

文章编号: 1673-1689(2006)05-0040-04

HZ818 树脂在紫杉醇初分离工艺中的应用

郭立佳¹, 陶文沂^{*1}, 徐锋¹, 杨静², 过晓磊²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 无锡山禾药业股份有限公司, 江苏 无锡 214062)

摘要: 采用 HZ818 大孔吸附树脂对红豆杉浸膏中的紫杉醇成分进行吸附和洗脱试验, 同时利用液质联用进行分析检测, 确定了其最佳工艺参数。结果表明, HZ818 树脂对紫杉醇有良好的吸附分离效果。优化工艺条件为: 样品溶于体积分数 40% 甲醇, 以 1.5 mL/min 过柱, 体积分数 75% 甲醇淋洗, 体积分数 85% 甲醇以 0.5 mL/min 洗脱, 紫杉醇的质量分数从原浸膏中的 1.02% 提高到 8.1%, 回收率达 98.6%。

关键词: 紫杉醇; 大孔吸附树脂; 分离

中图分类号: R 979.1

文献标识码: A

The Application of HZ818 Macroreticular Resin in Pretreatment of Taxol Preparation

GUO Li-jia¹, TAO Wen-yi^{*1}, XU Feng¹, YANG Jing², GUO Xiao-lei²

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangzi University, Wuxi 214036, China; 2. Wuxi Shanhe Pharmaceutical Co. Ltd, Wuxi 214062, China)

Abstract: The optimum conditions for absorption and desorption of taxol yunnannenensis extracts by HZ818 macroreticular resins was determined. The static adsorption dynamic curve and isotherm of taxol on HZ818 resin shows that HZ818 macroreticular resins was suitable for adsorbing and separating taxol. The optimum technological parameters were as follows: the sample was dissolved in 40% methanol and was added on a column of the resin at the rate of 1.5 mL/min, then it was washed with 75% methanol, and was eluted with 85% methanol at the rate of 0.5 mL/min. The content of taxol was increased from 1.02% in the raw extract to 8.1% with the recovery of 98.6%, so this resin can be used for separation and concentration of taxol.

Key words: taxol; macroreticular resin; separation

紫杉醇(Taxol)是一种具有独特抗癌机理的二萜类化合物, 1971年, Wall^[1]等首次从太平洋红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中分离出紫杉醇。1992

年, 美国FDA正式批准其为抗卵巢癌新药, 目前仍是世界上最畅销的抗癌药物之一。由于紫杉醇在原料中含量极低, 分离纯化相当困难, 导致纯品价

收稿日期: 2005-11-09; 修回日期: 2006-01-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470016).

作者简介: 郭立佳(1980-), 男, 河北保定人, 发酵工程硕士研究生; *为通讯作者.

格昂贵,因此寻找一套简单高效的分离纯化工艺显得至关重要。

紫杉醇的初分离对整个提取工艺有着很大的影响,文献报道几乎都是采用了液液萃取方法^[2-4]。该方法除杂率不高,溶液易乳化,并且耗费大量有机溶剂。

大孔树脂是20世纪60年代末发展起来的一类有很好吸附性能的有机高聚物吸附剂,目前应用日益广泛,特别是在天然产物的提取分离方面逐渐显示出其优越性^[5]。作者用前段试验筛选出的HZ818大孔吸附树脂对红豆杉浸膏中的紫杉醇进行分离富集,取得了较好的效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

液质联用仪:Platform ZMD 4000 WATERS公司产品;旋转蒸发仪:无锡星海王生化设备有限公司产品;D100B型蠕动泵:上海沪西仪器厂产品;红豆杉浸膏(紫杉醇质量分数1.02%):作者所在实验室制备;紫杉醇标准品(纯度 $\geq 97\%$);HZ818树脂:华东理工大学华昌聚合物有限公司产品;其它试剂均为分析纯。

1.2 大孔吸附树脂的预处理与再生

大孔树脂用体积分数95%乙醇浸泡24 h,使其充分溶胀,湿法装柱,然后用树脂柱2倍体积的体积分数95%乙醇以2 BV/h的流速通过树脂层,并浸泡4 h;用蒸馏水以2 BV/h的流速洗柱3-5 BV至无醇味;再用2 BV质量分数5% HCl以6 BV/h流速通过树脂层,并浸泡4 h,后用蒸馏水以同样的流速洗出液呈中性;用2 BV质量分数2% NaOH以6 BV/h的流速通过树脂层,并浸泡4 h,最后用蒸馏水同样的流速洗至流出液呈中性备用。再生时采用甲醇充分淋洗树脂层至流出液澄清,再用蒸馏水洗至流出液呈中性备用。

