

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96112618

A61K 31/122 (2006.01)

※ 申請日期： 96.4.10

※IPC 分類： A61K 31/352 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於毒殺癌症細胞的組合物及其合成方法 /

COMPOSITION FOR TREATING CANCER CELLS AND

SYNTHESIS METHOD THEREOF

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)

高雄醫學大學 / KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

余幸司 /YU, HSIN-SU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

807 高雄市三民區十全一路 100 號 / No. 100, Shih-Chuan 1st
Road, San Ming District, Kaohsiung City, Taiwan, ROC

國 稷：(中文/英文)

中華民國 / TW

三、發明人：(共4人)

姓 名：(中文/英文)

林安聲 / LIN, AN-SHEN

吳永昌 / WU, YANG-CHANG

李國雄 / LEE, KUO-HSIUNG

張芳榮 / CHANG, FANG-RONG

國 稷：(中文/英文)

均為 中華民國 / TW

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為：年月日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係提供一種用於毒殺癌症細胞的組合物及其合成方法，其中本發明利用化學方法全合成或半合成多種黃酮類化合物，利用不同的起始物、反應物及中間產物，產生多種不同之衍生物，以此一方式進行化學合成，可對化合物的結構進行修飾，並且可以大量生產。

六、英文發明摘要：

The present invention provides a composition having the cytotoxicity to cancer cells and a synthesis method for preparation flavonoids, wherein the novel flavonoids include derivatives that total synthesized or semi-synthesized from different initiators, reactants, and intermediates. The chemical synthesis method can modify the structure of the flavonoids and product them on a large scale.

99年2月1日

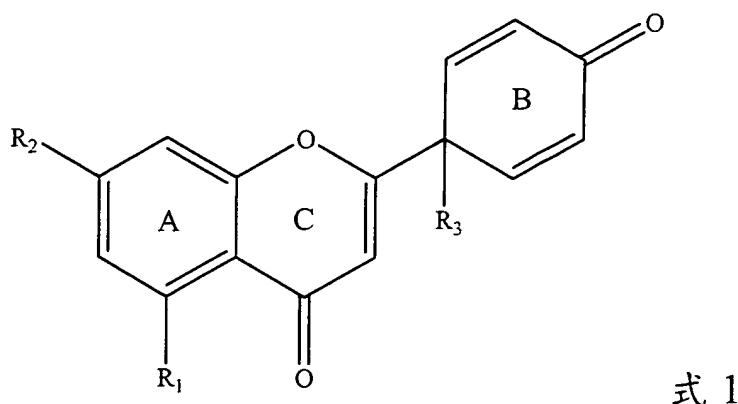
七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

本代表圖為流程圖及化學結構，無元件符號。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



其中 B 環是 4- 酮基 -2,5- 環己二烯基
(4-oxo-cyclohexa-2,5-dienyl group)，R₁- R₂ 分別選自氨基、羥基及 C1-C20 烷氧基其中之一，R₃ 選自羥基及 C1-C20 烷氧基其中之一，其中 R₁、R₂ 及 R₃ 不能同時為羥基。

99年2月1日

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種用於毒殺癌症細胞的組合物及其合成方法，特別是關於一種利用不同的起始物、反應物及中間產物，以化學方法全合成或半合成所產生的不同衍生物及其合成方法。

【先前技術】

近年來，許多源自植物的萃取成分與其衍生物，例如長春花鹼(vincristine 與 vinblastine)、喜樹鹼(camptothecin) 太平洋紫杉醇(taxol)及其衍生物 paclitaxel、docetaxel，已經廣泛應用在惡性腫瘤之臨床化學治療。此一顯示，以植物成分為藥物發展之研究導向，仍為兼具理論與成效之研究。

Protoapigenone 化合物最初為自台灣產蕨類植物金星蕨科(*Thelepteridaceae*)粗毛金星蕨(*Thelepteris torresiana*)中所發現。根據過去研究文獻報導，此一化合物對於多種人類癌症細胞株，包括兩種人類乳癌細胞株(MCF-7 與 MDA-MB-231)、兩種人類肝癌細胞株(Hep G2 與 Hep 3B)以及一種人類肺癌細胞株(A549)具有明顯的毒殺作用。(Planta Medica 71:867-870, 2005)

在此之前，欲得到此一化合物僅能藉由萃取以及分離方式獲得，包括植物基原鑑定、採集地的溫濕度、緯度、海拔高度、季節以及植物個體差異等等，皆可能影響收集化合物的效率，以致於成分來源不穩定。

