

高速逆流色谱法分离纯化环孢菌素

方东升 谢阳 陈勇 陈晓明 郑卫

(福建省微生物研究所, 福州 350007)

摘要: 应用高速逆流色谱法对环孢菌素的分离纯化进行研究,选择石油醚-丙酮-水(3:3:2,V/V)为两相体系,计算环孢菌素 A、B、C、D 在两相体系中的分配系数,以上相为固定相,下相为流动相进行高速逆流色谱分离纯化,高效液相色谱法测定单组分纯度。实验结果表明一次高速逆流色谱即可将环孢菌素粗品分离纯化,得到纯度 98.5% 以上的环孢菌素 A、B、C、D 单组分,收率达 85% 以上。

关键词: 高速逆流色谱; 环孢菌素; 分离纯化

中图分类号: R979.5 **文献标识码:** A

Separation of cyclosporins by high speed counter current chromatography

Fang Dong-sheng, Xie Yang, Chen Yong,

Chen Xiao-ming and Zheng Wei

(Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007)

ABSTRACT High speed countercurrent chromatography (HSCCC) was used for the separation of cyclosporin A, B, C, D by using petroleum ether/acetone/water (3 : 3 : 2, V/V) as two-phase solvent system. The lower phase was selected as the mobile phase and upper phase as the stationary phase based on the calculated partition coefficient (K) of cyclosporin A, B, C, and D. The purity of separated fractions was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Experiment data shows that cyclosporin A, B, C and D can be separated through one run of HSCCC with high purity (>98.5%) and recovery rates (>85%).

KEY WORDS High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC); Cyclosporins; Separation and purification

环孢菌素是由真菌产生的一组环状十一肽物质,由瑞士 Sandoz 公司于 1976 年首次报道,并从其产生菌多孔木霉 (*Tolypocladium inflatum*) 的发酵液中分离出二十多个同系物^[1],此后又陆续从其它真菌中寻找找到环孢菌素的产生菌^[2~6]。环孢菌素具有广泛的生物活性,如环孢菌素 A (CyA) 已作为免疫抑制剂广泛应用于器官移植时的抗排斥反应^[1],环孢菌素 H 是含 7 个跨膜区域的 G-蛋白耦合受体——甲酰化多肽受体的强抑制剂^[7,8],环孢菌素 D 的衍生物 PSC-833 可作为肿瘤多药耐药逆转剂^[9],环孢菌素 C 的衍生物具有抗 HIV 作用等^[10]。因此,从环孢菌素产生菌的代谢产物中分离纯化环孢菌素各组分并研究它们及其衍生物的生物活性具有重要的意义。目前分离纯化环孢菌

素的方法主要有凝胶色谱,硅胶层析和高效液相色谱等^[1]。由于环孢菌素同系物在结构上往往只是个别氨基酸甚至氨基酸构型的差异^[1,8],采用上述基于液-固色谱的分离方法往往很难将这些组分完全分离开来,因此探索环孢菌素新的分离技术具有很强的应用价值。

高速逆流色谱 (High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) 是国际上于 20 世纪 80 年代以来在液-液分配色谱基础上发展起来的新型分离技术,高速逆流色谱利用螺旋柱在高速行星运动时产生的巨大离心力,使螺旋柱中互不相溶的两相不断混合,同时保留其中的一相作为固定相,并将一相作为流动相用恒流泵连续输入,随流动相进入螺旋柱的溶质在两相

收稿日期:2004-04-09

作者简介:方东升,男,生于 1968 年,工程师。主要从事微生物新药筛选的研究。

间反复分配,按在流动相中分配系数的大小而依次得到分离^[11~13]。

高速逆流色谱作为一种新型的分离技术,与传统液-固色谱相比具有许多优点。首先,它不用固态支撑体,不存在样品组分的吸附、变性、失活、拖尾等现象,节省了材料和溶媒消耗;其次,它的分离效率高,并且分离时间短,一般几个小时即可完成一次分离;此外,有广泛的液-液分配体系可供选择,体系更换方便、快捷;它的进样量大,这对于样品的纯化制备显示出很大的优势。近年来,随着梯度洗脱、pH 区带优化、离子交换顶替、手性选择分离等技术的引入,高速逆流色谱技术将会得到更广泛的应用^[14,15]。

本文报道高速逆流色谱在分离制备环孢菌素同系物方面的应用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

环孢菌素粗品粉末,福建省微生物研究所提供;高效硅胶板 50mm×100mm,青岛海洋化工厂;石油醚(60~90℃),上海联试化工试剂有限公司;丙酮,汕头达濠精细化学品公司;试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.2 仪器设备

