

真菌利用异丁胺和 NaNO_2 合成亚硝基哌啶*

季 川 李铭新 李金兰

(中国医学科学院肿瘤医院化学病因与癌变原理研究室, 北京)

致癌物亚硝基哌啶 (Nitrosopiperidine) 可以在林县食物中几种常见的真菌 (串珠镰刀菌、圆弧青霉、萎地青霉、白地霉、互隔交链孢霉和杂色曲霉) 参加下, 由异丁胺和 NaNO_2 合成。以白地霉和萎地青霉的合成能力为最强, 分别为每瓶 48120ng 和 40754ng, 是杂色曲霉合成量的十几倍。利用气相色谱 (GC)/热能分析器 (TEA) 分析和鉴定, 并用薄层色谱 (TLC) 将其纯化, 又用高分辨气相色谱 (GC)/质谱 (MS) 予以证实。本实验首次证明真菌可以使一级胺环化, 生成环状二级胺, 这为真菌与亚硝胺生成关系提供了新的线索。

关键词 真菌; 亚硝基哌啶合成

在探讨霉变食物与食管癌病因关系的研究中, 发现用接种串珠镰刀菌的发霉玉米面喂大鼠, 可以诱发前胃乳头状瘤及前胃鳞癌。若在霉变玉米面中加入 NaNO_2 , 诱癌率有明显增加^[1], 说明由霉菌代谢产生的毒素及亚硝化产物均有致癌作用。在研究霉菌与致癌的亚硝胺形成的关系中, 我们曾证明玉米面饼、馒头和小米饭, 经接种串珠镰刀菌等林县常见的真菌, 培养数日后, 再加小量的 NaNO_2 , 有数种致癌的亚硝胺形成, 而不接种真菌的对照样品, 没有或只有个别亚硝胺的生成^[2-4]。说明真菌提供了可亚硝化的前体物, 促进了亚硝胺的形成。最近, 我们对林县食物进行了挥发性亚硝胺类分析, 至少有七种亚硝胺存在于测试样品中, 而且食物存放愈久, 样品愈发霉, 所含亚硝胺的品种就愈多, 含量也偏高, 特别是一些不对称的亚硝胺^[5]。表明霉菌对这些亚硝胺的生成起重要作用。为了阐明霉菌与亚硝胺生成的关系, 我们研究真菌对一级胺的利用, 发现串珠镰刀菌可以将甲基转到异戊胺 (isopentylamine, 简称 IAA) 的 N 原子上, 从而产生甲基异戊胺 (Methylisopentylamine 简称 MIAA), 而

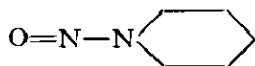
MIAA 经亚硝化就可形成致癌的甲基异戊基亚硝胺 (Methylisopentyl nitrosamine, 简称 NMIA)^[6]。说明串珠镰刀菌菌体中甲基化酶相当活跃, 可以使一级胺变成一个侧链为甲基的二级胺。我们又分别研究了林县几种常见的真菌对几种不同的一级胺的利用。

本文报告林县食物中几种常见的真菌: 串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme* Sheldon)、圆弧青霉 (*Penicillium cyclopium* Westling)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor* Tirab)、白地霉 (*Geotrichum candidum* Link)、互隔交链孢霉 (*Alternaria alternata* Keissler) 和萎地青霉 (*P. roqueforti* Thom) 对异丁胺 (Isobutylamine 简称 IBA) 的改造, 发现真菌具有环化作用并生成环状亚硝胺——亚硝基哌啶 (Nitrosopiperidine, 简称 NPIP)。它的结构式为

本文于 1985 年 10 月 23 日收到。

* 本课题得到国家科委的资助 (肿瘤攻关项目 36-2-2 号)。

真菌的分离鉴定工作由北京市肿瘤医院孙德令教授和我室马吉林同志协助完成, 标准 NPIP 由 NCI-Frederick Cancer Research Facility 的 G. M. Singer 博士赠送; 高分辨 GC/MS 测定由中国科学院化学所王光辉教授和贺玉珍同志协助进行, 特此致谢。



