

## 环孢素 A 在反相液相色谱中的吸附行为及分离纯化

李志东<sup>1</sup>, 傅青<sup>1</sup>, 戴卓舜<sup>1</sup>, 金郁<sup>1\*</sup>, 梁鑫淼<sup>1,2</sup>

(1. 华东理工大学药学院制药工程与过程化学教育部工程研究中心, 上海 200237;

2. 中国科学院分离分析化学重点实验室, 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 是由 11 个氨基酸组成的中性环状多肽, 是临床拮抗器官和组织移植后排异反应的首选药物。高效液相色谱法广泛应用于 CsA 的分离分析, 开展 CsA 色谱行为的研究是使用制备高效液相色谱纯化 CsA 的关键。该文首先在 C18 固定相上比较了 CsA 在甲醇-水和乙腈-水两种流动相体系中的保留行为, 结果表明其保留时间对有机相比例变化比较敏感。控制甲醇比例在 84%~88%, 或者乙腈比例在 75%~85%, CsA 的保留因子 ( $k$ ) 在 3~7 范围内。考察了上样量对 CsA 峰形的影响。随着上样量增加, 在两种流动相体系中, CsA 的峰形都由对称开始变得拖尾, 保留时间前移。因此在进行 CsA 纯化时, 需要特别注意前杂的去除情况。然后采用吸附等温线描述 CsA 的保留行为, 当流动相中 CsA 的质量浓度较低时, 有机相比例对溶质在固定相上的吸附量影响并不明显。随着溶质的质量浓度增加至 0.5 g/L 以上, 有机相比例降低有助于提高 CsA 在固定相上的吸附量。和甲醇-水体系相比, 在乙腈-水体系中固定相对溶质有更大的吸附容量。用模型对 CsA 的等温吸附曲线拟合, 在甲醇-水体系中符合 Langmuir 模型, 在乙腈-水体系中为 Moreau 模型。由模型参数可知在两种体系下, CsA 在 C18 固定相上均为单层吸附, 区别在于乙腈-水体系中 CsA 会产生较大的分子间作用力。最后, 实验采用 0~60 min 65%~75% 乙腈, 60~80 min 75% 乙腈的条件开展了环孢素 A 纯化的探索实验, 可将 CsA 的杂质控制在 0.2% 以下。本研究结果对采用制备高效液相色谱纯化 CsA 具有指导意义。

**关键词:**反相液相色谱; 制备高效液相色谱; 环孢素 A; 吸附等温线; 纯化

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2022)01-0066-08

## Adsorption, separation, and purification of cyclosporine A using reversed-phase liquid chromatography

LI Zhidong<sup>1</sup>, FU Qing<sup>1</sup>, DAI Zhuoshun<sup>1</sup>, JIN Yu<sup>1\*</sup>, LIANG Xinmiao<sup>1,2</sup>

(1. Engineering Research Center of Pharmaceutical Engineering and Process Chemistry, Ministry of Education, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography (HPLC) is widely used in the separation and analysis of cyclosporine A (CsA). Analyzing the chromatographic behavior of CsA is key to the purification of CsA by preparative HPLC. In this study, the retention behavior of CsA on the C18 column using mobile phases of methanol-water and acetonitrile-water was compared. The retention time of CsA was sensitive to the change in the ratio of the organic solvent. When 84%–88% methanol or 75%–85% acetonitrile was used, the retention factor ( $k$ ) was in the range of 3–7. The change in the peak shape of CsA was investigated with loading amounts of 5, 25, 50, 100, and 500 mg. With an increase in sample loading, the peak shape of CsA in both mobile phases changed from symmetric to tailing, and the retention time reduced. Therefore, it is necessary to focus on the removal of impurities that were eluted before CsA during the

收稿日期: 2021-01-29

\* 通讯联系人. Tel: (021) 64250633, E-mail: jiny@ecust.edu.cn.

基金项目: 国家重大科技专项课题 (2018ZX09735-002).

Foundation item: National Science and Technology Major Project (No. 2018ZX09735-002).

