台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 60(2):101–114 (2011)

白芷培植體及飲片歐前胡素之萃取[1]

蕭翌柱[2,4] 鄭統隆[3] 高瑞隆[3] 賴瑞聲[3] 黃嘉新[3]

摘　要

蕭翌柱、鄭統隆、高瑞隆、賴瑞聲、黃嘉新。2011。白芷培植體及飲片歐前胡素之萃取及含量分析。台灣農業研究 60:101–114。

白芷為國人延用已久的傳統藥材，其被廣泛地應用於治療一些症狀，像是鼻炎、鼻息肉以及皮膚病。白芷所含的有效成分主要是呋喃香豆素衍生物，包含有歐前胡素、白當歸素以及白芷素等，由於少有運用組織培養誘導產生白芷微塊莖和綠色癒傷組織等培植體的資料，因此，本研究目的乃探討萃取培植體中歐前胡素的方法。結果顯示，白芷癒傷組織繼代培養於含 WPM 基本鹽類並添加 30 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖和 8.5 $g \cdot L^{-1}$ 洋菜粉的固體培養基中 30 天後之鮮重最高 (25.0 g/瓶)，其次依序為接種在 B-5 (18.6 g/瓶)、1/2 MS (9.7 g/瓶) 和 MS (5.1 g/瓶) 基本鹽類培養基。將白色癒傷組織繼代培養於 $WB_1N_{0.5}$ 培養基 90 天後，誘導綠色癒傷組織生成的比率達到 60.0%。在三種不同的溶劑 (甲醇、去離子水和乙醇) 中，甲醇是最適當的溶劑，其可由每 1 g 的市售白芷根飲片乾燥樣品萃取到 772.3 μg 的歐前胡素。白芷白色癒傷組織以 WPM 培養基繼代培養 3 個月後，其歐前胡素之含量為 32.0 $\mu g \cdot g^{-1}$，但培育 3 個月的白芷微塊莖歐前胡素含量則可達到 83.3 $\mu g \cdot g^{-1}$。本研究顯示能利用白芷微塊莖大量生產歐前胡素及大量繁殖苗株的可行性。

關鍵詞：白芷、培植體、根飲片、歐前胡素。

前　言

白芷始載於距今約 1900 多年前的神農本草經，列為草部中品，爾後歷代諸家醫學典籍皆有著錄，為我國延用已久的傳統藥材之一。白芷味辛性溫，芳香通竅而表汗，能治療眉稜骨痛、頭風侵目淚出、去面部黑氣和斑痕，長肌膚、潤顏色、可作面脂、葉可作浴湯。近年來，隨著經濟發展及養生保健風氣逐漸興起，一些新興的香草、藥草栽培園區多引入作為種原保存及觀賞用植物；另外，白芷根部除了主要的藥材用途外，其嫩葉也能兼作蔬菜或沙拉鮮食 (Pistrick 2002)。

市售白芷藥材多為繖形科 (Umbelliferae) 獨活屬植物白芷 (*Angelica dahurica* Benth. et Hook.) 的乾燥根，其另有川白芷 (*A. anomala* Lallen) 以及台灣 (杭) 白芷 [*A. dahurica* Benth. et Hook. var. *formosana* (Boiss.) Yen] 等近緣植

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2516 號。接受日期：100 年 5 月 16 日。
2. 本所作物種原組助理研究員。台灣 台中市。
3. 本所生物技術組副研究員、助理研究員、助理研究員、助理研究員。台灣 台中市。
4. 通訊作者，電子郵件：yjshiau@tari.gov.tw；傳真機：(04)23331705。

物 (Yen 1980; Chiu & Chang 1995)。近代研究發現白芷複方製品具有嫩白皮膚的良好效果 (Su *et al.* 1994)，如應用於製造高價美白化妝品應具有經濟價值，然因自然原生地持續不斷受到人為開發與破壞，加上種原頻遭採擷，致使此一藥用植物野生族群已有日益減少趨勢，在貨源不繼下，不肖商家常以粗糙獨活 (*Heracleum scabridum* Franch) 偽品混充販售 (Zeng *et al.* 2001)，更突顯珍貴種原保存的重要。

目前，雖有學者選用同屬植物大和當歸 (*A. acutiloba*) 和中國當歸 (*A. sinensis*) 之莖頂、腋芽及體胚等進行離體培養研究 (Watanabe *et al.* 1998; Tsay & Huang 1998)，或是探討細胞懸浮培養量產歐前胡素 (imperatorin) 的技術 (Chang 1991)，但是，迄今尚未有運用組織培養誘導產生白芷微塊莖和綠色癒傷組織並分析其歐前胡素含量報導。因此，本研究將取市售不同根徑的白芷飲片為材料，探討萃取歐前胡素最適當的溶劑種類及方法，再據此應用高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 分析比較市售飲片以及誘導生成之微塊莖與癒傷組織培植體之歐前胡素含量。

材料與方法

材料來源

本試驗使用之市售白芷飲片係於民國 97 年 11 月購自台中市信譽良好的中藥進口商，其原產地來自中國大陸四川省。將原包裝啟封後，依飲片直徑大小檢選分類並個別進行萃取及分析。用於誘導微塊莖和綠色癒傷組織之白芷莖頂材料，則取自農試所田區試種觀察，並經選拔出生長勢強健且根系粗大的種苗。

培植體的消毒及預培養

白芷植株以自來水沖洗乾淨後，用 12 號解剖刀片自莖葉著生處之短縮莖，依序由外向內環刻去除 2–3 層葉鞘，再切取腋芽及長度約 2–3 cm 的頂芽進行外部消毒。亦即取前述材料依序經 70%酒精浸漬 15 秒，再以 0.5%次氯酸鈉水溶液震盪消毒5 分鐘，再仿照Pedersen & Brandt (1992) 的方法，在無菌操作台上用解剖刀環切去除 1–2 層包覆在芽體外之幼嫩葉鞘、葉柄和葉片，並取得長度約為 5 mm 之莖頂組織進行培養以促進微塊莖的發育。腋芽及莖頂培植體使用的培養基含有 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類，另添加 1 $mg \cdot L^{-1}$ BA、0.5 $mg \cdot L^{-1}$ NAA、30 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖及 8.5 $g \cdot L^{-1}$ 洋菜粉，pH 值為 5.7。誘導幼嫩葉鞘和葉柄生成白色癒合組織之初代培養基，則採用學者發表的配方，即含有 MS 基本鹽類、1 $mg \cdot L^{-1}$ 2,4-D、0.5 $mg \cdot L^{-1}$ kinetin、30 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖及 8.5 $g \cdot L^{-1}$ 洋菜粉，pH 值為 5.7 (Chang *et al.* 1993)。

培養基調配完成後在添加凝膠物質前，先以 1 N NaOH 或 0.5 N HCl 調整培養基 pH 值；另外，培養基以玻璃瓶分裝後，先以雙層鋁箔紙密封瓶口並置入殺菌釜內以溫度 121℃、壓力 1.05 $kg \cdot cm^{-2}$ 滅菌 15 分鐘，再取出放冷備用。各項試驗均置於溫度 24℃、光照 12 小時、光量為 100 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 及光波長為 350–800 nm 環境下進行培養，且經過預培養後，未受微生物污染之培植體，即可作為試驗用材料。

