

行政院衛生署中醫藥委員會 97 年度中醫藥研究計畫
計畫編號：CCMP 97 -RD-001

行政院衛生署中醫藥委員會 97 年度
研究計畫成果報告

中草藥資源永續使用之探討研究－
誘導枇杷癒傷組織之活性成分研究

執行機構：中國醫藥大學

計畫主持人：吳金濱

研究人員：何惠雅 羅佳祺

執行期限：97 年 2 月 29 日至 97 年 12 月 31 日

** 本研究報告 僅供參考，不代表本會意見，依合約之規定：如對媒體發布研究成果應事先徵求本會同意 **

子計畫二：誘導枇杷癒傷組織之活性成分研究

子封面	(48)
子目錄二	(49)
一、中文摘要	(50)
二、英文摘要	(51)
成果內容	
壹、前言	(52)
貳、材料與方法	(52)
參、結果	(54)
肆、討論	(56)
伍、結論與建議	(57)
陸、參考文獻	(58)
柒、圖、表	(59)

(共 15 頁)

中草藥資源永續使用之探討研究- 誘導枇杷癒傷組織之活性成分研究

吳金濱

中國醫藥大學

摘要

研究目的

枇杷為薔薇科植物 *Eriobotrya japonica* Lindl., 常用於止咳, 清肺和, 降氣化痰。其所含的主要成分有揮發油、三萜酸類、黃酮類、多酚類等。藥理作用指出三萜酸類成分具有良好的抗炎止咳、降血脂、降血糖、抗病毒和抗腫瘤等活性。但是由天然抽取含量不高。因此本研究利用組織培養方法評估癒傷組織的誘導生產三萜酸類之可行性。

研究方法

經由無菌苗誘導產生癒傷分別接種於接種於不同培養條件下。所獲得之細胞以溶媒萃取出後, 利用高效液相層析方法分析細胞所含五種三萜酸化合物。

結果與討論

將枇杷葉的種子經發芽後, 接種於的 MSBA 2.5mg/L+NAA1mg/L 培養基下可以誘導出淡黃色之癒傷組織。接著利用此癒傷組織分別再接種於不同培養條件下。結果顯示, 以葉子誘導的癒傷組織接種於的 MS 或 LS BA 2.5 mg/L+NAA1mg/L 培養基下在暗培養的條件下培養 30 天生長的速度最快且細胞乾重最重。且添加蛋白水解物, 酵母抽出物也是有助於生長與二次代謝產物之累積。在目前培養的條件得知癒傷組織的成分含量顯高於栽種含量的 8.21 倍, 且生長時間只需要 30 天。

關鍵詞：三萜酸、枇杷、組織培養

The reearch for traditional herbal resource suatainable utilization-The active ingredients study in calli induced from loquat

Jin bin Wu
China Medical University

ABSTRACT

Aim

The origin of Loquat was *Eriobotrya japonica* Lindl. and it was usually applied to relieve a cough and treated as a expectorant for lung. The major components were included volatile oils, triterpenes, flavonoids, polyphenols and etc. According to pharmacologic reported that triterpenes could provide with several efficacy on anti-inflammation, relieve a cough, hypolipidemic, hypoglycemic, anti-virus, anticancer and so on; however, the extract yield from crude plant was very little. In the study, we elevated the utilization of the plant tissue culture method to induce callus to produce triterpenes.

Method

We took the sterile cultured plant to induce the callus and then inoculated in various medium. In the period of time, determining the ratio and content of five triterpene compound in the extract from the callus cultured in different condition by high performance liquid chromatography (HPLC).

Results & Discussion

In the beginning, planted the seed of loquat on the BA2.5mg/L+NAA1mg/L MS medium with the sterile condition, and then obtained lemon yellow callus. The following were to utilize the induced calli transplanted to a variety of cultured condition. The result revealed that the primary induced callus inoculated darkly in BA 2.5 mg/L+NAA1mg/L MS or LS medium for 30 days would growth fast and get the most mass in dry weight. Besides, the addition of protein hydrolyte and yeast extract were both better for growth and the accumulation of secondary metabolite. The yield of experimental condition had exhibited the content from callus striled cultured for 30 days was 8.21 times than the original plant wild cultured.

Keywords : Triterpenes 、 Loquat 、 Tissue culture

壹、前言

本計畫以開發本土藥用植物資源為目的，特別是枇杷為台灣中部太平市的特產作物，因此本研究利用本土藥用植物資源，在中草藥資源永續使用之研究上利用組織培養快速取得原植物體有效成分為研究目標。枇杷為薔薇科植物 *Eriobotrya japonica* Lindl. 的乾燥葉，常用於止咳、清肺和降氣化痰。其所含的主要成分有揮發油、三萜酸類、倍半萜類、黃酮類、多酚類、有機酸類等等。藥理作用指出三萜酸類成分(Tormentic acid, Maslinic acid, Corosolic acid, Oleanolic acid and Ursolic acid) 具有良好的抗炎止咳⁽¹⁻⁷⁾、降血脂、降血糖⁽⁸⁻¹²⁾、抗病毒和抗腫瘤等活性⁽¹³⁻¹⁴⁾。但是由天然抽取含量不高，且容易受生長地區及季節變化影響其成分。此外在萃取有效成分的步驟中，又受到大量葉綠素的干擾不易排除⁽¹⁴⁾。因此若能利用組織培養獲得癒傷組織大量生產二次代謝產物，就能比自然植株生長快速且不受氣候之影響⁽¹⁵⁻¹⁷⁾，也能大量減少萃取有效成分時所耗費大量的溶劑與時間。為利用枇杷資源作為三萜酸類成分的發酵培養以及工業生產和各種藥理活性利用上提供產業上的價值。

