

即香草酸。

化合物Ⅶ:淡黄色粉末(甲醇-水),mp 199℃。¹H-NMR、¹³C-NMR光谱对照文献数据^[10],确定化合物Ⅶ为2,5-二羟基苯甲酸,即龙胆酸。

References:

- [1] Ueno A, Oguri N, Hori K, et al. Pharmaceutical studies on ferns. 18. chemical components in leaves of *Sphenomeris chusana* Copel. and *Cyathea fau* Copel. [J]. *Jpn J Pharm*, 1963 (83): 420-422.
- [2] Mei W L, Qi S H, Wu G F, et al. Flavonoids from *Cinnamomum zeylanicum* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2001, 23(3): 394-396.
- [3] Kato T, Monrita Y. C-Glycosylflavones with acetyl substitution from *Rumex acetosol* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38 (8): 2277-2280.
- [4] Davoust D, Massias M, Molho D. ¹³C-NMR-Investigation of flavonoid C-β-D-glucosides detection of a conformational equilibrium [J]. *Org Magn Reson*, 1980, 13(3): 218-229.
- [5] Dong Y J, Dai B H, Zhang N X, et al. A study on flavonoids in hawthorn leaves [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1996, 13(1): 31-33.
- [6] Chen Q, Wu L J, Ruan L J. Chemical studies on the constituents of *Lophatherum gracile* Brongn [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2002, 19(4): 257-259.
- [7] Jia L Y, Sun Q S, Huang S W. Isolation and identification of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2003, 13(3): 159-161.
- [8] Guo L N, Jiang L M, Wu L J, et al. Studies on the chemical constituents of the stems and leaves of *Acanthosax sessiliflorus* (Rupret Maxim.) Seem [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2002, 19(3): 180-182.
- [9] Gao H Y, Sui A L, Chen Y H, et al. Chemical constituents of *Dioscorea bulbifera* L [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(3): 178-180.
- [10] Xie J B, Li P. Studies on phenolic acids from *Ilex purpurea* Hassk [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(1): 76-77.

GPC法测定仙人掌多糖相对分子质量以及HPLC-ELSD法测定其单糖组成

金鑫^{1,2}, 赖凤英¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640; 2. 圣安娜饼屋(深圳)有限公司, 广东 深圳 518126)

多糖类的活性与其相对分子质量大小、聚合度、分支度以及溶液中高级构象等都有关系,多糖相对分子质量太大或太小均会引起活性的下降。因此,多糖的结构是其生物活性的基础,多糖的一级结构和高级结构与其生物活性间的构效关系是当前糖化学和糖生物学共同关注的焦点问题。多糖结构研究的主要内容有相对分子质量测定、多糖的单糖组成、糖苷键构型、聚合度、分支度等基本结构以及多糖的溶液构象等^[1]。本研究用热水提取的仙人掌粗多糖,提取液经Savag法脱蛋白后,采用Sephacryl S-400柱色谱纯化,得到仙人掌多糖(OP),经过高效凝胶渗透色谱和常压凝胶柱色谱分析表明,OP为均一多糖。

本实验对纯化后的仙人掌多糖组分OP的理化性质进行了研究,并利用凝胶渗透色谱法(GPC)测定仙人掌多糖OP的相对分子质量以及HPLC-ELSD分析其单糖组成。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂:米邦塔仙人掌:购于海南省仙科农业开发有限公司,晒干,磨粉备用。试验所用3,5-二硝基水杨酸、葡萄糖、苯酚、硫酸、氯仿、正丁醇、磷

酸二氢钾、茚三酮等均为分析纯。各种糖标准品:葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖醛酸购于Fluka公司。Sephacryl S-400 HR凝胶填料:Amersham公司。Sephadex G-200凝胶填料:Pharmacia公司。

1.2 试验仪器:旋转蒸发仪,电热恒温水浴锅,Waters 2410示差折光检测器, Waters 717plus自动进样器, Waters 1525 HPLC泵,柱温箱, Alltech ELSD 2000蒸发光散射检测器, S21-6型电子恒温水浴锅, 80-2型离心机, HL-2A恒流泵, DBS-100电脑全自动部分收集器, Unico-UV21202PC紫外-可见分光光度计、WZZ-2A自动旋光仪。