purification. In addition, the peak shapes of CsA in methanol-water and acetonitrile-water were similar in the tested concentration range. This indicates that it was not possible to tune the peak shape of CsA by changing the organic solvent. Adsorption isotherms were obtained to describe the retention behavior of CsA. When the mass concentration of CsA in the mobile phase was low, the effect of the organic solvent ratio on the adsorption capacity of CsA on the C18 stationary phase was not distinct. With an increase in the solute mass concentration above 0.5 g/L, the reduced proportion of organic solvent helped improve the adsorption capacity of CsA. When the mass concentration of CsA in the mobile phase reached 5 g/L, the adsorption capacities were 24.9 g/L in 88% methanol and 40.8 g/L in 84% methanol. The adsorption capacity of CsA in acetonitrile-water was higher than that in methanol-water. When the mass concentration of CsA was 5 g/L, the adsorption capacity increased to 46.4 g/L in 75% acetonitrile. Scatchard analysis showed that the slope of the adsorption isotherm decreased gradually, which was consistent with trend observed in the Langmuir adsorption isotherm for the shape of the Langmuir peak (i.e. trailing peak). When the mass concentration of CsA in the mobile phase was between 0.01 g/L and 0.03 g/L, the slope of the curve decreased significantly, and the peak shape of CsA rapidly tailed with increasing loading amount. However, when using a mobile phase with a lower proportion of organic solvent (84% methanol or 75% acetonitrile), this trend was weakened. The adsorption data of CsA were fitted to models. The Langmuir model was found to be suitable for the methanol-water mobile phase, and the Moreau model for the acetonitrile-water mobile phase. The model parameters indicated that the monolayer adsorption of CsA occurred on the C18 stationary phase in both mobile phases, the difference being that more intermolecular interactions between CsA occurred in the acetonitrile-water mobile phase, resulting in a higher adsorption capacity. In methanol-water, the intermolecular interactions between CsA were inhibited by methanol due to its role as a proton donor. As an aprotic solvent, acetonitrile could only weakly inhibit these interactions; hence, the interactions could be improved by increasing the acetonitrile proportion. As the proportion of acetonitrile changed from 85% to 75%, the saturated adsorption capacity increased from 123 g/L to 197 g/L, while the interaction constant decreased from 0.618 to 0.588. Finally, CsA was purified using the conditions of 0–60 min 65%–75% acetonitrile, 60–80 min 75% acetonitrile, by which the impurity could be controlled to below 0.2%. The results of this study will aid in the purification of CsA by preparative HPLC.

**Key words:** reversed-phase liquid chromatography (RPLC); preparative high performance liquid chromatography (prep-HPLC); cyclosporine A (CsA); adsorption isotherm; purification

环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 是由 11 个氨基酸组成的中性环状多肽 (见图 1), 在临床作为拮抗器官和组织移植后排异反应的首选药物<sup>[1-3]</sup>。在 CsA 的分离检测中, 使用最广泛的是高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[4,5]</sup>。依据 CsA 的脂溶性特点, HPLC 分析时多采用反相 C18 固定相, 流动相以乙腈-水、甲

醇-水为主, 添加乙酸铵、甲酸、磷酸、三氟乙酸等添加剂<sup>[6-11]</sup>。有文献报道, CsA 在 HPLC 中的保留时间随着温度升高没有明显降低。这是因为 CsA 具有独特的环状刚性结构, 在高温下的水溶剂化能力较差, 所以流动相的洗脱能力并没有随着升温而显著提高, CsA 的保留时间波动很小<sup>[12,13]</sup>。

引用本文:李志东,傅青,戴卓舜,金郁,梁鑫森.环孢素 A 在反相液相色谱中的吸附行为及分离纯化.色谱,2022,40(1):66-73.

LI Zhidong, FU Qing, DAI Zhuoshun, JIN Yu, LIANG Xinmiao. Adsorption, separation, and purification of cyclosporine A using reversed-phase liquid chromatography. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(1): 66-73.

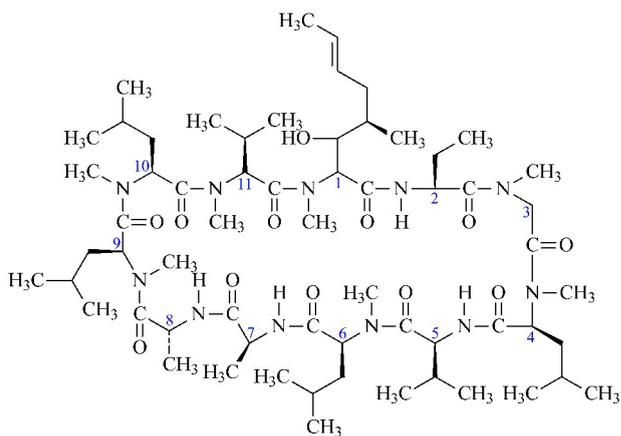


图 1 环孢素 A 的结构

Fig. 1 Structure of cyclosporine A

已报道的 CsA 及其衍生物的纯化方法包括了大孔树脂、柱层析和高速逆流色谱等<sup>[14-16]</sup>, 发酵液经过大孔树脂处理后, 可以达到去除杂质和富集环孢素的目的, 而随后采用硅胶柱层析或者高速逆流色谱法则可纯化得到环孢素单体。为了进一步去除杂质, 达到杂质的限量要求, 同时提高上样量、回收率等工艺参数, 更多先进的分离技术用于药品的纯化制备。制备高效液相色谱 (prep-HPLC) 具有柱效高、分离快速稳定、在线检测和自动收集的优势, 已广泛用于发酵来源的药物和天然产物这类复杂样品的分离纯化。开展 CsA 的色谱行为研究, 深入了解 CsA 的色谱特性, 可为 CsA 制备方法的选择与优化提供理论上的指导。从影响反相液相色谱 (RPLC) 制备的关键因素出发, 本文系统开展了 CsA 在 RPLC 模式下的保留行为研究, 包括考察有机溶剂种类和比例对 CsA 保留的影响, 探索 CsA 峰形和上样量之间的关系。并通过测定 CsA 的吸附等温线, 对其色谱行为给出理论上的支持。基于上述结果, 尝试开展 CsA 的纯化分离, 为 prep-HPLC 纯化 CsA 提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

