

杂色曲霉素的分离、纯化及鉴定*

楼建龙¹ 王月芳² 王殿升³ 孟昭赫

(中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所 北京 100050)

摘要 将两株杂色曲霉菌分别接种于 4 kg 玉米豆粉固体产毒培养基, 28℃ 静置培养 35 d。以甲醇-4% KCl(9:1) 混合液及甲醇-三氯甲烷混合液浸提杂色曲霉素 (Sterigmatocystin, 简称 ST), 再用三氯甲烷萃取, 经硅胶柱层析法初步纯化。在甲醇、乙腈、乙醚、丙酮等溶剂中多次重结晶, 最后得到 2271.6 mg 淡黄色针状结晶。经过熔点测定、元素分析、四种光谱学鉴定、薄层层析及高效液相色谱鉴定, 确认该晶体为 ST。纯度在 99.9% 以上。

关键词 杂色曲霉, 杂色曲霉素

杂色曲霉素 (Sterigmatocystin, 简称 ST) 是一种具有强烈致癌性和急性毒性的真菌毒素^[1-4], 常污染粮食和饲料^[5-8]。为了深入研究 ST 与人畜疾病的关系, 必须取得足够的 ST 纯品。我们已经筛选到了二株 ST 产量超过 500 mg/kg 的杂色曲霉菌株^[9]。本文介绍应用该菌株产 ST 的培养条件及一套经济有效的 ST 提取纯化方法。

1 材料与方法

1.1 产毒培养

杂色曲霉菌种按常规方法复苏于马铃薯-葡萄糖 (PDA) 斜面上, 置 28℃ 培养 7-10 d, 用无菌水制成孢子悬液, 接种于玉米豆粉固体产毒培养基 (SPM), 每个菌种接种约 2 kg SPM (装于 40~50 个 250 ml 三角瓶中), 置 28℃ 恒温箱避光培养 30~35 d, 分别在第 1、10、20、30 d 充分摇动培养基。SPM 培养基配制方法如下: 黄玉米 50 g, 黄豆粉 5 g, 加水 70 ml 于 250 ml 三角瓶, 经两次 121℃ 蒸汽灭菌(每天 1 次, 共 2 次)后备用。

1.2 ST 提取

将甲醇-4% KCl 混合液 (9:1, V/V, 下同) 倒入已培养好的 SPM 中, 浸泡过夜。然后用组织捣碎机将培养基及菌丝、孢子捣碎。减压抽滤取滤液。在滤渣中再依次加入甲醇、三氯甲烷各浸提 1 h。再减压抽滤, 合并所有滤液于分液漏斗中, 静置分层。移出三氯甲烷层。在甲醇水层中再加三氯甲烷, 萃取 ST 二次后, 合并所有三氯甲烷层。经无水硫酸钠及新华滤纸过滤, 用旋转蒸发器减压浓缩, 至每个菌种对应的 ST 粗提液总体积小于 150 ml 时放入冰箱备用。

* 国家自然科学基金资助课题。

1 现在地址: 北京大学生命科学学院 北京 100871。

2 中国兽药监察所中海公司 北京 100081。

3 北京市肿瘤防治研究所 北京 100034。

本文于 1994 年 3 月 21 日收到。

1.3 ST 纯化

用硅胶 G (青岛海洋化工厂, 10~40 μm) 装层析柱 4~5 \times 60~100 cm。柱底填 300 目尼龙网和无水硫酸钠 20~30 g, 硅胶层高 30~60 cm, 上面再装 30 g 无水硫酸钠。每根层析柱可上 ST 粗提液 10~20 ml。上样前用石油醚(沸程 30~60 $^{\circ}\text{C}$)将柱子平衡过夜, 上样后先用石油醚淋洗 2~3 个柱体积, 再用 10~100% 的二氯甲烷-石油醚连续梯度混合液洗脱, 流速 1~2 ml/min, 分部收集。用薄层层析 (TLC) 法及高效液相色谱 (HPLC) 法确定 ST 所在组份。合并所有含 ST 组份后, 旋转蒸发浓缩至出现结晶, 加入少量三氯甲烷溶解结晶物, 再加入约三倍于三氯甲烷体积的甲醇, 在热水浴中挥发掉部分三氯甲烷。置冰箱中, 待结晶大量析出后过滤。收集所有结晶, 重溶入三氯甲烷中。再加入乙腈, 旋转蒸发挥发掉部分溶剂后置冰箱中重结晶。然后再在甲醇-乙腈(1:1)、丙酮-乙醚(1:1) 中各重结晶一次。显微镜下观察, 只有单一类型的淡黄色针状晶体时备用。

