



# 小叶云实的化学成分及抗菌活性研究

陈屏<sup>1,2</sup>, 雷军<sup>1</sup>, 许旭东<sup>2</sup>, 杨峻山<sup>2\*</sup>

(1. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

**[摘要]** 目的:深入研究小叶云实的化学成分及其抗菌活性。方法:利用多种色谱方法对小叶云实根的化学成分进行研究,并对分得的单体化合物进行抗菌筛选。结果:鉴定了 6 个高异黄酮的化学结构,分别为 eucomin (1), intricatinol (2), 8-methoxybonducellin (3), bonducellin (4), 8-methoxyisobonducellin (5), 3-(4-methoxybenzyl)-5,7-dimethoxychroman-4-one (6), 并对从小叶云实中获得的单体化合物进行抗菌活性筛选。结论:化合物 1~6 均为首次从该植物根中分离得到。化合物 8-methoxyisobonducellin, intricatinol, 岩白菜素, 金丝桃苷和 11-没食子酰岩白菜素对金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、乙型链球菌和绿脓杆菌均有不同程度的抑制作用。

**[关键词]** 小叶云实; 抗菌; 黄酮; 岩白菜素

小叶云实 *Caesalpinia millettii* Hook. et Arn. 为豆科云实属植物,广泛分布于我国广东、广西、云南等省<sup>[1]</sup>。《新华本草纲要》记载:“根入药,用于治疗胃病,消化不良等症。”在前期工作中本课题组对小叶云实茎叶的化学成分进行研究,分离得到高异黄酮等化合物<sup>[2-3]</sup>,为了进一步合理开发利用小叶云实的天然资源,对小叶云实根的化学成分进行了系统研究,从小叶云实根中分离得到 6 个 eucomin type (3-benzylidenechroman-4-one) 高异黄酮;并对小叶云实中分得的单体化合物进行了抗菌活性筛选,为其临床抗菌应用提供实验数据。

## 1 材料

### 1.1 仪器和药材

X-4 型数字显示显微熔点测定仪(温度计未校正); Philips PYE Unicam Pu8800 型紫外光谱仪; Peking-Elmer 983G 型红外光谱仪,溴化钾压片; Bruker AM-500 型核磁共振仪测定,内标为 TMS; Autospec-Ultima ETOF 质谱仪; TCQ-250 型超声波清洗器(北京医疗设备二厂); RE-3000B 旋转蒸发器(上海亚荣); 10~100, 100~1 000  $\mu$ L 量程移液枪(eppen-

dorf); HD-650 超净台(吴江市伟峰净化设备有限公司); 所用试剂皆为分析纯。小叶云实于 2008 年 11 月采于云南省,经中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所云南分所彭朝忠研究员鉴定为云实属植物小叶云实 *C. millettii*。

### 1.2 菌种来源

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP)、乙型链球菌 (*Beta streptococcus*, BS) 和绿脓杆菌 (*Aeruginosus bacillus*, AB) 均购自中国医学科学院生技所菌种室。由中国中医科学院中药研究所药理室传代, -70  $^{\circ}$ C 保存,备用。

### 1.3 供试品来源

单体化合物 eucomin, 8-methoxyisobonducellin, intricatinol, 8-methoxybonducellin, 金丝桃苷<sup>[2]</sup>, 岩白菜素<sup>[2]</sup>, 11-没食子酰岩白菜素<sup>[2]</sup>, 桉柳黄素 3-O-(6"-O-E-咖啡酰基)- $\beta$ -D-半乳糖苷<sup>[3]</sup>均由本课题组从小叶云实茎和根中分离得到。

### 1.4 培养基

MH 肉汤培养基,批号 980226,由中国食品药品检定研究院提供。

## 2 方法

### 2.1 提取分离

取小叶云实根 2.5 kg, 95% 乙醇提取 2 次,回收乙醇得流浸膏(0.3 kg)。将流浸膏用水稀释,分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取。得氯仿部位 30 g, 乙酸乙酯部位 47 g, 正丁醇部位 83 g。将氯

[稿件编号] 20111223001

[基金项目] 吉林农业大学博士启动基金项目(2009010)

