

## 伸筋草中 1 个新芒柄花萜醇衍生物

袁瑞瑛<sup>1,2</sup>, 胡靖瑶<sup>2</sup>, 王希<sup>2</sup>, 谌顺清<sup>2</sup>, 蔡诗琪<sup>2</sup>, 王聪<sup>3\*</sup>, 蔡由生<sup>1,2\*</sup>

1. 西藏大学医学院, 西藏 拉萨 850012

2. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430071

3. 广西民族大学化学化工学院, 广西 南宁 530006

**摘要:** 目的 研究伸筋草 *Lycopodium Herba* 的化学成分。方法 采用多种柱色谱对伸筋草 95% 乙醇提取物进行分离纯化; 通过波谱数据对化合物进行结构鉴定; 采用 SRB 法对所得化合物进行细胞毒性测试。结果 从伸筋草 95% 乙醇提取物中分离得到 7 个化合物, 分别鉴定为 3-甲酰基-芒柄花萜醇 (1)、lycopodine (2)、lycoposerramine M (3)、4 $\alpha$ -hydroxy-anhydrolycodoline (4)、flabelliformine (5)、 $\beta$ -dihydrolycopodine (6)、lycodoline (7)。结论 化合物 1 为新的 serratene 型三萜, 命名为 3-甲酰基-芒柄花萜醇。活性测试结果表明化合物 1 没有明显的细胞毒活性, 没有降糖活性。化合物 5、6 为首次从该植物中分离得到。

**关键词:** 伸筋草; 石松; serratene 型五环三萜; 3-甲酰基-芒柄花萜醇; 细胞毒活性; flabelliformine;  $\beta$ -dihydrolycopodine

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)21-6660-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.002

## A new onocerin-type triterpenoid derivative from *Lycopodium Herba*

YUAN Rui-ying<sup>1,2</sup>, HU Jing-yao<sup>2</sup>, WANG Xi<sup>2</sup>, CHEN Shun-qing<sup>2</sup>, CAI Shi-qi<sup>2</sup>, WANG Cong<sup>3</sup>, CAI You-sheng<sup>1,2</sup>

1. Medical College, Tibet University, Lhasa 850012, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China

**Abstract: Objective** To study chemical constituents of Shenjincao (*Lycopodium Herba*). **Methods** Compounds in *Lycopodium Herba* were isolated and purified by column chromatography on silica gel column, Sephadex LH-20 gel column, and their structures were elucidated by analysis of its NMR and HRESIMS data. The cytotoxicity of the obtained compounds was evaluated by SRB methods. **Results** Seven compounds were obtained from 95% ethanol aqueous extract of *Lycopodium Herba* and their structures were identified as 3-formyloxyonocerin (1), lycopodine (2), lycoposerramine M (3), 4 $\alpha$ -hydroxy-anhydrolycodoline (4), flabelliformine (5),  $\beta$ -dihydrolycopodine (6) and lycodoline (7). **Conclusion** Compound 1 was a new serratene-type triterpenoid named 3-formyloxy-onocerin, which showed no cytotoxicity, but could promote the glucose absorption of L6 cells. Compound 5 and 6 are isolated from this plant for the first time.

**Key words:** *Lycopodium Herba*; *Lycopodium japonicum* Thunb.; serratene triterpenoids; 3-formyloxy-onocerin; cytotoxicity; flabelliformine;  $\beta$ -dihydrolycopodine

伸筋草 *Lycopodium Herba* 为石松科植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥全草, 别名石松、伸筋灵、狮子草<sup>[1]</sup>, 早在唐朝《本草拾遗》<sup>[2]</sup> 上就有记载: “生石上似松, 高一、二尺”。伸筋草味微苦、辛, 性温, 归肝、脾、肾经; 具有祛风除湿、舒筋活络的功能<sup>[1]</sup>。近年来药理研究表明伸筋

草具有抗炎、镇痛、免疫调节、抑制乙酰胆碱酯酶活性等作用<sup>[3-6]</sup>。临床上常被用于治疗类风湿性关节炎、颈椎病和急慢性软组织损伤等疾病<sup>[7-9]</sup>。我国大部分地区都生长有伸筋草, 药源丰富, 并对其进行了长时间大规模的研究, 但对其化学成分研究多关注于生物碱部分<sup>[10-11]</sup>。另外, 也发现一类 C 环为七

收稿日期: 2022-03-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973201); 湖北省自然科学基金面上项目 (2021CFB347)

作者简介: 袁瑞瑛, 武汉大学在读博士, 西藏大学副教授。E-mail: 3466822645@163.com

\*通信作者: 王聪, 副教授, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: wangcong123206@163.com

