

# 霉玉米粉中赤霉烯酮的分离、提纯和鉴定\*

张树荣 徐亚雄 达爱华

(中国科学院上海有机化学研究所,上海)

赤霉烯酮通常是镰刀菌感染麦类或玉米产生的一种类雌性激素。五十年和六十年代均有报道<sup>[1-3]</sup>。1966年 Urry 等<sup>[4]</sup>阐明了这个毒素的化学结构,并称这种毒素在已发现的霉菌毒素中唯有它损伤动物生殖器官。1973年,于上海郊区县发现猪吃了赤霉病麦后,出现外阴红肿、直肠脱出等病症<sup>[5]</sup>。从这批病麦中我们曾分离得到少量赤霉烯酮结晶。

1977年于贵州省西南部发现猪吃了霉玉米粉饲料后,外阴红肿,子宫脱垂,不长膘,且有部分死亡。我们对这批霉玉米粉进行了分离、提纯。现将结果报道如下。

## 一、粗毒素的提取

霉玉米粉大部分呈淡棕色,少部分绿色。且有部分结团成块。有刺鼻霉味。

称 1kg 霉玉米粉,加 150ml 水 (15%, W/V) 湿润,然后加乙酸乙酯 (3 × 5000ml),室温搅拌 7 小时抽提。减压蒸除溶剂,得棕色糖浆状物。再加入 250ml 氯仿溶解浆状物,并移入 500ml 分液漏斗中。用 1N NaOH (3 × 120ml) 萃取。提取液再以 60ml 氯仿洗涤二次。用 2N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调 pH7.5 再用氯仿 (3 × 150ml) 抽提,无水硫酸钠干燥,去氯仿,得赤霉烯酮粗提物 132.3mg。

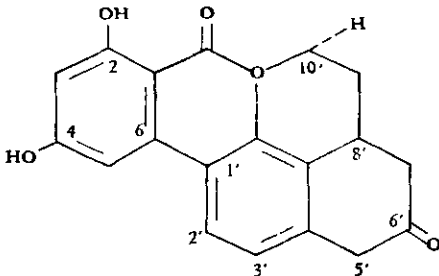


图1 赤霉烯酮的结构

## 二、薄层层析

薄层层析所用硅胶 G (浙江黄岩荧光化学厂生产)按常规方法涂板,室温下上行层析。结晶使用 6 种不同展开剂展开,其溶剂系统和 R<sub>f</sub> 值如下表:

表1 溶剂系统和层析结果

展开溶剂	溶剂比例(V/V)	R <sub>f</sub> 值
氯仿-乙醇	95:5	0.50
苯-丙酮	90:10	0.65
氯仿-异丙醇	96:4	0.61
苯-醋酸	90:10	0.61
二甲醚-乙酸乙酯-甲酸	60:30:10	0.75
石油醚-乙酸乙酯-冰醋酸	70:30:2	0.61

将展开后的硅胶板放在 254nm 紫外灯下观察,赤霉烯酮在硅胶板上出现蓝色荧光斑点。也可用 20% 硫酸喷雾硅胶板,115—120℃ 烘箱内保持 10—15 分钟,赤霉烯酮可显出柠檬黄色显色点。

## 三、毒素的纯化

我们选用柱层析和制备薄层层析纯化粗提物(硅胶由上海五四农场生产,100—354目)。用自动部分收集器定时收集洗脱液。

第一次柱层析纯化的层析柱高 70cm,内径 1.6cm。称硅胶 20g,用苯湿法装柱。以苯-丙酮洗脱,每分钟收集 10ml 洗脱液。洗脱液用氯仿-乙醇 (95:5, V/V) 液进行薄层层析,展开后,在 254nm 波长的紫外灯下观察,再用硫酸显色。合并有赤霉烯酮的洗脱液,减压蒸去溶剂,得 41.6mg 初步纯化的毒素。然后进行第二次柱层析纯化,柱高 45cm,内径 1.2cm,取 20g 硅胶苯湿法装柱。用苯-丙酮液洗脱。收集

