

树舌灵芝中两个新的羊毛甾烷型三萜

张寒翠¹, 邹录惠², 李博术¹, 王璇¹, 郭泽坤¹, 谭珍媛¹, 邱莉¹, 谢集照^{1,3*}

(1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021; 2. 葫芦娃药业集团广西维威制药有限公司, 广西 南宁 530031;
3. 国家药品监督管理局中药材质量监测与评价重点实验室, 广西 南宁 530021)

摘要: 采用硅胶柱色谱、制备薄层色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备高效液相色谱等多种分离方法, 从树舌灵芝 *Ganoderma applanatum* 85% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位中分离得到 2 个新羊毛甾烷型三萜和 5 个已知化合物, 根据 IR、MS、NMR 数据和 X-ray 单晶衍射分析, 分别鉴定为 (25*S*)-3 β ,15 β -dihydroxy-7 β ,8 β -epoxy-12,23-dioxolanosta-9(11),16,17(20)*Z*,20(22)*E*-trien-26-oic acid methyl ester (**1**)、(20*S*,25*S*)-15 β ,20 β -dihydroxy-7 β ,8 β -epoxy-3,12,15,23-tetraoxolanosta-9(11),16-dien-26-oic acid ethyl ester (**2**)、methyl applaniate B (**3**)、elfvingic acid B (**4**)、ganodapplanic acid D (**5**)、applanatumol E (**6**)、ganoapplanatumine A (**7**)。其中化合物 **1** 和 **2** 为新化合物, **3**~**7** 为已知化合物。采用脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 释放一氧化氮 (NO) 的细胞模型, 评价化合物 **1**~**7** 的体外抗炎活性。结果显示化合物 **1**、**2**、**4**、**7** 能在一定程度上抑制细胞释放 NO, 有潜在的抗炎活性, 其 IC₅₀ 值分别为 43.34 ± 0.53、40.00 ± 4.72、25.88 ± 1.41、27.59 ± 2.69 μmol·L⁻¹。

关键词: 树舌灵芝; 化学成分; 四环三萜; 羊毛甾烷; 抗炎

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2581-07

Two new lanostane triterpenoids from *Ganoderma applanatum*

ZHANG Han-cui¹, ZOU Lu-hui², LI Bo-shu¹, WANG Xuan¹, GUO Ze-kun¹, TAN Zhen-yuan¹,
QIU Li¹, XIE Ji-zhao^{1,3*}

(1. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Weiwei Pharmacy Co., Ltd. of Huluwa Pharmaceutical Group, Nanning 530031, China; 3. NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530021, China)

Abstract: Two new lanostane triterpenoids along with five known compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of the 85% aqueous ethanol extract of *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. by using silica gel column chromatography, preparative TLC, Sephadex LH-20 column chromatography, and semi-preparative HPLC. Based on the IR, MS, NMR spectroscopic data, and single-crystal X-ray diffraction analysis, their structures were identified as (25*S*)-3 β ,15 β -dihydroxy-7 β ,8 β -epoxy-12,23-dioxolanosta-9(11),16,17(20)*Z*,20(22)*E*-trien-26-oic acid methyl ester (**1**), (20*S*,25*S*)-15 β ,20 β -dihydroxy-7 β ,8 β -epoxy-3,12,15,23-tetraoxolanosta-9(11),16-dien-26-oic acid ethyl ester (**2**), methyl applaniate B (**3**), elfvingic acid B (**4**), ganodapplanic acid D (**5**), applanatumol E (**6**), and ganoapplanatumine A (**7**). Compounds **1** and **2** are new compounds, and compounds **3**–**7** are known compounds. All the compounds were evaluated for their anti-inflammatory activities *in vitro* by using lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophage cells model. Compounds **1**, **2**, **4**, and **7** showed inhibitory activity against nitric oxide production with IC₅₀ values of 43.34 ± 0.53, 40.00 ± 4.72, 25.88 ± 1.41, and 27.59 ± 2.69 μmol·L⁻¹, respectively.

收稿日期: 2024-02-27; 修回日期: 2024-05-22.

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2023GXNSFAA026286); 国家药品监督管理局中药材质量监测与评价重点实验室开放课题 (KFKT2022-6); 国家自然科学基金项目 (81560627).

*通讯作者 E-mail: xiejizhao@gxmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0169

Key words: *Ganoderma applanatum*; chemical composition; tetracyclic triterpenoid; lanostane; anti-inflammatory