蔡由生, 副教授, 研究方向为天然药物化学。E-mail: cysh2002@whu.edu.cn

元环系(有时开环)独特的 serratene 五环三萜。为进一步阐明不同产地石松中化学成分,本实验对产自贵州的伸筋草进行了研究,从中获得 1 个新的 serratene 五环三萜以及 6 个生物碱类化合物,分别鉴定为 3-甲酰基-芒柄花萜醇(1)、lycopodine(2)、lycoposerramine M(3)、4 $\alpha$ -hydroxyanhydrolycodoline(4)、flabelliformine(5)、 $\beta$ -dihydrolycopodine(6)、lycodoline(7)。其中化合物 1 为 1 个新的 serratene 五环三萜, C 环开环, 结构见图 1。活性测试结果表明化合物 1 没有明显细胞毒活性,没有降糖活性。化合物 5、6 为首次从该植物中分离得到。

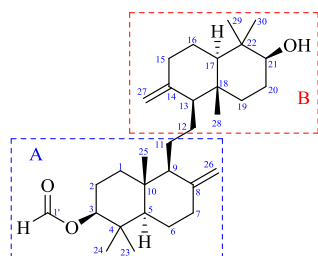


图 1 化合物 1 的结构

Fig. 1 Chemical structure of compound 1

## 1 仪器与材料

Avance 400 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); UV-2600 紫外光谱仪(日本岛津公司); Perkin-Elmer 341 旋光仪(美国 Perkin-Elmer 公司); Nicolet Nexus 470 FT-IR 红外光谱仪(美国 Thermo 公司); 柱色谱硅胶 200~300 目(青岛海洋化工, 安徽良臣硅源材料有限公司); MCI 树脂(CHP20P, 75~150  $\mu$ m, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.)和 Sephadex LH-20 凝胶(Pharmacia 公司); 薄层色谱硅胶板(安徽良臣硅源材料有限公司); 色谱试剂(中天化工、申试试剂公司); 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TAC)、磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)溶液均购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司。葡萄糖检测试剂盒, 美国 Cayman Chemical 公司; 二甲双胍, 中美上海施贵宝制药有限公司。

人乳腺癌 MCF-7 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞, American Type Culture Collection(ATCC); 大鼠骨骼肌细胞 L6, 武汉普诺赛生命科技有限公司。

伸筋草采集于我国贵州都匀, 经武汉大学药学院杨升平教授鉴定为石松科石松属植物石松 *L. japonicum* Thunb. 的干燥全草。标本(LJ2014-7Y)现存放于武汉大学药学院。

## 2 提取与分离

将 10 kg 干燥伸筋草粉碎后, 置于渗漉筒中, 加 95% 乙醇淹没植物粉体, 冷浸 2 周后, 得到提取液, 减压浓缩获得粗浸膏, 渗漉筒中伸筋草粉体继续加 95% 乙醇冷浸 2 周, 如此重复 3 次, 最终得到伸筋草样品总浸膏。

所得浸膏加适量水混悬, 再加入适量醋酸乙酯震荡溶解, 置于 3 L 梨形分液漏斗中。分多次向漏斗中加入新配的适量的 10%  $H_2SO_4$  溶液, 震荡与样品溶液混合均匀, 静置分层, 用 pH 试纸测定其 pH 值, 重复多次, 直至水层 pH 值为 1 左右, 从分液漏斗下层放出酸水层。重复上述操作, 用酸水萃取醋酸乙酯层 3 次, 检测醋酸乙酯层, 在 TLC 板蘸取少量醋酸乙酯层样品, 碘化铋钾不显色, 说明醋酸乙酯层生物碱基本萃取完毕。醋酸乙酯层用水洗多次, 直至用 pH 试纸检测 pH 值为 7 左右后, 收集醋酸乙酯层, 回收溶剂得非生物碱部位的醋酸乙酯浸膏。

不断向上述所得总酸水层加入新配的饱和  $Na_2CO_3$  溶液碱化, 用 pH 试纸检测, 直至水层 pH 值为 9~10。加入氯仿萃取碱化水层, 萃取多次, 检测碱水层, 在 TLC 板蘸取少量水层样品, 碘化铋钾不显色, 说明水层生物碱基本萃取完毕。减压浓缩氯仿层, 得总碱浸膏 28 g。

对非生物碱浸膏(醋酸乙酯浸膏)首先采用正相硅胶柱色谱(200~300)进行粗分, 以石油醚-醋酸乙酯-甲酸洗脱体系(10:1:0.1、5:1:0.1、3:1:0.1、2:1:0.1、1:1:0.1)梯度洗脱, 以在 TLC 板上展开效果分段, 分得 6 个子部分 N1~N6。N6(689 mg)过硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯-甲酸 5:1:0.1 的比例等度洗脱, 分成 3 个组分为 N6a、N6b 和 N6c, 其中 N6c LH-20 凝胶纯化后得到化合物 1(11 mg)。

