



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112645906 A

(43) 申请公布日 2021.04.13

(21) 申请号 202011600899.2

(22) 申请日 2020.12.29

(71) 申请人 重庆臻源红豆杉发展有限公司

地址 404600 重庆市奉节县鱼复街道步云街66号

(72) 发明人 徐胜博

(74) 专利代理机构 深圳市兴科达知识产权代理有限公司 44260

代理人 冉玲芬

(51) Int. Cl.

C07D 305/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,包括在层析柱内采用湿法填装硅胶,然后再采用湿法填装紫杉醇粗品,加入洗脱溶剂进行层析分离得多组流份,合并合格流份,浓缩至干得紫杉醇粗品H,最后将紫杉醇粗品进行三次水浴加热、两次搅拌,过滤得滤饼,再将滤饼干干燥得到紫杉醇产品。本发明提纯的紫杉醇含量、纯度 $\geq 99.5\%$,整个层析分离时间短,10~12小时即可完成紫杉醇层析分离,比常规层析分离时间缩短48~60小时,且一次层析分离紫杉醇合格品收率达到65%以上。

1. 一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - S1:将硅胶加入洗脱溶剂中,搅拌均匀,然后倾倒入层析柱内;
 - S2:关闭层析柱底部阀门,使硅胶沉降5~10小时;
 - S3:沉降之后将层析柱底部阀门打开,当层析柱内液面刚好和硅胶平面齐平时关闭阀门,层析柱准备完毕;
 - S4:将紫杉醇粗品加入洗脱溶剂中,水浴加热并搅拌至紫杉醇粗品完全溶解得到样品;
 - S5:将样品缓慢倾倒入步骤S3中准备好的层析柱内,当样品溶液全部进入硅胶后,加入洗脱溶剂开始层析分离;
 - S6:调整层析柱底部阀门开度,控制层析液流出速率,收集多个流份,流份用HPLC检测;
 - S7:合并合格流份,将流份浓缩至干,得紫杉醇粗品H;
 - S8:将紫杉醇粗品H加入甲醇溶液,水浴加热搅拌至完全溶解,冷却至室温,然后进行第一次冷冻结晶产生少量结晶颗粒,将料液搅拌均匀,进行第二次冷冻结晶,再次搅拌均匀,进行第三次冷冻结晶,过滤得到滤饼;
 - S9:将滤饼干燥得到紫杉醇产品。
2. 根据权利要求1所述的一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于:所述洗脱溶剂的组份包括二氯甲烷、乙酸乙酯和异丙醇,所述二氯甲烷:乙酸乙酯:异丙醇=91:6:1。
3. 根据权利要求2所述的一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于:所述步骤S1中,硅胶的大小为200~300目,重量为30~35kg,洗脱溶剂加入量为60~65kg。
4. 根据权利要求2所述的一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于:所述步骤S4中,紫杉醇粗品重量为600~1000g,含量为50~70%,洗脱溶剂加入量为1200~1800ml。
5. 根据权利要求1所述的一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于:所述步骤S4和步骤S8中,水浴温度为52~56℃。
6. 根据权利要求1所述的一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于:所述步骤S6中,控制层析液流出速率为 20 ± 1 L/h,每10L为1个流份,收集20个流份,然后用HPLC对每个流份进行检测。
7. 根据权利要求1所述的一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于:所述步骤S7中,用旋转蒸发仪在温度60℃,真空度-0.03MPa~-0.085MPa浓缩至干,得到的紫杉醇粗品重量为400~420g,紫杉醇含量为98.4%~98.7%。
8. 根据权利要求1所述的一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于:所述步骤S8中,甲醇加入量为4900~5000mL,冷冻结晶的温度为-25℃,第一次冷冻结晶时间为2~3小时,第二次冷冻结晶时间为1.8~2.4小时,第三次冷冻结晶时间为45~50小时。
9. 根据权利要求1所述的一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,其特征在于:所述滤饼的干燥温度为58~65℃,干燥时长35~40小时。

