

一种简易分离胞二磷胆碱的方法

胡兆庆 王建业 朱邦宰 邢根生 曾 和

(上海实验生物研究所)

(上海药用辅料厂)

胞嘧啶核苷二磷酸胆碱(简称胞二磷胆碱)是磷脂合成代谢的重要中间体,实验室利用这一核苷酸衍生物研究磷脂代谢。在医药上,胞二磷胆碱作为生化药物,治疗脑外伤、脑震荡后遗症、神经官能症、脂肪肝等疾病,效果良好。

用合成方法制备胞二磷胆碱时,以往的分离方法是将合成后的反应液通过阴离子交换树脂柱,然后借分步洗脱把胞二磷胆碱与反应液中的 5'-CMP 以及 CDP, CTP, 胞嘧啶二核苷酸等分开,从而获得纯产品。这一方法虽可达到分离效果,但洗脱时间冗长,得到的洗脱液体积大、浓度低,而且树脂的用量大、层析柱高;因此,此法用于大量制备或工业上成批生产这一药物时,均甚为不利。本文介绍一种分离胞二磷胆碱的新方法。其主要原理是利用高离子强度的样品溶液进行上柱,通过交联度大的 717 × 8 阴离子树脂,使样品中 CMP 等吸附柱上,而胞二磷胆碱则不被树脂吸附而直接流出,从而达到分离的目的。所获得的流出液再经去盐和浓缩,即可得到较高产量和较高纯度的产品。这一工艺克服了以往方法的弊病,简易可靠,分离效果好,为实验室制备和工业生产这一生化药物提供了新的简便途径。由于样品通过柱后, CMP 等被吸附在柱上,而胞二磷胆碱随上柱液顺流而下,类似滤过作用,因此我们简称此法为“滤过法”。

方 法

一、操作步骤

1. 胞二磷胆碱的合成

以 5'-CMP 和磷酸胆碱为原料,对-甲苯磺酰氯作缩合剂,用 N-二甲基甲酰胺作溶剂进行有机合成;胞二磷胆碱的转化率为 40—50% (详细方法见本刊 1975 年第 1 期)。

2. 分离的一般操作

(1) 调节上柱液的离子强度: 合成反应结束后,加水停止反应,每投料 1 克 CMP 加水 50 毫升。溶解后,用 0.10 当量氢氧化钠滴定其酸的浓度,通常为 0.7 M 左右。然后用水稀释反应液,使其酸的浓度在 0.1 M 以下,我们称此溶液酸的浓度为上柱液的“离子

强度”。

(2) 上 717 × 8 Cl⁻ 型阴离子交换树脂柱: 将已调好离子强度的溶液,经调 pH 8—9 后,上 717 × 8 Cl⁻ 型阴离子树脂柱。上柱量以每毫升树脂交换 140—250 光密度 (260 毫微米) 单位 (简称 OD₂₆₀) 计算。流速为每分钟每平方厘米柱截面积 1—1.5 毫升。收集上柱流出液。上柱完毕后,用少量水 (约一个柱体积) 洗柱至 OD₂₆₀ 在 0.5 以下,合并流出液及水洗液。此溶液经纸层析 (溶剂为 95% 乙醇—1 M 醋酸铵, 7:3, pH 7.5, 上行), 表明其中已不含有 CMP 等, 仅含胞二磷胆碱及无机盐和磷酸胆碱。后二者通过活性碳柱, 很容易除去。

(3) 脱盐: 将合并的溶液, 上 766 型活性碳柱, 以每克干活性碳吸附 2,500—3,000 OD₂₆₀ 计算, 胞二磷胆碱用酒精-氨-水溶液 (50:5:45) 洗脱。

(4) 上 711 × 4 Cl⁻ 阴离子树脂柱: 将上述酒精-氨-水洗脱液, 经减压浓缩除去酒精后, 上 711 × 4 Cl⁻ 树脂柱。上柱量每毫升树脂吸附 200—300 OD₂₆₀。用 0.02 当量甲酸溶液把胞二磷胆碱洗下来, 进行收集。所得洗脱液再经减压浓缩之后, 用丙酮、酒精反复沉淀, 可得产品。

