

• 化学成分 •

土荆皮抗真菌化学成分研究

徐云辉¹, 张 帅², 张 念¹, 孔德云¹, 华茉莉^{1*}

1. 上海医药工业研究院 创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200040

2. 郑州市儿童医院, 河南 郑州 450053

摘要: **目的** 对土荆皮 *Pseudolaricis Cortex* 抗真菌活性部位进行化学成分研究。**方法** 土荆皮粗粉以 95%乙醇回流提取, 所得浸膏采用溶剂法分为不同提取部位, 体外抗真菌活性测试显示其醋酸乙酯部位对白色念珠菌具有显著的抑制作用。采用硅胶、Sephadex LH-20、制备高效液相色谱对土荆皮醋酸乙酯部位进行分离纯化, 并通过波谱数据分析对化合物进行结构鉴定。**结果** 从土荆皮醋酸乙酯部位分离得到 5 个化合物, 分别鉴定为土荆皮酸 B (1)、土荆皮酸 C (2)、香草酸 (3)、香草酸-4-*O*- β -D-阿洛糖苷 (4)、17-羟基土荆皮酸 B (5)。**结论** 化合物 5 为一新化合物, 命名为土荆皮酸 I; 化合物 4 为首次从该植物中分离得到。体外抗真菌活性测试显示, 化合物 1 对白色念珠菌生长具有显著的抑制作用, 化合物 2 和 5 仅显示微弱的抑菌活性。

关键词: 土荆皮; 土荆皮酸 I; 土荆皮酸 B; 香草酸 4-*O*- β -D-阿洛糖苷; 抗真菌

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)02-0220-03

Antifungal constituents of *Pseudolaricis Cortex*XU Yun-hui¹, ZHANG Shuai², ZHANG Nian¹, KONG De-yun¹, HUA Mo-li¹

1. State Key Laboratory of New Drug & Pharmaceutical Shanghai Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

2. Children's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 430053, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from *Pseudolaricis Cortex* with antifungal activities. **Methods** The crude powder of *Pseudolaricis Cortex* was refluxed with 95% ethanol and different fractions were obtained with different solvents. *In vitro* antifungal results revealed that EtOAc fraction showed inhibitory effects on *Candida albicans*. Compounds were isolated by column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, and preparative HPLC from EtOAc fraction of *Pseudolaricis Cortex* and their structures were elucidated mainly by spectral data. **Results** Five compounds were identified as pseudolaric acid B (1), pseudolaric acid C (2), vanillic acid (3), vanillic acid-4-*O*- β -D-allopyranoside (4), and 17-hydroxypseudolaric acid B (5), respectively. **Conclusion** Compound 5 is a new compound named pseudolaric acid I, and compound 4 is isolated from this plant for the first time. Compound 1 shows stronger activity against the growth of *Candida albicans*, while compounds 2 and 5 have weak antifungal activities *in vitro*.

Key words: *Pseudolaricis Cortex*; pseudolaric acid I; pseudolaric acid B; vanillic acid-4-*O*- β -D-allopyranoside; antifungal

土荆皮为松科植物金钱松 *Pseudolarix kaempferi* Gord. 的根皮或近根树皮, 又称土槿皮、金钱松皮等, 具有祛风除湿、杀虫止痒之功效, 主要用于疥癣瘙痒。迄今, 从土荆皮分离得到的化学成分包括二萜类、三萜类、木脂素类、倍半萜类等^[1-2], 其中抗真菌活性成分除土荆皮酸 B (pseudolaric acid B) 较为明确^[3]外, 其他化学成分相关研究较少报道。本研究基于体外抗真菌活性测试筛选出的土荆皮抗真菌活性部位, 即醋酸乙酯部位, 采用多种色谱方

法开展化学成分研究, 分离得到 5 个化合物, 依据其理化性质及波谱数据分别鉴定为土荆皮酸 B (pseudolaric acid B, 1)、土荆皮酸 C (pseudolaric acid C, 2)、香草酸 (vanillic acid, 3)、香草酸 4-*O*- β -D-阿洛糖苷 (vanillic acid-4-*O*- β -D-allopyranoside, 4)、17-羟基土荆皮酸 B (17-hydroxypseudolaric acid B, 5)。其中化合物 5 为一新化合物, 命名为土荆皮酸 I (pseudolaric acid I); 化合物 4 为首次从该植物中分离得到。

收稿日期: 2011-10-28

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09301-007); 上海市科学技术委员会国际科技合作基金项目 (09540704500)

*通讯作者 华茉莉 Tel: (021)62479808-730 E-mail: huamoli@sh163.net

1 材料与仪器

Inova—400 核磁共振仪 (Varian 公司); DRX—500 核磁共振仪 (Bruker 公司); MSD—Trap—XCT, Q—TOF micro (ESI-MS) 型质谱仪 (Agilent 公司); RY—2 熔点测定仪 (天津分析仪器厂); WFH—203 三用紫外分析仪 (上海精科实业有限公司); Waters 高效液相色谱仪 (2487 检测器, 1525 二元泵); 硅胶 H (烟台芝罘黄务硅胶开发试验厂); Sephadex LH-20 凝胶 (安发玛西亚生物技术有限公司); P—2000 旋光仪 (JASCO)。

