

# 苦马豆素-BSA 的合成研究\*

童德文<sup>1</sup>, 曹光荣<sup>1</sup>, 程东亮<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100; 2 兰州大学 化学化工学院, 兰州 730000)

[摘要] 用溴乙酸制备的活性酯与苦马豆素反应, 产物真空干燥后得到白色粉末状物, 产率为 77%。经 MP、IR 鉴定和元素分析的结果判定, 白色粉末状物为苦马豆素-活性酯结合的季铵盐。季铵盐再与 BSA 反应, 产物经透析、冻干后呈白色针状结晶, 按 BSA 计算, 产率为 91%, 经测定, 平均每个 BSA 分子上结合了 18.17 个季铵盐分子。

[关键词] 苦马豆素; BSA; 活性酯; 季铵盐

[中图分类号] S856.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)04-009-04

疯草 (Locoweed) 是豆科棘豆属 (*Oxytropis*) 和黄芪属 (*Astragalus*) 有毒植物的总称, 也是世界范围内危害草原畜牧业生产最严重的一类毒草。在我国主要分布于西北、华北和东北的广大草原, 危害面积超过 400 万  $\text{hm}^2$ 。疯草所含的主要有毒成分吡咯兹定生物碱-苦马豆素 (swainsonine, SW), 不仅能够导致大批家畜中毒死亡, 而且致使母畜流产、不孕、胎儿畸形和公畜不育, 给草原畜牧业生产造成巨大的经济损失<sup>[1-3]</sup>。尽管国内外在疯草的有毒成分、毒理机制、化学防除和脱毒利用等方面取得了进展<sup>[4-9]</sup>, 但迄今还没有在控制疯草危害蔓延和疯草毒素检测方面取得突破性进展, 致使疯草中毒问题日趋严重, 成为草原畜牧业的大患。有关植物毒素免疫用于动物中毒性疾病的发病机理、诊断、预防和治疗, 是临床毒理学研究的全新的交叉性领域, 在国外也是刚刚起步, 仅有的几篇报道是, 免疫法预防植物雌激素毒性作用<sup>[10]</sup>, 免疫法预防马缨丹毒素中毒<sup>[11,12]</sup>, 免疫法预防羽扇豆中毒<sup>[13]</sup>, 在国内还未见这方面的报道。本研究通过化学合成的方法将 SW 与大分子载体蛋白-牛血清白蛋白 (BSA) 结合为 SW-BSA, 以便把该结合物作为免疫原接种动物, 如果能使动物获得免疫力并在采食疯草时得到保护,

动物就能安全利用疯草。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

苦马豆素由西北农林科技大学畜牧兽医学院毒物分析室制备。溴乙酸、N-羟基琥珀酰亚胺、1,2-二甲氧基乙烷、二环己基碳二亚胺 (DCC)、异丙醇、五氧化二磷、BSA 等均为国产或进口的分析纯。

