

串珠镰刀菌素的结构与毒性的关系

章 红 李季伦

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

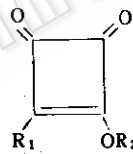
摘要 用 O_3 对串珠镰刀菌素去毒处理后,对产物进行了分离纯化,并通过红外、核磁共振等分析,证明串珠镰刀菌素双键消失,四元环已打开,产物为 2,3-二羟基-2,3 环氧-丁二酸(3)和 2-羧基-3-羟基-丁二酸(4)。以 1 日龄北京雏鸭为实验动物,将串珠镰刀菌素及其结构类似物方酸进行生物毒性对比试验,分别灌胃法给毒 8mg/kg 体重和方酸 24mg/kg 体重,方酸量为串珠镰刀菌素的三倍时仍无毒性,说明串珠镰刀菌素结构中的 H 对其毒性起关键作用。这在国内外尚属首次报道。

关键词 串珠镰刀菌素,方酸,去毒

串珠镰刀菌素(moniliformin)是一种对动物心脏有强烈损害作用的水溶性真菌毒素^[1]。其化学结构为(I):

串珠镰刀菌素通常以钠盐或钾盐形式存在于自然界中^[2]。北京鸭对此毒素最敏感,7 日龄北京鸭 LD_{50} 为 3.65mg/kg^[3]。已证实此毒素对受试动物的毒害机理主要是对丙酮酸脱氢酶系有特异性抑制作用^[4],从而影响产能代谢的正常进行,导致动物心力衰竭,最终死亡。

自李季伦等人^[5]提出串珠镰刀菌素可能是克山病的直接致病因子后,引起了国内医学界的广泛重视。姬政等人^[6]检出在云南大米和陕西玉米(两克山病区区粮)中均含有串珠镰刀菌素,而北京大米中未测到,这一结果为克山病真菌毒素致病说提供了重要依据。近年来,由于人民生活水平的提高和饮水条件的改善,我国克山病的流行已明显呈下降趋势。但因农村各种条件的限制,串珠镰刀菌素的危害仍有可能威胁农业和畜牧业的发展,急需采取一种成本低、方法简便、取材容易的对发霉粮食和污染源有效去毒的方法,我们的工作已证明漂白粉、臭氧等可有效地去除水中串珠镰刀菌素,5% H_2O_2 水溶液喷雾可有效地去除粮食中串珠镰刀菌素。由于臭氧暴气法对毒素水溶液完全脱毒处理后水溶液中只剩余脱毒产物,成分单一,容易分离、纯化和分析,为了搞清去毒机理,我们研究了用 O_3 去毒后毒素结构的改变。此外,方酸作为串珠镰刀菌素的结构类似物(II)^[7],与串珠镰刀菌素仅有一个基因的区别。我们比较了方酸钠盐与串珠镰刀菌素钠盐对动物的毒性,以确定毒素结构中毒性关键基因。



I: $R_1=H$ 串珠镰刀菌素
 $R_2=H, Na$ 或 K

II: $R_1=OH$ 方酸
 $R_2=H$

• 本课题由中国科学本文于 1992 年 11 月 26 日收到。

1 材料和方法

1.1 材料

串珠镰刀菌素钠盐结晶:串珠镰刀菌胶孢变种(*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*)培养后提取得到的黄色针状结晶,经鉴定为串珠镰刀菌素钠盐^[8]。

方酸(squaric acid):美国 Aldrich 化学公司产品。

1.2 方法

1.2.1 O_3 去毒及其结构测定:550mg 毒素结晶溶于 10ml 超纯水中,置于 U 型 10-043 型滤板吸收器中,通入 O_3 暴气 15 分钟。 O_3 处理条件:北京环境保护科学研究所 BX 3-A 型臭氧发生器, O_2 流量 0.8L/min, O_3 浓度 4.06×10^3 ppm(V/V)。将 O_3 处理后的毒素水溶液 4000r/min \times 20' 离心二次,白色沉淀与上清液分别进行冷冻干燥后,测定熔点。红外分析采用美国 Nicolet FT-5DX 红外分析仪,溴化钾压片 400-4000 cm^{-1} 区段扫描。

^{13}C -NMR 和偏共振谱分析采用 Jeol 90Q 核磁共振仪以四甲基硅烷(TMS)作内标,溶剂为氘代盐酸(DCl)、重水(D₂O),以确定脱毒后产物结构。

1.2.2 方酸与串珠镰刀菌素生物毒性对比试验:0.11g (1mmol)方酸加水搅拌滴加 NaOH 调节 pH 到 6.0 左右,配成 2.2 mg/ml;串珠镰刀菌素钠盐配成 0.4mg/ml 水溶液,动物给毒前停食 4 小时。一组灌胃串珠镰刀菌素 8mg/kg 体重;一组灌胃方酸钠盐 24mg/kg 体重;另一组不供毒作为对照。给药后 2 小时开始喂食、饮水,观察三天。

