

较:取水提液 300 L 浓缩至 50 L 时,加等体积 85 % 乙醇沉淀,取上清液回收乙醇,得水提醇沉浸膏 72 L,利用高效液相分别测定了超滤前后滤液和水提醇沉浸膏中二苯乙烯苷,将超滤前后药液和水提醇沉液浓缩干燥干膏,称定质量,计算固形物去除率和二苯乙烯苷转移率,结果见表 4。

表 4 超滤前后有效成分的比较

Table 4 Comparison on active components before and after microfiltration

样品	体积/L	性状	固形物 总量/kg	固形物去 除率/%	二苯乙烯苷 总量/g	二苯乙烯苷 转移率/%
原药液	300	浑浊	4.80		3.75	
滤过液	303	澄清	2.44	55.9	2.98	79.47
醇沉后浸膏	72	浑浊	2.78	42.1	2.41	64.30

3 讨论

比较了 3 种孔径氧化铝膜的分离性能,孔径为 50 nm 陶瓷膜对制首乌水提液具有较好的分离效

果,渗透通量大,有效成分转移率比较高。本体系合适的滤过操作参数为操作压差 0.8~1.2 MPa,滤过温度 50~60 °C,膜面流速 3.0 m/s

微滤过程中,药液浓缩到一定程度时,一次加入原药液 10 % 的去离子水,当微滤液收率达到原药液的 100 % 左右时,有效成分保留率达 82 %,即可结束微滤。采用强酸、强碱交替清洗的方法,膜通量的恢复率可达到 90 % 以上。

实验结果表明陶瓷膜超滤与水提醇沉相比,除杂率较相近,但二苯乙烯苷的量明显高于水提醇沉工艺。陶瓷膜超滤精制何首乌水提液工艺是可行的,其优点为杂质去除比较彻底,料液处理简单,产品质量得到保证,膜清洗方便,并可反复再生。

参考文献:

- [1] 黄仲涛. 无机膜技术及其应用[M]. 北京:中国石化出版社, 1999.

循环高速逆流色谱从曼地亚红豆杉枝叶提取物中分离紫杉醇和三尖杉宁碱

苏 静,谈 锋*,谢 峻,冯 巍,陈 斌

(西南大学生命科学学院,三峡库区生态环境教育部重点实验室,重庆市三峡库区

植物生态与资源重点实验室,重庆 400715)

摘 要:目的 研究曼地亚红豆杉枝叶提取物中分离紫杉醇及其类似物三尖杉宁碱的方法,提高紫杉醇的回收率及质量分数。方法 曼地亚红豆杉枝叶提取物先经 Al_2O_3 柱纯化后,再以正己烷-醋酸乙酯-甲醇-乙醇-水(5:7:5:1:6.5)为溶剂系统,利用循环高速逆流色谱分离紫杉醇和三尖杉宁碱。结果 经循环高速逆流色谱循环一次后,三尖杉宁碱与紫杉醇即达到基线分离,紫杉醇质量分数达 98.2 % 以上,回收率 83.0 %。结论 循环 HSCCC 法为分离紫杉醇和三尖杉宁碱提供了一条简便、快速的方法,使制备高质量分数、高回收率的紫杉醇成为可能。

关键词:曼地亚红豆杉枝叶;紫杉醇;三尖杉宁碱;循环高速逆流色谱

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)10-1569-04

Separation of paclitaxel and cephalomanine from extracts in *Taxus media* branches and leaves by recycling high-speed counter-current chromatography

SU Jing, TAN Feng, XIE Jun, FENG Wei, CHEN Bin

(Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Key Laboratory of Plant Ecology and Resources in Three Gorges Reservoir Region, School of Life Science, Southwest China University, Chongqing 400715, China)

Abstract : Objective To study the method for separating paclitaxel from the extracts in *Taxus media* branches and leaves and cephalomanine, and to increase recovery rate and content of paclitaxel. **Methods**

* 收稿日期:2009-01-27

基金项目:国家“863”课题资助项目(2002AA212191)

作者简介:苏 静(1985—),女,山东济南人,在读硕士研究生,研究方向为药用植物生物技术与生化工程。

Tel: (023) 68367091 E-mail: sujing07@swu.edu.cn

* 通讯作者 谈 锋 Tel: (023) 68252698 E-mail: tanfeng@swu.edu.cn

The extract in *T. media* branches and leaves was purified by Al_2O_3 firstly. Then the recycling high-speed counter-current chromatography (HSCCC) was used to separate paclitaxel and cephalomanine from the crude sample with a solvent system composed of *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-alcohol-water (5 : 7 : 5 : 1 : 6.5). **Results** Paclitaxel and cephalomanine were completely separated by recycling HSCCC preparation with one recycle. The content of paclitaxel was over 98.2 % and the recovery rate was 80.3 %.