貳、材料與方法

材料

台中縣頭汴坑枇杷果園成熟枇杷種子

試藥

滅菌水/1%次氯酸鈉/酸鹼調整液 HCl(1N)/NaOH (1N)/培養基：MS

(Murashige-Skoog medium), LS (Linsmaier – Skoog medium), White, B5

(Gamborg's B5 medium), N6 medium, SNN medium

植物生長調節劑：NAA(α -naphthaleneacetic acid)、2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)、BA (6-benzyladenine)、K(kinetin)水晶洋菜/二次水/HPLC 級的

甲醇/酒精/冰醋酸

儀器

蒸餾水製造器/電子天平/超音波振盪器/無菌操作台/殺菌斧/pH 檢測儀/高效液相層析儀/恆溫水浴鍋/離心濃縮機/烘箱/-4°C 冰箱

方法

一、癒傷組織誘導與培養方法：

(一)、無菌苗建立：

採集自台中縣頭汴坑枇杷果園成熟種子，置於水龍頭下以流水沖洗30分鐘後取出，以70%酒精浸泡1分鐘，再浸泡於含0.01% Tween 20的1%次氯

酸鈉溶液，在超音波震盪器中表面消毒15分鐘後，移入無菌操作台，以滅菌水清洗3~4次，將種子培養於添加30g/L蔗糖之MS培養基，2~3週後種子開始發芽，以發芽後2個月大試管種子苗之葉片，莖，根作為試驗材料。

(二)、癒傷組織誘導方法：

將種子苗之葉片，莖，根切成0.3公分大小後，分別移入以MS基本配方含2.5 ppm BA 與1 ppmNAA添加3%蔗糖及0.3% gelrite之固態培養基，經過一各月後由傷口處長出白色的癒傷組織。

(三)、癒傷組織培養方法

1. 培養基的配製：以MS等無機鹽類及有機成分為基本配方，添加3%蔗糖及0.3% gelrite，NAA、2,4-D、BA、kinetin各類植物生長調節劑，用1N NaOH(aq)及HCl(aq)將pH值調至 5.70 ± 0.01 ，然後以 121°C 進行高壓滅菌15分鐘後即可。
2. 培養環境：接種後，將材料置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 之恆溫、黑暗下培養。
3. 接種方法：以三角瓶為培養容器，內含100 ml 培養基，每各三角瓶接種1.5公克癒傷組織，經30天培養後進行萃取與分析。(每個試驗都重複10次)
4. 評估癒傷組織生長和成分變化在不同植物生長調節劑，培養基種類，培養環境，不同植物生長調節劑，碳源濃度，水解酪蛋白物，酵母抽出物等條件下之變化。

二、HPLC分析定量癒傷組織中 Tormentic acid, Maslinic acid, Corsolic acid, Oleanolic acid 及 Ursolic acid 等指標含量。

(一)、高效液相層析儀(HPLC)之分析條件

層析管：HyPURITY C-18 column ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250\text{mm}$)

移動相：A, Methanol; B, 0.15% acetic acid aqueous ; A : B = 85 : 15, v/v

流速：0.5 mL/min

檢測器：折射檢測器

(二)、檢量線

1、配製標準品

分別秤取純化的五種三萜酸化合物(Tormentic acid, Maslinic acid, Corsolic acid, Oleanolic acid 及 Ursolic acid) 精稱1mg作為標準品，溶於甲醇，配成1ml標準品母液(1000ppm)，再分別稀釋成750ppm、500ppm、250、150ppm。

2、五種指標成分之各種濃度其檢量液經 HPLC 分析後，所得之 area 數據(重複三次分析之平均值)進行直線回歸，繪成檢量線並得回歸直線之方程式。

3、癒傷組織之萃取製備

精稱癒傷組織1g，研碎，加入20ml乙醇加熱抽70°C共回流6小時(三次)，濃縮三次萃取得抽出物(mg)。

參、 結果

- 一、五種三萜酸類化合物指標成分 HPLC 如圖-1 所示，可以在移動相：甲醇：0.15% 酸水溶液=85：15，流速：每分鐘 0.5 毫升。檢測器為折射檢測器(RI)，層析管柱：HyPURITY C-18 column (5 μ m, 4.6 \times 250mm) 之條件下將五種成分同時作分析。另一方面，收集台灣不同產區活性成分含量其結果如表-1 顯示，台灣本產之枇杷葉在不同地區所含的各成分含量皆有所不同。以桃園產之枇杷葉(TA=0.57%，MA=0.15%，CA=0.28%，OA=0.1%，UA=0.47%)最接近市場品(TA=0.52%，MA=0.13%，CA=0.24%，OA=0.1%，UA=0.45%)所含三萜酸類化合物的含量。
- 二、將經表面消毒過的枇杷種子分別接種於MS培養基中，發芽後2個月大試管種子苗之葉片，莖，根進行癒傷組織之誘導，如圖-2所示。根，莖，葉在MS培養基中添加BA 2.5mg/L與NAA1mg/L，皆可以於傷口處誘導淡黃色癒傷組織。
- 三、將鮮重約 1.5g 不同部位誘導之癒傷組織分別接種於 MS BA2.5mg/L+NAA1mg/L 培養基中，經暗培養 30 天後葉，莖，根癒傷組織之誘導，如圖-3 所示細胞生長相當快速。檢測其細胞乾重與有效成分變化，結果如圖-4 所示以葉誘導來的細胞乾重最重(乾重=1.28g)與有效成分最高(總五種三萜酸類化合物=144mg/g)。其次為莖(115mg/g)大於根(82mg/g)。因此選擇葉部癒傷組織作為下一階段的實驗材料。
- 四、葉部的癒傷組織分別接種於 MSBA2.5mg/L+NAA1mg/L 培養基中於暗培養與亮培養環境，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化，結果如圖-5 所示:暗培養之細胞生長(乾重=1.28g)與有效成分含量有 2 倍以上的增加量。而在照光的條件下(乾重=0.51g;總五種三萜酸類化合物 98 mg/g)是不利於細胞的生長與有效成分累積。
- 五、葉部癒傷組織分別接種於 MSBA2.5mg/L+NAA1mg/L 培養基中，觀察其生長曲線和有效成分變化如圖-6 所示，結果得知:0-9 天為細胞生長誘導期，9-24 天為細胞對數生長期，24-42 天進入定常期。最佳的成分收穫的時間為 30 天，最適當繼代培養細胞時間為 20 天。
- 六、葉部癒傷組織在 MSBA2.5mg/L+NAA1mg/L 培養基中添加不同蔗糖濃

