

中国红豆杉叶浸膏中紫杉烷的分离纯化及成分鉴定*



余龙江, 兰文智

(华中科技大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

YU L J

摘 要: 以中国红豆杉[*Taxus chinensis*(Pilger)Rehd.]叶为原料,利用甲醇或乙醇为溶剂制备浸膏。甲醇浸膏中的紫杉醇和紫杉醇的含量高于乙醇浸膏。采用萃取和层析方法相结合的分离纯化工艺,从甲醇浸膏中获得 10 个化合物纯品。利用 NMR, IR, MS 和 HPLC 等方法对其成分进行结构鉴定,确定 5 个化合物分别为紫杉醇、 β -乙酰基-5,7,10-去乙酰基紫杉醇、紫杉醇、紫杉醇 VI 和 7,9,10,13-去乙酰基紫杉醇 VI, HPLC 检测它们的纯度相应为 98.4%, 98.7%, 99.1%, 99.65% 和 92.94%。分离的紫杉醇和紫杉醇得率分别为 62.6% 和 57.6%。这些结果表明所建立的制备及分离纯化的工艺可用于红豆杉叶生产紫杉醇及其前体物。

关键词: 红豆杉叶; 浸膏; 紫杉醇; 分离纯化

中图分类号: S791.49

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2002)03-0045-04

紫杉醇(taxol)是世界公认的近 20 年来找到的最有希望成为首选的新型抗癌药物,它在治疗多种癌症方面具有明显疗效^[1]。美国 FDA 于 1992 年 12 月 29 日正式批准紫杉醇作为治疗癌症的新药上市。目前临床使用的紫杉醇都是从红豆杉[*Taxus chinensis*(Pilger)Rehd.]树的树皮中分离得到的。红豆杉树不仅生长缓慢(需 100 年才能成材使用),而且紫杉醇含量甚微(仅为干质量的万分之一左右),故紫杉醇药源稀少,解决药源问题已成当务之急。红豆杉属(*Taxus* sp.)植物共有 11 个种,我国有 4 个种和 1 个变种,它们分布在西藏、云南、贵州、四川、广东、广西、湖南、江西、福建、浙江、安徽、河南、湖北、陕西、山西、甘肃和吉林山区^[2],生长在我国境内的红豆杉均含紫杉醇及其类似物,统称为紫杉烷类化合物。但不同种之间、同种不同株、同株不同部位的紫杉烷成分及含量都存在差异^[3~4]。本研究利用湖北神农架林区红豆杉枝叶为原料,设计研究其分离纯化工艺,并对分离纯化所获得的化合物进行纯度分析和结构鉴定,分离精制出紫杉醇及其前体物。

1 材料与方 法

1.1 材 料

中国红豆杉叶来源于湖北神农架林区。将叶洗净并晾干,用以制备浸膏。

1.2 浸膏制备

既使同一地区、同一品种的红豆杉,其叶中的紫杉烷含量是不同的。因此,在浸膏制备前,有必要对叶中紫杉烷含量进行测定。采用 70% 的甲醇或乙醇作为溶剂制备浸膏,其工艺过程为:将紫杉烷含量较高(用 HPLC 检测)的红豆杉叶洗净,干燥并粉碎后,用甲(乙)醇浸提 48 h,如此反复 3 次,合并浸出

* 收稿日期: 2001-09-10

基金项目: 2000 年高等学校骨干教师基金资助项目

作者简介: 余龙江(1966-),男,湖北黄梅人,教授,博士,从事植物生物技术、天然产物及生物工程研究。

液,得红豆杉叶浸膏,再进行检测分装(HPLC检测浸膏中紫杉醇、前驱体含量),最后计算浸膏提取收率,确定质量标准。

1.3 紫杉烷的分离纯化

由于用甲醇制备的浸膏质量较好,因此仅用甲醇浸膏分离纯化紫杉烷。经大孔交换树脂柱分离后,可以分离出几十种组分,检测并合并相同的组分。以HPLC检测,合并相同的组分。因此,紫杉烷各组分是完全分开的。

紫杉烷的分离纯化工艺过程如下:将1.2节所得的红豆杉叶甲醇浸膏进行浓缩、过滤等预处理,预处理后留浸膏进行萃取(萃取相和萃余相分别回收溶剂),萃取物经大孔交换树脂柱洗脱,分步收集,检测后合并相同的组分,同时回收溶剂,再经装有反相载体柱纯化,重复2~3次,用HPLC分别检测其浓度,合并紫杉烷和各前体组分,分别经重结晶得紫杉醇和浆果赤霉素(baccatin III)等纯品。

1.4 成分分析与结构鉴定

1.4.1 高效液相色谱法定量分析醇浸膏及柱纯化组分中紫杉烷的含量

1.4.1.1 醇浸膏样品的制备 取一定量的醇浸膏50 mL,置分液漏斗,用石油醚脱脂,然后用氯仿萃取,合并氯仿提取液,回收氯仿,样品抽干,用甲醇定容,稀释后,用外标法进行定量。

