

红豆杉培养细胞紫杉醇的分离及鉴定*

甘烦远 郑光植 彭丽萍 沈月毛

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

关键词 红豆杉;紫杉醇;细胞培养;分离鉴定

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TAXOL FROM CULTURED CELLS OF TAXUS

Gan Fanyuan, Zheng Guangzhi, Peng Liping and Shen Yuemao

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract

Taxol, a novel anticancer agent, was isolated from the cultured cells of three species of *Taxus*, including *Taxus yunnanensis*, *T. chinensis* and *T. baccata*. Results of spectroscopic and chemical analyses showed that it was identical with the taxol isolated from *Taxus* plant.

Key words *Taxus*; taxol; cell culture; isolation and identification

在以前研究工作^[1]基础上,本文简报从云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)、红豆杉(*T. chinensis*)及欧洲红豆杉(*T. baccata*)3种植物细胞培养物中分离和鉴定紫杉醇的结果。

1 实验部分

熔点用 WC-1 型显微熔点仪测定,温度未经校正;红外光谱用 Perkin-Elmer 577 型红外光谱仪测定, KBr 压片法;核磁共振用 Bruker AM-400 超导核磁共振仪测定,内标 TMS;质谱用 Finnigan-4510 型质谱仪测定, EI 源, 70 eV; FAB-MS 由加拿大哥伦比亚大学 Towers 教授测定。元素分析用 EA-1106 型元素分析仪测定;紫外光谱用 210 A 型分光光度计测定。旋光用 Dip-370 Digital polarimeter (JASCO) 测定。TLC: 国产硅胶 G 板, 薄层层析展开剂: 氯仿: 丙酮 (4: 1), 浓硫酸显色。HPLC: 岛津 LC-3A 高效液相色谱仪, Spherisorb C6H5 (10 μ m, 4 \times 250 mm) 色谱柱, 检测波长 228 nm, 流动相: 甲醇: 乙腈: 水 (2: 3: 8.5)。

1.1 实验材料

供试材料为经驯化筛选后得到的 3 种红豆杉: 云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis*)、欧洲红豆杉 (*T. baccata*) 和红豆杉 (*T. chinensis*) 的愈伤组织无性系, 通过大量培养收获细胞培养物, 经冰冻干燥至恒重。

1.2 紫杉醇的提取与分离

3 种红豆杉细胞培养物共 3 kg, 工业乙醇冷浸 4 次, 每次 6 h, 合并提取液, 减压回收乙醇得乙醇提取物约

收稿日期: 1995-11-12 接受日期: 1996-01-26

* 中国科学院“八五”重点科研项目

65 g. 加少量水溶解,氯仿萃取 3 次,蒸干氯仿提取液得残渣约 15 g. 残渣经反复硅胶柱层析,用氯仿:丙酮不同比例洗脱,收集含 Taxol 组分. 于甲醇:水(4:1)中可得到 Taxol 结晶,重结晶后得纯 Taxol 约 320 mg,得率为 0.011%左右.

2 鉴定结果

2.1 紫杉醇的结构

本文所获样品为甲醇/水结晶,白色针状,mp 213~215 °C,分子式 $C_{47}H_{51}O_{14}N$,相对分子质量 $M_r = 853$, $[\alpha]_D^{20} -50^\circ$ (c 0.180, MeOH),经光谱鉴定为紫杉醇(Taxol). 其 MS、IR、UV 和 1H -NMR 与文献^[2]报道的基本一致;其 ^{13}C -NMR 数据见后;TLC 与 HPLC 检测为 1 个斑点或 1 个单峰,其结构见图 1.

2.2 紫杉醇的鉴定

IR $_{max}^{KBr}$ (cm^{-1}): 3450 (OH, NH), 1730, 1710(OCO, C=O), 1640(NHC=O).

UV $_{max}^{EtOH}$ (nm): 203(ϵ , 22 691.4), 228(ϵ , 25 093.1), 271(ϵ , 497).

FAB-MS m/z : 854 (MH^+), 794 ($MH^+ - HOAc$), 569 ($MH^+ - C_{16}H_{15}O_4N$).

EI-MS m/z : 550 ($M^+ - H_2O - C_{16}H_{15}O_4N$), 490, 430, 404, 386, 326, 308, 222, 210, 193, 165, 147, 122, 105, 91, 77.