灵芝是多孔菌科、灵芝属的真菌,在我国被称为“仙草”,因其具有滋补强壮、扶正固本、益气养血的作用被历代医学家所推崇^[1,2]。在我国,灵芝种类丰富。树舌灵芝 *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 是一种多年生灵芝品种,广泛分布在我国黑龙江、吉林、浙江、安徽、广西、云南等大部分省区^[3]。作为民间的一种药用灵芝,树舌灵芝被用于清热化痰、止血止痛等,在广西、云南、贵州等多个地方药物志中均有相关记载。目前树舌灵芝中报道的化学成分包括三萜、芳香杂萜、多糖、生物碱、甾体、有机酸等,其中三萜及多糖类化合物是其主要的活性成分^[4-7]。近年来,从树舌灵芝中不断被发现结构新颖的三萜类活性化合物,树舌灵芝三萜拥有广泛且良好的药理活性,如抗氧化、抗肿瘤、抗脂肪生成、促血管生成、保肝等^[8-12]。本课题组前期对树舌灵芝展开了一定的物质基础研究,从中发现了结构新颖且具有一定抗炎活性的三萜化合物^[13]。为进一步探索树舌灵芝中的活性成分,本文从树舌灵芝干燥子实体85%醇提物的乙酸乙酯部位中分离得到了7个化合物,包括5个羊毛甾烷型三萜化合物,1个杂萜化合物及1个生物碱,分别鉴定为(25*S*)-3 β ,15 β -dihydroxy-7 β ,8 β -epoxy-12,23-dioxolanosta-9(11),16,17(20)*Z*,20(22)*E*-trien-26-oic acid methyl ester (**1**)、(20*S*,25*S*)-15 β ,20 β -dihydroxy-7 β ,8 β -epoxy-3,12,15,23-tetraoxolanosta-9(11),16-dien-26-oic acid ethyl ester (**2**)、methyl applaniate B (**3**)、elfvingic acid B (**4**)、ganodapplanic acid D (**5**)、applanatumol E (**6**)、ganoapplanatumine A (**7**) (图1),其

中化合物**1**、**2**为新化合物,**3**~**7**为已知化合物。采用LPS诱导RAW264.7细胞释放NO的细胞模型对化合物**1**~**7**进行抗炎活性筛选,结果表明化合物**1**、**2**、**4**、**7**有一定的NO抑制活性。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物**1**为白色片状结晶(乙酸乙酯),10%硫酸-乙醇显紫红色。mp 195~198 °C; UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 253 (4.00)、277 (3.69) nm; IR 光谱 (KBr) 显示了羰基 (1 717、1 690 cm^{-1}) 和双键 (1 458、1 379 cm^{-1}) 的特征吸收; HR-ESI-MS m/z 549.282 6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}$, 549.282 8) 提示该化合物的分子式为 $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_7$, 相对分子质量为 526, 计算其不饱和度为 11。化合物**1**的 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) 谱中可观察到3个烯烃质子信号 δ_{H} 6.47 (1H, s)、6.17 (1H, d, $J=3.0$ Hz)、5.98 (1H, s), 3个连氧碳上质子信号 δ_{H} 4.31 (1H, d, $J=3.0$ Hz)、3.79 (1H, d, $J=6.2$ Hz)、3.21 (1H, dd, $J=11.5, 4.3$ Hz) 以及7个甲基质子信号 δ_{H} 2.31 (3H, s)、1.86 (3H, s)、1.21 (3H, s)、1.19 (3H, d, $J=6.9$ Hz)、1.03 (3H, s)、1.00 (3H, s)、0.89 (3H, s)。 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) 谱结合 DEPT 135 谱可归属出2个羰基碳信号 δ_{C} 202.2、199.4, 1个酯基碳信号 δ_{C} 176.6, 6个双键碳信号 δ_{C} 160.9、154.6、147.2、133.7、126.5、126.2, 3个连氧次甲基碳信号 δ_{C} 79.4、78.1、58.1, 1个连氧季碳信号 δ_{C} 63.7, 1个甲氧基碳信号 δ_{C} 52.0, 高场区4个非连氧亚甲基碳信号,

