

一种新的霉菌毒素——CBD₂ 的分离和结构研究

徐一纯 黄 玄 蔡余生

(上海市粮食科学研究所, 上海)

从田间感染禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum* Schw.) 的赤霉病大麦中分离得到一种新的霉菌毒素——赤霉病麦毒素 II (CBD₂)。通过光谱分析和化学反应研究了它的结构, 初步确定该毒素为 3-乳酰氧基-7, 15-二羟基-12, 13-环氧单端孢毒素-9-烯-8-酮。该毒素可抑制豌豆种子发芽并引起兔子皮肤发炎。

麦类赤霉病是由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum* Schw.) 引起的一种常见真菌病害。在谷物上生长的禾谷镰刀菌能产生一些引起人、畜中毒的物质, 据报道, 其中主要的一类物质为单端孢霉烯类毒素(Trichothecene toxin)^[1]。为了弄清我国感染赤霉病的谷物中所含有的毒素情况, 对上海郊区金山县收获的感染赤霉病大麦中所含的毒素, 进行了分离、纯化和结构研究。通过提取、硅胶柱层析和薄层层析, 从病麦中分离出一种毒素。该毒素为白色针状结晶, 熔点 158—159℃, 分子量为 368, 分子式为 C₁₈H₂₄O₈ (核磁共振积分测量氢总数为 24)。经光谱分析和水解反应, 并与一已知赤霉病麦毒素——脱氧雪腐镰刀菌醇(Deoxynivalenol)^[2] 进行比较研究, 初步认为该毒素的结构为 3-乳酰氧基-7, 15-二羟基-12, 13-环氧单端孢毒素-9-烯-8-酮。这是一种迄今未见报道的新的单端孢霉烯类毒素, 定名为赤霉病麦毒素 II (CBD₂) (图 1)。

材 料 和 方 法

(一) 生物毒性测定

1. 鸽子致吐试验: 选用体重为 300—400g 的菜鸽, 进行灌胃试验。灌胃量一般为 2—8 ml, 每

个剂量用 3 只鸽子。

2. 兔子皮肤发炎试验: 选用体重 2kg 左右的成年大白兔, 在颈背部剃毛后划出受试部位, 将待测样品定量溶于乙酸乙酯中, 用微量注射器将样品滴涂于受试部位, 并作乙酸乙酯滴涂对照。24 小时后观察结果。

3. 豌豆种子发芽试验: 选用发芽率在 95% 以上的青豌豆种子, 表面消毒后, 在 CBD₂ 水溶液中浸泡过夜(约 20 小时), 置于培养皿中, 在 25℃ 温箱中培养, 观察发芽情况。

(二) 薄层层析

1. 硅胶板的制备: 作分离用的硅胶浆厚度为 1mm, 分析用的为 0.3mm。涂好的硅胶板先在 50℃ 烘箱内放置 1 小时, 然后逐渐升温至 110℃, 烘烤 1 小时后冷却, 置于干燥器中备用。

2. 展开溶剂系统: 所用展开溶剂配比如下:

A. 氯仿: 甲醇(90:10)

B. 苯: 丙酮(3:2)

C. 氯仿: 乙醇: 乙酸乙酯(90:5:5)

D. 甲苯: 乙酸乙酯: 90% 甲酸(6:3:1)

E. 乙酸乙酯: 正己烷(3:1)

3. 显色: 展开后的硅胶板用茚香醛显色剂喷雾, 在 115—120℃ 烘箱中加热约 5 分钟后取出观察。毒素所在位置显示出特有的黄色色点。

本文于 1980 年 5 月 4 日收到。

本工作蒙屠传忠、徐达道、赵同芳三位教授指导, 并蒙黄量教授审阅全文, 一并致谢。

实验结果

(一) CBD₂ 的分离和纯化

1. CBD₂ 粗毒素的提取: 取赤霉病麦粉 200 kg, 用 95% 乙醇浸提, 提取液减压浓缩后用苯:水(1:1)溶液萃取 3—4 次, 全部水层用活性炭吸附, 再用丙酮洗 4—5 次, 洗脱液减压浓缩后用乙酸乙酯:水(1:1)溶液萃取多次, 合并乙酸乙酯层, 减压浓缩得到 145g CBD₂ 粗毒素。

