

中國醫藥大學藥學院
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

台灣產波葉山螞蝗 (*Desmodium sequax* WALL.) 和排錢樹
(*Phyllodium pulchellum* L.) 之生藥學研究

**Pharmacognostical studies on *Desmodium sequax* WALL.
and *Phyllodium pulchellum* L. in Taiwan**

研究生：張 肇 元

Chang Chao-Yuan

中 華 民 國 96 年 7 月

目錄

略字解.....	II
圖目錄.....	III
表目錄.....	IV
中文摘要.....	V
英文摘要.....	VI
第一章 序言.....	1
第二章 總論.....	2
第一節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的本草學考察.....	2
第二節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的藥用植物學考察.....	3
第三節 台灣產波葉山螞蝗與排錢樹植物的藥用植物學考察.....	15
第四節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的生藥學文獻考察.....	24
第五節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的化學成分考察.....	27
第六節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的藥理作用考察.....	31
第三章 材料與方法.....	36
第一節 實驗材料、試料與儀器.....	36
第二節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的形態鑑定.....	43
第三節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的生藥組織學研究.....	46
第四節 波葉山螞蝗與排錢樹植物中 rutin 的定量.....	47
第五節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的指紋圖譜研究.....	55
第四章 實驗的結果與討論.....	60
第一節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的形態鑑定.....	60
第二節 波葉山螞蝗與排錢樹生藥組織學研究.....	71
第三節 波葉山螞蝗與排錢樹植物中 rutin 的定量.....	76
第四節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的指紋圖譜研究.....	84
第五章 結論.....	97
參考文獻	99
成果發表.....	106

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：排錢樹(根) 橫切面組織圖.....	25
圖 2：排錢樹(根) 粉末組織圖.....	26
圖 3：肝細胞切片.....	33
圖 4：HPLC 中標準品(rutin)與內部標準品(ethyl 4-hydroxybenzoate)位置.....	48
圖 5：Rutin 標準品之回歸曲線.....	53
圖 6：波葉山螞蝗萃取物之 HPLC 分析圖.....	53
圖 7：排錢樹萃取物之 HPLC 分析圖.....	54
圖 8：波葉山螞蝗之 HPLC 層析圖.....	55
圖 9：波葉山螞蝗植物圖.....	61
圖 10：排錢樹植物圖.....	61
圖 11：波葉山螞蝗種子電子顯微鏡圖.....	62
圖 12：排錢樹種子電子顯微鏡圖.....	63
圖 13：波葉山螞蝗花粉電子顯微鏡圖.....	66
圖 14：排錢樹花粉電子顯微鏡圖.....	67
圖 15：波葉山螞蝗果的形態圖.....	69
圖 16：排錢樹果的形態圖.....	69
圖 17：波葉山螞蝗果的電子顯微鏡圖.....	70
圖 18：排錢樹果的電子顯微鏡圖.....	70
圖 19：波葉山螞蝗之組織切片圖.....	74
圖 20：排錢樹之組織切片圖.....	75
圖 21：rutin 的 UV 吸收波長.....	78
圖 22：24 小時內 rutin 在 methanol 中的穩定性.....	80
圖 23：波葉山螞蝗之 HPLC 指紋圖譜.....	85
圖 24：排錢樹之 HPLC 指紋圖譜.....	85
圖 25：internal transcribed spacer (ITS) 區域與 18S、5.8S 及 28S rDNA 之相對位置以及 intergenic spacer (IGS) 之位置.....	87
圖 26：PCR 引子.....	87
圖 27：台灣產排錢樹之序列.....	89
圖 28：台灣產波葉山螞蝗之序列.....	90
圖 29：波葉山螞蝗與排錢樹的序列比較.....	91
圖 30：許多高等植物 rDNA 的 ITS1 之序列保留區與波葉山螞蝗和排錢樹之相對應序列比較.....	96

表目錄

表 1: 各組大鼠膠原蛋白結果比較.....	31
表 2: 排錢草對四氯化碳 (CCl ₄) 誘導肝纖維化之肝生化值.....	32
表 3: 排錢草對四氯化碳 (CCl ₄) 誘導肝纖維化之血清 HA 值.....	32
表 4: 排錢樹水提物和醇提物對 CCl ₄ 致肝纖維化大鼠肝臟中膠原蛋白含量的影響.....	34
表 5: 加入不同量 AP 各管 O ₂ ⁻ 濃度比較 μmol/L.....	35
表 6: 排錢樹、三草膠囊和 Vc 對 O ₂ ⁻ 清除率比較.....	35
表 7: 加入不同量三草膠囊各管 O ₂ ⁻ 濃度和 O ₂ ⁻ 清除率比較.....	35
表 8: 波葉山螞蝗的採集地點、時間、經緯度、採集編號.....	36
表 9: 排錢樹的採集地點、時間、經緯度、採集編號.....	37
表 10: 移動相條件.....	47
表 11: 24 小時內穩定性測試.....	48
表 12: 波葉山螞蝗回收率試驗.....	49
表 13: 排錢樹回收率試驗.....	50
表 14: rutin 之 intraday 分析.....	51
表 15: rutin 之 Interday 分析.....	52
表 16: Rutin 與 I.S. 經 HPLC 所得之積分面積.....	52
表 17: PCR 反應溫度與時間.....	58
表 18: 不同條件下 rutin 的滯留時間.....	77
表 19: HPLC 移動相之條件.....	79
表 20: rutin 含量.....	82
表 21: 波葉山螞蝗各 peak 之滯留時間.....	84
表 22: 波葉山螞蝗在 HPLC 中各 peak 高度與排錢樹 rutin peak 之高度比.....	84
表 23: 排錢樹在 HPLC 中各 peak 高度與排錢樹 rutin peak 之高度比.....	84
表 24: 波葉山螞蝗與排錢樹序列長度.....	88
表 25: 波葉山螞蝗與排錢樹 ITS 區域中各序列之長度與 G+C 百分比.....	94
表 26: 波葉山螞蝗與排錢樹 rDNA 之 ITS 各區長度與 G+C 百分比及與其他高等植物之比較.....	95

中文摘要

波葉山螞蝗(*Desmodium sequax* WALL.)和排錢樹(*Phyllodium pulchellum* L.)均為豆科(Leguminosae=Fabaceae)植物，波葉山螞蝗是山螞蝗屬(*Desmodium*)植物，排錢樹則是排錢樹屬(*Phyllodium*)植物。我們發現這兩種植物在外部的形態上極為相似，而排錢樹原本也是分類在山螞蝗屬之中，因此我們希望能建立一套鑑別方法，來區分這兩種植物。

本研究主要是藉由觀察植物的外部形態(果實、種子、花粉)及內部構造，來區別波葉山螞蝗和排錢樹。另外，我們萃取這兩種植物的DNA，利用PCR

(Polymerase chain reaction)的技術複製ITS (Internal Transcribed Spacer) 區域的序列。ITS 區序列在屬內、族群中或個體內，不同物種間之長度及序列上常有很大變異，廣泛用於高等植物近緣物種的鑑別。經過定序之後，得到波葉山螞蝗的ITS1序列長度為225 bp，ITS2序列長度為197 bp。排錢樹的ITS1序列長度為225 bp，ITS2序列長度為209 bp，應可為區別。

我們利用 HPLC 來測定波葉山螞蝗和排錢樹中對肝炎有效成分 rutin，發現在波葉山螞蝗全草含量大約在 0.004 %，而排錢樹全草含量大約在 0.026 %。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，確實為有效的分析方法。另外，在建構指紋圖譜方面，確定選取 5 個波峰來比對波葉山螞蝗和排錢樹，確實可作為鑑定上的參考。

利用上述的方法，可以作為我們鑑定波葉山螞蝗和排錢樹的依據，作為中草藥開發的參考依據。

Abstract

Desmodium sequax WALL. and *Phyllodium pulchellum* L. belong to the family Leguminosae(Fabaceae). In past *Phyllodium pulchellum* was named *Desmodium pulchellum*. *Desmodium sequax* and *Phyllodium pulchellum* look similarly, so we need to find a method to identify them.

This research is mainly to discover the differences between *Desmodium sequax* and *Phyllodium pulchellum* by appearance (fruit, seed, pollen) and histological anatomy. And, we duplicate ITS (Internal Transcribed Spacer) region extracted from plant using by the technology of PCR (Polymerase chain reaction). ITS region is different in each species, even they are the same genus. So it is usually used to identify differences in plants. By sequencing, we found that ITS1 and ITS2 length of *Desmodium sequax* is 225 bp and 197 bp. ITS1 and ITS2 length of *Phyllodium pulchellum* is 225 bp and 209 bp.

We set up a quantitative method of HPLC to determine the content of rutin in *Desmodium sequax* and *Phyllodium pulchellum*. The result shows that the rutin content of *Desmodium sequax* is 0.004 % and of *Phyllodium pulchellum* is 0.026 %. This method has a high degree of sensitivity, reproducibility, precision and recovery rate. Base on HPLC method, we select 5 peak to set up fingerprint in order to identify *Desmodium sequax* and *Phyllodium pulchellum*.

In this study, we try to find a best method to identify *Desmodium sequax* and *Phyllodium pulchellum*. In future our aim is to find hepatoprotective effect in this two plants.

第一章 緒言

波葉山螞蝗(*Desmodium sequax* WALL.)和排錢樹(*Phyllodium pulchellum* L.)都是豆科(Leguminosae=Fabaceae)植物，波葉山螞蝗是山螞蝗屬(*Desmodium*)植物，排錢樹則是排錢樹屬(*Phyllodium*)植物。山螞蝗屬植物約 350 種，多分布于亞熱帶和熱帶地區。中國有 27 種 5 變種，台灣則有 18 種其中 2 個是特有種。排錢樹屬(*Phyllodium*)植物世界上約 6 種，分佈熱帶亞洲及大洋洲。中國有 4 種，台灣則只有 1 種¹⁻³。我們發現這兩種植物在外部的形態上有相似的地方，而排錢樹原本也是分類在山螞蝗屬之中⁴，因此我們需要建立一種鑑別方法，來區分這兩種植物。

為了開發波葉山螞蝗和排錢樹的生藥資源，我們針對台灣產波葉山螞蝗和排錢樹進行研究；針對其植物外部形態，利用光學及電子顯微鏡觀察，鑑定植物的果實、種子以及其花粉形態；內部構造則以組織切片，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，將波葉山螞蝗和排錢樹植物 rDNA 的 ITS 區域加以複製，進一步分析及定序，得到其 ITS 區域 DNA 的序列，利用此新的技術，能更有效的來判別親緣間的關係。

另外，我們亦針對台灣產波葉山螞蝗和排錢樹對於肝炎有效之成分 rutin，以 HPLC 之方法進行定量，以確定此化合物在波葉山螞蝗及排錢樹中的含量，做為臨床醫療運用之參考。

利用這些方法，定能在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，減少誤用情形發生。

第二章 總論

第一節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的本草學考察

波葉山螞蝗和排錢樹植物為民間藥，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⁵⁻¹¹：

排錢樹：

《全國中草藥滙編》稱為排錢草，以根和葉入藥。性淡，澀，平。有小毒。清熱利濕，活血祛淤，軟堅散結。

《生草藥性備要》稱龍鱗草、午時合

《嶺南採藥錄》稱金錢草、午時靈

《廣西野生資源植物》稱疊錢草、排錢草

《福建民間草藥》稱雙排錢

《泉州本草》稱金錢豹、四季春

《江西草藥手冊》稱錢串草

《福建中草藥》稱雙金錢、紙錢劍、獵狸尾草

波葉山螞蝗：

《台灣藥用植物手冊》稱為山毛豆花、烏山黃檀花，全草用於治淋病、頭痛，根用於治創傷。

第二節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的藥用植物學考察

一、豆科的科特徵及分佈³

喬木、灌木、亞灌木或草本，直立或攀緣，常有能固氮的根瘤。葉常綠或落葉，通常互生，稀對生，常為一回或二回羽狀複葉，少數為掌狀複葉或3小葉、單小葉，或單葉，罕可變為葉狀柄，葉具葉柄或無；托葉有或無，有時葉狀或變為棘刺。花兩性，稀單性，輻射對稱或兩側對稱，通常排成總狀花序、聚繖花序、穗狀花序、頭狀花序或圓錐花序；花被2輪；萼片(3)~5(6)，分離或連合成管，有時二唇形，稀退化或消失；花瓣(0)~5(6)，常與萼片的數目相等，稀較少或無，分離或連合成具花冠裂片的管，大小有時可不等，或有時構成蝶形花冠，近軸的(adaxil)1片稱旗瓣，側生的2片稱翼瓣，遠軸的(abaxil)2片常合生，稱龍骨瓣，遮蓋住雄蕊和雌蕊；雄蕊通常10枚，有時5枚或多數(含羞草亞科)，分離或連合成管，單體或二體雄蕊，花藥2室，縱裂或有時孔裂，花粉單粒或常連成複合花粉；雌蕊通常由單心皮所組成，稀較多且離生，子房上位，1室，基部常有柄或無，沿腹縫線具側膜胎座，胚珠2至多顆，懸垂或上升，排成互生的2列，為橫生、倒生或彎生的胚珠；花柱和柱頭單一，頂生。果為莢果，形狀種種，成熟後沿縫線開裂或不裂，或斷裂成含單粒種子的莢節；種子通常具革質或有時膜質的種皮，生於長短不等的珠柄上，有時由珠柄形成一多少肉質的假種皮，胚大，內胚乳無或極薄。

約650屬，18000種，廣布於全世界。中國有172屬，1485種，13亞種，153變種，16變型；各省區均有分佈。

本科為被子植物中僅次於菊科及蘭科的三個最大的科之一，分佈極為廣泛，生長環境各式各樣，無論平原、高山、荒漠、森林、草原直至水域，幾乎都可見到豆科植物的蹤跡。本科具有重要的經濟意義，它是人類食品中澱粉、蛋白質、油和蔬菜的重要來源之一。

農業上的豆類作物有大豆、花生、蠶豆、豌豆、赤豆、綠豆、虹豆、四季豆和扁豆等。本科植物的根部常有固氮作用的根瘤，是優良的綠肥和飼料作物，如苜蓿、紫雲英、田菁、三葉草、黃花草木樨、苜子等。藥用植物中有兒茶、決明、甘草、黃耆、葛、苦參、雞血藤等。有些種類的枝幹和樹皮常含有單寧、樹膠及染料，用於醫藥、印染及其他工業中，如黑荊、金合歡、阿拉伯樹膠、蘇木等。綠化造林樹種中有台灣相思、楹樹、鐵刀木、鳳凰木、格木、刺槐、槐、黃檀等，木材可供建築、傢俱、農具等用。田菁和瓜爾豆的種子膠還可配製成水基壓裂液，可增加含油地層的滲透性，從而提高油井的產量。

花粉：具 2 核，單粒或複合，通常具 3 溝孔或 3 孔。

解剖學特徵：節具 3 葉隙或極少具 5 葉隙；導管部分具單穿孔；無穿孔管狀分子通常或全部具小的單紋孔，有時具隔膜，篩管質體含不規則蛋白質似晶體和澱粉粒，很少僅含澱粉粒。

化學成分：種子或營養體中通常含非蛋白質氨基酸，具含單寧的細胞，以及其他分泌細胞或腔，通常具原花色苷（proanthocyanin），有時具含氰的（cyanogenic）化合物，但無鞣花酸（ellagic acid）及硫蟻類（iridoid）化合物；常含生物鹼，特別是吡啶（pyridine）、喹啉（quinolizidine）及吲哚（indole）類成分。

二、中國產豆科分亞科之檢索表³

1. 花輻射對稱，花瓣鑷合狀排列，分離或連合，花藥頂端有時有 1 個脫落的腺體……………1. 含羞草亞科 Mimosoideae TAUB.

1. 花兩側對稱，花瓣覆瓦狀排列。

2. 花梢兩側對稱，近軸的 1 枚花瓣位於相鄰兩側的花瓣之內，花絲通常分離……………2. 雲實亞科 *Caesalpinioideae*

TAUB.

2. 花明顯兩側對稱，花冠蝶形，近軸的 1 枚花瓣（旗瓣）位於相鄰兩側的花瓣（翼瓣）之外，遠軸的 2 枚花瓣（龍骨瓣）基部沿連接處合生呈龍骨狀，雄蕊通常為二體（9 + 1）雄蕊或單體雄蕊，稀分離……………3. 蝶形花亞科 *Papilionoideae*

波葉山螞蝗和排錢樹都是屬於蝶形花亞科的，所以我們直接對蝶形花亞科進行考察。

蝶形花亞科³

喬木、灌木、藤本或草本，有時具刺。葉互生，稀對生，通常為羽狀或掌狀複葉，多為 3 小葉，稀單葉或退化為鱗葉，無二回以上的複葉，葉軸或葉柄上無腺體凸起；托葉常存在，有時變為刺，許多種、屬有小托葉。花兩性，單生或組成總狀和圓錐狀花序，偶為頭狀和穗狀花序，腋生、頂生或與葉對生；苞片和小苞片小，稀大型；花萼鐘形或筒形，萼齒或裂片 5，基部多少合生，最下方 1 枚通常較長，作上升覆瓦狀排列或鑷合狀排列，或因上方 2 齒較下方 3 齒在合生程度上較多而稍呈二唇形；下方全部合生成 1 齒時則呈焰苞狀；花瓣 5，不等大，兩側對稱，作下降覆瓦狀排列構成蝶形花冠，瓣柄分離或部分連合，上面 1 枚為旗瓣在花蕾中位於外側，翼瓣 2 枚位於兩側，對稱，龍骨瓣 2 枚位於最內側，瓣片前緣常連合，有時先端呈喙狀以至旋曲，並包裹著花蕊，在個別屬中退化僅存旗瓣或具二型花，閉花受精的花冠退化；雄蕊 10 枚或有時部分退化，連合成單體或二體雄蕊管，也有全部分離的，花藥 2 室，縱裂，基部有時具附屬物，同型或兩型，兩型時花藥背著和底著，花絲長短交互排列，花粉粒由單細胞組成，橢圓形或球形，具 3 孔溝；子房由單心皮組成，1 室，上位，有時由背腹縫線內

伸形成或寬或窄的隔膜，具柄或無柄，通常生於具蜜腺的花盤上，胚珠彎生，數目 1 至多數，邊緣胎座，花柱單一，通常上彎，有時作螺旋狀捲曲或扭曲，無毛或被髯毛，柱頭通常小，頭狀或歪斜。莢果呈各種形狀，沿 1 條或 2 條縫線開裂或不裂，有時具翅，有時橫向具關節而斷裂成節莢，偶呈核果狀；種子 1 至多數；通常具革質種皮，無胚乳或具很薄的內胚乳，種臍常較顯著，圓形或伸長成線形，中央有 1 條臍溝，種阜或假種皮有時甚發達；胚軸延長並彎曲，胚根內貼或折疊於子葉下緣之間，子葉 2 枚，卵狀橢圓形，基部不呈心形。

本亞科分 32 族，約 440 屬，12000 種，遍佈全世界。較原始的類型大多分佈於熱帶、亞熱帶地區，多為木本植物，較進化的類型是分佈於溫帶的草本植物。地中海區域的種屬分化甚為明顯。中國包括常見引進栽培的共有 128 屬，1372 種，183 變種（變型）。

本亞科許多屬的植物富含蛋白質、維生素等營養物質，其中食用豆類在人類食物上的重要意義僅次於禾本科。雖然多數豆科植物含油量不多，但花生、大豆卻是重要的油料作物；蠶豆、豌豆、菜豆等是人們日常的食物。由於動物蛋白和脂肪食用多會罹致心血管疾病，許多國家正在發展豆類蛋白食品，其成本低於肉類和乳品；我國食用豆類和豆製品生產有很久的歷史，只是近年來發展很慢，豆類種植面積和總產量在世界上降為第三位，為了滿足人們對豆類的需要，豆類的生產極需有個較快的發展。豆科牧草和飼料的種植僅次於禾本科，苜蓿和車軸草對畜牧業至關重要，種植面積很廣。中國西北地區和一些較乾寒高原的岩黃屬、草木犀屬、苜蓿屬、野豌豆屬、山薰豆屬、驢豆屬、錦雞兒屬和百脈根屬是特有的優良牧草，這些屬在改良天然草場和建立飼料基地上都有很大的價值。此外，個別豆科植物如葛屬、豆薯、千斤拔、土國兒等的塊根含有大量澱粉。

對農業來說，土壤中單位面積的氮含量在很大程度上決定於有沒有豆科植物，因為豆科植物的根分泌的硫胺素、生物素、可溶性碳水化合物和有機酸可培養根瘤菌，而根瘤菌和豆科植物的根系共生可以把大氣中的游離氮轉化為亞硝酸鹽和硝酸鹽，綠色植物利用這些物質來合成蛋白質。所以豆科植物不僅本身含有豐富的蛋白質，同時由於它的生長活動還使土壤含氮量增加而使其他作物受

惠。農業上利用豆科作物進行輪作或間作可以提高土壤的肥力，田菁、紫雲英、毛著子、紫穗槐、豬屎豆、合萌等都是很好的綠肥。

熱帶、亞熱帶地區的豆科喬木有些是優良的木材，如紅豆屬、黃檀屬和紫檀屬的植物。還有一些大型的藤本組成熱帶雨林的景觀特徵。許多豆科植物的葉、莖、果中含有各種次生化合物如黃酮類化合物、生物鹼、萜類化合物、非蛋白質氨基酸等，我國民間利用其來治療疾病。黃耆屬、棘豆屬、野決明屬含有大量對牲畜有毒的生物鹼。還有許多種類的種子含有植物凝血素，這是一種大分子蛋白質，它對某些血型的人有凝血作用，並能抑制某些腫瘤細胞，1985年我國首次將小扁豆的植物凝血素應用於診斷早期肝癌；美國也報導過綠豆芽含有很強的抗癌物質。大豆、木豆可以提取避孕藥成分，正受到醫藥界的關注。豆科植物不僅種屬眾多，分佈廣泛，而且作為潛在的生物資源開發利用的前景也十分可觀，有人稱之為三養（養人、養畜、養地）和三高（經濟效益高、社會效益高、生態效益高）的應用植物。

蝶形花亞科分族檢索表³

1. 花絲全部分離，或在近基部處部分連合，花藥同型。
 2. 奇數羽狀複葉（僅藤槐和單葉紅豆為單葉），托葉小或無；花萼通常具近等長的5短齒；喬木、灌木，偶為藤本.....I·槐族 Trib. SOPHOREAE SPRENG.
 2. 掌狀三小葉（僅沙冬青常雜有單葉），托葉常與葉柄連合甚至抱莖，無小托葉；花萼通常深裂成5裂片；灌木或草本.....XXI·野決明族 Trib. THERMOPSIDEAE YAKOVI.
1. 花絲全部或大部分連合成雄蕊管，雄蕊單體或二體，二體時對旗瓣的1枚花絲勻其餘合生的9枚分離或部分連合，花藥同型、近同型或兩型。
 3. 花藥同型或近同型即不分成背著和底著，也不分成長短交互而生。
 4. 花絲絲狀，上部不膨大。
 5. 莢果不橫向斷裂成節莢，種子1至多粒。
 6. 雄蕊單體，花絲連合成多少閉合的雄蕊管，有時在基部具裂口，但上部都連合。
 7. 植株被丁字毛；藥隔頂端具硬尖，花柱無毛，總狀花序腋生；草本.....IV·木藍族 Trib. INDIGOFEREAE (BENTH.) RYDB.
(瓜兒豆屬 *Cyamopsis* DC.)
 7. 植株不被丁字毛；藥隔頂端無附屬體也無腺體；花序總狀、圓錐狀或單花，頂生或腋生；木本，偶為草本。
 8. 莢果不裂，半圓形或腎形，種子1~2粒；草本或半灌木；葉柄宿存，有時變刺.....XIII·岩黃耆族 Trib. HEDYSAREAE DC.
(驢豆屬 *Onobrychis* MILL.)
 8. 莢果開裂；總狀花序或圓錐花序，頂生，有時花單生葉腋或頂軸上。
 9. 喬木、灌木或藤本；托葉不呈戟形或缺如.....IV·灰毛豆族 Trib. TEPHROSIEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)

9. 二年生草本；托葉戟形.....XII· 山羊豆族 Trib. GALEGEAE (BRONN)
TORREY et GRAY (部分)
6. 雄蕊二體，通常對旗瓣的1枚花絲分離或部分連合，如為單體時則在上部或頂端分離。
10. 掌狀複葉或單葉。
11. 葉片下面無腺點或透明斑點。
12. 莢果內壁在種子間具隔膜；無小托葉；花序腋生或基生，呈穗狀、總狀或頭狀.....XII· 山羊豆族 Trib. GALEGEAE (BRONN) TORREY et GRAY (部分)
12. 莢果內壁在種子間無隔膜。
13. 植株具丁字毛；藥隔頂端具腺體或附屬體；花序總狀或穗狀，腋生.....
.....VI· 木藍族 Trib. INDIGOFEREAE (BENTH.) RYDB.
木藍屬 *Indigofera* LINN.)
13. 植株無毛或被單細胞毛；藥隔頂端無腺體也無附屬體。
14. 小葉遠緣多少具鋸齒，側脈直達葉緣，托葉常與葉柄連生，無小托葉；通常為三出複葉草本.....
.....XVIII· 車軸草族 Trib. TRIFOLIEAE (BRONN) BENTH. (部分)
14. 小葉全緣，側脈不達葉緣，具小托葉；通常為灌木或亞灌木，稀草本。
15. 莢果分節，但不橫向斷裂成節莢，或種子僅1粒.....
.....VII· 山螞蝗族 Trib. DESMIDIEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)
15. 莢果不分節.....VIII· 菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC. (部分)
11. 葉片下面有腺點或透明斑點。
16. 莢果開裂，種子1至多數；三出複葉或單葉.....
.....VIII· 菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC. (部分)
16. 莢果不裂，通常種子1粒；單葉.....
.....IX· 補骨脂族 Trib. PSORALEAE (BENTH.) RYDB.
10. 羽狀複葉，包括羽狀三小葉。
17. 葉片下面有腺點或透明斑點；胚珠少數。
18. 莢果開裂；三出複葉.....VIII· 菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC. (部分)
18. 莢果不裂，密佈腺狀小疣點；花冠僅存旗瓣，花藥背著；奇數羽狀複葉.....
.....X· 紫穗槐族 Trib. AMORPHEAE BORISS.
17. 葉片下面無腺點或透明斑點；胚珠4粒以上，偶為1~2(3)粒。
19. 莢果開裂或有時僅在頂端開裂。
20. 旗瓣或龍骨瓣明顯比其他瓣片大；具小托葉，有時呈腺體狀.....
.....VIII· 菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC.
(刺桐亞族 Subtrib. ERYTHRINIAE DC.)
20. 花瓣長度近相等，有時翼瓣甚短，龍骨瓣略長於其他瓣片，有時先端呈喙狀或捲曲。
21. 植株具丁字毛；藥隔頂端具腺體或附屬體；有小托葉.....
.....VI· 木藍族 Trib. INDIGOFEREAE (BENTH.) RYDB.
(木藍屬 *Indigofera* LINN.)
21. 植株無毛或具單細胞毛；藥隔頂端無腺體或附屬體。
22. 花序軸上的節增厚成結；具小托葉。
23. 花柱無毛，龍骨瓣不捲曲.....VIII· 菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC.
(刀豆亞族 Subtrib. DIOCLEINAE BENTH.)
23. 花柱內側有縱列髯毛，龍骨瓣常作螺旋狀捲曲.....
.....VIII· 菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC. (部分)
22. 花序軸上的節不增厚，無或有小托葉。
24. 葉軸先端有捲鬚或針刺狀，無小托葉。
25. 雄蕊10枚，花單生或總狀花序或數朵簇生於葉腋，旗瓣柄與雄蕊管分離.....
.....XVI· 蠶豆族 Trib. VICIEAE (ADANS.) DC. (部分)
25. 雄蕊9枚，對旗瓣的1枚退化，總狀花序腋生，旗瓣柄多少與雄蕊管連合.....
.....III· 相思子族 Trib. ABREAE (WIGHT et AM.) HUTCH.
24. 葉軸先端無捲鬚，有或無小托葉。
26. 莢果內壁在種子間常具隔膜，有時腫脹.....
.....XII· 山羊豆族 Trib. GALEGEAE (BRONN) TORREY et GRAY
(黃耆亞族 Subtrib. ASTRAGALINAE (ADANS.) BENTH.)
26. 莢果內壁在種子間無隔膜，有時雖有橫向短膜，但不分離成節。
27. 莢果膨脹呈囊泡狀，有時僅在頂端開裂.....
.....XII· 山羊豆族 Trib. GALEGEAE (BRONN) TORREY et GRAY (部分)

