

甘肃棘豆中苦马豆素提取工艺改进初报^{*}

刘志滨, 赵兴华, 余永涛, 王建华

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 用 40 kHz 超声波水媒处理甘肃棘豆草粉 1.5 kg, 代替传统的索氏提取法或溶剂冷浸法, 水提液浓缩除杂后, 用正丁醇萃取, 正丁醇萃取液用稀酸水萃取, 浓缩后的稀酸水萃取液用氨性氯仿萃取, 浓缩氨性氯仿萃取液成浸膏, 此浸膏经石蜡油浴升华得到 24 mg 白色晶体, 经薄层层析检验, 可初步鉴定为苦马豆素。此法不用柱层析, 简化了苦马豆素提取的步骤, 提取率为 16 mg/kg。

[关键词] 苦马豆素; 超声波; 甘肃棘豆

[中图分类号] S856.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)01-0097-03

自 Colegate 等^[1]首次报道从灰苦马豆中分离出苦马豆素以来, 国内外相继报道从若干种植物和菌类材料中分离出了苦马豆素^[2-3]。目前, 从甘肃棘豆中提取苦马豆素时, 草粉处理大多采用索氏提取法或溶剂冷浸法, 其提取液再依次经酸水、碱水萃取和硅胶柱层析纯化, 最后对纯化物在 100℃条件下进行减压油浴升华。该方法步骤繁琐, 周期长, 且需消耗大量有机溶剂。

超声波协助提取技术与传统的索氏提取法和溶剂冷浸法相比, 具有能耗低、时间短、效率高等优点^[4-5], 在植物有效成分提取方面, 有很好的应用前景。关于超声波协助提取技术应用于甘肃棘豆中苦马豆素提取的研究, 尚未见报道。为此, 本试验用 40 kHz 的超声波处理甘肃棘豆草粉, 建立了小批量提取苦马豆素的工艺流程, 为建立周期短、节省试剂、提取率高的苦马豆素提取方法进行有益的探索。

1 材料与方法

1.1 材 料

甘肃棘豆为 2002 年在甘肃省采集的甘肃棘豆(花期)的地上部分, 干燥并粉碎后过孔径为 0.36 mm 的筛, 备用; 正丁醇, 分析纯, 天津市登峰化学试剂厂产品; 三氯甲烷, 分析纯, 天津市化学试剂六厂产品; 苦马豆素标准样品, 由西北农林科技大学动物科技学院生物毒素与分子毒理实验室提供。

1.2 主要实验仪器

KQ-500D 型医用数控超声清洗器, 频率 40

kHz, 功率 500 W, 昆山市超声仪器有限公司生产; FA 1104 型电子天平, 上海民桥精密科学仪器有限公司生产; LD Z5-2 型低速自动平衡离心机, 北京医用离心机厂生产; WM ZK-01 型温度指示控制仪, 上海华辰医用仪表有限公司产品; SHB-III 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 简易流程 甘肃棘豆草粉 → 加入蒸馏水 → 超声波处理 → 电炉加热浓缩 → 离心除杂 → 正丁醇萃取 → 酸水萃取 → 氨性氯仿萃取 → 浓缩成膏 → 油浴升华。

1.3.2 具体操作过程 取 1.5 kg 甘肃棘豆草粉, 加入 10 L 蒸馏水中, 在超声清洗器中浸渍 12 h, 然后用 40 kHz 超声波 50℃处理 1 h, 过滤后草粉按上述方法再处理 1 次, 共收集得 18 L 水提液。将此水提液用电炉加热浓缩至 2 L, 1 500 r/min 离心 10 min, 除去固体杂质, 然后在水浴锅上 95℃继续浓缩至 1 L。加入适量氨水调 pH 值至 8~10, 用 1 L 正丁醇萃取此浓缩液, 反复 5 次; 用 300 mL 0.2 mol/L 稀硫酸萃取正丁醇萃取液; 稀硫酸萃取液浓缩成膏状, 再用 1~2 L 氨性氯仿萃取; 浓缩氨性氯仿萃取液得 0.35 g 浸膏; 最后, 浸膏于 -0.09 MPa 条件下在石蜡油浴中进行升华。

