

臺灣白及(*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.) 假球莖發育與成分分析¹

陳盈君²、李宗徽³、洪惠娟²、張正⁴、張隆仁²、魏芳明²

摘 要

臺灣白及(*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.)為多年生臺灣原生蘭科植物，假球莖乾燥可視為白及(*Bletilla striata*)藥材使用。臺灣白及人工授粉後10週之種子進行無菌播種，5~6個月後移植出瓶，2007年3月於田間栽植，2008年5月植株開花率達55.6% (90/162)，最大假球莖之直徑可達40.1 mm，直徑25~30 mm假球莖平均鮮重為 154.6 ± 5.8 mg。2009年4~5月間植株開花率可達80.5% (124/154)，植株生長強壯，花朵呈粉紅色，部份花莖可形成3~4支側花莖。臺灣白及假球莖進行化學成分分離與分析，共分離、鑑定得到七個主要化合物，經各種光譜資料解析及文獻資料比對，確認其化學結構分別為militarin (1)、formoside (2)、gymnoside IX (3)、benzyl alcohol (4)、*trans*-coumaric acid methyl ester (5)、coelonin (6)和 batatasin III (7)，其中formoside (2)為新化合物。

關鍵字：臺灣白及、假球莖、化學成份分析、militarin、formoside。

前 言

蘭科植物白及屬植物在全世界約有6種，分佈由緬甸北部經中國至日本，中國共有4種⁽¹⁹⁾，臺灣則有1種。臺灣白及(*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.)廣泛分佈於臺灣各地，喜好生長在陽光直接照射的芒草原內、公路旁或土石坡上，冬天莖葉會枯萎脫落，但假球莖宿存在土壤中過冬，為多年生草本植物⁽¹⁶⁾。

白及假球莖黏性強，主要化學成份為揮發油、黏液質及白及甘露聚糖(Bletillamannan)，可作為糊料、塗料、蔬果保鮮劑^(2,3)、釀酒或開發為具有殺菌消炎、驅斑美白、抗皺防衰的天然化妝品^(8,14,15,21)；近代藥理研究指出白及具有止血的作用，可促進血液凝集，縮短凝血時間；保護黏膜；具有抗菌性，特別是對革蘭氏陽性菌及特定黴菌；並有抗氧化及抗腫瘤⁽²⁵⁾等作用，而在中醫史上應用長久且廣泛，其味苦、辛、平、微寒、無毒，具有收斂止血、消腫生肌等功效，內服用於食道炎、糜爛性胃炎等，外用可於皮膚燒燙傷等症^(12,20)或作為皮膚敷料⁽¹⁾。

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0716 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員、助理研究員、副研究員、副研究員兼分場主任。

³ 臺北醫學大學生藥學研究所副教授。

⁴ 國立中興大學園藝學系助理教授。

白及繁殖以分株為主，將成熟假球莖分切為數小塊後種植，但繁殖倍率較低，難以滿足大規模生產的需要⁽¹⁸⁾。隨著世界人口高齡化及對中草藥的需求日增，加上野生資源的日益缺乏，應用組織培養技術繁殖中草藥植物並建立其人工栽培技術為重要課題⁽¹⁹⁾。已有多項研究報導關於白及屬植物應用組織培養技術以進行大量繁殖，如野生黃花白及⁽¹⁷⁾、小白及⁽¹³⁾、白及^(4,6,18)及臺灣白及^(10,11)，主要利用種子、莖頂或是側芽作為培植體進行快速繁殖^(4,8)，或以超低溫技術保存白及種子^(22,23)及應用分子標誌技術進行白及屬植物種原鑑定^(9,17)。

