

文章编号: 1008-1534(2010)01-0035-03

美伐他汀提取工艺研究

王 健^{1,2}, 张雪霞^{1,2}, 王淑华³, 王海燕^{1,2}, 李晓露^{1,2}, 张金娟^{1,2}, 张 丽^{1,2}

(1. 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 河北石家庄 050015; 2. 华北制药集团微生物药物国家工程研究中心, 河北石家庄 050015; 3. 华北制药集团维尔康制药有限公司, 河北石家庄 050031)

摘 要: 研究从发酵液中提取美伐他汀的工艺条件。通过单因素实验确定了从美伐他汀发酵液中提取美伐他汀的最佳工艺条件。结果表明, 醋酸丁酯作为提取溶剂时, 其最佳工艺条件如下: 提取温度为 50 ℃, 物料比(醋酸丁酯体积(mL): 菌丝质量(g))为 8:1, 提取时间为 3 h, 闭环温度为 70 ℃, 闭环时间为 6 h。本工艺简便, 收率高, 适用于工业化生产。

关键词: 美伐他汀; 发酵液; 提取

中图分类号: R972.6 文献标识码: A

Study on process of mevastatin extraction

WANG Jian^{1,2}, ZHANG Xue-xia^{1,2}, WANG Shu-hua³, WANG Hai-yan^{1,2},
LI Xiao-lu^{1,2}, ZHANG Jin-juan^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}

(1. New Drug Research and Development Company Limited, NCPC, Shijiazhuang Hebei 050015, China; 2. National Microbial Medicine Engineering and Research Center, NCPC, Shijiazhuang Hebei 050015, China; 3. Welcome Pharmaceutical Company Limited, NCPC, Shijiazhuang Hebei 050031, China)

Abstract: The process conditions of mevastatin extraction from mevastatin fermentation are studied. Through single factor test, the optimal conditions are determined. The results show that butyl acetate as extracting solvent requires the best technology conditions: temperature 50 ℃, ratio(butyl acetate volume/mL: mycelium weight/g) 8:1, time of extracting 3 hours, temperature of ring closed 70 ℃, and time of ring closed 6 hours. This process is simple, of high yield, and suitable for industrial manufacture.

Key words: mevastatin; fermentation; extraction

羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-COA) 还原酶抑制剂美伐他汀(mevastatin, compactin) 最早是由 ENDO 等于 1976 年从桔青霉提取液中发现的活性化合物(结构式见图 1), 后来日本 Sankyo 公司研制出了美伐他汀的微生物转化产物普伐他汀(pravastatin) 并应用于临床治疗高胆固醇血症^[1~3]。研究表明, 美伐他汀还有诸多非降脂作用, 如抗骨质疏

松、抗肿瘤等^[4,5]。普伐他汀是新型高效降血脂药, 它是由前体美伐他汀经转化菌羟基化得到的。美伐他汀的质量直接影响转化菌的转化效率和普伐他汀的纯度, 同时它也是普伐他汀生产成本的主要来源, 因此制备低成本、高质量的美伐他汀对提高普伐他汀的得率和纯度, 降低生产成本具有重要意义。目前药厂生产美伐他汀大多采用大孔树脂吸附结合柱层析的工艺, 该工艺存在操作繁琐、提取成本高、生产周期长、收率低等问题。为此, 在竞争日趋激烈的市场经济条件下, 开发出低成本、适合于工业化生产的美伐他汀提取工艺具有很重要的意义。笔者通过

收稿日期: 2009-08-31; 修回日期: 2009-09-27

责任编辑: 张士莹

作者简介: 王 健(1978-), 男, 山东潍坊人, 工程师, 主要从事生物药物和天然药物提取工艺及其中试放大等方面的研究。

实验开发了一种适合于工业化生产的美伐他汀提取工艺。该工艺较传统的提取工艺(大孔树脂吸附结合柱层析)具有一定的优越性:影响因素少,工序简单,操作方便;生产周期短,提取率高,提取成本低;适用于工业化生产。

