

菟丝子中两个中性杂多糖的化学结构研究

王 展, 鲍幸峰, 方积年

(中国科学院 上海生命科学研究院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要: 目的 研究中药菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 种子中的多糖成分. 方法 采用 DEAE-cellulose 离子交换与凝胶层析方法进行分离纯化, 通过理化常数, 化学和光谱分析研究其化学结构特征. 结果 分别从稀碱提取物与沸水提取物中分得 2 个多糖, 即 H6 与 H8, 其中 H6 的相对分子量为 3.14×10^5 u, 而 H8 的相对分子量大于一 1.0×10^6 u, 两者均为结构复杂的中性杂多糖, 都是由阿拉伯糖, 鼠李糖, 木糖和半乳糖组成. 结论 它们均为首次从该植物中分得的多糖类的化合物.

关键词: 菟丝子; 中性杂多糖; NMR 光谱; 甲基化分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)08-0675-04

Studies on structural features of two neutral heteropolysaccharides from *Cuscuta chinensis*

WANG Zhan, BAO Xing-feng, FANG Ji-nian

(Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institute of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Object Polysaccharide constituents in the seed of *Cuscuta chinensis* Lam. were investigated. **Methods** Individual constituent was isolated and purified by DEAE-cellulose and gel-filtration chromatography, and its structural features were further studied by physicochemical constants, and spectral analysis. **Results** Two polysaccharides, named H6 and H8, were obtained from alkalescent or boiling water extract fractions, respectively. The molecular mass of H6 was 3.14×10^5 and that of H8 was more than 1.0×10^6 . Both structures were found to be complex neutral heteropolysaccharides composed of Ara, Rha, Gal and Xyl. **Conclusion** These polysaccharides were obtained from this plant for the first time.

Key words *Cuscuta chinensis* Lam.; neutral heteropolysaccharides; NMR spectrum; methylation analysis

菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 是旋花科植物, 在我国大部分地区都有分布. 它的种子作为一种常用的中药具有补肝肾, 益精, 明目, 安胎, 强心等功效^[1]. 菟丝子的化学成分研究已有文献报道^[2,3], 但对其中多糖组分的结构研究, 国内外均未见报道. 我们对其碱提粗多糖 CHC 和水提粗多糖 CHA, 用 DEAE-cellulose 及 Sephacryl S-300 柱层析进行分离纯化, 分别获得纯多糖组分 H6 和 H8, 并利用化学方法以及光谱分析方法对它们的结构进行了研究

1 实验部分

1.1 材料, 试剂和仪器; 菟丝子的种子购自上海市药材公司, 经本所黄秀兰教授鉴定为中药菟丝子 *Cuscuta chinensis*

实验中所使用的单糖对照品: 鼠李糖, 阿拉伯

糖, 木糖, 甘露糖, 半乳糖, 葡萄糖均为 Merck 公司出品. 多糖纯度和分子量分布测定所用的标准品为 T 系列的 Dextran, 为 Pharmacia 公司出品. 硼氢化钠 (NaBH₄), 三氟醋酸 (TFA) 为 Merck 公司出品. 碘甲烷为上海中国远航试剂厂出品, AR 级, 用前重蒸. 二甲基亚砜 (DM SO), 购于 Merck 公司, 用前以分子筛 4A 处理. 其它试剂为国产 AR 级. 纤维素薄层板购于 Merck 公司; DEAE-cellulose 与 Sephacryl S-300 均为 Pharmacia Biotech 出品.

气相色谱仪 (GC) 为 Shimadzu-9A 型, 配有 5% OV 225/AW-MDCS-Chromosorb W (80~100 目) 玻璃柱, 柱长 1.3 m. 气质联用仪 (GC-MS) 为 MD800 型, Finnigan 公司生产, 配有 HP-1 毛细管色谱柱. 核磁共振仪为 Bruker AM-400 型. 红外光谱仪为 Perkin-Elmer 559B 型. 旋光度在 PE-24 型

收稿日期: 2000-11-26

作者简介: 王 展 (1972-), 女, 安徽宣城人, 博士. 研究方向: 植物及藻类中多糖类物质的分离纯化, 结构分析及生物活性研究, 已在国内外期刊上发表论文 10 余篇

* 联系人. Tel 021-64311833-601; Fax: 021-64370269; E-mail jnfang@mail.shnc.ac.cn

数字旋光仪上测定。纯度及分子量在 BIO-RAD 1330型高效液相色谱仪上分析,用 TSK40-TSK50串联柱,示差检测仪为 Shodex RI SE-71型,记录仪为 WATERS 746型。

