

中華民國第四十六屆中小學科學展覽會
作品說明書

高職組 農業及生物科技科

第一名

091402

台灣稀有水生植物蓴菜周年生長調查及成分分析研究

學校名稱：臺北市立松山高級工農職業學校

作者： 職三 陳暉凱	指導老師： 張詩悌 蘇恆誠
---------------	---------------------

關鍵詞：蓴菜、植群調查、管柱色層分析

壹、摘要

本研究針對臺灣稀有水生植物「蓴菜」之周年生長狀況進行觀察，並分析其主要成分暨化合物。由本研究結果得知：

一、位於宜蘭縣崙埤湖內之稀有浮葉型水生植物蓴菜的生長周期為：以沈水葉型態休眠（1~2 月）；地下走莖與幼葉生長期（3~4 月）；開花期（5 月）；快速生長期（6 月）；花萎凋（7 月）；結種籽、盾葉成熟不再長新葉（8 月）；由葉片、葉柄、莖漸次凋萎，開始進入休眠（9~10 月）；以沈水葉型態休眠（11~12 月）。

二、由蓴菜之葉片分離出十種成分，分別為：

BS-2 (Kaempferol-7-*O*-Glucosids)、

BS-3 (Quercetin-7-*O*-glucosids)、

BS-4 (5,8,4' -Trihydroxyflavone-7-*O*-glucosids)、

BS-5 (3,5,8,3' 4' -Pentahydroxy flavone)、

BS-6 (Vitamin E: α -Tocopherol)、

BS-7 (Glyceride)、

BS-8 (1-*O*- (4-hydroxy bengoyl) - β -glucose)、

BS-9 (Quercetin)、BS-10 (Kaempferol)、

BS-11 Luteolin-8-*c*- β -glucospyranoside。

其中經測試 BS-8 對神經膠腫瘤細胞株有 18.42%之抑癌效果，另外，BS-2、BS-3、BS-5、BS-10、BS-11 等成分，呈現良好之抑制黑色素美白作用。

貳、研究動機：

在 92 年開始進行初步調查崙埤湖蓴菜生長環境之後，發現蓴菜的生長並無特殊的環境限制：在水溫 17~26°C 間、水深低於 160 公分、偏微酸性無污染的水中皆可生長。因此，推測目前在台灣為稀有分佈的蓴菜，應可進一步有規模化的農業栽植。為進一步探求其是否具有對人體健康上應用價值，因此本研究嚐試以本草綱目對於蓴菜消炎抗菌的功能論述為參考，進一步將蓴菜有效活性成分用化學層析分離，以探討並鑑定其成分之化學結構，希望可探知蓴菜療效的潛力。同時，在考慮未來要有規模化的農業栽植，也需要進行周年生長觀察，以利栽培管理工作的調節。

故本研究主要有二大部份，第一部份為自崙埤湖採集成份分析用之蓴菜時，進行周年生長記錄；第二部份則為成份分離試驗。期望依據兩者的結果，探討蓴菜於臺灣導入做為休閒農業主題作物價值之參考，做為生態復育外保護稀有植物的另一種可能方法。

本研究在架構上為植物周年生活史之觀察記錄、以及植物成份分析測試，為高職所學課程中生物與農業概論相關課程知識之延伸探究。

參、研究目的：

一、瞭解崙埤湖蓴菜之周年生長狀態：

- (一) 觀察每個月份的蓴菜植株生長狀態。
- (二) 調查蓴菜群落於崙埤湖內的周年分佈情形。

二、分析蓴菜之主要成分暨化合物：

- (一) 萃取、分離與純化蓴菜成分。
- (二) 鑑定蓴菜成分化合物之結構。
- (三) 評估蓴菜成分之抗菌、抑癌、與抑黑色素美白之生物活性。

肆、研究設備及器材

一、崙埤湖蓴菜之周年生長狀態研究使用器材：

工程測量級 GPS 衛星定位儀 (Trimble Asset Surveyor v5.12 TSC1)

二、蓴菜之主要成分暨化合物分析儀器：

(一) 儀器：

減壓濃縮機、冷卻循環機、冷凍乾燥機、純水製造器、超音波震盪器、高效率液相層析儀紫外光-可見光偵測器、高效率液相層析儀幫浦。

(二) 試藥及溶媒：

Methanol、Methanol-d₄、Acetone、Ethyl acetate、Ethyl formate、Formic acid、Ferric chloride。

(三) 色層分析法器材：

ODS、Diaion HP20、Sephadex LH-20、MCI Gel CHP20P、Fractogel、Sellulose、玻璃分離管柱、薄層色層分析板、高效率液相層析儀逆相層析管柱、高效率液相層析儀逆相層析管柱、高效率液相層析儀逆相層析管柱。

(四) 薄層層析材料：

Kiesel gel 60 F₂₅₄ (0.25mm, E. Merck)、RP-18 W/UV₂₅₄ (0.15mm, Macherey-Nagel)

伍、研究過程與方法

一、崙埤湖樣區之衛星定位測繪：

以工程量測 GPS 衛星定位系統測崙埤湖精準位置，將設定之樣區範圍(宜蘭縣大同鄉棲蘭野生動物重要棲息環境範圍內 74 林班地)做描繪。衛星測繪流程：

- (一) 儀器架設：將工程測量級 GPS 衛星定位儀之電源與訊號線路架設連接。
- (二) 現場測繪定位：將儀器打開於紀錄畫面，確定衛星訊號已接收到後，沿著湖泊之水域範圍繞行一圈測繪紀錄，並且將資料載入筆記型電腦確認後帶回室內進行疊圖繪製作業。
- (三) 疊圖描繪：將資料讀出後，至林務局 GIS 地理資訊系統下載即時差分，進行差分校正，得到正確點位圖後，再將正確之來源圖資配合測繪圖做疊繪。
- (四) 衛星觀測：將崙埤池之衛星基本資料建立完成。



湖泊測繪



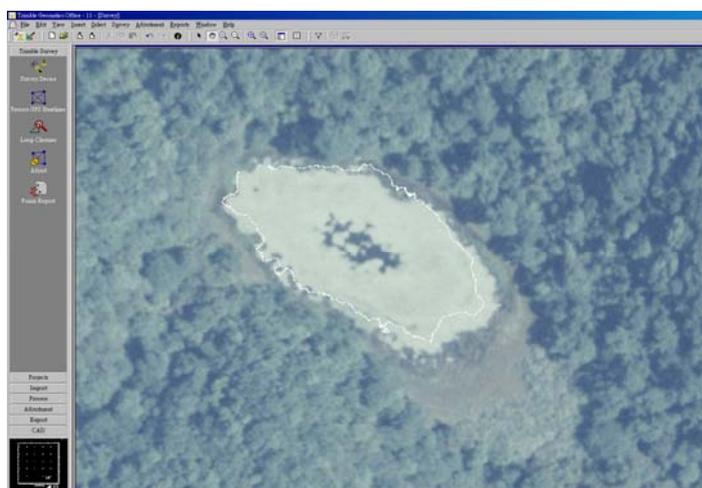
湖泊測繪



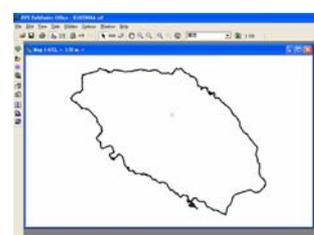
田野資料傳輸收集



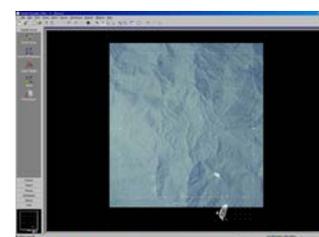
儀器架設



Trimble Geomatics office-11 軟體
將校正完之測繪圖與正攝圖作疊合



Pathfinder 軟體測繪圖
插分校正抓取



農林航測所彩色正攝圖

二、崙埤湖蕁菜植群環境調查方式：

採用直線排列樣區(line plots)，從湖中心往長短軸方向拉兩條垂直樣帶，以橫跨植群及環境之梯度，所得資料變異最小(劉棠瑞、蘇鴻傑，1983)。樣線的兩端結束在草生植群及森林植群交會處，長軸與短軸長度分別為 160m 與 68m，為了使樣區植群具代表性，故取 4m×4m 的正方形樣區大小，並排在樣線上，第一樣區的中心點為此樣線的 2m 處，以此類推，第 n

樣區的中心點爲此樣線的 $(4n-2)$ m 處。所以長軸與短軸有 40 個與 17 個樣區。以 2005 年的一月、四月、七月、十月代表四季，在這四個月份對每個樣區做植物種類、物種覆蓋度、遮陰度、中央水深、離岸距離做紀錄，以分析植群。

三、植群與環境因數分析：

草地樣區植物 IVI

- 覆蓋度 (coverage) = 某種植物所佔面積 ÷ 所調查之總樣區數
- 相對覆蓋度 (relative coverage%) = (某植物之覆蓋度 ÷ 所有植物覆蓋度之總和) × 100%
- 頻度 (frequency) = 某種植物出現之總樣區數 ÷ 所調查之總樣區數
- 相對頻度 (relative frequency, %) = (某種植物之頻度 ÷ 所有植物頻度之總和) × 100%
- 相對覆蓋度 + 相對頻度 = 草地樣區植物 IVI。

