

編號：CCMP92-RD-041

## 半夏炮製技術之研究（2-1）

溫武哲

財團法人製藥工業技術發展中心

### 摘要

本計畫進行半夏藥材炮製方法、炮製前後化學成分變化化學指紋圖譜、大鼠急性毒性（LD50）及細胞毒性試驗研究分析。

在炮製方法研究方面進行了：1.半夏藥材基原鑑定研究，以組織切片及顯微鏡檢確定半夏藥材正確基原，再進行藥材炮製；2.炮製方法篩選，依據古籍記載炮製方法進行炮製，最後篩選出最適炮製方法—清半夏：篩選1~1.5cm 經基原確立之生半夏藥材，以藥材5倍體積量之1%礬水浸泡，每天更換1%礬水，共七天，以50°C烘乾48小時得清半夏；薑半夏—取經前述方法炮製完成之清半夏，以2.5倍藥材水量煮5小時，切成1-1.5mm薄片，再以30°C冷風烘乾或風乾48小時，其LOD值為8~12%，得薑半夏成品。在半夏炮製前後化學變化研究，開發HPLC分析方法及分析半夏藥材炮製過程中成份變化指紋圖譜，研究結果顯示，炮製7天後之半夏藥材，其HPLC圖譜中，40分鐘前中高級性化學成分減少消失，顯示炮製過程中高級化學成分會被去除。在毒性部分研究，分成兩部份，大鼠急性毒性（LD50）試驗與細胞毒性試驗。於大鼠LD50試驗中結果數據顯示，不論生半夏或炮製7天後清半夏，其對大鼠動物均無急性致死劑量（10g/kg），而細胞試驗（BHK-21）結果亦顯示對此細胞並無毒性，有待進一步評估，以確定其毒性。

本研究成果可提供生產品質穩定之清半夏和薑半夏，並可提供半夏藥材炮製流程方法規格化及科學化之參考依據。所建立之品質管控方法，可提供制定炮製方法規範之參考，對於促進此藥材之現代化與國際化有相當之助益。

關鍵詞：藥材炮製、清半夏、薑半夏、急性毒性（LD50）、細胞毒性、品質  
管制

Number:CCMP92-RD-041

# The Study of Process Technology of *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. (2-1)

Wu-Che Wen

Pharmaceutical Industry Technology and Development Center

## ABSTRACT

The objective of research is to study the process technology of *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit., the fingerprint of *Pinellia ternate* before and after processing, the acute toxicity of *Pinellia ternate* to the rats (LD50), and the cytotoxic effects of *Pinellia ternate* to BHK-21 cells.

Before the study, we had identified the original of *Pinellia ternate*, via the methods of histology and microscopy analysis. At the process technology study, we had first according to the tradition methods of Chinese tradition medicine to process *Pinellia ternate*, then to screen the best methods of producing “water processed *Pinellia ternate*” and “ginger processed *Pinellia ternate*”. “Water processed *Pinellia ternate*” were prepared by using 1~1.5cm of *Pinellia ternate* which had already been original identification, bathed with 5 times volume of 1% alum water solution, replaced with 1% alum water solution every day for continuously seven days, and dried at 50°C for 48 hours. “Ginger processed *Pinellia ternate*” were prepared by using “water processed *Pinellia ternate*”, boiled with 2.5 times volume of water solution which contained ginger and alum, then were cut as 1-1.5mm slice, and dried at 30°C for 48 hours (LOD 8~12%). At the chemistry study of processed *Pinellia ternate*, we had developed the HPLC analysis methods and analyzed the fingerprint of *Pinellia ternate* before and after processing. Our results showed that, after seven days of *Pinellia ternate* processing, at HPLC fingerprint profile, there are some kinds of chemical

ingredients disappeared. The toxicity study of processed *Pinellia ternate* included the acute toxicity of *Pinellia ternate* to the rats (LD50) and the cytotoxic effects of *Pinellia ternate* to BHK-21 cells. The data showed that there are no significant difference of the rat's acute toxicity (10g/kg) between “*Pinellia ternate*” and “water processed *Pinellia ternate*”. To evaluate the cytotoxic effects of *Pinellia ternate*, we still need more data to confirm our results.

Our study will provide the methods for producing stable quality of “water processed *Pinellia ternate*” and “ginger processed *Pinellia ternate*”. It will also contribute as the standard and scientific reference for the methods of processing of *Pinellia ternate*. These quality-controlled methods will not only give us an example of how to set up the processing model of *Pinellia ternate*, will be also beneficial to the modernization and internalization of *Pinellia ternate*.

Keywords: herb processing, water processed *Pinellia ternate*, ginger processed *Pinellia ternate*, acute toxicity (LD50), cytotoxicity, quality-control

## 壹、前言

半夏，是天南星科(Araceae)半夏屬(*Pinellia* Tenore)植物 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.的乾燥塊莖。全國及台灣之新竹以北及花蓮山區均有分布<sup>1</sup>。

典籍記載中<sup>1~5</sup>，半夏辛溫有毒，孕婦忌用。半夏最早著錄於神農本草經草部下品，並沿用迄今之重要藥材之一。半夏能燥濕化痰，降逆止嘔，消痞散結，用於痰多咳喘，痰飲眩悸，風痰眩暈，痰厥頭痛，嘔吐反胃，胸脘痞悶，梅核氣症。

未炮製過，洗淨，除去外皮及根鬚，曬乾為“生半夏”，力強而擅消腫散結，一般不內服，外用，因有毒<sup>6</sup>。《肘後方》以生半夏研末，用雞蛋白調敷患處，治癰疽發背及乳瘡。

半夏炮製的方法很多，功效亦有不同，本計畫針對清半夏及薑半夏炮製進行研究。清半夏是以選取洗淨去皮生半夏，用1%白礬水浸泡，至內無乾心，口嘗微麻舌感，切厚片乾燥，用於[化痰]。薑半夏是用生薑、白礬水浸漬共煮之，宜于[止嘔]，用於燥濕消痞，降逆止嘔，治噁心嘔吐，胃脘痞滿。生半夏中部份成分對局部有強烈的刺激性，故生食時可使舌、咽、口腔產生麻木、腫痛、流涎反應，重者可引起嘔吐、喉部痙攣、呼吸困難，甚至窒息死亡<sup>7~14</sup>。因典籍記載生半夏有小毒，把薑汁和半夏粉末一起攪拌共煮之後，可以制半夏的毒，使半夏更能發揮臨床上的功能。但因民間傳統清半夏及薑半夏藥材炮製乃師徒相傳，繼承下來，各地遵循不一，說法不一，欠缺科學方法分析評估薑半夏炮製的結果，亦無品管控制系統，以致薑半夏炮製藥材品質參差不齊，也間接引影響到薑半夏的療效與形象。發展以科學化、系統化的方法，進行薑半夏炮製技術的適用性，乃是當務之急，也是本研究計畫進行目的之一。

本研究的內容分別探討：一、半夏藥材的炮製，篩選建立清半夏及薑半夏炮製方法；二、分析炮製過程中半夏藥材化學成分的變化<sup>15</sup>；三、建立清半夏和薑半夏之炮製規格程序；四、以動物急性毒性(LD50)試驗及細胞毒性試驗評估半夏毒性。從本研究結果中顯示生半夏對大鼠動物並無急性毒性(10g/kg)且對BHK-21細胞也無毒性，但炮製過程中化學成分有顯著變化，對於清半夏和薑半夏炮製規格化建立，於本研究中有深入研究。總之，本研究期能以科學規格系統化炮製製程，生產品質穩定、均一及安全之清半夏和薑半夏。

## 貳、材料與方法

### 一、儀器設備及試劑耗材

#### (一) 設備儀器：

1. 純水製造機

Milli-RO 30 Plus, Millipore, 美國

2. 高效液相層析儀

HP 1100, Hewlett Packard, 美國

3. 電子分析天平

AT261, Mettler, 瑞士

4. 電子秤

5. 電爐

6. 加熱包

7. Olympus CX41, Bhtm-明暗視野偏光，光學顯微鏡

8. Nikon-995, 334 萬像素數位相機

#### (二) 原料、試劑及耗材：

1. 生半夏：經基原鑑定之半夏藥材

2. 生薑：市售生薑

3. 明礬：食品級；台灣明礬公司

4. 細胞株來源：BHK-21

食品工業發展研究所菌株中心 (CCRC 60041)

5. 氟甲烷 (ACN) 及甲醇 (MeOH)：台灣默克 (Merck)

6. 分析管柱：Cosmosil 5C<sub>18</sub> MSII 4.6 X 250 mm 5μ

## 二、實驗方法

### (一) 基原鑑別

#### 1. 外觀鑑別：

鑑別方法：依典籍記載敘述一一比對外觀徵鑑別。

#### 2. 組織切片顯微鏡檢鑑別：

鑑別方法利用其組織切片鏡檢所得之特徵和公定書中所列之已知種、屬之藥材組織切片之特徵進行比對，以鑑別其基原品種。生薑藥材以刀片切成  $24\mu\text{m}$  以下薄片，再以顯微鏡檢視其結果。

### (二) 炮製方法

本計畫所採用之清半夏及薑半夏炮製方法乃使用中華人民共和國藥典記載炮製方法為依據，進行後續之炮製研究。對於整個炮製過程均以科學化、系統化及規格化方式進行，並依標準製造流程程序詳實記載 (SOP) 每一實驗步驟。實施方法如下：

將半夏藥材炮製工程分為淨選、浸泡、薑製、切製及乾燥等幾部份工程；其分別敘述如下。

#### 1. 淨選：

主要目的在除去攏於藥材中之雜質；如藥材採集過程中所攏雜之土石、未去淨之皮鬚、藥材之破片等等，此淨選流程為未來炮製產品品質大小均一重要之工程。

##### (1) 淨選實驗方法：

以篩網篩選直徑  $0.8\sim1.5\text{cm}$  之半夏顆粒以供後續半夏炮製研究之用，並於篩選過程中除去破片顆粒及其他非藥材雜質。

#### 2. 浸泡：

##### (1) 浸泡實驗方法：

稱取 50g 明礬溶於 5 公升純水中為 1% 明礬之水溶液。於上述明礬水中加入 100g 淨選後之半夏顆粒浸泡，注意需將半夏完全浸入 1% 明礬水溶液中。每日（24 小時）更換新鮮配製之明礬水溶液浸泡，每天（24hr）取半夏藥材切開檢測，浸泡至切開內無乾心（7 天），以 50°C 烘乾 48 小時得清半夏。

