

文章编号: 1001-8689(2019)12-1347-05

Rakicidin B1 发酵提取液活性炭脱色工艺的研究

陈丽 江宏磊 赵薇 江红 林凤*

(福建省微生物研究所, 福建省新药(微生物)筛选重点实验室, 福州 350007)

摘要: **目的** 研究 rakicidin B1 发酵提取液的脱色工艺条件, 提高纯化后 rakicidin B1 样品的质量。**方法** 以 UV 和 HPLC 为检测方法, 以脱色率和 rakicidin B1 保留率为指标, 先通过单因素实验考察活性炭用量、脱色时间、脱色温度以及 pH 值对指标的影响。在单因素基础上, 采用 4 因素 3 水平正交试验分析各因素与两个指标的关系。**结果** Rakicidin B1 发酵提取液采用活性炭脱色最佳条件为活性炭用量 0.5%、脱色时间 40min、脱色温度 50℃、pH7.0, 在该条件下活性炭脱色率达 74.53%, rakicidin B1 保留率为 85.66%。**结论** 该脱色工艺简单可靠, 脱色效果较好, 适合于工业化生产。

关键词: Rakicidin B1; 活性炭; 脱色; 正交试验

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Study on the activated carbon decolorization process of rakicidin B1 extract

Chen Li, Jiang Hong-lei, Zhao Wei, Jiang Hong and Lin Feng

(Fujian Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007)

Abstract Objective To discuss the process of bleaching rakicidin B1 extracting solution with activated carbon. **Methods** Based on the single factor experiment, the influence of four main factors including the amount of activated carbon, bleaching time, temperature, and pH were researched. Orthogonal test design was applied to screen out the optimal conditions for the decolorization of rakicidin B1 extract. The decolorization ratio and the retention ratio of rakicidin B1 were used as indexes, which were determined by ultraviolet spectrophotometer and HPLC. **Results** The experimental results showed that the optimal bleaching conditions were as follows: rakicidin B1 was decolorized at 50℃ for 40min with the addition of 0.5% of activated carbon adjusted to pH7.0, bringing forth a decolorization rate of 74.53% and a retention ratio of 85.66%. **Conclusion** This method is simple and available for the commercial process.

Key words Rakicidin B1; Activated carbon; Decolorization; Orthogonal test design

Rakicidins 类化合物由小单孢菌或链霉菌产生的一类具有重要应用价值的抗肿瘤抗生素^[1], 本实验室已从海洋小单孢菌中分离得到一系列具有抑制多种肿瘤细胞生长的 rakicidins 化合物^[2-4], 这类化合物在乏氧环境下对肿瘤细胞的抑制活性比其在常氧环境下的强上几倍甚至几十倍^[5-6]。Rakicidin B1 是 2016 年分得的新化合物, 其结构相较于其他 rakicidins 类

化合物仅在于脂肪链的长度和甲基位置的不同, 研究发现其对 HCT-8、MGC803、A549、A375、HepG2 和 CASKI 等人肿瘤细胞株具有显著的抑制活性。进一步实验用移植 HCT-8 人结肠癌肿瘤细胞斑马鱼模型测试其体内抑瘤活性, 发现其对斑马鱼体内的 HCT-8 细胞移植瘤有较强的抑制活性, 并推断其抗乏氧肿瘤细胞是基于其能有效抑制 HIF-1(乏氧诱导

收稿日期: 2019-10-24

基金项目: 国家“十三五”重大新药创制项目 (No. 2018ZX09711001-007-007 和 2019ZX09721001-002-005); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项 (No. 2018R1009-8 和 2018R1009-9)

作者简介: 陈丽, 女, 生于 1982 年, 硕士, 助理研究员, 主要从事天然产物研究, E-mail: chenli821228@163.com

* 通讯作者, E-mail: life8810@aliyun.com

因子-1)的表达。2017年本实验室首次报道该类化合物具有良好的抗致病艰难梭菌等厌氧菌活性,发现rakicidin B1对艰难梭菌、疮疱丙酸杆菌、牙龈卟啉单胞菌及厌氧消化链球菌等多种革兰阳性厌氧菌具有很强的抑制作用, MIC 值为0.125~0.5 $\mu\text{g/mL}$ ^[7]。

