

利用高速逆流色谱从真菌 HCCB00106 转化液分离转化产物

Isolation of bioconversion product from a fungus strain HCCB00106 by HSCCC

夏兴^{1,2} 戈梅^{1,2,*} 陈代杰¹Xia Xing^{1,2}, Ge Mei^{1,2} and Chen Dai-jie¹

(1 上海医药工业研究院, 上海 200040

2 上海来益生物药物研究开发中心, 上海 201203)

(1 Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040;

2 Shanghai Health Creation Center of Biopharmaceutical R&D, Shanghai 201203)

摘要: 采用高速逆流色谱法(HSCCC)对真菌HCCB00106的雄甾烯二酮(4AD)转化产物进行了分离研究,在选定体系中底物4AD、杂质及主要产物得到了较好的分离。经鉴定,主要产物为睾内酯(17 α -氧代-D-扩环-雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮)。

关键词: 高速逆流色谱; 雄甾烯二酮; 生物转化

中图分类号: O652.6 **文献标识码:** A

高速逆流色谱作为一种较新型的分离手段在国外已得到较广泛的应用,在国内的重要领域也不断有报道^[1,2],浙江大学曾将其用于甾体激素的定量研究^[3]。本实验在研究甾体的微生物转化的过程中将其用于雄甾烯二酮(4AD)及其相关物质的分离,获得了较好的效果。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

TBE-300A 高速逆流色谱仪为深圳同田生化技术有限公司产品,配 8823B-UV 紫外检测仪;高效液相色谱仪 1100 型为 Agilent 科技公司产品。

实验用试剂均为分析纯,购于上海医药集团。硅胶板(GF₂₅₄)购自 Merck 公司。转化底物 4AD 由浙江医药新昌制药厂提供。4AD 标准品购自 SIGMA 公司。

1.2 实验方法

(1) 转化液制备及其预处理 在真菌 HCCB00106 的培养液中加入 4AD, 转化 72h 后将转化液离心。上清液以适量二氯甲烷萃取两次;沉淀用丙酮浸泡 2h 后浓缩,用适量二氯甲烷萃取。合并二氯甲烷萃取液,浓缩至干。

(2) 色谱分离条件 利用选定系统进行色谱分离^[4-6]。溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(4:5:4:5),配制一定量的两相溶剂,静置分相。以上相为固定相,下相为流动相。称取粗提物 200mg,用流动相配成 20ml 的样品溶液。将固定相充实整个螺

旋柱后,开启色谱仪,调节转速为 800r/min,然后以 2ml/min 的流速导入流动相,待两相达到平衡后进样,并以 800r/min 的转速,用流动相以 2ml/min 的流速进行洗脱。收集合并洗脱液,TLC 和 HPLC 分析洗脱结果。

(3) TLC 展开条件 乙酸乙酯-二氯甲烷(2:1),254nm 紫外波长检测。

(4) HPLC 检测条件 反相 C₁₈ 柱,柱温 50℃,流动相:甲醇-水(75:25),流速 1ml/min,检测波长 242nm。

2 结果与讨论

转化产生了一个主要产物,在转化液中还残留有少量的底物 4AD 和其他杂质(Fig 1)。应用高速逆流色谱,在上述条件下从转化液中分离得到一个主要产物,纯度 > 98%,收率 > 85%。

经鉴定,转化主产物为睾内酯(17 α -氧代-D-扩环-雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮)。其数据如下:分子量 300; ¹H-NMR (δ : 7.29, 7.03, 6.25, 6.22, 6.07, 2.61, 2.51, 1.31, 1.29 等), ¹³C-NMR (δ : 85.66, 170.53, 167.02, 154.13, 127.99, 124.07, 82.27, 50.87, 45.59, 42.87, 38.89, 37.91, 32.16, 28.41, 23.31, 20.09, 20.00, 18.61); λ_{max} 254nm。结构见 Fig 2。

