

中國醫藥大學 藥物化學研究所  
碩士論文

指導教授：邱泰惠 教授

共同指導教授：李昭瑩 副教授

台灣產野甘草(*Scoparia dulcis* L.)之生藥學研究

Pharmacognostical studies on *Scoparia dulcis* L. in Taiwan

研究生：蔡 仁 傑

**Tsai Jen-Chieh**

中 華 民 國 九 十 五 年 六 月

# 目錄

略字解	II
圖目錄	III
表目錄	V
中文摘要	VI
英文摘要	VII
謝辭	IX
第一章 序言	1
第二章 總論	3
第一節 野甘草屬( <i>Scoparia</i> )植物的本草學考察	3
第二節 野甘草屬( <i>Scoparia</i> )植物的藥用植物學考察	4
第三節 台灣產野甘草屬( <i>Scoparia</i> )植物的藥用植物學考察	8
第四節 野甘草屬( <i>Scoparia</i> )植物的生藥學文獻考察	13
第五節 野甘草屬( <i>Scoparia</i> )植物的化學成分考察	16
第六節 野甘草屬( <i>Scoparia</i> )植物的藥理作用考察	25
第三章 材料與方法	31
第一節 實驗材料、試藥與儀器	31
第二節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的形態鑑定	38
第三節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的生藥組織學研究	40
第四節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的成分分離	41
第五節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物中木犀草素(luteolin)的定量	49
第六節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的指紋圖譜研究	55
第四章 實驗結果與討論	59
第一節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的形態鑑定	59
第二節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的生藥組織學研究	67
第三節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的成分分離	69
第四節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物中木犀草素(luteolin)的定量	82
第五節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的指紋圖譜研究	93
第五章 結論	103
第一節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的形態鑑定	103
第二節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的生藥組織學研究	103
第三節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的成分分離	104
第四節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物中木犀草素(luteolin)的定量	104
第五節 野甘草( <i>Scoparia dulcis</i> )植物的指紋圖譜研究	105
參考文獻	107
附錄	116

## 略字解

略號	中文名	術語
bf	韌皮纖維	bast fiber ; phloem fiber
cu	角質層	cuticular layer
cx	皮層	cortex
ep	表皮	epiderims
L. S.	縱切	longitudinal section
m	髓部	pith
mr	髓線；射髓；射線	medullary ray
ph	篩部	phloem
R. L. S.	放射性縱切；徑縱切	radial longitudinal section
T. L. S.	切線性縱切；弦縱切	tangential longitudinal section
TNM	國立自然科學博物館 植物標本館	Herbarium of National Museum of Natural Science
v	導管	vessel
X. S.	橫切	cross section

## 圖目錄

圖 1：野甘草之手繪形態圖(據 Flora of Taiwan).....	11
圖 2： <i>S. dulcis</i> 中兩種 chemotype 中時間與細胞生長及 SA 含量之關係.....	13
圖 3： <i>S. dulcis</i> 中時間與細胞生長及 SDY 含量之關係.....	14
圖 4：SPEt 效果之比較.....	26
圖 5：正常鼠與實驗鼠不同體重之 SPEt 效果比較.....	26
圖 6：SDB 對 $H^+, K^+$ -ATP 酶的效果.....	27
圖 7：野甘草全草之抽提流程圖.....	42
圖 8：HPLC 中標準品(luteolin)與內部標準品(piroxicam)位置.....	49
圖 9：Luteolin 標準品之回歸曲線.....	53
圖 10：野甘草萃取物之 HPLC 分析圖.....	53
圖 11：野甘草之 HPLC 層析圖.....	55
圖 12：野甘草之各部形態圖.....	59
圖 13：野甘草葉部放大圖.....	60
圖 14：野甘草花的放大圖.....	61
圖 15：野甘草果的形態圖.....	62
圖 16：野甘草果皮電子顯微鏡觀察圖.....	63
圖 17：野甘草花粉手繪圖 (據黃增泉, 台灣植物花粉圖誌).....	64
圖 18：野甘草花粉形態圖.....	65
圖 19：野甘草種子之電子顯微鏡觀測圖.....	66
圖 20：野甘草之組織切片圖.....	68
圖 21：Glutinol 結構圖.....	69
圖 22：Glutinol 質譜斷裂式.....	70
圖 23：Friedelin 結構圖.....	72
圖 24：Friedelin 質譜斷裂式.....	73
圖 25：Betulinic acid 結構圖.....	75
圖 26：Betulinic acid 質譜斷裂式.....	76
圖 27：Coixol 結構圖.....	78
圖 28：Coixol 質譜斷裂式.....	78
圖 29：Luteolin 結構圖.....	80
圖 30：Luteolin 之 UV 圖.....	84
圖 31：野甘草之 HPLC 層析圖.....	85
圖 32：Luteolin 標準品與內部標準品 ( I.S. ) 之 HPLC 層析圖.....	87
圖 33：24 小時內 luteolin 在 methanol 中的穩定性.....	88
圖 34：野甘草中各部位 luteolin 含量比較.....	92
圖 35：野甘草之 HPLC 指紋圖譜.....	94
圖 36：高等植物 ribosomal DNA 結構圖.....	95

圖 37：野甘草之 PCR 引子.....95  
圖 38：台灣產野甘草之序列.....96  
圖 39：台灣產野甘草與澳洲產野甘草之比對。1. 台灣產，2. 澳洲產.....97  
圖 40：許多高等植物 rDNA 的 ITS1 之序列保留區與野甘草之相對應序列  
比較.....102



## 表目錄

表 1：SDX 型癒合組織中光照週期影響細胞生長及 SDY 含量之效果·····	14
表 2：餵食不同劑量之血糖變化·····	25
表 3：餵食不同劑量 <i>S. dulcis</i> 水草物給予正常與實驗鼠，觀察15天內 血糖變化·····	25
表 4：提取液對清醒大白鼠動脈血壓之影響·····	29
表 5：採集地點、時間、經緯度、採集編號·····	31
表 6：移動相條件·····	49
表 7：24 小時內穩定性測試·····	50
表 8：回收率試驗·····	51
表 9：Luteolin 之 intraday 分析·····	51
表 10：Luteolin 之 Interday 分析·····	52
表 11：Luteolin 與 I.S. 經 HPLC 所得之積分面積·····	52
表 12：化合物 H-1 碳譜數據與文獻碳譜數據比對表·····	71
表 13：化合物 H-2 碳譜數據與文獻碳譜數據比對表·····	74
表 14：化合物 C-3 碳譜數據與文獻碳譜數據比對表·····	77
表 15：化合物 C-4 碳譜數據與文獻碳譜數據比對表·····	79
表 16：化合物 E-5 碳譜數據與文獻碳譜數據比對表·····	81
表 17：不同管柱不同條件下 luteolin 的滯留時間·····	83
表 18：HPLC 不同移動相條件之比較·····	84
表 19：不同內部標準品之滯留時間比較·····	86
表 20：HPLC 移動相之條件·····	87
表 21：Luteolin 積分面積之 RSD 值·····	89
表 22：野甘草植物 luteolin 含量·····	90
表 23：野甘草中各部位每克中 luteolin 含量·····	91
表 24：野甘草各 peak 之滯留時間·····	93
表 25：野甘草在 HPLC 中各 peak 高度與 luteolin peak 之高度比·····	93
表 26：野甘草 ITS 區域中各序列之長度與 G+C 百分比·····	100
表 27：野甘草 rDNA 之 ITS 各區長度與 G+C 百分比及與其他高等植物之比較·····	101

## 中文摘要

野甘草屬(*Scoparia*)，為玄參科(Scrophulariaceae)植物，多生長於熱帶及亞熱帶之低海拔地區。野甘草屬在美洲熱帶地區約有 20 種，而在台灣只有一種，即為野甘草(*Scoparia dulcis*)，具有清熱解毒、利尿消腫的功效。現代藥理研究亦證明其有抗病毒、抗腫瘤、降血糖及降血壓等作用。但在民間用藥常有誤用情形，故其基原有必要確立。

本研究針對台灣產野甘草屬進行其外部形態鑑定(包含花、葉、果實、種子、花粉等)及其生藥組織切片研究，確定其植物特徵，可作為植物基原鑑定的參考。

成分分離部分，野甘草之乾燥全草之甲醇粗抽物經分離純化及結構鑑定後，自野甘草分離出之成分有 glutinol (H-1)、friedelin (H-2)、betulinic acid (C-3) 及 6-Methoxybenzoxazolinone (C-4)、luteolin(E-5)等成分，均為已知成分。

針對野甘草所含 luteolin 進行定量研究，發現含量約在 0.00197 ~ 0.00563 % 之間，藥用部位以果實部分所含的 luteolin 含量最高。本實驗所確立的定量方法，其敏感度、重現性、精密度、回收率均好，可作為評價野甘草植物的一種方法。

在建構指紋圖譜方面，發現在所選的 10 個波峰的高度比，可以作為野甘草屬鑑定上的參考。

在 PCR 研究方面，以聚合酶連鎖反應擴增部份核糖體去氧核糖核酸區域之 ITS1、5.8S 及 ITS2 產物，複製產物長為 821 bp。將此序列送入基因庫進行比對，證實此 DNA 片段為 rDNA 之 ITS 區域，其中有 142 bp 屬於 18S rDNA 基因 3'端，66 bp 屬於 26S rDNA 基因 5'端，真正屬於 ITS 區域的序列有 613 bp，此區包含 ITS1、5.8S rDNA 基因與 ITS2 等三區，其長度分別為 196、164 及 253 bp，G+C 百分比分別為 56、62 及 65 %，此結果將有助於野甘草屬之植物鑑定。

# Abstract

The genus *Scoparia* (Scrophulariaceae) is distributed in low altitude area of tropics and subtropics and has about 20 species in Americas tropic area, but only has one species in Taiwan. This species is *Scoparia dulcis* L.. According to the reports, It has effects of heat-clearing, clearing away toxin, inducing diuretic and subduing swelling. Modern pharmacological studies provides evidence that it can be used to anti-virus, anti-tumor, anti-hypertension and anti-hyperglycemia. Because it was often misused, it is a necessary to build up a method to determine its origin.

We appraise the morphology (flowers, fruits, seeds and pollens) and histological anatomy (leaves and stems). This result can provide an useful method to identify *Scoparia* plants.

The methanolic extract of dry entire plant of *S. dulcis* was partitioned and separated by chromatographic methods. Four known compounds were isolated, included glutinol (H-1), friedelin (H-2), betulinic acid (C-3), 6-Methoxybenzoxazolinone (C-4) and luteolin(E-5).

We set up a quantitative method of HPLC to determine the quantity of luteolin. This method has a high degree of sensitivity, reproducibility, precision and recovery rate. The result shows that the luteolin content of *S. dulcis* is 0.00197 ~ 0.00563 % and is the highest in the fruits than other parts.

Analyse the peak height of *S. dulcis* described above by HPLC method. We discovered that the peak height ratio of the chosen 10 peaks, it can distinguish *S. dulcis* successfully.

The entire internal transcribed spacer (ITS) region between 18S and 26S ribosomal DNA of *S. dulcis* is amplified by polymerase chain reaction



(PCR). The length of PCR product was 821 bp. Comparing the obtained sequence with the sequence of ITS from other higher plant species showed that the cloned sequence contained 66 bp of 26S rDNA, ITS region, and 142 bp of 18S rDNA. The length of ITS region was 613 bp, including 196 bp of ITS1, 164 bp of 5.8S rDNA, and 253 bp of ITS2. The G+C contents of ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 regions were 56 %, 62 % and 65 %, respectively. It can provide a clear and definite evidence to identify *Scoparia* species.



## 謝辭

本論文承蒙業師邱泰惠教授及李昭瑩副教授之指導與教誨，方得以順利完成，由衷感謝，永誌難忘。感謝口試委員邱少婷副教授對於論文審查，惠賜寶貴意見，使論文得以更加完善，謹致衷心謝忱。

研究期間蒙黃順爵助理教授、黃太鴻助理教授鼎力相助，對於實驗技術及儀器使用，均不吝指導，點滴在心，不勝感激。並感謝廖江川助理教授於植物採集及辨識上的協助。感謝所內黃麗嬌所長、郭盛助教授、陳勝智教授、林宗平副教授、連金城副教授及藥學系陳甘霖副教授於課程上的指導與指教。感謝所內學長姐李健源、黃元照、陳華鑫、劉晉育、廖昌亮、中藥所賴尚志，同學郭瓊文、林慧怡、林昭蓉、劉怡伶、蘇怡芳、葉尚柏、林凱鵬、詹淑玲、黃俊龍、宋秉欣、湯先佑、賴珮妘、曹嘉蕙，以及學弟張肇元、藥學所曾懷慶、陳弘偉、藥學系江俊達，給予實驗上及生活上的協助，在此致上最高謝意。

謹以此論文獻給我敬愛的父母親及家人，以及一路支持我的育戎，在我求學過程中，無怨無悔的支持與照顧，讓我無後顧之憂，可以全力以赴，使學業得以順利完成，再次致上十二萬分的感謝。

# 第一章 序言

野甘草(*Scoparia dulcis* L.)，又名甜珠草<sup>1</sup>，是玄參科(Scrophulariaceae)野甘草屬(*Scoparia*)的植物，多生長於熱帶及亞熱帶之低海拔地區。野甘草屬在美洲熱帶地區約有 20 種，而在台灣只有一種<sup>2</sup>。野甘草原產於美洲，現今則廣佈於世界，在台灣則於平原、路旁、耕地及低海拔山坡地皆可發現蹤跡，為常見植物。

野甘草為一種民間藥，全草具有清熱解毒，利尿消腫的功效。用於治療肺熱咳嗽、暑熱吐瀉、腳氣浮腫、小兒麻疹、濕疹、熱癩、高血壓和丹毒等。在世界其他地方也是很早就在醫療方面具有重要的價值。在印度，野甘草用於治療牙痛、淋病、糖尿病和胃疾病；在巴拉圭，用於治療胃疾病和肝機能障礙等<sup>3</sup>；在巴西，用於治療支氣管炎、腸胃道障礙、昆蟲咬傷和皮膚創傷等<sup>4</sup>。

1988 年，日本學者 Masaru Kawasaki<sup>5</sup>等，從野甘草中分離出許多化合物，其中也包含一個黃酮類化合物—luteolin，此化合物在許多植物中均有存在，也曾有文獻<sup>6</sup>針對此化合物進行肝臟方面的藥理試驗，發現 luteolin 在體外抑制肝星狀細胞增殖及其膠原合成，作用在低濃度即顯著，使得在體內容易達到有效濃度，可能具有預防或治療肝纖維化的作用。因此，此化合物有可能是野甘草治療肝炎的有效成分。

為了開發野甘草屬植物的生藥資源，本研究針對台灣產野甘草，進行植物生藥學研究；針對其植物外部形態，利用光學及電子顯微鏡觀察，包括花、果實、種子以及其花粉形態進行鑑定；內部構造的組織切片，確定其內部細胞構造及特徵；另外利用聚合酶連鎖反應(PCR)的技術，將野甘草屬植物 rDNA 的 ITS 區域加以複製，進一步分析及定序，得到其部份 DNA 的序列，整合這些基礎，定能在基原鑑定上有更高的準確度，以提供藥材鑑定及臨床研究之參考，減少誤用情形之發生。

另外，在確立其植物基原之後，本研究亦針對台灣產野甘草中，前述文獻所提之肝炎有效成分—luteolin，藉由 HPLC 之方法，進行定量，以確定此化合物

在野甘草中的含量，以做為臨床醫療運用之參考。



## 第二章 總論

### 第一節 野甘草屬(*Scoparia*)植物的本草學考察

野甘草屬(*Scoparia*)植物為民間藥，在歷代本草文獻中並無特別記載，但在一些地區性的文獻中有一些報導。整理如下<sup>(7,8)</sup>：

《新華本草綱要》稱為“葉上珠”。

《全國中草藥匯編》稱之“米碎草”，主要用於疏風止癢。治肺熱咳嗽，腸炎，痢疾，外用治瘡子，皮膚濕疹。

《福建藥物誌》稱之為“豎枝珠子草”、“萬粒珠”，可以清熱利尿，治麻疹，感冒中暑，痢疾，咽喉炎，支氣管炎，腳氣，丹毒，跌打損傷。

《福建民間草藥》稱為“珠子草”、“香儀”<sup>8</sup>，味甘，性平，無毒，可以解熱利尿，調中益肺。

《廣西中藥誌》稱為“假甘草”、“土甘草”、“假枸杞”，味甘，性平，可以退熱祛風，解木薯中毒。

《閩南民間草藥》稱為“四時茶”，

《廣東中藥》稱為“冰糖草”、

《廣西中草藥》稱為“通花草”、

《福建中草藥》則稱之為“節節珠”。

在台灣則有“甜珠子草”、“雞骨廣”、“金荔枝”之名稱<sup>1</sup>。

## 第二節 野甘草屬(*Scoparia*)植物的藥用植物學考察

### 一、玄參科的科特徵及分佈<sup>9</sup>

草本、灌木或少有喬木。葉互生、下部對生而上部互生、或全對生、或輪生，無托葉。花序總狀、穗狀或聚傘狀，常合成圓錐花序，向心或更多離心。花常不整齊，萼片5，少有4基數；花冠4~5裂，裂片多少不等或作二唇形；雄蕊常4枚，而有一枚退化，少有2~5枚或更多，花藥1~2室，藥室分離或多少匯合，花盤常存在，環狀、杯狀或小而似腺；子房2室，極少僅有一室；花柱簡單，柱頭頭狀或2裂或2片狀；胚珠多數，少有各室2枚，倒生或橫生。果為蒴果，少有漿果狀，具生於1游離的中軸上或著生於果片邊緣的胎座上；種子細小，有時具翅或有網狀種皮，臍點側生或在腹面，胚乳肉質或缺少；胚伸直或彎曲。

約200屬3000種，廣佈全球各地。中國玄參科有56屬，種類繁多。

### 二、中國產玄參科分屬之檢索表<sup>9</sup>

1. 花冠上方的2個裂片或上唇在花蕾中處於外方，包裹下方3個裂片或下唇。……………1. 玄參亞科 Scrophularioideae
2. 葉均互生，花冠無管或僅有極短之管；有性雄蕊5枚或4枚；花序簡單而向心。……………1. 毛蕊花族 Verbasceae 1. 毛蕊花屬 *Verbascum* L. (*Celsia* L.)
2. 葉至少下部對生，極少互生，花冠有明顯之管(在野甘草屬中幾無管)；有性雄蕊4枚或2枚；花序主要為聚傘狀(離心)，多合為複花序。
3. 蒴果在室背或室間以一線開裂，其隔膜以蒴果壁上碎落或不規則破裂；花冠不成囊狀，亦無距。
4. 喬木或灌木；萼齒革質而厚，有星毛，柱頭微膨大，端凹陷。……………2. 泡桐族 Paulownieae
5. 蒴果室背開裂；萼具5齒。
6. 灌木；花藥有鬚毛；花序腋生，無葉，或頂生，或在一種中莖生；花梗有小苞片。……………2. 來江藤屬 *Brandisia*
6. 喬木；花藥無鬚毛，花成腋生聚傘，但常因苞葉脫落而成頂生圓錐花序。……………3. 泡桐屬 *Paulownia*
5. 蒴果室間開裂；萼具3-4齒。……………4. 美麗桐屬 *Wightia*
4. 草本；萼齒革質或膜質，無星毛。
7. 柱頭結合，多少頭狀；花藥匯合成一室，橫生，藥隔及花絲頂端膨大；退化雄蕊著生於上方2個花冠裂片之間；花冠上唇常長於下唇。……………3. 玄參族 Scrophularieae (Cheloneae)
8. 莖明顯，高超過10釐米，花多成聚傘圓錐花序，少有單生，有明顯之梗；花冠筒短。……………5. 玄參屬 *Scrophularia* L.
8. 莖極短，貼地而生，高不超過10釐米，花幾無梗，簇生葉腋，筒細長。……………6. 藏玄參屬 *Oreosolen*
7. 柱頭分離，扁平而片狀(7·8·25等3屬除外)，花藥不為上述，退化雄蕊不生於上方2個裂片之間；花冠上唇常短於下唇。……………4. 水八角族 Gratioleae
9. 藥室2，分離，植物有莖
10. 藥室併行，花梗有時具2小苞。
11. 花冠輻狀，白色，內方全面密生長毛，其裂片甚長於管部，上方2裂片完全結合為一，藥與柱頭遠深花外，蒴果在室間與室背作相等的4裂。……………7. 野甘草屬 *Scoparia* L.
11. 花管多少有較長的管，內方非全面有長毛；花藥與柱頭不伸出花外。
12. 藥室靠近；葉無柄，全緣或幾全緣，均對生。
13. 萼基有兩小苞；萼齒不相等，分離；蒴果室背與室間均開裂；葉均發達
14. 雄蕊5枚；萼齒很不相等，後方1枚最大而心臟型，側方2枚最狹而在內。……………8. 假馬齒莧屬 *Bacopa*
14. 雄蕊僅2枚發育；萼齒相等或略不同。……………9. 水八角屬 *Gratiola* L.

13. 萼基無小苞；萼齒均相等，基部結合；蒴果僅室間開裂；葉僅下部者發達，中上部者小或鱗片狀。  
 15. 莖肉質，基部分枝，直立；花絲頂端直，花藥無毛。……………10. 毗眼屬 *Dopatricum*  
 15. 莖非肉質，上升或傾臥；花絲頂端扭曲；花藥有毛。……………11. 津番椒屬 *Deinostemma*
12. 藥室為一藥隔的短臂所分隔；葉有柄至抱莖，有細齒或兩回羽狀分裂，對生或輪生。  
 16. 蒴果室背開裂為兩瓣。……………12. 鐘萼草屬 *Lindenbergia*  
 16. 蒴果4瓣裂或室間開裂為兩瓣，每瓣又作兩淺裂。  
 17. 萼齒不相等；雄蕊4枚，前方2枚的兩個藥室中有一個或兩個均小而中空，和有時後方的2枚雄蕊的2個藥室中有一個小而中空。……………13. 毛麝香屬 *Adeosma*  
 17. 萼齒相等或僅稍稍不等；雄蕊4枚完全。……………14. 石龍尾屬 *Limmophila*
10. 藥室又分；花梗無小苞。  
 18. 果不裂，外皮薄肉質；植物莖極短，花從葉叢中發出。……………15. 肉果草屬 *Lancea*  
 18. 蒴果開裂；植株有明顯之莖。  
 19. 蒴果室間開裂；前方一對花絲自花冠喉部發出，其下部與花管結合。  
 20. 萼有4齒，上下兩齒大，包於外面，側齒狹小而在內。……………16. 苦玄參屬 *Pieria*  
 20. 萼具3齒或5齒，或為兩唇狀。  
 21. 萼具3小齒，並生有3翅，翅寬而成半圓形。……………17. 三翅屬 *Logazpia*  
 21. 萼具5齒  
 22. 萼無翅，亦無明顯之稜；花冠小，不超過10毫米；子房上部無粗毛。……………18. 母草屬 *Lindernia*  
 22. 萼有明顯之翅或稜；花冠大，超過10毫米；子房上部生有粗毛。……………19. 蝴蝶草屬 *Torenia L.*  
 19. 蒴果室背開裂；前方一對花絲在花管深處即分離。  
 23. 植物柔弱，經常傾臥或有匍枝，上部分枝，葉正常。  
 24. 萼有高凸之稜5條，結合至3/4以上，頂端幾乎截頭，其細小之齒遠距；花冠上唇僅略短於下唇；苞片葉狀。……………20. 溝酸漿屬 *Mimulus L.*  
 24. 萼無稜，有脈10條，最多結合至一半；花冠上唇甚短於下唇；苞片針型。……………21. 通泉草屬 *Mazus*  
 23. 植物體較堅挺，上部分枝稠密；葉不發達。……………22. 野胡麻屬 *Dodartia*
9. 藥室完全匯合而開裂為一室；植物無莖。  
 25. 蒴果上下均為二室，室背二裂；葉對生，無柄。……………23. 小果草屬 *Microcarpaea*  
 25. 蒴果下部二室，上端處為一室，室背二裂；葉有長柄，基生或束生在匍枝上，少有互生。……………24. 水茫草屬 *Limosella L.*
3. 蒴果頂端不以完整的果瓣開裂，而以孔或多變的周面孔開裂；花冠成囊狀或有距。……………5. 龍頭花族 *Antirrhineae*  
 蒴果之室相等或不相等，後方1室長不裂或2室均以1至多數之孔開裂。……………25. 柳穿魚屬 *Linaria*
1. 花冠下方3個裂片或下唇在花蕾中處於外方(僅兔耳草屬例外)。……………2. 鼻花亞科 *Rhynantboideae*  
 26. 花冠上方2個裂片平坦或僅微微弓曲，不作明顯的盔狀或兜狀。  
 27. 花冠裂片的側方2枚或其中1枚在蕾中處於外方；藥室多頂端匯合而下部分離，極少全部匯合，2枚均正常發達；非寄生或半寄生植物。  
 28. 雄蕊明顯2強，內藏，絕不超出花冠；花冠筒部發達伸長。……………6. 毛地黃族 *Digitalieae*  
 29. 葉對生，條狀披針形，僅有極少數幾乎看不見的細齒；萼膜質，半透明，有高凸之肋，完全包裹花冠之管。……………26. 蝦子草屬 *Mimulicalyx*  
 29. 葉互生，形較寬，齒明顯；萼非膜質而半透明，花管遠遠生出萼外。  
 30. 花冠顯二唇狀，上唇甚短於下唇，不裂，寬凹頭或二淺裂，下唇中裂有時囊狀膨大；蒴果室間開裂。……………27. 毛地黃屬 *Digitalis*  
 30. 花冠上下唇近於相等，上唇明顯二裂，下唇絕不膨大；蒴果室背開裂。  
 31. 萼齒全緣，或僅偶有淺裂；體多分泌細胞。……………28. 地黃屬 *Rehmannia*  
 31. 萼齒均3裂或三叉戟狀；體無分泌細胞。……………29. 呆白菜屬 *Trienophora*
28. 雄蕊2枚，或4枚等長(僅在胡黃連屬中有一個種，雄蕊明顯作2強，在此情況下，其前方一對必然明顯伸出花冠之外)；花冠有時幾無管，很少管長過於其裂片。  
 32. 蒴果肉質，紅色，遲遲在頂部室間開裂，並微作室背開裂；葉強烈二形，在主莖上者卵形，對生，在分枝上者捲為針狀，密集似松葉；莖的外皮剝落。……………7. 鞭打繡球族 *Hemiphragmeae*  
 ………………30. 鞭打繡球屬 *Hemiphragma*
32. 蒴果乾燥，作一般開裂；葉非二形；莖皮不剝落。……………8. 婆婆納族 *Veroniceae*  
 33. 雄蕊4枚。  
 34. 花冠裂片5枚；花輻射對稱，單生葉腋，其花梗細長，在花後扭捲；葉互生於匍莖上，有長柄，羽狀深裂。……………31. 幌菊屬 *Elliaophyllum*  
 34. 花冠裂片4枚；花左右對稱，集成頂生穗狀花序，無梗；葉成基生蓮座狀之叢，不裂而多少匙形。……………32. 胡黃連屬 *Picrorhiza*
33. 雄蕊2枚。  
 35. 花冠不作強二唇狀；果為開裂之蒴果；花萼之齒不結合，非膜質或透明；葉多莖生。  
 36. 萼齒5枚，幾相等或極少後方1枚僅其餘的半長。  
 37. 雄蕊多少伸出於花外；柱頭不擴大；萼齒近於相等；根常被黃色茸毛。……………33. 腹水草屬 *Veroniastrum*  
 37. 雄蕊內藏；柱頭棒狀；萼齒裂片不相等，後方1枚只及其餘的半長。……………34. 細穗玄參屬 *Scroffella*  
 36. 萼齒4枚，如有5枚則後方1枚已退化的狀態存在，遠遠小於其餘4枚；花冠簡短管狀或極短而使花冠成輻狀。……………35. 婆婆納屬 *Veronica*
35. 花冠明顯二唇狀，果為核果狀或不裂；萼膜質或透明，常結合，前方開裂至基部，後方則開裂1/3至基部，成二裂片狀或後方僅淺裂或成佛焰苞狀。葉多基生，常作蓮座狀。……………36. 兔耳草屬 *Lagotis J.*

27. 花冠裂片平展，後方2枚處於內面，前方1枚處於最外；藥室完全分離，有時一室退化；多為寄生或半寄生植物。……………9. 黑草族 *Buchnerieae*
38. 藥2室，其室相等，或其中一室狹小；花冠鐘形，其擴張之喉部內面無毛或幾無毛；萼寬鐘形。
39. 蒴果室間與室背均開裂；心皮頂部分離。
40. 藥室相等。……………37. 鐘山草屬 *Petitmenginia*
40. 藥室中有一個無藥或多少退化。……………38. 胡麻草屬 *Centranthera*
39. 蒴果僅室背開裂，其心皮頂部分離。
41. 花藥之室分離，相等而並行。
42. 種子很多；花萼包裹花冠筒，花後膨大；葉卵狀披針形，全緣，有齒或基部亞缺刻狀，基出3脈，花梗上有小苞對。……………39. 黑蒴屬 *Melaema*
42. 種子很少，每室僅有2枚，或因敗育而僅餘1枚；花萼包裹花冠筒的半長，花後不膨大；葉基僅有單脈；花梗無小苞。……………40. 方莖草屬 *Leptorhabdos*
41. 花藥2枚，均成對粘連，藥室中有一室有性，另一室小而有柄，中空；花梗上有小苞片一對。……………41. 短冠草屬 *Sopubia*
38. 藥因一室敗育而僅存一室；花高腳碟狀，其狹小之喉部內面有毛；萼管狀鐘形。
43. 花冠筒部伸直，外面無毛；萼的主脈不明顯；葉長圓形至長圓形針狀。……………42. 黑草屬 *Buchnera* L.
43. 花冠筒部在近端處下彎，外面有毛；萼的主脈高凸成脊；葉線狀披針形或鑽形。……………43. 獨腳金屬 *Striga*
26. 花冠上方裂片頂部明顯弓曲，成一盔瓣，包裹其花藥(僅在50屬中不很弓曲)；花藥常連著；雄蕊4個，二強；多為寄生或半寄生植物。……………10. 鼻花族 *Rhinantheae*
44. 藥室不等或一室退化。
45. 萼管狀，側面壓扁，4裂，深度不等，前後方較深；花冠下唇裂片平展。……………44. 火焰草屬 *Castilleja*
45. 萼管狀鐘形，均等4裂，前方2齒稍短；花冠下唇裂片頂端多少成兜狀。……………45. 直果草屬 *Orthocarpus*
44. 藥室相等。
46. 果室含1~2枚種子；無小苞；葉對生；花冠盔瓣壓扁。……………46. 山羅花屬 *Melampyrum*
46. 果室中含有多數種子。
47. 萼下無小苞。
48. 花冠的盔瓣具內捲之緣。
49. 種子有網紋；葉羽狀開裂。……………47. 松蒿屬 *Phtheirospermum*
49. 種子有網紋；葉全緣或掌狀開裂。
50. 花梗極短或無；上部之花作穗狀排列。……………48. 小米草屬 *Euphrasia* L.
50. 花梗極細長；花作疏總狀排列。……………49. 臍草屬 *Omphalothrix*
48. 花冠的盔瓣邊緣不折疊或僅下半部稍稍摺疊，全緣或有齒。
51. 花冠上唇幾不作盔瓣狀，幾乎伸直；深裂過半；萼齒5枚，後方1枚較小。……………50. 五齒草屬 *Pseudobartsua*
51. 花冠上唇強烈弓曲。
52. 萼具4齒；蒴果球形至長圓形，不偏斜。……………51. 療齒草屬 *Odontites*
53. 萼鐘形，不囊狀膨大，均等4裂；種子橢圓形。……………52. 鼻花屬 *Rhinanthus*
53. 萼膨大成囊狀，壓扁，僅後方裂得較深，其餘淺裂；種子扁平。……………52. 鼻花屬 *Rhinanthus*
52. 萼具2~5齒；蒴果在大部種類中偏斜。……………53. 馬先蒿屬 *Pedicularis*
47. 萼下有苞一對。
54. 莖在基部即生尋常葉。
55. 萼卵形而大，具5脈；葉全緣或有齒。……………54. 翅莖草屬 *Pterygiella*
55. 萼細長，管狀，具10脈；葉羽狀開裂。……………55. 陰行草屬 *Siphonostegia*
54. 莖基部生鱗片狀葉。
56. 蒴果2室均開裂，果瓣不反捲。……………56. 大黃花屬 *Cymbaria* L.
56. 蒴果僅背面開裂，果瓣強烈反捲；種子多數。……………57. 鹿茸草屬 *Monochasma*

### 三、野甘草屬之特徵與分佈<sup>9</sup>

多枝草木或小灌木。葉對生或輪生，全緣或有齒，常有腺點。花腋生，具細梗，單生或常成對，萼4~5裂，裂片覆瓦狀，卵形或披針形。花冠幾無管而近乎輻狀，喉部生有密毛，裂片4枚，覆瓦狀，在蕾中時後方一片處於外方，略較其他3片為寬；雄蕊4枚，幾等長，藥室分離，併行或2分；子房球形，內含多



數胚珠，花柱頂生稍稍膨大。蒴果球形或卵圓形，室間開裂，果瓣薄，緣內卷；種子小，倒卵圓形，有稜角，種皮貼生，有蜂窩狀紋。

分佈於墨西哥和南美洲，其中有一種分佈於全球熱帶。中國僅產一種。

#### 四、中國產野甘草屬植物之形態與分佈<sup>9</sup>

##### 1. 野甘草 *Scoparia dulcis*

直立草本或為半灌木狀，高可達 100 厘米，莖多分枝，枝有稜角或狹翅，無毛。葉對生或輪生，菱狀卵形至菱狀披針形，長者達 35 毫米，寬者達 15 毫米，枝上部葉較小而多，頂端鈍，基部長見狹，全緣而成短柄，前半部有齒，齒有時頗深多少缺刻狀而重出，有時近全緣，兩面無毛。花單朵或更多成對生於葉腋，花梗細，長 5~10 毫米，無毛；無小苞片，萼分生，齒 4，卵形矩圓形，長約 2 毫米，頂端有鈍點，具睫毛，花冠小，白色，直徑約 4 毫米，有極短的管，喉部生有密毛，瓣片 4，上方 1 枚稍稍較大，鈍點，而緣有嚙痕狀細齒，長約 2~3 毫米；雄蕊 4，近等長，花葯箭形，花柱挺直，柱頭截形或凹入。蒴果卵圓形至球形，直徑 2~3 毫米，室間室背均開裂，中軸胎座宿存。

分佈於廣東、廣西、雲南、福建；原產於美洲熱帶，現已廣布於全球熱帶。喜生於荒地、路旁，亦偶見於山坡。

### 第三節 台灣產野甘草屬(*Scoparia*)植物的 藥用植物學考察

界 Kingdom	植物界	Plant kingdom
門 Division	被子植物門	Anthophyta (Magnoliophyta)
綱 class	雙子葉植物綱	Dicotyledons
亞綱 subclass	合瓣花亞綱	Sympetalae
目 order	管花目	Tubiflorae
科 family	玄參科	Scrophulariaceae
屬 genus		Scoparia

#### 一、野甘草屬植物的特徵<sup>(1, 2, 10, 11)</sup>

根據 Flora of Taiwan<sup>2</sup> 的記載，野甘草屬植物為玄參科的一屬，通常為一年生或多年生草本，少有小灌木；莖為直立，具有多枝節。葉無托葉，大部分為對生或輪生，葉的邊緣全緣或鋸齒狀。

花為單生或對生，腋生；花萼鐘形，裂片通常 4 到 5 裂，無苞，輻射狀，半裂或靠近基部，花瓣 4 片，約略相等，兩裂片在花蕾內，雄蕊 4 枚，幾乎相等，花藥明顯，種類簡單，柱頭頭狀花序，全緣或淺的 2 裂，蒴果開裂，2 全緣或兩裂瓣，種子外堅皮有小瘤。在美洲熱帶地區約 20 種，臺灣有 1 種。

#### 二、玄參科之屬檢索表<sup>10</sup>

1. 木本.....16. *Paulownia*
1. 草本。
  2. 花冠上唇 2 裂，花苞期時包住下唇。
  3. 雄蕊 2；假雄蕊極無或微小。
    4. 花有柄；花冠明顯二唇化.....6. *Dopatrium*
    4. 花無柄；花冠具 5 片約略相等之花瓣裂片.....14. *Microcarpaea*
  3. 雄蕊 4；2 孕性及 2 不孕性時，不孕雄蕊（假雄蕊）極為顯著。
    5. 萼片寬度明顯不等.....2. *Bacopa*

5. 萼片寬度相等或約略相等。
6. 柱頭單一或微裂.....20. *Scrophularia*
6. 柱頭明顯二裂裂，寬過花柱。
7. 花藥明顯分開.....11. *Limnophila*
7. 花藥至少有一對相連聯。
8. 蒴果胞間開裂。
9. 花萼具三翅，翅近圓形.....10. *Legazpia*
9. 花萼具五稜或五翅。
10. 花萼筒上端約略等高.....12. *Lindernia*
10. 花萼筒上端明顯傾斜，一邊裂至半途.....23. *Torenia*
8. 蒴果苞背開裂。
11. 萼片深裂至底.....4. *Deinostema*
11. 萼片明顯具萼筒。
12. 花聚合成頂生總狀花序.....13. *Mazus*
12. 花腋間單生.....15. *Mimulus*
2. 花冠上唇不裂，花苞期為下唇包住。
13. 葉互生。
14. 花單生.....7. *Ellisiophyllum*
14. 花成總狀或穗狀花序。
15. 花序總狀；花長4~6 cm.....5. *Digitalis*
15. 花序穗狀；花長短於1 cm.....25. *Veronicastrum*
13. 葉對生或輪生（至少下半部葉）。
16. 雄蕊2.....24. *Veronica*
16. 雄蕊4。
17. 花冠上層縱摺成兜帽狀。
18. 花萼底部具2小苞片.....21. *Siphonostegia*
18. 花萼底部無小苞片。
19. 花冠兜帽直，邊緣不反折.....17. *Pedicularis*
19. 花冠兜帽斜上，邊緣反折。
20. 花瓣黃色、白色或紫色；葉緣淺裂或鋸齒狀.....8. *Euphras*
20. 花瓣紫色；葉羽裂.....18. *Phtheirospermum*
17. 花冠上唇平直。
21. 雄蕊約略等長。
22. 莖匍匐.....9. *Hemiphragma*
22. 莖直立.....19. *Scoparia*
21. 二強雄蕊。
23. 葉鋸齒緣.....1. *Alectra*
23. 葉全緣或近乎全緣。

24. 花藥藥室不等長；花瓣裂片約略等長.....3. *Centranthera*  
24. 花藥藥室等長；花瓣裂片明顯二分.....22. *Striga*

### 三、台灣產野甘草之形態與分佈<sup>(1, 2, 8, 10-12)</sup>

**【形態】**台灣產野甘草為一年生草本，高可以長到 25~80 cm，根粗壯，全株光滑無毛，莖直立，多分枝，枝有稜角或狹翅，下部有木質化現象。

葉主要是三葉輪生或對生，具有短柄，柄長約 3~10 mm 長，形狀為卵形或橢圓形，10~25 mm 長，3~15 mm 寬，越往上葉會變小，基部漸狹，先端短尖，邊緣鋸齒狀或齒狀，上表面光滑無毛，下表面腺狀或有小點。

