

反柄紫芝中二个新生物碱

田磊^{1,2}, 王心龙², 王彦志¹, 程永现^{2*}¹河南中医学院, 郑州 450008;²中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201

摘要: 利用各种色谱技术从反柄紫芝中分离得到 6 个化合物, 借助波谱学方法鉴定了它们的结构, 分别为: ganocochlearine A (1)、ganocochlearine B (2)、2,3-dihydro-4(1H)-quinolone (3)、8-hydroxy-2,3-dihydro-4(1H)-quinolone (4)、fornicatin A (5) 和 (3S,6S)-3-[[1'S]-1-methylpropyl]-6-(phenylmethyl)-piperazine-2,5-dione (6)。其中化合物 1 和 2 为新生物碱。

关键词: 反柄紫芝; 生物碱; 喹诺酮; fornicatin A

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.08.001

Two New Alkaloids from *Ganoderma cochlear*TIAN Lei^{1,2}, WANG Xin-long², WANG Yan-zhi¹, CHENG Yong-xian^{2*}

¹Henan College of Traditional Chinese Medicine Zhengzhou 450008, China; ²State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences Kunming 650201, China

Abstract: Six compounds including two new alkaloids were isolated from the fruiting bodies of *Ganoderma cochlear*. Their structures were identified as ganocochlearine A (1), ganocochlearine B (2), 2,3-dihydro-4(1H)-quinolone (3), 8-hydroxy-2,3-dihydro-4(1H)-quinolone (4), fornicatin A (5) and (3S,6S)-3-[[1'S]-1-methylpropyl]-6-(phenylmethyl)-piperazine-2,5-dione (6) respectively by means of spectroscopic methods. Among these compounds 1 and 2 were new alkaloids.

Key words: *Ganoderma cochlear*; alkaloid; quinolone; fornicatin A

灵芝是我国传统名贵中药,素有“仙草”之美称,最早记载于《神农本草经》,被列为上品^[1],灵芝属种类较多,《中华人民共和国药典》仅收录了赤芝(*Ganoderma lucidum*)或紫芝(*G. sinensis*)的干燥子实体作为药材正品来源^[2],其实灵芝属多种真菌在我国民间被广泛应用并在药材市场流通。以往研究发现灵芝可调节人体代谢和内分泌功能,对免疫系统、神经系统、心血管系统、呼吸系统等均具有较好的干预效果,同时还具有保肝、抗肿瘤、抗氧化、延缓衰老、抗炎等作用^[3],临床上或民间被广泛用于治疗多种疾病,如慢性支气管炎、消化不良、神经衰弱、慢性肝炎、高血压、肿瘤、AIDS等^[4]。虽然灵芝属的研究已进行多年,但其化学成分多局限于三萜、多糖和生物碱^[5,6]。近年,我们从灵芝中发现了一系列活性杂萜,引起了业界高度关注^[7-9]。反柄紫芝与紫芝

功能相近,形态上反柄紫芝的柄是反背而生,前期我们对其进行了研究,曾报道灵芝杂萜 cochlearols A 和 B 的结构及其肾保护作用^[10]。进一步对其进行深入研究过程中,从中分离得到 6 个化合物,其中 2 个为新生物碱,该研究将进一步丰富人们对灵芝化学的认识。

1 仪器与材料

Shimadzu UV2401PC 紫外可见光分光光度计, Waters Xevo TQ-S 质谱仪及 API QSTAR Pulsar i 质谱仪; Bruker AM-400 及 Avance III 600 MHz 核磁共振仪(TMS 作为内标, δ 为 ppm, J 为 Hz); 200 ~ 300 目柱色谱用硅胶、硅胶 H 和 GF254 薄层色谱用硅胶(青岛海洋化工厂); 45 ~ 75 μ m MCI gel CHP 20P(日本三菱公司产品); 25 ~ 100 μ m Sephadex LH-20(Pharmacia 公司); 40 ~ 63 μ m RP-18(日本 Daiso)。

反柄紫芝于 2013 年 9 月购自中国广东省广州同康药业有限公司,样品经中国科学院昆明植物研究所杨祝良研究员鉴定,凭证标本(CHYX-0570)保

收稿日期: 2015-03-30 接受日期: 2015-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(21472199)