2. CBD₂ 的纯化: 将 1kg 硅胶(100—140 目)用苯饱和后装柱。把 CBD₂ 粗毒素 100g 溶于丙酮后拌以无水硫酸钠上柱。用 4:1 苯:2:1 苯:丙酮(95:5)、2:1 苯:丙酮(90:10)、4:1 苯:丙酮(85:15)依次洗脱, 分部收集。以氯仿:甲醇(90:10)作展开剂进行薄层层析, 用茴香醛显色, 观察每一收集部分所含色点, 并作鸽子致吐毒性试验(表1)。

将上述 a 4 部分减压浓缩的样品 27 g

再进行柱层析(硅胶 500g 用氯仿饱和后装柱。)洗脱溶剂为氯仿:甲醇(99:1), 每 120ml 收集一次。用薄层层析检出第 15—28 收集部分中含有上述 Rf 值为 0.31 的黄色点。

将上述第 15—28 收集部分合并减压浓缩至干, 溶于少量乙酸乙酯中, 点样于制备硅胶薄层板上, 经纯化分离得到的黄色浆状物, 在乙酸乙酯:正己烷(1:2)溶液中结晶和重结晶, 得到白色针状晶体即为 CBD₂。

3. CBD₂ 在不同展开溶剂系统中的 Rf 值: 见表 2。

(二) CBD₂ 的毒性试验

1. 兔子皮肤毒性试验: 将 CBD₂ 的结晶溶于乙酸乙酯中, 以各不同剂量涂于兔子受试部位。结果表明, 在兔子颈背部涂 3 μ g/点以上剂量的 CBD₂, 即能引起强烈的皮肤毒性反应(表 3)。

2. 抑制豌豆种子发芽试验: 以不同浓

表 1 柱层析分部收集液的鸽子致吐毒性及薄层析色点

Table 1 Emetic activity on pigeon and Rf value on TLC of fractions eluted from column

收集部分(溶液体积, ml) Fractions (volume of solvent, ml)	试验剂量(样品重/鸽体重) Dosage tested (mg, wt. sample/kg, wt. pigeon)	致吐毒性(呕吐鸽数/受试鸽数) Emetic activity (no. emeting pigeon/no. pigeon tested)	Rf (颜色) Rf value (color)
a1 2,000	—	—	—
a2 1,000	100	3/3	—
a3 1,000	100	0/3	—
a4 4,000	150	3/3	0.31 黄色 yellow
a5 6,000	—	—	0.23 黄色 yellow*

* 为脱氧雪腐镰刀菌醇。Deoxynivalenol

表 2 CBD₂ 在不同展开溶剂系统中的 Rf 值

Table 2 Rf value of CBD₂ in different developed solvent systems on TLC

展开溶剂系统 Developed solvent systems	Rf 值 Rf value
氯仿:甲醇(90:10) Chloroform:methanol	0.31
苯:丙酮(3:2) Benzene:acetone	0.32
氯仿:乙醇:乙酸乙酯(90:5:5) Chloroform:ethanol:ethyl acetate	0.21
甲苯:乙酸乙酯:90% 甲酸(6:3:1) Toluene:ethyl acetate:90% formic acid	0.14
乙酸乙酯:正己烷(3:1) Ethyl acetate:n-hexane	0.17

表 3 CBD₂ 对兔子皮肤的毒性反应*Table 3 Toxicity of CBD₂ on rabbits by skin test

受试后天数 Days after treatment	剂量 (CBD ₂ mg/点) Dosage (mg, CBD ₂ /spot)				对照(0.2ml 乙酸乙酯/点) Blank (0.2ml, ethyl acetate/spot)
	0.003	0.012	0.025	0.05	
2	0	0	0	0	0
3	+	+	+	+	0
4	+	++	++	+++	0
7	++	+++	+++	+++	0