实例: 投料 40 克 5'-CMP 进行合成, 反应三小时后, 加水 2,000 毫升, 停止反应。精确吸取 1 毫升溶液于三角烧瓶内, 用 0.10 当量 NaOH 滴定 (以酚酞为指示剂), 测得反应液酸的浓度为 0.73 M; 然后将反应液加水稀释至 20,000 毫升, 得离子强度为 0.073 M 的溶液, 其总 OD₂₆₀ 为 1,080,000。溶液用氨水调 pH 为 8—9, 上 717 × 8 Cl⁻ 型 100—150 目树脂柱, 柱高 80 厘米, 直径 10 厘米, 流速每分钟 90—120 毫升, 收集流出液。上柱完毕后, 用水洗柱, 合并流出液与水洗液共 20,900 毫升 (475,475 OD₂₆₀)。随后用盐酸调至 pH 2, 上活性碳柱, 柱高 64 厘米, 直径 6 厘米, 流速每分钟 28 毫升。上柱完毕, 用水洗碳柱至中性, 然后用酒精-氨-水溶液洗脱, 进行收集。洗脱液共 5,100 毫升 (473,400 OD₂₆₀), 于 40℃ 以下减压浓缩, 除去酒精, 维持 pH 8—9, 上 711 × 4 Cl⁻ (20—50 目) 树脂柱, 柱高 45 厘米, 直径 8 厘米; 待溶液上完后, 用水洗柱, 然后用 0.02 M 甲酸溶液把胞二磷胆碱洗下, 收集洗脱液

4,488 毫升(430,828 OD₂₆₀)；于 40℃ 以下减压浓缩至小体积后,用 5—6 倍体积丙酮、酒精反复沉淀,得白色粉末状产品 31 克,纯度 97%。表 1 示滤过法分离胞二磷胆碱的效果。

表 1 “滤过法”分离胞二磷胆碱的效果

	上柱反应液	分离各步骤获得的 OD ₂₆₀ 数		
	OD ₂₆₀ 数	717×8 树脂柱	活性炭柱	711×4 树脂柱
	1,080,000	475,475	473,400	430,828
获得 OD ₂₆₀ 数占上柱 OD ₂₆₀ 数的%		44		
胞二磷胆碱的回收率*		100		90

* 本次实验的胞二磷胆碱的转化率为 44%。胞二磷胆碱转化率的计算:对反应液进行纸层析,剪下所获的斑点,浸泡于 0.01N HCl 溶液中,在 260 毫微米紫外光下测其光密度数值,以胞二磷胆碱占所有斑点的光密度值总和的百分数为其转化率

表 2 上柱液的不同离子强度对分离的影响

上柱液	离子强度 (M)	0.26	0.2	0.13	0.1	0.05	0.02	0.01
	上柱量 (OD ₂₆₀ 数)	1,904	1,904	1,904	2,328	2,379	2,295	2,295
上柱流出液的 OD ₂₆₀ 数占上柱 OD ₂₆₀ 数的%		58.4	54.3	43.3	39.7	39	40	40
上柱流出	胞二磷胆碱 (%)	68.8	78	93	100	100	100	100
液中含有*	CMP (%)	31.2	22	7	0	0	0	0

* 以上柱流出液的 OD₂₆₀ 数为百分之百

上述结果表明,维持反应液的离子强度在 0.1—0.01 M 这一相当宽的范围内,都可取得良好的分离效果;所得上柱流出液仅含胞二磷胆碱而不含 CMP,其 OD₂₆₀ 数占上柱 OD₂₆₀ 的 39—40%,与转化率 40% 相当,即几乎可以获得转化的胞二磷胆碱全量。而离子强度高于 0.1 M 时,其上柱流出液的 OD₂₆₀ 的百分率为 43.3—58.4,大于转化率;纸层析表明,其中含有不同程度的 CMP 量。离子强度越高,流出液的 OD₂₆₀ 数越多,而 CMP 的含量也越多,分离效果越差。为了工业生产实用起见,我们认为以采用离子强度在 0.07 M 左右为宜。

