大孔树脂法分离纯化伏环孢素

刘甲甲[1]，麦子丹[2]，韩月文[2]，李 颖[1]，何永富[3]，张福利[1]*

（1. 中国医药工业研究总院有限公司，上海医药工业研究院有限公司，上海 201203；2. 上海工程技术大学，上海 201203；3. 博峭（杭州）生物制药有限公司，浙江杭州 311404）

摘要：伏环孢素是一种新型钙调神经磷酸酶抑制剂，已被列入第三批鼓励仿制药品目录。该研究开发了基于大孔树脂的伏环孢素分离和纯化工艺，并优化了大孔树脂种类和纯化工艺参数。优化得到的分离和纯化条件为：采用树脂 3 号，用 50%乙醇溶液配制为 0.1 g/mL 的伏环孢素样品溶液，设置上样流速为 20 mL/h，上样体积为 30 mL，洗脱剂为 50%～ 70%乙醇溶液，结晶溶剂则选用体积比为 3 ∶ 3 的丙酮 - 水混合溶液。结果显示，该工艺高效、稳定、可重复，精制得到的伏环孢素纯度 >99.2%，纯化收率 60%，为伏环孢素的工业化生产提供了一种可行且高效的纯化策略。

关键词：伏环孢素；环肽；钙调磷酸酶抑制剂；分离；纯化；大孔树脂

中图分类号：R914.4；TQ460.6+4　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)05-0659-06

引用：刘甲甲，麦子丹，韩月文，等．大孔树脂法分离纯化伏环孢素［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(5)：659-664．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.05.013

Separation and Purification of Voclosporin by Macroporous Resin

LIU Jiajia[1], MAI Zidan[2], HAN Yuewen[2], LI Ying[1], HE Yongfu[3], ZHANG Fuli[1]*

（*1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203; 2. Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201203; 3. Boxiao (Hangzhou) Biopharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311404*）

ABSTRACT: Voclosporin is a novel calcineurin inhibitor that has been included in the third batch of the encouraged generic drug list. This study developed a separation and purification process for voclosporin based on macroporous resins, and optimized the type of macroporous resins and purification process parameters. The optimal conditions were as follows: using Resin No. 3, preparing voclosporin sample solution (0.1 g/mL) with 50% ethanol aqueous solution, maintaining an sampling flow rate of 20 mL/h, a loading volume of 30 mL, employing 50 % – 70 % ethanol as eluent, and utilizing the acetone-water mixture in a volume ratio of 3 ∶ 3 as crystallization solvent. This optimized process consistently yielded voclosporin with purity over 99.2 % and purification recovery of 60 % . These results demonstrated the high efficiency, stability, and reproducibility of the developed method, providing a viable and effective purification strategy for industrial production of voclosporin.

Key Words: voclosporin; cyclic peptide; calcineurin inhibitor; separation; purification; macroporous resin

伏环孢素（voclosporin，**1**，图 1）的分子式为 $C_{63}H_{111}N_{11}O_{12}$，相对分子质量为 1 214.65，CAS 登记号为 515814-01-4，是由加拿大 Aurinia 制药公司开发的一种新型短环肽类钙调磷酸酶抑制剂[1]。**1** 可由环孢素 A（cyclosporin A，**2**）经结构修饰得到。**1** 因作用机制独特、临床效果显著，已于 2021 年 1 月 22 日被 FDA 批准上市，2022 年 9 月又被 EMA 批准上市，用于狼疮性肾炎成年患者的治疗。目前，**1** 已被国家卫生健康委员会等列入第三批鼓励仿制药

收稿日期：2024-10-12

作者简介：刘甲甲（1991—），男，硕士研究生，专业方向：药物合成工艺。

通信作者：张福利（1968—），男，研究员，博士生导师，从事药物合成工艺的研究与开发。

E-mail：zhangfulisipi@126.com

品目录[2—4]。

1 为半合成环肽类化合物，文献[5]综述了多种专利或其他合成方法。2024 年，JIANG 等[6]以 **2** 为起始物料，经乙酰化反应、臭氧化反应、烯丙基化 -Peterson 消除及水解得到 **1** 粗品后，再经分离、纯化，得到 **1**，合成路线如图 1 所示。