有鑑於此，本案發明人經長期對於植物成分研究及化學合成之經驗，將此一具有毒殺癌症細胞的化合物，以化學方式加

99年2月1日

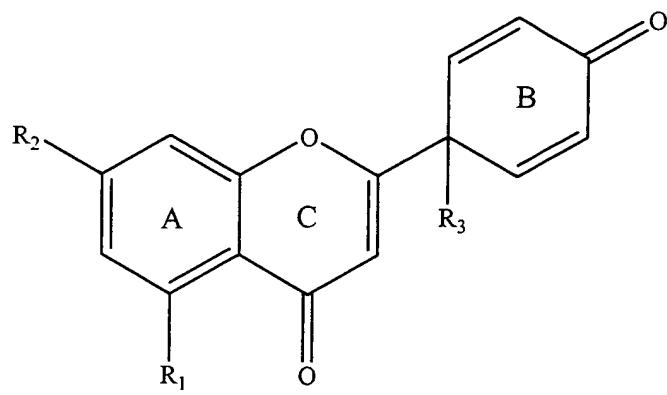
以全合成或半合成，使其可以在實驗室製造，不需經由植物萃取，而經由市售的化學藥品加以合成，確保化合物的來源穩定，且可節省時間，以此一方式進行化學合成，更可以化合物結構與活性的關係進行修飾，而且可以預測化合物產率，以化學方式大量生產。

另外，利用不同的起始物、反應物及中間產物，產生多種不同之衍生物，並以不同的取代基團，藉以改變化合物之酸性、鹼性、脂溶性、水溶性等等，或改變化合物生物作用的活性與毒性，經過生物活性比較，合成化合物與天然產物之活性並無明顯區別，始完成本發明。

【發明內容】

本發明之目的，係在提供一種用於毒殺癌症細胞的組合物及其合成方法，以化學方法合成取得的黃酮類化合物，比從天然物萃取的來源更加穩定，而且具有大量生產的優點。

根據本發明之構想，係提供一種用於毒殺癌症細胞的組合物，其包含一黃酮類化合物，其結構如式 1 所示，



式 1

其中 B 環是 4- 酮基 -2,5- 環己二烯基
(4-oxo-cyclohexa-2,5-dienyl group)，R₁- R₂ 分別選自氨基、羥基

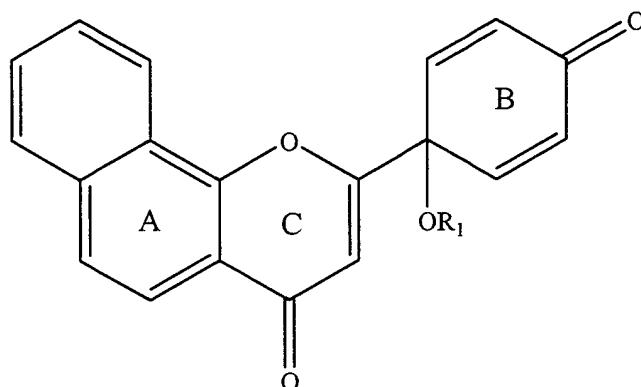
1991年2月1日

及 C1-C20 烷氧基其中之一，R₃ 選自羥基及 C1-C20 烷氧基其中之一，其中 R₁、R₂ 及 R₃ 不能同時為羥基。

根據上述構想，該黃酮類化合物是自一化學合成方法而得。

根據上述構想，該化學合成方法是以全合成或半合成方式進行。

根據本發明之構想，提供另一種用於毒殺癌症細胞的組合物，其包含一黃酮類化合物，其結構如式 2 所示，



式 2

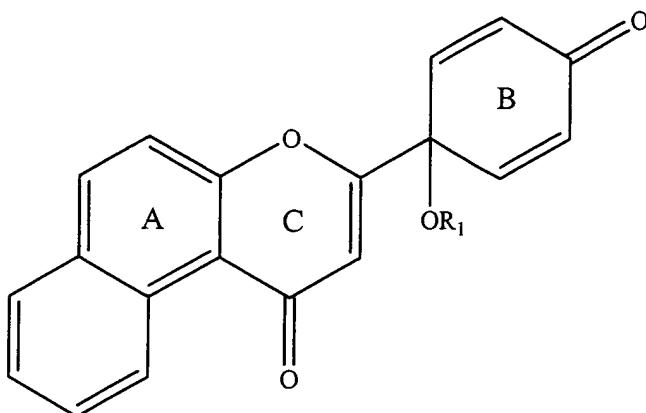
其中該黃酮類化合物包含一 4-酮基-2,5-環己二烯基 (4-oxo-cyclohexa-2,5-dienyl group)，R₁ 選自於氨基及 C1-C20 烷基其中之一。

根據上述構想，該黃酮類化合物是自一化學合成方法而得。

根據上述構想，該化學合成方法是以全合成或半合成方式進行。

根據本發明之構想，提供又一種用於毒殺癌症細胞的組合物，其包含一黃酮類化合物，其結構如式 3 所示，

99年2月1日發明



式 3

其中該黃酮類化合物包含一 4-酮基-2,5-環己二烯基 (4-oxo-cyclohexa-2,5-dienyl group)，R₁ 選自於氨基及 C1-C20 烷基其中之一。

根據上述構想，該黃酮類化合物是自一化學合成方法而得。

根據上述構想，該化學合成方法是以全合成或半合成方式進行。

根據本發明另一構想，更提供一種包含上述黃酮類化合物的醫藥組合物，可用於治療哺乳動物之疾病。

根據上述構想，該哺乳動物為人類。

根據上述構想，該疾病為癌症。

另一方面，本發明提供一種製備含有 B 環為 4-酮基-2,5-環己二烯基的上述黃酮類化合物的方法，其包含之步驟為：將一含有兩個第一保護基於 4'與 6'位置的 2',4',6' 三羥基苯乙酮與一含有一第二保護基的對位羥基苯甲醛進行 Claisen-Schmidt 縮合反應；加入一鹵素催化劑；去除該第二保護基；加入一氮氧自由基與一高價碘化合物以進行一氧化反應；以及加入一酸溶液，以脫去該第一保護基，而得到含有該 4-酮基-2,5-環己二烯基的該黃酮類化合物。