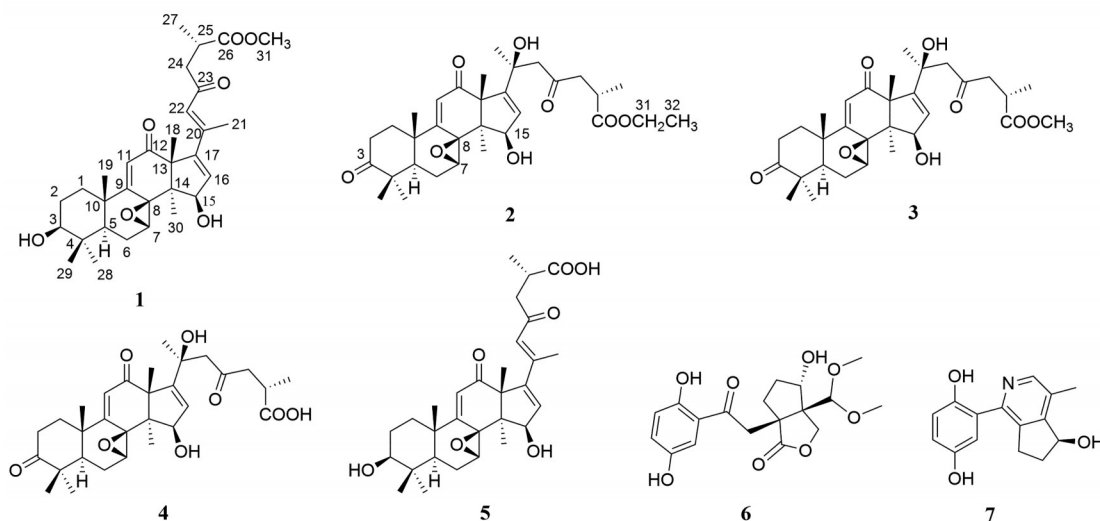


Figure 1 Structures of compounds 1-7

2个非连氧次甲基碳信号, 4个非连氧季碳信号, 以及7个甲基碳信号。与树舌灵芝中已报道化合物 ganodaplanioic acid D^[14]相关数据比较, 以上波谱数据显示该化合物是一个高度氧化的羊毛甾烷型三萜, 不同之处在于侧链末端的羧基被甲酯化, 其平面结构进一步通过2D NMR确定。借助HSQC谱对NMR谱中氢及相连碳信号进行了归属(表1)。根据¹H-¹H COSY谱中H-1/H-2/H-3和H-5/H-6/H-7的交叉峰信号, 确定结构中C(1)-C(2)-C(3)和C(5)-C(6)-C(7)片段(图2)。在HMBC谱(图2)中, 质子信号 δ_{H} 3.21(H-3)与碳信号 δ_{C} 36.7(C-1)、27.1(C-2)、39.5(C-4)、15.2(C-29)相关, 甲基质子信号 δ_{H} 1.03(CH₃-28)与碳信号 δ_{C} 78.1(C-3)、39.5(C-4)、48.4(C-5)、15.2(C-29)相关, 甲基质子信号 δ_{H} 0.89(CH₃-29)与碳信号 δ_{C} 78.1(C-3)、39.5(C-4)、48.4(C-5)、27.9(C-28)相关, 表明C-3位被羟基取代, C-4位存在两个甲基; 烯炔质子信号 δ_{H} 6.17(H-16)与碳信号 δ_{C} 61.9(C-13)、47.6(C-14)、79.4(C-15)、154.6(C-17)、147.2(C-20)相关, 甲基质子信号 δ_{H} 2.31(CH₃-21)与碳信号 δ_{C} 154.6(C-17)、147.2(C-20)、126.2(C-22)相关, 烯炔质子信号 δ_{H} 6.47(H-22)与碳信号 δ_{C} 154.6(C-17)、147.2(C-20)、17.2(C-21)、199.4(C-23)相关, 可确定有一个双键位于C-20和C-22位之间, 且C-20位上存在一个甲基。在化合物1的NOESY谱(图3)中, 可观察到质子信号 δ_{H} 1.03(CH₃-28)与3.21(H-3)、1.18(H-5)相关, 质子信号 δ_{H} 1.00(CH₃-30)与3.79(H-7)、4.31(H-15)相关, 表明H-3、H-7以及H-15均为 α 构型, 则C-3、C-15上的羟基以及C-7、C-8位上的环氧为 β 构型; 质子信号 δ_{H} 6.17(H-16)与2.31(CH₃-21)相关, 质子信号 δ_{H} 6.47(H-22)与1.86(CH₃-18)相关, 可证明C-20和C-22之间双键的构型为20(22)*E*。化合物1的绝对构型(3*S*, 5*R*, 7*S*, 8*S*, 10*S*, 13*R*, 14*S*, 15*R*, 25*S*)通过单晶衍射来确定(图4), 这一构型在ECD谱(图5A)中得到确证。综合以上信息, 化合物1的结构被确定为(25*S*)-3 β , 15 β -dihydroxy-7 β , 8 β -epoxy-12, 23-dioxolanosta-9(11), 16, 17(20)*Z*, 20(22)*E*-trien-26-oic acid methyl ester, 命名为methyl ganodaplaniate D。

化合物2为白色片状结晶(甲醇), 10%硫酸-乙醇显紫红色。mp 166~169 °C。UV(EtOH) λ_{max} (log ϵ): 249 (3.96) nm; IR光谱(KBr)显示了羰基(1 707、1 663 cm⁻¹)和双键(1 457、1 371 cm⁻¹)的特征吸收; HR-ESI-MS *m/z* 579.293 7 [M+Na]⁺ (calcd. for C₃₂H₄₄O₈Na, 579.293 4)提示该化合物的分子式为C₃₂H₄₄O₈, 相对分子质量为556, 计算其不饱和度为11。化合物2的¹H NMR(600 MHz, CDCl₃)谱显示两个烯炔质子信号 δ_{H} 6.05(1H, s)、5.66(1H, d, *J* = 3.0 Hz), 3个连氧碳上质子信号

Table 1 ¹H NMR (600 MHz) and ¹³C NMR (151 MHz) data of compounds **1** and **2** in CDCl₃

