

黄花棘豆有毒成分的分离与鉴定*

曹光荣

李绍君

段得贤

赵效文

(西北农业大学兽医系)

(西安204研究所)

Russell J. Molyneux

(美国农业部西区研究中心)

摘 要

本研究从黄花棘豆中分离出吲哚兹定生物碱—苦马豆素,并证实这种生物碱对 α -甘露糖甙酶有抑制作用。研究表明:人工饲喂黄花棘豆中毒羊血浆的 α -甘露糖甙酶显著低于正常对照羊($p < 0.01$),停止饲喂黄花棘豆后,中毒羊逐渐康复,血浆 α -甘露糖甙酶迅速恢复正常。经测定黄花棘豆及甘肃棘豆的苦马豆素含量分别为0.012%, 0.021%。从而认为苦马豆素是黄花棘豆和甘肃棘豆的主要有毒成分。

关键词: 黄花棘豆; 甘肃棘豆; 吲哚兹定生物碱; 苦马豆素; 疯草病

棘豆和黄芪属(*Oxytropis* and *Astragalus*)植物的亲缘关系密切,形态特征颇有相似之处。分类学家主要根据棘豆龙骨瓣尖端具喙,荚果的背线向内延伸成隔膜,荚果沿腹缝开裂等特征将其与黄芪属分开^[1]。兽医毒理学家认为这两个属的有毒植物对动物几乎有相同的毒害作用,动物采食这些植物后可引起以神经症状为主的慢性中毒,因此把这类植物统称为疯草(*Locoweeds*),所引起的中毒病称为疯草中毒(*Locoism*)或称疯草病(*Loco-disease*)^[2-4]。据报道,美国西部每年由于有毒植物所造成的损失达1亿美元以上,其中危害最严重的就是疯草^[2]。我国疯草主要分布在西北、华北和西南广大牧区,给畜牧业造成巨大的经济损失。国内已报道的疯草中毒有棘豆属的小花棘豆(*Oxytropis glabra* D. C.),黄花棘豆(*O. ochrocephala* Pange),甘肃棘豆(*O. kansuensis* Bange),包头棘豆[*O. glabra* (Lam) DC. Var. *dracana* (Franch) C. W. Chang],急弯棘豆(*O. deflexa* Pall),黄芪属的茎直黄芪(*Astragalus strictus grahe* Benth);变异黄芪(*A. variabilis*)等^[5-10]。我国有黄芪属植物280多种,棘豆属植物120余种,除上述几种可引起家畜中毒外,其他种是否有毒还不清楚。

国外按疯草对家畜的毒性作用将中毒综合症分为三类,即含脂肪族硝基化合物黄芪所引起的急、慢性中毒;聚氧黄芪所引起的急、慢性中毒;疯草毒素所引起的慢性中毒。后一种危害最为严重,可造成家畜神经系统损害,引起流产,胎儿畸形,消瘦,成瘾性和高海拔地区牛的右心室衰竭等。我国已报告的疯草中毒,大都属于这一类。关于疯草毒素的研究历经70多年,直到Molyneux (1982)从斑荚黄芪和绢毛棘豆中分离出吲哚兹定生物碱—苦马豆

本文1989年1月6日收到。

* 本研究系国家自然科学基金资助项目。

素和氧化氮苦马豆素,才证明疯草毒素就是苦马豆素。国内学者也先后从小花棘豆、茎直黄花中提出生物碱,但未进行结构鉴定,也未证实其毒性^[8-10]。

本研究从黄花棘豆中分离出吲哚兹定生物碱—苦马豆素,证实其对 α -甘露糖甙酶有抑制作用,并进行了化学鉴定,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 植物样品

黄花棘豆1986年采集于宁夏海原县南华山,甘肃棘豆1987年8月采集于甘肃天祝县,自然干燥,粉碎,干燥保存。

1.2 生物碱的提取与分离

将植物样品用酸水浸泡两次,每次12h,合并酸滤液,通过阳离子交换树脂,交换速度控制在 $800\sim 1000\text{ml}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$,待酸水提取液全部通过树脂后,倾出树脂,用蒸馏水洗至中性,同时除去悬浮物。树脂经抽滤后,晾干用10%氨水调至 $\text{pH } 9\sim 10$,然后上柱,先用氯仿后用丙酮洗脱。将丙酮洗脱液浓缩,纯化得总生物碱。总生物碱经硅胶柱层析,用氯仿:丙酮:17%氨水(32.5:15.5:2, V/V)洗脱,每5ml收集一份。经薄层层析检查结合 α -甘露糖甙酶抑制试验结果,合并同类并浓缩,分离出生物碱单体。

