

# 甘肃棘豆中苦马豆素的分离与鉴定

童德文, 曹光荣, 李绍君

(西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

**[摘要]** 用升华法从甘肃棘豆中分离到一种白色细针状结晶, 经 TLC、MP、IR、MS 鉴定分析确定为苦马豆素, 经计算甘肃棘豆中的提取率为 14  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

**[关键词]** 疯草; 甘肃棘豆; 苦马豆素; 升华法

**[中图分类号]** S856.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1000-2782(2001)03-005-04

1873 年美国首次报道了疯草病(locodisease), 1905 年 Marsh<sup>[1]</sup> 试验证实了动物采食兰伯氏棘豆和密柔毛黄芪引起中毒。在随后的 70 多年里, 人们试图分离疯草毒素, 但只有两项研究相对成功, 一是 Cauch 从兰伯氏棘豆分离出一种物质, 他描述这种物质是一种稳定的多羟基含氮有机化合物, 具有吸湿性, 易溶于水而不溶于氯仿、乙醚和烃类溶剂, 在实验条件下可引起猫的疯草病<sup>[2]</sup>; 二是 Fraps<sup>[3]</sup> 对密柔毛黄芪进行了广泛的化学成分研究, 并分离出一种碱性、吸湿性强的不纯物质, 称为 Locoin, 这种物质的乙酰化产物及其酒石酸盐、柠檬酸盐都可以引起疯草病, 但生物碱试剂检查没有得到肯定结果。1978 年 Hertley<sup>[4]</sup> 将灰苦马豆与斑荚黄芪、绢毛棘豆进行毒性比较试验, 结果发现动物中毒后, 不仅临床症状一致, 而且病理组织学变化也没有明显差异, 都表现出神经细胞和内脏细胞空泡变性。而动物灰苦马豆中毒在形态学和生物化学方面的变化同安哥斯牛和人类的一种甘露糖甙酶缺乏引起的遗传性溶酶体贮积病——甘露糖过多症(mannosidosis)十分相似。1979 年 Colegate 等<sup>[5]</sup> 用甘露糖甙酶作为工具, 从灰苦马豆中分离出吡啶兹定生物碱——苦马豆素(swainsonine, SW)。1982 年 Molyneux 等<sup>[6]</sup> 以 Colegate 分离到的 SW 为标准品从斑荚黄芪中分离出 SW。国内 1989 年曹光荣等<sup>[7]</sup> 首次从黄花棘豆中分离出 SW, 并测定出它的含量为 0.12  $\text{mg}/\text{g}$ ; 丁伯良<sup>[8]</sup> 测定出甘肃棘豆中也含有 SW, 但是迄今尚未从甘肃棘豆中分离到 SW。近年来随着研究的深入进行, 人们还发现 SW 具有抗癌活性<sup>[9]</sup>。本研究试图

从甘肃棘豆中分离出 SW, 为进一步研究动物疯草中毒和 SW 的抗癌作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

甘肃棘豆, 1996 年 8 月采集于青海省泽库县西卜沙乡, 自然干燥后粉碎, 置阴凉干燥处保存备用。SW 标准品, 由美国农业部西部农业研究中心和有毒植物研究所 Dale R Gardner 博士和 Russell J Molyneux 博士提供。

### 1.2 方法

1.2.1 甘肃棘豆中总生物碱的提取 称取甘肃棘豆粉 5 000 g, 用甲醇浸泡 3 次, 每次 24 h, 合并甲醇液, 70  $^{\circ}\text{C}$  减压浓缩至浸膏, 1 mol/L HCl 溶解后过滤, 滤液上 732 强酸性阳离子交换树脂, 先用去离子水洗脱, 弃去洗脱液, 后用 1 mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$  洗脱, 收集洗脱液, 并挥发至干, 即得总生物碱 129.43 g。

1.2.2 SW 的分离 将总生物碱用甲醇反复溶解, 过滤, 挥干滤液后用氨性氯仿溶解, 回收氯仿, 残留物与 60~325  $\mu\text{g}$  硅胶研磨均匀后上硅胶(180  $\mu\text{g}$ ) 柱, 氯仿、甲醇、氨水、水体积比为 70:26:2:2 混合溶剂洗脱, 每 10 mL 收集 1 管, 共 160 管, 薄层层析结合抑制  $\alpha$ -甘露糖甙酶活性监测, 合并同类部分, 挥干后在 90  $^{\circ}\text{C}$ , -0.094 Pa 真空条件下升华。

1.2.3 薄层层析(TLC) 硅胶 G 湿法铺于 20 cm $\times$ 8 cm 玻璃板, 活化后点样, 氯仿、甲醇、氨水、水体积比为 70:26:2:2 上行法展开。自然干燥, 先喷乙酐液, 在加热板上加热约 1 min 直到闻不到乙酐味, 取下薄板再喷 Ehrlich's 液, 加热到出现

