

湖北产石松千层塔烯(serratene)三萜化学成分的研究

杨国勋, 臧毅, 胡长玲, 熊娟, 胡金锋*

复旦大学药学院 天然药物化学教研室, 上海 201203

摘要:目的 对产于湖北随州的石松 *Lycopodium japonicum* 的化学成分进行研究。方法 用硅胶、反相硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备 HPLC 多种方法分离纯化, 通过理化性质和波谱数据解析化合物的结构。结果 从石松全草的甲醇提取物中分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为 21-表千层塔烯二醇(1)、千层塔烯二醇(2)、 α -芒柄花醇(3)、serrat-14-en-3 β , 21 β , 24-triol (4)、3 β , 21 α -dihydroxyserrat-14-en-16-one (5)、石松三醇(6)、石松四醇(7)、3 α , 21 β , 24-trihydroxyserrat-14-en-16-one (8)。结论 化合物 1~8 均为千层塔烯(serratene)三萜, 为石松属植物中的特征性化学成分。化合物 5 为该植物中首次分得。

关键词: 石松属; 石松; 千层塔烯三萜; 千层塔烯二醇; 石松三醇; 石松四醇

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)24-3524-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.004

Serratene triterpenoids in *Lycopodium japonicum* from Hubei province

YANG Guo-xun, ZANG Yi, HU Chang-ling, XIONG Juan, HU Jin-feng

Department of Natural Products Chemistry, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents in the whole plant of *Lycopodium japonicum*, native to Suizhou city, Hubei province for the first time. **Methods** The compounds were isolated and purified by a combination of silica gel, ODS, and Sephadex LH-20 column chromatography and prep-HPLC. Their chemical structures were established by their physicochemical properties and spectral data. **Results** Eight pentacyclic triterpenoids have been isolated and characterized from the methanol extract of the whole plant, they are 21-episerratenediol (1), serratenediol (2), α -onocerin (3), serrat-14-en-3 β , 21 β , 24-triol (4), 3 β , 21 α -dihydroxyserrat-14-en-16-one (5), lycoclavanol (6), lycalaninol (7), and 3 α , 21 β , 24-trihydroxyserrat-14-en-16-one (8). **Conclusion** Compounds 1—8 are all serratene triterpenoids, the characteristic chemical constituents in the plants of genus *Lycopodium* L. Compound 5 is isolated from this plant for the first time.

Key words: *Lycopodium* L.; *Lycopodium japonicum* Thunb.; serratene triterpenoids; serratenediol; lycoclavanol; lycalaninol

石松又名伸筋草, 为石松科石松属植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥带根全草。主要分布于东北、华东、华南、西南及内蒙古、河南等地, 有祛风除湿、舒筋活络、止咳、解毒、消肿等作用, 主治关节痛、疮痈等症^[1-3]。由于在蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. (千层塔 *Lycopodium serratum* Thunb.) 中发现了石杉碱甲, 并且阐明它为强效、高选择性乙酰胆碱酯酶抑制剂^[4], 因而使得近缘植物石松属植物的化学成分研究受到广泛关注。除了石松生物碱类, 石松属中同时发现含有另一类特征性的千层塔烯(serratene)五环

三萜^[5-6]。该种三萜不同于一般的五环三萜结构, C 环为一个特征的七元环系(有时开环), 一般在 C-14 和 C-15 间存在双键, 3 位和 21 位为含氧官能团, 通常为羟基。serratene 五环三萜是石松属植物中除生物碱外另一类被广泛关注的化学成分。已经发现 serratene 五环三萜类具有多种生物活性, 如抗肿瘤、抗乙酰胆碱酯酶、抑制白色念珠菌分泌的天冬氨酸蛋白酶^[7-9]等。到目前为止, 化学成分研究较为充分的石松主要产自浙江省和云南省。为进一步阐明不同产地石松中化学成分的类型特征, 本实验首次对产自湖北随州的石松进行了研究, 从中得到 8

收稿日期: 2014-10-16

基金项目: 国家自然科学基金(21472021, 81273401, 81202420); 教育部高等学校博士学科点(博导类)基金(20120071110049); 上海市科委科技支撑计划(12401901001)

