

【11】證書號數：I323641

【45】公告日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 21 日

【51】Int. Cl. : A01H4/00 (2006.01) A61K36/88 (2006.01)
 A61K31/352 (2006.01) A61K31/122 (2006.01)
 A61P35/00 (2006.01)

發明

全 8 頁

【54】名稱：富含類黃酮化合物之巴西鳶尾組織與射干組織及其培養方法
 TISSUES WITH RICH FLAVONOIDS OF NEOMARICA GRACILIS AND
 BELAMCANDA CHINENSIS AND CULTURE METHODS FOR THE SAME

【21】申請案號：095149939 【22】申請日：中華民國 95 (2006) 年 12 月 29 日

【11】公開編號：200826837 【43】公開日期：中華民國 97 (2008) 年 07 月 01 日

【72】發明人：何錦玟 (TW) HO, CHIN WEN ; 朱庭慧 (TW) CHU, TIN HUI

【71】申請人：大同股份有限公司 TATUNG COMPANY

臺北市中山區中山北路 3 段 22 號

大同大學

TATUNG UNIVERSITY

臺北市中山區中山北路 3 段 40 號

【74】代理人：吳冠賜；楊慶隆；林志鴻

【56】參考文獻：

CN 1594307A

CN 1687099A

Akashi T., et al. "Isoflavonoid production by adventitious-root cultures of *Iris germanica* (Iridaceae)", *Plant Biotechnology*, 2005, 22(3), 207-215.

Jehan H. et al., "Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers", *Plant cell reports*, Sep 1994, 13(12) 671~675.

H. Etiennel & M. Berthouly, "Temporary immersion systems in plant micropropagation", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Jun 2002, 69(3), 215-231.

Monthakantirat O, et al., "Phenolic Constituents of the Rhizomes of the Thai Medicinal Plant *Belamcanda chinensis* with Proliferative Activity for Two Breast Cancer Cell Lines", *J. Nat. Prod.* Mar 2005, 68(3), 361-364.

[57]申請專利範圍

1. 一種富含類黃酮化合物巴西鳶尾組織之培養方法，包含以下步驟：(a)提供一巴西鳶尾組織，其中該巴西鳶尾組織細胞為具有分裂能力之葉基部；(b)將該巴西鳶尾組織置於一培養基中培養；以及(c)培養形成一巴西鳶尾根莖組織；其中該培養基包含至少一生長調節劑、一鹽類組成物、以及至少一碳水化合物；該生長調節劑係為細胞分裂素(cytokinins)、生長素(auxins)、或其混合物；以及該鹽類組成物係為鉀鹽、硝酸鹽、鉍鹽、鎂鹽、硫酸鹽、鈣鹽、氯鹽、磷鹽、錳鹽、碘鹽、硼酸鹽、鋅鹽、銅鹽、鈉鹽、鉬鹽、鈷鹽、鐵鹽、醋酸鹽、或其混合物。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中該細胞分裂素係為苯甲腺嘌呤(6-benzyladenine, BA)、激動素(kinetin)、或其混合物。

(2)

