



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104628802 B

(45)授权公告日 2017.01.18

(21)申请号 201310547873.X

(22)申请日 2013.11.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104628802 A

(43)申请公布日 2015.05.20

(73)专利权人 北大方正集团有限公司

地址 100871 北京市海淀区成府路298号方正大厦

专利权人 北大国际医院集团重庆大新药业股份有限公司
北大医疗产业集团有限公司

(72)发明人 李华德 张洪兰 欧建民

(74)专利代理机构 北京万象新悦知识产权代理
事务所(普通合伙) 11360

代理人 李稚婷

(51)Int.Cl.

G07H 19/01(2006.01)

G07H 1/06(2006.01)

(56)对比文件

US 4869901 A,1989.09.26,

CN 17005655 A,2005.12.07,

CN 86104185 A,1987.04.08,

CN 103214453 A,2013.07.24,

审查员 万玥

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

从发酵液中提取并纯化尼莫克汀的方法

(57)摘要

本发明公开了一种从发酵液中提取并纯化尼莫克汀的方法。首先将发酵液进行絮凝过滤,得到湿菌丝渣,然后用非水溶性的有机溶剂萃取,将得到的提取液进行酸洗涤纯化,随后进行真空浓缩,改用极性较小的有机溶剂溶解并进行碱性洗涤纯化,接着对尼莫克汀进行衍生处理,通过结晶分离出尼莫克汀衍生物,再对衍生物进行水解还原为尼莫克汀,萃取水解液中的尼莫克汀,经结晶、干燥得含量高于80%的尼莫克汀产品。本发明方法对生产设备的要求低,条件温和,操作简单,避免了使用昂贵的大孔树脂、层析硅胶及繁琐的层析操作过程,获得的尼莫克汀纯度高,更适宜进行规模化生产。

1. 一种从发酵液中提取并纯化尼莫克汀的方法,包括以下步骤:
 - 1) 将生产尼莫克汀的发酵液进行絮凝过滤,得到湿菌丝渣;
 - 2) 用非水溶性的有机溶剂萃取湿菌丝渣,得到提取液;
 - 3) 对提取液进行酸性洗涤纯化;
 - 4) 对酸洗后的提取液进行浓缩,用烃类有机溶剂溶解后进行碱性洗涤纯化;
 - 5) 对碱洗后的溶液进行尼莫克汀衍生处理,再通过结晶分离出尼莫克汀衍生物,其中衍生处理使用的衍生试剂为含苯环的酰氯或酸酐,缚酸剂为吡啶、二乙胺和/或三乙胺;
 - 6) 对尼莫克汀衍生物进行水解,还原为尼莫克汀;
 - 7) 萃取水解液中的尼莫克汀,经结晶、干燥得尼莫克汀产品。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1)首先要将发酵液的pH调节为7.5~9.0,然后加入絮凝剂进行絮凝,所用絮凝剂为无机高分子絮凝剂。
3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2)所用非水溶性有机溶剂为为醋酸丁酯和/或乙酸乙酯;萃取温度20-30℃。
4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤3)中酸性洗涤用酸为盐酸或硫酸;洗涤温度15-30℃。
5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤4)所述烃类有机溶剂选自下列溶剂中的一种或多种:甲苯、二甲苯、庚烷和己烷。
6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤4)碱性洗涤所使用的碱性洗涤液为 Na_2CO_3 或 K_2CO_3 溶液,洗涤温度为30-35℃。
7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤5)衍生反应终止后,反应液用 NaHCO_3 溶液洗涤,然后真空浓缩,降温结晶,控制结晶终点温度5-10℃,分离收集潮晶,真空干燥得尼莫克汀衍生物。
8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤6)将尼莫克汀衍生物用水溶性有机溶剂溶解,然后加碱进行水解反应,水解温度5-8℃。
9. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤7)向步骤6)的水解液中加入烃类有机溶剂萃取尼莫克汀,收集有机萃取相,真空浓缩,降温结晶,控制结晶终点温度为5-10℃,分离收集潮晶,干燥得尼莫克汀产品。

