黄曲霉毒素 M_1 的提取与鉴定

陈振元 黄祥贤 陆善新 顾健平 张瑞菊 陆正宏
（启东肝癌防治研究所，江苏）

黄曲霉毒素 M_1（以下简称 AFT M_1）是黄曲霉或寄生曲霉的次生代谢产物。它具有一定的毒性和致癌性[1]。本文报道 AFT M_1 的提取与鉴别的试验结果。

材料和方法

（一）产毒素菌体的制备

取黄曲霉 Q_{101}（*Aspergillus flavus*）接种于花生粉-Czapek 培养基平板上，28℃ 培养 5 天。取单菌落接种于斜面培养基 28℃ 培养 5—7 天后，待斜面上布满黄绿色菌丝及其初生孢子，即进行扩大培养。

花生粉-Czapek 培养基的成份为（g）：$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5，KCl 0.5，NH_4Cl 1.5，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01。无毒花生粉 100g，琼脂 20g，蔗糖 30g。蒸馏水 1000ml。

（二）AFT M_1 的扩大培养

将装有 50 g 花生粉培养基的 1000 ml 克氏瓶经 1kg30 分钟灭菌。用菌悬液接种于克氏瓶内的培养基上，加 15—20ml 蒸馏水，搅匀放成斜面 28℃ 培养 5—7 天。经薄层层析法检测，其 AFT M_1 的产量为 30,000PPb，AFT B_1 产量为 2.5×10^6ppb。

（三）AFT M_1 的粗提

把克氏瓶内菌落经 100℃ 15 分钟灭菌后，用注射器注入 20ml 氯仿。然后将培养物倒入渗滤桶内，加氯仿静置浸泡过夜，次日进行渗滤，流速 300ml/h。收集滤液，用铺有无水硫酸钠的 5 号砂蕊漏斗减压过滤。滤液在水浴上于氮气流下蒸馏回收氯仿。

用少许氯仿溶解固形物，经 5 号砂蕊漏斗过滤，滤液用前法浓缩至一定体积，加适量石油醚（b.p.60—90℃），边加边搅拌得淡黄色絮状沉淀，置冰箱过夜。用 4 号砂蕊漏斗过滤，收集沉淀物。经低温干燥即得主要混有 AFT B_1 的 AFT M_1 粗品。

（四）AFT M_1 的纯化

1. 吸附柱层析：取 120—200 目硅胶 200g，110℃ 活化 2 小时后，装入直径 25mm。长 700 mm 的层析柱中，用橡皮锤轻敲柱体并通入氮气，使硅胶均匀压紧。

将 AFT M_1 粗品 2g，溶于少量氯仿并滴加在硅胶柱上端，待其液面与硅胶面平齐时，迅速加上 10—20ml 由无水乙醚调成的硅胶糊状物，再用无水乙醚淋洗，流速 30ml/h。待亮黄色的色素洗脱后，改用氯仿：乙醇（99:1，V/V）淋洗，流速 20ml/h。每管收集 10ml 液体，用薄层层析法检测。当 AFT B_1 基本洗脱下来后，再改用氯仿：乙醇（95:5，V/V）淋洗，每管收集 5ml，直至 AFT M_1 从层析柱上全部洗下。合并含有 AFT B_1 的洗脱液，在水浴上于氮气流下浓缩后进一步可获 AFT B_1 的结晶体。合并含有 AFT M_1 的洗脱液，于水浴在氮气流下浓缩至干，即得 AFT M_1 的粗制品。

2. 分配柱层析：固定相为丙酮：氯仿（50:50，V/V），流动相为丙酮：氯仿（5:95，V/V），硅胶为支持物。取经 110℃，活化 2 小时的硅胶（120—200 目）100g 置于玻璃研钵，加入 50ml 固定相，研磨均匀，装入直径 20mm、长 500mm 的层析柱中，用橡皮锤不断轻敲柱体并通入氮气。将上述 AFT M_1 粗制品溶于少许氯仿并小心滴加于硅胶柱顶，并加入由流动相液体调成的硅胶糊状物，最后用流动相液体淋洗，流速为 20ml/h，每管收集 10ml。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

当洗脱一定时间后，用紫外荧光仪（波长365nm）检测，层析柱中出现二段蓝紫色的荧光带，夹在二段荧光带之间是无荧光带。经薄层层析法检测显示：前段为 $AFTB_1$ 荧光带，后段为 $AFTM_1$ 荧光带。分别收集二段的洗脱液。

将含 $AFTM_1$ 的洗脱液在水浴上于氮气流下浓缩至一定体积，加入经 110℃ 活化 2 小时的硅胶 H(Merck，粒度小于 0.08mm) 数克，搅匀在氮气流下挥干，加入正己烷调成硅胶糊状物。

