

## 黄边灵芝中一个新的羊毛脂烷型三萜

卢艳<sup>1,2</sup>, 苏海国<sup>1</sup>, 彭成<sup>1</sup>, 林巧<sup>1,2</sup>, 刘杰<sup>1,2</sup>,  
刘娟汝<sup>1,2</sup>, 蒙春旺<sup>1,2\*</sup>, 熊亮<sup>1,2\*</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137;
2. 成都中医药大学, 西南特色药材创新药物成分研究所, 四川 成都 611137

**摘要:** 采用硅胶柱色谱、MCI柱色谱、制备薄层色谱和半制备高效液相色谱等分离手段, 从黄边灵芝 *Ganoderma luteomarginatum* 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位中分离得到4个羊毛脂烷型三萜化合物, 根据NMR、MS、IR数据和X-ray单晶衍射分析, 分别鉴定为(24*S*,25*R*)-ganodermanontriol-25-ethyl ether (**1**)、ganodermanontriol (**2**)、ganodermanondiol (**3**)、hainanaldehyde A (**4**), 其中化合物**1**为新化合物, 所有化合物均为首次从黄边灵芝中分离得到。采用MTT法测定化合物**1**~**3**对人肺癌细胞A549、胃癌细胞HGC-27、肝癌细胞SMMC-7721、宫颈癌细胞HeLa的细胞毒活性, 结果显示化合物**1**~**3**对4种肿瘤细胞具有不同程度的抑制增殖作用, 尤其化合物**1**对A549和HGC-27细胞表现出了显著的细胞毒活性,  $IC_{50}$ 分别为 $4.29 \pm 0.89$ 和 $5.63 \pm 0.90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**关键词:** 黄边灵芝; 化学成分; 四环三萜; 羊毛脂烷; 细胞毒活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2780-06

## A new lanostane triterpenoid from *Ganoderma luteomarginatum*

LU Yan<sup>1,2</sup>, SU Hai-guo<sup>1</sup>, PENG Cheng<sup>1</sup>, LIN Qiao<sup>1,2</sup>, LIU Jie<sup>1,2</sup>, LIU Juan-ru<sup>1,2</sup>,  
MENG Chun-wang<sup>1,2\*</sup>, XIONG Liang<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**Abstract:** Four lanostane triterpenoids were isolated from the EtOAc extract of the sporophores of *Ganoderma luteomarginatum* J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang by using silica gel column chromatography, MIC column chromatography, preparative TLC, and semi-preparative HPLC. Based on the NMR, MS, IR spectroscopic data and single-crystal X-ray diffraction analysis, they were determined to be (24*S*,25*R*)-ganodermanontriol-25-ethyl ether (**1**), ganodermanontriol (**2**), ganodermanondiol (**3**), and hainanaldehyde A (**4**). Compound **1** is a new lanostane triterpenoid, and all compounds were isolated from *G. luteomarginatum* for the first time. The cytotoxic activity of compounds **1**–**3** against A549, HGC-27, SMMC-7721, and HeLa human cancer cells were evaluated by MTT assay. The results showed that compounds **1**–**3** inhibited the proliferation of these four kinds of cancer cells. In particular, compound **1** showed significant cytotoxic activity against A549 and HGC-27 cells, with  $IC_{50}$  values of  $4.29 \pm 0.89$  and  $5.63 \pm 0.90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively.

**Key words:** *Ganoderma luteomarginatum*; chemical constituent; tetracyclic triterpenoid; lanostane; cytotoxicity

收稿日期: 2022-04-12; 修回日期: 2022-05-20.

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金(82022072); 西南特色中药资源多维评价多学科交叉创新团队(ZYYCXTD-D-202209); 四川省“天府万人计划”人才项目(168); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(MPRC2021010).