Waters Alliance 高效液相色谱仪 (Waters, USA), 包括 2695 四元梯度泵、2489 UV-Vis 检测器、自动进样器和柱恒温系统; XP105DR 分析天平 (Mettler Toledo, 瑞士)。环孢素 A 原料药 (纯度 > 99%) 和粗品为浙江瑞邦药业有限公司提供, 分别用于吸附量测定和分离纯化实验。

色谱级甲醇 (MeOH)、乙腈 (ACN)、甲基叔丁基醚、磷酸 ( $H_3PO_4$ , 纯度 > 98%) 购自百灵威 (中国) 科技有限公司; 流动相水为娃哈哈纯净水, 经 0.22  $\mu m$  膜过滤。

### 1.2 实验条件

#### 1.2.1 流动相体系对环孢素 A 保留的影响

称取 CsA 原料药适量, 用甲醇溶解, 配制质量浓度为 10 g/L 的样品溶液, 用 0.22  $\mu m$  膜过滤备用。C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 10  $\mu m$ , 10 nm, 浙江华谱新创科技有限公司); 在甲醇-水和乙腈-水体系下采用等度洗脱, 甲醇-水的比例分别为 80/20、82/18、84/16、85/15、86/14、88/12、90/10 (v/v), 乙腈-水的比例分别为 60/40、65/35、70/30、75/25、80/20、85/15、90/10 (v/v)。进样量 5  $\mu L$ , 流速 1.0 mL/min; 柱温 55  $^{\circ}C$ , 检测波长 203 nm。

#### 1.2.2 考察上样量对环孢素 A 峰形的影响

分别称取适量 CsA 溶于甲醇中, 配成质量浓度为 1、5、10、20 和 40 g/L 的样品溶液。流动相分别采用甲醇-水 (88/12, 86/14, 84/16, v/v) 及乙腈-水 (85/15, 80/20, 75/25, v/v), 其余条件同 1.2.1。

#### 1.2.3 测定吸附等温线

采用前沿吸附法测定吸附等温线<sup>[17]</sup>, 以甲醇-水 (84:16) 体系为例: (1) 配制 84% 甲醇水溶液, 过 0.22  $\mu m$  膜作为流动相 A。(2) 分别称取 25、250、1250 mg CsA, 充分溶解于 A 相溶液中, 转移至 250.00 mL 容量瓶中, 用 A 相溶液定容至刻度线, 分别得到样品质量浓度为 0.1、1、5 g/L 的 84% 甲醇溶液, 过 0.22  $\mu m$  膜, 分别作为流动相 B、C、D。

实验方法 (以甲醇-水体系为例) 色谱柱: C18 (50 mm × 4.6 mm, 10  $\mu m$ , 10 nm, 浙江华谱新创科技有限公司), 柱温: 55  $^{\circ}C$ ; 流速: 1.0 mL/min; 用 A 相充分平衡, 开始进样, 进样体积设置为 0  $\mu L$ 。依次设置流动相 A、B、C 和 D 的比例, 以台阶梯度的方式改变流动相中 CsA 的浓度。控制 B (C 或 D) 的体积分数为 0、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%, 对应流动相中样品的质量浓度分别为 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09 和 0.1 g/L (C: 0.1 ~ 1 g/L, D: 0.5 ~ 5 g/L)。每个台阶梯度时间为 10 min。为了使紫外检测在线性范围内, 适当调整检测波长, 对应 B、C、D 相的检测波长分别为 230、245 和 255 nm, 环孢素 A 的紫外光谱图见图 2。在乙腈-水体系中的实验方法同上。

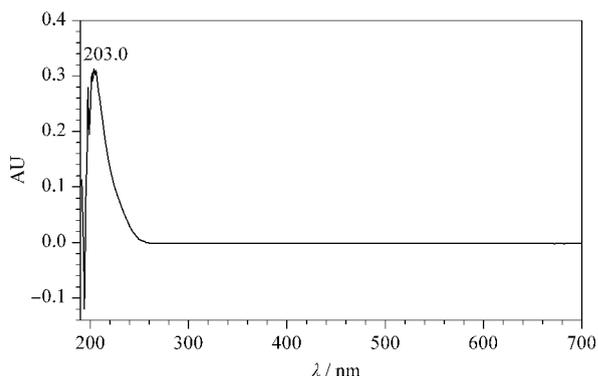


图 2 环孢素 A 的紫外光谱图  
Fig. 2 UV spectrum of CsA

死时间  $t_0$  的测定 称取  $\text{KNO}_3$  适量,配制质量浓度为 5 g/L  $\text{KNO}_3$  溶液,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜备用。分别在对应的流动相条件下进  $\text{KNO}_3$  溶液,进样体积 10  $\mu\text{L}$ ;洗脱方式:0~1 min, 100% A,记录  $\text{KNO}_3$  出峰时间,重复 3 次,取平均,记为  $t_0$ 。

