



黄曲霉毒素 B₁ 的提取与纯化*

陈振元 黄祥贤 梁 萍 陆善新 芮传新

(启东肝癌防治研究所,江苏)

我们从霉玉米中分离出产黄曲霉毒素 B₁ (以下简称 AFTB₁) 能力强的黄曲霉 (*Aspergillus flavus* Q₂₋₃), 以玉米为培养基进行大量培养后, 由培养物中提取出 AFTB₁ 结晶。结晶纯度与国外同类产品相同。本文报告提取与纯化方法和检测方法。

一、毒素的提取

1. 产毒菌株的培养

以黄曲霉 Q₂₋₃ 菌种接种于花生-Czapek 培养基平板上, 28℃ 恒温培养 5 天。取平板上的单菌落接种同成分的斜面培养基, 28℃ 培养 5—7 天后, 斜面上布满黄绿色菌丝、菌丝上略生孢子时, 用无菌水制成孢子悬液, 接种入装有玉米粉的 1000 ml 克氏瓶内 (瓶中装 50 g 干玉米粉, 15 磅 30 min 灭菌), 再加入 25 ml 无菌蒸馏水, 搅匀, 铺成斜面, 置 28℃ 培养 5—7 天。此时用薄层层析法检测, AFTB₁ 含量应稳定在 10⁶—2 × 10⁶ ppb。

2. 毒素的萃取

将培养好黄曲霉的克氏瓶, 以 100℃ 蒸汽灭菌 15 分钟, 小心打开棉塞, 加少量氯仿湿润培养物后倒入萃取桶内, 加氯仿静置浸泡过夜, 次日进行萃取。收集萃取液, 用铺有无水硫酸钠的 5 号砂芯玻璃漏斗过滤。滤液在水浴上于氮气流下蒸发浓缩, 回收氯仿。用少量氯仿溶解固体混合物, 用 5 号砂芯玻璃漏斗过滤。滤液再用前法浓缩至一定体积, 加适量石油醚 (b. P 60°—90°), 边加边搅, 得淡黄色絮状沉淀, 置冰箱过夜, 用 4 号砂芯玻璃漏斗过滤, 收集沉淀物, 低温干燥即得 AFTB₁ 粗制品。

110℃ 活化 2 h 后, 以氯仿为介质, 湿法装柱 (直径 25 mm, 长 700 mm)。将 AFTB₁ 粗制品 2 g 溶于适量氯仿, 用滴管小心滴加在硅胶柱上端, 待液面与硅胶面平齐时, 迅速加入用 10—20 ml 无水乙醚调成的硅胶糊状物, 然后用无水乙醚洗脱, 流速为 0.5 ml/min。随时用紫外荧光检测仪检测柱中 AFTB₁ 的蓝紫色荧光点位置。待亮黄色色素由柱中流出后, AFTB₁ 靠近柱底时, 改用氯仿甲醇混合液洗脱。每收集到 40 ml 洗脱液后用薄层层析法检测一次。选取荧光集中, 纯度较高的部分合并, 置水浴上在氮气流下回收洗脱剂, 可得到 AFTB₁ 的粗结晶。

2. 分配柱层析: 经两次分配柱层析, AFTB₁ 的纯度大为提高, 即可进行结晶。

第一次的固定相为甲醇: 苯 = 20:80 (体积比), 流动相为 1.75:98.25 (体积比) 的同种溶剂, 支持剂为硅胶 (Merck H₁, 粒度小于 0.08 mm)。方法是: 将 150 g 硅胶置于干燥乳钵中, 加入其重量 80% 的固定相研磨均匀, 干法装入直径 25 mm, 长 700 mm 的层析柱内, 用橡皮锤轻敲柱体, 并通入氮气, 使柱内均匀压紧。将前述粗结晶 1 g 用少许氯仿溶解, 以滴管小心加于硅胶柱顶。待液面与硅胶面平齐时, 迅速加入由流动相溶剂调成的硅胶糊状物 10 ml, 然后以 1—1.5 ml/sec 的流速, 用流动相溶剂洗脱。收集洗脱液, 每管 10 ml。每管中取 5 μl 滴于硅胶层析板上, 用标准 AFTB₁ 作对照, 以氯仿-丙酮 (体积比 90:10) 展开, 用紫外荧光仪 (波长 365 nm) 检测。选取所含样品点与标准 AFTB₁ 点 R_f 值基本一致的各管洗脱液, 合并,