作者简介: 杨国勋, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中草药活性成分。Tel: (021)51980106 E-mail: gxyang@fudan.edu.cn

*通信作者 胡金锋, 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物化学和化学生物学。Tel: (021)51980172 E-mail: jfhu@fudan.edu.cn

个 serratene 三萜, 分别鉴定为 21-表千层塔烯二醇 (21-episerratenediol, **1**)、千层塔烯二醇 (serratenediol, **2**)、 α -芒柄花醇 (α -onocerin, **3**)、serrat-14-en-3 β , 21 β , 24-triol (**4**)、3 β , 21 α -dihydroxy-serrat-14-en-16-one (**5**)、石松三醇 (lycoclavanol, **6**)、石松四醇 (lyclaninol, **7**)、3 α , 21 β , 24-trihydroxy-serrat-14-en-16-one (**8**)。结构见图 1。serratene 三萜类的研究兴起于 20 世纪六七十年代, 当时核磁共振技术处于起步阶段, 因而许多常见 serratene 三萜缺少碳谱数据; 即便是氢谱数据往往也是经转化后获得的 serratene 三萜乙酸酯的数据, 使得结构解析时直接进行数据比对会有一定的困难。本课题组通过 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS 分析并和文献数据比对, 部分化合物结合 DEPT 及 2D NMR (HSQC、HMBC、COSY) 技术, 对所分离到的 8 个 serratene 三萜的全部碳谱数据和氢谱的可归属甲基信号和特征质子信号进行了归属, 以便为今后该类化合物结构解析提供参考。

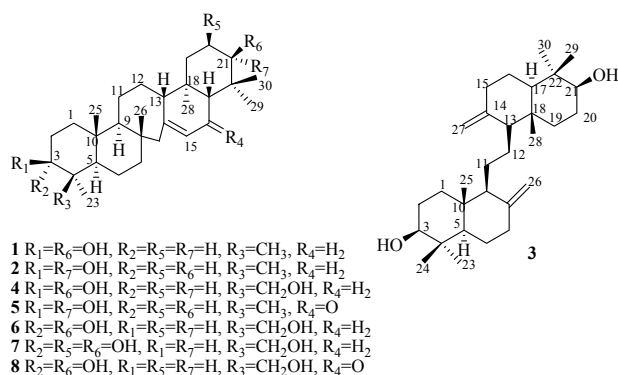


图 1 化合物 1~8 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—8

1 仪器与材料

Bruker AVANCE DRX—500 核磁共振仪; Bruker Daltonics micr OTOF 质谱仪; Beckman 公司半制备高效液相色谱仪 (508 自动进样器, 126 多溶剂输送泵, 168 紫外检测器, 配备 Sedex 80 型 ELSD 检测器), YMC-pack ODS-A 半制备柱 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm); Sephadex LH-20 为 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司产品; 硅胶: 200~300 目, 青岛亿基达公司; TLC 用硅胶薄层色谱板 (GF₂₅₄, 0.25 mm) 为烟台康必诺公司产品, 以 5% 硫酸-乙醇溶液为显色剂。

药材于 2010 年 5 月采自湖北省随州市, 由第二军医大学黄宝康教授鉴定为石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. 全草, 标本 (100521) 保存于复

