

垫状卷柏中化学成分分离及其抑制肿瘤细胞增殖活性

蔡蕊¹, 于远洋², 谢宁³, 徐强¹, 万慧慧¹, 王世盛^{3,4*}

¹大连理工大学分析测试中心, 大连 116024; ²大连市检验检测认证技术服务中心, 大连 116081;

³大连理工大学化工学院, 大连 116024; ⁴大连理工大学宁波研究院, 宁波 315016

摘要:利用质谱引导的自动纯化分离系统对垫状卷柏 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分进行选择分离纯化双黄酮类、呌酚类化合物。并利用 MS、¹H NMR、¹³C NMR、2D NMR 等光谱分析方法确定结构, 结果得到四个双黄酮类化合物, 分别为扁柏双黄酮(1)、异柳杉双黄酮(2)、苏铁双黄酮(3)、穗花杉双黄酮(4), 七个呌酚类化合物, 分别为 selaginellin(5)、selaginpulvinin A(6)、selaginpulvinin B(7)、selaginellin O(8)、selaginellin E(9)、selaginellin A(10)、selaginellin B(11)。采用 MTT 法评价了化合物 1~11 体外抑制人非小细胞肺癌细胞(NSCLC) H322 增殖活性, 结果表明, 除化合物 4 和 7 外, 其他化合物对人非小细胞肺癌细胞 H322 有不同程度的增殖抑制活性, 其中化合物 3 和 10 抑制作用较强, IC₅₀ 值分别为 16.70 和 9.54 μmol/L。

关键词:垫状卷柏; 分离纯化; 双黄酮; 呌酚; 肿瘤细胞增殖抑制

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)9-1507-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.9.007

Isolation of chemical constituents from *Selaginella pulvinata* and their anti-proliferative activity on tumor cells

CAI Rui¹, YU Yuan-yang², XIE Ning³, XU Qiang¹, WAN Hui-hui¹, WANG Shi-sheng^{3,4*}

¹Analytical Instrumentation Center, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

²Dalian Inspection and Certification Technical Service Center, Dalian 116081, China;

³Department of Pharmaceutical Sciences, School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

⁴Ningbo Institute of Dalian University of Technology, Ningbo 315016, China

Abstract: Targeting isolation of biflavonoids and selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata* (Hook. & Grev.) Maxim. was investigated by was performed on a Waters preparative LC-MS autopurification system and the ethyl acetate part of the 95% ethanol extract of *S. pulvinata* was separated and purified. The chemical structures of the separated compounds were identified by MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, 2D NMR and spectral analysis methods. Four biflavonoids were isolated and identified as hinokiflavone (1), isocryptomerin (2), sotetsuflavone (3) and amentoflavone (4). Seven selaginellin derivatives were obtained and identified as selaginellin (5), selaginpulvinin A (6), selaginpulvinin B (7), selaginellin O (8), selaginellin E (9), selaginellin A (10) and selaginellin B (11). The MTT assay was used to evaluate the inhibitory effect of compounds 1~11 on the proliferation of human non-small cell lung cancer cell line (NSCLC) H322 *in vitro*. The results showed that compounds 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10 and 11 had different degrees of inhibitory activity on human NSCLC cell line H322. Compounds 3 and 10 had stronger inhibitory activity on human NSCLC cell line H322, with IC₅₀ values of 16.70 μmol/L and 9.54 μmol/L, respectively.

Key words: *Selaginella pulvinata* (Hook. & Grev.) Maxim.; isolation and purification; biflavonoids; selaginellins; anti-proliferative activity on tumor cells

垫状卷柏 *Selaginella pulvinata* (Hook. & Grev.) Maxim. 为卷柏科卷柏属多年生草本植物, 又

名万年青、长生草、九死还魂草等。卷柏属植物在中国约有 50 余种, 广泛分布于广西、辽宁、云南、福建、浙江、山东、吉林、湖南、陕西、河北等地。《本草求真》记载其治有分生熟, 生则微寒, 力能破血通经, 故治症瘕淋结等症; 炙则辛温, 能以止血, 故治肠红

收稿日期: 2022-01-17 接受日期: 2022-04-29

基金项目: 中央高校基本科研业务费 (DUT21YG124)

* 通信作者 E-mail: wangss@dlut.edu.cn

脱肛等症^[1,2]。现代药理研究表明,垫状卷柏具有清热解毒、抗炎、抗肿瘤、抗衰老、免疫调节、治疗心血管疾病等作用^[3,4]。垫状卷柏主要成分有双黄酮类、黄酮类、呋喃类、生物碱类、有机酸类等^[5,6],其中双黄酮和呋喃类化合物是垫状卷柏主要的活性成分,而且 selaginellin 类化合物是目前仅在垫状卷柏属植物中发现的新型呋喃骨架类化合物。因此,对垫状卷柏中双黄酮类和呋喃类化合物进行纯化,对其进行深入药理作用机制研究具有重要的意义。

