

一株蛹拟青霉(*Paecilomyces militaris*)深层发酵产物中抗肿瘤活性物质分析

陆瑞利¹, 胡丰林^{2*}, 黄勃², 李春如², 李增智^{2*}

(安徽农业大学¹理学院应用化学系,²安徽省微生物防治重点实验室,合肥 230036)

摘要 【目的】分析蛹拟青霉(*Paecilomyces militaris*)菌株 RCEF0927 发酵液中的抗中国仓鼠卵巢瘤(CHO)细胞活性及活性成分的具体组成。【方法】用刃天青(Resazurin)法测定样品对 CHO 细胞的抑制率;用高效液相色谱-高分辨质谱和活性测定联用的方法进行活性成分分析和鉴定。【结果】活性测定结果表明菌株 RCEF0927 的发酵液具有较强的抗 CHO 细胞活性,提取实验结果表明抗肿瘤活性物质能较好地被乙酸乙酯提取出来;液相色谱-质谱-活性测定分析表明提取物中活性组分的可能分子式分别为 $C_{10}H_{13}N_5O_3$ 、 $C_{22}H_{22}O_9$ 、 $C_{23}H_{24}O_{10}$ 、 $C_{22}H_{22}O_{10}$ 、 $C_{15}H_{10}O_4$ 、 $C_{15}H_{10}O_5$ 、 $C_{36}H_{70}O_{11}$ 、 $C_{36}H_{68}O_{12}$ 、 $C_{38}H_{74}O_{11}$ 、 $C_{40}H_{76}O_{13}$ 和 $C_{44}H_{82}O_{14}$ 。【结论】根据细胞毒性、色谱特性、紫外光谱特征和质谱碎片,可初步推断发酵物中抗肿瘤活性成分分别为虫草素、4'-羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙、6-甲氧基-4'-羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙、5',7'-二羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙、7',4'-二羟基异黄酮、5',7',4'-三羟基异黄酮、油酸酯聚氧乙烯醚、聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯脱水化合物、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯,以及含聚氧丙烯或聚氧丁烯结构单元的聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯衍生物等化合物。上述化合物对 CHO 细胞的毒性为首次发现。

关键词: 蛹拟青霉(*Paecilomyces militaris*)、抗肿瘤、成分、液质联用分析、中国仓鼠卵巢瘤(CHO)细胞

中图分类号: Q939.93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)10-1332-09

恶性肿瘤是目前世界上死亡率仅次于心血管系统疾病的第二大疾病,因此有关抗肿瘤活性物质的研究一直是世界研究热点之一^[1-3]。在一次对虫生真菌代谢物进行大规模的抗肿瘤活性物质体外筛选中,发现一株蛹拟青霉(RCEF0927)提取物有较强的抑制中国仓鼠卵巢瘤细胞(CHO)活性。为得到较多的供试样品,以备进一步的活性成分分析、制备、体外试验及将来的产品开发,本研究进行了中试规模的深层发酵,并对中试发酵的发酵液进行了活性测定和活性组分的组成分析。虽然本研究的前期已对蛹拟青霉(菌株 RCEF0718)提取物的抗肝肿瘤 Bel-7402 细胞、抗口腔癌 KB 细胞和抗结肠癌 HCT-08 细

胞的活性进行了研究报道^[4],但就蛹拟青霉发酵产物对 CHO 细胞的毒性及活性成分的组成都未进行系统研究。本研究将在确认发酵罐深层发酵的产物具有 CHO 细胞毒性的基础上,进一步搞清发酵产物中活性成分的组成和结构,该研究将对抗肿瘤活性物质的开发和工业化发酵生产具有一定的指导意义,同时也为昆虫病原真菌化学生态学积累一定的科学数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源: 蛹拟青霉 *Paecilomyces militaris*(菌

株号为 RCEF0927),由安徽农业大学虫生真菌研究中心提供。

1.1.2 培养基:菌株固体斜面培养基(g/L):葡萄糖 40、蛋白胨 10、酵母浸出粉 10 和琼脂 20。液体摇瓶培养基(g/L):葡萄糖 20、黄豆粉 30、蛋白胨 10 和酵母浸出粉 10。发酵罐培养基(g/L):葡萄糖 20、黄豆粉 30、蛋白胨 10、酵母浸出粉 10 和消泡剂 2。细胞培养基:DMEM/F₁₂ 培养基(含 10% 小牛血清以及 100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)。

1.1.3 发酵及处理:摇瓶发酵及处理:500 mL 三角瓶装 200 mL 培养液,25℃、180 r/min 培养 12 d 后分离出发酵液,浓缩至原体积的 1/5 后加入两倍体积的 95% 乙醇进行醇沉处理,取上清液进行浓缩脱醇,然后进行冷冻干燥处理备用。发酵罐发酵及处理:采用 30/300 L 自动发酵罐进行发酵。种子罐初始装液量 20 L,接种量 5%,通气量 1:1(V/V),压力 0.1 MPa,以消泡剂进行消泡,25℃ 恒温通气培养 3 d 后压入 300 L 发酵罐发酵 7 d。发酵罐的初始装液量为 150 L,其它发酵条件同种子罐。出罐后先用管式离心机分离菌丝和发酵液。菌丝冷冻干燥备用。发酵液经微滤膜粗滤后,用反渗透膜初步浓缩后用 50 L 旋转蒸发仪真空浓缩,最后冻干备用。

1.1.4 仪器和试剂:恒温震荡培养箱,哈尔滨市联电子技术开发有限公司;2K-15 超速离心机为 Sigma 公司产品;Spectra Max M2 酶标仪,购自美国 Molecular Device 公司;FreeZone12 冷冻干燥系统,购自美国 Labconco 公司;离心真空浓缩仪,为德国 Christ 公司产品;高分辨液质联用分析仪(6210 Time of flight LC/MS),包括 Agilent 1100 高效液相色谱(HPLC)二极管阵列检测器(DAD)、高分辨飞行时间质谱仪(HRTOF)和电喷雾离子源(ESI),购于美国 Agilent 公司;分析柱有:Waters C18 反相柱,规格为 250×4.6 mm 5 μm,填料为 ODS2;分析纯乙酸乙酯购自安徽淮南化学试剂厂;分析纯石油醚为上海化学试剂有限公司产品;分析纯甲醇为上海一试剂有限公司产品;色谱纯甲醇购自美国 Tedia 公司。