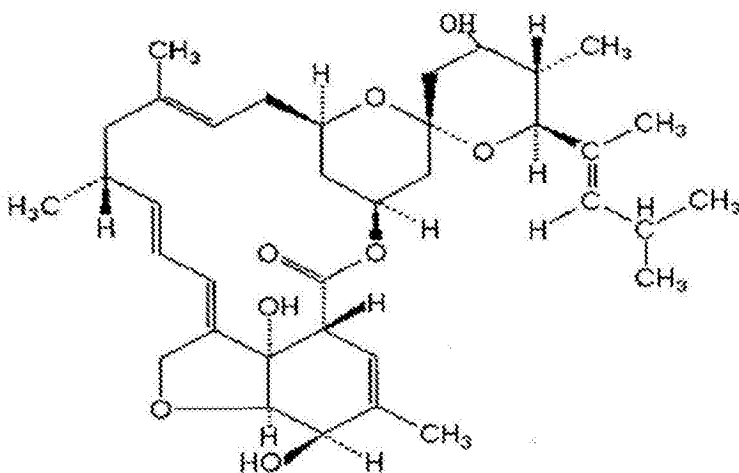
从发酵液中提取并纯化尼莫克汀的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物农药技术领域,特别涉及从尼莫克汀的发酵液中提取尼莫克汀,继而对产物进行纯化,获得高纯度的尼莫克汀的方法。

背景技术

[0002] 尼莫克汀(Nemadectin)、莫西克汀(Moxidectin)属于莫西菌素,是微生物产生的次级代谢物,是广谱、高效、新型的生物农药,莫西克汀是尼莫克汀的结构衍生物。尼莫克汀是一种十六元大环内酯类抗生素,由蓝灰链霉菌经发酵过程生产,用于制备抗寄生虫制剂,但更广泛用于合成活性更强的驱虫药莫西克汀。尼莫克汀的结构如下式所示:



[0003]

尼莫克汀(Nemadectin)结构式

[0004] 欧洲专利EP0170006A2公开了一种尼莫克汀的生产培养基与发酵生产工艺。首先将蓝灰链霉菌接种于含葡萄糖1.0%、糊精2.0%、酵母浸出物0.5%、NZ胺(酪蛋白的酶水解物)0.5%、碳酸钙0.1%的培养基中(注:各物质的百分含量单位为g/ml,这是生化领域中将固体物质配成溶液试剂的通用浓度表示方法,以下相同),28℃培养48-72h,作为一级种子;将一级种子接入同样的培养基,28℃培养48h,作为二级种子;将1L二级种子液接入含糊精1.0%、大豆蛋白胨1.0%、糖蜜1.0%、碳酸钙0.1%的培养基30L中,于30℃发酵培养,发酵罐空气流量30L/min、罐压8磅,搅拌500rpm,培养9h后放罐。该发明同时公开了发酵液中的尼莫克汀及其结构类似物的分离纯化方法:对发酵液加硅藻土为助滤剂过滤得到湿菌丝渣;用甲醇萃取湿菌丝渣;萃取液经浓缩后用二氯甲烷萃取;收集二氯甲烷经无水硫酸钠干燥、浓缩,再经硅胶柱层析、收集层析液得到尼莫克汀。该发明所揭示的提取纯化方法存在以下缺陷:使用水溶性的甲醇萃取湿菌渣,用量大且分离困难;使用一次性的硅胶分离尼莫克汀,有机溶剂使用量大,回收条件要求高,导致尼莫克汀的提取纯化成本高。

[0005] 申请号为201010237843.5的中国专利申请公开了一种尼莫克汀的制备方法,其制备方法如下:将生产尼莫克汀的发酵液直接进行喷雾干燥,得到固体粉末;然后用有机溶剂萃取该固体粉末,将萃取液过滤后用大孔树脂吸附尼莫克汀;最后将大孔树脂吸附的尼莫克汀洗脱下来,对洗脱液进行萃取、浓缩、干燥、获得尼莫克汀。该发明公开的方法中存在以

下缺陷：对发酵液进行直接喷雾干燥，能耗的利用率低，生产能耗特别高；对萃取液进行简单的过滤处理，就使用大孔树脂直接吸附，吸附单位低，树脂使用量大，使用周期短，生产成本高（因为萃取液中杂质含量高，对树脂的损害大）。

[0006] 申请号为200810126358.3的中国专利申请公开了一种制备高纯度莫西克汀的方法，其中尼莫克汀的制备方法如下：采用固液分离方式处理发酵液，浸取后得到HPLC纯度在13-18%之间的尼莫克汀提取液；然后用20-40目的大孔树脂吸附提取液中的尼莫克汀，尼莫克汀对应树脂吸附量为10g/L；再用有机溶剂与水的混合溶剂洗脱被吸附的尼莫克汀，洗脱液经浓缩处理后得到纯度约41-45%的尼莫克汀初品。该发明使用大孔树脂吸附只有纯度为13-18%的尼莫克汀，吸附量低，树脂的再生使用困难；使用混合溶剂洗脱，溶剂的回收工作量大；获得的尼莫克汀的纯度较低。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种从发酵液中提取并纯化尼莫克汀的方法。本发明避开了在尼莫克汀提取纯化过程中使用大量树脂或硅胶的分离纯化途径，开辟了全新的尼莫克汀的提取纯化方法。本发明的技术方案如下：

