

HCl 反应阳性。 ^{13}C -NMR 见表 2。 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 与文献报道^[9]比较,鉴定化合物 XⅡ 为槲皮素(queracetin)。

化合物 XⅢ:黄色粉末,mp 248~249 °C, Mg-HCl 反应阳性。 ^{13}C -NMR 见表 2。 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和文献报道^[10]比较,鉴定化合物 XⅢ 为柚皮素(naringenin)。

化合物 XIV:黄色粉末,mp 174~176 °C, Mg-HCl 反应阳性。 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) 见表 2。 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 同文献报道^[11]基本一致,鉴定化合物 XIV 为山奈素-3-*O*-葡萄糖苷(kaempferol-3-*O*-glucopyranoside)。

表 2 化合物 XI~XVI 的 ^{13}C -NMR 数据

Table 2 ^{13}C -NMR data of compounds XI—XVI

碳	XI	XⅡ	XⅢ	XIV	XV	XVI
2	164.1	146.8	78.6	156.6	83.2	80.2
3	103.7	135.7	42.0	133.2	69.1	67.8
4	181.7	175.8	195.8	179.1	28.8	29.6
5	157.3	160.7	162.7	161.5	157.2	29.6
6	98.8	98.1	96.2	98.6	96.6	98.6
7	163.7	163.8	164.7	164.1	158.1	158.3
8	93.9	93.3	94.1	93.5	96.2	96.2
9	161.1	156.1	161.7	156.3	157.9	158.0
10	102.9	102.9	102.2	104.0	101.1	100.4
1'	121.1	121.9	129.8	120.9	132.5	132.6
2'	128.4	115.6	128.9	130.4	116.4	116.2
3'	115.9	145.0	115.7	115.2	146.5	146.1
4'	161.4	147.7	159.0	156.0	146.0	146.3
5'	115.9	115.0	115.7	115.2	115.6	115.6
6'	128.4	120.0	128.9	130.4	120.3	119.7
1"				101.0		
2"				74.1		
3"				76.4		
4"				69.9		
5"				73.3		
6"				60.8		

化合物 XV:白色粉末,mp 172~174 °C;硫酸香草醛显色呈红色, ^{13}C -NMR (CD₃OH, 400 MHz) 数据见表 2。 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和文献报道^[12]儿茶素

基本一致,化合物 XV 鉴定为儿茶素(catechin)。

化合物 XVI:白色粉末,mp 239~241 °C;硫酸香草醛显色红色; ^{13}C -NMR (CD₃OH, 400 MHz) 见表 2。 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和文献报道^[13]基本一致,化合物 XVI 鉴定为表儿茶素(epicatechin)。

References:

- [1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine. *China China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [2] Zhong X Q, Xu H H. Summary of the research about *Ficus officinalis* plant [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(9): a3-a4.
- [3] Hillis W E, Carle A. The chemistry of eucalypt kinos. (+)-Afzele chin, pyrogallol, and (+)-catechin from *Eucalyptus calophylla* Kino [J]. *Aust J Chem*, 1960, 13: 390.
- [4] Xu G J, Xu L S. *Variety Coordinate and Quality Research of Familiar Medicinal Materials* (常用中药材品种整理和质量研究) [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1997.
- [5] Sholichin M, Yamasaki K, Kasai R, et al. Nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulin and betulinic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 20(3): 1006.
- [6] Cheng D C. ^{13}C -NMR and its Use in Chinese Traditional and Herbal Drugs Chemistry (碳谱及其在中草药化学中的应用) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [7] Sun H X, Ye Y P, Yang K. Studies on chemical constituents in *Radix Astilbes Chinensis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(10): 751-754.
- [8] Ren Y L, Yang J S. Study on chemical constituents of *Saussurea tridactyla* Sch-Bip I [J]. *China J Chin Mater Med* (中国药学杂志), 2001, 36(9): 590.
- [9] Yu D Q, Yang J S. *Manual of Analysis Chemistry—Analysis of NMR* (分析化学手册·核磁共振分析) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1999.
- [10] Hildebert W, Vedantha M C, Johann S. ^{13}C -NMR spektren Natürlich Vorkommender Flavonoids [J]. *Tetrahedron Lett*, 1976, 21: 1799.
- [11] Ren F Z, Xi J Q, Qu H H, et al. Studies on chemical constituents of *Lysimachia clethroides* Duby [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学学报), 2001, 17(4): 178-180.
- [12] Yoshiki K, Hiroyuki I, Keiko Y, et al. Tannins and related compounds XC III. Occurrence of enantiomeric proanthocyanidins in the *Leguminosae* plants, *Cassia fistula* L. and *C. javarica* L [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(4): 888-893.
- [13] Foo L Y, Lu Y, McNabb W C. Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(8): 1689-1696.

