



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96193149.3

[43] 授权公告日 2003 年 4 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1104426C

[22] 申请日 1996.11.1 [21] 申请号 96193149.3

[30] 优先权

[32] 1995.12.13 [33] US [31] 08/572,240

[86] 国际申请 PCT/US96/17545 1996.11.1

[87] 国际公布 WO97/21696 英 1997.6.19

[85] 进入国家阶段日期 1997.10.8

[71] 专利权人 塞克化学有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 R·C·潘德伊 L·K·扬科

[56] 参考文献

CN106995 1993.03.17 C07C67/48

审查员 吴顺华

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 马崇德 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 16 页

[54] 发明名称 紫杉醇和三尖杉宁碱的分离和纯化

[57] 摘要

本发明叙述了从天然原料如红豆杉树种的皮、针叶和树枝，组织培养物和真菌中提取和分离紫杉烷类、尤其是紫杉醇的方法，其中紫杉烷类从粗提取物中分离的过程为：在极性和非极性溶剂两相间分配，在非极性溶液中沉淀，通过卤化不饱和紫杉烷衍生物使混合物发生反应，然后层析分离并从极性和非极性溶剂混合物中结晶出紫杉烷类；更具体地说，叙述了在紫杉醇存在下卤化不饱和侧链紫杉烷衍生物、尤其是三尖杉宁碱的方法，其中溴优选加到不饱和紫杉烷的双键上，紫杉醇不发生变化，紫杉醇容易从含有较少极性的卤化紫杉烷衍生物的混合物中分离出来。

- 1.一种从含有紫杉烷混合物的有机原料中分离和纯化紫杉醇的方法，所述方法包括：
- (1) 从上述有机原料中提取含有紫杉化合物的组合物；
 - 5 (2) 从所述组合物中层析分离含有紫杉醇、三尖杉宁碱和其它紫杉烷的混合物，然后
 - (3) 选择有效条件，将混合物与卤素反应，选择性地将三尖杉宁碱转变成二卤代三尖杉宁碱的非对映异构体混合物；然后
 - (4) 从上述混合物中，分离紫杉醇。
- 10 2.权利要求1的方法，其中有机原料用第一萃取溶剂萃取后，蒸发得到含紫杉醇的第一残渣；然后用第二萃取溶剂萃取第一残渣，再蒸发，得到含紫杉醇的第二残渣，接着进一步用结晶法纯化第二残渣。
- 3.权利要求2的方法，其中第一萃取溶剂是甲醇，含紫杉醇的第一残渣被分配于水相和选自下列的有机相之间：二氯甲烷、二氯乙烷和氯仿，该残渣经所述溶剂萃取后，干燥，得第二残渣，将此含紫杉醇的第二残渣溶于丙酮中，加己烷沉淀出非极性杂质，再将此丙酮-己烷溶液蒸发到原体积的1/3，得到含紫杉醇的粘稠状第三残渣。
- 15 4.权利要求3的方法，其中所述溶剂和水的体积比1:1。
- 5.权利要求3的方法，其中向粘稠状第三残渣中加入10倍体积的己烷，析出浅黄色沉淀，形成含紫杉醇的固体第四残渣。
- 20 6.权利要求4的方法，进一步包括将第四固体残渣溶于丙酮与二氯甲烷和/或二氯乙烷的混合溶剂中，通过硅胶柱和色谱溶剂进行闪式色谱分离，将含有紫杉醇和三尖杉宁碱混合物所得的各级分合并、蒸干，得到含紫杉醇的第五残渣。
- 25 7.权利要求6的方法，其中所述色谱所用的溶剂是丙酮与二氯甲烷或二氯乙烷的混合物，其体积比是1:9到3:7。
- 8.权利要求6的方法，其中将第五残渣溶于选自下列的氯代溶剂中： CCl_4 、 CHCl_3 、 $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ 或 CH_2Cl_2 ，并与卤素反应。
- 9.权利要求8的方法，其中所说的卤素是溴。
- 30 10.按权利要求9的方法，其中溴溶于卤代溶剂中，其浓度为0.01M到0.1M。
- 11.权利要求10的方法，其中溴化反应在温度 -20°C 到 20°C 和黑暗

条件下进行。

12.权利要求 11 的方法，其中存在于上述氯代溶剂中的三尖杉宁碱基本上完全转变成二溴代三尖杉宁碱非对映异构体混合物，然后从该反应混合物中分离紫杉醇。

5 13.权利要求 12 的方法，其中含紫杉醇的有机物质选自：短叶红豆杉的树皮、红豆杉各品种的植物原料，红豆杉各品种的细胞培养物以及能产生紫杉醇的霉菌。

14.权利要求 12 的方法，其中通过硅胶层析，将紫杉醇自反应混合物中分离出来，层析用的洗脱液是丙酮与二氯甲烷或二氯乙烷的混合物，其体积比是 1: 9 到 3: 7。
10

15.权利要求 12 的方法，其中分离出的紫杉醇在丙酮与己烷混合物中结晶，使紫杉醇析出。

16.一种从含有紫杉醇和三尖杉宁碱混合物中分离紫杉醇的方法，所述方法包括以下步骤：a) 将该混合物与卤素反应，反应温度和时间应充分保证，让三尖杉宁碱基本上完全被卤化；b) 将紫杉醇与三尖杉宁碱卤代衍生物分离。
15

17.权利要求 16 的方法，其中所述卤素可选用氟、氯、溴或碘。

18.权利要求 17 的方法，其中所述卤素是溴。

19.权利要求 18 的方法，其中溴的浓度是 0.01M 到 0.1M。

20 20.权利要求 16 的方法，其中反应 a) 的温度范围是 -20℃ 至 20℃。

21.权利要求 19 的方法，其中溴溶于氯代溶剂 CCl_4 、 CHCl_3 或 CH_2Cl_2 中。

22.权利要求 21 的方法，其中氯代溶剂是 CCl_4 或 CHCl_3 。

23.权利要求 16 的方法，其中反应 a) 在黑暗条件下进行。

25 24.权利要求 16 的方法，其中 b) 步分离是采用硅胶层析，选用适当溶剂作洗脱液。

25.权利要求 24 的方法，其中溶剂是丙酮与二氯甲烷或 1,2 二氯乙烷的混合物，其体积比是 1: 9 到 3: 7。

26.权利要求 25 的方法，其中含紫杉醇的各个部分，蒸干成固体残渣。
30

27.权利要求 26 的方法，其中用结晶法进一步纯化紫杉醇。

28.权利要求 27 的方法，其中固体残渣被溶于丙酮中。

-
- 29.权利要求 28 的方法，其中紫杉醇从己烷内结晶析出。
- 30.权利要求 25 的方法，其中紫杉醇与 2", 3" - 二溴代三尖杉宁碱的非对映异构体混合物分离。
- 31.权利要求 16 的方法，其中反应 a)用 HPLC 监测。
- 5 32.权利要求 16 的方法，其中混合物是来自含有紫杉醇的原料。
- 33.权利要求 32 的方法，其中含紫杉醇原料选自：短叶红豆杉树皮，红豆杉各品种的植物原料、红豆杉各品种的细胞培养物以及能产生紫杉醇的霉菌。

紫杉醇和三尖杉宁碱的分离和纯化

发明领域

5 本发明是关于各种来源的紫杉醇 (paclitaxel) 的分离和纯化, 紫杉醇的来源包括有机物质如植物原料, 人工培养品和霉菌, 更主要的是来源于短叶红豆杉 (*Taxus. brevifolia*, Pacific Yew) 树皮, 以及欧红豆杉 (*T. baccata*)、云南红豆杉 (*T. yunnanensis*) 和西藏红豆杉 (*T. Walichiana*)。本发明提供的方法可分离和纯化紫杉烷 (Taxane) 混合物中的紫杉醇, 10 该混合物中含有不同浓度的紫杉醇和其它各种紫杉烷, 包括具有不饱和侧链与紫杉醇极其相似的紫杉烷, 如三尖杉宁碱 (cephlomannine)。

发明背景

紫杉醇是治疗各种转移肿瘤的有名的化疗药。它已被美国 FDA (Food and Drug Administration, 食品与药品管理部门) 批准用于治疗卵巢和乳15 腺癌, 最近又正进行治疗肺癌和结肠癌的临床试验。

该化合物是天然产物, 主要由短叶紫杉树皮中提取, 同时在欧洲红豆杉、西藏红豆杉及云南红豆杉 (*T. yunnanensis*) 中也有发现, 另外, 自其它植物原料中也得到了生物量的提取物, 如自 *T. hicksii*, *T. densiformis*, *T. gem*, *T. wardii*, 东北紫杉 (*T. cuspidata*), *T. capitata*, *T. brownii* 和 *T. dark green spreader* 它们含有紫杉烷型化合物的混合物。紫杉醇也可通过植物的细胞培养及霉菌中得到。试剂级的紫杉醇市场上可以买到, 例如 Aldrich 化学公司, 该产品号为 NO. 41,701-7; Sigma 化学公司, 该产品号为 T7002, T1912, 两种编号的产品来源不一样; Fluka 化学公司的产品编号为 NO. 86346, ICN 生物医药公司的产品编号为 NO. 25 193532。

在各种原料中, 紫杉醇的浓度是特别低, 例如在短叶红豆杉皮中, 其含量在 0.0004 - 0.08% (重量比) 之间。从含量那样低的原料中, 提取并纯化供临床用的化合物, 是很困难的, 要推向市场, 更是不现实。

目前, 关于紫杉醇的提取和纯化方法, 已有几个报道。Wani 等, *J. Am. Chem. Soc.* 93,9: 2325 - 2327 (1971), 该文介绍, 短叶红豆杉的茎皮用乙醇提取, 浓缩提取液, 有氯仿和水提取, 紫杉醇溶于氯仿相。进一步的纯化是采用硅酸镁、交联葡聚糖和硅胶柱层析。30

国立癌症研究所 (NCI) 的方法 (1983 年) 是用甲醇提取短叶红豆杉的树皮, 接着用二氯甲烷自提取液中萃取。蒸干二氯甲烷, 加丙酮溶解, 再加正己烷沉淀除杂质, 溶液部分进一步用柱层析纯化。

上述两个方法产率都很低, 少于 0.02%。不可能得到市售数量的产品。这是因为有各种其它紫杉烷共存, 例如与紫杉醇极其相似的三尖杉宁碱, 它们在结构上及物理性质上都很相似, 图 1 表明了两者的化学结构。

在 Potier 等 (J. Nat. Prod., 47, 1: 131 - 137[1984]) 制订的方法里, 将国立癌症研究所方法中沉淀步骤, 改为溶剂对萃取, 即用极性递增的各种溶剂, 进行连续萃取。经氧化铝和硅胶柱层析后, 紫杉醇被富集, 但与三尖杉宁碱共存。最后用 HPLC 分离紫杉醇与三尖杉宁碱, 其产率比用 Wani 等的方法或 NCI 的方法都高得多。

Potier 等的方法和 Wani 等及 NCI 方法一样, 存在着一个主要的障碍, 就是要采用多次常规层析方法来分离具有近似分离参数的各种紫杉烷, 才能得到紫杉醇纯品。为了得到足够量的达到临床要求纯度的产品, 必须进行大规模的多次常规层析分离, 这就要消耗大量资金, 因此, 大批生产实际上是不可能的。

由于紫杉醇和三尖杉宁碱在结构上和性质上的极其相似性, 反复多次分离是必需的。如图 1 所示, 两者的差别仅在于, 紫杉醇侧链上的氨基是同苯甲酸进行酰化的, 而三尖杉宁碱侧链上的氨基是含双键的顺芷酸酰化的。

分离紫杉醇和三尖杉宁碱的非层析方法已有报道。例如将三尖杉宁碱的侧链上双键进行化学改造。例如 Kingston 等 (J. Nat. Prod., 55: NO. 2,259 - 261[1992]) 报道, 在氧化锇 (OsO_4) 存在条件下, 催化氧化三尖杉宁碱侧链双键, 得到二醇, 然后用层析和重结晶方法来与紫杉醇分离。这个方法的问题在于, 它采用未经纯化的紫杉烷混合物, 而 OsO_4 的催化氧化是不适用于粗提物的, 因为它氧化三尖杉宁碱侧链上双键的选择性太低。当然, 如果这个方法能用的话, 将大大降低萃取和纯化过程的价格。另外, OsO_4 有严重的毒性, 不适用于制药工业。

在美国专利 (Nos. 5,334,732 和 5,336,648 Murray 等) 中, 介绍了用臭氧氧化三尖杉宁碱侧链的方法。该方法用臭氧氧化粗提物, 将会产生许多不希望发生的反应。臭氧分介反应是很强的、而且无选择性, 它能

因紫杉醇和三尖杉宁碱中的许多官能团发生不希望的氧化反应。例如同紫杉醇分子中的醛、酮、胺等反应，或者同紫杉醇及三尖杉宁碱的紫杉烷环上的双键反应。此外，臭氧发生器，设备也很昂贵。

5 这样，自含有复杂的紫杉烷的生物量的粗提混合物中，或者极而言之，自主要含有紫杉醇和三尖杉宁碱较纯的混合物中分离和纯化紫杉醇，当前还是局限于上述的非经济的层析技术和非选择性的氧化方法。因此，需要一个经济实用的方法。以便自紫杉醇与三尖杉宁碱混合物中以及其它非常相似的紫杉烷中分离纯化出有价值的抗癌化合物紫杉醇。

10 因此，本发明就是提供一个比现有方法更简单，更经济有效的方法，分离纯化重要的化疗化合物紫杉醇。

发明概要

15 为了达到上述目标，本发明提供一个新的、独特的方法，自含有紫杉醇的紫杉烷型复杂混合物的生物材料粗提中，分离纯化紫杉醇，尤其是自短叶红豆杉 (*T. brevifolia*)、欧洲红豆杉 (*T. baccata*)、云南红豆杉 (*T. yunnanensis*) 和西藏红豆杉 (*T. wallichiana*) 生树皮中，以及从植物原料如各种红豆杉的针叶和树枝中分离纯化紫杉醇。本发明方法进一步包括由紫杉的细胞培养和产生紫杉醇的霉菌中所得到的紫杉醇的进一步纯化。

