

用二维核磁共振技术研究赤芝孢子内酯 A 和 B 的结构 *

陈若芸 于德泉

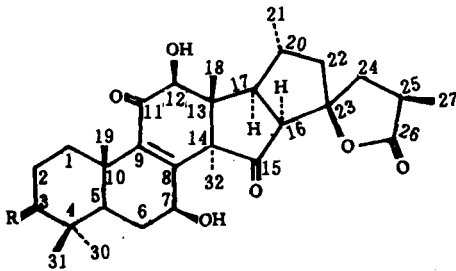
(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

摘要 通过 $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 相关谱(COSY), $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 远程偶合相关谱(COLOC)及 NOE 二维谱(NOESY)等新的二维核磁共振技术确定了两个新化合物赤芝孢子内酯 A 和 B 的结构。

关键词 赤芝孢子内酯 A; 赤芝孢子内酯 B; 赤芝; 孢子粉; 2D NMR

赤芝 [*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst] 是中国民间常用的滋补药物。近年来从赤芝中分到了多种萜类化合物, 其中有些具有一定生理活性^(1~9), T. Kikuchi 等^(10~12) 用 $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 相关谱(COSY)等核磁共振技术确定了从赤芝中分到的十二个新四环三萜类化合物的结构。我们从赤芝孢子粉中分到了二个新的五环三萜内酯化合物, 命名为赤芝孢子内酯 A (ganosporelactone A) 和赤芝孢子内酯 B (ganosporelactone B), 其结构及立体构型主要通过 2D NMR 技术确定。

赤芝孢子内酯 A 和 B 的结构如下:



Ganosporelactone A R=O

Ganosporelactone B R= $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{matrix}$

赤芝孢子内酯 A 为白色针状结晶, mp 238 ~ 240 °C, $[\alpha]_D^{25} + 74.5^\circ$ (c 0.057, CHCl_3), 由高分辨质谱确定其分子式为 $\text{C}_3\text{H}_{40}\text{O}_7$, (M^+ 512.2777, 计算值 512.2773)。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 252 nm ($\log \epsilon$ 3.60), 表明存在 α, β 不饱和羰基。IR (KBr) cm^{-1} : 3400 (OH), 1765, 1720, 1700, 1660 (C=O), 1050, 说明分子中存在羟基和羰基。赤芝孢子内酯 A 的 ^1H NMR (见表 1) 表明分子中含有 7 个甲基及 2 个羟基 (由 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ COSY 证明), 另外尚有 17 个氢分布为五组。由其 ^{13}C NMR (见表 2) 证明分子中存在 30 个碳, 其中 7 个 CH_3 , 5 个 CH_2 , 7 个 CH 及 11 个季碳。

赤芝孢子内酯 A 的 ^{13}C NMR 化学位移及 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 相关谱 (见图 1) 证明 C_{23} 不连有 H, 是一个季碳。在 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 相关谱中表明有五组相关的 H (见图 2)。第一组 (从低场起): 7-OH - 7-H - 6 α -H - 6 β -H - 5 α -H 相关。第二组: 12-H 与 12-OH 相关。第三组: 16 α -

