



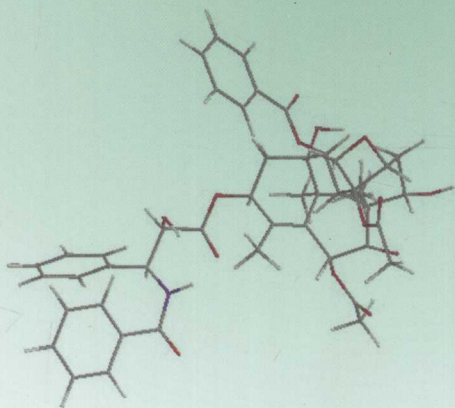
新世纪学术创新团队著作丛书


南方红豆杉可再生资源 高效加工利用技术


丛书主编 祖元刚

著者 付玉杰 祖元刚 顾成波

孙蕊 罗猛 等



 科学出版社
www.sciencep.com

 新世纪学术创新团队著作丛书

南方红豆杉可再生资源 高效加工利用技术

丛书主编 祖元刚

著者 付玉杰 祖元刚 顾成波 孙蕊 罗猛等

科学出版社

北京

内 容 简 介

红豆杉中紫杉烷类抗癌活性成分的提取纯化工艺，一直是红豆杉加工利用技术领域研究中的热点问题。本书共分10章，主要介绍了南方红豆杉可再生资源的高效加工利用技术；确定了南方红豆杉中紫杉烷类化合物含量积累的动态变化规律等内容。本书汇集了编著者长期积累的教学与实践经验，旨在为从事红豆杉加工的工作者提供较系统的理论知识和较全面的实用技术。

本书可供医药业、林业、生物化工等相关行业的科技工作者参考使用，也可作为高等院校植物学、植物化学、药学、制药工程、食品等相关专业研究生、本科生课程的教学用书或实验参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

南方红豆杉可再生资源高效加工利用技术/付玉杰等著. —北京: 科学出版社, 2010

(新世纪学术创新团队著作丛书)

ISBN 978-7-03-025094-0

I. 南… II. ①付… III. 红豆杉属-再生资源-综合利用-研究
IV. Q949.66

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 126494 号

责任编辑: 霍春雁 席 慧/责任校对: 张怡君

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 王 浩

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年2月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2010年2月第一次印刷 印张: 12 1/4

印数: 1—1 000 字数: 226 000

定价: 56.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

国家林业局引进国际先进农业科学技术创新项目
(2006-4-75) 资助

国家自然科学基金项目 (30770231) 资助

国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD18B04) 资助

黑龙江省杰出青年基金项目 (JC200704) 资助

本书编著者名单

付玉杰 祖元刚 顾成波 孙 蕊 罗 猛
李双明 祖柏实 刘 威 孔 羽 王 莹
骆 浩 华 欣

前 言

天然抗癌药物对攻克人类顽症、提高健康水平具有重大意义，是目前世界范围内医药领域的一大热点。近年来，人们在寻找抗癌生物资源及其天然产物方面获得了很大成功，尤其红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 中抗癌药物——紫杉醇及其衍生物的发现，使此项工作取得了突破性的进展。

从天然或栽培的红豆杉中提取分离紫杉醇仍是目前生产紫杉醇及半合成前体的主要途径。但红豆杉生长缓慢，紫杉醇在树皮中的含量极低，采用传统方法从红豆杉树皮中分离提取紫杉醇，资源耗费大，不能解决紫杉醇原料来源问题。

我国红豆杉加工利用技术水平较低，多数生产企业缺乏具有自主知识产权的创新技术，紫杉烷类化合物提纯工艺简单粗糙，获得产品种类少、产率低、纯度低、成本高、质量不稳定。为满足我国现代医药生产需求，改进传统红豆杉提取加工生产工艺，获取高收率和高质量的紫杉烷产品，已成为当务之急。

