI-MS m/z : 531.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.08 (3H, s, H-18), 1.15 (3H, s, H-28), 1.21 (3H, s, H-29), 1.34 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, H-21), 1.39 (3H, d, $J = 5.2$ Hz, H-27), 1.43 (3H, s, H-19), 1.47 (3H, s, H-30), 4.69 (1H, s, H-12), 5.15 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) 见表1。以上数据与文献^[8]报道的 $7\beta, 12\alpha$ -dihydroxy-3, 11, 15, 23-tetraoxo- 5α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid M) 一致。

灵芝酸 C6 (ganoderic acid C6, 8) ESI-MS m/z : 531.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.90 (3H, s, H-18), 1.12 (3H, s, H-29), 1.14 (3H, s, H-28), 1.18 (3H, s, H-30), 1.22 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 1.27 (3H, s, H-19), 4.29 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) 见表1。以上数据与文献^[9]报道的 15α -hydroxy-3, 7, 11, 23-tetraoxo- 5α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid C6) 一致。

灵芝酸 AM1 (ganoderic acid AM1, 9) ESI-MS m/z : 515.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.94 (3H, s, H-29), 1.02 (3H, d, $J = 4.8$ Hz, H-21), 1.04 (3H, s, H-18), 1.13 (3H, s, H-28), 1.35 (3H, s, H-19), 1.36 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, H-27), 1.71 (3H, s, H-30), 3.27 (1H, dd, $J = 5.6, 11.0$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) 见表2。以上数据与文献^[10]报道的 3β -hydroxy-7, 11, 15, 23-

tetraoxo- 5α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid AM1) 一致。

灵芝酸 G (ganoderic acid G, 10) ESI-MS m/z : 533.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz): δ 0.80 (3H, s, H-29), 1.02 (3H, s, H-18), 1.04 (3H, s, H-28), 1.14 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 1.19 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, H-27), 1.32 (3H, s, H-19), 1.43 (3H, s, H-30), 3.22 (1H, dd, $J = 6.0, 10.0$ Hz, H-3), 4.38 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-12), 4.80 (1H, td, $J = 4.5, 8.5$ Hz, H-7); ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz) 见表2。以上数据与文献^[11]报道的 $3\beta, 7\beta, 12\beta$ -trihydroxy-11, 15, 23-trioxo- 5α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid G) 一致。

灵芝酸 I (ganoderic acid I, 11) ESI-MS m/z : 533.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz): δ 1.09 (3H, s, H-29), 1.24 (3H, s, H-28), 1.31 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-18), 1.45 (3H, s, H-27), 1.46 (3H, s, H-19), 1.56 (3H, s, H-21), 1.70 (3H, s, H-30), 3.46 (1H, dd, $J = 4.8, 11.2$ Hz, H-3), 5.16 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-7); ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz) 见表2。以上数据与文献^[11]报道的 $3\beta, 7\beta, 20\xi$ -trihydroxy-11, 15, 23-trioxo- 5α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid I) 一致。

灵芝赤芝酸 A (ganolucidic acid A, 12) ESI-MS m/z : 501.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.86 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 0.91 (3H, s, H-18), 1.08 (3H, s, H-28), 1.12 (3H, s, H-19), 1.12 (3H, s, H-29), 1.18 (3H, s, H-30), 1.18 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 4.41 (1H, dd, $J = 5.5, 9.0$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) 见表2。以上数据与文献^[11]报道的 15α -hydroxy-3, 11, 23-trioxo- 5α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganolucidic acid A) 一致。

表2 化合物9~16的 ^{13}C NMR数据

Table 2 ^{13}C NMR data for compounds 9-16

No.	9	10	11	12	13	14	15	16
1	37.1	35.6	35.6	35.0	35.7	36.6	37.3	37.9
2	28.4	28.6	28.6	34.2	28.8	27.2	34.4	34.3
3	76.9	77.7	77.6	218.5	77.8	77.4	215.1	215.5
4	39.9	39.4	39.2	46.9	39.7	40.4	47.0	47.0
5	51.8	49.8	48.5	51.6	49.9	51.3	51.5	49.6
6	34.3	28.2	27.9	18.6	28.2	33.2	33.8	28.8
7	199.9	66.4	67.0	29.5	67.0	198.9	199.3	65.8
8	151.9	158.9	158.0	163.8	158.6	151.7	149.8	140.6
9	147.3	142.6	142.6	138.4	145.0	145.7	146.9	158.4

