

• 化学成分 •

香鳞毛蕨中 1 对间苯三酚类同分异构体的分离与抗真菌活性研究

陈文浩¹, 宋国强¹, 贾小舟¹, 唐春萍¹, 冯淡开², 沈志滨^{1*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东恒健制药有限公司, 广东 江门 529040

摘要: 目的 分离香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* 的间苯三酚类化合物并探讨其抗真菌活性。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶和制备 HPLC 等技术进行化学成分分离, 根据理化性质和波谱数据鉴定化合物结构。采用美国临床实验室标准研究所 (CLSI) 制定的 M38-A2 方案 (微量稀释法) 研究化合物对红色毛癣菌和石膏样小孢子菌的抗真菌活性。结果 从香鳞毛蕨中分离得到 1 对间苯三酚类同分异构体异黄绵马酸 PB (1)、黄绵马酸 PB (2)。化合物 1 和 2 对红色毛癣菌的最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 13.33 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.875 $\mu\text{g/mL}$, 对石膏样小孢子菌的 MIC 分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.325 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为异黄绵马酸 PB。化合物 2 首次从该植物中分离得到。化合物 1 和 2 互为同分异构体, 且对红色毛癣菌和石膏样小孢子菌均有较好的抑制作用。

关键词: 香鳞毛蕨; 间苯三酚衍生物; 异黄绵马酸 PB; 黄绵马酸 PB; 抗真菌活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)03-0433-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.003

Isolation and antifungal activities of a pair of isomers of phloroglucinol derivatives from *Dryopteris fragrans*CHEN Wen-hao¹, SONG Guo-qiang¹, JIA Xiao-zhou¹, TANG Chun-ping¹, FENG Dan-kai², SHEN Zhi-bin¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Hengjian Pharmaceutical Limited Company, Jiangmen 529040, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents and antifungal activity of phloroglucinol derivatives from *Dryopteris fragrans*. **Methods** The phloroglucinol derivatives were isolated by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and pre-HPLC. The chemical structures were elucidated on the basis of physicochemical and spectral properties. The antifungal activities against *Trichophyton rubrum* and *Microsporum gypseum* were tested by CLSI M38-A2 broth microdilution methods. **Results** Two phloroglucinol derivatives were isolated and identified as disflavaspic acid PB (1) and flavaspic acid PB (2). The minimum inhibitory concentration (MIC) of compounds 1 and 2 were 13.33 and 1.875 $\mu\text{g/mL}$ against *T. rubrum* respectively, 10 and 1.325 $\mu\text{g/mL}$ against *M. gypseum*. **Conclusion** Compound 1 is a new compound named disflavaspic acid PB. Compound 2 is isolated from *D. fragrans* for the first time. Compounds 1 and 2 are a pair of isomers with promising antifungal activity.

Key words: *Dryopteris fragrans* (L.) Schott; phloroglucinol derivant; disflavaspic acid PB; flavaspic acid PB; antifungal activity

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott 是鳞毛蕨科 (Dryopteridaceae) 鳞毛蕨属 *Dryopteris* Adanson 植物, 主要分布在中国东北地区, 俄罗斯、日本、欧洲、韩国也有分布^[1]。根据民间验方记载, 其对多种皮肤病疗效显著, 特别是对由真菌引起的脚气、

脚癣等, 因此被视为“皮肤病的克星”^[2-3]。

化学成分研究表明, 香鳞毛蕨的主要化学成分包括间苯三酚类、萜类、黄酮类、苯丙素类、挥发油类等^[4-9]。本课题组前期研究显示香鳞毛蕨乙醇部位为抗真菌有效部位, 且抗菌活性与其中的间苯三

收稿日期: 2016-07-22

基金项目: 广东省应用型科技研发专项 (2015B020234009)

