

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 117 期

连续流层析 MCSGP 在大麻二酚
(CBD) 纯化的应用



2019 年 3 月

第 117 期 连续流层析 MCSGP 在大麻二酚 (CBD) 纯化的应用

大麻二酚 (cannabidiol, CBD) 可用于治疗多种病症及缓解疼痛。最近, FDA 批准了一种高纯度 CBD 制剂 (Epidiolex) 用于治疗癫痫。从大麻植物中提取的 CBD 粗提物含有大量其它物质, 包括精神活性物质四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol, THC), 由于 THC 在大多数国家是受管控的, 因此纯化 CBD 时必须要求将 THC 降低至 100-1000 ppm。传统的 CBD 纯化方法, 即单柱层析, 是以牺牲 CBD 收率为代价将 THC 含量降低至该水平的, 浪费了大量目标产物。通过 Multi-column Counter-current Solvent Gradient Purification (MCSGP, 多柱逆流溶剂梯度纯化) 可有效解决该问题, 能够分离出高纯度、高收率、高产量的目标产物, 且纯化效率显著优于单柱层析。本文阐述如何从预处理的大麻植物提取物中获得高纯度 CBD, 并将 THC 含量降低至要求范围内。

介绍

在大麻二酚 (CBD) 的生产中, THC 及其它植物性杂质 (如蜡质和色素) 很难去除, 需要经过一系列的预处理和纯化步骤, 才能从大麻中提取获得高纯度、低 THC 含量的 CBD 产品。

从大麻提取物中纯化 CBD 需要进行预处理, 包括植物的粉碎、干燥、CO₂ 提取、脱羧和蒸馏、层析和结晶。为了将大麻相关杂质 (主要是 THC) 降低至 100 ppm, 必须采用层析方法。提取物中的蜡质和其它杂质会对层析填料造成污染, 所以必须在层析之前通过预处理将这些杂质去除干净。大麻素类物质的水溶性较差, 需要采用反相层析进行纯化, 相关工艺的有机溶剂用量很大。一些杂质与 CBD 产品出峰有重叠部分, 分离具有挑战性。采用单柱层析, 需要在纯度和收率之间做出权衡, 两者此消彼长, 若要获得高纯度的 CBD, 通常收率都很低。如何在获得高纯度的产品的同时, 保证高收率, 是该工艺所面临的难点。

MCSGP 原理

Multi-column Counter-current Solvent Gradient Purification (MCSGP) 是采用双柱进行连续纯化, 可以解决单柱层析时纯度和收率无法同时保证的问题。

