

海洋病原细菌 *Pseudomonas* sp. ER22 对氯霉素中间体的手性转化 *

孟繁梅, 艾云灿
(中山大学有害生物控制及资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 海洋病原细菌 *Pseudomonas* sp. ER22 (C_m^+ , MIC=64 μ g/mL) 接种在含有 25 μ g/mL 标准品氯霉素中间体 (*D*-($-$)-苏-2-氨基-1-对硝基苯基-1,3-丙二醇) LB 培养基中培养 24 h 后, 可检测到由 (1*R*, 2*R*) 形式转化生成 (1*S*, 2*S*) 对映体。LC-MS/MS 分析显示互为对映体的特征指纹峰相同 (m/z 213), 保留时间分别为 3.74 min 和 4.98 min
关键词: 海洋细菌; 氯霉素中间体; 手性; 生物转化; LC-MS/MS 分析
中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 01-0129-02

氯霉素自 1947 年发现以来很快成为临床特效药^[1], 同时在大农业领域广泛应用。造成环境中累积并进入食物链, 残留氯霉素严重危害食品安全, 已成为近年绿色贸易壁垒制裁和重大国际贸易争端。氯霉素耐药性问题严重削弱氯霉素治疗效果。研究氯霉素代谢及耐药性机制具有重要理论意义和实践应用价值^[2]。已知氯霉素中有 2 个手性碳原子构成 4 种对映体, 但是只有左旋体有活性, 右旋体则没有。研究氯霉素及中间体的手性转化机制是重要课题, 目前未见文献报道^[2]。本文报道新发现的病原细菌 *Pseudomonas* sp. ER22 对氯霉素中间体的手性转化现象。

1 菌种和培养基

供试菌株 *Pseudomonas* sp. ER22 (C_m^+ , MIC=64 μ g/mL) 为本实验室保藏。标准品氯霉素中间体 *D*-($-$)-苏-2-氨基-1-对硝基苯基-1,3-丙二醇 (*D*-($-$)-*threo*-2-amino-1-(*p*-nitrophenyl)-1,3-propanediol) (99%, 购自 Sigma 公司)。参见文献 [3] 配制肉汤培养基 (LB), LB 用做摇瓶液体培养基时不加琼脂。含 25 μ g/mL 标准品氯霉素中间体 LB 培养基用作转化试验。

2 方法与结果

将菌株 ER22 纯种接入 5 mL LB 液体培养基 (含 25 μ g/mL 氯霉素中间体) 中 22 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 24 h, 离心 8 000 r/min 10 min, 取上清液转移至 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 乙酸乙酯涡旋 10

min, 离心 5 000 r/min 5 min, 吸取 20 mL 有机相转移至蒸发瓶中于 45 $^{\circ}$ C 水浴旋转蒸发干燥, 再用 1 mL 流动相溶剂重新溶解。采用 Thermo Finnigan 公司 LCQ DECA XP LC-MS 高效液相色谱-质谱联用仪检测, 色谱柱 Hypersil GOLD (150 $\times$ 1.5 mm 3 μ), 流动相体积比溶剂 A (甲醇) 45% 溶剂 B (水) 55%, 流动相流速 150 μ L/min, 紫外检测波长 280 nm, 进样体积 10 μ L。检测源电喷雾离子检测器 (ESI), 根据需要选择正或负电离模式。鞘气流速 1.5 arb, 喷射电压 4.50 kV, 碰撞电压 25 V, 毛细管温度 275.00 $^{\circ}$ C, 毛细管电压 18.00 V, 碰撞气体氮气。转化产物检测如图 1。可见标准品氯霉素中间体 (A) 在正电离方式 LC-MS/MS 谱图上 R_f =3.70 min, 特征指纹峰离子相对分子质量为 m/z 213 (c)。经过 ER22 菌株转化后 (b), 可以将左旋 (1*R*, 2*R*) 形式 (R_f =3.74 min) 转化生成右旋 (1*S*, 2*S*) 形式 (R_f =4.98 min) 的对映异构体, 其特征指纹峰离子相对分子质量为 m/z 213 (d), 与 (1*R*, 2*R*) 形式的 (c) 完全相同。这项新发现暗示菌株 ER22 中可能存在氯霉素抗性的一种新机制, 且在生物医药手性转化与生物合成领域有重要应用前景。