1.2 活性测定

用 CHO Cytotoxicity Assay 模型。细胞的亚培养:CHO 细胞经 0.25% 胰酶消化后加新鲜培养液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞生长到对数分裂期,将细胞从培养瓶中转移到 96 孔板中培养。96 孔板种子细胞的培养:以每孔 2.0×10⁴ 个细胞接种

于 96 孔细胞培养板中,每孔体积 100 μL,同时留出 3 个空白孔(不加细胞),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。样品与细胞共培养:细胞在 96 孔板中培养 24 h 且贴壁后,用移液器吸出旧的培养液,然后每孔加 90 μL 新鲜培养液和 10 μL 经 0.22 μm 膜过滤的 12.5% DMSO 溶解的样品,同时设 100% 对照组(加不含细胞的培养液)、0% 对照组(加无样品的 12.5% DMSO 溶液),每组设 3 个重复,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。酶标仪检测:细胞加样品共培养 72 h 后,每孔加 20 μL 0.05% Resazurin,于培养箱中作用 2 h,用酶标仪检测荧光强度 Fluorescence,激发波长 530 nm,发射波长 590 nm。

细胞毒性计算:

$$\text{Cytotoxicity}\% = [1 - (\text{FLU}_{\text{sample}} - \text{FLU}_{100\%}) / (\text{FLU}_{0\%} - \text{FLU}_{100\%})] \times 100$$

在确认发酵液具有 CHO 细胞毒活性的基础上进行不同提取物的活性测定,确定最佳提取溶剂后进行活性组分提取和组成分析。

1.3 HPLC-MS-Cytotoxicity assay 联合分析

将活性提取物配成 20 mg/mL 的甲醇溶液(对难溶解的样品可适当添加其它试剂),进样 10 μL 进行高分辨 HPLC-DAD-MS 分析,同时按 1:4 的分流比用 1.5 mL Eppendorff 管收集分流物,每 1.0 min 收集一管,30 min 后收集于 1 个大 Eppendorff 管。重复进样 3 次。将收集的 Eppendorff 管进行离心真空干燥。干燥后每管加 20 μL 12.5% 的 DMSO 溶解,取 10 μL 用 CHO Cytotoxicity Assay 模型进行活性测定,找出活性组分。

HPLC 洗脱条件为:0~3 min 用 100% 水洗脱;3~33 min 甲醇由 0% 上升到 100%;100% 甲醇继续洗脱 12 min。洗脱速度:为 1.0 mL/min。

紫外检测条件为:200 nm 到 400 nm 全波长扫描。质谱检测条件:ESI 离子源的雾化气温度 325℃,气压为 35 Psi,氮气流速为 12 L/min;阳离子模式时离子化电压为 4000 V,碎片电压 215 V;阴离子模式时离子化电压为 3500 V,碎片电压 175 V。

2 结果和分析

2.1 发酵罐深层发酵产物的活性

将经过醇沉处理的发酵罐发酵液冻干品用 12.5% 的 DMSO 配成 250、500、1000、1500 和 2000 μg/mL 的样品溶液,取 10 μL 用 CHO Cytotoxicity

Assay 模型进行分析。结果显示发酵罐发酵液有较强的抗肿瘤细胞毒性,其对 CHO 的半致死浓度 LD_{50} 为 $47.52 \pm 2.51 \mu\text{g/mL}$ 。下面将通过活性组分的追踪来初步揭示活性物质的具体组成。

2.2 活性物质的提取

称取 9 份发酵罐发酵的冻干发酵液粉 1000 mg 左右,按 $10 \mu\text{L/mg}$ 加乙酸乙酯、甲醇和水浸提 2 次

(每种溶剂 3 个重复),第一次浸提时间为 24 h,第 2 次为 2 h。浸提前都先用 40 KHz 的超声波处理 10 分钟)将 2 次浸提物合并,离心后取上清液,用氮气初步吹干后冻干并加氩气保护备用。用 12.5% 的 DMSO 配成 800、600、400、200 和 $100 \mu\text{g/mL}$ 的样品溶液,取 $10 \mu\text{L}$ 用 CHO Cytotoxicity Assay 模型进行分析。结果见表 1。

表 1 发酵液不同溶剂提取物对 CHO 细胞的半致死浓度

Table 1 Half lethal concentration of different solvent extracts from the fermentation broth against CHO cells

Serial number	Name	Half lethal concentration (LD_{50} , $\mu\text{g/mL}$)		
		Ethylacetate	Methanol	Water
RCEF0881	<i>Paecilomyces militaris</i>	12.47 ± 2.45	54.28 ± 1.91	98.50 ± 3.97

从表 1 可看到,菌株 RCEF0927 发酵液的乙酸乙酯提取物活性最强,其次是甲醇提取物,水提物活性较弱。由此可知发酵液中的主要活性组分为中低极性的化合物,乙酸乙酯是较理想的提取剂。下面将对乙酸乙酯提取物进行活性组分分析。

2.3 RCEF0927 提取物中活性成分分析

将 20 mg/mL 乙酸乙酯提取物进样 $10 \mu\text{L}$,按前述 HPLC-MS-Cytotoxicity Assay 联合分析法进行活性组分分离和活性测定。HPLC、MS 和对 CHO 细胞抑制率的测定结果分别见图 1 和表 2。