旦大学药学院天然药化教研室。

2 提取分离

石松全草 10 kg, 粉碎, 用 70% 甲醇 (20 L) 常温提取 3 次, 并用 80% 乙醇 (10 L) 热回流提取 3 次, 浓缩蒸去溶剂, 得到深褐色浸膏 (945.5 g)。总浸膏以水混悬, 用石油醚 (2.0 L $\times$ 6)、醋酸乙酯 (2.0 L $\times$ 6) 和正丁醇 (2.0 L $\times$ 6) 依次萃取。醋酸乙酯萃取物浸膏 230 g, 首先通过硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯 (15:1 $\rightarrow$ 0:1) 和醋酸乙酯-甲醇 (20:1 $\rightarrow$ 4:1), 分为 14 个组分 Fr. 1~14。Fr. 7 通过硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (15:1 $\rightarrow$ 0:1) 和醋酸乙酯-甲醇 (20:1 $\rightarrow$ 10:1) 梯度洗脱分为 5 个部分 Fr. 7A~7E。Fr. 7C 组分进一步通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇 (2:1) 作为流动相, 得到化合物 **1** (15.7 mg)、**2** (40.5 mg) 和 **3** (35.2 mg)。Fr. 7D 组分通过硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-醋酸乙酯 (1:0 $\rightarrow$ 2:1) 和醋酸乙酯-甲醇 (15:1) 梯度洗脱又分为 4 个部分 Fr. 7D1~7D4。Fr. 7D2 经过 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 2:1), 获得化合物 **5** (23.5 mg)。Fr. 7D4 组分先经固相萃取分离, 对其 85% 甲醇/水洗脱组分进一步凝胶柱色谱纯化得到化合物 **4** (10.1 mg)。Fr. 13 经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 60:1 $\rightarrow$ 5:1) 梯度洗脱分为 7 个组分 (Fr. 13A~13G), 其中 Fr. 13C 组分经反复溶剂洗脱和滤过得到化合物 **6** (8.1 mg)。Fr. 13D 组分先通过硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 10:1) 等度洗脱, 并经半制备 HPLC 纯化 (甲醇-水梯度洗脱, 25 min 内 67% 甲醇-水上升到 78% 甲醇-水; 体积流量 3 mL/min; $t_R=21.5$ min) 得到化合物 **8** (3.0 mg)。Fr. 13E 先经固相萃取分离 (溶剂梯度: 甲醇-水 65%~75%~100%), 其中 75% 甲醇-水洗脱组分经凝胶柱色谱 (Sephadex LH-20, 二氯甲烷-甲醇 2:1) 纯化获得化合物 **7** (6.2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 m/z 465.373 1 (计算值 465.370 3, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2\text{Na}$)。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.80 (3H, s, 23- CH_3), 0.89 (3H, s, 24- CH_3), 0.77 (3H, s, 25- CH_3), 0.84 (3H, s, 26- CH_3), 0.69 (3H, s, 28- CH_3), 0.93 (3H, s, 29- CH_3), 0.97 (3H, s, 30- CH_3), 3.18 (1H, dd, $J=11.6, 4.7$ Hz, H-3), 3.45 (1H, brs, H-21), 5.33 (1H, brs, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) 见表 1, 与 Chernenko 等^[10]报道的 21-表千层塔烯二醇

表1 化合物1~8的 ^{13}C -NMR数据
Table 1 ^{13}C -NMR spectral data of compounds 1—8

碳位	1	2	3	4	5	6	7	8
1	38.6	38.7	37.0	39.2	38.5	34.6	34.3	34.5
2	27.2	27.3	28.0	29.0	26.5	26.6	26.9	27.3
3	78.8	78.9	78.9	80.3	78.6	70.1	70.1	70.3
4	38.2	38.3	39.1	44.1	37.2	44.3	44.3	44.6
5	55.7	55.8	54.7	56.8	55.6	50.3	50.4	50.5
6	18.9	19.0	24.0	20.0	18.7	19.5	19.8	19.9
7	45.2	45.2	38.3	46.1	45.0	46.1	46.1	46.2
8	37.4	36.2	148.4	38.3	38.2	37.9	37.9	38.6
9	62.9	63.0	57.6	63.3	62.6	63.0	63.1	63.1
10	39.0	39.0	39.3	38.5	37.8	38.4	39.0	38.9
11	25.2	25.4	22.6	25.8	25.0	25.6	25.7	25.6
12	27.5	27.5	22.6	28.1	27.4	27.6	27.7	27.1
13	56.8	57.3	57.6	57.5	58.8	57.4	57.8	59.5
14	138.5	138.2	148.4	139.3	163.5	139.2	139.1	164.1
15	122.1	122.3	38.3	123.1	128.8	122.6	122.8	129.4
16	24.0	24.1	24.0	24.9	199.7	24.5	24.5	201.7
17	43.4	49.6	54.7	43.7	63.7	43.7	43.4	60.0
18	35.9	37.2	39.3	36.7	44.5	36.3	37.8	45.1
19	31.2	29.7	37.0	32.2	37.8	31.9	41.4	32.4
20	25.4	27.6	28.0	26.8	26.6	26.5	66.6	26.3
21	76.2	79.2	78.9	75.6	79.0	75.1	79.7	76.3
22	37.1	38.9	39.1	37.7	38.9	37.7	38.7	38.0
23	28.1	28.1	28.3	24.0	28.1	23.4	23.7	24.1
24	15.4	15.4	15.4	64.8	15.7	65.9	65.9	66.2
25	15.7	15.7	14.5	16.8	15.4	16.5	16.7	17.0
26	19.8	19.8	106.7	20.3	19.9	20.1	20.2	20.4
27	56.2	56.1	106.7	56.9	55.6	56.9	56.8	56.4
28	13.3	13.4	14.5	14.1	14.7	13.8	14.8	15.6
29	21.8	14.6	15.4	22.5	14.6	22.0	21.8	22.5
30	27.7	27.8	28.3	29.1	28.2	28.5	28.9	29.4