四、蓴菜成份分析

(一) 蓴菜之主要成分分析實驗流程 (如圖 5-1)。



圖 5-1 蓴菜各部位成份分離實驗流程

(二) 蓴菜萃取

採 20 kg 之蓴菜地下部及 13.5 kg 葉子部位分別萃取。地下部以有機溶媒 70% Acetone (丙酮) 冷浸萃取；地上部葉以 100% (MeOH) 甲醇冷浸萃取，經過濾後減壓濃縮秤重紀錄。如圖 5-2 所示。



圖 5-2 有機溶劑大量冷浸萃取

(三) TLC 植株組成成分分析：

1. TLC：

TLC 物質成分分析探討層析所含物質成分種類，原理爲利用少許萃取物，利用酒精均勻溶解，依序以毛細管將微量之樣品吸起滴於 TLC 板吹乾，將各組 TLC 板放進溶媒之中，將樣品分別展開，以 U.V. 燈觀察展開情形並作記號。

2. TLC 板呈色：

展開後將 TLC 板以溶液噴霧，並以加熱板 Hot Play 烤乾，盡快拍照。

3. 極性分層：

以分液漏斗將萃取物進行分配，製備成水層、正丁醇層，再分別濃縮，以達到初步的分葉子部份極性差異大之成分分離。



圖 5-3 極性分層實驗

地下部成份利用 TLC 薄層層析檢測，在成分上較多屬於高極性之成分，且萃取量較多，所以就直接進行 Diaion HP-20 column (100% H₂O~100% MeOH~70% Acetone) 管柱層析劃分出不同的 fraction，並配合活性追蹤。(如圖 5-3)

(四) 薄層層析(thin layer chromatography) 之展開系統條件找尋：

用薄層層析配合不同之溶媒並配合溶媒極性的高低，尋找出最適合之展開比例，才得以呈現出混合物中有幾種成分，故多找幾種展開條件之系統進行分離之實驗。(如圖 5-4)

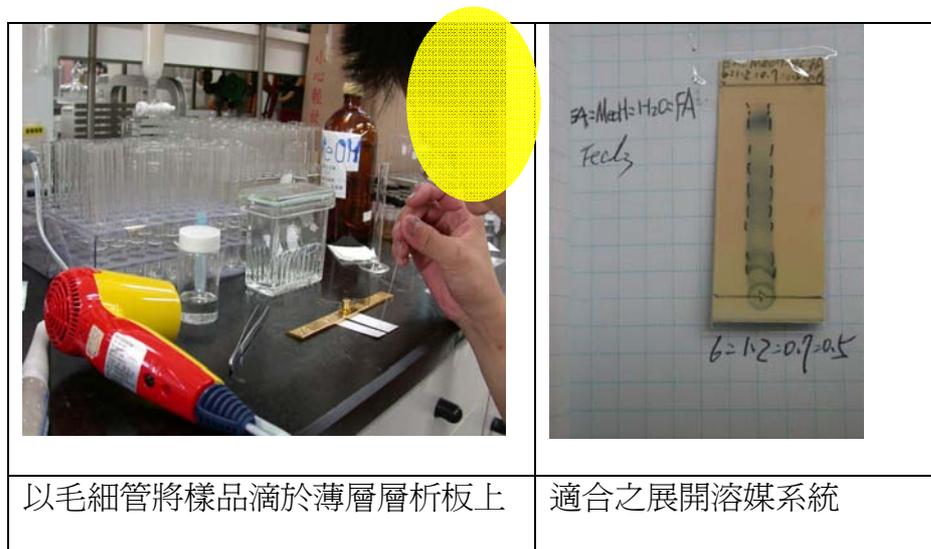


圖 5-4 薄層層析實驗

(五) 管柱分離：

1.管柱分離:

分離管柱中置不同固定相介質，以不同比例、種類之移動相進行沖提分離，以自動收集器做定量之收集。經薄層層析板呈色確認後，分割成數分離物進行純化。(如圖 5-5)

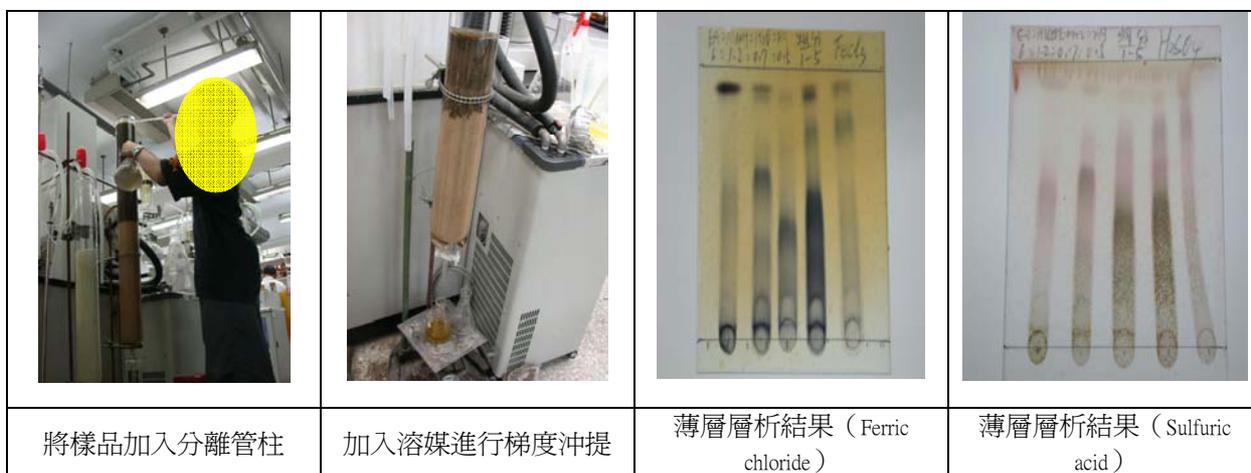


圖 5-5 管柱層析實驗流程

2.低壓管柱分離:

一般低壓管柱分離之固定相以 ODS、Silica Gel 為主，在進行加壓分離時亦不影響分離效果且時間快，能將混合物分的較細，到最後有兩三種化合物無法於開放式管柱分離時，使用此種方法做分離實驗。(詳見圖 5-6)

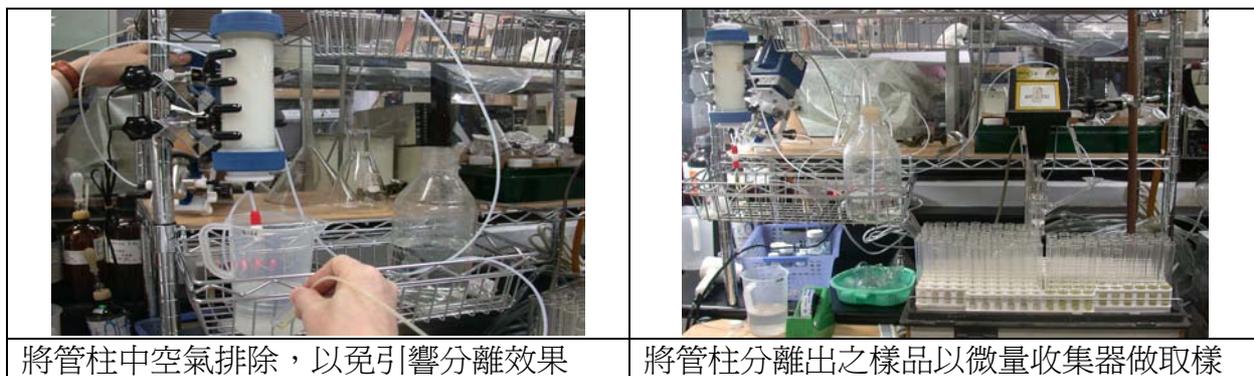


圖 5-6 低壓管柱分離實驗

3. 高效能液相層析管柱分離 (High performance liquid chromatography) :

簡稱 **HPLC**，此分離方式是在前兩種分離方式皆無法將混合物分離時使用。分離原理大致與低壓管柱分離相同，但利用 UV 偵測器直接做液相之分離，偵測分離前必須先確認試藥在 UV 偵測下之最佳吸收波長。萹菜之部分以高極性成分居多所以以甲醇、二次水再加 0.1% 三氟氯醋酸 Trichloroacetic Acid 做調配。(如圖 5-7)