1.4.1.2 标准品制备 将各种紫杉烷的标准品以甲醇为溶剂,制备成质量浓度为100和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准液。紫杉烷的含量采用Waters液相色谱仪测定,其测定条件:色谱柱为Nova-Pak C₁₈柱(3.9 mm \times 150 mm,粒度4 μm),检测波长227 nm,流动相CH₃OH:H₂O=75:25,流速:0.5~1.0 mL/min。以甲醇为溶剂,溶解柱纯化后组分。其含量的测定同上。

1.4.2 薄层层析法定性分析柱纯化组分中紫杉烷 采用硅胶薄层板,溶剂系统为氯仿和丙酮混和物,前体物和紫杉醇的标准品质量浓度均为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,样品制备同高效液相色谱法,显色剂为硫酸茴香醛,显色温度为105 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4.3 结构鉴定 利用本实验设计的工艺对红豆杉叶醇浸膏进行分离纯化,经柱层析得到10个馏份的纯品,然后采用NMR,MS,IR,HPLC等进行结构鉴定。

2 结果与分析

2.1 两种醇制备浸膏工艺的比较

表1 甲(乙)醇制备的浸膏比较

由表1可知,以甲醇或乙醇得到的浸膏量基本相同,但甲醇制备的浸膏中 baccatin III和紫杉醇的含量分别为乙醇制备的浸膏中的160%和112%。由于甲醇成本较低,因此,利用甲醇制备浸膏效果较好。但由于甲醇有较强毒性,可造成人的永久性失明,因此,使用甲醇进行提取,应在通风效果好的环境中进行。

提取剂 extracting solvent	原料量/kg material mass	浸膏得率/% extract yield	浸膏中紫杉烷含量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) taxanes contents in extract	
			浆果赤霉素 baccatin III	紫杉醇 taxol
甲醇 methanol	40	26.3	328	56
乙醇 ethanol	110	26.6	274	50

2.2 结构鉴定

甲醇浸膏经分离纯化后,得到10个化合物。对这10个化合物进行波谱分析、标准品对照及与文献报道的相同化合物的数据核对,鉴定出5个紫杉烷二萜类化合物,其理化参数如下。

2.2.1 紫杉醇 白色针晶(MeOH+H₂O), mp: 209~211 $^{\circ}\text{C}$; TLC: 显紫红色,分子式C₄₇H₅₁NO₁₄, M_w: 853; IR(KBr) cm^{-1} : 3450(OH, NH), 1740, 1730, 1660, 1255; ¹H NMR(200 MHz) δ : 1.16(3H, s, 17-CH₃), 1.25(3H, s, 16-CH₃), 1.73(3H, s, 19-CH₃), 1.82(3H, s, 18-CH₃), 2.25, 2.40(each 3H, s, OAcX₂), 2.55(1H, m, 6- α H), 1.88(1H, m, 6-H), 3.79(1H, d, J=7, 3-H), 4.20(1H, d, J=8.5, 2 θ -H), 4.30(1H, d, J=8.5, 2 θ - α H), 4.40(1H, dd, 7- α H), 4.78(1H, dd, 2'-H), 4.94(1H, d, J=9.5, 5- α H), 5.68(1H, d, J=7, 2-H), 5.78(1H, d, J=9, 3'-H), 6.23(1H, d, 13-H), 6.27(1H, s, 10-H), 7.02(1H, d, J=9, 3'-NH), 7.30~7.85(13H, m, brt, Ar-H), 8.16(2H, d, J=7, Ar-H)。

2.2.2 浆果赤霉素 III(简称 B III) 无色针晶 mp: 223~ 225 °C; TLC 显色及 R_f 值与标准品一致; 分子式 $C_{31}H_{38}O_{11}$ M_w : 586; FAB-MS m/z : 625 ($M + H + K$)⁺; IR (KBr) cm^{-1} : 3450, 1720, 1700, 1240; ¹H NMR(400 MHz) δ : 1.11(6H, s, 16-CH₃), 1.67(3H, s, 19-CH₃), 20.5(3H, s, 18-CH₃), 2.25(3H, s, 4-OAc), 2.29(3H, s, 10-OAc), 1.18(1H, m, 6- β H), 2.55(1H, m, 6- α H), 3.84(1H, d, $J = 7$, 3-H), 4.15(1H, d, $J = 8$, 20- β H), 4.31(1H, d, $J = 8$, 20- α H), 4.45(1H, m, 7-H), 4.86(1H, t, $J = 9$, 13-H), 4.98(1H, d, $J = 10$, 5-H), 5.62(1H, d, $J = 7$, 2-H), 7.48(2H, m, OBz, meta), 7.59(1H, t, OBz, para), 8.1(2H, d, OBz, ortho)。