根據上述構想，該第一保護基係為甲氧基甲基 (Methoxymethyl，MOM)。

根據上述構想，該第二保護基係為苯甲基。

99年2月1日

根據上述構想，該鹵素催化劑係為碘。

根據上述構想，該氮氧自由基係為 2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氮氧自由基 (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl, TEMPO)。

根據上述構想，該高價碘化合物係為二醋酸碘苯或雙三氟乙醯氧碘化苯。

根據上述構想，該酸溶液係為濃鹽酸。

本發明更提供另一種製備含有 B 環為 4-酮基-2,5-環己二烯基之上述黃酮類化合物的方法，其包含之步驟為：混合一 B 環為對位羥基的黃酮類化合物、一氮氧自由基以及一高價碘化合物以進行一氧化反應，而獲得一第一化合物；以及加入一酸溶液，以得到含有該 4-酮基-2,5-環己二烯基的該黃酮類化合物。

根據上述構想，該氮氧自由基係為 2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氮氧自由基 (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl, TEMPO)。

根據上述構想，該高價碘化合物係為二醋酸碘苯或雙三氟乙醯氧碘化苯。

根據上述構想，該酸溶液係為濃鹽酸。

【實施方式】

本發明提供一種用於毒殺癌症細胞的組合物，該組合物包含一黃酮類化合物，所述黃酮類化合物是自化學合成方法而得，所述組合物的合成方法如下。

實施例一：化合物 protoapigenone 的全合成方法

請參閱第一圖，其係本發明中用於全合成一黃酮類化合物的方法之流程圖。在本發明的方法中，首先在含有 2',4',6'-三甲氧基苯乙酮 ($2',4',6'$ -Trihydroxy-acetophenone monohydrate) 的丙酮溶液中，加入過量的碳酸鉀 K_2CO_3 ，例如：7 當量，並加以攪拌。再將 3 當量氯甲基甲基醚(chloromethyl methyl ether)一滴一滴緩慢加入溶液。加熱迴流九十分鐘使其

methyl ether)一滴一滴緩慢加入溶液。加熱迴流九十分鐘使其反應，靜置後過濾出沈澱物，並以丙酮及氯仿沖洗沈澱物，再以正己烷/乙酸乙酯 90/10 的比例進行管柱層析，即可得到在 4' 與 6' 位置上形成具有 MOM 保護基的 2'-羥基-4',6'-二甲氧基苯乙酮(2'-hydroxy-4',6'-dimethoxymethyl-acetophenone)，產率為 50.3%。

將前一步驟所得到的 2'-羥基-4',6'-二甲氧基苯乙酮與 4-苄氧基苯甲醛(4-benzyloxy-benzaldehyde)進行 Claisen-Schmidt 縮合反應(Claisen-Schmidt Condensation)。在含有 2'-羥基-4',6'-二甲氧基苯乙酮的乙醇溶液中加入 2 當量的 4-苄氧基苯甲醛，攪拌後加入催化量的氫氧化鉀，室溫下攪拌 30 小時後，進行減壓濃縮以去除溶劑，再以正己烷/乙酸乙酯進行管柱層析，即可得到第一化合物，產率為 87.2%。

將第一化合物溶解於適量吡啶之中，並加入 0.2 當量的碘。加熱迴流 5 小時後，加入硫代硫酸鈉並以乙酸以酯/水萃取，有機層經減壓濃縮後以管柱層析分離可得到第二化合物，產率為 85.5%。

在溶有第二化合物的乙酸乙酯/甲醇溶液中，加入 1 當量的 10 % 碳鈀，在氫氣的催化之下反應三小時，過濾除去碳鈀之後，將溶液進行減壓濃縮，即可得到第三化合物，產率為 88.9%。

第三化合物加入催化量的 TEMPO 後，在加熱的條件下以 1 當量的二醋酸碘苯(iodobenzene diacetate)或雙三氟乙醯基碘化苯[bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene 進行氧化反應，得到一反應產物 a，將該反應產物 a 以乙酸乙酯/水萃取，得到一有機層萃取物，再將該有機層萃取物以反覆的管柱層析分離之後即可得到第四化合物，產率為 22.2%。