白芷白色癒傷組織繼代培養及綠色癒傷組織之誘導試驗

不同鹽類培養基對於白色癒傷組織繼代培養之影響：選取白芷幼嫩葉柄再接種於誘導產生白色癒傷組織之固體培養基，取此種白色癒傷組織作為供試材料並繼代培養於僅含有 MS、1/2 MS、WPM (Lloyd & McCown 1980) 和 B-5 (Gamborg *et al.* 1968) 基本鹽類並添加 30 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖和 8.5 $g \cdot L^{-1}$ 洋菜粉的固體培養基中 30 天，再調查白色癒傷組織生長情形。每一處理重複 3 次，每次各接種 500 mL 容量之蘭花瓶 5 瓶，每瓶含 100 mL 培養基並接種 1.5 g 供試材料。

含 BA 和不同濃度 NAA 培養基對於誘導白芷生成綠色癒傷組織之影響：取前項繼代培

養生長最佳的白色癒傷組織，分別接種於含有 WPM 基本鹽類另添加 30 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖、8.5 $g \cdot L^{-1}$ 洋菜粉、1 $mg \cdot L^{-1}$ BA 和不同濃度 NAA (0.5, 1, 2, 4, 8 $mg \cdot L^{-1}$) 的固體培養基中，各處理組代號分別為 WPM (對照組)、$WB_1N_{0.5}$、WB_1N_1、WB_1N_2、WB_1N_4 和 WB_1N_8。培植體在各培養基中培養 90 天後，調查綠色癒傷組織生成情形。每一處理重複 3 次，每次各接種 500 mL 容量之蘭花瓶 5 瓶，每瓶含 100 mL 培養基並接種 1.5 g 材料。

白芷歐前胡素萃取及定量

不同溶劑對於歐前胡素萃取量之影響：試驗係將市售白芷飲片區分為 A (2.5 cm 以上)、B (1.5–2.5 cm) 和 C (0.8–1.5 cm) 三組後，個別置於不鏽鋼盤並放入恆溫 50℃的烘箱內烘乾，再秤重並磨粉。進行指標成分萃取時，每一樣品的用量為 0.2 g；樣品依試驗需要，分別以 20 mL 的去離子水、甲醇 (99.9%, Mallinckrodt Chemical Ltd., USA) 或乙醇 (95%, Taiwan Sugar Corporation, Taiwan) 作為供試溶劑，經充分與樣品粉末混合後，用超音波震盪器 (Elma® D-78224, Germany) 加以震盪，同時配合隔水加熱 (恆溫 50℃) 1 小時，使材料內含成分完全釋出。粗萃溶液先經離心機 (Hermle Z-383K, Germany) 在 15℃低溫下高速離心 (9000 rpm) 10 分鐘以取得第一次萃取之上清液。第一次萃取後殘留的藥渣，則再加入 10 mL 的去離子水、甲醇或乙醇進行第二次萃取；最後，合併所有的上清液並以高速離心機 (Savant™ SC-110, USA) 配合真空濃縮機 (Savant™ RVT-110, USA) 濃縮 1.5 小時，再用 95%乙醇定量到 5 mL，再經 0.22 μm 微孔膜 (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland) 過濾後，即可進行 HPLC 檢測和分析。

本試驗使用之 HPLC 包括分離模組 (Waters 2695 HPLC separation module, USA)、光電矩陣檢測器 (Waters 2996 Photodiode Array Detector, USA) 以及自動樣品注入器。固定相 (stationary phase) 使用 Symmetry® C18 層析管柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Ireland) 並且層析管柱溫控裝置的設定溫度為 30 ℃；移動相 (mobile phase) 為 0.01%三氟乙酸 (TFA) 及乙腈 (ACN) (40 : 60, v/v) 之混合溶液；儀器檢測時之移動相流速設定為 1 $mL \cdot min^{-1}$；所有供試樣本和標準品溶液在光電矩陣檢測器以 295 nm 光波長進行檢測前，皆以 0.22 μm 過濾膜先濾除雜質，再以每次 30 μL 的注射量進行含量分析。此外，本試驗使用 ChromaDex™ imperatorin 標準品 (ASB-00009070-005, China) 並以 100%甲醇溶解後，再配製成 0.1、1、10、20、80 和 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 的標準濃度，以繪製標準檢量線及層析光譜。

不同乾燥法對於歐前胡素萃取量的影響：白芷苗株莖基部培植體培養在 500 mL 玻璃蘭花瓶約 60 天，其基部可形成微塊莖，每次秤取 8 g 微塊莖作為材料進行乾燥試驗及分析，並調查各處理組培植體之鮮/乾重比值以及歐前胡素含量的差異。萃取流程如前項說明，惟供試材料除烘乾法 (以 40℃熱風乾燥 48 小時) 外，另採用冷凍乾燥機 (FD-25B3P8，宏誠，台灣) 進行真空冷凍乾燥，以比較不同乾燥方式對於歐前胡素萃取量的影響，使用的 8 段式冷凍乾燥溫度及時間依序為-20℃ (0.5 小時)、-10℃ (1 小時)、-5℃ (1.5 小時)、4℃ (2 小時)、12℃ (5 小時)、18℃ (5 小時)、22℃ (5 小時) 及 26℃ (48 小時)。乾燥後之各供試樣本分別再經磨粉及秤重取樣，並選擇乙醇作為溶劑，最後仍如前述方法取上清液進行 HPLC 分析。

白芷培植體歐前胡素之定量分析

取白芷苗株莖基部發育產生的微塊莖 (培養期 3 個月)、白色癒傷組織 (培養 1 個月及 3 個月) 與綠色癒傷組織 (培養 1 個月及 3 個月) 等材料，依照前項試驗所得最佳條件，個別進行指標成分歐前胡素之萃取及定量分析。

試驗統計分析

以上試驗每一處理皆重複 3 次，獲得的資料計算各處理之算術平均值及其標準機差 (standard error, SE)，並以 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 統計軟體進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 後，在 5%顯著性水準下以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test, LSD test) 檢定各處理間差異的顯著性。

結　果

不同鹽類培養基對於白色癒傷組織繼代培養之影響

白芷癒傷組織分別繼代培養於含有 MS、1/2 MS、WPM 和 B-5 基本鹽類並添加 30 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖和 8.5 $g \cdot L^{-1}$ 洋菜粉的固體培養基 30 天後，以繼代於 WPM 基本鹽類培養基之白色癒傷組織不但質地鬆軟且體積大於其他處理組，平均鮮重也由原本的每瓶 1.5 g 增加為 (25.0 ± 1.4) g (表 1)，顯著高於接種於 MS (5.1 ± 0.6) g、1/2 MS (9.7 ± 0.4) g 和 B-5 (18.6 ± 1.0) g 基本鹽類之處理組，以 MS 和 1/2 MS 固體培養基培育的癒傷組織呈淡黃色，質地較硬脆且體積小於以 WPM 固體培養基培育者；此外，調查癒傷組織平均乾物重及鮮重/乾重比值，也以培養於 WPM 基本鹽類培養之癒傷組織最高，分別為 0.6 g 和 42.8。

