

千层塔中脂肪族类化学成分的抗肿瘤活性研究

曹 朵^{1,2}, 李佳慧³, 侯梦阳⁴, 王 燕⁵, 李 涛^{5*}¹延安大学生命科学院;²延安大学红枣重点实验室,延安 716000;³安徽理工大学医学院,淮南 232000;⁴大连理工大学生物工程学院,大连 116000;⁵上海市普陀区利群医院,上海 200333

摘要:千层塔中脂肪族类化学成分及其抗肿瘤活性研究。在肿瘤抑制活性引导下,采用 AB-8 大孔树脂、氧化铝、硅胶、Sephadex LH 20 和半制备液相等方法,对千层塔甲醇提取物进行较系统分离纯化,并结合现代波谱手段对分离到的化合物进行结构鉴定。共分离鉴定了 9 个单体化合物,分别为 pentyl-4-oxoicosa-2(*Z*),6(*Z*)-dienoate (**1**)、2-(2-ethoxy-1-hydroxy-2-oxoethyl)-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid (**2**)、ethyl (9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dienoate (**3**)、(*Z*)-nonadec-10-enal (**4**)、油酸酰胺 (**5**)、反式-9-十八碳烯酸 (**6**)、bacillamidin A (**7**)、(3*Z*,6*Z*,9*Z*)-3,6,9-二十二碳三烯 (**8**)、oplopandiol (**9**)。其中,化合物 **1** 和化合物 **2** 为新化合物,化合物 **3**~**9** 系首次从千层塔中分离。肿瘤抑制活性结果显示,化合物 **1** 和 **3** 对 HepG2 细胞具有抑制作用,其 IC₅₀ 分别为 41.12、80.54 μmol/L。

关键词:千层塔;脂肪族类化学成分;抗肿瘤

中图分类号:R284.1;R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)1-0040-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.1.005

Anti-tumor activity of aliphatic compounds from *Huperzia serrata*CAO Duo^{1,2}, LI Jia-hui³, HOU Meng-yang⁴, WANG Yan⁵, LI Tao^{5*}¹School of Life Sciences, Yan'an University; ²Key Laboratory of Jujube, Yan'an University, Yan'an 716000, China;³School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232000, China;⁴School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116000, China;⁵Liquan Hospital, Putuo District, Shanghai, Shanghai 200333, China

Abstract: The anti-tumor activity of aliphatic in *Huperzia serrata* was studied. Guided by antitumor activity, the AB-8 macroporous resin, alumina, silica gel, Sephadex LH 20 and pre-HPLC were used to separate and purify the methanol extract of *H. serrata*. The structures were identified by modern spectroscopic methods. Nine compounds were isolated and identified, which were classified as pentyl-4-oxoicosa-2(*Z*),6(*Z*)-dienoate (**1**), 2-(2-ethoxy-1-hydroxy-2-oxoethyl)-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid (**2**), ethyl (9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dienoate (**3**), (*Z*)-nonadec-10-enal (**4**), oleamide (**5**), *trans*-octadec-9-enoic acid (**6**), bacillamidin A (**7**), (3*Z*,6*Z*,9*Z*)-3,6,9-docosatriene (**8**), oplopandiol (**9**). Compounds **1** and **2** were new compounds. Compounds **3**~**9** were isolated from *H. serrata* for the first time. The results of HepG2 cells inhibitory activity showed that compounds **1** and **3** had inhibitory effect on HepG2 with IC₅₀ of 41.12 and 80.54 μmol/L, respectively.

Key words: *Huperzia serrata*; aliphatic compounds; anti-tumor activity

千层塔 *Lycopodium serratum* Thunb., 又名蛇足石杉或蛇足草,为石杉科属植物,通常高 10~30 cm,孢子叶的两侧可见淡黄色肾形孢子囊^[1]。千层塔主要分布在我国华南地区和其他亚洲国家(日本、泰国、菲律宾和马来西亚等),生长在海拔 300~

2700 m 的森林或灌木丛下^[1]。在我国民间疗法中,千层塔的使用已有一千多年的历史,其化学成分主要有石松类生物碱和三萜^[2]。在临床上,生物碱已成功用于治疗重症肌无力,阿尔茨海默氏病和痴呆症^[3]。

天然产物具有结构多样性和新颖性,是药物先导分子的重要来源^[4]。该植物中化学成分主要结构类型有生物碱、三萜类和脂肪族类化合物等,其中生物碱表现出胆碱酯酶抑制活性,三萜类表现出抗

收稿日期:2021-12-27 接受日期:2022-10-24

基金项目:陕西省科学技术协会青年人才托举计划(20220321);延安大学疫情防控应急科研项目(ydfk067)上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目(ptkwws20 2118)