本文于 1990 年 2 月 28 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

Tab 1. ¹HNMR spectral data of ganosporelactone A and B*

Proton	A		B	
	δppm	J=Hz	δppm	J=Hz
1α	1.25 ddd	13.7, 12.6, 6.6	1.64 m	
1β	2.75 ddd	13.7, 6.6, 3.8	2.57 ddd	13.7, 9.8, 4
2α	2.64 ddd	15.5, 6.6, 6.6	0.88 m	
2β	2.32 ddd	15.5, 12, 3.8	1.64 m	
3α			3.19 dd	9.3, 7.3
5α	1.37 dd	13.8, 2.2	0.84 m	
6α	2.14 dd	8.5, 2.2	2.25 ddd	11.7, 8.2, 3
6β	1.77 ddd	13.8, 8.5, 8.5	1.68 m	
7α	4.62 dd	8.5, 2.8	4.60 t	8.2
7-OH	4.80 d	2.8		
12α	4.35 d	2	4.3 s	
12-OH	3.68 d	2	3.7 s	
16α	3.34 d	12.4	3.55 d	12.3
17α	2.80 dd	12.4, 7.9	2.82 dd	12.3, 7.8
18-CH ₃	0.90 s		0.86 s	
19-CH ₃	1.44 s		1.31 s	
20	2.43 dqd	13.7, 9, 6.5	2.43 dqd	13.7, 8, 6.4
21-CH ₃	1.18 d	6.5	1.21 d	6.4
22α	2.17 dd	13, 6.5	2.19 dd	13.7, 6.4
22β	1.67 dd	13, 13	1.72 dd	13.7, 13
24α	2.48 dd	13, 9.3	2.49 dd	12.7, 9.3
24β	1.93 dd	13, 11	1.95 dd	12.7, 11.2
25α	3.20 dqd	11.9, 3, 7.2	3.24 dqd	11.2, 7.3, 9.3
27-CH ₃	1.24 d	7.2	1.27 d	7.3
30-CH ₃	1.07 s		1.02 s	
31-CH ₃	1.09 s		0.90 s	
32-CH ₃	1.57 s		1.61 s	

* Ganosporelactone A was taken at 600 MHz, CDCl₃; Ganosporelactone B was taken at 500 MHz, CDCl₃.

Tab 2. ¹³CNMR spectral data of ganosporelactone A and B*

Carbon	A	B	Carbon	A	B	Carbon	A	B
1	35.2	35.0	12	78.1	79.0	23	87.0	87.5
2	34.3	28.3	13	49.9	50.5	24	40.6	40.4
3	213.2	77.0	14	63.3	63.0	25	34.3	34.8
4	47.0	38.6	15	215.5	215.0	26	178.6	179.0
5	49.8	49.6	16	60.4	60.6	27	15.6	15.6
6	27.9	27.9	17	54.2	54.0	30	25.8	28.5
7	65.8	66.6	18	12.8	13.3	31	21.3	16.0
8	157.8	156.8	19	18.3	19.2	32	25.2	24.6
9	140.9	143.0	20	33.0	33.3			
10	37.8	39.2	21	19.2	19.6			
11	199.4	200.5	22	52.5	52.3			

* ¹³CNMR spectrum of ganosporelactone A was taken at 150.9 MHz, CDCl₃; Ganosporelactone B was taken at 125.5 MHz, C₅D₅N.

