

反柄紫芝中的二个新化合物

秦付营^{1,2} 戴伟锋^{2,3} 程永现^{1,2*}¹河南中医药大学, 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; ³昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500

摘要: 采用色谱法从反柄紫芝的子实体中分离得到 4 个化合物, 波谱学方法鉴定了它们的结构, 分别为: cochlearol E (1)、cochlearol F (2)、ganocin A (3) 和 ganocin B (4)。其中化合物 1 和 2 是新化合物, 化合物 3 和 4 系文献已报道的源自本菌子实体的多环芳香杂萜。化合物 1、3 和 4 均是外消旋体, 对新化合物 1 进行了手性拆分并通过量子化学计算方法确定了其对映体的绝对构型。

关键词: 反柄紫芝; 灵芝科; 杂萜; 外消旋体; 绝对构型

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.6.001

Two New Compounds from *Ganoderma cochlear*QIN Fu-ying^{1,2}, DAI Wei-feng^{2,3}, CHENG Yong-xian^{1,2*}

¹Henan University 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; ³Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: Two new meroterpenoids termed cochlearols E (1) and F (2), along with two known meroterpenoids, ganocins A (3) and B (4) were isolated from the fruiting bodies of *Ganoderma cochlear*. The structures of the new compounds were identified on the basis of spectroscopic methods. In particular, compounds 1, 3 and 4 were isolated as racemic mixtures, chiral separation of 1 followed by computational methods assigned its absolute configuration.

Key words: *Ganoderma cochlear*; Ganodermataceae; meroterpenoids; racemates; absolute configuration

灵芝属于菌物类中药, 其在我国的应用已长达 2000 多年, 被誉为“中华仙草”。古时如《神农本草经》按五色将灵芝分为赤芝、黑芝、青芝、白芝、黄芝五类, 分类方法虽简单但亦表明药用灵芝有多种, 但目前《中华人民共和国药典》(2015 年版一部) 仅收录了赤芝与紫芝, 而实际上市场流通并药用的灵芝品种多达 10 余种, 反柄灵芝 (*Ganoderma cochlear*) 即是其中之一。反柄灵芝又名背柄紫灵芝、匙状灵芝, 因其形态上菌柄背生与紫芝相异而得名, 该灵芝分布于我国云南、福建、广东、广西、香港等地, 也可见于印度尼西亚等其它国家。灵芝属的研究虽备受关注, 但化学成分的研究相对局限于三萜、多糖等^[1], 我们曾从赤芝中发现了结构新颖的芳香杂萜类成分具有显著的肾保护和神经系统活性^[2,3], 从而促使我们对灵芝属的杂萜成分进行了深入的定向研究,

并有了诸多新发现^[4-7]。鉴于反柄灵芝具有重要的药用价值, 我们曾对其进行了研究并从中发现系列结构新颖的芳香杂萜, 部分化合物在体外呈现较好的抗肾脏纤维化作用和神经系统活性^[3,8]。为了进一步认识反柄灵芝中杂萜成分的结构特征, 我们重新提取了 200 kg 材料, 并取出 1000 g 提取物 (相当于原料 10.87 kg) 进行了针对性研究, 本文将报道从中鉴定的 4 个芳香杂萜, 其中 2 个是新化合物, 另 2 个则是他人从本菌子实体中首次报道的多环芳香杂萜成分。

1 仪器与材料

Shimadzu UV-2401PC 紫外可见光分光光度计; Horbia SEPA-300 型数字式旋光仪; Xevo TQ-S 质谱仪、Bruker HCT/Esquire 质谱仪及 Agilent 6200 系列 TOF/6500 系列高分辨质谱仪; Bruker AM-400 及 Avance 600 MHz 核磁共振仪 (TMS 为内标, δ 为 ppm, J 为 Hz); 硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); RP-18 (40 ~ 63 μm , 日本 Daiso); MCI gel CHP 20P (75 ~

