

用 HPLC- MS- MS 快速分析和鉴定三尖杉植物 内生真菌发酵液中的 Brefeldin A

方美娟¹, 王建锋^{1, 3}, 赵玉芬^{1, 2}, 张永杰³, 黄耀坚³,
宋思扬³, 苏文金³

(1. 厦门大学 化学化工学院 福建省化学生物学重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 清华大学
生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084
3. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用 HPLC- MS- MS 联用技术, 分析了 C56 和 C65 两株具有抗肿瘤活性的三尖杉植物内生真菌发酵液抽提物, 首次报道了这两株真菌都能产生 Brefeldin A (BFA)。采用 ESI- MS 总离子流跟踪分析 HPLC 的洗脱液, 并用低能量的 CID- MS- MS (碰撞诱导裂解方式) 进一步确定目标离子峰为 BFA 分子离子峰, 这为植物内生真菌发酵液中的有效成分的早期鉴别奠定了基础。

关键词: 液相色谱- 质谱; 内生真菌; Brefeldin A; 抗肿瘤

中图分类号: O657. 63; Q949. 32 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2005) 01- 0021- 04

Rapid Screening and Identification of Brefeldin A from Endophytic Fungi by LC- MS- MS

FANG Mei_juan¹, WANG Jian_feng^{1, 3}, ZHAO Yu_fen^{1, 2}, ZHANG Yong_jie³,
HUANG Yao_jian³, SONG Si_yang³, SU Wen_jin³

(1. College of Chemistry and Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. The Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry, Ministry of Education, Department of Chemistry School of Life Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Brefeldin A (BFA, C₁₆H₂₄O₄, M_r 280), a naturally occurring macrolide, exhibits a diversity of biological activities, such as antibiotic, antiviral, cytostatic, antimetabolic and antitumor effects. Thus, developing a rapid method for the identification of BFA in crude microbial extracts is of urgent need. In this paper, the screening and identification of BFA from *Cephalataxus fortunei* plant in China using HPLC- MS- MS and HPLC- ESI- MS is reported.

Key words: HPLC- MS- MS; Endophytic fungi; Brefeldin A; Antitumor

布雷菲德菌素 (Brefeldin A, BFA, C₁₆H₂₄O₄, M_r 280) 也称作斜卧菌素或蓝菌素或壳二孢素, 是一种大环内酯类真菌代谢产物, 最早分离自 *Penicillium brefeldianum*, 其化学结构如图 1 所示。它具有多种生物活性, 如抗真菌、抗病毒 (抗生、抗滤过性病原体、抗有丝分裂、抑制细胞生长)、抗肿瘤等^[1]。BFA 的主要功能是能诱导高尔基体的分解, 抑制蛋白从内质网 (ER) 中转移为高尔基体的复合物 (小分子 BFA 能非竞争性地抑制蛋白), 目前被作为一种重要的分子工具广泛用于研究哺乳动物的信号传导途径的研究^[2, 3]。最近, 国际肿瘤协会在抗肿瘤体外筛选中发现 BFA 作为血疗法试剂有很大的应用前景^[4]。

液相色谱- 电喷雾离子化质谱法 (LC- ESI/MS- MS) 是近年来出现的一种新型分离分析联用技术, 能准确测定相对分子质量, 特别是对微量混合物样品的分离分析具有独特的优势, 现已广泛应用于化学、生物学、医药药学等多个领域^[5- 7]。

Wang 等采用了 X_{ray} 单晶衍射、TLC、核磁共振等方法确认了两株分别分离自南方红豆杉和香榧中的内生真菌能够产生 BFA, 推测 BFA 是这两株真菌的主要抗肿瘤活性物质^[8]。鉴于 BFA 具有多

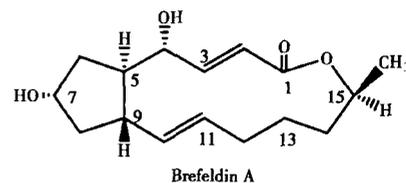


图 1 布雷菲德菌素 A 的化学结构
Fig 1 Chemical structure of Brefeldin A

收稿日期: 2003- 12- 19; 修回日期: 2004- 10- 15

基金项目: 福建省科技基金资助项目 (2001F008); 福建省重点科技基金资助项目 (2002H011)