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中該生長素係為萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid,NAA)、吲哚乙酸(indoleacetic acid,IAA)、二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid,2,4-D)、或其混合物。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中該生長調節劑之劑量範圍係為 0.01~2.0 mg^l⁻¹。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中該鹽類組成物係為 MS 基礎鹽類培養基(Murashige and Skoog medium)。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中該碳水化合物為醣類化合物。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之培養方法，其中該醣類化合物為肌醇(myo-inositol)、蔗糖(sucrose)、或其混合物。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中該培養基更包含一維生素，該維生素為維生素 B₁(thiamine HCl)、維生素 B₆(pyridoxine HCl)、菸鹼酸(nicotinic acid)、或其混合物。
9. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中該培養基之酸鹼值範圍係為 5~7。
10. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中步驟(b)之培養溫度範圍為 20 ~30 。
11. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中步驟(b)中係以震盪培養該巴西鳶尾組織。
12. 如申請專利範圍第 1 項所述之培養方法，其中步驟(b)中係將該巴西鳶尾組織於潮汐灌溉系統(Temporary Immersion System,T.I.S.)中培養。
13. 如申請專利範圍第 12 項所述之培養方法，其中該潮汐灌溉系統係為每 2~4 小時浸潤 1~3 分鐘。
14. 一種富含鳶尾異黃酮之巴西鳶尾根莖組織，且該巴西鳶尾組織具有鳶尾異黃酮含量 2.5~65mg/kg 巴西鳶尾組織乾重，其中該巴西鳶尾根莖組織係由以下步驟形成：(a)提供一巴西鳶尾組織，其中該巴西鳶尾組織細胞為具有分裂能力之葉基部；(b)將該巴西鳶尾組織置於一培養基中培養；以及(c)培養形成一巴西鳶尾根莖組織；其中該培養基包含至少一生長調節劑、一鹽類組成物、以及至少一碳水化合物；該生長調節劑係為細胞分裂素、生長素、或其混合物；以及該鹽類組成物係為鉀鹽、硝酸鹽、鉍鹽、鎂鹽、硫酸鹽、鈣鹽、氯鹽、磷鹽、錳鹽、碘鹽、硼酸鹽、鋅鹽、銅鹽、鈉鹽、鉕鹽、鈷鹽、鐵鹽、醋酸鹽、或其混合物。
15. 如申請專利範圍第 14 項所述之巴西鳶尾根莖組織，其中該巴西鳶尾組織具有總類黃酮化合物含量相當於 150~950mg 桂皮酸/g 巴西鳶尾組織乾重。
16. 如申請專利範圍第 14 項所述之巴西鳶尾根莖組織，其中該細胞分裂素係為苯甲腺嘌呤、激動素、或其混合物。
17. 如申請專利範圍第 14 項所述之巴西鳶尾根莖組織，其中該生長素係為萘乙酸、吲哚乙酸、二氯苯氧乙酸、或其混合物。
18. 如申請專利範圍第 14 項所述之巴西鳶尾根莖組織，其中該鹽類組成物係為 MS 基礎鹽類培養基。
19. 如申請專利範圍第 14 項所述之巴西鳶尾根莖組織，其中該碳水化合物為醣類化合物。
20. 如申請專利範圍第 19 項所述之巴西鳶尾根莖組織，其中該醣類化合物為肌醇、蔗糖、或其混合物。
21. 如申請專利範圍第 14 項所述之巴西鳶尾根莖組織，其中該培養基更包含一維生素，該維生素為維生素 B₁、維生素 B₆、菸鹼酸、或其混合物。
22. 如申請專利範圍第 14 項所述之巴西鳶尾根莖組織，其中步驟(b)中係將該巴西鳶尾組織於潮汐灌溉系統中培養。

(3)

23. 一種富含類黃酮化合物的萃取物之製造方法，包含以下步驟：(a)提供一巴西鳶尾根莖組織，且該巴西鳶尾根莖組織具有鳶尾異黃酮含量 2.5~65mg/kg 巴西鳶尾根莖組織乾重，其中該巴西鳶尾根莖組織係由以下步驟形成：(1)提供一巴西鳶尾組織，其中該巴西鳶尾組織細胞為具有分裂能力之葉基部；(2)將該巴西鳶尾組織置於一培養基中培養；以及(3)培養形成一巴西鳶尾根莖組織；其中該培養基包含至少一生長調節劑、一鹽類組成物、以及至少一碳水化合物；該生長調節劑係為細胞分裂素、生長素、或其混合物；以及該鹽類組成物係為鉀鹽、硝酸鹽、銨鹽、鎂鹽、硫酸鹽、鈣鹽、氯鹽、磷鹽、錳鹽、碘鹽、硼酸鹽、鋅鹽、銅鹽、鈉鹽、鉬鹽、鈷鹽、鐵鹽、醋酸鹽、或其混合物；(b)乾燥該巴西鳶尾根莖組織；(c)將已乾燥之巴西鳶尾根莖組織，置於一醇類溶液，並加熱該醇類溶液；以及(d)冷卻該醇類溶液，且過濾該醇類混合物，以得一萃取物。
24. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中乾燥方法為冷凍真空乾燥法。
25. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中該醇類溶液係為甲醇或乙醇。
26. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中加熱溫度範圍係為 50 ~70 。
27. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中加熱時並同時震盪該醇類化合物。
28. 如申請專利範圍第 27 項所述之製造方法，其中震盪係以超音波震盪。
29. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中該細胞分裂素係為苯甲腺嘌呤、激動素、或其混合物。
30. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中該生長素係為萘乙酸、吲哚乙酸、二氯苯氧乙酸、或其混合物。
31. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中該鹽類組成物係為 MS 基礎鹽類培養基。
32. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中該碳水化合物為醣類化合物。
33. 如申請專利範圍第 32 項所述之製造方法，其中該醣類化合物為肌醇、蔗糖、或其混合物。
34. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中該培養基更包含一維生素，且該維生素為維生素 B₁、維生素 B₆、菸鹼酸、或其混合物。
35. 如申請專利範圍第 23 項所述之製造方法，其中步驟(2)係將該巴西鳶尾組織於潮汐灌溉系統中培養。
36. 一種富含類黃酮化合物之萃取物，其中該萃取物係由以下步驟製成：(a)提供一巴西鳶尾根莖組織，且該巴西鳶尾根莖組織具有鳶尾異黃酮含量 2.5~65mg/kg 巴西鳶尾根莖組織乾重，其中該巴西鳶尾根莖組織係由以下步驟形成：(1)提供一巴西鳶尾組織，其中該巴西鳶尾組織細胞為具有分裂能力之葉基部；(2)將該巴西鳶尾組織置於一培養基中培養；以及(3)培養形成一巴西鳶尾根莖組織；其中該培養基包含至少一生長調節劑、一鹽類組成物、以及至少一碳水化合物；該生長調節劑係為細胞分裂素、生長素、或其混合物；以及該鹽類組成物係為鉀鹽、硝酸鹽、銨鹽、鎂鹽、硫酸鹽、鈣鹽、氯鹽、磷鹽、錳鹽、碘鹽、硼酸鹽、鋅鹽、銅鹽、鈉鹽、鉬鹽、鈷鹽、鐵鹽、醋酸鹽、或其混合物；(b)乾燥該巴西鳶尾根莖組織；(c)將已乾燥之巴西鳶尾根莖組織後置於一醇類溶液，並加熱該醇類溶液；以及(d)冷卻該醇類溶液，且過濾該醇類溶液，以得一萃取物。
37. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中該萃取物具有抑制癌細胞生長之能力。
38. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中乾燥方法為冷凍真空乾燥法。
39. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中該醇類溶液係為甲醇或乙醇。
40. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中加熱溫度範圍係為 50 ~70 。
41. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中加熱時並同時震盪該醇類化合物。

