微生物药物筛选

文章编号:1001-8689(2009)11-0654-05

东方拟无枝酸菌发酵液小组分的分离鉴定

刘效稳[1]　李秋爽[2]　阮林高[2]　韩威[1]　陈代杰[2,3]　戈梅[2,*]

(1 沈阳药科大学生命科学与制药学院，沈阳 110016；
2 上海来益生物药物研发中心，上海 200240；
3 上海医药工业研究院，上海 200040)

摘要： 本文首次从万古霉素产生菌东方拟无枝酸菌的发酵液中分离纯化出三个微量组分 LYV09lx01、LYV09lx02、LYV09lx03。考察了摇瓶装量的影响，确定了适合 LYV09lx01、LYV09lx02 富集的摇瓶发酵条件。LYV09lx03 则通过万古霉素水解来富集提取。经筛选获得一种具有特异性吸附作用的弱极性大孔吸附树脂 AB-8，结合中压液相色谱及高效液相色谱技术进一步纯化鉴定得到一新结构的异黄酮苷，并对其理化性质及体外活性进行了初步研究

关键词： 东方拟无枝酸菌；　发酵；　水解液；　异黄酮；　分离

中图分类号：TQ465　　**文献标识码：**A

Isolation and identification on the metabolites from *Amycolatopsis orientalis* fermentation

Liu Xiao-wen[1], Li Qiu-shuang[2], Ruan Lin-gao[2], Han Wei[1], Chen Dai-jie[2,3] and Ge Mei[2]

(1 College of Life Science and Technology Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016;
2 Shanghai Health Creation Center for Biopharmaceuticals R&D, Shanghai 200240;
3 Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040)

ABSTRACT Three minor components named LYV09lx01, LYV09lx02 and LYV09lx03 were for the first time obtained from the *Amycolatopsis orientalis* fermentation broth. Conditions suitable for producing LYV09lx01 and LYV09lx02 were determined based on proper loading volume of fermentation flasks. Another minor component LYV09lx03 was enriched by means of the hydrolysate of vancomycin. Several adsorptive resins of different types were tested, among which resin AB-8 was chosen for the primary separation, followed by the combination of medium-pressure LC and HPLC preparations. A new isoflavone compound was obtained, which is elucidated as 4H-1-Benzopyran-4-one, 5,7-[(6-deoxy-L-mannopyranosyl)oxy]-3-(4-hydroxyphenyl). The physical and chemical properties and the activity in vitro of these compounds are also preliminary studied.

KEY WORDS *Amycolatopsis orientalis*; Fermentation; Hydrolysis; Isoflavone; Separation

万古霉素是从东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientali*)发酵液中分离得到的一种糖肽类抗生素[1]，是临床上用于治疗由 MRSA 引起的严重感染疾病的首选药物[2]。万古霉素发酵液中各小组分的含量对终产品质量层次有较大影响，目前国内外对万古霉素发酵液中各相关物质的分析鉴定鲜有报道。东方拟无枝酸菌发酵液的各组分 HPLC 分析 vancomycin、demethylvancomycin、desamidovancomycin 两同分异构体、desvancosaminylvancomycin、aglucovancomycin 已由上海来益生物药物研发中心分离纯化并进行了结构鉴定。

收稿日期：2009-04-16

基金项目：国家自然科学基金(编号：30672558)。

作者简介：刘效稳，男，生于 1983 年，在读硕士研究生。主要从事于微生物药学的研究。　　*通讯作者，E-mail：gemei@yeah.net

我们在研究万古霉素组分的过程中，发现东方拟无枝酸菌及其工程菌的发酵产物中存在一些含量较低的未知组分 LYV09lx01、LYV09lx02 和 LYV09lx03，对于这些组分的分离纯化及理化性质国内外未见报道。要阐明东方拟无枝酸菌发酵液中小组分，常规的分离纯化手段难以得到高纯度的精制样品，对此我们采取了以下两条路线：一是改变发酵条件，提高目的产物的含量；二是从水解液中提取 LYV09lx03。采用树脂吸附、中压液相色谱和高压液相色谱分离技术相结合的方法，成功地分离纯化出未知微量组分 LYV09lx01、LYV09lx02 和 LYV09lx03，这对万古霉素产品质量和分析测试体系的进一步完善提供了有价值的信息。