采用 MCSGP, 可将含有不纯组分的产品回收再纯化, 进行循环式的层析操作, 从而最大限度地提纯产品, 使得纯度和收率二者兼得。

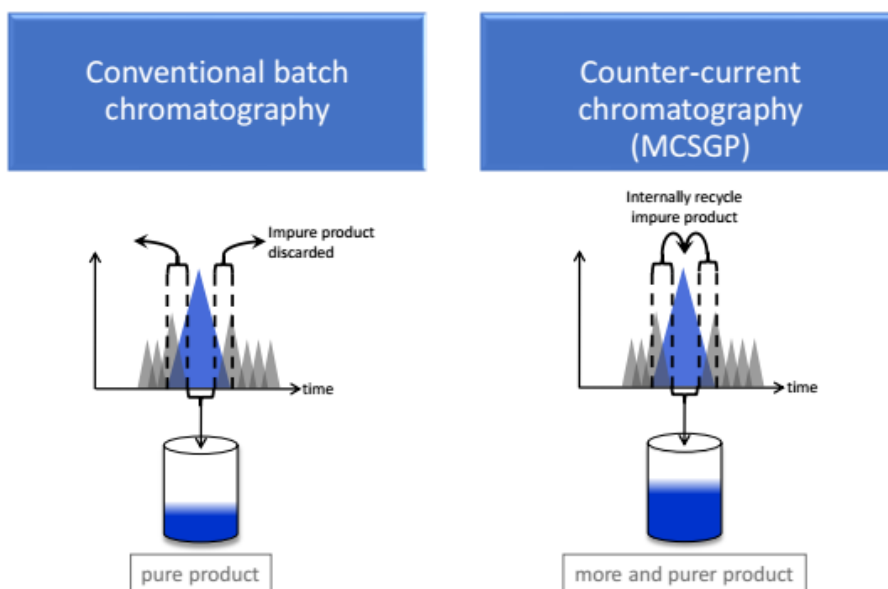


图 1. 传统单柱层析（左）：重叠组分被舍弃；MCSGP（右）：重叠组分被在线回收，再次纯化。

材料和方法

工艺步骤：大麻是在室内受控环境下生长的，需对大麻进行采摘、干燥、预处理和纯化。

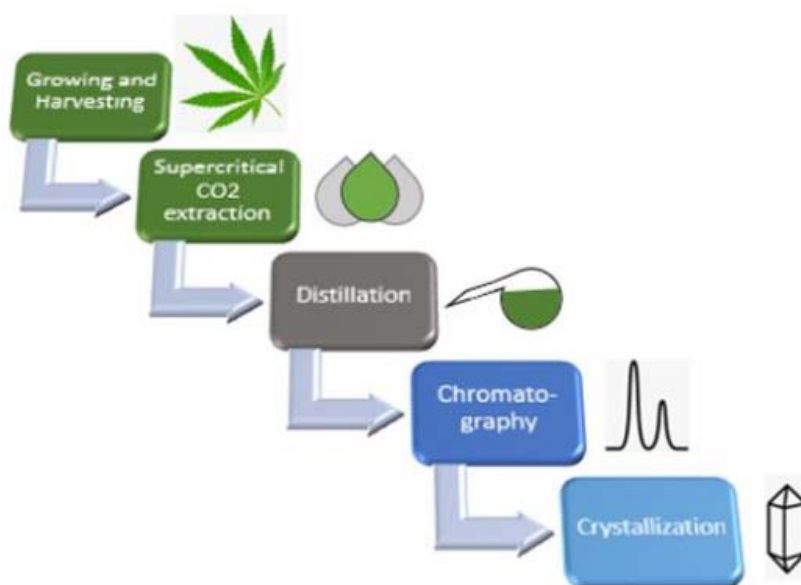


图 2. CBD 工艺步骤

层析样品：层析的上样样品是蒸馏液和甲醇的混合物，CBD 纯度为 85.2%，浓度为 250 g/L。该结果通过 Agilent 1100 型高效液相，采用 C8 反相柱测得，测定波长为 230 nm，标准进样量为 10 μ L。经测定，上样样品中的 THC 含量为 4.8%（48,000 ppm）。