TBE-300 高速逆流色谱仪,深圳同田生化技术有限公司;LC-10ADVP 高效液相色谱仪(自动进样器、紫外二极管阵列检测器),日本岛津仪器公司;BSZ-100 自动分部收集器,上海沪西分析仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 溶剂系统的选择^[14] 溶剂系统的选择对于高速逆流色谱对样品的分离十分关键,要求溶剂可分层、被分离的溶质的分配系数(K)范围在 0.2~2。结合实验积累的经验,选择石油醚-丙酮-水(3:3:2)溶剂系统,配制一定量的两相溶剂,静置分层。

1.3.2 确定固定相和流动相 各取 2ml 上相和下相于小试管中,加入 1mg 含环孢菌素 A(CyA)、B(CyB)、C(CyC)、D(CyD)的粗品,剧烈振荡 1min 后静置分层,用毛细管吸取近似等量的上下分层溶液于薄层高效硅胶板上,待溶剂挥发完后用水饱和的乙酸乙酯为展层剂,碘蒸汽显色,计算 R_f 值^[16]。进样前的环孢菌素粗品,在 TLC 板上展开为四个斑点,分别为环孢菌素 A、B、C、D 组分,它们的 R_f 值分别为 0.56、0.34、0.23、0.69。

分别取上相和下相溶液进行 HPLC 检测,根据积分面积计算出环孢菌素 A、B、C、D 组分的分配系数 K 分别为 1.4、0.6、0.2、5.6。选择上相为固定相,下相为流动相。根据 K 值判断,流动相中环孢菌素 C、B、A 依

次流出,而环孢菌素 D 应留在固定相中,可以达到分离目的。

1.3.3 固定相保留率的测定 将固定相泵满螺旋柱,开启色谱仪,调节转速到 600r/min(正转),然后以 2ml/min 的恒定速度将流动相泵入螺旋柱,收集主机出口流出的固定相。当主机出口流出流动相时,螺旋柱内固定相和流动相达到动力学平衡状态,此时测量被流动相推出的固定相体积 $V_{出}$,按下式计算固定相保留率 ρ (固定相保留率 ρ 必须 $\geq 40\%$,否则该溶剂系统不适用)。

$$\rho = (V_{总} - V_{出}) / V_{总} \times 100\%$$

式中: $V_{总}$ —管路总体积(ml);

$V_{出}$ —流动相推出的固定相体积(ml)

经计算,固定相保留率 $\rho = 69\%$ 。

1.3.4 样品分离方法和组分收集 称取环孢菌素粗品 200mg,用流动相配成 20ml 的样品溶液,在固定相和流动相达到平衡状态后,由进样阀将样品溶液引入螺旋柱,转速 600r/min(正转),用流动相以 2ml/min 的流速洗脱,用分部收集器在进样 60min 后开始收集,每 3min 收集一管,每管 6ml。

1.3.5 高效液相色谱分析方法 将收集到的环孢菌素各组分进行高效液相色谱分析,分析条件:Nucleosil C₁₈ 色谱柱,填料粒径 5 μ m,流动相甲醇-水(80:20),流速 1ml/min,紫外检测波长 205nm,柱温 60℃,进样量 20 μ l。

