

文章编号:1001-6880(2014)3-0427-05

# 微波辐射合成小檗红碱的工艺研究

刘丽贤<sup>1,2</sup>,袁晓<sup>2</sup>,高英<sup>3</sup>,周东斌<sup>2</sup>,李卫民<sup>1\*</sup><sup>1</sup>广州中医药大学中药学院,广州 510006; <sup>2</sup>广州老牌生物科技有限公司,广州 510000;<sup>3</sup>广州中医药大学新药中心,广州 510006

**摘要:**首次以 DMF 为反应介质,微波法快速合成小檗红碱。通过单因素法,考察了反应功率、液料比、反应时间对产率的影响,并采用析晶的方法纯化产物,产品纯度和结构经 HPLC、UV、IR、ESI-MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 确定,得出最佳合成工艺条件:微波功率 400 W、微波时间 15 min、小檗碱与 DMF 料液比为 1:25 (g: mL),析晶纯化,纯度 98%,收率 93%。并与传统的真空热解法相比,微波辅助合成可使产率提高近 15%,反应时间缩短近 4 倍;且反应物纯度高(≥95%),可直接析晶纯化,方法经济简便。

**关键词:**小檗红碱;微波;合成;小檗碱;真空热解

中图分类号:O629.3;R284.3

文献标识码:A

## Synthesis of Berberrubine under Microwave Irradiation

LIU Li-xian<sup>1,2</sup>, YUAN Xiao<sup>2</sup>, GAO Ying<sup>3</sup>, ZHOU Dong-bin<sup>2</sup>, LI Wei-min<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; <sup>2</sup>PI & PI Biotechnology (Guangzhou) INC, Guangzhou 510000, China; <sup>3</sup>New Drug R&D Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** In this study, DMF was adopted as reaction medium for the first time in the synthesis of berberrubine under microwave irradiation. The effect of reaction power, solid-liquid ratio and reaction time on yield of berberrubine was studied using single factor tests. After crystallization and purification, the purity and structure of berberrubine was tested by HPLC, UV, IR, ESI-MS, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR. The optimal synthetic conditions were determined to be: microwave power 400 W, microwave time 15 min, berberine/DMF ratio 1:25 (g: mL). The yield was up to 93% under the optimized experimental conditions and the purity of berberrubine after purification was as high as 98%. Compared with traditional method of synthesizing berberrubine by vacuum pyrolysis, the yield of berberrubine under microwave irradiation was increased by nearly 15% while the reaction time was shortened by 4 times. In addition, the purification process was economic and simple.

**Key words:**berberrubine; microwave; synthesis; berberine; vacuum pyrolysis

小檗碱(Berberine, BBR)与小檗红碱为异喹啉生物碱,均具有抗微生物、抗肿瘤、降压、抗心律等作用<sup>[1,2]</sup>。此外,BBR 还具有降糖、治疗阿尔茨海默病等多种药理活性<sup>[1]</sup>,但因溶解性差及生物利用度低,制约其临床应用。BBR 结构中不存在制备前药的“抓手”,如羟基(-OH)、羧基(-COOH)等基团,而高温下小檗碱(C9-CH<sub>3</sub>)易脱甲基生成小檗红碱(C9-OH)。为此,小檗碱 C-9 位的修饰,大部分以小檗红碱为中间体进一步衍生,其衍生物具有抗肿瘤,抗 HIV 等多种活性<sup>[3,4]</sup>。

目前,小檗红碱传统合成方法是真空热解法。

Jwasa K<sup>[3]</sup>将 BBR 在真空 190 °C 加热 15 min,粗品用乙醇/甲醇重结晶,产率 69%;而 Hardik S<sup>[4]</sup>等,则反应 1~2 h,粗品用氯仿/甲醇 9:1 硅胶柱层析,产率 90%。本课题组对上述反应方法进行重现,未经纯化,产率约为 84%。

