豆类丝核菌中苦马豆素的提取

杨鸣琦 曹光荣 李绍君
(西北农业大学动物科学与动物医学学院,陕西杨凌 712100)

摘 要 采用 H_2O∶CH_2Cl_2萃取、732型阳离子树脂交换等方法,从豆类丝核菌中分离到纯结晶,经薄板层析法发现,豆类丝核菌提取物浓缩的粗品液和苦马豆素标准品经 Ehrlich's试剂显色后,二者均出现一椭圆形紫色斑点,且 R_f 值均为 0.81;气相色谱法研究发现,提取物纯品标样(15.942 0 mg/L)与苦马豆素标准品在同一色谱条件下显示出完全一致的峰形,证明从豆类丝核菌中分离到的纯结晶是苦马豆素纯品。研究还表明豆类丝核菌干燥菌丝体中苦马豆素含量达 1.23%~2.99%.

关键词 豆类丝核菌,苦马豆素,提取与分离
分类号 S859.8

苦马豆素的出现引起了植物学、毒理学、病理学、化学、生物化学、免疫学和医学界的极大兴趣,从而促进了苦马豆素的应用研究。业已证明,苦马豆素可作为免疫调节剂、肿瘤转移及扩散抑制剂、抗病毒和细胞保护剂等药物使用[1,2],引起世界各国的极大重视。对苦马豆素(*Swainsonine*)的研究可追溯到 1873年美国首次发现疯草中毒[3]。真正有意义的进展是澳洲学者 Colegate等[4]从灰苦马豆(*Swainsona canescæs*)中分离到苦马豆素,随后,Molyneux等[3]以 Colegate博士提供的苦马豆素为标准品,从斑荚黄芪和绢毛棘豆中分离出苦马豆素。我国在这方面的研究起步较晚,曹光荣等[5]从黄花棘豆中分离到苦马豆素,黄有德等[6]从变异黄芪中分离到苦马豆素。值得注意的是 Schneider等[7]、Broquist等[8]还分别从美国标准菌库保存的豆类丝核菌中分离到苦马豆素。目前存在的问题是苦马豆素在植物中含量很低(2.5~370 mg/kg),人工合成成本很高(152 $/mg)[1,2];国内尚无产品供应,亦无定量方法。本研究的目的在于从自行分离的豆类丝核菌中分离苦马豆素并建立小批量提取苦马豆素的工艺流程及其微量定量方法,为苦马豆素的获得提供新途径,为其进一步研究奠定物质基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

豆类丝核菌 系笔者 1994年在西北农业大学附近采得的 16组豆科植物上分离保存的 10株菌,分别是 94053103A, 94053103B, 94060907A, 94060907B, 94060907C, 94060910B, 94060913, 94060914, 94060915和 94060916.

仪器装置 163型气相色谱仪,日本松下公司; EB-280-12型电子天平,日本京都 SHIMADZU公司; 1602MP8-1型电子天平,德国 SARTORIUS GÖTTINGEN公司。

收稿日期 1998-01-16
课程来源 杨凌科研基金资助项目,93J-02;西北农业大学青年科研基金资助项目
作者简介 杨鸣琦,男,1963年生,讲师,硕士

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

试剂 苦马豆素纯品,批号 900412,由日本大阪 Fujisawa公司提供;薄层层析用硅胶 G,分析纯,批号 810611,上海五四农场化学试剂厂;732型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂(湿计),Na^+ 型,上海化学试剂公司;本研究所用其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

豆类丝核菌培养 将菌种在无菌罩中接种于生产用改良 Czapek's培养基内,25℃培养 14 d,用镊子收集菌丝体,自然干燥,备用。

苦马豆素提取 将自然干燥后的菌丝体,用乙醇提取(Soxhlet,24 h),乙醇提取物减压浓缩成糖浆状,加入 H_2O和 CH_2Cl_2移入分液漏斗内,剧烈震摇,静置 4 h,弃掉 CH_2Cl_2层;给水层再加入 CH_2Cl_2并调 pH至碱性,剧烈震摇,弃掉 CH_2Cl_2层,水层含有苦马豆素;该水层经浓缩并调 pH至中性经 732型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂,吸附 30 min,用水冲洗,然后用 NH_4OH洗脱,洗脱液浓缩,调 pH为 7,冻干即可得到浅黄色粉末,此即苦马豆素粗品,粗品纯化即可得到苦马豆素纯品。提取分离苦马豆素的工艺流程如图 1.