作者简介: 陈文浩 (1990—), 男, 2014 级硕士研究生。E-mail: 564743559@qq.com

*通信作者 沈志滨 (1964—), 女, 博士, 教授, 从事中药及复方化学成分研究。E-mail: szb8113@126.com

酚的量直接相关^[10]。因此,本实验对香鳞毛蕨中的间苯三酚类化合物进行富集、分离及抗真菌活性研究。从中分离并鉴定出 1 对间苯三酚类同分异构体,分别鉴定为异黄绵马酸 PB(disflavaspidic acid PB, **1**)、黄绵马酸 PB(flavaspidic acid PB, **2**)。化合物 **1** 为新化合物,命名为异黄绵马酸 PB。化合物 **2** 首次从该植物中分离得到。化合物 **1** 和 **2** 互为同分异构体,对红色毛癣菌和石膏样小孢子菌均有较好抑制作用。

1 仪器与材料

Waters ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(含 QSM 四元溶剂管理器、SM-FTN 样品管理器、PDA 二极管阵列检测器及 Empower 3 工作站,美国 Waters 公司);LC-6AD 型半制备液相色谱仪(SPD-20A 检测器,日本岛津公司);LCQTM DECA 离子阱质谱仪(美国 Thermo-Finnigan 公司);Varian UNITY INOVA 500 型超导脉冲傅里叶变换核磁共振仪(美国 Varian 公司);Zf20D 暗箱式紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂);YOKO-XR 显色加热器(武汉药科新技术开发公司);X-5 显微熔点测定仪(巩义市科瑞仪器有限公司)。

柱色谱硅胶(青岛海洋化工有限公司);Sephadex LH-20 型凝胶(Pharmacia 公司);羧甲基纤维素钠(广东汕头市西陇化工厂);固兰 BB 盐(上海化学试剂厂);乙醇、正己烷、丙酮、甲酸、醋酸乙酯等均为分析纯。

香鳞毛蕨采自黑龙江省五大连池,经哈尔滨商业大学药学院张德连副教授鉴定为鳞毛蕨属植物香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott。标本

(XLMJ20130406)存放于广东药科大学中药学院标本室。

2 提取与分离

将香鳞毛蕨全株干燥粗粉 10 kg 用 10 倍体积分数为 50% 的乙醇回流提取 3 次,时间分别为 2、1.5、1.5 h,减压浓缩回收乙醇至无醇味得样品水溶液,用质量分数为 10% 的稀盐酸调节 pH 为 2.4,静置至完全沉淀后,离心得浸膏 1.2 kg。将样品用醋酸乙酯和甲醇溶解后,用硅胶(60~100 目)拌样,进行硅胶柱色谱初步分离,依次采用不同比例的石油醚-丙酮(100:1、70:1、50:1、30:1、10:1、1:1)洗脱,各流分经过 TLC 检识,合并相似流分,得到组分 A(96 g)、B(320 g)、C(60 g)、D(305 g)、E(160 g)、F(100 g)。

取组分 C 经反复硅胶柱色谱分离,石油醚-丙酮(80:1→30:1)梯度洗脱,TLC 检识后合并相似流分,结合凝胶 Sephadex LH-20 柱纯化,氯仿-甲醇(1:1)洗脱,重结晶,得淡黄色结晶,再用制备 HPLC 分离制备得到化合物 **1**(18 mg)和 **2**(37 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色针状结晶(丙酮),UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 298, GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析,喷以质量分数为 0.3% 的固蓝 BB 盐溶液,105 °C 显色为红色斑点。ESI-MS m/z : 433.187 2 $[M+H]^+$, 分子式为 C₂₃H₂₈O₈。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 743, 3 576 (羟基和酚羟基); 3 438 (分子间氢键伸缩振动); 2 979 (-CH₃), 2 927, 2 867 (-CH₂-); 1 641, 1 604, 1 464, 1 424 (苯环)。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 和 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 具体数据见表 1。

表 1 化合物 **1** 的波谱数据
Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data of compound **1**

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	—	187.5	1'	—	111.2
2	—	108.0	2'	—	155.6
3	—	198.1	3'	—	102.2
4	—	44.1	4'	—	161.5
5	—	171.8	5'	—	106.0
6	—	106.5	6'	—	160.4
7	1.45 (3H, brs)	24.3	7'	2.11 (3H, s)	7.7
8	1.53 (3H, brs)	25.2	8'	—	211.1
9	—	207.4	9'	3.96 (1H, m)	39.0
10	3.24 (2H, q, $J=7.5$ Hz)	34.8	10'	1.21 (3H, d, $J=7.5$ Hz)	19.3
11	1.19 (3H, t, $J=7.5$ Hz)	8.6	11'	1.21 (3H, d, $J=7.5$ Hz)	19.3
1''	3.54 (2H, s)	17.0	2'-OH	10.1 (1H, s)	
3-OH	11.5 (1H, s)		4'-OH	16.1 (1H, s)	
5-OH	10.6 (1H, s)		6'-OH	15.6 (1H, s)	