1　实验部分

1.1　材料

东方拟无枝酸菌 *Amycolatopsis orientalis* HCCB10007（上海来益生物药物研发中心保藏）。高效液相色谱仪：Agilent1100、色谱柱：DIKMA Diamonsil®-C_{18}、FLASH + TM 中压层析系统：Biotage，inc（A Dyax Corp. Company）。本实验所用试剂纯度均为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2　实验方法

发酵及发酵液预处理：

（1）斜面培养基：高氏Ⅰ号培养基。

（2）种子培养基（%）：可溶性淀粉 4.0，黄豆粉 2.0，葡萄糖 1.5，硝酸钾 1.5，磷酸二氢钾 0.02，硫酸镁 0.02，消前 pH6.8。28℃、转速 220r/min、40h。

（3）发酵培养基（%）：甘油 2.0，硝酸钾 0.6，黄豆粉 2.0 磷酸二氢钾 0.03，氯化镁 0.06，碳酸钙 0.3，消前 pH6.2。28℃、转速 220r/min、120h。

本试验采用 500ml 的摇瓶以 20% 装量发酵。发酵结束用 4mol/L HCl 酸化发酵液，调 pH 至 3～4 离心收集上清，供 HPLC 分析及后续分离纯化之用。

培养基对照试验：为了证明 LYV09lx01 不是培养基基质本身所含有的组分，设计了三个样品组：经同步摇床培养的黄豆粉水溶解样、发酵培养基空白对照样、发酵培养基空白对照和 LYV09lx01 的混合样品，分别进行 HPLC 检测。发酵培养基空白对照指配制好的培养基灭菌后不转入菌种即摇床培养。

树脂静态吸附：将预处理好的不同型号树脂抽干后，准确称量 1.5g。分别加入 25ml 预处理好的东方拟无枝酸菌发酵液上清，于恒温磁力搅拌器上搅拌 2h，至充分吸附，检测此时 LYV09lx01 浓度，计算静态饱和吸附量。过滤并收集树脂，以 50 ml 40% 的乙醇水溶液解吸测定解吸液浓度，计算解吸量和解吸率[3]。

静态饱和吸附量（mg/g）=（初始浓度-吸附后浓度）×发酵液体积/树脂干重；

静态解吸量（mg/g）= 解吸液浓度 × 解吸液体积/树脂干重；

静态解吸率 = 静态解吸量/静态饱和吸附量 × 100%

树脂分离、反相中压层析：大孔吸附树脂预处理后，将发酵液以流速 1.5ml/min 流入填好的树脂柱中，分别用乙醇水溶液梯度洗脱。HPLC 检测各流分的组成及目标产物浓度，合并、浓缩含有目标组分的溶液。

配制不同浓度甲醇水溶液作为流动相，脱气。取经树脂分离后浓缩样品 80～100mg，溶于 10ml 流动相中。待反相中压柱平衡后，用注射器注入柱中。梯度洗脱，254nm 紫外吸收检测仪检测，分步收集有紫外吸收部分洗脱液（50ml/瓶），HPLC 测定洗脱液中各组分的组成及浓度，合并含有目的组分的溶液，减压浓缩。