关于分离和纯化 **1** 的文献报道较少。MAENG 等[7]使用制备型液相色谱法纯化 **1**。但该法对设备要求较高、工艺较复杂、制备成本较高，限制了工业化生产。目前已有多项研究聚焦于短环肽类化合物的纯化和分离工艺。例如，赵传猛等[8]利用大孔树脂分离和纯化短环肽化合物达福普汀。大孔吸附树脂分离法具有吸附选择性好、处理容量大、再生简便、解吸条件温和、使用周期长、成本低等优点，适于工业化生产[9—10]。因此，为开发操作简便、适于工业化生产的 **1** 分离和纯化工艺，本研究参考 **2** 的纯化方式[11—12]，建立基于大孔吸附树脂的 **1** 分离和纯化工艺。

1　仪器与试药

Thermo U3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；N-1300V-WB 型旋转蒸发仪（东京理化器械株式会社）。

1 粗品（实验室自制，纯度约 92%）；**1** 对照品（浙江博崎生物制药有限公司，含量 99%，批号 C2308-M240305）；大孔吸附树脂 D101[艾美科健（中国）生物医药有限公司，20210218]；大孔吸附树脂色谱 3 号（20231014）、色谱 5 号（20230929）、色谱 7 号（20231017）均购于上海华震科技有限公司；大孔吸附树脂 LXT-036（20230821）、LXT-052（20230718）、LXT-060（20230911）、LXT-081（20231023）均购于西安蓝晓科技新材料股份有限公司；大孔吸附树脂 LS-305（安徽泽升科技股份有限公司，批号 O7SARXMA）；大孔吸附树脂 HZ-801（P2815534）、乙腈（色谱纯）均购于上海泰坦科技股份有限公司；其他试剂均为化学纯；0.22 μm 滤膜（上海安谱实验科技股份有限公司）。

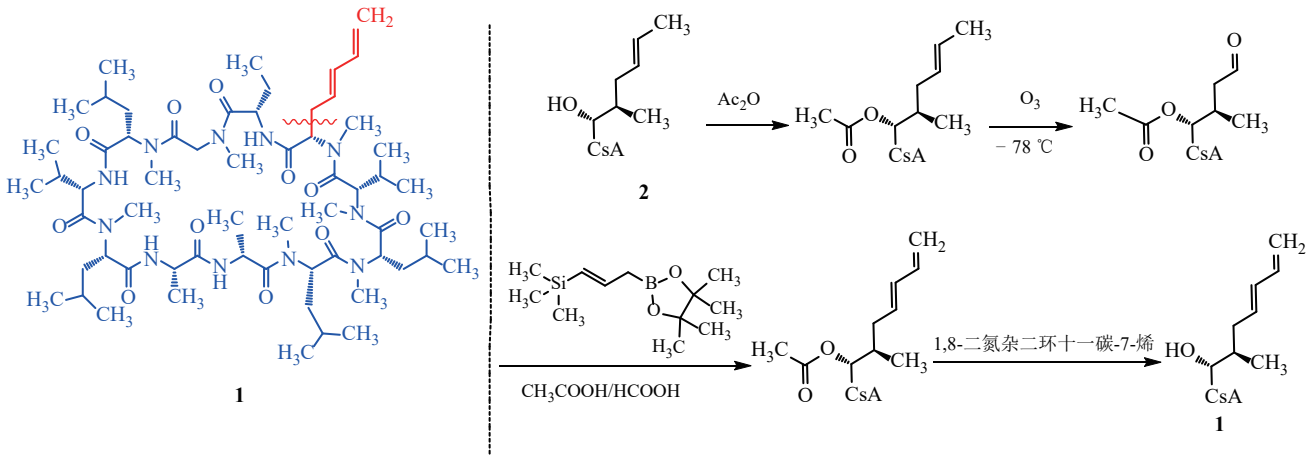
2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱　ChromCore 120 C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3 μm）；流动相 A 为 0.1% 磷酸溶液，B 相为乙腈，梯度洗脱（表 1）；流速　1.0 mL/min；柱温　60 ℃；检测波长　210 nm；进样量　10 μL。

2.2　分析方法结果

精密称取一定量的 **1** 对照品，加入甲醇溶解并稀释成质量浓度为 100、150、200、250、300、350、400、450、500 μg/mL 的系列对照品溶液，按“**2.1**”项下条件进样检测，以 **1** 质量浓度（*c*）为横坐标、吸收峰面积（*A*）为纵坐标，进行线性回归。结果显示，



