

芫花花蕾中一个新的瑞香烷二萜类化合物

杨春霞¹, 关吉利¹, 张蕾^{2*}¹三亚市中医院, 三亚 572000; ²海南医学院第一附属医院, 海口 570102

摘要:为了研究中药芫花(*Daphne genkwa*)的干燥花蕾化学成分及其抑制皮肤病原真菌活性,采用正相硅胶及半制备 HPLC 等多种色谱技术对芫花花蕾 95% 乙醇提取物进行分离纯化得到 2 个瑞香烷型二萜类化合物,并通过 MS、NMR 和 ECD 等波谱技术和文献数据比对鉴定化合物结构,分别为 daphgenin A(**1**)和 yuanhuakine B(**2**),其中化合物 **1** 为新的瑞香烷型二萜类化合物。同时,结合 MIC 法测定该化合物对皮肤真菌犬小孢子菌、红色毛癣菌、须癣毛癣菌和马拉色菌的抑制活性,结果表明化合物 **1** 和 **2** 对皮肤病原真菌有一定的抑制活性,化合物 **1** 对红色毛癣菌和须癣毛癣菌的抑制活性与阳性对照组相当(MIC 值 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),化合物 **2** 对红色毛癣菌显示显著的抑制活性,其 MIC 值为 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词:芫花;化学成分;瑞香烷型二萜;抗皮肤真菌活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)4-0602-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.4.006

A new daphnane diterpenoid from the flower buds of *Daphne genkwa*YANG Chun-xia¹, GUAN Ji-li¹, ZHANG Lei^{2*}¹Sanya Traditional Chinese Medicine Hospital, Sanya 572000, China;²The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, China

Abstract: To study the chemical constituents and their anti-dermatophyte activities of *Daphne genkwa*. Two daphnane diterpenoid derivatives were isolated from the 95% ethanol extract of *Daphne genkwa* using various column chromatography, such as silica gel and preparative HPLC. And the structures were identified by NMR, MS, and ECD spectroscopic techniques, as well as comparison with literatures. Compound **1** was a new daphnane diterpenoid compound, and named as daphgenin A (**1**), compound **2** was identified as yuanhuakine B (**2**). The anti-dermatophyte activities of the obtained compounds against *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Malassezia restricta* were evaluated by MIC method. The results showed that compounds **1** and **2** displayed certain inhibitory activity against dermatogenic fungi. The inhibitory activities of **1** against *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* with MIC value 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, were equivalent to that of the positive control group, and compound **2** showed significant inhibitory activity against *T. rubrum* with MIC value 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words: *Daphne genkwa*; chemical composition; daphnane diterpenoid; anti-dermatophyte activities

芫花为瑞香科 Thymelaeaceae 瑞香属 *Daphne* Linn. 落叶灌木芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾,又名药鱼草、老鼠花、闹鱼花、头痛花、闷头花、蜀桑、鱼毒,主要分布于我国长江流域诸省及黄河流域的部分地区^[1,2]。《中国药典》记载芫花味苦、辛,性温;有毒,用于水肿胀满、胸腹积水、痰饮积聚、气逆喘咳、二便不利,外用治疗疥癣秃疮、冻

疮^[3]。现代化学成分及药理活性研究表明,芫花含有黄酮、香豆素、木质素、瑞香烷型二萜、甾醇等丰富的化学结构,具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、抗惊厥、兴奋子宫、抗生育、调节免疫功能等广泛的生理活性^[4-8]。而其外用治疗疥癣秃疮、冻疮等皮肤疾病的相关研究和报道较少。鉴于中药芫花花蕾可能对人皮肤病原真菌具有一定的抗性,作者对芫花花蕾 95% 乙醇提取物的化学成分进行研究,以期从中分离鉴定出具有抗皮肤病原真菌活性的天然先导分子,为中药芫花花蕾的抗皮肤病原菌药物的开发和利用提供基础数据。

收稿日期:2022-09-21

接受日期:2023-01-04

基金项目:海南省卫生计生行业科研项目(16A200077)

* 通信作者 E-mail: zhanglei898189@163.com

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Bruker-AVANCE600 NMR 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);高分辨质谱仪 Q-TOF(美国 Waters 公司);Chirascan CD 圆二色谱仪(英国应用光物理公司);SGW-1 自动旋光仪(上海精科物光仪器有限公司);P3000 型高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司);制备型 C₁₈ 色谱柱:5 μm, 250 mm × 10 mm(日本 YMC 公司);柱色谱硅胶(200~300 目)及硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(青岛海洋化工有限公司);水(杭州娃哈哈集团有限公司),常规试剂甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇均为国产分析纯。