1.4 薄层层析检查

在操作过程中, 每步均取少量样品用于监测其成分。常规方法制备硅胶板, 将每步所得样品及苦马豆素标准样品用少量甲醇溶解, 用毛细管吸取少量

^{*} [收稿日期] 2005-05-13

[作者简介] 刘志滨(1981-), 男, 黑龙江泰来人, 在读硕士, 主要从事有毒植物成分的分离提取及其活性研究。

[通讯作者] 王建华(1948-), 男, 河南南阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事家畜中毒性疾病和营养代谢性疾病研究。

溶液点于硅胶板上,以 $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{氨水}}:V_{\text{蒸馏水}}=70:26:2:2$ 的混合液为展开剂,上行法展开。取出后挥干溶剂,显色时先喷过氧化氢,置于 115°C 加热 10 min ,取下放凉,再喷体积分数 10% 醋酸酐无水乙醇液,置于同样温度环境中,待闻不到酸味时,取下放凉,最后喷 Ehrlich's 试剂显色 10 min 。记录各板颜色,计算 R_f 值。

2 结果与分析

2.1 苦马豆素的鉴定

最后所得的浸膏以薄层层析法检查,结果显示紫色、桃红色、淡红色 3 个斑点, R_f 值分别为 0.45 ,

0.68 和 0.78 。第一个斑点显示紫色,其形状及 R_f 值与苦马豆素标准样品相符;正丁醇萃取液和酸水萃取液薄层层析检查所示与上述结果相似,但颜色淡,脱尾较严重;而水提液显色极不明显。

将升华所得白色结晶和苦马豆素标准样品用 3 种不同的展开剂在相同条件下展开,二者的斑点形状和颜色相同, R_f 值相近,可初步断定此白色结晶为苦马豆素,详细结果见表 1。

2.2 苦马豆素的提取率

将 1.5 kg 甘肃棘豆草粉按上述流程提取,结果得白色结晶 24 mg ,提取率为 16 mg/kg 。

表 1 白色结晶与苦马豆素标准品在展开系统中的展开结果

Table 1 Comparison between the white crystal and the criterion swainsonine

展开系统 Spreading system	标准样品 Standard		白色结晶 Sample	
	R_f	颜色 Color	R_f	颜色 Color
$V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{氨水}}:V_{\text{蒸馏水}}=70:26:2:2$ $V_{\text{chloroform}}:V_{\text{methanol}}:V_{\text{ammonia}}:V_{\text{distilled water}}=70:26:2:2$	0.45	紫色 Purple	0.46	紫色 Purple
$V_{\text{甲醇}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{蒸馏水}}:V_{\text{氨水}}=1:6:1:1$ $V_{\text{methanol}}:V_{\text{acetone}}:V_{\text{distilled water}}:V_{\text{ammonia}}=1:6:1:1$	0.50	紫色 Purple	0.49	紫色 Purple
$V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:4$,加少量氨水 $V_{\text{methanol}}:V_{\text{ethyl acetate}}=1:4$,with little ammonia	0.53	紫色 Purple	0.55	紫色 Purple

3 讨 论

3.1 苦马豆素的性质与作用

苦马豆素(SW)从化学结构上分析属于多羟基吲哚里西啶生物碱^[6],为白色针状结晶,熔点 $144\sim 145^{\circ}\text{C}$,分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3$,相对分子质量为 173 ,易溶于水和乙醇、乙醚、丙酮、氨性氯仿等有机溶剂,酸离解常数(pK_a)为 7.4 。

苦马豆素是疯草(豆科黄芪属和棘豆属的有毒植物)的主要毒性成分,家畜采食疯草后,可导致低聚糖在溶酶体内蓄积,引起中毒、死亡、流产等,给畜牧业造成很大损失。疯草生命力顽强,不断蔓延,使草地结构劣变,生态恶性演替^[7]。目前对疯草的治理主要采取机械防除和化学防除 2 种方法,但效果均不佳。童德文等^[8-9]通过化学合成法将 SW 与牛血清蛋白(BSA)结合为 SW-BSA,作为疫苗免疫接种动物,获得初步成功。

