

石松生物碱成分的研究

牛艳芬¹, 崔圆圆², 杨光忠², 陈 玉^{1*}

1. 中南民族大学化学与材料科学学院, 湖北 武汉 430074

2. 中南民族大学药学院, 湖北 武汉 430074

摘要: 目的 研究石松 *Lycopodium japonicum* 全草的生物碱成分。方法 采用正、反相硅胶柱色谱及半制备型 HPLC 等技术进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定化合物的结构, 并以脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞建立细胞炎症模型, 采用 Griess 法检测一氧化氮 (NO) 量以评价化合物的抗炎活性。结果 从石松全草甲醇提取物中分离得到 19 个化合物, 分别鉴定为 lycoposerramine-M *N*-oxide (1)、acetyllycoposerramine-M (2)、石松碱 (3)、lycoposerramine-M (4)、miyoshianine-C (5)、12-epilycodoline *N*-oxide (6)、gnidioidine (7)、lycoposerramine-K (8)、光泽石松灵碱 (9)、4 α -hydroxyanhydrolycodoline (10)、flabelline (11)、hydroxypropyllycodine (12)、石松定碱 (13)、去-*N*-甲基- α -玉柏碱 (14)、 α -玉柏碱 (15)、去-*N*-甲基- β -玉柏碱 (16)、石松佛利星碱 (17)、lycoflexine *N*-oxide (18) 和法氏石松定碱 (19)。化合物 5 和 18 可以抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 NO 释放, 其 IC₅₀ 分别为 31.82、40.69 μ mol/L。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为 *N*-氧化石松碱 M, 化合物 2、6、11、12、16、18、19 为首次从该植物中分离得到; 化合物 5 和 18 表现出潜在的抗炎活性。

关键词: 石松; 生物碱; 抗炎活性; RAW264.7 细胞; *N*-氧化石松碱 M; 法氏石松定碱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1269-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.003

Lycopodium alkaloids from *Lycopodium japonicum*

NIU Yan-fen¹, CUI Yuan-yuan², YANG Guang-zhong², CHEN Yu¹

1. College of Chemistry and Materials Science, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

2. College of Pharmacy, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in the whole herb of *Lycopodium japonicum*. **Methods** The constituents were isolated and purified by silica gel and semi-preparative HPLC, and their structures were elucidated by means of physicochemical properties and spectroscopic analysis. All the isolated compounds were evaluated using relevant *in vitro* anti-inflammatory assay against LPS-induced NO releases. **Results** Nineteen compounds were isolated from the whole herb of *L. japonicum*, and identified as lycoposerramine-M *N*-oxide (1), acetyllycoposerramine-M (2), lycopodine (3), lycoposerramine-M (4), miyoshianine-C (5), 12-epilycodoline *N*-oxide (6), gnidioidine (7), lycoposerramine-K (8), lucidioline (9), 4 α -hydroxyanhydrolycodoline (10), flabelline (11), hydroxypropyllycodine (12), lycodine (13), *des-N*-methyl- α -obscurine (14), α -obscurine (15), *des-N*-methyl- β -obscurine (16), lycoflexine (17), lycoflexine *N*-oxide (18), and fawcettidine (19). Compound 5 and 18 could inhibit the release of nitric oxide (NO) in the RAW264.7 cell line stimulated by lipopolysaccharide. The IC₅₀ values of 5 and 18 are 31.82 and 40.69 μ mol/L, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, named lycoposerramine-M *N*-oxide, compounds 2, 6, 11, 12, 16, 18, and 19 are isolated from this plant for the first time. Compounds 5 and 18 exhibit the potent inhibitory activity.

Key words: *Lycopodium japonicum* Thunb. ex Murray; alkaloids; anti-inflammatory activity; RAW264.7 cell; lycoposerramine-M *N*-oxide; fawcettidine

石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. ex Murray 是石松科 (Lycopodiaceae) 石松属 *Lycopodium* L. 植物, 为传统中药材, 全草可入药, 有祛风除湿、舒筋活络的功效, 主要可治疗关节疼痛、屈伸不利

等, 广泛分布于我国广东、广西、云南、贵州等省^[1]。石松生物碱类成分表现出良好的抗胆碱酯酶活性而受到广泛关注, 截至目前已分离得到 300 多个石松生物碱^[2-4], 近年来, 从该属植物中分离得到一些新

收稿日期: 2015-03-03

基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAI27B06); 湖北省自然科学基金和创新群体项目 (2013CFB450, 2013CFA013)

*通信作者 陈 玉, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事天然药物化学的研究。Tel: (027)67842752 E-mail: chenyuwh888@126.com