度下，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化，結果如圖-7 所示：隨著添加蔗糖濃度越高生長與增加萃取重量也隨之增加(蔗糖濃度=10g/L,乾重=0.4 g,萃取重量=0.1 g;蔗糖濃度=20g/L,乾重=0.8g,萃取重量=0.2 g;蔗糖濃度=30 g/L,乾重=1.3 g,萃取重量=0.6 g;蔗糖濃度=40g/L,乾重=1.2g,萃取重量=0.5g;蔗糖濃度=50g/L,乾重=1.6g,萃取重量=0.8g)是有助於生長與增加萃取重量，但是以最佳的有效成分累積還是選擇 30g/L 最適宜。

七、葉部癒傷組織在不同培養基種類下添加 BA2.5mg/L+NAA1mg/L 培養基中，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化，結果如圖-8 所示：MS 培養基與 LS 培養基中有助於癒傷組織且細胞重量最重(MS 培養基乾重=1.28 g; LS 培養基乾重=1.22 g)，而 MS 培養基與 White 培養基在成分的含量的較高於其他培養基(MS 培養基總五種三萜酸類化合物 144.9mg/g; White 培養基總五種三萜酸類化合物 122.0mg/g)。

八、葉部癒傷組織在 LS 培養基中添加不同植物生長調節劑濃度下，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化，結果如圖-9~圖-12 所示：

(一)、在含有 2.5mg/L BA 的濃度配合不同濃度的 NAA，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化結果如圖-9 所示：癒傷組織在 NAA 濃度為 1mg/L 時生長重量最佳(乾重=1.22 g)。在 NAA 濃度為 2.5 mg/L 時成分的含量有最高含量累積(乾重=1.07 g;總五種三萜酸類化合物 113.7 mg/g)。

(二)、在含有 2.5mg/L BA 的濃度配合不同濃度的 2,4-D，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化結果如圖-10 所示：癒傷組織在有 2,4-D 時生長狀況差(乾重=0.28g 到 0.57g 之間)。但是成分的含量上，隨著 2,4-D 濃度增加總三萜酸含量增加，其中又以 corosolic acid (CA)的累積量隨 2,4-D 濃度增加而增加(2,4-D 濃度=0.5 mg/L,CA=15.5 mg/g; 2,4-D 濃度=1 mg/L,CA= 25.7 mg/g; 2,4-D 濃度=2.5 mg/L,CA= 26.8 mg/g; 2,4-D 濃度=5 mg/L,CA= 38.3mg/g; 2,4-D 濃度=10 mg/L,CA= 41.3 mg/g)。

(三)、在含有 2.5mg/L K 的濃度配合不同濃度的 NAA，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化結果如圖-11 所示：癒傷組織在 NAA 濃度為 0.5 mg/L 時生長重量最佳(乾重=1.41g)。在 NAA 濃度為 1mg/L 時成分的含量有最高含量累積(乾重=0.87g;總五種三萜酸類化合物 75.9 mg/g)。

(四)、在含有 2.5mg/L K 的濃度配合不同濃度的 2,4-D，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化結果如圖-12 所示：癒傷組織在有 2,4-D 時生長狀況差(乾重=0.45g 到 0.76g 之間)。但是成分的含量上，隨著 2,4-D 濃度增加總三萜酸含量增加，其中又以 corosolic acid

(CA)的累積量最高(CA=32.9mg/g 到 49.1mg/g 之間)。

九、葉部癒傷組織在 LSBA2.5mg/L+NAA1mg/L 培養基中添加不同水解酪蛋白濃度下，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化，結果如圖-13 所示：少量水解酪蛋白是有助於生長重量，但是濃度越高時反而抑制細胞的生長。在有效成分累積方面，添加了加水解酪蛋白會增加有效成分的含量。因此選擇在培養基中加入水解酪蛋白濃度= 1g/L 是最適宜(乾重=1.43 g;總五種三萜酸類化合物 141.5 mg/g)。

十、葉部癒傷組織在 LSBA2.5mg/L+NAA1mg/L 培養基中添加不同酵母抽出物濃度下，經暗培養 30 天後檢測其乾重與有效成分變化，結果如圖-14 所示：少量添加酵母抽出物是有助於生長重量，但是濃度越高時反而抑制細胞的生長。在有效成分累積方面，添加了加酵母抽出物會增加有效成分的含量。因此選擇在培養基中加入酵母抽出物濃度= 1g/L 是最適宜(乾重=1.34g;總五種三萜酸類化合物 103.5 mg/g)。

