

# 正相干柱和反相柱色谱组合快速分离 纯化长春瑞滨技术研究

赵春芳, 吴泽强, 余龙江, 李 硕, 熊 茵

(华中科技大学生命科学与技术学院, 资源生物学与生物技术研究所, 武汉 430074)

**摘要:**采用正相干柱硅胶色谱与反相聚苯乙烯(MCI-GEL CHP-20)柱色谱相结合的方法,将化学半合成抗癌药物长春瑞滨粗产物进行快速分离纯化。结果显示绝大部分粗原料中长春碱衍生物、反应中间产物、以及产物伴生杂质可快速与长春瑞滨分离,产物纯度达 98% 以上。该法具有快速、节省溶剂、分离效果好、回收率高等优点。

**关键词:**长春瑞滨;正相干柱色谱;反相色谱;分离纯化

中图分类号:TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2007)05-0042-03

## Study on separation and purification of vinorelbine in tandem using normal dry-column flash and reversed-phase chromatography

ZHAO Chun-fang, WU Ze-qiang, YU Long-jiang, LI Shuo, XIONG Yin

(School of Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** The normal dry-column flash and MCI-GEL CHP-20 reversed-phase chromatography was used to quickly separate and purify vinorelbine, an anticancer drug semi-synthesized by the chemical reaction. Results indicated that most ramification of vinca alkaloid in source material, intermediates created during the process of chemosynthesis and accompanying impurities can be separated from vinorelbine quickly, the purity of end product can be up to 98%. This method of separation has high efficiency with quick speed, low solvent cost, and high recovery.

**Key words:** vinorelbine; reversed-phase chromatography; dry-column flash chromatography; separation and purification

长春瑞滨(Vinorelbine, VRL)又名去甲长春碱、异长春碱、失碳长春碱或去甲基脱水长春碱等,1989年由法国皮尔法伯(Pierre Fabre)公司首先生产上市。长春瑞滨作为一种化学半合成的长春花类生物碱抗肿瘤药物,具有抗癌活性高、抗癌谱广、毒副作用小等特点,目前临床上已用单药或联合用药治疗非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、恶性淋巴瘤等<sup>[1]</sup>。合成长春瑞滨所用的原料主要是天然提取的长春碱,由于其中含有很多结构类似的生物碱,加之从长春碱到长春瑞滨至少需要经过 3 步复杂的有机反应,过程中往往伴生出许多新的杂质,因此分离纯化工作一直是规模化生产长春瑞滨原料药的难点之一。目前国内外报道的纯化制备长春瑞滨的方法<sup>[2-5]</sup>主要是通过反复多次过硅胶柱或氧化铝柱,再结合重结晶技术获得原料药,但是这些方法在实践中也存在一些问题。一是需要多次过柱才能达到较好的纯化目的;二是硅胶或氧化铝的吸附能力较

强,目标产物易发生不可逆吸附,因而收率较低;三是反复多次过柱耗时、耗费大量有机溶剂,引起环境污染。另外填装好的硅胶柱一般很难重复使用,反复填柱不仅增加了工人的劳动强度,原材料成本也相应提高。

利用反相聚苯乙烯填料 MCI-GEL CHP-20 对中草药有效成分进行分离纯化显示了良好的应用潜力<sup>[6]</sup>。在前期实验中笔者发现该类填料能将多个结构相似的长春花类生物碱很好的分离,但由于该类高效能的商品化填料目前价格较贵,且需要消耗大量色谱纯的有机流动相,运行成本较高。如果直接使用反应后的粗提物,易造成填料变性、失效。所以在利用 MCI-GEL CHP-20 填料精制长春瑞滨之前,有必要对合成的长春瑞滨粗品进行初分离。实验中采用正相快速干柱硅胶与反相聚苯乙烯柱组合,分离纯化长春瑞滨,为研究开发出一种高效、实用的分离纯化长春瑞滨新技术提供依据。

收稿日期:2007-01-20

作者简介:赵春芳(1964-),女,博士,副教授,主要从事天然药物活性成分的分析、分离新技术及方法研究,027-87792264-807, zhaocf2006@

126.com。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Waters 2695 高压液相色谱仪,美国 Waters 公司;紫外投射反射分析仪,北京新技术应用研究所。薄层色谱硅胶 GF254,青岛海洋化工有限公司;MCI-GEL CHP-20P 填料,日本三菱公司。