3.吸附柱层析：取活化后的硅胶 H（同上产品)装入直径 15mm，长 300mm 的层析柱中，通入氮气使硅胶均匀压紧。把含有 $AFTM_1$ 的正己烷硅胶糊状物加于柱顶。先用 200ml 正己烷淋洗，后用 200ml 正己烷：氯仿（1:1，V/V) 混合液洗脱，最后用氯仿洗脱，流速均为 10—15ml/h。每管收集氯仿洗脱液 5ml，经薄层层析法检测选取纯度高、色素少的 $AFTM_1$ 洗脱液合并，同前法浓缩至干获得 $AFTM_1$ 粗品。

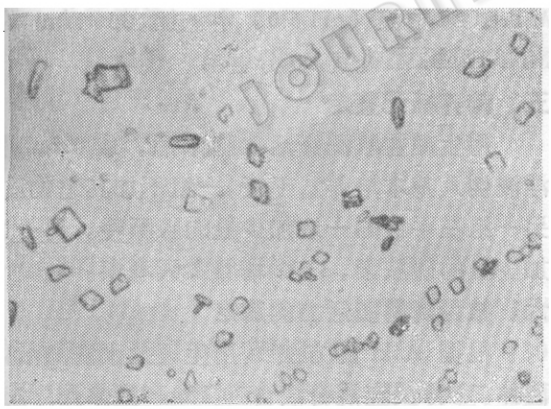

图 1　$AFTM_1$ 结晶

4.结晶：将上述粗品溶于适量氯仿，经 5 号砂蕊漏斗过滤，取滤液于带盖玻璃称量瓶中。将其浓缩至近饱和状态后，滴加分析纯乙腈，放冰箱过夜即有 $AFTM_1$ 晶体析出。经数次重结晶可获得 $AFTM_1$ 纯结晶。其结晶形状见图 1。

结　　果

（一）气相色谱/质谱检测

测试仪器为 D300 型气相色谱/质谱仪；质谱参数：离子源发射电流为 300 μA，温度 230℃，电子能量为 70ev；进样方式为直接进样，进样温度为 105℃。

结果表明在 M/e328 处出现高谱峰，其后未见其他峰。表明 M/e328 谱峰为分子离子峰，即分子量为 328。在 M/e299、271、243 处出现明显而典型的碎片谱峰。试验说明我所提取的 AFT M_1 质谱棒状图与标准 $AFTM_1$ 质谱棒状图一致[2,3]。

（二）紫外光谱检测

测试仪器为 DYE SP1800 紫外分光光度计，将适量 $AFTM_1$ 纯品，溶于甲醇测其紫外光 λnm 210—400 范围内的光密度值 A，绘出 A-λnm 紫外吸收光谱曲线。结果表明曲线具有三个吸收峰，其波长λmax分别为 λnm226、λnm265 和 λnm357，这与文献报道一致[2]。

（三）红外光谱检测

测试仪器为 557-红外分光光度计，采用 KBr 压片法。结果表明吸收峰的频率在 3420 cm^{-1}、2920cm^{-1}、1755 cm^{-1}、1630 cm^{-1}、1590 cm^{-1}，说明其分子结构中存在—OH、$-\overset{|}{\underset{|}{C}}-O$、$-\overset{|}{\underset{|}{C}}-$、$=C=O$、$-C_6H_5$ 基团。

（四）纯度检测

测试仪器为紫外荧光检测仪、硅胶薄层层析板。

取提纯品 $AFTM_1$ 样液（浓度10μg/ml)5μl，加进口 $AFTM_1$ 标准液 5μl 重叠点于硅胶薄层层析板(10×16，硅胶 G (Merck)，δ=0.2—0.3 mm)。另取提纯品 $AFTM_1$ 样液和进口 $AFTM_1$ 标准液各 5μl，分别点于同块薄层板的同一条基线上，间距 1cm。在异丙醇：丙酮：氯仿(5:10:85，V/V) 中展开，其距离为 10cm。结果表明，在紫外荧光检测仪 λnm365 紫外光下：每

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

点样处上方都只有一个蓝紫色荧光点，其 Rf 值一致；在薄层层析板点样处用三氟乙酸处理，$AFTM_1$ 的提纯物得到确证[4]。

讨　论

培养基的成份及其培养条件，对微生物产生 $AFTM_1$ 的产量影响很大，试验说明花生饼粉是产 $AFTM_1$ 最好的天然培养基。最适培养温度为 27—28℃，培养时间为 7 天。若培养温度低于 23℃，时间低于 5 天，对 $AFTM_1$ 的产量影响很大，温度低于 10℃，$AFTM_1$ 就不产生。加水量为培养基的 30—40% 为宜。在纯化 $AFTM_1$ 的过程中，硅胶吸附柱层析和分配柱层析的淋洗速度必须严格控制，过快吸附和解吸作用过程不充分，过慢影响硅胶层析效果。

参 考 文 献

[1] 居乃琥：黄曲霉毒素，轻工业出版社，北京，76—86，1980。

[2] Stubblefield, R. D. et al.: *J. Amer. oil Chem. Soc.*, 47: 389—390. 1970.

[3] Haelelon, F. et al.: *J. AOAC*. 60(1): 107—113. 1970.

[4] 孟昭赫主编：真菌毒素研究进展，人民卫生出版社，北京，109—154，1979。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn