

文章编号: 1001-8689(2018)06-0701-04

## 分离纯化与化学合成

A-40926混合物中B<sub>0</sub>组分的分离纯化

宋盼 郭月玲 王崔岩 彭亮 倪会敏 仲伟潭\*

(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, 石家庄 050015)

**摘要:** **目的** 开发一种高纯度A-40926混合物中B<sub>0</sub>组分(以下简称A-40926 B<sub>0</sub>)的分离纯化工艺。**方法** 采用中压色谱系统, 以聚合物微球为载体, A-40926 B<sub>0</sub>的收率为指标, 筛选聚合物微球的类型, 优化洗脱条件。**结果** 型号为UniPS30-300的微球为最佳层析介质, 上样量为10mg(每毫升填料), 洗脱剂依次为体积分数30%, 45%的乙醇溶液, 流速为1.5BV/h(BV: 层析柱体积); 所得产品纯度大于95%, 层析总收率大于75%。**结论** 此种高纯度A-40926 B<sub>0</sub>的分离纯化方法简单易行, 收率稳定, 适于工业化生产。

**关键词:** A-40926 B<sub>0</sub>; 聚合物微球; 分离纯化**中图分类号:** R987.1; O625.66 **文献标志码:** ASeparation and purification of component B<sub>0</sub> in antibiotic A-40926

Song Pan, Guo Yue-ling, Wang Cui-yan, Peng Liang, Ni Hui-min and Zhong Wei-tan

(National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering &amp; Technology Research Center, New Drug Research &amp; Development Company of NCPC, Shijiazhuang 050015)

**Abstract Objective** To develop the separation and purification process of B<sub>0</sub> component in the A-40926 mixture (here in after referred to as A-40926 B<sub>0</sub>). **Methods** Using medium pressure chromatography system, the polymer microspheres were used as carriers and the yield of A-40926 B<sub>0</sub> as indexes. The types of polymer microspheres were screened and the elution conditions were optimized. **Results** The type of UniPS30-300 polymer particles were selected as the best chromatographic media. The optimal conditions were as follows: The sample loading amount was 10mg (per 1mL filler), and 30% and 45% ethanol solution was used as the elution solution at a flow rate of 1.5BV/h (BV: column volume). The purity of the product was higher than 95% and the yield was above 75%. **Conclusion** The established purification process of A-40926 B<sub>0</sub> was simple to operate and the yield was high and feasible. Thus the process was suitable for industrialized production.

**Key words** A-40926 B<sub>0</sub>; Nanoscale polymer particles; Separation and purification

达巴万星是新一代糖肽类抗生素, 其作用机制同万古霉素和替考拉宁, 通过抑制革兰阳性菌细胞壁的生物合成, 被广泛用作治疗皮肤和软组织感染, 且具有万古霉素和替考拉宁所没有的抗淋病

奈瑟球菌的作用<sup>[1-2]</sup>。达巴万星具有独特的药动学性质, 可每周间隔用药<sup>[3]</sup>。美国食品和药物管理局(FDA)已于2014年5月23日批准达巴万星上市<sup>[4]</sup>。

达巴万星是半合成糖肽类抗生素, 其前体为

收稿日期: 2017-05-18

作者简介: 宋盼, 女, 生于1985年, 硕士, 工程师, 主要从事微生物药物的分离纯化工艺研究, E-mail: sp121021@163.com

\*通讯作者, E-mail: zhwt@126.com

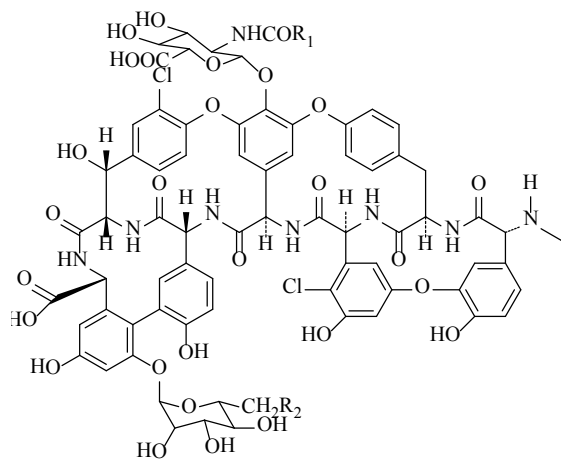
A-40926<sup>[5]</sup>。目前的合成途径是先将前体的氨基葡萄糖醛酸上的羧基经酯化保护后，再将38位羧基酰胺化，然后酯水解去保护基，最后加酸成盐制得<sup>[6]</sup>。A-40926由野野村放线菌属ATCC39727发酵产生，有5个主要组分：PA、PB、A、B<sub>0</sub>和B<sub>1</sub>，这5种组分具有相同的母核结构(图1)。其中PA和PB在碱性条件下，会水解失去乙酰基，转化为A和B。B<sub>0</sub>组分为A-40926的主要有效组分，是合成达巴万星的关键中间体。