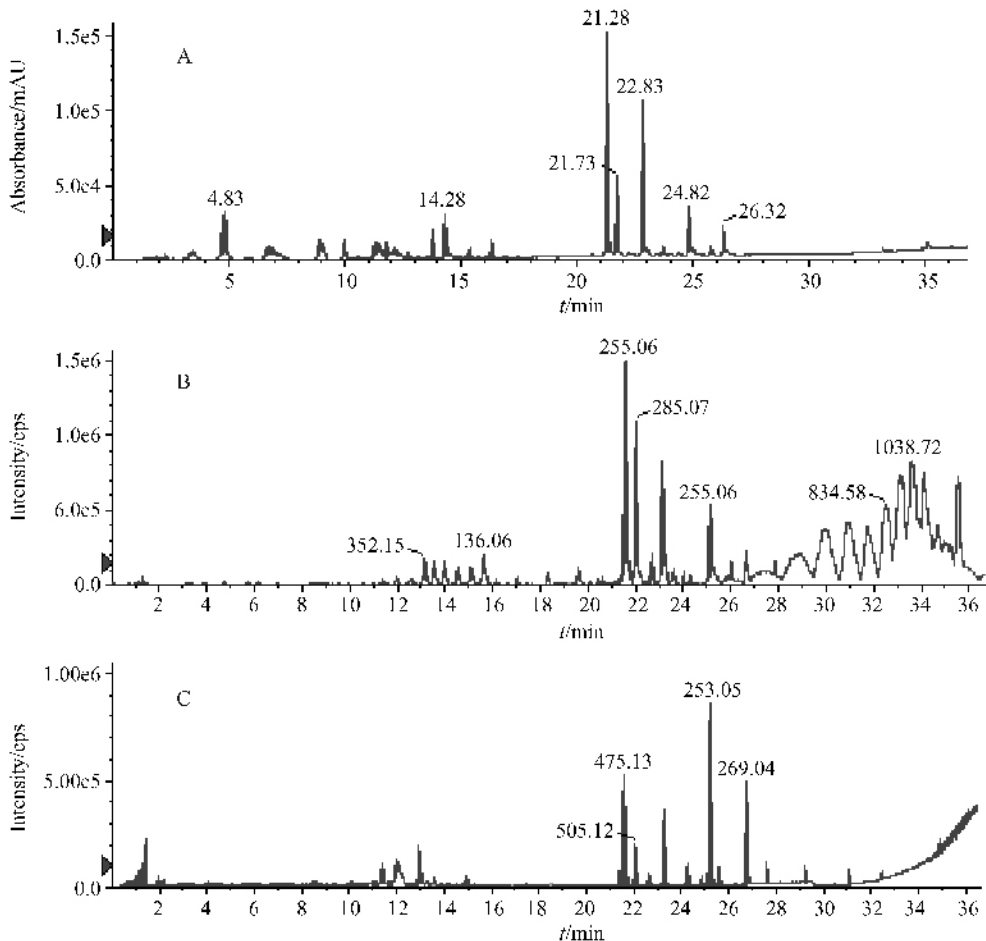


图 1 RCEF0927 发酵液乙酸乙酯提取物的图谱

Fig. 1 Chromatograms of ethylacetate extract from fermentation broth of RCEF0927. A: HPLC; B: HPLC-MS(Positive ion); C: HPLC-MS(Negative ion).

从表 2 可看到 RCEF0927 发酵液的乙酸乙酯提取物经 HPLC 分离后的流份中,第 15、18、21、22、23、25、26、27、28、29、30 和 31 号收集物都有较强的细胞毒性,其中 22 号和 31 号活性最强。比对上述活性组分对应的液相紫外吸收峰(图 1-A)、质谱阳离子流峰

(图 1-B)和阴离子流峰(图 1-C)发现,组分 15、22、23、25、27、28、29、30 和 31 号活性组分在液相或质谱图上都有较强的对应峰(注:MS 信号比 U_v 信号滞后 0.3-0.4 min,下文的保留时间都以 HPLC 的紫外色谱图为准),因此下面将对这些组分进行重点分析。

表 2 RCEF0927 发酵液乙酸乙酯提取物的 HPLC 流份细胞毒活性测定表

Table 2 Cytotoxicity of the HPLC eluates of ethylacetate extract from RCEF0927

Retention Time /min	Cytotoxicity /%	Retention time /min	Cytotoxicity /%	Retention Time /min	Cytotoxicity /%
1-14	≤ 5.0	22	77.4 ± 3.9	28	41.3 ± 2.0
15	13.1 ± 1.9	23	24.5 ± 2.1	29	33.1 ± 2.5
16-17	≤ 5.0	24	6.2 ± 1.7	30	36.0 ± 2.6
18	12.9 ± 2.3	25	26.9 ± 2.8	31	94.7 ± 4.2
19-20	≤ 5.0	26	10.6 ± 2.2		
21	9.7 ± 2.5	27	53.8 ± 1.4		

2.3.1 活性流份 15 的成分分析:流份 15 在 HPLC 上对应峰的保留时间(R_t)为 14.28 min。该峰对应的紫外图谱的 λ_{\max} 为 260 nm(图 2-A),有典型的核苷类化合物特征。对应的 MS 阳离子图谱(图 2-B)上有 252.1095 和 136.0615 两个峰,对应的离子式分别是 $C_{10}H_{14}N_5O_3^+$ 和 $C_5H_6N_5^+$ 。它们与虫草素标样的 $M + H^+$ 峰(误差 $1.51 e^{-6}$)和虫草素的碎片腺嘌呤加氢质子峰(误差 $1.98 e^{-6}$)完全一致。从质谱和紫外图谱可初步确定流份 15 中主要活性化合物为虫草素。该流份在阴离子流图上无对应峰,也与虫草素在 ESI 源中不易形成阴离子的性质一致,因此可初步确定流份 15 中的活性化合物主要成分为虫草素(Cordycepin)。

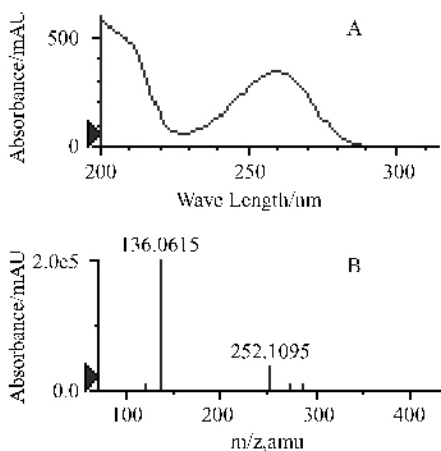


图 2 色谱峰 R_t 14.28 min 对应的紫外和阳离子质谱图谱
Fig.2 U_v and positive ion MS spectra of the peak at 14.28 min. A : Ultraviolet spectrum ; B : Positive ion MS.