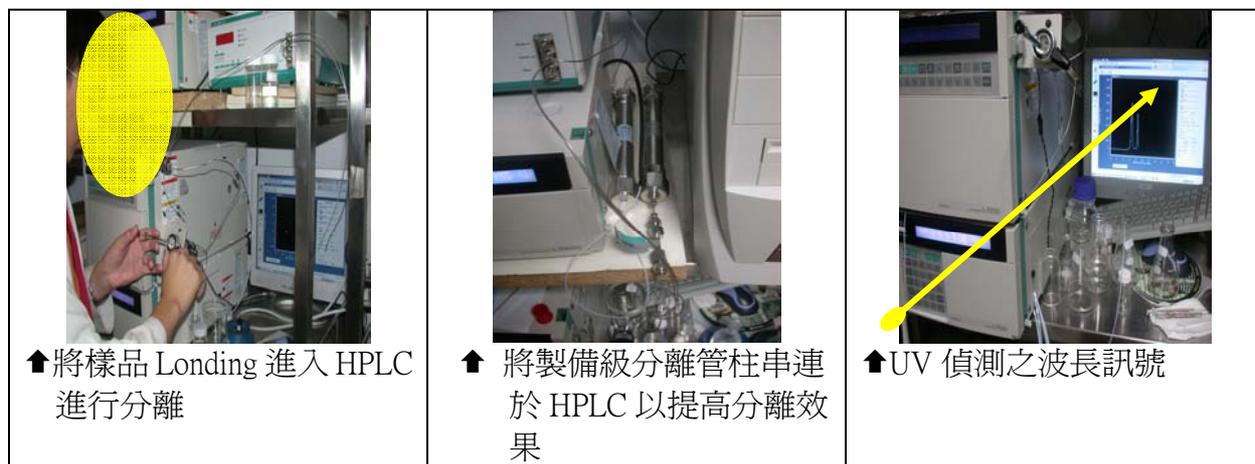


圖 5-7 高效能液相層析實驗流程

陸、研究結果

一、崙埤湖之衛星定位及樣區標定：

崙埤湖位於雪山山脈主要稜線南側，海拔高度 845 公尺，是演替末期前的池沼型態湖泊，目前為台灣野生蓴菜種源生育最穩定的地區（如圖 6-1）。

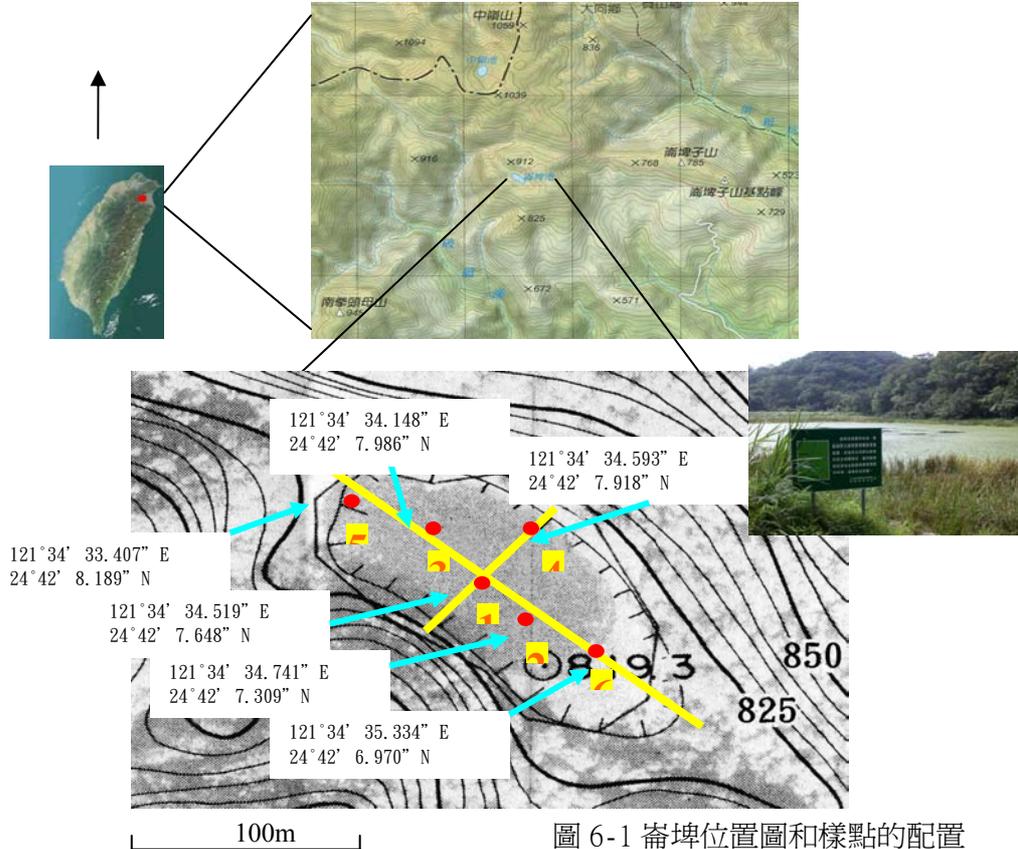


圖 6-1 崙埤位置圖和樣點的配置

二、崙埤湖內及週邊植群調查：

於 2005 年一月開始對崙埤湖進行蓴菜生長之植群調查分析，並做季節的持續性調查。

(一) 崙埤湖優勢水域植物族群調查

崙埤湖內水域植物做優勢族群線截百分比之調查，以五尺為一個單位，計算崙埤湖內之優勢族群，以族群之分佈總長度除以線截總度，再乘上百分之百，即為優勢族群線截百分率。調查結果可得，在崙埤湖內最優勢族群為蓴菜（東西向線測中，優勢百分率為 36.4404%；在南北向線測中，優勢百分率為 14.8339%）。崙埤湖水域及週邊植物現況如示意圖 6-2、6-3。

(二) 崙埤湖蓴菜之季節生長變化及物候調查：

周年針對蓴菜生長觀察，可清楚看到蓴菜在一年中特殊的以沈水葉越冬之休眠行為。以在崙埤湖中設定之樣區水域範圍內蓴菜生長之相對覆蓋度（relative coverage, %）做出季節生長變化之基礎生長資料。（如圖 6-2；圖 6-3；圖 6-4；圖 6-5；表 6-1；表 6-2；圖 6-6；圖 6-7。）

以湖內水深依 50 公分為基準進行分析，可發現在不同季節的生長相對覆蓋都是分佈於水深 50 cm 到 100 cm 處的最高，其次則是位於水深 100 cm 到 150 cm 處的；而水深 0