睾内酯是一种内源性的甾体芳香酶抑制剂,能非竞争性和不可逆结合芳香酶,从而有效抑制雄激素转化为雌激素。在临床上睾内酯可作为抗肿瘤剂使用,主

收稿日期: 2006-10-13 修回日期: 2006-11-06

作者简介: 夏兴,男,生于 1979 年,在读硕士研究生。主要从事分离纯化研究。

* 通讯作者, E-mail: hccb002@yahoo.com.cn

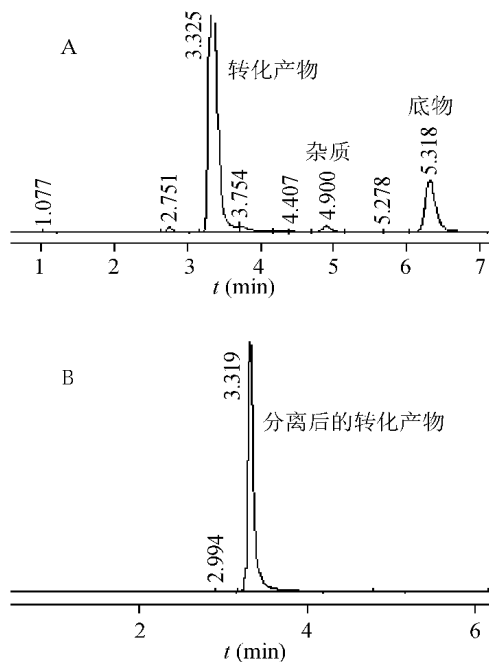


Fig 1 HPLC profiles before (A) and after (B) HSCCC separation

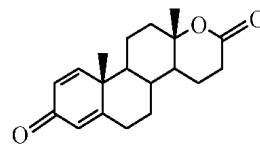


Fig 2 Structure of testolactone

效果,较高的样品回收率,同时不使用固体支撑体,不存在对样品的吸附和变性现象,决定了高速逆流色谱在制备分离样品方面的巨大优势。本实验的结果说明,高速逆流色谱的确可以作为一种新型有效的分离技术用于微生物转化产物的分离。

参考文献

- [1] 袁黎明,傅若农,张天佑 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用[J] 药物分析杂志,1998,18(1): 60
- [2] 叶龙忠,汪敏燕,陈秀,等 高速逆流色谱研究进展[J] 化工生产与技术,2003,10(4): 27
- [3] 马忠明,章连众,韩世钧 高速逆流色谱法分离和测定甾体激素[J] 分析化学,1995,23(9): 1066
- [4] 戴德舜,伍方勇,王义明,等 高速逆流色谱实验体系的选择和优化[J] 分析仪器,2001,(3): 31
- [5] 颜继忠,褚建军,童胜强 中药分离中高速逆流色谱溶剂体系的选择[J] 中国现代应用药学杂志,2003,20(5): 374
- [6] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J] *J Chromatogr A*, 2005, 1065(2): 145
- [7] 顾铭,苏志国 高速逆流色谱用于天然产物分离和指纹图谱构建[J] 生物加工工程,2003,1(2): 59
- [8] 黄宝康,秦路平,郑汉臣,等 高速逆流色谱技术在天然产物及中药质控中的应用[J] 中药材,2001,24(10): 757
- [9] 孙媛媛,唐玉海 高速逆流色谱技术在中草药有效成分分离中的应用[J] 西北药学杂志,2003,18(6): 282

要用于治疗绝经后妇女某些类型的乳腺癌。

在国内,高速逆流色谱已被广泛应用于中药成分分析和制备^[7-9],在微生物产物的分离纯化方面也有所应用,但尚未被当作主要的分离手段。在使用高速逆流色谱的分离过程中,固定相保留率、分配系数是重要的衡量指标。一般认为固定相保留率 ρ 40%,分配系数 K 在0.2~2之间为适合的相条件。本实验的固定相保留率为60%,计算得到AD、杂质以及转化产物的分配系数 K 分别为1.86、0.88和0.19。比较其它方法,高速逆流色谱技术具有较高的进样量、较好的分离

(上接第158页)

参考文献

- [1] von Itzstein M, Wu W Y, Kok G B, et al Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication [J] *Nature*, 1993, 363(6428): 418
- [2] Natalia A I, Nicolai V B, Robert GW, et al Combination chemotherapy, a potential strategy for reducing the emergence of drug-resistant influenza A variants [J] *Antivir Res*, 2006, 70(3): 121
- [3] 李卓荣,刘宗英,陶佩珍,等 一组长链烷氧烷基取代唾液酸衍生物及其制备方法[P] CN: 200610083842.3, 2006-10-25
- [4] 尚广东,李卓荣,王以光 N-乙酰-D-神经氨酸(Neu5Ac)醛缩酶的克隆、表达和活性测定[J] 中国抗生素杂志, 2004, 29(7): 391
- [5] Malcolm C, Mark J B, Richard C, et al Synthesis of the potent influenza neuraminidase inhibitor 4-guanidino Neu5Ac2en. X-Ray molecular structure of 5-acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-erythro-L-glucurononic acid [J] *J Chem Soc Perkin Trans*, 1995, 1: 1173