◇药物分析◇

高压液相色谱技术分离制备杆菌肽各组分的研究

仲伟潭,宋盼,彭亮,郭月玲,王崔岩,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、
华北制药集团新药研究开发有限责任公司,河北 石家庄 050015)

摘要:目的 开发制备型高压液相色谱分离杆菌肽各组分的方法。**方法** 根据杆菌肽各组分化学结构性质,采用纳微 Unisil C_{18}柱,通过改变流动相 pH 和流动相配比,以及不同的上样量,探索杆菌肽各组分分离的方法。收集分离得到的不同组分,经脱盐-冷冻干燥,得到相应杆菌肽组分冻干粉。**结果** 纳微 Unisil C_{18}柱可以用于杆菌肽各组分的分离,流动相配比为甲醇(A):[1.54‰乙酸铵水溶液(乙酸调 pH 至 5.0)-乙腈(9:1,*V/V*)](B) = 9.0:11.0(*V/V*),总流速 40 mL · min^{-1},上样量 200 mg,检测波长为 254 nm。制备得到的杆菌肽各组分纯度均大于 95%。**结论** 该方法上样量大,稳定性好,收集到的各组分纯度高,为杆菌肽各组分的分离制备提供了借鉴。

关键词:杆菌肽各组分;分离制备;制备型高压液相
doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.03.009

Preparation of bacitracin components by preparative HPLC

ZHONG Weitan, SONG Pan, PENG Liang, GUO Yueling, WANG Cuiyan, ZHANG Xuexia
(*National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, New Drug Research & Development Company of NCPC, Shijiazhuang, Hebei* 050015, *China*)

Abstract: Objective To develop the separation and preparation method of bacitracin components by preparative HPLC. **Methods** The appropriate separation method was determined through the pH of mobile phase, the ratio of mobile phase, and the loading quantity of sample by using nanomicro Unisil C_{18}. Freeze-dried powders of bacitracin components were obtained by desalination and freeze drying of the collected solution. **Results** Nanomicro Unisil C_{18} chromatographic column could be used for separation. The ratio of mobile phase was A:B = 9.0:11.0 (*V/V*) [A was methanol and B consisted of 1.54‰ ammonium acetate solution (pH adjusted to 5.0)-acetonitrile (9:1, *V/V*)]. The flow rate was 40 mL · min^{-1} and the sample load was 200 mg. The wavelength was 254 nm. The purities of bacitracin components were all above 95%. **Conclusions** The method is of great loading quantity of sample, good stability, and high purity of the prepared components. It provides reference for the separation and preparation of bacitracin components.

Keywords: bacitracin components; separation and preparation; preparative HPLC

杆菌肽是多肽类抗生素,1943 年被美国 Johnson 第一次发现,可以从枯草杆菌和地衣芽胞杆菌发酵液中提取分离制得[1]。杆菌肽由 12 个氨基酸组成[2],含有 A、B、C、D、E、F、G 等至少 9 种组分,其中,杆菌肽 A 为主要活性组分[3],杆菌肽 A 在碱性条件下可自发氧化,形成没有抗菌活性的杆菌肽 F 组分[4]。杆菌肽的抗菌谱与青霉素相似,主要用于治疗耐青霉素的葡萄球菌感染[5]。由于其副作用大,在临床上主要是外用,广泛用于治疗深部真菌、皮肤[6]和黏膜真菌等疾病。杆菌肽还是一个重要的饲料添加剂,$5 \times 10^{-6} \sim 100 \times 10^{-6}$浓度可促进家禽和牲畜对食物的利用以增重[4]。

目前,对于杆菌肽的提取分离方法[7]以及分析检测方法[8-10]的报道已经不少,但是对于分离制备杆菌肽各组分的报道极少,并且工艺复杂。本文运用制备型高压液相色谱技术,优化工艺条件,分离制备出了杆菌肽组分 A、B_1、B_2、B_3、C_1、C_2、C_3,其化学结构式见图 1,为杆菌肽的进一步研究奠定了基础。