27. 莢果扁平。
28. 托葉通常與葉柄連生，小葉邊緣具鋸齒；多為草本..... XVIII · 車軸草族 Trib. TRIFOLIEAE (BRONN) BENTH. (部分)
28. 有托葉或無，托葉不與葉柄連生，小葉全緣。
29. 子房具胚珠 1 粒；莢果為宿存花萼所包；三出複葉或單葉..... XII · 山螞蝗族 Trib. DESMODIEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)
29. 子房具胚珠 2 至多數。
30. 總狀花序頂生、與葉對生或于枝端組成圓錐花序..... IV · 灰毛豆族 Trib. TEPHROSIEAE BENTH. HUTCH. (部分)
30. 花單生、簇生或組成腋生的總狀花序。
31. 喬木或灌木；奇數羽狀複葉，小葉在 10 對以下..... V · 刺槐族 Trib. ROBINIEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)
31. 草本或亞灌木。
32. 直立草本；偶數羽狀複葉，小葉在 10 對以上；莢果內壁有橫隔膜..... V · 刺槐族 Trib. ROBINIEAE (BENTH.) HUTCH. (田菁屬 *Sesbania* Scop.)
32. 纏繞草本，有時灌木狀；三小葉；莢果內壁無橫隔膜..... VIII · 菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC. (部分)
19. 莢果不開裂；無小托葉。
33. 莢果膨脹呈囊泡狀..... XII · 山羊豆族 Trib. GALEGEAE (BRONN) TORREY et GRAY (部分)
33. 莢果不膨脹呈囊泡狀。
34. 奇數羽狀複葉，小葉互生..... II · 黃檀族 Trib. DALBERGIEAE BRONN ex DC.
34. 三小葉；種子 1 粒。
35. 莢果扁平，革質..... VII · 山螞蝗族 Trib. DESMODIEAE (BENTH.) HUTCH. (胡枝子亞族 Subtrib. LESPEDEZINAE (HUTCH.) SCHUBERT)
35. 果皮肥厚呈核果狀，木質..... XX · 山豆根族 Trib. EUCHRESTEAE (NAKAI) OHASHI
5. 莢果橫向斷裂或縮成莢節，每節具 1 粒種子。
36. 有小托葉..... VII · 山螞蝗族 Trib. DESMODIEAE (BENTH.) HUTCH. (山螞蝗亞族 Subtrib. DESMODIINAE)
36. 無小托葉。
37. 龍骨瓣歪斜，先端截平，翼瓣短，稀與龍骨瓣等長..... XIII · 岩黃耆族 Trib. HEDYSAREAE DC. (部分)
37. 龍骨瓣鈍頭或喙狀捲曲，翼瓣常具橫皺褶紋..... XI · 合萌族 Trib. AESCHYNOMENEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)
4. 花絲頂端全部或部分膨大下延。
38. 莢果由莢節組成，多少呈四稜形，不裂..... XV · 小冠花族 Trib. CORONILIEAE (ADANS.) BOISS.
38. 莢果不分成節，開裂或不裂，有時內壁具橫向短膜。
39. 葉軸先端成針刺或捲鬚；花單生或組成腋生的總狀花序；托葉分離，側脈直伸到葉緣鋸齒上..... XVII · 應嘴豆族 Trib. CLCEREAE ALEFELD
39. 葉軸先端有葉，無捲鬚也無針刺。
40. 全部或部分瓣柄雄蕊管連生；小葉常具鋸齒，側脈直伸到葉緣鋸齒上..... XVIII · 車軸草族 Trib. TREOLIEAE (BRONN) BENTH. (車軸草屬 *Trifolium* LINN.)
40. 瓣柄不與雄蕊管連生。
41. 托葉退化成腺點，下方 1 對小葉呈托葉狀，小葉全緣，側脈不伸到葉緣..... XIV · 百脈根族 Trib. LOTEAE DC.
41. 托葉大部分與葉柄連生，小葉邊緣具鋸齒，側脈通常直伸到葉緣鋸齒上..... XVIII · 車軸草族 Trib. TRIFOLIEAE (BRONN) BENTH. (部分)
3. 花葯兩型，即背著與底著交互，有時長短交互排列。
42. 花絲上部腫大或擴展；一年生或多年生草本，或為亞灌木，常具刺和腺毛..... XVIII · 車軸草族 Trib. TRIFOLIEAE (BRONN) BENTH. (芒柄花屬 *Ononis* LINN.)

42. 花絲上部不腫大也不擴展。
43. 莢果橫向分節並斷裂成具單粒種子的莢節，有時僅有1莢節.....
.....XI·合萌族 Trib. AESCHYNOMENEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)
43. 莢果不橫向分成節，如分節時也不斷裂成莢節。
44. 花絲連合成一多少閉合的雄蕊管，上部分離；小托葉缺，或甚小。
45. 瓣柄多少與雄蕊管連生；托葉甚小或缺.....
.....XXII·染料木族 Trib. GEMSTEAE (ADANS.) BENTH.
(染料木屬 *Genista* LINN.)
45. 瓣柄與雄蕊管分離。
46. 子房具胚珠1粒；莢果具種子1粒.....
.....XI·合萌族 Trib. AESCHYNOMENEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)
46. 子房具胚珠1至多粒；莢果具種子1至多粒.....
.....XXII·染料木族 Trib. GEMSTEAE (ADANS.) BENTH. (部分)
44. 絲連合成一上方縫裂的雄蕊管，有時對旗瓣的1枚雄蕊分離或部分分離。
47. 單葉；總狀或穗狀花序頂生或與葉對生，花柱內具髯毛.....
.....XIX·豬屎豆族 Trib. CROTALARIEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)
47. 複葉或三出複葉。
48. 葉片下面具腺點；花柱被髯毛或柱尖周圍被毛。
49. 花葯兩型，即背著與底著互生，花萼二唇形；有小托葉.....
.....VIII·菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC. (部分)
49. 花葯近同型，背著，花萼鐘形；無小托葉.....
.....IX·補骨脂族 Trib. PSORALEAE (BENTH.) RYDB. (部分)
48. 葉片下無腺點；花柱無毛或有毛。
50. 花柱無毛。
51. 羽狀複葉，通常具小托葉；莢果有時具片狀橫褶並常具螫毛於花序腋生或老莖生.....
.....VIII·菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC.
(黨豆屬 *Mucuna* ADANS.)
51. 掌狀三出複葉，無小托葉；莢果無螫毛；花序頂生或與葉對生.....
.....XIX·豬屎豆族 Trib. CROTALARIEAE (BENTH.) HUTCH.
(羅頓豆屬 *Lotononis* ECKL. et ZEYH.)
50. 花柱具毛。
52. 花柱具髯毛或柱頭具睫毛；莢果常膨脹.....
.....XIX·豬屎豆族 Trib. CROTALARIEAE (BENTH.) HUTCH. (部分)
52. 花柱通常在基部被柔毛；莢果不膨脹.....
.....VIII·菜豆族 Trib. PHASEOLEAE DC.

三、山螞蝗屬²

草本、亞灌木或灌木。葉為羽狀三出複葉或退化為單小葉；具托葉和小托葉，托葉通常為膜質，有條紋，小托葉鑽形或絲狀；小葉全緣或淺波狀。花通常較小；組成腋生或頂生的總狀花序或圓錐花序，小為單生或成對生于葉腋；苞片宿存或早落，小苞片有或缺；花萼鐘狀，4~5裂，裂片較萼筒長或短，上部裂片全緣或先端2裂至微裂；花冠白色、綠白、黃白、粉紅、紫色、紫堇色，旗瓣橢圓形、寬橢圓形、倒卵形、寬倒卵形至近圓形，翼瓣多少與龍骨瓣貼連，均有瓣柄；雄蕊二體(9+1)或少有單體；子房通常無柄，有胚珠數顆。莢果扁平，不開裂，背腹兩縫線稍縊縮或腹縫線勁直；莢節數枚，子葉出土萌發。

屬模式種：蝦尾山螞蝗 *Desmodium scorpiurus* (Sw.) Desv. (*Hedysarum Scorpiurus* Sw.)

約 350 種，多分布于亞熱帶和熱帶地區。中國有 27 種 5 變種，大部分分布于西南經中南部至東南部，僅 1 種產陝、甘西南部。

山螞蝗屬分種檢索表²

1. 二體雄蕊，對著旗瓣 1 枚雄蕊與其他 9 枚完全離生。
 2. 葉柄兩側具的狹翅寬 0.2~0.4 毫米；具小苞片；花瓣綠白色或黃白色，具明顯脈紋〔亞屬 1 小槐花亞屬 Subgen. *Catenaria* (Benth.) Baker〕.....1 · 小槐花 *D. caudatum* (Thunb.) DC.
 2. 葉柄兩側無翅；無小苞片；花瓣膜質，通常粉紅、紫色、紫堇色，有時兼有白色，脈紋不明顯。
 3. 莢果線形；莢節線形、長圓形、長圓狀線形至狹倒卵形，長為寬的 3 倍以上〔亞屬 2 山螞蝗亞屬 Subgen. *Desmodium*〕
 4. 葉全為 3 小葉的羽狀複葉。
 5. 頂生小葉長 1~4 厘米，寬 0.7~2.5 厘米，側脈每邊 4~5 條；托葉長 2 毫米.....5 · 蝎尾山螞蝗 *D. scorpiurus* (sw.) Desv.
 5. 頂生小葉較大，長 4.5~10 (~15) 厘米，寬 3~6 (~8) 厘米，側脈每邊 7~12 條；托葉長 7~10 毫米.....2 · 大葉拿身草 *D. laxiflour* DC.
 4. 葉為單小葉或近基部處有時為 3 小葉。
 6. 葉全力單小葉，卵形、卵狀橢圓形或披針形，長 5~12 厘米，寬 2~5 厘米，側脈每邊 7~10 條；莢果長 8~12 厘米，有莢節 6~8；莢節長 12~20 毫米.....3 · 單葉拿身草 *D. zonatum* Miq.
 6. 葉大部為單小葉，但在莖的近基部處有葉為 3 小葉，小葉寬三角形或寬卵形，長 2~3.5 厘米，寬 1.5~2.5 厘米，側脈每邊 5~6 條；莢果長 2~3.5 厘米，有莢節 3~5；莢節長 6~7 毫米.....4 · 細葉山螞蝗 *D. gracillimum* Hemsl.
 3. 莢果狹長圓形；莢節通常為近圓形，近長圓形，近方形，長與寬幾相等，或長稍大于寬，但不超過 1 倍〔亞屬 3 三點金亞屬 Subgen. *Sagotia* (Duchass. et Walpers) Baker〕
 7. 葉為 3 小葉的羽狀複葉（僅南美山螞蝗、二歧山螞蝗、顯脈山綠豆、異葉山螞蝗、小葉三點金有時近基部兼有 1 小葉）。
 8. 頂生小葉較大，通常長在 2.5 厘米以上，
 9. 總狀花序較長，長 10~45 厘米，花略稀疏。
 10. 小葉上面無光澤，疏被毛，頂行小葉橢圓形、寬橢圓形、卵形、寬卵形、菱狀卵形至倒卵形，側脈直達葉緣或近葉緣處彎曲。
 11. 莢果腹、背兩縫線于節間縮呈念珠狀，托葉宿存。
 12. 花梗長 5~13 毫米，結果時長達 15 毫米，被小鈎狀毛和腺毛；莢節長 3~5 毫米；苞片早落；小葉兩面疏被毛，側脈每邊 4~6 條.....6. 南美山螞蝗 *D. tortuosum* (sw.) DC.
 12. 花梗長 2~5 毫米，被小鈎狀毛和小柔毛；莢節長 2.5 毫米；苞片宿存；小葉上面被貼伏毛和混有少數鈎狀毛，下面密被貼伏毛，側脈每邊 8~13 條.....7 · 二歧山螞蝗 *D. dichotomum* (Sw.) DC.
 11. 莢果腹縫線近直或微波狀，背縫線于節間深縮至腹縫線，不呈念珠狀；托葉早落；頂生小葉橢圓形或倒卵形.....8. 凹葉山螞蝗 *D. concinnum* DC.
 10. 小葉上面有光澤，無毛，機生小葉狹卵形、卵狀橢圓形至長橢圓形，側脈近葉緣處彎曲連結.....14 · 顯脈山綠豆 *D. reticulatum* Champ. ex Benth.
 9. 總狀花序較短，長 2.5~7 厘米，花極稠密。
 13. 總花梗密被開展的淡黃色鈎狀毛.....13a · 假地豆(原變種) *D. heterocarpon* (Linn.) DL var. *heterocarpon*

13. 總花梗密被貼伏白色的糙伏毛.....
13b. 糙毛假地豆 (變種) *D. heterocarpon* (LINN.) DC. var. *strigosum* VAN MEEUWEN
8. 頂生小葉較小, 通常長 2.5 厘米以下。
 14. 總狀花序有花 6 至多數。
 15. 小葉倒三角狀卵形或倒卵形, 長 1~2.5 厘米, 寬 1~1.6 厘米; 分枝被開展的黃褐色或誘色短柔毛.....12 · 疏果山螞蝗 *D. griffithianum* BENTH.
 15. 小葉較大的為倒卵狀長橢圓形或長橢圓形, 長 1~1.2 厘米, 寬 0.4~0.6 厘米, 較小的為倒卵形或橢圓形, 長 0.2~0.6 厘米, 寬 0.15~0.4 厘米; 分枝近無毛.....
18 · 小葉三點金 *D. microphyllum* (THUNB.) DC.,
 14. 花單生或對生于葉腋內, 不成花序或 2~3 朵散生于總梗上。
 16. 花梗無毛或頂部有少數鈎狀毛, 花梗長 10~25 毫米; 莢節較大, 長 3.5~4 毫米, 頂生小葉寬橢圓形或寬橢圓狀倒卵形.....
19 · 異葉山螞蝗 *D. heterophyllum* (WILLD.) DC.
 16. 花梗全部或頂部有開展的柔毛, 花梗長 3~8 毫米; 莢節較小, 長 2~2.5 毫米, 頂生小葉倒心形、倒三角形或倒卵形.....
20 · 三點金 *D. triflorum* (LINN.) DC
7. 葉通常只有單小葉 (僅絨毛山螞蝗、赤山螞蝗、金錢草有時兼有 3 小葉)。
 17. 小葉不為圓形、近圓形、腎形或扁菱形, 通常長大于寬。
 18. 小葉較大, 長通常在 3 厘米以上, 寬 2 厘米以上; 莢果被毛或幾無毛。
 19. 花疏生于花序總軸上; 小葉上面除中脈外無毛, 下面具灰色柔毛, 分枝疏生鈎狀毛或柔毛。
 20. 花綠白色; 花梗長 2~5 毫米于莢果被鈎狀柔毛.....
9 · 大葉山螞蝗 *D. gangeticum* (LINN.) DC.
 20. 花紫色或堇色; 花梗長 12 毫米; 莢果幾無毛.....
10 · 長圓葉山螞蝗 *D. oblongum* WALL. ex BENTH.
 19. 花密集于花序總軸上; 小葉兩面被黃褐色絨毛。
 21. 苞片鑽形, 較短, 長 2~3.5 毫米; 花序短, 長 4~10 厘米.....
11a · 絨毛山螞蝗 (原變種) *D. velutinum* (WILLD.) DC. var. *velutinum*
 21. 苞片披針形, 較長, 長 7~10 毫米; 花序較長, 長達 20 厘米.....
11b · 長苞絨毛山螞蝗 (變種) *D. velutinum* (WILLD.) DC
 var. *longibracteatum* (SCHINDL.) VAN MEEUWEN
 18. 小葉較小, 長 1~2.2 厘米, 寬 0.7~1.2 厘米, 通常為橢圓形; 莢果無毛.....
15 · 赤山螞蝗 *D. rubrum* (LOUR.) DC.
 17. 小葉長小于寬或幾相等, 圓形, 近圓形或腎形、扁菱形。
 22. 小葉厚紙質至近革質, 圓形或近圓形, 長與寬幾相等, 下面密被貼伏白色絲狀毛, 側脈每邊 8~10 條.....
16 · 廣東金錢草 *D. styracifolium* (OSBEEK) MERR.
 22. 小葉膜質, 腎形或扁菱形, 通常長小于寬, 下面無毛, 側脈每邊 3~4 條.....
17 · 腎葉山螞蝗 *D. renifolium* (LINN.) SCHINDL.
1. 單體雄蕊, 對著旗瓣 1 枚雄蕊與其他 9 枚雄蕊花絲中部以上連合 (僅長波葉山螞蝗在中下部連合); 莢節長為寬 1~1.5 倍或約相等 (亞屬 4 餓螞蝗亞屬 Subgen. *Dollinera* (ENDL.) SCHINDL.)
 23. 托葉多為狹卵形、狹三角形、三角形、不為線形; 龍骨瓣較翼瓣短; 莢果扁平, 不為念珠狀, 具鈎狀毛和直毛或無毛。
 24. 小葉先端具硬細尖, 乾時葉常呈黑色; 無小苞片; 龍骨瓣基部無耳; 莢果密被褐色絲狀毛.....
21 · 餓螞蝗 *D. multiflorum* DC.
 24. 小葉先端無梗細尖, 乾時葉不呈黑色; 有小苞片; 龍骨瓣基部具耳; 莢果無毛, 如有毛則不為褐色絲狀毛。
 25. 頂生小葉較狹小, 寬 1~5 厘米。
 26. 頂生小葉披針形或披針狀線形, 長為寬 4 倍以上; 莢果全無毛.....
24 · 狹葉山螞蝗 *D. stenophyllum* PAMPAN.
 26. 頂生小葉不為上述形狀, 若為披針形, 則其長為寬的 2 倍以下; 莢果被毛或近無毛。
 27. 旗瓣先端圓形, 不微凹, 龍骨瓣先端有細尖; 幼枝幾無毛.....
23 · 美花山螞蝗 *D. callianthum* FRANCH.
 27. 旗瓣先端微凹, 龍骨瓣先端無細尖, 幼枝被短柔毛。
 28. 莢果明顯被毛; 頂生小葉卵狀橢圓形、寬卵形、菱形或圓菱形; 花梗較短, 長 4~10 毫米。
 29. 小葉下面密被或疏被灰色短柔毛至近無毛; 花萼裂片較萼筒短; 莢果疏被貼

- 伏灰色短柔毛.....22a ·圓錐山螞蝗 (原變種) *D. elegans* DC. var. *elgans*
29. 小葉下面密被白色開展的絨毛和絲狀毛; 花萼裂片明顯較萼筒長; 莢果密被白色開展絨毛和絲狀毛.....22c. 鹽源山螞蝗 (變種) *D. elegans* DC. var. *handelii* (SCHINDL.) OHASHI
28. 莢果疏生小柔毛, 成熟時無毛; 頂生小葉狹卵形或卵狀披針形, 花梗較長, 開花時長 1.3~2.2 厘米.....12b. 川南山螞蝗 (變種) *D. elegans* DC. var. *wolohoense* (SCHINDL.) OHASHI
25. 頂生小葉較寬大, 寬 5~17 厘米。
30. 幼枝被白色柔毛; 頂生小葉卵形或寬卵形, 偶有菱形或近圓形, 基部偏斜, 中脈偏離下面密被絲狀毛或散生短柔毛; 龍骨瓣先端有鈎狀毛。
31. 小葉下面密被絲狀毛; 總花梗、花梗及花萼被開展柔毛和鈎狀毛, 花梗長 4~10 毫米; 莢節被小鈎狀毛, 有時混有直毛.....25a ·滇南山螞蝗 (原變種) *D. megaphyllum* ZOLL var. *megaphyllum*
31. 小葉下面散生短柔毛; 總花梗、花梗及花萼散生毛或近無毛, 花梗較長, 長 9~11 毫米; 莢節幾無毛或無毛.....25b ·無毛滇南山螞蝗 (變種) *D. megaphyllum* ZOLL var. *glabrescens* Prain
30. 幼枝密被白色或灰色或灰色絨毛; 頂生小葉近圓形、卵形或倒卵形, 基部不偏斜, 中脈不偏高, 下面密被灰色或白色絨毛; 龍骨瓣無毛.....26 ·雲南山螞蝗 *D. yunnanense* FRANCH.
23. 托葉線形, 龍骨瓣與翼瓣等長; 莢果近念珠狀, 密被銹色或褐色小鈎狀毛; 小葉邊緣中部以上波狀.....27. 長波葉山螞蝗 *D. sequax* WALL.

四、排錢樹屬²

灌木或亞灌木。葉為羽狀三出複葉, 具托葉和小托葉。花 4~15 朵組成繖形花序, 由對生、圓形、宿存的葉狀苞片包藏, 在枝先端排列呈總狀圓錐花序狀, 形如一長串錢牌; 花萼鐘狀, 被柔毛, 5 裂, 但上部 2 裂片合生為 1, 或先端微 2 裂, 下部 3 裂, 較上部萼裂片長, 萼筒多少較萼裂片長; 花冠白色至淡黃色或稀為紫色, 旗瓣倒卵形或寬倒卵形, 基部漸狹或具瓣柄, 翼瓣狹橢圓形, 較龍骨瓣小, 有耳, 具瓣柄, 龍骨瓣弧曲, 有耳, 具長瓣柄; 雄蕊單體, 雌蕊較雄蕊長, 具花盤, 花柱較子房長, 通常近基部有柔毛。莢果腹縫線稍縊縮呈淺波狀, 背縫線呈淺牙齒狀, 無柄, 不開裂, 有莢節 (1~) 2~7; 種子在種臍周圍具明顯帶邊假種皮; 子葉出土萌發。

世界上約有 6 種, 分佈熱帶亞洲及大洋洲。中國有 4 種, 產於福建、廣東、海南、廣西、雲南等省區。

排錢樹屬分種檢索表²

1. 頂生小葉披針形或長圓形，長 13~20 厘米，側生小葉較短，頂生小葉較側生小葉長 4~5 倍；葉狀苞片斜卵形.....
.....1. 長葉排錢樹 *P. longipes*(CRAIB) SCHINDL.
1. 頂生小葉卵形、橢圓形或有時倒卵形，通常為 5~12 厘米，與側生小葉近等長或長 1 倍。
2. 頂生小葉與側生小葉近等長或稍長；葉狀苞片寬橢圓形或寬卵形；莢果稍有柔毛或變無毛。.....
.....2. 長柱排錢樹 *P. kurzianum* (KUNTZE) OHASHI
2. 頂生小葉較側生小葉長 1 倍，葉狀苞片圓形或寬橢圓形，如是寬橢圓形，則莢果密被銀灰色絨毛。
3. 葉上面近無毛；葉狀苞片圓形，略被短柔毛及緣毛；莢果通常有 2 莢節，成熟時無毛或略被短柔毛及緣毛。.....
..... 排錢樹 *P. Pulchellum* (LINN.) Desv.
3. 葉上面密被絨毛；葉狀苞片寬橢圓形，密被絨毛，莢果通常有莢節 3~4，密被銀灰色絨毛。..... 毛排錢樹 *P. elegans* (LOUR.) Desv.



