

# 液相色谱-四极杆飞行时间质谱法筛选 产来氟米特芽胞杆菌菌株

陈 峥, 刘 波\*, 朱育菁, 潘志针

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

**摘 要:** **目的** 筛选产来氟米特的芽胞杆菌菌株。**方法** 采用液相-四级杆飞行时间质谱的方法分析了 31 株芽胞杆菌菌株的发酵液胞外成分。**结果** 在谱库扫描得到的代谢物中, 来氟米特的含量相对较高, 且与谱库的匹配率最高。筛选出含来氟米特成分的菌株为科恩芽胞杆菌 (*Bacillus cohnii* FJAT-10017)、嗜碱芽胞杆菌(*Bacillus alcalophilus* FJAT-10014)、土壤短芽胞杆菌(*Brevibacillus agri* FJAT-10018)、解硫酸素解硫酸素芽胞杆菌(*Aneurinibacillus aneurinilyticus* FJAT-10004)、蜥蜴纤细芽胞杆菌(*Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266)。其中该成分含量最高的为蜥蜴纤细芽胞杆菌(*Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266), 占其发酵液总代谢物相对含量的 12.16 %。**结论** 蜥蜴纤细芽胞杆菌(*Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266)为来氟米特高产菌株。该研究为芽胞杆菌来源的免疫调节剂的开发与利用提供理论依据。

**关键词:** 液相色谱-四极杆飞行时间质谱法; 芽胞杆菌; 来氟米特

## Screening of *Bacillus* strains producing Leflunomide based on liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry

CHEN Zheng, LIU Bo\*, ZHU Yu-Jing, PAN Zhi-Zhen

(Institute of Agro-biological Resources, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

**ABSTRACT: Objective** To screen *Bacillus* strains producing Leflunomide. **Methods** Extracellular metabolites of 31 *Bacillus* strains were analyzed by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF MS). **Results** Extracellular metabolites were detected in 31 *Bacillus* strains. The content of Leflunomide was relatively high in the detected compounds, and with the highest match degree. The result showed that six *Bacillus* strains contained Leflunomide, including *Bacillus cohnii* FJAT-10017, *Bacillus alcalophilus* FJAT-10014, *Brevibacillus agri* FJAT-10018, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* FJAT-10004, and *Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266. The content of Leflunomide was highest in *Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266, with the relative content of 12.16 %.  
**Conclusion** *Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266 was the high-yield *Bacillus* strain producing leflunomide. This result provided the theory basis for development and utilization of this immunomodulator from *Bacillus*.

**KEY WORDS:** liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry; *Bacillus*; Leflunomide

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370059)、公益性行业(农业)科研专项(201303094)、福建省农科院青年创新基金项目(2013dq-d-6)、福建省农科院杰出青年人才基金项目(2014JQ-2)、省属公益类科研院所专项(2015R1018-11)

**Fund:** Supported by National Natural Science Foundation of China (31370059), the Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303094), the Youth Innovation Fund of FAAS (2013dq-d-6), the Outstanding Youth Fund of FAAS (2014JQ-2), and Provincial Public Research Institutes Special (2015R1018-11)

\*通讯作者: 刘波, 研究员, 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物。E-mail: fzliubo@163.com

\*Corresponding author: LIU Bo, Researcher, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian 350003, China. E-mail: fzliubo@163.com

## 1 引言

芽胞杆菌能产生内生芽胞,具有抵抗所生存环境中干燥、热、紫外线辐射所造成的伤害,该生物学特性使芽胞杆菌具有非常良好的应用前景<sup>[1]</sup>。在工业上用于淀粉酶和蛋白酶的生产,在农业上用于生物农药和饲用微生物制剂等,在医学上用于活菌制剂、药物和蛋白质载体等。芽胞杆菌种类繁多,数量大,能够产生应用及潜在应用价值的菌株,而这些应用的提前就是对菌株及其代谢物的挖掘和利用。

免疫抑制剂是对机体的免疫反应有抑制作用的药物,主要功能为抑制机体异常的免疫应答反应<sup>[2]</sup>。从20世纪60年代至今,已获得近30种不同微生物来源的免疫抑制剂<sup>[3]</sup>。20世纪70年代末,具有免疫抑制活性的环孢菌素 A(CsA)被发现,成为脏器移植中抗排斥反应的首选药物,并应用与治疗一些自身免疫性疾病中<sup>[4]</sup>。重要的微生物来源的免疫抑制剂包括硫唑嘌呤、咪唑立宾、麦考酚酸、环孢素、他克莫司、西罗莫司、15-去氧精肌菌素、麦考酚酯等<sup>[3]</sup>。近年来,一大批具有免疫抑制活性的化合物也分离成功,其中一些已用于临床<sup>[4]</sup>。微生物来源免疫剂成为研究的热点。