作者简介: 方美娟 (1979-), 女, 浙江义乌人, 博士研究生; 赵玉芬, 联系人, Tel: 0592- 2185780, E- mail: yfzhao@xmu.edu.cn

种生物活性及潜在的药用价值^[9, 10], 而国内对该化合物的研究甚少, 为了能快速分析目标菌株中是否含 BFA, 我们采用 HPLC-MS-MS 对分离自三尖杉的 2 株具有抗肿瘤活性的内生真菌的发酵液抽提物进行了研究。实验发现菌株抽提物中含 BFA, 并利用低能量的 CID-MS-MS(碰撞诱导裂解方式)确认了抽提液中的目标正离子峰为 BFA 的分子离子峰。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

菌株来源: 菌株 C56 和 C65 分离自福建省梁野山自然保护区的三尖杉植物皮层细胞^[11]。肿瘤细胞株: 人白血病 HL₆₀ 细胞和人口腔上皮癌细胞 (KB), 购自中科院上海细胞所。主要试剂: 甲醇(色谱纯, Sigma), 三蒸水, 噻唑蓝 (MTT)。主要仪器: HP1100 低压四元泵 (Agilent), Esquire 3000Plus 离子阱质谱仪 (Bruker)。色谱柱: Rascil C18, AICHROM, 250×4.6 mm。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 张永杰等分离的内生真菌^[11]的菌丝块接种于球脂培养基 (PDA) 中, 25 °C、160 r/min 培养 7 d, 发酵液经冻融, 在室温下使用组织匀浆机进行匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过滤除菌(滤膜孔径 0.22 μm), -20 °C 保存备用。

1.2.2 细胞毒 MTT 法测定^[11, 12] 把培养好的 HL₆₀ 细胞和 KB 细胞用完全培养基 (RM-PI1640 基本培养液, 加胎牛血清至 15% (HL₆₀ 细胞) 或加牛血清至 10% (KB 细胞, 三抗至 1%) 制成单细胞悬浮液, 血球计数板计数, 按 48 000~50 000 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中, 置 CO₂ 培养箱中, 37 °C 培养 24 h 后加入完全培养基稀释的样品 20 μL, 继续培养 72 h 后取出, 加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液(溶于磷酸盐缓冲液中) 10 μL, 37 °C 反应 3 h, 加入 100 μL 的 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS)-0.01 mol/L HCl, 37 °C 过夜。用酶标仪 (M3550) 测量吸光度(测量波长 570 nm, 参考波长 655 nm), 依照下式计算抑制率为 50% 的样品所稀释的倍数为 ID₅₀。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100\%$$

1.2.3 色谱分离条件 色谱分离按二元梯度方式进行。梯度洗脱程序: 在 0~20 min 内, 流动相 A(甲醇)由 60%~100%, 流动相 B(水)由 40%~0%; 流速: 0.8 mL/min。进样量为 20 μL, 柱后流出物依次经 UV 和 MSD 检测。UV 检测波长为 230 nm, 经 UV 检测器流出的流分进入电喷雾离子化 (ESI) 喷雾室。

1.2.4 质谱检测参数 m/z 扫描范围 120.00~800.00, 干燥气温度 250 °C, 干燥气流速 8.0 L/min, 雾化气压力 40 Pa, 电喷雾电压 4 000 V, 离子化方式: ESI, 质谱扫描间隔 0.20 u。

2 结果与讨论

2.1 菌株的抗肿瘤活性测定

试验中, 两株高活性菌株 (ID₅₀> 3 000) 分离于三尖杉。其中菌株 C56 对 KB 和 HL₆₀ 的 ID₅₀ 分别 3 200、6 250。菌株 C65 对上述两种细胞的 ID₅₀ 分别是 3 600、7 290, 均有很高的细胞毒活性。经初步鉴定, 两株菌株均为拟青霉属真菌 (*Paecilomyces* sp.), 形态较为特殊, 具有较高的深入研究价值, 其活性成分的分离鉴定工作正在进行中。

