



动态轴向压缩柱色谱技术装备及其应用*

□许文东** 陈日星 冯锦玲 葛发欢

(中药提取分离过程现代化国家工程研究中心 广州 510240)
(广州汉方现代中药研究开发有限公司)

崔万臣 沈志刚 (北京创新通恒科技有限公司 北京 100085)

摘要:随着科学技术的发展,传统的分离手段渐渐难以满足生产所需的高纯度要求,人们把高效分离纯化技术的研究重点转移到色谱法上,进而促进了色谱分离技术及装备的发展,使得色谱技术及装备从分析规模发展到制备和生产规模,从而促使工业规模制备色谱的产生。制备色谱的核心是色谱柱,而色谱柱的装填,尤其是工业生产规模大直径色谱柱的装填,存在相当大的困难。动态轴向压缩柱色谱技术及装备就是在这种背景下发展起来的,是最常用、最易实现的、效果较为理想的装填技术。本文重点介绍了动态轴向压缩柱色谱技术装备中色谱柱的特点和柱效的影响因素以及该项色谱技术及装备在长春碱类抗肿瘤原料药工业生产中的应用。

关键词:制备色谱 动态轴向压缩 柱装填 长春碱类似物 应用

目前,色谱分离技术已成为有机化学和生物化学中一项十分重要的分离与纯化技术。在对高效的分离与纯化技术探索中,人们将研究重点转向色谱法,进而促进了色谱分离技术及装备的迅速发展,使得色谱分离在理论上从线性色谱发展到非线性色谱,在实践中从分析规模发展到生产规模。近10余年来,高效制备色谱已成为当代高效分离与纯化技术的研究前沿。制备色谱与分析色谱有许多不同之处。分析色谱需要全面反映样品的组成信息,无需收集特定的馏分,且洗脱液通常为废弃;而在制备色谱中,目标产物的纯度、产量、回收率、生产周期和运行成本等成为主要的考虑

因素,因此,制备色谱与分析色谱在操作参数的优化上有很大不同。而制备色谱同分析色谱一样,色谱柱是其核心部件;传统制备色谱采用简单的管状柱,填充大颗粒的无定形填料,因而柱效低、不稳定、重现性差、分离周期长,在很长一段时间里发展缓慢。近年来,由于高效制备色谱快速发展,制备色谱的应用范围也不断拓展。

随着现代制药行业的快速发展,植物中的天然活性成分越来越受到人们的关注和重视,而大规模的分离制备植物中的天然活性成分是目前研究的重点和难点。工业制备色谱就成为大规模分离和制备植物活性成分的重要方法和手段,按操作方式分为连续色谱和间隙色谱,其中间隙色谱技术通过选择固定相介质和冲洗剂可得到广泛应用。

收稿日期:2009-11-27

修回日期:2009-12-08

* 国家科技部等14个部委和广东省人民政府共同主办的“2009'传统医药国际科技大会暨博览会”同期活动五——“现代中药制药装备研究开发论坛”推荐论文。

** 联系人:许文东,主要研究方向:主要从事天然产物相关研究,Tel: 020-34400080-611,E-mail:xwd21@163.com。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 912

色谱柱的填装必须满足柱床层的连续性、均匀性、稳定性和紧密性的要求。色谱柱的装填,尤其是工业生产规模的大直径柱的装填,存在相当大的困难。目前,使用最广泛也是最容易实现的是动态轴向压缩(Dynamic Axial Compression, DAC)技术及装备。