来氟米特(Leflunomide, LEF)是一个具有多重生理活性的新型免疫调节剂<sup>[5]</sup>。通过其活性代谢产物 A-771726 抑制二氢乳清酸脱氢酶活性,抑制嘧啶的从头合成途径,从而抑制 T、B 细胞增殖和抗体的合成;抑制 NF KB 的活化,下调多种炎症因子包括 IL-1、TNF 等。医药上使用的来氟米特是人工合成的小分子异噁唑衍生物。陈峥等<sup>[6]</sup>从吉氏芽胞杆菌中检测出该成分,匹配得分为 90.89,相对含量为 1.14%。我们从 31 个芽胞杆菌种类筛选到 5 个能产来氟米特的芽胞杆菌种类,包括了科恩芽胞杆菌(*Bacillus cohnii*)、嗜碱芽胞杆菌(*Bacillus alcalophilus*)、解硫酸素解硫酸素芽胞杆菌(*Aneurinibacillus aneurinilyticus*)、土壤短芽胞杆菌(*Brevibacillus agri*)、蜥蜴纤细芽胞杆菌(*Gracilibacillus dipsosauri*),并对其进行分析检测。本研究选用液相四级杆飞行时间质谱(LC-QTOF-MS),对 31 个芽胞杆菌菌株发酵液中来氟米特成分进行快速筛选和研究,初步构建从大量菌株中快速筛选功能代谢物的方法,为了进一步探索能具有生物活性的成分提供科学依据。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

供试菌株:芽胞杆菌菌株 31 株,来自 7 个属,具体见表 1,由福建省农业科学院农业生物资源研究所提供。菌株种子培养基:淀粉 1.0%,牛肉膏 0.5%,蛋白胨 0.3%,蔗糖 1.0%,酵母粉 0.5%,CaCl<sub>2</sub> 0.5%,pH 7.0。菌株发酵培养基:TSB。实验试剂:TSB 培养基(美国 BD 公司),色谱纯乙腈(美国 JT Baker 公司),色谱纯乙酸铵(CNWX,上海安谱科学仪器有限公司)。

实验仪器:液相四级杆飞行时间质谱联用仪 Agilent 1260/6520(美国安捷伦科技公司);电子天平 METTLER TOLEDO AL104(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);恒温培养震荡器智城 ZHWY-2102C(上海智城分析仪器有限公司);pH 计 Sartorius PB-10(德国赛托利斯公司)。

### 2.2 方 法

发酵液制备:用 LB 培养基平板将芽胞杆菌菌株划线活化并培养 24 h。取活化的菌株接入 20 mL LB 种子培养基中,以 37 °C 200 r/min 振荡培养 12 h,成为种子液。取该种子液以 1%接种量接入预先装入 50 mL 的 TSB 液体培养基中,继续 37 °C 200 r/min 振荡培养 48 h。将芽胞杆菌发酵液密封后,置于 4 °C 冰箱中准备制备。

样品制备方法:取 50 mL 芽胞杆菌发酵液,离心取上清液,过 0.25 μm 微孔滤膜后,加入 GC 小瓶。置于 4 °C 冰箱保存,等待进样。色谱质谱条件:色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend C<sub>18</sub> (2.1 μm×50 mm, 1.8 μm);柱温:35 °C;进样量:2 μL;流动相:A=10 mmol/L 乙酸铵+水, B=乙腈;流速:0.2 mL/min;梯度程序:90%B 0~3 min;50%B 3~25 min;90%B 25~35 min;MS 运行条件:负离子模式;干燥气温度 300 °C,干燥气流速 5 L/min;喷雾 30 psig;毛细管电压 3500 V;碎裂电压 175 V;分流电压 65.0 V;扫描范围 150~1000 m/z。