生物活性测定及高效液相色谱（HPLC）分析：参照《中国药典》2005 版二部附录Ⅺ及附录 V 中的方法

2　结果与讨论

2.1　培养基对照试验

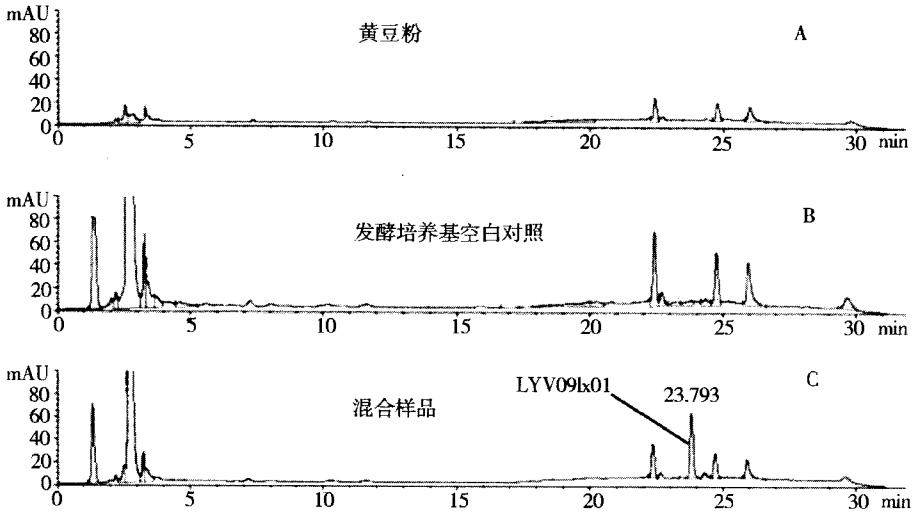
本试验发酵培养基中虽然氮源黄豆粉成分复杂，由图 1 可见，在黄豆粉和培养基空白对照组都没有 LYV09lx01 对应的峰，因此本试验可以证明 LYV09lx01 并不是培养基中所含有的组分。

2.2　摇瓶装量的考察

由于东方拟无枝酸菌发酵液中目的组分 LYV09lx01 和 LYV09lx02 含量很低，如通过发酵条件的改进，使其含量增高或者其他组分的含量降低，将有利于后续的分离纯化。

在对东方拟无枝酸菌众多的发酵条件考察中，通气量是影响产物产量的一个重要因素。由表 1 可见，随着摇瓶发酵液装量的增加，万古霉素产量下降，LYV09lx01、LYV09lx02 产量和万古霉素成负相关，当装量达到 20% 时，LYV09lx01、LYV09lx02 成为发酵液中主要产物（图 2b）。通过发酵条件的改变，关键是通气量的控制，其它组分降低了，而 LYV09lx01、LYV09lx02 产量分别增长了 18% 和 65%。因此，在对目的样品累积的过程中，采用 500ml，20% 装量的摇瓶发酵。

该试验中发酵液变红可能与加入的氮源黄豆粉有关[4,5]，由于装量的增加，溶氧不足，氮源相对过剩，菌体在经历一个短暂的初级代谢后便迅速进入次级代谢，生成大量的色素。