1.3 仙人掌多糖OP的理化特性分析:观察仙人掌多糖OP的外观,测定OP的比旋光度、在不同溶液中的溶解度以及不同化学试剂的特异性反应。

1.4 凝胶渗透色谱法(GPC)测定多糖相对分子质量^[2]:色谱条件:TSK G-5000 PW×L凝胶柱, TSK G-3000 PW×L凝胶柱;流动相为0.02 mol/L KH₂PO₄溶液, pH 6.0;体积流量0.6 mL/min;柱温40℃;进样20 μL;标样为已知相对分子质量的葡聚

收稿日期:2006-05-26

作者简介:金鑫(1981—),女,硕士研究生,主要从事天然产物提纯分离及活性研究。

Tel:13751760520 E-mail:jxinemail@126.com

糖标准品(Dextran, 相对分子质量为 0.44×10^4 , 2.14×10^4 , 1.24×10^5 , 1.96×10^5 , 2.77×10^5 , 4.01×10^5 , Sigma 公司); 检测器为 Waters 2410 示差折光检测器。

测定方法: 将已知相对分子质量的葡聚糖标准品分别用流动相配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 进样量为 $20 \mu\text{L}$, 记录 GPC 色谱图, 用 Breeze GPC 软件以标准葡聚糖相对分子质量的对数 $\log M_w$ 对洗脱体积 Elution Volume 进行回归处理^[3]。将多糖样品用流动相配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 进样 $20 \mu\text{L}$, 测得多糖样品的保留时间, 利用标准曲线求得多糖相对分子质量。

1.5 HPLC/ELSD 分析仙人掌多糖 OP 的单糖组成: 色谱条件: C_{18} 柱; 流动相为乙腈-水 (70 : 30), 体积流量为 1.2 mL/min ; 柱温 40°C ; ELSD 漂移管温度为 100°C ; 气体压力 2.4 L/h 。仙人掌多糖 OP 水解样品制备: 取 40 mg 加入到 2 mL 硫酸 (2 mol/L) 中, 105°C 封管水解 10 h 后于 50°C 水浴中以 BaCO_3 中和, 高速离心除去沉淀。测定方法: 将单糖标准品分别配制成 1.0 、 2.0 、 3.0 、 4.0 、 5.0 mg/mL 的溶液, 进样量为 $5 \mu\text{L}$, 记录色谱图, 用 origin 软件以峰面积 (A) 的对数 $\log A$ 对单糖标准品浓度进行回归处理, 得出单糖标准曲线。再配置混合标准单糖溶液, 进样量为 $5 \mu\text{L}$ 。再将多糖水解样品进样, 记录色谱图, 测得多糖水解样品的各单糖的保留时间及峰面积, 利用混合标准单糖和单糖标准曲线求出仙人掌多糖组分 OP 的单糖组成及摩尔比^[4]。

2 结果与讨论

2.1 OP 的理化性质: 仙人掌多糖 OP 为淡黄色粉末; 易溶于水, 不溶于乙醇、乙醚及丙酮等有机溶剂; 比旋光度为 $[\alpha]_D^{20} = +11.25^\circ$; 与 KI-I_2 作用不显蓝色; OP 与硫酸-苯酚作用显棕黄色; 与茚三酮作用显淡紫色。

2.2 GPC 测定 OP 分子量: 图 1 为经 Breeze GPC 软件处理, 以标准葡聚糖相对分子质量的对数 $\log M_w$ 对洗脱体积进行回归所得葡聚糖 Dextran 系列标准品的 GPC 标准曲线图, 标准曲线方程为 $\log M_w = 1.03e + 002 - 1.86e + 001V + 1.18e + 000 V^2 - 2.51e - 002V^3$ (其中 V 表示洗脱体积)。由标准曲线求得 OP 的重均分子量 (M_w) 为 1.73×10^5 , 数均相对分子质量 (M_n) 为 1.25×10^5 , 峰位相对分子质量 (M_p) 为 3.47×10^5 , 相对分子质量分布宽度为 1.42 。