柱外流经时间  $t_1$  的测定 在对应的流动相条件下,取下色谱柱,用三通连接两端管路,洗脱方式:0~0.5 min, 100% A; 0.5~5 min, 100% B。取曲线上升到一半高度时的保留时间减去 A 相流经的 0.5 min 即为柱外流经时间  $t_1$ (示意图见图 3a)。重复 3 次,取平均值。

吸附量计算方法 采用中点法计算吸附量,见图 3b 和公式(1)。

$$\Delta q = (t - t_0 - t_2) v \Delta c / V_a \quad (1)$$

其中  $\Delta q$  为吸附增量; $t$  是对应浓度下的样品突破时间,即读取每个浓度下曲线上升到一半高度时对应的保留时间; $t_1$  是柱外流经时间(见图 3a); $t_2$  表示对应浓度转换的时间点,由设定的梯度条件决定,如本实验中为 10 min; $v$  为流动相流速(量); $\Delta c$  为每一阶梯样品浓度增量; $V_a$  表示色谱柱中固定相的体积。

#### 1.2.4 环孢素 A 的纯化

称取环孢素 A 粗品适量用甲醇溶解,配制质量浓度为 500 g/L 的样品溶液,过 0.22  $\mu\text{m}$  膜。C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 10 nm, 10  $\mu\text{m}$ );流动相组成:A 为水,B 为乙腈,梯度洗脱:0~60 min, 65% B~75% B; 60~80 min, 75% B;流速:0.6 mL/min;柱温:55  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长:203 nm,进样量:30  $\mu\text{L}$ ;按照时间对色谱峰进行收集,每 2 min 收集一次。

馏分纯度分析:Unitary C18 色谱柱(250 mm×

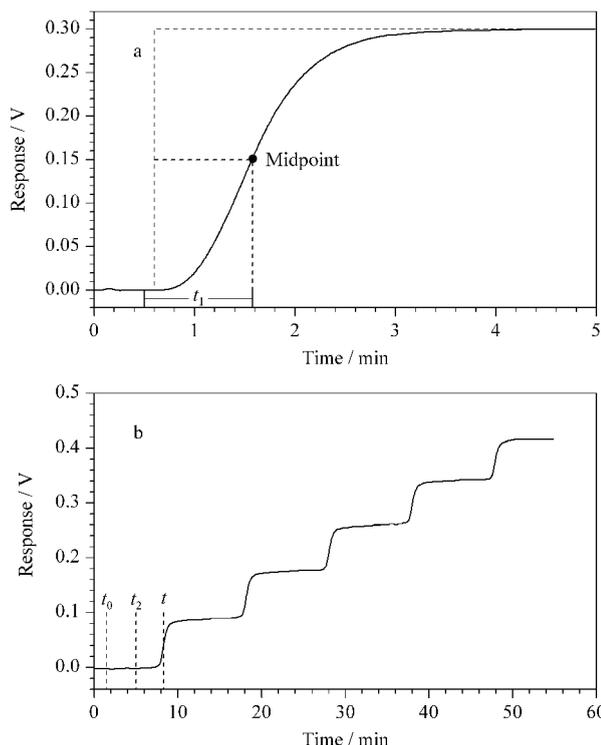


图 3 (a) 柱外流经时间  $t_1$  和 (b) 吸附量增量  $\Delta q$  的计算方法图  
Fig. 3 Calculated method plots for the determination of (a) extra-column flow time ( $t_1$ ) and (b) increased adsorption capacity ( $\Delta q$ )

$t_0$ : dead time;  $t_2$ : the time point of the corresponding concentration conversion, which is determined by the set gradient conditions;  $t$ : the breakthrough time of the sample at the corresponding concentration, which is the corresponding retention time when the curve rises to half of the height at each concentration.

4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 10 nm, 浙江华谱新创科技有限公司),流动相:乙腈-水-磷酸-甲基叔丁基醚(490/460/1/50, v/v/v/v),等度洗脱,流速 1.5 mL/min,柱温 60  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相种类与比例对环孢素 A 保留的影响

甲醇和乙腈是 RPLC 中两种常用的洗脱剂。在 C18 固定相上,分别考察 CsA 在甲醇-水和乙腈-水两种体系下的保留情况,流动相组成与保留因子( $k$ )的关系见图 4。

在甲醇-水体系中,随着甲醇比例降低,CsA 的保留时间明显增加。当甲醇-水的体积比为 90/10 时, $k \approx 2$ ,当调整为 80/20 时, $k$  增加到 18。对比 84%、86%、88% 甲醇的保留,甲醇每增加 2%, $k$  会增加 3 左右。控制甲醇比例在 84%~88%,CsA 的  $k$

