

編號：CCMP94-RD-102

# 本土中草藥選種育種及有機栽培研究 (2-2)

陳世雄

中興大學

## 摘 要

本研究以中藥菘藍及馬藍為試驗材料，探討其種源收集、成分分析、選種以及GAP栽培模式之建立，並擬進一步進行適應本地環境之育種工作。中醫藥學界已肯定菘藍及馬藍抗病毒疾病之功效。本計畫擬利用蒐集的菘藍及馬藍與建立之無菌苗為主要材料，純化遺傳背景。其次利用去年已馴化之馬藍材料生產種子，無菌播種在無病蟲害干擾環境下提高存活率，可在小面積進行大量種苗，可望在高強度的逆境篩選，得到多樣化菘藍及馬藍品種，亦可望獲得若干特殊栽培習性之菘藍及馬藍品系。利用液相層析(LC/UV)及液相層析質譜儀(LC/MS)，進行藍染植物包括菘藍及馬藍之化學成分分析，比較活性成分的差異，並探討不同栽培方式對成分的影響。依照已建立的分析方法來進行品管，以配合育種與選種及最佳栽培條件，與收穫的季節時間等等之需要之外，同時將在不同的植物部位，進行所含主要之非染料成分的單離與鑑定，以期找出其他合適之指標成分。

本計畫全程目的在篩選中藥菘藍及馬藍重要種源，詳細調查性狀及分析其有效成分，選取適合本土栽培特性，及高有效成份之種源，進行雜交或誘變育種，並建立GAP 模式。相關結果，將來亦可推廣及於其他中草藥GAP 栽培。預期本計畫之執行，將有助於未來我國中草藥原料本土化栽培及無污染生產，對中草藥原料品質之管制及品質之提昇，有所貢獻。

## 一、研究方法

為探討本土中草藥菘藍及馬藍是否有藥用價值，本計畫擬建立菘藍與馬藍 GAP 栽培制度，並探討指紋圖譜及有效活性成分的分離與鑑定，將各種不同種源之菘藍及馬藍的根與葉，區別其化學成份，或比較其有效活性成分，以作為化學分析基原鑑定之用，作為選種之依據。並期找出具活性指標之藥效成分，以利開發新的本土中藥。

### (一) 菘藍試驗方法：

1. 不同肥料試驗：以菘藍 C3 品系為試驗材料。主區以兩種有機肥施用量處理(0、4000 kg / ha)。副區為兩種苦土石灰施用量處理(0、2000 kg / ha)。小區為鉀肥處理(60、120、180 kg / ha)。施用有機肥料處理小區，另外施用氮、磷肥 40 kg / ha。未施用有機肥處理小區則需施用氮素 80 kg / ha、磷肥 100 kg/ha。試驗區採雙重裂區設計，每處理 3 重複。
2. 不同品系栽培試驗：以菘藍品系 C1、C2、C3、C4 為試驗材料，肥料處理為有機肥 4000 kg/ha、苦土石灰 2000 kg / ha 與鉀肥 120 kg / ha。試驗區採區集逢機處理，每處理 6 重複。
3. 試驗調查：每三個月調查一次，調查項目為葉長、根粗、葉鮮重、根鮮重、葉乾重、根乾重、葉含水率、根含水率等。

### (二) 馬藍試驗方法：

1. 栽培密度處理：分別以 10、20 和 30 公分三種株距，配合行距 30 公分，每一試區 15 平方公尺，調查單位面積產量，及探討適合的栽培密度。
2. 氮肥處理：分別施用 75、150 和 225 kg / ha 的氮肥，每一試區 10 平方公尺，調查單位面積產量及有效成份，探討適合的氮肥處理。
3. 探討馬藍之 GAP 栽培方法，包括栽培密度及氮肥管理。

從馬藍根部分離出兩個較特殊的成分，均為生物鹼類化合物，分別為 2-benzoxazolinone 與 2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one,2-(D-glucopyranosyloxy)。本年度主要在大量分離出上年度由馬藍

單離出之兩個生物鹼 2-benzoxazinone (A), 與化合物 2(R)-2-O-β-D-glucopyranosyl-2H, 4-benzoxazin-3(4H)-one(B)外, 另又分得一個生物鹼, 經 HPLC 及購得之標準品比對後, 確證其為喹唑二酮(2,4 (1H,3H)quinazolinedione) (C)。因此配置共六個生物鹼 (以上 A、B 及 C 三種生物鹼外另加入 Indigo blue, indirubin, and tryptanthrin) 標準溶液之層析圖, 可做為馬藍或菘藍鑑別依據。另期未來能以此三種生物鹼為指標成分, 進行液相層析/質譜分析。

## 二、結果與討論

- (一) 菘藍施用鉀肥 112 kg / ha 及 124 kg / ha 處理, 葉片及根可分別獲得最高產量。
- (二) 延長菘藍栽培時間可以增加葉及根產量, 但須於開花前採收。
- (三) 使用馬藍枝條作為繁殖材料, 建議利用 IBA (4%), 可減少植入田間時幼根傷害率, 使根部生長更健壯。
- (四) 高密度種植馬藍會減少單株枝重。馬藍植株高度與節間長度, 會隨栽培密度增加而遞增。節間較長可使光之穿透度較佳。建議栽培密度以 30 × 18 公分最佳。
- (五) 在馬藍的氮肥試驗中, 隨著氮肥追施量的增加, 植株的重量也隨之增加。
- (六) 於氮肥試驗中, 氮肥的施用量增加, 馬藍葉中靛藍、靛玉紅及色胺酮的含量也隨著增加。

以高壓液相層析/紫外光 (HPLC/UV), 進行馬藍根部與葉部指標成分偵測, 結果顯示根部含有較多之非色素生物鹼, 尤其是化合物 (A) 與 (C) 為其主成分, 而靛藍與靛玉紅等色素生物鹼則在葉部較多。

關鍵詞：種原蒐集、耐熱性、馬藍、菘藍、選種、育種、GAP 栽培、液相層析指紋圖譜、指標成分、定性定量分析

Number:CCMP94-RD-102

## Research on Selection, Breeding and Organic Farming for Medicinal Herbs (2-2)

Shih-Shiung Chen

National Chung Hsing University

### ABSTRACT

#### Aim

Natural herb Ma-Lam (*Strobilanthes cusia*), and Sung-Lam (*Isatis indigotica*) were chosen to identify their germplasms, purify the genotypes, establish the good agricultural practices (GAP) model, analysis the effective components, and breed for the local elite lines.

The native herb Ma-Lam, and Sung-Lam served as effective Chinese medicine. Seeds and materials were imported without genotypically identified. Tissue culture protocols of the herbs are established first to produce enough pest-free plantlets. With genetically purified test, these materials are used to standardize the farming practices and analysis the effective chemical components. Mass propagation of the herbs from pest and disease-free seedling in cultural medium can be achieved. From this diversified materials, stress tolerance lines such as extreme temperature, and water logging may selected for good agricultural practices (GAP) in Taiwan.

GAP is necessary for good quality and stability of effective chemical components. Fingerprinting of chemical components and its seasonal fluctuations are analyzed to find the key indicator of the effective chemical components and proper harvesting time. Finally, high quality and stable genotypes of these herbs that suitable for local GAP and organic culture are bred.

## Method

Field experiment of *Isatis indigotica* was conducted in split plot design at Minjian, Nantou from 2004 through 2005. The main plot was two level of organic fertilizer (0 and 4,000 kg / ha). The sub plot was dolomite treatments (0 and 2,000 kg / ha). And the sub-plot was potassium fertilizer (60, 120 and 180 kg / ha) in 3 replications. For the observation for cultivars, C1, C2, C3, and C4 were cultivated with randomized complete block design in 6 replications.

Field experiments of *Strobilanthes cusia* were conducted from 2004 through 2005 at Luku. To investigate three planting density ( 10、20 and 30 cm )and nitrogen fertilizer treatment ( 75、150 and 225 kg / ha ) weed control methods in GAP farming. As affected Yields of the Biomass and indigo dye from *S. cusia*.

Component analysis including the calibration of the three standard compounds, preparation of the samples, optimum parameter of the instrument including LC/UV and LC/MS, and the chromatographic conditions.

Two alkaloids--compound A as a 2-benzoxazolinone and and B (2R)-2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl -2H -1,4- benzoxazin-3 (4H)-one were isolated from the root of *Strobilanthes cusia* last year. This year we have finished the whole isolation of the root part of *S. cusia*. A total of 9 compound were obtained. Among them, another alkaloid , 2, 4 (1H, 3H) quinazolinone was isolated. We use these three compound plus the previous standards including tryptanthrin, indigo and indirubin as our six alkaloid standards to run the HPLC to distinguish *Isatis* species from and *Strobilanthes* plants used as the resource of Chinese drug Banlangen due to the absence of the three alkaloids we isolated from *S. cusia* in *I. species*. And the comparison between leaves and root, we obtained a significant varies between the leaves and root part on the content of these alkaloids.

## Results & Discussion

1. Application of 112 kg K<sub>2</sub>O / ha and 124 kg K<sub>2</sub>O / ha potassium fertilizer gave *Strobilanthes cusia* the highest yield of leaf and root, respectively.
2. The optimum harvest time of *Strobilanthes cusia* is the pre-flowering stage.
3. Application of 4 % IBA is beneficial for rooting system when crafting of *Strobilanthes cusia*.