* 通信作者 Tel:86-013661585793; E-mail:tonyli120@hotmail.com

肿瘤活性,但有关其脂肪族类化合物的生物活性鲜有报道^[5]。

康莱特注射液是一种用于治疗脾虚、小细胞肺癌、肺癌、原发性肝癌和肝癌的药物,其有效成分有甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯和脂肪酸酯等脂肪族类化合物^[6]。本研究意图通过对千层塔中脂肪族化合物进行富集、分离和纯化,并对分离到的单体化合物进行抗肿瘤活性筛选。在前期的预实验中,我们初步发现千层塔全株药材提取后氯仿层萃取部位具有抑制 HepG2 细胞的生物活性。结合多种现代分离纯化技术对千层塔中化学成分进行较系统的分离,通过波谱学方法对分离得到的化学成分进行结构表征,并对所分离到的单体化合物进行 HepG2 细胞抑制活性检测,以期对千层塔的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

高分辨 ESI 质谱仪(Agilent Series, 1100 SL 液质联用仪);1D 和 2D 核磁共振(Bruker, Avance 500 和 AV 800 型);旋转蒸发仪(中国上海亚荣生化仪器有限公司, RE-6000A 及 RE3000A 型);半制备高效液相色谱仪(江苏汉邦科技有限公司, 汉邦 NP7000C 型泵, NU3000 型紫外检测器);RP-18 色谱柱(日本 YMC 公司, 250 mm × 4.6 mm, 5 μmol/L; 250 mm × 10 mm, 10 μmol/L);正相柱层析硅胶(青岛海洋化工厂, 100 ~ 200, 200 ~ 300, 300 ~ 400 目);薄层层析硅胶(青岛海洋化工厂, GF254);大孔树脂(中国北京慧德易科技有限责任公司, AB-8);RP-18 反相硅胶填料(上海技舟化工科技有限公司, 30 和 60 μmol/L, 100 A);有机试剂(天津科密欧化学试剂有限公司, 分析纯);HepG2 细胞(Procell, 武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 药材来源与鉴定

千层塔药材购于湖北省恩施市,全株暗绿色、高 15 ~ 40 cm, 根须状、茎直立或下部平卧、叶纸质、椭圆状披针形,叶缘具粗齿,经西北大学生命科学学院郭斌研究员鉴定为石松科(Lycopodiaceae P. Beauv. ex Mirb.) 石杉属(*Huperzia* Bernh) 植物千层塔 *Lycopodium serratum* Thunb. 全株药材,该中药标本存放于西北大学生命科学院(编号:17-03-10)。

1.3 提取与分离

取千层塔干燥全株 19 kg, 粉碎后加 10 倍量的甲醇加热回流,反复提取 4 次,每次约 2 h, 过滤后合

并滤液,65 °C 下减压浓缩得到浸膏约 5.5 kg。将浸膏分为 3 份,每份加 5 L 酸水(pH 2.5 的醋酸水溶液),超声使其充分溶解后,过滤得滤液,加入 NaCO₃ 调节滤液至碱性(pH 10 ~ 11)后,分别加入与碱水等体积的石油醚、氯仿或乙酸乙酯进行萃取,每份萃取 3 次,分别合并水层、石油醚层、氯仿层和乙酸乙酯层萃取液,减压浓缩有机相,得到石油醚层约 2.0 kg、氯仿层浸膏约 1.5 kg 和乙酸乙酯层浸膏约 500 g,对石油醚部位、氯仿部位和乙酸乙酯部位粗提物进行生物活性筛选,结果显示氯仿层显示出抗肿瘤活性。取氯仿层浸膏 1.4 kg,采用 AB-8 大孔树脂柱分离纯化,乙醇/水(0:100, 30:70, 50:50, 70:30, 90:10 和 100:0)梯度洗脱,TLC 检测合并相似组分,氯仿部位得 Fr. A ~ G,其中 Fr. B 和 Fr. D 显示出较好的抗肿瘤活性。Fr. B 进一步通过 RP-18 反相硅胶填料常压柱层析分离,甲醇/水(30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:20 和 90:0)梯度洗脱,TLC 检测后合并得 Fr. B1 ~ B6。Fr. B3 通过 MCI 柱色谱分离纯化,甲醇/水洗脱(40:60, 50:50, 60:40, 70:30 和 80:20)得到 5 个组分 Fr. B31 ~ B35。Fr. B32(320 mg)再经常压 RP-18 反相硅胶柱层析得到 6 个组分 Fr. B321 ~ 226。Fr. B323(116.8 mg)经半制备液相 HPLC(乙腈/水)纯化得到化合物 **3**(9.65 mg)、**7**(10.29 mg)、**9**(13.32 mg)。Fr. B324(202 mg)经半制备液相 HPLC(甲醇/水 = 35:65)纯化得到化合物 **6**(12.34 mg)、**2**(7.67 mg)、**1**(8.56 mg)。Fr. D(约 219 g)经中性氧化铝柱层析,二氯甲烷/甲醇(100:0 → 0:100)梯度洗脱,TLC 检测合并得 Fr. D1 ~ D6。其中 Fr. D3(约 91 g)经常压正相硅胶柱层析,氯仿/甲醇(100:0 → 0:100, 1% 三乙胺, V/V)梯度洗脱,TLC 检测后合并得到 5 个组分 Fr. D31 ~ D35。其中 Fr. D33(约 400 mg)再经 Sephadex LH 20 凝胶柱层析,甲醇洗脱,TLC 检测得到 5 个部分 Fr. D331 ~ D335。Fr. D333(101 mg)和 Fr. D334(约 132 mg)再经半制备液相 HPLC 分离得到化合物 **4**(10.60 mg)、**5**(7.54 mg)、**8**(6.43 mg)。