骨架类型的石松生物碱^[5-6], 研究表明石松生物碱也具有抗肿瘤、抗炎等其他药理活性^[7-8]。在前期工作中本课题组对石松属植物玉柏石松进行了研究, 分离得到 13 个石松生物碱, 包括 2 个新生物碱类化合物^[9]。为进一步寻找新颖结构的石松生物碱, 本实验对石松全草进行了系统研究, 共分离鉴定了 19 个生物碱类化合物, 其中石松碱类 11 个: lycoposerramine-M *N*-oxide (1)、acetyl-lycoposerramine-M (2)、石松碱 (lycopodine, 3)、lycoposerramine-M (4)、miyoshianine C (5)、12-epilycodoline *N*-oxide (6)、gnidioidine (7)、lycoposerramine-K (8)、光泽石松灵碱 (lucidioline, 9)、4 α -hydroxyanhydrolycodoline (10)、flabelline (11); 石松定碱类 5 个: hydroxypropyl-lycodine (12)、石松定碱 (lycodine, 13)、去-*N*-甲基- α -玉柏碱 (*des-N*-methyl- α -obscurine, 14)、 α -玉柏碱 (α -obscurine, 15)、去-*N*-甲基- β -玉柏碱 (*des-N*-methyl- β -obscurine, 16); 伐斯替明碱类 3 个: 石松佛利星碱 (lycoflexine, 17)、lycoflexine *N*-oxide (18)、法氏石松定碱 (fawcettidine, 19)。其中化合物 1 为新化合物, 命名为 *N*-氧化石松碱 M。化合物 2、6、11、12、16、18、19 为首次从该植物中分离得到。并以脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞建立细胞炎症模型, 采用 Griess 法检测一氧化氮 (NO) 的量评价了化合物的抗炎活性。化合物 5 和 18 可以抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 NO 释放, 表现出潜在的抗炎活性, 其 IC₅₀ 分别为 31.82 和 40.69 μ mol/L。

1 材料与仪器

BrukerAM-400 型核磁共振波谱仪 (布鲁克公司); Finnigan MAT 95 型质谱仪 (美国菲尼根公司); Perkin-Elmer 341 旋光仪 (珀金埃尔默公司); Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (美国戴安公司); 半制备型色谱柱为 5C18-MS-II (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m); 50 μ m 反相材料 ODS (日本 YMC 公司); 300~400 目硅胶和硅胶 H-TLC 薄层预制板 (青岛海洋化工厂); 色谱甲醇和乙腈由美国 Tedia 试剂公司生产, 其余试剂均为分析纯, 由国药集团化学试剂有限公司和天津博迪化工有限公司生产; DMEM 培养基、胎牛血清 (Hyclone, 美国), MTT、脂多糖 (LPS)、地塞米松 (Sigma, 美国), Griess 检测试剂盒 (碧云天公司), 酶标仪 (Tecan Infinite M200, 瑞士)。

石松干燥药材全草, 购于安徽亳州中药材市场,

由中南民族大学药学院刘新桥博士鉴定为石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. ex Murray。

2 实验方法

2.1 提取与分离

石松全草 (20.8 kg) 粉碎后用 120 L 甲醇室温浸泡 3 次, 每次 24 h。真空抽滤得滤液, 减压旋蒸, 得甲醇提取物 (4.1 kg)。将甲醇提取物用 3% 酒石酸溶解后用醋酸乙酯萃取, 下层水相用饱和 Na₂CO₃ 调节 pH 至 10 后再用醋酸乙酯萃取, 此萃取液蒸干, 得到碱性醋酸乙酯浸膏 (35 g)。将此碱性醋酸乙酯浸膏经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇 (95:5 $\rightarrow$ 0:1) 梯度洗脱, TLC 分析后合并相同组分, 共收集 9 个组分 Fr. A~I。Fr. C (0.8 g) 经半制备 HPLC 纯化得到化合物 10 (5 mg) 和 19 (6 mg)。Fr. D (2.5 g) 经反复正、反相硅胶柱色谱分离和半制备 HPLC 纯化得到化合物 2 (80 mg) 和 13 (6 mg)。Fr. E (6.5 g) 经反复正、反相硅胶柱色谱分离和半制备 HPLC 纯化得到化合物 3 (10 mg)、6 (15 mg)、7 (5 mg)、8 (9 mg) 和 12 (4 mg)。Fr. F (2.0 g) 经正、反相硅胶柱色谱分离和半制备 HPLC 纯化得到化合物 14 (5.9 mg)、16 (30 mg) 和 17 (10 mg)。Fr. G (2.4 g) 经过反相硅胶柱色谱分离和半制备 HPLC 纯化得到化合物 1 (4 mg)、15 (300 mg)、18 (13 mg)。Fr. H (2.8 g) 经过反相硅胶柱色谱分离和半制备 HPLC 纯化得到化合物 4 (12 mg)、5 (7 mg)、9 (13 mg) 和 11 (5 mg)。

2.2 抗炎活性测试

2.2.1 化合物对细胞活力的影响 细胞活力测定采用 MTT 法, 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基制成 1×10^5 个/mL 单细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养至细胞贴壁后, 加入不同浓度的化合物, 受试化合物终浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25 μ mol/L, 以 DMSO 为溶剂对照组, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后, 吸去上清液, 用含 0.5 mg/mL MTT 的无血清 DMEM 孵育 3 h 后, 弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 在酶标仪上于 492 nm 处检测吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{溶剂对照组}}$$

2.2.2 化合物对 LPS 活化的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基制成 2×10^5 个/mL 单细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂

培养箱培养至细胞贴壁后。将细胞分为7组：正常组（不加LPS和化合物）；LPS对照组（LPS终质量浓度为10 μg/mL）；阳性对照组 [LPS终质量浓度为10 μg/mL，地塞米松（DM）终浓度为10 μmol/L]；药物组（根据MTT实验结果，在细胞存活率大于80%的范围内设置4个浓度梯度，分别为50、25、12.5、6.25 μmol/L，且LPS终质量浓度为10 μg/mL）。培养48 h后，收集各孔中的细胞培养液上清，用Griess试剂盒检测上清中NO的量，实验操作按说明书进行。