我国南方红豆杉具有资源储量大、生长快等优点，为改变我国红豆杉提取加工工艺技术落后的局面，充分开发利用我国红豆杉资源，提高紫杉烷类药物国际市场竞争能力，本研究旨在提高我国红豆杉加工利用的整体技术水平，建立具有自主知识产权的一次投料同时获得多个紫杉烷类化合物高附加值产品的高效率、高收率、高纯度的南方红豆杉产业化生产新工艺。

我的导师祖元刚教授自 1992 年以来长期从事植物活性成分基础和应用研究。1999 年我在祖教授的指导下进入博士研究生学习阶段，在导师的精心指导和设计下，我先后参加并完成了甘草黄酮、喜树碱、长春碱、紫杉醇等活性成分的高效诱导和提取分离等一系列研究工作。本书是课题组全体同事经过 4 年艰苦努力所完成的红豆杉中紫杉烷类活性成分提取加工技术的部分研究内容，现总结成本书。希望本书的出版能够促进以紫杉烷类抗癌活性成分为核心的林源活性物质的开发利用，推动我国红豆杉人工种植业、加工业和医药业经济产业链的发展，拉

动地方经济的增长，增加就业岗位，提高农民的收入；对我国林业生物制剂产业的快速发展和林业生物产业结构的合理升级起到积极的推动作用；并为癌症患者提供更多安全、有效、质量可靠的紫杉烷类药品，为人民健康事业做出一定贡献。

本书是集体智慧的结晶，是东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室和林业生物制剂教育部工程研究中心在药用植物活性成分提取纯化研究方面多年的工作总结。值此专著出版之际，谨向我的导师祖元刚教授及所有参加过此项研究工作的老师和同学致以崇高的敬意！感谢广东省农业科学院花卉研究所徐晔春先生友情提供的西藏红豆杉及中国红豆杉图片，感谢云南省丘北县林业局纪军先生友情提供的云南红豆杉图片。

由于作者水平有限，本书的不足和疏漏在所难免，不妥之处殷盼指正！

付玉杰

2008年8月

目 录

前言

第一章 绪论	1
一、红豆杉资源概述	1
(一) 中国红豆杉	3
(二) 云南红豆杉	4
(三) 西藏红豆杉	6
(四) 东北红豆杉	7
(五) 南方红豆杉	8
(六) 引入种——曼地亚红豆杉	10
二、红豆杉的开发利用价值	11
(一) 药用价值	11
(二) 其他应用价值	12
三、红豆杉中主要化学成分	13
(一) 紫杉烷类化合物	13
(二) 非紫杉烷类化合物	25
四、紫杉醇的生物合成	27
(一) 萜类前体 IPP 的生物合成	27
(二) 紫杉醇骨架及侧链的生物合成	29
五、紫杉醇的来源	31
(一) 直接从天然红豆杉植物提取	31
(二) 化学全合成法	31
(三) 化学半合成法	33
(四) 红豆杉组织、细胞及器官培养法	34
(五) 微生物发酵法	38
(六) 代谢工程法	42
(七) 优良红豆杉人工大规模种植	43
六、红豆杉资源加工利用技术研究现状	45
(一) 紫杉醇的初提工艺	46
(二) 紫杉醇纯化工艺	49
七、研究背景与目的	53