2.3.2 活性流份 22 的成分分析:流份 22 在 HPLC 上对应峰有 2 个峰,其保留时间(R_t)分别为 21.28 和 21.73 min。

保留时间为 21.28 min 的色谱峰对应紫外图谱的 λ_{\max} 为 248 和 298 nm(图 3-A)。根据阳离子的质荷比(图 3-B)可计算出对应的离子是 $C_{22}H_{23}O_9^+$ (误差 $1.62 e^{-6}$)、 $C_{44}H_{44}O_{18}Na^+$ (误差 $1.64 e^{-6}$)和 $C_{15}H_{11}O_4^+$ 。从阴离子的质荷比(图 3-C)可计算出对应的阴离子为 $C_{22}H_{21}O_9^-$ (误差 $0.48 e^{-6}$)、 $C_{44}H_{43}O_{18}^-$ (误差 $1.27 e^{-6}$)和 $C_{23}H_{23}O_{11}^-$ (误差 $0.60 e^{-6}$)。根据阴阳离子式可推知 R_t 21.28 min 峰对应的分子为 $C_{22}H_{22}O_9$ 。结构单元包括 $C_{15}H_{10}O_4$ 和 $C_7H_{12}O_5$ 。比较我们先前对菌株 RCEF0927 摇瓶发酵液的成分分析结果,发现该化合物的保留时间、分子式和紫外吸收峰都和 4'-羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙完全一致^[5]。由于本次发酵用的菌种和培养基于摇瓶发酵相同,同时分析条件也一致,因此可推断 R_t 21.28 min 峰对应的化合物与已鉴定的摇瓶发酵产物是同一物质。

保留时间为 21.73 min 的色谱峰对应紫外图谱的 λ_{\max} 为 258 和 325 nm(图 3-D)。从该峰对应阳离子质荷比(图 3-E)可计算出对应的离子是 $C_{23}H_{25}O_{10}^+$ (误差为 $0.16 e^{-6}$)、 $C_{46}H_{48}O_{20}Na^+$ (误差 $1.15 e^{-6}$)和 $C_{16}H_{13}O_5^+$ (误差 $0.52 e^{-6}$)。从对应的阴离子质荷比(图 3-F)可计算出对应的离子是 $C_{23}H_{23}O_{10}^-$ (误差 $0.37 e^{-6}$)、 $C_{46}H_{47}O_{20}^-$ (误差 $2.1 e^{-6}$)和 $C_{24}H_{25}O_{12}^-$

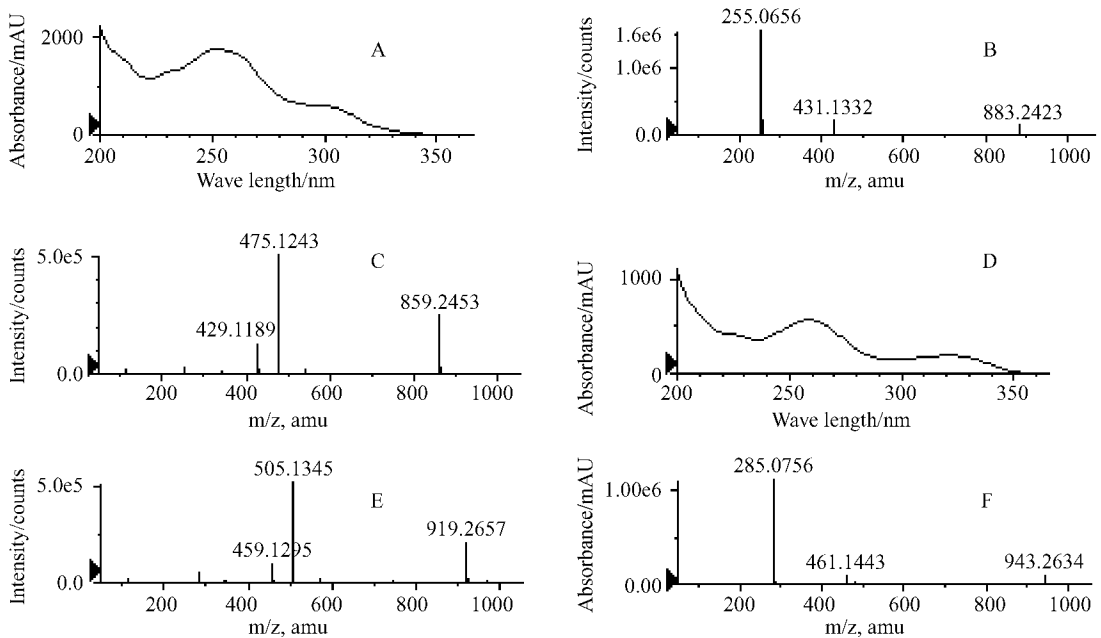


图3 色谱峰 Rt21.28 min 和 Rt21.73 min 对应的紫外和质谱图

Fig.3 Uv and MS spectra of the peak at 21.28 and 21.73 min. A : Uv of the Rt21.28 peak ; B : Positive ion MS of the Rt21.28 peak ; C : Negative ion MS of the Rt21.28 peak ; D : Uv of the Rt21.73 peak ; E : Positive ion MS of the Rt21.73 peak ; F : Negative ion MS of the Rt21.73 peak .