2 结果与分析

2.1 高速逆流色谱分离结果

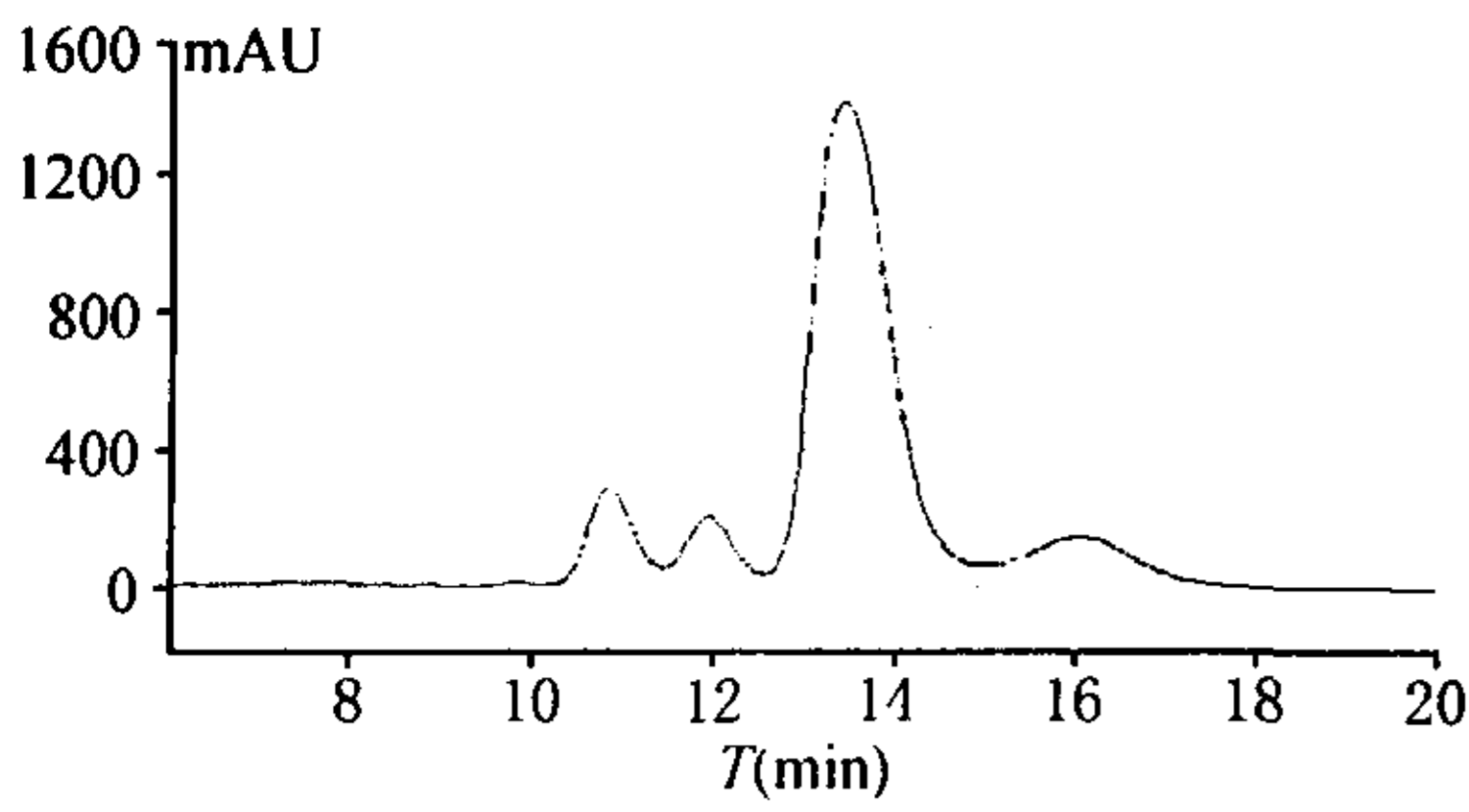
经高速逆流色谱分离,得到的样品收集管用毛细管点样在高效硅胶板上,用水饱和的乙酸乙酯为展层剂,碘蒸汽显色,计算 R_f 值,将 TLC 行为相同的收集管合并,收集到的样品可分为三部分。进样 450min 后,停止高速逆流色谱主机运转,用固定相将主机螺旋柱内的液体全部推出,收集为第四部分(表 1)。

2.2 HPLC 测定分析结果

2.2.1 进样前样品组分及含量分析 进样前环孢菌素粗品经 HPLC 分析,主要含有环孢菌素 C、B、A、D 四个组分(图 1),各组分含量见表 2。

表 1 收集到的四部分样品情况

	收集时间 (min)	收集管数	收集体积 (ml)	R_f 值
第一部分	93~120	9	54	0.25
第二部分	162~195	11	66	0.36
第三部分	276~435	53	318	0.58
第四部分	—	—	330	0.70