由于 selaginellin 类及双黄酮类化合物结构相近,用常规的分离手段难以分离^[7,8]。因此利用质谱引导的自动纯化分离技术,通过质谱对 selaginellin 类及双黄酮类化合物的分子及碎片的分子量进行检出,然后将相应的化合物进行在线液相制备,同时结合减压、常压柱层析等手段,从垫状卷柏 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分中,对双黄酮和呋喃类化合物进行选择分离,得到四个双黄酮类化合物和七个 selaginellin 类化合物,通过化学和波谱

数据确定了它们的结构,并评价了这些化合物对人非小细胞肺癌细胞(NSCLC)H322 的体外增殖抑制活性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 自动分离纯化系统(2767 样品管理器,2545 二元梯度泵,2489 紫外检测器,515 补偿泵,系统流路管理器,SQD2 质谱,MassLynx 和 FractionLynx 操作系统);HPLC 色谱柱:Unitary C₁₈(250 mm × 4.6 mm,5 μm);制备液相色谱柱:Unitary C₁₈(250 mm × 4.6 mm,10 μm)。EYELA N-3010、N-1000 旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社);Milli-Q Direct16 纯水/超纯水的一体化系统;Bruker Avance 400 MHz 核磁共振仪;Agilent 1200 型液相色谱仪。

薄层层析硅胶及柱层析硅胶(青岛海洋化工有限公司);HPLC 所用水为超纯水,甲醇为色谱甲醇(天津市光复精细化工研究所),其余试剂均为分析纯(西陇化工股份有限公司);垫状卷柏药材2014

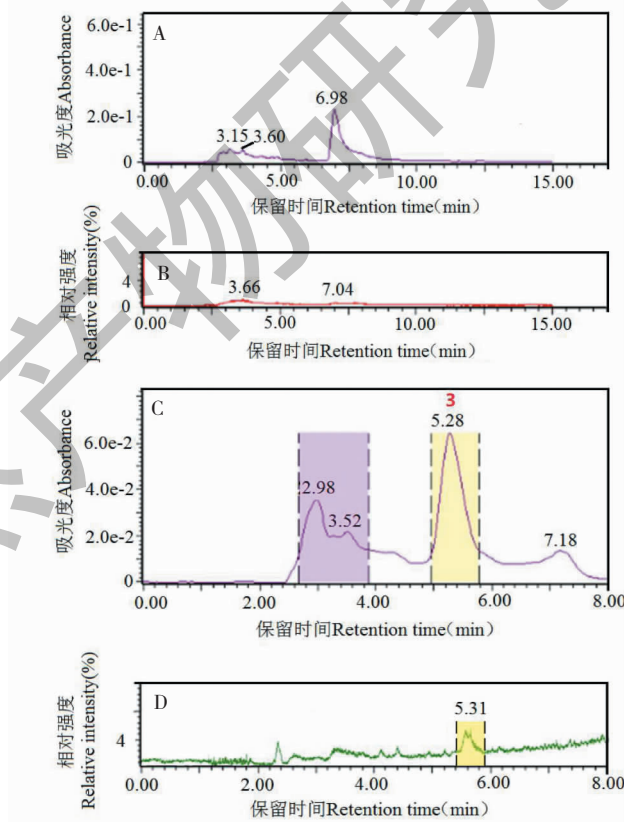


图1 组分 I 的制备液相色谱图

Fig. 1 Chromatograms of preparative-scale separation of Fr. I

注:A、C:优化前、后 LC-UV 图;B、D:优化前、后 LC-MS 图,下同。Note:A and C:LC-UV chromatograms before and after optimization;B and D:LC-MS chromatograms before and after optimization,the same below.

年3月购自安徽省亳州市龙辉药业销售有限公司,经大连药检所鉴定为垫状卷柏的干燥全草,样本存放于大连理工大学化工学院药理学系。

1.2 提取与分离

干燥的垫状卷柏粉末1 kg用95%乙醇5 000 mL回流提取2 h,提取2次,乙醇提取液浓缩干燥后得到浸膏69 g。浸膏加水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,并分别浓缩,得到乙酸乙酯萃取层浸膏21 g。取乙酸乙酯部分16 g,经减压硅胶柱层析分离,二氯甲烷/甲醇梯度洗脱得到化合物1(89 mg)、化合物2(6 mg)及组分I(90 mg)、组分II(592 mg)、组分III(417 mg)。

