

文章编号: 1673 1689(2010)04-0710-05

D4020 大孔树脂提纯发酵液中紫杉醇的研究

李勇超, 杨靖, 职明星, 孟丽*

(河南科技学院 生物技术系, 河南 新乡 453003)

摘要: 采用 D4020 型大孔树脂对红豆杉产紫杉醇内生真菌发酵液的粗提液进行吸附和洗脱试验, 同时应用 HPLC 进行分析检测, 确定了最佳工艺条件。结果表明, D4020 型吸附树脂对紫杉醇有吸附分离效果。优化工艺条件为: 室温下, 样品溶于体积分数 50% 甲醇-水溶液, 上柱液体积流量 1.5 mL/min, 体积分数 80% 乙醇-水溶液以体积流量 0.5 mL/min 洗脱, 洗脱剂用量为 7 倍量树脂体积, 回收率达 90%。

关键词: 紫杉醇; 提纯; 大孔树脂; 吸附

中图分类号: TQ 321

文献标识码: A

The Study of Purification of Taxol from Endophytic Fungi Fermentation Broth by D4020 Macroporous Resin

LI Yong-chao, YANG Jing, ZHI Ming-xing, MENG Li*

(Department of Biotechnology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Absorption on D4020 macroporous resin was studied as a method to purify the taxol from endophytic fungi fermentation broth. The optimum conditions for absorption and desorption of taxol was determined and listed as follows: The adsorbed temperature at room temperature, the sample was dissolved in 50 % methanol, and added on a column of the resin at the rate of 1.5 mL/min, then it was washed with 20% ethanol, and was eluted with 7 BV 80% ethanol at 0.5 mL/min speed. Under the optimum conditions, the recovery rate achieved at 90%, so this resin can be used for separation and concentration of taxol. The static absorption dynamic curve and isotherm of taxol on D4020 resin showed that D4020 macroreticular resin was suitable for absorbing and separating taxol.

Key words: taxol, purification, macroporous resin, absorption

紫杉醇(Taxol)是一种经次生代谢而产生的四环二萜酯, 不仅具有强抗癌活性^[1], 而且还具有诱导细胞凋亡^[2], 调节机体的免疫^[3]等作用。目前紫

杉醇主要从红豆杉的树皮中提取, 其含量低微且资源紧缺。自从 1993 年 Stierle 与 Stroble^[4]首次报道了从太平洋紫杉树中分离出一种可产紫杉醇的内

收稿日期: 2009-09-23

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(082102330006)。

作者简介: 李勇超(1978-), 男, 河南南阳人, 讲师, 主要从事天然药物的分离纯化工作。Email: yongchaoli@hist.edu.cn

* 通信作者: 孟丽(1959-), 女, 河南睢县人, 教授, 主要从药用植物资源学研究。Email: histml@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

生真菌 (*Taxomyces andreanae*) 以来, 利用产紫杉醇内生真菌进行大规模发酵生产紫杉醇被认为是具有广阔的前景的方法之一, 也将是紫杉醇来源的重要途径^[5]。利用内生真菌发酵生产紫杉醇的一个关键步骤是筛选并构建高产紫杉醇的菌株。筛选过程往往是先对其进行 PDA 培养, 然后用有机溶剂提取发酵物中的紫杉醇, 最后用 HPLC 法对提取物进行紫杉醇检测^[6-7]。但是由于在发酵过程中不同种属的微生物会产生有不同吸收波长的色素、蛋白等杂质, 致使色谱柱损耗大、效率低, 也影响液相色谱的精确度, 因此很有必要对紫杉醇提取液进行柱前预处理。

大孔吸附树脂是近年来新发展起来的一种有机高分子聚合物吸附剂^[8], 其应用日趋广泛, 特别是在天然产物的分离纯化方面逐渐显示出其优越性^[9], 其中 D4020 型大孔树脂在纯化紫杉醇浸膏中表现出色^[10]。然而, 研究大孔吸附树脂吸附分离纯化发酵液中紫杉醇的文献报道尚少见。作者选用非极性大孔吸附树脂 D4020 对发酵液中的紫杉醇进行分离纯化, 优化提取工艺参数, 旨在为研究发酵液中紫杉醇的提取分离方法提供一定的参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器、材料和试剂