1.2 提取和分离:干燥的菟丝子种子 5 kg(粉碎),置于容器中,以 95%乙醇室温浸泡,至浸出液接近无色,取出药材于通风处自然阴干,晾干后的药材用沸水提取,提取液用苯酚-硫酸法跟踪检测,直至检验无明显颜色反应为止。合并提取液,浓缩,离心除去不溶物。上清液用流动水透析 3 d,透析液合并,浓缩至小体积,离心除去不溶物,上清液在不断搅拌下,缓缓加入 95%乙醇(终浓度为 50%),静置,离心得沉淀,沉淀物以无水乙醇,丙酮依次洗涤。醇沉物以适量的水溶解后,在搅拌状态下,加入 30%三氯醋酸(终浓度为 15%)沉淀蛋白,离心。上清液以 10% NaOH调 pH至中性,然后再进行透析。透析液浓缩至小体积,在搅拌状态下,加入 3倍量的乙醇沉淀,离心后,沉淀物以无水乙醇,丙酮依次洗涤,然后于真空干燥器中 40℃下干燥 2~3 d,得到浅棕色多糖(CHA) 100 g。沸水提取后的菟丝子残渣再以 1 mol/L NaOH于 4℃以下提取过夜,然后在均匀搅拌下,慢慢加入 2 mol/L盐酸中和至中性,上清液用流动水透析 3 d,袋内透析液浓缩后,加入三倍体积的乙醇沉淀,离心。离心后,沉淀物以无水乙醇,丙酮依次洗涤,然后于真空干燥器中 40℃下干燥 2~3 d,得灰褐色酸性粗多糖(CHC) 30 g。粗多糖 CHA和 CHC经 DEAE-cellulose和 Sephacryl S-300柱层析(2.6 cm×100 cm)多次分离纯化,分别得两个多糖组分 H8和 H6,经 HPLC纯度检测均为单一对称峰。

1.3 纯度及分子量的测定^[4]:先测出标准品 T-2000, T-110, T-80, T-70, T-40, T-20等 T系列 dex-tan 葡聚糖的保留时间,以公式 $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ 计算出对应的 K_{av} ,然后以 $\log M_w - K_{av}$ 作图得标准曲线,这样由样品 V_e 的值,就可从标准曲线上求得样品的分子量。

1.4 糖组分分析^[5]:i)全水解及薄层分析(TLC):取 3~5 mg的样品,放入试管中,加入 4 mL 2 mol/L三氟醋酸(TFA),充 N₂后封管,在 110℃下水解 4 h。试管内溶液减压蒸干(<40℃),除尽 TFA。再向样品中加入 0.5 mL左右的水使样品溶解,用纤维素板作薄层层析分析,检测样品的糖组成。ii)还原,将水解后的样品溶于 3 mL蒸馏水中,加入 20 mg NaBH₄于室温下还原 2 h,再用冰醋酸破坏过量

的 NaBH₄,减压蒸干。iii)乙酰化,还原后的样品中加入 2 mL醋酐,密塞,100℃反应 1 h,减压蒸干,除去过剩的醋酐。衍生物溶于 CHCl₃后进行气相色谱(GC)分析。

1.5 甲基化分析^[6]:多糖样品按改良的 Hakomori法进行甲基化,以 IR检测甲基化程度,确认样品已甲基化完全后,先用 90%的 HCOOH于 100℃解聚 6 h,再用 2 mol/L TFA于同样温度下水解 4 h,以 NaBH₄还原,然后按糖组分分析中的乙酰化的方法对还原产物进行乙酰化,衍生物溶于 CHCl₃作气质联用(GC-MS)分析。

2 结果与讨论

2.1 H6的结构:H6的相对分子量为 3.14×10^5 u (HPSEC测定),比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = -25.04^\circ$ (c 1.390, H₂O), H6的 IR光谱显示一系列吸收峰: 3 400, 2 950, 1 417, 1 050, 900 cm⁻¹等,分别为羟基, C-H键, C-O-H(或 C-O-C)键和环的特征吸收峰。但 IR谱中未显示糖醛酸的特征吸收峰 1 730 cm⁻¹及甘露糖的特征吸收峰 810 cm⁻¹和 870 cm⁻¹,提示 H6中可能不含有糖醛酸和甘露糖。