(误差 1.20×10^{-6})。从阴阳离子式可推知该化合物的分子式是 $C_{23}H_{24}O_{10}$,结构单元包括 $C_{16}H_{12}O_5$ 和 $C_7H_{12}O_5$ 。比较我们先前对菌株 RCEF0927 摇瓶发酵液的成分分析结果 ,发现该化合物的出峰保留时间、分子式和紫外吸收峰都与 6-甲氧基-4'-羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙完全一致^[5] ,因此可判断保留时间 21.73 min 峰对应的化合物是 6-甲氧基-4'-羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙。

虽然该活性流份对应有两个化合物 ,但这两化合物是同类物质 ,因此该流份的活性应由这 2 个化合物共同引起 ,即这两个化合物都有对 CHO 细胞的细胞毒活性。虽然上述化合物的结构已报道 ,但其对 CHO 的细胞毒活性尚属首次发现。

2.3.3 活性流份 23 的成分分析 :流份 23 在 HPLC 上对应峰的保留时间(Rt)为 22.83 min。该峰对应紫外图谱的 λ_{max} 为 258 和 325 nm(图 4-A)。从对应的阳离子质荷比(图 4-B)可计算出对应的离子是 $C_{22}H_{23}O_{10}^+$ (误差为 0.50×10^{-6})、 $C_{44}H_{44}O_{20}Na^+$ (误差 0.89×10^{-6})和 $C_{15}H_{11}O_5^+$ (误差 0.36×10^{-6})。从阴离子质荷比(图 4-C)可计算出对应的离子是 $C_{22}H_{21}O_{10}^-$ (误差 0.04×10^{-6})、 $C_{44}H_{43}O_{20}^-$ (误差 0.65×10^{-6})、 $C_{23}H_{23}O_{12}^-$ (误

差为 0.61×10^{-6})和 $C_{15}H_9O_5^-$ (误差为 0.56×10^{-6})。根据阴阳离子可推知 Rt22.83 min 峰对应的化合物分子式是 $C_{22}H_{22}O_{10}$,结构单元包括 $C_{15}H_{10}O_5$ 和 $C_7H_{12}O_5$ 。通过比对我们先前对菌株 RCEF0927 摇瓶发酵液的成分分析结果 ,发现该化合物的出峰保留时间、紫外和质谱都与 5,4'-二羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙一致^[5] ,因此可判断流份 23 中活性化合物是 5,4'-二羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙。

2.3.4 活性流份 25 的成分分析 :流份 25 对应的色谱图有一个色谱峰 ,保留时间为 24.82 min。该峰对应的紫外图谱的 λ_{max} 为 248 和 298 nm(图 4-D)。从该峰对应的阳离子质荷比(图 4-E)可计算出它对应的离子式是 $C_{15}H_{11}O_4^+$ (误差为 1.11×10^{-6})和 $C_{15}H_{10}O_4Na^+$ (误差 1.2×10^{-6})。它们应该分别是 M + H⁺ 峰和 M + Na⁺ 峰。从对应的阴离子质荷比(图 4-F)可计算出对应的离子为 $C_{15}H_9O_4^-$ (误差 0.66×10^{-6})。结合阳离子和阴离子分析 ,可推断峰 25 对应的分子式是 $C_{15}H_{10}O_4$ 。此与保留时间为 21.28 峰对应化合物 4'-羟基异黄酮-7-O-(4"-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙的苷元分子一致 ,其紫外光谱也非常相似 ,因此该化合物

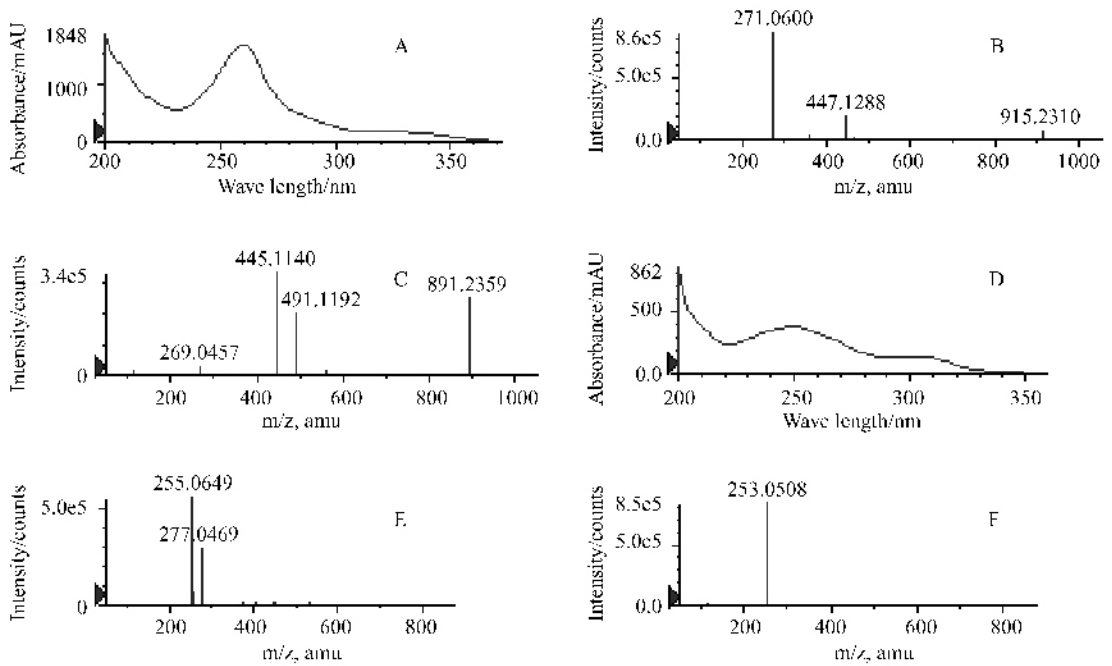


图4 色谱峰 Rt22.83 min 和 Rt24.82 min 对应的紫外和质谱图

Fig.4 Uv and MS spectra of the peak at 22.82 and 24.82 min. A : Uv of the Rt22.83 peak ; B : Positive ion MS of the Rt22.83 peak ; C : Negative ion MS of the Rt22.83 peak ; D : Uv of the Rt24.82 peak ; E : Positive ion MS of the Rt24.82 peak ; F : Negative ion MS of the Rt24.82 peak .

