

· 综述与专论 ·

紫杉醇的提取与纯化技术[△]

天津大学化工学院 (300072) 韩金玉* 肖 剑 王 华 常贺英

摘 要 对紫杉醇的提取与纯化技术包括溶剂萃取法、色谱法、膜分离法、超临界流体萃取法、离子交换树脂法、键合物解离法、化学反应法及药理作用靶点法的研究进展进行了较全面的介绍。

关键词 紫杉醇 提取 纯化

紫杉醇 (paclitaxel, 商品名为 Taxol) 是从红豆杉属植物中分离出来的一种二萜类化合物, 1992 年底被美国食品与药物管理局 (FDA) 批准作为抗晚期癌症的新药上市。从天然红豆杉属植物中提取紫杉醇的工作十分复杂, 难度较大。其主要原因是: 紫杉醇在植株体内的含量太低, 最高含量不到万分之二; 存在大量的紫杉醇类似物。这些类似物的化学结构和性质均和紫杉醇相近, 致使紫杉醇与它们的分离十分困难, 尤其是与 cephalomannine 的分离。国内外学者围绕紫杉醇的提取与纯化开展了大量卓有成效的工作。

1 溶剂萃取法

溶剂萃取法常用于紫杉醇的粗提阶段^[1~6]。紫杉醇的粗提阶段又可分为初级萃取和次级萃取。在这两级萃取过程中, 溶剂的选择对于粗提产物的质量和过程经济性具有重要影响。

初级萃取和次级萃取一般采用的溶剂系统不同。各个时期的研究者对这两个过程的溶剂系统的研究结果已有详细的总结^[2]。最近, 日本学者对紫杉醇提取的溶剂种类进行了详细的研究^[3], 结果表明: 在乙酸乙酯、乙醚、乙腈、丙酮、甲醇、己烷、异丙醇、乙酸乙酯-甲醇、乙酸乙酯-二氯甲烷、乙酸乙酯-丙酮、乙酸乙酯-乙醚等溶剂中, 以乙酸乙酯-丙酮 (1: 1) 混和溶剂提取的效果最好, 所得浸膏仅为植物干重的 7.70%, 紫杉醇的含量高达浸膏的 0.084%, 而用甲醇提取所得浸膏为植物干重的 20.98%, 紫杉醇的含量为浸膏的 0.027%, 尚需要多次抽提才能得到紫杉醇含量较高的浸膏。现在看来利用乙酸乙酯-丙酮 (1: 1) 一次便可以使紫杉醇提取量高于以通常用溶剂所能得到的量, 这就为后续的分离纯化工作带来很大的方便, 由于乙酸乙酯-

丙酮 (1: 1) 的价格与甲醇的价格相当, 且可回收再利用, 因此, 这一提取方法的经济性较为合理。

在初级萃取过程中引入超声技术, 可大大缩短初级萃取过程的时间。例如: Xu^[4]采用甲醇-二氯甲烷 (95: 5) 作初级溶剂, 所需萃取时间约为 35~ 60 min。在溶剂系统不变的情况下, 将原料与溶剂的混和物进行超声振荡, 萃取达到平衡的时间缩短到仅 5 min, 与此对比, Hoke 等人^[5]采用纯甲醇作为初级溶剂, 无超声振荡, 所需时间长达 16~ 48 h。

超声技术的引入, 除可大大缩短萃取平衡时间外, 还可以使初级萃取在低温下进行, 从而避免了紫杉醇在高温下转化为其它物质而造成收率降低^[6]。

2 色谱法

早期的色谱纯化紫杉醇工艺是采用多根硅胶层析柱串联的一种操作, 因为硅胶对紫杉醇的不可逆吸附造成的损失很大, 使得紫杉醇的收率很低, 仅为 0.004% 左右。近年来, 随着色谱技术的进步, 不断有新的色谱技术被引入到紫杉醇的分离提取过程中来。除了 HPLC^[7~10] (其中包括正相-HPLC、反相-HPLC) 外, 还有薄层色谱 (TLC) 法^[11, 12]、胶束电动色谱 (MEKC)^[13] 和高速逆流色谱 (HSCCC)^[14, 15] 等。

各种类型的 HPLC 和 TLC 的共同缺点是: 负载量小, 不适于日常大量样品的处理, 仅能达到半制备规模的水平。为此, Wickremesinhe 提出对甲醇粗提物通过 C₁₈ 的反相柱进行浓缩, 然后再用 C₁₈ 反相制备 HPLC 进行纯化。Mattina 等人则提出了用 C₁₈ 固相萃取法 (SPE) 从粗提物中大量收集浓缩紫杉烷类混和物的方法, 结果表明 SPE 优于 TLC 纯化过程, 而且具有节省时间和溶剂用量少的优点。