对生物碱浸膏(氯仿浸膏)首先采用正相硅胶(200~300)柱进行粗分, 以氯仿-甲醇-二乙胺(100:1:0.1、50:1:0.1、30:1:0.1、15:1:0.1、7.5:1:0.1、3:1:0.1、2:1:0.1 和 1:1:0.1)梯度洗脱, 分得 5 个部分 A~E。B 组分(2.1 g)通过硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯-二乙胺(30:1:0.1、15:1:0.1、7.5:1:0.1、3:1:0.1、2:1:0.1、1:1:0.1)梯度洗脱, 分成 6 个组分 B1~B6, 其中 B3 通过 LH-20 凝胶纯化后得到化合物 2(321 mg)。C(3.7 g)组分通过硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯-二乙胺(10:1:0.1、5:1:0.1、

3 : 1 : 0.1、2 : 1 : 0.1 和 1 : 1 : 0.1) 梯度洗脱, 分成 6 个组分 C1~C6, 其中 C6 (479 mg) 过硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯-二乙胺 (5 : 1 : 0.1) 等度洗脱, 分成 3 个组分为 C6a、C6b、C6c, 其中 C6c (170 mg) 通过 LH-20 凝胶纯化后得到化合物 **3** (8 mg)。C1 组分重结晶得到化合物 **5** (140 mg)。C2 组分 (369 mg) 使用 LH-20 凝胶分离后, 通过硅胶柱色谱进一步分离, 以石油醚-醋酸乙酯-二乙胺 (15 : 1 : 0.1) 等度洗脱, 得到化合物 **4** (5 mg)、**6** (7 mg)、**7** (28 mg)。

### 3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色针状晶体 (甲醇),  $[\alpha]_D^{20} + 19.0$  ( $c$  0.03, MeOH)。根据 HR-ESI-MS 给出的准分子离子峰  $m/z$ : 493.365 3  $[M+Na]^+$  (计算值为 493.365 8), 并结合 1D NMR 数据 (表 1) 确定其分子式为  $C_{31}H_{50}O_3$ , 包含 7 个不饱和度。从化合物 **1** 的  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ) 谱图中可以观察到 6 组单峰甲基质子信号 [ $\delta_H$  1.00 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.86 (3H, s), 0.76 (3H, s), 0.67 (3H, s), 0.64 (3H, s)], 2 组烯烃质子的信号 [ $\delta_H$  4.84 (2H, d,  $J = 5.0$  Hz), 4.56 (2H, d,  $J = 9.7$  Hz)], 以及 2 个连氧次甲基信号 [ $\delta_H$  4.65 (1H, dd,  $J = 11.5, 3.8$  Hz), 3.27 (1H, dd,  $J = 11.7, 4.1$  Hz)]。综合分析  $^{13}C$ -NMR、HSQC 和 DEPT 图谱, 将化合物 **1** 的 31 个碳归属为 6 个季碳 (包括 2 个

$sp^2$  杂化和 4 个  $sp^3$  杂化的季碳)、1 个羧酸羰基、6 个次甲基 (其中 2 个为连氧次甲基)、12 个亚甲基 (其中 2 个为  $sp^2$  杂化的亚甲基) 以及 6 个甲基。文献调研发现, 化合物 **1** 的  $^{13}C$ -NMR 数据与已知三萜化合物  $\alpha$ -onocerin<sup>[12]</sup> 非常相似, 推断化合物 **1** 可能是  $\alpha$ -onocerin 的衍生物。进一步分析化合物 **1** 的  $^{13}C$ -NMR 数据, 发现除了 C-3 ( $\delta_C$  81.4) 和 C-21 ( $\delta_C$  79.3) 之间的化学位移差别较大外, 大部分碳原子信号都是以近似的化学位移成对出现, 如 C-11 ( $\delta_C$  22.6) 和 C-12 ( $\delta_C$  22.9)、C-8 ( $\delta_C$  148.9) 和 C-14 ( $\delta_C$  148.5)、C-26 ( $\delta_C$  107.5) 和 C-27 ( $\delta_C$  107.2) 等, 且化合物 **1** 具有 31 个碳原子比  $\alpha$ -onocerin 多出了 1 个羰基碳信号 ( $\delta_C$  161.7)。上述结果说明化合物 **1** 是由 2 个结构基本一致的单元组成 (单元 A 和 B), 即化合物 **1** 基于已知三萜  $\alpha$ -onocerin 的对称结构, 在某个位置的取代基发生变化, 该结果通过分析 2D NMR 图谱得到进一步验证。根据  $^1H$ - $^1H$  COSY 图谱, 确定化合物 **1** 具有 5 个自旋偶合片段, 即 C-1/C-2/C-3、C-5/C-6/C-7、C-15/C-16/C-17、C-19/C-20/C-2 和 C-9/C-11/C-12/C-13。根据 H-1、H-3 与 C-5, H-2 与 C-4 以及 H-9 与 C-5 和 C-7 之间的 HMBC 远程关联信号, 确定十氢萜烷为单元 A 的骨架。同样, 根据 H-19、H-21 与 C-13, H-20 与 C-22 以及 H-13 与 C-15 和 C-17 之间的 HMBC 远程关联信号, 确定