近年来,苦马豆素作为一种新的抗癌药物受到极大关注,有关苦马豆素抗肿瘤的实验国内外已多次报道。苦马豆素可抑制溶酶体内 α -甘露糖苷酶 I 和高尔基体内 α -甘露糖苷酶 II 的活性,其作用特点

是既具有杀伤癌细胞作用,又具有免疫调节作用^[10]。

苦马豆素可制成疫苗,预防疯草中毒病的发生,同时又具有极大的开发为抗肿瘤药物的潜力,其市场应用前景广阔。但无论是人工合成还是从植物及真菌中提取苦马豆素,其步骤均较繁琐,且需要消耗大量的人力、物力^[11-12],从而使价格非常昂贵,限制了对它的深入研究。本试验所建立的提取方法,提高了苦马豆素的生产效率,降低了产品成本,对深入研究动物疯草中毒病或苦马豆素的开发利用均有重要意义。

3.2 苦马豆素的超声波协助提取

超声波是指频率为 $0.02\sim 50\text{ MHz}$ 的弹性波,不能引起人的听觉,其在介质中主要产生 2 种形式的振荡,即横向振荡(横波)和纵向振荡(纵波)。横波只能在固体中产生,纵波可在固体、液体、气体中产生。超声波协助提取植物有效成分的基本原理是超声波的空化作用、热作用和机械作用。超声波的空化作用能使液体内部产生无数个小气泡,小气泡内部可达几千度的高温和几千个大气压的高压,可使植物细胞壁破裂。超声波的机械作用可在液体中形成

有效的搅动,加速细胞内的物质溶解于介质,这种作用是低频机械搅动无法比拟的^[13-14]。

超声波协助提取植物有效成分的影响因素包括超声波频率、强度、作用时间、预浸渍时间、温度、料液比、溶剂浓度以及处理次数等。通常认为超声波最佳作用条件为频率 20 kHz,温度 40~60℃,预浸渍 10 h 以上。

本试验在相同条件下将升华所得白色结晶与苦马豆素标准样品在 3 种不同的展开系统中展开, Ehrlich's 试剂显色,结果显示二者斑点的颜色、形状相同, R_f 值相近,可初步确定为苦马豆素。至于超声波处理甘肃棘豆草粉的最佳工艺,还有待进一步研究。

3.3 苦马豆素的提取率

甘肃棘豆的采集时间、地点和年份均会对其苦马豆素的含量造成影响,提取过程中的萃取时间、次

数和升华时间等均会影响苦马豆素的提取率。童德文等^[15]报道,用传统方法从甘肃棘豆中提取苦马豆素的提取率为 14 mg/kg。本试验应用 40 kHz 的超声波处理甘肃棘豆草粉代替传统的索氏提取法或溶剂冷浸法,提取率为 16 mg/kg。本方法虽可提高提取率,节约有机溶剂,但其水提液与甲醇或者乙醇提取液相比,沸点高,不易浓缩,试验中采用电炉加热的方法浓缩水提液,费时、费电。另外,加热温度是否会对苦马豆素的提取率造成影响仍待探讨。

与传统方法相比,不需经过柱层析是本提取方法的最大优点。柱层析技术对于甘肃棘豆化学成分的 system 分析效果虽然较好,但是要消耗大量的试剂,步骤繁琐,技术要求较高,不适于批量提取苦马豆素。本提取方法省掉了柱层析过程,明显提高了苦马豆素的提取效率,为苦马豆素批量提取工艺流程的设计做好了铺垫。

[参考文献]