从目前文献报道情况来看, HSCCC 有望成为

* Address: Han Janyu, College of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin

△国家自然科学基金资助项目 (No. 29606007)

一种新的大规模制备生产紫杉醇的方法。这种方法的主要优点是:具有较高的样品负载量,分离周期短,操作简便,由于这种色谱自身无固体载体,避免了分离样品与固体表面产生化学反应而变性和不可逆吸附造成的样品损失。不足之处在于紫杉醇和 cephalomannine 不能完全分开,约有一半左右的二者混和物需经制备 HPLC 或 TLC 再次分离,才可得紫杉醇纯品。另外,在 HSCCC 中,溶剂系统的选择对于分离效果影响较大,宜选用两相分层时间短、样品在两相溶剂各个组分中的分配系数差别较大的溶剂系统。

MEKC 虽然具有分离效率高、溶剂消耗小、速度快等优点,但其处理量小,操作复杂的缺点限制了它的应用范围,目前只能用于分析检测。

3 膜分离法

1994 年, Carver 等人^[16]采用平板式、中空纤维式和管式膜组件,对超滤膜和反渗透膜在紫杉烷类物质的分离过程中的应用进行了研究,结果表明:采用膜分离方法可以进一步浓缩粗提过程所得浸膏,使紫杉烷类物质的浓度提高 5 倍左右,相当于对浸膏又进行了一次预处理,从而减小了后序色谱分离的负担和紫杉醇的损失。

Raymond 等人^[17]用 $0.2\ \mu\text{m}$ 的尼龙膜和 PVDF 膜处理紫杉醇的组织培养液时,发现尼龙膜截留了几乎所有的 10-去乙酰基紫杉醇和紫杉醇以及绝大部分的 cephalomannine,对其它的紫杉烷类几乎没有截留作用,而 PVDF 膜则截留了所有的紫杉烷类,说明尼龙膜可选择性地吸附紫杉烷类。同时研究还发现,被尼龙膜截留的紫杉醇,大部分可以用 30%、40% 和 50% 的甲醇水溶液洗脱下来,用 20% ~ 40% 乙醇溶液洗脱时,也可达到类似的效果。在用含水溶剂洗脱 PVDF 膜截留的紫杉烷时,紫杉醇和所有的紫杉烷在溶剂极性变化小的范围内都被洗脱下来。尽管从理论上讲,有选择地从膜上洗脱紫杉烷类组分是可行的,但他们未获成功。研究者认为,今后通过对尼龙膜进行化学修饰,将可以实现从紫杉烷类混和物中选择性洗脱紫杉醇的目标。

4 超临界流体萃取法

将超临界流体萃取 (SFE) 技术引入到紫杉醇的纯化过程中,减少了含氯有机溶剂的使用,是一种不污染环境的高新技术。SFE 最常用的溶剂是 CO_2 , 它本身无毒,在提取产物中又无残留,因而从用药安全角度来讲,这种技术具有其独特的优点。

1992 年, Jennings 等人^[18]用 CO_2 和加入乙醇改

性剂的 CO_2 作 SFE 溶剂,在 318 K 的温度和 18.07 ~ 25.79 MPa 的压力下进行紫杉醇的提取研究,结果发现树皮中的紫杉醇大部分都能得到有效的提取,提取率高达 0.08% (常规方法仅为 0.01%),而且对紫杉醇的选择性要比传统的单纯乙醇提取效果好。Nair 等人^[19]用含 0.001% ~ 15% 的丙酮或乙腈的 CO_2 作溶剂,在 43.4 MPa, 308 K 下用超临界技术提取紫杉醇也获得了满意的效果。Caster 等人^[20]以红豆杉枝叶和嫩芽做原料,用超临界技术提取紫杉醇时,先以纯 CO_2 做溶剂,以除去原料中的脂类,然后加入乙醇以调节溶剂的极性,使紫杉醇的产率达到了 0.04%。

虽然超临界技术在紫杉醇的提取中显示出收率高、时间省等优点,但该方法对设备要求高,操作条件严格,目前还难以进行大量原料的超临界萃取。

5 离子交换树脂法

元英进等人^[21]采用 8 种树脂对东北红豆杉提取物进行脱色能力及吸附研究,结果表明聚苯乙烯型强碱树脂 (Ps-A) 及多乙烯多胺——环氧氯丙烷缩聚型弱碱树脂 (Pc-A) 对二氯甲烷粗提物的吸附及脱色性能较好,有望用于紫杉醇的纯化分离。

