

植物环肽的薄层化学识别新方法及其在植物化学研究中的应用

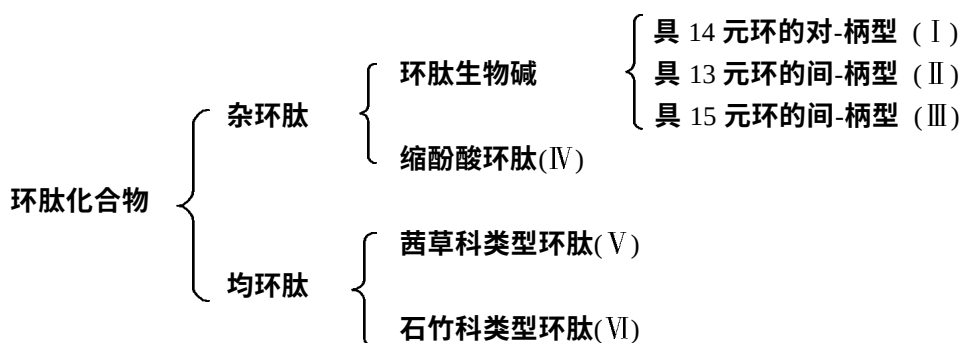
周 俊 谭宁华

(中国科学院昆明植物研究所植物化学开放研究实验室, 昆明 650204. E-mail: nhtan@mail.kib.ac.cn)

摘要 报道了一种专一的植物环肽的薄层化学识别新方法, 该法是一种应用茚三酮试剂显色的薄层原位化学反应方法. 应用该法从 5 个科 14 个属的 17 种植物中共分离鉴定了 73 个环肽化合物, 其中包括 68 个新环肽. 在这些植物环肽结构鉴定中应用了各种波谱、化学、酶学方法(特别是各种 2D-NMR 和 FAB-MS)确定其分子中的氨基酸残基及其序列. 只介绍该识别方法, 并列出了目前应用本法发现并鉴定的所有环肽的来源和结构. 同时在双向薄层层析上还比较了环肽和肽酰胺的不同薄层行为.

关键词 薄层化学识别方法 环肽

环肽(cyclopeptides 或 cyclic peptides)是指一类主要由常见氨基酸和一些不常见氨基酸以肽键形成的环状化合物. 自 1963 年 Goutarel 从 *Waltheria americana* 中分离得到 adouetine X, Y 和 Z 后, 目前已发现 200 多个植物环肽. 环肽主要分布于石竹科(Caryophyllaceae)、番荔枝科(Annonaceae)、鼠李科(Rhamnaceae)和茜草科(Rubiaceae), 零散分布于菊科(Compositae)、Hymenocardiaceae、唇形科(Labiatae)、紫金牛科(Myrsinaceae)、露兜树科(Pandaceae)、茄科(Solanaceae)、梧桐科(Sterculiaceae)、荨麻科(Urticaceae)和马鞭草科(Verbenaceae)^[1].



基于已发现植物环肽骨架结构我们提出了环肽可分为下列类型: 即包括两大类(均环肽和杂环肽)共 6 小类 (见图 1)^[1].

目前还没有一种专一的化学识别方法检测植物中是否含有环肽. 因为多数环肽没有裸露的 N 端, 对茚三酮试剂不显色. 在一些环肽生物碱即类型 I、II 和 III 研究中曾应用检测生物碱的 Dragendorff 试剂检测这 3 类环肽, 但此试剂主要用于发现生物碱, 对环肽不仅无专一性, 而且灵敏度低. 从 1991 年我们在石竹科植物太子参(*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax et Hoffm.)中发现环肽的基础上^[2], 逐步建立了一种专一的植物环肽的薄层化学识别新方法, 该法是一种应用茚三酮试剂显色的薄层原位化学反应方法. 应用该法我们从 5 个科 14 个属的 17 种植物中共分离鉴定了 73 个环肽化合物, 其中有 68 个新环肽, 主要是环二肽及环六

