IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 427, 3 074, 2 875, 2 540, 2 227, 1 653, 1 587, 1 498, 1 410, 1 340, 1 309, 1 255, 1 030, 858; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{Me}_2\text{CO-d}_6$, 400 MHz) δ : 9.75 (1H, s, H-7), 7.60 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 7.34 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{Me}_2\text{CO-d}_6$, 100 MHz) δ : 190.2 (d, C-7), 150.1 (s, C-4), 146.7 (s, C-5), 130.8 (s, C-1), 128.1 (d, C-6), 113.7 (d, C-2), 110.1 (s, C-3)。参考文献数据^[11]鉴定化合物 X 为 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛。

References:

- [1] Xu N J, Fan X, Han L J, et al. Screening marine glage from Shandong coast for antitumor activity [J]. *Oceanol Limnol Sin* (海洋与湖沼), 2001, 32(4): 408-413.
- [2] Kurata K, Amiya T. Two new bromophenols from the red alga *Rhodomela larix* [J]. *Chem Lett*, 1977, (12): 1435-1438.
- [3] Fan X, Xu N J, Shi J G. Bromophenols from the red alga *Rhodomela confervoides* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(3): 455-458.
- [4] Kurihara H, Mitani T, Kawabata J, et al. Inhibitory potencies of bromophenols from Rhodomelaceae algae against

α -glucosidase activity [J]. *Fish Sci*, 1999, 65(2): 300-303.

- [5] Weinstein B, Rold T L, Harrell C E, et al. Reexamination of the bromophenols in the red alga *Rhodomela larix* [J]. *Phytochemistry*, 1975, 14: 2667-2670.
- [6] Suzuki M, Kowata N, Kurosawa E. Bromophenols from the red alga *Rhodomela larix* [J]. *Bull Chem Soc JPN*, 1980, 53(7): 2099-2100.
- [7] Beyer J, Lang-Fugmann S, Mühlbauer A, et al. A convenient synthesis of 4-hydroxy [$1-^{13}\text{C}$] benzoic acid and related ring-labelled phenolic compounds [J]. *Synthesis*, 1998, 1047-1052.
- [8] Olivera R, Sanmartin R, Dominguez E, et al. A convenient strategy for the synthesis of 4, 5-bis (O-haloaryl) isoxazoles [J]. *J Org Chem*, 2000, 65: 6398-6400.
- [9] Ireland R E, Thompson W J, Srouji G H, et al. Approach to the total synthesis of chlorothricolide: synthesis of "7-epi-bottom half" and its union with "top half" systems [J]. *J Org Chem*, 1981, 46: 4863-4869.
- [10] Weinstein B, Rold T L, Harrell C E, et al. Reexamination of the bromophenols in the red alga *Rhodomela larix* [J]. *Phytochemistry*, 1975(14): 2667-2670.
- [11] Kurata K, Amiya T. A new bromophenol from the red alga *Polysiphonia urceolata* [J]. *Bull Chem Soc JPN*, 1980, 53: 2020-2022.

白及多糖硫酸酯化前后理化性质和结构的比较研究

陈景耀^{1,2}, 张卫明³, 芮海云², 陆长梅², 蒋继宏¹, 吴国荣^{2*}

(1. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097; 3. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

多糖的化学修饰对拓展多糖的生物学活性意义重大,特别是硫酸酯化以后,其保护免疫细胞、减少艾滋病(HIV)感染及抑制乙肝病毒等多种生物学效应,受到药物研究人员的极大关注^[1,2]。在分离、纯化出白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 多糖的基础上^[3],对白及多糖的硫酸酯化修饰的优选工艺进行了实验研究,确定了合适的硫酸酯化工艺^[4]。为了进一步阐明白及多糖在酯化后部分理化性质的变化,本实验通过高效凝胶渗透色谱法、UV、IR、核磁共振等方法比较测定了白及多糖酯化修饰后前后相对分子质量及其分布、溶解度及化学结构的变化,旨在为随后的生物学活性研究及构效关系的阐述提供理论依据。