cm到 50 cm處或 150 cm到 200 cm處的蓴菜，生長相對覆蓋都較差。

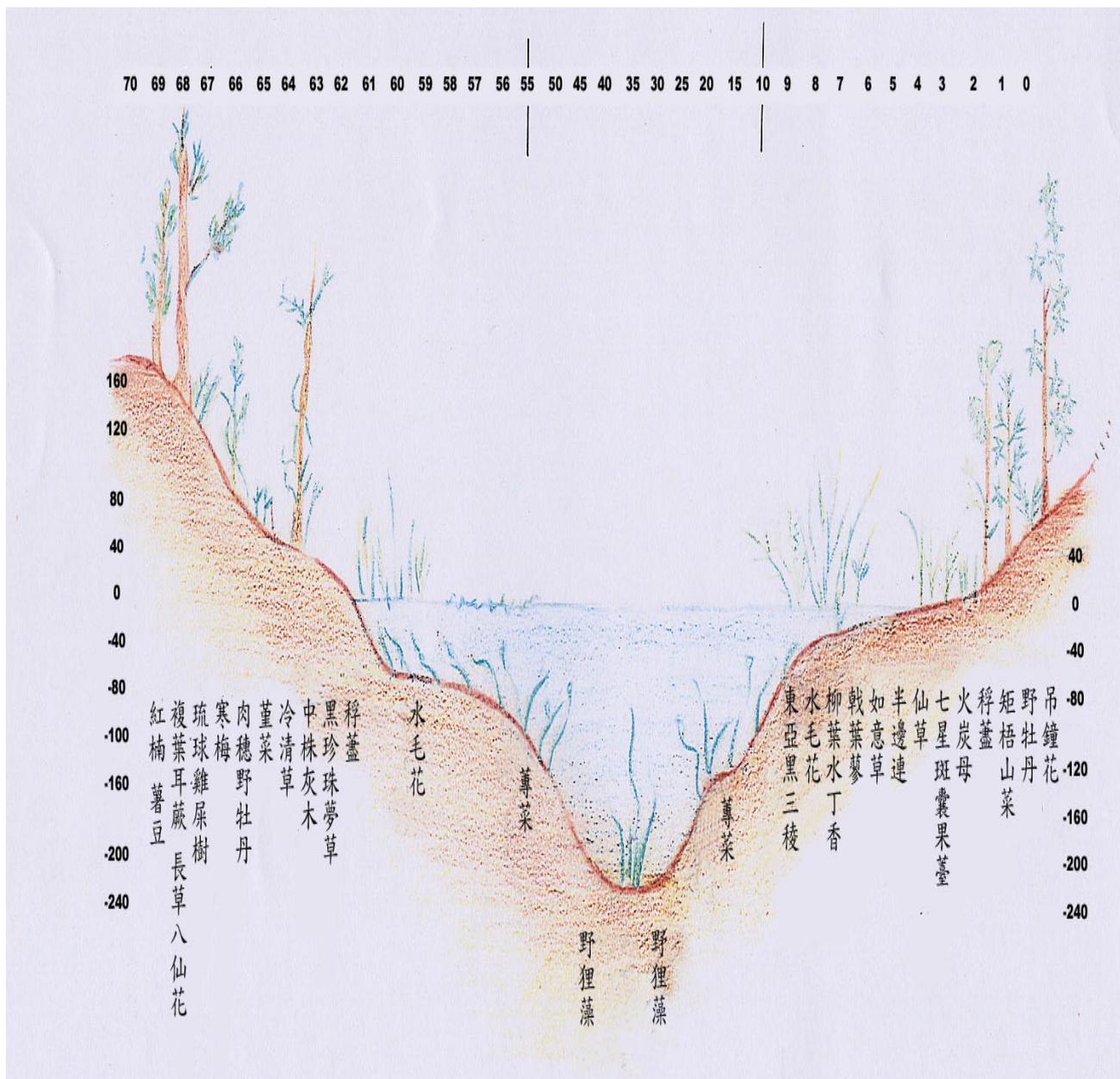


圖 6-2 崙埤湖水域及週邊植物社會示意圖（東-西）

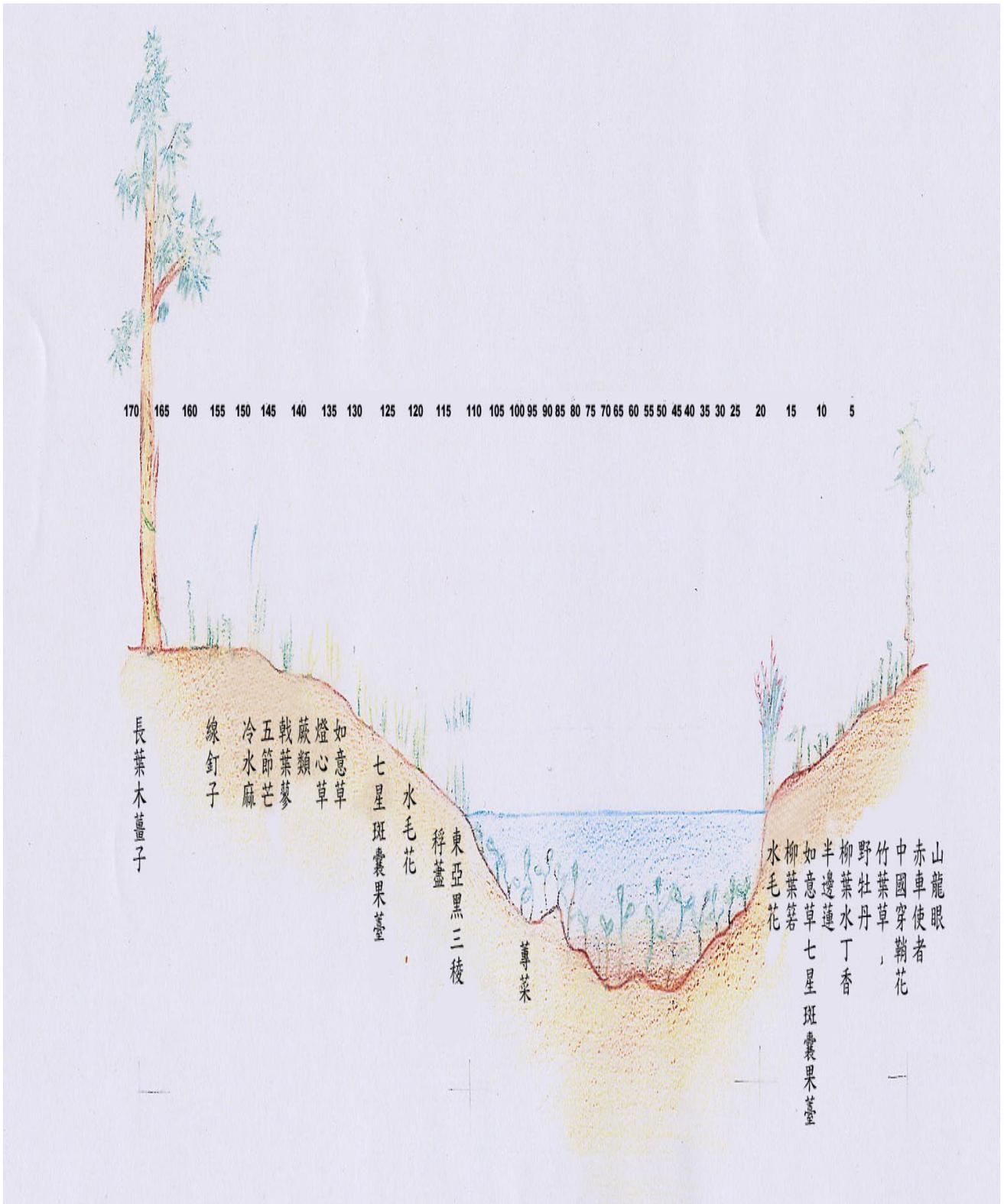


圖 6-3 崙埤湖剖面圖水生植物棲地社會示意圖（南-北）

表 6-1 長軸樣區蕁菜季節生長相對覆蓋度

長軸樣帶	160m			%	%	%	%
編號	距離(m)	水深(cm)	物種	春	夏	秋	冬
4	12 到 16	15 cm	蕁	5	20	15	10
5	16-20m	35 cm	蕁	80	100	100	80
6	20-24m	40 cm	蕁	50	100	100	60
7	24-28m	45 cm	蕁	85	100	100	90
8	28-32m	55 cm	蕁	70	100	99	85
9	32-36m	55 cm	蕁	80	100	100	100
10	36-40m	65 cm	蕁	80	100	100	100
11	40-44m	75 cm	蕁	85	100	100	100
12	44-48m	85 cm	蕁	80	100	99	70
13	48-52m	90 cm	蕁	50	100	90	65
14	52-56m	95 cm	蕁	30	100	98	65
15	56-60m	100 cm	蕁	30	80	50	35
16	60-64m	125 cm	蕁	20	70	35	35
17	64-68m	125 cm	蕁	50	60	25	10
18	68-72m	130 cm	蕁	30	75	55	40
19	72-76m	145 cm	蕁	80	100	90	75
20	76-80m	145 cm	蕁	85	100	98	95
21	80-84m	150 cm	蕁	65	100	99	85
22	84-88m	160 cm	蕁	95	100	100	99
23	88-92m	160 cm	蕁	100	100	100	99
24	92-96m	165 cm	蕁	100	100	100	100
25	96-100m	165 cm	蕁	100	100	100	100
26	100-104m	165 cm	蕁	85	100	98	90
27	104-108m	15 cm	蕁	60	75	100	35

表 6-2 短軸樣區蕁菜季節生長相對覆蓋度

短軸樣帶	68m			%			
編號	距離(m)	水深(cm)	物種	春	夏	秋	冬
4	12-16m	25	蕁	70	100	95	85
5	16-20m	65	蕁	100	100	100	100
6	20-24m	105	蕁	100	100	100	100
7	24-28m	160	蕁	60	100	99	90
8	28-32m	160	蕁	45	80	70	60
9	32-36m	165	蕁	30	80	75	55
10	36-40m	155	蕁	60	95	90	75
11	40-44m	140	蕁	95	100	100	99
12	44-48m	105	蕁	100	100	100	100
13	48-52m	75	蕁	100	100	100	100
14	52-56m	35	蕁	35	90	50	45