2.2.3 统计学分析 应用Graphpad prism软件进行处理，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用ANOVA进行统计学分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**：白色粉末， $[\alpha]_D^{27.0} -5.12^\circ$ (c 0.567, MeOH-CHCl₃ 1:1)，由HR-EI-MS得到分子式为C₁₆H₂₅NO₃ (m/z : 279.183 1 [M]⁺，计算值279.183 4)，EI-MS中由于氧原子的丢失而出现碎片离子峰 m/z 263 [M-16]⁺，表明该化合物含有N-氧化基团。¹³C-NMR和DEPT谱表明该化合物含1个羰基碳、1个sp³季碳、5个次甲基、8个亚甲基和1个甲基。¹H-NMR和¹³C-NMR中 δ_H 3.14 (1H, brs)和 δ_C 67.0 (d)的信号表明该化合物有1个羟基取代，以上数据说明该化合物为单羟基取代的N-氧化石松碱类生物碱。其¹H-¹H COSY和HSQC谱中分析可见以下3个片段：-CH₂CH₂CH₂CH-(C1-C4)、-CH₂CH₂CHCH-(C9-C12)-CH₂CHCH₂CH(CH₃)CH₂-(C6-C8-C15(C16)-C14)；HMBC谱中可见H-6 (δ_H 3.36)与C-4、C-5相关，H-12 (δ_H 2.23)、H-14 (δ_H 2.10)与C-13相关，H-7 (δ_H 2.37)与C-5、C-12相关，H-1 (δ_H 3.56)与C-9、C-13相关。以上3片段的HMBC相关信号连接见图1。

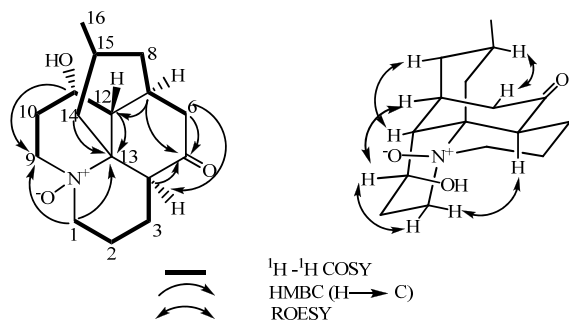


图1 化合物**1**的重要HMBC、¹H-¹H COSY和ROESY相关
Fig. 1 Key HMBC, ¹H-¹H COSY, and ROESY correlations of compound **1**

另外ROESY谱中可见H-11 (δ_H 4.06)与H-7 (δ_H 2.37)、H-9β (δ_H 2.82)相关，H-12 (δ_H 2.23)与H-8 (δ_H 1.24)相关，H-4 (δ_H 3.69)与H-9α (δ_H 4.22)相关，H-6 (δ_H 2.11)与H-15 (δ_H 1.47)相关，该化合物的相对构型确定（图1）。比较化合物**1**与已知化合物lycoposerramine-M (**4**)的波谱数据（表1）^[10]，其主要差别为**1**的C-1 (δ_C 63.7)，C-9 (δ_C 54.9)，C-13 (δ_C 75.4)较**4**的C-1 (δ_C 47.3)，C-9 (δ_C 41.7)，C-13 (δ_C 59.5)向低场移动，这是由于氧原子电负性对氮原子邻位碳的影响而产生的；而**1**的C-10 (δ_C 29.2)，C-12 (δ_C 40.9)，C-14 (δ_C 34.6)较**4**的C-10 (δ_C 35.3)，C-12 (δ_C 47.6)，C-14 (δ_C 43.5)向高场移动，这个变化是由于N-O键对氮原子γ位的γ-gauche效应产生的，这说明化合物**1**为lycoposerramine-M (**4**)的N-氧化物。其¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)和¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)数据见表1。因此确定了化合物**1**的结构（图1），并命名为N-氧化石松碱M。

化合物 **2**：无色柱状晶体（甲醇）。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.19 (1H, ddd, J = 2.8, 2.8, 2.8 Hz, H-11), 3.39 (1H, dd, J = 14.4, 3.6 Hz, H-1a), 3.30 (1H, dd, J = 12.8, 4.0 Hz, H-9a), 3.22 (1H, dd, J = 11.6, 2.4 Hz, H-4), 2.75 (1H, dd, J = 16.4, 6.8 Hz, H-6a), 2.65 (1H, dd, J = 13.2, 4.0 Hz, H-14a), 2.57 (1H, dd, J = 14.8, 4.4 Hz, H-1b), 2.50 (1H, m, H-9b), 2.26 (1H, s, H-7), 2.20 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-6b), 2.08 (2H, m, H-3a, 10a), 2.04 (3H, s, OCCH₃), 1.98~1.94 (2H, m, H-10b, 2a), 1.86 (1H, m, H-12), 1.66 (1H, brd, J = 12.8 Hz, H-8a), 1.59 (1H, ddd, J = 13.6, 13.6, 4.4 Hz, H-3b), 1.49~1.40 (2H, m, H-15, 2b), 1.32 (1H, ddd, J = 12.4, 12.4, 2.8 Hz, H-8b), 0.93 (1H, dd, J = 12.8, 12.8 Hz, H-14b), 0.84 (3H, d, J = 6.4 Hz, 16-CH₃)；¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)数据见表2。以上数据与文献报道一致^[11]，故鉴定化合物**2**为acetyllycoposerramine-M。