抗生素的分离纯化方法应用较多的主要包括溶媒提取法、膜分离法和色谱法。溶媒提取是最常用的方法,主要利用有机物在互不相溶的两相溶剂之间溶解度不同的特性,使待提取的物质从一种溶媒转移到另一种溶媒中去,以达到分离纯化的目的。膜分离法是根据不同有机物分子量的差异进行分离纯化的方法,主要有超滤、纳滤、渗析和反渗透等。色谱法主要包括吸附色谱法、离子交换色谱法、凝胶层析色谱法和高效液相色谱法,是根据抗生素的不同组分在固定相和流动相之间的不均匀分配进行分离纯化。目前报道的提取rakicidins的方法主要采用溶剂提取法^[8-9],在分离过程中结合色谱法进行分离纯化。由于rakicidins发酵液中含有大量的色素,使提取液呈现深棕色或深红棕色,采用大孔吸附树脂纯化时,很容易堵塞柱子,减慢流速,使分离纯化时间延长,且会使部分色素进入样品,影响样品的外观,降低产品的质量。活性炭利用其孔状结构对色素产生吸附作用而使之与有效成分分离达到脱色的目的,且活性炭的成本低廉、吸附能力较强,在工业上被广泛用于药物组分的分离和纯化,如金华等^[10-12]在从银杏叶中提取黄酮过程中采用活性炭脱色方法脱除色素,谢建华等利用活性炭的吸附作用对青钱柳的多糖进行脱色等。目前rakicidin B1正作为候选化合物进行成药性研究,需要分离纯化制备大量的样品。本实验将rakicidin B1的提取液直接用活性炭脱色,而未将样品处理成粉末后再经溶剂溶解脱色,是因该样品在一定浓度的乙醇溶液中比较稳定,处理成粉末后一部分样品会遭到破坏而降低收率。故而本文探索在实验中采用活性炭吸附法对rakicidin B1的乙醇提取液进行脱色的工艺条件,并结合正交试验设计法优化该工艺,发现脱色后样品的色素大量减少,脱色效率较高且有利于后续的分

1 材料与仪器

1.1 仪器与设备

1260 Infinity II 高效液相色谱仪(美国Agilent Technologies); Allegra X-15R 离心机(美国

Beckman Coulter); UH5300 紫外分光光度计(日本Hitachi公司); XSE105DU 电子天平、S210-S 型数显pH计(瑞士Mettler Toledo); KQ300DE 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司); 电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司); DHG-9023A 型烘箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 原料与试剂

Rakicidin B1 发酵提取液和rakicidin B1 样品均由本实验室提供,粉末活性炭;无水乙醇(AR),乙腈(Merck公司),去离子水:自制;其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 活性炭预处理方法

将粉末活性炭在烘箱中置于105℃下烘40min,以备后用。

2.2 Rakicidin B1 发酵提取液的制备方法

加入3倍体积乙醇于rakicidin B1 发酵液中,振荡混匀,超声波提取2次,每次30min,4500r/min离心20min,取上清液,过滤得到rakicidin B1 的发酵提取液,低温保存备用。

2.3 脱色率的测定方法

于400~700nm 波长范围内对rakicidin B1 发酵提取液进行扫描,确定色素的最大吸收波长为450nm。将rakicidin B1 发酵提取液稀释成不同浓度,在450nm下测定其吸光度值,以吸光度对浓度作图,得到回归方程: $Y=0.6337X-0.0064(r=0.9994)$,线性范围为1~10 $\mu\text{g/mL}$ 。