4. The optimum planting space of *Isatis indigotica* is 30×18 cm.
5. Biomass of *Strobilanthes cusia* was enhanced as nitrogen fertilizer increased.
6. Indigo blue, indirubin, and tryptanthrin of *Isatis indigotica* increased as nitrogen fertilizer increased.

Leaf of *Isatis indigotica* showed a high indigo blue and indirubin contents, while root showed a high tryptanthrin content.

Keywords : Natural herbs, *Strobilanthes cusia*, *Isatis indigotica*, Germplasms, heat-tolerance, Good agricultural practice(GAP), Fingerprinting, Indicator components

## 壹、前言

本研究以中藥菘藍及馬藍為試驗材料，探討其種源收集、成分分析、選種以及GAP栽培模式之建立，並擬進一步進行適應本地環境之育種工作。利用液相層析(LC/UV)及液相層析質譜儀 (LC/MS)，進行藍染植物包括菘藍及馬藍之化學成分分析，並比較其活性成分差異，及探討不同栽培方式對成分的影響。

本計畫也進行大量馬藍植物成分的單離，主要是想分離出較多之兩個主要之生物鹼，分別是化合物 A (2-benzoxazolinone)，及化合物 B，((2R)-2-O-β-D-glucopyranosyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one)。由於化合物 B 首次由馬藍分離出，可顯示其特異性，日後可作為南北板藍的鑑別診斷的指標成分。

年度以benzoxazinoid類化合物為指標成分，進行馬藍與菘藍藥材鑑別分析。文獻報導在單子葉禾本科植物及雙子葉植物，包括爵床科、玄蔘科及毛茛科中才有benzoxazinoid化合物，馬藍是爵床科植物，菘藍否。研究顯示，此類化合物存在於許多禾本科植物中，具抗昆蟲、抗真菌、抗細菌及病毒之有效活性成分，又為傳統抗發炎之民間藥，因此將進一步探討此一純化合物之藥理活性，以為開發本土中藥馬藍之依據。

## 貳、材料與方法

### 一、菘藍

本研究田間試驗分別在中興大學農業試驗場及名間舉行，篩選適合 GAP 栽培之品系，探討菘藍及馬藍適合之 GAP 栽培方法，包括栽培密度、肥培管理以及病蟲害防治方法。

#### (一) 蒐集菘藍相關種源：

菘藍：本試驗材料為十字花科 (Cruciferae) 植物菘藍 (*Isatis indigotica*)，又名板藍根。利用進口的 4 個菘藍品系 (C1、C2、C3、C4) 種子。經由型態鑑別 (鑑定種子、鮮株、乾葉、乾根特徵) 與 HPLC 成分鑑定 (鑑定 indigo 靛藍、indirubin 靛玉紅、tryptanthrin 色胺酮三種指標成分)，確定其基原。

## (二) 菘藍試驗方法：

- 1.不同肥料試驗：以菘藍 C3 品系為試驗材料。主區以兩種有機肥施用量處理(0、4,000 kg/ha)。副區為兩種苦土石灰施用量處理(0、2,000 kg / ha)。小區為鉀肥處理(60、120、180 kg / ha)。施用有機肥料處理小區，另外施用氮、磷肥 40 kg / ha。未施用有機肥處理小區則需施用氮素 80 kg / ha、磷肥 100 kg / ha。試驗區採雙重裂區設計，每處理 3 重複。
- 2.不同品系栽培試驗：以菘藍品系 C1、C2、C3、C4 為試驗材料，肥料處理為有機肥 4,000 kg / ha、苦土石灰 2,000 kg / ha 與鉀肥 120 kg / ha。試驗區採區集逢機處理，每處理 6 重複。
- 3.試驗調查：每三個月調查一次，調查項目為葉長、根粗、葉鮮重、根鮮重、葉乾重、根乾重、葉含水率、根含水率等。

(三) 菘藍有效成分含量：分析不同施肥等級及不同栽培期菘藍有效成分含量。

## 二、馬藍

### (一) 試驗材料

本試驗材料為爵床科(Acanthaceae)植物馬藍(*Strobilanthes cusia* (Nees) O. Ktze)，又名山藍(經由台灣手工藝研究所鑑定)。利用二年生之植株中段(具兩節)枝條為扦插苗。

### (二) 試驗地點

本試驗在南投縣鹿谷鄉農家進行田間試驗。

### (三) 試驗期間

2004 年 5 月 12 日扦插，2004 年 9 月 16 日收穫(一年二收)；採宿根栽培，2005 年 5 月 23 日收穫。



#### (四) 實驗設計

探討馬藍之 GAP 栽培方法，包括栽培密度及氮肥管理。

- 1.栽培密度處理：分別以 10、20 和 30 公分三種株距，配合行距 30 公分，每一試區 15 平方公尺，調查單位面積產量，及探討適合的栽培密度。
- 2.氮肥處理：分別施用 75、150 和 225 kg / ha 的氮肥，每一試區 10 平方公尺，調查單位面積產量及有效成份，探討適合的氮肥處理。

## 參、結果

### 一、菘藍

#### (一) 不同肥料試驗：

分別於 93 年 9、11 月，及 94 年 2 月採樣並分析其產量。於 5 月齡時分別調查施用苦土石灰 2,000 kg / ha 與氯化鉀 60 kg / ha 處理，其葉片與根產量分別為 4,886 kg / ha、5,814 kg / ha。未施苦土石灰，僅施用鉀肥 120 kg / ha 處理，葉片與根產量分別僅有 2,443 kg / ha、3,300 kg / ha。顯示，混合施用苦土石灰與化學肥可以增加菘藍產量。施用有機肥 4,000 kg / ha、鉀肥 180 kg / ha 處理，葉片與根產量分別為 5,272 kg / ha 及 5,114 kg / ha。顯示，鉀肥施用量增加，產量有下降趨勢。同時施用有機肥 4,000 kg / ha、苦土石灰 2,000 kg / ha 與鉀肥 60 kg / ha，葉片與根產量最高，分別為 5,157 kg / ha 及 5,729 kg / ha。顯示，鉀肥施用量增加，產量有下降趨勢。所以混合施用有機肥、苦土石灰有助於提高菘藍產量，若單獨施用苦土石灰產量較差(表一、表二)。

#### (二) 不同品系栽培試驗：

於 93 年 9、11 月與 94 年 2、7 月，採樣 4 次分析其產量。3 月齡，C1 品系葉根產量最低，分別為 2,957 kg / ha、2,443 kg / ha (表四、表五)，葉根含水率分別為 88.4%、63.2% (表六、表七)，C4 品系葉根產量最高，分別為 4,629 kg / ha、3,343 kg / ha，葉根含水率分別為 88.3 %、64.5%(表七)。5 月齡，C3 品系葉根產量最低，分別為 5,043 kg / ha、5,286 kg / ha，葉根含水率分別為 86.9%、65.0%(表六、表七)，C1 品系葉根產量最高，分別為 14,443 kg / ha、9,172 kg / ha(表四、表五)，葉根含水率分別為 89.3 %、68.05 %(表六、表七)。8 月齡，C3 品系根葉產量最低，分別為 13,015 kg / ha、12,486kg / ha(表四、表五)，葉根含水率分別為 86.3 %、66.0%(表六、表七)，C1 品系根葉產量最高，分別為 16,224 kg / ha、15,227 kg / ha(表四、表五)，葉根含水率分別為 88.9 %、68.25 %(表六、表七)。開花後 12 月齡，C1 品系葉產量最低為 1,650 kg / ha(表四)，葉含水率為 85.7 %(表七)，C4 品系根產量最高

為 27,429 kg / ha(表五)，葉含水率為 76.0 %(表六)。結果顯示菘藍栽培越久，鮮根產量越高，但開花後植株養分大量被花與種子消耗鮮葉產量急遽下降，根含水率由 65 %上升至 76 %影響板藍根產量。因此建議菘藍栽培應增加栽培時間，並於開花前採收才能獲得最高產量。

## 二、馬藍

- (一) 採收種植在鹿谷之馬藍，隨著氮肥追施量的增加，植株的重量及藍靛也隨之增加。栽培密度則以 30 × 18 cm 莖葉收穫量及藍靛最佳。
- (二) 建立初步的馬藍 GAP 栽培規範。

## 肆、討論

### 一、菘藍

在菘藍不同肥料試驗中，施用苦土石灰有助於提升產量。8 月齡施用苦土石灰 2,000 kg / ha 與氯化鉀 120 kg / ha 處理，葉片與根產量分別為 8,672 kg / ha 及 11,685 kg / ha。未施苦土石灰，僅施用鉀肥 120 kg / ha，葉片與根產量，分別僅有 6,808 kg / ha 及 7,132 kg / ha。因名間試驗田為紅壤土，pH 值為 4.5，屬於偏酸性土壤，施用苦土石灰 2,000 kg / ha 可以改良土壤 pH 值至 6.2，有助於改善菘藍土壤環境，提升菘藍產量。施用有機肥 4,000 kg / ha、鉀肥 120 kg / ha 處理，葉片與根產量分別為 12,520 kg / ha 及 11,279 kg / ha。若同時施用有機肥 4,000 kg / ha、苦土石灰 2,000 kg / ha 與鉀肥 120 kg / ha，葉片與根產量最高，分別為 13,015 kg / ha 及 12,486 kg / ha。混合施用有機肥、苦土石灰有助於提高菘藍產量，僅施用有機肥亦可以達到高產，若單獨施用苦土石灰產量較差。