枸杞子多肽的 MALDI-TOF-MS 定性分析

张志斐^{1,2}, 杨兆勇³

- (1. 河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 华北煤炭医学院 药理学系, 河北 唐山 063000; 3. 中国医学科学院医药生物技术研究所 国家新药筛选中心, 北京 100050)

多肽类化合物广泛存在于自然界中, 应用这些

活性肽可作为药物、疫苗、导向药物、诊断试剂、酶抑

制剂及药物先导化合物等^[1,2],随着分离、纯化技术和结构鉴定等研究方向的飞速发展,越来越多的具有某种生物活性及药用价值的天然多肽类化合物被分离鉴定出来。

枸杞子具有滋补肝肾、益精明目之功效。现代药理研究表明:枸杞子具有提高机体免疫功能、抗氧化、抗衰老、保肝、增加白细胞等作用。本实验采用传统的多肽提取方法,由该种枸杞子中获取多肽提取液,对其各组分进行了分析,从而为其定性及进一步深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料:枸杞子为枸杞 *Lycium barbarum* L. 的果实,采自内蒙古自治区呼和浩特市托克托县,由内蒙古医学院药理学系鉴定,洗净晾干后备用。

1.2 仪器与试剂:Voyager-DE™ PRO 型质谱仪(美国 ABI 公司);Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司);20 μ L 加样器、50~200 μ L 加样器(Beckman 公司);10 kD 孔径的滤膜、0.22 μ m 滤膜(华美公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 步骤与方法

1.3.1 枸杞子多肽的制备:取洗净晾干枸杞子,置于3倍于枸杞子质量的水中,4 $^{\circ}$ C条件下浸泡24 h,充分搅拌,滤过,收集浸泡液,室温条件下5 000 r/min,离心20 min。取上清弃沉淀,称取一定量的硫酸铵置于此上清液中,4 $^{\circ}$ C条件下静置12 h,5 000 r/min离心10 min,弃上清取沉淀,低温真空干燥,称定质量待用。应用时取干燥固体若干,溶于一定量超纯水中,用相对分子质量为1 000孔径的滤膜进行超滤,得到枸杞子多肽。

1.3.2 组成成分及各组分相对分子质量的测定:质谱条件:激光: N_2 ;波长:37 nm;激光的脉冲宽度:2 ns;加速电压:25 kV;检测电压:1 750 V;基体:芥子酸。所有谱图均是100次累加的结果,未经任何圆滑处理。相对分子质量用外标法校准。取样品5 μ L、基体溶液5 μ L混匀,取1 μ L滴于靶片,空气中室温吹干后放入激光质谱仪中测试。

2 结果

经传统的多肽提取方法,由枸杞子中可获得微红色多肽液体。应用MALDI-TOF-MS,在上述的条件下获得如图示的图谱1。结果表明枸杞子多肽主要由5种成分组成,相对分子质量分别为2 810.37、3 211.45、3 563.72、3 682.96、4 230.84 Da。