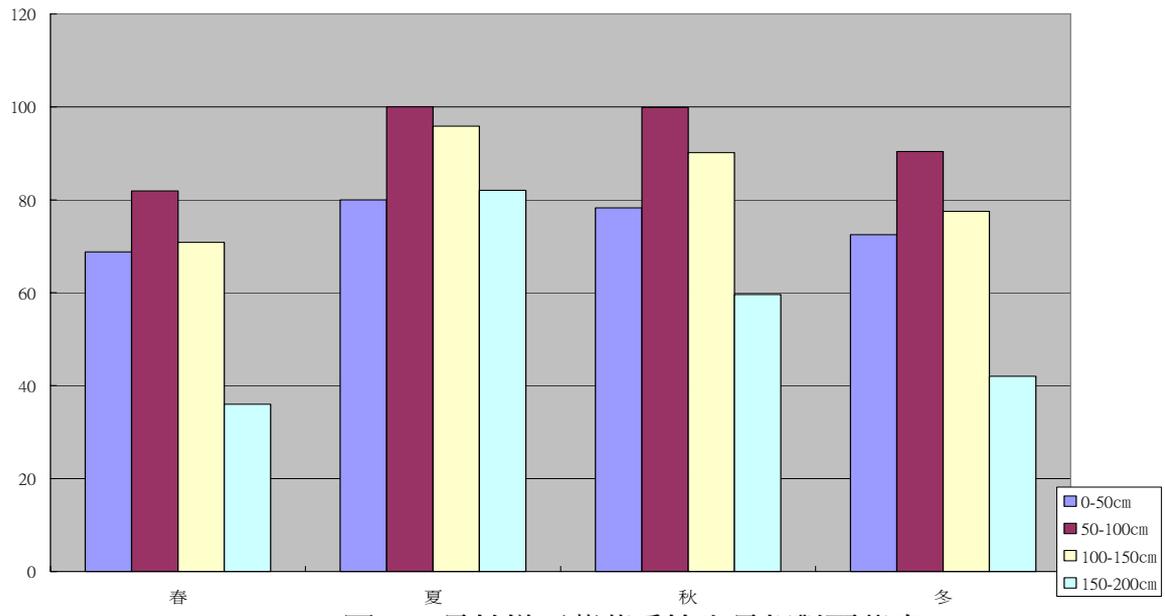


圖 6-4 長軸樣區萵菜季節生長相對覆蓋度

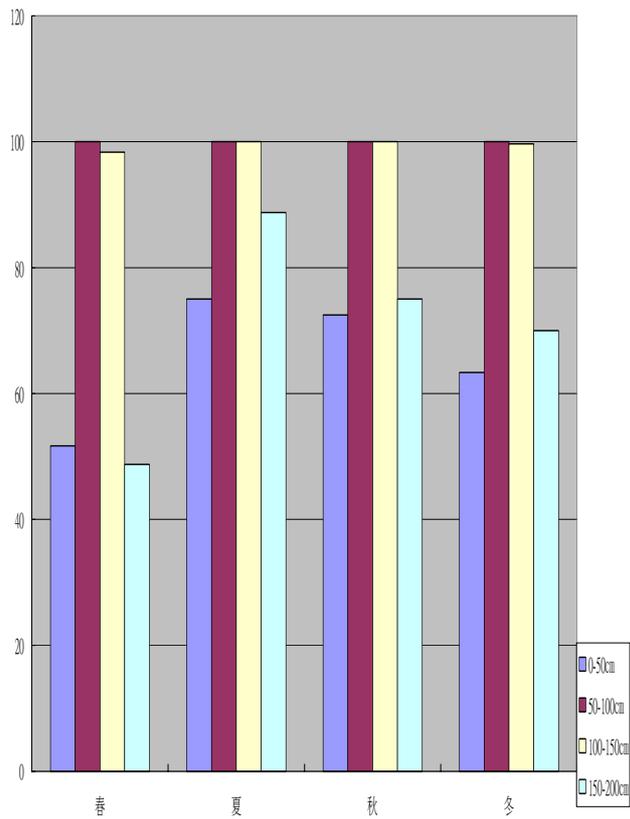


圖 6-5 短軸樣區萵菜季節生長相對覆蓋度

		一月	二月
崙埤湖蓴菜群落		 	 
	蓴菜型態	蓴菜休眠期，以沈水葉為主要越冬型態，少數浮水葉殘存。	
		三月	四月
崙埤湖蓴菜群落			
	蓴菜型態	地下走莖開始分化，湖泊邊緣已有部份葉已長幼葉	長新葉，且幼葉及葉柄上均有豐富之膠質。

圖 6-6 崙埤湖蓴菜 1-4 月份生長物候觀測紀錄

	五月	六月
崙埤湖蓴菜群落		
蓴菜型態		<p>蓴菜抽花梗開花，快速生長新葉亦屬花期。</p>
	七月	八月
崙埤湖蓴菜群落		
蓴菜型態	<p>花開始萎凋</p>	<p>盾葉成熟結種子，且不再長新葉</p>

圖 6-7 崙埤湖蓴菜 5-8 月份生長物候觀測紀錄

	九月	十月
崙埤湖蓴菜群落		
蓴菜型態	部分老葉開始萎凋	葉柄以及莖部開始萎凋進入休眠
	十一月	十二月
崙埤湖蓴菜群落		
蓴菜型態	持續進行萎凋，僅剩下湖泊邊緣一部份葉片尚未萎凋	進入休眠僅剩下沉水葉

圖 6-8 崙埤湖蓴菜 9-12 月份生長物候觀測紀錄

三、蓴菜之主要成分暨化合物分析：

(一) TLC 蓴菜地下根莖、葉柄及葉片之組成成分分析

經由 TLC 展開呈色後，明顯觀察到丙酮所萃取出之萃取液之成份種類較多，為三組溶液中最者。成分分析中，莖、葉柄以及葉片之組成成分較為相似。(如圖 6-9、圖 6-10、圖 6-11)

TLC 編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9
萃取溶媒	甲醇	甲醇	甲醇	丙酮	丙酮	丙酮	水	水	水
蓴菜部位	根	莖	葉	根	莖	葉	根	莖	葉

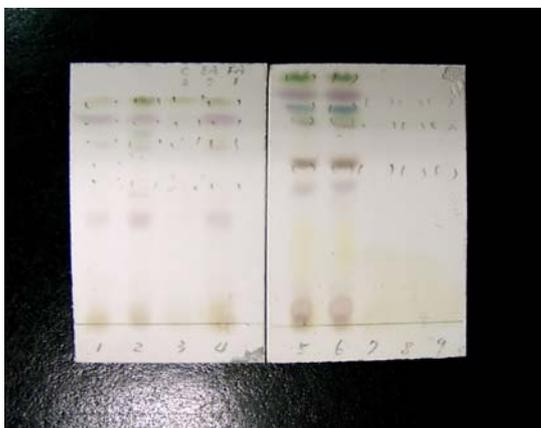


圖 6-9 以 1:7:1 之比例展開溶媒之組成成分分析



圖 6-10 以 2:7:1 之比例展開溶媒之組成成分分析

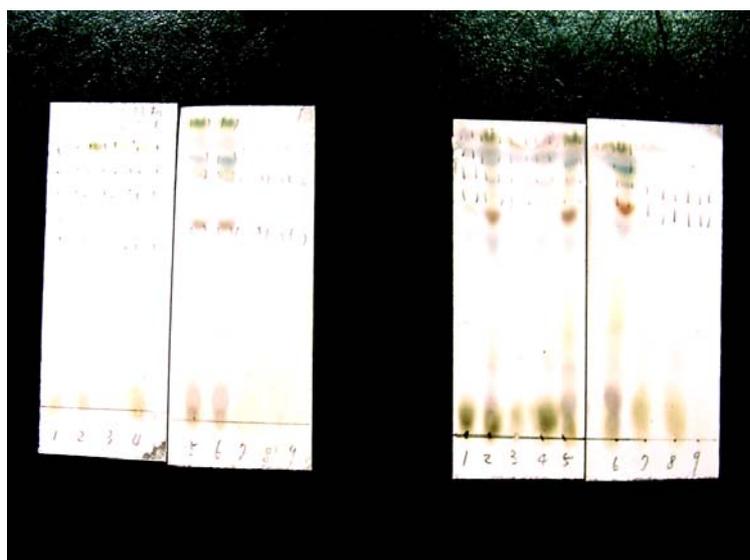


圖 6-11 TLC 所有蕁菜萃取物成份分析

(二) 蕁菜之地下根莖萃取物抑制金黃葡萄球菌之成分分離

蕁菜(*Brasenia schreberi Gmel.*)新鮮之地下莖合併濾液經減壓濃縮，其 70%丙酮抽取物以得到水(H₂O)層萃取物。

水層萃取物溶於水，以 Diaion HP20 層析管柱進行分離，利用 100%水到 100%甲醇梯度沖提，每 250ml 收集一瓶經過薄層層析片(TLC plate)分析，得到 Fr H2O 1~Fr H2O5 五個部分，其中 Fr H4 再經由抑菌活性之檢測後，對金黃葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC6341) 有抑菌之活性。再以 Sephadex LH-20 層析管柱，以 100%水到 100%甲醇梯度沖提，並自動收集器進行分離，劃分為 Fr H4-1~Fr H4-7 共七個部分，Fr H2-2 利用 Sephadex LH-20 層析管柱，以 100%水到 100%甲醇梯度沖提，劃分為五個部分。另因 Fr H4-6-1-5 與 Fr H4-6-2-5 在 TLC 薄層層析上屬同一種混合物，故混合一起再以 Fractogel TSKHW-40.5 進行分離，分為三個部份，最後以高效能液相層析儀進行分離，(條件為一逆相層析管柱 Biosil 5 ODS-W 10mm I.D. X 250mm，移動相 2%(MeOH in 100% H₂O) 並加入 0.1%三氟乙酸 Trichloroacetic Acid，流速 3ml/min，偵測器 UV280nm 分離純化)，得到化合物 BS-1 (9mg)。分離流程圖及化合物名稱如圖 6-12、圖 6-13 所示。