本研究目的為建立臺灣白及假球莖繁殖系統、栽培管理以及成分分析技術，作為開發本土性藥用蘭科植物之基礎。

材料與方法

臺灣白及無菌播種及種苗繁殖

臺灣白及開花時行自交授粉，授粉後10週切取蒴果，先以酒精擦拭表面後，以3%次氯酸鈉滅菌15分鐘，於操作臺中以無菌水清洗3次，將蒴果剖開取出種子，均勻播種於含有9 ml 水晶洋菜培養基之玻璃試管(Pyrex no. 9820, USA)。培養基組成分為1/4 MS salts (Murashige and Skoog, 1962)⁽²⁶⁾、0.5 mg/l niacin、0.5 mg/l pyridoxine HCl、0.1 mg/l thiamine HCl、100 mg/l myo-inositol、1 g/l peptone、20 g/l sucrose、6 g/l potato powder (PhytoTechnology LaboratoriesTM, No. p692)、1 g/l activated charcoal、150 ml/l coconut milk、10 g/l agar (Pronadisa No. 1802.00, Spain)，pH值調整為5.2。弱光培養，光照環境為1,000 lux光度及12 h/day光週期，光源為40 W 螢光燈(FL30D/29，東亞，臺北)，培養溫度則維持 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

種子發芽形成約1 cm小苗時進行第一次繼代培養，每兩個月繼代一次。小苗繼代於含有100 ml培養基之蘭花玻璃瓶，繼代培養基為1/2 MS salts、0.5 mg/l niacin、0.5 mg/l pyridoxine HCl、0.1 mg/l thiamine HCl、100 mg/l myo-inositol、1 g/l peptone、20 g/l sucrose、6 g/l potato powder、1 g/l activated charcoal、150 ml/l coconut milk、10 g/l agar，pH值調整為5.5。培養環境為3,000 lux光度及12 h/day光週期，光源為40 W 螢光燈(FL30D/29，東亞，臺北)，溫度維持 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

瓶苗生長至約10 cm時，移入溫室馴化1週後，取出瓶苗並仔細清洗根部，栽植於水苔介質並以保鮮膜覆蓋以保持濕度，約1週後掀開保鮮膜，持續於溫室栽培，並定時換盆，栽培介質為培養土混合少許蛇木屑。植株生長至20 cm左右時，種植於本場及埔里分場田間，畦高20~25 cm，株距40 cm，持續觀察其生長發育狀態。

種球成份分析

取新鮮之白及假球莖約2 kg，未經磨碎處理，直接以5公升甲醇浸泡萃取三次，合併之萃取液經減壓濃縮後得萃出物350 g，接著分別以正己烷、乙酸乙酯及正丁醇與水進行分配萃取，其中乙酸乙酯層(83 g)續以Sephadex LH-20管柱(3 × 65 cm)進行膠滲層析後，劃分出7個分液，其中第二分液以HPLC進一步純化，管柱為Thermo Hypersil-Keystone BDS HYPERSIL C18 (10 × 250 mm, 5 m)，沖提液為氬甲烷/水(2:3)，流速為2 mL/min，得化合物1 (126 mg)、

2 (151 mg)及3 (35 mg)；第三分液以相同的HPLC系統進一步純化，得化合物4 (12 mg)及5 (24 mg)；第四分液以相同的HPLC系統進一步純化，得化合物6 (8 mg)；第五分液以相同的HPLC系統進一步純化，得化合物7 (15 mg)。

結果與討論

一、臺灣白及無菌播種及種苗繁殖

臺灣白及花朵呈淡粉紅色，蒴果綠色並帶有紅條紋，授粉10週後種子行無菌播種，一個月後約有80%發芽形成小苗，瓶苗經兩次繼代後植株高度約達10 cm，可移入溫室馴化(圖一a)，出瓶之小苗以水苔為介質栽植於有孔塑膠籃，並以保鮮膜覆蓋保持濕度約1週(圖一b)，掀開保鮮膜於溫室栽培(圖一c)，2個月後將存活植株移入含有培養土及少許蛇木屑為介質之塑膠盆，同樣於溫室栽培。2007年3月份於田間栽培(圖一d)，畦高20~25 cm，株距40 cm，每個植穴植入2~3棵，2008年4月份有5株開花，5月份有32株開花，6月份有90株開花，開花率達55.6% (90/162)，開花後收穫部份植株，假球莖基部著生許多不定根，部份側芽已形成並抽出葉片(圖一e)，剪除地上部及不定根，假球莖清洗後呈白色或綠色紡錘形，橫切面可觀察假球莖內部呈白色黏滑狀(圖一f)，最大假球莖之直徑可達40.1 mm，挑取50顆直徑25~30 mm假球莖秤其鮮重，單棵平均鮮重為 154.6 ± 5.8 mg。

