

真菌由一级胺合成二级胺的例证—— 甲基异戊胺和哌啉的微生物合成

季川 李铭新 李金兰 赵守金

(中国医学科学院肿瘤研究所化学病因及癌变原理研究室,北京)

致癌的甲基异戊基亚硝胺和亚硝基哌啉的前体物——甲基异戊胺和哌啉可由食管癌高发区(林县)食物中常见的真菌(串珠镰刀菌和圆弧青霉)利用异戊胺和异丁胺来合成。本文报道这项实验结果,并对真菌在致癌物亚硝胺形成中的作用进行了探讨。

关键词 串珠镰刀菌;圆弧青霉;异戊胺;异丁胺;甲基异戊胺;哌啉

微生物特别是肠道细菌与致癌物亚硝胺的关系很早就有人研究^[1-4],但将食物中的污染菌与亚硝胺的形成联系起来还是近几年由我们实验室开始的。过去曾报道玉米面饼接种串珠镰刀菌, 28℃ 培养数日后,加 NaNO₂,有多种亚硝胺形成^[5]。继之,我们发现两种新的亚硝胺,N-3-甲基丁基-N-1-甲基丙酮基亚硝胺(Nitroso-N-1-methylacetyl-N-3-methylbutylamine,简称 NMAMBA)和 N-2-甲基丙基-N-1-甲基丙酮基亚硝胺(Nitroso-N-1-methylacetyl-N-2-methylpropylamine,简称 NMAMPA)可以在霉变食物中形成^[6-7],而且证实某些真菌能将硝酸盐还原成亚硝酸盐,并使食物中二级胺总量增加几倍到几十倍^[8-9]。进一步研究表明:将食管癌高发区林县食物中几种常见的真菌:串珠镰刀菌、(*Fusarium moniliforme* Sheldon简称 Fm)、圆弧青霉(*Penicillium cyclopium* Westling 简称 Pc)、萎地青霉(*Penicillium roqueforti* Thom 简称 Pr)以及杂色曲霉(*Aspergillus versicolor* Tirab 简称 Av)分别与异戊胺共同培养,然后加入 NaNO₂,可以生成甲基异戊基亚硝胺(Nitrosomethylisomyamine,简称 NMIA)^[10];将这几种真

菌以及白地霉(*Geotrichium candidum* Link,简称 Gc)、互隔交链孢霉(*Alternaria alternata* Keissler 简称 Aa)等,分别与异丁胺一起培养,并加入 NaNO₂,可以形成亚硝基哌啉(Nitrosopiperidine,简称 NPIP)^[11]。从而间接证明这些真菌能由一级胺合成二级胺。最近,我们参照 Singer 等^[12]提取二级胺的方法,根据实验的要求加以改进,以 Fm 和 Pc 为代表,研究了真菌对一级胺的利用以及二级胺的生成。从测试真菌和异戊胺(Isoamylamine,简称 IAA)或异丁胺(Isobutylamine,简称 IBA)的培养物中,分别提取出甲基异戊胺(Methylisomyamine,简称 MIAA)和哌啉(Piperidine 简称 PIP),从而有力地证明了真菌不仅能使一级胺甲基化生成一个侧链为甲基的二级胺,而且能将一级胺重排和环化生成环状二级胺。本文报道 Fm 和 Pc 利用 IAA 和 IBA 生成 MIAA 和 PIP 的实验结果。

本文于1985年10月7日收到。

实验所用测试菌由我室马吉林同志协助分离,北京市肿瘤所孙鹤龄教授协助鉴定。PIP-Ts 标准物由美国 NCI-Frederick 癌症研究中心的 G. M. Singer 博士合成并赠送,特此致谢。