杨雪峰等^[22]采用 PSp-6 大孔树脂,以工业反相制备色谱从云南红豆杉树皮及东北红豆杉针叶粗提物中分离紫杉醇及半合成前体取得成功。在中试中,单柱一次负载云南红豆杉浸膏 (含紫杉醇 1.2%) 达 5 kg,经三级色谱分离及重结晶得到紫杉醇产品纯度大于 99%,总产品收率大于 80%,生产周期约 196 h,生产成本约 1000 元人民币/kg,很有产业化前景。

6 紫杉醇键合物解离法

紫杉醇键合物是在紫杉醇的三环二萜基本内核骨架上又以化学键的形式结合了其他大分子的一类物质。常见的一般为糖基紫杉醇,如:7-木糖基紫杉醇和 7-木糖基-10-去乙酰基紫杉醇等^[23],因糖基是水溶性基团,这些化合物都是水溶性的。由于紫杉醇不溶于水,因此人们推测,紫杉醇键合物可能是紫杉醇在植物体内运输的一种特殊形式^[24]。一般认为紫杉醇的合成部位是嫩芽、枝叶或根、茎等,而储存部位是树皮。因此,非水溶性的紫杉醇要从合成部位到树皮中,必须要结合一个水溶性的基团,才能实现这一转运过程。

用甲醇或以 95% 乙醇浸提红豆杉的树皮和树叶,经去脂后,用 $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$ 或 $\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ 萃取,再通过柱层析分离、纯化,此方法往往使那些水溶性

好的糖基化紫杉醇进入水相而有所损失。为了有效地提取这部分糖基化的紫杉醇, Durzan 等^[25]利用木聚糖酶、纤维素酶、果胶酶酶解短叶红豆杉培养细胞和树皮的甲醇浸膏,发现经木聚糖酶酶解后紫杉烷类化合物的含量比未经酶解处理的分别提高了3倍和0.2倍。尽管酶解法的效果很好,但因其成本高,故还是无法被实际生产所采用。

Carver 等^[26]利用甲醇浸提短叶红豆杉树皮或叶片,然后将所得的浸提液经过氧化铝柱处理,经过 HPLC 分析后表明紫杉醇的含量是未经氧化铝柱处理的4.1倍。他们推测当浸提液与氧化铝接触时可产生放热反应,所放出的热量足以使糖基化紫杉醇的糖基脱离下来。当糖基化的紫杉醇转化成紫杉醇时,其水溶性就大大降低。此时,再用 CH_2Cl_2 - H_2O 或 CHCl_3 - H_2O 进行萃取,就几乎不再存在糖基化紫杉醇损失的问题了。于是,自由态和糖基化的束缚态紫杉醇几乎同时都能得到有效的提取。该法可提高紫杉醇提取分离的产量,简便易行,实用前景较好。

赵凌云^[2]针对紫杉醇的键合物,研究了离子交换树脂对键合物的催化解离过程。结果表明树脂对于键合物的催化解离是一个连串反应过程,反应过程与树脂的不同配比和作用时间长短有关;质量比1:1的大孔型树脂解离含键合紫杉醇的物料20~40 min 是较好的方案,阴离子交换树脂是键合紫杉醇催化裂解的主要动力;阳离子交换树脂是防止紫杉醇发生深度反应的抑制剂;外扩散对离子交换树脂解离键合紫杉醇为游离紫杉醇的过程有较大影响。发现树脂对紫杉醇的吸附过程较为复杂:阳离子树脂对紫杉醇的吸附呈现二次平衡,最后达到结晶-溶解-吸附平衡;阴离子树脂在甲醇-水(1:1)溶剂中会使紫杉醇发生异构或降解反应,最后达到吸附-反应-脱附平衡;混合树脂对紫杉醇的吸附特性和单一阴树脂相似。大孔型阴离子树脂对紫杉醇的吸附受表面反应控制或表面吸附控制。作者还研究开发了固定床和气液固三相循环流化床工艺催化解离紫杉醇键合物,结果表明:通过控制操作参数,使紫杉醇的含量明显提高。流化床工艺优于固定床。