目前，关于A-40926 B<sub>0</sub>组分提取分离的文献报道较少，且已有的制备方法<sup>[7-10]</sup>存在工艺复杂、溶剂消耗量大、所得产品纯度不高、收率低等诸多缺点。本研究以聚合物微球为分离介质对A-40926混合物中B<sub>0</sub>进行分离纯化，可以得到纯度大于95%的精粉。该工艺简单易行、收率稳定，所得产品质量好，为合成达巴万星奠定了坚实基础。

1 仪器与材料

瑞士Buchi公司中压色谱系统，含C-601型泵、C-615型控制器、C-616型收集器和C-635型检测器；岛津高效液相色谱仪LA-2010A型，CUV-VIS检测器，Easy3000工作站；冻干机，德国Martin Christ公司。

A-40926发酵液、去离子水，华北制药新药研发中心自制；A-40926 B<sub>0</sub>标准品，美国Sigma公司；乙腈(色谱纯)，美国Merck公司；乙醇(工业级)，沧州兴隆化工有限公司；其它试剂均为国产分析纯。



A-40926组分	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
A	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub>	OH
PA	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
B <sub>0</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH
B <sub>1</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	OH
PB	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

图1 A-40926各组分结构式  
Fig. 1 The structures of each component in A-40926

2 方法与结果

2.1 HPLC法测定A-40926 B<sub>0</sub>色谱条件

色谱柱：Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm)；流动相A：乙腈:水=1:9(1000mL流动相A含1.54g醋酸铵)；流动相B：乙腈；流速1.0mL/min；紫外检测波长254nm；进样量5μL；柱温40℃；梯度洗脱0~11min，B浓度变化18%~32%；11~15min，B浓度变化32%~18%。运行时间21min。以A-40926 B<sub>0</sub>标准品为参照。

2.2 粗品的制备

A-40926 B<sub>0</sub>的发酵液用30%的NaOH溶液调pH至10.5~11.5，加入1倍发酵液体积的工业乙醇搅拌1h，真空抽滤，滤液减压浓缩除去乙醇，得浓缩液，将浓缩液调pH至7.0后经HZ816树脂吸附解吸<sup>[11]</sup>，活性炭脱色，真空浓缩，冷冻干燥，得A-40926 B<sub>0</sub>粗粉(图2A)，纯度为47.3%。

2.3 微球层析工艺研究

聚合物微球是一种反相色谱填料，利用不同物质在固定相和流动相构成的体系中具有不同的分配系数，从而使各物质达到分离。UniPS®色谱填料基质是高交联度的聚苯乙烯和二乙烯基苯，具有刚性强、粒径均一、低反压、耐酸碱等特点，且有无与伦比的使用寿命，在极端的酸碱溶液和有机溶液中都保持高度的物理和化学稳定性，从而降低生产成本。

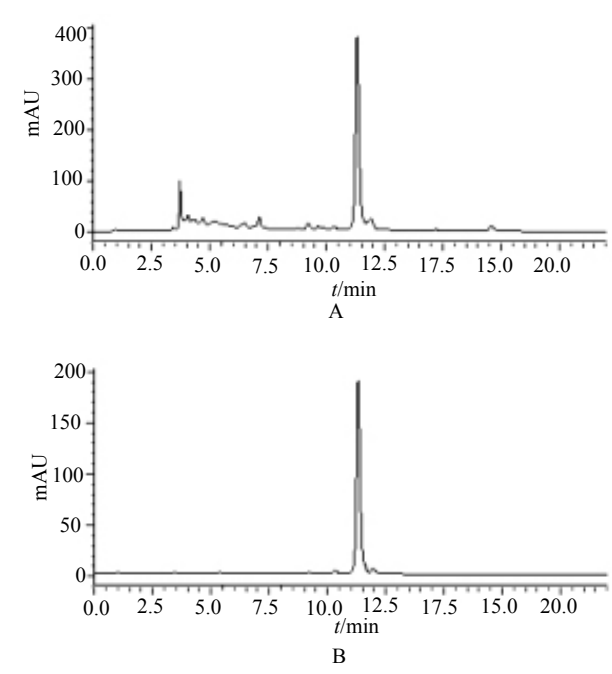


图2 A-40926 B<sub>0</sub>粗粉(A)和精粉(B)的HPLC图谱  
Fig. 2 HPLC chromatograms of A-40926 B<sub>0</sub> crude product (A) and the purified (B)

