

Bruker AC-250 FT-NMR 核磁共振仪。制备薄层板为 Merck 公司出品,柱色谱用硅胶等均为日本产品。实验用材料购于陕西省黄龙县药材公司。

2 提取和分离

阴干的羊红膻根粉碎成粗粉,以石油醚冷浸 3 次,每次 7d(3×7d),回收石油醚,将石油醚提取物以水蒸气蒸馏法收得挥发油部位。将挥发油部位上硅胶柱层析,以 n-hexane-AcOEt 不同比例洗脱,19:1 流份再进行硅胶柱层析,并以 n-hexane-CH₂Cl₂ 不同比例洗脱,收集 9:1 流份即得化合物 I。

3 鉴定

化合物 I: 无色液体,分子式 C₁₀H₁₀O₂。UVλ_{max}^{MeOH} nm: 249, 292, 300。IR(KBr) cm⁻¹: 2 940, 1 610, 1 470, 1 440, 1 200。¹HNMR(CDCl₃) δ: 2.43(3H, d, J= 1.0 Hz, 2-CH₃), 3.82(3H, s, -OCH₃), 6.30(1H, q, J= 1.0 Hz, H-3), 6.80(1H, dd, J= 2.5, 9.0 Hz, H-6), 6.95(1H, d, J= 2.5 Hz, H-4), 7.29(1H, dd, J= 9.0 Hz, H-7)。¹³CNMR(CDCl₃) δ: 13.6(CH₃), 55.3(-OCH₃), 102.7(C-3), 102.8(C-4), 110.7(C-7), 111.1(C-6), 129.7(C-9), 149.6(C-8), 155.6(C-5), 156.0(C-2)。MS m/z: 162[M]⁺, 147(M-CH₃)⁺, 131(M-CH₃O)⁺, 119(M-C₂H₃O)⁺, 此化合物的结构已经合成所证实。

化合物 II: 无色液体,分子式 C₇H₁₂O₅。IR

(KBr) cm⁻¹: 3 550, 3 095, 3 000, 2 920, 1 720, 1 640, 1 360, 1 240, 1 043。¹HNMR(CDCl₃) δ: 2.01(3H, s, CH₃), 1.99(3H, s, CH₃), 7.70(1H, d, J= 5.0 Hz, CH), 4.19(4H, m, 2×CH₂), 5.03(OH)。¹³CNMR(CDCl₃) δ: 20.7(-CH₃), 20.8(-CH₃), 170.8(C=O), 62.3(CH₂), 67.8(CH₂), 67.8(CH)。与 dacetin 标准品混合后图谱不变,故鉴定为 dacetin。

化合物 III: 无色液体,分子式 C₈H₈O₃。¹HNMR(CDCl₃) δ: 3.78(3H, s, -OCH₃), 6.92(1H, d, J= 9.5 Hz, H-3), 6.97(1H, d, J= 3.0 Hz, H-6), 7.13(1H, dd, J= 9.5, 3.0 Hz, H-4), 9.92(-OH), 10.62(1H, s, CHO)。¹³CNMR(CDCl₃) δ: 55.8(-OCH₃), 115.1(C-6), 125.1(C-1), 152.7(C-2), 118.6(C-3), 119.9(C-4), 155.9(C-5), 196.1(CHO)。DEPT 谱测定,有 1 个-CH₃, 3 个-CH-, 根据以上数据分析,并与 isovanillin 标准品混合后测定图谱不变,故确定为 isovanillin。

化合物 IV: 白色粉末, mp 62.5 °C, MS: 256 [M]⁺。分子式 C₁₆H₃₂O₂, 与标准品 palmitic acid 的 TLC, UV, IR, ¹HNMR, ¹³CNMR 谱一致。

化合物 V: 与油酸(oleic acid)与标准品的 MS, NMR 及 TLC 一致。

参考文献

1 苗爱蓉,等. 陕西新医药, 1981, 11: 48

(1999-04-19 收稿)

龙葵多糖的分离、纯化和鉴定(II)