第三節 台灣產波葉山螞蝗與排錢樹植物的藥用植物學考察

台灣產豆科屬之檢索表^{1, 12}

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
目 order	豆目	Fabales
科 family	豆科	Leguminosae = Fabaceae
亞科 subfamily	蝶型花亞科	Faboideae
屬 genus		Desmodium Phyllodium

草本，藤本，灌木或喬木，根絕大多數具根瘤菌。葉單葉或複葉，常為羽狀複葉，一般互生，具葉枕。子房上位，單一心皮。莢果。

臺灣自生及歸化的有 79 屬。

屬檢索表¹²

1. 整齊花；花瓣鑷合狀排列.....Mimosoideae 含羞草亞科
2. 雄蕊等於或少於 10 枚，離生。
 3. 植株具捲鬚；花藥具腺體.....33. *Entada*
 3. 植株不具捲鬚；花藥無腺體。
 4. 花序底部不孕花具退化雄蕊。
 5. 花瓣白色；果無柄.....27. *Desmanthus*
 5. 花瓣黃綠色；果具柄.....57. *Neptunia*
 4. 不孕花不具退化雄蕊。
 6. 有刺草本或灌木.....54. *Mimosa*
 6. 無刺灌木或小喬木.....46. *Leucaena*
2. 雄蕊多於 15 枚，合生或離生。

7. 雄蕊離生.....2. *Acacia*
7. 雄蕊為單體雄蕊。
8. 莢果鑷狀，縫線加厚.....9. *Archidendron*
8. 莢果舌狀，縫線未加厚.....4. *Albizia*
1. 不整齊花；花瓣覆瓦狀排列。
9. 旗瓣為翼瓣所包圍；雄蕊離生或單體雄蕊.....Caesalponioideae 蘇木亞科
10. 單葉，先端二裂.....11. *Bauhinia*
10. 複葉。
11. 植株有刺。
12. 攀緣性灌木；莢果具刺.....12. *Caesalpinia*
12. 直立喬木；莢果平滑。
13. 二回羽狀複葉.....24. *Delonix*
13. 一回羽狀複葉.....39. *Gleditsia*
11. 植株無刺。
14. 二回羽狀複葉.....41. *Haematoxylon*
14. 一回羽狀複葉。
15. 雄蕊藥室縫線處具纖毛；莢果裂瓣捲繞..... 18. *Chamaecrista*
15. 雄蕊藥室縫線處無毛；莢果不開裂或裂瓣不捲繞.....67. *Senna*
9. 旗瓣包圍翼瓣；雄蕊離生，單體或兩體雄蕊.....Papilionoideae 蝶形花亞科
16. 雄蕊離生。
17. 小葉3~5.....59. *Ormosia*
17. 小葉11~21。
18. 莢果念珠狀；灌木.....70. *Sophora*
18. 莢果不成念珠狀；喬木.....48. *Maackia*
16. 雄蕊合生。
19. 花藥兩型.....22. *Crotalaria*
19. 花藥同型。
20. 葉不具葉枕，常具托葉脊。
21. 單葉或三出葉。
22. 單葉.....63. *Psoralea*
22. 三出葉。
23. 葉掌狀三出葉.....75. *Trifolium*
23. 葉羽狀三出葉。
24. 莢果2~3捲；小葉倒卵形.....51. *Medicago*
24. 莢果不捲繞；小葉倒披針形.....52. *Melilotus*
21. 羽狀複葉。
25. 葉先端成捲鬚.....77. *Vicia*
25. 捲鬚無。
26. 小葉5片.....47. *Lotus*
26. 小葉多於9片.....10. *Astragalus*
20. 葉具明顯葉枕。
27. 莢果單一種子或種子間收縮或成節。

28. 莢果僅具一種子。
29. 三出複葉。
30. 莖枝具倒刺.....43. [Kummerowia](#)
 30. 莖枝不具倒刺。
31. 頂小葉具明顯 2 小托葉.....19. [Christia](#)
 31. 頂小葉不具明顯可見之小托葉。
32. 花柄單生，長於 5 mm.....15. [Camplotropis](#)
 32. 花柄 2~4 簇生，短於 2 mm.....45 [Lespedeza](#)
29. 羽狀複葉。
33. 小葉 7~9 枚.....36. [Euchresta](#)
 33. 小葉 5 枚.....62. [Pongamia](#)
28. 莢果具種子多數。
34. 葉單身複葉.....72. [Tadehagi](#)
 34. 葉非單身複葉。
35. 莢果為苞片或萼片所包住。
36. 花序為兩苞片所包.....61. [Phyllodium](#)
 36. 花序為萼片所包，不包於苞片內.....76. [Uraria](#)
35. 莢果不為苞片或萼片所包住。
37. 單葉或頂生小葉具小托葉。
38. 莢果多少扁平。
39. 莢果明顯成節.....28. [Desmodium](#)
 39. 莢果於種間收縮。
40. 頂小葉大於側生小葉 2 倍以上.....21. [Codariocalyx](#)
 40. 頂小葉略大於側生小葉。
19. 花葯兩型.....22. [Crotalaria](#)
 19. 花葯同型。
20. 葉不具葉枕，常具托葉脊。
21. 單葉或三出葉。
22. 單葉.....63. [Psoralea](#)
 22. 三出葉。
23. 葉掌狀三出葉.....75. [Trifolium](#)
 23. 葉羽狀三出葉。
24. 莢果 2~3 捲；小葉倒卵形.....51. [Medicago](#)
 24. 莢果不捲繞；小葉倒披針形.....52. [Melilotus](#)
21. 羽狀複葉。
25. 葉先端成捲鬚.....77. [Vicia](#)
 25. 捲鬚無。
26. 小葉 5 片.....47. [Lotus](#)
 26. 小葉多於 9 片.....10. [Astragalus](#)
20. 葉具明顯葉枕。
27. 莢果單一種子或種子間收縮或成節。

28. 莢果僅具一種子。
29. 三出複葉。
30. 莖枝具倒刺.....43. *Kummerowia*
 30. 莖枝不具倒刺。
31. 頂小葉具明顯2小托葉.....19. *Christia*
 31. 頂小葉不具明顯可見之小托葉。
32. 花柄單生，長於5 mm.....15. *Camplotropis*
 32. 花柄2~4簇生，短於2 mm.....45 *Lespedeza*
29. 羽狀複葉。
33. 小葉7~9枚.....36. *Euchresta*
 33. 小葉5枚.....62. *Pongamia*
28. 莢果具種子多數。
34. 葉單身複葉.....72. *Tadehagi*
 34. 葉非單身複葉。
35. 莢果為苞片或萼片所包住。
36. 花序為兩苞片所包.....61. *Phyllodium*
 36. 花序為萼片所包，不包於苞片內.....76. *Uraria*
35. 莢果不為苞片或萼片所包住。
37. 單葉或頂生小葉具小托葉。
38. 莢果多少扁平。
39. 莢果明顯成節.....28. *Desmodium*
 39. 莢果於種間收縮。
40. 頂小葉大於側生小葉2倍以上.....21. *Codariocalyx*
 40. 頂小葉略大於側生小葉。
41. 頂小葉橢圓形.....56. *Neonotonia*
 41. 頂小葉菱形.....60. *Pachyrhizus*
38. 莢果膨大筒狀。
42. 單葉.....5. *Alysicarpus*
 42. 三出複葉。
43. 莢果多少念珠狀.....25. *Dendrolobium*
 43. 莢果突出橫紋.....65. *Pycnospora*
37. 複葉，頂小葉不具小托葉。
44. 羽狀複葉。
45. 奇數羽狀複葉.....58. *Ormocarpum*
 45. 偶數羽狀複葉。
46. 小葉30枚以上.....3. *Aeschynomene*
 46. 小葉20枚以下.....69. *Smithia*
44. 小葉2~4枚
47. 小葉2或4。
48. 小葉4枚.....8. *Arachis*
 48. 小葉2枚.....79. *Zornia*

47. 小葉 3 枚。
48. 托葉成鞘.....71. *Stylosanthes*
48. 托葉離生，不形成托葉鞘。
49. 果莢 2 粒種子.....66. *Rhynchosia*
49. 果莢種子多數。
50. 旗瓣約等長於翼瓣.....13. *Cajanus*
50. 旗瓣長約為翼瓣之半.....55. *Mucuna*
27. 莢果平直不收縮。
51. 花頂端有小尖凸突起.....42. *Indigofera*
51. 花藥無附屬物。
52. 羽狀複葉，小葉 5 枚以上。
53. 偶數羽狀複葉。
54. 攀緣性灌木.....1. *Abrus*
54. 直立草本至灌木.....68. *Sesbania*
53. 奇數羽狀複葉。
55. 具小托葉。
56. 花瓣無柄.....20. *Clitoria*
56. 花瓣具長柄.....53. *Milletia*
55. 小托葉無。
57. 小葉互生.....23. *Dalbergia*
57. 小葉對生。
58. 花柱捲繞.....7. *Apios*
58. 花柱彎曲。
59. 莢果開裂.....73. *Tephrosia*
59. 莢果不開裂.....26. *Derris*
52. 三出複葉或單葉。
60. 葉及萼片具腺點。
61. 藤本.....31. *Dunbaria*
61. 直立木本或草本。
62. 珠柄位於種臍一端；單葉.....34. *Eriosema*
62. 珠柄位於種臍中央；三出葉或單葉，單葉者花序具大苞片.....7. *Flemingia*
60. 葉及萼片不具腺點。
63. 旗瓣瓣上具附屬物。
64. 花柱上部有毛。
65. 花柱上部整圈有毛.....44. *Lablab*
65. 花柱上部一邊有毛。
66. 柱頭側生.....78. *Vigna*
66. 柱頭明顯頂生。
67. 花柱上方明顯膨大，柱頭化.....49. *Macroptilium*
67. 花柱圓柱形.....32. *Dysolobium*

64. 花柱光滑無毛，柱頭有毛。
68. 龍骨瓣及翼瓣之柄長過半.....30. *Dumasia*
68. 龍骨瓣及翼瓣之柄長甚小於瓣身長。
69. 植株無毛.....29. *Dolichos*
69. 植株被毛.....50. *Macrotyloma*
63. 旗瓣不具附屬物。
70. 花瓣明顯不等長。
71. 樹木；旗瓣最長.....35. *Erythrina*
71. 藤本；翼瓣最長.....55. *Mucuna*
70. 花瓣多少等長或近似之。
72. 萼片至少上方合生。
73. 萼片二唇化.....16. *Canavalia*
73. 萼片不二唇化。
74. 旗瓣具距。
75. 葉無毛.....17. *Centrosema*
75. 葉被褐毛.....64. *Pueraria*
74. 旗瓣不具距。
76. 花序具膨大的節.....38. *Galactia*
76. 花序平直.....40. *Glycine*
72. 萼片五片相等離生。
77. 雄蕊交互孕性；具鈎狀之宿存花柱.....74. *Teramnus*
77. 雄蕊全部孕性；不具鈎狀之宿存花柱。
78. 龍骨瓣及翼瓣之柄長過半.....6. *Amphicarpaea*
78. 龍骨瓣及翼瓣不具明顯之柄.....14. *Calopohonium*

DESMODIUM 山螞蝗屬¹²

草本或灌木。單葉、三出葉至五出葉，小葉具小托葉。圓錐總狀花序。花萼鐘形或筒狀，上方二片合生，下方一片者稍長。花瓣蝶形。兩體雄蕊，9+1。莢果扁平，腹面深收縮，成熟時斷裂成1節1粒種子的莢節。

台灣有18種。

種檢索表¹²

1. 三出葉。
 2. 頂小葉長於 2 cm。
 3. 葉上無毛。
 4. 頂小葉短於 3 cm。
 5. 花序梗具鉤毛.....a. *D. heterocarpum* var. *heterocarpum*
 5. 花序梗具直毛.....5b. *D. heterocarpum* var. *strigosum*
 4. 頂小葉長於 3 cm。
 6. 葉柄具翼.....1. *D. caudatum*
 6. 葉柄不具翼。
 7. 花梗 5~12 mm 長.....9b. *D. laxum* var. *leptopum*
 7. 花梗短於 5 mm。
 8. 頂小葉菱形.....12a. *D. podocarpum* subsp. *podocarpum*
 8. 頂小葉披針形.....12b. *D. podocarpum* subsp. *oxyphyllum*
 3. 葉上面有毛。
 9. 托葉扇形，包圍枝條.....14. *D. scorpiurum*
 9. 托葉披針形，不包圍枝條。
 10. 莢果 2~4 節.....9a. *D. laxum* subsp. *laterale*
 10. 莢果超過 5 節。
 11. 莢節之長寬約略相等。
 12. 小葉菱形.....15. *D. sequax*
 12. 小葉卵形至倒卵形。
 13. 草本；頂小葉窄於 4 cm.....7. *D. intortum*
 13. 灌木；頂小葉寬過 4 cm.....11. *D. multiflorum*
 11. 莢節長約為寬的 3 倍以上。
 14. 莢果側邊平滑無紋.....2. *D. diffusum*
 14. 莢果側邊有條紋脈.....8. *D. laxiflorum*
 2. 葉短於 2 cm。
 15. 半灌木；莢果在節處兩面收縮.....10. *D. microphyllum*
 15. 草本；莢果在節處僅在腹面收縮。
 16. 小葉先端圓形.....6. *D. heterophyllum*
 16. 小葉尖端凹形.....16. *D. triflorum*
1. 單葉。
 16. 葉 1~1.5 cm 長.....13. *D. renifolium*
 16. 葉長過 3 cm。
 17. 葉兩面被毛。
 18. 托葉披針形；枝條密被毛.....3. *D. gangeticum*
 18. 托葉錐形；枝條疏毛.....17. *D. velutinum*
 17. 葉上面無毛，背面披毛。
 19. 葉三角狀心臟形.....4. *D. gracillium*
 19. 葉長橢圓形.....18. *D. zonatum*

Desmodium sequax WALL. 波葉山螞蝗¹²

小灌木，高約 1~2 公尺，相較於其他山螞蝗，波葉山螞蝗有較粗且堅韌的木質部。枝被淡黃色短柔毛。葉為羽狀三出複葉，大形，頂生小葉卵形、菱狀卵形、長橢圓形，長 4~10 公分，寬 3~7 公分，先端銳尖或漸尖，基部寬楔形，葉緣呈明顯的波浪形，兩面均被毛。花紫紅色或粉紅色，頂生或腋生的總狀花序，每朵小花約 1 公分長，常組合為一大型圓錐花序，雄蕊 10 枚，二體，花萼闊鐘狀，萼齒三角形。莢果線形，稍彎，4~5 公分，暗褐色，沿上縫線有較淺的向內凹，下縫線則向內凹至寬的 1/4 左右處，有 6~12 節，密生黃色鉤毛，節易斷落，但不裂開。成熟後斷裂，可沾附在動物身上，代為傳播種子。

全島中低海拔空地。

PHYLLODIUM 排錢樹屬¹²

灌木。三出葉，具托葉及小托葉。總狀花序頭狀，4~8 朵花，為一葉狀苞片所包圍，然後再聚集成圓錐花序。花萼鐘形，4 裂。花瓣蝶形。雄蕊 10，單體雄蕊。莢果分節，不開裂，寬長橢圓形至四稜形。

台灣只有 1 種。

Phyllodium pulchellum (L.) DESV. 排錢樹¹²

半灌木，高 0.5~1.5 公尺。根細而彎曲。莖直立，分枝多而纖細，被有柔毛。三出複葉互生，葉柄短，有鑽形托葉 1 片，中間小葉大，橢圓狀卵形或披針狀卵形，長 5.5~11.5cm，寬 2.5~6.5cm，先端稍鈍，基部寬楔形，邊緣淺波狀，下面脈上被短柔毛，兩側小葉較小。秋季葉腋生花，花序長達 30cm，葉狀苞片約 30 對排為總狀，兩兩對生，好像兩串錢；苞片近圓形，直徑約 1cm，每對苞片

內著生由 2 至數朵花組成的繖形花序；蝶形花冠白色，長約 6mm。莢果僅 2 莢節，莢節處緊縮，長約 6mm，先端有長喙，邊緣被毛。種子細長，近矩形。

【分布】中南部低海拔路旁、草原及荒廢地。

【採集加工】夏、秋採收，洗淨切碎，鮮用或曬乾。

【性味功能】淡、澀，平。有小毒。清熱利濕，活血祛瘀，軟堅散結。

【主治】感冒發熱，瘧疾，肝炎，肝硬化腹水，血吸蟲病肝脾腫大，風濕疼痛，跌打損傷。



第四節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的生藥學文獻考察

排錢樹屬在世界上約有 6 種，台灣產的排錢樹只有一種，中國產的則有 4 種，灌木。三出葉，具托葉及小托葉。總狀花序頭狀，4~8 朵花，為一葉狀苞片所包圍，然後再聚集成圓錐花序。花萼鐘形，4 裂。花瓣蝶形。雄蕊 10，單體雄蕊。莢果分節，不開裂，寬長橢圓形至四稜形。

在 2003 年的時候，周麗娜等人探討了壯族民間常用草藥排錢樹¹³。他們取廣西恭城縣的排錢樹的根來觀察，發現：

1. 藥材的性狀：

發現根呈團塊狀，直徑 0.5~3cm；表面灰色至灰褐色，有栓皮，粗糙，不平坦；支根較多，多橫出，呈圓柱形，直徑 1~3mm，斷面黃白色，具密集同心性環紋及細孔。鬚根細長。質硬，不易折斷；斷面皮部棕褐色至深褐色，厚約 1mm，木部黃白色，黃棕色。氣微，味淡。

2. 顯微的鑑別：

(1.) 根橫切面(直徑 3.5mm)：

木栓 5~9 列，細胞呈長方形或類橢圓形，切向延長，排列整齊；皮層含大量色素細胞或紅棕色樹脂狀物質(通稱棕色塊)；韌皮部由含紅棕色樹脂狀物質與韌皮纖維呈切向間隔排列，韌皮纖維常含草酸鈣方晶，形成晶纖維。形成層 1~3 列。木質部射線寬 1~2 列細胞，徑向延長；導管直徑大，常單個或 2~3 個成群，木纖維多含草酸鈣方晶，形成晶纖維，草酸鈣方晶靠形成層處多散在，越近中部分佈越密，多成群存在；木薄壁細胞少，散在。(圖 1)

(2.) 粉末：

黃白色。木栓細胞呈長方形或類橢圓形，淡黃色，微木化；韌皮纖維細長，微彎曲，直徑 6~13 μ m，壁薄，晶纖維多；木纖維直徑 9~25 μ m，壁稍厚，微木化，晶纖維多；導管多網紋，少具緣紋孔，直徑約為 16~63 μ m；

草酸鈣方晶多而大，呈長方形、類方形、棱形或錐形等，長13~25 μm ；紅棕色或淡黃色樹脂狀分泌物大面多，呈塊狀、卵圓形、圓柱狀等，木髓線細胞呈長方形，長50~125 μm ，寬10~25 μm ，具單紋孔；木薄壁細胞呈類方形，直徑15~25 μm ，具單紋孔；澱粉粒少數，單粒呈圓形、卵形或橢圓形，直徑2~12 μm ，臍點短縫狀、人字形或點狀等，複粒由2~4個單粒組成。(圖2)

3. 理化鑒別：

取本品粗粉(20目)5g，加70%乙醇40ml，浸漬過夜，濾過，濾液蒸乾，加稀鹽酸10ml溶解殘渣，濾過，用氫試液調pH值至10，用氯仿10ml提取1次，蒸乾，殘渣加稀鹽酸10ml溶解，濾過，取濾液2ml，加稀碘化鉍鉀試液3滴生成橘紅色沉澱；取濾液2ml加碘化汞鉀試液3滴，生成淡黃色沉澱；取濾液2ml，加矽鎢酸試液3滴，生成灰白色沉澱(生物鹼反應)。

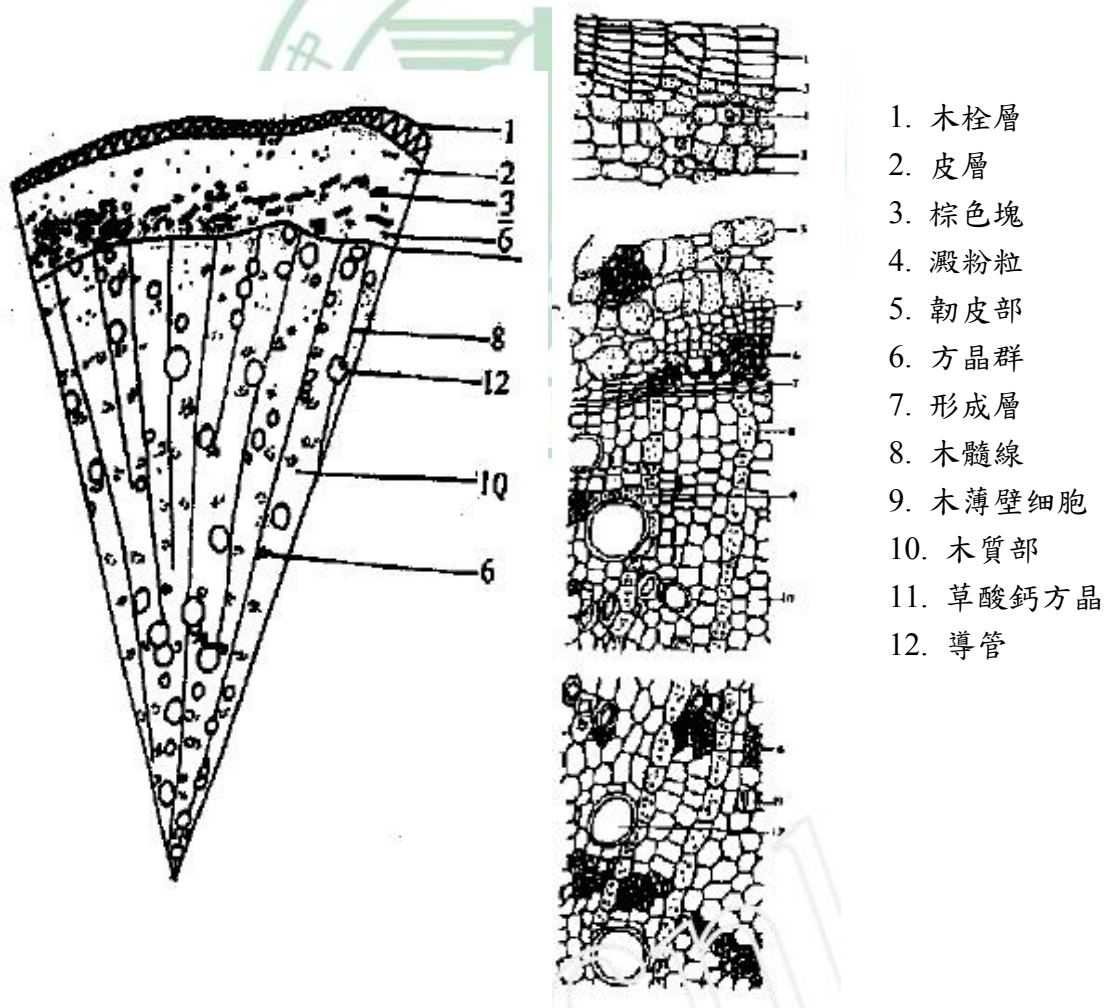


圖1 排錢樹(根) 橫切面組織圖¹³



圖2 排錢樹(根) 粉末組織圖¹³

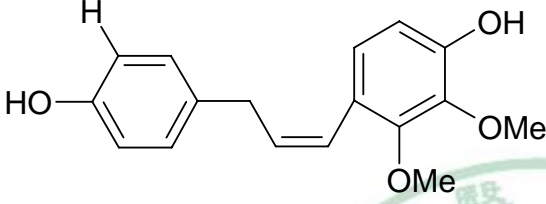
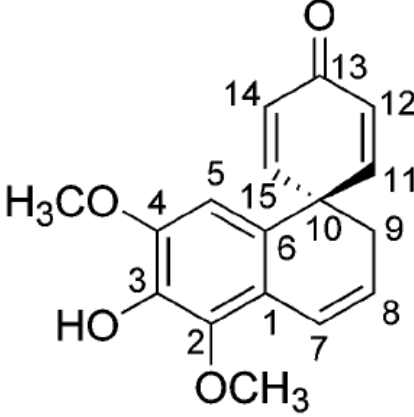
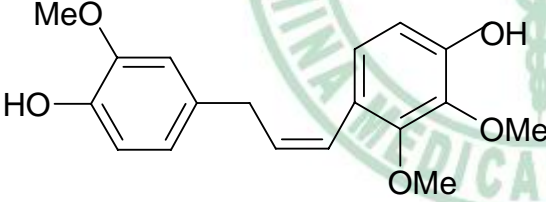
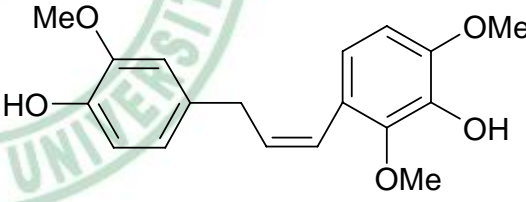
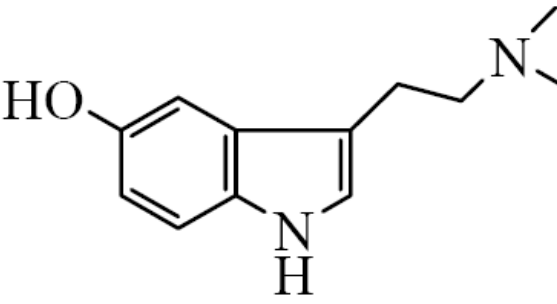
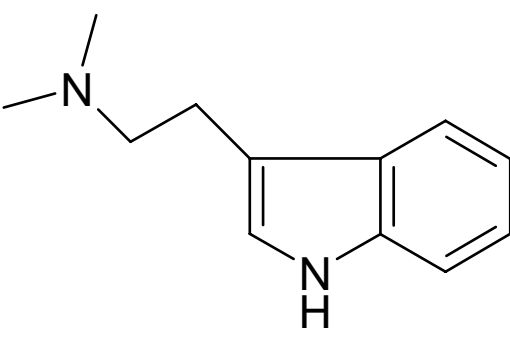


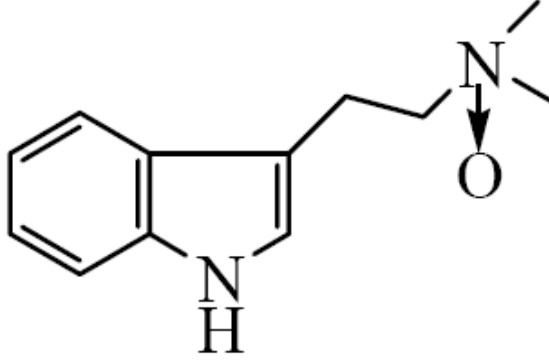
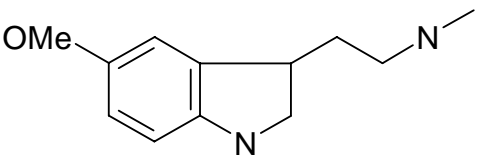
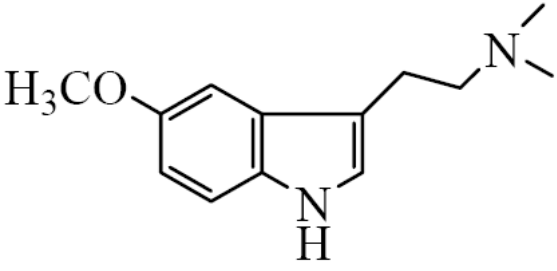
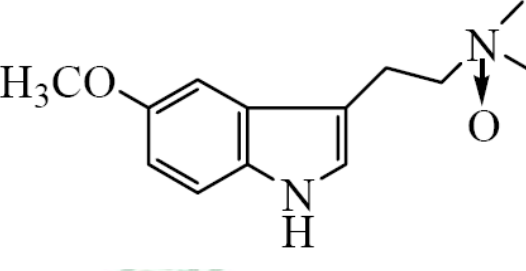
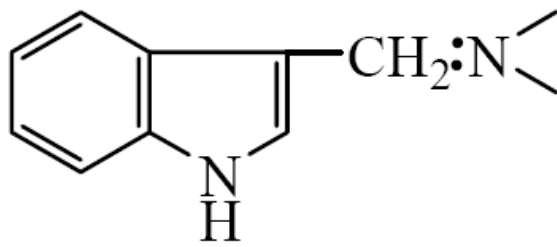
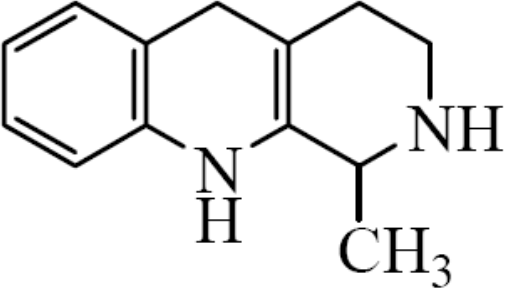
第五節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的化學成分考察