No.	9	10	11	12	13	14	15	16
10	40.5	39.0	39.2	37.0	39.4	39.1	39.4	38.5
11	200.3	200.9	198.4	198.5	198.5	194.0	199.2	199.6
12	49.9	79.3	51.4	51.4	51.3	79.1	49.0	51.7
13	44.9	52.3	46.3	46.7	45.9	47.9	44.0	45.0
14	57.5	60.3	59.9	53.5	59.4	58.5	57.2	60.4
15	207.8	216.8	217.7	72.8	217.3	205.9	206.7	216.8
16	41.2	38.9	37.0	38.4	42.0	37.9	39.8	41.0
17	45.4	46.8	49.7	48.4	47.0	44.6	44.4	45.9
18	17.8	12.9	19.6	17.2	17.7	12.1	16.1	16.9
19	18.2	19.2	18.8	18.8	19.0	17.9	18.6	18.3
20	32.5	29.1	72.8	32.5	34.0	29.3	32.1	34.2
21	19.9	22.1	27.3	19.3	20.1	21.6	19.8	21.2
22	49.5	49.0	55.6	49.6	44.0	48.3	48.9	48.4
23	208.7	209.1	209.4	208.7	66.8	207.5	207.5	208.1
24	47.2	47.0	48.4	46.4	144.2	46.3	46.5	46.3
25	35.8	35.7	35.5	34.5	129.6	34.5	34.6	35.2
26	178.3	178.3	178.2	180.9	170.8	180.4	179.2	178.3
27	16.4	17.8	17.5	16.9	13.5	16.9	16.9	12.1
28	28.5	28.8	28.7	27.7	28.9	27.8	27.6	27.9
29	16.4	16.4	16.3	19.0	16.5	15.5	20.3	21.3
30	21.7	23.7	25.1	20.5	24.9	21.2	21.2	26.3
31						170.3		
32						20.9		

灵芝酸 ϵ (ganoderic acid ϵ , 13) ESI-MS m/z : 517.2 [M + H]⁺, ¹H NMR (C₅D₅N, 400 MHz): δ 1.09 (3H, s, H-29), 1.10 (3H, s, H-18), 1.15 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-21), 1.25 (3H, s, H-28), 1.40 (3H, s, H-19), 1.43 (3H, s, H-30), 2.14 (3H, s, H-27), 3.22 (1H, dt, J = 3.6, 13.6 Hz, H-3), 5.15 (3H, t, J = 8.8 Hz, H-7), 7.37 (3H, dd, J = 8.8, 1.2 Hz, H-24); ¹³C NMR (C₅D₅N, 100 MHz) 见表 2。以上数据与文献^[12]报道的 3 β , 7 β , 23 ξ -trihydroxy-11, 15-dioxo-5 α -lanosta-8, 24-dien-26-oic acid (ganoderic acid ϵ) 一致。

灵芝酸 H (ganoderic acid H, 14) ESI-MS m/z : 573.2 [M + H]⁺, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.81 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.97 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.02 (3H, s), 1.20 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.32 (3H, s), 1.72 (3H, s), 2.23 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J = 4.8, 10.8 Hz), 5.62 (1H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) 见表 2。以上数据与文献^[13]报道的 3 β -hydroxy-12 β -acetoxo-7, 11, 15, 23-tetraoxo-5 α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid H) 一致。

灵芝酸 E (ganoderic acid E, 15) ESI-MS m/z : 513.2 [M + H]⁺, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ

0.88 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21), 1.11 (3H, s, H-29), 1.14 (3H, s, H-28), 1.22 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-27), 1.28 (3H, s, H-19), 1.64 (3H, s, H-30); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) 见表 2。以上数据与文献^[14]报道的 3, 7, 11, 15, 23-pentaoxo-5 α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganolucidic acid E) 一致。

灵芝酸 D (ganoderic acid D, 16) ESI-MS m/z : 515.2 [M + H]⁺, ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.84 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.15 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.23 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.25 (3H, s), 1.44 (3H, s), 1.44 (3H, s), 4.83 (1H, t, J = 8.8 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) 见表 2。以上数据与文献^[15]报道的 7 β -hydroxy-3, 11, 15, 23-tetraoxo-5 α -lanosta-8-en-26-oic acid (ganoderic acid D) 一致。