可能是 7,4'-二羟基异黄酮。由于苷元的极性小因此出峰较迟,这与本实验结果完全一致,进一步证明了上述推断是正确的。

2.3.5 活性流份 27 的成分分析:流份 27 对应色谱峰的 Rt 为 26.32 min,其对应的紫外图谱的 λ_{\max} 为 258 和 325 nm(图 5-A)。从该峰对应的阳离子质荷比(图 5-B)可计算出对应的离子是 $C_{15}H_{11}O_5^+$ (误差为 1.1×10^{-6})和 $C_{15}H_{10}O_5Na^+$ (误差 1.5×10^{-6})。它们应

该分别是 $M + H^+$ 峰和 $M + Na^+$ 峰。阴离子仅有质荷比为 269.0458 的峰(图 5-C),它对应的离子是 $C_{15}H_9O_5^-$ (误差 0.94×10^{-6})。它应是 $(M-H)^-$ 峰。结合阳离子和阴离子分析,可推断峰 27 对应的分子式是 $C_{15}H_{10}O_5$ 。与前面分析的化合物比较发现,此化合物分子式与 5,4'-二羟基异黄酮-7-O-(4''-O-甲基)- β -D-葡萄糖苷的苷元一致,同时,其紫外光谱也很相似,另外,该化合物出峰较迟也符合苷元特征,因此

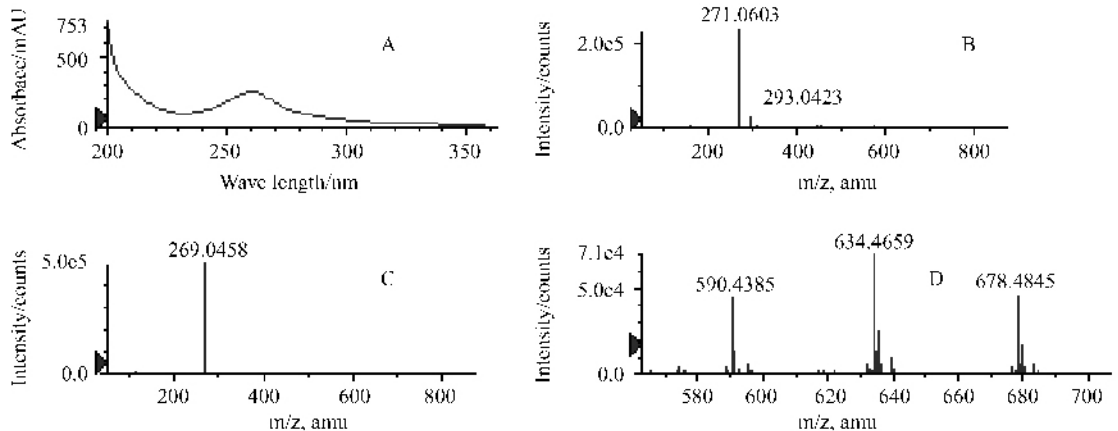


图5 色谱峰 Rt26.32 min 对应的紫外和质谱及流份 28 对应的阳离子质谱图

Fig.5 Uv and MS spectra of the peak at 26.32 min, and positive ion MS of the number 28 eluate. A : Uv of the Rt26.32 peak ; B : Positive ion MS of the Rt26.32 peak ; C : Negative ion MS of the Rt26.32 peak ; D : MS of the number 28 eluate.

可推断 R_t 为 26.32 min 峰对应的化合物是 5,7,4'-三羟基异黄酮。

2.3.6 活性流份 28-31 的成分分析:流份 28-31 在色谱图(图 1-A)上无紫外吸收峰,说明这些活性组分对应的化合物中没有大的共轭体系,或含量很低。它们在阴离子流图(图 1-C)上也没有明显的峰,但在阳离子流图(图 1-B)上有较强的峰,说明该化合物易形成阳离子。第 28 流份对应的质谱(图 5-D)显示有聚合物的特点,其中 3 个主要峰的质荷比分别为 590.4385、634.4659 和 678.4845,对应的离子为 $C_{32}H_{62}O_9^+$ (误差 $0.56 e^{-6}$)、 $C_{34}H_{66}O_{10}^+$ (误差 $1.33 e^{-6}$)

和 $C_{36}H_{70}O_{11}^+$ (误差 $1.31 e^{-6}$),离子间恰好相差 C_2H_4O ,可见它们是聚氧乙烯类化合物。对流份 29 的质谱(图 6-A)分析发现该流份也是聚氧乙烯类化合物,其对应的离子分别为 $C_{30}H_{56}O_9^+$ (误差 $1.09 e^{-6}$)、 $C_{32}H_{60}O_{10}^+$ (误差 $4.3 e^{-6}$)、 $C_{34}H_{64}O_{11}^+$ (误差 $11.85 e^{-6}$)和 $C_{36}H_{68}O_{12}^+$ (误差 $2.12 e^{-6}$),离子间恰好相差 C_2H_4O 。对流份 30 及 31 对应的多个化合物的质谱(图 6-B、6-C 和 6-D)分析发现各组离子间都恰好相差 C_2H_4O ,都是聚氧乙烯类化合物。