1　　**2**

注：右侧合成路线中的化合物基团“CsA”即为左侧化合物 **1** 化学结构中的蓝色部分。

图 1　1 的化学结构及其文献合成路线

Fig.1　Chemical Structure of **1** and Its Synthetic Route in the Literature

表 1 梯度洗脱参数

Tab.1 Gradient Elution Parameters

t/min	A/%	B/%
0	45	55
20	15	85
24	15	85
25	45	55
32	45	55

1 在 100 ～ 500 μg/mL 与 *A* 的线性关系良好，标准曲线方程为 *A*=1.927 8*c* - 3.966 1（R^2=0.999 2）。方法学验证结果显示，此法的检测限为 1 μg/mL（信噪比 8.4 ～ 9.6），定量限为 2 μg/mL（信噪比范围 15.7 ～ 21.2），满足试验需求。

2.3 大孔吸附树脂型号的选择

2.3.1 树脂的预处理和再生

取 10 种不同型号的大孔吸附树脂，即 D101、色谱 3 号、色谱 5 号、色谱 7 号、LXT-036、LXT-052、LXT-060、LXT-081、LS-305、HZ-801，用无水乙醇浸泡 24 h，除去致孔剂、色素和杂质后，按各型号树脂的操作规程进行预处理，待用。树脂再生方法和预处理方法基本相同。

2.3.2 静态吸附与解吸

1 的吸附与解吸试验均在树脂柱中、室温条件下进行。**1** 在水中不溶，在乙醇中溶解，因此试验过程中使用 50%乙醇溶液配制 **1** 溶液。

静态吸附：称取 **1** 粗品（纯度 92%）1.20 g 于 500 mL 锥形瓶中，加入无水乙醇 200 mL 溶解，再加入纯化水 200 mL，搅匀，经 0.22 μm 滤膜过滤除去不溶物，得 3.0 mg/mL 的 **1** 溶液，备用。取上述预处理好的不同型号树脂各 3.0 g，分别加入 3.0 mg/mL **1** 溶液 30 mL，每 1 h 取样 1 mL，其中 10 μL 按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，剩余部分倒回树脂柱中继续吸附。按式①、②计算比吸附量［A_a/(mg·g^{-1})］和吸附率（A_r/%），绘制吸附曲线。

$$A_a=(c_0 - c_1)\times V/M \quad ①$$

$$A_r=(c_0 - c_1)/c_0\times 100\% \quad ②$$

式中：c_0 和 c_1 表示吸附前和吸附后的 **1** 质量浓度/(mg·mL^{-1})；V 表示 **1** 溶液体积/mL；M 表示大孔吸附树脂的质量/g。

解吸附：取吸附后的树脂，抽滤至干，置 100 mL 锥形瓶中，加入 70%乙醇溶液 25 mL，于室温下以 50 ～ 100 r/min 的速率振荡，静置后取上清液，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测洗脱液中的 **1**，按式③、④计算比洗脱量［E_m/(mg·g^{-1})］和洗脱率（E_r）。

$$E_m=(c_2\times V_1)/M \quad ③$$

$$E_r=(c_2\times V_1)/(c_0 - c_1)\times V \quad ④$$

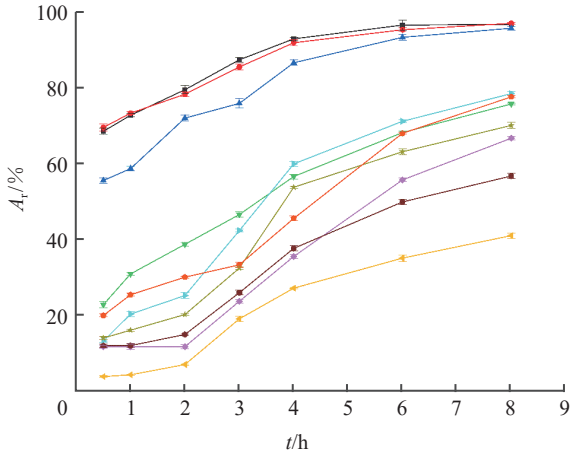
式中：c_2 表示解吸后 **1** 的质量浓度/(mg·mL^{-1})；V_1 表示解吸后 70%乙醇溶液的体积/mL。

