

利用超高效合相色谱 (UPC²) 和制备型超临界流体色谱 (Prep SFC) 提高安卓奎诺尔的纯化效率

Rui Chen¹, John McCauley¹, Jo-Ann Jablonski¹, Carol Fang²和Jacquelyn Runco¹

¹沃特世公司 (美国马萨诸塞州米尔福德)

²沃特世台湾分公司

应用优势

- 对于安卓奎诺尔及其衍生物来说，与RPLC相比，UPC²具有更好的分离度，且在随后的制备型SFC方法中可获得更高的质量负载。
- 与RPLC相比，UPC²和制备型SFC方法的洗脱顺序更有利，并且由于质量负载的增大，进一步促进纯化步骤。
- 通过制备型SFC进行纯化使整体效率提高了九倍，并且与制备型HPLC方法相比，有机溶剂的用量降低了77%。

沃特世解决方案

配有ACQUITY TQD的ACQUITY UPC²™系统

配有SQD2的ACQUITY UPLC® H-Class系统

配有3100质谱仪的AutoPurification™ LC系统

配有3100质谱仪的Prep 100q SFC系统

ACQUITY UPC² 2-EP和BEH 2-EP色谱柱

Viridis® Silica 2-EP色谱柱

HSS T3色谱柱

关键词

天然产物，纯化，制备，UPC²，SFC，合相色谱，CC，安卓奎诺尔

简介

天然产物因具有高度化学多样性、生化特异性以及“类似药物”的分子性质，而成为新型先导药物的生产来源¹⁻⁴。市面上现有的大多数药物都是直接从天然化合物中提取而来或是受到天然产物的启发而制成。此外，天然产物还以食品补充剂、保健品和替代药物等形式被直接使用⁵。生物活性化合物的分离和纯化在天然产物研究中起着重要的作用。最常用的工艺流程包括从细胞基质中萃取目标化合物，以及利用多种低至中等压力液相色谱技术（主要是反相液相色谱，RPLC）进行预纯化⁶。RPLC是一种可用于多种化合物的通用色谱技术，但它不能保证全部分析物都达到足够的分离度，尤其是对于天然产物中的结构类似物和极性相似的异构体。因此，许多人认为纯化步骤会影响速度，这也是天然产物药物开发的主要瓶颈⁷。针对于此，基于超临界流体的色谱技术，包括超高效合相色谱 (UPC²®，一种将UPLC的性能优势应用到超临界流体色谱中的新型分析色谱技术) 和制备型超临界流体色谱 (prep SFC)，通过为RPLC提供广泛的选择性补充，为天然产物研究工具组合带来了切实可行的全新产品。

图1示出了安卓奎诺尔的结构，它是最近从台湾特有的寄生性真菌牛樟芝的菌丝体中分离出来的一种泛醌衍生物⁸。

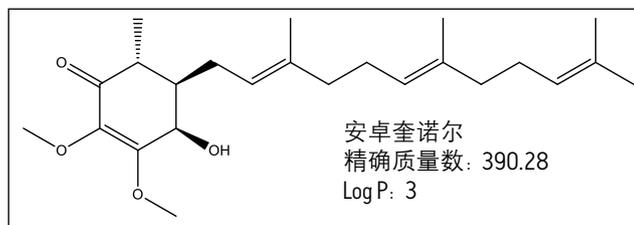


图1. 安卓奎诺尔的化学结构、分子质量和Log P。

实验

材料与试剂

HPLC级甲醇和异丙醇 (IPA) 购自Thermo Fisher Scientific (美国新泽西州费尔劳恩)。工业乙醇 (试剂级) 购自Sigma-Alrich (美国密苏里州圣路易斯)。安卓奎诺尔初级产物 (纯度为98%) 通过商业途径得来, 并以1 mg/mL的浓度溶解于甲醇中用于分析实验, 以及以20 mg/mL的浓度用于制备实验。

色谱

UPLC[®]/MS实验 在配有SQD 2的Waters[®] ACQUITY UPLC H-Class中进行。UPC²/MS实验在配有ACQUITY[®] TQD的Waters ACQUITY UPC²中进行。这两种系统都由Masslynx[®]软件控制。LC/MS实验在配有3100质谱检测器的Waters AutoPurification LC系统中进行。制备型SFC实验在配有3100质谱检测器的Waters Prep 100q SFC系统中进行。这两种系统都由Masslynx软件和FractionLynx™应用软件控制。详细的实验参数汇总于表1和表2中。

