

气相色谱内标法测定两种黄芪属疯草中苦马豆素含量

崔忠华,赵兴华,李勤凡,王建华,耿果霞

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**建立一种苦马豆素(Swainsonine,SW)的微量定量检测方法。**【方法】**以甲基- α -D-吡喃甘露糖苷(me-Gal,纯度99%)为内标,在柱温200℃、进样口温度300℃、氢火焰离子化检测器(FID)温度280℃、高纯氮气载气压力200 kPa条件下,对苦马豆素进行气相色谱分析,以SW进样质量浓度对SW和me-Gal峰面积的比值进行回归分析,得回归方程,并进行单点校正因子测定和加样回收试验。**【结果】**单点校正因子为1.067 8,在0.047~6 mg/mL SW进样质量浓度对SW和me-Gal峰面积比值的线性关系良好。加样平均回收率为107.33%,变异黄芪地上部分SW含量为 (39.2 ± 0.16) mg/kg,茎直黄芪地上部分SW含量为 (43.6 ± 0.13) mg/kg。**【结论】**气相色谱内标法准确、重现性好,可作为苦马豆素的微量定量检测方法。

[关键词] 黄芪属;疯草;苦马豆素;气相色谱;内标法

[中图分类号] O657.7⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)05-0017-05

Determination of Swainsonine in *Astragalus locoweed* by internal standard gas chromatography

CUI Zhong-hua, ZHAO Xing-hua, LI Qin-fan, WANG Jian-hua, GENG Guo-xia

(College of Animal Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study established a method for determination of Swainsonine. **【Method】** Swainsonine in *Astragalus locoweed* was determined by main internal standard gas chromatography with me-Gal as internal standard under the oven temperature 200℃, injection temperature 300℃, detector (FID) temperature 280℃ and flow rate of carrier gas 200 kPa. **【Result】** The analysis results of single-calibration-ratio was 1.067 8 and good linear relationship was obtained in the range of 0.047 to 6 mg/mL. The recovery percentage was 107.33%. The SW contents of *A. variabilis* and *A. strictus* were (39.2 ± 0.16) mg/kg and (43.6 ± 0.13) mg/kg respectively. **【Conclusion】** The internal standard method had high accuracy and good repeatability and could be a determination method of Swainsonine.

Key words: *Astragalus*; locoweed; Swainsonine; gas chromatography; internal standard method

疯草(Locoweed)是棘豆属(*Qxytropis*.)和黄芪属(*Astragalus*)有毒植物的总称。1979年,Collegate等^[1]首次从灰苦马豆中分离出吡啶兹定生物碱——苦马豆素(Swainsonine,SW)。近年来国内外研究发现,SW除有毒性外,还具有很强的抗癌活

性^[2-3]和免疫增强功能^[4-6]。在苦马豆素(SW)中毒机理及其应用研究中,均要对SW进行定量分析,因此建立一种准确、灵敏的SW测定方法具有重要意义。目前,国内采用的SW定量分析方法主要有薄层色谱扫描法^[7]、气相色谱法(GC)^[8-10]和高效液相

* [收稿日期] 2007-05-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571315)

[作者简介] 崔忠华(1980—),男,山西临汾人,在读硕士,主要从事动物中毒性疾病研究。

[通讯作者] 李勤凡(1968—),男,甘肃张家川人,副教授,硕士生导师,主要从事家畜中毒性疾病和营养代谢病研究。
E-mail:liqinfan@yahoo.com.cn

色谱法^[11]。薄层色谱扫描法检测受自制的硅胶板厚度、板面平整度和活化程度等因素的影响。气相色谱法和高效液相色谱法虽能进行含量测定,但目前主要采用外标法,重现性和精确性都较差。内标法是一种间接或相对的校准方法,在分析测定样品中某组分含量时,加入一种内标物质以校准和消除因操作条件波动而对分析结果产生的影响,从而提高分析结果的准确度。本试验以甲基- α -D-吡喃甘露糖苷(me-Gal)为内标物,对 SW 进行气相色谱分析,以期建立一种准确、灵敏的 SW 测定方法,为进一步研究动物疯草中毒和 SW 的药用价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料和试剂 苦马豆素标准品(SW,西北农林科技大学动物医学院生物毒素与分子毒理实验室提供);甲基- α -D-吡喃甘露糖苷(me-Gal,SIGMA 公司产品,纯度 99%);双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)+三甲基氯硅烷(TMCS)(硅烷化试剂,美国 SUPELCO 公司产品);变异黄芪(2006-08 采于内蒙古自治区阿拉善左旗);茎直黄芪(2005-07 采于西藏郊区,西北农林科技大学动物医学院生物毒素与分子毒理实验室赵宝玉副教授惠赠);正丁醇、甲醇、吡啶均为分析纯。