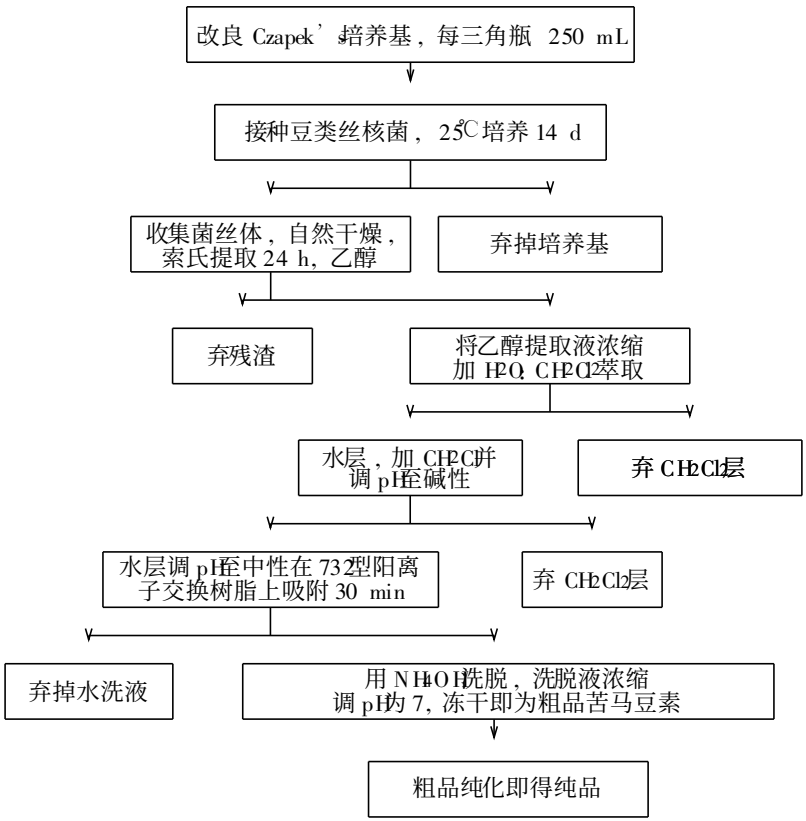

图 1 从豆类丝核菌中提取苦马豆素的工艺流程

苦马豆素薄层层析 把不同阶段的提取物浓缩后与标准品点于预先制备好的 3 cm × 8 cm硅胶 G板,在笔者遴选的展开剂(氯仿∶甲醇∶二乙胺∶氨水∶水= 70∶26∶7∶2∶2)中展开,待干燥后,先用无水乙醇醋酸酐喷雾,加热除去醋酸酐,再喷 Ehrlich's试

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

剂,加热至烟雾消失,显出紫色斑点,计算 R_f 值。

苦马豆素气相色谱　检测器 FID;柱温,200℃;进样口温度 250℃;进样量 1μL;衰减度 10^4;H_2 40 mL/min;N_2 30 mL/min;Air 400 mL/min;纸速 10 mm/min.

2 结　果

薄层层析　把粗品液与标准品用展开剂展开,经 Ehrlich's试剂显色后,标准品和 94053103A, 94053103B, 94060907A, 94060907B, 94060907C, 94060916提取物均出现一个椭圆形的紫色斑点,其 R_f 值均为 0.81.

气相色谱　以获得的纯品为标样 (15.942 0 mg/L),与苦马豆素标准品在同一色谱条件下进行比较,得到了二者的气相色谱图 (图 2),标样峰形与苦马豆素标准品峰形完全一致,表明获得的标样就是苦马豆素纯品。用气相色谱法也可进行微量定量测定。

菌丝体中苦马豆素含量测定　有 4株菌 (94060910B, 94060913, 94060914, 94060915)在改良 Czapek's培养基上生长不良,有待进一步研究。对 94053103A, 94053103B, 94060907A, 94060907B, 94060907C和 94060916这 6株菌经提取、定量、计算,结果表明:其自然干燥菌丝体中苦马豆素含量达 12.3~29.9 g/kg.

苦马豆素获得　菌株经扩大培养后,共收集干燥菌丝体 1 200 g,并从中提取分离出苦马豆素纯结晶 11 mg,粗品液 8 L中含苦马豆素约 32 g.