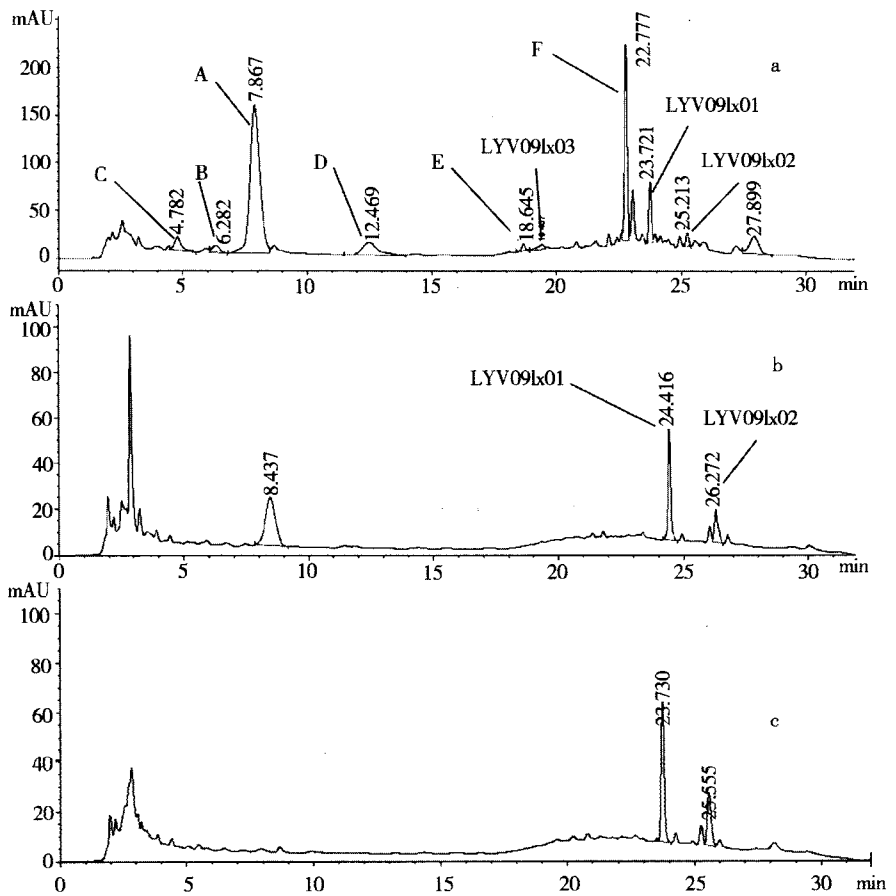


A：黄豆粉对照；B：发酵培养基空白对照；C：LYV09lx01 和空白培养基的混合样品

图 1　培养基对照试验的 HPLC 检测结果

表 1　摇瓶装量(500ml 摇瓶)对相关发酵组分的影响

装量	颜色	pH	万古霉素	Aglucovancomycin	LYV09lx01	LYV09lx02
40ml	微黄	8.59	100%	100%	100%	100%
50ml	微黄	8.74	89.9%	92.5%	99.7%	105%
60ml	浅红	8.28	33.5%	--	114%	129%
80ml	暗红	8.19	33.1%	--	115%	136%
100ml	暗红	8.08	20.4%	--	118%	165%



a：东方拟无枝酸菌发酵液；b：摇瓶装量改变后的发酵液；c：树脂洗脱液

图 2　各组分 HPLC 图

2.3 不同类型的树脂对 LYV09lx01 的吸附和解吸比较

为了分离获得纯化的 LYV09lx01，首先要筛选对其选择性较好的树脂。采用静态吸附的方法将发酵液上清分别加入到非极性树脂 a、b，弱极性树脂 c、d、e 及中等极性树脂 f、g 中。结果如表 2 所示。

表 2　不同类型的树脂对 LYV09lx01 的吸附和解吸

树脂型号	静态饱和吸附量 (mg/g)	静态解吸量 (mg)	静态解吸率
a D101	13.25	3.21	24.2%
b HPD100	12.79	10.59	82.7%
c ADS-5	12.61	11.21	88.9%
d ADS-9	15.09	12.86	85.2%
e AB-8	16.89	14.67	86.8%
f XAD-7	9.98	7.20	72.1%
g HPD-300	10.26	8.19	79.8%

由表 2 可见，AB-8 树脂的静态饱和吸附量较其它树脂高，每克干树脂可吸附 16.89 mg LYV09lx01。该树脂的解吸率也较高，可达 86.8%，虽然 ADS-5 树脂的解吸率也比较高，但其吸附量较低，因此本试验在以后的分离提取过程中均选用 e 树脂 AB-8 对 LYV09lx01 进行初步分离。

取预处理好的东方拟无枝酸菌发酵液上清，以 AB-8 树脂进行动态吸附，以乙醇-水溶液进行梯度洗脱，30% 的乙醇水溶液洗脱液中 LYV09lx01 和 LYV09lx02 含量最高。将此洗脱液浓缩即得到总含量约 70% 的 LYV09lx01 和 LYV09lx02 粗品。

2.4 反相中压层析条件的建立

在中压制备的过程中，需要克服的技术难点就是发酵液色素与 LYV09lx01、LYV09lx02 的分离。采用水提醇沉、活性炭吸附、萃取等传统常规方法很难将色素去除，在反相 C_{18} 柱上，固相载体对 LYV09lx01、LYV09lx02 和色素的吸附力都很强，当把流动相 pH 调至 3.3～4.5 之间，LYV09lx01、LYV09lx02 预先解析下来，从而实现与色素的分离。

先以 35% 甲醇水溶液洗脱除杂，然后配制流动相甲醇：水 = 44：56，磷酸调 pH 至 3.8 洗脱收集，LYV09LX01 和 LYV09lx02 先后依次流出，其 HPLC 纯度达到 98%，且不含色素、收率较高，达到 70%。将流出液调至中性、脱盐、减压浓缩即能得到 97% 以上的 LYV09lx01 和 LYV09lx02 精制品。

