

石上柏化学成分及生物活性的研究

赵倩, 王彩霞, 李艳玲, 刘翠艳, 容彦华

石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 河北 石家庄 050035

摘要: 目的 研究石上柏 *Selaginella doederleinii* 的化学成分及其生物活性。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、反相 C₁₈ 柱色谱等分离纯化, 利用理化性质和波谱学数据鉴定化合物结构。并对醋酸乙酯部位进行体外抑制肿瘤细胞的活性测试。结果 从石上柏醋酸乙酯部位中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为穗花杉双黄酮(1)、粗贝壳杉黄酮 4'-甲醚(2)、5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-六羟基(2', 8'') 双黄酮(3)、7, 4', 7'', 4'''-四甲氧基穗花杉双黄酮(4)、5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-六羟基(2', 6'') 双黄酮(5)、银杏双黄酮(6)、异银杏双黄酮(7)、槲皮素-3-O- α -D-阿拉伯糖苷(8)、川陈皮素(9)、没食子酸(10)、莽草酸(11); 从正丁醇部位中分离得到 2 个生物碱, 分别鉴定为小檗碱(12)、巴马汀(13)。体外药理研究表明石上柏醋酸乙酯部位能显著抑制 HeLa 与 HepG2 细胞的生长, IC₅₀ 分别为 0.12 mg/mL 和 0.60 mg/mL。体内实验表明醋酸乙酯部位对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠抑瘤率为 43%。结论 化合物 5 为一新天然产物, 化合物 3、6~10、12、13 为首次从该植物中分离得到。

关键词: 石上柏; 5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-六羟基(2', 6'') 双黄酮; 银杏双黄酮; 没食子酸; 巴马汀

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)23-3270-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.004

Chemical constituents from *Selaginella doederleinii* and their bioactivities

ZHAO Qian, WANG Cai-xia, LI Yan-ling, LIU Cui-yan, RONG Yan-hua

CSPC Zhongqi Pharmaceutical Technology Shijiazhuang Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from *Selaginella doederleinii* and their bioactivities. **Methods** Column chromatography on silica gel, RP-C₁₈, and Sephadex LH-20 columns was used to separate and purify the chemical constituents. The structures were elucidated by physicochemical properties and spectroscopic analyses. The inhibition of EtOAc fraction on the tumor cells was tested *in vivo* and *in vitro*. **Results** Eleven compounds were obtained from EtOAc fraction and identified as flavonoids and phenolic acids. These compounds were asamentoflavone (1), robustafavone 4'-methyl ether (2), 5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-hexahydroxy-(2', 8'')-biflavone (3), 7, 4', 7'', 4'''-tetra-O-amentoflavone (4), 5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-hexahydroxy-(2', 6'')-biflavone (5), ginkgetin (6), isoginkgetin (7), quercetin-3-O- α -D-arabinofuranoside (8), nobiletin (9), gallic acid (10), and shikimic acid (11). Two alkaloids, berberine (12) and palmatine (13) were obtained from *n*-BuOH fraction. The bioassays indicated that EtOAc fraction could inhibit the growth of HeLa and HepG2 *in vitro* with IC₅₀ values of 0.12 and 0.60 mg/mL, respectively. The tumor-inhibition rate in S₁₈₀-bearing mice was 43%. **Conclusion** Compound 5 is a new natural product, and compounds 3, 6—10, 12, and 13 are isolated from the plant for the first time.