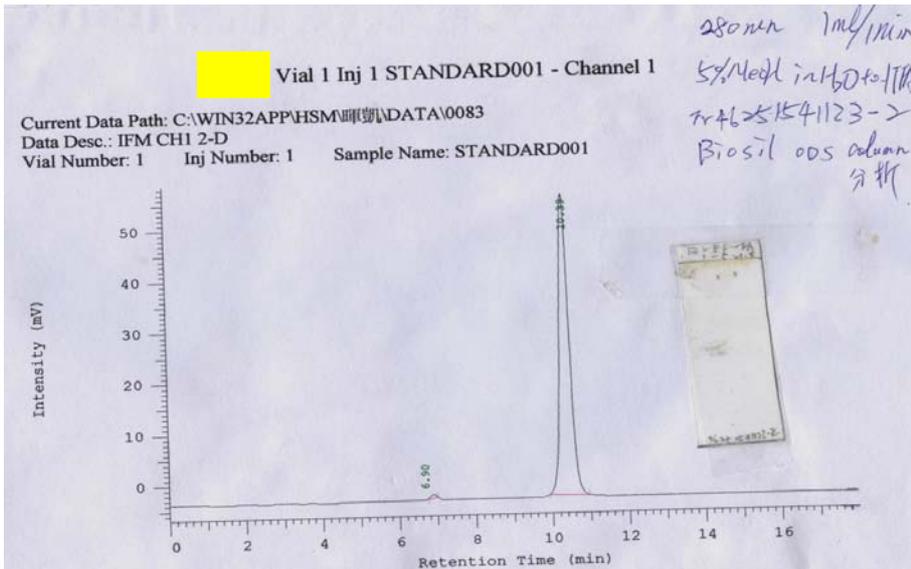


圖 6-12 高效能液相層析圖

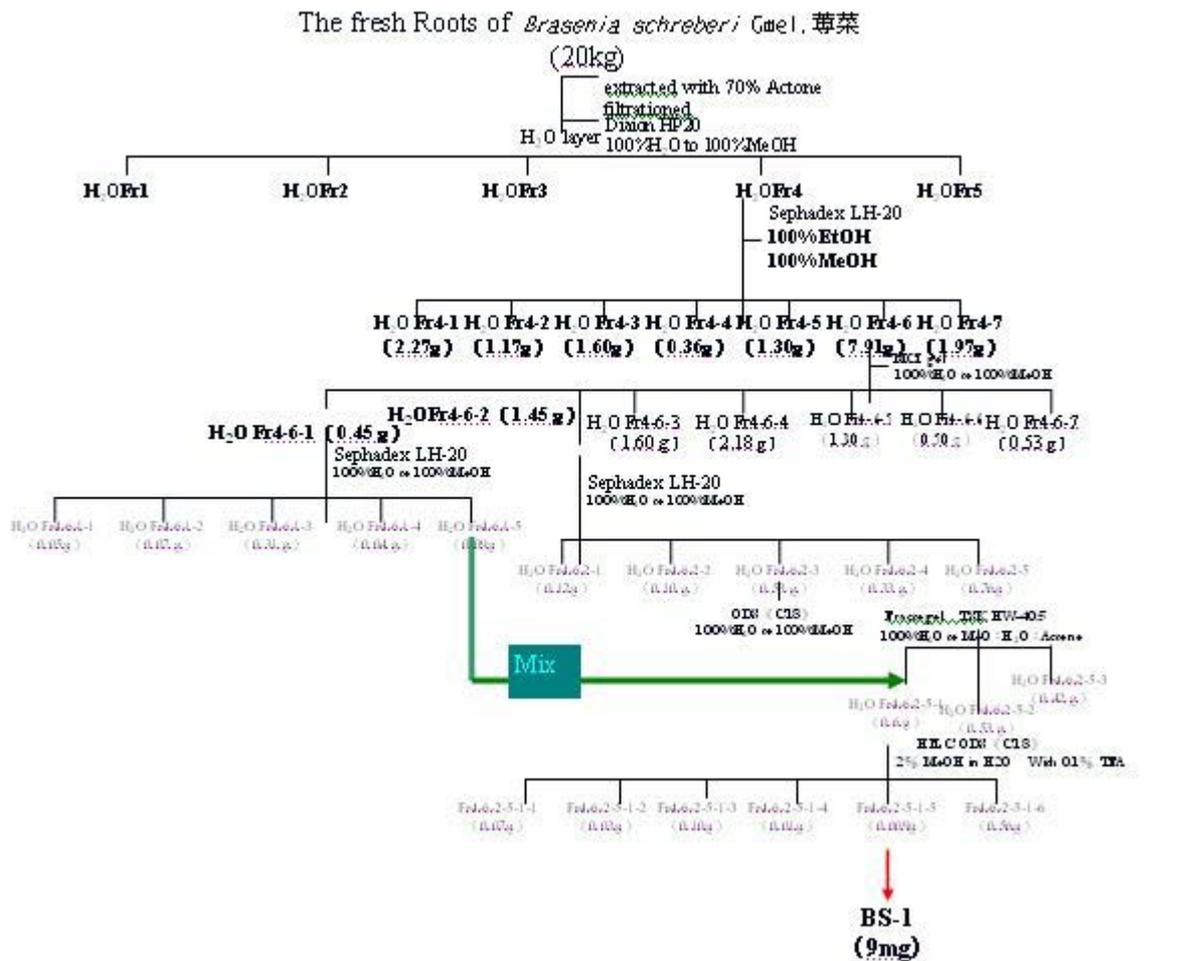


圖 6-13 The isolation of the Roots of *Brasenia schreberi* Gmel. 蕁菜

(三) 蓴菜之莖與葉片萃取物成分分析

1. 成分萃取

蓴菜(*Brasenia schreberi* Gmel.)新鮮之莖、葉部 13.5 公斤，合併濾液減壓濃縮，其 100% 甲醇萃取物進行分層，得到(BuOH)層萃取物共 62.85g。

正丁醇層萃取物溶於酒精，以 Sephadex LH-20 層析管柱進行分離，利用 100% 酒精，每 250ml 收集一瓶經過薄層分析，得到 Fr B1~Fr B6 六個部分，其中 Fr B2、Fr B5、Fr B6 皆以 Sephadex LH-20 層析管柱，梯度沖提自動收集器進行收集之方式相同於根部之方式，分別分離出 BS-2 (297mg)、BS-3 (78.8mg)、BS-4 (78.8mg)、BS-5 (8mg)、BS-6 (92.4mg)、BS-8 (442.1mg)、BS-10 (48.8mg)、BS-11 (19.5mg) 八種化合物。另外因 Fr B-1 經由薄層層析確認，屬於較非極性之成分，所以先以 Sephadex LH-20 層析管柱進行分離，由 100% Acetone 沖提至 85% H₂O 劃分為 Fr B11~Fr B14 四個部分，其中 Fr11 之成分以 Silica gel 進行正相之分離並以 100% Benzen to 40% EtOH 進行沖提，劃分為 Fr B11-1~Fr B11-6 六個部分，其中 B11-3 為化合物 BS-7 (33.3mg)。而 B116 一樣以 Silica gel 進行正相之分離，但此次沖提之溶媒由 100% Benzen to 50% Acetone 進行純化，分離得到 BS-9 (420.9mg)。經葉部成份分離總共萃取出十種化合物，並進行核磁共振以鑑定出化學結構，最後再將純化合物進行抗癌、抗氧化之活性檢測。分離流程圖及化合物名稱如圖 6-14。

