編號：CCMP96-RD-041、CCMP97-RD-105

常用中西藥同時併用之交互作用風險評估（全程總報告）

胡幼圃
國防醫學院藥學系

摘　要

針對人體主要第一相及第二相代謝酵素 CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4 及 UGT2B7 有顯著抑制作的常用濃縮中藥(如蒼耳散、正骨紫金丹、甘露飲及清心蓮子飲)進行動物試驗，確認其產生交互作用的風險。

(1)單一劑量常用濃縮中藥併服經 CYP3A4 代謝模式藥物之動物藥動試驗：控制組大鼠僅口服給予模式藥物 midazolam 20mg/kg，實驗組大鼠另外併服知柏地黃丸萃取液，劑量為仿單臨床服用劑量的 5 倍。(2)單一劑量濃縮中藥併服經 UGT2B7 代謝模式藥物之動物藥動試驗：控制組大鼠僅口服給予模式藥物 Nalbuphine 20 mg/Kg，實驗組大鼠另外併服桑菊飲，劑量為仿單臨床服用劑量的 5 倍。(3)多劑量濃縮中藥併服經 CYP2C9 代謝模式藥物之動物藥動試驗：控制組大鼠給予生理食鹽水(tid, 7days)後，第八天僅口服給予模式藥物 Fluvastatin 1.5mg/Kg，實驗組大鼠則餵食甘露飲及銀翹散(tid, 7days)，劑量為仿單臨床服用劑量的 1 倍，第八天口服給予中藥懸浮液及模式藥物；(4)多劑量常用濃縮中藥併服經 CYP2D6 代謝模式藥物之動物藥動試驗：控制組給予生理食鹽水(tid, 7days)後，第八天僅口服給予模式藥物 dextromethorphan 20 mg/kg，實驗組大鼠則餵食正骨紫金丹及川芎茶調散(tid, 7days)，劑量為仿單臨床服用劑量的 1 倍，第八天口服給予中藥懸浮液及模式藥物。控制組及實驗組於最後一次給藥後於特定時間點自大白鼠尾靜脈取血，每次取血 0.3ml 並加入適量之肝素，以防止凝血，利用超高速離心將血漿分離後置於-80℃冰箱冷凍。血液檢品的處理方法是採用串連質譜儀高層液相分析儀的分析方法探針藥物在大鼠體內隨時間的變化分析後，即可以 WinNonlin 分析探針藥物於大鼠體內的藥動學參數。(5)大白鼠肝毒理組織切片觀察：動物試驗經餵食過中藥之大白鼠將進行組織切片觀察，以肝組織切片觀察其肝臟的變化以確認該中藥對肝臟的影響。

大白鼠口服 midazolam 同時併服知柏地黃丸後會使 midzolam 在體內之吸收量(AUC_{total})顯著增加 1.39 倍($p<0.005$)，體內最高濃度(C_{max})也顯著升高 1.36 倍($p<0.05$)，病理切片觀察發現，併服知柏地黃丸組 HAI score 與控制組並未達顯著

差異之程度。大白鼠口服 nalbuphine 同時併服桑菊飲後會使 nalbuphine AUC_{total} 顯著增加 2.90 倍($p<0.001$)，C_{max} 也顯著升高 3.31 倍($p<0.05$)，病理切片觀察發現，併服桑菊飲並不會有肝損傷發現。大白鼠長期餵食甘露飲、銀翹散後併用 Fluvastatin，Cmax 顯著增加 1.7 倍($p<0.05$)、1.8 倍($p<0.01$)，AUCtotal，也顯著升高 1.8 倍($p<0.005$)、1.6 倍($p<0.005$)，Cl/F 顯著減緩至 0.6 倍($p<0.005$)、0.7 倍($p<0.01$)，Vd/F 也顯著減緩 0.4 倍($p<0.005$)、0.5 倍($p<0.005$)。另由肝病理切片觀察發現：長期服用銀翹散、甘露飲後併服 fluvastatin 對大白鼠肝組織會有輕微但不顯著的傷害。大白鼠長期餵食正骨紫金丹、川芎茶調散後併服 dextromethorphan，大白鼠體內血漿之 dextromethorphan 濃度及藥物動力學並無顯著改變，肝組織亦無顯著的傷害。

關鍵詞：肝臟代謝酵素、中西藥交互作用、濃縮中藥

Number: CCMP96-RD-041、CCMP97-RD-105

Chinese Medicines Affect the Activity of Hepatic Metabolic Enzymes (Final Report)

Oliver Yoa-Pu Hu, Ph.D.
School of Pharmacy, National Defense Medical Center

ABSTRACT

To evaluate the drug-drug interaction between Chinese medicine and marketed drug. This project is help to clarify the safety of Chinese medicine and then help the people keeping from hepatic injury when using Chinese medicines and synthetic agents.

(1)SD rats PK study of single dose of midazolam and Zhi-bai-di-huang-wan (ZBDHW): 12 SD rats were randomly and equally divided into study and control group. 6 rats of study groups were orally given 20 mg/kg of midazolam and 0.33 mg/kg of ZBDHW and the other 6 SD rats were orally given 20 mg/kg of midazolam only. (2)SD rats PK study of single dose of nalbuphine and Sang-ju-yin (SJY): 12 SD rats were randomly and equally divided into study and control group. 6 rats of study group were orally given 20 mg/kg of nalbuphine and 0.17 mg/kg of SJY and the other 6 SD rats of control group were orally given 20 mg/kg of nalbuphine only. (3)SD rats PK study of single dose of fluvastatin and multiple doses of Gan-Lu-Yin (GLY) or Yin-Chao-San (YCS): 18 SD rats were randomly and equally divided into GLY, YCS and control group. 6 rats of GLY groups were orally given 1.5 mg/kg of fluvastatin and multiple doses of 33 mg/kg of GLY (tid for 7 days), 6 rats of GLY groups were orally given 1.5 mg/kg of fluvastatin and multiple doses of 66 mg/kg of YCS (tid for 7 days), and the other 6 SD rats were orally given 20 mg/kg of fluvastatin only. (4)SD rats PK study of single dose of dextromethorphan and multiples doses of Cheng-Gu-Zu-Gin-Dan (CGZGD) or Chuan-Ziun-Cha-Tiao-San (CZCTS): 18 SD rats were randomly and equally divided into CGZGD, CZCTS and control group. 6 rats of CGZGD group were orally given 20 mg/kg of dextromethorphan and multiple doses of 71.1 mg/kg of CGZGD (tid for 7 days), 6 rats of CGZGD group were orally given 20 mg/kg of dextromethorphan and multiple doses of 55.5 mg/kg of CZCTS (tid for 7 days) and the other 6 SD rats of control group were orally given 20 mg/kg of

dextromethorphan only. All the blood samples were expressed into plasma and stored at -80°C before assayed with LC/MS/MS. (5)Pathological observations of liver slices were also conducted to confirm the effects of target Chinese medicine to liver tissues.

The extent of absorption (AUC_{total}) of midzolam in SD rats were significantly increased to 1.39 folds by ZBDHW ($p<0.005$).The Cmax of midazolam in SD rats were also significantly increased 1.36 folds ($p<0.05$). No significant pathological observation was found between study and control groups. The extent of absorption (AUC_{total}) of nalbuphine in SD rats were significantly increased to 2.90 folds by SJY ($p<0.001$). The Cmax of nalbuphine in SD rats were also significantly increased 3.31 folds $p<0.05$). No significant pathological observation was found between study and control groups. The extent of absorption (AUC_{total}) of fluvastatin in SD rats were significantly increased to 1.8 and 1.6 folds by GLY and YCS ($p<0.005$).The Cmax of fluvastatin in SD rats were also significantly increased 1.65 and 1.78 folds ($p<0.05$). No significant pathological observation was found between study and control groups. The extent of absorption (AUC_{total}) and Cmax of dextromethorphan in SD rats of CGZGD and CZCTS group were not significantly different from control group. No significant pathological observation was found between study and control groups.

Significant drug-drug interactions were found between Chinese and Western medicines.

Keywords: CYP450, UGT, drug-drug interaction

壹、前言

藥物對肝臟產生毒性主要會造成肝臟的血流量的改變及肝細胞本身的損傷，而這些改變及損傷所造成的影響最主要的即是肝臟代謝功能的變化。而肝臟代謝功能的變化即直接可能造成毒性物質的累積、藥物-藥物交互作用的產生等等嚴重影響人體健康的後果，因此，無論中藥或西藥均應特別注意其對肝臟代謝功能之影響。

中藥於國人已有數千年的使用經驗，一般民眾無論是在養生或保健上均有使用的需求及習慣，因此，中西藥併用的機會實較西方社會高出許多。而中藥不同於西藥之處即在於其成份之複雜、作用之廣泛，即便與已有清楚藥物資訊的上市藥物併用亦難避免不良交互作用的發生，而且中藥對肝功能的影響測試未如西藥一樣已成例行要求的試驗。

腸肝的藥物代謝效應常常在口服吸收中扮演非常重要的角色，一個很顯著的例子即為葡萄柚汁反映在小腸及肝的藥物代謝酵素在人的體內的實驗，這個研究包含以葡萄柚汁當作一個選擇性小腸的 CYP3A 同功酶抑制劑[1-6]，而使 felodipine 有較高的口服生體利用率。然而，在葡萄柚汁中負責酵素抑制的活性成份還沒有被真正的確認。這個例子證明：一杯葡萄柚汁就很有可能增加口服利用率，卻使我們更加憂心：國人常用之中藥亦非常可能傷害肝臟及影響人體代謝藥物的酵素進而與上市西藥產生嚴重的交互作用。因此，基於此想法，本計畫的目標即為評估以 CYP2D6、CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 及 UGT2B7 代謝活性影響之中藥為指標，進一步評估中西藥併服發生交互作用的風險。

Cytochrome P450 (CYP450)為藥物體內代謝以進行氧化還原反應之重要酵素，CYP450 區分為多種亞型 (subfamily)，廣泛分佈在肝臟、腸道及其他組織中[7]，以進行 phase I reaction 而利於代謝物排出體外，各種亞型及次亞型一般依據胺基酸序列相似度予以區分[8]，因此其酵素命名橫跨生物界各物種之間，包含動物、植物及微生物，Cytochrome P450 中文譯名為『細胞色素 P450』，Cytochrome 乃指一群含三價鐵離子並附著於細胞內質網的酵素蛋白質，此含鐵蛋白結構及功能類似血紅素(hemoglobin)可負責電子轉移及能量釋放，一般稱之為 heme-group 或 prosthetic group，CYP450 則表示當一氧化碳結合於此酵素後，經可見光分光光譜儀檢測[9]，在波長 450 nm 上具有最大吸光係數，因此定義為 CYP450。

藥物經由各種給藥途徑吸收進入體內後，遵循動力學模式接續進行代謝及排除過程，藥物在體內的代謝方式主要分為一相反應(phase Ⅰ reaction)及二相反應(phase Ⅱ reaction)，兩種機制皆可形成親水性代謝物，以利藥物排出體外。

混合功能單氧化酶(mixed function monooxygenase)是負責體內 phase I reaction 的主要酵素，而 CYP450 則是屬於此型酵素，也就是經由 CYP450, CYP450 reductase, cytochrome b5 等群組蛋白負責藥物的氧化還原及水解反應，而 phase Ⅱ reaction 則主要為接合反應 (conjugation)，可大致區分為六類，其中以 glucuronidation、sulfation 及 glutathione conjugation 三種最為常見。

Glucuronidation 是體內最主要的 phase Ⅱ reaction，具有較高的催化容量 (catalytic capacity)，意即當受質濃度增加時，代謝過程仍可維持一階次酵素動力學，glucuronidation 的代謝過程是由醣蛋白酵素(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)催化受質接上 glucuronic acid 以形成親水性代謝物，而此 glucuronic acid 則來自於一高能量中間體 UDP-glucuronic acid (UDPGA)[10]，sulfation 及 glutathione conjugation 則屬低催化容量的 phase Ⅱ reaction，當體內受質濃度偏高時，即可能產生酵素飽合現象，而遵循零階次酵素動力學。

1994 年 Shimada 及 Yamazaki 等學者，為求瞭解細胞色素的含量比及種類分佈，而分離三十位日本人及高加索人的肝臟酵素，其研究發現雖然西方人細胞色素總體含量較東方人高，但人類肝臟細胞色素的含量比例並不隨人種及性別而有顯著差異[11]，此研究也提供後續研究者對於藥物代謝及酵素專一性一個相當完整資訊，其中值得討論的是：各型細胞色素的含量以 CYP3A 所佔比例最高約為 28.2 %，這個結果同時也輔證過去一般認定體內藥物代謝主要經由 CYP3A 負責 phase I 代謝的定論，然而經由免疫化學分析法鑑定結果，CYP2C subfamily 同時也佔整體 CYP450 酵素含量的 18.2 %，其含量比高居第二，僅次於 CYP3A，其次分別是 CYP1A2 (12.7%)、CYP2E1 (6.6%)、CYP2A6 (4.0%)、CYP2D6 (1.5%) 及 CYP2B6 (0.2%)；其中值得注意的是 CYP2D6 僅佔整體含量 1.5 % 卻專一性的代謝約 25 %的臨床用藥，由以上分析，本計畫即選擇 Phase I 及 Phase II 中含量最多及代謝藥物最多的 CYP2D6、CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 及 UGT2B7 等代謝酵素來進行與中藥對經其代謝藥物的交互作用的評估。

今日國人使用中藥藥物治療疾病有明顯增加的趨勢，常常中藥與西藥之間產生嚴重交互作用而未發覺，如：金絲桃草(St. John’s wort)常被使用於抗憂鬱症，對於輕度到中度的憂鬱症的治療效果，在德國是很多年的傳統藥草，在美國則以健康食品的膠囊或錠劑食品上市，然而已有數個臨床報告指出使用金絲桃草的萃取物會與多種的處方藥物產生重要的交互作用[12-19]。在相關的仿單中亦增加此項交互作用的警語，主要是經由對腸道及肝臟 CYP3A 酵素的誘導效應，如 Cyclosporin、Portease inhibitor：indinavir、nevirapine、Oral contraceptives： ethinyloestradiol、Anticoagulants、Digoxin、

Antidipressant：amitriptyline 及 Theophylline 造成藥物交互作用，使得藥物療效降低[12-19]。

雖然我國傳統中草藥的使用已有數千年歷史，在【神農本草經】中記載：「藥有君臣佐使，以相宜攝合和」。所謂『君臣佐使』，即制方的法度，也就是中藥處方的準則。『君』乃指制方時，根據病變的主要症候選擇針對性的藥物為主藥；『臣』是指能輔助君藥加強療效的藥物；『佐』是既輔佐君藥，又幫助解決一些其它方面問題的藥物；而『使』乃指某種可以調和諸藥作用的藥物。

而中藥含有豐富的黃酮類，生物黃酮(Bioflavonoid, Flavonoid)這一類的物質，它們多存在於許多各種蔬果中，以花椰菜、胡蘿蔔、柑橘、黃豆、蘋果、蕃茄…等含量較高，黃酮類對於體內肝臟酵素及 P-glycoprotein 的影響，已經證實具有相當影響，實值得系統性探討其與西藥並用時可能產生的影響。因此，天然的中藥，即使是科學中藥亦是由植物或藥草研磨或萃取製成的;即使是單方的科學中藥,其中絕大部分均含有許多物質或成分(而非單一成分),目前已知已超過 6500 種 Flavonoids 經確認廣泛分佈於中藥植物中，誠如前所言，文獻已証實這些成分可經由抑制或促進負責藥物代謝的酵素，進而可能影響到其他西藥藥物吸收及代謝，以致常常造成了中西藥物交互作用(drug interaction)的可能及影響預期的藥物療效或造成毒性反應。

我們過去多年已進行了許多的中藥的研究，發現許多的中藥純成份的確能有效改變藥物吸收，其中包括可大幅促進 acyclovir, piroxicam 及 buprenorphine 等藥經皮吸收的中藥成份；另外，也發現許多可有效抑制或促進 Phase I 代謝酵素 CYP1A、CYP3A、CYP2C9 及 Phase II 代謝酵素 UGT2B 的中藥成份，而這些研究成果已成功獲得國內及國際共十項專利，另有四項專利正在申請中。本計畫將以二年時間，針對人體主要第一相及第二相代謝酵素 CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4 及 UGT2B7 有顯著抑制作的常用濃縮中藥(如蒼耳散、正骨紫金丹、甘露飲及清心蓮子飲)進行動物試驗，搭配 5 種主要經由 CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4 及 UGT2B7 代謝之西藥(如 theophylline, dextromethorphan, fluvastatin, midazolam 及 nalbuphine)短期及長期併服上述有顯著抑制作用之常用濃縮中藥再以 LC/MS/MS 檢測動物(大鼠或小鼠)體內藥物濃度即可進一步確認產生交互作用的風險。經動物試驗確認後，選擇其中交互作用最顯著者再進行人體臨床試驗，以真正驗証及評估中西藥併用產生交互作用的風險，供中西醫政策上之參考。本計畫之完成將可替中醫藥委員會建立常用中藥對肝功能影響之基礎資料庫及中西藥合併使用，可能造成之影響之資料庫。

貳、材料與方法

一、儀器設備

(一)液相層析串聯式質譜儀分析系統(LC/MS/MS):

1. Shimadzu HPLC 液相層析系統：

Central controller x1 (SCL-10Avp)

Autosampler x1 (SIL- 10ADvp)

Pump---------- x2 (LC- 10ADvp)

Column oven------x1 (CTO-10ASvp)

2. Column: 3μm, 50 × 2.1 mm, Cyano reverse phase column (Hypersil®)

3. ABI API 3000 串聯式質譜儀

(二)其他：

Sorvall® RT7 高速離心機

二、試藥

Morphine,6β-hydroxytestosterone, Testosterone, Morphine-3-glucuronide (購自 Cerilliant™); Ethoxyresorufin, Tolbutamide, Dextromethorphan, Alam ethicin , Resorufin, Dextrorphan ,4-hydroxytolbutamide (購自 Sigma®); Fluv astatin 購自 Norvatis; dextromeyhorphan 由美時製藥提供。

三、濃縮中藥

知柏地黃丸、桑菊飲、銀翹散、甘露飲、正骨紫金丹、川芎茶調散

四、分析方法

(一)Midazolam 及 1-OH-midazolam 分析

1. HPLC/MS/MS 條件及設定

採用高效能液相層析質譜儀 (Liquid Chromatography /Mass/ Mass LC/MS/MS, API 3000 triple-quadupole mass spectrometer equippe with an ionspray LC/MS interface) 進行分析：

(1) 幫浦：LC-10 AD VP series Binary, Shimadzu, Japan.

(2) 自動注射器：SIL-10AD VP, Shimadzu, Jopan.

(3) 質譜：API 3000 LC/MS/MS with Analyst 1.4, Applied Biosystems.

(4) 管柱：Hypersil® C18, 3 μm, 50 × 2.1 mm, Thermo Scientific, U.S.A.

(5) 移動相：0.1%Formic acid in water：0.1%Formic acid in MeOH= 45：55 (v/v)

(6) 流速：0.3 mL/min

(7) 注射體積：10 μL
(8) 分析時間：5 mins
(9) Ionization mode : ESI
(10) Ion Spray Voltage (IS) : 5.5 kV
(11) Curtain Gas (CUR) : 11
(12) Nebulizer Gas(NEB) : 10
(13) Temperature (TEM) : 375℃
(14) Collisionally Activated Dissociation (CAD) : 8
(15) Multiple reaction monitoring (MRM) parameter
(16) midazolam 母離子選擇為 326.3 (m/z)，子離子選擇為 291.2 (m/z); 1-OH-midazolam 母離子選擇為 342.1 (m/z)，子離子選擇為 324.1 (m/z); 內部標準品(internal standard) flunitrazepam 母離子選擇為 314 (m/z)，子離子選擇為 268 (m/z)

2. 試樣處理方法

檢品的處理步驟為，取 50μL 大鼠血漿，加入 50 μL 之內部標準品（internal standard: Flunitrazepam 10μg/mL）及 1 ml 的 dichlormethane/ ether（3: 7, v/v），震盪 4 分鐘後，以 2900×g 離心五分鐘，將離心後之檢品置於-80℃冰箱 20 分鐘，接著取出上清液，於 50℃下利用氮氣將檢品吹乾，並以 3mL 甲醇/ mini-Q 水(1:1, v/v)溶解已乾燥之檢品，取 50 μL 檢品以 HPLC-MS/MS 分析。

3. 校正曲線製作

取 Midazolam stock solution 1mg/mL 20μL 加入 dilute solvent (plasma)，以序列稀釋作一組標準濃度依序為 10000、8000、6000、4000、2000、1000、500、100、20 ng/mL，再加入 50 μL 內部標準品 Flunitrazepam(10μg/mL)後以 2900×g 離心 5 分鐘，取上清液注入 LC/MS/MS，以 midazolam 及內部標準品的波峰面積比值與其相對濃度作圖，計算標準檢量曲線，並以標準偏差（standard deviation, SD）、變異係數（%CV）及誤差（%error）來驗證分析方法的精確性及準確性，同時以線性迴歸係數來代表標準曲線之線性（linearity）關係，並確效同日間（Intra-day）及異日間（Inter-day）的品管檢品。

取 1’-OH-midazolam stock solution 100μg/mL 50μL 加入 dilute solvent (plasma)，以序列稀釋作一組標準濃度依序為 25、250、500、1000、2000、3000、4000、5000 ng/mL，再加入 50 μL 內部標準品 Flunitrazepam(10μg/mL)後以 2900×g 離心 5 分鐘，取上清液注入 LC/MS/MS，以 1’-OH-midazolam 及內部標準品的波峰面

積比值與其相對濃度作圖，計算標準檢量曲線，並以標準偏差（standard deviation, SD）、變異係數（%CV）及誤差（%error）來驗證分析方法的精確性及準確性，同時以線性迴歸係數來代表標準曲線之線性（linearity）關係，並確效同日間（Intra-day）及異日間（Inter-day）的品管檢品。

(二)Fluvastatin 分析

1. HPLC/MS/MS 條件及設定

採用高效能液相層析質譜儀 (Liquid Chromatography /Mass/ Mass LC/MS/MS, API 3000 triple-quadupole mass spectrometer equippe with an ionspray LC/MS interface) 進行分析：

(1) 幫浦：LC-10 AD VP series Binary, Shimadzu, Japan.
(2) 自動注射器：SIL-10AD VP, Shimadzu, Jopan.
(3) 質譜：API 3000 LC/MS/MS with Analyst 1.4, Applied Biosystems.
(4) 管柱：層析管採用 3μm, 50 × 2.1 mm, C18 reverse phase column (Hypersil®)
(5) 移動相：移動相採由 formic acid: H2O: Methanol = 2: 20: 80
(6) 流速：流速設定為 250 μl/min
(7) 注射體積：5 μL
(8) 分析時間：5 mins
(9) Ionization mode : ESI
(10) Ion Spray Voltage (IS) : 5.5 kV
(11) Curtain Gas (CUR) : 11
(12) Nebulizer Gas(NEB) : 10
(13) Temperature (TEM) : 375℃
(14) Collisionally Activated Dissociation (CAD) : 8
(15) Multiple reaction monitoring (MRM) parameter
(16) Fluvastatin 母離子選擇為 412.2 (m/z)，子離子選擇為 266 (m/z)；內部標準品(internal standard) indomethacin 母離子選擇為 358.3 (m/z)，子離子選擇為 138 (m/z)