2 结果和讨论

2.1 O_3 去毒及其结构测定

串珠镰刀菌素的结构特点决定了其不耐氧化,容易被漂白粉、 H_2O_2 和 O_3 分解脱毒。串珠镰刀菌素水溶液为黄色,在 O_3 处理过程中,开始黄色变淡,处理至第 8 分钟时有少量白色沉淀析出,此后黄色消失,白色沉淀增多,至第 15 分钟结束处理。离心后分别冷冻干燥所得白色沉淀,熔点为 158.5—159.5 $^{\circ}C$ 。红外图谱显示在 3418、3369 cm^{-1} 有一宽峰,1674 cm^{-1} 有羰基吸收峰(图 1),提示有羟基和羧基。以 TMS 作内标进行 ^{13}C -NMR 和偏共振谱测定,根据串珠镰刀菌素的结构, O_3 去毒后可能产生 8 种产物。由于白色沉淀的 ^{13}C -NMR 只有两条谱线(图 2-a),偏共振显示均为季碳,说明产物有对称性。 ^{13}C 化学位移为 173.70ppm 的碳为羰基,94.45ppm 的碳是一个与两个氧原子相连的季碳。与方酸的 ^{13}C -NMR ($\delta=190.40$, DMSO- d_6) 比较,其羰基吸收向高场移动了 16.70ppm,说明串珠镰刀菌素的四元环被打开成为羧基。从此排除了其它七种产物的可能性,该沉淀唯一可能的结构是 2,3-二羟基-2,3-环氧-丁二酸(3)。

冷冻干燥后上清部分为白色粉末状固体,该固体物质水溶液与 2,4-二硝基苯肼反应出现桃红色沉淀,说明有羰基存在。其 ^{13}C -NMR 上有 3 条谱线(图 2-b),偏共振谱说明有一个 CH, 2 个季碳峰,其化学位移分别为 72.43ppm、166.21ppm 和 173.68ppm,推测应含有一个 CHOH 片段。与上述白色沉淀的 ^{13}C -NMR 比较, 173.68ppm 与上述羰基的羰

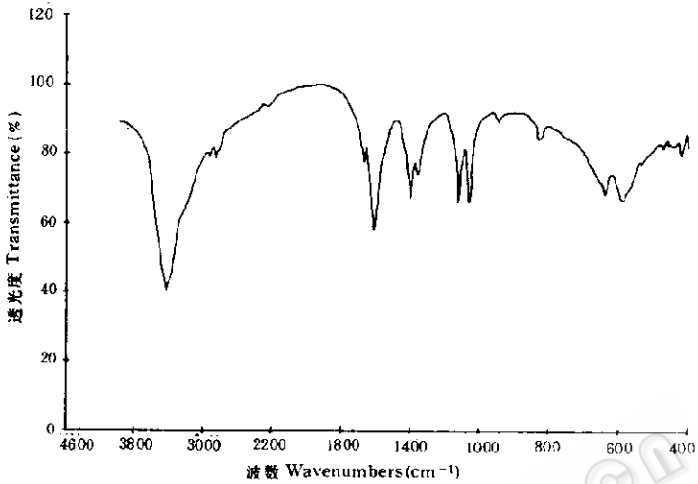


图 1 O_3 去毒后沉淀部分样品红外吸收图谱

Fig. 1 Infrared absorption spectrum of precipitate of moniliformin after treated with O_3

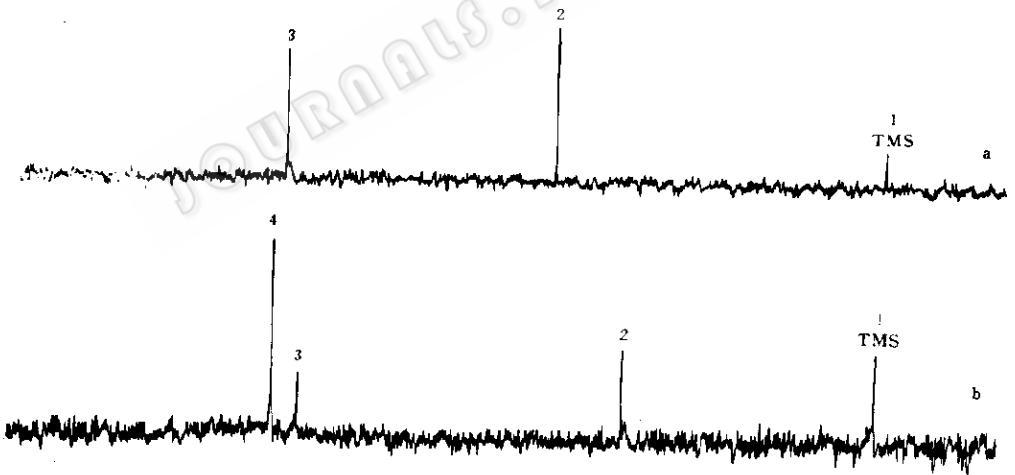


图 2 O_3 去毒后样品(a:沉淀部分,b:上清部分) ^{13}C -核磁共振图谱

TMS: 四甲基硅烷(内标)

