

高速逆流色谱技术制备石杉碱甲单体

陈建华, 黄少烈, 李忠 (华南理工大学化工与能源学院广东省绿色化学产品技术重点实验室, 广州 510640)

摘要:目的 从千层塔植物提取物中分离制备石杉碱甲单体。方法 利用高速逆流色谱技术, 通过寻找合适的两相溶剂体系及工艺参数, 研究及讨论石杉碱甲分离制备的新方法。结果 以 $n\text{-Hexane}/n\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1:5, V/V/V) 为两相溶剂体系, 在优化的工艺参数条件下, 利用高速逆流色谱技术, 获得了单体纯度为 98.6% (HPLC) 的石杉碱甲单体。结论 利用高速逆流色谱技术成功地从千层塔植物提取物中分离制备了纯度高于 98% 的石杉碱甲单体。

关键词: 高速逆流色谱 (HSCCC); 石杉碱甲; 千层塔 (蛇足石杉); 植物单体制备

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)04-0295-03

Prepare Huperzine A by High-speed Countercurrent Chromatography

CHEN Jian-hua, HUANG Shao-lie, LI Zhong (School of Chemical & Energy Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Prepare Huperzine A from herb extract of *Huperzia serrata* Thunb. (Trev.). **METHODS** Using the technology of HSCCC, research and discuss a new preparative method of Huperzine A by searching a suitable two-phase solvent system and relative technical parameters. **RESULTS** Using $n\text{-Hexane}/n\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1:5, V/V/V) as the two-phase solvent system, Huperzine A with the purity of 98.6% (HPLC) was successfully obtained under the optimized HSCCC conditions. **CONCLUSION** HSCCC was successfully used for the preparation of Huperzine A from *Huperzia serrata* Thunb. (Trev.) at over 98% purity.

KEY WORDS: High-speed Countercurrent Chromatography (HSCCC); Huperzine A; Qianceng Ta (*Huperzia serrata* Thunb. (Trev.)); Prepare monomer from Natural Herb

高速逆流色谱 (High-speed Countercurrent Chromatography, 简称 HSCCC) 技术是一种较为新型的无固体支撑的液-液分配色谱技术, 由美国国立健康研究院 (National Institute of Health, U. S. A) Ito 博士最先研制开发。它利用螺旋管分离柱在做行星式运动时形成的单向性流体动力平衡体系, 使

得互不溶解的两相溶剂不断混合, 同时保留其中的一相作为色谱分离的固定相, 而另一相在恒流泵的作用下连续输入作为色谱分离的流动相, 从而在螺旋管柱内形成固定相与流动相连续的两相分割与对流趋势, 实现连续、高效的液-液分配过程^[1]。目前此项技术已被应用于生化、生物工程、医药、天

作者简介: 陈建华 (1979.05-), 男, 福建泉州人, 博士, 从事天然产物分离与纯化技术研发 (如高速逆流色谱、分子蒸馏及超临界萃取等), chejhch@scut.edu.cn, 020-8758-0250, 1372-524-9796

然产物化学、有机合成、环境分析、食品、地质、材料等领域^[2]。20世纪90年代以来,高速逆流色谱技术被广泛地应用于天然药物成分的分离制备与分析鉴定中^[3]。

石杉碱甲是从中国特有植物千层塔(蛇足石杉)中提取的一种生物碱,是中国独创的一种世界级新药,属于可逆性胆碱酯酶抑制剂,是目前治疗良性记忆障碍和老年性痴呆症最为安全有效的药物之一^[4-5]。石杉碱甲单体在千层塔植物干燥全草中的含量约为0.02%,且常伴有成分复杂、结构相似的共生生物碱,应用常规的分离方法难以大量获得^[6]。目前采用的生产方法为溶剂法,产品得率低,生产周期长^[7-11]。有机合成石杉碱甲由于技术问题,目前尚未获得突破^[12-13]。

利用现代高新分离技术——高速逆流色谱,以千层塔植物提取物为原料,对石杉碱甲单体的制备进行研究,获得重大突破,取得一种分离周期短、产品纯度高、分离量大且稳定的工艺路线。本文将对这一研究成果作一简要的介绍,而与本课题相关的分项研究,如高速逆流色谱溶剂体系的选择、分离样品的预处理、高速逆流色谱主要工艺参数(温度、转速及流速)的优化及工艺的产业化拓展研究(上样量及两相溶剂体系的单独配制)等将在其他论文中陆续发表。

1 仪器及试剂

高速逆流色谱系统: TBE300A高速逆流色谱主机 + AK-TA Prime系统(主要含泵、检测器及收集器等) + MultiTemp II恒温水浴 + Prime View 2.0色谱工作站,上海同田生化技术有限公司 + Amersham Pharmacia Biotech; 高效液相色谱系统: HP1100 + HP ChemStation, HP Corporation。千层塔植物提取物: 约5%石杉碱甲含量,宁波立华制药有限公司; 石杉碱甲对照品: 99.1%石杉碱甲含量,宁波立华制药有限公司; n-Hexane, n-BuOH, Triethanolamine 均为分析纯; Methanol: HPLC色谱纯; 双蒸水及反渗透水均为自制获得。