1.4 ST 的熔点测定

用显微镜热板熔点测定法。将上述晶体置于显微熔点测定仪 (X4 熔点测量显微镜, 北京第三光学仪器厂) 的加热台表面中心位置, 盖上隔热玻璃。控制电压, 使加热台徐徐加热。到 200 $^{\circ}\text{C}$ 以上时控制温度上升速度在 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。到 240 $^{\circ}\text{C}$ 以上时, 温度上升速度控制在 0.2~0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 不断观察样品熔化情况, 记录晶形结构开始消失和完全消失时的温度。重复四次, 求平均值。

1.5 TLC 法鉴定 ST 及其纯度

按 GB5009.25—8510 方法铺硅胶 G 板 (10 \times 20cm, 5 \times 20cm 或 5 \times 10cm), 或用 TLC 硅胶 G 预制板 (10 \times 20 cm, 福山生化试剂厂), 或 TLC 硅胶 H 预制板 (2.5 \times 7.5cm, 青岛海洋化工厂), 用前经 110 $^{\circ}\text{C}$ 活化 1h。微量注射器吸取检样或标准 ST 应用液点样, 每点 10~80 μl , 每板 2~8 点, 样点间距 1 cm, 离底边 1.5 cm。展开剂用甲苯-乙酸乙酯-甲酸(6:3:1)。采用垂直上行展开法密闭式展层, 展开至离顶边 1 cm 左右取出, 挥干溶剂, 于暗处置波长 253.7 nm 或 360 nm 的紫外灯下观察。然后用 20% AlCl_3 乙醇溶液喷雾, 置 80~110 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10~15 min, 再在上述紫外灯下观察。测出比移值 R_f 。

1.6 HPLC 法鉴定 ST 及其纯度

测定仪器为 Varian Liquid Chromatography Model 5000, 配以 μ -Bondapak ODS C18 柱 (4 \times 150 mm), 紫外检测器使用 $\lambda = 320 \text{ nm}$ 。流动相为 45% 乙腈 + 55% 酸化水 (在 900 ml 双蒸水中加 40 ml 冰乙酸配成), 用前经超声脱气和 0.45 μm Millipore 滤膜过滤, 操作温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.5 ml/min。仪器控制及数据处理用 Vista 401 Chromatography Data System。先用标准 ST (Sigma) 进样 10 μl , 再分别检测样品 (溶于乙腈)。采用内、外标二种方法确定 ST。

1.7 ST 的元素分析及光谱分析

用 Heraeus CHN-RAPID 元素分析仪分析 ST 样品中 C 和 H 含量。测定时氧化温度 950 $^{\circ}\text{C}$, 还原温度 600 $^{\circ}\text{C}$ 。样品 ST 分别溶于苯、乙腈、乙醇后, 用紫外分光光度计 Shimadzu graphicord UV-240 测定 ST 在上述溶剂中的紫外吸收光谱。扫描波长范围

190~400 nm。用 KBr 压片法测定 ST 晶体的红外吸收光谱,仪器是 Perkin-Elmer Model 683 红外光谱仪,扫描波数 $400\sim 4600\text{ cm}^{-1}$ 。用 Bruker AC-200p 核磁共振仪进行 ST 的核磁共振氢谱分析, CDCl_3 为溶剂,内标为 TMS。用 AEIMS50 质谱仪以电子轰击法分析 ST 的质谱,加速电压 8 kV,电子轰击能量 65 eV,离子源温度 200°C ,汽化温度小于 200°C 。

