

## 氧化铝催化 7-表-紫杉醇转化为紫杉醇的机理探索

张志强\* 苏志国

(中国科学院化学冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 在碱性氧化铝作用下,云南红豆杉浸膏中 7-表-紫杉醇被催化转化为紫杉醇。该异构化反应是由氧化铝表面 L 酸中心、碱中心的协同作用而催化,在室温条件下就可进行,氧化铝表面酸碱中心的种类和强度都将影响反应进行的程度,适量的甲醇对反应有促进作用。

**关键词** 氧化铝, 7-表-紫杉醇, 紫杉醇, 催化

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0378-05

紫杉醇是一种对晚期乳腺癌和卵巢癌有特殊疗效的植物天然抗癌药物<sup>[1,2]</sup>,近年来引起了人们的广泛重视。在前面的研究中,我们已有报道<sup>[3]</sup>,云南红豆杉浸膏经价廉的氧化铝柱层析处理,一步层析不仅紫杉醇达到初分离,而且可使物料中紫杉醇的含量大大提高,而另外的无机层析介质如硅胶、羟基磷灰石等则无增加物料中紫杉醇总量的功能。物料中紫杉醇增量的主要来源是 7-表-紫杉醇被催化转化为紫杉醇<sup>[4]</sup>。为进一步层析实现紫杉醇转化回收和分离纯化的最优化,有必要研究氧化铝催化紫杉醇生成的机理。

### 1 实验材料和方法

#### 1.1 材料

紫杉醇对照品, Sigma 公司产,纯度大于 98%。红豆杉浸膏由云南张峰植物加工厂生产。7-表-紫杉醇及紫杉醇混合物为本实验室从云南红豆杉浸膏中提纯,杂质含量小于 5%。层析氧化铝(200~300 目)为上海新诚精细化学品有限公司生产。层析硅胶(100~200 目),青岛海洋化工厂生产。常压层析系统(Pharmacia 公司)。层析柱(16 mm × 300 mm),上海锦华实验器械厂。高效液相色谱仪(FL-750),Beckman 公司。HPLC 柱(C<sub>18</sub>-硅胶, 4.6 mm × 250 mm),Beckman 公司。旋转蒸发器(XZ-6A)北京科龙仪器公司。甲醇等溶剂(分析纯),北京化工厂。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 硅铝胶的制备:** 硅铝胶是指含一定量的层析用氧化铝的层析用硅胶。将一定比例的氧化铝和硅胶充分混合,在马福炉中 600℃ 烘烤 1 h 后,置干燥器中冷却至室温备用。

**1.2.2 硅铝胶的总酸量、Lewis 酸量及 Bronsted 酸量的测定:** 硅铝胶的总酸量、Lewis 酸量及 Bronsted 酸量的测定参照斯波等<sup>[5]</sup>的方法。

**1.2.3 氧化铝柱层析:** 甲醇及三氯甲烷等溶剂用分子筛脱水,层析用氧化铝在 190℃、1 托的真空下干燥 6 h,用脱水的三氯甲烷充分浸泡并脱气后,装成 15 mm × 250 mm 的层析柱。将紫杉醇原料溶解在 99:1(V/V)的三氯甲烷/甲醇中,进料后,用 99:1 的三氯甲烷/甲醇淋洗去未被吸附的杂质,然后采用 96:4 的三氯甲烷/甲醇进行洗脱,收集洗脱出的紫杉醇峰,用旋转蒸发器在 40~50℃ 蒸发,从所得固体物中取样, HPLC 测定其纯度。

**1.2.4 紫杉醇和 7-表-紫杉醇在氧化铝柱的转化:** 将碱性氧化铝介质装填入层析柱中,并用三氯甲烷充分清洗。用平衡液充分平衡后,将溶解好的物料加到氧化铝柱中,关闭柱出口,使物料在柱上停留一定的时间,然后开始快速洗脱。将收集的各洗脱液,减压蒸发溶剂,得固体物作 HPLC 分析。