该化合物与黄绵马酸 PB 具有相似结构^[11], 仅与绵马酚酸环的 5'位取代基存在差异。对比文献报道^[12]可知, ¹H-NMR 谱给出的双峰甲基信号 δ 3.96, 1.21 (3H, d, $J = 7.5$ Hz) 以及 ¹³C-NMR 谱给出的 δ 211.1, 39.0 和 19.3 为连接在绵马酚酸环 5'位的异丁酰基信号。因此, 推断该化合物由异丁酰基取代黄绵马酸 5'位的丁酰基所得。通过 HMQC 谱指认了所有与氢相连的碳信号。从 HMBC 谱中 (图 1), 观察到异丁酰基的 10'位 δ_{H} 1.21 与 8'位的 δ_{C} 211.1、9'位的 δ_{C} 39.0、11'位的 δ_{C} 19.3 具有远程相关。验证了以上推断。检索 Scifinder, 没有发现相关报道, 确认化合物 1 为新化合物, 命名为异黄绵马酸 PB。

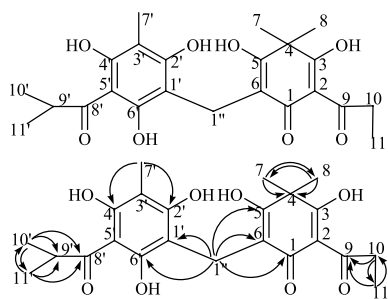


图 1 化合物 1 的结构和重要 HMBC 相关 (H→C)

Fig. 1 Structure and key HMBC correlations (H→C) of compound 1

化合物 2: 淡黄色针状结晶 (丙酮), $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 292, GF_{254} 硅胶薄层色谱, 喷以质量分数为 0.3% 的固蓝 BB 盐溶液 105 °C 显色为红色斑点。ESI-MS m/z : 433.167 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_8$ 。 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 2.11 (3H, s, H-7'), 3.09 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-9'), 1.74 (2H, m, H-10'), 1.00 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11'), 3.54 (2H, brs, H-1''), 1.44 (3H, brs, H-7), 1.53 (3H, brs, H-8), 3.20 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, H-10), 1.77 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 10.1 (1H, s, 2'-OH), 16.1 (1H, s, 4'-OH), 15.6 (1H, s, 6'-OH), 10.6 (1H, s, 5-OH), 11.5 (1H, s, 3-OH); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 111.2 (C-1'), 156.3 (C-2'), 102.2 (C-3'), 161.5 (C-4'), 106.5 (C-5'), 159.9 (C-6'), 7.7 (C-7'), 207.6 (C-8'), 45.9 (C-9'), 18.4 (C-10'), 14.2 (C-11'), 17.3 (C-1''), 187.3 (C-1), 108.4 (C-2), 198.0 (C-3), 44.3 (C-4), 171.7 (C-5), 105.5 (C-6), 24.9 (C-7), 25.1 (C-8), 207.0 (C-9), 35.0 (C-10), 8.6 (C-11)。以上波谱数据与文献报道^[10]一致, 故鉴定化合物 2 为黄绵马酸 PB。

4 体外抗真菌活性评价

4.1 实验菌株

红色毛癣菌 [CMCC(f)T1b]、石膏样小孢子菌 [CMCC(F)M2C], 购于中国医学科学院皮肤研究所。质量控制(QC)株采用近平滑念珠菌(ATCC22019), 购于中国医学科学院皮肤研究所。

4.2 微量稀释法^[13]