2. 試樣處理方法

檢品的處理步驟為，取 100μL 大鼠血漿，加入 50 μL 之內部標準品（internal standard: Indomethacid 200ng/mL）及 1 ml 的 0.75M Ammonium acetate pH=3(以濃 HCl 滴定)，再加入 5 mL diisopropyl ether，voter 30 分鐘後，將檢品置於-80℃冰箱 30 分鐘，接著取出上清液，於 30℃下利用氮氣將檢品吹乾，並 100μL

mobile phase (水：MeOH=25:75)溶解已乾燥之檢品，取 100 μL 檢品以 HPLC-MS/MS 分析。

3. 校正曲線製作

取 Fluvastatin stock solution 1mg/mL 20μL 加入 dilute solvent (plasma)，以序列稀釋作一組標準濃度依序為 0.25、0.5、1、5、10、50、100、250 ng/mL，再加入 50 μL 內部標準品 Indomethacid (200ng/mL)及 1 ml 的 0.75M Ammonium acetate pH=3(以濃 HCl 滴定)，再加入 5 mL diisopropyl ether，voter 30 分鐘後，將檢品置於-80℃冰箱 30 分鐘，接著取出上清液，於 30℃下利用氮氣將檢品吹乾，並 100μL mobile phase (水：MeOH=25:75)溶解已乾燥之檢品，取 100 μL 檢品以 HPLC-MS/MS 分析。

以 Fluvastatin 及內部標準品的波峰面積比值與其相對濃度作圖，計算標準檢量曲線，並以標準偏差（standard deviation, SD）、變異係數（%CV）及誤差（%error）來驗證分析方法的精確性及準確性，同時以線性迴歸係數來代表標準曲線之線性（linearity）關係，並確效同日間（Intra-day）及異日間（Inter-day）的品管檢品。

(三)Dextromethorphan 分析

1. HPLC/MS/MS 條件及設定

採用高效能液相層析質譜儀 (Liquid Chromatography /Mass/ Mass LC/MS/MS, API 3000 triple-quadupole mass spectrometer equippe with an ionspray LC/MS interface) 進行分析：

(1) 幫浦：LC-10 AD VP series Binary, Shimadzu, Japan.
(2) 自動注射器：SIL-10AD VP, Shimadzu, Jopan.
(3) 質譜：API 3000 LC/MS/MS with Analyst 1.4, Applied Biosystems.
(4) 管柱：層析管採用 3.5μm, 100 × 4.6 mm, C18 reverse phase column (Symmetry®)
(5) 移動相：移動相採由 formic acid: H2O: ACN = 2: 20: 80
(6) 流速：250 μl/min
(7) 注射體積：10 μL
(8) 分析時間：5 mins
(9) Ionization mode : ESI
(10) Ion Spray Voltage (IS) : 5.5 kV
(11) Curtain Gas (CUR) : 11
(12) Nebulizer Gas(NEB) : 10

(13) Temperature (TEM) : 375℃

(14) Collisionally Activated Dissociation (CAD) : 8

(15) Multiple reaction monitoring (MRM) parameter

(16) Devtromethorphan 母離子選擇為 272.4 (m/z)，子離子選擇為 147.1 (m/z)；內部標準品(internal standard) propranolol 母離子選擇為 261.2 (m/z)，子離子選擇為 116.2 (m/z)

2. 試樣處理方法

檢品的處理步驟為，取 100μL 大鼠血漿，加入 50 μL 之內部標 準品（internal standard: propronolol 5mcg/mL）、100 μL 0.4N NH_4OH 及 3 mL methyl tert butyl ether，voter 5 分鐘後，離心 x 2900rpm, 5 min，將檢品置於-80℃冰箱 30 分鐘，接著取出上清液，於 40℃下利用氮氣將檢品吹乾，並加 200μL mobile phase(水:ACN=50:50)溶解已乾燥之檢品，取 100 μL 檢品以 HPLC-MS/MS 分析。

3. 校正曲線製作

取 dextromethorphan stock solution 1mg/mL 20μL 加入 dilute solvent (plasma)，以序列稀釋作一組標準濃度依序為 0.5、1、5、10、25、50、100、250 ng/mL，再加入 50 μL 內部標準品 propronolol (5mcg/mL)；100 μL 0.4N NH_4OH 及 3 mL methyl tert butyl ether，voter 5 分鐘後，離心 x 2900rpm, 5 min，將檢品置於-80℃冰箱 30 分鐘，接著取出上清液，於 40℃下利用氮氣將檢品吹乾，並 200μL mobile phase(水:ACN=50:50)溶解已乾燥之檢品，取 100 μL 檢品以 HPLC-MS/MS 分析。

以 Dextromethorphan 及內部標準品的波峰面積比值與其相對濃度作圖，計算標準檢量曲線，並以標準偏差（standard deviation, SD）、變異係數（%CV）及誤差（%error）來驗證分析方法的精確性及準確性，同時以線性迴歸係數來代表標準曲線之線性（linearity）關係，並確效同日間（Intra-day）及異日間（Inter-day）的品管檢品。

五、單一劑量常用濃縮中藥(知柏地黃丸)併服經 CYP3A4 代謝模式藥物(midazolam)之動物藥動試驗

在進行動物實驗之前，大鼠(SD rat)須禁食一日，控制組大鼠僅口服給予模式藥物 midazolam 20 mg/kg(藥品濃度 5mg/ml)，實驗組大鼠另外合併服用知柏地黃丸，給予大鼠知柏地黃丸的劑量為仿單標示人體平常服用劑量的 5 倍(0.33 克/公斤體重)。控制組及實驗組於給藥後 0, 2, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 與 240 分鐘自大白鼠尾靜脈取血 0.3 ml 並加入適量之肝素

(heparin)，以防止凝血，利用超高速離心將血漿分離後置於-80 ℃冰箱冷藏。血液檢品的處理方法是採用串連質譜儀高層液相分析儀的分析方法，探針藥物(midazolam)及其經 CYP3A4 代謝物(1-OH-midazolam)在大鼠體內隨時間的變化分析後，即可以 WinNonlin 分析探針藥物於大鼠體內的藥動學參數，亦即模式藥物於大鼠體內的吸收、分佈、代謝及排除在併服或不併服中藥製劑之後的變化即可做一比較，由此即可確認中藥製劑與西藥併服所產生的交互作用。

六、單一劑量常用濃縮中藥(桑菊飲)併服經 UGT2B7 代謝模式藥物(nalbuphine)之動物藥動試驗

在進行動物實驗之前，大鼠(SD rat)須禁食一日，控制組大鼠僅口服給予模式藥物 Nalbuphine 20 mg/Kg（溶於 Q 水，20 mg/mL），實驗組大鼠另外合併服用桑菊飲（順天堂製藥），給予桑菊飲的劑量為仿單標示人體平常服用劑量的 5 倍(0.17 克/公斤體重)。控制組及實驗組於最後一次給藥後於 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 及 24 小時，自大白鼠尾靜脈取血 0.3 ml 並加入適量之肝素(heparin)，以防止凝血，利用超高速離心將血漿分離後置於-80 ℃冰箱冷凍。血液檢品的處理方法是採用串連質譜儀高層液相分析儀的分析方法模式藥物(nalbuphine)在大鼠體內隨時間的變化分析後，即可以 WinNonlin 分析探針藥物於大鼠體內的藥動學參數，亦即探針藥物於大鼠體內的吸收、分佈、代謝及排除在併服或不併服中藥製劑之後的變化即可做一比較，由此即可確認中藥製劑對肝臟酵素的實際影響。

七、多劑量常用濃縮中藥併服經 CYP2C9 代謝模式藥物(Fluvastatin)之動物藥動試驗

控制組大鼠給予生理食鹽水(300mcL, tid, 7 days)後，第八天僅口服給予模式藥物 Fluvastatin 1.5 mg/Kg（溶於 Q 水，20 mg/mL），實驗組大鼠則是餵食甘露飲及銀翹散(tid, 7 days)，給予甘露飲及銀翹散的劑量為仿單標示人體平常服用劑量的 1 倍(33 mg/公斤體重、66 mg/公斤體重)，第八天口服給予中藥懸浮液及模式藥物 Fluvastatin 1.5 mg/Kg，在進行動物實驗之前，大鼠(SD rat)須禁食一日。控制組及實驗組於最後一次給藥後於 0.17, 0.33, 0.67, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 30 小時，自大白鼠尾靜脈取血 0.3 ml 並加入適量之肝素(heparin)，以防止凝血，利用超高速離心將血漿分離後置於-80 ℃冰箱冷凍。血液檢品的處理方法是採用串連質譜儀高層液相分析儀的分析方法，探針藥物(Fluvastatin)在大鼠體內隨時間變化的血中濃度經分析後，即可以 WinNonlin 分析探針藥物於大鼠體內的藥動學參數，亦即模式藥物於大鼠體內的吸收、分佈、代謝及排除在併服或不併服中藥製劑之後的變化即可做一比較，由此即可確認中藥製劑與西藥併服所產生的交互作用。

八、多劑量常用濃縮中藥併服經 CYP2D6 代謝模式藥物(dextromethorphan)

之動物藥動試驗：

控制組大鼠給予生理食鹽水(300mcL, tid, 7 days)後，第八天僅口服給予模式藥物 dextromethorphan 20 mg/kg(藥品濃度 20 mg/ml)，實驗組大鼠則是餵食正骨紫金丹及川芎茶調散(tid, 7 days)，給予正骨紫金丹及川芎茶調散的劑量為仿單標示人體平常服用劑量的 1 倍(71.1 mg/公斤體重、55.5 mg/公斤體重)，第八天口服給予中藥懸浮液及模式藥物 dextromethorphan 20 mg/Kg，在進行動物實驗之前，大鼠(SD rat)須禁食一日。控制組及實驗組於最後一次給藥後於 0.17, 0.33, 0.67, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 小時，自大白鼠尾靜脈取血 0.3 ml 並加入適量之肝素(heparin)，以防止凝血，利用超高速離心將血漿分離後置於-80 ℃冰箱冷凍。血液檢品的處理方法是採用串連質譜儀高層液相分析儀的分析方法探針藥物在大鼠體內隨時間的變化分析後，即可以 WinNonlin 分析探針藥物於大鼠體內的藥動學參數。

九、病理觀察

動物試驗經餵食過中藥之大白鼠將進行大白鼠毒理組織切片觀察，以肝組織切片觀察其肝臟的變化以確認該中藥對肝臟的影響。大白鼠在處理過後立刻犧牲，將以光學顯微鏡觀察之肝試樣以 10%磷酸緩衝液緩衝之福馬林固定脫水，並以 paraffin 包埋，接著將包埋之試樣切成 5μm 厚之切片，再以 hematoxylin, eosin 及 periodic acid Schiff 染色後即可做病理觀察之用。另外，將以電子顯微鏡觀察之肝切片，先以 cacodylate 緩衝液(0.1M, pH7.4)清洗，再於 20% aqueous osmium tetroxide 固定 1 小時，接著以 graded alcohol 脫水並包埋於 Spurr 樹脂。包埋後之試樣再以鑽石刀切成超薄片，再以 uranyl acetate 與 lead citrate 染色，處理好之試樣將以 transmission electron microscope (Hitachi 600, Hitachi Co., Japan)來做病理觀察，最後由病理醫師以 Modified Histological Activity Index (Modified HAI)判讀評分，肝組織受損越嚴重，其 HAI 分數越高，分數範圍 0-20 分。

參、結果

一、分析方法確效

(一)Midazolam

Midazolam 於大白鼠血漿中測定之標準曲線濃度範圍為 20～10000ng/mL。標準曲線異日間（n=6，如圖一）之線性迴歸，r 值為 0.9997，顯示本分析系統在所使用的濃度範圍內線性關係良好，精密度（precision, CV）與準確度（accuracy, ％error）皆在 15％規定範圍之內，如表一。

Midazolam 的分析確效驗證，包括 LLOQ (20ng/mL)、LQC (50ng/mL)、Medium QC (5000ng/mL)、High QC (7000ng/mL)四種濃度，其同日間（n=6）及異日間（n=6）之精密度（precision, CV）與準確度（accuracy, ％error）皆在 15％規定範圍之內，如表二-1 和表二-2。

(二)1-OH-midazolam

1'-OH-midazolam 於大白鼠血漿中測定之標準曲線濃度範圍為 25～5000ng/mL。標準曲線異日間（n=6，如圖二之線性迴歸，r 值為 0.9999，顯示本分析系統在所使用的濃度範圍內線性關係良好，精密度（precision, CV）與準確度（accuracy, ％error）皆在 15％規定範圍之內，如表三。

1'-OH-midazolam 的分析確效驗證，包括 LLOQ (25ng/mL)、LQC (50ng/mL)、Medium QC (2500ng/mL)、High QC (3500ng/mL)四種濃度，其同日間（n=6）及異日間（n=6）之精密度（precision, CV）與準確度（accuracy, ％error）皆在 15％規定範圍之內，如表四-1 和表四-2。由圖三可知 1'-OH-midazolam 與 4-OH-midazolam 分子量相同，但經由 LC-MS/MS 可以將 1'-OH-midazolam 與 4-OH-midazolam 分離，也確認本實驗所測得之 1'-OH-midazolam 濃度並非 1'-OH-midazolam 與 4-OH-midazolam 總和之濃度。

(三) Fluvastatin

Fluvastatin 於大白鼠血漿中測定之標準曲線濃度範圍為 0.25～250 ng/mL。標準曲線異日間（n=6，如圖四）之線性迴歸，r 值為 0.9998，顯示本分析系統在所使用的濃度範圍內線性關係良好，精密度（precision, CV）與準確度（accuracy, ％error）皆在 15％規定範圍之內，如表五。

Fluvastatin 的分析確效驗證，包括 LLOQ (0.25ng/mL)、LQC (0.75ng/mL)、Medium QC (125ng/mL)、High QC (225ng/mL)四種濃度，其同日間（n=6）及異日間（n=6）之精密度（precision, CV）與準確度（accuracy, ％error）皆在 15％規定範圍之內，如表六-1 和表六-2。

(四) Dextromethorphan

Dextromethorphan 於大白鼠血漿中測定之標準曲線濃度範圍為 1～250 ng/mL。標準曲線異日間（n=5，如圖五）之線性迴歸，r 值為 0.9984，顯示本分析系統在所使用的濃度範圍內線性關係良好，精密度（precision, CV）與準確度（accuracy, ％error）皆在 15％規定範圍之內，如表七。

Dextromethorphan 的分析確效驗證，包括 LLOQ (1ng/mL)、LQC (1.5ng/mL)、Medium QC (125ng/mL)、High QC (225ng/mL)四種濃度，其同日間（n=6）及異日間（n=6）之精密度（precision, CV）與準確度（accuracy, ％error）皆在 15％規定範圍之內，如表八-1 和表八-2。

二、單一劑量常用濃縮中藥(知柏地黃丸)併服經 CYP3A4 代謝模式藥物(midazolam)之動物藥動試驗

Midazolam 為強效安眠鎮靜劑，midazolam 在體內主要是經由 CYP3A4 代謝為 1-OH-midazolam，故 CYP3A4 的活性對 midazolam 在體內的代謝預期會有顯著的影響。本計畫選擇 midazolam 為模式藥，中藥則選擇在體外試驗對 CYP3A4 活性有顯著影響之知柏地黃丸(95 年計畫成果)。如圖八及九所示，當大白鼠口服 midazolam，同時給予單劑量(0.33 g/kg) 知柏地黃丸後，大白鼠體內血漿之 midazolam 及其代謝物 1-OH-midazolam 濃度均會顯著升高，而由表九之 midazolam 動力學參數來看，midazolam 體內最高濃度(Cmax)由控制組的 1.35 ± 0.25 μg/mL，在單劑量服用知柏地黃丸後，顯著升高至 2.21 ± 0.74 μg/mL ($p < 0.05$)。代表體內吸收藥物的總量的 AUC_{total}，則由控制組的 114.8 ± 35.6 min*μg/mL，單劑量服用桑菊飲後，顯著升高至 236.7 ± 62.0 min*μg/mL ($p < 0.001$)，大幅增加吸收達 2.06 倍；而代表藥物代謝速度的排除半衰期($t_{1/2}$)，由控制組的 57.1 ± 16.0 min，單劑量服用知柏地黃丸後，減緩至 63.3 ± 13.3 但未達統計之顯著差異，知柏地黃丸顯然會增加大白鼠吸收 midazolam 的能力。另外，由表十來看，併服知柏地黃丸也使代謝物 1-OH-midazolam 的最高濃度(Cmax) 由控制組的 565 ± 134 ng/mL，顯著升高至 767 ± 132 ng/mL ($p < 0.05$)；AUC_{total}，則由控制組的 50.1

± 8.3 min*μg/mL，顯著升高至 69.6 ± 9.9 min*μg/mL ($p < 0.005$)，增加達 1.39 倍。由此可知，人體併服 midazolam 及知柏地黃丸極可能會造成藥物交互作用，而產生危險。

三、單一劑量常用濃縮中藥(桑菊飲)併服經 UGT2B7 代謝模式藥物(nalbuphine)之動物藥動試驗

Nalbuphine 為嗎啡類強效鎮痛劑，一般用於手術後止痛及癌症疼痛控制，與其他嗎啡類藥物相同的是其主要副作用為呼吸抑制。Nalbuphine 在體內主要是經由 UGT2B7 代謝為 nalbuphine-3-glucuronide，故 UGT2B7 的活性對 nalbuphine 在體內的代謝預期會有顯著的影響。本計畫選擇 nalbuphine 為模式藥，中藥則選擇對 UGT2B7 活性有顯著影響之桑菊飲(95 年計畫成果)。如圖十一所示，當大白鼠口服 nalbuphine，同時給予單劑量(0.17 g/kg)桑菊飲後，大白鼠體內血漿之 nalbuphine 濃度會顯著升高，而由表十一之 nalbuphine 動力學參數來看，nalbuphine 體內最高濃度(Cmax)由控制組的 18 ± 7 ng/mL，在單劑量服用桑菊飲後，顯著升高至 60 ± 26 ng/mL ($p < 0.05$)。代表體內吸收藥物的總量的 AUC_{total}，則由控制組的 39.0 ± 11.6 hr*ng/mL，單劑量服用桑菊飲後，顯著升高至 113.2 ± 16.1 hr*ng/mL ($p < 0.001$)，大幅增加吸收達 2.9 倍；而代表藥物代謝速度的排除半衰期($t_{1/2}$)，由控制組的 2.92 ± 1.86 hr，單劑量服用桑菊飲後，減緩至 4.15 ± 3.02 但未達統計之顯著差異，桑菊飲顯然會增加大白鼠吸收 nalbuphine 的能力。由此可知，人體併服 nalbuphine 及桑菊飲極可能會造成藥物交互作用，而產生危險。

四、多劑量常用濃縮中藥(銀翹散、甘露飲)併服經 CYP2C9 代謝模式藥物(Fluvastatin)之動物藥動試驗

本實驗選用降血脂藥 fluvastatin (Lescol®) 作為體內試驗之模式藥，fluvastatin 是第一種完全由化學合成之 HMG-CoA reductase 抑制劑，口服生體可用率約 25~30 %，專一性受 CYP2C9 代謝，fluvastatin sodium 口服吸收可達 90 %，因此嚴重的初度效應是造成低生體可用率的主要原因，其中 CYP2C9 負責代謝 80 % fluvastatin，而其餘 isoenzyme 則負責另外的 20 %。中藥則選擇在體外試驗對 CYP2C9 活性有顯著影響的銀翹散與甘露飲。

濃縮中藥溶於擬胃液（1.2 g/L NaCl, pH = 1.2 ~ 2.0），超音波振盪 10 分鐘，以 1N NaOH 調整 pH 至 6.8，再以超音波振盪 10 分鐘，給藥前必須混合均勻。

多劑量組大白鼠(SD-rat)每次口服給予 66mg/kg 的甘露飲或 33mg/kg 的銀翹散，一天三次(0900, 1330, 1800)共七天，控制組則給予等量的生理食鹽

水。大鼠實驗前禁食乙日，多劑量組大鼠口服投予 66mg/kg 的甘露飲或 33mg/kg 的銀翹散併服 fluvastatin 1.5 mg/kg (溶於水, 2 mg/ml)，控制組僅給予 fluvastatin 1.5 mg/kg，抽血點連同空白檢品 (Blank) 共計十三點持續三十小時，分別為 0, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 360, 480, 720, 1080, 1440, 1800 min，每點抽血約 0.3~0.4 ml (可分離血漿約 150~200 μl)，取血之微量管預先加入 10 μl 500 IU 肝素 (heparin) 以防止凝血，血漿分離後避光置於 -80 ℃ 冰箱冷藏。因 Fluvastatin 具光敏感性，所以實驗時及處理樣品時需在黃光或綠光環境中進行。

如圖十二及十三所示，當大白鼠給予多劑量甘露飲(66mg/kg, tid, 7day)及銀翹散(33mg/kg, tid, 7day)後，第八天給與口服 Fluvastatin 併服甘露飲(66mg/kg)或銀翹散(33mg/kg)，大白鼠體內血漿之 Fluvastatin 濃度均會顯著升高，而由表十二之 Fluvastatin 動力學參數來看，Fluvastatin 體內最高濃度(Cmax) 由控制組的 8.7 ± 3.5 ng/mL，升高至 14.4 ± 1.7 ($p < 0.05$)、15.5 ± 5.46 ($p < 0.01$)。代表體內吸收藥物的總量的 AUCt，則由控制組的 80.3 ± 15.0 hr*ng/mL，升高至 141.1 ± 17.0 hr*ng/mL ($p < 0.005$)、129.2 ± 34.0 hr*ng/mL ($p < 0.005$)，增加吸收達 1.8、1.6 倍；AUC∞則由控制組的 92.4 ± 22.9 hr*ng/mL，顯著升高至 156.5 ± 23.2 hr*ng/mL ($p < 0.01$)、147.7 ± 52.8 hr*ng/mL ($p < 0.05$)，增加吸收 1.7、1.6 倍；而代表藥物清除速率的 Cl/F，由控制組的 17.12 ± 4.42 L/hr/kg，減緩至 9.76 ± 1.35 L/hr/kg ($p < 0.005$)、11.24 ± 3.79 L/hr/kg ($p < 0.01$)，代表藥物分布體積的 Vd/F，由控制組的 255.5 ± 100.1 L/kg，顯著降至 109.1 ± 21.0 L/kg ($p < 0.005$)、119.1 ± 48.1 L/kg ($p < 0.005$)銀翹散、甘露飲與顯然會增加大白鼠吸收 Fluvastatin 的能力；由此可知，銀翹散或甘露飲與 Fluvastatin 併服極可能會造成藥物交互作用，而產生危險。

五、多劑量常用濃縮中藥(正骨紫金丹、川芎茶調散)併服經 CYP2D9 代謝模式藥物(Dextromethorphan)之動物藥動試驗

Dextromethorphan 是一種鎮咳藥物，它的氫溴酸鹽（Dextromethorphan hydrobromide）常用於藥品中，Dextromethorphan 在中樞神經系統作用，抑制咳嗽，卻不抑制纖毛活動。Dextromethorphan 在腸胃被迅速吸收，在口服後 15 至 60 分鐘內可發揮藥效。口服後藥力可維持大約 3 至 8 小時。Dextromethorphan 在體內主要是經由 CYP2D6 代謝成 dextrorphan，即 3-hydroxy derivative of dextromethorphan，故 CYP2D6 的活性對 dextromethorphan 在體內的代謝預期會有顯著的影響。本計畫選擇 dextromethorphan 為模式藥，中藥則選擇對 CYP2D6 活性有顯著影響之正骨

紫金丹、川芎茶調散(95 年計畫成果)。濃縮中藥溶於擬胃液(1.2 g/L NaCl, pH = 1.2 ~ 2.0)，超音波振盪 10 分鐘，以 1N NaOH 調整 pH 至 6.8，再以超音波振盪 10 分鐘，給藥前必須混合均勻。