在不同菘藍品系試驗中，8 月齡時菘藍鮮葉、鮮根產量分別可達 13,000 及 15,000 kg / ha，開花後 12 月齡菘藍鮮葉、鮮根產量分別為 1,900 及 23,000 kg / ha。三、五、八月與開花後 12 月齡根含水率分別為 65 %、65 %、66 % 及 76 %。結果顯示，菘藍栽培時間越久，根產量越高，但開花後植株養分大量被花與種子消耗鮮葉產量急遽下降，而菘藍根含水率也在開花後上升，進而影響菘藍根產量。因此建議菘藍栽培可延長栽培時間，但必須在開花前採收才能獲得最高產量。

### 二、馬藍

追施氮肥處理試驗中，以施用氮肥 225 kg / ha 的馬藍單株莖重和葉重最高，分別為 179.91 g 及 321.18 g，其次是施用氮肥 150 kg / ha 的馬藍單株莖重和葉重，分別為 128.26 g 及 234.14 g，施用氮肥 75 kg / ha 的馬藍單株莖重和葉重表現最差，分別為 116.96 g 及 194.69 g (表八)。

栽培密度試驗上，以 30 × 10 cm 節間距為 14.67 cm 最長，植株高度可達 149.33 cm。其次是 30 × 20 cm 節間距為 10.67 cm，植株高度達 97 cm。30 × 30 cm 節間距為 6.83 cm，植株高度為 91.67

cm。而植株單株莖重與葉重以 30 × 30 cm 最高，分別為 294.52 g 及 421.96 g。其次為 30 × 20 cm 分別為及 253.35 g 及 407.14 g，30 × 10 cm 植株單株莖重與葉重最差分別為 294.52 g 及 421.96 g (表八)。

藍靛是利用採收之新鮮枝葉進行加工而得，因此莖葉的採收量越高，藍靛的產量越高。在馬藍的栽培密度試驗上，莖葉採收量以 30 × 10 cm 約 2,3947 kg / ha 最高，其次是 30 × 10cm 約 21,867 kg / ha，30 × 30cm 約 17,640 kg / ha。但是藍靛產量以 30 × 20 cm，1,067 kg / ha 為最佳，30 × 10 cm 及 30 × 30 cm 均為 889 kg / ha (表九)。氮肥試驗中，施用氮肥 75 kg / ha 的莖葉採收量約 19,730 kg / ha。施用氮肥 150 kg / ha 的莖葉採收量 1,427 kg / ha，施用氮肥 225 kg / ha 的莖葉採收量 18,800 kg / ha。藍靛產量以施用氮肥 225 kg / ha 約為 1,067 kg / ha 最高，其次為施用氮肥 75 kg / ha 的藍靛產量為 967 kg / ha，因遭受蟲害，故施用氮肥 150 kg / ha 的藍靛產量最低，僅 676 kg / ha (表十)。

氮肥的施用對於植物體內有效成分的含量亦有影響。追施氮肥 150 kg / ha，可使馬藍葉中靛藍含量由 51.88 μg / g 提升至 84.84 μg / g。靛玉紅含量由 19.85 μg / g 提升至 53.82 μg / g。色胺酮含量由 10.915 μg / g 提升至 20.008 μg / g (表十一)。

## 伍、結論與建議

- 一、經由回歸分析，菘藍栽培建議施用苦土石灰處理。施用鉀肥 125 kg/ha，可以獲得葉片最高產量，施用鉀肥 144 kg/ha，可以獲得根最高產量。施用有機肥，苦土石灰處理，建議施用鉀肥 112 kg/ha，可以獲得葉片最高產量，施用鉀肥 124 kg/ha，可以獲得根最高產量(表三)。
- 二、延長菘藍栽培時間可以增加葉及根產量，但須於開花前採收才可以獲得最高產量。
- 三、本試驗結果建議，C1 品種為採收大青葉之適當品種。C4 品種為適製青黛之品種。C1、2、3 品種為採收板藍根之適當品種。
- 四、使用馬藍枝條作為繁殖材料時建議利用 IBA (4%)，可使根部生長更健壯以減少植入田間時幼根傷害率。
- 五、葉面積隨栽培密度增加而遞減，但葉面積指數( leaf area index, LAI )與植株上部之葉面積基礎淨光合作用(leaf-area-based net photosynthesis; Pa)卻隨之遞增。高密度種植馬藍會減少單株枝重，植株之高度與節間之長度隨栽培密度增加而遞增，節間較長可使光之穿透度較佳。建議馬藍栽培以 30 × 18 cm 行株距為最佳栽培密度。
- 六、氮肥為肥料三要素之一。氮肥能促進營養生長，使的植株葉面積增加，合成之葉綠素增加葉片呈現濃綠色。在馬藍的氮肥試驗中，隨著氮肥追施量的增加，植株的重量也隨之增加。
- 七、對於氮肥的施用對於馬藍葉中靛藍、靛玉紅及色胺酮的含量，隨著氮肥的施用量加，馬藍葉中靛藍、靛玉紅及色胺酮的含量也隨著增加。
- 八、成分分離部份：進行馬藍植物(3 kg)之全分離，共分離得到九個化合物 (A-I)，其分離流層圖見表 12、13 及其結構見圖一。
- 九、以高壓液相層析/紫外光(HPLC/UV)偵測進行指標成分，包括六種生物鹼之定性分析，層析圖見圖二、圖三。

實驗最佳條件如下：

- 1.儀器：Beckman System Gold Programmable Solvent Module 125 with Diode Array Detector Module 168。
- 2.管柱 Column：Merk RP-18e(5 $\mu$ m) 250 x 4 mm。

3.動相 Mobil phase : A : water + 0.005%TFA

B : CAN + 0.005%TFA

4.流速 Flow rate : 0.4 ml/min

5.沖提 Gradient : 0-5min : 15%B ,

5-20min : 15-50%B ,

20-40min : 50%B ,

40-45min : 50-98%B ,

45-50min : 98%B ,

50-55min : 98-15%B ,

55-60min : 15%B 。

十、以高壓液相層析/紫外光(HPLC/UV)偵測，進行馬藍根部與葉部指標成分，包括六種生物鹼之分析比較，如層析圖圖四至圖七。結果顯示根部含有較多之非色素生物鹼，尤其是化合物(A)與(C)為其主要成分，而靛藍與靛玉紅等色素生物鹼則在葉部較多。

十一、以高壓液相層析/質譜儀(HPLC/APCI/MS)偵測，進行藍染植物包括菘藍及馬藍之葉部之有效活性成份分析與比較。

1.完成 LC/MS 之最佳化參數之尋找，列於表十四，並完成靛藍、靛玉紅與色胺酮之 LC/MS 檢量線(圖八)。

2.已完成利用 LC/MS 分析植物樣品(乾燥的菘藍葉、乾燥的菘藍根)中靛藍、靛玉紅與色胺酮之定量分析(圖九、十)。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-102 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

### 【中文參考文獻】

1. 中華民國衛生署中醫藥委員會。1999。中藥材品質管制組織型態學鑑定。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。p.269。
2. 中華民國衛生署藥物食品檢驗局。2002。易混淆及誤用藥材之鑑別（I）。行政院衛生署藥物食品檢驗局。台灣。台北。p.156-163。
3. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2004。中藥對照指標成分物理化學資料彙編。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。p.65-213。
4. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2004。台灣中醫藥防治 SARS 關鍵成果報告彙編(一)。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。p.120-127。
5. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2004。中華中藥典。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。p.46。
6. 何玉鈴，2001。板藍根、大青葉及青黛之生藥學及藥理學研究，中國醫藥學院中醫藥研究所。
7. 楊秀賢、呂曙華、吳壽金，1995。馬藍葉化學成分的研究，中草藥 26(12): 622。
8. 胡世林，1989。中國道地藥材，哈爾濱，黑龍江科學出版社，110。
9. 高國清、何玉鈴、何禮剛、張永勳，2001。馬藍根中含氮雜環，苯并二氫噁挫-2-酮及 2-OH-1，4-苯并噁，中醫藥雜誌，12(1): 41-49。

### 【英文參考文獻】

1. Henning Danz, S. Stoyanova, P. Wippich, A. Brattstrom, M. Hamburger. 2001. Identification and isolation of the Cyclooxygenase-2 inhibitory principle in *Isatis tinctorica*. *Planta Med.* 67:411-416.
2. Wu, X. and G. Qin, 1997, "new alkaloids from *Isatis indigotica*" *Tetrahedron.* 53:13323; b. X.Wu, Y. Liu, W.sheng, J.Sun and G.Qin, Chemical constituents of *Isatis indigotica*. *Planta Medica.* 63:55-57.
3. Kao K. C., Y. L. Ho., L. K. Ho., Y. S. Chang, Flavone glycosides from *Strobilanthes formosanus*. *J. Chinese Chem. Soc.* 2003 in press.
4. Singh B., A. K. Saxena, B. K. Chandan. 2001. Hepatoprotective activity of indigotone. *Phytotherapy research: PTR.* 15(4): 294.
5. Sreepriya M., T. Devaki. 2001. Effect of *indigofera tinctoria* Linn on liver antioxidant defense system. *Indian J. experimental biology.* 39(2):181.



- 6.Kwon,Y. S., H. M. Won. 2000. Flavonoids from *indigofera pseudo- tinctoria* stem. Saengyak Hakhoechi . 31(3):280.
- 7.Garce, z., S.Waldir, z. Garce, R. Fernanda. 2003. Additional 3-nitropropanoyl ester of glucose from *indigofera suffruticosa* Biochem. Systematics and Ecology. 31(2): 207.
- 8.Domingue, z., A. Xorge, z., Martine, Carolina. 1978a. Chemical components from jiquelite *indigofera suffruticosa* Mill. Planta Medica. 34(2):172.
- 9.Domingue, z., A. Xorge, z., Martine, Carolina. 1978b. Louisfieserone an unusual flavanone derivative from *indigofera suffruticosa* Mill Tetrahedron letters(5): 429.
- 10.Han, R. 1994. Highlights on the studies of anticancer drugs derived from plants in China. Stem Cells .12(1): 53-63.