磷酸、正己烷、氯仿、二氯甲烷、无水甲醇、乙酸,分析纯,上海振兴化工一厂;二乙胺,分析纯,天津市大茂化学试剂厂。

### 1.2 长春瑞滨粗品的获得

以硫酸长春碱为原料,在威尔斯迈尔试剂作用下,经过脱水反应得到脱水长春碱,再将脱水长春碱进行溴代反应,然后缩环得到含长春瑞滨的反应液<sup>[2-3,7]</sup>,减压蒸去有机溶剂,得到长春瑞滨粗品。

### 1.3 干柱柱色谱展开剂的选择及分离过程

选择展开剂系统:二氯甲烷、甲醇、正己烷、水(少许二乙胺或者乙酸调节 pH)。调节各组分中的浓度,并在薄层色谱硅胶薄板(TLC)上对合成的瑞滨反应液进行展开实验,紫外显色,选择出具有最佳展开效果的溶剂体系。

正相干柱柱色谱分离<sup>[8-9]</sup>:取适量硅胶 GF<sub>254</sub>粉末,活度保持在 II ~ III 级。常压、干法装入  $\Phi$  1.5 cm 的柱状 PVC 塑料膜中,制成 1.5 cm × 15 cm 的干柱。称取 90 mg 长春瑞滨粗品,用 0.5 mL 甲醇溶解,加入干柱的顶端,在常压条件下,采用选择好的溶剂体系自上而下进行展层,直到溶剂展至柱底,停止展层。将展好的硅胶干柱均分成 4 段刮出,然后氯仿浸泡振荡,砂芯漏斗抽滤,减压浓缩,TLC 与高压液相(HPLC)跟踪检测,与标样对照品对比,合并含长春瑞滨的部分,得到中度分离的长春瑞滨。

### 1.4 反相 MCI-GEL CHP-20 柱色谱分离过程

反相柱色谱是本工艺的关键步骤。采用内径 1.0 cm 的自制层析柱,操作过程如下:MCI-GEL CHP-20P 用甲醇充分浸泡,脱气后,用湿法装柱。每克经干柱纯化过的瑞滨粗品,用 10 mL 洗脱剂溶解后上柱,再用不同比例的洗脱剂(主要是指甲醇、乙腈、水的组成和成分的比例)进行洗脱,用蠕动泵输送洗脱剂,流速约为 0.2 mL/min,分部收集器分段收集流出液,用 TLC 定性,合并含长春瑞滨的部分,减压浓缩至干,称量后用甲醇溶解,经 HPLC 定量分析<sup>[10]</sup>。

流动相的选择及优化:床层高度 15 cm(床层体积 11.8 mL),填料负载量 10 mg/g,采用不同的洗脱

剂(主要是指甲醇、乙腈、水的组成和成分的比例)进行洗脱,得到流动相组成对柱色谱分离过程的影响。

负载量的优化:在床层高度 15 cm(床层体积 11.8 mL)、不同负载量情况下,采用  $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=80:20$  洗脱剂进行洗脱,得到负载量组成对柱色谱分离过程的影响。

### 1.5 长春瑞滨的结构确认以及含量检测

采用红外(IR)、核磁共振(NMR)确认样品的结构。长春瑞滨的含量参照文献<sup>[11-12]</sup>用高效液相色谱测定。HPLC 检测条件:色谱柱为 C<sub>18</sub>柱( $\Phi$  4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m, Amersham Biosciences),柱温为 28℃,流动相  $V(\text{二乙胺}):V(\text{水}):V(\text{甲醇}):V(\text{乙腈})=3:165:280:152$ (磷酸调 pH 至 6.8),流速 1 mL/min,检测波长 267 nm,进样量 10  $\mu$ L。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 干柱柱色谱展开剂的选择及柱分离结果

在硅胶 GF<sub>254</sub>的薄层实验中,发现 4 个溶剂系统能使长春瑞滨的  $R_f$  值在 0.3 ~ 0.8 之间,它们分别是:① 纯甲醇;②  $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷})=95:5$ ;③  $V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷})=95:5$ ;④  $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷}):V(\text{水})=49:49:2$ 。长春瑞滨粗品在上述 4 个展开体系中的 TLC 结果如表 1 所示。综合比较后选取  $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷})=95:5$  体系作为干柱色谱的展开剂。