环孢菌素 C、B、A、D 组分保留时间分别为 10.86、11.95、13.46 和 16.05min

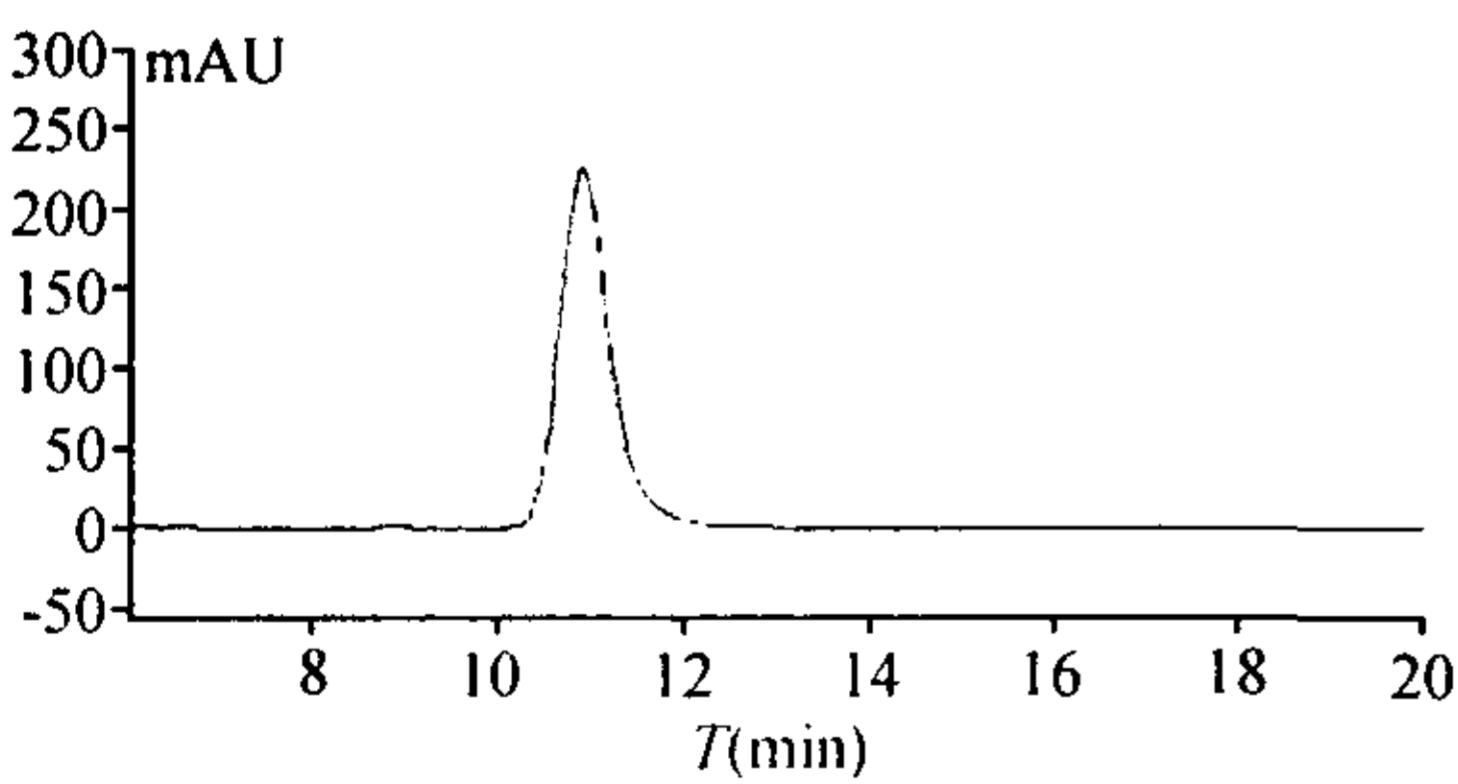
图 1 进样前环孢菌素粗品 HPLC 图

表 2 环孢菌素粗品组分含量与重量

	含量(%)	重量(mg)
Cyclosporin C	9.1	18.2
Cyclosporin B	5.8	11.5
Cyclosporin A	76.4	152.8
Cyclosporin D	6.2	12.5