KQ-100DE 数控超声波清洗器: 昆山市超声仪器有限公司产品; Re-52AA 旋转蒸发仪: 上海亚荣生化仪器厂产品; 循环水式多用真空泵: 郑州市长城科工贸有限公司产品; SHA-C 恒温水浴振荡器: 常州市国华电器有限公司产品; JFSD-100 粉碎机: 上海嘉定粮油仪器有限公司产品; HL-2 恒流泵: 上海青浦沪西仪器厂产品; HPLC-2010C 色谱仪和 C₁₈ 色谱柱: 日本岛津公司产品。

产紫杉醇内生菌菌种由作者所在实验室分离获得^[11]。

大孔吸附树脂 D4020(比表面积为 540~580 m²/g, 平均孔径: 10.0~10.5 nm), 南开大学化工厂产品; 柱紫杉醇标准品: 美国 SIGMA 公司产品; 甲醇(AR 和高效液相色谱用两种); 乙腈(高效液相色谱用); 乙醇(AR); 流动相水(三蒸水)等。

1.2 大孔树脂预处理

取大孔树脂用质量分数 5% NaOH 水溶液浸泡 24 h, 用蒸馏水洗至中性, 再用质量分数 10% 盐酸洗涤, 最后用蒸馏水洗至中性。以乙醇湿法装柱, 用体积分数 95% 的乙醇以 2 BV/h 的流速通过树脂层, 洗至流出液加去离子水不变白色浑浊为

止, 然后以大量蒸馏水冲洗, 到水洗液无醇味为止。

1.3 样品制备与检测方法

1.3.1 培养基 固体培养基为 PDA 培养基。马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 L, pH 7.0。配制方法是马铃薯去皮切条, 水煮 30 min, 4 层纱布过滤, 溶入琼脂、葡萄糖, 然后加水定容, 121 °C 灭菌 30 min, 在超净工作台内倒平板。液体培养基制作方法与固体培养基相同, 只是不加入琼脂。分装至 250 mL 三角瓶中, 每瓶 60 mL, 121 °C 灭菌 30 min。

1.3.2 内生真菌的液体培养 将分离纯化后得到的内生真菌菌株接种到 PDA 液体培养基中, 培养 3 d 后取 6 mL 接入 250 mL 三角瓶中, 28 °C, 220 r/min, 每瓶 60 mL 培养 7 d。

1.3.3 紫杉醇粗提 纱布过滤发酵物, 将滤液部分用等体积的二氯甲烷萃取, 取水相部分再用等体积的二氯甲烷萃取一次, 菌丝部分经液氮研碎, 超声 30 min, 静置过夜后用等体积的二氯甲烷萃取, 重复处理一次, 将所有的二氯甲烷萃取液合并, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤后用旋转蒸发器在 35 °C 下减压蒸馏至干, 溶解于 3 mL 甲醇中, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 定容至 10 mL, 避光冷藏, 备用。

1.3.4 紫杉醇的检测 标品配制: 精确称取紫杉醇标准品 1.0 mg, 用 10 mL 甲醇溶解, 配成 100 mg/L 母液备用。将母液稀释成 100, 200, 400, 800 μg/L, 1.6 mg/L 的系列标准品溶液。取 1 mL 溶液(标准品溶液、样品制备液和洗脱液)用 0.22 μm 滤膜过滤后转入色谱仪专用样品瓶, 4 °C 下检测。采用高效液相法(HPLC)进行检测, 色谱条件: 日本岛津 HPLC 2010CH T 高效液相色谱仪, 固定相: VP-ODS (C₁₈) 柱(*D* 4.6 mm × 150 mm; 5 μm); 流动相: *V*(乙腈): *V*(甲醇): *V*(水) = 35: 20: 45; 体积流量 0.7 mL/min; 检测波长 227 nm; 灵敏度: 0.1 AUFS; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。