2.2.3 7,9,10,13-去乙酰基浆果赤霉素 VI(简称 DA B VI) 无色结晶(MeOH+H₂O), mp> 250 °C; 分子式 $C_{29}H_{38}O_{10}$, M_w : 546; IR (KBr) cm^{-1} : 3450, 3000, 1742, 1285, 1268; FAB-MS m/z : 585 ($M + H + K$)⁺, 569 ($M + H + Na$)⁺; EIMS m/z : 528 ($M - H_2O$), 510 ($M - 2H_2O$), 467, 450; ¹H NMR(500 MHz) δ : 1.06(3H, s, 16-CH₃), 1.12(3H, s, 17-CH₃), 1.68(3H, s, 19-CH₃), 1.94(3H, s, 18-CH₃), 2.20(3H, s, OAc), 1.77(1H, dd, 14- α H), 1.85(1H, m, 6- α H), 2.28(1H, dd, 14- β H), 2.58(1H, m, 6- β H), 3.30(1H, d, $J = 7.5$, 3-H), 4.09(1H, d, $J = 7.57$, 9-H), 4.23(1H, t, $J = 8.42$, 13-H), 4.34(1H, d, $J = 10$, 20-H), 4.45(1H, d, $J = 7.5$, 10-H), 4.54(1H, d, $J = 10$, 20-H), 4.58(1H, t, $J = 7$, 5-H), 4.88(1H, d, $J = 8.41$, 7-H), 6.07(1H, d, $J = 7.51$, 2-H), 7.46(2H, m, Ar-H, meta), 7.60(1H, m, Ar-H, para), 8.01(2H, m, Ar-H, ortho)。

2.2.4 浆果赤霉素 VI(简称 B VI) 白色结晶(MeOH+H₂O), mp: 240~ 245 °C; TLC 显蓝黑色, 分子式 $C_{87}H_{46}O_{14}$, M_w : 714; FAB-MS m/z : 737 ($M + H + Na$)⁺, 677 ($M + H + NaAcOH$)⁺; IR (KBr) cm^{-1} : 3450, 1740, 1710, 1370, 1245, 1225; ¹H NMR(400 MHz) δ : 1.23(3H, s, 17-CH₃), 1.60(3H, s, 16-CH₃), 1.78(3H, s, 19-CH₃), 1.86(1H, m, 6- β H), 2.05(2H, m, 6-H₂), 2.0(3H, s, 18-CH₃), 2.03, 2.10, 2.11, 2.20, 2.29(each 3H, s, OAc \times 5), 2.50(1H, m, 14- α H), 3.18(1H, d, $J = 6$, 3-H), 4.12(1H, d, $J = 8$, 20- β H), 4.33(1H, d, $J = 8$, 20- α H), 4.97(1H, d, $J = 8$, 7-H), 5.54(1H, dd, 7-H), 5.88(1H, d, $J = 6$, 2-H), 6.0(1H, d, $J = 11$, 9-H), 6.17(1H, t, 13-H), 6.25(1H, d, $J = 11$, 10-H), 7.48(2H, m, Ar-H, meta), 7.61(1H, m, Ar-H, para), 8.08(2H, m, Ar-H, ortho)。

2.2.5 1-乙酰基-5,7,10-去乙酰基浆果赤霉素 I(简称 ADA B I) 无色结晶(MeOH+H₂O), mp: 245~ 250 °C; TLC 显蓝黑色, 分子式 $C_{28}H_{40}O_{12}$, M_w : 568; IR (KBr) cm^{-1} : 3460, 3270, 3020, 1740, 1660, 1380, 1260, 1250; FAB-MS m/z : 607 ($M + H + K$)⁺, 591 ($M + H + Na$)⁺; EIMS m/z : 608, 490, 448, 430, 388; ¹H NMR(500 MHz) δ : 1.23(3H, s, 16-CH₃), 1.38(3H, s, 17-CH₃), 1.53(3H, s, 19-CH₃), 2.05(3H, s, 18-CH₃), 2.096, 2.13, 2.15, 2.18(each 3H, s, OAc \times 4), 1.86(1H, m, 6- β H), 2.88(1H, m, 14-H), 2.07(1H, m, 6- α H), 2.32(1H, d, $J = 5$, 20-H), 2.50(1H, dd, 14-H), 3.07(1H, d, $J = 3.44$, 3-H), 3.46(1H, d, $J = 5$, 20-H), 4.198(1H, t, 5-H), 4.26(1H, dd, 7-H), 4.57(1H, d, $J = 10.5$, 10-H), 5.30(1H, d, $J = 3.43$, 2-H), 6.05(1H, d, $J = 10.5$, 9-H), 6.04(1H, t, 13-H)。

