

绵马贯众中间苯三酚类化合物分离及其抑菌活性研究

祁燕¹, 贾小舟³, 郑银丽¹, 唐春萍¹, 沈志滨^{1,2*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省局精准药物递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

3. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 研究绵马贯众 *Dryopteris crassirhizoma* 中间苯三酚类化合物并探讨其抑菌活性。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20、半制备液相及重结晶等方法进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据 (MS、¹H-NMR、¹³C-NMR) 鉴定结构; 采用美国临床实验室标准研究所 (CLSI) 制定的 M38-A2 和 M07-A9 方案分别研究化合物对真菌和细菌的抑菌活性。结果 从绵马贯众 50%乙醇提取物中分离得到 10 个间苯三酚类化合物, 分别鉴定为 1-丁酰基间苯三酚 (1)、1-甲基-3-丁酰基间苯三酚 (2)、2-乙酰基-4-丁酰基间苯三酚 (3)、1-甲基-3-乙酰基-5-丁酰基间苯三酚 (4)、黄绵马酸 PB (5)、异黄绵马酸 AB (6)、异黄绵马酸 AB (6)、黄绵马酸 AA (7)、绵马酸 ABA (8)、黄绵马酸 AB (9)、绵马酸 ABP (10)。化合物 8 对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌表现出与阳性对照头孢西丁相当的抑制活性, 最小抑菌浓度 (MIC) 均达到 2.5 μg/mL。结论 化合物 1~4 首次从绵马贯众中分离得到。化合物 8 对真菌和细菌都有明显的抑菌活性。

关键词: 绵马贯众; 间苯三酚类化合物; 抑菌活性; 1-丁酰基间苯三酚; 绵马酸 ABA; 黄绵马酸 AB

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)23-4860-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.007

Isolation and antibacterial activities of phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma*

QI Yan¹, JIA Xiao-zhou³, ZHENG Yin-li¹, TANG Chun-ping¹, SHEN Zhi-bin^{1,2}

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

2. Guangdong Engineering & Technology Research Center of topical precise drug delivery system, Guangzhou 510006, China

3. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To isolate the phloroglucinol derivatives in *Dryopteris crassirhizoma* and to discuss its antibacterial activity.

Methods The phloroglucinol derivatives were isolated and purified by column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, semi preparative liquid phase, and recrystallization. Structures were proved by physicochemical properties and spectral methods (MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR). The antibacterial activities against fungi and bacteria were tested by CLSI M38-A2 and M07-A9. **Results** 10 derivatives were obtained from ethanol extracts of *D. crassirhizoma*, and were identified as 1-butyrylphloroglucinol (1), 1-methyl-3-butyrylphloroglucinol (2), 2-acetyl-4-butyrylphloroglucinol (3), 1-methyl-3-acetyl-5-butyrylphloroglucinol (4), flavaspidic acid PB (5), norflavaspidic acid AB (6), flavaspidic acid AA (7), filixic acid ABA (8), flavaspidic acid AB (9), and filixic acid ABP (10). The antibacterial activity of compound 8 against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) was similar to cefoxitin (positive control), and the MIC of compound 8 was 2.5 μg/mL. **Conclusion** Compounds 1—4, new compounds, are isolated from *D. crassirhizoma*. Compound 8 has both antibacterial activities against fungi and bacteria.

Key words: *Dryopteris crassirhizoma* Nakai; phloroglucinol derivatives; antibacterial activities; 1-butyrylphloroglucinol; filixic acid ABA; flavaspidic acid AB

收稿日期: 2017-07-10

基金项目: 广东省科技厅应用型研发专项 (2015B020234009); 2015 年国家中医药管理局中医药行业科研专项 (201507004); 广东省普通高等院校重大科研项目 (2016KZDXM039); 广东大学生科技创新培育专项 (攀登计划 51328004)

作者简介: 祁燕 (1988—), 女, 2015 级硕士研究生。E-mail: 583637928@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

