

台灣紅豆杉萃取紫杉醇、10-去乙酰巴卡亭III及三尖杉寧鹼之研究

許文光、楊博文

E-mail: 9708318@mail.dyu.edu.tw

摘要

台灣紅豆杉 (*Taxus mairei*)，又稱「南洋紅豆杉」或「南方紅豆杉」，屬於紅豆杉科 (*Taxaceae*) 之紅豆杉屬 (*Taxus*)，為裸子植物，是台灣貴重針葉五木之一，也是台灣國寶級的樹種。台灣針葉五木包括檜木類、臺灣杉、香杉、台灣肖楠以及臺灣紅豆杉，它們都是台灣最珍貴的樹種，木材品質優異，被分類為針一級木，多屬於高大的喬木。尤其是台灣紅豆杉的針葉部位含有有效的抗癌成分，紫杉醇 (Paclitaxel)，是極具有開發利用價值的植物。紫杉醇成分在南方紅豆杉乾枝葉中含量大約為0.05~0.07%kgw/w，而在東北紅豆杉樹葉中紫杉醇含量僅只有0.04%，而紫杉醇的半合成原料，10-去乙酰巴卡亭III (10-deacetylbaicatin III, 10-DAB)，在台灣紅豆杉乾枝葉中含量大約1公斤重，可萃取出1公克左右 (0.1%) 的10-DAB。就經濟價值而言，紫杉醇目前每公斤價格高達25萬美元，全球銷售金額在20億美元左右，10-DAB原料每公克90美元以下，所以從台灣紅豆杉乾枝葉中萃取出紫杉醇當作抗癌用的針劑原料，又或者萃取出紫杉醇半合成原料，10-DAB，並且設法提高萃取率以及純度，在未來將是一個值得開發研究的商機。而三尖杉寧鹼因其結構與紫杉醇結構相似，若日後以三尖杉寧鹼當作紫杉醇半合成的原料，也是值得開發的商機。萃取紫杉醇的方法目前為止只有有機溶劑萃取法，所以，如何萃取出高產量的紫杉醇、10-DAB和三尖杉寧鹼，萃取溶劑的使用是一個相當重要的關鍵，因此，所用的有機溶劑，在本研究中，將以五種不同有機溶劑各別萃取試驗，並且使用傳統萃取法 (包含旋轉攪拌萃取法以及熱回流萃取法)、超音波震盪萃取法、微波萃取法等，結合田口氏直交試驗法之應用，萃取出紫杉醇、10-DAB以及三尖杉寧鹼 (Cephalomannine)，之後再分別經過HPLC分析。萃取過程中採用田口氏直交法探討出最適當的、最符合經濟成本的、而且對環境污染程度最低的有機溶劑，並且找出最佳、最有效益的萃取方法，來提高紫杉醇、10-DAB以及三尖杉寧鹼的萃取率。

關鍵詞：台灣紅豆杉、紫杉醇、10-去乙酰巴卡亭III、微波萃取法、田口氏直交試驗法、HPLC

目錄

封面內頁 授權書 中文摘要iv 英文摘要vi 誌謝viii 目錄ix 圖目錄xi 表目錄xiii 第一章 前言1 第二章 文獻回顧5 第一節 紅豆杉科植物簡介5 第二節 紫杉醇的由來與來源8 第三節 紫杉醇的介紹12 第四節 萃取純化紫杉醇研究文獻回顧18 第三章 實驗材料與方法31 第一節 實驗材料31 第二節 實驗方法32 一、樣品前處理32 二、不同萃取方法之建立35 (一) 傳統攪拌萃取法35 (二) 超音波震盪萃取法37 (三) 微波輔助萃取法40 三、分析方法43 第四章 結果與討論51 第一節 傳統萃取台灣紅豆杉葉之分析結果51 第二節 超音波震盪萃取台灣紅豆杉葉之分析結果69 第三節 微波輔助萃取台灣紅豆杉葉之分析結果88 第四節 傳統萃取法、超音波震盪萃取法以及微波輔助萃取法之比較107 第五章 結論115 參考文獻116