多劑量組大白鼠(SD-rat)每次口服給予 55.5mg/kg 的川芎茶調散或 71.1mg/kg 的正骨紫金丹，一天三次(0900, 1330, 1800)共七天，控制組則給予等量的生理食鹽水。大鼠實驗前禁食乙日，多劑量組大鼠口服投予 55.5mg/kg 的川芎茶調散或 71.1mg/kg 的正骨紫金丹併服 dextromethorphan 20 mg/kg (溶於水: MeOH=1 : 1, 20 mg/ml)，控制組僅給予 dextromethorphan 20 mg/kg，抽血點連同空白檢品 (Blank) 共計十三點持續二十四小時，分別為 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720, 1440 min，每點抽血約 0.3~0.4 ml (可分離血漿約 150~200 μl)，取血之微量管預先加入 10 μl 500 IU 肝素 (heparin) 以防止凝血，血漿分離後避光置於 -80℃ 冰箱冷藏。

如圖十四及圖十五所示，當大白鼠口服，同時給予多劑量的正骨紫金丹或川芎茶調散後併服 dextromethorphan，大白鼠體內血漿之 dextromethorphan 濃度並無顯著增加，而由表十三之 dextromethorphan 動力學參數來看，在川芎茶調散組其數值並無顯著的改變；在正骨紫金丹組，$t_{1/2}$ 及 MRT 雖有降低的趨勢，但並未達到顯著差異。

六、併服知柏地黃丸及 midazolam 對大白鼠肝臟組織之影響

以 Modified Histological Activity Index (Modified HAI)判讀評分單獨給予 midazolam 之控制組及同時給予 midazolam 及單劑量知柏地黃丸之實驗組，其 HAI score 分別為 1.50 ± 0.84 及 2.00 ± 0.00，以 Kruskal-Wallis test 及 Mann-Whitney test 分析二組間之差異，結果發現兩組之 HAI score 沒有顯著差異。

另由圖十六至十九之控制組的肝組織切片來看，無論是 portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery)或 central vein (CV)，細胞之 morphology 均無異狀；而單劑量給予知柏地黃丸組之圖二十至二十三來看，在 central vein (CV)附近則發現有發炎細胞增多(圓圈標記處)現象。由以上觀察可知，併服 midazolam 及知柏地黃丸對大白鼠肝組織會有一些輕微的不顯著的傷害。

七、併服桑菊飲及 nalbuphine 對大白鼠肝臟組織之影響

以 Modified Histological Activity Index (Modified HAI)判讀評分單獨給予 nalbuphine 之控制組及同時給予 nalbuphine 及單劑量桑菊飲之實驗組，其 HAI score 分別為 1.33 ± 0.82 及 1.00 ± 1.10，以 Kruskal-Wallis test 及 Mann-Whitney test 分析二組間之差異，結果發現兩組之 HAI score 沒有顯著差異。

另由圖二十四至二十六之控制組的肝組織切片來看，無論是 portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery)或 central vein (CV)，細胞之 morphology 均無異狀；而單劑量給予桑菊飲組之圖二十七至二十九來看，除在 CV 附近有極少發炎細胞被發現，基本上都跟控制組類似。由以上觀察可知，併服 nalbuphine 及桑菊飲對大白鼠肝組織並不會有顯著的傷害。

八、給予多劑量銀翹散或甘露飲後併服 fluvastatin 對大白鼠肝臟組織之影響

以 Modified Histological Activity Index (Modified HAI)判讀評分單獨給予 fluvastatin 之控制組及給予多劑量銀翹散或甘露飲(1x, tid)七天後併服 fluvastatin 之實驗組，其 HAI score 分別為 1.00 ± 0.33、3.33 ± 0.89 及 5.33 ± 0.44。

另由圖三十至三十二之控制組的肝組織切片來看，無論是 portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery)或 central vein (CV)，細胞之 morphology 均無異狀；而多劑量給予銀翹散組之圖三十三至三十五來看，在 central vein (CV)附近及 portal area (PV, 包含 bile duct, portal vein, hepatic artery)則發現有發炎細胞增多(圓圈標記處)現象。而多劑量給予甘露飲組之圖三十六至十九來看，在 central vein 附近及 portal area 則發現有發炎細胞增多(圓圈標記處)現象，肝葉及門脈區周邊(periportal)細胞出現空泡。由以上觀察可知，長期服用甘露飲或銀翹散後併服 fluvastatin 對大白鼠肝組織會有輕微但不顯著的傷害。

九、給予多劑量正骨紫金丹或川芎茶調散後併服 dextromethorphan 對大白鼠肝臟組織之影響

以 Modified Histological Activity Index (Modified HAI)判讀評分單獨給予 dextromethorphan 之控制組及給予多劑量川芎茶調散或正骨紫金丹七天後併服 dextromethorphan 之實驗組，其 HAI score 分別為 1.33 ± 0.44、2.17 ± 0.28 及 1.67 ± 0.44。

另由圖四十至四十二之控制組的肝組織切片來看，在 portal area 或 central vein，細胞之 morphology 均無異狀；而多劑量給予正骨紫金丹組之圖四十三至四十六來看，在 central vein 附近及 portal area 則發現有發炎細胞增多現象，肝葉及門脈區周邊(periportal)少部分細胞出現空泡現象。由以上觀察可知，對大白鼠肝組織會有些微但不顯著的傷害。而多劑量給予川芎茶調散之圖四十七至五十二來看，有發炎細胞之聚集，在 CV 周邊的細胞出現空泡，由以上觀察可知，對大白鼠肝組織會有些微但不顯著的傷害。

肆、討論

一、大鼠的肝臟代謝酵素基本雖與人體相似，但還是有不同的地方，大鼠代謝藥物的方式不盡與人體相同，因此，未來還是需要以臨床試驗做進一步確認本計畫所得到的結果。

二、肝臟代謝酵素一般均分佈在 central vein 附近較多，而在本計畫的實驗中，在實驗組大白鼠的肝臟切片中發現 central vein 附近有輕微發炎現象，較控制組大白鼠明顯，顯然這是造成代謝酵素活性下降的可能原因。

三、併服 nalbuphine 及桑菊飲雖然對肝臟沒有顯著的影響，不過在腸胃道也有為數甚多的 UGT2B7，故造成 nalbuphine 藥動性質改變的原因有可能是因為腸胃的 UGT2B7 活性受到影響所致。

四、本連續性計畫根據前年計畫成果，挑選六個在體外試驗中會顯著抑制代謝酵素活性的中藥來進行大鼠體內藥動試驗，結果發現有四種中藥會與西藥產生顯著的藥物-藥物交互作用，顯然體內體外試驗之相關性甚高，未來，體外試驗做為篩檢藥物-藥物交互作用是值得參考的工具。

五、在摘要及結果中所提及之對藥物藥動學參數有「顯著影響」，意指民眾若服用會「顯著影響」藥物藥動學參數之中藥後，同時併服其他藥物時即可能使藥物在體內的濃度產生不預期之變化，進而可能造成藥物失效或產生副作用的情形。

伍、結論與建議

一、本計畫今年根據去年計畫成果，挑選兩個在體外試驗中會顯著抑制代謝酵素活性的中藥來進行大鼠體內藥動試驗，結果發現這兩種中藥均會與西藥產生顯著的藥物-藥物交互作用，顯然體內體外試驗之相關性甚高，未來，體外試驗做為篩檢藥物-藥物交互作用是值得參考的工具，因此，建議應利用此一工具繼續大量且快速地篩檢已上市的中藥製劑，以進一步評估上市中藥用藥的風險。

二、知柏地黃丸及桑菊飲經本計畫之大白鼠體內藥動試驗，發現在併服 midazolam 或 nalbuphine 後會明顯產生藥物-藥物交互作用；而長期餵食銀翹散及甘露飲，併服 fluvastatin 後亦會明顯產生藥物-藥物交互作用，未來應再進一步以臨床試驗來確認。

三、本計畫針對經 CYP3A4、UGT2B7、CYP2C9 及 CYP2D6 代謝之藥物進行體內試驗，明年應持續針對其他代謝酵素進行同樣的體內藥動試驗，以擴大了解各種代謝酵素所引起的藥物-藥物交互作用的可能。

四、未來中藥新藥上市前，也應測試其對主要肝臟代謝酵素的影響，以進一步評估其上市後用藥的風險。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP96-RD-041、CCMP97-RD-105 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

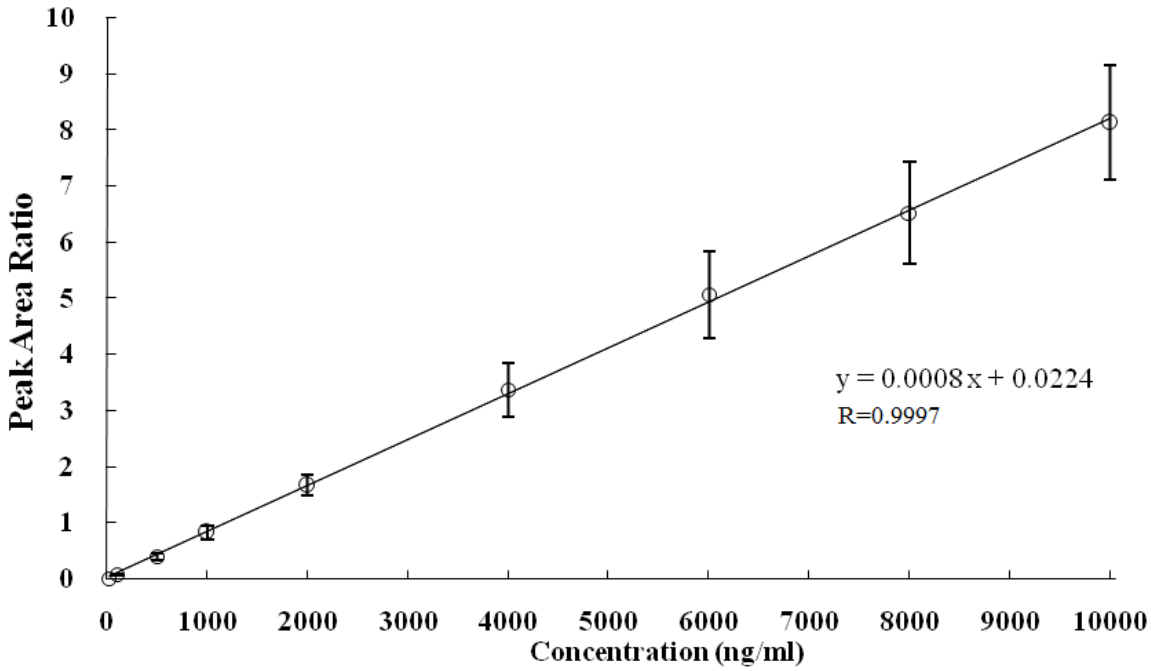
陸、參考文獻

1. Regardh CG, Baamhielm C, Edgar B, Hoffman KJ. Pharmacokinetics and biotransformanon of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists. *Prog Drug Metab* 1990; **12**: 41-86.
2. Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari MA, Baarnhielm C, Berntsson P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P450111A4.J *Med Chem* 1991; **34**:1834-1844.
3. Bailey DG, Bend JR, Arnold JMO, Tran LT, Spence JD. Erythromycin-felodipine interaction: magnitude, mechanism, and comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **60**: 25-33.
4. Kolars JC, Schmiedlin-Rem P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampicin-inducible P450ⅢA4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1871-1878.
5. De Waziers I , Cugnenc PH, Yan CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrorne P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. J *Pharmacol Exp Ther* 1990; **253**: 287-294.
6. Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, *et al*. Grapefruit juice Increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. J *Clin Invest* 1997; **99**: 2545-2553.
7. Krishna D. and Klotz U., Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clinical Pharmacokinetics* 1994; **26**:144-160.
8. Slaughter R.L. and Edward D.J., Recent advances: the cytochrome P450 enzymes. *The Annals of Pharmacotherapy* 1995; **29**:619-624.
9. Omura T. and Sato R., The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 1964; **239**:2370-2378.
10. Radominska-Pandya A., Czernik P.J., Little J.M., Battaglia E., and Mackenzie P.I., Structure and functional studies of UDP–glucuronosyl -transferase. *Drug Metabolism Reviews* 1999; **31**:817-899.
11. Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y. and Guengerich F.P., Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994; **270**:414-423.
12. Barnes J. Anderson LA. Phillipson JD. St John's wort (Hypericum

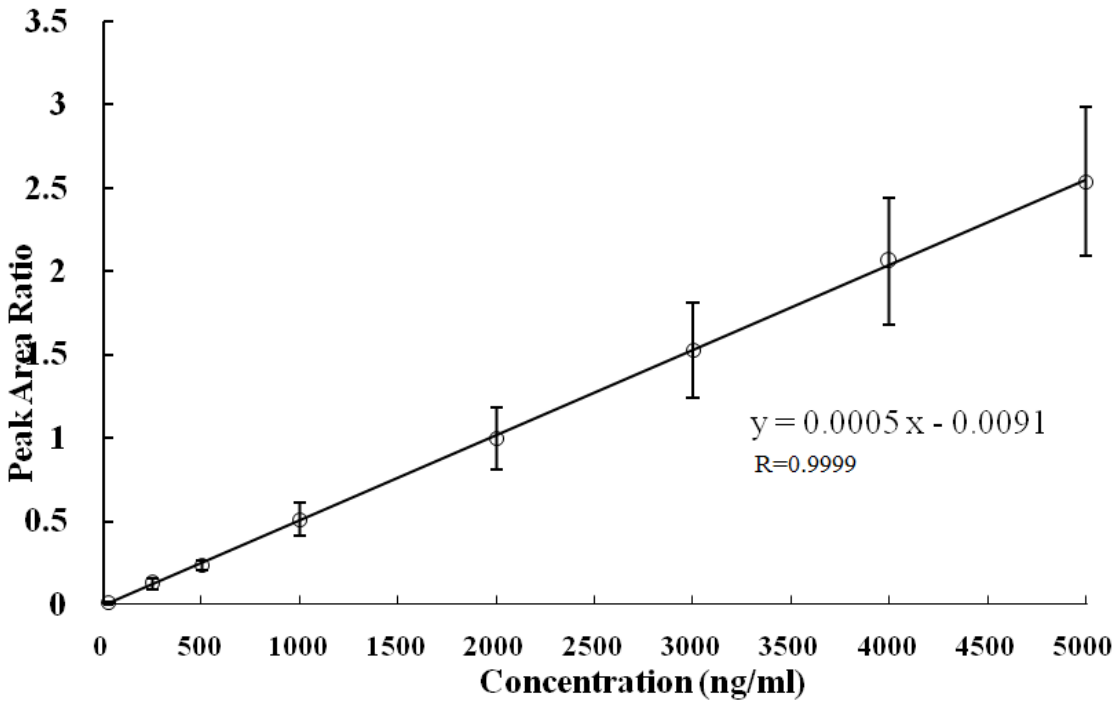
perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 2001; **53**(5):583-600.

13. Bergonzi MC. Bilia AR. Gallori S. Guerrini D. Vincieri FF. Variability in the content of the constituents of Hypericum perforatum L. and some commercial extracts. *Drug Development & Industrial Pharmacy* 2001; **27**(6):491-7.
14. Johne A. Brockmoller J. Bauer S. Maurer A. Langheinrich M. Roots I. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (Hypericum perforatum). *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1999; **66**(4):338-45.
15. Muller WE. Rolli M. Schafer C. Hafner U. Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 1997; **30** Suppl 2:102-7.
16. Nebel A. Schneider BJ. Baker RK. Kroll DJ. Potential metabolic interaction between St. John's wort and theophylline. *Annals of Pharmacotherapy* 1999; **33**(4):502.
17. Piscitelli SC. Burstein AH. Chaitt D. Alfaro RM. Falloon J. Indinavir concentrations and St John's wort. [erratum appears in Lancet 2001 Apr 14;357(9263):1210.]. *Lancet* 2000; **355**(9203):547-8.
18. Ruschitzka F. Meier PJ. Turina M. Luscher TF. Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 2000; **355**(9203):548-9.
19. Yue QY. Bergquist C. Gerden B. Safety of St John's wort (Hypericum perforatum). *Lancet* 2000; **355**(9203):576-7.
20. 林宜信：建立臺灣中藥用藥安全環境，衛生署中醫藥委員會，93 年 12 月，台北，p:1-6。
21. Gibson, G. and P. Skett, 1994, "Chapter 4: Factors affecting drug metabolism: internal factors," in Introduction to drug metabolism, London: Blackie Academic & Professional.
22. Dierks EA, Stams KR, Lim HK, et al. A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome p450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Meta & Dispos.* 2001;**29**(1):23-29.

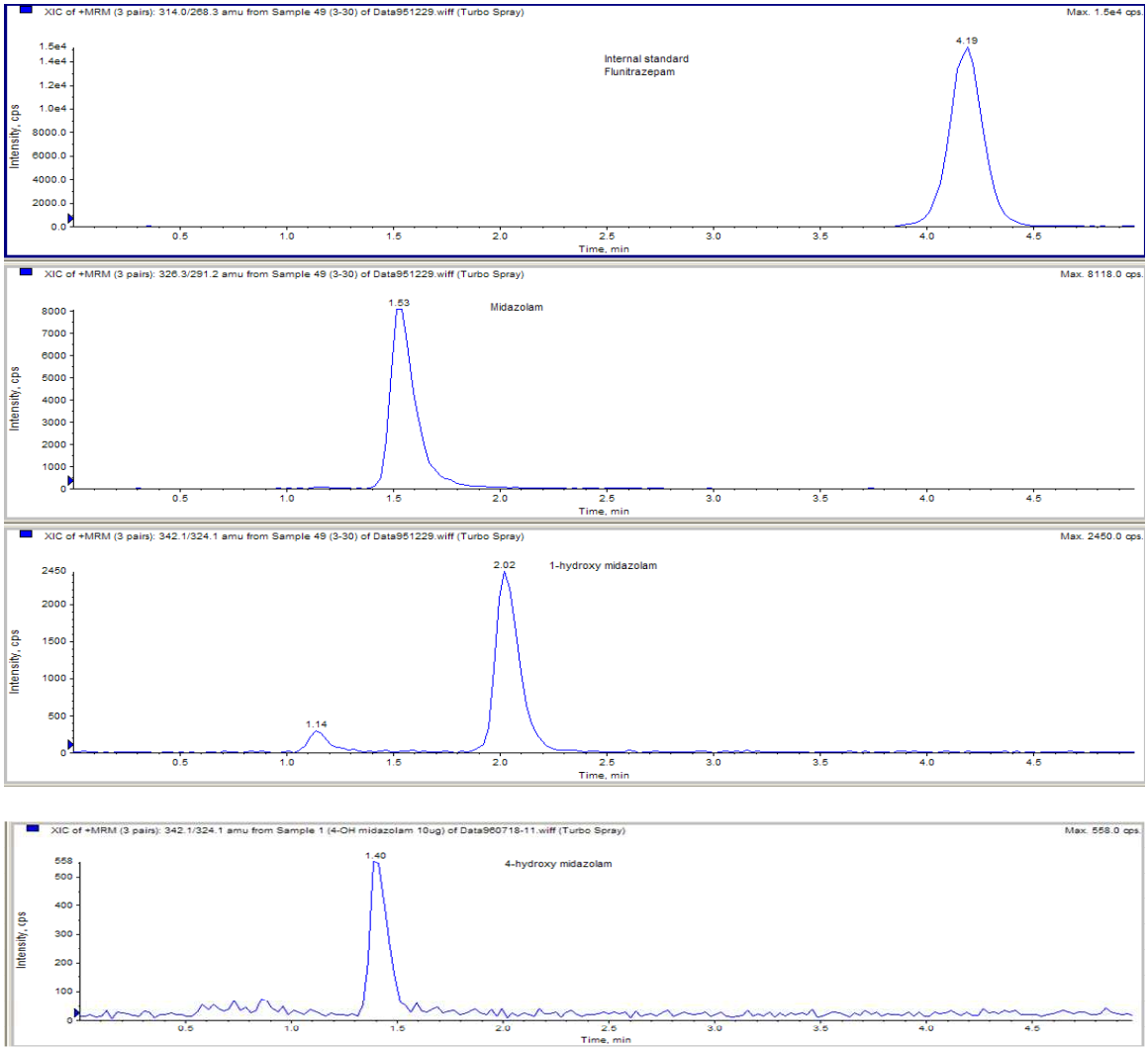
柒、圖、表



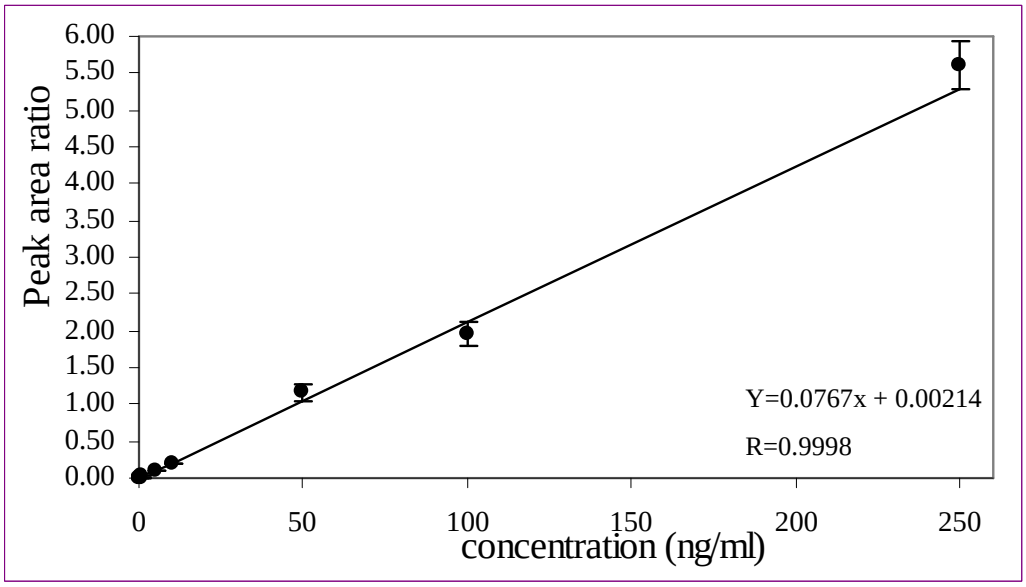
圖一、Midazolam 於大鼠血漿中異日間之標準曲線(n=6)



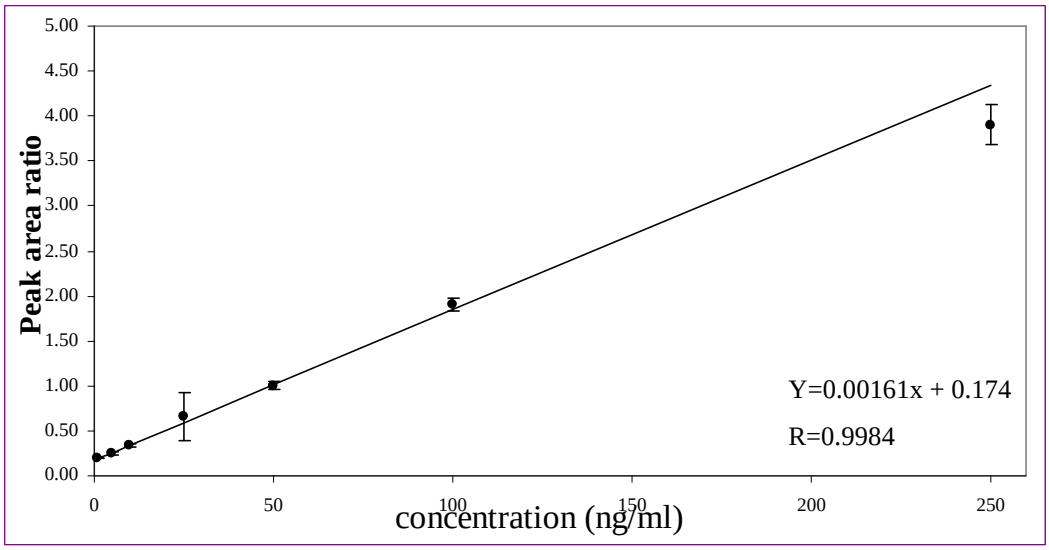
圖二、1-OH-Midazolam 於大鼠血漿中異日間之標準曲線(n=6)