化合物 **3**：无色晶体（甲醇）。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.41 (1H, dd, J = 14.0, 3.6 Hz, H-1a), 3.18 (1H, dd, J = 11.6, 2.4 Hz, H-9a), 2.85 (1H, dd, J = 11.6, 2.4 Hz, H-9b), 2.71 (1H, brd, J = 12.0 Hz, H-1b), 2.55 (1H, dt, J = 16.4, 6.0 Hz, H-6a), 2.20 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-6b), 0.84 (1H, d, J = 6.0 Hz, 16-CH₃)；¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)数据见表2。以上数据与文献报道一致^[12]，故鉴定化合物**3**为石松碱。

化合物 **4**：无色固体。¹H-NMR (400 MHz,

表1 化合物1和4的¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 和¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据
Table 1 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) data of compounds 1 and 4

碳位	1		碳位	4	
	δ_C	δ_H		δ_C	δ_H
1a	63.7	3.56 (1H, ddd, $J = 11.6, 11.6, 4.0$ Hz)	1a	47.3	3.37 (1H, ddd, $J = 14.4, 14.4, 3.6$ Hz)
1b		3.05 (1H, m)	1b		2.57 (1H, dd, $J = 14.4, 4.4$ Hz)
2a	21.3	1.82 (1H, m)	2a	19.5	1.87 (1H, m)
2b		0.91 (1H, m)	2b		1.40 (1H, brd, $J = 13.6$ Hz)
3a	17.6	2.07 (1H, m)	3a	19.8	2.03 (1H, m)
3b		1.51 (1H, m)	3b		1.55~1.44 (1H, m)
4	51.1	3.69 (1H, m)	4	46.1	3.49 (1H, m)
5	211.6		5	215.7	
6a	44.1	3.36 (1H, dd, $J = 16.4, 6.8$ Hz)	6a	45.1	3.30 (1H, dd, $J = 16.4, 6.8$ Hz)
6b		2.11 (1H, m)	6b		2.15 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)
7	35.5	2.37 (1H, brd, $J = 4.4$ Hz)	7	36.1	2.30 (1H, m)
8a	43.0	1.57 (1H, m)	8a	44.2	1.68 (1H, brd, $J = 12.8$ Hz)
8b		1.24 (1H, ddd, $J = 12.4, 12.4, 4.8$ Hz)	8b		1.28 (1H, ddd, $J = 12.4, 12.4, 3.2$ Hz)
9a	54.9	4.22 (1H, td, $J = 12.4, 2.4$ Hz)	9a	41.7	3.55 (1H, ddd, $J = 12.8, 12.8, 2.0$ Hz)
9b		2.82 (1H, m)	9b		2.48 (1H, m)
10a	29.2	2.73 (1H, m)	10a	35.3	2.03 (1H, m)
10b		1.63 (1H, m)	10b		1.75 (1H, ddd, $J = 13.6, 2.4, 2.4$ Hz)
11	67.0	4.06 (1H, ddd, $J = 2.8, 2.8, 2.8$ Hz)	11	69.9	4.19 (1H, ddd, $J = 2.8, 2.8, 2.8$ Hz)
12	40.9	2.23 (1H, m)	12	47.6	1.55~1.44 (1H, m)
13	75.4		13	59.5	
14a	34.6	2.10 (1H, m)	14a	43.5	2.61 (1H, dd, $J = 14.0, 4.4$ Hz)
14b		1.98 (1H, m)	14b		0.87 (1H, m)
15	25.7	1.47 (1H, m)	15	25.6	1.55~1.44 (1H, m)
16	22.6	0.84 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	16	22.9	0.82 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)
-OH		3.14 (1H, brs)	-OH		

CDCl₃) 和¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表1。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物4为 lycoposerramine-M。

化合物5: 无色晶体(甲醇)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.01 (1H, dd, $J = 12.0, 2.8$ Hz, H-8), 3.87 (1H, t, $J = 3.2$ Hz, H-4), 3.74 (1H, td, $J = 12.8, 2.4$ Hz, H-9a), 3.42 (1H, dt, $J = 13.2, 4.0$ Hz, H-1a), 3.14 (1H, dd, $J = 16.4, 5.6$ Hz, H-6a), 3.06 (1H, m, H-3a), 2.91 (1H, dd, $J = 12.8, 3.6$ Hz, H-9b), 2.67 (1H, dd, $J = 12.4, 4.4$ Hz, H-1b), 2.37~2.15 (4H, m, H-2a, 7, 11a, 14a), 2.11 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-10a), 2.01 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-6b), 1.88 (1H, dd, $J = 12.0, 3.6$ Hz, H-11b), 1.63 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-2b), 1.53~1.49 (3H, m, H-3b, 10b, 15), 1.42 (1H, dd, $J = 12.4, 5.2$ Hz, H-14b), 0.79 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表2。以上数据与文献报

道一致^[13], 故鉴定化合物5为 miyoshianine-C。

化合物6: 无色晶体(甲醇)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.06 (1H, td, $J = 12.4, 3.2$ Hz, H-9a), 3.62 (1H, td, $J = 13.6, 4.4$ Hz, H-1a), 3.05~2.95 (2H, m, H-9b, 10a), 2.92 (1H, dd, $J = 14.0, 4.8$ Hz, H-1b), 2.84 (1H, dd, $J = 12.0, 2.8$ Hz, H-4), 2.74 (1H, t, $J = 13.2$ Hz, H-14a), 2.61 (1H, dd, $J = 17.2, 6.0$ Hz, H-6a), 2.42 (1H, dd, $J = 17.2, 1.6$ Hz, H-6b), 2.23 (1H, td, $J = 13.2, 4.4$ Hz, H-11a), 2.17 (1H, m, H-3a), 2.07 (1H, m, H-8a), 2.04 (1H, brs, H-7), 1.88~1.66 (5H, m, H-2a, 2b, 3b, 10b, 14b), 1.63 (1H, dd, $J = 13.6, 4.8$ Hz, H-11b), 1.31~1.21 (2H, m, H-8b, 15), 0.93 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表2。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物6为 12-epilycodoline N-oxide。