1 材料和仪器

1.1 材料:白及多糖(BSPS)按文献方法^[3]制备。

1.2 试剂:DEAE-52 为 Whatman 公司产品, Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司进口分装产品,标准相对分子质量多糖 Dextran T 系统为 Pharmacia 公司产品, TFA 为 Fluka 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器:HP1100 高效液相色谱仪, FT-IR Nexus 670 型红外光谱仪 (Nicolet 公司), Lambda 17 紫外可见光扫描仪 (Perkin-Elmer 公司), Bruker AV-500 核磁共振仪, 冷冻干燥器 (日本岛津公司), 3k30 低温调整离心机 (Sigma 公司)。

2 实验方法

2.1 白及多糖硫酸酯的制备与分离纯化:样品按照文献的优化工艺制备^[3,5],经 DEAE-52 吸附,先用

收稿日期:2005-12-25

基金项目:国家科技部科研院所科技开发专项资金(2002EG163191);江苏省药用植物生物技术重点实验室开放基金(KJS02118)

作者简介:陈景耀(1974-),男,江苏泗阳人,硕士研究生,主要从事植物化学及天然活性物质的研究。

Tel:(025)83598216 E-mail:musiclike@163.com

* 通讯作者 吴国荣

0.02 mol/L NaCl 溶液洗脱, 硫酸蒽酮法检测, 未见多糖洗脱峰。再以 0.02~4 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 在洗脱液浓度为 1.6 mol/L 左右得单一多糖洗脱峰, 收集后, 再经 Sephadex G-100 色谱, 蒸馏水洗脱, 硫酸蒽酮法跟踪检测得单一对称的多糖峰, 收集、透析、冷冻干燥得白及多糖硫酸酯(BSPSS)。浊度法测定硫酸基取代度^[6,7]。

2.2 纯度、相对分子质量及其分布测定^[8]: Shodex OHpak SB-802HQ 不锈钢色谱柱(300 mm×7.8 mm); 流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.8; 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 45 °C; 进样量 20 μL; 标准品是 Dextran T-10、Dextran T-40、Dextran T-70、Dextran T-150、Dextran T-500、Dextran T-2000; 检测器为 HP1100 折光示差检测器; HP1100 色谱数据处理工作站。

分别将已知相对分子质量的 T 系列多糖标准品和样品 BSPS、BSPSS 用流动相配制成 3 mg/mL 的溶液, 进样, 分别记录下各自的示差色谱图, 用分析软件以标准多糖相对分子质量的对数 $\lg M_w$ 对保留时间 t_R 进行回归处理求出标准曲线, 对照标样的回归曲线, 分别算出样品的重均相对分子质量、数均相对分子质量及相对分子质量分布。

2.3 紫外可见光谱分析: 称取样品 BSPS、BSPSS, 用双蒸水溶解, 扫描范围 190~500 nm。

2.4 红外光谱: 分别称取 BSPS、BSPSS 各 3 mg, KBr 压片, 扫描范围 4 000~400 cm^{-1} 。

2.5 ¹³C-NMR、¹H-NMR 测定: 溶剂为重水(D₂O), 测定温度为 313 K(40 °C), 样品质量浓度为 40 mg/mL。

3 结果与分析

3.1 BSPS、BSPSS 的理化性质: BSPS、BSPSS 分别经柱色谱纯化、冷冻干燥后, 皆为白色纤维状固体, BSPS 易溶于热水, 略吸潮; BSPSS 极易溶于冷水, 暴露空气中一段时间即成液滴。浊度法测定, BSPS 阴性, 不含硫酸基, BSPSS 的硫酸基取代度为 1.31。硫酸基的取代对多糖一级结构和高级结构皆会产生较大的影响, 影响氢键的形成及电荷的分布, 成为聚阴离子。提高了 BSPSS 的溶解性, 也为其新的生理活性提供了物质基础。

3.2 纯度鉴定: 经 Sephadex G-100、高效液相凝胶渗透色谱法(HPGPC)测定, BSPS 和 BSPSS 均为单一对称峰, 说明均为纯多糖。

3.3 相对分子质量及相对分子质量分布的测定: 经 HPGPC 测得 BSPS 重均相对分子质量为 9.965 8×

10⁴, 相对分子质量分布为 2.48, BSPSS 相对重均分子质量为 9.060 7×10⁴, 相对分子质量分布为 1.32。表明酯化过程中多糖有部分降解, 相对分子质量变小, 相对分子质量分布变窄, 均一度提高。

