

红石耳多糖的研究

西安医科大学药理学系(710061) 丁东宁* 靳菊情 张鸣喜**

陕西教育学院生物系 阎宝琦

摘要 红石耳用热水提取、乙醇沉淀,精制得UMH多糖,经Sephadex G-150柱层析证明为均一性多糖。糖的含量为90.4%,气相色谱检测由葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、葡萄糖醛酸(GlcA)组成,克分子比为45:1:9,平均分子量为 40×10^4 。经高碘酸氧化,Smith降解,红外光谱分析,UMH多糖主要由 $\alpha(1 \rightarrow 6)$, $(1 \rightarrow 4)$ 甙键聚合而成的酸性杂多糖。

关键词 地衣 红石耳 多糖。

红石耳*Umbilicaria hypococcinea* Liano, 是石耳科石耳属的一种地衣植物^[1],在秦巴山区亦有分布,陕西太白县,眉县等地民间作为草药治病已有很长历史。该药性淡、微苦、平,具有健胃、消食、利尿、消胀、驱虫等功效,主治消化不良、腹痛、痢疾、小儿疳积、妇女白带异常等症。据报道^[2,3]含有二聚体羟基蒽醌化合物,三萜色酸,黑茶渍素,苔色酸,松萝酸等化合物。研究表明地衣多糖具有强的抗癌活性,能增强机体的免疫能力,为开发高效低毒副作用的抗癌新药,我们对红石耳多糖(UMH)的化学成分进行了研究。

1 材料、试剂和仪器

1.1 材料:1991-05 购于陕西眉县槐芽药材公司,经鉴定确认为红石耳*Umbilicaria hypococcinea* Liano.。

1.2 试剂:标准葡聚糖 T_{2000} 、 T_{500} 、 T_{70} 、 T_{40} 、 T_{10} (Made in Sweden);Sephadex G-150;Sephadex G-200(Pharmacia Co),层析微晶纤维素(上海试剂四厂);葡萄糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸均为分析纯;肌醇六乙醚酯(自制气相色谱检测为单一峰)。Brine Shrimp卵(西安医科大学刘次伯教授提供)。

1.3 仪器:日本岛津GC-9A气相色谱仪;C-R3A数据处理机;PE938G红外光谱仪;WZZ自动指示旋光仪;721-分光光度计(上海第三分析仪器厂);ZFA-型旋转蒸发器(上海玻璃二厂);IBM计算机(美国国际通用机器厂)。

2 方法与结果

2.1 UMH多糖的提取与纯化:称取风干粉碎的红石耳40g,用三氯甲烷抽提除去色素,将药渣风干放入烧杯中,加蒸馏水机械搅拌加热,温度控制在70~80℃左右,提取2h,共提取3次,合并提取液,用旋转蒸发器浓缩至150ml左右,加乙醇沉淀,静置24h,抽滤,用无水乙醇洗3次,干燥,得UMH粗多糖17g。将所得粗多糖再用丙酮抽提4h,进一步除去色素。取2.0g用蒸馏水-乙醇重结晶。然后过微晶纤维素柱用蒸馏水洗脱。浓缩洗脱液,再用乙醇沉淀,静置24h,抽滤,用无水乙醇洗3次,丙酮洗2次,得白色粉末状UMH多糖1.2g。

2.2 理化分析:UMH多糖溶于水中,更易溶于碱性水溶液中,不溶于三氯甲烷,乙醇等有机溶剂,Molish反应为阳性,茚三酮检测为阴性,碘-碘化钾反应为阴性,元素分析不含氮,比旋光度 $[\alpha]_D^{27} + 33.3^\circ$ (c, 1.810^{-2} g/ml, 0.03mol/L NaOH水溶液),红外光谱

*Address: Ding Dongning, Department of Pharmacology, Xi'an Medical University, Xian

** 药理学系92届毕业生

在 $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$ 扫描有多糖的特征吸收, 839cm^{-1} 有吸收峰, 说明含有 α 甙键。