Key words: *Selaginella doederleinii* Hieron.; 5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-hexahydroxy-(2', 6'')-biflavone; ginkgetin; gallic acid; palmatine

石上柏 *Selaginella doederleinii* Hieron. 为蕨类植物门卷柏科卷柏属植物, 又名深绿卷柏、大叶菜、水柏枝等, 主产于我国贵州、云南、广西、福建、浙江、台湾等地, 其性味甘、微苦、涩, 性凉, 有清热解毒、祛风除湿、活血化淤之功效, 常用于治疗咽喉肿痛、肺热咳嗽、乳腺炎、湿热黄疸、风湿痹痛、外伤出血等^[1-2]。现代药理研究表明, 深绿卷

柏有较好的抗癌作用, 能增强机体代谢和网状内皮系统功能, 具有“扶正祛邪”的双重作用, 临床上可用于治疗绒毛膜上皮癌、肺癌、鼻咽癌、宫颈癌及多种感染性炎症^[3-4]。研究认为石上柏的主要药效成分为黄酮类化合物。本实验从石上柏醋酸乙酯部分分离得到了 11 个化合物, 主要为黄酮类化合物, 分别鉴定为穗花杉双黄酮(amentoflavone, 1)、粗

收稿日期: 2013-09-27

基金项目: 科技部“十一五”重大新药创制(2008ZX09401-004)

作者简介: 赵倩(1976—), 女, 工程师, 硕士, 主要从事新药开发研究。Tel: (0311)67808833 E-mail: zhaoqian@scptc.com

贝壳杉黄酮 4'-甲醚 (robustafavone 4'-methyl ether, 2)、5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-六羟基 (2', 8'') 双黄酮 [5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-hexahydroxy-(2', 8'')-biflavone, 3]、7, 4', 7'', 4'''-四甲氧基穗花杉双黄酮 (7, 4', 7'', 4'''-tetra-O-amentoflavone, 4)、5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-六羟基 (2', 6'') 双黄酮 [5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-hexahydroxy-(2', 6'')-biflavone, 5]、银杏双黄酮 (ginkgetin, 6)、异银杏双黄酮 (isoginkgetin, 7)、槲皮素-3-O- α -D-阿拉伯糖苷 (quercetin-3-O- α -D-arabinofuranosi, 8)、川陈皮素 (nobiletin, 9)、没食子酸 (gallic acid, 10)、莽草酸 (shikimic acid, 11); 从正丁醇部分得到 2 个生物碱, 分别鉴定为小檗碱 (berberine, 12) 和巴马汀 (palmatine, 13)。其中化合物 5 为一新的天然产物, 化合物 3、6~10、12、13 为首次从该植物中分离得到。对石上柏体外活性研究表明石上柏醋酸乙酯部位能显著抑制 HeLa 与 HepG2 细胞的生长, IC₅₀ 分别为 0.12、0.60 mg/mL; 体内实验表明醋酸乙酯部位对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤抑制率为 43%。

1 材料

1.1 仪器、试剂与药材

自动流分收集器 (上海沪西分析仪器厂有限公司), LC/MS/MS: LC 为 Shimadzu 20A (日本岛津公司), ESI-MS 为 API 4000 型液相色谱-三重四级杆质谱联用仪 (美国 AB 公司), Bruker Avance—500、Bruker ARX—600 型核磁共振谱仪 (德国 Bruker 公司), Thermo VF 型酶标仪, 梅特勒 AL204 型电子分析天平。薄层 GF254 色谱板 (烟台大学生物与工程研究所), 柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20、C₁₈ (北京慧德易科技有限责任公司), 反相 C₁₈ 板、Lchroprep[®] RP-18 均为 Merk 公司产品, 95%乙醇为医药用酒精, 甲醇、石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇、冰醋酸、DMSO 均为国产分析纯, RPMI 1640 培养液 (Gibco), MTT (Amresco), 96 孔板 (Corning)。

石上柏购于安国康泰尔医药有限公司, 由石药集团中奇制药技术 (石家庄) 有限公司中药室刘翠艳高级工程师鉴定为蕨类植物门卷柏科卷柏属植物石上柏 *Selaginella doederleinii* Hieron.。