含 BA 和不同濃度 NAA 培養基對於誘導白芷生成綠色癒傷組織之影響

將白色癒傷組織接種於 WPM (對照組)、$WB_1N_{0.5}$、WB_1N_1、WB_1N_2、WB_1N_4 和 WB_1N_8 之培養基 90 天後，誘導綠色癒傷組織生成的比率，係以 $WB_1N_{0.5}$ 處理組最高 (60.0 ± 9.4)%，對照組和 WB_1N_8 處理組則無綠色癒傷組織生成 (表 2)；WB_1N_4 處理組癒傷組織的平均鮮重 (33.3 ± 2.1) g 及鮮/乾重比值 (30.9 ± 1.9) 皆顯著高於對照組之平均鮮重 (26.4 ± 0.5) g 及鮮/乾重比值 (25.0 ± 1.3)；至於比較各處理組之間癒傷組織的平均乾重並無顯著差異。

不同溶劑對於歐前胡素萃取量之影響

市售白芷飲片依根徑區分為 A (2.5 cm 以上)、B (1.5–2.5 cm) 和 C (0.8–1.5 cm) 三組 (圖 1) 並比對 HPLC 標準檢量線 (圖 2) 以檢測其歐前胡素含量，結果以去離子水作為溶劑時，自 B、C 兩組萃取之指標成分含量分別為 (30.3 ± 2.1) $\mu g \cdot g^{-1}$ 與 (29.0 ± 3.1) $\mu g \cdot g^{-1}$，這些數值雖略高於 A 組之 (22.3 ± 2.4) $\mu g \cdot g^{-1}$ (表 3)，但比較後並無顯著差異；若以甲醇或乙醇作為溶劑時，則各組所萃取出來的指標成分數量仍是以

表 1. 不同鹽類培養基對於白芷癒傷組織繼代培養之影響

Table 1. Effect of different basal salt media on growth of callus of *Angelica dahurica* [z]

Basal salts media	Fresh weight/flask (g)	Dry weight/flask (g)	Fresh weigh/dry weight ratio
MS	5.1 ± 0.6 d [y]	0.3 ± 0.1 c	19.6 ± 2.4 b
1/2 MS	9.7 ± 0.4 c	0.4 ± 0.1 bc	22.4 ± 1.7 b
WPM	25.0 ± 1.4 a	0.6 ± 0.0 a	42.8 ± 1.9 a
B-5	18.6 ± 1.0 b	0.5 ± 0.1 ab	39.8 ± 1.0 a

[z] Data is mean and statistical analysis of three replications, each replication with 5 flasks per treatment. Callus (1.5 g fresh weight) was inoculated in each 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL solid media and incubated at 24℃ under 100 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ photosynthetic photon flux density for 30 days. Each basal salt medium (MS, 1/2MS, WPM and B-5) contained 30 $g \cdot L^{-1}$ sucrose and 8.5 $g \cdot L^{-1}$ Difco agar. The pH value is 5.7 for all the four media.

[y] Data presented are mean ± standard error (n = 3). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. BA 和不同濃度 NAA 對於白芷白色癒傷組織誘導綠色癒傷組織之影響

Table 2. Effect of BA and different NAA concentrations on production of green callus from white callus of *Angelica dahurica* [z]

BA ($mg \cdot L^{-1}$)	NAA ($mg \cdot L^{-1}$)	Green callus induction rate (%)	Average fresh weight per flask (g)	Average dry weight per flask (g)	Fresh weigh/dry weight index
0	0	0.0 ± 0.0 c [y]	26.4 ± 0.5 b	1.1 ± 0.1 a	25.0 ± 1.3 b
1	0.5	60.0 ± 9.4 a	31.1 ± 1.0 ab	1.1 ± 0.1 a	27.6 ± 1.0 ab
1	1	53.3 ± 5.4 a	31.9 ± 0.8 ab	1.1 ± 0.1 a	28.4 ± 1.3 ab
1	2	26.7 ± 5.4 b	30.2 ± 1.5 ab	1.0 ± 0.1 a	29.3 ± 0.6 ab
1	4	13.3 ± 5.4 bc	33.3 ± 2.1 a	1.1 ± 0.1 a	30.9 ± 1.9 a
1	8	0.0 ± 0.0 c	31.5 ± 2.8 ab	1.1 ± 0.1 a	29.9 ± 1.6 ab

[z] Data is mean and statistical analysis of three replications, each replication with 5 flasks per treatment. Callus (1.5 g fresh weight) was inoculated in each 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL solid media and incubated at 24℃ under 100 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ photosynthetic photon flux density for 90 days. The culture medium contained WPM basal salts, 30 $g \cdot L^{-1}$ sucrose, 8.5 $g \cdot L^{-1}$ Difco agar and different concentrations of plant growth regulators (BA and NAA), pH = 5.7.

[y] Data presented are mean ± standard error (n = 3). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.



圖 1.中藥房之白芷不同根徑乾燥飲片(A–C)。 (A) 2.5 cm 以上； (B) 1.5–2.5 cm； (C) 0.8–1.5 cm。 (比例尺 = 3.7 cm)

Fig. 1. Dry root slices of *Angelica dahurica* from a drug sror showing differences in root diameter (A–C). (A) above 2.5 cm; (B) 1.5–2.5 cm; and (C) 0.8–1.5 cm. (Scale bar = 3.7 cm)

