

腺梗菘的化学成分研究 (II)

高 辉¹, 李平亚², 李德坤³, 杜晓平^{4*}

(1. 华北煤炭医学院 药学系, 河北 唐山 063000; 2. 吉林大学新民校区基础医学院, 吉林 长春 130021; 3. 天士力集团 中药研究所, 天津 300402; 4. 唐山市中医院, 河北 唐山 063000)

菘草为菊科菘草属植物, 一年生草本, 分为菘 *Siegesbeckia orientalis* L.、腺梗菘 *S. pubescens* Makino 及毛梗菘 *S. glabrescens* Makino。到目前为止, 国内外学者从中分离了 40 余种二萜类化合物, 主要是贝壳杉烷、海松烷型二萜类化合物, 具有抗炎、降压、舒张血管、抗疟、抗生育、免疫抑制和抗菌等生理活性^[1]。已报道了从腺梗菘中分离了 3 个化合物^[3], 本文将继续报道 4 个化合物。

1 仪器与材料

原料采自吉林省抚松县, 原植物由吉林大学药学院生药室张竟敏主任鉴定为腺梗菘 *S. pubescens* Makino

仪器: Kofler 显微熔点测定仪 (未校正); 5DX-F 型红外光谱仪 (美国 Nicolet); VG-Quattro 串联质谱仪 (英国 VG 公司); Bruker ARX-300 型核磁共振仪, 以 TMS 为内标。柱: 薄层色谱硅胶 G (H 青岛海洋化工厂生产 (100~200, 200~300, 400 目)); 显色剂: 10% H₂SO₄-EtOH 溶液。

2 提取与分离

将药材粉碎, 用 95% 乙醇回流提取 3 次, 减压回收乙醇得浸膏, 将乙醇浸膏用甲醇-水 (1:10) 分散, 溶解, 依次经氯仿、乙酸乙酯萃取。氯仿部分经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇 (10:1) 洗脱, 得到化合物 II 和 III, 氯仿-丙酮水 (7:3:1, 下相) 洗脱, 再经氯仿-甲醇 (20:30) 洗脱, 得化合物 I 和 IV。

3 鉴定

化合物 I: 白色针状结晶, mp 139 °C~140 °C (MeOH)。溶于氯仿-甲醇。分析 ¹³CNMR 及 ¹HNMR 确定分子式为 C₂₉H₄₈O。Liebermann-Burchard 反应呈阳性, 推测为甾体化合物。将化合物 I 与甾醇标准品同板薄层展开, 采用 3 种不同展开剂, 二者 R_f 值均一致。故鉴定化合物 I 为甾醇。

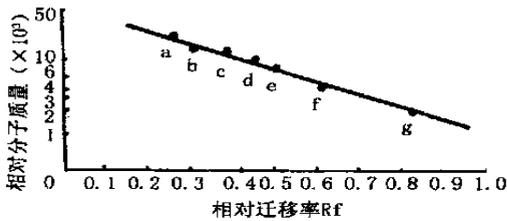
化合物 II: 白色粉末, mp 71 °C~72 °C (MeOH)。溶于氯仿-乙酸乙酯, 不溶于水。EI-MS 480 [M]⁺, 结合 ¹HNMR, ¹³CNMR 谱确定分子式为

C₃₂H₆₄O₂ IR_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1735 (>C=O), 1191, 1178 为一酯带, 2848 (-CH₂-) EI-MS m/z: 480 [M]⁺, 452 [M-2CH₂]⁺, 424 [M-4CH₂]⁺, 396 [M-6CH₂]⁺, 340 [M-8CH₂]⁺。将该化合物与化合物 III 比较, 相对分子质量多出 112, 为 8 个 -CH₂- IR 确定为酯, 推测化合物 III 为廿四酸辛酯^[2]。¹HNMR (CDCl₃) 谱给出 δ7.27 (-OH), 4.05 (2H, t, α H), 2.29 (2H, t, α' H), 1.61 (2H, br., β H), 1.26 (4H, br.) 和 0.88 (6H, t, 2CH₃)。 ¹³CNMR (CDCl₃) 谱: δ179.0 (>C=O), 64.1 (C-1'), 34.4 (C-2'), 31.9 (C-2), 29.7~25.0 (C-3~23, C-3'~6'), 22.6 (C-7') 和 14.1 (C-24)。进一步鉴定化合物 II 为廿四碳酸辛酯, 为首次从该植物中获得。