表 1 化合物 **1** 的  $^1H$ -NMR 和  $^{13}C$ -NMR 数据 (400/100 MHz,  $CDCl_3$ )  
Table 1  $^1H$ -NMR and  $^{13}C$ -NMR data of compound **1** (400/100 MHz,  $CDCl_3$ )

碳位	$\delta_H$	$\delta_C$	碳位	$\delta_H$	$\delta_C$
1	1.70 (1H, m), 1.10 (1H, m)	37.5	17	1.19 (1H, m)	55.1
2	1.70 (2H, m)	30.2	18		39.6
3	4.65 (1H, dd, $J = 11.5, 3.8$ Hz)	81.4	19	1.70 (1H, m), 1.10 (1H, m)	37.1
4		39.5	20	1.70 (2H, m)	28.4
5	1.19 (1H, m)	55.2	21	3.27 (1H, dd, $J = 11.7, 4.1$ Hz)	79.3
6	1.70 (1H, m), 1.39 (1H, m)	24.9	22		38.7
7	2.41 (1H, m), 1.98 (1H, m)	38.5	23	1.00 (3H, s)	28.7
8		148.9	24	0.86 (3H, s)	15.9
9	1.51 (1H, m)	57.9	25	0.67 (3H, s)	15.0
10		39.7	26	4.84 (2H, d, $J = 5.0$ Hz)	107.5
11	1.51 (1H, m), 1.39 (1H, m)	22.6	27	4.56 (2H, d, $J = 9.7$ Hz)	107.2
12	1.51 (1H, m), 1.39 (1H, m)	22.9	28	0.64 (3H, s)	14.5
13	1.51 (1H, m)	57.8	29	0.76 (3H, s)	15.0
14		148.5	30	0.90 (3H, s)	28.6
15	2.41 (1H, m), 1.98 (1H, m)	38.4	COOH	8.12 (1H, s)	161.7
16	1.70 (1H, m), 1.39 (1H, m)	24.5			

单元 B 的基本骨架与 A 相同。根据 HMBC 图谱中, H-11 与 C-8, H-12 与 C-14 之间的关联信号, 确定 2 个结构类似的单元 A 和 B 通过 C-9/C-11/C-12/C-13 片段连接起来。进一步分析 HMBC 图谱, 发现除了 C-3 和 C-21 外, A、B 部分其他位置的取代基都保持一致 (图 2), 而 H-3 与羰基碳 ( $\delta_C$  161.7) 之间的 HMBC 信号表明, 化合物 1 的 C-3 处不再是与 C-21 处对称的羟基取代, 而是换成了羧基取代, 这是其与已知三萜  $\alpha$ -onocerin 的主要区别。

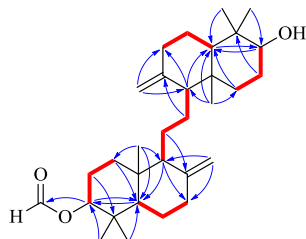


图 2 化合物 1 的 COSY 和关键 HMBC 相关信号

Fig. 2 COSY and key HMBC correlations of compound 1

NOESY 谱图显示 H<sub>3</sub>-25 [ $\delta_H$  0.67 (s, 3H)] 与 H<sub>2</sub>-11 [ $\delta_H$  1.51 (m), 1.39 (m)], H<sub>3</sub>-28 [ $\delta_H$  0.64 (s, 3H)] 与 H<sub>2</sub>-12 [ $\delta_H$  1.51 (m), 1.39 (m)] 之间有相关, 表明 C-25、C-28 和单键 C-11/C-12 为  $\beta$  取向。根据 H-5 和 H-9, H-5 和 H-3, H-17 和 H-13 以及 H-17 和 H-21 之间的 NOE 相关信号, 确定上述氢原子都处于  $\alpha$  取向。至此建立起化合物 1 的相对构型与芒柄花萜醇一致, 确定该新化合物结构为 3-甲酰基-芒柄花萜醇 (图 1)。