组分I、组分II和组分III分别用Waters自动分离纯化系统进一步分离。样品分析与制备所用流动相均为甲醇-水体系。自动纯化系统色谱、质谱条件:流速为1 mL/min,柱温为23 ℃,分流比为1/1 000,补偿液为质谱级甲醇,补偿液流速1 mL/min,以ESI源为离子化源进行负模式检测,毛细管电压:3.0 kV,锥孔电压:30 V,离子源温度:150 ℃,脱溶剂气温度:500 ℃,锥孔气体流速:50 L/h,脱溶剂气

流速:1 000 L/h。

1.2.1 组分I的分离纯化

组分I(54 mg)用甲醇溶解后,进行制备LC-MS分析,流动相为80%甲醇等度洗脱15 min,检测波长为365 nm,ESI(-)模式下在保留时间6.98 min的色谱峰中,获得的质荷比 m/z 551信号(图1A、1B)。针对性优化制备色谱条件,选择制备流动相82%甲醇等度洗脱8 min(图1C、1D),收集保留时间为5.28 min的组分,得到化合物3(8 mg)。

1.2.2 组分II的分离纯化

组分II(427 mg)甲醇溶解后进行LC-MS分析。流动相:65%~80%甲醇梯度洗脱15 min,检测波长为254 nm,在保留时间依次为4.47、5.92和11.38 min的色谱峰中,ESI(-)模式下依次获得的质荷比分别为 m/z 511、511、537信号(图2A、2B)。针对性优化制备色谱条件,制备液相色谱流动相:60%~80%甲醇梯度洗脱15 min(图2C、2D),依次收集保留时间5.58、7.73、11.92 min的组分,得到化合物4(19 mg)、化合物5(17 mg)和化合物6(20 mg)。

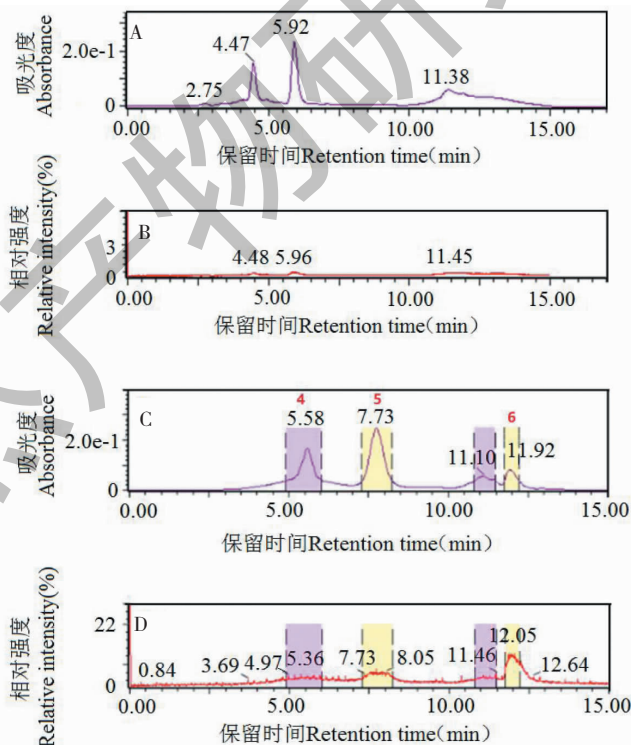


图2 组分II的制备液相色谱图

Fig. 2 Chromatograms of preparative-scale separation of Fr. II

1.2.3 组分III的分离纯化

组分III(298 mg),甲醇溶解后进行LC-MS分

析。流动相:75%~85%甲醇梯度洗脱12 min,检测波长为254 nm,在保留时间为5.18、6.15、6.85、

7.83 和 9.48 min 的色谱峰中,ESI(-)模式下获得的质荷比分别为 m/z 509、555、509、481、495 信号(图 3A、3B)。针对性优化制备色谱条件,用 75% 甲醇等度洗脱 14 min(图 3C、3D),根据关注的 MS 信号,

依次收集保留时间 5.20、6.38、7.20、8.73 和 11.70 min 的组分,分别得到化合物 **7**(8 mg)、化合物 **8**(6 mg)、化合物 **9**(8 mg)、化合物 **10**(17 mg)、化合物 **11**(6 mg)。