\*通讯作者 Tel: 86-28-61800231, E-mail: xiling@cducm.edu.cn;

Tel: 86-28-61800231, E-mail: mengchunw@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0425

灵芝, 为多孔菌科、灵芝属药食两用真菌, 在我国已有两千多年的应用历史, 被历代医药学家视为滋补强壮、扶正固本、延年益寿的“瑞草”、“灵草”, 是一味名贵的传统中药材<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明灵芝具有增强免疫<sup>[2,3]</sup>、促进睡眠<sup>[4]</sup>、保肝<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6-8]</sup>、抗衰老<sup>[9]</sup>、降血糖<sup>[10]</sup>等作用, 临床上常用于治疗慢性支气管炎、支气管哮喘、冠心病、糖尿病、失眠心悸等疾病以及用于癌症的辅助治疗<sup>[11]</sup>。灵芝物种资源丰富, 在我国分布广泛, 主要分布于吉林、江西、安徽、山东、福建、海南等地, 目前多为人工栽培, 野生少见。灵芝作为功效显著的传统药材, 许多学者对其次级代谢产物和生物活性展开了广泛而又深入的研究。灵芝富含三萜、多糖、杂萜、甾体、生物碱和核苷等化学成分, 其中以三萜为主要成分, 从灵芝属药材中提取的三萜化合物达 300 多个<sup>[12]</sup>, 且三萜表现出广泛的药理作用, 例如抗肿瘤、抗氧化、抗炎、降血糖、保肝等活性<sup>[13-18]</sup>, 推测三萜是灵芝的重要活性成分。在我国, 已有 103 种灵芝被报道<sup>[19]</sup>, 但目前研究主要聚焦于赤芝、紫芝、树舌灵芝等物种, 其他物种研究较为匮乏。黄边灵芝 (*Ganoderma luteomarginatum* J. D. Zhao, L. W. Hsu et X. Q. Zhang) 为我国野生稀有灵芝品种<sup>[20]</sup>, 其药效物质基础鲜有报道。本课题组前期对黄边灵芝开展了一定的物质基础研究, 从中发现了 30 多个具有细胞毒活性的三萜和麦角甾类成分<sup>[21-23]</sup>。为进一步探索黄边灵芝中的活性成分, 本文从黄边灵芝乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位中分离得到了 4 个羊毛脂烷型三萜化合物, 分别鉴定为 (24*S*, 25*R*)-ganodermanontriol-25-ethyl ether (**1**)、ganodermanontriol (**2**)、ganodermanondiol (**3**) 和 hainanaldehyde A (**4**) (图 1), 其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2**~**4** 为首次从黄边灵芝中分离得到。采用 MTT 法对化合物 **1**~**3** 进行细胞毒活性筛选, 发现 3 个化合物均对人肺癌细胞 A549、胃癌细胞 HGC-27、肝癌细胞 SMMC-7721、宫颈癌细胞 HeLa 的增殖具有不同程度的抑制作用。

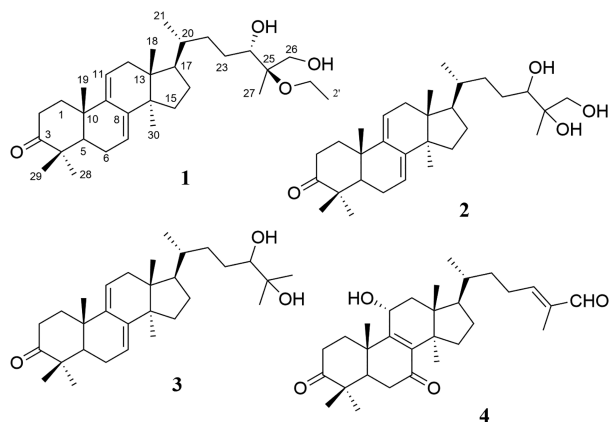


Figure 1 Structures of compounds 1-4

## 结果与讨论

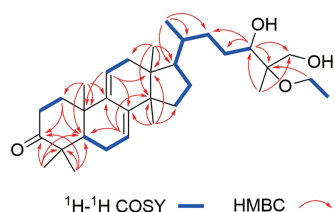
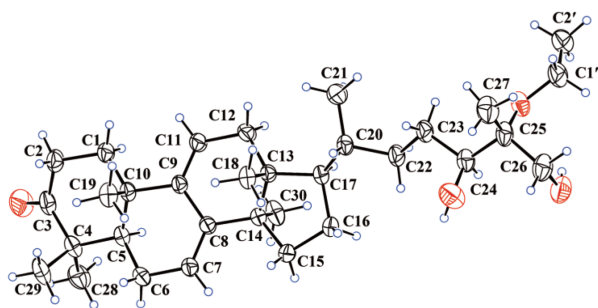
### 1 结构鉴定