[通信作者] \* 杨峻山, Tel: (010) 62899707, E-mail: junshanyang@sina.com

[作者简介] 陈屏, 讲师, 研究方向为天然产物化学, E-mail: chenping2009@yahoo.com.cn



仿和乙酸乙酯部位分别上硅胶柱和凝胶柱进行分离纯化,将氯仿部分(石油醚-乙酸乙酯 95:5~8:2)分成3部分,Fr.1经硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 9:1),经凝胶纯化,得化合物**6**(18 mg),**5**(14 mg);Fr.2经硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 85:15),经凝胶纯化,得化合物**3**(24 mg),**4**(7 mg);乙酸乙酯部位经硅胶柱色谱(石油醚-氯仿-甲醇 9:1:0.2)分离得到**1**(12 mg),乙酸乙酯部位经硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 7:3)分离得到**2**(13 mg)。

## 2.2 抗菌筛选<sup>[4]</sup>

以无菌水为空白,以溶解样品溶剂甲醇为对照,用96孔培养板将药液用MH肉汤培养基作2倍系列稀释,每孔150 μL,取用MH肉汤36℃培养过夜的菌液,用麦氏比浊管校正其浓度。再稀释成 $1 \times 10^6$ /mL菌落形成单位,每孔加入该菌液15 μL,混匀,如此每mL含细菌约 $1 \times 10^5$ 菌落形成单位。将培养板置36℃孵育过夜后观察结果。药物最低浓度孔无细菌生长者,即为该菌的最低抑菌浓度(MIC)。

## 3 结果

### 3.1 结构鉴定

化合物**1** 黄色针晶(CHCl<sub>3</sub>-MeOH),mp 199~201℃;EI-MS  $m/z$  298 (M)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 7.70(1H, s, H-9), 7.43(2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 7.06(2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 5.92(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 5.88(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.35(2H, s, H-2), 3.82(3H, -OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 184.46(C-O), 166.83(C-7), 164.28(C-5), 162.14(C-8a), 160.77(C-4'), 136.41(C-9), 132.70(C-2', 6'), 127.36(C-13), 126.36(C-3), 114.57(C-3', 5'), 101.89(C-4a), 96.26(C-6), 95.00(C-8), 67.23(C-2), 55.55(-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[5]报道的 eucomin 数据一致。

化合物**2** 黄色针晶(CHCl<sub>3</sub>-MeOH),mp 124~125℃;EI-MS  $m/z$  312 (M)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 10.36(-OH), 7.64(1H, s, H-9), 7.49(1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-5), 7.41(2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 7.04(2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.61(1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-6), 5.41(2H, s, H-2), 3.81(3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.70(3H, -OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 179.77(C-O), 160.31(C-

4'), 156.94(C-7), 155.10(C-8a), 135.46(C-9), 135.03(C-8), 132.24(C-2', 6'), 128.63(C-1'), 126.45(C-3), 123.06(C-5), 115.27(C-4a), 114.29(C-3', 5'), 110.04(C-6), 67.78(C-2), 60.28(-OCH<sub>3</sub>), 55.33(-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道[6]一致,确定该化合物为8-methoxybonducellin。

化合物**3** 黄色针晶(CHCl<sub>3</sub>-MeOH),mp 196~197℃;EI-MS  $m/z$  298 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 3.81(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 5.35(2H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 6.55(1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-6), 7.05(2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3', 5'), 7.25(1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5), 7.41(2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2', 6'), 7.63(1H, s, H-9)。以上数据与文献报道[7]一致,确定该化合物为 intricatinol。

化合物**4** 黄色针晶(CHCl<sub>3</sub>-MeOH),mp 205℃;<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 3.81(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 5.35(2H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 6.31(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.52(1H, dd, *J* = 8.5 Hz, 2 Hz, H-6), 7.03(2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 7.39(2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 7.62(1H, s, H-9), 7.72(1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 10.61(7-OH)。以上数据与文献报道[7]一致,确定该化合物为 bonducellin。

化合物**5** 黄色针晶(MeOH),mp 230℃;EI-MS  $m/z$  312 [M]<sup>+</sup>。根据熔点、相对分子质量及薄层检识,确定该化合物为8-methoxyisobonducellin。

化合物**6** 黄色针晶(CHCl<sub>3</sub>-MeOH),mp 208~210℃。EI-MS  $m/z$  [M<sup>+</sup>] 312。<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 7.78(1H, s, H-9), 7.41(2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 7.02(2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.01(1H, d, *J* = 2 Hz, H-8), 5.95(1H, d, *J* = 2 Hz, H-6), 5.43(2H, s, H-2)。该化合物数据与文献[8]报道的 3-(4-hydroxybenzylidene)-5,7-dihydroxychroman-4-one 数据一致。