结果如表 2、图 2 所示，色谱 3 号、色谱 5 号、色谱 7 号、D101、LXT-036、LXT-081 对 **1** 的吸附能力较好，但 D101、LXT-036、LXT-081 的吸附速率相对较慢，吸附时间较长（>5 h）；HZ-801、LXT-052、LXT-060、LS-305 不仅吸附速率慢，而且吸附能力较差（吸附率 <75%）。解吸附结果则显示，乙醇对色谱 3 号、色谱 5 号、HZ-801、LS-305、LXT-060 的洗脱能力好。综合考虑，选择色谱 3 号、色谱 5 号、HZ-801、LXT-060 4 种大孔吸附树脂，进

表 2 不同类型树脂的静态吸附试验结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2 Static Adsorption Test Results of Different Types of Resins（$\bar{x}\pm s$, n=3）

树脂型号	A_a/(mg·g^{-1})	8 h 时的 A_r/%	E_m/(mg·g^{-1})	E_r/%
色谱 3 号	38.64±0.41	96.77±0.53	26.62±0.81	68.84±0.53
色谱 5 号	38.71±0.39	97.04±0.28	21.68±0.96	56.02±0.84
色谱 7 号	39.48±0.82	95.73±0.51	14.56±0.69	36.88±0.76
D101	35.93±0.65	75.74±0.26	12.81±0.71	35.64±0.93
HZ-801	32.50±0.42	66.68±0.42	17.05±0.59	52.44±0.49
LS-305	17.88±0.19	40.93±0.73	15.01±1.08	83.96±0.68
LXT-036	37.19±0.74	78.48±0.55	12.14±0.83	32.63±0.37
LXT-052	32.16±1.01	56.67±0.69	2.61±0.95	8.07±0.67
LXT-060	32.46±0.59	70.07±0.89	24.21±0.38	74.59±0.87
LXT-081	37.16±0.82	77.61±0.31	12.28±0.61	33.04±0.96



■—色谱 3 号；●—色谱 5 号；▲—色谱 7 号；▼—D101；◆—HZ-801；◀—LS-305；▶—LXT-036；●—LXT-052；★—LXT-060；●—LXT-081。

图 2　不同类型树脂的静态吸附曲线（n=3）

Fig.2　Static Adsorption Curves of Different Types of Resins (n=3)

一步考察其动态吸附与解吸性能。

2.3.3　动态吸附与解吸

称取色谱 3 号、色谱 5 号、HZ-801、LXT-060 4 种大孔吸附树脂各 15.0 g（约 20 mL），湿法装柱，每个试验平行 3 份，分别称取 **1** 粗品（纯度 92%）0.20 g，用 50% 乙醇溶液 2 mL 溶解后，湿法上样。以 100 mL/h（即 5.0 BV/h）的洗脱速度，先用 50% 乙醇溶液 200 mL 洗脱（2 h），再用 60% 乙醇溶液 300 mL 洗脱（3 h），最后用 70% 乙醇溶液约 300 mL 洗脱（3 h），收集上样流出液和所需洗脱液，计算动态吸附时的比吸附量（A_a'）、吸附率（A_r'）、比洗脱量（E_m'）、洗脱率（E_r'）。收集所需洗脱液，浓缩至干，剩余物用丙酮和水（体积比为 3 ∶ 3）混合溶液溶解并重结晶，经 0.22 μm 滤膜过滤、烘干，得纯化后的 **1**。

按“**2.1**”项下色谱条件检测，计算 **1** 的纯度和收率，结果如表 3 所示。

由表 3 可见，大孔吸附树脂色谱 3 号的纯化效果较好，纯化后的 **1** 纯度 >99.2%，最大单杂 < 0.30%，收率 60%～70%。结合工业放大的可行性，后续试验选用色谱 3 号大孔吸附树脂。

2.4　纯化工艺参数的优化

2.4.1　上样量及上样流速的优化

取大孔吸附树脂色谱 3 号 15 g（约 20 mL）装柱，设置 3 份平行。用 50% 乙醇溶液将 **1** 粗品配制成 0.1 g/mL 的溶液，以 20、40、60 mL/h（即 1.0、2.0、3.0 BV/h）湿法上柱 150 mL，每 15 mL 收集 1 次流出液，按“**2.1**”项下色谱条件测定流出液中 **1** 的含量，并绘制泄露曲线，结果如表 4、图 3 所示。