3.4 紫外可见光谱分析: BSPS 在 260 和 280 nm 处无吸收峰, 表明不含蛋白质和核酸, 而其经过酯化后的 BSPSS 在 262.5 nm 附近有一新的吸收峰产生, 提示接上了硫酸基团。

3.5 红外光谱分析: BSPS 与 BSPSS 整体谱相似, 二者在 3 600~3 200 cm^{-1} 为一组较宽的糖的特征峰, 是糖的羟基 O-H 的伸缩振动吸收峰。810.09 及 875.88 cm^{-1} 附近吸收峰是甘露糖(Man)残基的特征吸收峰, 说明含有 Man, 757 cm^{-1} 附近为 D-葡萄糖(D-Glc)吡喃环对称伸缩振动的吸收峰, 与以往报道白及多糖为葡甘聚糖相符^[9]。在 896 cm^{-1} 有明显的吸收峰, 844 cm^{-1} 附近未见明显吸收峰, 可知吡喃糖的异头碳主要为 β 型。2 929.73 cm^{-1} 是亚甲基(-CH₂-)的 C-H 伸缩振动峰, 是 Glc 和 Man 单元的特征吸收峰。2 888.05 cm^{-1} 为 -CH₃ 的 C-H 伸缩振动峰, 同时在 1 380 cm^{-1} 附近也出现了甲基的 C-H 变角振动吸收峰, 表明含有甲基。1 731.43 cm^{-1} 为羰基的 C=O 伸缩振动的吸收峰。1 150 cm^{-1} 是醚键 C-O-C 的 C-O 伸缩振动吸收峰。除此以外 BSPSS 的红外光谱与 BSPS 相比, 也出现了一些明显的变化, 1 255 和 822.44 cm^{-1} 为修饰后新产生的吸收峰, 是由 -O-SO₃⁻ 的 S=O 和 C-O-S 伸缩振动产生的。表明 BSPS 经过酯化反应已经接上了硫酸基团。

3.6 核磁共振(¹³C-NMR 和 ¹H-NMR)谱分析: 据参考文献报道^[10~13], BSPS 的 ¹³C-NMR 谱中, δ 102.416 和 δ 98.995 为 D-Glc 的异头碳信号, 为 β-D-Glc 和 α-D-Glc, δ 100.085 为 β-D-Man 的异头碳信号, BSPS 的 ¹H-NMR 中 δ 5.494 4 为 α-D-Glc 异头氢的质子峰, δ 4.754~4.930 为 β-D-Man 的异头氢的共振峰, δ 4.51~4.67 处的共振峰是 β-D-Glc 的异头氢质子峰。就构型而言, ¹³C-NMR 和 ¹H-NMR 分析的结论是一致的。δ 20.3 应为乙酰基-COCH₃ 的振动峰, 同时在 δ 172 处可见对应的羰基峰, 说明含有乙酰基, 与红外光谱结论一致, 具体连接位置有待进一步确定。根据各相关化学位移值, 根据 BSPS 的 ¹³C-NMR 分析, 各残基的连接方式为 1,6-linked Glc、1,4-linked Glc 和 1,4-linked Man, 根据目前的数据尚不能确定是否含有支链, 含有较多的 1,4-linked Glc、1,4-linked Man; 1,6-linked Glc 较少。

比较 BSPS 和 BSPSS 的碳谱和氢谱,发现在酯化后,BSPS 碳谱上的化学位移 δ 60 左右的 $-CH_2-$ 共振峰消失,在 BSPSS 共振谱上移到了 δ 66.45~68.8 处,提示 1,4-linked Glc 和 1,4-linked Man 的 C-6 上的羟基被硫酸基取代,化学位移向低场移动,C-6 位上的羟基空间位阻较小,比较活泼,所以一般硫酸酯化容易在 C-6 位发生取代。酯化后异头氢的共振峰都不同程度的向低场移动,可能是由于酯化后糖链变得更加舒展,暴露出较多的羟基,容易与溶剂形成氢键,使得屏蔽效应降低,其中硫酸基起了重要的作用,同时由于硫酸基的影响,各基团的化学环境的改变使得其 ^{13}C -NMR 共振谱峰相对较弱,难以详细解析。

