

# 豆类丝核菌培养液中苦马豆素分离提取

戴卉敏, 杨鸣琦\*, 李锡杰, 张伟, 郭卫华 (西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100)

**摘要** [目的]探索豆类丝核菌培养液中苦马豆素的提取工艺。[方法]从豆类丝核菌培养液中分离苦马豆素,采用薄层层析、气相色谱对分离产物进行鉴定分析。[结果]产物经薄层层析、气相色谱法及熔点测定鉴定分析,确定分离到的粉末为苦马豆素,检测结果较好。

[结论]该研究对于苦马豆素的批量化生产有着重大意义。

**关键词** 豆类丝核菌; 培养液; 分离; 苦马豆素

**中图分类号** S43 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)28-13440-01

苦马豆素(Swainsonine, SW)最初由 Colegate 等于 1979 年利用  $\alpha$ -甘露糖苷酶从灰苦马豆中分离出来<sup>[1]</sup>。研究表明 SW 在杀伤肿瘤细胞的同时又能增强机体免疫力,具有抗癌和免疫调节双重作用,克服了传统抗癌药物在抗癌的同时又降低机体免疫力的缺点。因此,SW 作为一种新的抗癌药物已成为国内外研究的热点。深入研究从豆类丝核菌中分离 SW 的方法,对于 SW 的批量化生产有着重大意义。

## 1 材料与方 法

**1.1 培养基** 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基;改良的 Czapek's 培养基。

**1.2 豆类丝核菌的移接** 无污染且生长良好的豆类丝核菌株置 4℃冰箱保藏。每 3 个月移接 1 次。

**1.3 豆类丝核菌培养液常规化学成分检测** 采用正丁醇、石油醚等极性不同的溶剂对发酵液分别进行萃取,制成相应的供试液,采用不同极性下的发酵液用于化学成分的系统预试验。

**1.4 豆类丝核菌培养液中苦马豆素的分离** 取 1 000 ml 预处理完备的豆类丝核菌培养液,调 pH 值为 10.0 后用 H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3:1, V/V) 萃取,弃去 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 层,将水层调 pH 值为 10.0 后,再用 H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3:1, V/V) 萃取,弃去 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 层,将水层调 pH 值为 7.0 后过滤,4 000 r/min 离心 45 min,弃去沉淀,上清液在 732 型强酸性阳离子交换树脂柱上吸附 45 min,先用去离子水冲洗,弃去水洗液,后用浓度 1 mol/L 氨水洗脱,收集洗脱液,挥干即得总生物碱。总生物碱用无水乙醇索氏提取 24 h,过滤,75℃减压浓缩,回收乙醇,浓缩液挥干,干燥物用氨性氯仿反复溶解,过滤,冷冻干燥,干燥物上硅胶柱,用氯仿-甲醇-氨水-水体积比为 70:26:2:2 的混合溶剂洗脱,每 10 ml 收集 1 管,共 170 管,薄层层析(TLC)进行适时监测,合并同类部分,蒸干。

## 1.5 豆类丝核菌培养液中苦马豆素的鉴定

**1.5.1 薄层层析(TLC)鉴定。** 蒸干所得物和 SW 标准品用少量甲醇溶解,点样,然后以氯仿:甲醇:氨水:水 = 70:26:10:10 (V/V)、氯仿:甲醇:氨水:水 = 70:26:2:2, (V/V) 和氯仿:甲醇:氨水:水 = 70:26:6:6 (V/V) 为展开剂,上行法展开,展开后挥干溶剂。显色时先喷过氧化氢,置于 115℃ 加热 10 min,取下放凉,再喷浓度 10% 无水乙醇醋酸酐溶液,于同样温度放置,待闻不到酸味时,取下放凉,最后喷 Ehrlich's 试剂,120℃

加热 15 min,取下放凉,记录各板显色斑点的颜色,计算 R<sub>f</sub> 值。

**1.5.2 气相色谱(GC)鉴定。** 准确称取 1 mg 升华产物和 4 mg SW 标准品,用 1 ml 吡啶溶解,取 0.1 ml 加入等量双(三甲基硅)三氟乙酰胺,50℃水浴加热 30 min,取反应液 1  $\mu$ l,直接进行气相色谱检测。色谱条件为:A T. SE-54 型毛细管色谱柱(30 m  $\times$  0.25),柱温 200℃,进样口温度 300℃,氢气火焰离子化检器(FID)温度 280℃,分流比为 60:1,载气为高纯氮气,载气压为 200 kPa。