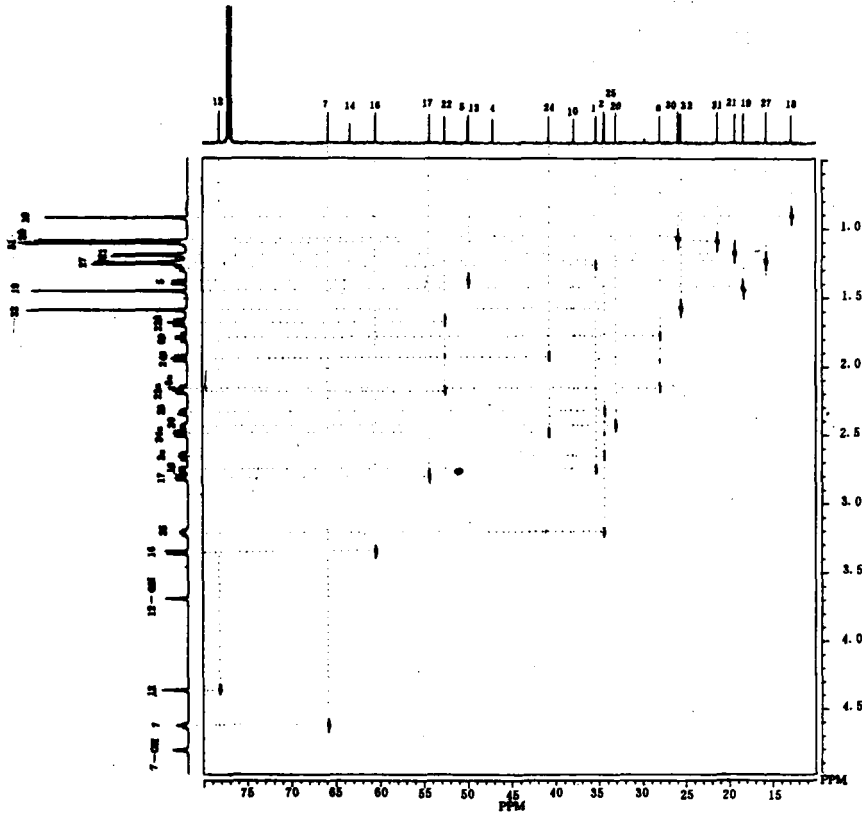


Fig 1 . Contour map of the ^1H - ^{13}C COSY spectrum of ganosporelactone A in the upfield region

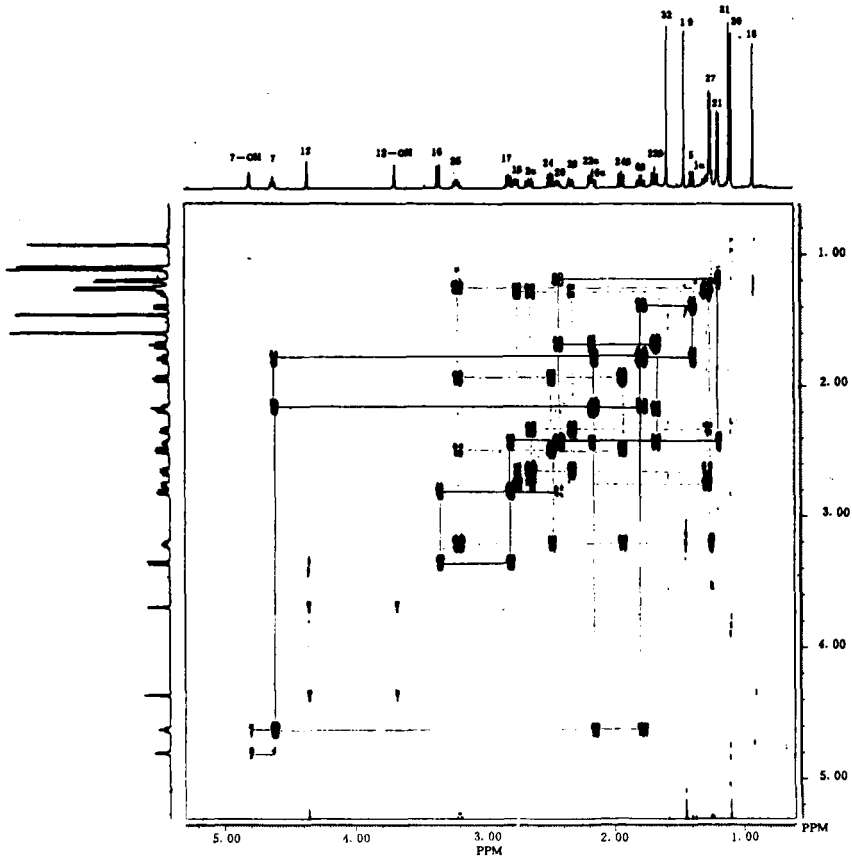


Fig 2. Contour map of the ^1H - ^1H COSY spectrum of ganosporelactone A.