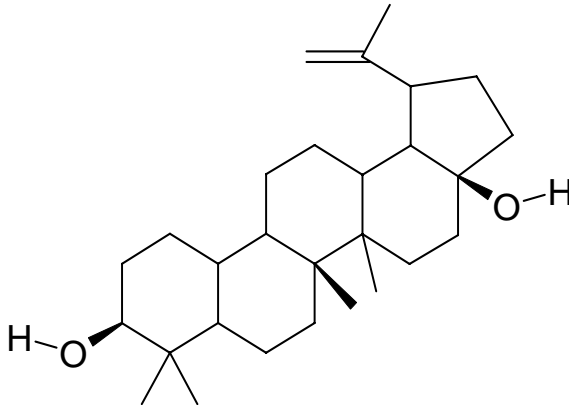
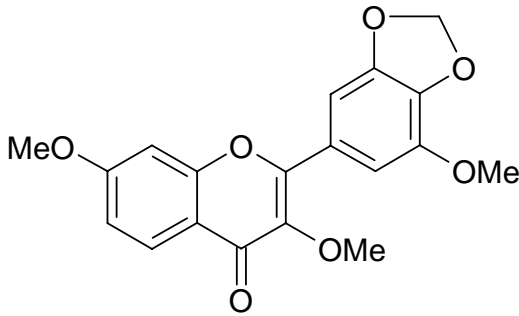
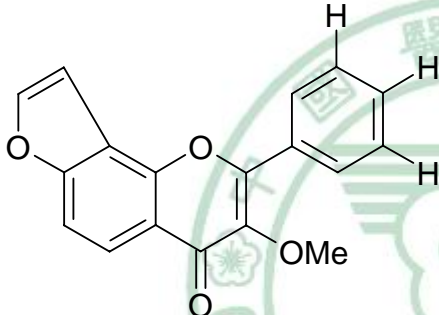
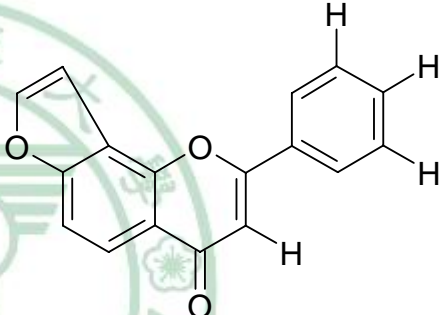
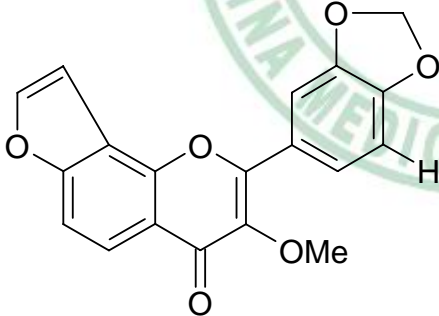
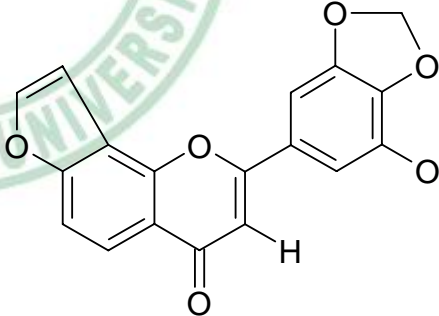
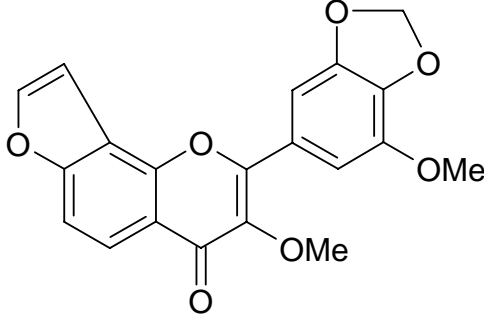
Chemical type	Name	plant	Ref
flavone	Karanjin	D.seq	14
	Lanceolatin-B	D.seq	14
	Pongapin	D.seq	14
	5'-methoxypongapin	D.seq	14
	Kanujin	D.seq	14
	Glabra- II	D.seq	14
cinnamylphenol	Pulchelstyrene A	P.pul	15
	Pulchelstyrene B	P.pul	15
	Pulchelstyrene C	P.pul	15
	Pulchelstyrene D	P.pul	15
alkaloid	5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine	P.pul	16
	Bufotenine	P.pul	16
	N,N-Dimethyl-tryptamine	P.pul	16
	DMT-N-oxide	P.pul	16
	5-Methoxy-N-methyltryptamine	P.pul	17
	Gramine	P.pul	17
	5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine-N-oxide	P.pul	17
	N,N-Dimethyltryptamine-N-oxide	P.pul	18
	Gramine	P.pul	18
	6-Methoxy-N-methyl- β -carbolinium cation	P.pul	19
	6-Methoxy-tetrahydro-harman	P.pul	19
	6-Methoxy-N β -methyl-H ⁴ - β -carboline	P.pul	19
	6-Methoxy-1,2-dimethyl- β -carbolinium cation	P.pul	19
	Bufotenine-N-oxide	P.pul	19
	2-Methyl- β -carbolinium cation	P.pul	19
	DMT Metho cation	P.pul	19
	(24xH)-Stigmast-5-en-3b-ol	P.pul	20
	Urs-12-en-3b-ol; a-amyrin; a-amyrenol	P.pul	20
	Betulin	P.pul	20

	[2-(5-Methoxy-indol-3-yl)-ethyl]-trimethyl-ammonium	P.pul	21
	(2-Indol-3-yl-ethyl)-trimethyl-ammonium	P.pul	21
	6-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-b-carbolin-2-ium	P.pul	21

結構圖

<p>Pulchelstyrene A</p> 	<p>Pulchelstyrene D</p> 
<p>Pulchelstyrene B</p> 	<p>Pulchelstyrene C</p> 
<p>Bufotenine</p> 	<p><i>N,N</i>-Dimethyltryptamine</p> 

<p><i>N,N</i>-Dimethyltryptamine oxide</p> 	<p>5-Methoxy-<i>N</i>-methyltryptamine</p> 
<p>5-Methoxy-<i>N,N</i>-dimethyltryptamine</p>	<p>5-Methoxy-<i>N,N</i>-dimethyltryptamine oxide</p>
	
<p>Gramine</p>	<p>Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline</p>
	

<p style="text-align: center;">betulin</p> 	<p style="text-align: center;">Glabra-II</p> 
<p style="text-align: center;">Karanjin</p> 	<p style="text-align: center;">Lanceolatin-B</p> 
<p style="text-align: center;">Pongapin</p> 	<p style="text-align: center;">5'-methoxypongapin</p> 
<p style="text-align: center;">Kanujin</p> 	

第六節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的藥理作用考察

抗肝纖維化

2005年鍾鳴、陳清²²等人觀察排錢樹總生物鹼對免疫性肝纖維化大鼠肝臟膠原沉積和轉化生長因數 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)表達的影響，研究其對肝纖維化形成的抑制作用，並探討可能的作用機制。他們設立負對照組、正對照組、排錢樹總生物鹼高、中、低劑量組和正常組，以腹腔注射豬血清方法誘導大鼠肝纖維化動物模型。排錢樹總生物鹼高、中、低劑量組大鼠在注射豬血清的同時分別灌服排錢草總生物鹼30mg/kg, 20mg/kg, 10mg/kg, 1次/d, 共8周。大鼠肝臟HE染色，觀察各組大鼠肝組織的炎性壞死與膠原纖維沉積變化；免疫組化觀察大鼠肝纖維化形成過程中排錢樹總生物鹼對肝臟表達I、III、IV型膠原蛋白及TGF $\beta 1$ 的影響。結果發現與正常組比較，負對照組大鼠肝臟出現典型的肝纖維化表現，肝臟膠原纖維間隔廣泛形成，肝小葉與肝竇內膠原增生沉積明顯，I, III, IV型膠原 (1.28 ± 2.59 vs 13.82 ± 6.55 , 1.00 ± 1.22 vs 14.69 ± 7.16 , 1.03 ± 1.46 vs 12.44 ± 6.89 , P值均 < 0.001) 及 TGF $\beta 1$ 表達明顯增多。高、中、低劑量排錢樹總生物鹼均可以明顯減輕大鼠肝臟內膠原纖維增生沉積 (P < 0.05)，抑制肝臟I, III, IV型膠原蛋白 (P值均 < 0.05) 及 TGF $\beta 1$ 的合成表達。因此可以發現排錢樹總生物鹼通過抑制肝纖維化大鼠肝臟I, III, IV型膠原蛋白及 TGF $\beta 1$ 的合成表達，起到良好地抗肝纖維化作用 (表1)。

表 1: 各組大鼠膠原蛋白結果比較

組別	I型膠原	III型膠原	IV型膠原
正常組	1.2806 \pm 2.5910	1.0027 \pm 1.2231	1.0299 \pm 1.4559
負對照組	13.8169 \pm 6.5482	14.6913 \pm 7.1632	12.4445 \pm 6.8877
正對照組	3.8442 \pm 2.7095	3.7064 \pm 2.6195	1.4943 \pm 1.4742
高劑量組	1.9244 \pm 1.7428	2.3620 \pm 2.2254	1.0651 \pm 1.4742
中劑量組	2.3241 \pm 3.2345	2.0253 \pm 1.4246	1.6262 \pm 1.2747
低劑量組	1.4120 \pm 2.6313	2.4949 \pm 1.7314	5.2385 \pm 5.5808

另外鍾鳴、楊增艷²³ 等人在 2001 年觀察排錢樹總生物鹼對實驗性肝纖維化的作用效果及其作用機制。他們採用四氯化碳 (CCl₄) 誘導肝纖維化模型，分別按阻斷肝纖維化實驗研究方法和治療肝纖維化實驗研究方法，從血清相關指標、肝臟羧脯氨酸含量和病理組織學等觀察排錢樹總生物鹼的療效，以秋水仙鹼作為陽性對照藥。結果發現排錢樹總生物鹼能顯著降低肝纖維化大鼠血清 ALT、HA、γ 球蛋白及肝組織羧脯氨酸含量。肝臟病理組織學檢查亦顯示良好的作用效果。證明排錢樹總生物鹼具有較好的抗肝纖維化作用 (表 2~3)。

表 2: 排錢樹對四氯化碳 (CCl₄) 誘導肝纖維化之肝生化值

	n	ALT(U/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)	血清 γ 球蛋白
排錢樹總生物鹼	15	160.13±23.03	71.67±3.30	29.91±1.10	16.15±1.99
秋水仙鹼陽性組	15	168.20±62.90	69.03±4.40	28.61±2.41	16.11±1.46
負對照組	15	365.43±51.49	61.43±3.44	27.74±3.10	18.64±2.51
控制組	15	43.91±19.71	71.49±2.13	31.61±1.70	15.46±2.59

表 3: 排錢樹對四氯化碳 (CCl₄) 誘導肝纖維化之血清 HA 值

	n	血清 HA(ng/ml)	肝臟 Hyp(mg/g 肝粉)
排錢樹總生物鹼	15	49.33±9.36	21.05±2.93
秋水仙鹼陽性組	15	47.32±10.17	21.69±3.44
負對照組	15	57.45±8.12	26.51±4.12
控制組	15	42.24±8.75	20.87±3.63

在 2001 年鍾鳴、楊伯寧²⁴ 觀察排錢樹總生物鹼對肝纖維化大鼠肝臟組織病理改變的影響。他們用四氯化碳 (CCl₄) 複製肝纖維化大鼠動物模型。結果發現動物造模後顯微鏡下肝細胞變性壞死程度加重、膠原纖維分佈明顯增多。顯微鏡下肝細胞及細胞器形態結構破壞明顯，貯脂細胞、枯否氏細胞增多，膠原纖維分佈廣泛。經排錢樹總生物鹼治療後，肝組織病變減輕，上述與纖維化有關細胞及膠原纖維明顯減少。因此排錢樹總生物鹼可以減輕 CCl₄ 致肝纖維化的病變程度，抑制肝纖維化的發展(圖 3)。

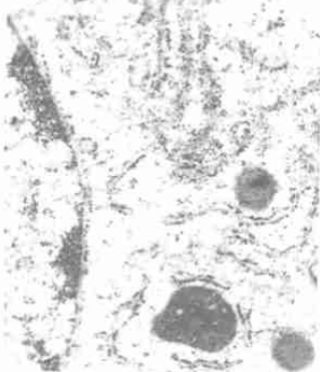

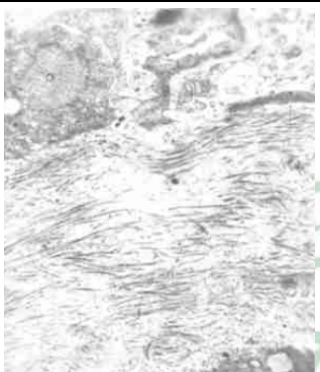
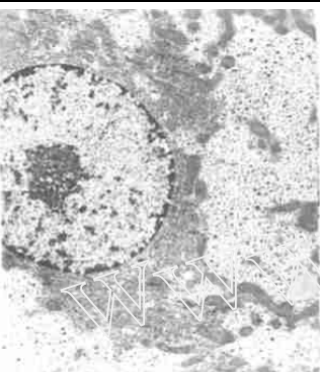

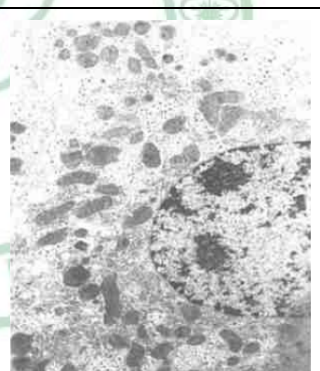
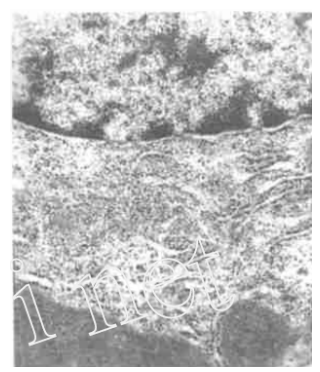

	
正常對照組 20000 ×	病理組 3800 ×
	
病理組 8500 ×	高劑量組 3800 ×
	
高劑量組 20000 ×	低劑量組 3800 ×
	
低劑量組 20000 ×	陽性組 3800 ×

圖 3: 肝細胞切片

1999 年余勝民²⁵ 等人觀察排錢樹對四氯化碳 (CCl₄) 致肝纖維化大鼠肝臟膠原蛋白含量的影響。他們通過灌胃(ig) 給藥相當於原生藥 5g/kg 體重和 3g/kg 體重 (下同) 的排錢樹水提物和醇提物。結果發現連續給藥 8 周後各治療組肝臟膠原蛋白含量明顯低於模型組 (分別 P<0.05、P<0.01 或 P<0.001), 肝臟病理組織檢查亦顯示各治療組肝細胞變性壞死及肝纖維化程度較模型組輕, 而各治療組之間以及與正對照組、控制組之間的差異並不明顯。得知排錢樹具有抗肝纖維化作用, 其機理可能與其能保護肝細胞免受損傷破壞, 從而間接減少肝內膠原纖維形成有關(表 4)。

表 4: 排錢樹水提物和醇提物對 CCl₄ 致肝纖維化大鼠肝臟中膠原蛋白含量的影響

(X ±SD)			
	劑量	動物數(隻)	膠原蛋白含量(mg/g 肝粉)
水抽物高劑量組	5g/kg	8	15.37±3.13
水抽物低劑量組	3g/kg	10	15.65±4.56
醇抽物高劑量組	5g/kg	11	13.23±2.52
醇抽物低劑量組	3g/kg	12	14.79±1.95
正對照組	25mg/kg	13	15.54±3.37
負對照組	3ml/kg	13	20.07±4.66
控制組		12	15.36±3.41

2003 年韋英群等人²⁶ 觀察排錢樹及三草膠囊對超氧陰離子自由基(O₂⁻) 清除率的影響。他們將排錢樹醇提液和三草膠囊水提液分別加到 TEMET-AP 系統中, 用比色法測定並計算 O₂⁻ 含量和 O₂⁻ 清除率, 並與維生素 C 對 O₂⁻ 清除率比較。結果發現排錢樹、三草膠囊和維生素 C 對 O₂⁻ 均有明顯的清除作用, 且隨加入量的增加對 O₂⁻ 清除率升高 (相關係數分別為 R=0.97, R=0.94, R=

0.93)。但各藥物之間的 $O_2^{\cdot-}$ 清除率有明顯差異 ($P < 0.01$)。排錢樹和三草膠囊對 $O_2^{\cdot-}$ 均有明顯的清除作用(表 5~7)。

表5: 加入不同量AP 各管 $O_2^{\cdot-}$ 濃度比較 $\mu\text{mol/L}$

	1	2	3	4	5	R
次數	6	6	6	6	6	
樣品加入量/mL	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	
$O_2^{\cdot-}$ 濃度(x)	0.36	0.73	1.52	3.10	6.13	0.996

表 6: 排錢樹、三草膠囊和 Vc 對 $O_2^{\cdot-}$ 清除率比較 ($x \pm s, \%$)

	1	2	3	R
次數	5	5	5	
樣品加入量/mL	1	0.5	0.25	
排錢樹	35.42±3.02	22.86±1.71	14.29±1.91	0.97
三草膠囊	17.01±0.66	13.06±0.38	6.69±0.29	0.94
Vc	100.00±0.00	77.14±5.10	36.82±5.19	0.93
P	<0.01	<0.01	<0.01	
F	2974.19	614.61	120.12	

表 7: 加入不同量三草膠囊各管 $O_2^{\cdot-}$ 濃度和 $O_2^{\cdot-}$ 清除率比較

	1	2	3
次數	10	10	10
加入量/mL	1.00	0.50	0.25
$O_2^{\cdot-}$ 濃度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3.64±0.10	3.82±0.05	4.05±0.09
$O_2^{\cdot-}$ 清除率/%	17.01±0.66	13.06±0.38	6.69±0.29

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

本實驗採集新鮮波葉山螞蝗以及排錢樹，標本存放在台中市國立自然科學博物館，採集記錄如表 8~9 所示：

表 8：波葉山螞蝗的採集地點、時間、經緯度、採集編號

採集時間	採集地點	經緯度	採集者	鑑定者	採集編號
2005.9.16	<u>卓社林道</u> <u>南投</u>	N 23°54'13.3" E 121°01'01.6"	張肇元 曾懷慶 陳弘偉 廖江川	邱泰惠	C.Y.Lee402
2005.9.16	<u>卓社林道</u> <u>南投</u>	N 23°54'32.2" E 121°00'50.5"	張肇元 曾懷慶 陳弘偉 廖江川	邱泰惠	
2005.11.25	<u>竹山 南</u> <u>投</u>	N 23°47'11.7" E 120°42'41.3"	張肇元 曾懷慶 廖江川	邱泰惠	
2006.2.10	<u>埔里 南</u> <u>投</u>	N 23°56'51.2" E 120°58'40.3"	張肇元 曾懷慶 陳弘偉 廖江川	邱泰惠	
2006.9.11	<u>竹山 南</u> <u>投</u>	N 23°47'11.6" E 120°42'41.1"	張肇元 蔡仁傑 張瓊之	邱泰惠	
2006.10.6	<u>滿月圓自</u> <u>導式步道</u> <u>台北</u>	N 24°49'46.1" E 121°26'40.5"	蔡仁傑	邱泰惠	

表 9：排錢樹的採集地點、時間、經緯度、採集編號

採集時間	採集地點	經緯度	採集者	鑑定者	採集編號
2005.9.30	<u>公仔羊</u> <u>大肚山</u> 山下巷 <u>台中</u>	N 24°14'46.0" E 120°35'49.8"	張肇元、廖江川	邱泰惠	C.Y.Lee401
2005.11.25	<u>竹山 南</u> <u>投</u>	N 23°47'11.7" E 120°42'41.3"	張肇元 曾懷慶 廖江川	邱泰惠	
2006.2.10	<u>埔里 南</u> <u>投</u>	N 23°56'49.8" E 120°58'38.6"	張肇元 曾懷慶 陳弘偉 廖江川	邱泰惠	
2006.9.11	<u>竹山 南</u> <u>投</u>	N 23°47'11.7" E 120°42'41.3"	張肇元 蔡仁傑 張瓊之	邱泰惠	

實驗材料

- (1) 植物體
- (2) 種子
- (3) 花粉粒

2. 實驗試劑

(1) Acetolysis 所需試藥

- ①. 10% HCl
- ②. 10% KOH
- ③. H₂SO₄ (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

3. 儀器

- (1) 顯微鏡 Optima G303，
- (2) 數位相機 Nikon 4500，日本
- (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) Phloroglucinol solution
- (4) Hydrochloric acid (12 N)
- (5) 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、Rutin 定量部分（液相層析部分）

1、實驗試劑：

- (1) Rutin：季昺企業有限公司(Alderich)
- (2) 內部標準品 (I.S.)： ethyl-4-hydroxybenzoate，季昺企業有限公司(Alderich)
- (3) 甲醇 (methanol)：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 μ m 濾膜： minipore PVDF 25 mm
- (3) 流速 0.8 ml/min.
- (4) 檢測條件： UV 255 nm
- (5) 注射量： 20 μ l
- (6) 溫度：室溫 (25 $^{\circ}$ 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) : BRANSON 5510
- (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, Tuttlingen, 德國
- (10) 可調式定量吸管 : Pipetman 20、100、200、1000 μ 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) MgCl₂ (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 ddH₂O
- (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 9700 (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 波葉山螞蝗與排錢樹植物的形態鑑定

一、植物外觀

利用外觀鑑別並以數位相機拍攝。(圖 9、10)

二、果皮、種子

(1) 烘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。(圖 11、12)

三、花粉粒

(1) 取花粉粒

取花粉粒須先經由 acetolysis (Erdtman 1952)²⁷ 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。(圖 13、14)

鍍金機操作步驟：

1. Pump—on。
2. Power—on：等待約 10 min (Ready—on：綠燈亮)。如果太久未達到真空，表示 sample 乾燥不完全。
3. HT turn on：轉至 5 Volt，看到紫紅色火焰時 (表示 I，5 mA，此時 gold 才能被離子化而放出)。
4. Timer—on。
5. I (電流指針) 跳至 10~15 mA：如果超過 15 mA，表示真空度不好，HT turn off，待真空度夠了，在 HT turn on 至 5 volt。
6. 一段時間後，I (電流指針) 會下降 (真空度變好)。
7. 微調 Gas：讓 I (電流指針) 保持在 5 mA (保持足夠空氣量，才能夠撞擊 goldtarget)。
8. Ready—off (燈暗)。
9. Gas 慢慢調整至 0。
10. 等一分鐘。
11. Power—off。

電子顯微鏡操作步驟：

1. turn on cooling system
2. turn on key
3. 放入待測檢品
4. 按 EVAC
5. waiting for 「HT ready」
6. 「HT」 on
7. 調整 FILAMENT
8. 按 EXP 調整 CONTRAST 和 BRIGHTNESS



第三節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的生藥組織學研究

一、生藥組織鑑別：

- (1) 將採集之臺灣產波葉山螞蝗和排錢樹之莖及葉，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 波葉山螞蝗與排錢樹植物中 rutin 的定量

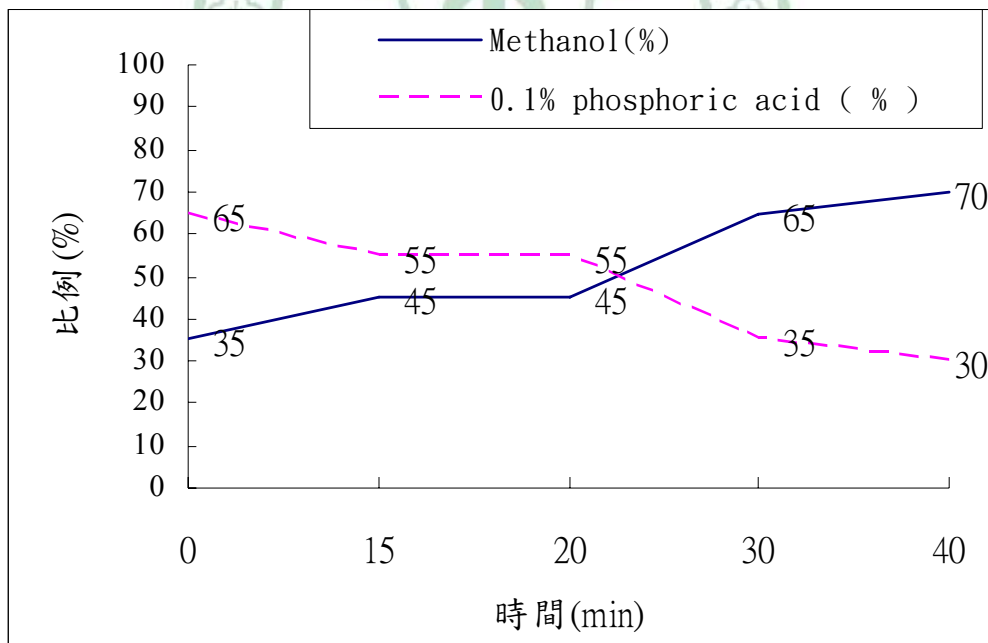
1、Rutin 抽提方法：

取植物(波葉山螞蝗或排錢樹)全草的粉末 1 g，以 10 ml methanol 超音波震盪加熱 50 °C 30 分鐘，提取 3 次，靜置至室溫，合併三次濾液，濃縮至乾，加入 5 ml methanol 使其溶解，以 0.22 μ m 濾膜過濾後進樣 HPLC。

2、移動相條件：

移動相以 methanol 與 0.1% phosphoric acid 改變不同比例來行成梯度變化，流速為 0.8 ml/min，其變化如表 10，所得的圖如圖 4：

表 10：移動相條件



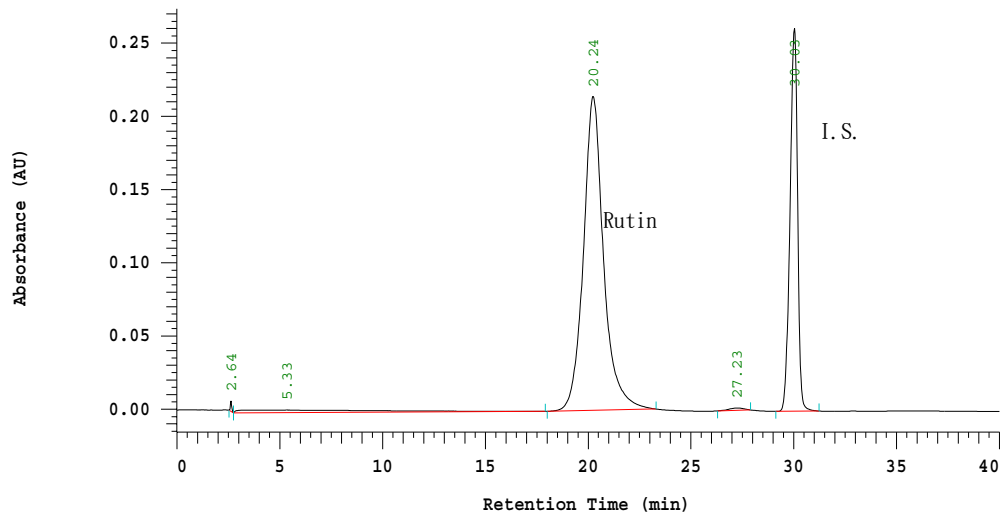


圖 4：HPLC 中標準品(rutin)與內部標準品(ethyl 4-hydroxybenzoate)位置
250 mm x 4 mm I.D. Rp-18

3、穩定性測試：

將 0.0508 g 的 rutin 溶於 100 ml 的 methanol 中配置成濃度 $508 \mu\text{g/ml}$ ，取 0.9 ml rutin 加入 0.1 ml 內標 (rutin 濃度成為 $457.2 \mu\text{g/ml}$)，每三小時進樣一次，連續二十四小時(表 11)

表 11：24 小時內穩定性測試.