20 一方面本发明提供了一个自有机原料中，尤其是紫杉烷混合物中分离纯化紫杉醇的方法，方法包括有机溶剂萃取，得到含有紫杉醇的组合物，接着层析分离紫杉醇和其它紫杉烷。最好再用闪式色谱 (Flash Chromatography)，以硅胶为吸附剂的正相色谱进行分离，得到含有紫杉醇、三尖杉宁碱和其它紫杉烷的精制混合物。采用适合于三尖杉宁碱不饱和支链选择卤化的条件，将该精制混合物与卤素，最好是溴进行卤化反应，得三尖杉宁碱二卤代非对映异构体的混合物；这样，紫杉醇就25 很容易从混合物中分出，产率很高。

30 本发明的另一方面，自粗提的有机物质中分离纯化紫杉醇方法的每一步，都伴随有三尖杉宁碱的选择性卤化，不论是粗提的混合物还是主要含有紫杉醇、三尖杉宁碱和其它紫杉烷的精制混合物，用常规的层析技术提取和纯化之前或之后，都要进行三尖杉宁碱的选择性卤化。

本发明的再一个方面，是通过对三尖杉宁碱的新型的化学改造，使紫杉醇能同与之十分相似的三尖杉宁碱高效地、经济地并实际上是定量

地分离出来。

本发明的紫杉醇和三尖杉宁碱的分离和纯化的方法具体如下所述：

1.一种从含有紫杉烷混合物的有机原料中分离和纯化紫杉醇的方法，所述方法包括：

- 5 (1) 从上述有机原料中提取含有紫杉化合物的组合物；
- (2) 从所述组合物中层析分离含有紫杉醇、三尖杉宁碱和其它紫杉烷的混合物，然后
- (3) 选择有效条件，将混合物与卤素反应，选择性地将三尖杉宁碱转变成二卤代三尖杉宁碱的非对映异构体混合物；然后
- 10 (4) 从上述混合物中，分离紫杉醇。

2.上述1的方法，其中有机原料用第一萃取溶剂萃取后，蒸发得到含紫杉醇的第一残渣；然后用第二萃取溶剂萃取第一残渣，再蒸发，得到含紫杉醇的第二残渣，接着进一步用结晶法纯化第二残渣。

- 15 3.上述2的方法，其中第一萃取溶剂是甲醇，含紫杉醇的第一残渣被分配于水相和选自下列的有机相之间：二氯甲烷、二氯乙烷和氯仿，该残渣经所述溶剂萃取后，干燥，得第二残渣，将此含紫杉醇的第二残渣溶于丙酮中，加己烷沉淀出非极性杂质，再将此丙酮-己烷溶液蒸发到原体积的1/3，得到含紫杉醇的粘稠状第三残渣。

4.上述3的方法，其中所述溶剂和水的体积比1: 1。

- 20 5.上述3的方法，其中向粘稠状第三残渣中加入10倍体积的己烷，析出浅黄色沉淀，形成含紫杉醇的固体第四残渣。

- 25 6.上述4的方法，进一步包括将第四固体残渣溶于丙酮与二氯甲烷和/或二氯乙烷的混合溶剂中，通过硅胶柱和色谱溶剂进行闪式色谱分离，将含有紫杉醇和三尖杉宁碱混合物所得的各级分合并、蒸干，得到含紫杉醇的第五残渣。

7.上述6的方法，其中所述色谱所用的溶剂是丙酮与二氯甲烷或二氯乙烷的混合物，其体积比是1: 9到3: 7。

8.上述6的方法，其中将第五残渣溶于选自下列的氯代溶剂中： CCl_4 、 CHCl_3 、 $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ 或 CH_2Cl_2 ，并与卤素反应。

- 30 9.上述8的方法，其中所说的卤素是溴。
- 10.上述9的方法，其中溴溶于卤代溶剂中，其浓度为0.01M到0.1M。
- 11.上述10的方法，其中溴化反应在温度 -20°C 到 20°C 和黑暗条件

下进行。

12.上述 11 的方法，其中存在于上述氯代溶剂中的三尖杉宁碱基本上完全转变成二溴代三尖杉宁碱非对映异构体混合物，然后从该反应混合物中分离紫杉醇。

5 13.上述 12 的方法，其中含紫杉醇的有机物质选自：短叶红豆杉的树皮、红豆杉各品种的植物原料，红豆杉各品种的细胞培养物以及能产生紫杉醇的霉菌。

10 14.上述 12 的方法，其中通过硅胶层析，将紫杉醇自反应混合物中分离出来，层析用的洗脱液是丙酮与二氯甲烷或二氯乙烷的混合物，其体积比是 1: 9 到 3: 7。

15.上述 12 的方法，其中分离出的紫杉醇在丙酮与己烷混合物中结晶，使紫杉醇析出。

15 16.一种从含有紫杉醇和三尖杉宁碱混合物中分离紫杉醇的方法，所述方法包括以下步骤：a) 将该混合物与卤素反应，反应温度和时间应充分保证，让三尖杉宁碱基本上完全被卤化；b) 将紫杉醇与三尖杉宁碱卤代衍生物分离。

17.上述 16 的方法，其中所述卤素可选用氟、氯、溴或碘。

18.上述 17 的方法，其中所述卤素是溴。

19.上述 18 的方法，其中溴的浓度是 0.01M 到 0.1M。

20 20.上述 16 的方法，其中反应 a) 的温度范围是 -20℃ 至 20℃。

21.上述 19 的方法，其中溴溶于氯代溶剂 CCl_4 、 CHCl_3 或 CH_2Cl_2 中。

22.上述 21 的方法，其中氯代溶剂是 CCl_4 或 CHCl_3 。

23.上述 16 的方法，其中反应 a) 在黑暗条件下进行。

25 24.上述 16 的方法，其中 b) 步分离是采用硅胶层析，选用适当溶剂作洗脱液。

25.上述 24 的方法，其中溶剂是丙酮与二氯甲烷或 1,2 二氯乙烷的混合物，其体积比是 1: 9 到 3: 7。

26.上述 25 的方法，其中含紫杉醇的各个部分，蒸干成固体残渣。

30 27.上述 26 的方法，其中用结晶法进一步纯化紫杉醇。

28.上述 27 的方法，其中固体残渣被溶于丙酮中。

29.上述 28 的方法，其中紫杉醇从己烷内结晶析出。

30.上述 25 的方法，其中紫杉醇与 2", 3"-二溴代三尖杉宁碱的非对映异构体混合物分离。

31.上述 16 的方法，其中反应 a)用 HPLC 监测。

32.上述 16 的方法，其中混合物是来自含有紫杉醇的原料。

- 5 33.上述 32 的方法，其中含紫杉醇原料选自：短叶红豆杉树皮，红豆杉各品种的植物原料、红豆杉各品种的细胞培养物以及能产生紫杉醇的霉菌。

参考下面有关本发明的具体方案、实例和附图的详细描述，将有助于对本发明的充分理解。

10

附图简要说明

图 1，紫杉醇和三尖杉宁碱结构的一般表达。

图 2，能按本发明进行卤化的带有各种不饱和支链的几个不饱和紫杉烷和其中的官能团结构的一般表达。

- 15 图 3，较好地体现本发明的一个方面，自短叶红豆杉中分离和纯化紫杉醇的工艺流程图。

图 4，三尖杉宁碱选择性溴化的较好的反应路线图。

图 5，用本发明方法获得的紫杉醇的紫外光谱图。

图 6，用本发明方法制得的紫杉醇的红外光谱图。

图 7a，用本发明方法制得的紫杉醇的质子 (^1H) 核磁共振谱图。

- 20 图 7b，用本发明方法制得的紫杉醇的碳 13 (^{13}C) 核磁共振谱图。

图 8a 和 8b，用本发明方法制得的紫杉醇的电子轰击源质谱 (EI-MS) 图。

图 9，用本发明方法制得的紫杉醇的直接化学电离源质谱 (DCI-MS) 图。

- 25 图 10，用本发明方法制得的紫杉醇的快原子轰击源质谱 (FAB-MS, 正离子型) 图。

图 11，用本发明方法制得的紫杉醇的快原子轰击源质谱 (FAB-MS, 负离子型) 图。

图 12，用本发明方法制得的紫杉醇的高效液相色谱图 (HPLC)。

- 30 图 13，用本发明方法制得的紫杉醇的热重分析 (TGA) 图。

图 14，用本发明方法制得的紫杉醇的差示扫描量热 (DSC) 图。

本发明优选实例的详细描述

本发明提供一个简单、经济的方法，从各种生物原料中提取和纯化紫杉醇，如从含有紫杉烷混合物的植物材料中，例如从短叶红豆杉 (*T. brevifolia*, Pacific Yew tree) 和云南红豆杉 (*T. yunnanensis*) 的树皮中，从其它品种的红豆杉针叶和树枝中，以及其它含有紫杉醇的原料，如多种红豆杉的细胞培养品及能产生紫杉醇的霉菌中来提取纯化紫杉醇。

本发明的方法包括选择性卤化，最好是溴化，未被纯化过、部分纯化过或经过纯化的混合物，混合物中含有紫杉醇、三尖杉宁碱和带有不饱和侧链的其它紫杉烷衍生物，卤化结果选择性地使某些紫杉烷的结构变换，但不破坏紫杉醇。

下面是本发明方法的一个具体实例：

含有各种紫杉烷的复杂混合物的生物材料，优选用低级醇，如甲醇、乙醇等提取，混合物最好加工成具有较大的表面体积比，以便提高紫杉醇在最初提取相中的质量转移率，例如用短叶红豆杉树皮为原料，其中含紫杉醇低于 0.1% (w/w)。将树皮粉碎成细碎的混合物，加甲醇提取到认为混合物中的紫杉醇已充分被提取出来。然后将甲醇提取液浓缩(例如旋转蒸发)到原体积的二十分之一。

接着进行进一步的提取，例如将甲醇浓缩物，分配于适当的溶剂如二氯甲烷、氯仿或二氯乙烷和水两相之间，两相体积比最好是 1: 1，这样水溶性成分即被萃取进水相。这些水溶性成分可能是紫杉醇的水溶性苷，和其它极性更大的化合物，这些成分留待进一步加工，制备有用的物质。在本发明的这个实施例中，将含紫杉醇的有机相蒸发成含紫杉醇的残渣，再通过沉淀去杂质进行纯化。例如，将残渣溶于丙酮中，加入等体积的己烷，则非极性杂质呈焦油状沉淀析出，并通过过滤除去。滤去沉淀后的丙酮-己烷溶液被浓缩，再加新鲜己烷，析出的沉淀在 40℃ 下，抽高真空 (1mm 至 2mm) 进行干燥。

在此实施例中，残渣最好溶解于最小量的层析溶剂中，例如二氯甲烷或二氯乙烷中，然后通过硅胶柱，闪式层析。流动相可能是丙酮与二氯甲烷的混合物或丙酮与二氯乙烷的混合物，体积比为 1: 9 到 3: 7。首先流出柱子的几份洗脱液，含有低级性化合物，接着的洗脱液含有不同浓度的紫杉醇和三尖杉宁碱。淋洗结束，用丙酮和甲醇洗硅胶柱子，洗脱液弃去。

合并含有紫杉醇和三尖杉宁碱的各份洗脱液，蒸发成含有紫杉醇的

残渣。此残渣最好溶于氯代溶剂中，如四氯化碳、二氯甲烷、氯仿或二氯乙烷中。在此溶液中，在适合于三尖杉宁碱分子内的不饱和侧链双键（包括其它含紫杉烷的不饱和侧链）的选择性卤化条件下，进行卤化，得到一个二卤代三尖杉宁碱的非对映异构体与紫杉醇的混合物溶液，其中还含有其它侧链卤化了的紫杉烷化合物。虽然所有卤素都能适用，但最好是用溴，因为它卤化效率高，且价格低廉。最好溶液中所有的三尖杉宁碱都完全转变成三尖杉宁碱的二卤代非对映体混合物，以便紫杉醇能容易地自混合物中分离出来。

5 优选在接近 0℃，避光条件下、并剧烈搅拌，使氯代溶剂中的紫杉烷进行溴化。

反应速率最好慢一点，以便控制氢溴酸的产生速率，减少或完全避免紫杉醇残渣的水解。通过色谱分析，例如高效液相色谱分析（HPLC），测定三尖杉宁碱反应完全或基本上反应完全后，停止加溴。主要含有紫杉醇和二溴化三尖杉宁碱异构体的溴化溶剂溶液，首先用稀亚硫酸钠溶液洗涤，接着用碳酸氢钠洗，以除去和中和剩余的溴及反应中产生的氢溴酸。

15 有机相再经水洗涤后，用无水硫酸钠干燥，然后蒸干。固体残渣溶于小量溶剂中，例如二氯甲烷中，通过层析法，可将含三尖杉宁碱的二溴代异构体的级分与含紫杉醇的级分分开，如层析柱为硅胶柱、洗脱液优选为丙酮-二氯乙烷（1: 9, v/v）、借助 TLC（薄层层析）和 HPLC（高效液相色谱）的检测，合并含有紫杉醇的各份洗脱液并蒸干。将得到的固体残渣溶于丙酮中，加己烷使紫杉醇结晶析出。滤出结晶，洗涤，干燥后得最终产物。

上述方法简便易行。紫杉醇和三尖杉宁碱的产品及副产品的分析测定，最好用 TLC 和 HPLC，以避免产物的损失。从上面我们已经看到三尖杉宁碱的卤化，尤其是溴化，是一个新颖的、方便的方法。在将含有紫杉醇和三尖杉宁碱的混合物进行层析分离时，使用该法增加了紫杉醇分离的选择性。与过去报道的化学改造紫杉烷（taxanes）的方法不同，本发明的方法中，溴化反应能够被控制，使紫杉醇不致有明显的损失。