2.3 均一性测定: 提取UMH精品 13.1mg 溶于 3ml 水中, 上予先平衡好的SephadexG-150柱($1.8\times 40\text{cm}$), 用蒸馏水洗脱, 每 3ml 收集一管, 用硫酸酚法在721分光光度计上检测, 结果为单一峰, 说明UMH为均一性多糖。

2.4 糖含量的测定: 以葡萄糖为标准, 用硫酸酚法测定标准曲线的回归方程 $A = 7.52C - 0.00134$, 相关系数 $r = 0.9994$, UMH糖的含量为 90.49% 。

2.5 UMH组分的测定^[4]: 精密称取UMH多糖 21.0mg , 于 10ml 安瓶瓶中, 加 1mol/L 硫酸 3ml , 封口在 100°C 条件下水解 6h 。加碳酸钡中和, 过滤, 水洗滤渣, 将滤液浓缩至干, 制成糖腈乙酯的衍生物, 进行气相色谱检测。色谱条件 1.5% OV-17玻璃填充柱($3\text{mm}\times 2\text{m}$), Shimalite W(AW-DMCS)800~100目, 气化室温度 240°C , 检测温度 240°C , 柱温 190°C , 载气氮气, 流速 20ml/min , 进样量 $0.5\mu\text{l}$ 。根据保留时间与标准糖对照定性, 内标法定量。测定结果UMH多糖由葡萄糖, 甘露糖, 葡萄糖醛酸聚合而成的酸性杂多糖, 克分子比为Glc-Man-GlcA(45:1:9)。

2.6 分子量的测定^[5]: 用凝胶过滤法测定多糖的分子量。将 2.2g Sephadex G-200用蒸馏水溶胀 72h , 装柱($1.5\times 40\text{cm}$)用 0.05mol/L 氯化钠溶液平衡 3d 。然后将已知标准葡聚糖, T_{2000} 、 T_{500} 、 T_{70} 、 T_{40} 、 T_{10} 和兰色葡聚糖各 5.0mg , 分别相继上柱, 用 0.05mol/L 氯化钠溶液洗脱, 每 3ml 收集一管用硫酸-酚法测定洗脱体积 V_e , 兰色葡聚糖测出柱外水体积 V_o , 用 V_e/V_o 与相应分子量的对数关系作图, 得标准曲线。称取UMH 4.9mg 上柱, 用同样的方法洗脱, 洗脱体积为 26.1ml , 由标准曲线求得UMH多糖的平均分子量为 40×10^4 。

2.7 高碘酸氧化与Smith降解^[6]: 称取 31.0mg UMH多糖, 溶于 25ml 0.05mol/L 高碘酸溶液中, 放置暗处 96h 氧化完全。用 0.009mol/L NaOH中和法, 测得甲酸的放出量为每葡萄糖单位 0.97mol 。用碘量法测得高碘酸钠的消耗, 为每葡萄糖单位 1.04mol 。将氧化完全的UMH多糖用硼氢化钠还原, 加乙二醇透析 24h , 将透析液浓缩至干, 加 1mol/L 硫酸封管水解 8h , 用碳酸钡中和, 滤液浓缩至糖稀状。进行纸层析鉴定, 展开剂为乙酸乙酯-吡啶-水(10:4:3), 显色剂为高碘酸钠-联苯胺。结果有丙三醇和赤藓醇生成说明UMH多糖是由(1→6), (1→4)甙键聚合而成的杂多糖。

3 细胞毒性的初步观察^[7]

用Brine Shrimp(海虾)致死性生物测定法, 进行细胞毒性试验。将Brine Shrimp卵在海水中培养 48h , 有幼虫浮动, 生长正常。将UMH多糖配制成浓度为10、100、 1000×10^{-6} , 各取 5ml , 每浓度组平行样3管, 空白对照一组。分别加10个幼虫, 放置 24h , 观察幼虫存活情况, 计算出死亡百分率, 用Finney Computer程序在IBM计算机上算出UMH多糖 $\text{LC}_{50}>1000$, 说明UMH多糖不具有细胞毒性。