Conclusion The recycling HSCCC provides a convenient and rapid way to separate paclitaxel and cephalomanine which could make it possible to prepare paclitaxel with high content and recovery rate.

Key words: branches and leaves of *Taxus media* cv. Hicksii; paclitaxel; cephalomanine; recycling high-speed counter-current chromatography

紫杉醇是从红豆杉属植物中分离出来的一种具有独特抗癌机制的天然产物,1992年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准作为抗晚期癌症的新药上市,目前已成为当前世界上最热门、最畅销、最紧缺、最昂贵的广谱抗癌药物^[1]。但是紫杉醇在植物体中量极低而且与多种类似物共存,其中三尖杉宁碱与紫杉醇的区别仅在于C-13位侧连的不同(图1),只有结构上的细微差别使得它们的分离十分困难,而实际应用中对紫杉醇的质量分数要求又很高,从而使紫杉醇及其类似物的分离成为纯化紫杉醇的关键。高速逆流色谱(HSCCC)是近十几年来发展起来的新型高效液-液分配技术,具有回收率高、制备量大、操作简便等优点。国内外已有将其应用于紫杉醇的分离纯化的报道^[2,3],取得了一定的成果,但均未能将三尖杉宁碱与紫杉醇完全分开。近年来,多维逆流色谱在类似物的分离方面取得了显著效果^[4],但由于需要两台以上的逆流色谱仪,价格较高,未能被广泛应用。循环高速逆流色谱则是简单的利用一台高速逆流色谱仪通过循环阀将待分离部分多次泵入主机中进行循环分离,提高分离效果的方法。此法简便、快速,国外已有将其应用于类似物分离的报道^[5]。本实验对循环 HSCCC 法分离类似物进行了探索,并利用这种方法成功的分离了紫杉醇及其类似物三尖杉宁碱。

1 仪器与材料

TBE-300A 型高速逆流色谱仪(上海同田生化),LC-20AD 型岛津高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

曼地亚红豆杉枝叶浸膏由本实验室提供,含紫杉醇 1.82 %、三尖杉宁 0.22 %。紫杉醇对照品(上海同田生化,质量分数 $\geq 99\%$),三尖杉宁碱对照品(上海融禾医药科技发展有限公司,质量分数 $\geq 98\%$),中性氧化铝(100~200 目,广西平果贵成科技公司),高效液相色谱试剂为色谱纯,其他试剂均

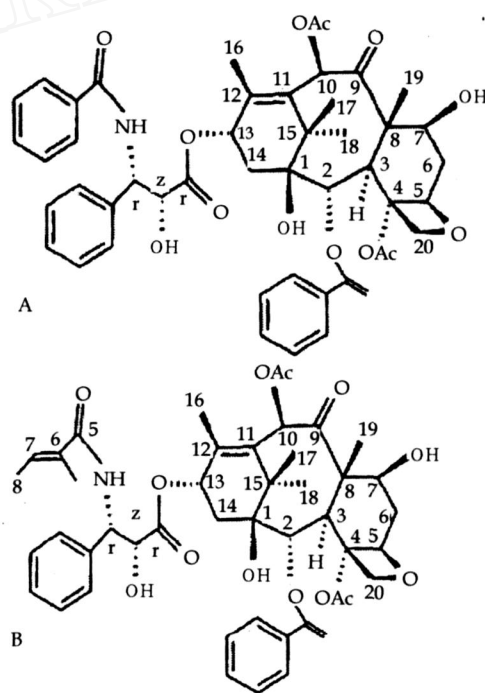


图1 紫杉醇(A)和三尖杉宁碱(B)的结构

Fig 1 Structures of paclitaxel (A) and cephalomanine (B) of analytical purity.