化合物7: 黄色油状物。¹H-NMR (400 MHz,

表 2 化合物 2、3、5~10 的 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据
Table 2 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) data of compounds 2, 3, 5—10

碳位	δ_{C}							
	2	3	5	6	7	8	9	10
1	46.9	46.7	60.5	63.4	48.3	47.9	47.3	46.7
2	19.0	18.9	19.2	21.6	22.7	22.8	24.7	20.4
3	19.6	19.4	26.8	18.0	19.4	19.4	22.9	24.3
4	45.2	43.3	46.4	50.1	54.0	49.7	42.8	75.5
5	213.8	213.2	212.3	207.3	212.6	211.0	72.4	210.1
6	44.1	42.8	45.3	44.3	40.7	78.3	77.4	43.6
7	34.8	36.8	42.0	41.4	46.6	48.1	47.1	40.7
8	43.9	42.4	72.3	35.4	79.3	39.2	40.6	44.3
9	41.8	47.3	57.2	59.9	45.2	45.1	44.4	45.4
10	30.6	25.8	16.7	16.6	26.0	26.4	25.8	26.0
11	72.0	25.0	32.9	29.8	119.4	121.1	114.7	119.1
12	46.4	44.8	72.4	71.1	142.4	139.2	143.1	139.3
13	58.9	60.4	73.6	72.9	60.7	60.0	55.4	63.7
14	43.3	42.9	36.4	29.8	37.1	37.0	34.2	34.4
15	25.2	25.5	25.6	24.9	32.5	25.7	22.3	25.0
16	22.5	23.0	21.8	22.7	19.0	22.9	23.1	22.8
C=O	170.0							
COCH ₃	21.7							

CDCl_3 δ : 5.68 (1H, t, J = 3.6 Hz, H-11), 3.32 (1H, dd, J = 10.0, 4.4 Hz, H-8), 3.02 (1H, td, J = 13.2, 4.0 Hz, H-1a), 2.97 (1H, m, H-9a), 2.82~2.78 (2H, m, H-6a, 7), 2.71~2.58 (3H, m, H-1b, 4, 9b), 2.38~2.26 (4H, m, H-6b, 10a, 10b, 14a), 1.69 (1H, m, H-2a), 1.57~1.49 (2H, m, H-2b, 3a), 1.34 (1H, m, H-15), 1.18 (1H, t, J = 13.6 Hz, H-14b), 0.95 (3H, d, J = 6.0 Hz, 16-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 2。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 7 为 gnidioidine。

化合物 8: 无色粉末。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.70 (1H, dd, J = 4.0, 4.0 Hz, H-11), 3.82 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 3.08 (1H, dd, J = 12.8, 2.8 Hz, H-1a), 3.01 (1H, dd, J = 12.0, 2.4 Hz, H-4), 2.87 (1H, m, H-9a), 2.73 (1H, dd, J = 11.2, 5.6 Hz, H-9b), 2.68 (1H, m, H-7), 2.62 (1H, dd, J = 12.8, 2.8 Hz, H-1b), 2.36 (1H, dd, J = 13.2, 4.0 Hz, H-14a), 1.96 (1H, brd, J = 12.0 Hz, H-3a), 1.81 (1H, m, H-8a), 1.69~1.42 (4H, m, H-2a, 2b, 3b, 15), 1.32 (1H, ddd, J = 13.2, 13.2, 4.8 Hz, H-8b), 1.13 (1H, t, J = 12.8 Hz, H-14b), 0.82 (3H, d, J = 6.0 Hz, 16-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 2。以上数据与文献报

道一致^[10], 故鉴定化合物 8 为 lycoposerramine-K。

化合物 9: 无色针晶(甲醇)。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ : 5.23 (1H, dd, J = 4.0, 2.8 Hz, H-11), 4.82 (1H, d, J = 4.0 Hz, 5-OH), 4.30 (1H, d, J = 3.2 Hz, 6-OH), 3.51 (1H, brs, H-5), 3.48 (1H, dd, J = 5.6, 5.6 Hz, H-6), 3.01 (1H, dddd, J = 11.6, 11.6, 5.6, 5.6 Hz, H-15), 2.90 (1H, ddd, J = 12.0, 12.0, 2.8 Hz, H-1a), 2.60~2.53 (2H, m, H-9a, 9b), 2.40 (1H, dd, J = 12.0, 2.4 Hz, H-1b), 2.25 (1H, dd, J = 4.4, 2.0 Hz, H-7), 2.14~2.07 (2H, m, H-10a, 14a), 1.94~1.82 (2H, m, H-4, 10b), 1.74 (1H, dd, J = 12.4, 5.6 Hz, H-8a), 1.62~1.55 (2H, m, H-2a, 3a), 1.50 (1H, m, H-2b), 1.30 (1H, dd, J = 12.4, 2.4 Hz, H-3b), 1.07 (1H, ddd, J = 12.4, 5.6, 5.6 Hz, H-8b), 0.92 (1H, t, J = 12.4 Hz, H-14b), 0.76 (3H, d, J = 6.8 Hz, 16-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO) 数据见表 2。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 9 为光泽石松灵碱。

