

省產天然台灣紅豆杉母樹枝葉內紫杉烷類 含量之變異*

何政坤^{1,2)} 張淑華¹⁾ 陳振榮¹⁾

摘要

台灣紅豆杉以胸徑 50-100 cm 以上的巨樹, 稀疏散生於台灣的高山上。從本省各地區採集台灣紅豆杉枝葉 35 株, 每株採集小量樣品約 50 g 鮮重, 用 HPLC 分析 6 種紫杉烷類的含量, 包括: 10-deacetyl baccatin III (DB), baccatin III (BC), 10-deacetyl taxol (DTX), cephalomannine (CPH), taxol (紫杉醇), 7-epi-10-deacetyl taxol (ETX), 依各地區、天然群生的種原、母樹進行層級分析, 結果顯示枝葉中 CPH 與紫杉醇主要的變異來源係在地區內種原間, 而 DB、DTX 與 ETX 則來自種原內母樹間。顯示要找尋高含量紫杉醇化學品系可在地區的種原間發現, 而 DB 則可在單株間發現。針葉中紫杉烷類間之相關分析顯示, 除了 ETX 外, 紫杉醇與其他紫杉烷類均呈現極顯著的相關, 但在綠枝中紫杉醇與其他紫杉烷類含量並無相關存在。針葉中紫杉烷類含量, 除了 DB 與 BC 含量與綠枝相當外, 其他均高於綠枝 2-3 倍。為了進一步由小量樣品確定紫杉烷類的含量, 大量樣品經萃取後經管柱層析純化後再加以定量, 結果顯示在管柱的滯留時間較長的 DTX, CPH, 紫杉醇與 ETX 的含量在大、小量樣品間相當一致, 但 DB 與 BC 則顯示被低估。由於不同母樹間針葉中紫杉醇類的含量為 0-368 ppm, DB 為 0-3600 ppm, 二者的變異相當大, 顯示其選種價值極高。

關鍵詞: 紫杉烷類、紫杉醇、台灣紅豆杉、變異分析。

何政坤、張淑華、陳振榮 1997 省產天然台灣紅豆杉母樹枝葉內紫杉烷類含量之變異。台灣林業科學 12(1): 23-37。

Content Variation of Taxanes in Needles and Stems of *Taxus mairei* Trees Naturally Distributed in Taiwan

Cheng Kuen Ho^{1,2)}, Shu Hwa Chang¹⁾ and Zen Zong Chen¹⁾

【 Summary 】

Taxus mairei, standing as giant trees with more than 50-100 cm in diameter at breast height is sparsely scattered in high mountains of Taiwan. To determine content variation of 6 taxanes: 10-deacetyl baccatin III (DB), baccatin III (BC), 10-deacetyl taxol (DTX), cephalomannine (CPH), taxol, and 7-epi-10-deacetyl taxol (ETX), small samples (50 mg fresh weight) of needles and stems each were

1) 台灣省林業試驗所育林系, 台北市南海路53號 Division of Silviculture, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nan-Hai Rd., Taipei, Taiwan, ROC.

2) 通訊作者 Corresponding author

1996年8月送審 1996年9月通過 Received August 1996, Accepted September 1996.

* 本研究承行政院農業委員會85-科技-1.1-糧-49(16)研究計畫經費補助, 特予致謝。

collected separately from 35 individual trees. A 3-level nested analysis was conducted according to different locations in Taiwan, the provenance where trees are scattered in the same mountain area, and individual trees within a provenance. The results revealed that most variation of sources of CPH and taxol came from a provenance within locations, whereas that of DB, DTX, and ETX came from individual trees within a provenance for both needles and stems. This suggests that chemical races with high contents of taxol in branches should be selected within a provenance while those with high DB content should be from individual trees. Taxol content in needles showed a very significant relationship with other taxanes except ETX, however, it did not show any relation with other taxanes in stems. Amounts of taxanes in needles were 2-3 times more than those in stems, except for DB and BC. To confirm the amounts of taxanes determined by small-quantity samples, more precise quantification of taxanes was performed by purifying extracts of a large amount of needles using column chromatography. Taxanes with longer retention times such as DTX, CPH, Taxol, and ETX had similar concentrations between small- and large- quantity samples. However, DB and BC, that are easily interfered with impurities, were under-estimated in small samples. In needles of different trees, the existence of great variations of taxol ranging from 0 to 368 ppm and DB ranging from 0 to 3600 ppm showed that it is important to select for breeding in *Taxus mairei*.

Key words : taxanes, taxol, *Taxus mairei*, variation analysis.

Ho, C. K., S. H. Chang, and Z. Z. Chen. 1997. Content variation of taxanes in needles and stems of *Taxus mairei* trees naturally distributed in Taiwan. *Taiwan J. For. Sci.* 12(1): 23-37.

一、緒言

紫杉醇為 1980 年代來，被譽為最具希望之抗癌藥物，對卵巢癌尤具效力（何禮剛，1993）。由於紫杉醇僅存在於全世界均稀有的紫杉類樹種中，而估計治療一個病人需 2-3 株 50-60 年生樹木的樹皮，而 1 公斤紫杉醇需要砍 2,000 到 4,000 株樹（Christopher, 1993）。因此找尋可再生的材料成為世界性的目標，總計這些方法可歸類如下：(1)採收枝葉 — 尋找高含量之化學品系（Mattina and Paiva, 1992; Wheeler and Hehnen, 1993）。(2)半合成 — 利用紫杉醇之前驅物合成紫杉醇，其中最重要的前驅物為：10-deacetyl baccatin 與 baccatin III（Zhiri *et al.*, 1995）。(3)全合成 — 需要 28 個步驟，尚未包括開始合成前的二化學物，且這些步驟中有一步驟的合成率僅 23%，致總收率僅 0.5%，離商業生產還有漫長的路（Nicolaou *et al.*, 1994）。(4)利用寄生在太平洋紫杉之真菌 *Taxomyces andreanae* 來生產紫杉醇（Stierle *et al.*, 1993），此方法相當被看好，但目前尚無進一步的報告。(5)利用組織培養生產

（Fett-Netto *et al.*, 1992, 1993）。目前在這些方法中以採收枝葉提煉紫杉醇最快速且經濟可行，Wyerhauser 公司即選育高含量紫杉醇的品種栽植 15,000,000 株，以建立紅豆杉枝葉採割林（Wheeler and Hehnen, 1993）。其次為組織培養，目前已有多篇報告與專利。因此選育優良的化學品系以提高生產，頗受重視，為紫杉醇供應的主要來源。紅豆杉針葉內紫杉醇含量分析在許多的紫杉屬內如：太平洋紫杉（*T. brevifolia*）（Witherup *et al.*, 1990; Vance *et al.*, 1994）、英國紫杉（*T. bacata*）（Denis *et al.*, 1988; Vanhaelen-Fastre *et al.*, 1992）、日本紫杉或稱東北紫杉（*T. cuspidata*）（Yoshizaki *et al.*, 1988; Fett Netto and DiCosmo, 1992; Fang *et al.*, 1993）加拿大紫杉（*T. canadensis*）（Blay *et al.*, 1993）、及紫杉（*T. chinensis*）（Xu and Liu, 1991; Zhang *et al.*, 1995）均有研究報告發表，在台灣紅豆杉（*T. mairei*）雖然已有多篇有關其木材、根部之二萜類（diterpenoids）成分的報告（Lian *et al.*, 1988; Yeh *et al.*, 1988; Liang and Kingston, 1993; Shen *et al.*, 1996），但有系統的對其枝葉紫杉烷類含量的報告卻未之見。台灣紅豆杉係散生且稀疏分佈於