1.4 抑制 HepG2 细胞活性的粗提物和活性物质筛选

将装有 HepG2 细胞培养液的 75 cm² 培养瓶放置在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,隔天换一次培养液,待细胞密度打到 80% 以上,按照 1:3 传代。将细胞以 5 × 10⁴ 个/mL 的密度接种于 96 孔板,100 μL/孔。将 96 孔板放入培养箱在 37 °C、5% CO₂ 的条件下预培养 24 h。

对 HepG2 细胞进行培养、传代、活性检测及细胞存活率计算,其中细胞培养液中提取液的供试品溶液浓度为 1 mg/mL,萃取物的供试品液浓度为 100 μ g/mL,化合物供试品溶液的浓度梯度为 1、3、10、30 和 100 μ mol/L。

1.5 统计分析

采用统计软件 GraphPad Prism7 软件进行数据分析,实验结果表示为均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。使用单因素方法分析和 t 检验评估数据的重要性。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色无定形粉末,易溶于甲醇和氯仿;HR-ESI-MS; m/z 393.346 8 [$M + H$] $^+$ (calcd for $C_{25}H_{45}O_3$, 393.354 3),提示其分子式为 $C_{25}H_{44}O_3$ 。 1H NMR 谱(见表 1)在高场显示 2 个 sp^3 杂化甲基峰 δ_H 0.90 (3H, t, $J = 7.1$ Hz) 和 0.98 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 4 个烯烃氢质子 δ_H 5.34 (2H, td, $J = 4.6, 2.3$ Hz), 7.64 (1H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz) 及 7.71 (1H, dd, $J = 5.6, 3.3$ Hz),提示化合物 **1** 有 4 个顺式烯烃氢质子。 ^{13}C NMR 和 DEPT 数据(数据见表 1)提示化合物 **1** 含有 25 个碳,其中 2 个甲基碳、17 个亚甲基碳、4 个次甲基不饱和碳(δ_C 129.8、130.8、130.8、132.3)和 2 个季碳。HSQC 谱中显示 δ_H 7.64 (1H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz) 与 δ_C 132.3 相关, δ_H 7.71 (1H, dd, $J = 5.6, 3.3$ Hz) 与 δ_C 129.8 相关, δ_H 5.34 (2H, td, $J = 4.6, 2.3$ Hz) 与 δ_C 130.8 相关, δ_H 4.29 (2H, t, $J = 6.6$ Hz) 与 δ_C 66.6 存在相关性, δ_H 2.19 (2H, m) 与 δ_C 36.5 相关, δ_H 2.03 (2H, d, $J = 6.6$ Hz) 与 δ_C 28.1 相关, δ_H 1.59 (2H, m) 与 δ_C 26.9 相关, δ_H 1.45 (2H, m) 与 δ_C 23.7 相关, δ_H 1.34 (1H, m) 与 δ_C 20.2 相关, δ_H 0.90 (3H, t, $J = 7.1$ Hz) 与 δ_C 14.4 相关, δ_H 1.32 (2H, m) 与 δ_C 31.7 相关, δ_H 1.31