2.2 菌株抽提物 HPLC 结果分析

由于 C56、C65 菌株活性相对较高, 怀疑其发酵液中含 BFA, 因此采用 HPLC-UV 对菌株做了的分析。实验发现在相同的条件下菌株抽提物的 HPLC 色谱图(图 2) 中的 BFA 的保留时间和标样 BFA 色谱图的保留时间一致(均为 9.1 min), 结果重现性好。根据加入标准验证(图 2c), 说明抽提物中可能含 BFA。

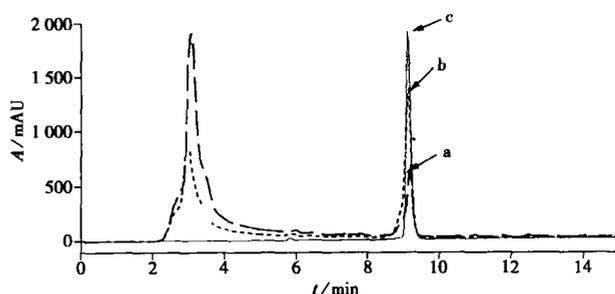


图 2 HPLC 测定 C56 的发酵液

Fig. 2 Determination of C56 fermentative solution with HPLC
a. chromatogram of 20 μL BFA standard; b. chromatogram of 20 μL C56; c. chromatogram of 10 μL BFA+ 10 μL C56

2.3 菌株抽提物总离子流图和质谱图分析

为了进一步确证 BFA 的存在, 采用 HPLC- MS 联用技术对菌株的发酵液进行相对分子质量跟踪实验。图 3 为 C56 总离子流图。实验发现, 取 BFA 保留时间作质谱分析时, 样品和 BFA 具有相同的质谱图。图 4 是菌株 C56 在采用 HPLC- MS 联用技术时, 保留时间为 634 s 时的质谱图, 图中显示了 BFA 的几种准分子离子峰 ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+K]^+$) 和自身二聚的特征离子峰 ($[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$, $[2M+K]^+$) (见表 1)。

2.4 菌株抽提物中目标离子峰 m/z 281 的 CID- MS- MS

为了进一步探讨 m/z 281 的正离子峰为 BFA, 实验中对该目标离子峰进行了 CID- MS- MS 谱的测定。图 5 表示了准分子离子 m/z 281 ($[M+H]^+$) 的 CID- MS- MS 的质谱图 (CID 谱的碰撞气体为 He)。由 BFA 的化学结构式可知 BFA 中存在 2 个羟基 (4 位, 7 位) 和 1 个酯基 (1 位), 这使得 BFA 极易相继失去 3 分子的水开环或再失去两分子水并相继失去一分子乙醇开环。通过样品中的 m/z 281 正离子峰的 CID- MS- MS 裂解和 BFA 的准分子离子峰 m/z 281 CID- MS- MS 的裂解做比较, 可确切地证实未知物是否为 BFA。图 5 中存在相关的特征碎片离子峰为: 由准分子离子直接失去 1 分子水 (4 位或 7 位) 得到的正离子 $[M+H-H_2O]^+$ (m/z 263.0), 准分子离子失去 2 分子水得到的正离子 $[M+H-2H_2O]^+$ (m/z 245.0) 及其相继失去一个乙醇分子的正离子 $[M+H-2H_2O-C_2H_5OH]^+$ (m/z 199.0), 准分子离子直接失去 3 分子水得到的正离子 $[M+H-3H_2O]^+$ (m/z 226.9), 另外还有一些其他碎片离子峰。上述结果进一步证明了 BFA 存在于菌株 C56 的天然提取物中, 同样可证明 C65 中也含有 BFA。