2 方法与结果

2.1 紫杉醇和三尖杉宁碱的 HPLC 检测方法

2.1.1 色谱条件: Phenomenex Luna C_{18} 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(63 : 37);体积流量:1 mL/min;检测波长:228 nm;进样量:20 μL 。

2.1.2 标准曲线的制作:分别称取紫杉醇和三尖杉宁碱对照品适量,甲醇溶解,得 1 mg/mL 母液。依次稀释成含紫杉醇和三尖杉宁碱各 20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,按上述色谱条件检测。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程。紫杉醇: $Y = 38471 X - 20969$, $R^2 = 0.9999$;三尖杉宁碱: $Y = 37423 X - 5823$, $R^2 = 0.9999$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备:待测样品浓缩干后甲醇定容,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.4 测定:在完全相同的条件下,准确进样与对照品溶液相同体积的供试品溶液,根据待测组分的信号,用回归方程计算样品中紫杉醇和三尖杉宁碱的质量浓度。

2.2 循环 HSCCC 分离纯化粗样品

2.2.1 粗样品的制备:将曼地亚红豆杉枝叶浸膏 500 mg 上中性氧化铝柱(30 cm $\times$ 2 cm),先用氯仿和氯仿-甲醇(98.5 : 1.5)各洗一个柱床(60 mL)除杂,再用氯仿-甲醇(96 : 4)洗脱 1.5 个柱床^[6],洗脱液浓缩烘干得粗样品,其中含紫杉醇达到 7.97%,回收率为 94.1%。循环 HSCCC 分离三尖杉宁碱和紫杉醇。

2.2.2 溶剂系统的选择:Chiou 等^[2]采用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-乙醇-水(5 : 7 : 5 : 1 : 6.5)体系,利用常规 HSCCC 法分离紫杉醇和三尖杉宁碱,取得了一定效果,但未将两者完全分开。本实验采用同样溶剂体系,利用循环 HSCCC 分离紫杉醇和三尖杉宁碱。溶剂体系上相作为固定相,下相作为流动相。

2.2.3 上样溶液的制备:将粗样品 250 mg 用 10 mL 流动相溶解作为上样溶液。

2.2.4 操作步骤:以 9 mL/min 的流速向主机中泵入固定相,待固定相充满管道后,打开主机调整转速为 800 r/min,主机正转。当达到设定转速时,以 2 mL/min 的流速泵入流动相。当流动相从主机出口流出时进样,进样量 10 mL,检测波长 254 nm,主机温度控制在 25 $^{\circ}\text{C}$ 。开始出峰时,弃前面的杂质峰,待三尖杉宁碱与紫杉醇出峰时(时间在 110 min 时),将 HSCCC 出口的管道与输液泵的流动相入口管道连接,依次将含三尖杉宁碱和紫杉醇的流动相重新泵入主机,待两者的峰出完后(时间在 170 min 时),断开 HSCCC 出口管道与输液泵流动相入口管道,后者插入流动相中。当三尖杉宁碱再次出峰时(时间在 260 min 时),4 mL 收集一管, HPLC 法检测每管中紫杉醇和三尖杉宁碱的质量浓度,至此即完成一次循环。见图 2。

如果循环一次分离结果不好,可采用多次循环的方法,直到待分离物达到基线分离,断开连接进行收集。上述管路变化可以通过一个二位六通低压阀方便地实现切换。由于上样粗样品中杂质较多,循环后紫杉醇再次出峰时(时间 310 min 时)与保留时间较长的杂质峰峰 A 出现重叠,影响了紫杉醇的质量分数。这种情况可以先将粗样品进行常规 HSC-