1.3 生物碱对 α -甘露糖甙酶的抑制试验

总生物碱及单体对血浆中 α -甘露糖甙酶的抑制试验,采用文献[15]报道的方法进行。

1.4 生物碱单体的化学鉴定

对单体进行红外光谱(Medel-260-10型衍射光栅红外分光光度仪,日本产)、质谱(Mat-312型双聚焦质谱仪,美国产)鉴定及元素分析,并和澳大利亚Colegate博士提供的标准样(苦马豆素)作比较。

1.5 人工发病羊血浆中 α -甘露糖甙酶的测定

成年西农改良种奶山羊14只,每天通过人工瘤胃瘘管给予黄花棘豆粗粉10g/kg,对照羊8只(正常饲喂)。试验羊出现典型临床症状时。静脉采血,分离血浆,测定 α -甘露糖甙酶的活性,方法同前。

2 结果和分析

2.1 生物碱的提取与分离结果

从黄花棘豆中提取出总生物碱,并从总生物碱母液中分离出纤细的白色结晶(I)和白色针状结晶(II)及一种黄色吸湿性物质。

2.2 生物碱对 α -甘露糖甙酶抑制试验结果

总生物碱、结晶(I)、黄色吸湿性物质对 α -甘露糖甙酶有较强的抑制作用,而结晶(II)的抑制作用极弱。

2.3 生物碱单体的化学鉴定

(1) 结晶(I)的元素、红外光谱、质谱分析结果:

元素分析			
	C	H	N
测定值	54.88	8.69	7.95
计算值	55.49	8.69	8.09

计算值与测定值基本一致。

红外光谱 (IR KBr) : 3431, 3370 ($-\text{OH}$) , 2946, 2806 (CH) , 2806~2725 (Bohlman band), 1074 ($\text{C}-\text{O}$) 等吸收峰 (图 1)。目前还未见苦马豆素的红外光谱, 根据图中

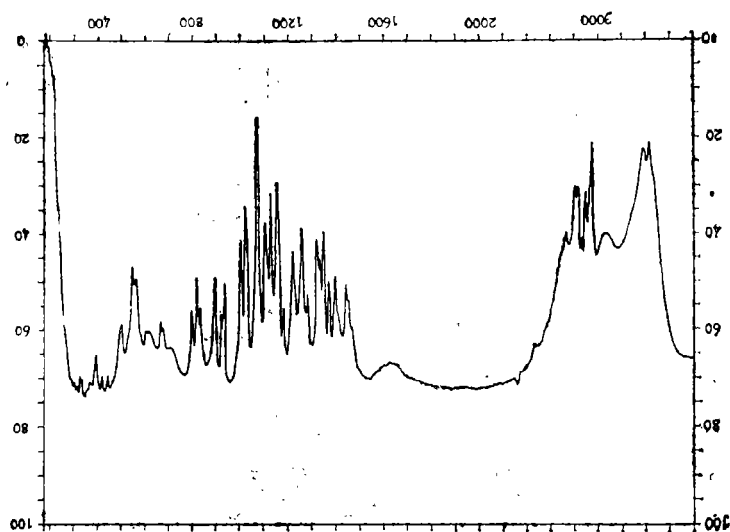


图 1 苦马豆素 (结晶 I) 的红外光谱

与澳大利亚 Colegate 提供的标准苦马豆素的质谱分析一致 (见图 2 a), 初步确定样品为苦

素的红外光谱, 根据图中 2806~2725 cm^{-1} 出现的谱带判断为 Bohlman band, 这说明样品存在着 trans $\text{CH}-\text{N}$ 的吸收, 与苦马豆素的两环结构相符合。其它基团如羟基, 碳氢吸收及碳氧吸收与苦马豆素一致。