肆、討論

枇杷為薔薇科植物 *Eriobotrya japonica* Lindl. 的乾燥葉，常用於止咳清肺和降氣化痰。其所含的主要成分有揮發油、三萜酸類、倍半萜類、黃酮類、多酚類、有機酸類等等。藥理作用指出三萜酸類成分(Tormentic acid, Maslinic acid, Corosolic acid, Oleanolic acid and Ursolic acid)具有良好的抗炎止咳、降血脂、降血糖、抗病毒和抗腫瘤等活性。經由本次研究，收集台灣不同產區（包含：花蓮/桃園/苗栗/台中/南投/彰化/台東/市場品）的枇杷葉利用高效液相層析法分析所含三萜酸的含量，結果顯示由天然採收的含量不高（總三萜酸含量約 8mg/g 到 16 mg/g 之間）且容易受生長地區及季節變化影響其成分。此外在萃取有效成分的步驟中，又受到大量葉綠素的干擾不易排除。因此若能利用組織培養的技術獲得癒傷組織大量生產二次代謝產物，將有機會生產三萜酸類成分。

經由收集到的枇杷種子消毒滅菌後由根莖葉成功誘導枇杷的癒傷組織後，利用此細胞接種於不同植物生長調節劑，培養基種類，培養環境，不同植物生長調節劑，碳源濃度，水解酪蛋白物，酵母抽出物等條件下評估癒傷組織生長和成分變化。在枇杷細胞生長速度方面：以含有高鹽類的培養基 MS 或是 LS 的培養基時細胞生長速度最快。而植物生長調節劑為影響癒傷組織生長之重要因素之一。一般常以 Cytokinin (K,BA)與 anxin (NAA, 2,4-D)配合使用。結果顯示以含有 BA 配合 NAA 的生長比添加 K 或是 2,4-D 植物生長調節劑對細胞生長較佳。此外在暗培養環境下，添加水解酪蛋白

與酵母抽出物是最常加入癒傷組織生長培養基中氨基酸的來源，具有促進細胞分裂之功能。在本實驗中少量添加這兩種養分也有助於細胞生長。不同蔗糖濃度方面，糖是培養基中含量最多的有機物質，主要提供植物生長所需碳源及調節滲透壓結果發現，當隨著蔗糖濃度增加時癒傷組織生長的重量增加，碳源不夠時癒傷組織生長不良。

在二次代謝產物的含量方面：在枇杷不同部位皆可以成功誘導之癒傷組織，但是以有效成分來比較時以葉部誘導的癒傷組織最適合有效成分的累積。而從生長曲線來看成分的累積主要是在 24-30 天之間可觀察到成分快速的累積。所以以 30 天為一個最適合採收有效成分的時間。在植物生長調節劑方面在含有 2,4-D 培養基，特別以 corosolic acid 的成分累積最佳。而以 NAA 培養基，特別以 tormentic acid 與 corosolic acid 的成分累積最佳。原植物的含量比例以 tormentic, corosolic acid 與 ursolic acid 的成分累積最多。五種三萜酸的含量比例，隨著不同的培養條件個別累積的含量也不相同。假如需要其中某一項成分時，就可以利用不同培養條件來生產所指定的成分；此外五種酸的結構相近，但是結構之間沒有相互影響。反而在分子量小的 oleanolic 與 ursolic acid 的培養時間月久對於的成分累積是比較有利的。暗培養條件下添加適當濃度比例的水解酪蛋白與酵母抽出物也有助於含量累積。蔗糖濃度方面，隨著蔗糖濃度增加細胞生長重量增加但是含量累積並沒有隨著增加。由上述結果可以知道二次產物的增加與細胞培養條件息息相關，想要獲得大量的有效成分就必須先了解癒傷組織對於這些培養基與營養物質的提供，培養的環境與成分表現的時間點等等相關影響因素。在這樣的基礎條件下作為下一步進行懸浮培養時調控生長細胞與有效成分的重要指標。

伍、結論與建議

目前建立之固態培養方法所得到的細胞成分含量，遠高於由各種不同地區栽種的含量。結果顯示經由台灣本產枇杷種子誘導出的癒傷組織所生產五種三萜酸的產率，在目前培養的條件得知癒傷組織的成分含量（總三萜酸含量約 100 mg/g 到 150 mg/g 之間）明顯高於栽種含量的 8 倍以上，且生長時間只需要 30 天。比較栽種之枇杷葉受到不同地區之氣候條件，栽種時間長與栽種方法的不同所含的有效成分的差異性相當大且含量不高；提取有效成分方面需要消耗大量的有機溶劑與能源。此外食品衛生上，由於枇杷是具有經濟價值的水果，因此在栽種時需要噴灑農藥才能確保枇杷水果的採收量及美觀，這樣收集枇杷葉時又會產生與重金屬殘留問題。因此選擇利用組織培養方法生產所需的三萜酸在中草藥資源永續使用之研究發展上是值得開發利用之植物資源。但是固體培養癒傷組織是無法於培養時控制營養液的比例而且培養空間受限導致無法同時大量表現有效成分。

因此也希望未來繼續在之前研究枇杷癒傷組織固態培養之最好調控條件的基礎下，進行液態懸浮培養探討獲得大量生產細胞及有效成分的可行性。

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:CCMP 97-RD-001)提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此致謝。