\* 贵州省兴义县科技局提供霉玉米;陆小燕、郭翠兰参加部分工作,一并致谢。

洗脱液和鉴定的方法同前。合并洗脱液，去溶剂得 18.9mg 淡黄色糖浆状物。将此浆状物溶于少量丙酮，薄层层析展开，紫外灯下确定毒素的位置，刮下后溶于甲醇，过滤，减压蒸去溶剂，得 13.0mg 纯化的毒素。此毒素以氯仿-正己烷结晶，再用相同溶剂重结晶，最后得无色针状结晶 6mg。其中第一次上柱样品重 132.3mg，收得样品重量 126.4mg，第二次柱层析纯化样品时，上柱样品重量 41.6mg，收得样品重量 41.6mg。

#### 四、结晶毒素的鉴定

结晶溶于丙酮，用前述展开剂展开后，层析板在 254nm 处进行紫外灯观察。样品的显色点以 20%  $H_2SO_4$  喷板，只有一个柠檬黄色显色点，因此可认为所得结晶为纯品。

用 Kofler 熔点测定器测其熔点为 163.5—164.5℃。重结晶样品熔点为 164—165℃。紫外吸收光谱用 751 型紫外分光光度计测定。在 236 ( $\epsilon$ 29700)、274 ( $\epsilon$ 13909)、314 ( $\epsilon$ 6020)nm 处显示出吸收峰 (乙醇)。红外光谱用 Perkin-Elmer 577 型仪器，溴化钾压片测定。在 3320、1680、1645、1616、970  $cm^{-1}$  处出现吸收峰。

MAT-112 型气-质谱联用仪测得这个化合物分子量为 318。其化合物  $m/e$ : 318 ( $M^+$ )、300、282、231、202、188、176、161、151、125、112、91、69、55、41。此化合物质谱特征性碎片  $m/e$  在 41、51、69、125、151 等由脂肪族产生。而  $m/e$  在 161、318 之间为含芳香烃环碎片。核磁共振的测定：将结晶毒素溶于  $CDCl_3$

中。用  $R_{12}$  核磁共振仪测定此毒素，证实该化合物具有下列特征性化学位移： $\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$  12.00 (1H, s, C<sup>2</sup>-OH 的氢)，7.24 (1H, s, C<sup>4</sup>-OH 的氢)，7.10 (1H, d, C<sup>1</sup> 的氢,  $J = 16Hz$ )，6.48 (1H, d, C<sup>3</sup> 和 C<sup>5</sup> 的氢,  $J = 4Hz$ )，5.74 (1H, m, C<sup>2'</sup> 的氢,  $J = 5Hz$ )，5.05 (1H, C<sup>10'</sup> 的氢, m,  $J = 4Hz$ )，1.39 (3H, d, C<sup>11'</sup> 的氢,  $J = 7Hz$ )。

上述结果均与文献报道的赤霉烯酮结果相同。

我们从 1kg 霉玉米粉饲料中，获得 6mg 的赤霉烯酮毒素结晶，该毒素含量为饲料的百万分之六。实验结果表明，贵州西南部猪群生殖器官中毒的病因，是由于猪食入霉玉米粉所致。猪中毒的症状是明显的。

贵州西南部地区及上海郊区县，都曾有过猪群生殖器官中毒症状的反映，但没有其他家禽中毒的反映，是否猪对赤霉烯酮比较敏感。至于这一毒素和人的关系，尚待研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Me Elean, B. A.: *Vet. Rec.* **64**: 539, 1952.
- [2] Stob, M. et al.: *Nature*, **196**: 1318, 1962.
- [3] Christensen, C. M., G. H. Nelson and C. J. Mirocha: *Appl. Microbiol.* **13**: 653 1965.
- [4] Urry, W. H. et al.: *Tetrahedron Letters*, 3109, 1966.
- [5] 中国科学院上海有机化学研究所，上海市粮食研究所：《有机化学》，No. 3,4,11, 1981。中国科学院上海有机化学研究所出版，上海。
- [6] Mirocha, C. J., C. M. Christensen and G. H. Nelson: *Appl. Microbiol.* **15**: 497, 1967.