2. 不同量的上柱液对分离的影响

取不同量的 0.07 M 离子强度的反应液(分别含 OD₂₆₀ 数由 500—4,000),上 717×8 树脂柱,进行观察。树脂体积、柱的尺寸以及其它操作步骤等均同前。结果发现,上柱样品量少,获得胞二磷胆碱的量低;随

二、影响“滤过法”分离的因素

“滤过法”成功与否主要取决于能否造成适当条件,使胞二磷胆碱与 CMP 等在树脂上具有不同的吸附能力,以达到分离目的。为了求得最适分离条件,我们对下列一些因素的影响进行了观察。

1. 上柱液的不同离子强度对分离的影响

取一定量的已知胞二磷胆碱转化率为 40% 的反应液,分别用水稀释成 0.26—0.01 M 几种不同离子强度的溶液,按上述分离的一般操作法,上 711×8 Cl⁻ 型树脂柱。树脂 12 毫升(柱高 12 厘米,直径 1.1 厘米),上柱量为 2,000 OD₂₆₀ 左右。反应液通过柱后,即取得胞二磷胆碱与 CMP 等的分离效果。收集上柱流出液,并用一个柱体积水洗柱,合并水洗液与流出液,测定其 OD₂₆₀ 数,计算此 OD₂₆₀ 数占上柱 OD₂₆₀ 数的百分率;同时对流出液进行纸层析,分析其中除胞二磷胆碱外,是否尚杂有 CMP 以及二者含量的比例。如果分离效果好则应无 CMP 存在,同时上柱流出液的 OD₂₆₀ 数占上柱 OD₂₆₀ 数的百分率应与转化率相当。实验结果见表 2。

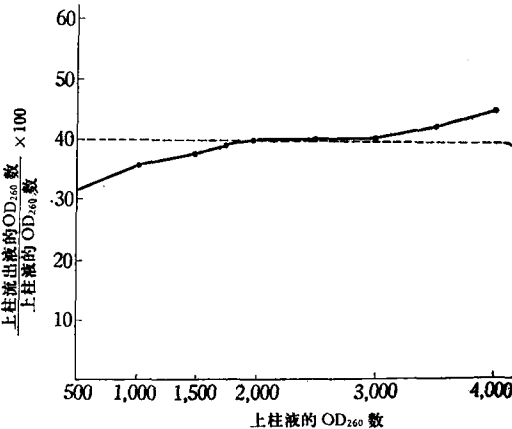


图 1 不同量的上柱液对分离的影响

---- 转化率为 40% 的不同量上柱液,应获得胞二磷胆碱量的理论值;
—— 不同量上柱液经分离后所得胞二磷胆碱的量

表 3 711 × 4 树脂对分离的影响

上柱液	离子强度 (M)	0.3	0.2	0.07	0.04
	上柱量(OD ₂₆₀ 数)	2,000	2,000	2,000	2,000
上柱流出液的 OD ₂₆₀ 数占上柱 OD ₂₆₀ 数的%		48.7	35.8	24.5	22.6
上柱流出液中含有*	胞二磷胆碱 (%)	65	78	100	100
	CMP (%)	35	22	0	0

* 以上柱流出液的 OD₂₆₀ 数为百分之百

出液 OD₂₆₀ 数的百分率低于转化率, 且已有 22% 的 CMP 存在。在最适离子强度 0.07 M 以及 0.04 M 时, 可得较纯的胞二磷胆碱, 但其量只占上柱 OD₂₆₀ 数的 24.5—22.6%, 为转化率的 3/5 弱, 损失太大, 分离效果很差。这一结果的造成是否由于树脂不同, 要求上柱量不同的缘故? 因此我们进一步观察不同上柱量对 711 × 4 树脂分离的影响。所获结果表明改变上柱量, 并不改变 711 × 4 树脂分离效果差的情况 (见表 4)。