1.2 植物材料

药材采购于河北安国药材市场,由海南医学院药学院李慧研究员鉴定为瑞香科植物茺花 *D. genkwa* 的干燥花蕾,标本(DG20191008)存贮于海南医学院中药室标本馆。

1.3 实验方法

1.3.1 提取与分离

干燥茺花花蕾 2.5 kg,采用 95% 乙醇冷浸提取 3 次(每次 7 d),过滤,减压回收溶剂,浓缩后得总浸膏 205.5 g。所得总浸膏用适量水混悬,依次用石油醚(60~90 °C)、乙酸乙酯、正丁醇反复萃取,减压浓缩得到石油醚部位 44.6 g,乙酸乙酯部位 52.5 g,正丁醇部位 80.9 g。取石油醚部位经硅胶柱层析,用石油醚-乙酸乙酯及乙酸乙酯-甲醇溶剂系统进行梯度洗脱得 10 个流分(Fr. A~Fr. J)。Fr. B 经硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱(90:1→0:100)得 6 个流分(Fr. B1~Fr. B6)。Fr. B3 经反相 C₁₈ 柱层析,以乙醇-水梯度洗脱(30:70→90:10)得 4 个流分(Fr. B3-1~Fr. B3-4)。Fr. B3-4 经半制备高效液相色谱(CH₃OH:H₂O=80:20, 2.0 mL/min)分离纯化得到化合物 **1**(4.3 mg, *t_R* 23.4 min)。Fr. B2 经半制备高效液相色谱(CH₃OH:H₂O=85:15, 2.0 mL/min)分离纯化得到化合物 **2**(8.8 mg, *t_R* = 26.6 min)。

1.3.2 抗皮肤真菌活性筛选

供试菌株犬小孢子菌 *Microsporum canis* Bodin、红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum* (Castellani) Sabouraud、须癣毛癣菌 *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Blanchard 和马拉色菌 *Malassezia restricta* E. Guého, J. Guillot et Midgley, 由三亚市中医院获得。参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and

Laboratory Standards Institute, CLSI) 制定的方案,采用微量倍比稀释法测定试药对真菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值^[9-11]。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末,易溶于甲醇、氯仿等有机试剂, $[\alpha]_D^{25} + 48.8$ (c 0.25, MeOH)。通过 HR-ESI-MS: *m/z* 665.295 7 [M + H]⁺ (calcd for C₃₇H₄₅O₁₁, 665.296 2), 推测化合物 **1** 的分子式为 C₃₇H₄₄O₁₁, 计算其不饱和度为 16。UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 240 (3.85) nm; IR (KBr) ν_{max} 345 0, 1692 cm⁻¹; 表明该化合物结构中存在羟基和共轭羰基等官能团。化合物 **1** 的 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) (见表 1) 谱中显示 4 个甲基氢信号: δ_H 0.91 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-10''), 1.85 (3H, s, H-17), 1.37 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-18) 和 1.80 (3H, s, H-19); 1 个末端双键: δ_H 5.01 (1H, s, H-16a) 和 4.97 (1H, s, H-16b); 以及 5 个芳香质子信号: δ_H 7.93 (2H, dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, H-3'/7'), 7.47 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-4'/6'), 7.59 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-5')。结合 ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) (见表 1) 和 HSQC 图谱, 该化合物显示 37 个碳信号, 包括 4 个特征性甲基碳信号 δ_C 13.9 (C-10''), 19.0 (C-17), 18.3 (C-18) 和 10.1 (C-19); 1 个末端烯碳信号 δ_C 113.9 (C-16); 12 个双键碳信号 δ_C 123.5 ~ 159.7; 2 个羰基碳信号 δ_C 165.2 (C-1') 和 209.1 (C-3)。16 个不饱和度由一个酮羰基, 一个苯甲酰基, 五个双键以及多个多元环组成。