由结果可知，当流速为 40 和 60 mL/h 时，流出 15 mL 后，流出液中 **1** 的含量迅速增高；而当流速为 20 mL/h 时，**1** 要在流出 30 mL 后出现泄漏。为确保纯化效果及效率，最终选取上样速度为 20 mL/h，上样浓度为 0.1 g/mL 的 **1** 50% 乙醇溶液，上样量为 30 mL（约 1.5 倍 BV）。

表 4　不同上样量及上样流速时流出液中 1 的含量 /（mg·mL^{-1}）（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4　**1** Contents in the Eluates under the Conditions of Different Loading Volumes and Sampling Flow Rates/ (mg·mL^{-1}) ($\bar{x}\pm s$, n=3)

洗脱液序号	上样流速 /（mL·h^{-1}）		
	20	40	60
1	0.001±0	0.001±0	0.002±0.001
2	0.002±0.001	0.654±0.028	1.254±0.038
3	0.485±0.011	1.576±0.035	1.793±0.019
4	1.379±0.023	7.272±0.062	9.714±0.088
5	7.836±0.088	6.813±0.056	7.048±0.129
6	6.572±0.099	7.128±0.112	6.924±0.084
7	6.984±0.113	6.858±0.071	6.887±0.095

表 3　动态吸附试验结果

Tab.3　Dynamic Adsorption Test Results

树脂型号	动态吸附试验中的树脂性能				**1** 的纯度和收率		
	A_a'/(mg·g^{-1})	A_r'/%	E_m'/(mg·g^{-1})	E_r'/%	洗脱液中 **1** 纯度 /%	重结晶后纯度 /%	总收率 /%
色谱 3 号	33.62	84.12	28.61	85.07	99.17	99.23	64.26
色谱 5 号	30.73	76.83	24.73	80.48	98.43	98.53	55.65
HZ-801	26.54	66.37	24.46	92.17	98.13	98.35	55.01
LXT-060	22.26	55.64	17.38	78.09	98.39	98.87	38.94

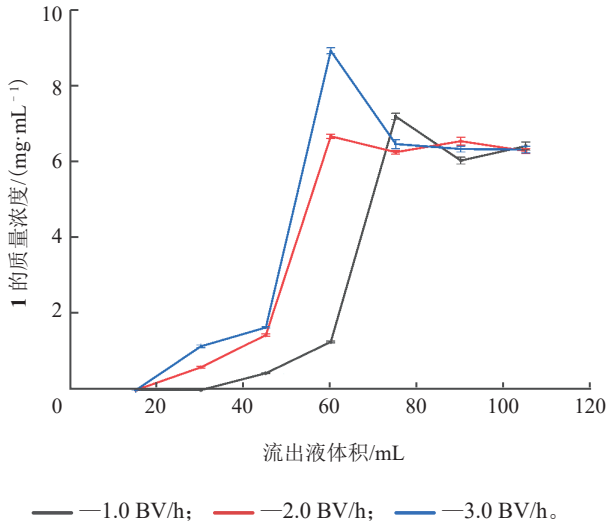


图 3　不同上样量及上样流速时 1 的泄露曲线（*n*=3）

Fig.3　Leakage Curves of **1** at Different Sample Volumes and Sampling Flow Rates (*n*=3)

2.4.2　洗脱剂的优化

称取预处理好的色谱 3 号大孔吸附树脂 15.0 g，湿法装柱；另称取 **1** 粗品 0.3 g，用 50%乙醇溶液溶解后湿法上样。设置 4 份平行，分别使用 50%～70%甲醇溶液、50%～70%乙醇溶液、50%～70%丙酮溶液、50%～70%乙腈溶液洗脱，以 100 mL/h (5.0 BV/h) 的速度洗脱。将收集的洗脱液浓缩至干，使用体积比为 3 ∶ 3 的丙酮 - 水溶液溶解并重结晶，经 0.22 μm 滤膜过滤、烘干，得到纯化 **1**。按“**2.1**”项下色谱条件检测，计算 **1** 的纯度和收率，结果如表 5 所示。采用乙醇溶液作为洗脱剂纯化得到的 **1** 纯度最高，收率也相对较高，因此选用乙醇 - 水溶液作为洗脱剂继续进行工艺参数筛选。