* 0 无反应 No action

+ 皮肤发红 Reddish

++ 红肿并有出血点 Red and swollen, haemorrhage

+++ 溃烂并结厚痂 Fester, then form a scab

表 4 CBD₂ 抑制豌豆种子发芽试验效果Table 4 Seed germination inhibitory effect of CBD₂ on pea

播种后天数 Days after seeding	发芽率 germination percentage(%)				
	处理 (CBD ₂ mg/ml水) Treatments (mg, CBD ₂ /ml water)				对照(水) Blank (water)
	0.015	0.025	0.035	0.05	
1	0	0	0	0	80
2	0	0	0	0	100
3	50	30	10	0	100

表 5 CBD₂ 及其水解物等的熔点和混合熔点Table 5 M. P. and mixed M. P. of CBD₂ and its hydrolyzed product

	CBD ₂	CBD ₂ 水解物 Hydrolyzed pro- duct of CBD ₂	脱氧雪腐镰刀菌醇 Deoxynivalenol	CBD ₂ + 脱氧雪 腐镰刀菌醇 CBD ₂ + Deoxynivalenol	CBD ₂ 水解物 + 脱氧雪腐 镰刀菌醇 Hydrolyzed product of CBD ₂ + Deoxynivalenol
熔点 M.P.(°C)	158—159	150—151	150.5—151.5	128—134	150.5—151.5

度的 CBD₂ 水溶液浸泡豌豆种子, 观察其抑制发芽情况。结果表明, 剂量为 50 μg/ml 时可全部抑制。

(三) CBD₂ 的结构

1. CBD₂ 的水解反应: 将 CBD₂ 的结晶加入 4N 氢氧化铵乙醇溶液中, 在室温下放置过夜后, 水解液经薄层层析分离、纯化得到白色针状结晶水解物。

2. 熔点测定: 用 Kofler 熔点测定器测出 CBD₂ 等的熔点见表 5。

3. 紫外吸收: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 227 毫微米 (ϵ 7500); 红外吸收: ν_{\max}^{KBr} : 3450, 1740, 1690, 1224, 1120 cm⁻¹; 质谱: m/e: 368(M⁺), 350(M⁺ - H₂O), 338(M⁺ - CH₂O), 320(M⁺ - H₂O - CH₂O), 295(M⁺ - C₃H₅O₂), 271(M⁺ - CH₂O - H₂O - CH₂OH), 265(M⁺ - CH₂O - C₃H₅O₂) 核磁共振 $\delta_{\text{Me}_2\text{SO}-d_6}^{\text{CDCl}_3}$ (J): 3.86d(4), 5.24m, 2.26 m, 4.74s, 6.40 d(6.0), 4.60 d(6.4), 3.11ABq (4), 1.16s, 3.86s, 1.86s, 4.36ABq (6), 1.45d(6.4)。元素分析: C₁₈H₂₄O₈ 计算

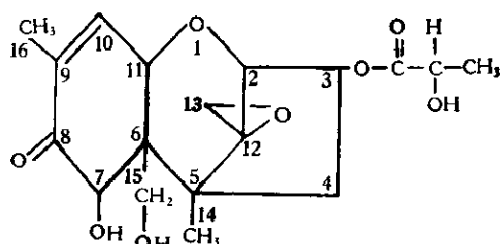


图1 CBD₂ 的结构式
Fig. 1 Structure of CBD₂

值:C58.69,H6.52。实测值:C58.35,H6.63。
结构式见图1。

讨 论

1. CBD₂ 的紫外吸收测定表明分子中有 α 、 β -不饱和酮基存在。

2. 红外光谱(图2)测定表明, 3450cm^{-1} 显示其分子中存在着羟基。 1690cm^{-1} 显示有 α 、 β -不饱和酮基。 1224cm^{-1} 显示有环氧—C—C—基。 1740cm^{-1} 及 1120cm^{-1} 显示其含有酯基。与脱氧雪腐镰刀菌醇的红外光谱比较,可看到 CBD₂ 多了 1740cm^{-1} 和 1120cm^{-1} 两处表示酯基的吸收峰,说明