2.3 HPLC-ELSD 分析仙人掌多糖 OP 单糖组成: 由各种糖的标准品的 ELSD 色谱图可得出各种糖

的保留时间和峰面积。用 origin 软件以峰面积的对数 $\log A$ 对各种糖的浓度进行回归处理, 得出各种糖的浓度标准曲线, 见表 1。

图 1 为混合标准品 ELSD 色谱图, 包括葡萄糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖。与各种糖标准品单标准 ELSD 色谱图比较, 根据保留时间可得出 1 为葡萄糖醛酸、2 为鼠李糖、3 为阿拉伯糖、4 为葡萄糖、5 为蔗糖、6 为麦芽糖。

表 1 糖类对照品的保留时间和标准曲线

Table 1 Retention time and standard curve of reference monosaccharides

对照品	保留时间/ min	标准曲线 (C 代表糖的质量浓度 mg/mL)
葡萄糖醛酸	2.730	$\log A = 1.55738 + 1.54757 \log C$
鼠李糖	3.737	$\log A = 1.29837 + 1.05405 \log C$
阿拉伯糖	4.024	$\log A = 0.63432 + 1.84639 \log C$
葡萄糖	4.617	$\log A = 1.63977 + 1.20426 \log C$
蔗糖	5.364	$\log A = 1.73281 + 0.95423 \log C$
麦芽糖	5.955	$\log A = 1.77283 + 0.85650 \log C$

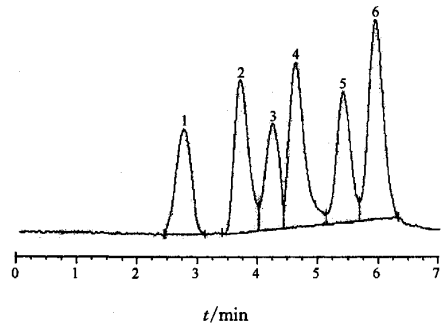


图 1 混合对照品 ELSD 色谱图

Fig. 1 ELSD Chromatogram of complex reference monosaccharides

图 2 OP 水解样品的 ELSD 色谱图由保留时间和峰面积可得出, 仙人掌多糖组分 OP 是由葡萄糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖 4 种单糖组成的杂多糖, 由峰面积代入各单糖标准曲线求出各单糖的浓度, 再除以各单糖的摩尔相对分子质量得出这 4

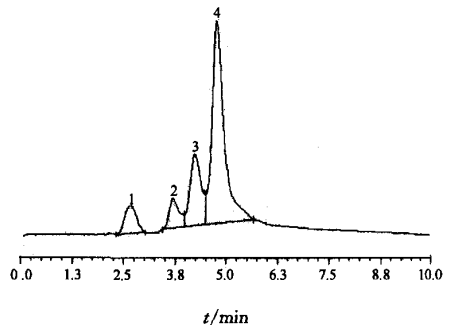


图 2 OP 水解样品的 ELSD 色谱图

Fig. 2 ELSD Chromatogram of OP hydrolyzate sample

种单糖的摩尔比为 0.59 : 1 : 2.98 : 2.57。

3 小结

3.1 仙人掌多糖 OP 理化性质为淡黄色粉末;易溶于水;不溶于乙醇、乙醚及丙酮等有机溶剂;比旋光度为 $[\alpha]_D^{20} = +11.25^\circ$;与 KI-I₂ 作用不显蓝色;OP 与硫酸-苯酚作用显棕黄色;与茚三酮作用显淡紫色。

3.2 凝胶渗透色谱法(GPC)测定 OP 的 M_w 为 1.73×10^5 , M_n 为 1.25×10^5 , M_p 为 3.47×10^5 , 相对分子质量分布宽度为 1.42。

3.3 用 HPLC-ELSD 测定 OP 单糖组成为葡萄糖

醛酸:鼠李糖:阿拉伯糖:葡萄糖=0.59 : 1 : 2.98 : 2.57。

References:

- [1] Kitamura S. An antitumor, branched (1-3)- β -D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *cryptoporus volvatus* [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 263: 111-121.
- [2] Zhang W J. *Biochemical Technology of Compound Polysaccharide* (复合多糖生化技术) [M]. Beijing: China Scientific and Technical Publishers, 1992.
- [3] Habibi Y, Heyraud A, Mahrouz M, et al. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits [J]. *Carbohydr Res*, 2004 (339): 1119-1127.
- [4] Huang Y Z, Wang L. The application of HPLC/ELSD in natural medicament analyse [J]. *New Chin Tradit Med Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2001, 12(6): 447-448.