參考文獻

- 1.元英進、那平、胡宗定、王道賓、何炳林。1994。東北紅豆杉提取物吸附法脫色的初步探討。離子交換與吸附10(6):543-545。
- 2.元英進。2002。抗癌新藥紫杉醇和多烯紫杉醇。化學工業出版社。北京。
- 3.呂秀陽、楊亦文、任其龍、吳平東。2001。紫杉醇提取工藝的放大與優化。農業工程學報。17(4):119-121。
- 4.何政坤。2003。專題報導 藥用及保健植物 台灣紅豆杉抗癌藥物紫杉醇的另一個家。科學發展(364):22-29。
- 5.李春斌、佟憬憬、范聖第。2005。東北紅豆杉紫杉醇的提取純化與HPLC檢測。大連民族學院學報7(5):22-25。
- 6.肖國勇、林炳昌、馬子都。1999。從東北紅豆杉樹葉中提取紫杉醇的過程分析。鞍山科技大學學報22(1)。
- 7.林鵝程、高東紅、馬考賢。2003。西藏紅豆杉不同部位紫杉醇含量的分佈研究。青海師專學報 (教育科學) (6):87-88。
- 8.徐禮單、劉愛茹。1991。藥學學報。26(7):537。
- 9.陳振德、鄭漢臣、張虹、王洪泉、李金昌。1998。一種製備紫杉醇的新方法。1197796。
- 10.梅興國和黃偉。1999。紫杉醇提取分離和分析檢測研究進展。藥物分析雜誌。19(4)。
- 11.張麗華、高麗娟、林炳昌。2003。鞍山地區山棒子樹皮中紫杉醇的提取。福建分析測試12(2):1765-1778。
- 12.楊恭毅、陳運造。1984。楊氏園藝植物大典。P6734。楊青造園企業，中國花卉雜誌社。台北。
- 13.賈繼明、吳立軍、任瑞濤、王立新。2006。黑龍江帽兒山樹枝條中的紫杉醇提取方法初探。中醫藥信息23(1):25-27。
- 14.閻家麟、劉虹、王九一。中國醫藥工業雜誌。1994。25(10):433。
- 15.劉欣和張佩玲。1991。藥學學報26(7):2510。
- 16.趙凌雲。1998。離子交換樹脂催化解離鍵結紫杉醇機理及工藝的研究。天津大學化工學院。天津。
- 17.劉莉、徐新剛、陳飛龍、安春志、羅佳波。2006。超臨界CO₂萃取雲南紅豆杉枝葉中紫杉醇的研究。中成藥28(4):480-482。
- 18.雒麗娜、董慧茹、鄭云、趙京城。2005。固相萃取高效液相色譜法快速測定紅豆杉枝葉中的3種紫杉烷類化合物。分析試驗室24(7):80-84。
- 19.鄭廣樂、葛彬彬、黃天偉、傅瑞樹。2004。HPLC法分析紅豆杉中紫杉醇的含量。福建分析測試13(3-4)2011-2013。
- 20.鍋田憲助、田崎弘之、江部洋史。1994。特開平。15:7329日本。
- 21.應紹舜。1985。台灣高等