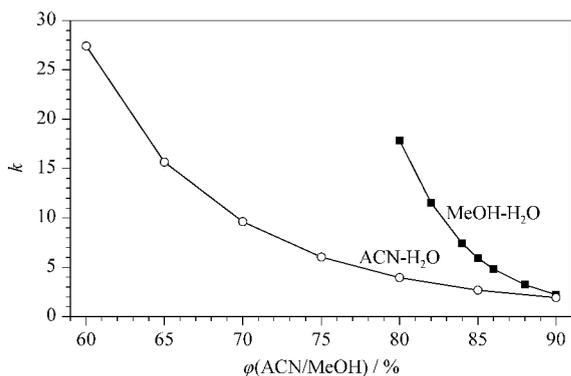


图 4 环孢素 A 在甲醇-水和乙腈-水流动相体系中的保留因子

Fig. 4 Retention factors ( $k$ ) of CsA in MeOH-H<sub>2</sub>O and ACN-H<sub>2</sub>O mobile phases

C18 column (150 mm×4.6 mm, 10  $\mu\text{m}$ ); column temperature: 55  $^{\circ}\text{C}$ ; detection wavelength: 203 nm; flow rate: 1.0 mL/min.

在 3~7 范围内,保留适中。

在乙腈-水体系中,当乙腈比例由 90% 降低至 65%, CsA 的  $k$  由 1 增加至 17 左右。在乙腈比例改变 5% 的情况下 (75%、80%、85%), CsA 的  $k$  相差 3 左右,控制乙腈比例在 75%~85%,  $k$  在 3~6 范围

内。通过有机相比例对保留影响的考察,注意到 CsA 的保留对于有机相比例改变较为敏感,在有机相比例稍有变动时,保留相差较大,这就需要注意提高有机相比例控制的精度,才能保证分离的稳定性。相对来讲,乙腈比例改变对于 CsA 保留的影响不及甲醇那样明显。

## 2.2 上样量对环孢素 A 峰形的影响

根据制备色谱的非线性理论,峰形是影响制备纯度的关键因素。实验分别考察了两种流动相体系下 CsA 的峰形与上样量之间的关系见图 5。无论是甲醇-水体系 (图 5a1~a3), 还是乙腈-水体系 (图 5b1~b3), 随着上样量的增加, CsA 的峰形都由对称开始变得拖尾。如果溶质保留时间长, 拖尾现象尤其明显, 保留时间前移。此实验结果提示, 在进行 CsA 纯化时, 需要注意保留时间在目标物前的杂质 (即前杂) 的分离。根据制备色谱的非线性理论, 随着上样量的增加, 前杂会因为挤压效应而影响主峰分离的纯度。另外, 两种常用的有机相, 无论是质子供体的甲醇, 还是质子受体的乙腈, 在所测试的浓度范围内, 在保留相当的情况下, 峰形和展宽程度是相

