

中压制备色谱在天然产物分离纯化中的应用

林楠¹, 王尉^{1,2*}, 张经华^{1,2}, 高峡^{1,2}

- (1. 北京市理化分析测试中心, 有机材料检测技术与质量评价北京市重点实验室, 北京 100089;
2. 北京市科学技术研究院分析测试技术重点实验室, 北京 100089)

摘要: 中压制备色谱(medium pressure liquid chromatography, MPLC)是相对于常压色谱和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)而言, 其压力介于 0~200 psi 之间, 主要应用于天然产物化学、生物化学、药物化学、有机合成以及生命科学等领域产品的分离与纯化。MPLC 一般由计量泵、检测器、收集器和工作站组成。MPLC 最大特点是分离速度快、效率高, 可短时间内制备毫克到数十甚至百克的样品, 可应用于正相填料和反相填料。与常压柱色谱相比, 它具有分辨率高、分离速度快的优势和制备量大、时间短的特点。近年来, MPLC 已逐渐发展为一种备受欢迎的分离和纯化方法。本文主要介绍了 MPLC 的特点、与高速逆流色谱的比较以及反相 MPLC 在分离纯化中的应用等。

关键词: 中压制备色谱; 高速逆流色谱; 天然产物; 分离纯化

Applications of medium pressure liquid chromatography in separation and purification of natural products

LIN Nan¹, WANG Wei^{1,2*}, ZHANG Jing-Hua^{1,2}, GAO Xia^{1,2}

- (1. Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing Key Laboratory of Organic Materials Testing Technology & Quality Evaluation, Beijing 100089, China; 2. Beijing Academy of Science and Technology Key Laboratory of Analysis and Testing Technology, Beijing 100089, China)

ABSTRACT: Medium pressure liquid chromatography (MPLC) is relative to the atmospheric pressure chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC), and its pressure is between 0~200 psi, which is mainly applied for the separation and purification in the fields of natural product chemistry, biochemistry, pharmaceutical chemistry, organic synthesis and life science products, etc. MPLC generally consists of metering pump, detector, collector and workstation. The biggest characteristics of MPLC were high separation speed, high efficiency, and preparation of milligrams to dozens or even up to hundreds of grams of samples within a short time. It can be used both in the positive phase filler and the reverse packing. Compared with the normal pressure column chromatography, MPLC has the advantages of high resolution, fast separation and the characteristics of large amount of preparation and short time. In recent years, MPLC has gradually developed into a popular method for separation and purification. This paper mainly introduced the characteristics of MPLC, comparison with high-speed countercurrent chromatography and the application of reversed-phase MPLC in the separation and purification and so on.

KEY WORDS: medium pressure liquid chromatography; high-speed countercurrent chromatography; natural product; separation and purification

*通讯作者: 王尉, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为天然产物分离纯化。E-mail: wangwei_1217@126.com.

*Corresponding author: WANG Wei, Master, Research Associate, Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, 27 West 3rd ring North Road, Haidian District, Beijing 100089, China. E-mail:wangwei_1217@126.com.

1 中压制备色谱的概念与特点

中压制备色谱(medium pressure liquid chromatography, MPLC)是相对于常压色谱和高效液相色谱而言,其压力介于0~200 psi之间,主要应用于天然产物化学、生物化学、药物化学、有机合成以及生命科学等领域的产品分离与纯化。该系统是基于在同一推动力作用下,不同组分在固定相中的滞留时间有长有短(由于各组分性质结构不同,与固定相作用的强弱有差异),从而按不同次序从固定相流出,实现不同组分的分离。

MPLC一般由计量泵、检测器、收集器和工作站组成。泵为流动相提供推动力,并使流动相进行梯度实时可变的洗脱^[1]。MPLC的检测器一般配有紫外检测器和蒸发光散射检测器。收集器往往具有二维坐标定位功能,可以根据不同收集容器进行调节。工作站则是编辑制备方法、调节收集馏分、保存和读取实验记录、打印报告等的重要工具。MPLC的固定相有商品化的FLASH柱,包括反相C₁₈填料、硅胶填料和键合氨基填料,也可以手动装填色谱柱。

