ISSN 2305-087X

Yearbook of Chinese Medicine and Pharmacy

(DVD version)

中醫藥年報

(光 碟 版)

年刊2017(106年)第六期

Annual 2017 Issue 6

(第一冊)電子書



中華民國一百零六年十一月 製作

Published in November, 2017

衛生福利部
Ministry of Health and Welfare

ISSN：2305-087X

中　醫　藥　年　報

（光碟版）

Yearbook of Chinese Medicine and Pharmacy (DVD version)

年刊 2017（106 年）　　第六期

Annual 2017　　Issue 6

衛生福利部
Ministry of Health and Welfare
中華民國一百零六年十一月 製作
Published in November, 2017

中醫藥年報(光碟版)第六期

總目錄(第一冊)

計畫編號	計畫名稱	執行機構	計畫主持人
CCMP100-RD-101	台灣紫蘇與薑黃之有機GAP栽培模式研究(2-2)	明道大學	陳世雄
CCMP100-RD-105	痤瘡外用方劑之應用開發(2-2)	臺北醫學大學	王靜瓊
CCMP100-RD-120	建立中藥抗流感病毒之篩選平臺-藥效及作用機制之評估(2-2)	中山醫學大學	陳志豪
CCMP101-RD-011	開發具抗病毒及抗腫瘤活性之台灣本土中草藥並推廣其應用(2-1)	中央研究院農業生物科技研究中心	楊寧蓀
CCMP101-RD-015	臺灣本土藥用植物闊葉麥門冬與臺灣油點草之研究與開發(2-1)	中國醫藥大學	吳永昌
CCMP101-RD-017	中草藥抗肝癌轉移之研究	國立臺灣師範大學	林榮耀
CCMP102-RD-005	以動物及細胞實驗評估蛇床子與蛇床子素對血管內皮前驅細胞作用之研究(2-1)	臺北醫學大學	侯文琪 李泰霖 呂岳霖 等
CCMP102-RD-008	以高黏度浸膏系統探討中(草)藥造粒新製程及抗結塊技術研發	國立中興大學	江伯源
CCMP102-RD-013	健全中醫藥管理體制與法規環境(2-1)	中華民國藥事品質改革協會	陳憲堂
CCMP102-RD-016	羌活之固體分散製劑開發(2-1)	中國醫藥大學	余建志
CCMP102-RD-019	台灣特有種藥用植物－阿里山十大功勞改善高脂飲食誘導非酒精性脂肪肝小鼠之代謝體及保健功效研究(2-1)	中國醫藥大學	彭文煌
CCMP102-RD-115	開發具抗病毒及抗腫瘤活性之台灣本土中草藥並推廣其應用(2-2)	中央研究院農業生物科技研究中心	楊寧蓀
CCMP102-RD-116	臺灣本土藥用植物闊葉麥門冬與臺灣油點草之研究與開發(2-2)	中國醫藥大學	吳永昌
MOHW103-CMAP-M-114-112424	利用腫瘤摘除動物模式，以研發合併食用中草藥於控制乳腺腫瘤細胞轉移與復發之治療策略	中央研究院農業生物科技研究中心	楊寧蓀
MOHW103-CMAP-M-114-122402	以動物及細胞實驗評估蛇床子與蛇床子素對血管內皮前驅細胞作用之研究(2-2)	臺北醫學大學	侯文琪 李泰霖 呂岳霖 等
MOHW103-CMAP-M-114-122404	健全中醫藥管理體制與法規環境(2-2)	中華民國藥事品質改革協會	陳憲堂
MOHW103-CMAP-M-114-122406	羌活之固體分散製劑開發(2-2)	中國醫藥大學	余建志

計畫編號	計畫名稱	執行機構	計畫主持人
MOHW103-CMAP-M-114-122408	台灣特有種藥用植物－阿里山十大功勞改善高脂飲食誘導非酒精性脂肪肝小鼠之代謝體及保健功效研究(2-2)	中國醫藥大學	彭文煌
MOHW103-CMAP-M-114-122411	全民健康保險對於濃縮中藥給付之合理性及對策研究(2-2)	中華民國藥事品質改革協會	鄭慧文
MOHW104-CMAP-M-114-000417	「提升中醫醫療照護品質類」建立民俗調理業服務禮券管理模式委託辦理計畫	泰鼎法律事務所	葉慶元
MOHW104-CMAP-M-114-000422	中藥材基原內容編修與諮詢	大仁科技大學	劉崇喜
MOHW104-CMAP-M-114-000423	中藥濃縮製劑內容編修	中國醫藥大學	彭文煌

編號：CCMP100-RD-101

台灣紫蘇與薑黃之有機 GAP 栽培模式研究

陳世雄
明道大學

摘　要

研究目的：

紫蘇與薑黃自古即為中醫理氣散寒與通氣止痛之常用重要中藥材。未來全世界對紫蘇與薑黃等具治療心血管疾病、抗菌、抗病毒類中藥材之需求，將更為殷切。於臺灣建立這些藥材 GAP 栽培模式，生產品質穩定均一的優良藥材，應為當務之急。中藥材紫蘇與薑黃有機與 GAP 模式之建立、成分分析及多元化利用等研究對於臺灣中藥產業之發展，具有指標性與建設性的意義與價值。

研究方法：

本研究計畫在引種、選種與繁殖紫蘇與薑黃正品基原種苗。調查分析其性狀、產量及有效成分，選取最適合的栽培方法與條件，建立臺灣紫蘇與薑黃有機及 GAP 栽培模式。計畫工作概要 1.蒐集紫蘇與薑黃種原，鑑定其正品基原，並進行生育習性與產量調查。2.研究有機肥料施用量對紫蘇與薑黃產量及成分之影響。3.建立紫蘇與薑黃有機與 GAP 栽培模式。4.編輯臺灣中藥有機與 GAP 栽培手冊。5.舉辦紫蘇與薑黃有機栽培觀摩會。

結果與討論：

1. 紫蘇：蒐集有 4 種紫蘇種原。紫蘇經組織切片與 TLC 鑑定為正品基原，紫蘇栽培研究顯示產量高，並含高量迷迭香酸與紫蘇醛成分。因此評估紫蘇為適宜生產蘇葉與蘇梗之品系。紫蘇栽培以牛糞堆肥 4,000 Kg/ha 處理之紫蘇產量最高，乾紫蘇葉與乾紫蘇梗分別可 3,839 Kg/ha 與，15,425 Kg/ha。迷迭香酸與紫蘇醛成分以牛糞堆肥 2,000 Kg/ha 處理含量最高。因此建議紫蘇栽培宜施用腐熟之堆肥，施用量以 2,000~4,000 Kg/ha 為宜。
2. 薑黃：蒐集有 8 種薑黃屬種原。橙黃種薑黃產量為 39,597 Kg/ha，鮮黃種薑產量為 2,9156

   Kg/ha，莪术產量為 36,262 Kg/ha。橙黃種薑黃其薑黃素含量最高為 58.1 mg/g，其鬱金薑黃素含量為 3.95 mg/g。薑黃素含量為鮮黃種的 8 倍、莪术的 138 倍、市售薑黃藥材的 1.62 倍，其鬱金薑黃素含量為市售鬱金的 14.6 倍。

橙黃種薑黃為值得推廣種植之藥用薑黃品系。有機肥施用量 6,000-8,000 Kg/ha 可以獲得較高薑黃產量。薑黃可以進行連作栽培。

3. 本計畫於 2012/09/01 舉辦紫蘇薑黃有機與 GAP 栽培觀摩會廣受好評。

關鍵詞：有機農業、優良農業操作、引種、紫蘇、薑黃、連作

Number: CCMP100-RD-101

Reseach on Organic Planting and GAP for *Perilla frutescens*(L.)Britt. and *Curcuma longa* L. in Taiwan

Shih-Shiung Chen
Ming Dao University

ABSTRACT

Aim:

This research aims to establish traceability production system for superior quality *Perilla frutescens* (L.)Britt. and *Curcuma longa L.* in Taiwan. High value potential *Perilla frutescens* (L.)Britt. and *Curcuma longa L.* are collected to establish germplasmic resources center for providing healthy seedling supply. Organic and GAP farming will be applied to the medicinal herbs production and quality control system. The manual for organic and GAP production including cultivation approaches will be published for references of producers and farmers in Taiwan.

Method:

This project plan to make mass selection and propagation for the correct and healthy seedling of *Perilla frutescens* (L.)Britt. and *Curcuma longa* L.We screened and selected cultivars and their characteristics, yields, and active components are investigated. The work in this project including: Organic fertilizer test and GAP models for *Perilla frutescents* (L.)Britt. and *Curcuma longa L.*will be established.

