

测定(温度未校正);红外用 Perkin-Elmer 983 型红外光谱仪测定(KBr 压片);氢谱和碳谱用 Bruker ACF-300 型核磁共振仪测定(^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz;以 DMSO- d_6 或 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 或 CD_3OD 为溶剂, TMS 作内标);质谱用 ZAB-HS 型质谱仪(FAB-MS)和 R10-10 型质谱仪(DIC-MS)测定。

药材采自江西省修水县,品种经鉴定为枳椇属植物枳椇 *H. acerba* Lindl. 的干燥叶。

2 提取与分离

枳椇叶的提取与分离前文已报道^[1],从 S1 部分得化合物 I, S4 部分得化合物 IX。

3 结构鉴定

I: 白色针晶($\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$), mp 243℃~244℃, 溴甲酚绿反应和三氯化铁反应均呈阳性。元素分析:实验值% C 55.22, H 5.43;计算值% C 55.32, H 5.52, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ 。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 500~2 400(COOH), 1 715(C=O), 1 695(C=O), 1 640(C=C), 1 610, 1 520(芳环), 1 125(-C-O-C-), 1 080, 980, 908, 813; $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 见表 1, 2。

IX: 微黄色针晶($(\text{CH}_3)_2\text{CO-CH}_3\text{OH}$),

mp 226℃~228℃, $[\alpha]_D^{20} - 96.5 \cdot (c, 1.0, \text{H}_2\text{O})$ 。茚三酮反应呈紫红色。元素分析:实验值% C 47.65, H 7.27, N 9.07;计算值% C 46.13, H 7.75, N 8.97。分子式为 $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ 。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 400~2 200($\text{N}^+\text{-H}$), 1 620(COO^-), 1 402, 1 306, 1 205, 1 080, 1 030, 920; DIC-MS m/z 146(M+H), 128(M+H-H $_2\text{O}$), 100(M-COOH), 82(M-H $_2\text{O-COOH}$); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 见表 3; $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ 44.4(N-CH $_3$), 72.2(C $_2$), 173.0(COO^-), 40.6(C $_3$), 71.2(C $_4$), 64.5(C $_5$)。

参考文献

- 1 梁侨丽,等. 中草药, 1996, 27(10): 581
- 2 Corse J, et al. Phytochemistry, 1996, 5: 767
- 3 Morishita H, et al. Journal of Chromatography, 1984, 315: 253
- 4 Sadtler Standard Carbon-13 NMR Spectra V 76-80: 15605C
- 5 Kelley C J, et al. J Org Chem, 1976, 41: 49
- 6 Sciuto S, et al. Phytochemistry, 1983, 22(10): 2311
- 7 Abraham R J, et al. J Chem Soc, 1964: 3739
- 8 Andreatta R H, et al. Aust J Chem, 1967, 20: 2701
- 9 Becconsall J K, et al. J Chem Soc, 1965: 1726
- 10 Figliuolo R, et al. Phytochemistry, 1987, 26(12): 3255

(1996-03-07 收稿)

银杏叶多糖的化学研究

广西医科大学(南宁 530021) 黄桂宽* 曾麒燕

摘要 从银杏叶水提液中,得到两种多糖,经凝胶过滤、高效液相色谱、过碘酸钠氧化、Smith 降解、红外光谱等方法,证实一种银杏叶多糖的分子量为 1.7×10^5 ,含葡萄糖、鼠李糖、木糖,其摩尔比为 49.82:28.40:21.75,糖基以 $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6)}\text{(1}\rightarrow\text{3)}\text{(1}\rightarrow\text{4)}$ 连接;另一种多糖是葡聚糖,分子量为 1.4×10^4 ,糖基以 $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{4)}\text{(1}\rightarrow\text{3)}\text{(1}\rightarrow\text{6)}$ 连接。抗氧化效果试验表明银杏叶多糖对 O_2^- 有一定清除作用。

关键词 银杏叶 多糖 抗氧化

延缓衰老,健康长寿,为人们日益期盼。现存的古老中生代子遗植物之一的银杏树,

素有裸子植物活化石之称,因而近年来银杏叶药品及保健品已遍及国内外。天然多糖具

* Address: Huang Guikuan, Guangxi Medical University, Nanning
黄桂宽 大学本科毕业,副教授,从事化学教学工作,还进行微量元素、植物多糖等方面研究,曾获 1990 年卫生部科技进步奖三等奖。