### 1.2 试验方法

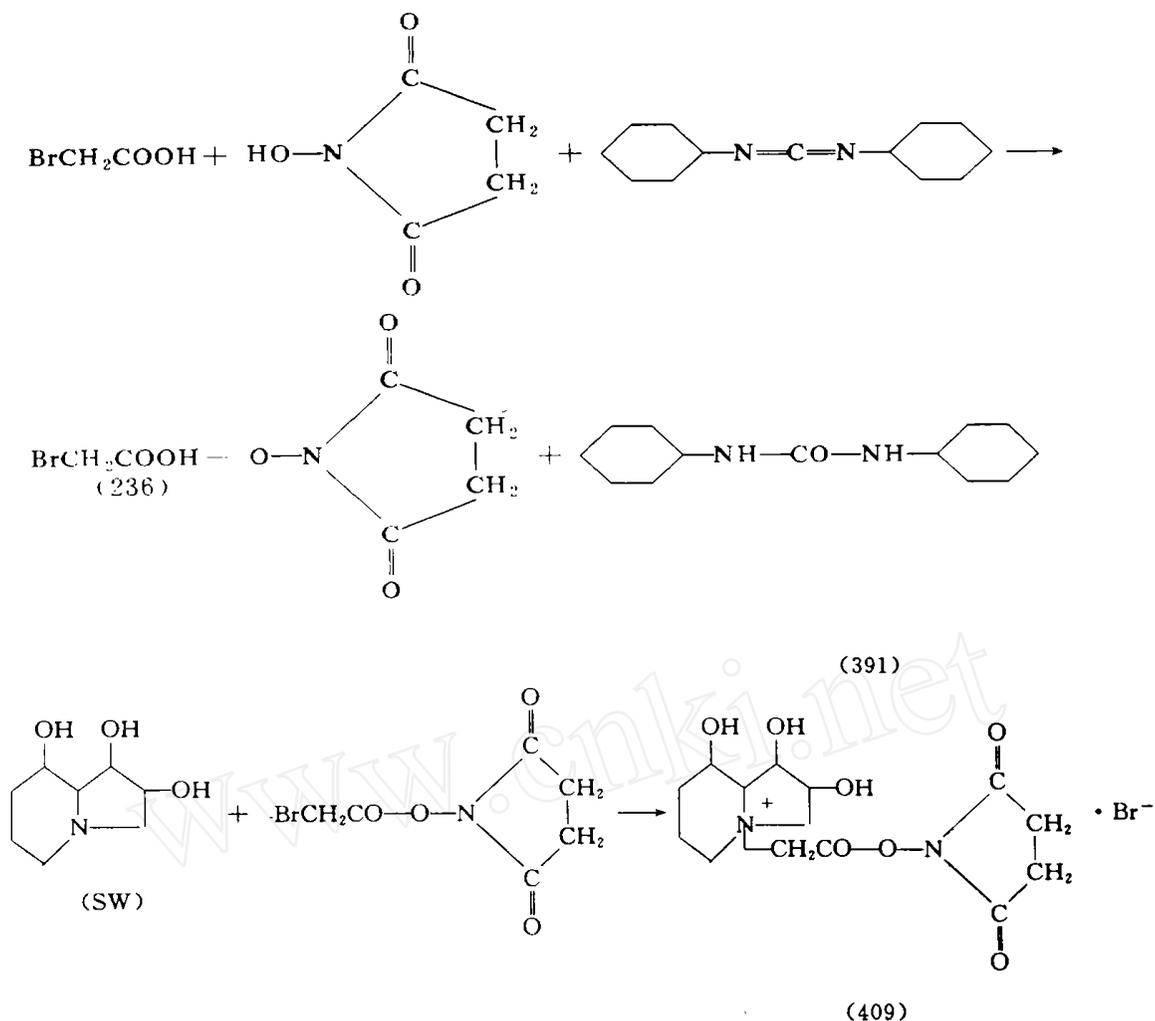
1.2.1 活性酯的制备 取溴乙酸 139 mg (1 mmol), 加入 N-羟基琥珀酰亚胺 115 mg (1 mmol) 后, 放入溶剂干燥的 1,2-二甲氧基乙烷 3 mL, 在冰水浴搅拌下加入 DCC 206 mg (1 mmol)。混合物在冰箱中保存过夜 (0~5 ℃), 过滤除去 N,N-二环己(基)脲 (DCU), 挥干溶剂, 粗产品用异丙醇重结晶 2 次。计算产率, 并进行 MP、MS 鉴定。

1.2.2 SW-活性酯 (季铵盐) 的合成 取 SW 17.3 mg (0.1 mmol) 在干燥的丙酮液中完全溶解后, 加入用溴乙酸制备的活性酯 23.6 mg (0.1 mmol), 80 ℃ 搅拌回流反应 9 h, 过滤, 丙酮洗涤,  $\text{P}_2\text{O}_5$  真空干燥。计算产率, 并进行 MP、IR、元素分析鉴定。

\* [收稿日期] 2001-03-01

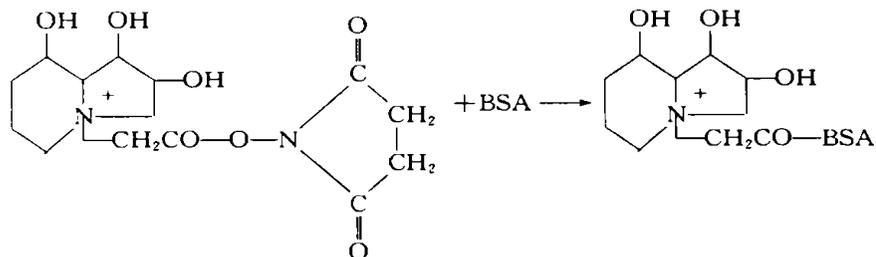
[基金项目] 国际自然科学基金资助项目 (IFS.No. 2906-1); 国家自然科学基金资助项目 (39770571)