2008年度種植於本場埔里分場植株於第二年(98年度) 4~5月間再次開花，其開花率為80.5% (124/154)，植株生長強壯，花朵呈粉紅色，部份花莖可形成3~4支側花莖(圖一g, 一h)；97年度收穫假球莖產生之側芽於98年度再次種植於本場埔里分場田間，其開花率可達83.9% (52/62)，皆可於田間著果，顯示其植株生長狀態良好穩定。

前人研究中針對多種野生白及屬植物進行大量繁殖，野生黃花白及自然授粉成熟未開裂的蒴果進行無菌播種，60天後有80%原球體抽出葉片，移入含有0.5 mg/l NAA之繼代培養基，30天後可長出3~6條幼根⁽¹⁷⁾。白及種子播種後30天形成之原球體來進行增殖，培養於添加有1 mg/l BA及0.1 mg/l NAA之MS培養基培養60天後，同時誘導產生類原球體及不定芽。應用側芽與莖頂培養於含有4.0 mg/l kinetin及0.2 mg/l NAA之MS培養基中，40天後增殖倍率可達4.5倍，但其於初始材料之建立則須3~6個月⁽⁴⁾。曾等(2004)提及試管苗出瓶後3~4年可採收作為藥材使用，本研究顯示，以授粉後10週之種子行無菌播種至出瓶僅需5~6個月時間，於田間種植約1年後即可採收假球莖進行成分萃取。

二、種球成份分析

傳統使用之白及藥材為白及(*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.)乾燥假球莖，但由於野生族群減少，已被中國列為珍稀瀕危植物⁽¹⁹⁾，常有混雜情形，造成其價格與質量多有爭議。臺灣原生之臺灣白及亦有研究發表其假球莖乾燥可視為白及藥材入藥^(10,11)，甚或在成份含量或DPPH清除能力優於市售白及藥材⁽⁵⁾。本研究應用組織培養大量繁殖之植株於田間栽種之假球莖進行成分分離與分析，共分離得到七個化合物，經各種光譜資料包括：核磁共振譜、電灑法質譜及紅外光譜等的解析後，與文獻資料加以比對，確認其化學結構分別為militarin (1)、



圖一、臺灣白及種苗培育、田間栽培、假球莖及花形態。

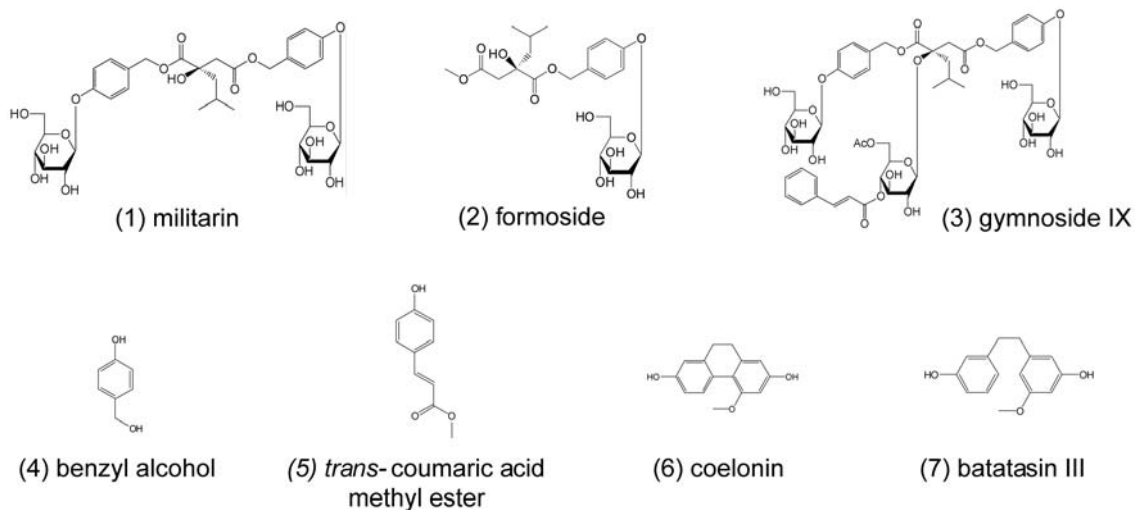
Fig. 1. The seedling development, plantlet cultivation, pseudobulb and flowering of *Bletilla formosana*.

