

· 综述 ·

中药小分子物质非线性分离原理与实验研究

王曼莹, 饶 华

(江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022)

摘 要:概述了非线性色谱理论(NLCT)在中药小分子有机化合物分离纯化中的应用。以本实验室进行的杜仲叶黄酮类活性物质非线性分离实验研究为例,简要介绍了建立中药小分子物质非线性分离纯化系统的理论与方法。NLCT应用于中药小分子物质的规模化生产,可超量上样,最大限度利用色谱柱效应,获得理想的目的物纯品。这一理论与技术的应用,可突破线性放大的传统理念,加快实验室研究成果产业化进程,有利于中药制药现代化的实现。

关键词:非线性;分离;中药;小分子

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1098-04

Principle of nonlinear separation of low molecular substances in Chinese materia medica and their experimental studies

WANG Man-ying, RAO Hua

(Jiangxi Key Laboratory for Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources,

College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Key words: nonlinear; separation; Chinese materia medica; low molecule

中药药效物质的提取与规模化生产技术的更新是研制质量高、稳定性好的中成药的关键。色谱理论与技术是中药化学成分分析与生产所依据的理论基础与不可或缺的重要技术。非线性色谱理论(nonlinear chromatography theory, NLCT)是近 10 年来发展的关于制备型分离的理论与技术,是色谱理论与技术领域研究的前沿与热点^[1]。现有极少数应用于生物大分子蛋白质制备型分离纯化的报道^[2],而中药小分子物质非线性分离的理论与实验研究几乎是空白。“中药化学成分非线性分离基础研究”是本实验室获得的国家自然科学基金资助项目,有助于突破传统中药生产理念的束缚,创新中药现代化生产的模式与效率。

1 中药复杂体系中的基础问题

中药是一个非常复杂的系统,中药药效成分大都为次级代谢物,是结构、性质与功能各不相同的小分子有机化合物。如:黄酮类、萜类等化合物。

长期以来,中药药效成分实验研究成果转化为大规模生产过程中普遍存在的问题是:成本高、效率低,甚至屡屡失败。其关键问题在于忽视了非线性复杂系统科学原理与适应性研究。中药产业化一直是沿用实验室研究结果的机械放大法,而实验室研究沿用的是分析型色谱的线性分离理论与技术。这与规模化生产中客观存在的典型非线性复杂系统的真实状态相违背。因此,遵循中药规模化生产中非线性复杂系

统的客观规律,进行制备型分离的重要基础理论——NLCT的研究与应用,是改变中药生产现状,创新中药生产模式的一个关键。

当前,这一关系中药现代化的科学问题,已成为中医学、中药学与中西医结合理论研究的关注焦点之一。重视与加强非线性复杂适应系统科学原理及相关技术研究的指导性意见已正式增写入 2005 年度国家自然科学基金项目指南^[3]。应用 NLCT 探索中药小分子物质制备型分离与纯化的共性与特性,有利于中药制药技术的创新。在实际应用中可产生辐射效应,带来明显的经济效益与社会效益。

2 生物活性物质非线性色谱分离理论与技术的发展

以线性分离理论为基础的分析型色谱技术发展了近一个世纪,已成为化学分析与制药研究中一项十分重要的技术。随着现代生物技术的迅猛发展,天然药物市场的巨大潜力,使得以小分子有机化合物为主要药效物质的中药产业、以生物大分子为主的生物制品(如酶蛋白、干扰素、生长激素等)产业特别引人注目。

在制备型生产中,以线性分离为基础的色谱技术,不仅效率不高,而且往往达不到所需的纯度要求。因此,人们将研究的重点由分析型色谱转向了制备型色谱,在理论方面,从线性色谱理论(linear chromatography theory, LCT)发展到非线性色谱理论^[4]。近十几年来,制备型高效液相色谱

收稿日期:2006-12-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30260120)

作者简介:王曼莹(1944—),女,江西武宁人,教授,博士生导师,江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室主任,研究方向为中药生物工程——中药有效成分及天然活性物质分离、分析,重组表达与产业化研究。

Tel:(0791)8507365 E-mail:wmy8888@sohu.com

(preparative high performance liquid chromatography, PHPLC)已成为当代高效分离与纯化技术的前沿。归纳分析型色谱与制备型色谱的各项条件与要求,在应用目的、上样要求、流速、固相特性、载体负荷等多方面均有很大不同^[5,6],见表 1。线性分离与非线性分离的色谱行为也有显著差异,归纳起来有三大不同,见表 2。