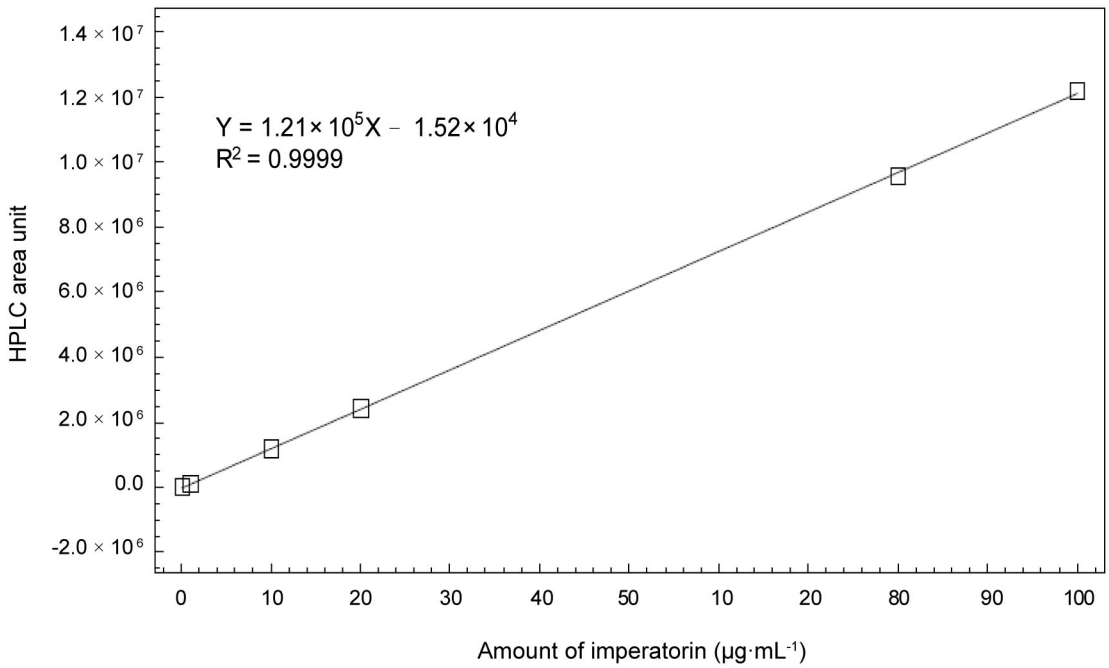


圖 2. 歐前胡素之高效液相層析儀 (HPLC) 標準檢量線 (標準溶液濃度：0.1、1、10、20、80 和 100 μg·mL^{-1})。

Fig. 2. The high performance liquid chromatography (HPLC) standard calibration curve of imperatorin (standard concentrations: 0.1, 1, 10, 20, 80 and 100 μg·mL^{-1}).

表 3. 不同溶劑對市售白芷飲片歐前胡素萃取量之影響

Table 3. Effect of different solvents on imperatorin extracted quantity of market *Angelica dahurica* slices [z]

	Solvents		
Slice specifications	Deionized water (μg·g^{-1})	Methanol (μg·g^{-1})	Ethanol (μg·g^{-1})
A [y]	22.3 ± 2.4 a [x]	581.3 ± 49.1 b	521.0 ± 38.3 a
B	30.3 ± 2.1 a	696.0 ± 34.8 ab	526.0 ± 23.7 a
C	29.0 ± 3.1 a	772.3 ± 21.3 a	585.5 ± 28.5 a

[z] Data is mean and statistical analysis of three replications, each replication with 0.2 g dry weight and 20 mL solvent for extracting the imperatorin composition per treatment.
[y] Diameter of root slices, A: above 2.5 cm; B: 1.5–2.5 cm; C: 0.8–1.5 cm.
[x] Data presented are mean ± standard error (n = 3). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

C 組最高、其次為 B 組；A 組樣本不論採用甲醇或乙醇進行萃取，其歐前胡素含量均比 B、C 二組低，分別為 (581.3 ± 49.1) μg·g^{-1} 及 (521.0 ± 38.3) μg·g^{-1}。另外，若以 C 組樣本為例，比較三種不同溶劑對於白芷飲片歐前胡素之萃取量，則甲醇溶劑可自乾燥白芷樣本，萃取出最高 (772.3 ± 21.3) μg·g^{-1} 的指標成分，如使用乙醇溶劑則為 (585.5 ± 28.5) μg·g^{-1}，若以去離子水作為溶劑之歐前胡素萃取量最低 (表 3、圖 3)。

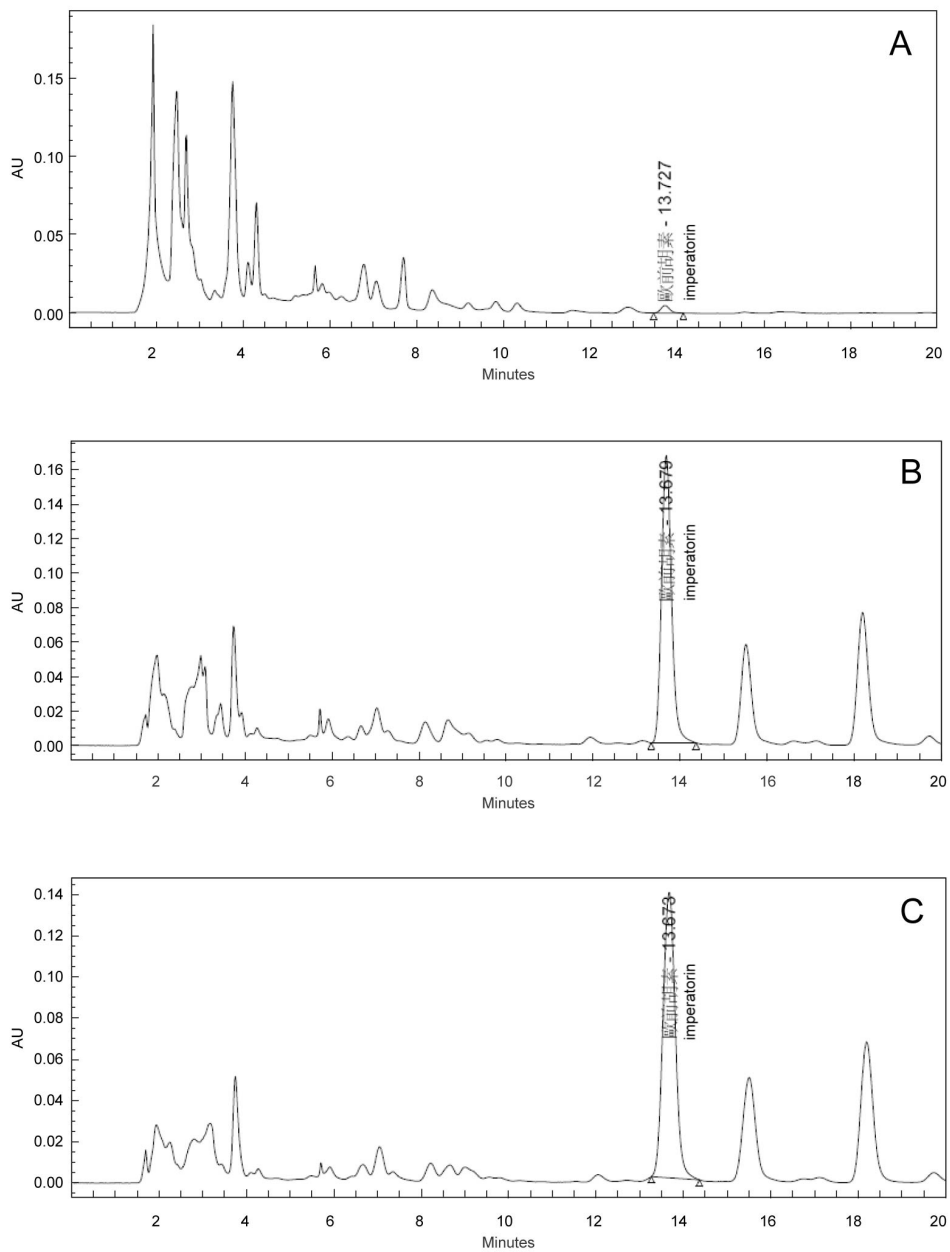


圖 3. 以不同溶劑萃取市售白芷飲片 (根徑 0.8–1.5 cm) 歐前胡素之 HPLC 層析光譜圖。(A) 去離子水；(B) 甲醇；(C) 乙醇。

Fig. 3. The HPLC chromatograms of imperatorin extracted contents of market *Angelica dahurica* slices (root slices diameter from 0.8–1.5 cm) throug various solvents. (A) deionized water; (B) methanol; (C) ethanol.