材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌株: 所用测试菌株均由林县的食物中分离培养得到。串珠镰刀菌来自小米, 圆弧青霉和娄地青霉来自馒头, 互隔交链孢霉来自玉米, 白地霉由酸菜中分离出。

2. 葡萄糖硝酸铵培养基 (GAN): 按照 Brain 等^[7]的方法制备, 浓度加倍。

(二) 分析方法

1. 气相色谱 (GC)/ 热能分析器 (TEA): 采用 Perkin Elmer Sigma I 型 GC 及 502-A 型 TEA。

GC 条件: 不锈钢柱长 2m, 内径 2mm, 用 5% 的 FFAP 涂在 80—100 目的 Chromosorb WHP 上作为填充物; 载气氩 (Ar), 流速为 25ml/min; 炉温程序: 在 120℃ (2 分钟) 以 10℃/min 的速度升温到 190℃ (10 分钟); 进样口温度 200℃。

TEA 条件: 热解炉温 480℃, 冷阱用液氮/乙醇, 温度低于 -130℃; 氧气流速 20ml/min; 真空度 0.5—0.7 托。

2. 硅胶薄层对样品的净化: 取 10g 硅胶 G, 加 25ml 水, 均匀涂布到 $5.5 \times 22\text{cm}^2$ 的四块玻璃板上, 室温下阴干后, 于 100℃ 烘箱中活化 45 分钟。将样品成条状点于板上, 以己烷: 乙醚: 二氯甲烷 (4:3:2) 为展开剂, 0.3% 的茚三酮乙醇溶液为显色剂, 将对显色剂呈阳性反应的区带刮下, 并用 15ml 二氯甲烷洗脱, 洗出液于 K-D 瓶中浓缩至 0.4ml 进行 GC/MS 分析。

3. 高分辨气相色谱/质谱 (Pyc 104 GC/AEI-MS50/AEI DS30) 对纯化的样品进行证实鉴定 (分辨率为 7000)。

(三) 试验步骤

加 50ml GAN 培养基于试验瓶中, 分别接种几种真菌, 除串珠镰刀菌采用湿法接种外, 其它各种真菌均用干法接种, 每瓶中加 IBA 1.7mmol, 用灭菌蒸馏水使培养基的终体积为 100ml。对照瓶不接种测试菌或不加 IBA, 其它同实验瓶。将对照瓶和实验瓶同时于 28℃ 培养 5—8 天, 然后每瓶加 5.8mmol NaNO_2 , 继续培养 15 小时, 加入

10ml 20% 的氨基磷酸铵-硫酸水溶液, 以终止反应。然后水蒸气蒸馏, 用二氯甲烷提取蒸馏物, 最终于 K-D 瓶中浓缩至 0.4ml, 用无水乙醇稀释至 1.0ml 进行 GC/TEA 分析。对呈阳性响应的样品, 加倍量提取, 经薄层净化, 再经 GC/TEA 分析证明阳性响应仍存在, 即可进行 GC/MS 的证实鉴定。

结 果

用 GC/TEA 对试验瓶样品进行分析时, 发现在色谱保留时间为 7.3 分时都有一强峰出现 (图 1-a), 与标准 NPIP 色谱保留值一致 (图 1-b), 而只加真菌或 IBA 的对照样品此时未出现峰。将试验瓶的样品经薄层纯化后, 经高分辨 GC/MS 分析时, 发现在 7.3 分出现峰的分子离子为 m/e 114, 其它主要碎片离子为 m/e 42、55、30、41、56 和 84; 与 Lijinsky 等报道的 NPIP 标准质谱图^[8]基本相同; 对其分子离子峰 114 进行了峰匹配测定, 证明其分子组成为 $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$, 分子量为 114.0792 (NPIP 分子量的理论数值为 114.0793)。说明样品中的化合物很可能是 NPIP。又用标准的 NPIP 及样品提取物分别在 Pyc 104 GC/LKB 2091MS 低分辨质谱仪上进行质谱扫描, 以及加合试验 (将标准 NPIP 加到样品中, 检查样品中待测化合物峰与标准物峰是否重合。若重合, 则待测物和标准物很可能为同一物质; 反之, 则为不同物质)。结果待测样品的质谱与标准 NPIP 的质谱图完全一致 (图 2-a, 2-b); 而且二者的色谱峰也叠加, 进而证明样品中的化合物就是 NPIP。

