

## 正相和反相柱层析组合分离纯化紫杉醇

张志强<sup>1</sup> 苏志国<sup>2</sup>

(大连理工大学生化工程研究所 大连 116012) (中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 采用正相氧化铝柱层析和反相 C<sub>18</sub> 柱层析从东北红豆杉培养细胞浸提物中分离纯化了紫杉醇。优化了氧化铝柱层析和反相柱层析的操作条件。实验发现,经过氧化铝柱层析后,测得的紫杉醇量大大增加。经两步层析,使紫杉醇的含量从小于 1.0% 提高到 95%,样品中微量杂质继以重结晶步骤除去,即可获得纯度超过 98% 的紫杉醇晶体。采用 <sup>13</sup>C NMR 对晶体分析,所得产物结构与文献上紫杉醇的结构一致。

**关键词** 紫杉醇,正相柱层析,分离纯化

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0069-05

从红豆杉树中分离出的紫杉醇(Taxol)是近 20 年来发现的最有效的天然抗癌药物<sup>[1]</sup>,因紫杉醇的抗癌作用独特,几年来引起了世界各国的重视。最初,紫杉醇是从天然红豆杉树皮中提取分离得到的,其在树皮中的含量平均为万分之一点五,提取所得到的实际上平均为万分之一点二<sup>[2]</sup>。为解决紫杉醇有限的药源及防止天然红豆杉树的乱砍乱伐问题,一方面,国内外学者围绕红豆杉植物的栽培、紫杉醇的化学合成、红豆杉的组织和细胞培养进行了有益的探索<sup>[3,4]</sup>;另一方面,研究高效、经济的提取分离方法,尽量避免产物的损失。有关紫杉醇的提取分离的研究,已有不少报道。液-液萃取、层析和高效液相色谱(HPLC)往往是必不可少的<sup>[5]</sup>。液-液萃取过程消耗大量的有机溶剂,产生废水污染环境。HPLC 精制过程设备和介质投资大,生产成本低。如果能用几种常压层析的组合来取代萃取和 HPLC 则有可能发展一条简捷、低成本的分离纯化路线。本文在这一方面做了初步的探索。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料、仪器

**1.1.1 材料:**东北红豆杉培养细胞由本实验室提供<sup>[6]</sup>。紫杉醇对照品为 Sigma 产品,纯度大于 99%。C<sub>18</sub> 烷基-硅胶色谱填料(100~200 目,C 含量大于 20%)参照 Shih-Hsien 等<sup>[7]</sup>的方法由本实验室自制。层析氧化铝(200~300 目)为上海新诚精细

化学品有限公司生产。分子筛(4A)购于北京化学试剂公司。

**1.1.2 仪器:**FL-750HPLC 仪为 BECKMAN 公司产品。XZ-6A 旋转蒸发器为北京科龙仪器公司产品。Type C 常压层析系统为 Pharmacia 公司产品。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 紫杉醇粗品的制备:**收集东北红豆杉培养细胞,室温下每克干细胞用 100mL 甲醇浸泡 2d,过滤,取滤液用旋转蒸发器在 40~50℃ 蒸发,回收甲醇,所得固体物每克溶解于 10mL 三氯甲烷中备用。

**1.2.2 氧化铝柱层析:**甲醇及三氯甲烷等溶剂每升用 30 克分子筛脱水,层析用氧化铝在 190℃、1 托的真空中干燥 6h,用脱水的三氯甲烷充分浸泡并脱气后,装成 15mm×250mm 的层析柱。三氯甲烷清洗柱后上样,用三氯甲烷淋洗去未被吸附的杂质,然后采用不同浓度的甲醇/三氯甲烷进行洗脱,确定并收集洗脱出的紫杉醇峰,用旋转蒸发器在 40~50℃ 蒸发,从所得固体物中取样,HPLC 测定其纯度。柱层析在常温常压下操作。

**1.2.3 反相柱层析:**将制备的 C<sub>18</sub> 烷基-硅胶用乙腈充分浸泡,脱气后,重力沉降法装成 15mm×260mm 的柱,用乙腈充分洗出胶中的杂质,再用 40% 乙腈水溶液平衡。经氧化铝柱层析初步纯化的紫杉醇固体样品,重新溶解于 40% 乙腈水溶液后上柱,并用不同浓度的乙腈水溶液进行洗脱,收集紫杉醇洗脱峰,HPLC 测定纯度,层析过程在常温常压下

