

银合欢豆荚中的酚类化学成分

雷婷^{1,2}, 徐巧林³, 周忠玉¹, 谭建文^{1*}, 贾永霞¹

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 广东省林业科学研究院生物技术部, 广州 510520)

摘要: 为探讨银合欢(*Leucaena leucocephala*)的化学成分, 从银合欢豆荚乙醇提取物中分离得到7个酚类化合物, 经过波谱分析, 鉴定为原儿茶酸乙酯(1)、丁香酸(2)、3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基苯基)丙烷-1-酮(3)、咖啡酸甲酯(4)、(Z)-对香豆醛(5)、3-甲氧基-4-羟基苯丙烷-7,8,9-三醇(6)、愈创木基甘油-8-O-4'-芥子醇醚(7)。所有化合物均为首次从该植物中分离得到。化合物1对大肠杆菌和鼠伤寒氏菌有一定的抑制活性。

关键词: 银合欢; 酚类化合物; 抑菌活性

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.05.012

Phenolic Compounds from Pods of *Leucanea leucocephala*

LEI Ting^{1,2}, XU Qiao-lin³, ZHOU Zhong-yu¹, TAN Jian-wen^{1*}, JIA Yong-xia¹

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Biotechnology Division, Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China)

Abstract: In order to understand the chemical constituents of *Leucanea leucocephala*, seven phenolic compounds were isolated from the ethanol extract of *L. leucocephala* pods. On the basis of spectral data, they were identified as ethyl protocatechuate (1), syringic acid (2), 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-1-one (3), caffeic acid methyl ester (4), (Z)-*p*-coumaric aldehyde (5), 3-methoxy-4-hydroxy-phenylpropane-7,8,9-triol (6), and guaiacylglycerol-8-O-4'-(sinapyl alcohol) ether (7). All the compounds were obtained from *L. leucocephala* for the first time. Compound 1 showed *in vitro* antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* strains.

Key words: *Leucanea leucocephala*; Phenolic compound; Antibacterial activity

银合欢[*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit]为含羞草科(Mimosaceae)银合欢属植物, 原产墨西哥南部, 在热带和亚热带地区广泛栽培^[1]。银合欢生长速度非常快, 并且是一种高效固氮植物, 其叶具有清热解毒、消食解渴开胃的功效, 海南及广西民间常用作茶饮^[2]。银合欢种子和叶具有降血糖作用, 并且银合欢的提取物具有杀虫作用, 但具体

活性物质不详^[3-4]。目前对银合欢的研究主要集中在生物学和农业方面, 有关其化学成分则少有报道, 已报道的化学成分包括含羞草素、三十一烷醇、十八烷酸、β-谷甾醇、胡萝卜苷、槲皮素-3-*O*-α-L-鼠李糖甙、槲皮素-3-*O*-α-L-阿拉伯糖甙、杨梅素-3-*O*-α-L-鼠李糖甙^[2-5]。为了明确银合欢豆荚的药用潜质, 我们对银合欢豆荚的化学成分进行了研究,

收稿日期: 2013-12-05

接受日期: 2014-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270406); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-Z-0804); 中国科学院仪器设备功能开发项目(YG2012050)资助

作者简介: 雷婷, 女, 硕士研究生, 研究方向为生物有机化学。E-mail: 834802228@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jwtan@scbg.ac.cn

以期为银合欢的开发利用提供依据。本文报道首次从银合欢豆荚中分离得到的7个酚类化合物。

1 材料和方法

1.1 材料

银合欢[*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.]于2012年7月采自中国科学院华南植物园,材料由本园邢福武研究员鉴定。柱色谱正相层析硅胶为青岛海洋化工有限公司产品;反相层析硅胶ODS-A(50 μm)为日本YMC公司生产;薄层色谱正相硅胶板(HFGF₂₅₄)为山东烟台江友硅胶开发有限公司产品;凝胶 Sephadex LH-20 为瑞典Amersham Biosciences公司生产。显色方法包括紫外荧光显色(254 nm)、碘蒸气显色以及喷洒硫酸-乙醇溶液(10:90, V/V)加热显色。

1.2 仪器

减压浓缩采用日本东京理化公司N-1000旋转蒸发仪、CCA-1110循环式冷却箱和SB-1000电热恒温水浴锅;HPLC采用日本岛津公司LC-20AT型液相色谱仪、SPD-M20A检测器和Shim-Pack PRC-ODS色谱柱(粒径5 μm,孔径12 nm,250 mm×20 mm);中压半制备采用上海创新通恒有限公司(Dr Flash-S)分离纯化系统;电喷雾质谱(ESI-MS)为MDS SCIEX API 2000LC/MS/MS仪,以甲醇为溶剂,直接进样测定;比旋光度用Perkin-Elmer 341旋光仪器测定;¹H NMR谱和¹³C NMR谱分别采用Bruker DRX-400核磁共振仪和Bruker Avance 600核磁共振仪,并以四甲基硅烷为内标测定。