### 3. 薑製：

#### （1）實驗方法：

浸泡過 7 天明礬水的半夏顆粒 100g 置於鍋內，加入生薑 25g，白礬 12g，並加水 1000mL 煎煮 5 小時至內無白心為止，煎煮過程需每小時採樣切開觀查。

### 4. 乾燥：

#### （1）實驗方法：

將上述薑製半夏取出，以 30°C 冷風烘乾或室溫晾乾 48 小時，至表面析出一層白礬。

### 5. 切製：

#### （1）實驗方法：

取出薑製完成晾涼 48 小時之半夏顆粒，以刀切薄片厚度 1~2mm，陰乾至 LOD 為 8~12%。

### 6. 細胞株毒性試驗：

#### （1）實驗檢測方法：

種植  $5 \times 10^3$  的 BHK-21 細胞於 96 格細胞培養盤中，於 37°C 環境下隔夜培養。吸取原培養液後加入含不同濃度半夏萃取液的新鮮培養液 100  $\mu\text{l}$ ，於 37°C 環境下培養 24 小時。吸取原培養液後以 PBS buffer 水洗再加入 100  $\mu\text{l}$  MTT (1mg/ml) 於 37°C 環境下培養 3 小時，最後加入 100  $\mu\text{l}$  lysis buffer (50% DMSO, 5% SDS) 於 37°C 環境下隔夜培養，以分光光度計測其 O.D.<sub>570</sub><sup>16~19</sup>。

7. 大鼠急性毒性口服投予動物試驗（委託綠色四技生物科技股份有限公司）

(1) 動物實驗方法：

- a. 動物品系：Sprague-Dawley ( SD )
- b. 來源：國立陽明大學實驗動物中心
- c. 試驗動物品系選擇理由：大鼠是適合用來做毒性試驗的實驗動物，已被廣泛使用於單一劑量毒性試驗。本品系大鼠已有豐富的基礎參考資料與數據，可應用於本試驗結果之分析與評估。
- d. 動物週齡：5 週齡

(2) 飼育管理

- a. 飼育環境：溫度  $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$   
濕度  $60 \pm 10\%$   
照明時間 12 小時 (6:00 開燈、18:00 熄燈)  
落菌數每月 1 次
- b. 環境監測：每日溫度、濕度監測
- c. 飼育籠與頭數：馴化、檢疫期間雌雄大鼠分別以 5 隻 1 篓，飼養於經高溫高壓滅菌之塑膠製飼育籠 ( $10\frac{1}{2}''\text{W} \times 19''\text{D} \times 8''\text{H}$ )。  
試驗期間：雌雄大鼠分別以 3 隻 1 篓，飼養於經高溫高壓滅菌之塑膠製飼育籠 ( $10\frac{1}{2}''\text{W} \times 19''\text{D} \times 8''\text{H}$ )。
- d. 飼料：名稱 Lab Diet 5010 Rodent Diet

(3) 投藥量設定

- a. 對照組：比照高劑量投藥體積（注射用蒸餾水）
- b. 低劑量組： $1 \text{ g/kg}$
- c. 中劑量組： $5 \text{ g/kg}$
- d. 高劑量組： $10 \text{ g/kg}$

#### (4) 試驗組別

組 別	投藥劑量 (g/kg)	動 物 數	
		雄	雌
對 照 組	0	6	6
低 劑 量 組	1	6	6
中 劑 量 組	5	6	6
高 劑 量 組	10	6	6

#### (5) 飼化及檢疫

試驗動物入室後，先暫做臨時編號並量測體重。經過約2週的馴化、檢疫，在此期間每日進行臨床症狀之觀察，最後經由獸醫師判斷，必須保證健康且體重正常增重的動物，方提供做試驗。

#### (6) 試驗物質、對照物質的投予

##### a.投藥方法、投藥途徑、投藥次數

試驗開始當日以口服投予試驗物質，每次最大投予量為 10 ml/kg。

##### b.投藥期間

試驗開始投藥一次，在上午完成投藥。對照組則只投予注射用蒸餾水。

##### c.投藥量

投藥量之計算乃根據當日投藥前量測之體重為基準，投藥劑量單位 g/kg。

##### d.動物個體識別

耳號（打耳洞法）

## (7) 動物觀察及檢查項目

### a. 臨床症狀觀察

試驗期間每日進行臨床觀察，並記錄動物是否有臨床症狀，其他異常中毒症狀或死亡。發現日及所有異常症狀與程度記錄在個別動物資料表。死亡動物進行剖檢，並找出可能致死原因。

### b. 體重測定

試驗動物於投藥日投藥開始前，投藥後每週一次及剖檢前，量測動物體重。

### c. 尸體解剖與肉眼檢查

試驗期間，死亡或瀕死之動物立即進行剖檢，並做成紀錄。試驗結束，所有存活的動物，經安樂死後進行剖檢，以肉眼檢查外觀、口腔、顱腔及胸、腹腔內所有組織器官，並做成紀錄。

## 參、結果

### 一、清半夏炮製結果

#### (一) 半夏原料藥材基原鑑定

##### 1. 外觀鑑別：

圓球形、半圓球形或偏斜狀，徑 0.8-2cm，外皮有黃色斑點，上部多圓平，有凹陷之黃棕色點為葉或芽之殘痕，周圍密布棕色凹點狀鬚根痕，下部鈍圓而光滑，質堅實，緻密，外皮表面白或淺黃色，縱切面腎臟形，潔白，粉性足，質老或乾燥不當，有灰白或黃色紋，有嗆鼻的味道（如圖一及圖二）。

##### 2. 組織切片顯微鏡檢鑑別

依據其外觀性狀及組織切片鏡檢所得之特徵結果和公定書中所列之品種、屬之藥材組織切片之特徵相符合，鑑定其基原品種正確。半夏塊莖之橫切面如圖三。皮部含草酸鈣針晶束（圖四、圖五），切片時，澱粉粒及針晶束常散落至玻片上。多見環紋導管（圖六），直徑約  $20\mu\text{m}$ ，另可見螺紋導管，直徑約  $25\mu\text{m}$ （圖七），其內側為柔細胞（圖八），呈類圓形，直徑約  $50-75\mu\text{m}$ 。柔細胞中充滿澱粉粒（圖九），呈類圓形，直徑約  $5-15\mu\text{m}$ ，部分可見線狀、星狀臍點，較大之澱粉粒可見明顯層紋。維管束為並立型（圖十）。

##### 3. 半夏組織切片結果

項 目	批 號	生薑
草酸鈣針晶		有
油細胞		有
階紋導管		有
螺紋導管		有
環紋導管		有
維管束類型		並立型維管束
澱粉粒		有

實驗切片結果顯示半夏藥材鏡檢圖與公定書記載內容相符

## (二) 生薑原料藥材

### 1. 生薑藥材性狀外觀鑑別

根莖呈不規則塊狀，具有指狀分枝，厚 2~4 cm。表面黃棕色，粗糙，具縱皺紋及明顯環節。分枝頂端有莖痕或芽，質地堅硬。斷面黃白色，多纖維，具有汁液，有一明顯圓環，具特殊香氣及辛辣味（如圖十一、圖十二）。

### 2. 組織切片顯微鏡檢

利用其組織切片鏡檢所得之特徵和公定書中所列之已知種、屬之藥材組織切片之特徵進行比對，以鑑別其基原品種。根莖部橫切，栓皮層已被洗去，表皮層 1~2 列，呈紅褐色，大部分細胞均破裂。靠近表皮層之部分柔細胞內含草酸鈣方晶。表皮層之下皮層寬廣，可見許多油細胞，呈橢圓形，細胞壁薄，內含油狀物。（如圖十三、圖十四）中心柱佔莖部大部分，具有許多散生之外韌型維管束。向下延伸則具有中柱鞘，維管束緊密排列呈環狀。樹脂細胞常伴隨在維管束附近，內含紅棕色分泌物。導管大多為階紋導管（圖十五），其次為螺紋導管，直徑 10~20 $\mu\text{m}$ （如圖十六）。澱粉粒極多（如圖十七），單粒，臍點呈線狀，大小 5~10 $\mu\text{m}$ 。纖維大多成束存在（如圖十八）。

### 3. 生薑組織切片結果

項 目	批 號	生薑
草酸鈣方晶		有
油細胞		有
階紋導管		有
螺紋導管		有
孔紋導管		無
環紋導管		無
纖維類型		成束纖維
澱粉粒		有

實驗切片結果顯示生薑藥材鏡檢圖與公定書記載內容相符

### (三) 生半夏藥材炮製過程中水漂時間對其成分變化之 HPLC 分析

#### 1. 浸泡水量研究

在浸泡水量測試時發現，乾品半夏顆粒至少需要 3 倍體積的水量方可完全覆蓋所有的半夏顆粒。但是在浸泡 1 天之後，半夏會因為吸水膨潤，半夏顆粒變大且水量下降而無法完全被水浸泡。經過加入 4 倍體積水及 5 倍體積水量試驗，結果顯示 4 倍水量於浸泡 1 天後，仍有部分藥材露出水面，因此浸泡之水量應以 5 倍較適當。

#### 2. 清水炮製半夏藥材檢測時間對炮製清半夏之影響

根據典籍記載半夏炮製方法有很多種經比較各種不同方法後進行半夏炮製時，需七天（每天 24hr），且每天換水一次，只用清水炮製，發現泡至第二天時（48hr），整個炮製液會起泡並出現惡臭，至第三天時（72hr）半夏藥材呈現灰色，至第四天（96hr）時半夏藥材有黑點產生，至第五天（120hr）時整個半夏藥材呈灰黑色，顯示藥材已發酵壞了，因此不再繼續進行清水炮製半夏實驗。改以 1% 磺水進行試驗，則無此發霉現象。故浸泡時須以 1% 磺水進行炮製。

#### 3. 半夏炮製浸泡時間與重量變化試驗

半夏藥材以 5 倍 1% 磺水浸泡不攪拌，每日更換 1% 磺水並採樣切開觀察浸泡狀況。發現於炮製第 2 日時已完全浸透，見圖十九及圖二十。若以浸泡半夏乾燥後重量來看，則在第 3 天已無明顯變化，見表一。

#### 4.1% 明礬水炮製半夏藥材檢測時間對炮製半夏成分之影響

以 1% 明礬水浸泡半夏 7 天，取出每日浸泡一天（24 小時）後之半夏藥材與浸泡液，分別以 HPLC 分析其化學成分。取其 1~7 天（24、48、72、96、120、144 及 168 小時）之半夏藥材各 2g，及其浸泡液 50mL（檢測時濃縮至 10mL 後以 0.45uL 濾膜過濾後再注入 HPLC 分析），依下列 HPLC 分析方法，檢測分析其成分，在進行生半夏藥材與炮製半夏成分變化關析前，先檢測生半夏藥材 HPLC 成分分析圖譜，分析方法及條件如下，其結果如圖十九。

## (1) 樣品萃取方法

取2克樣品加入10mL 70%甲醇，置於圓底燒瓶內熱迴流30分鐘，冷卻後置於離心管後以2500rpm離心10分鐘，取上清液倒入10mL定量瓶內，以70%甲醇定量到10mL，再將此檢測液，以0.45μm濾膜過濾，濾液取10μL注入HPLC檢測其成分。

## (2) HPLC分析條件

前置管柱：Merck 5C<sub>18</sub> pre-column

分離管柱：Cosmosil MSII 5C18, S-5μm, 12 nm, 250×4.6mm I. D.