化合物 III: 白色粘状固体, mp 70 °C~70.5 °C (Me₂O)。易溶于氯仿、乙醚, 难溶于水。EI-MS 给出分子离子峰 369 [M+]⁺。结合 ¹HNMR, ¹³CNMR 谱确定分子式为 C₂₄H₄₈O₂。EI-MS 中 m/z: 341, 313, 285, 257 分别为 [M-2CH₂+1]⁺, [M-4CH₂+1]⁺, [M-6CH₂+1]⁺ 和 [M-8CH₂+1]⁺。IR_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1706 (>C=O), 2918 (-OH), 示有 -COOH, 2849 (-CH₂-), 2930 (-CH₃), 无其他信号, 因此化合物可能为饱和脂肪酸类。¹HNMR (CDCl₃) 谱给出 δ7.27 (-OH), 2.36 (2H, t, α H), 1.64 (2H, br., β H), 1.26 (4H, br.) 和 0.87 (3H, t)。 ¹³CNMR (CDCl₃) 谱: δ179.0 (-COOH), 33.8, (C-2), 31.9 (C-3), 29.6~29.0 (C-4~C-21), 24.7 (C-22), 22.9 (C-23) 和 14.1 (C-24)。进一步鉴定化合物 III 为廿四碳酸, 为首次从该植物中获得。

化合物 IV: 白色片状结晶, mp 250 °C~251 °C (MeOH)。分析 ¹HNMR, ¹³CNMR 确定分子式为 C₂₀H₃₂O₄。易溶于甲醇、吡啶, 微溶于水。分析 ¹HNMR, ¹³CNMR 确定分子式为 C₂₀H₃₂O₄。该化合物 ¹³CNMR (C₅D₅N) 谱给出二十个碳号, 其中 δ180.0 为羰基信号, δ67.1, 70.6 为两个连氧碳信

(下转第 602 页)



a-卵清蛋白 (45 000) b-碳酸酐酶 (30 000) c-胰蛋白酶抑制剂 (20 100) d-溶菌酶 (14 300) e-抑肽酶 (6 500) f-胰岛素 B 链 (3 500) g-胰岛素 A 链 (2 500)
a-ov albumin (45 000) b-carbonic anhydrase (30 000)
c-pancreatic trypsin inhibitor (20 100) d-lysozyme (14 300)
e-aptrotinin (6 500) f-insulin B (3 500) g-insulin A (2 500)

图 2 标准相对分子质量曲线

Fig. 2 Curve of standard molecular weight

浓度高的样品在 HPLC 上吸收峰面积也大, 3 批样品测得含量依次为 96.09%, 97.11%, 94.22%, RSD 分别为 0.44%, 0.50%, 0.69% ($n=3$), 与 SDS-PAGE 结果呈大致平行关系

表 1 3 批蜂毒素样品含量测定结果 ($n=9$)

Table 1 Determination results of melittin in three groups ($n=9$)

批号	样品 /mg	纯度 %	RSD %
20020209	12.00	90.58	1.01
20020314	11.00	91.45	1.06
20020521	10.10	89.75	1.17