**[收稿日期]** 2001-02-19

**[基金项目]** 国际科学基金资助(IFS, NO2906-1); 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科研工作。

紫红色斑点为止,计算 Rf 值,并与标准品对照。

1.2.4  $\alpha$ -甘露糖甙酶活性抑制试验 用蒸馏水将分析纯的对-硝基酚配成 4 mmol/L 的母液,再用蒸馏水配成 10, 25, 50, …, 2 000  $\mu$ mol/L 27 个梯度浓度的对-硝基酚标准液,405 nm 比色,制作标准曲线。50  $\mu$ L 羊血清、50  $\mu$ L 反应缓冲液(0.2 mol/L 乙酸缓冲液, pH 4.0)、50  $\mu$ L 收集液和 50  $\mu$ L 底物溶液(4 mmol/L 对-硝基苯基- $\alpha$ -D-甘露糖甙)混匀,37  $^{\circ}$ C 水浴 4 h,加入 1.8 mL 终止缓冲液(0.2 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, pH 10.07),每管设对照,对照管除底物溶液在终止反应后加外,其他与测定管相同,充分混匀后,测定光密度,结果查标准曲线。

1.2.5 SW 的鉴定 TLC(方法同 1.2.3)、熔点(MP, 熔点测定仪测定)、红外光谱(IR, 溴化钾压片)、质谱(MS, 直接进样, 汽化温度 230  $^{\circ}$ C, 0.981 min 扫描 30 次)。

## 2 结果

### 2.1 TLC 和 $\alpha$ -甘露糖甙酶活性抑制试验结果

TLC 检测结果表现为, Ehrlich's 液显色后,

25~43 管(I)的洗脱液有一紫色斑点, Rf 值为 0.60。65~79 管(II)的洗脱液有一紫红色斑点, Rf 值为 0.44, 与标准品的斑点颜色和 Rf 值完全一致。106~120 管(III)的洗脱液有一紫红色斑点, Rf 值为 0.12。 $\alpha$ -甘露糖甙酶活性抑制试验结果表现为, 硅胶柱层析洗脱液 I、II 部分对  $\alpha$ -甘露糖甙酶活性有较强的抑制作用, 而 III 部分的抑制作用相对较弱。升华 II 部分得到白色细针状结晶 70 mg, 植物中的提取率为 14  $\mu$ g/g。

### 2.2 SW 的鉴定结果

2.2.1 TLC 和 MP 鉴定结果 Ehrlich's 液显色后, 在 Rf 值为 0.44 处有一紫红色斑点, 与标准品完全一致。测定的 MP 为 144~145  $^{\circ}$ C。

2.2.2 IR 鉴定结果 IR<sup>max</sup> (KBr 压片,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3 414.70, 3 376.41 (-OH 吸收峰); 3 060.42, 2 942.40, 2 886.32 (CH 吸收峰); 2 797.95~2 724.55 (Bohlman band); 1 073.78 (C-O 吸收峰) (图 1)。图 1 中 2 797.95~2 724.55 (Bohlman band) 说明样品中存在着 transCH-N 吸收, 与 SW 的两环结构相符合, SW 的其他基团的吸收, 如羟基、碳氢、碳氧吸收峰在图 1 中均可见到。