化合物 2: 黄色无定形粉末, 低分辨质谱 LR-ESI-MS  $m/z$  248.2 [M+H]<sup>+</sup> 结合核磁数据确定其分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3.37 (1H, td,  $J$  = 14.1, 3.7 Hz, H-1a), 3.15 (1H, td,  $J$  = 12.0, 3.4 Hz, H-9a), 2.87 (1H, dd,  $J$  = 11.8, 3.0 Hz, H-4), 2.64 (2H, dd,  $J$  = 13.2, 3.1 Hz, H-9b, 14a), 2.52 (2H, ddd,  $J$  = 17.8, 15.3, 5.6 Hz, H-1b, 6a), 2.24~2.16 (1H, m, 6b), 2.08 (2H, ddd,  $J$  = 18.7, 11.3, 2.7 Hz, H-3a, 7), 1.88~1.79 (2H, m, H-2a, 10a), 1.78~1.66 (3H, m, H-8a, 10b, 11a), 1.64~1.53 (3H, m, H-3b, 11b, 12), 1.48~1.40 (1H, m, H-15), 1.36~1.31 (1H, m, H-2b), 1.24 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, H-8b), 0.88 (1H, d,  $J$  = 5.3 Hz, H-14b), 0.86 (3H, d,  $J$  = 6.2 Hz, H-16); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 213.7 (C-5), 59.7 (C-13), 47.2 (C-9), 46.6 (C-1), 44.9 (C-12), 43.2 (C-14), 43.0 (C-4), 42.9 (C-6), 42.8 (C-8), 37.0 (C-7), 26.1 (C-10), 25.4 (C-15), 25.2 (C-11), 22.9 (C-16),

19.5 (C-3), 18.9 (C-2)。以上数据与文献对比一致<sup>[13]</sup>, 确定该化合物为 lycopodine。

化合物 3: 淡黄色无定形粉末, 低分辨质谱 LR-ESI-MS  $m/z$  286.2 [M+Na]<sup>+</sup> 结合碳谱数据确定其分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 4.22 (1H, td,  $J$  = 2.8 Hz, H-11), 3.52 (1H, dd,  $J$  = 6.8, 2.8 Hz, H-9a), 3.50~3.47 (1H, m, H-4), 3.36 (1H, m, H-1a), 3.31 (1H, dd,  $J$  = 10.1, 5.5 Hz, H-6a), 2.63 (1H, dd,  $J$  = 13.2, 3.9 Hz, H-14a), 2.56 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 4.8 Hz, H-1b), 2.47 (1H, ddd,  $J$  = 12.1, 4.4, 2.6 Hz, H-9b), 2.36~2.31 (1H, m, H-7), 2.16 (1H, dd,  $J$  = 14.5, 1.5 Hz, H-6b), 2.08~2.00 (2H, m, H-3a, 10a), 1.87 (1H, dd,  $J$  = 8.8, 4.8 Hz, H-2a), 1.78~1.73 (1H, m, H-10b), 1.68 (1H, d,  $J$  = 12.9 Hz, H-8a), 1.52 (3H, dd,  $J$  = 16.4, 8.5 Hz, H-3b, 12, 15), 1.40 (1H, d,  $J$  = 13.6 Hz, H-2b), 1.28~1.23 (1H, m, H-8b), 0.86 (1H, m, H-14b), 0.85 (3H, t,  $J$  = 6.0 Hz, H-16); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 215.8 (C-5), 69.8 (C-11), 59.2 (C-13), 47.5 (C-1), 47.5 (C-12), 45.8 (C-4), 44.9 (C-6), 44.1 (C-8), 43.6 (C-14), 41.5 (C-9), 40.0 (C-7), 35.3 (C-10), 25.5 (C-15), 22.8 (C-16), 19.8 (C-3), 19.3 (C-2)。以上数据与文献对比一致<sup>[14]</sup>, 确定该化合物为 lycoposerramine M。

