

高速逆流色谱技术在药物研究开发中的应用*

曹学丽**

(北京工商大学化学与环境工程学院 北京市植物资源研究开发重点实验室 北京 100037)

摘要:对高速逆流色谱(HSCCC)技术。在天然药用植物活性成分分离及标准品制备、中药指纹图谱分析、天然新药的研发和活性部位筛选等方面中的应用及其在生物药物以及药物工业化领域的应用发展趋势进行了综述。

关键词:高速逆流色谱 药物研究开发 活性成分分离

高速逆流色谱(High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)是一种连续高效的液-液分配色谱分离技术。该技术由于不需要固体支撑体,物质的分离依据其在两相中分配系数的不同而实现,因而避免了因不可逆吸附引起的样品损失、失活、变性等,特别适合于天然生物活性成分的分离。而且由于被分离物质与液态固定相之间能够充分接触,使得样品的制备量大大提高,是一种理想的制备分离手段,目前已广泛应用于生物医药、天然产物、食品和化妆品等领域,尤其是在我国生物医药以及中药现代化等领域的应用愈来愈广。

HSCCC在过去的20~30年中发展十分迅速,产生了一系列新型的分离技术,积累了大量的科研成果。

自1995年以来,国外已有5本英文专著出版^[1-5],我国目前也已出版两本中文专著^[6,7]。本文将重点就近年来HSCCC在药物研究开发中的应用进行讨论和综述。

一、高速逆流色谱工作原理

作为一种色谱分离方法,HSCCC与高效液相色谱(HPLC)最大的不同在于其柱分离系统。如果将一套大家所熟知的制备HPLC系统的色谱柱部分用一台HSCCC的螺旋管式离心分离仪代替,即可构成一套HSCCC色谱分离系统,它包括储液罐、泵、螺旋管分离柱、检测器、色谱工作站或数据采集软件或记录仪以及馏分收集器等组成部分。

在实际分离时,首先选择预先平衡好的两相溶剂中的一相为固定相,并将其充满螺旋管柱,然后使螺旋管柱在一定的转速下高速旋转,同时以一定的流速将

收稿日期:2006-10-10

修回日期:2006-11-30

* 北京市教育委员会科技发展教育计划项目(KM200410011001);天然药物活性成分分离纯化技术研究,负责人:曹学丽;北京市自然科学基金项目(2042006)高速逆流色谱螺旋形圆盘柱分离系统的研究,负责人:曹学丽。

** 联系人:曹学丽,博士,教授,主要从事天然植物和药物活性成分的逆流色谱分离纯化技术研究。Tel: 010-68983116, E-mail: Caoxl@th.btbu.edu.cn

流动相泵入柱内。在体系达到流体动力学平衡后(即开始有流动相流出时),将待分离的样品注入体系,其中组分将依据其在两相中分配系数的不同实现分离。分离效果与所选择的溶剂系统、固定相和流动相的选择、洗脱方式、流动相的流速、仪器的旋转的方向和转速、样品浓度和进样方式以及柱温等都有密切关系。因而,在采用逆流色谱分离时,在操作方法和工作程序等方面都有许多独特之处。常用的检测器有紫外-可见光检测器(UV-VIS),此外还有蒸发光散射检测器(ELSD)以及质谱检测器等。