表 1 多糖 H6与 H8的甲基化分析结果

部分甲基化糖基	摩尔比		主要质谱片段峰 (m/z)
	H6	H8	
2, 3, 5-Me ₃ Ara	3.2	1.7	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161
2, 3-Me ₂ Ara	2.3	2.0	43, 87, 101, 117, 129, 189
2-Me Ara	2.8	2.4	43, 71, 87, 129, 159, 189
3, 4-Me ₂ Xyl	5.7		43, 89, 101, 117, 129, 161, 189
2, 3, 4-Me ₃ Xyl		2.2	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161
2, 4-Me ₂ Rha	0.9	1.9	43, 87, 114, 131, 159, 189
2, 3, 4, 6-Me ₄ Gal	1.1	1.0	43, 101, 117, 129, 145, 161, 205
2, 3, 6-Me ₃ Gal	2.0	1.4	43, 87, 101, 117, 161, 173, 233
2, 3, 4-Me ₃ Gal	1.0	1.8	43, 71, 101, 117, 129, 161, 189, 223
2, 3, 6-Me ₃ Gal	5.0	2.5	43, 87, 101, 117, 129, 161, 189, 223
2, 4-Me ₂ Gal	1.5	3.0	43, 71, 87, 101, 117, 129, 189, 233

H6经完全酸水解后, TLC分析表明 H6中含有阿拉伯糖,半乳糖和木糖,在紫外检测仪下未发现有滞后并具有荧光的斑点,进一步证明 H6中不含有糖醛酸。H6的 GC分析结果显示 H6是由阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和木糖组成。与 TLC分析结果相比,多了鼠李糖,可能是由于鼠李糖的含量较低,因而在纤维素薄层层析未显现出来。这 4种糖在 H6分子中的摩尔比率为: Ara: Rha: Gal: Xyl= 1.3: 0.3: 1.9: 1.0。

H6甲基化 3次后,经 IR谱检测,羟基峰基本消失,而甲基峰(2 900 cm⁻¹)显著增大,由此可推断 H6已甲基化完全。甲基化后样品的 GC-MS分析结果见表 1。结果显示, H6中阿拉伯糖是以 1,5-linked

Ara, 1, 3, 5-linked Ara和末端基形式存在,木糖是以 1, 2-linked Xyl形式存在,鼠李糖为 1, 2-linked Rha,半乳糖是以 1, 4-linked Gal, 1, 6-linked Gal, 1, 3-linked Gal, 1, 3, 6-linked Gal和末端基形式存在。

结合甲基化分析, GC分析结果和文献^[7-11],对 H6的特征¹³C NMR信号进行了归属(表 2),位于 δ 111. 41与 δ 109. 62的峰为阿拉伯糖异头碳信号,并可推定其构型为 α -型的呋喃环形式(α -L-Araf); δ 105. 58和 δ 106. 70应为半乳糖的异头碳的信号,其构型应为 β -型的吡喃环形式(β -D-Galp); δ 103. 84和 δ 103. 10为木糖的异头碳的信号,其构型为 β -型的吡喃环形式(β -D-Xylp)。鼠李糖由于含量低, H6的¹³C NMR谱未显示出其异头碳的信号,但在最高场处显示出了其 C-6位的甲基信号 δ 18. 82

表 2 多糖 H6与 H8的特征¹³C NMR信号及其归属

H6		H8	
化学位移	信号归属	化学位移	信号归属
111. 41	C1 of α -L-Araf	111. 36	C1 of α -L-Araf
109. 62	C1 of α -L-Araf	109. 63	C1 of α -L-Araf
105. 58	C1 of β -D-Galp	106. 0	C1 of β -D-Galp
103. 84	C1 of β -D-Xylp	105. 52	C1 of β -D-Galp
103. 10	C1 of β -D-Xylp	104. 0	C1 of β -D-Galp
71. 50	C6 of β -D-Galp	86. 08	C3 of α -L-Araf
68. 90	C5 of α -L-Araf	71. 44	C6 of β -D-Galp
65. 13	C5 of β -D-Xylp	69. 0	C6 of α -L-Araf
63. 25	C6 of β -D-Galp	63. 21	C5 of α -L-Araf
	or C5 of α -L-Araf		or C6 of β -D-Galp
18. 82	C6 of Rhap	19. 02	C6 of Rhap

综上所述,可以知道 H6是一个相对分子量为 $3. 14 \times 10^5$ u,水中的比旋光度为 $-25. 04^\circ$,由阿拉伯糖、鼠李糖、木糖和半乳糖 4种糖组成的杂多糖,它由 1, 5-linked Ara_f, 1, 3, 5-linked Ara_f, 1, 2-linked Xyl_p, 1, 2-linked Rha_p, 1, 4-linked Gal_p, 1, 3-linked Gal_p和 1, 3, 6-linked Gal_p构成,并在 1, 3, 5-linked Ara_f和 1, 3, 6-linked Gal_p处形成分枝点。由 1-linked Ara_f和 1-linked Gal_p构成链的末端。连接与分枝点 1, 3, 5-linked Ara_f的 C-3位或 C-5位和 1, 3, 6-linked Gal_p的 C-3位或 C-6位。

