

红豆杉细胞培养生产紫杉醇粗品制备紫杉醇原料药的研究

赵俊宏,薛宝玉,李岩,李文锋,樊燕鸽

(河南省科学院 化学研究所有限公司,郑州 450002)

摘要:通过考察紫杉醇提纯的多种方法,优化结晶析出法和柱层析法的工艺参数,首次将红豆杉细胞培养生产的65%的紫杉醇粗品分离纯化为符合美国药典 USP 标准的紫杉醇原料药.以红豆杉细胞培养生产的65%的紫杉醇粗品为原料提纯制备紫杉醇原料药的方法,重复性好、工艺合理、操作简单、绿色安全,有望解决紫杉醇原料药的药源供应严重不足的问题.

关键词:红豆杉细胞培养;紫杉醇;原料药

中图分类号:R979.1

文献标志码:A

紫杉醇是从红豆杉属植物中分离提取的一种具有紫杉烷二萜骨架^[1]的新型抗癌药物.其对大多数实体肿瘤有强力抑制作用,而对正常细胞基本无影响,属于低毒高效的天然产物^[2].紫杉醇类药物现已成为一线抗癌和广谱抗肿瘤药物^[3-4].然而作为提取紫杉醇主要来源的红豆杉类植物属于珍稀物种,在我国被列为国家一级保护植物.重要的是,紫杉醇在红豆杉茎皮^[4]中含量极低,只约占0.01%~0.05%^[5].所以尽管紫杉醇抗癌药物在临床上已广泛应用,但是由于受原料红豆杉类植物稀有短缺的制约,市场对紫杉醇的需求的缺口很大^[2].目前,紫杉醇在临床中大量应用的瓶颈受到紫杉醇药源不足的严重限制^[5].

近年来,为解决红豆杉资源稀有短缺与紫杉醇需求日益增加的矛盾问题,相关研究者们主要从以下几个方面进行了紫杉醇原料的研究:化学全合成^[6-9]、化学半合成^[10-12]、人工栽培^[13-14]、微生物真菌发酵^[15-21]和红豆杉细胞培养^[22-23]等方法.其中红豆杉细胞培养法不破坏自然资源、不受自然条件限制、可在生物反应器中进行大规模培养,同时该方法还可生产出紫杉醇前体化合物及其他有抗癌活性化合物等优点.因此,红豆杉细胞培养生产紫杉醇是当前解决紫杉醇药源问题的很有前景的方法^[24].然而,本方法只能制备出含量65%左右的紫杉醇粗品,远无法达到作为临床使用前高纯度原料药的要求.本文研究利用红豆杉细胞培养技术生产的65%紫杉醇粗品,通过优化组合多种分离手段和纯化技术,制备出符合美国药典 USP 标准的紫杉醇原料药.该工艺的开发利用有望解决目前紫杉醇原料药严重短缺的问题,造福人类和社会.

1 实验部分

1.1 原料来源与组成

采用红豆杉细胞培养技术生产的紫杉醇粗品,取样进行高效液相色谱检测,利用标准工作曲线计算出该紫杉醇粗品中的紫杉醇含量为63%~68%,三尖杉宁碱含量为1.74%~1.86%,而其他未知物含量为3.51%~3.95%.

1.2 仪器与试剂

高效液相色谱仪 Agilent 1290 Infinity LC, DAD 二极管阵列管检测器(美国 安捷伦);DHJF Series 低温恒温搅拌反应浴(郑州长城科工贸有限公司);旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式多用真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);DZF-300 型真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公

收稿日期:2017-04-19;修回日期:2017-09-10.

基金项目:河南省重点科技攻关项目(152102310396);河南省科技开放合作项目(172106000010).

作者简介(通信作者):赵俊宏(1978-),男,河南滑县人,河南省科学院助理研究员,研究方向为天然药物研究、结构修饰及开发、应用,E-mail: zhaopassion@126.com.