与其它的色谱分离技术相比,高速逆流色谱具有分离效率高,制备量大,操作灵活,回收率高,应用范围广,分离成本低等优点。

二、HSCCC在天然药用植物活性成分分离及标准品制备中的应用

天然植物活性成分的分离具有很多的困难和问题。因为我们感兴趣的活性物质通常仅以很低的含量存在于极其复杂的基质当中,因此色谱方法一直是天然产物分离纯化中的主要手段,尤其是高效液相色谱方法,它在复杂混合物的分离中可以达到很高的分辨率。但是,目标物质在固体填料表面上的不可逆吸附和变性是固相载体色谱所遇到的共同问题。而HSCCC是一种无需任何固体支撑体的液-液分配色谱分离技术,可以完全避免上述问题。因此,HSCCC在天然植物活性成分的分离中得到了相当广泛的应用,在黄酮、生物碱、植物多酚、醌类、萜类、木脂素、香豆素、皂苷等几乎所有的天然植物化学成分分离中都有应用,笔者就近年来HSCCC在天然植物活性成分分离中的应用进行了较为详细的归纳和总结^[7]。HSCCC在植物药物活性成分分离中的优势主要体现在同一台仪器可用于不同极性的物质的分离,且制备量大,分离效率高,操作灵活。可以实现多种形式的梯度洗脱过程,如pH梯度、极性梯度等,还可以进行正向洗脱或反向洗脱,甚至可以使两相溶剂同时双向流动,实现真正连续的逆流色谱过程。图1为对一个混合物进行正向和反向两步双向洗脱分离过程的示意图^[5]。从图中可以看出,采用这种方式可以使复杂混

合物中极性范围分布非常宽的组分同时实现分离和回收,而柱子可以重复使用而不需补充任何溶剂,这是其它方法无法比拟的。

另外,随着人们的生活观念的转变,以及崇尚绿色、回归自然意识的增强,安全健康的消费观念逐渐成为市场消费的主流,国际社会对纯天然产品需求日益增长,以传统植物资源为原料的药品、功能性食品、保健品及护肤品日益受到人们的重视和青睐。我国具有丰富的天然植物和天然产物资源,以传统中草药为代表的天然药物的研究开发和利用已有悠久的历史。而目前国际市场上可用于质量控制的植物活性成分对照品及标准品仍然非常缺乏,且价格昂贵。而逆流色谱技术从其优点和目前仪器的制备规模来看,非常适合于高纯度活性成分单体的制备。笔者曾参与了我国最早的10余种经国家质量技术监督检验检疫局审定的天然有效成分国家标准样品的研制工作,其中几乎全都用到了HSCCC。这些标准品包括三萜酚、异鼠李素、槲皮素、淫羊藿苷、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)、白藜芦醇、白藜芦醇苷、2,3,5,4-四羟基二苯乙烯苷、葛根素、3-甲氧基-葛根素

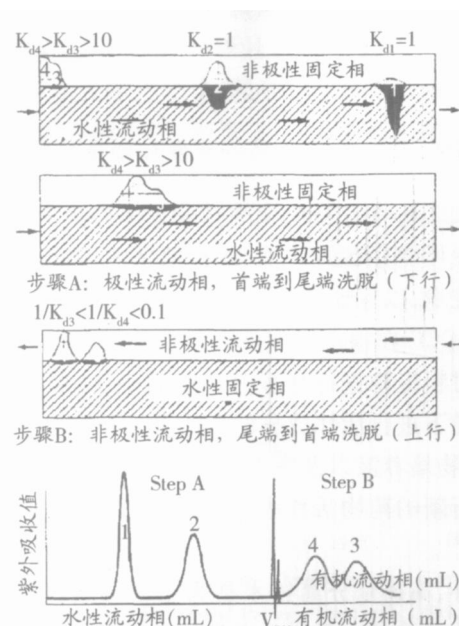


图1 正向和反向双向分离过程示意图

等。HSCCC在小批量、高纯度、高附加值活性成分单体的制备方面显示了其独特的优势^[8]。

三、分析型 HSCCC在快速分离和中药指纹图谱分析中的应用

分析型 HSCCC与制备型 HSCCC之间应该说没有严格的界定,但是通常将螺旋管柱内径 1mm,柱体积 50mL 的多层螺旋管行星式管离心分离仪 (multilayer coil planet centrifuge,MLCPC)称为分析型高速逆流色谱仪。尽管分析型 HSCCC的分离效率不能与分析型 HPLC相比,但由于具有柱体积小,分离速度快,溶剂消耗量小等优点,它在溶剂体系的快速优化、样品的小量制备以及分配系数的测定等方面得到了很好的应用^[9]。同时由于分析型 HSCCC继承了 HSCCC的诸多与生俱来的优点,对于一些天然活性成分的分离可以达到很高的分离度,且重现性良好,将其用于中药指纹图谱研究更能全面地反映其中活性成分的本来面目,这些对于中药化学指纹图谱分析非常重要。分析型 HSCCC技术在多种中药指纹谱分析方面已有一些尝试^[10,11],如用于何首乌、沙棘、雪莲、丹参等粗提物指纹图谱的研究,并取得了较好的效果。可以预期,随着微型化的发展以及与质谱仪 (MS)等多种结构分析检定技术的联用,分析型 HSCCC在中药指纹图谱的研究中将具有良好的应用前景。