(2H, m) 与 δ_C 33.0 相关, δ_H 0.98 (3H, t, $J = 7.4, 3.2$ Hz) 与 δ_C 14.0 相关。HMBC 谱中显示 2 个羰基碳 δ_C 169.3 和 179.3 分别与 1H NMR 谱中 δ_H 7.71 (1H, dd, $J = 5.6, 3.3$ Hz) 和 δ_H 7.64 (1H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz) 相关,提示双键碳(δ_C 129.8, 132.3)两端均连有羰基;其中羰基碳 δ_C 179.3 与 δ_H 2.19 (2H, m) 相关,提示该羰基与亚甲基碳 δ_C 36.5 相连; δ_C 36.5 与 δ_H 5.34 (2H, td, $J = 4.6, 2.3$ Hz) 相关,提示亚甲基碳与双键碳连接; δ_H 2.03 (2H, d, $J = 6.6$ Hz) 与 δ_C 130.8 相关; 1H - 1H COSY 谱中 δ_H 2.03 (2H, d, $J = 6.6$ Hz) 与烯烃氢质子 δ_H 5.34 (2H, td, $J = 4.6, 2.3$ Hz) 相关,提示双键碳与亚甲基 δ_H 5.34 (2H, td, $J = 4.6, 2.3$ Hz) 相连, 1H - 1H COSY 谱中还可可见 δ_H 4.29 (2H, t, $J = 6.6$ Hz) 与 δ_H 1.32 (2H, m) 相关, δ_H 1.34 (2H, m) 与 δ_H 1.31 (2H, m) 和 δ_H 0.98 (3H, t, $J = 7.4$ Hz) 相关, δ_H 0.98 (3H, t, $J = 7.4$ Hz) 与 δ_H 1.34 (2H, m) 相关, δ_H 1.32 (2H, m) 与 δ_H 1.34 (2H, m) 和 δ_H 1.31 (2H, m) 相关。另外,在 HMBC 谱中 δ_H 4.29 (2H, t, $J = 6.6$ Hz) 与 δ_C 31.7 和 δ_C 20.2 相关, δ_H 0.98 (3H, t, $J = 7.4$ Hz) 与 δ_C 20.2 和 δ_C 31.7 存在相关性, δ_C 20.2 与 δ_H 1.32 (2H, m) 及 δ_H 1.31 (2H, m) 相关;结合 HMBC 谱和 1H - 1H COSY 谱提示正戊醇片段的的存在。在 HMBC 谱中还可可见 δ_H 4.29 (2H, t, $J = 6.6$ Hz) 与 δ_C 169.3 羰基碳存在相关性,提示羰基碳与正戊醇成酯;HMBC 谱中 δ_C 23.7 与甲基质子 δ_H 0.90 (3H, t, $J = 7.1$ Hz) 和 δ_H 1.59 (2H, m) 相关(见图 1)。综合以上信息推测化合物 **1** 的结构为 pentyl-4-oxoicos-2(Z),6(Z)-dienoate, Scifinder 数据库检索显示化合物 **1** 为新化合物。化合物 **1** 和 **2** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 (www.trcw.ac.cn)。

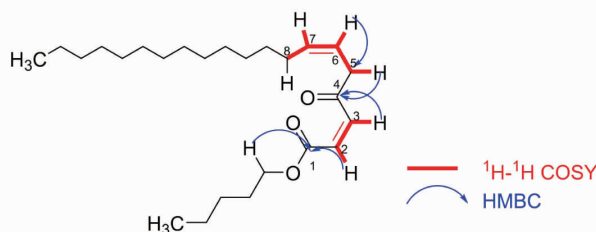


图 1 化合物 **1** 的关键 HMBC 和 1H - 1H COSY 相关

Fig. 1 The key HMBC and 1H - 1H COSY correlations of compound **1**

表1 化合物1的¹H NMR和¹³C NMR数据(800和200 MHz, CDCl₃)

Table 1 ¹H NMR and ¹³C NMR data for compound 1 (800 and 200 MHz, CDCl₃)

No.	δ_{H}	δ_{C}
1	-	169.3
2	7.71(1H, dd, $J = 5.6, 3.3$ Hz)	129.8
3	7.64(1H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz)	132.3
4	-	179.3
5	2.19(2H, m)	36.5
6	5.34(2H, td, $J = 4.6, 2.3$ Hz)	130.8
7	5.34(2H, td, $J = 4.6, 2.3$ Hz)	130.8
8	2.03(2H, d, $J = 6.6$ Hz)	28.1
9~17	1.32~1.35(18H, m)	30.3~30.8
18	1.59(2H, m)	26.9
19	1.45(2H, m)	23.7
20	0.90(3H, t, $J = 7.1$ Hz)	14.4
1'	4.29(2H, t, $J = 6.6$ Hz)	66.6
2'	1.31(2H, m)	33.0
3'	1.32(2H, m)	31.7
4'	1.34(2H, m)	20.2
5'	0.98(3H, t, $J = 7.4$ Hz)	14.0

化合物2 白色无定形粉末,易溶于甲醇和氯仿;HR-ESI-MS; m/z 257.0993 [$M + Na$]⁺(calcd for C₁₀H₁₈O₆Na, 257.0874),提示其分子式为C₁₀H₁₇