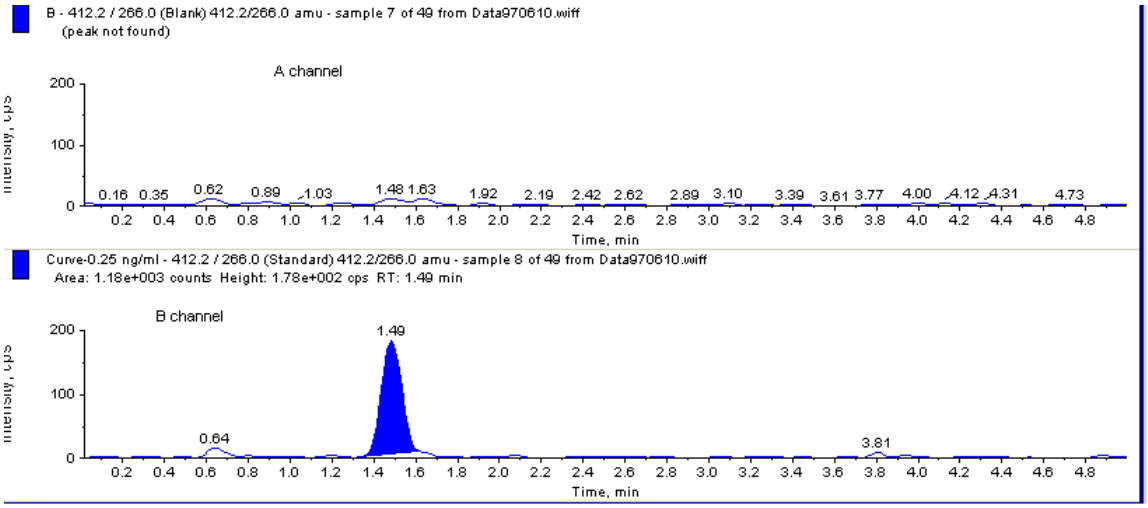
圖三、Midazolam、1’-OH-midazolam、4-OH-midazolam 與內部標準品 Flunitrazepam 於老鼠血漿之 LC-MS/MS 圖譜。



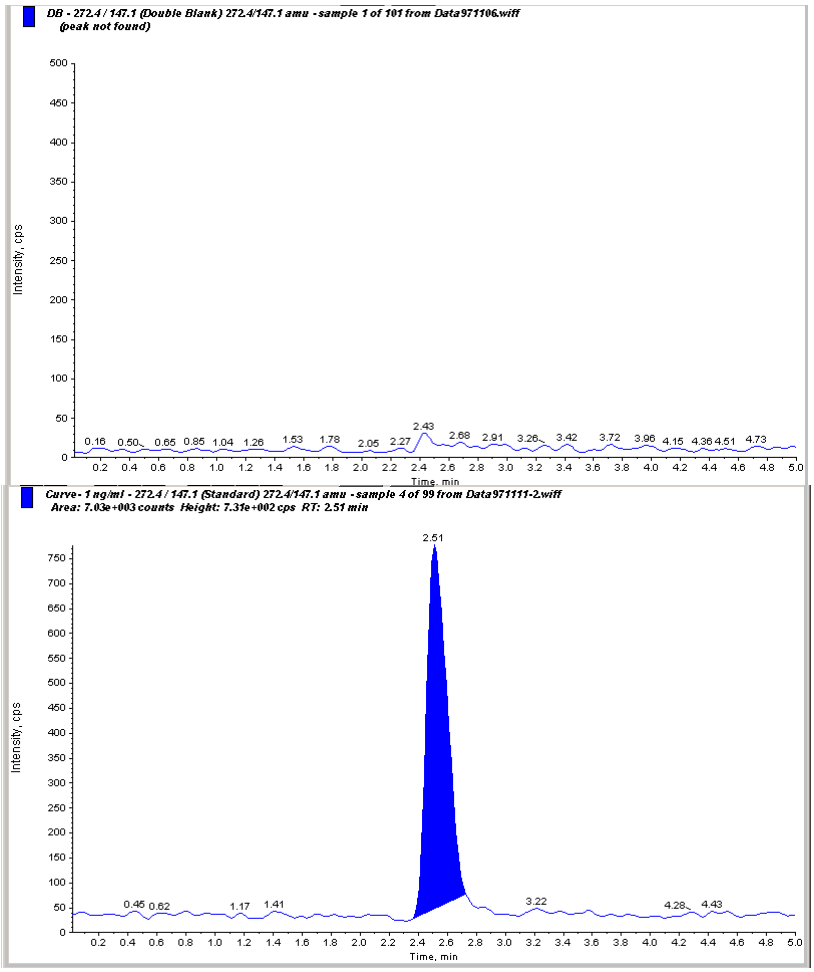
圖四、Fluvastatin 於大鼠血漿中異日間之標準曲線(n=6)



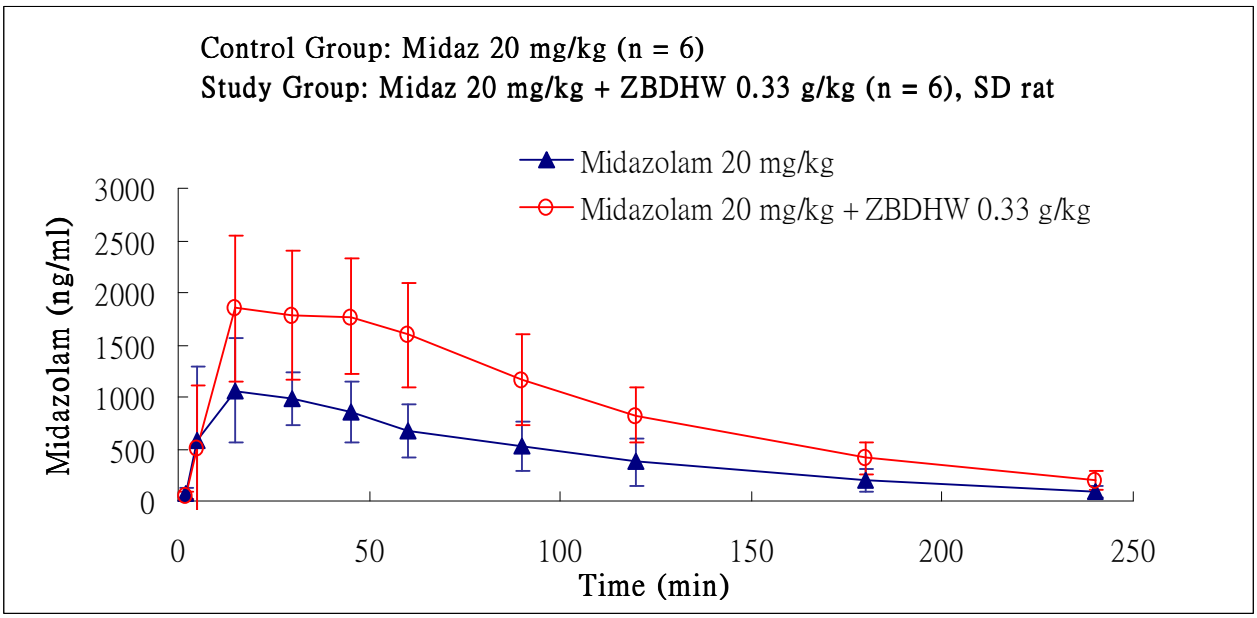
圖五、Dextromethorphan 於大鼠血漿中異日間之標準曲線(n=6)

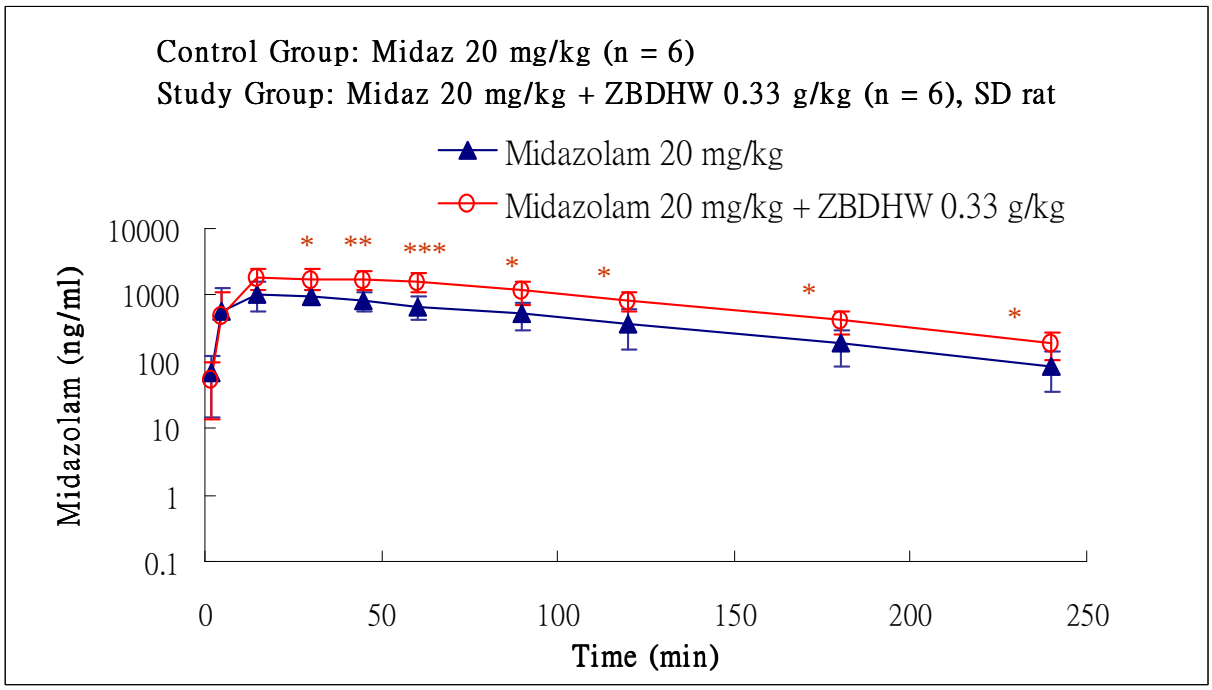


圖六、老鼠空白血漿(不含 Fluvastatin)及含 Fluvastatin 最低可定量濃度(LLOQ : 0.25 ng/mL)的液相層析串聯質譜圖譜



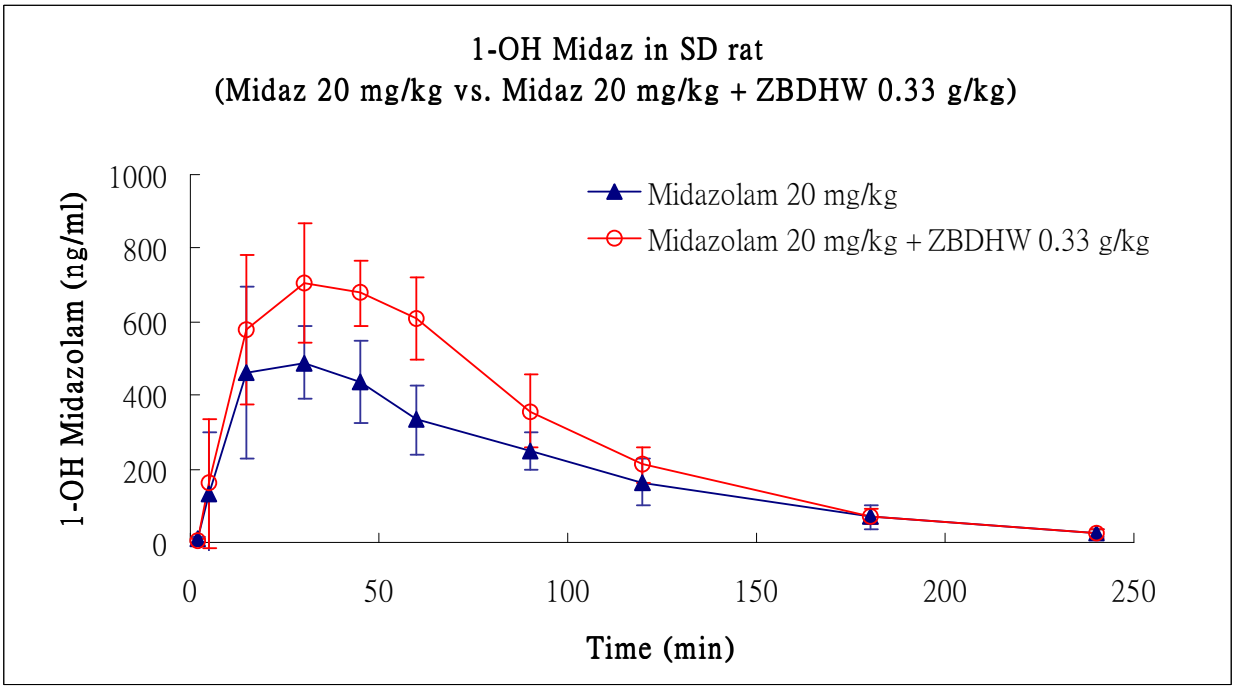
圖七、老鼠空白血漿(不含 Dextromethorphan)及含 Dextromethorphan 最低可定量濃度(LLOQ : 1 ng/mL)的液相層析串聯質譜圖譜

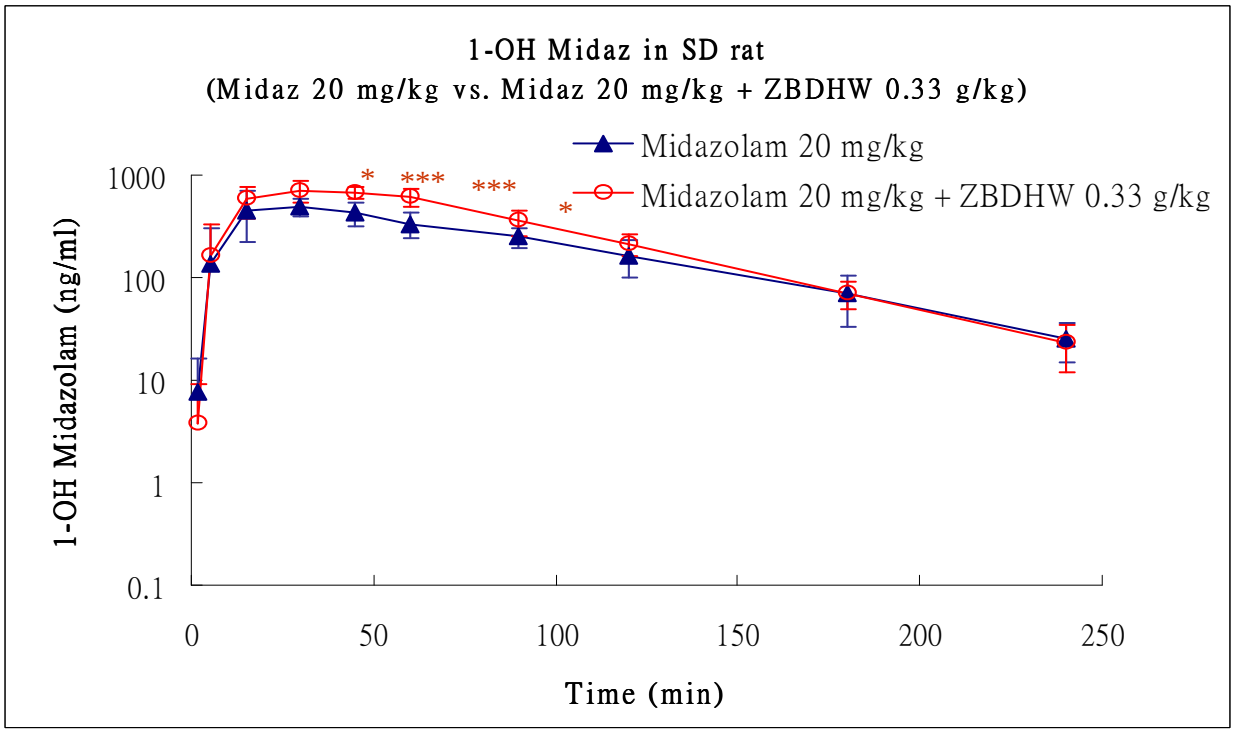




* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.005 (statistical analysis: t-test), Data: mean ± SD

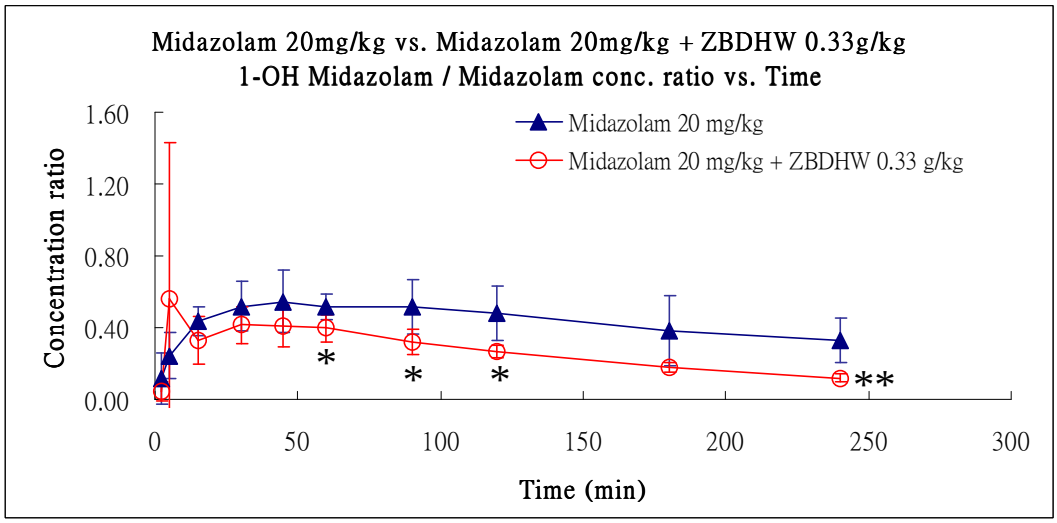
圖八、大鼠口服 midazolam 併服或不併服知柏地黃丸對其 midazolam 血中濃度之影響(上圖為一般座標，下圖為半對數座標)



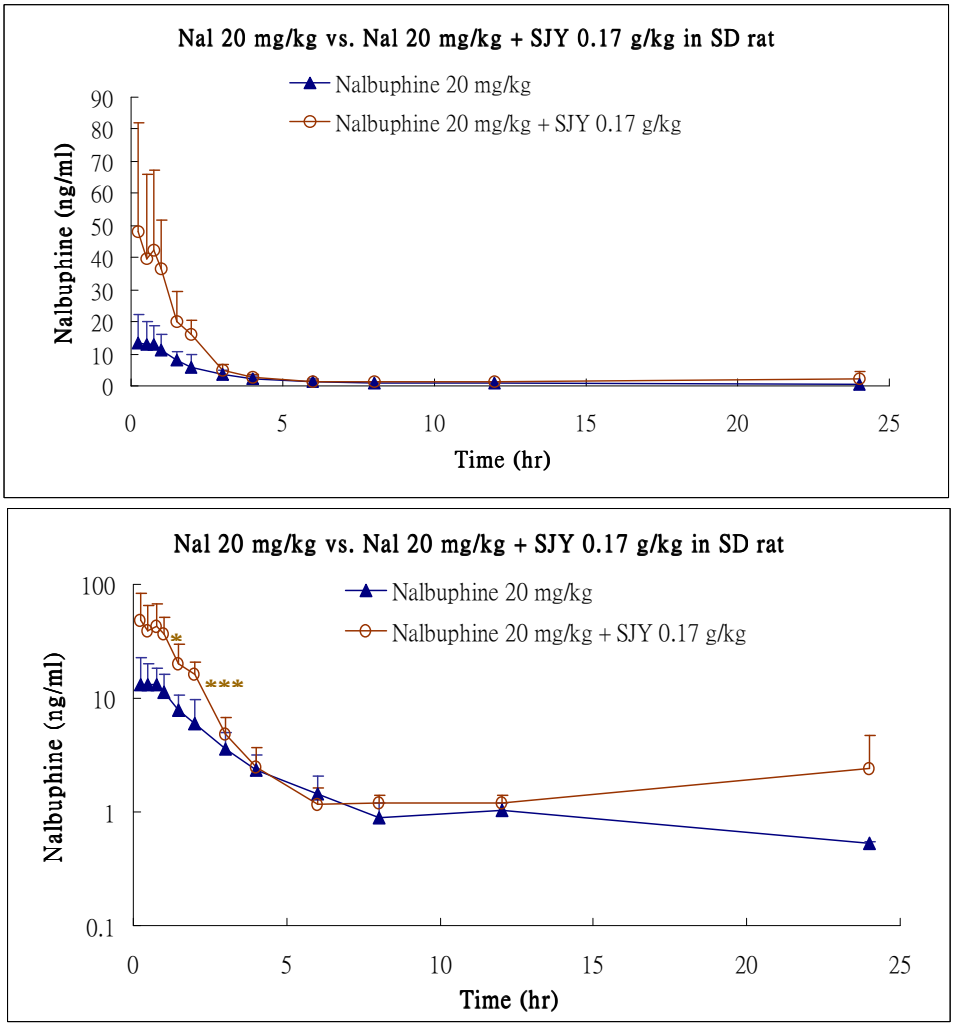


* P < 0.05, *** P < 0.005 (statistical analysis: t-test), Data: mean ± SD

圖九、大鼠口服 midazolam 併服或不併服知柏地黃丸對其代謝物 1-OH-midazolam 血中濃度之影響(上圖為一般座標，下圖為半對數座標)

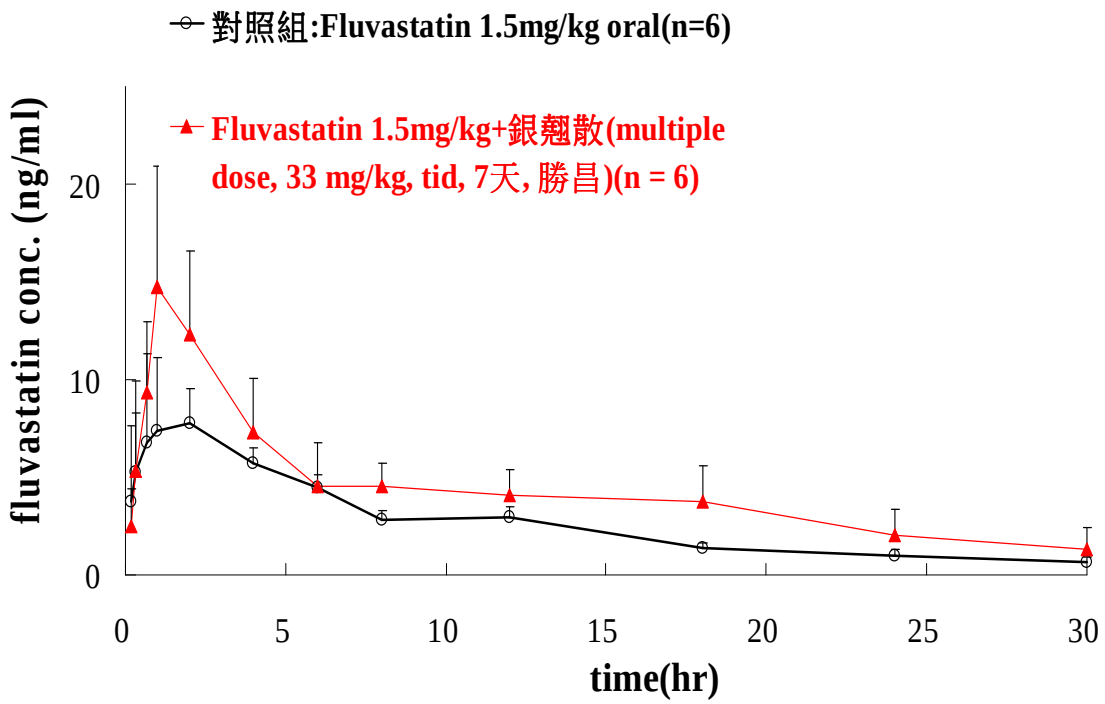


圖十、大鼠口服 midazolam 併服或不併服知柏地黃丸對其 1-OH- midazolam/ midazolam (midazolam 代謝比)之影響 (* p <0.05; ** p<0.01)