2.3.1 微球型号的筛选

分别取UniPS30-300型、UniPSA30-300型和UniPSN30-300型聚合物微球各100mL，用45%乙醇浸泡2h，重力沉降法装柱( $\Phi$ :H=1:8，S=6.15cm<sup>2</sup>)用去离子水平衡系统。

准确称取A-40926 B<sub>0</sub>粗粉1.0g，用去离子水5mL溶解后上样于色谱柱，然后依次用30%和45%的乙醇溶液洗脱，洗脱速度2.5mL/min，并通过中压色谱系统检测器在线监测，以观察主峰与杂质峰的分离效果，监测波长254nm。根据监测记录，分管收集洗脱液，每管10mL。合并含量大于95%(HPLC峰面积归一法，下同)的洗脱液，根据公式(1)计算收率。不同型号聚合物微球的主要技术指标及洗脱收率结果见表1。可见，UniPS30-300型聚合物微球洗脱收率最高，故选为A-40926 B<sub>0</sub>粗粉的纯化介质。

表1 不同型号聚合物微球的主要技术指标及洗脱收率  
Tab. 1 The major technical indicators and elution yields of different types of PM

微球型号	骨架	平均粒径/ $\mu$ m	比表面积/(m <sup>2</sup> /g)	孔容/(cm <sup>3</sup> /g)	平均孔径/ $\text{\AA}$	洗脱收率/%
UniPS30-300	聚苯乙烯/二乙烯基苯	30 $\pm$ 3	~850	~1.6	~300	77.6
UniPSA30-300	聚苯乙烯/二乙烯基苯	30 $\pm$ 1.5	~850	~2.2	~300	73.3
UniPSN30-300	聚苯乙烯/二乙烯基苯	30 $\pm$ 1.5	~680	~1.45	~300	72.6

表2 洗脱剂浓度对层析收率的影响  
Tab. 2 Yields of different concentration eluent

乙醇体积分数/%	解吸液体积/mL	解吸液浓度/( $\mu$ g/mL)	洗脱收率/%
30	26	1180	6.5
40	65	5070	69.1
45	52	7080	77.8
50	43	7320	66.5

条件为：先用30%乙醇洗去色素和极性大的杂质，再用45%乙醇洗脱，收集洗脱液。

2.3.3 洗脱流速的选择

各取1.0g A-40926 B<sub>0</sub>粗粉用去离子水溶解后注入微球UniPS30-300层析柱，然后依次用体积分数30%，45%的乙醇溶液洗脱，洗脱速度分别为1.0、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0mL/min，分管收集洗脱液。合并HPLC含量大于95%的洗脱液，计算收率。结果见图3。

从图3可以看出，流速过低，洗脱不集中，层析收率偏低；而过高的流速，亦不利于有效成分的分离，反而影响层析收率，因此选择中流速2.5mL/min为最佳洗脱流速。

2.3.4 上样量的确定

$$\text{洗脱收率}(\%) = (C \times V) / (M \times \omega) \quad (1)$$

公式中：C：洗脱液浓度( $\mu$ g/mL)；V：洗脱液体积(mL)；M：上样质量( $\mu$ g)； $\omega$ ：样品质量含量(%)。

2.3.2 洗脱剂浓度的选择

根据环保工艺要求和A-40926 B<sub>0</sub>粗粉的溶解特性，本研究选择乙醇作洗脱剂。各取1.0g A-40926 B<sub>0</sub>粗粉用去离子水溶解后注入微球UniPS30-300层析柱，再分别用30%、40%、45%或50%的乙醇溶液洗脱，分管收集洗脱液。合并HPLC含量大于95%的洗脱液，计算收率，结果见表2。

由表2可知，30%乙醇洗脱时，主要洗脱的是色素和极性大的杂质；用40%乙醇洗脱时，拖尾严重且洗脱率低；用50%乙醇洗脱时，主峰下来稍快，不能与杂质峰有效分离；45%乙醇洗脱时分离效果最佳，杂质去除率和产品纯度较高。因此确定洗脱

分别将0.5、0.8、1.0、1.2和1.5g A-40926 B<sub>0</sub>粗粉用去离子水溶解后注入100mL微球UniPS30-300层析柱，然后依次用体积分数30%，45%的乙醇溶液洗脱，洗脱速度为2.5mL/min，分管收集洗脱液。合并HPLC含量大于95%的洗脱液，计算收率，结果见图4。

由图4可知，上样量过低，样品分散严重，层析收率偏低；随着上样量的增加，收率有所增加，但上样量过大会使层析柱过载，主峰与杂质交叉严重，反而造成洗脱收率下降。因此选择1.0g(每

