



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01804134.5

[45] 授权公告日 2005 年 2 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1187347C

[22] 申请日 2001.11.9 [21] 申请号 01804134.5

[30] 优先权

[32] 2000.11.28 [33] US [31] 09/724,504

[86] 国际申请 PCT/EP2001/012982 2001.11.9

[87] 国际公布 WO2002/044162 英 2002.6.6

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.25

[71] 专利权人 因德纳有限公司

地址 意大利米兰

[72] 发明人 B·加贝塔 G·齐尼

审查员 肖 鹏

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 林柏楠 刘金辉

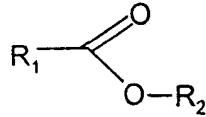
权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 紫杉醇和三尖杉宁碱的层析分离方法

[57] 摘要

分离紫杉醇和三尖杉宁碱以及其它相关化合物的方法，其中包括获得含紫杉醇和三尖杉宁碱的原料；将原料溶解于任何一种特定的溶剂如甲酸丁酯和乙酸丁酯中以形成混合物；将此混合物进行柱层析以获得紫杉醇的洗脱级分、三尖杉宁碱的洗脱级分 and 一种残余物；并分别干燥紫杉醇和三尖杉宁碱级分以分别获得独立的紫杉醇和三尖杉宁碱的结晶。

- 1、分离紫杉醇和三尖杉宁碱的方法，其中包括：
获得含紫杉醇和三尖杉宁碱的原料；
将原料溶解于具有如下结构式的溶剂中以形成混合物：



其中 R₁ 是氢原子或甲基，而 R₂ 为含有 4 至 7 个碳原子的烷基或芳基烷基；

用上式的单一溶剂作为洗脱剂将此混合物进行柱层析以获得紫杉醇的洗脱级分、三尖杉宁碱的洗脱级分和一种残余物；并

分别干燥紫杉醇和三尖杉宁碱级分以分别获得独立的紫杉醇和三尖杉宁碱的结晶。

- 2、根据权利要求 1 所述的方法，其中所述原料含有任何比例的三尖杉宁碱和紫杉醇。

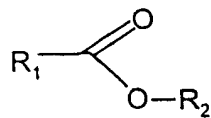
- 3、根据权利要求 1 所述的方法，其中所述原料是鲜和干的红豆杉的根、叶、枝、种子或其混合物的提取物。

- 4、根据权利要求 1 所述的方法，其中所述原料是得自红豆杉属物质的细胞培养物的提取物。

- 5、根据权利要求 1 所述的方法，其中所述原料是固体、浆状物和半固体胶状物形式。

- 6、根据权利要求 1 所述的方法，其中所述溶剂结构包括 R₁ 为氢原子或甲基，而 R₂ 为正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。

- 7、分离紫杉醇和三尖杉宁碱的方法，其中包括：
获得含紫杉醇和三尖杉宁碱的原料；
将此原料溶解于下式结构的溶剂中以形成混合物：



其中 R₁ 是氢原子或甲基, 而 R₂ 为含有 4 至 7 个碳原子的烷基或芳烷基;

将所述混合物用正相硅胶柱用上式的单一溶剂作为洗脱剂进行柱层析, 得到紫杉醇的洗脱级分、三尖杉宁碱的洗脱级分和一种残余物; 及

分别干燥紫杉醇和三尖杉宁碱级分, 以分别获得独立的紫杉醇和三尖杉宁碱的结晶形式。

8、根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述式的溶剂包括 R₁ 为氢原子或甲基, 而 R₂ 为正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。

9、根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述硅胶的用量为原料的 50 至 100 重量份。

10、根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述原料含有任何比例的三尖杉宁碱和紫杉醇。

11、根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述原料是鲜或干的红豆杉根、叶、枝、种子或其混合物的提取物。

12、根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述原料是由红豆杉属物质的细胞培养物获得的提取物。

13、根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述原料是固体、浆状物或半固体浆状物的形式。

14、权利要求 7 所述的方法, 其中所述式的溶剂包括 R₁ 为氢原子或甲基, 而 R₂ 是正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。

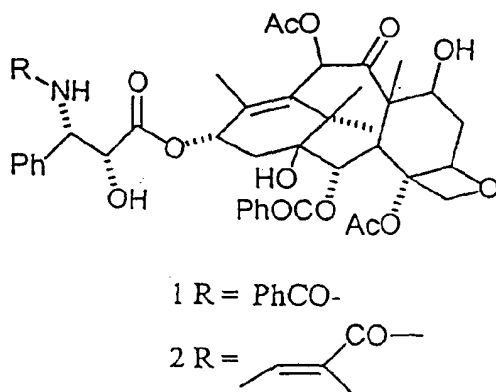
紫杉醇和三尖杉宁碱的层析分离方法

发明领域

本发明涉及分离紫杉醇和紫杉醇类似物三尖杉宁碱(cephalomannin), 该分离由红豆杉属植物 (*Taxus*) 的植物提取物或其细胞培养物开始。具体地讲, 是通过正相硅胶柱上用层析方法将三尖杉宁碱与紫杉醇分离。