表 1 瑞滨粗品在 4 个不同展开体系中的 TLC 结果

不同体系	①	②	③	④
$R_{f_1}$	0.74	0.38	0.32	0.51
$R_{f_2}$	0.83	0.69	0.57	0.77
分离效果	稍许拖尾	较好	样品点未完全展开	拖尾

注: $R_{f_1}$ 为长春瑞滨, $R_{f_2}$ 为主要杂质点。

以体系②为展开剂,对合成后的粗品进行干柱硅胶分离,将干柱硅胶从上到下均分为 4 段,用氯仿充分萃取后,用 HPLC 法定量检测每段长春瑞滨的含量。结果显示,长春瑞滨几乎全部分布在干柱的第 2 和第 3 段硅胶里面,杂质主要分布在第 1 和第 4 段硅胶里面。第 2 段和第 3 段纯度大于 71.4% 和 78.3%,与分离前的纯度(34.7%)相比,长春瑞滨纯度明显提高。合并第 2、第 3 段蒸干后的残留物,称量,计算得干柱色谱回收率为 65.9%。

### 2.2 反相 MCI-GEL CHP-20 柱色谱

#### 2.2.1 流动相的选择及优化

使用 MCI-GEL CHP-20 填料对长春瑞滨粗品

进行预实验表明,甲醇/水体系可作为良好的洗脱剂体系,进一步对该体系进行优化。表 2 显示,随着流动相中甲醇含量的增加,产品纯度和洗脱体积显著下降,产品回收率略有增加。当  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 80:20$  时,既能保证一次性过柱产品纯度大于 96.0%,又能达到使用较少洗脱液的目的(约为 4.2 个床层体积)。

表 2 流动相组成对柱层析分离过程的影响

$V(\text{甲醇}):V(\text{水})$	95:5	90:10	80:20	70:30
纯度/%	91.6	93.7	96.2	98.3
回收率/%	98.6	97.5	97.0	96.3
洗脱体积/mL	27	38	49	88

### 2.2.2 反相 MCI-GEL CHP-20 柱色谱负载量的优化

从表 3 可见,随着进料量的增加,产品纯度下降,而回收率差异不大,且都很高。如果要求通过一次柱层析达到纯度 96.0% 以上的产品,不能有很高的负载量(指每克填料负载的样品质量),合适的负载量为 10 mg/g。

表 3 负载量对柱层析分离过程的影响

负载量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	5	10	20	30
纯度/%	98.1	96.4	93.4	91.5
回收率/%	98.1	97.6	97.8	98.5

### 2.3 长春瑞滨的进一步纯化以及结构确认

HPLC 分析结果显示,经 MCI-GEL CHP-20P 柱纯化后长春瑞滨的含量达到 96%。再经过  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 90:10$  溶剂体系缓慢结晶,晶体过滤、洗涤,HPLC 分析结果表明了纯度达 98% 以上,其 IR、NMR、MS 谱数据与进口标准样品一致。

## 3 讨论

在探寻硅胶 TLC 展开剂条件时,笔者观察到,使用脱水和未经脱水处理的甲醇,获得的长春瑞滨与主要杂质斑点的  $R_f$  比值(含一定水分)并不相同,后者比前者对长春瑞滨的洗脱能力更强,说明微量的水分存在下有利于长春瑞滨与杂质的分离。相应地,当干柱分离粗样品时,使用未经活化处理的硅胶比经 105℃ 活化处理 1 h 的硅胶对长春瑞滨与杂质的分离效果稍好(结果未列出)。另外,不论是硅胶色谱还是在 MCI-GEL CHP-20 柱或者  $C_{18}$  柱(HPLC 分离)上,长春瑞滨的保留值都较其他物质大。这些都提示,对长春瑞滨和其结构类似的伴生杂质分离,