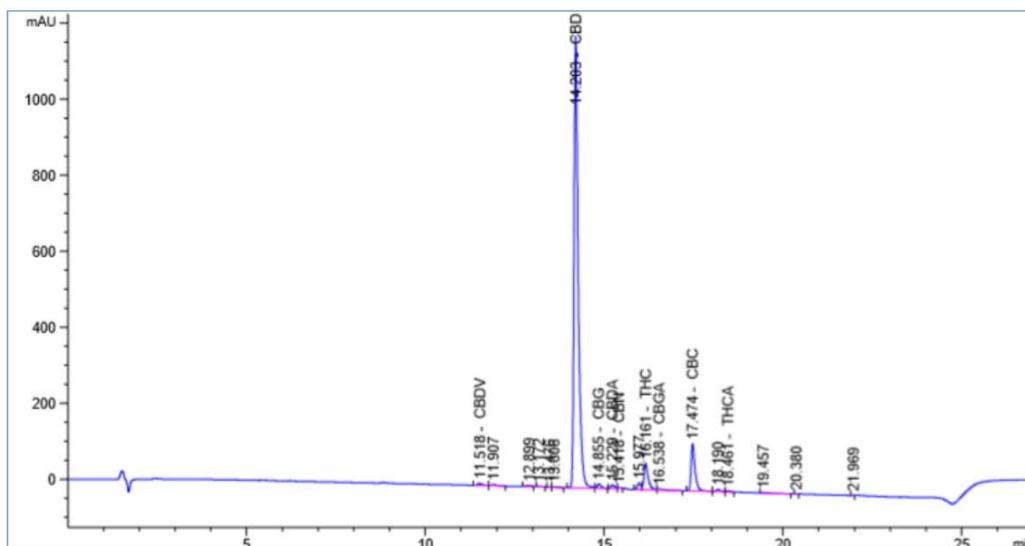


图 3. 上样样品分析图谱

层析纯化:同时采用单柱层析和双柱 MCSGP 纯化 CBD, 监测 280 nm 处紫外吸收值。层析柱内径 10 mm, 柱床高度 150 mm, 柱床体积 11.9 mL, 装填介质为 C18 反相填料。每次上样体积为 0.37 mL。以 70% B 进行等度洗脱, 洗脱流速 305 cm/h (即 4 mL/min), 洗脱时长 90 min。洗脱完毕后进行层析柱清洗。所有操作均在室温 (25°C ± 3°C) 进行。该条件下, 层析柱的反压为 50 bar。

单柱层析结果

层析过程图谱见图 4 和图 5。分段收集洗脱产物, 并进行液相分析 (图 5)。

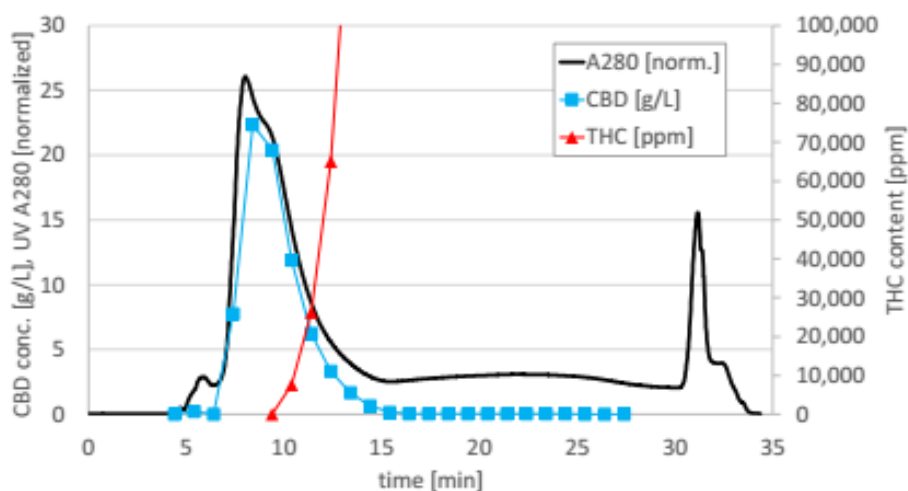


图 4. C18 纯化 CBD 过程图谱, 显示 UV280 nm、CBD 浓度、THC 含量 (THC 含量在 10min 左右开始显著升高)