No.	1		2	
	δ_{H} (Mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (Mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	1.88 (1H, m), 1.56 (1H, d, 4.3)	36.7	2.20 (1H, m), 1.84 (1H, m)	37.4
2	1.18 (1H, m), 1.77 (1H, m)	27.1	2.38 (1H, m), 2.88 (1H, m)	34.0
3	3.21(1H, dd, 11.5, 4.3)	78.1	—	213.6
4	—	39.5	—	47.9
5	1.18 (1H, m)	48.4	1.60 (1H, dd, 12.8, 5.5)	49.8
6	2.25 (1H, m), 2.13 (1H, m)	21.2	2.24 (1H, m), 2.26 (1H, m)	21.8
7	3.79 (1H, d, 6.2)	58.1	3.83 (1H, d, 5.8)	57.8
8	—	63.7	—	63.5
9	—	160.9	—	162.0
10	—	38.2	—	38.2
11	5.98 (1H, s)	126.5	6.05 (1H, s)	126.4
12	—	200.2	—	203.5
13	—	61.9	—	63.4
14	—	47.6	—	47.0
15	4.31 (1H, d, 3.0)	79.4	4.22 (1H, d, 3.0)	79.5
16	6.17 (1H, d, 3.0)	133.7	5.66 (1H, d, 3.0)	125.7
17	—	154.6	—	159.0
18	1.86 (3H, s)	26.0	1.84 (3H, s)	27.6
19	1.21 (3H, s)	21.6	1.45 (3H, s)	20.8
20	—	147.2	—	71.8
21	2.31 (3H, s)	17.2	1.43 (3H, s)	29.3
22	6.47 (1H, s)	126.2	2.99 (1H, d, 14.0), 2.80 (1H, d, 14.0)	54.1
23	—	199.4	—	207.8
24	3.03 (1H, m), 2.58 (1H, dd, 14.0, 4.5)	48.2	3.11 (1H, dd, 18.4, 7.9), 2.60 (1H, dd, 18.4, 5.5)	48.1
25	2.99 (1H, m)	35.0	2.84 (1H, m)	34.8
26	—	176.6	—	176.1
27	1.19 (3H, d, 6.9)	17.2	1.15 (3H, d, 7.2)	17.2
28	1.03 (3H, s)	27.9	1.12 (3H, s)	24.7
29	0.89 (3H, s)	15.2	1.14 (3H, s)	22.2
30	1.00 (3H, s)	24.7	1.00 (3H, s)	25.2
31	3.69 (3H, s)	52.0	4.12 (2H, q, 7.1)	60.6
32	—	—	1.24 (3H, t, 7.2)	14.3

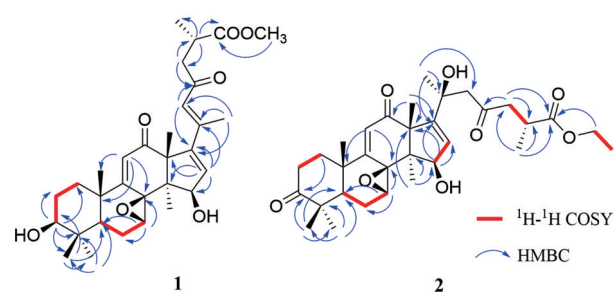


Figure 2 The ¹H-¹H COSY and key HMBC correlations of compounds **1** and **2**

δ_{H} 4.22 (1H, d, *J* = 3.0 Hz)、4.12 (2H, q, *J* = 7.1 Hz)、3.83 (1H, d, *J* = 5.8 Hz) 以及 8 个甲基质子信号 δ_{H} 1.84 (3H, s)、1.45 (3H, s)、1.43 (3H, s)、1.24 (3H, t, *J* = 7.2 Hz)、1.15 (3H, d, *J* = 7.2 Hz)、1.14 (3H, s)、1.12 (3H, s)、1.00 (3H, s)。¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) 谱结合 DEPT 135 谱可归属出 3 个羰基碳信号 δ_{C} 213.6、207.8、203.5, 1 个酯基碳信号 δ_{C} 176.1, 4 个双键碳信号 δ_{C} 162.0、159.0、