Rakicidin B1 脱色率(%)=(脱色前吸光度值-脱色后吸光度值)/脱色前吸光度值 $\times 100\%$ 。

2.4 Rakicidin B1 保留率的测定

精确称取一定量的rakicidin B1 对照品,配制成浓度为1.6mg/mL的rakicidin B1 标准溶液,分别用移液管移取一定体积的标准溶液于10mL容量瓶中,逐级稀释配制成浓度分别为800、640、480、320、160、80和40 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,按照文献报道的高效液相色谱法^[9]测定不同浓度下rakicidin B1 的峰面积,以峰面积对浓度作图,得回归方程: $Y=11.82X+8.53(r=0.9999)$,线性范围为40~640 $\mu\text{g/mL}$ 。根据HPLC测定的rakicidin B1 发酵提取液脱色前后的峰面积值,结合回归方程计算提取液中rakicidin B1 的含量。

Rakicidin B1 保留率(%)=脱色后rakicidin B1 含量/脱色前rakicidin B1 含量 $\times 100\%$ 。

2.5 单因素试验

2.5.1 活性炭添加量对 rakicidin B1 脱色效果的影响

用移液管吸取 5.0mL rakicidin B1 发酵提取液于具塞试管中, 依次按照活性炭添加量为 0.05%、0.075%、0.1%、0.125%、0.25%、0.5%、0.75% 和 1.0% 的比例加入, 在 pH7.0、温度为 40℃ 下振摇 1h, 取上清液, 用 0.22μm 滤膜过滤, 测定吸光度和 rakicidin B1 的含量, 计算脱色率和 rakicidin B1 保留率, 每种溶液测定 3 次, 计算平均值。

2.5.2 脱色时间对 rakicidin B1 脱色效果的影响

用移液管吸取 5.0mL rakicidin B1 发酵提取液于具塞试管中, 加入 0.5% 的活性炭, 在 pH7.0、温度 40℃ 条件下, 设置震摇时间分别为 10、20、30、40、50、60 和 70min, 取上清液, 用 0.22μm 滤膜过滤, 测定吸光度和 rakicidin B1 的含量, 计算脱色率和 rakicidin B1 保留率, 每种溶液测定 3 次, 计算平均值。

2.5.3 脱色温度对脱色率的影响

用移液管吸取 5.0mL rakicidin B1 发酵提取液于具塞试管中, 加入 0.5% 的活性炭, 在 pH7.0、分别在 30、40、50、60、70 和 80℃ 条件下, 振摇 40min, 取上清液, 用 0.22μm 滤膜过滤, 测定吸光度和 rakicidin B1 的含量, 计算脱色率和 rakicidin B1 保留率, 每种溶液测定 3 次, 计算平均值。

2.5.4 溶液 pH 对脱色率的影响

用移液管吸取 5.0mL rakicidin B1 发酵提取液于具塞试管中, 加入活性炭的量为 0.5%, 在 40℃ 条件下, 用 0.1mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节溶液 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 振摇 30min, 取上清液, 用 0.22μm 滤膜过滤, 测定吸光度和 rakicidin B1 的含量, 计算脱色率和 rakicidin B1 保留率, 每种溶液测定 3 次, 计算平均值。

2.6 正交试验设计优化脱色工艺条件

为了考察各因素之间的交互影响, 在单因素试验基础上, 采用正交试验设计, 以活性炭添加量、脱色时间、脱色温度以及 pH 值为因素, 以脱色率和 rakicidin B1 保留率为考察指标, 用 4 因素 3 水平的正交试验优化工艺条件, 因素水平表见表 1。

表 1 试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of activated carbon

水平	因素			
	A 活性炭 用量 /%	B 脱色 时间 /min	C 脱色 温度 /℃	D 脱色 pH 值
1	0.25	30	30	6.0
2	0.5	40	40	7.0
3	0.75	50	50	8.0

3 结果与讨论

3.1 活性炭脱色的单因素试验结果

3.1.1 活性炭用量对脱色率和 rakicidin B1 保留率的影响

由图 1 可知, rakicidin B1 的脱色率随着活性炭添加量的增加呈逐渐升高趋势, 活性炭添加量从 0.5% 到 1.0% 时增加趋势逐渐平缓, 1.0% 时脱色率最高为 84.90%。而 rakicidin B1 的保留率则相反, 随活性炭添加量增加逐步减小, 当活性炭添加量在 1.0% 时, rakicidin B1 保留率仅为 55.61%。综合考虑 rakicidin B1 保留率及脱色率, 选择 0.5% 为最佳活性炭添加量, 此时脱色率为 79.65%, rakicidin B1 保留率为 82.28%。