1.3 提取和分离

银合欢豆荚(15 kg)用95%的乙醇浸提4次,每次3 d。乙醇浸提液减压浓缩后加水成悬浮液,用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取,得到石油醚部分、乙酸乙酯部分、正丁醇部分和水部分。

乙酸乙酯部分(50 g)经硅胶柱层析(200~300目),以氯仿-甲醇(100:1~0:100)梯度洗脱,经TLC薄层层析检测合并主点相同的流分,得到E1~E8共8个组分。E3组分(2.5 g)经中压ODS反相硅胶柱层析(50 μm),以甲醇-水(20:80~100:0)梯度洗脱,得到E3-1~E3-11共11个亚组分。从甲醇-水(20:80)洗脱馏分中得到E3-1组分(0.6 g),

经Sephadex LH-20柱层析,以甲醇洗脱,所得亚组分E3-1-1经浓缩得化合物**4**(8 mg);E3-1-3亚组分(100 mg)用HPLC制备纯化,以甲醇-水(25:70~40:60)梯度洗脱得化合物**2**(16 mg);E3-3组分(300 mg)经Sephadex LH-20柱层析,以甲醇洗脱,所得亚组分经由正相硅胶柱层析(200~300目),以石油醚-丙酮(4:1)等度洗脱得化合物**3**(5 mg);E4组分(9 g)部分经中压ODS反相硅胶柱层析(50 μm),以甲醇-水(20:80~100:0)梯度洗脱,得到8个亚组分,E4-4组分(0.6 g)经Sephadex LH-20柱层析,以甲醇洗脱得8个亚组分,E4-4-1经TLC制备得化合物**1**(3 mg);E4-4-5亚组分用HPLC制备,以甲醇-水(35:65)等度洗脱得化合物**7**(12 mg);E6组分(3.8 g)部分经中压ODS反相硅胶柱层析(50 μm),以甲醇-水(20:80~100:0)梯度洗脱,得到E6-1~E6-26共26个亚组分,E6-16组分(123 mg)经Sephadex LH-20柱层析,以氯仿:甲醇=1:4洗脱得2个亚组分,E6-16-2亚组分(24 mg)经TLC制备得化合物**5**(6 mg)。

正丁醇部(100 g)经硅胶柱层析(200~300目),以氯仿-甲醇(95:5~0:100)梯度洗脱,经TLC薄层层析检测合并主点相同的流分,得到N1~N6共6个组分。N3组分(2.4 g)经中压ODS反相硅胶柱层析(50 μm),以甲醇-水(10:90~100:0)梯度洗脱,得到N3-1~N3-6共6个亚组分。N3-2亚组分(540 mg)经Sephadex LH-20柱层析,以甲醇洗脱所得亚组分经由正相硅胶柱层析(200~300目),以氯仿-甲醇(20:1)等度洗脱,再经由HPLC制备纯化,以甲醇-水(5:95~10:90)梯度洗脱得化合物**6**(13 mg)。

1.4 结构鉴定

原儿茶酸乙酯(Ethyl protocatechuate, 1) 黄色粉末;分子式C₉H₁₀O₄;ESIMS m/z: 183 [M + H]⁺, 205 [M + Na]⁺; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 7.41 (2H, m, H-2,6), 6.80 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 4.29 (2H, q, J = 7.1 Hz, H-1'), 1.35 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-2'); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 168.40 (C=O), 151.64 (C-4), 146.17 (C-3), 123.54 (C-1), 122.90 (C-2), 117.39 (C-5), 115.82 (C-6), 61.65 (C-1'), 14.65 (C-2')。上述光谱数据与文献[6]报道的一致。

丁香酸(Syringic acid, 2) 白色粉末;分子式为C₉H₁₀O₅;ESIMS m/z: 199 [M + H]⁺, 419 [2M + Na]⁺, 197 [M - H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ

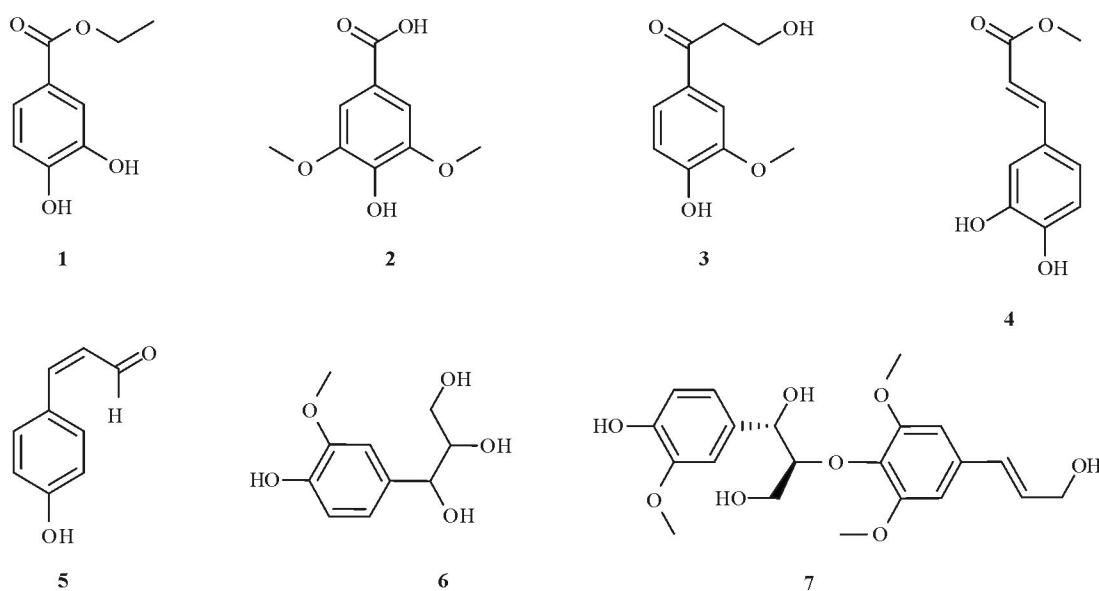


图1 化合物1~7的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1~7

7.34 (2H, s, H-2, 6), 3.89 (6H, s, OME-3,5); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 170.11 (C=O), 148.78 (C-3,5), 141.62 (C-4), 122.14 (C-1), 108.31 (C-2,6), 56.76 (OME-3,5)。上述光谱数据与文献[6]报道的一致。

3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基苯基)丙烷-1-酮 (3-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-1-one, 3) 黄色粉末; 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$; ESIMS m/z : 197 [M + H]⁺, 219 [M + Na]⁺, 195 [M - H]⁻, 236 [M + Cl]⁻; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 7.56 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6), 7.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.85 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 3.94 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-9), 3.89 (3H, s, OME-3), 3.15 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 199.68 (C-7), 153.36 (C-4), 149.04 (C-3), 130.55 (C-1), 124.71 (C-6), 115.79 (C-2), 111.85 (C-5), 58.91 (C-9), 56.36 (OME-3), 41.62 (C-8)。上述光谱数据与文献[7]报道的一致。

咖啡酸甲酯 (Caffeic acid methyl ester, 4) 黄色粉末; 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$; ESIMS m/z : 195 [M + H]⁺, 217 [M + Na]⁺; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.17 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3), 7.06 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-5), 6.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6), 6.31 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 3.88 (3H, s, OME-10); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 171.1 (C=O), 150.9 (C-4), 149.7 (C-3), 147.0 (C-7), 128.8 (C-1), 124.1 (C-5), 116.7 (C-2), 116.8 (C-

6), 111.9 (C-8), 56.6 (OME-10)。上述光谱数据与文献[8]报道的一致。

(Z)-对香豆醛 [(Z)-*p*-Coumaric aldehyde, 5] 白色粉末; 分子式 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$; ESIMS m/z : 149 [M + H]⁺, 187 [M + K]⁺, 147 [M - H]⁻; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 7.61 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2,6), 6.82 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-7), 6.74 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3,5), 5.76 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-8); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 193.1 (C=O), 157.9 (C-4), 152.7 (C-7), 131.1 (C-2,6), 127.8 (C-1), 127.9 (C-8), 116.7 (C-3,5)。上述光谱数据与文献[9]报道的一致。