O₆。¹H NMR谱(见表2)在高场显示3个 sp^3 杂化甲基峰 δ_{H} 0.93(3H, d, $J = 6.6$ Hz)、1.00(3H, d, $J = 6.6$ Hz)和1.30(3H, t, $J = 7.1$ Hz)。¹³C NMR和DEPT数据(数据见表1)提示化合物2含有10个碳,其中3个甲基碳、2个亚甲基碳、2个次甲基碳1个季碳(δ_{C} 80.0)和2个羰基碳(δ_{C} 171.5和177.0)。HSQC谱中显示 δ_{H} 1.30(3H, t, $J = 7.1$ Hz)与 δ_{C} 14.2相关、 δ_{H} 0.93(3H, d, $J = 6.6$ Hz)与 δ_{C} 23.7相关、 δ_{H} 1.00(3H, d, $J = 6.6$ Hz)与 δ_{C} 24.1相关、 δ_{H} 1.82(1H, m)和 δ_{H} 1.87(1H, dd, $J = 14.5, 6.1$ Hz)与 δ_{C} 24.4均相关、 δ_{H} 4.25(1H, dq, $J = 10.7, 7.2$ Hz)和 δ_{H} 4.32(1H, dq, $J = 10.8, 7.2$ Hz)均与 δ_{C} 62.9相关、 δ_{H} 4.39(1H, s)与 δ_{C} 80.0相关。HMBC谱中显示 δ_{H} 4.25和 δ_{H} 4.32均与 δ_{C} 14.2相关、 δ_{H} 4.39与 δ_{C} 43.5相关、 δ_{H} 4.25与 δ_{C} 76.0相关、 δ_{H} 1.82、 δ_{H} 1.87和 δ_{H} 2.00均与 δ_{C} 80.0相关、 δ_{H} 1.30与 δ_{C} 62.8相关、 δ_{H} 2.00和 δ_{H} 4.39与 δ_{C} 177.0均相关、 δ_{H} 4.25和 δ_{H} 4.32与 δ_{C} 171.5均相关、 δ_{H} 1.00和 δ_{H} 0.93与 δ_{C} 43.5均相关、 δ_{H} 1.00与 δ_{C} 24.1和 δ_{C} 24.4均相关、0.93与24.4相关。¹H-¹H COSY谱中显示 δ_{H} 1.82和 δ_{H} 1.87与 δ_{H} 0.93均相关、 δ_{H} 2.00与 δ_{H} 1.87相关、 δ_{H} 4.25和 δ_{H} 4.32与 δ_{H} 1.30均相关(见图2)。综合以上信息推测化合物2的结构为2-(2-ethoxy-1-hydroxy-2-oxoethyl)-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid, Scifinder数据库检索显示化合物2为新化合物。

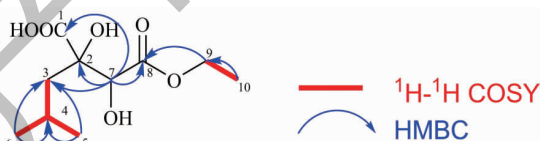


图2 化合物2的关键HMBC和¹H-¹H COSY相关

Fig. 2 The key HMBC and ¹H-¹H COSY correlations of compound 2

表2 化合物2的¹H NMR和¹³C NMR数据(800和200 MHz, CDCl₃)

Table 2 ¹H NMR and ¹³C NMR data for compounds 2 (800 and 200 MHz, CDCl₃)

No.	δ_{H}	δ_{C}
1	-	177.0
2	-	75.9
3	1.87(1H, dd, $J = 14.5, 6.6$ Hz); 2.00(1H, dd, $J = 14.5, 6.6$ Hz)	43.5
4	1.82(1H, m)	24.4
5	0.93(3H, d, $J = 6.6$ Hz)	23.7
6	1.00(3H, d, $J = 6.6$ Hz)	24.1

续表 2 (Continued Tab. 2)

No.	δ_{H}	δ_{C}
7	4.39(1H, s)	80.0
8	-	171.5
9	4.25(1H, dq, $J = 10.7, 7.2$ Hz); 4.32(1H, dq, $J = 10.8, 7.2$ Hz)	62.9
10	1.30(3H, t, $J = 7.1$ Hz)	14.1

化合物 3 白色无定形粉末(氯仿), 易溶于氯仿; $^1\text{H NMR}$ (800 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.37 ~ 5.31 (1H, m, H-9), 4.04(1H, q, $J = 7.1$ Hz, H-10), 3.57 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-13), 2.74 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-14), 3.31(2H, s, H-12), 2.31 ~ 2.24(2H, m, H-11), 2.02(1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 1.56(1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-1'), 1.17(3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-24); $^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 173.3 (C-1), 14.6 (C-2), 22.3 (C-3/C-4), 23.4 (C-5/C-6), 20.9 (C-7), 30.2 (C-8), 130.2 (C-9/C-10), 34.0 (C-11), 128.3 (C-12), 128.3 (C-13), 31.4 (C-14), 29.4 (C-15), 29.2 (C-16), 29.0 (C-17), 28.9 (C-18), 28.9 (C-19), 27.1 (C-20), 25.7 (C-21), 24.9 (C-22), 22.4 (C-23), 14.4 (C-24), 60.1 (C-1'). 以上数据与文献^[7]报道一致, 故鉴定该化合物为 ethyl (9*Z*, 12*Z*)-octadeca-9.