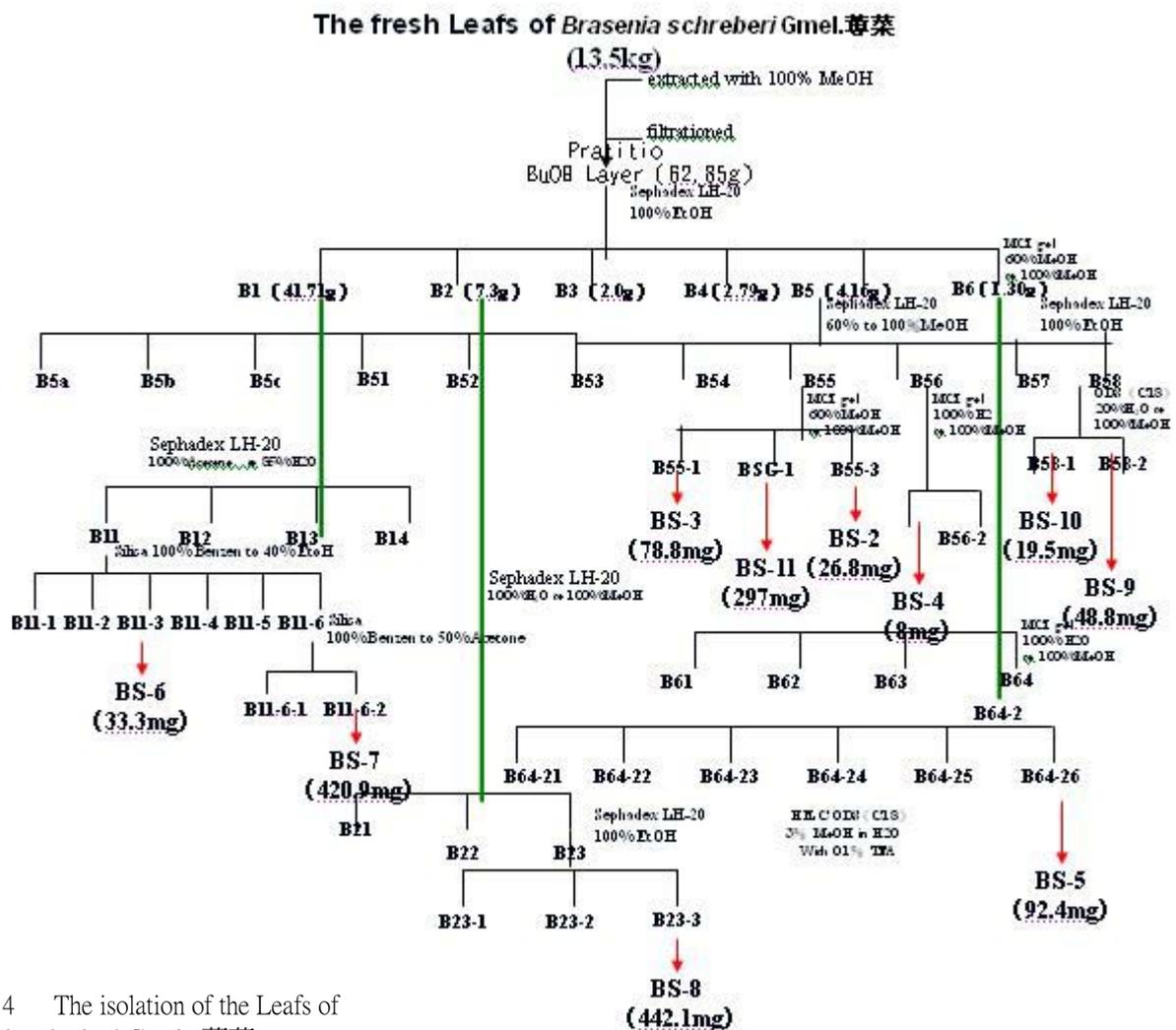


圖 6-14 The isolation of the Leaves of *Brasenia schreberi* Gmel. 蓴菜

2.成分分離結果

本次由莖部以及葉部純化分離出之化合物共計 10 種，為 BS-2~BS-11，於萹菜之地下根莖部位，經由抑菌活性追蹤分離出化合物 1 種 BS-1，經由 MNR 核磁共振儀之光譜檢測，其結構得知分別為下表化合物清單。如表-1

表 6-3 萹菜植株成分化合物清單

Compound	重量	學名
BS-1	9mg	Gallic acid
BS-2	26.8mg	Kaempferol-7-O-Glucosids
BS-3	76.8mg	Quercetin-7-O- Glucosids
BS-4	8mg	5,8,4' Trihydroxy-7-O-Glucosids
BS-5	92.4mg	3,5,8,3' 4' - Pentahydroxy flavone
BS-6	33.3mg	VitaminE (d-Tocopherol)
BS-7	420.9mg	Glyceride
BS-8	442.1mg	1-O- (4-hydroxy bengoyl) - β -glucose
BS-9	48.8mg	Cuercetin
BS-10	19.5mg	Kaempferol
BS-11	297mg	Luteolin-8-c- β -glucospyr anoside

3. 抗癌活性篩選結果

抗癌活性篩選之原理為：將癌細胞培養到適量，再將癌細胞染色後先測前吸光值再加入試藥後，持續反應 72 小時後再測得後吸光值，再將後值減前值與 Control 的側質做比對得知結果。

因實驗過程中抗癌的活性篩選需更專門精密之技術操作，因此委由臺北醫學大學藥學研究所進行實驗之協助。以分離出的 11 個化合物(如表 3-2)，經由 C6 (Glioma) 神經膠腫瘤細胞株做活性篩選，發現 BS-8 在 50 μ g/ml 之濃度下對神經膠腫瘤細胞株有 81.58%之抑制效果。如表 2-3-3。BS-8 學名為 1-O- (4-hydroxy bengoyl) - β -glucose，是由萹菜分離出的黃酮類化合物中，量最多且結構單純的一種，但就算量多也僅有 442.1mg。

4. 酪胺酸酶 (Tyrosinase) 抗黑色素之美白抑制活性測定結果

美白抑制活性測定的操作為：於 96 格微量盤(96-well microtiter plate)下進行試驗，反應液中含 0.4M HEPES 緩衝溶液(pH 6.8) 140 μ L、400 u/ml 酪胺酸酶 20 μ L，與測試樣品 100 μ L，並以不含酪胺酸酶為空白對照組，混合均勻靜置 10 分鐘，在 450nm 波長下測第一次吸光值，之後加入 2.5mM 左旋酪胺酸(L-tyrosine) 20 μ L，混合均勻後靜置 20 分鐘，在 450nm 波長下測第二次吸光值，進行抑制率計算。抑制率計算方式如下：

$$\text{抑制率} = \frac{(\Delta A_{450nm_A} - \Delta A_{450nm_B}) - (\Delta A_{450nm_C} - \Delta A_{450nm_D})}{\Delta A_{450nm_A} - \Delta A_{450nm_B}} \times 100\%$$

- A: 不含樣品，有酪胺酸酶
- B: 不含樣品，無酪胺酸酶
- C: 含樣品，有酪胺酸酶
- D: 含樣品，無酪胺酸酶

表 6-4 Cell line: C6 (Glioma) Test concentration: 50g/ml

NO.	OD value	Survival
Control	1.90	100.00 %
BS-1	0.78	41.05%
BS-2	1.02	53.68%
BS-3	1.63	85.79%
BS-4	1.46	76.84%
BS-5	1.25	65.79%
BS-6	2.34	123.16%
BS-7	1.89	99.47%
BS-8	0.35	18.42%
BS-9	0.88	46.32%
BS-10	1.83	96.32%
BS-11	1.12	58.95%

表 6-5 Tyrosinase 抗黑色素之
美白抑制活性測定結果

06/13/2005	Inh(%)
BS-2	93.08±13.68
BS-3	72.56±5.45
BS-5	70.3±1.75
BS-6	2.96±9.59
BS-9	244.72±69.86
BS-10	93.97±0.82
BS-11	62.02±3.34

檢測結果，共計有 BS-2、BS-3、BS-5、BS-10、BS-11，這 5 種成分具有良好的抑黑色素美白效果。兩次吸光值的差異計算如表 6-5。

柒、討論

一、崙埤湖蓴菜之季節生長變化及物候調查

推測最適合蓴菜生長的水深應是水深 50~150 公分。在四種不同水深生長的蓴菜，四季當中的生長相對覆蓋度都可見有一致的趨勢，即是生長相對覆蓋度自第一年夏季的最高，漸次進入秋季、冬季至隔年春季依序遞減。

二、崙埤湖蓴菜周年生長型態

自 2002 年開始進行物候之調查，根據四年之蓴菜季節生長觀察，瞭解多年生草本水生植物的蓴菜之季節生長史為：4 月初時開始有蓴菜新葉長出，到了 4 月底 5 月初，蓴菜之地下走莖會開始生長出莖以及葉，群落穩定的成長；生長旺期為春末夏初 5 至 7 月，5 月份開始有花梗抽出水面，以利於花開後的授粉，直至 7 月份花期結束，大部份花萎凋，而此時期為幼葉生長最旺盛之時期（因為幼葉含有充分之膠質，於大陸地區是採收蓴菜之幼葉食用時期。）；8 月份為花期結束後結種籽的時期，盾葉成熟並不再長出新葉；9 月左右進入秋季至冬季時期，蓴菜之老葉（浮水葉）會開始萎凋，準備進行休眠，多數是以沈水葉越冬，但此時湖面上依然可見有少數蓴菜之浮水葉殘存。

配合四季敘述蓴菜生長變化為：(A)春季：自越冬沈水葉的植株部份長出新葉及走莖進入生長旺盛期，並擴大分佈範圍，約 1 個月的時期以營養生長為主，接著營養生長更形旺盛，並進入生殖生長；(B)夏季：8 月份結種籽後，生殖生長已完成，植株不再需提供生殖生長養份，也不再將養份用於長新葉；(C)秋冬季：蓴菜以沈水葉型態保存次年生長的實力，另方面因湖水溫度雖低但未至結冰，利用少數殘存的成熟葉片仍可進行光合作用，並不致使全株受寒害。這種生活史的模式應是蓴菜成為崙埤湖中優勢植物的重要原因。

因蓴菜之休眠期不再長出新的浮水葉，因此 4 月份蓴菜新葉開始長出時期與 9 月份開始進入休眠期，是攝影觀察湖面群落分佈最明顯之時期。

三、蓴菜之主要成分暨化合物分析

在找出蓴菜成份的天然化合物具有抑癌效果之餘，我們也可以發現純化出的量與原料使用的植物體重量相比算是相當的少。因此，對於這種成份的利用就不可能是一般認為的完全自植物體提煉使用，倒是由於它較單純的結構，可能有助於未來進一步分析其以化學合成或半合成的可行性，成為發現自自然界而能以化學方式生產供利用的一種研發途徑。

其實，抑黑色素美白成份的價值是隨現代人愛白的審美觀而產生的，但我們也知道人類皮膚產生黑色素，其實是具有保護皮膚細胞免受紫外線傷害的功能存在，因此，要應用這一項發現，必須考慮美白之際，如何配套的進行防紫外線傷害的方式，才不致於反而使健康受損。

