

多西紫杉醇合成原料 10-脱乙酰基巴卡亭提取工艺研究

洪东风,周文明*,李玲玲,马海丹,李日升

(西北农林科技大学理学院,陕西杨凌 712100)

摘 要:以欧洲紫杉(*Taxus Daecata*)枝叶为原料,提取并分离活性成分 10-脱乙酰基巴卡亭(10-DAB)。通过对提取溶剂和提取条件的筛选,得出以丙酮/乙酸乙酯混合溶剂在 65℃回流提取为最佳提取条件。改进了传统以二氯甲烷/水萃取条件,而以二氯甲烷/20%乙醇 2%氢氧化钠水溶液萃取,降低了乳化提高了产品含量和收率。利用柱层析色谱技术及重结晶技术等现代分离技术分离并纯化了 10-DAB,并通过 HPLC 进行含量测定,最后得到含量 96.8%、总收率为 67.2%的 10-DAB。

关键词:欧洲紫杉;10-脱乙酰基巴卡亭;提取工艺

中图分类号:O626. 26

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2007)05-0227-04

Study of Extraction 10-deacetyl Baccatin for Docetaxel Synthesis

HONG Dong-feng, ZHOU Wen-ming*, LI Ling-ling, MA Hai-dan and LI Ri-sheng

(Science College of Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The 10-deacetyl baccatin (10-DAB) isolated and purified from leaves and branches of *Taxus Daecata*. And the best condition was reflux-extracting at 65℃ by acetone/ethyl acetate, through straining extracting solvent and condition. Replaced the traditional extracting method, the material was isolated by dichloromethane/20% ethanol /2% sodium hydroxide, for less emulsify and increased the production and extract yield. The 10-DAB was purified by column chromatography and recrystallization and elucidated by HPLC. The total yield of 10-DAB was 67.2% and the purity of 10-DAB was 96.8%.

Key words: *Taxus Daecata*; 10- deacetyl baccatin; Extraction

多西紫杉醇被认为是迄今疗效最显著的抗癌药物之一,1996 年经 FDA 确认开始用于肺癌、乳腺癌、结肠癌等方面的临床药物^[1~3]。多西紫杉醇和紫杉醇(Taxol)一样具有广谱的抗白血病和抗实体肿瘤活性,结构复杂,多官能团和多手性中心等,全合成成本高、难度较大^[4,5]。当发现欧洲红豆杉的针叶中提取到浓度较高的紫杉烷类似物 10-脱乙酰基巴卡亭(10-deacetyl baccatin, 10-DAB)中间体后,多西紫杉醇的合成才变为规模化生产^[6]。

10-DAB 主要分布在紫杉的枝叶中,在一年生叶中含量最高,小枝次之,而在多年生的树皮含量最少^[7,8]。其分布与紫杉醇的分布刚好相反,紫杉

醇主要分布在多年生的红豆杉树皮中,而在叶中含量极低,大多不及树皮中含量的十分之一。枝叶是可再生性资源,因此,生产 10-DAB 不象生产紫杉醇以牺牲有限的红豆杉资源为代价,其含量高达 0.1%以上,远比紫杉醇含量高,紫杉醇在树皮中的含量多在 0.03% 以下^[9]。绝大多数的多西紫杉醇都是以提取的 10-DAB 为原料再经过半合成生产出来的^[10]。因此,研究 10-DAB 的提取工艺具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 原料及试剂

欧洲紫杉(*Taxus Daecata*)一年生干燥枝叶

收稿日期:2007-01-29 修回日期:2007-04-13

作者简介:洪东风(1977—),男,硕士研究生,研究方向为天然药物化学。Tel:13109598191.