陸、參考文獻

- 1 何英姿:枇杷葉有效成分提取及藥理作用研究進展. *Journal of Guangxi University of Technology* 2007; 8 : 81-84.
2. Yan Huang , Jun Li , Qi Cao , Shi-Chun Yu, Xiong-Wen Lv , Yong Jin , Lei Zhang , Yu-Hong Zou , Jin-Fang Ge: Anti-oxidative effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf in chronic bronchitis rats. *Life Sciences* 2006 ; 78 : 2749-2757.
3. 林玉霖,林文津,林力強:枇杷葉的研究現狀與開發前景. *中藥材* 2006; 29: 1111-1114.
4. (中國)國家中醫藥管理局《中華本草》編委會 中華本草 第四卷 上海:上海科技出版社, 1999: 1401.
5. 江蘇新醫學院編; 中藥大辭典: 上冊,上海科技出版社,2000:P1248
6. 王立為,劉新民,餘世春:枇杷葉抗炎和止咳作用研究. *中草藥* 2004; 35: 174-176.
7. 鞠建華,周亮,林耕:枇杷葉中三萜酸類成分及其抗炎、鎮咳活性研究. *中國藥學雜誌* 2003; 38: 752-757.
8. Norihiro BANNO, Toshihiro AKIHISA, Harukuni TOKUDA, Ken YASUKAWA, Yosuke TAGUCHI, Hiroyuki AKAZAWA, Motohiko UKIYA, Yumiko KIMURA, Takashi SUZUKI, and Hoyoku NISHINO: Anti-inflammatory and Antitumor-Promoting Effects of the Triterpene Acids from the Leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biol. Pharm. Bull.* 2005 ; 28: 1995-1999.
9. De Tommasi N , De Simone F , Cirino G: Hypoglycemic effect of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica* . *Planta Med.* 1991 ; 57: 414-416.
10. Noreen W , Wadood A , Hidavat H K: Effect of *Eriobotrya japonica* on blood glucose levels of normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta Medica.* 1988; 54: 196-199.
11. Somova, L.O., Nadar, A., Rammanan, P., Shode, F.O., 2003. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine.* 10 : 115-121.
12. Toshihiro MIURA, Naoya UEDA, Koutaro YAMADA, Mitsuo FUKUSHIMA, Torao ISHIDA, Tetsuo KANEKO, Futoshi MATSUYAMA,

and Yutaka SEINO: Antidiabetic: Effects of Corosolic Acid in KK-Ay Diabetic Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29:585–587.

13. Hideyuki Ito, Eri Kobayashi, Yoshie Takamatsu: Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. *Chem Pharm Bull* 2000; 48:687–693.
14. Shoko Taniguchi, Yoko Imayoshi, Eri Kobayashi: Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica*. *Phytochemistry* 2002; 59:315–323.
15. 劉謙, 張永清: 利用藥用植物組織培養生產次生代謝產物的研究進展. *Qilu Pharmaceutical Affairs* 2006; 25: 350–353.
16. 吳宗賢, 王亞男: 台灣三角楓癒合組織誘導及細胞懸浮培養. *Quarterly Journal of Chinese Forestry* 2003; 36: 39–49.
17. 張淑華, 何政坤, 蔡錦瑩: 台灣紅豆杉之細胞培養與紫杉烷類生產. *台灣林業科學* 2004; 19: 43–42.

柒、圖、表

表-1 台灣本產之枇杷葉在不同地區所含的各成分含量

代號	地區	含量 (%)				
		tormentic acid	maslinic acid	corosolic acid	oleanolic acid	ursolic acid
001	花蓮	0.37 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.34 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.54 ± 0.01
002	花蓮	0.18 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.35 ± 0.01
003	桃園	0.57 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.47 ± 0.03
004	苗栗	0.29 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.39 ± 0.01
005	台中	0.38 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.26 ± 0.01
006	南投	0.36 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.41 ± 0.01
007	南投	0.33 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.67 ± 0.01
008	彰化	0.23 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.39 ± 0.02
009	台東	0.27 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.34 ± 0.01
010	市場品	0.52 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.45 ± 0.01