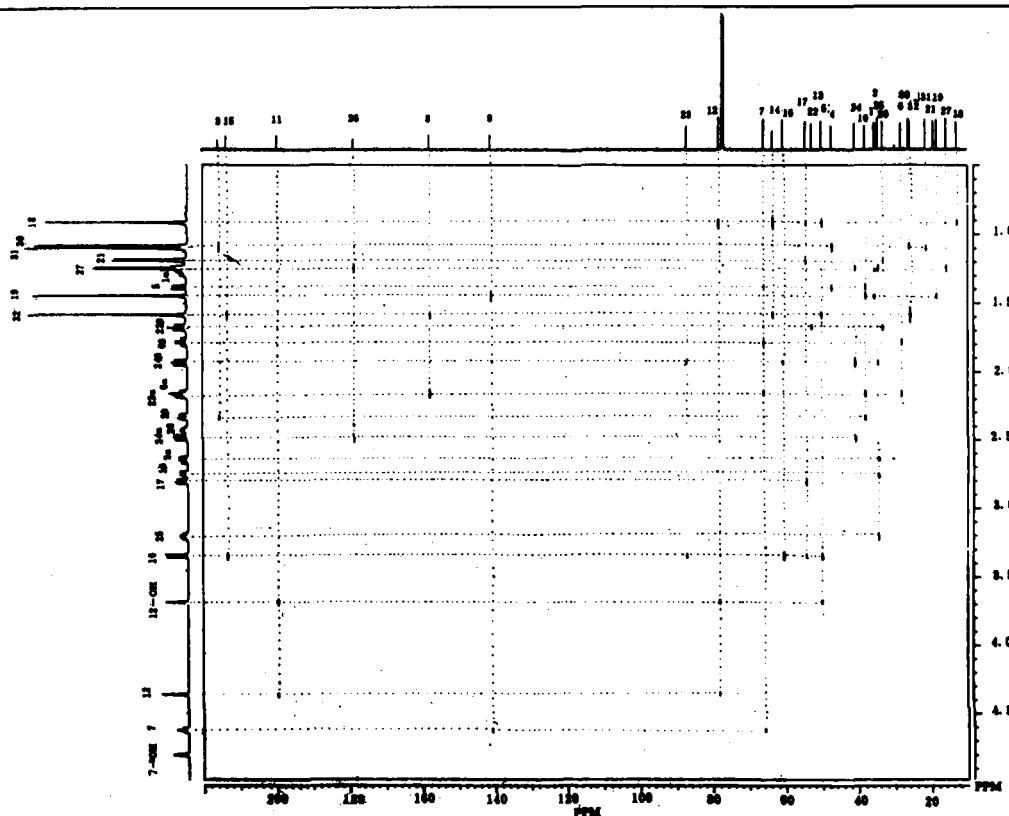


Fig 3. Contour map of the ^1H - ^{13}C COLOC spectrum of ganosporelactone A.