1.2 细胞与动物

HeLa 细胞 (人宫颈癌细胞)、HepG2 细胞 (人肝癌细胞)、S₁₈₀ 细胞 (小鼠肉瘤细胞) 均购自中国科学院上海生命科学研究院。清洁级昆明种小鼠,

体质量 18~22 g, 河北省实验动物中心提供, 生产许可证号为 SCXK [冀] 2008-1-003。

2 提取与分离

石上柏 5 kg 用 95%乙醇加热回流提取, 回收乙醇, 浓缩后用水混悬, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 取醋酸乙酯层经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇 (100:1→1:1) 梯度洗脱, 得 5 个流分, 再反复经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、反相 C₁₈ 开放柱色谱等, 得到化合物 1 (670 mg)、2 (570 mg)、3 (34 mg)、4 (68 mg)、5 (20 mg)、6 (9 mg)、7 (8 mg)、8 (21 mg)、9 (18 mg)、10 (15 mg)、11 (12 mg)。取正丁醇层反复经 Sephadex LH-20 柱色谱、反相 C₁₈ 开放柱色谱等, 得到化合物 12 (17 mg)、13 (14 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色粉末, 分子式 C₃₀H₁₈O₁₀, ESI-MS m/z : 537 [M-H]⁻。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 和 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) 数据见表 1、2。与文献报道的数据一致^[5], 故鉴定化合物 1 为穗花杉双黄酮。

化合物 2: 黄色粉末, 分子式 C₃₁H₂₀O₁₀, ESI-MS m/z : 549 [M-H]⁻。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 和 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) 数据见表 1、2。与文献报道的数据一致^[6], 故鉴定化合物 2 为粗贝壳杉黄酮 4'-甲醚。

化合物 3: 黄色粉末。分子式 C₃₀H₁₈O₁₀, ESI-MS m/z : 537 [M-H]⁻。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 和 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) 数据见表 1、2。与文献数据对照^[7], 鉴定化合物 3 为 5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-六羟基 (2', 8'') 双黄酮。

化合物 4: 黄色粉末, 分子式 C₃₄H₂₆O₁₀, ESI-MS m/z : 593 [M-H]⁻。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 图谱与化合物 1 相对照, 高场区多出 4 个甲氧基氢信号, 其余与化合物 1 一致。故确定化合物 4 为 7, 4', 7'', 4'''-四甲氧基穗花杉双黄酮。具体氢信号归属见表 1。

化合物 5: 黄色粉末, 分子式 C₃₀H₁₈O₁₀, ESI-MS m/z : 537 [M-H]⁻。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。¹H-NMR 谱中可以看出低场区 δ 13.05 附近 2 个 s 峰, 为双黄酮的 2 个 5 位羟基峰;

表1 化合物1~5的¹H-NMR数据 (DMSO-*d*₆)
Table 1 ¹H-NMR data of compounds 1—5 (DMSO-*d*₆)

碳位	1	2	3	4	5
3	6.83 (1H, s)	6.89 (1H, s)	6.65 (1H, s)	7.02 (1H, s)	6.84 (1H, s)
6	6.19 (1H, s)	6.21 (1H, s)	6.18 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	6.38 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	6.19 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)
8	6.45 (1H, s)	6.51 (1H, s)	6.46 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	6.80 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	6.47 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)
2'	8.04 (1H, brs)	7.84 (1H, s)	—	8.11 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	—
3'	—	—	8.16 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	—	8.00 (1H, brs)
5'	7.12 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	7.25 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	7.78 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 2.0 Hz)	7.40 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	8.02 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
6'	8.00 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 2.0 Hz)	8.10 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	6.84 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	8.25 (1H, dd, <i>J</i> = 9.0, 2.0 Hz)	7.15 (1H, dd, <i>J</i> = 9.0, 2.0 Hz)
3''	6.79 (1H, s)	6.83 (1H, s)	6.67 (1H, s)	6.96 (1H, s)	6.80 (1H, s)
6''	6.36 (1H, s)	—	—	6.70 (1H, s)	6.41 (1H, s)
8''	—	6.65 (1H, s)	6.28 (1H, s)	—	—
2''', 6'''	7.60 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	7.97 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	7.92 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	7.62 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	7.58 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
3''', 5'''	6.71 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	6.96 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	6.94 (2H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	6.94 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	6.72 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
5-OH	13.12 (s)	12.96 (s)	13.01 (s)	12.91 (s)	12.98 (s)
7-OH	10.78 (brs)	10.81 (brs)	—	—	10.79 (brs)
4'-OH	10.78 (brs)	10.81 (brs)	—	—	10.36 (brs)
5''-OH	13.00 (s)	13.24 (s)	13.81 (s)	13.22 (s)	13.22 (s)
7''-OH	10.78 (brs)	10.81 (brs)	—	—	10.57 (brs)
4'''-OH	10.23 (brs)	10.38 (brs)	—	—	10.25 (brs)
-OCH ₃	—	3.82 (3H, s)	—	3.85, 3.84, 3.81, 3.76 (各3H, s)	—