2.2 H8的结构: H8的分子量用 HPSEC法测定为大于 $1. 0 \times 10^6$ u,比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = -5. 41^\circ$ (c 1. 046, H₂O), H8的 IR光谱显示 $3 405. 7 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为羟基 O-H的特征吸收峰, $2 980, 1 417. 4 \text{ cm}^{-1}$ 为 C-H键的特征吸收峰, $1 070. 3$ 与 $1 039. 5 \text{ cm}^{-1}$ 为 C-O-H(或 C-O-C)键的特征吸收峰, 900 cm^{-1} 为环的特征吸收峰。同时, H8的 IR谱未显示糖醛酸的特征吸收峰 $1 730 \text{ cm}^{-1}$ 和甘露糖的特征吸收峰 810 和 870 cm^{-1} ,提示 H8中也不含有糖醛酸和甘露糖。

H8用 TFA完全酸水解后, TLC分析表明 H8含有鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖。纤维素板在紫外检测仪下检测,未观察到糖醛酸的斑点,因而进一步证明 H8中不含有糖醛酸。H8的 GC分析结果表明 H8是由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖和半乳糖 4种糖残基组成,其摩尔比为: Rha: Ara: Xyl: Gal= 0. 8: 2. 6: 1. 0: 4. 2

H8甲基化分析结果(表 1)表明, H8中鼠李糖为吡喃环形式的 1, 3-linked Rha,阿拉伯糖为呋喃环形式 1, 5-linked Ara, 1, 3, 5-linked Ara和末端基;木糖为吡喃形式的末端基;半乳糖为吡喃环形式 1, 4-linked Gal_p, 1, 6-linked Gal_p, 1, 3-linked Gal_p, 1, 3, 6-linked Gal_p和末端基。

H8的¹³C NMR谱中,异头碳区中 δ 111. 36与 δ 109. 63峰应归属为阿拉伯糖残基的异头碳的信号,并提示阿拉伯糖的构型为 α -型的呋喃环形式(α -L-Araf)^[7,8]; δ 106. 0, δ 105. 5和 δ 104. 0峰应为半乳糖残基的异头碳的信号,且其构成为 β -型的吡喃环形式(β -D-Galp)^[8,9];鼠李糖和木糖的含量较低,因而未显示出其碳信号,只在最低场处显示了鼠李糖 C-6位的甲基信号 δ 19. 02^[7]。结合分析结果以及通过与文献^[7-10]对照,对 H8的¹³C NMR谱中有关特征碳信号进行了归属,详见表 2。

综上所述, H8为一相对分子量大于 $1. 0 \times 10^6$ u,水中比旋光度为 $-5. 41^\circ$,由阿拉伯糖、木糖、鼠李糖和半乳糖组成的中性杂多糖。它由 1, 5-linked Ara_f, 1, 3, 5-linked Ara_f, 1, 4-linked Gal_p, 1, 6-linked Gal_p, 1, 3-linked Gal_p, 1, 3, 6-linked Gal_p和 1, 3-linked Rha_p构成主链,在 1, 3, 5-linked Ara_f, 1, 3, 6-linked Ara_f, 1, 4, 6-linked Gal_p处形成分枝点,由 1-linked Xyl_p, 1-linked Ara_f和 1-linked Gal_p形成链的末端。

比较多糖 H6与 H8的化学结构特征,可以发现它们具有相同的单糖组成,但组成的比例不同,连接方式也有较大差异,详细的结构分析与药理活性筛选还有待于深入研究。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1985.
- [2] Yahara S, Domoto H, Sugimura C, et al. An alkaloid and two lignans from *Cuscuta chinensis* [J]. Phytochemistry, 1997, 37: 1755-1757.
- [3] Miyahara K, Du X M, Watanabe M, et al. Two novel acylated trisaccharides related to resin glycoside from the seeds of *Cuscuta chinensis* [J]. Chem Pharm Bull, 1996, 44: 481-485.
- [4] Hagel L. Comparison of some soft gels for the molecular-weight distribution analysis of dextran at enhanced flow-rates