(21-episerratenediol) 的数据基本吻合, 进一步查阅文献报道^[11]并结合化合物 **2**、**4**~**8** 的碳谱数据, 将 11 位碳和 12 位碳的数据进行了对调。

化合物 **2**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 465 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.80 (3H, s, 23- CH_3), 0.83 (3H, s, 24- CH_3), 0.77 (3H, s, 25- CH_3), 0.83 (3H, s, 26- CH_3), 0.67 (3H, s, 28- CH_3), 0.96 (3H, s, 29- CH_3), 0.97 (3H, s, 30- CH_3), 3.19 (1H, dd, $J = 11.5, 4.1$ Hz, H-3), 3.23 (1H, dd, $J = 11.4, 4.1$ Hz, H-21), 5.32 (1H, brs, H-15)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **2** 为千层塔烯二醇。

化合物 **3**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 465 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.64 (6H, s, 25, 28- CH_3), 0.76 (6H, s, 24, 29- CH_3), 0.99 (6H, s,

23, 30- CH_3), 3.25 (2H, dd, $J = 11.9, 4.1$ Hz, H-3, 21), 4.56 (2H, brs, H-26, 27), 4.84 (2H, s, H-26, 27)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。以上数据与文献报道基本一致^[12-13], 故鉴定化合物 **3** 为 α -芒柄花醇。

化合物 **4**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 481 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 1.54 (3H, s, 23- CH_3), 0.83 (3H, s, 25- CH_3), 0.79 (3H, s, 26- CH_3), 0.80 (3H, s, 28- CH_3), 0.95 (3H, s, 29- CH_3), 1.17 (3H, s, 30- CH_3), 3.64 (1H, dd, $J = 11.7, 4.4$ Hz, H-3), 3.68 (1H, s, H-21), 3.71 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, H-24b), 4.51 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, H-24a), 5.47 (1H, s, H-15)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 数据见表 1。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **4** 为 serrat-14-en-3 β , 21 β , 24-triol。

化合物 **5**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 479 $[M+Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.79 (3H, s, 23-CH₃), 0.87 (3H, s, 24-CH₃), 0.77 (3H, s, 25-CH₃), 0.82 (3H, s, 26-CH₃), 0.98 (3H, s, 28-CH₃), 1.09 (3H, s, 29-CH₃), 1.30 (3H, s, 30-CH₃), 3.20 (2H, d, J = 11.5 Hz, H-3, 21), 3.49 (1H, s, H-17), 5.73 (1H, s, H-15). ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) 数据见表 1, 以上数据与文献报道基本一致^[14-15], 故鉴定化合物 **5** 为 3 β , 21 α -dihydroxyserrat-14-en-16-one。

化合物 **6**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 481 $[M+Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 1.60 (3H, s, 23-CH₃), 0.91 (3H, s, 25-CH₃), 0.84 (3H, s, 26-CH₃), 0.81 (3H, s, 28-CH₃), 0.94 (3H, s, 29-CH₃), 1.16 (3H, s, 30-CH₃), 3.67 (1H, brs, H-21), 3.87 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-24), 4.11 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-24), 4.45 (1H, brs, H-3), 5.45 (1H, brs, H-15). ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) 数据见表 1, 以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **6** 为石松三醇。