4 体外保肝活性

MTT 法观察树灵芝化合物对人肝细胞 HL-7702 细胞成活率的影响。

HL-7702 细胞在 37℃、含 5% CO₂ 的孵箱中培养, 培养基为 RPMI1640 (含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素, pH7.2 ~ 7.4)。以培养基将细胞分散, 使成为密度为 1 \times 10⁵ 个/mL 的

单细胞悬液,并以每孔 0.1 mL 接种于 96 孔板。培养 24 h 后换含有受试药物(终浓度为 1×10^{-5} M)的培养基,并与给药后 1 h 加入 DL-半乳糖胺(终浓度

为 25 mM)继续培养,24 h 后加入 MTT(0.5 mg/mL)培养 4 h,吸去上清,沉淀以 DMSO 振荡使溶解,测定各孔吸光值。

表 3 树灵芝部分化合物肝保护活性测定结果

Table 3 Hepatoprotective effects of 2,5,6,11,15 and 16 on the survival rate of HL-7702 cells injured by DL-GalN (10 μ M)

名称 Name	分子量 Molecular weight	剂量 Dose	$\bar{x} \pm s$	成活率 Survival rate
正常对照 Normal control	-	-	0.520 \pm 0.031	100%
模型 GalN	-	-	0.217 \pm 0.012	35% ^{###}
双环醇 Bicyclol	392	1×10^{-5} M	0.249 \pm 0.016	42% *
2	526	1×10^{-5} M	0.331 \pm 0.009	60% * *
5	516	1×10^{-5} M	0.263 \pm 0.023	45% *
6	516	1×10^{-5} M	0.315 \pm 0.034	56% * *
11	532	1×10^{-5} M	0.255 \pm 0.019	44% *
15	512	1×10^{-5} M	0.272 \pm 0.004	47% * *
16	530	1×10^{-5} M	0.269 \pm 0.024	47% *

注:与正常组比较,^{###} $P < 0.001$;与模型组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control,^{###} $P < 0.001$;Compared with model group,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ 。

5 结论

本研究从树灵芝乙醇提取物氯仿部位分离鉴定了 16 个三萜类化合物,其中化合物 2、5、6、11、15 和 16 对人肝 HL-7702 细胞的成活率分别为 60%、45%、56%、44%、47% 和 47%,均高于双环醇 42% 的成活率,具有临床上肝保护的应用前景。

参考文献

- Chen RY(陈若芸),Yu DQ(于德泉). Progress of studies on the chemical constituents of *Ganoderma* triterpene. *Acta Pharm Sin B*(药学学报),1990,25:940-953.
- Min B,Nakamura N,Miyashiro H,*et al.* Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem Pharm Bull*,1998,46:1607-1612.
- Chairu L,Tokuyama T,Aayashi Y,*et al.* Applanoxidic acids A,B,C and D,biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*,1991,30:4105-4109.
- Luo J,Zhao YY,Lin ZB. A new lanostane-type triterpene from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *J Asian Nat Prod Res*,2002,4:129-134.
- Chen RY(陈若芸),Yu DQ(于德泉). Studies on the triterpenoid constituents of the spores from *Ganoderma lucidum* karst. *Acta Pharm Sini B*(药学学报),1991,26:267-273.
- Nishitoba T,Sato H,Sakamura S. New terpenoids, ganoderic acid J and ganolucidic acid C, from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Agric Biol Chem*,1985,49:3637-3638.
- 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. *Helv Chim Acta*,1982,65:611-619.

- Nishitoba T,Sato H,Sakamura S. Triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*,1987,26:1777-1784.
- 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. *Chem Pharm Bull*,1986,34:3695-3712.
- Lin CN,Kuo SH,Won SJ. Steroids of Formosan *Ganoderma maamboinense*. *Phytochemistry*,1993,32:1549-1551.
- Kikuchi T,Matsuda S,Murai Y,*et al.* Ganoderic acid G and I and ganolucidic acid A and B,new triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull*,1985,33:2628-2631.
- Min BS,Gao JJ,Nakamura N,*et al.* Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against Meth-A and LLC tumor cells. *Chem Pharm Bull*,2000,48:1026-1033.
- 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*. *Chem Pharm Bull*,1985,33:2624-2627.
- Nishitoba T,Oda K,Sato H,*et al.* Novel triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Agric Biol Chem*,1988,52:367-372.
- Komoda Y. Nuclear magnetic resonance spectra of *Ganoderma lucidum* terpenoid constituents and their derivatives. *Iyo Kizai Kenkyusho Hokoku (Tokyo Ika Shika Daigaku)*,1985,19:45-54.