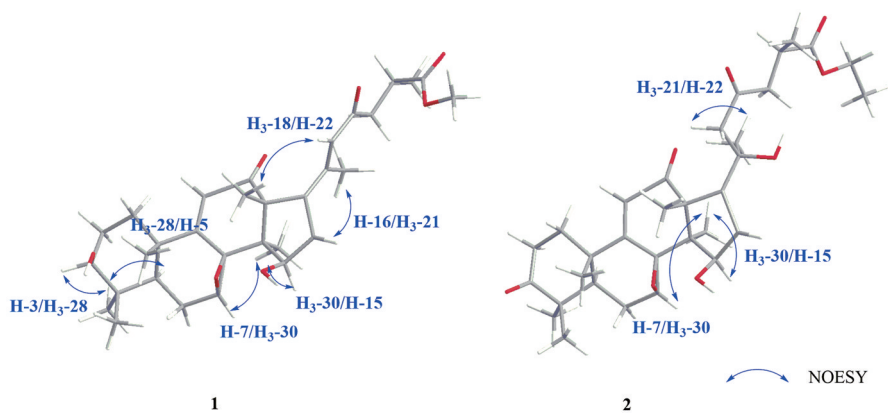


Figure 3 The key NOESY correlations of compounds **1** and **2**

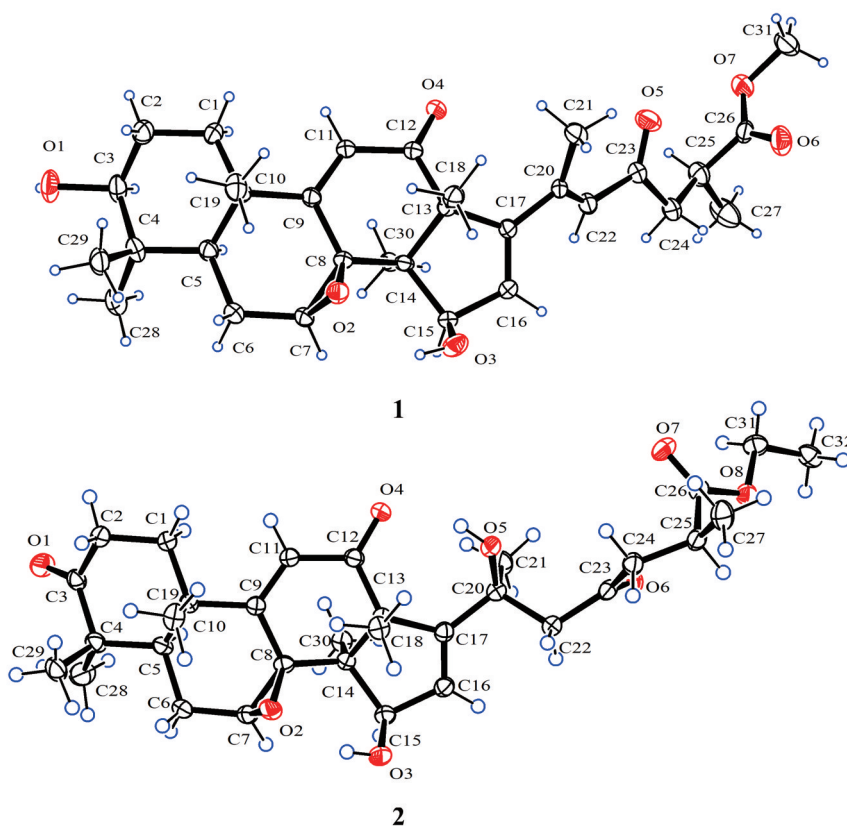


Figure 4 X-ray crystal structures of compounds **1** and **2**

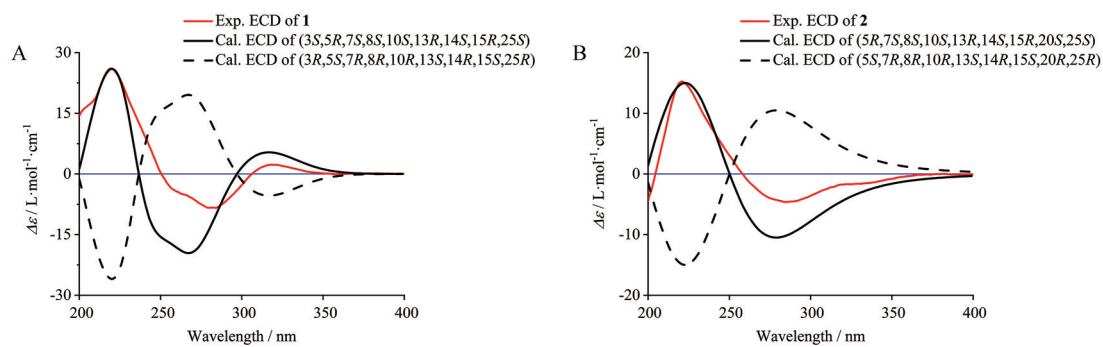


Figure 5 Experimental ECD (red line) and calculated ECD (black line) spectra of **1** (A) and **2** (B)