综合比较 1D NMR 数据和 2D NMR 谱图(见图 1), 化合物 **1** 与 daphgenkins A~G 具有相同的瑞香烷型二萜类骨架^[12]。在 HMBC 谱图中显示(见图 1), H-3'/H-7' 与 C-1' 相关, H-12 (δ_H 5.22) 与 C-1' 相关, 表明 C-12 位有苯甲酰基取代; H-2'' (δ_H 5.72)/H-3''' (δ_H 6.72) 与 C-1'' (δ_C 116.8) 相关, 提示脂肪链连接在 C-1'' 位; 末端烯氢 H-16 与 C-15 (δ_C 143.2)/C-13 (δ_C 83.9) 相关, 以及 H₃-17 与 C-15 相关, 表明异烯丙基连接在 C-13 位; H-20 (δ_H 3.98, 4.24) 与 C-5 (δ_C 81.9)/C-6 (δ_C 78.6) 相关, 表明 C-6 位有羟甲基取代; H₃-19 与 C-1 (δ_C 159.7)/C-2 (δ_C 137.3)/C-3 相关, 表明 C-2 位有甲基取代。进一步分析 2D NMR 谱图(见图 1), 发现化合物 **1** 与已知化合物 yuanhuakine B^[13] 具有非常相似的结构, 主要不同在于 C-6''/C-7'' 位存在双键。化合物 **1** 中 δ_C 128.5 (C-6''), 137.7 (C-7'') 与化合物 yuanhuakine

B 中 δ_C 32.8 (C-6''), 28.8 (C-7'') 的碳化学位移相比, 向低场显著迁移, 结合该化合物的分子量以及

2D NMR 相关性, 表明化合物 **1** 中 C-6''/C-7'' 位有双键存在。

表 1 化合物 **1** 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (600 和 150 MHz, CDCl_3)

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR data of compound **1** (600 and 150 MHz, CDCl_3)

No.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	No.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	7.63, s	159.7	1'	-	165.2
2	-	137.3	2'	-	129.7
3	-	209.1	3'/7'	7.93, dd(7.8, 1.2)	129.6
4	-	73.7	4'/6'	7.47, t(7.8)	128.9
5	3.92, s	81.9	5'	7.59, t(7.8)	133.7
6	-	78.6	1''	-	116.8
7	4.32, d(9.6)	68.2	2''	5.72, d(15.6)	123.5
8	2.74, dd(9.6, 3.0)	36.4	3''	6.72, dd(15.0, 7.8)	135.0
9	-	77.6	4''	6.09, m	130.3
10	3.02, s	50.4	5''	6.34, dt(15.0, 10.8)	137.1
11	2.80, q(7.2)	43.3	6''	6.13, m	128.5
12	5.22, s	79.0	7''	5.79, m	137.7
13	-	83.9	8''	2.09, dd(14.4, 7.2)	35.1
14	5.25, d(3.0)	76.4	9''	1.43, m; 1.30, m	22.5
15	-	143.2	10''	0.91, t(7.2)	13.9
16	4.97, s; 5.01, s	113.9			
17	1.85, s	19.0			
18	1.37, d(7.2)	18.3			
19	1.80, s	10.1			
20	3.98, d(11.4); 4.24, d(11.4)	62.0			

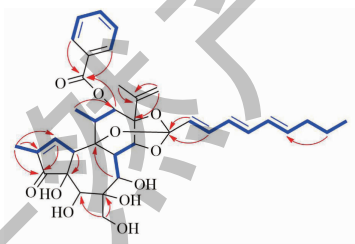


图 1 化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 关键相关

Fig. 1 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound **1**

化合物 **1** 的相对构型由偶合常数和 NOESY 谱图判断 (见图 2)。H-7/H-8 偶合常数为 9.6 Hz, 表明 OH-7 羟基为 β 位; 在 NOESY 谱图中, H-10 与 H-7/H-5 存在相关, 表明他们是 α 位; H-14/H-11 与 H-8 与 H₃-18 相关, 表明 H-8 与 H-14 为 β 位。

为了进一步确定其绝对构型, 参考该类化合物的生物合成途径以及在 B3LYP/6-31 G (d) 基组水

平的计算 ECD 图谱与化合物 **1** 的实验图谱一致 (见图 3), 确定其绝对构型为 4*S*, 5*R*, 6*S*, 7*R*, 8*S*, 9*R*, 10*R*, 11*R*, 12*R*, 13*S*, 14*R*, 1''*S*-1。经文献检索, 确定该化合物为新化合物, 命名为 daphgenin A。化合物 **1** 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)。