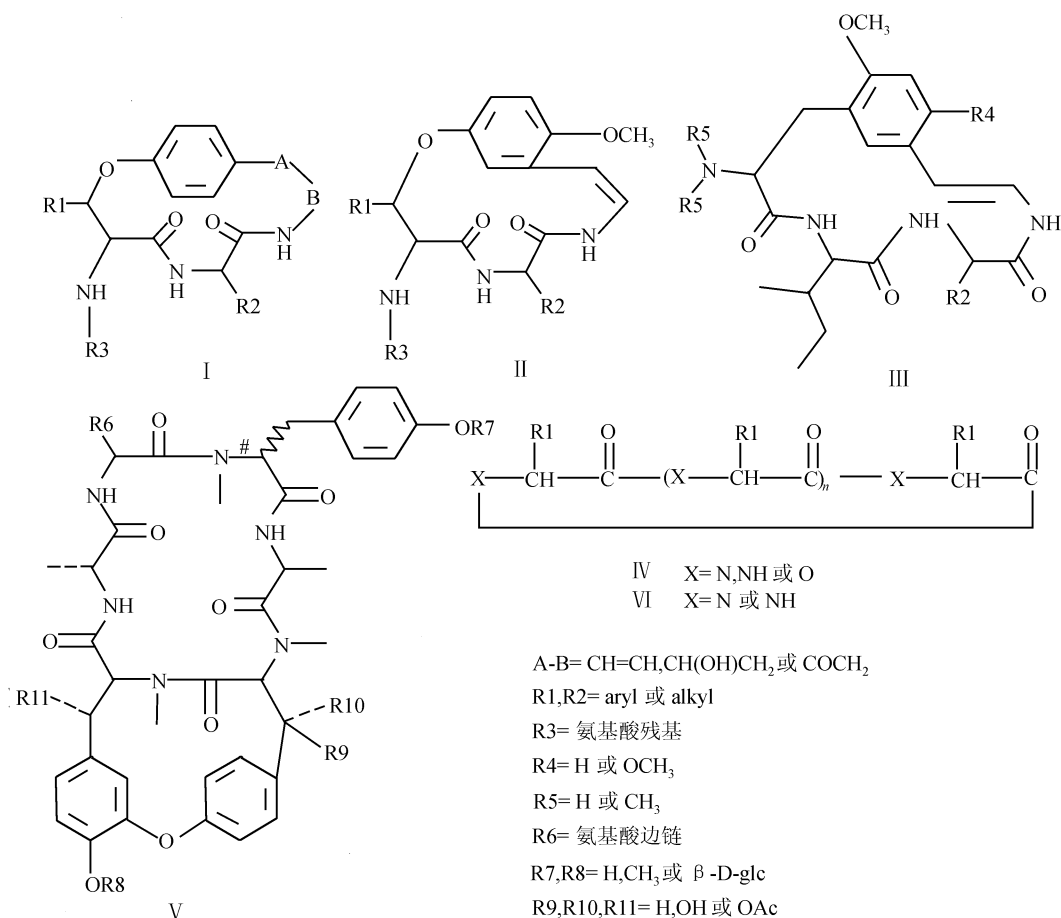


图 1

肽至环八肽(表略), 详见文献[2~23]^{1),2)}。同时酰胺中的一类, 即由 α -氨基酸的氨基与其侧链上的羧基(内酰胺)或其他羧基以酰胺键形成的酰胺(本文中命名为肽酰胺)亦对本法呈正反应, 应用该法我们发现心血管和神经系统活性的焦谷氨酸(pyroglutamic acid)是生脉散的主要成分之一, 还发现人参、五味子、麦冬、天麻等重要生药中均含有焦谷氨酸。因此在双向薄层层析上我们比较了环肽和肽酰胺的不同薄层行为。本文详细介绍该识别方法, 并列出了目前我们应用本法发现并鉴定的所有环肽的来源和结构。

1 实验

(1) 材料。所有溶剂和试剂为化学纯, 薄层层析硅胶 G 板和柱层析硅胶 H 为青岛海洋化工厂产品, 反相柱层析材料 RP-8 和 MCI 为 Merck 产品, 植物材料为待测含环肽或肽酰胺植

1) Cheng Y X, Zhou J, Tan N H, et al. A new cyclopeptide from *Brachystemma calycinum*. Chinese Chemical Letters (待发表)

2) Tan N H, Wang S M, Zhou Jun, et al. Dicyclopeptides of *Panax notoginseng* and lactams of *Panax ginseng*. Chinese Chemical Letters (待发表)

物的各个部位,本文以太子参环肽检测为例.