质谱 (图 2 b) 分析: 因 173 与 155, 138, 116 等离子丢失合理, 确定 m/e 173 为分子离子。由奇质量数的分子离子确定样品结构中含奇数氮原子。经查该图与文献 [14] 的质谱图相符, 且

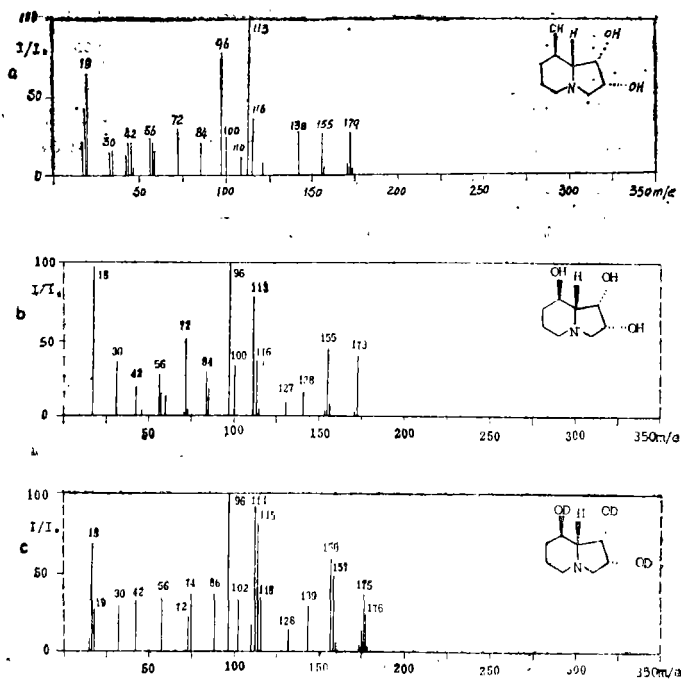


图 2 苦马豆素的质谱

a—标准品; b—结晶 I; c—乙酰结晶 I

马豆素。因文献中未给出质谱全图, 我们为了进一步确定结构, 将样品进行氘代处理, 即将样品的羟基氢用氘取代, 进行质谱分析, 得出质谱图 (见图 2c)。

参照文献中对苦马豆素的质谱裂解讨论, 我们以原样和氘代样质谱为依据, 对苦马豆素的质谱裂解表示如下 (图 3 A, B)。

文献中只注意到五元环的裂解而得出一条裂解路线C, 水丢失和羟基的裂解路线a, 我们认为除这两条裂解路线外, 尚存在六元环裂解的可能, 因此提出另一条裂解路线b, 结果重质试样证实了这一点。

(2) 结晶(I)的质谱及红外光谱分析结果

质谱 (见图 4)。

质谱表明, 可能是含奇数氮原子的化合物, 因为丢失合理, 有可能其分子量为 155, 为吡啶兹定醇类化合物。

红外光谱 (IR cm^{-1}): 3438 (-OH), 2918 (C-H), 2850~2757 (Bohlman band) 和弱的 1730 (C=O) cm^{-1} 吸收 (图 5)。