全省中高海拔 1000-2500 公尺難以到達的高山上, 多呈胸徑 50-100 cm 以上的巨木存在 (Li, 1975), 為台灣極重要的寶貴資產。本研究即在探討省產台灣紅豆杉針葉紫杉烷類 (taxanes) 含量的變異, 是否值得進行高含量紫杉醇化學品系的選育研究。

二、材料與方法

(一) 母樹採集及試驗設計

在本省各地區採集台灣紅豆杉天然母樹 35 株, 依據母樹分佈地區及群生狀態, 劃分成北、中、東、南部, 其成區域性散生聚集狀態視為一種原, 但有的種原的台灣紅豆杉並沒有群聚的現象, 僅能發現 1-2 株, 如東部慈恩與南部藤枝, 僅可供作該區的參考。由於台灣紅豆杉樹形高大, 故所採的枝葉係屬樹冠中、下層的枝葉, 並無樹冠上層的枝葉參與試驗。各種原內每株母樹採集針葉及去除針葉的綠色小枝鮮重約 50 g, 經萃取分析其成分後, 以 SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, 1989) 之層級分析 (nested analysis) 統計地區、種原、母樹間之變異。

(二) 紫杉烷類成分之定性與定量

以美國癌症研究所 (National Cancer Institute) 所贈與之 6 種紫杉烷標準品: 10-deacetyl baccatin III (10-去乙酰巴卡亭 III, 簡寫 DB), baccatin III (巴卡亭 III, 簡寫 BC), 10-deacetyl taxol (10-去乙酰紫杉醇, 簡寫 DTX), cephalomannine (三尖杉醇, 簡寫 CPH), taxol (紫杉醇, 簡寫 TX), 7-epi-10-deacetyl taxol (7-表-10-去乙酰紫杉醇, 簡寫 ETX) 等六種標準品, 各製成 10, 50, 250 ng/ μ L 濃度, 在 TC4 軟體 (Perkin Elmer Co.) 控制下, 用自動取樣機 (Autosampler, IS200, Perkin Elmer Co.) 取 20 μ L (即紫杉烷類標準濃度為 200, 1000, 5000 ng), 定量注射入 HPLC (Series 200 Lc pump, Perkin Elmer Co.), 經光電二極體偵測器 (235c Diode Array Detector, Perkin Elmer Co.) 在 230 nm 的波長下偵測。所用的管柱係 Lichrospher RP-18 分析管, 管柱長 250 \times 4 mm, (particle size: 5 μ m, end capped, Merck Co.), 沖提溶液之移動相組成

(mobile phase) 為 20:38:42 MeOH (methanol) /ACN (acetonitrile) /H₂O 的溶液組成 (Vanhalen-Fastre *et al.*, 1992), 流速為 1 mL/min, 求出各標準品濃度的直線公式, 當下述不同母樹枝葉萃取液樣品經 HPLC 分離與偵測後, 此時 TC4 軟體會比對標準品與樣品各分離成分的滯留時間 (retention time), 並鑑定該成分, 同時也可顯示此一成分之最大光波吸收值及純度值, 並依該標準品的濃度直線公式求出此成分的含量。各紫杉烷類含量係以每公斤葉粉乾重所含該成分的毫克數 (mg/kg 乾重) - ppm 表示, 其算法係該成分依標準品濃度直線公式求出的濃度 ng \div 20 μ L 樣品注射量 \times 30 mL 樣品萃取液 \div 葉粉萃取後乾重 g。每樣品均重複注射 2 針以上, 各成分之含量即取其均值。

(三) 枝葉萃取與成分分析

針葉與綠枝的萃取系改變自 Fetto-Netto and DiCosma (1992) 與 Witherup *et al.* (1990) 方法, 取針葉及去葉之綠色小枝各 50 g 與 100 mL hexane 混合, 在攪碎機中打碎成約 0.1 mm-4 mm 大小的碎片, 置於震盪器中 24 小時後, 將 hexane 過濾掉, 將剩餘的葉粉與 100 mL dichloromethane (DCM): methanol (MeOH) 等比例混合溶液充分混合後, 置於震盪器上, 以 120 rpm 震盪萃取約 3 天, 過濾出萃取液, 將剩餘的葉渣再用等比例的 DCM 與 MeOH 溶液萃取一次, 將萃取過的葉渣置於以秤好乾重的濾紙上, 在 60 $^{\circ}$ C 烘箱內烘乾 3 天, 取出秤到恆重, 以獲得葉粉乾重。將二次的萃取液合在一起, 用真空減壓濃縮機 (vacuum evaporator) 在 40 $^{\circ}$ C 濃縮乾燥, 再用 100 mL DCM 溶解後, 加 100 mL 純水, 攪拌混合 2 小時後置於分液漏斗, 靜置分離, 取出下層之 DCM 溶液, 上層之水溶液再加 100 mL DCM 萃取, 將二次所獲得的 DCM 層溶液, 用真空減壓濃縮機濃縮, 然後用 30 mL MeOH 溶出。吸取 2 mL MeOH 萃取液, 經 0.2 μ m 之 nylon milipore 過濾後, 經上述 HPLC 的條件偵測出 6 種紫杉醇類之含量。