3 讨论

对具有一定生物活性多肽的研究,一直是药物

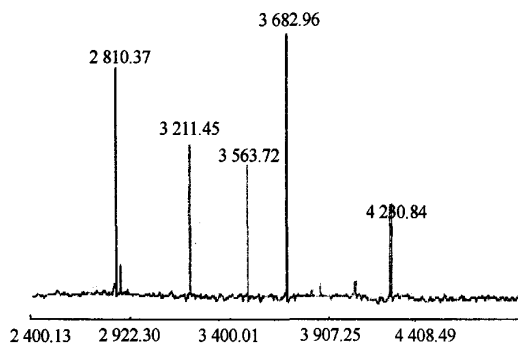


图1 枸杞子多肽主要组分质谱图

Fig. 1 GS chromatogram of main components in polypeptides from *L. barbarum* fruit

研究中的一个活跃领域。本实验建立在已对枸杞子多肽进行一定药理学的基础上,对其组成成分及各组分相对分子质量进行定性分析,从而为此种多肽的深入研究奠定理论基础。

MALDI-TOF-MS是近年发展起来的一种主要用于展示生物大分子相对分子质量分布的质谱仪^[4],具有较高的分辨率,测量精度可达0.005%,且已广泛用于蛋白质、核酸、寡糖等生物大分子的分析。它除了具有传统质谱的灵敏度高、速度快的优点外,可用于复杂体系中混合物的同时测定以及抗干扰能力强是其区别于传统质谱的重要特点。其基本原理是通过基质分子吸收了激光的能量,转化为系统的激发能,导致大分子样品的电离和气化,生成的离子在真空无场区飞行并到达检测器。不同质荷比的离子依次到达检测器,实现分离和检测。目前国内外多为将MALDI-TOF-MS用于小分子药物组分的相对分子质量分布测定^[5]。此外,与电喷雾质谱法(ESI/MS)相比,MALDI-TOF-MS法对样品的基体要求低,允许有少许盐和其他杂质存在,且质量测定范围大,样品消耗少,是蛋白质、多肽等大分子相对分子质量测定的首选工具。

MALDI-TOF-MS分析中,基体的选择直接影响分析结果。考察了多种基体后发现,基体芥子酸是一种适用性较广的基体,对多种化合物的分析都取得了较好的结果。且其在低相对分子质量部分背景较少,当相对分子质量高于600时已基本没有基体芥子酸造成的质谱峰。因此本实验采用芥子酸作为基体。

应用MALDI-TOF-MS对中草药进行分析具有速度快(几分钟完成一次分析)、信息量高、无明显的组分歧视效应(对无紫外吸收的组分不需要衍生就可直接测定)等优点。许多中草药在性状上极为相近,难以区分。利用MALDI-TOF-MS分析中草药

的优势,结合迅速发展的计算机技术,建立中草药的指纹数据库,将为中草药的研究与开发提供一种新的快速鉴别与分析的手段。这对于中草药走向世界以及中草药的现代化都具有重要意义。

References:

- [1] Chene P, Fuchs J, Bohn J, *et al.* A small synthetic peptide, which inhibits the p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines [J]. *Mol Biol*, 2000, 299(1): 245-253.
- [2] Dakappagari N K, Douglas D B, Triozzi P L, *et al.* Prevention of mammary tumors with a chimeric HER-2B-cell epitope peptide vaccine [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(14): 3782-3789.
- [3] Yin J. *Modern Research and Clinical Application of Chinese Materia Medica* (中药现代研究和临床应用) [M]. Vol Ⅲ. Beijing: Traditional Chinese Medicine and Ancient Book Publishing House, 1997.
- [4] Yuan X L, Zhang Y K, Zou H F. Study on identification of traditional Chinese medicine - *Radix Astragali* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21(1): 7-9.