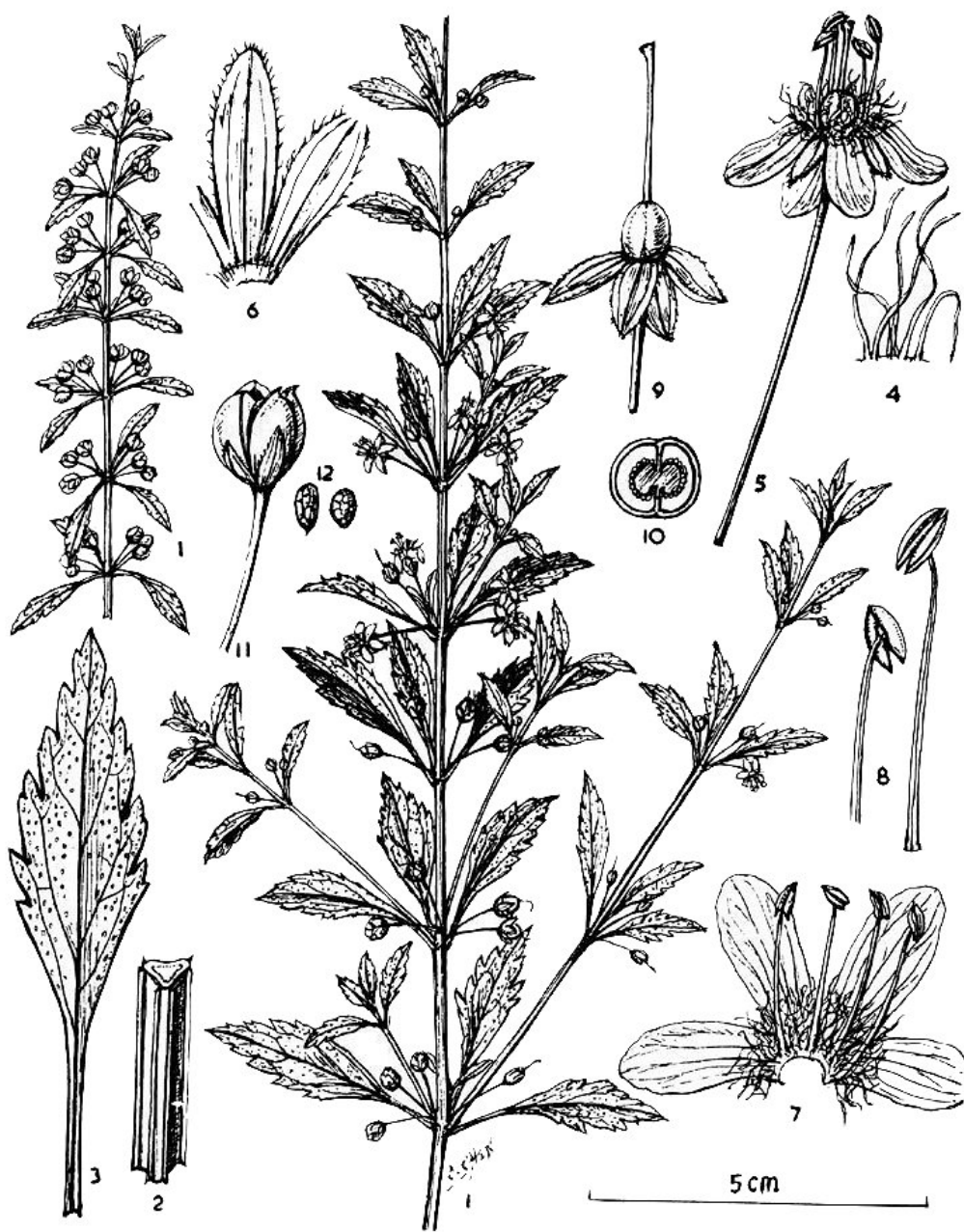
花小，多數；主要是白色花，單生或對生，生於葉腋。花梗細小，約 4~8 mm 長，無小苞片，萼片分生，4 枚，卵狀矩圓形，1.5~2 mm 長，先端較鈍，具有毛。花冠小，為輻射狀，直徑 4~5 mm，4 裂，裂片精圓形，喉部具有濃密的毛。雄蕊 4 枚，約略等長，花藥箭頭形，黃綠色。雌蕊 1 枚，花柱細長挺直，柱頭盤狀。果實為蒴果，卵狀至球形，成熟之後呈現黃褐至深褐色，直徑 2~3mm，室間室背均開裂，花柱宿存，熟後裂開，中軸胎座。花期夏秋間。(圖 1)<sup>2</sup>

**【分佈】**熱帶地區低海拔田野或低海拔潮濕地帶，生於荒地，路旁，偶見於山坡。

**【採集·加工】**全年採全草，鮮用或曬乾後使用。

**【產地】**原產於美洲，現廣布於世界各地，台灣地區全境平野至低海拔地區之村落，路旁多伴自生之雜草。

**【效用】**清熱解毒，利尿消腫，疏風止咳，清熱利濕。主治感冒發熱，肺熱咳嗽，暑熱泄瀉，腳氣浮腫，咽喉腫痛，腸炎，痢疾，小便不利，腳氣水腫，濕疹，癩子，高血壓，糖尿病，眼炎，肝炎，肺炎，肺炎，黃疸，小兒麻痺，丹毒。



1. flowering stem; 2. part of stem; 3. leaf; 4. hairs; 5. flower; 6. calyx; 7. corolla and stamens; 8. stamens; 9. calyx and pistil; 10. cross section of ovary; 11. capsule; 12. seeds (Li, 1978. Pl. 1118)

圖 1：野甘草之手繪形態圖(據 Flora of Taiwan)

【方例】

1. 治高血壓：野甘草一至二兩，水煎服。
2. 治肺炎：野甘草三兩，蜜棗三粒，水煎後代茶飲。
3. 治感冒咳嗽：野甘草 30 克，薄荷 9 克，魚腥草 15 克，水煎服。《全國中草藥匯編》
4. 治小兒肝炎煩熱：鮮野甘草 15 克酌加冰糖，開水燉服。《福建民間草藥》
5. 治濕疹、熱痱：鮮野甘草搗汁外擦。《廣西中藥志》
6. 治小兒外感發熱，腸炎，小便不利：野甘草五錢至一兩，水煎服。《廣西中草藥》
7. 治喉炎：鮮野甘草四兩，搗汁調蜜服。《福建中草藥》
8. 治丹毒：鮮野甘草二兩，食鹽少許，同搗爛，水煎服。
9. 防治麻疹：野甘草水煎作茶飲，連服三天。《閩南民間草藥》



#### 第四節 野甘草屬(*Scoparia*)植物的生藥學文獻考察

野甘草屬在世界約有 20 種，但在台灣只有一種，即為野甘草(*Scoparia dulcis*)，文獻紀錄中，關於野甘草屬植物的生藥論文並不多。

日本學者Toshimitsu Hayashi曾經做過一系列的研究<sup>13-16</sup>，將巴拉圭產*S. dulcis*所培養的組織依其所含成分分成幾種 chemotype：scoparic acid A (SA)、scopadulcic acid B (SDB)、scopadulin (SD)、scopadiol(SDX)和 scopadulciol (SDY)，然後研究組織培養與化學成分含量的關係，試著找出最佳的培養方式。

首先，以 Murasie-Skoog's medium (包含 5  $\mu$ M 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 和1  $\mu$ M 6-benzyladenine (BA)) 培養 *S. dulcis* 癒合組織，然後將癒合組織移到 Gamborg-B5 medium 和 liquid B5 medium 中繼續培養。之後經由HPLC分析，比較時間與細胞生長及化學成分含量的關係 (圖2)，發現在持續日光照射下的細胞生長比在黑暗中的細胞好，而在日光照射下，SA 型的癒合組織生長得比 SDB 型的癒合組織好。另外在化學成分含量上，在兩種 chemotype 的癒合組織中只能偵測到 SA，且含量遠比完整植物來得少<sup>13</sup>。

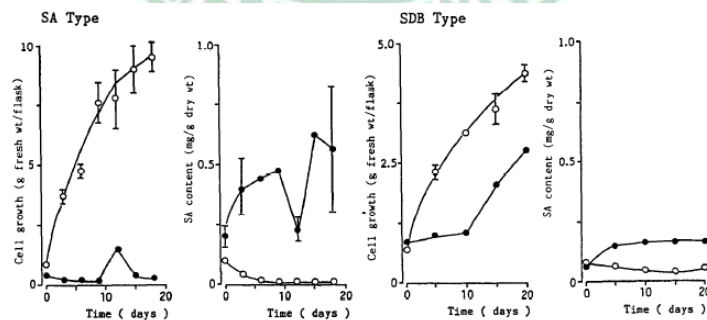


圖 2：*S. dulcis* 中兩種 chemotype 中時間與細胞生長及 SA 含量之關係。

圖中空心點表示在日照下生長之癒合組織；實心點表示在黑暗中生長之癒合組織。

另外，在 SDX 型癒合組織也得到 scopadulciol (SDY)<sup>14</sup>。依照前述之培養方法，得到 SDX 型癒合組織，以 HPLC 分析時間與細胞生長及 SDY 含量的關係 (圖

3)，結果發現，與 SA 及 SDB 型癒合組織相同，細胞在持續日光照射下的生長比在黑暗中好，但是癒合組織所產生的 SDY 含量卻是在黑暗中生長比持續日照來得高，綜合上述兩者，在培養瓶中 SDY 總含量與細胞一樣逐漸增多，到第 12 達到最高。

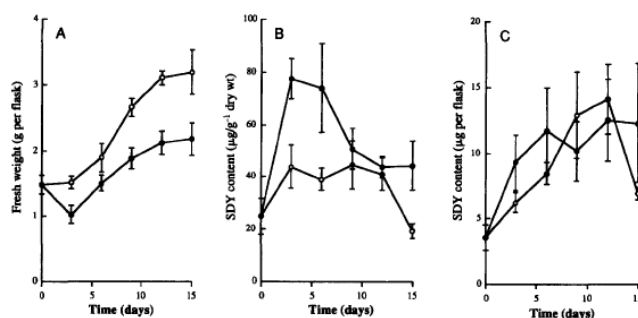


圖 3：*S. dulcis* 中時間與細胞生長及 SDY 含量之關係。圖中空心點表示在日照生長之癒合組織；實心點表示在黑暗中生長之癒合組織。

而在日照週期與 SDY 含量的比較上(表 1)，日照時間增長，SDY 含量會減少，而細胞生長增加，在每天日照 16 小時的情況下最好，培養瓶中 SDY 含量則是在每日照 12 小時含量最高。

表 1：SDX 型癒合組織中光照週期影響細胞生長及 SDY 含量之效果

Photoperiod (hr day <sup>-1</sup> )	Fr. wt (g per flask)	Dry wt (mg per flask)	SDY	
			(µg g <sup>-1</sup> dry wt)	(µg per flask)
0 (n = 5)	0.6 ± 0.1	49 ± 10	21.8 ± 4.7	1.05 ± 0.21
12 (n = 4)	0.9 ± 0.3	78 ± 18	14.0 ± 2.7	1.09 ± 0.33
16 (n = 4)	1.3 ± 0.4	104 ± 29	10.7 ± 4.0	1.00 ± 0.43
24 (n = 4)	1.1 ± 0.3	87 ± 19	9.1 ± 1.0	0.80 ± 0.13

\*B5 liquid medium containing 5 µM NAA and 1 µM BA was used. Values are expressed as means ± SE (n = 4 or 5).

為了選擇葉部組織適當生長方式，觀察 *S. dulcis* 的生長 diterpenoid 含量關係，發現種子發芽 4 週後其 diterpenoid 趨於穩定，因此選擇 4 週大的植物其葉部組織作為培養的組織。分別以 2-Isopentenyladenine (2IP)、kinetin (K)、N-benzyladenine (BA) 和 N-phenyl-N'-(4-pyridyl) urea (4PU) 測試其影響組



織生長及diterpenoid含量的關係，結果發現只有4PU 0.1  $\mu$ M是具有影響的<sup>15</sup>。

此外，Toshimitsu Hayashi<sup>16</sup>也以〔1-<sup>13</sup>C〕 glucose做為標誌分子，並以<sup>13</sup>C NMR光譜分析，確定了*S. dulcis*中bicyclic及tetracyclic diterpenoid mevalonate-independent之生合成路徑。



## 第五節 野甘草屬(*Scoparia*)植物的化學成分考察

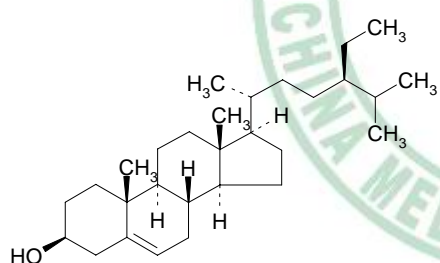
Chemical type	Compound	Plant part	Ref.
Steroid	Daucosterol	Entire plant	17
	Stigmasterol	Entire plant	17
	$\beta$ -sitosterol	Entire plant	18
	Taraxerol	Entire plant	17
Diterpene	Dulcinol	Entire plant	19
	Scoparinol	Entire plant	20, 21
	Scopadiol	Aerial part	22
	Scopadulciol	Aerial part	22, 23
	Scopadulcic acid A	Entire plant	24, 25
	Scopadulcic acid B	Entire plant	22, 24, 26
	Scopadulin	Entire plant	27
	Scoparic acid A	Entire plant	22, 24, 26, 28, 29
	Scoparic acid B	Entire plant	29
	Scoparic acid C	Entire plant	29
	Scopanlal	aerial part	21
Triterpene	$\alpha$ -amyrin	Entire plant	30
	Betulinic acid	Entire plant, Root	30, 31
	Dulcioic acid	Entire plant	30
	Friedelin	Entire plant	30
	Glutinol	Leaf+stem Entire plant	30

	glutenol	Aerial part	32
	Ifflaionic acid	Entire plant	30
Flavone	Acacetin	Leaf+stem	8
	Apigenin	Entire plant	5
	Cirsimarin	Aerial part	33
	Cynaroside	Entire plant	5
	5, 7, 8, 3', 4', 5' - Hexahydroxy-flavone glucuronide	Entire plant	5
	5-Hydroxy-6, 7-dimethoxyflavone 4' -O-D-glucose	Entire plant	5
	Hymenoxin	Entire plant	34
	Linarin	Entire plant	5
	Luteolin	Entire plant	5
	Luteolin-7-glucoside	Entire plant	5
	Scutellarein	Entire plant	5, 35
	Scutellarin	Entire plant Leaf	5 35
	Scutellarin Methyl Ester	Entire plant	5
	Vicenin-2	Entire plant	5
Vitexin	Entire plant	5	
Nitrogen heterocy	Benzoxazolinone	Entire plant	19
	Coixol (6-Methoxybenzoxazolinone)	Root	21, 37
		Leaf+stem	23
		Entire plant	33
	2-Hydroxy-2-H-1, 4-benzoxazol-3-one	Aerial part	36
	6-Methoxy-2-benzoxazolinone	Callus tissue	38
6-Methoxy-2, 3-H-benzoxazolone:	Aerial part	36	

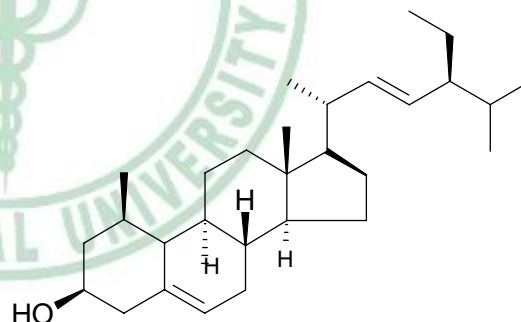
Phenylpropanoid	p-coumaric acid	Entire plant	19
Benzenoid	Gentisic acid	Leaf	39
Carbohydrate	Mannitol	Rootbark	18

Compound structure of *Scoparia dulcis*

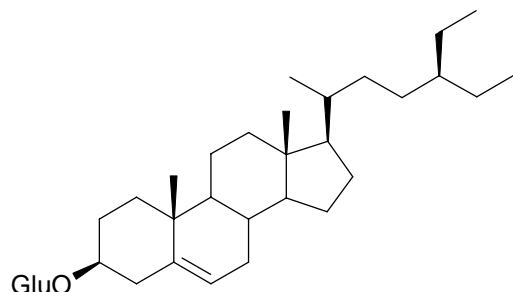
### Steroid



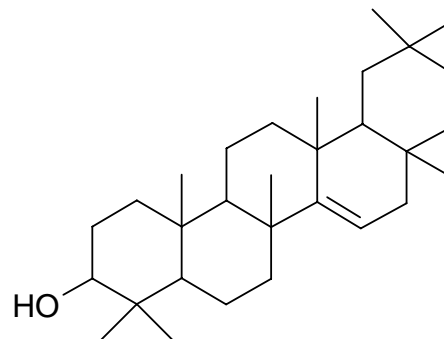
$\beta$ -sitosterol



Stigmasterol

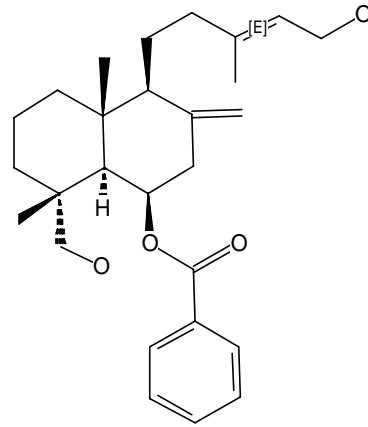
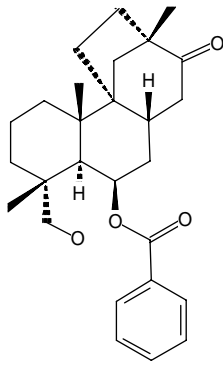


Daucosterol



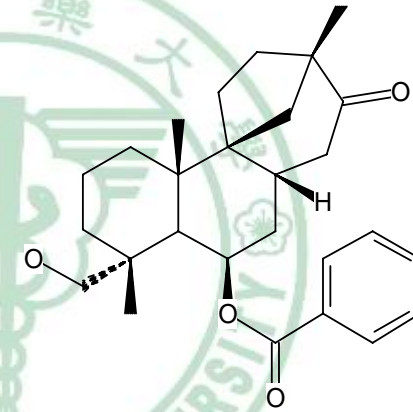
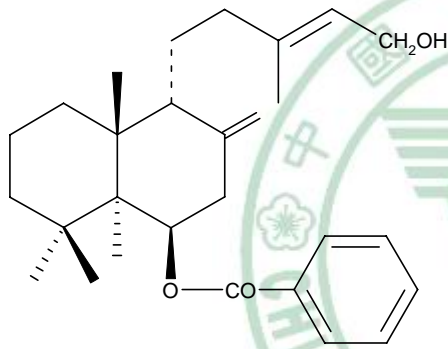
Taraxerol

## Diterpene



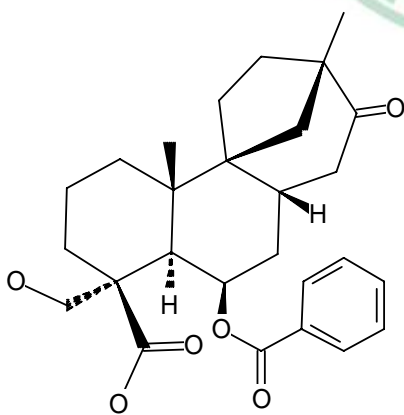
Dulcinol

Scoparinol

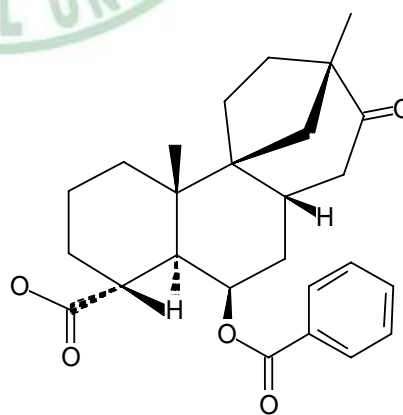


Scopadiol

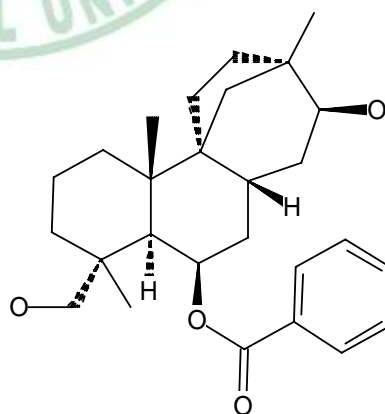
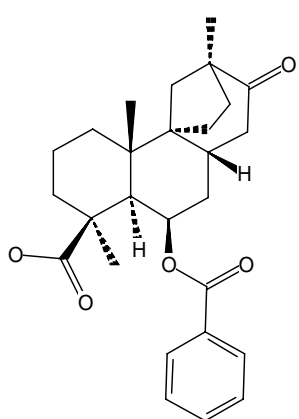
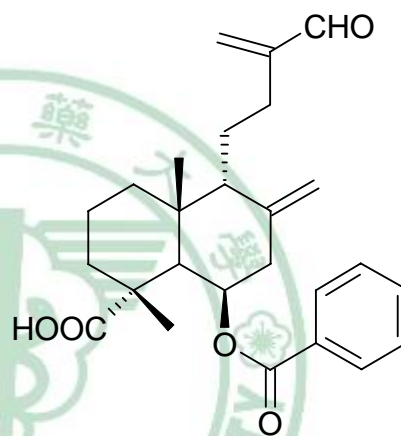
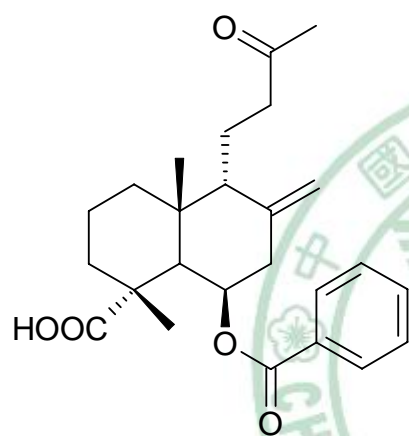
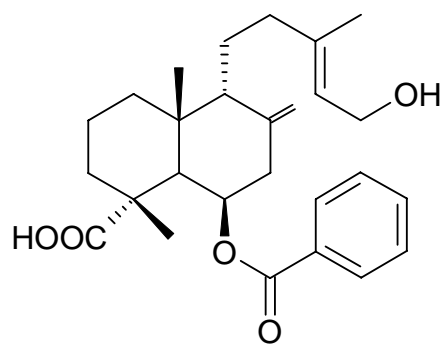
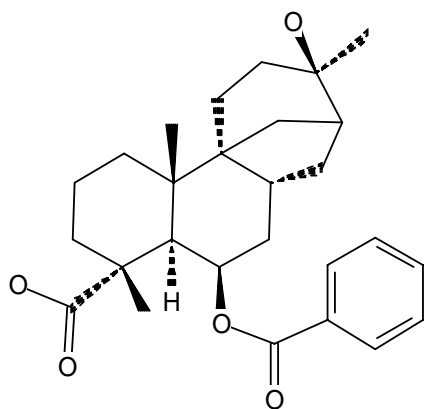
Scopadulciol

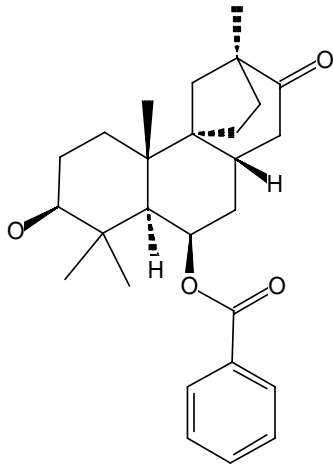


Scopadulcic acid A

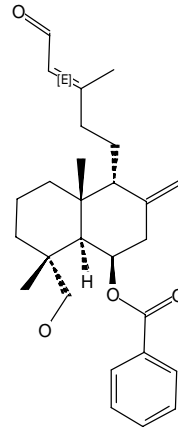


Scopadulcic acid B



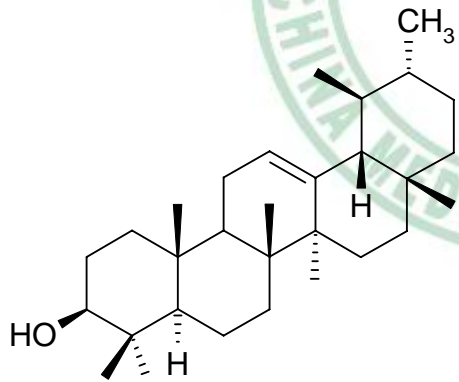


Iso-dulcinol

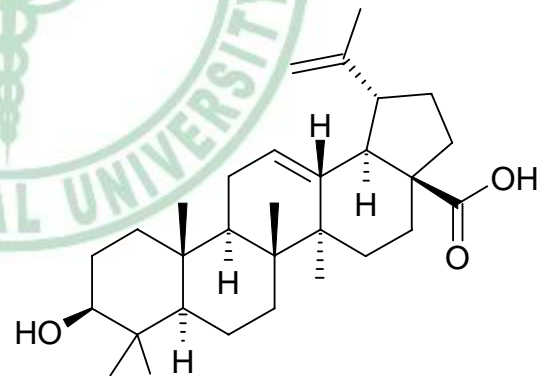


Scoplanol

**Triterpene**

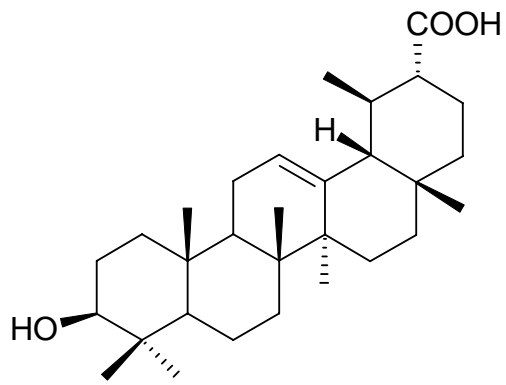


$\alpha$ -amyrin

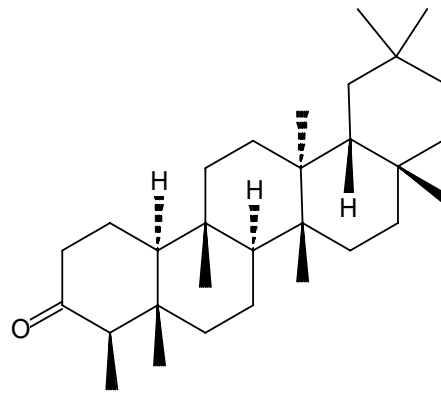


Betulinic acid

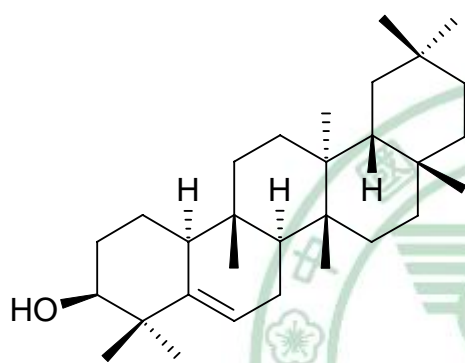




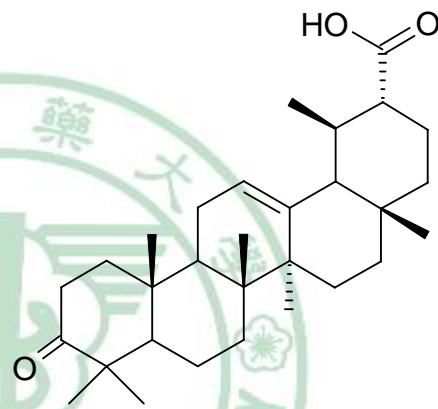
Dulcioic acid



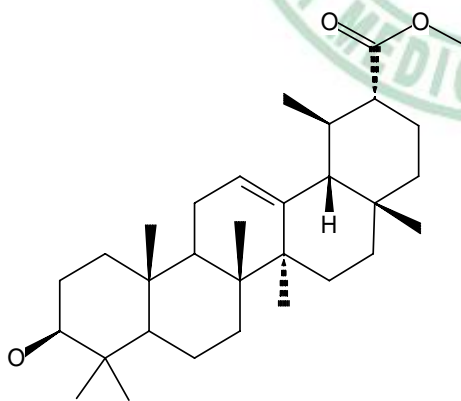
Friedelin



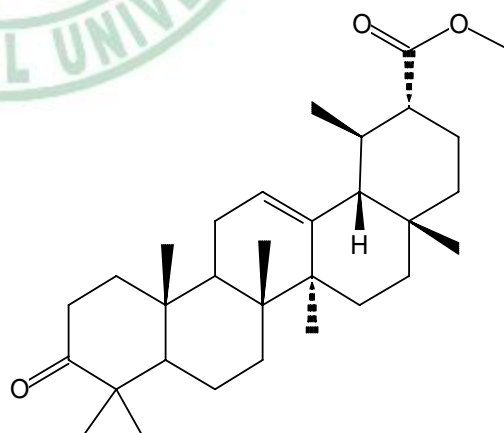
Glutinol(3 $\beta$ )  
Glutenol(3 $\alpha$ )



Ifflaionsaeure



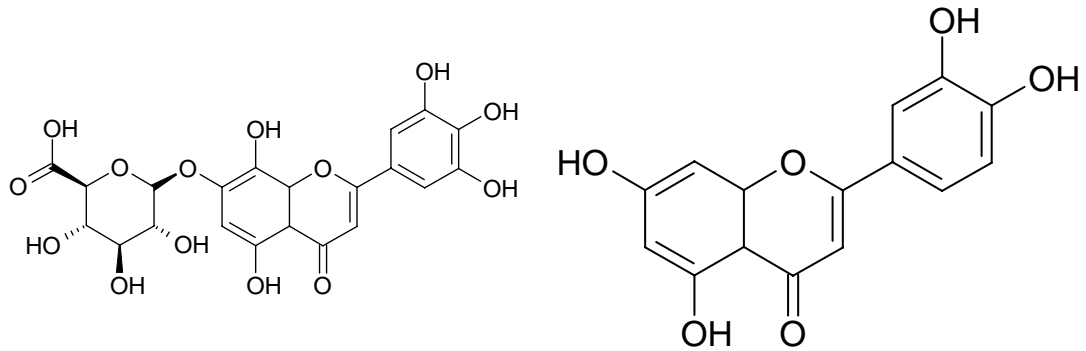
Methyl dulcioate



Methyl ifflaionate

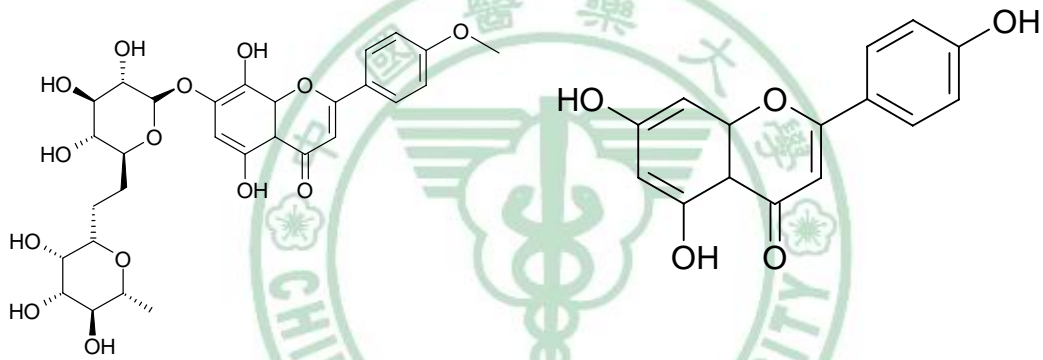


## Flavone



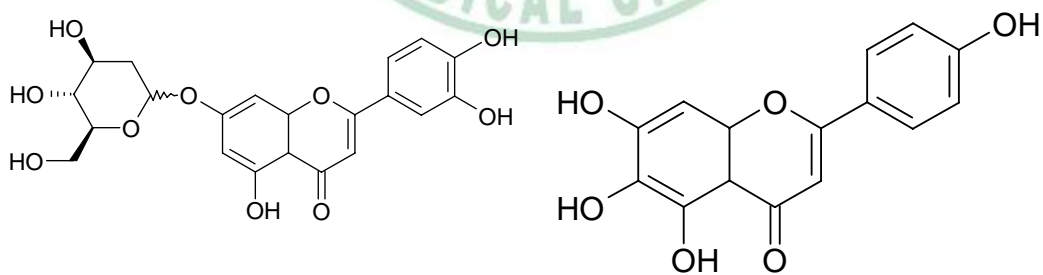
5, 7, 8, 3', 4', 5' -Hexahydroxy-  
flavone glucuronide

Luteolin



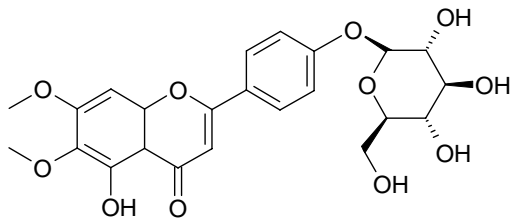
Linarin

Apigenin



Luteolin-7-glucoside

Scutellarein



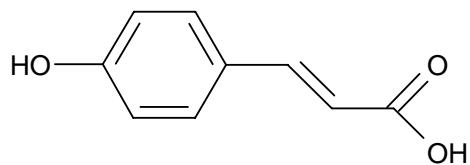
5-Hydroxy-6,7-dimethoxyflavone  
4'-O-D-glucose

### Others



Coixol  
(6-Methoxybenzoxazolinone)

2-Hydroxy-4H-benzo[1,4]oxazin-3-one



p-coumaric acid

## 第六節 野甘草屬(*Scoparia*)植物的藥理作用考察

### ➤ 降血糖作用

Pari<sup>40</sup> 等曾以 alloxan 誘導小鼠造成血糖過高，再以 *S. dulcis* 葉部的水萃取物(the aqueous extract of the *S. dulcis* leaves (SLEt))分別口服餵食 0.15, 0.30 and 0.45 g/kg/day，連續餵食 45 天，發現可以明顯的降低血中血糖濃度，其中以 0.45 g/kg/day 餵食的降血糖效果最佳(表 2)。

表 2：餵食不同劑量之血糖變化

Group	Body weight (g)		Fasting blood glucose (mg/dL)	Haemoglobin (g/dL)	Glycosylated haemoglobin (mg/g Hb)	Urine sugar <sup>b</sup>
	Initial	Final				
Normal	186.68 ± 5.90	192.48 ± 5.60	76.70 ± 04.13	12.60 ± 0.61	0.28 ± 0.02	Nil
Diabetic control	193.61 ± 7.46	196.63 ± 5.71 <sup>a</sup>	264.10 ± 21.23 <sup>a</sup>	5.64 ± 0.46 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.07 <sup>a</sup>	+++
Diabetic + SLEt (0.15 g/kg)	187.98 ± 7.10	194.60 ± 8.31 <sup>a</sup>	239.79 ± 20.45 <sup>b</sup>	6.16 ± 0.52 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.06 <sup>a</sup>	++
Diabetic + SLEt (0.30 g/kg)	179.43 ± 2.59	187.60 ± 4.36 <sup>a</sup>	168.56 ± 09.90 <sup>a</sup>	8.84 ± 0.75 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>a</sup>	+
Diabetic + SLEt (0.45 g/kg)	182.46 ± 5.19	197.58 ± 6.11 <sup>a</sup>	82.60 ± 04.56 <sup>a</sup>	12.11 ± 0.62 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	Nil
Diabetic + glibenclamide	189.53 ± 4.08	193.63 ± 5.60 <sup>a</sup>	95.08 ± 05.75 <sup>a</sup>	9.53 ± 0.66 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>a</sup>	Trace

<sup>a</sup> Values are given as mean ± SD from six rats in each group. Diabetic control was compared with normal. Experimental groups were compared with diabetic control.  
<sup>b</sup> 0.25% sugar and (+++) indicates more than 2% sugar.

<sup>c</sup> Values are statistically significant at  $p < 0.001$  compared with diabetic control.

<sup>d</sup> Values are statistically significant at  $p < 0.01$  compared with diabetic control.

<sup>e</sup> Not significant compared with diabetic control.

另外，在近期的文獻中，Muniappan Latha<sup>41</sup> 等也曾 streptozotocin 誘導小鼠造成血糖過高，兩天後開始餵食 *S. dulcis* 全草的水萃取物 (*S. dulcis* plant extract (SPEt))，分別以 100, 200 及 400 mg/kg 餵食，並與對照組比較，發現以 200 mg/kg 餵食的這一組其降低血中血糖濃度的效果最佳。如以下所示：

表3：餵食不同劑量 *S. dulcis* 水萃物給予正常與實驗鼠，觀察15天內血糖變化

Groups	0 day	2nd day	5th day	12th day	15th day
<i>Blood Glucose Levels (mg/dL)</i>					
Normal	81.0 ± 3.0	85.3 ± 5.1	83.0 ± 5.9	84.57 ± 6.2	83.50 ± 6.4
Diabetic control	82.8 ± 4.6	270.0 ± 18.3**	283.5 ± 11.3**	291.0 ± 14.6**	300.0 ± 16.4**
Diabetic + SPET-Aq-100	79.3 ± 3.1	246.6 ± 15.1**	223.2 ± 12.5*	189.5 ± 13.2**	142.0 ± 10.2**
Diabetic + SPET-Aq-200	83.0 ± 5.9	250.0 ± 13.7**	192.0 ± 12.0*	130.0 ± 12.3**	112.0 ± 10.0**
Diabetic + SPET-Aq-400	81.6 ± 5.0	253.6 ± 13.0**	202.0 ± 12.0**	151.1 ± 12.3**	130.8 ± 10.0**

Values are given as mean ± S.D for 6 rats in each group. Experimental groups were compared with corresponding values after streptozotocin injection (2nd day).

\*p < 0.01.

\*\*p < 0.001.