* 通讯作者:周文明(1966—),男,湖南桑植人,副教授,主要从事有机合成和天然药物化学的研究。

产于加拿大,由陕西进出口公司提供;10-脱乙酰基巴卡亭标准品纯度为 99.5%,由中国协和医科大学提供;薄层层析用硅胶(GF254),柱层析用硅胶由青岛海洋化工有限公司提供;所用试剂均为市售分析纯。

1.2 主要仪器

Agilent Hp1100 高效液相色谱仪 色谱柱: Agilent Hypersil ODS2 柱(4.6 mm×250 mm×5 μm); YRT-30 数显熔点仪(天津港东公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 10-脱乙酰基巴卡亭的提取工艺路线 欧洲紫杉干燥枝叶(粉碎过筛)→紫杉枝叶细粉(溶剂提取)→提取液(回收部分溶剂,脱叶绿素)→含水稀浸膏(二氯甲烷萃取)→二氯甲烷溶液(无水硫酸钠干燥,回收溶剂拌入硅胶)→拌硅胶料(氯仿:甲醇)→第 1 次柱层析(环己烷:乙酸乙酯)→第 2 次柱层析(石油醚:丙酮)→第 3 次柱层析→结晶及重结晶→10-脱乙酰基巴卡亭

1.3.2 10-DAB 的分析方法 ①标准溶液配制和测定条件选择 以 10-DAB 标准品为标样,准确称取 10-DAB 样品 10.12 mg,甲醇溶解并定容到 100.00 mL,即对照品备用(0.1012 mg/mL)。检测波长 227 nm,流动相乙腈/水(v/v)45/55,流速 0.8 mL/min,进样量 10.0 μL,每次进样 3 次。

②标准曲线和线性范围 准确移取 10-DAB 样品 1.0、2.0、5.0、10.0、25.0、50.0 mL 分别用甲醇定容到 50.0 mL,得 1~6 样。

表 1 HPLC 测定峰面积与样品浓度关系

Table 1 The relationship between the peak areas and numbers of sample by HPLC

样品编号 Sample number	样品浓度/(mg/mL) Sample concentration	峰面积 Peak area
1	0.020	134.6
2	0.040	269.4
3	0.101	672.9
4	0.202	1345.8
5	0.501	3365.8
6	1.012	6729.4

以面积为纵坐标,样品浓度为横坐标得线性回归方程: $Y=6655.7X+5.3061, R^2=0.9999$ 。样品浓度在 0.020~1.012 mg/mL 之间线性关系良好,且叶绿素及其他杂质对其没有影响。

③原料 10-DAB 含量测定 称取粉碎原料 3 份,每份 10.00 g,用石油醚索氏回流提取 2 h 除叶绿素,过滤,所得滤渣再用甲醇索氏回流提取 4 h,过滤所得甲醇提取滤液用甲醇定容到 100

mL。超滤后准确进样 10.0 μL,进样 3 次,得峰面积求平均值,以线性回归方程测得甲醇提取液中的 10-DAB 含量为 0.0858 mg/g,并按下列公式计算原料 10-DAB 含量(0.858 mg/g)和萃取效率。

原料含量=浸体液浓度(mg/mL)×100 mL/(10.00 g)×100%

萃取率=—萃取前浸膏质量(g)×萃取前浸膏含量(%) / 萃取后浸膏质量(g)×萃取后浸膏含量(%)×100%

④定性鉴定 以 10-DAB 标准品为对照,用薄层层析法(硅胶 GF254)定性鉴定样品中的 10-DAB。展开剂:氯仿/甲醇(v/v)=95/5,显色剂:乙醇/浓硫酸(v/v)=96/4。展开后在 105℃加热 10 min 显色,测得样品中 10-DAB 的 $R_f=0.42$ 。

2 结果与分析

2.1 提取条件的选择

用工业甲醇、丙酮、乙酸乙酯、甲醇/丙酮(v/v)1:1、丙酮/乙酸乙酯 1:1 五个溶剂体系分别在室温渗滤和 65℃回流提取,每次提取粉碎原料 2 kg。65℃回流提取 4 次,溶剂量分别为 4 倍、3 倍、3 倍和 3 倍量,每次提取 3 h,合并 4 次提取液;室温渗滤用 13 倍量溶剂连续渗滤 12 h。分别回收溶剂得浸膏,称重、测含量,计算收率,将相同溶剂得到浸膏最后合并,提取结果见表 1。