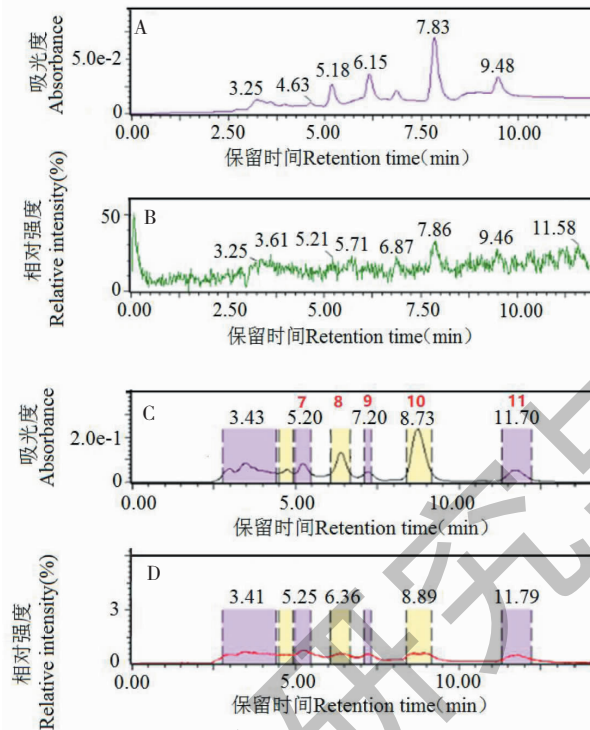


图 3 组分 III 的制备液相色谱图

Fig. 3 Chromatograms of preparative-scale separation of Fr. III

1.3 体外肿瘤细胞增殖抑制活性测试

化合物 **1** ~ **11** 分别配成终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 受试样品母液(DMSO),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 MTT 方法对上述化合物进行体外肿瘤细胞增殖抑制活性测试。取处于对数生长期人非小细胞肺癌细胞 H322,接种于 96 孔培养板中,每孔 8 000 个细胞,体积为 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,培养 24 h,显微镜观察,细胞贴壁生长,状态正常。取终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的受试样品母液,用含小牛血清的 DMEM 培养液分别稀释,浓度梯度为 100、80、60、40、20 $\mu\text{mol/L}$ 。同时设置空白组(含培养液、无细胞)和对照组(培养细胞不加药),重复三次,采用 MTT 方法进行活性测试^[9]。抑制率计算公式如下:

$$\text{细胞生长抑制率} =$$

$$\left[\frac{1 - (OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}})}{(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})} \right] \times 100\%$$

1.4 数据统计分析

统计分析采用 SPSS 13.0 方法,用 t 检验分析不同组间差异, $P < 0.05$ 则视为差异显著,用 SPSS 13.0

进行 IC_{50} 的计算。

2 结果与讨论

2.1 样品分析纯化

制备高效液相色谱与质谱联用技术分离效率高,但是天然产物成分复杂,直接用乙醇提取物分离制备化合物单体较难实现。垫状卷柏中的炔酚类化合物含量较低,且结构差异很小,常规色谱方法分离效率极低。所以首先用石油醚萃取乙醇提取物,除去其中的脂溶性色素等杂质,然后用乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯部分经 LC-MS 分析,主要成分的分子量为 512、510、538、556、482、496、552。其中分子量为 538 的化合物,推测分子式是 $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$,经查阅文献与穗花杉双黄酮的分子式相同。在此基础上,分子量 552 的化合物,推测为分子量是 538 的双黄酮类化合物中一个羟基被甲氧基取代而成。分子量为 512 的化合物,分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{O}_5$,与已报道的炔酚类化合物 selaginellin 分子式相同。在此基础上,推测分子量为 510 的化合物,应该是此类结构中脱去-2H,

增加一个不饱和度的结构;分子量为 556 的化合物是在 510 的基础上,结构中原子数增加了 C_2H_6O ;分子量为 482 的化合物是在 510 的基础上,分子量减少 28,推测为脱去 C_2H_4 或 CO ;分子量为 496 的化合物是在 510 的基础上,结构中原子数减少了 CH_2 形成的;故确定乙酸乙酯部分主要含有双黄酮和呋酮类化合物。针对 LC-MS 分析发现的这两类结构的组分,通过减压硅胶柱层析进行分段,并采用质谱引导的制备液相色谱对组分 I ~ III 进行精细分离,快速高效得到双黄酮及呋酮类化合物 **1** ~ **11**。

2.2 化合物结构鉴定

分离得到的化合物 **1** ~ **11**,均通过 HPLC 确定纯度,化合物 **1** ~ **11** 的纯度分别为:98.0%、87.6%、89.2%、99.6%、99.7%、99.2%、93.6%、68.2%、92.6%、98.4%、98.7%。经 MS 及 NMR 数据分析,鉴定了 11 个化合物的结构。