[作者简介] 童德文 (1967-), 男, 安徽太湖人, 讲师, 博士, 主要从事病理学和毒理学的教学和研究。



1.2.3 SW-BSA 的合成 取晶状BSA 167.5 mg (0.0025 mmol), 完全溶于 4 mL 蒸馏水后, 加入制备的季铵盐 40.9 mg (0.1 mmol), 冰浴搅拌反应 18

(311)



h. 测定结合率后, 反应产物装入透析袋中, 蒸馏水中透析 24 h, 中间更换 3 次蒸馏水。冻干透析袋中共轭物。计算产率。

1.2.4 SW-BSA 的结合率计算 分别按季铵盐与 BSA 80:1, 60:1, 40:1, 20:1 和 10:1 摩尔比 12 h 完成合成反应, 产物经 p-Amino Benzidine-4B 凝胶(LKB)过柱分离(柱体积 25 cm<sup>3</sup>; 上样量每次 0.7 mL; 蒸馏水洗脱, 洗脱速度 0.2 mL/(cm<sup>2</sup>·min), 得到合成物、未反应的 BSA 及未

反应的季铵盐。因季铵盐在 259 nm 处具有光吸收性质, 在一定浓度范围内, 其紫外吸收与浓度成正比。测定不同比例反应后, 结合季铵盐残余量可定量确定其结合率。方法是, 将制备的季铵盐分别配制成 0.781, 1.562, 3.120, 6.250, 12.500 mg/mL 的质量浓度作紫外光谱, 测定不同质量浓度条件下的光

吸收值,作标准曲线。最后测定样品中残留的季铵盐光吸收值,查标准曲线,得到样品中残留的季铵盐质量浓度。根据结合率 $= (40.9 - 4 \times M) / 409 \times 0.0025$ ,计算结合率。其中,40.9为加入季铵盐的量, $M$ 为测定的反应后残留的季铵盐质量浓度,4为反应体积,409为季铵盐分子质量,0.0025为加入的BSA摩尔量。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性酯的制备

试验得到白色的活性酯结晶,产率为73%,熔点155~156,质谱鉴定MS( $m/e$ ):237(分子离子峰),201(237-2H<sub>2</sub>O),178(201-2C+1H),140(BrCH<sub>2</sub>COO-出峰),98(琥珀酰亚胺环出峰),56(基

峰)。根据MP测定,MS出峰表现出质子裂解合理判定,白色结晶即为所需要的活性酯。

### 2.2 SW-活性酯(季铵盐)的合成

活性酯与SW反应,产物经真空干燥后得到白色粉末状物,产率为77%,具有很强的吸水性,MP为324~325,IR<sup>max</sup>(KBr压片):3335.75(-OH吸收峰),2941.55(CH吸收峰),2703.65,2562.92(-CH<sub>2</sub>COO-吸收带),1759.82,1722.99(母核吸收带),1082.51(C-O吸收峰)。产物所有基团都有出峰。元素分析结果见表1。由表1可知,N,C和H的理论值和测定值之差分别为0.07%,0.11%和0.09%,均在误差范围内,H值稍高而N和C值稍低,这可能是样品中含极少量水的缘故。

表1 季铵盐元素分析结果

Tab. 1 The elementary analysis of quaternary ammonium salt

	N	C	H
理论值 Theoretical value	6.85	41.08	5.13
测定值 Measuring value	6.78	40.97	5.22
差值 Difference	0.07	0.11	0.09

根据MP测定,IR鉴定和元素分析结果判定,白色粉末状物即为所要制备的季铵盐。

### 2.3 SW-BSA的合成

透析袋中的共轭物冻干后呈白色针状结晶,按BSA计算,产率为61%。

### 2.4 SW-BSA的结合率计算

质量浓度为0.781,1.562,3.120,6.250,12.500 mg/mL的季铵盐在259 nm处的吸光值分别为0.053,0.116,0.252,0.470,0.942,作标准曲线。合成的SW-BSA在A<sub>259 nm</sub>处吸光值为0.418,查标准曲线得质量浓度为5.580 mg/mL,代入公式计算出结合率为18.17%。

## 3 讨论与结论

SW的分子质量小(173),只能作为半抗原,不具有免疫原性,只有连接到大分子载体蛋白上才能诱导出免疫原性<sup>[14-16]</sup>。为了避免大分子蛋白对SW分子的屏蔽作用,选择了SW先与用溴乙酸制备的活性酯反应,生成季铵盐后再与蛋白质反应,这样在半抗原(SW)与蛋白质(BSA)之间提供了一个含有碳原子的“桥”,达到避免屏蔽的功效。本研究中,