在酸的條件之下將第四化合物以濃鹽酸加熱脫去 4' 與 6' 位置上的 MOM 保護基，即可得到 protoapigenone，產率 46.7%。

實施例二：化合物 protoapigenone 衍生物的半合成方法

本實施例為以化學方法半合成化合物 8a: protoflavonone (IUPAC 名稱為 2-(1-羥基-4-酮基-2,5-環己二烯基)-4 氢-色烯-4-酮，2-(1-hydroxy-4-oxocyclohexa-2,5-dienyl)-4H-chromen-4-one)、化合物 10a: 5-hydroxyprotoflavone (IUPAC 名稱為 2-(1-羥基-4-酮基-2,5-環己二烯基)-5-羥基-4 氢-色烯-4-酮，2-(1-hydroxy-4-oxocyclohexa-2,5-dienyl)-5-hydroxy-4H-chromen-4-one)、化合物 15a: β -naphthoflavonone (IUPAC 名稱為 3-(1-羥基-4-酮基-2,5-環己二烯基)-1 氢-苯并[f]色烯-1-酮，3-(1-hydroxy-4-oxocyclohexa-2,5-dienyl)-1H-benzo[f]chromen-1-one) 與化合物 18a : 5-hydroxy-7-methoxyprotoflavonone (IUPAC 名稱為 5-羥基-2-(1-羥基-4-酮基-2,5-環己二烯基)-7-甲氧基-4 氢-色烯-4-酮，5-hydroxy-2-(1-hydroxy-4-oxocyclohexa-2,5-dienyl)-7-methoxy-4H-chromen-4-one)。

將市售的 4'-羥基黃酮(4'-hydroxyflavone)、4'-5-二羥基黃酮(4'-5-dihydroxyflavone)、4'-羥基- β -萘黃酮(4'-hydroxy- β -naphthoflavone) 與 4',5- 二 羥 基 -7- 甲 氧 基 黃 酮 (4',5-dihydroxy-7-methoxyflavone)溶於適量的水中，再分別加入催化量的 TEMPO 後，在加熱的條件下以 1 當量的二醋酸碘苯 (iodobenzene diacetate) 或 雙三氟乙醯氧碘化苯 [bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene 進行氧化反應，得到一反應產物 b，將該反應產物 b 以乙酸乙酯/水萃取，再將有機層萃取物以反覆的管柱層析分離之後即可得到 protoflavonoen (化合物 8a)、5-methylprotoflavonone (化合物 10a)、 β -naphthoflavonone (化合物 15a) 與 5-hydroxy-7-methoxyprotoflavonone (化合物 18a)，結構變化如第二圖所示，產率為 20-30 %。

在另一情況下，也可將市售的 4'-羥基黃酮

(4'-hydroxyflavone)、4'-5-二羥基黃酮(4'-5-dihydroxyflavone)、4'-羥基- β -萘黃酮(4'-hydroxy- β -naphthoflavone)與 4',5-二羥基-7-甲氧基黃酮 (4',5-dihydroxy-7-methoxyflavone)溶於適量的甲醇中，再分別加入催化量的 TEMPO 後，在加熱的條件下以 1 當量的二醋酸碘苯(iodobenzene diacetate)或雙三氟乙醯氯碘化苯[bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene 進行氧化反應，得到一反應產物 c，將該反應產物 c 以乙酸乙酯/水萃取，再將有機層萃取物以反覆的管柱層析分離之後即可得到在 1'位置帶有甲氧基團的 1'-methoxyprotoflavonone (化合物 8b)、1'-methoxy-5-methylprotoflavonone (化合物 10b)與 1'-methoxy- β -naphthoflavonone (化合物 15b)，結構變化如第三圖所示，產率為 25-35 %。

實施例三：化合物 protoapigenone 衍生物的生物活性

細胞組織培養

人類肝癌細胞(HepG2、Hep3B)、乳癌細胞(MCF-7、MDA-MB-231)、肺癌細胞(A549)培養於 minimal essential medium 培養液中，其中含 10% 胎牛血清(fetal calf serum)及含 100 units/ml 盤尼西林與 100 μ l/ml 鍾黴素培養於 5% 二氧化碳、37°C 及含飽和水蒸氣之培養箱。每三天更換一次培養基溶液，當長至培養瓶單層長滿(confluent)時便作轉殖。實驗期視實驗目的，以血球計數器計算細胞數目，再取適當細胞數目作分析。

細胞毒殺試驗

此實驗為利用 MTT 染色法可將活細胞內蛋白質染色，再以有機溶劑將染色物質溶出，經由光學活性吸光值之檢測，進而得知細胞存活率。取 5×10^3 至 1×10^4 細胞種於 96 孔盤中，於 95% 氧氣、5% 二氧化碳之培養箱中，在加入不同濃度之 protoapigenone、合成衍生物與活性對照藥物 72 小時之後，加

入 MTT (0.5 mg/ml) 染色 1 小時後，吸除上清液後加入二甲基亞楓(DMSO)，於酵素免疫分析儀(ELISA reader)波長 550 nm 下，測定其吸光值(optical density, O.D.)。生物試驗結果如表一所示，其中 IC₅₀ 值代表可抑制 50% 細胞生長之化合物濃度，並且以具有毒殺癌症細胞活性的 Doxorubicin 作為正控制組 (positive control)。

結果

如表一所示，

表一

毒殺各細胞株的 IC₅₀ (μg/mL)

