

浙产片姜黄抗早孕有效成分的初步研究

浙江卫生实验院药物研究所 石慧芳 韩燕艺 周有作

提要 为了阐明片姜黄中抗早孕的有效成分,我们进行了初步研究。片姜黄水煎液经乙醇沉淀,分别对溶液和沉淀进行分离和分析。溶液部分含有两种未知氨基酸和十四种已知氨基酸。经纸层析分得结晶性物质,其理化性质确认为门冬氨酸和苏氨酸。沉淀物经凝胶电泳测定蛋白质,约在八万分子量处显示二条蛋白带。沉淀物经透析膜透析,分析该膜内物,系由门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸等十六种氨基酸组成的蛋白质。

片姜黄为姜科植物温郁金(*Curcuma Wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling. C. *aromatica* salisb. C. *aromatica* CV *Wenyujin*)^[1]的侧根茎,纵切成片者称“片姜黄”,为我省地道药材,具有破血行气、通经止痛之功效。中医用作破血消积药,认为孕妇忌用。近年有报道,片姜黄对动物离体和在体子宫均有明显收缩作用,并有利胆、抑菌和抗炎作用。我所药理室在抗早孕药物筛选中,发现片姜黄有明显终止动物妊娠作用^[2,3]。关于片姜黄的化学成分,除挥发油外,尚未见其他报告。

片姜黄的挥发油,我们仅作了含量和薄层分析^[4],与文献报道相似。药理研究初步表明有终止妊娠作用,但有一定毒性,暂未作深入分离。

抗早孕筛选系水煎液有效,故对片姜黄水溶液部分进行了检出试验,含有姜黄素、氨基酸、蛋白质和淀粉。

根据上述分析,我们对片姜黄水煎液经乙醇沉淀,并分别对沉淀和溶液进行分离和分析。由于氨基酸种类繁多,分离较为复杂,因而采用氨基酸自动分析仪,测定水解前后氨基酸种类及其含量,初步鉴定了水解前含有十五种已知氨基酸和三种未知氨基酸,水

解后比水解前多一种丝氨酸。根据谱峰面积确定各氨基酸的含量和总量,其总量水解后比水解前增加119.8%。

溶液部分,经离子交换树脂处理,得总氨基酸,再经分析,含有十四种已知氨基酸和二种未知氨基酸。溶液通过离子交换树脂,用氢氧化铵(NH_4OH)洗脱,从洗脱液中分得结晶性物质,熔点 253°C (分解),用双向纸层析分析,系含有二个斑点,为此,又经制备性纸层析分离,根据其理化性质,确认为门冬氨酸和苏氨酸。

乙醇沉淀物经聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量,约在八万分子量处显示二条蛋白带。为此,将沉淀物经透析膜透析,膜内物经葡聚糖凝胶 G-100 (Sephadex G-100) 分离^[5],用紫外光谱检出,合并相同流份,经水鲜处理后,分析该膜内物原由门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸等十六种氨基酸组成的蛋白质。经初步药理筛选,有一定终止妊娠作用。

实 验 部 分

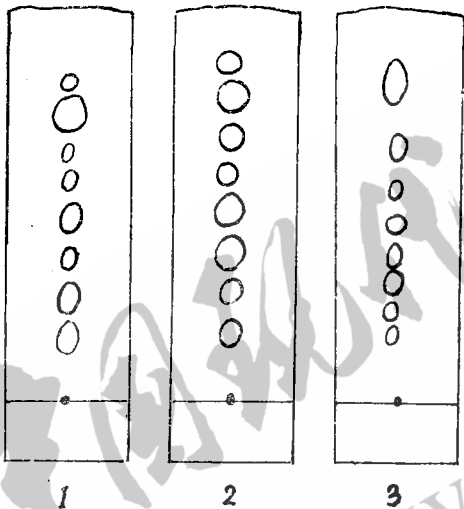
本文采用:氨基酸自动分析仪(日本) 835型;微量旋光仪(西德) PERKIN-ELMER 241型;微量熔点测定仪(日本) SERIAL No

1611 (未校正); 阿贝折光仪 (WYS); 紫外光谱测定仪 (日本) 岛津 210A 型; 层析滤纸为新华 1 号; 离子交换树脂为 1×3 强酸性阳离子 (江苏扬州); 透析膜 (进口); Sephadex G-100 (进口); 硅胶 G 为青岛海洋化工厂产; 片姜黄购自杭州市和温州市医药公司。

一、挥发油的提取和分析

片姜黄经挥发油测定器提取, 测得含油量平均约为 1.5%, $n_D^{27} = 1.4963$, $[\alpha]_D^{20} = +0.6368$ 。

薄板层析见图一。



图一

样品: 片姜黄挥发油
吸附剂: 1% CMC 硅胶板 (20×4cm) 110℃ 活化半小时。
展开剂: 1. 正己烷: 乙酸乙酯 = 9:1
2. 石油醚: 乙酸乙酯 = 9:1
3. 石油醚: 乙酸乙酯 = 85:15
显色剂: 0.1% 茴香醛酸溶液。