1.4 静态吸附试验

1.4.1 静态吸附动力学曲线的测定 称取 D4020 干树脂 0.5 g 于三角瓶, 再加入 150 mL 样品溶液, 摇床振荡 24 h 使其吸附平衡, 每隔 15 min 取样检测, 以单位质量树脂的紫杉醇吸附量对时间作图绘制吸附动力学曲线。

1.4.2 静态吸附等温线的测定 分别量取 25、50、75、100、125、150 mL 供试液, 用体积分数 50% 甲醇分别稀释至 150 mL 制成不同质量浓度的紫杉醇样品粗提液, 再各称取 0.5 g D4020 树脂加至各溶液, 室温振荡 12 h, 取样检测。以达到吸附平衡时单位质量树脂的吸附量对粗提液中紫杉醇的质

量浓度作图,绘制树脂的吸附等温线。

1.5 树脂的动态吸附和洗脱试验

将预处理好的树脂装入 $D\ 1.0\text{ cm}\times 25\text{ cm}$ 的玻璃层析柱中,将一定浓度紫杉醇粗提液以一定的流速通入树脂,考察不同上样流速、紫杉醇质量浓度对树脂吸附性能的影响,确定最佳的吸附条件。对吸附饱和的树脂进行洗脱实验,考察洗脱剂对树脂洗脱性能的影响,确定洗脱条件。

2 结果与分析

2.1 静态吸附

2.1.1 静态吸附动力学曲线 由图 1 看出, D4020 型大孔树脂吸附紫杉醇主要发生在两者接触的 60 min 以内。60 min 之后树脂的吸附量几乎不再增加。在室温自然 pH 值下,紫杉醇在该树脂上的最大吸附量约为 4.2 mg/g 。这种能够在较短时间达到吸附平衡点的特性在紫杉醇分离上有潜在应用价值。

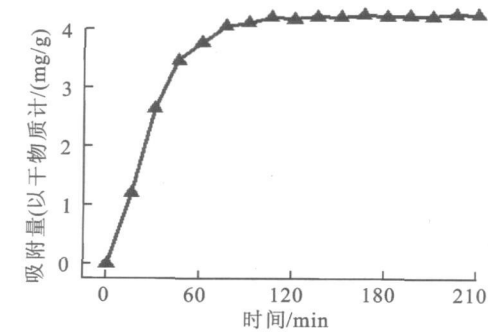


图 1 紫杉醇的静态吸附动力学曲线

Fig. 1 Static absorption dynamic curve of taxol

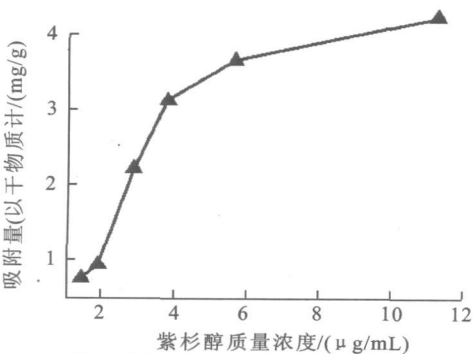


图 2 紫杉醇在 D4020 树脂上的吸附等温线

Fig. 2 Absorption isotherm of taxol on D402

2.1.2 吸附等温线 树脂对紫杉醇的吸附量等温线如图 2 所示。由图看出,树脂对紫杉醇的吸附量随紫杉醇质量浓度的增大而增大,当紫杉醇质量浓度 $\geq 6\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,吸附量渐趋平缓。

2.1.3 洗脱剂体积分数的确定 精确称取处理后的干树脂 1.0 g ,置于具塞磨口 250 mL 锥形瓶中,

加入 50 mL 样品液,于 220 r/min 室温振荡吸附 2 h ,分离树脂,晾干,用水洗至不变色后,以一定浓度的乙醇-水溶液为洗脱剂,室温振荡洗脱 5 h ,测洗脱液浓度,计算洗脱率。洗脱剂浓度对洗脱率的影响如图 3 所示。结果显示紫杉醇洗脱率随洗脱剂体积分数先增加而增加,体积分数超过 80% 后洗脱率递增放缓,趋于恒定。但由色谱图表明,大于体积分数 80% 的乙醇水洗脱液中含有较多杂质,纯化效果不够理想,故选择 80% 乙醇-水溶液为洗脱剂。

