

高速逆流色谱法纯化曼地亚红豆杉枝叶提取物中紫杉醇

祝顺琴¹, 刘万宏^{1,2}, 谈锋^{1*}

(1. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆科技学院 生物系, 重庆 400042)

摘要:目的 研究从紫杉醇浸膏中分离紫杉醇的方法。方法 利用高速逆流色谱技术, 采用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(4:5:3.5:5)为溶剂体系。结果 经过高速逆流色谱一次纯化, 紫杉醇的质量分数由5.1%上升到85.5%, 回收率达到98.6%。结论 为制备高纯度紫杉醇提供了一条新途径。

关键词:曼地亚红豆杉; 紫杉醇; 高速逆流色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1491-02

Purification of taxol from extract in branches and leaves of *Taxus media*
by high-speed counter-current chromatography

ZHU Shun-qin¹, LIU Wan-hong^{1,2}, TAN Feng¹

(1. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Department of Biology, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 400042, China)

Key words: *Taxus media* CV. Hicksii; taxol; high-speed counter-current chromatography (HSCCC)

紫杉醇能诱导和促进微管蛋白结合, 从而阻止癌细胞的增殖, 对人的卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌、CNS癌、黑色素瘤、肝癌和白血病细胞系等有细胞毒作用, 是继阿霉素和顺铂后最热门的抗癌药物^[1,2], 紫杉醇已成为国际医药市场上销售额最大的抗肿瘤药物。目前分离紫杉醇一般采用多次柱色谱分离, 但有回收率低、生产成本高等劣势。高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)的流动相和固定相都是液体, 这两种液体是互不相溶的。利用螺旋柱在类似行星运动时产生的离心力, 使这互不相溶的两相溶剂系统不断混合, 保留在聚四氟乙烯管中的一相为固定相, 得用恒流泵连续输入的为流动相, 随流动相进入螺旋柱的溶质在两相之间反复分配, 按分配系数的大小, 被依次洗脱, 在流动相中分配比例大的先被洗脱出来。HSCCC具有无可逆吸附、高回收率、操作简便等优点, 现今越来越多的应用在天然产物的分离纯化中。曼地亚红豆杉不仅树皮中含有紫杉醇, 而且枝叶中的量也高达0.017%~0.046%。^[3,4]是红豆杉树皮的最佳替代资源。本实验利用高速逆流色谱从曼地亚红豆杉枝叶提取物中纯化紫杉醇, 不仅操作简便, 而且分离度好、回收率高、溶剂可以全部回收, 降

低生产成本。

1 仪器与材料

曼地亚红豆杉枝叶浸膏(自制, 紫杉醇质量分数为5.1%), 正己烷、醋酸乙酯、甲醇等均为分析纯, 上海同田生化TBA-300A(半制备型)高速逆流色谱仪。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Beckman 高效液相色谱系统; 流动相为甲醇-水(65:35); 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 228 nm; 色谱柱: 大连依利特 C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

2.2 溶剂系统的选择: 溶剂系统的选择是高速逆流色谱分离效果是关键的因素, 选择溶剂系统的原则是利用溶质的分配系数(K), 要求 0.5 < K < 2, 最好为 0.67~1.5^[5]。K值即是在一定温度下, 化合物在两相间达到分配平衡时, 在固定相与流动相中质量浓度之比。K = [C_s]/[C_m] (C_s-溶质在固定相中的质量浓度, C_m-溶质在流动相中的质量浓度)。

以四元溶剂系统正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)为基础, 得出紫杉醇在溶剂系统中的K=0.35, 通过调节这4种溶剂的不同配比, 用试管法结合HPLC进行分析筛选溶剂系统, 得到几种配比符合K值达到0.5 < K < 2的条件, 结果见表1。

收稿日期: 2006-12-25

基金项目: 国家863项目资助(2002AA212191); 重庆市科技项目资助(2002-6222); 西南师范大学青年基金项目资助(SWNUQ026)

作者简介: 祝顺琴(1981—), 女, 重庆梁平人, 硕士研究生, 助教, 研究方向为生化制药。

Tel: (023) 68252365 E-mail: zhushunqin@163.com

* 通讯作者 谈锋 Tel: (023) 68367091

表1 紫杉醇在不同溶剂系统的K值

Table 1 Taxol K value in different solvent systems

溶剂系统正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水	K 值
5:5:5:5	0.35(对照)
4:5:4:5	0.66
4:5:3.5:5	1.48
4:5:3:5	1.78