(四) 大量針葉之萃取及純化

由於小量樣品在萃取過程中可能產生誤差, 因此需以大量樣品來比較小量樣品的估值。由於

台灣紅豆杉係屬列管的保育樹種，因此僅擇枝葉較茂盛的單株大禹嶺 (R1) 與 瑞岩 (ZB26) 的針葉各約 340 與 780 g 鮮重，其萃取與純化的步驟流程如 Fig. 5 所示，其中萃取濃縮過程與小量樣品相同，唯因不純物含量高，需進行管柱層析 (column chromatography) 純化，首先利用薄層分析 (thin layer chromatography) 測定適當的沖提溶液組成，方法是矽膠薄層 (silica gel 60F254, aluminum sheet, Merck 10554) 切成長 7 cm 寬 3 cm 大小，將紫杉醇標準品及微量濃縮物的 MeOH 溶解液點滴在基線上，用不同的 acetone (ACT)/DCM 比例及 MeOH 溶液沖提 (Castor and Tyler, 1993)，測定出不純物與紫杉烷類分離的最佳的溶液組成，然後運用在管柱層析上，方法是將 70—230 mesh 的矽膠 180 g 裝填在長 46.5 cm 內徑 3.2 cm 的玻璃管柱內，再以薄層的海砂鎮壓。管柱先用 500 mL ACT/DCM 為 1/10 (v/v) 比例流洗條件化後，再沿著管壁將溶於 ACT/DCM (1/1, v/v) 溶液的樣品萃取濃縮液緩緩注入，然後依次用：ACT/DCM 比例 1/10、1/5、1/1、10/1 各 1 L 沖提，最後用 100% MeOH 1 L 將所有成分沖提出來。各部份沖提出來的溶液經濃縮後秤重，其總重與沖提前之濃縮物重之百分比，即為經過管柱層析後的回收率 (% yield)。各部份沖提物取約 2.5 mg 溶於 2 mL MeOH 溶液，用 HPLC 測定出各沖提物內所含成分的種類及含量，發現大部份成分均在第三部份 (Fraction 3) ACT/DCM 為 1/1 的沖提液中，由於仍有不純物存在，故又取此部份的沖提物進行第二次的管柱層析，此次用粒子較小的矽膠 230-430 mesh 180 g 填充於玻璃管柱 (長 25 cm，內徑 3.2 cm)，以 ACT/DCM 1/3 (v/v) 100、100、200、500 mL 及 ACT/DCM 1/1 (v/v) 500 mL 依次沖提收集，各部份沖提液分別經濃縮後，依上述同樣的方法經 HPLC 測定出其成分種類與含量。並用成分收集器 (Foxy Jr. Fraction Collector, ISCO) 收集各不同滯留時間的成分，進一步確定其成分含量的純度，作為管柱層析條件的選擇依據。

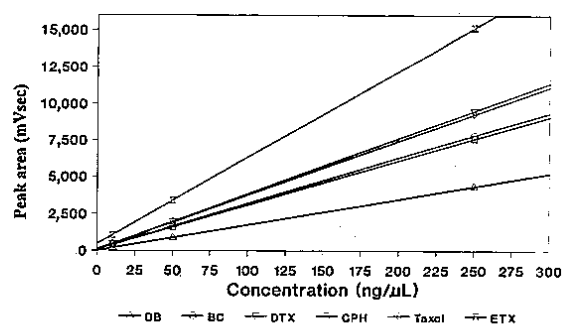


Fig. 1. Linearity curves of 6 taxane standards. Chromatographic conditions: isocratic at 1 mL/min at MeOH:ACN:H₂O (20:38:42). DB: 10-deacetyl baccatin III, BC: baccatin III, DTX: 10-deacetyl baccatin III, CPH: cephalomannine, ETX: 7-epi-10-deacetyl taxol.

三、結果與討論

(一) 紫杉醇類標準品之濃度曲線及樣品之鑑定與定量

將 6 種紫杉烷類 (taxanes) 標準品：DB，BC，DTX，CPH，TX，ETX，以 MeOH (HPLC 級) 溶解後，互相混合成各成分均具有 650-1000 ng/μL MeOH 的濃度混和溶液，以 1 mL/min 流速的沖提溶液流經 Lichrospher RP-18 管柱，起初所用之沖提溶液組成為等濃度 (isocratic) 混和之 MeOH/ACN/H₂O 為 20:35.2:44.8 (Mattina and Paiva, 1992)，唯所需分離的時間需達 40 分鐘 (Fig. 3)，後又經試驗不同比例混和之移動相組成後，發現用 MeOH/ACN/H₂O (20:38:42 (Vanhaelen-Fastre *et al.* 1992) 可在 15 分內將 6 種紫杉烷類全部分離出來 (Fig. 2)，雖然紫杉醇與 ETX 二成分間略有重疊，但實際樣品中，ETX 濃度較低，重疊度不大，對估測值影響較小。CPH、TX 與 ETX 三種成分很難在等濃度不同比例的 MeOH:ACN:H₂O 組成的沖提溶液中分離出來 (Richeimer *et al.*, 1992; Ketchum and Gibson, 1993) 因此有許多報告曾嘗試用多種管柱希望能有效的分離出此 3 種成分，甚至因此發展出特別分析此三成分的管柱如思必可有限公司 (Super Chroma Enterprise, Ltd.) 之 LC-F 管柱，但經作者等實驗結果，仍與本實驗所用的 RP-18 類似，

CPH 與 TX 或 TX 與 ETX 之 peak 間總略有重疊, 利用不同濃度梯度 (gradient) 的沖提溶液組成, 雖能有效分離 (Richheimer *et al.*, 1992; Ketchum and Gibson, 1993), 但所需時間長達 50-60 分鐘, 且二樣品間的注射平衡時間也要 5-10 分鐘, 時間過長, 樣品儲存在試樣瓶內, 瓶蓋經自動取樣器穿孔後, 由於 MeOH 的揮發, 造成兩針間的濃度容易產生嚴重的誤差, 此外對大量樣品間的檢定, 費時頗長, 故仍採用本實驗建立之條件。

依據 6 種紫杉烷類標準品在不同濃度所測定出之濃度直線如 Fig. 1 所示, 直線的相關係數 $r > 0.99$, 因此依據此一直線公式可估測出樣品中各種紫杉醇類的濃度。為進一步確認樣品中各成分與標準品一致, 另再加入標準品於樣品中, 再從其層析圖 (chromatogram) 中, 觀察被認定的成分的波峰 (peak) 是否加強, 如 Fig. 3a1. 為 ZB26 樣品之層析圖, a2 為加入標準品紫杉醇 (TX) 之層析圖, 其 TX 波峰吸收面積 a1 由原來的 2175 mV.sec (註: Fig. 3 之波峰吸收面積單位 $1000 \mu Vsec = 1 mVsec$) 增加至 a2 的 4090 mVsec, a3 為紫杉醇標準品之層析圖, 三者的 TX 波峰滯留的時間均一致, 顯示此一波峰當為紫杉醇。比對此三個層析圖的紫杉醇波峰在紫外光區的吸收光譜 (spectrum), 亦呈現相當一致 (Fig. 3b)。利用此一模式, 可確認台灣紅豆杉 6 種紫杉烷類的成分及含量。不過在此 6 種紫杉烷類中因 DB 極性較其他 5 種成分強, 滯留在管柱的時間較短, 因此在樣品的分析中, 常與不純物相伴而出, 無法準確定量, 暫以該成分的波峰與其前後成分之波谷為基線, 粗估其含量, 唯有經過純化後之大量枝葉萃取樣品, 才可能確認其準確的含量。

(一) 台灣紅豆杉枝葉之紫杉醇類成分之變化

1. 地區間的變異

根據上述建立的分析方法, 將不同地區採集台灣紅豆杉針葉與綠枝, 經化學溶劑萃取及 HPLC 分析後, 所測得知各單株枝葉之 6 種紫杉烷類的含量, 依照台灣紅豆杉在北、中、東、南 4 地區及各地區不同種原之層級進行統計分析, 結