经证实, 安卓奎诺尔对多种肿瘤细胞株具有细胞毒性⁹⁻¹¹。来自于菌丝体萃取物的安卓奎诺尔的预纯化包括两个RPLC步骤, 分别是使用硅胶和分子排阻凝胶, 生成的初级产品纯度达98%⁹。为了支持需要产品纯度较高 (>99%) 的医药研究, 必须开发一种高效且经济的纯化策略以进一步纯化初级产品。本文介绍了一项对比性研究, 通过使用制备型LC和制备型SFC对安卓奎诺尔初级产品进行纯化, 并达到>99%的纯度。其中对分析物的色谱行为 (包括分离度和洗脱顺序)、每种技术的使用以及对下游制备型色谱的影响进行了讨论。同时还比较了每种纯化技术的效率和溶剂消耗情况。

	图2A		图2B		图4A	
仪器	ACQUITY UPLC H-Class/ SQD 2系统		AutoPurification LC MS系统		ACQUITY UPLC H-Class/ SQD 2系统	
流速 (mL/min)	0.60		1.46		0.75	
流动相A	水		水		水	
流动相B	甲醇		甲醇		甲醇	
反压 (psi)	N/A		N/A		N/A	
MS检测	ESI+		ESI+		ESI+	
色谱柱	ACQUITY UPLC HSS T3 (3.0 × 150 mm, 1.8 μm)		Atlantis T3 (4.6 × 150 mm, 5 μm)		ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.7 μm)	
温度 (°C)	60		室温		60	
进样体积 (μL)	1		变化		0.5	
梯度	时间 (min)	%B	时间 (min)	%B	时间 (min)	%B
	0	92	0	88	0	80
	5	96	3.08	88	4	80
	5.25	92	8.21	94		
	6	92	8.61	100		
			9.22	88		
			20.90	88		

表1. LC的关键实验参数。

	图3A		图3B	
仪器	ACQUITY UPC ² /ACQUITY TQD		配有3100质谱检测器的Prep 100q SFC系统	
流速 (mL/min)	1.5		80	
流动相A	CO ₂		CO ₂	
流动相B	异丙醇		异丙醇	
反压 (psi)	1740		1740	
MS检测	APCI+		ESI+	
温度 (°C)	45		40	
进样体积 (μL)	1		600	
色谱柱	ACQUITY UPC ² 2-EP (3.0 × 100 mm, 1.7 μm)		Viridis Silica 2-EP (19 × 150 mm, 5 μm)	
梯度	时间 (min)	%B	时间 (min)	%B
	0	5	0	5
	2.50	25	1	5
	2.75	40	6.5	9
	3.25	40	7	9
	3.50	5	7.25	5
	4	5	8	5

表2. UPC²和Prep SFC的关键实验参数。

结果与讨论

图2A显示了安卓奎诺尔初级产品的UPLC/MS谱图。 m/z 391处的峰是安卓奎诺尔的钠加合物， m/z 383处的杂质峰是去甲氧基化安卓奎诺尔的钠加合物。尽管达到了基线分离，但安卓奎诺尔及其衍生物之间的结构相似性导致分离度相当受限，这也严重影响了制备型LC中的上样能力。图2B汇总了在分析柱（4.6 × 150 mm, 5 μm）上进行的初级产品上样研究。仅10 μL进样时可达到了基线分离。随着进样体积增加，分离度变差，当采用80 μL的进样体积时完全无法分离。如果几何放大到19 × 150 mm半制备型色谱柱，最大上样量将达到170 μL。在20 mg/mL的浓度下，每次进样的最大上样量为3.4 mg。