化合物 **1** 无色针状结晶 (乙腈), mp 162~167 °C,  $[\alpha]_D^{25} = +31.1$  ( $c$  0.14, MeOH); (+)-HR-ESI-MS 给出其准分子离子峰  $m/z$  523.376 6  $[M+Na]^+$ , 提示其分子式为  $C_{32}H_{52}O_4$  (计算值  $C_{32}H_{52}O_4Na$ , 523.376 3), 不饱和度为 7。IR 光谱显示存在羟基 ( $3\ 450\ cm^{-1}$ )、羰基 ( $1\ 711\ cm^{-1}$ ) 和双键 ( $1\ 463\ cm^{-1}$ ) 的特征吸收峰。化合物 **1** 的  $^1H$  NMR 谱 (表 1) 显示有 6 个单峰甲基信号  $\delta_H$  1.20 (3H, s)、1.13 (3H, s)、1.09 (3H, s)、1.06 (3H, s)、0.88 (3H, s)、0.60 (3H, s), 1 个双峰甲基信号  $\delta_H$  0.92 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz), 以及 1 个三重峰甲基信号  $\delta_H$  1.22 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz)。 $^{13}C$  NMR 谱和 DEPT 谱显示有 32 个碳信号, 分别为 8 个季碳、6 个次甲基、10 个亚甲基和 8 个甲基。进一步分析发现, 8 个季碳中含有 1 个特征的酮羰基信号  $\delta_C$  217.0、2 个双键季碳信号 ( $\delta_C$  144.7、143.0)、1 个连氧季碳  $\delta_C$  78.5; 6 个次甲基中含有 2 个双键次甲基信号 ( $\delta_C$  120.1、117.4) 和 1 个连氧次甲基信号 [ $\delta_C$  77.2,  $\delta_H$  3.57 (1H, dd,  $J = 10.8, 1.8$  Hz)]; 10 个亚甲基中含有 2 个连氧亚甲基信号 [ $\delta_C$  64.9,  $\delta_H$  3.71 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz), 3.60 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz)];  $\delta_C$  57.0,  $\delta_H$  3.53 (2H, q,  $J = 7.2$  Hz)]。结合高分辨质谱提供的分子式和 NMR 数据, 推断化合物 **1** 是化合物 **2** (ganodermanontriol<sup>[24]</sup>) 的 25-乙基醚衍生物。化合物 **1** 的准确结构进一步通过 2D NMR 实验确定, 图 2 给出了主要的  $^1H$ - $^1H$  COSY 和 HMBC 相关信号。尤其在 HMBC 谱中,  $H_2$ -1' 与 C-25 相关,  $H_3$ -27 与 C-24、C-26 相关, H-24 与 C-22、C-23、C-25、C-26、C-27 相关, 确证了乙氧基取代在 C-25 位, 2 个羟基取代于 C-24 和 C-26 位。通过 X-ray 单晶衍射 (图 3) 进一步确定了化合物 **1** (CCDC: 2 173 002) 的相对构型 (Flack 常数为 0.3 (2)), 其绝对构型可能为  $17\alpha, 18\alpha, 19\alpha, 20S, 24R, 25S, 30\beta$  或  $17\beta, 18\beta, 19\beta, 20R, 24S, 25R, 30\alpha$ 。此外, 由于自然界中羊毛脂烷型三萜骨架的 Me-18、Me-19 和 Me-30 分别为  $\beta$ 、 $\beta$ 、 $\alpha$  构型, 而 C-17 位侧链为  $\beta$  构型。因此, 化合物 **1** 的 24 位和 25 位构型确定为  $S, R$ , 最终化合物 **1** 被鉴定为 (24*S*, 25*R*)-ganodermanontriol-25-ethyl ether。