化合物	HepG2	Hep3B	MDA-MB-231	MCF-7	A549
protoapigenone	2.32	0.65	0.41	1.07	3.96
8a	1.71	0.32	0.18	0.44	1.33
8b	10.95	1.45	1.47	2.14	>20
10a	1.34	0.35	0.18	0.93	1.37
10b	7.64	0.66	0.54	1.55	16.36
15a	1.08	0.09	0.12	0.20	0.55
15b	3.16	0.35	0.37	0.86	8.20
18a	0.17	0.20	0.13	0.51	0.93
Doxorubicin*	0.29	0.36	0.08	0.43	0.21

*Doxorubicin 為活性對照藥物。

如表一所示，在各化合物毒殺癌症細胞株的結果中，與 protoapigenone 及 Doxorubicin 對照，可知化合物 8a, 10a, 15a, 15b 與 18a 對於癌症細胞株具有良好的毒殺效果，尤其對於 Hep3B 與 MDA-MB-231 細胞株，效果更是顯著。由此實驗可知，以化學方法合成之 protoapigenone 及其衍生物，與植物中萃取的 protoapigenone 相同，都具有對癌症細胞之毒殺效果。根據本發明所揭露之化學合成方法，可產生許多對癌細胞具有毒殺作用的衍生物，並依據這些衍生物的生物活性，進一步開

發出更具有療效的化合物，或找出針對特殊癌細胞更有選擇性的治療方法，使癌症病患的治療更為有效。

綜上所述，本案之「用於毒殺癌症細胞的組合物及其合成方法」不僅可利用化學方法全合成或半合成產生具有毒殺癌症細胞的化合物 protoapigenone，更特別的是所述合成方法也能產生其他具有相似生物活性，甚至活性更強的衍生物。

本發明得由熟習此技藝之人士任施匠思而為諸般修飾，然皆不脫如附申請專利範圍所欲保護者。

【圖式簡單說明】

第一圖係一流程圖，其係說明本發明以全合成方法製備黃酮類化合物的方法。

第二圖係為化學結構圖，其係說明本發明以半合成方法製備化合物 8a，10a，15a 及 18a。

第三圖係為化學結構圖，其係說明本發明以半合成方法製備化合物 8b，10b 及 15b。

【主要元件符號說明】

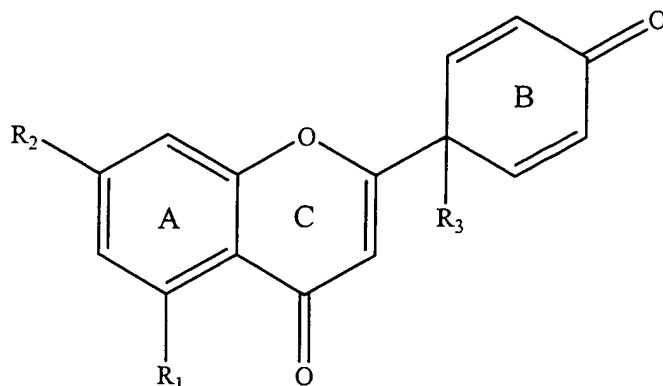
無。

99年2月1日

十、申請專利範圍：

1. 一種用於毒殺癌症細胞的組合物，其包含：

一黃酮類化合物，其結構如式 1 所示，



式 1

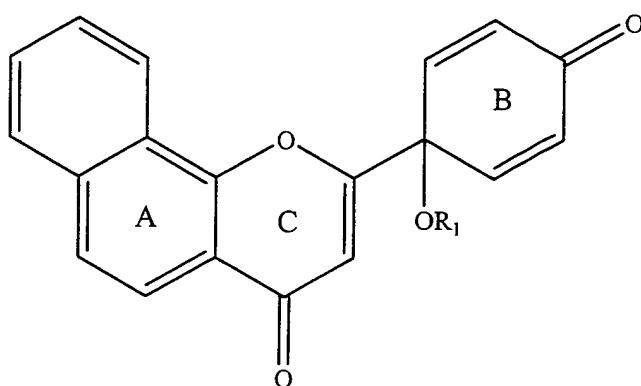
其中 B 環是 4- 酮基 -2,5- 環己二烯基 (4-oxo-cyclohexa-2,5-dienyl group)，R₁- R₂ 分別選自氨基、羥基及 C1-C20 烷氧基其中之一，R₃ 選自羥基及 C1-C20 烷氧基其中之一，其中 R₁、R₂ 及 R₃ 不能同時為羥基。

2. 如申請專利範圍第 1 項的組合物，其中該黃酮類化合物是自一化學合成方法而得。

3. 如申請專利範圍第 2 項的組合物，其中該化學合成方法是以全合成或半合成方式進行。

4. 一種用於毒殺癌症細胞的組合物，其包含：

一黃酮類化合物，其結構如式 2 所示，



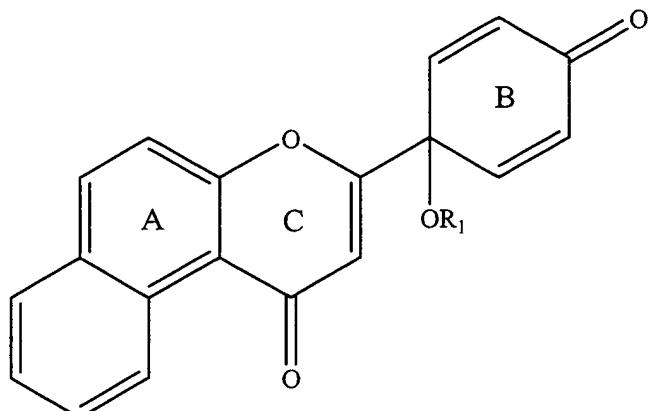
式 2

其中該黃酮類化合物包含一 4- 酮基 -2,5- 環己二烯基 (4-oxo-cyclohexa-2,5-dienyl group)，R₁ 選自於氨基及 C1-C20

