

# 万古霉素的磁性亲和吸附分离

郭立安<sup>1\*</sup> 朱宝泉<sup>2</sup> 陈代杰<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(第四军医大学化学教研室,西安 710032)

<sup>2</sup>(上海医药工业研究院,上海 200040)

关键词 万古霉素, 纯化, 磁性分离, 亲和色谱

中图分类号 O658, Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0584-03

磁性亲和分离技术是近年新兴的一个分离方法,它可直接从初始样品液体中(无论是浑浊或清亮液)分离目标产物,克服了传统色谱方法需要离心和过滤除杂质的步骤,分离过程所用仪器极其简单,大大降低了操作费用,且易于实现规模化;此外,同亲和色谱一样也具有高的特异性及应用范围广等优点。使其在蛋白质、细胞的分离方面表现出了巨大的应用前景<sup>[1-4]</sup>。万古霉素是一个多肽类的抗菌素,临床上用于治疗耐甲氧苯青霉素葡萄糖球菌的感染。目前虽有多种纯化方法<sup>[5,6]</sup>,但大多工艺复杂,回收率较低,尤其是在纯化过程中,万古霉素极易降解,迫使人们寻求更好的纯化方法来解决这个问题。

本文合成了能用于万古霉素纯化用的磁性亲和载体,并从发酵液中一步纯化得到可使纯度达到 97% 以上的纯品。该法纯化方法简单、快速,且成本低。有望经进一步完善后,用于规模化工业生产。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂和仪器

万古霉素、万古霉素的亲和配体 D-丙氨酸-D-丙氨酸(D-

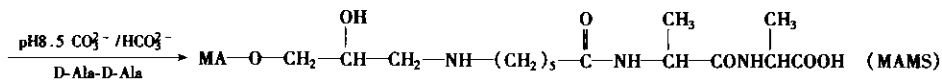
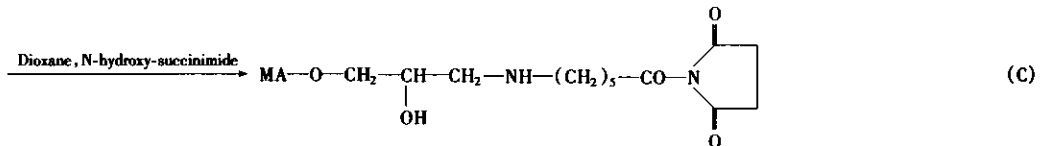
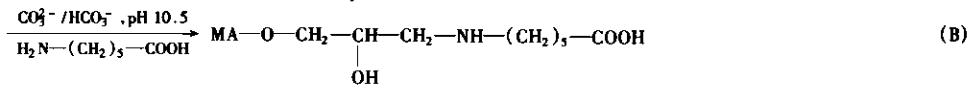
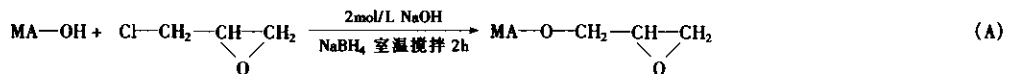
Ala-D-Ala)购于 Sigma 公司。Agarose 为 Pharmacia 公司生产。乙腈(分析纯和 HPLC 级)、环氧氯丙烷为北京化学试剂厂生产。N-羟基琥珀酰亚胺、CNBr、NaBH<sub>4</sub> 购于 Fluck 公司。其它试剂均为分析纯试剂,由北京化学试剂厂生产。

HPLC 为 Shimadzu 公司生产的 LC-9A 液相色谱系统,包括两台 LC-9A 二元梯度高压泵,一台 UV 可变波长检测仪,CR-3A 数据处理器,SCL-6A 系统控制器。液相色谱柱为 C18, 5μm,孔径 10nm,250×4.6mm I.D.,由 Kromasil 提供。氨基酸分析由 Watertown 公司的 Sequemat 进行分析。

色谱条件: A: 0.1mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH3.2, 7% 乙腈; B: 0.1mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH3.2, 30% 乙腈。梯度洗脱 100% A 到 100% B, 30min, 1mL/min。检测波长 254nm, AUFS 为 0.08。