土荆皮购于上海雷允上中药饮片厂, 经上海医药工业研究院吴彤研究员鉴定为金钱松科植物金钱松 *Pseudolarix kaempferi* Gord. 的根皮。

白色念珠菌为上海医药工业研究院生物部保藏菌种。

2 提取与分离

干燥土荆皮药材 (10 kg), 粉碎, 以 95%乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩得稠浸膏 (650 g), 浸膏以甲醇超声溶解后, 以粗硅胶 (100~200 目) 拌样, 依次以石油醚 (60~90℃)、

醋酸乙酯、甲醇超声提取, 甲醇提取液浓缩后以水分散, 用水饱和正丁醇萃取, 由此分别得到石油醚、醋酸乙酯、正丁醇及甲醇提取部位。

醋酸乙酯提取部位 (122.5 g) 经硅胶柱色谱 (200~300 目), 石油醚-醋酸乙酯-甲醇梯度洗脱, 得到 9 个流分 (Fr. 1~9)。Fr. 1、Fr. 2 经反复硅胶和 Sephadex LH-20 凝胶色谱, 得到化合物 **1** (501.3 mg)、**2** (10.5 mg) 和 **3** (15.7 mg), Fr. 4 经反复硅胶和凝胶色谱, 得到化合物 **4** (20.5 mg), Fr. 7 经反复硅胶和凝胶色谱, 最终由制备液相色谱得到化合物 **5** (8.3 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, 溶于甲醇, 5%硫酸乙醇显色呈灰蓝色; ESI-MS m/z : 455.15 $[M+Na]^+$, 431.16 $[M-H]^-$, 分子式 $C_{23}H_{28}O_8$, 不饱和度 10。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 数据见表 1, 与文献数据对比^[3], 并用薄层色谱法与土荆皮酸 B 对照品对照, Rf 值一致, 故鉴定化合物 **1** 为土荆皮酸 B。

化合物 **2**: 无色针晶, 溶于甲醇, mp 193~194℃; 5%硫酸乙醇显色呈灰蓝色; ESI-MS m/z : 413.14

表 1 化合物 **5** 的 1H -NMR and ^{13}C -NMR 及化合物 **1** 的 1H -NMR 数据

Table 1 1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound **5** and 1H -NMR data of compound **1**

碳位	化合物 1	化合物 5	
	δ_H	δ_H	δ_C
1	1.75 (2H, m)	1.75 (2H, brs)	32.7
2	1.67 (2H, m)	1.66 (2H, m)	23.9
3	3.23 (1H, m)	3.22 (1H, brs)	48.8
4			88.9
5	2.97 (1H, m), 1.60 (1H, m)	2.95 (1H, m), 1.59 (1H, m)	30.3
6	2.71 (1H, m), 2.16 (1H, m)	2.71 (1H, m), 2.18 (1H, m)	19.8
7			133.8
8	7.04 (1H, m)	7.05 (1H, m)	141.9
9	2.61 (2H, m)	2.62 (2H, m)	27.4
10			54.8
11			83.6
12	1.53 (3H, s)	1.52 (3H, s)	27.7
13	6.22 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)	6.23 (1H, d, $J = 15.0$ Hz)	144.8
14	6.37 (1H, dd, $J = 15.6, 11.2$ Hz)	6.53 (1H, dd, $J = 15.0, 11.5$ Hz)	120.7
15	7.11 (1H, d, $J = 11.2$ Hz)	7.09 (1H, m)	137.1
16			129.7
17	1.83 (3H, s)	4.18 (2H, s)	55.6
18			169.4
19			167.3
20			172.3
21	3.65 (3H, s)	3.65 (3H, s)	51.9
22			169.4
23	2.12 (3H, s)	2.13 (3H, s)	21.5

$[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.13 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-15), 7.01 (1H, m, H-8), 6.33 (1H, dd, $J = 14.8, 11.2$ Hz, H-14), 6.20 (1H, d, $J = 14.8$ Hz, H-13), 3.65 (3H, s, -OCH₃), 1.83 (3H, s, CH₃-17), 1.49 (3H, s, CH₃-12)。光谱数据与文献报道一致^[3], 故鉴定化合物 **2** 为土荆皮酸 C。

化合物 **3**: 白色无定形粉末, 溶于甲醇; ESI-MS m/z : 167.07 $[M-H]^-$, 分子式 C₈H₈O₄。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.20 (1H, brs, 1-COOH), 7.45 (2H, m, H-2, 6), 6.84 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 3.82 (3H, s, 3-OCH₃)。与文献数据对比^[4], 并用薄层色谱法与香草酸对照品对照, R_f 值一致, 故鉴定化合物 **3** 为香草酸。