UPC²提供了一个具有吸引力的替代方法。图3A显示了安卓奎诺尔初级产品的UPC²/MS谱图。与UPLC（图2A）相比较，采用UPC²方法可让安卓奎诺尔与其衍生物之间实现更好的分离，并增加了随后的制备型SFC方法中的质量负载。还值得注意的是，这时安卓奎诺尔及其衍生物的洗脱顺序与在RPLC中相反。当使用诸如2-EP的极性固定相时，UPC²类似于正相色谱（NPLC）并为RPLC提供了正交选择性。因此，分析物的洗脱顺序通常与RPLC相反。洗脱顺序对于制备型色谱的整体效率十分重要，特别是难以分离的洗脱目标或杂质对。因为在相同的时间间隔内，峰头通常比峰尾所占的全峰比重要高，所以目标化合物必须在杂质前洗脱，这样，当目标物和杂质比基线更难分离时，将只有小部分的目标峰未被收集。在采用RPLC的研究中，杂质在目标物之前被洗脱。当进样体积为40 μL时（图2B），可以得到高纯度的安卓奎诺尔，但目标物的回收率和整体效率却大打折扣。相比而言，制备型SFC色谱图给出的结果更令人满意（图3B）。由于杂质在目标物之后被洗脱，因此可以收集到高纯度的安卓奎诺尔，并且效率的损失小到可以忽略不计，甚至在安卓奎诺尔和杂质发生轻微重叠的上样水平下也同样如此，如图3B所示。

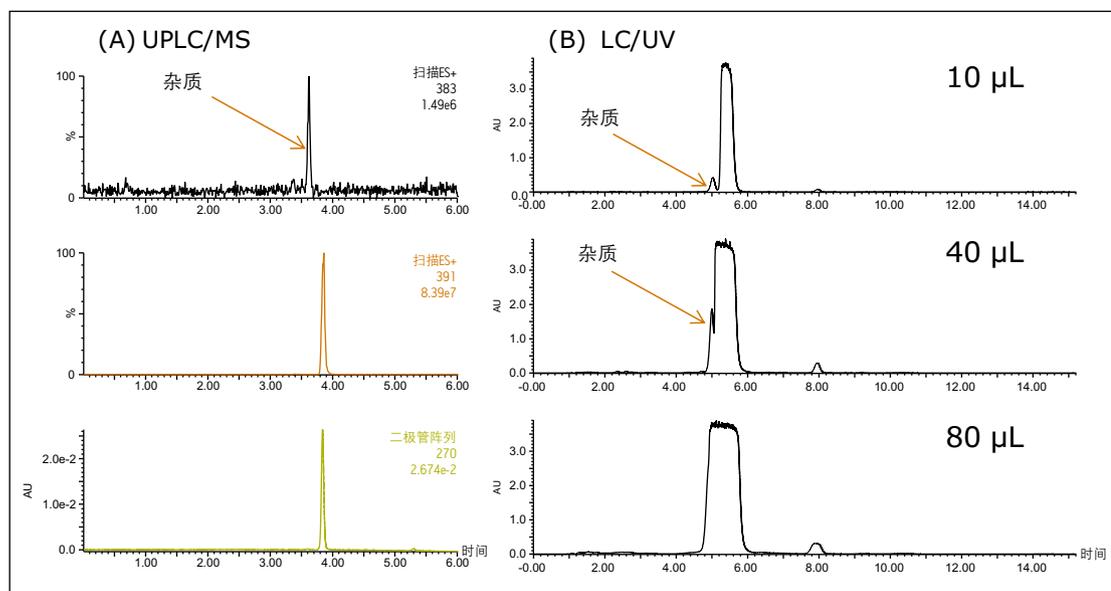


图2. (A) 1 mg/mL 安卓奎诺尔初级产品的UPLC/MS和 (B) 20 mg/mL 安卓奎诺尔初级产品的LC/UV色谱图。

将UPC²方法放大到19 × 100 mm的半制备型色谱柱。基于图3A所示的色谱行为，采用的集中梯度范围为5%至9%的流动相B。所得色谱图如图3B所示。总运行时间为8分钟，而使用RPLC时，运行时间为20分钟。根据经验确定最大上样量为600 μL。当浓度为20 mg/mL时，代表每次进样12 mg。