不同乾燥法對於歐前胡素萃取量的影響

在 500 mL 玻璃蘭花瓶培養 60 天的白芷微塊莖，其採用烘乾方式得到的樣本鮮/乾重比值為 10.3 ± 1.0 (圖 4)；採用冷凍乾燥法之樣本鮮/乾重比值則為 10.5 ± 0.2，二者並無顯著差異；若再比較不同乾燥方法對於歐前胡素萃取量的差異得知，白芷樣本不論採用烘乾方式或冷凍乾燥法後之歐前胡素萃取量，仍分別為 (386.7 ± 102.8) μg·g^{-1} 和 (393.8 ± 3.8) μg·g^{-1}，二者經比較並無顯著差異。

白芷培植體歐前胡素之定量分析

取 WPM 培養基繼代培養 1 個月及 3 個月後之白芷白色癒傷組織 (圖 5)，經烘乾並檢測其歐前胡素含量依序為 (2.5 ± 2.0) μg·g^{-1} 和 (32.0 ± 2.2) μg·g^{-1} (圖 6)；另取綠色癒傷組織作為檢測對象，則不論培養期是 1 個月或是 3 個月，其歐前胡素含量皆未被檢出；若檢測白芷微塊莖 (圖 7) 的歐前胡素含量，則最高可達到 (83.3 ± 21.6) μg·g^{-1}。

討　論

在植物組織培養過程中，常在培養基內加入不同種類和濃度的生長調節劑，以促進培植體之生長與分化，其中又以添加如 NAA 及 2,4-D 等植物生長素 (auxin) 並配合 BA 或 kinetin 等細胞分裂素 (cytokinin) 較為普遍，例如，將大和當歸 (*A. acutiloba*) 莖頂及腋芽培養於含有 0.1 mg·L^{-1} kinetin 及 0.01 mg·L^{-1} NAA 之 MS 培養基 8 週，可以誘導不定芽萌生；若切取高約 3 cm 芽體並繼代培養於添加 0.5 mg·L^{-1} IAA 的 MS 培養基，則能促進不定根的形成 (Watanabe *et al.* 1998)。在培養基中添加 4 mg·L^{-1} BA 及 0.5 mg·L^{-1} NAA 或是單獨添加 0.01 mg·L^{-1} TDZ，也有促進彩虹鳥蕉莖頂培植體萌生新芽的作用 (Shiau 1999)。在誘導甘蔗培植體萌生不定芽的試驗，則以添加 1 mg·L^{-1} BA、1 mg·L^{-1} kinetin 及 0.5 mg·L^{-1} NAA 之 MS 培養基效果最佳，且學者認為此種配方優於其他處理組的主要原因，可能與 cytokinin 和 auxin 的濃度及比例維持平衡有關 (Ramanand *et al.* 2006)，此一論點也與早期的研究結果相似，亦即 cytokinin 和 auxin 間含量的相對比值較高時，可促進新梢的生長，當相對比值較低時，則有利於根系形成，如果二者含量約略相等，則促進癒合組織的生長 (Miller & Skoog 1953; Skoog & Tsui 1948)。

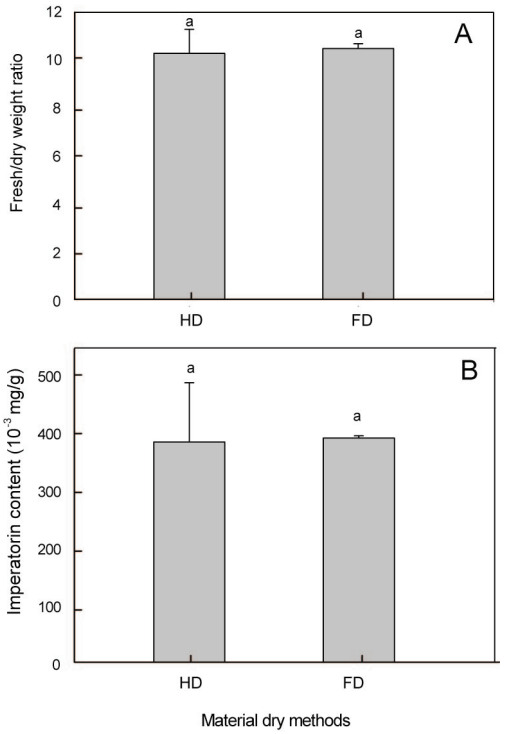


圖 4. 乾燥方法對於白芷微塊莖鮮/乾重比值 (A) 及歐前胡素含量 (B) 之影響。 HD：在 40 ℃溫度下烘乾 48 hr；FD：依序以-20℃ (0.5 h)、-10℃ (1 h)、-5℃ (1.5 h)、4 ℃ (2 h)、12℃ (5 h)、18℃ (5 h)、22℃ (5 h) 和 26℃ (48 h) 冷凍乾燥。試驗計算平均值和標準機差 (n = 3)。

Fig. 4. Effect of drying methods on fresh/dry weight ratios (A) and imperatorin contents (B) of *Angelica dahurica* microtubers. HD: heat dried at 40℃ for 48 hr; FD: freeze dried at -20℃ (0.5 h), -10℃ (1 h), -5℃ (1.5 h), 4℃ (2 h), 12℃ (5 h), 18℃ (5 h), 22℃ (5 h), 26℃ (48 h), respectively. Vertical bars indicate standard error (n = 3).

