

【论著摘要】

文章编号: 1000-7423(2001)-0-0318-02

油菜籽成分 2-羟基-3-丁烯基硫苷的分离、鉴定及杀钉螺试验

冯新港^{1*} 易健民² 施天益³

中图分类号: R943.519

文献标识码: A

我国日本血吸虫病疫区现有钉螺面积约为 30 亿平方米¹。目前, 易感地带灭螺仍然是我国(特别是在湖沼地区)控制血吸虫病的有效措施之一^{1,2}。但是, 目前使用的化学灭螺药如氯硝柳胺除对环境造成一定程度的污染外, 尚存在价格较高等问题。因此, 开发高效、低毒、价廉的植物源灭螺药的研究受到重视。油菜籽是芥菜(辣油菜)、白菜(甜油菜)和甘蓝类油菜的种子, 是我国食用植物油一菜油的主要原料, 油菜籽中除含植物油外, 尚含有蛋白质和硫苷等物质, 这些物质榨油后留在菜籽饼中。菜籽饼可用作饲料, 但必须通过脱毒后才能作家畜饲料, 被脱的毒物主要为硫苷, 它也是一种乏中药³。在预实验中, 我们发现菜籽饼粗提取物具有较高的杀螺效果。本研究进一步对其中的杀螺有效成分进行分离、鉴定, 并评估其室内杀钉螺的效果, 为开发这种植物灭螺药提供基础。

1 材料

市售甘蓝型油菜籽, 并收集榨油后的菜籽饼作提取材料, 104℃干燥 4 h, 粉碎成 60 目细粉备用。湖北钉螺指名亚种(*Oncomelania hupensis*) 采自洞庭湖君山岛前湖州。清水洗涤, 人工饲养 2 wk 后, 通过逸幼实验选出阴性螺供试验用。

2 方法

2.1 活性成分的分离 参照文献⁴报道的方法进行, 取 50 g 脱脂菜籽粉, 加 500 ml 沸水浸提 20 min 后, 加入 20 ml 0.5 mol/L Pb(Ac)₂-Ba(Ac)₂ 溶液, 冷却, 离心。提取液经蠕动泵泵入 DEAE Sephadex A-25 柱中, 分别用醋酸吡啶和水以 2 ml/min 淋洗, 用 0.25 mol/L K₂SO₄ 溶液以流速 1 ml/min 洗脱。收集的洗脱液在 60℃蒸发致干, 用甲醇脱盐与过滤, 溶液在 45℃蒸发至 2 ml, 加 2 ml 水溶解, 转入离心管中, 用 20 ml 无水乙醇冲洗, 4℃过夜结晶, 然后以 32 800 g 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 2 ml 水溶解; 用 ODS 柱, 0.5% 的 CH₃CN 为流动相, 高效液相色谱法分离, 收集洗脱液, 45℃蒸发至干, 用少量水溶解沉淀, 并转入离心管中 4℃过夜结晶, 并于 32 800 g 4℃离心 10 min, 弃上清, 然后冷却干燥备用。

2.2 活性成分结构鉴定 据文献报道⁴⁻⁶的方法进行: 上

述分离样品直接上样到质谱仪(AV-HF-3F, V.G Ltd., USA)入口, 用快原子轰击法检测, 根据质谱数据确定分子量。分离物纯度的检测采用反相高效液相色谱法, 样品溶解在水中后装入 C18 柱, 以甲醇:水(4:6)溶液为流动相, 在色谱仪(HP5000, Hewlett Packard Co., USA)上进行, 记录洗脱峰。分离样品的紫外吸收用紫外扫描法测定, 先配制浓度为 40 mg/L 样品的水溶液, 在扫描仪(UV-2201, Shimadzu Co., Jpn)上进行。为进一步证实分离物的结构, 进行了红外光谱测定实验, 取 110℃干燥 10 h 的 2 mg 样品与 KBr 粉混合及压片, 在红外分光光度计上检测(60 S×B, Nicolet Ltd., USA)。所有实验进行 3 次。

我们修改的方法简述如下: 取 200 g 油菜籽粉或菜籽饼粉用分级蒸馏法经正己烷和无水乙醇等分别提取; 当油性物被抽提时, 粗的硫苷也被分离。最后用乙醚洗涤, 室温干燥。