表 4 不同上柱量对 711 × 4 树脂分离胞二磷胆碱的影响

上柱液	离子强度 (M)	0.07	0.07	0.07
	上柱量(OD ₂₆₀ 数)	6,000	4,000	2,000
上柱流出液的 OD ₂₆₀ 数占上柱 OD ₂₆₀ 数的%		42.8	35.9	24.5
上柱流出液中含有*	胞二磷胆碱 (%)	84.8	95	100
	CMP (%)	15.2	5	0

* 以上柱流出液的 OD₂₆₀ 数为百分之百

三、用“滤过法”分离CMP-胞二磷胆碱混合液

用高离子强度的上柱液上 717 × 8 树脂柱, 可造成树脂对胞二磷胆碱和 CMP 等选择性的吸附。为了进一步验证离子强度的作用, 同时为了扩大“滤过法”的应用范围, 观察了它对含有 CMP 和胞二磷胆碱两种成分的溶液的分离作用。我们配制了含 63% 胞二磷胆碱和 37% 5'-CMP 的混合液作为样品, 外界加入无机盐氯化铵以调节成不同离子强度的溶液, 进行上柱分离。结果表明, 混合液的离子强度在 0.1 M 以下, 可取得与反应液同样好的分离效果。这说明无论通过稀释反应液或外界加入无机盐, 只要维持所要求的离子强度, 即可造成树脂对 CMP 与胞二磷胆碱二者不同的吸附能力, 起到分离作用 (见表 5)。

上柱量增多, 得量增高。当上柱量在 1,700—3,000 OD₂₆₀ 时, 获得胞二磷胆碱的量恒定, 与转化的胞二磷胆碱的理论值相当。当上柱量超过 3,000 OD₂₆₀ 时, 流出液的 OD₂₆₀ 的百分率大于转化率, 其中含有 CMP。因此可见不同上柱量对分离的影响不是线性关系。而最适上柱量为每毫升树脂上柱 140—250 OD₂₆₀, 大于或小于此量时均对分离有影响 (见图 1)。

3. 胞二磷胆碱的不同转化率对分离的影响

用不同转化率的反应液 (胞二磷胆碱的转化率由 8.5—60%) 为样品, 调节到最适离子强度 0.07 M, 上 717 × 8 树脂柱, 其余条件同前。结果由图 2 可见, 通过分离得到的胞二磷胆碱的量, 与不同转化率时应得到胞二磷胆碱量的理论值相吻合, 都能获得全量, 也无 CMP 存在, 说明转化率的差异 (由 8.5—60%) 并不影响分离效果。

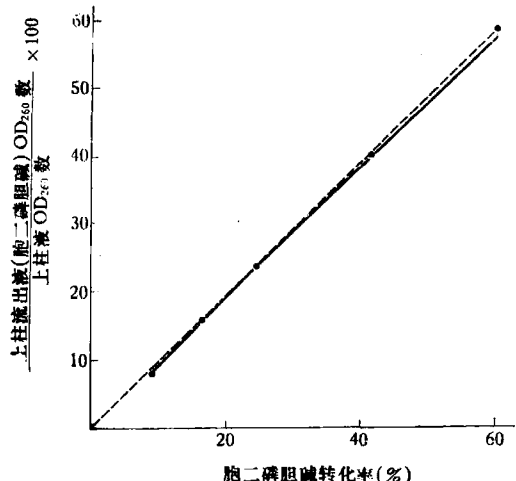


图 2 胞二磷胆碱的不同转化率对分离的影响

----- 在不同转化率时, 应获得胞二磷胆碱量的理论值;
—— 在不同转化率时, 实际分离所得胞二磷胆碱的量

4. 树脂的类型对分离的影响

在以“滤过法”分离胞二磷胆碱时, 我们采用 717 × 8 树脂, 获得很好的效果。这一树脂是聚苯乙烯型强碱性阴离子交换树脂, 具有交联度高、网状结构紧密、孔隙小的特点。为了比较树脂对分离的影响, 我们用同一类型但交联度为 4 的 711 × 4 树脂, 进行分离观察。表 3 所示结果表明, 711 × 4 树脂的分离效果很差。