Fig. 2 Nuclear magnetic resonance spectrum of moniliformin after treated with O_3 .
(a. Precipitate; b. Upper phase)

a.	No.	ppm	b.	No.	ppm
	1.	0.000		1.	0.000
	2.	94.446		2.	72.426
	3.	173.700		3.	166.213
				4.	173.675

基几乎没发生变化,推测也是羧基。而 166.21ppm 是一个新的吸收峰。证明是羰基。考虑到串珠镰刀菌素被 O_3 氧化时,原有的两个羰基被破坏而成两个羧基,因此有可能该化合物的两个羧基中的羰基化学位移正好相同而成一条谱线,故此推断该化合物的结构是 2-羰基-3-羟基-丁二酸(4)。由于(2')为半缩醛结构,不稳定,易于互变为(4),这与实际观察到从白色变为黄色的现象一致。

推测串珠镰刀菌素在 O_3 作用下的氧化机制为:

2.2 方酸与串珠镰刀菌素毒性对比试验

对 1 日龄北京鸭分别供方酸 24mg/kg 体重和串珠镰刀菌素 8mg/kg 体重后,供毒组 10 只雏鸭在给毒后 2 小时内全部死亡,而供方酸组及对照组雏鸭三天内全部健康存活,无任何中毒症状。方酸量为毒素量三倍时对实验动物无毒性。

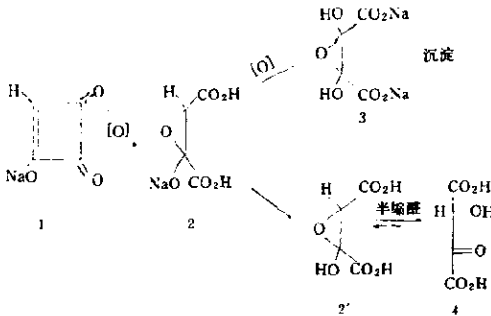
方酸酸性很强,可与硫酸相比, $PK_1=1.5$, $PK_2=3.5$,未见它对动物有任何毒害作用的报道。为了避免直

接灌胃腐蚀雏鸭食道,本实验采用 NaOH 调节 pH 为 6.0 左右,使方酸成为钠盐形式。证明了串珠镰刀菌素上唯一的 H 在毒性上起重要作用。这在国内外是首次报道。

致谢 中国军事医学科学院药物毒物研究所罗毅同志协助 IR 测定,本校应用化学系刘军同志协助 NMR 测定,王明安同志帮助图谱分析,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 孙丽红,等. 中华医学杂志,1990,70(11):621-623.
- [2] Springer J P et al. *J Am Chem Soc*, 1974,96,2267-2268.
- [3] Engelhardt J A et al. *Avian Dis*,1989,33(2):357-360.
- [4] Gathercole P S et al. *Biochem J*,1986,233,719-723.
- [5] 李季伦,章红,等. 医学研究通讯,1986,15:306-307.
- [6] 姬政,等. 中华医学杂志,1991,71(1):14-15.
- [7] 李聚才,等. 化学试剂,1992,14(2):115-116.
- [8] 章红,李季伦. 微生物学报,1989,29(2):93-100.



DETOXIFICATION OF MONILIFORMIN

Zhang Hong Li Jilun

(College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Moniliformin is highly toxic to animals. It can be detoxified by treating with Ozone(O₃). The structure of moniliformin treated with O₃ was analysed by means of IR and NMR spectrum etc. It was proved that the double bond was disappeared and the 4-C ring structure was opened. The structure of the two products are 1,2-dihydroxy-1,2-dicarboxyl-epoxyethane and 2-carbonyl-3-hydroxy-dibutyric acid. The experiment of toxicity comparison between moniliformin and its analogous material squaric acid was made using one-day age Beijing Ducklings by oral applying both medicines at dosage of 8mg/kg and 24mg/kg body weight separately. The result showed that squaric acid had no toxic to animals though its dosage was as three times as that of moniliformin. Author concluded that H in moniliformin is the key factor of its toxicity.

Key words Moniliformin, Squaric acid, Detoxification

JOURNALS. IM. AC. CN