(2) 样品制备. 称取 50~100 g 干燥植物细粉,用 95%的乙醇回流提取 3 h,过滤并回收溶剂得乙醇流浸膏.乙醇流浸膏首先用乙酸乙酯或氯仿萃取,继用正丁醇萃取,回收溶剂所得的乙酸乙酯或氯仿部分用于环肽和肽酰胺检测,正丁醇部分用于环肽配糖体检测.如果供检样品系植物种子或富含油脂成分时,样品首先要用石油醚回流脱脂 3 h 后再按上述方法制备.由于制备的样品常含有色素及水溶性成分,一般需将该萃取部分用正相柱层析(硅胶 H, 氯仿-甲醇)或反相柱层析(RP-18 或 MCI, 甲醇-水)脱去色素或去掉水溶性成分后再检测.现以 100 g 太子参为例,其根部干粉按照上述方法制备得到了乙酸乙酯部分供下面检测.

(3) 环肽和肽酰胺的发现. 取两块 25 mm×50 mm 的硅胶 G 板(板 1 和 2)将样品分别点在两块板上,用氯仿-甲醇(8.5:1.5 或 9:1)展开;挥掉溶剂后,板 1 放置,而板 2 悬于底部加有约 1 mL 浓盐酸的密闭的磨口玻璃缸中(耐酸和耐高温玻璃缸),置于已升温至 110℃的烘箱中,加热水解 1~2 h,冷却后取出板 2,在通风柜中挥掉盐酸;然后将未经水解的板 1 和加热水解的板 2 同时喷洒 0.2% 茚三酮丙酮试剂,用电吹风加热几分钟即可显色.用上述方法重复操作一次.根据两次实验结果,如板 2 在多数情况下显示几个紫红色斑点,少数情况下显示某些黄色斑点,而板 1 在相应位置上无显色斑点,由此提示此植物样品可能含有环肽或肽酰胺.

(4) 环肽和肽酰胺的区别. 取一块 50 mm×50 mm 的硅胶 G 板(板 3)按照双向薄层层析板点样方法将前述显示有环肽或肽酰胺的样品点在板上,用氯仿-甲醇(8.5:1.5 或 9:1)作第一向展开;挥掉溶剂后,先按前述方法浓盐酸高温水解冷却挥掉盐酸后,然后在下列溶剂系统 A 或 B 中进行第二向展开: A 系统: 氯仿-甲醇-冰醋酸(8:2:2 滴), B 系统: 氯仿-甲醇-水-冰醋酸(7:3:0.5:4 滴),挥掉溶剂后,板 3 喷洒 0.2% 茚三酮丙酮试剂,用电吹风加热几分钟斑点即显出.按照上述方法再重复操作一次,如板 3 在第二向的同一轴上只显示一个红紫色斑点,表明此植物样品可能含有肽酰胺;而板 3 在第二向的同一轴上显示多个紫红色或黄色斑点,表明此植物样品可能含有环肽成分.

2 结果与讨论

(1) 检测结果评估. 比较板 1(单向不水解板)和板 2(单向水解板)显色斑点,当板 2 显示一些紫红色或黄色斑点,而板 1 在相应处不显色时,为正反应,说明该样品可能含有环肽或肽酰胺.分析板 3(双向水解板)显色斑点在第二向的变化情况(详见本节(4)).