从 0.04—0.3 M 的不同离子强度的上柱液, 经分离得到各自的上柱流出液, 其 OD₂₆₀ 数占上柱 OD₂₆₀ 数的百分率无一与转化率 40% 相当。在高离子强度 0.3 M 时, 虽然上柱流出液 OD₂₆₀ 数占上柱 OD₂₆₀ 数的 48.7%, 高于转化率, 但其中含有较多的 CMP, 而胞二磷胆碱仅占其中 65%, 因此并不能获得转化的胞二磷胆碱全量。在 0.2 M 离子强度时, 不但所得上柱流

表 5 对 CMP-胞二磷胆碱混合液的分离

上柱液	离子强度(M)	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01	0
	上柱量(OD ₂₆₀ 数)	1,700	1,700	1,700	1,700	1,700	1,700
上柱流出液的 OD ₂₆₀ 数 占上柱 OD ₂₆₀ 数的%		78	64	63	62	49.9	0
上柱流出	胞二磷胆碱(%)	77	100	100	100	100	
液中含有*	CMP(%)	23	0	0	0	0	

* 以上柱流出液的 OD₂₆₀ 数为百分之百

讨 论

1956年 Kennedy 用有机化学方法合成了胞二磷胆碱,至今虽然在合成方法上已有了很大进展,但在分离方法上很少改进,一直沿用 Kennedy 的柱层析法,即将样品全部吸附离子树脂柱上,进行洗脱分离。Kennedy 用 1×15 厘米甲酸型 Dowex 1×2 树脂柱,分离以 120 毫克 CMP 合成胞二磷胆碱的反应液,分离所得胞二磷胆碱与 CMP 有交叉峰。Kikugawa (1971) 提高树脂用量及柱的高度 1.7—3 倍,虽然分离效果较好,但是同 Kennedy 的方法一样,存在着洗脱过程慢、时间长、收集液的体积大、浓度低等缺点。Tochikura (1970) 用 20—30 微克分子的 CMP 为底物,进行微生物合成胞二磷胆碱,反应后先将反应液通过活性碳柱,之后再经 1×19 厘米氯型 Dowex 1×2 树脂柱分离,也仍有上述缺点。这些问题的存在,对工业上生产这一药物很不利。

毛主席教导我们:“独立自主、自力更生”,“打破洋框框,走自己工业发展道路。”结合生产实际,我们认为,旧方法需要把胞二磷胆碱和 CMP 等全部吸附在柱上再进行分离,是造成上述洗脱时间长、树脂用量大等弊病的原因。用阴离子树脂分离核苷酸及其衍生物,通常维持样品溶液在 pH 7 以上,离子强度在 0.02 M 以下进行上柱;pH 过低,离子强度过高,不利于吸附,从而导致失败。因此对分离来说,这些因素是不利的。但是,“一切矛盾着的东西,互相联系着,不但在一定条件之下共处于一个统一体中,而且在一定条件之下互相转化”。不利的因素有可能转化为有利因素,由于不吸附造成分离失败有可能转变为分离成功。我们采用高离子强度的样品溶液上柱,用交联度大的树脂来分离,使通常是不利的因素变为分离的最适条件,建立了新的分离工艺——“滤过法”。这一方法革除了洗脱步骤,克服了旧法的缺点,缩短了生产周期,分离快、效果好,胞二磷胆碱的回收率和纯度均可达到 90% 以上,树脂用量及柱高也仅需旧法的一半。因此,对于实验