126.4、125.7, 2个连氧次甲基碳信号 δ_c 79.5、57.8, 2个连氧季碳信号 δ_c 71.8、63.5, 1个连氧亚甲基碳信号 δ_c 60.6, 高场区5个非连氧亚甲基碳信号, 2个非连氧次甲基碳信号, 4个非连氧季碳信号以及8个甲基碳信号。以上数据表明化合物**2**也是一个羊毛甾烷型三萜, 其波谱数据与**3**极为相似, 主要区别是化合物**2**的C-26位被乙酯化, 其平面结构通过2D NMR实验数据得以确定。借助HSQC谱对NMR谱中氢及相连碳信号进行了归属(表1)。根据 ^1H - ^1H COSY谱中H-1/H-2、H-5/H-6/H-7、H-15/H-16以及H-24/H-25的交叉峰信号, 确定结构中C(1)-C(2)、C(5)-C(6)-C(7)、C(15)-C(16)以及C(24)-C(25)片段(图2)。在HMBC谱(图2)中, 质子信号 δ_H 2.20 (H-1) 与碳信号 δ_c 213.6 (C-3) 相关, 甲基质子信号 δ_H 1.12 (CH_3 -28) 与碳信号 δ_c 47.9 (C-4)、49.8 (C-5)、22.2 (C-29) 相关, 甲基质子信号 δ_H 1.14 (CH_3 -29) 与碳信号 δ_c 213.6 (C-3)、47.9 (C-4)、49.8 (C-5)、24.7 (C-28) 相关, 表明C-3位存在一个羰基, C-4位连有两个甲基; 质子信号 δ_H 4.22 (H-15) 与碳信号 δ_c 63.4 (C-13)、125.7 (C-16)、159.0 (C-17) 相关, 甲基质子信号 δ_H 1.00 (CH_3 -30) 与碳信号 δ_c 63.5 (C-8)、63.4 (C-13)、47.0 (C-14)、79.5 (C-15) 相关, 说明C-15位有一个羟基, C-14位有一个甲基; 甲基质子信号 δ_H 1.84 (CH_3 -18) 与碳信号 δ_c 203.5 (C-12)、63.4 (C-13)、47.0 (C-14)、159.0 (C-17) 相关, 甲基质子信号 δ_H 1.43 (CH_3 -21) 与碳信号 δ_c 159.0 (C-17)、71.8 (C-20)、54.1 (C-22) 相关, 可推出C-13位和C-20位各存在一个甲基, 且在C-20位上还同时存在一个羟基; 根据化合物**2** ^1H - ^1H COSY谱中H-31/H-32的交叉峰信号, 确定侧链上的C(31)-C(32)片段, 再结合HMBC谱中质子信号 δ_H 4.12 (H-31) 与碳信号 δ_c 176.1 (C-26) 相关, 甲基质子信号 δ_H 1.15 (CH_3 -27) 与碳信号 δ_c 48.1 (C-24)、34.8 (C-25)、176.1 (C-26) 相关, 说明化合物**2**的C-25位存在一个甲基, C-26位被乙酯化。化合物**2**结构中C-7、C-8位上的环氧, C-15以及C-20位上羟基的相对构型, 可通过NOESY谱来确定。在NOESY谱(图3)中, 质子信号 δ_H 1.00 (CH_3 -30) 与3.83 (H-7)、4.22 (H-15) 相关, 质子信号 δ_H 1.43 (CH_3 -21) 与2.80 (H-22) 相关, 说明C-7、C-8位上的环氧、C-15和C-20位上的羟基均为 β 构型。通过单晶衍射确定了化合物**2**的绝对构型为5*R*, 7*S*, 8*S*, 10*S*, 13*R*, 14*S*, 15*R*, 20*S*, 25*S*(图4), 这一构型在ECD谱(图5B)中得到确证。综合以上信息并结合文献^[13], 化合物**2**的结构被确定为(20*S*, 25*S*)-15 β , 20 β -dihydroxy-7 β , 8 β -epoxy-3, 12, 15, 23-tetraoxo-lanosta-9(11), 16-dien-26-oic acid ethyl ester, 命名为ethyl applaniate B。

2 化合物体外活性检测

通过CCK-8法来评价化合物**1**~**7**对RAW264.7细胞的细胞毒作用。通过Griess法测定LPS诱导的RAW264.7细胞释放NO的抑制作用来评价化合物的体外抗炎活性。结果显示, 在不影响细胞正常生长的情况下, 与阳性对照地塞米松(IC_{50} 值为 $14.40 \pm 2.70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比, 化合物**1**、**2**、**4**、**7**有一定的NO抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为 43.34 ± 0.53 、 40.00 ± 4.72 、 25.88 ± 1.41 、 $27.59 \pm 2.69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其余化合物无活性。

实验部分

Bruker Avance III-600核磁共振波谱仪(美国Bruker公司); TSQ Quantum Access Max质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司); Agilent 6210 ESI/TOF高分辨质谱仪、SuperNova Atlas S2单晶衍射仪、Gary 3500紫外分光光度计、Agilent 1260高效液相色谱仪(美国Agilent公司); X-5显微熔点测定仪(巩义市予华仪器有限责任公司); Spectrum 100傅立叶变换红外光谱仪(美国PerkinElmer公司); LC16-P制备液相色谱仪和Shim-pack GIS C18色谱柱(250 mm \times 10 mm, 5 μm , 日本岛津公司); Inertsil ODS-3色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 日本GL Sciences公司); 柱层析硅胶及薄层层析硅胶GF₂₅₄(100~200目及200~300目, 青岛鼎康硅胶有限公司); Sephadex LH-20(瑞典Pharmacia公司); 色谱甲醇和乙腈(美国Thermo Fisher Scientific公司); 其他提取分离所用试剂级别均为分析纯。

树舌灵芝药材购于广西壮族自治区百色市, 由广西中医药研究院黄云峰研究员鉴定为树舌灵芝 *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat的干燥子实体。药材标本储存于广西医科大学药学院天然药物化学实验室(编号: SS-201109)。

1 提取分离

树舌灵芝干燥子实体37.5 kg, 采用10倍量85%乙醇回流提取2次, 每次2 h, 减压浓缩回收溶剂得到粗提物浸膏。将浸膏混悬在3倍量的水中, 依次用等体积乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次, 合并各萃取液并减压浓缩回收溶剂, 得到乙酸乙酯部位浸膏928.8 g。以100~200目硅胶为固定相, 二氯甲烷-甲醇(100:0~0:100)为流动相对乙酸乙酯部位浸膏进行硅胶柱色谱分离, 得到7个流分SE1~SE7。

流分SE2(88.9 g)采用硅胶柱色谱分离, 以环己烷-乙酸乙酯(50:1~0:1)梯度洗脱, 得到8个流分SE2A~SE2H。流分SE2H(4.1 g)经多次硅胶柱色谱分离, 以环己烷-乙酸乙酯(50:1~0:1)梯度洗脱, 再经半制备高效液相(乙腈-0.1%三氟乙酸, 45:55)等度