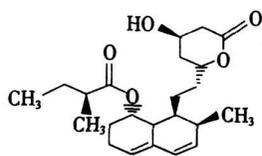


图 1 美伐他汀结构式

Fig. 1 Mevastatin structural formula

1 试剂与仪器

美伐他汀发酵液,华北制药股份公司提供;美伐他汀对照品, SIGMA 公司提供;乙醇,分析纯;醋酸丁酯,丙酮,均为工业级。

高效液相色谱仪, Waters 公司提供; SHB-II 型循环水式多用真空泵, 河南郑州长城科工贸公司提供; T-1000 型电子天平, 江苏常熟双杰测试仪器厂提供; 数控式水浴锅, 上海实验仪器总厂提供; 旋转蒸发仪, Heidolph 公司提供; pH S23C 型酸度计, 上海雷磁仪器厂提供; DZF6050 电热真空干燥箱, 上海精宏仪器有限公司提供; SXJQ-1 型调速搅拌机, 河南郑州长城科工贸公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsi C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温为室温, 流动相为乙腈 0.05% (质量分数, 下同) 醋酸水溶液(二者体积比为 78:22), 流速为 1.0 mL/min; 检测波长: 238 nm; 进样量: 20 μL。美伐他汀保留时间为 7.1 min, 理论塔板数大于 1500。将 0.5 mg 美伐他汀对照品配制成 1 mL 乙醇溶液, 取对照品溶液 20 μL, 注入色谱仪, 按外标法测定, 以峰面积计算。本方法测得美伐他汀的平均回收率为 99.80% (n=5), RSD 值为 0.20%; 精密度为 99.89% (n=5), RSD 值为 0.20%。美伐他汀对照品溶液 HPLC 图谱见图 2。

2.2 工艺流程

取美伐他汀发酵液过滤, 得到湿菌丝, 湿菌丝经过干燥后, 加一定量的醋酸丁酯提取, 提取液用一定 pH 值的醋酸水溶液净化后, 再用活性炭脱色, 经减压浓缩闭环、冷却结晶, 得到粗粉。将粗粉用丙酮溶解(加热), 再经活性炭脱色、降温结晶, 得到美伐他汀成品(注: 中间过程的检测及成品含量的测定均采

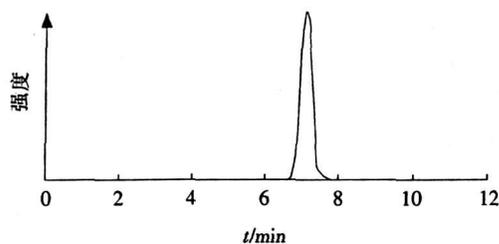


图 2 美伐他汀对照品溶液 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of mevastatin reference substance

用 HPLC 方法)。

2.3 发酵液单位的测定

精确量取美伐他汀发酵液 10 mL, 置于 100 mL 试管中, 加入乙醇至 100 mL 刻度线, 在 30 °C 条件下, 浸泡 4 h, 用外标法测定滤液量(μg/mL), 计算美伐他汀发酵液量。

$$\text{美伐他汀发酵液量} = \frac{\text{滤液量} \times 100}{10}$$

2.4 提取溶剂的选择

选用醋酸乙酯、乙醇、醋酸丁酯、甲苯、二氯甲烷、正己烷等溶剂进行菌丝提取实验。实验结果表明, 醋酸丁酯作为提取溶剂时, 提取率最高, 提取率在 96% 左右。所以本工艺选用醋酸丁酯作为菌丝的提取溶剂。

2.5 美伐他汀提取过程中单因素实验

2.5.1 提取时间对提取率的影响

称取一定质量的菌丝, 按照物料比(醋酸丁酯体积(mL): 菌丝质量(g) = 5, 下同)加入提取溶剂醋酸丁酯, 控制提取温度为 40 °C, 开启搅拌进行提取实验, 测定不同的提取时间(1, 2, 3, 4, 5, 6 h)对美伐他汀提取率的影响, 实验结果见图 3。

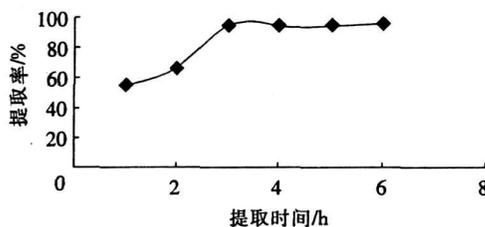


图 3 提取时间对提取率的影响

Fig. 3 Effect of different extracting time on yield of mevastatin

由图 3 可看出, 美伐他汀的提取是一个扩散传质过程, 随着时间的延长, 传质逐渐达到平衡, 平衡之前, 单位时间的提取量逐渐增大, 提取率也随之增大, 但 3 h 后, 美伐他汀的萃取已基本达到平衡, 提取时间不再对提取率产生影响。

2.5.2 提取温度对提取率的影响

称取一定质量的菌丝,按照物料比加入提取溶剂醋酸丁酯,控制不同的提取温度(25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C),开启搅拌提取 3 h,测定不同的提取温度对美伐他汀提取率的影响,实验结果见图 4。