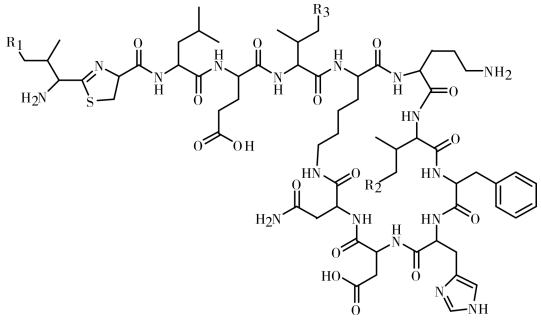

图 1 杆菌肽各组分的结构式

通信作者:张雪霞,女,研究员,研究方向:天然药物研究,E-mail:zhangxuexiazxx@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 杆菌肽粗粉,华北制药新药研发中心自制;HZ816 大孔吸附树脂,上海华震科技有限公司;甲醇(制备级),安徽时联特种溶剂股份有限公司;乙醇(工业级),沧州兴隆化工有限公司;甲醇(色谱级),美国 Merck 公司;乙腈(色谱级),美国 Merck 公司;去离子水,华北制药新药研发中心自制;其它试剂均为国产分析纯。高压液相制备色谱仪,汉邦科技有限责任公司;LA-2010A 型高效液相色谱仪,岛津公司;冻干机,德国 Martin Christ 公司;RE-52AA 型旋转蒸发器,上海荣生化仪器厂;pH 计,梅特勒·托利多实验室 pH 计 FE20;Nicolet Magna-IR 550 型傅立叶红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;TU-1901 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;INVOA 500 型核磁共振波谱仪,美国 Varian 公司;ZMD Micromass 型质谱仪,美国 Micromass 公司。

1.2 方法

1.2.1 *色谱条件* (1)分析色谱条件。分析型色谱柱:纳微 Unisil C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:A 为甲醇;B 为 1.54‰乙酸铵水溶液(乙酸调 pH 至 5.0)-乙腈(9∶1,*V*/*V*);A∶B=53∶47;柱温:40 ℃;流速:1.0 mL·min^{-1};进样量:10 μL;分析时间:40 min;检测波长:254 nm。(2)高压液相制备色谱条件。制备型色谱柱:纳微 Unisil C_{18} 色谱柱(30 mm×250 mm,10 μm);流动相:A 为甲醇(制备级);B 为 1.54‰乙酸铵水溶液[(乙酸调节 pH 至 5.0)-乙腈=(9∶1,*V*/*V*)];A∶B=9.0∶11.0;总流速:40 mL·min^{-1};上样量:200 mg;分析时间:60 min,检测波长:254 nm。

1.2.2 *杆菌肽粗粉的纯化* 称取 130 g 杆菌肽粗粉用 300 mL 去离子水溶解,注入 4LHZ816 吸附树脂柱,流速 60 mL·min^{-1},弃去柱流出液。吸附完成后,用 3BV(BV:树脂柱床体积)30% 乙醇溶液洗涤,弃去柱流出液。再以 4BV 60% 乙醇溶液洗脱,收集洗脱液。将洗脱液中的乙醇经旋转蒸发回收后,浓缩液冷冻干燥,得 42 g 杆菌肽样品。

1.2.3 *杆菌肽各组分的制备* 称取杆菌肽样品 2.0 g,加入 20 mL 流动相溶解,0.45 μm 微孔滤膜过滤,注入分析型高压液相色谱仪,根据色谱图分别收集各组分流出液[8]。分别合并分析型高压液相色谱仪检测后单个组分含量高于 90% 的杆菌肽组分收集液,45 ℃真空浓缩,除去甲醇(回收)后,上 HZ816 树脂柱吸附,水洗,60% 乙醇解析,解析液浓缩至杆菌肽组分大约 60 g·L^{-1},冷冻干燥,得杆菌肽组分冻干粉。