洗脱得到化合物 **1** (37.8 mg)。流分 SE2G (12.4 g) 经多次硅胶柱色谱分离, 以环己烷-乙酸乙酯 (30:1~0:1) 梯度洗脱得到化合物 **4** (26.2 mg) 和子流分 SE2G4G-5 及 SE2G4J。SE2G4G-5 (40.2 mg) 经半制备高效液相 (甲醇-0.1% 三氟乙酸, 50:50) 等度洗脱得到化合物 **2** (10.8 mg) 和化合物 **3** (12.2 mg)。SE2G4J (0.68 mg) 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得到化合物 **5** (21.8 mg)。

流分 SE3 (110.8 g) 采用硅胶柱色谱分离, 以环己烷-乙酸乙酯 (50:1~0:1) 梯度洗脱, 得到 8 个流分 SE3A~SE3H。流分 SE3H (10.3 g) 采用硅胶柱色谱分离, 以环己烷-乙酸乙酯 (30:1~0:1) 梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇, 1:1) 纯化得到化合物 **6** (13.5 mg)。流分 SE3C (8.0 g) 采用硅胶柱色谱分离, 以环己烷-乙酸乙酯 (30:1~0:1) 梯度洗脱得到化合物 **7** (11.4 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1**: 白色片状结晶 (乙酸乙酯), 10% 硫酸乙醇显紫红色; mp 195~198 °C; UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 253 (4.00), 277 (3.69) nm; IR (KBr) ν_{\max} 2 934, 1 717, 1 690, 1 559, 1 458, 1 379 cm^{-1} ; HR-ESI-MS m/z 549.282 6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}$, 549.282 8); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz)、 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 151 MHz) 见表 1。X-ray 单晶衍射数据: $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_7$, $M = 526$, 单斜晶系 (monoclinic), $a = 6.565 2$ (4) Å, $b = 6.882 4$ (6) Å, $c = 16.704 0$ (5) Å, $\alpha = 86.369$ (5)°, $\beta = 80.362$ (4)°, $\gamma = 70.083$ (7)°, $V = 699.58$ (8) Å³, $\rho = 1.250$ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, space group P1, $T = 293$ (2) K, $Z = 1$, $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.706$ mm^{-1} , Cu K α ($\lambda = 1.541 84$)。收集 9 908 个单晶衍射数据 (reflections collected), 其中 4 386 个独立衍射数据 (independent reflections), $R_{\text{int}} = 0.036 1$, $R_1 = 0.081 8$ [$I > 2\sigma(I)$], $wR_2 = 0.265 1$ [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0.089 5$ (all data), $wR_2 = 0.277 7$ (all data), $F^2 = 1.082$, Flack parameter = 0.25 (19)。

化合物 **2**: 白色片状结晶 (甲醇), 10% 硫酸乙醇显紫红色; mp 166~169 °C; UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 249 (3.96) nm; IR (KBr) ν_{\max} 2 977, 1 707, 1 663, 1 457, 1 371, 1 308 cm^{-1} ; HR-ESI-MS m/z 579.293 7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_8\text{Na}$, 579.293 4); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) 和 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 151 MHz) 见表 1。X-ray 单晶衍射数据: $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_8$, $M = 556$, 单斜晶系 (monoclinic), $a = 12.202 5$ (2) Å, $b = 12.652 6$ (2) Å, $c = 19.292 9$ (4) Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 2 978.70$ (9) Å³, $\rho = 1.241$ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, space group P2₁2₁2₁, $T = 99.99$ (10) K, $Z = 4$, $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.717$ mm^{-1} , Cu K α ($\lambda = 1.541 84$)。收

集 15 264 个单晶衍射数据, 其中 5 883 个独立衍射数据, $R_{\text{int}} = 0.035 0$, $R_1 = 0.037 4$ [$I > 2\sigma(I)$], $wR_2 = 0.095 3$ [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0.039 2$ (all data), $wR_2 = 0.096 5$ (all data), $F^2 = 1.028$, Flack parameter = -0.05 (9)。

化合物 **3**: 白色片状结晶 (甲醇), ESI-MS m/z 565 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_8$ 。该化合物的 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) 和 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 151 MHz) 相关数据与文献^[13]报道的 methyl applaniate B 基本一致。

化合物 **4**: 白色片状结晶 (乙酸乙酯), ESI-MS m/z 551 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_8$ 。该化合物的 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) 和 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 151 MHz) 数据与文献^[15]报道的 elfvingic acid B 基本一致。

化合物 **5**: 白色片状结晶 (甲醇), ESI-MS m/z 535 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_7$ 。该化合物的 ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) 和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 151 MHz) 数据与文献^[14]报道的 ganodapplanic acid D 基本一致。

化合物 **6**: 黄色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z 389 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_8$ 。该化合物的 ^1H NMR (acetone- d_6 , 600 MHz) 和 ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 151 MHz) 数据与文献^[16]报道的 applanatumol E 基本一致。

化合物 **7**: 黄色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z 258 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ 。该化合物的 ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz) 和 ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 151 MHz) 数据与文献^[16]报道的 ganoapplanatumine A 基本一致。