1.1.2 主要仪器 GC-14C 气相色谱仪(日本岛津),威玛龙色谱数据工作站,AT. SE-54 型毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm)(中国科学院兰州化学物理研究所色谱技术研究开发中心),赛多利斯 BP211D 型电子天平(德国)。

1.2 方法

1.2.1 疯草样品的前处理(超声波协助提取法)

准确称取疯草草粉(变异黄芪和茎直黄芪)各 20 g 于烧瓶中,加入 300 mL 蒸馏水,在超声清洗器中浸渍 12 h 后,用 40 kHz 超声波于 50 $^{\circ}$ C 处理 1 h,更换溶媒并在相同条件下重复 1 次,共收集得 550 mL 水提液;然后加热浓缩至 100 mL,1 500 r/min 离心 10 min,除去固体杂质,加入适量氨水调 pH 至 8~10,用 100 mL 正丁醇萃取此浓缩液,反复 5 次;接着用 300 mL 0.2 mol/L 稀硫酸溶液萃取;将最后酸水溶液浓缩至 100 mL,放在水浴锅上 95 $^{\circ}$ C 继续浓缩成浸膏。用 500 μ L 吡啶溶解并离心备用^[12]。

1.2.2 标准品溶液和内标溶液的制备 精密称取 SW 标准品 4.8 mg 于 400 μ L 吡啶中,摇匀,作为 SW 标准品溶液 A。精密称取 me-Gal 16 mg 于 8

mL 吡啶中,摇匀,作为内标溶液 A。

1.2.3 色谱条件 AT. SE-54 型毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm),柱温 200 $^{\circ}$ C,进样口温度 300 $^{\circ}$ C,氢火焰离子化检测器(FID)温度 280 $^{\circ}$ C,分流比为 60:1,载气为高纯氮气,载气压力为 200 kPa,进样量为 1 μ L。

1.3 内标物的分析

精密吸取 100 μ L SW 标准品溶液 A 至 1 mL 离心管,加 20 μ L 内标溶液 A、40 μ L 吡啶和 40 μ L BSTFA+TMCS(99:1)摇匀,静置 3 h 后进行气相色谱分析。

1.4 SW 进样质量浓度对 SW 和 me-Gal 峰面积比值的线性关系

精密吸取 200 μ L SW 标准品溶液 A 至 1 mL 离心管中,再取 7 支 1 mL 离心管分别加 100 μ L 吡啶,按倍比稀释的方法配制成 6,3,1.5,0.75,0.375,0.188,0.094,0.047 mg/mL 8 个质量浓度梯度的溶液。在每个离心管中加 20 μ L 内标溶液 A、40 μ L 吡啶和 40 μ L BSTFA+TMCS(99:1)摇匀,静置 3 h 后进行气相色谱分析。以 SW 进样质量浓度 Y 对 SW 和 me-Gal 峰面积比值 X 进行回归分析。

1.5 单点校正因子的测定

精密称取 2 mg me-Gal 于 1 mL 吡啶中,摇匀,作为内标溶液 B。精密称取 SW 标准品 1.2 mg 于 200 μ L 吡啶中,摇匀,作为 SW 标准品溶液 B。精密量取 25 μ L SW 标准品溶液 B 和 20 μ L 内标溶液 B,再加 40 μ L 吡啶和 40 μ L BSTFA+TMCS(99:1),静置 3 h 后进行气相色谱分析,取 1 μ L 进样,连续进样 6 次,按 SW 和 me-Gal 峰面积比值的平均值计算校正因子。

1.6 加样回收试验

精密称取 SW 标准品 0.6 mg 至 1 mL 离心管,加 30 μ L SW 标准品溶液 B,再加 20 μ L 内标溶液 B 和 40 μ L BSTFA+TMCS(99:1),最后加 910 μ L 吡啶,摇匀,静置 3 h 后进行气相色谱分析。

1.7 样品的测定

取上述制备的疯草样品溶液 200 μ L,分别加 20 μ L 内标溶液 A,再加 40 μ L BSTFA+TMCS(99:1),静置 3 h 后进行气相色谱分析,重复 3 次,以回归方程、校正因子计算疯草样品中 SW 含量。