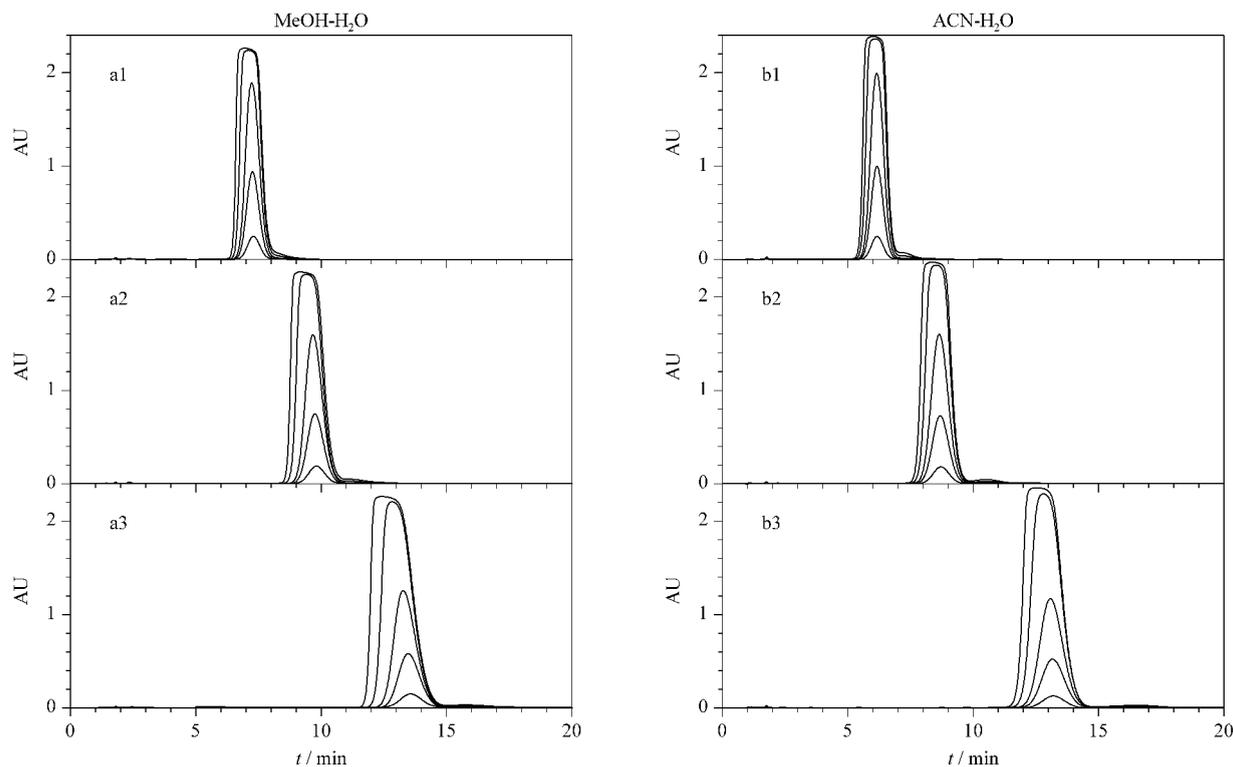


图 5 甲醇-水及乙腈-水流动相体系中环孢素 A 的峰形随上样量的变化

Fig. 5 Change in the peak shape of CsA with increased sample loading in MeOH-H<sub>2</sub>O and ACN-H<sub>2</sub>O mobile phases

C18 column (150 mm×4.6 mm, 10  $\mu\text{m}$ ); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 55  $^{\circ}\text{C}$ ; detection wavelength: 203 nm; injection volume: 5  $\mu\text{L}$ . Mobile phase: a1-a3: MeOH-H<sub>2</sub>O, 88/12, 86/14, and 84/16 (v/v); b1-b3: ACN-H<sub>2</sub>O, 85/15, 80/20 and 75/25 (v/v).

Sample mass concentration: 1, 5, 10, 20 and 40 g/L.

似的,即无法通过改变有机相种类对峰形和展宽程度进行调节。

### 2.3 环孢素 A 的吸附等温线

采用连续前沿吸附法,分别测定环孢素 A 在 6 种条件下的吸附等温线(见图 6),其中,横坐标表示流动相中溶质的质量浓度  $C$  (g/L),纵坐标表示溶质在固定相上的吸附量  $q$  (g/L)。在 3 种不同比例甲醇-水或者乙腈-水体系中,当流动相中 CsA 浓度较低时,有机相比例对样品在固定相上的吸附量影响并不明显,而当流动相中溶质质量浓度继续增加到 0.5 g/L 以上时,如果流动相中有机相比例降低, CsA 在固定相上的吸附量则逐渐增加。当流动相中的样品质量浓度达到 5 g/L 时,在 88% 甲醇中,吸附量为 24.9 g/L,而在 84% 甲醇中,吸附量增加至 40.8 g/L(见图 6a)。在乙腈-水体系中, CsA 在固定相上的吸附量比在甲醇-水体系中更大些。同样在流动相中样品质量浓度在 5 g/L 时,在 75% 乙腈中,吸附量增加至 46.4 g/L(见图 6b)。当采用制备色谱进行纯化时,采用乙腈-水体系,对于增加 CsA 在固定相上的吸附量是更有利的。虽然有机相的比例降低有利于改善分离和提高在固定相上的吸附量,但是会增加制备时间和导致峰展宽,所以有机相比例的选择要兼顾分离度、吸附量、分离时间和峰展宽众多因素。

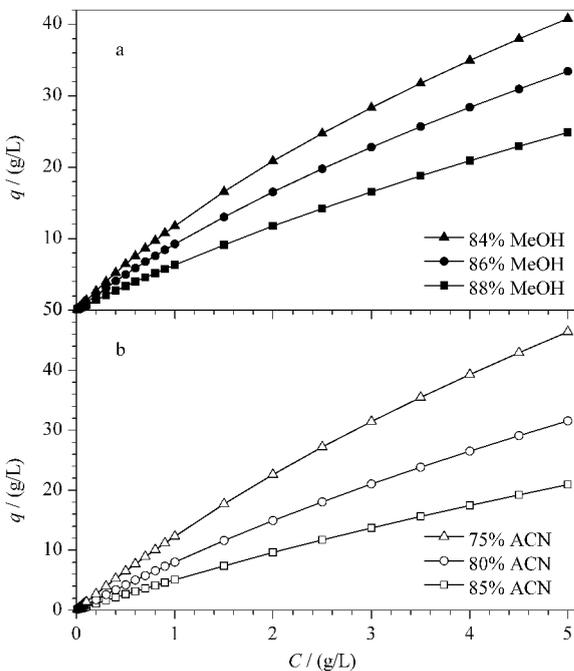


图 6 环孢素 A 在 (a) 甲醇-水和 (b) 乙腈-水中的吸附等温线  
Fig. 6 Adsorption isotherms of CsA in (a) MeOH-H<sub>2</sub>O and (b) ACN-H<sub>2</sub>O

用  $q/C$  对  $q$  作图,在甲醇-水和乙腈-水体系下得到了近似的结果(见图 7)。 $q/C$  随着  $q$  增加而递减,意味着吸附等温曲线的斜率逐渐减小,符合 Langmuir 型吸附行为,对应 Langmuir 峰形(即拖尾峰),与 2.2 节峰形考察结果一致。当流动相中样品的质量浓度在 0.01~0.03 g/L 时, $q/C$  的值随着吸附量  $q$  的增加迅速下降,此时 CsA 的峰形会随着上样量的增加而拖尾。而在低有机相比例中(84% 甲醇或 75% 乙腈),这种趋势会减弱。