化合物 4 白色无定形粉末(氯仿), 易溶于氯仿和二氯甲烷; $^1\text{H NMR}$ (800 MHz, CD_3OD) δ : 5.34 (2H, m, H-10/H-11), 2.38(2H, t, $J = 10.7$ Hz, H-9), 2.16(4H, m, H-8), 0.88(3H, t, $J = 10.9$, 2.2 Hz, H-19); $^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CD_3OD) δ : 201.0 (C-1), 47.9 (C-2), 29.4 (C-3), 29.3 (C-4), 29.3 (C-5), 29.2 (C-6), 29.2 (C-7), 29.2 (C-8), 35.1 (C-9), 129.4 (C-10/C-11), 31.7 (C-12), 29.1 (C-13), 29.1 (C-14), 28.9 (C-15), 26.7 (C-16), 25.5 (C-17), 22.3 (C-18), 13.0 (C-19)。以上数据与文献^[8]报道一致, 故鉴定该化合物为 (*Z*)-nonadec-10-enal。

化合物 5 白色无定形粉末(氯仿), 易溶于氯仿和二氯甲烷; $^1\text{H NMR}$ (800 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.03 (2H, NH_2), 0.88(3H, t, $J = 10.8$ Hz, H-22); $^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 174.9 (C-1), 35.6 (C-2), 26.6 (C-3), 24.1 (C-4/C-5), 22.1 (C-6/C-7), 31.7 (C-8), 130.1 (C-9/C-10), 29.5 (C-11), 29.5 (C-12), 29.4 (C-13), 29.3 (C-14), 29.3 (C-15), 29.2 (C-16), 29.2 (C-17), 29.0 (C-18), 27.0 (C-19), 25.6 (C-20), 22.6 (C-21), 14.4 (C-22)。以上

数据与文献^[9]报道一致, 故鉴定该化合物为油酸酰胺。

化合物 6 白色无定形粉末(氯仿), 易溶于氯仿和二氯甲烷; $^1\text{H NMR}$ (800 MHz, CD_3OD) δ : 0.87 (2H, s, H-18), 2.35(4H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 4.24 (1H, ddd, $J = 10.8, 5.7, 1.2$ Hz, H-17), 7.53(1H, dd, $J = 5.7, 3.2$ Hz, H-9), 7.71(1H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-10); $^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CD_3OD) δ : 178.0 (C-1), 35.1 (C-2), 31.7 (C-3), 29.4 (C-4), 29.4 (C-5), 29.3 (C-6), 29.3 (C-7), 29.2 (C-8), 129.5 (C-9), 129.5 (C-10), 29.2 (C-11), 29.1 (C-12), 28.9 (C-13), 28.9 (C-14), 26.7 (C-15), 25.5 (C-16), 22.3 (C-17), 13.1 (C-18), 以上数据与文献^[10]报道一致, 故鉴定该化合物为反式-9-十八碳烯酸。

化合物 7 白色无定形粉末(氯仿), 易溶于氯仿和二氯甲烷; $^1\text{H NMR}$ (800 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.84 (6H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11/H-12), 2.78 (1H, dd, $J = 16.4, 9.6$ Hz, H-2''), 4.60 (1H, ddd, $J = 9.6, 7.6, 6.0$ Hz, H-1'), 8.32 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 55.9 (C-1), 175.4 (C-2), 35.8 (C-3), 25.6 (C-4), 28.4 (C-5), 29.4 (C-6), 29.8 (C-7), 26.5 (C-8), 38.7 (C-9), 26.5 (C-10), 22.6 (C-11), 22.1 (C-12), 50.0 (C-1'), 170.6 (C-2'), 35.9 (C-3'), 172.4 (C-1''), 52.0 (C-2'')。以上数据与文献^[11]报道一致, 故鉴定该化合物为 bacillamidin A。

化合物 8 白色无定形粉末(氯仿), 易溶于氯仿和二氯甲烷; $^1\text{H NMR}$ (800 MHz, CDCl_3) δ : 0.80 (3H, t, $J = 11.4, 2.0$ Hz, H-22), 0.88 (3H, t, $J = 11.1, 1.9$ Hz, H-1), 5.29 (1H, m, H-10), 5.43 (1H, m, H-9), 5.38 (2H, m, H-3/H-4), 5.43 (2H, m, H-6/H-7); $^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 14.6 (C-1), 15.0 (C-2), 131.3 (C-3), 129.9 (C-4), 31.9 (C-5), 128.1 (C-6), 128.0 (C-7), 29.7 (C-8), 127.0 (C-9), 126.9 (C-10), 29.7 (C-11), 29.6 (C-12), 29.5 (C-13), 29.4 (C-14), 29.3 (C-15), 29.3 (C-16), 27.2