4 讨论

物质的化学结构是其性质和功能的基础,多糖的结构测定是比较困难的,但是解析多糖的低级的空间结构,对于明确多糖的生物学功能具有重要的意义。

白及多糖酯化后相对分子质量变小,相对分子质量分布呈现变窄趋势,变得相对均一。通过紫外光谱除了可以看到多糖的特征吸收在 190 nm 附近,酯化后还看到增加了硫酸基的吸收峰。对酯化前多糖的红外吸收谱分析,可以对部分糖残基的种类和构型进行初步的判断,酯化后也能看出产生了新的硫酸基吸收峰。通过碳谱和氢谱的分析,初步得出白及多糖由 1,6-lined Glc,1,4-lined Glc 和 1,4-linked Man 连接而成,酯化后硫酸基接在 C-6 上。要获取其更多的结构信息,准确清晰的阐述其更为具体的结构特征还需采取多种方法进一步研究。通过酯化前后的比较,发现硫酸酯化引起了白及多糖多种理化性质及结构的变化,而这些为研究多糖的构效关系提供了很多基础信息。

References:

- [1] Chen C Y, Huang X H, Zhou J Y, et al. Sulfation of polysaccharides isolated from *Indocalamus tessellatus* and their anticytopathic effect on human immunodeficiency virus type [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1998, 33(4): 264-268.
- [2] Tian G Y, Li S T, Song M L, et al. Synthesis of *Achyranthes bidentata* polysaccharide sulfate and its antiviral activity [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1995, 30(2): 107-111.
- [3] Rui H Y, Wu G R, Zhang W M, et al. Research on extraction of polysaccharide from *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2001, 20(1): 14-16.
- [4] Chen J Y, Wu G R, Wang J A, et al. Sulfation techniques of *Bletilla striata* polysaccharide by orthogonal design [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 43-46.
- [5] Ueno Y, Okamoto Y, Yamauchi R, et al. Anantitumor activity of the alkali-soluble polysaccharide and its derivatives obtained from the Sclertia of *Grifora umbellata* (Fr.) PILAT [J]. *Carbohydr Res*, 1982, 101: 160-167.
- [6] Zhang H F, Li B C, Fan J H. Determination of sulfate radical content in sulfated polysaccharides (SPS) by gravimetric analysis of hydrochloric acid hydrolysis and barium sulfate precipitation [J]. *Food Sci* (食品科学), 2002, 23(5): 107-111.
- [7] Zhang W J. *Biochemical Techniques in Complex Carbohydrates* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1994.
- [8] Wei Y A, Fang J N. To determine the homogeneity and molecular weight of polysaccharide by HPGPC [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1989, 24(7): 532-536.
- [9] Zhu X P, Wu D R. Isolation, purification, composition and properties of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. polysaccharide [J]. *J Anhui Univ* (安徽大学学报), 1991, 4: 86-91.
- [10] Zhang W J. *Biochemical Technology of Study on Carbohydrate Complex* (糖复合物生化研究技术) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987.
- [11] Liang X T. *The Analysis and Application of High Resolution 1H -NMR* (核磁共振高分辨氢谱的解析和应用) [M]. Beijing: Science Press, 1982.
- [12] Pinto G L D, Martinez M, Mendoza J A, et al. Structural studies of the polysaccharide isolated from *Spondias purpurea* gum exudates [J]. *Carbohydr Res*, 1996, 290: 97-103.
- [13] Wang Z, Fang J N. The application of high resolution NMR to the structure of polysaccharide [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2000, 28(2): 211-214.

水黄皮化学成分的研究

黄欣碧,龙盛京*

(广西医科大学 化学教研室,广西南宁 530021)

水黄皮 *Pongamia pinnata* (L.) Merr. 为豆科

水黄皮属的半红树植物^[1],是广西 5 种半红树植物

收稿日期:2005-12-24

基金项目:教育部 2003 年春晖计划资助项目;广西科学基金资助项目(0342003-4)

作者简介:黄欣碧(1972-),女,广西德保人,执业药师,主管药师,广西医科大学 2002 级研究生,主要从事天然药物的研究。

Tel:(0771)3044529 E-mail:gxnhxb930@sohu.com

* 通讯作者 龙盛京 Tel:(0771)5358827 E-mail:shjlong@126.com