2 结果

2.1 高压液相制备色谱条件的确立 由于杆菌肽组分的化学结构式中有大量的酰胺键(酰胺基)、羧基、氨基等,分子极性较大;从电荷性质看,单个分子中含有两个游离羧基、两个游离氨基、两个含氮唑环,整体偏碱性更多一些,在这个基础上选用纳微 Unisil C_{18} 反相色谱柱进行分离制备,检测波长选定为 254 nm。根据参考文献[11-12],最终对制备色谱条件的流动相配比、pH 值、上样量等因素进行优化。

2.1.1 *流动相 pH 的确立* 由于杆菌肽 A 在碱性条件下可自发氧化,形成没有抗菌活性的杆菌肽 F,所以选用了偏酸性的 pH 进行实验。从制备色谱图上看,见图 2,pH 为 5.0 时分离效果比较好,从高压液相色谱仪检测结果看,在此 pH 值各组分的收集液纯度均达到 95% 以上,因此选用 pH 值 5.0 制备杆菌肽各组分,见表 1。

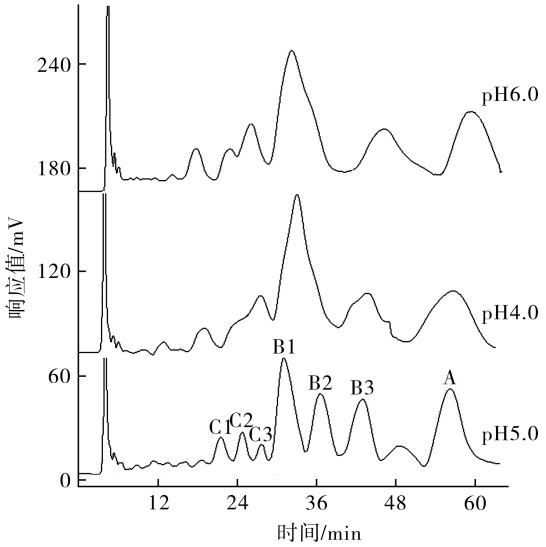

图 2 不同 pH 的流动相下杆菌肽各组分的高压液相色谱图

表 1 杆菌肽各组分的结构式

杆菌肽组分	R_1	R_2	R_3
A	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$
B_1	$-H$	$-CH_3$	$-CH_3$
B_2	$-CH_3$	$-H$	$-CH_3$
B_3	$-CH_3$	$-CH_3$	$-H$
C_1	$-H$	$-H$	$-CH_3$
C_2	$-H$	$-CH_3$	$-H$
C_3	$-CH_3$	$-H$	$-H$

表 2 不同 pH 的流动相制备杆菌肽各组分的 HPLC 结果

杆菌肽组分	各组分纯度/%		
	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0
A	89.5	97.5	91.3
B_1	80.2	96.4	75.7
B_2	75.9	95.8	76.2
B_3	86.4	95.2	80.3
C_1	78.1	97.3	90.6
C_2	63.6	96.6	70.8
C_3	80.9	98.7	89.5

2.1.2 *流动相配比的确立* 不同的流动相配比对分离度和柱压都有一定的影响,因此本实验分别考察了 A∶B = 8.0∶12.0、A∶B = 9.0∶11.0、A∶B = 10.0∶10.0、A∶B = 11.0∶9.0 配比下杆菌肽各组分的分离情况,结果表明:A 比例越高,各组分出峰越快,可以缩短制备周期,但是 A 比例过高,分离度明显下降,以至于不能收集到高纯度的 C_3 组分,适当降低 A 比例,有利于提高分离度,使各组分有效分离,但 A 比例太低,柱压会升高,各组分出峰时间会延迟。综合考虑,选择 A∶B = 9.0∶11.0 为最佳流动相配比。