司);KQ3200DE型数控超声波清洗器(昆山舒美);MilliQ超纯水机.紫杉醇标准品、三尖杉宁碱标准品(北京万佳首化生物科技有限公司 国家标准物质中心);丙酮、正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、石油醚 60~90 °C、丙醇、正戊烷、异辛烷(天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯);五氧化二磷 P_2O_5 (上海展云化工有限公司);乙腈为色谱级(J. T. Baker);硅胶 300~400目(青岛海洋硅胶化工有限公司).

1.3 液相色谱条件

Agilent 色谱柱(型号 TC-C₁₈ 250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(体积比 65:35), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 紫外检测波长 227 nm^[25-29];进样量为 5 μL;柱温为 35 °C^[30].

在该色谱条件下,紫杉醇、三尖杉宁碱均被洗脱且基线分离(见图 1).根据紫杉醇标准品、三尖杉宁碱标准品的 HPLC 图谱和色谱保留值规律、光谱特征吸收曲线综合定性,确定 2.7 中样品 4(纯化后的高纯紫杉醇)的 HPLC 图谱中保留时间 $t=6.295$ min 吸收峰为紫杉醇,而 $t=5.498$ min 吸收峰为三尖杉宁碱.

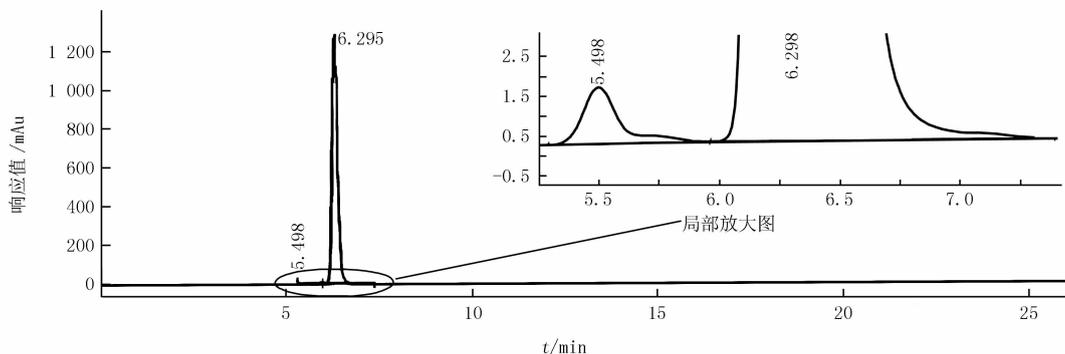


图1 高纯紫杉醇(2.7中样品)HPLC图谱

1.4 紫杉醇溶液标准工作曲线的制备、液相精密度试验和方法重复性试验

用移液管分别精密吸取 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的紫杉醇标准母液 0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL 定容于 10 mL 容量瓶中,然后用色谱级乙腈分别稀释成浓度为 $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $60\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度紫杉醇溶液,分别取之 5 μL 注入液相色谱仪,将峰面积 Y 与浓度 X 绘制标准工作曲线,得其回归方程: $Y = -1.516 + 0.2367X$, $r = 0.999$,在 $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \sim 120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈现良好的线性关系.在上述色谱条件下, $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 紫杉醇标准溶液重复进样 6 次,计算 RSD 为 1.03%,表明液相色谱系统稳定;配置 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 紫杉醇标准溶液 6 份,分别进样测试,计算 RSD 为 1.07%,表明液相色谱系统下该测试方法重复性好.

1.5 实验方案

采用结晶析出法和正相柱层析法有机相结合的方法分离提纯紫杉醇粗品,解决了以往分离紫杉醇方法中不能有效分离紫杉醇与三尖杉宁碱的问题,最终得到高纯度的紫杉醇.

首先,将从红豆杉细胞培养生产的 65% 左右的紫杉醇土黄色粗品(HPLC 图谱如图 2 所示, $t=6.270$ min 吸收峰为紫杉醇, $t=5.481$ min 吸收峰为三尖杉宁碱,而 $t=9.113$ min 吸收峰为未知物)溶解在极性较大的有机溶剂中,然后逐滴加入反向非极性溶剂.搅拌一定时间样品完全溶解后,每隔 10 min 滴加入 5% 的反向非极性溶剂,直至最终反向非极性溶剂:极性溶剂(V:V)为一适当值,静置一定时间,结晶获得纯度大于 85% 的紫杉醇淡黄色固体样品.其次,将上述 85% 的紫杉醇固体样品用极性溶剂溶解,然后采用柱层析法进一步分离纯化紫杉醇,固定相为 200~300 目硅胶,流动相为二氯甲烷和乙酸乙酯或正己烷和丙酮的二元梯度混合溶剂,可得到纯度大于 98% 的紫杉醇白色固体.