材料与方 法

(一) 材料

1. 菌株: 所用测试菌株均由林县的食物中分离得到。Fm19 由小米中分离出; Pc 由馒头中分离得到。

2. 葡萄糖-硝酸铵培养基(简称 GAN 培养基, 按照 Brain 等^[1]的方法制备。

(二) 二级胺的提取及衍生方法

参照 Singer 等人的方法^[1], 根据实验条件加以改进。具体方法如下: 样品 100ml, 加 NaOH (2.5 mol/L) 50ml, 加 Ba(OH)₂ 饱和水溶液 100ml, 水蒸气蒸馏, 蒸馏液收集到 10ml HCl (2mol/L) 中, 共收集约 500ml。用 CH₂Cl₂ 70ml × 3 洗蒸馏液, 以去除其内可能有的中性化合物。将洗过的蒸馏液于 70℃ 减压浓缩到约 20ml, 再用旋转蒸发器于 65℃ 浓缩至干。将残留物定量转移到 50ml 的三口瓶中, 加对苯磺酰氯 (*p*-toluenesulfonyl chloride, 简称 Ts-Cl) 600mg, NaOH (2.5mol/L) 20ml, 于 115℃ ± 5℃ 油浴中回流 1 小时, 用丙酮-干冰作冷阱, 以防止胺类在反应中丧失。将反应液在 15—20ml 乙醚于 50℃ 水浴中连续提取 1 小时 20 分钟, 醚提液用 HCl (2mol/L) 5ml × 2 洗, 以去掉可能存在的三级胺。然后用无水 Na₂SO₄ 脱水干燥, 最终于 K-D 瓶中浓缩至干。加乙醇 0.5ml, 取 2μl 进行气相色谱 (GC)/质谱 (MS) 分析。

(三) 分析方法

用 Pyc 104GC/LKB 2091 MS 进行分析。

1. GC 的条件: 选用 1.5M × 2mm (内径) 的玻璃柱, 以 3% 的 OV-17/Chromosorb WHP (80—100 目) 填充; 用氮 (N₂) 作载气, 流速为 30ml/min; 炉温程序: 在 150℃ 保持 2 分钟, 以 10℃/min 速度升温到 250℃ (保持 5 分钟); 进样口温度为 240℃。

2. MS 的条件: 采用双咀喷射式分子分离器, 温度为 180℃; 离子源温度为 200℃; 电离电压为 70eV; 加速电压为 3.5kV。

(四) 实验步骤

分别将测试菌 Fm19 及 Pc 接种于 100ml GAN 培养基中。在接种 Fm19 的实验瓶中加 IAA

1.7mmol; 在接种 Pc 的实验瓶中加 IBA 1.7mmol; 对照瓶不加 IAA 或 IBA。实验瓶与对照瓶均于 28℃ 培养 5 天(对 Fm19) 或 8 天(对 Pc), 然后按上述方法提取二级胺并将其衍生成对苯磺酰胺 (*p*-Toluenesulfonylamide)。

结 果

当含有测试菌 Fm19 及 IAA 的样品提取物用 GC/MS 分析时, 在色谱保留值为 9.4 分钟时出现一峰, 对其进行质谱扫描, 发现其分子峰为 *m/e* 255; 其它主要碎片峰是 *m/e* 155、198、91、30、44、65 和 186 (图 1-a)。根据我们曾在 Fm19 及 IAA 培养物的亚硝化产物中提出 NMIA 这一线索, 又结合其质谱碎片峰进行分析, 推测在 9.4 分钟出峰的化合物可能是 MIAA。用 IAA 与 CH₃I 合成了 MIAA, 并将 MIAA 与 Ts-Cl 反应生成了甲基异戊基对苯磺酰胺 (Methylisoamyl-toluenesulfonylamide, 简称 MIAA-Ts)。对 MIAA-Ts 进行 GC/MS 分析, 结果表明, 其色谱保留值及质谱图(图 1-b) 与样品提取物中未知化合物的色谱保留值及质谱图完全一致, 从而证明该未知物就是 MIAA。只含测试菌的对照样品未检出 MIAA。

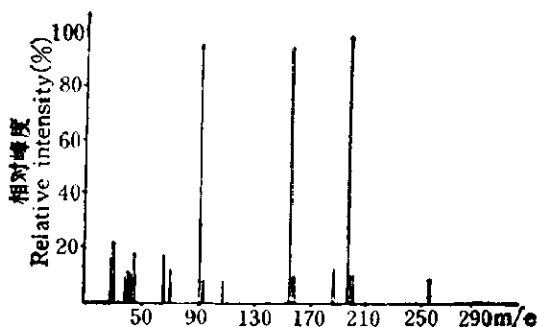


图 1-a 测试菌由 IAA 合成 MIAA, 经衍生后生成 MIAA-Ts 质谱图
Fig. 1-a Mass spectrum of MIAA-Ts formed in medium contained IAA by *Fusarium moniliforme*

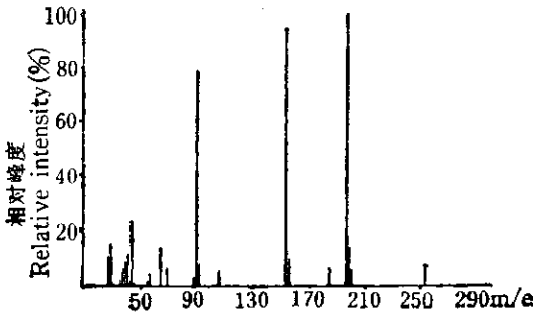


图 1-b 标准 MIAA-Ts 质谱图

Fig. 1-b Mass spectrum of MIAA-Ts standard

当对含有测试菌 Pc 及 IBA 的样品提取物进行 GC/MS 分析时,发现色谱保留值为 10.8 分钟时出现一峰,对照样品没有此峰。对这一峰进行质谱扫描时,发现其