果顯示針葉中各紫杉烷類在不同地區間的變異成分百分比中 (Table 1), 以 BC 最大, 佔了 56%, 其次為 DB。紫杉醇 (TX) 與三尖杉醇 (CPH) 沒有地區上的差異。這可以從地區間各紫杉烷類成分含量均值的標準偏差 (STD) 看出, DB 與 BC 的 STD 特別高, 甚至高過均值。從 Table 3 之 BC 在南部藤枝 (TD) 與東部慈恩 (TN) 顯著高於北、中地區。DB 則以東部高於其他地區。紫杉烷類在綠枝的含量, 在地區間僅 ETX 變異較大 (Table 2), 其他成分在各地區呈現相當一致。從 Table 4 中顯示南部的 ETX 含量近乎零, 可以看出變異來源的主因。

比較針葉與綠枝中紫杉烷類含量顯示除了 DB 與 BC 外, 其他各成分針葉含量均高於綠枝 1-2 倍以上, 主要原因係綠枝因含有木質化的維管束, 乾重較重, 另一個原因可能如 Vidensek *et al.* (1990) 的分析指出紫杉烷類主要存在於皮部而木心部含量極少所致。DB 在綠枝含量可比擬針葉, 主要原因係綠枝的萃取液的不純物低於針葉, 因此 DB 的分離效果較針葉佳, 因此測出的含量也較接近於真正的含量。

2. 地區內種原間的變異

地區內種原間變異的來源在針葉中, 以 CPH、紫杉醇最明顯, 高達 57%-73% (Table 1), 顯示在某一地區之種原含量特別高, 從 Table 3 各地區間種原內單株針葉成分的含量顯示, 中部地區之梨山、大禹嶺 (LC、DR) 種原, 東部

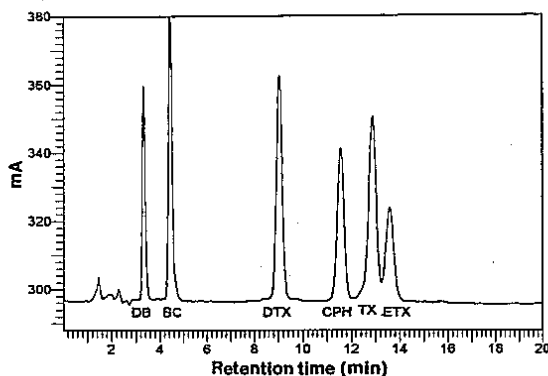


Fig. 2. Chromatogram of a mixture of 10-acetyl baccatin III, baccatin III, 10-deacetyl taxol, cephalomannine, taxol, and 7-epi-10-deacetyl taxol on RP-18 column. Chromatographic conditions: isocratic for 20 min at 1 mL/min with MeOH/ACN/H₂O (20:38:42).

之慈恩 (TN) 種原之此二成分含量均較高，而其他地區之各種原有偏低的趨勢。變異成分百分比次高的為 DTX ，在 Table 3 亦可看出東部慈恩 (TN)、中部梨山 (LC) 含量較高。

在綠枝中之紫杉烷類之變異，除了紫杉醇和 CPH 與針葉一樣為主要變異來源外，BC 與 DTX 也同樣的高達約 60% 以上 (Table 2)，如 BC 以中部的大禹嶺 (LC)、畢祿溪 (WS)，而 DTX、CPH 及紫杉醇均以大禹嶺 (DR) 最

高 (Table 4)。

3. 種原內單株間的變異

在針葉中，DB、DTX、ETX 單株間的變異高達 50% 以上 (Table 1)，其次為 BC，較低的為 CPH 與紫杉醇，但也有約 20% 的變異率。以 ETX 與 DB 二成分而言，變異成分百分比達 86 與 74%，所以在 Table 5 中各單株含量中，南庄的 NJ 11 含 ETX 415 ppm，梨山的 LC5 與 LC8 含 DB 3000 ppm 以上，均顯著高於其他單株。BC 則以慈恩的 TN1，藤枝的 DNI 含量較高，有 130 ppm 左右。DTX 則以大禹嶺的 DR2、南庄的 NJ4 及慈恩的 TN1 含 400-500 ppm 以上最佳。CPH 仍以慈恩 TN1 及大禹嶺 DR1 有 400 ppm 以上最佳。最重要的紫杉醇含量，以梨山的 LC8 含 368 ppm 顯著高於其他單株。Fig. 4 為四種差異較大的單株與紫杉醇標準品重疊的層析圖，可以看出有的單株紫杉醇與 ETX 的含量均高 (LC8)，有的較低 (TD1) 或幾近全無 (AN1)，有的紫杉醇極低但 ETX 含量 11 特高 (NJ11)。以同樣方法萃取，各單株的不純物含量也不一致，故對 DB 含量的影響也就各異，如 NJ11 不純物較少，故 DB 波形純度高，但其他 3 株的 DB 波形的中、下部與不純物重疊，由於 DB 的定量係以 DB 波形前後的波谷連線的吸收面積所測定，故 DB 含量在本實驗確有被低估的現象 (參見下文經純化後的 DB 含量)。在所分析的單株中，AN1 係最特殊的一株，其紫杉烷類含量近乎全無。

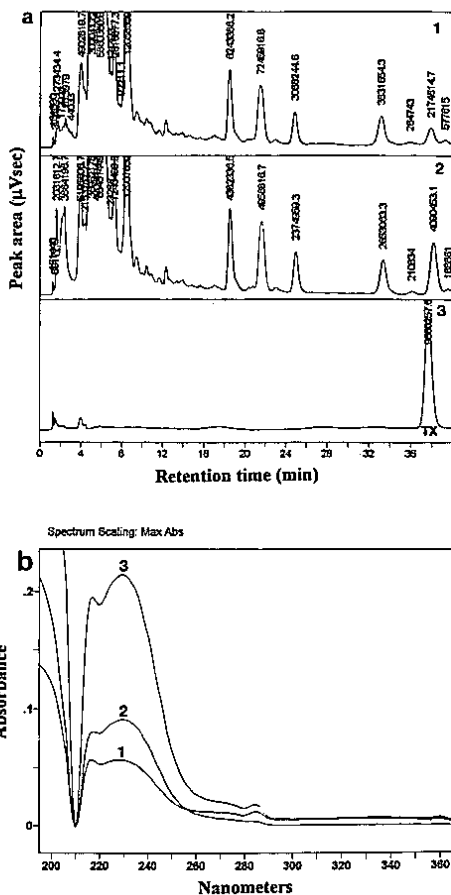


Fig. 3. Chromatographic profiles of extracts of *T. mairei* needles and taxol standard (a)，and their spectra of taxol peaks scanned by diode array detector (b)。a1 and b1: chromatogram and spectrum of needle extract of tree ZB26; a2 and b2: ZB26 extract plus taxol standard; a3 and b3: taxol standard. Chromatographic conditions: isocratic for 40 min at 1 mL/min with MeOH/ACN/H₂O (20: 35.2:44.8)。Values above peaks of chromatogram represent the absorption areas of components (unit: μ Vsec)。

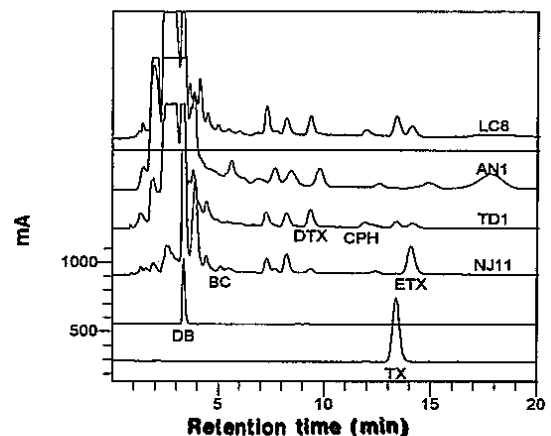


Fig. 4. chromatographic profiles of 4 needle extracts of different trees and taxol standard to represent the great variation of taxanes among *T. mairei* trees.