表 1 分析型色谱与制备型色谱主要不同点

Table 1 Main differences between analytical chromatography and preparative chromatography

项目	分析型色谱	制备型色谱
应用目的	样品成分定性、定量	样品目的物纯化、生产
上样要求	上样量<0.5 mg,分批上样	上样量≥0.1 kg,分批或连续上样
液相流速	<1.0 mL/min	>10 mL/min
固相特性	柱直径<5 mm,柱长 20~50 cm,小球形颗粒(3~10 μm)	柱直径 10~1 600 mm,柱长圆饼状大球形或不规则颗粒(10~20 μm)
载体负荷	每克填料 10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻³ g	每克填料 10 ⁻³ ~10 ⁻¹ g
检测装置	高灵敏度	中等灵敏度
样品处理	样品随流动相丢弃	收集样品中被分离物质,获得产品
理论基础	线性色谱理论(LCT)	非线性色谱理论(NLCT)

表 2 线性分离与非线性分离色谱行为不同点

Table 2 Differences between linear separation and nonlinear separation of samples

对照项目	线性液相分离色谱	非线性液相分离色谱
色谱峰形	对称峰、高斯正态分布	不对称、拖尾、伸舌或卷浪形
色谱峰高	重要的定量依据	不能作定量依据
保留时间	常数、可作定性指标	非常数、不可作定性依据

非线性复杂分离系统(nonlinear complicated isolation system, NCIS)是指在非线性分离状态下,与色谱分离过程相关的各种参数及其影响参数的相关因子组成的体系。所谓“复杂”是因为被分离系统中并非含单一组分,而是由多组分构成的体系,甚至于存在着严重的干扰物质。

在色谱学中,如果 $C_s = k C_m$,呈直线函数关系,则为线性色谱。 k 为分配系数, C_m 是被分离物质在固定相中的浓度, C_s 是被分离物质在流动相中的浓度。如果 C_s 与 C_m 之间不存在线性关系,而是出现其他函数关系(或指数函数、或对数函数、或其他复杂的函数),则为非线性色谱。

NLCT 就是在吸附平衡热力学、吸附平衡动力学与基本物料平衡规律等基本理论的指导下,研究被分离物质在固定相中的浓度与流动相中的浓度处于非线性关系状态时,各种实验参数对色谱分离过程的影响规律,从而建立柱参数、被分离物质性质与操作条件之间的定量关系式。具体地说,就是研究被分离物质在固、液两相中呈高浓度情况下的浓度变化与吸附等温线、进样方式、传质速率等因素的关系,建立被分离物质的定量函数关系式。从而预测最佳分离条件,最大限度提高柱效应,获得满意的制备效果。

NLCT 首先在蛋白质规模化生产中显示出科学性、高效性与实用性,比传统线性色谱技术更最大限度地利用了固定相的潜在分离能力。建立的固定相超载洗脱等非线性分离工艺,可在低耗高产的优化条件下获得高纯度的目的产物。如:溶菌酶的非线性分离^[7]。这是因为生理功能与临床疗效各不

相同的活性蛋白,在化学结构上却同属一类,因此,在制备型分离中有明显的共性。

3 中药小分子物质非线性分离研究思路与实施方案

相对于生物大分子来说,结构各异的小分子有机化合物的非线性分离基础研究更为复杂,其共性的探索与特性的分析更为艰巨。要顺利地进行中药药效成分规模化制备与生产,实验室研发阶段的小试工作必须在线性分离的基础上继续获得非线性条件下的实验数据,确保中试顺利进行,为过渡到规模化生产奠定基础。

3.1 研究思路:寻找样品中小分子目的物在流动相与固定相中浓度处于非线性关系(超载)时,各实验参数对色谱分离过程的影响规律;建立溶质性质、柱参数及操作条件之间的相互关系,达到分离效果最大化;提出小分子非线性分离条件设定的方案与理论依据。

3.2 实施方案:以中药黄酮类物质为例。选择适当的同类物(根据被分离物质的化学结构,如槲皮素等)制作吸附等温线→建立吸附模型→改变非线性吸附状态时的柱参数分析效果相关性→推导函数关系→建立优化的非线性分离体系→应用于实践。