收稿日期:1998-10-29,修回日期:1999-07-22。

基金项目:国家自然科学基金重点项目(29736180)。

\* 联系人。现地址(100080)北京 中国科学院微生物研究所资源室。© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

进行,流动相速度 1.0mL/min。

1.2.4 紫杉醇样品的结晶: 取 300mg 经反相柱层析纯化的紫杉醇样品, 溶解于 120mL 甲醇中, 再加入 30mL 水, 充分混匀后, 室温下结晶, 收集白色的紫杉醇针晶。

1.2.5 紫杉醇的定量定性分析: 采用 HPLC 对紫杉醇进行分析, 检测波长为 227nm, 4.6mm × 250mm 的 C<sub>18</sub> 柱 (BECKMAN 公司), 同溶剂洗脱 (Isocratic elution), 流动相为甲醇/乙腈/水 (25:35:40), 流速 1.0mL/min。以紫杉醇标准品为对照, 外标法作定量分析。

## 2 实验结果

### 2.1 氧化铝柱层析条件优化

2.1.1 层析系统含水量对分离的影响: 层析系统的含水量是影响氧化铝柱层析分离效果的重要因素, 用含水情况不同的氧化铝及溶剂进行实验, 结果如图 1 所示。实验测得经氧化铝柱层析, 样品中紫杉醇的总量大大增加, 这一结果已被重复多次。在 ABC 3 种操作方式中, 方式 A 即溶剂和氧化铝均经脱水处理时, 层析所得的紫杉醇纯度和回收率都较高。当溶剂和氧化铝不经脱水处理时 (方式 C), 紫杉醇纯度和回收率都明显降低, 而以氧化铝经过脱水而溶剂没有脱水时 (方式 B) 紫杉醇的纯度最高。

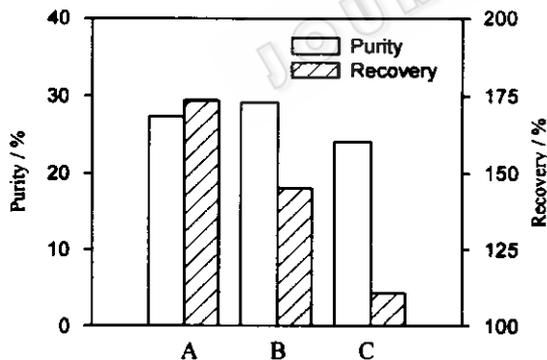


图 1 含水量对氧化铝层析分离的影响

Fig.1 The influence of H<sub>2</sub>O on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatography

Chromatogr. conditions: 15mm × 250mm, Sample loading: 200mg, washing buffer: CHCl<sub>3</sub>, Elution: 4% CH<sub>3</sub>OH CHCl<sub>3</sub>, (V/V), Elution rate: 2~3mL/min. A: Solvent and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> both dehydrated, B: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dehydrated only, C: Solvent and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> not dehydrated

2.1.2 洗脱剂极性的影响: 实验中用不同浓度的甲醇-氯仿溶液进行洗脱。结果如图 2 所示。随着甲醇浓度的增大, 紫杉醇的纯度降低, 而紫杉醇的回收趋完全。在正相色谱中, 洗脱剂的极性决定了不同极性的物质在柱上的保留时间, 洗脱剂极性越大,

物质在柱上的保留时间就越短。1% 的甲醇溶液不能将紫杉醇洗脱下来, 而当甲醇浓度超过 4% 时, 越来越多的极性比紫杉醇大的杂质也随着紫杉醇一起被洗下来。因此, 以 4% 的甲醇浓度为佳。

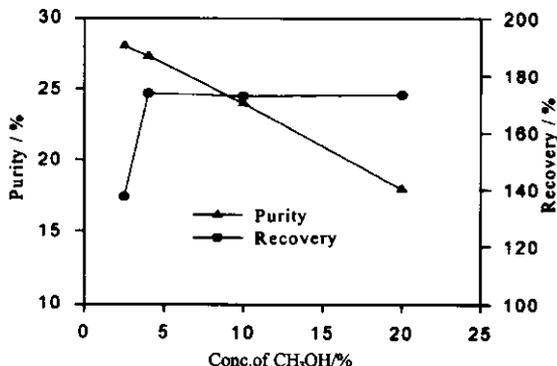


图 2 洗脱剂中甲醇含量对分离效果的影响

Fig.2 The influence of the content of CH<sub>3</sub>OH on the separation of taxol