3.1.2 脱色时间对脱色率和 rakicidin B1 保留率的影响

图 2 的结果表明, rakicidin B1 的脱色率随着时间延长逐渐上升, 同时 rakicidin B1 保留率随着时间的延长逐渐降低, 推测是因活性炭在一定的时间内, 对 rakicidin B1 的吸附过饱和, 致使部分 rakicidin B1

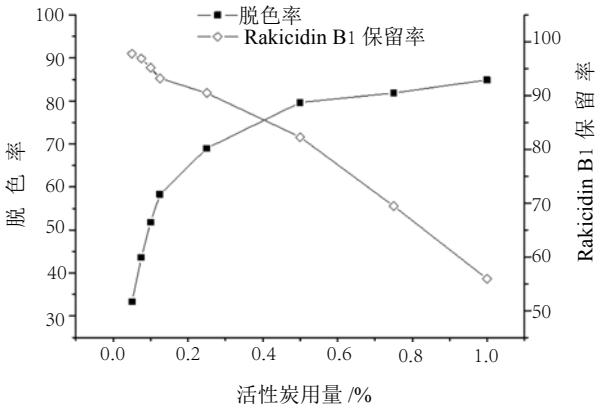


图 1 活性炭用量对脱色效果的影响

Fig. 1 The effect of different added amount of activated carbon on the decolorization

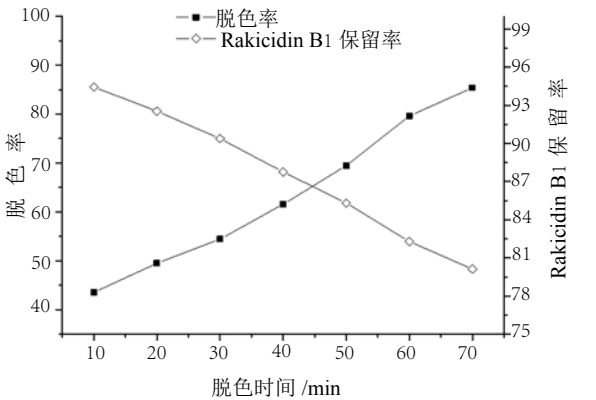


图 2 脱色时间对脱色效果的影响

Fig. 2 The effect of bleaching time on the decolorization

样品损失。为使 rakicidin B1 保留率及脱色率都在较好的状态, 本实验选择 40min 为脱色时间合适。

3.1.3 脱色温度对脱色率和 rakicidin B1 保留率的影响

由图 3 可知, 从 30~50℃时, 由于温度的升高使色素分子运动加剧, 使 rakicidin B1 的脱色率也逐步升高。当温度从 50℃升高到 80℃时, 脱色率随着温度的升高趋势逐渐变得平缓, 推测是因溶液里乙醇的存在导致活性炭的吸附作用减弱。从趋势上看, rakicidin B1 的保留率从 30℃升高到 60℃时呈现逐渐减小趋势, 应是活性炭的吸附作用引起, 而从 60℃升高到 80℃时, 保留率略微增加, 推测是因为温度升高乙醇得到的溶解能力增强, 导致活性炭的吸附作用减弱。结合以上分析, 并考虑脱色率及 rakicidin B1 保留率以及样品的稳定性, 选择 40℃为脱色温度合适。

3.1.4 溶液 pH 对脱色率和 rakicidin B1 保留率的影响

图 4 表明, rakicidin B1 的脱色率随着 pH 的升高而减小, 由 80.31% 增至 72.34%, 而 rakicidin B1 保留率随溶液 pH 由 4 上升至 6~7 时逐渐增加, 并