(4)

42. 如申請專利範圍第 41 項所述之萃取物，其中震盪係以超音波震盪。
43. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中該細胞分裂素係為苯甲腺嘌呤、激動素、或其混合物。
44. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中該生長素係為萘乙酸、吲哚乙酸、二氯苯氧乙酸、或其混合物。
45. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中該鹽類組成物係為 MS 基礎鹽類培養基。
46. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中該碳水化合物為醣類化合物。
47. 如申請專利範圍第 46 項所述之萃取物，其中該醣類化合物為肌醇、蔗糖、或其混合物。
48. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中該培養基更包含一維生素，且該維生素為維生素 B₁、維生素 B₆、菸鹼酸、或其混合物。
49. 如申請專利範圍第 36 項所述之萃取物，其中步驟(2)係將該巴西鳶尾組織於潮汐灌溉系統中培養。
50. 一種富含類黃酮化合物射干組織之培養方法，包含以下步驟：(a)提供一射干組織，其中該射干組織細胞為具有分裂能力之根部或葉部；(b)將該射干組織置於一培養基中培養；以及(c)培養形成一射干癒合組織；其中該培養基包含至少一生長調節劑、一鹽類組成物、以及至少一碳水化合物，且該生長調節劑係為細胞分裂素(cytokinins)、生長素(auxins)、或其混合物；以及該鹽類組成物係為鉀鹽、硝酸鹽、銨鹽、鎂鹽、硫酸鹽、鈣鹽、氯鹽、磷鹽、錳鹽、碘鹽、硼酸鹽、鋅鹽、銅鹽、鈉鹽、鉬鹽、鈷鹽、鐵鹽、醋酸鹽、或其混合物。
51. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中該細胞分裂素係為苯甲腺嘌呤(6-benzyladenine,BA)、激動素(kinetin)、或其混合物。
52. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中該生長素係為萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid,NAA)、吲哚乙酸(indoleacetic acid,IAA)、二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid,2,4-D)、或其混合物。
53. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中該生長調節劑之劑量範圍係為 0.01~2.0 mg^l⁻¹。
54. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中該鹽類組成物係為 MS 基礎鹽類培養基(Murashige and Skoog medium)。
55. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中該碳水化合物為醣類化合物。
56. 如申請專利範圍第 55 項所述之培養方法，其中該醣類化合物為肌醇(myo-inositol)、蔗糖(sucrose)、或其混合物。
57. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中該培養基更包含一維生素，且該維生素為維生素 B₁(thiamine HCl)、維生素 B₆(pyridoxine HCl)、菸鹼酸(nicotinic acid)、或其混合物。
58. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中該培養基之酸鹼值範圍係為 5~7。
59. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中步驟(b)之培養溫度範圍為 20 ~30 。
60. 如申請專利範圍第 50 項所述之培養方法，其中步驟(b)中係以震盪培養該射干組織。
61. 一種富含類黃酮化合物之射干癒合組織，且該射干癒合組織具有總類黃酮化合物含量相當於 400~3000mg 桂皮酸/g 射干癒合組織乾重，其中該射干癒合組織係由以下步驟形成：(a)提供一射干組織，其中該射干組織細胞為具有分裂能力之根部或葉部；(b)將該射干組織置於一培養基中培養；以及(c)培養形成一射干癒合組織；其中該培養基包含至少一生長調節劑、一鹽類組成物、以及至少一碳水化合物；該生長調節劑係為細胞分裂