## 2 结果与分析

目前西北农林科技大学动物医学院实验室尚且保存的豆类丝核菌共有 10 株,经 4 d、25℃培养,各菌株生长良好,其中 10.2442、3.2871A、9.2412 为白色菌丝,9.2443、2.0104、94-2B 为棕色菌丝,9.2461 为深褐色菌丝,94-1A 为黑色菌丝,生长旺盛,94-2A 有大量菌核散布于菌丝上。

**2.1 苦马豆素的提取与分离** 离子交换柱用氨水洗脱后,挥干洗脱液,提取到浅黄色总生物碱,然后通过索氏提取、硅胶柱层析和减压升华的方法对总生物碱进行分离纯化,最后得到 SW 粗品。

## 2.2 苦马豆素的鉴定

**2.2.1 薄层层析法鉴定结果。** 对展开剂进行比较后可发现氯仿:甲醇:氨水:水 = 70:26:2:2 (V/V) 液的展开效果最好,斑点无拖尾,在 R<sub>f</sub> 值为 0.42 处有一紫红色斑点,与 SW 标准品完全一致。

**2.2.2 气相色谱法鉴定结果。** 升华产物(结晶)与 SW 标准品在同一色谱条件下进行检测,得到两者的气相色谱图,分析气相色谱图可知结晶与 SW 标准品出峰时间相同,均在 7.35 min 左右处出现特征峰,两者峰形也完全一致,表明所得物质含有苦马豆素。

## 3 结论与讨论

目前由于 SW 的来源不同,对 SW 的研究不足以及操作条件不同等原因,分离方法及效果差异很大,还没有成熟的分离方法。当前的分离方法存在着损失巨大、生产效率低、操作复杂、成本高等共同问题,如何解决这些问题非常关键。

在实验室中使用的 SW 主要检测方法是薄层层析色谱法、气相色谱法,其中由于薄层层析色谱简单快捷、定性准确,用于分离过程中的适时监测,气相色谱检测快捷、分析精确、检出率高,用于 SW 的定性与定量检测,特别因为气相色谱内标法具有准确性高、重复性好等优点,所以可以作为 SW

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(30270979)。

**作者简介** 戴卉敏(1984-),女,青海西宁人,硕士研究生,研究方向:细胞病理及毒理。\* 通讯作者,教授,硕士生导师, E-mail: xbandymq@163.com。

**收稿日期** 2009-05-31

(下转第 13458 页)

行固体催化剂连续催化酯交换反应工艺条件和设备的研究。连续生产是降低生产成本,提高生物柴油市场竞争力的一种有效方式,目前国内外利用固体催化剂连续制取生物柴油的工艺和设备的研究还很欠缺。⑤进行固体催化剂对环境的影响作用和废弃固体催化剂处理工艺的研究。研制固体催化剂的目的是降低环境污染、简化生物柴油后提取工艺。固体催化剂能否满足对环境友好的目的,以及废弃固体催化剂的处理措施目前还未有研究,而这些研究将是固体催化剂研究领域不可缺少的内容。

### 参考文献

- [1] 杨颖. 生物柴油制备方法研究进展[J]. 粮油食品科技, 2007, 15(5): 35-37.
- [2] 陈颖, 孙雪, 李金莲, 等. 固体超强酸催化制备生物柴油研究进展[J]. 化工进展, 2009, 28(3): 383-389.
- [3] 廖伟英, 蔡建国, 王世文. 制备生物柴油固体催化剂及过程强化研究进展[J]. 化工生产与技术, 2008, 15(2): 26-30.
- [4] 吴志鹏, 周玉杰, 张建安, 等. 固体酸催化制备生物柴油研究进展[J]. 现代化工, 2008, 28(2): 126-129.
- [5] SATODHI FURUTA, HIROMI MATSUHASHI, KAZUSHI ARATA. Biodiesel fuel production with solid superacid catalysis in fixed bed reactor under atmospheric pressure[J]. Catalysis Communications, 2004(5): 721-723.
- [6] DORA E LOPEZ JAMES G, GOODWIN J R, DAVID A BRUCE, et al. Esterification and transesterification using modified zirconia catalysts[J]. Applied Catalysis A: General, 2008, 339: 76-83.
- [7] NI J, MEUNIER F C. Esterification of free fatty acids in sun flower oil over solid acid catalysts using batch and fixed bed-reactors[J]. Applied Catalysis A: General, 2007, 333: 122-130.
- [8] SANDRO L BARBOSA MIGUEL J, DSBDOUB, GABRIELA RHURTADO et al. Solvent free esterification reactions using Lewis acids in solid phase catalysis[J]. Applied Catalysis A: General, 2006, 313: 146-150.
- [9] JATURONG JITPUTTI, BOONYARACH KITTYANAN, PRAMOCH RANG-SUNVIGIT, et al. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts[J]. Chemical Engineering Journal, 2006, 116: 61-66.
- [10] QING SHU, BOLUN YANG, HONG YUAN, et al. Synthesis of biodiesel from soybean oil and methanol catalyzed by zeolite beta modified with  $La^{3+}$  [J]. Catalysis Communications, 2007, 8(12): 2159-2165.
- [11] 赵淑战. 生产生物柴油的新型固体酸催化剂首次工业化应用[J]. 国