考察发酵原料,发现发酵过程中加入的消泡剂

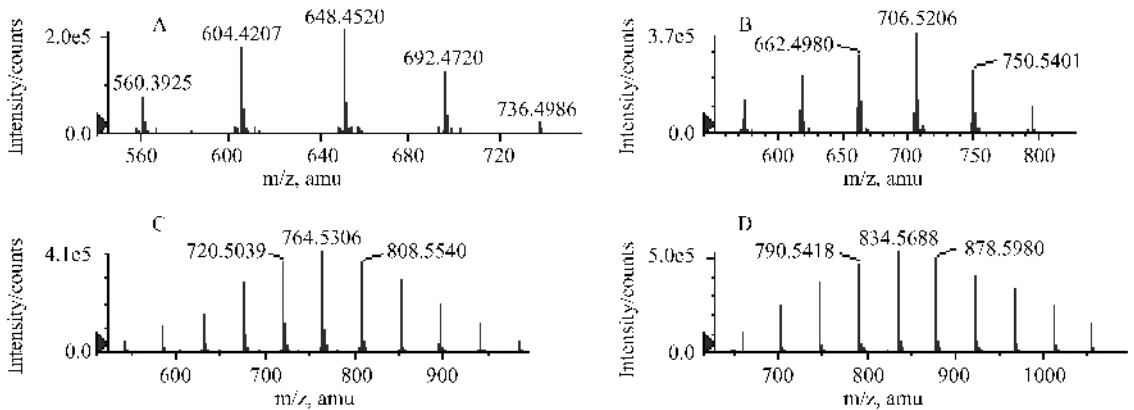


图 6 流份 29-31 对应的阳离子质谱图

Fig. 6 Positive ion MS of eluate number 29 to 31. A: MS of the number 29 eluate; B: MS of the number 30 eluate; C: MS of the 31-1 eluate; D: MS of the 31-2 eluate.

聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯与本研究发现的化合物分子类似。仔细研究发现,第 28 流份对应的分子 $C_{36}H_{70}O_{11}$ 与油酸酯聚氧乙烯醚(聚合有 9 个 C_2H_4O)一致。流份 29 对应的分子 $C_{36}H_{68}O_{12}$ 与聚合度为 6 的聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯的分子一致。流份 30 的主要离子(m/z 为 706.5206)对应的分子式为 $C_{38}H_{74}O_{11}$,比相应得聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯多出 C_4H_8 ,可能分子中含聚氧丙烯或聚氧丁烯结构单元。流份 31 对应多个化合物,但都是聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类物质,仅以保留时间约为 31 和 32 min 的两质谱为例(见图 6-C 和 6-D),其主要离子对应的分子式分别为 $C_{40}H_{76}O_{13}$ 和 $C_{44}H_{82}O_{14}$,它们分别与聚合度为 8 和 10 的聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯的脱一个水分子和脱两个水分子的分子一致。为验证来源于消泡剂的上述聚合物对 CHO 细胞的毒性,本研究将消泡剂及聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯纯品按 $100 \mu\text{g/mL}$ 的浓度分别进行 CHO 细胞毒

性试验,发现 24 h 后细胞死亡率分别达 89% 和 52%,可见流份 28-31 中的 CHO 细胞毒成分确有可能是上述各聚氧乙烯类物质。

3 结论和讨论

从上面的分析可得到如下结论:菌株 RCEF0927 在中试规模的发酵液有较强抗 CHO 细胞的活性。提取实验结果表明该活性物质能较好地被乙酸乙酯提取出来。高效液相色谱-高分辨质谱-活性测定联合分析结果发现,提取物中有多个活性组分,它们对应的可能分子式分别为 $C_{10}H_{13}N_5O_3$ 、 $C_{22}H_{22}O_9$ 、 $C_{23}H_{24}O_{10}$ 、 $C_{22}H_{22}O_{10}$ 、 $C_{15}H_{10}O_4$ 、 $C_{15}H_{10}O_5$ 、 $C_{36}H_{70}O_{11}$ 、 $C_{36}H_{68}O_{12}$ 、 $C_{38}H_{74}O_{11}$ 、 $C_{40}H_{76}O_{13}$ 和 $C_{44}H_{82}O_{14}$ 等。结合色谱特性、紫外光谱特征、质谱碎片和数据库查询可初步推断它们分别为虫草素、4'-羟基异黄酮-7-O-(4''-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙、6-甲氧基-4'-羟基异黄酮-7-O-(4''-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙、5,4'-二羟基异黄酮-7-

O-(4'-O-甲基)- β -D-葡萄糖甙、7,4', r -二羟基异黄酮、5,7,4', r -三羟基异黄酮、油酸酯聚氧乙烯醚、聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯脱水化合物、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯,以及含聚氧丙烯或聚氧丁烯结构单元的聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯衍生物等物质。

资料查询发现上述化合物中7,4', r -二羟基异黄酮和5,7,4', r -三羟基异黄酮普遍存在于大豆中^[6],因此,它们应由培养基带入,并非真菌代谢产物。上述三个异黄酮的甲基葡萄糖苷并不存在于大豆中,但其苷元与大豆异黄酮一致,因此它们可能是大豆异黄酮苷的甲基化产物。

虽然虫草素和大豆异黄酮类化合物的抗肿瘤活性已有报道,但这些化合物及其甲基化衍生物对CHO细胞的毒性是首次发现。

上述活性组分中,流份28-31对应的化合物为一类较为复杂混合聚合物,包括油酸酯聚氧乙烯醚及多种聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类化合物。虽然有报道表明聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类化合物在抗癌试验中表现有协同作用^[7-9],但本研究首次发现其对中国仓鼠卵巢瘤(CHO)细胞的毒性,这也许为开发该类化合物的新用途具有一定参考价值。

聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类物质被认为是一类安全性较高的化合物,如聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯对大鼠的LD₅₀大于10 g/kg,该类物质被广泛用于各类食品加工中^[10],按GB 2760-2007的规定,仅面包中的添加量就可达2.5 g/kg。值得注意的是,从本研究的分析结果来看,发酵液中的聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类物质与消泡剂标明的聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯并不完全一致,虽然有关报道表明合成产品常常是混合物^[11],但细胞毒实验表明,本研究中市购的混合消泡剂毒性明显大于聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯纯品,可见在发酵产品中的消泡剂使用及质量控制应值得人们充分重视,特别是聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类物质易溶于低极性溶剂,在进一步加工中尤其要注意该成分的富集而使含量超标。由于发酵过程也可能引起聚氧乙烯类化合物的成分变化,而不单纯是消泡剂质量问题,因此有关研究尚待进一步深入。