2.3 紫杉烷的分离纯化工艺评价

以 3.0 kg 的甲醇浸膏进行紫杉烷的分离纯化, 其结果: 紫杉醇含量为 56 μ g/g, 产量 31.2 μ g/g, 得率 57.6%, 纯度 98.4%; baccatin III 含量为 328 μ g/g, 产量 204 μ g/g, 得率为 62.2%, 纯度 98.7%, DA B VI 纯度 92.94%, B VI 纯度 99.65%, ADA B I 纯度 99.1%。

以上可知, 本实验所采用的方法提取紫杉醇和 baccatin III, 得率在 55% 以上, 而且纯化效果好。说明所设计的工艺是合理的。

3 讨论

紫杉醇最早是从太平洋紫杉(*T. brevifolia* Nutt.) 的树皮中得到的。后来的研究表明, 紫杉醇不仅存在于短叶红豆杉的树皮中, 也存在于其针叶、根和树枝中^[5]。湖北神农架林区红豆杉枝叶含有一定

量的紫杉醇。利用甲醇或乙醇作溶剂制备的浸膏仍有一定量的紫杉烷。因红豆杉叶再生迅速,且易于通过扩大栽培灌木来获取红豆杉叶源,此外,全国各地尤其是华中地区各省均有红豆杉资源,若能合理利用可再生的枝叶资源,不会影响自然资源与生态平衡。提取分离紫杉醇及其前体物的所有溶剂全部回收利用,对极少量残留溶剂采用排污处理系统分解消化,因此以枝叶为原料提取紫杉烷不会造成任何环境污染。

由于单一的萜类化合物在植物中的含量低,需要较多分离步骤才能纯化出来。如果一共有10个分离步骤,每个单个步骤的收率是90%,最后的总收率也只有 $(90\%)^{10} = 34.9\%$ 。因此,采用有效的提取方法和缩短分离步骤提高每步的收率是成功的关键。本研究利用萃取和层析方法相结合,得到57.6%的紫杉醇产量,而且分离到的10种不同成分,其中5种为紫杉烷。经纯化后4种成分(紫杉醇、浆果赤霉素 III、1-乙酰基-5,7,10-去乙酰基浆果赤霉素 I 和浆果赤霉素 VI)的纯度大于98%。Sigma公司生产的标准试剂紫杉醇的纯度为>95%。说明实验采用的分离纯化的工艺是可行的。

本研究所建立的工艺无论在产物收率还是纯度方面均比较理想,根据该工艺进行生产规模的设计放大,大量生产紫杉醇及其前体物,并把本研究已经确定的几个前体物馏份通过生物或者化学半合成,将其转化为具有临床价值的紫杉醇或其类似物^[6],所带来的经济效益和社会效益是不言而喻的。

参考文献:

- [1] 梅兴国,余龙江,等.抗癌新药紫杉醇[M].武汉:华中理工大学出版社,1999.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第七卷)[M].北京:科学出版社,1978.436.
- [3] CHOI M S, KWAK S S, Liu J R. Taxol and related compounds in Korean native yews (*Taxus cuspidate*) [J]. *Planta Med*, 1995, 61: 264-267.
- [4] VAVCE N C, KELSEY R G, SABIN T E. Seasonal and tissue variation in taxane concentrations in *Taxus brevifolia* [J]. *Phytochem*, 1994, 36: 1 241-1 244.
- [5] VIDENSEK N, LIM P, CAMPBELL A. Taxol content in bark, wood, root, twig, and seedling from several *Taxus* species [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53: 1 609-1 612.
- [6] DENIS J N, GREENE A E, GUÛNARD D, et al. A highly efficient, practical approach to nature taxol [J]. *J Am Chem Soc*, 1988, 110: 5 917-5 920.

SEPARATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF TAXANES IN EXTRACT OF *TAXUS CHINENSIS* LEAVES

YU Long-jiang, LAN Wen-zhi

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and
Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Extract of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. leaves was prepared by methanol or ethanol solvent extraction. Contents of baccatin III and taxol in methanol extract were higher than those in ethanol extract. From methanol extract, 10 pure compounds were obtained through isolation and purification process combined with extraction and chromatographic analysis. Ingredients were structurally identified through methods of NMR, IR, MS and HPLC, and five compounds were ascertained as taxol, 1-acetyl-5,7,10-deacetyl baccatin I, baccatin III, baccatin VI and 7,9,10,13-deacetyl baccatin VI of purity 98.4%, 98.7%, 99.1%, 99.65%, 92.94%, respectively. Moreover, extraction yield of taxol and baccatin III reached 62.6% and 57.6%, respectively. Results showed that the established preparation and purification technique could be applied to produce taxol and its precursors from *T. chinensis* leaves.

Key words: *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. leaves; extracts; taxane; separation and purification