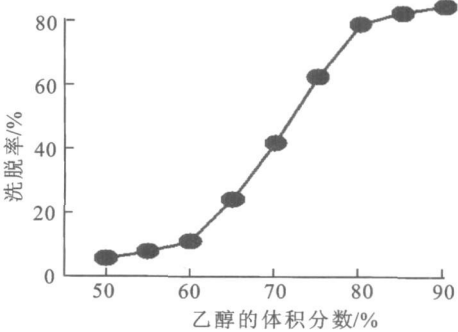


图 3 乙醇体积分数对洗脱率的影响

Fig. 3 Effect of ethanol concentration of on the elution ratio

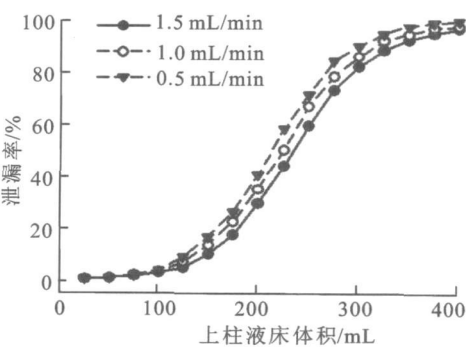


图 4 上样体积流量对吸附效果的影响

Fig. 4 Effect of different flow speed on taxol absorption

2.2 动态吸附

2.2.1 流量对吸附性能的影响 取 1.0 g 树脂装小柱,室温条件下,选取 1.5 、 1.0 、 0.5 mL/min 3 种体积流量上柱进行动态吸附,每 25 mL 收集一份检测,结果见图 4。可见流速低则有利于吸附,但 D4020 树脂结合紫杉醇的速度比较快,3 种流量下的泄漏率趋势图相差不大。因此,可以选择 1.5 mL/min 的上样速度以提高效率。在此流量下, 1 g 树脂能够处理的最佳样品溶液体积为 100 mL 左右。该结果与相关研究^[12]一致。

2.2.2 上柱液质量浓度对吸附性能的影响 样品制备液经色谱检测质量浓度为 $564.28\text{ }\mu\text{g/mL}$,取 1 mL 加 1 倍体积蒸馏水,再加 8 mL 体积分数 50% 乙醇溶液,制成紫杉醇质量浓度为 $56.43\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的

体积分数为 50% 的乙醇溶液。依此法制成紫杉醇的 20 倍和 40 倍的体积分数 50% 乙醇溶液作为上样液。不同上柱液质量浓度对动态吸附过程的影响结果见图 5, 结果表明, 上柱液中紫杉醇质量浓度越低, 树脂处理的溶液量就越大。