## 3 结果与分析

### 3.1 产来氟米特芽胞杆菌的筛选

从 31 个芽胞杆菌菌株的代谢物分析中得到产来氟米特的菌株 5 株(见表 2),分别为:解硫酸素解硫

表 1 供试芽胞杆菌菌株  
Table 1 *Bacillus* strains for test

序号	菌株编号	学名	中文名称	属名
1	FJAT-10004	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	解硫酸素解硫酸素芽胞杆菌	解硫酸素芽胞杆菌属
2	FJAT-8775	<i>Bacillus mycoides</i>	蕈状芽胞杆菌	芽胞杆菌属
3	FJAT-10012	<i>Bacillus funiculus</i>	绳索状芽胞杆菌	芽胞杆菌属
4	FJAT-10013	<i>Bacillus agaradhaerens</i>	黏琼脂芽胞杆菌	芽胞杆菌属
5	FJAT-10016	<i>Bacillus clarkia</i>	克氏芽胞杆菌	芽胞杆菌属
6	FJAT-14260	<i>Bacillus safensis</i>	沙福芽胞杆菌	芽胞杆菌属
7	FJAT-14270	<i>Bacillus cohnii</i>	科恩芽胞杆菌	芽胞杆菌属
8	FJAT-10022	<i>Bacillus halmapalus</i>	盐敏芽胞杆菌	芽胞杆菌属
9	FJAT-14248	<i>Bacillus macyae</i>	马氏芽胞杆菌	芽胞杆菌属
10	FJAT-14249	<i>Bacillus methanolicus</i>	甲醇芽胞杆菌	芽胞杆菌属
11	FJAT-14250	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	枯草芽胞杆菌斯氏亚种	芽胞杆菌属
12	FJAT-14251	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	枯草芽胞杆菌 inaquosorum 亚种	芽胞杆菌属
13	FJAT-14252	<i>Bacillus isronensis</i>	印空研芽胞杆菌	芽胞杆菌属
14	FJAT-14253	<i>Bacillus taeanensis</i>	大安芽胞杆菌	芽胞杆菌属
15	FJAT-14254	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	枯草芽胞杆菌枯草亚种	芽胞杆菌属
16	FJAT-14257	<i>Bacillus shackletonii</i>	沙氏芽胞杆菌	芽胞杆菌属
17	FJAT-14258	<i>Bacillus murimartini</i>	马丁教堂芽胞杆菌	芽胞杆菌属
18	FJAT-14261	<i>Bacillus selenitireducens</i>	还原硒酸盐芽胞杆菌	芽胞杆菌属
19	FJAT-14262	<i>Bacillus selenatarsenatis</i>	硒砷芽胞杆菌	芽胞杆菌属
20	FJAT-14231	<i>Bacillus seohaeanensis</i>	西岸芽胞杆菌	芽胞杆菌属
21	FJAT-14846	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	热噬淀粉芽胞杆菌	芽胞杆菌属
22	FJAT-10014	<i>Bacillus alcalophilus</i>	嗜碱芽胞杆菌	芽胞杆菌属
23	FJAT-10025	<i>Bacillus altitudinis</i>	高地芽胞杆菌	芽胞杆菌属
24	FJAT-14247	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	花津滩芽胞杆菌	芽胞杆菌属
25	FJAT-10018	<i>Brevibacillus agri</i>	土壤短芽胞杆菌	短芽胞杆菌属
26	FJAT-14266	<i>Gracilibacillus dipsosauri</i>	蜥蜴纤细芽胞杆菌	纤细芽胞杆菌属
27	FJAT-10007	<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	软骨素类芽胞杆菌	类芽胞杆菌属
28	FJAT-10020	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	解葡聚糖类芽胞杆菌	类芽胞杆菌属
29	FJAT-14255	<i>Psychrobacillus psychrotolerans</i>	耐冷嗜冷芽胞杆菌	嗜冷芽胞杆菌属
30	FJAT-10026	<i>Viridibacillus arenosi</i>	沙地绿芽胞杆菌	绿芽胞杆菌属
31	FJAT-10028	<i>Viridibacillus arvi</i>	田地绿芽胞杆菌	绿芽胞杆菌属

表 2 产来氟米特芽胞杆菌列表  
Table 2 List of *Bacillus* strains which produce Leflunomide

序号	菌株名称	菌株编号	保留时间	匹配度	相对含量	精确分子量	[M-H] <sup>-</sup>
1	蜥蜴纤细芽胞杆菌	FJAT-14266	6.350	97.42	12.16	270.0615	269.0615
2	科恩芽胞杆菌	FJAT-10017	6.459	91.63	1.59	270.0613	269.0613
3	土壤短芽胞杆菌	FJAT-10018	6.400	79.60	0.40	270.0612	269.0612
4	嗜碱芽胞杆菌	FJAT-10014	6.490	59.38	0.25	270.0624	269.0624
5	解硫酸素解硫酸素芽胞杆菌	FJAT-10004	6.438	56.17	0.18	270.0606	269.0606

续表 2

序号	菌株名称	菌株编号	保留时间	匹配度	相对含量	精确分子量	[M-H] <sup>-</sup>
6	蕈状芽胞杆菌	FJAT-8775	-	-	0	-	-
7	绳索状芽胞杆菌	FJAT-10012	-	-	0	-	-
8	黏琼脂芽胞杆菌	FJAT-10013	-	-	0	-	-
9	克氏芽胞杆菌	FJAT-10016	-	-	0	-	-
10	沙福芽胞杆菌	FJAT-14260	-	-	0	-	-
11	盐敏芽胞杆菌	FJAT-10022	-	-	0	-	-
12	马氏芽胞杆菌	FJAT-14248	-	-	0	-	-
13	甲醇芽胞杆菌	FJAT-14249	-	-	0	-	-
14	枯草芽胞杆菌斯氏亚种	FJAT-14250	-	-	0	-	-
15	枯草芽胞杆菌 inaquosorum 亚种	FJAT-14251	-	-	0	-	-
16	印空研芽胞杆菌	FJAT-14252	-	-	0	-	-
17	大安芽胞杆菌	FJAT-14253	-	-	0	-	-
18	枯草芽胞杆菌枯草亚种	FJAT-14254	-	-	0	-	-
19	沙氏芽胞杆菌	FJAT-14257	-	-	0	-	-
20	马丁教堂芽胞杆菌	FJAT-14258	-	-	0	-	-
21	还原硝酸盐芽胞杆菌	FJAT-14261	-	-	0	-	-
22	硒砷芽胞杆菌	FJAT-14262	-	-	0	-	-
23	西岸芽胞杆菌	FJAT-14231	-	-	0	-	-
24	热噬淀粉芽胞杆菌	FJAT-14846	-	-	0	-	-
25	高地芽胞杆菌	FJAT-10025	-	-	0	-	-
26	花津滩芽胞杆菌	FJAT-14247	-	-	0	-	-
27	软骨素类芽胞杆菌	FJAT-10007	-	-	0	-	-
28	解葡聚糖类芽胞杆菌	FJAT-10020	-	-	0	-	-
29	耐冷嗜冷芽胞杆菌	FJAT-14255	-	-	0	-	-
30	沙地绿芽胞杆菌	FJAT-10026	-	-	0	-	-
31	田地绿芽胞杆菌	FJAT-10028	-	-	0	-	-