1.3 色谱条件

采用液质联用测定紫杉醇的含量。色谱仪:Waters Platform ZMD 4000;检测器:Waters 996;分析柱:Sunfire C-18 D 2.1 mm \times 150 mm;流动相:乙腈-水梯度洗脱;柱温35 $^{\circ}$ C;体积流量0.3 mL/min;进样量20 μ L。

1.4 标准曲线的绘制

取5 mg紫杉醇标准品于100 mL容量瓶,加甲醇至刻度,摇匀。再取1 mL该溶液上液质联用仪,在选择离子模式下检测紫杉醇的含量,进样体积分别为0.25、0.5、1.5、2.0 μ L,以紫杉醇进样量

和峰面积绘制标准曲线。回归方程为 $Y = 84.181X - 6.106.4$,回归因子 $R^2 = 0.9995$,即紫杉醇进样量在12.5~100 ng之间与峰面积成良好线性。

1.5 样品溶液的制备

准确称取定量红豆杉浸膏,按10 mg浸膏溶于10 mL体积分数40%甲醇水溶液制备上柱供试样。

1.6 静态吸附动力学曲线的测定

称取HZ818干树脂0.3 g于三角瓶,再加入150 mL样品溶液,摇床振荡使其吸附平衡,不同时间取样检测,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,

1.7 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40%甲醇水溶液分别稀释至150 mL制成不同体积分数的浸膏溶液,再各称取0.3 g HZ818树脂加至各溶液,室温振荡5 h,取样检测。以达到吸附平衡时单位质量树脂的吸附量对红豆杉浸膏溶液中紫杉醇的质量浓度作图,绘制树脂的吸附等温线。

1.8 大孔树脂对紫杉醇的动态吸脱试验

将制得的供试液以一定的速度通过装有HZ818树脂的层析柱,用不同甲醇浓度的溶液进行梯度洗脱,分批收集流出液进行检测。由于环境温度不易控制,以及在调上柱液pH值过程中发现极易产生沉淀,因此只考察上柱流速对树脂吸附性能的影响,同时考察洗脱速度,洗脱液浓度,洗脱体积等因素对树脂洗脱性能的影响。

2 结果与讨论

2.1 静态吸附实验结果

2.1.1 静态吸附动力学曲线 由图1看出, HZ818树脂在较短时间内即可将绝大部分紫杉醇吸附。30 min后紫杉醇的吸附量增长缓慢,1 h之后吸附量基本上不再增加。静态吸附条件下,紫杉醇在HZ818树脂上的最大吸附量约为3.6 mg/g树脂。这种起始瞬间吸附速率极大,短时间内即可达到吸附平衡的特点使该树脂在紫杉醇的初分离上具有潜在的工业应用价值。

2.1.2 吸附等温线 图2显示,随红豆杉浸膏浓度的增加,树脂对紫杉醇的吸附量也逐渐增加,当紫杉醇质量浓度 ≥ 8 mg/L时,吸附量趋于平缓,即8 mg固体浸膏溶于10 mL体积分数40%甲醇水溶液。这说明该树脂对紫杉醇的吸附符合Langmuir模型,属于单分子层吸附,吸附比较稳定,这也为后面洗脱剂强度的选择提供了一定依据。