Time (Hr)	rutin peak area	IS peak area	rutin/IS
0	10534766	3448258	3.055097965
3	10580446	3460382	3.057594797
6	10565564	3463399	3.050634362
9	10531010	3437183	3.063849088
12	10594815	3460000	3.06208526
15	10608348	3455314	3.07015455
18	10603665	3452986	3.070868228
21	10602592	3454796	3.068948789
24	10534766	3448258	3.055097965
Average	10577650.75	3454039.75	3.06240413
S.D.	30947.19946	8317.184839	0.007481112
R.S.D.(%)	0.292571576	0.240795863	0.244288859

4、 rutin 的回收率試驗：

先取 0.016 g 的 rutin 溶於 300 ml methanol (53.33 μ g/ml) (即為 A 溶液)，取植物(波葉山螞蝗或排錢樹)全草的粉末 1 g，以 10 ml A 液超音波震盪加熱 50 °C 30 分鐘，提取 3 次，靜置至室溫，合併三次濾液，濃縮至乾，加入 5 ml methanol 使其溶解，以 0.22 μ m 濾膜過濾。取植物(波葉山螞蝗或排錢樹)全草的粉末 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。

實驗的結果，詳見表 12~13。

表 12 波葉山螞蝗回收率試驗

	rutin peak area	IS peak area	rutin/IS
D. blank 1	248311	3606020	0.06886
D. blank 2	248254	3626884	0.068448
D. blank 3	248032	3599439	0.068909
Average	248199	3610781	0.068739
S.D.	147.4076	14328.55	0.000253
R.S.D.(%)	0.059391	0.396827	0.36792
D. sample 1	1222802	3694497	0.330979
D. sample 2	1230966	3535706	0.348153
D. sample 3	1233638	3548573	0.347643
Average	1228704	3707727	0.331391
S.D.	6022.391	13175.83	0.001482
R.S.D.(%)	0.490142	0.355362	0.447142
回收率(%)	94.25	94.25	94.25

表 13：排錢樹回收率試驗

	rutin peak area	IS peak area	rutin/IS
P. blank 1	654758	3578628	0.182963
P. blank 2	662914	3649500	0.181645
P. blank 3	659041	3647194	0.180698
Average	658904.3	3625107	0.181769
S.D.	4079.717	40268.79	0.001138
R.S.D.(%)	0.619167	1.11083	0.625915
P. sample 1	1743888	3860226	0.451758
P. sample 2	1753275	4214505	0.41601
P. sample 3	1759796	3885354	0.452931
Average	1761679	3934916	0.447845287
S.D.	18803.87	108335.8	0.007814615
R.S.D.(%)	1.067383	2.753193	1.744936229
回收率(%)	95.49	95.49	95.49

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，對標準品 rutin 進行定量，在同一天內對三種不同濃度（高，中，低）連續重複注射四次（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 rutin 和 I.S. (ethyl 4-hydroxybenzoate) 9：1 的比例混勻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 14~15。

表 14： rutin 之 intraday 分析

rutin conc.(μ g/ml)	Day	n	Average \pm S.D.	R.S.D. (%)
517	1	4	2.7867 \pm 0.0053	0.19
	2	4	2.7910 \pm 0.0046	0.16
	3	4	2.7566 \pm 0.0047	0.17
206.8	1	4	1.0720 \pm 0.0027	0.25
	2	4	1.0553 \pm 0.0033	0.32
	3	4	1.0673 \pm 0.0039	0.37
51.7	1	4	0.2594 \pm 0.0031	1.21
	2	4	0.2552 \pm 0.0031	1.23
	3	4	0.2565 \pm 0.0003	0.14

n : Numbers of injection in one day

表15： rutin之Interday分析

rutin conc.(μ g/ml)	Day	n	Average \pm S.D.	R.S.D. (%)
517	7	12	2.7780 \pm 0.0166	0.60
206.8	7	12	1.0649 \pm 0.0079	0.74
51.7	7	12	0.2570 \pm 0.0029	1.15

n : Numbers of injection in one week

6、檢量線製作：

將 rutin 的標準品分別配製濃度為 25.85、51.7、206.8、361.9、517 μ g/ml，分別進樣，以 rutin 和 I.S. (ethyl 4-hydroxybenzoate = 50.8 μ g/ml) 的 HPLC 積分面積比和 rutin 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 5，表 16)

表 16：Rutin 與 I.S.經 HPLC 所得之積分面積

Conc. (μ g/ml)	Rutin	I.S.	Rutin/I.S.
517	10563826.6	3452886.6	3.060626
361.9	7310631	3340454.8	2.187343
206.8	4033000.2	3692557.6	1.091977
51.7	1014899.2	3537688.8	0.286202
25.85	473361	3622593.4	0.130662

$$y = 0.006 x - 0.0493 \quad R^2 = 0.9976$$

Y=rutin 濃度 X=rutin/I.S.面積比

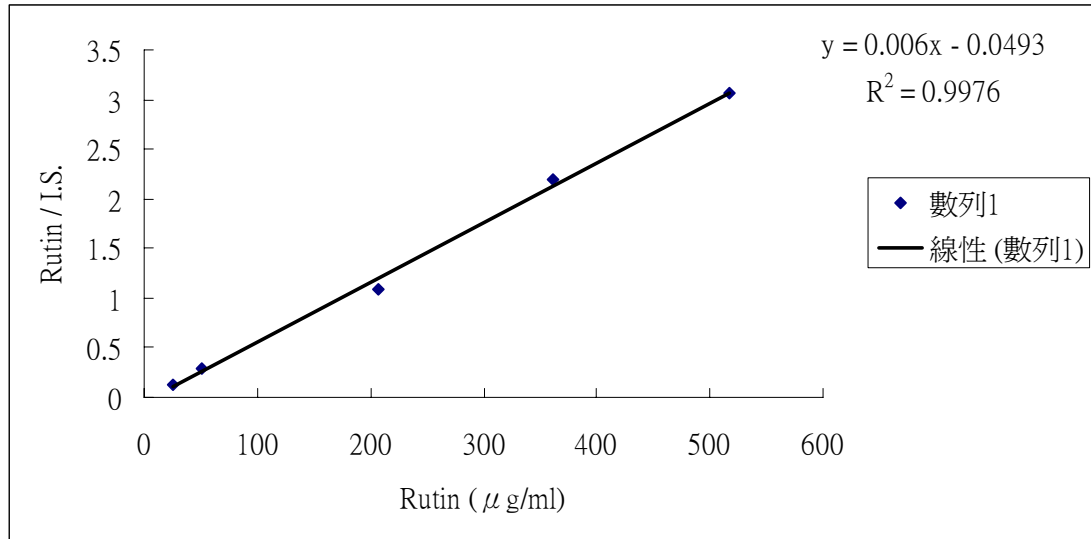


圖 5. Rutin 標準品之回歸曲線

7、樣品中 rutin 的含量測定：

取植物(波葉山螞蝗或排錢樹)全草的粉末 1 g，以上述方法提取 rutin，將抽提液與 I.S. (50.8 $\mu\text{g/ml}$) 以 9:1 比例混勻，測得層析圖譜(圖 6~7)。

樣品中 rutin 的含量測定依以下三步驟：

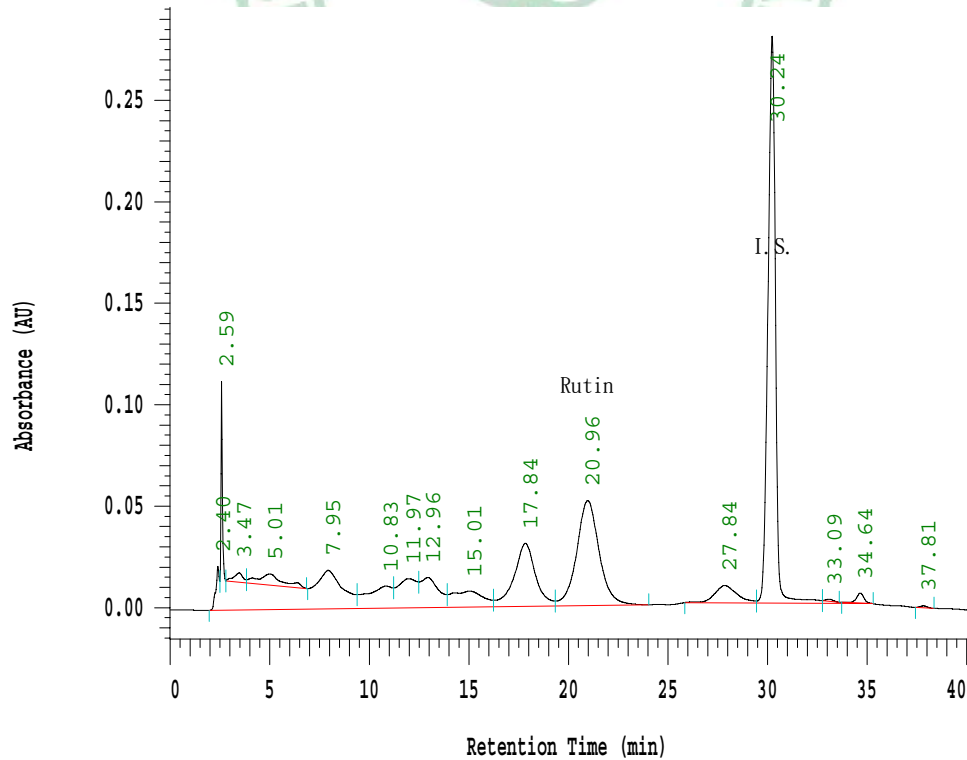


圖 6：波葉山螞蝗全草萃取物之 HPLC 分析圖
250 mm x 4 mm I.D. column packed with RP-18

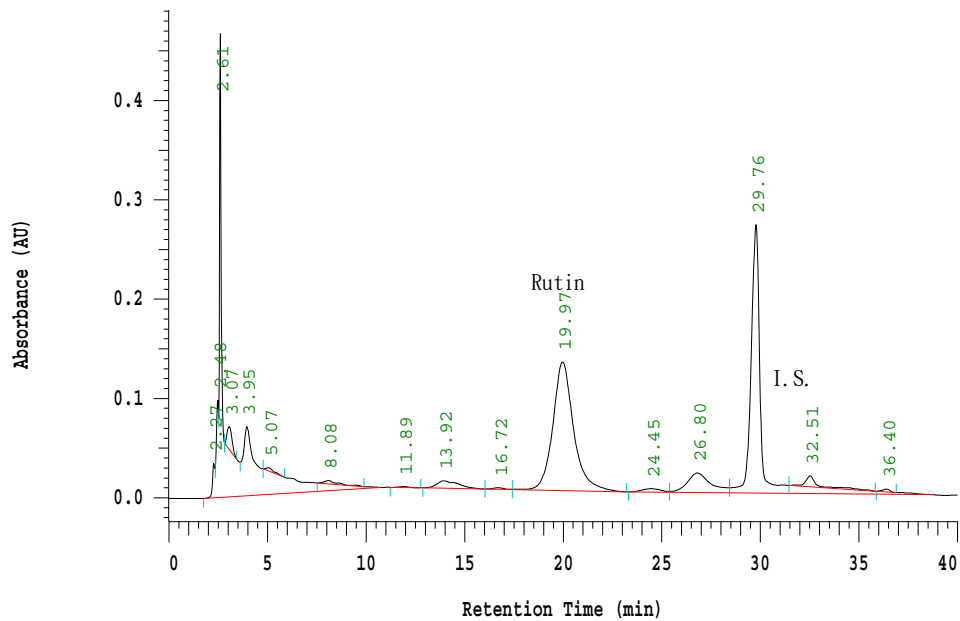


圖 7：排錢樹全草萃取物之 HPLC 分析圖
250 mm x 4 mm I.D. column packed with RP-18

- (1) 由層析圖譜計算 rutin 與 I.S.波峰面積的比值。
- (2) 由檢量線獲得 rutin 與 I.S.相對波峰面積比值的 rutin 在樣品中的濃度。
- (3) 由 rutin 在樣品中的濃度，得到樣品中 rutin 的重量。
由此可換算成 rutin 在乾燥樣品中的重量百分比。

8、最低濃度的探討：

參照 USP(United States Pharmacopeia) 28²⁸ 中使用儀器分析，我們同時測定已知分析物含量的樣品和空白樣品，得到儀器的數值分別為 S（信號）和 N（雜訊），我們將能得到的 S/N 比在 2：1 或是 3：1 時樣品中的分析物濃度定為 LOD；而當 S/N 比在 10：1 的時候，我們把樣品中的分析物濃度定為 LOQ。

9、波葉山螞蝗及排錢樹全草中 rutin 之定量：

- (1) 波葉山螞蝗及排錢樹全草中 rutin 提取方法之選擇。
- (2) 波葉山螞蝗及排錢樹全草中 rutin 含量。

第五節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的指紋圖譜研究

一、植物之層析圖譜

1、指紋圖譜樣品處理法

考慮仿照rutin定量所使用的樣品處理方法，來建立指紋圖譜。精密秤取植物(波葉山螞蝗或排錢樹)全草的粉末1 g，以 10 ml methanol 超音波震盪加熱50°C 30分鐘，提取3次，靜置至室溫，合併三次濾液，濃縮至乾，加入 5 ml methanol 使其溶解，以 0.22 μ m濾膜過濾後進樣 20 μ l，波長為 255 nm。

2、指紋peak 的選擇

我們打入波葉山螞蝗sample所得圖譜為圖8，我們選取的5個peak，以rutin的peak (peak 3)為基準。之後我們各選取rutin左右鄰近2個較高的peak (peak 1, 2, 4, 5)，計算這5個波峰的峰高百分比，繪製成折線圖(圖23)，比較各波峰之間的關係。排錢樹也與波葉山螞蝗相同，選取相同滯留時間的peak來做比較。(圖24)

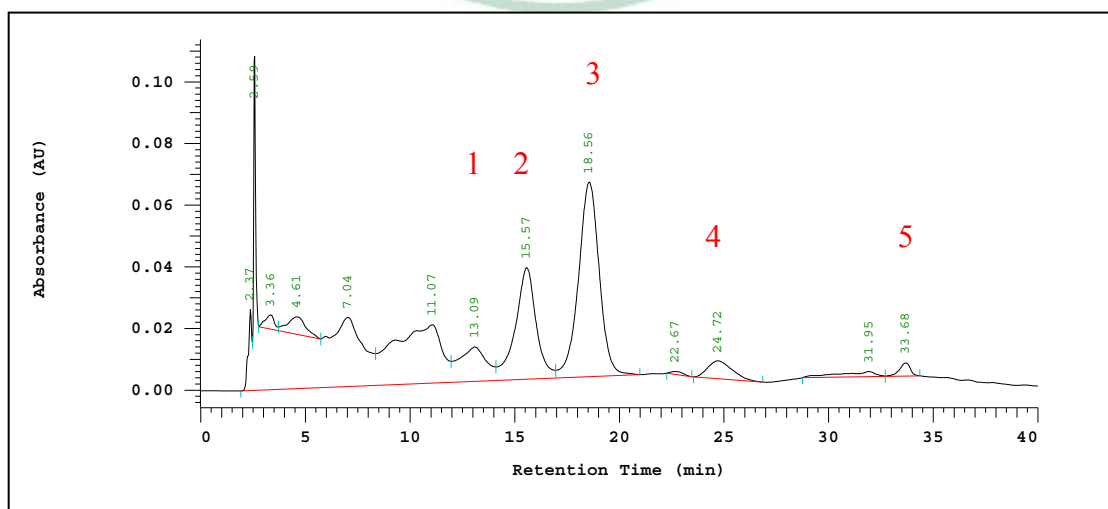


圖8. 波葉山螞蝗之HPLC層析圖

二、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排錢樹及波葉山螞蝗植物新鮮葉子，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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下備用。DNA 之抽取使用 Dellaporta method²⁹。

(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°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 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 離心 20 分鐘，取上清液至新離心管，加入 10 ml 之異丙醇在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下約 5~10 分鐘，使之沉澱。
- ②. 在 12 krpm ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)

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：

- (1) 2.5 μ l of 10 X reaction buffer
- (2) 0.5 μ l dNTP mix (8 mM)
- (3) 25 μ M 18D 引子 2.5 μ l
- (4) 25 μ M 28CC 引子 2.5 μ l
- (5) 0.5 μ l Taq polymerase ,
- (6) 最後加入 1 μ l 的範本 DNA ,
- (7) 加無菌去離子水使總體積成 25 μ l , 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表 17 :

表 17 : PCR 反應溫度與時間

反應溫度	時間	循環次數
94 °C	5 分鐘	1
55 °C	1 分 30 秒	
72 °C	3 分鐘	
94 °C	1 分鐘	40
60 °C	1 分鐘	
72 °C	1 分 30 秒	
72 °C	10 分鐘	1
4 °C	持續保存	

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 1 g 瓊膠加入 100 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 μ l 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 μ l (事先加入 2 μ l dye)。

- (6) 加 PCR 複製產物 5 ul。
- (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。(圖 27, 28)



第四章 實驗結果與討論

第一節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的形態鑑定

一、外觀形態鑑定

根據文獻^{1,12}的描述，可以得知波葉山螞蝗是小灌木，高約 1~2 公尺，相較於其他山螞蝗屬植物，波葉山螞蝗有較粗且堅韌的木質部。枝被淡黃色短柔毛。葉為羽狀三出複葉，大形，頂生小葉卵形、菱狀卵形、長橢圓形，長 4~10 公分，寬 3~7 公分，先端銳尖或漸尖，基部寬楔形，葉緣呈明顯的波浪形，兩面均被毛。而排錢樹則是半灌木，高 0.5~1.5 公尺。根細而彎曲。莖直立，分枝多而纖細，被有柔毛。三出複葉互生，葉柄短，有鑽形托葉 1 片，中間小葉大，橢圓狀卵形或披針狀卵形，長 5.5~11.5cm，寬 2.5~6.5cm，先端稍鈍，基部寬楔形，邊緣淺波狀，下面脈上被短柔毛，兩側小葉較小。

我們觀察實際植物的狀況，發現波葉山螞蝗確實是高 1~2 公尺，葉為三出複葉，表面及背面皆有短絨毛，不黏人，葉片呈現現波浪狀，不尖銳，頂生的小葉比較大，總狀的花絮，果莢 6~12 節，會黏人，且成熟之後容易斷裂，通常生長在向陽的地方(圖 9)。

排錢樹植物的高度與波葉山螞蝗相差不大，也是 1~2 公尺高左右，但其新生的植株，其葉子為三出複葉，與波葉山螞蝗不同處為其沒有波浪狀，但其成熟後的植株葉片會排列像錢幣狀，兩兩對生，排列成一串因此被取名為排錢樹。花的生長在兩片葉子之間，成熟後果實只有 2 節，不黏人，包藏在葉子中間，成熟後也是容易斷裂，生長在紅土的區域(圖 10)。



圖 9：波葉山螞蝗植物圖



圖 10：排錢樹植物圖

二、種子形態鑑定

波葉山螞蝗的種子，形狀約為橢圓球形微彎(圖 11)，長約 $400\sim 500\mu\text{m}$ ，直徑約為 $900\sim 1000\mu\text{m}$ ，種子有一端較鈍，另一端則較尖，較尖的部分略小，由種子放大圖，可以看出其表面有非常明顯的稜紋，且稜紋是互相交錯的，形成七字型或人字型，再放大來觀看，稜紋或凹處佈滿了類似魚鱗狀的突起。

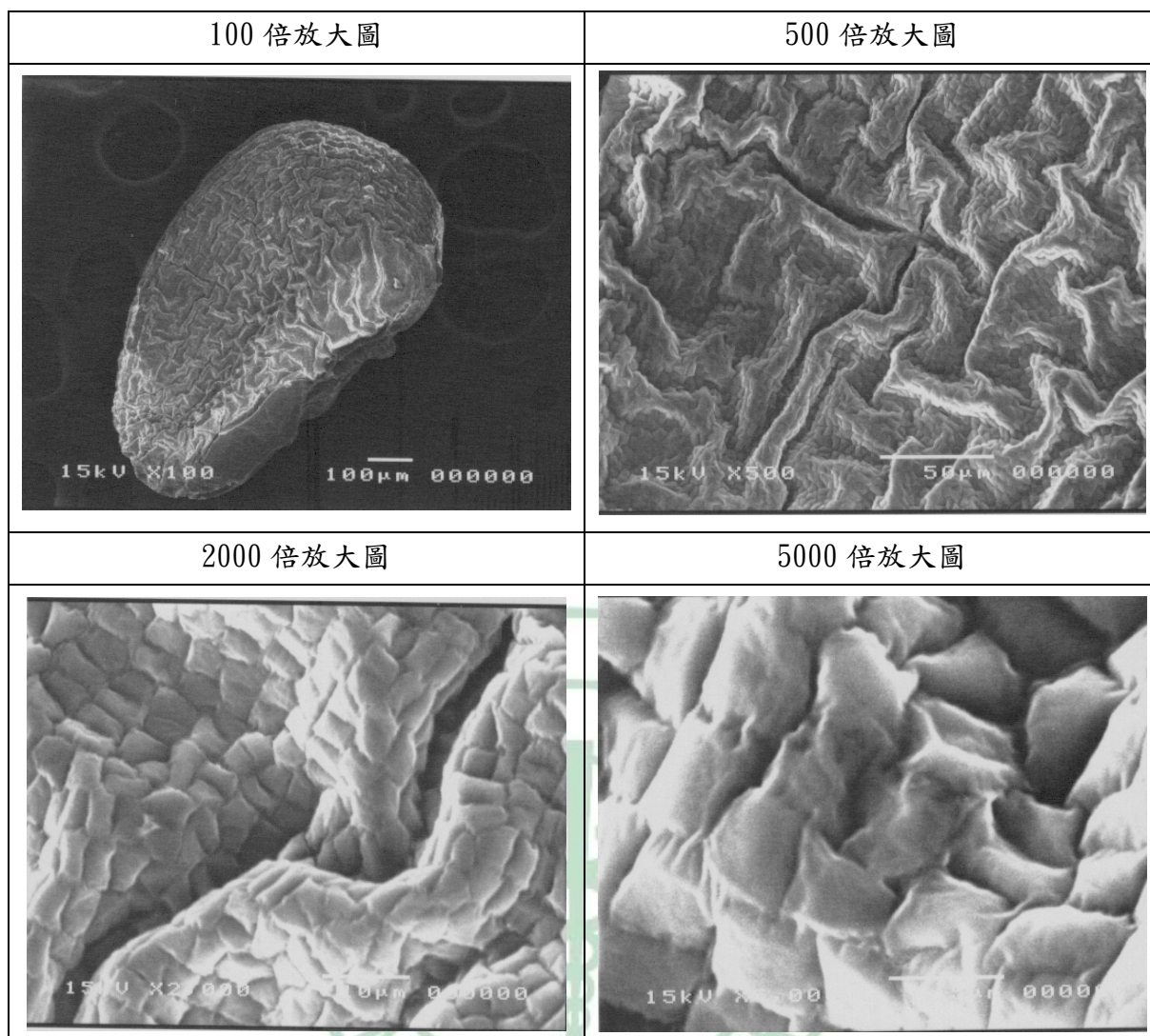


圖 11：波葉山螞蝗種子電子顯微鏡圖

排錢樹的種子，形狀約為近圓球形先端微彎(圖 12)，長約 1400~1500 μm ，直徑約為 1500~1600 μm ，種子頭部的部分有蒂略微彎進去，放大 500 倍之後可以稍微看出表面有紋路，放大至 1000 倍時，則可清楚看見表面的網狀紋路，放大至 2000 倍時可以看到紋路呈現不規則型，或人字型，或七字型，或十字型，且有小小突起的點。

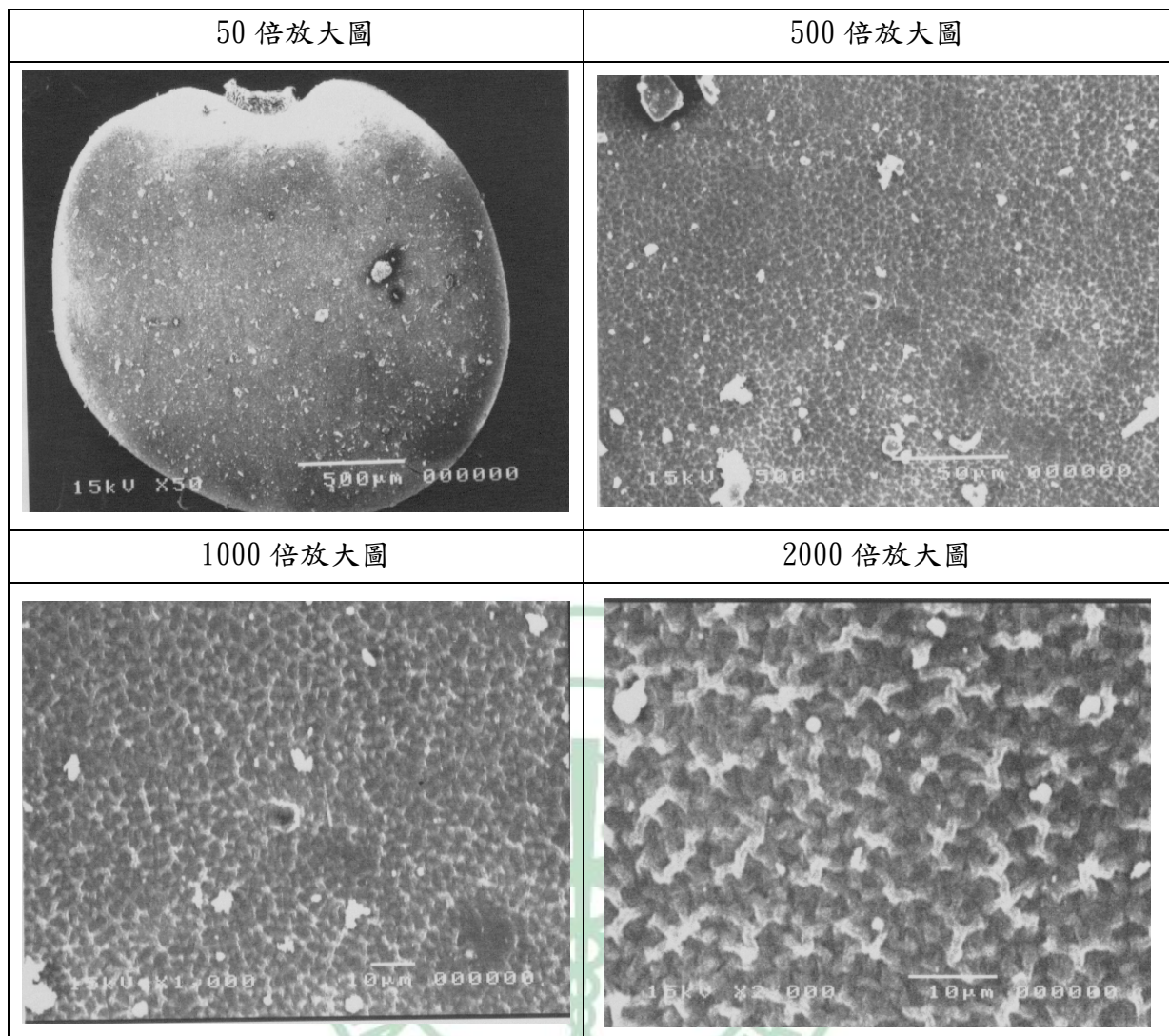


圖 12：排錢樹種子電子顯微鏡圖

三、花粉的形態鑑定

根據黃增泉³⁰等對於台灣產的波葉山螞蝗花粉描述如下(圖 13)：

Pollen class：3-溝孔粒(3-colporate)

Shape：

- (1) 赤道面觀：長球形-類球形 ~ 扁長形-類球形(prolate-spheroidal ~ olate-spheroidal)

(2) 頂面觀：圓形(amb circular)

Size : 22~27 × 22~26 μ

Aperture type : 在 colpus 中的內孔是平行橫過 colpus 的呈現橢圓形 (ora transversally elliptic)。

Tectum : 在 tectum 之上的一層是光滑的或粗糙，沒有明顯的突起。
(psilate or with scabrate process) 。

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

根據黃增泉³⁰等對於台灣產的排錢樹花粉描述如下(圖 14)：

Pollen class : 3-溝孔粒(3-colporate)

Shape :