收稿日期: 2016-02-17 接受日期: 2016-04-29

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

150 μm ,日本三菱公司产品); Sephadex LH-20(25 ~ 100 μm ,Pharmacia 公司)。Agilent 1200 型 HPLC 和北京创新通恒 LC3000 型 HPLC ,色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm \times 9.4 mm i. d. 5 μm) ,Thermo Hypersil GOLD-C₁₈(250 \times 21.2 mm i. d. 5 μm) 和 Daicel Chiralpak IC(250 mm \times 10 mm i. d. 5 μm)。化学计算软件为 Gaussian 09、Conflex 7 和 SpecDis ,计算任务在 Linux 系统执行。

反柄灵芝于 2014 年 7 月购自中国广东省同康制药有限公司 ,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-0589)保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

取干燥反柄灵芝子实体 200 kg ,粉碎后用 80% 的乙醇回流提取(3 \times 120 L ,3,3 h) ,浓缩得总提取物。取出相当于原药材 10.87 kg 的提取物(1000 g)用水混悬后以氯仿萃取 3 次 ,得到氯仿萃取部分 450 g ,取出其中的 300 g ,其经 MCI gel CHP 20P 柱层析 ,以甲醇-水(60% ~ 100%)梯度洗脱 ,得到 5 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 5)。Fr. 2(30 g)行 MCI gel CHP 20P 柱(甲醇-水,70% ~ 100%)得 6 个组分(Fr. 2.1 ~ Fr. 2.6)。其中 Fr. 2.6(6 g)先经 RP-18 柱(甲醇-水,80% ~ 100%) ,再行 Sephadex LH-20(MeOH)和制备液相色谱得化合物 3(1.5 mg)和 4(1.0 mg)。Fr. 3(80 g)经硅胶柱层析(氯仿-甲醇,99:1,96:4,90:10,70:30,0:100)得 4 个组分(Fr. 3.1 ~ Fr. 3.4)。其中 Fr. 3.1(10 g)经 RP-18 柱(甲醇-水,80% ~ 100%)得 6 个组分(Fr. 3.1.1 ~ Fr. 3.1.6)。其中 Fr. 3.1.4(1.5 g)先后经制备薄层色谱(氯仿-甲醇,9:1)和 Sephadex LH-20(MeOH)纯化得化合物 1(10 mg);同样,Fr. 3.1.5(1.8 g)先后经制备薄层精制(氯仿-甲醇,9:1)和 Sephadex LH-20(MeOH)纯化得化合物 2(20 mg)。化合物 2 为外消旋体 ,其经 Daicel Chiralpak IC 手性柱(250 mm \times 10 mm i. d. 5 μm)拆分(正己烷-乙醇,96:4)为 (+)-2(1.8 mg)和 (-)-2(1.6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 淡黄色固体 ,UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 328 (3.79) ,269 (4.84) ,227 (4.40) ,202 (4.44) nm。由 ¹³C NMR、DEPT 谱及高分辨质谱

[m/z 311.1645 [M-H]⁻(calcd for C₂₀H₂₃O₃, 311.1653)]可以确定其分子式为 C₂₀H₂₄O₃(不饱和度为 9)。¹H NMR 谱芳香区显示一个典型的 ABX 自旋系统(δ_{H} 7.38, d, J = 3.0 Hz, H-3; δ_{H} 7.24, dd, J = 9.0, 3.0 Hz, H-5; δ_{H} 7.45, d, J = 9.0 Hz, H-6) ,提示结构中含有一个 1,2,4-三取代的苯环。¹³C NMR 及 DEPT 谱(表 1)给出 3 个甲基 4 个亚甲基,6 个次甲基(烯区或芳香区)及 7 个季碳(1 个羰基,3 个连氧烯碳)。以上信号提示化合物 1 与 cochlearol C^[9] 结构上相近。仔细比较其 NMR 数据发现化合物 1 的 C-2' 向高场位移 ,表明 C-2' 无烷基取代 ,这一推论也被观测到的 H-2' 与 C-1', C-3', C-4' 的 HMBC 相关所证实(图 1)。化合物 1 的侧链上含有 2 个双键 ,其中 C-6' 与 C-7' 构成的双键因 H-6'/H-8' 的 ROESY 相关而被确定为反式(图 1)。至此化合物 1 的结构得以鉴定 ,并命名为 cochlearol E。化合物 1 的核磁及其它相关详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载(www.trew.ac.cn)。从化合物 1 的结构可以看出 ,其侧链实际上为失去 1 个碳原子的降倍半萜。另外 ,值得一提的是化合物 1 的 C-3' 明显向低场位移 ,这一现象源于色原酮结构中的共轭效应与诱导效应 ,类似现象在含有色原酮结构的 coniochaetone A 和 coniochaetone B 中也同样被观察到^[10]。