## 柒、圖、表

表一、有機肥、苦土石灰及鉀肥處理對 5 月齡菘藍葉片產量之影響

有機肥 (ton / ha)	苦土石灰 (ton / ha)	鉀 肥 (kg / ha)		
		60	120	180
0	0	2,443	4,836	3,717
	2	4,886	4,843	4,500
4	0	5,529	6,000	5,272
	2	5,157	5,043	4,786

\*名間試驗田，2004 年 11 月採樣。

\*有機肥處理區另外施用氮、磷肥 40(kg / ha)。

\*未施用有機肥處理區加施氮肥 80(kg / ha)、磷肥 100(kg / ha)。

表二、有機肥、苦土石灰及鉀肥處理對 5 月齡菘藍根產量之影響

有機肥 (ton / ha)	苦土石灰 (ton / ha)	鉀 肥 (kg / ha)		
		60	120	180
0	0	3,300	3,672	3,886
	2	5,814	6,707	5,300
4	0	5,686	5,214	5,114
	2	5,729	5,286	5,300

\*名間試驗田，2004 年 11 月採樣。

\*有機肥處理區另外施用氮、磷肥 40(kg / ha)。

\*未施用有機肥處理區加施氮肥 80(kg / ha)、磷肥 100(kg / ha)。

表三、有機肥及鉀肥處理對菘藍產量之二次回歸方程式與鉀肥推薦施用量

有機肥 (ton / ha)	採收部位	二次回歸方程式	鉀肥推薦施用量 (kg / ton)
0	葉	$Y=1226+10.2917X-0.04125X^2$	124
	根	$Y=33+44.15X-0.15278X^2$	144
4	葉	$Y=1638+-8.9X-0.0397X^2$	112
	根	$Y=-239+34X-0.1361X^2$	124

\*以上均為施用苦土石灰 2,000 處理。

\*X=鉀肥施用量；Y=菘藍產量。

表四、不同菘藍品系與月齡對菘藍葉產量之影響

菘藍品系	採 樣 天 數			
	90	120	240	360
C1	2,957	14,443	16,224	1,650
C2	2,957	9,000	13,033	1,800
C3	4,157	5,043	13,015	1,973
C4	4,629	7,286	13,376	1,971

\*名間試驗田，2004年9、11月採樣，及2005年2、7月採樣。

\*施用有機肥處理 4,000 kg / ha、苦土石灰 2,000 kg / ha、鉀肥 120 kg / ha。

表五、不同菘藍品系與月齡對菘藍根產量之影響

菘藍品系	採 樣 天 數			
	90	120	240	360
C1	2,443	9,172	15,227	23,400
C2	2,229	7,714	15,041	21,343
C3	2,886	5,286	12,486	18,102
C4	3,343	8,614	14,560	27,429

\*名間試驗田，2004 年 9、11 月採樣，及 2005 年 2、7 月採樣。

\*施用有機肥處理 4,000 kg / ha、苦土石灰 2,000 kg / ha、鉀肥 120 kg / ha。

表六、不同菘藍品系與月齡對菘藍葉含水率(%)之影響

菘藍品系	採 樣 天 數			
	90	120	240	360
C1	63.2	68.05	68.25	76.0
C2	65.0	62.63	66.63	76.7
C3	68.0	65.0	66.0	73.8
C4	64.5	65.93	66.93	75.6

\*名間試驗田，2004 年 9、11 月，及 2005 年 2、7 月採樣。

\*施用有機肥處理 4,000 kg / ha、苦土石灰 2,000 kg / ha、鉀肥 120 kg / ha。

表七、不同菘藍品系與月齡對菘藍根含水率(%)之影響

菘藍品系	採樣天數			
	90	120	240	360
C1	88.4	89.30	88.90	85.7
C2	86.7	87.76	87.96	88.1
C3	87.4	86.9	86.3	85.3
C4	88.3	87.76	87.73	86.4

\*名間試驗田，2004年9、11月採樣，及2005年2、7月採樣。  
\*施用有機肥處理 4,000 kg / ha、苦土石灰 2,000 kg / ha、鉀肥 120 kg / ha。

表八、追施氮肥處理及栽培密度對於馬藍的單株重及株高之影響

處理	單株重		株高(cm)	節間距(cm)
	葉重(g)	莖重(g)		
施用氮肥(kg / ha)				
75	116.96 <sup>b</sup>	194.69 <sup>b</sup>	94.13 <sup>a</sup>	11.17 <sup>a</sup>
150	128.26 <sup>b</sup>	234.14 <sup>b</sup>	92.40 <sup>a</sup>	10.67 <sup>a</sup>
225	179.91 <sup>a</sup>	321.18 <sup>a</sup>	100.23 <sup>a</sup>	10.33 <sup>a</sup>
栽培密度(cm×cm)				
10×30	176.31 <sup>b</sup>	313.78 <sup>b</sup>	149.33 <sup>a</sup>	14.67 <sup>a</sup>
20×30	253.35 <sup>a</sup>	407.14 <sup>a</sup>	97 <sup>b</sup>	8.17 <sup>b</sup>
30×30	294.52 <sup>a</sup>	421.96 <sup>a</sup>	91.67 <sup>b</sup>	6.83 <sup>b</sup>

表九、栽培密度對於馬藍莖葉及藍靛產量之影響(2005 年 5 月 23 日於鹿谷)

栽培密度(cm×cm)	莖葉產量( kg / ha )	藍靛產量( kg / ha )
	5 月	5 月
30 × 10	21,600	1,440
30 × 20	22,622	1,735
30 × 30	14,089	876

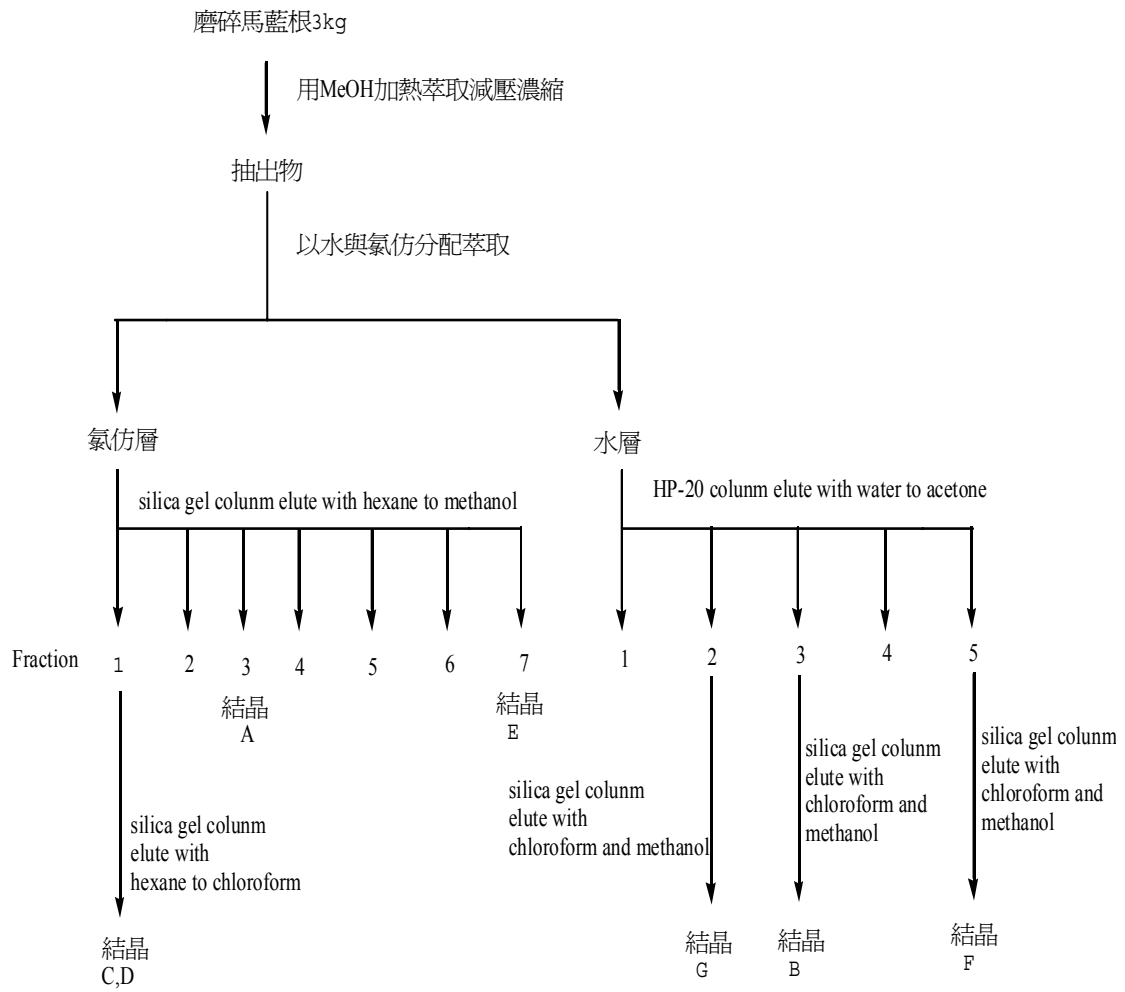
表十、追施氮肥對於馬藍莖葉及藍靛產量之影響(2005 年 5 月 23 日於鹿谷)