2 结果与讨论

用二株杂色曲霉按本文介绍的方法进行 ST 产毒培养,从 4 kg SPM 中提取到了 2271.6 mg ST 晶体。用硅胶 G 柱层析法纯化 ST 时,看到了多条色带。经手提式紫外灯照射观察及洗脱组份的 HPLC 和 TLC 分析,确定在现有层析条件下 ST 位于第二条主色带中。经收集、浓缩、反复重结晶后的 ST 为淡黄色针状晶体。该晶体的熔点为 $245\sim 246^\circ\text{C}$,与文献[11]报道的 ST 熔点值(246°C)基本一致。元素分析表明该晶体含碳为 67.5%,含氢为 4.74%,与理论计算值(66.7%,3.74%)基本一致。与 Steyn 等^[12]介绍的 ST 提纯方法相比较,用硅胶 G 取代纤维素粉,不必进行复杂的预处理就可以应用;而用石油醚取代正己烷,在不影响分离效果的情况下更经济。TLC 鉴定时,ST 在现有设定条件下的 R_f 值为 0.68 (硅胶 H 板) 或 0.50 (硅胶 G 板)。未喷 AlCl_3 -乙醇液前,ST

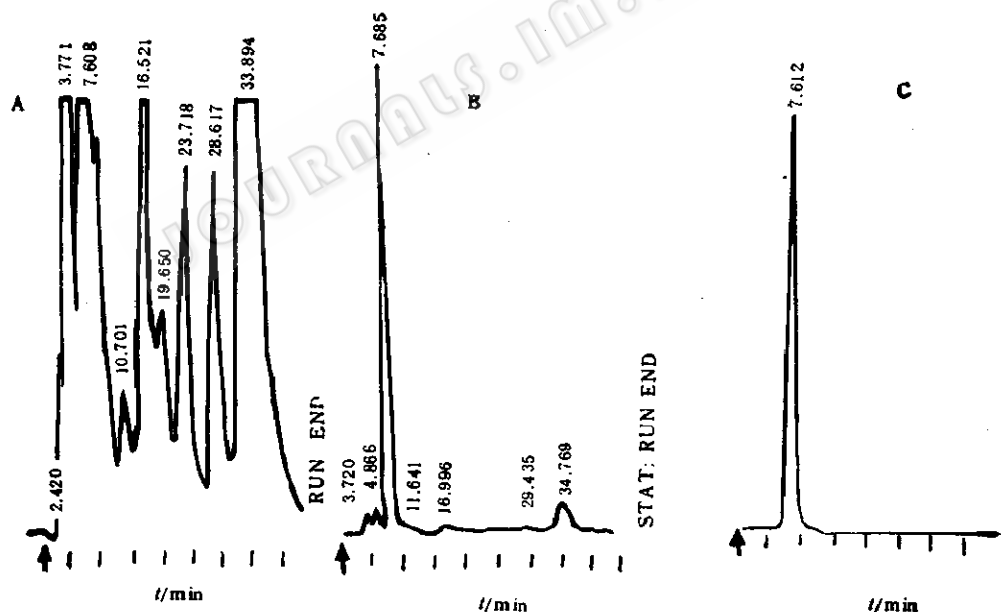


图 1 ST 三氯甲烷粗提物 (A)、柱层析纯化后 (B) 及重结晶四次后样品 (C) 的 HPLC 分析图谱

注: 仪器条件见正文, 此时 ST 的 R_t 值为 7.6 min 左右, 其余为杂质峰。↑ 指示进样起点。
Fig. 1 Chromatograms of crude sterigmatocystin samples (A), samples posterior to column chromatographic purification (B), or samples after recrystallization in methanol, acetonitrile, acetone and diethyl ether (C) recorded during HPLC analysis. Operation conditions are described in the text. The R_t value of ST is ca. 7.6 min.