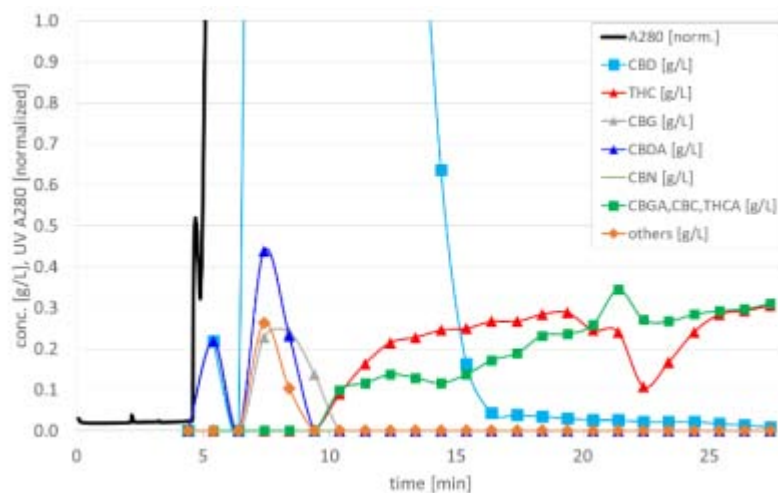


图 5. 层析过程图谱局部放大，显示目标物（CBD）和主要杂质浓度

MCSGP 设计

MCSGP 采用与单柱工艺相同的层析柱、溶剂及基本工艺参数。

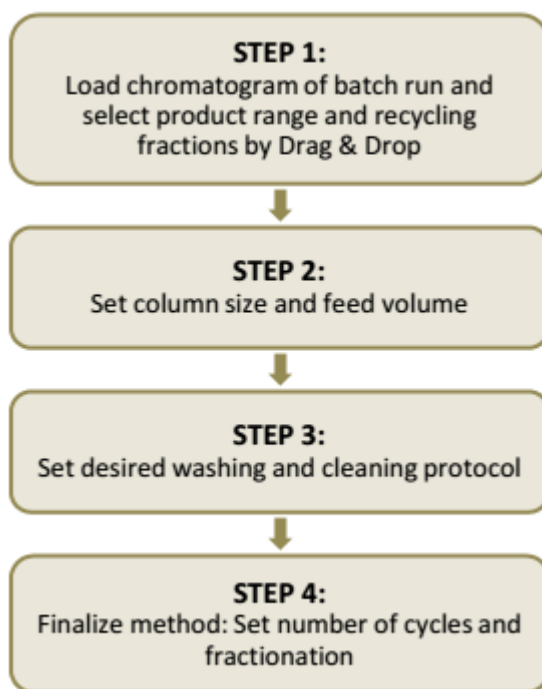


图 6. MCSGP 工艺设计流程图

STEP 1: 根据分段收集及液相分析结果，对单柱层析图谱进行区域划分设计（图 7）。

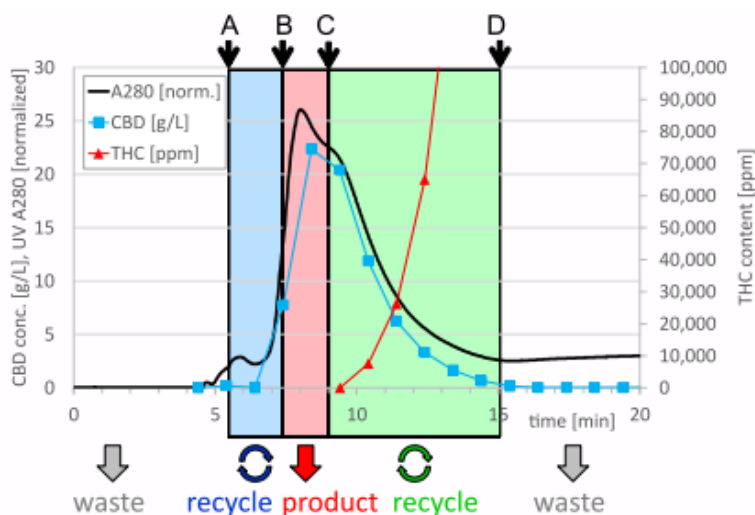


图 7. 单柱层析图谱进行区域划分设计

- A: CBD 浓度 2.7 g/L (2,000 mAU) 时开始进行回收 (recycle);
- B: CBD 浓度 13.3 g/L (10,000 mAU) 时开始收集目标产物 (product);
- C: 紫外值低于最大峰值 10% 时结束收集目标产物, 并再次开始回收;
- D: 6 min 后, 结束回收。

STEP 2: 设定层析柱规格及上样量。MCSGP 所用 2 根层析柱的规格与单柱层析完全相同。

STEP 3: 设定基本工艺参数。MCSGP 基本工艺参数与单柱层析完全相同。

STEP 4: 设定 cycle 次数, MCSGP 向导软件自动显示上样总量, 自动生成 StartUP 及 ShutDown 方法。如因环境条件 (温度等) 造成出峰漂移等, 可选择开启 MControl 过程控制功能, 保证工艺稳定性。

MCSGP 向导软件可自动计算回收阶段的在线稀参数, 并可显示所需进料的总体积、溶剂和运行时间等。

MCSGP 操作

为了优化 MCSGP 工艺, 在不同的操作条件下进行了多次运行, 对产品洗脱区和回收区的划分进行了细微调整, 最终确定出最佳条件, 并以该条件运行 MCSGP。图 8 显示了最终用于 CBD 纯化的 MCSGP 运行图谱, 总计运行了 8 个 cycle, 由图可见 cycle 重现性良好。