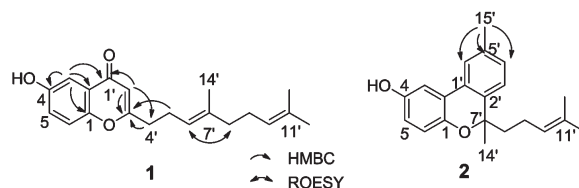


图 1 化合物 1 和 2 的关键 HMBC 和 ROESY 相关
Fig. 1 Key HMBC and ROESY correlations for 1 and 2

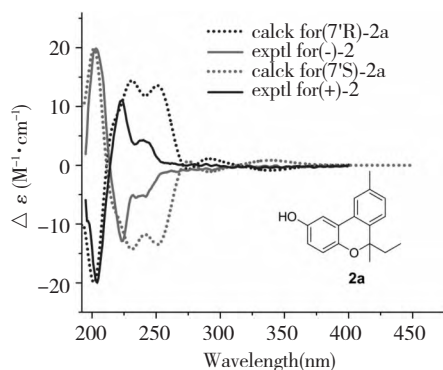


图 2 化合物 (+)-2 和 (-)-2 的计算 ECD 与实验值比较
Fig. 2 Calculated and experimental ECD for compounds (+)-2 and (-)-2

表1 化合物1和2的氢谱(600 MHz)和碳谱(150 MHz)数据(CD₃OD, δ in ppm, J in Hz)
Table 1 ¹H (600 MHz) and ¹³C NMR (150 MHz) data of 1 and 2 (CD₃OD, δ in ppm, J in Hz)

Position	1		Position	2	
	δ_{H}	δ_{C}		δ_{H}	δ_{C}
1		152.1 s	1		146.8 s
2		125.0 s	2		123.4 s
3	7.38 (d, 3.0)	108.8 d	3	7.19 (d, 2.8)	109.4 d
4		156.2 s	4		150.1 s
5	7.24 (dd, 9.0, 3.0)	125.1 d	5	6.70 (dd, 8.8, 2.8)	116.3 d
6	7.45 (d, 9.0)	120.5 d	6	6.82 (d, 8.8)	118.8 d
1'		180.7 s	1'		128.6 s
2'	6.16 (s)	109.6 d	2'		136.4 s
3'		172.2 s	3'	7.08 (overlapped)	124.0 d
4'	2.71 (t, 7.2)	35.3 t	4'	7.08 (overlapped)	128.9 d
5'	2.45 (m)	26.2 t	5'		128.6 s
6'	5.13 (t, 7.5)	123.0 d	6'	7.45 (br s)	123.0 d
7'		138.4 s	7'		79.4 s
8'	1.94 (overlapped)	40.6 t	8'	Ha 1.92 (m) Hb 1.70 (m)	39.7 t
9'	1.94 (overlapped)	27.6 t	9'	2.04 (m)	22.9 t
10'	4.95 (overlapped)	125.1 d	10'	5.03 (t, 7.6)	124.1 d
11'		132.4 s	11'		131.8 s
12'	1.57 (s)	25.8 q	12'	1.62 (overlapped)	25.5 q
13'	1.51 (s)	17.7 q	13'	1.52 (s)	17.1 q
14'	1.54 (s)	16.1 q	14'	1.62 (overlapped)	25.8 q
			15'	2.38 (s)	21.4 q