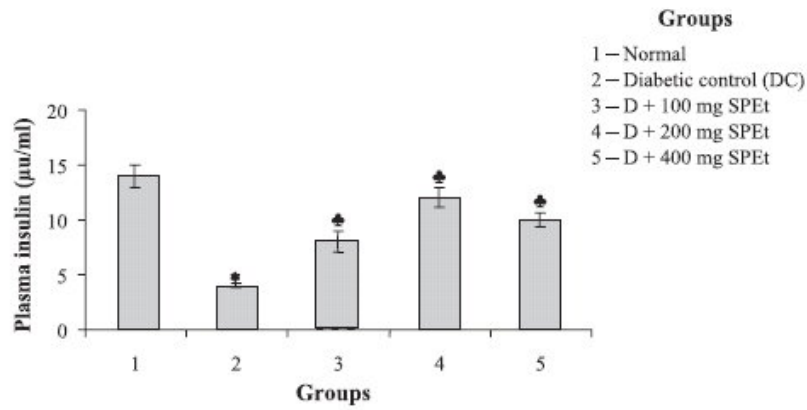


圖4：SPEt效果之比較

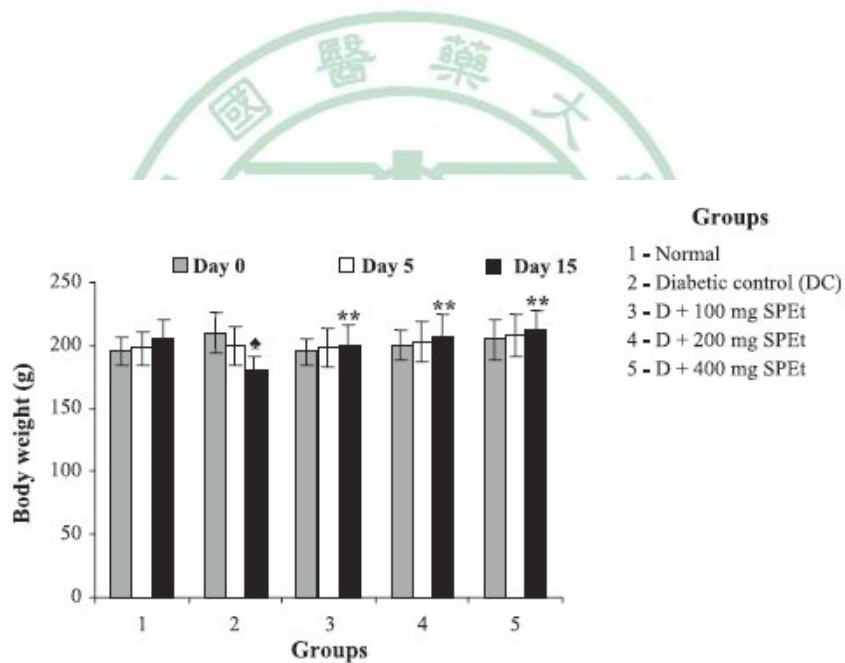


圖5：正常鼠與實驗鼠不同體重之SPEt效果比較

由上述研究顯示，餵食*S. dulcis*之小鼠其體內insulin明顯增加，顯示*S. dulcis*之降血糖作用應是促進體內 $\beta$ -cell分泌胰島素，且若*S. dulcis*量太多，反而造成效果下降，表示其中應有阻撓有效成分的因數存在。另外研究中也發現餵食*S. dulcis*之小鼠體重較對照組高，這可能與促進血糖的控制有關。

### ➤ 抗胃潰瘍作用

1987年，Toshimitsu Hayashi 等從 *S. dulcis* 植物全草中分離出兩個新的成分，scopadulcic acid A (SDA) 和 scopadulcic acid B (SDB)<sup>24</sup>，並進行藥理學研究，結果發現，與 SDA 比較之下，SDB 能抑制豬胃中  $H^+, K^+$ -ATP 酶的活性和進入胃囊的質子運輸<sup>42</sup>，如圖 6 所示，SDB 抑制活性 dose-dependent，而其半數抑制濃度 ( $IC_{50}$ ) 約為 20~30  $\mu M$ ，藥物動力學顯示口服 SDB 鈉鹽 (SDB-Na) 或 SDB 效果較注射緩慢，但有較好的腸吸收。

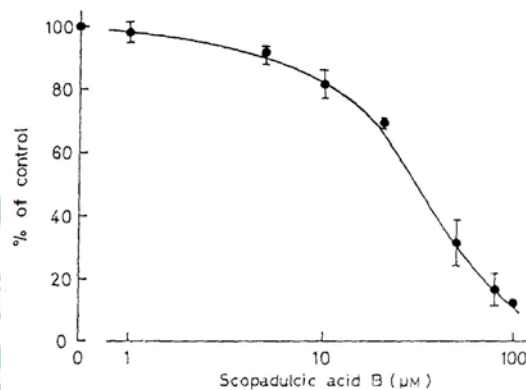


圖 6：SDB 對  $H^+, K^+$ -ATP 酶的效果

另外，也研究 SDB 衍生物對豬胃  $H^+, K^+$ -ATP 酶的抑制作用<sup>23</sup>，結果發現羧基 (carboxyl group) 的甲基化及 C-13 及 C-18 位引入 acetyl group 或 oxime 均能顯著增強其抑制作用。在 30 個化合物中篩選出 SDB 的甲酯衍生物的抑制效果最強。同研究中也發現 scopadulciol 具有輕度的抑制豬胃  $H^+, K^+$ -ATP 酶作用。

### ➤ 抗病毒作用

Kyoko Hayashi<sup>43</sup> 等從 *S. dulcis* 中分離出五個雙萜類化合物，研究其體外抗第一型單純皰疹病毒活性，發現 scopadulcic acid B 可以抑制病毒的複製，而其抑制作用並非殺病毒作用或阻止病毒進入宿主細胞，而是影響病

毒細胞週期的早期。實驗方法為 hamster test model，口服或腹膜內注射 scopadulcic acid B 100 及 200 mg/kg /day，可以有效延長病毒開始造成傷害的時間。

Toshimitsu Hayashi<sup>27</sup> 等對分離的 scopadulin 進行藥理研究，發現 scopadulin 對 HeLa 細胞株(一種子宮頸癌細胞株)呈現細胞毒性作用，半數抑制劑量 (ID<sub>50</sub>) 為 285  $\mu$ g/ml，並能抑制第一型單純皰疹病毒，半數有效劑量 (ED<sub>50</sub>) 為 38  $\mu$ g/ml。

### ➤ 抗腫瘤作用

Nishino<sup>44</sup> 等研究發現，從 *S. dulcis* 分離出一個四環雙萜類化合物 — scopadulcic acid B (SDB)，可以在體內及體外試驗中抑制一種促進腫瘤的物質，12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)。在 cultured cell 中，SDB 可以抑制 TPA 促進磷脂生成的作用，而且可以抑制 TPA 促進皮膚腫瘤起始物質 — 7,12-dimethylbenz[a]anthracene 的作用。SDB 較其他具有相同作用的萜類化合物如 glycyrrhetic acid 效果較強。

另外，Ahsan<sup>31</sup> 等亦曾 *S. dulcis* 的地上部份分離出六個 labdane-derived diterpenes — iso-dulcinol (1)、4-epi-scopadulcic acid B (2)、dulcidiol (4)、scopanolal (5)、scopadulciol (3) 及 scopadiol (6)，發現 1-4 及 6 對一種或多種胃癌 cell line 具有抗細胞毒性，另外也發現粗提取物與純物質一樣對人類胃癌 cell line 具有細胞毒性。

### ➤ 鎮痛、抗發炎作用

Ahmed<sup>20</sup> 等研究發現，由 *S. dulcis* 分離出的雙萜類化合物 — scoparinol，在動物實驗具有鎮痛 ( $p < 0.001$ ) 及抗發炎 ( $p < 0.01$ ) 的效果，在鎮靜作用上，scoparinol 可使 pentobarbital 所誘導的睡眠起始時間 (onset) 減短及作用時間 (duration) 增長 ( $p < 0.05$ )，另外，在尿

液容量的測量也發現具有利尿的效果。

而在另一項研究中，Freire<sup>45</sup>等由 *S. dulcis* 的水抽提物及乙醇抽提物比較其鎮痛及抗發炎作用，並由乙醇抽提物中分離出一個三萜類化合物—glutinol。以 0.8 % acetic acid(0.1 ml/10 g, i.p.)誘導小鼠造成蠕動情況，分別餵食水抽提物及乙醇抽提物之後發現，服用乙醇抽提物之小鼠蠕動情形降低，而餵食水抽提物之小鼠則無明顯改變，另以 carrageenan 誘導造成小鼠腳爪水腫，同樣以水抽提物及乙醇抽提物給食，亦發現乙醇抽提物有降低水腫情形，而水抽提物則無。以 glutinol 重複上述實驗，發現具有與乙醇抽提物相同效果，因此推測鎮痛及抗發炎作用可能與 glutinol 有關。

#### ➤ 降血壓作用

*S. dulcis* 根的水或醇提取物給麻醉貓注射均可引起血壓下降，在初期的動物試驗中，從 *S. dulcis* 分離出的化合物—coixol，呈現明顯的降壓作用<sup>4</sup>。另有文獻報導<sup>46</sup>，*S. dulcis* 水提取液對清醒大白鼠給藥劑量在 6 g/kg 時會使動脈血壓不變或微昇；調整到 9.6 g/kg 時反而會使動脈血壓微降；但是提升到 17.2 g/kg 時，又會使動脈血壓微昇；而若以醇提取液，則均會造成血壓微昇(表 4)。

表 4：提取液對清醒大白鼠動脈血壓之影響

提取液	劑量(g/kg)	動脈血壓變化	作用時間(min)
水提取液	6	不變或微昇	—
	9.6	微降	20
	17.2	微昇	—
醇提取液	8.9	微昇	—
	18.5	微昇	—

➤ 抑制  $\beta$ - glucuronidase 作用

Masaru Kawasaki 等由 *S. dulcis* 分離出一個新的黃酮類化合物— 5, 7, 8, 3', 4', 5'-hexahydroxyflavone glucuronide，發現具有抑制  $\beta$ - glucuronidase 的作用<sup>5</sup>。另外 Toshimitsu Hayashi 等也發現另一個化合物，Scoparic acid A，也同樣具有抑制  $\beta$ - glucuronidase 的作用<sup>29</sup>。

➤ 其他藥理作用

Plant part	Activity test	Type extract	Test model	Ref
Entire plant	Diuretic effect	Fraction: scoparinol	Animal (in vivo)	20
Entire plant	Toxicity assessment	ETOH:H <sub>2</sub> O 1:1	IP mice	47
Entire plant	Spasmogenic	ETOH(95%)	Rat	48
Entire plant	Binding effect	ETOH(80%)	Rat	49



## 第三章 材料與方法

### 第一節 實驗材料、試藥與儀器

#### 一、外部形態鑑定部分

##### 1. 植物採集

本實驗採集新鮮野甘草，標本存放在台中市國立自然科學博物館

(TNM)，採集記錄如表5所示：

表5：採集地點、時間、經緯度、採集編號

採集時間	採集地點	經緯度	採集編號
2004.12.30	台中縣沙鹿	120° 33' 51" E 24° 12' 50" N	TNM C. Y. Lee 185
2005.3.18	中國醫藥大學 前柳川河堤	120° 33' 43.8" E 24° 13' 27.3" N	
2005.11.24	台中縣沙鹿鎮 北勢里福至路	120° 33' 43.8" E 24° 12' 50" N	

##### 2. 實驗材料

- (1) 植物體
- (2) 花
- (3) 果皮、種子
- (4) 花粉粒

##### 3. 實驗試劑

- (1) Acetolysis 所需試藥

- ①. 10% HCl

- ②. 10% KOH
- ③. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (concentrated)
- ④. Acetolysis solution: 是由 10 ml 的 sulphuric acid 和 90 ml 的 acetic anhydride 混合而成
- ⑤. Hydrofluoric acid
- ⑥. 95% Ethanol

#### 4. 儀器

- (1) 顯微鏡            Olympus
- (2) 數位相機        Nikon 4500
- (3) 鍍金機            JFC-1100E, 日本 Jeol
- (4) 電子式掃描顯微鏡 JSM-5400, 日本 Jeol
- (5) Acetolysis 所需器材
  - ①. 離心管
  - ②. 水浴鍋
  - ③. 10 ml 和 100 ml 量筒
  - ④. 攪拌棒

## 二、植物組織切片部分

### 1、實驗試劑：

- (1) Chloral hydrate solution
- (2) Glycerin : water (1 : 1)
- (3) Glycerin : alcohol : water (1 : 1 : 1)
- (4) Phloroglucinol solution
- (5) Potassium chlorate
- (6) Iodine test solution
- (7) Hydrochloric acid (12 N)

(8) Potassium hydroxide (50 %)

(9) Safranine

(10) SudanIII solution

## 2、儀器：

(1) 顯微鏡 (OPTIMA G303) 及照相設備

(2) 立體顯微鏡 (OPTIMA ZM160AT) 及照相設備

(3) 顯微測微計 (Erma 0.01 mm Micrometer)

(4) 照相機 (Nikon COOLPIX 5900) 電腦及其周邊設備與相關軟體

## 三、成分分離部份

### 1、實驗試劑

(1) 正己烷、氯仿、乙酸乙酯、甲醇、丙酮等溶媒(以上購自 Merck)。

(2) 測核磁共振(NMR)光譜所用之溶媒  $\text{CDCl}_3$  (Deuterium chloroform)、  
MeOD (Deuterium methanol)、DMSO (dimethyl- sulfoxide)等  
均為光譜級(以上購自 Merck)。

(3) 顯色劑：10 % Sulfuric acid spray reagent。

### 2. 薄層層析(Thin Layer Chromatography)

TLC plate : Kieselgel 60 F<sub>254</sub> silica gel pre-coated aluminium plate ,  
厚度 2 mm (Merck)。

### 3. 管柱色層層析(Column Chromatography)

以 Pyrex 或 Merck 公司生產之不同型號管柱

填充物質：Kieselgel 60 70~230 mesh (Merck) ,

Sephadex LH-20

## 2、儀器：

(1) 迴轉式濃縮機：EYELA, 日本

(2) 烘箱：MEMMERT

- (3) 電子天平：SHIMADZU LIBROR AEG-120
- (4) 電熱板：CORONING MODEL PC-320。
- (5) 超音波震盪器：Transsonic-TP690，Elma，德國
- (6) 玻璃展開槽：120 mm x 150 mm 及 220 mm x 70mm
- (7) 紫外線燈（波長 254nm 及 366nm）：CAMAG UV-CABINET
- (8) 微量熔點測定器

Electrothermal's Series IA 9100 and IA9200 Digital Melting point，測定範圍 50.00~500.0°C 之間，其溫度未經校正。

- (9) 紅外線分光光譜儀 (Infared Spectrophotometer)

使用 Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrophotometer 測定，固體以乾的 KBr 粉末混合均勻，在真空下加壓成透明薄片測定之，光譜單位為波數( $\text{cm}^{-1}$ )(中國醫藥大學)。

- (10) 質譜儀(MS) JOEL JMS-SX/SX 102A Tandem Mass Spectrometer (中興大學)。
- (11) 核磁共振光譜儀 Bruker DPX-200 FT-NMR (中國醫藥大學)。

Internal standard 為 Tetramethy Silane (TMS)，化學位移(Chemical shift)以  $\delta$  表示，單位 ppm，以 J 表示偶合常數(coupling constant)，單位 Hz 峰線訊號以“s”表示單峰(singlet)，“d”表示雙重峰(doublet)，“t”表示三重峰(triplet)，“q”表示四重峰，“m”表示多重峰(multiplet)。

#### 四、Luteolin 定量部分 (液相層析部分)

##### 1、實驗試劑：

- (1) Luteolin：日本和光純藥工業株式會社 (Wako)
- (2) 內部標準品 (I.S.)：piroxicam
- (3) 丙腈 (acetonitril)：德國 Merck 公司
- (4) 磷酸 (phosphoric acid)：德國 Merck 公司

(5) 水 (water) : Milli Q system

(6) 其他試劑 : 分析試藥級或 HPLC 級

## 2、材料：

(1) 分離管：Rp-18，德國 Merck 公司 LiChroCART 250-4 Purospher® STAR

(2) 0.22 μm 濾膜：minipore PVDF 25 mm

(3) 流速 1 ml/min.

(4) 檢測條件：UV 350 nm

(5) 注射量：20 μl

(6) 溫度：室溫 (25 °C)

## 3、儀器：

(1) 純水製造機 (Water purification equipment) : Milli Q system  
Milli-Q-Academic, Minipore, 美國

(2) 高效液相層析儀 (High-performance Liquid Chromatography ;  
HPLC) :

本裝置由下列組成：

①. 液相層析溶劑輸送系統 (Solvent Delivery Pump) : L-7100

②. 紫外光可見光檢測器 (UV-Visible Detector) : L-7400

③. 二極體列陣檢測器 (Diode Array Detector) : L-7455

④. 自動注射器 (Auto-sampler) : L-7200

⑤. 除氣系統 (Degas) : DG-2410

(3) 酸鹼度計 (pH meter) : Model 6071, Jenco, 台灣

(4) 水壓抽氣機 (Aspirator) : Aspirator A-3S, Eyla, 日本

(5) 電子分析天平 : CP 224S, Sartorius, 德國

(6) 超音波震盪器 (Ultrasonic) : Transsonic-TP690, Elma, 德國

(7) 抽氣過濾器 : EYELA Aspirator A-3S

(8) 觸動式震盪器 (Minishaker) : MS1, IKA® Works (Asia), 馬來西

亞

(9) 高速離心機：Hettich Zentrifugen D-7200，Tuttligen，德國

(10) 可調式定量吸管：Pipetman 20、100、200、1000  $\mu$ l，GILSON，

美國

## 五、PCR 部分

### 1、實驗試劑：

(1) Liquid nitrogen

(2) 20% SDS

(3) Extraction buffer，EB

100 mM Tris-HCl pH=8.0，50 mM EDTA-Na pH=8.0

500 mM NaCl，10 mM beta-mercaptoethanol

(4) K-solution：galatic acetic acid 11.5 ml

5M potassium acetate 60.0 ml

Milli-Q 28.5 ml

(5) Phenol

(6) Isopropanol

(7) Chloroform: isoamylalcohol=24:1

(8) TE buffer (Buffer B, TE=5: 1)

(9) Ammonium acetate(7.5M)

(10) Absolute EtOH

(11) RNase A (10 mg/ml; Sigma)

(12) Template DNA

(13) Primers : 18D (5'-CACACCGCCCGTCGCTCCTACCGA-3')

28CC (5'-ACTCGCCGTTACTAGGTGAA-3')

(14) 10X buffer (Promega, Madison, USA)

- (15) MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- (16) Taq polymerase (Promega, Madison, USA)
- (17) dNTPs (2mM stock)
- (18) Markers Lambda/HindIII (Invitrogen/Life Technologies)
- (19) Ethidium bromide solution 10 mg/ml
- (20) 15X loading Dyes50X
- (21) TBE [5X stock solution(1liter):  
54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20 ml 0.5 M, EDTA, pH 8.0]
- (22) Sterile ddH<sub>2</sub>O
- (23) Agarose (powder)

## 2、儀器：

- (1) 離心管
- (2) 微量離心管(microfuge tube)
- (3) 瑪瑙研鉢
- (4) 水浴鍋
- (5) PCR 反應器：GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER)
- (6) 膠體電泳槽及電源：APELEX PS-305
- (7) UV trans-illuminator and camera system：KODAK EDAS 290
- (8) 微波爐
- (9) 計時器
- (10) 固定式/可調式微量吸管：RAININ 美國

## 第二節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的形態鑑定

### 一、植物外觀

利用外觀鑑別並以數位相機拍攝。

### 二、花

從植物體上取下花後，1 小時之內以 20 倍 Olympus 顯微鏡觀察，以數位照相機拍攝。

### 三、果皮、種子

(1) 風乾後以顯微鏡觀察之

(2) 以鍍金機真空鍍金後以電子顯微鏡觀察之

### 四、花粉粒

#### (1) 取花粉粒

取花粉粒須先經由 acetolysis (Erdtman 1952)<sup>50</sup> 步驟處理。

Acetolysis 步驟：

1. 將經過乾燥處理之樣品放入試管
2. 加入 10% HCl (去除 carbonates)
3. 以蒸餾水稀釋 (distilled water)
4. 離心後除去上清液
5. 重複 3, 4 步驟兩次
6. 加入 10% KOH (去除一些有機物)
7. 以蒸餾水稀釋
8. 離心後除去上清液
9. 重複 7, 8 步驟兩次。
10. 加入冰醋酸
11. 離心後除去上清液 (如果有明顯的雜質則重複步驟 2~11)
12. 加入 acetolysis solution (去除有機雜質，製備花粉粒)
13. 水浴 15 min



14. 從水浴鍋拿出，靜置至室溫
15. 以蒸餾水稀釋
16. 離心後除去上清液
17. 至無色（如仍有顏色則重複步驟 15-16）
18. 加入 95% alcohol
19. 離心後除去上清液
20. 加入 95% alcohol

(2) 電子顯微鏡觀察：

置備好的花粉粒，先置於 95% alcohol 中，以滴管吸取滴於載波片上，乾掉後標號置於玻片保存盒中，使用時，剪取鍍碳膠帶合適大小，黏貼於銅座上，然後在載玻片上稍微黏取，得到花粉粒，之後將銅座置於鍍金機鍍金（電流 10 mA 1 min\*2），以掃描式電子顯微鏡觀察之。

### 第三節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的生藥組織學研究

#### 一、生藥組織鑑別：

- (1) 將採集之臺灣產野甘草之莖及葉，利用徒手切片法進行  
橫切 (transverse section, X.S.)  
徑縱切 (radial longitudinal section, R.L.S.)  
弦縱切 (tangential longitudinal section, T.L.S.)
- (2) 置檢體於載玻片上，先以 chloral hydrate solution 清除細胞內容物後，再滴加各種不同化學染劑。內部組織構造之記載及說明，以橫切面為主。

特殊組織之觀察以下列方法處理之：

- ①. phloroglucinol solution 與 hydrochloric acid 進行木化反應。
- ②. 以 sudanⅢ 染色，再以 glycerin:alc:water (1:1:1) 混合溶液清洗之，觀察木栓化反應。
- ③. 利用 Schultze's 與 KOH maceration method 將材料予以加熱解離，最後以 glycerin:water (1:1)，當做封鎖劑，觀察其細胞解離情形。

#### 二、顯微鏡觀察

先用低倍鏡頭檢查檢品之弱擴大圖，再用高倍鏡觀察內部組織之特徵，使用顯微測微計測量各組織或其細胞大小。並利用顯微鏡之照相設備，將鑑別所需組織照相以供鑑定之用。

## 第四節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的成分分離

### 一、萃取與分離

取野甘草已陰乾之全草 1.8 kg，以甲醇萃取取得粗抽液，經過濾、合併、減壓濃縮即得野甘草甲醇萃取物約 140 g，抽出率約 7.78 %。再將此甲醇總抽出物依植物化學之方法，加入蒸餾水形成懸浮液。再以正己烷分配 (partition) 分離，正己烷層合併減壓濃縮至乾後得正己烷層 (Fr.H) 共 26 公克，同上法氯仿層 (Fr.C) 為 17 公克，乙酸乙酯層 (Fr.E) 為 7 公克，最後剩餘水層 (Fr.W) 為 88 公克。

利用管柱色層層析法 (Column Chromatography)，以 Silica gel (70 至 230 mesh) 充填在玻璃管柱內為固定相，以不同濃度梯度沖提，並利用再結晶法純化所得之化合物。結果分離得到下列化合物：

目前由正己烷層及氯仿層分離出之成分如下列：

(1) 正己烷層分離出之成分有：

H-1 : Glutinoside

H-2 : Friedelin

(2) 氯仿層分離出之成分有：

C-3 : Betulinic acid

C-4 : 6-Methoxybenzoxazolinone

## 二、實驗流程圖

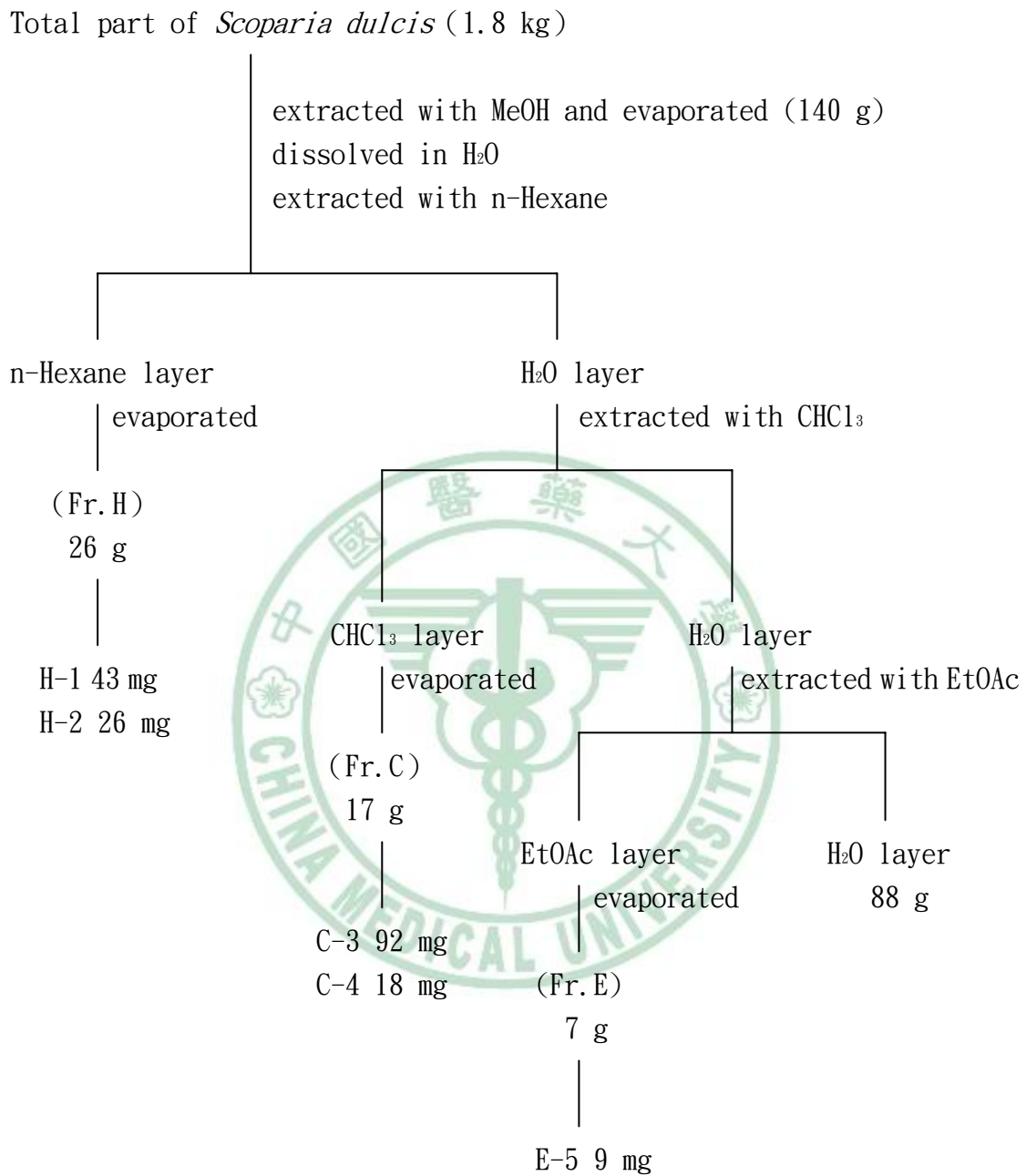


圖 7：野甘草全草之抽提流程圖

### 三、圖譜鑑定

#### (1) H-1 : Glutinol

1. 白色針狀結晶 (n-Hexane-CHCl<sub>3</sub>)

2. m. p. : 212~214 °C

3. TLC : R<sub>f</sub> =0.44 (n-Hexane : EtOAc=4 : 1)

4. IR  $\nu_{\max}^{KBr}$  (cm<sup>-1</sup>) (附圖 1) :

3455 , 2928 , 2360 , 1466 , 1384 , 1036

5. EI-MS (70eV) m/z (%) (附圖 2) :

426(M <sup>+</sup> , 3)	408(2)	274(83)	259(81)
205(24)	173(21)	152(34)	134(73)
109(64)	95(91)	81(69)	69(100)
55(85)			

6. <sup>1</sup>H-NMR (in CDCl<sub>3</sub>, 200MHZ) ppm (附圖 3) :

0.92 (6H, s)

1.15, 1.16, 1.28, 1.31, 1.38, 1.40 (each 3H, s)

3.68 (1H, m)

4.20 (2H, m)

5.60 (1H, d)

7. <sup>13</sup>C-NMR (in CDCl<sub>3</sub>, 50MHZ) ppm (附圖 4) :

141.5 (C-5)      122.0 (C-6)      76.3 (C-3)      49.6 (C-10)

47.4 (C-8)      43.0 (C-18)      40.8 (C-4)      39.3 (C-14)

38.9 (C-22)      37.8 (C-13)      35.9 (C-19)      35.0 (C-16)

34.8 (C-9)      34.6 (C-15)      34.6 (C-30)      33.1 (C-11)

32.4 (C-28)      32.0 (C-21)      32.0 (C-29)      30.3 (C-12)

30.1 (C-17)      28.9 (C-23)      28.3 (C-20)      27.8 (C-2)

25.4 (C-24)      23.6 (C-7)      19.6 (C-27)      18.4 (C-26)

18.2 (C-1)      16.2 (C-25)

8. DEPT ( $\pi/4$ ,  $2\pi$ ,  $3\pi/4$ )  $\delta$   $\delta$  (附圖 5) :

CH<sub>3</sub> : 16.1, 18.3, 19.6, 25.4, 28.9, 32.0, 32.3, 34.4

CH<sub>2</sub> : 18.1, 23.5, 27.7, 30.3, 32.0, 33.0, 34.5, 35.0, 35.9, 38.9

CH : 43.0, 47.3, 49.6, 76.2, 122.0

(2) H-2 : Friedelin

1. 針狀結晶 (n-Hexane-CHCl<sub>3</sub>)

2. m. p. : 261~264 °C

3. TLC : R<sub>f</sub>=0.6 (n-Hexane : CHCl<sub>3</sub>=2:1)

4. IR  $\nu_{\max}^{KBr}$  (cm<sup>-1</sup>) (附圖 6) :

2863, 1714 (C=O), 1458, 1388

5. EI-MS (70eV) m/z (%) (附圖 7) :

426(M <sup>+</sup> , 8)	411(3)	341(2)	302(7)
273(14)	246(11)	218(12)	205(14)
191(10)	179(14)	163(19)	149(13)
123(56)	109(61)	95(72)	81(62)
69(100)	55(80)		

6. <sup>1</sup>H-NMR (in CDCl<sub>3</sub>, 200MHZ) ppm (附圖 8) :

0.72 (3H, s, H-24)

0.86 (3H, s, H-25)

0.89 (3H, d, J=6.6Hz H-23)

0.95 (3H, s, H-29)

1.00 (6H, s, H-26, 30)

1.05 (3H, s, H-27)

1.18 (3H, s, H-28)

7.  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{CDCl}_3$ , 50MHZ) ppm (附圖 9) :

213.1 (C-3)      59.2 (C-10)      57.9 (C-4)      52.8 (C-8)

42.8 (C-18)      42.5 (C-5)      41.3 (C-2)      41.0 (C-6)

39.2 (C-13)      39.0 (C-22)      38.3 (C-14)      37.4 (C-9)

36.0 (C-16)      35.4 (C-11)      35.1 (C-19)      34.8 (C-30)

32.8 (C-15)      32.5 (C-21)      32.1 (C-28)      31.8 (C-29)

30.5 (C-12)      29.9 (C-17)      28.2 (C-20)      22.1 (C-1)

20.3 (C-26)      18.4 (C-27)      17.9 (C-7)      17.7 (C-25)

14.4 (C-24)      6.6 (C-23)

8. DEPT ( $\pi/4$ ,  $2\pi$ ,  $3\pi/4$ )  $\delta$  (附圖 10) :

$\text{CH}_3$  : 6.7, 14.6, 17.9, 18.6, 20.2, 31.7, 32.0, 34.9

$\text{CH}_2$  : 18.2, 22.2, 30.4, 32.3, 32.7, 35.3, 35.5, 35.9, 39.2,  
41.2, 41.4

$\text{CH}$  : 42.7, 53.0, 58.1, 59.4

(3) C-3 : Betulinic acid

1. 無色結晶 ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH)

2. m. p. : 283~285°C

3. TLC :  $R_f$  = 0.53 ( $\text{CHCl}_3$  : EtOAc=4 : 1)

4. IR  $V_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) (附圖 11) :

3445 , 2935 , 2862 , 1680 , 1635 , 1451

5. EI-MS (70eV) m/z (%) (附圖 12) :

456(M <sup>+</sup> , 1)	438(1)	248(12)	234(8)
220(14)	207(36)	189(67)	175(21)
135(20)	105(27)	95(46)	81(73)
69(81)	55(100)		

6. <sup>1</sup>H-NMR (in CDCl<sub>3</sub>, 400MHZ) ppm (附圖 13) :

0.83、0.94、0.97、0.98、1.27 ( 3H each, s, 5×CH<sub>3</sub> )

1.98 (3H, s)

3.49 (1H, m, J=15.8, 7.44 Hz, H-3α)

4.61 (1H, br. s)

4.74 (1H, br. s)

7. <sup>13</sup>C-NMR (in CDCl<sub>3</sub>, 100MHZ) ppm (附圖 14) :

180.0 (C-28)	150.4 (C-20)	109.7 (C-29)	79.0 (C-3)
56.3 (C-17)	55.4 (C-5)	50.3 (C-9)	49.3 (C-19)
46.9 (C-18)	42.5 (C-14)	40.7 (C-8)	38.9 (C-4)
38.7 (C-1)	38.4 (C-13)	37.2 (C-22)	37.0 (C-10)
34.4 (C-7)	32.2 (C-16)	30.6 (C-15)	29.7 (C-21)
28.0 (C-23)	27.5 (C-2)	25.5 (C-12)	20.9 (C-11)
19.4 (C-30)	18.3 (C-6)	16.1 (C-26)	16.0 (C-25)
15.4 (C-24)	14.7 (C-27)		

8. DEPT (π/4, 2π, 3π/4) δ (附圖 15) :

CH<sub>3</sub> : 14.7, 15.4, 16.0, 16.1, 19.4, 28.0

CH<sub>2</sub> : 18.3, 20.9, 25.5, 27.5, 29.7, 30.6, 32.2, 34.4, 37.2, 38.7,



109.7

CH : 38.4, 46.9, 49.3, 50.3, 55.4, 79.0

(4) C-4 : Coixol(6-Methoxybenzoxazolinone)

1. 無色結晶 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH)

2. m. p. : 144~147 °C

3. TLC : R<sub>f</sub> = 0.48 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc = 4 : 1)

4. IR  $V_{\max}^{KBr}$  (cm<sup>-1</sup>) (附圖 16) :

3748, 2923, 2868, 2360, 2340, 1714(C=O), 1458, 1388

5. EI-MS (70eV) m/z (%) (附圖 17) :

165(M <sup>+</sup> , 100)	150(57)	136(6)	122(15)	109(20)
106(39)	94(5)	80(21)	79(19)	69(12)
52(28)				

6. <sup>1</sup>H-NMR (in DMSO, 200MHZ) ppm (附圖 18) :

3.71 (3H, s)

6.67 (dd, J<sub>1</sub> = 9, J<sub>2</sub> = 3 Hz),

6.94(d, J = 3 Hz)

6.98 (d, J = 9 Hz)

7. <sup>13</sup>C-NMR (in DMSO, 50MHZ) ppm (附圖 19) :

155.4 (C-6)    154.9 (C-2)    144.2 (C-9)    123.8 (C-8)

110.1 (C-4)    109.3 (C-5)    97.2 (C-7)    55.9 (C-12)

8. DEPT (π/4, 2π, 3π/4) δ (附圖 20) :

CH<sub>3</sub> : 56.1

CH : 97.4, 109.5, 110.2

(5) E-5 : Luteolin

1. 黃色粉末
2. m. p. : 326~329 °C
3. TLC :  $R_f = 0.41$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 4 : 1$ )
4. IR  $V_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) (附圖 21) :  
3836 , 3751 , 3661 , 2360 , 2336 , 1716(C=O) , 1698 , 1649 , 1507
5.  $^1\text{H-NMR}$  (in DMSO , 200MHZ) ppm (附圖 22) :  
6.18 (1H, d, H-6)  
6.43 (1H, d, H-8)  
6.65 (1H, s, H-3)  
6.87 (1H, d, H-5')  
7.38 (1H, d, H-2')  
7.41 (2H, m, H-6')
6.  $^{13}\text{C-NMR}$  (in DMSO , 50MHZ) ppm (附圖 23) :

182.5 (C-4)	165.0 (C-7)	164.8 (C-2)	162.3 (C-5)
158.1 (C-9)	150.5 (C-4')	146.6 (C-3')	122.4 (C-1')
119.8 (C-6')	116.9 (C-5')	114.2 (C-2')	104.6 (C-10)
103.7 (C-3)	99.7 (C-6)	94.7 (C-8)	

## 第五節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物中木犀草素(luteolin)的定量

### 1、Luteolin 抽提方法：

取野甘草植物的粉末 1 g，以 10 ml methanol 超音波震盪加熱 50 °C 20 分鐘，提取 3 次，靜置至室溫，以融 g 玻璃漏斗過濾，合併三次濾液，濃縮至乾，加入 5 ml methanol 至全溶，以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾後進樣 HPLC。

### 2、移動相條件：

移動相以 acetonitril 與 0.05% phosphoric acid 做比例不同之梯度變化，其變化如表 6，所得的圖如圖 8：

表 6：移動相條件

時間 ( min )	Acetonitril ( % )	0.05% phosphoric acid ( % )
0	22	78
36	28	72
40	28	72

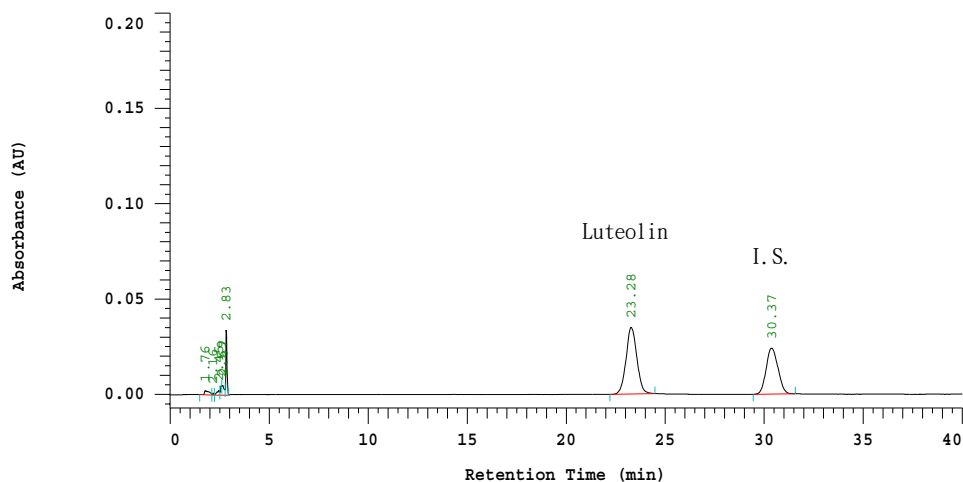


圖 8：HPLC 中標準品(luteolin)與內部標準品(piroxicam)位置  
250 mm x 4 mm I.D. Rp-18

### 3、穩定性測試：

將 0.00145 g 的 luteolin ( $14.5 \mu\text{g/ml}$ ) 溶於 100 ml 的 methanol 中，取 0.9 ml luteolin 加入 0.1 ml 內標 (luteolin 濃度成為  $13.05 \mu\text{g/ml}$ )，每二小時進樣一次，連續二十四小時(表 7)

表 7：24 小時內穩定性測試.

Time (Hr)	GA peak area	IS peak area	GA/IS
0	377041	496683	0.759118
2	379786	499173	0.76083
4	378897	498036	0.760782
6	374059	498036	0.751068
8	374950	490076	0.765085
10	374392	490303	0.763593
12	374914	489587	0.765776
14	374859	489203	0.766265
16	374292	490475	0.763121
18	376155	491021	0.766067
20	376412	493237	0.763146
22	377850	493273	0.766006
Average	376133.9167	493258.5833	0.762572
S. D.	1827.232354	3581.232945	0.004147
R. S. D. (%)	0.485793031	0.726035606	0.543861

### 4、luteolin 的回收率試驗：

先取 0.0022 g 的 luteolin 溶於 250 ml methanol ( $8.8 \mu\text{g/ml}$ ) (即為 A 溶液)，取野甘草植物的粉末 1 g，以 10 ml A 液超音波震盪加熱  $50^\circ\text{C}$  20 分鐘，提取 3 次，靜置至室溫，以融砂玻璃漏斗過濾，合併三次濾液，濃縮至乾，加入 5 ml methanol 至全溶，以  $0.22 \mu\text{m}$  濾膜過濾。取野甘草

植物的粉末 1 g，以 10 ml methanol 依前述提取方法為 blank。各取 0.9 ml 加入 0.1 ml 的內標 (I.S.) 進樣。

luteolin 標準品與 I.S. 的面積比為 0.545369。實驗的結果，詳見表 8。

表 8：回收率試驗

	GA/I. S. 1	GA/I. S. 2	GA/I. S. 3	Average	Recovery
Blank	0.539585	0.554408	0.54199	0.545369	
<i>S. dulcis</i> 1	1.046395	1.037327	1.072831	1.052184	99.46%
<i>S. dulcis</i> 2	1.036797	1.084424	1.058233	1.059818	100.96%
<i>S. dulcis</i> 3	1.062927	1.079865	1.079295	1.074034	103.74%
R. S. D.					2.15%

#### 5、精密度試驗：

在精密度實驗部分，我們以我們所選擇的移動相，對 luteolin 進行定量，在同一天內對三種不同濃度(高=中=低)連續重複注射三次(intraday)及不同天(一星期內)重複注射三次(interday)，總計每一個濃度的樣品共注射 12 次。分別以 luteolin 和 I.S. (piroxicam) 的吸收面積比及滯留時間來計算相對標準偏差 (R. S. D.)。實驗的結果，詳見表 9，表 10。

表 9：Luteolin 之 intraday 分析

luteolin conc. ( $\mu$ g/ml)	Day	n	Average $\pm$ S. D.	R. S. D. (%)
44.8	1	4	2.706269 $\pm$ 0.004117	0.15
	2	4	2.716211 $\pm$ 0.003352	0.12
	3	4	2.713846 $\pm$ 0.004883	0.18
22.4	1	4	1.310916 $\pm$ 0.00434	0.33
	2	4	1.306398 $\pm$ 0.002692	0.21
	3	4	1.316682 $\pm$ 0.008198	0.62
4.48	1	4	0.245517 $\pm$ 0.001368	0.56
	2	4	0.238086 $\pm$ 0.00275	1.15
	3	4	0.246102 $\pm$ 0.001732	0.70

n: Numbers of injection in one day

表10： Luteolin之Interday分析

luteolin conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Day	n	Average $\pm$ S. D.	R. S. D. (%)
44.8	7	12	2.712109 $\pm$ 0.005814	0.21
22.4	7	12	1.311332 $\pm$ 0.006691	0.51
4.48	7	12	0.243195 $\pm$ 0.004173	1.72

n: Numbers of injection in one week

6、檢量線製作：

將 luteolin 的標準品分別配製濃度為 2.24、4.48、8.96、13.44、17.92、22.4 及 44.8  $\mu\text{g/ml}$ ，分別進樣，以 luteolin 和 I.S. (piroxicam = 20  $\mu\text{g/ml}$ ) 的 HPLC 積分面積比和 luteolin 的濃度作圖，進行直線迴歸，繪成檢量線並得迴歸直線方程式。(圖 9，表 11)

表 11：Luteolin 與 I.S. 經 HPLC 所得之積分面積

Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	luteolin	I. S.	luteolin/I. S.
44.8	1307676	486702	2.686823787
22.4	648810	495400	1.309670579
17.92	526698	505756	1.04139891
13.44	385525	496348	0.776723028
8.96	258305	484963	0.532632725
4.48	126572	482261	0.262455419
2.24	61779	473443	0.130487954

$$Y = 16.671X + 0.2676 \quad R^2 = 0.9997$$

Y=luteolin 濃度    X=luteolin/I.S. 面積比

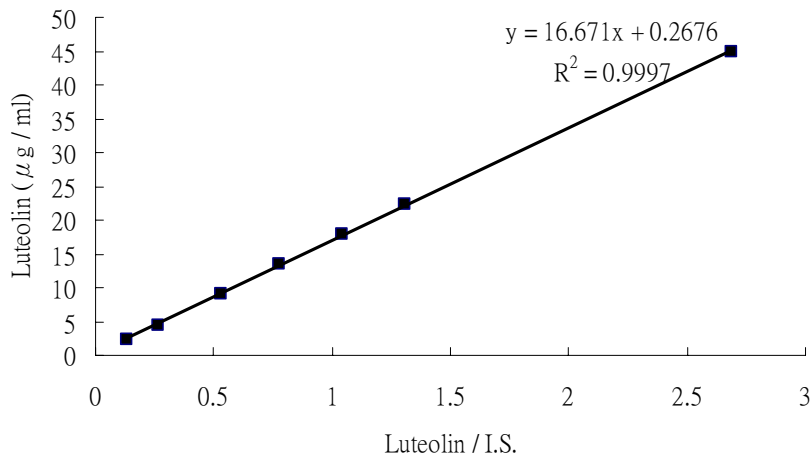


圖 9. Luteolin 標準品之回歸曲線

7、樣品中 luteolin 的含量測定：

取 1 g *S. dulcis* 粉末，以上述方法提取 luteolin，將抽提液與 I.S. (20 μg/ml) 混勻，測得層析圖譜 (圖 10)。樣品中 luteolin 的含量測定依以下三步驟：

