文章编号：1001-8689(2018)12-1493-05

分离纯化与化学合成

闰年霉素分离纯化工艺研究

高月麒 李晓露 王海燕 王娅莉 林旸 任风芝* 张雪霞*
(微生物药物国家工程研究中心，河北省工业微生物代谢工程技术研究中心，抗体药物研制国家重点实验室，石家庄 050015)

摘要：目的 开发闰年霉素的分离纯化工艺。**方法** 采用二元液相分离系统，以反相填料为载体，对填料的类型和洗脱条件进行优化，得到适宜的操作条件。**结果** 反相硅胶 C_{18} 为最佳层析介质，洗脱剂为 50% 乙腈 - 酸水，上样量为 10mg/mL 填料。在此实验条件下所得产品纯度≥ 98.5%，纯化收率≥ 70%。**结论** 此种闰年霉素的纯化方法简单易行，收率稳定，适于产业化应用。

关键词：闰年霉素；十八烷基硅烷键合硅胶；分离纯化
中图分类号：R978.1 **文献标志码：**A

Studies on the separation and purification of lipiarmycin

Gao Yue-qi, Li Xiao-lu, Wang Hai-yan, Wang Ya-li, Lin Yang, Ren Feng-zhi and Zhang Xue-xia
(National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, State Key Laboratory of Antibody Research & Development, Shijiazhuang 050015)

Abstract **Objective** To develop the separation and purification processes of lipiarmycin. **Methods** Using a binary liquid chromatography system, the separation and purification processes of lipiarmycin were studied by optimizing the different types of chromatography fillers and elution conditions to obtain a suitable operating conditions. **Results** The results showed that the type of reverse phase silica gel C_{18} was selected as the best chromatography filler, 50% acetonitrile-H_2O was used as the eluent, and the amount of sample was 10mg/mL filter . The purity of the final product was more than 98.5% and the yield of lipiarmycin was above 70% under the optimal conditions. **Conclusion** The method is simple and available for the commercial process.

Key words Lipiarmycin; Octadecylsilyl; Separation and purification

闰年霉素是通过指孢囊菌发酵产生的一种 18 元环结构的新型大环内酯类抗生素，属于窄谱型抗菌化合物，对革兰阳性需氧及厌氧菌具有优良的抗菌作用 [1-2]。分子式 $C_{51}H_{72}Cl_2O_{18}$，分子量为 1042，结构式如图 1 所示。

闰年霉素与非达霉素具有相同的抗菌谱，体外对艰难梭菌菌株有很好的抗菌活性，为较有潜力的用于治疗艰难梭菌感染引起腹泻的化合物 [3]。目前，对闰年霉素的研究，主要集中在其抗菌活性研究领域 [3-5]，而关于闰年霉素的制备方法，则很少有人对其进行深入的探讨和研究。本文以反相硅胶 C_{18} 为分离介质对闰年霉素粗品进行纯化并制备闰年霉素产品。该方法简单易行、收率稳定，具有产业化应用前景。

1 材料与仪器

闰年霉素发酵液 (本公司提供)；硅胶 (青岛海洋化工厂)；聚合物微球、反相硅胶 Unisil C_{18}(苏州纳微

收稿日期：2018-07-23
基金项目：国家“重大新药创制”科技专项 (No. 2018ZX09302010)
作者简介：高月麒，男，生于 1984 年，高级工程师，主要从事天然和微生物药物研究，E-mail: gaoyueqi1984@sina.com
* 通讯作者，任风芝，E-mail: rfzhhj@sohu.com；张雪霞，E-mail: zhangxuexiazxx@163.com