4 中药小分子有机化合物非线性分离实验研究

4.1 选择同类物对照品作为制作吸附等温线的物质,如黄酮类物质常以槲皮素等作对照品。槲皮素等黄酮类物质是以二苯基色原酮(氧化 $C_6-C_3-C_6$)为母核的系列衍生物。

4.2 制作同类物标准品吸附等温线

4.2.1 定义:在一定温度下,被分离物质在两相界面(流、固相)发生吸附过程达到平衡时,被分离物质在两相中浓度之间的线性关系。

4.2.2 原理: $Q = \Delta C \cdot V/G$, Q 为被分离物质在固相上的浓度, C 为被分离物质浓度, V 为溶液的体积, G 为固相吸附剂量。

4.2.3 方法:主要有静态法和动态法。静态法是将一系列 Q 值与其相平衡 C (被分离物质浓度)做图;动态法是前沿分析法(制作高精度吸附等温线)。

4.2.4 微量吸附等温线测定仪的基本结构:见图 1。应用微量吸附等线测定仪可精确测定各种小分子化合物的吸附等温线。

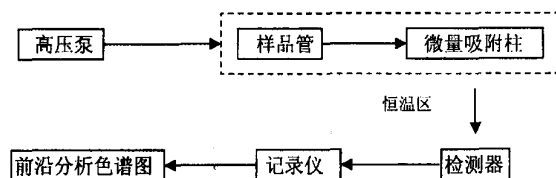


图 1 微量吸附等温线测定仪基本结构

Fig. 1 Basic structure of trace adsorption isothermal curve assay apparatus

4.2.5 吸附等温线类型:见图 2。图中,横坐标 C 表示被分离物质浓度,纵坐标 Q 表示被分离物质经固相吸附的浓度。大多数小分子化合物在非线性状态呈凸形吸附等温线,少数凹型、S 型。凸形吸附等温线是液固系统中常见的一种,它反映了溶质分子在固体表面达到饱和时生成了单分子吸附层。

随着溶质浓度的增加,吸附等温线的曲率逐渐减小,最后为零,即达到饱和态。本研究实验表明,槲皮素标准品在非线性范围呈典型凸形吸附等温线。

4.3 预测非线性分离色谱峰形

4.3.1 分析吸附等温线,预测非线性分离色谱峰形:被分离物质的吸附等温线类型与非线性色谱峰形有相关性。在非线性的色谱中,流动相中样品的浓度与固定相中样品的浓度之间没有线性关系,因而,峰形一般都不对称,出现“拖尾”、“伸舌”或“卷浪”等现象(图 3)。

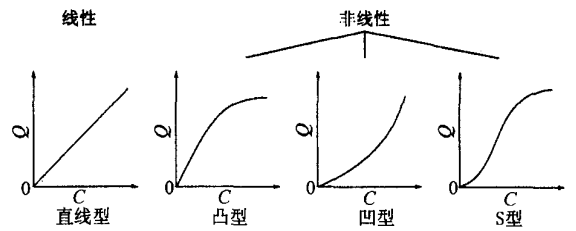


图 2 典型的吸附等温线类型

Fig. 2 Types of adsorption isothermal curve

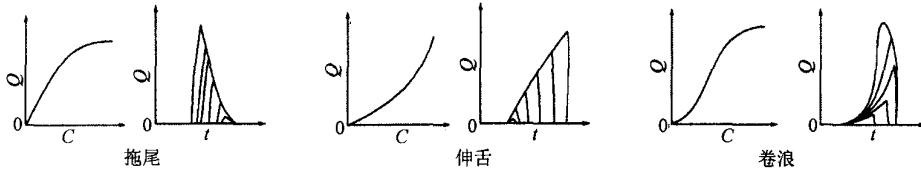


图 3 典型的非线性分离色谱峰形

Fig. 3 Types of non-linear separation chromatographic peak

4.3.2 调整柱参数改变峰形:在非线性的吸附范围,调整敏感性参数如填料、流动相组成、体积流量、pH、离子强度等,力图使不对称的凸型、凹型或 S 型吸附等温线渐近于直线态,从而使色谱峰形趋于高斯正态分布,极大限度提高柱效应,达到满意的分离效果。