化合物 **7**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 497 $[M+Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 1.60 (3H, s, 23-CH₃), 0.90 (3H, s, 25-CH₃), 0.84 (3H, s, 26-CH₃), 0.83 (3H, s, 28-CH₃), 0.96 (3H, s, 29-CH₃), 1.21 (3H, s, 30-CH₃), 3.83 (1H, brs, H-21), 3.87 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-24b), 4.11 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-24a), 4.38 (1H, brd, J = 10.5 Hz, H-20), 4.45 (1H, brs, H-3), 5.45 (1H, s, H-15). ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) 数据见表 1, 以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **7** 为石松四醇。

化合物 **8**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 495 $[M+Na]^+$. 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 1.60 (3H, s, 23-CH₃), 0.90 (3H, s, 25-CH₃), 0.73 (3H, s, 26-CH₃), 0.89 (3H, s, 28-CH₃), 1.37 (3H, s, 29-CH₃), 1.70 (3H, s, 30-CH₃), 3.03 (1H, s, H-17), 3.59 (1H, brs, H-21), 3.87 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-24b), 4.08 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-24a), 4.44 (1H, brs, H-3), 5.94 (1H, s, H-15). ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) 数据见表 1. 以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **8** 为 3 α , 21 β , 24-trihydroxyserrat-14-en-16-one。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 江苏新医学院编. 中药大辞典 [M]. 第 2 版. 上海: 上海人民出版社, 2006.
- [3] 邹桂欣, 尤献民, 吴 怡. DPPH 法评价伸筋草不同提取物清除自由基的能力 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(5): 359-361.
- [4] Liu J S, Zhu Y L, Yu C M. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity [J]. *Can J Chem*, 1986, 64(4): 837-839.
- [5] Yan J, Yi P, Chen B, *et al.* Polyhydroxyserratane triterpenoids from *Diphasiastrum complanatum* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(2): 506-510.
- [6] Zhang Y, Yi P, Chen Y, *et al.* Lycopajonicuminol A-F: Cytotoxic serratene triterpenoids from *Lycopodium japonicum* [J]. *Fitoterapia*, 2014, 96: 95-102.
- [7] Tsujii H, Yamada T, Kajimoto T, *et al.* Hybrids of 3 α -methoxyserrat-14-en-21 β -ol (PJ-1) and 3 β -methoxyserrat-14-en-21 β -ol (PJ-2) and various anti-oxidants as cancer chemopreventive agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45(6): 2191-2197.
- [8] Orhan I, Terzioglu S, Şener B. α -Onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(3): 265-267.
- [9] Zhang Z, ElSohly H N, Jacob M R, *et al.* Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Lycopodium cernuum* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(7): 979-985.
- [10] Chernenko G F, Bagryanskaya I Y, Gatilov Y V, *et al.* Polyfunctional triterpenoids from the bark of Yeddo spruce [J]. *Chem Nat Compd*, 1992, 28(6): 575-579.
- [11] Haruo S, Kazuo F, Xu G Y, *et al.* Assignments of the 1H - and ^{13}C -NMR spectra of four lycopodium triterpenoids by the application of a new two-dimensional technique, heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) [J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52(7): 1797-1801.
- [12] Pauli G F. Comprehensive spectroscopic investigation of α -onocerin [J]. *Planta Med*, 2000, 66(3): 299-302.
- [13] 蔡 雄, 潘德济, 徐光漪. 玉柏石松的四环三萜成分研究 [J]. 化学学报, 1989, 47(10): 1025-1028.
- [14] Zhou H, Li Y S, Tong X T, *et al.* Serratane-type triterpenoids from *Huperzia serrata* [J]. *Nat Prod Res*, 2004, 18(5): 453-459.
- [15] Tsuda Y, Fujimoto T. Triterpenoids of *Lycopodium clauaturn*: the structures of three new triterpenoids containing conjugated ketone groups [J]. *Chem Commun*, 1969(18): 1042-1043.