一、动态轴向压缩柱色谱技术装备简介

20 世纪 70 年代,人们开始尝试制备型色谱柱的动态压缩填装方法,主要有轴向压缩、径向压缩和环向压缩。目前,这 3 种方法中,前两种已有使用设备,对后一种人们还未进行深入的研究。动态轴向压缩技术具有多方面的优越性,因而得到了更为深入的研究和发展,同时它也是装填制备柱(柱内径大于 50mm)的最佳技术。动态轴向压缩填装色谱柱法源于 Godbille 等^[1]的研究工作,其中所采用的设备是一套不同于传统匀浆法的新型色谱设备。其后,Colin 等^[2]在 20 世纪 90 年代开发了该项技术(DAC),其原理是通过活塞的上下运动来装柱、维持柱压和卸柱,活塞周边配备了特殊设计的密封圈,能容许活塞上下自由滑动,同时又能保持高的密封压。活塞运动和压力维持靠的是液压或是柱效,通常每米的塔板数在 35000 以上,甚至可达 40000 以上,与分析柱相仿的柱效;同时,颗粒度较小的填料会带来较高的柱压降,但目前配套工业化高压制备泵可以完美打破这一个分离纯化过程中的瓶颈,如 P6000-80L 高压制备泵,其最大压力可以长期工作于 10Mpa。

3. 流速高

流动相的线速一般在 $5\sim 10\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$,以便提高产率,降低生产成本。

目前,系统中成套的 DAC 色谱柱,由于外界压缩空气一直将柱体内部活塞头的压力保持在恒定的范围,因此,可以长期保持柱床的稳定,就不会出现因柱床塌陷而引起的拖尾或峰型变化,工艺条件更稳定,易再现,从而使得产品纯度及回收率更高。

三、影响动态轴向压缩柱柱效的几个因素

工业制备色谱系统一般由 DAC 系统、输液系统、进样系统、匀浆输送系统、在线检测及电器控制系统、软件系统等组成,其中输液泵、色谱柱、检测器是关键部件(图 1~4),尤其是动态轴向压缩色谱柱是该套系统的核心部件,同时在线检测系统也是工业制备色谱的一大亮点。由于色谱柱是工业制备色谱的核心,其柱效直接影响到工业制备色谱的分离效果,因此,影响色谱柱柱效的因素就变得尤为重要,下面就一些影响柱效的常见因素进行讨论。

1. 柱体的加工、制作

气压,压动力比轴向压缩柱的弹簧动力更稳定、更均匀。动态轴向压缩柱在使用过程中,活塞始终能产生一定的压力压缩填料,随时消除产生的死空间。活塞与顶端法兰均配有多孔不锈钢虑板以及能使样品及洗脱液在柱截面上均匀分布的分散器。液流分散器保证了大量样品尽可能地瞬间分散在柱截面上,进而快速均匀进入柱床,克服了柱中心样品局部过浓现象,保证了色谱柱的高效。DAC 柱性能稳定且柱效高,可填装 $10\sim 16\mu\text{m}$ 细颗粒填料,该类柱广泛用于制药工业,如图 3。

二、动态轴向压缩色谱柱的特点

1. 柱长短、内径大、呈圆饼状

目前,高效制备柱的柱长与常规分析柱相仿,一般长度为 $20\sim 50\text{cm}$,远短于使用长度(通常为 1m 甚至于 1m 以上)的开管柱;而内径为 $10\sim 1000\text{mm}$,因此,在较大的流速下不会产生很高的柱压降,纯品的分离周期较短,产品的产出率及回收率较高。

2. 填料颗粒小,分布窄

填料采用直径为 $10\sim 20\mu\text{m}$ 的细颗粒,孔径及粒度分布均很窄的多孔球形替代大颗粒($40\sim 200\mu\text{m}$)、宽分布的无定形填料填充制备柱,因而具有很高的



图 1 输液系统(DSC07260)

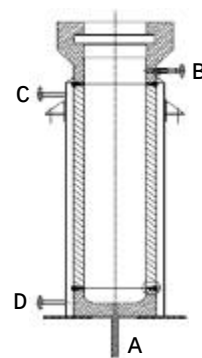


图 2 检测系统(DSC07217)



图3 动态轴向压缩柱色谱系统 (DAC2004)



图4 控制面板示意图

柱头,常需要在筛板前加上一块分配板。分配器的死体积应低于填充体积的2%,这样当样品溶液自连接管流至柱头时,可以通过精心设计、加工出来的沟槽和孔洞,使样品溶液均匀地分配至柱头全截面的柱床上。