2 高速逆流色谱分离实验

2.1 实验步骤

取 n-Hexane, n-BuOH 及 H₂O 按 4:1:1 的比例配制约 2 000 mL 的两相溶剂体系,并于室温下平衡过夜;根据石杉碱甲的结构特性,利用一定的方法把千层塔植物提取物处理成石杉总碱;取少量石杉总碱用高速逆流色谱溶剂体系配制样品溶液,按如下“2.2”的工作流程进行高速逆流色谱分离实验。

2.2 工作流程

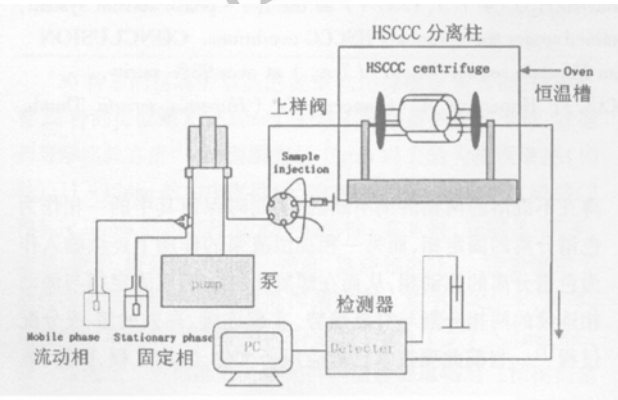


图 1 高速逆流色谱实验的工作流程

Fig 1 Flow chart of HSCCC experiment

图 1 表示出了本研究工作所采用的高速逆流色谱系统的工作流程。实验过程中,溶剂在泵的作用下经过六通上样阀,按一定的通路,进入水平行星式高速旋转的螺旋管分离柱中,样品在其中进行分配分离,流分通过紫外检测器等进行检测,并通过分布收集器收集,实验过程的参数及实验结果通过色谱工作站监控并记录。本研究工作根据选定溶剂体系的特性,首先采用正向洗脱方式把目标组分及其周围的组分洗脱出分离管柱,之后把仪器的运作方式切换为反向洗脱,以把存留在管柱里的易溶于固定相的组分洗脱出来,这种操作方式即有利于缩短分离时间又有利于降低多次实验间的相互影响。

2.3 分离结果

利用选定的溶剂体系——n-Hexane-n-BuOH-H₂O(4:1:5)及优化后的高速逆流色谱工艺参数(螺旋管柱转速 700 r/min 正向洗脱;流动相流速 2.0 mL/min;恒温水浴循环水温度 45℃;紫外检测波长 280 nm;另外反向洗脱时螺旋管柱的转速依然为 700 r/min)上样 386 mg 石杉总碱进行高速逆流色谱分离实验,其结果如图 2 所示,其中实线为紫外检测分离的色谱图结果,点画线为电导检测分离的色谱图结果,虚线为上相溶剂的体积百分率曲线。

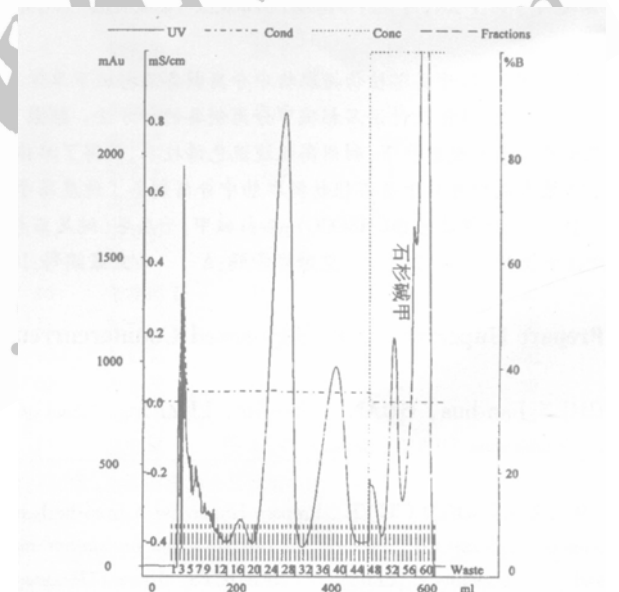


图 2 石杉总碱在选定条件下的 HSCCC 分离谱图

Fig 2 Separation result of total hupeazines by HSCCC in the selected conditions

3 分离结果的高效液相色谱分析测试

图 2 中第 3 部位份经高效液相色谱分析,其结果如图 3-a 所示。另外往这一流份中加入少量的石杉碱甲对照品在同样的色谱条件下进行高效液相色谱分析,其结果如图 3-b 所示。分析所用的色谱条件为:色谱柱(Hypersil ODS 5μm, 4.6 mm × 250 mm, Agilent);流动相(Methanol/H₂O/Triethanolamine = 60:40:0.02, V/V/V);流动相流速(1.0 mL/min);柱温(40.0℃);紫外检测波长(310 nm);样品溶媒(HPLC 流动相);样品溶液经 0.45μm 微孔滤膜过滤。