八、主要研究内容	54
参考文献	54
第二章 南方红豆杉中紫杉烷类化合物分析检测方法的研究	64
一、引言	64
(一) 高效液相色谱法	64
(二) 薄层色谱法	66
(三) 酶联免疫吸附法	67
(四) 毛细管电泳法	68
(五) 细胞生物学方法	68
(六) 超临界流体色谱法	68
二、实验材料和仪器	69
(一) 实验材料	69
(二) 实验仪器	69
三、实验方法	70
(一) 标准溶液的配制	70
(二) 样品溶液的制备	70
四、结果与讨论	70
(一) 色谱条件的优化	70
(二) 方法学的确定	71
(三) 样品溶液的测定	74
五、本章小结	75
参考文献	75
第三章 南方红豆杉中紫杉烷类活性成分含量动态变化规律研究	78
一、引言	78
二、实验材料和仪器	78
(一) 实验材料	78
(二) 实验仪器	79
三、实验方法	79
(一) 样品溶液制备	79
(二) 紫杉烷类化合物的 HPLC 检测条件	79
四、结果与讨论	80
(一) 南方红豆杉叶和茎中紫杉烷类化合物的时间分布规律	80
(二) 南方红豆杉新叶萌发期新老叶与茎中紫杉烷类化合物的分布规律	82
(三) 不同贮存温度对南方红豆杉中紫杉烷类化合物含量的影响	83
五、本章小结	83

参考文献	84
第四章 南方红豆杉中紫杉烷类化合物含量高效诱导技术研究	85
一、引言	85
二、紫外照射对南方红豆杉中紫杉烷类化合物含量诱导的研究	86
(一) 实验材料和仪器	87
(二) 结果与讨论	88
(三) 本节小结	92
三、氧气空化对南方红豆杉中紫杉烷类化合物含量诱导的研究	92
(一) 实验材料和仪器	93
(二) 实验方法	93
(三) 结果与讨论	93
(四) 本节小结	94
四、酸对南方红豆杉中紫杉烷类化合物含量诱导的研究	94
(一) 实验材料和仪器	95
(二) 实验方法	96
(三) 结果与讨论	97
(四) 本节小结	99
五、酶对南方红豆杉中紫杉烷类化合物含量诱导的研究	100
(一) 实验材料和仪器	101
(二) 实验方法	102
(三) 结果与讨论	103
(四) 本节小结	105
六、本章小结	106
参考文献	107
第五章 南方红豆杉中紫杉烷类化合物提取技术研究	109
一、引言	109
(一) 常用提取方法	109
(二) 常用提取溶剂选择	111
二、实验材料和仪器	112
(一) 实验材料	112
(二) 实验仪器	112
三、实验方法	113
(一) 紫杉烷类化合物的 HPLC 分析	113
(二) 不同提取方法的样品制备	113
四、结果与讨论	115

(一) 提取方法的选择	115
(二) 提取溶剂浓度的选择	116
(三) 提取液固比的选择	117
(四) 提取时间的选择	117
(五) 提取次数的选择	119
(六) 工艺验证	119
五、本章小结	120
参考文献	120
第六章 大孔吸附树脂 AB-8 对南方红豆杉中10-DAB III和 7-xyI-10-DAT 的富集分离技术研究	122
一、引言	122
二、实验材料和仪器	123
(一) 实验材料	123
(二) 实验仪器	123
三、实验方法	124
(一) 大孔吸附树脂的物理性质	124
(二) 大孔吸附树脂的预处理	124
(三) 树脂含水率的测定	125
(四) 样品溶液的制备	125
(五) 静态吸附与解吸实验	125
(六) AB-8、H1020、NKA-II 树脂的吸附动力学曲线	126
(七) AB-8 树脂的吸附等温线	126
(八) 动态吸附、解吸实验	126
(九) 树脂的吸附量和解吸率公式	126
四、结果与讨论	127
(一) 静态吸附与解吸实验	127
(二) AB-8、H1020 与 NKA-II 树脂的吸附动力学曲线	127
(三) AB-8 树脂的吸附等温线	128
(四) 动态吸附与解吸实验	132
五、本章小结	137
参考文献	137
第七章 南方红豆杉中紫杉烷类化合物的精制纯化技术研究	139
一、引言	139
(一) 柱层析	139
(二) 重结晶	141