广州医学院基础医学部(广州 510182) 肖桂武* 曾和平**

摘要 首次从中草药龙葵 *Solanum nigrum* L. 的稀碱提取液中分离得到 2 种多糖 SNL-3, SNL-4。分别经琼脂糖凝胶电泳、凝胶柱层析法分析,证实均为单一组分。SNL-3, SNL-4 经酸水解、Smith 降解、红外等确知, SNL-3 由 D-木糖(75.7%)、D-甘露糖(9.2%)、D-葡萄糖(4.9%)和 D-半乳糖(10.2%)组成,分子量为 23 700; SNL-4 由 D-木糖(89.4%)、D-甘露糖(1.7%)和 D-半乳糖(8.9%)组成,分子量为 47 700。SNL-3 和 SNL-4 均以 1,3Xyl 残基为主连结而成。

关键词 龙葵 龙葵多糖 免疫活性

Isolation, Purification and Identification of Polysaccharides from Black Nightshade (*Solanum nigrum*) (II)

Department of Basic Medicine, Guangzhou Medical College (Guangzhou 510182) Xiao Guiwu and Zeng Heping

Abstract Water-soluble polysaccharides SNL-3, SNL-4 were isolated from *Solanum nigrum* L..

* Address: Xiao Guiwu, Department of Basic Medicine, Guangzhou Medical College, Guangzhou

肖桂武 男, 1964 年生。1995 年获理学硕士学位, 现于广州医学院基础医学部任讲师。1997 年进入中山大学化学与化学工程学院攻读(在职)博士研究生, 专业为生物有机化学, 研究具有生物活性的天然和合成物质。已在国内外重要刊物上发表论文 9 篇, 申报专利 1 项。

** 华南师范大学化学系

Each of them was shown to be a single homogeneous component by agarose gel electrophoresis and Sephadex column chromatography. Their molecular weights were respectively estimated to be 23 700 and 47 700. Acid hydrolysis, periodate oxidation, Smith degradation and IR spectroscopic analysis showed that SNL-3 contained *D*-xylose (75.7%), *D*-mannose (9.2%), *D*-glucose (4.9%) and *D*-galactose (10.2%); SNL-4 contained *D*-xylose (89.4%), *D*-mannose (1.7%) and *D*-galactose (8.9%). Both of them were mainly composed of Xy I residues via $\beta(1\rightarrow3)$ glucosidic linkage.

Key words *Solanum nigrum* L. polysaccharides from *Solanum nigrum* L. immunologic competence

现代的研究表明,多糖能用来治疗肝炎、风湿痛、癌症、艾滋病^[1,2]等疾病。龙葵作为我国传统的中草药,被用于治疗疔疮、肾炎、癌症等疾病,前人已从中分离出生物碱等脂溶性有效成分,但水溶性有效成分的研究至今未见报道^[3]。

龙葵的稀碱提取液经 DEAE 纤维素,凝胶 G-100 柱层析,得 2 种多糖精制品即 SNL-3, SNL-4, 生物活性测试结果表明,多糖精制品均具有免疫活性(生物活性的研究另报道)。

1 材料与方法

1.1 材料:龙葵全草鲜样采自秋末,红外光谱用 PERKIN-ELMER 1700, 紫外光谱用 Shimadzu UV-240, 旋光仪用 WZZ-T1, 高效液相色谱用岛津 LC-6A 测定。标准多糖 Dextran 分子量分别为 1×10^4 、 5×10^4 、 7×10^4 、 2×10^6 (标准蓝色葡聚糖),均为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 龙葵粗多糖的提取和分离:将采集的龙葵鲜样切碎后,用 95% 乙醇浸泡 2 个月,晒干。取干燥的龙葵 1 kg, 水提取后残渣加 0.5 mol/L NaOH^[4](水提取液另分析),温水浴中加热 6 h, 共 2 次。过滤后,往滤液中逐渐加入冰醋酸,产生大量绿色沉淀。滤除沉淀后,调 pH 至中性。将碱提取液敞口蒸发至 1 L, 残渣弃去。在碱提取浓缩液中加入 1 L 95% 乙醇,离心,干燥,得棕色固体 A 154.5 g。

1.2.2 龙葵粗多糖的纯化:取棕色固体 A 100 g, 经 Sevage 法除蛋白并反复溶解、醇析,得固体 B 33 g (所除杂质未分析)。

DEAE 纤维素柱层析:上样量 B 4 g, 上样体积 B 38 mL, 先以蒸馏水进行洗脱, 尔后以 1 mol/L NaCl 为上限溶液进行梯度洗脱。洗脱液以 0.2% 硫酸蒽酮试剂显色后测吸光度。依吸光度对洗脱液体积作图,得到洗脱曲线。分别收集单一峰,浓缩后用无水乙醇沉淀、透析,干燥后得灰白色的 SNL-3