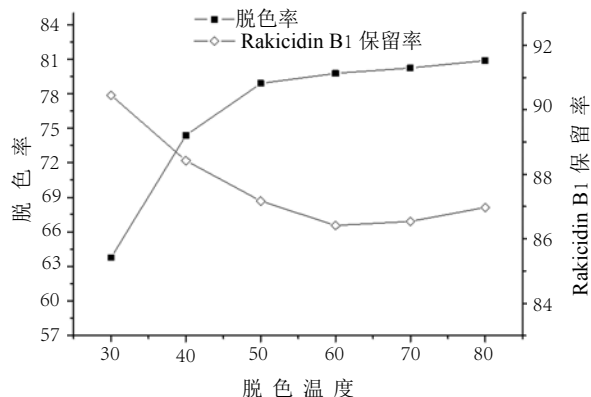


图 3 温度对脱色效果的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the decolorization

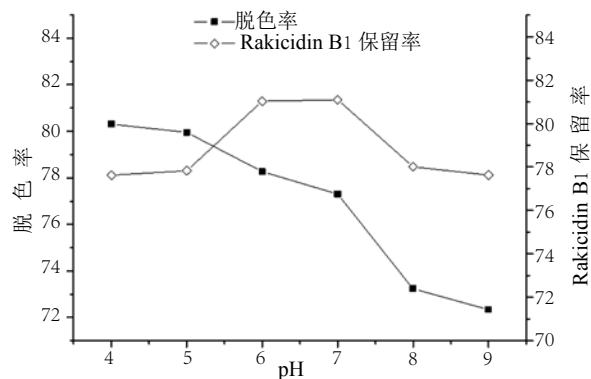


图 4 pH 对脱色效果的影响

Fig. 4 The effect of pH value on the decolorization

保持最高状态, 至 pH 值为 8、9 时, 保留率分别降为 78.01% 和 77.63%, 可能是由于活性炭的吸附能力随 pH 升高而下降。考虑脱色率和 rakicidin B1 保留率二者都应保持在较好的状态, 且使后续分离纯化过程中样品保持更为稳定的状态, 选择 pH 为 7.0 更好, 此时脱色率为 77.30%, rakicidin B1 保留率为 81.10%。

3.2 活性炭脱色的正交试验工艺条件优化

本正交试验采用综合加权评分法^[13], 两项权重系数均为 0.5, 将脱色率和 rakicidin B1 保留率中最大的指标定位 100 分, 其它各项按下式评分: 综合评分 = (rakicidin B1 保留率 / 93.23% × 100 × 0.5) + (脱色率 / 79.33% × 100 × 0.5), 结果见表 2。

由表 2 可知, 4 种影响 rakicidin B1 活性炭脱色率和保留率的因素, 影响程度强弱分别为 A>D>B>C, 即活性炭添加量对脱色效果影响最大, 其次为脱色 pH, 脱色时间和脱色温度影响较小。故优化后 rakicidin B1 脱色最佳工艺条件为 A2B2C3D2, 即活性炭添加量为 0.5%, 脱色时间为 40min, 脱色温度为 50℃, pH 值为 7.0, 此时 rakicidin B1 的脱色率和保留率均保持在较高的水平。

3.3 验证试验

在上述最佳工艺条件下进行 3 次验证试验, 以检验该结果是否可靠。得到 rakicidin B1 的脱色率为 74.53%, rakicidin B1 的保留率为 85.66%。计算得相对偏差分别为 0.73% 和 0.47%, 说明上述所得的最佳工艺条件可靠合理。

4 结论

本试验采用将 rakicidin B1 的乙醇提取液进行活性炭脱色, 首先是因该样品在乙醇溶液中能够保持较好的稳定性, 另一方面, 活性炭条件温和, 用量较少, 采用活性炭脱色后, 一部分杂质能够通过活性炭孔状结构的吸附沉淀下来, 改善乙醇提取液的色泽, 以至于在后续的柱层析分离纯化过程中, 不会引起树脂柱柱头的堵塞。在乙醇溶剂中采用正交试验设计优化 rakicidin B1 活性炭脱色工艺, 确定了 rakicidin B1 的活性炭脱色最佳工艺为: 活性炭添加量为 0.5%, 脱色时间为 40min, 脱色温度为 50℃, pH 值为 7.0。在此条件下验证试验结果, rakicidin B1 脱色率为 74.53%, rakicidin B1 保留率为 85.66%。该工艺条件下 rakicidin B1 具有较好的脱色效果和较高的保留率, 并可使下一步的分离纯化更为顺利, 为规模化制备合格样品打下基础。