施用氮肥( kg / ha )	莖葉產量( kg / ha )	藍靛產量( kg / ha )
	5 月	5 月
75	62,100	4,140
150	54,200	2,710
225	64,700	4,960

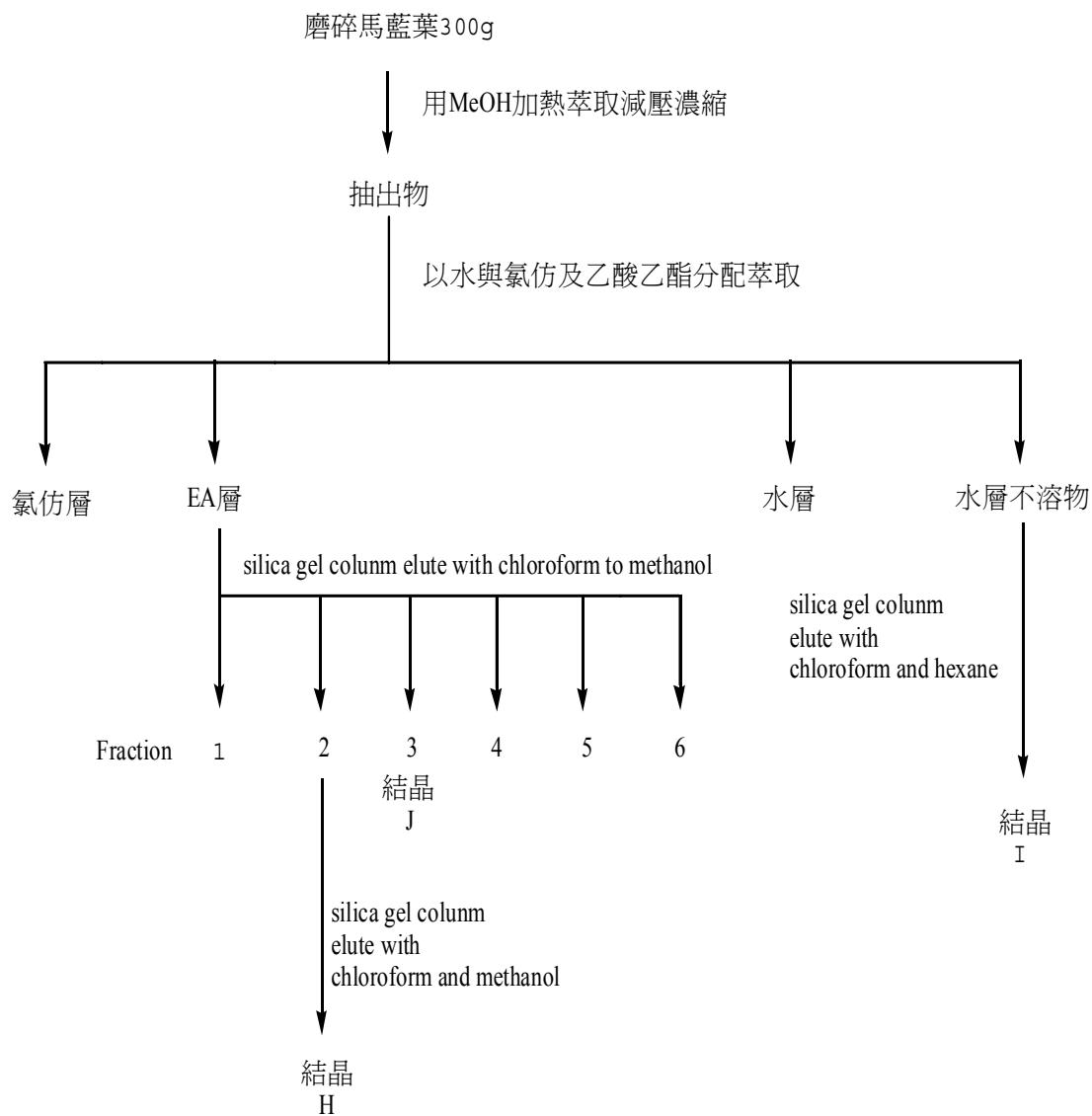
表十一、氮肥的施用對於馬藍葉中靛藍、靛玉紅及色胺酮的含量之影響

	施用氮肥(kg / ha)		
	75	150	225
靛藍( µg / g )	51.88	70.29	84.84
靛玉紅( µg / g )	19.85	27.32	53.82
色胺酮(µg / g )	10.92	9.86	20.01

表十二、馬藍根成分之抽取與分離流程圖



表十三、馬藍葉成分之抽取與分離流程圖

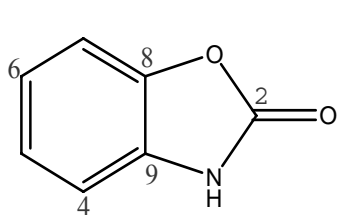




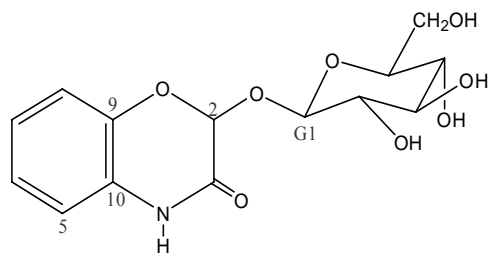
表十四、LC-APCI-MS 之最佳化參數

Segment 1 was used to detect tryptanthrin; Segment 2 was used to detect indigo and indirubin; Segment 3 was used to detect tanshinone(IS).

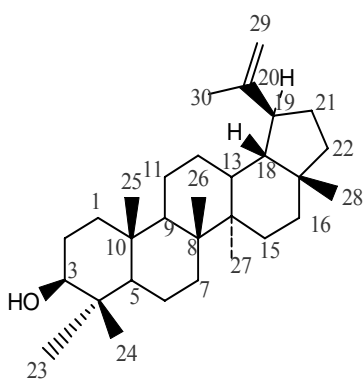
MS Parameters	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Sheath gas flow rate(arb)	40	20	80
Aux gas flow rate(arb)	5	0	0
Discharge Current( $\mu$ A)	3.5	3.5	5.5
Vaporize temp.( $^{\circ}$ C)	575	575	575
Capillary temp.( $^{\circ}$ C)	200	200	200
Capillary voltage(V)	10	10	10
Tube Lens offset(V)	0	0	0
Injection time(ms)	500	500	500
Scan period(min)	0-12	12-22.5	22.5-27



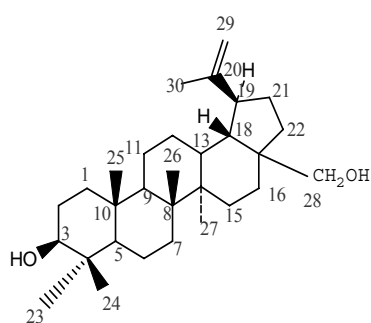
A: 2-benzoxazolinone



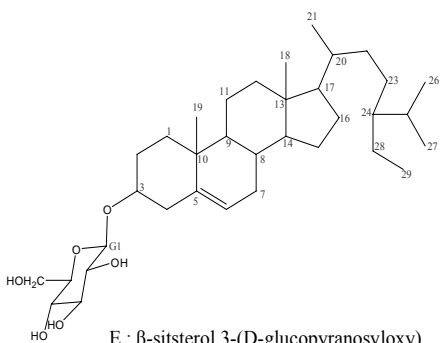
B: 2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 2-(D-glucopyranosyloxy)



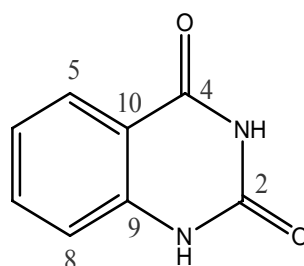
C: Lupeol



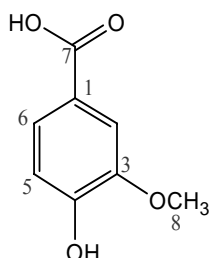
D: Betulin



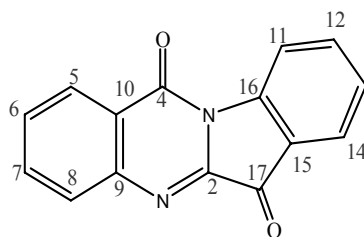
E:  $\beta$ -sitosterol, 3-(D-glucopyranosyloxy)