30 图 3 是自短叶红豆杉中分离纯化紫杉醇的一个较好的流程图。图 4 是三尖杉宁碱选择性溴化的一个较好的反应线路图。

按照本发明，分离过程与原料中紫杉醇浓度无关、也与起始原料混

合物的组成无关。因此，本发明的工艺规程也能很方便地应用于其它原料中紫杉醇的分离纯化的下游工程，例如从培养的植物细胞和产生紫杉醇的霉菌中进一步分离纯化紫杉醇。选择性卤化可以在工艺过程中任何一步应用，以利于紫杉醇的分离和纯化。

- 5 混合物中含有三尖杉宁碱和1% - 99.9%的紫杉醇，卤化过程都是相似的。混合物最好溶于大量的氯代溶剂中。例如 CCl_4 或 CHCl_3 中，冷却到接近 0°C ，在搅拌情况下，加入化学计量的（是三尖杉宁碱摩尔当量数的1.2倍）溴的 CCl_4 或 CHCl_3 的稀溶液，直到三尖杉宁碱溴化完全。整个反应在黑暗中进行，温度不超过 20°C ，最好是 5°C ，反应进行程度通过 HPLC 检测控制。溴化结束后，洗涤反应混合物除去剩余的溴。

在所有情况下，溴化三尖杉宁碱和其它不饱和的紫杉烷，紫杉醇的回收率高。利用各种方法，例如层析法和结晶法分离和纯化含有紫杉醇和溴代化合物的混合物。将三尖杉宁碱转换成极性较小的二溴衍生物，使紫杉醇有可能较容易地从混合物中分离出来。

- 15 向混合物中加入溴的摩尔当量数，主要取决于三尖杉宁碱和其它不饱和化合物的浓度。一般来说，纯度较差的混合物（即相对于三尖杉宁碱量来说，不饱和紫杉烷的量较大）需要溴的摩尔数比纯度高的混合物需溴量较大，以便使不饱和紫杉烷溴化完全。图2表明了各种不饱和紫杉烷的结构。如果混合物中不饱和化合物含量较高，例如 taxicin、taxicin - 1、taxinin 和（或）云实醇（brevifoliol，短叶紫杉醇），则要求加入
- 20 溴的摩尔数较多，因为它们吸收的溴多于1摩尔当量。

- 卤化过程所用的溶剂，对于所用的卤素，尤其是溴一定是惰性的。按照本发明，采用的溶剂最好是氯代溶剂，如 CCl_4 、 CHCl_3 、 CH_2Cl_2 、 $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ ，而以 CCl_4 较好。卤化过程的温度，对溴化来说有效的是 -20°C 到 $+20^\circ\text{C}$ ，较好的是 -5°C 到 $+5^\circ\text{C}$ 。进行上述反应较好的试剂是 0.01M 到 0.1M 溴的 CCl_4 或 CHCl_3 溶液。这些试剂，市场上都能买到。
- 25

- 根据常识应当了解，利用卤素，例如用溴来溴化含有几个官能团（它们对溴或其它卤素是灵敏的）的紫杉烷化合物时，紫杉醇或其它列于表2的化合物，将会发生不希望的反应。但是实验发现，三尖杉宁碱侧链双键卤化的选择性特别高，其它含有环外双键的紫杉烷溴化也有很高的选择性。在本发明的方法里，溴化反应期间，紫杉醇既无明显的降解，也不被溴化。但反应如果曝光太长或者卤素过量太多，紫杉醇也会降解成
- 30

几个未知的化合物。在卤化（溴化）期间，定期用 HPLC 监测，则可很容易避免紫杉醇的降解。

实例

下面实例是关于紫杉醇的纯化，是本发明工艺流程的优选实施方案。实验所用的试剂均由制造厂商或供应厂商提供。由产品或副产品得到的紫杉醇和三尖杉宁碱都用薄层色谱（采用 Merck # 5554, F₂₅₄ 硅胶板）和 HPLC 监测。HPLC 系统由 Waters（沃特斯）510 泵，660E 系统控制器，712WISP 或 710E WISP 自动进样器，Waters 490 程序控制多波长检测器，Waters 990 光敏二极管序列检测器，NEC APCIV 计算机，Waters
10 LambdaMax 481 型分光光度计和数据处理单元组成。HPLC 柱包括 3.9mm × 300mm 苯基反相 Waters μbondapak 柱和苯基防护柱。闪式色谱所用的硅胶是购自 ICM 生物医学公司（Biomedicals）的 32 - 63mm 筛孔的硅胶。

应当了解，下面例子仅是为了解释本发明，而不是用来限制本发明或权利要求的范围或精神。

15

例 1

自粗生物材料样品中纯化紫杉醇

第一步

将短叶红豆杉（*Taxus brevifolia*）的树皮切成 2 - 4mm 大小。其中紫杉醇含量为 0.03 - 0.1% w/w。将 45 公斤树皮置于不锈钢罐内。用 150
20 升甲醇提取三次，每次提取时间为 5 天，令提取物频频再循环，以促进混合。采用旋转蒸发浓缩提取液到 10 - 15 升。提取温度不超过 40℃。结果 99% 的紫杉醇能被提取到甲醇相。

第二步

由第一步得到的甲醇提取液的浓缩物，分配于两相中，例如二氯甲烷或二氯乙烷及其类似物与水两相中。将等体积的二氯甲烷和水加入到
25 15 升甲醇提取物中。混合物缓慢搅拌 15 分钟，静置 2 小时，两相分层。二氯甲烷相用于进一步分离紫杉醇。根据检测，若水相中仍含有紫杉醇，则用二氯甲烷再萃取，合并两次萃取后的二氯甲烷相。若萃取过程中发生乳化，则加 0.5 - 1 升甲醇破乳。将二氯甲烷萃取物旋转蒸发到干。固
30 体残渣在 0.9 - 1.1kg 之间，紫杉醇的含量为 1.8 - 2.2% w/w。在整个工艺过程中，温度不得超过 40℃。

第三步

第二步的水相含有紫杉醇苷，10-脱乙酰基浆果赤霉素 III (10-deacetyl baccatin III)，浆果赤霉素 III (baccatin III) 和其它极性化合物。向 35 升水相中加入 5 升盐水溶液后，用 20 升乙酸乙酯萃取，分层。上层乙酸乙酯相含有紫杉醇苷，10-脱乙酰基浆果赤霉素 III，浆果赤霉素 III 及其它极性化合物。下层水相再用乙酸乙酯萃取。合并两次的乙酸乙酯相，约 30-35 升，然后旋转蒸发呈粘稠状棕黑色液体，体积在 2.8-3.2 升之间，储存起来，可进一步从中分离出苷。

第四步

将第二步得到的二氯甲烷固体残渣，溶于 2 升丙酮中。在强烈搅拌下，加入等体积己烷。在此条件下，极性杂质沉淀析出。静置澄清，倾析出上清液，进一步加工。用丙酮-己烷 (1: 1, v/v) 洗沉淀，过滤；滤液与前面倾析出的上清液合并，旋转蒸发到原体积的 1/3，得到 1.5-3.0 升的黄棕色的粘稠状残渣。

第五步

第 4 步得到的丙酮-己烷残渣滴加到 10~15 升己烷中，边加边强烈地搅拌。亮黄色的沉淀开始形成。经过将近 8 个小时，滤出沉淀在 40℃ 下，真空 (1mm 到 2mm) 干燥，得到产物约 0.5-0.6kg。

第六步

第 5 步得到的固体残渣，溶于 0.5 升丙酮-二氯甲烷 (1: 9, v/v) 中。利用硅胶柱，进行闪式色谱分离，上述相同溶剂作流动相。柱中装填的硅胶在 3.5-4kg 之间。每份收集洗脱液的体积为 1 升。用 TLC 和 HPLC 监测每个样品。三尖杉宁碱与紫杉醇同时洗脱下来。合并含有三尖杉宁碱和紫杉醇的级分，旋转蒸发到干。固体残渣是紫杉醇和三尖杉宁碱粗的混合物，约 55 克到 70 克，含 45-55% (w/w) 的紫杉醇，或 36g 到 40g 紫杉醇。

第七步

由第 6 步得到的紫杉醇和三尖杉宁碱混合物，经测定含 28.8% (w/w) 的三尖杉宁碱和 51.2% (w/w) 的紫杉醇，经化学改造后，分离紫杉醇和三尖杉宁碱。将 10g 粗的混合物溶于 1 升氯代溶剂中，如 CCl_4 ， CHCl_3 ， CH_2Cl_2 和二氯乙烷中。较好体现本发明的做法是，在 0℃，强烈搅拌条件下，用 0.01M 溴的 CCl_4 溶液与上述粗的混合物溶液，避光缓慢地进行反应。反应过程用 HPLC 监测。当三尖杉宁碱完全参加反应了，

则终止溴化反应。用亚硫酸钠水溶液洗去痕量剩余的溴。反应期间生成的氢溴酸，用碳酸氢钠稀溶液（0.5%，w/w）洗去。最后的有机提取物经无水硫酸钠干燥后，旋转蒸发得固体残渣，重量为 13.2g。

5

第 8 步

从第 7 步制得的溴化残渣溶于丙酮 - 二氯甲烷混合物（1: 9, v/v）中，通过硅胶柱进行层析分离。收集的各级分用 TLC 和 HPLC 检测。将含有紫杉醇的各部分合并，旋转蒸发到干。得到的白色固体残渣，重 6.1g。

10

第 9 步

将第 8 步制得的残渣溶于丙酮中，加等体积的正己烷或己烷使紫杉醇结晶析出。晶体用冷丙酮 - 己烷（1: 1, v/v）洗涤后，在 40℃真空干燥。得到的固体结晶 4.84g，通过 HPLC 测定，其中紫杉醇含量 >97%，w/w。

15

例 2

部分纯化过的三尖杉宁碱的溴化

将 0.63g 含有 91.5% 三尖杉宁碱（0.0007 摩尔）和 6 - 7% 紫杉醇的样品，溶于 150ml CCl_4 中，加入到 500ml 园底三口烧瓶内，烧瓶上装有一个 250ml 分液漏斗。将烧瓶浸于冰盐浴内，当温度达到 -5℃，将溴的（0.1221g） CCl_4 溶液（76.31mL, 0.01M）在搅拌情况下，缓慢地加入烧瓶中，通过调整加入溴的速率，控制反应速度，使反应温度不致超过 5℃。三尖杉宁碱对溴的摩尔比为 1: 1.1。加溴的时间约需 3 小时，反应结果的溶液呈混浊的浅棕色。

利用 HPLC 每个小时取样分析，监测溴化反应进行的程度。根据 HPLC 的测定，当所有的三尖杉宁碱转变成 2", 3" - 二溴衍生物时，溴化就完成了，总共需要 8 个小时。由于溴逐渐被消耗，反应混合物呈浅黄色至无色。

接着将反应混合物转移到 1 升的分液漏斗中，先后用 0.5% 亚硫酸钠水溶液（300mL）、0.5% 碳酸氢钠水溶液（300ml）洗涤，最后用去离子水（每次 200ml）洗两次，使 pH 值达到 6.5。合并水相，用 CH_2Cl_2 萃取一次。将萃取后的 CH_2Cl_2 相与前面的有机相萃取物合并，加 Na_2SO_4 干燥后，过滤，滤液蒸干，得到 0.76g 浅奶油色固体，根据原料计算，产率

接近 100%。

将得到的奶油色固体产物，在硅胶柱上（50g，ICN Silitech, 32 - 63D, 60A）进行柱层析，洗脱液为丙酮 - CH_2Cl_2 （10: 90）。收集洗脱液，每 50ml 一份，通过 TLC（Silicagel 60 F₂₅₄, Merck *5554, 展开剂为丙酮 - CH_2Cl_2 （20: 80）；显色剂为香草醛 - 硫酸的甲醇溶液）进行监测。合并仅出现一个斑点（ $R_f = 0.64$ ）的各部分（第 26 - 38 份），浓缩到干，得 0.485g 浅奶油色到白色的结晶，mp（熔点）：158℃，经鉴别为 2'', 3'' - 二溴代三尖杉宁碱。以原料三尖杉宁碱为基础，产率约为 70%。

10

例 3

含有三尖杉宁碱，紫杉醇和

其它紫杉烷型化合物的粗混合物的溴化

采用与例 2 相似的装置，将紫杉醇粗产品 2g（根据 HPLC 测定，含 51.2% 紫杉醇，28.8% 三尖杉宁碱和约 20% 其它紫杉烷及非紫杉烷杂质）溶于 150mL CCl_4 和 150mL CH_2Cl_2 中，溶液呈透明的浅黄色。将烧瓶浸入冰盐水中，并搅拌溶液。当温度达到 -5℃，加入溴溶液（0.1332g 纯溴溶于 83.13mL（0.01M） CCl_4 中，1M 三尖杉宁碱：1.2M 溴），控制加溴的速度，保持反应混合物的温度低于 5℃。整个加溴过程约需 3 小时，最后溶液呈棕黄色混浊液。加溴结束后，让反应在相同条件下，继续进行 8 小时，每小时用 HPLC 测定紫杉醇和三尖杉宁碱的含量。溶液呈浅黄色或无色后反应完成，所有的三尖杉宁碱都转变成二溴代衍生物。如果 8 小时后，溶液中仍有 1 - 2% 的三尖杉宁碱，则在反应起始条件下，再滴加 10mL 0.01M 的溴 CCl_4 溶液，继续反应 1 小时，再取样用 HPLC 分析。