红外光谱 Bohlman band 的出现说明氮原子附近有反式的氢存在与氮上的孤对电子, 这与吡啶兹定环的光谱特征相同。结合质谱提出

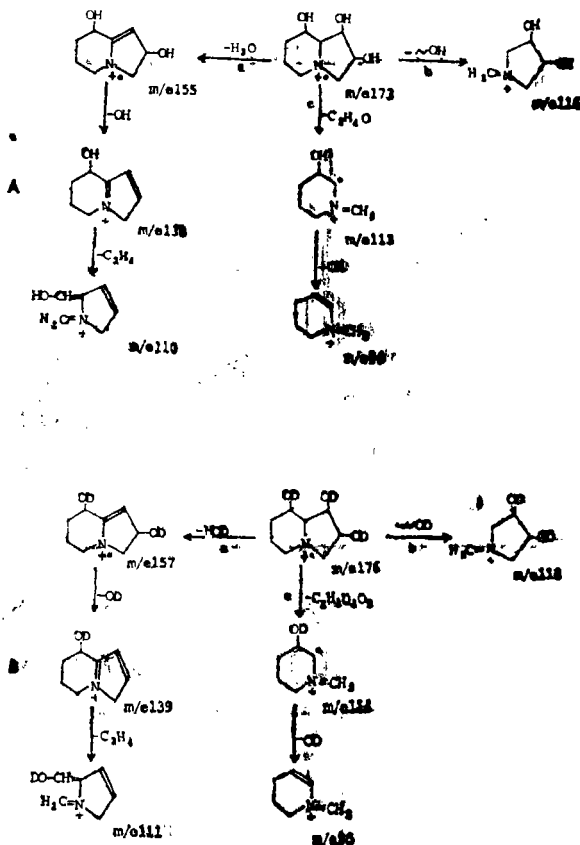


图 3 苦马豆素 (A) 和氘代苦马豆素 (B) 的质谱裂解

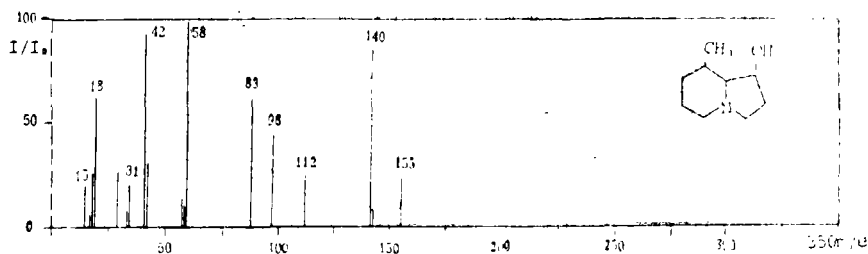
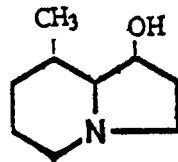


图 4 结晶 I 的质谱

该样品可能是 8-甲基-1-羟基吡啶兹定醇结构见右, 这种结构尚未见报道。因样品太少无法进行其它分析, 仅供研究者参考。

(3) 黄色吸湿性物质因难以形成结晶, 未进行分析。



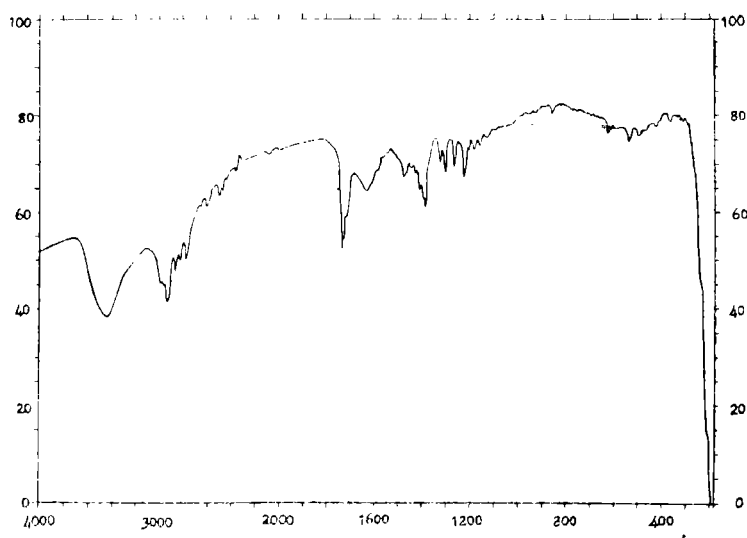


图5 结晶Ⅰ的红外光谱

(4) 黄花棘豆及甘肃棘豆样品经分析, 苦马豆素含量分别为0.012%和0.021%。

4 人工发病中毒羊血浆中 α -甘露糖甙酶活性的测定

中毒羊血浆中 α -甘露糖甙酶为 53.88 ± 4.70 活性单位, 而对照羊为 111.87 ± 22.28 , $p < 0.01$ 说明中毒羊与对照羊有极显著差异。中毒羊主要症状为沉郁, 步态蹒跚, 共济失调, 消瘦, 采食、饮水困难, 终因衰竭而死亡, 同自然发病一致。对中毒羊停止饲喂黄花棘豆, 能逐渐康复, 血浆 α -甘露糖甙酶亦迅速恢复正常。