MPLC的最大特点是分离速度快、效率高,可短时间内制备毫克到数十甚至百克的样品。它不但可以应用于正相填料也可以应用于反相填料。与常压柱色谱相比,具有分辨率高、分离速度快的优势,与高效制备液相相比,具有制备量大、时间短的特点。同时,可以自主填充分离柱的填料,增加分离选择性,节约生产成本,在天然产物分离纯化研究工作中发挥重要的作用,近几年来已逐渐发展为一种备受欢迎的分离和纯化方法^[2]。

2 MPLC与高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)的比较应用

本课题组在天然产物分离纯化方面进行了大量研究工作,如采用MPLC法分离蛇床子素、花椒毒酚、亚麻木酚素等,同时也对比了不同上样量和不同制备型仪器的分离结果。

林楠等^[3]采用90%乙醇对粉碎过的中药蛇床子进行3次超声提取,将得到的粗提物干燥,以此为研究对象直接进行MPLC分离纯化,实验采用12 g和120 g的博纳艾杰尔ODS FLASH柱,分别考察了20 mg和600 mg 2种不同上样量下蛇床子提取物的分离纯化效果。结果表明,20 mg上样量所制得的花椒毒酚和蛇床子素的HPLC纯度分别为98.9%和99.3%,回收率分别为52.2%和56.8%;600 mg上样量所制得的上述物质HPLC纯度分别为97.5%和96.8%,回收率分别为60.4%和61.6%。

林楠等^[4]对比了高速逆流色谱和MPLC对亚麻木酚素的分离情况,分离条件见表1,分离结果见表2。

研究发现,HSCCC具有节约溶剂、绿色环保的优点。同时,由于其液-液分离的方式回收率远高于传统的固-液分离。但是仪器的上样量非常有限,更适合实验室研究过程。然而MPLC具有分离速度快、操作简便的特点。同时,由于FLASH柱规格较多,可以进行一次性10 mg~1.5 g不等的上样量,也可购买玻璃柱管装填规格更大的中压色谱柱,实现至少10 g的上样量,自动化程度较高,有利于亚麻木酚素的大规模生产。

3 反相MPLC在分离纯化中的应用

周显凤等^[5]通过RP-18中压柱层析对从红树林内生真菌拟茎点霉A-1-2-3诱变后突变株GI-1固体发酵提取物中的去乙酰真菌环氧酯进行了纯化精制,对RP-18柱层析纯化去乙酰真菌环氧酯的操作条件进行了考察,使去乙酰真菌环氧酯的含量从28%左右提高到81.5%左右,回收率大于90%。

李大伟等^[6]采用高聚物反相色谱柱PDVB(49 mm×460 mm, 30 μm)的MPLC系统对酯型儿茶素(epigallocatechin gallate, EGCG)进行分离纯化,优化并放大了色谱分离参数,确定最佳流动相为30%乙醇溶液(pH 4.0),流速为50 mL/min等度洗脱,检测波长为278 nm,进样量不超过6.4 g时,回收率在77.5%以上,纯度可达90.99%。采用中心切割的方式收集,获得的产品纯度可达97%以上。

表1 HSCCC和MPLC分离条件
Table 1 Separation conditions of HSCCC and MPLC

参数	HSCCC	MPLC
仪器	上海同田生物技术有限公司 TBE-300	天津博纳艾杰尔公司 CHEETA200
色谱柱	聚四氟乙烯螺旋管 280 mL	ODS FLASH 120 g
流动相	叔丁基甲醚-正丁醇-乙腈-水(1:3:1:5, V:V:V:V)等度洗脱	0~40 min, 甲醇:水=10:90~30:70(V:V); 40~65 min 甲醇:水=30:70~40:60(V:V)
流速	1.2 mL/min	60 mL/min
检测波长	254 nm	254 nm