4.3.3 分析各柱参数对非线性分离过程的影响规律,建立被分离物质的吸附模型。

4.3.4 进一步分析分子结构与吸附行为之间的相关性,为根据分子结构预测吸附性能,或根据吸附性能预测分子结构积累原始数据。比如对于槲皮素等黄酮类物质,通过比较分析槲皮素、山柰酚、异鼠李素等黄酮类物质的吸附行为可显示 3'-位基团的不同,从非线性吸附等温线还可以获得其他不同信息。

4.4 建立小分子物质非线性分离条件与分析效果相关性:

1)在杜仲叶黄酮类活性物质非线性分离实验研究工作中,以被分离物的同类化合物作参照物(如槲皮素标准品等),定量分析,计算得率。2)在非线性范围优化组合各因素,测定分离效果(图 4)。表示杜仲叶黄酮类物质在非线性状态下,选用不同分离条件组合(系列 1-4)经同一色谱柱非线性分离产生的实际效果。在非线性分离状态下,获得理想的组合条件,使被分离小分子物质得到满意的分离效果。3)比较分析参照物在线性条件与最佳非线性条件下分离色谱峰的异同,发现内在规律与特点,包括保留时间的明显改变、保留时间改变的规律、色谱图的变化规律、色谱图形与分子结构的相关性等。4)采用非线性分离优化组合条件,进一步分离样品中的目的物及其参照物(如槲皮素)的混合体系,验证与计算实际分离效果。

5 应用实例——建立杜仲叶黄酮类物质非线性分离体系

首先采用系统溶剂提取法,从杜仲叶获得 5 个提取分离部分(I、II、III、IV、V)。HPLC 分离纯化第 I 部分黄酮类物质,在线性分离条件基础上,调整柱参数,获得非线性分离条件下的理想组合条件,进行第 I 提取部分黄酮类物质的制备

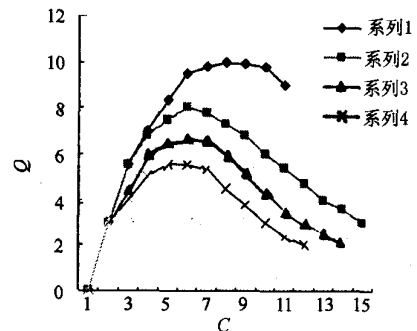


图 4 不同组合条件下杜仲叶黄酮类物质非线性分离色谱变化

Fig. 4 Nonlinear separation chromatography of flavonoids from leaves of *Encommia ulmoides* in different isolation combinations

型分离。这是从线性分离的实验室小试到非线性制备的重要过渡阶段研究,也是大规模工业化生产的前期研发工作。按已建立的非线性分离条件,从杜仲叶中获得黄酮类物质纯品。与线性分离比较实际效率,计算柱效应提高倍数。采用非线性分离工艺指导生产。

6 中药小分子物质非线性分离理论与技术研究展望

当前,非线性分离理论与技术研究得到极大的重视与发展。研究证明非线性分离理论与技术适用于不同生物活性物质的制备分离。

本研究组从事中药小分子的非线性分离研究工作多年,非线性色谱对中药黄酮类物质的分离纯化已显示了一定的效果。NLCT 应用于中药药效成分分离纯化具有很好的发展前景,但相关理论与技术的研究还有待于进一步深化。

首先,中药小分子物质分离是一个多组分构成的复杂系统,NLCT 尚未建立。第二,制备型色谱柱设计的关键技术有待解决。第三,优质价廉、批间重现性好的高效填料亟待开发。最后,不同小分子物质的吸附等温线与相关数学模型的

建立是非线性分离理论完整与升华的标志。因此,中药制药领域的非线性分离基础研究刚刚开始,还有许多重大问题需要解决。中药小分子物质非线性分离原理与实验研究对加快我国中药制药工业现代化进程具有重大的指导意义,重视与加速非线性复杂适应系统科学原理在中医药领域的研究与应用,可推动中医药学科建设与产业发展。

References:

[1] Fabrice G, Georges G. Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1099: 1-42.
 [2] Larson T M, Davis J. Use of process data to assess chromatographic performance in productionscale protein

purification columns [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19 (2): 485-492.
 [3] Zu D B. 2005 Project guide of national science foundation of China. [J]. *Bull Nat Sci Found China* (中国科学基金), 2004, 19: 29-30.
 [4] Georges G. Preparative liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 965: 129-161.
 [5] Pate M E, Thornhill N F. The use of principal component analysis for the modelling of high performance liquid chromatography [J]. *Biopro Eng*, 1999, 21(4): 261-272.
 [6] Pate M E, Turner M K. Principal component analysis of nonlinear chromatography [J]. *Biotechnol Prog*, 2004, 20: 215-222.
 [7] Tang J B, Huang J X. Preparative separation of lysozyme on TSK Gel Cm-5PW analytical column on the scale of several hundred milligrams by overloading elution technique [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 1996, 54: 392-397.