最后将 98% 的紫杉醇再用结晶析出法进一步提纯得到纯度 $\geq 99\%$ 的紫杉醇白色固体.最终将纯度 $\geq 99\%$ 的紫杉醇样品在 P_2O_5 存在下 45 °C 真空干燥 48 h,可获得符合美国药典 USP 标准的紫杉醇固体.

2 方法和结果

2.1 不同的极性溶剂溶解紫杉醇粗品对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

不同的极性溶剂对 65% 左右的紫杉醇粗品都有相当的溶解能力,但当溶液中滴加入相同的反向非极性

溶剂后,由于极性溶剂的极性不同而导致最终紫杉醇结晶析出体系极性的不同,对结晶析出紫杉醇的纯度及其收率都有一定的影响.因此,极性各异的极性溶剂对紫杉醇粗品的溶解将最终影响结晶析出紫杉醇纯度和收率.实验结果见表 1 所示.综合考虑结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响,实验优选二氯甲烷极性溶剂对 65%左右的紫杉醇粗品进行溶解,以进行下一步实验.

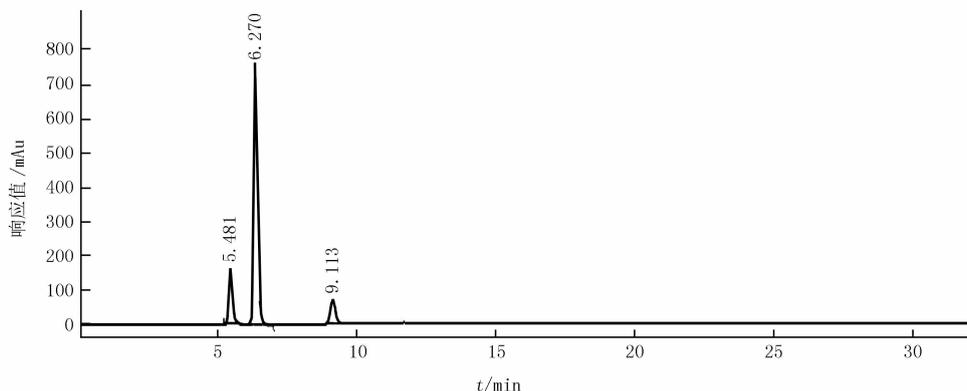


图 2 紫杉醇粗品 HPLC 图谱

表 1 不同的极性溶剂溶解紫杉醇粗品对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

溶剂	二氯甲烷	四氢呋喃	氯仿	乙醇	乙酸乙酯	丙酮	乙腈	甲醇
紫杉醇纯度/%	85	87	87.5	88	89	93	95	96
紫杉醇收率/%	83.1	72	68	65	62	60	57	55

2.2 不同的反向非极性溶剂的对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

依据 2.1 中实验结果,用极性溶剂二氯甲烷完全溶解 65%左右的紫杉醇粗品,使其浓度为一定值,然后依次滴加常用的非极性反向溶剂环己烷、正己烷、石油醚(60~90 °C)、正戊烷、四氯化碳等,考察不同的反向非极性溶剂对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响.结果见表 2 所示.

表 2 不同的反向非极性溶剂的对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

溶剂	环己烷	正己烷	石油醚(60~90 °C)	正戊烷	四氯化碳
紫杉醇纯度/%	89	87	88	88	86
紫杉醇收率/%	83	82.5	83.1	82.7	81.9

由实验结果表 2 可知,常用的反向非极性溶剂环己烷、正己烷、石油醚(60~90 °C)、正戊烷、四氯化碳对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响差别不大.但考虑这五种常用反向非极性溶剂的安全性、经济性及结晶析出紫杉醇纯度、收率等综合因素,优选反向非极性溶剂石油醚(60~90 °C).