绵马贯众为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎及叶柄残基, 主要分布于我国东北 3 省^[1]。临床上常见绵马贯众单方或复方用于治疗癌症肿瘤、流感病毒等疾病。目前绵马贯众的研究主要集中在抗疟、抗肿瘤等方向^[2], 而在抑制真菌、细菌上研究较少, 尤其是对临床常见皮肤癣菌的抑制作用研究较少, 而绵马贯众中间苯三酚类化合物对细菌活性研究未见报道。本实验室前期研究发现, 民间药香鳞毛蕨中的间苯三酚类化合物有较好的抑菌作用, 绵马贯众与香鳞毛蕨是同科同属的植物, 富含间苯三酚类化合物^[3]。因此本实验对绵马贯众中的间苯三酚类化合物进行分离, 从其 50%乙醇提取物中分离得到 10 个此类化合物, 分别鉴定为 1-丁酰基间苯三酚 (1-butrylphloroglucinol, **1**)、1-甲基-3-丁酰基间苯三酚 (2-acetyl-4-butrylphloroglucinol, **2**)、2-乙酰基-4-丁酰基间苯三酚 (2-acetyl-4-butrylphloroglucinol, **3**)、3-甲基-5-乙酰基-1-丁酰基间苯三酚 (1-methyl-3-acetyl-5-butrylphloroglucinol, **4**)、黄绵马酸 PB (flavaspidic acid PB, **5**)、异黄绵马酸 AB (norflavaspidic acid AB, **6**)、黄绵马酸 AA (flavaspidic acid AA, **7**)、绵马酸 ABA (filixic acid ABA, **8**)、黄绵马酸 AB (flavaspidic acid AB, **9**)、绵马酸 ABP (filixic acid ABP, **10**)。并探讨其对真菌和细菌的体外抑菌活性。其中, 化合物 **1**~**4** 为首次从绵马贯众中分离得到。化合物 **8** 对真菌和细菌都有明显的抑菌活性, 尤其对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的最小抑菌浓度 (MIC) 均为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

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); AVANCE AV 500 型核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); N-1100-SB 1200 旋转蒸发仪 (日本 Eyela 东京理化公司); X-5 显微熔点测定仪 (河南巩义市科瑞仪器有限公司)。

柱色谱硅胶、GF₂₅₄ 硅胶预制薄层板 (青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 型凝胶 (Pharmacia 公司); 色谱甲醇 (Ocenpeak 公司); 所用试剂均为分析纯。

绵马贯众 (产地黑龙江, 批号 1403001) 购自河北金木药业有限公司, 经广东药科大学中药学院刘基柱副教授鉴定为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎及叶柄残基, 标本 (1403001) 存放于广东药科大学中药学院标本室。

2 提取与分离

绵马贯众药材 40 kg 粉碎, 用 15 倍 50%乙醇冷浸提取 3 次, 每次 24 h。合并提取液按 1:8 比例浓缩后, 用质量分数为 10%的稀盐酸调节 pH 值为 2.5, 静置完全沉淀后, 离心得到总提物 700 g。总提物用硅胶柱色谱粗分, 经石油醚-丙酮 (100:0 \rightarrow 1:1) 梯度洗脱, 得到 9 个部位 (Fr. 1~9), 将 Fr. 2、5、6、7 再经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮 (100:1 \rightarrow 10:1) 梯度洗脱, 从 Fr. 2 得到组分 A (0.9 g) 和 B (1.32 g), 从 Fr. 5 得到组分 C (1.76 g), 从 Fr. 6 得到组分 D (4.78 g), 从 Fr. 7 得到组分 E (重结晶) 和 F (1.03 g)。组分 A 经凝胶柱色谱, 用丙酮反复重结晶, 得到化合物 **7** (9 mg)。组分 B 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-丙酮 (100:1 \rightarrow 40:1) 梯度洗脱, 得到石油醚-丙酮 (70:1) 洗脱成分经凝胶柱色谱纯化, 氯仿-甲醇 (1:1) 洗脱, 经制备液相 (98%甲醇) 得到化合物 **1** (10 mg) 和 **2** (8 mg)。组分 C 经硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮 (60:1 \rightarrow 50:1) 梯度洗脱并经 TLC 检测合并石油醚-丙酮 (50:1) 洗脱成分, 经凝胶柱色谱纯化, 氯仿-甲醇 (1:1) 洗脱, 经制备液相 (98%甲醇) 得到化合物 **3** (15 mg) 和 **4** (10 mg)。组分 D 经凝胶柱色谱纯化, 氯仿-甲醇 (1:1) 洗脱, 经制备液相 (98%甲醇) 得到化合物 **5** (21 mg) 和 **6** (12 mg)。组分 E 经丙酮重结晶得到化合物 **10** (9 mg)。组分 F 经制备液相 (98%甲醇) 得到化合物 **8** (11 mg) 和 **9** (13 mg), 以上化合物均经 UPLC 检测, 面积归一化法计算, 其质量分数大于 98%。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色无定形粉末 (氯仿), mp 179~181 $^{\circ}\text{C}$, GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3%固蓝 B 显色剂, 显橙红色。ESI-MS m/z : 197 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 C₁₀H₁₂O₄。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.90 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-10), 1.59 (2H, m, H-9), 2.95 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 5.79 (各 2H, s, H-3, 5), 10.31 (1H, s, 4-OH), 12.23 (各 1H, s, 2, 6-OH); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 103.7 (C-1), 164.1