* 通讯作者 Tel: 86-871-65223048; E-mail: yxcheng@mail.kib.ac.cn

存于中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室。

2 提取与分离

取反柄紫芝子实体 100 kg, 粉碎后用 70% 的乙醇室温提取 (6 × 300 L × 48 h), 浓缩得总提物 (10 kg)。总提物用水适当稀释后用乙酸乙酯萃取 3 次, 得到乙酸乙酯部分 2 kg。经硅胶色谱柱进行分离, 以氯仿-甲醇 (100:1 ~ 1:1) 梯度洗脱, 得到 7 个组分 (F1 ~ F7)。F5 (61 g) 经 MCI gel CHP 20P 柱以甲醇-水 (10% ~ 100%) 梯度洗脱得到 3 个组分 (F5.1、F5.2、F5.3)。F5.2 (14 g) 经正相柱硅胶色谱柱, 以氯仿-甲醇 (50:1 ~ 1:1) 梯度洗脱得到 4 段组分 (F5.2.1 ~ F5.2.4)。F5.2.3 (3 g) 经 Sephadex LH-20 柱 (MeOH), RP-18 柱, 以甲醇-水 (50% ~ 70%) 洗脱, 得到化合物 **1** (4 mg) 和 **2** (1 mg)。F5.2.4 (4 g) 经 MCI gel CHP 20P 柱, 以甲醇-水 (10% ~ 50%) 梯度洗脱, 制备薄层, 用氯仿-甲醇 (10:1) 展开, 再经 Sephadex LH-20 柱 (MeOH), 得化合物 **3** (2 mg)。F5.3 (5 g) 经 RP-18 柱, 以甲醇-水 (60% ~ 90%) 洗脱, 再经 Sephadex LH-20 柱 (MeOH), 得化合物 **4** (2 mg)、**5** (6 mg) 和 **6** (1 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 黄色粉末, 由 ^{13}C NMR、DEPT 谱及高分辨质谱 { m/z : 228.1022 [M + H] $^+$ (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_2$, 228.1025) } 确定其分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$, 计算其不饱和度为 9。化合物 **1** 的 ^1H NMR 谱芳香区出现三个质子信号 [δ_{H} 7.27 (1H, brs), δ_{H} 6.78 (2H, overlapped)], 提示结构中可能含有一个 ABX 系统; 低场区的二个质子信号 δ_{H} 8.38 (1H, s) 和 δ_{H} 7.85 (1H, s) 提示结构中还可能含有一个 1,2,4-三取代芳杂环; 高场区显示三个亚甲基信号 [δ_{H} 3.02 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), δ_{H} 2.98 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), δ_{H} 2.15 (2H, q, $J = 7.5$ Hz)]。 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱显示 14 个碳信号, 包括 3 个 sp^3 杂化的亚甲基, 5 个 sp^2 杂化的次甲基, 6 个烯区/芳香区季碳。以上信号与化合物 sinensine D 相似^[11], 提示它们是类似物, 其区别在于化合物 sinensine D 的 6-OH 在化合物 **1** 中消失, 这可从 ^1H - ^1H COSY 谱中 H-4/H-5/H-6 (δ_{H} 2.98) 的相关加以证明 (图 1), 同时, H-4/C-3, C-9 和 H-6/C-7, C-8 的 HMBC 相关也进一步表明了五元环的连接位置 (图 1)。化合物 **1** 与 sinensine D 的

另一区别是化合物 sinensine D 中的酚羟基已成环, 而化合物 **1** 中的 2'-OH 是游离的, 这可由 ^1H NMR (DMSO- d_6) 谱显示两个游离羟基质子信号 5'-OH (1H, δ_{H} 8.88, s) 和 2'-OH (1H, δ_{H} 13.63, s) 得到证明。另外, HMBC 谱中 H-6'/C-2, C-5' (δ_{C} 112.9) 的相关进一步证明了苯环上 OH 位置。因此, 化合物 **1** 的结构得以确定, 其为一个新的生物碱, 命名为 ganocochlearine A。

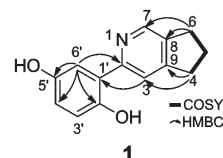


图 1 化合物 **1** 的关键 HMBC 和 COSY 相关

Fig. 1 Key HMBC and COSY correlations for compound **1**

化合物 **2** 黄色粉末, 由 ^{13}C NMR、DEPT 谱及高分辨质谱 { m/z : 242.1177 [M + H] $^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_2$, 242.1181) } 确定其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$, 计算其不饱和度为 9。 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与化合物 **1** 相比较较为相似, 提示它们是类似物, 其区别在于化合物 **2** 较化合物 **1** 多了一个甲基信号, HMBC 谱中 H₃-10/C-6, C-7, C-8 的相关表明 H₃-10 与 C-6 相连。化合物 **1** 和 **2** 的另一区别是五元环的位置发生了变化。HMBC 谱中 H-3/C-9, C-2, H-6', H-7/C-2, H-5/C-8, C-6 的相关表明了五元环的连接位置 (图 2)。至此可确定化合物 **2** 为一个新的生物碱, 命名为 ganocochlearine B。