其次也有 2 篇微波法合成的报道。2002 年, Das<sup>[5]</sup>等首次提出微波合成法,以氧化铝浴中微波反应 5 min,收率 98%。2010 年,张明晓<sup>[6]</sup>等则直接将 BBR 放入微波炉中 600 W 反应 5 min。本课题组通过重现试验发现,按方法<sup>[6]</sup>即使反应 1 h, BBR 也基本不发生转化;而方法<sup>[5]</sup>的重现结果则是 BBR 受热十分不均,往往只有局部发生转化,或局部反应过剧而碳化,未能达到 98% 的收率。

由此可见,现时的微波合成法虽比真空热解法节能省时,但两种方法均存在受热不均、产物纯度低,产率低的问题。为此,本课题组创新选择高沸点稳定的极性介质 DMF 为溶剂,采用微波法合成小檗碱,具有受热均匀,反应时间短,产物纯度、产率高,纯化方法简单等优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

微电脑微波化学反应器 WBFY-201(800W),有机合成装置,隔膜真空泵 YH-700,X-5 显微熔点测定仪,低温冷却循环泵 DLSB-5/25(均购于巩义市予华仪器有限责任公司);HITACHI 高效液相色谱仪(含 HITACHI 1110 泵,1410 紫外检测器,1210 自动进样器);UV-1601 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);Bio-Rad Merlin 红外谱仪;Agilent 1100 LC/MSD 系统;AVANCE-300 超导核磁共振仪(德国 BRUKER 公司);分离纯化系统 Dr Flash-S(江苏利穗科技);PiPo-02 大孔树脂(广州牌牌生物科技有限公司);盐酸小檗碱(BBR,96%);小檗红碱对照品(自制, $\geq 98\%$ );N,N-二甲基甲酰胺(DMF,天津市富宇精细化工有限公司);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 反应原理



#### 1.2.2 实验步骤

在圆底烧瓶中加入一定量料液比为 1:25(g:mL) 的 BBR 和 DMF,数颗沸石,回流冷凝,在 400 W 微波辐射下,反应 15 min。取出反应瓶,趁热加入 1.5 倍水稀释冷却,冷藏过夜,使析晶完全,抽滤,干燥,得红色针晶,收率约 72%;滤液另以 PiPo-02 大孔树脂柱分离,依次用 40%、45%、50%、55%、60%、65% 及 70% 甲醇洗脱,收集 70% 甲醇洗脱部位,浓缩,得红色针晶,收率约 21%;产品总收率约 93%,纯度 $\geq 98\%$ 。

#### 1.2.3 单因素实验

##### 1.2.3.1 反应功率的考察

在 100 mL 圆底烧瓶中加入数颗沸石,小檗碱

100 mg(0.27 mmol),DMF 5 mL,即料液比为 1:50(g:mL),分别在 240、400、640、800 W 微波辐射下,回流冷凝 15 min,反应重复 3 次,按“1.2.6”项下计算产量及产率,取平均值。

##### 1.2.3.2 料液比的考察

在 250 mL 圆底烧瓶中加入数颗沸石,小檗碱 1 g(2.69 mmol),分别加入 DMF 5、10、15、20、25、30、50 mL,400W 微波辐射下(即“1.2.3.1”项下的最佳反应功率),回流冷凝 15 min,反应重复 3 次,按“1.2.6”项下计算产量及产率,取平均值。

##### 1.2.3.3 反应时间的考察

在 250 mL 圆底烧瓶中加入数颗沸石,小檗碱 1 g(2.69 mmol),DMF25 mL,即“1.2.3.2”项下的最佳料液比 1:25(g:mL),400W 微波辐射下,回流冷凝,分别反应 5、10、15、20、25、30 min,反应重复 3 次,按“1.2.6”项下计算产量及产率,取平均值。

#### 1.2.4 HPLC 分析条件及方法学考察

##### 1.2.4.1 色谱条件

YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm,5  $\mu$ m);流动相:乙腈-0.2% 甲酸水溶液(25:75);柱温:30 °C;流速:1 mL/min;检测波长:265 nm。在此条件下,小檗碱与小檗红碱的色谱峰可达基线分离,分离度大于 1.5。对照品、反应物 HPLC 色谱图见图 1。