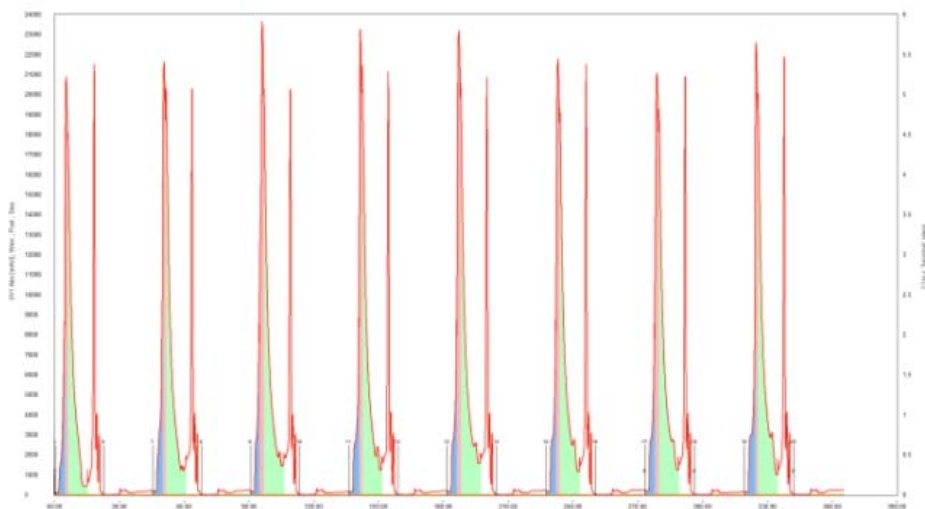


图 8. MCSGP 运行图谱，总计运行 8 个 cycle。该图仅显示柱 1 的 UV 变化，蓝色和绿色区域为回收区，位于蓝色和绿色之间的红色区域为目标产物收集区。

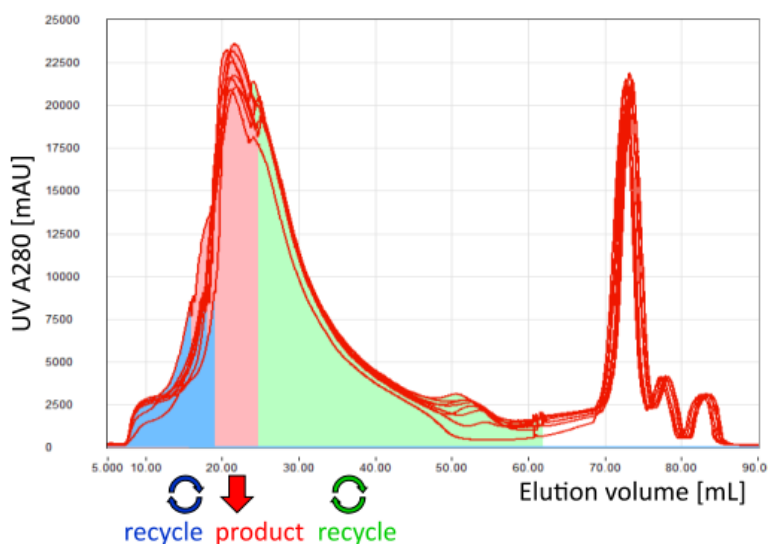


图 9. MCSGP 各 cycle 的叠加图谱

图 9 各 cycle 重叠性良好，表明 MCSGP 功能运行稳定，各 cycle 的产率、产品浓度及纯度均保持稳定。保留时间和峰形的变化由 MControl 自动补偿，MControl 根据紫外线阈值启动 CBD 收集，当紫外信号低于最大峰值 10% 时结束收集。

使用分析液相测定 MCSGP 每个 cycle 洗脱产物（2 个/cycle，每柱各 1 个）的纯度和产物浓度。图 10 显示，CBD 产品的纯度大于 99.5%。