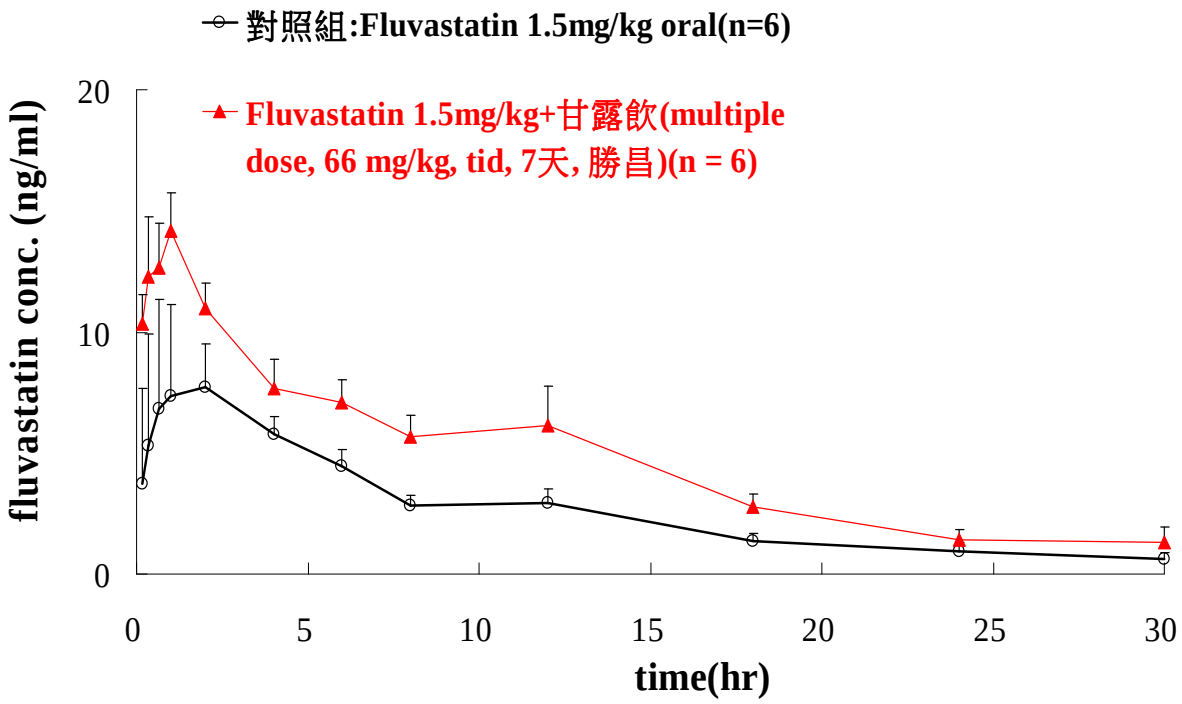


* P < 0.05, *** P < 0.005 (statistical analysis: t-test), Data: mean ± SD

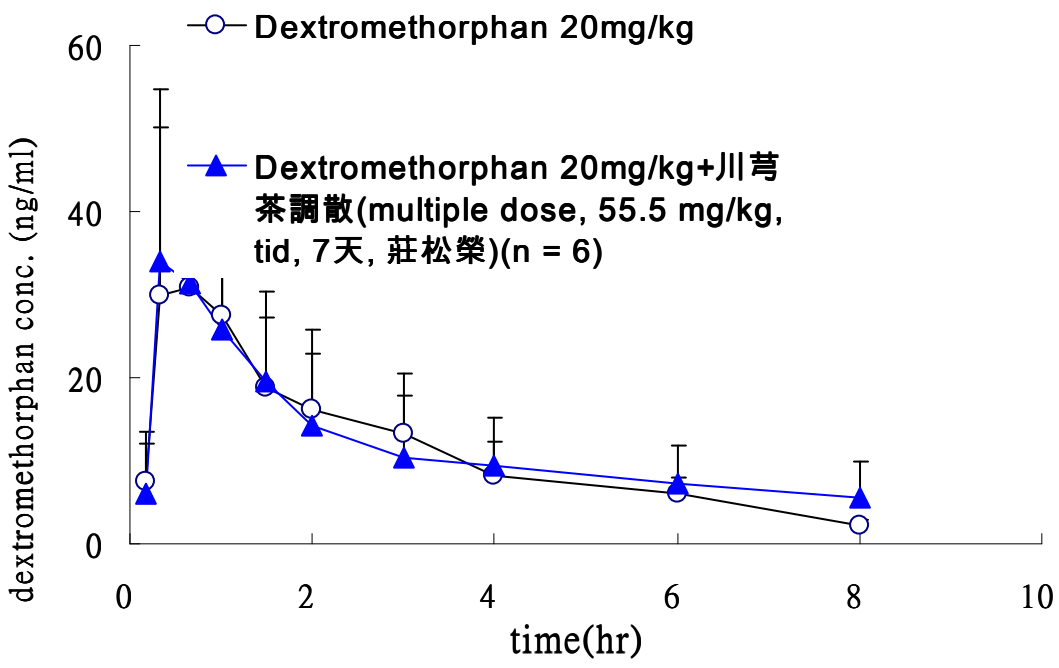
圖十一、大鼠口服 nalbuphine 併服或不併服桑菊飲對其 nalbuphine 血中濃度之影響(上圖為一般座標，下圖為半對數座標)



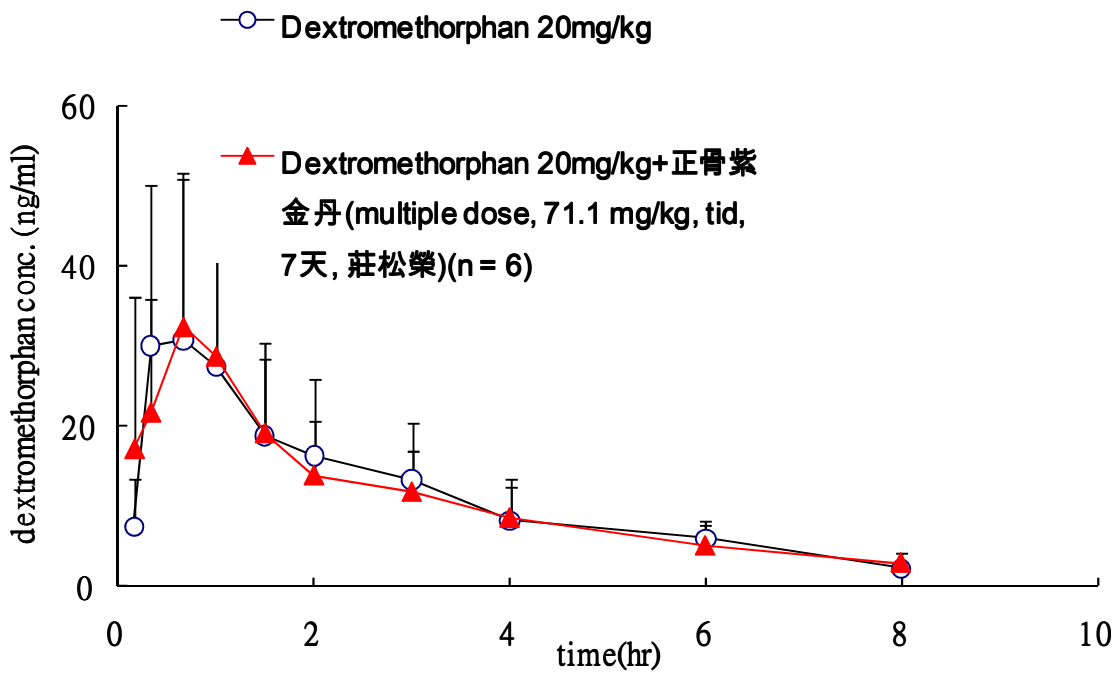
圖十二、大鼠口服 fluvastatin 併服或不併服銀翹散對其 fluvastatin 血中濃度之影響(小圖為半對數座標)



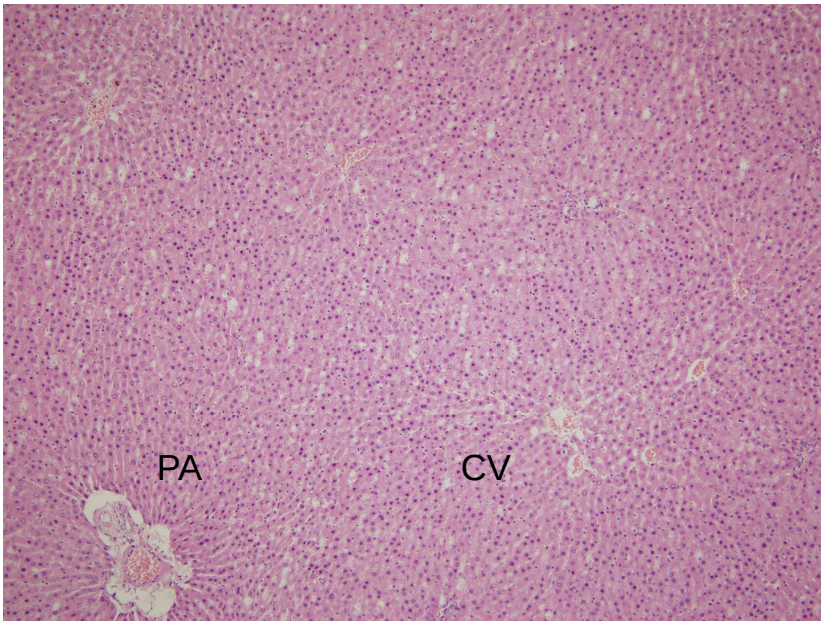
圖十三、大鼠口服 fluvastatin 併服或不併服甘露飲對其 fluvastatin 血中濃度之影響(小圖為半對數座標)



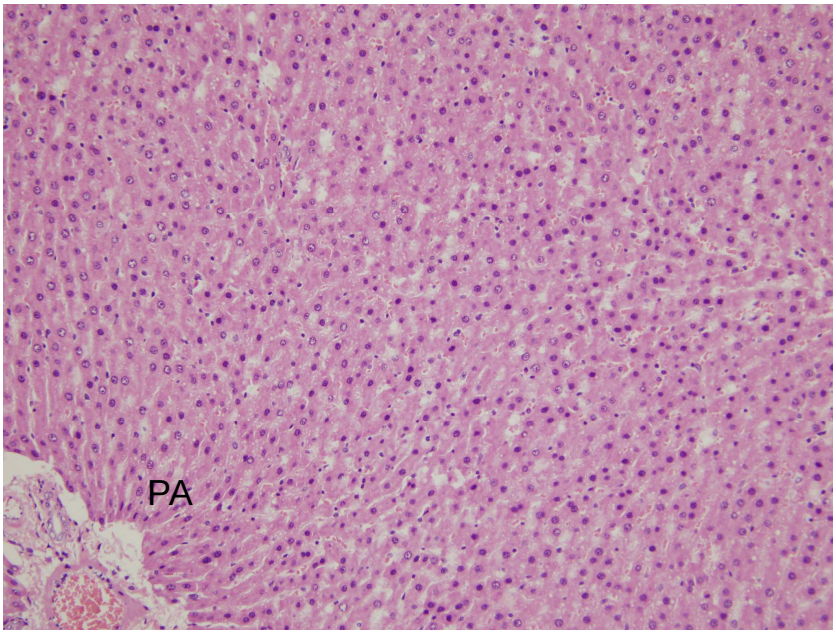
圖十四、大鼠口服 dextromethorphan 併服或不併服川芎茶調散對其 dextromethorphan 血中濃度之影響(小圖為半對數座標)



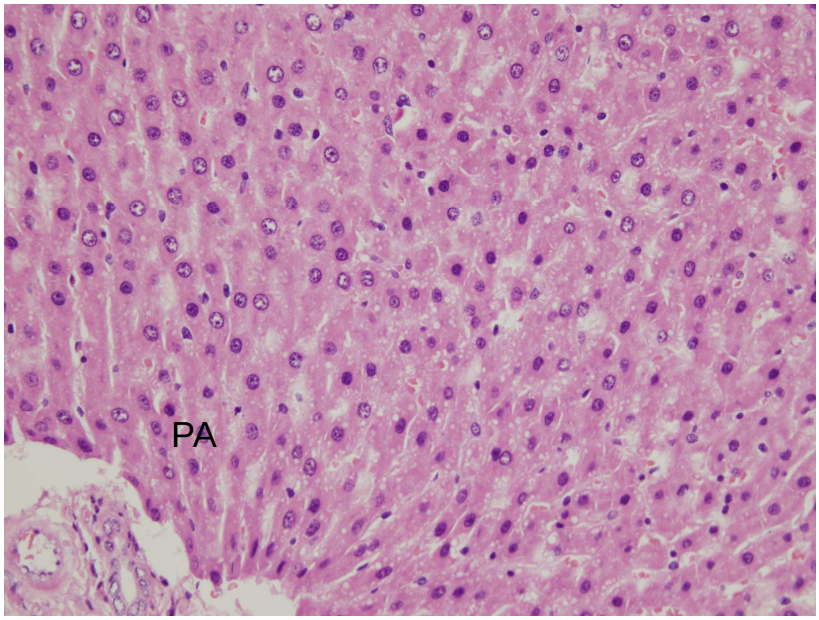
圖十五、大鼠口服 dextromethorphan 併服或不併服正骨紫金丹對其 dextromethorphan 血中濃度之影響(小圖為半對數座標)



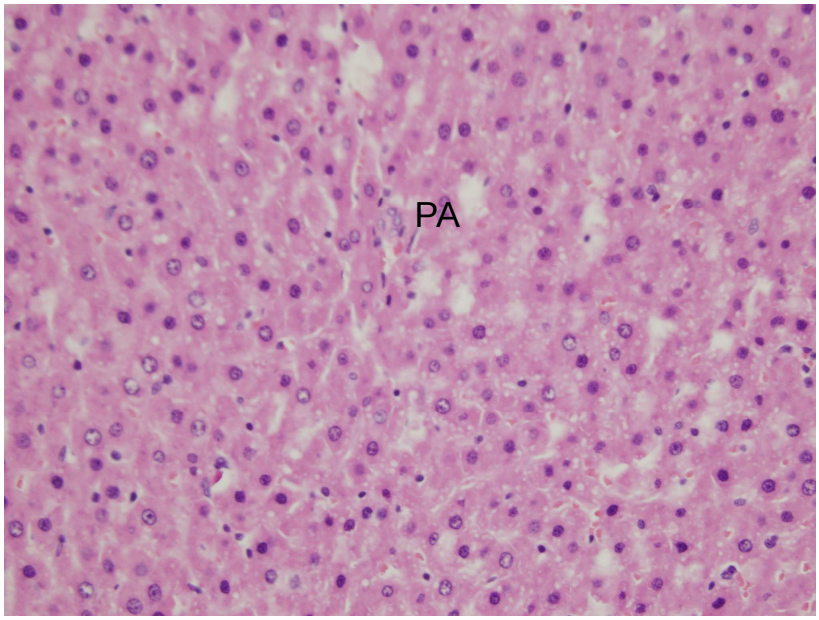
圖十六、單獨服用 midazolam 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；PA: portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery); CV: central vein



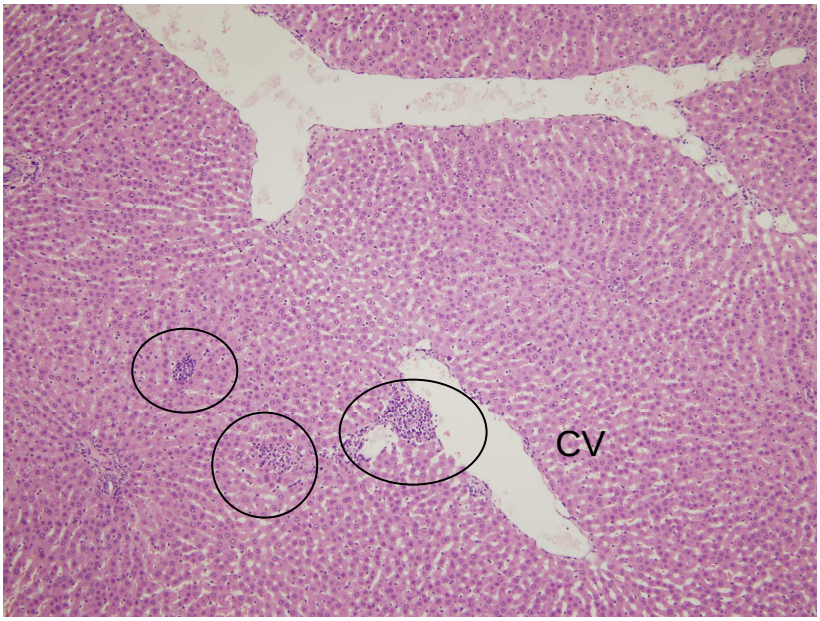
圖十七、單獨服用 midazolam 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；PA: portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery); CV: central vein



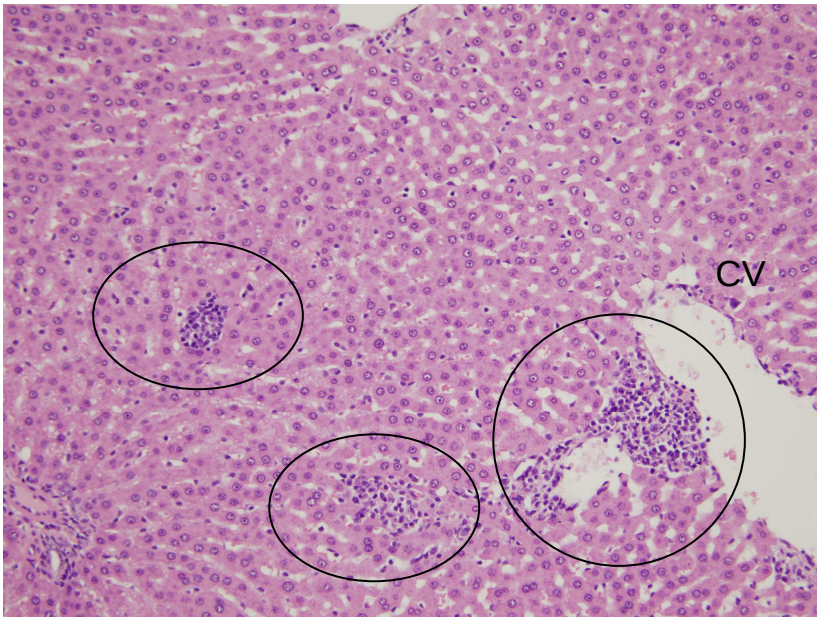
圖十八、單獨服用 midazolam 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；PA: portal area



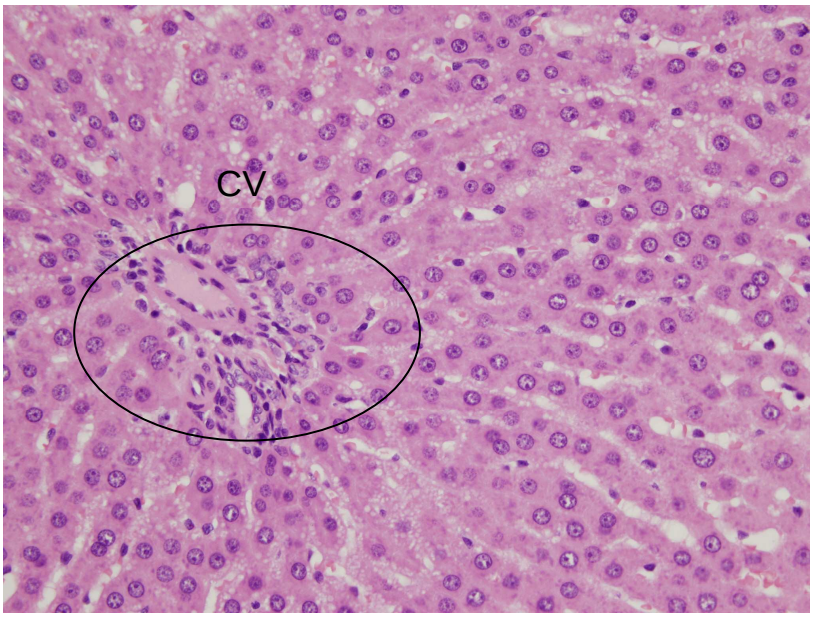
圖十九、單獨服用 midazolam 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；PA: portal area



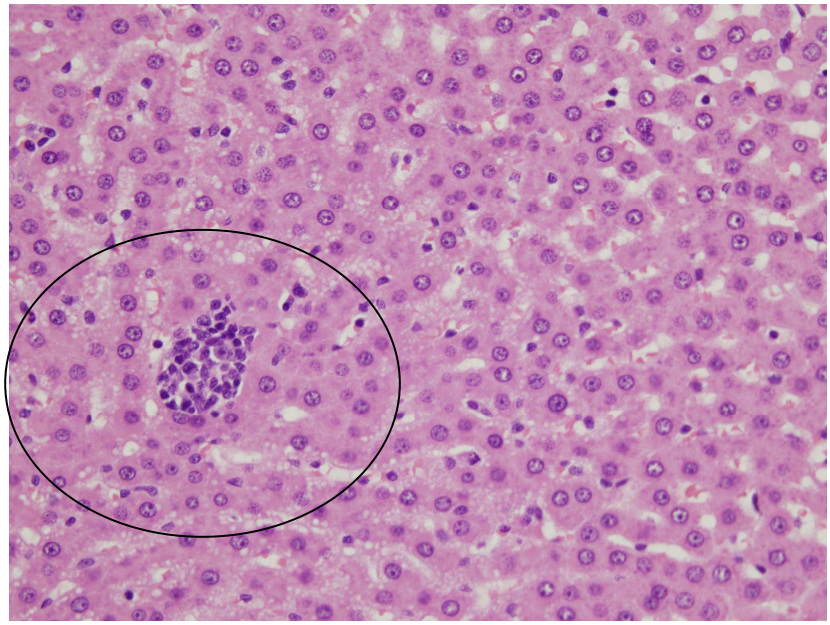
圖二十、服用 midazolam 及單劑量知柏地黃丸之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；CV: central vein；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集