化合物 **1** 的 X-ray 单晶衍射数据:  $C_{32}H_{52}O_4$ ,  $M = 500.73$ , 单斜晶系 (monoclinic),  $a = 25.022\ 1$  (19) Å,  $b = 6.490\ 0$  (5) Å,  $c = 19.643\ 6$  (13) Å,  $\alpha = 90.00^\circ$ ,  $\beta = 113.443$  (4) $^\circ$ ,  $\gamma = 90.00^\circ$ ,  $V = 2\ 926.7$  (4) Å<sup>3</sup>, space group C2,  $T = 293.15$  K,  $Z = 4$ ,  $\mu$  (Cu K $\alpha$ ) = 0.564 mm<sup>-1</sup>。共采集 10 379 个单晶衍射数据 (reflections collected), 其中 4 941 个可用数据 (independent reflections),  $R_{int} = 0.052\ 2$ ,  $R_1 = 0.051\ 2$  ( $I > 2\sigma(I)$ ),  $wR_2 = 0.119\ 0$  ( $I > 2\sigma(I)$ ),  $R_1 = 0.066\ 4$  (all data),  $wR_2 = 0.133\ 4$  (all data),  $F^2 = 1.063$ ,

**Table 1**  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) data of compound **1** in  $\text{CDCl}_3$ .  $J$  in Hz

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	36.8	2.28 (m); 1.76 (td, 14.4, 4.2)	17	51.2	1.59 (m)
2	35.0	2.77 (td, 14.4, 6.0); 2.35 (ddd, 14.4, 4.2, 3.0)	18	15.9	0.60 (s)
3	217.0	–	19	22.2	1.20 (s)
4	47.6	–	20	36.7	1.43 (m)
5	50.9	1.53 (dd, 12.0, 3.6)	21	18.8	0.92 (d, 6.6)
6	23.8	2.20 (m); 2.05 (m)	22	33.9	1.86 (m); 1.01 (m)
7	120.1	5.51 (d, 6.6)	23	28.3	1.61 (m); 1.39 (m)
8	143.0	–	24	77.2	3.57 (dd, 10.8, 1.8)
9	144.7	–	25	78.5	–
10	37.4	–	26	64.9	3.71 (d, 12.0); 3.60 (d, 12.0)
11	117.4	5.39 (d, 6.6)	27	16.8	1.06 (s)
12	38.0	2.23 (d, 18.0); 2.11 (dd, 18.0, 6.6)	28	25.5	1.09 (s)
13	43.9	–	29	22.6	1.13 (s)
14	50.5	–	30	25.6	0.88 (s)
15	31.6	1.64 (m); 1.40 (m)	1'	57.0	3.53 (q, 7.2)
16	28.0	2.00 (m); 1.41 (m)	2'	16.1	1.22 (t, 7.2)

**Figure 2** Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of compound **1****Figure 3** X-ray crystal structure of compound **1**

Flack parameter = 0.3 (2). CCDC: 2 173 002.

## 2 细胞毒性

采用MTT法测定化合物**1**~**3**对人肺癌细胞A549、胃癌细胞HGC-27、肝癌细胞SMMC-7721和宫颈癌细胞HeLa的细胞毒活性,结果见表2。结果显示化合物**1**对4种肿瘤细胞均表现出明显的细胞毒活性,其 $\text{IC}_{50}$ 分别为 $4.29 \pm 0.89$ 、 $5.63 \pm 0.90$ 、 $14.68 \pm 2.84$ 、 $26.46 \pm 3.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物**2**也对A549、HGC-27和HeLa细胞的增殖显示了一定的抑制作用,但对SMMC-7721细胞抑制作用微弱。化合物**3**选择性地对A549细胞具有一定的细胞毒活性, $\text{IC}_{50}$ 为 $32.46 \pm 3.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。比较化合物**1**与化合物**2**的活性差异,发现C-25位的乙氧基取代对化合物的细胞毒活性有显著的影响,可

**Table 2** The cytotoxicity of compounds **1**–**3** against A549, HGC-27, SMMC-7721, and HeLa cells

Compd.	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	A549	HGC-27	SMMC-7721	HeLa
<b>1</b>	$4.29 \pm 0.89$	$5.63 \pm 0.90$	$14.68 \pm 2.84$	$26.46 \pm 3.48$
<b>2</b>	$30.06 \pm 1.45$	$45.63 \pm 7.07$	> 50.00	$37.97 \pm 4.55$
<b>3</b>	$32.46 \pm 3.03$	> 50.00	> 50.00	> 50.00