Results & Discussion:

We also collected seeds of *Perilla frutescens* (L.)Britt from Japan. The treatment of organic fertilizer 4,000 kg /ha showed the highest yield 3,839 Kg/ha for dry leaf and 18603 Kg/ha for dry stem of *Perilla frutescens* (L.)Britt. It is suggested that for leaf yield, the effective plant part of *Perilla frutescens* (L.)Britt.., organic fertilizer 2,000~4,000 kg /ha would promised the highest yield.

We collected native *Perilla frutescens* (L.) Britt. and *Curcuma longa L.* in India, Japan and China. All the plant then transferred to grow in Ming Jien, Nan-Tou County

in screen house . Effect of basal fertilizers and potassium on growth of *Curcuma longa L.* was investigated. The treatment of organic fertilizer gave the highest yield. The treatment of organic fertilizer showed the highest yield 48,283 Kg/ha for dry stem tuber of *Curcuma longa L.* It is suggested that for stem yield, the effective part of *Curcuma longa L..,* application of organic fertilizer 6,000~8,000 Kg/ha would promised a highest yield. The healthy production models will enhance the quality control of medicinal herbal materials and thus a well development to the enterprises of herbal medicine in Taiwan.

Keywords: Organic Agriculture, Good Agriculture Practice, *Perilla frutescens* (L.) Britt., *Curcuma longa* L.

壹、前言

一、紫蘇與薑黃

紫蘇與薑黃自古即為中醫理氣散寒與通氣止痛之常用重要中藥材。紫蘇 *Perilla Frutescens* (L.) Britt.為唇形科植物其乾燥葉、梗與種子皆可入藥。紫蘇原名蘇為名醫別錄草部中品藥。紫蘇於中國栽培歷史約有兩千多年，最早見載於先秦古籍《爾雅》:「蘇，桂荏。」《中華中藥典》、《中國藥典》更收載 *Perilla Frutescens* (L.) Britt.本種為中藥紫蘇葉、紫蘇梗與紫蘇子的法定正品基原植物。

紫蘇主產於江蘇、浙江、安徽等地，於臺灣生長良好。紫蘇以葉入藥，其性溫，味辛，微苦，有發汗解表、安神寧心、定喘止咳、利尿消腫、祛濕止痛等功效。

紫蘇梗性味與紫蘇葉相同，但紫蘇梗下氣稍緩，虛者宜之。紫蘇子與葉同功，潤心肺，由能下氣。現代藥理研究顯示紫蘇具有解熱、抗菌等功效。紫蘇於中醫臨床使用量大，含紫蘇藥材之藥方超過 15 種以上，為治療感冒等呼吸道疾病重要藥材。

薑黃，薑科 Zingiberaceae 植物薑黃 *Curcuma longa* L.以其乾燥根莖入藥。薑黃原產印度與熱帶亞洲，自古以來在印度、孟加拉、緬甸、巴基斯坦、斯里蘭卡與泰國廣泛應用為香料、化妝品與藥品。迄今已超過 6000 年以上的歷史（Ishimine *et al*., 2004）。在《中華中藥典》、《中國藥典》均收載 *Curcuma longa* L.為中藥薑黃的法定正品基原植物，薑黃於中國產地為四川、福建、江西、廣東、廣西、雲南等地。薑黃色黃入脾兼入肝經，味苦辛，具有行氣破血，通經止痛等功效。薑黃具有改善肝臟與腎臟功能、抗發炎、預防心血管疾病、預防阿茲海默症（Alzheimer's disease）、抗腫瘤、抗菌、改善血液循環等活性（Ishimine *et al*., 2004；Li *et al*., 2011）。薑黃主要成分為薑黃素(curcumin)、薑黃酮(turmerone)、芳薑黃酮(arturmerone)、薑黃烯(curcumene)等，其中指標成分為薑黃素，薑黃素依其化學結構之差異可分為薑黃素(curcumin)、去甲氧基薑黃素(demethoxy curcumin，DMC)、去二甲氧基薑黃素(bidemethoxycurcumin，BDMC) 三個成分，合稱為類薑黃素(curcuminoids)（Green *et al*., 2008）。薑黃為大眾化藥材，並已在食品與飲料加工業上廣泛被使用（邱等，1993a；胡等，2003）。

目前我國所用紫蘇與薑黃藥材，皆自中國進口為主，臺灣僅少量生產。近年來由於許多病毒傳染病對於抗生素等藥劑，逐漸產生嚴重抗藥性，使

此類疾病蔓延更迅速，範圍更廣闊，未來疫情也可能更加劇。預測未來全世界對紫蘇與薑黃等具治療心血管疾病、抗菌、抗病毒類中藥材之需求，將更為殷切。於臺灣建立藥材有機農法與 GAP 栽培模式，生產品質穩定均一的優良藥材，應為當務之急。

中藥材紫蘇與薑黃 GAP 模式之建立、成分分析及多元化利用等研究對於臺灣中藥產業之發展，具有指標性與建設性的意義與價值。

二、紫蘇與薑黃柴胡有機栽培及優良農業操作模式之建立

有機農法(Organic farming)不允許施用任何化學肥料及農藥，以乾淨、無污染的方式生產乾淨品質優良的農產品，對消費者的健康與生態環境保育具有正面意義。「GAP」為 Good Agriculture Practice 之縮寫，意思是優良農業操作。優良農業操作是為確保農產品的質量，以最合乎自然的耕作生產條件來種植農作物，減少因農業帶來對自然生態的傷害，能適時適地適種，合理使用農業資材（包括肥料及農藥..等），並完整記錄生產履歷及嚴格遵守相關規範（包括生態環境、種源、土壤、水、作物栽培過程、採收、加工、包裝、儲藏、運輸..等規範），依此原則生產的農業生產過程，即為 GAP。有機農業與 GAP 之差異為有機農業強調完全不施用任何合成化學物質，而 GAP 則可以合理適當使用農業資材（包括肥料及農藥..等），但共同目標皆為保護自然生態，生產自然、健康、安全、衛生的農產品。因此，以有機農法及優良農業操作規範應用於建立中草藥栽培模式，以生產健康自然、質量均一、安全之中草藥，應為未來臺灣中草藥產業發展重要生產研究方向。

臺灣地處亞熱帶與熱帶氣候的交會處，三千公尺以上的山峰百座，由於特殊的地理位置與地形影響，植物種類相當豐富。但是國人所需的中草藥材九成來自中國，價格與品質無法保持穩定，嚴重影響醫療效果。為保證醫療效果以及管制品質，必須從中草藥的種植開始，也就是建立中草藥的優良農業操作（Good Agriculture Practice；GAP）生產規範。篩選優良基原植物，探討影響生產潛力及品質的關鍵條件，如土壤的理化及生物特性、施肥種類及田間管理技術等，開發一系列應用於中草藥之栽培技術，期望在短時間內生產大量高品質及高有效成分的藥草原料，同時阻絕重金屬、化學肥料及農藥殘留的污染。

明道大學有機農場積極研究中草藥有機栽培與優良農業操作模式之建立。明道大學有機農場位於彰化溪州鄉，佔地 12 公頃，多年來均施行有機栽培的田間操作方法，不施用任何化學農藥與化學肥料。生產的作物種類

繁多，包括有機稻米、有機香蕉、紅龍果、以及有機蔬菜等，為完全使用有機栽培的農場，近年來並成功栽植有機板藍根、大青葉、有機紫錐菊..等藥材。未來擬繼續以本場做為臺灣地區中草藥有機栽培及 GAP 栽培示範農場，提供從事中草藥栽培工作者建立有機農法模式，熟悉有機操作技術，生產健康無污染之中草藥原料。

三、紫蘇與薑黃之引種與繁殖

引種（Introduction）由其他國家或地區引入育種材料。目的在樹立新作物之栽培事業，改良品系與充實育種材料。引種先須由地方品系著手，並考慮氣候之相似性（盧，1961）。評估為種源保育與利用的前提，評估步驟包括：1.種子繁殖與初步評估。2.系統化的農藝型態特性調查。3.利用大規模篩選選拔性狀。4.精密測試(張，1997) 。評估工作必須符合作物改良目標，需評估項目包括：外觀性狀、抗病蟲性、品質性狀、對環境之抗逆性與適應性…等（蕭，1995）。經過一系列試驗選留下來的材料才能推廣利用。

本研究目前共收集有 4 種紫蘇與 8 種薑黃屬之藥用薑黃種原材料，以進行有機栽培、基原鑑定、繁殖與相關性狀之評估與調查，並進一步進行有機及 GAP 栽培試驗與成分分析，以期選育出適合臺灣栽培之紫蘇與薑黃品系並建立其優良農業操作規範與模式。