室制备特别是工业上大批地生产这一药物,此法显得较以往方法优越。

在“滤过法”中,胞二磷胆碱与 CMP 等二者受离子的影响并不相同,离子强度的差异甚大;维持离子强度在 0.1 M 以下主要是使 CMP 等可吸附于柱上,而在离子强度 0.01 M 时,已足以导致胞二磷胆碱流出柱外。应用不同交联度的树脂,效果不同,交联度小的树脂比交联度大的分离效果差;实验结果表明以使用 717×8 树脂为宜。上柱量虽有影响,但不呈线性关系;转化率(由 8.5—60%)并不影响分离。因此,我们认为造成胞二磷胆碱的流出,达到和 CMP 等分离的作用,不能归结为树脂交换容量所致。对于产生这些差异的原因及“滤过法”分离的原理,我们初步解释是由于:(1)胞二磷胆碱的分子结构与 CMP 不同,它含有一个强的生物碱分子,因此离子的阴电荷弱,同时分子量比 CMP 大,所以阴树脂对胞二磷胆碱的交换吸附能力差。(2)胞二磷胆碱和 CMP 对溶液中离子的竞争能力不同,前者较强,后者则弱。(3)交联度大的树脂孔隙小,也大大限制了胞二磷胆碱的吸附。基于上述因素的综合,因而在分离柱上造成两种作用:一种是 CMP 等与树脂进行离子交换的作用,被吸附于柱上;一种是胞二磷胆碱由柱上顺流而下,产生类似分子筛的过滤作用;由于树脂选择性的吸附,使二者分离。用交联度小的 711×4 树脂时,它的孔隙大,对二者的吸附都不造成限制。此时虽然在高离子强度溶液中二者的吸附都不利,只是因为胞二磷胆碱本身吸附能力弱,才有部分流出。离子强度高于 0.1 M 时,CMP 受离子的竞争也增强,以致也流出柱外。

用外界加入无机盐调节离子强度的方式,对 CMP-胞二磷胆碱混合液的分离成功,进一步验证了离子强度的作用。同时也表明“滤过法”不限于分离有机合成的胞二磷胆碱,还可同样好的用于其它制备胞二磷胆碱的方法中。如用微生物合成法,在发酵液通过活性碳柱获得酒精-氨水洗脱液之后,即可采用“滤过法”进行分离。用外界加入无机盐分离 CMP-胞二磷胆碱混

(下转第 24 页)

三、 ^3H -cAMP 的分析鉴定

纸层析鉴定 ^3H -cAMP 只有一紫外吸收点(溶剂系统前),比移值与标准 cAMP 相同。

^3H -cAMP 的紫外吸收光谱性质与标准 cAMP 一致。放化纯度是将放射层谱用液体闪烁计数器纸片法鉴定,从点样线前 1 厘米至前沿,分成 25 等分,测定结果见图 4。两次氟化实验所得 ^3H -cAMP 的放化纯度均在 98% 以上。

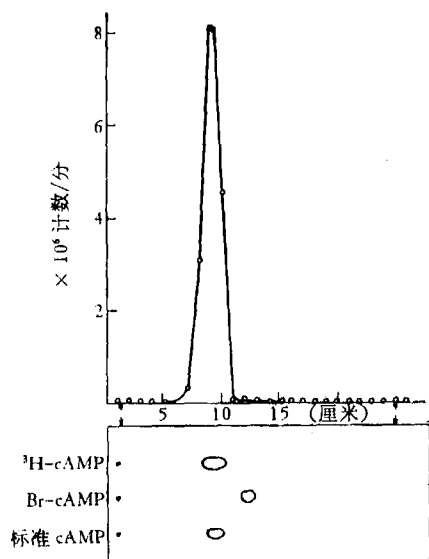


图 4 ^3H -cAMP 放射层析谱

(箭头所示处分别为点样线和溶剂前沿线)