流動相：A：0.1%H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

B：ACN/H<sub>2</sub>O=90/10

偵測波長：210nm

梯度沖提程式：

Time (min)	A	B
0	100	0
20	95	5
40	80	20
60	75	25
70	70	30
80	60	40
85	40	60
95	20	80
110	0	100
120	0	100

## a.半夏藥材炮製時間與成分變化HPLC圖譜

半夏藥材經七天炮製後，依上述HPLC分析方法檢測其各不同炮製時間與其成分變化情形，結果如圖二十一、圖二十一、圖二十二、圖二十三及表二所示。由上述圖譜及數據表得知，當生半夏炮製進行五天(120hr)後其A、B、C及D四成分幾乎全部消失，而E及F成分僅小部分變化，可見水溶性成分幾乎於五天(120hr)

內均被浸泡至水中，而較低級性 E 及 F 成分部分，則較不受影響。

#### b. 生半夏炮製各天浸泡液水中成分變化分析

為了解生半夏經 7 天炮製，其所炮製水中成分變化，將炮製半夏之水，以中心開發完成 HPLC 方法檢測，各不同炮製時間與其成分變化情形如上圖二十四所示。由上述圖譜及數據得知，當生半夏炮製進行至 120hr 後其 A、B、C 及 D 四成分幾乎全部浸出，而 E 及 F 成分則無被浸出現象，可見生半夏水溶性成分幾乎於可於 120hr 內被浸出至水中，而低級性 E 及 F 成分，則不受水浸影響。

## 二、半夏炮製前後毒性差異

### (一) 半夏炮製前後細胞株毒性試驗

種植  $5 \times 10^3$  的 BHK-21 細胞於 96 孔盤格細胞培養盤中 (100 $\mu$ l)，置放於 37°C 下隔夜培養 (16hr) 小時讓細胞附著於 96 孔盤，而後加入含不同濃度半夏萃取液 (0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% 及 5%) 100  $\mu$ l，置於 37°C 下培養 24 小時，吸取原培養液後以 100  $\mu$ l PBS buffer 清洗一次後再加入 100  $\mu$ l MTT (1mg/ml)，於 37°C 環境下培養 3 小時，再加入 100  $\mu$ l lysis buffer (50% DMSO, 5% SDS) 於 37°C 環境下隔夜 (16hr) 培養，將細胞自 96 孔盤溶出，以分光光度計測其 O.D.<sub>570</sub> 紀錄其檢驗結果，並計算出細胞的增殖率<sup>16,17,18,19</sup>。檢測結果如表三。

從上表數據資料中得知，不論生半夏或炮製 7 天半夏進行細胞株毒性試驗細胞均無明顯減少死亡情形，顯見半夏藥材萃取液對此種 BHK-21 細胞並無明顯毒性。

註：生半夏煮為使用熱迴流萃取；生半夏振為使用超音波震盪萃取 (未加熱)。炮製半夏煮為炮至七天半夏使用熱迴流萃取；炮製半夏振為使用超音波震盪萃取 (未加熱)。

### (二) 半夏炮製前後動物急性毒性口服投與試驗

此項計畫委託綠色四技生物科技股份有限公司進行大鼠急性毒性 (LD<sub>50</sub>) 試驗，此試驗之物質為藥材直接磨成粉末。試

驗項目分為兩項：一為生半夏；另一為炮製七天半夏，因經費限制（每一項需 10 萬元）故只能進行兩項試驗。試驗結果如表四至表八。

從試驗結果表中數據顯示：

1. 雌雄鼠各對照組與劑量組之臨床症狀觀察並無發現異常之臨床症狀。
2. 試驗期間，雌雄鼠各對照組與劑量組並無死亡現象發生。
3. 試驗期間，雌雄鼠各劑量組體重增重情形與對照組相比較並無顯著差異（如圖二十五）。
4. 試驗期間，雌雄鼠各劑量組飼料攝取量與對照組相比較並無顯著差異。
5. 試驗結束後，存活大鼠進行犧牲與剖檢，雌雄鼠並無可觀察之肉眼病變。

因此當雌雄大鼠經一次投藥後，在各劑量組之臨床症狀並無異常狀況；在飼料消耗量、平均增重量與對照組比較，均無顯著之差異，而且大鼠在試驗期間均未發現死亡。肉眼觀察病變也無可觀察之病變產生。且不論生半夏或炮製 7 天後半夏其對大鼠動物均無急性致死劑量（已使用至 10g/kg），故生半夏對大鼠並未有急性致死毒性（LD50），對於其他部分之毒性則有待進一步確認。

### 三、薑半夏產品 HPLC 分析檢測

#### （一）薑製半夏時間試驗

在薑製時間試驗中，各以乾品清半夏 100 克，分別進行薑製工程 1、2、3、4 及 5 小時，所得成品以 80°C 乾燥後重量如表九所示。在薑製過程中，每小時進行採樣並切開樣品，見、圖二十六、圖二十七、圖二十八、圖二十九及圖三十，發覺在保持微沸的狀態下進行薑製過程至 5 小時，才可將半夏煮透，故進行薑製時間至少需 5 小時，方可煮透至內無白心。

## (二) 薑製水量試驗

從薑製時間試驗中得知，薑製之時間需 5 小時。因此固定薑製時間，各以乾品清半夏 100 克，加入 2.5 倍、5 倍及 10 倍水煎煮 5 小時，再以 HPLC 檢測指標成分 E、F 及 6-gingerol 成分含量，結果如表五所示，顯示以 2.5 倍水量共煮時會得到較高成份含量。而烘乾時需以陰乾或低溫乾燥所得之薑半夏產品指標成分 E、F 及 6-gingerol 產品成分較高如表十。

## 肆、結論

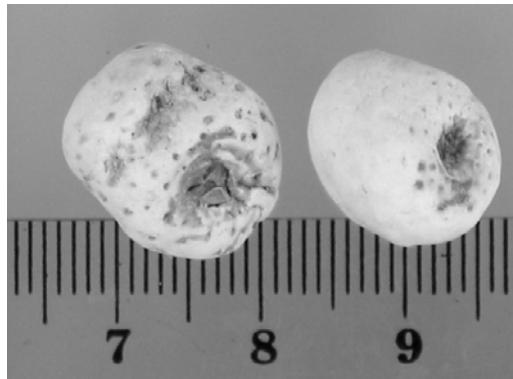
- 一、炮製時須先確定藥材基原品種，是炮製成品正確無誤的基本要求。
- 二、進行生半夏及生薑藥材基原鑑別時，其特徵需與公定書中所列之已知種、屬之藥材外觀、組織切片結果相符合，以確定其正確基原品種。
- 三、開發建立之 HPLC 分析法可有效監控半夏藥材化學成分及其炮製前後化學成分變化。
- 四、進行清半夏炮製時需使用 1% 磬水浸泡藥材才不會發霉，且浸泡藥材水量需為藥材體積 5 倍量，才能使藥材完全浸入水中。
- 五、從上述實驗結果顯示，當生半夏藥材浸泡至三天 (72hr) 時其 40 min 以前之化學成分幾乎不會再減少。
- 六、生薑原料藥材以 HPLC 方法分析時，可取 6-gingerol 為指標成分，並可作為薑製半夏品管之指標成分。
- 七、進行薑製半夏時需進行 5 小時共煮時間即可煮至內無白心，不需煮超過此時間，否則半夏會隨著時間增加而越糊化。而薑製時水量只須以 2.5 倍半夏藥材體積量，即可達到最適炮製結果。
- 八、烘乾薑半夏時需自然陰乾或低溫乾燥，否則薑之 6-gingerol 成分會因高溫乾燥過程而流失。
- 九、細胞毒性試驗顯示，不論生半夏或炮製 7 天半夏進行細胞株毒性試驗細胞均無明顯減少死亡情形，顯見半夏藥材萃取液對此種 BHK-21 細胞並無明顯毒性。
- 十、大鼠動物急性毒性試驗 (LD50) 顯示，不論生半夏或炮製 7 天後半夏其對大鼠動物均無急性致死劑量 (已使用至 10g/kg)，故生半夏對大鼠並未有急性致死毒性 (LD50)。

## 伍、建議

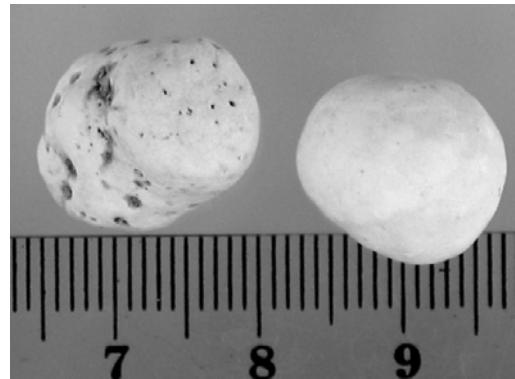
從動物急性毒性試驗 (LD50) 及細胞試驗中發現生半夏或炮製七天半夏，不論對於細胞或動物均無立即毒性，至於其他毒性試驗如慢性毒性、懷孕毒性等，需再進行進一步實驗。若未來有經費可再進行其他毒性試驗及毒性成分單離鑑定及藥效增強試驗，以期能釐清半夏炮製真正目的。