(1) 赤道面觀：半長球形 ~ 扁長形-類球形(subprolate ~ olate-spheroidal)

(2) 頂面觀：半有角~圓形(semi-angular ~ circular)

Size : 22~31 × 24~29 μ

Aperture type : 在 colpus 中的內孔是平行橫過 colpus 的呈現橢圓形或圓形
(ora transversally elliptic or circular)。

Tectum : 在 tectum 之上的一層是光滑的或粗糙，沒有明顯的突起。
(psilate or with scabrate process) 。

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

在我們的實驗中，利用掃描式電子顯微鏡觀察花粉，如圖 13~14，由頂面觀，可以看出波葉山螞蝗花粉的形狀約略為類圓形或些微近似三角形，而排錢樹花粉的形狀則有點近圓形，我們可以明顯看出兩者的不同，但相同的皆是具有 3-溝孔粒的形狀。若由赤道面觀察，可以看出波葉山螞蝗花粉形狀約略為長球形至扁長球形，而且可以看出為 3-溝孔粒，且其形狀為類圓形，而排錢樹則為半長球

形誌扁球形，有些近似橢圓，但仍可看出半有角的形狀。而兩種植物皆是具有網紋，但是我們可以發現排錢樹的網紋較波葉山螞蝗稍大一些，而兩者的網紋上面都是呈現光滑的情況，都沒有明顯的突起。另外我們觀察到在 coplus 中央位置有一個明顯的孔狀結構，波葉山螞蝗的部分我們可以看到是類似圓形的形狀，在排錢樹的部分是圓形或是橢圓形的形狀。

綜合以上所提，可以知道我們所採集到的波葉山螞蝗和排錢樹，在花粉的鑑定上，與文獻³⁰所描述相符。



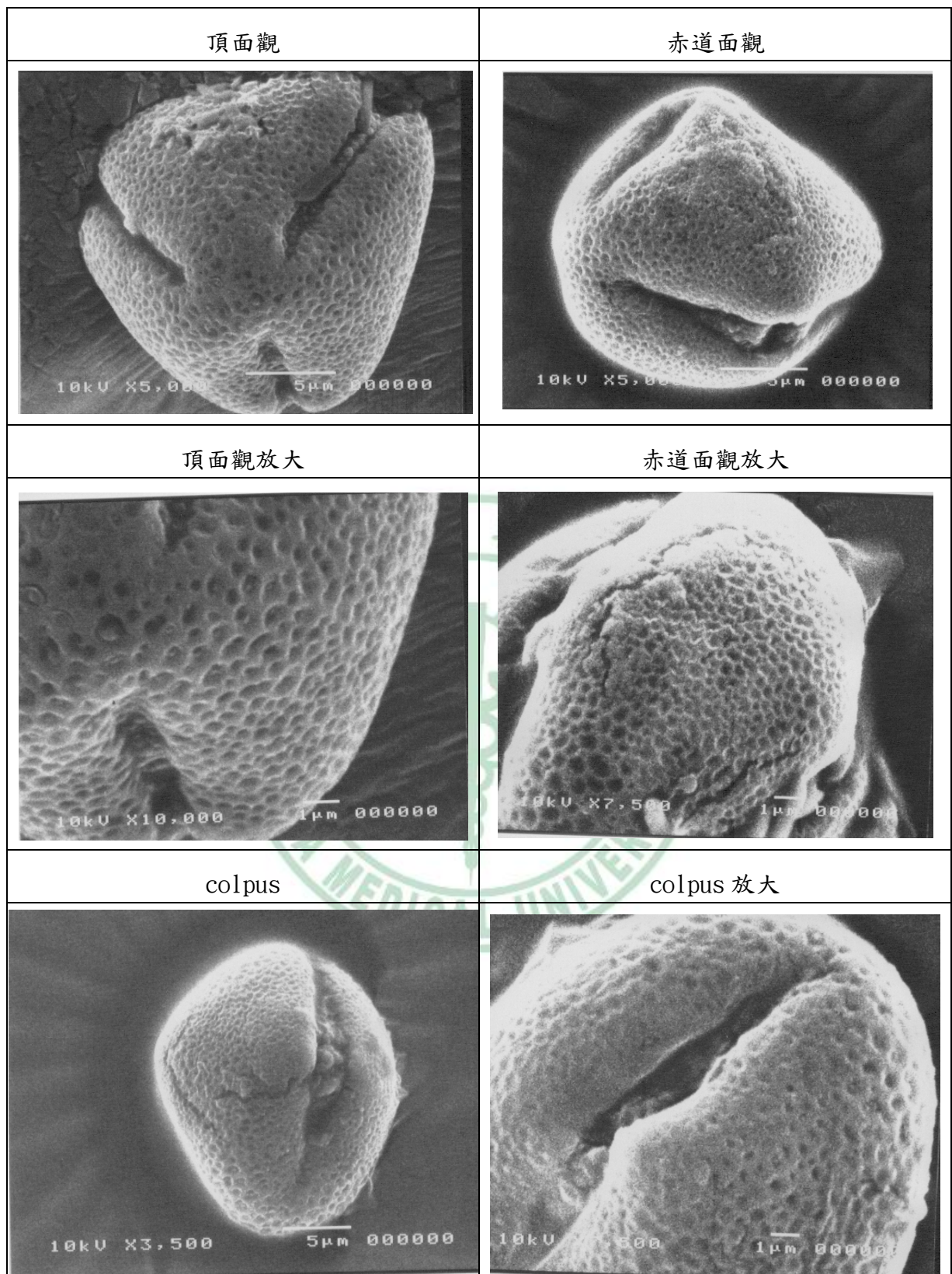


圖 13：波葉山螞蝗花粉電子顯微鏡圖

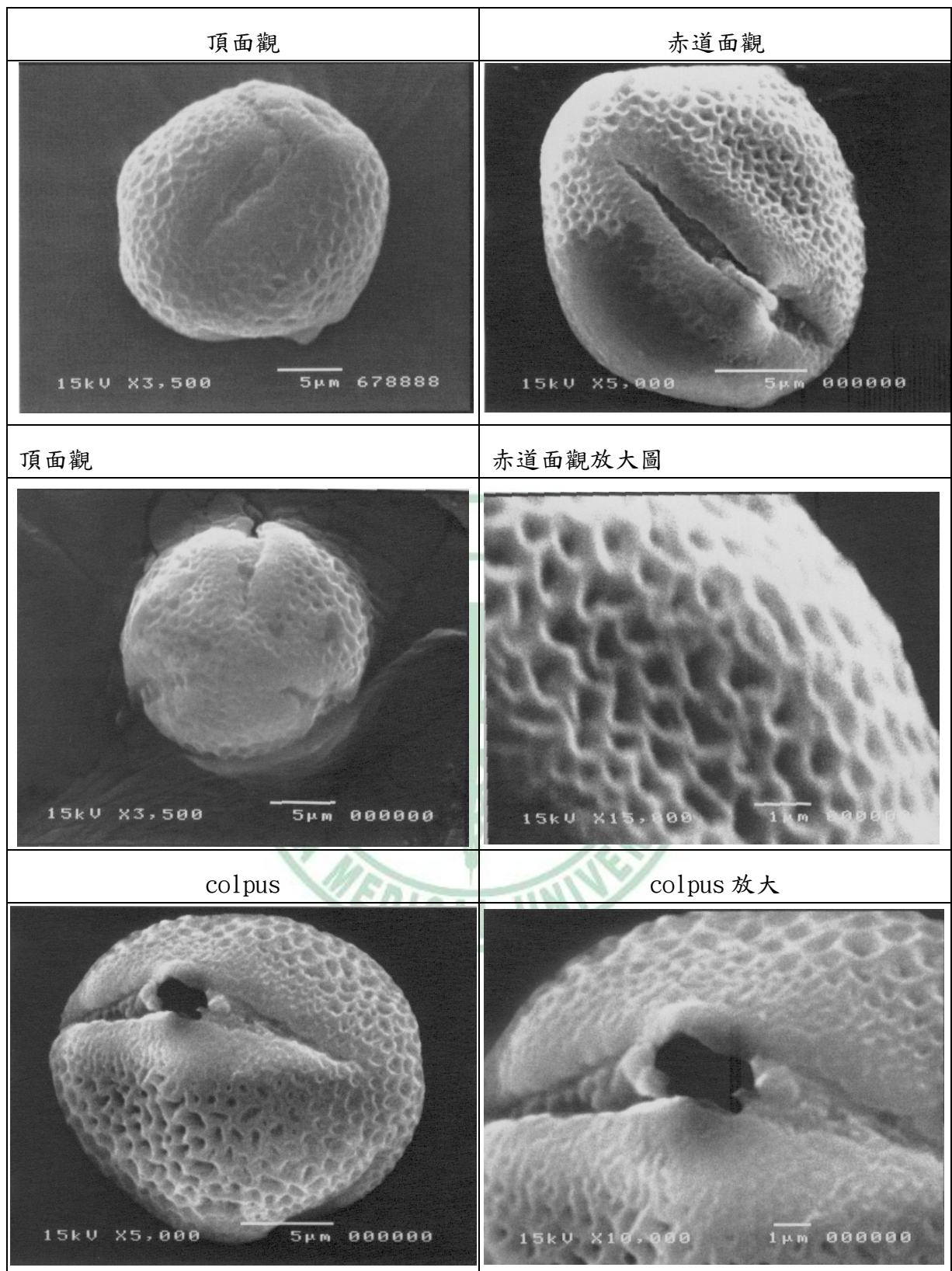


圖 14：排錢樹花粉電子顯微鏡圖

四、果的形態鑑定

根據文獻^{1,12}所述，台灣產的波葉山螞蝗果線形，稍彎，4~5公分，暗褐色，沿上縫線有較淺的向內凹，下縫線則向內凹至寬的1/4左右處，有6~12節，密生黃色鉤毛，節易斷落，但不裂開。成熟後斷裂，可沾附在動物身上，代為傳播種子(圖15)。而台灣產排錢樹果僅2莢節，莢節處緊縮，長約6mm，先端有長喙，邊緣被毛。種子細長，近矩形(圖16)。

經過實際上觀察我們採集到的植物之後可以發現到，波葉山螞蝗的果莢上面確實密佈著鉤毛，且顏色為淺綠~黃褐色，每一節的長度比排錢樹小，大約2~3mm；而排錢樹果莢則是具有網狀的紋路但不具有鉤毛，顏色看起來則是黃褐色~褐色，每一節的長度比波葉山螞蝗長，大約3~4mm。另外我們也可以發現到，波葉山螞蝗植物的果莢確實有6~12節，而排錢樹的果莢則只有2節，長度的話自然是波葉山螞蝗的果莢較長，約有3~4公分，排錢樹的果莢則約為6~7mm，而兩者果皮的內面在光學顯微鏡下都是呈現光滑的形狀。而去掉果皮之後看到裡面的種子，我們可以觀察到，波葉山螞蝗的種子較小，大約0.5mm；而排錢樹的種子則有1~2mm大小。

本研究亦將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17~18可以發現，波葉山螞蝗果皮的外側部分具有鉤毛，我們由放大的圖也可以看出鉤毛的形狀，我們仔細看也可以看出外側的果皮表面上也具有網狀的紋路，分布較不規則，果皮內側也是具有網狀紋路，分布較為規則。排錢樹果皮正面則可以看到不像波葉山螞蝗一樣具有鉤毛，但仍有網狀的紋路，但網狀紋路比波葉山螞蝗規則，果皮的內側一樣是光滑的，具有網狀的紋路，但其紋路則比波葉山螞蝗來的密集。

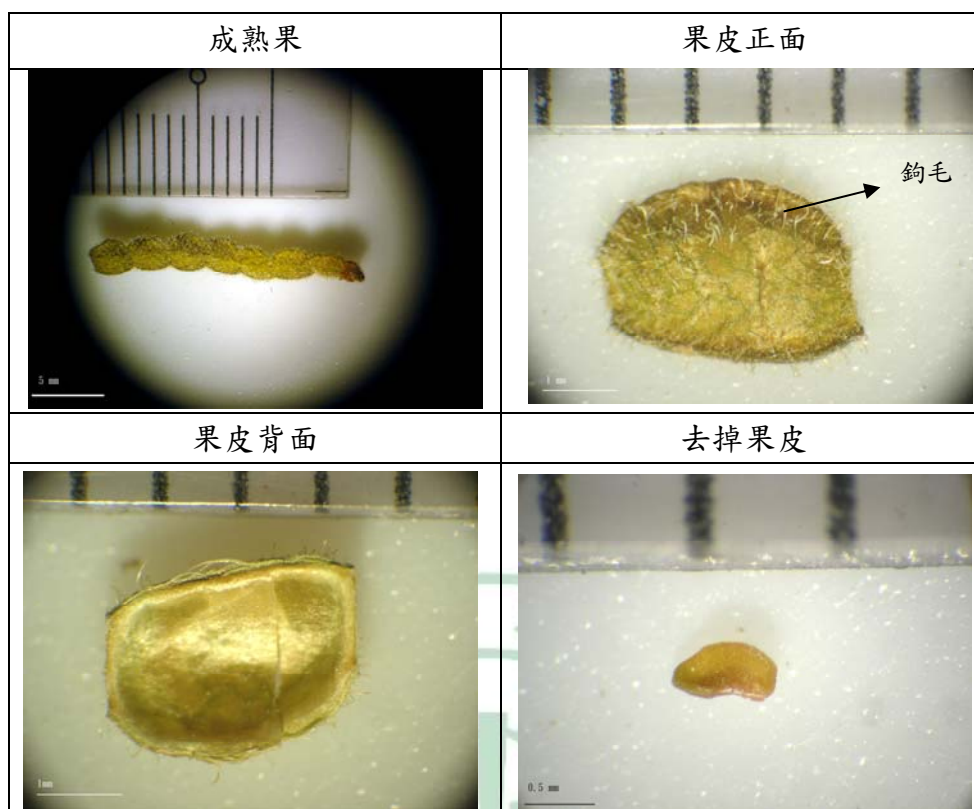


圖 15：波葉山螞蝗果的形態圖

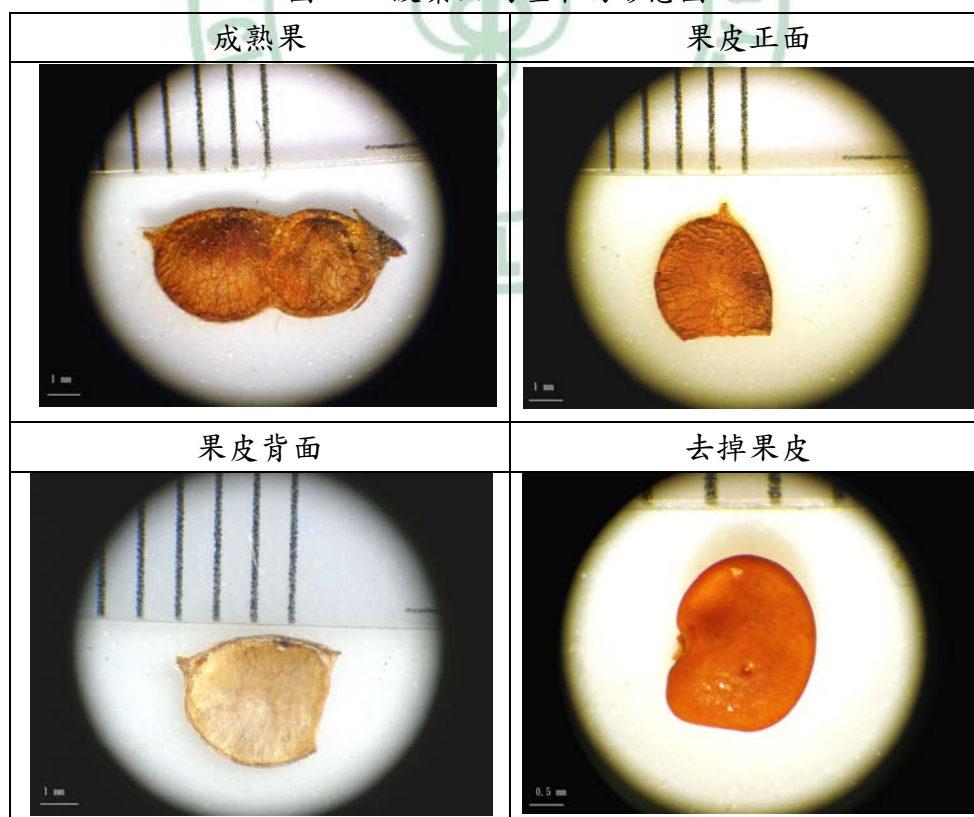


圖 16：排錢樹果的形態圖

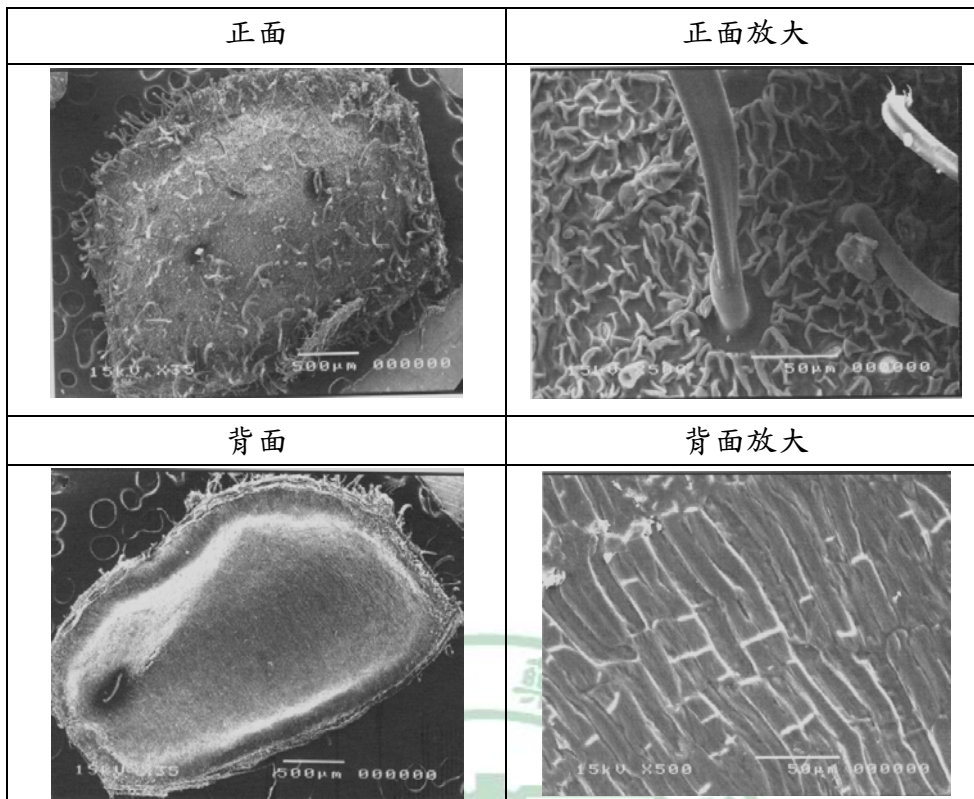


圖 17：波葉山螞蝗果的電子顯微鏡圖

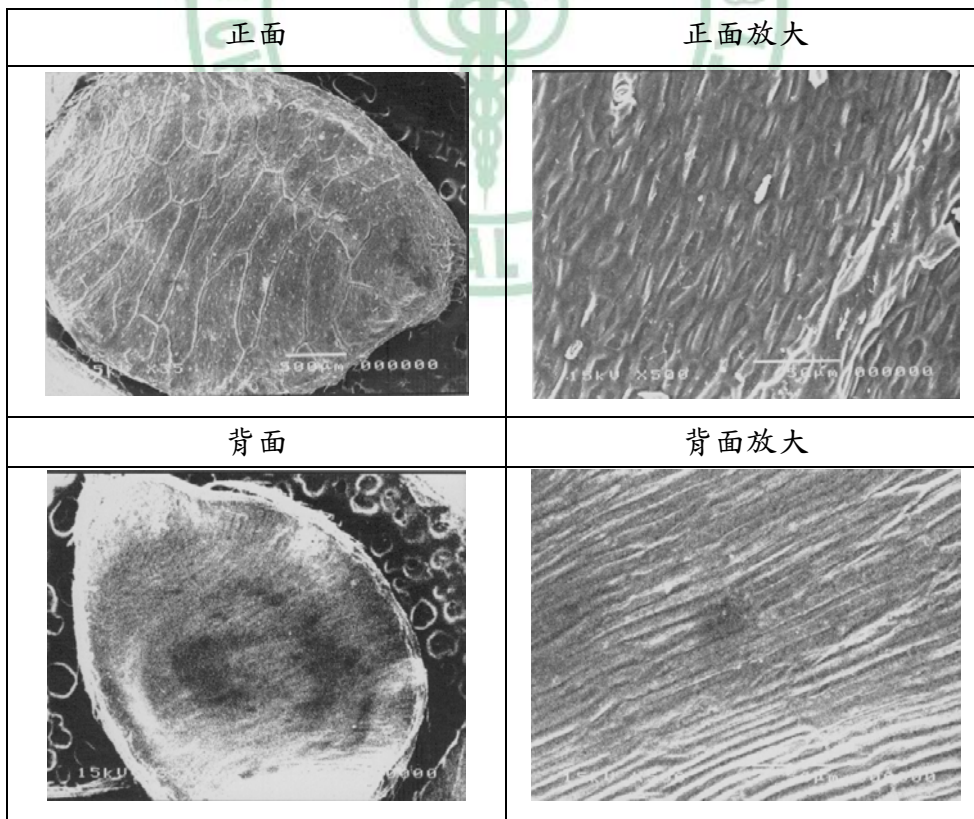


圖 18：排錢樹果的電子顯微鏡圖

第二節 波葉山螞蝗與排錢樹生藥組織學研究

一、波葉山螞蝗

(1) 性狀

乾燥莖呈黃褐色，圓柱形，長 100~200cm，表面具細微而明顯之縱走皺紋，密披黃白色短絨毛，會黏人，質稍硬韌，折斷面具纖維性，呈淡黃白色~黃綠色，氣味微甘清香。

葉多數脫落，少數殘存，往往皺縮或殘缺；黃綠~綠色，葉為羽狀三出複葉，大形，頂生小葉卵形、菱狀卵形、長橢圓形，邊緣呈現波浪狀，5~10cm × 3~5cm。(圖 19)

(2) 莖組織

①. 莖之弱擴大圖

徑 0.3~0.5 cm，以放大鏡檢視其莖之橫切面，呈類四方形~類圓形。最外層之表皮為黃褐色，皮部與木部之比例約為 1:1~1:3，中央髓部明顯，約佔 1/2。(圖 19)

②. 鏡檢

以顯微鏡檢視其莖之橫斷面，上表皮細胞一層，細胞呈類長方形，外披角質層。皮層細胞約 5~7 層，呈類圓形或類長方形，細胞大小不一，皮層內側具 4~6 層紅色連續性韌皮纖維層。篩部細胞呈不規則形，5~7 層，內含黃棕色油滴樣物質。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，導管成類圓形環繞著髓部排列，以網紋、螺旋紋為主，直徑約 5~20 μm 。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。(圖 19)

(3) 葉組織

以顯微鏡檢視其葉之橫斷面，上表皮細胞一層，細胞呈類方形、類圓形或不規則形，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， $5 \times 10 \mu\text{m}$ 。主脈向下凸出，厚 $60\sim 65 \mu\text{m}$ ，約葉片的 $2\sim 2.5$ 倍，葉片厚 $20\sim 30 \mu\text{m}$ 。葉的下表皮可以看到有非腺毛的組織。(圖 19)

二、排錢樹

(1) 性狀

乾燥莖呈黃褐色~褐色，圓柱形，長 $50\sim 150\text{cm}$ ，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~黃綠色，氣味平淡、清香。

葉多數脫落，少數殘存，往往殘缺；黃綠~綠色，初生的葉為三出複葉互生，葉柄短，有鑽形托葉一片，中間小葉大，橢圓狀卵形或披針狀卵形，長 $5.5\sim 11.5\text{cm}$ ，寬 $2.5\sim 6.5\text{cm}$ ，而成熟之後則成為單葉對生，葉柄短，有鑽形托葉一片，葉片成倒卵圓形。(圖 20)

(2) 莖組織

③. 莖之弱擴大圖

徑 $0.3\sim 0.5 \text{ cm}$ ，以放大鏡檢視其莖之橫切面，呈類圓形。最外層之表皮為黃褐色，皮部與木部之比例約為 $1:2\sim 1:3$ ，中央髓部明顯，約佔 $1/3$ 。
(圖 20)

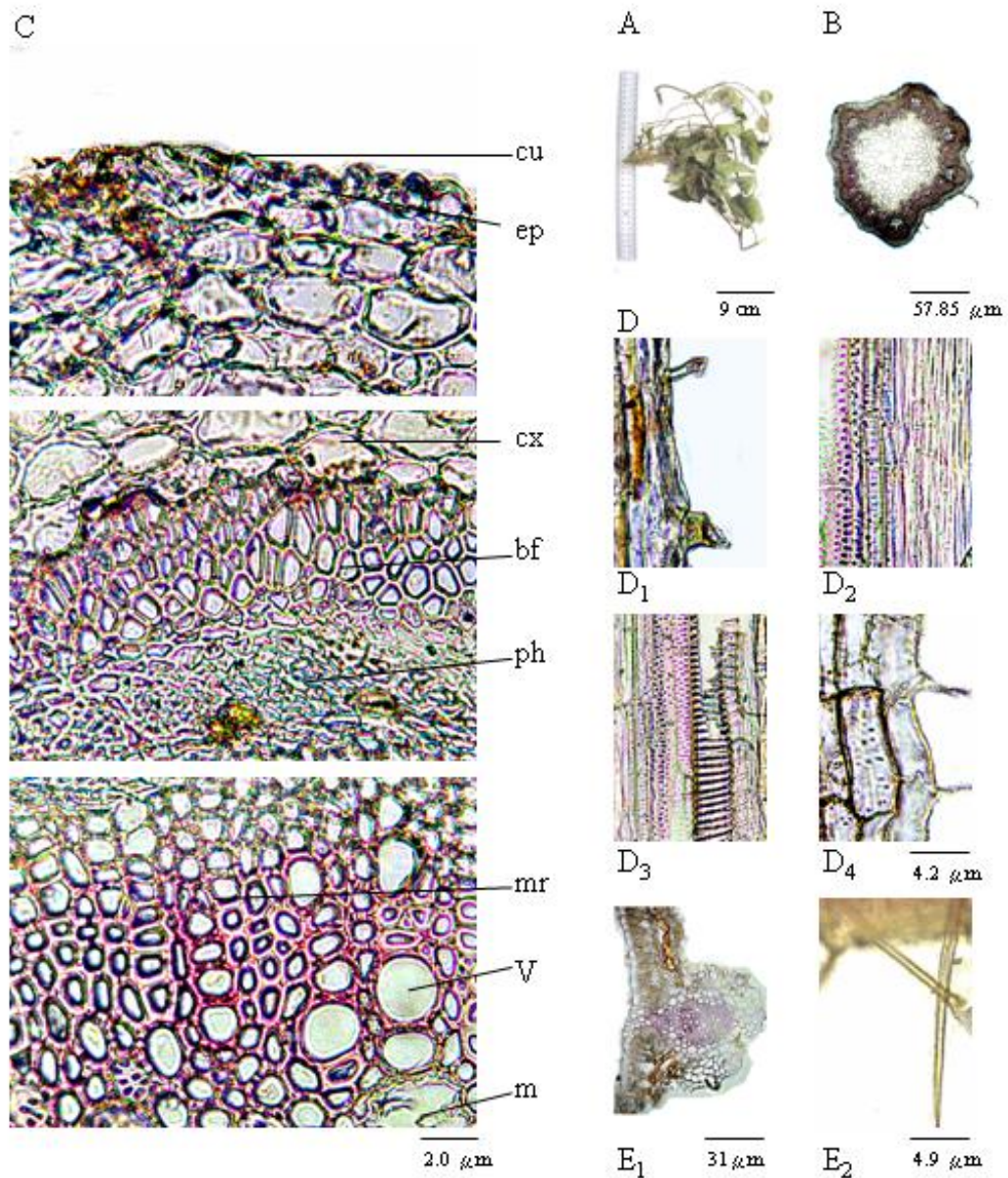
④. 鏡檢

以顯微鏡檢視其莖之橫斷面，上表皮細胞一層，細胞呈類長方形，外披角質層。皮層細胞約 $5\sim 10$ 層，呈類圓形或長橢圓形，細胞大小不一，皮層內側具 $3\sim 4$ 層紅色連續性韌皮纖維層。篩部細胞呈不規則形， $5\sim 7$ 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，導管成類圓形環繞著髓部排列，以網紋為主，直徑約 $20\sim 80 \mu\text{m}$ 。髓線寬狹不一，較不明顯，細胞呈放射狀延長。中央髓部明顯，細胞呈類圓形。(圖 20)