**1.2.5 紫杉醇的定量定性分析:** 采用 HPLC 对紫杉醇进行分析,称取 1~5 mg 紫杉醇物料,用甲醇溶解于 5 mL 的容量瓶中,过滤。HPLC 柱为 4.6

收稿日期:1999-08-09,修回日期:1999-11-29。

基金项目 国家自然科学基金重点项目(29736180)

\* 现通讯地址:中国科学院微生物研究所资源室 北京 100080。

mm×250 mm 的 C<sub>18</sub>-硅胶柱,流动相为甲醇/乙腈/水(25:35:40),流速 1.4 mL/min,紫外检测器波长为 227 nm,外标法作定量分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碱性氧化铝层析处理红豆杉浸膏

采用碱性活性氧化铝层析分离云南红豆杉浸膏 4:96 的 CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> 为洗脱剂,经一步常压层析,可以使紫杉醇的纯度从小于 1.0% 提高到大于 27%,紫杉醇的表观回收率在 170% 以上。层析谱图如图 1 所示,峰 1 为紫杉醇峰。而类似的用硅胶代替氧化铝处理红豆杉浸膏,紫杉醇的表观回收率仅在 99% 左右<sup>[3]</sup>,即基本没有新的紫杉醇生成。进一步的实验研究表明<sup>[4]</sup>,紫杉醇的表观回收率超过 100%,不是 HPLC 分析误差所造成的,紫杉醇增量主要来源于 7-表-紫杉醇在氧化铝表面的异构化,而层析用碱性氧化铝颗粒表面确实存在催化新紫杉醇生成的活性中心。本文主要研究 7-表-紫杉醇被碱性氧化铝催化转化的这种作用机理。

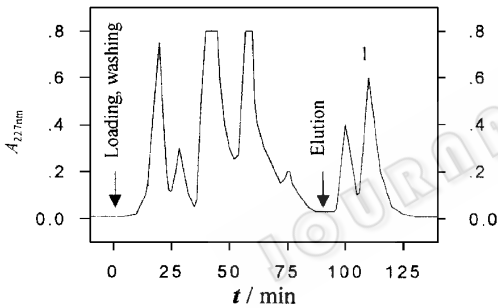


图 1 氧化铝柱层析图谱

Fig. 1 The profile of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatography

Chromatogr. conditions: solvent and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dehydrated, 15 mm×260 mm column, Feed loading: 200 mg, Washing buffer: CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (1:99), Elution: CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (4:96), Elution rate: 2 mL/min, Peak 1 represent taxol

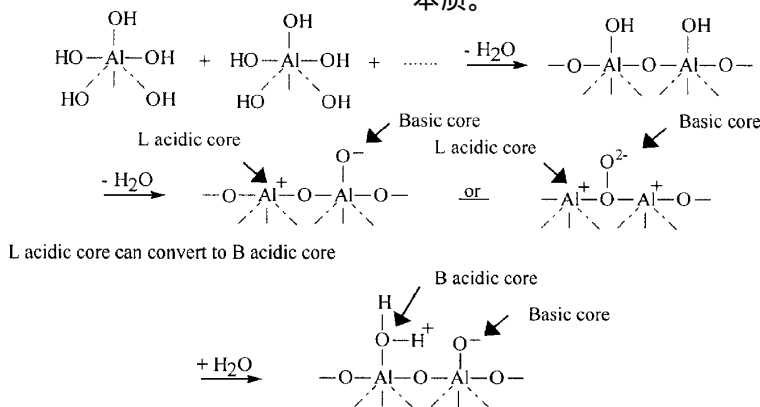


图 2 氧化铝表面酸中心和碱中心的形成

Fig. 2 The forming of acidic core and basic core on the surface of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gel

### 2.2 氧化铝的酸碱性及催化特性

按广义的酸碱定义,“给出质子的物质”是布郎斯台酸(Bronsted 酸,简称 B 酸);“能接受电子对的物质”叫路易斯酸(Lewis 酸,简称 L 酸)。因此很多固体物如氧化铝、氧化锰、氧化硅等均是酸或碱。