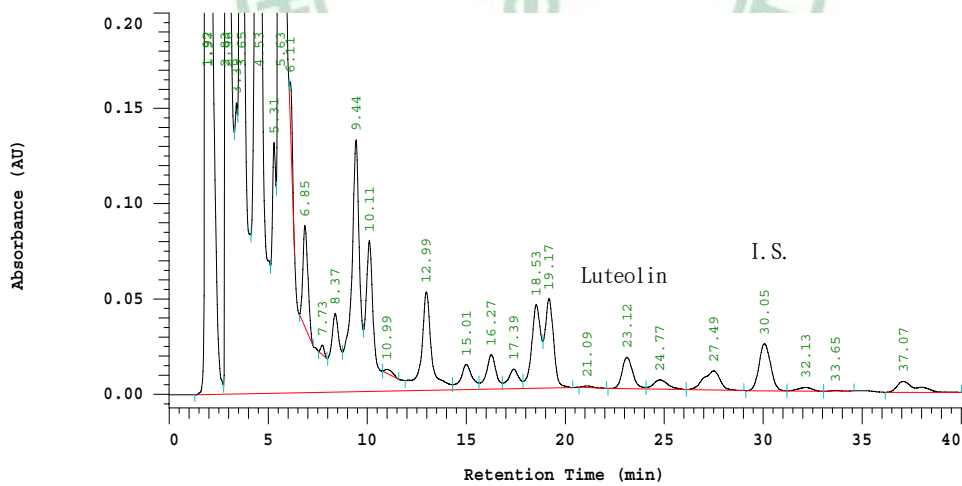


圖 10：野甘草萃取物之 HPLC 分析圖 250 mm x 4 mm I.D. column packed with RP-18

- (1) 由層析圖譜計算 luteolin 與 I.S. 波峰面積的比值。
- (2) 由檢量線獲得 luteolin 與 I.S. 相對波峰面積比值的 luteolin 在樣品中的濃度。

(3) 由 luteolin 在樣品中的濃度，得到樣品中 luteolin 的重量。

由此可換算成 luteolin 在乾燥樣品中的重量百分比。

#### 8、最低濃度的探討：

將 luteolin 稀釋成 10.4, 4.16, 3.12, 2.08, 0.728, 0.624, 0.52, 0.416, 0.312  $\mu\text{g/ml}$  不同濃度，個別進樣 20  $\mu\text{l}$ ，三次。計算 luteolin 波峰面積的 RSD，以做為偵測的最低濃度之依據。RSD 大於 5 % 表示不可信之數據。

#### 9、野甘草中 luteolin 之定量：

- (1) 野甘草植物 luteolin 提取方法之選擇。
- (2) 野甘草植物 luteolin 含量。
- (3) 不同部位的 luteolin 含量。





## 第六節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的指紋圖譜研究

### 一、野甘草植物之層析圖譜

#### 1、野甘草指紋圖譜樣品處理法

考慮仿照luteolin定量所使用的樣品處理方法，來建立指紋圖譜。精密秤取 1 g 的野甘草樣品，以 10 ml methanol 超音波震盪加熱50°C 20分鐘，提取3次，靜置至室溫，以融砂玻璃漏斗過濾，合併三次濾液，濃縮至乾，加入 5 ml methanol 至全溶，以 0.22  $\mu$ m濾膜過濾後進樣 20  $\mu$ l，波長為 350 nm。

#### 2、野甘草指紋peak 的選擇

使用luteolin定量樣品處理方式所得圖譜為圖11，我們選取的10個peak中，標號1的peak為圖譜中最早出現的peak，標號2~7為luteolin peak之前較明顯的6個peak，標號8的成分為luteolin，標號9，10的成分為luteolin peak之後的peak。計算這5個波峰的峰高百分比，繪製成折線圖（圖27），比較各波峰之間的關係。

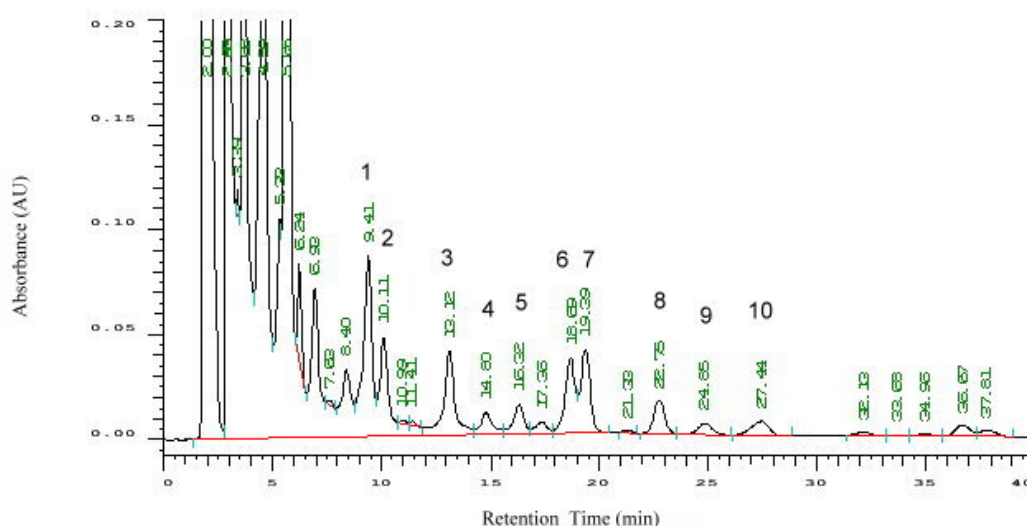


圖11. 野甘草之HPLC層析圖

## 二、野甘草植物 PCR 之研究

### 1、植物材料與 DNA 之抽取

本實驗之材料採集臺灣產野甘草植物新鮮葉子，標本存放在國立自然科學博物館植物標本館(TNM)。實驗所得 DNA 之序列登錄於 The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene bank 中。

葉片組織在液氮中研磨粉碎後貯藏於  $-20^{\circ}\text{C}$  下備用。DNA 之抽取使用 Dellaporta method<sup>51</sup>。

#### (1) 磨碎萃取：

- ①. 取 1~4 g 幼嫩葉於研鉢內，以液態氮研磨成粉末，移置於離心管中。
- ②. 加入 15 ml 之 Extraction buffer 及 1 ml 20 % SDS，強力搖晃 50 次使之混合，接著以  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 10 分鐘。
- ③. 加入 5 ml 之 potassium acetate solution，強力搖晃約 50 次後冰浴 20 分鐘。

#### (2) 異丙醇沉澱：

- ①. 在 12 krpm ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 離心 20 分鐘，取上清液至新離心管，加入 10 ml 之異丙醇在  $-20^{\circ}\text{C}$  下約 5~10 分鐘，使之沉澱。
- ②. 在 12 krpm ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 離心 15 分鐘，去掉上清液，倒立 10 分鐘，呈乾燥凝膠。
- ③. 加入 0.5 ml 之 TE buffer，重新將凝膠溶出呈懸浮液。

#### (3) 酚清洗：

- ①. 將懸浮液倒入收集管，加入等量 (0.5 ml) phenol (pH 8.0) 混勻，在 10 krpm ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 離心 5 分鐘。
- ②. 將上清液倒入新收集管，加入 0.25 ml chloroform (chloroform : isoamylalcohol=24 : 1) 和 0.25 ml phenol 混勻，在 10 krpm ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 離心 5 分鐘。
- ③. 將上清液倒入新收集管，加入 0.5 ml chloroform 混勻，在 10 krpm ( $4^{\circ}\text{C}$ )

下) 離心 5 分鐘。

(4) 酒精沉澱：

- ①. 將上清液倒入新收集管，加入 0.9 ml absolute EtOH 和 0.15 ml ammonium acetate (7.5 M)。
- ②. 將混合液置於 -20 °C 下 30 分鐘加強沉澱作用，在 10 krpm (4 °C 下) 離心 15 分鐘，去掉上清液，倒立 5~10 分鐘。
- ③. 再以 70 % EtOH 清洗，置於室溫下 15 分鐘。

(5) 真空乾燥：

在 10 krpm (4 °C 下) 離心 5 分鐘，去掉上清液，抽氣至完全乾燥。

(6) TE 溶解：

- ①. 加入 TE 緩衝液 (10:1) 0.2 ml 溶解產物。
- ②. 酌量加入 RNase A (10 mg/ml)，分解及處理 RNA。
- ③. 保存於 -20 °C 以供使用。

## 2、聚合酶連鎖反應(PCR)

DNA 通常為雙股，呈相反方向結合。其中一股為 5' (指核苷酸(Nucleotide)分子中五碳糖的第五個碳的方位) → 3'，另一股為 3' → 5'。DNA 係由核苷酸包括：腺嘌呤(adenine)(A)、鳥糞嘌呤(guanosine)(G)與胞嘧啶(cytosine)(C)及胸腺嘧啶(thymine)(T)所組成。且在配對氫鍵結合時均為 A 對 T，G 對 C。

選取特定引子 18D 和 28CC，利用 PCR 複製核糖體核酸基因間隔區(ITS)，這組 ITS1-5.8S-ITS2 引子序列是：

18D (5' - CACACCGCCCGTCGCTCCTACCGA-3' ) 和

28CC (5' -ACTCGCCGTTACTAGGTGAA-3' )

PCR 複製核糖體核酸基因間隔區的反應物及濃度如下：在 0.6 ml 的微量離心管內加入 10 µl of 10 X reaction buffer，10 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)，2 µl dNTP

mix (8 mM), 25 uM 的 18D 和 28CC 引子各 4  $\mu$ l, 和 10 U of Taq polymerase, 最後加入 4 ul 的範本 DNA, 加無菌水使總體積成 100 ul, 將微量離心管置入熱循環器。反應的熱循環溫度及時間如下, 先以 94  $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘, 然後 94  $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘, 60  $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘, 72  $^{\circ}$ C 反應 1 分 30 秒的三個步驟進行 40 個循環, 最後 72  $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘後, 將 PCR 複製產物維持在 4  $^{\circ}$ C 下備用。

### 3、電泳分析

將 PCR 複製產物進行電泳分析, 操作步驟如下:

- (1) 取 0.6 g 瓊膠加入 40 ml 0.5 X TBE 緩衝液中。
- (2) 在微波爐中加熱 2 分鐘。
- (3) 迅速加入 2 ul ethidium bromide (7.5 mg/ml), 小心振搖, 倒入膠盤。
- (4) 瓊膠在 10~15 分鐘內凝結。
- (5) 加 Marker 5 ul (事先加入 2 ul dye)。
- (6) 加 PCR 複製產物 5 ul (事先加入 2 ul dye)。
- (7) 在 50 V/100 V 電泳槽內進行電泳分離, 約 30 分鐘。
- (8) 以紫外燈箱上觀察, 並拍照電腦存檔, 以便作為判讀與分析之依據。

### 4、定序

在 UV 燈下觀察, 以確定其 PCR 擴增長度正確, 於 700~900 bps 下得一清晰環帶, 再將之交給源資國際生物科技股份有限公司定序(附圖 24)。

## 第四章 實驗結果與討論

### 第一節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的形態鑑定

#### 一、 外觀形態鑑定

根據前述，台灣產 *Scoparia* 屬植物只有一種，即是野甘草(*Scoparia dulcis*)，在台灣又稱為甜珠草或珠子草，在採集時，有許多特徵可以幫助我們正確辨認此植物。



圖 12：野甘草之各部形態圖 1. 野外生長圖；2. 局部圖；3. 莖部放大圖；4. 根部放大圖

據文獻記載<sup>10</sup>，野甘草為直立草本，莖三稜，葉三枚輪生，長橢圓卵形至橢圓形，鋸齒緣至牙齒緣。在本研究中，如圖 12-1，12-2 所示，可以看出野甘草

全株佈滿如珠子狀的果實，莖為直立，具有很多枝節，越往上莖越細，葉也越小。由圖 12-3 可以看出莖的部份具有稜角，全株光滑無毛。葉的部分由圖 13-1, 13-2 可看出為三葉輪生，形狀為橢圓形或卵形，邊緣為鋸齒狀，長 2~5 cm，寬 0.5~1 cm，葉面無毛，葉的先端短尖，基部漸狹而成一短柄，葉柄長約 2~8 mm，此部分與文獻所記載均相符合。另外，仔細觀察葉柄與莖的交接處(圖 13-2 箭頭處)，發現並沒有托葉，葉脈的部份，由圖 13 可以看出野甘草的葉脈主要為羽形的網狀葉脈。



圖 13：野甘草葉部放大圖 1. 葉的生長方式；2. 葉部形狀

## 二、 花的形態鑑定

在花的部份，通常我們在野外採集植物時，花的形態對於分辨野甘草植物時是有很大的幫助。以顯微鏡 20 倍放大後所拍攝的圖，可以看出一些野甘草植物的特徵。

由圖 14-1 可以看出野甘草的萌發的方式主要是由葉腋萌發，花的體積很小，直徑約只有 3~5 mm 長；由圖 14-2 可以看出花冠有四裂，呈輻射狀排列，喉部具有白色明顯且濃密的毛，這是在辨認此植物時，非常明顯的特徵；另外花冠的顏色，據 Flora of Taiwan<sup>2</sup> 的描述為淡紫色，但其他的文獻<sup>(1, 7-9, 10, 11)</sup> 所描述均為白色，而本研究所看到的花冠亦為白色(圖 14-2)。雄蕊的部分，由圖可看

出雄蕊有 4 枚，環繞著雌蕊排列，約略等長，花柱的部份較為細長，花藥則呈現箭頭形。

圖 14-3，14-4 為雌蕊與萼片部份的特徵圖，由圖中可以看出野甘草的雌蕊 1 枚，柱頭呈盤狀，頂端為黃綠色，子房上位。萼片(圖 14-3)有四枚，形狀呈現卵狀到長橢圓形，邊緣具有細毛，約 2~3mm 長。

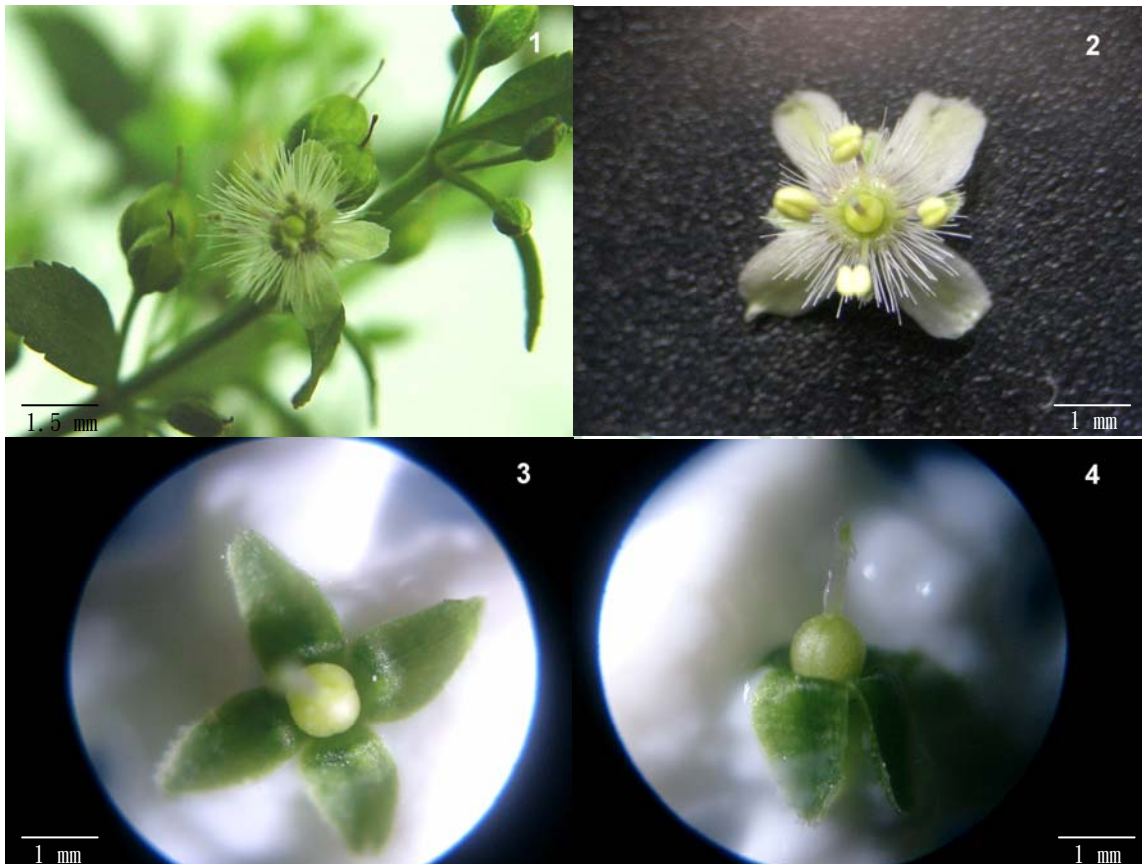


圖 14：野甘草花的放大圖 1. 花的生長形態；2. 花的顯微鏡觀察圖；3. 花萼與雄蕊頂面觀；4. 花萼與雄蕊側面觀

### 三、 果的形態鑑定

據文獻<sup>(2,10)</sup>所載，台灣產野甘草植物的果實為蒴果，卵形或球形，成熟之後呈現黃褐至深褐色，室間室背均開裂，花柱宿存，熟後裂開，中軸胎座。在本研究中，如圖 15-1，15-2 所示，未成熟的果實為黃綠色~綠色，

成熟的果實則呈現黃褐至深褐色，其果肉為深褐~黑褐色(圖 15-3)，果皮則呈黃褐~深褐色(圖 15-4)，直徑約為 2~5 mm；另外，比較圖 15-1，15-2 即可看出果實成熟後會裂開，裂開後果皮裂成四裂，裂口由下而上，使種子釋放出來，此部分與上述文獻所描述均相符。

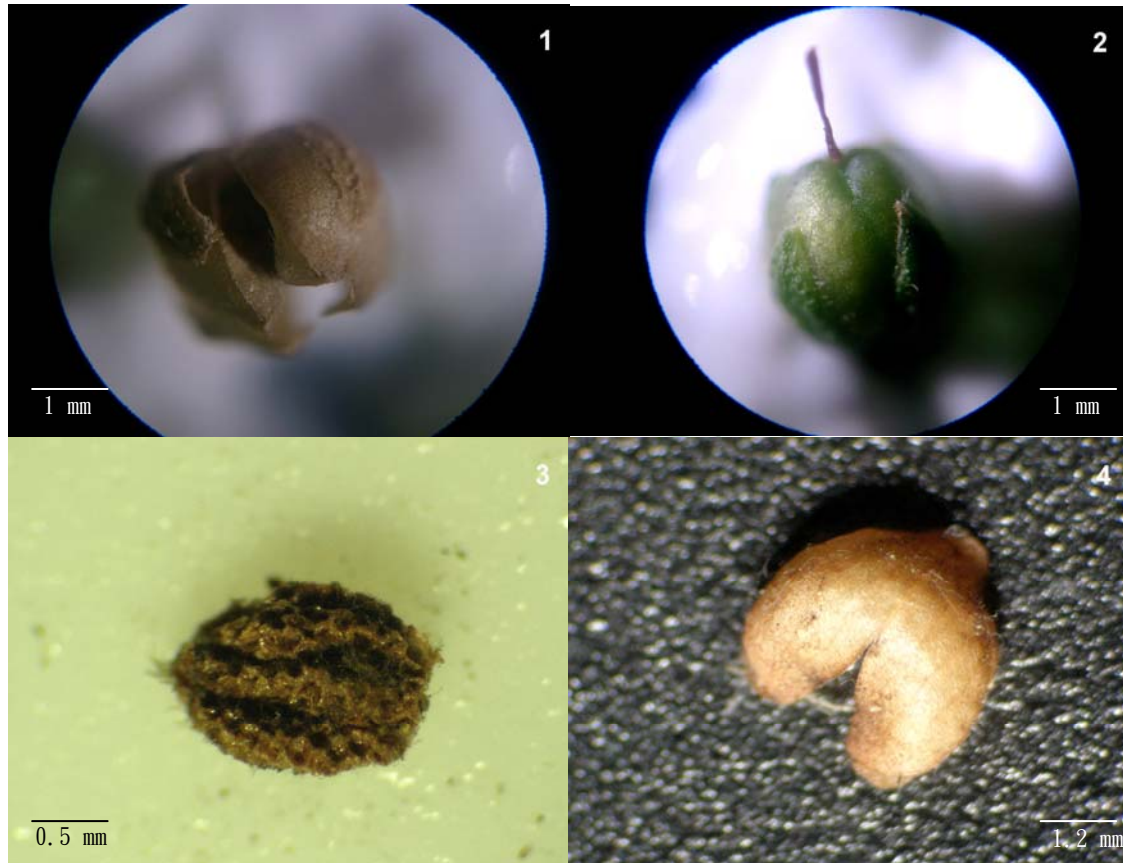


圖 15：野甘草果的形態圖 1. 成熟的果；2. 未成熟的果；3. 除去果皮部份；4. 果皮

本研究亦將野甘草的乾燥果皮經由鍍金處理，再以掃描式電子顯微鏡觀察其內外側，由圖 16-1，16-2 可以發現，果皮的外側部分較為粗糙，局部放大之後可看出外側具有網狀紋，紋路表面並非光滑，而是具有許多微小皺褶。而在果皮內側(圖 16-3，16-4)表面也有微小皺褶，但是並沒有網狀紋，這是與果皮外側最明顯的差距。



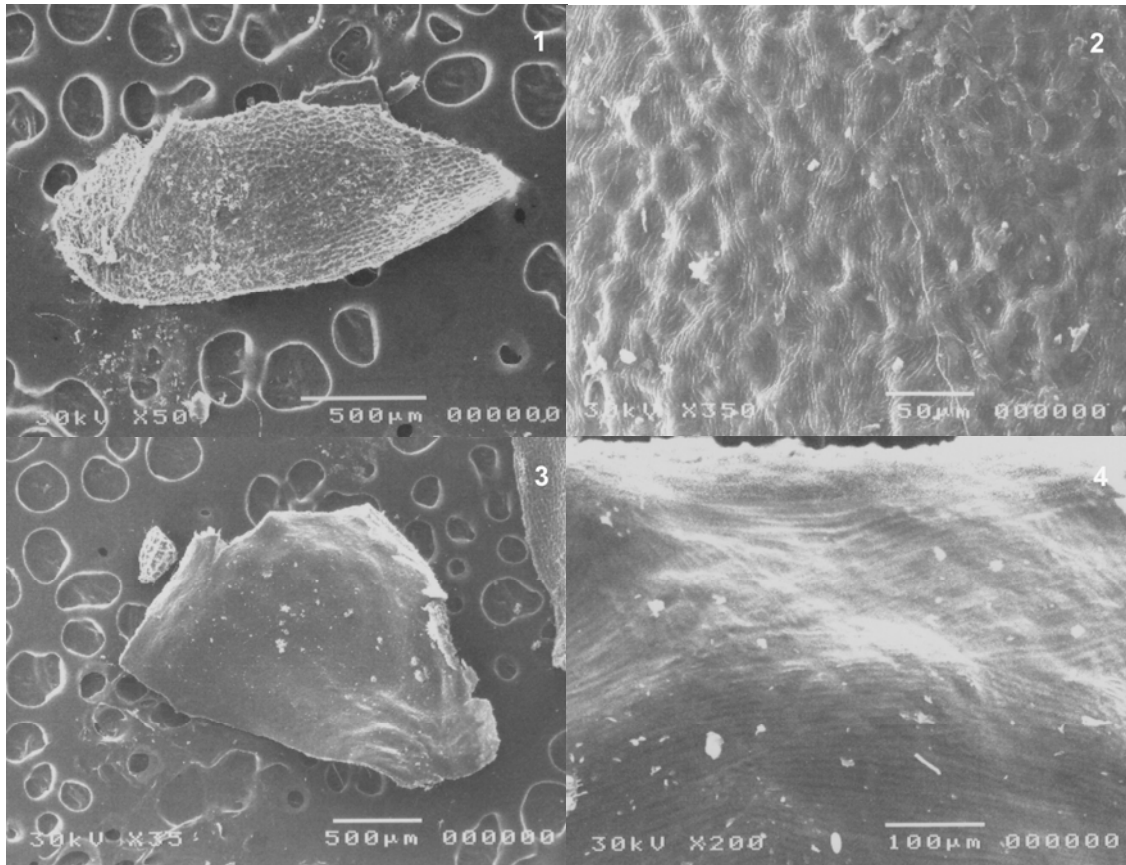


圖 16：野甘草果皮電子顯微鏡觀察圖 1. 果皮外側；2. 果皮外側放大圖；3. 果皮內側；4. 果皮內側放大圖

#### 四、 花粉的形態鑑定

根據黃增泉等對於台灣產野甘草的花粉描述如下<sup>52</sup>(圖 17)：

Pollen class：3-溝孔粒(3-colporate) (圖 17-1)

Shape：

(1) 赤道面觀：扁長形-類球形(prolate-spheroidal) (圖 17-2)

(2) 頂面觀：圓形(amb circular) (圖 17-3 )

Size：14-16 × 11-16  $\mu$

Aperture type：在 colpus 中的內孔是平行橫過 colpus 的(ora transversally parallel) (圖 17-4)。

Tectum：在 tectum 之上的一層是光滑的，沒有明顯的突起，亦即花粉的表面為光滑的 (圖 17-5)(psilate)。

Sexine：經由 OL-pattern 分析，是屬於網狀紋(finely reticulate，with OL-pattern)(圖 17-6)。

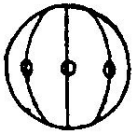
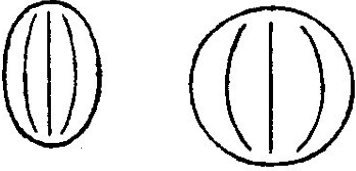
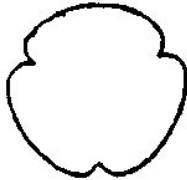


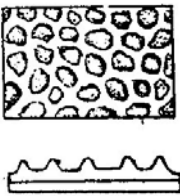
 1	 2	 3
3-colporate	Prolate      Spheroidal	amb circular
 4	 5	 6
Ora transversally	Psilate	reticulate

圖 17. 野甘草花粉手繪圖(據黃增泉，台灣植物花粉圖誌)

在我們的實驗中，利用掃描式電子顯微鏡觀察花粉，如圖 18，由頂面觀，可以看出其形狀約略為類圓形。若由赤道面觀察，很明顯可以看出其形狀約略為圓形至橢圓形，而且可以看出為 3-溝孔粒，且其形狀為類圓形，與文獻所描述相符，P/E ratio 約為  $8\sim 12 \times 10\sim 14 \mu\text{m}$ 。

另外，觀察其紋路的放大圖後，可以看到明顯的網狀紋的結構，而且花粉的表面光滑，沒有任何突起的形狀。另外，觀察其 colpus，可以看到約在位於 coplus 中央位置有一個明顯的孔狀結構，應為文獻中所提 ora transversally parallel。

綜合以上所提，可以知道我們所採集到的野甘草，在花粉的鑑定上，與文獻<sup>54</sup>所描述均相符。

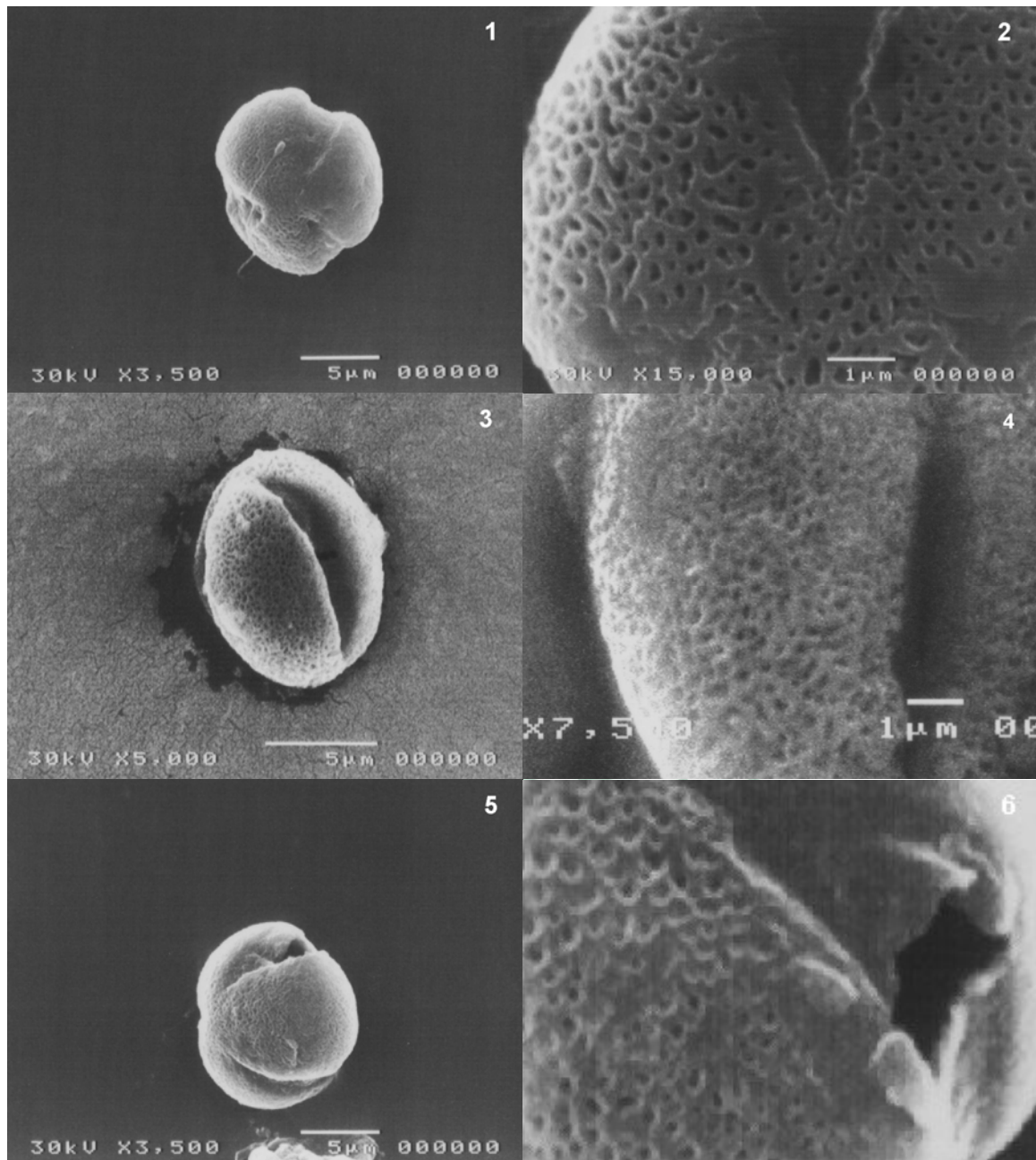


圖 18：野甘草花粉形態圖。1. 頂面觀 2. 頂面觀放大圖 3. 赤道面觀 4. 赤道面觀 5.colpus 6.colpus 放大圖

## 五、 種子形態鑑定

野甘草的種子，形狀約為橢圓球形(圖 19)，長約 300~350  $\mu\text{m}$ ，直徑約為 200~220  $\mu\text{m}$ ，種子有一端較鈍，另一端有明顯的凸起，由種子側面觀看其放大圖，可以看出其表面有非常明顯的稜紋，且稜紋是互相交錯的，形成網狀紋，而稜紋

交錯而成的凹處，凹處佈滿了細小的稜線，而且具有非常多明顯的小瘤狀突起，但在稜紋處並沒有此種凸起。

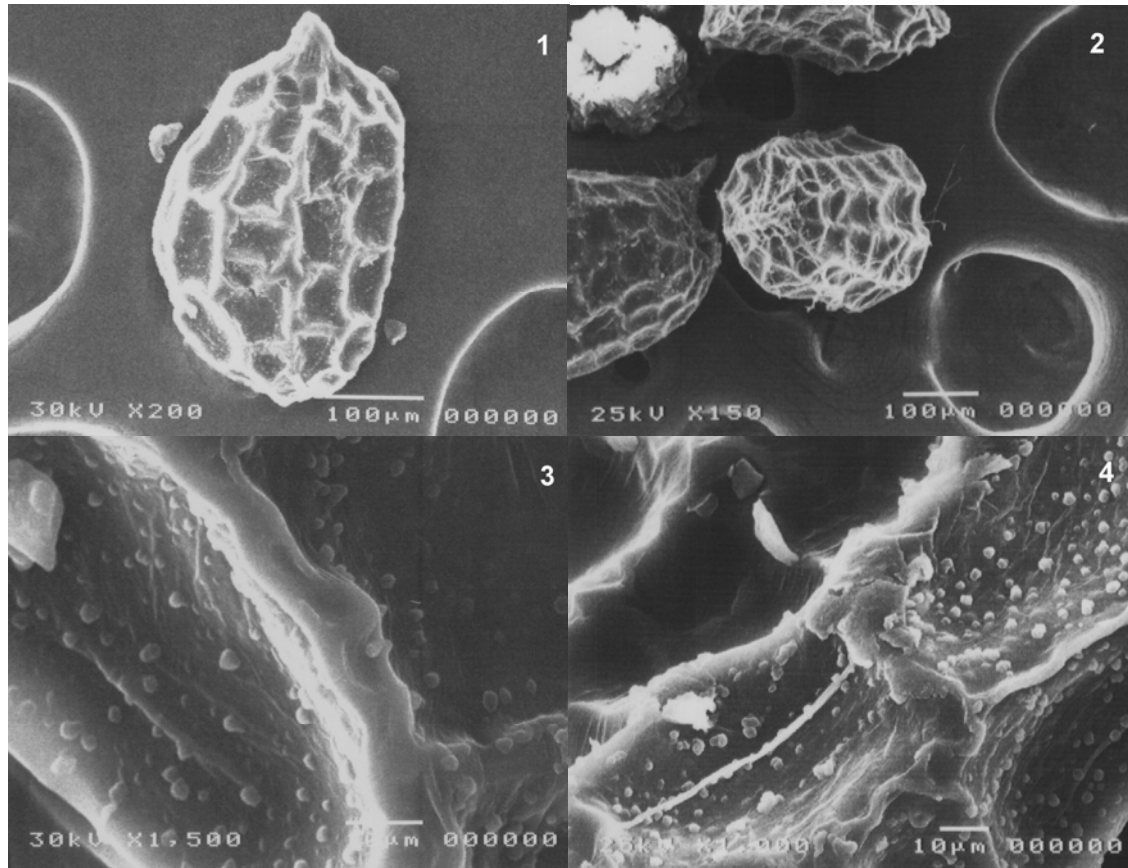


圖 19：野甘草種子之電子顯微鏡觀測圖 1. 側面觀 2. 頂面觀 3. 4. 局部放大圖

## 第二節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的生藥組織學研究

### (1) 性狀

乾燥莖呈黃綠色，圓柱形，長 20~80cm，表面具細微而明顯之縱走皺紋，質稍硬韌，折斷面具纖維性，呈淡黃白色，氣無，味淡。

葉多數脫落，少數殘存，往往皺縮或殘缺；黃綠~綠色，三葉輪生或對生，邊緣鋸齒狀，1~3cm × 0.5~1.5cm，呈卵形至長橢圓形。

### (2) 莖組織

#### ①. 莖之弱擴大圖

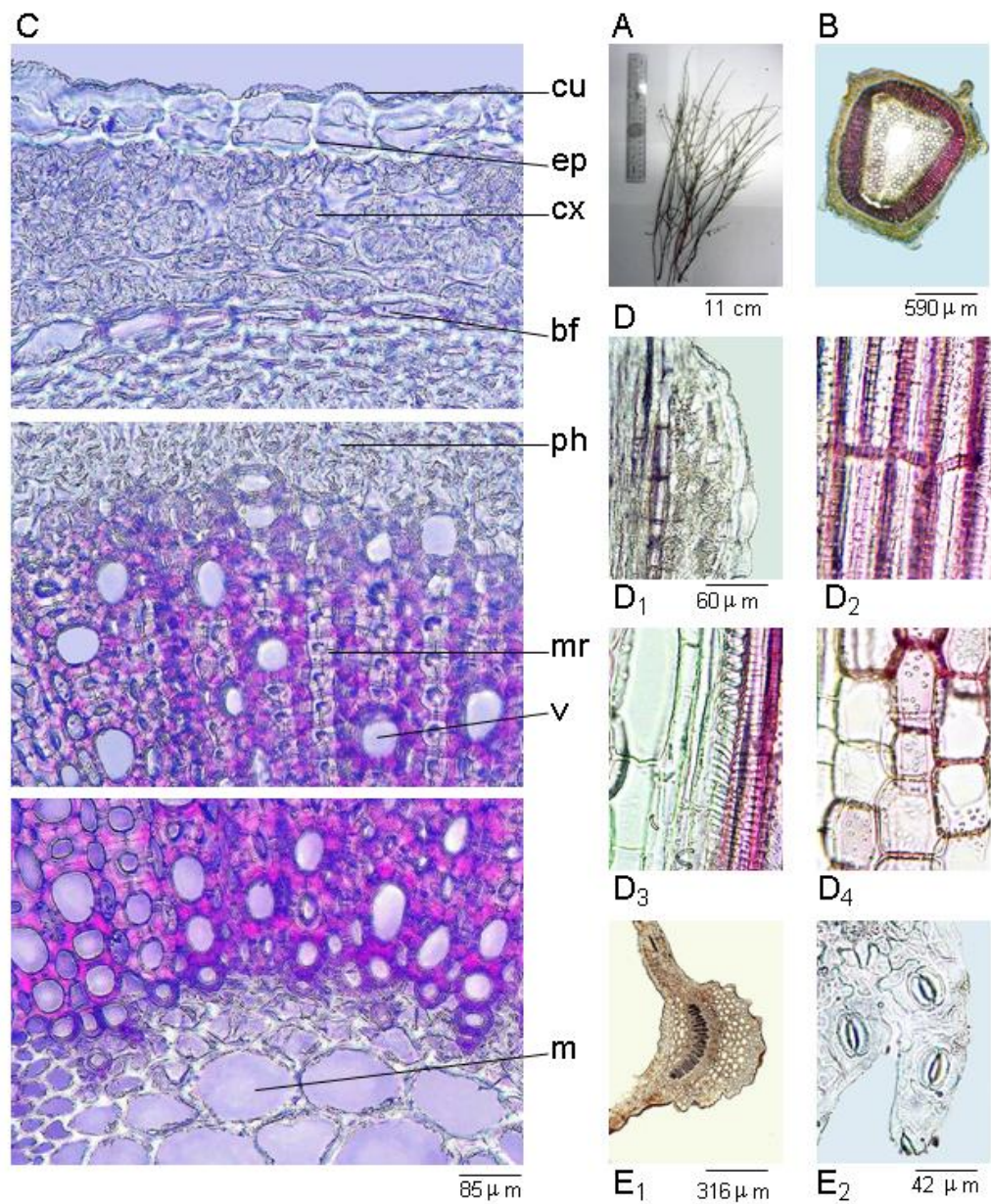
徑 0.1~0.3 cm，以放大鏡檢視其莖之橫切面，呈類四方形。最外層之表皮為黃綠色，皮部與木部之比例約為 1:1~1:3，中央髓部明顯，約佔 1/2。

#### ②. 鏡檢

以顯微鏡檢視其莖之橫斷面，上表皮細胞一層，細胞呈類方形，外披角質層。皮層細胞約 5~6 層，呈類圓形或長橢圓形，細胞大小不一，皮層內側具 2~3 層紅色連續性韌皮纖維層。篩部細胞呈不規則形，5~7 層。形成層不明顯。木部由木部纖維、導管群及木部薄壁細胞組成。導管及木部細胞呈放射狀排列，導管成類圓形環繞髓部排列，以網紋、螺旋紋為主，直徑約 15~80  $\mu\text{m}$ 。髓線寬狹不一，細胞呈放射狀延長。中央髓部明顯，細胞呈類圓形。

### (3) 葉組織

以顯微鏡檢視其葉之橫斷面，上表皮細胞一層，細胞呈類圓形、多角形或不規則形，外披角質層。葉肉組織係由一層柵狀細胞及數層海綿狀柔細胞所組成。柵狀細胞一層，不通過中肋。木質部為螺旋紋導管，韌皮部細胞呈不規則形，排列緊密。下表皮細胞一層，細胞較小，氣孔僅存於下表皮，15 × 20  $\mu\text{m}$ 。主脈向下凸出，厚 500~520  $\mu\text{m}$ ，約葉片的 3.0~3.2 倍，葉片厚 145~160  $\mu\text{m}$ 。(圖 20)



- A. photo showing the plant
- B. cross section of the stem
- C. transverse section of the stem (in largement from epiderm to pith)
- D. tissue elements :
  - D<sub>1</sub> : epidermis
  - D<sub>2</sub> : reticulate vessel
  - D<sub>3</sub> : spiral vessel
  - D<sub>4</sub> : xylem parenchyma
- E. Leaf :
  - E<sub>1</sub> : transverse section of the midrib
  - E<sub>2</sub> : stoma

圖 20：野甘草之組織切片圖

### 第三節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的成分分離

#### 一、H-1 : Glutinol

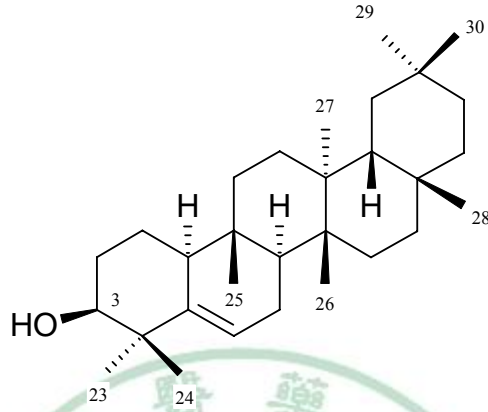


圖 21 : Glutinol 結構圖

化合物 H-1 經氯仿及正己烷再結晶後得白色針狀結晶，熔點 212~214°C。TLC 片經溶媒(n-hexane : EtOAc = 4 : 1)展開後 Rf 值為 0.44，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 加熱後呈紫色。初步推定化合物 H-1 為植物固醇或三萜類化合物。