表2 化合物1~3、5的¹³C-NMR数据 (DMSO-*d*₆)
Table 2 ¹³C-NMR data of compounds 1—3 and 5 (DMSO-*d*₆)

碳位	1	2	3	5	碳位	1	2	3	5
2	163.9	163.4	163.9	164.9	2''	163.7	163.7	164.2	162.4
3	103.4	103.4	103.0	102.2	3''	102.5	102.8	102.6	101.9
4	181.7	181.7	181.8	181.2	4''	182.0	181.8	182.2	181.6
5	161.4	161.2	160.6	161.5	5''	160.9	158.9	161.1	164.0
6	99.0	98.9	98.7	98.7	6''	98.8	108.6	98.9	111.5
7	164.1	164.2	163.8	163.9	7''	160.5	162.0	162.0	161.6
8	94.0	94.1	94.1	93.8	8''	104.3	93.4	103.7	95.8
9	157.3	157.4	157.4	157.3	9''	154.5	156.4	154.5	156.7
10	102.8	103.5	104.1	103.6	10''	103.7	103.7	103.8	101.0
1'	120.5	122.4	121.0	118.0	1'''	121.4	121.2	120.1	121.6
2'	127.6	130.2	127.8	126.2	2'''	128.2	128.5	128.2	128.1
3'	120.4	122.6	121.5	123.5	3'''	115.7	116.0	115.8	115.9
4'	160.2	160.6	159.7	159.1	4'''	161.4	161.4	161.5	160.8
5'	116.6	111.7	116.3	118.8	5'''	115.7	116.0	115.8	115.9
6'	131.4	127.9	131.4	131.4	6'''	128.2	128.5	128.2	128.1
-OCH ₃	—	55.8	—	—	—	—	—	—	—

δ 8.16 (1H, d, $J=2.0$ Hz)、 δ 7.78 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz) 和 δ 6.84 (1H, d, $J=9.0$ Hz) 为典型的 ABX 耦合系统, 判断黄酮 B 环上有 1, 2, 4 或 1, 3, 4 位取代。 δ 7.92 (2H, d, $J=8.5$ Hz) 和 δ 6.94 (2H, d, $J=8.5$ Hz) 为互为耦合的一组峰, 推断为黄酮 B 环为 1, 4 位取代。 δ 6.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz) 和 δ 6.46 (1H, d, $J=2.0$ Hz) 也为互为耦合的一组峰, 推断为黄酮 A 环的 6、8 位的氢信号。 δ 6.28 (1H, s) 为黄酮 6 位或 8 位的氢信号。 δ 6.65 (1H, s) 和 δ 6.67 (1H, s) 应该为黄酮 3 位的氢信号。由此推断该化合物为一个双黄酮类化合物, 对比化合物 **1**、**2** 和 **3**, 推断该化合物为 2'和 6''相连的 5, 5'', 7, 7'', 4', 4'''-六羟基 (2', 6'') 双黄酮, 该化合物为一新的天然产物。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) 数据见表 1、2。