2.3 分离物杀湖北钉螺试验 用小宫浸泡法⁷使钉螺与分离样品充分接触, 每组 30 个成螺暴露至倍比稀释的样品溶液中(即由预实验确定的溶液浓度 100, 50, 25, 12.5 mg/L, 外加一组浓度为 90 mg/L), 24℃~26℃浸泡 48 h, 并重复进行 1 次检测; 用极大似然概率单位法计算 LC₅₀ 值⁸。

3 结果和讨论

3.1 活性成分的分离结果 据文献^{4,5}方法分离得到的活性成分为白色结晶物。用我们修改的方法所得结果也较好, 从菜籽中分离的样品也为类白色结晶物, 镜检只发现有少量的油、脂肪及磷脂类物质, 得率为 0.2%~0.3%。从菜籽饼中分离的样品则为褐色, 纯化较为困难, 主要是榨油过程中温度高, 使菜籽中的糖和蛋白质类物质焦化分解所致, 更纯的样品可以通过进一步提取而获得。

比较经我们修改的方法与常规工业法的一些特点: 用我们的方法分离所获油和脂肪的纯度较高, 颜色为橘黄色, 得率为 41.5%。在硫甙去除的同时, 磷脂和蛋白质类物质也能回收。而常规工业法过程则是首先在高温下榨油, 故焦化物均残留于油和饼中, 使得进一步纯化蛋白质和硫甙等步骤较为困难。用我们的方法操作简单和成本较低等优点, 不需要文献^{3,4}所述的昂贵的仪器和试剂, 但分离的样品也能满足进一步实验如结构鉴定、杀螺及其它毒理学测试等的要求。

3.2 分离物的鉴定 分离物 HPLC 结果显示: 在波长 λ = 228nm 条件下存在 4 个峰, 但主峰的面积占整个色谱峰面积的 90% 以上, 即含量在 90% 以上; 主峰对应于硫甙的峰(图 1)。此外, 我们发现流动相甲醇与水的最佳比为 4:6。在提取物的紫外吸收图谱上, 只在 λ = 228nm 处有一特异吸

基金项目: 瑞典国际科学基金资助项目(International Foundation for Science No; F/2642-1)

作者单位: 1 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所, 上海 200232; 2 岳阳师范学院, 岳阳 414000; 3 湖南省寄生虫病防治研究所, 岳阳 414000

* 本文通讯作者地址: 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所, 上海市石龙路 345 弄 3 号, 上海 200232