紅外光光譜顯示(附圖 1)，在 3445cm<sup>-1</sup> 為 OH 的特性吸收帶，也有一般三萜類含有的吸收峰(1466, 1384, 1036 cm<sup>-1</sup>)。

由 EI-MS 圖譜(附圖 2)顯示，m/z 426 [M<sup>+</sup>] 為分子離子峰，亦即分子量為 426，推測其分子式為 C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O。由碎片 m/z 274、259、205、152 可以推得其斷裂式，如圖 22 顯示，推測化合物可能為 glutinol。

<sup>1</sup>H-NMR 圖譜(附圖 3)顯示 δ 0.92、0.92、1.15、1.16、1.28、1.31、1.38、1.40 (3H, s) 有八個甲基吸收訊號，δ 3.68、4.20 為接-OH 基之碳的質子訊號，δ 5.6 為雙鍵上之質子訊號。

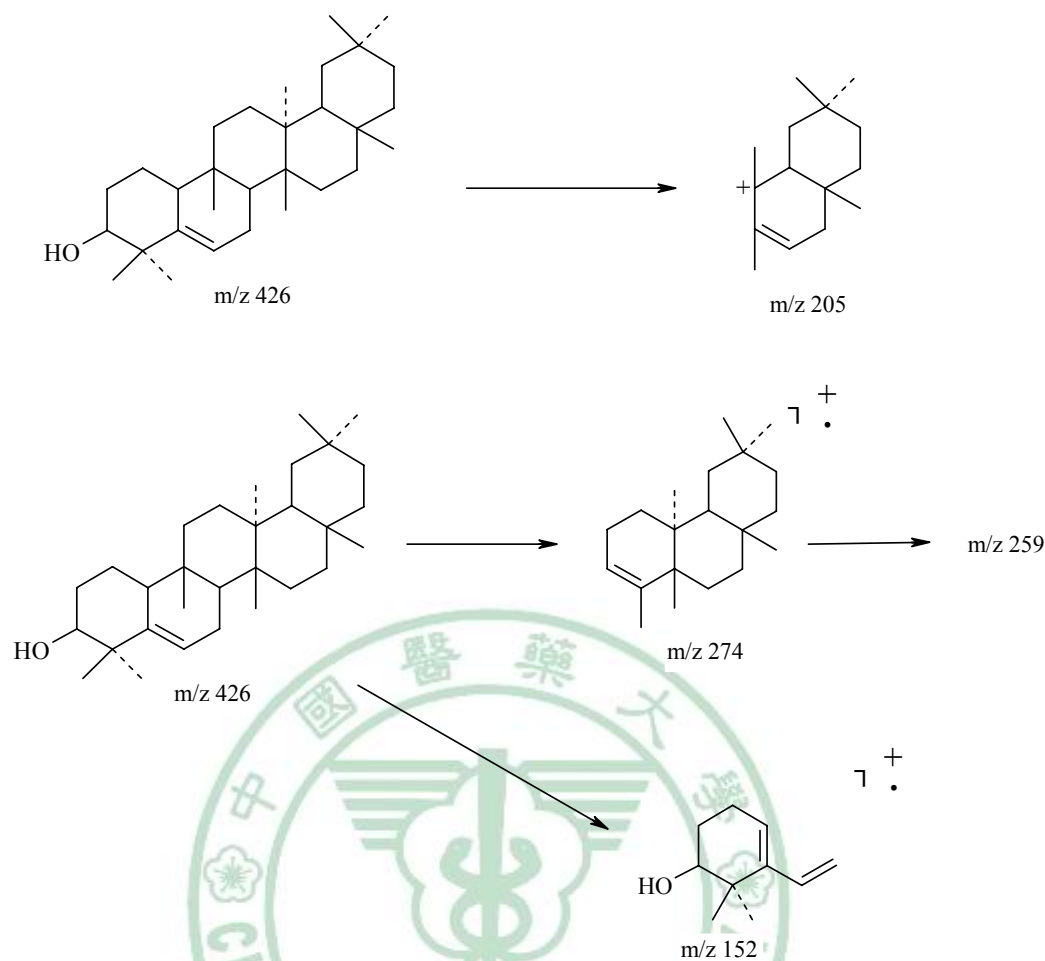


圖 22：Glutinol 質譜斷裂式

$^{13}\text{C}$ -NMR 圖譜(附圖 4)及 DEPT 圖譜(附圖 5)顯示其共有三十個碳原子吸收訊號，其中有八個碳原子訊號屬於  $\text{CH}_3$ ，分別為  $\delta$  34.6(C-30)、32.4(C-28)、32.0(C-29)、28.9(C-23)、25.4(C-24)、19.6(C-27)、18.4(C-26)、16.2(C-25)。有十個碳原子訊號屬於  $\text{CH}_2$ ，分別為  $\delta$  38.9(C-22)、35.9(C-19)、35.0(C-16)、34.6(C-15)、33.1(C-11)、32.0(C-21)、30.3(C-12)、27.8(C-2)、23.6(C-7)、18.2(C-1)。有五個碳原子訊號屬於  $\text{CH}$ ，分別為  $\delta$  122.0(C-6)、76.3(C-3)、49.6(C-10)、47.4(C-8) 43.0(C-18)。其餘的七個碳原子訊號屬於四級碳，分別為  $\delta$  141.5(C-5)、40.8(C-4)、39.3(C-14)、37.8(C-13)、34.8(C-9)、30.1(C-17)、28.3(C-20)。其中  $\delta$  141.5, 122.0 為雙建 C-5, C-6 之吸收訊號， $\delta$  76.3 為接-OH 基上 C-3 的訊號。



表 12：化合物 H-1 碳譜數據與文獻<sup>(53)</sup> 碳譜數據比對表

No. of C	$\delta_c$ of H-1	$\delta_c$ of literature data
C-1	18.1	18.3
C-2	27.8	27.9
C-3	76.3	76.4
C-4	40.8	40.9
C-5	141.5	141.7
C-6	122.0	122.1
C-7	23.6	23.7
C-8	47.4	47.5
C-9	34.8	34.9
C-10	49.6	49.8
C-11	33.1	33.2
C-12	30.3	30.4
C-13	37.8	37.9
C-14	39.2	39.4
C-15	34.5	34.7
C-16	35.0	35.2
C-17	30.0	30.2
C-18	43.0	43.2
C-19	35.9	35.2
C-20	28.2	28.3
C-21	32.0	32.2
C-22	38.9	39.0
C-23	28.9	29.0
C-24	25.4	25.5
C-25	16.2	16.2
C-26	18.4	18.4
C-27	19.6	19.7
C-28	32.4	32.4
C-29	32.0	32.1
C-30	34.4	34.6

綜合以上光譜資料與文獻比對<sup>53</sup>，推定化合物為 glutinol。

## 二、H-2：Friedelin

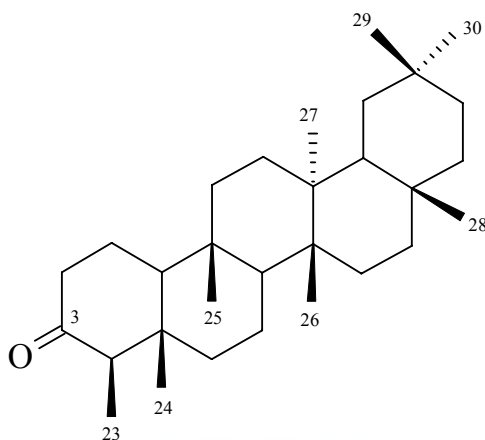


圖 23：Friedelin 結構圖

化合物 H-2 經氯仿及正己烷再結晶後得白色針狀結晶，熔點 261~264°C。TLC 片經溶媒(n-hexane：chloroform = 2：1)展開後 R<sub>f</sub> 值為 0.6，噴 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 加熱後呈紫色。初步推定化合物 H-1 為植物固醇或三萜類化合物。

紅外光光譜(附圖 6)顯示，在 1714cm<sup>-1</sup>有 C=O 官能基的吸收峰，也有一般三萜類含有的吸收峰(1458, 1388 cm<sup>-1</sup>)，無不飽和 C-H 伸縮振動的吸收。

由 EI-MS 圖譜(附圖 7)顯示，m/z 426 [M<sup>+</sup>] 為分子離子峰，亦即分子量為 426，推測其分子式為 C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O。由碎片 m/z 411, 341, 302, 273, 246, 205, 191 可以推得其斷裂式，如圖 24 顯示，推測化合物可能為 friedelin。

<sup>1</sup>H-NMR 圖譜(附圖 8)顯示 δ 0.72 (3H, s)、0.86 (3H, s)、0.89 (3H, d, J=6.6Hz)、0.95 (3H, s)、1.00 (6H, s)、1.05 (3H, s)、1.18 (3H, s) 有八個甲基吸收訊號。

由 <sup>13</sup>C-NMR 圖譜(附圖 9)及 DEPT 圖譜(附圖 10)顯示其共有三十個碳原子吸收訊號，其中有八個碳原子訊號是屬於 CH<sub>3</sub>，分別為 δ34.8(C-30)、32.1(C-28)、31.8(C-29)、20.3(C-26)、18.4(C-27)、17.7(C-25)、14.4(C-24)、6.6(C-23)。有十一個碳原子訊號屬於 CH<sub>2</sub>，分別為 δ41.3(C-2)、41.0(C-6)、39.0(C-22)、36.0(C-16)、35.4(C-11)、35.1(C-19)、32.8(C-15)、32.5(C-21)、30.5(C-12)、

22.1(C-1)、17.9 (C-7)。有四個碳原子訊號屬於CH，分別為 $\delta$ 59.2(C-10)、

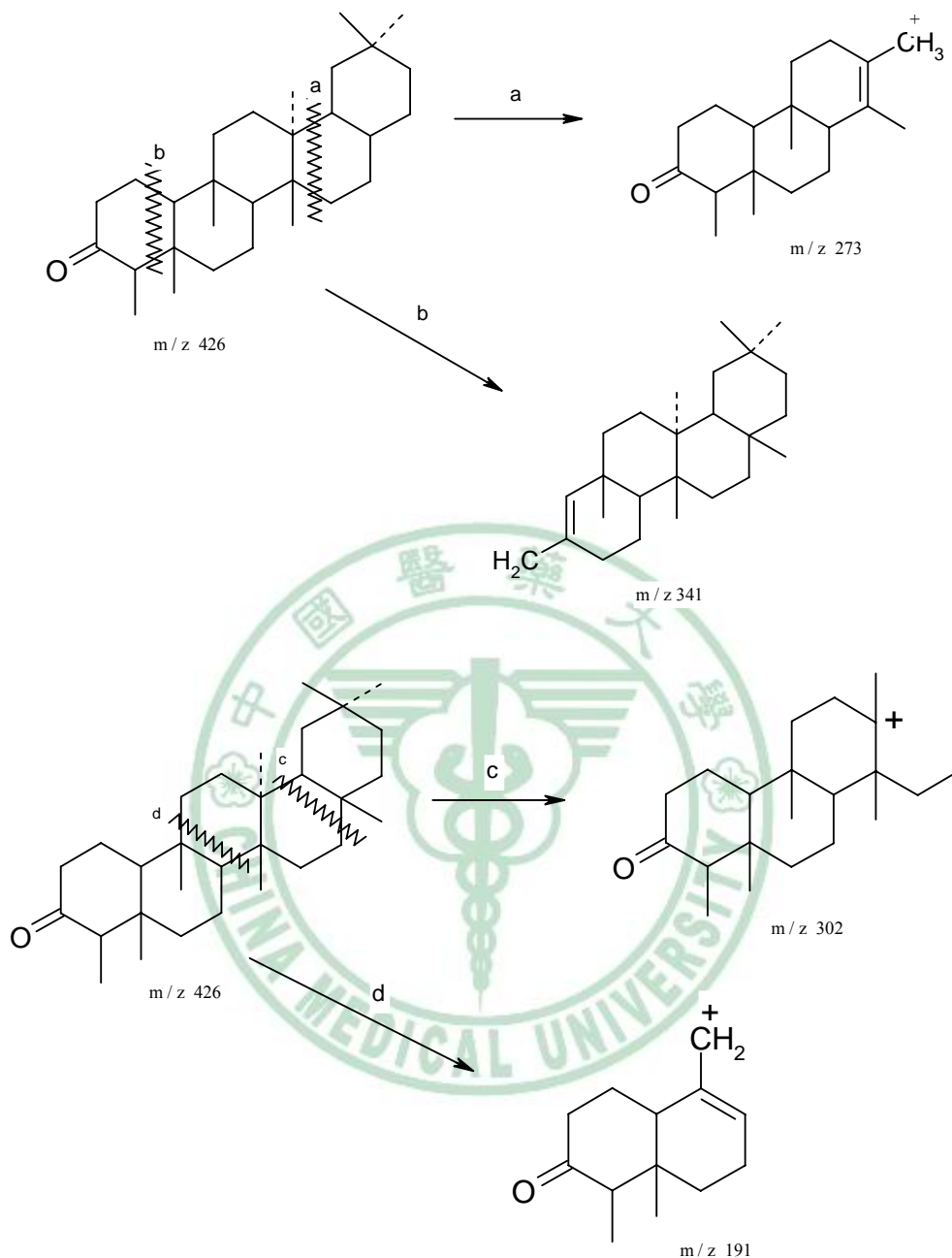


圖 24：Friedelin 質譜斷裂式

57.9(C-4)、52.8(C-8)、42.8 (C-18)。其餘的七個碳原子訊號屬於四級碳，分別為 $\delta$ 213.1(C-3)、42.5(C-5)、39.2(C-13)、38.3(C-14)、37.4 (C-9)、29.9(C-17)、28.2(C-20)，其中 $\delta$  213.1 為 C=O 基之碳的吸收訊號。

表 13：化合物 H-2 碳譜數據與文獻<sup>(54-55)</sup> 碳譜數據比對表

No. of C	$\delta_c$ of H-2	$\delta_c$ of literature data
C-1	22.1	22.3
C-2	41.3	41.5
C-3	213.1	213.2
C-4	57.9	58.2
C-5	42.5	42.3
C-6	41.0	41.3
C-7	17.9	18.2
C-8	52.8	53.1
C-9	37.4	37.4
C-10	59.2	59.5
C-11	35.4	35.6
C-12	30.5	30.5
C-13	39.2	39.7
C-14	38.3	38.3
C-15	32.8	32.8
C-16	36.0	36.0
C-17	29.9	29.9
C-18	42.8	42.8
C-19	35.1	35.3
C-20	28.2	28.2
C-21	32.5	32.4
C-22	39.0	39.2
C-23	6.6	6.8
C-24	14.4	14.7
C-25	17.7	17.9
C-26	20.3	20.3
C-27	18.4	18.7
C-28	32.1	32.1
C-29	31.8	31.8
C-30	34.8	35.0

綜合以上光譜資料與文獻比對<sup>54,55</sup>，推定化合物為 friedelin。

### 三、C-3：Betulinic acid

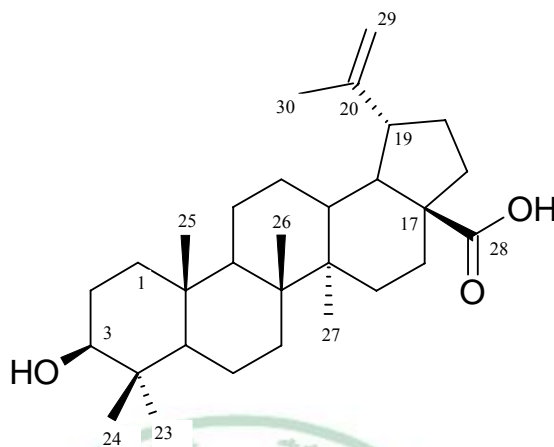


圖 25：Betulinic acid 結構圖

化合物 C-3 於氯仿層中得到，為無色結晶，以氯仿-甲醇再結晶，溶點 283~285 °C，其 TLC 片以氯仿：乙酸乙酯=4：1 展開後， $R_f$  值為 0.3，噴 10%  $H_2SO_4$  加熱後呈色變化為黃褐色→紫色，推測可能為三萜類化合物。

IR 圖譜(附圖 11)顯示  $\nu_{max}^{KBr}$  ( $cm^{-1}$ ) 在 3445 (br.)  $cm^{-1}$  為 OH 的特性吸收帶，2935  $cm^{-1}$  為  $CH_2$  的特性吸收帶，1451  $cm^{-1}$  為  $CH_2$  的特性吸收帶。

MS 圖譜(附圖 12) $M^+$  ( $m/z$ ) 顯示分子量為 456，推測分子式為  $C_{30}H_{48}O_3$ 。其斷裂碎片如圖 26 所示。

$^1H$ -NMR 圖譜(附圖 13)顯示  $\delta$  0.83、0.94、0.97、0.98、1.27、1.98 (s) 分別為六個甲基之質子訊號； $\delta$  4.61、4.74 (2H, br. s)，為雙鍵上之質子訊號； $\delta$  3.49 (1H, m) 為 C-3 連接-OH 之次甲基的質子訊號。

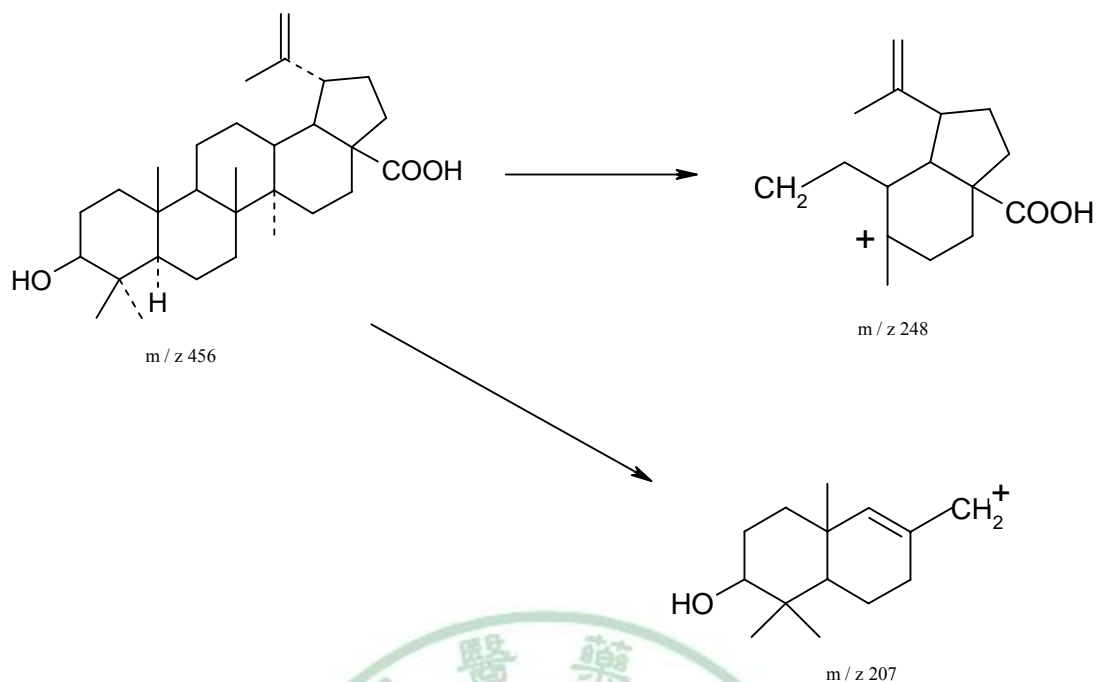


圖 26：Betulinic acid 質譜斷裂式

由  $^{13}\text{C}$ -NMR 圖譜(附圖 14)及 DEPT 圖譜(附圖 15)顯示顯示其共有三十個碳原子吸收訊號，其中有六個碳原子訊號是屬於  $\text{CH}_3$ ，分別為  $\delta 14.7(\text{C}-27)$ 、 $15.4(\text{C}-24)$ 、 $16.0(\text{C}-25)$ 、 $16.1(\text{C}-26)$ 、 $19.4(\text{C}-30)$ 、 $28.0(\text{C}-23)$ 。有十一個碳原子訊號屬於  $\text{CH}_2$ ，分別為  $\delta 18.3(\text{C}-6)$ 、 $20.9(\text{C}-11)$ 、 $25.5(\text{C}-12)$ 、 $27.5(\text{C}-2)$ 、 $29.7(\text{C}-21)$ 、 $30.6(\text{C}-15)$ 、 $32.2(\text{C}-16)$ 、 $34.4(\text{C}-7)$ 、 $37.2(\text{C}-22)$ 、 $38.7(\text{C}-1)$ 、 $109.7(\text{C}-29)$ 。有六個碳原子訊號屬於  $\text{CH}$ ，分別為  $\delta 38.4(\text{C}-13)$ 、 $46.9(\text{C}-18)$ 、 $49.3(\text{C}-19)$ 、 $50.3(\text{C}-9)$ 、 $55.4(\text{C}-5)$ 、 $79.0(\text{C}-3)$ 。其餘的七個碳原子訊號屬於四級碳，分別為  $\delta 37.0(\text{C}-10)$ 、 $38.9(\text{C}-4)$ 、 $40.7(\text{C}-8)$ 、 $42.5(\text{C}-14)$ 、 $56.3(\text{C}-17)$ 、 $150.4(\text{C}-20)$ 、 $180.0(\text{C}-28)$ 。其中  $\delta 150.4$ 、 $109.7$  分別為外環雙鍵之碳原子訊號； $\delta 79.0$  為接-OH 基 C-3 之碳原子訊號。 $\delta 180.0$  為 COOH 之碳原子訊號。

表 14：化合物 C-3 碳譜數據與文獻<sup>(56)</sup> 碳譜數據比對表

No. of C	$\delta_c$ of C-3	$\delta_c$ of literature data
C-1	38.7	39.3
C-2	27.5	28.3
C-3	79.0	78.1
C-4	38.9	39.5
C-5	55.4	55.9
C-6	18.3	18.8
C-7	34.4	34.8
C-8	40.7	41.1
C-9	50.3	50.9
C-10	37.0	37.5
C-11	20.9	21.2
C-12	25.5	26.1
C-13	38.4	38.6
C-14	42.5	42.8
C-15	30.6	31.2
C-16	32.2	32.9
C-17	56.3	56.6
C-18	46.9	47.8
C-19	49.3	49.8
C-20	150.4	151.3
C-21	29.7	30.2
C-22	37.2	37.6
C-23	28.0	28.6
C-24	15.4	16.3
C-25	16.0	16.4
C-26	16.1	16.4
C-27	14.7	14.9
C-28	180.0	178.9
C-29	109.7	109.9
C-30	19.4	19.4

綜合以上光譜資料與文獻比對<sup>56</sup>，推定化合物為 Betulinic acid。

#### 四、C-4：Coixol(6-Methoxybenzoxazolinone)

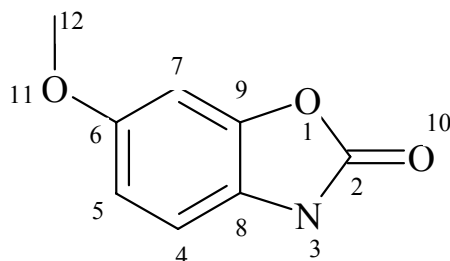


圖 27：Coixol 結構圖

化合物 C-4 於氯仿層中得到，為無色結晶，以氯仿-甲醇再結晶，溶點 144~147 °C，其 TLC 片以二氯甲烷  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : EtOAc = 4 : 1 展開後， $R_f$  值為 0.48。

IR 圖譜(附圖 16)顯示  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 在 3748、2923、2868、2360、2340、1714( $\text{C}=\text{O}$ )、1458、1388  $\text{cm}^{-1}$  有吸收峰，其中 1714  $\text{cm}^{-1}$  為  $\text{C}=\text{O}$  的訊號。

由 EI-MS 圖譜(附圖 17)顯示， $m/z$  165 [ $\text{M}^+$ ] 為分子離子峰，亦即分子量為 165，推測其分子式為  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$ 。由碎片  $m/z$  150，106 可以推得其斷裂式，如圖 28 顯示，推測化合物可能為 coixol(6-Methoxybenzoxazolinone)。

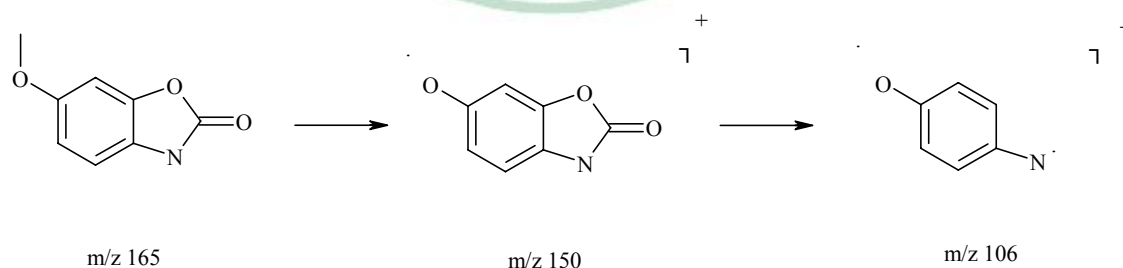


圖 28：Coixol 質譜斷裂式

$^1\text{H-NMR}$  圖譜(附圖 18)顯示  $\delta$  3.71 (3H, s) 為甲氧基之質子訊號； $\delta$  6.67 (dd,  $J_1 = 9$ ,  $J_2 = 3$  Hz)、6.94 ( $d$ ,  $J = 3$  Hz)、6.98 ( $d$ ,  $J = 9$  Hz)，為苯環上之質子訊號。



由<sup>13</sup>C-NMR圖譜(附圖19)及DEPT圖譜(附圖20)顯示其共有八個碳，其中有一個碳原子訊號是屬於CH<sub>3</sub>，為δ 55.9(C-12)。有三個碳原子訊號是屬於CH，分別為δ110.1 (C-4)、109.3(C-5)、97.2(C-7)。其餘的七個碳原子訊號屬於四級碳，分別為δ155.4(C-6)、154.9(C-2)、144.2(C-9)、123.8(C-8)。而δ155.4(C-6)、144.2 (C-9)、123.8(C-8)、110.1(C-4)、109.3(C-5)、97.2(C-7)為苯環之碳原子的吸收訊號，δ154.9(C-2)為C=O之碳原子的吸收訊號，δ55.9(C-10)為OCH<sub>3</sub>之碳原子的吸收訊號。

表 15：化合物 C-4 碳譜數據與文獻<sup>(57-58)</sup> 碳譜數據比對表

No. of C	δ <sub>c</sub> of C-3	δ <sub>c</sub> of literature data
C-2	154.9	155.1
C-4	110.1	109.9
C-5	109.3	109.1
C-6	155.4	155.4
C-7	97.2	97.1
C-8	123.8	123.9
C-9	144.2	144.3
C-12	55.9	55.8

綜合以上光譜資料與文獻比對<sup>(57-58)</sup>，推定化合物為 coixol。

## 五、E-5：Luteolin

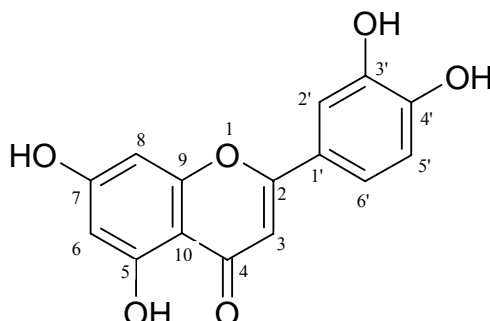


圖 29：Luteolin 結構圖

化合物 E-5 於乙酸乙酯層中得到，為黃色粉末，溶點 326~329°C，其 TLC 片以  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 4 : 1$  展開後， $R_f$  值為 0.41。

IR 圖譜(附圖 21)顯示  $V_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 在 3836、3751、3661、2360、2336、1716( $\text{C}=\text{O}$ )、1698、1649、1507  $\text{cm}^{-1}$  有吸收峰，其中 1716  $\text{cm}^{-1}$  為  $\text{C}=\text{O}$  的訊號。

$^1\text{H-NMR}$ 圖譜(附圖22)顯示  $\delta$  6.18 (1H, d, H-6)、6.43 (1H, d, H-8)、6.65 (1H, s, H-3)、6.87 (1H, d, H-5')、7.38 (1H, d, H-2')、7.41 (2H, m, H-6') 為環上質子的訊號。

由  $^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜(附圖23)圖譜顯示其共有十五個碳，分別為  $\delta$  182.5( $\text{C}-4$ )、165.0( $\text{C}-7$ )、164.8( $\text{C}-2$ )、162.3( $\text{C}-5$ )、158.1( $\text{C}-9$ )、150.5( $\text{C}-4'$ )、146.6( $\text{C}-3'$ )、122.4( $\text{C}-1'$ )、119.8( $\text{C}-6'$ )、116.9( $\text{C}-5'$ )、114.2( $\text{C}-2'$ )、104.6( $\text{C}-10$ )、103.7( $\text{C}-3$ )、99.7( $\text{C}-6$ )、94.7( $\text{C}-8$ )。其中  $\delta$  182.5( $\text{C}-4$ )為 $\text{C}=\text{O}$ 之碳原子的吸收訊號； $\delta$  162.3( $\text{C}-5$ )、165.0( $\text{C}-7$ )、150.5( $\text{C}-4'$ )、146.6( $\text{C}-3'$ )為接-OH基之碳原子訊號。

表 16：化合物 E-5 碳譜數據與文獻<sup>(59-60)</sup> 碳譜數據比對表

No. of C	$\delta_c$ of C-3	$\delta_c$ of literature data
C-2	164.8	164.4
C-3	103.7	103.3
C-4	182.5	182.1
C-5	162.3	161.9
C-6	99.7	99.3
C-7	165.0	164.5
C-8	94.7	94.3
C-9	158.1	157.7
C-10	104.6	104.2
C-1'	122.4	122.0
C-2'	114.2	113.8
C-3'	146.6	146.2
C-4'	150.5	150.1
C-5'	116.9	116.5
C-6'	119.8	119.4

綜合以上光譜資料與文獻比對<sup>(59-60)</sup>，推定化合物為 luteolin。

## 第四節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物中木犀草素(luteolin)的定量

在 Masaru Kawasaki<sup>5</sup> 等發表的研究中，曾經在巴拉圭產的野甘草中，經由管柱分離得到木犀草素〔luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone)〕，據文獻指出<sup>(6,61-63)</sup>，luteolin 是很強的自由基清除劑，具有抑制 nitric oxide (NO) 合成的作用，肝纖維化過程中自由基和 NO 合成增加被認為是肝星狀細胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化和細胞外基質 (ECM) 合成增加的重要因素之一，luteolin 可能是經由此種機轉，在體外抑制增殖及其膠原合成，作用在低濃度即顯著，使得在體內容易達到有效濃度，而干擾素在體外降低 HSC 活化及其 ECM 的合成，在體內有治療肝纖維化的作用，因此 luteolin 可能具有預防或治療肝纖維化的作用。本研究即針對台灣產野甘草中 luteolin 這個成分進行定量，以確定其在此植物中的含量。

Luteolin 為一個黃酮類化合物，結構如圖 29 所示，分子式為  $C_{15}H_{10}O_6$ ，分子量為 286.23，微溶於水<sup>64</sup>。

### 一、分析條件的選擇

分析的條件我們以幾個方向來討論：(1) 管柱種類；(2) 移動相；(3) UV 值；(4) 內部標準品 (以下簡稱 I.S.)

首先，luteolin 的極性偏高，在逆向的管柱中較容易被洗脫，所以管柱的選擇以 RP-18 管柱為主，在參考文獻中關於管柱的使用後 (表 17)，因為本實驗室中即有 RP-18 (Merck LiChroCART 250-4) 的管柱，故以此作為分析的管柱，所以在條件的選擇以移動相條件以及 UV 檢測波長為主。

表 17：不同管柱不同條件下 luteolin 的滯留時間

Column	Mobile phase	Flowrate (ml/min <sup>-1</sup> )	Rt	UV (nm)	Ref.
ODS-C18 (25 cm)	磷酸鹽緩衝液(10 mmol/L, pH =2.5 ) : 甲醇:四氫呋喃:異丙醇 (65.0 : 7.8 : 11.7 : 15.5)	0.6	27	350	65
ODS Column (25 cm)	Methanol : H <sub>2</sub> O (5 : 45 v/v, 水用 乙酸調pH = 2.7)	1	約 12	350	66
伊利特-C18 (25 cm)	Methanol : H <sub>2</sub> O (50 : 50), 以磷酸 調整pH值至3.0	0.8	11.8	360	67
Spherisorb 5 μm ODS2 (25cm)	solvent A : water with 1% glacial acetic acid solvent B : water with 6% glacial acetic acid solvent C : water/acetonitrile (65:30 v/v)with 5% glacial acetic acid 100% A, 0~10 min ; 100% B, 10~30 min ; 90% B/10% C, 30~50 min ; 80% B/20% C, 50~60 min ; 70% B/30% C, 60~70 min ; 100% C, 70~105 min ; 100% A, 105~110 min	0.5		280	68

在 UV 檢測條件的選擇上，luteolin 的 UV 如圖 30 所示，在 350 nm 附近有非常明顯的吸收峰，故選擇以 350 nm 為定量的波長。

移動相選擇的部分，在參考完文獻（表 17）後，可見：①Proestos<sup>68</sup>等所用的方法，所需要配製的移動相手續較繁雜，容易因為繁複的步驟出現較大的誤差。②我們添加磷酸以降低 pH 值，使得 luteolin 得以維持分子態。磷酸的添加是先加到水中，比例為 0.05%。

由表 17 可見，文獻中所用的移動相大部分為 MeOH 與水的比例來作為移動相條件，因此我們也以 MeOH 與 0.05% 磷酸做為移動相，調整其比例，但是實際操作之後，發現以 MeOH 與 0.05% 磷酸在野甘草植物中並無法使 luteolin 與其他 peak 完全分離(表 18)，因此將有機溶媒改為 Acetonitril，以 Acetonitril 與 0.05% 磷酸比例之不同來尋找最佳移動相條件。

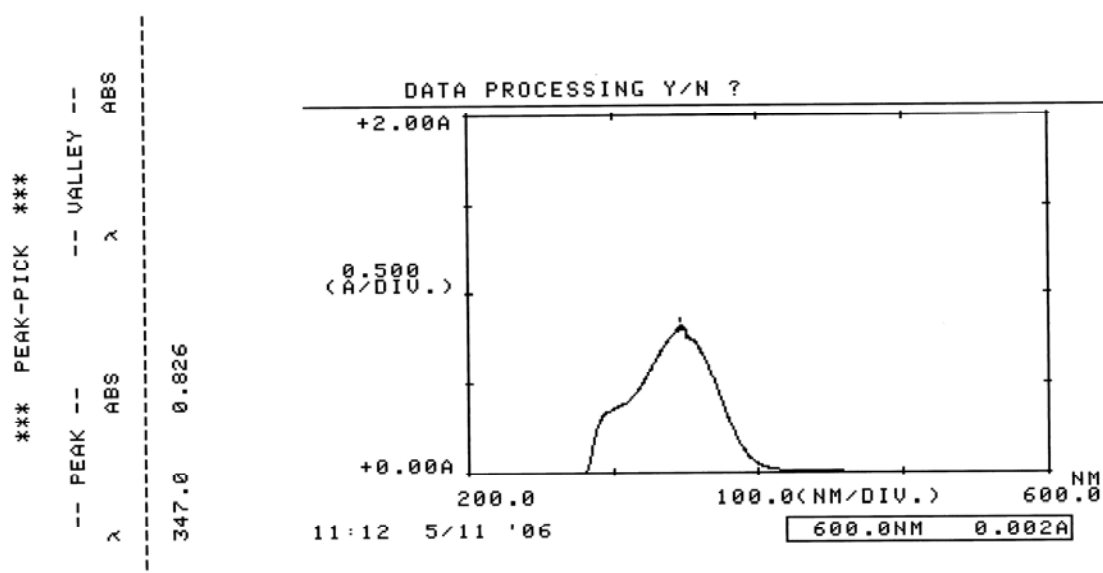


圖 30：Luteolin 之 UV 圖

表 18：HPLC 不同移動相條件之比較

	移動相比例	GA Rt (min)	結果與討論
(1)	ACN : 0.05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = 25 : 75 (pH=2)	19.97	夾雜於其他的 peak 中
(2)	ACN : 0.05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = 24 : 76 (pH=2)	25.31	仍然和其他 peak 重疊
(3)	ACN : 0.05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = 23 : 77 (pH=2)	29.57	雖然 peak 位於較令人滿意的位置，但仍然和其他 peak 重疊
(4)	ACN : 0.05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = 22 : 78 (pH=2)	33.53	雖然 peak 位於較令人滿意的位置，但仍然和其他 peak 重疊且

			時間稍晚
(5)	ACN : 0.05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = 0 min 22 : 78 36 min 28 : 72 40 min 28 : 72	23.52	無重疊，分離度佳，luteolin 的出現位置又不會太晚

當確立了移動相的條件之後，接下來便是要確立內標，以上述的移動相(5)將野甘草萃取液進樣到 HPLC，得到其圖譜，如圖 31，做為參考依據來選擇 I. S.。

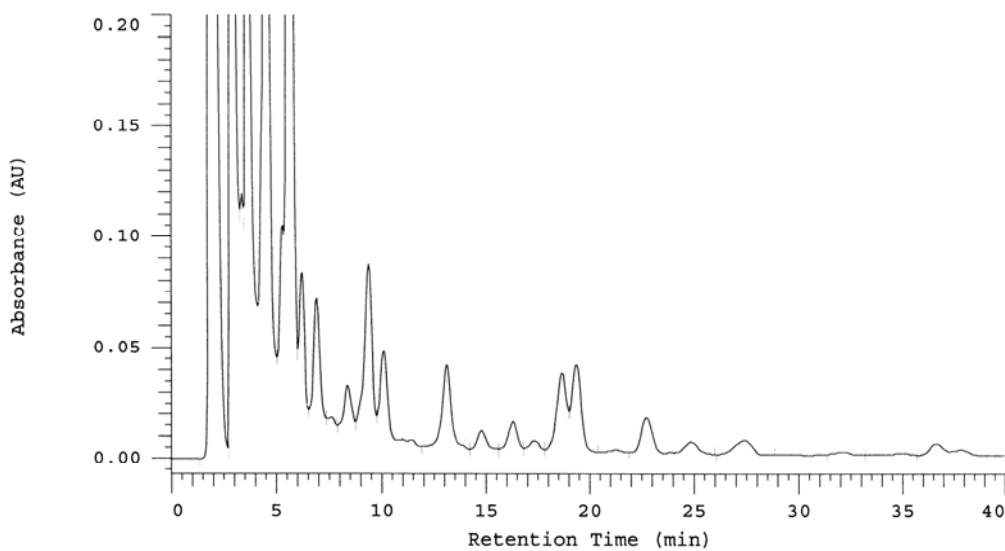


圖 31：野甘草之 HPLC 層析圖

由此張 HPLC 圖可以大約發現，在這個移動相條件之下，要得到好的內標物的 Rt 值，大約位於 20~22 min、28~31 min、33~36 min 或 39 min 以後，因為在這些區域內受到其他成分的干擾較小，但是詳細觀察之後發現，在 20~22 min 的 Rt 位置似乎仍不是十分的平整，可能有一些較微量的物質，若以此段時間為考量，可能產生誤差，並且 39 min 之後出現的時間，已經和 luteolin 的 Rt 值相差太多，故將找尋的焦點放在 28~31 min、33~36 min 上。表 19 為內標的測試結果，由表中可知，imipramine, anthnone 及 piroxicam 在時間點上較為適合，但是 imipramine 的 peak 產生嚴重的拖尾，會影響到其他 peak 的觀察，anthnone

則有夾雜著其他較小的 peak 產生，此化合物似乎不純，若要作為內部標準品可能需要經過再結晶的處理，較為麻煩，而 piroxicam 除了時間點剛好之外，與其他 peak 之分離度也良好，且無拖尾情況產生，因此選擇此化合物做為內部標準品。

表 19：不同內部標準品之滯留時間比較

成分	Retention Time	Description
Berberine	14.59	太早
Ferulic acid	7.55	太早
Propyl paraben	X	40 分鐘內不出現
Methyl paraben	5.41	太早
Hydroflumethazide	7.66	太早
Doxepine	17.52	有 peak 夾雜，拖尾
Trimipramine	X	40 分鐘內不出現
Imipramine	30.77	時間剛好，但有嚴重拖尾
Theophylline	X	40 分鐘內不出現
$\alpha$ -methylprednisolone	37.15	有 peak 夾雜
Prednisolone	19.09	有 peak 夾雜
Cortisone	21.20	有 peak 夾雜
Indomethacin	X	40 分鐘內不出現
*Piroxicam 如圖 32	30.53	時間剛好，分離度良好
Mefenamic acid	X	40 分鐘內不出現
Anthnone	30.99	時間剛好，但似乎不純
Benzoic acid	12.21	太早
Flavone	X	40 分鐘內不出現
5, 6, 7-trihydroxyflavone	X	40 分鐘內不出現
Chlorogenic acid	X	40 分鐘內不出現