(2) 太子参环肽的检测结果. 前述制备的太子参乙酸乙酯部分的薄层层析检测结果见图 2,结果显示了该样品的 3 个主要环肽成分.在本法的单向薄层层析的追踪检测下,在分离中又发现了 5 个微量环肽成分,共分离得到 8 个环肽化合物即太子参环肽 A~H(表略).

(3) 应用. 在本法的单向薄层层析的追踪检测下,共有 73 个环肽化合物从 17 种植物中分离得到,其结构通过各种波谱方法(特别是各种二维核磁共振新技术)并配以生化方法确定(表略).

(4) 环肽和肽酰胺的区别. 应用本法除了分离得到环肽外,对茚三酮试剂亦显正反应的

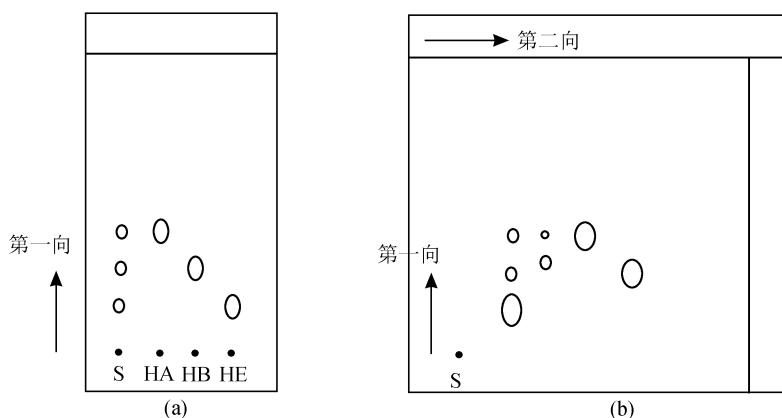


图 2

肽酰胺也分离得到, 包括焦谷氨酸和酯及其类似物、其他酰胺类化合物^{[24], 1), 2)}. 为了在薄层层析上区别环肽和肽酰胺, 我们仔细地比较了它们在单向和双向薄层层析上的展开情况, 发现它们在显色后颜色及其变化和双向上的斑点情况存在明显差异. 环肽一般显紫红色或黄色, 褪色快, 在双向薄层层析的第二向的同一轴上通常有两个或更多斑点; 而肽酰胺一般显红紫色, 褪色慢, 在双向薄层层析的第二向的同一轴上通常是一个斑点.

(5) 结论. 茚三酮试剂是氨基酸、直链肽和蛋白质的常用显色试剂. 我们将茚三酮试剂和薄层层析结合起来, 建立了一个新的薄层原位化学反应方法(浓盐酸, 110℃, 1~2 h), 应用于植物环肽和肽酰胺的化学识别. 自 1991 年以来, 通过这几年的应用发现本法重复性好、灵敏度高、专一性强, 有利于发现环肽和肽酰胺, 不仅能有效地预测某种植物提取物是否含有环肽和肽酰胺, 而且还可以有效地指导环肽和肽酰胺的分离纯化. 从我们的研究工作和有关文献的报道我们发现环肽较普遍地存在于石竹科、番荔枝科、茜草科和鼠李科植物中.

致谢 对李朝明、邹澄、赵玉瑞、张荣平、汪有初、丁中涛、王双明、程永现、陈昌祥、何敏和赵守仁等人给予的帮助, 在此一并致谢. 本工作为国家自然科学基金、中国博士后科学基金、云南省应用基础研究基金和中国科学院昆明植物研究所植物化学开放研究实验室基金资助.