- [1] Colegate S M, Dorling P R, Huxtable C R. A Spectroscopic investigation of swainsonine: an α mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*[J]. Aust J Chem, 1979(32): 2257-2264
- [2] Braun K, Romero J, Liddell C, et al. Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed[J]. Mycol Res, 2003, 107(8): 980-988
- [3] Driemeier D, Colodel E M, Gimeno E J, et al. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats[J]. Vet Pathol, 2000, 37(2): 153-159
- [4] 董嘉德. 超声技术在中药提取中的应用[J]. 传统医药, 2002, 11(11): 55-56
- [5] 王铮敏. 超声波在植物有效成分提取中的应用[J]. 三明高等专科学校学报, 2002, 19(4): 45-51
- [6] Molyneux R J, James L F. Loco intoxication indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*) [J]. Science, 1982, 216(6): 190-191
- [7] 史志诚. 动物毒理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001
- [8] 童德文, 曹光荣, 程东亮. 苦马豆素-BSA 的合成研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(4): 95-102
- [9] 童德文, 陈德坤, 曹光荣. 苦马豆素-BSA 对家兔的免疫原性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(5): 11-14
- [10] De Gasperi R, Daniel P E, Warren C D. A human α mannosidase specific for the core of complex glycans[J]. J Biol Chem, 1992, 267: 9706-9712
- [11] 赵宝玉. 疯草(甘肃棘豆)生物碱系统分析及其毒性的比较病理学研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2001
- [12] 周维善. 苦马豆素(Swainsonine)的不对称合成研究[C]//第五届全国天然有机化学学术会议论文集. 北京: 化学工业出版社, 1993: 88-91
- [13] 严伟, 李淑芬, 田松江. 超声波协助提取技术[J]. 化工进展, 2002, 21(9): 649-651
- [14] 杨祖荣. 超声技术在天然药物有效成分提取中的应用[J]. 云南中医学院学报, 2003, 26(3): 29-31
- [15] 童德文, 曹光荣, 李绍君. 甘肃棘豆中苦马豆素的分离与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(3): 5-7

(下转第 104 页)

- [7] 江家椿. 不同海拔高度牦牛西藏高原若干血液生理常值的比较[J]. 畜牧兽医学报, 1991, 22(1): 20-26
- [8] Ramirez G, Bittle P A, Rosen R, et al. High altitude living: genetic and environmental adaptation[J]. Aviat Space Environ Med, 1999, 70(1): 73-81.
- [9] Chappell M A, Snyder L R G. Biochemical and physiological correlates of deer mouse α -chain hemoglobin polymorphism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 5484-5488
- [10] Snyder L R. Low P_{50} in deer mice native to high altitude[J]. J Appl Physiol, 1985, 58(1): 193-199

Cloning and sequencing analysis of Chinese yak β globin gene

YUAN Qing-yan¹, ZHANG Qing-bo¹, HUANG Zhi-guo¹, XIE Zhuang¹,
YIN Pu-lu², ZHAO Yong-hua³

(1 College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2 Hongsongwaba Reeder Farm, Chengde, Hebei 310034, China;

3 Longri Reeder Farm, Hongyuan, Sichuan 624400, China)

Abstract: Yak β globin is amplified by primers designed from cattle β globin gene. The cloning and sequencing results indicate that they have very high homology with cattle β globin gene with a value of above 97%. Two alleles, $\beta^{3A\ sn}$ and $\beta^{35A\ sn}$, were detected at β globin locus in Chinese yak. The sample 67 has these two alleles, while individual 64 has allele $\beta^{35A\ sn}$ and individual 1078 has allele $\beta^{3A\ sn}$. The allele $\beta^{35A\ sn}$ is the characteristic of Chinese yak after residue blasting. It is suggested that the $\beta^{135A\ sn}$ of this allele could reduce the oxygen affinity of yak hemoglobin.

Key words: yak; β globin gene; allele; oxygen affinity

(上接第 99 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)01-0097-EA

Preliminary study on improving the extraction technology of the Swainsonine from *Oxytropis kansuensis*

LIU Zhi-bin, ZHAO Xing-hua, YU Yong-tao, WANG Jian-hua

(College of Animal Sci-Tec, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 1.5 kg *Oxytropis kansuensis* powder was disposed with 40 kHz ultrasound in water to substitute the traditional Soxhlet extraction technology or the extraction in cold solvent. After concentration and removal of the impurity, n-butanol extracted by sparse acid was employed. The concentrated acid liquid was extracted with ammoniated chloroform, which was then concentrated to residue. The residue was sublimed in 100 °C olefin and 24 mg white crystal, which was preliminary determined as swainsonine was collected. This method simplified the extraction and the extraction rate reached 16 mg/kg.

Key words: swainsonine; ultrasound; *Oxytropis kansuensis*