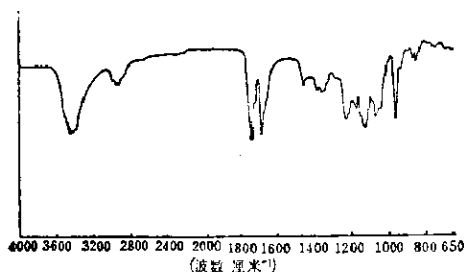


图2 CBD₂ 的红外光谱
Fig. 2 IR spectrum of CBD₂

CBD₂ 有可能是脱氧雪腐镰刀菌醇的一种酯。根据 CBD₂ 水解物(碱性溶液中)的熔点与脱氧雪腐镰刀菌醇的相同,混合熔点不下降,并且 CBD₂ 水解物的红外光谱与脱氧雪腐镰刀菌醇完全一致,也说明了 CBD₂ 是脱氧雪腐镰刀菌醇的一种酯。比较 CBD₂ 的分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_8$ 和脱氧雪腐镰刀菌醇的分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$, 可推算出 CBD₂ 的酰基部分为 $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$ 。

3. CBD₂ 的质谱测定表明,当分子 M^+ 失去酰基部分 ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$) 后得到碎片部分 295, 以及从 295 以下的碎片部分: 278、265、249 等与已报道的脱氧雪腐镰刀菌醇的质谱^[2]相一致。进一步证实了上述结果。