(C-2, 6), 94.6 (C-3, 5), 164.4 (C-4), 205.0 (C-7), 45.0 (C-8), 17.7 (C-9), 13.8 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 故鉴定化合物 **1** 为 1-丁酰基间苯三酚。

化合物 **2**: 浅黄色无定形粉末 (氯仿), GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显橙红色。ESI-MS m/z : 211 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₁H₁₄O₄。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.90 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-10), 1.59 (2H, m, H-9), 1.82 (3H, s, H-11), 2.96 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 5.99 (1H, s, H-3), 10.25 (1H, s, 4-OH), 10.49 (1H, s, 6-OH), 14.01 (1H, s, 2-OH); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 101.3 (C-1), 159.6 (C-2), 93.9 (C-3), 163.4 (C-4), 103.5 (C-5), 162.3 (C-6), 205.0 (C-7), 45.0 (C-8), 17.8 (C-9), 13.8 (C-10), 7.3 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物 **2** 为 1-甲基-3-丁酰基间苯三酚。

化合物 **3**: 浅黄色无定形粉末 (氯仿), GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显橙红色。ESI-MS m/z : 239 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₂H₁₄O₅。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.90 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-10), 1.59 (2H, m, H-9), 2.46 (3H, brs, H-12), 2.97 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 5.89 (1H, s, H-5); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 105.0 (C-1), 160.9 (C-2), 94.6 (C-3), 162.6 (C-4, 6), 103.8 (C-5), 205.3 (C-7, 11), 45.0 (C-8), 17.7 (C-9), 13.8 (C-10), 24.4 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **3** 为 2-乙酰基-4-丁酰基间苯三酚。

化合物 **4**: 浅黄色无定形粉末 (氯仿), GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显橙红色。ESI-MS m/z : 253 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₃H₁₆O₅。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.90 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-10), 1.59 (2H, m, H-9), 3.04 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 2.50 (3H, s, H-12), 2.37 (3H, s, H-13), 6.97 (1H, s, 4-OH), 7.07 (1H, s, 6-OH), 7.17 (1H, s, 2-OH); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 104.4 (C-1), 157.5 (C-2), 102.1 (C-3), 161.1 (C-4,6), 107.3 (C-5), 205.4 (C-7), 45.3 (C-8), 17.9 (C-9), 13.8 (C-10), 199.0 (C-11), 24.8 (C-12), 7.8 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **4** 为 3-甲基-5-乙酰基-1-丁酰基间苯三酚。

化合物 **5**: 浅黄色针状结晶 (丙酮), GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显红色斑点。ESI-MS m/z : 433 [M + H]⁺, 分子式为