* 收稿日期: 2005-10-08
基金项目: 广东省科技计划重点引导资助项目 (2005B20501001); 国家自然科学基金资助项目 (40376046); 广东省自然科学基金资助项目 (031624); 教育部回国留学人员科研启动基金资助项目; 教育部高等学校骨干教师资助计划资助项目; 中山大学测试科学基金和 985 I 期专项资助项目
作者简介: 孟繁梅 (1965 年生), 女, 讲师; 通讯联系人: 艾云灿; E-mail: ls08@zsu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

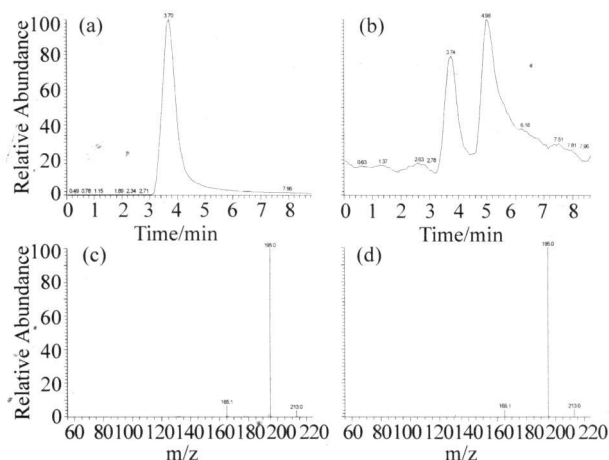


图 1 ER22 菌株转化氯霉素中间体的产物 LC-MS/MS 质谱
Fig. 1 LC-MS/MS spectrum of metabolites of chloramphenicol base by strain ER22 obtained by negative ion spray
(A) 标准品氯霉素中间体的左旋 (1R, 2R) 形式;
(B) 经过菌株 ER22 转化后产物中左旋 (1R, 2R) 和右旋 (1S, 2S) 形式; (C) (1R, 2R) 形式的特征指纹峰; (D) (1S, 2S) 形式的特征指纹峰

Chiral Transformation of *D*-($-$)-*threo*-2-amino-1-(*p*-nitrophenyl)-1,3-propanediol by Marine Pathogenic Bacterium *Pseudomonas* sp. ER22

MENG Fan-mei AI Yun-can

(State Key Lab of Biocontrol Sun Yat sen University, Guangzhou 510275 China)

Abstract A case of chiral transformation of chloramphenicol base [*D*-($-$)-*threo*-2-amino-1-(*p*-nitrophenyl)-1,3-propanediol] by a marine pathogenic bacterium *Pseudomonas* sp. ER22 (Cm^r, MIC=64 μ g/mL) is reported. After having incubated with LB medium containing 25 μ g/mL authentic chloramphenicol base for 24 hours, two significant fingerprint peaks at R_t =3.74 min and 4.98 min respectively corresponding to (1R, 2R)- and (1S, 2S)- chloramphenicol base with the same ion molecular weight of m/z 213 were detected out by liquid chromatography-mass spectrometry.

Key words marine bacteria; chloramphenicol base; chirality; bio transformation; LC-MS/MS analysis

参考文献:

- [1] EHRLICH J Q, BARTZ Q R, SMITH R M, et al. Chloromycetin: a new antibiotic from a soil actinomycete[J]. *Science* 1947, 106: 417.
- [2] STEFAN S, CORINNA K, BENOIT D, et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol[J]. *FEMS Microbiology Reviews* 2004, 28: 519-542.
- [3] 沈萍. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.