2 结果与分析

2.1 内标物分析结果

在 1.2.3 色谱条件下分别进样测定,me-Gal 和

SW 出峰时间相近又能完全分离,SW 保留时间为 7.93 min,内标物 me-Gal 保留时间为 7.32 min(图 1,图 2 和图 3),符合内标物的标准,满足定量分析要求。

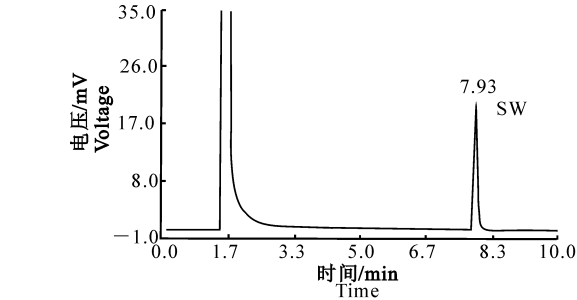


图 1 SW 气相色谱图

Fig. 1 Determination of SW by gas chromatography

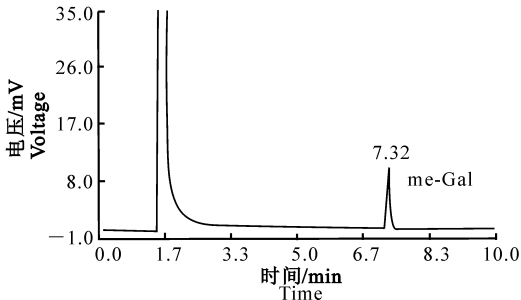


图 2 me-Gal 气相色谱图

Fig. 2 Determination of me-Gal by gas chromatography

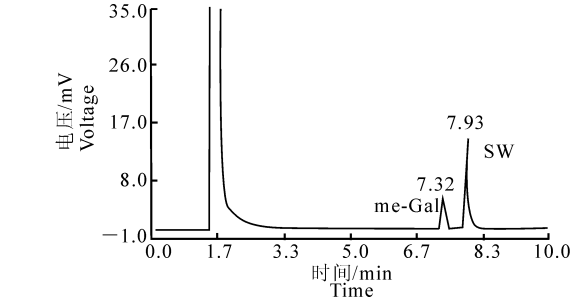


图 3 SW+me-Gal 气相色谱图

Fig. 3 Determination of SW and me-Gal by gas chromatography

2.2 SW 进样质量浓度对 SW 和 me-Gal 峰面积值的线性关系

以 SW 进样质量浓度 Y 对 SW 和 me-Gal 峰面积比值(表 1) X 进行回归分析,得回归方程: $Y=0.198\ 3X-0.069\ 5$, $r=0.999\ 4$,表明 SW 进样质量浓度(0.047~6 mg/mL)对 SW 和 me-Gal 峰面积比值线性关系良好,结合信噪比 $S/N=3$ 这一原则可以推断,该方法的检出限为 0.01 mg/L。

表 1 不同质量浓度 SW 气相色谱分析测定结果
Table 1 Results of standard curve of SW

SW 质量浓度/ (mg · mL ⁻¹) Concentration of SW	SW 峰面积 Peak area of SW	me-Gal 峰面积 Peak area of me-Gal	SW 和 me-Gal 峰面积比 Ratio of SW peak area to me-Gal	SW 和 me-Gal 平均峰面积比 Ratio of SW average peak area to me-Gal
6	804 143	26 922	29.869	30.277
	1 044 247	35 084	29.764	
	869 003	27 855	31.197	
3	514 320	32 172	15.986	16.142
	509 189	32 778	15.534	
	398 446	23 570	16.904	
1.5	288 493	38 996	7.398	7.611
	211 755	26 614	7.956	
	280 236	37 478	7.477	
0.75	111 820	24 490	4.565	4.461
	148 518	34 353	4.323	
	134 673	29 959	4.495	
0.375	59 820	23 901	2.503	2.442
	74 209	30 398	2.441	
	87 859	36 906	2.381	
0.188	40 305	32 307	1.248	1.228
	41 270	33 959	1.215	
	38 847	31 801	1.221	
0.094	14 014	23 073	0.607	0.612
	19 524	31 701	0.616	
	20 141	32 801	0.614	
0.047	7 498	22 893	0.328	0.311
	8 568	27 663	0.310	
	9 702	26 922	0.295	