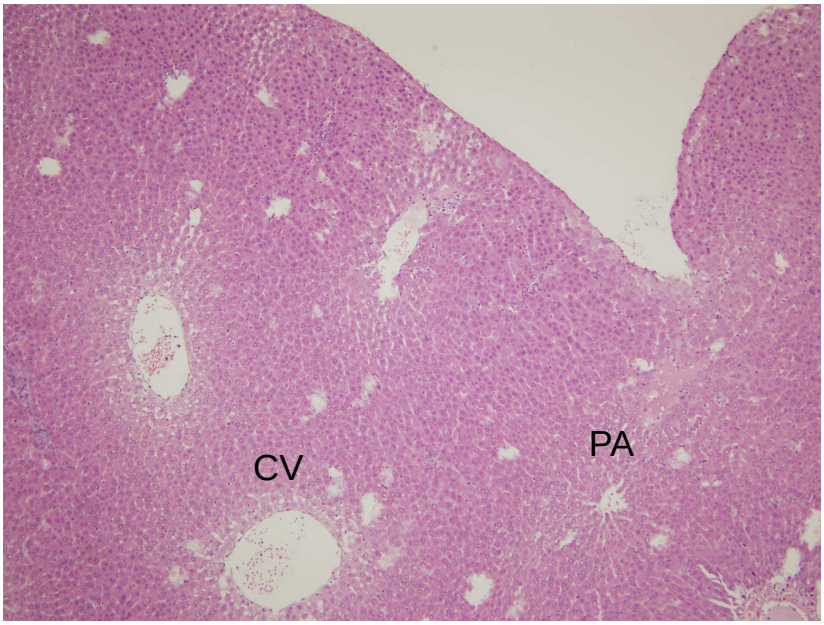
圖二十一、服用 midazolam 及單劑量知柏地黃丸之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；CV: central vein；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集



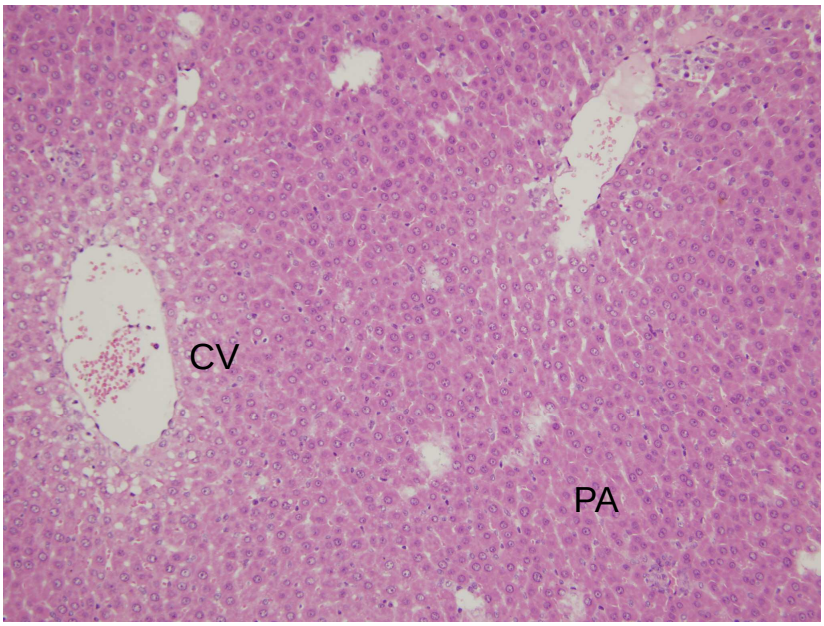
圖二十二、服用 midazolam 及單劑量知柏地黃丸之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；CV: central vein；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集



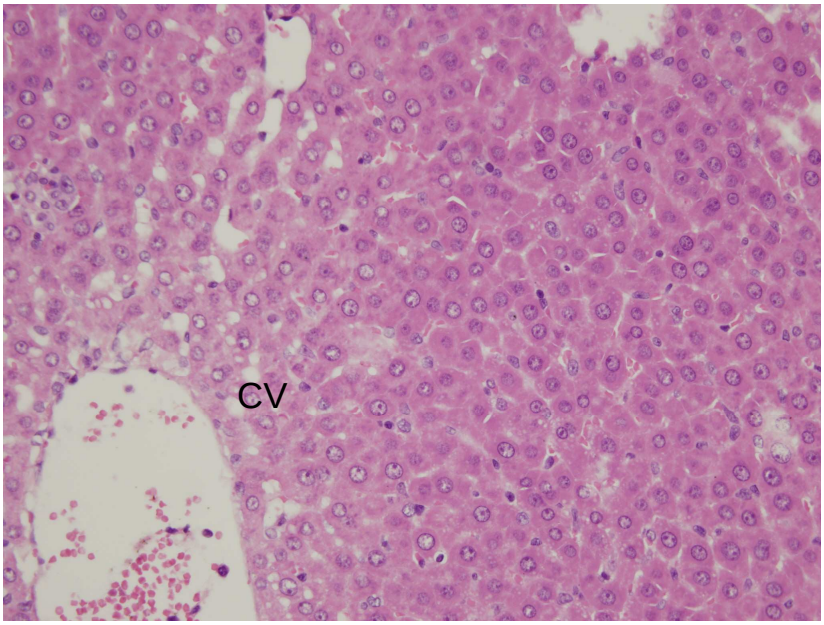
圖二十三、服用 midazolam 及單劑量知柏地黃丸之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集



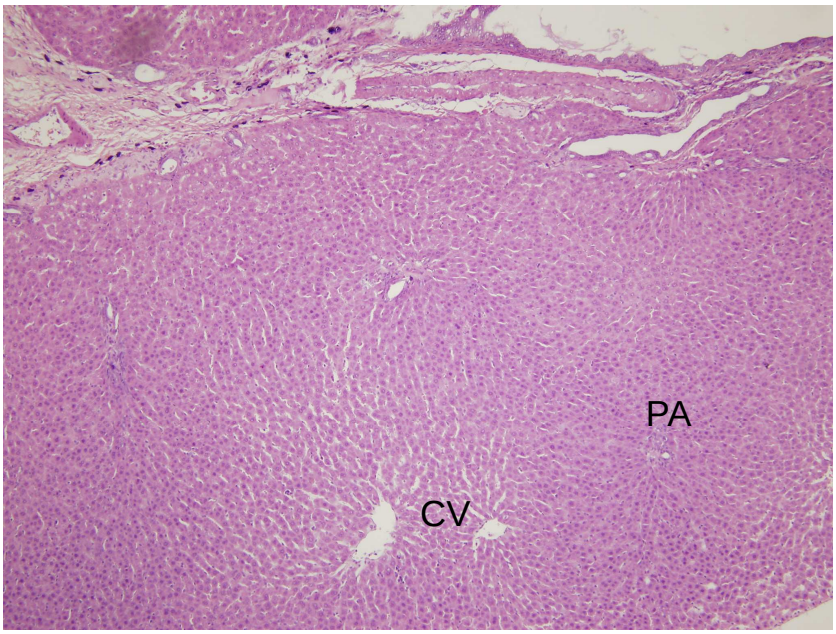
圖二十四、單獨服用 nalbuphine 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；CV: central vein; PA: portal area



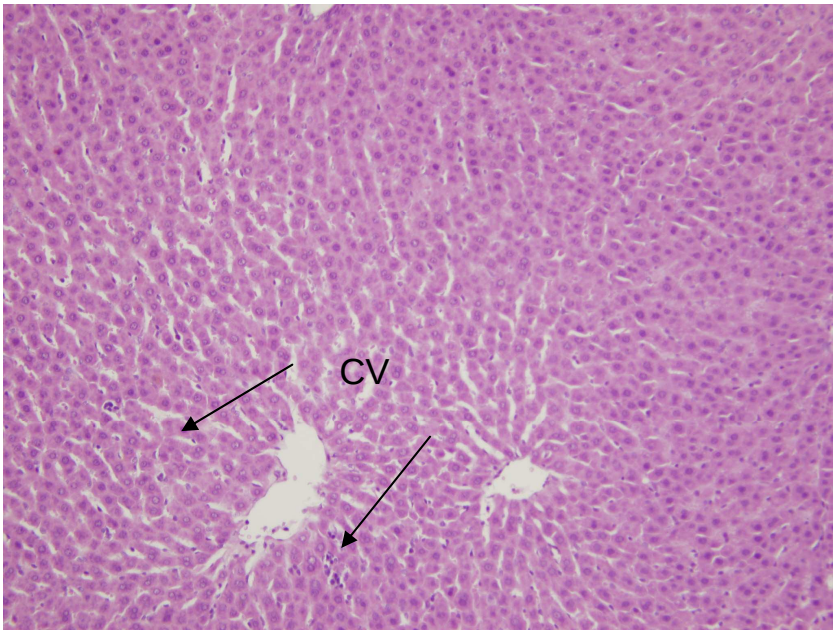
圖二十五、單獨服用 nalbuphine 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；CV: central vein; PA: portal area



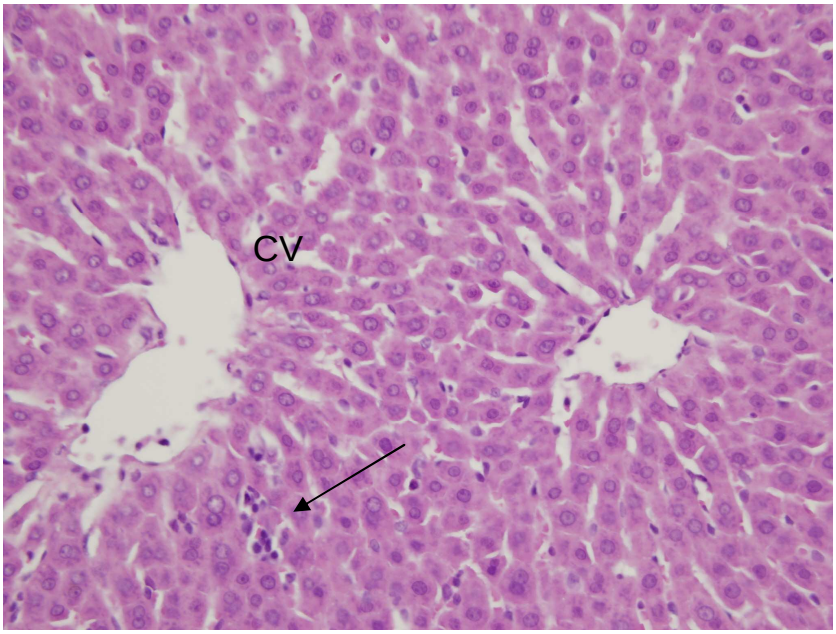
圖二十六、單獨服用 nalbuphine 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；CV: central vein



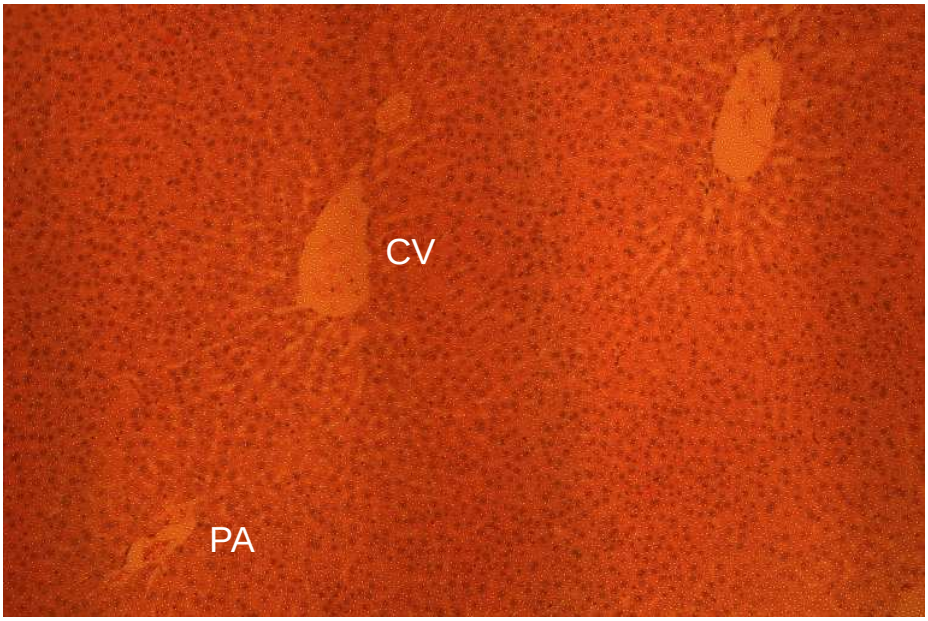
圖二十七、服用 nalbuphine 及桑菊飲之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；CV: central vein; PA: portal area；無明顯發炎現象



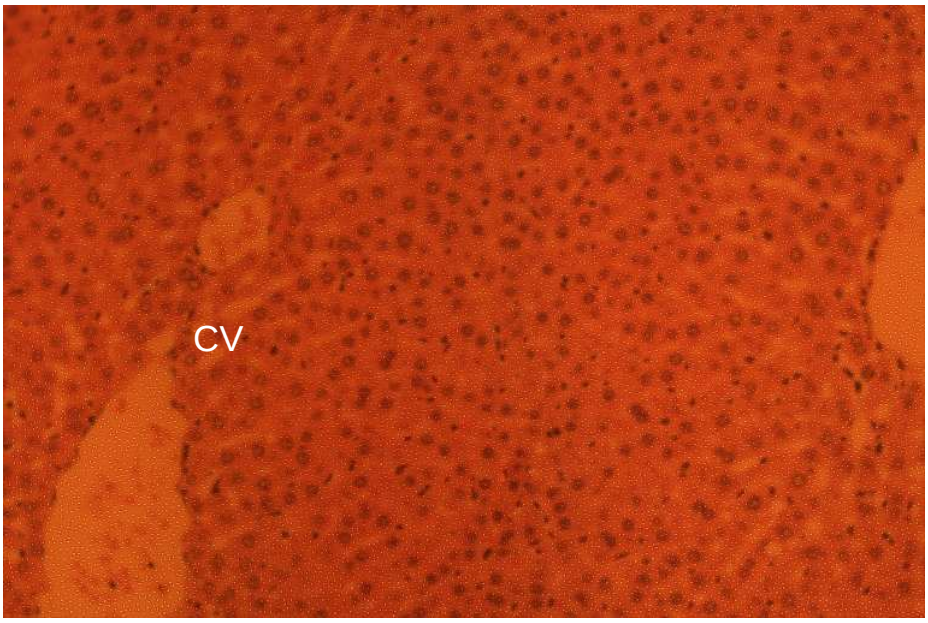
圖二十八、服用 nalbuphine 及桑菊飲之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；CV: central vein；無明顯發炎現象



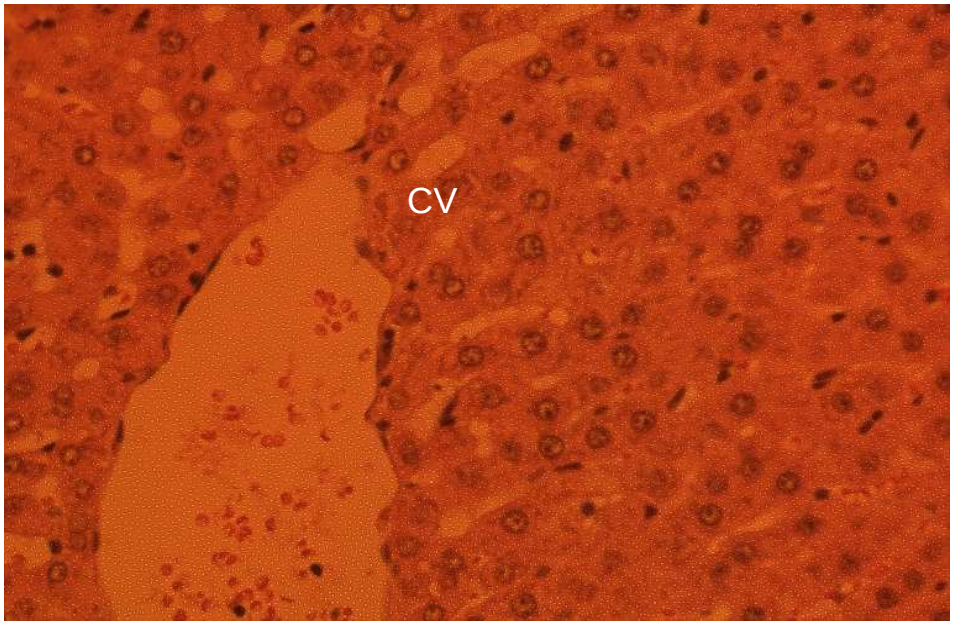
圖二十九、服用 nalbuphine 及桑菊飲之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；CV: central vein；無明顯發炎現象



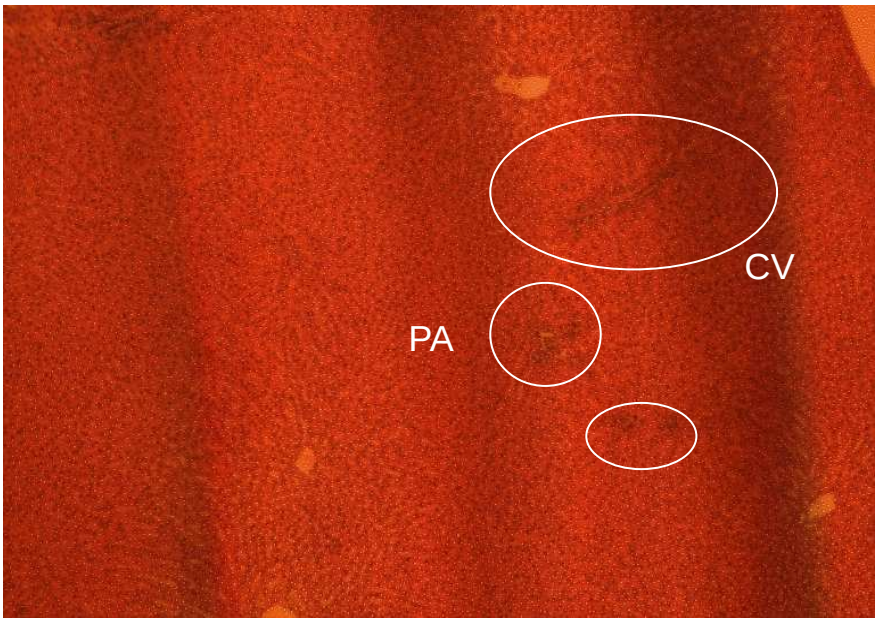
圖三十、單獨服用 fluvastatin 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；PA: portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery); CV: central vein



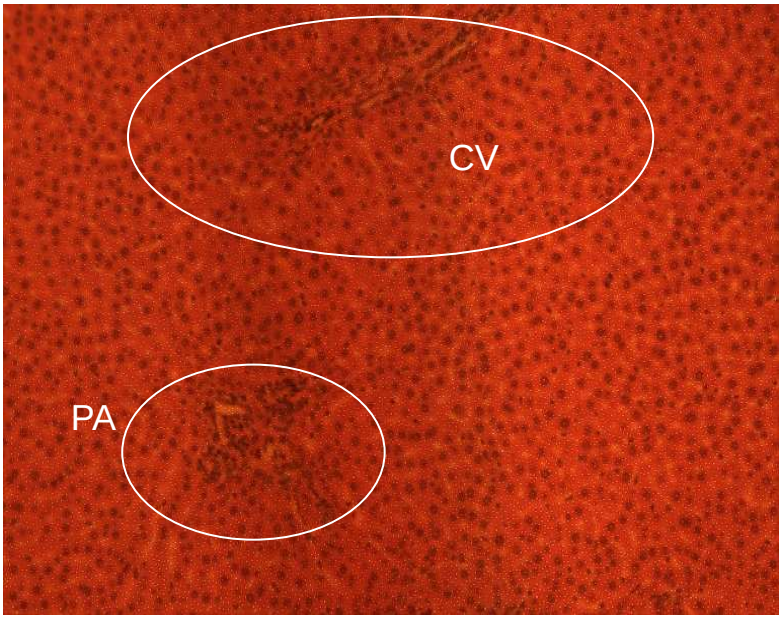
圖三十一、單獨服用 fluvastatin 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；PA: portal area (bile duct, portal vein, hepatic artery); CV: central vein



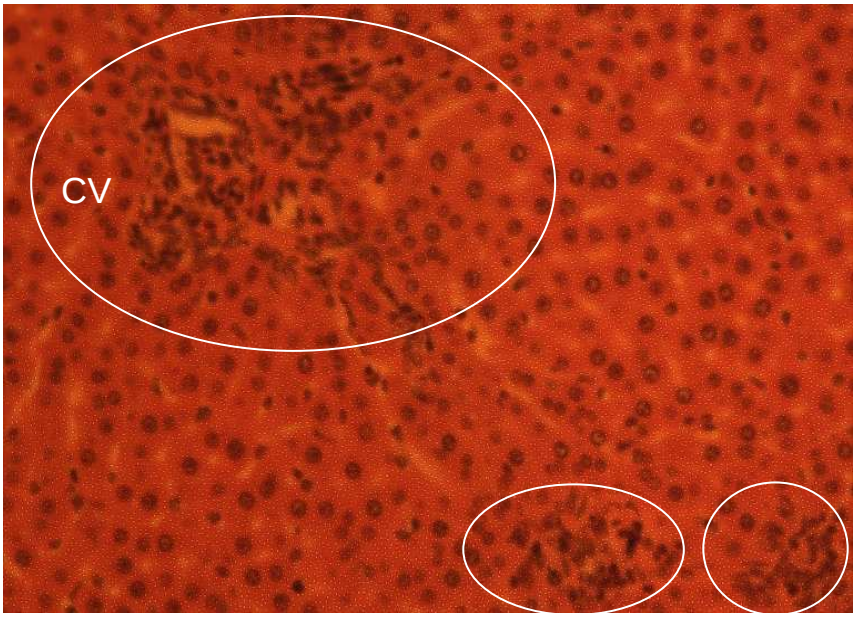
圖三十二、單獨服用 fluvastatin 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；PA: portal area



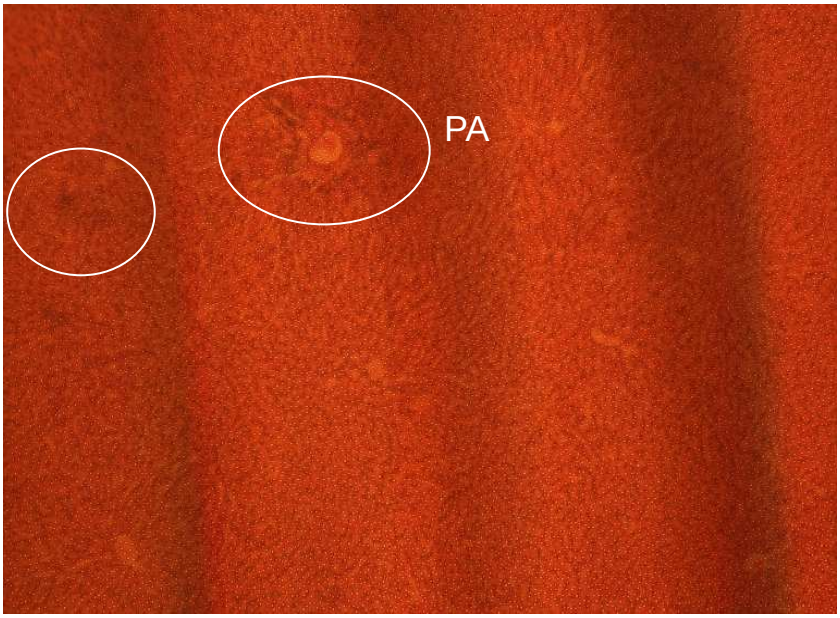
圖三十三、多劑量銀翹散組併服 fluvastatin 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集；PA: portal area, CV: central vein