烷基其中之一。

- 5.如申請專利範圍第 4 項的組合物，其中該黃酮類化合物是自一化學合成方法而得。
- 6.如申請專利範圍第 5 項的組合物，其中該化學合成方法是以全合成或半合成方式進行。
- 7.一種用於毒殺癌症細胞的組合物，其包含：

一黃酮類化合物，其結構如式 3 所示，



式 3

其中該黃酮類化合物包含一 4-酮基-2,5-環己二烯基 (4-oxo-cyclohexa-2,5-dienyl group), R₁選自於氨基及 C1-C20 烷基其中之一。

- 8.如申請專利範圍第 7 項的組合物，其中該黃酮類化合物是自一化學合成方法而得。
- 9.如申請專利範圍第 8 項的組合物，其中該化學合成方法是以全合成或半合成方式進行。
- 10.一種包含申請專利範圍第 1, 4, 7 項中至少一黃酮類化合物之醫藥組合物，可用於治療哺乳動物之疾病。
- 11.如申請專利範圍第 10 項的醫藥組合物，其中該哺乳動物為人類。
- 12.如申請專利範圍第 10 項的醫藥組合物，其中該疾病為癌症。
- 13.一種合成如申請專利範圍第 1 項至第 9 項中含有 B 環為 4-酮基-2,5-環己二烯基的該黃酮類化合物的方法，其包含以下步驟：

將一含有兩個第一保護基於 4'與 6'位置的 2',4',6'三羥基苯乙

酮與一含有一第二保護基的對位羥基苯甲醛進行 Claisen-Schmidt 縮合反應；

加入一鹵素催化劑；

去除該第二保護基；

加入一氮氧自由基與一高價碘化合物以進行一氧化反應；以及

加入一酸溶液，以脫去該第一保護基，而得到含有該 4-酮基-2,5-環己二烯基的該黃酮類化合物。

14.如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該第一保護基係為甲氧基甲基 (Methoxymethyl, MOM)。

15.如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該第二保護基係為苯甲基。

16.如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該鹵素催化劑係為碘。

17.如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該氮氧自由基係為 2,2,6,6- 四 甲 基 -1- 味 呪 氮 氧 自 由 基 (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl, TEMPO)。

18.如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該高價碘化合物係為二醋酸碘苯或雙三氟乙醯氫碘化苯。