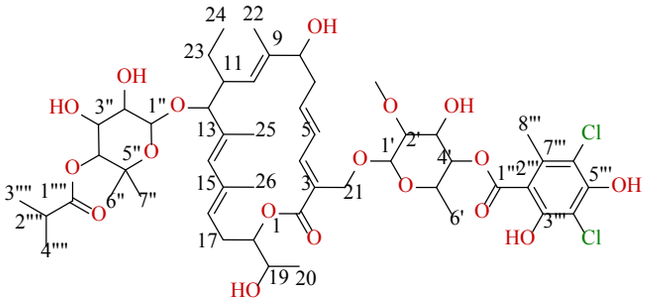


图 1　非达霉素结构式

Fig. 1　Structure of fidaxomicin

生物科技有限公司)；去离子水 (本实验室自制)；乙腈 (色谱纯，美国 Merck 公司)；其他试剂均为国产分析纯。

高效液相色谱仪 (SPD-M20A 型紫外检测器、LC-20AT 泵、SIL-20A 自动进样器、CTO-10AS 柱温箱，日本 Shimadzu 公司)；二元液相分离纯化系统 (汉邦科技有限责任公司)；MS 型质谱检测器和 Masslynx 工作站 (美国 Waters 公司)；Avance III-500 型核磁共振谱仪 (德国 Bruker 公司)；Loborat000 旋转蒸发器 (Heidolph 公司)；TGL-16G 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

2　实验方法

2.1　HPLC 法测定闰年霉素

色谱柱 Unitary C_{18}(4.6mm×150mm, 5μm)；流动相：乙腈 :0.5‰醋酸水溶液 (55:45)；流速 1.0mL/min；柱温 35℃；检测波长 230nm；进样量 10μL。

2.2　闰年霉素粗品制备

闰年霉素发酵液 100L，经板框过滤得到闰年霉素菌丝体，菌丝体加入 100L 工业乙醇搅拌浸泡 2h，经板框过滤得到闰年霉素浸泡液，浸泡液减压浓缩除去乙醇，加入等体积乙酸乙酯萃取，萃取液浓缩、过滤、干燥，得到闰年霉素粗品 87g，HPLC 检测含量为 62.6%，HPLC 图谱见图 2A。

2.3　纯化条件优化

2.3.1　层析介质的选择

分别选用柱层析硅胶 (300~400 目)、聚合物微球 (UniPS 30~300) 和反相硅胶 C_{18}(粒径 30μm) 进行层析试验。取 300~400 目硅胶 100g 干法装柱，将 1.0g 闰年霉素粗品用乙酸乙酯溶解、拌样后，加样于硅胶层析柱顶，用正己烷 - 乙酸乙酯层析，洗脱比例依次为 1:1、1:1.5 和 1:2，洗脱速度 6mL/min；分别取聚合物微球和反相硅胶 C_{18} 各 100mL 装柱，30% 乙腈 - 酸水 (0.5‰ 醋酸溶液，下同) 平衡后，分别将

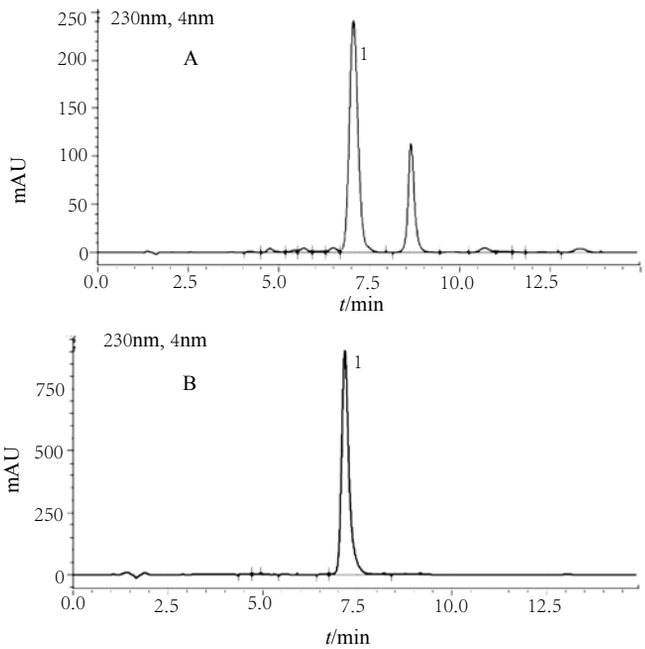


图 2　闰年霉素粗品 (A) 和精粉 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 2　HPLC chromatograms of Lipiarmycin crude product(A) and the purified(B)

闰年霉素粗品 1.0g 用 5mL 甲醇溶解后注入色谱柱，用 30%~80% 乙腈 - 酸水梯度洗脱，洗脱速度 6mL/min；各洗脱条件分管收集，HPLC 检测分离效果，将闰年霉素含量 (面积归一法，下同) 大于 98.5% 的洗脱液合并，每组实验做 3 次平行实验，数据取平均值，计算洗脱收率，洗脱收率 100%。