比放射性的测定是用液体闪烁计数器和紫外吸收光谱,分别测定 ^3H -cAMP 的放射性及浓度。两次氟化产物的比放射性分别为 11.6 居里/毫克分子及 11.2 居里/毫克分子。

四、 ^3H -cAMP 的稳定性

浓度为 1 毫居里/毫升及 0.5 毫居里/毫升的

(上接第 21 页)

合液时,我们发现离子强度的下限为 0.02 M,低于 0.02 M 时获得胞二磷胆碱的量较差,这与有机合成反应液时不同。考虑到反应液中主要含有机离子,而外界加入的是无机离子,因此是否因离子性质不同而分离效果不同? 我们认为,当使溶液中离子的强度足以影响胞二磷胆碱吸附时,离子性质的差异不显现;当离子强度低时,有机的与无机的离子作用的差异才显示出来,因而分离效果不同。我们曾用对-甲苯磺酰氯等来代替氯化铵加入 CMP-胞二磷胆碱混合液中,调到低的离子强度 0.01 M 来分离,结果获得胞二磷胆碱的量确较同浓度氯化铵的高。

^3H -cAMP, 在 50% 乙醇溶液中贮存于低温冰箱 (-20°C) 六个月后,经层析鉴定,放化纯度仍可达 97%;但在水溶液中贮存时,三个月后放化纯度已降至 65% 左右。

五、讨论

制备氟标记化合物时,选择适当的溶剂对氟化效率有很大的影响。当需要比度较高的氟标记化合物时,多选用不含有可交换氢的有机溶剂,如二氧六环、乙酸乙酯等。但核苷酸之类的生化试剂不溶或极少溶于有机溶剂,给制备此类氟标记化合物带来了很大困难。Filip 等人^[1]研究了在不同浓度 H^+ 及 OH^- 溶液中氢与氟的交换,指出在碱性 pH 时,氢与氟的交换较还原脱卤的速度低。我们在制备 ^3H -cAMP 时,在碱性水溶液中以 Pd/BaSO₄ 为催化剂氟化(或氢化)脱卤,在 20—30 分钟内即顺利完成,得到比度较高的 ^3H -cAMP。增加氟化时间并不提高比度。

在工作中,我们采用了体积较小的反应瓶,每次反应只需 2 毫升氟气,既可节省氟源,又便于小量制备。

核苷酸等类化合物在酸性 pH 吸附于活性碳,又容易被碱性的乙醇溶液洗脱,因此如果被氟化的此类化合物较纯,经氟化后用活性碳柱分离纯化远较纸层析分离简便,回收量也高。

参 考 资 料

- [1] Ikahara, M. et al: *Chem. Pharm. Bull.*, 17, (2), 348, 1969.
- [2] Filip, J. et al: *Czech.*, 137984, 15 Aug, 1970.
- [3] Muneyama, K. et al: *Biochem.*, 10, (12), 2390, 1971.
- [4] Kuhn, R. et al: *Liebigs Ann. Chem*, 713, 50, 1968.
- [5] 中国科学院上海生物化学研究所, 上海第二医学院: 未发表。

[本文于 1975 年 5 月 5 日收到]

用“滤过法”可以很容易地将胞二磷胆碱与 CMP 等分开,大大简化了分离步骤,但是在流出液中含有多量的盐,因而需采用活性碳柱来去盐。为了使产品色泽好、纯度高和便于应用在微生物合成法上除去含有的胞苷,因此增加一个 711 $\times$ 4 浓缩柱(使用 711 $\times$ 4 柱作浓缩柱,是因为它的交换容量大)。从所获结果来看,产品回收率较好,但有少部分损失,步骤尚可改进简化。如果分离的树脂采用 OH^- 型取代 Cl^- 型,以避免上柱流出液中存在大量的盐,使流出液可直接上浓缩柱,省去活性碳柱,则可进一步提高分离效率。

[本文于 1975 年 3 月 20 日收到]