Chromatogr. conditions: Solvent and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> being dried, 15mm × 250mm; Sample loading: 200mg; Washing buffer: CHCl<sub>3</sub>, Elution rate: 2~3mL/min

2.1.3 柱高对分离的影响: 层析实验结果如图 3 所示。采用 15mm 内径的柱, 当柱高从 250mm 降低到 100mm 时, 紫杉醇的纯度降低了 8%, 变化比较大。按塔板理论, 当其余条件不变时, 理论塔板数随柱高的增加而增大。很显然, 随着柱高的增加, 得到的紫杉醇的纯度也将增大, 但无限增加柱高是不现实的, 如引起柱阻力的加大、最大流速减小等。

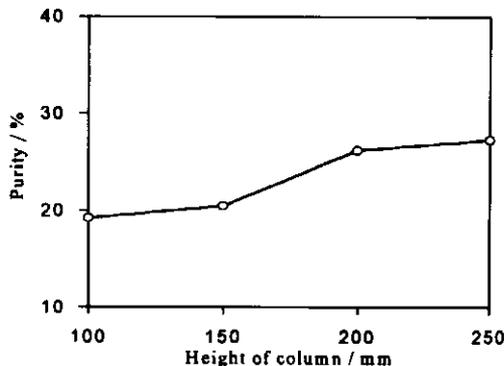


图 3 柱高对分离效果的影响

Fig.3 The influence of the height of column on the separation of taxol

Chromatogr. conditions: Solvent and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dried beforehand; Sample loading: 200mg; Washing buffer: CHCl<sub>3</sub>; Elution: 4% CH<sub>3</sub>OH CHCl<sub>3</sub>, (V/V); Elution rate: 2~3mL/min

采用优化的操作条件重复实验, 即溶剂和氧化铝均经脱水处理, CHCl<sub>3</sub> 为平衡液, 上样量 200~

500mg, 柱 15mm×250mm, 用 1% 的 CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (V/V) 为淋洗液, 4% 的 CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (V/V) 可洗脱出紫杉醇, 流速控制在 2~3mL/min, 经一步氧化铝柱层析, 可以使紫杉醇的含量从小于 1.0% 提高到大于 27%, 初分离后的物料中测得紫杉醇的含量相当于粗品中测得的紫杉醇含量的 1.7 倍。层析谱图如图 4 所示, 峰 1 为紫杉醇峰。

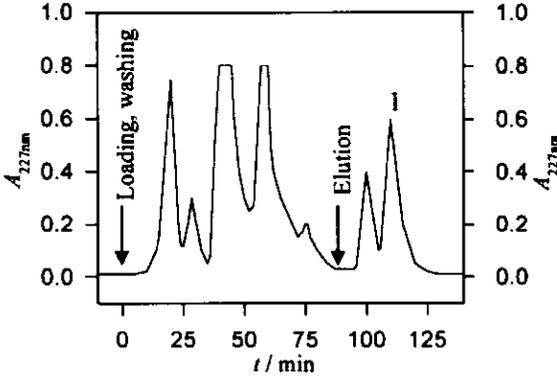


图 4 氧化铝柱层析图谱

Fig. 4 The profile of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatography

Chromatogr. conditions: Solvent and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> being dried 15mm × 260mm column, Sample loading: 200mg; Washing buffer: 1% CH<sub>3</sub>OH CHCl<sub>3</sub>, (V/V), Elution: 4% CH<sub>3</sub>OH CHCl<sub>3</sub>, (V/V), Elution rate: 2~3mL/min, Peak 1 represent taxol