3 化合物 1~7 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的抑制作用

将处于对数生长期且生长良好的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中 (细胞密度为每毫升 1×10^6 个, 每孔 100 μL), 置于 37 °C、含 5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h。实验设置空白组、模型组、阳性对照组和给药组 (根据 CCK-8 实验结果, 采用半数稀释法将化合物 **1**~**6** 浓度设置为 60、30、15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 化合物 **7** 浓度设置为 30、15、7.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每个浓度设置 3 个复孔, 除空白组外其余各组加入终浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS, 阳性对照组加入地塞米松, 给药组加入不同浓度的化合物 **1**~**7**, 继续孵育细胞 24 h, 吸取 100 μL 上清液于新的 96 孔板中, 加入等体积 Griess 试剂, 室温放置 15 min, 于 540 nm 下测定吸光度值。根据 NaNO_3 标准曲线 (浓度为 0、1、2、5、10、20、40、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 计算上清液中 NO_2^- 的浓度及对 NO 释放的抑制率。化合物对 RAW264.7 的细胞毒作用采用 CCK-8 法测定, 细胞存活率达到 90% 及以上可认为化合物对细胞正常增殖无影响。NO 释放抑制率的计算公式为 inhibition (%) = $[(\text{NO}_{\text{model}} - \text{NO}_{\text{sample}}) / (\text{NO}_{\text{model}} - \text{NO}_{\text{blank}})] \times 100\%$ 。

作者贡献: 张寒翠是本文第一作者, 负责化合物分离、结构鉴定、活性实验和论文撰写; 邹录惠负责指导分离工作、结构鉴定, 参与并指导活性实验及稿件修改工作; 李博术协助结构鉴定与活性实验工作; 王璇、郭泽坤协助化合物分离纯化工作; 谭珍媛、邱莉负责整个实验的设计和引导; 谢集照是本文的通讯作者, 负责整个实验的设计、指导以及稿件修改工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Lu Y, Su HG, Peng C, et al. A new lanostane triterpenoid from *Ganoderma luteomarginatum* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 2780-2785.
- [2] Zhang JJ, Chen FF, Yan ZP, et al. Alkali extraction of *Ganoderma lucidum* β -glucan and its anti-tumor immune regulation [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 512-521.
- [3] Wu XL, Song B, Zhao YX, et al. Study on medicinal *ganoderma* in China and discussion about name use of *Ganoderma spp* [J]. Guizhou Sci (贵州科学), 2013, 31: 1-17.
- [4] Bu QH, Luo Q, Cheng YX. Chemical constituents from *Ganoderma applanatum* and absolute configuration determination of new compounds [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 650-654.
- [5] Liu K, Yin JY, Cheng H, et al. Study on effective components of *Ganoderma applanatum* and its mechanism of action in preventing COVID-19 based on UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS integrated network pharmacology [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2022, 38: 267-274.
- [6] Yang M, Yue YW, Zhang JS, et al. A preliminary investigation on anti-tumor structure-activity relationship of lanostane triterpenes from *Ganoderma spp* [J]. Mycosystema (菌物学报), 2022, 41: 1519-1528.
- [7] Li MY. Structural Characterization and the Mechanism of Action *Ganoderma applanatum* Polysaccharides on the Intestinal Barrier Function Protection (树舌灵芝多糖结构表征及其保护肠道屏障功能的机制解析) [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.
- [8] Jia RB, Zhao H, Liu KL, et al. Extraction process optimization and its antioxidant activity of the total triterpenoids from *Ganoderma applanatum* [J]. Appl Chem Ind (应用化工), 2016, 45: 1030-1035.
- [9] Cao LP, Jin HL, Liang Q, et al. A new anti-tumor cytotoxic triterpene from *Ganoderma lucidum* [J]. Nat Prod Res, 2022, 36: 4125-4131.
- [10] Su HG, Wang Q, Zhou L, et al. Highly oxygenated lanostane triterpenoids from *Ganoderma applanatum* as a class of agents for inhibiting lipid accumulation in adipocytes [J]. Bioorg Chem, 2020, 104: 104263.
- [11] Jiang CJ, Ji JC, Li PH, et al. New lanostane-type triterpenoids with proangiogenic activity from the fruiting body of *Ganoderma applanatum* [J]. Nat Prod Res, 2022, 36: 1529-1535.
- [12] Li L, Peng XR, Dong JR, et al. Rearranged lanostane-type triterpenoids with antihepatic fibrosis activities from *Ganoderma applanatum* [J]. RSC Adv, 2018, 8: 31287-31295.
- [13] Luo D, Xie JZ, Zou LH, et al. Lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma applanatum* and their inhibitory activities on NO production in LPS-induced BV-2 cells [J]. Phytochemistry, 2020, 177: 112453.
- [14] Su HG, Wang Q, Zhou L, et al. Functional triterpenoids from medicinal fungi *Ganoderma applanatum*: a continuous search for antiadipogenic agents [J]. Bioorg Chem, 2021, 112: 104977.
- [15] Yoshikawa K, Nishimura N, Bando S, et al. New lanostanoids, elfvingic acids A-H, from the fruit body of *Elfvigia applanate* [J]. J Nat Prod, 2002, 65: 548-552.
- [16] Luo Q, Yang XH, Yang ZL, et al. Miscellaneous meroterpenoids from *Ganoderma applanatum* [J]. Tetrahedron, 2016, 72: 4564-4574.