化合物 **6**: 黄色粉末, 分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$, ESI-MS m/z : 565 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.09 (1H, s, 5''-OH), 12.92 (1H, s, 5-OH), 10.83 (1H, brs, 7''-OH), 10.28 (1H, brs, 4'''-OH), 8.22 (1H, dd, $J=8.8, 1.5$ Hz, 6'-OH), 8.10 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-2'), 7.50 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2''', 6'''), 7.37 (1H, d, $J=8.8$ Hz, 5'-H), 7.01 (1H, s, H-3''), 6.81 (1H, s, H-3), 6.80 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-8), 6.72 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3''', 5'''), 6.41 (1H, s, 6''-H), 6.38 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-6), 3.84 (3H, s, 7-OCH₃), 3.80 (3H, s, 4'-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **6** 为银杏双黄酮。

化合物 **7**: 黄色粉末, 分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$, ESI-MS m/z : 565 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.09 (1H, s, 5''-OH), 12.93 (1H, s, 5-OH), 10.83 (2H, brs, 7, 7''-OH), 8.19 (1H, dd, $J=8.8, 1.5$ Hz, 6'-OH), 8.06 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-2'), 7.62 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2''', 6'''), 7.36 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5'), 7.01 (1H, s, H-3), 6.93 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3''', 5'''), 6.92 (1H, dd, $J=9.0, 2.0$ Hz, H-3''), 6.48 (1H, d, $J=1.0$ Hz, H-8), 6.42 (1H, s, H-6''), 6.20 (1H, d, $J=1.0$ Hz, H-6), 3.80 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.76 (3H, s, 4'''-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **7** 为异银杏双黄酮。

化合物 **8**: 黄色粉末。分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$, ESI-MS m/z : 433 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ :

12.95 (1H, s, 5-OH), 7.58 (1H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 7.49 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.60 (1H, s, H-1''), 4.16 (1H, m, H-4''), 4.04 (1H, m, H-2''), 3.73 (1H, m, H-3''), 3.58 (1H, m, H-5''); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.7 (C-4), 164.2 (C-7), 161.3 (C-5), 160.0 (C-9), 156.4 (C-2), 148.5 (C-4'), 145.1 (C-3'), 133.4 (C-3), 121.7 (C-6'), 121.0 (C-1'), 115.8 (C-5'), 115.1 (C-2'), 107.9 (C-1''), 104.0 (C-10), 98.7 (C-6), 93.6 (C-8), 85.8 (C-4''), 82.2 (C-2''), 77.0 (C-3''), 60.7 (C-5'')。与文献数据对照^[9], 鉴定化合物 **8** 为槲皮素-3-*O*- α -D-阿拉伯糖苷。

化合物 **9**: 黄色粉末。分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$, ESI-MS m/z : 401 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。盐酸镁粉反应阳性, 初步判断为黄酮类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.67 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 7.55 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.14 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-5'), 6.71 (1H, s, H-3), 4.12, 4.05, 3.96, 3.94, 3.91 (各 3H, s, OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD₃OD) δ : 179.0 (C-4), 163.9 (C-2), 154.0 (C-4'), 153.2 (C-5), 151.0 (C-3'), 149.4 (C-9), 145.8 (C-6), 140.0 (C-8), 125.2 (C-1'), 121.6 (C-6'), 114.2 (C-10), 113.3 (C-5'), 110.8 (C-2'), 107.3 (C-3), 62.9, 62.8, 62.5, 62.4, 57.0, 56.9 (6 $\times$ OCH₃)。与文献数据对照^[10], 鉴定化合物 **9** 为川陈皮素。