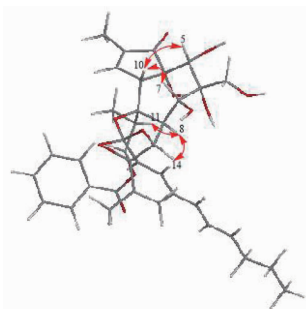


图 2 化合物 **1** 的 NOESY 主要相关

Fig. 2 Key NOESY correlations of compound **1**

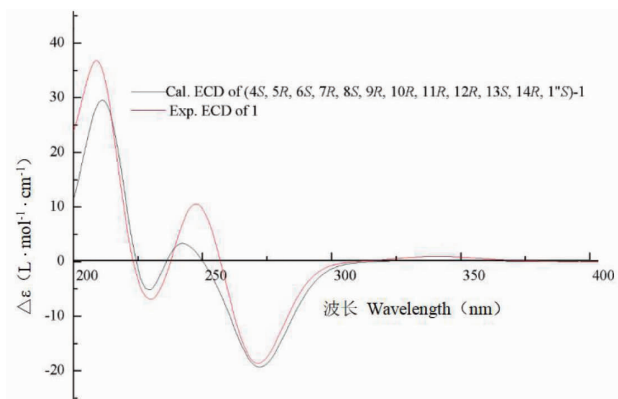


图3 化合物1的实测和计算ECD谱图

Fig. 3 Experimental and calculated ECD spectra of compound 1

化合物 2 白色粉末(氯仿); $[\alpha]_D^{25} + 32.5$ (c 0.2, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 242 (3.74) nm; HR-EI-MS: m/z 649.301 0 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{37}H_{45}O_{10}$, 649.301 3); IR (KBr) ν_{\max} 345 5, 295 2, 285 0, 169 0, 160 5, 143 3, 127 0, 944 cm^{-1} ; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.92 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-3'/7'), 7.62 (1H, s, H-1), 7.58 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5'), 7.46 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4'/6'), 6.68 (1H, dd, $J = 15.6, 10.8$ Hz, H-3''), 6.06 (1H, dd, $J = 15.6, 10.8$ Hz, H-4''), 5.87 (1H, m, H-5''), 5.64 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2''), 5.24 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-14), 5.22 (1H, s, H-12), 5.01 (1H, s, H-16b), 4.96 (1H, s, H-16a), 4.31 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-7), 4.24 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-20b), 4.00 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-20a), 3.89 (1H, s, H-5), 3.01 (1H, s, H-10), 2.79 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-11), 2.74 (1H, dd, $J = 9.6, 2.4$ Hz, H-8), 2.11 (2H, m, H-6''), 1.85 (3H, s, H-17), 1.78 (3H, s, H-19), 1.39 (1H, m, H-

7''b), 1.37 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-18), 1.31 (1H, m, H-8''b), 1.30 (1H, m, H-9''b), 1.28 (1H, m, H-7''a), 1.27 (1H, m, H-8''a), 1.26 (1H, m, H-9''a), 0.88 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-10''); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 159.6 (C-1), 137.1 (C-2), 209.0 (C-3), 73.6 (C-4), 81.6 (C-5), 78.5 (C-6), 68.2 (C-7), 36.3 (C-8), 77.4 (C-9), 50.3 (C-10), 43.1 (C-11), 78.8 (C-12), 83.7 (C-13), 76.2 (C-14), 143.1 (C-15), 113.7 (C-16), 18.9 (C-17), 18.2 (C-18), 10.0 (C-19), 61.9 (C-20), 165.1 (C-1'), 129.5 (C-2'), 129.4 (C-3'/7'), 128.7 (C-4'/6'), 133.6 (C-5'), 116.7 (C-1''), 122.2 (C-2''), 135.0 (C-3''), 128.5 (C-4''), 139.5 (C-5''), 32.7 (C-6''), 28.7 (C-7''), 31.4 (C-8''), 22.5 (C-9''), 14.1 (C-10''). 以上数据与文献^[13]报道基本一致, 故鉴定化合物 2 为 yuanhuakine B。