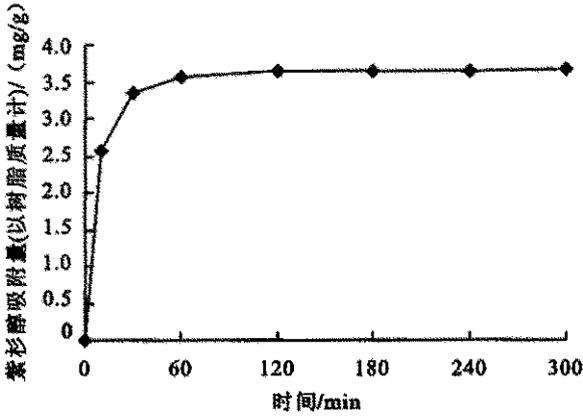


图1 紫杉醇的静态吸附动力曲线

Fig.1 Static adsorption dynamic curve of taxol

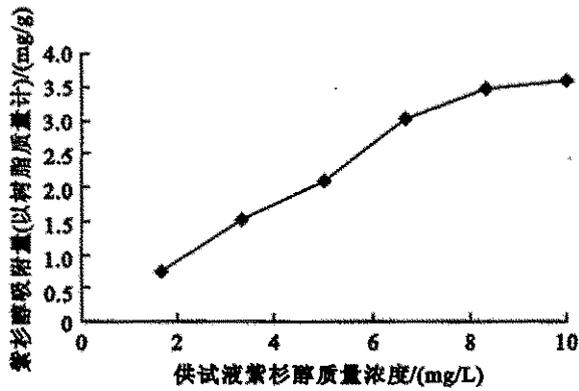


图2 紫杉醇在 HZ818 树脂上的吸附等温线

Fig.2 Adsorption isotherm of taxol on HZ818 resin

2.2 动态吸附实验结果

取 1 g 树脂装小柱,室温条件下,选取 0.5、1.0、1.5 mL/min 3 种体积流量上柱进行动态吸附,每 50mL 收集一份检测,结果见图 3。可见流速越低越有利于吸附,但由于 HZ818 树脂的吸附速率很快,3 种流速下的泄漏率趋势图相差不是太大,而过低的流速又会延长操作周期,在保证低泄漏率范围内完全可以选择 1.5 mL/min 吸附流量以缩短分离周期,在此流速下,1 g 树脂的最佳处理样品溶液量为 100 mL 左右。

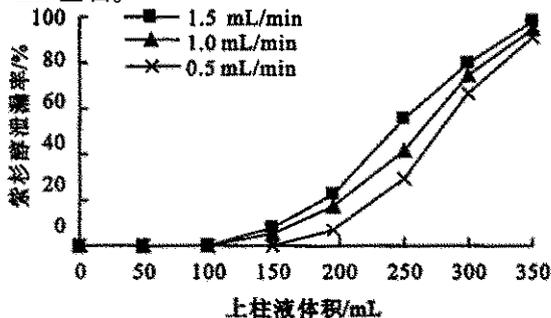


图3 不同体流量的紫杉醇在树脂上的泄漏曲线

Fig.3 Effect of rates on the taxol leakage

2.3 动态洗脱实验结果

2.3.1 甲醇浓度对树脂洗脱性能的影响 对吸附了红豆杉浸膏溶液的树脂柱,依次用体积分数 55%、65%、75%、80%、85%、90% 甲醇各 3BV 以 0.5 mL/min 流速进行洗脱。结果见表 1。紫杉醇在 HZ818 树脂上的保留比较强,到体积分数 80% 甲醇时才有紫杉醇洗出,但其解吸率仅有 10.4%,若采用此浓度洗脱,洗脱曲线将拉的很长,不仅消耗大量溶剂,还会延长分离周期,而体积分数 90% 甲醇洗脱时有某种红色色素物质同时被洗出,综合考虑溶剂用量及产品纯度,采用体积分数 85% 甲醇为最佳洗脱溶剂。

表1 不同体积分数甲醇的解吸效果

Tab.1 Effects of different concentration of methol on desorption

甲醇 体积分数/%	紫杉醇 回收率/%	紫杉醇 累积回收率/%
55	—	—
65	—	—
75	—	—
80	10.4	10.4
85	57.8	68.2
90	31.3	99.5

2.3.2 洗脱剂流速及洗脱体积的确定 取 6 g 树脂装成 25 mL 柱,600 mL 供试液过柱吸附。选取 0.3、0.5、1.0 mL/min 3 个体积流量进行洗脱,每 1 BV 收集一馏分检测,结果见图 4。洗脱流速越慢洗脱效果越好,考虑到流速过慢会延长分离周期,选择 0.5 mL/min 为最佳洗脱流量。在此流量下,收集 1-6BV 馏分经计算可得到总紫杉醇质量分数的 98.2%。因此确定 6 BV 为最佳洗脱体积。