## 陸、圖、表目錄

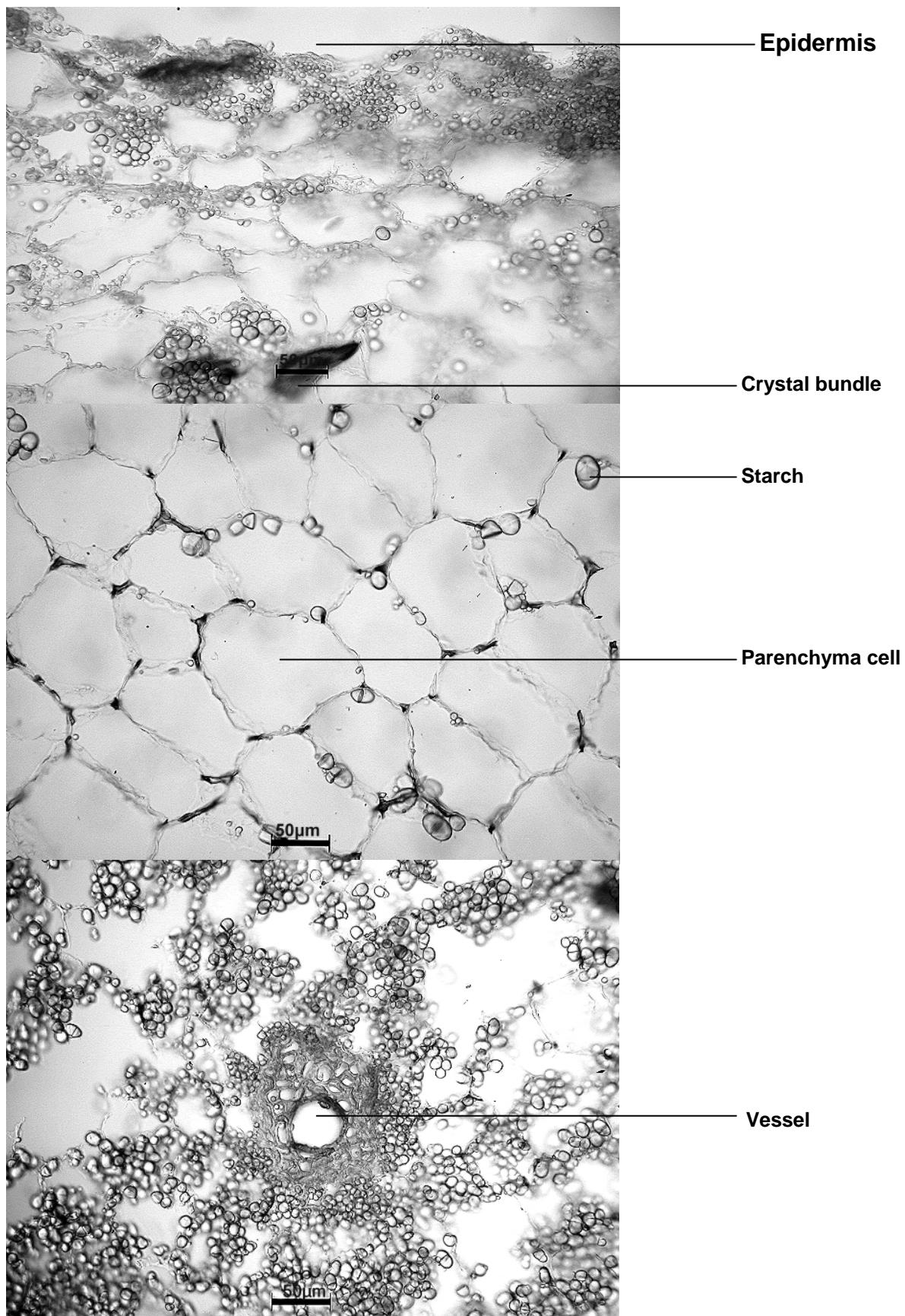
### 一、圖目錄



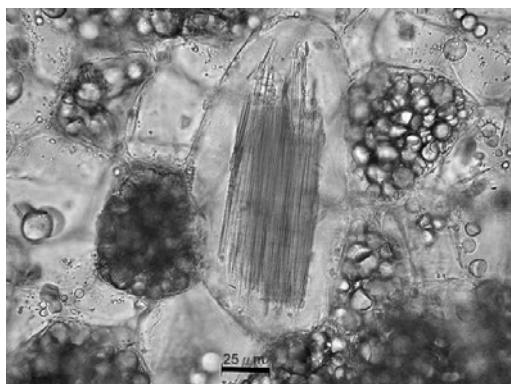
圖一 半夏上部圖



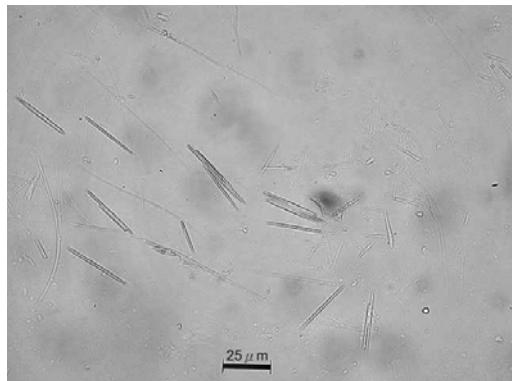
圖二 半夏下部圖



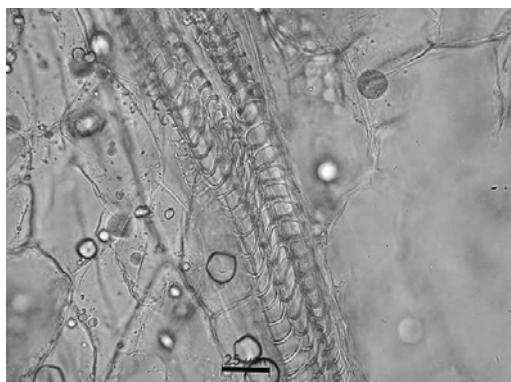
圖三 半夏塊莖橫切面



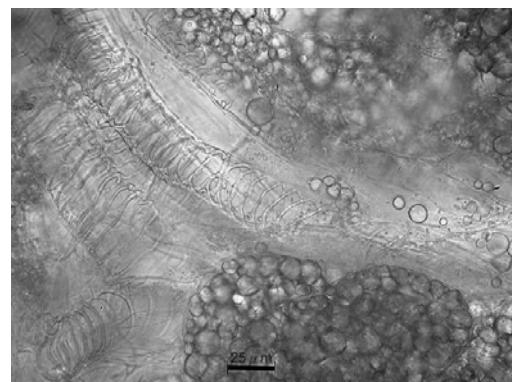
圖四 草酸鈣針晶束



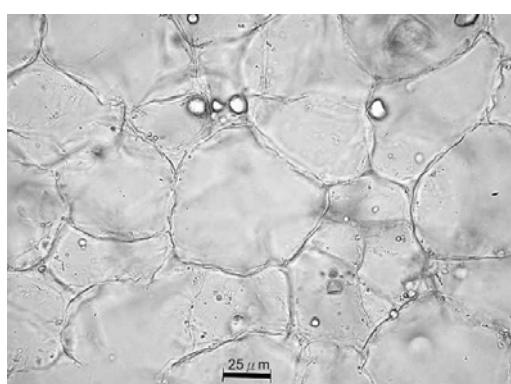
圖五 草酸鈣針晶束



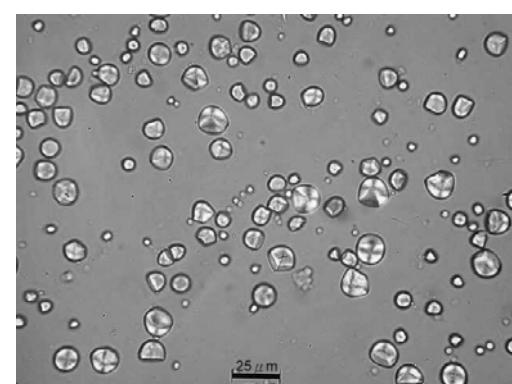
圖六 環紋導管多



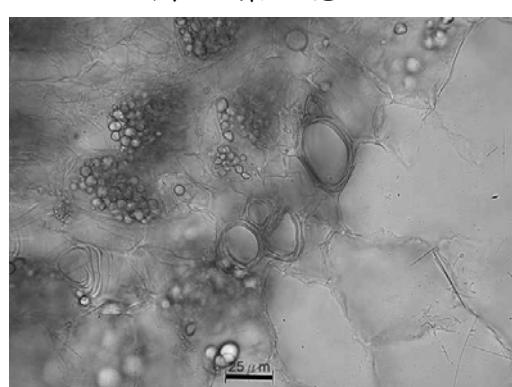
圖七 螺旋、導管



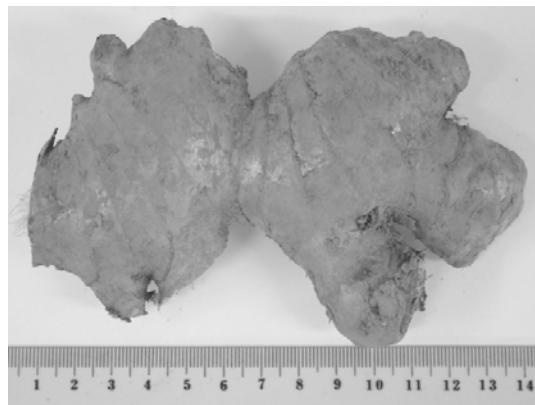
圖八 柔細胞



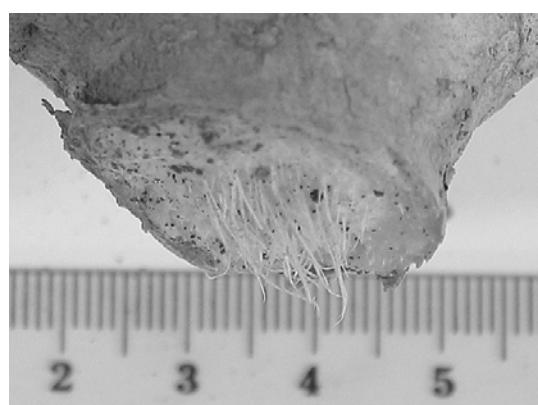
圖九 澱粉粒



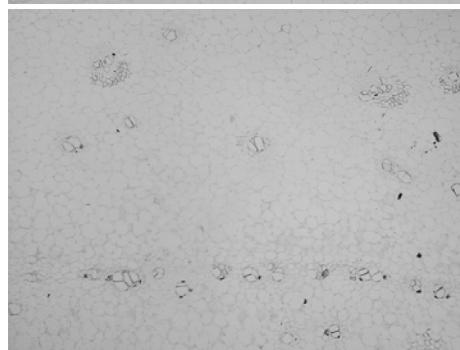
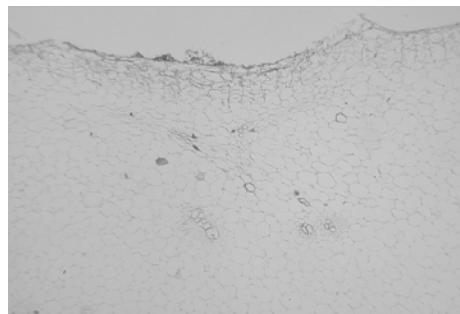
圖十 導管