3 结论

从黄花棘豆中分离出一种纤细的白色结晶, 根据对 α -甘露糖甙酶的抑制作用和元素、红外光谱、质谱分析以及同Colegate博士提供的标准品比较, 证明这种结晶就是吲哚 兹定生物碱—苦马豆素。经分析黄花棘豆和甘肃棘豆中苦马豆素含量分别为0.012%, 0.021%。人工发病中毒羊的主要临床症状同自然发病羊完全一致, 病羊血浆中 α -甘露糖甙酶活性明显下降($p < 0.01$)。停止采食黄花棘豆后, 症状逐渐消失, 血浆中 α -甘露糖甙酶迅速恢复正常。从而证实苦马豆素是黄花棘豆和甘肃棘豆的主要有毒成分。

4 讨论

4.1 国外文献报道, 有263种黄芪属植物含有3-硝基丙醇和3-硝基丙酸, 可引起家畜后躯衰弱, 震颤, 呼吸困难和虚脱。黄花棘豆是否也象某些黄芪属植物一样含有脂肪族硝基化合物? 经我们对不同生长期的黄芪棘豆用Griess-Llosvay方法检查, 结果证实黄花棘豆不含脂肪族硝基化合物^[16-18]。

4.2 国外文献报道大约有25种黄芪属聚硒植物可引起急、慢性硒中毒, 特别是慢性中毒与疯草毒素中毒相似。经我们用杨泳元等(1985)的2,3-二氨基荧光光度法, 分析了黄芪棘豆的根茎叶以及中毒羊的肝、肾、血、羊毛等, 含硒量均低于中毒水平。据目前的资料来看我国

的棘豆属植物中毒与碱关系不大^[6-8,16]。

4.3 关于苦马豆素抑制 α -甘露糖甙酶的作用机制,据Dorling等人的研究认为,苦马豆素的阳离子同甘露糖甙的阳离子在构型上的相似性及其对甘露糖甙酶的高度亲合性,从而抑制了溶酶体中 α -甘露糖甙酶,造成甘露糖贮积,同时也抑制糖蛋白的合成,产生富含甘露糖的混合天冬酰胺多糖,其结果溶酶体内大量的低聚糖不能代谢而聚积,导致细胞,特别是神经细胞所谓空泡变性,动物出现一系列神经症状^[10]。

4.4 美国1873年发现疯草病,Marsh(1905~1907)证实疯草病和采食某些黄芪属和棘豆属植物有关。随后的70年间,许多人试图分离毒素,但只有两项研究是成功的。Cauch(1929)从兰伯氏棘豆分离出一种提取物,在实验条件下可引起猫的疯草病。他断定一种有毒物质可引起疯草病,但是当时没有能够充分确定这种物质的特性。他描述过这种物质是一种稳定的,含氮元素,具有吸湿性,高羟基化的有机化合物,易溶于水,但不溶于氯仿、乙醚和烃类溶剂。虽然他认为不是生物碱,但对吡咯衍生物的裂解试验呈阳性反应^[16]。

