

一种快速、高效分离微生物转化产物 5-氟尿苷的方法

姜立春^{1,2}, 古静燕², 彭正松¹, 阮期平^{1,2*}西华师范大学生命科学学院, 南充 637002 ²绵阳师范学院分子生物学与生物制药重点实验室, 绵阳 621000

摘要: 使用一种有效的柱色谱方法分离微生物转化产物 5-氟尿苷。该方法采用干燥柱真空层析和三种不同的溶剂系统, 使获得的 5-氟尿苷的纯度达 98%, 收率为 92%。该方法适用于从酶反应混合物中分离核苷类似物。

关键词: 生物转化产物; 5-氟尿苷; 干燥柱真空色谱

中图分类号: R 284.2; TQ 464.6

文献标识码: A

An Efficient Method for Separating Biotransformed Products(5'-DFUR)

JIANG Lìchun^{1,2}, GU Jìng-yan², PENG Zheng-song¹, RUAN Qìping^{1,2*}¹School of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, China²Key Laboratory of Molecular Biology and Biopharmaceutics Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China

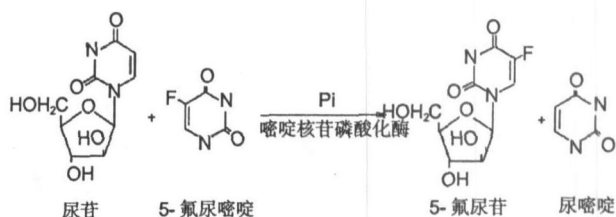
Abstract An efficient method column chromatography was used to separate the biotransformed products-5-fluorouridine. This method adopts the "Dry Column Vacuum Chromatography (DCVC)" and three different solvent systems. The purity and yield of 5-fluorouridine obtained were 98% and 92%, respectively. The method was suitable for separating nucleoside analogues from enzyme reaction mixture.

Key words biotransformation products; 5-fluorouridine; dry column vacuum chromatography

商品氟铁龙 (Furtulon), 5'-脱氧-5-氟尿苷 (5'-deoxy-5-fluorouridine, 5'-DFUR), 是一种良好的抗肿瘤药物。其主要作用机制是: 抑制胸腺嘧啶脱氧核苷酸合成酶, 阻断尿嘧啶核苷酸转变成胸腺嘧啶核苷酸, 影响 DNA 的合成, 从而阻止肿瘤生长。此外, 还能掺入 RNA, 通过阻止尿嘧啶和乳清酸掺入 RNA 而达到抑制 RNA 合成的作用。临床用于治疗胃癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、膀胱癌等。临床研究表明, 5'-DFUR 治疗癌症的总有效率为 35% (8/23), PS 评级好转率为 56% (13/23)^[1-3]。近年来研究发现, 5'-DFUR 与环磷酰胺、秦索帝等结合服用可有效的治疗顽固转移性乳腺癌和转移性前列腺癌^[4-5]。由于 5'-DFUR 有选择性抗肿瘤、抗肿瘤转移、改善恶性液质的特点, 具有疗效高、毒副作用小、延长生命和改善生命质量等优越性。因此, 该药是目前临床用于治疗癌症的主要化疗药物之一, 故而市场需求量大。

近年来, 利用微生物产生的某些酶类, 如核苷磷

酸化酶、脱氧核糖转移酶及腺苷脱氨酶合成核苷类抗病毒、抗肿瘤药物取得了较大的发展^[6]。但是, 生物转化法所面临的一个最关键的技术问题就是转化产物的分离。例如采用生物转化合成 5-氟尿苷。



由于 5-氟尿苷与尿苷在结构上的差异只是嘧啶环 5-C 上的 H 被 F 取代, 二者在极性上的差异很小, 因此很难将 5-氟尿苷从反应液中分离出来, 致使该转化法的技术推广受到限制。