C₂₃H₂₈O₈。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.91 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11'), 1.56 (3H, m, H-11), 1.56 (3H, s, H-12), 1.58 (2H, m, H-10'), 1.60 (3H, t, $J = 6.0$ Hz, H-10), 2.40 (3H, s, H-12'), 2.95 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-9'), 3.05 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-9), 3.33 (2H, s, H-7); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 107.2 (C-1), 103.7 (C-1'), 205.1 (C-2), 158.1 (C-2', 4'), 107.6 (C-3), 103.6 (C-3'), 205.6 (C-4), 45.1 (C-5), 106.1 (C-5'), 162.4 (C-6, 6'), 8.9 (C-7), 206.2 (C-8), 205.8 (C-8'), 36.4 (C-9), 45.3 (C-9'), 9.0 (C-10), 17.8 (C-10', 11, 12), 13.8 (C-11'), 0.8 (C-12')。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **5** 为黄绵马酸 PB。

化合物 **6**: 浅黄色无定形粉末 (丙酮), GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显紫红色斑点。ESI-MS m/z : 405 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₁H₂₄O₈。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.91 (3H, q, $J = 7.0$ Hz, H-11'), 1.59 (2H, m, H-10'), 2.95 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-9'), 2.41 (3H, brs, H-9), 1.19 (各 3H, brs, 10, 11-CH₃), 3.35 (2H, s, H-7); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 103.5 (C-1), 103.7 (C-1'), 198.5 (C-2), 158.2 (C-2', 4'), 103.7 (C-3), 103.5 (C-3'), 205.0 (C-4), 45.3 (C-5), 94.1 (C-5'), 163.4 (C-6), 161.6 (C-6'), 6.8 (C-7), 205.2 (C-8), 205.6 (C-8'), 22.4 (C-9), 40.0 (C-9'), 15.8 (C-10), 17.7 (C-10'), 15.8 (C-11), 13.9 (C-11')。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **6** 为异黄绵马酸 AB。

化合物 **7**: 浅黄色针状结晶 (氯仿), GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显橙红色。ESI-MS m/z : 391 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₀H₂₂O₈。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.19 (各 3H, s, H-10, 11), 1.88 (3H, s, H-12'), 2.49 (各 3H, s, H-9, 9'), 3.35 (2H, s, H-7); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 102.5 (C-1), 104.6 (C-1', 3'), 198.8 (C-2), 157.6 (C-2', 4'), 107.0 (C-3), 198.0 (C-4), 45.4 (C-5), 104.6 (C-5'), 160.9 (C-6, 6'), 8.0 (C-7, 12'), 205.8 (C-8, 8'), 24.8 (C-9, 9'), 17.8 (C-10, 11)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **7** 为黄绵马酸 AA。

化合物 **8**: 浅黄色针状结晶 (氯仿), mp 164~166 °C, GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显紫红色斑点。ESI-MS m/z : 614 [M + H]⁺, 分子式为 C₃₂H₃₆O₁₂。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.91 (3H, q, $J = 7.5$ Hz, H-21), 1.15 (各 3H, brs, H-16, 16', 17, 17'), 1.87 (2H, m, H-20), 3.03

(2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-19), 2.36 (各 3H, brs, H-15, 15'), 3.31 (各 2H, s, H-7, 7'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 107.3 (C-1, 1'), 199.0 (C-2, 2', 18), 106.3 (C-3, 3', 12), 161.6 (C-4, 4'), 45.3 (C-5, 5', 19), 157.8 (C-6, 6', 9, 11), 13.8 (C-7, 7', 21), 104.5 (C-8, 10), 161.8 (C-13), 205.6 (C-14, 14'), 21.6 (C-15, 15'), 143.2 (C-16, 16', 17, 17'), 17.8 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **8** 为绵马酸 ABA。