几种被测试真菌都能利用 IBA 和 NaNO_2 合成 NPIP, 但合成的能力相差很大。白地霉和娄地青霉利用 IBA 的能力最强。在所用的试验条件下, 白地霉和娄地青霉产生的 NPIP 分别为每瓶 48120ng

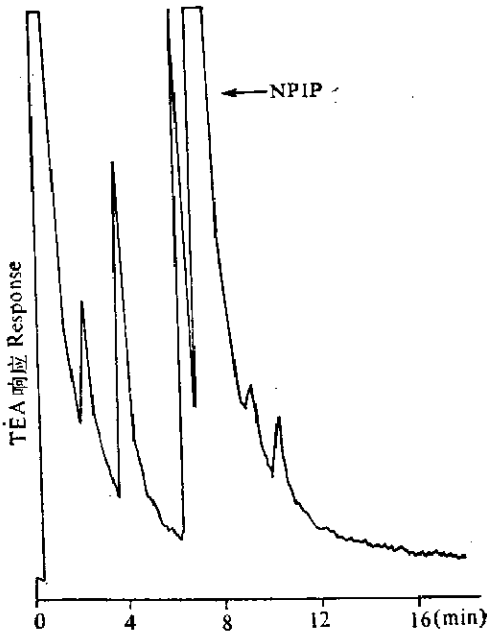


图 1-a 含有测试菌 IBA 和 NaNO_2 试验瓶提取物的色谱图

Fig. 1-a Chromatogram of extract from experimental flask with testing fungus, IBA and NaNO_2