表 5　不同洗脱剂对 1 纯化的结果

Tab.5　Purification Results of **1** by Different Eluents

洗脱剂	洗脱液中 **1** 纯度 /%	结晶后 **1** 纯度 /%	总收率 /%
甲醇 - 水体系	96.47	96.85	66.7
乙醇 - 水体系	99.06	99.14	64.3
丙酮 - 水体系	94.72	95.68	56.6
乙腈 - 水体系	95.94	96.27	46.7

2.4.3　洗脱剂 pH 值的确定

1 为环肽类化合物，在酸性或碱性条件下可能不稳定，其乙醇溶液在浓缩时可能也存在不稳定的风险，因此需考察使用不同 pH 值洗脱剂在 25 ℃洗脱和 45 ℃浓缩时的影响。先用 1 mol/L 盐酸和 30%氢氧化钠溶液配制 pH 值为 1 ～ 3、3 ～ 5、6 ～ 7、8 ～ 9、11 ～ 13 的水溶液，再分别加入乙醇制成不同 pH 值的 50%乙醇溶液，用以配制 0.1 g/mL 的 **1** 粗品溶液。各样品每隔 1 h 取样，按“**2.1**”项下色谱条件检测，分别考察 25 和 45 ℃时不同 pH 值乙醇溶液中 **1** 的稳定性，绘制稳定性曲线，结果如图 4 所示。

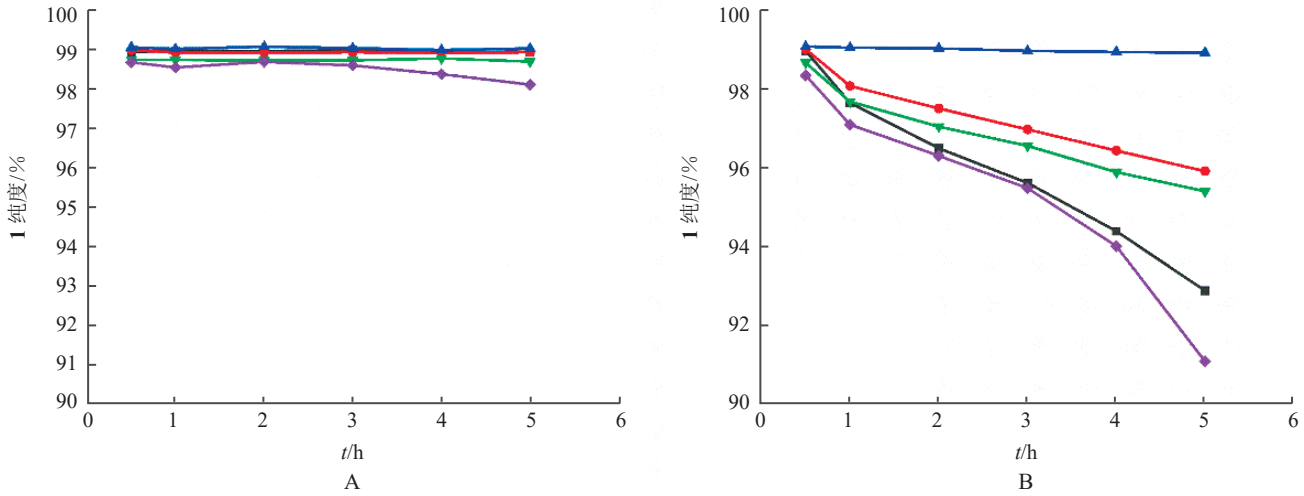


图 4　25 ℃（A）和 45 ℃（B）时 1 在不同 pH 值乙醇溶液中的稳定性曲线

Fig.4　Stability Curves of **1** in the Ethanol Solutions with Different pH Values at 25 ℃ (A) and 45 ℃ (B)

室温（25 ℃）下，**1** 在酸性条件（pH 1 ～ 5）下的稳定性较好，在碱性条件（pH 8 ～ 13）下发生不同程度降解，且 pH 值越高，降解越快。在 45 ℃时，**1** 在酸性或碱性条件下均会发生不同程度降解。考虑到洗脱液后续要进行浓缩，因此选用中性（pH 6 ～ 7）的乙醇溶液作为洗脱液。