有非特异性免疫功能与抗衰老等诸多药理作用,我们从银杏叶提取纯化多糖,研究其理化性质、结构分析及其抗氧化效果,为探讨银杏叶抗衰老作用的构效关系提供依据。

1 材料、仪器和试剂

1.1 材料:银杏叶产于广西省临桂县。

1.2 仪器:PEλ12-紫外光谱仪、岛津 470 红外光谱仪、Beckmen-332 高效液相色谱仪、岛津 120-02 紫外分光光度计、DG-3030 发光光度计、WXG-4 旋光仪、ZFQ85A 旋转蒸发仪。

1.3 试剂:聚丙烯酰胺凝胶、赤藓醇、鲁米诺为 Merck 产品;各种 Dextran、Sephadex 为 Pharmacia 产品;甲苯胺蓝为 Chroma 进口分装;各种单糖为生化试剂,其它均为国产。

2 方法

2.1 多糖的提取纯化:银杏叶粉经脱脂、水溶、醇沉、去蛋白、透析、再反复醇沉后,真空干燥得银杏叶粗多糖 LGBP (Polysaccharide from Leave of *Ginkgo biloba*)。粗多糖上 Sephadex G-100 层析柱(3×45 cm),用 0.1 mol/L NaCl 洗脱,得到 2 种多糖。分别再上一次 Sephadex G-100 柱(2×100 cm),两部分收集液经醇沉、洗涤、真空干燥得到两种纯银杏叶多糖 LGBP-1 和 LGBP-2,产率分别为 1.5% 与 1.9%。

2.2 纯度检测

2.2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳:缓冲液为 pH9.5 的硼砂液,染色剂是高碘酸-希夫试剂。

2.2.2 醋酸纤维薄膜电泳:pH12.0 的硼砂缓冲液,甲苯胺蓝染色。

2.2.3 凝胶过滤法:Sephadex G-150 层析柱(2×100 cm),0.1 mol/L NaCl 洗脱,蒽酮-硫酸法检测。

2.2.4 紫外光谱分析:在 200~400 nm 区间进行紫外扫描。

2.2.5 用硫酸-蒽酮法测定两种多糖的含量,用硫酸-咔唑法测定糖醛酸的含量。

2.3 分子量测定:采用 Sephadex G-150 柱层析法。取标准分子量系列的 Dextran,测其

洗脱体积 V_e ,用分子量 2×10^6 的 Blue dextran 测外水体积 V_o ,将 V_e/V_o 与分子量对数作图得标准曲线,多糖按同样条件上柱求得分子量。

2.4 多糖的化学结构分析

2.4.1 单糖的组分分析:多糖用 2 mol/L 三氟乙酸 100℃密封水解 8 h,水解液用 732 (OH^-)阴离子交换树脂除酸,旋转蒸发浓缩,作纸层析检测:展开剂为正丁醇-冰乙酸-水,碱性硝酸银染色。再作高效液相色谱分析:水解液上氨基键合色谱柱,用示差法检测。

2.4.2 糖基键合分析:a)红外光谱分析:在 4000~400 cm^{-1} 区间进行红外扫描。b)过碘酸盐氧化反应^[1]:分别取 20 mg 多糖溶解在 25 mL 0.01 mol/L NaIO_4 中,于 4℃避光氧化,每天依时取样,用紫外分光光度计,在 223 nm 处测定 NaIO_4 的消耗量,至不再氧化为止。同时用 0.01 mol/L NaOH 中和法测定甲酸的释放量。c)Smith 降解反应:将氧化完全的反应液,加乙二醇以分解未反应的 NaIO_4 ,透析 24 h,浓缩后用 KBH_4 还原,放置 12 h,用 1%醋酸调至 pH=5,透析 24 h,浓干。用 2 mol/L 三氟乙酸 100℃水解 12 h,中和后浓液作纸层析检测:展开剂为正丁醇-乙醇-水,溴甲酚紫显色。

2.5 多糖抗氧化效果试验:用化学发光法测定银杏叶多糖对氧自由基的清除作用。连苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化释放出 O_2^- ,生成的 O_2^- 与鲁米诺反应而发光^[3]。加入 25~100 μL 的银杏叶多糖样品,测定其发光强度,并与维生素(Vc)作比较,每个样品测 3 次取平均值,按清除率=(空白值-测定值/空白值)×100%的分式算出清除率。

3 结果与讨论

3.1 多糖的理化性质:水溶性银杏叶多糖由 2 个单一多糖组成,均为白色粉状物,不溶于高浓度的乙醇及丙酮、正丁醇等有机溶剂中,Molish 反应呈阳性,茚三酮反应呈阴性,碘反应 LGBP-1 为阴性,LGBP-2 呈蓝色。

两种多糖经聚丙烯酰胺凝胶电泳和醋酸纤维薄膜电泳,均为单一色带,经 Sephadex G-150 柱层析,流出液均为一单峰,可以证明它们均为单一组分。经紫外光谱检测,在 260~280 nm 处未见到核酸和蛋白质的吸收峰。两种多糖的分子量、多糖与糖醛酸含量及比旋光度如表 1 所示。