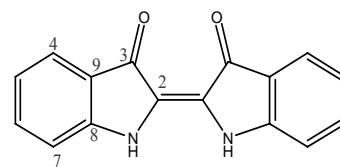
F: 2,4(1H,3H)-quinazolinone



G: 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid

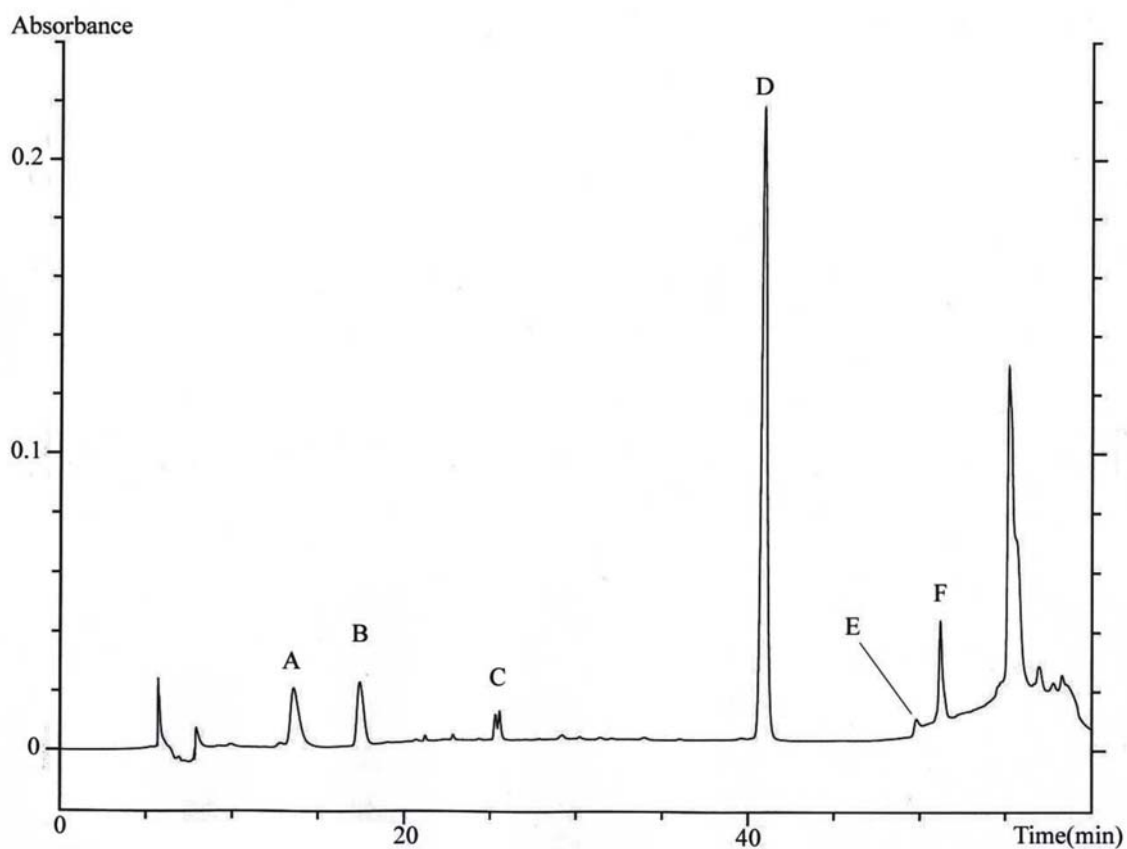


H: Tryptanthrin



I: Indigo

圖一 化合物(A-I)之結構



圖二 六種標準品(Mix Standards UV 254 nm)

A: 2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 2-(D-glucopyranosyloxy)(13.53 min).

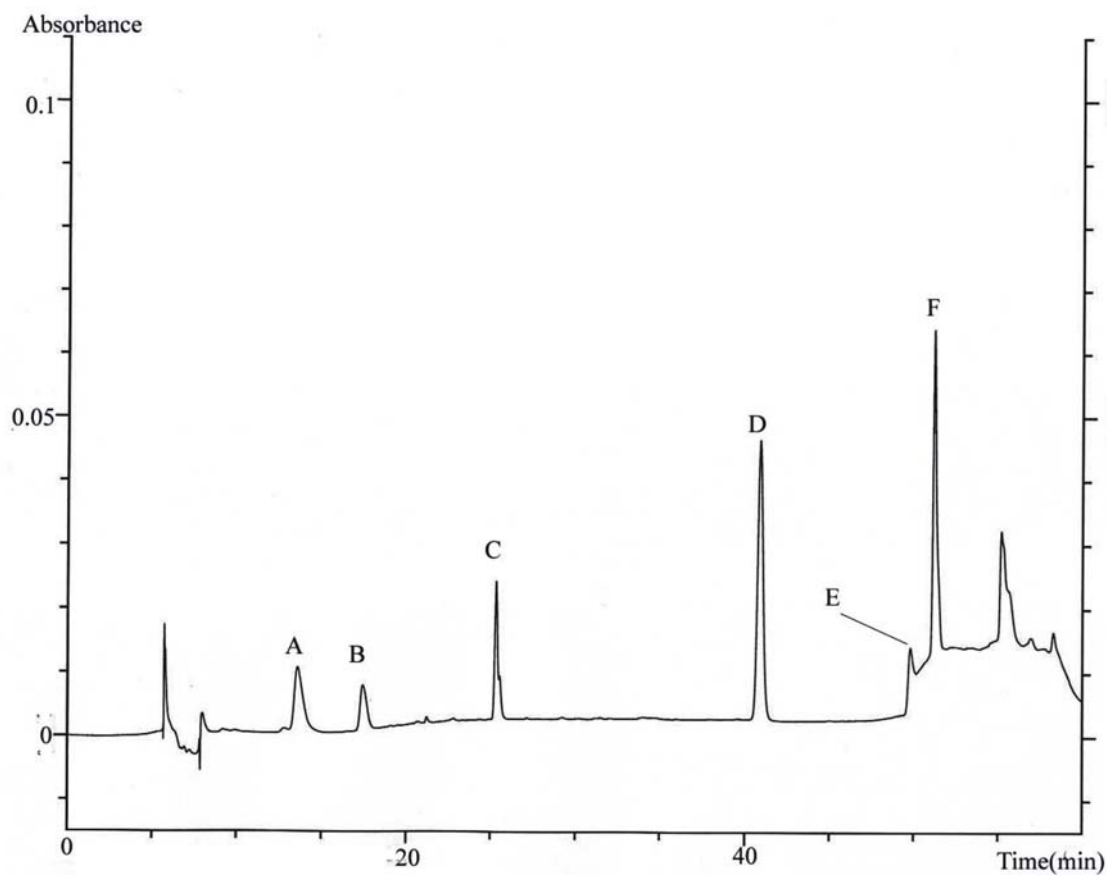
B:(1H,3H)quinazoline-2,4-dione(17.44 min).

C: 2-benzoxazolinone(25.36 min).

D: tryptanthrin(40.79 min).

E: indigo(49.82 min).

F: indirubin(51.22 min).



圖三 六種標準品(Mix Standards UV 280 nm)

A: 2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 2-(D-glucopyranosyloxy)(13.53 min).

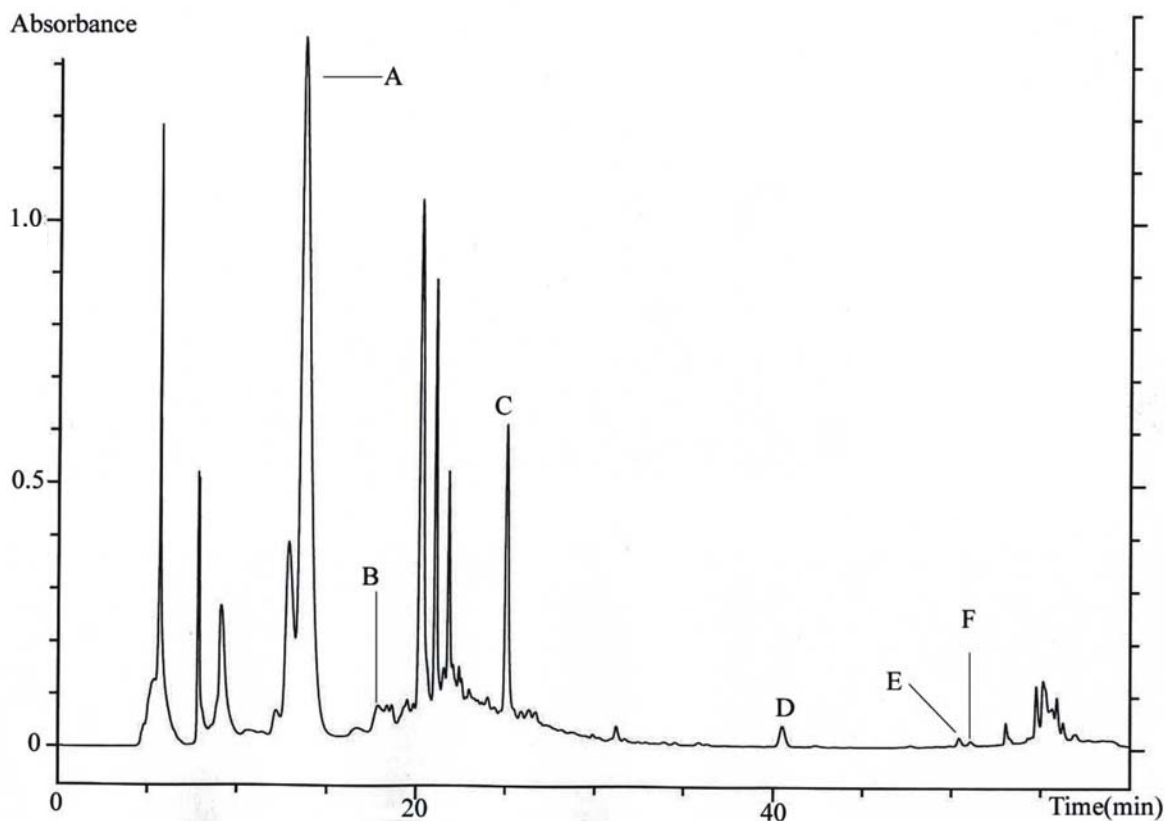
B:(1H,3H)quinazoline-2-4-dione(17.44 min).

C: 2-benzoxazolinone(25.36 min).

D: tryptanthrin(40.79 min).