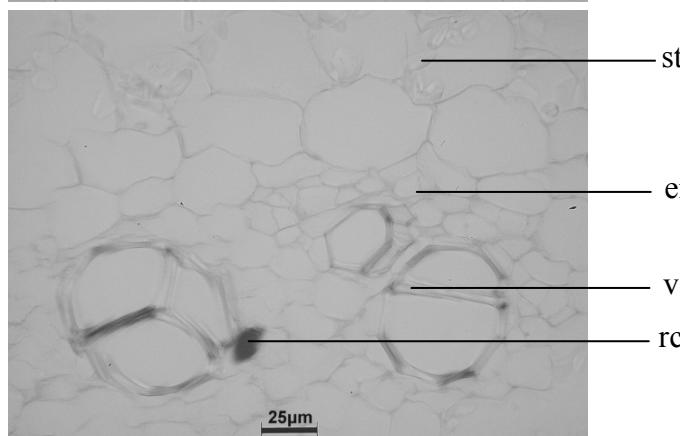
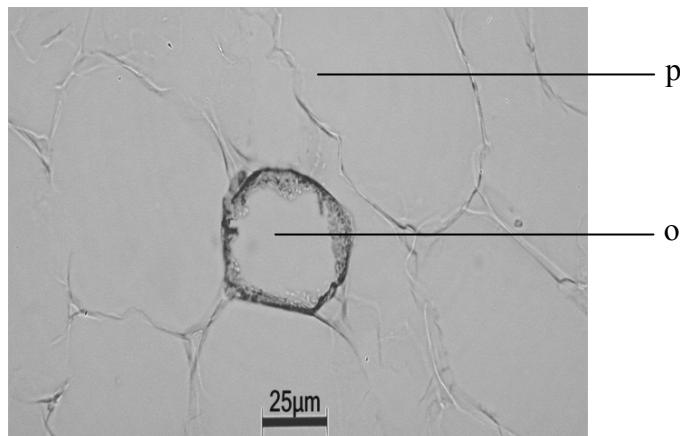
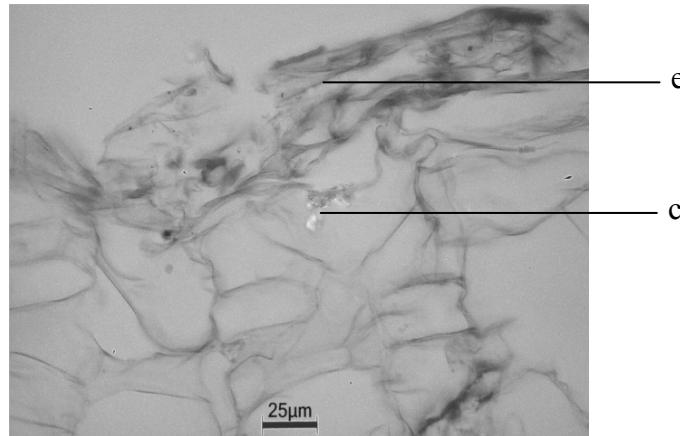
圖十一 生薑外觀