1.3 g、SNL-4 1.6 g。

SNL-4 的上样量和上样体积分别为 600 mg、600 mg; 18 mL、23 mL。以蒸馏水进行洗脱,洗脱液经收集后,用 0.2% 硫酸蒽酮溶液检测,依洗脱曲线收集其中单峰区域部分,浓缩后,按 1:1 体积比加入无水乙醇,沉淀干燥后得多糖精制品 SNL-3 403 mg, SNL-4 480 mg。

1.2.3 龙葵多糖的均一性测定:琼脂糖凝胶电泳 $7.5\text{ cm}\times 2.5\text{ cm}$, 0.025 mol/L 硼酸盐溶液,电压 300 V, 电流 10~15 mA, 电泳 1 h, 0.1% 阿利新蓝染色。Sephadex G-200 凝胶柱层析($37\text{ cm}\times 1.1\text{ cm}$)上样量为 1 mg, 流速 5~6 mL/h, 蒸馏水洗脱,按每 2 mL 体积分部收集,0.2% 硫酸蒽酮显色后测定吸光度,依相关数据绘出曲线(图 1)。

1.2.4 多糖的特征分析:分别以水、二甲亚砜、乙醇、丙酮等溶剂试验其溶解性质。在水溶液浓度为 0.03 g/mL 时测定比旋光度,采用 KBr 固体压片法测定多糖的红外光谱。

分子量:柱规格 $72\text{ cm}\times 2.7\text{ cm}$, 展层剂为蒸馏水,所用凝胶为 Sephadex G-200, 标准多糖 Dextran 分子量分别为 1×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 7×10^4 、 2×10^6 (标准蓝色葡聚糖)。将标准多糖(均取 3 mg)上柱,精确测出各自的洗脱体积(V_e),得出与分子量对数关系的标准曲线,经线性回归处理,得校正的工作曲线(图 2),相关系数 $r=0.997\ 4284$, 相关方程 $Y=-0.894\ 975\ 8X+6.083\ 59$ ($Y=V_e/V_o$, $X=\text{Log } M$)。尔后以同样条件测定多糖的洗脱体积,在标准曲线上查出相应的分子量。

完全水解:分别称取多糖 SNL-3、SNL-4 为 26 mg、28 mg,加入 1.3 135 mol/L H_2SO_4 为 2.0 mL、2.0 mL、充氮气除氧封管,均于 100 °C 水解 8 h, 水解液用碳酸钡中和,过滤。水解液的检出:高效液相色谱:色谱柱 HRC-NH₂($4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$) 流动相为乙腈-水=75:25, 流量为 0.8 mL/min, 示差检测,定量分析采用外标法(一点校正)。

Smith 降解:称取 SNL-3、SNL-4 为 14 mg、15 mg, 分别加 11 mL、11 mL 浓度为 0.02 mol/L 的

凝胶 G-100 柱层析(Sephadex G-100): SNL-3、

NaIO₄, 暗处放二周, 加乙二醇(各约加 0.6 mL)后, 溶液于透析袋中透析 2 d, 加硼氢化钠(25 mg), 搅拌 2 h, 放置过夜, 加醋酸除去过量硼氢化钠, 透析 2 d, 减压蒸发至干, 残留物用 1.3 135 mol/L H₂SO₄ 溶解充氮气封管, 于室温水解 4 d, 水解液用碳酸钡中和, 过滤, 清液进行 HPLC 分析。

2 结果与讨论

我们采用稀碱液提取、经除蛋白、DEAE 纤维素柱层析、凝胶 G-100 柱层析等方法精制, 得到活性多糖 SNL-3、SNL-4, 两者分别为 403 mg、480 mg, 收率各为 1.1%、1.3%。