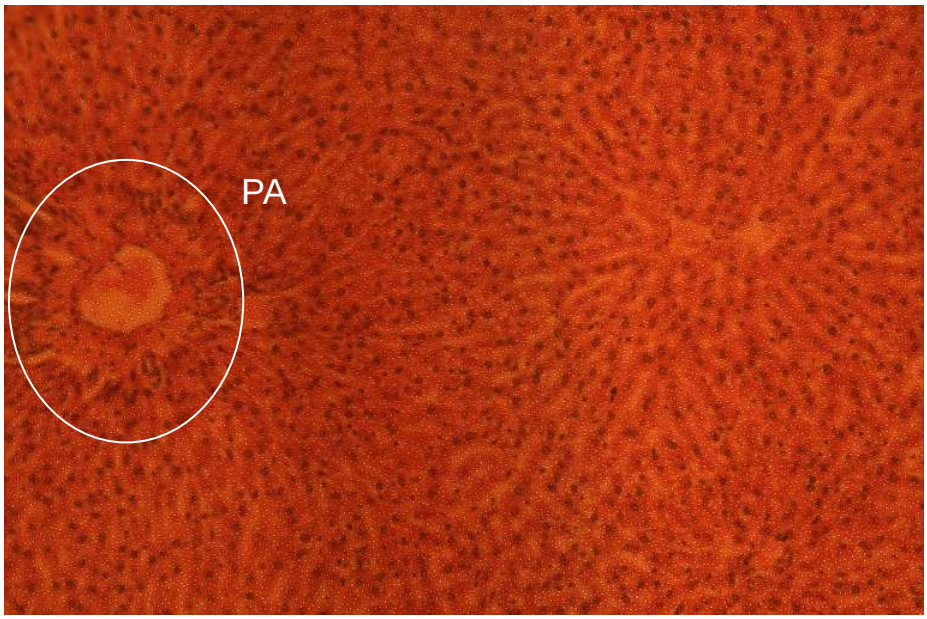
圖三十四、多劑量銀翹散組併服 fluvastatin 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集；CV: central vein



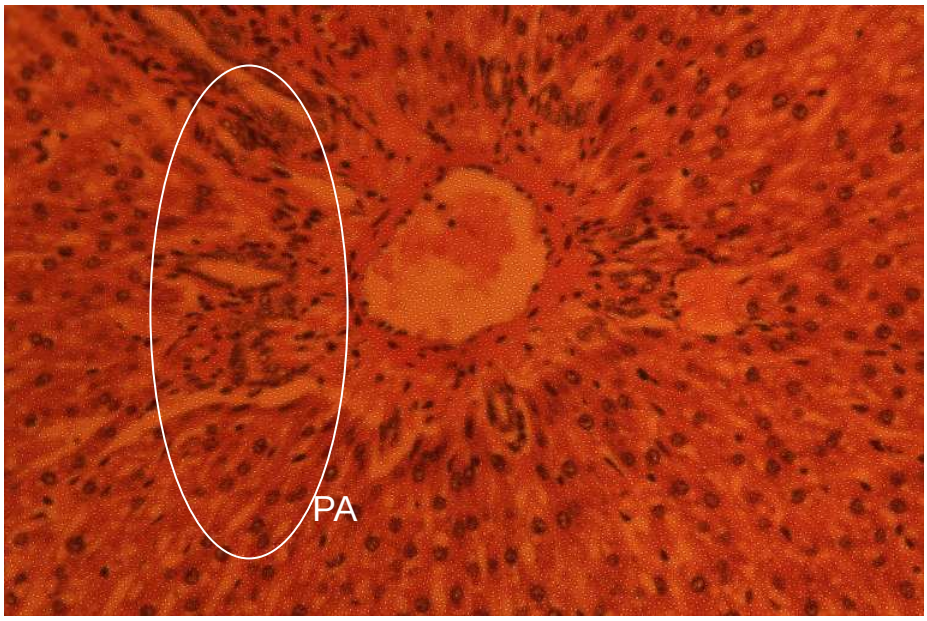
圖三十五、多劑量銀翹散組併服 fluvastatin 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集；CV: central vein



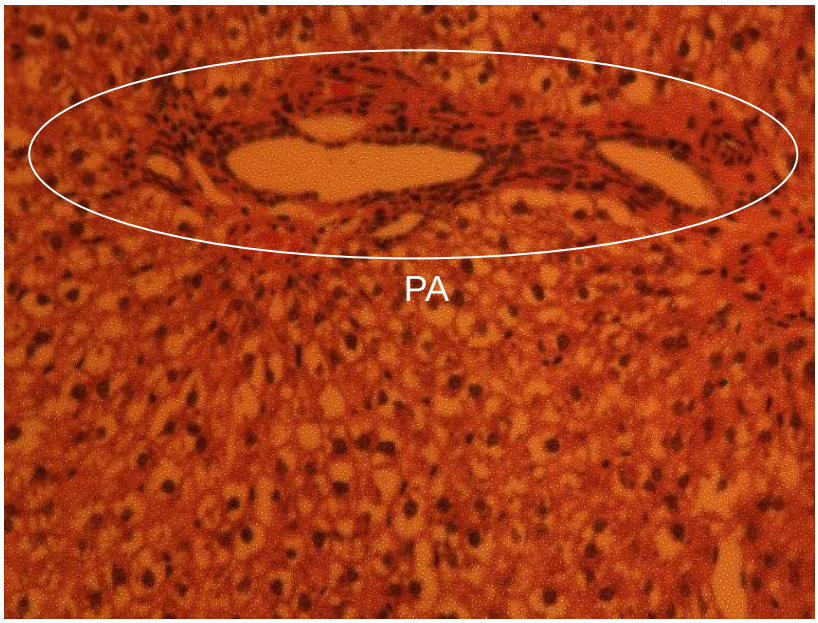
圖三十六、多劑量甘露飲組併服 fluvastatin 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，肝細胞出現空泡，有 Degeneration and Focal Necrosis；PA: portal area



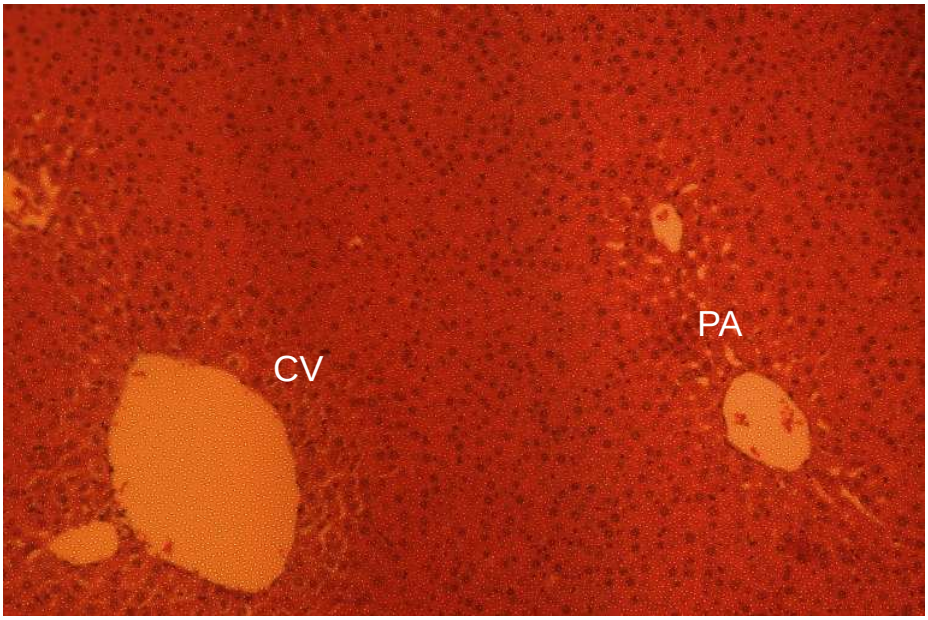
圖三十七、多劑量甘露飲組併服 fluvastatin 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，肝葉及門脈區周邊(periportal)細胞出現空泡，有 Degeneration and Focal Necrosis；PA: portal area



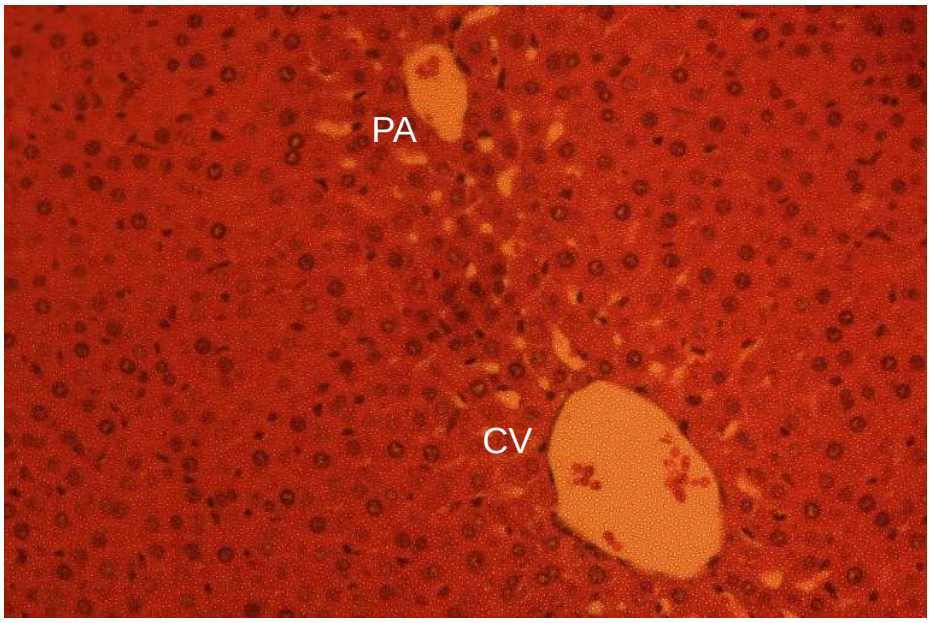
圖三十八、多劑量甘露飲組併服 fluvastatin 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，肝葉及門脈區周邊(periportal)細胞出現空泡，有 Degeneration and Focal Necrosis；PA: portal area



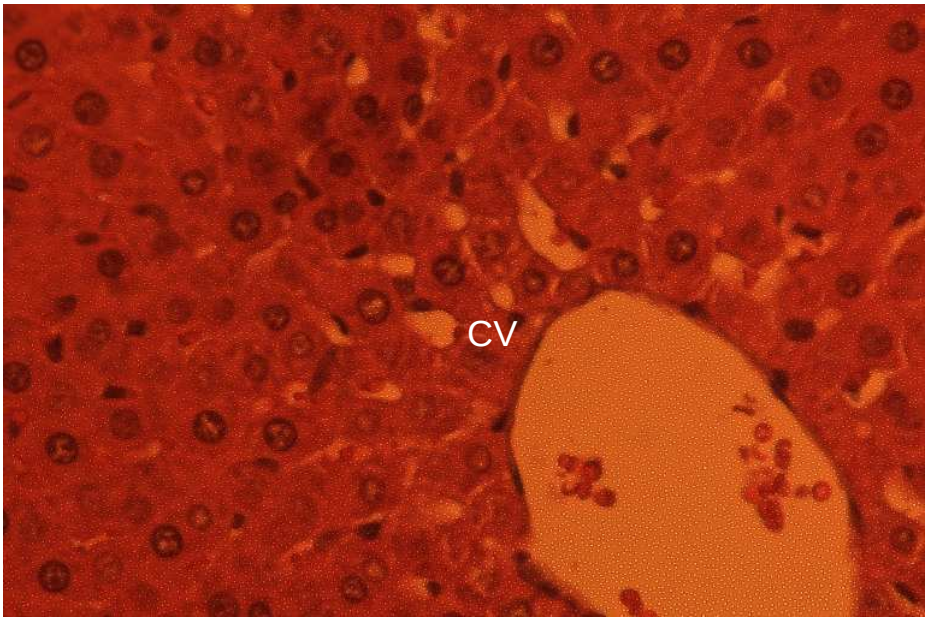
圖三十九、多劑量甘露飲組併服 fluvastatin 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，肝葉及門脈區周邊(periportal)細胞出現空泡，有 Degeneration and Focal Necrosis；PA: portal area



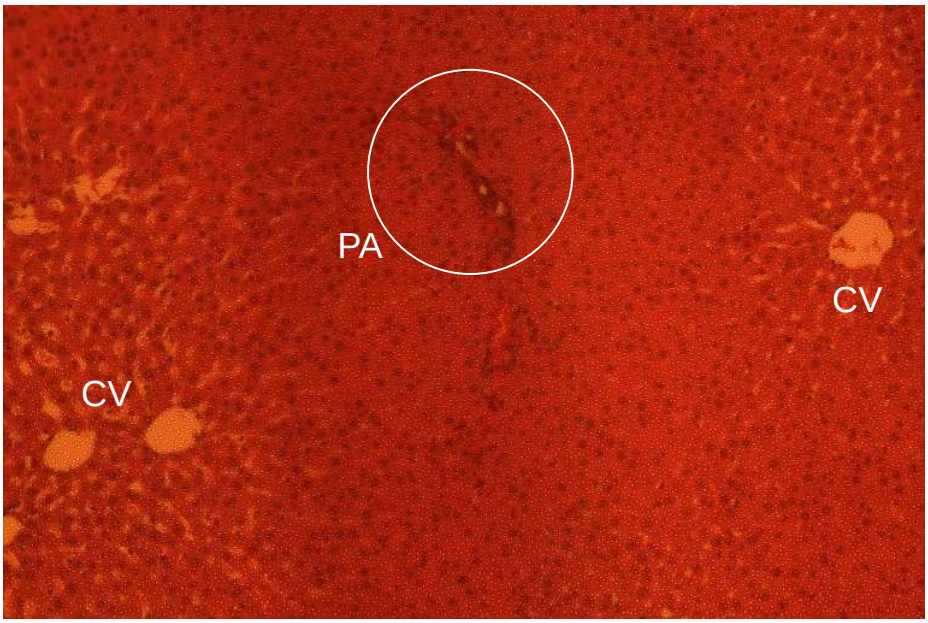
圖四十、單獨服用 dextromethorphan 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；PA: portal area; CV: central vein



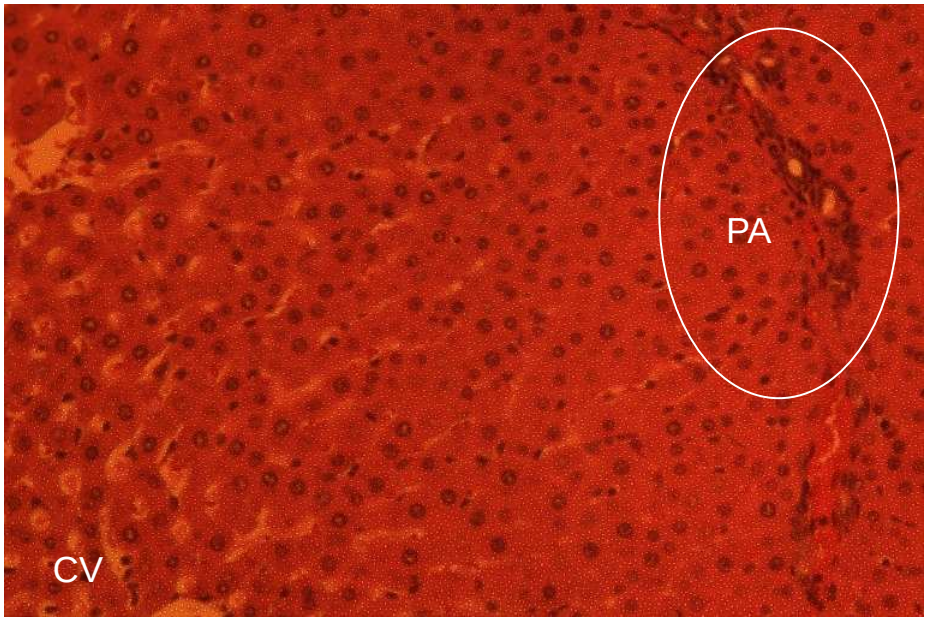
圖四十一、單獨服用 dextromethorphan 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；PA: portal area; CV: central vein



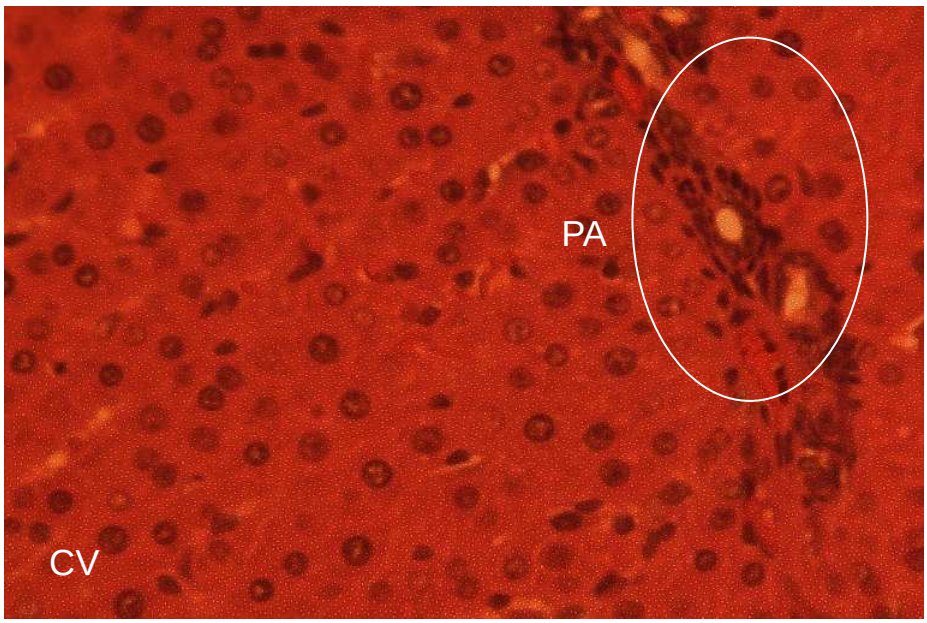
圖四十二、單獨服用 dextromethorphan 之大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；CV: central vein



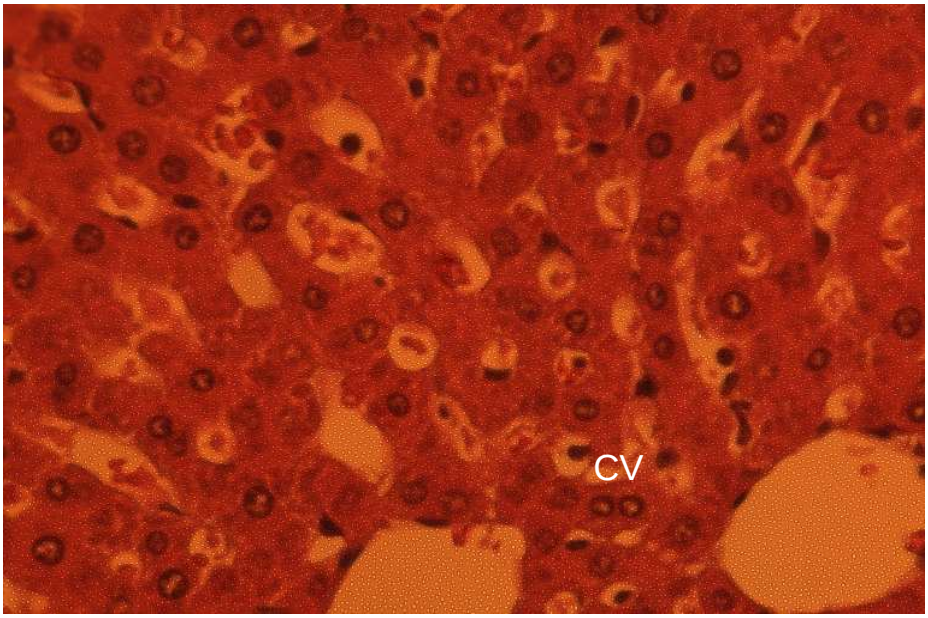
圖四十三、多劑量正骨紫金丹組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，在 CV 周邊的細胞出現空泡；PA: portal area , CV: central vein



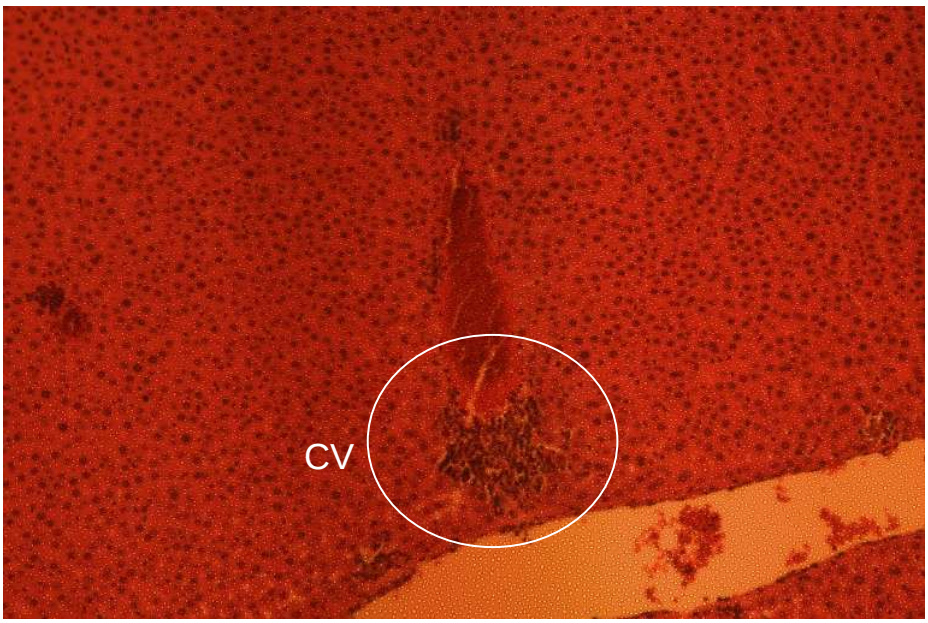
圖四十四、多劑量正骨紫金丹組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，在 CV 周邊的細胞出現空泡；PA: portal area, CV: central vein



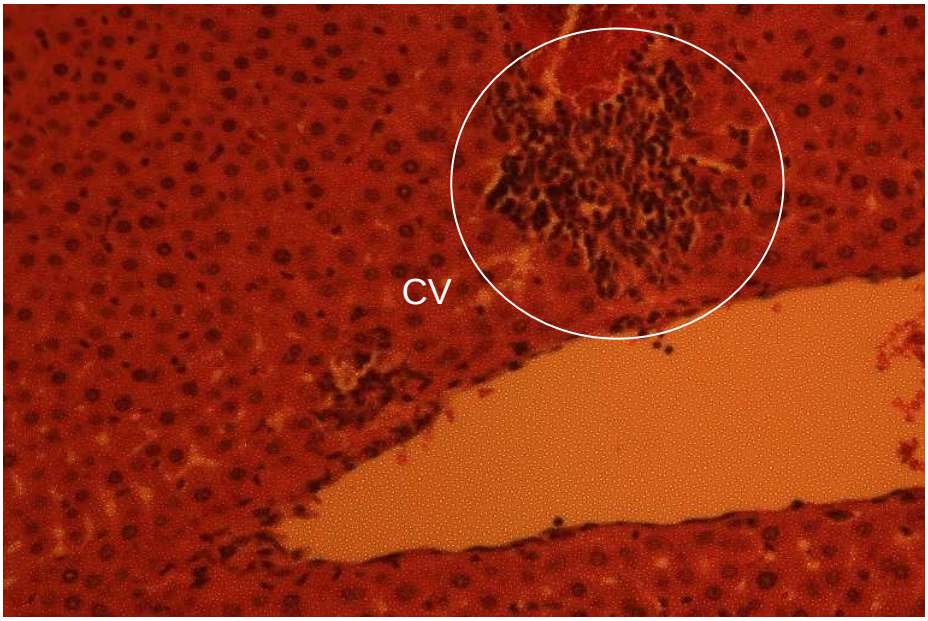
圖四十五、多劑量正骨紫金丹組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集；PA: portal area