胺素芽胞杆菌 FJAT-10004、嗜碱芽胞杆菌 FJAT-10014、科恩芽胞杆菌 FJAT-10017、土壤短芽胞杆菌 FJAT-10018、蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266。其他菌株暂无检出该成分。其中, 蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266、科恩芽胞杆菌 FJAT-10017 中的来氟米特与谱库检索得分(Score)较高, 均在 90 以上。蜥蜴纤细芽胞杆菌胞外代谢物中来氟米特的相对含量最高, 为 12.16%。

### 3.2 芽胞杆菌来源的来氟米特成分分析

有检出来氟米特成分的芽胞杆菌离子提取色谱、质谱图, 见图 1~7。其中蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266 中来氟米特的离子提取色谱图的丰度大

约为  $1.4 \times 10^5$ , 而解硫胺素解硫胺素芽胞杆菌 FJAT-10004 的离子提取色谱图的丰度仅约为  $1.2 \times 10^3$ 。来氟米特在不同样品中的相对含量不同。

蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266 的质谱图结果见图 6, 谱图提供了同位素峰的相对强度和同位素峰的间距。由于本试验采用负离子模式电离, 负离子模式下产生的不同的分子离子, 如  $[M-H]^-$ 、 $[M+X]^-$  (X 为所有溶剂或缓冲剂阴离子) 等。故判断 269.0542 峰为  $[M-H]^-$  分子离子峰。根据所预测的分子式结果, 同时参考同位素峰的相对强度和间距, 以及 metlin 库中匹配的分值, 基本可以确定该成分为来氟米特。

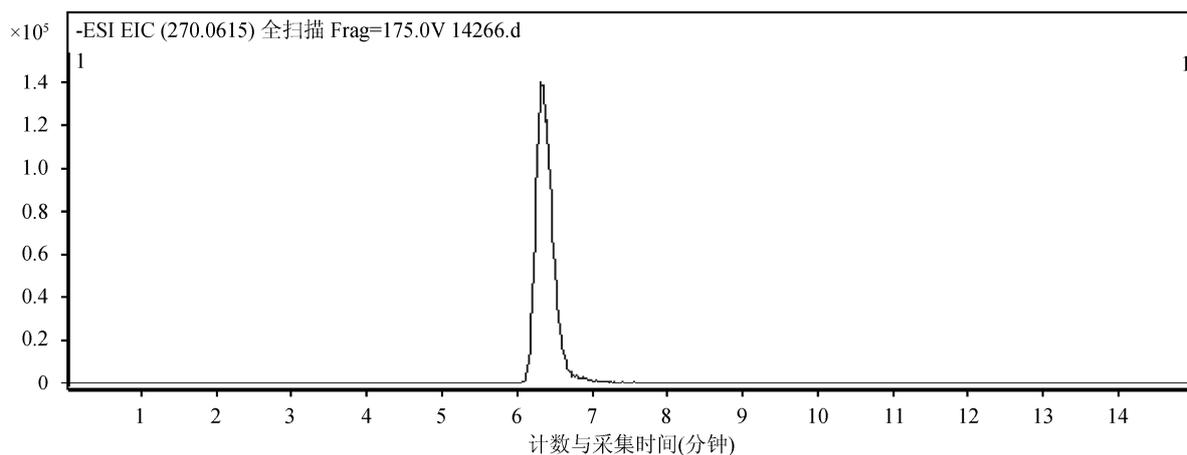


图 1 蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266 来氟米特离子提取色谱图

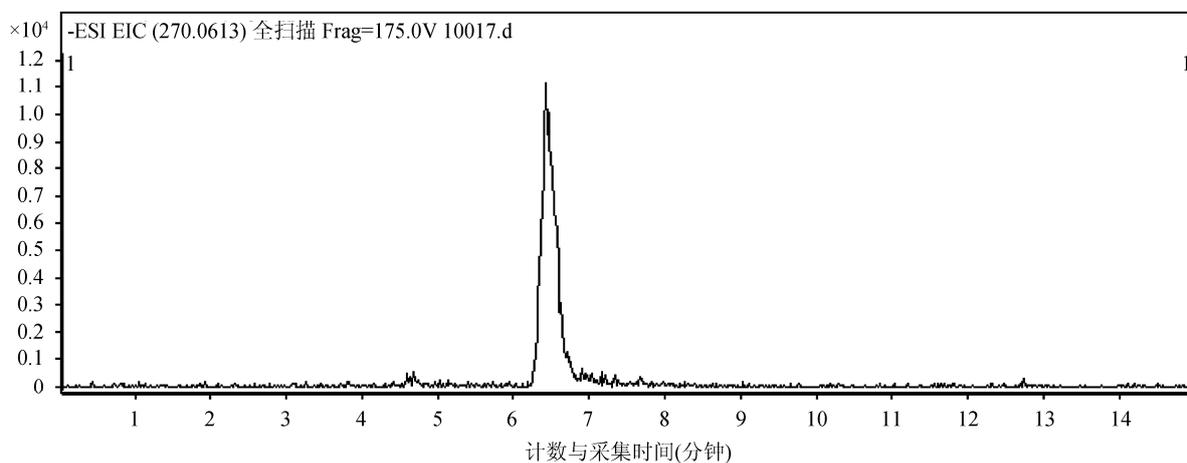
Fig. 1 Extracted ion chromatogram (EIC) of Leflunomide in *Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266