用吸附等温线模型对以上数据进行拟合,在甲醇-水体系中,最佳模型为 Langmuir 模型<sup>[18]</sup>,即

$$q = q^* \frac{bC}{1+bC} \quad (2)$$

而在乙腈-水体系中,最佳模型为 Moreau 模型<sup>[19]</sup>,即

$$q = q^* \frac{bC + I(bC)^2}{1 + 2bC + I(bC)^2} \quad (3)$$

其中  $q^*$  为单层吸附饱和量, $b$  为吸附位点的吸附平衡常数, $C$  为流动相中样品的质量浓度, $I$  为溶质间相互作用力。

此拟合结果说明, CsA 在甲醇-水体系中,固定相与溶质之间为单层吸附,只有一类吸附位点起主要作用。随着甲醇比例降低,单层饱和和吸附量  $q^*$  增

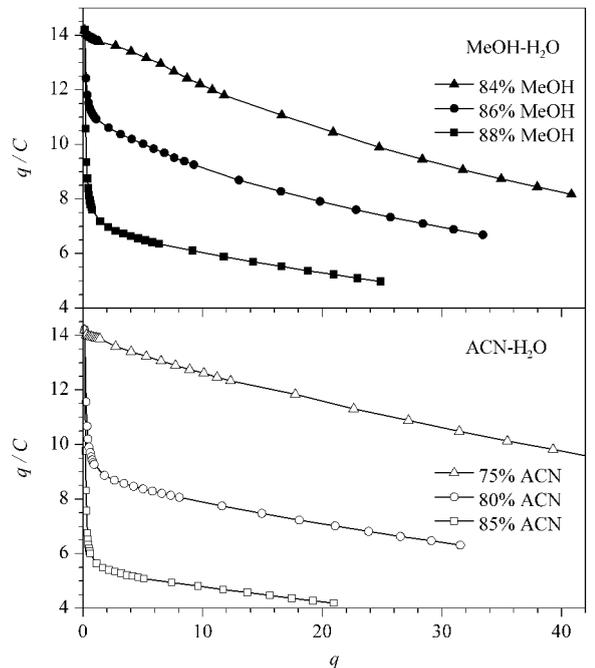


图 7 环孢素 A 在甲醇-水和乙腈-水流动相体系下的 Scatchard 分析图

Fig. 7 Scatchard plots of CsA in MeOH-H<sub>2</sub>O and ACN-H<sub>2</sub>O mobile phases

大,而吸附平衡常数  $b$  减小,样品之间的相互作用力可以忽略(见表 1)。Moreau 模型是 Langmuir 模型的一个简单延伸,因此固定相与 CsA 之间仍为单层吸附,但是溶质之间的相互作用力是不能忽略的。推测这种差异主要是由于有机溶剂类型不同造成的。在甲醇-水体系中,甲醇是质子型溶剂,会对 CsA 分子之间的作用力,比如氢键作用产生一定的破坏作用,而乙腈是非质子型溶剂,对这种分子间作用力破坏能力弱,这也说明了乙腈浓度越高,溶质之间的分子作用力越强。如表 1 所示,随着乙腈比例从 85% 降低至 75%,饱和吸附量  $q^*$  由 123 g/L 增加到 197 g/L,而  $I$  由 0.618 降低到 0.588。对比两种体系下的参数,在乙腈-水体系下,固定相对溶质有更大的吸附容量。

表 1 甲醇-水和乙腈-水中环孢素 A 的吸附模型参数  
Table 1 Adsorption model parameters for CsA in MeOH-H<sub>2</sub>O and ACN-H<sub>2</sub>O

Mobile phase	Volume ratio	$q^*$	$b$	$I$	$R^2$
MeOH-H <sub>2</sub> O	84/16	104.335	0.127		0.9998
	86/14	95.778	0.156		0.9998
	88/12	90.936	0.075		0.9999
ACN-H <sub>2</sub> O	75/25	197.104	0.068	0.588	0.9999
	80/20	154.067	0.056	0.603	0.9999
	85/15	123.012	0.044	0.618	0.9999

$q^*$ : saturation capacity of the monolayer adsorption;  $b$ : adsorption equilibrium constant;  $I$ : interaction between the adsorbates;  $R^2$ : coefficient of determination.