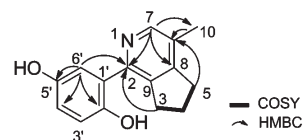


图 2 化合物 **2** 的关键 HMBC 和 COSY 相关

Fig. 2 Key HMBC and COSY correlations for compound **2**

化合物 **1** 黄色粉末, UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 343 (3.83), 265 (4.15), 213 (4.41) nm; ESI-MS: m/z 228 [M + H] $^+$, HR-ESI-MS: m/z 228.1022 [M + H] $^+$ (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_2$, 228.1025); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 及 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) 数据见表 1。

化合物 **2** 黄色粉末, UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 336 (3.33), 255 (3.64), 205 (4.10) nm; ESI-MS: m/z 242 [M + H] $^+$, HR-ESI-MS: m/z 242.1177

表1 化合物1和2在氘代甲醇中的核磁共振数据
Table 1 NMR data of **1** and **2** in methanol- d_4 (δ , ppm)

| Position | 1 ^a | | 2 ^b | |
|----------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|
| | δ_{H} (mult, J in Hz) | δ_{C} | δ_{H} (mult, J in Hz) | δ_{C} |
| 2 | | 156.6 | | 147.4 |
| 3 | 7.85 (s) | 116.4 | 3.13 (t, 7.8) | 33.3 |
| 4 | 3.02 (t, 7.5) | 33.9 | 2.23 (m) | 25.4 |
| 5 | 2.15 (m) | 26.1 | 3.15 (t, 7.8) | 33.5 |
| 6 | 2.98 (t, 7.5) | 30.9 | | 132.7 |
| 7 | 8.38 (s) | 142.5 | 8.30 (s) | 140.8 |
| 8 | | 140 | | 164.7 |
| 9 | | 157.7 | | 143.3 |
| 10 | | | 2.44 (s) | 16.1 |
| 1' | | 120.8 | | 120.3 |
| 2' | | 150.7 | | 150 |
| 3' | 6.77 (overlapped) | 119.3 | 6.86 (overlapped) | 118.3 |
| 4' | 6.77 (overlapped) | 119.3 | 6.86 (overlapped) | 118.3 |
| 5' | | 153.4 | | 151.4 |
| 6' | 7.27 (brs) | 112.9 | 6.88 (brs) | 116.8 |
| 2'-OH | 13.63 (s) ^c | | | |
| 5'-OH | 8.88 (s) ^c | | | |

Note: ^a400 MHz for ¹H NMR and 150 MHz for ¹³C NMR; ^b600 MHz for ¹H NMR and 150 MHz for ¹³C NMR; ^cObserved signals at 600 MHz in DMSO- d_6 .

$[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_2$, 242.1181); ¹H NMR (600 MHz, CD_3OD) 及 ¹³C NMR (150 MHz, CD_3OD) 数据见表1。

化合物 3 淡黄色粉末, ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.26 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 7.97 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-3), 7.70 (1H, m, H-7), 7.59 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-8), 7.42 (1H, m, H-6), 6.34 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-2); ¹³C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 141.6 (C-2), 109.8 (C-3), 180.7 (C-4), 126.7 (C-5), 125.3 (C-6), 133.5 (C-7), 119.6 (C-8), 141.6 (C-9), 126.1 (C-10)。以上数据和文献^[12]基本一致,故确定化合物**3**为2,3-dihydro-4(1H)-quinolone。

化合物 4 淡黄色粉末, ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.94 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-3), 7.71 (1H, dd, J = 8.2, 0.8 Hz, H-5), 7.24 (1H, t-like, J = 8.0 Hz, H-6), 7.12 (1H, dd, J = 7.6, 0.8 Hz, H-7), 6.36 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-2); ¹³C NMR (150

MHz, CD_3OD) δ : 132.3 (C-2), 109.7 (C-3), 180.8 (C-4), 115.5 (C-5), 116.0 (C-6), 125.3 (C-7), 148.3 (C-8), 140.5 (C-9), 127.8 (C-10)。以上数据和文献^[12]基本一致,故确定化合物**4**为8-hydroxy-2,3-dihydro-4(1H)-quinolone。