二、实验材料和仪器	142
(一) 实验材料	142
(二) 实验仪器	142
三、实验方法	142
(一) 正相柱层析中硅胶的预处理与硅胶柱的制备	142
(二) 正相柱层析样品的制备与上样	143
(三) 正相柱层析样品的洗脱	143
(四) 反相柱层析中硅胶的预处理与硅胶柱的制备	143
(五) 反相柱层析中样品的制备与上样	144
(六) 反相柱层析中柱层析样品的洗脱	144
(七) 10-DAB III的结晶与重结晶	144
四、结果与讨论	144
(一) 正相柱层析对紫杉烷类化合物的分离纯化效果	144
(二) 反相柱层析对紫杉烷类化合物的分离纯化效果	146
(三) 10-DAB III的结晶与重结晶效果	147
五、本章小结	150
参考文献	150
第八章 南方红豆杉可再生资源高效加工利用技术中试试验	152
一、引言	152
二、南方红豆杉可再生资源匀浆空化-酶生物转化中试试验	152
(一) 试验原材料与仪器设备	152
(二) 中试工艺条件	154
(三) 结果与讨论	154
三、负压空化提取-负压空化快速解析技术粗分离南方红豆杉中紫杉烷 类化合物中试试验	155
(一) 试验原材料与仪器设备	155
(二) 中试工艺条件	159
(三) 结果与讨论	160
四、大孔吸附树脂 AB-8 分离纯化南方红豆杉中 7-xyl-10-DAT 和 10- DAB III 的中试试验	161
(一) 试验原材料与仪器设备	161
(二) 中试工艺条件	161
(三) 结果与讨论	162
五、连续中压柱层析技术分离纯化南方红豆杉中紫杉烷类化合物中试 试验	162

(一) 试验原材料与仪器设备	162
(二) 中试工艺条件	163
(三) 结果与讨论	165
六、本章小结	170
参考文献	171
第九章 南方红豆杉可再生资源高效加工利用技术的自主创新	172
一、建立了 RP-HPLC 同时快速分析检测南方红豆杉中紫杉烷类化合物的方法	172
二、首次建立了匀浆空化-酶生物转化技术高效诱导红豆杉中紫杉烷类化合物含量增量	172
三、首次建立了负压空化提取-负压空化快速解析技术粗分离紫杉烷类化合物	173
四、建立了应用大孔吸附树脂 AB-8 分离纯化 7-xyl-10-DAT 和 10-DAB III 的工艺条件	174
五、建立了连续中压正相、反相柱层析和重结晶技术分离纯化紫杉烷类化合物的工艺	174
六、结论与意义	175
第十章 中国发展红豆杉产业的主要对策	177

第一章 绪 论

肿瘤是一类严重威胁人们生命健康和生活质量的重大和主要疾病。据世界卫生组织报道,近几十年来全球癌症发病率每年以2%~3%的幅度递增,全球每年新增癌症发病人数现已超过1000万,每年死于癌症的总人数达630万以上。美国、欧洲各国、日本等发达国家每年新增的癌症患者达400万人左右。我国是癌症高发区之一,每年新增癌症发病人数达200万人左右,呈明显上升趋势。

目前,我国临床使用的抗肿瘤药物主要以植物生物碱和天然药物、烷化剂、抗代谢药物以及细胞毒类药物为主。长期以来,寻找抗癌生物资源与天然药物成为各国医药、化学及生物学家的共同愿望。科学家已经分别从植物、动物及海洋生物中提取出抗癌天然产物,尤其是继长春花植物中发现抗癌新药长春碱与长春新碱以后,从天然植物中寻找结构新颖、高效低毒、作用机制独特的抗癌活性成分已成为国内外抗癌新药的研发热点。20世纪90年代,紫杉醇及其衍生物的发现,更使这一领域的研究获得突破性进展。

紫杉醇是从珍稀濒危药用植物红豆杉的树皮、树根及枝叶中提取分离的一种植物次生代谢产物,是近年国际市场上最热门的抗癌药物,被誉为20世纪90年代抗癌药物的“三大发现”之一,具有极高的开发价值。