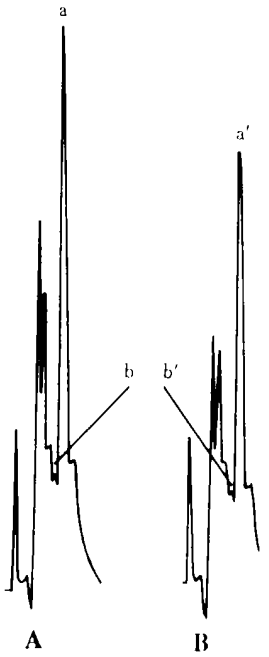

图 2　苦马豆素标准品 (A)与样品 (B)气相色谱图

t_{ra}= t_{ra}'= 74 s; t_{rb}= t_{rb}'= 54 s

3 讨　论

豆类丝核菌 (*Rhizoctionia leguminicola*)属真菌门 (*Fungi*)半知菌类 (*Fungi imperfecti*)无孢菌群 (*Mycelia sterlia*)丝核菌属 (*Rhizoctonia*)。国内原无该菌种保存,从笔者在西北农业大学附近的豆科植物上分离的 6株豆类丝核菌中分离到纯结晶和粗品液,经薄板层析和气相色谱与标准品对照分析 (图 2),结果表明纯结晶是苦马豆素纯品。苦马豆素属吲哚兹定生物碱 (indolizidine alkaloids),在吲哚兹定环的 1, 2, 8位上各带有 1个 – OH,即为 1, 2, 8-三羟基八氢吲哚兹定 (1, 2, 8-trihydroxyoctahydroindolizidine);其 3个 – OH直接连在烃基上,属于醇类,故苦马豆素按立体化学结构被命名为 1T, 2T, 8U, 8TU-吲哚兹定三醇 (indolizidine triol)[9,10]。

含苦马豆素的植物较多,包括黄芪属和棘豆属 (统称为疯草),分布于全世界,其中美国和中国居多;还有苦马豆属,主要分布在澳大利亚和中国青海省。但是苦马豆素在以上这些植物中含量很低,分离过程复杂,需要大量的人力和物力,严重影响苦马豆素的深入研究。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

本研究为国内首次从自行分离的豆类核菌中,提取分离到小批量苦马豆素纯品和粗制品,并初步建立了从豆类丝核菌中提取苦马豆素的工艺流程和苦马豆素的气相色谱微量定量方法,为苦马豆素的深入研究奠定了物质基础和理论依据。

参 考 文 献

1 杨鸣琦,曹光荣.苦马豆素的性质、分离与检测.动物医学进展, 1997, 18(1): 8~ 13

2 杨鸣琦,曹光荣.苦马豆素的毒性、代谢与用途.动物医学进展, 1997, 18(4): 20~ 25

3 Molyneux R J, James L F. Loco intoxication: Indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). Science, 1982, 216(6): 190~ 191

4 Colegate S M, Dorling P R, Huxtable C R. A Spectroscopic investigation of swainsonine: an α-mannosidase inhibitor isolated from *Swaisona canescens*. Aust J Chem, 1979, 32: 2257~ 2264

5 曹光荣,李绍君,段得贤,等.黄花棘豆有毒成分的研究.中国兽医科技, 1988(3): 41~ 43

6 黄有德,肖志国,孟聚诚,等.变异黄芪有毒成分的分离与分析.中兽医医药杂志, 1992(4): 3~ 6

7 Schneider M J, Ungemach F S, Broquist H P, et al. 1, 2, 8-Trihydroxyoctahydroindolizine (swainsonine), an α-mannosidase inhibitor from *Rhizoctonia leguminicola*. Tetrahedron, 1983, 39: 29~ 32

8 Broquist H P, Mason P S, Wickwire B, et al. Swainsonine production in the mold *Rhizoctonia leguminicola*. Plant Toxicology, 1984, 5(14~ 18): 301~ 307

9 Colegate S M, Dorling P R, Huxtable C R. The isolation and identification of a toxic principle from *Swainsona canescens*. Plant Toxicology, 1984, 5(14~ 18): 249~ 254

10 Dorling P R, Huxtable C R, Colegate S M. The pathogensis of chronic *Swainsona* SP. toxicity. Plant Toxicology, 1984, 5(14~ 18): 255~ 265

Abstraction of Swainsonine from *Rhizoctonia leguminicola*

Yang Mingqi Cao Guangrong Li Shanjun

(*College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi* 712100)

Abstract The crystals of swainsonine were isolated from *Rhizoctonia leguminicola* by means of extraction between H_2O: CH_2Cl_2 and a 732 type cation exchang resin for the first time in China. It discoverd that the purple elliptic spots are displayed in thin-layer chromatography (TCL) between semifinished product solution of donse abstracts of *R. dlegum inicola* and standardized sample of swainsonine dyed with Ehrlich's reagent and all the volumes of R_f are 0.81. The study with gas chromatography (GC) discovers that the same peaks type appear in pure abstract sample (15.942 0 mg/L) and standardized sample of swainsonine under the same conditions, and therefore it is clear that the pure crystals isolated from *R. leguminicola* is pure swainsonine. The studies show that dry mycelium of *Rhizoctonia leguminicola* contains 1.23% – 2.99% swainsonine, which has opened a new way to obtain swainsonine.

Key Words *Rhizoctionia leguminicola*, swainsonine, Abstraction

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w