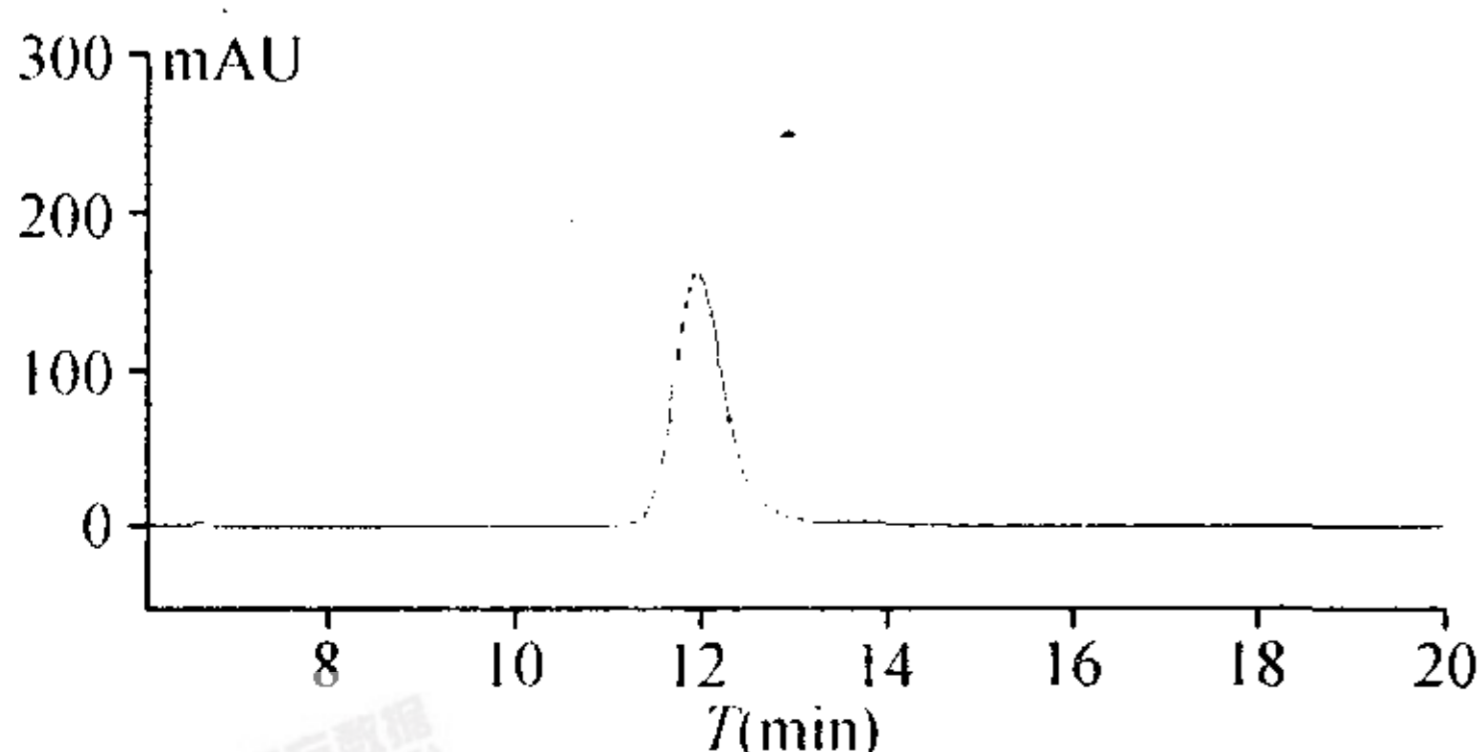
表 3 HSCCC 分离后环孢菌素各组分纯度和收率

HPLC 测定组分名称	重量(mg)	纯度(%)	收率(%)
第一部分 Cyclosporin C	15.5	99.3	85.0
第二部分 Cyclosporin B	10.2	98.7	88.5
第三部分 Cyclosporin A	137.8	98.6	90.2
第四部分 Cyclosporin D	10.8	98.5	86.3