2.5 LYV09lx03 的分离

在东方拟无枝酸菌发酵液中，LYV09lx03 组分的含量不到 0.1%，Nagarajan[6] 等曾报道水解万古霉素粗品的方法制备 Aglucovomycin。我们发现水解液中也含有与 LYV09lx03 保留时间一致的峰（图 3～3），通过紫外吸收光谱及 TLC 层析证实它们为同一物质。为了提高 LYV09lx03 在酸解液中含量，考察了盐酸浓度、水解时间以及水解温度对水解液中 LYV09lx03 含量的影响。

表 3　因素和水平

水平	A 水解时间(t)	B 盐酸浓度(mol/L)	C 水解温度(℃)
1	2	3	60
2	2.5	4	70
3	3	5	80

表 4　正交试验结果

试验号	A	B	C	LYV09lx03 含量(%)
1	1	1	1	5.81
2	1	2	2	6.60
3	1	3	3	7.59
4	2	1	2	6.81
5	2	2	3	8.01
6	2	3	1	7.75
7	3	1	3	7.60
8	3	2	1	7.03
9	3	3	2	7.91
k_1	6.67	6.74	6.87	
k_2	7.53	7.22	7.11	
k_3	7.52	7.76	7.74	
R	0.86	1.01	0.87	

由表 3～4 看出，三个因素对 LYV09lx03 水解产率的影响程度依次为 B > A > C，三个因素的最佳水平组合为 $A_2B_2C_3$，即最佳水解条件为采用 4mol/L 盐酸，80℃水解 2.5h 能得到相对含量较高的 LYV09lx03。经 AB-8 树脂，以 15% 的乙醇水溶液、磷酸调 pH 至4.0 洗脱收集，再经 C_{18} 中压层析柱，以 0.02mol/L 的 NaH_2PO_4 缓冲盐-甲醇为流动相梯度洗脱收集、脱盐便得到 95% 的 LYV09lx03。

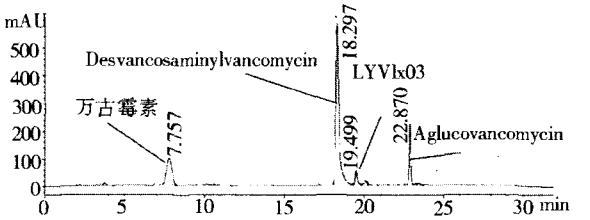


图 3　万古霉素水解液 HPLC 图谱

2.6 生物活性测定

LYV09lx03 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌所产生的抑菌圈直径分别为 10.6mm 和 8.7mm，均低于同浓度下万古霉素的抑菌圈（分别为 18.2mm 和21.6 mm）。体外抑菌试验证实，该化合物具有一定的抑菌效果，但明显弱于同剂量的万古霉素。LYV09lx01 和 LYV09lx02 无抗细菌活性，其抗真菌活性还在进一步的研究中。

2.7 理化性质及结构鉴定

LYV09lx01 和 LYV09lx02 的紫外吸收光谱显示两者在 200 和 255nm 都有两个强吸收带，判断为结构类似物；二者外观为白色粉末，略带棕色；易溶于水，可溶于甲醇，不溶于丙酮、丁醇、乙酸乙酯；分子量分别为 562D 和 400D。

化合物 LYV09lx01，$[\alpha]_D^{25}$-91.4°（c = 1，CH_3OH），经 NMR 结构鉴定为 4H-1-Benzopyran-4-one，5，7-[（6-deoxy-L-mannopyranosyl）oxy]-3-（4-hydroxyphenyl），是一新结构的异黄酮苷化合物（图 4）。