二、毒素的纯化

1. 吸附柱层析: 取 120—200 目硅胶 200 g,

* 本工作中的部分检测项目承中国医学科学院卫生研究所和肿瘤研究所, 中国科学院上海有机化学研究所、江苏农学院帮助, 特此致谢。

于水浴上,在氮气流下回收溶剂,得 AFTB₁ 粗结晶。

第二次分配柱层析的固定相为丙酮:氯仿(体积比 50:50),流动相为体积比 10:90 的同样溶剂,支持剂为 120—200 目的硅胶。方法是:取 150 g 硅胶于研钵中,加入为硅胶重量 50% 的固定相溶剂,研磨均匀,干法装入直径 25mm,长 700mm 的层析柱中,装法与第一次相同。将 AFTB₁ 粗结晶溶于少量氯仿,用滴管小心加于柱中,待液面与硅胶面平齐时,立即加上由流动相调成的硅胶糊状物约 10ml。然后用流动相溶剂洗脱,收集洗脱液,每管 10ml,用薄层层析法检测后,取 AFTB₁ 纯度高的各管合并,在水浴上于氮气流中回收溶剂,可得到 AFTB₁ 结晶。

3. 重结晶:将上述 AFTB₁ 结晶溶于少量氯仿,用 5 号砂芯玻璃漏斗过滤,收集滤液于带盖的玻璃小容器中,先在水浴上于氮气流中蒸发至器壁出现小晶体,再小心滴加石油醚或己烷,至出现混浊为止,盖紧器皿,在室温下放置过夜,待大量析出结晶,吸取母液,将结晶溶于少量氯仿中,同前法再行结晶,但在氯仿液中滴加甲醇。重复结晶操作 4—6 次。收集晶体置暗处,置氮气流中干燥后,于 78℃ 减压干燥 1 小时,即得到 AFTB₁ 纯结晶,结晶为针状,无色或淡黄色。

三、毒素提纯品的鉴定

1. 气相色谱质谱检测:用 LKB 2091 气相色谱/质谱仪。离子源温度 200℃,电子能量 70 ev,直接进样温度 100℃,电压 3.5kv。以 Makor Chemical IsracI 产品为对照。所得结果见表 1。

2. 核磁共振波谱检测:用 200 兆周核磁共振仪测定,以氘代氯仿为溶剂,所得结果见表 2。由此结果证明某确为 AFTB₁。

3. 紫外吸收光谱:以苯:乙腈(体积比 98:2)为溶剂,用 Makor Chemical IsracI 产品为对照。所得结果见图 1。

4. 纯度检测:称取 9.92 mg AFTB₁ 提取纯品 9.92 mg,溶于 1000 ml 甲醇,在 223、265、

表 1 AFTB₁ 的提取纯品与对照的质谱

质荷比 m/e	质谱峰相对强度	
	提纯品	对照
312	100	100
313	21.8	22.3
314	14.7	8.8
284	26.4	26.1
283	17.6	17.3
269	11.8	11.9
256	14.6	13.8
255	10.0	9.6
228	14.6	15.4
226	13.8	13.8
241	8.8	8.8
213	10.6	10.4

表 2 AFTB₁ 提纯品的核磁共振波谱

谱线	峰别	氢原子数	归属
2.64	多峰	2H	
3.42	多峰	2H	
4.00	单峰	3H	
4.80	多峰	1H	
5.50	三峰	1H	
6.44	单峰	1H	
6.50	三峰	1H	
6.84	二峰	1H	