表 1 LGBP-1 和 LGBP-2 的性质

组份	分子量	多糖含量 (%)	糖醛酸含量 (%)	$[\alpha]_D^{20}$
LGBP-1	1.7×10^5	99.10	—	+37.2°
LGBP-2	1.4×10^4	98.42	—	+121.0°

3.2 多糖化学结构的分析:LGBP-1 酸水解产物经纸层析和高效液相层析,检出组成的单糖及其百分含量比为 D-葡萄糖:L-鼠李糖:D-木糖=49.85:28.40:21.75,说明 LGBP-1 是以 D-葡萄糖为主的中性杂多糖。红外光谱测定在 890 cm^{-1} 附近有吸收峰,为 β -吡喃糖苷键特征峰。经 NaIO_4 氧化,平均每摩尔糖基消耗 1.08 mol NaIO_4 ,同时产生 0.45 mol 甲酸,可推测肯定有 1 $\rightarrow$ 6、1 $\rightarrow$ 3 键合的糖基^[3]。Smith 降解的产物水解后经纸层析检出甘油、葡萄糖、鼠李糖、木糖和少量赤藓醇,进一步说明 LGBP-1 的糖基是以 β -(1 $\rightarrow$ 6)(1 $\rightarrow$ 3)连接为主,尚有少量的 1 $\rightarrow$ 4 连接键^[4]。

LGBP-2 酸水解产物经纸层析和高效液相色谱分析,只检出 D-葡萄糖,说明 LGBP-2 是葡聚糖。红外光谱测定在 840 cm^{-1} 附近有

特征吸收峰,在 $1250\sim 950\text{ cm}^{-1}$ 之间有一组强峰,说明该多糖糖链是 α -吡喃糖苷键^[4]。经 NaIO_4 氧化,平均每摩尔糖基消耗 0.69 mol NaIO_4 ,同时产生 0.08 mol 甲酸。Smith 降解有赤藓醇、葡萄糖和少量甘油,表明 LGBP-2 的糖基是以 α -(1 $\rightarrow$ 4)(1 $\rightarrow$ 3)和少量(1 $\rightarrow$ 6)连接,其中以 α -(1 $\rightarrow$ 4)连接为主。又因该多糖能与碘生成蓝色配合物,这一性质及其结构都与直链淀粉有一定相似性。

生物体内自由基反应与衰老关系密切已为人们所共识,而 O_2^- 是生物体内产生的一种主要自由基。我们通过在体外产生 O_2^- ,用银杏叶多糖作清除剂,并与抗氧化能力强且常用的自由基清除剂 Vc 作比较,结果见表 2。可以算出,0.05 mg 的 Vc 与 1 mg 的 LGBP 清除率相当,说明 LGBP 对 O_2^- 有一定清除作用,初步证实了银杏叶多糖对银杏叶抗衰老功能会起一定作用,其药理活性还需进一步的实验确证。

表 2 LGBP 和 Vc 的 O_2^- 清除作用

样品	LGBP(1%)			Vc(0.1%)		
样品量(μL)	25	50	100	5	15	50
清除率(%)	38.83	55.68	78.50	20.24	39.91	79.97

参考文献

1 Ikenaka T, et al. J Biochem, 1963, 54: 328
2 李润秋. 东北师大学报, 1982, (3): 43
3 Sasaki T, et al. Carbohydr Res, 1976, 47: 99
4 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科技出版社, 1987. 163

(1997-02-04 收稿)

新 书 介 绍

近期由辽宁科技出版社出版的《中草药及其制剂质量分析方法》新书,系统介绍了中草药及其制剂分析中的常用方法,包括高效液相色谱法,气相色谱法,薄层扫描法等,并对这些方法的基本原理、操作条件、定性和定量分析的程度进行了详细的论述。各论介绍了 200 种单味药及其制剂的含量测定方法,是从事中医中药科研、生产、临床特别是开发的工作人员较好的一本工具参考书。

本书作者赵余庆,男,40 岁。现任辽宁中医学院教授。《中草药》杂志副主任编委。从事天然药物研究近二十年,在国内外刊物发表学术论文 50 余篇,出版专著三部。该书是作者结合本人多年研究经验编写而成。

本书分精装与简装两种。精装定价 26.00 元,简装定价 19.80 元,另加邮费 5 元,欲购者请将书款寄至: 110003 沈阳市和平区文化路 41 号沈阳飞龙保健品有限公司科技发展中心 王月敏收,款到即寄书。

联系电话: (024) 3905564, 3906934