2.3.2　洗脱条件的确定

根据线性洗脱结果，乙腈浓度在 45%~55% 范围时，主产物被集中洗脱。因此，取闰年霉素粗品 1.0g 用 5mL 甲醇溶解后注入反相硅胶 C_{18} 层析柱，分别采用 45%、50% 和 55% 乙腈 - 酸水洗脱，洗脱速度 6mL/min，通过层析色谱检测器在线监测，分管收集洗脱液，HPLC 检测，将闰年霉素含量大于 98.5% 的洗脱液合并，计算洗脱收率。

2.3.3　洗脱流速的选择

取闰年霉素粗品 1.0g 用 5mL 甲醇溶解后注入反相硅胶 C_{18} 层析柱，用 50% 乙腈 - 酸水洗脱，分别采用 4、6、8 和 10mL/min 的洗脱速度进行洗脱，分管收集洗脱液，HPLC 检测，将闰年霉素含量大于 98.5% 的收集液合并，计算洗脱收率。

2.3.4　上样量的确定

分别按照装量每 100mL 反相硅胶 C_{18} 加载 0.5、0.8、1.0、1.2 和 1.5g 闰年霉素粗品，用 50% 乙腈 - 酸水洗脱，流速为 6mL/min，分管收集洗脱液，

HPLC 检测，将闰年霉素含量大于 98.5% 的洗脱液合并，计算洗脱收率。

3 实验结果

3.1 纯化条件的选择

3.1.1 层析介质的确定

由表 1 可知，反相硅胶 C_{18} 在 30%~80% 乙腈 - 酸水线性梯度洗脱时对闰年霉素的分离效果均优于其它两种层析介质。因此，选择反相硅胶 C_{18} 作为层析介质。

3.1.2 洗脱条件的确定

由表 2 可知，用 45% 乙腈洗脱时，洗脱液体积大，洗脱不集中；用 55% 乙腈洗脱时，目标峰与杂质峰交叉部分多，收率反而降低。综合分离效果和层析收率，洗脱剂选择 50% 的乙腈 - 酸水。

3.1.3 洗脱流速的选择

由图 3 可知，洗脱流速小于 6.0mL/min 时，洗脱峰有拖尾现象，用时久；洗脱流速大于 6.0mL/min 时，洗脱较快，目标产物与杂质被同时洗脱，分离效果差，收率低；洗脱流速为 6.0mL/min 时，洗脱收率最高。因此，选择洗脱流速为 6.0mL/min。

3.1.4 上样量的确定

由图 4 可知，在闰年霉素上样量过低时，样品分散较严重，致使层析收率偏低，随着上样量的增加，收率有所增加；但上样量过大时闰年霉素与杂质重叠，影响了层析效果，反而造成洗脱收率显著下降。因此，在保证分离度的前提下选择上样量为 10mg/mL 填料。

3.2 精粉制备与结构鉴定

称取闰年霉素粗品 10g，采用“2.3" 项优选的纯化条件，进行纯化实验。收集合并闰年霉素纯度大于 98.5% 的洗脱液，减压浓缩除去有机溶剂，再加入等体积的乙酸乙酯萃取，萃取液经浓缩、干燥，得到闰年霉素精粉 4.5g，HPLC 纯度为 99.2%，HPLC 图谱见图 2B。所得精粉进行质谱分析，结合 ^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR 推断其分子式为：$C_{51}H_{72}C_{l2}O_{18}$，经与文献 [3] 比较，确定为闰年霉素。质谱分析见图 5，^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 3。

3.3 工艺验证

按上述优选工艺条件，用装量为 1000mL 的反相硅胶 C_{18} 层析柱，进行连续 3 批工艺验证，结果见表 4。

由表 4 可知，3 批验证实验均可得到纯度大于 98.5% 的闰年霉素精粉，说明该工艺稳定。

4 讨论

闰年霉素是经微生物发酵产生的一种大环内酯类抗生素。最近研究发现，闰年霉素与利福霉素连用，可以产生协同杀菌效应，在更低的使用剂量下有效，毒性更低，且不易产生耐药性 [6]。本文从闰年霉素发酵液开始，利用固液分离与溶剂萃取技术得到闰年霉素粗品，再以反相硅胶 C_{18} 为纯化介质，通过优选纯化条件，所得产品纯度大于 98.5%，纯化收率大

表 1 不同类型层析介质的洗脱收率 (*n*=3)