化合物 10: 无色晶体(氯仿)。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.65 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-11), 3.14 (1H, dd, J = 15.2, 7.2 Hz, H-6a), 2.85 (1H, td, J = 14.0, 2.4 Hz, H-1a), 2.76 (2H, m, H-7, 9a), 2.55 (1H, dd, J = 12.0, 6.4 Hz, H-9b), 2.41 (2H, m, H-1b, 10a),

2.27 (1H, d, $J = 14.8$ Hz, H-6b), 2.13 (1H, dd, $J = 13.2, 4.0$ Hz, H-14a), 1.93~1.84 (4H, m, H-2a, 3a, 8a, 10b), 1.70~1.60 (3H, m, H-2b, 3b, 15), 1.28~1.25 (2H, m, H-8b, 14b), 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表2。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **10** 为 4α-hydroxyanhydrolycodoline。

化合物 **11**: 淡黄色粉末。该化合物最初在 1963 年被分离得到^[17], 但查阅相关文献均未发现其波谱数据报道, 通过解析其一维和二维核磁谱, 对其数据进行归属。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.24 (1H, s, NH), 3.51 (1H, dd, $J = 13.2, 3.6$ Hz, H-1a), 3.04 (1H, dd, $J = 13.6, 3.6$ Hz, H-9a), 2.75~2.65 (2H, m, H-1b, 9b), 2.58 (1H, dd, $J = 16.8, 4.4$ Hz, H-6a), 2.46 (1H, brd, $J = 10.0$ Hz, H-3a), 2.34 (1H, dd, $J = 12.4, 4.0$ Hz, H-14a), 2.01 (3H, s, OCCH₃), 1.98~1.90 (3H, m, H-2a, 3b, 7), 1.86 (2H, m, H-6b, 10a), 1.79~1.66 (4H, m, H-2b, 10b, 12, 15), 1.62~1.54 (3H, m, H-8a, 11a, 11b), 1.31~1.25 (2H, m, H-8b, 14b), 0.88 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表3。由以上数据确定化合物 **11** 结构, 鉴定为 flabelline。

化合物 **12**: 无色固体。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3), 6.96 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2), 4.21 (1H, ddq, $J = 8.8, 6.4, 2.8$ Hz, H-18), 3.11 (1H, dd, $J = 18.8, 7.2$ Hz, H-6a), 2.84~2.75 (3H, m, H-17a, 17b, 9a), 2.67 (1H, d, $J = 18.8$ Hz, H-6b), 2.48 (1H, ddd, $J = 13.2, 13.2, 2.4$ Hz, H-9b), 2.07 (1H, m, H-7), 1.76 (1H, brd, $J = 12.4$ Hz, H-8a), 1.60~1.45 (4H, m, H-10a, 10b, 12, 14a), 1.32 (1H, dd, $J = 12.8, 3.6$ Hz, H-8b), 1.26 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 19-CH₃), 1.22~1.18 (4H, m, H-11a, 11b, 14b, 15), 0.77 (3H, d, $J = 5.2$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表3。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **12** 为 hydroxypropyllycodine。

化合物 **13**: 无色针晶 (甲醇)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.40 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz, H-1), 7.96 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3), 7.18 (1H, dd, $J = 7.6, 4.8$ Hz, H-2), 3.18 (1H, dd, $J = 18.8, 7.2$ Hz, H-6a), 2.97 (1H, m, H-9a), 2.74 (1H, d, $J = 18.8$ Hz, H-6b), 2.52 (1H, m, H-9b), 0.78 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表3。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **13** 为石松定碱。

化合物 **14**: 无色晶体 (甲醇)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.83 (1H, s, NH), 2.83 (1H, dt, $J = 12.4, 3.2$ Hz, H-9a), 2.47~2.31 (5H, m, H-2a, 2b, 3a, 3b, 9b), 0.83 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表3。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **14** 为去-N-甲基-α-玉柏碱。

化合物 **15**: 无色粉末。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.73~2.59 (2H, m, H-9a, 9b), 2.43 (3H, s, N-CH₃), 2.41 (4H, m, H-2a, 2b, 3a, 3b), 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表3。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **15** 为 α-玉柏碱。

化合物 **16**: 白色粉末。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.64 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 6.46 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-2), 2.95 (1H, dd, $J = 18.8, 7.2$ Hz, H-6a), 2.84 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-9a), 2.43~2.39 (2H, m, H-6b, 9b), 2.05 (1H, m, H-7), 1.71 (1H, brd, $J = 12.8$ Hz, H-8a), 1.57~1.45 (5H, m, H-10a, 10b, 12, 14a, 15), 1.31~1.22 (3H, m, H-8b, 11a, 11b), 1.11 (1H, m, H-14b), 0.81 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表3。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **16** 为去-N-甲基-β-玉柏碱。

化合物 **17**: 无色油状物。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.18 (1H, brd, $J = 14.8$ Hz, H-17a), 3.12 (1H, ddd, $J = 12.0, 6.0, 2.4$ Hz, H-9a), 2.96 (1H, dd, $J = 12.8, 4.0$ Hz, H-1a), 2.81 (2H, m, H-1b, 9b), 2.63 (1H, m, H-6a), 2.38 (1H, dd, $J = 18.8, 8.8$ Hz, H-6b), 1.01 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表3。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **17** 为石松佛利星碱。