- [J]. J Chromatogr, 1978, 160: 59-71.
- [5] Honda S, Suzuki S, Kakehi K. Analysis of the monosaccharide compositions of total non-dialyzable urinary glycoconjugates by the dithioacetal method [J]. J Chromatogr, 1981, 226: 341-350.
- [6] Needs P W, Selvendran R R. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide [J]. Carbohydr Res, 1993, 245: 1-10.
- [7] Cur W W, Eskin M N A, Biladeris C G, et al. NMR characterization of a 4-O-methyl- β -D-glucuronic acid-containing rhamnogalacturonan from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) mucilage [J]. Carbohydr Res, 1996, 292: 173-183.
- [8] Pinto G L D, Martinez M, Mendoza J A, et al. Structural study of the polysaccharide isolated from *Spondias purpurea gum exudate* [J]. Carbohydr Res, 1996, 290: 97-103.
- [9] Pinto G L D, Maritza M, Corredor A L D, et al. Chemical and 13 C NMR studies of *Enterolobium cyclocarpum* gum and its degradation products [J]. Phytochemistry, 1994, 37: 1311-1315.
- [10] 方积年. C-13 NMR在多糖结构分析上的应用 [J]. 国外药学(抗生素分册), 1982, 3: 107-112.
- [11] Verbruggen M A, Spronk B A, Schols H A, et al. Structures of enzymically derived oligosaccharides from *sorghum* glucuronarabinoxylan [J]. Carbohydr Res, 1998, 306: 265-274.

盔瓣耳叶苔化学成分研究

李光耀, 娄红祥, 王浩

(山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要:目的 研究耳叶苔科植物盔瓣耳叶苔 *Frullania muscicola* Steph. 的化学成分。方法 用硅胶、Sephadex LH-20柱层析, 通过理化性质鉴定及光谱数据分析确定化合物的结构。结果 分离到 3 个甾体化合物和 4 个黄酮化合物, 分别鉴定为豆甾醇二十烷酸酯 (I)、谷甾醇 (II)、洋芹素-7, 4'-二甲醚 (III)、黄芩素-6, 4'-二甲醚 (IV)、6-羟基木犀草素-6, 3'-二甲醚 (V)、黄芩素-6-甲醚 (VI) 和胡萝卜苷 (VII)。结论 化合物 I 为新化合物, 其余 6 个化合物均为首次从该植物中分得。

关键词: 盔瓣耳叶; 苔藓植物; 豆甾醇二十烷酸酯

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)08-0678-04

Studies on chemical constituents of *Frullania muscicola*

LI Guang-yao, LOU Hong-xiang, WANG Hao

(School of Pharmacy, Shandong University, Jinan Shandong 250012, China)

Abstract Object To study the chemical constituents of *Frullania muscicola* Steph. (Frullaniaceae).

Methods Seven compounds were obtained from the petroleum ether extract of *F. muscicola* by repeated chromatography over silica gel and Sephadex LH-20. Their structures were identified by analysis of their spectral data and chemical reactions. **Results** Three steroids and four flavonoids had been isolated and their structures were identified as stigmasterol arachidate (I), sitosterol (II), apigenin-7, 4'-dimethyl ethers (III), scutellarin-6, 4'-dimethyl ethers (IV), 6-hydroxyluteolin-6, 3'-dimethyl ethers (V), scutellarin-6-methyl ether (VI), and daucosterol (VII). **Conclusion** Compound I was new and the other six were obtained from this plant for the first time.

Key words *Frullania muscicola* Steph; bryophyte; stigmasterol arachidate

耳叶苔属植物为耳叶苔科含植物种较多的属, 全球约 800 余种, 以热带和亚热带分布为主, 个别种在温带亦有较广泛的分布^[1]。本属植物盔瓣耳叶苔体小, 红褐色或褐绿色, 平铺丛生于背阴岩面或树干上, 在我国大部分省份山区均有分布, 在泰山民间被称为石花, 捣碎后外敷, 可用于治疗流行性腮腺炎, 有抗菌消炎之功效。为开发我国苔藓资源, 从中寻找生物活

性成分, 我们对其化学成分进行了系统研究。从其石油醚部分分离鉴定出 7 种成分, 分别为豆甾醇二十烷酸酯 (I)、谷甾醇 (II)、洋芹素-7, 4'-二甲醚 (III)、黄芩素-6, 4'-二甲醚 (IV)、6-羟基木犀草素-6, 3'-二甲醚 (V)、黄芩素-6-甲醚 (VI) 和胡萝卜苷 (VII)。其中化合物 I 为新天然产物, 其余 6 个化合物均为首次从该植物中分得。洋芹素, 黄芩素 (6-羟基洋芹素) 以及 6-