内外石油化工快报, 2008, 38(3): 15-16.

- [12] 王仰东, 刘国文. 废油脂制备生物柴油新型固体酸催化剂研究[J]. 现代化工, 2007, 27(11): 54-74.
- [13] 文利柏, 谭文广, 王运, 等. 固体酸催化催化乌柏籽油制备生物柴油[J]. 中国油脂, 2008, 33(6): 44-47.
- [14] 孙晋峰, 任天瑞, 薛思佳. 固体酸催化麻疯树油酯交换制备生物柴油[J]. 过程工程学报, 2008, 8(6): 1167-1172.
- [15] 陈和, 王金福. 固体酸催化棉籽油酯交换制备生物柴油[J]. 过程工程学报, 2006, 6(4): 571-575.
- [16] 张海荣, 邬国英, 林西平. 固体酸催化酯化酸化油合成生物柴油的研究[J]. 石油与天然气化工, 2007, 36(2): 411-711.
- [17] 田志茗, 邓启刚, 赵德丰. Ce 改性 SBA-15 分子筛催化合成棕榈酸甲酯[J]. 石油化工, 2007, 36(8): 763-767.
- [18] MASATO KOZU, TAKEKAZU KASUNO, MASAHICO TAJIKA, et al. Active phase of calcium oxide used as solid base catalyst for transesterification of soybean oil with refluxing methanol[J]. Applied Catalysis A: General, 2008, 334: 357-365.
- [19] DAVID G CZNTRELL, LISA J GILLIE, ADAM F LEE, et al. Structure-reactivity correlations in MgAl hydrotalcite catalysts for biodiesel synthesis[J]. Applied Catalysis A: General, 2005, 287: 183-190.
- [20] WALLACE MAGALHA ES ANTUNES, CLAUDIA DE OLIVEIRA VELOSO, CRISTIANE ASSUMPÇO, A O HENRIQUES. Transesterification of soybean oil with methanol catalyzed by basic solids[J]. Catalysis Today, 2008 (133/135): 548-554.
- [21] HAN H Y, GUAN Y P. A novel method for preparation of biodiesel by transesterification of rapeseed oil using  $K_2O/\gamma-Al_2O_3$  nano-solid-base catalyst[C]. The 12th International Rapeseed Congress V, Sustainable Development in Cruciferous Oilseed Crops Production, 2007: 318-321.
- [22] XIE W L, LI H T. Alumina-supported potassium iodide as a heterogeneous catalyst for biodiesel production from soybean oil[J]. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2006, 255: 1-9.
- [23] 许慎敏, 陈慧, 梁宝臣.  $Na_2O/MCM-41$  固体碱催化的废油脂酯交换反应研究[J]. 天津理工大学学报, 2008, 24(2): 43-45.
- [24] XIE W L, PENG H, CHEN LG. Calcined Mg-Al hydrotalcites as solid base catalysts for methanolysis of soybean oil[J]. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2006, 246: 24-32.
- [25] 郭登峰, 李为民, 潘剑波, 等. 钙镁负载型固体碱催化剂制备生物柴油[J]. 应用化学, 2007, 24(10): 1149-1152.
- [26] LIU X J, HE H Y, WANG Y J, et al. Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst[J]. 2008, 87: 216-221.
- [27] 宋华民, 徐桂转, 张百良. 固体碱催化剂制备生物柴油的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(5): 2005-2007.

(上接第 13440 页)

的微量定量检测方法。研究采用薄层层析色谱法进行适时监测,通过对结晶的 TLC、GC 鉴定分析,确定所得物质为苦马豆素粗品。

### 参考文献

- [1] 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.