貳、材料與方法

一、紫蘇與薑黃材料種原蒐集及基原鑑定

蒐集**紫蘇與薑黃**基原材料，進行植物性狀調查與鑑別，並進行有機栽培試驗研究。臺灣地區市場所售紫蘇與薑黃藥材以中國生產之紫蘇與薑黃為主。本年度已蒐集材料有 4 種紫蘇與 8 種薑黃屬之藥用薑黃種原材料，分別於明道大學校區、中興大學北溝農場及名間八卦山台地（海拔 400 公尺）進行栽培試驗（附件 1-2：土壤物理化學分析資料；附件 3：灌溉水水質分析資料氣象資料）。

蒐集採料來源分別為：

(一)紫蘇材料：

已蒐集 4 種紫蘇種原，分別為紫蘇 *Perilla frutescens*、皺葉紫蘇 *Perilla frutescens* var. *crispa* f. *crispa*、青紫蘇 *Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridis* 及皺葉青紫蘇 *Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridi-crispa*。紫蘇經由植物組織切片與 TLC 鑑定為紫蘇正品基原（紫蘇 TLC 鑑定方法係根據中華藥典方法）。

(二)薑黃材料：

由印度、日本、中國等地收蒐集 8 個薑黃種原。分別為薑黃橙黃種 *Curcuma longa* L. (A)、薑黃鮮黃種 *Curcuma aromatic* (B)、蓬莪朮 *Curcuma phaeocaulis* Val. (C)、溫鬱金 *Curcuma wenyujin* Chen et Ling (WO)及自日本引種的三種藥用薑黃分別為秋鬱金 *Curcuma longa* L. (J1)、春鬱金 *Curcuma aromatica*(J2)、紫鬱金 *Curcuma zedoaria* Roscoe (J3)，此外我們從日本引種的紫鬱金中篩選出淡藍色根莖的紫鬱金 *Curcuma zedoaria* Roscoe (J4)品系。而橙黃種薑黃之根莖與塊根經由植物組織切片與 TLC 鑑定為薑黃與鬱金正品基原。其中 6 個薑黃種原經由 TLC 鑑定，結果顯示薑黃橙黃種與市售薑黃相同，含有高量薑黃素，而薑黃鮮黃種亦含有少量薑黃素，其薑黃素含量與日本秋鬱金相似（薑黃 TLC 鑑定方法係根據中華藥典方法）。

二、紫蘇與薑黃生育習性調查與品系評估

將蒐集到的紫蘇與薑黃進行種原、馴化與品系評估，並將紫蘇與薑黃種苗移植到田間進行生育習性調查。將所蒐集的紫蘇與薑黃種原移至田間定植，藉以篩選評估高產量與高有效成分之品系。試驗材料為所蒐集之紫

蘇與薑黃植物種原，以育成種苗定植至田間進行試驗，兩週後進行疏苗、補植與調查。

三、紫蘇與薑黃有機栽培試驗

(一)紫蘇不同有機肥料施用量試驗

以不同種類之有機肥料-大豆粕、花生粕、芝麻粕、牛糞堆肥進行試驗，評估有機肥料種類對紫蘇生長與產量之影響。調查內容包括株高、節數、分枝數、莖粗、葉長、葉片鮮重、莖鮮重、葉片乾重、莖乾重與產量...等。產量以每公頃種植55,278株進行計算。化學肥為台肥有機複合肥料寶效1號（N-11%，P-11%，K-11%，含30%以上動物性有機質）。

(二)薑黃不同根莖部位對成分與產量之影響

以薑黃不同根莖部位（M-第一分生子莖、S1-第二分生子莖、S2-第三分生子莖）進行試驗，評估薑黃不同根莖部位對薑黃生長、產量與成分之影響。調查內容包括株高、分蘗數、葉長、葉寬、莖徑、總葉片數、主莖葉片數、葉片鮮重、根莖鮮重與產量...等。產量以每公頃種植55,278株進行計算，並分析其指標成分含量。

(三)薑黃之有機肥料施用量連作試驗

以連作方式進行不同有機肥料施用量試驗，評估連作對薑黃生長、產量及成分之影響。

(四)紫蘇不同乾燥溫度試驗

紫蘇不同乾燥溫度試驗，分別以日曬法、室內蔭乾法、低溫乾燥機烘乾法（溫度分別為50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃）進行處理，每處理3重複，每重複為2Kg新鮮紫蘇。測定其迷迭香酸（Rosmarinic acid）、紫蘇醛（Perillaldehyde）與紫蘇醇（Perilly alcohol）含量。

四、成分分析

(一)試藥與試劑

1. 薑黃素(curcumin, 65-70 %)：Sigma Chem. Co. (St, Lious, MO, USA)
2. 薑黃素(curcumin, ≧95.0 %)：Fluka Chem. AG (Buchs, Switzerland)
3. 藥用酒精(ethanol)：臺灣菸酒公賣局
4. 甲醇溶液(methanol)：TEDIA Co. (Fairfield, Ohio, USA)
5. 實驗用之三次水為經過Millipore超純水系統(Bedford, USA)處理

後之去離子(Milli-Q) 純水。

(二)實驗儀器設備及裝置材料

1. 超音波震盪器：Sonorex supper PK 225H (Bandelin, Switzerland)
2. 震盪器：Thermolyene 376000 (Mixer, USA)
3. 微量天秤：AP 210S (OHAUS, Switzerland)
4. 高效液相層析儀(HPLC)：
   (1) 幫浦：BAS PM-80 (West Lafayette, IN, USA)
   (2) 紫外光檢測器：S-3702 UV-VIS detector (Soma, Tokyo, Japan)
   (3) 檢品注射器：20 µl Rheodyne 7725 injector (Cotati, CA, USA)
   (4) 層析管柱：Hypersil® ODS C-18 column (250 × 4.6 mm I.D.; 5 µm) (E. Merk, Dermstadt, Germany)
5. 微孔徑過濾膜：0.45 µm HV, Durapore Membrane Filters (Millipore, Ireland)
6. GC- Shimadzu GC-2014 -a.檢品注射器：Auto sampler AOC-20
7. 檢測器為火焰燃燒離子化檢器(flame ionization detector，FID)
8. GC column氣相層析管柱：CP-Wax 52CB (60m ×0.25mm I.D.，0.25µm film thickness，WCOT，荷蘭Chrompack公司)：30x0.25x0.25

(三)高效液相層析法之分析條件

1. 層析管柱：Hypersil® ODS C-18 column (250 × 4.6 mm I.D.; 5 µm) (E. Merk, Dermstadt,Germany)
2. 檢測波長：280 nm及 430 nm
3. 移動相流速：0.8 mL/min
4. 移動相：含有1 %醋酸、55 %氰甲烷、45 % 10 mM磷酸鹽，並將配製好的移動相以磷酸調整pH值為3.0，最後再經0.45 µm微孔徑薄膜濾網來過濾雜質並驅趕氣泡。
5. 標準品：薑黃素(Retention time = 7.0 min)
6. 注入量：20 µL
7. 樣品分析時間：萃取樣品分析時間為 10 分鐘。

(四)標準品檢量線製作

為了確認迷迭香酸、薑黃素定量分析方法的再現性穩定性，將標準品薑黃素等，分別以 methanol 配置成 1000 µg/mL 之儲存溶液(stock solution)，置於 0 ℃下儲存，在配置檢量線時則個別稀釋

至 10 μg/mL，作為工作溶液(working solution)，為達同時分析與快速測定之目的，採取將各標準品以 1：1 的方式混和配置以便於同時測定，以 10、20、50、100、250、500、1000、1500、2000 ng/mL 的濃度，分別配置於標準品溶液中(70% methanol)，每個濃度在配置時並個別添加 1,000 ng/mL 的內標準品(internal standard)。