图 2 科恩芽胞杆菌 FJAT-10017 来氟米特离子提取色谱图

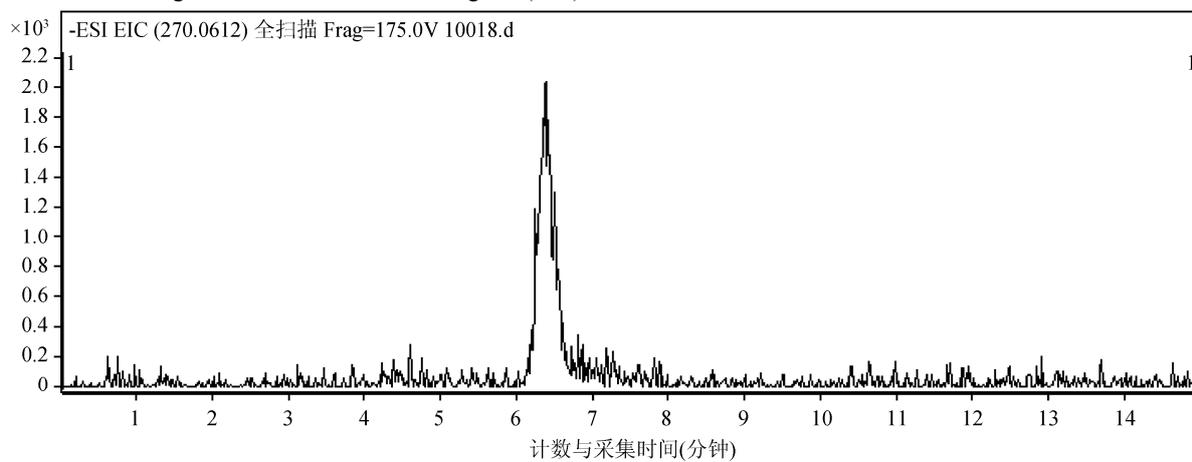
Fig. 2 Extracted ion chromatogram (EIC) of Leflunomide in *Bacillus cohnii* FJAT-10017

图 3 土壤短芽胞杆菌 FJAT-10018 来氟米特离子提取色谱图

Fig. 3 Extracted ion chromatogram (EIC) of Leflunomide in *Brevibacillus agri* FJAT-10018