3-甲氧基-4-羟基丙烷-7,8,9-三醇 (3-Methoxy-4-hydroxy-phenylpropane-7,8,9-triol, 6) 白色油状; 分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5$; ESIMS m/z : 215 [M + H]⁺, 237 [M + Na]⁺; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 6.99 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 6.80 (1H, dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, H-6), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 4.52 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7), 3.86 (3H, s, OME-3), 3.67 (1H, td, $J = 6.3, 4.0$ Hz, H-8), 3.48 (1H, dd, $J = 11.3, 3.9$ Hz, H-9b), 3.35 (1H, dd, $J = 11.3, 6.4$ Hz, H-9a); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 148.86 (C-3), 147.08 (C-4), 134.81 (C-1), 120.65 (C-6), 115.86 (C-5), 111.50 (C-2), 77.59 (C-8), 75.44 (C-7), 64.23 (C-9), 56.33 (OME-3)。上述数据与文献[10]报道的一致。

愈创木基甘油-8-O-4'-芥子醇醚 [Guaiacylglycerol-8-O-4'-(sinapyl alcohol) ether, 7] 黄色油

状; 分子式 $C_{21}H_{26}O_8$; ESIMS m/z : 429 [$M + Na$]⁺, 405 [$M - H$]⁻, 441 [$M + Cl$]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 7.02 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 6.88 (1H, dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, H-6), 6.76 (2H, s, H-2',6'), 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.55 (1H, d, $J = 15.8$, H-7'), 6.34 (1H, dt, $J = 15.8, 5.6$ Hz, H-8'), 5.00 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7), 4.23 (2H, d, $J = 5.12$ Hz, H-9'), 4.03 (1H, dt, $J = 7.0, 3.4$ Hz, H-8), 3.87 (6H, s, OME-3',5'), 3.84 (3H, s, OME-3), 3.83 (1H, dd, $J = 11.7, 5.37$ Hz, H-9b), 3.73 (1H, dd, $J = 11.8, 4.0$ Hz, H-9a); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 154.34 (C-3',5'), 148.77 (C-3), 147.22 (C-4), 136.94 (C-4'), 134.89 (C-1'), 133.41 (C-1), 131.29 (C-8'), 129.99 (C-7'), 120.97 (C-6), 115.87 (C-5), 111.80 (C-2), 104.85 (C-2',6'), 89.19 (C-8), 74.60 (C-7), 63.57 (C-9'), 61.71 (C-9), 56.65 (OME-3',5'), 56.36 (OME-3)。上述光谱数据与文献[11]报道的一致。

1.5 抗菌活性测试

化合物 **1~7** 的体外抑菌活性(即最低抑菌浓度 MIC 值)采用文献报道的刃天青显色法^[12]进行测定, 其中采用的阳性对照为广谱抗菌素头孢拉定(Cephadine); 阴性对照为 DMSO, 由天津市富宇化学试剂厂生产; 供试菌株包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CMCC26003)、大肠杆菌(*Escherichia coli* CMCC44102) 和鼠伤沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* CMCC44102), 均购自广东省微生物研究所; 培养基为牛肉浸膏蛋白胨培养基。

2 结果和讨论

应用硅胶柱层析、葡聚糖凝胶柱层析和 HPLC 等色谱分离手段, 从银合欢豆荚中分离得到 7 个酚类化合物, 经波谱分析, 鉴定为原儿茶酸乙酯(**1**)、丁香酸(**2**)、3-羟基-1-(3-甲氧基-4-羟基苯基)丙烷-1-酮(**3**)、咖啡酸甲酯(**4**)、(Z)-对香豆醛(**5**)、3-甲氧基-4-羟基丙烷-7,8,9-三醇(**6**)、愈创木基甘油-8-O-4'-芥子醇醚(**7**)。它们均为首次从银合欢植物中分离得到。

体外抑菌活性实验结果显示, 原儿茶酸乙酯对大肠杆菌和鼠伤沙门氏菌有一定的抑制活性(其对大肠杆菌和鼠伤沙门氏菌的 MIC 值均为

128 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 但弱于阳性对照头孢拉定(头孢拉定对两种菌株的 MIC 值均为 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 测定化合物 **2~7**(以及阴性对照 DMSO)的 MIC 值均大于 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 表明无抑菌活性。

据文献报道, 咖啡酸甲酯高浓度时具有促进大脑皮层神经细胞存活的作用, 丁香酸衍生物具有较好的抗血小板聚集的活性^[13], 丁香酸对苦瓜种子发芽及幼苗生长具有一定的抑制作用^[14], 化合物愈创木基甘油-8-O-4'-芥子醇醚有中等抗氧化活性^[15]。另有研究表明, 咖啡酸具有较强的抗氧化活性, 但其在空气中不稳定, 因此通常将其设计为衍生物的形式再以寻找水解方法发挥抗氧化作用, 因此咖啡酸甲酯具有潜在的抗氧化活性^[16]。