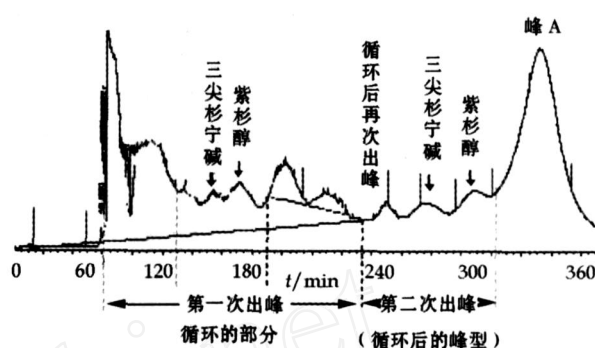


图 2 循环 HSCCC 分离纯化粗样品的色谱图

Fig 2 Chromatogram of crude sample by recycling HSCCC 制备,收集含三尖杉宁碱和紫杉醇的峰(时间 110~170 min),浓缩后得两者的混合物,再将两者的混合物进行循环 HSCCC 制备。

2.3 循环 HSCCC 分离三尖杉宁碱和紫杉醇的混合物:为避免循环后紫杉醇与峰 A 重叠,先将粗样品 250 mg 进行常规 HSCCC 制备,收集含三尖杉宁碱和紫杉醇的峰,浓缩烘干,得三尖杉宁碱和紫杉醇的混合物。然后将其用流动相溶解作为上样溶液,进行循环 HSCCC 分离纯化。三尖杉宁碱开始出峰时(110 min)连接循环,峰出完时(180 min)断开连接。循环后三尖杉宁碱再次出峰时(240 min),每 4 mL 收集一管,直接上 HPLC 检测每管中三尖杉宁碱和紫杉醇的质量浓度。循环 HSCCC 色谱图见图 3。

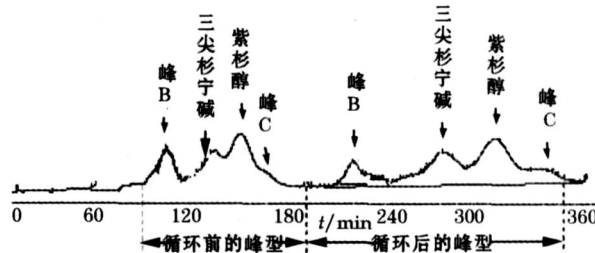


图 3 循环 HSCCC 分离紫杉醇和三尖杉宁碱混合物的色谱图

Fig 3 Chromatogram of mixture of paclitaxel and cephalomanine by recycling HSCCC

可以看出循环一次后三尖杉宁碱和紫杉醇峰的分度度明显增加;其中峰 B 和峰 C 是邻近紫杉醇和三尖杉宁碱的杂质峰,循环后杂质峰 B、C 分别与三尖杉宁碱和紫杉醇的分度度也增加了,进一步纯化了紫杉醇,也得到了三尖杉宁碱的纯品。

2.4 循环 HSCCC 分离结果及验证:采用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-乙醇-水(5 : 7 : 5 : 1 : 6.5)体系,利用常规 HSCCC 和循环 HSCCC 分离紫杉醇和三尖杉宁碱,出峰时 4 mL 收集一管,所收各管直接上 HPLC 检测,见图 4。常规 HSCCC 制备的各管中

紫杉醇和三尖杉宁碱并未达到完全的基线分离。循环 HSCCC 制备的各管中三尖杉宁碱和紫杉醇达到基线分离。

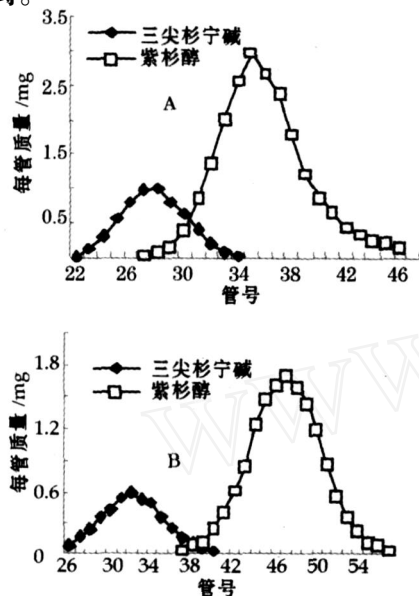


图 4 常规 HSCCC (A) 和循环一次后 HSCCC (B) 制备的各管中紫杉醇和三尖杉宁碱

Fig 4 Paclitaxel and cephalomannine content in each tube prepared by routine HSCCC (A) and once recycling HSCCC (B)