2.1 均一性测定: 琼脂糖凝胶电泳均为一个蓝色斑点, 说明都为均一组分。凝胶柱层析依实验数据, 绘出相应的洗脱曲线(图 1)。

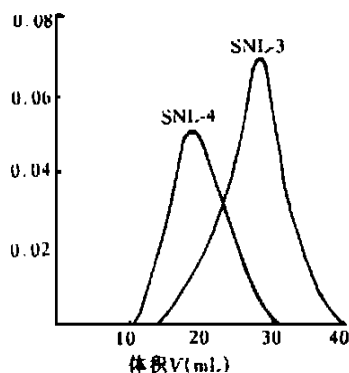


图1 SNL-3和SNL-4的
Sephadex G-200 柱层析

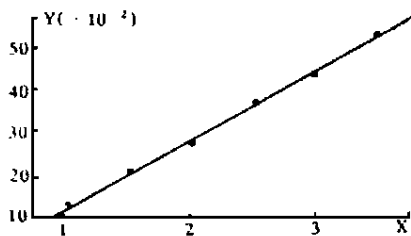


图2 分子量测定的标准曲线

多糖都只有单一峰, 且峰形基本对称, 说明各组分为均一组分。

2.2 多糖的特征分析:

2.2.1 溶解性: SNL-3、SNL-4 易溶于水, 均不溶于二甲亚砜、乙醇、丙酮等有机溶剂。

2.2.2 比旋光度: 比旋光度值分别为 SNL-3

$[\alpha]_D^{20} = +179.3^\circ$; SNL-4 $[\alpha]_D^{20} = +95.3^\circ$ 。

2.2.3 红外光谱: 多糖在 3 400 cm⁻¹附近都有 O-H 伸缩振动的强吸收, 2 900 cm⁻¹附近有 C-H 的伸缩振动, 1 400~1 200 cm⁻¹是 C-H 的变角振动吸收峰, 1 200~1 000 cm⁻¹附近有 C-H 的伸缩振动, 1 000~1 200 cm⁻¹是 C-H 的变角振动吸收峰, 1 200~1 000 cm⁻¹的一组强峰, 是吡喃糖环的 C-O (属于 C-O-C 和 C-O-H 类) 伸缩振动所引起的。SNL-3、SNL-4 都在 800 cm⁻¹有吸收, 提示可能存在 β 型糖苷键^[5]。

2.2.4 分子量: 选用凝胶柱层析法进行测定, 标准曲线见图 2。多糖的洗脱体积分别为 104 mL、91 mL, 依标准曲线求得分子量分别为 23 700、47 700。

2.2.5 完全水解: 将多糖全水解液进行高效液相色谱分析, 结果表明: SNL-3 由 D-木糖(75.7%)、D-甘露糖(9.2%)、D-葡萄糖(4.9%)和 D-半乳糖(10.2%)组成, SNL-4 由 D-木糖(89.4%)、D-甘露糖(1.7%)和 D-半乳糖(8.9%)组成。SNL-3 和 SNL-4 均以 Xyl 残基为主连结而成。

2.2.6 Smith 降解: 多糖的降解产物经 HPLC 分析, 结果表明: SNL-3 和 SNL-4 的降解产物均为乙二醇、甘油和木糖醇, 其摩尔比分别为 1:2:78 和 3:1:96, 说明降解产物中主要是木糖醇, 木糖醇应为抗氧化的 1,3Xyl 残基的降解产物。

综合全水解、Smith 降解、红外等实验结果, 我们认为, SNL-3 和 SNL-4 均以 1,3Xyl 残基为主连结而成。必须指出的是, 由于本实验采用了稀碱液提取, 所以不排除发生去皮反应的可能性, 所得活性多糖可能为降解物。有关这方面的研究还有待我们更深入进行。

致谢: 华南师范大学实验中心帮助测试红外光谱和高效液相色谱, 本文中使用的龙葵全草由马广智博士鉴定, 生物活性由唐梅老师完成, 在此表示衷心的感谢。

参考文献

- 1 Hatanaka K, et al. J Med Chem, 1987, 30: 810
- 2 Yasuhito K. JP 02, 178, 229, 1990. 7. 11
- 3 肖桂武, 等. 华南师范大学学报研究生学术论文专辑. 1994: 42
- 4 方积年. 药学通报, 1984, 19: 10
- 5 Percival ECV. J Garnet Miller Ltd, London, 1962: 211

(1999-04-29 收稿)

纪念《中华人民共和国广告法》实施5周年