一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及紫杉醇分离纯化技术领域,具体涉及一种工业化高效硅胶层析分离纯化紫杉醇与紫杉醇结晶纯化方法。

背景技术

[0002] 紫杉醇是从红豆杉属植物中提取分离的一种具有紫杉烷。二萜骨架的新型抗癌药物,是目前所了解的唯一一种可促进微管聚会和稳定已聚合微管的药物。用于初疗或其后化疗失败的转移性卵巢癌一线化疗,联合化疗失败或辅助化疗6个月内复发的转移性乳腺癌,一线治疗晚期非小细胞肺癌,乳腺癌淋巴结阳性术后的辅助治疗。

[0003] 随着国内红豆杉繁育种植技术的不断提高,种植规模不断扩大,紫杉醇的生产原料红豆杉供给短缺矛盾得到有效解决,天然紫杉醇的规模化生产得到保障。红豆杉中紫杉醇含量非常低,含量仅为0.01~0.02%,生产过程都需要采用层析分离方法将紫杉醇从紫杉烷类物质中分离出来,常见的紫杉烷类化合物主要有三尖杉宁碱、10-去乙酰基-7-差向紫杉醇、7-差向紫杉醇、巴卡亭Ⅲ、10-乙酰基紫杉醇、紫杉醇C等,由于结构和性质比较相近,从而造成紫杉醇与其类似物分离十分困难。此外,作为一种复杂结构大分子活性物质,紫杉醇受温度、酸、碱等环境因素的影响,容易发生降解或异构化而生成其它紫杉烷类物质。紫杉醇在临床应用中要求其纯度很高,含量、纯度均要求达到99.5%以上,对生产工艺提出了严苛要求。紫杉醇资源珍贵,价格居高不下,分离纯度、分离效率和生产收率成为制约紫杉醇成本的关键因素。基于上述几个方面,使得开发高效、廉价的紫杉醇分离纯化工艺成为研究的热点。

[0004] 紫杉醇规模化生产都是采用正向层析柱分离或反向层析柱分离,有关紫杉醇分离纯化的专利申请有多项。专利号为CN101020671A,专利名称“一种高效分离纯化紫杉醇的方法”中采用洗脱压力为10~20MPa的正向硅胶层析工艺;专利号为CN1611496A,专利名称“一种利用高压液相色谱制备高纯度紫杉醇的方法”中采用高压液相色谱提纯得到高纯度紫杉醇。

[0005] 现有紫杉醇工业化生产的不足主要有:目前紫杉醇生产采用正向柱层析工艺的,由于工艺条件不完善,紫杉醇与相似结构性质紫杉烷类物质特别是三尖杉宁碱分离效率低、周期长,一次性分离后紫杉醇合格品收率仅只有35~40%,反复分离造成紫杉醇损失和成本增大。反向柱层析法采用特制的反向硅胶C18等材料,其市场价格昂贵、约20万元/kg,一套一次上样量150g的反向层析柱系统,反向硅胶需30kg,配套压力柱和泵系统,成本就需要1000万元,大大增加了分离紫杉醇的成本,限制了其规模化生产的可能。

发明内容

[0006] 针对上述不足,本发明的目的在于,提供一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,通过硅胶常压层析分离得到高纯度紫杉醇,缩短层析分离时间,提高紫杉醇合格品收率。

[0007] 为实现上述目的,本发明所提供的技术方案是:

- [0008] 一种高效层析分离纯化紫杉醇的方法,包括以下步骤:
- [0009] S1:将硅胶加入洗脱溶剂中,搅拌均匀,然后倾倒入层析柱内;
- [0010] S2:关闭层析柱底部阀门,使硅胶沉降5~10小时;
- [0011] S3:沉降之后将层析柱底部阀门打开,当层析柱内液面刚好和硅胶平面齐平时关闭阀门,层析柱准备完毕;
- [0012] S4:将紫杉醇粗品加入洗脱溶剂中,水浴加热并搅拌至紫杉醇粗品完全溶解得到样品;
- [0013] S5:将样品缓慢倾倒入步骤S3中准备好的层析柱内,当样品溶液全部进入硅胶后,加入洗脱溶剂开始层析分离;
- [0014] S6:调整层析柱底部阀门开度,控制层析液流出速率,收集多个流份,流份用HPLC检测;
- [0015] S7:合并合格流份,将流份浓缩至干,得紫杉醇粗品H;
- [0016] S8:将紫杉醇粗品H加入甲醇溶液,水浴加热搅拌至完全溶解,冷却至室温,然后进行第一次冷冻结晶产生少量结晶颗粒,将料液搅拌均匀,进行第二次冷冻结晶,再次搅拌均匀,进行第三次冷冻结晶,过滤得到滤饼;
- [0017] S9:将滤饼干燥得到紫杉醇产品。
- [0018] 优选的,所述洗脱溶剂的组份包括二氯甲烷、乙酸乙酯和异丙醇,所述二氯甲烷:乙酸乙酯:异丙醇=91:6:1。
- [0019] 优选的,所述步骤S1中,硅胶的大小为200~300目,重量为30~35kg,洗脱溶剂加入量为60~65kg。
- [0020] 优选的,所述步骤S4中,紫杉醇粗品重量为600~1000g,含量为50~70%,洗脱溶剂加入量为1200~1800ml。
- [0021] 优选的,所述步骤S4和步骤S8中,水浴温度为52~56℃。
- [0022] 优选的,所述步骤S6中,控制层析液流出速率为 20 ± 1 L/h,每10L为1个流份,收集20个流份,然后用HPLC对每个流份进行检测。
- [0023] 优选的,所述步骤S7中,用旋转蒸发仪在温度60℃,真空度-0.03MPa~-0.085MPa浓缩至干,得到的紫杉醇粗品重量为400~420g,紫杉醇含量为98.4%~98.7%。
- [0024] 优选的,所述步骤S8中,甲醇加入量为4900~5000mL,冷冻结晶的温度为-25℃,第一次冷冻结晶时间为2~3小时,第二次冷冻结晶时间为1.8~2.4小时,第三次冷冻结晶时间为45~50小时。
- [0025] 优选的,所述滤饼的干燥温度为58~65℃,干燥时长35~40小时。
- [0026] 本发明的有益效果为:本发明在层析柱内采用湿法填装硅胶,然后再采用湿法填装紫杉醇粗品,加入洗脱溶剂进行层析分离得多组流份,合并合格流份,浓缩至干得紫杉醇粗品H,最后将紫杉醇粗品进行三次水浴加热、两次搅拌,过滤得滤饼,再将滤饼干燥得到紫杉醇产品。本发明提纯的紫杉醇含量、纯度 $\geq 99.5\%$,整个层析分离时间短,10~12小时即可完成紫杉醇层析分离,比常规层析分离时间缩短48~60小时,且一次层析分离紫杉醇合格品收率达到65%以上。

具体实施方式

[0027] 为详细说明本发明的技术内容、所实现目的及效果,以下结合实施方式详予说明。

[0028] 称取30~35kg 200~300目硅胶加入洗脱溶剂(二氯甲烷:乙酸乙酯:异丙醇=91:6:1)64kg,搅拌均匀,倾倒入层析柱(直径27.3cm、高165cm),关闭柱底部阀门,让硅胶沉降5~10小时,打开柱底部阀门、液面刚好和硅胶面齐平时关闭,层析柱准备完毕。

[0029] 称取紫杉醇粗品600~1000g(紫杉醇含量50~70%),加入洗脱溶剂(二氯甲烷:乙酸乙酯:异丙醇=91:6:1)1200~1800ml,在水浴温度52~56℃加热、搅拌溶解完全,缓慢倾倒入已准备完毕的层析柱,样品溶液全部进入硅胶后,加洗脱溶剂(二氯甲烷:乙酸乙酯:异丙醇=91:6:1)开始层析分离,调整柱底部阀门开度,控制层析液流出速率为 20 ± 1 L/小时,每10L为1个流份,接20个流份,流份用HPLC检测。