### 3.2 单体化合物的 MIC

对8个单体化合物进行抑菌活性筛选,结果表明化合物 intricatinol, 8-methoxyisobonducellin, 岩白菜素, 金丝桃苷和 11-没食子酰岩白菜素具有不同程度的抑菌作用,见表1。其中 Intricatinol 对金黄色葡萄球菌和乙型链球菌的抑菌效果最好,8-methoxyisobonducellin 次之。intricatinol 和 金丝桃苷对肺炎克雷伯氏菌有抑制作用。Intricatinol 对绿脓杆菌的抑菌效果最好,8-methoxyisobonducellin 次之。



表1 8个单体化合物的最低抑菌浓度

Table 1 The minimum inhibitory concentration of eight compounds  $g \cdot L^{-1}$

样品名称	SA	KP	BS	AB
intricatinal	0.029 4	0.941 6	0.117 0	0.058 8
8-methoxyisobonducellin	0.025 5	-	0.102 0	0.102 0
岩白菜素	1.058 0	-	0.529 1	0.529 1
金丝桃苷	0.916 6	0.916 6	0.458 3	0.458 3
11-没食子酰岩白菜素	-	-	0.462 5	0.462 5
eucomin	-	-	-	-
8-methoxybonducellin	-	-	-	-
怪柳黄素 3-O-(6"-O-E-咖啡酰基)- $\beta$ -D-半乳糖苷	-	-	-	-

注: - 表示无抗菌活性。

#### 4 讨论

B环均为4'-甲氧基取代的高异黄酮中:反式(E型)5,7-二羟基高异黄酮 eucomin 没有抗菌作用,而反式(E型)7,8位二羟基高异黄酮 intricatinal 有抗菌作用;8位被甲氧基取代后无抗菌作用;顺式(Z型)7-羟基-8-甲氧基高异黄酮具有很好的抗菌活性。比较2个异香豆素类化合物:岩白菜素具有很

好的抗菌活性,11位被没食子酸酰化后抗菌作用变强且专属性增强。

#### [参考文献]

[1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志. 第39卷[M]. 北京: 科学出版社,1979: 98.

[2] 陈屏,杨峻山. 小叶云实化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志, 2008,43(24): 1852.

[3] Chen P, Yang J S. Flavonol galactoside caffeate ester and homoisoflavones from *Caesalpinia millettii* Hook. et Arn. [J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55(4): 655.

[4] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社,1991: 286.

[5] Böhler P, Tamm C. The homo-isoflavones, a new class of natural product. Isolation and structure of eucomin and eucomol[J]. Tetrahedron Lett, 1967, 36: 3479.

[6] Mcpherson D D, Cordell G A, Soejarto D D, et al. New peltogynoids and homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(12): 2835.

[7] Wall M E, Wani M C, Manikumar G, et al. Plant antimutagens, 6. Intricate and intricatinal, new antimutagenic homoisoflavonoids from *Hoffmannoseggia intricata* [J]. J Nat Prod, 1989, 52(4): 774.

[8] Alfonse S, Bonaventure T N, Berhanu M A. Homoisoflavonoids and stilbenes from the bulbs of *Scilla nervosa* subsp. *rigidifolia* [J]. Phytochemistry, 1999, 52: 947.

## Chemical constituents and antibacterial activity contained in *Caesalpinia millettii*

CHEN Ping<sup>1,2</sup>, LEI Jun<sup>1</sup>, XU Xudong<sup>2</sup>, YANG Junshan<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] To study chemical constituents contained in roots of *Caesalpinia millettii* by HPLC. Six homoisoflavonoids were identified by spectroscopic data and physicochemical property as eucomin(1), intricatinal(2), 8-methoxybonducellin(3), bonducellin(4), 8-methoxyisobonducellin(5) and 3-(4-methoxybenzyl)-5, 7-dimethoxychroman-4-one(6). All compounds were separated from the root of this genus for the first time. An antibacterial screening was made on eight monomeric compounds. Among them, 8-methoxyisobonducellin, intricatinal, bergenin, hyperoside and 11-O-galloylbergenin showed a inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella Peneumoniae*, *Beta streptococcus* and *Aeruginosus bacillus*.

[Key words] *Caesalpinia millettii*; antibacterial activity; flavone; bergenin

doi:10.4268/cjcmm20121415

[责任编辑 孔晶晶]