## 2.2 C<sub>18</sub>烷基-硅胶反相柱层析条件优化

**2.2.1 洗脱剂组成的考察:** 在反相液-固层析中, 最常用的溶剂是 CH<sub>3</sub>OH、MeCN、四氢呋喃 (THF) 等, 不同溶剂对样品的选择性有很大的差异, 上述 3 种溶剂同水组成的反相柱层析流动相对紫杉醇分离的影响如图 5 所示, 以 MeCN-H<sub>2</sub>O 和 CH<sub>3</sub>OH-MeCN-H<sub>2</sub>O 组成的流动相对紫杉醇的选择性最高, 考虑到工业过程中溶剂的回收, 我们选用 MeCN-H<sub>2</sub>O 为流动相组成。

**2.2.2 洗脱剂组成对分离的影响:** 紫杉醇是非水溶性的物质, 流动相有机溶剂含量低, 紫杉醇的溶解度下降, 将使柱进出口压差增大, 同时使样品在反相柱上的保留偏长, 甚至洗脱不下来。而若有机溶剂含量偏高, 则影响到样品的分离度。实验中用 MeCN 来调节洗脱剂的强度, 层析纯化结果如图 6 所示。45% 的 MeCN/H<sub>2</sub>O (V/V) 仅能将紫杉醇部分洗脱下来, 而以 50% 的 MeCN/H<sub>2</sub>O (V/V) 洗脱效果最好, 紫杉醇的纯度可达 95.3%, 回收率为 88.0%, 过程中损失的紫杉醇包括反相介质上紫杉醇的不可逆吸附, 以及分离过程中紫杉醇的降解两部分。典型的反相层析谱图如图 7 所示, 其中峰 1 为紫杉醇峰。

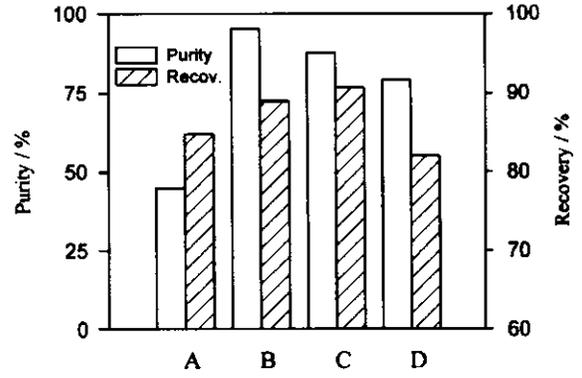


图 5 洗脱剂组成对层析的影响

Fig. 5 The influence of composition of eluent on chromatography

Chromatogr. conditions: 15mm × 260mm; Sample loading: 200mg, Elution rate: 1.0mL/min; A: CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (3 : 7); B: CH<sub>3</sub>OH-MeCN-H<sub>2</sub>O (1 : 2 : 2); C: MeCN-H<sub>2</sub>O (1 : 1); D: THF-MeCN-H<sub>2</sub>O (2 : 7 : 10)

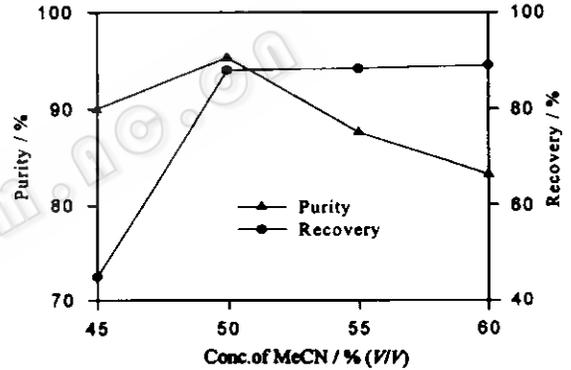


图 6 洗脱剂组成对紫杉醇的分离影响

Fig. 6 The influence of the composition of eluent on the separation of taxol

Chromatogr. conditions: 15mm × 260mm; Sample loading: 200mg, Elution rate: 1.0mL/min