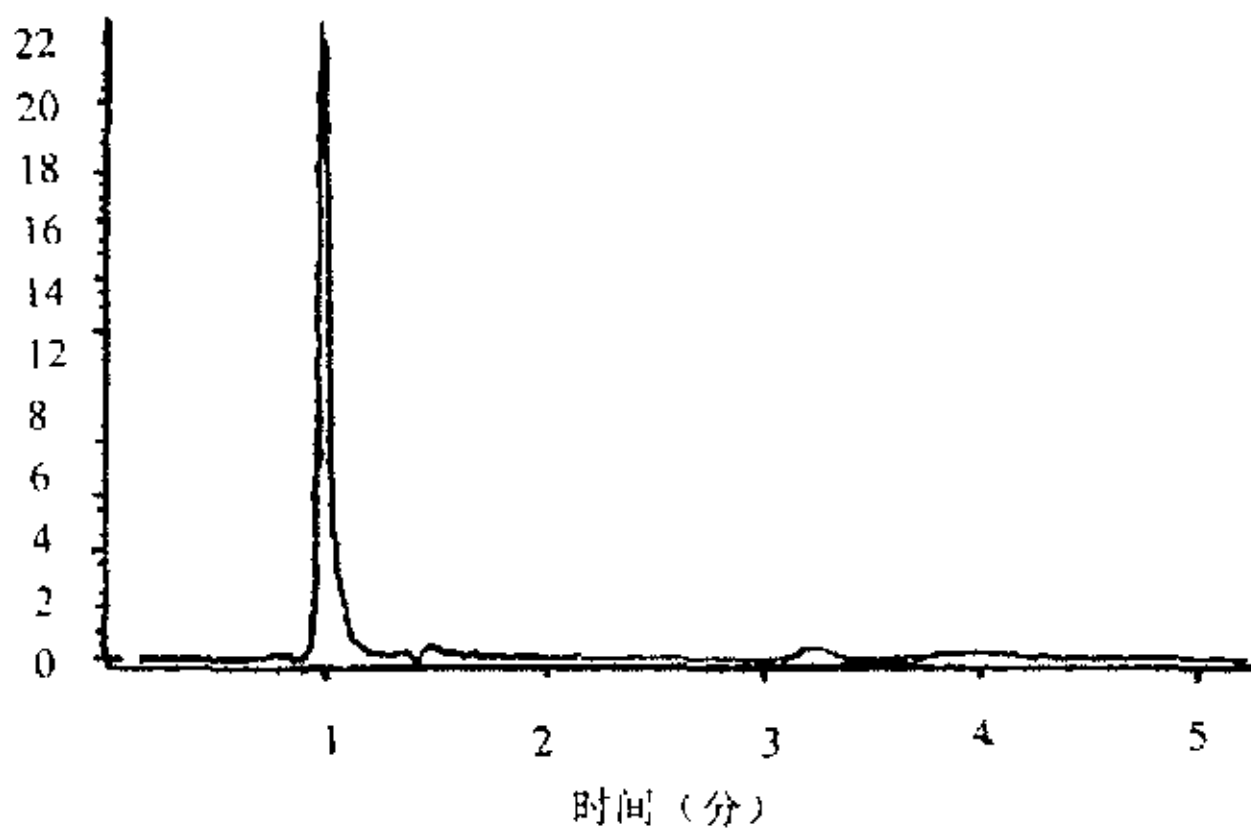


图 1 分离化合物的色谱图 $\lambda = 228$, 流动相: MeOH: H₂O (4:6)