2.3 单点校正因子的测定结果

按 SW 进样质量浓度和 me-Gal 峰面积比值的平均值计算校正因子,校正因子为 1.067 8, $RSD=1.26\%$ ($n=6$)。

2.4 加样回收试验结果

以回归方程、单点校正因子计算样品中 SW 含量为 0.837 2 mg,理论值为 0.78 mg,平均回收率

为 107.33%, $RSD=1.008\%$ ($n=5$)。

2.5 变异黄芪和茎直黄芪中 SW 含量测定结果

以回归方程、单点校正因子计算样品中的 SW 含量。色谱图见图 4、图 5,气相色谱测定结果见表 2。变异黄芪(内蒙古阿拉善左旗)地上部分 SW 含量(39.2 ± 0.16) mg/kg,茎直黄芪(西藏郊区)地上部分 SW 含量(43.6 ± 0.13) mg/kg。

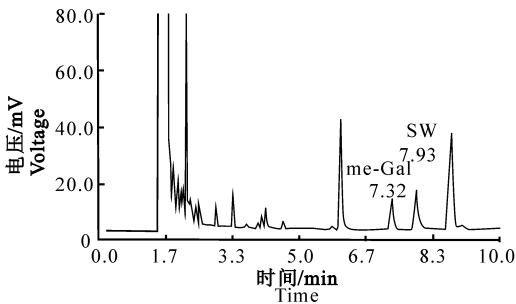


图 4 变异黄芪样品色谱分析结果

Fig. 4 Determination of *A. variabilis* by gas chromatagrapy

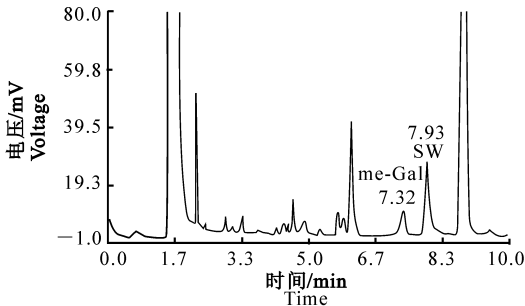


图 5 茎直黄芪样品色谱分析结果

Fig. 5 Determination of *A. strictus* by gas chromatagrapy

表 2 变异黄芪和茎直黄芪中 SW 气相色谱分析的测定结果

Table 2 Results of *A. variabilis* and *A. strictus* of SW

样品 Sample	SW 峰面积 Peak area of SW	me-Gal 峰面积 Peak area of me-Gal	SW 和 me-Gal 峰面积比 Ratio of SW peak area to me-Gal	SW 和 me-Gal 平均峰面积比 Ratio of SW average peak area to me-Gal
变异黄芪 <i>A. variabills</i>	201 572	55 027	3.663	3.652
	189 436	49 876	3.798	
	201 689	57 704	3.495	
茎直黄芪 <i>A. strictus</i>	225 418	59 351	3.798	3.930
	212 523	53 917	3.941	
	199 767	49 297	4.052	

3 结论与讨论

本试验采用超声波协助提取法处理样品,不通过柱层析,简化了操作步骤,减少了 SW 在分离提取过程中的损失。采用气相色谱外标法测定 SW 含量,重现性和精确性都较差。本试验建立的气相色谱内标法检测 SW 含量,可校准和消除进样量不同引起的误差,因为该法是用待测组分 SW 和内标物 me-Gal 峰面积的相对值进行计算,所以对进样量的准确性要求较低。本试验结果表明,气相色谱内标法准确、重现性好,可作为苦马豆素的微量定量检测方法。但在 SW 家畜中毒机理和药用价值的研究中,要更进一步降低最低检测限,尚需深入研究。

【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] 刘巍,张晓彬,李雅,等. 苦马豆素的抑瘤和免疫增强作用[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(6): 258-260.
Liu W,Zhang X B,Li Y, et al. The antitumor and immunogenicity of swainsonine [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2006, 21(6): 258-260. (in Chinese)

[3] 张黎,杨鸣琦. 豆类丝核菌次级代谢产物对肿瘤细胞超微结构的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 7-9.
Zhang L,Yang M Q. Effects of secondary metabolites of *Rhizoctonia leguminicola* on Hepatoma 22 cells were observed by TEM [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(7): 7-9. (in Chinese)

[4] White S L. Stimulation of DNA synthesis in murine lymphocytes by the drug swainsonine immunomodulatory properties [J]. Biophys Res Commun, 1988, 150: 615-625.

[5] Myc A,Kunicka J E. Effect of swainsonine on stimulation of cell cycle progression of human lymphocytes [J]. Cancer Res, 1989, 49: 2879-2883.

[6] Grzegorzew S. Induction of macrophage tumoricidal activity, major histocompatibility complex class II antigen expression and interleukin-1 production by swainsonine [J]. Cancer Commun, 1986, 1: 373-379.