由表 2 可知,每种溶剂体系在 65℃回流提取均比室温渗滤收率高,在 5 个溶剂体系中甲醇在 65℃回流收率最高达 99.1%,收率与丙酮/乙酯混合溶剂相当,乙酯的收率最低。而所得的 10-DAB 含量中丙酮/乙酸乙酯(1:1)收率与传统用甲醇收率基本相同,其所得浸膏中 10-DAB 含量(8.53 mg/g)高于甲醇浸膏(5.15 mg/g)。因此,建议在今后工艺中用丙酮/乙酸乙酯(1:1)混合溶液代替甲醇提取。

2.2 叶绿素的去除

欧洲红豆杉枝叶中含有大量叶绿素,若不预先处理而直接进行下一步工艺,将会造成溶剂严重浪费,也会给进一步纯化带来不少困难,因此必须将其除去。将上述得到的浸膏全部合并共 2 247 g,用 3 倍量乙醇加热回流溶解,得乙醇溶液,回收部分乙醇。加醇量 30%的水,冰箱 0℃内静止过夜,离心去除叶绿素。含水乙醇溶液真空减压下回收溶剂得到膏状物 1 625 g。

表 2 不同溶剂体系分别在室温渗滤和 65℃ 回流提取效果比较

Table 2 Comparison on the efficiency of normal temperature extraction and 65℃ reflux extraction in different solvent system

提取溶剂 Extracting solvent	室温渗滤 Normal temperature extract			回流提取 Reflux extraction		
	浸膏重/g Extract mass	10-DAB 含量 /(mg/g) 10-DAB contents in extract	收率/% Extract yield	浸膏重/g Extract mass	10-DAB 含量 /(mg/g) 10-DAB Contents in extract	收率/% Extract yield
甲醇 Methol	235.0	6.15	84.2	330.4	5.15	99.1
丙酮 Acetone	208.4	6.20	75.3	268.4	5.96	93.2
乙酸乙酯 Ethyl acetate	130.8	5.56	42.4	181.4	6.18	65.3
甲醇/丙酮 Methol/Acetone	214.6	6.27	78.4	310	5.28	95.4
丙酮/乙酸乙酯 Acetone/Ethylacetate	169.4	7.14	70.5	199.4	8.53	99.0

2.3 萃取条件的选择

用二氯甲烷提取除去叶绿素的醇膏,提取 3 次过滤去除不溶物,二氯甲烷溶液合并后平均分为 4 等份。分别向此 4 份二氯甲烷溶液中加入等体积水,20% 乙醇水溶液,2% NaOH 水溶液和 2%

NaOH 20% 乙醇水溶液进行萃取。再分别用二氯甲烷将所得水相萃取 5 次,弃去水相,分别合并二氯甲烷相。无水硫酸钠干燥过夜,回收二氯甲烷,称浸膏重量、测含量、计算萃取率,萃取效果见表 2。

表 3 4 种不同溶剂体系萃取效果比较

Table 3 Comparison of the extraction efficiency in four different solvent system

萃取体系 Extract system	浸膏重/g Extract mass	10-DAB 含量/% 10-DAB contents in extract	萃取效率/% Extract yield
水 Water	295.2	0.98	84.0
20%乙醇 20%ethanol	245.5	1.24	88.4
2%NaOH 2%sodium Hydroxide	232.1	1.27	85.7
2%NaOH/20%乙醇溶液 20%ethanol/2%sodium Hydroxide	201.5	1.54	90.2