收峰, 也是唯一的吸收峰 (图 2), 表明分子中没有苯环或共轭双键结构, 只有孤立双键或 C=O 和 C=N 等基团存在, 这对应于硫苷的吸收峰特征⁴⁻⁶⁾。

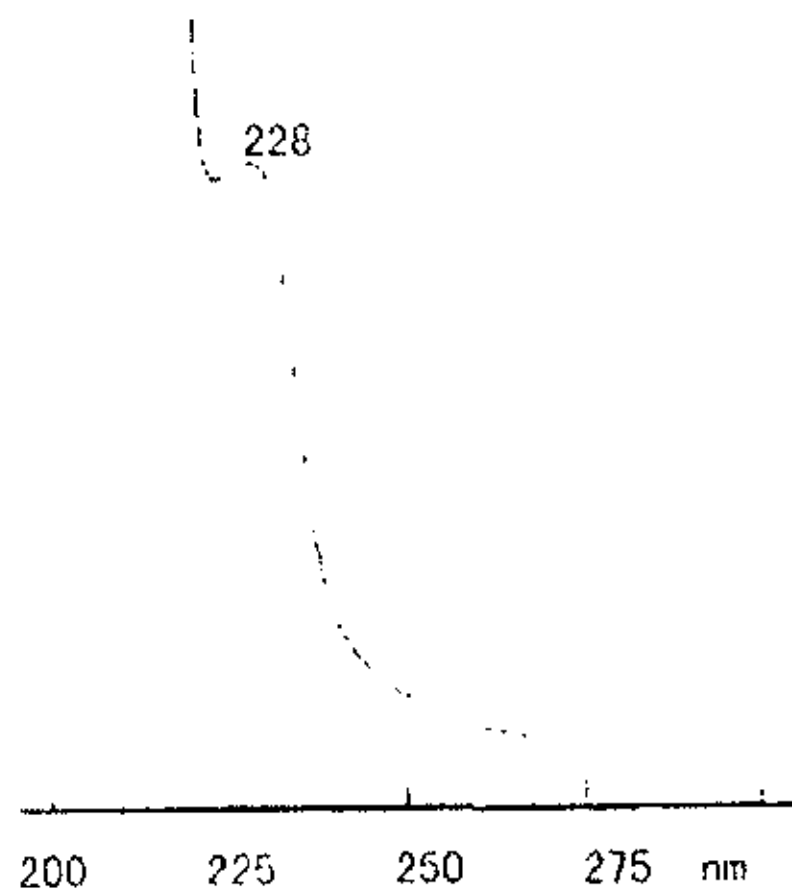


图 2 分离物的紫外扫描图谱

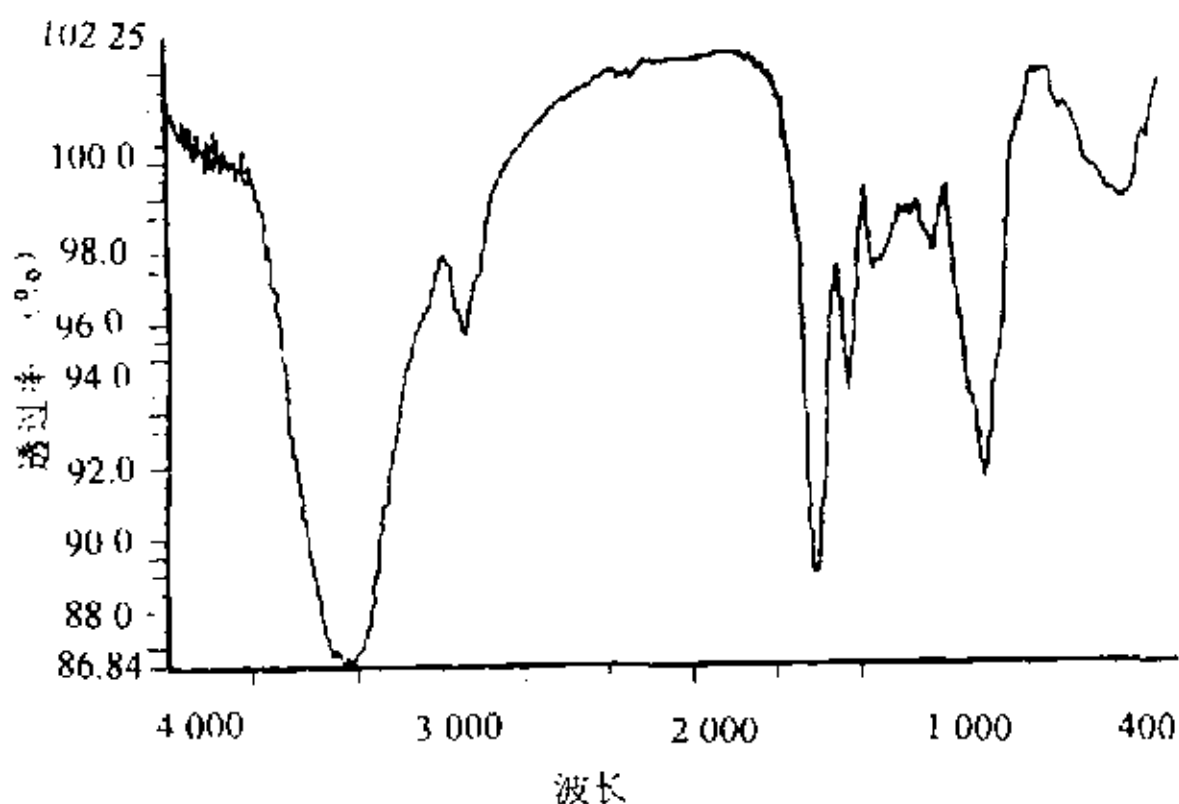


图 3 分离物的红外吸收图谱

如图 3 所示, 在红外吸收图谱的 3375 cm⁻¹ 处有一极强的吸收峰, 表明分子中有多个羟基互相以氢键联系或有一单糖分子存在; 1657 cm⁻¹、1053 cm⁻¹ 及 820 cm⁻¹ 处吸收峰