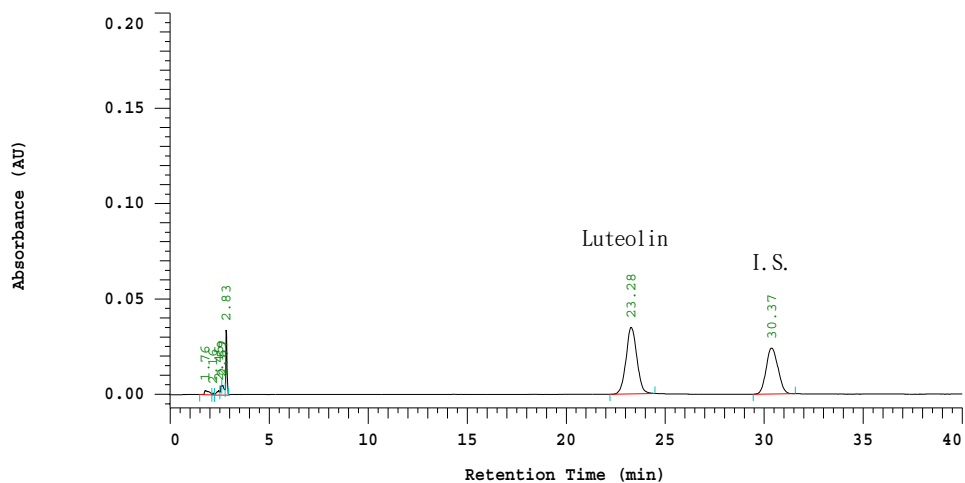


圖 32：Luteolin 標準品與內部標準品（ I.S. ）之 HPLC 層析圖

## 二、高效液相層析法系統定量

為了能夠確保定量的準確性，故使用下述的定量條件：

- (1)、管柱種類：Merck LiChroCART 250-4
- (2)、移動相：

使用 Acetonitril 與 0.05% phosphoric acid (pH= 2.43) 為移動相溶媒，並以不同比例之梯度變化作為移動相條件，其變化如表 20 所示：

表 20：HPLC 移動相之條件

時間 ( min )	Acetonitril ( % )	0.05% phosphoric acid ( % )
0	22	78
36	28	72
40	28	72

- (3)、內部標準品（以下簡稱 I.S.）：Piroxicam

- (4)、UV 波長：350 nm

取野甘草植物的粉末 1 g，以 10 ml methanol 超音波震盪加熱 50 °C 20 min，提取 3 次，靜置至室溫過濾，合併三次濾液，濃縮至乾，加入 5 ml methanol 至全溶，以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後進樣 HPLC。

### 1、luteolin 穩定性測試

由結果可看出（圖 33，表 7），luteolin 的濃度在 24 小時內穩定，變化不大，故所有的樣品處理都需要在 24 小時內完成，則無太大的誤差。

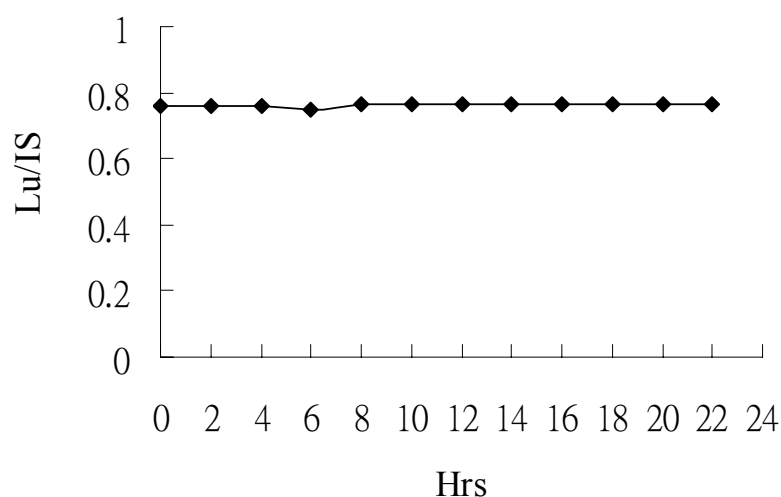


圖 33：24 小時內 luteolin 在 methanol 中的穩定性

### 2、luteolin 檢量線製作

luteolin 檢量線製作是以不同濃度 luteolin (Y) 對 luteolin 與 I.S. 之層析峰面積比 (X) 的反應值 (圖 9，表 11)。所得到的檢量線方程式為

$$Y=16.671X + 0.2676 \quad R^2=0.9997$$

此圖可顯示當 luteolin 濃度在 2.24-44.8  $\mu\text{g/ml}$  之間時具有良好的線性關係。

### 3、luteolin 回收率試驗

由實驗結果可知 luteolin 在經過和野甘草植物定量相同的步驟後，回收

率介於 99.46% ~103.74%，標準誤差介於 2.15% 之間，顯示回收率良好(表 8)。

#### 4、luteolin 精密度試驗

由實驗的結果顯示，利用此種 HPLC 定量條件的再現性良好，同一天的面積比相對標準差介於 0.21~1.72 % 之間，以及異日間的面積比相對標準差介於 0.12~1.15 % 之間，均在可以接受的範圍以內(表 9，表 10)。

#### 5、最低濃度的探討

結果顯示(表 21)，濃度在 0.14  $\mu\text{g/ml}$  以下，則無法正確定量。

表 21：Luteolin 積分面積之 RSD 值

Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD %
8.96	0.22
4.48	0.72
2.24	0.09
1.12	1.86
0.56	1.16
0.28	3.78
0.14	13.583
0.07	×

### 三、野甘草植物 luteolin 之定量

臺灣產野甘草植物 luteolin 之含量，列於表 22。

表 22：野甘草植物 luteolin 含量

採集時間	採集地點	重量( $\mu\text{g}$ )	含量(%)
2004.12.30	台中縣沙鹿	19.6761	0.00197
2005.03.18	中國醫藥大學 前柳川河堤	43.0155	0.00430
2005.11.24	台中縣沙鹿鎮 北勢里福至路	56.3523	0.00563

#### 四、討論

##### 1、野甘草植物 luteolin 提取方法之選擇

在樣品處理方法的選擇上，我們分別以下列方法提取：

- (1) methanol 萃取
- (2) 0.1% phosphoric acid 和 methanol 萃取
- (3) methanol 和 H<sub>2</sub>O
- (4) H<sub>2</sub>O 萃取
- (5) 0.1% phosphoric acid 萃取

比較上述提取方法，發現以 methanol 萃取所得 luteolin 含量最高，因此我們選擇以 methanol 作為樣品處理的溶媒。

另外，選擇好溶媒之後，接下來便是萃取方法，我們以下列四種方法來提取：

- (1) 超音波萃取法 30 分鐘
- (2) 冷浸法（並用磁石攪拌）在室溫下，18 小時
- (3) 加熱法 20 分鐘
- (4) 超音波加熱 50 °C，20 分鐘

結果發現在相同狀況之下(野甘草粉末 1 g) 所提取出來 luteolin 的含

量(4) > (3) > (1) > (2)。故選用超音波加熱法，可以使萃取時間短，效率高。

為了確保 luteolin 的提取完全，我們將野甘草的粉末 1 g，以 10 ml MeOH 重複提取 4 次之後，將第 4 次所得萃取液進樣 HPLC(重複三次)，發現第 4 次的萃取液裡已不到偵測 luteolin 的存在。因此由此實驗可知：luteolin 可以利用 10 ml MeOH 提取三次的方法，完全提取。

## 2、luteolin 的定量：

在本研究中，由於所採集的野甘草均是在中部地區採集到，因此無法比較各地區野甘草的含量。

如表 21 所示，可以發現 2004 年 12 月 30 所採集的野甘草，其 luteolin 含量遠低於另外兩次採集的含量，其正確原因仍須進一步探討。

## 3、不同部位的 luteolin 含量

野甘草各部位的 luteolin 含量測定，我們將野甘草各部位分開來，各取 1 g，依上述提取方法處理，所得結果如圖 34 及表 23。可以顯示出，在野甘草各個部位的樣品中，luteolin 含量最高的為果的部份，而根部則因含量太少而無法偵測其含量。各部位的含量比較則為：果 > 葉 > 莖 > 根。

表 23：野甘草中各部位每克中 luteolin 含量

Parts	Contents ( $\mu\text{g}$ )	Contents (%)
Root	0	0
Stem	2.17155	0.00022
Leaf	9.84021	0.00098
fruit	86.3601	0.0086

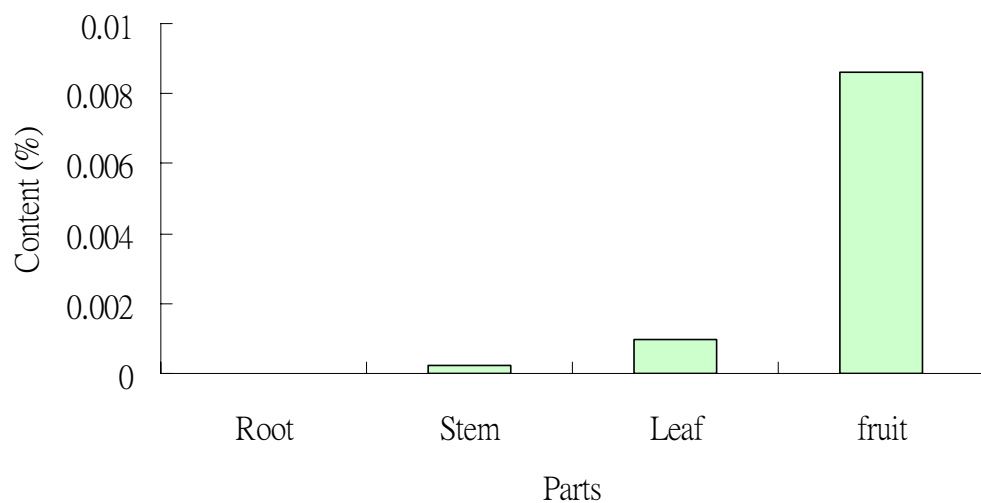


圖 34：野甘草中各部位 luteolin 含量比較



## 第五節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的指紋圖譜研究

### 一、野甘草植物之層析圖譜

如圖11，我們選取的10個 peak (表24)，以luteolin(peak 8)之波峰為基準，計算這10個波峰的高度與luteolin波峰的高度比，得其比值(表25)，繪製成折線圖(圖35)，比較各波峰之間的關係。

表24：野甘草各peak 之滯留時間

波峰 標號	Retention Time (min)	波峰 標號	Retention Time (min)
1	9.41	6	18.69
2	10.11	7	19.39
3	13.12	8	22.75
4	14.80	9	24.85
5	16.32	10	27.44

表25：野甘草在HPLC中各peak高度與luteolin peak之高度比

Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8	Peak 9	Peak 10
5.45	2.98	2.55	0.66	0.91	2.28	2.51	1.00	0.34	0.40

計算所有樣品中這10個滯留時間的波峰高度(intensity(AU))比，來制定標準的野甘草圖形。將所有的資料繪成圖表(圖35)，比較所選取的波峰之間的關係。一般，相同品種的植物其成分比應該類似。

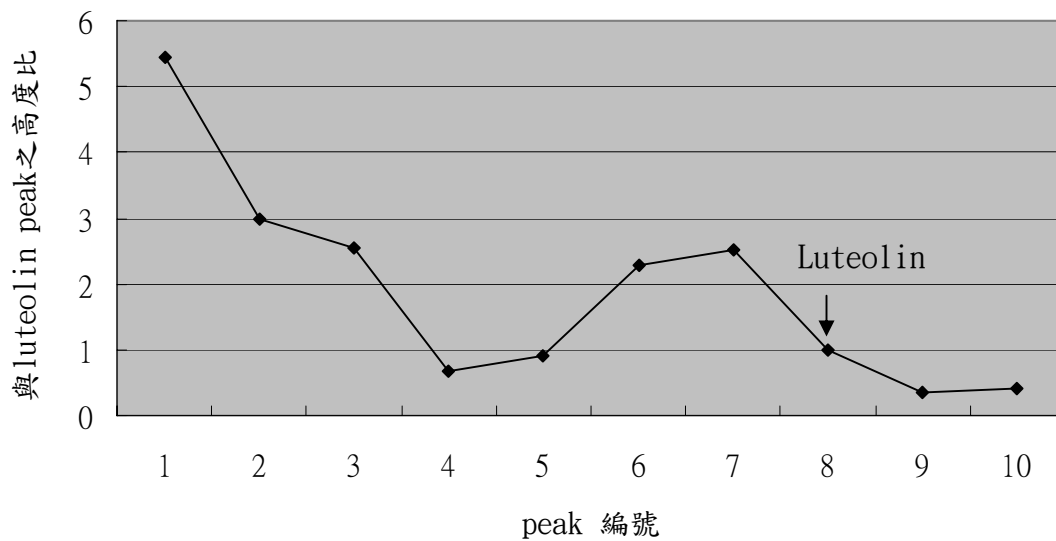


圖35：野甘草之HPLC指紋圖譜

## 二、野甘草植物 PCR 之研究

rDNA ITS序列是近年來用於探討植物種內變異和種間、近緣屬間分子系統關係的重要分子標記之一，隨著時代的進步，利用基因體定序資料庫來鑑別植物基原成為一個新的趨勢。高等植物的核糖體DNA( nuclear ribosomal DNA , rDNA)是由串聯重複排列的單位組成，每個單位包括編碼區和內轉錄間隔區，編碼區包括18S、5.8S 及 26S rRNA等三個基因 (圖36)，序列高度保守；編碼區之間為內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)，依順序分為第一轉錄間隔區(ITS1)和第二轉錄間隔區(ITS2)<sup>69-71</sup>。在轉錄過程中，當rDNA初轉錄形成一個轉錄單位(transcription unit)時，經過一系列製程(processing)後，上述2個轉錄間隔區會在製程中除去，形成成熟的rRNA(mature RNA)。成熟的rRNA包含18S、5.8S 和 26S rRNA，會與核糖體蛋白組成核糖體(ribosome)，而核糖體即是蛋白質合成的地點。因此，rDNA在蛋白質合成、生物生長、發育與生殖上扮演重要角色<sup>72</sup>。



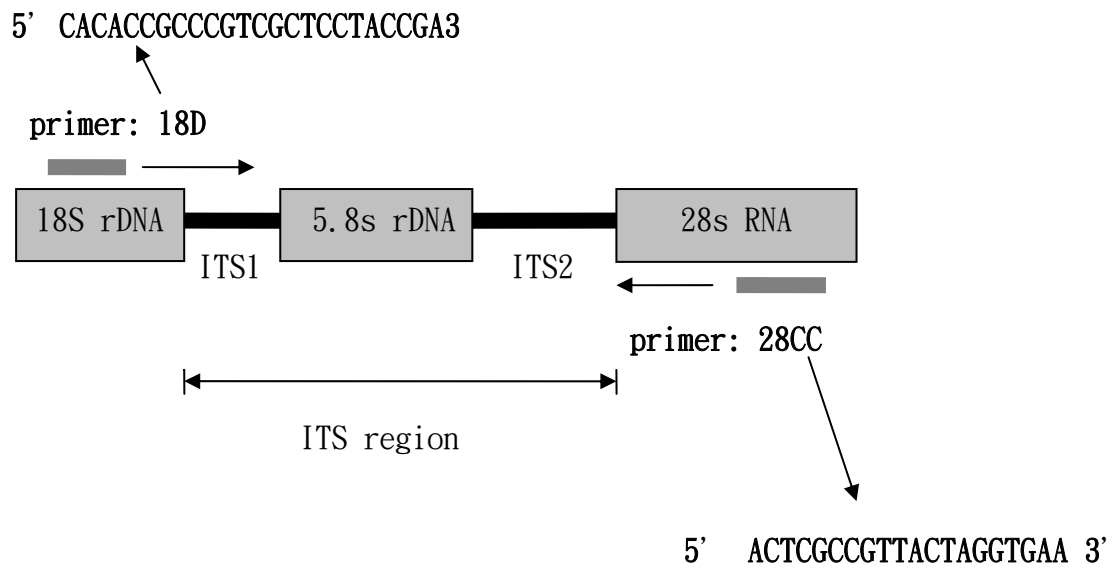


圖 36：高等植物 ribosomal DNA 結構圖，圖示為 internal transcribed spacer (ITS) 區域與 18S、5.8S 及 26S rDNA 之相對位置以及 intergenic spacer (IGS) 之位置

另外，在 rDNA 之序列結構中，在 18S、5.8S 和 26S rRNA 基因區中之序列，在不同物種間相當一致；但在 ITS 和 IGS 的區域中，不同物種間之長度及序列常有很大變異，可以用來鑑別不同的物種。ITS 區序列進化速度較快，其速度恰與近緣種進化較一致，因此被廣泛用於高等植物近緣種的鑑別。

台灣產野甘草在民間廣泛的使用，為了建立此植物的鑑定基礎，本研究利用基因體 DNA 萃取技術，萃取野甘草之 DNA，採用一組引子：18D 及 28CC (圖 37)。引子長度 18D 為 24 mer，28CC 為 20 mer。經過 DNA 的萃取、PCR 擴增，將台灣產野甘草 rDNA 的 ITS 區域加以複製，並進一步分析該序列，希望能用於品種鑑定、育種及親緣研究等方面。

18D：5' CACACCGCCCGTCGCTCCTACCGA-3'

28CC：5' ACTCGCCGTTACTAGGTGAA-3'

圖 37：野甘草之 PCR 引子

利用上述這組引子可以有效將野甘草 rDNA 之 ITS 區域複製，經過進一步定序

後，序列長為 821 bp (圖 38)。將此序列送入基因庫進行比對，證實此 DNA 片段為 rDNA 之 ITS 區域，其中有 142 bp 屬於 18S rDNA 基因 3' 端，66 bp 屬於 26S rDNA 基因 5' 端，真正屬於 ITS 區域的序列有 613 bp，其中有 196 bp 為 ITS1

18S rDNA gene 3' 端：

TCCCGTGTCG GAGTGTTCCG ATCGCGACGA CGTGAGCGGT TCGCTGCCCCG CGACGTCGCG  
AGAAGTCCAC TGAACCTTAT CATTTAGAGG AAGGAGAAGT CGTAACAAGG TTTCCGTAGG  
TGAACCTGCG GAAGGATCAT TG

ITS 1：

TCGAAACCTT CAAATCAGAC CCGCGAACAC GTTTCAAAAC AAGATCCGCC GCCCGGCCTG  
CGCCCCGTGC GTCCGTCCGG TCGGGTCTAA CAAACCCCGG CGCAAACGCG CCAAGGAAAA  
CTATGAAAGA AGCGCCGGCC CTCCCGAGAC CCGTCCGCGG TGTGCGAGGG GGAACCGTG  
CGTCTCTTGA AATGTC

5. 8S rDNA gene：

TAAACGACTC TCGGCAACGG ATATCTCGGC TCTCGCATCG ATGAAGAACG TAGCGAAATG  
CGATACTTGG TGTGAATTGC AGAATCCCGT GAACCATCGA GTCTTTGAAC GCAAGTTGCG  
CCCGAAGCCA TTAGCCGAG GGCACGTCTG CCTGGGCGTC ACGC

ITS 2：

ATCGCGTCGC CCCCCTCCCC ATCCCTCTCG AAAGAAGGGG TGAGGCCGCA GGTGGGGCGG  
AGATTGGCCT CCCGTGGTAT TCTATCCCGC GGCCGGCCCA AATGCGATCC CGCACCGGCG  
GAAGTCACGA CTAGTGGTGG TTGAACCCTC AACGCGCGTG CTGTCGTGGC GGACTCCGTC  
CGGTGTACGG GCATCATATC GACCCAACGG CCCTTTGTCT CTCTCTCACG AGCGTAGCGA  
AGAGCCTCCG ACC

26S rDNA gene 5' 端：

GCGACCCAG GTCAGCGGA CTACCCGCTG AGTTTAAGCA TATCATAAGC GGAGGAAAGG  
AACTAC

圖 38：台灣產野甘草之序列

序列，164 bp 為 5.8S rDNA 基因，253 bp 為 ITS2 序列。此結果登錄於 NCBI (The National Center for Biotechnology Information) 的 GenBank 中，登錄碼為 AY963776。

得到野甘草植物的序列之後，查看 NCBI 的 Genbank 發現澳洲也有學者針對此依植物進行 rDNA 序列的鑑定，其登錄碼為 AY492119<sup>73</sup>，將兩種序列進行比對，結果如圖 39 發現澳洲產與台灣產有著些許的差異，是因產地而引起，或因品種不同而引起，有待進一步檢討。

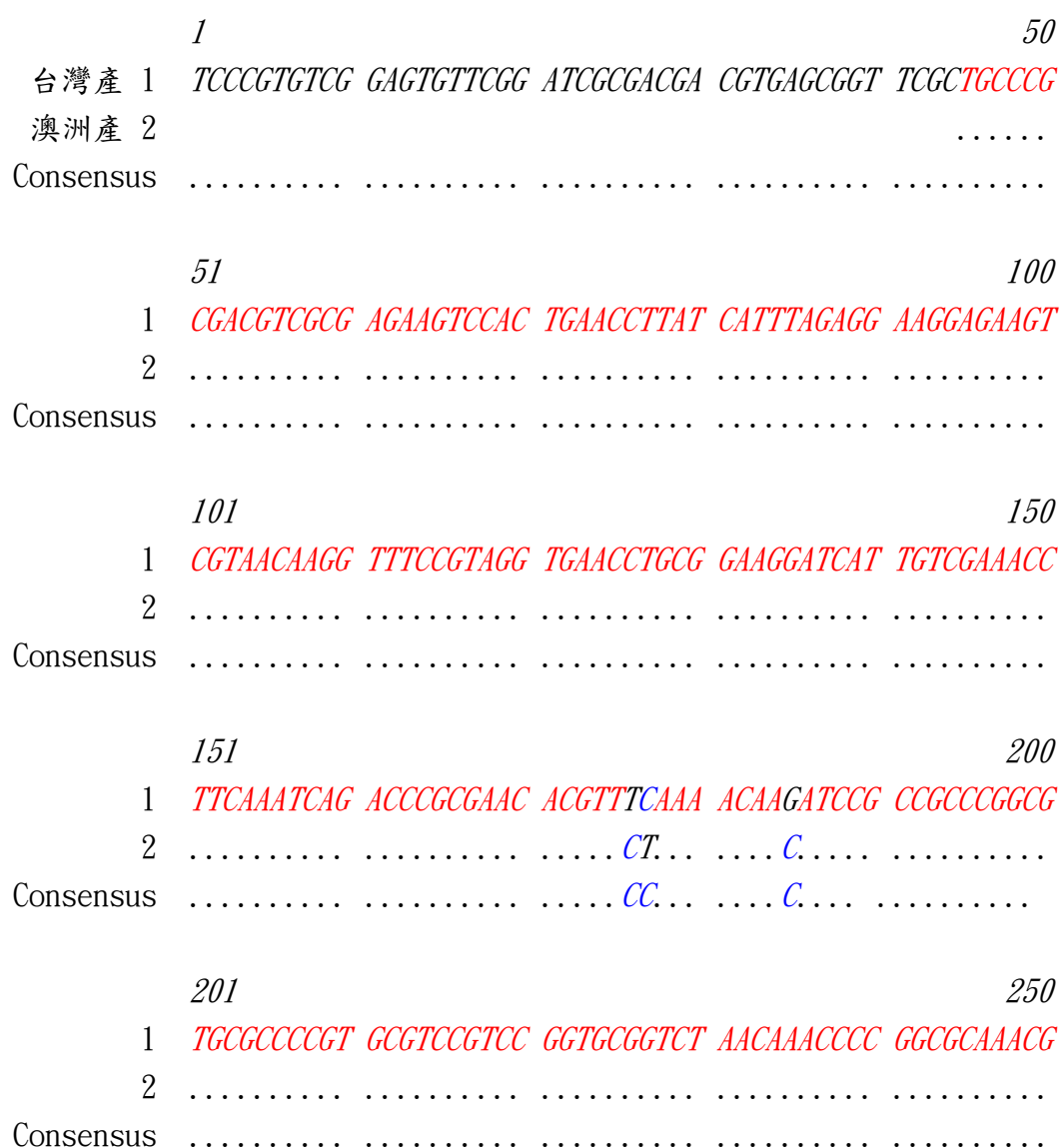


圖 39：台灣產野甘草與澳洲產野甘草之比對。1. 台灣產，2. 澳洲產

	<i>251</i>	<i>300</i>
1	<i>CGCCAAGGAA AACTATGAAA GAAGCGCCGG CCCTCCCAG ACCCGTCCGC</i>	
2	.....	
Consensus	.....	
	<i>301</i>	<i>350</i>
1	<i>GGTGTGCGAG GGGGGAACCG TCGTCTCTT GAAATGTCTA AACGACTCTC</i>	
2	..... <i>C</i> .....	
Consensus	..... <i>C</i> .....	
	<i>351</i>	<i>400</i>
1	<i>GGCAACGGAT ATCTCGGCTC TCGCATCGAT GAAGAACGTA GCGAAATGCC</i>	
2	.....	
Consensus	.....	
	<i>401</i>	<i>450</i>
1	<i>ATACTTGGTG TGAATTGCAG AATCCCGTGA ACCATCGAGT CTTTGAACGC</i>	
2	.....	
Consensus	.....	
	<i>451</i>	<i>500</i>
1	<i>AAGTTGCGCC CGAAGCCATT AGGCCGAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC</i>	
2	.....	
Consensus	.....	
	<i>501</i>	<i>550</i>
1	<i>GCATCGCGTC GCCCCCTCC CCATCCCTCT CGAAAGAAGG GGTGAGGCCG</i>	
2	..... <i>T</i> .....	
Consensus	..... <i>C</i> .....	
	<i>551</i>	<i>600</i>
1	<i>CAGGTGGGGC GGAGATTGGC CTCCCGTGGT ATTCTATCCC GCGGCCGGCC</i>	
2	..... <i>C</i> .....	
Consensus	..... <i>C</i> .....	

圖 39(續)

	601	650
1	<i>CAAATGCGAT CCCGCACCGG CGGAAGTCAC GACTAGTGGT GGTGAACCC</i>	
2	..... T.....	
Consensus	..... G.....	
	651	700
1	<i>TCAACGCGCG TGCTGTCGTG GCGGACTCCG TCCGGTGTAC GGGCATCA</i>	
2	..... T..... GN..... G.	
Consensus	..... C..... AN..... G.	
	701	750
1	<i>TCGACCCAAC GGCCCTTTGT CTCTCTCTCA CGAGCGTAGC GAAGAGCCTC</i>	
2	..... N.....	
Consensus	..... N.....	
	751	800
1	<i>CGACCGCGAC CCCAGGTCAG CGGGACTACC CGCTGAGTTT AAGCATATCA</i>	
2	.....	
Consensus	.....	
	801	821
1	<i>TAAGCGGAGG AAAGGAACTA C</i>	
2	.....	
Consensus	.....	

圖 39(續)

另外，在本研究中，參考小蘗科八角蓮屬 (*Dysosma species*) 之DNA定序，採用一組引子<sup>74</sup>，18D 及28CC，利用基因體DNA萃取技術，萃取臺灣產野甘草植物新鮮葉子之DNA，結果發現，臺灣產野甘草之ITS1、5.8S rRNA 基因及ITS2 之長度與G+C百分比和其他高等植物類似。野甘草植物之5.8S rRNA基因長度為164 bp，G+C百分比為54.9 %。ITS1之G+C百分比為62.2 %，ITS2區域之G+C百分比為64.8 % (表26)。綜合已發表之高等植物 rDNA 之ITS 各區的長度與 G+C 百分比<sup>75</sup> (表27)，5.8S rRNA基因之長度可於162~167 bp之間，但多為163 或164 bp；G+C 百分比幾乎皆在 50~60 %間。與其他高等植物之相同區域相比，野甘草之

ITS區域在長度及G+C百分比上並無特別之處。

就演化觀點而言，5.8S rRNA 基因區為比較保守的區域，但在ITS1及ITS2區域卻變化很大，乃是因為基因區攸關生物體的存歿，不適當的變異會造成生物體死亡，然而，ITS1及ITS2 區域在演化過程中容易產生變異，因其變異度大，故適合探討較相近分類群之親緣關係 (phylogenetic relationship)。

表 26：野甘草 ITS 區域中各序列之長度與 G+C 百分比 \*表示 (ITS1+5.8S+ITS2)，\*\*表示 (18S+ITS1+5.8S+ITS2+26S)

	18S		ITS1		5.8S		ITS2		*		26S		**	
	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)
<i>S. dulcis</i>	142	55.6	196	62.2	164	54.9	253	64.8	613	61.3	66	54.5	821	59.8

>18S : TCCCGTGTCCGAGTGTTCCGGATCGCGACGACGTGAGCGGTTTCGCTGCCCGGACGTCGCG  
AGAAGTCCACTGAACCTTATCATTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG  
TGAACCTGCGGAAGGATCATTG

>5.8S : TAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATG  
CGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG  
CCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGC

>26S : GCGACCCCAGGTCAGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCATAAGCGGAGGAAAGG  
AACTAC

另外，雖然ITS1, ITS2 區域序列變異較快，但是在高等植物中，ITS1 區域中，還是可以發現序列保留區，GGCRY-(4to7n)- GYGYC AAGGAA (Y表C或T, R表G或A)。因此推測此保留區在rDNA初轉錄形成一個轉錄單位時，扮演著將之修飾形成成熟的rRNA (mature RNA) 的重要角色。在本研究中，野甘草植物的序列保留區為GGCGC【AAAC】GCGCCAAGGAA。與其他高等植物序列保留區比對發現結果一致 (圖40)<sup>76</sup>。但是其他高等植物有些與序列保留區中會有一些不吻合之處，因此在高等植物中ITS1序列保留區的研究方面，需累積更多資料方能找出真正序列保留區。

表27：野甘草rDNA之ITS各區長度與G+C百分比及與其他高等植物之比較

Taxa, reference	Family	ITS1		5.8S rDNA		ITS2	
		Length	G+C	Length	G+C	Length	G+C
		bp	%	bp	%	bp	%
<b>Monocots</b>							
<i>Oryza sativa</i>	Gramineae	196	72.7	163	59.5	232	59.5
<i>Imperata cylindrica</i> *	Gramineae	205	65.9	163	57.1	216	
<i>Triticum aestivum</i>	Gramineae	222	62.2	163	59.5	217	61.3
<i>Agave dasylirioides</i>	Gramineae	250	65.2			239	70.2
<i>Oncidium vokalati</i>	Agavaceae	211	54.5	163	58.3	247	56.3
<b>Dicots</b>							
<i>Scoparia dulcis</i>	Scrophulariaceae	196	62.2	164	54.9	253	64.8
<i>Mimulus glaucescens</i>	Scrophulariaceae	206	44.0	162	50.6	225	47.0
<i>Paeonia</i>	Ranunculaceae	267	54.3-56.6	164	53.7	220	57.2-59.5
<i>Sinapis alba</i>	Cruciferae	265	50.6	163	52.8	188	54.3
<i>Canella winterana</i>	Canellaceae	272	62.5	163	55.8	209	62.6
<i>Arceuthobium americanum</i>	Viscaceae	209	34.0	167	41.9	227	30.4
<i>Vicia faba</i>	Leguminosae	235	51.9	164	50.6	208	49.6
<i>Vigna radiata</i>	Leguminosae	205	60.0	163	52.8	220	59.1
<i>Gossypium</i>	Malvaceae	293-294	58.0			210-226	61.0
<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	215	49.4	164	54.2	224	52.3
<i>Apioideae</i>	Apiaceae	204-221	49.1-57.7			216-226	42.7-59.6
<i>Osmanthus fragrans</i>	Oleaceae	237	57.4	163	52.1	217	56.2
<i>Nicotiana rustica</i>	Solanaceae	216	69.4	163	55.2	217	65.4
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanaceae	236	62.3	163	55.2	224	68.3
<i>Populus deltoides</i> )	Salicaceae	214	66.8	164	55.4	207	69.5

Many higher plants	GGCRY-(4 to 7n)-GYGYCAAGGAA
<i>Scoparia dulcis</i>	GGCGC AA --- AC GCGCCAAGGAA
<i>Amica mollis</i> :	GGCAC AAC -- AT GTG <u>CC</u> AAGGAA
<i>Arabidopsis thaliana</i> :	GGCAC GAA -- AA GTG <u>T</u> CAAGGAA
<i>Sinapis alba</i> (mustard):	GGCAC GAA -- AA GTG <u>T</u> CAAGGAA
<i>Tasmannia laceolata</i> :	GGCGC AAC -- GG GCGCCAAGGAA
<i>Drimys winteri</i> :	GGCGC AAT -- GG GCGCCAAGGAA
<i>Oryza sativas</i> (rice):	GGCGC CGA -- CG GCG <u>T</u> CAAGGAA
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato):	GGCGC GGA -- AA GCGCCAAGGAA
<i>Triticum aestivum</i> (wheat):	GGCGC CGA -- AG GCG <u>T</u> CAAGGAA
<i>Daucus carota</i> (carrot):	GGCGC TAG -- AT GCGCCAAGGAA
<i>Vicia faba</i> (broad bean):	GGCGC TGA -- AA GCG <u>T</u> CAAGGAA

圖 40：許多高等植物 rDNA 的 ITS1 之序列保留區與野甘草之相對應序列比較。序列中 R 表示 G 或 A；Y 表示 C 或 T

綜合以上所述，ITS 序列是鑑定植物近緣種非常理想的指標，通過序列測定、同源性的比較，可成為一種很好的分子標記、可用於植物品種的鑑定及與其外觀相似品種的鑑定，供應用於野甘草植物品種鑑定、育種及品種專利，可做為未來市售標準檢驗之準則。



## 第五章 結論

### 第一節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的形態鑑定

野甘草屬(*Scoparia*)植物，在世界約有 20 種，在臺灣只有一種，即為野甘草(*Scoparia dulcis*)，在台灣民間廣泛使用，常有混用誤用的情形發生，為了確立其形態，本研究利用光學顯微鏡及掃描式電子顯微鏡，觀察野甘草植物的外部形態，包括根、莖、葉、花、果實、種子以及花粉的形態，已確立形態鑑定的基礎。

在本研究中所看到的植物特徵與文獻大部分均相符，只有花冠的顏色，據 *Flora of Taiwan*<sup>2</sup> 的描述為淡紫色，但其他的文獻<sup>(1,7-9,10,11)</sup> 所描述均為白色，而本研究所看到的花冠亦為白色。

### 第二節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的生藥組織學研究

生藥鑑定的方法有許多種，例如：組織切片，色層分析法(GC, HPLC, …等)、光譜法(UV, IR, …等)與 X 射線繞射法，對植物所含成分進行分析等，而其中組織切片法是最經濟實惠且信賴度高的一種方法。花費不多即能鑑別植物特徵。

本研究依生藥組織學原則，記述其內部組織構造，包括莖的橫切，縱切，葉的橫切，縱切，並以光學顯微鏡觀察其組織，如圖 20，此結果可為野甘草屬植物鑑定或臨床使用等進一步研究之參考。

### 第三節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的成分分離

本實驗由野甘草甲醇萃取物之正己烷得到 2 個純化合物、氯仿層中得 2 個純化合物，乙酸乙酯層得到 1 個純化合物，經證實為下列化合物：

(1)正己烷層

Glutinol

Friedelin

(2)氯仿層

Betulinic acid

Coixol(6-Methoxybenzoxazolinone)

(3)乙酸乙酯

Luteolin

上述化合物中均為野甘草已知之成分，其中，glutinol 可能發展為生技之產品，將進一步探討其含量。

### 第四節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物中木犀草素

#### (luteolin)的定量

#### 1、野甘草植物 luteolin 提取方法之選擇

luteolin 可以利用 10 ml MEOH 提取三次的方法，完全提取。

#### 2、野甘草植物 luteolin 之定量

本研究所採集之野甘草其含量約在 0.00197 ~ 0.00563 % 之間

#### 3、不同部位的 luteolin 含量：

野甘草的各個部位中， luteolin 含量最高的部位是在果的部份，而根部則因含量太少而無法偵測其含量。各部位的含量比較則為：果 > 葉 > 莖 > 根。



## 第五節 野甘草(*Scoparia dulcis*)植物的指紋圖譜研究

### 一、野甘草植物之層析圖譜

對於 HPLC 波峰的分析結果如表 24，本研究建立野甘草的層析圖譜，可以作為鑑定上的參考。

### 二、野甘草植物 PCR 之研究

本研究中，台灣產野甘草植物序列長為 821 bp。將此序列送入基因庫進行比對，證實此 DNA 片段為 rDNA 之 ITS 區域，其中有 142 bp 屬於 18S rDNA 基因 3' 端，66 bp 屬於 26S rDNA 基因 5' 端，真正屬於 ITS 區域的序列有 613 bp，其中有 196 bp 為 ITS1 序列，164 bp 為 5.8S rDNA 基因，253 bp 為 ITS2 序列。5.8S G+C 百分比為 54.9 %。ITS1 之 G+C 百分比為 62.2 %，ITS2 區域之 G+C 百分比為 64.8 %。

將此結果與 NCBI 的 Genbank 中澳洲學者所定序之 *Scoparia dulcis* 序列，進行比對，結果發現澳洲產與台灣產有著些許的差異，是因產地而引起，或因品種不同而引起，有待進一步檢討。

雖然 ITS1, ITS2 區域序列變異較快，但是在高等植物中，ITS1 區域中，還是可以發現序列保留區，GGCRY-(4to7n)- GYGYC AAGGAA (Y 表 C 或 T, R 表 G 或 A)。因此推測此保留區在 rDNA 初轉錄形成一個轉錄單位時，扮演著將之修飾形成成熟的 rRNA (mature RNA) 的重要角色。在本研究中，野甘草植物的序列保留區為 **GGCGC** **【AAAC】** **GCGCCAAGGAA**。此結果可用於植物品種的鑑定及與其外觀相似品種的鑑定，供應用於野甘草植物品種鑑定、育種及品種專利，可做為未來市售標準檢驗之準則。

## 參考文獻

1. N. Y. Chiu (邱年永) and K. H. Chang (張光雄): 原色台灣藥用植物圖鑑(1), 南天書局, 臺北, p. 195, 1983
2. M. J. Deng and J. C. Wang: *Scoparia* L. Flora of Taiwan, Published by the Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Second Edition, Taipei, 4: 621~623, 1998.
3. Michaeln A. Riel, Dennis E. Kyle, Wilhous: Efficacy of Scopadulcic Acid A Against *Plasmodium falciparum* in Vitro. *J. Nat. Prod.* 65: 614~615, 2002.
4. 李宗友等: 野甘草的化學、藥理. *國外醫學中醫中藥分冊*. 16[2]: 11~14, 1994.
5. Kawasaki M., Hayashi T., Arisawa M., Morita N., Berganza LH.: 8-Hydroxytricetin 7-glucuronide, A Beta-Glucuronidase Inhibitor From *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry*. 27[11]: 3709~3711, 1988.
6. 趙穩興, 梁崇禮, 陳忠民, 龐榮清, 趙彬, 陳志榮: 木犀草素抑制肝星狀細胞增殖及其膠原合成. *中華肝臟病雜誌*. 10[3]: 204~206, 2002.
7. 江蘇新醫學院: 中藥大辭典(下), 上海人民出版社, 上海, p. 2132, 1975.
8. 國家中醫藥管理局中華本草編委會: 中華本草(第7冊), 上海科學技術出版社, 上海, p. 388~390, 1999.
9. 中國科學院中國植物志編輯委員會: 中國植物志, 科學出版社, 北京, 68: 1~212, 1963.
10. 楊遠波、劉和義、呂勝由、彭鏡毅、施炳霖: 臺灣維管束植物簡誌(4), 中華民國行政院農業委員會出版/發行, 臺北, p. 171, 2000.
11. 鄭武燦: 台灣植物圖鑑(2), 國立編譯館, 臺北, p. 1308, 2000.