化合物 **9**: 浅黄色的粉末 (氯仿), mp 190~193 °C, GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显紫红色斑点。ESI-MS m/z : 419 [M+H]⁺, 分子式为 C₂₂H₂₆O₈。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.05 (3H, q, $J = 7.0$ Hz, H-11'), 1.87 (2H, m, H-10'), 1.87 (3H, brs, H-9), 3.07 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, H-9'), 2.38 (3H, s, H-12'), 1.16 (各 3H, brs, H-10, 11), 3.33 (2H, s, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 102.2 (C-1), 104.3 (C-1', 3', 5'), 206.2 (C-2, 8, 8'), 157.6 (C-2', 4', 6'), 107.2 (C-3), 198.9 (C-4), 36.7 (C-5, 9'), 161.0 (C-6), 7.9 (C-7, 12'), 8.9 (C-9, 11'), 17.9 (C-10, 10', 11)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **9** 为黄绵马酸 AB。

化合物 **10**: 浅黄色不规则粉末 (正己烷-丙酮), GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱分析, 喷以 0.3% 固蓝 B 显色剂, 显紫红色斑点。ESI-MS m/z : 628 [M+H]⁺, 分子式为 C₃₃H₃₈O₁₂。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.09 (各 3H, m, H-21, 18'), 1.27 (各 3H, s, H-16, 16'), 1.28 (各 3H, s, H-17, 17'), 1.43 (2H, m, H-20), 2.07 (各 2H, m, H-15, 15'), 2.46 (2H, m, H-19), 3.62 (2H, m, H-7), 4.01 (2H, m, H-7'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 105.5 (C-1, 1', 10), 188.9 (C-2, 2'), 106.8 (C-3, 3', 8, 12), 197.5 (C-4, 4', 18), 49.7 (C-5, 5'), 175.5 (C-6, 6', 13), 9.1 (C-7, 7'), 136.5 (C-9, 11), 204.8 (C-14, 14'), 22.4 (C-15, 15'), 14.5 (C-16, 16', 17, 17', 21), 42.2 (C-19), 19.0 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **10** 为绵马酸 ABP。

4 体外抗菌活性评价

4.1 实验菌株

4.1.1 真菌 红色毛癣菌 [*Trichophyton rubrum*, 编号 CMCC(F)T1d]、须癣毛癣菌 [*Trichophyton mentagrophytes*, 编号 CMCC (F) T5c]、石膏样小孢子菌 [*Gyposium microspore bacteria*, 编号 CMCC (F) M2e]、犬小孢子菌 [*Microsporum canis*, 编号 CMCC

(F) M3d]、近平滑念珠菌标准株 [*Candida parapsilosis*, 编号 ATCC 23059], 以上菌株均购于中国医学科学院皮肤研究所 (南京)。

4.1.2 细菌 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 编号 ATCC6538)、绿脓杆菌 (*P. aeruginosa*, 编号 ATCC9027)、金黄色葡萄球菌标准株 (编号 ATCC29213), 购自广东省菌种保藏中心; 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, 编号 ATCC8739)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, 编号 ATCC8739), 由广东药科大学基础学院提供。

4.2 阳性对照药

氟康唑 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 A0414A); 头孢西丁 (江西博莱大药厂有限公司, 批号 YQ160524)。

4.3 方法

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。测定了绵马贯众中间苯三酚类化合物 **1~10** 对真菌的抑制作用。用血细胞计数板进行活菌计数, 调节菌液浓度为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL。各菌株重复平行测定 4 次, 计算 MIC 的几何平均数。采用 M07-A9 方案测定化合物 **1~10** 对细菌的抑制作用。在 35 °C 培养 18~24 h 记录结果, 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。各菌株重复平行测定 4 次, 计算 MIC 的几何平均数。

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, 真菌的质控 (QC) 株采用近平滑念珠菌 (编号 ATCC 23059), 阳性对照药物为氟康唑。细菌的 QC 株采用金黄色葡萄球菌标准株 (编号 ATCC29213), 阳性对照药物为头孢西丁。

4.4 结果与讨论

细菌和真菌实验的 QC 株的 MIC 均在规定的范围内 (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 1 和 2。

由表 1 可知, 不同化合物对 4 种真菌均有一定的抑菌作用, 化合物 **8** 对不同真菌抑菌作用显著, 尤其对犬小孢子菌的最小抑菌浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 化合物 **3** 和 **6** 抑制犬小孢子菌的最小抑菌浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$, 不同化合物对犬小孢子菌的抑菌作用更显著; 由表 2 可见, 不同化合物对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌具有较强的抑菌活性, 对绿脓杆菌和大肠杆菌的抑菌作用较弱。化合物 **8** 对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌抑菌活性与阳性药头孢西丁的