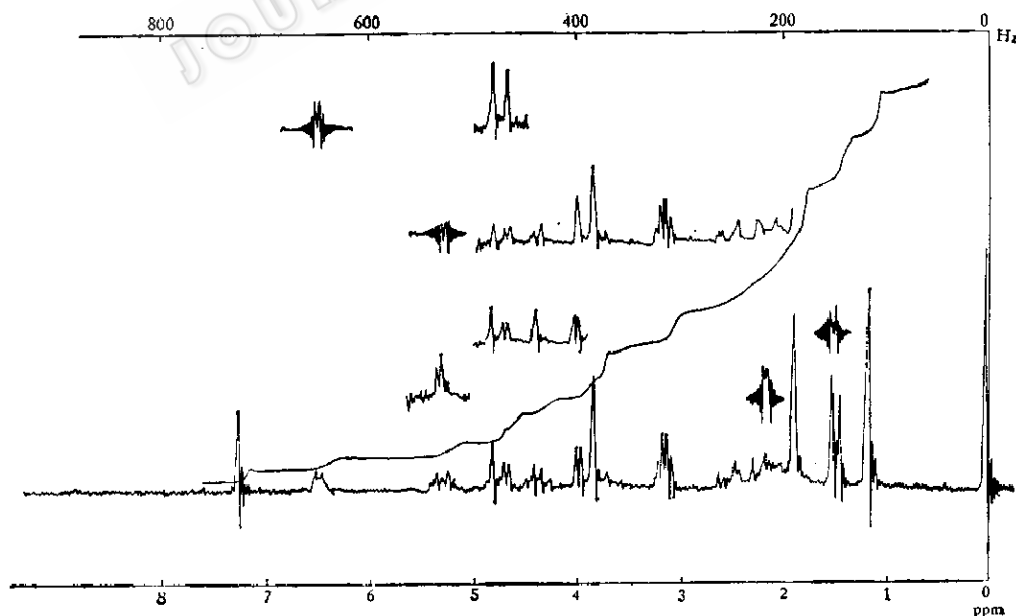


图3 CBD₂ 的核磁共振谱
Fig. 3 NMR spectrum of CBD₂

4. 从 CBD₂ 的核磁共振谱(图 3)看出, 当应用双照射法照射 δ 2.26(C₄-H) 处时, δ 5.24 处的多峰变为双峰。当照射 δ 5.24 处时, 则 δ 2.26 (C₄-H) 处的多峰变为 AB 系统的四重峰, 而 δ 3.86(C₂-H) 处的双峰变为单峰。可见 δ 5.24 处为与 C₂ 和 C₄ 相邻的 C₃ 位的氢的化学位移值。与脱氧雪腐镰刀菌醇的核磁共振谱^[2] 比较, 可看出 C₃ 位上的氢的 δ 值从脱氧雪腐镰刀菌醇的 4.48 变为 CBD₂ 的 5.24。根据羟基被酯化时, 处于同一碳上的氢的 δ 值会有不同程度的增加, 由此可推知原在脱氧雪腐镰刀菌醇 C₃ 位上的羟基在 CBD₂ 的分子中已被酰基所代替。同时 C₇ 和 C₁₅ 位的 δ 值未发生变化, 因而证明 CBD₂ 分子中的酯酰基位于 C₃ 位上。从图 3 中还可看到 CBD₂ 分子中的酰基上的甲基 (δ 1.45), 为一典型的双峰。根据双照射法可确定为与该甲基相邻

的质子位于 δ 4.36 处, 积分线表明该处只有一个氢原子, 因而是一个亚甲基。该处的化学位移值 δ 4.36 表明这一亚甲基还连接着一个羟基和一个羰基, 这也符合理论计算值。这样, 在 CBD₂ 分子中 C₃ 位上连

$$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{O} \\ | \quad || \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{C} - \end{array}$$

接的酰基可定为 CH₃-CH(OH)-C(=O)-, 这一结果也符合上述质谱所计算的 C₃H₅O₂。因此, CBD₂ 的化学结构可推断为 3-乙酰氧基-7, 15-二羟基-12, 13-单端孢毒素-9-烯-8-酮。

参 考 文 献

- [1] Bamburg, J. R. et al.: 12, 13-Epoxytrichothecens, ed by Kadis, S., Microbial Toxin, Vol. 7, Academic Press, Inc. New York, 1971.
- [2] Vesonder, R. F. et al.: *Appl. Microbiol.*, 26: 1008, 1973.

ISOLATION AND STRUCTURE OF CBD₂—A NEW TRICHOTHECENE TOXIN

Xu Yichun Huang Xuan Cai Yusheng

(Institute of Cereal Science of Shanghai, Shanghai)

A new mycotoxin responsible for vomiting in human and swine had been isolated from *Fusarium*-contaminated field barley grown in suburb of Shanghai.

The UV analysis of the mycotoxin in ethanol showed only end absorption at 227 nm (ϵ 7,500). The major IR bands and probable assignments are 3450(OH), 1740(ester), 1120(ester), 1690(α,β -unsaturated ketone), 1224(epoxy) cm⁻¹. The MS analysis showed a molecular ion (M⁺) at m/e 368 (calcd for C₁₈H₂₄O₈, 368). Fragment ions appeared at m/e 350(-H₂O), 338(-CH₂O), 320(-H₂O, -CH₂O), 295(-C₂H₅O₂). The NMR spectrum of the mycotoxin in CDCl₃ showed

$\delta_{\text{Me}_2\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$ (J): 3.86d(4), 5.24m, 2.26m, 4.74s, 6.40d(6.0), 4.60d(6.4), 3.11ABq(4), 1.16s, 3.68s, 1.86s, 4.36ABq(6), 1.45d(6.4). Elemental analysis gave C, 58.35; H, 6.63 (calcd for C₁₈H₂₄O₈: C, 58.69; H, 6.53). Melting point of the compound is 158—159°C.

According to the data from spectral analyses and chemical tests the new mycotoxin was elucidated as 3-Lactyloxy-7,15-dihydroxy-12,13-epoxy-trichothec-9-en-8-one, which is a new member of trichothecene toxins and has been named CBD₂.

The toxic properties of CBD₂ were observed by skin tests on rabbits and seed germination inhibitory effect on pea.