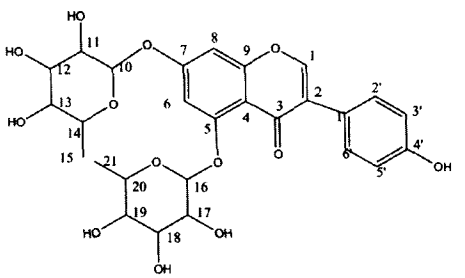


图 4　LYV09lx01 的化学结构

LYV09lx02 较之于 LYV09lx01 分子量少 162，采用 2M 盐酸对 LYV09lx01 的水解 1.5 h，发现水解后的 HPLC 图谱含有 LYV09lx02 组分。由于同一菌产生，根据生源途径推测为侧链少一个鼠李糖。按图 3-4 所标的编码，在 LYV09lx01 结构中处于低场的氢只有 1 位，如果是 7 位碳上的糖断裂，8 和 6 位的氢将会出现四重峰，低场的氢也不会发生变化；如果 5 位碳上的糖断裂，6 位的氢将会出现四重峰，8 位变化不大，5 位上的氢受到羰基的影响，应处于低场中。综上所述，经 1H NMR 确证 LYV09lx02 为 Daidzein 7-rhamnoside，$[\alpha]_D^{25}$-146°（c = 1，CH_3OH）结构如图 5 所示。

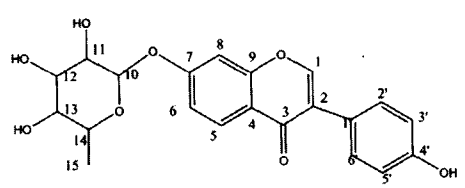


图 5　LYV09lx02 的化学结构

LYV09lx03 其紫外吸收光谱显示有芳香族特征的 E 吸收带（200 ~ 210nm）和 B 吸收带（282nm），主要发色基团与万古霉素一致，判断为万古霉素的结构类似物，易溶于 DMSO，溶于水，微溶于甲醇，不溶于丙酮与乙醚。分子量为 1318D，化学结构有待于进一步鉴定。

表 5　LYV09lx01 的 NMR 光谱数据

碳位	δ_H^a（J in HZ）	δ_C^b，mult	HMBC（H→C）
1	7.95，d（3.5）	153.0，CH	2，3，9，1′，2′，6′
2		124.2 qc	
3		177.3，qC	
4		112.2，qC	
5		162.0，qC	
6	6.76，d（1.0）	103.3，CH	4，5，7，8
7		158.6，qC	
8	6.84，d（1.0）	98.9，CH	4，6，9，4′
9		160.8，qC	
10	5.45，br. d（1.5）	100.7，CH	11，12，14，4′
11	4.41，br. d（1.5）	71.8，CH	10，12，13
12	4.05，br. dd（9.5，2.5）	71.9，CH	10，11，14
13	m	73.6，CH	11，12，14，15
14	m	71.3，CH	10，12，13，15
15	m	18.0，CH3	13，14
16	5.51，br. d（1.5）	100.1，CH	5，17，18，20
17	4.0，br. d（1.5）	71.6，CH	16，18，19
18	3.79，br. dd（9.5，2.5）	72.0，CH	16，17，19，20
19	m	73.8，CH	17，18，20，21
20	m	71.4，CH	16，18，19，21
21	m	18.1，CH_3	19，20
1′		127.3 qc	
2′	7.26，dd（7.5，6.0）	131.6，CH	2，3′，4′，6′
3′	6.78，dd（7.5，6.0）	116.1，CH	2，2′，4′，5′
4′		158.7，qC	
5′	6.78，dd（7.5，6.0）	116.1，CH	2，3′，4′，6′
6′	7.26，dd（7.5，6.0）	131.6，CH	2，2′，4′，5′

a：500MHz 记录；b：400MHz 记录。

3 结论

通过摇瓶发酵液装量的改变使 LYV09lx01、LYV09lx02 含量分别提高了 18% 和 65%，经筛选获得了一种具有特异性吸附作用的弱极性大孔吸附树脂 AB-8 并确定了万古霉素水解液提取 LYV09lx03 的最佳工艺条件。借助吸附树脂方法并结合中压液相色谱、高压液相色谱分离技术，成功分离纯化出万古霉素发酵液中三个微量组分，其中的异黄酮苷化合物 4H-1-Benzopyran-4-one，5，7-[（6-deoxy-L-mannopyranosyl）oxy]-3-（4-hydroxyphenyl）是一尚未见报道的新化学物质，它可能是黄豆粉中的某种成分经东方拟无枝酸菌的生物转化而产生的。LYV09lx02 可（下转第 683 页）