化合物2 黄色固体, UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 334 (3.75) 273 (3.93) 241 (4.12) 204 (4.51) nm. $[\alpha]_{\text{D}}^{19} + 21.5$ (c 0.18, MeOH), CD (MeOH) $\Delta\epsilon_{240} + 4.29$, $\Delta\epsilon_{223} + 11.01$, $\Delta\epsilon_{204} - 19.97$, (+) -2; $[\alpha]_{\text{D}}^{19} - 34.8$ (c 0.06, MeOH), CD (MeOH) $\Delta\epsilon_{242} - 5.35$, $\Delta\epsilon_{223} - 12.92$, $\Delta\epsilon_{204} + 19.85$, (-) -2。从¹³C NMR、DEPT谱及高分辨质谱 [m/z : 353.1757 [M + COOH]⁺ (calcd for C₂₂H₂₅O₄, 353.1758)] 确定化合物2的分子式为C₂₁H₂₄O₂ (不饱和度为10)。化合物2的¹H NMR谱芳香区给出1个典型的ABX自旋系统(δ_{H} 7.19, d, $J = 2.8$ Hz, H-3; δ_{H} 6.70, dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz, H-5; δ_{H} 6.82, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 表明结构中存在1个1,2,4-三取代的苯环。¹³C NMR及DEPT谱(表1)显示21个碳信号, 分属于4个甲基, 2个亚甲基, 7个烯区次甲基以及8个季碳(2个连氧烯碳和1个连氧脂肪碳)。比较化合物2与ganocochlearin C^[11]发现二者的NMR数据极为相似, 其区别在于化合物2的C-15'在ganocochlearin C

中被氧化成了醛基, 这可从H₃-15'与C-4', C-5'及C-6'的HMBC相关加以证实(图1)。手性柱分析表明化合物2同ganocochlearin C一样均为外消旋体, 但由于文献中未对ganocochlearin C对映体的绝对构型进行归属, 因此无法通过CD谱比较确定化合物2对映体的立体化学。为此, 我们对化合物2进行了手性拆分, 并拟通过量子化学计算的方法确定单手性化合物的绝对构型。考虑到化合物2中侧链对CD的贡献不大, 但却会因自由旋转产生多个构象, 增加量子化学计算的任务量, 因此我们对简化的化合物2(即2a, 图2)采用量子化学计算的方法(B3LYP-SCRF(PCM)/6-311G(d,p)//B3LYP/6-311G(d,p), MeOH)计算了7'R和7'S的ECD谱^[12], 结果表明计算的7'R和7'S的ECD谱分别与化合物(+)-2和(-)-2的实验值吻合较好(图2), 故确定化合物(+)-2和(-)-2的构型分别为7'R和7'S。至此, 化合物2的结构得以鉴定, 并命名为cochlearol F。化合物2的核磁及其它相关详细结构鉴定数据原始图

谱可从本刊官网免费下载(www.trew.ac.cn)。

化合物 3 淡黄色固体,ESI-MS: m/z 339 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 9.45 (1H, s, H-15'), 6.97 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-3), 6.77 (1H, s, H-2'), 6.63 (1H, overlapped, H-6), 6.63 (1H, overlapped, H-5), 2.47 (1H, m, H-10'), 2.35 (1H, m, Ha-4'), 2.13 (1H, overlapped, Hb-4'), 2.13 (1H, overlapped, Ha-5'), 2.13 (1H, overlapped, Ha-8'), 1.70 (1H, overlapped, Hb-5'), 1.70 (2H, overlapped, H-9'), 1.70 (1H, overlapped, Hb-8'), 1.40 (3H, s, H-14'), 1.29 (3H, s, H-13'), 1.18 (3H, s, H-12'); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 195.3 (C-15'), 153.3 (C-4), 152.8 (C-2'), 147.4 (C-1), 140.7 (C-3'), 131.5 (C-2), 120.3 (C-6), 116.8 (C-5), 114.4 (C-3), 90.1 (C-7'), 85.1 (C-11'), 79.5 (C-1'), 63.1 (C-10'), 62.2 (C-6'), 40.6 (C-8'), 32.8 (C-13'), 31.8 (C-5'), 26.1 (C-12'), 25.0 (C-9'), 23.7 (C-14'), 20.1 (C-4')。以上数据和文献^[13]对照,基本一致,故确定化合物 3 为 ganocin A。化合物 3 为外消旋体:固定相为 Daicel Chiralpak IC(250 mm × 10 mm i. d. 5 μ m),流动相为正己烷-乙醇(85:15),保留时间分别为 12.3 和 12.8 min。