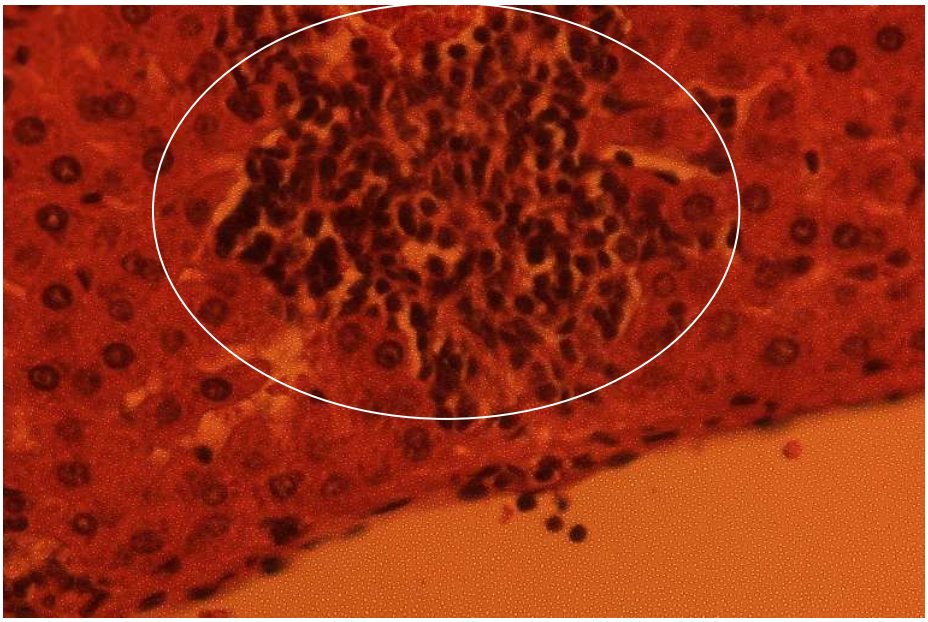
圖四十六、多劑量正骨紫金丹組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；在 CV 周邊的細胞出現空泡；CV: central vein



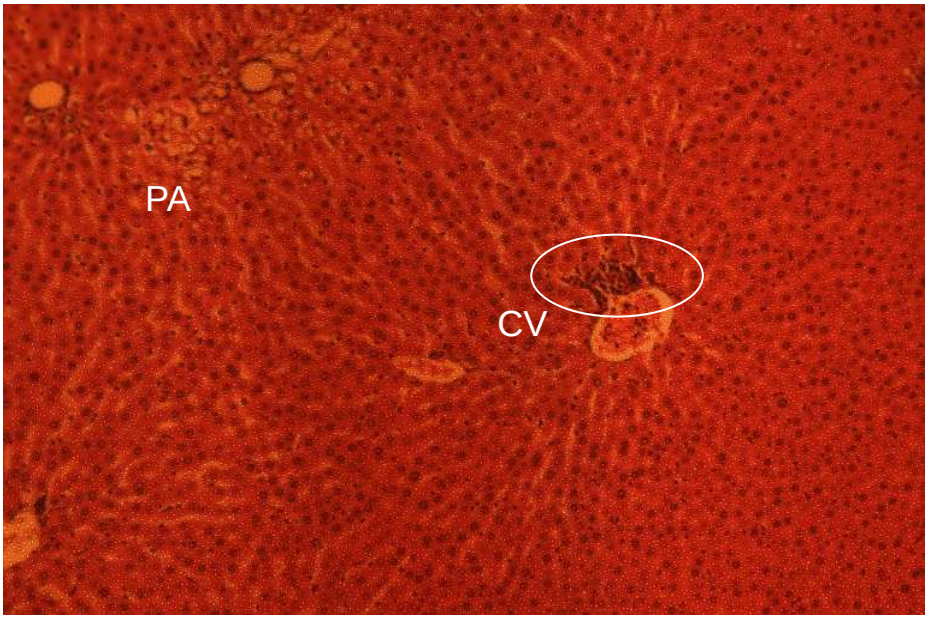
圖四十七、多劑量川芎茶調散組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集；CV: central vein



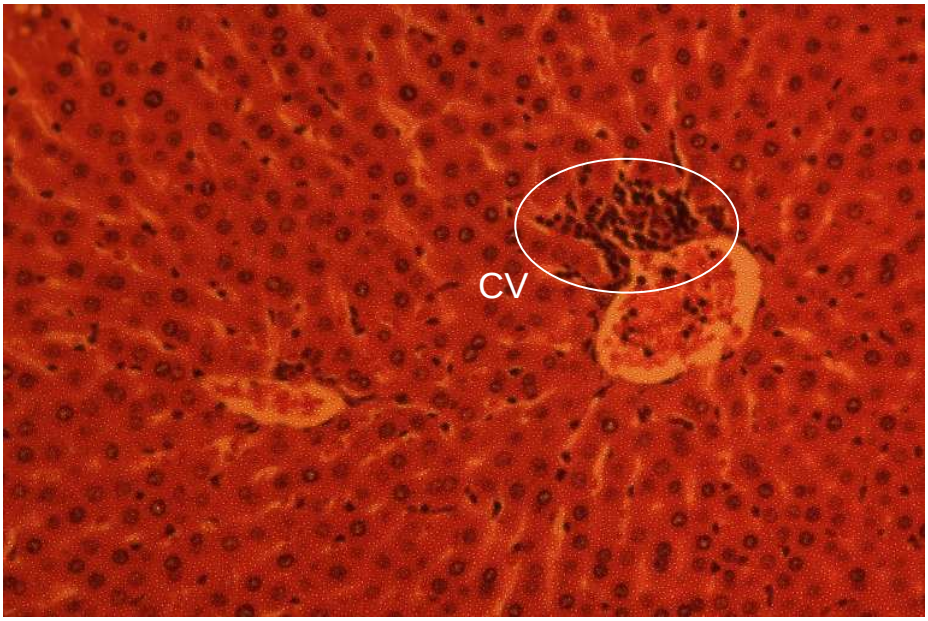
圖四十八、多劑量川芎茶調散組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集；CV: central vein



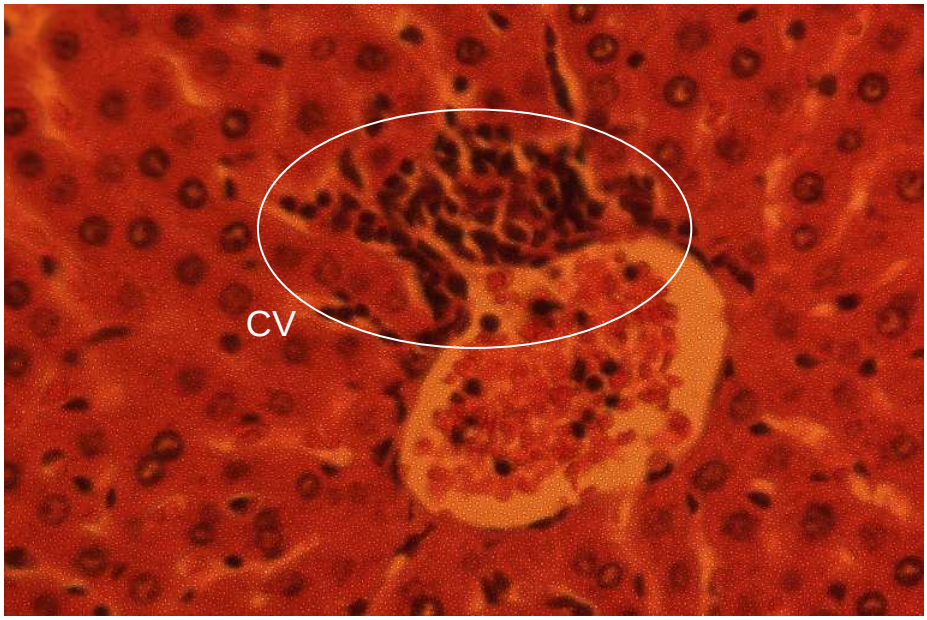
圖四十九、多劑量川芎茶調散組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集



圖五十、多劑量川芎茶調散組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 100 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，肝葉及門脈區周邊(periportal)細胞出現空泡，PA: portal area, CV: central vein



圖五十一、多劑量川芎茶調散組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 200 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，肝葉部分細胞出現空泡，CV: central vein



圖五十二、多劑量川芎茶調散組併服 dextromethorphan 大白鼠肝切片 H&E 染色圖，放大倍率 400 倍；圓圈標記處明顯有發炎細胞之聚集，CV: central vein

表一、Midazolam 於大鼠血漿中異日間之標準曲線數據（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	SD	CV (%)	Accuracy (%err)
	No. 1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
20	20.1	20.5	20.6	20.2	19.7	20.0	20.2	0.3	1.7	0.9
100	98.1	87.0	85.8	94.6	108.7	101.2	95.9	8.7	9.1	-4.1
500	439.7	510.1	491.2	488.0	495.1	485.3	484.9	23.8	4.9	-3.0
1000	1058.9	978.3	947.4	969.2	1026.3	1057.1	1006.2	47.7	4.7	0.6
2000	2134.8	1975.7	2123.0	1968.0	1990.1	2049.2	2040.1	74.5	3.7	2.0
4000	4132.3	4249.7	3960.6	3983.2	4119.7	4141.6	4097.8	108.2	2.6	2.4
6000	5990.1	6160.9	6482.3	6612.5	5985.2	5778.5	6168.3	320.4	5.2	2.8
8000	7889.6	7802.2	8063.9	8032.0	7793.4	8029.0	7935.0	122.1	1.5	-0.8
10000	9888.5	10540.6	10429.0	10104.5	9172.7	9364.2	9916.6	556.1	5.6	-0.8

表二-1、Midazolam 於大鼠血漿中同日間之品管檢品(QC sample)在 LC-MS-MS 分析確效驗證結果（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	S.D.	CV（%）	Accuracy (%err)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
20	21.7	21.4	16.0	20.8	17.7	19.1	19.45	2.27	11.67	2.75
50	43.2	42.8	41.4	52.6	44.6	49.8	45.73	4.44	9.72	8.53
5000	4840	5130	4760	4810	4850	5120	4918.3	163.1	3.32	1.63
7000	6780	6450	6700	6830	6320	6720	6633.3	202.0	3.04	5.24

表二-2、Midazolam 於大鼠血漿中異日間之品管檢品在 LC-MS-MS 分析確效驗證結果（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	SD	CV（%）	Accuracy (%err)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
20	17.3	16.7	17.9	20.6	16.1	15.3	17.32	1.85	10.66	-13.42
50	49.3	38.3	48.4	45.6	45.1	41.6	44.72	4.16	9.30	-10.57
5000	4890	5160	5020	5080	4900	5140	5031.67	116.69	2.32	0.63
7000	6900	6790	6970	6360	7000	6540	6760.00	257.14	3.80	-3.43

表三、1'-OH-midazolam 於大鼠血漿中異日間(Inter-day)之標準曲線數據（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	SD	CV (%)	Accuracy (%err)
	No. 1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
25	24.9	25.1	25.0	25.1	25.2	25.1	25.1	0.1	0.3	0.3
250	272.2	241.4	244.0	244.1	238.8	244.1	247.5	12.3	5.0	-1.0
500	421.3	485.7	502.5	478.6	478.4	478.6	474.2	27.5	5.8	-5.2
1000	1027.5	973.1	1040.6	1044.4	980.5	1044.4	1018.4	32.9	3.2	1.8
2000	2009.3	1977.8	1999.4	1960.1	1994.1	1960.1	1983.4	20.8	1.0	-0.8
3000	3057.0	3076.1	2977.0	3012.0	3085.7	3012.0	3036.7	42.8	1.4	1.2
4000	4105.2	4138.2	4002.5	4086.7	4201.1	4086.7	4103.4	65.6	1.6	2.6
5000	4965.2	5178.8	4921.9	5064.1	5126.4	5064.1	5053.4	96.3	1.9	1.1

表四-1、1'-OH-midazolam 於大鼠血漿中同日間之品管檢品(QC sample) 在 LC-MS-MS 分析確效驗證結果（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	S.D.	CV（%）	Accuracy (%err)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
25	29.6	29.5	25.8	26.6	26	25.6	27.2	1.9	6.9	8.7
50	45.6	49.5	48.1	51.7	48.4	56.0	49.9	3.6	7.2	-0.2
2500	2400	2550	2460	2390	2410	2520	2455.0	67.2	2.7	-1.8
3500	3540	3490	3670	3490	3440	3560	3531.7	79.9	2.3	0.9

表四-2、1'-OH-midazolam 於大鼠血漿中異日間之品管檢品在 LC-MS-MS 分析確效驗證結果（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	SD	CV（%）	Accuracy (%err)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
25	22.9	22	26.4	28.4	25	22.5	24.5	2.5	10.3	-1.9
50	48.2	51	52.2	46.7	52.1	51.1	50.2	2.2	4.5	0.4
2500	2490	2410	2560	2380	2440	2470	2458.3	63.7	2.6	-1.7
3500	3710	3470	3700	3490	3610	3800	3630.0	131.0	3.6	3.7

表五、Fluvastatin 於大鼠血漿中異日間之標準曲線數據（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	SD	CV（%）	Accuracy (%)
	No. 1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
0.25	0.272	0.263	0.257	0.257	0.253	0.252	0.26	0.007	2.88	-3.6
0.5	0.486	0.467	0.444	0.441	0.491	0.485	0.47	0.022	4.71	6.2
1.0	0.987	0.935	1.10	1.11	0.981	1.04	1.03	0.070	6.83	-2.6
5.0	5.03	4.88	5.37	5.37	4.99	4.92	5.09	0.221	4.33	-1.9
10	9.86	10.1	10.7	10.6	9.97	9.91	10.19	0.367	3.60	-1.9
50	47.6	55.4	51.1	51.0	48.2	49.7	50.50	2.791	5.53	-1.0
100	100	93.1	94.2	93.9	97.4	98.3	96.15	2.799	2.91	3.9
250	253	265	221	220	247	249	242.5	18.152	7.49	3.0

表六-1、Fluvastatin 於大鼠血漿中同日間之品管檢品(QC sample)在 LC-MS-MS 分析確效驗證結果（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Concentrations Calculated (ng/mL) N=6						Mean N=6	SD	CV (%)	Accuracy (%)
0.25	0.23	0.22	0.30	0.25	0.25	0.29	0.26	0.032	12.63	2.5
0.75	0.722	0.84	0.78	0.74	0.73	0.72	0.75	0.047	6.22	0.5
125.00	141.00	130.00	146.00	143.00	145.00	157.00	143.67	8.710	6.06	14.9
225.00	232.00	227.00	231.00	241.00	227.00	243.00	243.00	6.921	2.85	8.0

表六-2、Fluvastatin 於大鼠血漿中異日間之品管檢品在 LC-MS-MS 分析確效驗證結果（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	SD	CV (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
0.25	0.272	0.263	0.257	0.257	0.253	0.252	0.26	0.007	2.88	-3.6
0.75	0.746	0.739	0.693	0.768	0.713	0.732	0.73	0.03	3.58	2.42
125.00	126	123	121	136	128	124	126.3	5.31	4.21	-1.07
225.00	224	220	234	236	220	229	227.2	6.94	3.06	-0.96

表七、Dextromethorphan 於大鼠血漿中異日間(Inter-day)之標準曲線數據（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	SD	CV（%）	Accuracy (%)
	No. 1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
1	1.03	1	1.01	0.98	0.99	1.02	1.01	0.019	1.86	-0.5
5	4.32	4.81	4.78	4.94	5.64	4.99	4.91	0.428	8.71	1.73
10	9.27	10.3	10.1	10	10.3	9.9	9.98	0.382	3.83	0.22
25	3.11	30.1	30.2	24.8	25.4	24.6	23.04	10.094	43.82	7.86
50	53.2	55.1	51.3	49.6	49.1	50.8	51.52	2.269	4.40	-3.03
100	107	102	107	101	97.2	102	102.7	3.77	3.67	-2.7
250	261	219	231	242	236	241	238.3	13.91	5.84	4.67

表八-1、Dextromethorphan於大鼠血漿中同日間之品管檢品(QC sample)在LC-MS-MS分析確效驗證結果（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	S.D.	CV（%）	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
1	1.01	1.03	0.99	1.01	1.02	0.98	1.006667	0.02	1.85	-0.67
1.5	1.52	1.56	1.58	1.52	1.54	1.55	1.545	0.02	1.52	-3.0
125	128	131	121	133	120	135	128	6.26	4.89	-2.4
225	223	217	213	237	239	219	224.6667	10.84	4.82	0.15

表八-2、extromethorphan於大鼠血漿中異日間之品管檢品在LC-MS-MS分析確效驗證結果（n=6）

Actual Conc. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)						Mean (ng/ml)	SD	CV（%）	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
1	1.03	1	1.01	0.98	0.99	1.02	1.01	0.019	1.86	-0.5
1.5	1.44	1.41	1.51	1.47	1.37	1.45	1.44	0.049	3.35	3.89
125	146	112	140	108	143	127	129.3	16.367	12.65	-3.47
225	235	229	207	187	206	221	214.2	17.646	8.24	4.81

表九、併服知柏地黃丸(ZBDHW)對大鼠口服 midazolam 之 midazolam 藥動參數影響

PK parameter	(A) Midazolam 20 mg/kg (n = 6)	(B) Midazolam 20 mg/kg + ZBDHW 0.33 g/kg (n = 6)	Ratio of B / A	P value (t-test)
k (1/min)	0.014 ± 0.003	0.011 ± 0.003	0.89	0.381
$t_{1/2}$ (min)	57.09 ± 15.96	63.30 ± 13.34	1.11	0.482
Tmax (min)	20.83 ± 14.29	22.50 ± 12.55	1.08	
Cmax (ug/ml)	1.35 ± 0.25	2.21 ± 0.74 *	1.63	0.036
$AUC_{0\to t}$ (min*ug/ml)	107.18 ± 33.12	218.09 ± 62.55 **	2.03	0.006
$AUC_{0\to\infty}$ (min*ug/ml)	114.77 ± 35.63	236.65 ± 61.97 ***	2.06	0.003
Vd/F (L/kg)	15.51 ± 6.19	8.23 ± 2.76 *	0.53	0.034
Cl/F (ml/min/kg)	187.61 ± 52.95	89.65 ± 24.82 ***	0.48	0.004
MRT (min)	92.81 ± 22.61	103.25 ± 16.20	1.11	0.382

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.005; Data = Mean ± SD

表十、併服知柏地黃丸(ZBDHW)對大鼠口服 midazolam 之代謝物 1-OH-midazolam 藥動參數影響

PK parameter	(A) Midazolam 20 mg/kg (n = 6)	(B) Midazolam 20 mg/kg + ZBDHW 0.33 g/kg (n = 6)	Ratio of B / A	P value (t-test)
k (1/min)	0.015 ± 0.005	0.018 ± 0.003	1.20	0.244
$t_{1/2}$ (min)	49.46 ± 12.62	39.70 ± 7.05	0.80	0.138
Tmax (min)	25.00 ± 15.49	32.50 ± 11.29	1.30	
Cmax (ng/ml)	565.33 ± 133.50	767.33 ± 131.69 *	1.36	0.025
$AUC_{0\to t}$ (min*ug/ml)	46.97 ± 8.31	67.36 ± 9.42 ***	1.43	0.003
$AUC_{0\to\infty}$ (min*ug/ml)	50.08 ± 8.34	69.59 ± 9.94 ***	1.39	0.005
MRT (min)	83.96 ± 15.31	75.32 ± 9.65	0.90	0.274

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.005; Data = Mean ± SD

表十一、併服桑菊飲(SJY)對大鼠口服 nalbuphine 之 nalbuphine 藥動參數影響

PK parameter	(A) Nalbuphine 20 mg/kg (n = 11)	(B) Nalbuphine 20 mg/kg + SJY 0.17 g/kg (n = 5)	Ratio of B / A	P-value (t-test)
k (1/hr)	0.35 ± 0.21	0.29 ± 0.25	0.84	0.676
$t_{1/2}$ (hr)	2.92 ± 1.86	4.15 ± 3.02	1.42	0.436
Tmax (hr)	0.48 ± 0.24	0.60 ± 0.34	1.26	
Cmax (ng/ml)	17.97 ± 7.45	59.56 ± 25.74 *	3.31	0.021
$AUC_{0\to t}$ (hr*ng/ml)	35.62 ± 11.48	103.93 ± 14.50 ***	2.92	< 0.001
$AUC_{0\to\infty}$ (hr*ng/ml)	39.00 ± 11.63	113.19 ± 16.05 ***	2.90	< 0.001
Vd/F (L/kg)	2179.14 ± 1229.97	1041.55 ± 681.95 *	0.48	0.034
Cl/F (L/hr/kg)	578.46 ± 266.85	179.59 ± 25.72 ***	0.31	< 0.001
MRT (hr)	4.02 ± 2.39	7.08 ± 4.60	1.76	0.220

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.005; Data = Mean ± SD

表十二、多劑量銀翹散(YCS)、甘露飲(GLY)併服 Fluvastatin 對大鼠之 Fluvastatin 藥動參數影響

PK parameter	Fluvastatin (A) n=6	Fluvastatin (B) with 甘露飲, n=6 (B/A)		Fluvastatin (C) with 銀翹散, n=6 (C/A)	
Cmax (ng/mL)	8.68 ± 3.46	14.40 ± 1.71*	(1.7)	15.50 ± 5.46**	(1.8)
Tmax (hr)	1.95 ± 1.16	0.95 ± 0.13	(0.5)	1.28 ± 0.57	(0.7)
AUCt (hr*ng/mL)	80.3 ± 15.0	141.1 ± 17.0***	(1.8)	129.2 ± 34.0***	(1.6)
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	92.3 ± 22.9	156.3 ± 23.3**	(1.7)	147.7 ± 52.8*	(1.6)
t1/2 (hr)	11.4 ± 6.9	7.90 ± 2.3	(0.7)	7.80 ± 3.3	(0.7)
Cl/F (L/hr/kg)	17.12 ± 4.42	9.76 ± 1.35***	(0.6)	11.24 ± 3.79**	(0.7)
Vd/F(L/kg)	255.5 ± 100.1	109.1 ± 21.0***	(0.4)	119.1 ± 48.1***	(0.5)
MRT (hr)	14.0 ± 5.0	12.4 ± 2.2	(0.9)	13.5 ± 5.2	(1.0)

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.005; Data = Mean ± SD

表十三、多劑量正骨紫金丹(TGJTD)、川芎茶調散(CCCTS)併服 dextromethorphan 對大鼠之 dextromethorphan 藥動參數影響

PK parameter	A：DEX 20mg/Kg, n=6(A)	B：DEX 20mg/Kg with 川芎茶調散，n=6(B/A)	C：DEX 20mg/Kg with 正骨紫金丹，n=6(B/A)
C max(ng/mL)	32.7 ± 21.6	37.8 ± 17.9 (1.2)	34.1 ± 17.8 (1.0)
T max(hr)	0.67 ± 0.3	0.5 ± 0.19 (0.7)	0.72 ± 0.25 (1.1)
AUC t(hr*ng/mL)	88.2 ± 48.6	88.7 ± 51.9 (1.0)	88.1 ± 43.6 (1.0)
$AUC_{INF(hr*ng/mL)}$	107.9 ± 35	120 ± 65.9 (1.1)	97.3 ± 44.9 (0.9)
k(1/hr)	0.33 ± 0.21	0.22 ± 0.09 (0.7)	0.33 ± 0.08 (1.0)
t1/2(hr)	4.78 ± 5.95	3.72 ± 1.88 (0.8)	2.22 ± 0.48 (0.5)
MRT(hr)	6.83 ± 8.02	4.96 ± 2.26 (0.7)	3.54 ± 0.84 (0.5)
Cl/F(mL/min/kg)	207 ± 84	239 ± 177 (1.2)	241 ± 98.0 (1.2)
Vd/F(mL/kg)	1531 ± 1819	1067 ± 491 (0.7)	782 ± 377 (0.5)

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.005; D