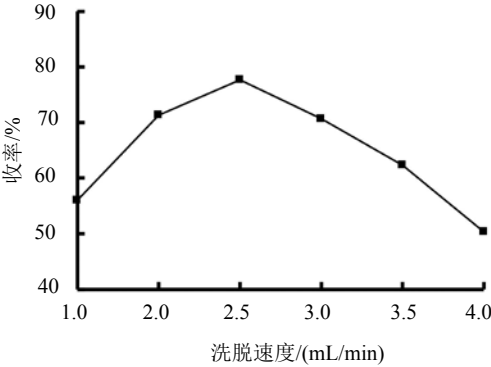


图3 不同洗脱速度时的层析收率  
Fig. 3 Chromatographic yield of different elution rates

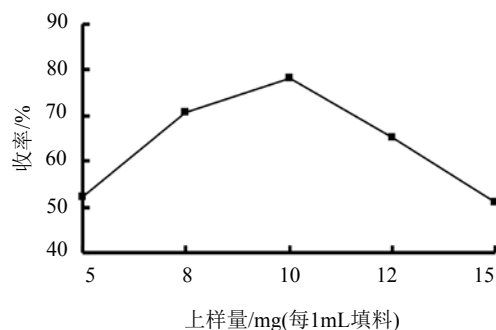


图4 不同上样量下的层析收率

Fig. 4 Chromatographic yield of different loading capacities

100mL填料)为最佳上样量。

#### 2.4 工艺验证

将10g A-40926 B<sub>0</sub>粗粉用去离子水溶解后注入1L微球UniPS30-300层析柱(Φ:H=1:8, S=27.33cm<sup>2</sup>), 然后依次用体积分数30%, 45%的乙醇溶液洗脱, 流速为25mL/min, 分管收集洗脱液。合并HPLC含量大于95%的洗脱液, 45℃真空浓缩(除去乙醇)至A-40926 B<sub>0</sub>浓度约为100g/L, 冷冻干燥, 得A-40926 B<sub>0</sub>精粉(图1B), 数据结果见表3。

#### 3 结论

新型半合成糖肽类抗生素达巴万星作为抗菌药使用时, 其主要成分B<sub>0</sub>要求不低于75%, 因此得到高纯度的达巴万星关键中间体A-40926 B<sub>0</sub>是有效合成达

巴万星的基础。本研究以一种反相色谱填料聚合物微球为载体, 通过优选微球型号和洗脱参数, 建立了分离纯化达巴万星关键中间体A-40926 B<sub>0</sub>的工艺, 采用此方法进行3批工艺验证试验, 所得产品纯度均大于95%, 层析总收率在75%以上。该工艺简单易行, 所用溶剂毒性低, 收率稳定, 适用于工业化生产。

#### 参考文献

- [1] 沈晓放, 陈少欣. 半合成糖肽类抗生素达巴万星前体A40926的生物合成[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(2): 141-147.
- [2] 陈昌发, 张海红, 张长清, 等. A40926高产菌株的选育及发酵工艺优化[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 39(1): 28-32.
- [3] 别一, 郭明, 袁建栋. 一种生产达巴万星前体A40926的方法: CN, 105671110A[P]. 2016-10-15.
- [4] 张贵民, 刘志钰, 沈进军. 一种发酵法生产A40926的方法: CN, 106520871A[P]. 2017-03-22.
- [5] 陈明, 张春枝, 祖国仁. 天然脂糖肽类抗生素A40926的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(4): 308-313.
- [6] 邵昌, 周伟澄. 半合成糖肽类抗生素的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(5): 378-387.
- [7] 邓小宽, 田敏, 朱辉. 糖肽类抗生素提取分离的研究概况[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(11): 784-788.
- [8] Selva E, Gropello C, Goldstein B, *et al.* Antibiotic A40926 mannosyl aglycon: US, 0228015A2[P]. 1987-07-08.
- [9] Selva E, Gastaldo L, Denaro M, *et al.* Method for selectively enhancing the production of factors A or B<sub>0</sub> of antibiotic A40926 complex: US, 5843679[P]. 1998-12-01.
- [10] 朱辉, 邹敬源, 韩晓彤, 等. 一种道谷霉素关键中间体A40926 B<sub>0</sub>组分的纯化制备方法: CN, 101851277A[P]. 2010-10-06.
- [11] 宋盼, 郭月玲, 王崔岩, 等. 大孔树脂分离纯化达巴万星中间体A-40926B<sub>0</sub>的工艺研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(10): 747-750.

表3 工艺验证实验

Tab. 3 The experiment of process validation

批次	A-40926 B <sub>0</sub> 精粉		
	重量/g	含量/%	收率/%
1	3.8	96.2	77.3
2	3.9	95.5	78.7
3	3.8	96.4	77.4