化合物 1 土黄色固体;ESI-MS: m/z 537 $[M-H]^-$,分子式为 $C_{30}H_{18}O_{10}$ 。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.02 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'/6'), 7.98 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2''/6''), 7.04 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'/5'), 6.95 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3''/5''), 6.87 (2H, s, H-3/3''), 6.74 (1H, s, H-8''), 6.49 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (C-2), 103.8 (C-3), 181.8 (C-4), 160.6 (C-5), 98.9 (C-6), 163.1 (C-7), 94.6 (C-8), 157.1 (C-9), 103.9 (C-10), 124.2 (C-1'), 128.3 (C-2'/6'), 115.3 (C-3'/5'), 161.3 (C-4'), 164.2 (C-2''), 102.6 (C-3''), 182.1 (C-4''), 153.1 (C-5''), 124.7 (C-6''), 157.4 (C-7''), 94.0 (C-8''), 153.7 (C-9''), 104.2 (C-10''), 121.1 (C-1'''), 128.6 (C-2'''/6'''), 116.0 (C-3'''/5'''), 161.4 (C-4''')。经与文献^[10]对照,鉴定化合物 **1** 为扁柏双黄酮(结构见图 4)。

化合物 2 土黄色无定型粉末;ESI-MS: m/z 551 $[M-H]^-$,分子式为 $C_{31}H_{20}O_{10}$ 。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.02 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'/6'), 8.01 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2''/6''), 7.13 (1H, s, H-8''), 7.04 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'/5'), 6.96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3''/5''), 6.94 (1H, s, H-3), 6.86 (1H, s, H-3''), 6.49 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.89 (3H, s, 7''-OCH₃)。经与文献^[11]对照,鉴定化合物 **2** 为异柳杉双黄酮。

化合物 3 黄色无定型粉末;ESI-MS: m/z 551

$[M-H]^-$,分子式为 $C_{31}H_{20}O_{10}$ 。 1H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 8.08 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 8.03 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-6'), 7.65 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'''/6'''), 7.24 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'''/5'''), 6.71 (1H, s, H-3), 6.67 (1H, s, H-3''), 6.60 (1H, s, H-6''), 6.52 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.25 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.92 (3H, s, 7''-OCH₃)。经与文献^[12]对照,鉴定化合物 **3** 为苏铁双黄酮。

化合物 4 黄色粉末;ESI-MS: m/z 537 $[M-H]^-$,分子式为 $C_{30}H_{18}O_{10}$ 。 1H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 8.13 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 8.03 (1H, dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, H-6'), 7.65 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'''/6'''), 7.25 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'''/5'''), 6.73 (1H, s, H-3), 6.66 (1H, s, H-3''), 6.45 (1H, s, H-6''), 6.52 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 163.4 (C-2), 104.4 (C-3), 183.5 (C-4), 160.3 (C-5), 99.8 (C-6), 99.8 (C-8), 165.1 (C-7), 158.9 (C-9), 104.4 (C-10), 123.4 (C-1'), 132.7 (C-2'), 123.5 (C-3'), 161.8 (C-4'), 117.6 (C-5'), 128.9 (C-6'), 164.9 (C-2''), 103.8 (C-3''), 183.1 (C-4''), 94.8 (C-6''), 158.9 (C-5''), 162.6 (C-7''), 105.4 (C-8''), 156.2 (C-9''), 105.6 (C-10''), 120.9 (C-1'''), 129.2 (C-2'''/6'''), 116.8 (C-3'''/5'''), 162.8 (C-4''')。经与文献^[13]对照,鉴定化合物 **4** 为穗花杉双黄酮。

化合物 5 紫红色粉末;ESI-MS: m/z 511 $[M-H]^-$,分子式为 $C_{34}H_{24}O_5$ 。 1H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 7.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-16), 7.36 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-17), 7.14 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3/5), 7.14 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-8/12), 7.08 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-28/32), 6.86 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-20/24), 6.74 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-29/31), 6.64 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-21/23), 6.52 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2/6), 6.52 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-9/11), 5.00 (2H, s, H-34); ^{13}C NMR (100 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 173.5 (C-1), 122.2 (C-2/6), 137.2 (C-3/5), 131.3 (C-4), 160.4 (C-7), 137.2 (C-8/12), 122.2 (C-9/11), 173.5 (C-10), 131.3 (C-13), 122.5 (C-14), 143.4 (C-15), 127.8 (C-16), 130.5 (C-17), 142.1 (C-18), 141.8 (C-19), 130.7 (C-20/24), 115.5 (C-21/23), 157.5 (C-22), 132.5 (C-25), 84.7

(C-26), 99.8 (C-27), 133.9 (C-28/32), 116.4 (C-29/31), 159.0 (C-30), 114.3 (C-33), 63.0 (C-34)。经与文献^[14]对照, 鉴定化合物 **5** 为 selaginellin。