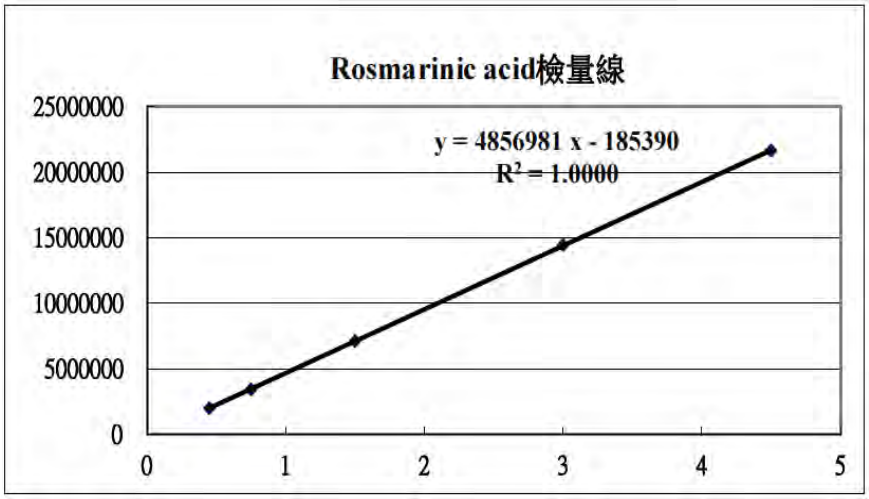


Fig. 1 紫蘇標準品 Rosmarinic acid 之檢量線

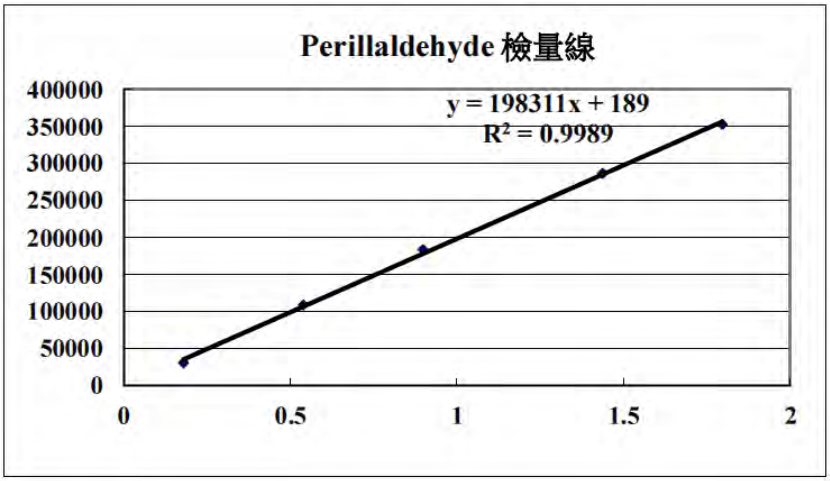


Fig. 2 紫蘇標準品 Perillaldehyde 之檢量線

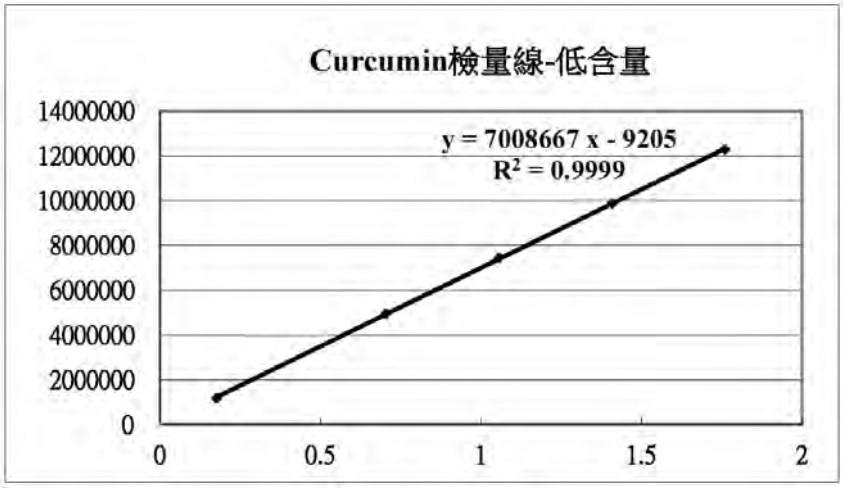


Fig. 3 薑黃標準品 Curcumin 之低含量檢量線

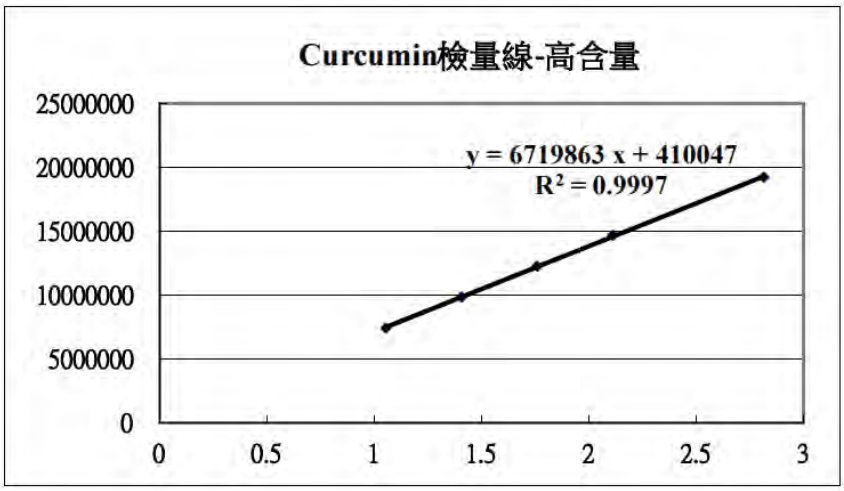


Fig. 4 薑黃標準品 Curcumin 之高含量檢量線

(五)樣品萃取

1. 薑黃：30g 樣品加入 70 %甲醇 50 mL，攪拌混合 30 分鐘，取上清液過濾，取 1mL 以 70 %甲醇定量到 100 mL。
2. 莪朮：30 克樣品加入 70 %甲醇 50 mL，攪拌混合 30 分鐘，取上清液過濾，取 1mL 以 70 %甲醇定量到 10 mL。
3. 紫蘇：GC 樣品萃取：1 克樣品加入 95 %乙醇，超音波震盪 30 分鐘後，以 0.45μm 濾膜過濾。

   HPLC 樣品萃取：0.5 克樣品加入 20mL 70%甲醇，超音波震盪 15 分鐘，再以 40℃水浴以 160 rpm 搖浴 20 分鐘，放置冷卻，以 0.45 μm 濾膜過濾。

4. GC 注射條件：

(1) 注射口溫度：260 ℃
(2) FID偵測器溫度：300 ℃
(3) 分流比：50:1
(4) 注射量：1 μl
(5) GC column：30x0.25x0.25
(6) 條件：40℃停留2 min, 5 ℃/min速率上升到260 ℃，然後停留4 min

五、紫蘇與薑黃樣品之檢驗分析

(一)乾燥減重（中華中藥典--生藥檢驗法附錄五）

1. 先將蒸發皿，於烘箱內以105 ℃乾燥一小時，於乾燥器內放冷，稱量。
2. 取檢品約5 g，置已知重量之蒸發皿中，精確稱量，於烘箱內以105 ℃乾燥五小時，於乾燥器內放冷，稱量。
3. 繼續以105 ℃乾燥，每隔一小時稱量一次，直到先後二次之減重相差不超過0.25 %為止。
4. 由其減失之重量計算檢品乾燥減重百分率。

(二)灰份

1. 先將坩堝，於灰化爐內以550 ℃熾灼一小時，於乾燥器內放冷，稱量。
2. 取檢品約2 g，置已知重量之坩堝中，精確稱量，於電熱板上加溫先使其碳化，再置入灰化爐，以不超過550 ℃熾灼四小時至碳分完全揮散，於乾燥器內放冷，稱定其重量，計算其灰分百分率。

(三)酸不溶性灰份

將灰份檢驗法所得之總灰分，加稀鹽酸(10 %) 25 mL，煮沸五分鐘，用已知重量之坩堝及無灰濾紙過濾，濾渣以熱水洗淨後，熾灼三小時，於乾燥器內放冷，稱定其重量，並計算檢品含酸不溶性灰分之百分率。

(四)稀乙醇抽提物

1. 先將蒸發皿於烘箱內以105 ℃乾燥一小時，於乾燥器內放冷，稱量。
2. 取製備之檢品約2.3 g，精確稱定，置有玻璃塞之三角錐瓶中，加稀醇(50 %乙醇)約70 mL，每隔三十分鐘加以振搖一次，浸漬

八小時，靜置十六小時後，以相當於No.2孔隙之濾紙自然過濾。三角錐瓶用稀醇(50%乙醇)洗滌，並將洗液通過濾器洗滌殘渣而與濾液合併，直至全量達100 mL為止。

3. 分取濾液50 mL，置已知重量之蒸發皿中，於水浴器上蒸乾，並於烘箱內以105 ℃乾燥四小時，然後計算檢品所含稀醇抽提物之百分率，再依檢品含水百分率換算成乾品之稀醇抽提物之百分率。

(五)水抽提物

以水為抽提溶媒，同材料與方法稀醇抽提物之抽提方法操作。

(六)黃麴毒素

本測試參考衛生署藥物食品檢驗局之公告方法署授食字第0991903564號公告，以液相層析螢光偵測器(HPLC/FLD)分析。使用儀器為Waters H-class (HPLCFLD)，標準品來源為SUPLECO。