Tab. 1 Elution yield of different types of chromatography fillers(*n*=3)

层析介质	上样量 /g	洗脱液			
		体积 /mL	浓度 /μg/mL	色谱纯度 /%	洗脱收率 /%
柱层析硅胶	1.0	95	3672	98.7	55.7
聚合物微球	1.0	82	5036	98.6	66.0
反相硅胶 C_{18}	1.0	73	6193	98.9	72.2

表 2 洗脱条件的优化

Tab.2 Optimization of the elution conditions

乙腈体积 /%	上样量 /g	洗脱液			洗脱收率 /%
		体积 /mL	浓度 /μg/mL	色谱纯度 /%	
45	1.0	79	5521	98.9	69.7
50	1.0	71	6357	99.4	72.1
55	1.0	63	6741	98.6	67.8

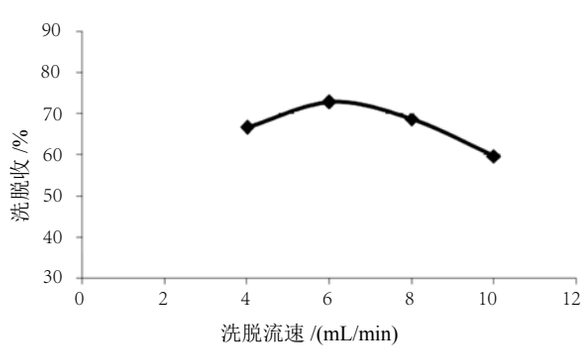


图 3 不同洗脱速度时的洗脱收率

Fig. 3 Elution yield for different elution speeds

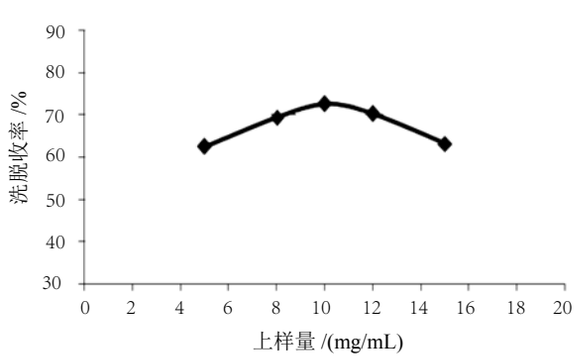


图 4 不同上样量时的洗脱收率

Fig. 4 Elution yield for different amounts of sample

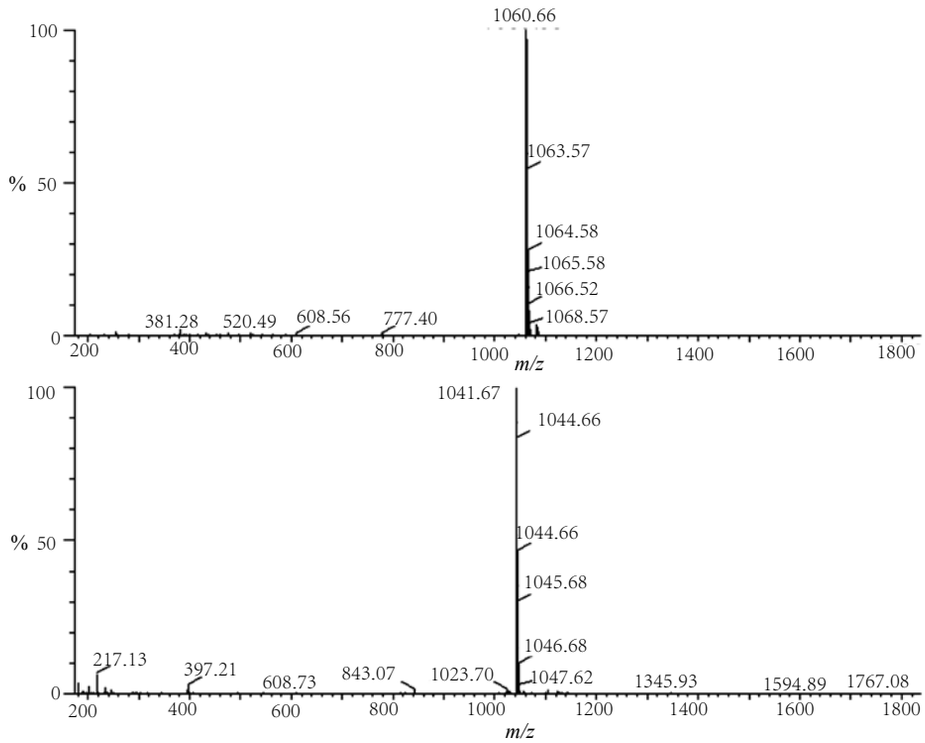


图 5　闰年霉素的 ESI-MS (*m/z*)