[7] 童德文,曹光荣,耿果霞,等. 薄层扫描测定 5 种疯草中苦马豆

- 素含量[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(2): 183-185.
- Tong D W, Cao G R, Geng G X, et al. Determination on content of Swainsonine in five locoweeds [J]. Chin J Vet Sci, 2003, 23(2): 183-185. (in Chinese)
- [8] McIn-Romero J. The toxicosis of *Embellisia* fungi from locoweeds is similar to locoweeds toxicosis in rat [J]. Career and Technical Education, 2004, 82: 2169-2174
- [9] 丁伯良, 王建辰, 薛登民, 等. 甘肃棘豆及中毒奶山羊尿液、胎水、胎儿胎盘中苦马豆素的检验 [J]. 草地学报, 1994, 2(2): 66-73.
- Ding B L, Wang J C, Xue D M, et al. The detection of swainsonine from *Oxytropis kansuensis* and urine, Placental fluid and fetoplacenta of poisoned dairy goats [J]. Acta Agrestia Sinica, 1994, 2(2): 66-73. (in Chinese)
- [10] Joshua B, Taylor M S. Effect of subacute Swainsonine consumption on immunocompetence and serum constituents of sheep in a Nutrient-Restricted state [J]. Veterinary and Human Toxicology, 2000, 42(4): 199-204.
- [11] 郭治安, 张小辉, 赵景婵, 等. 离子抑制色谱法测定棘豆属植物提取物中的苦马豆素 [J]. 色谱, 2006, 24(6): 656.
- Guo Z A, Zhang X H, Zhao J J, et al. Determination of Swainsonine in plant extract of *Oxytropis* locoweeds by ion suppression chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24(6): 656. (in Chinese)
- [12] 李勤凡, 王建华, 刘志斌, 等. 萃取法提取甘肃棘豆中的苦马豆素研究初报 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 143-145.
- Li Q F, Wang J H, Liu Z B, et al. Preliminary reports on extraction Swainsonine from *Oxytropis kansuensis* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(5): 143-145. (in Chinese)

(上接第 16 页)

〔参考文献〕

- [1] Yellon S M, Bittman E L, Lehman M N. Importance of timing of nocturnal melatonin secretion in determining the reproductive response to inductive photoperiod in the ewe [J]. Biol Reprod, 1985(32): 523-529.
- [2] Thomas K B, Iuvone P M. Circadian rhythm of tryptophan hydroxylase activity in chicken retina [J]. Cell Mol Neurobiol, 1991, 11(5): 511-527.
- [3] Klein D C. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland [J]. Ciba Found Symp, 1985, 117: 38-56.
- [4] Jilg A, Moek J, Weaver D R, et al. Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signaling [J]. European Journal of Neuroscience, 2005, 22(11): 2845-2854.
- [5] Jimenez-Jorge S, Jimenez-Caliani A J, Guerrero J M, et al. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland [J]. Journal of Pineal Research, 2005, 39(1): 77-83.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual [M]. 2nd ed. Jin D Y, Li M F, translated. Beijing: Science Press, 1992. (in Chinese)
- [7] Hosaka T, Mimuro T, Hamada N, et al. Stimulatory effects of LH on release of melatonin and activities of its synthesizing enzymes NAT and HIOMT in organ-cultured pineal glands of female rats [J]. Horm Metab Res, 2002, 34(8): 441-445.
- [8] Bernard M, Voisin P, Guerlotte J, et al. Molecular and cellular aspects of hydroxyindole-O-methyltransferase expression in the developing chick pineal gland [J]. Dev Brain Res, 1991, 59(1): 75-81.
- [9] Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 278(5): R1339-R1345.
- [10] Ebihara S, Marks T, Hudson D J, et al. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse [J]. Science, 1986, 231(4737): 491-493.
- [11] 张小辉. MLT、LH 和 FSH 对绵羊季节性发情的调控作用研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- Zhang X H. The regulation of melatonin, LH and FSH on the seasonal oestrus of sheep [D]. Yangling Shaanxi: Northwest A & F University, 2004. (in Chinese)
- [12] 赵文忠, 周国林, 何海怀. 海南岛两株甲病毒基因组 3' 末端核苷酸序列的克隆与分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2000, 14(3): 213-217.
- Zhao W Z, Zhou G L, He H H. Cloning and primary analysis of 3' end genome of two alphaviruses isolated from Hainan Province of China [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2000, 14(3): 213-217. (in Chinese)