(七)總生菌數

行政院衛生署98.08.13署授食字第0981800288號公告修正指定之CNS 10890 N6186食品微生物之檢驗法-生菌數之檢驗。

(八)大腸桿菌

行政院衛生署90.04.20衛署食字第0900025538號食品微生物檢驗法-大腸桿菌之檢驗。

(九)大腸桿菌群

行政院衛生署98.08.13署授食字第0981800288號公告修正指定之CNS 10984 N6194食品微生物之檢驗法-大腸桿菌群之檢驗。

(十)重金屬檢驗

本測試參考USEPA method 3051，以感應耦合電漿質譜儀(ICP/MS)分析。使用儀器為Angilent 7500C (ICPMS)，標準品來源為Accutrace。

(十一)農藥檢驗

本測試參考中華民國國家標準CNS 13570-2方法─食品中殘留農藥檢驗方法：多重殘留分析方法(II)(88/08/04公告)；衛生署公告食品中殘留農藥－多重殘留分析方法(三)(公告字號：署授食字第1001904771號公告)及衛生署公告食品中殘留農藥－多重殘留分析方法(四)(公告字號：署授食字第1001904777號公告)。以氣相層析串聯離子阱質譜儀(GC/MS/MS)及液相層析串聯質

譜儀(LC/MS/MS)檢測。

使用儀器為Waters Xevo TQ (LCMSMS)及Waters Quattro Micro (GCMSMS)，委託試驗單位SGS無法逐一表列318項農藥標準品來源。

六、紫蘇與薑黃有機栽培及優良農業操作模式之建立

(一)建立紫蘇與薑黃之中藥有機栽培標準作業程序。

(二)建立紫蘇與薑黃有機及 GAP 栽培模式。

(三)試驗區已完成土壤、灌溉用水水質之檢測與有機肥料重金屬檢測，符合有機農業法規之標準。

七、紫蘇與薑黃有機及 GAP 栽培觀摩會

(一)觀摩會規劃與議程

(二)觀摩會執行情況與新聞稿

(三)貴賓致詞

明道大學陳世雄校長致詞

(四)觀摩會照片集錦

(五)紫蘇與薑黃有機及 GAP 栽培觀摩會-新聞報導

(六)學員會後滿意度調查與綜合討論

(七)中藥有機栽培手冊之編印

八、統計分析

本試驗將紫蘇與薑黃農藝性狀、產量與成分分析進行LSD分析（SAS Institute, 1988）來比較各組間的差異(differential)，其中$P<0.05$表示在統計上有顯著差異。

參、結果

一、紫蘇與薑黃之型態與生育習性調查

(一)紫蘇*Perilla frutescens*與青紫蘇*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridis*

為唇形科一年生藥用草本植物。全株具有濃厚香氣，以葉尤甚；莖鈍四稜形，上部多分枝，紫色或綠色；葉對生，具長柄，葉片呈紫紅色葉緣皺摺狀，卵形或圓卵形，先端突尖或長尖，基部圓形或鈍形，葉呈鋸齒緣。夏秋間於枝先端抽出總狀花序頂生或腋生，唇形小花，紅色或淡紅色。生長期長達300~330天，花期9~10月，果期10~11月。紫蘇種子千粒重為1.75 g，紫蘇種子於11-12月萌芽，前2-3月苗期生長緩慢，中後期植株生長快速，其植株高度可達120-190公分(Table 1；Fig. 5)。

(二)皺葉紫蘇*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *crispa*與皺葉青紫蘇*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridi-crispa*

為唇形科一年生藥用草本植物。全株具有濃厚香氣，以葉尤甚；莖鈍四稜形，上部多分枝，紫色或綠色；葉對生，具長柄，葉片呈紫紅色或綠色皺摺狀，卵形或圓卵形，先端突尖或長尖，基部圓形或鈍形，葉呈鋸齒緣。夏秋間於枝先端抽出總狀花序頂生或腋生，唇形小花，白色。生長期為150~180天，花期為播種後4~5月，果期播種後5~6月。紫蘇種子千粒重為1.75 g，植株生長勢較紫蘇與青紫蘇差，其植株高度為52-60公分(Table 1；Fig. 5)。



Fig. 5 不同紫蘇品系之植株型態。a. 紫蘇 *Perilla frutescens*、b.皺葉紫蘇 *Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridi-crispa*、c.青紫蘇 *Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridis* 及 d. 皺葉青紫蘇 *Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridi-crispa*。

Table 1.不同紫蘇品系農藝性狀

部位/品系	紫蘇	青紫蘇	皺葉紫蘇	皺葉青紫蘇
學名	*Perilla frutescens*	*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridis*	*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *crispa*	*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridi-crispa*
科屬別	唇形科紫蘇屬	唇形科紫蘇屬	唇形科紫蘇屬	唇形科紫蘇屬
生長期	300~330 天	270~300 天	150~180 天	150~180 天
株高	180~190 cm	140~150 cm	52~60 cm	45~60 cm
葉位	對生	對生	對生	對生
葉色	紅紫色	綠色	紅紫色	綠色
葉形	圓卵形，基部圓形或鈍形	圓卵形，基部圓形或鈍形	皺摺狀，基部圓形或鈍形	皺摺狀，基部圓形或鈍形
葉緣	鋸齒緣	鋸齒緣	鋸齒緣	鋸齒緣
葉脈	網狀脈	網狀脈	網狀脈	網狀脈
莖色	紅紫色	綠色	紅紫色	綠色
莖形	鈍四稜形	鈍四稜形	鈍四稜形	鈍四稜形
花序	總狀花序	總狀花序	總狀花序	總狀花序
花色	淡紅色	白色	淡紅色	白色
花期	9~10 月	8 月	播種後 4~5 月	播種後 4~5 月
果期	10~11 月	9 月	播種後 5~6 月	播種後 5~6 月
葉乾重產量	3277 Kg/ha	2042 Kg/ha	201 Kg/ha	27.5 Kg/ha
莖乾重產量	9216 Kg/ha	5617 Kg/ha	288 Kg/ha	176 Kg/ha

(三)薑黃：薑黃*Curcuma longa* L. (橙黃種薑黃、鮮黃種薑黃、秋鬱金)、*Curcuma aromatic* (春鬱金)為薑科薑黃屬多年生草本植物，高約1~1.5公尺；地下為多肉之根莖，橢圓形或長橢圓形，多分枝，叢聚呈指狀或蛹狀，外皮黃褐色，肉質鮮黃色或橙黃色；根粗壯，從根狀莖生出，其末端膨大形成紡錘形的塊根。根莖隨生長時間越長顏色越深，此為薑黃素高量之指標。葉基生，具長葉柄，葉片長橢圓形，葉綠色或黃綠色，葉長45~60cm，寬15~30公分，平行脈，先端漸尖，基部漸窄，葉片光滑柔軟無毛，部分品系葉背

具絨毛，平均1株10葉。秋季從苞葉中抽出30~60cm花穗，具多層淡綠色橢圓之鱗片狀花苞，苞片上部帶淡粉色渲染，一苞具3、4花；花冠漏斗狀呈黃色，瓣唇倒卵形，呈淺3裂。雄蕊2枚，2側並立，呈花瓣狀，花柱絲狀，子房下位。蒴果球形，膜質，熟時3瓣裂。臺灣薑黃出土時間約於6月初（端午節前後），7~9月為薑黃地上部生育最旺盛時期，8~9月部分植株開花，10月下旬地上部發育逐漸停止，下位葉枯萎，鮮黃種於12月地上莖葉逐漸乾枯，並於1月上旬倒伏，而橙黃種於1月份地上莖葉逐漸乾枯，並於2月上旬倒伏(Table 2-1、2-2；Fig. 6~8)。

Table 2-1.不同薑黃品系農藝性狀

部位/品系	橙黃種薑黃	鮮黃種薑黃	蓬莪朮	溫鬱金 WO
學名	*Curcuma longa L.*	*Curcuma longa L.*	*Curcuma phaeocaulis* Val.	*Curcuma wenyujin* Chen et Ling
科屬別	薑科薑黃屬	薑科薑黃屬	薑科薑黃屬	薑科薑黃屬
生長期	240~270 天	210~240 天	210~240 天	210~240 天
株高	120~130 cm	140~150 cm	130~140 cm	170~180 cm
葉色	黃綠色	綠色	綠色，葉片中心紅色	綠色
葉形	長橢圓形	長橢圓形	長橢圓形	長橢圓形
葉長	56~60 cm	57~70 cm	62~65 cm	80~91 cm
葉寬	15~20 cm	18~22 cm	15~18 cm	24~28 cm
葉脈	平行脈	平行脈	平行脈	平行脈
葉背	平滑	平滑	披絨毛	披絨毛
莖柄顏色	黃綠色，基部紅色	綠色	綠色，基部紅色	綠色
主莖徑	3.0~4.1 cm	3.1~4.5 cm	3.6~4.1 cm	6.5~7.3 cm
主根莖	卵圓形	卵圓形	卵圓形	卵圓形
分支根莖	長橢圓形	長橢圓形	長橢圓形	長橢圓形
根莖肉色	橙黃色	淡橙黃色	黃藍紫色	白色
花序	穗狀花序	穗狀花序	穗狀花序	穗狀花序
花色	淡綠色花苞上部帶淡粉色	淡綠色花苞上部帶淡粉色	綠色花苞上部紅色	淡綠色花苞上部粉紅色
花冠	漏斗狀呈黃色	漏斗狀呈黃色	漏斗狀呈紅色	漏斗狀呈黃色
花期	9~10 月	9~10 月	5~6 月	5~6 月
花長	29~32 cm	46~55 cm	31~35cm	30~35 cm
根莖鮮重產量	39,597 Kg/ha	30,058 Kg/ha	36,262Kg/ha	69,931 Kg/ha