更适合利用“反相分离”模式。

以硫酸长春碱为原料,经过脱水、溴代、缩环等步骤得长春瑞滨的反应过程中,长春碱双吡啶环上面的活性基团容易发生氧化水解等反应,主要生成以下几种长春碱衍生物杂质<sup>[13]</sup>:一是长春碱双吡啶环上面的 3 个甲酯键极易发生水解,生成如 4-O-deacetylvinorelbine(相对分子质量为 737)等去乙酰基长春瑞滨;二是 6' 位的 N 原子发生氧化,生成氮氧化合物 vinorelbine 6'-oxide(6'-氧化长春瑞滨,相对分子质量为 795);三是 20' 位的 C 原子发生氧化,形成 20'-hydroxyvinorelbine(20'-羟基长春瑞滨,相对分子质量为 795)。这几种杂质结构与长春瑞滨极其相似,分子质量相近,所以用一般的填料很难将这些杂质与长春瑞滨高效率分离。另一方面,由于吡啶环上的酯键被水解为羟基,氮原子上形成了新的 N—O 键,这些杂质的极性都略大于长春瑞滨。从理论上讲,采用聚苯乙烯系列反相色谱系统,应该能得到较好的分离效果,本实验良好的分离结果证实了这一推测。

干柱柱色谱能省时省工,节约溶剂,利用它先将有机合成中的大部分极性较大的杂质除去,可以降低后续分离对精细填料的损害,从而降低分离成本。在目前实际工业生产中,已经发明了一种组合式色谱干柱装置<sup>[14]</sup>,解决了目前色谱干柱存在的吸附剂取出不便等问题,而且展开剂流速更快,所以干柱柱色谱有着广泛的产业化应用前景;再利用 MCI-GEL CHP-20 填料对难分离的长春瑞滨结构类似物分离,实验显示良好的纯化效果,该反相填料能反复利用,所需设备简单,正、反相两步色谱相结合,大大缩短了操作时间,也提高了产品回收率。

此方法也适用于其他长春花类生物碱的纯化精制工艺的研究,比如从天然植物中分离制备长春花类生物碱单体等。

## 参考文献

- [1] 潘启超. 长春碱类的新进展: 失碳长春碱[J]. 癌症, 1996, 15(3): 228-231.
- [2] 浙江海正药业股份有限公司. 合成长春瑞滨的方法: 中国, 1552716A[P]. 2004-12-08.
- [3] Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR). Process for the synthesis of vinblastine and leurosidine: US, 4305875 [P]. 1981-12-15.
- [4] Board of Regents, the University of Texas System. Synthesis of navelbine analogs: US, 5220016 [P]. 1993-06-15.

(下转第 46 页)

池,采用好氧培养,周期为 24 h,曝气量为 2 L/min。每个周期运行方式为:瞬时进水 + 好氧曝气 + 沉淀 + 瞬时出水。进水采用自配水,主要成分质量浓度(mg/L)为:乙酸钠 1 092, KCl 234,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  150,  $NH_4Cl$  194,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  306,  $CaCl_2$  54,  $FeCl_3 \cdot 3H_2O$  9.8, 蛋白胨 334, 酵母膏 124。

每周周期沉淀 30 min 后排出 3 L 上清液。培养驯化 10 天后,污泥性状稳定,外观由黑色逐渐转变为浅褐色,沉降性能良好,污泥体积指数(SVI)值为 105 mL/g 左右, COD 去除率为 90% 左右,可以认为该系统活性污泥基本培养驯化成熟,初步达到稳定运行的要求。驯化成熟后的活性污泥每周期的菌体生长量趋于稳定,污泥质量浓度由 2.0 g/L 上升至 2.4 g/L 左右,每周周期在好氧结束后排出 1 L 左右的活性污泥混合液,以控制反应器内污泥质量浓度为 2.0 g/L,维持污泥龄为 5d。取每周周期好氧结束后排出的剩余污泥进行下一步的烧杯实验。

## 1.2 分析测试方法

**污泥浓度(MLSS):**采用细胞干重法。取反应器内混合液 8 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 水洗, 收集菌体在 105℃ 下烘干至恒重, 称重。

**PHB 的含量:**采用紫外分光光度法<sup>[15]</sup>。取一定量的污泥,加入 3 mL 次氯酸钠溶液破坏细胞结构,再加入 10 mL 氯仿抽提细胞内含物。混合液在 60℃ 水浴摇床中, 150 r/min 萃取 90 min。萃取后分层,分离出含有 PHB 的氯仿层。测定时吸取一定量的氯仿(PHB 的含量为 5~50 μg),加热除去氯仿,加入 10 mL 浓硫酸, 100℃ 水浴加热 10 min, 冷至室温并混匀,在 235 nm 处测定吸光度,再根据工作曲线确定 PHB 的含量。