化合物 **10**: 无色针状结晶, 分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, ESI-MS m/z : 169 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.16 (1H, brs, -COOH), 9.14 (2H, s, 3, 5-OH), 8.79 (1H, s, 4-OH), 6.91 (2H, s, H-2, 6); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.3 (COOH), 145.3 (C-3, 5), 137.9 (C-4), 120.4 (C-1), 108.7 (C-2, 6)。与文献数据对照^[11], 鉴定化合物 **10** 为没食子酸。

化合物 **11**: 白色粉末, 分子式 $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$, ESI-MS m/z : 173 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.77 (1H, s, H-2), 4.34 (1H, s, H-3), 3.96 (1H, dd, $J=12.0, 5.3$ Hz, H-4), 3.64 (1H, dd, $J=7.0, 4.0$ Hz, H-5), 2.67 (1H, m, H-6 α), 2.16 (1H, m, H-6 β); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.4 (-COOH), 138.9 (C-2), 131.1 (C-1), 73.1 (C-3), 68.7 (C-4), 67.6 (C-5), 32.0 (C-6)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **11** 为莽草酸。

化合物 **12**: 黄色针晶。分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4$,

ESI-MS m/z : 335 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 9.77 (1H, s, H-8), 8.71 (1H, s, H-13), 8.11 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-11), 8.01 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-12), 7.66 (1H, s, H-1), 6.95 (1H, s, H-4), 6.10 (2H, s, $-OCH_2O-$), 4.93 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-6), 4.20 (3H, s, $-OCH_3$), 4.10 (3H, s, $-OCH_3$), 3.25 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 152.5 (C-9), 152.3 (C-3), 150.2 (C-2), 146.7 (C-8), 146.1 (C-10), 142.6 (C-13a), 135.5 (C-12a), 132.2 (C-4a), 128.4 (C-13), 124.9 (C-10), 122.6 (C-1a), 122.2 (C-11), 121.8 (C-8a), 109.7 (C-4), 106.9 (C-1), 103.9 ($-OCH_2O-$), 62.9 (9- OCH_3), 58.0 (C-6), 57.5 (10- OCH_3), 28.5 (C-5)。与文献数据对照^[13], 鉴定化合物 **12** 为小檗碱。

化合物 **13**: 黄色针晶。分子式 $C_{21}H_{22}NO_4$, ESI-MS m/z : 353 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 9.77 (1H, s, H-8), 8.83 (1H, s, H-13), 8.11 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-11), 8.05 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-12), 7.68 (1H, s, H-1), 7.06 (1H, s, H-4), 4.94 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-6), 3.25 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-5), 4.21 (3H, s, $-OCH_3$), 4.11 (3H, s, $-OCH_3$), 4.00 (3H, s, $-OCH_3$), 3.94 (3H, s, $-OCH_3$)。与文献数据对照^[13], 鉴定化合物 **13** 为巴马汀。

4 活性测定

4.1 石上柏醋酸乙酯部位对 HeLa 细胞和 HepG2 细胞体外抑制作用

取对数生长期的 HeLa 细胞和 HepG2 细胞, 分别用新鲜的 RPMI 1640 培养液配制密度为 4×10^4 个/mL 和 6×10^4 个/mL 的细胞悬液, 以 100 μ L/孔接种于 96 孔板, 置 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱内培养 24 h 后, 每孔加入 100 μ L 药液, 使终浓度分别为 0.01、0.03、0.1、0.3、1 mg/mL, 对照组加入 100 μ L

RPMI 1640 培养液, 同时设只加培养液的空白对照, 每浓度 6 个复孔。继续培养 48 h 后, 小心吸去上清液, 每孔加入 200 μ L RPMI 1640 培养液, 及 5 g/L 的 MTT 染色液 20 μ L, 再培养 4 h 后, 弃去上清液, 加入 DMSO 150 μ L/孔, 震荡 10 min, 待孔内沉淀完全溶解后, 用酶标仪测定 570 nm 处吸光度 (A) 值, 按公式计算对细胞的抑制率 (IR)。

$$IR = (A_{\text{空白}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{空白}}$$

然后用 Bliss 法计算药物对细胞的 IC_{50} 值。石上柏醋酸乙酯部位对 HeLa 细胞和 HepG2 细胞体外抑制作用的 IC_{50} 值分别为 0.12、0.60 mg/mL。