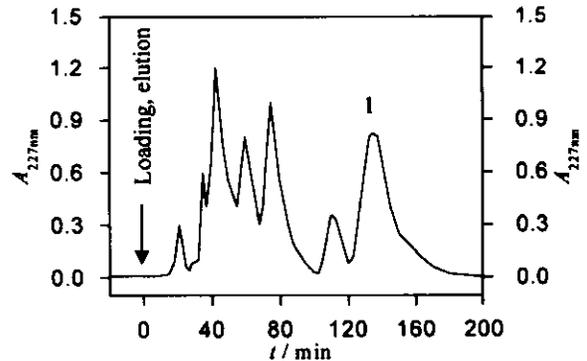


图 7 C<sub>18</sub>-硅胶反相柱层析图谱

Fig. 7 The profile of C<sub>18</sub>-silica reversed-phase chromatography

Chromatogr. conditions: 15mm × 260mm; Sample loading: 200mg, Washing buffer: 40% MeCN/H<sub>2</sub>O (V/V); Elution: 50% MeCN/H<sub>2</sub>O (V/V); Elution rate: 1.0mL/min, 227nm; Peak 1 represent taxol

### 2.3 紫杉醇样品的结晶

经两步层析,紫杉醇的纯度可以达到 95%。此时的样品中仍有少量的杂质,采用 CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O 结晶,就可使紫杉醇的纯度提高到 98% 以上。东北红豆杉培养细胞浸膏采用本工艺分离精制的总结果如表 1。

### 2.4 紫杉醇的鉴定

本工艺分离和精制的紫杉醇样品的核磁共振碳谱化学位移值同文献 [8] 比较见表 2, 二者的值是一致的。可以认为,分离和精制的产品是紫杉醇。

表 1 紫杉醇分离纯化的结果

Table 1 Results of taxol purification

Steps	Total W/mg	Taxol/mg	Purity/%	Recovery/%
Grude sample	5000	32.5	0.65	100
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> chromatogr.	204.1	55.9	27.4	172.1
r. p. chromatogr.*	51.6	49.2	95.3	151.4
Crystallization	44.0	43.5	98.8	133.8

\* Note :r. p. chromatogr. :Reversed-phase chromatography ;Total W :total weighty of sample

表 2 紫杉醇在 CDCl<sub>3</sub> 中的核磁共振谱

Table 2 The <sup>13</sup>CNMR spectra of taxol in CDCl<sub>3</sub> at 500MHz

C	Sample	Literature <sup>[8]</sup>	C	Sample	Literature <sup>[8]</sup>
C-1	78.844	79.0	C-2'	73.122	73.2
C-2	74.923	74.9	C-3'	55.058	55.0
C-3	45.599	45.6	4-O,Ac=O	170.339	170.4
C-4	81.147	81.1	Me	22.591	22.6
C-5	84.367	84.4	10-O,Ac=O	171.270	171.2
C-6	35.621	35.6	Me	20.852	20.8
C-7	72.085	72.2	C=O,Ph1	166.861	167.00
C-8	58.537	58.6	q-Ph1	129.176	129.1
C-9	203.630	203.6	o-Ph1	130.168	130.2
C-10	75.563	75.5	m-Ph1	128.688	128.71
C-11	133.173	133.2	p-Ph1	133.677	133.7
C-12	141.855	142.0	q-Ph2	133.585	133.6
C-13	72.375	72.3	o-Ph2	127.025	127.03
C-14	35.621	35.7	m-Ph2	128.337	128.68
C-15	43.173	43.2	p-Ph2	131.999	131.9
C-16	21.829	21.8	C=O,Ph3	167.334	167.02
C-17	26.802	26.9	q-Ph3	137.918	138.0
C-18	14.810	14.8	o-Ph3	127.025	127.04
C-19	9.562	9.5	m-Ph3	129.008	129.0
C-20	76.479	76.5	p-Ph3	128.688	128.3
C-1'	172.780	172.7			

Detection conditions :Solvent CDCl<sub>3</sub> ,Room temperature ,500MHz ,Determined by state key laboratory of natural products and biomimetic pharmaceutical ,Beijing Medical University.

## 3 讨 论

从本工艺得到产物的分析和鉴定说明,在紫杉醇的制备分离中,HPLC 精制并非是必不可少的,关键要选择合适的层析方法及优化的层析操作条件。采用一个正相层析和一个反相层析的组合,是可以取代萃取和 HPLC 的。

从表 1 本工艺分离精制的总结果可知,C<sub>18</sub> 烷基-硅胶反相层析及重结晶步骤的回收率在 90% 左右,而氧化铝柱层析纯化后物料中测得紫杉醇的含量相当于粗品中测得的紫杉醇含量的 1.7 倍。引起氧化铝柱层析回收率大于 100% 的现象的原因有两