氧化铝作为一种被广泛使用的层析吸附剂和固体酸碱催化剂,其吸附活性和催化功能是在表面部分脱羟基后显露出来的。氧化铝表面的 B 酸性很弱,但 L 酸性很强,因此氧化铝表面酸主要是 L 酸。Cornelius 等<sup>[6]</sup>认为,这主要是由于脱水的氧化铝表面产生了歪扭的 Al—O—Al 键。在形成 L 酸中心的同时,生成的表面 O 离子起到碱中心作用。也就是说,L 酸中心越多,对应的碱中心也越多。氧化铝表面强的 L 酸中心则是表露出的不饱和配位的 Al 离子。氧化铝水合物经脱水而产生 L 酸中心及碱中心,这一过程可描述为图 2。L 酸中心易吸水变成 B 酸中心。因此,在氧化铝的表面,有强的 L 酸中心、较弱的 B 酸中心及强的碱中心存在。层析用氧化铝包括酸性、中性及碱性三种,其中酸性氧化铝的碱中心基本被屏蔽,但总酸度较强,而碱性氧化铝中则含有更多的碱中心。

在所催化的各种反应中,氧化铝的催化活性中心在结构和本质上是十分不同的。如 H<sub>2</sub> 和 CH<sub>4</sub> 的解离可能是具有高梯度静电场的高度变形的中心所催化<sup>[7]</sup>。在烷烃的异构化、烯烃的聚合等反应中,氧化铝的活性完全归因于氧化铝表面的酸性。一些反应表明,酸性部位的数量和它们的酸强度是影响氧化铝催化活性的重要因素。

### 2.3 硅铝胶层析催化转化和提纯紫杉醇

研究催化剂的机理,人们最常用的方法是应用催化反应的中毒效应,以揭示催化剂活性中心的本质。

2.3.1 硅铝胶对紫杉醇的分离作用和催化效应:用不同碱性氧化铝含量的硅铝胶分离红豆杉浸膏(7-表-紫杉醇和紫杉醇二者的比例大致为 1:1)的结果如图 3 所示。从图数据可以看出,紫杉醇的表观回收率和纯度随着氧化铝含量的增加而提高。即随着氧化铝含量的增加,7-表-紫杉醇异构化生成紫杉醇的量增多,从而使紫杉醇的回收率呈上升的趋势。说明硅铝胶催化 7-表-紫杉醇异构化的活性与碱性氧化铝的含量正相关。

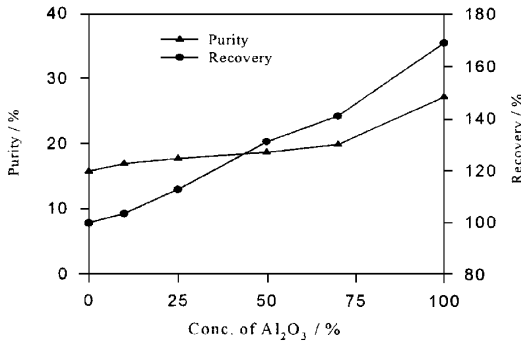


图 3 硅铝胶催化分离紫杉醇

Fig. 3 The catalysis and separation fo taxol with silica and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gel

Experiment condotions :The initial feed :Extract of *Taxus* ,Feed loading :200 mg ,Column :15 mm × 260 mm ,Washing buffer :CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> ( 1 : 99 , V/V ) ,Elution ;CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> ( 4 : 96 , V/V )

硅胶和氧化铝混合加热形成的硅铝胶也是常用的固体酸催化剂。硅铝胶按氧化铝含量的多少分为高铝催化剂和低铝催化剂。硅胶上的硅醇基在本质上是弱酸,即硅胶是一种很弱的固体酸,其酸中心的强度远比氧化铝的低。尽管硅胶单独存在时,酸性较弱,但与氧化铝结合后,可表现出强的酸性。对硅铝胶表面的酸度变化情况如图 4 所示,与斯波<sup>[5]</sup>等人的测定结果相一致。从图 4 可以看出,氧化铝的含量增加,则总酸度增大,L 酸度也增加。当氧化铝的含量在 30%左右时,B 酸度出现极大值。