化合物 **4**: 无色针状结晶, 溶于甲醇, mp 193~194 °C; ESI-MS m/z : 353.15 $[M+Na]^+$, 分子式 C₁₄H₁₈O₉。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.52 (1H, dd, $J = 2.0, 7.5$ Hz, H-6), 7.47 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.10 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5), 5.24 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 3.92 (1H, m, H-6'), 3.80 (3H, s, 3-OCH₃), 3.70 (1H, m, H-5'), 3.66 (1H, m, H-6'), 3.64 (1H, m, H-6'), 3.46 (1H, m, H-4'), 3.43 (1H, m, H-2'); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 124.5 (C-1), 112.6 (C-2), 148.4 (C-3), 150.3 (C-4), 114.0 (C-5), 122.6 (C-6), 167.3 (C-7), 55.6 (3-OCH₃), 97.8 (C-1'), 74.7 (C-2'), 71.6 (C-3'), 66.9 (C-4'), 70.1 (C-5'), 60.8 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 **4** 为香草酸-4- β -D-阿洛糖苷。

化合物 **5**: 白色粉末, 溶于甲醇, 5%硫酸乙醇显色呈灰蓝色; $[\alpha]_D^{20} -23$ (c 0.319, MeOH), ESI-MS m/z : 471.22 $[M+Na]^+$, 487.20 $[M+K]^+$, 高分辨 ESI-MS m/z : 471.163 5 $[M+Na]^+$, 推断分子式为 C₂₃H₂₈O₉。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) 和 ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) 具体数据见表 1。

与土荆皮酸 B 的实测氢谱数据及文献报道碳谱数据^[3]比较, 片段 A (图 1) 部分数据基本一致, HMBC 谱 (图 2) 显示 δ_C 54.8 与 δ_H 7.05 (H-8), 2.95 (H-5), 2.62 (H-9), 1.75 (H-1) 有远程相关, 可以确定为母核 C-10; 片段 B (图 1) 中, C-13, 14, 15, 16, 18 的氢谱数据接近, 但化合物 **5** 无 C-17 的甲基信号峰 δ_H 1.83 (3H, s), 其 HSQC 谱显示 δ_C 55.6 与 δ_H 4.18 (2H) 相关, HMBC 谱显示 δ_C 55.6 与 δ_H 7.09 (H-15) 相关, NOESY 谱未显示 NOE 信号, 1H - 1H COSY 谱

显示 H-14 与 H-13 及 H-15 相关, 化合物 **5** 的结构见图 2, 经检索证实为一新化合物, 命名为土荆皮酸 I。

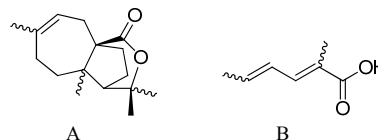


图 1 片段 A 和片段 B 的结构

Fig. 1 Structures of segments A and B

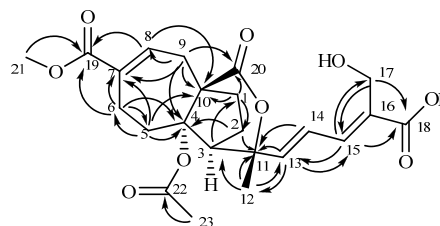


图 2 化合物 5 的结构及其主要 HMBC 相关

Fig. 2 Structure and key HMBC correlations of compound 5

4 体外抗真菌活性测试

取化合物 **1**、**2**、**5**, 分别以甲醇溶解, 配制成 1 mg/mL 的供试品溶液, 备用。

采用纸片扩散法进行体外抗真菌活性测试, 分别吸取各供试品溶液 20、40、80 μ L 于纸敏片 (直径 6 mm) 上, 吹干后贴在白色念珠菌培养基平板上, 盖上陶瓦盖, 同时设空白对照, 置于 28 °C 培养箱内培养 20 h, 测量其抑菌圈直径。结果显示化合物 **1** 对白色念珠菌生长具有显著的抑制作用, 抑菌圈直径达 10~22 mm, 化合物 **2** 及化合物 **5** 仅显示微弱抑菌活性。

参考文献

- [1] Yang S P, Wu Y, Yue J M. Five new diterpenoids from *Pseudolarix kaempferi* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(7): 1041-1044.
- [2] 冯苏秀, 郭洪祝, 刘 鹏, 等. 土荆皮化学成分研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(1): 10-12.
- [3] Li E, Clark A M, Hufford C D. Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, a major constituent of *Pseudolarix kaempferi* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(1): 57-67.
- [4] Sang S, Lapsley K, Jeong W S, et al. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(8): 2459-2463.
- [5] 王光凤, 李 燕, 吴 彤, 等. 藤香树茎藤中一个新酚苷的结构鉴定 [J]. *中草药*, 2006, 37(9): 1293-1295.