冲液(pH7.0) + 1% 胰酶,按溶出度测定方法检测,45min 时 6 颗胶囊在介质 1 ~ 3 中的平均溶出量分别为 44%、49%、47%。结果显示加酶后对溶出结果无明显改善,故囊壳中明胶与主药交联作用尚不明显。可见,出现溶出度差别显著的原因,还应是厂家工艺的影响。

3　讨论

(1)近年来,我们对于药品越来越关注的是其的内在品质,而不仅仅是对其标准的简单复核。对于难溶性的口服药物来说,不是制成制剂了,就制定出一个溶出条件把主成分溶出来,而不考虑病人是否能吸收利用,应转变观念,要做到"制剂跟着溶出度试验走",即"为能符合一个严格的溶出度试验条件,深入地研究制剂工艺"。那么制定一个溶出度试验标准,应该更为科学、有效地建立起体外溶出度试验与体内生物利用度的相关性,通过科学、合理的溶出度评价标准,来促进药品生产制剂工艺的提高与改良,从而完善药品内在品质。

本方法确定的溶出介质改革了原具有挥发性刺激气味的正丙醇溶出介质,保护了环境,并避免了实验者身体受伤害,更能近似逼真地模拟样品在肠胃道中的生物利用度;经对全国 7 个厂家的 19 批样品测定结果表明,国内多数厂家的产品能符合本方法标准要求。

本方法现制定的限度为 70%,希望该标准收载于 2010 版中国药典后,各生产企业采用新标准后,对此品种工艺及辅料作进一步研究及改善,使其产品的生物利用度达到更高。为下一步标准的继续提高打下基础。

(2)采用 HPLC 法测定洛伐他汀胶囊的溶出度,文献方法均未见报道,实验结果表明,该方法准确、可靠、灵敏度高。本文考察了全国部分洛伐他汀胶囊的生产厂家的产品,均达到国家标准和国际标准要求。所以,本文所研究的方法,对提高产品的质量、产品的安全性及稳定性有重大意义。

参　考　文　献

[1] 国家药典委员会编. WS1-(X-362)-2003Z,洛伐他汀片剂局颁标准(试行)[S]. 国家食品药品监督管理局 国家药品标准新药转正标准第 45 册,172.

[2] The United States Pharmacopoeial Convention Inc. The United States Pharmacopoeia [S]. (XXXI). Published by the Board of Trustees, 2008:2555 ~ 2557.

(上接第 658 页)对 β-半乳糖苷酶具有较强的竞争性抑制作用,且毒副作用小[7],因此,对一些糖代谢紊乱性疾病如糖尿病,肥胖病等有临床应用价值。微量组分 LYV09lx03 的体外活性虽低于万古霉素,但仍有可能将其作为前体进行修饰改造,因而在新药研发中具有一定的应用价值。

致谢:特别感谢上海来益生物药物研发中心在读博士杨志钧在核磁解析方面所给予的帮助。

参　考　文　献

[1] James J, Alan T, Alan W. Vancomycin production in batch and continuous culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 49(4):412 ~ 415.

[2] Ramakrishnan N. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35(4):605 ~ 608.

[3] 杨志钧,殷瑜,洪文荣,等. 大孔阳离子交换树脂对井冈霉素的吸附研究[J]. 离子交换与吸附,2005,21(6):551 ~ 56.

[4] Altaf M, Venkateshwar M, Srijana M, *et al*. An economic approach for L-(+) lactic acid fermentation by Lactobacillus amylophilus GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources[J]. *Appl Microbiol* 2007,103(2):372 ~ 80.

[5] Marrion O, Schwertz A, Fleurence J. Improvement of the digestibility of the proteins of the red alga *Palmaria palmata* by physical processes and fermentation[J]. *Nahrung*, 2003 Oct,47(5):339 ~ 44.

[6] Nagarajan R, Schabel A. A. J. *Chem. Soc. Chem. Comm* [M], 1988: 1306 ~ 1307.

[7] Hazato T, Naganawa H, Kumagai M. β-galactosidase-inhititing new isoflavonoids produced by actinomycetes[J]. *J Antibiot*, 1978, 28(3):217 ~ 234.