[0008] 一种从发酵液中提取并纯化尼莫克汀的方法，包括以下步骤：

[0009] 1)将生产尼莫克汀的发酵液进行絮凝过滤，得到湿菌丝渣；

[0010] 2)用非水溶性的有机溶剂萃取湿菌丝渣，过滤得到提取液；

[0011] 3)对提取液进行酸洗涤纯化；

[0012] 4)对酸洗后的提取液进行真空浓缩，用烃类有机溶剂溶解后进行碱性洗涤纯化；

[0013] 5)对碱洗后的溶液进行尼莫克汀衍生处理，再通过结晶分离出尼莫克汀衍生物；

[0014] 6)对尼莫克汀衍生物进行水解还原为尼莫克汀；

[0015] 7)萃取水解液中的尼莫克汀，经结晶、干燥得含量高于80%的尼莫克汀产品。

[0016] 上述步骤1)将生产尼莫克汀的发酵液絮凝过滤，首先要将发酵液的pH调节为7.5~9.0，然后再加入絮凝剂，最后过滤得到湿菌丝渣。其中通常用NaOH溶液(例如0.5mol/L的NaOH溶液)调节pH7.5-9.0；所述絮凝剂为高分子絮凝剂，优选聚合氯化铝、聚合硫酸铁等。操作温度为室温，优选为15-30℃。

[0017] 上述步骤2)用湿菌丝渣重量3-4倍体积(V/W,即1g湿菌菌丝用3-4mL溶剂)的非水溶性有机溶剂进行萃取，优选使用醋酸丁酯和/或乙酸乙酯于20-30℃搅拌萃取3-4小时，过滤收集萃取液；然后将过滤渣用其重量3-4倍体积(V/W)的相同溶剂，于20-30℃搅拌二次萃取2-3小时，过滤收集萃取液，合并收集的萃取液，得到提取液。

[0018] 上述步骤3)提取液的酸性洗涤纯化过程可以是：在15-30℃(通常为室温)下，加入提取液体积50%(V/V)的氢离子浓度为0.08~0.10mol/L的酸性洗液搅拌洗涤10-20分钟，静置40-60分钟，分离排尽洗涤废水。其中所述酸性洗液优选为盐酸或硫酸溶液。

[0019] 上述步骤4)碱性洗涤纯化：将酸洗后的提取液进行真空浓缩，蒸尽之前的提取溶剂，然后加入非水溶性烃类有机溶剂将浓缩物溶解为尼莫克汀2-3万 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液，所述有机溶剂优选为甲苯、二甲苯、庚烷和/或己烷；控制温度30-35℃，加入溶解液体积的0.8~1.0倍体积的碱性洗涤液，优选使用5%的 Na_2CO_3 或 K_2CO_3 溶液，搅拌洗涤10-15分钟，静置2-3小时，分离排尽洗涤废水。

[0020] 上述步骤5)尼莫克汀的衍生、结晶纯化的过程具体可以是:将碱洗纯化后的溶解液进行真空浓缩至尼莫克汀含量为7-9万 $\mu\text{g}/\text{mL}$,控制温度28-30 $^{\circ}\text{C}$,加入尼莫克汀总当量的3.5-4倍当量的衍生试剂和2.5-3倍当量的酸束缚剂,搅拌反应2-4小时,用HPLC检测控制反应时间,待色谱检测中尼莫克汀的峰面积小于1%,即可终止反应;加入反应液1倍体积的5%的 NaHCO_3 溶液,搅拌洗涤10-15分钟,静置30-40分钟,分离废水;对洗涤后的反应液进行真空浓缩至原体积的二分之一,开始降温、搅拌结晶,控制结晶终点温度5-10 $^{\circ}\text{C}$,分离收集潮晶,于50-60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥除去有机溶剂。其中所述衍生试剂为含苯环的酰氯或酸酐,优选为对硝基苯甲酰氯、邻硝基苯甲酰氯和/或苯甲酰氯,所述缚酸剂优选为吡啶、二乙胺和/或三乙胺。