提示分子中有 -N=C-S- 基团, 该结构为 2-羟基-3-丁烯基硫苷所特有⁴⁻⁶⁾。

质谱分析结果显示分离物的分子离子峰为 466, 故分子量为 466 (图 4), 质谱图也对应于 2-羟基-3-丁烯基硫苷⁴⁻⁶⁾。

综合分析分离物的色谱和光谱资料提示活性成分的结构为 2-羟基-3-丁烯基硫苷。

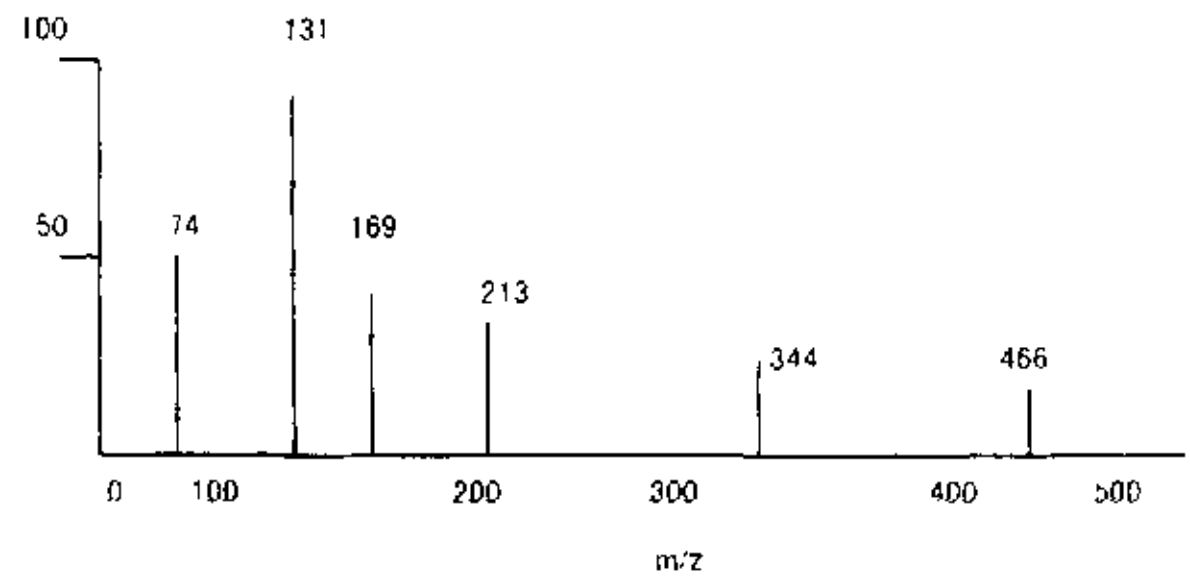


图 4 分离物的质谱图

2.3 分离物室内杀湖北钉螺试验 杀螺试验结果显示: 分离物杀湖北钉螺 LC₅₀ 值为 28.43 ± 1.38 mg/L。在植物灭螺剂 LC₅₀ 值中居于中等大小范围内^[1]。一般地说, 合成的灭螺剂的 LC₅₀ 值低于 10 mg/L, 但对大多数植物灭螺剂来说, LC₅₀ 值都要高于这一剂量。植物灭螺剂的杀螺活性成分从化学分类角度被分类为: 双萜类和倍半萜类、类黄酮和鱼藤酮类、呋喃香豆素类、链烷醇类、烯基酚类、脂肪酰胺类、皂甙和丹宁类等^[8]。本文首次报道硫甙类具有杀湖北钉螺的杀螺作用效果, 为进一步开发这种新的植物灭螺药提供了原创资料。

参 考 文 献

[1] 毛守白主编. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 619-642.
 [2] Report of a WHO Expert Committee. The control of schistosomiasis WHO Technical Report Series, 1985, 728: 7-26.
 [3] 林启寿主编. 中草药成分化学. 北京: 科学出版社, 1997: 115-133.
 [4] 吴谋成, 况成尘, 黄伟. 用液相制备色谱从菜籽中分离、纯化、制备硫代葡萄糖苷. 色谱, 1995, 13(1): 4-7.
 [5] 况成尘, 吴谋成. 菜籽中 2-羟基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的分离与纯化制备. 华中农业大学学报, 1993, 12: 197-200.
 [6] 洪山海. 光谱解析法在有机化学中的应用. 北京: 科学出版社, 1980: 1-85, 232-414.
 [7] Komiya Y, Hosaka Y, Yasuraoka K, et al. Study for the standardization of quantitative test of the susceptibility of *Oncomelania* snails to sodium pentachlorophenate. Jpn J Med Sci Biol, 1962, 15: 41-51.
 [8] Hederson TO. Biochemistry of recognized molluscicidal compounds of plant origin. In KE Mott Plant molluscicides. John Wiley & sons, Chichester, 1987: 109.
 [9] Ronald IT. Manual of pharmacological calculations with computer programs. New York: Springer-Verlag, 1981: 5-21.

(收稿日期: 2000-12-04 编辑: 李雅卿)