2.3 紫杉醇粗品在极性溶剂二氯甲烷中的浓度对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

综合 2.1 和 2.2 中实验结果,将从红豆杉细胞培养生产的 65%左右的紫杉醇粗品溶解在极性溶剂二氯甲烷中,而不同的浓度对滴加入反相非极性溶剂石油醚(60~90 °C)后紫杉醇结晶析出后的纯度和收率影响不一.将 65%左右的紫杉醇粗品溶解在二氯甲烷中的浓度依次设定为 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 g · mL⁻¹,滴加入反相非极性溶剂石油醚(60~90 °C)相同的体积,分析结果见图 2 所示.

65%左右的紫杉醇粗品溶解在二氯甲烷极性溶剂中不同的浓度,以在 0.04~0.10 g · mL⁻¹ 区

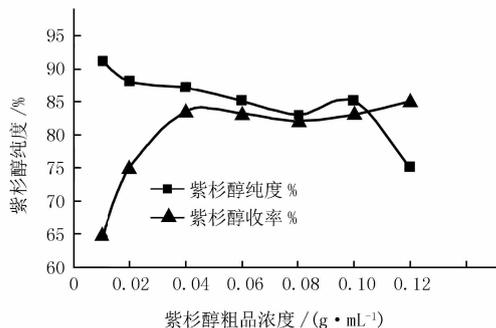


图 3 不同紫杉醇粗品浓度对其结晶析出纯度和收率的影响

间获得的紫杉醇纯度最好,同时收率也有保证.而在浓度的两端,要么获得紫杉醇纯度高而收率低,要么获得紫杉醇收率高却纯度低.所以综合考虑紫杉醇纯度及其收率两个因素,以在 $0.04\sim 0.10\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 区间最好.

2.4 不同初始反向非极性溶剂和极性溶剂体积比对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

综合 2.1、2.2 和 2.3 实验结果,用极性溶剂二氯甲烷溶解 65% 左右的紫杉醇粗品,使其浓度在 $0.04\sim 0.10\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 区间,然后滴加反向非极性溶剂,使最终反向非极性溶剂:极性溶剂 = 80 : 20 (V : V),然后初始的反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V) 对结晶析出紫杉醇纯度和收率有不同的影响.实验结果见表 3.

表 3 不同初始反向非极性溶剂和极性溶剂体积比对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

初始反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V)	10 : 90	15 : 85	20 : 80	25 : 75	30 : 70	35 : 65	40 : 60
紫杉醇纯度/%	85	86	85	83	82	70	65
紫杉醇收率/%	85	84	83.1	85	80	89	92

由实验结果表 3 可知,初始反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V) = (10~30) : (90~70) 范围内,结晶析出紫杉醇纯度和收率都基本相当,总体都不错.但是初始反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V) = (30~40) : (70~60) 范围内,虽然结晶析出紫杉醇的收率比较高,但是其纯度较低.原因是此段内的初始体积比,当加入反向非极性溶剂时,溶解 65% 左右紫杉醇粗品溶液有部分浑浊或析出所致.综合考虑不同初始反向非极性溶剂和极性溶剂体积比对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响,优选初始反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V) = 10 : 90.

2.5 不同最终反向非极性溶剂和极性溶剂体积比对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

综合 2.1、2.2、2.3 和 2.4 实验结果,用极性溶剂二氯甲烷溶解 65% 左右的紫杉醇粗品,使其浓度为 $0.06\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,然后滴加反向非极性溶剂,使初始的反向非极性溶剂:极性溶剂 = 10 : 90 (V : V),考察不同的最终反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V) 对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响.实验结果见表 4.

由实验结果表 4 可知,最终反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V) = (80~60) : (20~40) 范围内,结晶析出紫杉醇纯度和收率都基本相当,总体都不错.但是最终反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V) = (90~80) : (10~20) 范围内,虽然结晶析出紫杉醇的收率比较高,但是其纯度较低.原因是初始溶解 65% 左右紫杉醇粗品溶液此段由于加入的反向非极性溶剂比例高而致使 65% 左右紫杉醇粗品中的三尖杉宁碱尤其是未知杂质均有所析出,所以虽然结晶析出紫杉醇收率高,但是其纯度低.