25

剩余在反应混合物中的溴，通过用 0.5% Na_2SO_3 水溶液（300mL），0.5% NaHCO_3 水溶液（200ml）和去离子水（2 次，每次 200mL）洗涤去除。反应混合物经无水 Na_2SO_4 干燥后，真空浓缩至干，得到 2.35g 浅奶油色到白色的干燥结晶残渣。将此结晶残渣，按例 2 条件，用硅胶柱层析纯化。被分离的混合物与硅胶的比例为 1: 60，这样共需 120g 硅胶。硅胶柱流出的每一份用 TLC 检查，每第 3 份取样用 HPLC 分析。经 TLC 和 HPLC 检查，合并具有相同 R_f 和相同保留时间的各部分。这样得到两部分混合液。第 25 - 39 份，在 TLC 板上 $R_f = 0.64$ 的单一点的，为二溴

30

代三尖杉宁碱。而第 41 - 81 份, $R_f = 0.49$ 的单一点的为紫杉醇。

第 25 - 39 份, 在约 40°C 下, 真空浓缩到干, 得到白色到浅黄色的固体 (0.460g, 理论产率的 66.6%)。

得到的二溴代三尖杉宁碱测定结果如下:

5 m.p. (熔点): 158 - 160°C (色谱纯为 96.19%)

$R_f = 0.64$ (单点), 在硅胶 60 F₂₅₄ 板上,

(Merck, # 5554)

展开剂: 丙酮 - 二氯甲烷 (20: 80)

显色剂: 香草醛 - 硫酸的甲醇溶液

10 质谱测定[FAB]⁺:

$[M+H]^+ = 990, 992, 994$

$[M+Na]^+ = 1014$

$[M+K]^+ = 1030$

15 第 41 - 81 份, 浓缩干燥后, 得到 1.16g 的紫杉醇 (>100% 的理论产率), 采用丙酮/己烷 (50: 50) 重结晶, 过滤, 用与重结晶溶剂比例相同的冷溶剂洗涤, 40°C 下, 真空干燥 24 小时。得 0.902g (根据原料重量, 这相当于理论值的 45.11%; 根据原料中紫杉醇含量的 HPLC 测定, 相当于理论值的 88.1%) 白色结晶。

紫杉醇的 (分离和纯化) 测定结果如下:

20 m.p. 214 - 216°C

$R_f = 0.49$, 标准品在硅胶 60 F₂₅₄ 板上 [Merck # 5554]

展开剂: 丙酮 - CH₂Cl₂ (20: 80)

显色剂: 香草醛 - 硫酸的甲醇溶液

紫外光谱 (甲醇中): 228.4 (297146.8)

(λ_{max} nm, (ϵ)) 206.6 (26540.1)

红外光谱 (KBr, cm⁻¹): 3500, 1105, 1070 (叔和仲 OH)

3430, 1650, 1580 (-CONH-)

3070, 1610, 1520, 780, 710,

(单取代芳香环)

2950, 2910, 1480, 1450, 1370

(CH₃, CH₂, CH)

3020, 1315, 980 (双键)

1730, 1270 (芳香酯)
1715, 1240 (>C=O)
1730, 1180 (乙酸酯)
850 (环氧环)

样品的紫外光谱和红外光谱谱图, 均与纯的紫杉醇的谱图相符。

例 4

自粗的紫杉烷 (Taxanes) 混合物中
分离和纯化紫杉醇, 并作分析测定

- 5 将 10.00g 粗紫杉醇样品溶液 (根据 HPLC 分析, 此样品含 28.8% 三尖杉宁碱, 51.2% 紫杉醇及约 20% 的其它紫杉烷和非紫杉烷化杂质) 溶于 1.5 升 CCl_4 中。所得溶液置于 2.0 升三口烧瓶内, 并将三口烧瓶浸于冰-盐浴中。三口烧瓶上装有一个 500ml 的分液漏斗。回流冷凝管、温度计和磁搅拌器。搅拌反应混合物, 直到温度降到 5°C 。然后在 3 小时过
- 10 程中滴加 41.2ml 的 0.1M 的溴 (0.665g 溴) 的 CCl_4 溶液。三尖杉宁碱和溴的摩尔比率为 1: 1.2。反应整个过程中, 温度不超过 5°C 。加溴结束后, 继续搅拌, 维持温度在 -1 到 5°C 。每小时取样, 用 HPLC 监测反应的进行, 直到所有的三尖杉宁碱都转变成二溴代衍生物 (约 8 小时)。反应
- 15 完成后溶液体积为 1500 - 1600mL, 溶液颜色为浅黄色或奶油色, 这与起始的原料有关, 过量的少量溴的存在亦有影响。

为除去痕量溴, 先后用 0.5% Na_2SO_3 水溶液 (500mL), NaHCO_3 水溶液 (500mL) 和去离子水 ($2 \times 500\text{mL}$) 洗涤反应混合物。反应混合物经无水硫酸钠干燥后, 真空浓缩到干, 得到 13.20g 的浅奶油色到白色的结晶产物。

- 20 按照例 2 和 3 的条件, 采用硅胶柱, 对产物进行层析分离。玻璃柱 $100 \times 5\text{cm}$, 将 600g 硅胶拌成浆状灌入玻璃柱内 (比例 1: 50)。洗脱液为丙酮 - CH_2Cl_2 (10: 90)。最后用 1 升丙酮 - CH_2Cl_2 (25: 75) 淋洗。接收的每一份洗脱液用 TLC 检测, 每第 3 份洗脱液用 HPLC 检测。第 11 - 22 份洗脱液, 在 TLC 板上呈单个斑点, 其 $R_f = 0.64$, 合并后在 Buchi
- 25 旋转蒸发器上, 40°C 下, 真空浓缩蒸干, 得 3.25g (95%) 的 2'', 3'' - 二溴代三尖杉宁碱的白色到浅黄色固体。

产品分析如下:

m.p. (熔点): $158 - 160^\circ\text{C}$ 。

$R_f = 0.64$ (单点), 在硅胶 60 F₂₅₄ 板上 [Merck #5554]

展开剂: 丙酮 - CH₂Cl₂ (20; 80)。

显色剂: 香草醛 - 硫酸的甲醇溶液。

元素分析和分子量如下: (根据 HR FAB⁺);

C₄₅H₅₄NO₁₄⁷⁹Br₂ [M+H]⁺:

计算值: 990.191000

实测值: 990.191103 (Δm = 0.1ppm)

C₄₅H₅₄NO₁₄⁷⁹Br⁸¹Br [M+H]⁺:

计算值: 992.181000

实测值: 992.189057 (Δm = 8.1ppm)

C₄₅H₅₄NO₁₄⁸¹Br₂ [M+H]⁺:

计算值: 994.175000

实测值: 994.187011 (Δm = 12.1ppm)

C₄₅H₅₃NO₁₄Na⁷⁹Br⁸¹Br [M+Na]⁺:

计算值: 1014.161000

实测值: 1014.172002 (Δm = 9.9ppm)

C₄₅H₅₃NO₁₄K⁷⁹Br⁸¹Br [M+K]⁺:

计算值: 1030.097000

实测值: 1030.144940 (Δm = 46.5ppm)

紫外光谱 (CH₃OH 中): [λ_{max} nm, (ε)] 274.2 (1550.8); 227.1 (18610.4); 221.8 (18325.1)

红外光谱 (KBr) (cm⁻¹): 3500, 1105, 1070 (叔和仲 OH)
3420, 1670, 1580 (-CONH-)
3110, 3060, 1605, 1505, 770,
710 (单取代芳香化合物)
3060, 2960, 2915, 2870, 1465,
1370, (-CH₃, -CH₂-, =CH-)
3020, 1670, 1310, 980 (双键)
1730, 1270 (芳香酯)
1715, 1240 (>C=O)
1730, 1180 (乙酸酯)
855 (环氧环)

	520 (溴代化合物)
质子核磁共振(CDCl ₃ 中)(300MHz):	1.94 (d, 3H, -COC(Br)CH ₃ -5")
(ppm; 仅侧链质子)	1.98 (d, 3H, -HC(Br)CH ₃ -4")
	4.63 (qt, 1H, - ¹ CH(Br)-3")
¹³ C核磁共振(300MHz)	170.21 和 170.25(C-1')
(ppm; 仅侧链C)	172.26 和 172.32(C-1")
	72.76 和 72.90 (C-2')
	69.71 和 69.88 (C-2")
	54.34 和 54.52 (C-3)
	55.13 和 55.35(C-3")
	30.39 和 30.77 (C-4")
	27.21 和 27.62 (C-5")
电子轰击电离质谱: [M] ⁺ (m/z)	568, 551, 509, 491, 449, 431, 405,
(主要碎片)	391, 386, 329, 326, 308, 278
	264, 245, 217, 200, 188, 159, 149,
	122, 105, 91, 83, 77, 55, 43。
直接化学电离源质谱: [M+H] ⁺ (m/z)	569, 552, 510, 492, 474, 450, 432,
(主要碎片)	424, 392, 387, 370, 329, 327,
	309, 279, 265, 264, 246, 218, 200,
	188, 167, 149, 125, 124, 106,
	101, 100, 91, 83, 69。
FAB ⁺ -MS: (M/Z)	1030[M+K] ⁺ ; 1014[M+Na] ⁺ ; 992
	[M+H] ⁺ (见元素分析);
	974[M-H ₂ O] ⁺ ; 932[M-AcOH] ⁺ ; 914
	[M-AcOH-H ₂ O] ⁺ ; 912[M-HBr] ⁺ ; 870
	[M-BzOH] ⁺ ; 854[870-H ₂ O-2H];
	832[M-2HBr] ⁺ ; 705[M-243-Ac] ⁺ ;
	569[T] ⁺ ; 551[T-H ₂ O];
	509[T-AcOH] ⁺ ; 491[T-AcOH-
	H ₂ O] ⁺ ; 448[T-BzOH] ⁺ ;
	429; 424[SH ₂] ⁺ ; 413; 405[S-H ₂ O] ⁺ ;

391[S-O-H₂O]⁺;
 387[T-AcOH-BzOH]⁺; 376; 347
 [S-O-CO-HCHO]⁺; 338:
 327[387-AcOH]⁺; 315; 284[327-
 Ac]⁺; 279; 264[832 - T]⁺or
 [424-2HBr]⁺; 246[264-H₂O]⁺; 231;
 218[264-HCOOH]⁺; 188;
 167[S-C₅H₈ONBr₂]⁺; 149[167-H₂O]⁺;
 133; 122[BzOH]⁺; 113:
 105[Bz]⁺; 91[C₇H₇]⁺; 83; 77[C₆H₆]⁺;
 76; 57; 55;
 (T = 化合物中紫杉烷环; S - 化合物
 中酸(侧)链)

HPLC:

条件 1:

柱 CN 10 μ (250 x 4.6mm)
 流动相 CH₃CN: H₂O(40: 60)
 流速 1mL/min
 Waters 490 紫外检测器, 波长 227nm
 进样体积 20 μ L
 RT_{2'', 3''}-二溴代三尖杉宁碱 26.06 分。

条件 2:

柱: Curosil G 6 μ (250 x 3.2mm)
 流动相 CH₃CN: H₂O(45: 55)
 流速 0.75mL/min
 Waters 490 检测器, 波长 227nm
 进样体积 20 μ L
 RT_{2'', 3''}-二溴代三尖杉宁碱 2 非对映异构
 体:

$$RT_I = 23.53$$

$$RT_{II} = 24.50$$

热重分析 (TGA):

温度 (稳定性%) 28.04 $^{\circ}$ C
 (100.0%), 100.00 $^{\circ}$ C (99.64%),

150.00°C(98.88%),175.00°C(95.35%),
180.00°C(86.74%), 200.00°C
(60.38%), 250.00°C(45.03%)。

示差扫描量热法 (DSC): 173.76°C, 187.73°C

从第 26 - 68 份, 每份经 TLC 检测, 仅出现一个斑点 ($R_f = 0.49$, 与紫杉醇标准品相符), 经 HPLC 检测, 仅出现一个峰。将这些部分合并, 在 40°C 下, 采用 Buchi 旋转蒸发器, 真空浓缩干燥, 得到 6.10g 白色固体。将此固体置于 60mL 丙酮 - 己烷 (50: 50) 结晶, 过滤, 用同样比例的冷溶剂洗涤, 在 40°C 下, 高真空干燥 24 小时, 得到 4.84g (92%) 白色固体结晶。与紫杉醇标准品相比较, 确定为紫杉醇。

纯化过的紫杉醇分析如下:

10 m.p. (熔点): 214°C - 216°C

TLC

$R_f = 0.49$ (有紫杉醇标准品作对照)

硅胶 60F₂₅₄ 板 (merck #5554)

展开剂: 丙酮 - CH₂Cl₂ (20: 80)

15 显色剂: 香草醛 - 硫酸的甲醇溶液

元素分析:

C ₄₇ H ₅₁ O ₁₄ N:	% C	% H	% N
计算值:	66.11	6.02	1.64
实测值:	65.97	5.89	1.63

图 5

紫外光谱 (甲醇中):

(λ_{max} nm (ϵ)) 227.2 (29824.1)

图 6

208.0 (26256.3)

红外光谱 (KBr) (cm⁻¹)

3500, 1105, 1070, (叔和仲. OH)

3430, 1650, 1580(-CONH-)

1610, 1520, 780, 710 (单取代芳环)

2950, 2910, 1480, 1450, 1370 (-CH₃,
-CH₂-,>CH- 基)
3020, 1315, 980 (双键)
1725, 1270 (芳香酯)
1710, 1240 (>C = O)
850 (环氧环)

图 7a

质子核磁共振谱:
(300 MHz; CDCl₃) (ppm) 1.88 (S, 1 OH, C-1); 5.66 (d, 1H, C-2);
3.82(dd, 1H, C-3); 2.38 (S, 3H, CH₃COO, C-
4); 4.94 (dd, 1H,C-5);
1.88 (ddd, 1H, C-6); 2.48 (ddd, 1H,C-6)
2.53 (d, 1 OH, C-7); 4.38 (dd, 1H, C-7)
6.27 (S, 1H, C-10); 2.23 (S, 3H, CH₃COO,
C-10); 6.20 (Qt, 1H, C-13)
2.27 (ddd, 1H, C-14); 2.33 (dd, 1H, C-14);
1.13 (S, 3H, C-17);1.23 (S, 3H, C-18); 1.78
(S, 3H, C-18); 1.68 (S, 3H, C-19); 4.20 (dd.
1H, C-20); 4.30 (S, 1H, C-20); 3.77 (S, 1H,
C-2'); 4.78 (ddd, 1H, C-2'); 5.20 (ddd, 1H,
C-3), 7.10 (d, 1H, N-1); 7.30÷7.53(m. 10H, P-
和 m -芳环上的质子 A₁ B₁, &C₁); 7.64 (t 1H,
A₁-P); 7.72 (dd, 2H, C₁-O); 8.11 (dd, 2H, A₁-
O).