化合物 1 和 2 的结构见图 4。

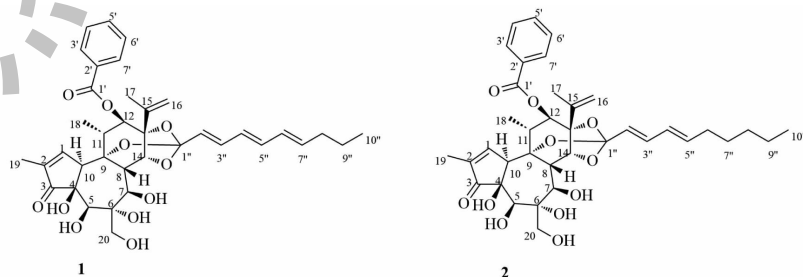


图4 化合物1和2的化学结构

Fig. 4 The chemical structure of compounds 1 and 2

2.2 抗皮肤真菌活性结果

采用 MIC 法, 以酮康唑为阳性对照药, 测定化

合物 1 和 2 对犬小孢子菌、红色毛癣菌、须癣毛癣菌和马拉色菌的抑制活性。实验结果(见表 2)表明,

化合物 **1** 和 **2** 对犬小孢子菌和马拉色菌的抑制活性不显著;化合物 **1** 对红色毛癣菌和须癣毛癣菌的抑制活性与阳性对照组相当;化合物 **2** 对红色毛癣菌

活性优于阳性对照组,对须癣毛癣菌的抑制活性与阳性对照组相当。

表 2 化合物 **1** 和 **2** 对皮肤真菌抑制活性

Table 2 Anti-dermatophyte activities of compounds **1** and **2**

化合物 Compound	MIC (μg/mL)			
	犬小孢子菌 <i>M. canis</i>	红色毛癣菌 <i>T. rubrum</i>	须癣毛癣菌 <i>T. mentagrophytes</i>	马拉色菌 <i>M. restricta</i>
1	8.0	4.0	4.0	12.0
2	12.0	2.0	4.0	8.0
酮康唑 Ketoconazole	4.0	4.0	4.0	2.0

3 结论

皮肤真菌病是世界性的传染病,我国南方如广东、海南、福建、香港湿热地区是皮肤真菌病的高发区。我国中药资源丰富,从中药材中寻找和开发新的抗皮肤真菌活性物质或药物显得十分必要。本研究通过色谱分离技术及天然产物结构鉴定方法,从具有治疗疥癣秃疮的芫花花蕾中分离鉴定 2 个萜香烷型二萜类化合物,其中 1 个为新化合物;采用 MIC 法测定了该化合物对犬小孢子菌、红色毛癣菌、须癣毛癣菌和马拉色菌的抑制活性,发现化合物 **1** 和 **2** 对红色毛癣菌和须癣毛癣菌具有较强的抑制活性。本文进一步丰富了芫花花蕾的化学成分,发现其体外抗皮肤真菌活性,为芫花花蕾的外用和开发积累了基础数据。

参考文献

- Chen YY, Duan JA, Tang YP, et al. Chemical constituents from flower buds of *Daphne genkwa* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2013, 44: 397-402.
- Sun Q, Wu J, Li FF, et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2014, 31: 94-98.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- Mo JC, Cheng JA. Advances on the research of the bioactivity of *Daphne* plants [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2003, 15: 167-170.
- Wang Y, Deng LL, Huang SY. Research progress on chemical

constituents from plants of *Daphne* and their pharmacological activities [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 221-228.

- Li LZ, Song SJ, Gao PY. Research progress in the chemical constituents and pharmacological activities of *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2007, 24: 587-592.
- Liu JM, Lu JQ, Gong M. The research progress of *Daphne genkwa* [J]. Hubei Agr Sci (湖北农业科学), 2019, 58: 1-3.
- Sun PL, Lin YQ, Guo DX. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of stems of *Daphne genkwa* [J]. J Pharm Res (药学研究), 2018, 37: 234-236.
- Feng RM, Shi WG, Lu JQ, et al. Diversity and anti-dermatophyte activities of endophytic fungi from *Datura metel* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 187-194.
- Gao L, Wu JM, Liu DY, et al. Study on the antibacterial effect of traditional Chinese medicine mixture on superficial dermatophytes in vitro [J]. Chin J Dermatovenereol (中国皮肤性病学杂志), 2022, 36: 32-36.
- Chen YJ, Liu CY, Lv MX, et al. Antibacterial activity of TTS-12 against *T. mentagrophytes* in vitro and in vivo [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 704-710.
- Pan RR, Zhang CY, Li Y, et al. Daphnane diterpenoids from *Daphne genkwa* inhibit PI3K/Akt/mTOR signaling and induce cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells [J]. J Nat Prod, 2020, 83: 1238-1248.
- Mi SH, Zhao P, Li Q, et al. Guided isolation of daphnane-type diterpenes from *Daphne genkwa* by molecular network strategies [J]. Phytochemistry, 2022, 198: 113144.