表 4 不同最终反向非极性溶剂和极性溶剂体积比对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响

最终反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V)	90 : 10	85 : 15	80 : 20	75 : 25	70 : 30	65 : 35	60 : 40
紫杉醇纯度/%	65	70	79	80	85	86	87
紫杉醇收率/%	92	90	88	85	83.1	82	81

综合考虑不同最终反向非极性溶剂和极性溶剂体积比对结晶析出紫杉醇纯度和收率的影响,优选最终反向非极性溶剂:极性溶剂 (V : V) = 70 : 30.

2.6 在上述优化条件下将红豆杉细胞培养生产的 65% 左右的紫杉醇粗品制备纯度 $\geq 85\%$ 的紫杉醇

综合 2.1、2.2、2.3、2.4 和 2.5 实验结果,用极性溶剂二氯甲烷完全溶解 65% 左右的紫杉醇粗品,使其浓度为 $0.06\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,然后滴加反向非极性溶剂石油醚 (60~90),使初始反向非极性溶剂石油醚 (60~90 °C) : 极性溶剂二氯甲烷 (V : V) = 10 : 90.搅拌一定时间样品完全溶解后,每隔 10 min 滴加入 5% 的反向非极性溶剂石油醚 (60~90),直至最终反向非极性溶剂石油 (60~90) : 极性溶剂二氯甲烷 (V : V) = 70 : 30,得到纯度大于 85% 的紫杉醇.实验结果见表 5.

表 5 优选实验条件下 5 批紫杉醇粗品结晶析出紫杉醇的纯度和收率

紫杉醇粗品纯度/%	63	65	68	63	65
紫杉醇纯度/%	85	85	89	88	85
紫杉醇收率/%	84	83.1	84	85	84

2.7 不同二元梯度混合洗脱剂对层析柱分离紫杉醇纯度和收率的影响

将 2.6 中实验所得纯度 $\geq 85\%$ 的紫杉醇,采用柱层析法进一步分离纯化.固定相为 300~400 目硅胶,流

动相为二氯甲烷和乙酸乙酯($V:V=2:1$)、正己烷和丙酮($V:V=1:4$)、正己烷和乙酸乙酯($V:V=1:5$)或石油醚($60\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$)和丙酮($V:V=1:4$)的二元梯度混合溶剂,可得到纯度大于 98%的紫杉醇.实验结果见表 6.

表 6 不同二元梯度混合洗脱剂对层析柱分离紫杉醇纯度和收率的影响

洗脱剂	二氯甲烷:乙酸乙酯	正己烷:丙酮	正己烷:乙酸乙酯	石油醚($60\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$):丙酮
	$V:V=2:1$	$V:V=1:4$	$V:V=1:5$	$V:V=1:4$
紫杉醇纯度/%	98	99	98	98.5
紫杉醇收率/%	82	85	83	84

由实验结果表 6 可以看出,4 种不同的二元梯度混合洗脱剂对于获得纯度 $\geq 98\%$ 紫杉醇的收率基本相当.考虑这五种常用溶剂的安全性和经济性两个方面,优选正己烷:丙酮($V:V=1:4$)或石油醚($60\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$):丙酮($V:V=1:4$)二元梯度混合洗脱剂.