19.如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該酸溶液係為濃鹽酸。

20.一種合成如申請專利範圍第 1 項至第 9 項中含有 B 環為 4-酮基-2,5-環己二烯基之該黃酮類化合物的方法，其包含以下步驟：

混合一 B 環為對位羥基的黃酮類化合物、一氮氧自由基以及一高價碘化合物以進行一氧化反應；以及

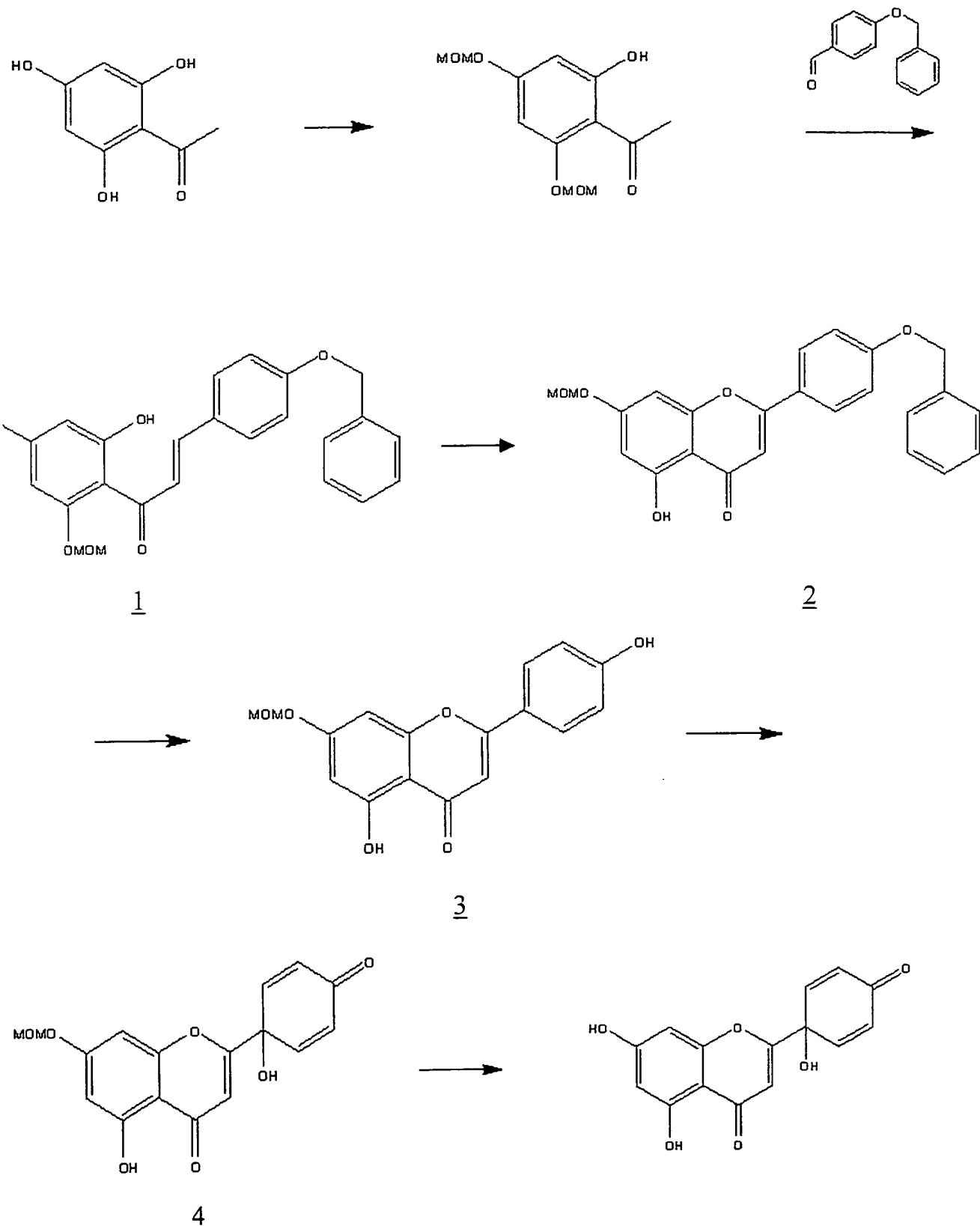
加入一酸溶液，以得到含有該 4-酮基-2,5-環己二烯基的該黃酮類化合物。

21.如申請專利範圍第 20 項的方法，其中該氮氧自由基係為 2,2,6,6- 四 甲 基 -1- 味 呪 氮 氧 自 由 基 (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl, TEMPO)。

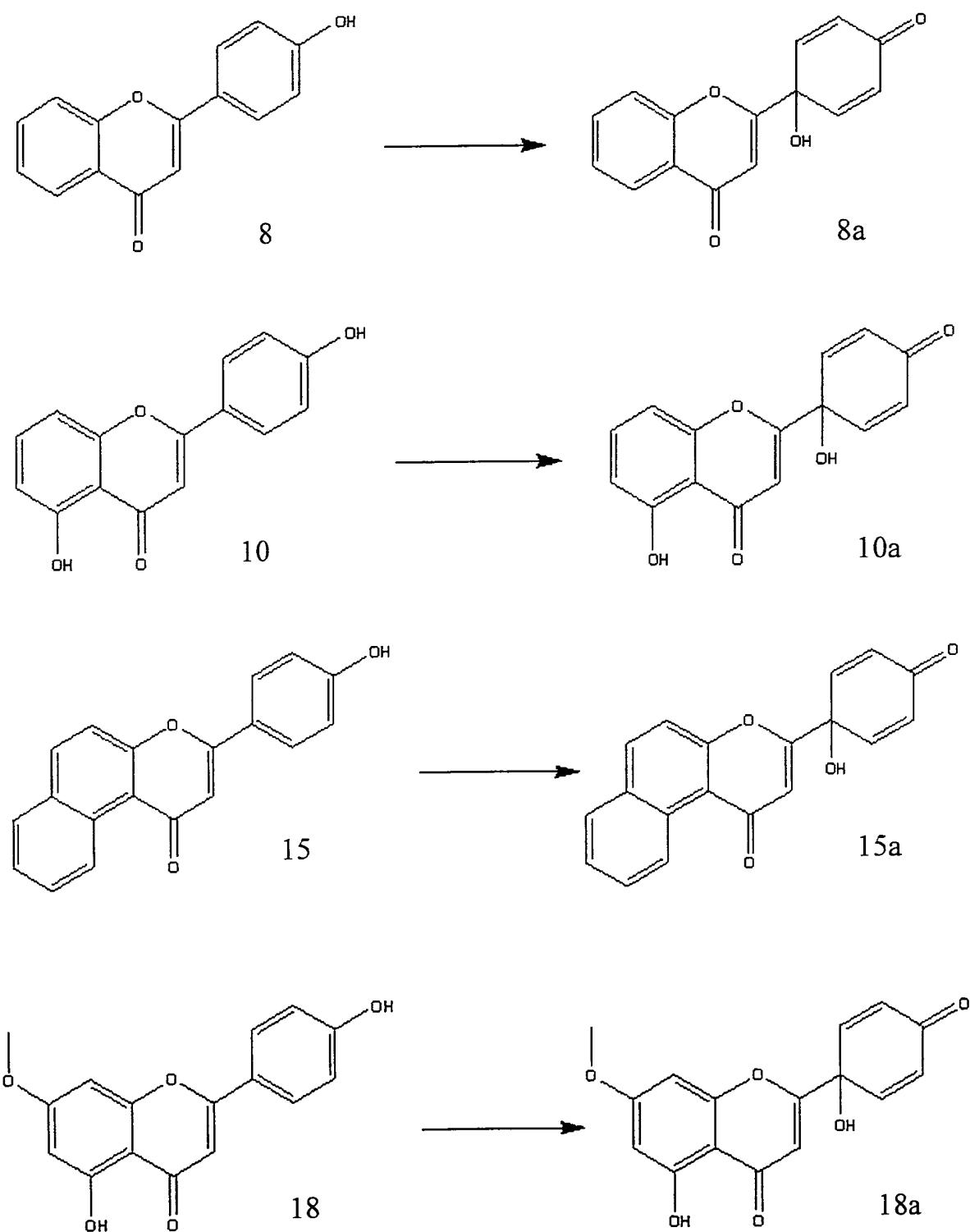
22.如申請專利範圍第 20 項的方法，其中該高價碘化合物係為二醋酸碘苯或雙三氟乙醯氧碘化苯。