##### 1.2.4.2 对照品的制备

分别精密称取小檗碱及小檗红碱对照品 25.0 mg 置于 200 mL 量瓶中,以甲醇定容,配成浓度为 0.125  $\mu$ g/ $\mu$ L 的对照品液。

##### 1.2.4.3 供试品的制备

①100 mg BBR 反应液:往反应液加入适量甲醇,超声溶解,补加甲醇定容至 20 mL,摇匀,吸取 5 mL 转移至 200 mL 量瓶定容,摇匀,即得。②1 g BBR 反应液:往反应液加入适量甲醇,超声溶解,补加甲醇定容至 200 mL,摇匀,吸取 5 mL 转移至 200 mL 量瓶定容,摇匀,即得。

##### 1.2.4.4 标准曲线制备

吸取小檗红碱对照品 2、4、6、8、10  $\mu$ L 进样,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制工作曲线。

##### 1.2.4.5 精密度试验

取小檗红碱对照品,进样 6  $\mu$ L,连续 6 次,测定小檗碱与小檗红碱峰面积,计算 RSD。

##### 1.2.4.6 稳定性试验

取小檗红碱对照品,在 0、2、4、8、16、24、48 h,分别

进样 6  $\mu\text{L}$ , 测定小檗碱峰面积, 计算 RSD。

#### 1.2.4.7 重复性试验

投料小檗碱 1 g, 按“1.2.2”项下方法反应及“1.2.4.3”项下方法制备供试品 6 份, 进样 6  $\mu\text{L}$ , 测定峰面积计算小檗碱含量, 计算 RSD。

#### 1.2.4.8 样品含量测定

反应液按“1.2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 进样 6  $\mu\text{L}$ 。按标准曲线法以峰面积计算小檗碱的含量。

#### 1.2.5 结构鉴定

对纯化产品采用 UV、IR、ESI-MS、 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 进行结构表征。

#### 1.2.6 产率的计算

产物产率  $y = \text{产品实际质量} / \text{产品理论质量} \times 100\%$

式中: 产品实际质量按“1.2.4.8”项下方法测定; 产品理论质量 =  $(W \times 96\% \times M_1) / M_2$ ,  $W$  为小檗碱投料量,  $M_1$ 、 $M_2$  分别为小檗红碱、小檗碱的摩尔质量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 辐射功率对产率的影响

由表 1 可知, 随着微波功率的增大, 产率逐渐提高, 增到 400 W 达最大, 后产率逐渐下降, 故选用 400 W 功率辐射。

表 1 微波辐射功率对产率的影响

Table 1 Effect of microwave power on yield of berberrubine

| 功率<br>Power (W) | 产量<br>Output (mg) | 产率<br>Yield (%) |
|-----------------|-------------------|-----------------|
| 240             | 74.0              | 80.1            |
| 400             | 88.1              | 95.4            |
| 640             | 81.7              | 88.5            |
| 800             | 77.1              | 83.5            |

#### 2.1.2 料液比对产率的影响

由表 2 可知, 随着 DMF 溶剂量的增大, 产率逐渐提高, 增到  $\text{BBR: DMF} = 1: 25 (\text{g: mL})$  达最大, 后产率基本平稳, 这是因为 BBR 在该比例的热 DMF 中可完全溶解, 故选用料液比  $1: 25 (\text{g: mL})$  反应。