2.8 五批紫杉醇粗品分别制备紫杉醇原料药

取 63%~68%的紫杉醇粗品 5 批,依次采用 2.6 中实验优选的参数结晶析出纯度 $\geq 85\%$ 的紫杉醇,然后将其用 2.7 中实验优选的二元梯度混合洗脱剂进行柱层析洗脱得到纯度 $\geq 98\%$ 的紫杉醇,最后再用 2.6 中实验优选的参数进行结晶析出,可获得纯度 $\geq 99\%$ 的紫杉醇.结晶析出和柱层析两种分离纯化紫杉醇方法的有机结合,解决了以往分离紫杉醇方法中不能有效分离紫杉醇与三尖杉宁碱的问题,提高了分离紫杉醇的纯度,分离去除了三尖杉宁碱,而其他未知物含量也大大降低或完全去除了其他未知物,大大降低三尖杉宁碱含量,得到纯度 $\geq 99\%$ 的紫杉醇.最后,将纯度 $\geq 99\%$ 的紫杉醇样品在 P_2O_5 存在下 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 48 h,可获得符合美国药典 USP 标准的紫杉醇,其中样品 4 的 HPLC 图谱如图 1 所示.其他技术指标经检测也均符合美国药典 USP 标准.实验结果见表 7.

表 7 5 批紫杉醇粗品制备样品分析结果

样品	纯度(HPLC)/%	含量(W/W)/%	三尖杉宁碱/%	其他单杂/%	总杂/%	是否符合 USP
1	99.96	99.24	$0<0.1$	$0.04\%<0.1$	$0.04\%<0.5$	符合
2	100	99.70	$0<0.1$	$0<0.1$	$0<0.5$	符合
3	100	99.77	$0<0.1$	$0<0.1$	$0<0.5$	符合
4	99.95	99.51	$0.05<0.1$	$0<0.1$	$0.05<0.5$	符合
5	100	99.85	$0<0.1$	$0<0.1$	$0<0.5$	符合

3 结 论

通过结晶析出法和正相柱层析法两种有效分离纯化紫杉醇方法的有机结合,将红豆杉细胞培养生产 65%左右的紫杉醇粗品制备成高纯度紫杉醇,进一步可制备成符合美国药典 USP 标准的紫杉醇原料药.本方法相关关键技术参数已获国家发明专利授权^[31].

本方法重复性好、工艺合理、操作简单、绿色安全,制备生产符合美国药典 USP 标准的紫杉醇原料药.开发了从红豆杉细胞培养生产 65%左右的紫杉醇粗品生产紫杉醇原料药的新途径,大大扩大了紫杉醇原料药的药源供应,有望从根本上解决市场上紫杉醇需求量日益增加与红豆杉资源愈发短缺的矛盾.

参 考 文 献

- [1] Wani MC, Taylor IIL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia*[J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] Crown J, O'Leary M, Ooi W S. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer; a review of clinical experience[J]. *Oncologist*, 2004, 9(2): 24-32.
- [3] Strobel G, Yang X, Sears J et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*[J]. *Microbiology*, 1996, 142(Pt2): 435-440.
- [4] 赵凯, 周东坡. 抗癌药物紫杉醇的提取与分离技术[J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(3): 309-312.