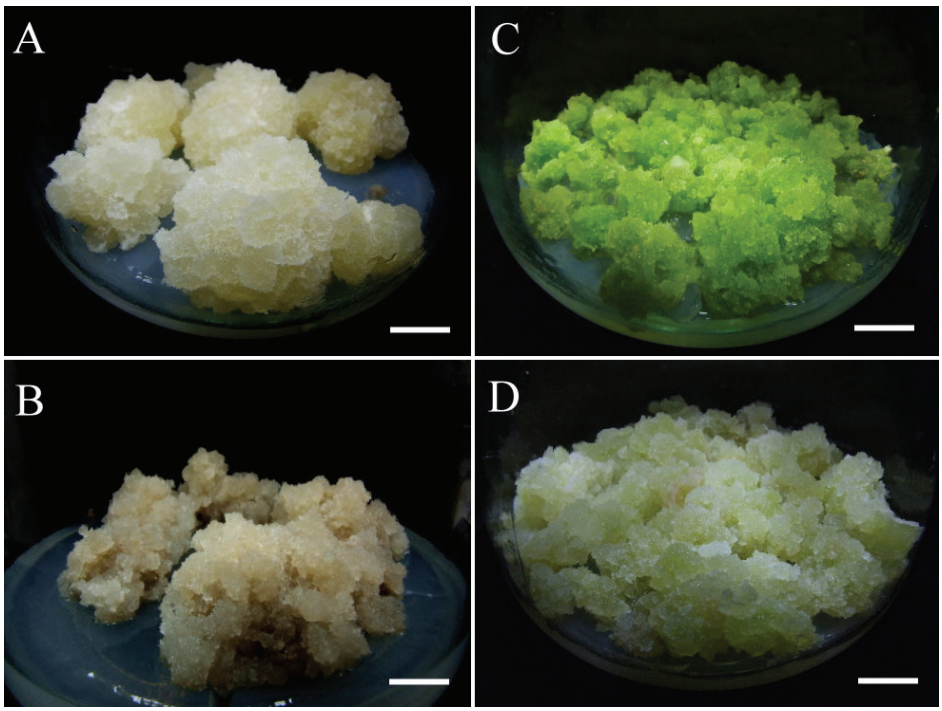


圖 5. 在 WPM 基本鹽類培養基培育 1 個月 (A、C) 以及在 WPM 基本鹽類配合 1 mg·L^{-1} BA 與 0.5 mg·L^{-1} NAA 培養基培育 3 個月 (B、D) 之白芷癒傷組織。(A) 培養 1 個月的白色癒傷組織 (比例尺 = 1.5 cm)；(B) 培養 3 個月的白色癒傷組織 (比例尺 = 1.2 cm)；(C) 培養 1 個月的綠色癒傷組織 (比例尺 = 1.4 cm)；(D) 培養 3 個月的綠色癒傷組織 (比例尺 = 1.4 cm)。

Fig. 5. Callus of *Angelica dahurica* cultured for 1 month (A, C) on WPM medium and 3 months (B, D) on the combincation of WPM basal salts, 1 mg·L^{-1} BA and 0.5 mg·L^{-1} NAA medium. (A) 1-month-old white callus (scale bar = 1.5 cm); (B) 3-month-old white callus (scale bar = 1.2 cm); (C) 1-month-old green callus (scale bar = 1.4 cm); and (D) 3-month-old green callus (scale bar = 1.4 cm).

本研究預備試驗結果則顯示 (圖表未提供)，使用 MS 基本鹽類並添加 1 mg·L^{-1} BA 及 0.5 mg·L^{-1} NAA 培養基，不但能誘導白芷微塊莖生成，且培植體伴隨產生的癒傷組織也較少，因此，可作為誘導白芷微塊莖生成的適當配方。

若探討含 MS、1/2 MS、WPM 和 B-5 等不同鹽類配方培養基對於白芷癒傷組織繼代培養的影響，則以 WPM 基本鹽類配方較佳且適合白芷癒傷組織的繼代培養 (表 1)。文獻報導指出，在培養 *Dendrobium phalaeopsis* 莖頂時，培養基中的氨鹽基 (NH_4^+) 比硝酸鹽基 (NO_3^-) 更能促進新芽培植體的生長 (Gandawidaja 1980)；De-Eknamkul (1985a) 也認為，*Anchusa officinalis* 進行癒合組織懸浮培養時，如果將 B-5 培養基中的 NO_3^- 含量由原本的 24.7 mM (1533.1 mg·L^{-1}) 降低為 15 mM (930 mg·L^{-1})，可使細胞生長更為良好。檢視 MS、WPM 和 B-5 三種基本鹽類配方，以 MS 培養基之 NH_4NO_3 與 KNO_3 各含 1650 mg·L^{-1} 和 1900 mg·L^{-1} 最高，換算 NH_4^+ 與 NO_3^- 含量分別為 371.3 mg·L^{-1} 及 2664.8 mg·L^{-1}，濃度比則為 1 : 7.2；WPM 培養基配方的氮源來自於 NH_4NO_3 (400 mg·L^{-1}) 與 $Ca(NO_3)_2$·$4H_2O$ (556 mg·L^{-1}) 二種化學藥品，換算 NH_4^+ 與 NO_3^- 含量分別為 90 mg·L^{-1} 及 615.8 mg·L^{-1}，

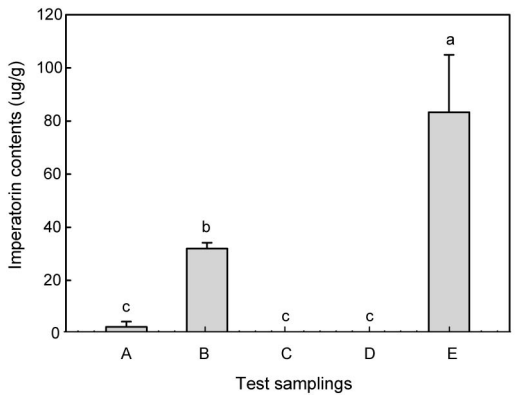


圖 6. 白芷癒傷組織及微塊莖之歐前胡素含量。(A) 培養 1 個月的白色癒傷組織；(B) 培養 3 個月的白色癒傷組織；(C) 培養 1 個月的綠色癒傷組織；(D) 培養 3 個月的綠色癒傷組織;(E) 培養 3 個月的微塊莖。試驗計算平均值和標準機差 (n = 3)。

Fig. 6. Contents of imperatorin in callus (A-D) and microtuber (E) of *Angelica dahurica*. (A) 1-month-old white callus; (B) 3-month-old white callus; (C) 1-month-old green callus; (D) 3-month-old green callus; (E) 3-month-old microtuber. Vertical bars indicate standard error (n = 3).



圖 7. 培養 3 個月之白芷微塊莖外觀。(比例尺 = 0.5 cm)

Fig. 7. The appearance of a 3-month-old microtuber of *Angelica dahurica*. (scale bar = 0.5 cm)

濃度比約為 1：6.8；至於 B-5 培養基氮源配方 KNO_3 的含量高達 2500 mg·L^{-1}，$(NH_4)_2SO_4$ 的含量僅有 134 mg·L^{-1}，換算 NH_4^+與 NO_3^-含量分別為 36.6 mg·L^{-1} 及 1519.6 mg·L^{-1}，濃度比約為 1 ： 41.6。據試驗結果顯示 (表 1)，使用 WPM 基本鹽類配方比 MS、1/2 MS 或 B-5 更適宜白芷癒傷組織生成，其原因除了添加的植物生長調節劑調控作用外，應與培養基中具有較低的 NO_3^-含量和適當的 NH_4^+與 NO_3^-濃度比值有關。此外，葉綠素的化學結構係由紫質 (porphyrin) 及葉綠素醇 (phytol) 所組成，紫質因為是由四個含氮的吡咯環 (pyrrole rings) 形成環狀結構，因此，培養基中的適當的氮源濃度以及植物生長調節劑的存在，也可能影響葉綠素的生合成，本研究之培養基中添加 1 mg·L^{-1} BA 及 0.5–1 mg·L^{-1} NAA，也顯示有助於誘導白色癒傷組織轉變成綠色癒傷組織 (表 2)。