小结与讨论

4.1 红石耳经三氯甲烷、丙酮相继脱色, 用水-乙醇多次重结晶, 通过微晶纤维素柱层析, 所得白色UMH多糖为一组均一性多糖, 由葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸组成, 克分子比为45:1:9, 通过 $\alpha(1\rightarrow 6)$, (1→4)甙键聚合成的酸性杂多糖。平均分子量为 40×10^4 , 比旋光度 $4[\alpha]_D^{27} + 33.3^\circ$, 糖含量为 90.4% 。用Brine Shrimp生物测定UMH多糖不具细胞毒性。

4.2 在UMH多糖的提取过程中, 由于红石耳中含有较多的红色二聚体羟基蒽醌等有色物

(下转第180页)

葫芦茶化学成分的研究(Ⅱ)

广东医药学院(广州 510224)

吕华冲 何蔚珩 杨其蓝 袁惠忠*

豆科植物葫芦茶 *Desmodium triquetrum* (L.) DC. 药用全草。味苦涩, 性凉, 有清热解毒, 消食利湿, 除烦止呕, 杀虫防腐的功效[1,2]。用于治疗感冒发热, 咽喉肿痛, 肝炎, 肾炎, 肠炎以及菌痢, 妊娠呕吐等。

前报[3]曾报道从葫芦茶的脂溶性部位分得木栓酮, 木栓醇和豆甾醇。本文报道从该植物的水溶性提取物中新分得的2个结晶性成分经化学方法及波谱分析鉴定为水杨酸(I)和原儿茶酸(II)。均为首次从该属植物中分得。药理实验表明, 原儿茶酸具有较强的抗菌作用[4], 而水杨酸通常被用作防腐剂和抗真菌剂, 提示这2种成分可能为葫芦茶杀虫防腐抑菌的活性成分。

1 提取和分离

葫芦茶枝叶粗粉10kg, 用水煮提3次, 过滤, 滤液浓缩至稠膏状, 加入70%的乙醇, 放置过夜。离心, 取上清液回收乙醇至无醇味; 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯提取, 浓缩后, 分别得石油醚部分, 氯仿部分和乙酸乙酯部分。

取乙酸乙酯部分, 进行硅胶柱层析, 以环己烷-乙酸乙酯作洗脱剂(洗脱剂中加入1%的甲酸), 进行梯度洗脱, 并经反复柱层析得晶I和晶II。

2 鉴定

晶I: 无色针状结晶(氯仿), mp157~159°C, FeCl₃反应阳性, 示有酚羟基; 紫外灯下显紫

色荧光。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 198.9, 232.8。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3239 (OH), 3009~2593 (羧酸中羟基的伸缩振动), 1661 (形成分子内氢键的C=O), 1614, 1580, 1484 (芳环, 骨架振动), 1445, 1248 (酚羟基), 1156, 759 (芳环邻二取代), 提示结晶I为1,2-二取代的芳香族化合物。其¹H NMR, MS, IR及薄层层析与标准品水杨酸相同, 鉴定为水杨酸。

晶II: 白色片状结晶(环己烷-乙酸乙酯), mp198~200°C。FeCl₃反应阳性, 示有酚羟基。在硅胶TLC上展开后, 置空气中斑点易氧化, 氯薰则呈黄色斑点。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 253.6, 209.4。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3255 (OH), 3000~2500 (羧酸中羟基的伸缩振动), 1675 (共轭C=O), 1615, 1600, 1530, 1467 (芳环骨架振动), 1423, 1226 (酚羟基), 1130, 824 (芳环上邻二氢), 887 (芳环上孤立芳氢), 表明结晶II为1,3,4-三取代的芳香化合物,¹H NMR δ ppm (CD₃COCD₃): 7.44 (1H, d, J=2.00Hz, C₂-H), 7.48 (1H dd, J=8.55, 2.00Hz, C₆-H), 6.89 (1H, dd, J=8.55, 1.00Hz, C₇-H)。MS m/z (%): 154 (M⁺, 100), 137 (M⁺-OH), 109 (M⁺-CO₂H), 81, 63, 44, 28。IR及薄层层析与标准品原儿茶酸相同, 鉴定为原儿茶酸。