图 7b

^{13}C 核磁共振谱 (300MHz, CDCl_3) (ppm) 79.1(C-1); 75.1(C-2); 45.8(C-3); 81.2(C-4); 84.4(C-5); 35.6(C-6); 72.1(C-7); 56.7(C-8); 203.6(C-9); 75.6(C-10); 133.3(C-11); 141.9(C-12); 72.3(C-13); 35.7(C-14); 43.2(C-15); 21.8(C-16); 26.9(C-17); 14.7 (C-18); 9.5(C-19); 76.5(C-20); 73.3(C-2'); 55.1(C-3') 20.7($\text{CH}_3\text{COat C-10}$); 22.6 (CH_3CO , C-4); 170.3 (CH_3CO , C-10); 171.1(CH_3CO , C-4); 167.0 (ArCO-A_1); 167.0 (ArCO-C_1); 172.7(phISCO-); 129.3 (aC-C_1); 133.8(aC-B_1) 138.1(aC-C_1); 130.3(O-C, A_1); 127.0(O-C, B_1); 127.0(O-C, C_1); 128.7(m-C, A_1); 128.6(m-C, B_1); 129.0(m-C, C_1); 133.6(p-C, A_1); 131.9(p-C, B_1); 128.3(p-C, C_1)

图 8a 和 8b

电子撞击电离质谱:
 $[\text{M}]^+ = 853$ (m/z, 主要碎片) 568 $[\text{T}]^+$; 550 $[\text{T-H}_2\text{O}]^+$; 508 $[\text{T-AcOH}]^+$; 490 $[\text{T-AcOH-H}_2\text{O}]^+$; 448 $[\text{T-2AcOH}]^+$ or $[\text{T-BzOH}]^+$ 386 $[\text{T-AcOH-BzOH}]^+$; 326 $[\text{T-BzOH-2AcOH}]^+$; 308 $[326-\text{H}_2\text{O}]^+$; 286 $[\text{M-T}]^+$ 或 $[\text{S}]^+$; 280; 268 $[\text{S-O}]^+$; 240 $[\text{S-O-CO}]^+$; 210 $[\text{S-O-CO-HCOH}]^+$; 122 $[\text{BzOH}]^+$; 105 $[\text{Bz}]^+$; 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$; 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$; 51; 43 $[\text{Ac}]^+$.

直接化学电离质谱: $[\text{M+H}]^+ = 854$ (m/z; 主要碎片) 569; 551; 509; 492; 449; 387; 327; 311; 287; 269; 240; 224; 222; 210; 165; 149; 123; 105; 92; 71。

图 10

快原子轰击质谱 (正离子) (m/z; 主要碎片) 892 $[\text{M+K}]^+$; 876 $[\text{M+Na}]^+$; 854 $[\text{M+H}]^+$; 569; 551; 523; 509; 495; 369; 327; 286; 240; 210; 277; 155; 149; 119; 105; 85; 69。

图 11

快原子轰击质谱 (负离子) 852 $[\text{M-H}]^-$

图 12

HPLC

柱

苯基键合柱 (μ Bondapak Phcnyl)

流动相

CH₃CN : CH₃OH : H₂O-32 : 20 : 48

流速

1mL/min

检测器

Waters 490, 波长 227nm

进样体积

20 μ L

图 13

热重分析法:

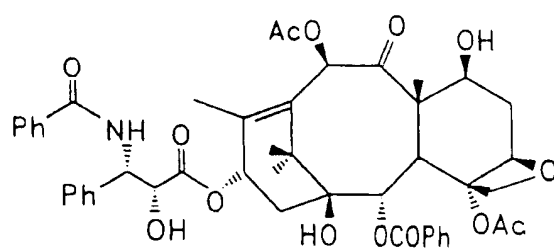
温度(稳定性): 50.00 $^{\circ}$ C(100.0%), 205.00 $^{\circ}$ C
(99.86%), 215.00 $^{\circ}$ C(99.10%), 220.00 $^{\circ}$ C
(92.19%), 250.00 $^{\circ}$ C(56.66%), 275.00 $^{\circ}$ C
(45.92%)。

图 14

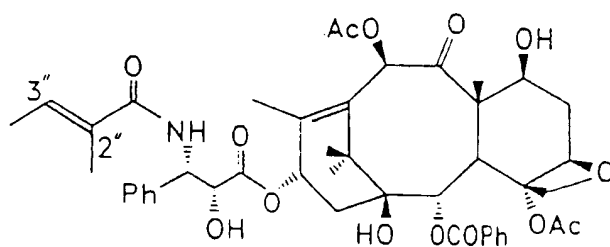
示差扫描量热法:

210.85 $^{\circ}$ C水含量 (% H₂O):

0.90 % (Karl Fischer)

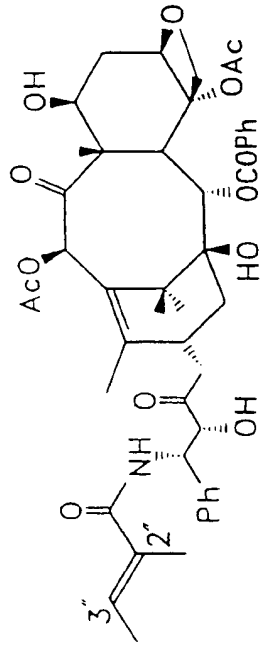


紫杉醇 (PACLITAXEL)

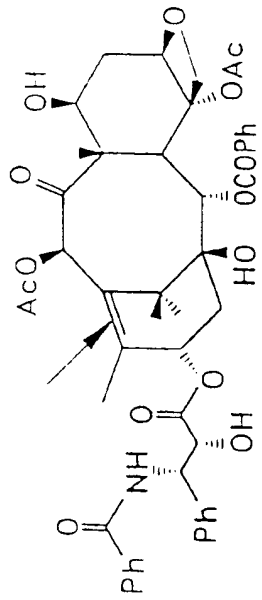


三尖杉宁碱 (CEPHALOMANNINE)

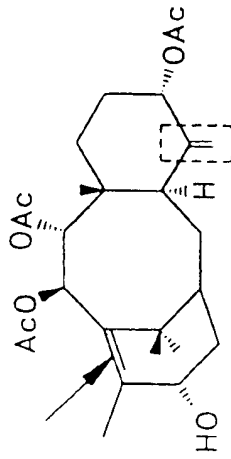
图 1



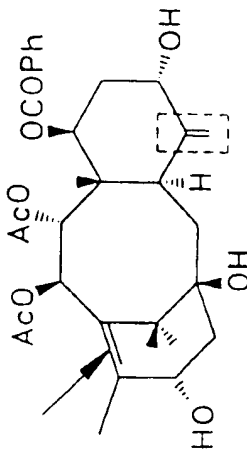
2. 三尖杉宁碱



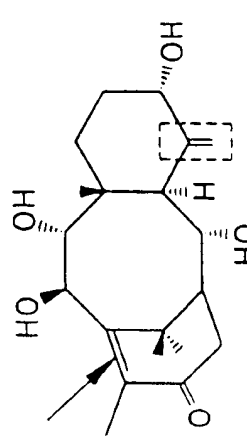
1. 紫杉醇



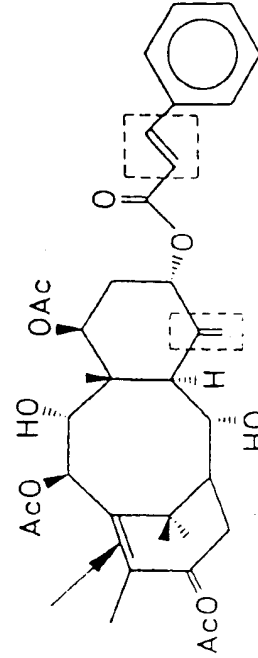
紫杉素 (Taxusin)



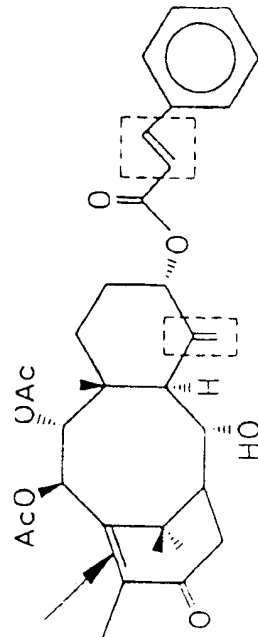
云实醇 (Brevifolol)