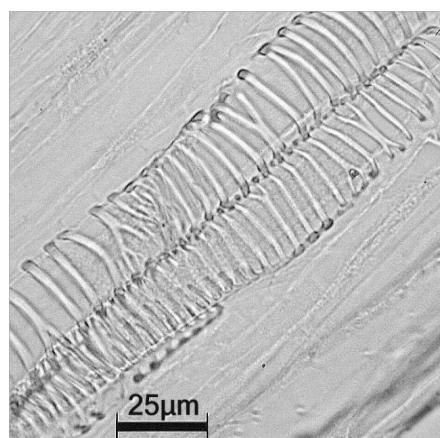
圖十二 生薑橫斷面



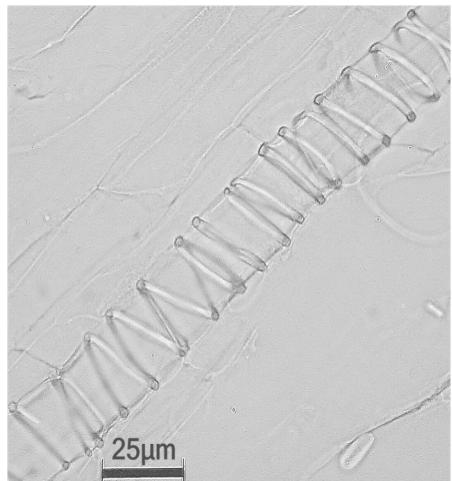
圖十三 根莖橫切面



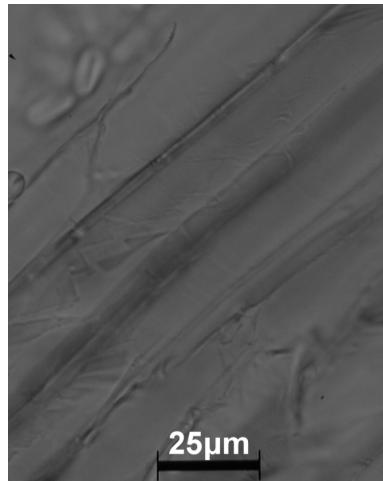
圖十四 根莖橫切面



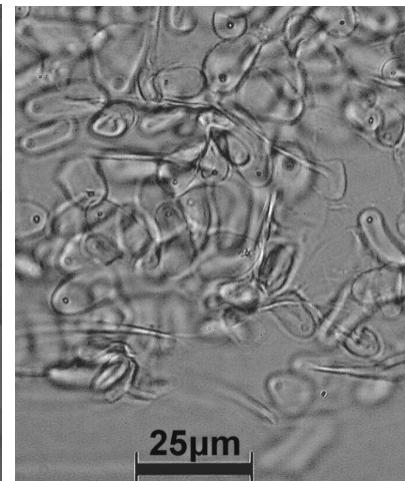
圖十五 階紋導管



圖十六 螺紋導管



圖十七 澱粉粒



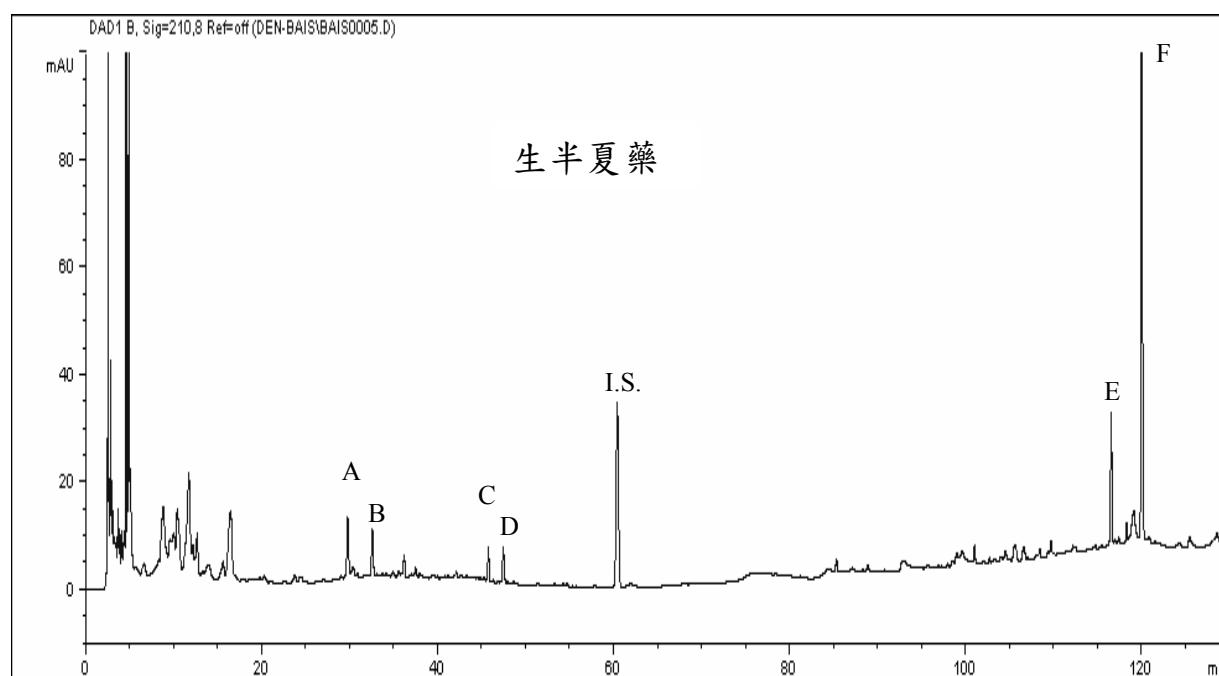
圖十八 纖維束



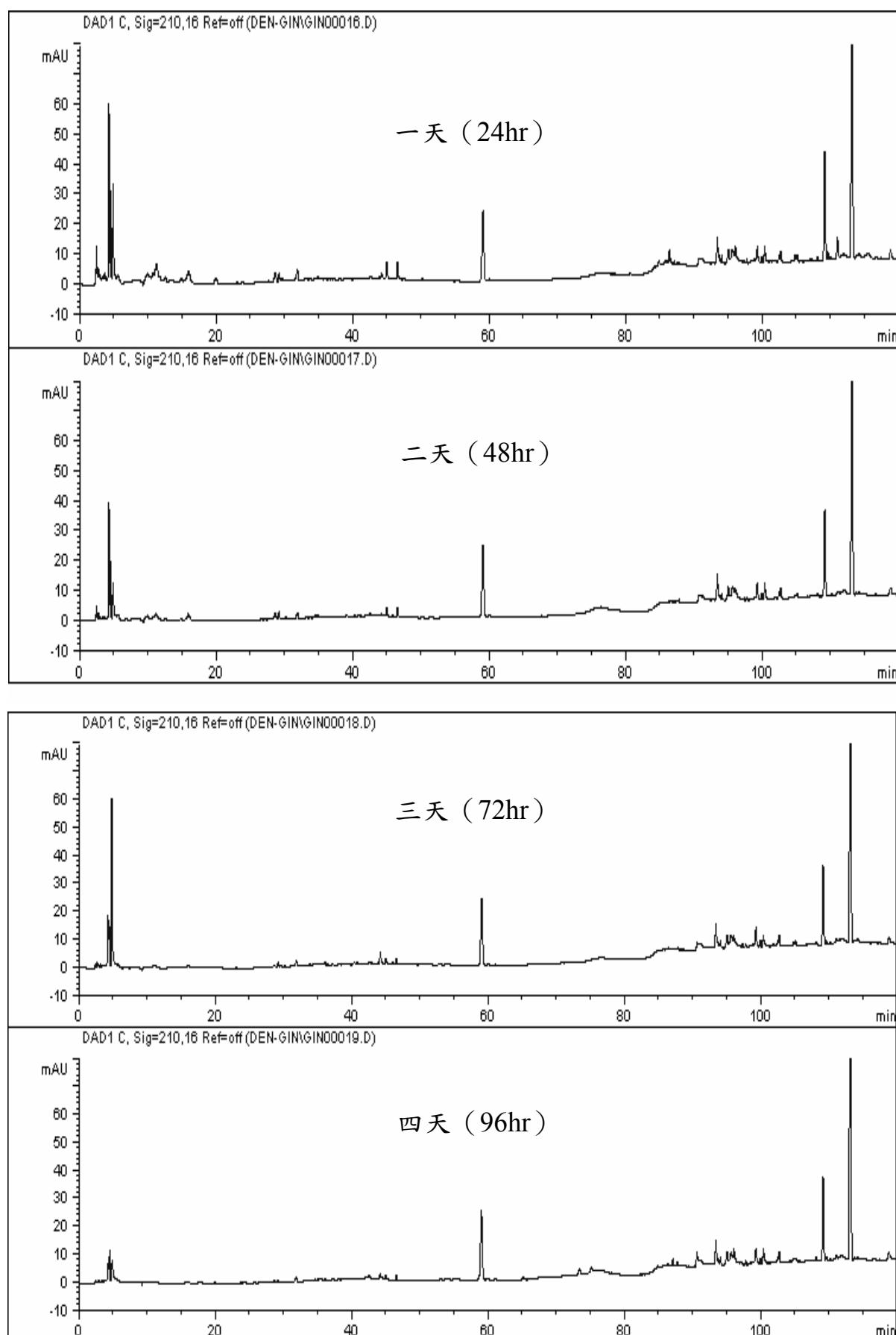
圖十九 半夏礬水浸泡一日



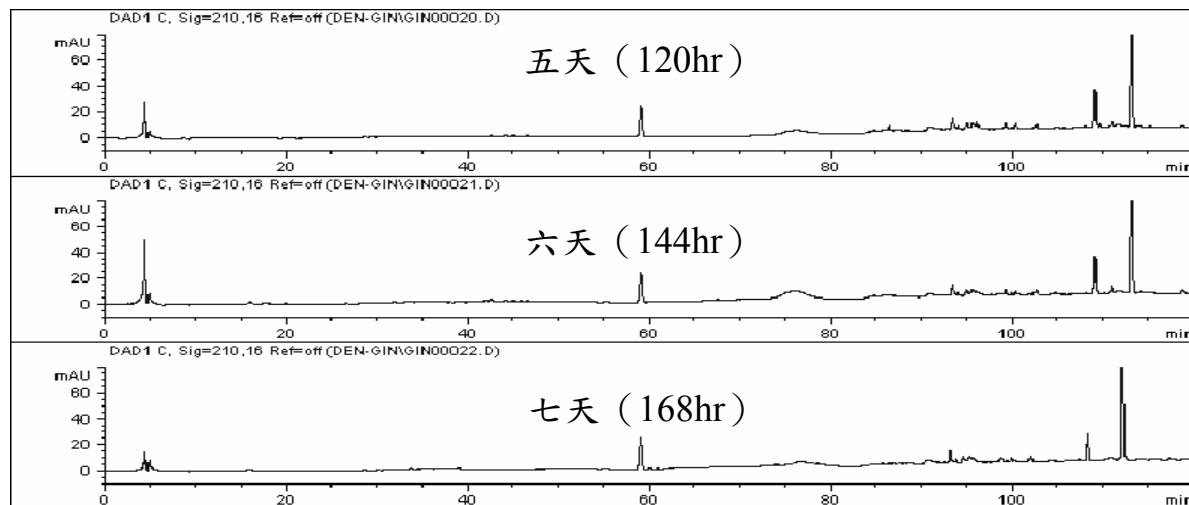
圖二十 半夏礬水浸泡二日



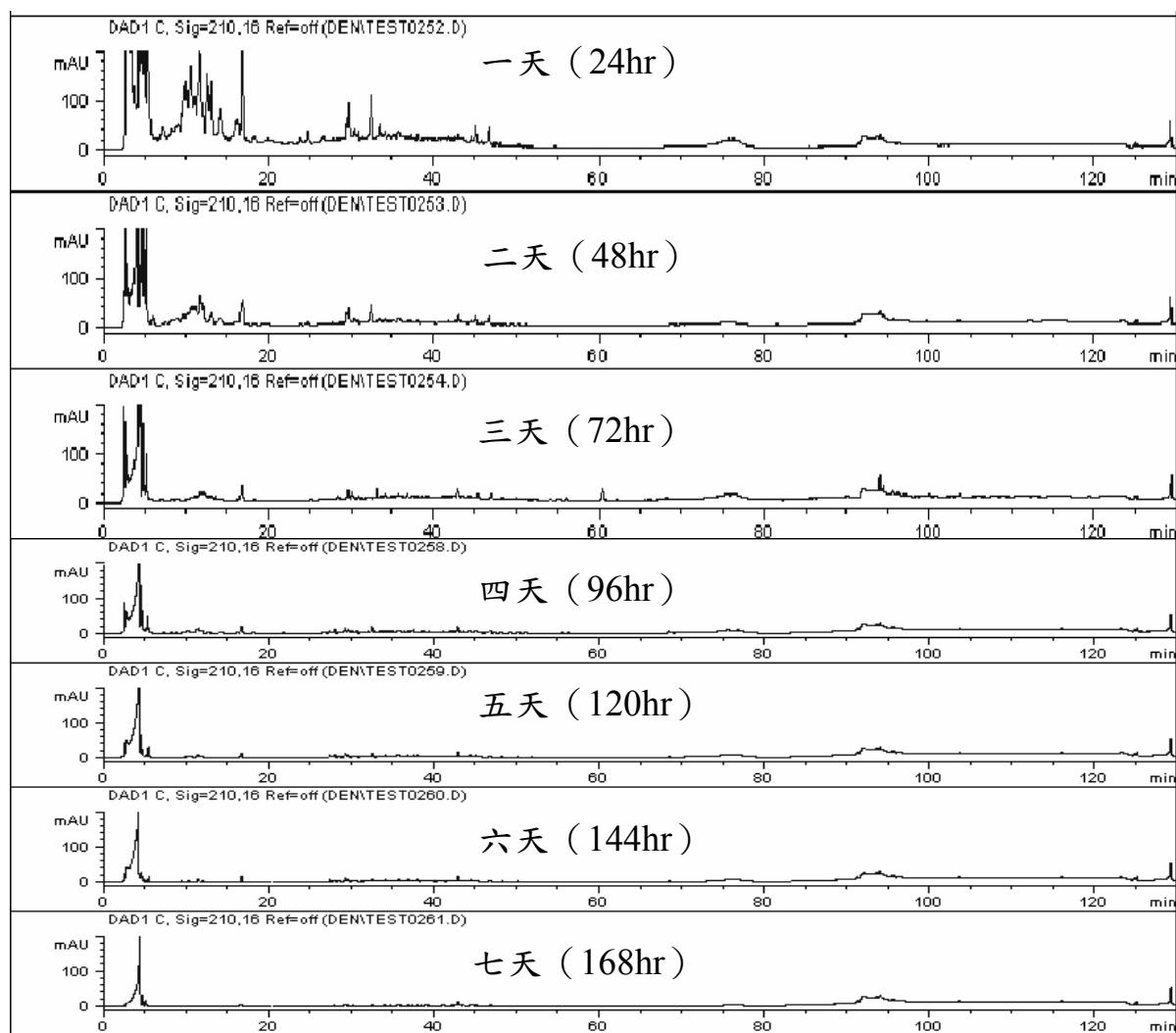
圖二十一 生半夏藥材 HPLC 分析圖譜



圖二十二 半夏藥材炮製時間與成分變化 HPLC 圖譜 (一)

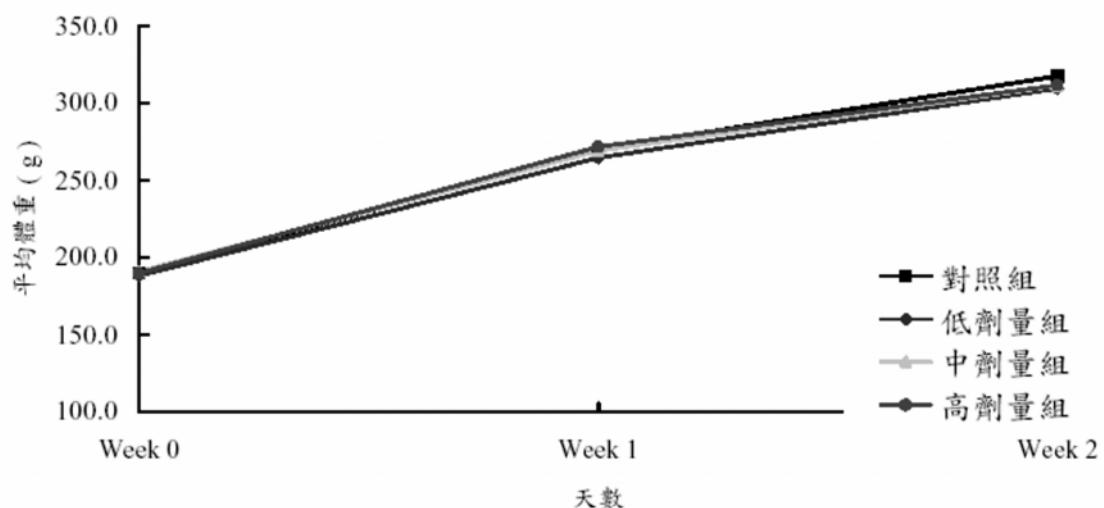


圖二十三 半夏藥材炮製時間與成分變化 HPLC 圖譜 (二)