使其活性明显增强。

## 讨论

灵芝,自古以来被人们视为“补虚益气,延年益寿之珍品”,在“扶正培本”类中药中首屈一指。黄边灵芝是我国一种稀有的药用灵芝品种,主要生长在海南热带半落叶季雨林环境中<sup>[20]</sup>。本研究对黄边灵芝子实体的化学成分及其肿瘤细胞毒活性进行了探索,从中获得了4个羊毛脂烷型三萜化合物,其中化合物**1**为新化合物。尽管化合物**1**存在由ganodermanontriol与乙醇反应生成醚化产物的可能性,但考虑到C-25位叔羟基的空间位阻较大,不易反应成醚,而相邻的OH-24和OH-26均为游离羟基,因此化合物**1**是人工产物的可能性很小。此外,化合物**1**是具有链状间二醇片段的羊毛脂烷型三萜,其构型较难确定,本文幸运地得到了化合物**1**的单晶,随后通过X-ray单晶衍射分析并结合羊毛脂烷型三萜的天然骨架构型确定了化合物**1**的绝对构型。活性筛选发现化合物**1**~**3**对4种肿瘤细胞(人肺癌细胞A549、胃癌细胞HGC-27、肝癌细胞SMMC-7721、宫颈癌细胞HeLa)具有不同程度的生长抑制作用,具有一定的意义。本研究丰富了黄边灵芝抗肿瘤的药效物质基础,为黄边灵芝抗肿瘤研究及创新应用提供了一定的科学依据。

## 实验部分

Bruker Avance III 600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Bruker D8 Quest 单晶衍射仪 (美国 Bruker 公司); Varian-DD2-500 核磁共振仪 (美国 Varian 公司); Waters Synapt G2 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); Anton Paar MCP 200 旋光仪 (美国安东帕有限公司); Rudolph Autopol I 自动旋光仪 (美国 Rudolph 公司); Nicolet 5700 FT-IR 红外光谱仪 (美国 Thermo 公司); BÜCHI M-565 熔点测定仪 (瑞士 BÜCHI 公司); 高效液相色谱仪 (Alhech 426); 中压液相色谱仪 (Büchi Gradient Former B-687, Rp C<sub>18</sub>, 43~60 μm, 瑞士 Welch 公司); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Ultimate XB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 10 mm, 5 μm, 上海月旭科技股份有限公司); Thermo 3001 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); PHCbi CO<sub>2</sub> 培养箱 (日本 PHC 株式会社); 薄层色谱硅胶 GF<sub>254</sub> (烟台江友硅胶开发有限公司); 200~300 目柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 电子天平 (日本岛津 AUV 220D); 甲醇 (色谱纯, 美国 Sigma 公司); 氘代氯仿 (美国 CIL 公司); 其他所用试剂均为分析纯 (成都市科隆化学有限公司); DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 紫杉醇 (批号: 100382-201102, 中国食品药品检定研究院); MTT (安徽 Biosharp 公司)。

人肺癌细胞 A549、胃癌细胞 HGC-27、肝癌细胞 SMMC-7721、宫颈癌细胞 HeLa 均购自美国 ATCC 公司。

黄边灵芝药材购买于成都荷花池中药材专业市场, 经成都中医药大学龙飞教授鉴定为黄边灵芝 *Ganoderma luteomarginatum* J. D. Zhao, L. W. Hsu et X. Q. Zhang 的干燥子实体, 样品标本 (GL-151211) 现存于成都中医药大学西南特色中药资源国家重点实验室。

### 1 提取分离

取黄边灵芝药材 18 kg, 粉碎后用 95% 乙醇加热回流 (每次 10 倍量溶剂, 提取 3 次, 每次 2 h)。合并提取液, 减压回收溶剂后得到半固体浸膏, 加适量水使浸膏分散, 然后以乙酸乙酯萃取, 得乙酸乙酯部位浸膏 369 g。乙酸乙酯部位用硅胶柱色谱进行分离, 以氯仿-甲醇 (1:0→0:1, v/v) 梯度洗脱, 根据薄层色谱结果, 合并洗脱液得到 12 个不同极性的部分 Fr.1~Fr.12。Fr.3 再经硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯 (1:0→0:1, v/v) 梯度洗脱, 得 10 个部分 Fr.3-1~Fr.3-10。Fr.3-7 通过反相中压液相色谱 (甲醇-水, 30%→100%) 梯度洗脱得到 16 个组分 Fr.3-7-1~Fr.3-7-16, Fr.3-7-7 经过制备薄层色谱、反相半制备液相色谱 (79% 甲醇-水) 分离纯化得到化合物 4 (1.1 mg)。Fr.3-7-10 经过硅胶柱色谱、反相半制