TAXICIN-II



TAXININ



TAXICIN-I

图 2

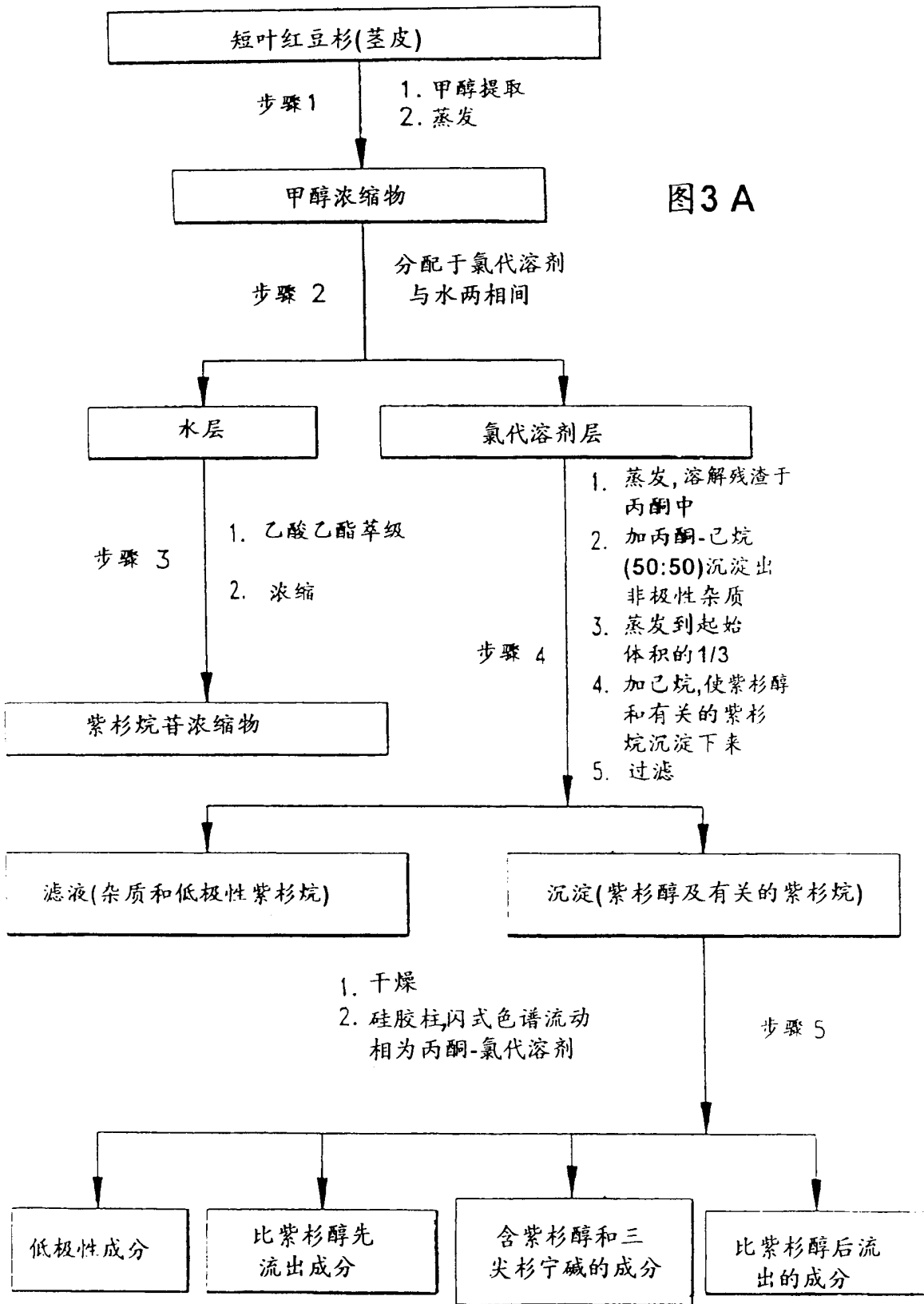


图3 A

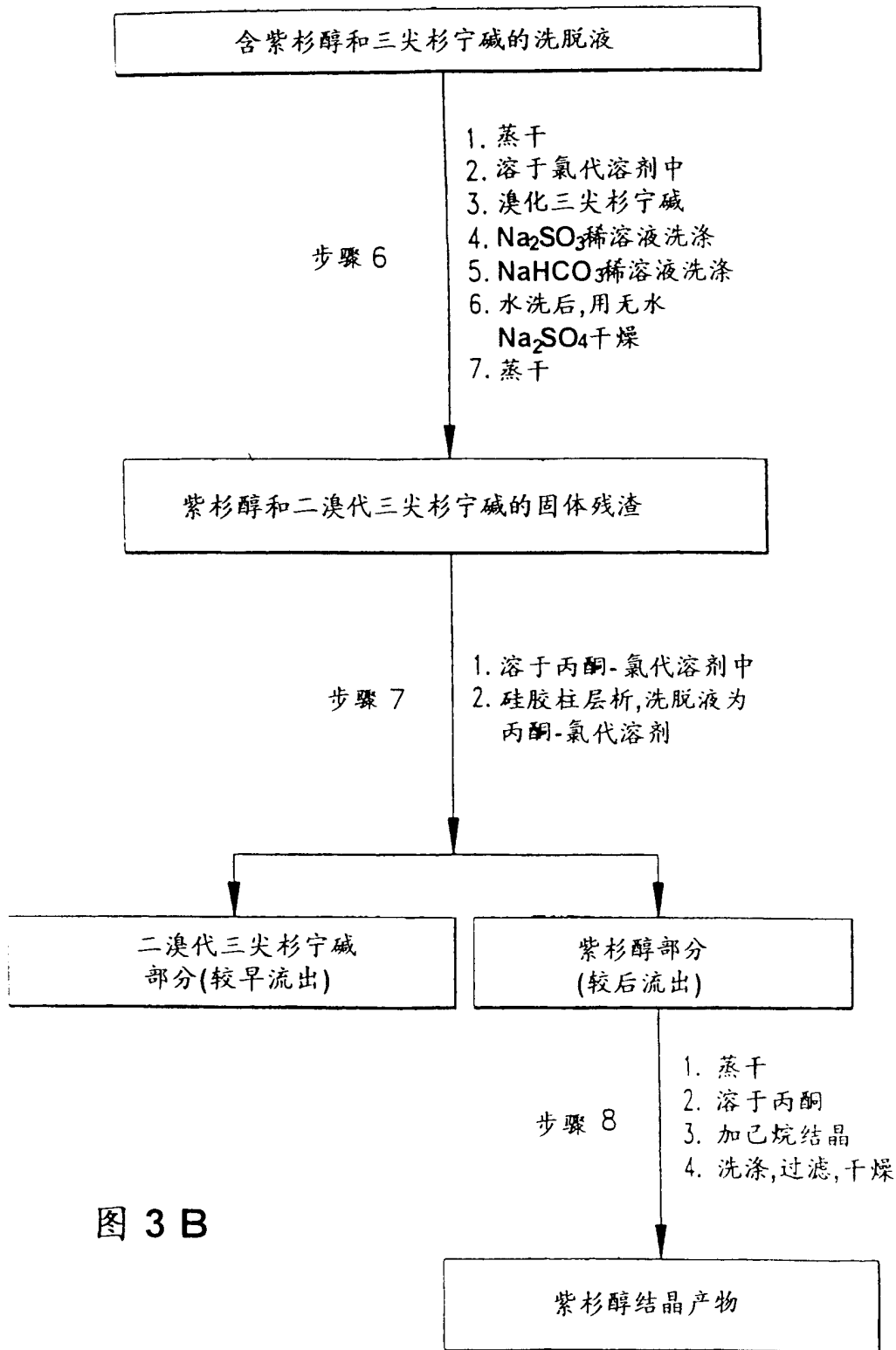


图 3 B

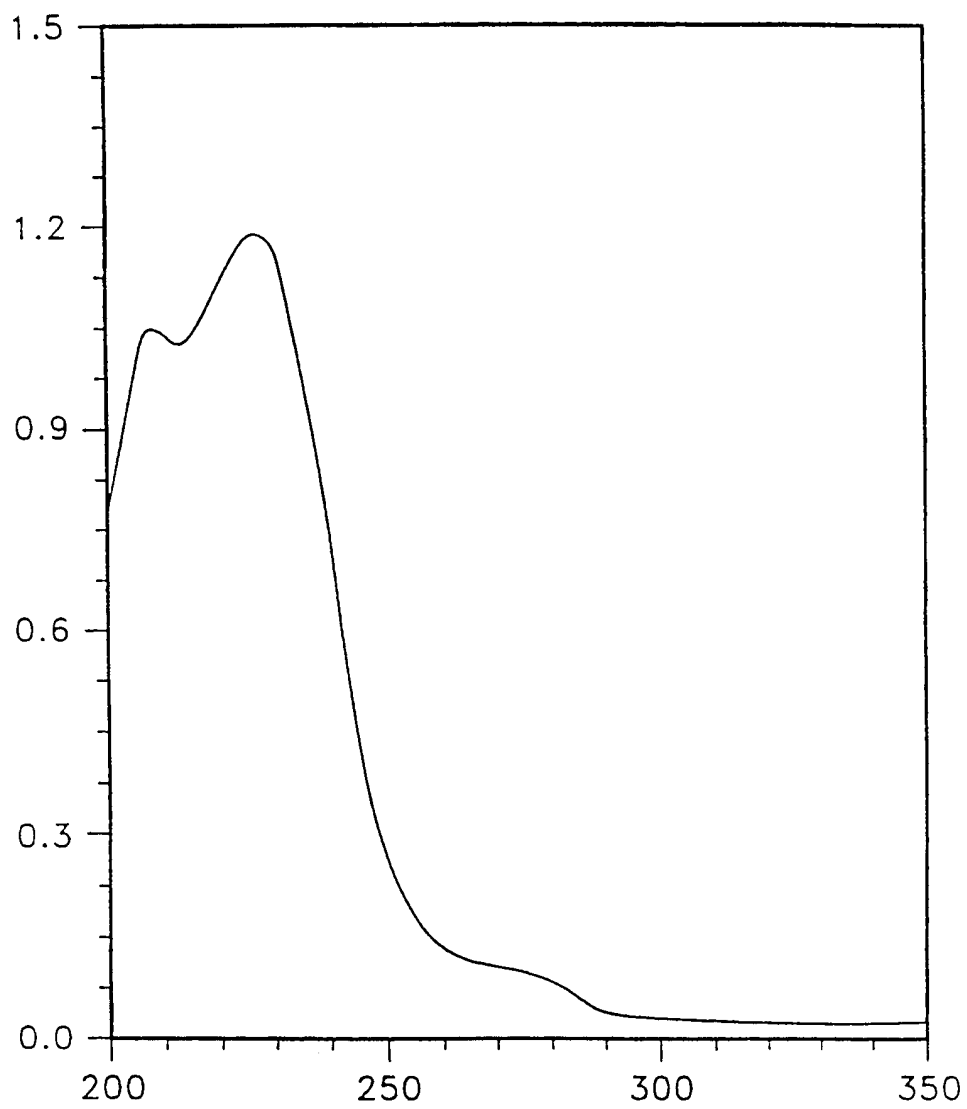
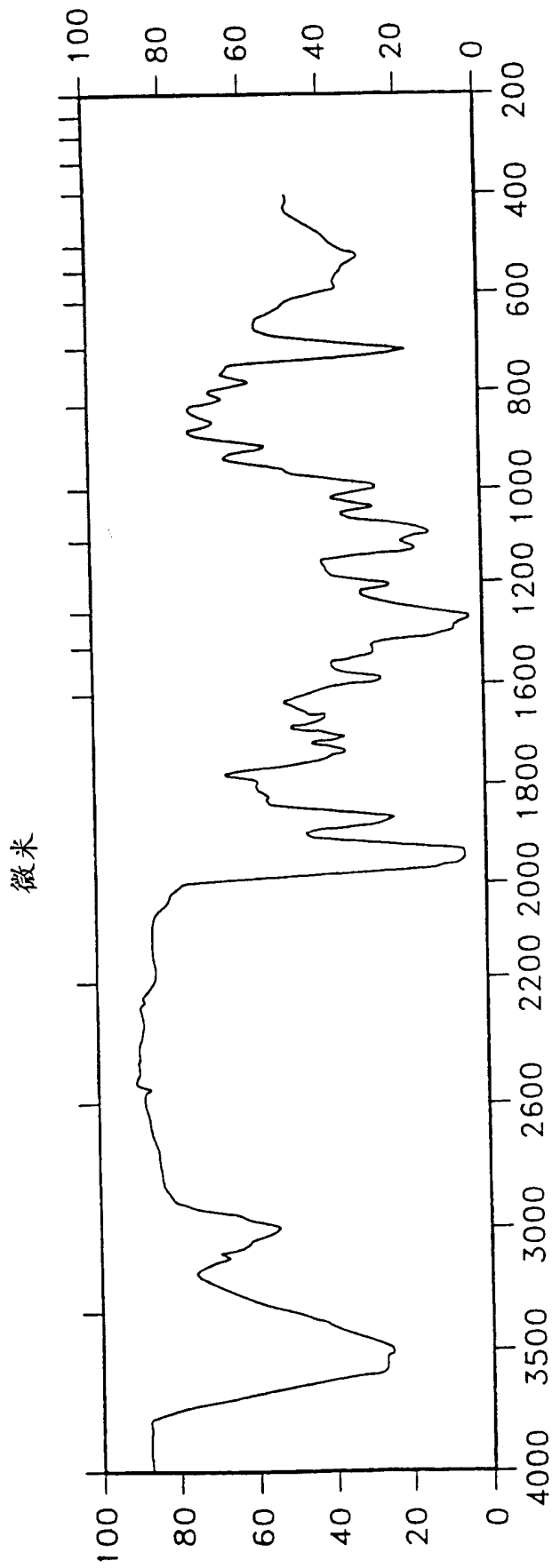


图 5



波数 (cm²)