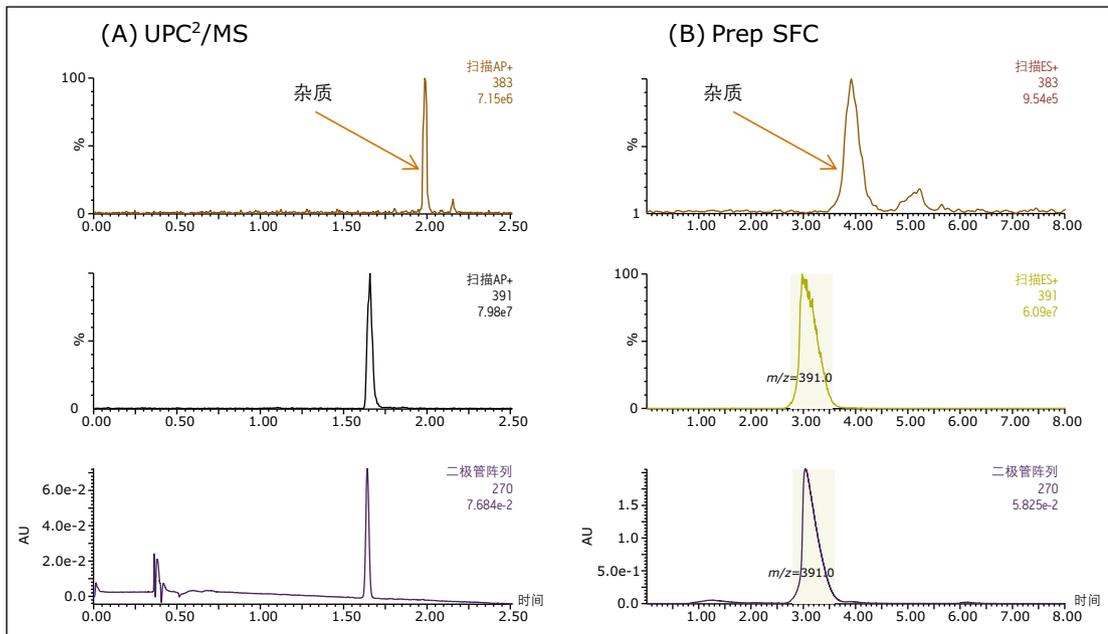


图3. (A) 1 mg/mL 安卓奎诺尔初级产品的UPC²/MS以及 (B) 20 mg/mL 安卓奎诺尔初级产品的制备型SFC/MS谱图。

使用UPC²/PDA/MS对经过纯化的等份安卓奎诺尔产品进行分析，结果如图4所示。在相应的质谱图中可以看到，*m/z* 361处的主要杂质被成功清除。通过270 nm的UV进行检测，显示安卓奎诺尔最终产品的纯度>99%。