在紫外光下显砖红色荧光, 而经 $AlCl_3$ 衍生化后则显亮黄绿色荧光。经硅胶 G 柱层析一次纯化的组份中有多个荧光点, 而经多次重结晶后只剩下一下荧光点。

HPLC 鉴定时, ST 在现有设定条件下的保留时间 R_t 值为 7.6 ± 0.1 min (图 1-C), 过硅胶 G 柱而未重结晶前的样品中还含有少量杂物, 可以从 R_t 值 7.6 min 以外的紫外吸收峰中看出 (图 1-B), 重结晶数次后, 纯度逐步提高, 最后达 99.9% 以上。

ST 在不同溶剂中的紫外吸收峰差异较大 (图 2)。乙醇中的紫外吸收峰与文献报道^[11] 完全一致, 除 325 nm 处的吸收峰, 还有 246, 233, 205 nm 三个吸收峰。在其它溶剂中的紫外吸收光谱以前未见文献报道过。ST 溶于苯时, 除了 320 nm 处的最大吸收峰, 还可见到 238 nm 处的反向吸收峰。而溶于乙腈时除了 320 nm 处的最大吸收峰, 还有 230 nm 和 205 nm 两个吸收峰。

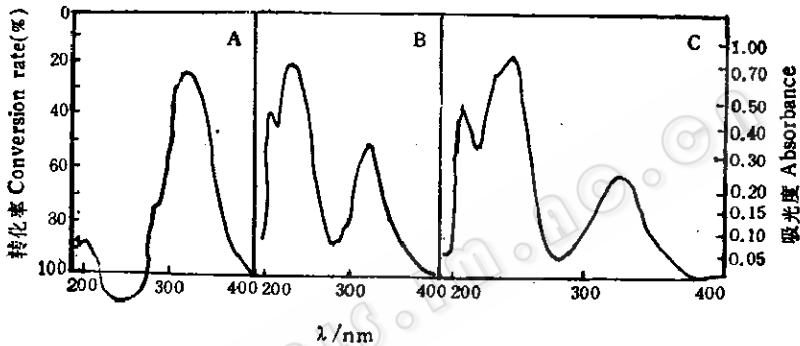


图 2 ST 溶于苯 (A)、乙腈 (B)、乙醇 (C) 时的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV spectra of sterigmatocystin in benzene (A), acetonitrile (B) and methanol (C)

ST 的红外吸收光谱见图 3, 其特征吸收波长或波数与文献报道^[11,13] 一致, 为 3470、3340、3090、1650、1630、1590、1485、1460、1410、1360、1305、1275、1230、1200、1126、1092、

