

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D471/04

//(C02F471/04, 221 : 00,
209 : 00)



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00114639.4

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1138776C

[22] 申请日 2000.6.20 [21] 申请号 00114639.4

[71] 专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 赵永芳 王银善 吴波 成汇

徐宁 闵向荣

审查员 刘姝晶

权利要求书 1 页 说明书 2 页

[54] 发明名称 吡咯喹啉醌的提取方法

[57] 摘要

本发明公开了一种提取 PQQ 的方法,它是将 PQQ 发酵液用亲水性阴离子交换剂吸附后,经洗涤、洗脱,真空浓缩干燥得到 PQQ 粗品,再经重结晶,除去粗品中 70% 以上的盐份;接着上用 Seppak C₁₈ 柱反相吸附柱,用含 5% 吡啶的乙醇流过一倍柱体积,随之用 70% 甲醇溶液洗脱,使回收率提高约 30% 左右,降低成本 30 - 40%。该方法具有工艺操作简单、成本低廉,产品回收率和纯度高等特点,可用于 PQQ 大规模生产的后处理过程。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种吡咯喹啉醌的提取方法，将吡咯喹啉醌发酵液用亲水性阴离子交换剂吸附后，经洗涤、洗脱，再用反相吸附柱吸附、甲醇洗脱，真空浓缩干燥后得到吡咯喹啉醌，其特征在于：经洗涤、洗脱后，进行真空浓缩干燥，得到吡咯喹啉醌粗品，溶解达到 KCl 饱和度，调 pH 值至 3.5，在 10℃ 以下结晶；反相吸附柱为 20 cm³ 柱；甲醇洗脱前用含 5% 吡啶的乙醇洗涤反相吸附柱一倍柱体积。

吡咯喹啉醌的提取方法

本发明涉及吡咯喹啉醌的一种提取方法。

吡咯喹啉醌 (Pyrroloquinoline Quinone, 简称 PQQ) 是一种小分子化合物。PQQ 能刺激一些微生物和植物生长, 促进雌鼠生长繁殖, 加速胞外基质成熟, 强化机体免疫力, 清除和调节体内自由基, 提高神经细胞和神经生长因子 (NGF) 生成, 防止酒精、乙醛对肝脏的损害等 [Van Kleef. M.A.G & Duine J A., Factors relevant in bacterial PQQ. Appl. Environ. Microbiol. 1989. 55. 1209-1213], 因此 PQQ 可作为保健品、新药物开发的一种有用的原材料。

PQQ 可以通过化学合成法或生物合成法 [Ameyama. M, Hayashi. M et al., Microbial production of PQQ. Agric. Biol. Chem. 1984, 48:561-565; Van. Kleef. M.A.G & Duine. J.A., L-Tyr is the precursor of PQQ biosynthesis in Hyphomicrobium X. FEBS 1988, 237:91-97; JP.昭 63-267287 C12P 17/18] 获得, 由于前者有工艺复杂, 异构体难以分离、成本高等弊端。因此, 目前 PQQ 主要采用生物合成法进行。其提取方法为: PQQ 发酵液 → 亲水性离子交换剂吸附 → 低盐溶液洗涤 → 高盐溶液洗脱 → 调 pH ≈ 2 → 反相吸附柱 (0.75cm³) → 70% 甲醇洗脱 → 真空干燥。但该方法仅适合于少量发酵液 (数十立升) 制备 PQQ, 且仍处在实验室小规模试制阶段, 产品价格极其昂贵 (德国 39 美元/mg, 日本 150 人民币/mg), 因此极大地限制了 PQQ 的开发应用。

本发明的目的在于提供一种吡咯喹啉醌 (PQQ) 的提取方法, 该方法应具有工艺操作简单、成本低廉, 产品回收率和纯度均高等特点, 可用于 PQQ 大规模生产的后处理过程。

为实现上述目的, 本发明所采用的技术方案如下:

一种吡咯喹啉醌的提取方法, 将吡咯喹啉醌发酵液用亲水性阴离子交换剂吸附后, 经洗涤、洗脱, 再用反相吸附柱吸附、甲醇洗脱, 真空浓缩干燥后得到吡咯喹啉醌, 其特征在于: 经洗涤、洗脱后, 进行真空浓缩干燥, 得到吡咯喹啉醌粗品, 溶解达到 KCl 饱和度, 调 pH 值至 3.5, 在 10℃ 以下结晶; 反相吸附柱为 20

cm³ 柱；甲醇洗脱前用含 5%吡啶的乙醇洗涤反相吸附柱一倍柱体积。

本发明更具体的技术方案如下：一种吡咯喹啉醌（PQQ）的提取方法，将 PQQ 发酵液用 DEAE-葡聚凝胶(亲水性阴离子交换剂)吸附后，用含 0.6mol/L KCl 的 20mmol/L Tris-HCl 溶液洗涤，再用含 0.6~1.2mol/L KCl 的 20mmol/L Tris-HCl 溶液洗脱，真空浓缩干燥得到 PQQ 粗品；将此粗品溶解达到 KCl 饱和度，溶液调 pH ≈3.5，在<10℃下结晶，离心得晶体 PQQ；将此加水溶解，调 pH≈3.5，用柱体积为 20cm³ 的 Seppak C₁₈ 柱进行反相吸附，用 pH≈2.5 的 Tris 溶液洗涤，用含 5%吡啶的乙醇流过一倍柱体积，再用 70%甲醇溶液洗脱，真空浓缩干燥得到产品 PQQ。用上述方法提取的 PQQ 经 HPLC 和毛细管电泳检测，结果表明其纯度分别为 98.3% 和 95%。从实验室收集的培养液，制备的 PQQ 经毛细管电泳检测其纯度达 100%。

本发明的提取方法中，经高浓度盐溶液洗脱后，从吸附剂上解离的 PQQ 溶液体积大，经真空浓缩得到含高盐的 PQQ 制品，再采用重结晶方法能除去粗 PQQ 制品中 70%以上的盐份。同时，反相吸附柱改 0.75 cm³ 小柱为 20cm³ 柱，前者适用于纯化含 10 余毫克 PQQ 发酵液，而后一柱则能纯化含数百毫克 PQQ 发酵液。PQQ 能有效地被反相层析柱吸附，若仅用 70%甲醇溶液洗脱，即使减慢洗脱速度，延长洗脱时间，也难于将 PQQ 完全洗脱出来。本发明中先采用用含 5%吡啶的乙醇洗涤反相吸附柱一倍柱体积，再用 70%甲醇溶液洗脱，不仅使回收率提高 30% 左右(由原来的 1mg/L 回收率提高到 1.3mg/L 左右)，并且该反向柱可反复使用，从而降低成本 30-40%。因此，本方法具有工艺操作简单、成本低廉，产品回收率和纯度高等特点，而且可用于 PQQ 大规模生产的后处理过程。

以下结合具体的实施例对本发明的技术方案作进一步的说明：

实施例：

将收集的 PQQ 发酵液用 DEAE-葡聚凝胶吸附后，用含 0.6mol/L KCl 的 20mmol/L Tris-HCl 溶液洗涤，接着用 0.6~1.2mol/L KCl 的 20mmol/L Tris-HCl 溶液洗脱，真空浓缩干燥得到 PQQ 粗品；将此粗品溶解达到 KCl 饱和度溶液（调 pH ≈3.5），在<10℃下结晶，离心得晶体 PQQ；将此加水溶解调 pH≈3.5，用 Seppak C₁₈ 柱反相吸附，pH≈2.5 溶液洗涤，用含 5%吡啶的乙醇流过一倍柱体积，再用 70%甲醇洗脱，真空浓缩干燥得到产品 PQQ。经毛细管电泳检测其纯度可达 95%~100%。PQQ 的回收率提高 30%。