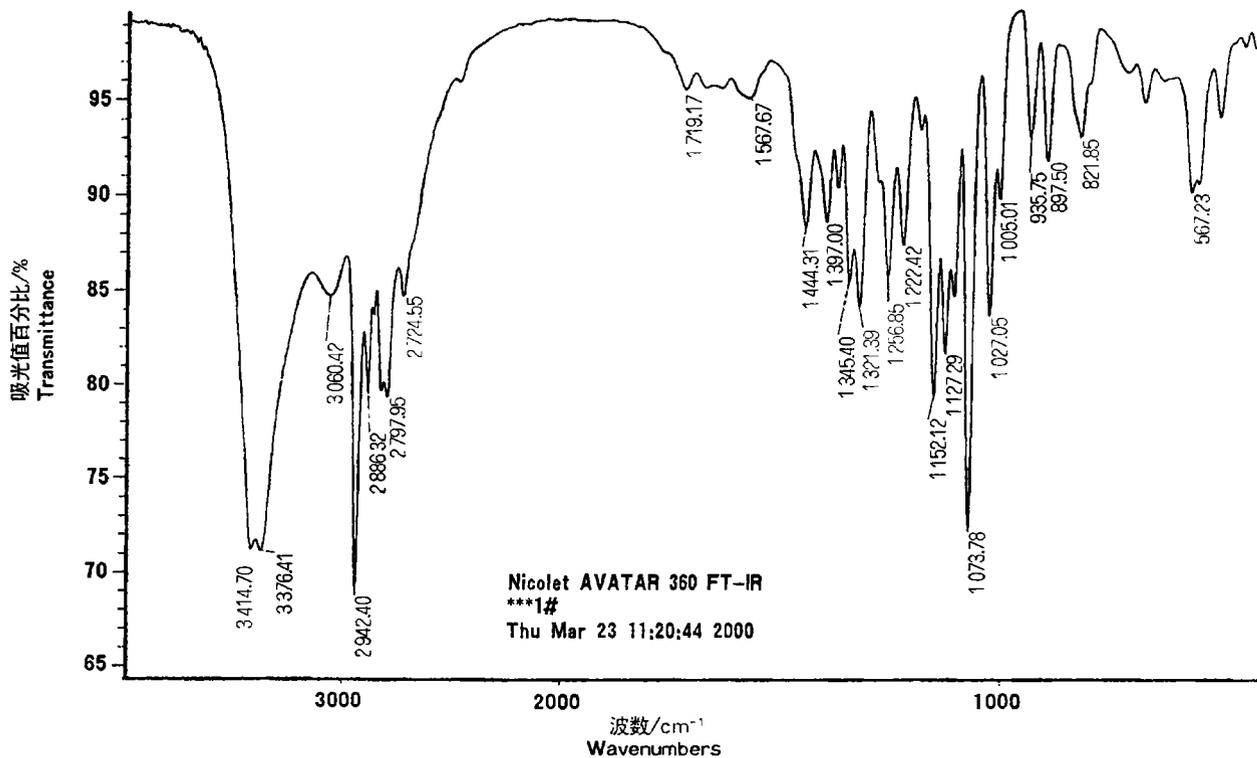


图 1 甘肃棘豆中分离出的白色细针状结晶的 IR

Table 1 IR of crystal of white needles isolated from *O. kansuensis* Bunge

2.2.3 MS 鉴定结果 MS(m/e):173(分子离子峰);155(173-H<sub>2</sub>O);138(155-OH);116(138-H<sub>2</sub>O-4H);96,84,72,43(均为母核裂解峰)(图2)。质子裂解合理,而且与 Molyneux 等<sup>[6]</sup>和曹光荣