结合图 3 和图 4 容易看出:紫杉醇的回收率同 B 酸强度没有同步变化关系,但随着 L 酸强度及总酸度的增强,紫杉醇的回收率提高。并且,当总酸度为  $4 \times 10^4$  mmol/m<sup>2</sup>,L 酸强度很小,即不含氧化铝时,紫杉醇的回收率低于 100%,说明此时紫杉醇的生成量很小,7-表-紫杉醇的催化异构反应基本没有进行。一定的总酸度可能只是催化反应的基本条件,在催化过程中 L 酸中心起着主导作用。因此随着 L 酸强度的增加,催化反应进行得更完全。这点

还可从紫杉醇回收率增加梯度同 L 酸强度增加梯度存在对应关系间接地证明。

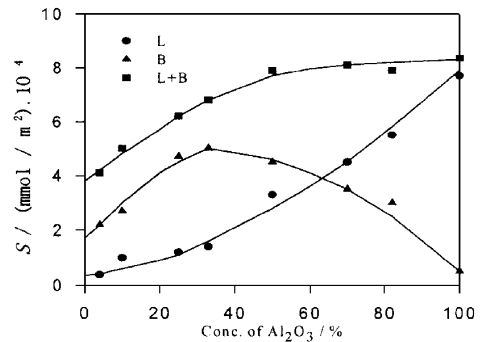


图 4 硅铝胶的酸度及酸中心类型对 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含量的关系

Fig. 4 Relationship of the acidity and the type of acidic core with the content of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in the silica and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gel

2.3.2 氧化铝的酸碱性对催化的影响:不同类型的氧化铝催化红豆杉浸膏的结果如图 5 所示。图中 A 为酸性氧化铝,B 为中性氧化铝,C 为碱性氧化铝。随着氧化铝碱性的增强,紫杉醇的回收率和纯度增加。用酸性氧化铝处理红豆杉浸膏时,紫杉醇的回收率在 95%左右,基本没有紫杉醇量的增加,说明此条件下 7-表-紫杉醇的异构化反应基本没有进行。用中性氧化铝处理红豆杉浸膏时,紫杉醇的总量稍有增加。而用碱性氧化铝处理时,紫杉醇的含量增加 70%左右,紫杉醇的纯度大于 27%。酸性氧化铝与碱性氧化铝的主要差异在于酸性氧化铝的碱中心基本被屏蔽,这说明碱性中心在 7-表-紫杉醇异构化反应中起到协同催化的作用。

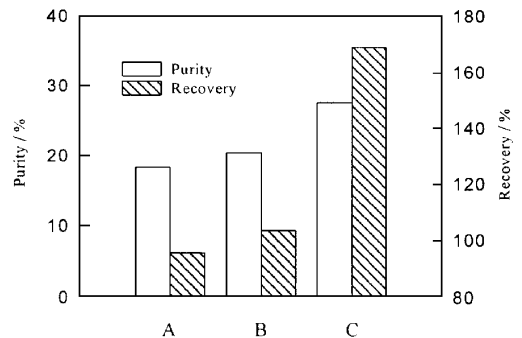


图 5 氧化铝的酸碱性对催化活性的影响

Fig. 5 The influence of acidity or basicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on the catalysis activity

Experiment condotions :The initial feed :Extract of *Taxus* ,Feed loading :200 mg ,Column :15 mm × 260 mm ,Washing buffer :CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> ( 1 : 99 , V/V ) ,Elution :CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> ( 4 : 96 , V/V )

A :Acidic Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ,B :Neutral Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ,C :Basic Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**2.3.3 水含量对氧化铝催化活性的影响：**水对氧化铝表面酸碱性的影响有两方面：一方面，从图 2 可知，活性氧化铝表面的 L 酸中心在吸附水的情况下变成 B 酸中心；另一方面是氧化铝碱量随着水量的增加而增加，吸附水达一定值后，使氧化铝表面的全部酸中心中毒<sup>[7]</sup>。