冬凌草化学成分的研究

刘 净, 谢 韬, 魏秀丽, 杨春华, 梁敬钰*

(中国药科大学 天然药物化学教研室, 江苏 南京 210038)

冬凌草, 学名碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara, 是一种唇形科香茶菜属植物, 产于我国河南、河北、湖南、湖北、四川、贵州、广西、陕西、甘肃、山西、浙江、安徽及江西等地。具有清热解毒、消炎止痛等功效, 用于治疗食管癌、贲门癌、原发性肝癌、咽喉炎、扁桃体炎等。近年来药理实验还证明其具有中枢抑制、抗氧化等活性。虽然国内外学者自 20 世纪 70 年代起就对冬凌草的化学成分陆续进行了研究, 但主要针对其二萜类成分, 而对其他成分研究很少。为全面了解冬凌草的化学组成, 探索其中的活性成分, 笔者对河南济源产冬凌草地上部分的化学成分进行了研究, 从中分离得到 10 个化合物, 经波谱解析和理化常数对照, 确定了它们的结构, 分别为 5, 8, 4'-三羟基-6, 7, 3'-三甲氧基黄酮(5, 8, 4'-trihydroxy-6, 7, 3'-trimethoxylflavone, I)、苜蓿素(tricin, II)、冬凌草乙素(ponicidin, III)、lasiodonin(IV)、冬凌草甲素(oridonin, V)、胡麻素(pedalitin, VI)、丁二酸(succinic acid, VII)、肌醇(inositol, VIII)、enmenol-1-O- β -D-glucoside(IX)和山奈酚-3, 7-O- α -L-二鼠李糖苷(kaempferol-3, 7-O- α -L-dirhamnoside, X)。其中, 化合物 I, II, VI, VIII 和 X 为首次从冬凌草中分离得到。

1 仪器与材料

X-4 数字显示显微熔点测定仪(温度未校正); Agilent UV-2501PC 紫外分光光度计测定紫外光谱; Nicolet Impact-410 型红外光谱仪(KBr 压片); Burkner AV-300 核磁共振波谱仪(TMS 内标); ESI-MS 质谱用 HP-100 型质谱仪(LC/MSD System, ESI Mode)测定; EI-MS 质谱用 VG 型质谱仪测定; 所用试剂均为分析纯; 柱色谱、薄层色谱硅胶及高效 GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶板均为青岛海洋化工厂产品。

药材由河南济源医药公司采购, 经中国药科大学中药标本馆宋学华副教授鉴定为唇形科香茶菜属植物碎米桠 *R. rubescens* (Hemsl.) Hara 的地上部分。

2 提取和分离

取冬凌草干燥地上部分 10 kg, 用 80% 乙醇回流提取(20 000 mL $\times$ 2), 减压浓缩提取液至含醇量约 60%, 静置过夜, 滤过。滤液减压浓缩至无醇, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取(得石油醚萃取液、醋酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液)。醋酸乙酯萃取液浓缩, 得该部分浸膏 151 g。正丁醇萃取液浓缩, 得该部分浸膏 139 g。

醋酸乙酯萃取液浸膏通过反复硅胶柱色谱(氯

收稿日期: 2006-02-10

作者简介: 刘 净(1981-), 女, 湖北省鄂州市人, 中国药科大学天然药物化学专业 2001 级硕士。

Tel: (025)85322738 E-mail: liujing919@hotmail.com

* 通讯作者 梁敬钰 Tel: (025)85391289 E-mail: lyjiang@publicl.ppt.js.cn