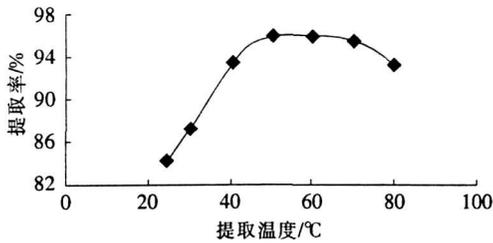


图 4 提取温度对提取率的影响

Fig. 4 Effect of different temperature on yield of mevastatin

由图 4 可以看出,提取温度为 25~50 °C 时,随着提取温度的升高提取率逐渐提高,当提取温度达到 50 °C 时提取率达到最大值;提取温度在 60 和 70 °C 时,提取率变化不大;提取温度达 70 °C 之后,提取率开始出现下降趋势,这是由于美伐他汀对热不稳定,产生了降解及二聚物反应,造成提取率下降。

2.5.3 物料比对提取率的影响

称取一定质量的菌丝,按照不同的物料比(醋酸丁酯体积(mL):菌丝质量(g)=2:1,3:1,4:1,5:1,7:1,8:1,9:1,10:1)加入提取溶剂醋酸丁酯,控制提取温度为 50 °C,开启搅拌提取 3 h,测定不同的物料比对美伐他汀提取率的影响,实验结果见图 5。

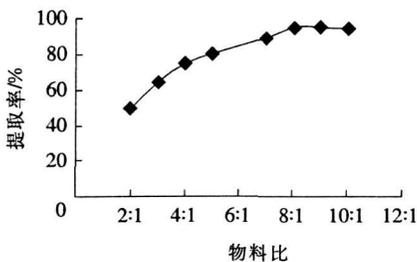


图 5 物料比对提取率的影响

Fig. 5 Effect of different ratio on yield of mevastatin

由图 5 可以看出,随着溶剂量的增加,提取率相应增加,但物料比达到 8:1 之后,随着溶剂量增加提取率几乎不再增加,传质达到平衡。

2.5.4 闭环温度对美伐他汀闭环率的影响

美伐他汀的发酵液菌丝体经过醋酸丁酯提取后得到醋酸丁酯提取液,提取液经过一定 pH 值的醋酸水溶液净化及活性炭脱色后,通过控制不同的闭环温度(60, 70, 80, 90, 100 °C)减压浓缩闭环(真空度大于 0.09 MPa),闭环时间为 5 h,测定不同的闭环温度对美伐他汀闭环率的影响,实验结果见图 6。

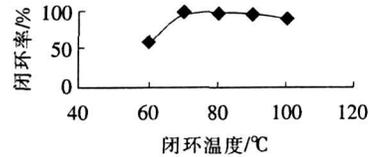


图 6 闭环温度对闭环率的影响

Fig. 6 Effect of different temperature on ring closed yield

由图 6 可以看出,闭环温度低于 70 °C 时,随着闭环温度的升高,闭环率逐渐提高,当闭环温度达到 70 °C 时闭环率达到最大值,70 °C 之后,由于美伐他汀对热不稳定,开始产生降解及二聚物反应,所以随闭环温度的升高,闭环率开始出现下降趋势。

2.5.5 闭环时间对美伐他汀闭环率的影响

美伐他汀的发酵液菌丝体经过醋酸丁酯提取后得到醋酸丁酯提取液,提取液经过一定 pH 值的醋酸水溶液净化及活性炭脱色后,在 70 °C 条件下减压浓缩闭环(真空度大于 0.09 MPa),测定不同的闭环时间对美伐他汀闭环率的影响,实验结果见图 7。

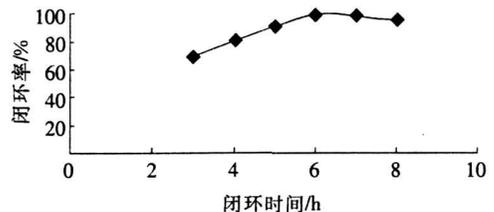


图 7 闭环时间对闭环率的影响

Fig. 7 Effect of different time on ring closed yield

由图 7 可以看出,美伐他汀闭环 6 h,闭环率达到最大值,之后随着闭环时间的增加,闭环率变化趋势不大,并且开始出现下降趋势。

由以上可知,醋酸丁酯作为提取溶剂时,从美伐他汀发酵液中提取美伐他汀的最佳工艺条件如下:物料比为 8:1,提取温度为 50 °C,提取时间为 3 h,闭环温度为 70 °C,闭环时间为 6 h。