参 考 文 献

- 1 谭宁华, 周 俊, 赵守训. 植物环肽研究进展. 药学学报, 1997, 32(5): 388~399
- 2 Tan N H, Zhou J, Chen C X, et al. Cyclopeptides from the roots of *Pseudostellaria heterophylla*. Phytochemistry, 1993, 32(5): 1327~1330
- 3 Li C M, Tan N H, Mu Q, et al. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. Phytochemistry, 1998, 47(7): 1293~1296
- 4 Li C M, Tan N H, Zhen H L, et al. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. Phytochemistry, 1999, 50(6): 1047~1052
- 5 Li C M, Tan N H, Lu Y P, et al. Annomuricin A, a new cyclopeptide from the seeds of *Annona muricata*. Acta Botanica Yunnanica, 1995, 17(1): 459~462
- 6 Li C M, Tan N H, Zhen H L, et al. Cyclopeptide from the seeds of *Annona muricata*. Phytochemistry, 1998, 48(3): 555~556
- 7 Li C M, Tan N H, Mu Q, et al. Cyclopeptide from the seeds of *Annona squamosa*. Phytochemistry, 1997, 45(3): 521~523
- 8 Wang Y C, Tan N H, Zhou J, et al. Cyclopeptides from *Dianthus superbus*. Phytochemistry, 1998, 49(5): 1453~1456

1) 见 1049 页脚注 2)

2) 郝小燕, 谭宁华, 周 俊. 黔产天麻的化学成分. 云南植物研究 (待发表)

- 9 Ding Z T, Wang Y C, Zhou J, et al. Two new cyclic peptides from *Psammosilene tunicoides*. Chinese Chemical Letters, 1999, 10(12): 1037~1040
- 10 Tan N H, Zhou J. Heterophyllin C, a new cyclopeptide from *Pseudostellaria heterophylla*. Acta Botanica Yunnanica, 1995, 17(1): 60
- 11 Zou C, Hao X J and Zhou J. Antitumor glycocyclohexapeptide from *Rubia yunnanensis*. Acta Botanica Yunnanica, 1993, 15(4): 399~402
- 12 He M, Zou C, Hao X J, et al. A new antitumor cyclic hexapeptide glycoside from *Rubia yunnanensis*. Acta Botanica Yunnanica, 1993, 15(4): 408
- 13 He M, Zou C, Hao X J, et al. New antitumor glycocyclohexapeptide from *Rubia yunnanensis*. Chinese Chemical Letters, 1993, 4: 1065~1066
- 14 汪有初, 周俊, 谭宁华, 等. 五味子的环二肽及其合成. 药学学报, 1999, 34(1): 19~22
- 15 Zhang R P, Zou C, He Y N, et al. Three new cyclopeptides from *Silene szechuensis*. Acta Botanica Yunnanica, 1997, 19(3): 304~310
- 16 Zhao Y R, Zhou J, Wang X K, et al. Three cyclopeptides from *Stellaria delavayi*. Phytochemistry, 1997, 46(4): 709~714
- 17 Zhao Y R, Zhou J, Wang X K, et al. Stelladelin D, a new cyclic undecapeptide from *Stellaria delavayi*. Chinese Chemical Letters, 1996, 7: 237~240
- 18 Zhao Y R, Zhou J, Wang X K, et al. Revision of the structure of stellarin A. Acta Botanica Yunnanica, 1995, 17(3): 345~349
- 19 Zhao Y R, Zhou J, Wang X K, et al. Cyclopeptides from *Stellaria yunnanensis*. Phytochemistry, 1995, 40(5): 1453~1456
- 20 Zhao Y R, Wang X K, Zhao T F, et al. Two new cyclopeptides from *Stellaria yunnanensis*. Chinese Journal of Chemistry, 1995, 13(3): 267~272
- 21 Zhao Y R, Wang X K, Zhou J, et al. Stellarins F and G, two new cyclopeptides from *Stellaria yunnanensis*. Chinese Journal of Chemistry, 1995, 13(6): 552~557
- 22 Zhao Y R, Zhou J, Wang X K, et al. The structure of stellarin H. Acta Botanica Yunnanica, 1995, 17(4): 463~467
- 23 Zhang Y P, Zou C, Tan N H, et al. Cyclopeptides from *Vaccaria segetalis*. Acta Botanica Yunnanica, 1998, 20(1): 105~112
- 24 邹澄, 张荣平, 赵碧涛, 等. 紫菀活性酰胺研究. 云南植物研究, 1999, 21(1): 121~124

(1999-11-04 收稿, 2000-01-20 收修改稿)