圖-1 枇杷三萜酸類 HPLC 的指紋圖譜

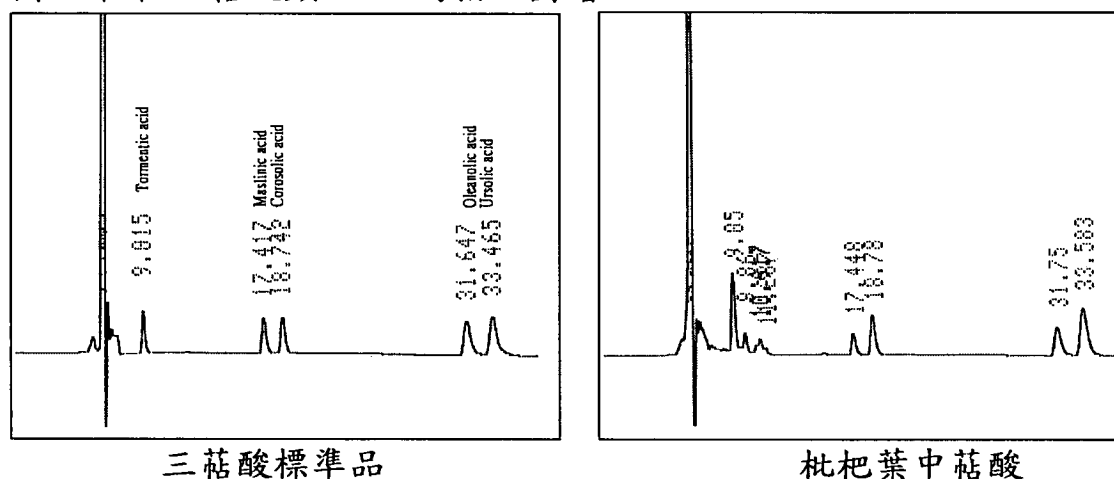


圖-2 葉，莖，根在MS培養基中添加BA 2.5mg/L與NAA1mg/L中誘導淡黃色癒傷組織



圖-3 經暗培養 30 天後葉，莖，根癒傷組織生長情形

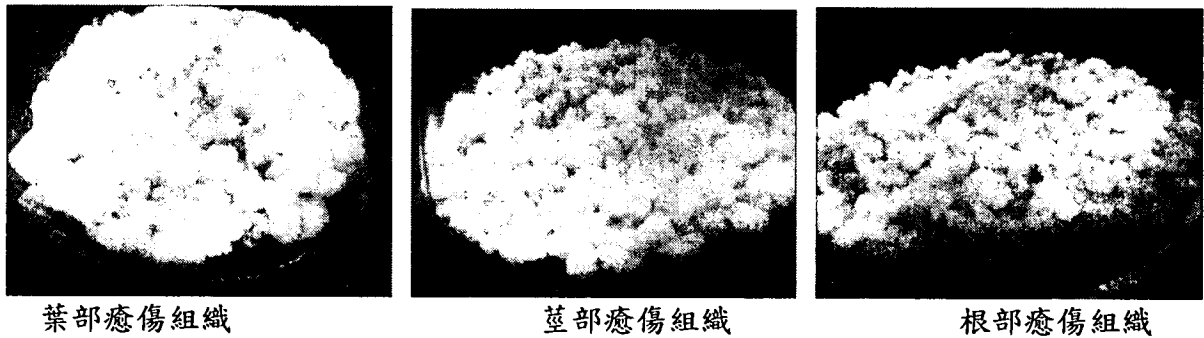


圖-4 不同部位誘導之癒傷組織與成分變化

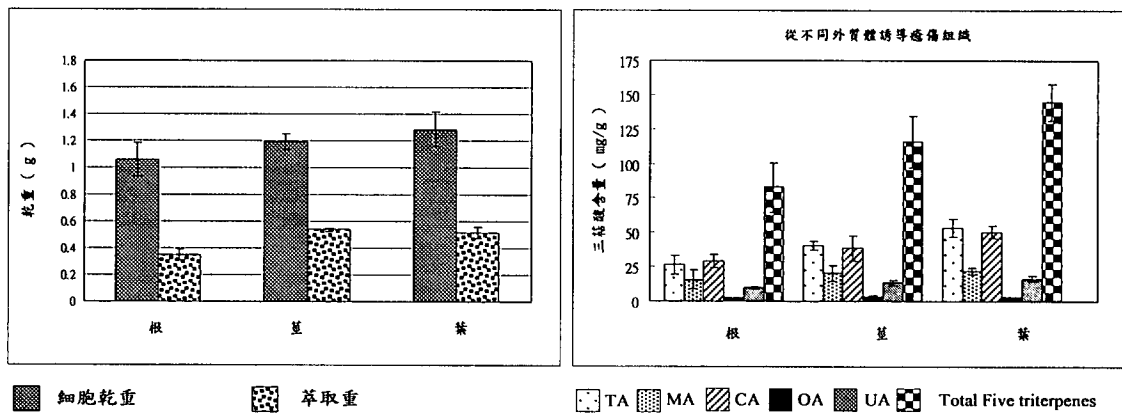


圖-5 暗培養與亮培養環境與成分變化

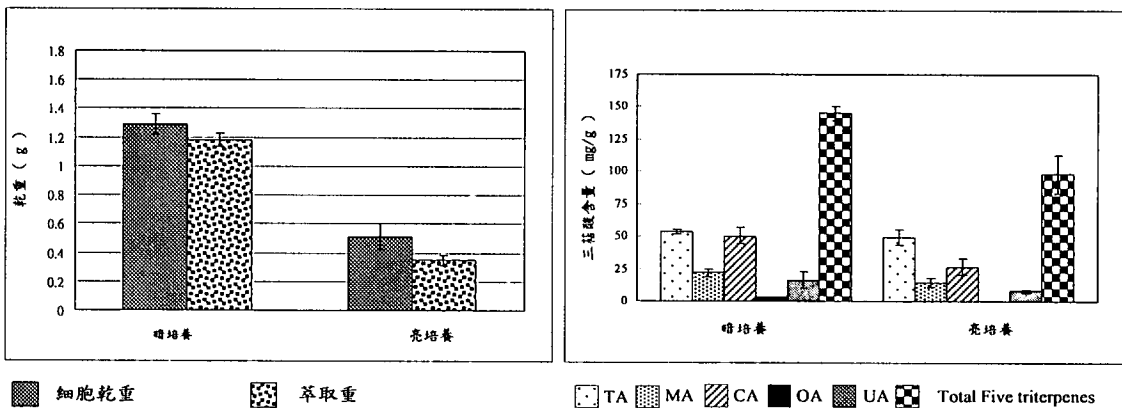