Table 2-2.不同薑黃品系農藝性狀

部位/品系	秋鬱金-J1	春鬱金-J2	紫鬱金-J3	紫鬱金-J4
學名	*Curcuma longa* L.	*Curcuma aromatica*	*Curcuma zedoaria* Roscoe	*Curcuma zedoaria* Roscoe
科屬別	薑科薑黃屬	薑科薑黃屬	薑科薑黃屬	薑科薑黃屬
生長期	210~240 天	210~240 天	210~240 天	210~240 天
株高	110~120 cm	130~140 cm	130~140 cm	170~180 cm
葉色	綠色	綠色	綠色，葉片中心紅色	綠色，葉片中心紅色
葉形	長橢圓形	長橢圓形	長橢圓形	長橢圓形
葉長	64~72 cm	66~76 cm	60~67 cm	62~68 cm
葉寬	21~22 cm	20~22 cm	16~19 cm	16~19 cm
葉脈	平行脈	平行脈	平行脈	平行脈
葉背	平滑	平滑	披絨毛	平滑
莖柄顏色	黃綠色，基部紅色	綠色	綠色，基部紅色	綠色
主莖徑	3.9~4.4 cm	3.6~4.8 cm	3.7~4.7 cm	3.8~4.9 cm
主根莖	卵圓形	卵圓形	卵圓形	卵圓形
分支根莖	長橢圓形	長橢圓形	長橢圓形	長橢圓形
根莖肉色	橙黃色	黃色	黃藍紫色	藍紫色
花序	穗狀花序	穗狀花序	穗狀花序	穗狀花序
花色	淡綠色花苞上部帶淡粉色	淡綠色花苞上部帶淡粉色	綠色花苞上部紅色	淡綠色花苞上部粉紅色
花冠	漏斗狀呈黃色	漏斗狀呈黃色	漏斗狀呈紅色	漏斗狀呈紅色
花期	9~10 月	9~10 月	5~6 月	5~6 月
花長	44~52 cm	45~52 cm	32~36cm	31~36 cm
根莖鮮重產量	53,837 Kg/ha	53,255 Kg/ha	35,102 Kg/ha	43,904 Kg/ha



Fig. 6 不同薑黃品系植株型態：A. 薑黃橙黃種 *Curcuma longa* L.、B. 薑黃鮮黃種 *Curcuma longa* L.、C. 蓬莪朮 *Curcuma phaeocaulis* Val.、J1. 秋鬱金 *Curcuma longa* L.、J2. 春鬱金 *Curcuma aromatica*、J3.紫鬱金 *Curcuma zedoaria* Roscoe、J4. 紫鬱金 *Curcuma zedoaria* Roscoe、WO. 溫鬱金.*Curcuma wenyujin* Chen et Ling、Q. 女王鬱金 *Curcuma petiolata Roxb.*。

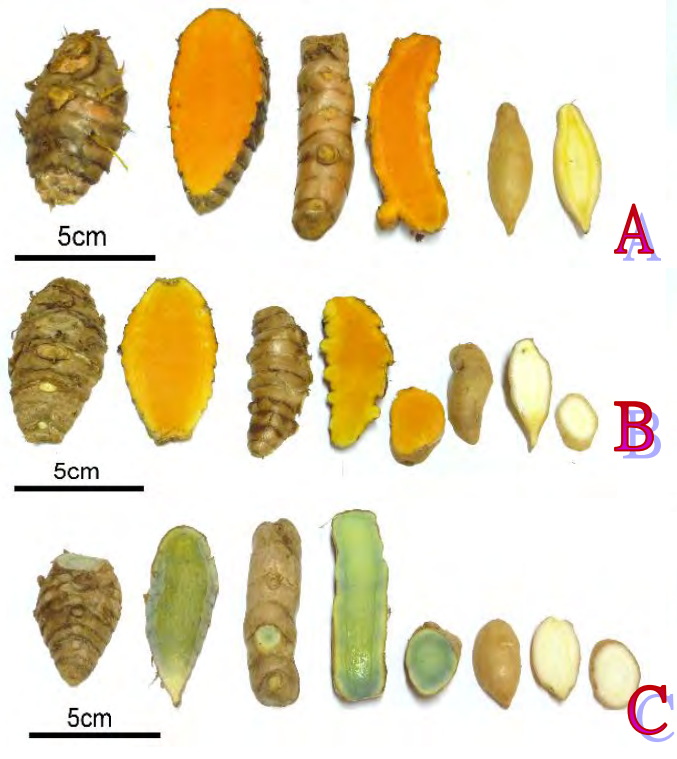


Fig. 7 不同薑黃品系之根莖型態。

A. 薑黃橙黃種 *Curcuma longa* L.

B. 薑黃鮮黃種 *Curcuma longa* L.

C. 蓬莪朮 *Curcuma phaeocaulis* Val.

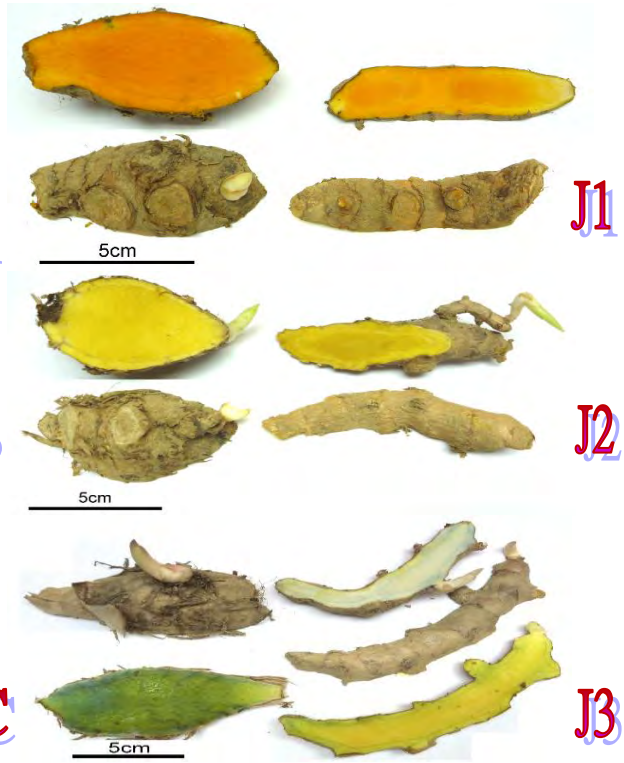


Fig. 8 日本引種之薑黃根莖型態。

J1. 秋鬱金 *Curcuma longa* L.

J2. 春鬱金 *Curcuma aromatic*

J3. 紫鬱金 *Curcuma zedoaria* Roscoe

(四)莪朮：蓬莪朮*Curcuma phaeocaulis* Val. 與紫鬱金*Curcuma zedoaria*（BERG.）Roscoe、溫鬱金*Curcuma wenyujin* Chen et Ling為薑科薑黃屬多年生草本植物，高約1.2~1.5公尺；地下為多肉之根莖，橢圓形或長橢圓形，多分枝，叢聚呈指狀或蛹狀，外皮黃褐色，肉質黃藍色或藍紫色；根粗壯，從根狀莖生出，其末端膨大形成紡錘形的塊根。葉基生，具長葉柄，葉片長橢圓形，葉綠色或黃綠色，葉長45~60cm，寬15~30公分，平行脈，先端漸尖，基部漸窄，葉片光滑柔軟無毛，部分品系葉背具絨毛，平均1 株10葉。春季5～6月從苞葉中抽出30~60cm花穗，具多層淡綠色橢圓之鱗片狀花苞，苞片上部帶淡紅色，一苞具3、4花；花冠漏斗狀呈黃色，瓣唇倒卵形，呈淺3裂。雄蕊2枚，2側並立，呈花瓣狀，花柱絲狀，子房下位。蒴果球形，膜質，熟時3瓣裂。臺灣自然生長薑黃之萌芽時間於4月初，5月初生長出土（薑黃栽培出土時間為6月初，端午節前後），7~9月為薑黃地上部生育最旺盛時期，8~9月部分植株