图 6

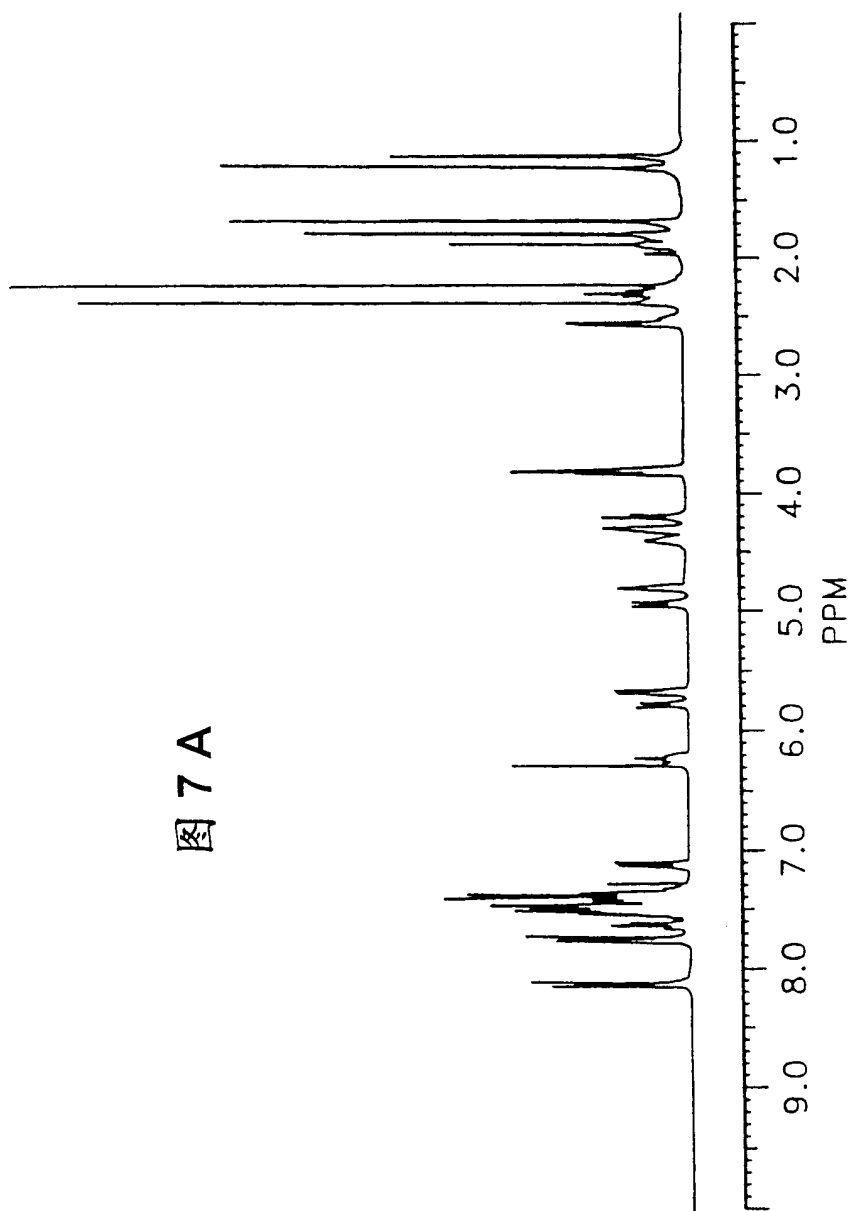


图 7 A

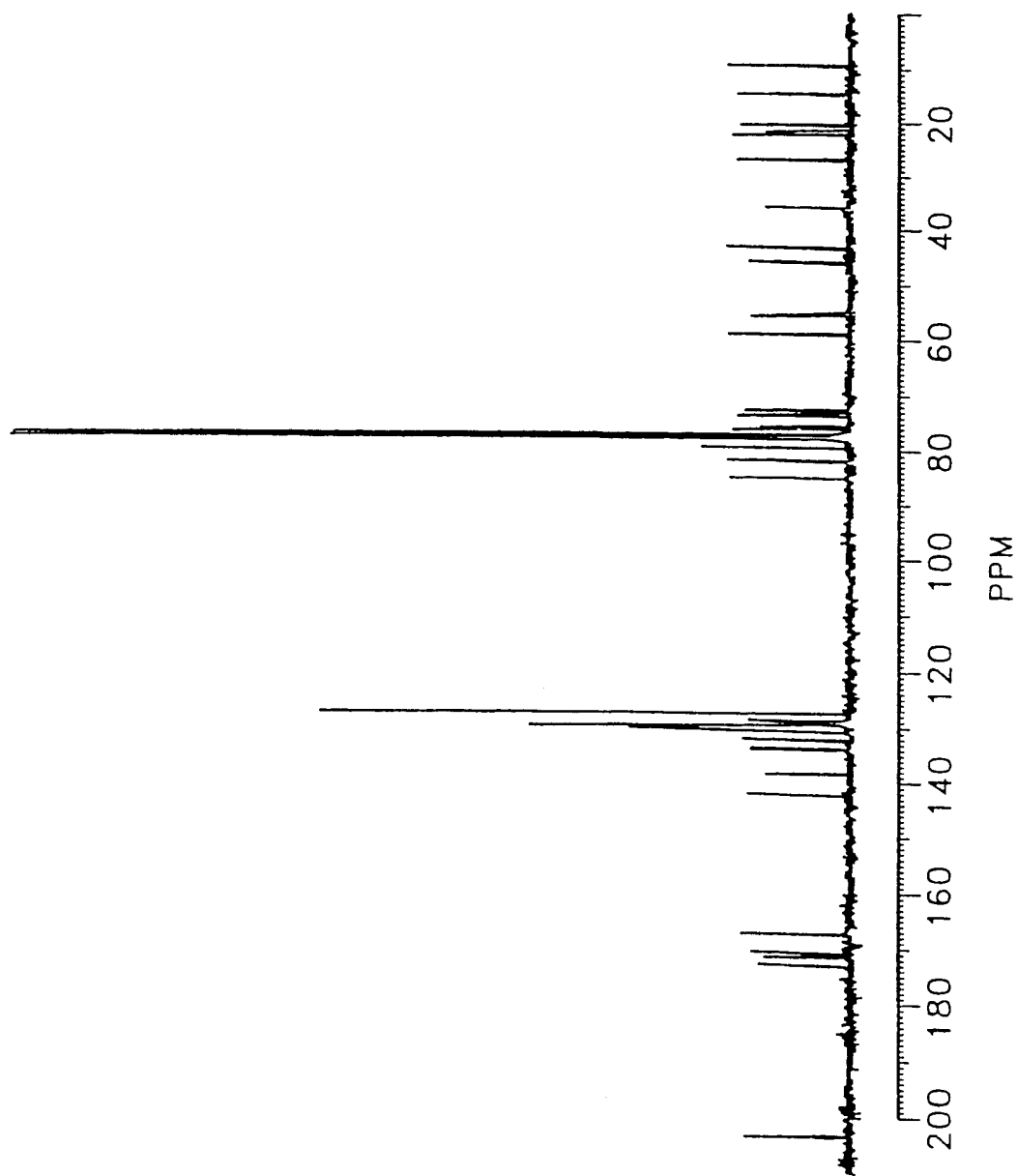


图 7 B

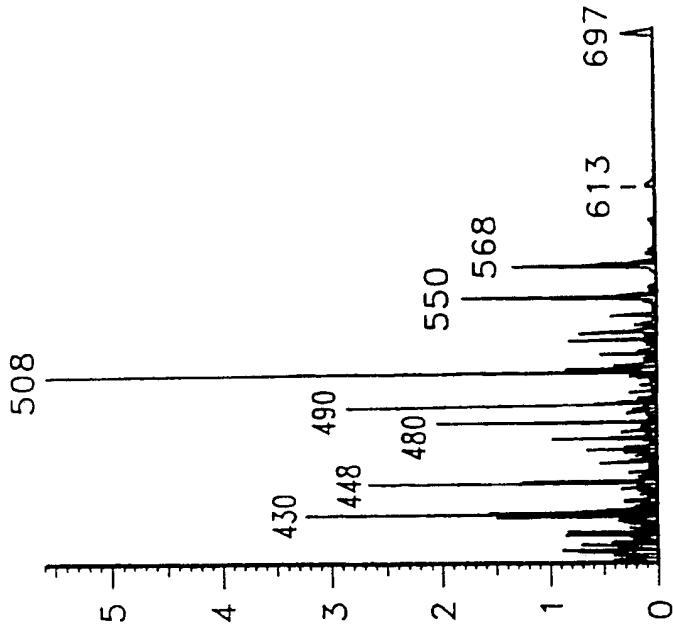


图 8 B

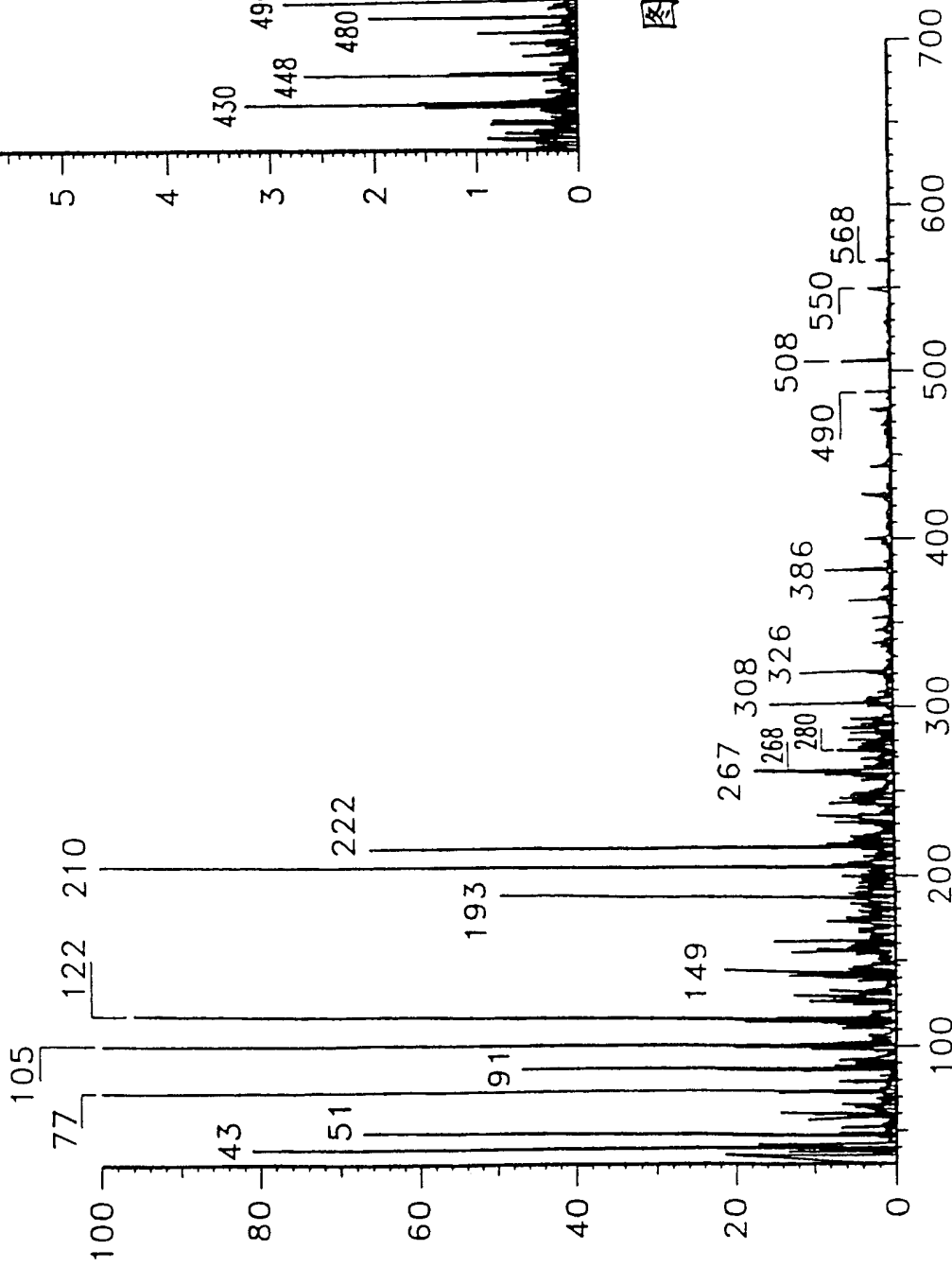


图 8 A

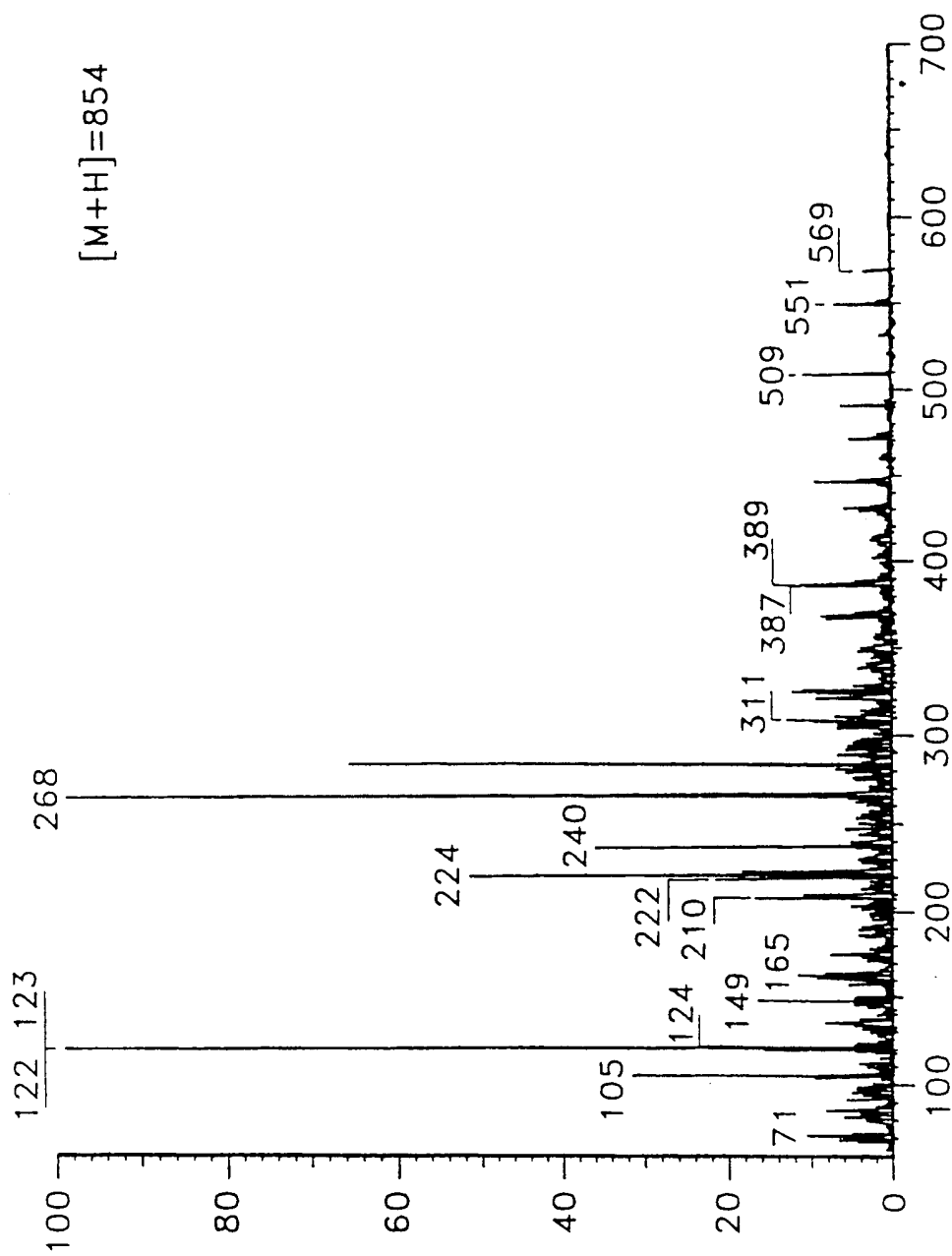


图 9

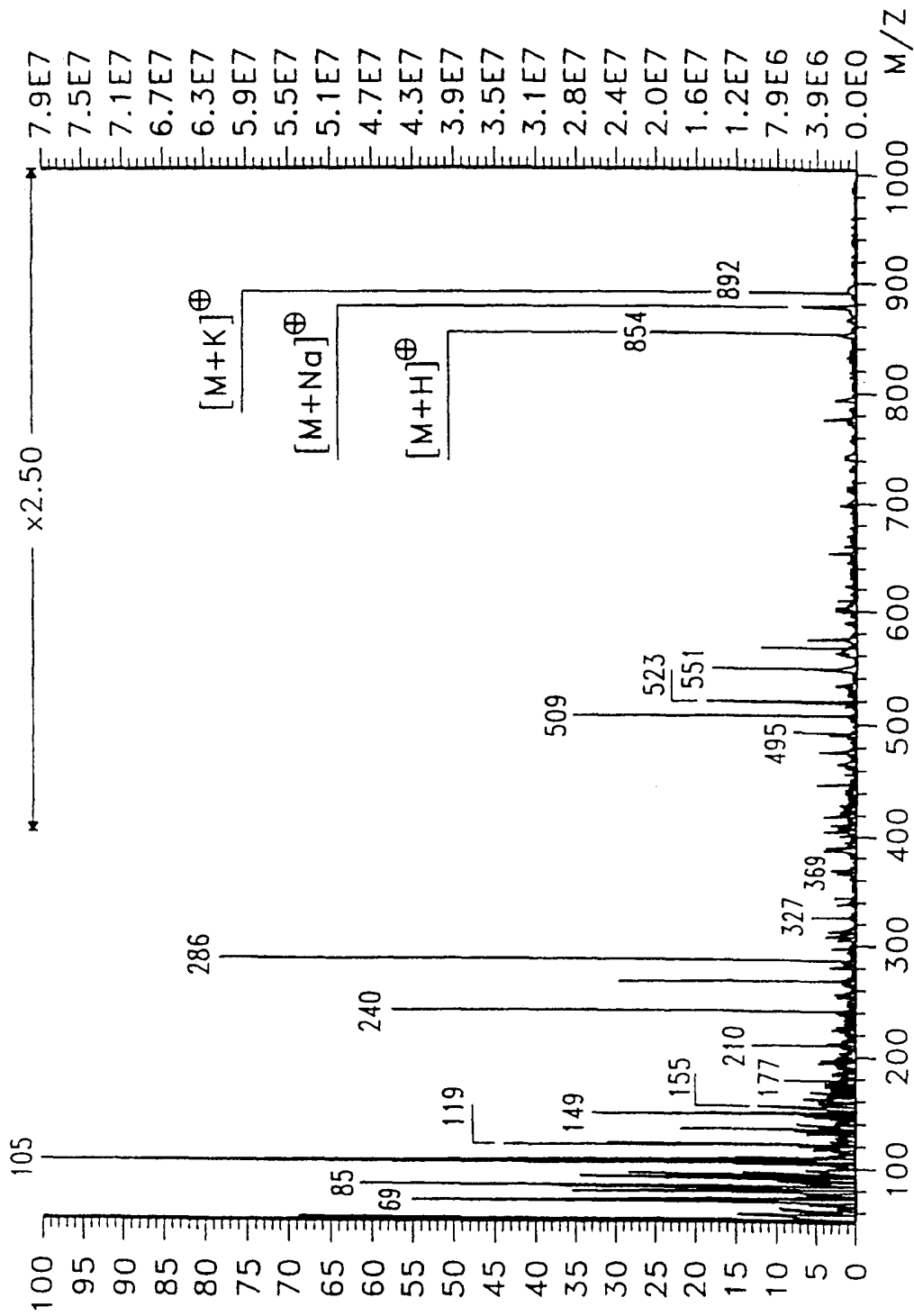


图 10

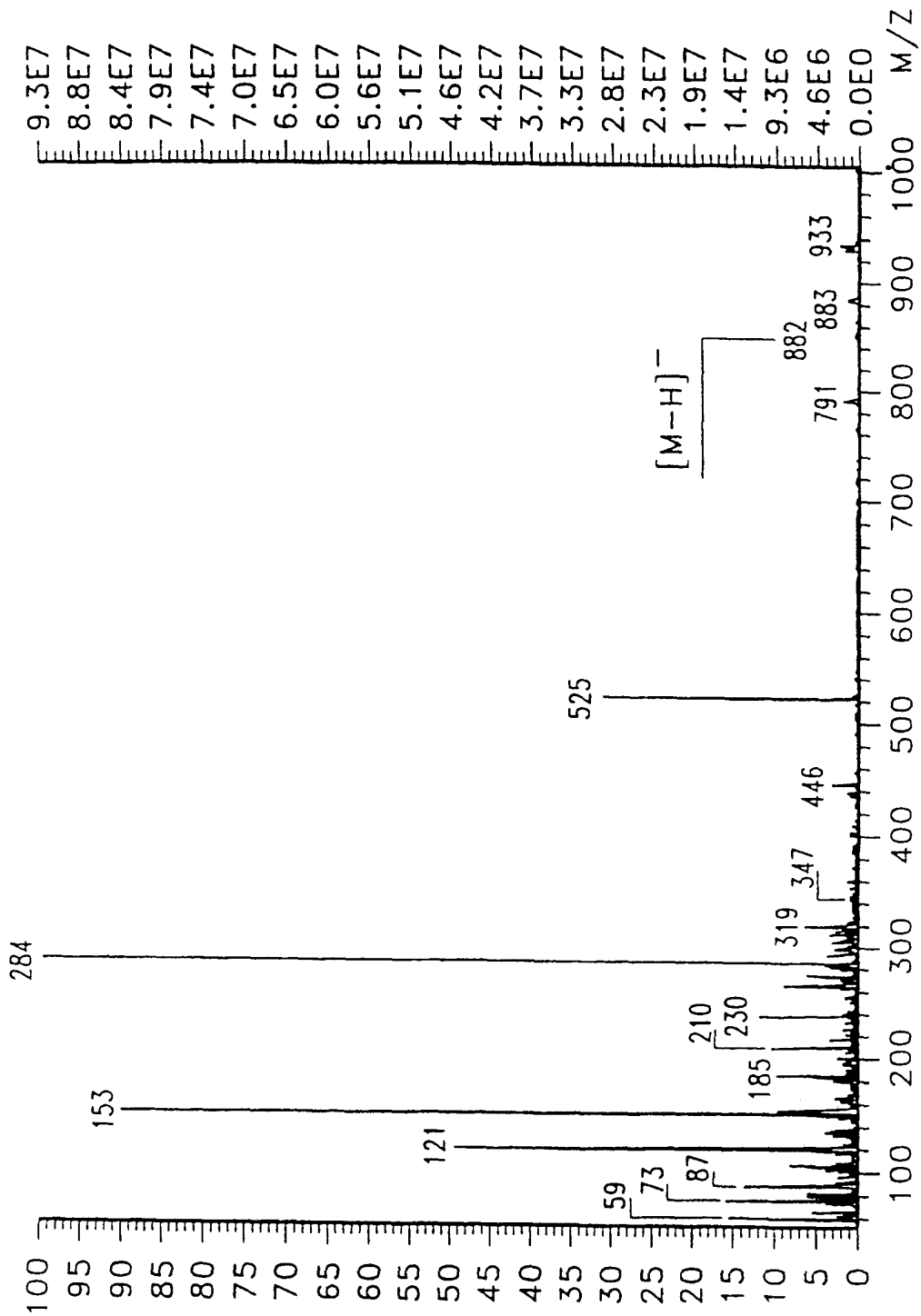
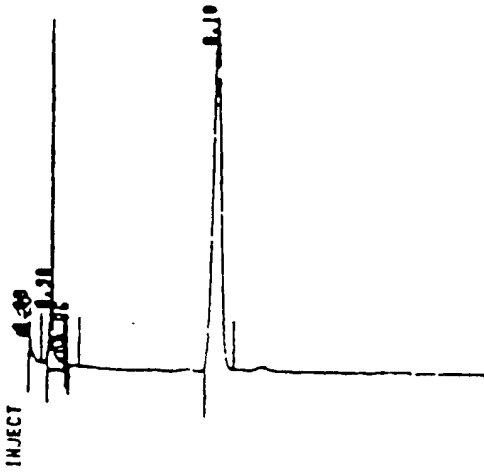


图 11

#XC-9J2



SAMPLE POSITION 13 AUTO MODE WISP REPORT

```

INJECTION VOLUME 0020
NUMBER OF INJECTIONS 1 INJECTIONS REMAINING 0
RUN TIME 00.20 EQUILIBRATION DELAY 00.00
NON-DEFAULT SYS MSG'S: 6500-0030 P81.70-1q