近年来,在高额利润的驱使下,我国野生红豆杉资源遭到了严重破坏,红豆杉原料供需矛盾的日益突出,红豆杉中紫杉烷类化合物提取分离技术落后,已成为红豆杉产业发展的“瓶颈”。如何在保护这一珍稀自然资源的基础上,促进资源的生长和可持续开发利用,是我国红豆杉加工利用产业面临的最大挑战。

我国红豆杉资源比较丰富,但红豆杉传统加工技术比较落后,本书以南方红豆杉为研究材料,对红豆杉中紫杉烷类化合物检测分析方法、动态变化规律、高效诱导技术、提取分离技术、精制纯化技术及中试生产技术等方面的关键问题进行了详细介绍,旨在推进利用自主创新技术,高效加工利用红豆杉资源的产业化进程,为促进我国红豆杉资源的保护及其规模化开发提供理论依据并指明努力方向。

一、红豆杉资源概述

红豆杉别名:紫杉、赤柏松、观音杉等。

植物界裸子植物门,红豆杉纲(Taxopsida),红豆杉目(Taxales),红豆杉科(Taxaceae),红豆杉属(*Taxus*)常绿针叶乔木和灌木。

红豆杉为浅根植物，其主根不明显，侧根发达。每到秋季，红豆杉绿色的叶子中泛起类似红豆一样鲜红的果实，故而得名红豆杉。红豆杉是第四纪冰川遗留下来的古老树种，在地球上已有 250 万年的历史，是世界珍稀濒危的古老树种，是植物中的“大熊猫”、“活化石”。红豆杉属植物被《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 列为保护物种，全世界野生红豆杉仅有 1000 万株左右。红豆杉因具有防癌、抗癌的巨大药用功能，而成为征服癌症的“希望之树”、价值昂贵的植物黄金。

红豆杉属植物为常绿乔木或灌木，为典型的阴性树种，高达 34 m，胸径可达 90 cm。一年生小枝绿色，秋季为黄绿色或淡褐色，2~3 年生小枝黄褐色、淡红褐色或褐色。叶螺旋状着生，基部扭转排成两列，条形，微弯，长 1.0~2.5 cm，宽 2.0~2.5 mm，边缘微反曲，前端渐尖或微急尖，上面深绿色，下面淡黄绿色，有两条淡黄绿色气孔带，中脉密生均匀的微小孔点。雌雄异生，球花单生叶腋，雄球花淡黄色，具柄，基部有鳞片的头状花序，雄蕊 8~11 枚，盾状，花药 4~8 枚。雌球花的胚珠单生于花轴上部侧生短轴的顶部，基部托以圆盘状假种皮，下部有苞片数枚。种子卵圆形，坚果状，生于红色杯状肉质的假种皮中，长 5.0~7.0 mm，直径 3.5~5.0 mm，前端具有 2 脊，种脐卵圆形，常 10 月份成熟。其天然更新有两种方式：种子繁殖和无性系萌芽繁殖。种子皮厚，处于深休眠状态。自然状态经两冬一夏才能萌发，形成的幼苗抗逆性差，成活率也很低。

红豆杉属植物全球约有 11 种，我国有 4 种及 1 变种。从全球范围看，红豆杉属植物分布于北半球温带至中亚热带地区，以亚洲的储量为最大，我国的红豆杉就占全球储量的一半以上。主要分布于欧洲的有欧洲红豆杉 (*Taxus baccata*)；主要分布于北美洲的有短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*)、加拿大红豆杉 (*Taxus canadensis*)、佛罗里达红豆杉 (*Taxus floridana*) 和直立杂种红豆杉 (*Taxus media*、*Taxus speciosa*、*Taxus fastigiata*) 等；主要分布于我国的有中国红豆杉 (*Taxus chinensis*)、云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis*)、西藏红豆杉 (*Taxus wallichiana*)、东北红豆杉 (*Taxus cuspidata*) 和南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *maireri*)，其中中国红豆杉和南方红豆杉为我国所特有 (中国科学院中国植物志编辑委员会，1978)。红豆杉全属所有种均已列为国家一级重点保护野生植物。