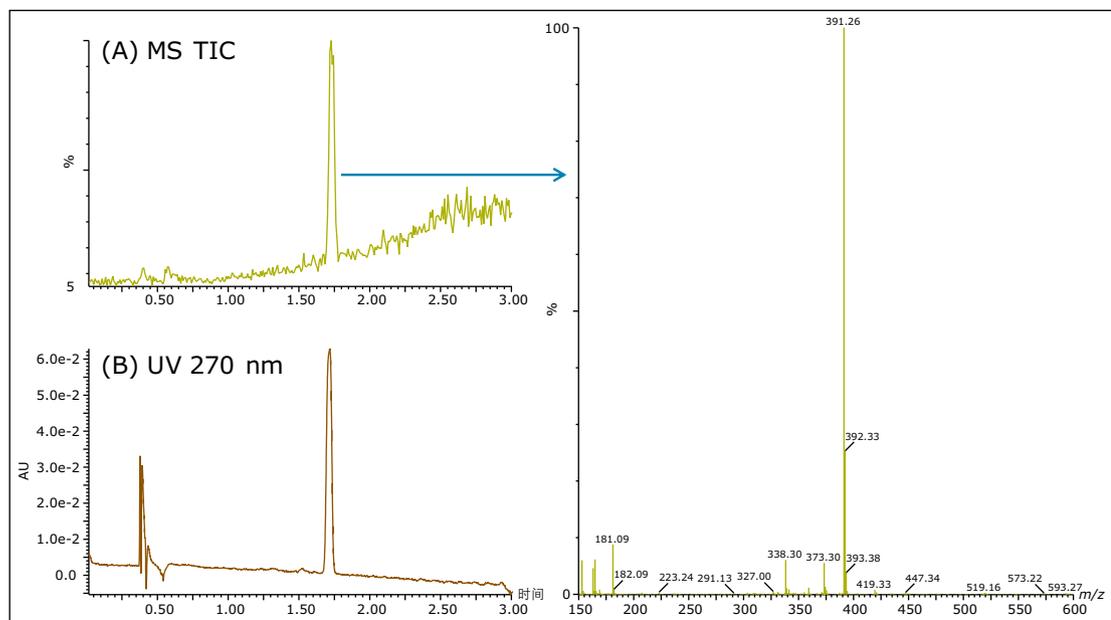


图4. 使用配有UV和MS检测器的UPC²分析安卓奎诺尔最终产品的纯度。

效率和溶剂消耗量的对比情况汇总于表3中。总的来说，通过使用制备型SFC代替制备型RPLC，纯化效率提高了九倍，并带来了以下优势：运行时间缩短2.5倍，并且上样量增加3.5倍。有机溶剂的用量也减少了77%。

制备型 色谱技术	效率 (g/24 h)	溶剂	有机溶剂消耗量 (L/24 h)	CO ₂ 用量 (kg/24 h)
HPLC	0.25	MeOH	33.52	N/A
SFC	2.25	甲醇/IPA	7.70	105

图3. 对比两种纯化方法的效率和溶剂消耗量。

结论

本应用纪要通过两种不同的色谱方法，将安卓奎诺尔初级产品纯化至所需的99%纯度。在HPLC方法中，安卓奎诺尔及其去甲氧基衍生物的关键对表现出有限的分离度；因此导致在制备型色谱中的质量负载受到限制，纯化效率也很有限。通过采用Waters UPC²和Prep 100q SFC技术，相比RPLC而言，相同的关键对得到更好的分离，并且洗脱顺序更为有利，当分析型UPC²方法被放大时，还提高了制备型SFC中的质量负载。总的来说，与制备型HPLC方法相比，制备型SFC方法使效率提高了九倍，有机溶剂的用量降低了77%。基于超临界流体的技术UPC²和制备型SFC，通过为RPLC提供选择性补充，扩大了用于天然产物研究的传统工具组合，让制药、中药、保健品和营养补充剂行业的实验室和制造商能够实现更加经济和高效的天然产物纯化。

参考文献

1. Harvey, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today* 2000; 5 (7):294-300.
2. Harvey, A. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* 2008; 13 (19/20):894-901.
3. Li J, Venderas J. Drug Discovery and natural products: end of an era or endless frontier? *Science* 2009; 325 (10):161-165.
4. Harvey A. Natural Products as a screening source, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007, 11: 480-484.
5. Sarker S, Latif Z, Gary A. Natural product isolation: an overview, *Natural Product Isolation*, 2nd ed. Eds. Sarker SD, Latif Z, Gary AI, *Humana Press Inc.* Totowa, NJ. 2006, P1-25.
6. Sticher, O. Natural product isolation, *Nat. Prod. Rep.*, 2008, 25, 517-554.
7. Koehn F, Carter G. The evolving role of natural products in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4: 206-220.
8. Geethangili M, Tzeng Y. Review of Pharmacological effects of *Anrodia camphorata* and its bioactive compounds, *Evid. Base Compl. Alternative Med.* 2009, 2011: 212641-58.
9. Lee T, Lee C, Tsou W, Liu S, Kuo M, Wen W. A new cytotoxic agent from solid-state fermented mycelium of *Anrodia camphorata*, *Planta Med.* 2007, 73: 1412-1415.
10. Chiang P, Lin S, Pan S, Kuo C, Tsai I, Kuo M, Wen W, Chen P, Guh J. Antroquinonol displays anticancer potential against human hepatocellular carcinoma cells: a crucial role of AMPK and mTOR pathways, *Biochemical Pharmacology* 2010, 79: 162-171.
11. Yu C, Chiang P, Lu P, Kuo M, Wen W, Chen P, Guh J. Antroquinonol, a natural ubiquinone derivative, induces a cross talk between apoptosis and senescence in human pancreatic carcinoma cells, *J. Nutr. Biochem.* 2012, 23: 900-907.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY, ACQUITY UPLC, Atlantis, UPLC, UPC², Viridis和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。ACQUITY UPC², AutoPurification和UltraPerformance Convergence Chromatography是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014年沃特世公司。印制于中国。2014年1月 720004798ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010-5209 3866
上海：021-6156 2666
广州：020-2829 6555
成都：028-6554 5999
香港：852-2964 1800

免费售后服务热线：800(400) 820 2676
www.waters.com