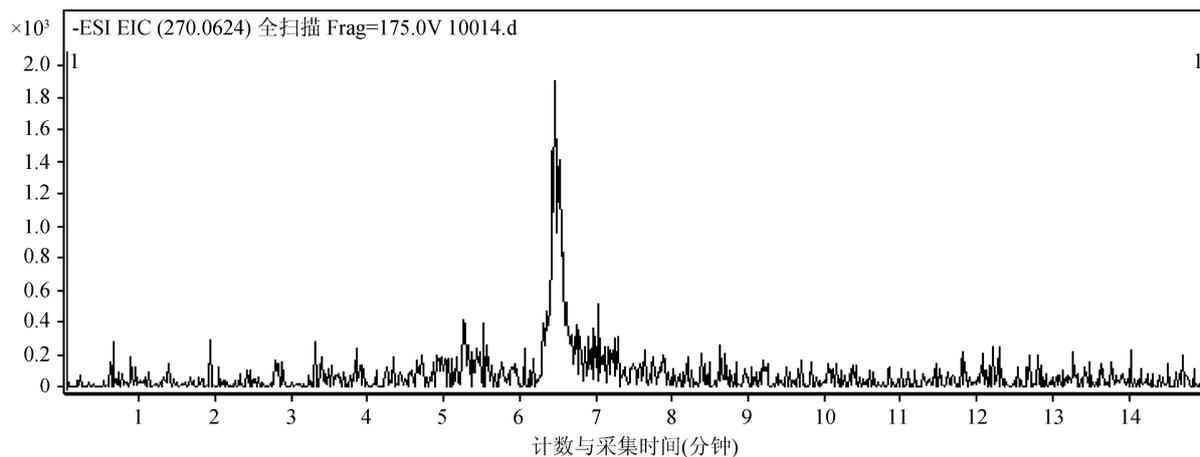


图4 嗜碱芽胞杆菌 FJAT-10014 来氟米特离子提取色谱图

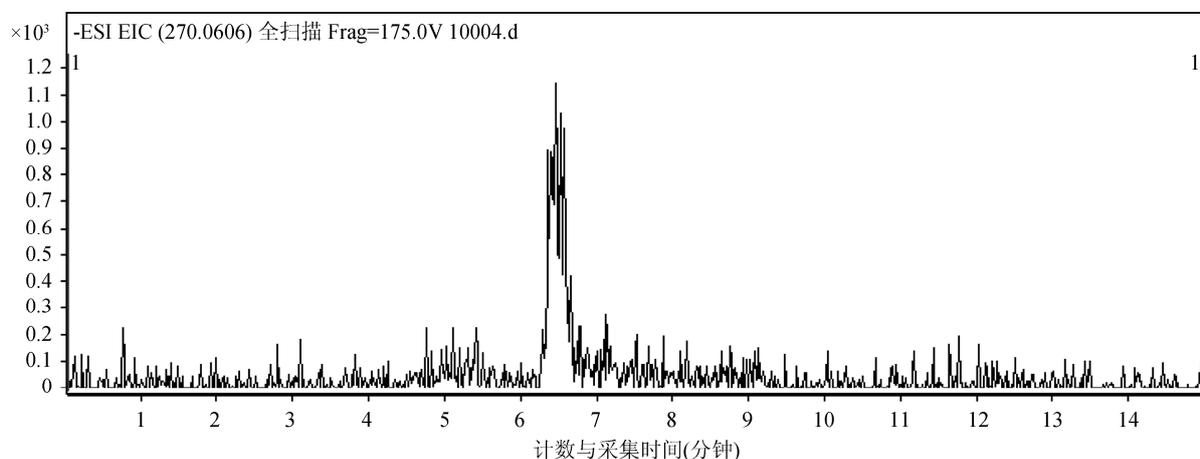
Fig. 4 Extracted ion chromatogram (EIC) of Leflunomide in *Bacillus alcalophilus* FJAT-10014

图5 解硫胺素解硫胺素芽胞杆菌 FJAT-10004 来氟米特离子提取色谱图

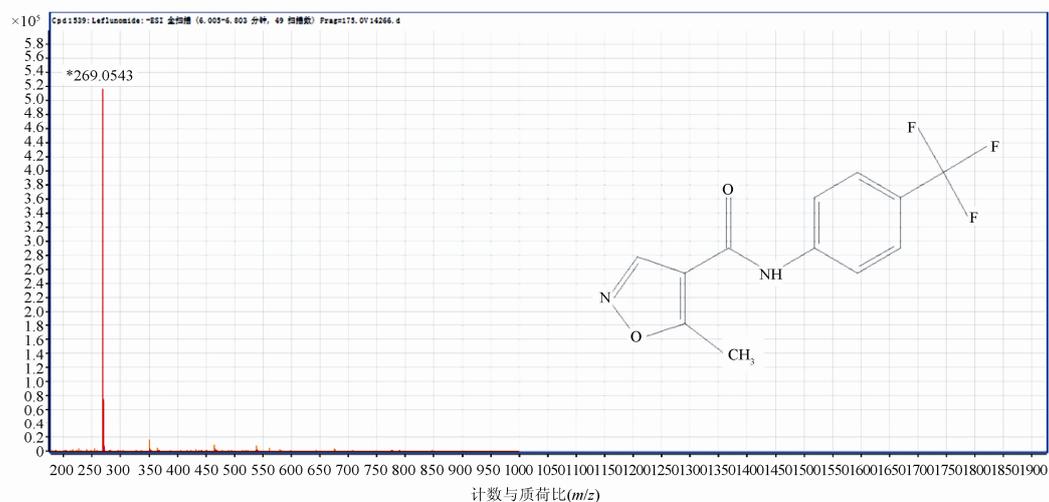
Fig. 5 Extracted ion chromatogram (EIC) of Leflunomide in *Aneurinibacillus aneurinilyticus* FJAT-10004

图6 蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266 中来氟米特质谱图

Fig. 6 Mass spectrum of Leflunomide in *Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266