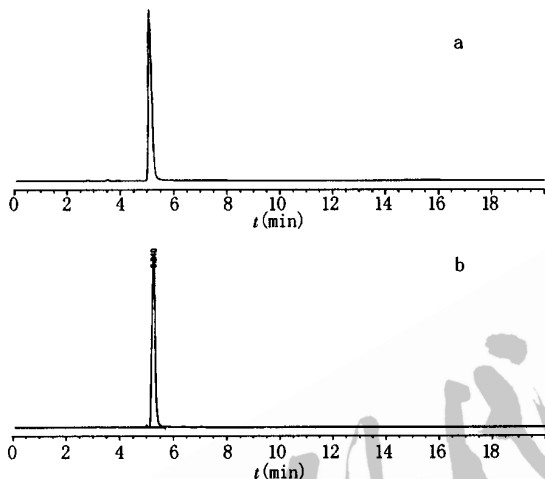


图 2 中石杉碱甲流份的确定

Fig 3 Confirming fraction part of huperzine A in Fig. 2

a. 第 3 部位流份的 HPLC 色谱图; b. 第 3 部位流份稀释液 + 石杉碱甲对照品叠加的 HPLC 色谱图

以上的分析结果说明图 2 中对应的第 3 部位流份的主成分为石杉碱甲, 且其在相应的 HPLC 色谱条件下, 除主成分峰外在 20 min 内未显示出杂质峰并与对照品在相同的色谱条件下具有相同的高效液相色谱峰特性。另外经过对照品外标法定量测定, 本实验所得的石杉碱甲产品纯度为 98.6% 且高速逆流色谱工艺的目标成分回收率为 81.3%。

4 结论

利用选定的溶剂体系——n-Hexane-n-BuOH-H₂O (4:1:5) 及优化后的高速逆流色谱工艺参数 (700RPM 正向洗脱、2 mL/min 及 45℃), 在分析与半制备型高速逆流色谱仪上, 从千层塔植物提取物中分离制备获得了石杉碱甲单体。工艺的分离周期较短, 产品纯度高, 分离量较大, 而且经实验验证工艺的稳定性较高。

参考文献

- [1] Ito Y. Efficient preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge [J]. J Chromatogr, 1981, 161:170.
- [2] 袁黎明, 傅若农, 张天佑. 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用 [J]. 药物分析杂志, 1998, 18(1): 60-64.
- [3] 张天佑. 逆流色谱技术. 北京: 北京科学技术出版社, 1991.
- [4] Ashani Y, Peggins JO, Doctor BP. Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A [J]. Bio Chem Bio Phys Res Comm, 1992, 184(2): 719-726.
- [5] Saxena A, Qian-N, Kovach-I-M, Kozikowski-A-P, *et al.* Identification of amino acid residues involved in the binding of Huperzine A to cholinesterases [J]. Protein Sci, 1994, 3(10): 1770-1778.
- [6] 孙远明, 余红英, 杨跃生, 等. HPLC 法测定蛇足石杉中石杉碱甲含量 [J]. 中草药, 2002, 33(12): 1078-1080.
- [7] 袁珊琴, 冯锐, 顾国明. 蛇足石杉生物碱成分的研究 (II) [J]. 中草药, 1994, 25(9): 453-454.
- [8] Liu JS, Zhu YL, Chao MY, *et al.* The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity [J]. Can J Chem, 1986, 64: 837-839.
- [9] 刘嘉森, 俞超美, 周有作, 等. 石杉碱甲和石杉碱乙的化学研究 [J]. 化学学报, 1986, 44: 1035-1040.
- [10] 沈生荣, 于海宁, 金超芳, 等. 石杉碱甲提取工艺研究 [J]. 浙江大学学报, 2002, 28(6): 591-595.
- [11] 张秀尧, 王惠康, 齐一萍. 蛇足草 (千层塔) 的化学成分研究 [J]. 中草药, 1990, 21(4): 2-4.
- [12] Campiani Giuseppe, Kozikowski Alan P, Wang SM. *et al.* Synthesis and anticholinesterase activity of huperzine A analogues containing phenol and catechol replacements for the pyridine ring [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1998, 8(11): 1413-1418.
- [13] Kaneko S, Nakajima AN, Shikano M. *et al.* Synthetic studies of huperzine A and its fluorinated analogues. 2. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel fluorinated huperzine A analogues [J]. Tetrahedron, 1998, 54(21): 5485-5506.