5. 筛板

色谱柱的另一种不可缺少的部件是筛板,即阻挡填料从柱中流失的多孔网。它一般采用具有特定粒度的不锈钢粉末或镍粉在模型中烧结而成,颗粒的间隙即为筛板的孔,控制颗粒的大小即可得到不同的筛孔,筛孔应小于填料的直径。在选用筛板时,宜选用厚度较薄者,以免引入过大的柱外体积而导致附加的峰展宽效应。此外,筛板的孔径宜与填料颗粒大小相匹配。

6. 填料

一般来说,分析 HPLC 柱中的填料可考虑用于制备 HPLC 中,但制备色谱由于填料使用量大,故对填料尤其是用于大规模工业化色谱中的填料有其特殊

色谱柱尤其是高效液相色谱柱的内壁应进行仔细的加工。首先对柱管进行珩磨,保证同心度,使活塞自由移动时仍能保证与柱壁之间的密封性,再使其内表面光滑,以减少内壁附近的沟流现象与贴壁填料层的不均匀性,降低柱壁引起的谱带展宽。一般情况下,柱管内壁光洁度应在 $\nabla 8$ 以下或以特殊的技术抛光成镜面。

2. 稳定可靠的液压系统

工业化制备柱控制部分选用液压控制,动力源采用气驱液泵的方式,其优点如下:

- (1)通过压力控制阀可进行压力调节或锁紧,操作方便、使用安全。
- (2)由空气驱动,特别适用于防爆应用领域,并且压力稳定。
- (3)支持大流量、高压的液压系统,装柱过程中,快速达到预设压力,填充密度均匀而结实。

(4)自动进行压力补偿,随时消除产生的死空间,保持柱压恒定。

(5)运行可靠,运行时噪音低,便于维护。

3. 小死体积的液路连接系统

(1)优化的管线连接在液相色谱系统中担负着液体传输的重要功能。为了减小死体积和阻止峰扩散,使进样泵、柱子和检测器之间的管路尽可能短、尽可能细,以保证色谱系统的死体积降到最低,而产生的反压又很小。

(2)保证管路的切口端平整。

(3)管路连接采用专用的管线,可承受高压,并且符合 CGMP 的相关材料要求。

4. 高效的分配器单元

制备柱的柱径较大,一般为 10mm 以上。为使样品能均匀地加至的要求。

(1)机械强度高,以便反复使用。

(2)负载量高,单位重量填料可处理的样品量大,提高产率。

负载量与比表面积、孔径大小、孔径大小的分布及表面官能团的密度等参数有关。

(3)易于放大。

在分析柱上获得的优化条件同样也能在制备柱上重现。

(4)可大量供应,批间的重现性好。

(5)颗粒大小合适、粒度分布范围窄。

7. 装柱

用高压匀浆法较难填充直径大于 100mm 的制备柱,为将细颗粒填料均匀装入更大直径的制备色谱柱中,目前均采用动态轴向压缩技术。随着 DAC 柱在制备色谱中的应用扩大,关于 DAC 柱性能和重现性等的研究也较多,最近研究者们研究了影响柱床稳定性及重现性的有关参数,结果表明,填料颗粒的性

质、匀浆溶剂的性质、压缩力的强度等对填充密度及柱效都有一定影响。

四、动态轴向压缩柱色谱在长春碱系列抗肿瘤原料药生产中的应用

长春碱系列抗肿瘤药物作为植物来源抗肿瘤药物,在当今抗肿瘤药物市场中有比较长和比较广泛的应用,研究表明该类药物可干扰细胞周期的有丝分裂阶段(M期),从而抑制细胞的分裂和增殖。其细胞毒性是通过与微管蛋白的结合来实现的,它们在微管蛋白二聚体上有共同的结合位点,可抑制微管聚合,妨碍纺锤体微管的形成,从而使分裂于中期停止,阻止癌细胞分裂增殖^[3]。