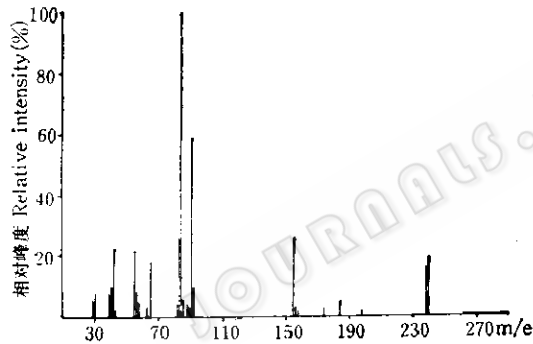


图 2-a 测试菌由 IBA 合成 PIP,经衍生后生成 PIP-Ts 的质谱图

Fig. 2-a Mass spectrum of PIP-Ts formed in medium with IBA by *Penicillium cyclopium*

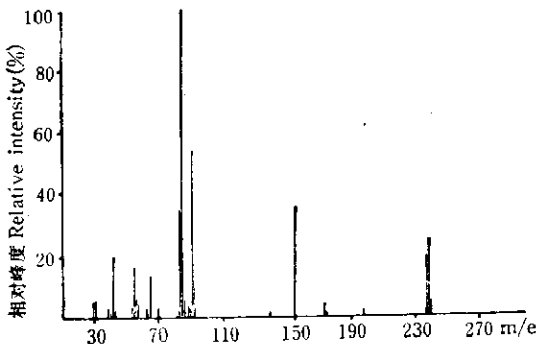


图 2-b 标准 PIP-Ts 质谱图

Fig. 2-b Mass spectrum of PIP-Ts standard

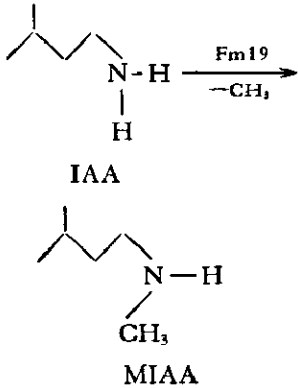
分子峰为 m/e 239, 基峰为 m/e 84, 其它主要碎片峰为 m/e 91、155、83、138、42、55 和 65。与标准哌啉的对苯磺酰衍生物 (PIP-Ts) 的色谱保留值及质谱图完全一致(图 2-a, 2-b),表明样品中色谱保留值为 10.8 分钟的化合物就是 PIP。在所用实验条件下, MIAA 和 PIP 的生成量分别为每瓶 0.1mg 和 1.5mg (未经回收校正)。

讨 论

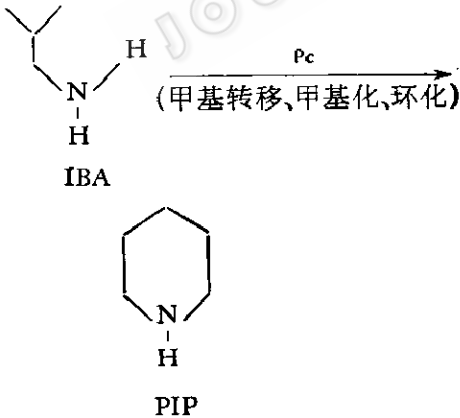
GC/MS 分析表明,实验所用试剂 IAA 中不含 MIAA; IBA 中不含 PIP。从对照样品提取物中亦未检出 MIAA 和 PIP。只有当测试菌与 IAA 或 IBA 共同培养时,才能检出 MIAA 或 PIP。从而证明测试菌能利用一级胺——IAA 或 IBA,合成二级胺——MIAA 或 PIP。