3 讨论

由于蛋白质的迁移率与相对分子质量成相关关系, 因而可以用 SDS-PAGE 法测定蛋白质的相对分子质量。对于相对分子质量小于 15 KD 的小分子多肽, 浓度越高的聚丙烯酰胺凝胶电泳其分辨率越高^[5]。蜂毒素系小分子多肽, 本实验采用了 20% 浓度的凝胶, 使各组分获得良好分离, 避免某些蛋白质迁移不规则而导致的相对分子质量测定误差; 银染法对于单一蛋白质条带, 能检出的蛋白质最低量为

2 ng, 其灵敏度较考马斯亮蓝法约提高了 100 倍^[6], 适于检测样品蛋白的单一性。故高浓度的 SDS-PAGE 结合银染法, 对分离小分子多肽, 具有高度准确性和分辨能力。

在蛋白质类物质的分离纯化和纯度检测中, 以一种方法进行, 往往难以得到准确结果, 习惯上采用两种以上的方法^[6]。SDS-PAGE 扫描所测得的含量略低于 HPLC 结果, 主要是由于电泳条带略有弥散, 在截取有效面积时有所损失, 导致结果偏低。将 SDS-PAGE 与半定量分析系统配合使用, 可以在获取样品相对分子质量信息的同时较准确地测定样品含量, 其检测结果与 HPLC 接近, 且两者的检测结果之间具有平行关系。因此, 本研究在已有蜂毒素 HPLC 质控方法的基础上, 建立了 SDS-PAGE 法用于蜂毒素的定性定量分析。

与 HPLC 法比较, SDS-PAGE 虽然检测结果的准确性及灵敏度略低, 但一次电泳可同时完成 10 个样品的上样检测, 效率高且操作简便, 实验成本低廉, 因此, 就蜂毒素等小分子及其相关产品的质控而言, 采用 SDS-PAGE 法基本可行的。

References

- [1] Barbara ECB. New methods of isolation bee venom peptide [J]. *Anal Biochem*, 1981, 116: 48-52.
- [2] Habermann E. Bee and wasp venom [J]. *Science*, 1972, 177: 314-322.
- [3] Liu L, Ling C Q, Hu J H, et al. Isolation, purification and determination of melittin from bee venom [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2001, 22(7): 609-611.
- [4] Ausubel F, Brent R, Kingston R, et al. *Short Protocols in Molecular Biology* (精编分子生物学实验指南) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [5] Guo R J. *Technique of Electrophoresis* (蛋白质电泳实验技术) [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [6] Xia Q C. *Technique and Development of Protein Chemistry* (蛋白质化学研究技术与进展) [M]. Beijing: Science Press, 1999.

(上接第 597 页)

号, 结合¹H NMR, 初步认为符合贝壳杉烷型四环二萜类化合物的谱学特征^[4]。 δ 67.1 70.6 提示为连有羟基的伯碳和叔碳信号, 分别确定为 C-17 位和 C-18 位信号。¹H NMR (C₅D₅N) 谱给出 δ 4.43 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H₈-Ha), 4.40 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H₈-Hb), 4.02 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H₇-Ha), 3.99 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H₇-Hb), 3.66 (1H, s, H-16) 和 1.12 (3H, s, C₂₀-CH₃) 等信号。该化合物与文献^[3]对照基本一致, 故鉴定该化合物为对映-16 α H, 17, 18-

二羟基-贝壳杉烷-19 羧酸

References

- [1] Wu W, Gao H, Wang L J, et al. Advances in research of *Siegesbackia pubescens* [J]. *Spec Wild Econ Anim and Plant Res* (特产研究), 1999, 22(4): 46-48.
- [2] Gao H, Li Y, Li D K, et al. Studies on chemical constituents from *Siegesbackia pubescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 495-496.
- [3] Xiong J, Ma Y B, Xu Y L. Diterpenoids from *Siegesbackia pubescens* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(3): 917-918.
- [4] Gao H, Li P Y, Li D K. The study and application of kauran tetranuclear diterpene compounds by ¹³C NMR [J]. *Chin J Magn Resonance* (波谱学杂志), 2000, 17(4): 335-342.