表 2 HSCCC 和 MPLC 分离参数对比
Table 2 Comparison of separation parameters of HSCCC and MPLC

	高速逆流色谱	MPLC
上样量(mg)	200	200
溶剂消耗(L)	0.7(有机溶剂 0.35)	3(有机溶剂 0.69)
分离时间(min)	240	50
样品纯度(%)	95.4	97.8
回收率(%)	85	57

陈家骄等^[7]采用二元中压制备液相色谱系统,以装有反相 C₁₈ 分离填料的两端具有锥形不锈钢接口的耐压玻璃柱制备色谱柱,流动相为甲醇/含 0.05 冰醋酸的水溶液,检测波长为 254 nm,从抱茎苦苣菜(苦碟子)总黄酮中快速高效地分离得到木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(L7GU)单体。所得单体经紫外光谱(ultraviolet spectrum, UV)、红外光谱(infrared spectroscopy, IR)、飞行时间质谱(time-of-flight mass spectrometry, TOF-MS)、核磁共振氢谱(¹H-nuclear magnetic resonance, ¹H NMR)、核磁共振碳谱¹³C NMR 方法进行了结构确证。经硅胶和聚酰胺薄层色谱检查,单体在 365 nm 紫外灯下均呈单一的黄绿色荧光斑点;HPLC-UV 分析表明,在 210、254、290、348 nm 4 个波长下,采用色谱峰面积归一化方法计算产品纯度均在 98%以上。该分离结果的产品可以直接作为对照品,用于苦碟子药材及制剂的质量控制。

叶茂英等^[8]以大豆异黄酮初提物为原料,采用 HPLC 法确定目标成分和分离条件,使用中压制备系统在 ODS C₁₈ 色谱柱,流动相甲醇-水(含体积分数为 0.4%的磷酸),流速 40 mL/min,梯度洗脱,检测波长 260 nm 条件下,分离制备得到黄豆苷、黄豆黄苷和染料木苷 3 种大豆异黄酮糖苷,并采用 HPLC 法鉴定其纯度分别为 99.69%、98.62% 和 96.26%,再以质谱分析法从化学结构角度对 3 种大豆异黄酮糖苷进行了鉴定。

李婷等^[9]首次采用反相 MPLC 从芦荟中一次分离制得芦荟苷 A、B 以及异芦荟色苷 D。以库拉索芦荟丙酮粗提物为原料,采用 MPLC 系统,色谱柱为 SCO 色谱柱(40 cm×26 cm, 30~50 μm),流动相为甲醇-0.5%乙酸水(33:67, V:V)进行等度洗脱,流速为 20 mL/min,柱温为室温,在检测波长 254 nm、收集波长 356 nm 下对芦荟样品进行分离制备,得到 3 种化合物单体。经 HPLC、UV、IR、MS 及 NMR 等方法分析表明,所得到的 3 种化合物分别是异芦荟色苷 D、芦荟苷 A 和芦荟苷 B,其纯度分别达到了 98.0%、96.0%和 98.9%。

4 其他填料中压制备液相的应用

李雪莹等^[10]采用水提取和大孔吸附树脂柱色谱得到

粗提物,以此粗提物直接进行反相 MPLC 分离,得到纯度较高的红花黄色素,经测定红花黄色素含量为 75.14%,该方法省时、简便、高效,值得推广应用。

倪付勇等^[11]利用 HPD200A 大孔树脂对金银花水提液中的新绿原酸富集,经反相中低压制备色谱分离,以乙睛-0.5%甲酸溶液(10:90, V:V)为流动相,流速为 20 mL/min,检测波长为 326 nm,分离纯化制备金银花中新绿原酸纯度达 98.86%,回收率为 89.1%。