(3) 葉組織

以顯微鏡檢視其葉之橫斷面，上表皮細胞一層，細胞呈類方形、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， $5 \times 20 \mu\text{m}$ 。主脈向下凸出，厚 $700 \sim 720 \mu\text{m}$ ，約葉片的 $3.0 \sim 4.0$ 倍，葉片厚 $250 \sim 280 \mu\text{m}$ 。葉的下表皮可以看到有單晶，葉脈的外圍也有非腺毛的構造。(圖 20)

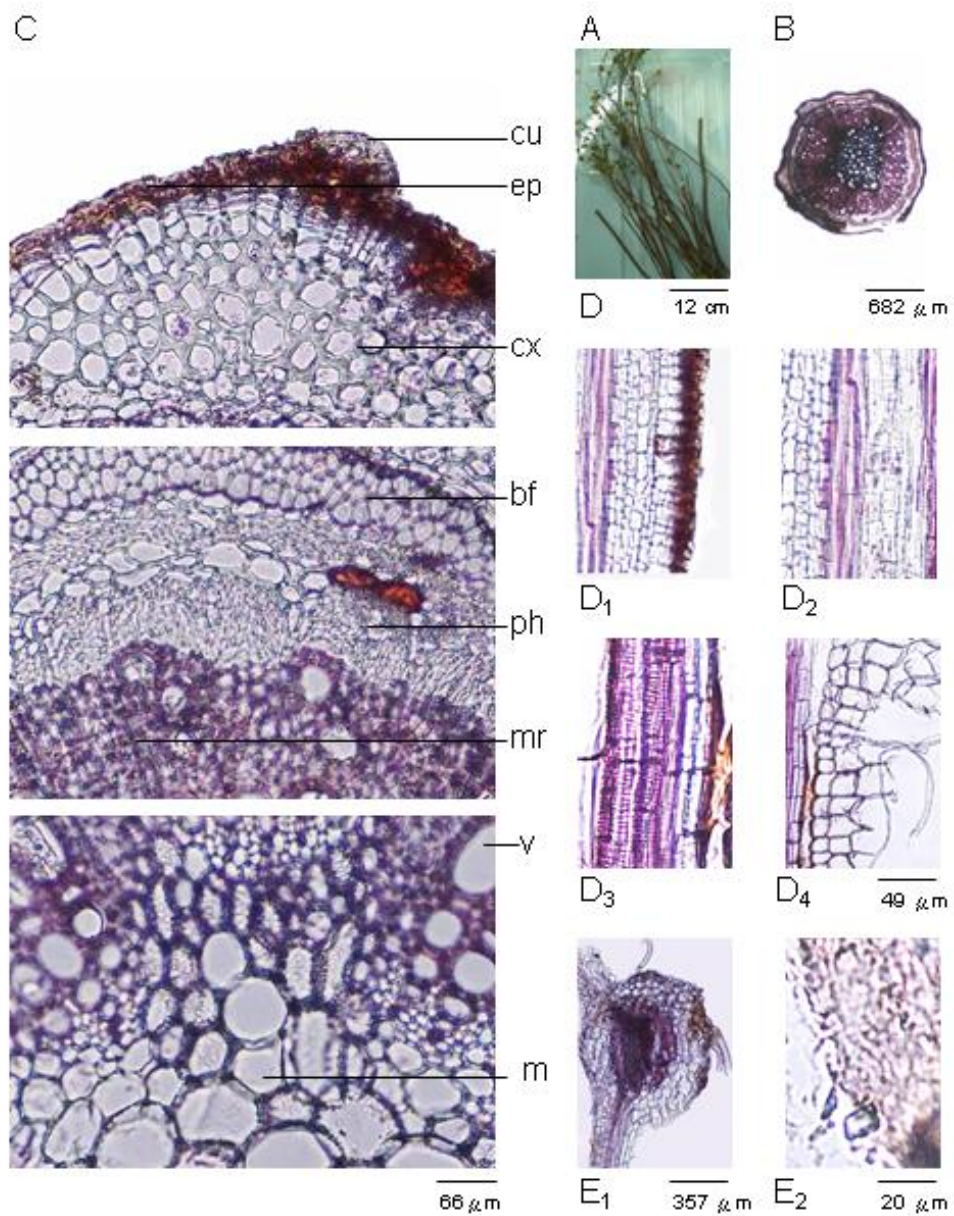




***Desmodium sequax* WALL**

- A. photo showing the plant
- B. cross section of the stem
- C. transverse section of the stem
- D. tissue elements: D₁: epidermis D₂: reticulate vessel
 D₃: spiral vessel D₄: pith
- E. Leaf :
 E₁: transverse section of the midrib
 E₂: non-glandular hair

圖 19：波葉山螞蝗之組織切片圖



***Desmodium pulchellum* LINN**

- A. photo showing the plant**
- B. cross section of the stem**
- C. transverse section of the stem**
- D. tissue elements :**
 - D₁: epidermis**
 - D₃: reticulate vessel**
 - D₂: bast fiber**
 - D₄: pith**
- E. Leaf :**
 - E₁: transverse section of the midrib**
 - E₂: single crystal**

圖 20：排錢樹之組織切片圖

第三節 波葉山螞蝗與排錢樹植物中 rutin 的定量

在2005年Pushpesh Kumar Mishra等人³¹從*Desmodium gangeticum*的植物中分離出rutin這個成份，他們發現到rutin及其他Glycolipids的成分都具有抗利什曼原蟲的效用，也具有免疫調節的功能。另外在2002年Khalid H.³²等人的研究中指出，rutin對於四氯化碳及paracetamol所以引起的肝臟毒性有保護的效用。當口服給予老鼠20 mg/Kg 後再投與四氯化碳 1.5 ml /Kg或是paracetamol 640 mg/Kg，這時候可以發現到對於四氯化碳或是paracetamol所造成的ALT和AST上升的情況有明顯的改善。所以我們推測同屬植物中有rutin的成分，因此選取rutin來進行定量，用以確定rutin在植物中的含量。

一、分析條件的選擇

我們以幾個方向來討論分析的條件：(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，rutin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，在參考有關於rutin的分離條件相關文獻之後，發現本實驗室中即有RP-18（Merck LiChroCART 250-4）的管柱，故以此作為分析的管柱，不需改變管柱的種類，所以在條件的選擇以朝向改變移動相條件及UV檢測波長為主。

在 UV 檢測條件的選擇上，rutin 的 UV 如圖 21 所示，在 255 nm 和 350 nm 附近有明顯的吸收峰，且相對上受到的干擾物質較少一些，在經由參考文獻³³之後，選擇以 255 nm 為定量的波長。

移動相選擇的部分，在參考完文獻（表 18）後，可見 Fang³⁴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。因此我

們添加磷酸以降低 pH 值，使得 rutin 得以維持分子態。我們加入 1ml 的磷酸再以 1000 c.c. 的定量瓶加水定容至 1000 c.c. 讓磷酸水的比例為 0.1%。

表18：不同條件下rutin的滯留時間

Column	Mobile phase	Flow rate (ml/min ⁻¹)	Rt	UV (nm)	Ref
HIQ SIL C18V reversed-phase column 25cm	methanol–acetonitrile–water (40:15:45, v/v/v) containing 1.0% acetic acid	1	5	257	33
Merck LiChrospher 100RP-18e 25cm	Solvent A : 19% acetonitrile, 5% methanol and 1% THF in water (pH 3.0) solvent B : 55% acetonitrile and 15% methanol in water(pH 3.0)	1	10	360	34
YMC ODS-AQE RP-18 column 25cm	A : 20% methanol and 0.5% TFA B : 10% methanol and 0.5% TFA	1	13.5	270	35
Luna C18(2) 25cm	Solvent A : 0.1% formic acid Solvent B : acetonitrile	0.7	13	255	36
C18 121ST column 25cm	acetonitrile 0.1% formic acid	1	20	370	37
Luna C18(2) 25 cm	methanol-buffer	1	11.7		38
RP–18 25cm	甲醇–水–磷酸 (60 : 40 : 015)	1	4.61	254	39
Spherisorb -C18 25cm	甲醇- 水- 冰醋酸 (40 : 58 : 2)	1		248	40

由表可見所用的移動相有使用 methanol 與水或是 acetonitrile 與水，經過我們實際操作之後，發現使用 acetonitrile 與水並沒有辦法將 rutin 的 peak 完全分離出來，仍然會與其他的 peak 夾雜，而選用 methanol 與水則可以將 rutin 完全的來分離，所以我們就選擇以 methanol 和水來作為移動相，接下來在改變 methanol 和水之間的比例，尋求最佳的分離條件。

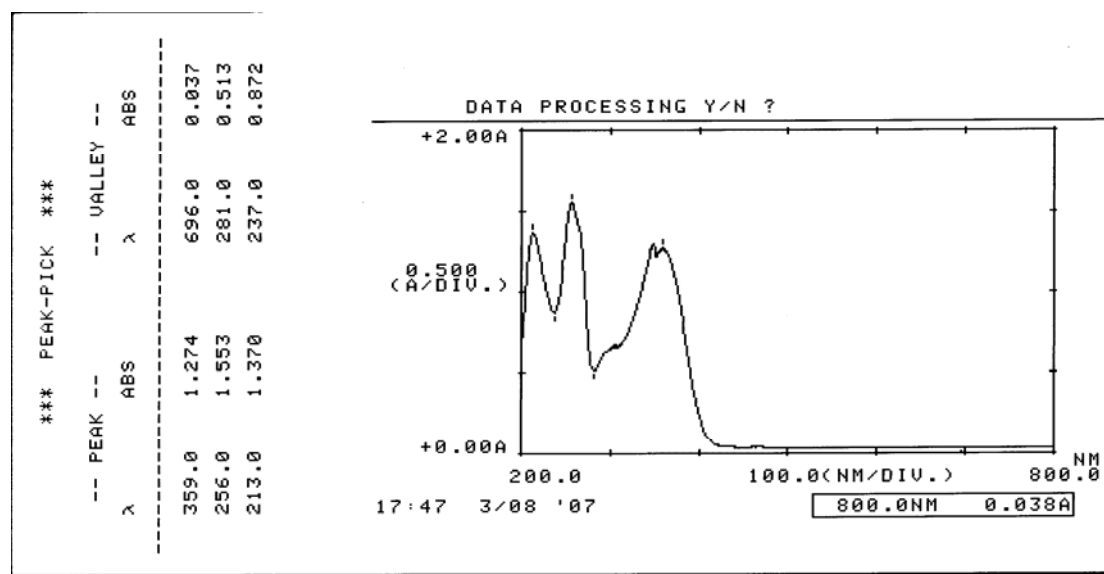


圖 21：rutin 的 UV 吸收波長

我們由圖 6~7 可以發現到內標的選擇應選在滯留時間 28~31 分鐘之間，因此我們選擇以 ethyl 4-hydroxybenzoate 來作為內標，因為其滯留時間約在 30 分鐘左右(圖 4)，正好符合我們的需求。

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 Methanol 與 0.1% 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 19 所示：

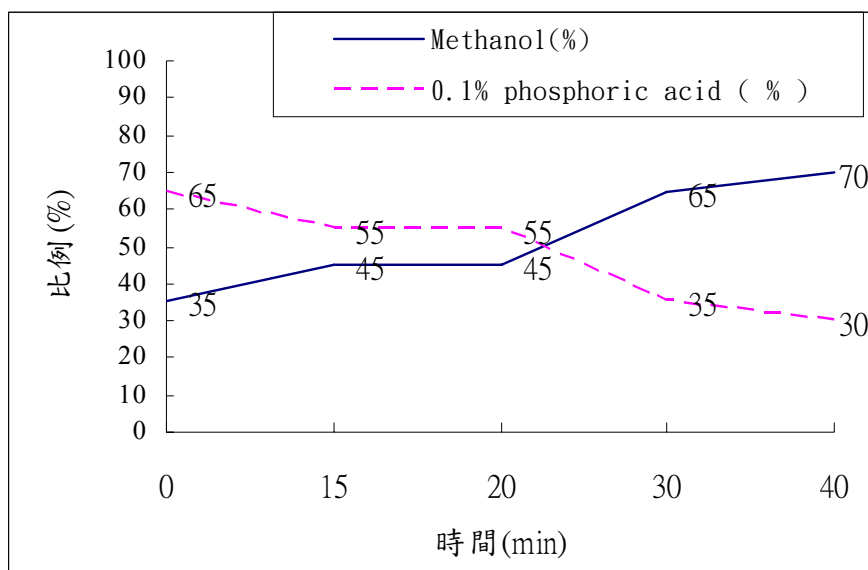


表 19：HPLC 移動相之條件

(3)、內部標準品（以下簡稱 I.S.）： Ethyl-4-hydroxybenzoate

(4)、UV 波長：255 nm

取植物(波葉山螞蝗或排錢樹)全草的粉末 1 g，以 10 ml methanol 超音波震盪加熱 50 °C 30 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 使其溶解，以 0.22 μ m 濾膜過濾後進樣 HPLC。

1、rutin 穩定性測試

由結果可看出（圖 22，表 11），rutin 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。

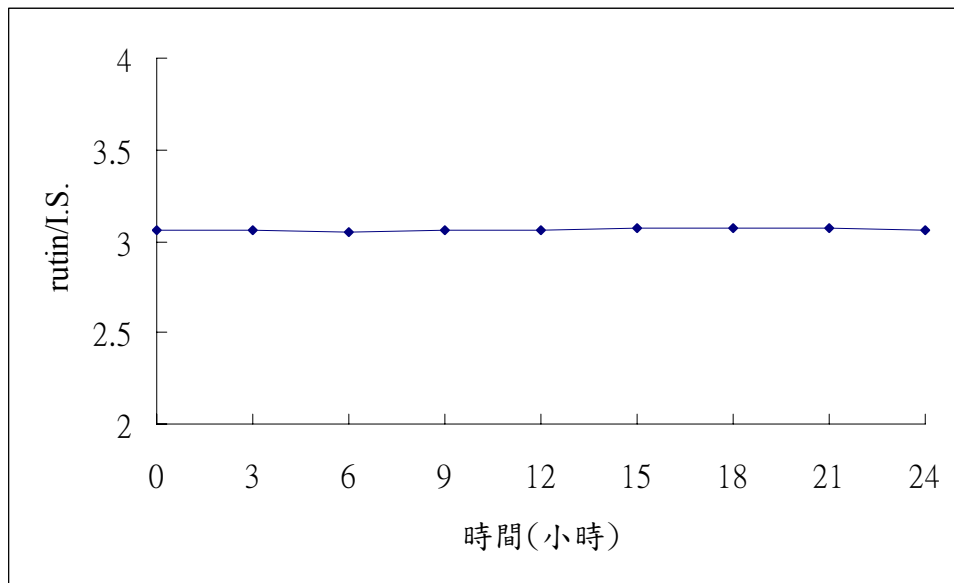


圖 22：24 小時內 rutin 在 methanol 中的穩定性

2、rutin 檢量線製作

rutin 檢量線製作是以不同濃度 rutin (X) 對 rutin 與 I.S.之層析峰面積比 (Y) 的反應值 (圖 5, 表 16)。所得到的檢量線方程式為

$$y = 0.006x - 0.0493 \quad R^2 = 0.9976$$

此圖可顯示當 rutin 濃度在 25.85~517 $\mu\text{g/ml}$ 之間時具有良好的線性關係。

3、rutin 回收率試驗

由實驗結果可知 rutin 在經過和植物定量相同的步驟後，回收率分別為 94.25 % 及 95.49 %，顯示回收率良好 (表 13)。

4、rutin 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 0.16~1.23 % 之間，以及異日間的面積比相對標準差介於 0.60~1.15 % 之間，均在可以接受的範圍以內 (表 12~15)。

5、LOD (limit of detection) 和 LOQ (limit of quantitation) 探討

在 USP 28^{28,41} 中，把 LOD 定義在規定的實驗條件下，分析方法能夠檢測 (但不需要定量) 的樣品中分析物的最低濃度。LOQ 的定義則是在規定的實

驗條件和具有可接受的精密度和準確度前提下，分析方法能夠測定樣品中分析物的最低準確濃度。

USP 28²⁸ 中使用儀器分析，我們同時測定已知分析物含量的樣品和空白樣品，得到儀器的數值分別為 S（信號）和 N（雜訊），我們將能得到的 S/N 比在 2：1 或是 3：1 時樣品中的分析物濃度定為 LOD；而當 S/N 比在 10：1 的時候，我們把樣品中的分析物濃度定為 LOQ。

我們經由實驗所得 LOD 的濃度為 3.34 $\mu\text{g/ml}$ ，而 LOQ 的濃度為 10 $\mu\text{g/ml}$ 。



三、植物 rutin 之定量

臺灣產波葉山螞蝗及排錢樹植物全草的 rutin 含量，列於表 20。

表 20： rutin 含量

植物	重量(μg)	含量(%)
波葉山螞蝗	40.20	0.004
排錢樹	260.73	0.026

四、討論

1、rutin 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_2O
- (4) H_2O 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 rutin 含量最高，因此我們選擇以 methanol 作為樣品處理的溶媒。

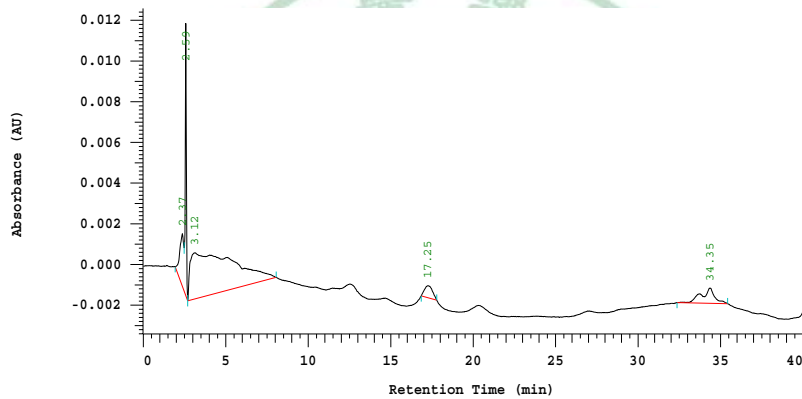
另外，選擇好溶媒之後，接下來便是萃取方法，我們以下列四種方法來提取：

- (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 30 分鐘

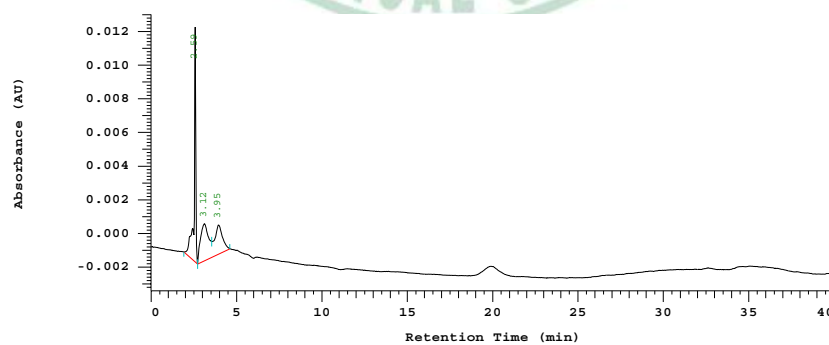
(4) 超音波加熱 50 °C，30 分鐘

結果發現在相同狀況之下所提取出來 rutin 的含量以超音波加熱 50 °C，30 分鐘最多；加熱法 30 分鐘次之；超音波萃取法 30 分鐘第三；冷浸法（並用磁石攪拌）在室溫下，18 小時最少。故選用超音波加熱法，可以使萃取時間短，效率高。

為了確保 rutin 的提取完全，我們取植物(波葉山螞蝗或排錢樹)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 次的萃取液裡已偵測不到 rutin 的存在。因此由此實驗可知：rutin 可以利用 10 ml MeOH 提取三次的方法，完全提取。



波葉山螞蝗第四次抽取圖



排錢樹第四次抽取圖

2、rutin 的定量：

由表 20 我們可以知以全草來看波葉山螞蝗跟排錢樹之間 rutin 的含量，排錢樹明顯高出許多。

第四節 波葉山螞蝗與排錢樹植物的指紋圖譜研究

一、植物之層析圖譜

如圖8，我們選取的5個 peak（表21），以排錢樹的rutin之波峰為基準，當作100%，計算波葉山螞蝗與排錢樹這5個波峰的高度和rutin波峰的高度比，得其比值（表22~23），繪製成折線圖（圖23~24），比較各波峰之間的關係。

表21：波葉山螞蝗各peak 之滯留時間

波峰標號	Retention Time (min)
1	13.39
2	15.57
3	18.56
4	24.72
5	33.68

表22：波葉山螞蝗在HPLC中各peak高度與排錢樹rutin peak之高度比

Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
7.90%	25.80%	44.90%	4.10%	3.00%

表23：排錢樹在HPLC中各peak高度與排錢樹rutin peak之高度比

Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
6.40%	1.70%	100%	3.10%	11.60%

我們選擇以排錢樹的rutin來當作標準將其含量定做100%，因為其含量在波葉山螞蝗及排錢樹中最高的peak，而後算出其他peak的百分比。經過計算之後，我們發現peak 1的含量都相差不多，但peak 2則是在波葉山螞蝗中有較多的含

量，peak 3也是我們欲定量的rutin，在排錢樹中的含量非常高，波葉山螞蝗中的量大約只有排錢樹的45%，明顯排錢樹中rutin量高出波葉山螞蝗許多，而peak 4兩個的含量都非常少，peak 5則是以排錢樹的量較為高，由這兩張指紋圖譜，可以觀察出不同植物中的成分、含量各有不同，可以作為鑑定的依據。

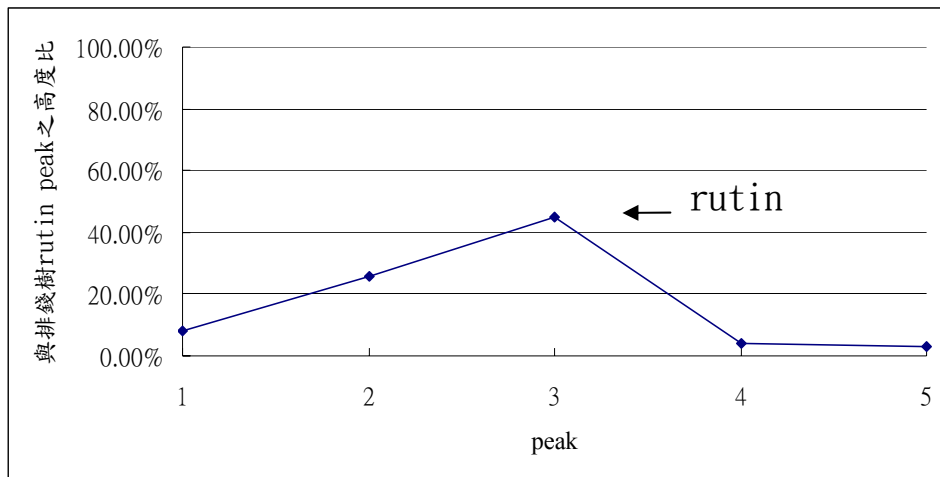


圖23： 波葉山螞蝗之HPLC指紋圖譜

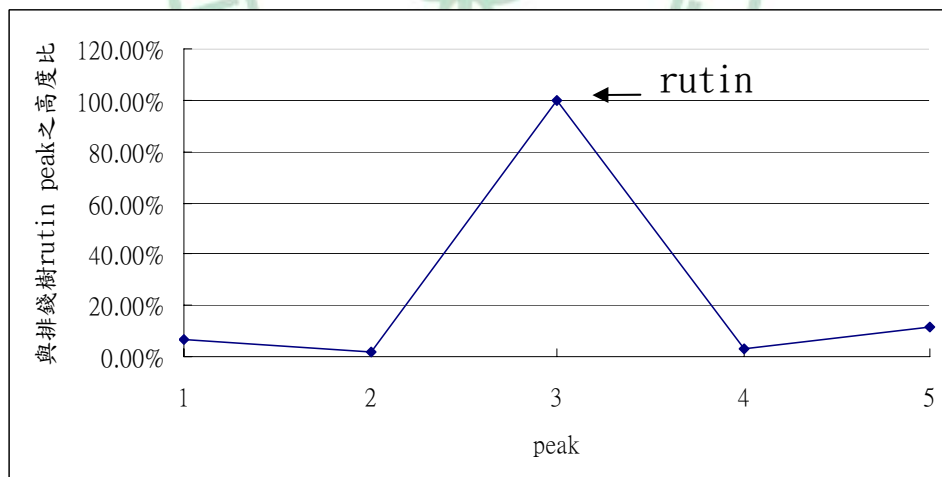


圖24： 排錢樹之HPLC指紋圖譜

二、植物 PCR 之研究

真核生物細胞核醣體DNA 在細胞核中重複數目(copy number)多，在植物基因組中以一基本單元序列重複排列(tandem arrays) 於一條或多條染色體核仁組成區中，可達數百至數千次，每一個重複單位是由18S、5.8S 及28S 之rDNA 基因編碼區、及其間隔序列 ITS (internal transcribed spacer)和基因之間的序列IGS (intergenic spacer) 所組成，在18S rDNA 與5.8S rDNA 之間的轉錄區序列稱為ITS1，而5.8S rDNA 與28S rDNA 之間的轉錄區序列稱為ITS2；IGS 由啟動子(promoter) 與18S rDNA 基因間的ETS (external transcribed spacer) 及無法進行轉錄的NTS (nontranscribed spacer) 所組成^{42, 43}。在DNA 進行轉錄時ITS1 與ITS2 會與18S、5.8S 及28S rRNA 一起被轉錄出來，之後細胞對轉錄之rRNA 進行修飾(processing) 過程中，ITS1 與ITS2 會被除去，產生成熟的rRNA⁴⁴。由於核醣體DNA重複單位不似單拷貝基因一般獨自進行演化，而是以一致性演化(concerted evolution) 的方式進行，故此序列於種內同質性(homogeneity) 相對較高^{45, 46}。根據重複單位內編碼區及非編碼區序列於不同物種間演化速率及保守性之差異，針對高階的門階層到低階的族群階層，皆可獲得合適分析的序列與分類結果。尤以ITS序列兩側均為密碼區，很容易發現適當的引子對，且序列長度又不大，是常用來研究植物屬或種間親源關係的最佳標記^{42, 43, 47, 48}(圖25)。