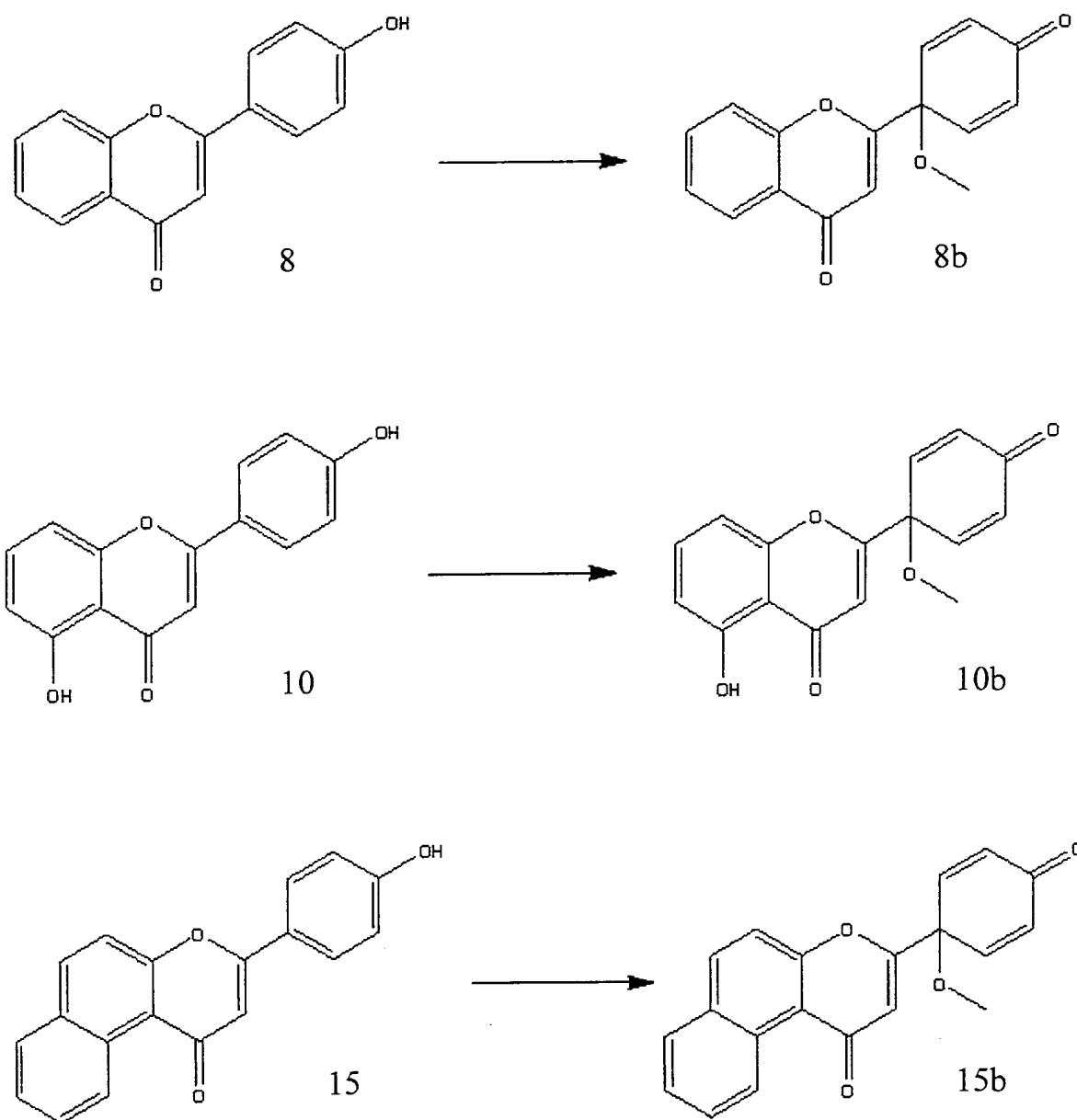
23.如申請專利範圍第 20 項的方法，其中該酸溶液係為濃鹽酸。

十一、圖式：



第一圖





第三圖