四、HSCCC在天然新药的研发和筛选中的应用

在天然新药的发现和筛选中,为了最大限度保留粗提物中可能存在的活性成分,必须采用温和而高效的分离技术,以保证低含量活性成分最大程度的保留。因此,HSCCC在很多以天然产物为来源的药物研究中被作为对粗提物进行初步分离的首选方法,在活性试验的指导下进行活性成分的跟踪和筛选。如从天然植物、微生物培养液以及海洋天然产物等复杂来源的基质中进行新的药物活性成分的筛选时,都有 HSCCC的应用^[12,13]。

此外,高通量分离技术是为了快速获得适合于高通量活性筛选的大量样品而发展起来的自动化高效色谱分离技术。与高通量筛选相对应的高通量分离制备

技术的研究已成为创新药物研究的焦点之一。这些技术能够同时或连续进行多个样品的快速分离纯化,利用梯度洗脱能够把复杂样品(如天然植物提取物)分离成数十个含有不同成分组的部位或单体,或通过不同色谱分离方法的串联使用和自动化控制把一个复杂样品分离成一系列高纯度单一化合物,因此,使复杂样品的分离纯化速度得到极大提高,这些成分组或单体可以直接用于高通量活性筛选,指导活性成分的进一步分离纯化和结构确认^[14]。由于 HSCCC与其它色谱分离技术相比具有许多独特的优点,如该分离条件温和,使用范围广,分离效率高,操作方式灵活,重现性好,成本低,制备量大等,因此它在天然新药的开发中,已经被用于配合活性试验,进行活性部位或活性成分的分离制备,并显示了其高效强大的分离和制备能力。尽管目前还没有可用于高通量筛选的 HSCCC仪器,但是可以预期,HSCCC技术作为高通量筛选前的高通量分离制备手段将会很有发展前途。

五、高速逆流色谱的发展趋势

1. HSCCC的微型化以及与多种分析技术的联用

近年来,分析型 HSCCC的柱系统越来越向微型化发展,如螺旋管柱体积可小到 3~5mL,柱内径小到 0.3~0.4mm,并可以通过各种接口技术与多种检测器和化合物结构分析技术相结合。尤其是 HSCCC与 MS的联用^[15,16],把 HSCCC分离的灵活性、多样性与 MS的高灵敏度检测和结构分析特性良好地结合在一起,在天然活性成分的快速分离和鉴定方面显示了其独特的优势,很有发展前景。同时,要将 HSCCC发展成为一种高通量分离技术,HSCCC的微型化也是必需的。

2. HSCCC在药物工业化制备方面的应用和发展

HSCCC从根本上是一种制备性色谱分离技术,目前实验室 HSCCC的制备能力已经达到中试 HPLC的制备规模。HSCCC与 HPLC的放大过程相比,其分离过程简单,所用溶剂量比 HPLC要少 75%^[17],且所得目标成分在分离级分中的浓度较高,易于回收或作进一步的处理。