Fig. 5　ESI-MS (*m/z*) of Lipiarmycin

表 3　闰年霉素的 ^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR 数据 (500MHz, CD_3OD)

Tab. 3　^{1}H NMR and ^{13}C NMR of lipiarmycin(500MHz, CD_3OD)

序号	C 化学位移 /ppm	H 化学位移 /ppm	序号	C 化学位移 /ppm	H 化学位移 /ppm
2	169.11		1'	102.21	4.67,1H,br s
3	125.61		2'	82.44	3.60,1H,m
4	146.17	7.24,1H,d	2'-OCH_3	62.18	3.59,3H,s
5	128.49	6.62,1H,dd	3'	72.69	3.79,1H,d
6	143.66	5.98,1H,ddd	4'	77.05	5.12,1H,t
7	37.32	2.54,1H,m;2.71,1H,m	5'	71.54	3.59,1H,m
8	73.47	4.26,1H,dd	6'	18.09	1.35,3H,d
9	137.01		1"	97.14	4.74,1H,br s
10	124.56	5.16,1H,br d	3"	70.53	3.76,1H,dd
11	42.53	2.73,1H,m	4"	75.92	5.05,1H,d
12	94.27	3.73,1H,d	5"	74.50	
13	136.33		6"	28.69	1.15,3H,s
14	134.58	5.86,1H,br s	7"	18.69	1.17,3H,s
15	136.94		1'''	170.20	
16	126.87	5.60,1H,br t	2'''	112.28	
17	28.34	2.45,1H,m;2.74,1H,m	*3'''	154.01	
18	78.62	4.75,1H,m	4'''	108.54	
19	68.26	4.06,1H,pentet	*5'''	155.24	
20	20.23	1.21,3H,d	6'''	115.49	
21	63.88	4.45,1H,d;4.64,1H,d	7'''	136.68	
22	15.41	1.68,3H,s	8'''	19.06	2.52,3H,s
23	26.87	1.31,1H,m;2.03,1H,m	1''''	178.35	
24	11.32	0.91,3H,t	2''''	35.37	2.62,1H, heptet
25	13.93	1.84,3H,s	**3''''	19.12	1.19,3H,d
26	17.52	1.80,3H,s	**4''''	19.52	1.21,3H,d

表 4　闰年霉素纯化工艺验证 (n=3)

Tab. 4　The purification process validation of lipiarmycin (n=3)

批次	闰年霉素粗品		闰年霉素精粉		收率 /%
	重量 /g	含量 /%	重量 /g	含量 /%	
1	10.0	62.6	4.5	99.1	71.2
2	10.0	62.6	4.5	99.3	71.4
3	10.0	62.6	4.6	98.7	72.5

于 70%。因此，本研究所述闰年霉素分离纯化工艺简洁易行、质量可控、收率稳定，适于产业化推广应用。

参 考 文 献

[1] Parenti F, Pagani H, Beretta G, *et al*. Lipiarmycin, anewantibiotic from actinoplanes. I. Description of the producer strain and fermentation studies[J]. *J Antibiot*, 1975, 28(4): 247-252.

[2] Adlman P J, Marks A M. Entrepreneu rial finance: Finance for small business[M]. NewJersey: Prentice Hall, 2002: 456.

[3] Y-K·舒 , C-K·王 , Y-H·邱 , 等 . 18 元环大环化合物及其类似物 , CN: 201210032395.4[P].

[4] Coronelli C, White R J, Lancini G C, *et al*. Lipiarmycin, anewantibiotic from actinoplanes. II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1975, 28(4): 253-259.

[5] 张长生 , 李苏梅 , 牛四文 , 等 . 六种台勾霉素类化合物及其制备方法和在制备抗菌药物中的应用 , CN: 201110104051[P].

[6] 王欣荣 , 褚以文 , 翟龙飞 , 等 . 含有利福霉素和闰年霉素