方面:

首先,我们采用的是 HPLC 对紫杉醇分析定量。粗品原料中紫杉醇的含量很低(0.65%),在此浓度下,HPLC 分析定量存在一定的误差。

其次,经一步氧化铝层析后,紫杉醇的总量提高幅度很大(0.7 倍,相当于回收率 170%)。完全将其归于 HPLC 定量误差,显然是不可信的。我们设计一组实验,在相同的层析条件下,用硅胶介质代替氧化铝介质,对紫杉醇粗品进行处理,发现紫杉醇的总量并没有增加,硅胶柱层析的紫杉醇回收率约在 98% 左右<sup>[9]</sup>。因此,可以肯定,在氧化铝分离紫杉醇的过程中,有新的紫杉醇生成。按 Carver<sup>[10]</sup>等人

所推测的,在层析过程中一部分糖基化的紫杉醇转化为紫杉醇,而使得回收率大于 100%。氧化铝是一种常用的固体酸碱催化剂<sup>[11]</sup>,它不仅可以做催化剂的载体,其本身也有很强的催化效应。如催化异构化、裂解、烷基化、脱水、水解等众多的反应。紫杉醇除了以游离态存在于植物体内外,常常还以结合态大量存在,如与糖基结合的 7-木糖紫杉醇。同时,在红豆杉植物中,还存在许多含紫杉醇核的紫杉

醇类似物如 7-去表-紫杉醇、N-去苯甲酰-N-苯乙酰紫杉醇等。尽管我们难以确证这一现象是因为糖基化的紫杉醇转化,还是某种紫杉醇类似物的变化,但却与 Carver 等人的实验结果相似,只不过他们重点考察的是离子交换介质。可以推测,在氧化铝层析的吸附过程中出现了某种化学反应。引起这一现象的微观机理我们正在进一步深入的研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Wani M C ,Taylor H L ,Wall M E *et al.* *J America Chem Society* ,1971 ,**93** :2325~2327
- [ 2 ] 沈征武,吴莲芬. 化学进展,1997,**9**(1):1~3
- [ 3 ] Yukimune Y ,Tabata H ,Higashi Y *et al.* *Nature Biotechnol* ,1996 ,**14**:1129~1134
- [ 4 ] Seki M ,Ohzora C ,Takeda M *et al.* *Biotechnol Bioeng* ,1997 ,**53** :214~1134
- [ 5 ] Koppaka V R ,Bhakuni R B ,Juchum J *et al.* *J Liq Chrom* ,1996 ,**19** :427~447
- [ 6 ] Xu J F ,Yin P Q ,Su Z G *et al.* *Biotech Tech* ,1998 ,**12**(3):241~244
- [ 7 ] Shih-Hsien H ,Fazio S D ,Tomellini S A *et al.* *Chromatographia* ,1985 ,**20**(3):161~163
- [ 8 ] Kingston D G I. *Pharmac Ther* ,1991 ,**52** :1~34
- [ 9 ] 张志强,田桂莲,苏志国等. 中国生化药物杂志,1999,**20**(2):58~61
- [ 10 ] Carver D R ,Prout T R ,Workman C T *et al.* *United States Patent* ,1994 ,5281727
- [ 11 ] Tanabe K. *Solid Acids and Bases* ,London :New York :Academic Press ,1970

## Separation and Purification of Taxol Using Normal- and Reversed-phase Chromatography in Tandem

ZHANG Zhi-qiang<sup>1</sup> SU Zhi-guo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (Biochemical Engineering Institute ,Dalian University of Technology ,Dalian 116012)

<sup>2</sup> (Institute of Chemical Metallurgy ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080)

**Abstract** A method is described for separation and purification of taxol from the extract of *Taxus cuspidate* callus culture with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> normal-phase chromatography and C<sub>18</sub> reversed-phase chromatography ,The operating conditions of the two chromatographic steps were investigated and optimized. The content of taxol was greatly increased after Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatography. The purity of taxol reached 95% from less than 1.0% after the two chromatographic steps. The final purity of taxol was more than 98% after the process of crystallization. The <sup>13</sup>CNMR spectrum of the product was identical to that of taxol reported in the literature.

**Key words** Taxol ,normal-phase column chromatography ,separation and purification