- [5] Kingston D G, Jagtap P G, Yuan H, et al. The chemistry of taxol and related taxoids[J]. *Fortschr Chem Org Naturst*, 2002, 84: 53-225.
- [6] 陈巧鸿, 王锋鹏. 抗癌药物紫杉醇的全合-Iolton 合成紫杉醇路线的剖析[J]. *天然产物研究与开发*, 2001, 13(3): 88-95
- [7] 李力更, 吴明, 史清文. 天然抗癌药物紫杉醇的全合成[J]. *天然产物研究开发*, 2008, 20(12): 1104-1107, 1113.
- [8] Li Y, Zhang G, Pfeifer B A. Current and emerging options for taxol production[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 148: 405.
- [9] Liu W C, Gong T, Zhu P. Advances in exploring alternative taxol sources[J]. *RSC Adv*, 2016, 6: 48800-48809.
- [10] 赵毅, 张大永, 吴晓明, 等. 紫杉醇半合成的工艺改进[J]. *精细化工*, 2013, 30(5): 555-560.
- [11] 王永毅, 冯锋, 田连忠, 等. 半合成紫杉醇工艺杂质研究[J]. *中国现代应用药学*, 2014, (12): 154-158
- [12] 姜梦笛. 紫杉醇的半合成及质量标准研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [13] 董晶晶. 南方红豆杉紫杉醇含量与叶片形态的相关性探究[D]. 南京: 南京大学, 2014.
- [14] 于少帅, 孙启武, 张小平, 等. 南方红豆杉人工引种及野生植株活性成分含量与分布[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(10): 2641-2647.
- [15] 张昕欣, 吴翰桂, 曹树勇, 等. 欧文氏菌发酵生产紫杉醇工艺的优化[J]. *中国医药工业杂志*, 2012, 43(8): 666-669.
- [16] 郭立佳. 紫杉醇分离纯化工艺的研究[D]. 江苏: 江南大学, 2006.
- [17] 陈清浦, 廖卫芳, 付春华. 紫杉醇生物合成途径中羟化酶的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2016(05): 554-556.
- [18] 匡雪君, 王彩霞, 邹丽秋. 紫杉醇生物合成途径及合成生物学研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2016(22): 4144-4149.
- [19] 施中东, 未作君, 元英进. 南方红豆杉细胞培养合成紫杉醇诱导子浓度的优化[J]. *天然产物研究与开发*, 2002, 12(4): 36-40.
- [20] 程龙, 马奇明, 陶冠军, 等. 产紫杉醇内生真菌的快速筛选方法研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2006, 37(12): 817-819.
- [21] Fett-Neto AG, Zhang WY, Dicosmo F. Kinetics of taxol production, growth and nutrient up-take in cell suspensions of *Taxus cuspidate* [J]. *Biotech Bioeng*, 1994, 44(2): 205-210.
- [22] 胡萍, 元英. 添加诱导子和紫杉醇合成前体物对红豆杉细胞培养的影响[J]. *中国医药工业杂志*, 2002, 33(5): 223-225
- [23] 白向阳. 南方红豆杉悬浮细胞培养生产紫杉醇及其细胞培养物的化学成分研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [24] 元英进, 刘家新, 卢伟仲. 大规模细胞培养生产紫杉醇的潜力[A]. 第九届全国化学工程科技报告会论文集[C]. 青岛: 中国化工学会化学工程专业委员会, 1998: 1163-1167.
- [25] 赵俊宏, 李文锋, 樊燕鸽, 等. RP-IIPLC 法测定新乡种植红豆杉树皮中的紫杉醇[J]. *河南科学*, 2011, 29(3): 288-290.
- [26] 李西林, 南艺蕾, 张钰泉, 等. IIPLC 法测定加拿大紫杉中紫杉醇的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(3): 9-10.
- [27] 惠俊峰. 从红豆杉中提取紫杉醇及 10-DAB 的研究[D]. 西安: 西北大学, 2006.
- [28] 赵俊宏, 薛宝玉, 李文锋, 等. RP-IIPLC 法测定新乡种植红豆杉树皮中的三尖杉宁碱[J]. *河南科学*, 2014, 32(8): 1407-1410.
- [29] 李乃伟, 束晓春, 彭峰. 紫杉醇提取方法和曼地亚红豆杉 IIPLC 指纹图谱的研究[J]. *江苏农业科学*, 2015(04): 296-298.
- [30] 赵广河, 张培正, 李大鹏. RP-IIPLC 法测定榛叶中紫杉醇的研究[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2009, 40(3): 385-388.
- [31] 赵俊宏, 李文锋, 樊燕鸽, 等. 一种从红豆杉细胞培养生产的紫杉醇粗品中分离纯化紫杉醇的方法制备方法: 中国, 201410063259.0[P]. 2014-05-28.

Preparation of Taxol Active Pharmaceutical Ingredients by Purification of Taxol from *Taxus chinensis* Cell Culture

Zhao Junhong, Xue Baoyu, Li Yan, Li Wenfeng, Fan Yange

(Institute of Chemistry Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A total of 65% taxol crude produced by *Taxus chinensis* cell culture was first purified to meet the requirements of USP standard of taxol in the United States Pharmacopoeia by investigating various methods of taxol purification, preferably by crystallization and column chromatography. The method has the advantages of good repeatability, reasonable process, simple operation and green safety. The drug supply of taxol active pharmaceutical ingredients was greatly expanded.

Keywords: *taxus chinensis* cell culture; taxol; active pharmaceutical ingredients

[责任编辑 王凤产]