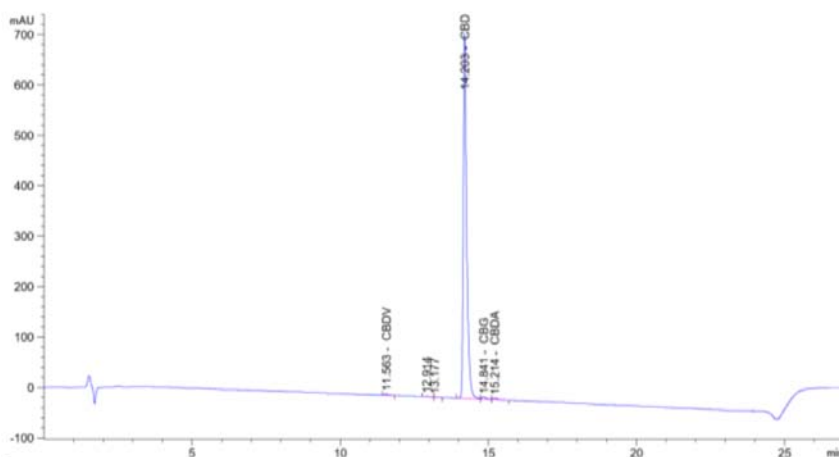


图 10. MCSGP 纯化所得 CBD 液相分析图谱

单柱层析与 MCSGP 的对比

从收率、纯度、产率、产品浓度和溶剂消耗等方面对单柱层析和双柱 MCSGP 进行了计算和比较，MCSGP 在各方面均表现出明显优势。

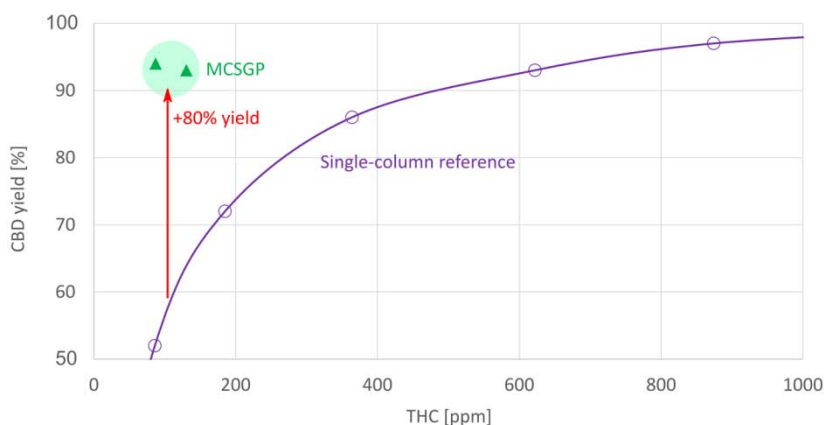


图 11. 纯度 - 收率曲线

图 11 为单柱层析与 MCSGP 收率对比图。已规定最大 THC 含量为 100 ppm，在这一水平，单柱层析的 CBD 收率仅为 52%，而 MCSGP 的 CBD 收率为 94%，比单柱层析高出 80%。

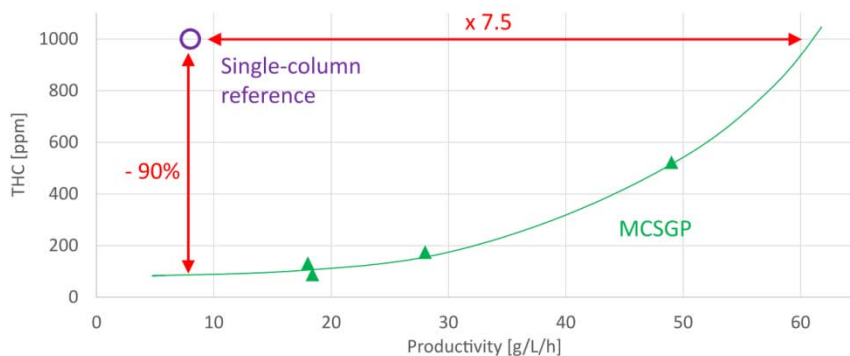


图 12. 纯度 - 产率曲线

MCSGP 可用于不同工艺要求。如果对目标产品的纯度要求并不高，采用 MCSGP 可使产率进一步提高。比如某企业要求 THC 含量上限为 1000 ppm 时，收率水平不得低于 85%，用 MCSGP 代替单柱层析后，产率由原来的 8 g/L/h 提高到了 60 g/L/h 以上。而另一工艺情况为，当从单柱层析转换为 MCSGP 时，保持产率不变，杂质 THC 含量可从 1000 ppm 降低至 100 ppm。见图 12 纯度 - 产率曲线。