E: indigo(49.82 min).

F: indirubin(51.22 min).



圖四 馬藍根(1g / ml ) (UV 254 nm)

A: 2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 2-(D-glucopyranosyloxy)(13.53 min).

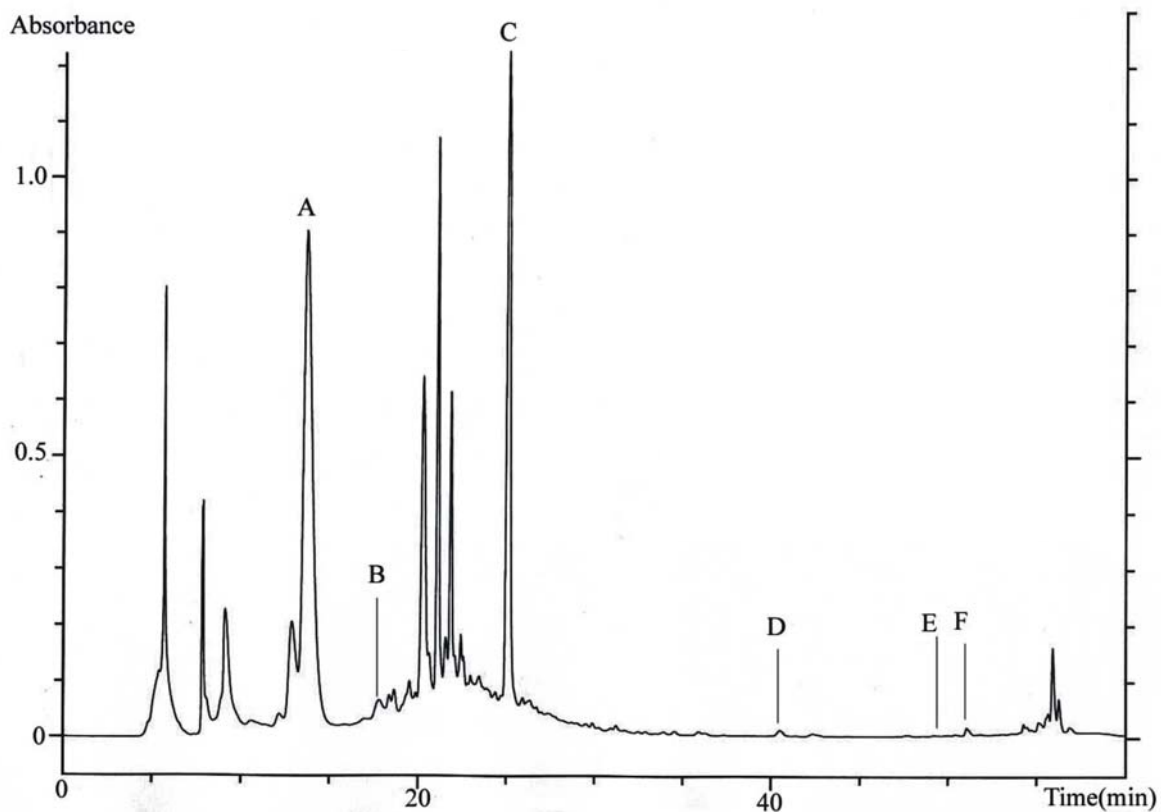
B:(1H,3H)quinazoline-2-4-dione(17.44 min).

C: 2-benzoxazolinone(25.36 min).

D: tryptanthrin(40.79 min).

E: indigo(49.82 min).

F: indirubin(51.22 min).



圖五 馬藍根(UV 280 nm)

A: 2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 2-(D-glucopyranosyloxy)(13.53 min).

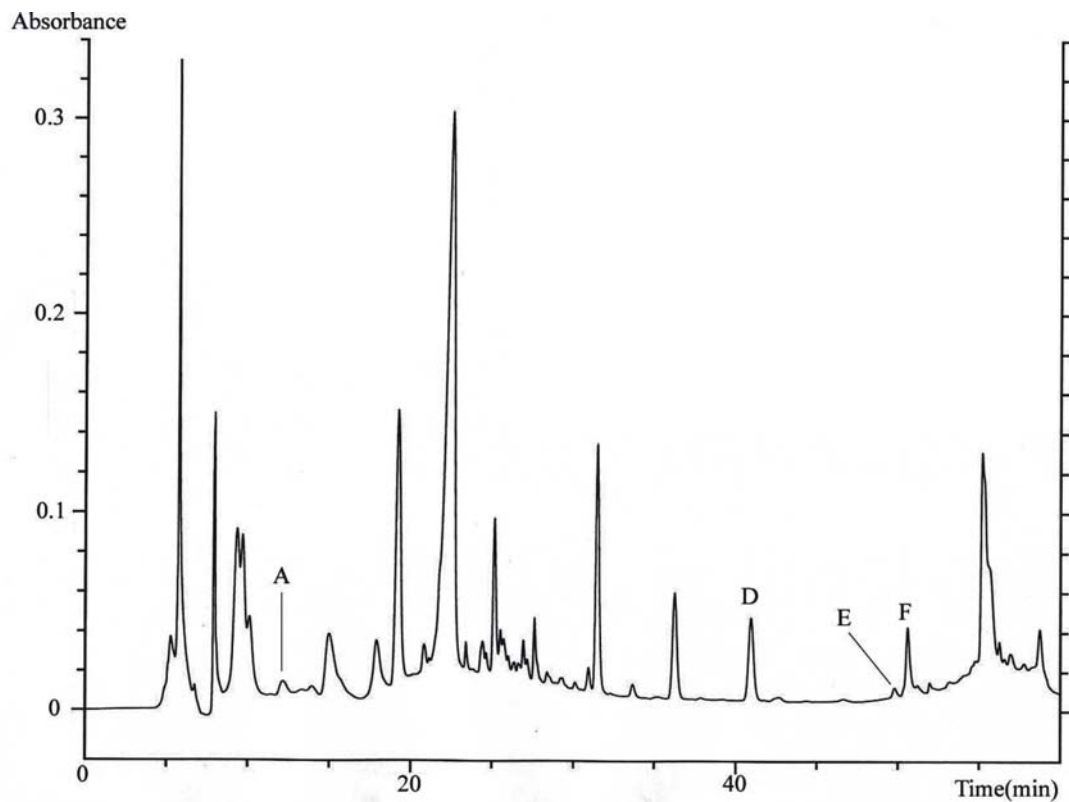
B:(1H,3H)quinazoline-2,4-dione(17.44 min).

C: 2-benzoxazolinone(25.36 min).

D: tryptanthrin(40.79 min).

E: indigo(49.82 min).

F: indirubin(51.22 min).



圖六 馬藍葉(1g / 10 ml) (UV 254 nm)

A: 2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 2-(D-glucopyranosyloxy)(13.53 min).

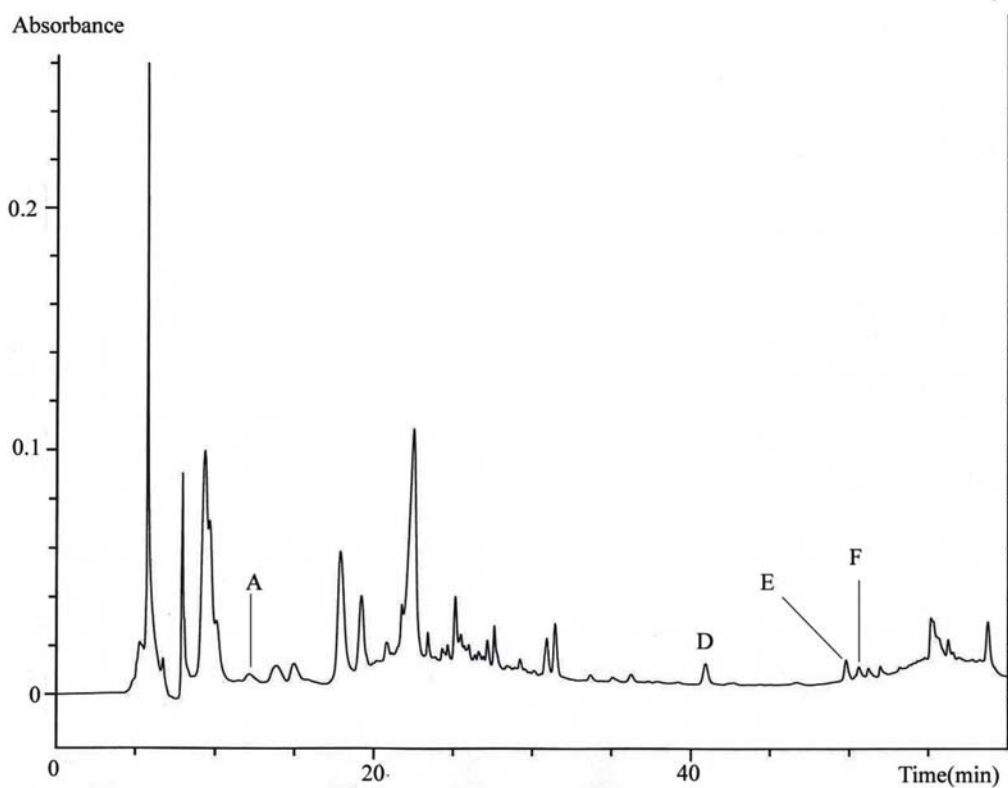
B:(1H,3H)quinazoline-2-4-dione(17.44 min).

C: 2-benzoxazolinone(25.36 min).

D: tryptanthrin(40.79 min).