阮期平等^[7]曾报道了一种 5-氟尿苷的分离方法, 即“两次硅胶柱色谱和两种展层系统洗脱”, 但存在着分离周期长、洗脱剂用量大及样品处理量少等缺点, 因此只适合于少量分析用样品的制备, 而不能用于大规模生产。最近, 我们建立了一种采用“干燥柱真空色谱 (dry column vacuum chromatography, DCVC)”分离 5-氟尿苷的方法。其原理是: 溶剂洗脱是不连续的, 当在进行溶剂洗脱时, 是将原有

收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-04-05

* 通讯作者 Tel 86-816-2200989; E-mail: rqp2200070@ yahoo.com.cn

溶剂在真空下全部抽出,使固定相“干”后才加入新的洗脱剂作下一回组分的收集,其原理类似薄层色谱的多次展开。这种方法高效、快速,对于那些极性小、难分的生物转化产物的分离不失为一种好的途径。本文介绍利用此方法分离 5-氟尿苷的过程。

1 材料与方法

1.1 实验材料

产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 突变株 EAM-Z1,由本实验室经诱变筛选而得。

对照品:尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、尿苷、5-氟尿苷(美国 Sigma 公司);尿苷(上海太平洋生物高科技有限公司);5-氟尿嘧啶、GF₂₅₄ 高效硅胶板(浙江四青生化厂);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 样品液的制备

参照文献^[7]的方法。将产气肠杆菌接种于液体培养基中,于 31℃ 培养 18~24 h 离心(8000 rpm, 10 min)收集湿菌体。

将湿菌体加入 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液(含 10 mmol/L 尿苷和 30 mmol/L 5-氟尿嘧啶, pH 7.8 菌体浓度 10%)中,于 60℃ 水浴震荡反应 8~16 h 用 3 mmol/L HCl 终止反应,离心(8000 rpm, 30 min),收集上清液。

上清液于旋转蒸发仪上浓缩至 1/10 体积(水温 75℃), 4℃ 下静置 24 h 离心(16000 rpm, 30 min),得样品液。

1.3 样品分析

1.3.1 薄层色谱(TLC)

将样品点于 GF₂₅₄ 硅胶板上,展开剂:二氯甲烷-四氢呋喃(4:1),在紫外分析仪($\lambda=254$ nm)观察。

1.3.2 高效液相色谱(HPLC)

HPLC 用于检测样品的纯度和浓度。将二氯甲烷-正丁醇(1:1)洗脱样品上 C₁₈ 柱,用 0.075 mol/L NaH₂PO₄-CH₃OH(98:2)洗脱,流速 1 mL/min,进样量 10 μ L。

1.4 干燥柱真空色谱(DCVC)

DCVC 是一种利用减压来增大流动相流速的色谱技术。这种技术的操作压是通过一个机械真空泵来实现。所有玻璃器皿、管、活塞等在真空下具有足够的耐压特性。

1.4.1 装柱

将吸附剂(薄层色谱硅胶 G-60 或 H-60 10~40 μ m)倾入柱(本实验采用的色谱柱规格为:8 cm $\times$ 2

cm)中,轻敲柱排除空气隙,并通过洗脱液储存瓶抽真空,使吸附剂填得更加致密。当吸附剂通过真空被充分压缩后,关闭抽真空活塞,然后用一个柔韧的金属棒(在一端固定着软木塞或橡皮塞)进一步压缩顶部的吸附剂。整个吸附剂压缩至柱体积的 30%~35% 为宜。

1.4.2 加样

采用干法上样。将样品液 3 mL 与硅胶混匀(样品与硅胶的配比为:1/10 v/w),于旋转蒸发仪上蒸发至干(水温 50~60℃)。将含有样品的硅胶干粉加入硅胶柱上部,并采用上述方法压缩至 0.5~1 cm,上面再覆盖一层硅胶(约 2 cm 厚),最后放一张同样直径的滤纸片于顶部。