苗抗立等^[12]用硅胶柱层及硅胶 RP-18 反相中压柱层析分离得到 7 个生物碱,经理化常数和光谱分析鉴定了它们的化学结构,分别为雷公藤吉碱、雷公藤次碱、雷公藤春碱、雷公藤碱、雷公藤定碱、1-去乙酰基雷公藤定碱和呋喃南蛇碱。

韩庆宏等^[13]采用中压液相色谱通过 Pharmacia DEAE-sepharose 柱分离,先以 1 mol/L NaCl 溶液活化后,再以 0.0025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液和 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液进行 2 次不同的梯度洗脱,并用 G-25 柱脱盐,从牛血红细胞分离纯化超氧化物歧化酶,具有简单、快速、上样量大,产品纯度高和活性高等优点,活性高达 12500 U/mg。

刘建福等^[14]应用 KTA explorer 100 型中压液相色谱快速纯化工艺,系统分离纯化了脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)的 β-D-半乳糖苷酶。*K. fragilis* 发酵生产的菌体细胞经过破碎、离心后的上清液中含有 *K. fragilis* β-D-半乳糖苷酶。粗酶经过 AKTA explorer 100 中压液相色谱的 HiprepR16/10 Source 30Q 强阴离子交换柱和 Hioad26/60 Superdex 凝胶过滤色谱连续两步纯化,酶的回收率为 27%,纯化倍数为 42。纯化的 *K. fragilis* β-D-半乳糖苷酶在垂直板十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,呈现一条染色谱带,表明纯化的酶具有较高的纯度。

5 小结

MPLC 上样量大,分离速度快,10~30 min 便可完成一次几百毫克至几十克样品的上样,而样品制备方法一般可直接从 HPLC 方法中优化得到,分离纯化后样品的纯度一般在 60%以上,甚至能够达到对照品的纯度,适合于实验室级别的中试生产,或为进一步分离纯化制备标准品、对照品做前体样品。目前 MPLC 应用越来越广泛,已经成为实验室常用的分离纯化手段。

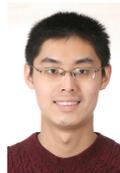
参考文献

- [1] 陈玉生,郭晓,傅亚琴,等. MPLC 技术在中药和天然产物提取中的应用[C]. 杭州: 全国中药注射剂安全性及产业发展交流研讨会, 2009: 91-92.
Chen YS, Guo X, Fu YQ, et al. Medium pressure preparative chromatography technology in the application of traditional Chinese medicine and natural products extraction [C]. Hangzhou: The National Chinese Medicine Injection and Safety Seminar on Development of