[0030] 合并合格流份,用旋转蒸发仪在温度60℃、真空度-0.030MPa~-0.085MPa浓缩至干,得紫杉醇粗品H,重量400~420g,紫杉醇含量98.4%~98.7%。

[0031] 紫杉醇粗品H加甲醇4900~5000mL,在水浴温度52~56℃下加热、搅拌溶解完全,冷却至室温,放入-25℃低温冰柜中进行第一次冷冻结晶,冷冻结晶2~3小时,此时有少量结晶颗粒产生,将料液搅拌均匀,进行第二次冷冻结晶1.8~2.4小时,再次搅拌均匀,进行第三次冷冻结晶45~50小时,过滤,滤饼在58~65℃下干燥35~40小时得紫杉醇产品。

[0032] 实施例1:

[0033] 称取32kg 200~300目硅胶加入洗脱溶剂(二氯甲烷:乙酸乙酯:异丙醇=91:6:1)64kg,搅拌均匀,倾倒入层析柱(直径27.3cm、高165cm),关闭柱底部阀门,让硅胶沉降8小时,打开柱底部阀门、液面刚好和硅胶面齐平时关闭,层析柱准备完毕。

[0034] 称取紫杉醇粗品800g(紫杉醇含量66.83%),加入洗脱溶剂(二氯甲烷:乙酸乙酯:异丙醇=91:6:1)1500ml,在水浴温度55℃加热、搅拌溶解完全,缓慢倾倒入已准备完毕的层析柱,样品溶液全部进入硅胶后,加洗脱溶剂(二氯甲烷:乙酸乙酯:异丙醇=91:6:1)开始层析分离,调整柱底部阀门开度,控制层析液流出速率为 20 ± 1 L/小时,每10L为1个流份,接20个流份,流份用HPLC检测,按峰面积归一法计算,紫杉醇纯度 $\geq 98\%$ 、三尖杉宁碱纯度 $\leq 0.7\%$ 、最大单个杂质纯度 $\leq 0.5\%$ 的流份合并为主含量段(即合格流份)。各流份用HPLC检测结果如表1所示:

[0035] 表1各流份用HPLC检测结果

层析流份编号	紫杉醇纯度 (%)	三尖杉宁碱纯度 (%)	最大单个杂质纯度 (%)
1~5	0	0	3.51
6	91.52	0	6.96
7	98.87	0	0.57
8	99.54	0	0.16
9	99.66	0	0.21
10	99.66	0	0.24
11	99.60	0	0.27
12	99.30	0.22	0.33
13	99.48	0.35	0.41
14	98.67	0.40	0.45
15	97.45	0.94	0.52
16	95.73	2.06	0.57
17	93.58	3.56	1.32
18	91.01	6.35	2.07
19	88.99	7.34	2.91
20	76.10	15.94	3.66

[0036]

[0037] 由表1可知,第8~14号流份为合格流份,合并第8~14号流份,用旋转蒸发仪在温度60℃、真空度-0.030MPa~-0.085MPa浓缩至干,得紫杉醇粗品H,重量410.2g,紫杉醇含量98.57%。

[0038] 将410.2g紫杉醇粗品H加甲醇4922ml,在水浴温度55℃加热、搅拌溶解完全,冷却至室温,放入-25℃低温冰柜中冷冻结晶,冷冻结晶2.5小时,此时有少量结晶颗粒产生,将料液搅拌均匀,继续冷冻结晶2小时,再次将搅拌均匀,冷冻结晶48小时,过滤,滤饼60℃干燥36小时得紫杉醇产品358.4g,紫杉醇含量99.61%、纯度≥99.73%,紫杉醇收率67.12%。

[0039] 根据上述说明书的揭示和教导,本发明所属领域的技术人员还可以对上述实施方

式进行变更和修改。因此,本发明并不局限于上面揭示和描述的具体实施方式,对本发明的一些修改和变更也应当落入本发明的权利要求的保护范围内。