#### 2.1.3 反应时间对产率的影响

由表 3 可知, 随着微波辐射时间的增加, 产率逐渐提高, 辐射 15 min 时产率达最大, 而后产率趋于

表 2 料液比对产率的影响

Table 2 Effect of the solid-liquid ratio on yield of berberrubine

| 二甲基甲酰胺<br>DMF (mL) | 小檗碱:二甲基甲酰胺<br>BBR: DMF (g: mL) | 产量<br>Output (g) | 产率<br>Yield (%) |
|--------------------|--------------------------------|------------------|-----------------|
| 5                  | 1: 5                           | 0.754            | 81.6            |
| 10                 | 1: 10                          | 0.768            | 83.2            |
| 15                 | 1: 15                          | 0.862            | 93.3            |
| 20                 | 1: 20                          | 0.875            | 94.7            |
| 25                 | 1: 25                          | 0.909            | 98.4            |
| 30                 | 1: 30                          | 0.876            | 94.9            |
| 50                 | 1: 50                          | 0.879            | 95.2            |

稳定。这是由于反应已基本达到平衡所致, 故选用辐射 15 min 为宜。

表 3 微波辐射时间对产率的影响

Table 3 Effect of microwave radiation time on yield of berberrubine

| 反应时间<br>Reaction time<br>(min) | 产量<br>Output (g) | 产率<br>Yield (%) |
|--------------------------------|------------------|-----------------|
| 5                              | 0.701            | 75.9            |
| 10                             | 0.809            | 87.6            |
| 15                             | 0.909            | 98.4            |
| 20                             | 0.894            | 96.8            |
| 25                             | 0.896            | 97.0            |
| 30                             | 0.893            | 96.7            |

#### 2.2 与真空热解法的比较

按文献<sup>[4]</sup>操作, 并考察了不同的反应时间对产率的影响, 见表 4。由表 4 可见, 当反应时间为 1 h 时, 基本稳定, 最高产率为 83.9%, 而微波法最高产率是 98.4%, 反应时间为 15 min, 与真空热解法相比, 微波法产率提高近 15%, 反应时间缩短近 4 倍。

表 4 真空热解时间对产率的影响

Table 4 Effect of vacuum pyrolysis time on yield of berberrubine

| 反应时间<br>Reaction time<br>(min) | 小檗碱<br>BBR (g) | 产量<br>Output (g) | 产率<br>Yield (%) |
|--------------------------------|----------------|------------------|-----------------|
| 15                             | 1              | 0.695            | 75.3            |
| 30                             | 1              | 0.733            | 79.4            |
| 45                             | 1              | 0.759            | 82.2            |
| 60                             | 1              | 0.775            | 83.9            |
| 120                            | 1              | 0.658            | 71.2            |

注: 190 °C, 10~15 mmHg, 小檗碱 1 g (2.69 mmol)。

Note: 190 °C, 10~15 mmHg, BBR 1 g (2.69 mmol)。

## 2.3 HPLC 分析及方法学考察结果

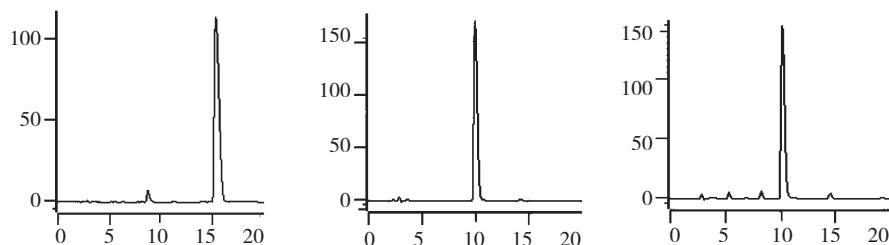


图 1 小檗碱(A)、自制小檗红碱对照品(B)及反应物(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of berberine standard (A), internal berberrubine standard (B) and the crude reaction product (C)

### 2.3.2 标准曲线制备

小檗红碱回归方程: $y = 3887678.8x - 21327.3$ ,  
 $r = 0.9999$ , 线性范围为  $0.253 \mu\text{g} \sim 1.254 \mu\text{g}$ 。