Table 1. Nested analysis of taxane contents in *Taxus mairei* needles among different locations, provenance, and trees.

Source of variation	Df	Component (%)					
		DB	BC	DTX	CPH	Taxol	ETX
Location	3	22	56	14	0	0	14
Provenance	5	0	0	25	57	73	0
Trees	26	74	43	52	18	26	86
Errors	36	4	1	9	25	1	1
Means (ppm) ± STD		720 ± 352.6	23 ± 25.7	147 ± 37.2	114 ± 37.2	97 ± 17.5	50 ± 20.5

DB: deacetyl baccatin; BC: baccatin III; DTX: 10-deacetyl taxol; CPH: cephalomannine; ETX: 7-epi-10-deacetyl taxol.

Table 2. Nested analysis of taxane contents in *Taxus mairei* green stems among different locations, provenance, and trees.

Source of variation	Df	Component (%)					
		DB	BC	DTX	CPH	Taxol	ETX
Location	2	0	0	0	0	0	21
Provenance	4	0	77	59	75	59	0
Trees	15	99.7	18	41	22	41	79
Errors	22	0.3	5	0	3	0	0
Means (ppm) ± STD		710 ± 0.0	16 ± 0.0	39 ± 3.0	27 ± 7.4	39 ± 3.0	13 ± 4.9

Table 3. Variation of taxane contents (ppm) in needles collected at different provenances.

Provenance	No. of trees	DB	BC	DTX	CPH	Taxol	ETX
C1	2(AN)	768 b	0 c	32 c	11 c	6 d	0 a
C2	8(LC)	1348 ab	16 c	154 c	150 b	188 b	54 a
C3	2(DR)	68 b	0 c	310 b	354 a	246 ab	51 a
C4	5(ZU)	767 b	4 c	49 c	81 bc	65 cd	14 a
C5	5(LS)	867 b	0 c	51 c	5 c	24 d	8 a
C6	1(WS)	255 b	0 c	44 c	36 bc	18 d	40 a
N1	11(NJ)	292 b	22 c	183 bc	102 bc	51 cd	84 a
S1	2(TD)	125 b	98 b	175 bc	60 bc	104 c	33 a
E1	1(TN)	2444 a	142 a	477 a	448 a	275 a	106 a
Range (ppm)		0-3605	0-131	0-547	0-435	0-368	0-415

The same letter within a given taxane among different provenances indicates no significant differences using Duncan's test, at 5% level.

Table 4. Variation of taxane contents (ppm) in green stems collected at different provenances.

Provenance	No.of trees	DB	BC	DTX	CPH	Taxol	ETX
C1	2(AN)	208a	0c	37bc	1b	18c	5a
C3	2(DR)	1078a	63a	117a	132a	94a	19a
C4	5(ZU)	107a	0bc	10bc	0b	72ab	0a
C5	5(LS)	1054a	9c	46b	7b	40bc	6a
C6	1(WS)	906a	45a	44b	27b	47abc	23a
N1	11(NJ)	832a	15bc	44b	35b	41bc	25a
S1	2(TD)	729a	22b	15bc	7b	43bc	0a
Range (ppm)		0-2160	0-63	0-117	0-132	15-135	0-83

The same letter within a given taxane among different provenances indicates no significant differences using Duncan's test, at 5% level.

不同單株上紫杉烷類的差異，在綠枝上的變異來源與針葉相似，以 DB 與 ETX 在單株的變異來源最大 (Table 2)，DB 幾乎全受單株影響，單株的變異從 0-2000 ppm 之間 (Table 6)，其中以瑞岩的 ZB13 含量最高。ETX 一般含量較低，含量最高的單株仍為南庄的 NJ11，此一單株的針葉含 ETX 也是最高的單株。其他 4 種紫杉烷類的變異成分在 20%-40% 間，仍以大禹嶺的 DR1 含量顯著高於其他單株。不過紫杉醇含量最高的單株卻是松泉岡的 LS1，含量為 135 ppm，而此一單株針葉的紫杉醇含量只有 36 ppm。

從以上的分析顯示枝葉所含的紫杉烷類中，除了針葉內的 BC 外，其變異來源主要在地區內種原間及種原內單株間呈現相當的差異性，具有選育的價值。針葉含紫杉烷類的含量一般均高於綠枝，除少數例外，同單株內，針葉與綠枝含紫杉烷類含量的高低相關性頗高。各紫杉烷類在針葉含量的消長，經相關分析顯示，除了 ETX 外，其他 4 種紫杉烷類與紫杉醇具有極顯著 ($p = 0.1\%$) 的相關 (Table 7)，即紫杉醇含量高的單株，其他紫杉烷類的含量也相當高。但在綠枝，紫杉醇僅與 CPH 有顯著相關 (Table 8)，與其他紫杉烷類無任何消長關係，反而是 BC、DB、DTX 與 CPH 四者的消長呈顯著相關。紫杉烷類在紅豆杉屬各樹種針葉的 HPLC 分析報告中，大都針對著紫杉醇進行分析，對於 DB 與 BC 的分析則僅限於含此二成分較高的英國紅豆杉。有系統對各單株進行比較僅有日本紫杉 (Fetto-Neto

and DiCosom, 1992) 及紅豆杉栽培品種 (Mattina and Paiva, 1992)，不過二者均針對紫杉醇含量的變異進行比較，並未進行各紫杉烷類間相關成分的探討，本研究顯示紫杉烷類在葉部與枝條的生物合成 (biosynthesis) 機轉可能不太一樣。