開花，10月下旬地上部發育逐漸停止，下位葉枯萎，於12月地上莖葉逐漸乾枯，並於1月上旬倒伏。

二、篩選評估適合臺灣生產栽培之紫蘇與薑黃種原

(一)紫蘇：目前已蒐集 4 種紫蘇種原，分別為紫蘇、青紫蘇、皺葉紫蘇及皺葉青紫蘇，並已完成不同紫蘇品系與部位之迷迭香酸(Rosmarinic acid)含量分析。

迷迭香酸屬於水溶性的多酚類成分具有相當高的抗氧化能力、清除過氧化物能力、抑制脂質過氧化、清除自由基以及抗過氧化氫的能力。

分析不同紫蘇品系與部位迷迭香酸含量，結果顯示，在葉片方面紫蘇與青紫蘇葉片含有高量的迷迭香酸，其含量分別為12.3 mg/g與12.25 mg/g，以皺葉青紫蘇葉片迷迭香酸含量最低為3.27 mg/g。在莖桿方面，分枝的迷迭香酸含量較主莖高1.2~2.7倍，其中以皺葉紫蘇與皺葉青紫蘇分枝迷迭香酸含量最高，分別為3.88 mg/g與3.81 mg/g。在花方面，以皺葉紫蘇其花的迷迭香酸含量最高，為19.67 mg/g。

研究指出紫蘇葉萃取物具抗發炎、抗過敏及增進免疫力活性。並具有抑制腫瘤壞死因子-α (tumor necrosis factor-α；TNF-α)的產生，預防其所引發的敗血性休克與急性器官衰竭或死亡。而紫蘇醛(Perillalde； hydelaevo- isopropenyl-1-cyclohexene-1-arboxaldehyde)為紫蘇精油中含量最高的成分。分析不同紫蘇品系與部位紫蘇醛含量，結果顯示，在葉片方面紫蘇與皺葉紫蘇葉片含有高量的迷迭香酸，其含量分別為2.94 mg/g與1.45 mg/g，以皺葉青紫蘇葉片紫蘇醛含量最低為0.36 mg/g。在莖桿方面，分枝的紫蘇醛含量較主莖高2.1~5.3倍，其中以皺葉紫蘇與皺葉青紫蘇分枝紫蘇醛含量最高，分別為0.48 mg/g與0.4 mg/g。

而紫蘇與皺葉紫蘇經由植物組織切片與TLC鑑定為紫蘇正品基原，其葉片含有高量迷迭香酸與紫蘇醛。因此建議紫蘇與皺葉紫蘇為生產蘇葉與蘇梗之品系，以獲得最高紫蘇栽培產量與最佳質量之紫蘇藥材。

(二)薑黃：完成橙黃種薑黃、鮮黃種薑黃等 8 種薑黃屬之種源評估，並已完成橙黃種薑黃、鮮黃種薑黃與莪术不同部位之薑黃素含量分析。橙黃種薑黃之根莖鮮重為 291g/株，根莖鮮重產量可達 16,089 Kg/ha，

鮮黃種薑黃根莖鮮重為446g/株，根莖鮮重產量可達24,676 Kg/ha，莪术根莖鮮重為587g/株，根莖鮮重產量可達32,499 Kg/ha，由日本引進之薑黃品系(J1~J4)產量亦相當高達25-40公噸/公頃，此外溫鬱金*Curcuma wenyujin* Chen et Ling (WO)產量高達69.9公噸/公頃，但其根莖為白色不含薑黃素，值得進一步研究比較。橙黃種薑黃產量高，且經由薑黃素成分分析發現，其薑黃素含量為58.1 mg/g，其鬱金（塊根）薑黃素含量為3.95 mg/g。而鮮黃種薑黃其薑黃素含量為7.25 mg/g，其鬱金（塊根）薑黃素含量未檢出。橙黃種薑黃其薑黃素含量為8個種原中最高，薑黃素含量為鮮黃種的8倍、莪术的138倍，其薑黃素更為市售薑黃藥材的1.62倍，其鬱金薑黃素含量為市售鬱金的14.6倍。故薑黃橙黃種為值得進行栽培與推廣種植之薑黃品系，鮮黃種為適合做為食用薑黃之品系。蓬莪朮、日本紫鬱金與溫鬱金根莖產量高，另外生長有高產量塊根，可做為生產莪朮與綠絲鬱金之品系。

三、有機肥料肥料施用量對紫蘇與薑黃產量與成分之影響

(一)紫蘇不同有機肥料種類與施用量試驗

評估有機肥料施用量對紫蘇與薑黃產量及成分之影響。有機肥料處理為4個有機肥施用量，分別為2,000 Kg/ha (O2)、4,000 Kg/ha (O4)、6,000 Kg/ha (O6)、8,000 Kg/ha (O8)，對照組為化學肥處理(CK)，每處理3重複。不同有機肥施用量對紫蘇生長之影響，結果顯示不同有機肥施用量對紫蘇生長之影響，4月齡紫蘇結果顯示，以牛糞堆肥6,000 Kg/ha與8,000 Kg/ha處理之紫蘇生長產量最高，以化學肥處理之產量最低。 8月齡之始花期紫蘇以牛糞堆肥4,000 Kg/ha與8,000 Kg/ha處理之紫蘇生長產量最高，乾紫蘇葉產量分別為3,839 Kg/ha與3,748 Kg/ha，乾紫蘇梗產量分別為15,425 Kg/ha與15,057 Kg/ha，以化學肥處理之產量最低，乾紫蘇葉與乾紫蘇梗產量分別為2,519 Kg/ha與10,123 Kg/ha。

分析不同有機肥料施用量對紫蘇迷迭香酸、紫蘇醛與紫蘇醇含量之影響。迷迭香酸分析結果顯示，以牛糞堆肥2,000 Kg/ha與8,000 Kg/ha處理之紫蘇葉片迷迭香酸含量最高，分別為14.44 mg/g與13.74 mg/g，分枝迷迭香酸含量為主莖的1.5~2.2倍。其中以牛糞堆肥8,000 Kg/ha處理之紫蘇分枝迷迭香酸含量最高，為6.25 mg/g。紫蘇醛與紫蘇醇分析結果顯示，以牛糞堆肥2,000 Kg/ha處理之紫蘇葉片紫蘇

醛含量最高為1.85 mg/g。隨有機肥料施用量之提高紫蘇葉之紫蘇醛含量逐漸降低，其中以牛糞堆肥8,000 Kg/ha處理之紫蘇醛含量最低為1.11 mg/g。而有機肥料施用量對紫蘇醇含量則無顯著影響，但施用有機肥料處理之紫蘇醇含量為化學肥處理的2倍。

(二)薑黃不同根莖部位對薑黃產量與成分之影響

以橙黃種(A)與鮮黃種薑黃(B)之第1分生子莖(M)、第2分生子莖(S1)、第3分生子莖(S2)與單株種植4個第3分生子莖進行種植試驗，探討不同根莖部位對薑黃產量之影響。結果顯示，種植根莖越大其產量越高，橙黃種以第1分生子莖（AM）種植可以收穫18,896Kg/ha，鮮黃種以第1分生子(BM)莖種植可以收穫55,435 Kg/ha，因此薑黃種植時，宜種植重量較高之種莖以提升薑黃產量，若單株種植4~5個第3分生子莖（AS3、BS3）亦可獲得高產量，橙黃種與鮮黃種薑黃產量分別為46,220 Kg/ha與51,805 Kg/ha。橙黃種AS3處理與AS1處理產量相近，顯示提升單株種莖重量可以提升產量，但AS3所種植的薑黃主莖徑較AS1小。另外調查二年生薑黃產量發現，二年生橙黃種(A2Y)與鮮黃種(B2Y)薑黃產量分別為89,138 Kg/ha與100,170 Kg/ha，高於為1年生橙黃種(AS1)與鮮黃種(BS1)薑黃產量的2.27與3.3倍，因此根據本研究實驗結果，可以改良薑黃一年種植採收模式，改為二年採收，以降低生產成本提高產量。

分析橙黃種(A)、鮮黃種薑黃(B)與莪术(C)之第1分生子莖(1)、第2分生子莖(2)、第3分生子莖(3)與鬱金(4)各部位薑黃素含量。發現以橙黃種薑黃素含量最高為鮮黃種的8倍與莪术的131倍。橙黃種與鮮黃種薑黃其薑黃素含量皆以第2分生子莖最高，次之為第1分生子莖與第3分生子莖，而橙黃種的鬱金含有高量薑黃素，其薑黃素含量為中國產鬱金的14.6倍，極具發展潛力。