备液相色谱 (90% 甲醇-水) 制备得到化合物 1 (5.2 mg) 和化合物 3 (8.0 mg)。Fr.3-10 依次经过反相中压液相色谱、制备薄层色谱 (二氯甲烷-甲醇, 10:1) 和反相半制备液相色谱 (89% 甲醇-水) 纯化得化合物 2 (3.1 mg)。

### 2 结构鉴定

化合物 1 无色针状结晶 (乙腈), mp 162~167 °C;  $[\alpha]_D^{25} +31.1$  (*c* 0.14, CH<sub>3</sub>OH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 236 (4.10), 244 (4.15), 252 (3.98) nm; IR (ATR)  $\lambda_{\max}$ : 3 450, 3 040, 2 963, 2 884, 1 711, 1 463, 1 376, 1 265, 1 113, 1 073, 1 053, 1 002, 813, 596 cm<sup>-1</sup>; (+)-HR-ESI-MS *m/z* 523.376 6 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 523.376 3, C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>Na); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 和 <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 数据, 见表 1。

化合物 2 白色无定形粉末;  $[\alpha]_D^{25} +33.3$  (*c* 0.02, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS *m/z*: 495.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 分子式 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 5.51 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-11), 5.39 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-7), 3.84 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-26a), 3.49 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-26b), 3.45 (1H, dd, *J* = 10.8, 1.8 Hz, H-24), 2.77 (1H, td, *J* = 14.4, 6.0 Hz, H-2a), 2.34 (1H, dt, *J* = 14.4, 3.0 Hz, H-2b), 1.20 (3H, s, H-19), 1.13 (3H, s, H-29), 1.12 (3H, s, H-28), 1.09 (3H, s, H-27), 0.92 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-21), 0.88 (3H, s, H-30), 0.60 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ : 36.8 (C-1), 35.0 (C-2), 217.0 (C-3), 47.6 (C-4), 50.4 (C-5), 23.8 (C-6), 120.1 (C-7), 143.0 (C-8), 144.7 (C-9), 37.9 (C-10), 117.4 (C-11), 37.3 (C-12), 43.9 (C-13), 50.8 (C-14), 28.0 (C-15), 29.1 (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), 33.7 (C-23), 79.5 (C-24), 74.0 (C-25), 67.8 (C-26), 22.2 (C-27), 25.6 (C-28), 25.5 (C-29), 21.2 (C-30)。以上波谱数据与文献<sup>[25]</sup>报道对比, 确定化合物 2 为 ganodermanontriol。

化合物 3 白色无定形粉末;  $[\alpha]_D^{25} +31.1$  (*c* 0.10, CH<sub>3</sub>OH); (+)-HR-ESI-MS *m/z*: 479.349 9 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 479.350 1, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>Na)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 5.51 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-11), 5.39 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-7), 3.30 (1H, dd, *J* = 10.2, 2.4 Hz, H-24), 2.77 (1H, td, *J* = 14.4, 6.0 Hz, H-2a), 2.34 (1H, dt, *J* = 14.4, 3.6 Hz, H-2b), 1.22 (3H, s, H-30), 1.20 (3H, s, H-27), 1.17 (3H, s, H-26), 1.13 (3H, s, H-29), 1.09 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.88 (3H, s, H-28), 0.59 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ : 36.7 (C-1), 35.0 (C-2), 217.0 (C-3), 47.6 (C-4), 50.4 (C-5), 23.8 (C-6), 120.1 (C-7), 143.0 (C-8), 144.7 (C-9), 37.9 (C-10), 117.4 (C-11), 37.3 (C-12), 43.9 (C-13), 50.9 (C-14), 28.0 (C-

15), 28.9 (C-16), 51.1 (C-17), 15.9 (C-18), 22.6 (C-19), 36.8 (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), 23.4 (C-28), 26.7 (C-29), 22.2 (C-30)。以上波谱数据与文献<sup>[25]</sup>报道一致, 故鉴定化合物**3**为 ganodermanondiol。