### 2.3.3 精密度试验

以峰面积计算, 小檗红碱 RSD 为 0.68%, 表明精密度良好。

### 2.3.4 稳定性试验

以峰面积计算, 小檗红碱的 RSD 为 2.44%, 表明它们在 48 h 内稳定。

### 2.3.5 重复性试验

含量计算小檗红碱平均 RSD 分别为 1.40%, 表明重现性好。

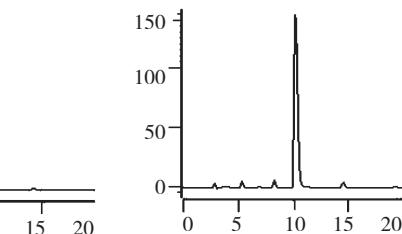
## 2.4 结构表征

小檗红碱 红色针晶(MeOH); mp. 280.3 ~ 281.5 °C; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  232, 271, 351, 440 nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3408 (s, -OH), 1250 cm<sup>-1</sup> (vs, C-O); ESI-MS  $m/z$  322.2 [M-Cl]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>, 322.2); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 7.35 (1H, s, H-1), 6.76 (1H, s, H-4), 3.04 (1H, t,  $J = 5.8$  Hz, H-5), 4.53 (1H, t,  $J = 5.8$  Hz, H-6), 9.20 (1H, s, H-8), 6.83 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-11), 7.46 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-12), 7.97 (1H, s, H-13), 5.95 (1H, s, H-15), 3.81 (1H, s, H-16); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ : 106.27 (C-1), 121.81 (C-1a), 151.42 (C-2), 149.97 (C-3), 109.14 (C-4), 131.16 (C-4a), 57.04 (C-6), 143.72 (C-8), 134.21 (C-8a), 147.84 (C-9), 147.84 (C-10), 120.21 (C-11), 123.21 (C-12), 131.16 (C-12a), 124.22 (C-13), 136.23 (C-14), 103.68 (C-15), 55.94 (C-16); 与文献<sup>[5,7]</sup>基本一致。

## 3 讨论

小檗红碱的合成一直以真空热解法为主, 由于

### 2.3.1 对照品及反应物的 HPLC 图



真空热解法, 是固体直接反应, 易受热不均, 产物纯度较低, 重现试验收率 80% 左右。而应用微波合成法的研究报道仅有两篇<sup>[5,6]</sup>。本课题组对微波法的两篇文献也进行了重现试验, 按文献<sup>[6]</sup>操作, BBR 直接微波 5 min 后, 根本没发生转化, 即使延长时间也不能顺利转化; 按文献<sup>[5]</sup>, 加入氧化铝做热传导介质后, 反应 5 min 也只有极少量的 BBR 发生转化; 延长反应时间至 10 min, 局部 BBR 发生转化; 而反应 15 min 则有碳化现象, 存在很明显的受热不均的问题。

由于 BBR 转化小檗红碱的临界温度在 160 °C 左右, 而微波辐射在极性介质中效率高, 为此本课题组选用高沸点稳定的极性溶剂 DMF 作为反应介质, 进行辐射反应。本课题组也曾尝试以低成本的水作为溶剂, 但发现以水为介质并不能达到热解温度, BBR 不转化。另外, 也尝试了以 DMSO 为溶剂, 但反应液产物复杂, 可能因 DMSO 高温下易分解所致。

## 4 结论

本文首次以 DMF 为反应介质微波合成小檗红碱, 较系统地考察了反应功率、反应时间、料液比三个影响因素, 并与传统的真空热解法进行了比较, 相对于真空热解法而言, 微波法具有快速、节能、产率高的优点, 为制备小檗红碱提供了一种新的合成途径。

## 参考文献

- Li B(李波), Zhu WL(朱维良), Chen KX(陈凯先). Advances in the study of berberine and its derivatives. *Acta Pharmacol Sin*(药学学报), 2008, 43:773-787.
- Yang Y(杨勇), Lei ZY(雷志英), Zhou XG(周细国), et al. Chemical and pharmacological research of berberrubine. *Prog Mod Biomed*(现代医学生物进展), 2013, 13:977-979.

(下转第 379 页)