[0021] 上述步骤6)尼莫克汀衍生物的水解过程具体可以是:将干燥后的尼莫克汀衍生物用水溶性有机溶剂(例如二氧六环、四氢呋喃)溶解为10%的溶液,控制温度5-8 $^{\circ}\text{C}$,加入碱液进行水解反应5-8小时,HPLC检测控制水解底物的色谱峰面积残留小于1%即可终止水解。其中所述碱液优选为 NaOH 、 KOH 溶液。

[0022] 上述步骤7)尼莫克汀的萃取、沉淀、干燥过程具体可以是:向水解液中加入1倍体积的水稀释,加入1倍体积的烃类有机溶剂萃取尼莫克汀,优选使用庚烷、甲基环己烷和/或环己烷;分离收集有机萃取相,真空浓缩,降温结晶,终点温度控制5-10 $^{\circ}\text{C}$,分离收集潮晶,于50-60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥得尼莫克汀产品。

[0023] 本发明提取并纯化尼莫克汀的方法对生产设备的要求低,条件温和,操作简单,避免了使用昂贵的大孔树脂、层析硅胶及繁琐的层析操作过程,获得的尼莫克汀纯度高,更适宜进行规模化生产,经济效益明显。

具体实施方式

[0024] 以下通过实施例对本发明作进一步说明,但这并非是对本发明的限制,本领域技术人员根据本发明的基本思想,可以做出各种修改或改进,但是只要不脱离本发明的基本思想,均在本发明的范围之内。

[0025] 实验原材料和设备:

[0026] 尼莫克汀发酵液:重庆大新药业股份有限公司生产

[0027] 尼莫克汀的发酵生产过程:

[0028]	发酵培养基:	葡萄糖	4.0%
		乳糖	6%
		黄豆粉	3.0%
		酵母浸出粉	0.5%
		硫酸镁	0.2%
		硝酸钾	0.5%

[0029] 将培养基调pH为7.0,然后121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌30min备用。

[0030] 将制备好的蓝灰链霉菌种子液(菌液浓度18-25%,为离心测得的菌沉淀的体积百

分含量)1L接种于30L已制备好的发酵培养基中。28℃培养220-250小时,发酵液中尼莫克汀的色谱纯度大于55%,根据HPLC色谱检测计算发酵液中的尼莫克汀单位。

- [0031] 工业盐酸 10-11mol/L,重庆天原化工厂
 [0032] NaOH 含量≥95%,重庆三阳化工有限公司
 [0033] 聚合氯化铝 $Al_2O_3 \geq 28\%$,巩义市永昌净水材料厂
 [0034] 醋酸丁酯 含量≥95%,重庆川东化工有限公司
 [0035] 旋转蒸发器 RE5220,上海亚荣生化仪器厂
 [0036] JJ-1电动搅拌器 江苏金坛荣化仪器制造公司
 [0037] 液相色谱仪 LC-2010AHT,日本岛津
 [0038] 色谱系统

柱: 4.6mm ×15 cm

填料: C18, 5μm

柱温: 50℃

[0039]

检测波长: 240nm

流动相流速: 1 ml/min

进样量 10μl

[0040] 流动相:85%甲醇(V/V)

[0041] HPLC检测发酵液中的尼莫克汀单位,方法是:取2mL发酵液加入乙醇至10mL体积,超声作用30min,离心,过滤,取上清液供HPLC分析。

[0042] 实施例1

[0043] 1、取重庆大新药业股份有限公司生产的尼莫克汀发酵液20L(尼莫克汀单位1980μg/mL),用0.5mol/L的NaOH液调pH8.0,在搅拌下加入1000mL5%的聚合氯化铝,搅拌絮凝20分钟,真空抽滤,得湿菌丝渣2000g。

[0044] 2、将湿菌丝渣投入7L醋酸丁酯中,于25℃搅拌萃取3.5小时,过滤收集萃取液6L;过滤菌渣用7L醋酸丁酯于25℃搅拌萃取3小时,过滤收集萃取液6.2L;合并萃取液得12.2L,含尼莫克汀单位3115μg/mL。

[0045] 3、向合并后的萃取液中加入6.1L0.1mol/L的HCl搅拌洗涤10分钟,静置50分钟,分层明显,排尽洗涤废水,得到12.15L洗后萃取液。

[0046] 4、碱性洗涤纯化:将酸洗涤后的萃取液于85℃水浴真空浓缩,除尽醋酸丁酯,用1.2L甲苯溶解浓缩物,控制温度32℃,加入1.2L5%的 Na_2CO_3 溶液搅拌洗涤10分钟,静置2小时,分离除尽洗涤废水,得洗涤后甲苯溶液1.21L。