素、生長素、或其混合物；以及該鹽類組成物係為鉀鹽、硝酸鹽、銨鹽、鎂鹽、硫酸鹽、鈣鹽、氯鹽、磷鹽、錳鹽、碘鹽、硼酸鹽、鋅鹽、銅鹽、鈉鹽、鉬鹽、鈷鹽、鐵鹽、醋酸鹽、或其混合物。

62. 如申請專利範圍第 61 項所述之射干癒合組織，其中該細胞分裂素係為苯甲腺嘌呤、激動素、或其混合物。
63. 如申請專利範圍第 61 項所述之射干癒合組織，其中該生長素係為萘乙酸、吲哚乙酸、二氯苯氧乙酸、或其混合物。
64. 如申請專利範圍第 61 項所述之射干癒合組織，其中該鹽類組成物係為 MS 基礎鹽類培養基。
65. 如申請專利範圍第 61 項所述之射干癒合組織，其中該碳水化合物為醣類化合物。
66. 如申請專利範圍第 65 項所述之射干癒合組織，其中該醣類化合物為肌醇、蔗糖、或其混合物。
67. 如申請專利範圍第 61 項所述之射干癒合組織，其中該培養基更包含一維生素，且該維生素為維生素 B₁、維生素 B₆、菸鹼酸、或其混合物。
68. 一種富含類黃酮化合物的萃取物之製造方法，包含以下步驟：(a)提供一射干癒合組織，且該射干癒合組織具有總類黃酮化合物含量相當於 400~3000mg 桂皮酸/g 射干癒合組織乾重，其中該射干癒合組織係由以下步驟形成：(1)提供一射干組織，其中該射干組織細胞為具有分裂能力之根部或葉部；(2)將該射干組織置於一培養基中培養；以及(3)培養形成一射干癒合組織；其中該培養基包含至少一生長調節劑、一鹽類組成物、以及至少一碳水化合物；該生長調節劑係為細胞分裂素、生長素、或其混合物；以及該鹽類組成物係為鉀鹽、硝酸鹽、銨鹽、鎂鹽、硫酸鹽、鈣鹽、氯鹽、磷鹽、錳鹽、碘鹽、硼酸鹽、鋅鹽、銅鹽、鈉鹽、鉬鹽、鈷鹽、鐵鹽、醋酸鹽、或其混合物；(b)乾燥該射干癒合組織；(c)將已乾燥之射干癒合組織置於一醇類溶液，並加熱該醇類溶液；以及(d)冷卻該醇類溶液，且過濾該醇類溶液，以得一萃取物。
69. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中乾燥方法為冷凍真空乾燥法。
70. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中該醇類溶液係為甲醇或乙醇。
71. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中加熱溫度範圍係為 50 ~70 。
72. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中加熱時並同時震盪該醇類化合物。
73. 如申請專利範圍第 72 項所述之製造方法，其中震盪係以超音波震盪。
74. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中該細胞分裂素係為苯甲腺嘌呤、激動素、或其混合物。
75. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中該生長素係為萘乙酸、吲哚乙酸、二氯苯氧乙酸、或其混合物。
76. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中該鹽類組成物係為 MS 基礎鹽類培養基。
77. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中該碳水化合物為醣類化合物。
78. 如申請專利範圍第 77 項所述之製造方法，其中該醣類化合物為肌醇、蔗糖、或其混合物。
79. 如申請專利範圍第 68 項所述之製造方法，其中該培養基更包含至少一維生素，其中該維生素為維生素 B₁、維生素 B、菸鹼酸、或其混合物。
80. 一種富含類黃酮化合物之萃取物，其中該萃取物係由以下步驟製成：(a)提供一射干癒合組織，且該射干癒合組織具有總類黃酮化合物含量相當於 400~3000mg 桂皮酸/g 射干癒合組織乾重，其中該射干癒合組織係由以下步驟形成：(1)提供一射干組織，其中該射干