植物彩色圖誌，第一卷。P68。著者自行出版。台北。22.薛豔華、祖元剛、史權、唐中華、于景華、韓梅。2005。幾種影響提取東北紅豆杉鮮枝葉中紫杉醇含量的乾燥方法比較。植物生理學通訊41(5):657-658。23.蕭久富。2007。不同萃取方法對台灣筋骨草及匍匐筋骨草活性成分之分析比較研究。P52-56。大葉大學碩士論文。彰化。24.蘇應娟、王艇、李雪雁、楊禮香、範國寬、柯亞永、朱建明。2001。影響南方紅豆杉細胞生長及紫杉醇含量的因素。生態科學20(4):12-15。25.Abou-Enein, H.Y. 1996. Liquid-chromatographic determination of taxol and related derivatives using a new polyfluorinated reversed-phase column. *Anal Chim Acta*. 319(1/2):187. 26.Adeline, M.T. 1997. Evaluation of Taxoids from *Taxus* spp crude extracts by high-performance liquid chromatography. *J. Liq Chromatogr & Relat Tech*. 20(19):3135. 27.Auriola, S.O.K. 1992. Determination of taxol by high-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. *J. Chromatogr*.594(1/2):153 28.Bitsh, F. 1993. Analysis of taxol and related diterpenoids from cell cultures by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr*. 615(2):2773. 29.Bui-Khac. 2002. Process for extraction and purification of paclitaxel from natural sources. P.6452024. US. 30.Cardellina, J.H. 1991. HPLC separation of Taxol and Cephalomannine. *Liq Chromatogr*.14 (4):659. 31.Carver, D.R., Prout, T.R., Workman, C.T. 1994. WO 9412268. 32.Castor, T.P. 1994. WO 9420486. 33.Chan, K.C., Muschik, G.M., Issaq, H.J.1994. *J. High Res Chromatogra*. 17:51. 34.Claiborne, C.F., Ranaud, J., Couladouros, E.A., Paulvannan, K. and Sorensen, E.J. 1994. *Nature*. 367:630. 35.Denis, J.N., Correa, A. and Greene, A.E. 1991. *J.Org.Chem*. 56:6939. 36.Eett-Neto, A.G., DiCosmo, F., Reynolds, W.F. and Sakata, K. 1992. *Biotechnology*. 10:1572. 37.Ellis, D.D., Zeldin, E.L., Brodhagen, M., Russin, W.A. and Mccown, B.H. 1996. *J.Nat.Prod*. 59:246. 38.Foo, Samuel Siang Kiang, Bai, Yili et al. 2000. Method for high yield and large scale extraction of paclitaxel from paclitaxel-containing material. P.6136989. US. 39.Forgacs, E. 1994. Using porous graphitized carbon column for determining taxol in *Taxus baccata*. *Chromatographia*. 39(10):740. 40.Heinstein, P., Zhou, J.Y., Wang, M., Liu, Y.C., Chen, X.Y., Chen, D., Hoke, S.H., Gaham Cooks, R. and Chang, C.J. 1996. *J.Chem.Soc.Perkin Trans*. 1:845. 41.Hoke, S. H., Wood, J.M., and Cooks, R.G. 1992. *Analytical Chem*. 64:2313. 42.Holton, R.A., Juo, R.R., Guenard, D. and Potier, P.J. 1988. *J.Am.Chem.Soc*. 110:6558. 43.Holton, R.A., Somoza, C., Kim, H.B., Liang, F.F., Biediger, R.J., Boatman, P.D., Shindo, M., Smith, C.C., Kim, S., Nadizadeh, H., Suzuki, Y., Tao, C., Vu, P., Tng, S., Zhang, P., Murchi, K.K., Gentile, L.N. and Liu, J.H. 1994. *J.Am.Chem.Soc*. 116:1597. 44.Huizing, M.T. 1995. High-performance liquid chromatographic procedures for the quantitative determination of paclitaxel (Taxol) in human urine. *J. Chromatogr B*. 664(2):373. 45.Incorvia Mattina, M.J., Iannucci Berger, W.A. and Denson, C.L. 1997. Process for mass production of GMP paclitaxel and related taxanes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45(12): 4691 – 4696. 46.Jennings, D.W., Deutsch, H.M., Zalkow, L.H. 1992. *J. Supercriti Flu*. 5:1. 47.Kasitu, Gertrude, C. and Noah. 2002. Process for mass production of GMP paclitaxel and related taxanes. P.6469186. US 48.Ketchum, R.E.B. and Gibson, D.M. 1995. A novel method of isolating taxanes from cell suspension cultures of yew (*Taxus* spp.). *J. Liq. Chromatogr*. 18(6):1093. 49.Ma,W., Park,G.L., Gomez,G.A., Nieder,M.H., Adams,T.L., Aynsely,J.S., Sahai,O.P., Smith,R.J., Stahlhut,R.W. and Hylands,P.J. 1994. *J.Nat.Prod*. 57:116. 50.Ma, W., Stahlhut, R.W., Adams, T.L., Park, G.L., Evans, W.A., Blumenthal, S.G., Gomez, G.A., Nieder, M.H. and Hylands, P.J. 1994. *J.nat.Prod*. 57:1320. 