由于红豆杉种群竞争力弱、天然更新缓慢和地理分布局限等客观因素，导致红豆杉属植物早在 20 世纪 80 年代就被列入国家二级保护植物。由于从红豆杉的树皮和枝叶中提取的紫杉醇是世界公认的具有抗癌功效的天然化合物。90 年代以来，随着抗癌新药紫杉醇的开发利用，红豆杉原料供需矛盾日益突出，人类掠夺式的生产经营活动，加剧了其濒危程度，1999 年我国将红豆杉属物种列入国家一级保护植物。

(一) 中国红豆杉

中国红豆杉 (*Taxus chinensis*) 是中国特有种 (图 1-1), 为我国原产, 属红豆杉科紫杉属 (*Taxus*) 常绿乔木。分布较为广泛, 主要分布于甘肃南部、陕西南部、湖北西部、四川等地, 华中区多见于 1000 m 以上的山地上部未干扰环境中, 华南、西南区多见于 1500~3000 m 的山地落叶阔叶林中。相对集中分布于横断山区和四川盆地周边山地约 40 余县, 现存资源蕴藏量较大, 保存相对较好 (钱能斌, 1996), 在广西北部、贵州东部、湖南南部也有分布。



图 1-1 中国红豆杉 (广东省农业科学院花卉研究所徐晔春 摄影)

Fig. 1-1 *Taxus chinensis* (Floriculture research institute of guangdong academy of agricultural sciences Xu yechun photography)

水平分布: 黄河以南部分省 (自治区)。

分布区: 陕西南部, 甘肃东南部, 四川西部、东部和西北部, 重庆南部, 云南东北部和东南部, 贵州中部和东南部, 湖北西部, 湖南西北部, 广西东北部, 安徽南部和浙江北部。

垂直分布: 在贵州东南部最低, 海拔 750 m, 在四川西南部最高, 达 2700 m。在湖北、湖南、安徽、云南、广西、浙江分布海拔为 1000~1600 m, 陕西、甘肃及重庆东部为 1400~1800 m。四川西部为 1600~2400 m, 四川西南

部为2200~2700 m。

分布特点：分布范围广，松散，种群密度低，多生长于针阔混交林中，呈零星分布。

中国红豆杉生物学特性

常绿乔木，高30 m，胸径达1 m。叶螺旋状，基部扭转为二列，条形，略微弯曲，长1~2.5 cm，宽2~2.5 mm，叶缘微反曲，叶端渐尖，叶背有2条宽黄绿色或灰绿色气孔带，中脉上密生有细小凸点（马明东和刘跃建，2004）。种子扁卵圆形，有2棱，种脐卵圆形，有红色杯状的假种皮，成熟期在9~11月。

性喜生长于气候较温暖多雨地方，为典型的阴性树种。常处于林冠下乔木第二、三层，散生，基本无纯林存在，也极少团块分布。只在排水良好的酸性灰棕壤、黄壤、黄棕壤上良好生长，苗喜荫、忌晒。其种子种皮厚，处于深休眠状态，自然状态下经两冬一夏才能萌发，天然更新能力弱。用种子繁殖。种胚休眠期较长，采种后必须在低温下用湿沙层积贮藏，春季播种，发芽期可延至第二年。用扦插法亦能繁殖。

（二）云南红豆杉

云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis*) 别名西南红豆杉 (图 1-2)，集中分布于



图 1-2 云南红豆杉 (云南省丘北县林业局纪军 摄影)

Fig. 1-2 *Taxus yunnanensis* (Forestry bureau of Qiubei county, Yunnan province Jijun photography)