圖-6 葉的生長曲線與成分變化

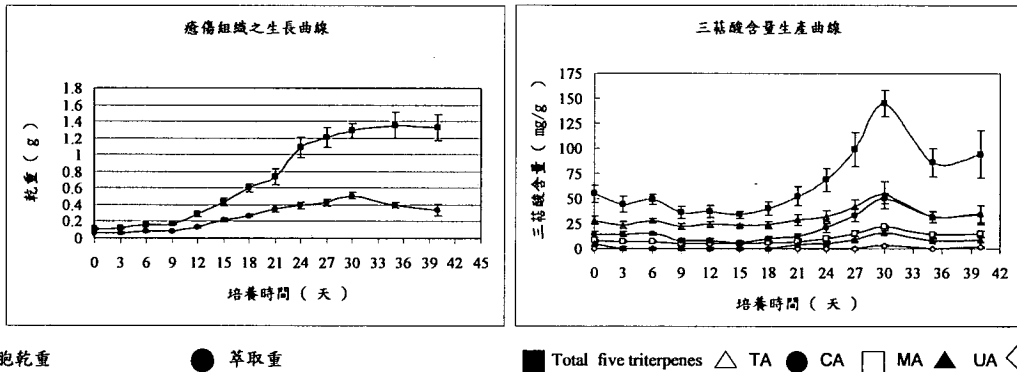


圖-7 不同蔗糖濃度下與成分變化

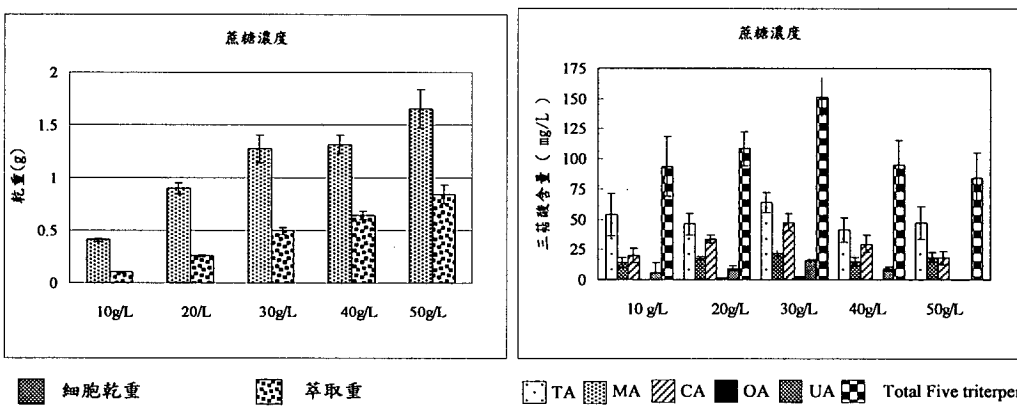


圖-8 不同培養基種類與成分變化

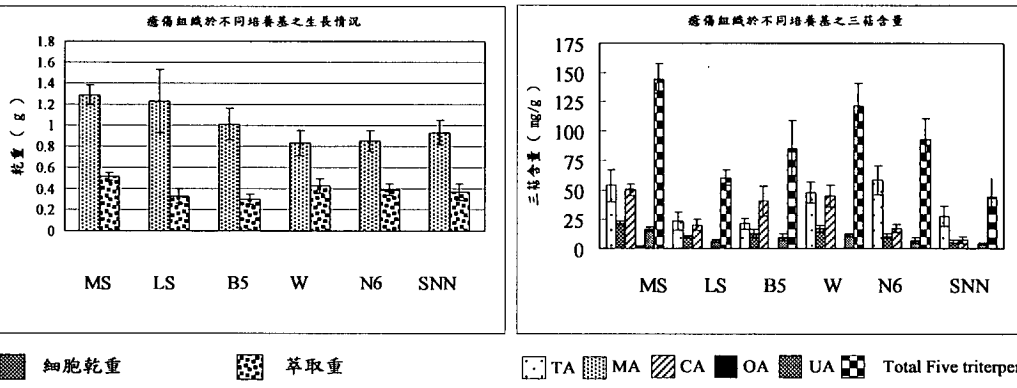


圖-9 含有 2.5mg/L BA 的濃度配合不同濃度的 NAA 與成分變化

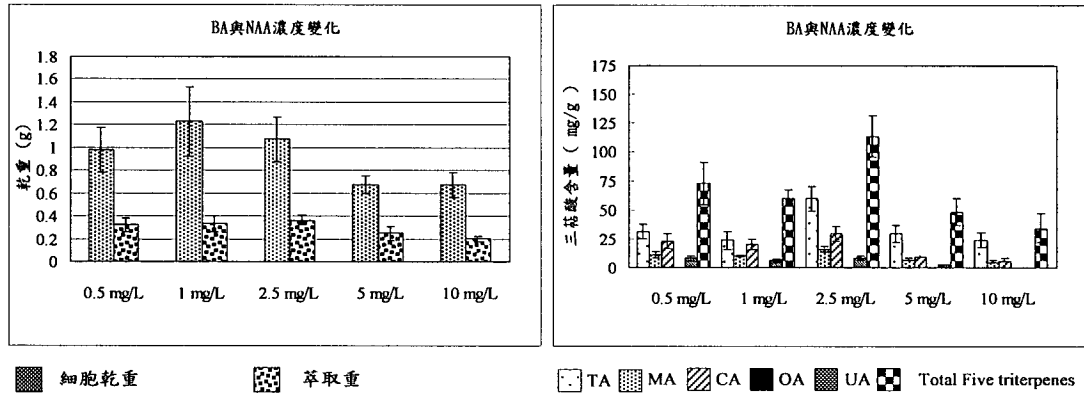


圖-10 含有 2.5mg/L BA 的濃度配合不同濃度的 2,4-D 與成分變化