目前,我司为全国最大的长春碱系列抗肿瘤原料药生产商之一,并已有以长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨等为代表的一系列抗肿瘤产品。这些产品原料药有的直接从植物中提取分离得到,有的通过半合成得到,但其半合成前体依然为提取分离的天然产物,这些天然提取物一般含多种生物碱和其他杂质。由于成分较复杂,一般重结晶或酸碱处理方法往往分离效果欠佳。多年来,生产实践中均采用常压色谱分离,其分离效果能符合要求,但是产量较小,需人工操作,费时费力。近年来,随着该类抗肿瘤药物市场需求的增加,单纯靠增添色谱柱来增加产量难以跟上市场发展的步伐,也跟不上现代科技发展的步伐,成为制约产品进一步发展的瓶颈。我司一直在进行长春碱系列抗肿瘤原料药分离纯化工作的改进和产业化研究,期望通过分离工艺的技术改进推动该系列产品的发展。我们先后尝试过减压和加压色谱分离,但是效果都不如常压色谱好,之后还在中压制备色谱上进行分离,发现效果也不是很理想。

此后,我们开发利用动态轴向压缩柱色谱系统进行分离,经过一段时间的设备安装调试和流动相洗脱条件的摸索,针对扩大生产需求量最大的长春瑞滨产品进行了制备分离,取得很好的分离效果(表1)。尤其是该公司的动态轴向压缩系统采用的是液压动力,比一般的轴向压缩系统的弹簧动力更稳定和均匀,使得分离效果更理想。我们在内径为50mm的压缩柱上小试取得成功后,接着对其进行了产业化研究,在生产中采用内径为200mm的大型制备压缩柱,同样取得成功,实现了长春瑞滨产品技术改进

表1 长春瑞滨常压柱色谱与动态轴向压缩柱色谱的各项技术参数比较

名称	常压柱色谱	动态轴向压缩柱色谱	备注
含量(HPLC测定)	96%±2	98%±1	指主馏分
收率	≤45%	≥45%	重量收率
生产周期	24h/批	4.5~5.5h/批	
柱子规格	φ32×1000(玻璃柱)	φ200(不锈钢)	
上样量	10g/根	300~500g/批	
填料消耗	每批更换	5~6批更换一次	

的产业化,极大地促进了该产品的发展。

从表1的各项参数比较可知,采用动态轴向压缩柱色谱后,该生产工艺在产品质量、收率、生产周期、每批产量和填料消耗方面都体现出明显的优势,不仅提高了生产效率,而且降低了生产成本。

由于长春碱类生物碱对光比较敏感,易产生一些副产物,并导致产品外观颜色变化,从而影响产品的质量。采用动态轴向压缩柱色谱进行分离后,其分离时间明显缩短,加上采用不锈钢柱体,无需额外的避光措施,因此,这个问题大大改观,光解产物含量几乎为零,远低于美国标准要求的0.3%。

另外,由于动态轴向压缩柱色谱系统自动化程度比较高,不仅减轻了职工的劳动强度,而且使生产环境也得到较大的改善,同时溶剂挥发也明显减少,从而降低劳动保护成本。此外,在填料使用方面,我们设想用一般色谱用硅胶代替专用的键合相硅胶,通过试验研究也取得成功,因此,在控制填料成本方面该色谱系统也有优异的表现。

目前,我司除长春瑞滨产品在动态轴向压缩柱色谱系统上实现产业化外,同系列产品长春地辛也在该色谱系统上成功实现产业化,这给予我们极大的信心对长春碱系列的其他产品在该色谱系统进行技术改进,目前,长春新碱的技术升级也在进行当中。不难预见,随着动态轴向压缩柱色谱技术开发与应用的不断深入,它必将在天然产物的分离纯化技术中占有越来越重要的地位。

参考文献

- 1 Godbille, E; Devaux, P. Use of an 18-mm I.D. column for analytical- and semi-preparative-scale high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1976, 122:317~329.
- 2 DINGENEN, J. A practical approach to chiral separations by liquid. *Journal of Chromatography*, 1998, 26:18~32.
- 3 Zhou, X J, Ranmani, R. Preclinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs*, 1992, 44(4):1~16.