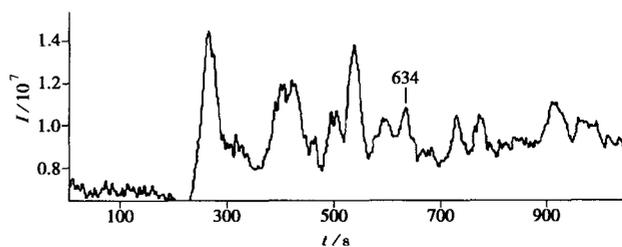


图 3 C56 的总离子流色谱图

Fig. 3 The total ion chromatogram of C56

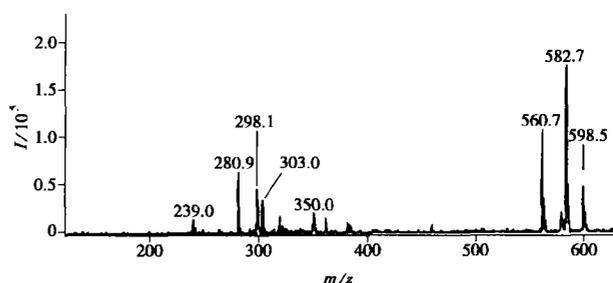


图 4 C56 在保留时间 634 s 时的质谱图

Fig. 4 The mass spectrum of C56 at a retention time of 634 s

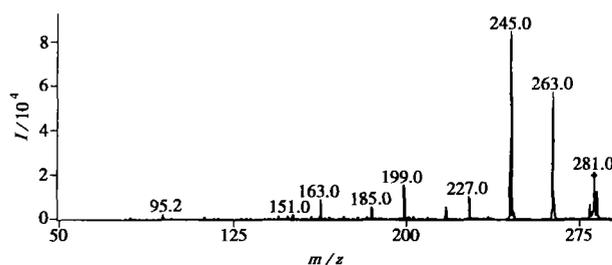


图 5 C56 中分子离子峰 m/z 281 的 CID- MS- MS

Fig. 5 The CID- MS- MS of molecular ion peak (m/z 281) of C56

表 1 图 4 的离子峰对应离子表

Table 1 Ions corresponded to the m/z values of ion peaks in Fig. 4

| m/z | 280.9 | 298.1 | 303.0 | 319.0 | 560.7 | 582.7 | 598.5 |
|-------|-----------|--------------|------------|-----------|------------|-------------|------------|
| Ion | $[M+H]^+$ | $[M+NH_4]^+$ | $[M+Na]^+$ | $[M+K]^+$ | $[2M+H]^+$ | $[2M+Na]^+$ | $[2M+K]^+$ |

3 讨论

链格孢属 (*Alternara*)、子囊菌属 (*Ascochyta*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯孢属 (*Curularia*)、尾孢属 (*Cercospora*)、叶点霉属 (*Phyllosticta*)、拟青霉 (*Paecilomyces sp.*) 和棒曲霉 (*Aspergillus clavatus*) 等真菌可产生 BFA。本工作用 HPLC、MS- MS 和 HPLC- MS- MS 等技术直接进行分析确认 2 株分离自三尖杉的内生真菌中存在 BFA, 目前, 对这两株的其他代谢产物的研究正在进行中。HPLC- MS- MS 联用技术比传统的植化系统分离手段 (提取、TLC、硅胶柱、活性检测、结晶、X 衍射、核磁、红外等等) 进行筛选

BFA 的研究方法简捷, 成功率会更高。该分离分析方法也适用于其他已知活性物质的筛选, 具有广泛的应用性并对未知活性物质开发也具有较好的引导作用。

参考文献:

- [1] PHILLIPS L, WOLF T, MALSPEIS L, *et al.* Analysis of brefeldin A and the prodnug breflate in plasma by gas chromatography with mass selective detection[J]. J Pham Biomed Anal, 1998, 16: 1301– 1309.
- [2] FUKUNAGA T, FURUNO A, HATSUZAWA K, *et al.* NSF is required for the brefeldin A-promoted disassembly of the Golgi apparatus[J]. FEBS Letters, 1998, 435: 237– 240.
- [3] PELHAM H. Multiple targets for brefeldin A[J]. Cell, 1991, 67: 449– 451.
- [4] NOJIRI H, MANYA H, ISONO H, *et al.* Induction of terminal differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cells by brefeldin A, a drug affecting fanfloside biosynthesis[J]. FEBS Letters, 1999, 453: 140– 144.
- [5] DILLEN L, LIANG F, DONGEN W. Isolation and mass spectrometric characterization of an oxidized form of vasodatin I, an N-terminal chromogranin A-derived protein, from bovine chromaffin cells[J]. J Mass Spectrum, 1995, 30: 1599.
- [6] 郭继芬, 魏淑香, 乔善义, 等. 液相色谱-串联质谱法测定猴血浆中纳曲酮及其代谢物纳曲醇浓度[J]. 分析测试学报, 2003, 22(5): 39– 40.
- [7] 王洪允, 高士宏, 江 骥, 等. 液相色谱串联质谱法测定人血浆、尿中的 L_苏糖酸[J]. 分析测试学报, 2003, 22(5): 43– 44.
- [8] WANG J, HUANG Y, FABG M, *et al.* Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces sp.* And *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2002, 34: 51– 57.
- [9] ZHU J, NAGASAWA H, NAGURA F, *et al.* Elucidation of structural requirements of brefeldin A as an inducer of differentiation and apoptosis[J]. Biorg Med Chem, 2000, 8: 455– 463.
- [10] WANG J, LI G, LU H, *et al.* Taxol from *Tubercularia sp.* Strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*[J]. FEMS Microbiology Letter, 2000, 193: 249– 253.
- [11] 张永杰, 王建锋, 黄耀坚, 等. 4 种裸子植物内生真菌抗肿瘤菌株的筛选[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(6): 804– 809.
- [12] MOSMANN F. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55– 63.

(上接第 20 页)

4 结 论

小波变换能够用于柴油短波近红外光谱数据压缩, 存储空间为原来的 1/ 8, 且不丢失谱图基本信息。直接利用小波逼近系数(c_{a3})作为分析变量, 建立柴油性质分析模型, 可以提高建模速度和分析速度, 简化建模工作, 而且不降低分析精度。

参考文献:

- [1] 陆婉珍, 袁洪福, 徐广通, 等. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京: 中国石化出版社, 2000. 193– 249.
- [2] 袁洪福, 陆婉珍. 近红外光谱分析技术正在快速进入石油化工领域[J]. 石油炼制与化工, 1998, 29(9): 47– 50.
- [3] 许 雷, 张恒义, 郑筱祥. 基于分形及正交小波变换的眼底图像快速压缩新方法[J]. 系统工程与电子技术, 1998, 20(11): 68– 73.
- [4] 李宪优, 蒲明辉. 小波变换实现地震信号的滤波去噪与压缩[J]. 现代电子技术, 1999, (3): 8– 10.
- [5] 秦 侠, 沈兰荪. 小波分析及其在光谱分析中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(6): 892– 896.
- [6] 章文军, 许 禄, 刘胜雄. 小波变换方法的比较——红外光谱数据压缩[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20(4): 534– 538.
- [7] TRYGG J, WOLD S. PLS regression on wavelet compressed NIR spectra[J]. Chemom Intell Lab Sys, 1998, 42(1– 2): 209– 220.
- [8] TRYGG J. 2D wavelet analysis and compression of on-line industrial process data[J]. 2001, 15(4): 299– 319.
- [9] MALLAT S G. A theory for multiresolution signal decomposition: The wavelet representation[J]. IEEE Trans on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1989, 11(7): 674– 693.
- [10] MALLAT S G. Multifrequency channel decomposition of images and wavelet models[J]. IEEE Trans Acoust Speech Signal Process, 1989, 37(12): 2091– 2110.
- [11] KENNARD R W, STONE L A. Computer aided design of experiments[J]. Technometrics, 1969, (11): 137– 148.
- [12] 徐广通, 袁洪福, 陆婉珍. CCD 近红外光谱谱图预处理方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(5): 619– 622.