参考文献

- 1 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 1975. 831
- 2 南京药学院《中草药》编写组. 中草药学. 中册. 南京: 江苏人民出版社, 1976. 467
- 3 杨其蓝, 等. 植物学报, 1989, 31(2): 128
- 4 南京药学院四季青科研组. 中草药通讯, 1971(3): 33

(1993-09-11收稿)

(上接第176页)

质, 经三氯甲烷清除色素后所得的粗多糖颜色较深。再经丙酮抽提后, 经重结晶, 过微晶纤维素柱等处理, 才得到白色UMH多糖。其抗癌活性与免疫活性正在研究中, 另行报道。

参考文献

- 1 李世全, 等. 秦巴山天然药物志. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987. 778
- 2 张振杰, 等. 植物学通报, 1984, 1: 38
- 3 李波, 等. 中草药, 1992, 23(3): 120
- 4 丁东宁, 等. 西北药学杂志, 1962, 7(3): 13
- 5 方积年, 等. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(3): 222
- 6 丁东宁, 等. 天然产物研究与开发, 1992, 4(4): 3

(1994-01-07收稿)

*本院93届实习生

ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES

Studies on the Chemical Constituents of *Sargentodoxa yvinea*

(*Sargentodoxa cuneata*)

Miao Kangli, Zhang Jianzhong, Wang Feiyin, et al

Six compounds were isolated from the EtOH extract of stems of *Sargentodoxa cuneata*. They were identified as β -sitosterol (I), β -daucosterol (II), madasiatic acid (III), acanthoside D (IV), sargencuneside (V), and sucrose (VI) on the basis of chemical and spectral analyses. Among them, V is a new compound.

(Original article on page 171)

A Study on Polysaccharide of the Hongshier (*Umbilicaria hypococeinea*)

Ding Dongning, Yan Baoqi, et al

UMH polysaccharide was isolated and purified with alcohol precipitation from hot water extract of *Umbilicaria hypococeinea* Lian. By Sephadex G-150 column chromatography, UMH was shown to be a single homogeneous substance, sugar content 90.4%. By gas chromatography analysis, UMH was composed of glucose, mannose and glucuronic acid, their molecule ratio was about 45:1:9. Its mean molecular weight was estimated to be 40×10^4 . IR analysis periodate oxidation and Smith degradation showed that the main chain of UMH is composed, of $\alpha(1 \rightarrow 6)$ and $(1 \rightarrow 4)$ linkage, and was an acidic hetro-saccharide.

(Original article on page 175)

Studies on the Chemical Constituents Bigflower Rhodiola (*Rhodiola crenulata*)

Peng Jiangnan, Ma Chengyu, Ge Yongchao, et al

Five compounds were isolated from the rhizome and roots of *Rhodiola crenulata* S.H.Fu. They were identified as rhodionin (I), rhodiosin (II), tyrosol (III), salidroside (IV) and gallic acid (V), respectively, by UV, MS, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic and chemical reactions.

(Original article on page 177)

Determination of Glycyrrhizic Acid and Chlorogenic Acid by HPLC

Rong Zhifen, Zhang Weiqing, Hu Wenjie, et al

A method for the determination of glycyrrhizic acid and chlorogenic acid in Chinese medicinal preparation by Rp-HPLC-UV was described. Mobile phase: methanol (0.5% HAc) : H_2O (0.5% HAc); C_{18} column and external standard was used.

(Original article on page 181)

Quantitative Determination of Borneol in Yuqingan Liquid

Wei Xiaoshu

Borneol in Yuqingan liquid was determined quantitatively by GC. The sample was first extracted by ethyl acetate and component determined by two types of column packed with 10% OV-17 and 10% PEG-20M/chromosorb WHP respectively. N-tetradecane was used as an