2.3 高速逆流色谱制备:取曼地亚红豆杉枝叶浸膏0.5 g,溶解在20 mL的做为固定相的下相溶剂中,分别采用溶剂系统纯化,用N2010色谱工作站在线监测,按色谱峰收集馏分。用HPLC检测各馏分的色谱峰,以紫杉醇对照品的峰面积做标准曲线,采用外标法计算各馏分中紫杉醇的质量浓度。将馏分浓缩,烘干至恒重,测定回收率(回收率=纯化前紫杉醇总质量/纯化后紫杉醇的总质量×100%)和质量分数(质量分数=样品中紫杉醇的质量/样品的总质量×100%)。结果见表2。

表2 不同溶剂系统的比较

Table 2 Comparison of different solvent systems

溶剂系统	回收率/ %	质量分数/ %	制备时间/ min
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水			
5:5:5.0:5	98.2	53.8	180
4:5:4.0:5	97.3	72.5	215
4:5:3.5:5	98.6	85.5	235
4:5:3.0:5	98.5	86.2	320

可见4种溶剂系统均有较高的回收率,后两种溶剂系统有较好的纯化效果。但是后者的出峰时间要迟85 min,所以最优化溶剂条件为溶剂系统正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(4:5:3.5:5)。浸膏经过一次分离,经HPLC检测得到29.4 mg紫杉醇,回收率为98.6%,质量分数为85.5%紫杉醇。分离图谱见图1,HPLC图谱见图2。

3 讨论

曼地亚红豆杉枝叶浸膏中紫杉醇质量分数为5.1%,经过HSCCC一次分离,紫杉醇的质量分数上升到85.5%,回收率达到98.6%。与HPLC相比,HSCCC法进样量较大,最多可达数克,是HPLC

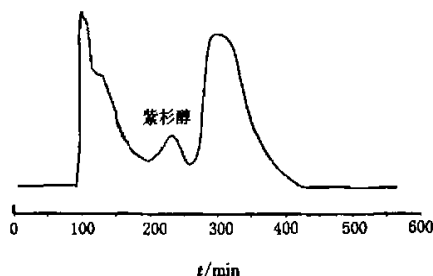


图1 浸膏中紫杉醇纯化的HSCCC图谱

Fig. 1 HSCCC Chromatogram of taxol purified in extract

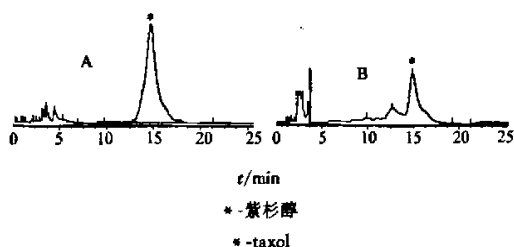


图2 紫杉醇对照品(A)和浸膏纯化产品的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC Chromatogram of taxol reference substance

(A) and purified product in extract (B)

的数百倍;与常压、低压色谱相比,HSCCC分离能力强,有些样品经一次分离即得到一个甚至多个单体,且分离时间短,一般数小时即可完成分离。HSCCC是一种有潜力的工业化生产紫杉醇的方法。

References:

- [1] Woo H L, Swenerton K D, Hoskins P J. Taxol is active in platinum resistant endometrial adenocarcinoma [J]. *Ann J Clin Oncol*, 1996, 19(3): 290-291.
- [2] Jones W B, Schneider J, Shapiro F, et al. Treatment of resistant gestational choriocarcinoma with taxol: A report of two cases [J]. *Gynecol Oncol*, 1996, 61(1): 126-130.
- [3] Cragg G M, Saul A S, Matthew S, et al. The taxol supply crisis; New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(10): 1657-1668.
- [4] Castor, Trevor P, Theodore A. Determination of taxol in *Taxus media* needles in the presence of interfering components [J]. *J Liq Chromatogr*, 1993, 16(3): 723-731.
- [5] Conway W D. *Modern Countercurrent Chromatography* [M]. Washington, D. C.: American Chemical Society, 1995.

《中草药》杂志被评为“第五届中国百种杰出学术期刊”

2006年10月27日中国科学技术信息研究所公布了“第五届中国百种杰出学术期刊”名单,《中草药》杂志获此殊荣——“第五届中国百种杰出学术期刊”。这个名单是按照期刊评价指标体系对重要指标(影响因素、总被引频次、他引总引比、基金论文比和即年指标)进行打分的结果,并在近几年来召开了20余场专家研讨会,对评价指标不断进行推敲和改进而评出的。

摘自中国科学技术信息研究所《2005年度中国科技论文统计与分析年度报告》