表 3 表明,4 组萃取结果中最后一组溶剂萃取效果最好,萃取率最高,所得浸膏 10-DAB 含量最高达 1.54%,收率达到 90.2%。传统工艺直接用水悬浮浸膏二氯甲萃取,由于乳化严重造成溶剂浪费使得 10-DAB 收率只有 84.0%,含量仅有 0.98%。加入少量乙醇的萃取体系乳化明显降低,加入少量碱能溶解更多酸性有机成份于水相中,因此,在萃取过程加入少量碱和醇对萃取有利,使得收率和含量明显提高。

2.4 10-DAB 柱层析分离

2.4.1 第一次柱层析 合并上述浸膏共 974 g,用丙酮溶解拌入 1.2 kg 100~200 目硅胶,自然条件下风干丙酮,称取 100~200 目硅胶 8.8 kg,用三氯甲烷湿法装柱,分别用氯仿: 甲醇 99:1、98.5:1.5、98:2、97:3、96:4、95:5 梯度洗脱。用薄层层析跟踪检测,合并含 10-DAB 的组分,减压回收溶剂得浸膏 80.4 g,10-DAB 含量 14.3%。

2.4.2 第二次柱层析 将得到的 80.4 g 浸膏用丙酮加热溶解完全,拌入 120 g 200~300 目硅胶,真空减压下烘干。称取 880 g 200~300 目硅胶,

用己烷湿法装注,分别用环己烷: 乙酯 4:1、3:1、2:1、1:1 和乙酸乙酯梯度洗脱。用薄层层析跟踪检测,合并含 10-DAB 的组分,减压回收溶剂得黄色粉末 25.0 g,10-DAB 含量 44.6%。

2.4.3 第三次柱层析 将第二次柱层析所得的 25.0 g 黄色粉末用丙酮溶解拌入 30 g 200~300 目硅胶,真空减压烘干,称取 300 g 200~300 目硅胶用石油醚湿法装柱。分别用石油酯: 丙酮 3:1、2:1、3:2、1:1 和丙酮梯度洗脱。用薄层层析跟踪检测,前后含 10-DAB 交叉部分合并回收溶剂,得黄色粉末 1.23 g,10-DAB 含量 31.4%;含 10-DAB 较多的中段部分合并回收溶剂,真空干燥后得淡黄色粉末 13.87 g,10-DAB 含量 76.2%。

紫杉枝叶内所含化合物复杂而紫杉醇类化合物结构相近,传统工艺用氯仿: 甲醇反复柱层析分离效果差,本试验采用氯仿: 甲醇、环己烷: 乙酯、石油醚: 丙酮 3 种溶剂体系,在层析中更利于除去不同极性和不同类型的化合物,从而利于 10-DAB 分离和纯化。

2.5 10-DAB 的结晶及重结晶

2.5.1 10-DAB 第一次结晶 将 13.87 g 淡黄色粉末用 50 mL 甲醇热溶、过滤,静置冷却至室温。在磁力搅拌下逐渐滴加蒸馏水,滴加速度 0.5 mL/min,至烧杯中出现大量淡黄色絮状沉淀后停止搅拌,加水 22 mL。0℃ 静止结晶 48 h,真空抽滤,母液回收溶剂得浸膏 4.10 g,10-DAB 含量 45.3%,固体 65℃ 真空干燥 20 h 以上得暗白色粉末 9.65 g,10-DAB 含量 89.7%。

2.5.2 10-DAB 的重结晶 将 9.65 g 暗白色 10-DAB 粉末用 40 mL 丙酮热溶完全过滤,冷却至 40℃ 以下,在磁力搅拌下逐渐滴加石油醚,滴加速度为 0.5 mL/min,至出现大量白色絮状沉淀停止搅拌,加入石油醚 34 mL,0℃ 结晶 48 h,真空减压抽滤,母液回收溶剂得淡黄色固体 2.10 g,10-DAB 含量 63.4%。结晶完全干燥后得白色粉末 7.50 g,10-DAB 含量 96.8%,熔点 231~234℃。