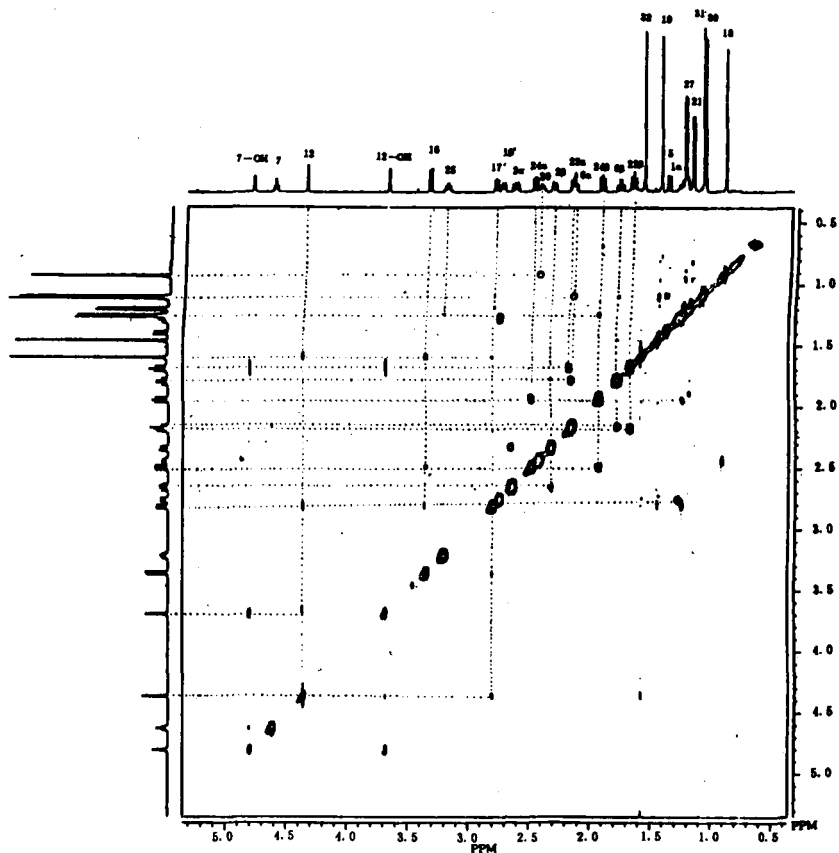


Fig 4. Contour map of the NOESY spectrum of ganosporelactone A.

H-17 α -H-20 β -H-22-H-21-CH₃ 相关。第四组: 25 α -H-24 α -H-24 β -H-27-CH₃ 相关。第五组: 1 β -H-2 α -H-2 β -H-1 α -H 相关。由 ¹H-¹H 相关谱可以明确指定 C₁₆ 只连接一个 H, 而该 H 只与 C₁₇-H 相关, 说明 C₁₆ 只能与另外二个季碳相连。在 ¹H-¹³C 远程偶合(相隔二个键及三个键)相关谱中(见图 3)则显示出 24-H 与 C₂₃, C₁₆, C₂₄ 及 C₂₅ 相关; 16 α -H 与 C₁₅, C₂₃, C₁₆, C₁₇ 及 C₁₃ 相关, 从而证实了 C₂₃ 与 C₁₆ 相连接。赤芝孢子内酯 A 的相对构型是通过 NOE 二维谱证明的。分子中空间接近的质子之间在 NOE 二维谱上均出现相关信号(见图 4)。16 α -H 与 17 α -H 有 NOE, 说明二者为顺式 α - 构型。12-H 与 32-CH₃, 17 α -H 之间产生 NOE 说明 12-H 及 32-CH₃ 亦是 α 构型。16-H 与 32-CH₃, 24 α -H, 17 α -H 之间的 NOE 说明 C₂₃ 螺环的存在使得 24 α -H 与 16 α -H 靠近, 从而证实了螺环的构型。17 α -H 与 21-CH₃, 32-CH₃, 16 α -H, 12 α -H 之间的 NOE 及 24 β -H 与 27-CH₃ 之间的 NOE 证明 20-H 及 27-CH₃ 均为 β - 构型, 而 25-H 为 α - 构型。在 NOE 二维谱中也显示了 6 β -H 与 31-CH₃, 19-CH₃, 6 α -H 之间的相关性, 进一步证明了这些质子的空间排列。

赤芝孢子内酯 A 的绝对构型是通过 CD 谱证明的。赤芝孢子内酯 A 的 CD 谱在 295 nm 呈负 Cotton ($\Delta\epsilon$ -4.5), 252 nm 正 Cotton ($\Delta\epsilon$ +12.5) 以及 209 nm 负 Cotton ($\Delta\epsilon$ -5.5)。这些数据与已知绝对构型的灵芝三萜 ganoderic acid C 的 CD 谱 Cotton 效应符号相同⁽²⁾, 从而证明赤芝孢子内酯 A 的绝对构型。