The Technical Equipment for Packing the Chromatographic Column by Dynamic Axial Compression and Its Application

Xu Wendong¹, Chen Rixing¹, Feng Jinling¹, Ge Fahuan¹, Cui Wanchen², Shen Zhigang²

(1. National Engineering Research Center for Modernization of Extraction and Separation Process of TCM/Guangzhou
Hanfang Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou 510240, China;
2. Beijing Chuangxin Tongheng Science and Technology Co., Ltd., Beijing 100085, China)

Abstract: With the development of separation and purification technology, the traditional separation methods could no longer satisfy the requirements of highly purified products. The chromatography capable of promoting the chromatographic technique and its equipment were thus developed and used from the analysis scale to the preparative, and finally to the industrial scale. Packing of the chromatographic column, especially the large-sized column on the industrial scale, is the core of the preparative chromatography. The technique of packing the chromatographic column by dynamic axial compression has been developed to solve this problem, and is considered the best technique available. This paper introduces the characteristics of this chromatographic column, the factors influencing the column efficiency, as well as the application of this technical equipment in the production of antitumor agents vinblastine analogues in our company.

Keywords: Preparative chromatography; Dynamic axial compression; Column pack; Vinblastine analogues; Application

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立巍)

肝脾肾同治法为 2 型糖尿病药物研发提供新思路

近日,由中国中医科学院广安门医院、北京中医药大学东方医院、北京中医药大学东直门医院、北京世纪坛医院对 265 例患者进行的临床研究表明,北京中医药大学校长高思华教授经多年临床经验总结出的肝脾肾同治法对于 2 型糖尿病的治疗效果肯定。

中医认为,糖尿病(属中医消渴病范畴)与肝、脾、肾三脏关系密切。从肝脾肾辨证治疗 2 型糖尿病是高思华教授在总结多年临床心得的基础上,依据中医学对消渴病的基本认识和西医学对糖尿病的病理生理认识而提出的糖尿病辨证治疗的基本观点。多年来,他以此观点指导临床,取得了良好的效果。此次研究人员随机选取 2005 年 1 月至 2006 年 12 月在上述 4 家医院就诊的 2 型糖尿病患者 265 例,根据症状分为 3 组,即脾肾气阴两虚兼肝阳偏亢且肝阳上亢为主者、肝郁气滞为主者、证属脾虚湿盛为主兼肝郁肾虚者,分别给予降糖消渴 1 号方(165 例)、2 号方(43 例)、3 号方(57 例)加减治疗。

其中,降糖消渴 1 号方以益肾平肝为主、健脾为辅,气阴两补佐以清热祛湿活血,由僵蚕、决明子、熟地黄、黄芪、丹参、黄连、茯

苓等组成;降糖消渴 2 号方以疏肝为主、健脾益肾为辅,气阴两补佐以清热祛湿活血,由柴胡、郁金、赤芍、黄芪、山药、生地黄、黄连、泽泻等组成;降糖消渴 3 号方以健脾为主、疏肝益肾为辅,气阴两补佐以祛湿活血,由生晒参、白术、柴胡、熟地黄、山药、仙灵脾、薏苡仁、丹参等组成。

临床观察结果表明,降糖消渴 1 号方、2 号方、3 号方对降低空腹血糖总有效率分别为 72.03%、64.10%、74.36%;降低餐后 2 小时血糖总有效率分别为 59.69%、62.86%、61.54%;改善中医症状的总有效率分别为 94.9%、90.57%、91.49%,具有统计学意义,并且无毒副作用。这说明肝脾肾同治的系列方药有着确切的临床疗效。

研究人员认为,协调肝脾肾三脏辨治糖尿病的方法揭示了糖尿病的证治规律,切合临床实际。该方法以中西医结合的理念为指导,病证结合,为 2 型糖尿病的防治提供了新的思路,提出了糖尿病辨证治疗的新观点和有效的辨证治疗方案,对提高糖尿病的防治效果具有重要意义,对 2 型糖尿病系列治疗药物的研发提供了重要参考。

(文 摘)