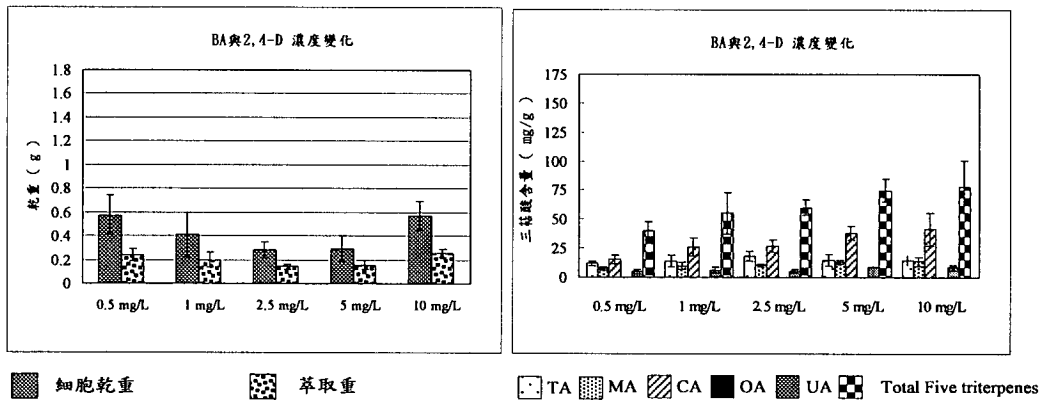


圖-11 含有 2.5mg/L K 的濃度配合不同濃度的 NAA 與成分變化

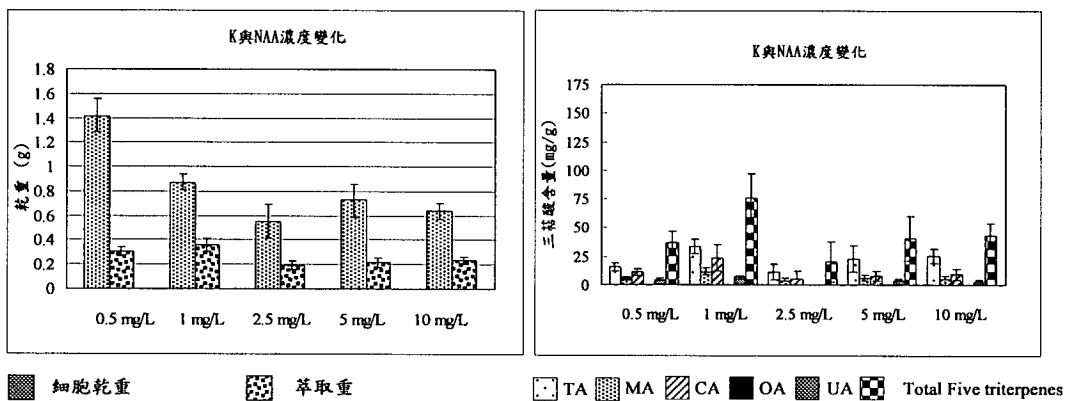


圖-12 含有 2.5mg/L K 的濃度配合不同濃度的 2,4-D 與成分變化

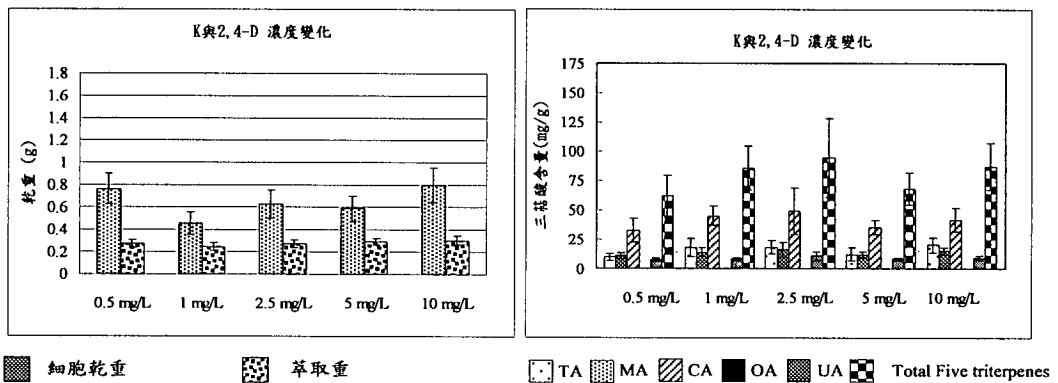


圖-13 不同水解酪蛋白濃度與成分變化

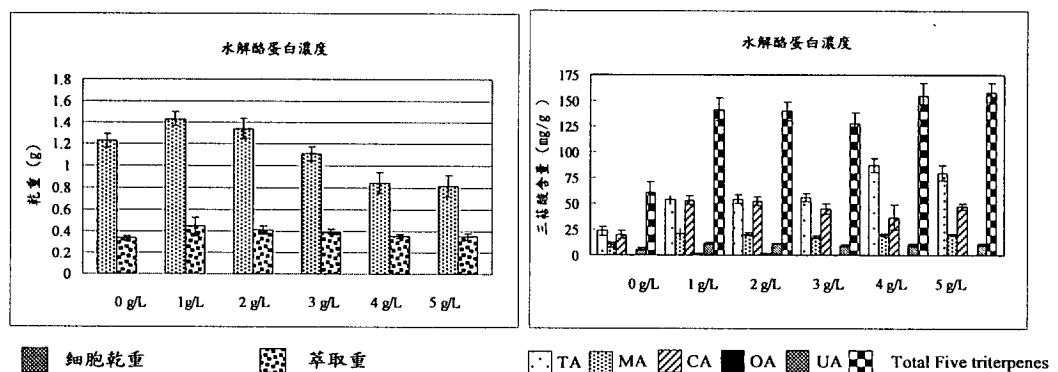


圖-14 不同酵母抽出物濃度與成分變化