2.4.4　工艺验证

采用上述优化的分离和纯化工艺条件［即以大孔吸附树脂色谱 3 号装柱，上样流速为 20 mL/h（1.0 BV/h），洗脱剂为 50%～ 70%乙醇溶液（pH 6 ～ 7），结晶溶剂是体积比为 3 ∶ 3 的丙酮 - 水溶液］，按“**2.3.3**”项下方法进行了 3 批试验，结果如表 6 所示。

经 3 批次试验验证，**1** 在经大孔树脂纯化、丙酮 - 水体系重结晶处理后，纯度可显著提升至 99.5%以上，且最大单杂低于 0.2%。同时，**1** 收率约为 60%，表明该纯化工艺不仅有效提升了产品质量，还具备良好的可重复性。

3　总结

根据 **1** 及大孔吸附树脂的特性，本研究开发了一种基于大孔吸附树脂制备高纯度 **1** 的工艺。试验表明，采用大孔吸附树脂色谱 3 号进行动态吸附，使用 50%～ 70%乙醇溶液进行洗脱，以体积比为 3 ∶ 3 的丙酮 - 水体系重结晶，纯化所得 **1** 的收率约 60%，纯度 > 99.2%。通过 3 批次小试试验，证明该纯化方法重现性好、方法简单、可操作性强，适于 **1** 粗品的纯化和分离，同时可用于 **1** 有关物质的分离及质量研究。

表 6　工艺验证试验结果

Tab.6　Results of Process Validation Experiments

批次	粗品纯度 /%	粗品质量 /g	纯品质量 /g	收率 /%	纯品纯度 /%	最大单杂 /%
1	92.3	0.8	0.47	58.75	99.72	0.12
2	92.3	7.0	4.31	61.57	99.53	0.17
3	92.7	20.0	12.76	63.80	99.67	0.15

参考文献：

［1］ 张　冰，王绍杰．伏环孢素［J］．中国药物化学杂志，2022, **32**(1)：80．

［2］ 国家卫生健康委办公厅，工业和信息化部办公厅，国家知识产权局办公室，等．关于印发第三批鼓励仿制药品目录的通知［EB/OL］．（2023-12-20）［2025-03-18］．www.gov．cn/zhengce/zhengceku/202312/content_6922542．htm．

［3］ 邓伟萍，胡长平，罗　平．新型钙调神经磷酸酶抑制药伏环孢素临床研究进展［J］．中南药学，2024, **22**(7)：1831-1837．

［4］ 付玉杰，李　静，马　毅，等．新型钙调神经磷酸酶抑制剂——伏环孢素［J］．临床药物治疗杂志，2024, **22**(8)：17-21．

［5］ 刘甲甲，潘海波，冯　磊，等．伏环孢素合成路线图解［J］．中国药物化学杂志，2023, **33**(9)：712-716．

［6］ JIANG B B, LIU J J, LI Y, *et al*．Synthesis and crystallization research of voclosporin［J］．*Org Process Res Dev*, 2024, **28**(4)：1151-1158．

［7］ MAENG J H, YANG Z, MANNING D D, *et al*．Organozirconium chemistry on cyclosporin: a novel process for the highly stereoselective synthesis of (*E*)-ISA247 (voclosporin) and close analogues［J］．*Synthesis*, 2012, **44**(1)：63-68．

［8］ 赵传猛，裘鹏程，肖　立，等．大孔吸附树脂法纯化达福普汀［J］．中国抗生素杂志，2013, **38**(3)：208-213．

［9］ 陈俊洵，余　平，李晶晶，等．大黄总蒽醌提取物的大孔树脂纯化工艺研究［J］．中华中医药杂志，2023, **38**(12)：6039-6045．

［10］ 黄丽荣，龙　文，骆　衡．大孔吸附树脂纯化右旋龙脑的工艺研究［J］．广州化工，2021, **49**(3)：36-38．

［11］ 陈秀明，方剑英，陈振伟，等．大孔吸附树脂柱层析结合高速逆流色谱分离纯化环孢菌素小组分［J］．中国抗生素杂志，2008, **33**(5)：276-279．

［12］ 董惠钧，赵军杰，陈启林，等．大孔吸附树脂结合硅胶柱层析纯化环孢菌素 A［J］．生物加工过程，2010, **8**(3)：6-12．