SW与活性酯的反应产物真空干燥后得到白色粉末状物,产率为77%,具有很强的吸水性,MP,IR鉴定结果表明,白色粉末状物为季铵盐。季铵盐再与BSA反应,产物冻干后呈白色针状结晶,按BSA计算,产率为61%。结合位点选择在N<sub>4</sub>原子上,是考虑到SW上的-OH可能是半抗原的抗原决定簇,N<sub>4</sub>原子与蛋白质结合后不影响,且远离了半抗原的抗原决定簇,易于产生高特异性的抗血清。结合位点还可以选择在SW吡啶环其他碳原子上,这样SW-BSA的合成会困难些,但效果可能会更好。因为这样不仅考虑到SW上的-OH可能是半抗原的抗原决定簇,而且考虑到了N<sub>4</sub>原子也是半抗原的抗原决定簇的可能。有关结合位点选择在SW吡啶环其他碳原子上的免疫效果有待进一步探索。

半抗原能否产生高特异性的抗血清,不仅决定于它与蛋白质的结合位点,而且取决于蛋白质分子上连接的半抗原数目。一般地说白蛋白上有60个游离氨基团,其中必须有15~20个以上的游离氨基团与半抗原结合,才可以诱导出半抗原的免疫原性<sup>[15,16]</sup>。本研究合成出来的SW-BSA的结合率,经测定,平均每个BSA分子上结合了18.17个季铵盐分子,也就是说,平均每个BSA分子上结合了18.17

个 SW, 应该能诱导出半抗原的免疫原性。

### [参考文献]

- [1] Marsh C D. The locoweed disease of the plains[R]. Washington D C: Bull NO. 112 U. S Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry, 1909. 1- 130
- [2] Molyneux R J, James L F, Panter K E, et al Analysis and distribution of swainsonine and related polyhydroxyindolizidine alkaloids by thin layer chromatography[J]. Phytochemical Analysis, 1991, 2: 125- 129
- [3] 曹光荣, 李绍君, 段得贤, 等. 黄花棘豆有毒成分的分离与鉴定[J]. 西北农业大学学报, 1989, 17(3): 1- 7
- [4] EL- Hamidi M, Leopold H W. Poisoning of sheep by *A stragalus lusitanicus* in Morocco: Field and experimental studies[J]. J Vet Med, 1989, 36: 115- 121.
- [5] Kirkpatrick J G. Loicism in horses[J]. Vet Hum Toxicology, 1990, 32(2): 168- 169
- [6] Van Kampen K R, Rhees R W, James L F. Locoweed poisoning in the United States[A]. Keeler R F, Van Kampen K R, James L F. Effects of Poisonous on Livestock[C]. America: Academic Press, 1978. 465- 471.
- [7] Oehme F W, Bailie W E, Hulbert L C. A *stragalus mollissimus* toxicosis in Western Kansas[J]. JAVMA, 1968, 152: 271- 278
- [8] James L F, Van Kampen K R, Staker G. Locoweed (*A stragalus lentiginosus*) poisoning in cattle and horses[J]. JAVMA, 1969, 155: 525- 530
- [9] James L F, Van Kampen K R. Acute and residual lesion of locoweed poisoning in cattle and horses[J]. JAVMA, 1971, 158: 614- 618
- [10] Cox R I. Immunophysiological control of phyto-oestrogen toxicity[A]. Seawright A A. Plant Toxicology[C]. America: Iowa State University Press, 1985. 98- 108
- [11] Stewart C, Lamberton J A, Fairclough R J, et al Vaccination as a possible means of preventing lantana poisoning[J]. Aust Vet J, 1988, 65: 349- 352
- [12] Pass M A, Stewart C. Immunisation against lantana toxins[A]. James L F. Plant Toxicology[C]. America: Iowa State University Press, 1992. 443- 447.
- [13] Payne A L, Than K A, Stewart P L, et al Vaccination against lupinosis[A]. James L F. Plant Toxicology[C]. America: Iowa State University Press, 1992. 234- 238
- [14] 余传霖, 叶天星, 陆德源. 现代医学免疫学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1998. 679- 680
- [15] 龙振洲. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 108- 117.
- [16] 张家骅. 家畜生殖内分泌学研究方法及原理[M]. 杨陵: 天则出版社, 1993. 37- 45

## Study on synthesis of swainsonine-BSA

TONG De-wen<sup>1</sup>, CAO Guang-rong<sup>1</sup>, CHENG Dong-liang<sup>2</sup>

(1 College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** In this study the swainsonine was synthesized with active ester, which was prepared by 2-bromine-acetic acid, to obtain white powder. The yield was 77%. The white powder was quaternary salt of swainsonine-ester identified by MP, IR and element analysis. The quaternary salt was synthesized with BSA, dialysed and lyophilized the production to obtain crystal of white needle. The yield was 91%, according to BSA. Each BSA molecule has combined 18-17 molecules of quaternary salt after determination.

**Key words:** swainsonine; BSA; active ester; quaternary salt