(6)

組織細胞為具有分裂能力之根部或葉部；(2)將該射干組織置於一培養基中培養；以及(3)培養形成一射干癒合組織；其中該培養基包含至少一生長調節劑、一鹽類組成物、以及至少一碳水化合物；該生長調節劑係為細胞分裂素、生長素、或其混合物；以及該鹽類組成物係為鉀鹽、硝酸鹽、鉍鹽、鎂鹽、硫酸鹽、鈣鹽、氯鹽、磷鹽、錳鹽、碘鹽、硼酸鹽、鋅鹽、銅鹽、鈉鹽、鉬鹽、鈷鹽、鐵鹽、醋酸鹽、或其混合物；(b)乾燥該射干癒合組織；(c)將已乾燥之射干癒合組織置於一醇類溶液，並加熱該醇類溶液；以及(d)冷卻該醇類溶液，且過濾該醇類溶液，以得一萃取物。

81. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中該萃取物具有抑制癌細胞生長之能力。
82. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中乾燥方法為冷凍真空乾燥法。
83. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中該醇類溶液係為甲醇或乙醇。
84. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中加熱溫度範圍係為 50 ~70 。
85. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中加熱時並同時震盪該醇類化合物。
86. 如申請專利範圍第 85 項所述之萃取物，其中震盪係以超音波震盪。
87. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中該細胞分裂素係為苯甲腺嘌呤、激動素、或其混合物。
88. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中該生長素係為萘乙酸、吲哚乙酸、二氯苯氧乙酸、或其混合物。
89. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中該鹽類組成物係為 MS 基礎鹽類培養基。
90. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中該碳水化合物為醣類化合物。
91. 如申請專利範圍第 90 項所述之萃取物，其中該醣類化合物為肌醇、蔗糖、或其混合物。
92. 如申請專利範圍第 80 項所述之萃取物，其中該培養基更包含一維生素，且該維生素為維生素 B₁、維生素 B₆、菸鹼酸、或其混合物。

圖式簡單說明

圖 1 係本發明之試管中巴西鳶尾根莖組織。

圖 2 係本發明之試管中射干癒合組織。

圖 3 係本發明之試管中巴西鳶尾根莖組織，於 0.1mg l^{-1} 萘乙酸、或 1.0mg l^{-1} 萘乙酸和 0.1mg l^{-1} 二氯苯氧乙酸培養下總類黃酮化合物之含量。

圖 4 係本發明之試管中巴西鳶尾根莖組織，於 0.1mg l^{-1} 萘乙酸、或 1.0mg l^{-1} 萘乙酸和 0.1mg l^{-1} 二氯苯氧乙酸培養下鳶尾異黃酮之含量。

(7)