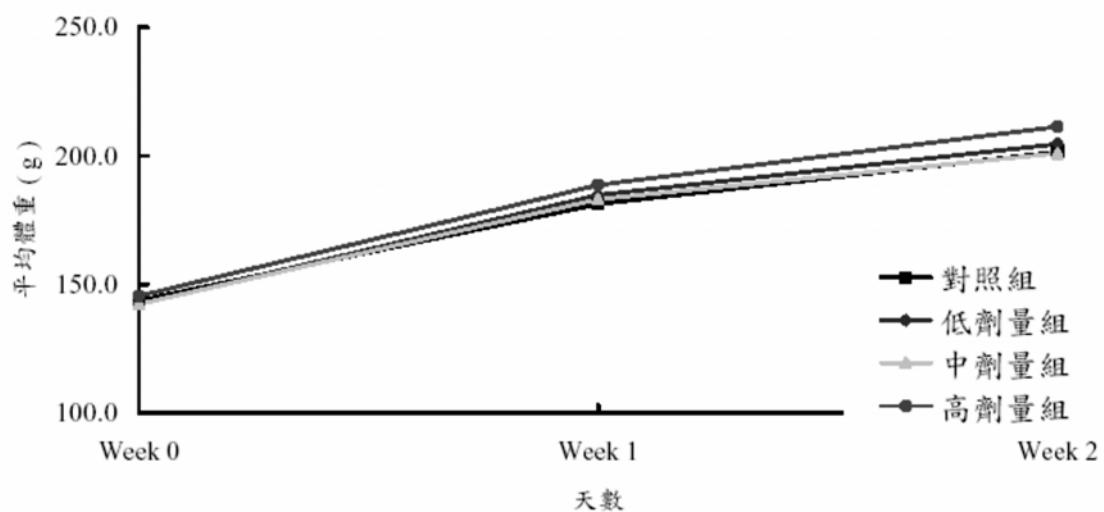


圖二十四 半夏炮製不同時間其炮製液水中成分變化

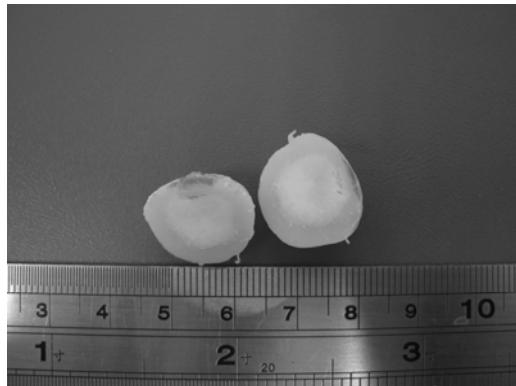
雄鼠



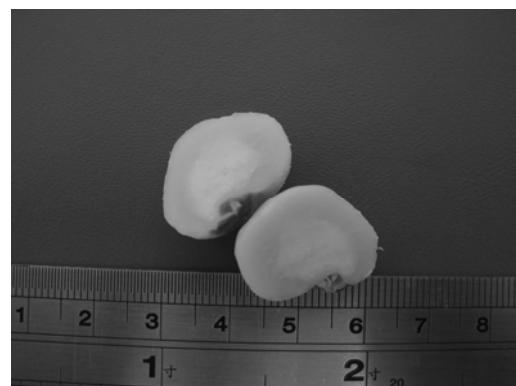
雌鼠



圖二十五 大鼠急性毒性 (LD50) 試驗試驗期間雌雄鼠體重變化



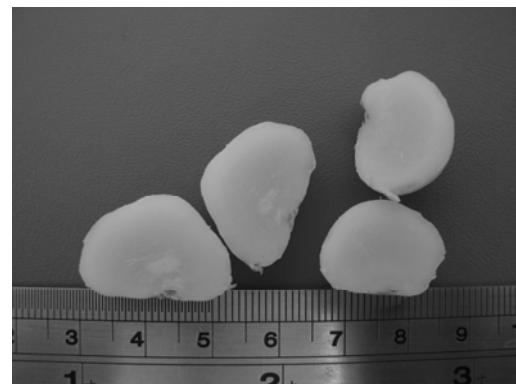
圖二十六 薑製半夏 1小時



圖二十七 薑製半夏 2小時



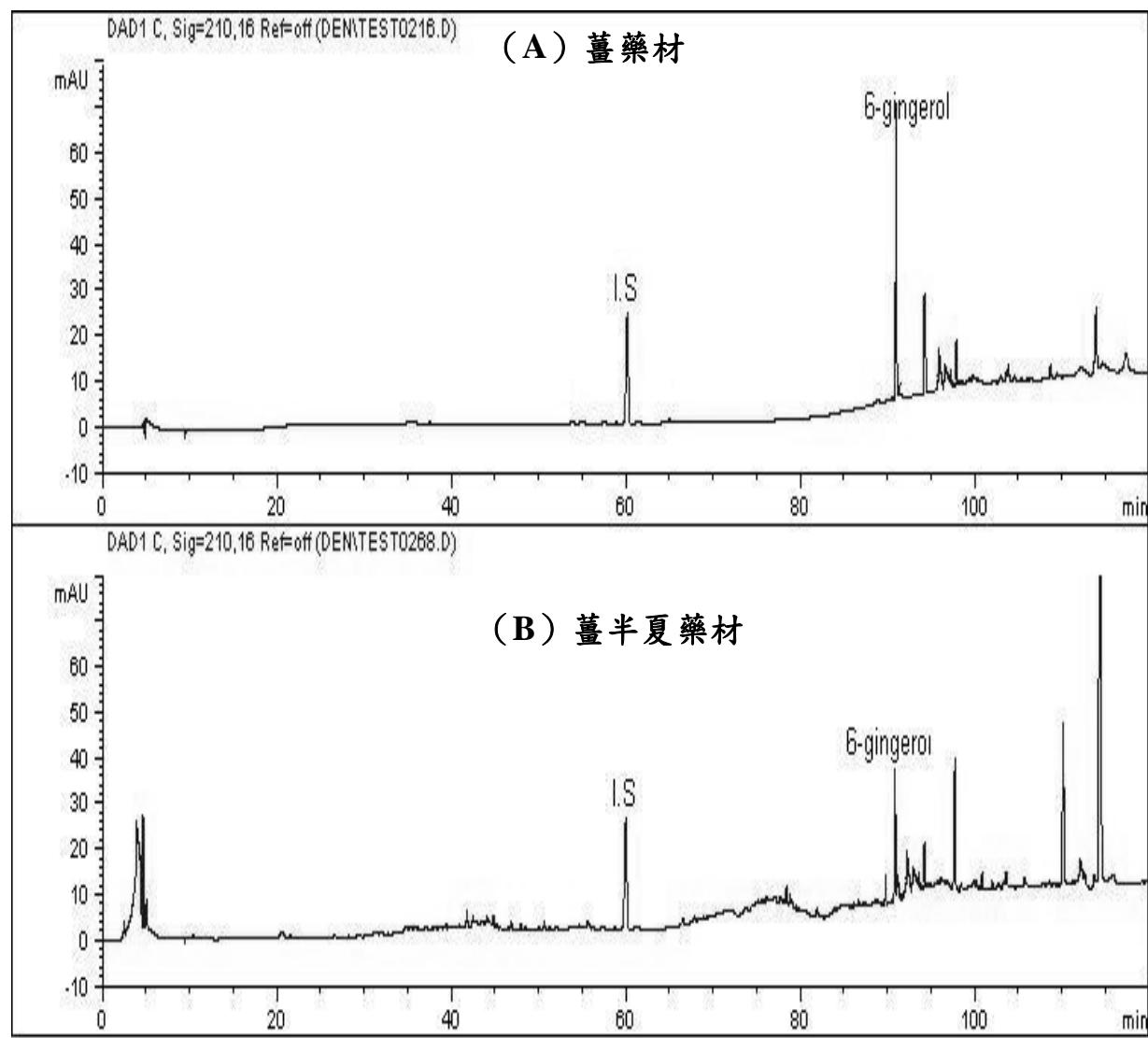
圖二十八 薑製半夏 3小時



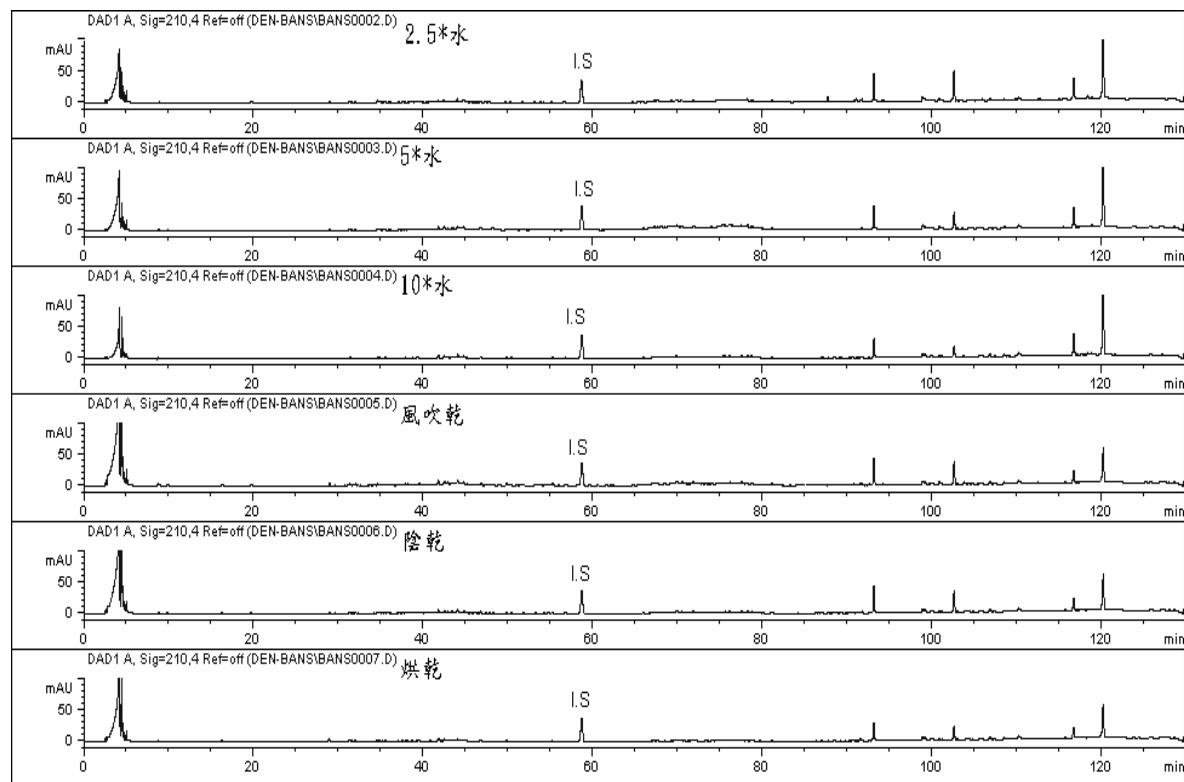
圖二十九 薑製半夏 4小時



圖三十 薑製半夏 5小時



圖三十一 薑藥材及薑半夏藥材圖



圖三十二 薑製半夏不同水量煎煮及烘乾方式 HPLC 層析圖

## 二、表目錄

表一、半夏礬水浸泡重量變化

浸泡時間(天)	0	1	2	3	4	5	6	7
重量變化(%)	100.00	85.07	83.92	83.33	82.95	82.79	82.35	82.14

表二、半夏原料各炮製時間及其指峰吸收面積(mAU)成分變化情形(n=3)