現代藥理證明，白芷根為中樞興奮藥及鎮痛、治風要藥，用於流行性感冒及產前產後之頭痛有卓效；對於齒痛、顏面神經痛、眉稜骨痛及便血等症狀有緩解功效；白芷及其他獨活屬植物所含的有效成分，主要是呋喃香豆素衍生物 (furo-coumarin derivatives)，例如，具有抗菌及治療白癜風與銀屑病效果良好的歐前胡素，以及白當歸素 (angelical)、白芷素 (byak-angelicin)、白芷酸 (angelic acid)、繖形花內酯 (umbelliferone) 及香檸檬油素 (bergaptene) 等成分 (Ken 1970; Yen 1980)。目前，由川白芷和台灣白芷植株葉柄部位能夠誘導產生癒合組織，若以細胞懸浮培養仍能檢測到歐前胡素的存在 (Chang 1998)；為探討市售白芷飲片的歐前胡素含量並藉以修正檢測流程和分析方法，本試驗自市售品中依根直徑之不同，將其區分成 3 組再分別採用去離子水、甲

醇和乙醇作為溶劑以評估萃取歐前胡素的效能，結果發現，根徑大小與歐前胡素含量似成反比關係 (表 3)，如果進一步分析不同來源的白芷材料 (市售品、微塊莖和癒傷組織)，則市售品的歐前胡素含量 (772.3 ± 21.3) μg·g^{-1} 仍高於培養 3 個月之微塊莖 (83.3 ± 21.6) μg·g^{-1} 或白色癒傷組織 (32.0 ± 2.2) μg·g^{-1} (表 3、圖 6)。Wang *et al.* (2007) 曾收集中國大陸 21 個不同地區的市售白芷藥材進行成分的鑑別與分析，在所有樣品中歐前胡素含量最高者為 1889.3 μg·g^{-1}，最低值則為 479.8 μg·g^{-1}，約有近半數地區的樣品其歐前胡素含量介於 600–900 μg·g^{-1}，也與本試驗檢測所用的市售品含量相近 (表 3)。Chang (1991) 則研究台灣白芷細胞懸浮培養以量產歐前胡素的技術，並分析比較市場品杭白芷 (667.3 μg·g^{-1})、野生台灣白芷根 (234.8 μg·g^{-1})、莖葉 (11.8 μg·g^{-1}) 和懸浮細胞 (8.2 μg·g^{-1}) 歐前胡素的含量；本試驗結果則發現，白芷微塊莖的歐前胡素含量顯著高於白色癒傷組織 (圖 6)，因此，若取微塊莖為材料，不但能以繼代培養方式生產歐前胡素，另一方面也可用於誘導產生優良苗株專供田間栽培販售，此應是一項值得參考的藥材量產策略。

以 WPM 固體培養基培養 3 個月後的白芷白色癒傷組織已呈現老化與褐化現象 (圖 5)，但是，分析其歐前胡素含量 (32.0 ± 2.2 μg·g^{-1}) 仍顯著高於培養 1 個月者 (2.5 ± 2.0 μg·g^{-1}) (圖 6)，此也符合在老化懸浮細胞中累積有較高量歐前胡素的論點 (Chang 1991)；至於，繼代培養在含有 WPM 基本鹽類並添加 1 mg·L^{-1} BA 及 0.5 mg·L^{-1} NAA 培養基 1 和 3 個月的綠色癒傷組織無法產生歐前胡素的原因，可能與植物生長調節劑之存在或是氮源的競爭有關，例如，以 0.1 mg·L^{-1} 低濃度的 NAA 取代原培養基中的 2,4-D，可大幅提升金雞納樹 (*Cinchona ledgeriana*) 緊實球狀組織 (Compact globular structures, CGS) 產生較多的 quinoline 生物鹼 (Hoekstra *et al.* 1990)；在藥用牛舌草 (*Anchusa officinalis*) 細胞懸浮培養的培養基中添加 1 mg·L^{-1} NAA 不但有助於細胞的生長並且能增加 rosmarinic acid 的生成量，若是添加 BA 或 kinetin 則無類似的效果 (De-Eknamkulc & Ellis 1985b)；Fujita *et al.* (1981) 曾研究改良硬紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) 細胞懸浮培養之培養基配方並探討外加植物生長調節劑對紫草素 (shikonin) 產量的影響，結果發現 NH_4^+的存在會抑制紫草素的形成，若是培養基中以 6.7 mM 的 NO_3^- (415.4 mg·L^{-1}) 作為培植體唯一的氮源時，則可以獲得較多量的紫草素；報導同時也指出，培養液添加 10^{-5} M kinetin 會阻礙紫草素的生合成，若是含有 10^{-6} M 吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)，則可提高紫草素的產量。Yazaki *et al.* (1987) 進一步試驗發現，紫草素的生合成並非受到 NH_4^+的影響，而是因麩氨醯氨 (glutamine) 的過度累積；對一般的植物體而言，NH_4^+可由固氮作用或自土壤中吸收取得，但 NH_4^+濃度太高不只抑制雙氮酶的作用，也會影響細胞能量的代謝並產生毒害，因此，植物體會迅速同化 NH_4^+，而其初級產物即是 glutamine；儘管 glutamine 影響紫草素生合成的機制尚不清楚，但是，本試驗之白芷白色癒傷組織，繼代培養於不添加生長調節劑但含有 NH_4^+ (90 mg·L^{-1}) 的 WPM 培養基中 3 個月，仍能累積 (32.0 ± 2.2) μg·g^{-1} 的歐前胡素 (圖 6)，故推測 glutamine 的存在應有利於歐前胡素的生合成；而白色癒合組織在轉變成為綠色癒合組織後，減低歐前胡素的生合成，其原因可能是在光照環境下，癒合組織細胞受到植物生長調節劑調控的影響，活化內部 δ-aminolevulinic acid dehydrase (ALA dehydrase) 或是 ALA synthetase 等酵素並促進 ALA 的生合成，而 ALA 即為合成葉綠素的前軀物質，上述物質的生合成會轉移和消耗培養基中的氮源，或許因此降低歐前胡素的生成量。

另外，表 3 和圖 3 試驗結果也顯示，甲醇雖是萃取歐前胡素頗具效能的溶劑，卻也是一種容易引起肝臟中毒的化學藥品，考量一般民間日常使用含有白芷的複方藥材，大多僅以清水煎煮藥液，因此，為求符合實際應用現況並期望研究成果能提供國人參考，本試驗仍選用乙醇進行白芷歐前胡素之萃取與分析；實驗數據也證明選用純水煎煮白芷飲片並不容易提取指標成分，故建議國人在煎煮含白芷的湯藥時，能酌量添加食用級乙醇或日常使用的米酒，對於提高藥材療效可能較有助益。

誌　謝

本試驗承農委會主管科技計畫經費補助 (98 農科-5.3.3-農-C1)，特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

Chang, W. D. 1991. Studies on Tissue Culture of *Angelica dahurica* var. *formosana*. Master thesis. China Medical University. Taichung. 77 pp. (in Chinese)

Chang, W. D. 1998. I. Studies on the Production of Secondary Metabolites by Tissue Cultures of Cryptocarya chinensis, Angelica dahurica and Lycium barbarum. II. Study on the Chemical Constituents of Suriana maritima. Ph. D. Dissertation, National Taiwan University, Taipei. 265 pp. (in Chinese)

Chang, W. D., C. C. Chen, Y. S. Chang, and H. S. Tsay. 1993. Studies on tissue culture of *Angelica dahurica* var. *formosana*. I. Callus induction and medium evaluation. Jour. Agric. Res. China. 42:253–264. (in Chinese with English abstract)

Chiu, N. Y. and K. H. Chang. 1995. Tai-wan pai-chih. p.149–150. *in:* The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan (3). (Chiu, N. Y. and K. H. Chang, eds.) Southern Materials Center Inc., Taiwan. (in Chinese)

De-Eknamkul, W. and B. E. Ellis. 1985a. Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Rep. 4:46–49.