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1.15 (3H, s, 17- CH_3), 1.27 (3H, s, 16- CH_3), 1.64 (3H, s, 19- CH_3), 1.81 (3H, d, $J=1.1$, 18- CH_3), 1.99, 2.02 (each 3H, s, OAc), 1.83 (1H, m, 6 β -H), 2.35 (2H, m, 14- H_2),

2.46 (1H, ddd, $J=6.6, 9.7, 14.9$, 6 α -H), 3.81 (1H, d, $J=7.0$, 3-H), 4.19, 4.30 (each 1H, d, $J=8.4$, 20- H_2), 4.33 (1H, dd, $J=6.6, 10.8$, 7-H), 4.78 (1H, brs, 2'-H), 4.97 (1H, dd, $J=2.1, 9.5$, 5-H), 5.63 (1H, d, $J=7.0$, 2-H), 5.64 (1H, d, $J=8.4$, 3'-H), 6.16 (1H, br, t, 13-H), 6.43 (1H, s, 10-H), 7.27 (1H, d, $J=8.9$, NH), 7.43 (5H, m, Ar-H), 7.49 (4H, m, Ar-H), 7.63 (2H, t, $J=7.0$, Ar-H), 7.83 (2H, d, $J=7.0$, Ar-H), 8.11 (2H, d, $J=7.0$, Ar-H).

^{13}C -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 205.1 (C-9), 174.4 (OAc-1'-CO), 171.7 (OAc-CO), 171.4 (OAc-CO), 170.2 (OBz-CO), 167.7 (OBz-CO), 142.1 (C-12), 140.0 (Ph-C), 135.6 ((OBz-CH), 135.0 (OBz-CH), 134.5 (Ph-CH), 132.8 (Ph-CH), 131.4 (OBz-C), 131.2 (OBz-CH), 129.7 (OBz-CH), 129.6 (Ph-CH), 128.9 (OBz-C), 128.5 (OBz-CH), 128.5 (OBz-CH), 85.9 (C-5), 82.4 (C-4), 79.1 (C-1), 77.5 (C-20), 76.8 (OAc-2'-CH), 76.4 (C-10), 74.9 (C-13), 72.4 (C-2), 72.4 (C-7), 59.3 (C-15), 57.7 (C-14), 49.6 (OAc-3'-CH), 47.9 (C-3), 44.6 (C-8), 36.7 (C-6), 27.0 (C-18), 23.2 (OAc- CH_3), 22.4 (OAc- CH_3), 20.8 (C-16), 14.7 (C-17), 10.43 (C-19).

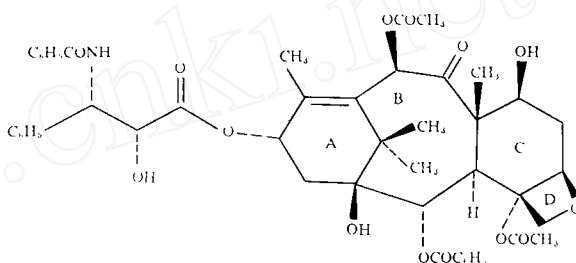


图 1 紫杉醇的结构式

Fig. 1 Structure of taxol

3 讨论

利用细胞培养方法生产紫杉醇,尽管已有不少成功报道^[3,4],但仍存在一些实际的困难,主要问题是组织培养物中紫杉醇的含量太低^[6]. 本研究亦遇到这个问题^[1]. 此外,红豆杉组织培养物的生长速度也有待提高.

目前,紫杉醇的低含量检出问题已可用酶标免疫方法初步解决^[6]。可以说,随着对红豆杉组织培养的研究深入,进行优良细胞系的筛选或生物合成和生物转化等研究^[6],工业化大规模生产紫杉醇将指日可待。

致谢 中国科学院昆明植物研究所植化室及民族植物室仪器组帮助测定光谱,加拿大哥伦比亚大学 Towers 教授帮助测定 FAB-MS。

参 考 文 献

- 1 甘烦远,郑光植,彭丽萍等. 红豆杉细胞培养及其生产紫杉醇的研究. 细胞生物学杂志. 1995,增刊 I :53
- 2 陈未名. 红豆杉属(*Taxus*)植物的化学成分和生理活性. 药学学报. 1990,25,277~240
- 3 Fett-Neto AG, DiCosmo F, Reynolds WF *et al.* Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Bio/Technology*. 1992,10(12):1572~1575
- 4 Ma WW, Park GL, Gomez GA *et al.* New bioactive taxoids from cell cultures of *Taxus baccata*. *J Nat Prod*. 1994,57:116~122
- 5 甘烦远,郑光植. 红豆杉的细胞工程学研究进展. 国外医药植物药分册. 1994,9:156~159
- 6 Jaziri M, Homes J. Enzyme Immunoassay methods for the *in vitro* detection of secondary plant products. *In Vitro*. 1991,27(3);Part I ,109A

www.cnki.net