HSCCC的放大过程不会改变其分离原理。分离过程可以采用典型的色谱理论很好地进行描述和模型

化。这种分离过程的可预测性、分离物质的高回收率以及不用固体支撑体等优点,使得 HSCCC 成为一种可用于工业化分离的很有前途和吸引力的分离制备方法。但是,逆流色谱的真正工业化应用还有很多的问题需要研究解决。大制备量仪器的研制首先要搞清放大倍数、产量、分离效率与柱体参数的关系,在理论指导下进行有目的的可预测的放大。近年来,英国 Brunel 大学生物工程研究所的 Sutherland 教授研究小组及其合作者在这方面进行了一系列的研究^[18],他们对一些试验样品的分离,在分离柱体积从 5mL 放大到 5L,上样量扩大 1000 倍的情况下,可以实现在几乎同样的时间 (< 10min) 内同等效率的分离结果,分离谱图基本吻合,为 HSCCC 仪器的工业化放大奠定了良好的基础。但总的来讲,目前国内外都还缺乏商业化的工业化制备分离仪器。目前英国 Brunel 大学的合作者 Dynamic Extraction 公司推出了 18L 柱容量的逆流色谱 (CCC) 分离设备,国内上海同田生物公司也在推出其 10L 的 CCC 分离设备。

3. HSCCC 在生物药物高效分离中应用和发展

HSCCC 在大环内酯类和环肽类等抗生素药物的分离制备中的应用早有报道^[19]。在氨基酸和肽类衍生物等生物药物成分的分离纯化方面也有应用,并且采用 pH-区带精制逆流色谱等新型分离纯化技术可以使酸性或碱性的这类物质达到 10g 量级的制备^[20]。但是采用 HSCCC 对蛋白质等生物大分子药物的分离制备还存在一些问题。主要是目前商业化的 HSCCC 仪器对于分离小分子药物所需要的含有机相两相溶剂体系有较高的固定相保留,而对于分离生物大分子所需要的聚合物双水相体系的保留能力较差,而固定相的保留值是关系到分离效率高低的的重要参数之一。因此,研究和开发高效的分离生物大分子的 HSCCC 仪器和方法是近年来人们研究关注的又一个热点问题^[21, 22]。

4. 制约 HSCCC 在药物研发中广泛应用的关键问题

首先, HSCCC 是一种相对较新的分离纯化技术,尽管它具有许多与生俱来的优点,但是人们对它的认识和理解还需要一个逐步深入的过程,因而从某种程

度上影响了它的应用;其次, HSCCC 技术的广泛应用还需要有更为成熟稳定的仪器设备条件的支撑。目前国内只有一二家专门从事逆流色谱仪器研发和生产的机构,主要生产可用于实验室半制备分离的仪器。另外国家对该项技术研发的投入和支持也很有限,缺乏对该项技术和相关设备的系统性的研究,目前国内可用于大规模生产的商业化仪器设备研制和开发还处于起步阶段。国外已有工业化仪器设备面世,但由于技术保密等方面的顾虑,目前还没有投放国内市场,且价格昂贵。因此, HSCCC 的工业化大规模应用还需要国家和有关行业的投入和支持。另外, HSCCC 是一种高效分离纯化技术,其优势更多地体现在高纯度目标成分的分离纯化和制备方面。尽管其成本普遍低于其他色谱分离技术,但在一些传统药物的研发中人们首先还是会考虑采用其他更为成熟廉价的传统提取分离技术。这些因素在很大程度上都制约了逆流色谱技术在药物研发和生产中的大规模应用。

六、结 语

高速逆流色谱是一种独特的不用固态载体的连续液-液分配色谱制备分离技术。经过近 30 年的发展,产生了多种新型高效分离技术,并在天然产物、生物医药、生命科学、食品等领域的研发中得到了广泛的应用,尤其是在天然药物活性成分的分离制备方面其优势得到了充分的发挥,积累了一批可供参考的技术数据。尽管 HSCCC 到目前为止还有许多理论和技术问题需要深入的研究解决,还缺乏大规模分离制备的仪器支撑条件,但是由于其具有许多其它色谱分离技术不可替代的优点,随着各种相关技术的不断发展和完善, HSCCC 将会在制药等相关领域发挥越来越重要的作用。

参考文献

- 1 Conway W D and Petroski R J (eds) Modern Countercurrent Chromatography ACS Symposium Series Vol 593. 1995.
- 2 Foucault A. Centrifugal Partition Chromatography, Chromatographic Science Series, Vol 68. Marcel Dekker, New York, 1995.
- 3 Ito Y and Conway W D (Eds) High-speed Countercurrent Chromatography Chemical Analysis, Vol 132. Wiley, New York, 1996.