根據國外紫杉醇含量的分析顯示：太平洋紫杉針葉含量在 10-50 ppm 間 (Witherup *et al.*, 1990; Wilson, 1993)，枝葉 (shoot) 含量為 10 ppm (Flores *et al.*, 1993)；加拿大紫杉針葉含量為 90 ppm，莖 (stem) 含量 20 ppm (Wilson, 1993)，日本紫杉年輕的針葉在雌雄株分別為 350 及 410 ppm，老葉則為 310 及 400 ppm，綠莖含量為 220 及 230 ppm (Fett-Neto and DiCosmo, 1992)；但日本紫杉的栽培品種 (*T. cuspidata* cv. *Capitata*) 針葉含量為 80 ppm，莖含量 40 ppm (Wilson, 1993)。英國紫杉的栽培品種 (*T. baccata* cv. *Repandens*) 針葉含量 30 ppm，莖含量 10 ppm (Witherup *et al.*, 1990)。Mattina and Paiva (1992) 曾對 14 個紅豆杉的栽培品種進行針葉分析，結果發現紫杉醇的變異從最低的 118 ppm (*T. cuspidata* cv. *Siboldii*) 到最高的 882 ppm (*T. x media* 'Nigra')，此一含量是目前所發表過含紫杉醇量最高的記錄。台灣紅豆杉莖葉含量低者如加拿大紫杉，高者可比擬日本紫杉，頗值得加以選育。此外在紫杉烷類中的 DB 與 BC 係可經半合成為與紫杉醇同藥效的紫杉德 (taxotere) 或紫杉醇 (Denis *et al.*, 1988; Zhiri *et al.*, 1995)，因此頗受重視，目前所知此一成分在英國紫杉的枝葉中含量最高，達 1000 ppm (Denis *et al.* 1988)。而

省產的台灣紅豆杉莖葉 DB 的含量為英國紫杉的 2-3 倍, 故用在生產 DB 上, 頗具開發價值。

(三) 大量針葉紫杉烷類之純化與定量

Table 5. Taxane contents in needles of individual trees at different locations and provenances.

Provenence	Tree code	DB	BC	DTX	CPH	Taxol	ETX
Central							
C1	An1	289 ijk	0 h	40 ij	22 f	0 p	0 n
	An2	1247 de	0 h	24 ij	0 f	11 op	0 n
C2	LC1	289 ijk	0 h	115 fg	161 cdef	146 e	17 klm
	LC2	155 ijk	0 h	208 def	96 def	102 f	13 lmn
	LC3	2289 c	64 d	148 efgh	265 bcd	228 cd	129 c
	LC4	388 hijk	0 h	174 efg	161 cdef	142 e	1 n
	LC5	3605 a	64 d	50 hij	82 def	240 c	41 gh
	LC6	93 jk	0 h	147 efgh	79 def	70 hijk	61 f
	LC7	876 efgh	23 g	118 fg	226 bcd	213 d	61 f
	LC8	3098 b	72 d	276 cd	131 cdef	368 a	112 d
C3	DR1	15 k	0 h	437 ab	435 a	271 b	37 ghi
	DR2	122 jk	0 h	547 a	367 a	221 cd	64 f
C4	ZB12	872 efgh	1 h	52 hij	47 ef	35 lmno	0 n
	ZB26	81 jk	0 h	92 ghij	168 cdef	76 ghij	8 mn
	ZBx	1371 d	19 g	22 ij	0 f	47 klm	19 kjlm
	ZD1	542 fg	0 h	0 j	49 ef	63 jk	0 n
C5	LS1	0 k	0 h	0 j	0 f	36 lmno	0 n
	LS1'	0 k	0 h	0 j	0 f	18 nop	0 n
	LS2	2312 c	0 h	135 efgh	13 f	21 mno	22 ijkl
	DN2	1024 def	0 h	79 ghij	125 cdef	92 fgh	35 ghij
C6	W1	255 ilk	0 h	44 hij	36 ef	18 nop	40 gh
North							
N1	NJ1	157 ijk	0 h	84 ghij	42 ef	14 op	21 jklm
	NJ2	254 ijk	16 g	21 ij	44 ef	13 op	42 g
	NJ3	477 ghij	0 h	173 efg	203 bcde	90 fg	20 jklm
	NJ4	931 def	0 h	434 ab	37 ef	98 fg	25 hijkl
	NJ5	3 k	50 e	92 ghij	32 f	24 mno	88 e
	NJ6	84 jk	5 h	92 ghij	42 ef	44 klmn	19 jklm
	NJ7	215 ijk	33 f	111 fg	80 def	65 ijk	222 b
	NJ8	59 jk	0 h	202 def	98 def	26 mnop	15 klmn
	NJ9	175 ijk	0 h	377 b	330 ab	107 f	21 jklm
	NJ10	212 ijk	0 h	341 bc	136 cdef	55 jkl	31 ghijk
	NJ11	650 fg	120 c	86 ghij	79 def	27 mnop	415 a
South							
S1	TD1	166 ijk	131 b	233 de	56 ef	116 f	44 g
	TD2	0 k	0 h	0 j	70 def	65 ijk	0 n
East							
E1	TN1	2444 c	142 a	477 a	448 a	275 b	106 d

The same letter within a given taxane among different individual trees indicates no significant differences using Duncan's test, at 5% level.

Table 6. Taxane contents in green stems of individual trees at different locations.

Provenance	Tree code	DB	BC	DTX	CPH	Taxol	ETX
Central							
C1	An1	208 ij	0 f	37 cf	1 g	18 ij	5 def
C3	DR1	1078 de	63 a	117 a	132 a	94 b	19 cdef
C4	ZB12	399 ghi	8 ef	48 d	0 g	45 efg	0 g
	ZB13	2047 a	27 cd	47 de	0 g	70 cd	0 g
	ZBx	1898 ab	0 f	54 d	0 g	25 ghij	0 g
C5	LS1	0 j	0 f	0 h	0 g	135 a	0 g
	LS1'	0 j	0 f	0 h	0 g	28 fghij	0 g
	LS2	381 ghi	0 f	34 f	0 g	22 hij	0 g
	DN2	370 ghi	10 ef	17 g	25 f	36 efg hi	21 cde
C6	W1	906 ef	45 b	46 de	27 f	47 ef	23 cd
North							
N1	NJ1	184 ij	0 f	32 f	4 g	15 j	10 cdefg
	NJ2	475 ghi	28 cd	3 h	3 g	25 ghij	28 c
	NJ3	397 ghi	6 ef	46 de	32 ef	51 e	0 g
	NJ4	2160 a	39 bc	73 c	102 b	86 bc	5 defgl
	NJ5	1323 cd	29 cd	29 f	32 ef	39 efg h	20 cdef
	NJ6	643 fgh	22 d	20 g	54 cd	43 efg	19 cdefg
	NJ7	1334 cd	17 de	19 g	35 def	36 efg hi	59 b
	NJ8	127 ij	0 f	45 de	39 def	27 fghij	2 fgmn
	NJ9	222 ij	26 d	81 bc	50 cde	35 efg hi	12 cdefg
	NJ10	292 hij	9 ef	86 b	45 cde	54 de	4 efg
	NJ11	1609 bc	0 f	45 de	8 fg	36 efg hi	83 a
South							
SI	TDI	729 bc	22 d	15 g	7 g	43 efg	0 g

The same letter within a given taxane among different individual trees indicates no significant differences using Duncan's test, at 5% level.

Table 7. Correlation analysis among different taxanes extracted from needles of individual trees.

Taxanes	BC	DTX	CPH	ETX	Taxol
DB	0.38***	0.12	0.11	0.15	0.51***
BC		0.25*	0.19	0.59***	0.39***
DTX			0.70***	0.06	0.54***
CPH				0.10	0.67***
ETX					0.14

*: significant at 5% level, ***: significant at 0.1% level.