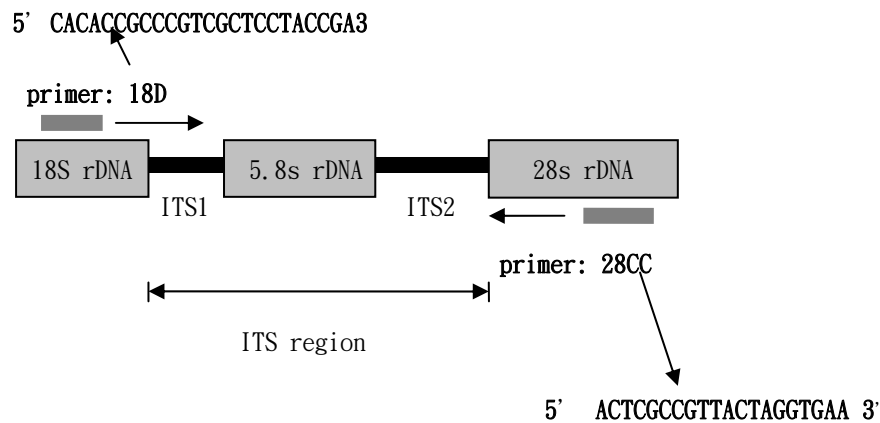


圖 25：圖示為 internal transcribed spacer (ITS) 區域與 18S、5.8S 及 28S rDNA 之相對位置以及 intergenic spacer (IGS) 之位置

另外，在 rDNA 之序列結構中，在 18S、5.8S 和 28S rDNA 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。

台灣產波葉山螞蝗和排錢樹在民間廣泛的使用，且在植物學的分類上，排錢樹曾經被歸類到山螞蝗屬之中，因此我們想藉由 ITS 序列的觀察比較兩者間的差異，建立植物的鑑定基礎，本研究利用基因體 DNA 萃取技術，萃取波葉山螞蝗與排錢樹之 DNA，採用一組引子：18D 及 28CC (圖 26)。引子長度 18D 為 24 mer, 28CC 為 20 mer。經過 DNA 的萃取、PCR 擴增，將 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 26：PCR 引子

利用上述這組引子可以有效將排錢樹及波葉山螞蝗 rDNA 之 ITS 區域複製，經過進一步定序後，序列長分別為 798 bp 及 794 bp (圖 27~28)。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，由表 24 可看出長度。

表 24：波葉山螞蝗與排錢樹序列長度

	排錢樹序列長度	波葉山螞蝗序列長度
18S rDNA 基因 3'端	133 bp	146 bp
28S rDNA 基因 5'端	67 bp	62 bp
ITS1 區域的序列	225 bp	225 bp
ITS2 區域的序列	209 bp	197 bp

18S rDNA gene 3'端：

CTTCTCGACACATAGCCCGTCGCTCCTACCGACACTAAACCCGACGCTCTT
ACAAACCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG
TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG

ITS 1：

TCGATGGCTCACAAGCAGTTTGACCGGCGAACACGTTCATCTGACCCACA
GGGGCTGGCTTGATCTCATCCTCCCCTCTGCCGAGAGGCGGTCGCGCGTGG
CGCGGCTTCCCCTGGGCAAAACACAAACCCCGGCGCTTAGTGCGCCAAGG
AATCCAAAAGTGTTGATTGCAGCCCCGGGGGACTTGGAGACAATGTCCCG
TGGGTCTGTCGCTGCACTCGAGCA

5.8S rDNA gene：

AAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT
AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGT
TTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAAGCCTTCGGGTCGAGGGGCACGTCTGCC
TGGGTGTCACGC

ITS 2 :

CATCACGGCGCACCCATCCGTGGGCTCCATTTTCAACCAACCACGACGCAC
CGCTCGCGGGAGGCCACCATGCACACGCCACGCAAGTGGCTAACAGTGTA
GACATTTTGC GTGAGGGTAACGGTGTGTGACACCCAGGCAGGCATGCCCTC
AGCCTAATGGCTTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTCACGG
GATTCT

28S rDNA gene 5'端 :

GCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAG
CCGAGATATCCGTTGA

圖 27：排錢樹之序列

18S rDNA gene 3'端 :

TTTTCCGTTATTCATTGAGCTTTTTGATATCGACGAGCGCGAGTTCGCTGCC
CGCGACGTTGTGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAA
GTCGTAACAAGGTTTCCG TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG

ITS 1 :

TCGATGGCTCACAATCAGTTTGACCGGCGAACATGTTTATCTAACCCATAG
GGTTGGCATGATCTCATCCTCCCCTCTGCCGAGAGGCGGCTGGCATAGC
GCGGCTTCCTCTCGACAAACACAAACCCCGGCGCTTTGTGCGCCAAGGAA
TCCAAAATTGTTCCGGTGC GGCCCCGGGGGACATTGGAGACAATGTCTCGC
GGGTCTCGTCACCACACACGAAAA

5.8S rDNA gene :

AAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT
AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGT
TTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAAGCCTTCGGGTCGAGGGCACGTCTGCC
TGGGTGTCACGC

ITS 2 :

ATCGTTACCCTCACGCAAATGTCTATTGTTAGCCACTGCGTGGTGTGTATG
CTGACCTCCC GCGAGCGGTGTCTCGTGGTTGGTTGAAAATCGAGTTCACG
GTCGAGTGCGCCGTGATAAAACGGTGGATGGGCAACGCCCGAGACCAAT
CATGCGTGATCCTGTCCGTTTGGACTCTTGGACCCCTGCGGGCGTCT

28S rDNA gene 5'端 :

TCGGATGCTCTTAGCGAGACCTCACGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTT
AAGCATATCTA

圖 28：波葉山螞蝗之序列

我們在得到排錢樹及波葉山螞蝗的序列之後，將兩者的序列來比對一下，觀察兩者間的相似程度(圖29)。我們可以發現兩者之間相似的程度有69.6%。

	1				50
Desmodium	TTTTCCGTTA	TTCATTGAGC	TTTTTGATAT	CGACGAGCGC	GAGTTCGCTG
Phyllodium		C TTCTCGACAC	AT----AGCC	CGTCGCTCCT	ACCGACACTA
5.8S					
18S		C TTCTCGACAC	AT----AGCC	CGTCGCTCCT	ACCGACACTA
Consensusc	ttctcgacac	at....agcc	cgtcgctcct	accgacacta
	51				100
Desmodium	CCC GCGACGT	TGTGAGAAGT	CCACTGAACC	TTATCATTTA	GAGGAAGGAG
Phyllodium	AACCCGACGC	TCTTACAAAC	CCACTGAACC	TTATCATTTA	GAGGAAGGAG
5.8S					
18S	AACCCGACGC	TCTTACAAAC	CCACTGAACC	TTATCATTTA	GAGGAAGGAG
Consensus	aacccgacgc	tcttacaaac	ccactgaacc	ttatcattta	gaggaaggag
	101				150
Desmodium	AAGTCGTAAC	AAGGTTTCCG	TAGGTGAACC	TGCGGAAGGA	TCATTGTCGA
Phyllodium	AAGTCGTAAC	AAGGTTTCCG	TAGGTGAACC	TGCGGAAGGA	TCATTGTCGA
5.8S					
18S	AAGTCGTAAC	AAGGTTTCCG	TAGGTGAACC	TGCGGAAGGA	TCATTG
Consensus	aagtcgtaac	aaggtttccg	taggtgaacc	tgcggaagga	tcattg....
	151				200

Desmodium TGGCTCACAA TCAGTTTGAC CGGCGAACAT GTTTATCTAA CCCATAGGGG
 Phyllodium TGGCTCACAA GCAGTTTGAC CGGCGAACAC GTTCATCTGA CCCACAGGGG
 5.8S
 18S
 Consensus

 201 250
 Desmodium TTGGCATGAT CTCATCCTCC CCTCTGCCGA GAGGCGGCTG -GCATAGCGC
 Phyllodium CTGGCTTGAT CTCATCCTCC CCTCTGCCGA GAGGCGGTTCG CGCGTGGCGC
 5.8S
 18S
 Consensus

 251 300
 Desmodium GGCTTCCTCT CGACAAA-CA CAAACCCCGG CGCTTTGTGC GCCAAGGAAT
 Phyllodium GGCTTCCCCT GGGCAAAAACA CAAACCCCGG CGCTTAGTGC GCCAAGGAAT
 5.8S
 18S
 Consensus

 301 350
 Desmodium CCAAAATTGT TCGGTGCGGC CCCGGGGGAC ATTGGAGACA ATGTCTCGCG
 Phyllodium CCAAAAGTGT TGATTGCAGC CCCGGGGGAC -TTGGAGACA ATGTCCCCTG
 5.8S
 18S
 Consensus

 351 400
 Desmodium GGTCTCGTCA CCACACACGA AAAAGAAATGA CTCTCGGCAA TGGATATCTC
 Phyllodium GGTCT-GTCG CTGCACTCGA GCATAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC
 5.8S TAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC
 18S
 Consensusaa.ga ctctcggcaa .ggatatctc

 401 450
 Desmodium GGCTCTTGCA TCGATGAAGA ACGTAGCGAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT
 Phyllodium GGCTCACGCA TCGATGAAGA ACGTAGCAAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT
 5.8S GGCTCACGCA TCGATGAAGA ACGTAGCAAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT

18S
Consensus ggctc..gca tcgatgaaga acgtagc.aa atgcgatact tgggtgtaat

451 500
Desmodium TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCCGAAG
Phyllodium TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTTTTTG AACGCAAGTT GCGCCCCGAAG
5.8S TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTTTTTG AACGCAAGTT GCGCCCCGAAG
18S
Consensus tgcagaatcc cgtgaaccat cgagt.tttg aacgcaagtt gcgcccgaag

501 550
Desmodium CCATTAGGTT GAGGGCATGC CTGCCTGGGT GTCACAC-AT CGTTACCCTC
Phyllodium CCATTGGGCC GAGGGCACGT CTGCCTGGGC GTCACGCCAT CACGGCGCAC
5.8S CCATTGGGCC GAGGGCACGT CTGCCTGGGC GTCACGC
18S
Consensus ccatt.gg.. gagggca.g. ctgcctggg. gtcac.c... ..

551 600
Desmodium ACGCAAATG- --TCTATTGT TAGCCA-CTG CGTGGTGT-G TATGCTGACC
Phyllodium CCATCCGTGG GCTCCATTTT CAACCAACCA CGACGCACCG CTCGCGGGAG
5.8S
18S
Consensus

601 650
Desmodium TCCCGCGAGC G-GTGTCTCG TGGTTGGTTG AAAATCGAGT TCACGGTCGA
Phyllodium GCCACCATGC ACACGCCACG CAAGTGGCTA ACAGTGTAGA CTTTTGCGT
5.8S
18S
Consensus

651 700
Desmodium GTGCG---CC GTGATAAAAC GGTGGATGGG CAACGCCCGA GACCAAT--C
Phyllodium GAGGGTAACG GTGTGTGACA CCCAGGCAGG CATGCCCTCA GCCTAATGGC
5.8S
18S
Consensus

	701		750
Desmodium	AT-GCGTGAT CCTGTCCGGT TTGGACTCTT GGACCCCTGC GGCCTCTTCG		
Phyllodium	TTCCGGGCGCA ACTTGCGTTC AAAGACTCGA TGGTTCACG- GGATTCTGCA		
	5.8S		
	18S		
Consensus		
	751		800
Desmodium	GAT-GCTCTT AGCGAGACCT CACGTCAGGC GGGGCTACCC GCTGAGTTTA		
Phyllodium	ATTACACCA AGTATCGCAT TTCGCTACGT TCTTCATCGA TGCGAGAGCC		
	5.8S		
	18S		
Consensus		
	801	814	
Desmodium	AGCATATCTA		
Phyllodium	GAGATATCCG TTGA		
	5.8S		
	18S		
Consensus		

圖 29：波葉山螞蝗與排錢樹的序列比較

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⁴⁹—18D 及28CC，利用基因體DNA萃取技術，測定臺灣產波葉山螞蝗和排錢樹植物新鮮葉子之DNA，結果發現，臺灣產波葉山螞蝗和排錢樹之ITS1、5.8S rDNA 基因及ITS2 之長度與G+C百分比和其他高等植物類似。波葉山螞蝗植物之5.8S rDNA基因長度為164 bp，G+C百分比為51.2 %。ITS1之G+C百分比為56.4 %，ITS2區域之G+C百分比為56.3 %；而排錢樹植物之5.8S rDNA 基因長度為164 bp，G+C百分比為54.2 %。ITS1之G+C百分比為61.4 %，ITS2區域之G+C百分比為58.9 % (表25)。綜合已發表之高等植物 rDNA 之ITS 各區的長度與 G+C 百分比^{50, 51} (表26)，5.8S rDNA基因之長度可於162~167 bp之間，但多為163 或164 bp，而波葉山螞蝗和排錢樹兩种植物的5.8S rDNA基因長度都是164 bp。

就演化觀點而言，5.8S rDNA 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 25: 波葉山螞蝗與排錢樹 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 + 28S)

	18S		ITS1		ITS2		*		28S		**	
	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>D.sequax</i>	146	44.6	225	56.4	197	56.3	586	54.9	62	54.8	794	53.5
<i>P.pulchellum</i>	133	49.7	225	61.4	209	58.9	598	58.6	67	47.8	798	56.1

>18S : TCCCGTGTTCGGAGTGTTCGGATCGCGACGACGTGAGCGGTTTCGCTGCCCGGACGTCCGCG
AGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGTTTTCCGTAGG
TGAACCTGCGGAAGGATCATTG

>5.8S : TAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATG
CGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCC
CCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGC

>28S : 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，波葉山螞蝗植物的序列保留區為GGCGC 【TTTGT】 GCGCCAAGGAA，排錢樹則為GGCGC 【TTAGT】 GCGCCAAGGAA。與其他高等植物序列保留區比對發現結果一致⁵² (圖30)。兩者間不同處只有括號內的第三個波葉為T，排錢樹則是A，這是不同的地方。

表26：波葉山螞蝗與排錢樹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	%
Monocots							
<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
Dicots							
<i>Desmodium sequax</i>	Fabaceae	225	56.4	164	51.2	197	56.3
<i>Phyllodium pulchellum</i>	Fabaceae	225	61.4	164	54.2	209	58.9
<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>Phyllodium pulchellum</i> :	<u>GGCGC TTA -- GT GCGCCAAGGAA</u>
<i>Desmodium sequax</i> :	<u>GGCGC TTT -- GT GCGCCAAGGAA</u>
<i>Amica mollis</i> :	GGCAC AAC -- AT <u>GT</u> GCCAAGGAA
<i>Arabidopsis thaliana</i> :	GGCAC GAA -- AA <u>GT</u> <u>GT</u> CAAGGAA
<i>Sinapis alba</i> (mustard):	GGCAC GAA -- AA <u>GT</u> <u>GT</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 <u>GCGT</u> CAAGGAA
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato):	GGCGC GGA -- AA GCGCCAAGGAA
<i>Triticum aestivum</i> (wheat):	GGCGC CGA -- AG <u>GCGT</u> CAAGGAA
<i>Daucus carota</i> (carrot):	GGCGC TAG -- AT GCGCCAAGGAA
<i>Vicia faba</i> (broad bean):	GGCGC TGA -- AA <u>GCGT</u> CAAGGAA

圖 30：許多高等植物 rDNA 的 ITS1 之序列保留區與波葉山螞蝗和排錢樹之相對應序列比較。(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，提供另一種鑑定的方法。

第五章 結論

我們利用光學顯微鏡及掃描式電子顯微鏡，觀察波葉山螞蝗和排錢草植物的外部形態，包括根、莖、葉、果實、種子以及花粉的形態，已確立形態鑑定的基礎。

在本研究中我們觀察到波葉山螞蝗與排錢樹植物的高度相差不大，新生的植株兩者都很相近只差在其葉子波葉山螞蝗是波浪狀，但成熟後則可以較明顯的由葉片來區分。排錢樹種子較波葉山螞蝗大，波葉山螞蝗種子外皮上有明顯鉤毛。花粉排錢樹較接近圓形，波葉山螞蝗則有點近似三角形。

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。

經過觀察，我們可以發現波葉山螞蝗導管具有螺旋紋及網狀紋，排錢樹則是以網狀紋為主。另外也可以看到排錢樹上有單晶。在波葉山螞蝗和排錢樹葉脈上也可以看到非腺毛。

我們對於 rutin 提取方法之選擇，發現到 rutin 可以利用 10 ml MEOH 提取三次的方法，完全提取。而 rutin 之定量中本研究所採集之波葉山螞蝗全草的 rutin 含量約在 0.004 % 之間，排錢樹全草的 rutin 含量則約在 0.026 % 間，兩者有顯著差異。

對於 HPLC 波峰的分析結果如圖 22~23，我們發現到波葉山螞蝗和排錢樹在 peak 1、4、5 的差異並不大，但在 peak 2、3 則有比較明顯的差別，波葉山螞蝗 peak 2 較高，排錢樹則是 peak 3 較高。

本研究中，臺灣產波葉山螞蝗和排錢樹之 ITS1、5.8S rDNA 基因及 ITS2 之長度與 G+C 百分比和其他高等植物類似，兩者間序列相似的程度是 69.6 %。波葉山螞蝗植物之 5.8S rDNA 基因長度為 164 bp，G+C 百分比為 51.2 %。ITS1 之 G+C 百分比為 56.4 %，ITS2 區域之 G+C 百分比為 56.3 %；而排錢樹植物之 5.8S

rDNA 基因長度為 164 bp，G+C 百分比為 54.2%。ITS1 之 G+C 百分比為 61.4%，ITS2 區域之 G+C 百分比為 58.9%。

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，波葉山螞蝗與排錢樹植物的序列保留區分別為 **GGCGC【TTTGT】GCGCCAAGGAA** 和 **GGCGC【TTAGT】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。



參考文獻

1. Chang-Fu Hsieh, Tseng-Chieng Huang, Zhen-Yu Li. *Flora of Taiwan*. second edition ed. taipei: the editorial committee of flora of taiwan; 1993.
2. 中國科學院中國植物志編輯委員會. *中國植物志*. 卷41. 北京: 科學出版社; 1995.
3. 中國科學院中國植物志編輯委員會. *中國植物志*. 卷39. 北京: 科學出版社; 1988.
4. Ohashi Hiroyoshi, *Ginkgoana*. No.1. Tokyo : Academia Scientific Book, 1973.
5. 江蘇新醫學院. *中藥大辭典(下)*. 上海: 上海人民出版社; 1977.
6. *台灣原住民藥用植物彙編*. 台北: 行政院衛生署中醫藥委員會; 2002.
7. 甘偉松. *台灣藥用植物誌*. 台北: 國立中國醫藥研究所; 1967.
8. 邱年永, 張光雄. *原色台灣藥用植物圖鑑1*. 台北: 南天書局有限公司; 民國72年.
9. 林宜信等. *台灣藥用植物資源名錄*. 台北: 行政院衛生署中醫藥委員會; 2003.
10. 全國中草藥匯編編寫組. *全國中草藥匯編*. 1st ed. 北京: 人民衛生出版社; 1975.

11. 高木村. 台灣藥用植物手冊. 第一版 ed. 台北: 南天書局; 1981.
12. 劉和義, 楊遠波, 施炳霖, 呂勝由. 臺灣維管束植物簡誌. 台北: 行政院農業委員會; 民國 89 年.
13. 周麗娜, 戴斌, 鍾鳴. 壯族民間常用草藥排錢草的生藥鑒定. 中國民族民間醫藥雜誌. 2003;(64):301-302.
14. Zeba Siddiqui, Asif Zaman. Chemical constituents of *Desmodium sequax*. *Indian journal of chemistry*. 1998;37B:1081-1082.
15. Chien-Chang Shen, Shr-Ting Wang, Show-Yinn Tsai, Hui-Chuan Yang, Bor-Jinn Shieh, Chien-Chih Chen. Cinnamylphenols from *Phyllodium pulchellum*. *J Nat Prod*. 2005;68:791-793.
16. Ghosal S, Mukherjee B. Alkaloids of *Desmodium pulchellum* Benth. ex Baker. *Chemistry and Industry*. 1964;1800.
17. Ghosal S, Mukherjee B. Occurrence of 5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine Oxide and Other Tryptamines in *Desmodium pulchellum* Benth ex Baker. *Chemistry and Industry*. 1965;793-794.
18. Ghosal S, Mukherjee B. Indole-3-alkylamine Bases Of *Desmodium Pulchellum*. *Journal of Organic Chemistry*. 1966;(31):2284-2288.

19. Ghosal S., Banerjee SK., Bhattacharya SK., Sanyal AK. Chemical and pharmacological evaluation of *Desmodium pulchellum*. *Planta Medica*. 1972;21(4):398-409.
20. Joshi KCea. *Indian journal of chemistry*. 1975;13:869-870.
21. Ghosal et al. *Planta Medica*. 1972;21:398-401.
22. 鍾鳴, 餘勝民, 楊增豔. 排錢草總生物鹼對免疫性肝纖維化大鼠 I、III、IV 型膠原及 TGFβ1 表達的影響. *中西醫結合肝病雜誌*. 2005;15(1):38-40.
23. 鍾鳴, 餘勝民, 黃琳芸, 楊增豔. 排錢草總生物鹼對實驗性肝纖維化動物相關指標的作用. *Chinese Hepatology*. 2001;6(3):168-170.
24. 鍾鳴, 楊增豔, 黃琳芸, 餘勝民, 雷晟, 楊伯甯. 排錢草總生物鹼對化學損傷性肝纖維化大鼠肝臟病理及超微結構變化的影響. *胃腸病學和肝病學雜誌*. 2001;10(3):230-232-251.
25. 余勝民, 鍾鳴, 黃琳芸, 張青青, 楊增豔. 排錢草對實驗性肝纖維化大鼠肝臟膠原蛋白含量的影響. *湖南中醫藥導報*. 1999;5(8):36-37.
26. 韋英群, 鍾鳴, 張樹球, 蒙金秋, 李朝敢. 排錢草及其複方三草膠囊對 O- 的影響. *現代中西醫結合雜誌*. 2003;12(8):795-796.

27. G. Erdtman: Pollen Morphology And Plant Taxonomy – Angiosperm (An Introduction To Paltnology. I.). New York, Hanfer Publishing Company, 1966.
28. *USP 28* ; 2005.
29. Dellaporta S.L., Wood J., hicks J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983;1(4):19-21.
30. Tseng-Chieng Huang. *Pollen Flora of Taiwan*. Published by National Taiwan University Botany Department Press; 1972.
31. Pushpesh Kumar Mishra, Nasib Singh, Ghufran Ahmad, Anuradha Dube, Rakesh Maurya. Glycolipids and other constituents from *Desmodium gangeticum* with antileishmanial and immunomodulatory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005;15:4543-4546.
32. Khalid H. Janbaz, Sheikh A. Saeed, Anwar H. Gilani. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*. 2002;73:557-563.
33. Yuangang Zu, Chunying Li, Yujie Fu, Chunjian Zhao. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of*

Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006;41:714-719.

34. Fang Fang, Jing-Ming Li, Qiu-Hong Pan, Wei-Dong Huang. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food chemistry*. 2007;101:428-433.

35. Wenkui Li, John F. Fitzloff. High performance liquid chromatographic analysis of St. John's Wort with photodiode array detection. *Journal of Chromatography B*. 2001;765:99-105.

36. Mingfu Wang, Yaakov Tadmor, Qing-Li Wu, Cheek-Kok Chin, Stephen A. Garrison, James E. Simon. Quantification of Protodioscin and Rutin in Asparagus Shoots by LC/MS and HPLC Methods. *journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51:6132-6136.

37. Takuya Katsube, Naoto Imawaka, Yasuhiro Kawano, Yoshimitsu Yamazaki, Kuninori Shiwaku, Yosuke Yamane. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food chemistry*. 2006;97:25-31.

38. Anna Wach, Krystyna Pyrzyn'ska, Magdalena Biesaga. Quercetin content in some food and herbal samples. *Food chemistry*. 2007;100:699-704.

39. 鄔建敏, 賈之慎, 唐雲湖. 竹類黃酮化合物總量及蘆丁含量的測定. *浙江農業大學學報*. 1998;24(4):339-343.
40. Liang Jieyi. Determination of Rutin in Xueyaping Tablets by HPLC. *廣東藥學院院學報*. 1998;14(4):259-261.
41. 曾經澤, 黃仁玉. 藥物分析方法的質量控制. *中國藥學雜誌*. 1996;31(12):707-710.
42. 林文煜. 利用核糖體內轉錄區間序列之種間特异性寡核苷酸探針快速檢測方法鑑定三種柴胡. 碩士論文, 清華大學, 新竹, 93年7月:26-42.
43. 陳婉玲. 以大豆葉綠體atpB-rbcL非轉錄區域及rDNA ITS1區域探討大豆品系間親緣關係. 碩士論文, 嘉義大學, 嘉義, 九十五年一月:23-35.
44. Renato D'Ovidio. Nucleotide sequence of a 5.8S rDNA gene and of the internal transcribed spacers from *Populus deltoides*. *Plant Molecular Biology*. 1992;19:1069-1072.
45. G.N. Fritz, J. Conn, A. Cockburn, J. Seawright. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *molecular biology and evolution*. 1994;11:406-416.

46. A.P. Vogler, R. DeSalle. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *molecular biology and evolution*. 1994;11:393-405.
47. Bruce G. Baldwin. Molecular Phylogenetics of Calycadenia (Compositae) Based on ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA: Chromosomal and Morphological Evolution Reexamined. *American Journal of Botany*. 1993;80(2):222-238.
48. Takaiwa, F., S. Kikuchi, K. Oono, M. Sugiura. Nucleotide sequence of the 17-25S spacer region from rice rDNA. *Plant Mol Biol*. 1985.;4:355-364.
49. R.Z.Fu, J.Wang, Y.R.Sun, P.C.Shaw. Extraction of Genomic DNA Suitable for PCR Analysis from Dried Plant Rhizomes/Roots. *Bio Techniques*. 1998;25(5):796-801.
50. 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，台中，2005:153.
51. 蔡仁傑. 台灣產野甘草(*Scoparia dulcis* L.)之生藥學研究. 碩士論文，中國醫藥大學，台中，2006:1-132.
52. 蔡奇助, 蔡勝忠, 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*. 1999;62:31-40.

成果發表

一、 Identification of *Desmodium pulchellum* (L.) based on ITS sequence of nuclear ribosomal DNA in Taiwan

張肇元 李昭瑩 邱泰惠

94 年台灣藥學會年會暨學術研討會

嘉南藥理科技大學 臺南縣 仁德鄉 2005/12/17-2005/12/18

二、 台灣產大葉山螞蝗之形態學研究

張肇元 李昭瑩 邱泰惠

天然物研討會

中國醫藥大學 2006/11/18-2006/11/19

三、 波葉山螞蝗之生物活性評估

蔡仁傑 張肇元 黃太鴻 李昭瑩 邱泰惠

95 年台灣藥學會年會暨學術研討會

中國醫藥大學 2006/12/23