等<sup>[7]</sup>报道的质谱图相符。

经 TLC、MP、IR、MS 鉴定分析,确定所分离到的结晶为 SW。

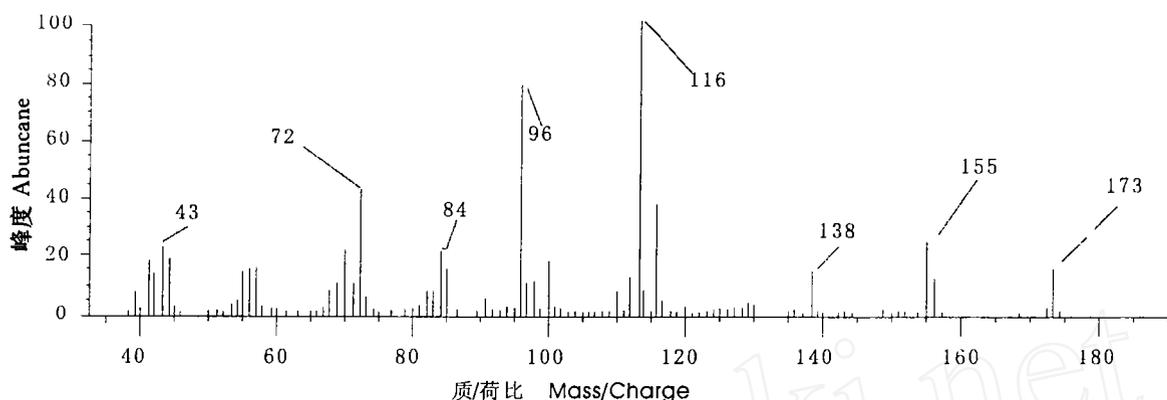


图2 甘肃棘豆中分离出的白色细针状结晶的MS

Table 2 MS of crystal of white needles isolated from *O. kansuensis* Bunge

### 3 讨论与结论

Colegate 等<sup>[5]</sup>首次报道分离 SW 的方法是,用热乙酸乙酯索氏提取 24 h,水溶部分上强酸性阳离子交换柱,收集稀氨水洗脱部分,浓缩后的残留物上药用琼脂糖凝胶 CL-6B,用氯化钠梯度洗脱,产物用氨性氯仿提取,回收溶剂后用氯仿/乙醚结晶和重结晶,得到白色针状结晶。在国内,曹光荣等<sup>[7]</sup>报道的方法是,将植物样品用酸水浸泡 2 次,每次 12 h,酸滤液过阳离子交换柱,倾出树脂,用去离子水洗至中性,晾干后用体积分数 10% 氨水调 pH 9~10,然后上柱,先用氯仿后用丙酮洗脱,浓缩丙酮洗脱液的总生物碱。总生物碱经硅胶柱层析,用氯仿、丙酮、体积分数 17% 氨水体积比为 82.5 : 15.5 : 2 洗脱,每 5 mL 收集 1 份,TLC 结合  $\alpha$ -甘露糖甙酶活性抑制试验结果,合并同类并浓缩,分离出苦马豆素单体。本研究用升华法首次从甘肃棘豆中分离得到 SW 纯品,提取率为 14  $\mu$ g/g,并通过 TLC、MP、IR、MS 对其结构进行了鉴定,为进一步研究动物疯草中毒和

SW 的抗癌活性奠定了基础。

关于 SW 抑制  $\alpha$ -甘露糖甙酶活性的作用机制,Dorling 等<sup>[10]</sup>的研究认为,SW 的阳离子同甘露糖基的阳离子在构型上的相似性及其对  $\alpha$ -甘露糖甙酶的高度亲和性,从而抑制了  $\alpha$ -甘露糖甙酶的活性,结果使大量的低聚糖聚积在溶酶体内,导致细胞、特别是神经细胞的空泡变性,动物出现一系列神经症状。本研究在监测硅胶柱层析后洗脱液时,选用了以对-硝基苯基- $\alpha$ -D-甘露糖甙为底物的  $\alpha$ -甘露糖甙酶活性抑制试验,结果发现,氨性氯仿提取物过硅胶柱分离,TLC 检测到 I、II、III 3 个单体成分,Rf 值分别为 0.60,0.44 和 0.12,其中 I、II 部分对  $\alpha$ -甘露糖甙酶活性有较强的抑制作用,而 III 部分的抑制作用相对较弱。II 部分经过鉴定为 SW,其余两部分可能是柱层析分离时有交叉,还含有 SW,TLC 检测不出,而  $\alpha$ -甘露糖甙酶活性检测较为敏感,体现出有抑制作用的缘故。至于这两部分的结构有待于进一步纯化和鉴定。

### [参考文献]

- [1] Marsh C D. The locoweed disease of the plains[J]. Bull U S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry, Washington D C, 1909, (112): 1-130.
- [2] Molyneux R J, James L F, Panter K E. Chemistry of toxic constituents of locoweed (*Astragalus* and *Oxytropis*) species[M]. Symposium, Plant Toxicology, Queensland, Australia, The Queensland Poisonous Plants Committee, 1984. 266-278.
- [3] Fraps G S. Locone, the poisonous principle in locoweed, *Astragalus earlei*[J]. Texas Agric Exper Sta Bull, 1936, 5, 537-538.
- [4] Hertley W J. A comparative study of *Swainsona* spp. Poisoning in Australia with locoweed (*Astragalus* and *Oxytropis* spp.) poisoning in

- North America[A]. Keeler R F, Van Kampen, James L F. In Effects of Poisonous Plants on Livestock[C]. New York: Academic Press, 1978. 363.
- [5] Colegate S M, Dorling P R, Huxtable C R. A spectroscopic investigation of swainsonine, an  $\alpha$ -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*[J]. Aust J Chem, 1979, (32): 2257—2264.
- [6] Molyneux R J, James L F. Loco intoxication: Indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*) [J]. Science, 1982, 216(6): 190—191.
- [7] 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.
- [8] 丁伯良. 甘肃棘豆引起母羊流产和公羊不育的机理研究[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学, 1993.
- [9] 邹恒琴, 徐峰, 张忠义, 等. 一种具有前景的抗癌药苦马豆素的研究进展[J]. 中草药, 1997, 28(7): 437—439.
- [10] Dorling P R, Huxtable C R, Colegate S M. Inhibition of lysosomal  $\alpha$ -mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*[J]. Biochem J, 1980, (191): 649—651.

## Isolation and identification of swainsonine from *O. kansuensis* Bunge

TONG De-wen, CAO Guang-rong, LI Shao-jun

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

**Abstract:** Swainsonine, a white needle crystal isolated from *O. kansuensis* Bunge by sublimation, was identified by TLC, MP, IR and MS. The yield was 14  $\mu\text{g/g}$ .

**Key words:** locoweed; *O. kansuensis* Bunge; swainsonine; sublimation

## 本刊加入“万方数据——数字化期刊群”的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,我刊现已入网“万方数据——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

“万方数据——数字化期刊群”是国家“九五”重点科技攻关项目。本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览本刊内容,并征订本刊。

网址为:<http://www.wanfangdata.com.cn>

<http://www.periodicals.com.cn>

<http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>

《西北农林科技大学学报》(自然科学版)编辑部

2001年5月