(C-17), 25.6 (C-18), 25.4 (C-19), 22.7 (C-20), 19.8 (C-21), 14.1 (C-22), 以上数据与文献^[12]报道一致,故鉴定该化合物为(3*Z*,6*Z*,9*Z*)-3,6,9-docosatriene。

化合物 9 白色无定形粉末(氯仿),易溶于氯仿和二氯甲烷;¹H NMR (800 MHz, CDCl₃) δ: 0.89 (3H, t, *J* = 10.9, 3.3 Hz, H-17), 0.90 (3H, t, *J* = 11.2, 3.2 Hz, H-1), 5.61 (1H, dd, *J* = 5.8, 1.9 Hz,

H-10), 5.62 (1H, m, H-10); ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 18.0 (C-1), 29.8 (C-2), 64.2 (C-3), 79.8 (C-4), 69.1 (C-5), 69.0 (C-6), 79.6 (C-7), 59.3 (C-8), 134.8 (C-9), 127.8 (C-10), 27.2 (C-11), 29.6 (C-12), 29.5 (C-13), 29.3 (C-14), 22.6 (C-15), 31.1 (C-16), 14.1 (C-17), 以上数据与文献^[13]报道一致,故鉴定该化合物为 oplopandiol。

化合物 1~9 的结构式见图 3。

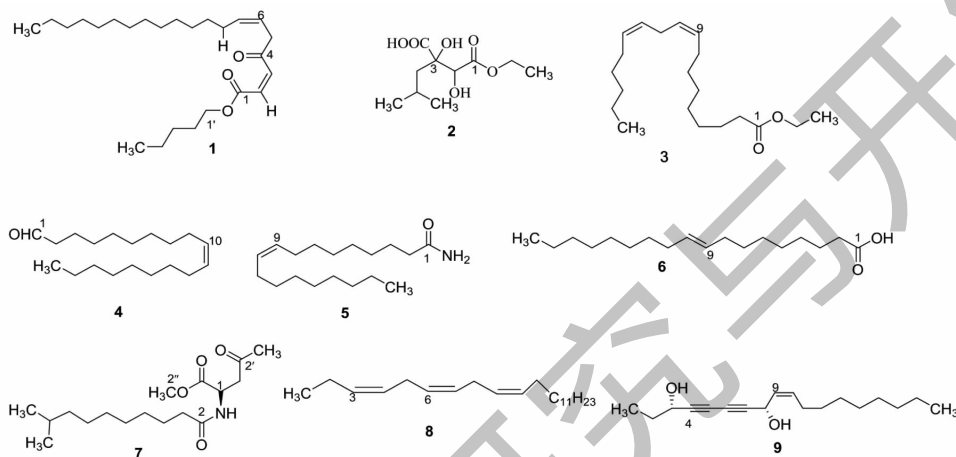


图 3 化合物 1~9 的化学结构

Fig. 3 The chemical structures of compounds 1-9

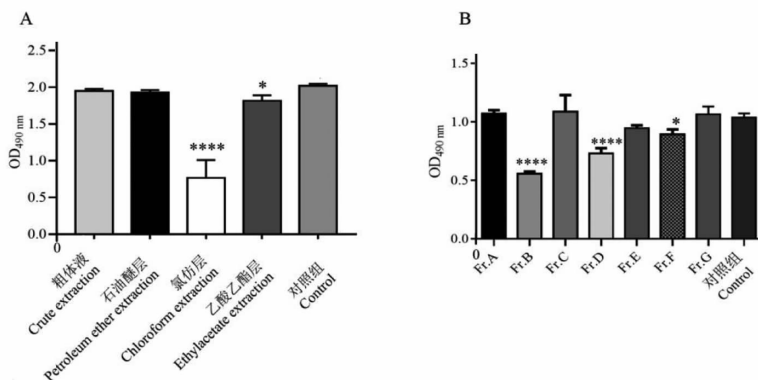
2.2 抑制 HepG2 细胞活性评价

按预先设定各孔加入 10 μL 的 PBS 和供试液,各平行 5 孔。有 HepG2 细胞但不加供试液只加 PBS 的一组作为对照组,有培养液但不加 HepG2 细胞和供试液只加 PBS 的一组作为空白组。在培养箱中孵育 36 h 后,向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液。将培养板在培养箱内孵育 1.5 h 后在 490 nm 下用酶标仪测定 OD 值,并计算细胞存活率,结果显示化合物 1 和化合物 3 对 HepG2 细胞具有抑制作用(见图 4),其 IC₅₀ 分别为 41.12、80.54 μmol/L,表明化合物 1 对 HepG2 细胞活性有明显抑制作用。

3 结论

本研究对千层塔全株药材进行酸提碱沉获得提取液,萃取后对活性部位氯仿层进行分离纯化,共分离鉴定了 9 个脂肪族类化合物,其中化合物 1 和 2 为新化合物,化合物 3~9 首次从千层塔中分离,对分离到的单体化合物进行了体外抑制 HepG2 细胞活性检测。