化合物 4: 灰白色无定形粉末, 低分辨质谱 LR-ESI-MS  $m/z$  284.1 [M+Na]<sup>+</sup> 结合碳谱数据确定其分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.67 (1H, d,  $J$  = 4.9 Hz, H-11), 3.14 (1H, dd,  $J$  = 14.9, 6.3 Hz, H-6a), 2.86 (1H, dd,  $J$  = 12.2, 3.7 Hz, H-1a), 2.83~2.75 (2H, m, H-7, 9a), 2.56 (1H, dd,  $J$  = 11.4, 6.3 Hz, H-9b), 2.46~2.37 (2H, m, H-1b, 10a), 2.28 (1H, dd,  $J$  = 15.2, 1.4 Hz, H-6b), 2.13 (1H, dd,  $J$  = 12.9, 3.7 Hz, H-14a), 1.97~1.93 (1H, m, H-10b), 1.91 (1H, dd,  $J$  = 8.4, 5.6 Hz, H-2a), 1.89~1.85 (1H, m, H-3a), 1.82~1.76 (1H, m, H-8a), 1.70 (2H, ddd,  $J$  = 18.6, 11.0, 4.8 Hz, H-2b, 3b), 1.60 (1H, ddd,  $J$  = 10.8, 7.2, 4.4 Hz, H-15), 1.26~1.22 (2H, m, H-8b, 14b), 0.87 (3H, d,  $J$  = 6.2 Hz, H-16); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 210.6 (C-5), 139.7 (C-12), 118.9 (C-11), 75.3 (C-4), 63.5 (C-13), 46.6 (C-1), 45.0 (C-9), 44.0 (C-8), 43.3 (C-6), 40.5 (C-7), 34.2 (C-14), 25.8 (C-10), 24.7 (C-15), 23.7 (C-3), 22.0 (C-16), 20.1 (C-2)。以上数据与文献对比一致<sup>[15]</sup>, 确定化合物 4 为 4 $\alpha$ -hydroxyanhydrolycodoline。

化合物 **5**: 白色针晶 (甲醇), 低分辨质谱 LR-ESI-MS  $m/z$  264.2  $[M+H]^+$ , 结合碳谱数据确定其分子式为  $C_{16}H_{25}NO_2$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 3.84 (1H, td,  $J = 11.6, 4.0$  Hz, H-1a), 3.39 (1H, dd,  $J = 14.0, 3.7$  Hz, H-9a), 3.33~3.24 (1H, m, H-6a), 2.57 (2H, ddd,  $J = 7.9, 5.1, 3.3$  Hz, H-14a), 2.53~2.40 (1H, m, H-9b), 2.23 (1H, ddd,  $J = 18.7, 11.9, 5.1$  Hz, H-7), 2.17~2.12 (1H, m, H-6b), 2.12~2.06 (1H, m, H-3a), 2.04~1.92 (1H, m, H-10a), 1.93~1.83 (1H, m, H-2a), 1.78~1.64 (3H, m, H-8a, 10b, 11a), 1.56 (1H, dd,  $J = 13.4, 4.2$  Hz, H-3b), 1.52~1.34 (3H, m, H-2b, 12, 15), 1.33~1.23 (1H, m, H-8b), 0.94 (1H, t,  $J = 13.4$  Hz, H-14b), 0.82 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-16);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 211.1 (C-5), 79.8 (C-4), 58.9 (C-13), 49.2 (C-9), 46.2 (C-12), 46.2 (C-1), 44.8 (C-14), 43.1 (C-8), 39.4 (C-6), 36.8 (C-7), 27.3 (C-11), 25.7 (C-10), 25.6 (C-3), 25.3 (C-15), 23.2 (C-16), 17.0 (C-2)。以上数据与文献对比一致<sup>[16]</sup>, 确定化合物 **5** 为 flabelliformine。

化合物 **6**: 淡黄色无定形粉末, 低分辨质谱 LR-ESI-MS  $m/z$  250.2  $[M+H]^+$ , 结合核磁碳谱数据确定其分子式为  $C_{16}H_{27}NO$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 3.95 (1H, t,  $J = 6.1$  Hz, H-5), 3.44 (1H, td,  $J = 13.9, 3.6$  Hz, H-1a), 3.16 (1H, td,  $J = 12.1, 3.2$  Hz, H-9a), 2.61 (1H, dd,  $J = 13.3, 5.8$  Hz, H-14a), 2.55~2.45 (2H, m, H-1b, 9b), 2.32 (1H, ddd,  $J = 12.3, 5.4, 2.8$  Hz, H-4), 2.12~2.02 (1H, m, H-2a), 1.96 (1H, dt,  $J = 14.9, 10.2, 5.2$  Hz, H-7), 1.82 (1H, dt,  $J = 12.1, 8.1$  Hz, H-6a), 1.77~1.63 (4H, m, H-3a, 8a, 10a, 11a), 1.50 (4H, ddd,  $J = 17.0, 16.4, 11.1$  Hz, H-3b, 6b, 10b, 11b), 1.40~1.31 (2H, m, H-15), 1.26 (1H, dd,  $J = 12.4, 3.6$  Hz, H-2b), 1.19 (1H, dd,  $J = 12.5, 4.9$  Hz, H-8b), 0.86 (3H, t,  $J = 8.7$  Hz, H-16), 0.77 (1H, t,  $J = 12.8$  Hz, H-14b);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 68.4 (C-5), 55.1 (C-13), 47.2 (C-9), 46.9 (C-1), 45.6 (C-12), 42.9 (C-14), 41.8 (C-8), 35.4 (C-7), 33.7 (C-6), 32.5 (C-4), 26.4 (C-10), 24.8 (C-11), 24.0 (C-16), 23.5 (C-15), 23.4 (C-3), 20.5 (C-2)。以上数据与文献对比一致<sup>[17]</sup>, 确定化合物 **6** 为  $\beta$ -dihydrolycopodine。