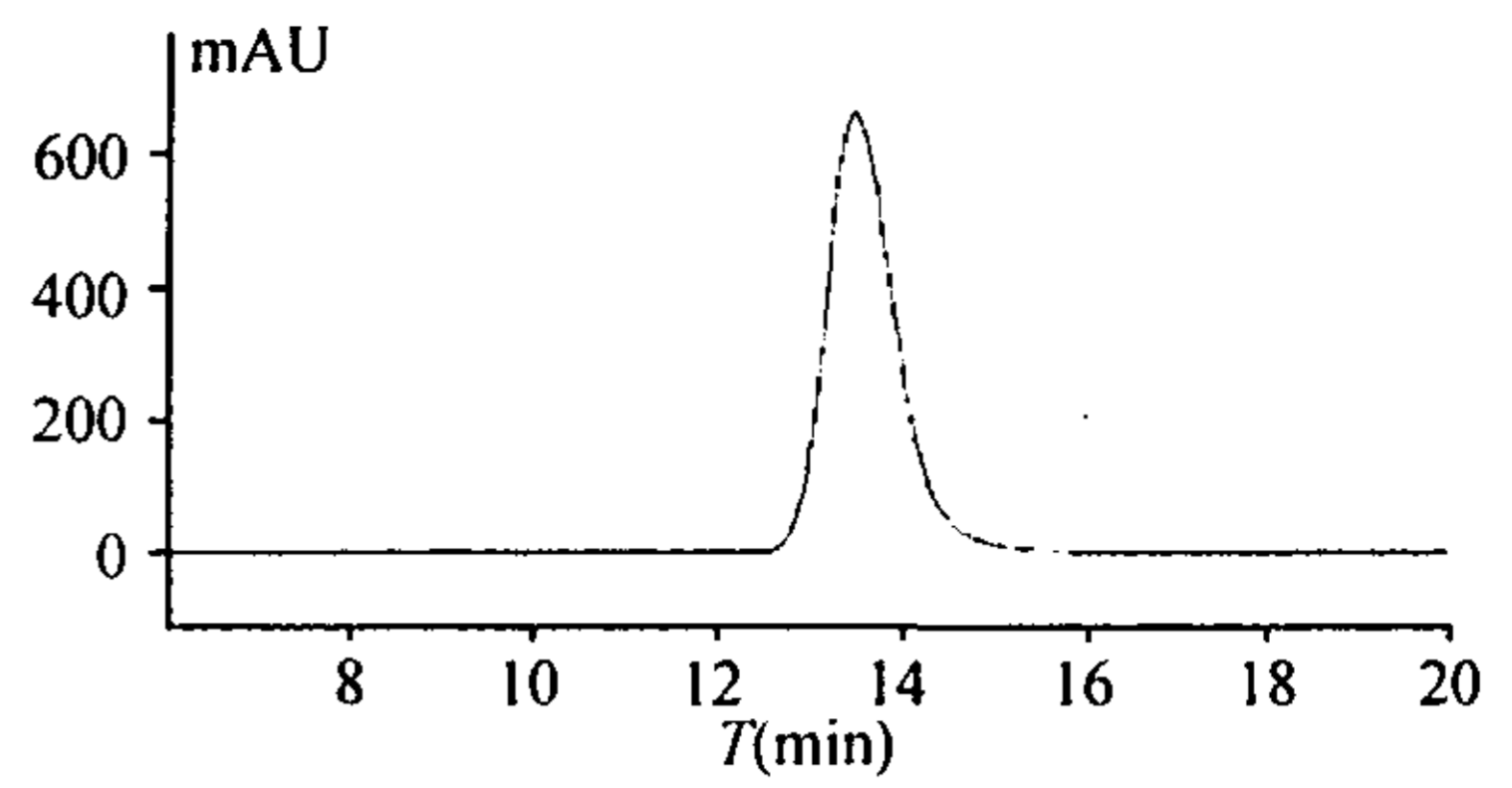
CyC 保留时间 10.82min

图 2 HSCCC 分离后环孢菌素 C 组分 HPLC 图



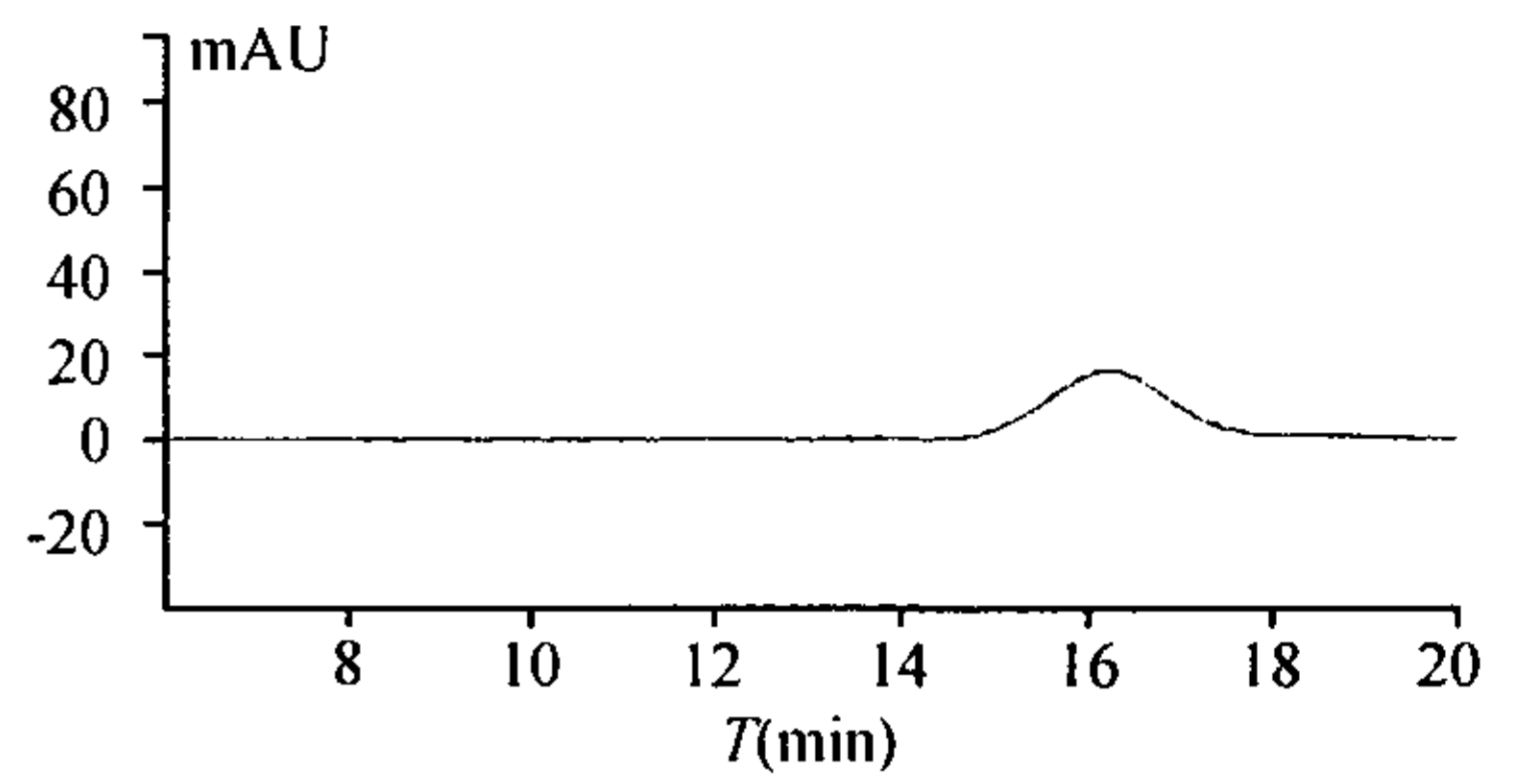
CyB 保留时间 11.92min

图 3 HSCCC 分离后环孢菌素 B 组分 HPLC 图



CyA 保留时间 13.49min

图 4 HSCCC 分离后环孢菌素 A 组分 HPLC 图



CyD 保留时间 16.04min

图 5 HSCCC 分离后环孢菌素 D 组分 HPLC 图

2.2.2 分离后环孢菌素各组分纯度和收率 将收集得到的四部分样品经 HPLC 分析,分别为环孢菌素 A、B、C、D,见表 3 和图 2~5。

3 结论

通过本实验可得出以下结论:

(1)在石油醚-丙酮-水(3:3:2,V/V)为两相系统条件下,用高速逆流色谱分离环孢菌素粗品,根据分配系数 $K_C < K_B < K_A$,依次收集得到环孢菌素 C、B、A 组分,分配系数较小的组分最先被洗脱出来;

(2)由于环孢菌素 D 组分的分配系数 $K=5.6$,即其在上相中的溶解度远大于在下相中的溶解度,本实验采用进样 450min 后,停机用固定相将主机内的液体全部推出,将收集液浓缩蒸干得到环孢菌素 D 组分。若该方法得到的环孢菌素 D 组分纯度不高,选择下相为固定相,上相为流动相,将收集液浓缩后进行第二次高速逆流色谱分离,可以分离到高纯度的环孢菌素 D 单组分,这一方法已在本实验中得到验证;

(3)实验中进样量达到 200mg,在 8h 内完成分离,实现了比高效液相更为有效的制备分离和提纯;

(4)利用高速逆流色谱可以有效地将环孢菌素粗品中的 A、B、C、D 组分分离出来,样品纯度高、回收率高,并且有很好的重复性;