1.4.3 洗脱

洗脱剂的选择:将样品液点于 GF₂₅₄ 硅胶板上,以采用柱层析用的洗脱液作为展层剂,在紫外分析仪上观察斑点,并计算各点的 R_f 值(表 1)。

通过 TLC 分析,我们选出了三种洗脱系统:乙酸乙酯-乙醇、正己烷-乙酸乙酯、二氯甲烷-正丁醇。

表 1 样品在 GF₂₅₄ 上的 R_f

Table 1 R_f of the sample on GF₂₅₄

样品 Sample	乙醇- 乙酸乙酯 Ethanol- ethyl acetate (2:98)	正己烷- 乙酸乙酯 Hexane- ethyl acetate (20:80)	二氯甲烷- 正丁醇 Dichloromethane- n-butanol (83:17)
5-氟尿嘧啶 5-Fluorouracil	0.68	0.61	0.52
尿嘧啶 Uracil	0.57	0.34	0.38
5-氟尿苷 5-Fluorouridine	0.48	0.16	0.18
尿苷 Uridine	0	0.11	0.12

根据表 1 中的 R_f 情况,我们采用了如下洗脱路线,即:先在第一根硅胶柱上,用乙醇-乙酸乙酯系统洗脱,将样品液中的尿苷去掉;然后换第二根硅胶柱,用正己烷-乙酸乙酯系统洗脱,将 5-氟尿苷与 5-氟尿嘧啶、尿嘧啶分开;最后采用第三根硅胶柱,用二氯甲烷-正丁醇系统洗脱即可得到较纯净的 5-氟尿苷。

其整个操作过程简述如下:

关闭洗脱液储存瓶活塞,打开真空泵活塞,使真空度达到 0.08~0.09 MPa 并保持恒定。倒入 25 mL 洗脱液于色谱柱中,洗脱液在真空状态下迅速抽入储存瓶中。当柱中的洗脱液被抽干后,关闭真

空泵活塞, 打开储存瓶活塞, 让洗脱液流入收集瓶中, 收集洗脱液, 做 TLC 检测。

1.5 精制

将纯化的样品于旋转蒸发仪中浓缩 (40 °C) 至 1/10 加入 5 倍体积的乙醇, 于 4 °C 下结晶 (反复 2 ~ 3 次), 真空干燥, 得 5-氟尿苷产品。

2 结果与讨论

DCVC 各洗脱部分经 TLC 分析的结果见图 1。

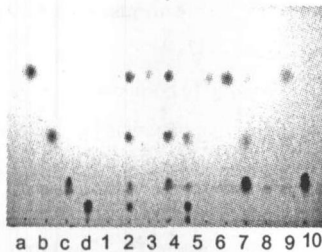


图 1 洗脱部分的 TLC 分析

Fig. 1 The TLC analysis of the eluted fraction

a 5-氟尿嘧啶 5-Fluorouracil b 尿嘧啶 Uracil c 5-氟尿苷 5-Fluorouridine d 尿苷 Uridine

1. 酶反应液; 2. 乙醇-乙酸乙酯 (1: 99); 3. 乙醇-乙酸乙酯 (2: 98); 4. 乙醇-乙酸乙酯 (10: 90); 5. 正己烷-乙酸乙酯 (1: 99); 6. 正己烷-乙酸乙酯 (20: 80); 7. 正己烷-乙酸乙酯 (10: 90); 8. 二氯甲烷-正丁醇 (75: 25); 9. 二氯甲烷-正丁醇 (74: 26); 10. 二氯甲烷-正丁醇 (1: 1)

1. Enzyme reaction 2. Ethanol-ethylacetate (1: 99); 3. Ethanol-ethylacetate (2: 98); 4. Ethanol-ethylacetate (10: 90); 5. Hexane-ethylacetate (1: 99); 6. Hexane-ethylacetate (20: 80); 7. Hexane-ethylacetate (10: 90); 8. Dichloromethane-n-butanol (75: 25); 9. Dichloromethane-n-butanol (74: 26); 10. Dichloromethane-n-butanol (1: 1)