化合物 **7**: 黄色无定形粉末, 低分辨质谱 LR-ESI-MS  $m/z$  286.2  $[M+Na]^+$ , 结合碳谱数据确定其分子式为  $C_{16}H_{25}NO_2$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )

$\delta$ : 3.27~3.15 (2H, m, H-1a, 9a), 3.03 (1H, s, OH), 2.95 (1H, dd,  $J = 11.7, 3.4$  Hz, H-4), 2.63~2.54 (2H, m, H-1b, 6a), 2.45 (1H, dd,  $J = 14.6, 5.3$  Hz, H-1b), 2.34 (1H, dd,  $J = 16.6, 1.9$  Hz, H-6b), 2.25 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-14a), 2.18~2.12 (1H, m, H-11a), 2.12~2.02 (3H, m, H-3a, 7, 8a), 1.98~1.83 (3H, m, H-2a, 3a, 10a), 1.74~1.66 (1H, m, H-3b), 1.63 (1H, ddd,  $J = 13.6, 5.0, 1.9$  Hz, H-15), 1.54~1.47 (1H, m, H-10b), 1.37 (3H, ddd,  $J = 8.7, 5.1, 3.0$  Hz, H-2b, 8b, 14b), 0.88 (3H, d,  $J = 5.7$  Hz, H-16);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 212.5 (C-5), 69.5 (C-12), 61.5 (C-13), 46.2 (C-9), 46.1 (C-1), 44.2 (C-6), 43.2 (C-4), 40.7 (C-7), 35.9 (C-14), 35.6 (C-8), 30.2 (C-11), 24.3 (C-15), 22.6 (C-16), 20.7 (C-10), 19.6 (C-3), 17.7 (C-2)。以上数据与文献对比一致<sup>[18]</sup>, 确定化合物 **7** 为 lycodoline。

## 4 生物活性

### 4.1 抗肿瘤活性筛选

采用 SRB 法<sup>[19-20]</sup>, 测试了各化合物对 MCF-7 细胞和 A549 细胞的生长抑制作用, 5-FU 为阳性对照, 选用对数生长期细胞, 胰酶消化后用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度至  $2 \times 10^4$  个/mL, 按照每孔 190  $\mu$ L 细胞悬液接种在 96 孔培养板中, 37  $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  培养 24 h。药物处理孔加入 10  $\mu$ L 样品溶液 (终质量浓度: 化合物为 5  $\mu$ g/mL; 混合物为 50  $\mu$ g/mL), 阳性药物孔加入终质量浓度为 5  $\mu$ g/mL 的 5-FU 进行处理; 对照孔加入含等体积溶媒的培养基, 37  $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  培养 3 d。弃去培养基, 加入 100  $\mu$ L 4  $^{\circ}C$  预冷的 50% TCA 固定细胞。先静置 5 min, 然后再移至 4  $^{\circ}C$  放置 1 h。倒掉固定液, 蒸馏水洗涤 5 次去除 TCA, 空气干燥 1 h。每孔加入 0.4% SRB 溶液 80  $\mu$ L, 室温染色 30 min。弃染液, 1% 醋酸洗涤 5 次充分去除未结合的 SRB, 空气干燥。加入 150  $\mu$ L 10 mmol/L Tris-base (pH 10.5) 溶解, 微型振荡器上振荡 5 min。M5 酶标仪测定 510 nm 吸光度 (A) 值。根据公式计算肿瘤细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