(5)本实验方法经调整溶剂系统比例和操作条件后,应用于环孢菌素发酵粗品的分离,有可能从中分离得到其它环孢菌素同系物。

高速逆流色谱作为一种有效的新型分离技术用于环孢菌素同系物的分离,效果十分理想。较高的进样量、较好的分离能力、较高的样品回收率以及没有不可逆吸附等特点,决定了它在抗生素单组分标准品制备、多组分同系物分离纯化鉴定及抗生素研究开发领域将得到越来越广泛的应用^[17]。我国是世界上较早开展逆流色谱技术的国家,并且在中草药的分离纯化上得到广泛应用^[12,18,19],但在抗生素的分离纯化上报道很少^[20],与国外相比,有很大的差距。因此,在我国开展高速逆流色谱技术在抗生素分离纯化方面的工作有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Von Wartburg A, Traber R. Cyclosporins, fungal metabolites with immunosuppressive activities [J]. *Prog Med Chem*, 1988, 25: 1
- [2] Sawai K, Okuno T, Tereda Y, et al. Isolation and properties of two antifungal substances from *Fusarium solani* [J]. *Agr Biol Chem*, 1981, 45: 1223
- [3] 洪丽娜,唐信东,缪昌城,等. 镰刀菌 4-11 产生环孢菌素 I 镰刀菌 4-11 的鉴定及生物学特性[J]. *抗生素*, 1984, 9(1): 1
- [4] Moussa F M, Jacques P, Schaarwachter P, et al. Cyclosporin C is the main antifungal compound produced by *Acremonium luzulae* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(5): 1739
- [5] Aarino T H, Agathos S N. Production of extracellular enzymes and cyclosporin by *Tolypocladium inflatum* and morphologically related fungi [J]. *Biotechnol Lett*, 1989, 11: 759
- [6] Nakajima H, Hamasaki K, Tanaka Y, et al. Production of cyclosporin by fungi belonging to the genus *Neocosmospora* [J]. *Agr Biol Chem*, 1988, 53: 2291
- [7] Loor F, Tiberghien F, Wenandy T, et al. Cyclosporins: structure-activity relationships for the inhibition of the human FPR1 formylpeptide receptor [J]. *Med Chem*, 2002, 45: 4613
- [8] 郑卫,卓锦明,翁其香,等. 茄病镰刀菌产生的环孢菌素 H 的研究-分离纯化和结构鉴定[J]. *中国抗生素杂志*, 2001, 26(6): 417
- [9] Demeule M, Laplante A, Sepehr-Araé A, et al. Inhibition of P-glycoprotein by cyclosporin A analogues and metabolites [J]. *Biochem Cell Biol*, 1999, 77: 47
- [10] Keller M, Wöhr T, Mutter M. Pseudo-prolines in drug design: one pot synthesis of novel cyclosporin C derivatives [J]. *Chem Eur J*, 2000, 6: 4358
- [11] Ito Y. High-speed countercurrent chromatography [J]. *CRC Crit Rev Anal Chem*, 1986, 17: 65
- [12] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京:北京科学技术出版社, 1993
- [13] 戴德舜,王义明,罗国安. 高速逆流色谱研究进展[J]. *分析化学*, 2001, 3: 31
- [14] Foucault A P, Chevolut L. Countercurrent chromatography: Instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification [J]. *Chromatog A*, 1998, 808: 3
- [15] Foucault A P. Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography [J]. *Chromatog A*, 2001, 906: 365
- [16] 谭龙泉,张所明,欧庆瑜. 薄层色谱在高速逆流色谱溶剂系统选择过程中的应用[J]. *分析化学*, 1996, 24(12): 1448
- [17] Oka H, Harada K-I, Ito Y, et al. Separation of antibiotics by counter-current chromatography [J]. *Chromatog A*, 1998, 812: 35
- [18] 张天佑. 逆流色谱技术仪在天然药物有效成份制备分离中的应用[J]. *分析仪器*, 1995, 1: 6
- [19] 袁黎明,傅若农,张天佑. 高速逆流色谱在植物有效成份提取中的应用[J]. *药物分析*, 1998, 18(1): 60
- [20] 毕汝仁,孔英梅,余方健,等. 国产抗生素的分析鉴定[J]. *抗生素*, 1982, 7(6): 370

(上接第 22 页)果。某种意义上讲,对产品中杂质(包括种类与量)的控制与对产品收率是同等重要的。因此,工艺改造过程中,质控人员的参与,利用先进的分析手段对产品的原材料,中间产物、半成品及终产品进行追踪分析,是生产工艺改进的重要保障。

对分离纯化生产工艺的评价,一般应综合考虑以下因素:(1)是否使产品的收率提高,成本降低;(2)是否使产品的杂质含量降低,且与原工艺产品比较没有

新杂质产生;(3)对工艺中产生的新杂质,能否推断出其来源、结构,并有效控制其含量;(4)工艺的稳定性。

参 考 文 献

- [1] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug substances, Q3A(R), 7 Feb. 2002
- [2] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug products, Q3B(R), 5 Feb. 2003