E: indigo(49.82 min).

F: indirubin(51.22 min).



圖七 馬藍葉(UV 280nm)

A: 2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 2-(D-glucopyranosyloxy)(13.53 min).

B:(1H,3H)quinazoline-2,4-dione(17.44 min).

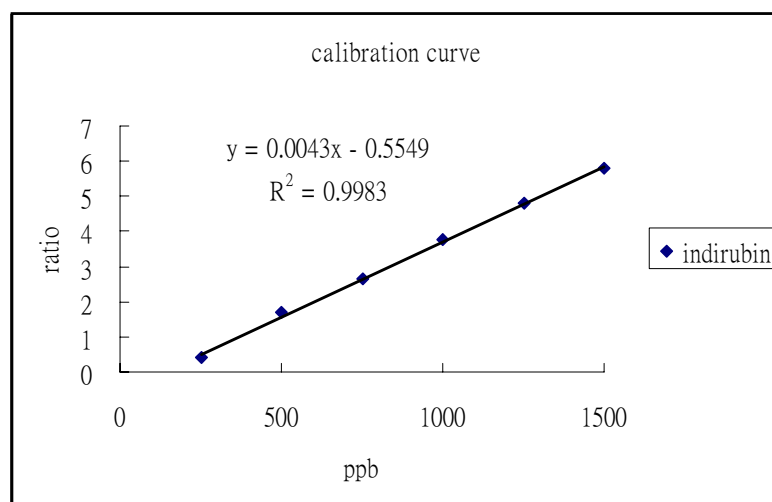
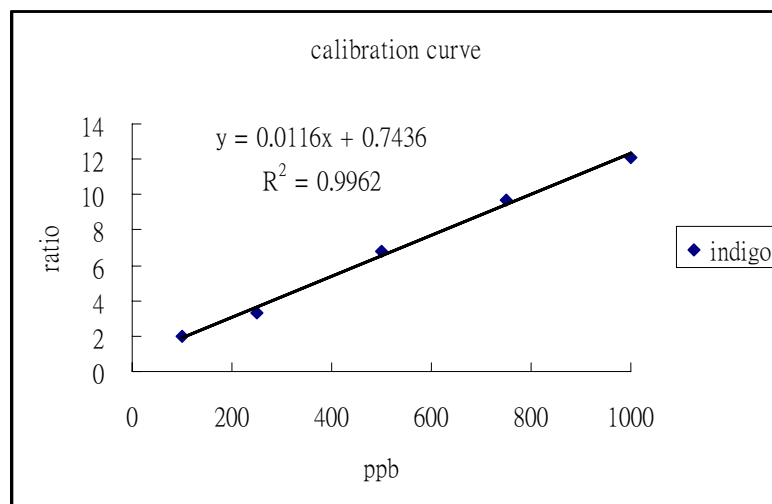
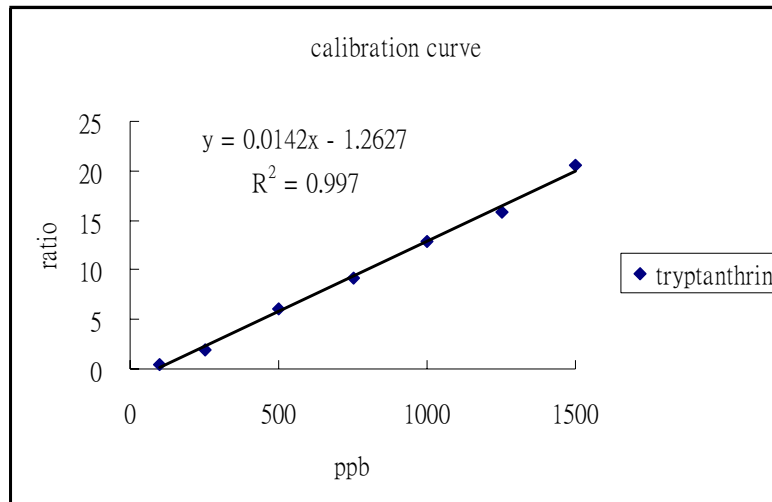
C: 2-benzoxazolinone(25.36 min).

D: tryptanthrin(40.79 min).

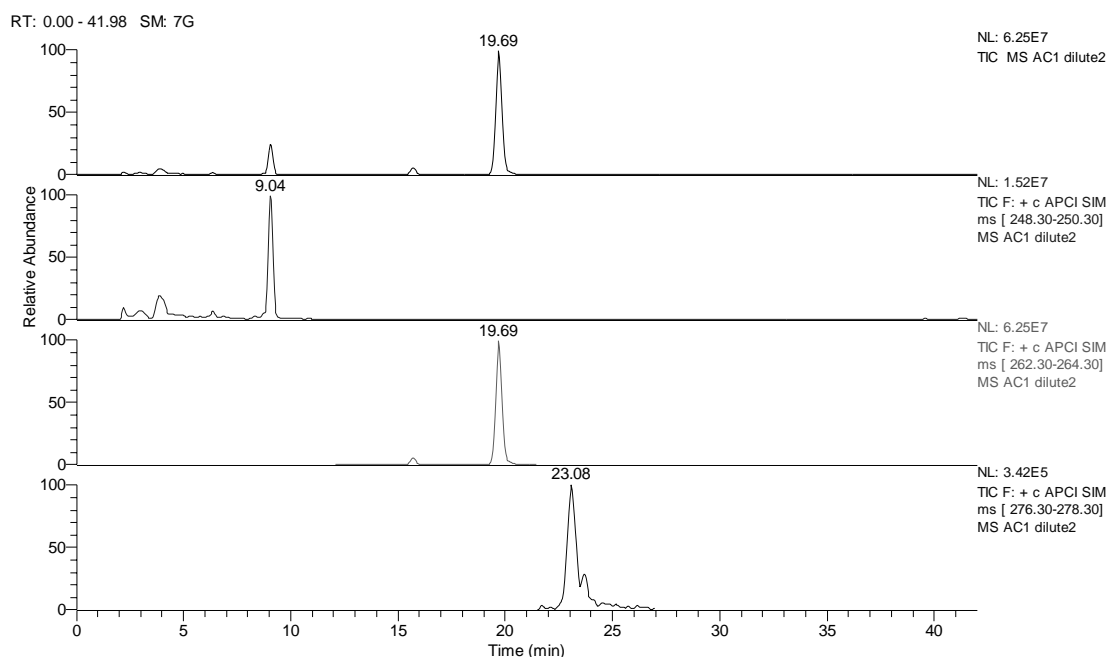
E: indigo(49.82 min).

F: indirubin(51.22 min).

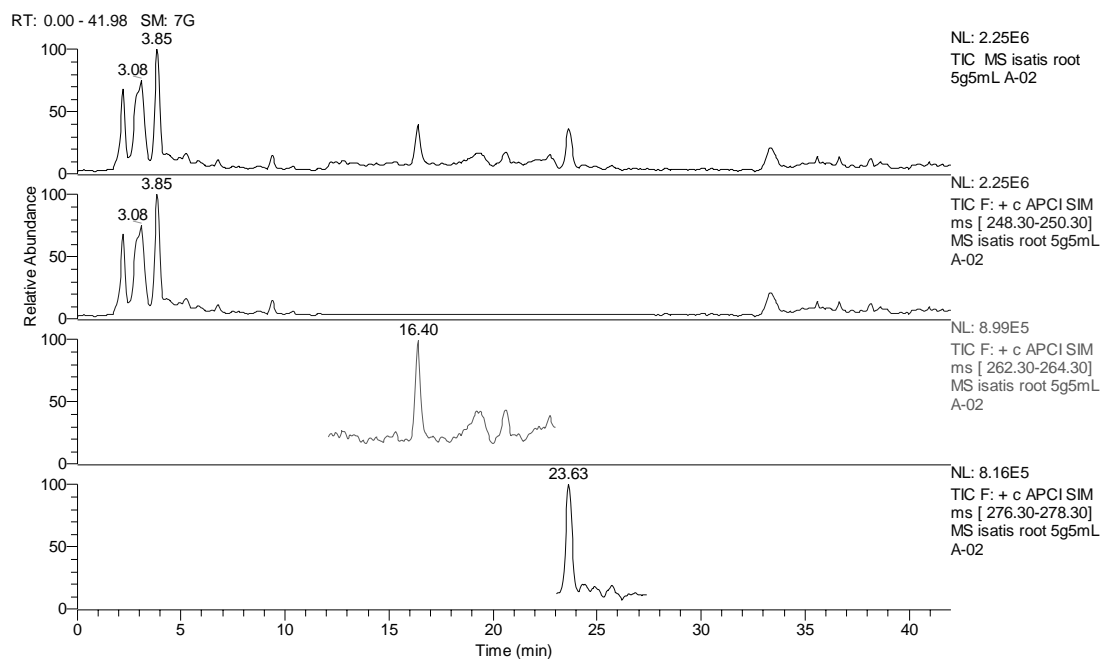




圖八 胺酮、靛藍與靛玉紅之 LC/MS 檢量線



圖九 The APCI SIM chromatograms of(a) TIC (b) tryptanthrin (c) indigo & indirubin(19.7min) (d) IS in dried *Isatis indigotica* leaves(菘藍乾燥葉)of MeOH extracts, 1g/20mL.



圖十 The APCI SIM chromatograms of(a) TIC (b) tryptanthrin (c) indigo & indirubin (d) IS in dried *Isatis indigotica* roots(菘藍乾燥根)of MeOH extracts, 1g/1mL.