51.Mangatal, L., Adeline, M.T., Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F. and Potiwe, P.1989. *Tetrahedron*. 45:4177. 52.MataChem-Keith, G.J. 1997. Paclitaxel stability in solution. *Anal Chem*. 69(1):72. 53.Mattina, M.J.I. and MacEachern, G.J. 1994. Extraction, purification by solid phase extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of taxanes from ornamental *Taxus* needles. *J Chromatogr*. 679(2):269. 54.Mattina, M.J.I., Berger, W.A.I. and Denson, C. L. 1997. Microwave-assisted Extraction of Taxanes from *Taxus* Biomass. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.45:4691. 55.Matysik, G. 1995. Stepwise gradient thin layer chromatography and densitometric determination of taxol in extracts from various species of *Taxus*. *Chromatographia*. 41(7/8):485. 56.Nair. 1993. J.B. EP0521675. 57.Nair, M.G. and Mich, O. 1994. Process for the isolation and purification of taxol and taxanes from *Taxus* spp. P.5279949. USA. 58.Nicolaou, K.C., Dai, W.M. and Guy, R.K. 1994. *Angew.chem.int.ed.engl*. 33:15. 59.Nicolaou, K.C., Nantermet, P.G., Ueno, H., Guy, R.K., Couladouros, E.A. and Sorensen, E.J. 1995. *J.Am.Chem.Soc*. 117:624. 60.Nicolaou, K.C., Yang, Z., Liu, J.J., Ueno, H., Nantermet, P.G., Guy, R.K., Claiborne, C.F., Ranaud, J., Couladouros, E.A., Paulvannan, K. and Sorensen, E.J. 1994. *Nature*. 367:630. 61.Palomo, C., Arrieta, A., Cossio, F.P., Aizpurua, J.M., Mielgo, A. and Aurrekoetxea, N. 1990. *Tetrahedron Lett*. 31:6429. 62.Pandey, Ramesh, C., Yankov, Luben, K. 1997. Isolation and purification of paclitaxel from organic matter containing paclitaxel, cephalomannine and other related taxanes. US. P. 5654448. 63.Royer, I. 1995. Paclitaxel metabolites in human plasma and urine identification of 6-hydroxytaxol, fepitaxol and taxol hydrolysis products using liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 9(6):495. 64.Schiff, P.B., Fant, J. and Horwitz, S.B. 1979. *Nature*. 22:665. 65.Shao, L.K. 1997. Determination of paclitaxel and related Taxane in bulk drug and injectable dosage forms by Reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chem*. 69(11):2008. 66.Stasko, M.W., Witherup, K.M., Ghiorzi, T.J. 1989. *J. Liq Chromatogr*. 12 (11):2133. 67.Song, D. and Au, J.L.S. 1995. Isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography assay of taxol in biological fluids and tissues using automated column switching. *J Chromatogr B*. 663(2):337. 68.Sparreboom, A. 1995. Determination of paclitaxel and metabolites in mouse plasma, urine and faeces by semiautomated reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 664(2):383. 69.Vandana, V., Teja, A.S., Zalkow, L.H. 1996. Supercritical extraction and HPLC analysis of taxol from *Taxus brevifolia* using nitrous oxide and nitrous oxide + ethanol mixtures. *Fluid Phase Equilib*.116 (1-2):162-169. 70.Vanhaelen-Fastre, R., Diallo, B. and Jaziri, M. 1992. *J. Liq Chromatogr*. 15(4):697. 71.Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M. E. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. of Am. Chem. Soc*.93:2325-2327. 72.Wender, P.A. and Mucciario, T.P. 1992. *J.Am.Chem.Soc*.114:5878 73.Wickremesinha, E.R.M., Arteca, R.N. 1993. *J. Liq. Chromatogr*. 16(15):3263. 74.Witherup, K.M., Look, S.A., Stasko, M.W. 1989. *J. Liq. Chromatogr*. 12(11):2117. 75.Wu, D.R. 1995. Preparative separation of taxol in normal and reversed-phase operation. *J Chromatogr*. 702(1/2):233. 76.Wu, Y. 1997.

High-performance liquid chromatography determination of taxol and related Taxanes from *Taxus callus* cultures. *J. Liq Chromatogr & Relat Tech.* 20(19):3147.