[0047] 5、尼莫克汀的衍生、结晶纯化:将碱洗后的1.21L甲苯溶液蒸出0.8L甲苯,降温至28℃,在搅拌下加入40g对硝基苯甲酰氯和12mL吡啶,反应3小时后HPLC色谱检测尼莫克汀的峰面积小于1%,加入0.6L5%的 $NaHCO_3$ 溶液,搅拌洗涤15分钟,静置40分钟,分离废水。将甲苯溶液进行真空浓缩至0.3L,开始降温、搅拌结晶,结晶终点温度8℃,分离收集潮晶68g,于50-60℃真空干燥得干品55g。

[0048] 6、尼莫克汀衍生物的水解:将干燥后的55g尼莫克汀衍生物用550mL二氧六环溶

解,控制温度5-8℃,加入100mL1mol/L NaOH液水解反应7小时,HPLC检测控制水解底物的色谱峰面积残留小于1%。

[0049] 7、尼莫克汀的萃取、沉淀、干燥:向水解液中加入650mL的水稀释,加入650mL甲基环己烷搅拌萃取30分钟;分离收集有机萃取相660mL,真空浓缩至280mL,降温结晶,终点温度6℃,分离得潮晶45g,于50-60℃干燥得尼莫克汀产品38g,经HPLC测定尼莫克汀含量为81.5%。

[0050] 实施例2

[0051] 1、取重庆大新药业股份有限公司生产的尼莫克汀发酵液25L(尼莫克汀单位1780μg/mL,用0.5mol/L的NaOH液调pH9.0,在搅拌下加入1200mL5%的聚合氯化铝,搅拌絮凝30分钟,真空抽滤,得湿菌丝渣2400g。

[0052] 2、将湿菌丝渣投入8.5L醋酸丁酯中,于30℃搅拌萃取3小时,过滤收集萃取液7.3L;过滤菌渣用8L醋酸丁酯于30℃搅拌萃取3小时,过滤收集萃取液7.7L;合并萃取液得15L,含尼莫克汀单位2850μg/mL。

[0053] 3、向合并后的萃取液中加入7.5L0.1mol/L HCl搅拌洗涤15分钟,静置40分钟,分层明显,排尽洗涤废水,得到14.8L洗后萃取液。

[0054] 4、碱性洗涤纯化:将酸洗涤后的萃取液于85℃水浴真空浓缩,除尽醋酸丁酯,用1.5L甲苯溶解浓缩物,控制温度28℃,加入1.5L5%的Na₂CO₃溶液,搅拌洗涤15分钟,静置3小时,分离除尽洗涤废水,得洗涤后甲苯溶液1.49L。

[0055] 5、尼莫克汀的衍生、结晶纯化:将碱洗后的1.49L甲苯溶液蒸出1.0L甲苯,降温至30℃,在搅拌下加入50g对硝基苯甲酰氯和16mL吡啶,反应2.5小时后HPLC色谱检测尼莫克汀的峰面积小于1%,加入0.8L5%的NaHCO₃溶液,搅拌洗涤10分钟,静置50分钟,分离废水。将甲苯溶液进行真空浓缩至0.31L,开始降温、搅拌结晶,结晶终点温度5℃,分离收集潮晶75g,于50-60℃真空干燥得干品60g。

[0056] 6、尼莫克汀衍生物的水解:将干燥后的60g尼莫克汀衍生物用600mL二氧六环溶解,控制温度5-8℃,加入110mL1mol/L NaOH液水解反应6.5小时,HPLC检测控制水解底物的色谱峰面积残留小于1%。

[0057] 7、尼莫克汀的萃取、结晶、干燥:向水解液中加入650mL的水稀释,加入650mL甲基环己烷搅拌萃取30分钟;分离收集有机萃取相660mL,真空浓缩至320mL,降温结晶,终点温度7℃,分离得潮晶50g,于50-60℃干燥得尼莫克汀产品43g,经HPLC测定尼莫克汀含量为82.5%。

[0058] 以上通过实施例描述了本发明所提供的从发酵液中提取并纯化尼莫克汀的方法,从事相关领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明实质的范围内,可以对本发明做一定的变化或修改,因此本发明的保护范围视权利要求范围所界定。