4.2 石上柏醋酸乙酯部位对小鼠 S_{180} 细胞实体瘤的抑制作用

选取体质量 18~22 g 的小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 即模型组、环磷酰胺组、石上柏低剂量组 (按生药量折算 45 g/kg)、高剂量组 (按生药量折算 135 g/kg)。除环磷酰胺组外, 各组给药 10 d, 模型组给予等量的蒸馏水。第 3 天接种肿瘤 (选取接种 S_{180} 细胞 7 d 的腹水型荷瘤小鼠, 断颈处死, 抽取乳白色黏稠腹水, 生理盐水注射液稀释至 5×10^6 /mL, 以每只 0.2 mL 接种于小鼠右侧腋窝皮下), 接瘤后环磷酰胺隔天给药。第 11 天剥瘤, 称量小鼠体质量、瘤质量。按公式计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量}) / \text{模型组平均瘤质量}$$

石上柏醋酸乙酯部位低、高剂量对小鼠 S_{180} 实体瘤的抑瘤率分别为 26% 和 43%。具体结果见表 3。

5 讨论

石上柏是我国民间广泛应用的一味中药, 临床常用于治疗鼻咽癌等多种肿瘤。目前关于石上柏的研究虽多以抗肿瘤作用为主, 但仍不够系统和深入, 特别是在其治疗鼻咽癌的药效物质基础及机理研究

表 3 石上柏醋酸乙酯部位对小鼠 S_{180} 实体瘤抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Tumor-inhibition of EtOAc fraction in S_{180} -bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	体质量 / g		瘤质量 / g	抑瘤率 / %
		给药前	给药后		
模型	—	19.6 ± 1.3	30.4 ± 3.4	1.91 ± 0.68	—
环磷酰胺	0.03	19.4 ± 1.3	29.0 ± 1.7	0.49 ± 0.24**	75
石上柏醋酸乙酯部位	45	19.2 ± 1.5	30.2 ± 2.6	1.42 ± 0.71	26
石上柏醋酸乙酯部位	135	19.3 ± 1.2	30.2 ± 2.6	1.09 ± 0.50*	43

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

方面仍很欠缺,对石上柏其他药理作用的验证和活性成分的确定方面仍然缺乏研究数据。因此,对其药效物质基础的进一步深入研究,将为有效开发和利用石上柏这一中药资源提供更详尽的科学依据,具有很高的医药价值和社会意义。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 黎 霜, 黄可龙. 深绿卷柏的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2637-2639.
- [4] 戴卫波, 梅全喜, 曾聪彦. 石上柏化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 药学专论, 2011, 20(2): 15-16.
- [5] 沈 杰, 杨峻山. 云南山竹子果实的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(9): 660-661.
- [6] Lin L C, Kuo Y C, Chou C J. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(5): 627-630.
- [7] 周 燕, 张 晓, 蒋舜媛, 等. 攀枝花苏铁的化学成分 [J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(4): 367-370.
- [8] 唐于平, 楼凤昌, 王景华, 等. 银杏叶中黄酮类成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(4): 231-233.
- [9] 石海峰, 冯宝民, 史丽颖, 等. 西南山茶化学成分分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(5): 357-360.
- [10] Wang D D, Wang J A, Huang X H, *et al.* Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 44(1): 63-69.
- [11] 汤芳萍, 吴翠芳. 山葡萄化学成分的研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2003, 23(4): 21-22.
- [12] 董旭俊, 罗仕德. 小花八角化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1041-1044.
- [13] 吴颖瑞, 马云宝, 赵友兴, 等. 岩黄连的抗乙肝病毒活性成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 32-37.