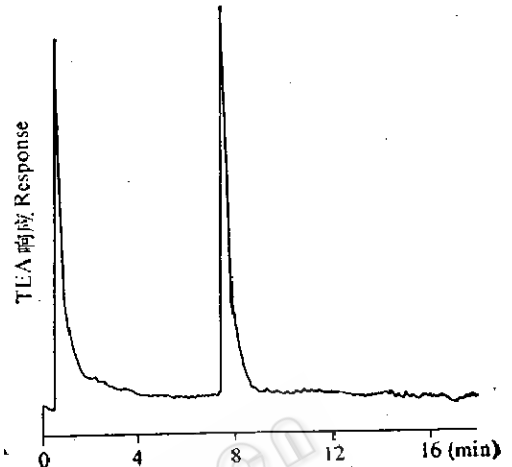


图 1-b 标准 NPIP 的色谱图

Fig. 1-b Chromatogram of NPIP standard

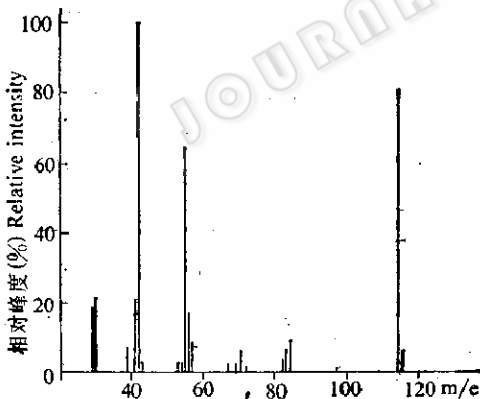


图 2-a 测试菌利用 IBA 和 NaNO_2 合成 NPIP 的质谱图

Fig. 2-a Mass spectrum of NPIP synthesized by fungus using IBA and NaNO_2

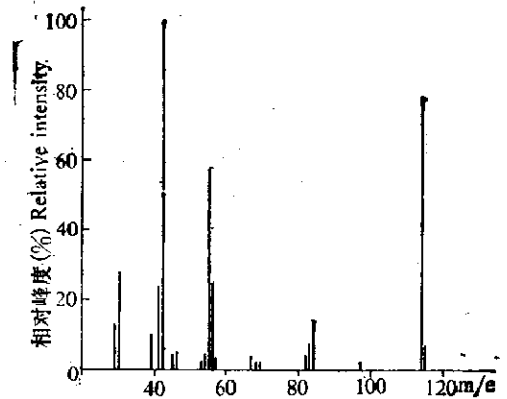


图 2-b 标准 NPIP 的质谱图

Fig. 2-b Mass spectrum of NPIP standard

和 40754ng (培养时间分别为 8 天和 5 天) 其次为圆弧青霉; 串珠镰刀菌和互隔交链孢霉合成的 NPIP 大约是它们的一半; 杂色曲霉合成能力还不足它们的 1/14。尽管如此, 杂色曲霉合成 NPIP 的量也远远高

于对照样品 (0—454ng/瓶), 平均 151ng, 相当于对照样品的十几倍。各种真菌合成 NPIP 的量及相对百分比见表 1 和表 2。

测试菌合成 NPIP 的量随培养时间延长而增多。以圆弧青霉为例, 培养 2 天时

表 1 真菌由异丁胺和 NaNO₂ 合成亚硝基哌啶的量及相对百分比*
Table 1 Amount of NPIP formed and its relative % in GAN medium from IBA and NaNO₂ by Fungi*

真 菌 Fungus	合成亚硝基哌啶的 量 (ng/瓶) Amount of NPIP formed in GAN medium (ng/fla- sk)	相对百分比 Relative(%)
串珠镰刀菌 19 <i>F. moniliforme</i> [#] 19	16691	41
杂色曲霉 <i>A. versicolor</i>	2846	7
圆弧青霉 <i>P. cyclopium</i>	37062	91
娄地青霉 <i>P. roqueforti</i>	40754	100

* 于 28℃ 培养 5 天。
Incubation at 28℃ for 5 days.

表 2 真菌由异丁胺和 NaNO₂ 合成亚硝基哌啶的量及相对百分比*
Table 2 Amount of NPIP formed and its relative % in GAN medium from IBA and NaNO₂ by Fungi*

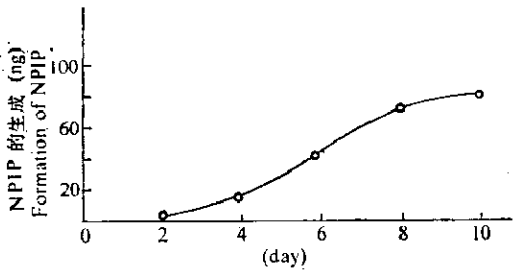
真 菌 Fungus	合成亚硝基哌啶的 量 Amount of NPIP formed in GAN medium (ng/flask)	相对百分比 Relative (%)
串珠镰刀菌 4 <i>F. moniliforme</i> [#] 4	30990	64
串珠镰刀菌 14 <i>F. moniliforme</i> [#] 14	28185	59
圆弧青霉 <i>P. cyclopium</i>	43487	90
白地霉 <i>G. candidum</i>	48120	100
互隔交链孢霉 <i>A. alternata</i>	20241	42

* 于 28℃ 培养 8 天。
Incubation at 28℃ for 8 days.

未鉴定出 NPIP; 4 天时, NPIP 产量每瓶高达 8491ng; 6 天时, 骤增到 24655ng, 8 天为 51782ng, 10 天高达 70391ng(图 3)。

讨 论

结果表明, 几种从食管癌高发区林县



培养时间 Incubation time
图 3 培养时间对测试菌利用 IBA 和 NaNO₂ 生成 NPIP 的影响
Fig. 3 Effect of incubation time (days) on formation of NPIP by fungus using IBA and NaNO₂

食物中分离的真菌: 串珠镰刀菌、圆弧青霉、娄地青霉、白地霉、互隔交链孢霉和杂色曲霉, 在 GAN 培养基中可以利用 NaNO₂ 和 IBA 合成致癌的亚硝基化合物——亚硝基哌啶。