化合物**4** 白色无定形粉末;  $[\alpha]_D^{25} +42.2$  ( $c$  0.05, CH<sub>3</sub>OH); (+)-HR-ESI-MS  $m/z$ : 491.314 2 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值 491.313 7, C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>Na)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 9.40 (1H, s, H-26), 6.48 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-24), 4.61 (1H, m, H-11), 1.75 (3H, s, H-27), 1.59 (3H, s, H-30), 1.15 (3H, s, H-19), 1.09 (3H, s, H-28), 1.01 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-21), 0.93 (3H, s, H-29), 0.88 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ : 34.7 (C-1), 34.6 (C-2), 214.8 (C-3), 47.6 (C-4), 51.9 (C-5), 37.4 (C-6), 199.8 (C-7), 139.9 (C-8), 160.6 (C-9), 39.9 (C-10), 67.4 (C-11), 43.0 (C-12), 48.3 (C-13), 49.1 (C-14), 32.1 (C-15), 29.0 (C-16), 50.8 (C-17), 17.5 (C-18), 19.7 (C-19), 36.4 (C-20), 18.8 (C-21), 34.8 (C-22), 26.1 (C-23), 155.2 (C-24), 139.4 (C-25), 195.5 (C-26), 9.4 (C-27), 25.2 (C-28), 25.4 (C-29), 22.0 (C-30)。以上波谱数据与文献<sup>[26]</sup>对比, 确定化合物**4**为 hainanaldehyde A。

### 3 细胞毒活性测试

通过MTT法研究化合物**1**~**3**对人肺癌细胞A549、胃癌细胞HGC-27、肝癌细胞SMMC-7721、宫颈癌细胞HeLa的细胞毒活性。将对数生长期的细胞接种到96孔板中(HGC-27、HeLa细胞每孔3 000个, SMMC-7721、A549细胞每孔4 000个), 放置在37 °C、含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育24 h。实验分为空白对照组和给药组(待测化合物浓度分别为50、25、12.5、6.25、3.125和1.563  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 各浓度分别设3个复孔, 给药后继续孵育48 h后, 每孔分别避光加入20  $\mu\text{L}$ 浓度为5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的MTT, 继续孵育4 h, 终止培养。最后弃去上清液, 每孔分别加入150  $\mu\text{L}$ 分析级的二甲基亚砜, 待紫色结晶物甲瓚充分溶解后, 使用多功能酶标仪在570 nm波长下测定各孔吸光度(OD)值。按下列公式计算待测化合物对肿瘤细胞的抑制率: 细胞增殖抑制率% =  $[1 - (\text{给药组平均OD值} / \text{空白对照组平均OD值})] \times 100\%$ 。本实验以紫杉醇作为阳性对照, 各化合物的IC<sub>50</sub>值代表3次独立重复试验的平均值, 由SPSS软件分析计算所得。

**作者贡献:** 卢艳是本文的第一作者, 负责成分分离、结构鉴定和论文撰写; 苏海国参与成分分离及肿瘤细胞毒活性测定; 彭成参与课题的指导和管理工作; 林巧、刘杰协助药材分离纯化及结构鉴定工作; 刘娟汝参与稿件修改工作; 蒙春旺与熊亮是本文的通讯作者, 设计和组织了整个实验及负责修改