12. 甘偉松：藥用植物學，國立中國醫藥研究所，臺北，p.503, 1969.
13. Hayashi T., Okamura K., Kawasaki M., Morita N.: Production Of Diterpenoids By Cultured Cells From Two Chemotypes Of *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry*. 33[2]: 353~356, 1993.
14. Hayashi T., Gotoh K., Kasahara K.: Production Of Scopadulciol By Cultured Tissues Of *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry*. 41[1]: 193~196, 1996.
15. Hayashi T., Kasahara K. and Sankawa U.: Efficient Production Of Biologically Active Diterpenoids By Leaf Organ Culture Of *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry*. 41: 517~520, 1997.
16. Hayashi T., Asai T., Sankawa U.: Mevalonate-Independent Biosynthesis Of Bicyclic And Tetracyclic Diterpenes Of *Scoparia Dulcis* L. *Tetrahedron Letters*. 40: 8239~8243, 1999.
17. Begum S.A., Nahar N., Mosihuzzsaman M.: Chemical And Biological Studies Of *Scoparia Dulcis* L. Plant Extracts. *J Bangladesh Acad Sci*. 24[2]: 141~148, 2000.
18. Satynarayans K.: Chemical Examination Of *Scoparia Dulcis* L. *J Indian Chem Soc*. 46[8]: 765~766, 1969.
19. Ahmed M., Jakupovic J.: Diterpenoids From *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry*. 29[9]: 3035~3037, 1990.
20. Ahmed M., Shikha H.A., Sadhu S.K., Rahman M.T., Datta B.K.: Analgesic, Diuretic, And Anti-Inflammatory Principle From *Scoparia Dulcis*. *Pharmazie*. 56[8]: 657~660, 2001.
21. Li J.X., Li Y.C., Nie R.L., Zhou J.: Coixol And Betulinic Acid Of *Scoparia Dulcis* L. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*. 3: 475~477, 1981.
22. Hayashi T., Okamura K., Tamada Y., Lida A., Fujita T., Morita N.:

- A New Chemotype Of *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry*. 322: 349~352, 1993.
23. Hayashi T., Asano S., Mizutani M., Takeguchi N., Kojima T., Okamura K., Morita N.: Scopadulciol, An Inhibitor Of Gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase From *Scoparia Dulcis*, And Its Structure-Activity Relationships. *J Nat Prod*. 54[3]: 802~809, 1991.
24. Hayashi T., Kishi M., Kawasaki M., Arisawa M., Shimizu M., Suzuki S., Yoshizaki M., Morita N., Tezuka Y., Kikuchi T., Berganza L. H., Ferro E., Basualdo L.: Scopadulcic Acid-A And -B, New Diterpenoids With A Novel Skeleton, From A Paraguayan Crude Drug "Tpychakuratu" (*Scoparia Dulcis* L.). *Tetrahedron Lett*. 28[32]: 3693~3696, 1987.
25. Hayashi T., Kishi M., Kawasaki M., Arisawa M., Morita N.: The Crystal Structure Of Scopadulcic Acid A From Paraguay Crude Drug "Tpycha Kuratu" (*Scoparia Dulcis*). *J Nat Prod*. 512: 360~363, 1988.
26. Hayashi T., Okamura K., Kawasaki M., Morita N.: Two Chemotypes Of *Scoparia Dulcis* In Paraguay. *Phytochemistry*. 30[11]: 3617~3620, 1991.
27. Hayashi T., Kawasaki M., Miwa Y, Taga T., Morita N.: *Chem Pharm Bull* 38[4]: 945~947, 1990.
28. Kawasaki M., Hayashi T., Arisawa M., Shimizu M., Horie S., Ueno H., Syogawa H., Suzuki S., Yoshizaki M., Morita N., Tezuka Y., Kikuchi T., Berganza L. H., Rerro E., Basualdo L.: Structure Of Scoparic Acid A, A New Labdane-Type Diterpenoid From A Paraguayan Crude Drug "Tpycha Kurata" (*Scoparia Dulcis* L.). *Chem Pharm Bull*. 35[9]: 3963~3966, 1987.
29. Hayashi T., Kawasaki M., Okamura K., Tamada Y., Morita N., Tezuka

- Y., Kikuchi T., Miwa Y., Taga T.: Scoparic Acid A, A Beta-Glucuronidase Inhibitor From *Scoparia Dulcis*. *J Nat Prod.* 55[12]: 1748~1755, 1992.
30. Mahato S. B., Das M. C., Sahu N. P.: Triterpenoids Of *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry.* 20: 171~173, 1981.
31. Ahsan Monira, Islam Sk. N., Gray Alexander I., Stimson William H.: Cytotoxic Diterpenes From *Scoparia Dulcis*. *J. Nat. Prod.* 66: 958~961, 2003.
32. Ferous A. J., Mamun M. A., Hasan C. M.: Glut-5(6)-en-3-beta-ol From The Aerial Parts Of *Scoparia Dulcis*. *Fitoterapia.* 64 [5]: 469, 1993.
33. Hayashi T., Uchida K., Hayashi K., Niwayama S., Morita N.: A Cytotoxic Flavone From *Scoparia Dulcis* L. *Chem Pharm Bull.* 36 [12]: 4849~4851, 1988.
34. Pereira-Martins S. R., Takahashi C. S., Tavares D. C., Torres L. M.: In Vitro And In Vivo Study Of The Clastogenicity Of The Flavone Cirsitakaoside Extracted From *Scoparia Dulcis* L. *Teratogen Carcinogen Mutagen.* 18[6]: 283~302, 1998.
35. Ramesh P., Nair A. G. R., Subramaniam S. S.: Flavonoids Of *Scoparia Dulcis* And *Stemodia Viscosa*. *Curr Sci.* 48: 67, 1979.
36. Kamperdick C, Lien T. P., Sung T. V, Adam G.: 2-Hydroxy-2-H-1,4-benzoxazin-3-one From *Scoparia Dulcis*. *Pharmazie.* 52[12]: 965~966 1997.
37. Chen C. M., Chen M. T.: 6-Methoxybenzoxazolinone And Triterpenoids From Roots Of *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry.* 15: 1997~1999, 1976.
38. Hayashi T., Gotoh K., Ohnishi K., Okamura K., Asamizu T.:



- 6-Methoxy-2-benzoxazolinone In *Scoparia Dulcis* And Its Production By Cultured Tissues. *Phytochemistry*. 37[6]: 1611~1614, 1994.
39. Griffiths L. A. : On The Distribution Of Gentisic Acid In Green Plants. *J Exp Biol*. 10: 437, 1959.
40. Pari L., Venkateswaran S. : Hypoglycemic Activity Of *Scoparia dulcis* L. Extract In Alloxan Induced Hyperglycemic Rats. *Phytotherapy Research*. 16[7]: 662~4, 2002.
41. Latha M., Paria L., Sitasawadb S., Bhondeb R. : Insulin-Secretagogue Activity And Cytoprotective Role Of The Traditional Antidiabetic Plant *Scoparia Dulcis* (Sweet Broomweed ). *Life Sciences*. 75: 2003 ~2014, 2004.
42. Hayashi T., Okamura K., Kakemi M., Asano S., Mizutanni M., Takeguchi N., Kawasaki M., Tezuka Y., Kikuchi T., Morita N. : Scopadulcic Acid B, A New Tetracyclic Diterpenoid From *Scoparia Dulcis* L. Its Structure, H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-Adenosine Triphosphatase Inhibitory Activity And Pharmacokinetic Behaviour In Rats. *Chem Pharm Bull*. 38[10]: 2740 ~2745, 1990.
43. Hayashi K., Niwayama S., Hayashi T., Nago R., Ochiai H. and Morita N. : In Vitro And In Vivo Antiviral Activity Of Scopadulcic Acid B From *Scoparia Dulcis* , Scrophulariaceae, Against Herpes Simplex Virus Type 1. *Antiviral Research*. 9[6]: 345~354, 1988.
44. Hayashi T., Arisawa M., Satomi Y., Iwashima A. : Antitumor-Promoting Activity Of Scopadulcic Acid B, Isolated From The Medicinal Plant *Scoparia Dulcis* L. *Oncology*. 50[2]: 100~103, 1993.
45. Freire S.M., Torres L.M., Roque N.F., Souccar C, Lapa A.J. : Analgesic Activity Of A Triterpene Isolated From *Scoparia Dulcis*

- L. (Vassourinha). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.* 86[2]: 149~51, 1991.
46. 周先樂，陳世明，楊政岷，徐灝：中藥藥理作用之研究(一)30種中藥的降壓作用之研究. *台灣醫誌.* 73: 729~739, 1974.
47. Dhawan B., Patnaik G., Rastogi R., Singh K., Tandon J. : Screening Of Indian Plants For Biological Activity. *Indian J Exp Biol.* 15: 208~219, 1977.
48. Freire S., Torres L., Souccar C., Lapa A. : Sympathomimetic Effects Of *Scoparia Dulcis* L. And Catecholamines Isolated From Plant Extracts. *J Pharm Pharmacol.* 48[6]: 624~628, 1996.
49. Hasrat Ja, De Backer Jp, Vauquelin G, Vlietinck Aj: Medicinal Plants In Suriname: Screening Of Plant Extracts For Receptor Binding Activity. *Phytomedicine.* 4[1]: 59~65, 1997.
50. G.Erdtman: Pollen Morphology And Plant Taxonomy-Angiosperm(An Introduction To Paltnology. I). New York, Hafner Publishing Company, 1966.
51. S.L.Dellaporta, J. Wood And J.B.Hicks: A Plant DNA Minipreparation: Version Ii. *Plant Mol Biol Reprtr.* 1: 19~21, 1983.
52. Tseng-Chieng Huang: Pollen Flora of Taiwan, Published by National Taiwan University Botany Department Press, p.2~8, 1972.
53. Antonio.G GonzaLez, Esteedian A. Ferro and Angel.G. Ravelo: Triterpenes From *Maytenus Horrida.* *Phytochemistry.* 26[10]: 2785~2788, 1987.
54. Betancor C., Freire R. : Three Triterpenes And Other Terpenoids From *Catha Cassnoids.* *Phytochemistry.* 19: 1989~1993, 1980.
55. Akihisa T., Yamamoto K., Tamura T., Kimura Y., Iida T., Nambbara

- T.: Triterpenoid ketones from *Lingnania chungii* Mc Clure.: arborinone, friedelin and glutinone. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 789~791, 1992.
56. Huang K.F., Yen Y.F.: Constituents of *Erythrina variegata*. *Chin. Pharm. J.* 49: 21~29, 1997
57. Chiu-Ming Chen and Ming-Yan Chen: 6-Methoxybenzoxazolinone And Triterpenoids From Roots Of *Scoparia Dulcis*. *Phytochemistry*. 15: 1997~1999, 1976.
58. Nagao T., Otsuka H., Kohda H., Sato T. and Yamasaki K.: Benzoxazinones From *Coix Lachryma-Jobi* Var. *Ma-Yuen*. *Phytochemistry*. 24[12]: 2959~2962, 1985.
59. Ludwig Nissler, Rolf Gebhardt, Stefan Bergr: Flavonoid Binding To A Multi-drug-resistance Transporter Protein: An STD-NMR Study. *Anal Bioanal Chem.* 379: 1045~1049, 2004.
60. 梁僑麗, 丁林生: 扁豆花化學成分研究. *中國藥科大學學報*. 27[4]: 205~207, 1996.
61. Maher J.J.: Interactions Between Hepatic Stellate Cells And The Immune System. *Semin Liver Dis.* 21: 417~426, 2001.
62. Kim H.K., Cheon B.S., Kim Y.H. *et al*: Effect Of Naturally Occurring Flavonoids On Nitric Oxide Production In The Microphage Cell Line Raw 264.7 And Their Activity Relationship. *Biochem. Pharmacol.* 58: 759~765, 1999.
63. Kawada N., Seki S., Lnoue M. *et al*: Effect Of Antioxidants, Revertrol, Quercetin And N-Acetylcysteine On The Function Of Cultured Rat Hepatic Stellate Cells And Kupffer Cells. *Hepatology*. 27: 1265~1274, 1998.
64. Susan Budavari, Maryadele J. O'Neil, Ann Smith, Patricia E. Heckelman: The Merck Index, Published by Merck & Co., Inc. p.5489,

- 1989.
65. 胡碧波, 蔣惠娣, 楊俊, 曾蘇: HPLC 法測定不同採收期杭白菊中木犀草素及其苷的含量. *浙江大學學報*. 33[1]: 29~32, 2004.
  66. 邱多隆, 王帥, 馬瀟, 趙亮, 蔣生祥: HPLC測定獨一味葉中木樨草素的含量. *中成藥*. 27[5]: 580~583, 2005.
  67. 馬瀟, 丁永輝, 徐培元, 趙建邦: HPLC測定藏藥獨一味膠囊中黃酮類成分的含量. *中成藥*. 27[6]: 657~659, 2005.
  68. C. Proestos, N. Chorianopoulos, G. J. E. Nychas, M. Komaitis: Rp-Hplc Analysis Of The Phenolic Compounds Of Plant Extracts. Investigation Of Their Antioxidant Capacity And Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1190~1195, 2005.
  69. Baldwin B., Sanderson M., Porter J. *et al*: The ITS Region Of Nuclear Ribosomal DNA : A Valuable Source Of Evidence On Angiosperm Phylogeny. *J. A Nn Missouri Bot Gard.* 85: 247, 1995.
  70. Sang T., Crawford D., Stuessy T.: Documentatio Of Reticulate Evolution In Peonies (Paeonia) Using Internal Transcribed Spacer Sequences Of Nuclear Ribosomal DNA: Implication For Biogeography And Concerted Evolution. *J. Proc Natl Acad Sci Usa* . 92: 6813, 1995.
  71. Coleman A., Jeffrey C.: Ribosomal DNA Its21 And Its22 Sequence Comparisons As A Tool For Predicting Genetic Relatedness. *J Mol Evol* 45: 168, 1997.
  72. 蔡奇助, 白佳惠, 蔡素蕙, 黃勝忠: 烏來杜鵑5.8s rRNA基因與內轉錄間隔區之選殖與分析. *台中區農業改良場研究彙報*. 63: 1~11, 1999.
  73. Albach D.C., Meudt H. and Oxelman B.: Piecing Together The 'New' Plantaginaceae. *Am. J. Bot.* 92[2]: 297~315, 2005.

74. R. Z. Fu, J. Wang, Y. R. Sun And P. C. Shaw : Extration Of Genomic DNA Suitable For PCR Analysis From Dried Plant Rhizomes/Roots. *Bio Techniques*. 25[5]: 796~798, 800~801, 1998.
75. 李昭瑩：台灣產油柑屬（*Phyllanthus*）植物之生藥學研究 博士論文，中國醫藥大學，臺中，p.153, 2005.
76. 蔡奇助，黃勝忠，易美秀：文心蘭‘草莓’品種5.8SrRNA基因與內轉錄間隔區之選殖. *台中區農業改良場研究彙報*. 62: 31~40, 1999.



# 附錄

## 目錄

一、 成果發表·····	117
二、 化合物光譜圖·····	118
三、 Sequences 原始圖·····	130
四、 NCBI 資料·····	131



## 一、成果發表

1. Identification of *Scoparia dulcis* L. Based on ITS Sequence of Nuclear Ribosomal DNA on Taiwan

以 rDNA 鑑定台灣產野甘草之 ITS 序列

蔡仁傑 李昭瑩 邱泰惠

94 年度 第 20 屆天然藥物研討會議程 2005/6/24~25

天然藥物學會 國立中國醫藥研究所

論文編號為 P-87 p.145 282

2. Pharmacognostical studies on *Scoparia dulcis* L. in Taiwan

蔡仁傑 李昭瑩 邱泰惠

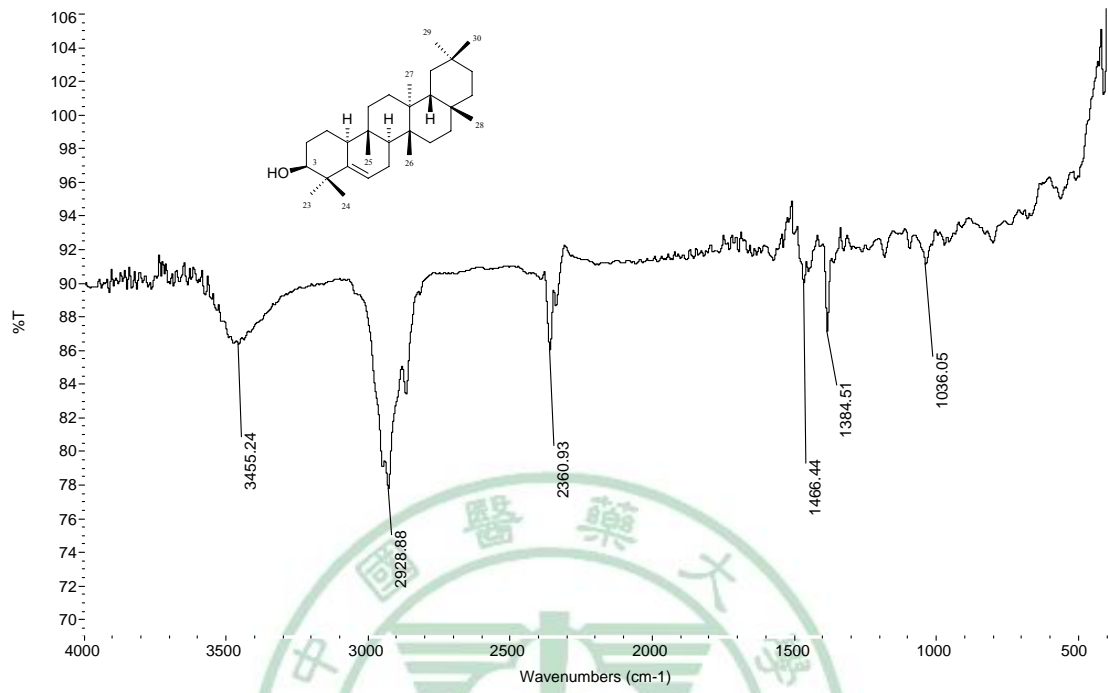
95 年度 中華民國生藥學會暨研討會 2006/5/7

中華民國生藥學會 全國大飯店

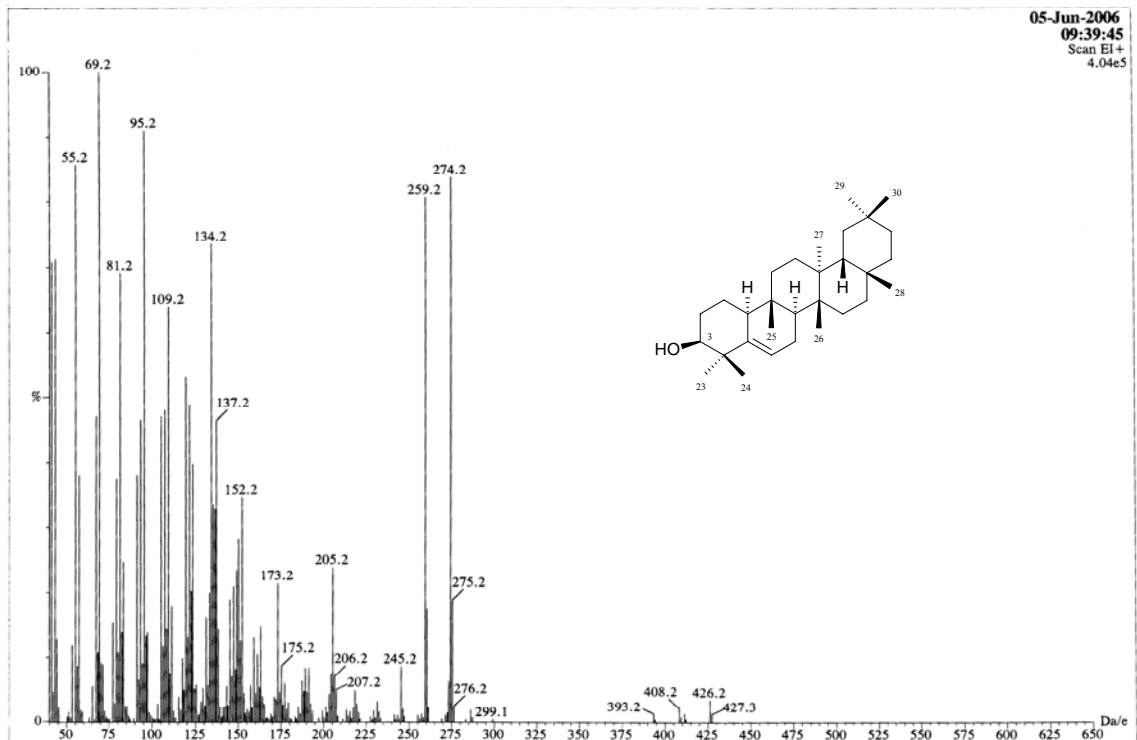
論文編號為 9 p.67



## 二、化合物光譜圖

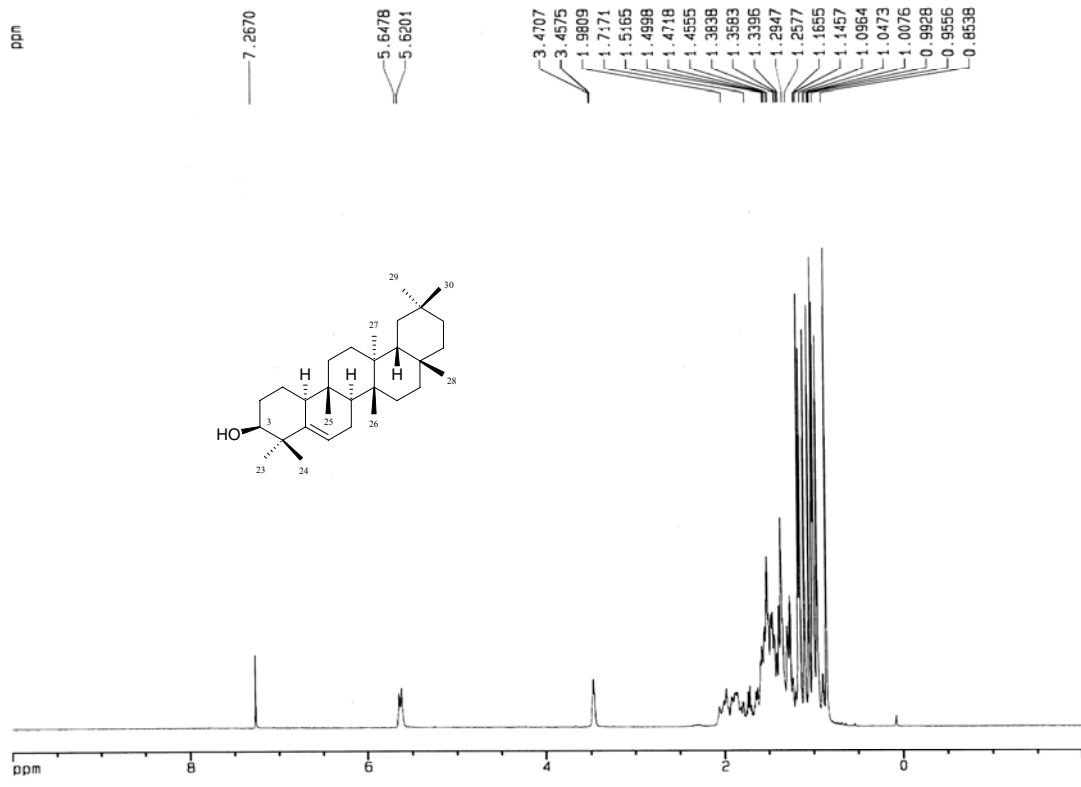


附圖 1：Glutinol 之 IR(KBr)光譜圖

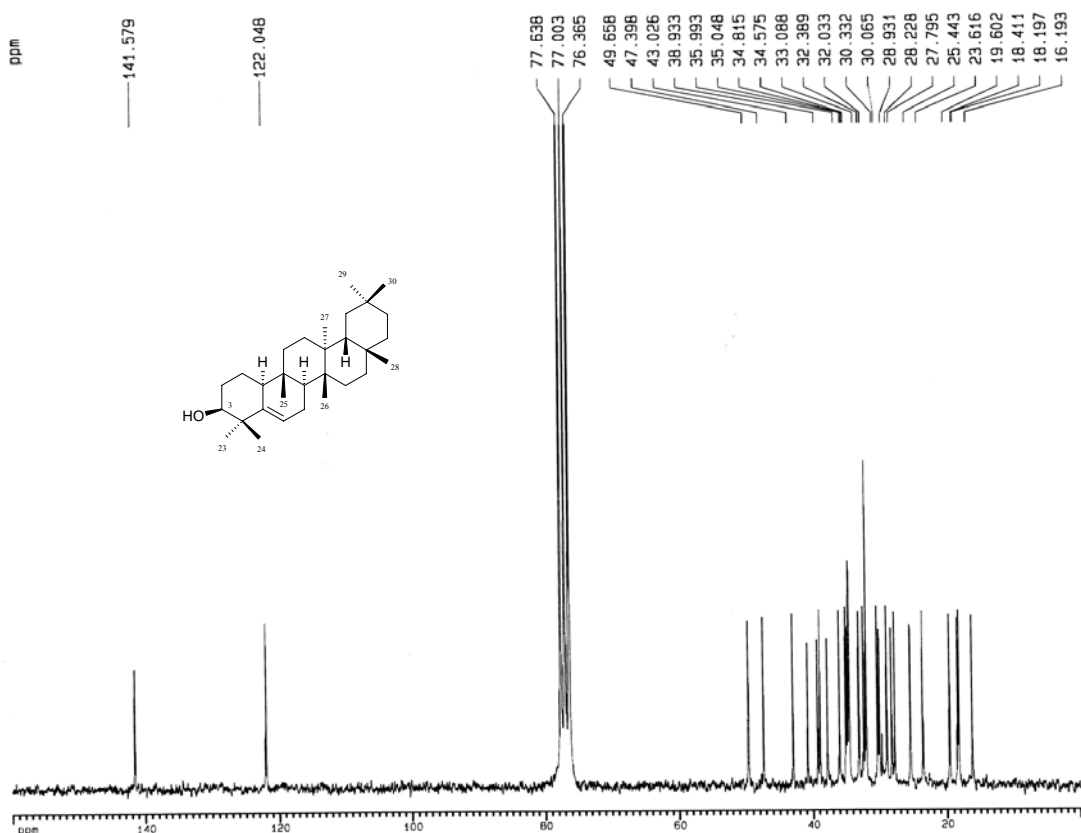


附圖 2：Glutinol 之 Mass(EI)光譜圖

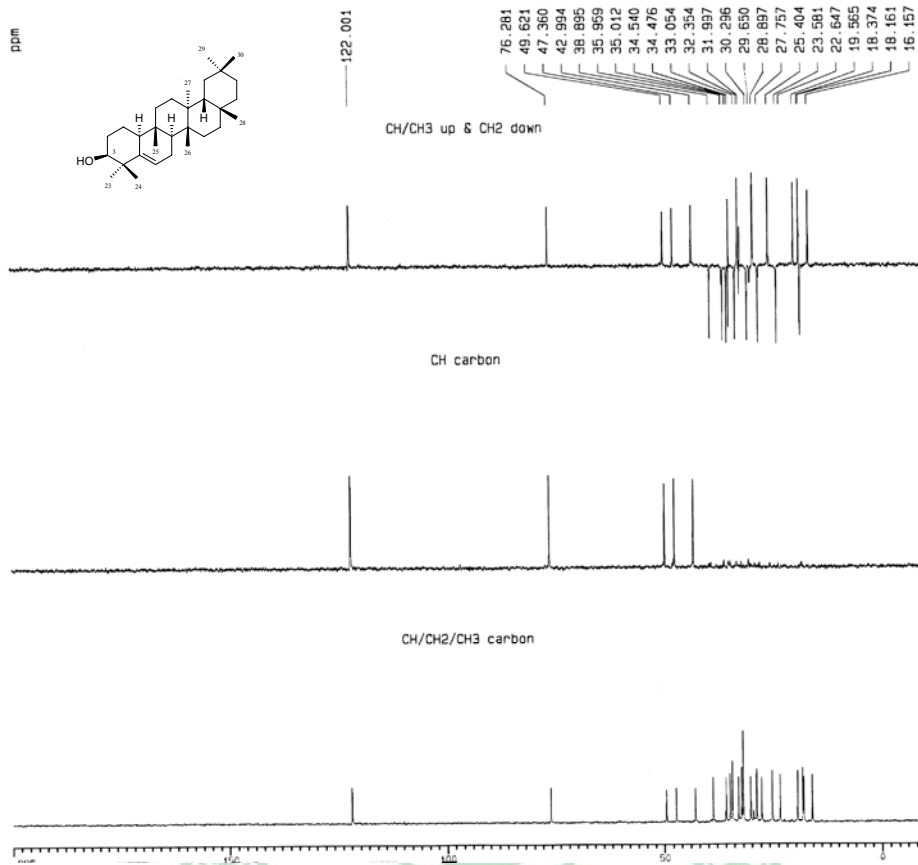




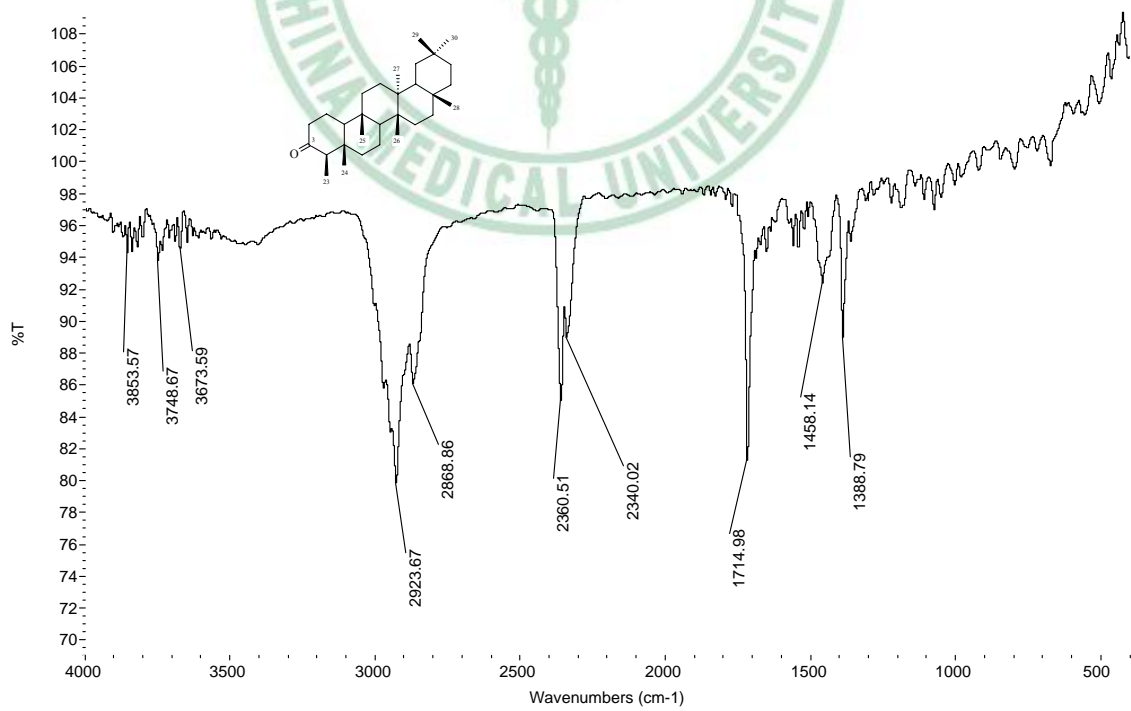
附圖 3 : Glutinol 之  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$  光譜圖



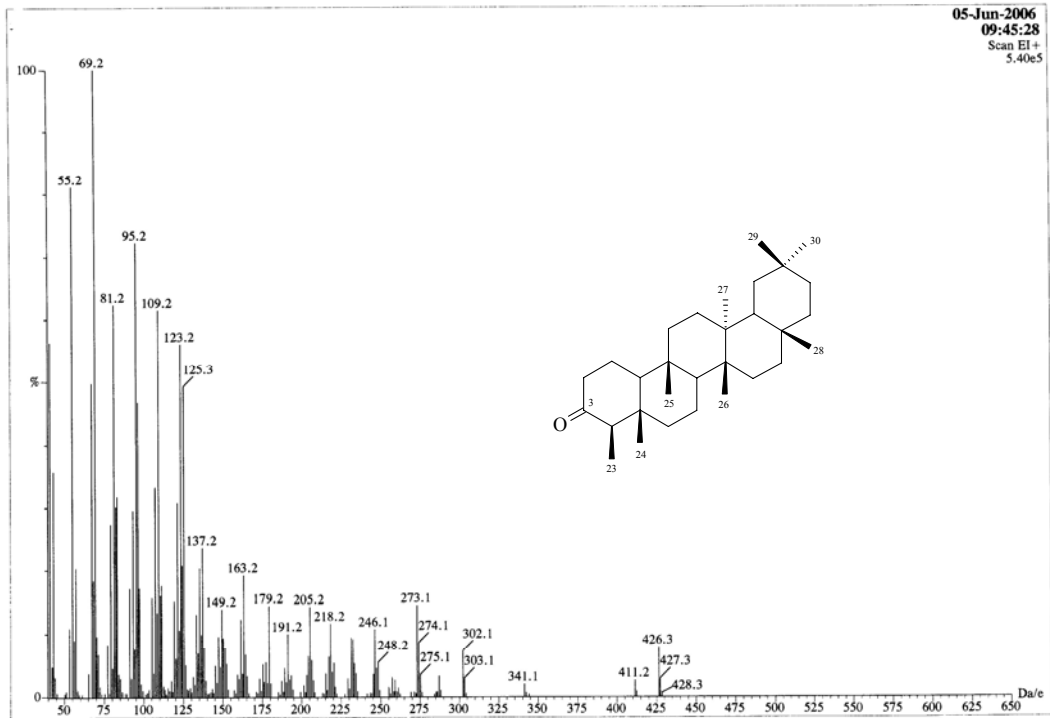
附圖 4 : Glutinol 之  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$  光譜圖



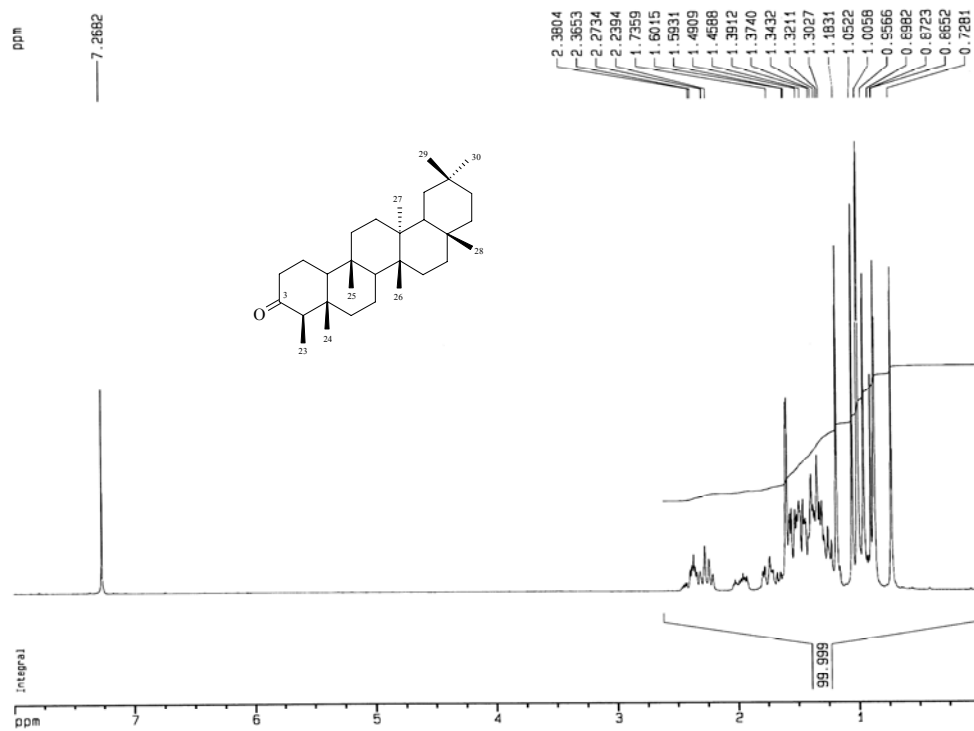
附圖 5 : Glutinol 之 DEPT( $\pi/4, 2\pi/4, 3\pi/4$ )光譜圖



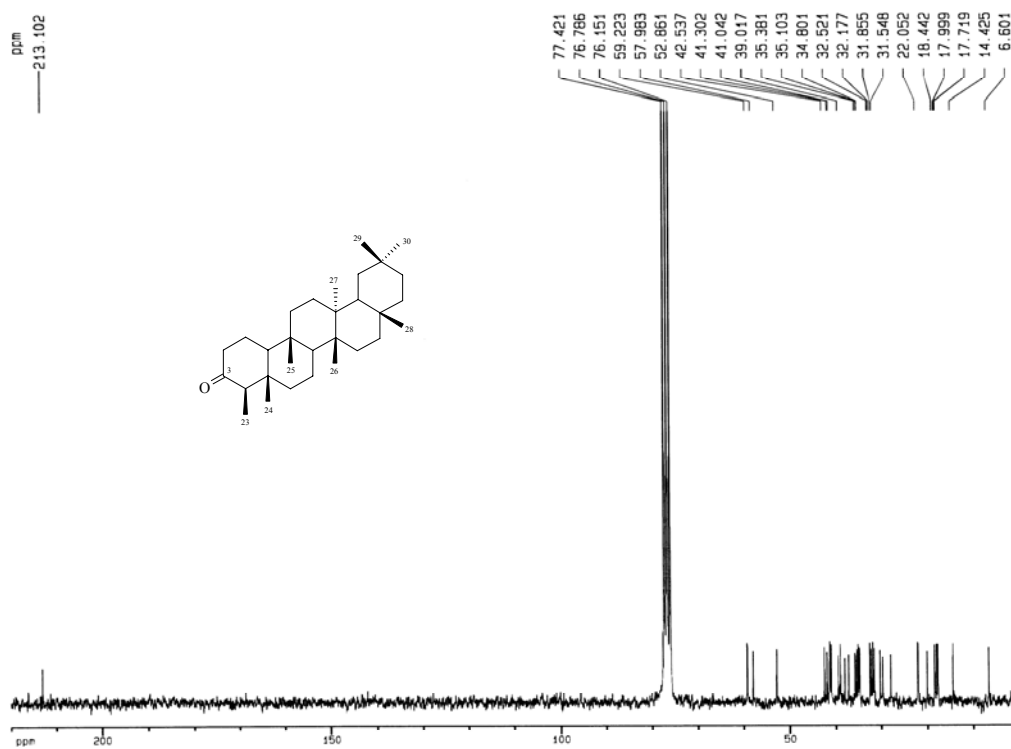
附圖 6 : Friedelin 之 IR(KBr)光譜圖



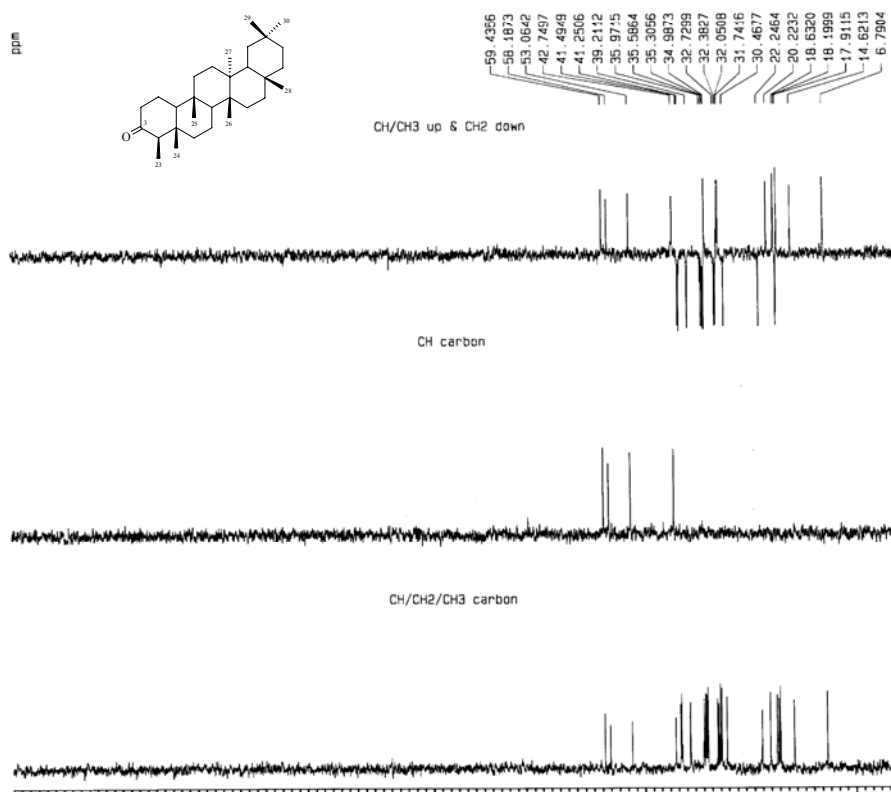
附圖 7: Friedelin 之 Mass(EI)光譜圖



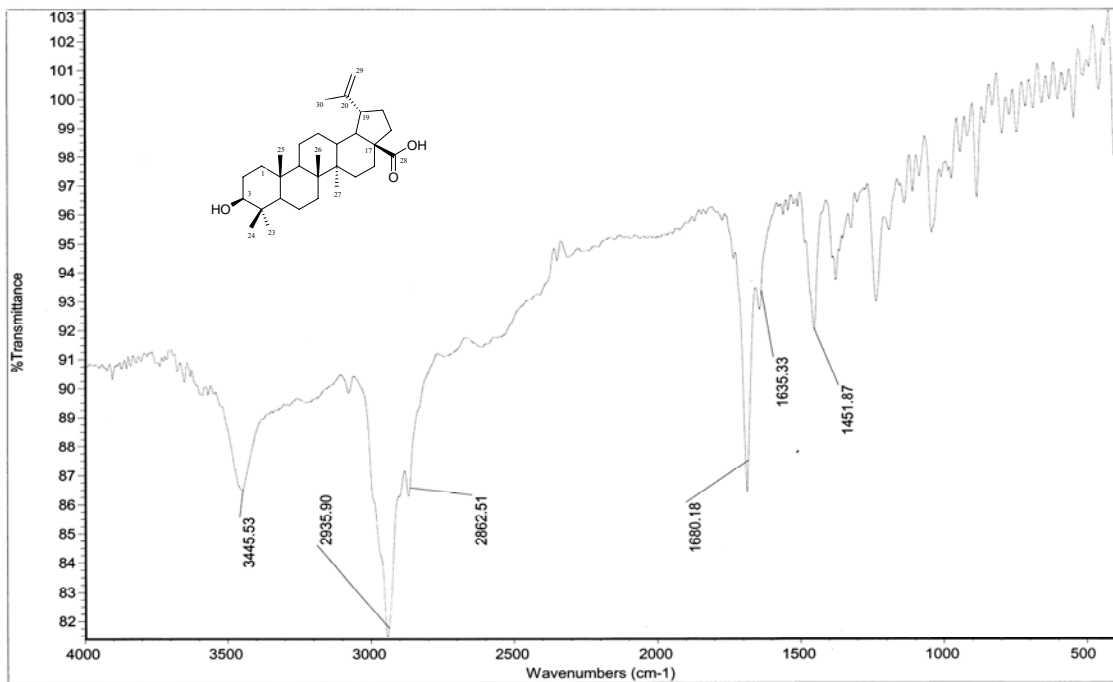
附圖 8: Friedelin 之  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ 光譜圖