2.1.3 *上样量的确立* 由于杆菌肽样品中各杂质组分含量较低,尤其是 C_3 组分含量仅有 5% 左右,上样量太小,影响制备量,制备周期延长,耗时耗材,因此分别考察上样量为 100、150、200、250 mg 的分离效果,以收集到的 C_3 组分纯度为指标,结果表明,上样量太大,分离度明显下降,收集不到高纯度的 C_3 组分。为了避免载样过量,保证一定的分离度,以及避免样品可能在柱子顶部沉积,对柱子造成损害,综合考虑,确定上样量为 200 mg。

2.2 样品检测 冷冻干燥制得的杆菌肽各组分,经分析型高压液相色谱仪测定分析,结果发现各组分色谱图基本为单一色谱峰,如图 3 所示,采用面积归一化法计算,纯度均在 95% 以上。制得的各组分红外光谱测定数据与其分子中功能团所应具有的红外吸收峰一致(见表 3)。在水溶液中,经紫外可见分光光度计测定,制得的各组分最大吸收波长为 251 nm,与杆菌肽各组分的化学结构应表现的性质一致。经质谱仪和核磁共振波谱仪对各组分进行波谱分析和结构鉴定,所得数据与文献[13]报道一致。

表 3 杆菌肽各组分红外(IR)吸收峰及其归属

样品吸收峰/cm^{-1}	振动类型	基团	吸收峰强度
3 304	N – H 伸缩振动	NH	m
2 963	C – H 伸缩振动	CH_3,CH_2	m
1 654	C = O 伸缩振动	酰胺	s
1 532	N – H 弯曲振动	NH	s
1 389	C – H 弯曲振动	CH_3	m
1 250	C – N 伸缩振动	酰胺	m

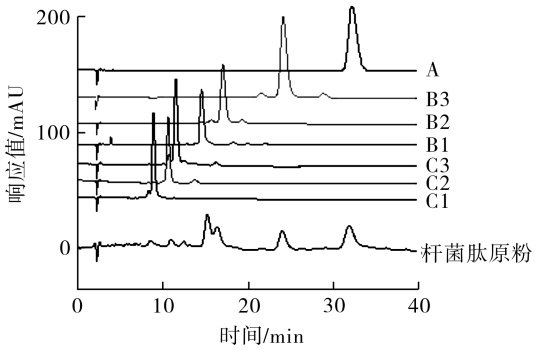

图 3 杆菌肽原粉及各组分的 HPLC 色谱图

3 讨论

杆菌肽是一种多组分的多肽类抗生素,在发酵产物中 A 和 B 的含量总和在 96% 左右,其它组分含量很低。要分离制备出杆菌肽的各组分,难度很大,目前相关方面的报道极少,并且工艺复杂。本文主要介绍用制备型高压液相色谱仪分离制备出杆菌肽 A、B_1、B_2、B_3、C_1、C_2、C_3 等 7 个组分的方法(7 个组分的详细分析数据和谱图将另文发表),产品纯度均在 95% 以上。此方法操作简单,所用有机溶剂可回收,对环境污染小,为杆菌肽的分离纯化奠定了基础。

参考文献

[1] 张炜,张雪霞,耿文飞,等. 一种杆菌肽及其锌盐的制备方法:中国,CN201610097982.X.[P].2016-04-20.

[2] 徐加兵,魏晓东,那可,等. 杆菌肽产生菌的诱变育种及培养基优化[J]. 中国医药工业杂志,2013,44(5):446-448,452.

[3] 徐超,吕凤霞,别小妹,等. 地衣芽孢杆菌 Bacitracin A 高产工业培养基优化[J]. 食品工业科技,2016,37(18):197-201,207.

[4] 胡立勇,宋友礼. 杆菌肽的研究[J]. 国外医药:抗生素分册,1988,9(1):55-64.

[5] RAUSSENS V, NARAYANASWAN V, GOORMAGHTIGH E, et al. Hydrogen/deuterium exchange kinetics of apolipophorin-Ⅲ in lipid-free and phospholipid-bund states. An analysis by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. J Biol Chem,1999,271(38):89.