3 结论

优化后的工艺路线为:原料丙酮/乙酸乙酯混合溶剂提取,二氯甲烷溶解浸膏加入 2% 氢氧化钠与 20% 乙醇组成混合溶液萃取,氯仿:甲醇、环己烷:乙酯、石油醚:丙酮 3 种溶剂体系梯度洗,甲醇-水结晶和石油醚-丙酮重结晶。10-DAB 收率为 67.2%,明显高于传统工艺路线收率的 59.7%。产品含量达 96.8%,符合 95.0% 以上的要求。因此,优化后工艺相当可行,适合工业化生产。

参考文献:

- [1] Francoise Gueritte General and recent aspects of the chemistry and structure-activity relationships of taxoids[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2001, (7):1229~1249.
- [2] Gueritte-Voegelein F., Guenard D, Lavelle F. *et al.* Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity[J]. *J. Med. Chem.*, 1991, 34 (3): 992~998.
- [3] Swain S M, Honig S F, Fefft M, *et al.* A Phase II trial of paclitaxel (Taxol) as first line treatment in advanced breast cancer[J]. *Invest New Drugs*, 1995, 13(3): 217~222.
- [4] Wani M, Taylor H L, Wall M E, *et al.* Isolation and Structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor from *taxus brevifolia* [J]. *J. Am. chem. Soc.*, 1971, 93: 23~25.
- [5] Bissery M, Guenard D, Voegelé G, *et al.* Experimental antitumor activity of taxotere a taxol analogue *Cancer Res*, 1991, 51, (18), 4845.
- [6] 元英进. 抗癌新药紫杉醇和多紫杉醇[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 190~205.
- [7] 王达明, 周云, 李莲芳, 等. 云南红豆杉抗癌药用成分的含羞[J]. *西部林业科学*, 2004, (9): 12~17.
- [8] 赵春芳, 余龙江, 刘智, 等. 中国红豆杉中主紫杉烷类物质的分布研究[J]. *林产化学与工业*, 2005, (3): 89~93.
- [9] 王力元, 王蕴峰, 齐传民, 等. 经不对称基化反应合成多西紫杉醇及其衍生物的新方法研究[J]. *化工科技*, 2003, 11 (5): 1~6.
- [10] 齐传民, 王蕴峰, 王力元, 等. 四步纯化合成多西紫杉醇的工艺研究[J]. *化工科技*, 2003, 11(2): 1~6.

作者：[洪东风](#)，[周文明](#)，[李玲玲](#)，[马海丹](#)，[李日升](#)，[HONG Dong-feng](#)，[ZHOU Wen-ming](#)，
[LI Ling-ling](#)，[MA Hai-dan](#)，[LI Ri-sheng](#)
作者单位：[西北农林科技大学理学院, 陕西杨凌, 712100](#)
刊名：[西北农业学报](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)
年，卷(期)：2007, 16(5)

参考文献(10条)

1. [Francoise Gueritte](#) [General and recent aspects of the chemistry and structure-activity relationships of taxoids](#) 2001(07)
2. [Gueritte-Voegelein F](#); [Guenard D](#); [Lavelle F](#) [Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity](#) 1991(03)
3. [Swain S M](#); [Honig S F](#); [Fefft Me](#) [A Phase II trial of paclitaxel \(Taxol\) as first line treatment in advanced breast cancer](#) 1995(03)
4. [Wani Mc](#); [Taylor H L](#); [Wall M E](#) [pant antitumor agents the isolation and Structure of Taxol. a novel antileukemic and antitumor from taxus brevifolia](#) 1971
5. [Bissery Mc](#); [Guenad D](#); [Voegelin G](#) [Experimental antitumor activity of taxotere a taxol analogue](#) 1991(18)
6. [元英进](#) [抗癌新药紫杉醇和多紫杉醇](#) 2002
7. [王达明](#), [周云](#), [李莲芳](#) [云南红豆杉抗癌药用成分的含量](#) [期刊论文] - [西部林业科学](#) 2004(3)
8. [赵春芳](#), [余龙江](#), [刘智](#), [孙友平](#), [李文兵](#) [中国红豆杉中主要紫杉烷类物质的分布研究](#) [期刊论文] - [林产化学与工业](#) 2005(1)
9. [王力元](#), [王蕴峰](#), [齐传民](#) [经不对称氨羟基化反应合成多西紫杉醇及其衍生物的新方法研究](#) [期刊论文] - [化工科技](#) 2003(5)
10. [齐传民](#), [王蕴峰](#), [王力元](#), [杨凌春](#) [四步纯化法合成多西紫杉醇的工艺研究](#) [期刊论文] - [化工科技](#) 2003(2)