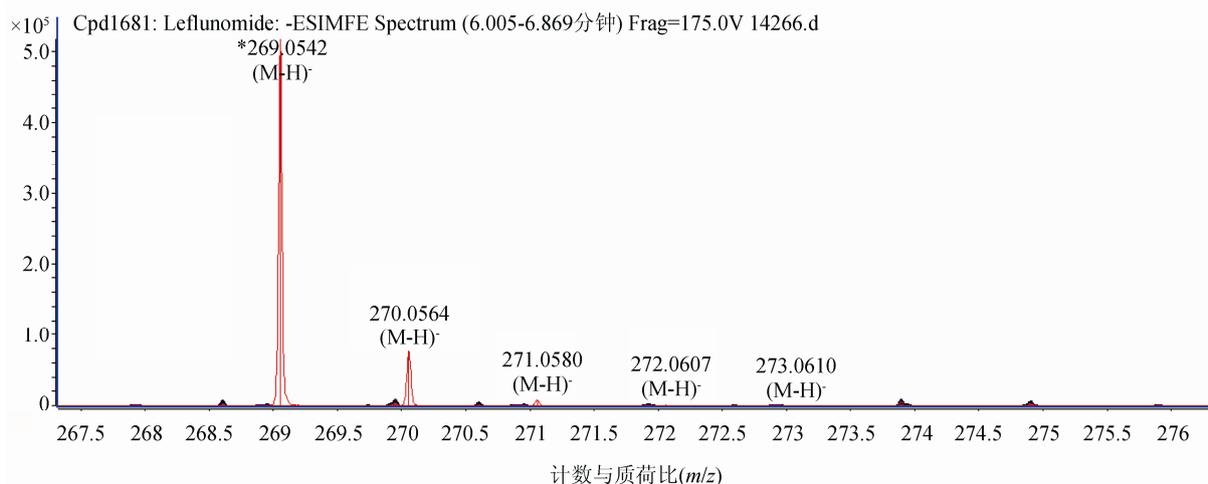


图 7 蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266 中来氟米特同位素峰结果

Fig.7 Isotopic peak of Leflunomide in *Gracilibacillus dipsosauri* FJAT-14266

## 4 讨 论

在芽胞杆菌发酵液代谢物研究方面, 常规方法包括常规柱色谱(硅胶柱、凝胶柱等)<sup>[7-9]</sup>、薄层层析<sup>[7,10]</sup>、高效液相色谱<sup>[7-9]</sup>、气相色谱-质谱联用<sup>[10,11]</sup>、液相色谱-质谱联用<sup>[12]</sup>及理化(温度、酸碱度、紫外线照射、有机溶剂和蛋白酶处理稳定性等)<sup>[8,9,13]</sup>和波谱分析等方法<sup>[8]</sup>等, 从而检测或获取目标化合物。常规芽胞杆菌发酵液的化学成分研究方法获得的代谢物鉴定结果虽然较可靠, 但分析的周期较长, 不适用于大量样品的研究。尤其在对菌株功能性代谢物的快速筛选上, 存在严重不足。本研究采用液相-四级杆飞行时间质谱联用仪(LC-QTOF MS)对芽胞杆菌发酵液进行代目标化合物的快速筛选与检测。利用该仪器的高灵敏度、高分辨率、高质量精度、高选择性等特点<sup>[14]</sup>和强大的定性分析能力<sup>[15]</sup>, 实现对产来氟米特芽胞杆菌菌株的快速筛选。

来氟米特(LEF), 化学名为 N-(4-三氟甲基苯基)-5-甲基异噁唑-4-甲酰胺, 化学式为  $C_{12}H_9F_3N_2O_2$ , 是一个具有抗增殖活性的异噁唑类免疫调节剂。主要功效在于治疗自身免疫性疾病、肾小球疾病、皮肤疾病、强直性脊柱炎等, 并在器官移植中被应用<sup>[16]</sup>。LEF 是一个具有多种活性的免疫调节剂, 在体内快速转化为活性代谢物 A-771726, 抑制酪氨酸磷酸化和嘧啶核苷酸的合成, 并通过抑制表皮生长因子受体酪氨酸激酶实现抗癌作用<sup>[17]</sup>; LEF 对酪氨酸激酶(PTK)有较强的抑制作用, 可阻断 T 细胞活化信号转导, 减少

单核细胞在炎症部位的聚集。并能抑制炎症前白细胞介素-2 水平、细胞表面白细胞介素-2 受体和转铁蛋白受体的表达, 具有抗炎作用<sup>[18]</sup>。LEF 的主要作用机制包括三个方面<sup>[16]</sup>: (1)抑制 T、B 淋巴细胞的增殖及影响细胞因子及其受体的表达; (2)抑制蛋白酪氨酸激酶的活性; (3)抑制二氢乳清酸脱氢酶的活性。

在医学上, 来氟米特主要通过化学合成来获得。在芽胞杆菌中存在为首次发现, 为芽胞杆菌来源的该免疫调节剂的开发与利用提供理论依据。含来氟米特成分的芽胞杆菌菌株为科恩芽胞杆菌 FJAT-10017、嗜碱芽胞杆菌 FJAT-10014、土壤短芽胞杆菌 FJAT-10018、解硫酸素解硫酸素芽胞杆菌 FJAT-10004 及蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266。其中来氟米特含量最高的为蜥蜴纤细芽胞杆菌 FJAT-14266, 占其发酵液总代谢物相对含量的 12.16%。初步认定该菌为来氟米特的高产菌株。为进一步开发利用该菌株建立理论基础。另外发酵液中与质谱谱库无匹配或者匹配率较低的成分有很多, 说明该微生物主要的次生代谢成分有待深入研究。该成分是否为来氟米特或者是来氟米特的同分异构体, 还有待进一步分离验证。

## 参考文献

- [1] 刘波, 陶天申, 葛慈斌, 等. 芽胞杆菌(第一卷): 中国芽胞杆菌研究进展[M]. 北京: 科学出版社, 2015.  
Liu B, Tao TS, Ge CB, et al. *Bacillus* (Volume One): Reviews of *Bacillus* researches in China [M]. Beijing: Science Press, 2015.
- [2] 吴斌. 免疫抑制剂不良反应的中医药干预概况[J]. 现代中西