Table 8. Correlation analysis among different taxanes extracted from green stems of individual trees.

Taxanes	BC	DTX	CPH	ETX	Taxol
DB	0.43**	0.38*	0.34*	0.42**	0.14
BC		0.47**	0.69***	0.17	0.27
DTX			0.71***	0.07	0.18
CPH				0.12	0.35*
ETX					-0.05

*: significant at 5% level; **: significant at 1% level; ***: significant at 0.1% level.

由於小量樣品在 HPLC 分析上，DB 與 BC 的含量與不純物夾雜而出，因此在定量上會產生很大的誤估，雖然利用 C-18 cartridge (minicolumn) 可以達到純化的效果，但因其 C-18 的填充物最大僅 200 mg，分離效果不著。因此取高、低紫杉醇含量的單株各為 R1 與 ZB26 的較大量針葉的萃取液進行管柱層析，Fig. 5 係以 R1 單株為例的純化過程，由於針葉的鮮重有 340 g，約為小量樣品的 7 倍，所有經 DCM、MeOH 萃取後的粗乾物重 (crude dry residue) 可以精確的量秤出來 (7.85 g)，以此為基準，經管柱層析後各沖提部份的回收物乾重總和與此粗乾物重相比，可以知道經管柱層析後的回收率 (% yield)，由於回收率均高達 98%，顯示大部份成分均可回收。尤其經第一次層析後，大量的不純物經用 1 L 的 ACT-DCM (1:10) 的 Fraction 1 (F1) 與 1 L MeOH (100%) 的 Fraction 5 (F5) 經管柱濾除，Fig. 6 為各部份沖提物 F1 至 F5 及 DB 與 TX 標準品的並列層析圖，F1 主要為不純物與小部份的 DB，F2 則全為不純物，所有的紫杉烷類出現在 F2 與 F3 的沖提物 (effluents) 內，F2 有微量的紫杉醇與 ETX，大部份的紫杉烷類均出現在 F3 (Table 9)，比較大、小量樣品各紫杉烷類含量的變異，可以發現 DTX、CPH、TX 與 ETX 等滯留時間較長的紫杉烷類，含量的估測值相當接近 (Tables 9 and 10)，而滯留時間較短的 DB 與 BC 則呈現低估現象，BC 含量在台灣紅豆杉較低，故誤差較少，但 DB 則明顯的被低估許多，如 R1 在小量樣品由於不純物太高，致低估為 69 ppm，但實際可達 2259 ppm，ZB26 不純物含量較低，小量樣品估測值較高為 81 ppm，在大量樣品則增加較少，為 315 ppm (Table 10)，由於各單株不純物含量不一致 (見 Fig. 4)，所以想

從大、小量的樣品所測得的 DB 含量比值，來作為矯正值，以估測其他單株正確的 DB 含量並不可行，要進一步精測各單株的 DB 含量，必須對所有的樣品進行管柱層析，才有可能，如何簡化小量樣品的管柱純化，有待進一步的研究，不過從 R1 的純化結果可以顯示 DB 在台灣紅豆杉的含量確實頗高。由於 DB 前後仍有不純物存在，因此又將第三部份的沖提物 (Fraction 3) 進行第二次的管柱層析，利用較小的矽膠粒子，剛開始每 100 mL 收集一次，再逐漸增加收集量至 200-500 mL，結果 5 個部份的沖提物 (F1'-F5') 回收率雖仍可達 98%，不過所能濾除的不純物在 F1' 極低，同時將紫杉烷類分散在其他 4 部份的沖提物內 (F2'-F5')，DB 與 BC 含量均略有損失，但其他紫杉烷類則仍保持原來的含量，因此以效率而言，第一次的管柱層析已經可以達到純化分離的效果，並經成分收集器 (fraction collector) 收集到相當純的紫杉烷類純品。

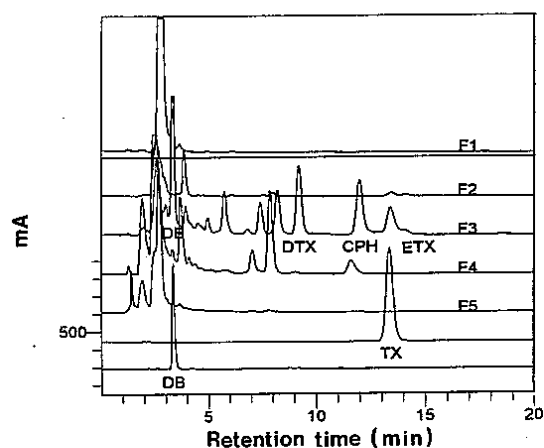


Fig. 6. Chromatographic profiles of DB and taxol standards and 5 fractions that were purified from needle extract of tree R1 through column chromatography.

Table 9. Comparison of quantities of different taxanes extracted from small and large amounts of needles of tree R1.

Fresh weight (g)	DB	BC	DTX	CPH	TX	ETX
50 g	69	0	492	401	246	51
340 g						
1st purification ¹⁾						
Fraction 1	639	0	0	0	0	0
Fraction 2	0	0	0	0	72	4
Fraction 3	1620	39	473	577	246	18
Fraction 4	0	0	1	0	0	0
Fraction 5	0	0		0	0	0
Total amounts	2259	39	474	577	318	22
2nd purification of F3 ¹⁾						
Fraction 1'	0	0	0	0	0	0
Fraction 2'	0	0	0	2	1	0
Fraction 3'	40	4	0	487	244	6
Fraction 4'	269	0	154	74	4	0
Fraction 5'	1147	0	279	0	0	0
Total amounts	1456	4	433	563	249	6

¹⁾F3: Effluent from the 3rd fraction through 1st column chromatography.

Table 10. Comparison of quantities of different taxanes extracted from small and large amounts of needles of tree ZB26.

Fresh weight (g)	DB	BC	DTX	CPH	TX	ETX
50 g	81	0	92	168	76	8
755 g ¹⁾	315	9	96	177	85	0

¹⁾Taxane contents each were determined after purification through 1st column chromatography.