7 化学反应法

Kingston 等^[26]用 OsO_4 处理紫杉醇与 cephalomannine 的混合物,发现 OsO_4 能选择性地氧化 cephalomannine C-13 侧链末端的双键,使之形成二元醇(cephalomannine-diol),而紫杉醇却不受影响。反应混和物经柱层析就可以将紫杉醇和 cephalomannine-diol 分开。这种方法的主要缺点

是:对底物的纯度要求高,反应条件苛刻,不适宜氧化那些没有纯化的紫杉烷类化合物的混合物中的 cephalomannine;氧化剂 OsO_4 毒性大,价格昂贵,缺乏实用性。

Murray 等^[27]发现用含 1%~10% 的 O_3 可氧化 cephalomannine taxusin brevifolia 中的某些烯键,而对紫杉醇、cephalomannine taxusin brevifolia 中的另一种烯键却不起反应。反应混和物经硅胶柱层析就可以使其中的紫杉醇得到有效的纯化。但这一方法仍然需要采用硅胶柱层析才能把紫杉醇和其它被氧化的紫杉烷类化合物分开,经济上还不是很合理。因此, Murray 对上述方法又进行了改进^[28]。在经 O_3 氧化后,再加入吉拉德氏酞肼-AcOH 混合物,使 ozo-cephalomannine (cephalomannine 被 O_3 氧化后的产物)转变成 ozo-cephalomannine-吉拉德氏脲这一复合物,最后通过选择性沉淀或乙酸乙酯-水等萃取就可以把紫杉醇分离出来。用 MeOH - H_2O (3:1) 选择性沉淀, EtOAc - H_2O - MeOH (10:2:1) 以及 EtOAc - H_2O 萃取得到的紫杉醇的纯度分别可达到 97.5%、90% 和 95%, 这使该法有望成为大规模纯化紫杉醇的理想方法。

1996年 Kingston 等人^[29]用液溴或吡啶-过溴化物、四丁基三溴铵作为氧化剂,室温下在氯仿中反应 5 min,可以使紫杉醇和 cephalomannine 混合物中的 cephalomannine 转化为 2'',3''-dibromocephalomannine (2'',3''-二溴 cephalomannine),而紫杉醇不受影响。反应混和物用二氯甲烷稀释后,依次用 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液、水和盐水洗涤,硅胶柱纯化,可得纯度为 95% 的紫杉醇和 2'',3''-dibromocephalomannine。而 2'',3''-dibromocephalomannine 在乙醇中有搅拌条件下,用锌处理 2 h,反应后的溶液用乙酸乙酯稀释 20 倍,依次用饱和 NaHCO_3 溶液、水和盐水洗涤后,经制备 TLC 纯化,cephalomannine 收率可达 92%,纯度为 88%。

8 药理作用靶点法^[30]

药理作用靶点法是本科研组首次提出的一种基于紫杉醇药理作用研究成果的全新的紫杉醇分离纯化方法。药物的作用靶点是指药物在生物体内发挥作用时进攻或结合的生理组织。紫杉醇的药理研究结果表明,紫杉醇的药理作用靶点是体内的微管,微管是微管蛋白的聚合态。微管蛋白最主要的特点是高温下聚合成微管,低温下解聚成微管蛋白二聚体(dimer)形式。紫杉醇可以靶向地结合在微管上并有效地抑制微管的解聚,而不与微管蛋白的二聚体

发生作用。与紫杉醇最难分离的 cephalomannine 不具有这种特性。通过初步的研究,在一定的条件下,紫杉醇与 cephalomannine 的混和物经药理作用靶点法纯化后,紫杉醇的纯度可达 95% 以上。

作为一种紫杉醇纯化新技术,药理作用靶点法具有以下特点: 1)依据天然抗癌物质与其药理作用靶点的可逆特异性结合作用来进行分离纯化,较常规的萃取、柱层析及各种组合色谱等方法具有简便、高效特异性的特点; 2)紫杉醇与其药理作用靶点微管,在天然抗癌物质及药理作用靶点两方面都具有代表性,其研究成果易于推广到其它抗癌物质及其药理作用靶点的物系,具有普遍应用价值。

9 结束语

天然抗癌药物如紫杉醇是目前世界范围内医药界的一大热点,前景广阔,对攻克人类顽症、提高健康水平具有重大意义。而在这些药物的研究、开发尤其是生产中,产品的分离纯化是最难解决的问题之一,迫切需要新型化工分离技术和化工研究人员的参与,这也是目前医药行业与化工技术结合越来越紧密的关键所在。