De-Eknamkul, W. and B. E. Ellis. 1985b. Effects of auxins and cytokinins on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Rep. 4:50–53.

Fujita, Y., Y. Hara, C. Suga, and T. Morimoto. 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Rep. 1:61–63.

Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspend cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158.

Gandawidaja D. 1980. Effect of nitrate and ammonium on the growth of tissue culture of *Dendrobium phalaeopsis* Fitzg. Ann. Bogor. 7:63–69.

Hoekstra, S. S., P. A. A. Harkes, R. Verpoorte, and K. R. Libbenga. 1990. Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. Plant Cell Rep. 8:571–574.

Ken, W. S. 1970. Pai-Chih. p.644–645. *in:* Manual of Medicinal Plants in Taiwan (3). (Ken, W. S., ed.) National Research Institute of Chinese Medicine. Taipei, Taiwan. (in Chinese)

Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially feasible micro-propagation of mountain laurel *Kalmia latufolia* by use of shoot tip culture. Pro. Inter. Plant Prop. Soc. 30:421–427.

Miller, C. O. and F. Skoog. 1953. Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. Am. J. Bot. 40:768–773.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Pedersen, C. and K. Brandt. 1992. A method for disinfection of underground rhizome tips of *Alstroemeria* and *Heliconia*. Acta Hort. 325:499–504.

Pistrick, K. 2002. Notes on neglected and underutilized crops: current taxonomical overview of cultivated plants in the families Umbelliferae and Labiatae. Genet. Res. Crop Evol. 49:211–225.

Ramanand, N. K., N. Subhanand, M. Lal, and S. B. Singh. 2006. Plantlet regeneration through leaf callus culture in sugarcane. Sugar Tech. 8:85–87.

Shiau, Y. J. 1999. The Study of Tissue Culture in *Heliconia psittacorum* L. f. cv. *rhizomatosa*. Master thesis. National Chung Hsing University, Taichung. 177 pp. (in Chinese)

Skoog, F. and C. Tsui. 1948. Chemical control of growth

and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. Am. J. Bot. 35:782–787.

Su, Z., L. J. Shou, Y. L. Bai, and J. M. Xin. 1994. Summary of pai-chih improved the looks. J. Henan Univ. Chin. Med. 9:46. (in Chinese)

Tsay H. S. and H. L. Huang. 1998. Somatic embryo formation and germination from immature embryo derived suspension cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. Plant Cell Rep. 17:670–674.

Wang, T. T., H. Jin, Q. Li, W. M. Cheng, Q. Q. Hu, X. H. Chen, and K. S. Bi. 2007. Isolation and simultaneous determination of coumarin compounds in radix Angelica dahurica. Chromatographia 65:477–481.

Watanabe, A., S. Araki, S. Kobari, H. Sudo, T. Tsuchida, T. Uno, N. Kosaka, K. Shimomura, M. Yamazaki, and K. Saito. 1998. *In vitro* propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analysis of Angelica plants. Plant Cell Rep. 18:187–192.

Yazaki, K., H. Fukui, M. Kikuma, and M. Tabata. 1987. Regulation of shikonin production by glutamine in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. Plant Cell Rep. 6:131–134.

Yen, K. Y. 1980. Pai-chih. p.25–26. *in:* The Illustrated Chinese Materia Medica Crude Drugs. (Yen, K. Y., ed.) Southern Materials Center Inc. Taiwan. (in Chinese)

Zeng, Y. H., X. H. Kuang, and C. Q. Xiong. 2001. Study on the differentiation between pai-chih and false xiang-pai-chih. China Pharmacist 4:232.

Extraction of Imperatorin from Root Slices and Explants of *Angelica dahurica*[1]

Yih-Juh Shiau[2,4], Toong-Long Jeng[3], Jui-Lung Kao[3], Jui-Sheng Lai[3], and Chia-Hsin Huang[3]

Abstract

Shiau, Y. J., T. L. Jeng, J. L. Kao, J. S. Lai, and C. H. Huang. 2011. Extraction of imperatorin from root slices and explants of *Angelica dahurica*. J. Taiwan Agric. Res. 60:101–114.

Angelica dahurica has long been a popular plant for traditional medicine by Chinese people. It is widely used to treat disorders, such as catarrh, nasal polypus and skin affections. The main active ingredients of *A. dahurica* are furo-coumarin derivatives, including imperatorin, angelical, and byak-angelicin. Information is scarce on extraction of imperatorin from microtubers and green callus of *A. dahurica* plants grown in tissue culture. The objective of this study was to investigate methods of extraction for imperatorin produced in explants of *A. dahurica*. Results showed that the fresh weight of callus of *A. dahurica* was the highest (25.0 g/flask) in 30-day-old cultures on the medium containing WPM basal salts supplemented with 30 $g \cdot L^{-1}$ sucrose and 8.5 $g \cdot L^{-1}$ agar, followed by cultures on B-5 basal salt medium (18.6 g/flask), 1/2 MS medium (9.7 g/flask) and MS medium (5.1 g/flask). The rate of formation of green callus was 60% after white callus of *A. dahurica* subcultured on $WB_1N_{0.5}$ medium for 90 days. Among the three solvents (methanol, water and ethanol) investigated, methanol was the best solvent for extraction of imperatorin from commercial root slices of *A. dahurica* which yielded 772.3 μg of imperatorin in each gram of dry sampling. Imperatorin in white callus from 3-month-old cultures on WPM medium was 32.0 $\mu g \cdot g^{-1}$, whereas imperatorin in microtubers from 3-month-old cultures was 83.3$\mu g \cdot g^{-1}$. This study suggests that it is possible for mass-production of imperatorin and mass-propagation of plantlets using microubers of *A. dahurica*.

Key words: *Angelica dahurica*, Explant, Root slice, Imperatorin.

---

1. Contribution No. 2516 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: May 16, 2011.

2. Assistant Researcher, Plant Germplasm Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Respectively, Associate Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Assistant Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.

4. Corresponding author, e-mail: yjshiau@tari.gov.tw; Fax: (04)23331705.