白桂木的化学成分研究

甘茂罗¹, 欧阳胜^{1*}, 谢平¹, 熊彦芬², 陈黎明²

(1. 江西中医学院 中药化学教研室, 江西 南昌 330006; 2. 江西东风药业股份有限公司, 江西 乐平 333300)

白桂木 *Artocarpus hypargyreus* Hance 为桑科波罗蜜属植物, 又名将军树, 红面将军, 分布于江西、广东、海南、福建、湖南、广西、云南等地区。其根入药, 味甘、淡, 性温, 具有祛风利湿、活血通络等功效, 主治风湿痹痛、腰膝酸软、头痛、胃痛、黄疸、产妇乳汁不足等症^[1]。在粤北、赣南地区民间应用较广, 用于治疗风湿性关节炎, 慢性腰腿疼痛等。白桂木的化学成分至今未见报道。本实验从白桂木根的木质部 90% 乙醇提取物的氯仿部分分离并鉴定了 6 个化合物, 分别是 β -谷甾醇(β -sitosterol, I)、棕榈酸(hexadecanoic acid, II)、5, 2', 4'-三羟基-7-甲氧基-3-(3-甲基-2-丁烯基)-6-(3-甲基-1-丁烯基)黄酮(artocarpin, III)、香豆酸(*p*-coumarinic acid, IV)、5, 7, 2', 4'-四羟基黄酮(norartocarpetin, V)、胡萝卜苷(daucosterol, VI)以上化合物均为首次从该植物中分离得到。化合物 IV 首次从波罗蜜属植物中分得。

1 仪器与材料

X-4 型显微熔点测定仪。NMR 使用日本电子 JNM-ECA-400 超导核磁共振波谱仪(¹H-NMR, 400 MHz; ¹³C-NMR, 100 MHz), TMS 为内标。EI-MS 用 Micromass ZabSpec 高分辨磁质谱仪。薄层色谱和柱色谱硅胶均为青岛海洋化工厂产品, 试剂均为分析纯。样品于 2003 年 9 月采自江西于都县山区, 由江西中医学院中药鉴定教研室刘庆华鉴定。

2 提取和分离

白桂木根心材干燥粗粉 40 kg, 90% 乙醇回流提

取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液, 回收乙醇至无醇味后, 加水适量稀释, 依次以石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 分别回收溶剂, 得到石油醚部分 98 g 浸膏、氯仿部分 390 g 浸膏、醋酸乙酯部分 540 g 浸膏、正丁醇部分 450 g 浸膏。取氯仿部分浸膏 200 g, 经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇(100:0~0:1)梯度洗脱, 每 1 000 mL 为 1 流份, 利用 TLC 检测合并相同流份。第 36~40 流份(氯仿洗脱部分)析出白色针状结晶, 经重结晶得化合物 I 500 mg; 合并第 74~84 流份, 即氯仿-甲醇(100:1)洗脱部分, 经硅胶柱色谱(氯仿-丙酮梯度洗脱), 氯仿-丙酮(50:1)洗脱的流份再经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以氯仿-甲醇(1:1)洗脱(下同), 纯化得化合物 II 60 mg; 合并第 118~120 流份, 即氯仿-甲醇(60:1)洗脱部分, 经反复硅胶柱色谱及 Sephadex LH-20 柱色谱纯化, 得化合物 III 110 mg; 第 129~142 流份, 即氯仿-甲醇(60:1)洗脱部分, 析出淡黄色粉末状结晶, 经 Sephadex LH-20 柱色谱纯化并经丙酮-环己烷反复重结晶得化合物 IV 260 mg; 合并第 196~204 流份, 即氯仿-甲醇(30:1)洗脱部分, 再经反复硅胶柱色谱及 Sephadex LH-20 柱色谱纯化得化合物 V 220 mg; 第 204~216 流份, 即氯仿-甲醇(30:1)洗脱部分, 析出白色粉末, 经反复硅胶柱色谱(氯仿-甲醇洗脱)得化合物 VI 430 mg。

3 结构鉴定

化合物 I: 白色针状结晶(氯仿), mp 138~140 °C, Liebermann-Burchard 反应阳性。与 β -谷甾醇对

收稿日期: 2004-10-12

作者简介: 甘茂罗(1976—), 男, 江西高安人, 江西中医学院天然药物化学专业 2002 级硕士研究生。

Tel: (0791) 7118993 E-mail: maoluogan@yahoo.com.cn

* 通讯作者 欧阳胜