化合物 6 红色粉末; ESI-MS: m/z 511 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₄H₂₄O₅。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7.75 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-17), 7.67 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-24), 7.59 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-16), 7.16 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3/5), 7.16 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-8/12), 6.99 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-28/32), 6.84 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-23), 6.81 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-29/31), 6.80 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-21), 6.67 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2/6), 6.67 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-9/11), 4.83 (2H, s, H-34); ¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 156.8 (C-1/10), 115.1 (C-2/6), 131.0 (C-3/5), 134.7 (C-4/13), 65.7 (C-7), 131.0 (C-8/12), 115.1 (C-9/11), 119.6 (C-14), 142.8 (C-15), 126.7 (C-16), 119.4 (C-17), 140.6 (C-18), 152.8 (C-19), 157.2 (C-20), 113.3 (C-21), 158.7 (C-22), 115.5 (C-23), 121.4 (C-24), 131.7 (C-25), 85.2 (C-26), 102.0 (C-27), 133.4 (C-28/32), 116.4 (C-29/31), 158.7 (C-30), 115.2 (C-33), 63.1 (C-34)。经与文献^[15]对照, 鉴定化合物 **6** 为 selaginpulvin A。

化合物 7 黄色粉末; ESI-MS: m/z 509 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₄H₂₂O₅。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7.92 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-16), 7.89 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-17), 7.82 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-24), 7.18 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3/5), 7.18 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-8/12), 7.03 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-28/32), 6.91 (1H, dd, J = 8.3, 2.2 Hz, H-23), 6.85 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-21), 6.82 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-29/31), 6.70 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2/6), 6.70 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-9/11), 10.54 (1H, s, H-34); ¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 157.1 (C-1/10), 115.3 (C-2/6), 131.0 (C-3/5), 133.8 (C-4/13), 65.8 (C-7), 131.0 (C-8/12), 115.3 (C-9/11), 125.3 (C-14), 134.8 (C-15), 128.1 (C-16), 119.6 (C-17), 147.7 (C-18), 153.8 (C-19), 158.9 (C-20), 113.3 (C-21), 160.3 (C-22), 116.2 (C-23), 123.1 (C-24), 130.4 (C-25), 83.5 (C-26), 104.6 (C-27), 133.8 (C-28/32), 116.5 (C-29/31), 159.4 (C-30), 114.2 (C-33), 191.3 (C-34)。经与文献^[15]对照, 鉴定化合物 **7** 为 selaginpulvin B。

化合物 8 红色粉末; ESI-MS: m/z 509 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₄H₂₀O₅。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 10.70 (1H, s, H-34), 8.02 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-16), 7.50 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-17), 7.17 (2H, m, H-3/5), 7.17 (2H, m, H-8/12), 7.17 (2H, m, H-28/32), 6.94 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-20/24), 6.76 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-29/31), 6.68 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-21/23), 6.51 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2/6), 6.51 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-9/11)。经与文献^[14]对照, 鉴定化合物 **8** 为 selaginellin O。

化合物 9 红色粉末; ESI-MS: m/z 555 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₆H₂₈O₄。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7.74 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-16), 7.36 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-17), 7.12 (2H, m, H-3/5), 7.12 (2H, m, H-8/12), 7.12 (2H, m, H-28/32), 6.87 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-20/24), 6.75 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-29/31), 6.65 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-21/23), 6.52 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2/6), 6.52 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-9/11), 5.86 (1H, s, H-34), 3.48 (6H, s, OCH₃)。经与文献^[16]对照, 鉴定化合物 **9** 为 selaginellin E。

化合物 10 紫红色粉末; ESI-MS: m/z 481 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₃H₂₂O₄。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7.64 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-15), 7.54 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-16), 7.34 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-17), 7.13 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3/5), 7.13 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-8/12), 7.06 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-28/32), 6.86 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-20/24), 6.73 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-29/31), 6.64 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-21/23), 6.52 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2/6), 6.52 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-9/11); ¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 157.7 (C-1/10), 122.3 (C-2/6), 137.1 (C-3/5), 131.1 (C-4), 132.5 (C-7), 137.1 (C-8/12), 122.3 (C-9/11), 131.1 (C-13), 125.6 (C-14), 131.1 (C-15), 130.0 (C-16), 130.8 (C-17), 144.0 (C-18), 142.0 (C-19), 130.7 (C-20/24), 115.6 (C-21/23), 159.0 (C-22), 115.6 (C-25), 87.4 (C-26), 94.5 (C-27), 134.0 (C-28/32), 116.3 (C-29/31), 159.7 (C-30), 114.3 (C-33)。经与文献^[17]对照, 鉴定化合物 **10** 为 selaginellin A。

化合物 11 红色粉末; ESI-MS: m/z 495 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₄H₂₄O₄。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7.45 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-16), 7.23 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-17), 7.13 (2H, d, J = 9.2 Hz,