赤芝孢子内酯 B 为白色针状结晶, mp 235 ~ 237 °C, $[\alpha]_D^{25} + 68.8$ (c 0.083, CHCl₃)。高分辨质谱确定其分子式为 C₃₀H₄₂O₇, (M⁺ 514.2930 计算值 514.2930)。UV λ_{max}^{EtOH} 263nm (log ϵ 4.0), 证明存在 α , β 不饱和羰基。IR (KBr) cm⁻¹: 3430 (OH), 1770, 1730, 1665 (C=O), 1040。表明赤芝孢子内酯 B 同赤芝孢子内酯 A 一样, 亦是个多羰基的化合物。其 ¹H NMR (见表 1) δ 3.19 (dd 1H) 比赤芝孢子内酯 A 多了一个 H 的信号, 该 H 为 C₃ α -H^(7,8), 说明赤芝孢子内酯 B 在 C₃ 上连接的是羟基。根据 ¹³C NMR 谱(见表 2) 证明分子中存在 30 个碳, 由 INEPT 谱证明其中存在 7 个 CH₃, 5 个 CH₂, 8 个 CH 及 10 个季碳, 与赤芝孢子内酯 A 比较 δ 213.2 的信号 (C₃ 羰基) 消失, 而出现 δ 77.0 的信号, 同时 C₃₀ 向低场位移 2.7 ppm, 而 C₃₁ 向高场位移 5.3 ppm⁽¹¹⁾, 因此进一步证明 C₃ 上连有羟基。赤芝孢子内酯 B CD 谱的 Cotton 效应与赤芝孢子内酯 A 一致, 说明二者绝对构型相同。用铬酐氧化赤芝孢子内酯 B, 薄层检查氧化产物与赤芝孢子内酯 A 的 Rf 值相同 (Rf 0.32, CHCl₃), 经硫酸显色后的颜色变化也相同, 氧化产物的 IR 光谱亦与赤芝孢子内酯 A 相同。

综上所述, 赤芝孢子内酯 A 和 B 是二个新型五环三萜化合物, 在生源上可能是从灵芝四环三萜通过连接 C₁₆ 与 C₂₃ 键衍变而来。

实 验 部 分

熔点用 Boetius 熔点仪测定, 未校正。UV 谱用岛津 UV 240 测定。IR 谱用 Perkin-Elmer 399 仪测定, KBr 压片。MS 用 MAT 711 测定。CD 谱用法国 Jobin-Yvon CD-V 测定。 $[\alpha]$ 用 Perkin-Elmer 241 测定。NMR 谱用 Bruker AM-600 及 AM-500 测定, TMS 为内标, CDCl₃ 为溶剂。分离用硅胶为青岛海洋化工厂产品。本所实验药厂提供赤芝孢子粉提取物。

一. 赤芝孢子内酯 A 和 B 的分离

赤芝孢子粉醚溶部分 1 kg, 以 4% KOH 水溶液 2.5 l 搅拌混匀, Et₂O 萃取, Et₂O 液 H₂O

洗至中性, 浓缩后得中性部分 152 g. 碱溶液以 HCl 调到 pH 2, Et₂O 萃取, Et₂O 液 H₂O 洗至中性, 浓缩得 245 g 酸性部分. 酸性部分 200 g 加 250 g 硅胶拌样, 在改良沙氏提取器中加 500 g 硅胶, 加入样品后以石油醚, Et₂O, Me₂CO, MeOH 依次回流洗脱. Et₂O 洗脱部分 14 g, 经硅胶 (1kg) 柱层析, CHCl₃-MeOH 梯度洗脱, 从 CHCl₃-MeOH (97:3) 洗脱部分得赤芝孢子内酯 B 64 mg. 其结晶后的母液经薄层层析显二个斑点, 上边斑点为赤芝孢子内酯 A, 下边的为赤芝孢子内酯 B. 经硅胶 GF 制备薄层, CHCl₃-MeOH (95:5) 展开, 切割后 MeOH 洗脱, MeOH 重结晶, 得赤芝孢子内酯 A 10 mg.

二. 鉴定

赤芝孢子内酯 A 白色针状结晶 mp 238 ~ 240 °C. $[\alpha]_D^{25} + 74.5^\circ$ (c 0.057, CHCl₃). IR (KBr) cm⁻¹: 3400, 2960, 1765, 1720, 1700, 1660, 1450, 1415, 1380, 1300, 1280, 1190, 1150, 1050. UVλ_{max}^{MeOH} nm (log ε): 206 (3.5), 252 (3.86). CD λ MeOH nm (Δε) 295 (-4.5), 275 (0), 252 (+12.5), 224 (0), 209 (-5.5). MS m/z (%): 512.2777 (M⁺, 47; 计算值 512.2773), 494 (54), 476 (7), 466 (20), 397 (10), 317 (7), 302 (20), 301 (40), 272 (24), 181 (25), 167 (76), 149 (68), 121 (67), 105 (32), 93 (100), 79 (30), 69 (28), 55 (29). ¹H NMR 见表 1, ¹³C NMR 见表 2.