参考文献

- [1] Kinghorn AD, Chin YW, Swanson SM. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2009, 12(2):189-196.
- [2] Aprile G, Mazzer M, Moroso S, Puglisi F. Pharmacology and therapeutic efficacy of capecitabine: focus on breast and colorectal cancer. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(4):217-229.
- [3] 许旭东, 胡晓茹, 杨峻山. 抗肿瘤药用植物有效成分研究概况. 中国中药杂志(*China Journal of Chinese Materia Medica*) 2008, 33(17):2073-2081.
- [4] 赵和平, 鄯洪文, 胡丰林, 樊美珍. 一种蛹拟青霉代谢产物中抗肿瘤活性组分的分离纯化. 中国生化药物杂志(*Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*) 2006, 27(4):293-298.
- [5] Hu FL, He YQ, Huang B, Chun-Ru Li, et al. Secondary metabolites in a soybean fermentation broth of *Paecilomyces militaris*. *Food Chemistry*, 2009, 116:198-201.
- [6] 刘广阳, 齐宁, 林红等. 大豆异黄酮含量与品质性状相关性分析. 大豆科学(*Soybean Science*) 2008, 27(4):701-707.
- [7] Tsujino I, Yamazaki T, Masutani M, Sawada U, Effect of Tween-80 on cell killing by etoposide in human lung adenocarcinoma cells, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1999, 43(1):176-171.
- [8] Sherman LR, Kellner LG. The synergistic effect of polysorbate 80 upon the toxicity of tributyltin chloride. *Applied Organometallic Chemistry*, 4(4):379-381.
- [9] 刘云, 陈海涛. 表面活性剂在抗癌药制剂中的应用. 日用化学工业(*China Surfactant Detergent & Cosmetics*) 2003, 33(4):251-254.
- [10] 汪小舟, 陆正清. 聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯的合成与应用. 安徽化工(*Anhui Chemical Industry*) 2004, A:18-20.
- [11] 靳坤, 张蓉, 彭勤纪, 张华, 王璧人. 典型表面活性剂结构和组成的波谱表征—山梨醇酐脂肪酸酯和聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯的波谱, 分析测试学报(*Journal of Instrumental Analysis*) 2002, 21(1):33-36.

Anti-tumor compounds from submerger fermentation products of a *Paecilomyces militaris* strain

Ruili Lu¹, Fenglin Hu^{2*}, Bo Huang², Chunru Li², Zengzhi Li^{2*}

(¹Applied Chemistry Department of Science College, ²Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University, Hefei 20036, China)

Abstract [Objective] The aim was to identify the antitumor compounds of the fermentation broth of *Paecilomyces militaris* (strain RCEF0927). **[Methods]** Anti-tumor activity was tested with a resazurin cytotoxicity assay model with Chinese hamster ovary (CHO) cells. Bioactive compounds were analysed with combined method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC), High Resolution Mass Spectrometer (HRMS) and antitumor assay. **[Results]** Antitumor test showed that the fermentation broth had strong cytotoxicity against CHO cells. Extraction tests showed that ethylacetate was the best solvent for the bioactive constituents extracting. HPLC-DAD- HRMS-Cytotoxicity assay revealed that the molecular formula of the active compounds in the extract were possibly C₁₀H₁₃N₅O₃, C₂₂H₂₂O₉, C₂₃H₂₄O₁₀, C₂₂H₂₂O₁₀, C₁₅H₁₀O₄, C₁₅H₁₀O, C₃₆H₇₀O₁₁, C₃₆H₆₈O₁₂, C₃₈H₇₄O₁₁, C₄₀H₇₆O₁₃ and C₄₄H₈₂O₁₄. **[Conclusion]** The possible structures of the bioactive compounds were deduced with bioassay, HRMS, Uv and database inquiry as cordycepin, daizein, genistein 7-*A'*-dihydroxyisoflavone-7-O-(4'-O-methyl)-*b*-D-glucopyranoside, 7, 4'-dihydroxy-6-methoxyisoflavone-7-O-(4'-O-methyl)-*b*-D-glucopyranoside, 5, 7, 4'-trihydroxyisoflavone-7-O-(4'-O-methyl)-*b*-D-glucopyranoside, polyoxyethylene ether oleate, dehydro products of polyoxyethylene sorbitan monostearate, polyoxyethylene sorbitan monooleate, polyoxypropylene or polyoxybutene contained derivants of polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester. Cytotoxicity of the compounds was revealed for the first time.

Keywords: *Paecilomyces militaris*; anti-tumor; components; HPLC-HRMS analysis; Chinese hamster ovary (CHO) cells

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870189, 30871676) and the Natural High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2007AA021506)

* Corresponding author. Tel: +86-551-5786887; Fax: +86-551-5786589; E-mail: hufenglin@hotmail.com; zzli@ahau.edu.cn

Received: 22 May 2009/Revised: 13 July 2009

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:我们的承诺是争取在2个月之内给予答复,5~7个月之内刊出。

- (1)收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审的2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2)完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给出作者发出e-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的),作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问:如我的投稿没有被贵刊录用,是否告知退稿原因?对退稿有异议怎么办?

答:本着对每一篇投稿负责的原则,本刊一贯遵循三审制的制度,即:编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿,都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- (1)对于每一篇退稿,我们都会详细写明退稿原因,为您进一步修改论文提供帮助。
- (2)如您对退稿意见有异议,可以给我们写信表明看法,本刊将请专家予以复审。

问:我可否指定审稿人,或言明请某审稿人回避?

答:您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单,或请予回避的审稿人名单,供编辑部参考,但编辑部是否采纳将视具体情况而定。