Fraps等(1936)对密柔毛黄芪进行了广泛的化学研究,并分离出一种不纯的、碱性、吸湿性强的物质,称为洛柯因(Locoin),其乙酰化产物及其酒石酸盐、柠檬酸盐都可引起疯草综合症,但用生物碱试剂检查没有得出肯定结果^[16]。早在1901年人们就发现美国羊的疯草病同澳大利亚羊灰苦马豆中毒的症状十分相似。70年之后,病理学研究发现饲喂密柔毛黄芪、绢毛棘豆和灰苦马豆的绵羊之间的病理变化没有明显的差别,都表现神经、内脏细胞空泡化。近来的研究证实了这一点。由于灰苦马豆中毒在形态学及生物化学方面的变化同遗传性甘露糖甙酶缺乏而引起的一种溶酶体贮积病——甘露糖贮积症相似,Colegate等(1973)利用甘露糖甙酶作为工具从灰苦马豆中分离出甘露糖甙酶抑制剂,吡啶兹定生物碱——苦马豆素,从而确定了灰苦马豆的有毒成分^[11]。这是一个极其有意义的进展。次后不久,Molyneux等开始疯草的化学研究,他意识到苦马豆和疯草中毒之间有密切关系,使用苦马豆素作为标准样品,于是在密柔毛黄芪中发现了苦马豆素,其含量比灰苦马豆高10倍。而且还发现第二个生物碱氧化氮苦马豆素(Swainsonine N-oxide)也是一种甘露糖甙酶抑制剂。从而确定苦马豆素及氧化氮苦马豆素就是疯草毒素^[14]。有趣的是苦马豆素及氧化氮苦马豆素的性质和Cauch从兰伯氏棘豆分离到的物质及Fraps等从密柔毛黄芪中分离出的洛柯因相似。事实上这些化学家已经分离出苦马豆素及其氧化氮的混合物,但是没有纯化到可以进行结构鉴定的程度。至于他们把这种物质当作非生物碱也不奇怪,因为事实上苦马豆素与常用的生物碱试剂如碘化铋钾等仅有微弱的反应^[14,16]。我们从黄花棘豆中分离到一种淡黄色吸湿性物质,对 α -甘露糖甙酶有抑制作用,性质酷似氧化氮苦马豆素,值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 张振万. 西北植物学报, 1986; 6 (3): 182—191
- 2 James L F et al. JAVMA, 1981; 178 (2): 146—150
- 3 James L F et al. Amer J Vet Res, 1976 128: 1379—1388
- 4 Keeler R F et al. Handbook of natural toxin, 1983; (1): 445—462 New York IN.
- 5 曹光荣等. 动物毒物学杂志, 1986; (1): 18—21
- 6 曹光荣等. 中国兽医科技, 1988; (3): 41—43
- 7 张生民等. 畜牧兽医学报, 1981; (3): 145—149
- 8 李祥煌. 内蒙古畜牧兽医, 1978; (1): 1—18
- 9 鲁科西. 动物毒物学杂志, 1986; (1): 32—33
- 10 朱甘培. 中国草原, 1984; (3): 30—33
- 11 Colegate S M et al. Aust J Chem, 1979; 32 (32): 2257—2264
- 12 James L F et al. Pathol Vet, 1970; 7: 116—120
- 13 Dorling P R et al. Biochem J, 1980; 191: 649—516
- 14 Molyneux R J et al. Science, 1982; 216: 190—191
- 15 Healy P J et al. Aust Vet J, 1979; 55: 534—536
- 16 Seawright A A et al. Plant toxicology Published by the Queensland Poisonous plants committee, 1985: 249—309
- 17 Williams M C. Amer J Vet Res, 1970; 31: 259—261
- 18 Williams M C. Phytochemistry, 1977; 16: 1438—1439
- 19 Tulsiani D R P et al. Archives of biochemistry and biophysics, 1984; 232 (1): 76—81
- 20 James L F et al. Amer J Vet Res, 1983; 44 (22): 254—259
- 21 Phillis M N. J Cell Biolgy, 101: 339—349

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TOXIC COMPONENTS FROM OXYTROPIS OCHROCEPHALA

Cao Guangrong Li Shaojun Duan Dexian

(Department of Veterinary Medicine, Northwestern Agricultural University)

Russell J. Molyneux

(USDA Western Regional Research Center)

Zhao Xiaowen

(Xian 204 Research Institute)

Abstract

The indolizidine alkaloid swainsonine which inhibits α -mannosidase has been isolated from *O. ochrocephala* in this experiment. plasma α -mannosidase of goats poisoned by feeding *O. ochrocephala* was significantly lower than that of normal control animals ($p < 0.01$). After *O. ochrocephala* feeding stopped, the goats poisoned recovered from their illness gradually, and plasma α -mannosidase returned to normal conditions rapidly. Swainsonine analysis of the plant samples showed that swainsonine ranges of *O. ochrocephala* and *O. kansuensis* were 0.012% and 0.021% (D.W) respectively. Therefore, it is considered that the swainsonine is the principal toxic component of *O. ochrocephala* and *O. kansuensis*.

Key Words: *O. ochrocephala*; *O. kansuensis*; Indolizidine alkaloid; Swainsonine; Locoweeds