化合物 **18**: 无色固体。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.70 (4H, m, H-1a, 9a, 9b, 17a), 3.35 (1H, ddd, $J = 12.4, 12.4, 2.8$ Hz, H-1b), 3.05 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-17b), 2.72 (1H, m, H-7), 2.41 (1H, dd, $J = 18.4, 7.6$ Hz, H-6a), 2.32 (2H, m, H-14a, 14b), 2.26~2.07 (7H, m, H-2a, 3a, 6b, 10a, 11a, 11b, 15), 2.03~1.92 (3H, m, H-2b, 3b, 10b), 1.85 (1H, m, H-8a), 1.74 (1H, ddd, $J = 14.8, 12.0, 4.4$ Hz, H-8b), 1.04 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 16-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 数据见表3。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **18** 为 lycoflexine N-oxide。

化合物 **19**: 白色粉末。¹H-NMR (400 MHz,

表 3 化合物 11~19 的 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据
Table 3 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) data of compounds 11—19

碳位	δ_{C}								
	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	46.6	157.7	147.5	171.6	172.0	164.7	53.7	70.8	52.2
2	17.5	121.7	122.1	31.3	30.3	117.9	19.7	22.5	24.1
3	22.1	134.3	133.7	18.9	19.5	140.1	29.6	21.8	29.4
4	123.4	134.3	136.2	111.9	114.2	118.1	58.7	58.0	56.4
5	129.7	157.7	158.7	131.2	130.6	145.0	218.7	213.8	219.0
6	33.1	35.2	35.2	30.3	31.5	30.0	40.5	40.4	44.3
7	34.0	33.7	33.6	33.6	33.8	33.3	40.8	42.0	37.5
8	43.2	43.7	43.8	43.6	43.7	43.1	31.6	31.3	39.4
9	49.3	41.5	41.1	42.8	51.5	41.5	57.1	75.2	60.6
10	26.8	26.1	25.7	27.2	19.6	27.9	26.2	27.8	31.6
11	25.3	30.1	29.8	26.0	26.6	25.7	36.5	34.6	34.4
12	43.6	44.7	44.9	44.5	35.6	44.3	60.1	60.7	46.4
13	65.3	55.9	56.2	56.0	58.9	55.3	214.3	212.4	146.2
14	42.1	50.8	51.7	46.1	43.0	49.2	47.2	47.3	127.4
15	26.7	26.0	26.0	26.6	27.3	26.1	28.5	28.5	28.0
16	22.4	22.1	22.1	22.0	22.5	22.0	22.9	22.5	21.1
17	168.3	44.2			36.2		53.8	68.4	
18	23.8	67.3							
19		23.3							

CDCl_3 δ : 5.71 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-14), 2.74 (1H, dd, J = 16.4, 7.2 Hz, H-6a), 1.03 (3H, d, J = 6.8 Hz, 16- CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 3。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 19 为法氏石松定碱。

3.2 抗炎活性

NO 作为炎症组织损伤的重要致病因子, 是由一氧化氮合酶 (iNOS) 催化而成, 为了评价 19 个

化合物的抗炎活性, 检测了化合物干预 LPS 活化的 RAW264.7 细胞培养液上清中 NO 的量, 化合物的浓度为 6.25~50 $\mu\text{mol/L}$ 。19 个化合物中 5 和 18 表现出良好的 NO 抑制活性 (图 2), 其 IC_{50} 分别为 (31.82 $\pm$ 3.74)、(40.69 $\pm$ 5.78) $\mu\text{mol/L}$ 。

4 讨论

石松为蕨类植物, 石松生物碱 *Lycopodium alkaloids* 是从石松及其近缘植物中分得的结构相似,

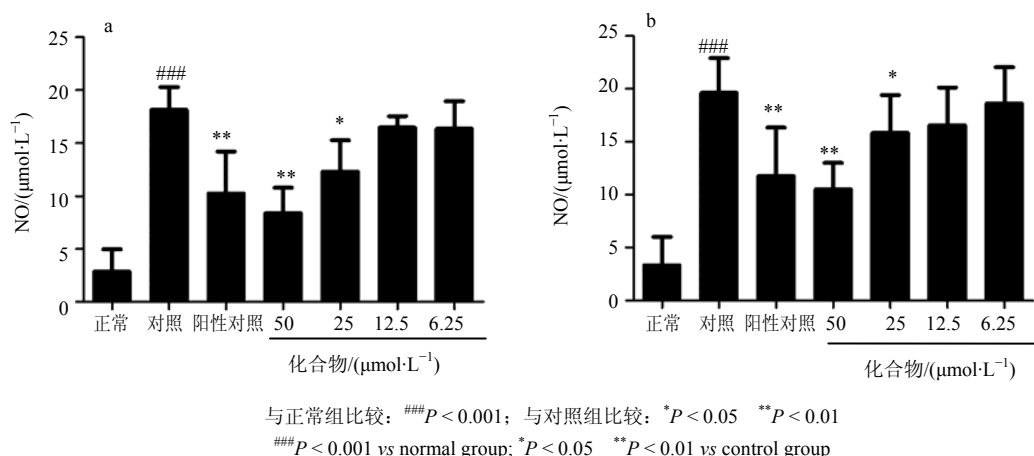


图 2 化合物 5 (a) 和 18 (b) 对 LPS 活化的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig. 2 Effects of compounds 5 (a) and 18 (b) on release of NO in LPS-activated RAW 264.7 cells