四、結論

台灣紅豆杉針葉與綠莖所含有最重要的抗癌成分：DB 與紫杉醇含量呈現相當大的變異，有的單株含量相當高，尤其是 DB 產量係目前已測定的紫杉屬樹種中含量最高，因此選擇優良的單株，以無性繁殖來增殖，如進一步分析其營養系枝葉的產率仍維持與母樹相同，將可大量的提高其產率。

本研究將六種常見的紫杉烷類在台灣紅豆杉

單株間的變異及含量間的相關變化進行系統的調查，發現了許多有趣的現象。例如紫杉醇的變異在種原間呈現較大的差異，尤其是中部地區的梨山 (LC)、畢祿溪 (WS)、松泉岡 (LS) 等種原相當接近，但紫杉醇的產量卻呈現顯著的差異。至於 DB 則在單株上呈現相當大的差異，雖在同一種原，含量差異變化如：梨山 (LC) 單株間含量從 93 到 3605 ppm，瑞岩 (ZB) 從 81 到 1371 ppm，松泉岡 (LS) 從 0 到 2312 ppm。前者種原之差異可能是此地區的高山區隔具有相當程度的隔離作用，但同種原內生長鄰近單株含 DB 懸殊差異，則可能跟 DB 係為其他高分子量

紫杉烷類如 DTX、CPH、紫杉醇、ETX 等的前驅物有關。相關分析顯示：在針葉中 DB 含量對 BC 及紫杉醇含量呈極顯著相關，但對於其他紫杉烷類並無相關存在，而在綠枝中 DB 與其他成分均略有相關，卻與紫杉醇含量無關，顯示葉莖間的生物合成產物的不同，對於尚未明瞭的紫杉醇生物合成途徑（何禮剛，1993），可指示出些許的線索。

謝誌

本研究承行政院農業委員會的經費補助（85 科技-1.1-糧-49(16)），及莫忘本博士在樣品萃取與純化方法的幫助及建立，林怡君小姐在 HPLC 分析的協助，林務局各林區管理處在台灣紅豆杉枝葉採集的幫忙協助，使得本研究得以完成，謹此致最大的謝意。

引用文獻

- 何禮剛 1993 紫杉醇：當今最熱門的抗癌藥物。化學 51(40): 457-464。
- Blay, P. K. S., P. Thibault, N. Thiberge, B. Kiecken, A. Lebrun, and C. Mercure.** 1993. Analysis of taxol and related taxanes from *Taxus canadensis* using liquid chromatography combined with mass spectrometry or tandem mass spectrometry. Mass Spectrom 7(7): 626-634.
- Castor, T. P., and T. A. Tyler.** 1993. Determination of taxol in *Taxus media* needles in the presence of interfering components. J. Liq. Chromatogr. 16(3): 723-731.
- Christopher, J.** 1993. Taxol: search for a cancer drug. Bioscience 43(3): 133-136.
- Denis, J. N., A. E. Greene, D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, and P. Potier.** 1988. A highly efficient, practical approach to natural taxol. J. Am. Chem. Soc. 110: 5917-5919.
- Fang, W., Y. Wu, J. Zhou, W. Chen, and Q. Fang.** 1993. Qualitative and quantitative determination of taxol and related compound in *Taxus cuspidata* Sieb et Zucc. Phytochem. Anal. 4(3): 115-119.
- Fett Neto, A. G., and F. DiCosmo.** 1992. Distribution and amounts of taxol in different shoot parts of *Taxus cuspidata*. Planta Med. 58: 464-466.
- Fett-Neto, A. G., F. DiCosmo, W.F. Reynolds, and K. Sakata.** 1992. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. Biotechnology 10: 1572-1575.
- Fett-Neto, A. G., S.J. Melanson, K. Sakata, and F. DiCosmo.** 1993. Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. Bio/Tch. 11: 731-734.
- Flores, T., L. J. Wanger, and H. E. Flores.** 1993. Embryo culture and Taxane production in *Taxus* spp. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 29P(4): 160-65.
- Ketchum, R. E. B., and D. M. Gibson.** 1993. Rapid isocratic reversed phase hplc of taxanes on new columns developed specifically for taxol analysis. J. L. Chromatogr. 16(12): 2519-2530.
- Li, H-L.** 1975. Taxaceae. Pages 499-501 in U.S. - R.O.C. Cooperative Science Program. ed. Flora of Taiwan. Vol. 1. Epoch Publishing Co., Ltd., Taiwan.
- Lian, J. Y., Z. D. Min, M. Mizuno, T. Tanaka, and M. Iinuma.** 1988. Two taxane diterpenes from *Taxus mairei*. Phytochemistry 27(11): 3674-3675.
- Liang, J., and D. G. I. Kingston.** 1993. Two new taxane diterpenoids from *Taxus mairei*. J. Nat. Prod. 56(4): 594-599.
- Mattina, M. J. I., and A. A. Paiva.** 1992. Taxol concentration in *Taxus* cultivars. J. Environ. Hort. 10(4): 187-191.
- Nicolaou, N. C., Z. Yang, J. J. Liu, H. Uene, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claaiborne, J.**

- Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, and E. J. Sorensen.** 1994. Total synthesis of taxol. *Nature* 367: 630-634.
- Richheimer, S. L., D. M. Tinnermeier, and D. W. Timmons.** 1992. High-performance liquid chromatographic assay of taxol. *Anal. Chem.* 64: 2323-2326.
- SAS Institute.** 1989. SAS/STAT^R. User's guide Version 6, 4th edition. Cary, NC. 846 pp.
- Shen, Y-C., H-R. Tai, and C-Y. Chen.** 1996. New taxane diterpenoids from the roots of *Taxus mairei*. *J. Nat. Prod.* 59: 173-176.
- Stierle, A., G. Strobel, and D. Stierle.** 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260(9): 214-216.
- Vanhaelen-Fastre, R., B. Diallo, M. Jaziri, M. L. Faes, J. Homes, and M. Vanhaelen.** 1992. High-speed countercurrent chromatography separation of taxol and related diterpenoids from *Taxus Baccata*. *J. Liq. Chromatogr.* 15(4): 697-706.
- Vance, N. C., R. G. Kelsey, and T. E. Sabin.** Seasonal and tissue variation in taxane concentrations of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry* 36(5): 1241-1244.
- Vidensek, N., P. Lim, A. Campbell, and C. Carlson.** 1990. Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species. *J. Nat. Prod.* 53: 1609-1610.
- Wheeler, N. C., and M. T. Hehnen.** 1993. Taxol: a study in technology commercialization. *J. For.* 16: 15-18.
- Wilson, C.** 1993. Pacific yew: an old species brings new research. *Forestry Research West*, May: 7-10.
- Witherup, K. M., S. A. Look, and M. W. Stasko.** 1990. *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. *J. Nat. Prod.* 53(5): 1249-1255.
- Xu, L., and A. Liu.** 1991. Determination of taxol in *Taxus chinensis* by HPLC method. *Acta Pharmaceutica Sinica* 26: 537-540.
- Yeh, M. K., J. S., L. P. Liu, and F. C. Chen.** 1988. A new taxane derivative from the heartwood of *Taxus mairei*. *Phytochemistry* 27(5): 1534-1539.
- Yoshizaki, F., R. Yanagihashi, and S. Hisamichi.** 1988. Determination of taxinin and seasonal variation of its content in the leaf of Japanese yew (*Taxus cuspidata*). *Shoyakugaku Zasshi* 42(2): 151-152
- Zhang, Z. P., H. Wiedenfeld, and E. Roder.** 1995. Taxanes from *Taxus chinensis*. *Phytochemistry* 38(3): 667-670.
- Zhiri, A., M. Jaziri, Y. Guo, R. Vanhaelen-Fastre, M. Vanhaelen, J. Homes, K. Yoshimatsu, and K. Shimomura.** 1995. Tissue cultures of *Taxus baccata* as a source of 10-deacetylbaccatin III, a precursor for the hemisynthesis of taxol. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376: 583-586.