通光藤化学成分和药理作用研究进展

李红岩,王 威*,董方言

(吉林省中医中药研究院,吉林 长春 130021)

摘要:通过对通光藤化学成分和药理作用研究进展进行综述,为其研究开发提供有价值的参考。通光藤主要含有 C₂₁甾体类化合物,其结构特点是苷元 11 α 和 12 β 位连有多种酰基取代基团,3 β 位连有糖链基团;药理研究证明其具有抗肿瘤、降血压、平喘等作用。通光藤抗肿瘤生物活性具有潜在开发前景,深入开展相关研究工作具有重要的意义。

关键词:通光藤;抗肿瘤;C₂₁甾体类化合物

中图分类号:R282.71 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2007)07-1101-04

Advances in studies on chemical constituents in stem of *Marsdenia tenacissima* and their pharmacological effects

LI Hong-yan, WANG Wei, DONG Fang-yan

(Jilin Province Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Changchun 130021, China)

Key words: the stem of *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn.; antitumor; C₂₁ steroids

通光藤系萝藦科牛奶菜属植物通光散 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎,又名乌骨藤、扁藤、下奶藤、黄木香及大苦藤等,始载于《滇南本草》,曾收载于《云南省药品标准》1974 年版和《中国药典》1977 年版,分布于云南、贵州、福建、广东、广西、台湾等省^[1]。味苦、微甘,性凉,具有清热解暑、止咳平喘之功效,用于治疗肺炎、支气管炎、支气管哮喘、咽喉炎、扁桃体炎、膀胱炎、疔疮肿毒^[2]。通光藤中制剂消癌平对胃癌、肺癌、肝癌等恶性肿瘤具有确切的临床疗效^[3-5],引起国内学者的关注,对通光藤化学成分和药理作用进行了研究。现将通光藤化学成分和药理作用研究进展做一综述,为其进一步研究开发提供有价值的参考。

1 化学成分

1.1 C₂₁甾体类:C₂₁甾体类化合物是通光藤的主要化学成分,以通光藤苷元 A (tenacigenin A)、通光藤苷元 B

(tenacigenin B)、17 β -通光藤苷元 B(17 β -tenacigenin B)、通光藤苷元 C (tenacigenin C)、二氢肉珊瑚苷元 (dihydro-sarcostin)、通光素 (tenacissigenin)、cissogenin 为苷元 (图 1)^[6-9]。迄今从通光藤中分离鉴定的 C₂₁甾体苷类化合物均为 3 β 位糖苷,糖链由 β -D-吡喃葡萄糖、 β -D-吡喃黄花夹竹桃糖、 β -D-吡喃洋地黄毒糖、 β -D-吡喃夹竹桃糖、 β -D-吡喃磁麻糖、6-脱氧-3-O-甲基- β -D-吡喃阿洛糖等组成,各单糖之间均以 1 \rightarrow 4 糖苷键相连。除糖链组成不同以外,苷元 11 α 和 12 β 位连有乙酰基(Ac)、丙酰基(Pro)、2-甲基丁酰基(Bu)、顺芷酰基(Tig)、苯甲酰基(Bz)、4-羟基苯乙酰基(HPA)、肉桂酰基(Cinn)等取代基团。

迄今报道以通光藤苷元 B 为苷元的化合物有 24 种,以二氢肉珊瑚苷元为苷元的化合物有 12 种,以通光藤苷元 A、17 β -通光藤苷元 B、通光藤苷元 C 为苷元的化合物各仅有 1 种,见表 1 和图 2。

收稿日期:2006-10-12

作者简介:李红岩(1981—),女,延边大学硕士在读研究生,主要从事天然药物化学和新药研究。 Tel:(0431)86816846

*通讯作者 王 威 Tel:(0431)86816224 E-mail:w. w. wangwei@263. net