利用 HPLC 检测了循环 HSCCC 制备的各管中三尖杉宁碱和紫杉醇的质量分数,按面积归一法计算,见图 5。可见 43~53 管的紫杉醇质量分数在 98.2% 以上,比 HSCCC 制备前提高了 12 倍以上,回收率达到 83.0%。32~35 管的三尖杉宁碱质量分数在 98.0% 以上,回收率为 43.6%。

3 讨论

循环 HSCCC 能有效地分离化学类似物,理论上只要循环的次数足够多,十分相似的物质都可以分开,但将质量分数较低的样品直接进行循环 HSCCC 时,循环后目的产物再次出峰时可能与前

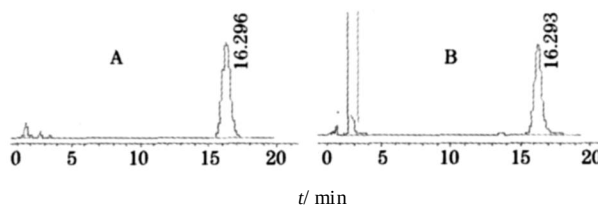


图 5 紫杉醇对照品(A)及循环 HSCCC 制备的紫杉醇样品(B)的 HPLC 图谱

Fig 5 HPLC Chromatograms of paclitaxel reference substance (A) and sample prepared by recycling HSCCC (B)

面保留时间较长的峰重叠。多维逆流色谱由于采用两台以上的逆流色谱仪,可以将目的产物泵入另一台主机进行分离,能有效避免与杂质峰重叠;在只有一台仪器时,则可将粗样品进行一次常规 HSCCC 制备,收集目标产物后再进行循环 HSCCC。

常规 HSCCC 纯化紫杉醇时,由于紫杉醇与前面的三尖杉宁碱及后面的杂质峰都不能达到基线分离,只能得到少量高质量分数的紫杉醇,回收率低;循环后,紫杉醇与三尖杉宁碱及杂质峰很好的分开,提高了回收率及质量分数,使制备高回收率、高质量分数的紫杉醇成为可能。

参考文献:

- [1] 王卫斌. 紫杉醇的研究进展[J]. 林业调查规划, 2007, 32 (4): 40-44.
- [2] Chiou F Y, Kan P, Chu I M, et al. Separation of Taxol and cephalomannine by counter current chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 1997, 20(1): 57-61.
- [3] 祝顺琴, 刘万宏, 谈 锋. 高速逆流色谱法纯化曼地红亚红杉枝叶提取物中紫杉醇[J]. 中草药, 2007, 38(10): 1491-1492.
- [4] Yang F Q, Quan J, Zhang, T Y, et al. Multidimensional counter-current chromatographic system and its application [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 803: 298-301.
- [5] Han Q B, Song J Z, Qiao C F, et al. Preparative separation of gambogic acid and its C-2 epimer using recycling high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1127: 298-301.
- [6] 张志强, 苏志国. 氧化铝层析从云南红豆杉植物中转化提取紫杉醇 [J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(3): 1-5.

欢迎订阅 2010 年《药学报》

《药学报》(CN: 11-2163/R, ISSN: 0513-4870) 是由中国药学会主办、中国医学科学院药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目: 述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来, 一直报道药学领域原创性、创新性科研成果, 旨在促进国内外学术交流。刊登论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药学等。

《药学报》为我国自然科学核心期刊, 据中国科学引文数据库的统计数据, 在中国科技核心期刊排行表中, 《药学报》名列前茅, 在药学类期刊中居首位; 本刊已被世界主要检索系统收录, 为我国药学界高水平的学术刊物, 在国际上享有一定知名度。

本刊为 112 页, 月刊, 大 16 开本。每期定价 30 元, 全年定价 360 元。国内邮发代码: 2-233, 国外代码: M105。欢迎广大作者踊跃投稿, 欢迎广大读者订阅。可采用的订阅方式如下:

通过当地邮局; 通过 E-mail (yxxb @imm. ac. cn) 或从网上 (www. yxxb. com. cn) 下载订阅单, 填好后寄至编辑部; 通过本刊编辑部, 联系人: 李淑芬、张晓晔 电话: 86-10-63165208 传真: 86-10-63026192

编辑部地址: 北京市先农坛街 1 号《药学报》编辑部 邮编: 100050