浸泡時間	(24hr)	(48hr)	(72hr)	(96hr)	(120hr)	(244hr)	(168hr)
指標 A	23	21	10	0	0	0	0
指標 B	56	51	42	25	0	0	0
指標 C	33	30	20	12	0	0	0
指標 D	39	33	27	15	0	0	0
指標 E	286	283	287	283	207	210	208
指標 F	1336	1715	1423	1228	1198	1197	1193

表三、BHK-21 細胞株毒性試驗

BHK-21

生半夏煮	第一次	第二次	第三次
0.00%	100.00%	100.00%	100.00%
0.50%	90.72%	100.95%	97.76%
1.00%	94.86%	100.16%	96.92%
2.00%	96.80%	99.58%	91.52%
3.00%	92.59%	90.89%	84.48%
4.00%	86.98%	95.09%	84.89%
5.00%	90.79%	97.39%	77.44%

BHK-21

生半夏振	第一次	第二次	第三次
0.00%	100.00%	100.00%	100.00%
0.50%	103.86%	100.42%	100.95%
1.00%	103.10%	97.76%	99.58%
2.00%	102.19%	96.92%	96.80%
3.00%	95.46%	94.68%	92.59%
4.00%	99.39%	96.54%	93.42%
5.00%	90.62%	99.49%	90.70%

BHK-21

炮製半夏煮	第一次	第二次	第三次
0.00%	100.00%	100.00%	100.00%
0.50%	94.27%	114.82%	106.64%
1.00%	93.22%	111.15%	94.27%
2.00%	94.27%	114.85%	98.06%
3.00%	88.93%	117.70%	93.90%
4.00%	84.04%	95.23%	86.23%
5.00%	95.77%	100.26%	81.32%

BHK-21

炮製半夏振	第一次	第二次	第三次
0.00%	100.00%	100.00%	100.00%
0.50%	106.64%	112.58%	111.15%
1.00%	98.00%	112.41%	106.64%
2.00%	94.65%	115.24%	117.70%
3.00%	105.42%	107.69%	93.90%
4.00%	100.59%	108.86%	88.41%
5.00%	99.70%	104.04%	89.17%

表四、大鼠動物急性毒性試驗 (LD50) 臨床症狀發生率

組別	對照組		低劑量組		中劑量組		高劑量組	
劑量 (g/kg)	0		1		5		10	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物隻數	6	6	6	6	6	6	6	6
正常	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

N/N：正常之動物數/每組動物數目

表五、大鼠動物急性毒性試驗 (LD50) 試驗期間死亡率

組別	對照組		低劑量組		中劑量組		高劑量組	
劑量 (g/kg)	0		1		5		10	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物隻數	6	6	6	6	6	6	6	6
死亡率	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

N/N：發生死亡之動物數/每組動物數目

表六、大鼠急性毒性試驗體重變化

## 雄鼠

組別	劑量 (g/kg)	動物隻數	體重 (g)		
			Week 0	Week 1	Week 2
對照組	0	6	189.8 ± 13.4	270.0 ± 15.7	317.7 ± 18.6
低劑量組	1	6	188.2 ± 13.1	264.7 ± 15.2	309.5 ± 17.0
中劑量組	5	6	191.0 ± 12.8	269.2 ± 14.2	311.3 ± 14.2
高劑量組	10	6	189.8 ± 10.2	271.8 ± 14.1	311.8 ± 18.7

Mean ± S.D., N=6 (N 為計算樣本數)

Week 0：為試驗第1天投藥前之大鼠體重

## 雌鼠

組別	劑量 (g/kg)	動物隻數	體重 (g)		
			Week 0	Week 1	Week 2
對照組	0	6	143.7 ± 8.4	181.3 ± 12.0	201.5 ± 13.9
低劑量組	1	6	142.3 ± 9.6	184.8 ± 9.3	204.7 ± 12.5
中劑量組	5	6	142.3 ± 8.5	183.2 ± 9.8	201.0 ± 11.2
高劑量組	10	6	145.5 ± 7.8	188.7 ± 9.8	211.3 ± 12.1

Mean ± S.D., N=6 (N 為計算樣本數)

Week 0：為試驗第1天投藥前之大鼠體重

表七、大鼠動物急性毒性試驗 (LD50) 試驗期間飼料攝取量

雄鼠

組別	劑量 (g/kg)	飼料攝取量 (g)	
		Week 1	Week 2
對照組	0	603.5 ± 3.5	752.0 ± 9.9
低劑量組	1	566.0 ± 26.9	731.5 ± 21.9
中劑量組	5	597.5 ± 19.1	731.5 ± 16.3
高劑量組	10	620.5 ± 33.2	748.5 ± 3.5

Mean ± S.D., N=2 (N 為計算樣本數)

雌鼠

組別	劑量 (g/kg)	飼料攝取量 (g)	
		Week 1	Week 2
對照組	0	417.5 ± 4.9	565.0 ± 14.1
低劑量組	1	430.5 ± 4.9	568.5 ± 12.0
中劑量組	5	428.5 ± 20.5	566.0 ± 32.5
高劑量組	10	434.5 ± 23.3	578.0 ± 19.8

Mean ± S.D., N=2 (N 為計算樣本數)

表八、大鼠動物急性毒性試驗 (LD50) 試驗期間肉眼病變發生率

組別	對照組		低劑量組		中劑量組		高劑量組	
劑量 (g/kg)	0		1		5		10	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物隻數	6	6	6	6	6	6	6	6
正常	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

N/N：正常之動物數/每組動物數目

表九、薑製時間與產品重量關係表

薑製時間	1小時	2小時	3小時	4小時	5小時	5小時
產品重量 (g)	83.50	75.6	70.1	66.3	61.1	55.2

表十、薑製半夏不同水量煎煮及烘乾方式對 E、F 及 6-gingerol 成分變化

	2.5x 水	5x 水	10x 水	30°C 烘乾	陰乾	冷風乾燥
指標 E	312	302	320	228	231	211
指標 F	1232	1220	1215	680	710	706
6-gingerol	321	225	179	195	188	165

## 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CCMP92-RD-041提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 柒、參考文獻

1. 苗明三、李振國。現代實用中藥質量控制技術（2000）；p.370-374。人民衛生出版社。
2. 張賢哲、蔡貴花。中藥炮製學（1995）；p.220-223。中國醫藥學院印行。
3. 葉定江、陳奇。中藥炮製學；知音出版社印行。
4. 葉定江、張世臣。中藥炮製學（1999）；p.282-287。人民衛生出版社。
5. 許鴻源。中藥之炮製（1980）；p.65-81。新醫藥出版社。
6. 《中華本草》國家中醫藥管理局編委會編纂，1999年出版。
7. Wu H., B C. Cai, Rong G. X. and Ye D. J.. (1994) The effect of Pinellia processed by ginger juice on gastric and intestinal function of animals. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 19 (9) :535-537.
8. Wu H., Tan X., Cai B. and Ye D.. (1996) Effect of ginger-processing on 1-ephedrine contents in rhizome Pinellia. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 21 (3) :157-158.
9. Wu H., Wen H., Guo R. and D. Ye.. (1998) Effect of ginger- processing on the contents of guanosine in Pinellia rhizome ( Banxia ) . *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 23 ( 11 ) :661-663.
10. Wu H., Tang Z., Qiu L. and Ye D.. (1999) The comparison of component contents and pharmacological action between two kinds of processed products of Pinellia rhizome prepared by ginger juice and alum. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 24 ( 1 ) :25-28.
11. Wu H., Li W., Han H., Ji R. and Ye D. J.. (1999) Studies on stimulating components of raw Pinellia ternate ( Thunb. ) ( banxia ) . *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 24 ( 12 ) :725-730.
12. Kim S. H., Jeong H., Kim Y. K., Cho S. H., Min K. U. and Kim Y. Y.. ( 2001 ) IgE-mediated occupational asthma induced by herbal medicine, Banha ( *Pinellia ternate* ) . *Clin Exp Allergy* 31 ( 5 ) :779-781.
13. Nijima A., Kubo M., Hashimoto K., Komatsu Y., Maruno M. and Okada M.. ( 1998 ) Effect of oral administration of *Pinellia ternate*, *Zingiberis* rhizome and their mixture on the efferent activity of the gastric branch of the vagus nerve in the rat. *Neurosci. Lett.* 258 ( 1 ) :5-8.
14. Kurata, K., Tai T., Yang Y., Kinoshita K., Koyama K., Takahashi K., Watanabe K. and Nunoura Y.. ( 1998 ) Quantitative analysis of anti-emetic

- principle in the tubers of *Pinellia ternata* by enzyme immunoassay. *Planta Med.* 64 (7) :645-648.
- 15.陳建欣、許順吉。(1997) 中藥材半夏及其相關藥對與製劑之 HPLC/CE 分析。國立台灣師範大學化學研究所碩士論文。
- 16.Lovschall H, Eiskjaer M.. (2002) Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol. In Vitro* 16 (1):63-9.
- 17.Inbara J., Kukielczak B. M., Bilski P., Sandvik S. L., Chignell C. F.. (2001) Photochemistry and photocytotoxicity of alkaloids from Goldenseal ( *Hydrastis Canadensis* L. ) 1. Berberine. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (11) : 1529-34.
- 18.Tachibana Y. and Kawanishi K.. (1992) Mitogenic activities in the protein fractions of crude drugs. *Planta Med.* 58 (3) :250-4.
- 19.Yang S. Y.( 1989 ) Pregnancy and embryo toxicity of *Rhizoma pinellia* in rats. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 9 (8) :481-4, 453-4.