致癌的亚硝胺类化合物形成有两个必要的条件:一是必须有可以被亚硝化的胺类(一般认为是二级胺,也包括某些氨基酸,三级和四级胺);二是必须有可以使胺类亚硝化的试剂(一般认为是亚硝酸盐,也包括氮的氧化物 NO_2 和某些有机的硝基和亚硝基化合物)。亚硝胺的微生物合成,就是以这两个必要条件为根据来进行的。先假定必要条件中的一个已经存在,设法由微生物创造另一个,最终导致亚硝胺的生成。某些肠道细菌或某些真菌,具有硝酸盐还原酶这一特点,将其与硝酸盐和二级胺(一般常用二甲胺或二乙胺)共同培养,由于硝酸盐被细菌还原成亚硝酸盐,即产生了亚硝化试剂,这种亚硝化试剂再与培养基中加入的二级胺反应,就产生出亚硝胺^[1-3]。我们把真菌与一级胺共同培养,在真菌酶系作用下,把一级胺改造成为各种不同的二级胺,从而提供了可以被亚硝化的胺类,当有亚硝酸盐存在时,即可发生亚硝化反应,生成亚硝胺。Fm19 与 IAA

共同培养能够产生 MIAA, 表明 Fm19 具有甲基化的酶类可以使 IAA 甲基化, 也就是说 Fm19 利用 IAA 作为甲基的受体, 在甲基化酶作用下把甲基转到 IAA 的氮原子上而合成 MIAA。Fm19 的这种作用可由下列示意图表示:



用 Pc 与 IAA 共同培养可以得到 PIP, 说明测试菌不仅具有甲基化能力, 而且还具有甲基转移及环化能力, 以至使具有 4 个碳原子(包括一个支链碳)一个氮原子的烷基一级胺 (IBA), 重建成为具有 5 个碳原子一个氮原子的杂环二级胺 PIP。PIP 的可能合成途径可用下列示意图表示:



此外, 我们还发现真菌具有去甲基化作用以及脱水作用。真菌就是通过这些作

用将一级胺转化成各种不同的二级胺的。

食管癌高发区林县的居民由于生活习惯和粮食保存不当, 食物经常为真菌污染, 为真菌利用一级胺合成二级胺创造了条件。硝酸盐、亚硝酸盐在林县食物中普遍存在, 而且实验表明, 某些真菌还能将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 这就给致癌物亚硝胺的合成提供了良好的物质基础。此外, 有的真菌还能催化二级胺与 $NaNO_2$ 反应, 加速亚硝胺的合成^[8]。可见真菌在亚硝胺的形成中起着十分重要的作用。因此, 在探讨林县食管癌亚硝胺病因的同时, 研究真菌合成亚硝胺及其前体物的机制, 并以此为根据采取相应的阻断和预防措施, 是降低食管癌发病率必不可少的途径之一。

参 考 文 献

- [1] Hawksworth, G. M.: *J. Med. Microbiol.*, 3: 9—10, 1970.
- [2] Hill, M. J. et al.: *IARC Sci. Publ.*, No 3, 116—121, 1972.
- [3] Ayanaba, A. K. & M. Alexander: *Appl. Microbiol.*, 25: 862—868, 1973.
- [4] Mills, A. L. & M. Alexander: *Environ. Microbiol.*, 31: 892—895, 1976.
- [5] 李铭新等: 中国科学, 4: 402—406, 1979.
- [6] 陆士新等: 中国科学, 4: 407—412, 1979.
- [7] 季川等: 中国科学, 2: 143—149, 1984.
- [8] 陆士新等: 中国医学科学院学报, 2: 24—28, 1980.
- [9] Uibu, J. et al.: *IARC Sci. Publ.*, No 19, 247—256, 1978.
- [10] 季川等: 中国科学, 9: 81—89, 1985.
- [11] 季川等: 微生物学报, 27(1): 1987.
- [12] Singer, G. M. & W. Linjinsky: *J. Agric. Fd. Chem.*, 24: 550—554, 1976.
- [13] Brain, P. W. et al.: *J. Exp. Botany*, 12: 1—12, 1961.

EVIDENCE OF SYNTHESIZING SECONDARY AMINES FROM PRIMARY AMINES BY FUNGI—MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF METHYLISOAMYLAMINE AND PIPERIDINE

Ji Chuan Li Mingxin Li Jinlan Zhao Shoujin

(Department of Chemical Etiology and Carcinogenesis, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Methylisoamylamine and piperidine, precursors of carcinogenic nitrosomethylisoamylamine and nitrosopiperidine respectively, can be synthesized from isoamylamine and isobutylamine by the participation of some fungi which are frequently encountered in foods of Linxian County, where there is a high incidence of esophageal cancer. The present paper reports our experimental results and discusses

the role of fungi (*Fusarium moniliforme* and *Penicillium cyclopium*) in the formation of these carcinogenic nitrosamines.

Key words

Fusarium moniliforme; *Penicillium cyclopium*; Isoamylamine; Isobutylamine; Methylisoamylamine; Piperidine