**COD 浓度:**重铬酸钾法<sup>[16]</sup>。

**溶解氧(DO)浓度:**采用上海雷磁仪器厂的

SJG-203A 数字溶氧分析仪进行溶解氧的测定。

**PHB 的提取:**将累积了 PHB 的活性污泥, 4 000 r/min 离心, 收集菌体, 加入次氯酸钠-氯仿溶液<sup>[17]</sup>, 在 60℃ 水浴摇床中, 150 r/min 萃取 90 min。萃取后分层, 分离出含有 PHB 的氯仿层。减压浓缩, 回收大部分的氯仿。浓缩液用 5 倍冷乙醇析出沉淀, 离心, 丙酮洗, 水洗, 60℃ 真空干燥 12 h, 即得 PHB 产品。

**PHB 结构分析:**采用德国 Bruker 公司 DRX-400 型核磁共振仪进行结构表征, 以氘代氯仿为溶剂, 四甲基硅烷(TMS)为内标, 测得标准品(Sigma 公司产品)和所提取的样品 PHB 的核磁共振的氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)及碳谱(<sup>13</sup>C-NMR)谱图。测得产物的 <sup>1</sup>H-NMR 谱图, 与标准品 <sup>1</sup>H-NMR 谱图的峰型和出峰位置一致, 也与林东恩等<sup>[12]</sup>的报道基本一致; 而 <sup>13</sup>C-NMR 谱图与标准品 <sup>13</sup>C-NMR 谱图和许旭萍等<sup>[18]</sup>所报道的的峰型和出峰位置一致。

## 1.3 PHB 的累积实验

### 1.3.1 考察好氧情况下不同营养条件的影响

取好氧结束后的活性污泥混合液 1 L 于烧杯中, 分别考察在营养平衡、缺氮、缺磷及缺氮缺磷条件下 COD 的去除和 PHB 的累积情况, 同时设置空白对照实验。连续曝气并保持曝气量为 2 L/min, 定时取样测量 MLSS、COD、PHB 浓度或含量。培养系统中不同营养成分及其含量如表 1 所示。

表 1 营养成分

系统	mg/L				
	空白	C	CN	CP	CNP
乙酸钠	0	1500	1500	1500	1500
$NH_4Cl$	0	0	153	0	153
$K_2HPO_4$	0	0	0	59	59

注: CNP 为营养平衡, CN 为缺磷, CP 为缺氮, C 为缺氮缺磷; 其中各种营养物的组成按 C、N、P 质量比 100:5:1 来添加。

(上接第 44 页)

- [5] Jones S F, 许爱英, 李凤龙. 一种新型的治疗非小细胞性肺癌的抗肿瘤药长春瑞宾[J]. 国外医学: 药学分册, 1997, 24(2): 82-84.
- [6] 吕洁丽, 杨中汉, 袁珂. 新型凝胶树脂及大孔吸附树脂在中草药成分分离纯化中的应用[J]. 中草药, 2005, 28(3): 239-242.
- [7] Potier P. Synthesis of the antitumor dimeric indole alkaloids from *Catharanthus* species[J]. *Journal of Natural Products*, 1980, 43(1): 72-87.
- [8] 王慧春, 张成总. 干柱色谱法分离大黄酚和大黄素甲醚[J]. 青岛大学学报, 2006, 24(1): 60-61.
- [9] 秦箐. 快速低压干柱色谱技术的改进及其在刺苋分离提纯中的应用[J]. 蛇志, 2000, 12(2): 76-77.

- [10] 袁珂, 吕洁丽, 殷明文. 海南含羞草中黄酮碳苷类化学成分的研究[J]. 药学学报, 2006, 41(5): 435-438.
- [11] 罗猛, 付玉杰, 祖元刚, 等. 反相高效液相色谱法快速测定长春花中 4 种生物碱[J]. 分析化学, 2005, 33(1): 87-89.
- [12] 朱丽, 徐为公, 赵广荣. 注射用重酒石酸长春瑞宾稳定性研究[J]. 中国药业, 2006, 15(10): 9-10.
- [13] Van Heugen J C, De Graeve J, Zorza G, et al. New sensitive liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometric detection for the clinical analysis of vinorelbine and its metabolites in blood, plasma, urine and faeces[J]. *Journal of Chromatography*, 2001, 926(A): 11-20.
- [14] 中国科学院大连化学物理研究所. 一种组合式色谱干柱: 中国, 1552500[P]. 2004-12-08. ■