表 2 Rakicidin B1 活性炭脱色的正交试验设计及结果
Tab. 2 Orthogonal analysis and results of the optimization of decolorization with activated carbon on rakicidin B1

试验号	因素				实验结果		
	A 活性炭添加量	B 脱色时间	C 脱色温度	D 脱色 pH	脱色率	Rakicidin B1 保留率	综合评分
1	1	1	1	1	66.89	93.23	92.16
2	1	2	2	2	70.38	90.52	92.91
3	1	3	3	3	69.16	87.86	90.71
4	2	1	2	3	72.65	81.75	89.61
5	2	2	3	1	74.47	85.58	92.83
6	2	3	1	2	72.97	86.31	92.28
7	3	1	3	2	78.58	71.83	88.05
8	3	2	1	3	78.84	69.26	86.84
9	3	3	2	1	79.33	69.47	87.26
K1	275.78	269.82	271.28	272.25			
K2	274.72	272.58	269.78	273.24			
K3	262.15	270.25	271.59	267.16			
k1	91.92	89.94	90.43	90.75			
k2	91.57	90.86	89.93	91.08			
k3	87.38	90.08	90.53	89.05			
R	4.54	1.02	0.60	2.03			

参考文献

[1] 林风, 陈晓明, 周剑, 等. 海洋小单孢菌产生的缩肽类化合物 rakicidins 抗肿瘤活性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(7): 516-519.

[2] 江红, 林如, 郑卫, 等. 海洋青铜小单孢菌 FIM02-523 产生的脂肽类化合物 FW523 的分离鉴别和生物学活性 [J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(5): 267-270.

[3] Lin F, Wang C X, Jiang H L, *et al.* Rakicidin B1, a new rakicidin analogue with antitumor activities from marine *Micromonospora* sp[J]. *Chin J Antibiot*, 2016, 41(7): 510-515.

[4] Chen L, Zhao W, Jiang H L, *et al.* Rakicidins G-I, cyclic depsipeptides from marine *Micromonospora chalcone* FIM 02-523[J]. *Tetrahedron*, 2018, 74(30): 4151-4154.

[5] Oku N, Matoba S, Yamazaki Y M, *et al.* Complete stereochemistry and preliminary structure-activity relationship of rakicidin A, a hypoxia-selective cytotoxin from *Micromonospora* sp[J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(11): 2561-2565.

[6] Yamazaki Y, Kunimoto S, Ikeda D. Rakicidin A: A hypoxia-selective cytotoxin[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(2): 261-265.

[7] 林风, 陈丽, 赵薇, 等. 缩肽类化合物 rakicidins 体内外抗艰难梭菌活性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(5): 343-347.

[8] McBrien K D, Berry R L, Lowe S E, *et al.* Rakicidins, new cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora* sp. fermentation, isolation and characterization[J]. *J Antibiot*. 1995, 48(12): 1446-1452.

[9] 赵薇, 江宏磊, 周剑, 等. 应用响应面法优化 rakicidin B 的提取工艺 [J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(4): 432-436.

[10] 金华, 钟方丽, 李秀萍, 等. 银杏叶黄酮活性炭脱色工艺的研究 [J]. 食品研究与开发, 2007, 44(4): 85-88.

[11] 谢建华, 申明月, 聂少平, 等. 青钱柳多糖活性炭脱色工艺 [J]. 南昌大学学报, 2013, 37(4): 382-385.

[12] 唐伟, 汪水呈, 陆兆新, 等. 表面活性素纯化工艺中活性炭脱色条件的优化 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(1): 113-120.

[13] 洪伟. 林业试验设计技术与方法 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1991: 148-158.