H-3/5), 7.13 (2H, d, $J = 9.2$ Hz, H-8/12), 7.09 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-28/32), 6.85 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-20/24), 6.73 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-29/31), 6.63 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-21/23), 6.50 (2H, d, $J = 9.2$ Hz, H-2/6), 6.50 (2H, d, $J = 9.2$ Hz, H-9/11); ^{13}C NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 157.5 (C-1/10), 122.3 (C-2/6), 137.0 (C-3/5), 131.2 (C-4), 132.6 (C-7), 137.0 (C-8/12), 122.3 (C-9/11), 131.2 (C-

13), 125.1 (C-14), 139.3 (C-15), 130.4 (C-16), 131.0 (C-17), 142.1 (C-18), 141.2 (C-19), 130.7 (C-20/24), 115.5 (C-21/23), 158.9 (C-22), 115.5 (C-25), 87.4 (C-26), 94.5 (C-27), 133.9 (C-28/32), 116.3 (C-29/31), 159.9 (C-30), 114.6 (C-33), 21.2 (C-34)。经与文献^[17]对照, 鉴定化合物 **11** 为 selaginellin B。

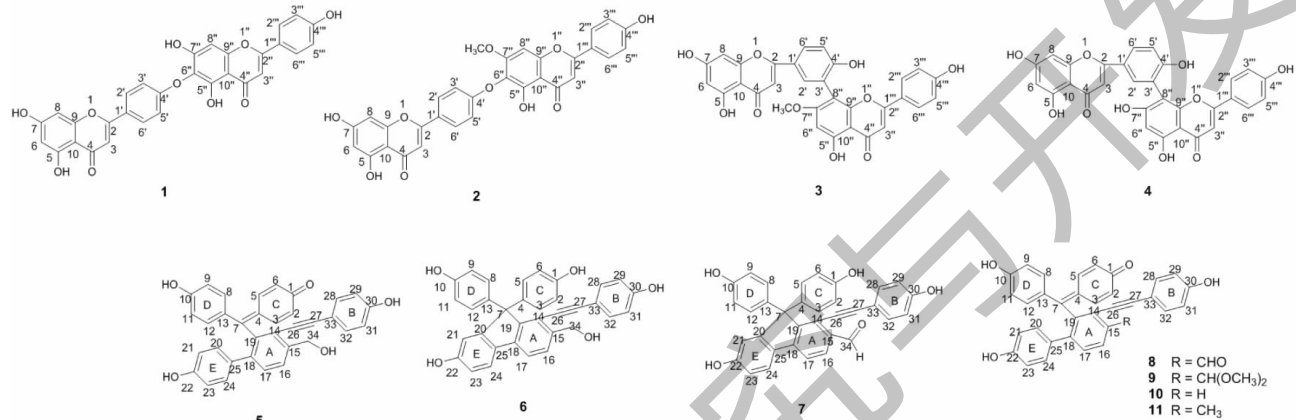


图4 化合物 **1** ~ **11** 的化学结构

Fig. 4 Structures of compound **1** ~ **11**

2.3 抑制肿瘤细胞增殖活性

采用 MTT 法测定化合物 **1** ~ **11** 体外抑制肿瘤细胞增殖活性, 结果如表 1 所示。

表 1 化合物 **1** ~ **11** 对人非小细胞肺癌细胞 H322 细胞抑制作用结果

Table 1 The inhibition effect of compounds **1-11** against NSCLC H322 cell

化合物 Compound	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	化合物 Compound	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
1	42.33 \pm 1.34	7	> 100
2	29.52 \pm 1.02	8	30.29 \pm 0.87
3	16.7 \pm 0.68	9	24.15 \pm 0.54
4	> 100	10	9.54 \pm 0.14
5	40.33 \pm 1.25	11	18.36 \pm 0.32
6	90.1 \pm 1.35		

IC₅₀ 结果显示, 化合物 **4** 和 **7** 对人非小细胞肺癌细胞 H322 细胞抑制活性较低, 其余化合物均有较好的抑制活性, 尤其是化合物 **3** (苏铁双黄酮) 和 **10** (selaginellin A) 对人非小细胞肺癌细胞 H322 细胞抑制活性最强, 显示这两类结构的化合物具有潜在的抗肿瘤应用前景。据文献^[18]报道, 炔酚类化合物

(selaginellin A) 具有抑制细胞增殖活性, 其中对 U251、Hela 以及 MCF-7 细胞系的 IC₅₀ 值分别约为 56、47、102 $\mu\text{mol/L}$, 对比发现, 炔酚类化合物对人非小细胞肺癌细胞 H322 细胞抑制作用更强。