赤芝孢子内酯 B 白色针状结晶 mp 235 ~ 237 °C, $[\alpha]_D^{25} + 68.8^\circ$ (c 0.083, CHCl₃). IR (KBr) cm⁻¹: 3430, 2930, 2870, 1770, 1730, 1665, 1450, 1370, 1310, 1270, 1200, 1160, 1100, 1040, 975, 930. UVλ_{max}^{EtOH} nm (log ε): 210 (3.5), 263 (4.0). CD λ MeOH nm (Δε) 295 (-5.8), 274 (0), 253 (+11.4), 225 (0), 209 (-5.0). MS m/z (%): 514.2930 (M⁺, 81; 计算值 514.2930), 496 (60), 468 (55), 348 (13), 303 (31), 302 (20), 274 (67), 181 (44), 167 (100), 149 (75), 121 (92). ¹H NMR 见表 1, ¹³C NMR 见表 2.

赤芝孢子内酯 B 的氧化 取样品 5 mg, 溶于 CH₂Cl₂ 3 ml, 加入铬酐—C₅H₅N (铬酐 100 mg 分批加到 C₅H₅N 1 ml 中), 反应液室温放置 2 h, 加 H₂O 5 ml, CH₂Cl₂ 萃取, H₂O 洗, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩后薄层纯化. IR (KBr) cm⁻¹: 3400 2960 1765, 1720, 1700, 1660, 1450, 1415, 1380.

致谢 西德 Bruker 公司 D. Moskan 博士测定二维核磁共振谱. 本所梁晓天教授对本工作热情指导; 仪器分析室代测 UV, IR, CD; 药厂提供赤芝孢子粉提取物.

参 考 文 献

1. Kubota T. 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.
2. Nishitoba T. et al. New bitter C₂₇ and C₃₀ terpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Agr Biol Chem* 1985; 49: 1793.
3. Hirofani M. et al. A Ganoderic acid derivative a highly oxygenated lanostane type triterpenoid from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 1985; 24: 2055.
4. Kohda H. et al. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release inhibitory triterpenes. *Chem Pharm Bull* 1985; 34: 1367.
5. Komoda Y. et al. Structures of new terpenoid constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst (Polyporaceae). *Ibid* 1985; 33: 4829.
6. Hirofani M. et al. Ganoderic acid T, S and R, new triterpenoids from the cultured mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Ibid* 1986; 34: 2282.
7. Morigiwa A. et al. Angiotensin converting enzyme - inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Ibid* 1986; 34: 3025.

8. Hirofumi M. et al. Ganodeic acid derivatives, highly oxygenated lanostane type triterpenoids, from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 1986; **25**: 1189.
9. Arisawa M. et al. Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. *J Nat Prod* 1986; **49**: 621.
10. Kikuchi T. et al. Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. I. *Chem Pharm Bull* 1986; **34**: 3695.
11. Kikuchi T. et al. Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. II. *Ibid* 1986; **34**: 4018.
12. Arisawa M. et al. Revision of ^1H - and ^{13}C -NMR assignments of lanostanoids from *Ganoderma lucidum* by 2D-NMR studies. *J Nat Prod* 1988; **51**: 54.

APPLICATION OF 2D NMR TECHNIQUES IN THE STRUCTURE DETERMINATION OF GANOSPORELACTONE A AND B

RY Chen and DQ Yu

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

ABSTRACT Structure and stereochemistry of ganosporelactone A and B isolated from the spores of *Ganoderma lucidum* have been elucidated by the use of ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C COSY, ^1H - ^{13}C COLOC and NOESY 2D NMR spectroscopy. Ganosporelactone A and B are two novel pentacyclic triterpenoids which may be biogenetically derived from lanostane skeleton through the construction of C_{16} and C_{23} bond.

Key words Ganosporelactone A; Ganosporelactone B; *Ganoderma lucidum*; Spores; 2D NMR