WISP CODES GENERATED: 63-03UL

NOV. 14. 1994 17:04:12 CHART 0.00 CM/MLN
RUN 017 CMC 00
SOLVENT SOLVENT OPR TO: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

```

PEAK	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
1	37.17300	0.00	0.00	37173 F	0.00000000
2	0.41000	0.23	0.23	410 L	0.00000000
3	310.40500	0.90	0.90	310405 L	0.00000000
4	24.40200	1.65	1.65	24402 HL	0.00000000
5	1230.03000	0.10	0.10	1230033 L	0.00000000
TOTAL	1610.50000				

图 12 紫杉醇的高效液相色谱图

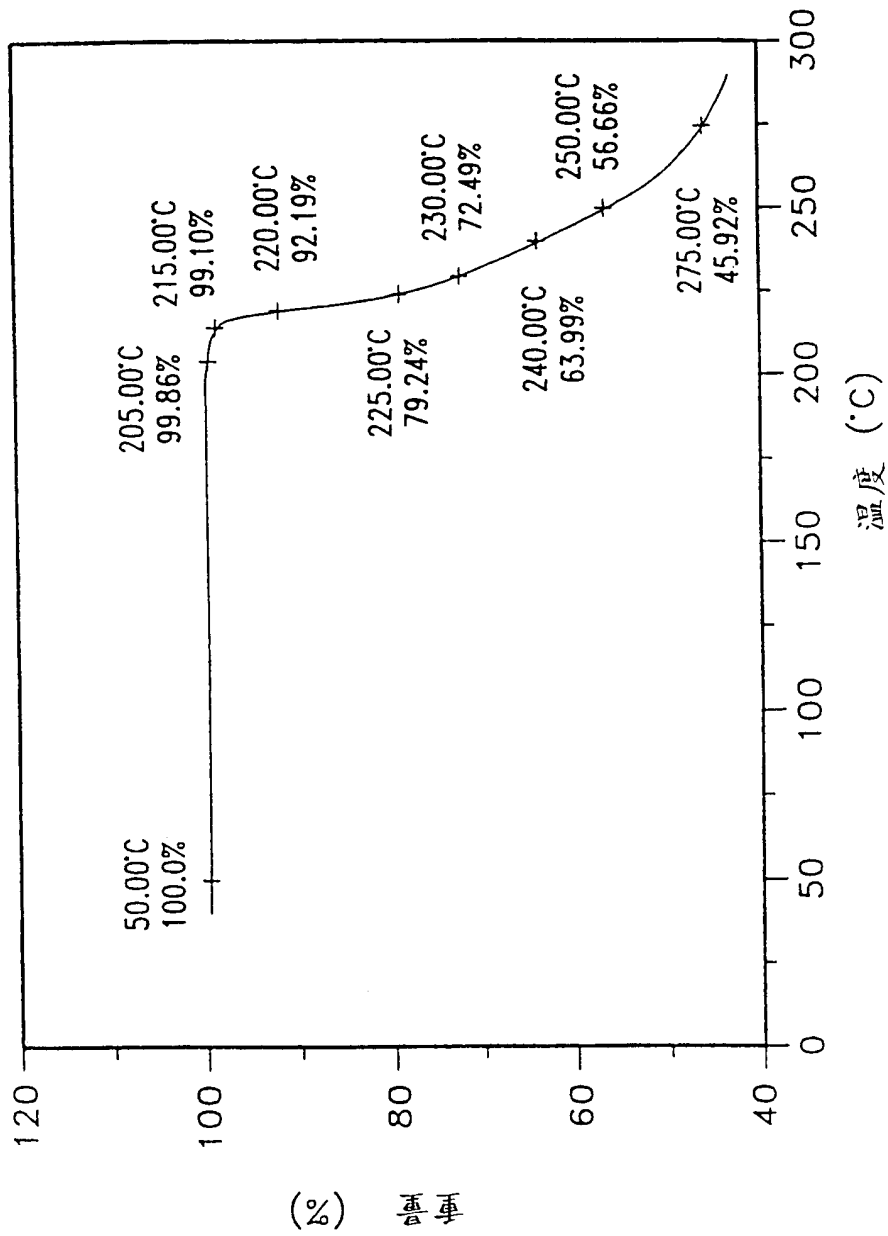


图 13

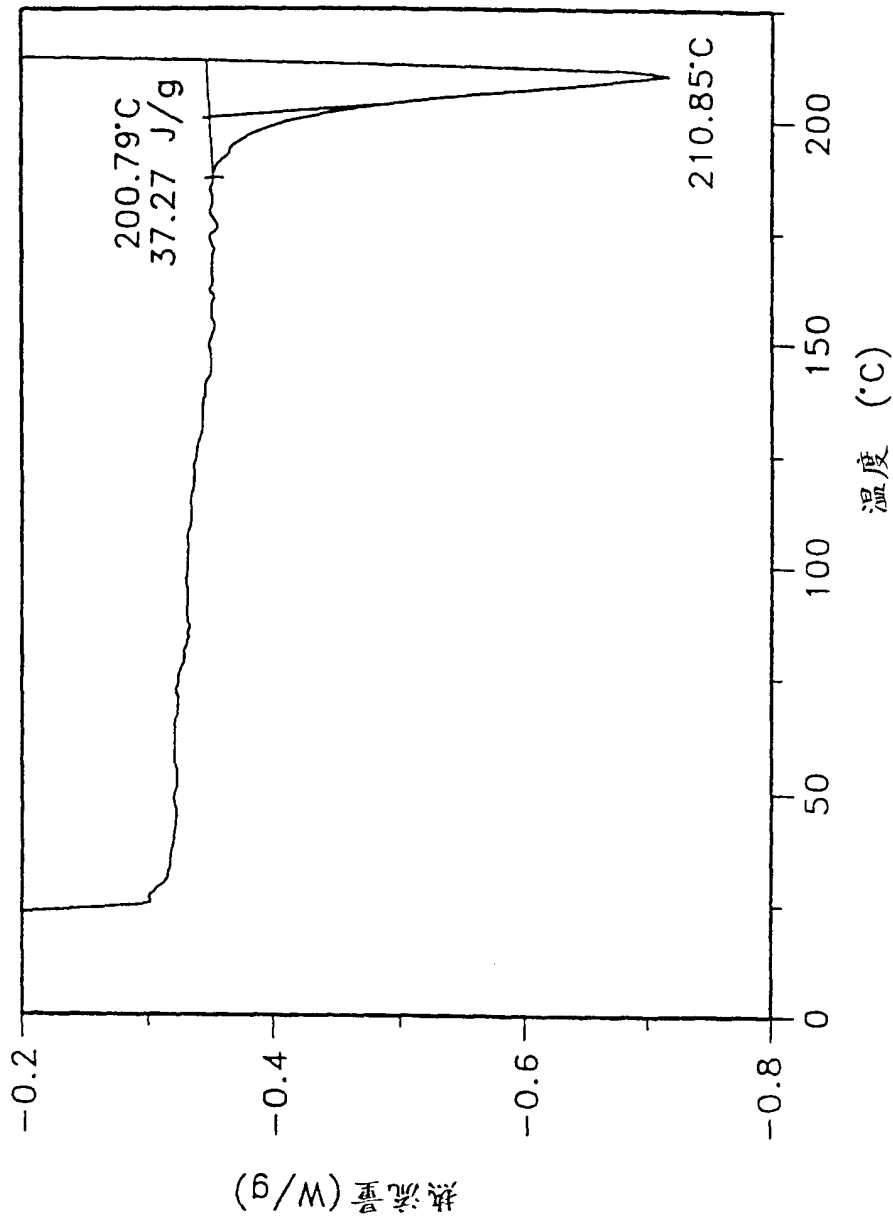


图 14