捌、結論

- 一. 自蓴菜中總共分離純化出 11 個化合物，其中有 7 種檢測出在目前醫療用途上具有功能。在葉片成分部份，經由抗癌活性篩選，得知 BS-8 (1-0- (4-hydroxy bengoyl) - β -glucose) 442.1mg，對細胞株 C6 (Glioma) 大白鼠之腦部神經膠腫瘤細胞株做活性篩選，在 50 μ g/ml 之濃度下對神經膠腫瘤細胞株有 18.42% 之抑制效果；另外在地下根莖成分經抗菌活性追蹤分離出一個成分 *Gallic acid*，對金黃葡萄球菌有輕度之抑制效果；葉片分離出之化合物中以酪胺酸酶 (Tyrosinase) 抗黑色素之美白抑制活性篩選，檢測結果，共計有 BS-2 (*Kaempferol-7-O-Glucosids*)、BS-3 (*Quercetin-7-O-Glucosids*)、BS-5 (3,5,8,3' 4' - *Pentahydroxy flavone*)、BS-10 (*Kaempferol*)、BS-11 (*Phenolic B*) 5 種成分具有良好的抗黑色素美白效果。雖然以自蓴菜純化分離出的量來看，這些成份在植物體的含量並不多，但所謂天然化合物的角色，在醫藥開發上，也可以是一種有效的構造標準，提供合成藥物的製造模型使用。
- 二. 經由周年性之調查得知，多年生的蓴菜最適合生長於水深 50 cm 到 150 cm 處，其生長的週期開始於春末的 4 月間，在夏季完成生殖生長後，以沈水葉為主要型態來度過氣候環境條件不佳的冬季，而以沈水葉越冬的模式幫助蓴菜的族群能確保生長的地盤，且待環境條件轉好，又可迅速擴張與完成生殖週期，是蓴菜成為崙埤湖優勢植物的重要因素。
- 三. 經由四年對臺灣原屬於野生植物的蓴菜進行研究，算是對蓴菜初步的研究。自一開始生長環境調查得知蓴菜在崙埤湖的生長環境並非嚴苛難以模擬後，又進一步想找出蓴菜對健康增進的價值，以利推廣大量栽培與物種復育，避免過去蓴菜在臺灣其他棲地不受重視的人為破壞重演而絕跡的事發生。因為，想找出蓴菜的價值讓大家一起來保護的目標，而產生了看似不相關的研究並列的這份研究報告。幸運的是，在野外不起眼的蓴菜，也許大家不曾發覺它的重要性，卻沒想到其成分對於我們人類最害怕的疾病癌症卻有抑制的作用，另外如抗菌、甚至基於人們愛美天性的美白效果，初步測試都有不錯的結果，我認為天然資源都與我們人類息息相關，今天沒有發現功用的，未來的價值也很難說。

玖、參考文獻及縮寫表

1. Kunii, Hidenobu (1999). Annual and seasonal variations in net production, biomass and life span of floating leaves in *Brasenia schreberi* J.F.Gmel. Japanese Journal of Limnology, 60 (3), 81-289.
2. Elakovich & SD;Wooten JW (1987). An examination of the phytotoxicity of the water shield, *Brasenia schreberi*. Journal of Chemical Ecology, 13 (9), 1935-1940.
3. Schneider&EL;Carlquist, S. (1996). Vessels in *Brasenia* (Cabombaceae): New perspective on vessel origin in primary perspectives on vessel origin in primary xylem of angiosperms, American Journal of Botany, 83 (9), 1236-1240.
4. BIERHORST, D. W., and P.M ZAMORA. 1965 Primary xylem elements and element associations of angiosperms. American Journal of Botany 52;657-710
5. CARLQUIST, S. 1992. Pit membrane remnants in perforation plates of primitive dicotyledons and their significance. American Journal of Botany 79; 660-672
6. SCHNEIDER, E. L. AND S CARLQUIST. 1995a. Vessels in the roots of *Barclaya otundifolia*{Nymphaeaceae}. American Journal of Botany 82; 1343-1349
7. KAKUTA, M. and SMITH A. F. 1962. Structure of the polysaccharide of the Japanese Water plant, *Brasenia schreberi*. J. Agric. food Chem. 10:104-108
8. SCHRENK, J. 1888. On the histology of the vegetative organs of *Brasenia schreberi*. Pursh. Bull. Torrey Bot. Club 15;29-47
9. KAKUTA, M., and, MISAKI, A, 1979b. Polysaccharid of junsai{ *Brasenia schreberi*. }mucilage; fragment analysis of successive Smith degradtions and partial acid hydrolysis. Agric. Biol Chem. 43;1269-1276
10. Graham, S. A. (1955) An ecological classification of vegetation types, Mich. For. No. 11, 11. 黃文哲；黃明利；賴滋漢 (民 92) 應用微生物。臺北：富林出版社。
12. 蔡文城 (民 85) 實用臨床微生物診斷學。臺北：瑞明彩色印刷有限公司。
13. 楊遠波；劉和義；呂勝由 (民 86) 台灣維管束植物簡誌。臺北：行政院農委會。
14. 林春吉 (民 91) 台灣水生植物 1。臺北：田野影像出版社。
15. 林春吉 (民 91) 台灣水生植物 2。臺北：田野影像出版社。

17. 林春吉 (民 92) 台灣水生植物 2 溼地生態導覽。臺北：田野影像出版社。
18. 林良平 (民 91) 微生物顯微鏡學。臺北：藝軒圖書出版社。
19. 楊恭毅 (民 69) 楊氏園藝植物大名典。臺北：中國花卉雜誌社。
20. 林文集 (民 91) 台灣生態之美。臺北：台灣。
21. 祝金明；呂家龍；李敏 (民 82)。中國特產的蓴菜。台灣之種苗，11，32-37
22. 謝寶全；黃俊智；林錚威 (民 89)。屏東科技大學報。洋蔥水萃取物及額外添加化學物質對抑菌活性之探討，9，173-185
23. 謝寶全 (民 89) 台灣農業化學與食品科學。肉桂萃取液之抑菌作用。，38，184-193
24. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局
25. 宜蘭社區大學蘭陽湖泊生態研習社 (<http://myweb.hinet.net/home2/lake02/>)
26. 水生植物烏托邦 (<http://www.taconet.com.tw/ihungliu/index.htm>)
27. 中國大陸武漢晚報 <http://www.npcnews.org>
28. <http://www.scwjie.com/slff699.htm>.
29. 楊遠波；劉和義；呂勝由 (民 86) 台灣維管束植物簡誌。臺北：行政院農委會。
30. 台灣植物誌第二版編輯委員會(1992)，台灣植物誌(Flora of Taiwan)，第二冊臺北：台灣植物誌第二版編輯委員會。
31. 大津高、曾晴賢、呂勝由、張萬福 (1989) 臺灣北部高山湖泊—鴛鴦湖湖沼生物學之調查，臺灣省立博物館年刊 32：17-33。
32. 林春吉 (2002) 台灣水生植物 (2) 溼地生態導覽，臺北：田野影像出版社。
33. 林則桐 (1987) 桃園沼澤地植物生態調查，76 年生態研究第 018 號，行政院農業委員會編印。
34. 吳首賢 (2003) 南仁湖水生植群生態之研究，屏東科技大學森林系。
35. 徐寶琛 (1991) 酸化夢幻湖與未酸化南仁湖湖濱草相之比較，中國文化大學。
36. 陳世輝 (1992) 蘭陽水生植物圖譜，花蓮師範學院。
37. 陳建志 (1998) 松蘿湖集水區植群之研究，國立中興大學植物學研究所碩士論文。
38. 黃忠村 (2003) 應用微生物。臺北：復文書局。
39. 黃惠曼 (2003) 五倍子對 Methicillin 與 Penicillin 抗藥性金黃葡萄球菌與表皮金黃葡萄球菌之抗菌活性研究，

40. 楊遠波、顏聖紘、林仲剛、黃世富、郭紀凡、梁慧舟 (2001) 台灣水生植物圖誌, 行政院農委會。
41. 劉崇瑞、蘇鴻傑 (1983) 森林植物生態學, 臺北: 臺灣商務印書館。
42. 蘇鴻傑 (2005) 台灣森林之棲地多樣系統, 森林與溼地生態研討會論文集。
43. 陳擎霞 (1987) 桃園池沼地區水生植物生態研究 (二), 76 年生態研究第 020 號, 行政院農業委員會編印。
44. 陳擎霞 (1986) 桃園池沼地區水生植物生態研究 (一), 76 年生態研究第 009 號, 行政院農業委員會編印。

縮寫表

全 名	縮 寫
Ultraviolet	UV
Nuclear magnetic resonance	NMR
Heteronuclear mutiple quantum coherence	HMQC
Heteronuclear mutiple bond correlation	HMBC
Correlated spectroscopy	COSY
High performance liquid chromatography	HPLC
Formic acid	FA
Ethyl Acetate	EA
Octadecyl silane	ODS
Trichloroacetic Acid	TFA

評 語

091402 台灣稀有水生植物蓴菜周年生長調查及成分 分析研究

1. 本研究對台灣稀有水生植物蓴菜的生長習性與化學成分作了很徹底的觀察與分析。
2. 本研究內容頗有深度，測定方法很先進，內容熟悉資料紮實。