### 1.2 磁性亲和微球制备方法

以 Agarose 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 为原料制备磁性载体 MA-OH<sup>[3,4,7]</sup>。MA-OH 与环氧氯丙烷反应(A),反应的产物在碱性条件下与 ω-氨基己酸加成(B)<sup>[8]</sup>,所得产物用 N-羟基琥珀酰亚胺作偶联剂与万古霉素的亲和配体 D-Ala-D-Ala 反应(C)<sup>[9]</sup>,制得磁性亲和微球(MAMS)。制备 MAMS 后,使用乙二醇封闭其他活性位点,减少非特异性的作用。化学反应式如下:



收稿日期:2001-02-07,修回日期:2001-06-22。

基金项目:国家自然科学基金(3008007),陕西省自然科学基金的(99H09)和高等学校骨干教师计划(2000-65-66)资助。

\* 通讯作者。Tel:86-29-3374473; Fax:86-29-2252738; E-mail:guoli-an@263.net

### 1.3 配体密度的测定

在 5.7mol/L 盐酸溶液中 110℃, 24h 水解 MAMS 样品。用氨基酸测定仪测定从载体上水解掉的氨基酸配体的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MAMS 的吸附容量测定

为了获得配体密度与吸附容量间的关系,在合成的 N-羧基琥珀酰亚胺的凝胶中分别加入了不同比例的配体(D-Ala-D-Ala),如表 1 所示,随着配体比例的增加,偶联量逐渐增大,结果也使吸附容量逐渐增加,但吸附容量与连接的配体量间的计量关系大于 1,这与文献报道的结果相一致<sup>[10]</sup>。根据溶质在液固表面的计量置换吸附原理和溶液中 D-Ala-D-Ala 同万古霉素的作用机理<sup>[11,12]</sup>,一个 D-Ala-D-Ala 配体只能与一个万古霉素相互进行吸附,也就是说, MAMS 表面配体吸附容量与配体连接量的摩尔数比最大只能等于 1,但实验结果表明其比例达到 1.5 左右,这或许与万古霉素分子间的相互聚集有关。

表 1 配体耦合容量与吸附万古霉素容量间的关系

Table 1 The relationship between coupled amount of ligand and adsorptive capacity for vancomycin

Coupling ratio <sup>a</sup>	The coupled amount of ligand <sup>b</sup> ( $\mu\text{mol/mL}$ MAMS)	Adsorptive capacity for vancomycin <sup>c</sup> ( $\mu\text{mol/mL}$ MAMS)
0.3	1.5	2.3
1.0	3.9	6.0
2.0	5.5	8.6
3.0	6.5	10.0

a:  $\mu\text{mol}$  ligand added per  $\mu\text{mol}$  activated sites on NHS gel. Maximum sites equal 15  $\mu\text{mol/mL}$  NHS gel.

b: Measured by amino acid analysis of acid hydrolyzed MAMS samples.

c: Amount of vancomycin bound per mL MAMS measured by reverse-phase HPLC.

### 2.2 分子臂长度与吸附容量间的关系

在磁性亲和分离技术中发现与亲和色谱一样分子臂长度对目标产物的分离也产生重要的影响。当使用 CNBr 活化法直接将 D-Ala-D-Ala 连接在 MAMS 上(分子臂长度为 2 个原子)和使用  $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{COOH}$ (分子臂长度为 6 个原子)、 $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{-COOH}$ (分子臂长度为 7 个原子)分别取代制备 MAMS 反应方程式(B)中的  $\text{H}_2\text{N-(CH}_2)_5\text{-COOH}$ (分子臂长度为 10 个原子)合成了不同长度的分子臂。利用 1.3 的方法测定配体密度,选择配体密度相同的 MAMS 作为研究对象。结果表明,在配体密度相同时,其最大吸附量分别为每毫升胶 2.1, 4.2, 6.0 和 10.0 $\mu\text{mol}$ 。说明分子臂愈长,吸附容量越大。

### 2.3 吸附量与达到平衡的时间

根据上述的研究结果,我们选择了间隔臂键长为 10 个原子(1.2 中  $\text{H}_2\text{N-(CH}_2)_5\text{-COOH}$  作为分子臂的 MAMS),配体密度为 6.5 $\mu\text{mol/mL}$  MAMS 的磁性亲和载体为研究对象。分别取相同量的胶在不同起始浓度的万古霉素溶液中进行亲