由图 1 可见, 在乙酸乙酯-乙醇系统的洗脱部分中, 乙醇-乙酸乙酯 (1: 99) 洗脱液中有少量 5-氟尿嘧啶出现, 大量的 5-氟尿嘧啶、5-氟尿苷和少量尿嘧啶在乙醇-乙酸乙酯 (2: 98) 洗脱液中出现, 而尿苷、尿嘧啶及少量 5-氟尿嘧啶则存在于乙醇-乙酸乙酯 (10: 90) 的洗脱液中。

在正己烷-乙酸乙酯系统的洗脱部分中, 在正己烷-乙酸乙酯 (30: 70) 和正己烷-乙酸乙酯 (20: 80) 洗脱液中只含有 5-氟尿嘧啶。5-氟尿苷则存在于正己烷-乙酸乙酯 (30: 70)、正己烷-乙酸乙酯 (20: 80) 的洗脱液中, 另外尚有极少量 5-氟尿嘧啶和尿嘧啶。

在二氯甲烷-正丁醇系统的洗脱部分中, 在二氯甲烷-正丁醇 (74: 26) 的洗脱液中只有 5-氟尿嘧啶和痕量尿嘧啶存在, 而在二氯甲烷-正丁醇 (1: 1) 中则只有 5-氟尿苷存在。

二氯甲烷-正丁醇 (1: 1) 洗脱部分精制后, 得到的产品作 HPLC 分析, 结果发现, 5-氟尿苷纯度在 98% 以上, 见图 2。

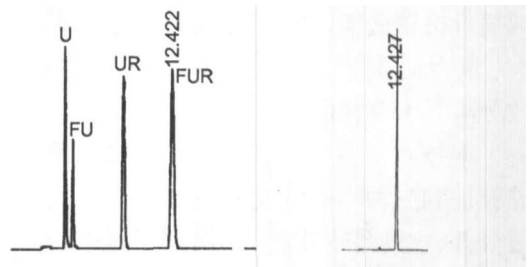


图 2 纯化样品的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of the purified sample

U. 尿嘧啶 Uracil FU. 5-氟尿嘧啶 5-Fluorouracil UR. 尿苷 Uridine FUR. 5-氟尿苷 5-Fluorouridine

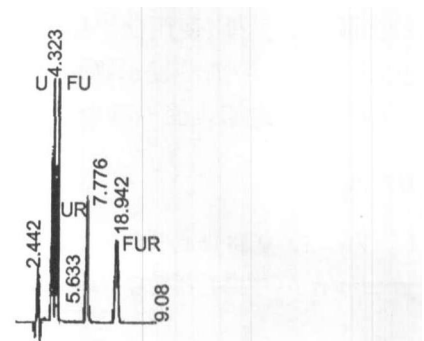


图 3 3 mL 样品液的 HPLC 分析

Fig. 3 The analysis of 3 mL sample

样品液中 5-氟尿苷的浓度由公式 $y = 106.75 + 3198.6x$ 算出 (式中 y 代表峰面积, x 代表被测物浓度)。经 HPLC 测得 3 mL 样品液中 5-氟尿苷的含量为 154 mg (见图 3), 而纯化后得到约 141 mg 5-氟尿苷, 其得率约为 92%。

由此可见, 我们建立的这种技术对于分离生物转化产物具有如下优点:

具有相当高的分辨率。为了获得高的分辨率, 我们采用了薄层色谱用硅胶, 并且硅胶的装填都是在真空条件下完成, 保证了整个柱都是致密、均匀的。因此对于那些结构非常相似, 极性相差很小的化合物都可用此方法分开。