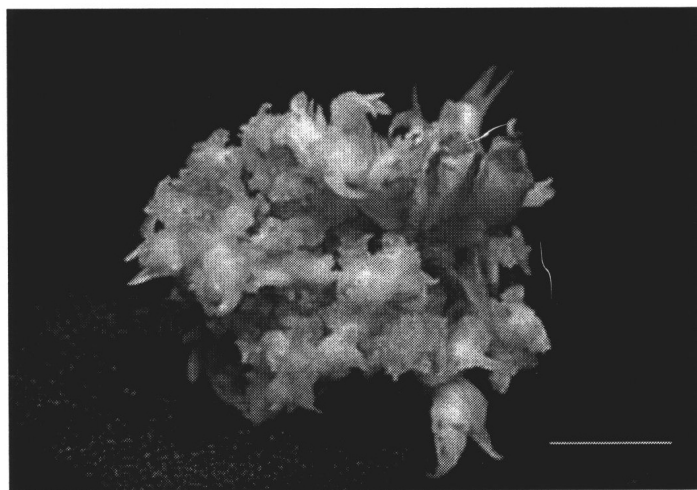


圖 1

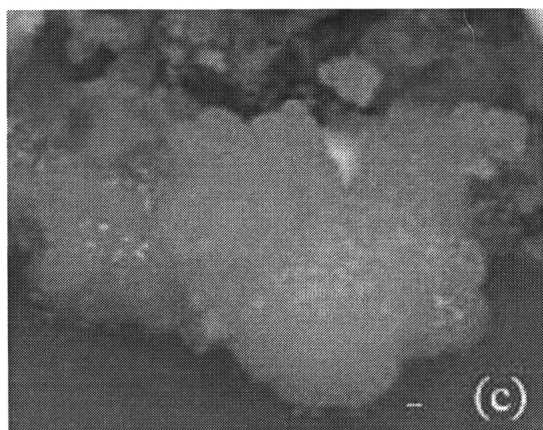


圖 2

(8)

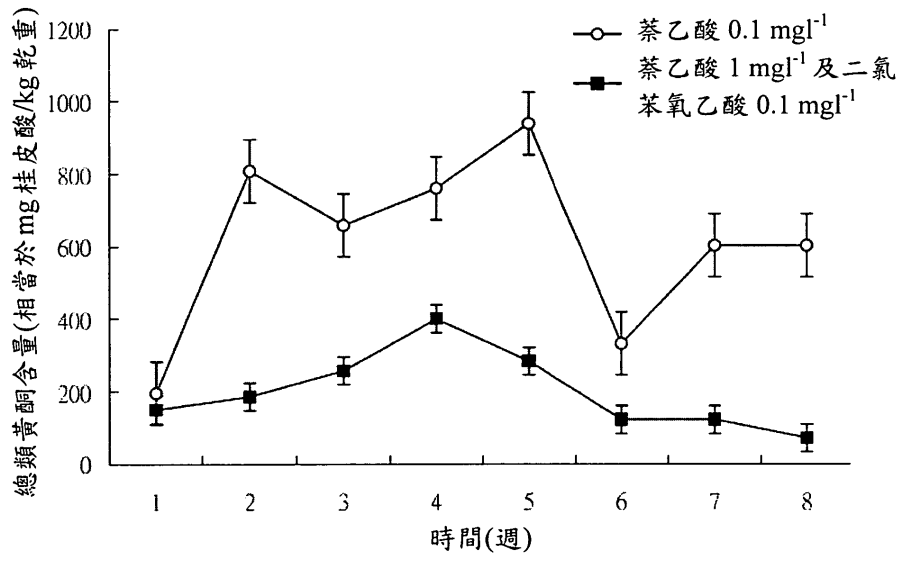


圖 3

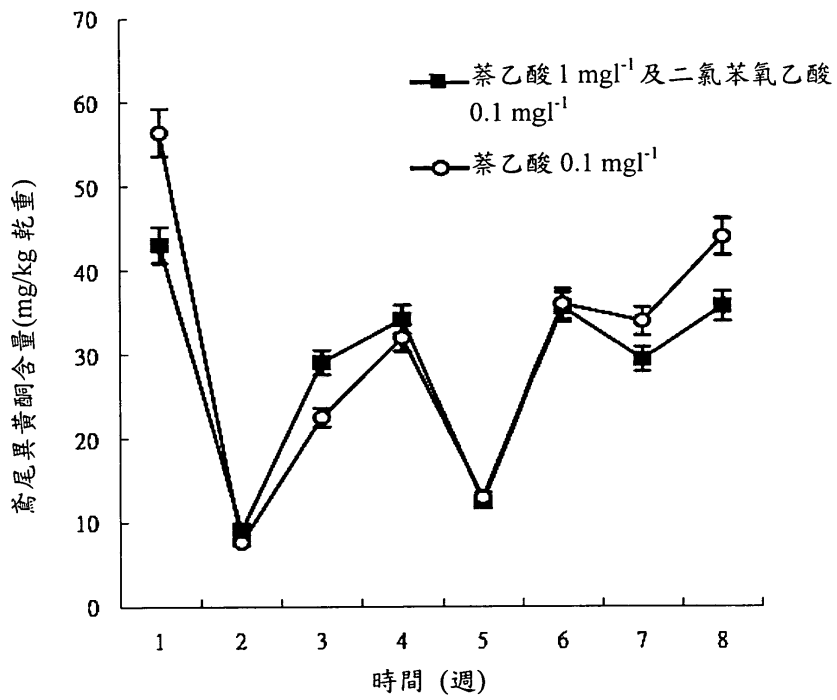


圖 4