千层塔中脂肪族类化合物尚未被学者们研究,本实验首次报道了千层塔中 9 个脂肪族类化合物。前期药理活性实验中发现千层塔粗提物氯仿萃取层具有抑制 HepG2 细胞活性的作用,对其进行了较为



续图 4 (Continued Fig. 4)

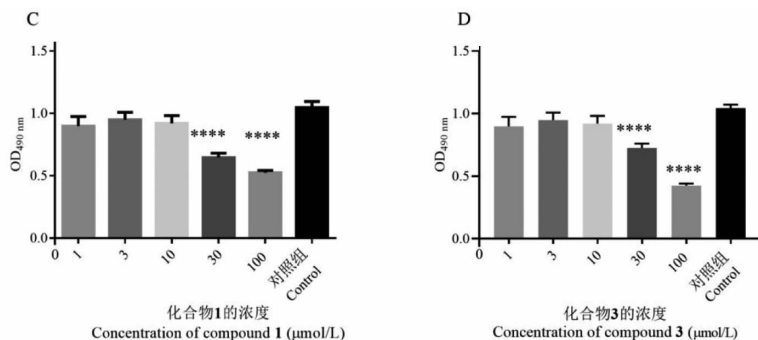


图4 千层塔萃取部位以及化合物1和3对HepG2细胞存活率的影响

Fig. 4 Effects of extractions and compounds 1 and 3 from *H. serrata* on the survival rate of HepG2 cells

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,**** $P < 0.0001$ 。Note:Compared with control group,* $P < 0.05$,**** $P < 0.0001$ 。

系统的分离纯化,对脂肪族类化合物生物活性的筛选得益于康莱特药物的启发。康莱特的有效成分为薏苡仁油,主要为甘油三酯类化合物。因此,我们对分离到的9个脂肪族类化合物进行了抗HepG2细胞活性的筛选,结果显示化合物1和3对HepG2细胞具有抑制作用,IC₅₀分别为41.12、80.54 μmol/L。本研究首次较集中地对千层塔中脂肪族类化合物进行了分离鉴定,在一定程度上丰富了千层塔的化学成分。此外,本实验首次开展了千层塔单体化合物抑制HepG2细胞抑制活性作用研究,为千层塔的植物化学资源合理开发利用提供参考依据,也为千层塔药理研究奠定了基础。

参考文献

- Cao D, Sun P, Sumana B, et al. Secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata* [J]. *Fitoterapia*, 2021, 155:104970.
- Zhu DY, Jiang SH, Huang MF, et al. Huperserratinine from *Huperzia serrata* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 34:1069-1072.
- Yu CM, Calhoun LA, Konder RM, et al. Huperzimine, a novel Lycopodium alkaloid from *Huperzia serrata* [J]. *Can J Chem*, 2014, 92:406-410.
- Yang XJ, Wang C, Jia YP, et al. Chemical constituents from the EtOAc extract of the roots of *Apium graveolens* L. and their cytotoxic activities [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34:1164-1168.
- Zheng KK, Zhao YY, Yuan PL, et al. Chemical constituents of non-alkaloids from *Huperzia serrata* [J]. *Chin Tradit Herb*

Drugs (中草药), 2016, 47:15-20.

- Sun YH, Li WJ, Cui Y, et al. Effects of Kanglaite injection on AFP-L3, AFP, GP73, γ-GGT in patients with primary liver cancer [J]. *J Mod Integr Med* (现代中西医结合杂志), 2020, 29:618-620.
- Alaiz M, Maza MP, Zamora R, et al. Epoxidation of ethyl (Z)-9-(Z)-12-(Z)-15-octadecatrienoate with m-chloroperbenzoic acid [J]. *Chem Phys Lipids*, 1989, 49:221-224.
- Estévez M, Ventanas S, Ramírez R, et al. Analysis of volatiles in porcine liver Ptés with added sage and rosemary essential oils by using SPME-GC-MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52:5168-5174.
- Wu J, Chen X, Su J, et al. Chemical constituents of *Bangia fuscopurpurea* [J]. *Chem Nat Compd*, 2019, 55:528-530.
- Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Negi AS, et al. Bioguided isolation and antiproliferative activity of constituents from *Smilax korthalsii* ADC leaves [J]. *J Chin Chem Soc*, 2016, 63:562-571.
- Zhou SY, Hu YJ, Meng FC, et al. Bacillamidins A-G from a marine-derived *Bacillus pumilus* [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16:326.
- Wang S, Zhang A. Facile and efficient syntheses of (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-nonadecatriene and homologues: pheromone and attractant components of Lepidoptera [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55:6929-6932.
- Wei W. Chemical constituents from Chuanxiong Rhizoma in standardization implantation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48:3017-3025.