化合物 5 白色粉末, ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 3.39 (1H, d, J = 11.0 Hz, Ha-28), 3.15 (1H, d, J = 11.0 Hz, Hb-28), 2.63 (1H, overlapped, Ha-12), 2.43 (1H, d, J = 18.2 Hz, Hb-12), 2.40 (1H, overlapped, Ha-1), 2.36 (1H, overlapped, Ha-2), 2.33 (1H, overlapped, Ha-23), 2.24 (1H, overlapped, Hb-23), 2.19 (1H, overlapped, H-5), 2.19 (1H, overlapped, Hb-2), 2.16 (2H, overlapped, H-6), 2.08 (1H, overlapped, Ha-16), 1.94 (1H, overlapped, Ha-15), 1.85 (1H, overlapped, Ha-22), 1.82 (1H, overlapped, Hb-1), 1.77 (1H, overlapped, H-17), 1.52 (1H, overlapped, H-20), 1.51 (1H, overlapped, Hb-16), 1.48 (1H, overlapped, Hb-15), 1.38 (3H, s, H-19), 1.38 (3H, s, H-29), 1.33 (1H, overlapped, Hb-22), 1.06 (3H, s, H-30), 1.01 (3H, s, H-18), 0.91 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21); ¹³C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 38.2 (C-1), 30.2 (C-2), 176.3 (C-3), 87.9 (C-4), 48.6 (C-5), 32.6 (C-6), 74.1 (C-7), 163.6 (C-8), 136.4 (C-9), 42.2 (C-10), 202.4 (C-11), 51.5 (C-12), 46.2 (C-13), 52.0 (C-14), 30.2 (C-15), 27.8 (C-16), 51.1 (C-17), 18.3 (C-18), 25.6 (C-19), 37.1 (C-20), 18.3 (C-21), 32.0 (C-22), 31.9 (C-23), 176.3 (C-24), 71.4 (C-28), 24.9 (C-29), 24.8 (C-30)。以上数据和文献^[13]基本一致,故确定化合物**5**为formicatin A。

化合物 6 白色粉末, ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.24 (5H, m, Ar-H), 4.32 (1H, m, H-6), 3.72 (1H, m, H-3), 3.25 (1H, d, J = 4.7 Hz, Ha-11), 3.0 (1H, dd, J = 13.8, 4.7 Hz, Hb-11), 1.42 (1H, m, H-7), 0.72 (3H, d, J = 8.0 Hz, H-9), 0.67 (3H, d, J = 4.0 Hz, H-10); ¹³C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 169.3 (C-2, C-5), 60.8 (C-3), 57.2 (C-6), 39.8 (C-7), 24.7 (C-8), 12.0 (C-9), 15.3 (C-10), 39.7 (C-11), 137.0 (C-12), 131.7

(C-13, C-17), 129.5 (C-14, C-16), 128.2 (C-15)。以上数据和文献^[14]基本一致,故确定化合物6为(3*S*, 6*S*)-3-[(1*S*)-4-methylpropyl]-6-(phenylmethyl)-piperazine-2,5-dione。

参考文献

- Liu SY (刘思妤), Wang Y (王艳), He RR (何蓉蓉) *et al.* The chemical constituents of *Ganoderma lucidum*. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2008, 25: 183-187.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I 363.
- EI-Mekkawy S, Meselhy R, Nakamura N, *et al.* Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 1998, 49: 1651-1657.
- Hu LL (胡丽丽), Ma QY (马青云), Huang SZ (黄圣卓). Chemical constituents in *Ganoderma tropicum*. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志) 2013, 23: 115-119.
- Cheng CR, Yue QX, Wu ZY, *et al.* Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 2010, 73: 1579-1585.
- Ma L (马林), Wu F (吴丰), Chen RY (陈若芸). Analysis of triterpene constituents from *Ganoderma lucidum*. *Acta Pharm Sin* (药学学报) 2003, 38: 50.
- Yan YM, Ai J, Zhou LL, *et al.* Lingzhiols, unprecedented rotatory door-shaped meroterpenoids as potent and selective inhibitors of p-smad3 from *Ganoderma lucidum*. *Org Lett*, 2013, 15: 5488-5491.
- Luo Q, Wang XL, Di L, *et al.* Isolation and identification of renoprotective substances from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *Tetrahedr Lett* 2015, 71: 840-845.
- Luo Q, Di L, Dai WF, *et al.* Applanatumin A, a new dimeric meroterpenoid from *Ganoderma applanatum* that displays potent antifibrotic activity. *Org Lett* 2015, 17: 1110-1113.
- Dou M, Di L, Zhou LL, *et al.* Cochlearols A and B, polycyclic meroterpenoids from the fungus *Ganoderma cochlear* that have renoprotective activities. *Org Lett* 2014, 16: 6064-6067.
- Liu JQ, Wang CF, Peng XR, *et al.* New alkaloids from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. *Nat Prod Biopr* 2011, 1: 93-96.
- Lange J, Bissember AC, Banwell MG, *et al.* Synthesis of 2,3-dihydro-4(1*H*)-quinolones and the corresponding 4(1*H*)-quinolones via low-temperature Fries rearrangement of *N*-arylazetidines. *Aust J Chem* 2011, 64: 454-470.
- Niu XM, Qiu MH, Li ZR, *et al.* Two novel 3,4-*seco*-trinorlanostane triterpenoids isolated from *Ganoderma fornicatum*. *Tetrahedr Lett* 2004, 45: 2989-2993.
- Sark T, Hofmann T. Structures, sensory activity and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 7222-7231.