本研究进一步丰富了银合欢的生物活性化学物质基础, 对于促进银合欢的更有效开发利用具有重要的意义。

参考文献

- [1] Zhao Y, Chen X B, Jiang C S. Advances on studies of *Leucaena bentham* in China [J]. Chin J Trop Agri, 2006, 26(4): 55–58,63.
赵英, 陈小斌, 蒋昌顺. 我国银合欢研究进展 [J]. 热带农业科学, 2006, 26(4): 55–58,63.
- [2] Hou X T, Deng J G, Zhou J Y, et al. Study on chemical constituents of the leaves from *Leucaena leucocephala* [J]. W China J Pharmac Sci, 2012, 27(6): 610–612.
侯小涛, 邓家刚, 周江煜, 等. 银合欢叶的化学成分研究 [J]. 华西药学杂志, 2012, 27(6): 610–612.
- [3] Li X J, Deng J G, Qin Z L, et al. Experimental study on antidiabetic effect of the total flavonoids in *Leucaena* seeds [J]. Chin J Chin Mat Med, 2005, 30(11): 842–844.
李学坚, 邓家刚, 覃振林, 等. 银合欢种子总黄酮降血糖作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(11): 842–844.
- [4] Midori T, Li W, Yoichi T, et al. A novel host shift and invaded range of a seed predator, *Acanthoscelides macrourhthalmus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), of an invasive weed, *Leucaena leucocephala* [J]. Entomol Sci, 2009, 12(1): 1–8.
- [5] Wang E J, Liang D H, Yang Z Y. Study on the flavonoids in *Leucaena* leaves [J]. J Hainan Norm Univ (Nat Sci), 2008, 21(2): 171–172,183.
王恩举, 梁德华, 杨智蕴. 银合欢叶黄酮类成分的研究 [J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2008, 21(2): 171–172,183.
- [6] Baderschneider B, Winterhalter P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from riesling wine and screening for antioxidant activity [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6): 2788–2798.
- [7] Jones L, Bartholomew B, Latif Z, et al. Constituents of *Cassia laevigata*

- [J]. Fitoterapia, 2000, 71(5): 580–583.
- [8] Hu K, Li J, Tu P F. Study on chemical constituents of *Microctis folium* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2012, 43(5): 844–846.
胡婷, 李军, 屠鹏飞. 布渣叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 844–846.
- [9] Yang Y, Li Sh G, Ye W C, et al. Study on chemical constituents of *Microctis folium* [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2010, 21(11): 2790–2792.
杨茵, 李硕果, 叶文才, 等. 布渣叶的化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2790–2792.
- [10] Comte G, Vercauteren J, Chulia A J, et al. Phenylpropanoids from leaves of *Juniperus phoenicea* [J]. Phytochemistry, 1997, 45(8): 1679–1682.
- [11] Lourith N, Katayama T, Suzuki T. Stereochemistry and biosynthesis of 8-O-4' neolignans in *Eucommia ulmoides*: Diastereoselective formation of guaiacylglycerol-8-O-4'-(sinapyl alcohol) ether [J]. J Wood Sci, 2005, 51(4): 370–378.
- [12] Rahman M M, Gray A I. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity [J]. Phytochemistry, 2005, 66(13): 1601–1606.
- [13] Yuan M, Zhao Y H, Li J M. Synthesis and anti-platelet aggregation activity of syringic acid derivatives [J]. Chin J New Drugs, 2011, 20(18): 1801–1804.
袁明, 赵永海, 李家明. 丁香酸衍生物的合成及抗血小板聚集活性 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(18): 1801–1804.
- [14] Li L X. Effect of syringic acid on seed germination and seedling growth of *Momordica charantia* L. [J]. Vegetables, 2013, 11(4): 56–57.
李龙秀. 丁香酸对苦瓜种子萌发、幼苗生长的影响 [J]. 蔬菜, 2013, 11(4): 56–57.
- [15] Li X, Cao W, Shen Y, et al. Antioxidant compounds from *Rosa laevigata* fruits [J]. Food Chem, 2012, 130(3): 575–580.
- [16] Xu Y P, Da Y F. Comparing the antioxygenic activity of ferulic acid and caffeic acid derivatives [J]. J Zhenjiang Med Coll, 1995, 5(4): 277–278, 280, 383.
许燕萍, 笪远峰. 阿魏酸和咖啡酸衍生物的抗氧化能力研究 [J]. 镇江医学院学报, 1995, 5(4): 277–278, 280, 383.