二、片姜黄水溶性成分的提取和分离

(一) 片姜黄水溶性成分的检出 试验水解前后氨基酸含量的比较, 见表 (一)、(二)。

水解前后氨基酸含量的比较:

取片姜黄 20 克, 加蒸馏水适量, 低温煮沸半小时, 过滤, 滤渣同上处理, 合并二次滤液, 浓缩至 20ml, 取 2ml 二份, 分别经氨

基酸自动分析仪测定, 其中一份通过水解处理, 其方法是: 将 2ml 样品蒸干, 装入样品水解管内, 加 6N HCl 6ml, 真空减压封口, 置于 110℃ 烘箱中水解 16 小时, 水解后取出冷却, 打开封口, 将水解液过滤于烧杯中, 水浴上赶走 HCl, 蒸干后用 0.01N HCl 溶解, 稀释至所需浓度。

表一 片姜黄水浸液及乙醇沉淀物
检出试验

试 剂	样 品	
	水 浸 液	乙醇沉淀物
浓 硫 酸	橙 红 色	
0.2% 茚三酮乙醇溶液	蓝 紫 色	
1% NaOH 和 1% CuSO ₄ 溶液	淡蓝紫色	淡蓝紫色
碘——碘化钾溶液	蓝 紫 色	蓝 紫 色

表二 片姜黄水液水解前后氨基酸
的比较

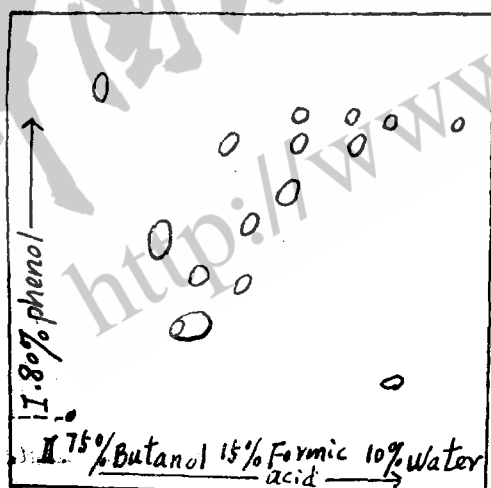
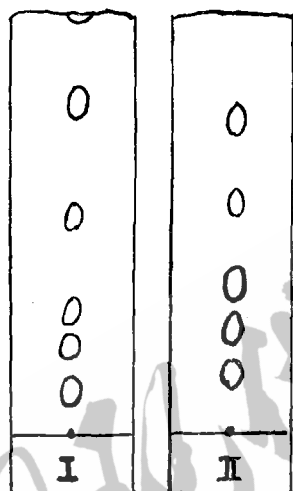
名 称	水 解 前 微克/克生药	水 解 后 微克/克生药	水解后比解 前增加%
门冬氨酸	1499.31	3882.52	
苏 氨 酸	422.51	161.86	
丝 氨 酸		163.74	
谷 氨 酸	434.21	1487.18	
甘 氨 酸	16.61	146.83	
丙 氨 酸	117.98	213.34	
胱 氨 酸	80.64	46.76	
缬 氨 酸	91.07	173.69	
蛋 氨 酸	139.09	114.75	
异亮氨酸	24.51	89.42	
亮 氨 酸	20.64	114.99	
酪 氨 酸	56.79	71.28	
苯丙氨酸	35.32	103.86	
赖 氨 酸	44.61	117.44	
组 氨 酸	63.88	103.55	
精 氨 酸	313.89	397.59	
总 量	3360.89	7388.80	119.8%
未知氨基酸	三 个	三 个	

(二) 片姜黄水溶性成分的分析

片姜黄经提出挥发油后的残渣水煎, 浓缩至适量, 加乙醇沉淀、放置、过滤, 得溶液和沉淀两部分。

1. 溶液部分

经乙醇沉淀后所得滤液、通过强酸型阳离子树脂 1×3 (按常规酸碱预处理), 用不同浓度的氢氧化铵溶液洗脱, 以纸层析检出, 合并相同流份, 其中17—33流份经纸层析(单向)显5个斑点、双向显16个斑点。见图二。17—33流份单向纸层析: 17—33流份双向纸层析:



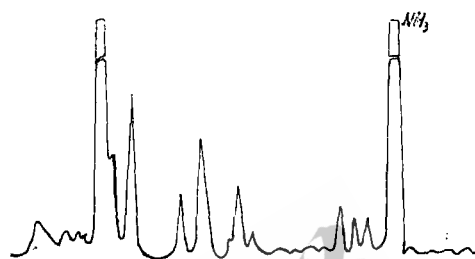
图二

展开剂: I. 80% 苯酚

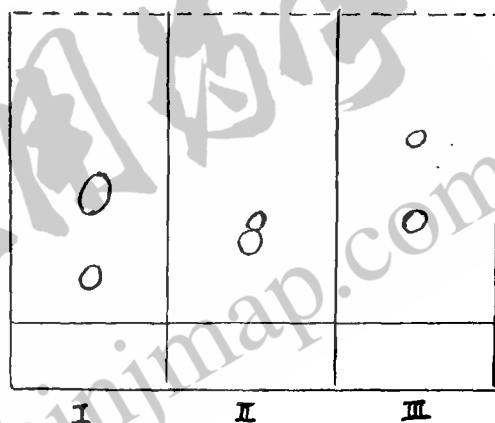
II. 正丁醇: 甲酸: 水 = 75%: 15%: 10% (6)

显色剂: 0.2% 茚三酮乙醇液。

用氨基酸自动分析仪分析, 测得含有十四种已知氨基酸和两种未知氨基酸, 见图三。



图三



图四

展开剂: I. 80% 苯酚

II. 正丁醇: 醋酸: 乙醇: 水 = 4: 2: 1: 2

III. 丙酮: 水 = 1: 1

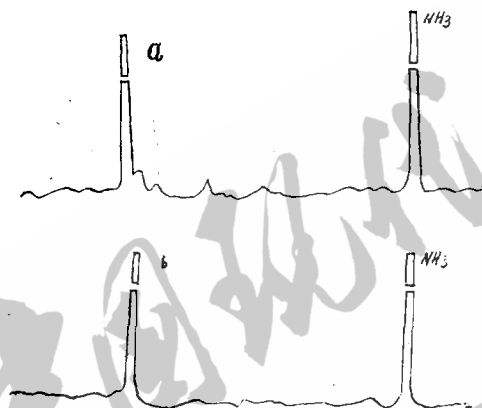
显色剂: 0.2% 茚三酮乙醇液。

17—33流份, 经浓缩至量、放置、析出结晶。熔点253℃(分解), 以单向和双向纸层析, 均显二个斑点, 见图四

经以上单向和双向纸层析、均得二个单一斑点, 而其中以展开剂Ⅲ较好, R_f 值分别为0.71和0.50。

结晶的分离和鉴定:

取上述结晶进行制备性纸层析, 由显色对照确定位置, 剪取相应色带, 经回流洗脱, 分别得到 a 和 b, 经紫外光谱及氨基酸自动分析仪测定, 见图五, 并与标准品对照、确定为门冬氨酸(a)和苏氨酸(b)。



图五

2. 乙醇沉淀部分的分析和分离:

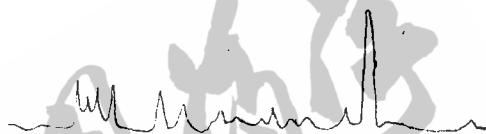
(1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳(S. D. S)测定蛋白质的分子量^[7]。

取沉淀适量, 经磷酸缓冲液盘电泳, 凝胶浓度为7.5%, 以卵蛋白酶、胰蛋白酶、溶菌酶和细胞色素C作标准、电泳结果、在凝胶柱内显示在八万分子量左右处有二条蛋白带。

(2) 沉淀的分离:

取乙醇沉淀物适量, 用蒸馏水调成糊状, 置于透析管内, 用蒸馏水低温透析一周, 管内

物溶于0.5N NaCl中, 上Sephadex G-100^[5]柱, 用0.5N NaCl^[8]洗脱, 依次分管收集流份, 用紫外光谱检出, 合并相同流份, 其中6—36流份在252nm和201—204nm处有较强的吸收峰。将6—36流份经透析除盐, 浓缩至适量, 水解处理, 经氨基酸自动分析仪定, 该组份由门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸等十六种氨基酸组成的蛋白质。见图六。



图六

乙醇沉淀物分离后, 经初步药理筛选, 有一定的终止妊娠作用, 有待进一步研究。

致谢: 氨基酸自动分析, 由浙江丝绸研究院测定; 紫外光谱由我院仪器分析室测定; S. D. S. 由我院韦育甫等同志协助测定; 浙江医科大学七八级实习生姜际春参加部分工作, 本文由赵守训教授审阅。在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈毓亨: 药学报16(5):385—388, 1981
- [2] S. K. GARG. *Planta medica* 26(3):225, 1974
- [3] 张寅恭等: 中医杂志(1):70—71, 1981
- [4] 方洪矩等: 药学报17(6):443—444, 1982
- [5] 刘培南等: 仪器分析及其在分子生物学中的应用, 第三册, 221页, 科学出版社1978
- [6] F. CRAMER: *Paper Chromatography* P. 60. ed 2 enlarged edition, 1955
- [7] 张龙翔等: 生化实验方法和 技术, 110—118 页, 人民教育出版社
- [8] 吴梧桐等: 药学报16(4):241—242, 1982