本文读者也读过(10条)

1. [马淑桢](#), [吴绵斌](#), [MA Shu-zhen](#), [WU Mian-bin](#) [南方红豆杉枝叶中10-脱乙酰巴卡亭III的分离与纯化](#) [期刊论文] - [中国新药杂志](#) 2006, 15(13)
2. [杨陶](#) [利用红豆杉枝叶及废料制备10-去乙酰基巴卡亭III的研究](#) [学位论文] 2005
3. [杨陶](#), [李明](#), [陈建民](#) [红豆杉中紫杉烷类化合物制备10-去乙酰基巴卡亭III](#) [期刊论文] - [复旦学报（自然科学版）](#) 2004, 43(6)
4. [袁传能](#), [许旋](#), [徐志广](#), [YUAN Chuan-neng](#), [XU Xuan](#), [XU Zhi-guang](#) [C\(4\)取代紫杉醇类似物的定量构效关系研究](#) [期刊论文] - [分子科学学报](#) 2008, 24(6)
5. [王小刚](#), [惠俊峰](#), [雷闫盈](#), [WANG Xiao-gang](#), [XI Jun-feng](#), [LEI Yan-ying](#) [东北红豆杉枝叶中紫杉醇和10-脱乙酰巴卡亭的分离纯化及检测](#) [期刊论文] - [食品与药品](#) 2006, 8(12)
6. [李海峰](#), [赵志莲](#), [刘光明](#), [LI Haifeng](#), [ZHAO Zhilian](#), [LIU Guangming](#) [从云南红豆杉细胞培养物中分离鉴定10-去乙酰巴卡亭III](#) [期刊论文] - [大理学院学报](#) 2008, 7(12)
7. [张明](#), [赵良忠](#), [夏湘](#), [张振华](#), [宫晓杰](#) [超临界CO₂-混合夹带剂萃取法提取10-脱乙酰基巴卡丁III工艺条件研究](#) [期刊论文] - [海峡科学](#) 2009(2)
8. [李华](#), [李明](#), [郑志坚](#), [吴蓓莉](#), [陈建民](#) [超临界CO₂>流体萃取法提取紫杉醇的研究](#) [会议论文] - 2003

9. [赵士魁](#), [陈玉芳](#), [李磊](#), [瞿鼎](#), [王玉成](#), [ZHAO Shi-Kui](#), [CHEN Yu-Fang](#), [LI-Lei](#), [QU Ding](#), [WANG Yu-Cheng](#) [替莫泊芬的合成](#)[期刊论文]-[中国医药工业杂志](#)2006, 37(11)
10. [刘莹](#), [王正平](#), [尚明](#), [王少清](#) [正相色谱法分离纯化紫杉醇工艺过程的研究](#)[期刊论文]-[哈尔滨商业大学学报\(自然科学版\)](#)2003, 19(5)

引用本文格式: [洪东风](#), [周文明](#), [李玲玲](#), [马海丹](#), [李日升](#), [HONG Dong-feng](#), [ZHOU Wen-ming](#), [LI Ling-ling](#), [MA Hai-dan](#), [LI Ri-sheng](#) [多西紫杉醇合成原料10-脱乙酰基巴卡亭提取工艺研究](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007(5)