参 考 文 献

- 1 阎家麒,刘虹,王九一,等. 中国医药工业杂志, 1994, 25(10): 433; 1996, 27(12): 531
- 2 赵凌云. 离子交换树脂催化解离键合紫杉醇机理及工艺的研究[学位论文]. 天津: 天津大学化工学院, 1998
- 3 锅田怎助,田崎弘之,江部洋史,等. 日本: 特开平, 6-157329, 1994
- 4 徐礼葵,刘爱茹. 药学报, 1991, 26(7): 537
- 5 Hoke S H, Wood J M, Cooks R G, *et al.* Analytical Chem, 1992, 64: 2313
- 6 Aurillola S O K, Lepisto A M, Naranlahti T, *et al.* J Chro-

- matogr, 1992, 153: 594
- 7 Witherup K M, Look S A, Stasko M W, *et al.* J Liq Chromatogr, 1989, 12(11): 2117
- 8 Cardellina J H. J Liq Chromatogr, 1991, 14(4): 659
- 9 Wickremesinhe E R M, Arteca R N. J Liq Chromatogr, 1993, 16(15): 3263
- 10 Mattina M J L. J Chromatogr A, 1994, 679: 269
- 11 Stasko M W, Witherup K M, Ghiorzi T J, *et al.* J Liq Chromatogr, 1989, 12(11): 2133
- 12 Matysik G, Glowniak K, Jozefczyk A, *et al.* Chromatography, 1995, 41(7/8): 485
- 13 Chan K C, Muschik G M, Issaq H J. J High Res Chromatogr, 1994, 17: 51
- 14 Vanhaelen-Fastre R, Diallo B, Jaziri M, *et al.* J Liq Chromatogr, 1992, 15(4): 697
- 15 饶畅,刘欣,张佩玲,等. 药学报, 1991, 26(7): 510
- 16 Carver D R, Prout T R, Workman C T, *et al.* WO 9412268, 1994
- 17 Ketchum R E B, Gibson D M. J Liq Chromatogr, 1995, 18(6): 1093
- 18 Jennings D W, Deutsch H M, Zalkow L H, *et al.* J Supercrit Fluid, 1992, 5: 1
- 19 Nair J B. EP0521675, 1993
- 20 Castor T P. WO 9420486, 1994
- 21 元英进,那平,胡宗定,等. 离子交换与吸附, 1994, 10(6): 543
- 22 杨雪峰,刘开录. CN 1140170A, 1996
- 23 Senilh V, Bleichert S, Colin M, *et al.* J Nat Prod, 1984, 47: 131
- 24 Durzan D J, Ventimiglia F. Cell Dev Biol, 1994, 30P: 219
- 25 Carver D R, Drout T R, Workman C T, *et al.* US 5281727, 1994
- 26 Kingston D G I, Gunatilake A A L, Ivey C A. J Nat Prod, 1992, 55(2): 259
- 27 Murray C K, Ziebarth T D, Bechvermit J T. US 5334732, 1994
- 28 Murray C K, Beckvermit J T, Anziano D J. US 5364747, 1994
- 29 Rimoldi J M, Molinero A A, Chordia M D, *et al.* J Nat Prod, 1996, 59: 167
- 30 肖剑. 药理作用靶点法分离纯化紫杉醇的研究[学位论文]. 天津: 天津大学化工学院, 1999

(1999-11-02收稿)

中药药动学血样预处理方法回顾与展望[△]

第四军医大学西京医院中药临床药理研究室(西安 710032) 张莉^{*} 黄熙^{**} 王骊丽

摘 要 综述了以血药浓度法研究中药药动学中的血样预处理方法并作简要评价,特别介绍了水浴法作为方剂血样预处理的新方法,为中药药动学及中药药效物质基础研究提供参考。
关键词 中药药动学 预处理 血药浓度

在以血药浓度法为研究的药动学中,药物成分从血样中的提取(包括简单的分离、纯化和富集)即预处理,常常是方法学研究的首要步骤。中药(指单

味或复方)中多种有效成分共存一体,因而不同于化学合成药物或经提取的天然药物单体,血样预处理方法是中药药动学研究中普遍性问题之一。国内多

^{*} Address: Zhang Li, Laboratory of Clinical Pharmacokinetics of Chinese Materia Medica, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an
张莉女,1988年国防科技大学本科毕业,在职研究生,讲师、主治医师。曾从事输血及血液质量控制工作,专业研究方向现为药物分析和中药临床药理,已发表论文 11 篇。
^{**} 为指导老师
[△]国家自然科学基金项目: No. 39870932