化合物 4 黄色粉末,ESI-MS: m/z 309 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.02 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-3), 6.82 (1H, dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, H-5), 6.65 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 6.50 (1H, s, H-2'), 4.63 (1H, s, Ha-13'), 4.62 (1H, s, Hb-13'), 3.13 (1H, t-like, $J = 8.0$ Hz, H-10'), 2.74 (1H, m, Ha-2'), 2.53 (1H, m, Hb-2'), 2.18 (1H, overlapped, Ha-8'), 2.18 (1H, overlapped, Ha-9'), 2.04 (1H, overlapped, Hb-8'), 2.04 (1H, overlapped, Hb-9'), 1.80 (1H, m, Ha-5'), 1.56 (1H, overlapped, Hb-5'), 1.41 (3H, s, H-12'), 1.28 (3H, s, H-14'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 199.3 (C-3'), 152.6 (C-1'), 149.5 (C-4), 149.4 (C-1), 145.1 (C-11'), 121.4 (C-5), 120.7 (C-2'), 119.7 (C-2), 119.4 (C-6), 114.5 (C-13'), 109.3 (C-3), 89.0 (C-7'), 53.0 (C-10'), 51.5 (C-6'), 37.9 (C-8'), 33.9 (C-5'), 33.5 (C-4'), 28.1 (C-9'), 23.1 (C-12'), 19.2 (C-14')。以上数据和文献^[13]对照基本一致,故确定化合物 4 为

ganocin B。化合物 4 为外消旋体:固定相为 Daicel Chiralpak IC(250 mm × 10 mm i. d. 5 μ m),流动相为正己烷-乙醇(85:15),保留时间分别为 13.9 和 19.8 min。

参考文献

- 1 Paterson RRM. *Ganoderma* - a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 2006 67: 1985-2001.
- 2 Yan YM, Ai J, Zhou LL, et al. Lingzhiols, unprecedented rotary door-shaped meroterpenoids as potent and selective inhibitors of p-Smad3 from *Ganoderma lucidum*. *Org Lett*, 2013, 15: 5488-5491.
- 3 Zhou FJ, Nian Y, Yan YM, et al. Two new classes of T-type calcium channel inhibitors with new chemical scaffolds from *Ganoderma cochlear*. *Org Lett* 2015, 17: 3082-3085.
- 4 Luo Q, Wang XL, Di L, et al. Isolation and identification of renoprotective substances from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *Tetrahedron* 2015, 71: 840-845.
- 5 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.
- 6 Luo Q, Tian L, Di L, et al. (\pm)-Sinensilactam A, a pair of rare hybrid metabolites with Smad3 phosphorylation inhibition from *Ganoderma sinensis*. *Org Lett* 2015, 17: 1565-1568.
- 7 Yan YM, Wang XL, Zhou LL, et al. Lingzhiolactones from *Ganoderma lingzhi* ameliorate adriamycin-induced nephropathy in mice. *J Ethnopharmacol* 2015, 176: 385-393.
- 8 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.
- 9 Dou M, Li RT, Cheng YX. Minor compounds from fungus *Ganoderma cochlear*. *Chin Herbal Med* 2016, 8: 85-88.
- 10 Wang HJ, Gloer JB, Scott JA, et al. Coniochaetones A and B: New antifungal benzopyranones from the coprophilous fungus *Coniochaeta saccardoii*. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36: 5847-5850.
- 11 Peng XR, Liu JQ, Wang CF, et al. Unusual prenylated phenols with antioxidant activities from *Ganoderma cochlear*. *Food Chem* 2015, 171: 251-257.
- 12 Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, et al. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc, Wallingford CT 2009.
- 13 Peng XR, Liu JQ, Wan LS, et al. Four new polycyclic meroterpenoids from *Ganoderma cochlear*. *Org Lett*, 2014, 16: 5262-5265.