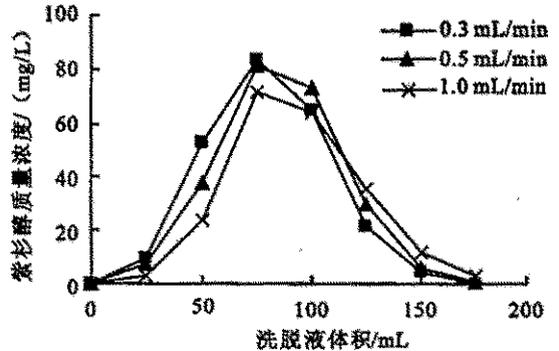


图4 不同体流量对紫杉醇洗脱效果的影响

Fig.4 Effect of rates on the taxol eluting effect

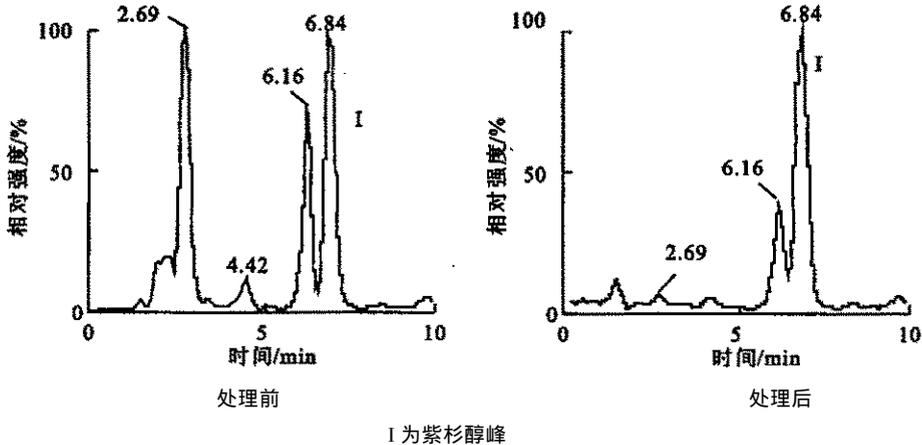
2.3.3 重复验证实验 在上述确定的各个最佳工艺条件下进行平行实验 3 次,浸膏样品溶于体积分

数 40% 甲醇以 1.5 mL/min 上树脂柱,采用体积分数 75% 甲醇淋洗,体积分数 85% 甲醇 0.5 mL/min 洗脱并收集 6 BV 该溶液旋转蒸发,干燥得干品,结果见表 2。产品中紫杉醇平均质量分数为 8.1%,过柱得率高达 98.6%。图 5 为样品经树脂处理前后的色谱图。由图可见,出峰时间在 5 min 之前的物质基本上被除去。过柱后样品颜色由原来的棕绿色成为浅黄色,可见 HZ818 树脂对浸膏中的紫杉醇进行了有效的富集。

表 2 HZ818 树脂对紫杉醇的富集效果

Tab. 2 Enrichment of taxol with HZ818 resin

试验编号	上柱液浸膏质量/mg	体积分数 85% 甲醇洗脱液总固形物质量/mg	紫杉醇质量分数/%	紫杉醇回收率/%
1	295	36.9	8.15	100.2
2	466	58.5	8.13	97.4
3	550	70.5	7.96	98.1



I 为紫杉醇峰

图 5 树脂处理前后样品的高效液相色谱图

Fig. 5 The HPLC chromatography of Sample

3 结 论

1) 通过试验确定了 HZ818 非极性大孔吸附树脂分离富集红豆杉浸膏中紫杉醇的最佳工艺参数: 室温下, 按 8 mg 浸膏溶于 10 mL 40% 甲醇水作为上柱液, 吸附流量为 1.5 mL/min, 体积分数 75% 甲醇淋洗, 体积分数 85% 甲醇洗脱, 洗脱流量 0.5 mL/

min、洗脱体积为 6 BV。在最佳工艺条件下, 紫杉醇纯度平均提高了近 8 倍, 回收率高达 98.6%。

2) 该方法操作简单, 树脂价格便宜, 易于再生, 经检测该树脂利用 8 次后紫杉醇回收率没有降低, 从而减少了生产成本。若将该树脂用于从植物细胞或真菌培养液中提取紫杉醇可减少蒸水过程, 降低能耗。因此采用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:

[1] Wani M C , Taylor H L , Wall M E , et al. Plant antitumor agents VI , The isolation and structure of taxol , a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxul brevifolia*[J] . **J Am Chem Soc** , 1971 , 93 :2325 - 2327 .
 [2] Witherup K M , Look S A , Stasko M W , et al. *Taxus spp.* needles contain amounts of taxol coparable to the bark of *Taxus brevifolia* : analysis and isolation[J] . **J Nat Prod** , 1990 , 53(5) :1249 - 1255 .
 [3] Rao K V. Taxol and related taxanes. I . taxanes of *taxus brevifolia* bark[J] . **Pharmaceutical Research** , 1993 , 10(4) 521 - 524 .
 [4] 吕秀阳, 杨亦文, 任其龙, 等. 紫杉醇提取工艺的放大与优化[J] . 农业工程学报 2001 , 17(4) :119 - 122 .
 [5] 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(7) :660 - 662 .

(责任编辑 朱 明)