参照美国 CLSI 颁布的产孢丝状真菌抗真菌药敏试验方案 (M38-A2) 提供的方法进行。以盐酸特比萘芬为阳性药。用接种环轻刮 SDA 培养基表面菌落, 使用无菌研磨器将菌丝研碎, 将皮肤癣菌悬浮于无菌生理盐水中, 使用血细胞计数板计算孢子数量及短菌丝数, 稀释菌液浓度至 $1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ CFU/mL。用 RPMI 1640 液体培养基稀释化合物 1、2 的贮备液至 20 $\mu\text{g/mL}$ 后加 200 μL 于 96 孔板上的第 1 列, 并用 RPMI 1640 液体培养基进行横向 2 倍稀释至第 10 列, 第 11 列为生长对照孔, 加入 100 μL 液体培养基; 第 12 列为空白对照, 加入 200 μL 液体培养基。然后再于第 1~11 列各孔中加入 100 μL 接种菌液。将 96 孔板置于 35 °C 恒温孵育 7 d, 以肉眼观察, 与生长对照比较对 80% 所测菌株的生长产生抑制的终浓度为 MIC。各菌株按以上操作平行重复测定 4 次, 计算 MIC 的几何均数。

为了明确药敏性试验操作是在可接受的标准内进行, 测试结果可信, 质控 (QC) 株采用近平滑念珠菌 (ATCC22019), QC 药物为氟康唑。

4.3 结果

QC 株的 MIC 在规定的范围内 (1.0~4.0 $\mu\text{g/mL}$)。各受试药物及阳性药物体外抗菌活性测定结果见表 2。

表 2 化合物 1 和 2 对供试菌的 MIC 值

Table 2 MIC of compounds 1 and 2 against tested fungus

化合物	MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	红色毛癣菌	石膏样小孢子菌
1	13.332	10.000
2	1.875	1.325
盐酸特比萘芬	0.032	0.016

5 讨论

考虑到间苯三酚类化合物因带有酚羟基而呈弱酸性, 在提取液中加入稀盐酸调节 pH 值, 使其在溶液中析出从而富集。本课题组目前正在研究这些化合物对其他浅部真菌的抑制作用及分子机制, 以

期为香鳞毛蕨作为民间用药提供理论依据, 为开发新型抗浅部真菌感染药奠定基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [2] 中国科学院植物研究所. 秦岭植物志 (第 2 卷) [M]. 北京: 科技出版社, 1974.
- [3] 殷先君. 香鳞毛蕨治疗 48 例难治性手足癣的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(1): 57-58.
- [4] Zhao D D, Zhao Q S, Liu L. Compounds from *Dryopteris Fragrans* (L.) Schott with cytotoxic activity [J]. *Molecules*, 2014, 19(3): 3345-3355.
- [5] 张彦龙, 付海燕, 张莹莹, 等. 香鳞毛蕨的化学成分及其细胞毒活性 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 648-651.
- [6] 沈志滨, 罗文英, 严优芍, 等. 香鳞毛蕨中萜类化合物的研究 [J]. 中药材, 2006, 29(4): 334-335.
- [7] 朱俊访. 香鳞毛蕨化学成分研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2008.
- [8] 赵丹丹, 张彦龙, 陆欣媛. 香鳞毛蕨中化学成分的研究 [J]. 黑龙江医药, 2006, 5(19): 353-355.
- [9] Kuang H X, Zhang Y L, Li G Y, *et al.* A new phenolic glycoside from the aerial parts of *Dryopteris fragrans* [J]. *Fitoterapia*, 2008, 79(4): 319-320.
- [10] 范华倩, 沈志滨, 陈艳芬, 等. 香鳞毛蕨不同提取液体外抗真菌作用研究 [J]. 中药材, 2012, 35(12): 1981-1985.
- [11] Lee H B, Kim J C, Lee S M. Antibacterial activity of two phloroglucinols, flavaspidic acids AB and PB, from *Dryopteris crassirhizoma* [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(5): 655-659.
- [12] Ishiguro K, Yamaki M, Kashihara M, *et al.* Saroaspidin A, B, and C: additional antibiotic compounds from *Hypericum japonicum* [J]. *Planta Med*, 1987, 53(5): 415-417.
- [13] Clinical and laboratory standards institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi [S]. Approved Standard-Second ed. CLSI Document M38-A2, 2008.