- 4 Menet J M and Thiebaut D. (eds) Countercurrent Chromatography, Characterization of the solvent system used in countercurrent chromatography, Marcel Dekker, Inc New York Basel, 1999.
- 5 Berthod A (ed) Countercurrent Chromatography Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry Vol XXXV III Elsevier 2002.
- 6 张天佑编著. 逆流色谱技术. 北京:北京科学技术出版社, 1991.
- 7 曹学丽编著. 高速逆流色谱分离技术及应用. 北京:化学工业出版社, 2005.
- 8 Zhang T Y, Cao X L, Han X. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2003, 26(9&10) 1565.
- 9 Schaufelberger D E. In: Ito Y and Conway W D (Eds) High - speed Countercurrent Chromatography. Chemical Analysis, Vol 132. Wiley, New York, 1996. 45.
- 10 顾铭, 苏志国. 高速逆流色谱用于天然产物分离和指纹图谱构建. 生物加工过程. 2003, 1(2) 59.
- 11 沈平孺. 高速逆流色谱 (HSCCC) 技术与色谱指纹谱. 中成药, 2001, 23(5) 313.
- 12 Alvi K A. In: Culter S J and Culter H G (Eds), Bioactive Natural Products CRC Press, Boca Raton, FL, 2000. 185.
- 13 Fregeau N L and Rinehart K L. Isolation of marine natural products by high - speed countercurrent chromatography. In: Ito Y, Conway W D (eds) High - Speed Countercurrent Chromatography. A Wiley - Interscience Publication, 1995. 265.
- 14 石建功, 王素娟, 莫顺燕, 等. 高通量技术在天然药物和中药现代化研究中的应用. 世界科学技术 - 中药现代化, 2003, 5(4) 48.
- 15 Oka H, Kai Y, Kawamuta N, et al Direct interfacing of high - speed countercurrent chromatography to Frit electron ionization, chemical ionization, and fast atom bombardment mass spectrometry. Anal Chem, 1991, 63 2861.
- 16 Kong Z R, Rinehart K L, Milberg R M, Conway W D. Application of high - speed countercurrent chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (HSCCC/ESMS) in natural products chemistry. J Liq Chrom & Rel Technol, 1998, 21(1&2) 65.
- 17 Graham A S, McConvey I F and Shering P J. An evaluation of the performance of a preparative CCC machine for the separation of an active pharmaceutical ingredient. J Liq Chrom and Rel Technol, 2001, 24 1811.
- 18 Sutherland I, Hawes D, Ignatova S, et al Review of progress towards the industrial scale - up of CCC. J Liq Chrom & Rel Technol, 2005, 28(12&13) 1877.
- 19 Oka H, Harada K, Ito Y, et al. J Chromatogr A, 1998, 812 35.
- 20 Ito Y, Ma Y. J Chromatogr A, 1996, 753 1.
- 21 Ito Y, Yang F Q, Fitze P, et al. Spiral disk Assembly for HSCCC: Column design and basic studies on chromatographic resolution and stationary phase. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2003, 26 1355.
- 22 Ito Y, Yang F Q, Fitze P, et al. Improved spiral disk assembly for high - speed countercurrent chromatography. J Chromatogr A, 2003, 1017 71.

HSCCC and Its Applications in Medical Research

Cao Xueli

(Beijing Key Laboratory of Plant Resource Research and Development,
Beijing Technology and Business University, Beijing 100037)

High-speed countercurrent chromatography, or HSCCC, is a continuous liquid-liquid partition chromatography developed in the 1980s. In recent years, HSCCC has been widely used in research and development of traditional Chinese medicine, biomedicine, natural products, functional foods and cosmetics, including separating natural active components from plant resources, developing standard reference material of natural components, fingerprint analysis of traditional Chinese medicine, and selecting and screening new natural medicines. A review is presented in this paper, on HSCCC separation mechanism, instrumentation, operation, and its applications in TCM research.

Keywords: High-speed countercurrent chromatography (HSCCC), traditional Chinese medicines (TCM)

(责任编辑:张述庆, 责任编辑:张志华, 责任译审:邹春申)