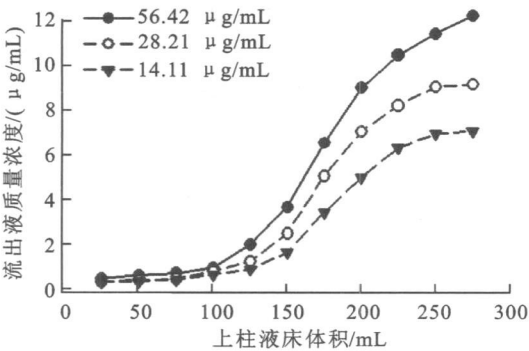


图 5 不同质量浓度下树脂的动态吸附曲线

Fig.5 Dynamic absorption curve of resin at different concentrations

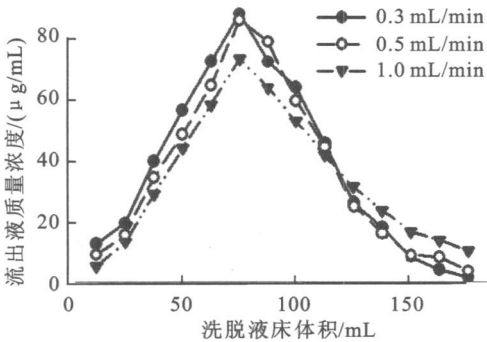


图 6 洗脱剂体积流量对洗脱效果的影响

Fig.6 Effects of elution agent flow speed on the elution effect

2 2 3 洗脱剂体积流量对洗脱性能的影响 取 10 g 树脂装成 25 mL 柱, 选取 0.3、0.5、1.0 mL/min 3 个体积流量进行洗脱, 每 0.5BV 收集一馏分检测。图 6 可见, 洗脱流量越小洗脱效果越好, 但流量过小将导致分离周期增长, 选择 0.5 mL/min 为最佳洗脱流量。在此流量下, 收集 1~7 BV 馏可得到总紫杉醇质量的 89.2%。因此确定 7 BV 为最佳洗脱体积。

2 2 4 最佳吸附-洗脱条件下的验证试验 在上述确定的各个最佳工艺条件下进行平行实验 3 次, 样品溶于体积分数 50% 甲醇以 1.5 mL/min 的流量上树脂柱, 采用体积分数 20% 乙醇淋洗, 80% 乙醇 0.5 mL/min 洗脱并收集 7 BV 该溶液旋转蒸发浓缩并检测, 结果见表 1。过柱回收率均为 90% 左右。图 7 为样品经树脂处理前后的色谱图。由图可见, 出峰时间在 10 min 之前的物质基本上被除去。过柱后样品颜色由原来的棕褐色成为浅黄色, 可见

D4020 树脂对紫杉醇有明显的富集作用。

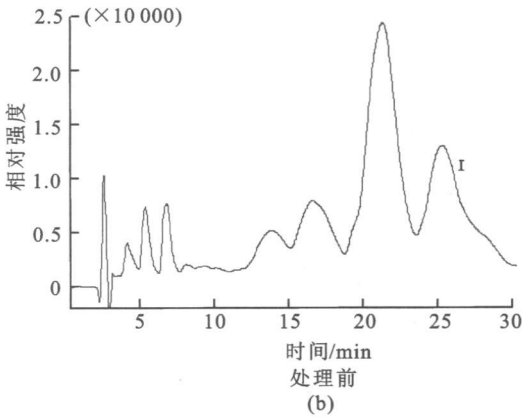
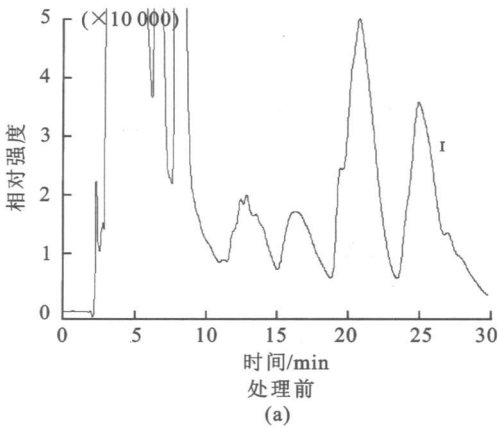


图 7 树脂处理前 (a) 和处理后 (b) 样品的高效液相色谱图

Fig.7 HPLC chromatography of non- purified sample (a) and Purified sample(b)

表 1 D4020 树脂对紫杉醇的富集效果

Tab.1 Enrichment of taxol with D4020

编号	上样液质量浓度/ (μg/mL)	洗脱液质量浓度/ (μg/mL)	回收率/ %
1	56.43	49.91	88.45
2	28.22	24.73	87.64
3	14.11	12.17	86.29

3 结 语

在筛选吸附树脂的基础上, 采用 D4020 型大孔树脂对紫杉醇粗提液进行吸附分离纯化, 通过静态吸附和动态吸附、解吸等研究, 获得了 D4020 树脂吸附分离紫杉醇的适宜工艺参数: 室温下, 发酵液紫杉醇提取液配加纯水制成体积分数为 50% 甲醇水的上样液, 质量浓度约为 12.58 μg/mL。液体流量 1.5 mL/min, 溶液处理量为 300 mL; 洗脱剂为体积分数 80% 乙醇-水溶液, 洗脱液流量 0.5 mL/min。在此工艺条件下紫杉醇的纯度提高了 6 倍。