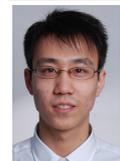
- Communication Industry, 2009: 91-92.
- [2] 林琰, 杜磊, 罗万春, 等. 几种常用分离提取设备的分离提取技术[J]. 实验科学与技术, 2010, 8(3): 4-6.
Lin L, Du L, Luo WC, *et al.* Separation and extraction technology of several commonly used equipments [J]. Exp Sci Technol, 2010, 8(3): 4-6.
- [3] 林楠, 王尉, 王覃, 等. MPLC 法分离纯化花椒毒酚和蛇床子素[J]. 现代科学仪器, 2014, 10(5): 142-146.
Lin N, Wang W, Wang T, *et al.* Purifying xanthotoxin and osthole by medium pressure liquid chromatography [J]. Mod Sci Instrum, 2014, 10(5): 142-146.
- [4] 林楠, 王尉, 周晓晶, 等. 高速逆流色谱与 MPLC 技术在亚麻木酚素分离纯化中的应用[C]. 威海: 第十届全国生物医药色谱及相关技术学术交流会议论文集, 2014: 201-202.
Lin N, Wang W, Zhou XJ, *et al.* High-speed counter-current chromatography with medium pressure preparative chromatography technology application in the numbness lignans purification [C]. Weihai: The Tenth National Biomedical Chromatography and Related Technology Proceedings of Academic Exchange, 2014: 201-202.
- [5] 周显凤, 张伟, 黄耀坚, 等. 反相柱层析制备去乙酰真菌环氧乙酯[J]. 厦门大学学报, 2009, 48(6): 871-874.
Zhou XF, Zhang W, Huang YJ, *et al.* Preparation of deacetylmycoepoxydiene with reversed phase chromatography [J]. J Xiamen Univ, 2009, 48(6): 871-874.
- [6] 李大伟, 朱跃进, 张海华, 等. 高聚物反相 MPLC 在儿茶素单体分离纯化中的应用[C]. 贵州: 第十五届中国科协年会论文集, 2014.
Li DW, Zhu YJ, Zhang HH, *et al.* The application of reversed-phase polymer medium-pressure preparation chromatography in the separation and purification of catechins [C]. Guizhou: Proceedings of the 15th Annual Meeting of China Association for Science and Technology, 2014.
- [7] 陈家骄, 王凤玉, 田旭辉, 等. 中压液相色谱法快速制备木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷单体及鉴别[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(5): 695-698.
Chen JJ, Wang FY, Tian XH, *et al.* Preparation and identification of luteolin-7-O- β -D-glucuronide by preparative medium pressure liquid chromatograph [J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26(5): 695-698.
- [8] 叶茂颖, 刘江. 中压制备系统分离制备大豆异黄酮糖苷[J]. 粮食科技与经济, 2009, 34(4): 43-45.
Ye MY, Liu J. Medium voltage separation preparation of soybean isoflavone indican preparation system [J]. Food Sci Technol Econ, 2009, 34(4): 43-45.
- [9] 李婷, 钟英, 王芝, 等. 芦荟苷 A、B 以及异芦荟苷 D 的同时分离纯化[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(5): 878-881, 945.
Li T, Zhong Y, Wang Z, *et al.* Isolation and purification simultaneous of aloins A and B and isoaloeresin D [J]. Nat Prod Res Dev 2011, 23(5): 878-881, 945.
- [10] 李雪莹, 吴永刚. 中压色谱快速制备红花中红花黄色素的含量测定[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(15): 8477-8479.
Li XY, Wu YG. Preparative separation of safflower yellow from *Flos carthami* by medium pressure column chromatography [J]. J Anhui Agric Sci, 2012, 40(15): 8477-8479.
- [11] 倪付勇, 宋亚玲, 刘露, 等. 中低压制备色谱制备新绿原酸对照品的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(9): 1818-1821.
Ni FY, Song YL, Liu L, *et al.* Preparation of neochlorogenic acid reference substances by medium-low-pressure preparative chromatography [J]. World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2015, 17(9): 1818-1821.
- [12] 苗抗立, 徐雪华, 汪红. 雷公藤生物碱的研究[J]. 中国现代应用药学, 2002, (s1): 9-12.
Miao KL, Xu XH, Wang H. Study of *Tripterygium wilfordii* alkaloid [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2002, (s1): 9-12.
- [13] 韩庆宏, 汪振珊, 徐晓莹, 等. 中压液相色谱纯化牛血红细胞超氧化物歧化酶[J]. 色谱, 1994, 12(1): 67-69.
Han QH, Wang ZS, Xu XY, *et al.* Purification of superoxide dismutase from bovine blood by medium pressure liquid chromatography(MPLC) [J]. Chin J Chromatogr, 1994, 12(1): 67-69.
- [14] 刘建福, 李素芬, 陈占洲, 等. 中压液相色谱快速分离纯化 *Kluyveromyces fragilis* β -D-半乳糖苷酶[J]. 食品与生物技术学报, 2007, (26)1: 116-119.
Liu JF, Li SF, Chen ZZ, *et al.* Purification of *Kluyveromyces fragilis* β -Galactosidase by medium-pressure liquid chromatography [J]. J Food Sci Biotechnol, 2007, (26)1: 116-119.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



林楠, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为色谱分析与天然产物分离纯化。
E-mail: lin.nan2008@163.com



王尉, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为天然产物分离纯化。
E-mail: wangwei_1217@126.com