具有相同生源的一类天然生物碱,自20世纪80年代初刘嘉森等^[22]从蛇足石杉中分离出一种高效低毒、可逆并选择性抑制乙酰胆碱酯酶的石杉碱甲以来,这类生物碱已引起了国内外科学家浓厚的兴趣。国外学者还发现石松总生物碱具有显著的抗炎活性,但对单体生物碱的抗炎活性并没有报道^[8]。2013年,国内学者报道了几种石松生物碱可以一定程度抑制LPS诱导的BV2细胞中NO释放,其IC₅₀均小于50 μmol/L,其中活性最好化合物α-lofoline的IC₅₀为4.23 μmol/L,但未进一步对其作用机制进行研究^[23]。本实验以LPS诱导RAW264.7细胞建立细胞炎症模型,采用Griess法检测NO量评价了从石松全草中分离得到的19个石松生物碱的抗炎活性,但只有化合物**5**和**18**具有一定的抗炎活性,IC₅₀分别为31.82和40.69 μmol/L,同总生物碱相比其抗炎活性较差,因而推测石松生物碱发挥抗炎活性,有可能通过协同的作用机制,其抗炎机制有待以后进一步阐明,本研究为进一步开发和利用石松奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Ma X Q, Gang D R. The lycopodium alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2004, 21(6): 752-772.
- [3] Liu J S, Zhu Y L, Yu C M, *et al.* The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity [J]. *Can J Chem*, 1986, 64(4): 837-839.
- [4] Puiatti M, Borioni J L, Vallejo M G, *et al.* Study of the interaction of *Huperzia saururus* Lycopodium alkaloids with the acetylcholinesterase enzyme [J]. *J Mol Graph Model*, 2013, 44(7): 136-144.
- [5] He J, Chen X Q, Li M M, *et al.* Lycojapodine A, a novel alkaloid from *Lycopodium japonicum* [J]. *Org Lett*, 2009, 11(6): 1397-1400.
- [6] Wang X J, Liu Y B, Li L, *et al.* Lycojaponicumins D and E: Two new alkaloids from *Lycopodium japonicum* [J]. *Org Lett*, 2012, 14(22): 5688-5691.
- [7] Mandal S K, Biswas R, Bhattacharyya S S, *et al.* Lycopodine from *Lycopodium clavatum* extract inhibits proliferation of HeLa cells through induction of apoptosis via caspase-3 activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 626(2/3): 115-122.
- [8] Orhan I, Küpeli E, Şener B, *et al.* Appraisal of anti-inflammatory potential of the club moss *Lycopodium clavatum* L [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 109(1): 146-150.
- [9] Chen Y, He H W, Mei Z N, *et al.* Lycopodium alkaloids from *Lycopodium obscurum* L [J]. *Helv Chim Acta*, 2014, 97(4): 519-523.
- [10] Takayama H, Katakawa K, Kitajima M, *et al.* Ten new lycopodium alkaloids having the lycopodane skeleton isolated from *Lycopodium serratum* Thunb. [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(10): 1163-1169.
- [11] Zhao F W, Sun Q Y, Yang F M, *et al.* Lycopodium alkaloids from *Palhinhaea cernua* [J]. *J Braz Chem Soc*, 2012, 23(2): 349-354.
- [12] Nakashima T T, Singer P P, Browne L M, *et al.* Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of some lycopodium alkaloids [J]. *Can J Chem*, 1975, 53(13): 1936-1942.
- [13] Sun Y, Yan J, Meng H, *et al.* A new alkaloid from *Lycopodium japonicum* Thunb. [J]. *Helv Chim Acta*, 2008, 91(11): 2107-2109.
- [14] Tan C H, Zhu D Y. Lycopodine-type lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata* [J]. *Helv Chim Acta*, 2004, 87(8): 1963-1967.
- [15] Halldorsdottir E S, Jaroszewski J W, Olafsdottir E S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *Alpestre* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2/3): 149-157.
- [16] He J, Wu X D, Liu F, *et al.* Lycopodine-type alkaloids from *Lycopodium japonicum* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2014, 4(4): 213-219.
- [17] Young J C F, Maclean D B. Lycopodium alkaloids: XIV. Flabelline [J]. *Can J Chem*, 1963, 41(11): 2731-2736.
- [18] Ayer W A, Kasitu G C. Some new Lycopodium alkaloids [J]. *Can J Chem*, 1989, 67(6): 1077-1086.
- [19] Takayama H, Katakawa K, Kitajima M, *et al.* Seven new lycopodium alkaloids, lycoposerramines-C, -D, -E, -P, -Q, -S, and -U, from *Lycopodium serratum* Thunb. [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(9): 8301-8311.
- [20] Katakawa K, Mito H, Kogure N, *et al.* Ten new fawcettimine-related alkaloids from three species of *Lycopodium* [J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(35): 6561-6567.
- [21] Pan G, Williams R M. Unified total syntheses of fawcettimine class alkaloids: fawcettimine, fawcettidine, lycoflexine, and lycoposerramine B [J]. *J Org Chem*, 2012, 77(10): 4801-4811.
- [22] 刘嘉森, 俞超美, 周有作, 等. 石杉碱甲和石杉碱乙的化学研究 [J]. *化学学报*, 1986, 44(10): 1035-1040.
- [23] Wang X J, Li L, Si Y K, *et al.* Nine new lycopodine-type alkaloids from *Lycopodium japonicum* Thunb. [J]. *Tetrahedron*, 2013, 69(30): 6234-6240.