回收率达 87%。另经检测,该树脂利用 8 次后尚没有表现出回收率下降、去杂效果减弱等情况。因此

用该大孔吸附树脂对紫杉醇进行初步分离富集具有良好的工业应用前景。

参考文献(References):

- [1] 江泽飞,宋三泰,冯奉仪,等. 国产紫杉醇注射液治疗 100 例恶性肿瘤[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2000, 7(2): 66– 67.
JIANG Ze fei, SONG San qin, FENG feng yi, et al. Clinical trial of domestic paclitaxel in the treatment of 100 cancer patients[J]. **Chinese Journal of Clinical Oncology and Rehabilitation**, 2000, 7(2): 66– 67. (in Chinese)
- [2] Moons P J, fitzpatrick. Taxane mediated gene induction is independent of microtubule stabilization: Induction of transcription regulators and enzymes that modulate inflammation and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci**, 1998, 95: 3896– 3901.
- [3] 袁金辉,郭立霞,王兴旺,等. 紫杉醇的最新研究进展[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(2): 135– 139.
YUAN Jin hui, GUO Li xia, WANG Xing wang, et al. Recent progress in the studies on taxol[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2001, 17(2): 135– 139. (in Chinese)
- [4] Stierle A, Strobel G A, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, 1993. 260(9): 214– 216.
- [5] 赵凯,平文祥,周东坡. 内生真菌发酵生产紫杉醇的研究现状与展望[J]. 微生物学报, 2008, 48(3): 403– 407.
ZHAO Kai, PING Wen xiang, ZHOU Dong po. Recent advance and prospect on taxol production by endophytic fungus fermentation – A Review[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2008, 48(3): 403– 407. (in Chinese)
- [6] 程龙,马奇明,陶冠军,等. 一株产紫杉醇的丝状真菌的系统分类鉴定[J]. 工业微生物, 2007, 37(4): 23– 30.
CHENG Long, MA Qi ming, TAO Guan jun, et al. Systemic identification of a paclitaxel producing endofungus[J]. **Industrial Microbiology**, 2007, 37(4): 23– 30. (in Chinese)
- [7] 孙端方,冉雪琴,王嘉福. 一株产紫杉醇罗汉松内生真菌的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 589– 595.
SUN Duan fang, RAN Xue qin, WANG Jia fu. Isolation and identification of a taxol producing endophytic fungus from *Podocarpus*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2008, 48(5): 589– 595. (in Chinese)
- [8] 艾心灵,王洪新,朱松. 大孔树脂吸附分离烟草绿原酸的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 161– 164.
AI Xin ling, WANG Hong xin, ZHU Song. Study on the adsorption and separation of tobacco chlorogenic acid by macro porous resins[J]. **Nat Prod Res Dev**, 2008, 20: 161– 164. (in Chinese)
- [9] 史作清,施荣富,范云鸽,等. 树脂吸附法在中草药有效成分提取中的应用[J]. 中草药, 2001, 32: 660– 662.
SHI Zu o qing, SHI Rong fu, FAN Yun ge, et al. Application of polymer adsorbent in extraction of medical herbs[J]. **Chin Tradit Herb Drugs**, 2001, 32: 660– 662. (in Chinese)
- [10] 徐怀德. 天然产物提取工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006. 435– 437.
- [11] 竺俊鑫,李勇超,孟丽. 红豆杉中产紫杉醇内生真菌分离部位的比较研究[J]. 生物技术通报, 2008, 25(4): 191– 194.
ZHU Jun xin, LI Yong chao, MENG Li. Comparative study on different parts of taxol producing endophytic fungi from *T. chinensis* in taihang mountain[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2008, 25(4): 191– 194. (in Chinese)
- [12] 郭立佳,陶文沂,徐锋,等. HZ818 树脂在紫杉醇初分离工艺中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(5): 40– 43.
GUO Li jia, TAO Wen yi, XU Feng, et al. The application of HZ818 macroreticular resin in pretreatment of taxol preparation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(5): 40– 43. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)