图 6 是碱性氧化铝层析流动相中的含水量对催化活性的影响。当流动相中无水时，紫杉醇的增量最大，而当含水量超过 0.1% 时，紫杉醇的总量基本没有增加。这说明，随着氧化铝介质中的 L 酸中心转变为 B 酸中心，最后全部酸中心中毒时，氧化铝的催化功能逐渐丧失。这表明仅有碱中心的存在，不足以催化 7-表-紫杉醇的异构化；在异构化反应中，L 酸中心的存在是非常必要的。

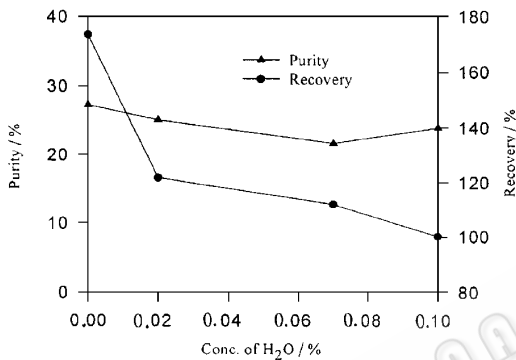


图 6 流动相中含水量对催化活性的影响

Fig. 6 The influence of the content of H<sub>2</sub>O in the mobile phase on the catalysis activity

Experiment condotions :The initial feed :Extract of *Taxus* ,Feed loading :200 mg ,Basic Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> column :15 mm × 260 mm

**2.3.4 甲醇对提高紫杉醇增量的影响：**在碱性氧化铝层析流动相中增加一定量的甲醇，可使紫杉醇的表观回收率纯度增大，结果如图 7 所示。流动相中甲醇的加入，增强了洗脱剂的强度，其作用体现在两个方面：一方面，按斯奈德等人的观点<sup>[8]</sup>，甲醇作为一种液固色谱的极性改性剂，它的加入可以屏蔽氧化铝介质的强吸附中心，使介质表面的吸附中心强度趋于均匀，从而提高层析分离的效率；另一方面，一定量的甲醇存在，可以使流动相保持一定的极性，而使初始物料中的一些杂质不被氧化铝吸附，这相对地会增加 7-表-紫杉醇等可转化为紫杉醇的物质被氧化铝的活性中心吸附的机会，从而增加异构化反应进行的机率。当然也不能完全排除甲醇对异构化反应有促进作用的可能。有关这方面的研究，还有待进一步的深入探索。

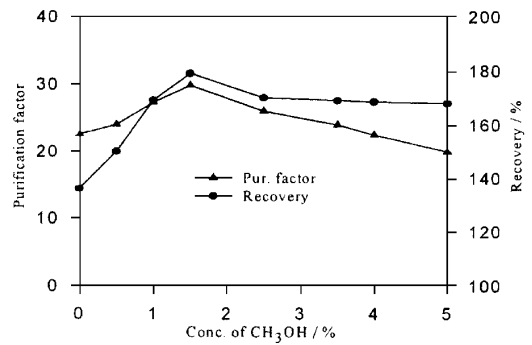


图 7 流动相中甲醇浓度对氧化铝催化活性的影响

Fig. 7 The influence of the concentration of CH<sub>3</sub>OH in the mobile phase on the catalysis activity

Experiment condotions :The initial feed :Extract of *Taxus* ,Feed loading :200 mg ,Column :15 mm × 260 mm ,Washing buffer :CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (1 :99) ,Elution :CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (4 :96)

Experiment condotions :Basic Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> column :15 mm × 260 mm ,Feed loading :200 mg ,Elution :CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (4 :96) ,Elution rate :2.5 mL/min

## 2.4 碱性氧化铝催化 7-表-紫杉醇异构化机理探讨

Knozinger 等<sup>[9]</sup>证明：以氧化铝为催化剂，H-H 键的活化（键解离）在 78~150K 下即能进行；C—H 键的活化（如双键异构化）在 300 K 下就能进行；在氧化铝表面，低温就能使烷烃的 C—H 键解离<sup>[10]</sup>。7-表-紫杉醇与紫杉醇的结构差异仅在 7 号碳原子上 -OH 基团和 -H 基团的空间位置的不同。7-表-紫杉醇的异构化生成紫杉醇的反应，一般只需 C—H 键的活化。因此，理论上说，碱性氧化铝是完全可能在常温下有效地催化 7-表-紫杉醇向紫杉醇的异构化。