3 结论

利用质谱引导的 PHPLC-MS 分离技术, 结合减压、常压柱层析等手段, 对垫状卷柏中的双黄酮类和炔酚类化合物进行了选择性制备分离, 得到了四个双黄酮类化合物 (**1** ~ **4**) 和七个炔酚类化合物 (**5** ~ **11**), 该方法可快速、高效地得到高纯度的双黄酮类和炔酚类化合物。抑制肿瘤细胞增殖活性评价结果显示, 这些天然化合物对人非小细胞肺癌细胞 H322 细胞均有较好的增殖抑制活性, 其中化合物 **3** 和 **10** 的 IC₅₀ 值分别为 16.70 $\mu\text{mol/L}$ 和 9.54 $\mu\text{mol/L}$ 。双黄酮及炔酚类化合物在抗肿瘤及抑制 COX-2 等方面都显示出较强的活性^[19], 炔酚类化合物显示出对氟康唑、酮康唑的抗念珠菌活性的体外增效作用^[20]。因此, 本文制备得到的化合物具备进一步研究及结构改造的价值。尤其是炔酚类结构目前仅在卷柏属植物中发现, 建立的快速制备方法, 也为垫状卷柏中双黄酮及炔酚类化合物的快速及规模化分离

纯化提供了有效的手段。

参考文献

- 1 Lee CW, Choi HJ, Kim HS, et al. Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* regulate the expression of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2008, 16: 732-738.
- 2 Liu R, Liu JF, Xu KP, et al. Chemical constituents in *Selaginella tamariscina* [J]. *Central South Pharm (中南药学)*, 2011, 9: 564-566.
- 3 Wang CJ, Hu CP, Xu KP, et al. Effects of selaginellin on homocysteine-induced senescence in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2010, 55: 560-566.
- 4 Zhang WF, Xu YY, Xu KP, et al. Inhibitory effect of selaginellin on high glucose-induced apoptosis in differentiated PC12 cells; role of NADPH oxidase and LOX-1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 694(3): 60-68.
- 5 Li S, Zhao M, Li Y, et al. Preparative isolation of six anti-tumour biflavonoids from *Selaginella doederleinii* Hieron by high-speed counter-current chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25(2): 127-133.
- 6 Zhang Y, Shi S, Wang Y, et al. Target-guided isolation and purification of antioxidants from *Selaginella sinensis* by offline coupling of DPPH-HPLC and HSCCC experiments [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(2): 191-196.
- 7 Zhang YX, Li QY, Yan LL, et al. Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25: 2173-2186.
- 8 Wu H, Guo J, Chen S, et al. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2013, 72: 267-291.
- 9 Zhang B, Zhang L, Fan WJ, et al. GC-MS analysis and antitumor activity of volatile oils from *Arisaema decipiens* Schott from various habitats [J]. *Fine Chem (精细化工)*, 2021, 38: 1830-1833.
- 10 Wu BW, Han KW, Hang B, et al. Flavonoids in *Sabina vulgaris* Antoine [J]. *Chem Nat Compd*, 2005, 41: 473-474.
- 11 Silva GL, Chai HY, Gupta MP, et al. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii* [J]. *Phytochem*, 1995, 40(1): 129-134.
- 12 Coulerie P, Nour M, Maciuk A, et al. Structure-activity relationship study of biflavonoids on the Dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp [J]. *Planta Med*, 2013, 79: 1313-1318.
- 13 Hanrahan JR, Chebib M, Davucheron NLM, et al. Semisynthetic preparation of amentoflavone: a negative modulator at GABA(A) receptors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 2281-2284.
- 14 Yang C, Shao Y, Li K, et al. Bioactive selaginellins from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2012, 8: 1884-1889.
- 15 Liu X, Luo HB, Huang YY, et al. Selaginpulvilins A-D, new phosphodiesterase-4 inhibitors with an unprecedented skeleton from *Selaginella pulvinata* [J]. *Org Lett*, 2014, 16(1): 282-285.
- 16 Cao Y, Chen JJ, Tan NH, et al. Antimicrobial selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 2456-2460.
- 17 Cheng XL, Ma SC, Yu JD, et al. Selaginellin A and B, two novel natural pigments isolated from *Selaginella tamariscina* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56: 982-984.
- 18 Zhang GG, Jing Y, Zhang HM, et al. Isolation and cytotoxic activity of selaginellin derivatives and biflavonoids from *Selaginella tamariscina* [J]. *Planta Med*, 2012, 78: 390-392.
- 19 Yu DY, Li XQ, Yang XX, et al. Anti-proliferative effect of three *Selaginella* plants on human monocytic leukemia U937 cell line [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2016, 28: 1618-1621.
- 20 Cao Y, Yao Y, Liu WD, et al. Synergistic effect of selaginellin *in vitro* on azoles against *Candidiasis* [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30: 1596-1600.