分离操作所需时间短。这种技术所采用的色谱柱均为短柱, 而且洗脱剂均在 0.08 ~ 0.09 MPa 的压力条件下流过色谱柱, 因此很快。一次洗脱仅花费几分钟时间。

装置简单, 用不到专用设备。装柱操作比常压与快速柱方便, 要求亦不高。真空色谱所用的柱子很短 (5 ~ 8 cm), 在真空条件下装柱往往只需十几

分钟即可完成。

节省试剂和硅胶。在本实验中,用洗脱液 225 mL就能分离样品 1 g 硅胶用量为 7~8 g 而且这些试剂价格较低廉,毒性小、易于回收再利用。

样品处理量大。这种真空层析能以较快速度有效分离几十克样品。

本技术借鉴生物大分子的分离策略,采用三根硅胶柱和三种不同洗脱系统,使样品中各组分分阶段分开,这既易于收集,又保证了得率,而且得到的尿苷和 5 氟尿嘧啶又可继续作为转化反应的底物。

此方法的不足之处是,每洗脱一次便要停止减压一次,使操作不便。我们正在设计一种多口(三口或四口)减压蒸馏收集器,以保证连续收集 3~4 份洗脱液。另外,使用低沸点溶剂时,要控制好真空度,防止大量溶剂蒸发逃逸。在减压抽取组分造成水蒸气在固定相表面冷凝也会降低分离效果。

参考文献

- 1 Xia LF(夏路风), Zhu X(朱翊). Furtulon *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1997, 6: 39-40.

- 2 Ma SL(马胜麟), Lv GQ(吕桂泉), Zhou YL(周燕陵). The clinic observation of malign tumor after the treatment with 5'-DFUR. *Tumor(肿瘤)*, 1998, 18: 30-31.
- 3 Guo J(郭军), Wang BC(王宝成), Dong B(董冰), et al. The curative analysis of late adenocarcinoma patient with the expression of multi-resistant gene after the application of 5'-DFUR and Cyclosporin A. *Tumor(肿瘤)*, 1998, 18: 108-109.
- 4 Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, et al. The efficacy of long-term oral chemotherapy with 5'-deoxy-5-fluorouridine and cyclophosphamide for recurrent breast cancer. *Int J Clin Oncol*, 2004, 9: 383-387.
- 5 Fischel JL, Ferrero JM, Formento P, et al. Taxotere-5'-deoxy-5-fluorouridine combination on hormone-refractory human prostate cancer cells. *Anticancer Drugs*, 2005, 16: 309-316.
- 6 Hannahan JR, Hutchinson DW. The enzymatic synthesis of antiviral agents. *J Biotechnol*, 1992, 23: 193-210.
- 7 Ruan QP(阮期平), Zhou CL(周长林), Dou J(窦洁), et al. Studies on biotransformation of 5-FUR. *Acta Microbiol Sinica* (微生物学报), 2002, 42: 117-120.

(上接第 126 页)

- 9 Li JM(李钧敏), Jin ZX(金则新), Ke SS(柯世省). Optimization choice for composition in RAPD analysis of *Heptracodium monoides*. *Chin Bull Botany* (植物学通报), 2002, 19(4): 452-456.
- 10 Zhang J(张娟), Zhang DY(张道远), Yin LK(尹林克). Genomic DNA extraction and RAPD experiment condition of *Tamarix hispida*. *Acta Bot Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23: 253-256.
- 11 Bian CM(边才苗), Li JM(李钧敏), Jin ZX(金则新), et

al. Effect of BSA on random amplified polymorphic DNA (RAPD) in plants. *Heredity* (遗传), 2002, 24: 279-282.

- 12 Li CX(李春喜), Wang ZH(王志和), Wang WL(王文林). Biostatistics (生物统计学), ed 2. Beijing: Science Press, 2000.
- 13 Guo XC(郭纯孝). Calculating Chemistry (计算化学). Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2004.
- 14 Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR in which bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied Environment Microbiology*, 1996, 62: 1102-1106.