和吸附,在不同的时间测定上清中万古霉素的吸附量,结果见图 1。可以看出,随起始浓度增大,达到吸附平衡的时间缩短。在起始浓度为 1.0 $\mu\text{mol/mL}$  的万古霉素溶液中,达到吸附平衡的时间需 40min。当起始浓度为 20 $\mu\text{mol/mL}$  时,30min 就可达到完全的吸附平衡。由此可见,使用磁性亲和分离技术所需平衡时间很短,可以在不到 1h 的时间内完成万古霉素的纯化。从图 1 中还可看出,尽管起始浓度相差 20 倍,但吸附量基本相同,1.0 $\mu\text{mol/mL}$  的吸附量仅比 20.0 $\mu\text{mol/mL}$  的低 15% 左右。也就是说,起始浓度对吸附量影响不大。这对从低浓度的发酵液中提纯万古霉素特别有用。避免了在传统提纯方法出现的当目标产物在发酵液中浓度较低时,就放弃纯化而造成极大浪费的做法。

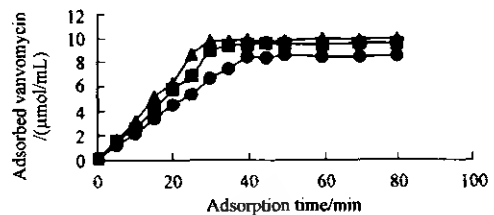


图 1 吸附容量与达到平衡的时间

Fig. 1 The adsorptive rates of vancomycin on the magnetic affinity microspheres

Start concentrations: ● 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ , ■ 5 $\mu\text{mol/mL}$ ; ▲ 20 $\mu\text{mol/mL}$  Temperature: 20℃

### 2.4 一步法纯化万古霉素

取万古霉素的发酵液 100mL,调整发酵液的 pH 至 7.0,直接加入 MAMS 10mL,使 MAMS 吸附发酵液中的万古霉素,吸附时间 50min,以确保达到吸附平衡。之后,使用磁铁吸附与万古霉素作用的 MAMS,倾倒不被吸附的菌体与其它液体。在吸附的 MAMS 中加 0.1mol/L 的醋酸铵 20mL 洗 2 次,再加入 0.1mol/L 醋酸铵-乙腈(50:50)使万古霉素从 MAMS 中释放出来。得到的万古霉素产品进行冷冻干燥,制备成干粉。MAMS 可以循环使用。

在反相高效液相色谱上对万古霉素纯化前后的样品进行了纯度和含量分析,结果见图 2。经 MAMS 纯化后的万古霉素的纯度达到 97% 以上,质量回收率 87%。而现在工业上生产万古霉素的纯化工序,需经离心除菌、树脂吸附、反相高效液相色谱等技术,纯化周期在 1 周以上,回收率只有 20% 左右,且在纯化过程中万古霉素极易降解。从以上的结果可以看出,本文建立的万古霉素的磁性亲和分离方法和工艺具有简单、快速和高效分离的特点。

万古霉素同其它抗生素一样是微生物的次生代谢产物,如果我们设计一个装置,使处于产生次生代谢产物状态细菌表达的抗生素利用磁性亲和分离技术及时地分离除去,降低抗生素次生代谢产物的浓度,可大大提高表达产物的产量,尤其对那些当抗生素表达量达到一定程度后就会抑制细菌进一步进行次生代谢表达的微生物,其应用价值会更大。

## 3 结论

本研究首次合成了万古霉素的磁性亲和载体并率先采

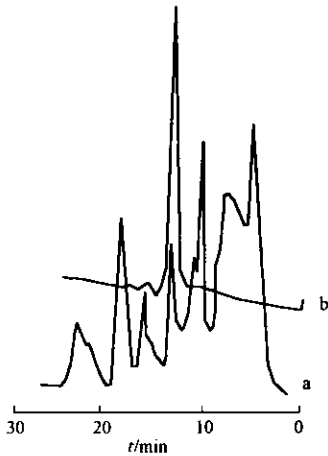


图 2 万古霉素纯化前后的反相高效液相色谱图

Fig.2 The chromatogram of vancomycin on the reverse-phase HPLC

AUFS 0.08, UV absorbance at 254nm

a. The chromatogram of fermentation liquor of vancomycin;

b. The chromatogram of vancomycin purified by magnetic affinity microbeads

用一步法直接从发酵液中提纯了万古霉素,克服了以往传统提纯方法需要经过离心、高效反相制备色谱等其它分离方法相结合才能获得纯品的缺点,其提纯设备简单、生产成本低、操作时间短、分离效果好。通过对磁性亲和微球技术进行进一步的研究,如研究发酵动力学,改善微球强度,有望在较短的时间内用于工业生产中。

#### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Safarik I, Safarikova M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatogr B*, 1999, 722:33 ~ 53
- [ 2 ] Gagne A, Lacouture S, Broes A *et al.* Development of an immunomag-
- netic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype I from tonsils. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:251 ~ 254
- [ 3 ] GUO L A(郭立安), ZHU B Q(朱宝泉), CHEN D J(陈代杰). Purification of recombinant human interferon- $\alpha$  by magnetic microsphere. *Journal of Fourth Military Medical University* (第四军医大学学报), 1999, 20(1):85 ~ 89
- [ 4 ] GUO L A(郭立安), CHEN W L(陈万录), ZHU B Q(朱宝泉) *et al.* Synthesis of immunomagnetic microsphere and its separation for recombinant human IL-2. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 1999, 15(1):47 ~ 50
- [ 5 ] Singh M, Clark W M. Partitioning of vancomycin using poly(ethylene glycol)-coupled ligands in aqueous two-phase systems. *Biotechnol Prog*, 1994, 10:503 ~ 512
- [ 6 ] Lee C K, Sandler S I. Vancomycin partitioning in aqueous two-phase systems: effects of pH, salts, and affinity ligands. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35:408 ~ 416
- [ 7 ] LIU Y K(刘元昆), GUO L A(郭立安), LIANG G D(梁国栋). Preparing magnetic albumin microspheres containing adriamycin. *Journal of Fourth Military Medical University* (第四军医大学学报), 1991, 12(5):399 ~ 400
- [ 8 ] GAO J P(高俊萍), LIANG F(梁峰), CHANG J H(常建华) *et al.* Study on the parkings of affinity chromatography for the separation of urokinase. *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), 2000, 18(2):164 ~ 167
- [ 9 ] Scouten W H. *Affinity chromatography: bioselective adsorption inert matrices*, New York: John Wiley & Sons, 1981
- [ 10 ] Folea-Wasserman G, Sitrin R D, Chapin F *et al.* Affinity chromatography of glycopeptide antibiotics. *J Chromatogr*, 1987, 392:225 ~ 238
- [ 11 ] Geng X D, Shi Y L. Stoichiometric displacement model of solute adsorption in liquid-solid system. *Science in China* (B Series), 1988, 32(1):11 ~ 22
- [ 12 ] Molinari H, Pastore A, Lian L Y *et al.* Structure of vancomycin and a vancomycin/D-Ala-D-Ala complex in solution. *Biochemistry*, 1990, 29:2271 ~ 2277

## Purification of Vancomycin by Using Magnetic Affinity Technique

GUO Li-An<sup>1\*</sup> ZHU Bao-Quan<sup>2</sup> CHEN Dai-Jie<sup>2</sup>

(Chemical Department, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200043, China)

**Abstract** A new kind of magnetic affinity microspheres (MAMS), whose ligand is D-Ala-D-Ala, was prepared using agarose as matrix. By using this new MAMS vancomycin was purified directly from crude fermentation liquor with only one step. The purity and the mass recovery of vancomycin measured by reverse-phase HPLC were 97% and 87%, respectively. The characteristic of this method was simpler, faster, cheaper and more effective than that of currently used ones.

**Key words** vancomycin, purification, magnetic separation, affinity chromatography

Received: February 7, 2001

This work was supported by the National Natural Science Funds of China(30080007), the Natural Science Funds of Shanxi Province (99H09) and the Project to Subsidize Core Teachers in Colleges and Universities(2000-65-66).

\* Corresponding author. Tel: 86-29-3374473; Fax: 86-29-2252738; E-mail: guoli-an@263.net