- a. 臺灣白及無菌播種瓶苗經 2 次繼代培養後移入溫室進行馴化(bar = 4.8 cm)
- a. The seedlings of *B. formosana* were subcultured twice in vitro and then transferred to greenhouse for acclimation (bar = 4.8 cm).
- b. 臺灣白及瓶苗出瓶後於保鮮膜覆蓋保濕之有孔塑膠籃栽植(bar = 3.1 cm)
- b. The seedlings of *B. formosana* were grown in the plastic basket which covered with saran wrap for moisture maintenance(bar = 3.1 cm).
- c. 移植存活小苗於溫室生長情形(bar = 7.9 cm)
- c. Survival plantlets were grown in the greenhouse(bar = 7.9 cm).
- d. 臺灣白及植株於田間栽培(bar = 24 cm)
- d. The plantlets were transplanted in the field(bar = 24 cm).
- e. 臺灣白及田間開花後，收穫之植株型態(bar = 3.6 cm)
- e. The morphology of plants which were grown in the field after they bloomed (bar = 3.6 cm).
- f. 臺灣白及假球莖清洗後呈白色或綠色紡錘型(bar = 2.0 cm)
- f. The pseudobulbs were white or green in color and the shape was similar to a spindle (bar = 2.0 cm).
- g. 本場埔里分場田間栽植臺灣白及第二年開花情形(bar = 24 cm)
- g. The plants were grown and flowering on the second year in the field of our Puli Branch (bar = 24 cm).
- h. 臺灣白及植株生長健壯，部份花梗可形成側花梗，花朵呈粉紅色，亦可於田間著果(bar = 1.2 cm)
- h. The plants of *B. formosana* grew well, the stalk or panicle with pink flowers and the capsules were formed naturally in the field(bar = 1.2 cm).

formoside (2)、gymnoside IX (3)、benzyl alcohol (4)、*trans*-coumaric acid methyl ester (5)、coelonin (6) 和 batatasin III (7)，各化合物之化學結構詳見圖二。其中化合物2為新化合物，其核磁共振氫譜及碳譜數據詳列於表一及圖三。

由白及假球莖分離出之 stilbenoids 類化合物，如 phenanthrene、dihydrophenanthrene、dimeric phenanthrene 及 bisbenzyls 可減少乳癌抑制蛋白的抗藥性⁽²⁵⁾。黃花白及假球莖可分離到 2,7-bis(allyloxy)-5-methoxy-3-methyl-9、10-dihydrophenanthrene、gastrodin、gastrodigenin、 β -sitosterol、stigmasterol、4-hydroxybenzaldehyde 及 daucosterol 等 7 種化合物⁽²²⁾。臺灣白及假球莖已被報導的化學成份則包括 militarin、cinnamic acid、1,8-bi(4-hydroxybenzyl)-4-methoxyphenanthrene-2,7-diol 和 4,7-dihydroxy-1-p-hydroxybenzyl-2-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene 等，其中 militarin 則被認為可應用作為質量好壞的指標成份⁽⁵⁾。

近年來，白及甘聚多糖(Bletillamannan)被認為是白及藥材之重要成份，白及甘聚多糖是由D-葡萄糖和D-甘露糖組成，葡萄糖與甘露糖比例約1:4，並有多篇報告針對其萃取方法及萃取量提昇加以研究^(7,21)，而吳(2006)則以 militarin 為評斷白及品質的指標成份。本研究已由假球莖中分離出 militarin，未來將進一步針對臺灣白及假球莖之白及甘聚多糖含量進行測定，以判斷何種成份最適為臺灣白及質量分析的指標成份，並開發本土藥用蘭科植物—臺灣白及之多樣化用途。



圖二、臺灣白及假球莖萃出物經分離、純化後所確認之 7 種化合物。

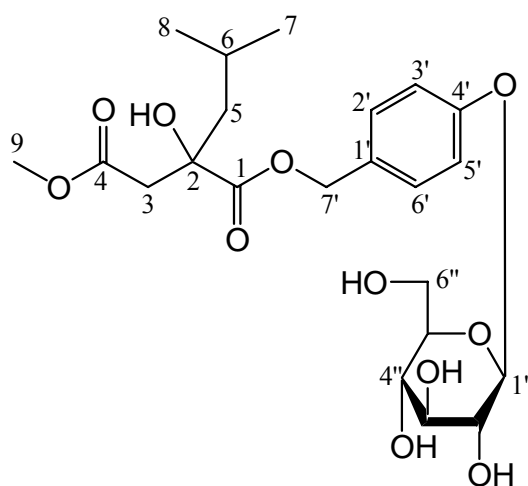
Fig. 2. The extraction, purification and identification of 7 chemical constituents in pseudobulbs of *Bletilla formosana*.