- 医结合杂志, 2010, 19(10): 1288–1290.
- Wu B. Overview of immune inhibitors of the intervention of traditional Chinese medicine adverse reaction [J]. Mod J Integr Chin Tradit Western Med, 2010, 19(10): 1288–1290.
- [3] 李晓虹, 朱宝泉. 微生物来源的几种重要的免疫抑制剂作用机制的研究[J]. 国外医学抗生素分册, 2000, 21(4): 145–150.
- Li XH, Zhu BQ. Research of several important immunosuppressive mechanism from microbial source [J]. Foreign Med Sci (Section of antibiotic), 2000, 21(4): 145–150.
- [4] 孟晓峰, 龚炳永, 朱宝泉. 微生物来源的免疫抑制剂的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 1997, 18(6): 401–417.
- Meng XF, Gong BY, Zhu BQ. The research progress of microbial sources of immunosuppressant [J]. Foreign Med Sci (Section of antibiotic), 1997, 18(6): 401–417.
- [5] 苏国栋, 姜永悦, 吕延文. 来氟米特合成工艺的改进[J]. 化工时刊, 2011, 25(4): 11–14.
- Su GD, Jiang YY, Lv YW. Improvement in synthesizing technology of leflunomide [J]. Chem Ind Times, 2011, 25(4): 11–14.
- [6] 陈峥, 刘波, 朱育菁, 等. 吉氏芽孢杆菌来源来氟米特分析与检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3672–3678.
- Chen Z, Liu B, Zhu YJ, et al. Analysis and testing on leflunomide from *Bacillus gibsonii* [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(11): 3672–3678.
- [7] 李占飞, 林陈强, 张慧, 等. 枯草芽孢杆菌 CS16 抑菌活性与胞外产物成分分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(6): 1155–1160.
- Li ZF, Lin CQ, Zhang H, et al. Analysis of antimicrobial activity and extracellular metabolites of *Bacillus subtilis* strain CS16 [J]. Chin J Trop Crops, 2013, 34(6): 1155–1160.
- [8] 高程海, 易湘西, 方燕, 等. 柳珊瑚共生细菌 *Bacillus subtilis* 发酵液化学成分研究[J]. 广西科学, 2011, 18(3): 222–225.
- Gao CH, Yi XQ, Fang Y, et al. Study on Chemical Constituents from Marine Gorgonian-associated Bacterium *Bacillus subtilis* [J]. Guangxi Sci, 2011, 18(3): 222–225.
- [9] 乔莉, 周玉枝, 陈欢, 等. 海洋细菌 *Bacillus* sp. 次生代谢产物的研究[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(3): 219–221.
- Qiao L, Zhou YZ, Chen H, et al. The metabolites from the broth of marine bacterium *Bacillus* sp. [J]. Chin J Med Chem, 2008, 18(3): 219–221.
- [10] 祁红兵, 宋军霞, 陈钧. 纳豆芽孢杆菌米糠发酵物中抗氧化成分分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(12): 7417–7416, 7419.
- Qi HB, Song JX, Chen J. Study on the antioxidant component in rice bran fermentation of *Bacillus natto* [J]. J Anhui Agric Sci, 2012, 40(12): 7417–7416, 7419.
- [11] 陈峥, 刘波, 车建美, 等. 龙眼微生物菌株 FJAT-0809-GLX 发酵液丙酮萃取液的分析[J]. 福建农业学报, 2012, 27(3): 294–298.
- Chen Z, Liu B, Che JM, et al. GC/MS Analysis on acetone extracts from microbial fresh-keeping agent for fruit longan [J]. Fujian J Agric Sci, 2012, 27(3): 294–298.
- [12] 吴小平, 彭建升, 谢宝贵, 等. 枯草芽孢杆菌 BS-2 对脉孢菌的抑菌活性成分分析[J]. 热带作物学报, 2010, 31(11): 1991–1995.
- Wu XP, Peng JS, Xie BG, et al. The analysis of antifungal activity composition of *Bacillus subtilis* BS-2 [J]. Chin J Trop Crops, 2010, 31(11): 1991–1995.
- [13] 牛伟, 耿海峰, 牛宇, 等. 枯草芽孢杆菌 B26 抑菌活性成分稳定性研究[J]. 农业科学与技术: 英文版, 2010, 11(8): 120–124.
- Niu W, Geng HF, Niu Y, et al. Stability of antimicrobial active ingredients of *Bacillus subtilis* B26 [J]. Agric Sci Tech, 2010, 11(8): 120–124.
- [14] 许国旺, 杨军. 代谢组学及其研究进展[J]. 色谱, 2003, 21(4): 316–320.
- Xu GW, Yang J. Recent advances in metabolomics [J]. Chin J Chromatogr, 2003, 21(4): 316–320.
- [15] 史怀, 刘波, 陈峥, 等. 基于 LC/QTOF MS 的芽孢杆菌代谢组学分析方法[J]. 福建农业学报, 2012, 27(10): 1112–1119.
- Shi H, Liu B, Chen Z, et al. Metabolomics analysis of *Bacillus* based on LC/Q-TOF MS [J]. Fujian J Agric Sci, 2012, 27 (10): 1112–1119.
- [16] 薛海, 张士勇. 来氟米特在免疫性疾病中的应用进展[J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 723–726.
- Xue H, Zhang SY. Progress in the application of Leflunomide in autoimmune disease [J]. Anhui Med Pharm J, 2009, 13(7): 723–726.
- [17] 贺俊峰, 恽榴红. 化学合成免疫调节剂研究进展[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(5): 547–550.
- He JF, Yun LH. Advances in synthetic immunomodulating agents [J]. Chin J New Drugs, 2005, 14(5): 547–550.
- [18] 王强, 陈利宏, 高秀侠, 等. 来氟米特治疗原发性难治性肾病综合征的临床观察[J]. 安徽医学, 2011, 32(5): 648–649.
- Wang Q, Chen LH, Gao XX, et al. Clinical observation of treatment of refractory nephrotic syndrome by Leflunomide [J]. Anhui Med J, 2011, 32(5): 648–649.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



陈 峥, 助理研究员, 主要研究方向为微生物代谢物研究。

E-mail: acerdestiny@163.com



刘 波, 研究员, 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物。

E-mail: fzliubo@163.com