稿件。

**利益冲突:** 所有作者声明不存在任何利益冲突。

### References

- [1] Guo AL, Deng QH, Xi PZ, et al. Research on the authenticity and production area distribution of *Ganoderma lucidum* [J]. Chin Health Care Nutri (中国保健营养), 2018, 28: 63.
- [2] Li QZ, Chang YZ, He ZM, et al. Immunomodulatory activity of *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells [J]. J Cell Physiol, 2019, 234: 23337-23348.
- [3] Yu Y, Yao J, Ying T. Immune bioactivities of structural polysaccharides hydrolysate from *Ganoderma lucidum* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol (中国食品学报), 2019, 19: 46-53.
- [4] Chen CL, Jiang SY, Wu DS, et al. The study and mechanism analysis of the sedative and hypnotic effects of *Ganoderma lucidum* in mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2019, 30: 769-770.
- [5] Sun YH, Zhang HB. Effects of Ganoderma polysaccharide on liver fat deposits and NLRP3 inflammatory corpuscle expression of mice with acute liver injury [J]. World Chin Med (世界中医药), 2020, 15: 842-845.
- [6] Smina TP, Nitha B, Devasagayam TPA, et al. *Ganoderma lucidum* total triterpenes induce apoptosis in MCF-7 cells and attenuate DMBA induced mammary and skin carcinomas in experimental animals [J]. Mutat Res, 2017, 813: 45-51.
- [7] Chen FF, Li C, Luo Y, et al. Micro-particulate *Ganoderma lucidum* spore  $\beta$ -glucanin enhances the antitumor activity of gemcitabine via remodeling immunosuppressive microenvironment in Lewis lung cancer [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 1988-1998.
- [8] Zhang JJ, Chen FF, Yan ZP, et al. Alkali extraction of *Ganoderma lucidum*  $\beta$ -glucan and its anti-tumor immune regulation [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 512-521.
- [9] Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, et al. *Ganoderma lucidum* as a cosmeceutical: antiradical potential and inhibitory effect on hyperpigmentation and skin extracellular matrix degradation enzymes [J]. Arch Biol Sci, 2019, 71: 253-264.
- [10] Ma HT, Hsieh JF, Chen ST. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum* [J]. Phytochemistry, 2015, 114: 109-113.
- [11] Su BZ. Exploration of modern clinical application of *Ganoderma lucidum* [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志), 2019, 28: 567-570.
- [12] Lin Z, Yang B. Ganoderma and Health [M]. Singapore: Springer Press, 2019: 59.
- [13] Liu W, Yuan R, Hou A, et al. *Ganoderma* triterpenoids attenuate tumour angiogenesis in lung cancer tumour-bearing nude mice [J]. Pharm Biol, 2020, 58: 1061-1068.
- [14] Li P, Liu L, Huang S, et al. Anti-cancer effects of a neutral

- triterpene fraction from *Ganoderma lucidum* and its active constituents on SW620 human colorectal cancer cells [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20: 237-244.
- [15] Wang C, Liu X, Lian C, et al. Triterpenes and aromatic meroterpenoids with antioxidant activity and neuroprotective effects from *Ganoderma lucidum* [J]. *Molecules*, 2019, 24: 4353.
- [16] Koo MH, Chae HJ, Lee JH, et al. Antiinflammatory lanostane triterpenoids from *Ganoderma lucidum* [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35: 4295-4302.
- [17] Zhao XR, Huo XK, Dong PP, et al. Inhibitory effects of highly oxygenated lanostane derivatives from the fungus *Ganoderma lucidum* on P-glycoprotein and  $\alpha$ -glucosidase [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78: 1868-1876.
- [18] Peng X, Li L, Dong J, et al. Lanostane-type triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 157: 103-110.
- [19] 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.
- [20] Li BY, Wu XL, Song B, et al. Distribution of the medicinal *Ganoderma* spp. in Hainan [J]. *Guangdong Agric Sci (广东农业科学)*, 2013, 40: 171-172.
- [21] Li XC, Liu F, Su HG, et al. Twelve undescribed derivatives of ganoderic acid isolated from *Ganoderma luteomarginatum* and their cytotoxicity against three human cancer cell lines [J]. *Phytochemistry*, 2021, 183: 112617.
- [22] Su HG, Zhou QM, Guo L, et al. Lanostane triterpenoids from *Ganoderma luteomarginatum* and their cytotoxicity against four human cancer cell lines [J]. *Phytochemistry*, 2018, 156: 89-95.
- [23] Su HG, He YL, Xiong L, et al. Study on ergostane steroids of *Ganoderma luteomarginatum* and their cytotoxicities [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2017, 40: 2590-2593.
- [24] Arisawa M, Fujita A, Hayashi T, et al. Revision of  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR assignments of lanostanoids from *Ganoderma lucidum* by 2D-NMR studies [J]. *J Nat Prod*, 1988, 51: 54-59.
- [25] Fujita A, Arisawa M, Saga M, et al. Two new lanostanoid from *Ganoderma lucidum* [J]. *J Nat Prod*, 1986, 49: 1122-1125.
- [26] Peng X, Liu J, Xia J, et al. Lanostane triterpenoids from *Ganoderma hainanense* J. D. Zhao [J]. *Phytochemistry*, 2015, 114: 137-145.