表一、formoside (2) 的核磁共振氫譜及碳譜數據[氫譜 (500 MHz); 碳譜 (125 MHz), methanol- d_4]。
Table 1. ^{13}C - and ^1H -NMR spectral data of formoside (2) (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C , methanol- d_4)

Position	δ_{C} (ppm) mult. ¹	δ_{H} mult. (J/Hz) ²	Position	δ_{C} (ppm) mult. ^a	δ_{H} mult. (J/Hz) ^b
1	176.1 s		1'	130.9 s	
2	76.6 s		2'	131.3 d	7.32 d (8.7)
3	45.8 t	2.61 d (15.7) 2.89 d (15.7)	3'	117.7 d	7.09 d (8.7)
4	172.3 s		4'	159.3 s	
5	49.0 t	1.56 dd (5.8, 14.0) 1.65 dd (6.2, 14.0)	5'	33.6 d	7.09 d (8.7)
6	25.1 d	1.70 m	6'	22.8 d	7.32 d (8.7)
7	24.0 q	0.80 d (6.6)	7'	68.0 t	5.10 d (11.9)
8	24.7 q	0.91 d (6.6)			5.14 d (11.9)
9	52.1 q	3.56 s	1''	102.3 d	4.90 d (7.5)
			2''	74.9 d	3.40 ~ 3.45
			3''	78.0 d	3.40 ~ 3.45
			4''	71.4 d	3.40 ~ 3.45
			5''	78.2 d	3.40 ~ 3.45
			6''	62.5 t	3.68 dd (5.5, 12.0)
					3.87 dd (1.9, 12.0)

¹ Multiplicities were obtained from DEPT experiments.

² Signals without multiplicity were picked up from COSY or HMQC spectra.



圖三、新化合物 formoside (2) 化學結構式。

Fig. 3. The chemical structure of the new compound, formoside (2).

誌 謝

感謝臺中區農業改良場賴順榮先生於田間管理之協助，以及張嫻君小姐協助實驗進行與樣品處理，俾使本研究能順利完成，特申謝忱。

參考文獻

1. 方詩馨 2006 以可降解性敷材包覆中藥白芨作為傷口癒合之可行性評估 中臺科技大學醫學工程暨材料研究所碩士論文。
2. 王如平、吳婷、張衛明、吳國榮 2008 丹皮酚及其白芨多糖包含物對葡萄保鮮作用的比較研究 食品科學 29(11): 645-648。
3. 何海玲、顧鞏平、張衛明 2007 白芨多糖膠塗膜保鮮櫻桃番茄的研究 食品科學 28(4): 336-340。
4. 余朝秀、李枝林、王玉英 2005 野生白芨組培快繁技術研究 西南農業大學學報 27(5): 601-605。
5. 吳姿穎 2006 臺灣產白芨藥材的成分分析、品質評價及抗氧化能力之研究 屏東科技大學農園生產系所碩士論文。
6. 吳華芬、姚宏、劉南祥、諸葛華 2008 離體培養麗水野生白芨快速繁殖 北方園藝6: 180-182。
7. 李及、張立新、周世玉 2005 中藥白芨的質量標準研究 成都中醫藥大學學報 28(2): 57-58。
8. 李嶸、王喆之 2006 白芨的研究概述及其資源利用對策 中草藥 37(11): 1751-1755。
9. 和志嬌、呂麗芬、楊麗雲、徐中志、和加衛、程在全、康平德、袁理春 2008 白芨種質資源遺傳多樣性的ISSR分析 西南農業學報 21(4): 1081-1085。
10. 林郁進 1989 臺灣白芨及組織培養研究 中國醫藥學院中國醫藥研究所碩士論文。
11. 林郁進、陳忠川、葉豐次、邱年永、蔡新聲 1994 臺灣白芨之組織培養I. 種子成熟度及前處理對種子萌芽與小苗發育的影響 中華農學研究 43: 40-50。
12. 林麗如 2005 內填白芨膠之矽膠管對大鼠截斷之坐骨神經再生的影響 中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文。
13. 孫長生、韓見宇、龍祥友 2004 小白芨的組織培養與快速繁殖 植物生理學通訊 40: 453。
14. 孫峰、史勁松、張衛明、顧鞏平、朱昌玲、薛華茂 2009 白芨多糖膠研究進展 食品科學 30(3): 296-298。
15. 張衛明、馬世宏、顧鞏平、史勁松、趙伯濤 2003 白芨多糖膠皮膚毒理學安全性評價研究 中國野生植物資源 22(5): 59-61。
16. 張正、宋珮綺、張芝瑄、陳盈君、林永浩 2006 臺灣白芨種子發育與貯存之研究 植物種苗 8(3): 29-38。