结合上述研究，认为 7-表-紫杉醇的异构化过程可用正碳离子微观机理来描述，如图 8 所示。第一步是 7-表-紫杉醇的被氧化铝表面的活性中心吸附。第二步是 L 酸中心从 7-表-紫杉醇的 7 号碳的 OH 背面向 7 号碳进攻，同时碱中心与 7 号碳竞争 H<sup>+</sup>，

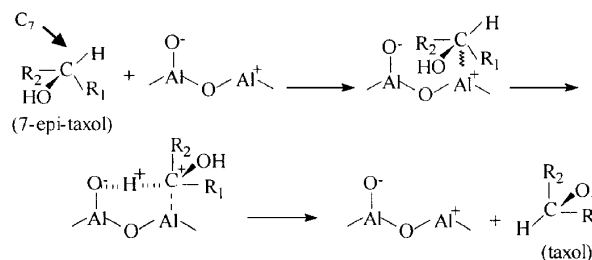


图 8 7-表-紫杉醇在氧化铝表面的异构化机理

Fig. 8 This isomeric mechanism of 7-epi-taxol on the surface of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

引发类似于亲核取代的反应( $S_N2$ 反应),使 7-表-紫杉醇分子发生重排而产生构型的改变。重排后,7号碳原子形成不稳的正碳离子。第三步,正碳离子与 L 酸中心脱离,并将  $H^+$  从碱中心竞争过来,形成异构化的紫杉醇分子。即 7-表-紫杉醇的异构化过

程是由碱性氧化铝表面的 L 酸中心和碱中心的协同作用催化的,此反应在室温条件下就可进行。酸碱中心的种类和强度都将影响反应进行的程度,流动相中适量的甲醇对转化反应有促进作用。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Wani M C, Taylor H L, Wall M E *et al.* *J Am Chem Soc*, 1971, **93**: 2325~2327
- [ 2 ] McGuire W P, Rowinsky E K, Rosenshein N B *et al.* *Ann Intern Med*, 1989, **111**: 273~279
- [ 3 ] 张志强, 田桂莲, 苏志国等. 中国生化药物杂志, 1999, **20**(2): 58~61
- [ 4 ] 张志强. 大连理工大学学位论文, 1999
- [ 5 ] 斯波忠夫, 佐藤正雄, 服部英等. 触媒, 1964, **6**: 80~89
- [ 6 ] Cornelius E B, Milliken T H, Mills G A *et al.* *J Phys Chem*, 1956, **60**: 1501~1512
- [ 7 ] 田部浩三, 御圆生诚, 小野嘉夫等. 新型固体酸和碱及其催化作用(郑禄彬等译), 北京: 化学工业出版社, 1992
- [ 8 ] 斯奈德 L R, 柯克兰 J J. 现代液相色谱法导论, 北京: 化学工业出版社, 1988, pp. 359~367
- [ 9 ] Knozinger H, Ratnasamy P. *Catal Rev Sci Eng*, 1978, **17**: 31~39
- [ 10 ] Larson J G, Hall W K. *J Phys Chem*, 1965, **69**: 3050~3057

## Studies of the Mechanism of 7-epi-taxol Converted to Taxol from *Taxus* Extract Catalyzed with $Al_2O_3$

ZHANG Zhi-Qiang SU Zhi-Guo

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** Under the catalysis of  $Al_2O_3$ , 7-epi-taxol in *Taxus yunnanensis* extract could convert to taxol. The factors including the concentration of  $CH_3OH$  in the mobile phase, the type of  $Al_2O_3$  and the reaction time could influence the isomeric reaction. The catalysis mechanism of  $Al_2O_3$  was investigated. The isomerization of 7-epi-taxol was under the cooperation of the Lewis souci activity core and the basic activity core in the surface of  $Al_2O_3$  at room temperature. The type and strength of activity core controlled the procedure of reaction, and the suitable content of  $CH_3OH$  in the mobile phase would accelerate the reaction.

**Key words**  $Al_2O_3$ , 7-epi-taxol, taxol, catalysis