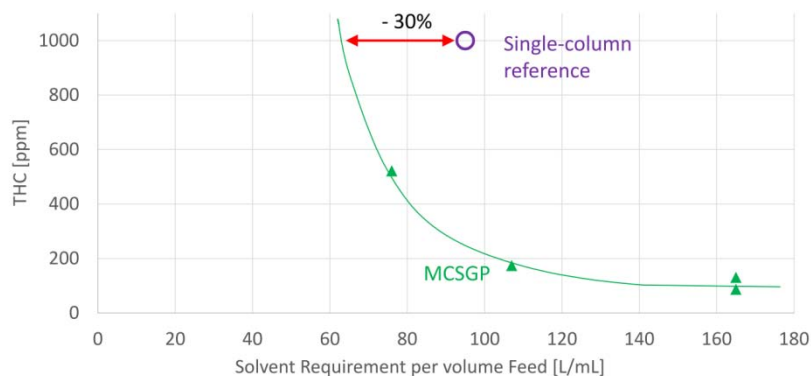


图 13 纯度 - 溶剂消耗曲线

图 13 显示了单柱层析和 MCSGP 的溶剂消耗对比。在要求 THC 最大含量为 1000 ppm 时，MCSGP 可使溶剂消耗量降低 30%。单柱层析的溶剂消耗量为每 mL 上样样品消耗 95 mL 溶剂，而 MCSGP 的溶剂消耗量仅为每 mL 上样样品消耗 65 mL 溶剂。

总结

与单柱层析相比，MCSGP 在大麻二酚（CBD）的纯化和杂质 THC 的去杂方面具有明显优势。主要包括：

1. 在 THC 含量要求 100 ppm 时，MCSGP 可使 CBD 收率提高 80% 左右；
2. 在 THC 含量要求 1000 ppm 时，MCSGP 可使产率提高 7.5 倍左右；
3. 在 THC 含量要求 1000 ppm 时，MCSGP 可使溶剂消耗量降低 30%。

溶剂消耗量的减少可显著降低溶剂采购成本、溶剂再生/处理成本，并减少制备和储存溶剂所需的占地面积。

MCSGP 的每个 cycle 仅收集 2 次 (per cycle / per switch)，而单柱层析过程的各组分需要分段收集、送检，因此采用 MCSGP，可使 HPLC 检验工作量显著降低。

通过 MCSGP 提高产率，可应用于多种生产方式：

1. 可采用更小规格的层析柱，在相同的时间内，完成与单柱层析相同的生产任务；
2. 可采用与单柱层析相同规格的层析柱，在更短的时间内完成生产任务；
3. 层析介质体积相同时，可在相同时间内获得更多的产品。

层析系统介绍

Contichrom HPLC: Contichrom HPLC 是一套多用途的制备型实验室级层析系统，可运行多种单柱和双柱模式。ChromIQ 是 Contichrom 系统的操作软件，其中包括 MCSGP 向导功能。



| <i>Contichrom HPLC 30/100 System Specifications</i> | |
|---|---|
| Flow rate range | 0.1 – 36 / 0.1 – 100 mL/min |
| Pressure rating | 100 bar |
| Number of columns | 1-2 |
| Number of buffers / solvents | Up to 18 |
| Fractionation | 3 fractions (valve), optional fraction collector |
| UV Detectors | Fixed wavelength A280, A255, detection behind each column Optional external variable wavelength detectors with 190-500 nm wavelength |
| Conductivity / pH detectors | 1 each included |

EcoPrime Twin HPLC : EcoPrime Twin HPLC 为生产型连续流层析系统，可在 GMP 条件下运行 MCSGP 功能，满足 MCSGP 工艺的有效线性放大。



北京慧德易专注于层析领域十余年，现与瑞士 ChromaCon 公司强强联合，将世界领先的 Contichrom

双柱连续流层析技术引进中国，并已于 2017 年在北京昌平生命科学园蛋白质药物国家工程研究中心成立慧德易实验室&培训中心，现已成功举办多期连续流技术培训班。



北京慧德易实验室&培训中心可为广大客户提供工艺开发、产品展示及培训服务，欢迎广大客户莅临指导！

PRESS RELEASES | EVENTS



October 27, 2017 | ChromaCon and its partner H&E open a training center in Beijing

Press release. The center will provide courses on automated and continuous chromatography with Contichrom FPLC equipment.



北京慧德易科技有限责任公司
咨询电话：010-59812370/1/2/3
公司官网：www.prep-hplc.com
邮 箱：sales@prep-hplc.com
微信公众号：北京慧德易