表 1 化合物 1~10 对 4 种真菌的 MIC

Table 1 MIC of compounds 1—10 against four types of fungus

化合物	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	红色毛癣菌	须癣毛癣菌	石膏样小孢子菌	犬小孢子菌
1	>160	>160	>160	>160
2	>160	>160	>160	>160
3	>160	>160	>160	20
4	>160	>160	160	80
5	160	>160	>160	40
6	160	160	>160	20
7	>160	160	80	40
8	40	20	40	10
9	>160	>160	>160	160
10	>160	>160	>160	80
硝酸咪康唑	0.094	4.0	0.25	0.031 25

表 2 化合物 1~10 对 4 种细菌的 MIC

Table 2 MIC of compounds 1—10 against four types of bacteria

化合物	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	绿脓杆菌	大肠杆菌
1	>160	>160	>160	>160
2	80	160	>160	>160
3	80	80	>160	>160
4	160	160	>160	>160
5	40	160	>160	>160
6	20	80	>160	>160
7	>160	>160	>160	>160
8	2.5	2.5	>160	>160
9	160	>160	>160	>160
10	20	20	>160	>160
头孢西丁	4	16	4	8

活性相当, 其 MIC 为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

从实验结果可知, 不同供试菌株对绵马贯众中间苯三酚类化合物的药敏性不同。绵马贯众中间苯三酚类化合物对犬小孢子菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌等菌株的抑菌作用极为显著, 尤其是

化合物 8 对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌有明显的抗菌活性, 在今后的研究中, 可进一步研究其抑菌机制, 为新药的研发奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 任强, 高桂花, 周宋男, 等. 鳞毛蕨属植物化学成分、质量分析及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1188-1198.
- [3] 邓国彤. 绵马贯众化学成分研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [4] Joshi B S, Ravindranath K R. Isolation and identification of two phenolic ketones and a chromone from *Dysophylla stellata* Benth [J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1977(4): 433-436.
- [5] Ma Y, Jiang J C, Tan W H, *et al.* Direct liquefaction of bamboo in ethanol-phenol co-solvent [J]. *Bio Resources*, 2016, 11(4): 9520-9532.
- [6] 陈贯虹, 孔学, 高永超, 等. 间苯三酚乙酰基衍生物合成及生物活性研究 [J]. 广州化工, 2011, 39(17): 32-34.
- [7] Chan J A, Shultis E A, Carr S A, *et al.* Novel phloroglucinols from the plant *Melicope sessiliflora* (Rutaceae) [J]. *J Org Chem*, 1989, 54(9): 2098-2103.
- [8] Noro Y, Okuda K, Shimada H, *et al.* Dryocrossin: A new acylphloroglucinol from *Dryopteris crassirhizoma* [J]. *Phytochemistry*, 1973, 12(6): 1491-1493.
- [9] Lee H B, Kim J C, Lee S M. Antibacterial activity of two phloroglucinols, flavaspidic acids AB and PB, from *dryopteris crassirizome* [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(5): 655-659.
- [10] 陈建新, 曾振灵, 杨运云, 等. 液相色谱-串联质谱法分析绵马贯众抗禽流感病毒活性部位的化学成分 [J]. 质谱学报, 2006, 27(增刊): 118-120.
- [11] 刘钊, 安熙强, 斯建勇, 等. 绵马贯众的活性成分研究 [J]. 西部医学, 2011, 23(12): 2300-2306.
- [12] 陈建新, 曾振灵, 方炳虎, 等. 绵马贯众抗禽流感病毒活性部位的高效液相色谱-质谱法分析 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 623-626.
- [13] Na M K, Jang J P, Min B S, *et al.* Fatty acid synthase inhibitory activity of acylphloroglucinols isolated from *Dryopteris crassirhizoma* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(18): 4738-4742.