17. 陶剛、朱英、劉作易、毛堂芬 2008 野生黃花白芨的組織快繁及分子鑑定 種子 27(8): 22-24。
18. 曾宋君、黃向力、陳之林、陳建通、段俊 2004 白芨的無菌播種和組織培養研究 中藥材 27(9): 625-627。
19. 趙中振、蕭培根 2006 白芨 p.144-147 當代藥用植物典第一冊 香港賽馬會中藥研究所 香港。
20. 劉光斌、黃忠、黃長干、王文敏 2005 天然植物白芨膠的功能及在化妝品中的應用 日用化學品科學 28(8): 22-24。
21. 劉光斌、黃忠、黃長干、溫余德、彭鶴斌 2007 白芨多糖提取工藝的研究 中國現代應用藥學雜誌 24(4): 289-291。
22. Cai, J. Y., Z. Lin and D. Z. Zhang. 2007. Chemical constituents from *Bletilla ochracea* Schltr. Chem. Res. Chineseu. 23(6): 705-707.
23. Hirano, T., T. Godo, M. Mii and K. Ishikawa. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. Plant Cell Rep. 23: 534-539.
24. Ishikawa, K., K. Harata, M. Mii, A. Sakai, K. Yoshimatsu and K. Shimomura. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. Plant Cell Rep. 16: 754-757.
25. Morita, H., K. Koyama, Y. Sugimoto and J. Kobayashi. 2005. Antimitotic activity and reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by stilbenoids from *Bletilla striata*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 15: 1051-1054.
26. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-479.

The Development, Cultivation and Chemical Constituents in Pseudobulbs of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.¹

Ying-Chun Chen², Tzong-Heui Lee³, Hui-chuan Hung², Cheng Chang⁴,
Long-Zen Chang² and Feng-Ming Wei²

ABSTRACT

Bletilla formosana (Hayata) Schltr., a perennial herb orchid native in Taiwan, produced pseudobulbs as the traditional Chinese medicine. Ten-week-old seeds were sown *in vitro* and the plantlets were subcultured every two months. The plantlets were then transplanted and grown in the greenhouse after 5-6 month culturing. The percentage of flowering was 55.6% and 80.5% in 2008 and 2009, respectively. The diameter of the biggest pseudobulb was 40.1 mm, and the average fresh weight of pseudobulbs in diameter of 25-30 mm was 154.6±5.8 mg. Seven compounds, militarin (**1**), formoside (**2**), gymnoside IX (**3**), benzyl alcohol (**4**), *trans*-coumaric acid methyl ester (**5**), coelonin (**6**), and batatasin III (**7**) were isolated and identified from the pseudobulbs, and among them, formoside is a novel compound.

Key words: *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr., chemical constituent analysis, militarin, formoside

¹Contribution No. 0716 from Taichung DARES, COA.

²Assistant Researcher, Assistant Researcher, Associate Agronomist and Associate researcher, respectively of Taichung DARES, COA.

³Associate Professor of Graduate Institute of Pharmacognosy Science, Taipei Medical University.

⁴Assistant Professor of Department of Horticulture, National Chung Hsing University.