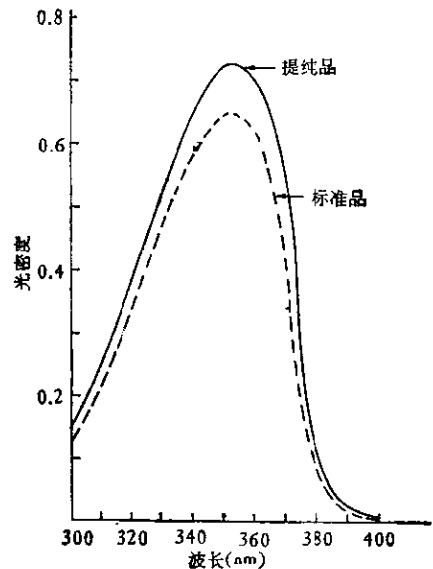


图 1 AFTB₁ 提取纯品与标准品的紫外吸收光谱

360 和 362nm 波长处测定其光密度值,并根据公式计算克分子消光系数和吸收峰比值。所得

结果见表3。

5. 薄层层析检测: 用 $10 \times 16 \text{ cm}^2$ 大小的硅胶 (Merck 产G硅胶)板,厚 0.2—0.3 mm, 用前活化 2 小时。取体积比为 98:2 的苯-乙腈为溶剂, 将毒素样品与标准品配成 $9.53 \mu\text{g/ml}$ 的溶

表3 AFTB₁ 的紫外光分子消光系数及吸收峰比值

波长 (nm)	光密度 (A)	克分子消光系数	
		测定值	文献值
223	0.700	22100	22100 ± 1600
265	0.395	12423	12400 ± 800
360	0.690	21701	21800 ± 1100
362	0.690	21701	

$A_{223}/A_{265} = 1.77$ (文献值: 1.77 ± 0.04)

$A_{362}/A_{265} = 1.75$ (文献值: 1.76 ± 0.04)

液,取 $5 \mu\text{l}$ 点样,分别用苯:甲醇:乙醇(90:5:5), 甲醇:氯仿(4:96), 丙酮:氯仿:水(12:88:1.5) 为溶剂系统进行展开, 结果如图2所示。表明确为 AFTB₁ 纯品。

6. 毒性测定: 测定对雏鸭的 LD_{50} 。用江苏邗江运西公社养殖场二日龄麻鸭 70 只,灌胃投药(10% 酒精溶液), 每只 0.4 ml。以 10% 酒

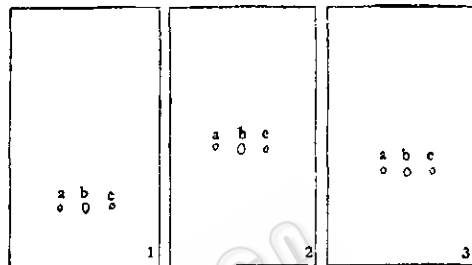


图2 AFTB₁ 在三种溶剂系统中的薄板层析谱。

展开剂: 1. 苯:甲醇:乙醇(90:5:5),

2. 甲醇:氯仿(4:96),

3. 丙酮:氯:水(12:88:1.5)。

a. 提纯品; b. 提纯品+标准品; c. 标准品

精为对照。 LD_{50} 为 0.286 mg/kg 。文献值为 $0.24—0.36 \text{ mg/kg}$ 。

参 考 文 献

- [1] Robertson, J. A. et al.: *Agri. Food Chem.*, 15: 798—801, 1967.
- [2] Stabblefield, R. D. et al.: *J. Amer. Oil Chem Soc.*, 47: 389—390, 1970.
- [3] 孟昭赫(主编): 真菌毒素研究进展, 人民卫生出版社, 北京, 1979 年, 第144—154页。
- [4] Horwitz et al. (ed.): *A. O. A. C.*, 12th ed. 1975. p. 463—465.
- [5] Joseph, V. R.: *J. A. O. A. C.*, 56: 1290—1291, 1973.