阳性对照 5-FU 对 2 株肿瘤细胞抑制率分别为 47.5%、73.0%。结果表明 7 个化合物对这 2 种细胞均无明显细胞毒活性。

### 4.2 降糖活性筛选

使用 2-NBDG 葡萄糖荧光标记检测试剂盒分析化合物 **1**~**7** 是否可以促进 L6 细胞的葡萄糖吸收。

将传代生长稳定的 L6 细胞换用含 2% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养基,每隔 24 h 换液 1 次,连续培养 7 d,促使 L6 细胞分化为肌管细胞。之后将分化好的细胞以  $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$  个/孔的密度种于黑色 96 孔板中,将每孔加入 100  $\mu$ L 的  $\alpha$ -MEM 培养基孵育细胞 12 h 直到细胞长满。设置对照组、二甲双胍阳性对照组和给药组 (30  $\mu$ g/mL),各组设 3 个复孔。随后生长稳定的 L6 细胞加入 100  $\mu$ L 含有 2-NBDG 以及各药物 (30  $\mu$ g/mL) 的  $\alpha$ -MEM 培养基,于恒温培养箱中孵育 30 min。30 min 后将 96 孔板在离心机中 400  $\times$  g 条件下充分离心 5 min,弃去上清液,之后所有细胞孔中加入 200  $\mu$ L 试剂盒缓冲液,利用移液器混匀,室温下使用离心机在 400  $\times$  g 的条件下离心 5 min。弃去试剂盒缓冲溶液后,向每孔中加入 100  $\mu$ L 试剂盒分析试剂。设置荧光酶标仪在 485 nm 激发波长和 535 nm 发射波长下对各孔细胞内荧光标记葡萄糖的荧光强度进行分析检测并记录。阳性对照二甲双胍对 L6 细胞的葡萄糖吸收活性倍数为 3.5。结果表明,生物碱化合物 2~6 和新的三萜化合物 1 对葡萄糖的摄取活性倍数与空白对照相当,没有降糖活性。

## 5 总结与展望

近年来针对伸筋草的研究主要针对石松生物碱及其活性,而对其非生物碱部分研究较少,本实验从该草全株中发现 1 个新芒柄花型三萜,并对该化合物进行了细胞毒和葡萄糖摄取活性测试,虽然结果显示该三萜没有细胞毒和降糖活性,但本工作仍对伸筋草的化学成分和活性研究有一定的指导作用。接下来将对该三萜成分进行抗炎活性以及 TRPC 离子通道抑制剂筛选等方面的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 任琴,徐康平,刘阳,等.伸筋草的化学成分研究[J].中南药学,2020,18(3):466-469.
- [2] 陈藏器.本草拾遗[M].芜湖:皖南医学院科研科,1983:76.
- [3] 郑海兴.伸筋草煎剂对小鼠抗炎镇痛药理实验研究[J].牡丹江医学院学报,2005,26(2):10-12.
- [4] 郑海兴,周忠光,何侗.伸筋草煎剂对小鼠免疫功能影响的实验研究[J].中医药学报,2005,33(4):36-37.
- [5] Orhan I, Terzioglu S, Sener B. Alpha-onocerin: An acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(3): 265-267.
- [6] Orhan I, Özçelik B, Aslan S, et al. Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss *Lycopodium clavatum* L [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6(1): 189-196.
- [7] 张妍妍,邢希旺,敖鹏,等.伸筋草对类风湿性关节炎大鼠踝关节滑膜组织 ICAM-1、MMP-3 及 OPG/RANKL/RANK 信号通路的影响[J].中医药学报,2020,48(11):10-14.
- [8] 蔡卓亚,周自桂,李萍,等.伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(2):297-304.
- [9] 蒋涛,孔博,颜威,等.基于网络药理学研究络石藤-伸筋草药对治疗骨关节炎的作用机制[J].世界中医药,2020,15(24):3733-3739.
- [10] 滕翠翠,何永志,王颖,等.伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J].医学综述,2008,14(20):3174-3175.
- [11] 李墨娇,刘杰,张玉波,等.伸筋草的化学成分研究[J].中草药,2015,46(1):33-37.
- [12] 杨国勋,臧毅,胡长玲,等.湖北产石松千层塔烯(serratene)三萜化学成分的研究[J].中草药,2014,45(24):3524-3527.
- [13] Halldorsdottir E S, Palmadottir R H, Nyberg N T, et al. Phytochemical analysis of alkaloids from the Icelandic club moss *Diphasiastrum alpinum* [J]. *Phytochem Lett*, 2013, 6(3): 355-359.
- [14] 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 (Tokyo)*, 2003, 51(10): 1163-1169.
- [15] He J, Wu X D, Liu F, et al. Lycopodine-type alkaloids from *Lycopodium japonicum* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2014, 4(4): 213-219.
- [16] 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.
- [17] Ma D H, Zhong Z L, Liu Z M, et al. Protecting-group-free total synthesis of (-)-lycopodine via phosphoric acid promoted alkyne aza-prins cyclization [J]. *Org Lett*, 2016, 18(17): 4328-4331.
- [18] 刘慧杰,汪治.石松生物碱化学成分的研究[J].中国中药杂志,2012,37(4):475-477.
- [19] 姜念,宋长伟,魏凌凯,等.佩兰乙醇提取物对结肠癌 RKO 细胞的抑制作用研究[J].中国民族民间医药,2018,27(16):32-35.
- [20] 袁瑞瑛,卓玛东智,韦玉璐,等.迷迭香中 2 个新松香烷型二萜化合物[J].中草药,2019,50(20):4853-4858.

[责任编辑 王文倩]