一级二胺在特定条件下, 可以环化脱氨形成环状二级胺。Lijinsky 等^[9]曾指出, 在烹调温度下, 腐胺 (Putrescine) 和尸胺 (Cadaverine) 可以环化脱氨产生环状二级胺, 这些二级胺再与 NaNO₂ 反应, 即可产生致癌的环状亚硝胺。Bills 等^[10]提到腐胺和精胺 (Spermidine) 在油和水体系中, 当加热到 170℃ 时可产生亚硝基吡咯烷 (Nitrosopyrrolidine 简称 NPYR)。这说明一级二胺可以在特定的条件下进行化学反应产生环状二级胺。但是, 有关一级胺的环化作用尚未见报道。本文首次报道在 GAN 培养基中, 常温下真菌可以使 IBA 改造并环化, 再进一步亚硝化生成致癌的 NPIP。

由 IBA 合成 PIP 需要经过分子的改造和重建, 即把 IBA 的支链变成直链, 把四个碳原子变成五个碳原子, 还要把首尾的碳原子与氮连接起来, 即所谓的“环化”, 这样复杂的过程可能只有在有机体酶系的参加下才能完成。这一步已经试验证实, 我们从测试菌和 IBA 的培养物中提出了 PIP^[11],

而不加测试菌的对照瓶中则没有 PIP 生成。至于测试菌可以使培养基的 pH 由 5.5 降到 4.5 左右,从而有利于 PIP 生成 NPIP 的亚硝化反应,我们已初步证明在 pH 为 4.5 的柠檬酸缓冲液中 PIP 的亚硝化反应速度与测试菌的存活无关,所以第二步反应很可能是非酶促性的。

试验进一步表明,真菌与致癌物亚硝胺的生成密切相关,真菌可以将一级胺转化成二级胺,进而合成亚硝胺。这项研究不仅对食管癌和其它消化道癌的病因研究具有重要意义,而且为化学致癌物的微生物合成提供了新的实验根据。

参 考 文 献

- [1] 李铭新等:中华肿瘤杂志,4:241—244,1982。
- [2] 李铭新等:中国科学,4:402—406,1979。
- [3] 陆士新等:中国科学,4:407—412,1979。
- [4] 季川等:中国科学,2:143—149,1984。
- [5] 季川等:中华肿瘤杂志(增刊),7:25—29,1985。
- [6] 季川等:中国科学,28:81—89,1985。
- [7] Brain, P. M. et al.: *J. Exp. Botany*, 12:1, 1961。
- [8] Lijinsky, W. et al.: Oak Ridge Nat. Lab., USA, p. 28, 1973。
- [9] Lijinsky, W. and S. S. Epstein: *Nature*(London), 225: 21, 1979。
- [10] Bills, D. D. et al.: *J. Agr. Food Chem.*, 21: 876, 1973。
- [11] 季川等:微生物学报,26(4):341,1986。

BIOSYNTHESIS OF NITROSOPIPERIDINE FROM ISOBUTYLAMINE AND NaNO_2 BY SOME FUNGI

Ji Chuan Li Mingxin Li Jinlan

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

Nitrosopiperidine, a carcinogenic N-nitroso compound, may be formed from isobutylamine and NaNO_2 by some fungi, i.e. *Fusarium moniliforme* Sheldon, *Penicillium cyclopium* Westling, *Penicillium roquefortii* Thom, *Alternaria alternata* Keissler, *Geotrichum candidum* Link or *Aspergillus versicolor* Tirab which encountered frequently in Linxian foods. Only a trace amount or just none of the nitrosamine could be detected by GC/TEA in culture medium of control samples in which isobutylamine or fungus was absent. All testing fungi were able to synthesize nitrosamine by using isobutylamine and NaNO_2 ; *G. candidum* and *P. roquefortii* produce 48120

ng and 40754 ng nitrosopiperidine per flask respectively, which are 10 times more than that formed by *A. versicolor*. The compound was detected by GC/TEA, purified by high resolution GC/MS.

This is the first report showing the formation of a secondary amine through the cyclization of primary amine by fungi. It may shed some new light on the relationship between fungi and the formation of carcinogenic nitrosamines.

Key words

Fungi; Nitrosopiperidine synthesis