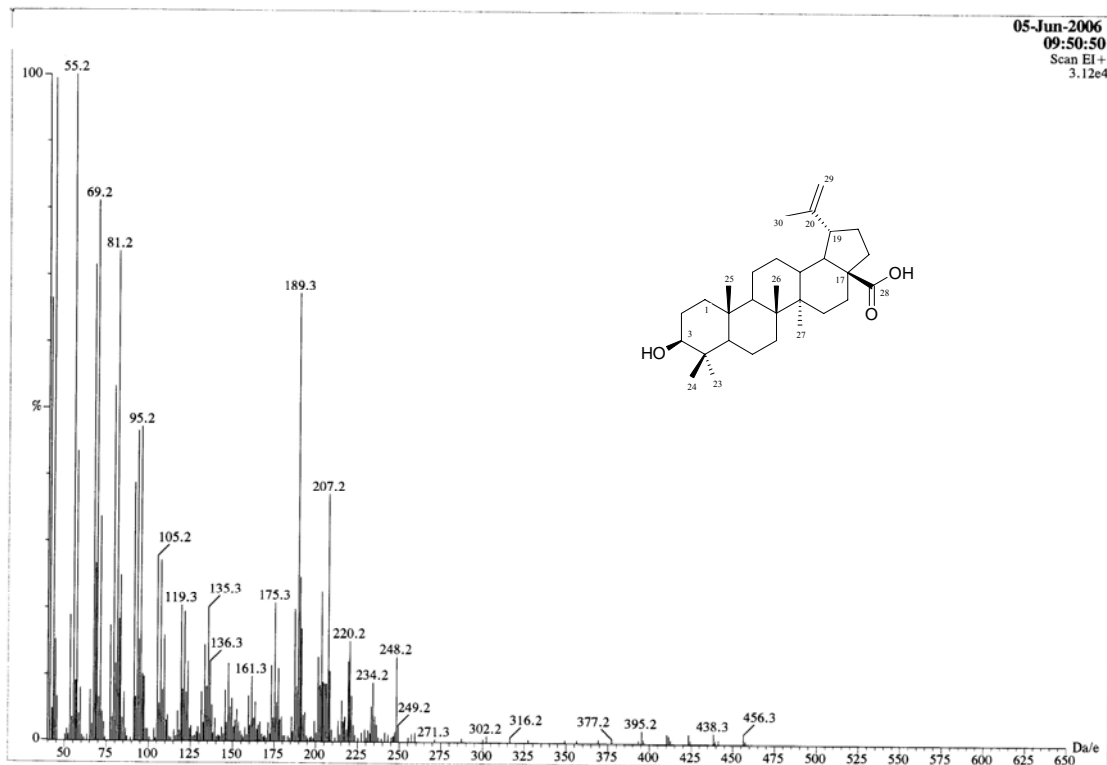
附圖 9：Friedelin 之  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$  光譜圖



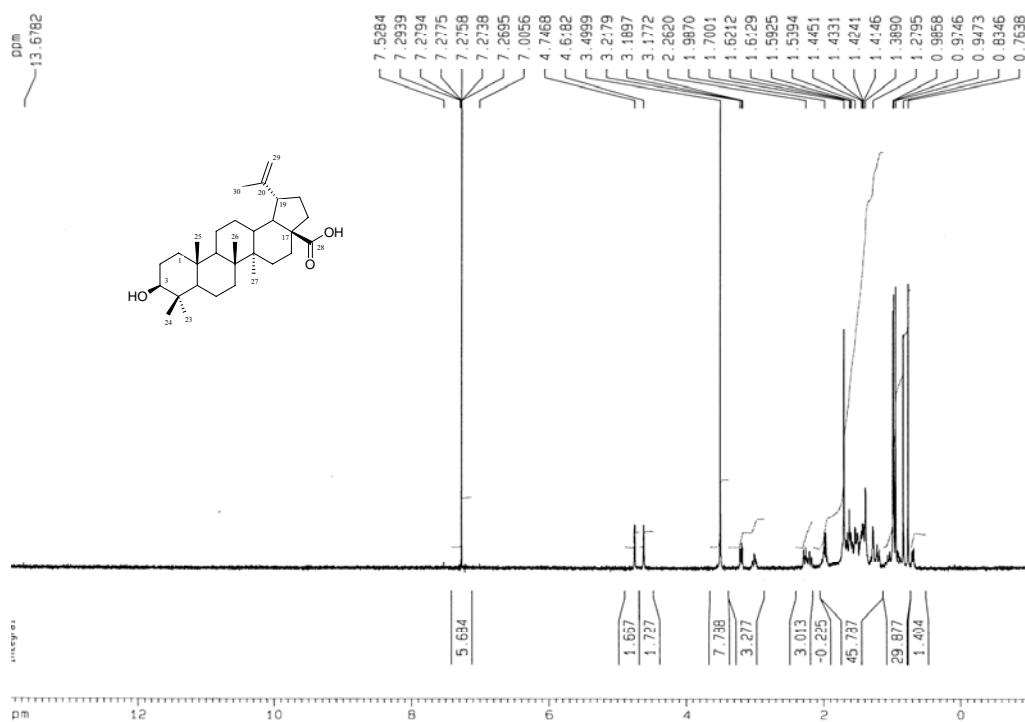
附圖 10：Friedelin 之 DEPT( $\pi/4, 2\pi/4, 3\pi/4$ ) 光譜圖



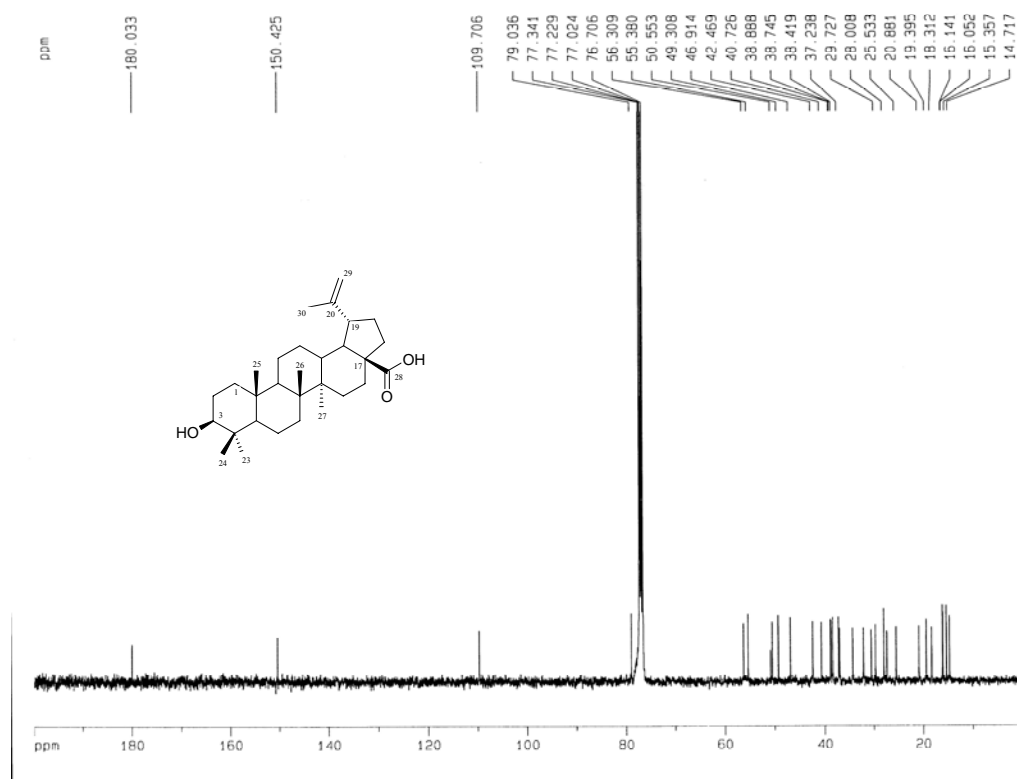
附圖 11 : Betulinic acid 之 IR(KBr)光譜圖



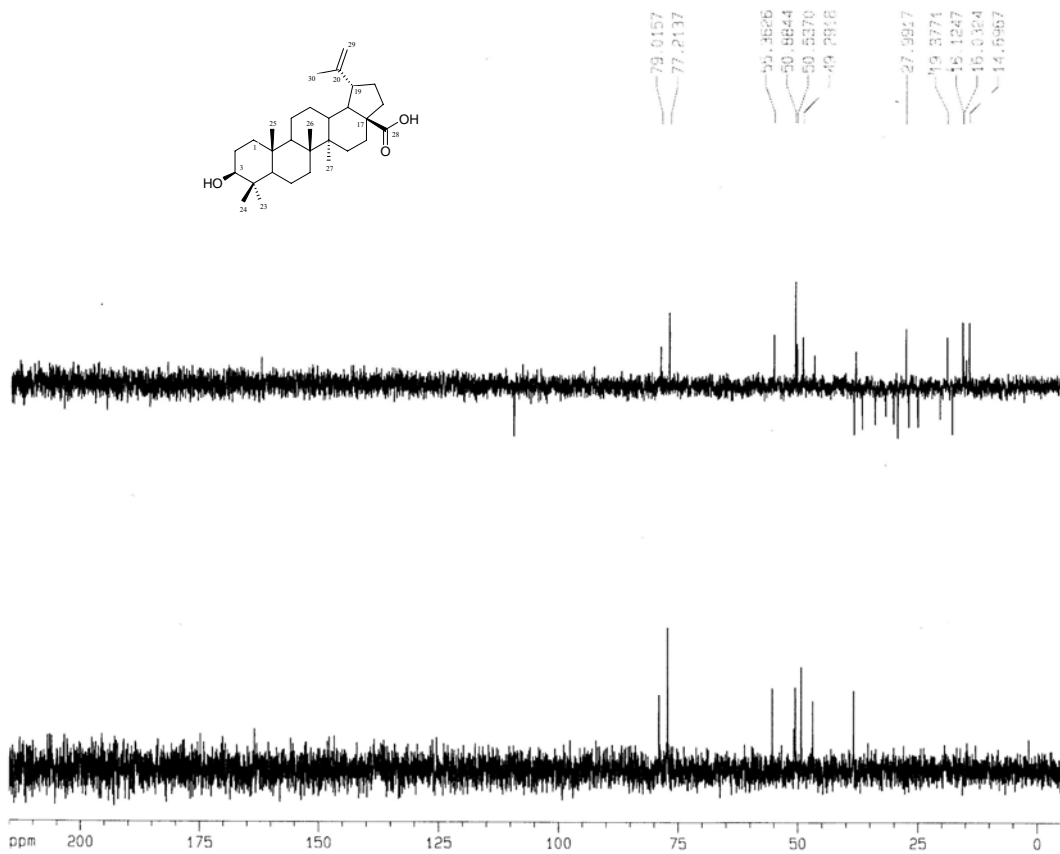
附圖 12 : Betulinic acid 之 Mass(EI)光譜圖



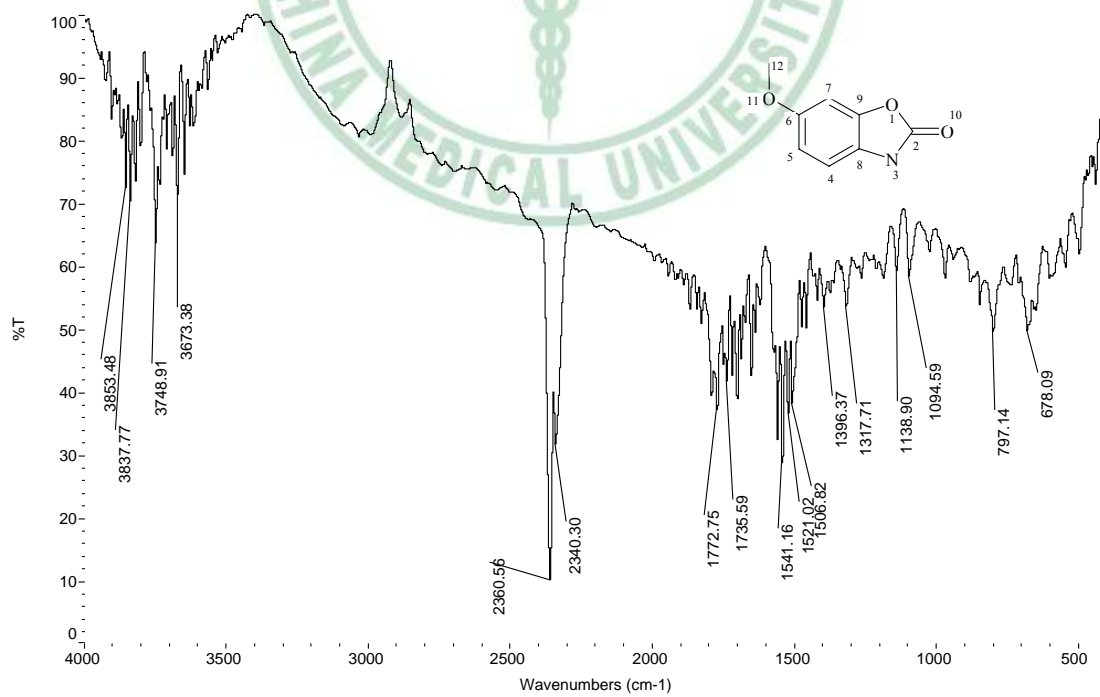
附圖 13 : Betulinic acid 之 <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) 光譜圖



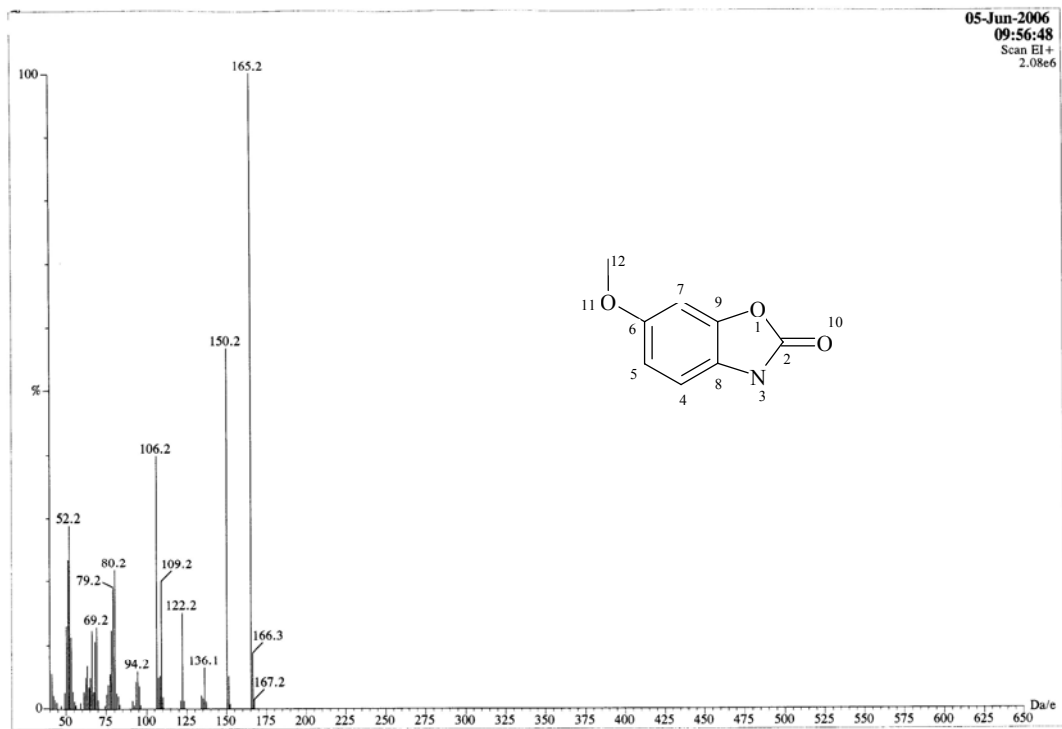
附圖 14 : Betulinic acid 之 <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>) 光譜圖



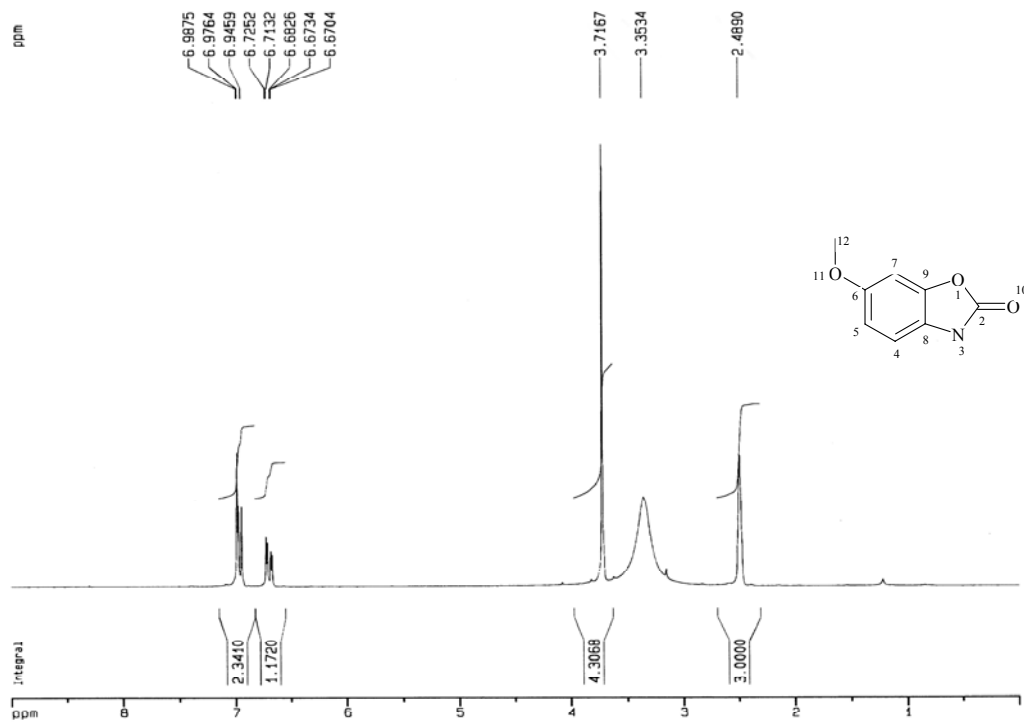
附圖 15 : Betulinic acid 之 DEPT( $2\pi/4, 3\pi/4$ ) 光譜圖



附圖 16 : Coixol 之 IR(KBr) 光譜圖

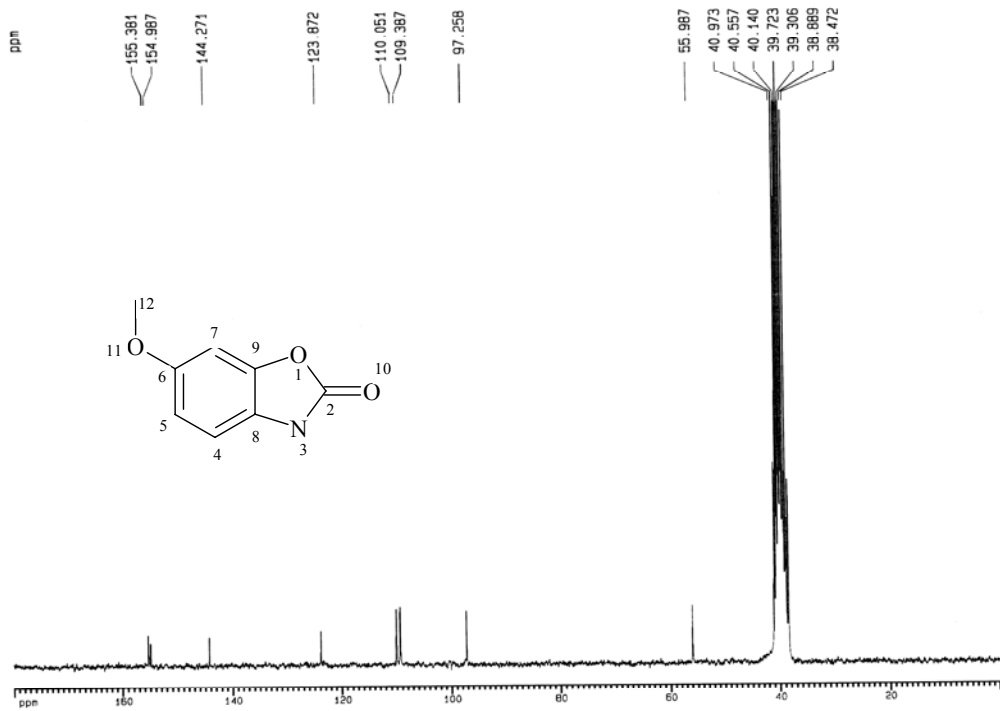


附圖 17: Coixol 之 Mass(EI)光譜圖

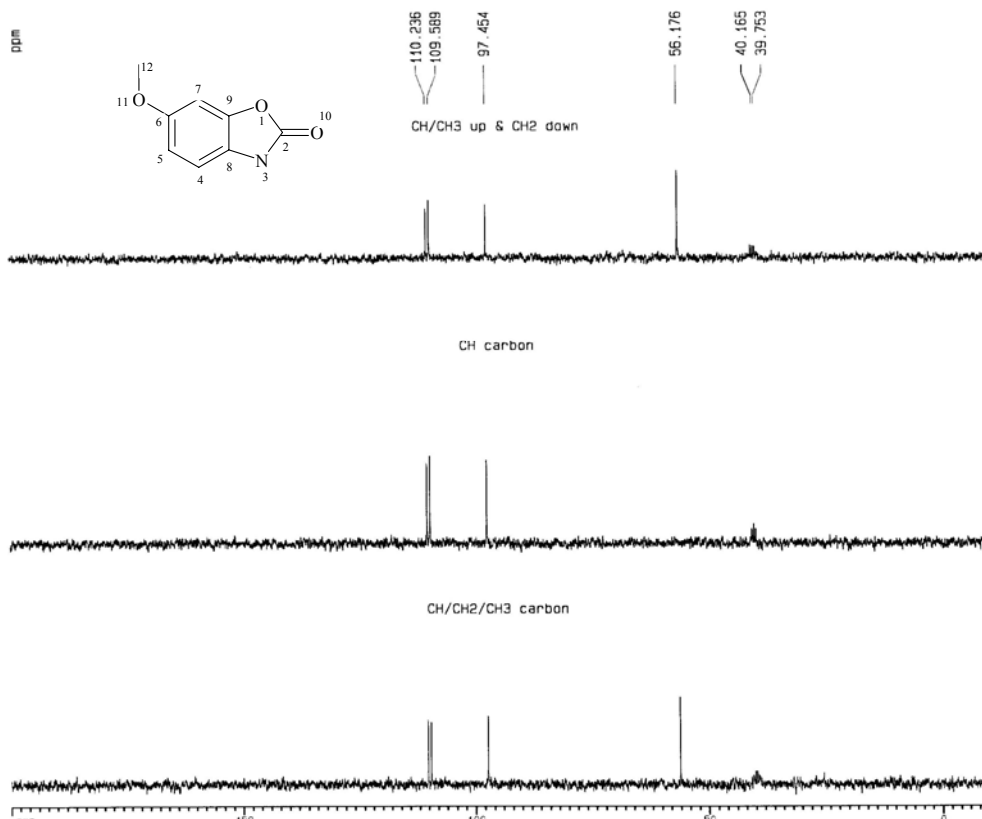


附圖 18: Coixol 之 <sup>1</sup>H-NMR(DMSO)光譜圖

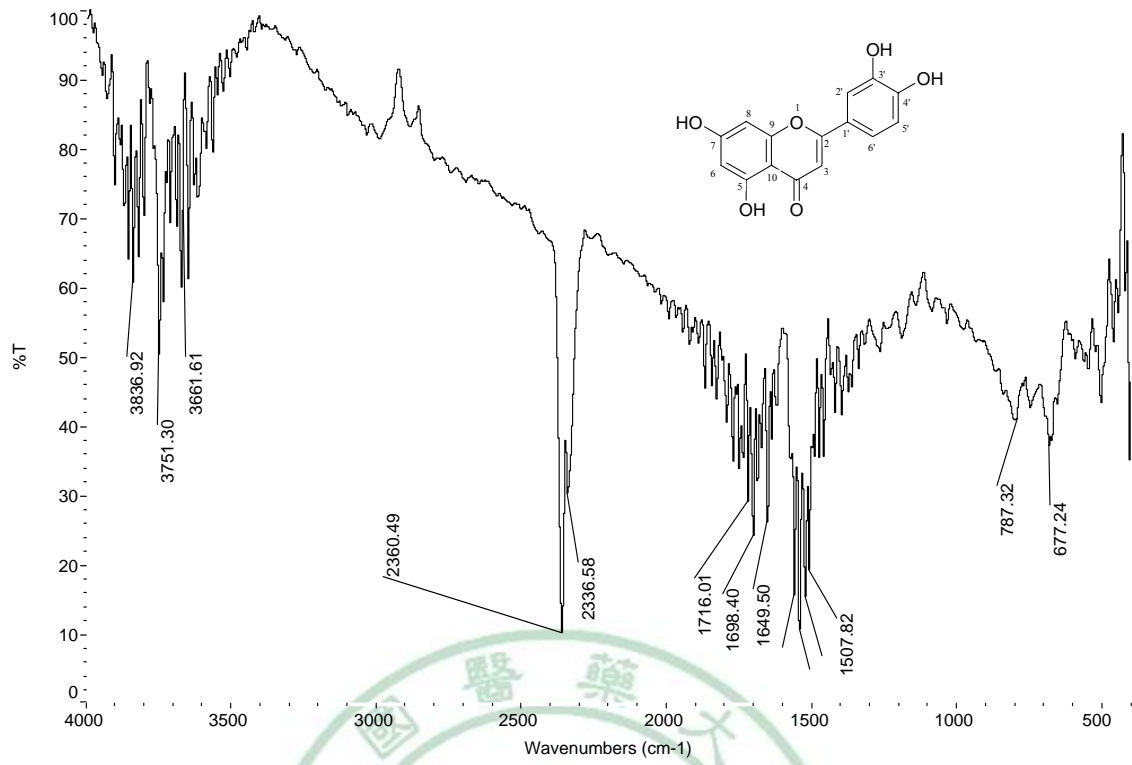




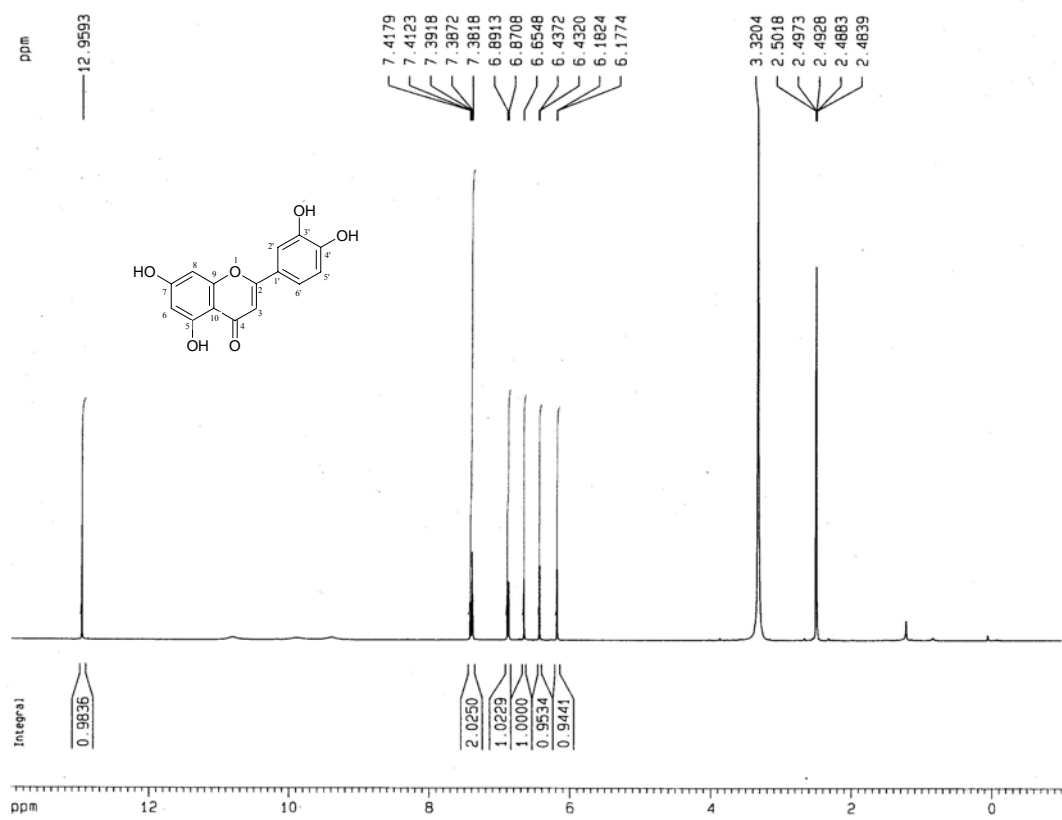
附圖 19 : Coixol 之  $^{13}\text{C}$ -NMR(DMSO)光譜圖



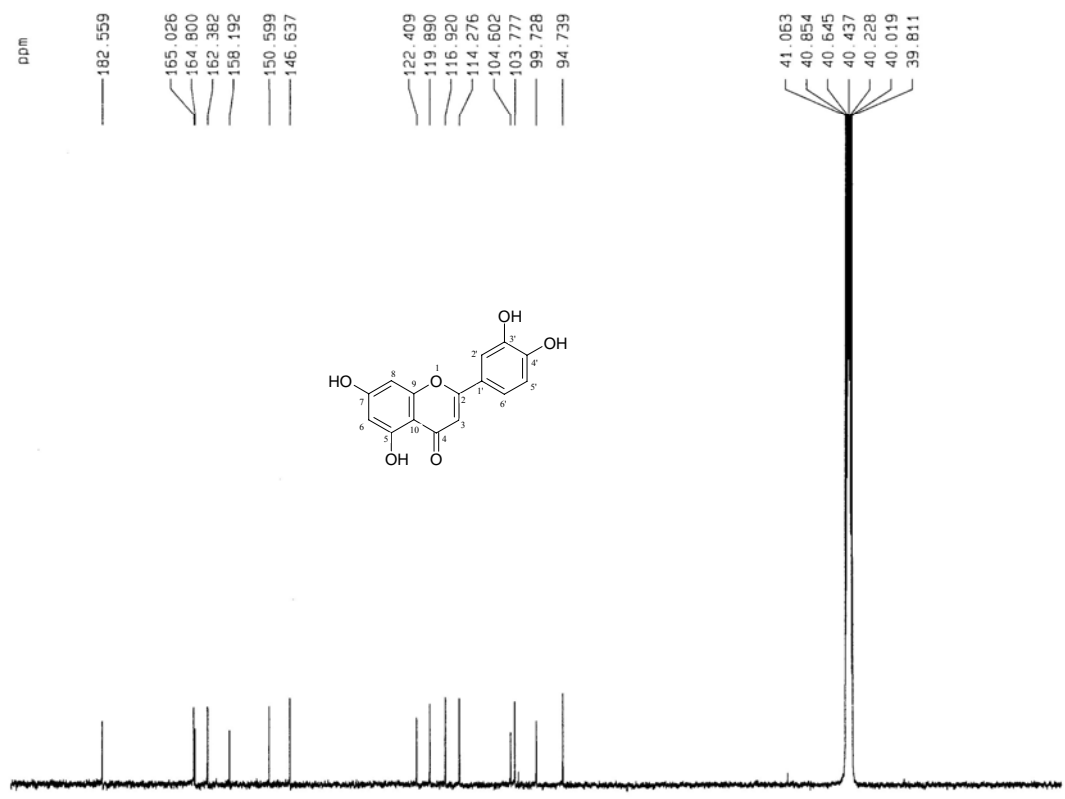
附圖 20 : Coixol 之 DEPT( $\pi/4$ ,  $2\pi/4$ ,  $3\pi/4$ )光譜圖



附圖 21 : Luteolin 之 IR(KBr)光譜圖



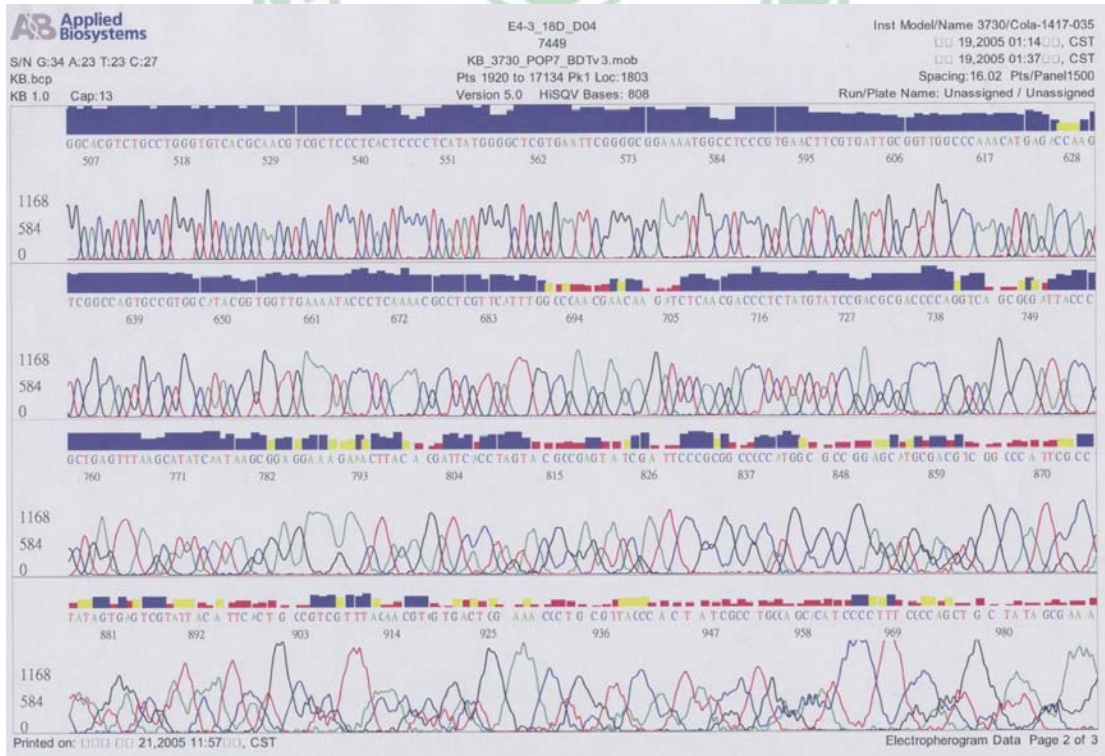
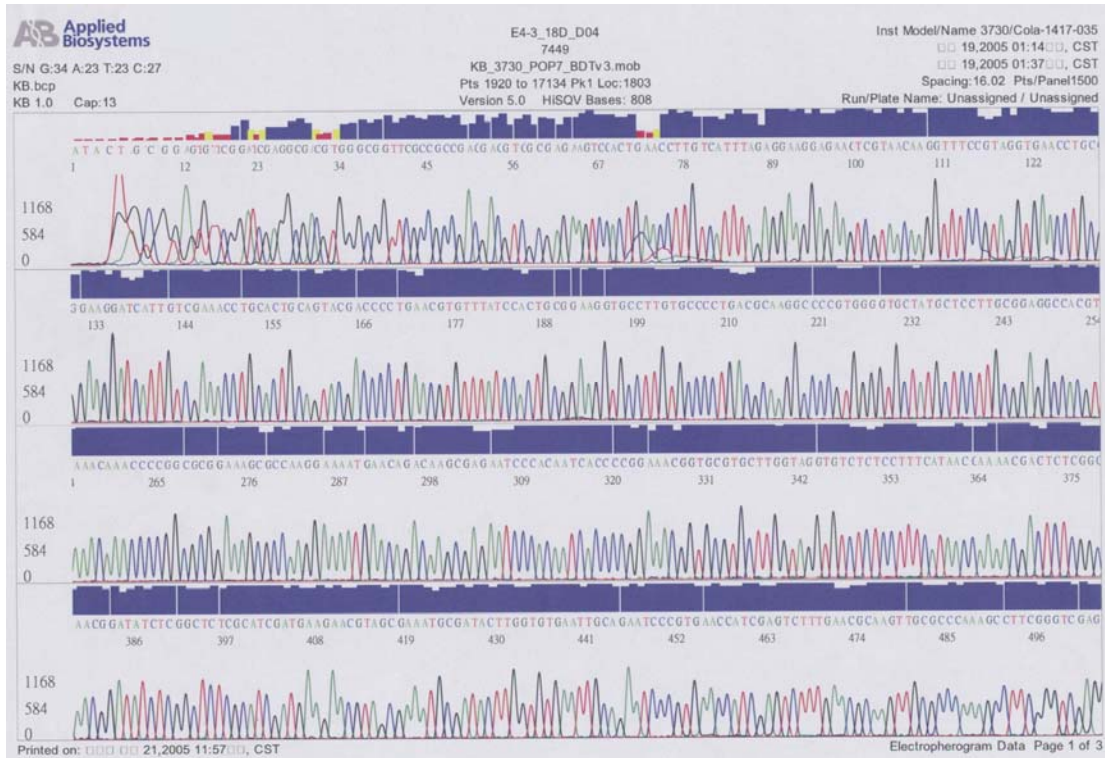
附圖 22 : Luteolin 之 <sup>1</sup>H-NMR(DMSO)光譜圖



附圖 23 : Luteolin 之  $^{13}\text{C}$ -NMR(DMSO)光譜圖



### 三、Sequences 原始圖



附圖 24：野甘草之序列圖

#### 四、NCBI 資料

LOCUS AY963776 821 bp DNA linear PLN 09-APR-2005  
DEFINITION *Scoparia dulcis* voucher NMNS Lee185 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION AY963776  
VERSION AY963776.1 GI:62178014  
KEYWORDS  
SOURCE *Scoparia dulcis*  
ORGANISM *Scoparia dulcis*  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Gratiolaceae; *Scoparia*.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 821)  
AUTHORS Lee, C. Y., Tsai, J. C. and Chiu, T. H.  
TITLE The Pharmacognosy Study of *Scoparia dulcis* (Scrophulariaceae) in Taiwan  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 821)  
AUTHORS Lee, C. Y., Tsai, J. C. and Chiu, T. H.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (16-MAR-2005) School of Pharmacy, China Medical University, No. 91 Hsueh-Shih Rd., Taichung 404, Taiwan  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..821  
/organism="Scoparia dulcis"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/specimen\_voucher="NMNS Lee185"  
/db\_xref="taxon:107240"  
/tissue\_type="leaf"  
rRNA <1..142 /product="18S ribosomal RNA"  
misc\_RNA 143..338 /product="internal transcribed spacer 1"  
rRNA 339..502 /product="5.8S ribosomal RNA"

misc\_RNA 503..755 /product="internal transcribed spacer 2"  
rRNA 756..>821 /product="26S ribosomal RNA"

#### ORIGIN

1 tcccgtgtcg gagtgttcgg atcgcgacga cgtgagcggg tcgctgcccc cgacgtcgcg  
61 agaagtccac tgaaccttat catttagagg aaggagaagt cgtaacaagg tttccgtagg  
121 tgaacctgcg gaaggatcat tgtcgaaacc ttcaaatcag acccgcgaac acgtttcaaa  
181 acaagatccg ccgcccggcg tgcgccccgt gcgtccgtcc ggtgcgggtc acaaaacccc  
241 ggcgcaaacg cgccaaggaa aactatgaaa gaagcgcggg ccctcccag acccgtccgc  
301 ggtgtgagcag gggggaaccg tgcgtctctt gaaatgtcta aacgactctc ggcaacggat  
361 atctcggctc tcgcatcgat gaagaacgta gcgaaatgcg atacttggtg tgaattgcag  
421 aatcccgtga accatcgagt ctttgaacgc aagttgcgcc cgaagccatt aggccgaggg  
481 cacgtctgcc tgggcgtcac gcatcgcgtc gccccctcc ccatccctct cgaagaagg  
541 ggtgaggccg caggtggggc ggagattggc ctcccgtggt attctatccc gcggccggcc  
601 caaatgcat cccgcaccgg cggaagtcac gactagtggg ggttgaacct tcaacgcgcg  
661 tgctgtcgtg gcgactccg tccggtgtac gggcatcata tcgaccaac ggccctttgt  
721 ctctctctca cgagcgtagc gaagagcctc cgaccgcgac cccaggtcag cgggactacc  
781 cgctgagttt aagcatatca taagcggagg aaaggaacta c

//