## 2.4 环孢素 A 的纯化制备探索

根据以上研究结果选择 CsA 的分离体系。从 CsA 的保留来看,甲醇-水或者乙腈-水通过调整比例都可以获得合适的保留,而且两者在上样量增加时,峰形变化是相似的。相对来讲,乙腈的比例变化对保留影响不那么剧烈,有利于分离稳定性的控制,而且在乙腈-水条件下,CsA 在固定相上的吸附量更大。在乙腈-水条件下优化了方法,使杂质有了更好的分离。实验也考虑采用小浓度范围的线性梯度的洗脱方式,一方面有利抑制峰展宽,而且也有利于保持分离的稳定。综上所述,尝试采用 0~60 min 65%~75% ACN, 60~80 min 75% ACN 的条件对环孢素 A 进行分离(见图 8)。上样量为 15 mg,按照时间对色谱峰进行收集和纯度分析,合并保留时间为 28~42 min 的馏分,可以将主峰的色谱纯度由粗品的 89% 提高到 99.8%,控制杂质含量小于 0.2%,回收率为 77.7%。此方法可以作为反相色谱模式下纯化 CsA 的参考。

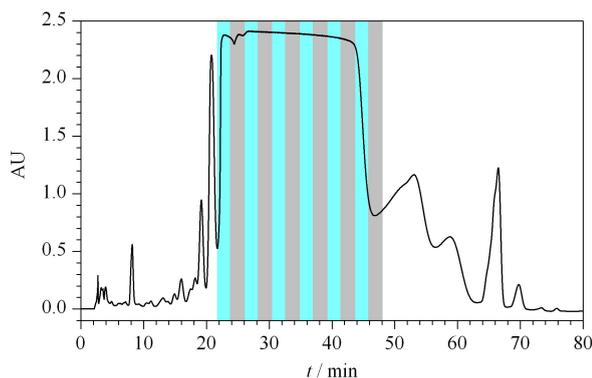


图 8 环孢素 A 的制备分离色谱图

Fig. 8 Chromatogram of preparative-scale separation of CsA

C18 column (150 mm×4.6 mm, 10 μm); mobile phase: 0–60 min, 65/35–75/25, 60–80 min, 75/25 (ACN-H<sub>2</sub>O); flow rate: 0.6 mL/min; column temperature: 55 °C; detection wavelength: 203 nm; sample concentration: 500 g/L; injection volume: 30 μL.

## 3 结论

本文开展了反相色谱模式下 CsA 保留行为的研究工作,考察了影响 CsA 峰形的关键因素,通过测定吸附等温线深入认识 CsA 在反相色谱中的吸附行为。研究结果为 CsA 进一步的制备纯化提供了理论依据。和已有的正相色谱方法相比,本工作发展的高效反相色谱制备方法流动相条件简单,在纯化效率和自动化控制方面具有一定的优势。后续工作将充分考察本方法的实际工业应用价值。

## 参考文献:

- [1] Curtis L M, Pavletic S Z, Salit R B, et al. Blood, 2015, 126 (23): 65
- [2] Li A, Wu Q V, Davis C, et al. Blood, 2018, 132: 814
- [3] Zhang Y, Zhang R. Drug Test Anal, 2018, 10(1): 81
- [4] Wang L, Sun W L, Chen J Q, et al. Chinese Journal of Clinical Laboratory Management (Electronic Edition), 2019, 7 (2): 65  
王磊, 孙文利, 陈佳琦, 等. 中华临床实验室管理电子杂志, 2019, 7(2): 65
- [5] Jiang Z M, Zhang L L, Luo T, et al. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China, 2018, 18(3): 289  
蒋志美, 张伶俐, 罗婷, 等. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(3): 289
- [6] Mei S H, Wang J Q, Chen D, et al. J Chromatogr B, 2018, 1087/1088: 36
- [7] Aljohani B, Alotaibi F, Ghazaly E, et al. J Bioequiv Availab, 2017, 9: 509
- [8] Krnaca D, Reiffovab K, Rolinski B. J Chromatogr B, 2019, 1128: 121772
- [9] Wang L, Wang H C, Liu H X. Laboratory Medicine and

- Clinic, 2019, 16(21): 3103  
王磊, 王红春, 刘红星. 检验医学与临床, 2019, 16(21): 3103
- [10] Xue B, Zhang Q, Zheng Z W. Chemistry & Bioengineering, 2016, 33(3): 68  
薛彬, 张晴, 郑占伟. 化学与生物工程, 2016, 33(3): 68
- [11] Pang W Z, Wang M L, Song G S, et al. Chinese Journal of Antibiotics, 2016, 41(6): 448  
庞文哲, 王茉莉, 宋更申, 等. 中国抗生素杂志, 2016, 41(6): 448
- [12] Sakai-Kato K, Nanjo K, Goda Y. Chem Pharm Bull, 2018, 66(8): 805
- [13] Sakai-Kato K, Yoshida K. J Pharmaceut Biomed, 2020, 180: 113064
- [14] Dong H J, Zhao J J, Chen Q L, et al. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2010, 8(3): 6  
董惠钧, 赵军杰, 陈启林, 等. 生物加工过程, 2010, 8(3): 6
- [15] Ren F Z, Zhang X X, Chen S H, et al. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(7): 512  
任风芝, 张雪霞, 陈书红, 等. 中国抗生素杂志, 2013, 38(7): 512
- [16] Amarouche N, Boudesocque L, Sayagh C, et al. J Chromatogr A, 2013, 1311: 72
- [17] Seidel-Morgenstern A. J Chromatogr A, 2004, 1037: 255
- [18] Langmuir I. J Am Chem Soc, 1918, 40: 1361
- [19] Moreau M, Valentin P, Vidal-Madjar C, et al. J Colloid Interface Sci, 1991, 141: 127