背景技术

紫杉醇以前称为 Taxol, 是特别有前途的抗癌剂。1971年, Wani 等将其从短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 的树皮中分离出来(J. Am. Chem. Soc. 93, 2325, 1971), 并用化学方法和 X 射线结晶学分析确定了它的结构。



FDA 已批准紫杉醇用于治疗乳腺癌和卵巢癌, 而其对肺癌和直肠癌的治疗目前处于临床试验阶段(例如, 见 W. P. McGuire 和 E. K. Rowinsky, 癌症治疗中的紫杉醇, M. Dekker, New York 1995, 1 至 337 页)。

紫杉醇的主要天然来源是太平洋浆果紫杉(短叶红豆杉)的树皮。还发现紫杉醇存在于其它浆果紫杉的地上部分和根中, 包括欧洲浆果紫杉(金黄欧洲红豆杉)、亚洲浆果紫杉(西藏红豆杉和中国红豆杉), 以及为观赏目的培育的紫杉树(例如, 密生红豆杉)。

从天然来源中分离紫杉醇的方法复杂且成本高,这部分因为在植物材料中的浓度较低,还因为它的一种同类物三尖杉宁碱的存在。紫杉醇和三尖杉宁碱的浓度及其之间的比率依目标植物的种类和部位随植物材料而变化。一般来说,现已发现紫杉醇和三尖杉宁碱的含量范围分别为 0.001%至 0.08%和 0.001%至 0.22%(K. M. Witherup 等, *J. Nat. Prod.*, 53, 1249, 1990; R. G. Kelsey 等, *J. Nat. Prod.*, 55, 912, 1992; N. C. Wheeler 等, *J. Nat. Prod.*, 55, 432, 1992)。具体地讲,作为可再生的植物材料,密生红豆杉类是制备紫杉醇最常用的原料,与其它种相比其中含有的三尖杉宁碱的浓度最高。

即使是基于紫杉细胞培养物的紫杉醇制备技术,最近其已得到实质性的提高,避免了对成本高的植物材料的常规提取,除紫杉醇外,仍得到了相当量的三尖杉宁碱。

紫杉醇和三尖杉宁碱之间结构的差别仅在于化合物的侧链部分,因此给出了相似的化学性质。因此,这两种化合物具有非常相似的层析性质,因此将这些相关化合物彻底分离非常困难。人们已提出了一些层析方法,这些方法主要基于使用反相色谱或高成本的键合相柱(J. H. Cardellina, *J. Liq. Chromatogr.*, 14, 659, 1991; S. L. Richeimer 等, *Anal. Chem.* 64, 2323, 1992; E. R. M. Wickremesinhe 等, *J. Liq. Chromatogr.*, 16, 3263, 1993; K. M. Witherup 等, *J. Liq. Chromatogr.*, 12, 2117, 1989),但是这些方法不易于大的商业规模操作。因此,分离紫杉醇和三尖杉宁碱的方法仍具有极其重要的实践上的意义。

过去,基于这两种化合物对氧化剂的不同反应性,曾有人提出了紫杉醇和三尖杉宁碱的分离方法。发现存在于三尖杉宁碱的甲基巴豆酸残基的双键可以被四氧化钼氧化(D. G. I. Kingston 等, *J. Nat. Prod.*, 55, 259, 1992)或被臭氧氧化(J. T. Beckvermit 等, *J. Org. Chem.*, 61, 9038, 1996),而紫杉醇在这些氧化反应期间不进行任何转变。另一研究考虑用溴处理紫杉醇和三尖杉宁碱的混合物(J. M. Rimoldi 等, *J. Nat. Prod.*, 59, 167, 1996)。用溴处理,在受控的温度和时间条件下进行,形成了二溴三尖杉宁碱,而紫杉醇不受此化学试剂的影响。但是,这些方法的缺点是使用如四氧化钼这样的毒性试剂,且在无论如何导致了三尖杉宁碱被破坏和转变为其衍生物,

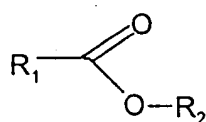
而只有通过困难的合成方法才能由这样的衍生物再生为三尖杉宁碱。因此,仍需要找到低成本的、简单、安全和有效的分离三尖杉宁碱和紫杉醇的方法。因此,本发明的主要目的是提供从其混合物或紫杉提取物中分离紫杉醇和三尖杉宁碱的简单方法。

发明概述

本发明提供了分离紫杉醇和三尖杉宁碱及其它相关化合物的方法。具体地讲,本方法包括:获得含紫杉醇和三尖杉宁碱的原料,将原料溶解于任何一种特定的溶剂中以形成混合物,将此混合物进行柱层析以获得紫杉醇的洗脱级分、三尖杉宁碱的洗脱级分和一种残余物;并分别干燥紫杉醇和三尖杉宁碱级分以分别获得独立的紫杉醇和三尖杉宁碱的结晶。溶剂优选甲酸丁酯或乙酸丁酯或乙酸苄基酯。

发明详述

令人惊奇的是,发现通过在一种正相硅胶柱上用一种溶剂作为洗脱剂进行色谱分离,可以获得极大收率的高纯度的紫杉醇和三尖杉宁碱。优选,此溶剂宜具有如下通式:



其中 R₁ 是氢原子或甲基,而 R₂ 优选含有 4 个碳原子,即它可以是正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。这些溶剂不常用于常规的柱色谱纯化中,但是在紫杉醇-三尖杉宁碱分离的特定情况中提供了惊人好的操作结果。

本发明的原料可以只是任何比例的三尖杉宁碱和紫杉醇的混合物,或者是鲜或干的红豆杉的根、叶、枝、种子或其混合物的提取物。本发明的方法还可以包括由细胞培养物获得的提取物。这些原料是本领域技术人员已知的,故不需要在本文中进一步叙述。

所述提取物可以是粗或者纯的提取物,后者已经过常规溶剂处理并进行了初步的色谱纯化。这些技术也是本领域技术人员熟知的,故不需要在

本文中进一步叙述。取决于用于制备的试验条件，原料可以是固体、浆状物或者半固体胶状物。在其溶解于本文中描述的溶剂之一后，该物质可以直接进行柱层析。

本发明的层析纯化，根据其组分使用占原料重量约 50 至 100 份的普通、正相硅胶。

用本发明溶剂进行的柱层析是快速的，不需要高压，在正常重力条件下进行。

表 1 显示了三尖杉宁碱和紫杉醇在薄层层析分析中用硅胶和本发明的系列溶剂的行为，使这两种化合物的分离是令人满意的。

表 1: 紫杉醇和三尖杉宁碱在硅胶板上的 R_f

溶剂	R_1	R_2	紫杉醇	三尖杉宁碱
甲酸正丁酯	H	n-C ₄ H ₉	0.17	0.12
甲酸异丁酯	H	i- C ₄ H ₉	0.20	0.15
甲酸叔丁酯	H	t- C ₄ H ₉	0.20	0.13
乙酸正丁酯	CH ₃	n- C ₄ H ₉	0.36	0.28
乙酸仲丁酯	CH ₃	s- C ₄ H ₉	0.35	0.24
乙酸异丁酯	CH ₃	i- C ₄ H ₉	0.31	0.19
乙酸叔丁酯	CH ₃	t- C ₄ H ₉	0.19	0.09
乙酸苄基酯	CH ₃	PhCH ₂	0.28	0.16

用本发明描述的溶剂在正相硅胶柱上通过层析分离紫杉醇和三尖杉宁碱有许多优点。

首先，通过柱层析得到了实际上不含三尖杉宁碱的紫杉醇，以及几乎不含紫杉醇的三尖杉宁碱。其次，正相硅胶的使用比文献中描述的反相硅胶的使用提供了相当的经济上的益处，第三，用一种溶剂进行柱洗脱允许其快速回收循环，不需要采取工业的连续制备相关操作中的分级蒸馏。原料中与紫杉醇和三尖杉宁碱同时存在的任何其它组分均可通过层析纯化除

去。

将洗脱的级分真空蒸发至干,并用适宜的溶剂将残余物结晶,以所需的晶型获得紫杉醇和三尖杉宁碱。

因此,通过增加所得量的收率,并创立此抗肿瘤药的廉价的制备方法,本发明描述的方法为制备大量的不含三尖杉宁碱的紫杉醇提供了简单的解决方案。

实施例

下列实施例非限制性地举例说明了本发明。

实施例 1: 由含三尖杉宁碱的密生红豆杉提取物中分离紫杉醇

通过 HPLC 分析,发现由 620kg 密生红豆杉(全植物)按照 V. Senilh 等描述的方法(J. Nat. Prod. 47, 131, 1984)制备的 290g 提取物含有 183g 紫杉醇和 81g 三尖杉宁碱。将此提取物溶解于 3.5 升乙酸叔丁酯中,并加样到含 60kg 硅胶的柱上。共洗脱出 1200 升的叔丁基。用 350 升溶剂洗脱后,得到 400 升含紫杉醇和少于 3% 三尖杉宁碱的级分,以及 200 升含三尖杉宁碱和少于 3% 紫杉醇的另一种级分。将这两种级分分别真空浓缩至干,并用己烷-丙酮将此残余物结晶。于是,获得了 154g 紫杉醇和 70g 三尖杉宁碱,它们的 HPLC 纯度大于 99%,且它们的理化数值和光谱值与文献(G. N. Chmurny 等, J. Nat. Prod. 55, 414, 1992; C. J. Falzone 等, Tetrahedron Letters, 33, 1169, 1992; V. Senilh 等, J. Nat. Prod. 47, 131, 1984)的记载相符。

实施例 2: 从其混合物中分离紫杉醇和三尖杉宁碱

将含 70g 紫杉醇和 30g 三尖杉宁碱的混合物溶解于 1.5 升 甲酸叔丁酯中,并上样到含 10kg 悬浮于同样溶剂的硅胶上。将此柱用甲酸叔丁酯洗脱,并在 HPLC/TLC 分析后合并级分。分别将含紫杉醇和三尖杉宁碱的级分

浓缩至干,并用适当比例的丙酮和庚烷将这些残余物结晶,得到 HPLC 纯度超过 99% 的紫杉醇和三尖杉宁碱。