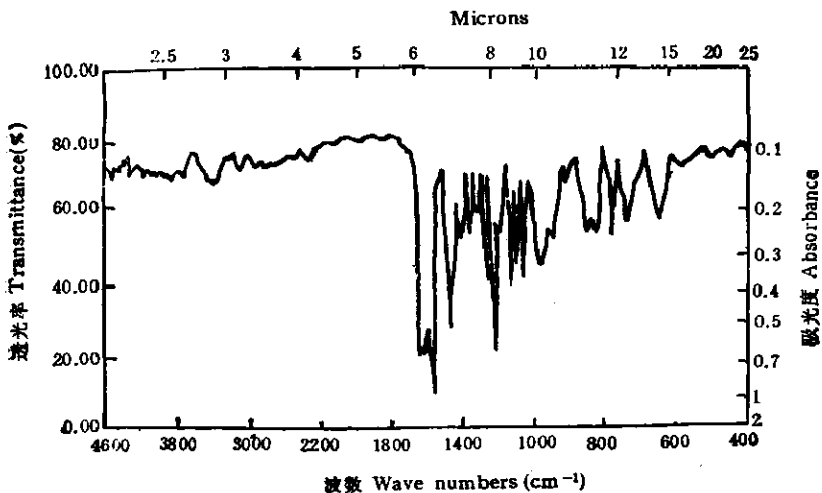


图 3 ST 的红外吸收光谱

Fig. 3 IR spectrum of sterigmatocystin

1062、974、950、900、844、824、775、730 和 640 cm^{-1} 。

ST 的 ^1H NMR 谱与文献报道^[11]一致。由其化学位移和积分面积推算出的质子数目和质子所处化学环境与 ST 的结构式一致。

ST 的质谱 (MS) 图谱见图 4, 主要离子峰 324, 306, 295, 265 等与理论分析值一致。

上述所有分析数据表明我们得到了纯度达 99.9% 以上的 ST, 可供进一步研究之用。

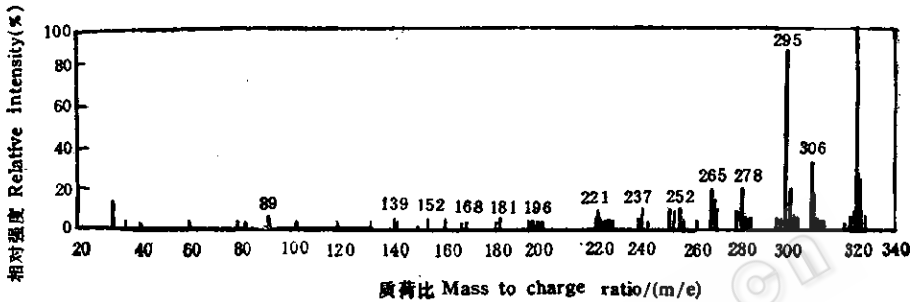


图 4 ST 的质谱分析图谱

Fig. 4. MS spectrum of sterigmatocystin

参 考 文 献

- [1] Adamson R. H. *Cancer Detect Prev.* 1989; 14 (2): 215.
- [2] 严瑞琪, 宋圆菊. 见: 孟昭赫等主编. 真菌毒素研究进展. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1979. 85.
- [3] Kiyoshi Terao. *J Toxicol. Toxin Reviews*, 1983; 2(1):77.
- [4] 谢同欣, 王凤荣, 谭少波, 等. 中华肿瘤杂志, 1990, 12(1): 21.
- [5] Vesonder R F, Horn B W. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49 (1):234.
- [6] 赵从中, 王景琳, 蔡芸, 等. 中国兽医科技, 1985, 11: 21.
- [7] Jia zhenzhen. A Review of the Study on Fungi and Mycotoxins in Food Stuffs in Beijing During the Last 10 Years. In: Natori S et al. Eds. *Mycotoxins and Phycotoxins* 88. Amsterdam: Elsevier, 1989. 135.
- [8] Kumar S R, Sinha A K. *India J Sci Food Agric*, 1991, 56:39.
- [9] 楼建龙, 孟昭赫. 卫生研究, 1993, 22(5): 299.
- [10] 中华人民共和国国家标准 GB5009. 25~85. 食品中杂色曲霉素的测定方法. 见: 食品卫生检验方法 (理化部分). 北京: 中国标准出版社, 1986. 95.
- [11] Richard J C, Richard HC. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. 1st edition. New York: Academic Press IHC, 1981. 67.
- [12] Steyn M, Rabic C J. *J Assoc Off Anal Chem.* 1975, 58 (3):622.
- [13] Udagawa S, Muroi T, Kurata H. *Can J Microbiol*, 1979, 25 (2):170.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF STERIGMATOCYSTIN*

Lou Jianlong Wang Yuefang Wang Diansheng Meng Zhaohe

(*Institute of nutrition and food hygiene, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050*)

Abstract Two strains of *Aspergillus versicolor* producing ST at $550.8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ substrate and $1160.8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ substrate were selected to inoculate 4 kg solid ST-producing media. After 35 days stationary incubation at 28°C in the dark, 2271.6mg of pale-yellow needle-shaped crystals were isolated and purified from the culture with a procedure applying column chromatography and recrystallization method. The crystal was proved to be sterigmatocystin by spectroanalysis and some physico-chemical analysis. The purity of the final material obtained were more than 99.9% as shown by HPLC and TLC detection. With this procedure, ST was obtained at about one tenth of its commercial cost.

Key words *Aspergillus versicolor*, Sterigmatocystin

* The Project Supported by National Natural Science Foundation of China.