2.6 工艺验证

本工艺在中试车间进行了 5 个批次的美伐他汀发酵液提取工艺验证,验证结果见表 1。

表 1 工艺验证结果

项目	0901 批	0902 批	0903 批	0904 批	0905 批
w(美伐他汀粉)	98.61	99.00	98.87	99.26	99.13
w(总杂质)	0.62	0.53	0.65	0.47	0.43
w(最大杂质)	0.14	0.12	0.14	0.12	0.09
提取总收率	77.31	75.82	76.20	74.65	74.12

(下转第 40 页)

表 3 直链有机物 RG 的标准汽化热
Tab. 3 Standard vaporization heat of normal organic compounds

基团 G	值别	R								
		Et	<i>n</i> -Pr	<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	<i>n</i> -C ₇ H ₁₅	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	<i>n</i> -C ₉ H ₁₉	<i>n</i> -C ₁₀ H ₂₁
OH	实验值	42.3	47.5	52.3	56.9	62.8	67.8	71.0	77.8	82.9
	计算值	41.7	47.5	52.9	58.0	63.0	67.8	72.5	77.2	81.7
OMe	实验值	—	27.6	32.5	—	—	—	—	—	—
	计算值	21.8	27.6	33.0	38.2	43.1	47.9	52.7	57.3	61.9
Cl	实验值	24.7	28.9	33.5	38.2	42.8	—	52.4	—	—
	计算值	23.4	28.9	34.1	39.1	43.8	48.5	53.1	57.6	62.0
Br	实验值	27.6	31.9	36.7	41.4	46.1	50.8	55.8	—	—
	计算值	26.6	31.9	37.0	41.8	46.5	51.1	55.5	60.0	64.3
I	实验值	31.9	36.2	—	—	—	—	—	—	—
	计算值	31.1	36.2	41.1	45.7	50.2	54.6	58.9	63.2	67.4
SH	实验值	27.3	32.0	36.6	41.1	45.8	50.6	53.3	—	64.5
	计算值	27.0	32.1	37.0	41.6	46.1	50.6	54.9	59.2	63.4
SMe	实验值	32.0	36.3	40.7	45.2	—	—	—	—	—
	计算值	31.1	36.2	41.1	45.8	50.3	54.7	59.1	63.3	67.6
OEt	实验值	27.2	31.1	—	—	—	—	—	—	—
	计算值	27.2	33.0	38.4	43.6	48.5	53.3	58.1	62.7	67.3
CHO	实验值	29.7	34.5	38.8	—	47.7	—	—	—	—
	计算值	29.2	34.6	39.6	44.4	49.1	53.6	58.1	62.5	66.8
COMe	实验值	34.9	38.2	42.3	—	—	56.4	—	—	71.8
	计算值	32.8	38.2	43.2	48.1	52.7	57.3	61.8	66.2	70.5
COEt	实验值	38.6	41.9	—	—	—	—	—	—	—
	计算值	38.4	43.8	48.8	53.7	58.3	62.9	67.4	71.8	76.1
CO ₂ H	实验值	56.2	58.0	65.0	72.4	74.6	80.3	82.4	89.4	—
	计算值	55.0	60.3	65.2	70.0	74.6	79.1	83.5	87.9	92.2
CO ₂ Me	实验值	—	—	43.1	48.0	51.6	56.4	—	66.7	71.4
	计算值	32.9	38.2	43.1	47.9	52.5	57.0	61.4	65.8	70.1
CO ₂ Et	实验值	39.1	—	—	—	—	—	—	—	—
	计算值	38.5	43.8	48.7	53.5	58.1	62.6	66.9	71.4	75.7

(上接第 37 页)

由表 1 可以看出, 本工艺稳定可靠, 提取精制得到的美伐他汀粉质量分数大于 98.50% (外标法), 提取总收率大于 70%。

3 结 语

开发的溶媒提取结晶的工艺从美伐他汀发酵液中有效提取, 得到了高含量的美伐他汀粉(质量分数大于 98.50%), 该提取工艺简便, 收率高, 适用于工业化生产。

参考文献:

[1] CHAKRAVARTI R, SAHAI V. Compactin a review[J]. Ap-

plied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(4): 618-622.

[2] ENDO A, KURODA M, TSUJITA Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by penicillium citrinum [J]. J Antibiot, 1976, 29(12): 1346-1348.

[3] 阮 君, 刘 萍. 氟喹诺酮类抗菌素莫西沙星[J]. 国外医药合成药, 2000, 21(3): 168.

[4] 姚 朗, 苏 勇, 蒋华良. 他汀类调血脂药物的潜在新作用——抗骨质疏松[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 4(2): 249.

[5] 刘泽林, 罗建民, 董作仁, 等. 美伐他汀对人多发性骨髓瘤细胞系 U266 体外增殖与凋亡的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2004, 12(3): 340-346.