(三)薑黃連作有機肥料施用量試驗

以連作方式進行不同有機肥料施用量試驗，評估連作對薑黃產量及成分之影響。有機肥料處理為4個有機肥施用量，分別為2,000 Kg/ha (O2)、4,000 Kg/ha (O4)、6,000 Kg/ha (O6)、8,000 Kg/ha (O8)，對照組為化學肥處理(CK)，每處理3重複。薑黃連作有機肥料試驗結果顯示，葉鮮重方面，隨有機肥料施用量升高可以提升薑黃葉鮮重，其中以8,000 Kg/ha處理之葉片鮮重最重，橙黃種與鮮黃種薑黃分別為633.0g/株與1245.6 g/株。以對照組之葉鮮重最低，橙黃種與

鮮黃種薑黃分別為346.7 g/株與762.7g/株。根莖鮮重方面，施用有機肥料可以提升薑黃根莖鮮重，其中以8,000 Kg/ha處理之根莖鮮重最高，橙黃種與鮮黃種薑黃分別為873.5 g/株與870.5 g/株。以對照組之根莖鮮重最低，橙黃種與鮮黃種薑黃分別為409.0 g/株與562.4 g/株。根莖鮮重產量方面，以8,000 Kg/ha有機肥施用量可以獲得較高薑黃產量。橙黃種與鮮黃種薑黃分別為48,283 Kg/ha與48,117 Kg/ha。

四、紫蘇不同乾燥溫度試驗

紫蘇以不同乾燥方法與溫度進行乾燥試驗，評估乾燥方法與溫度處理（日曬法、室內蔭乾法、低溫乾燥機烘乾法）對紫蘇迷迭香酸、紫蘇醛與紫蘇醇成分含量之影響。結果顯示，以乾燥機烘乾法 50℃處理之迷迭香酸含量最高為 17.6mg/g，以蔭乾法處理之紫蘇其紫蘇醛與紫蘇醇含量最高分別為 1.85mg/g、0.15mg/g。而迷迭香酸、紫蘇醛與紫蘇醇含量皆隨乾燥溫度之升高而下降。紫蘇採蔭乾法乾燥雖可以保持高量成分，但其乾燥時間較為費時。

五、臺灣產紫蘇與薑黃藥材檢驗分析

將本研究試驗所生產之紫蘇與薑黃藥材樣品委託 SGS (臺灣檢驗科技股份有限公司)進行 318 項農藥檢驗、生藥檢驗、總生菌數、大腸桿菌、大腸桿菌群、黃麴毒素與重金屬含量分析。

農藥檢驗結果顯示，本研究試驗生產之臺灣紫蘇與薑黃藥材通過 SGS-318 項農藥檢驗，未檢測出任何農藥殘留。

生藥檢驗結果顯示，本研究試驗生產之臺灣紫蘇與薑黃藥材符合中華中藥典之紫蘇與薑黃藥材生藥標準。紫蘇水抽提物與稀乙醇抽提物分別為 21.4%與 21.7%高於藥典標準的 2%。橙黃種薑黃水抽提物與稀乙醇抽提物分別為 13.1%與 20.0%高於藥典標準的 5%與 7%。鮮黃種薑黃水抽提物與稀乙醇抽提物分別為 13.3%與 16.1%高於藥典標準的 5%與 7%。

微生物檢驗結果顯示，本研究試驗生產之臺灣紫蘇與薑黃藥材符合藥事法所規定總生菌數與大腸桿菌數標準。紫蘇總生菌數為 2.1×10^5 CFU/g 低於中藥材總生菌數限量標準的 10^7 CFU/g。橙黃種薑黃與鮮黃種薑黃總生菌數分別為 7.3×10^6 CFU/g 與 8.5×10^6 CFU/g 低於中藥材總生菌數限量標準的 10^7 CFU/g。紫蘇與薑黃藥材大腸桿菌數檢驗為陰性。但在大腸桿菌群檢驗部分，紫蘇與薑黃藥材大腸桿菌群為 1100 MPN/g，高於食用食品類衛生標準的 1000 MPN/g。

大腸桿菌及大腸桿菌群之檢驗結果，可以用以評定為食品原料、半成品其於製造過程之基本衛生現況。大腸桿菌（*Escherichia coli*）為兼性厭氧性的革蘭氏陰性桿菌，大部份大腸桿菌是無害且生長在健康人的腸道中，某些大腸桿菌可提供人體所需的維生素 B12 和維生素 K，亦能抑制其它病原菌之生長。但有些特殊的大腸桿菌對人和動物有病原性，尤其對嬰兒和幼畜（禽），常引起嚴重腹瀉和敗血症。因該菌一般棲息在人和動物的腸道中，故可視為食品是否曾受糞便污染的指標。而大腸桿菌為不得檢出項目，因此檢驗結果為陰性，符合食品衛生標準。

大腸桿菌群（coliforms）係指一群好氣及兼性厭氧的革蘭氏陰性菌，為無孢子形成的桿菌，可在 35℃，48 小時發酵乳糖，並產生氣體，包括大腸桿菌、*Citrobacter freundii*，*Enterobacter aerogenes*，*E.cloacae* ，*Klebsiella pneumoniae*，一般棲息在人和動物的腸道中，可存於土壤、植物和多種食品中。這些細菌大部分並不會引起疾病，其可表示食品可能由於加工不適、設備清洗不完全、生熟食交叉汙染或儲存不當而受糞便污染。大腸桿菌群 1000 MPN/g 為食品衛生標準。本試驗紫蘇與薑黃樣品僅薑黃樣品經過清洗，且為避免樣品成分遭受破壞，係採用 50℃低溫乾燥而成，未經高溫殺菌因此樣品含菌量稍高。而中藥材使用多需經過煎煮，因此不會有使用之安全疑慮與問題。後續相關中藥材研究或檢驗，可針對此一項目進一步試驗出改善辦法。

黃麴毒素檢驗結果顯示，本研究試驗生產之臺灣紫蘇與薑黃藥材符合藥事法所規定黃麴毒素 15ppb 限量規定。紫蘇與薑黃藥材均未檢出黃麴毒素。

重金屬檢驗結果顯示，本研究試驗所生產之臺灣薑黃藥材符合衛生署規定中藥材重金屬限量標準。而紫蘇葉藥材之銅含量較高為 21.4ppm，詳細原因需更進一步分析與探討。

依據以上紫蘇與薑黃藥材之檢驗分析結果顯示，本研究所建立之紫蘇與薑黃有機與 GAP 栽培模式，可以於臺灣量產品質優良與安全之有機紫蘇與薑黃中藥材。

六、紫蘇與薑黃有機栽培及優良農業操作模式之建立

七、紫蘇與薑黃有機及 GAP 栽培觀摩會

(一)觀摩會規劃與議程

根據世界衛生組織統計，全球每年約有一千六百五十萬人死於心血管疾病，而近年來心血管疾病(CAD)已經成為臺灣十大死因之

第二位，僅次於癌症。高血壓、高血脂、糖尿病、吸煙、肥胖、忙碌的生活、飲食習慣西化，使得現代人血管壁容易堆積血脂，造成動脈粥狀硬化。冠狀動脈狹窄或阻塞引發急性心肌梗塞，且往往可能在數分鐘內致命，心血管疾病威脅性不容小覷。

許多研究證實紫蘇與薑黃為心血管疾病與婦科之重要中藥材，具有活血行氣之效，極具中醫藥與生技產業之發展應用價值。但我國每年進口高達四萬公噸中藥材，來自中國藥材約佔總進口量的77%。惟產自中國的中草藥原料常因含有禁用農藥、過量重金屬、硫磺燻蒸與黃麴毒素等問題，造成國人的疑慮。因此，於臺灣在地生產優質、安全之有機中藥原料，或退而求其次，發展中藥GAP栽培模式，將有其獨特之全球市場價值，並為臺灣中藥廠提供優質安全中藥原料，確保國人服用中草藥之安全與健康。

行政院衛生署中醫藥委員會委託明道大學辦理「紫蘇與薑黃有機GAP栽培觀摩研討會」，於101年9月1日上午8:30起至中午12:00，於明道大學伯苓大樓5樓良知堂舉行。會中邀請中醫藥委員會黃林煌主委演講「臺灣中藥市場概況與展望」，必安研究所莊武璋博士講解「中藥廠GAP藥材之源頭管理與採購」，並由明道大學陳世雄校長發表「紫蘇與薑黃有機GAP栽培研究成果」。會後由博士生助理謝瑞裕引導參觀紫蘇與薑黃有機GAP栽培示範田，及數十種具發展潛力之珍貴中藥基原植物，包括霍山石斛、川芎、丹參、北柴胡、半夏、板藍根、地黃、魚腥草、夏枯草、清華桂、黃精、羅漢果..等。

紫蘇與薑黃有機及 GAP 栽培觀摩研討會

主辦單位：行政院衛生署中醫藥委員會
承辦單位：明道大學
協辦單位：臺灣有機產業促進協會
　　明道大學精緻農業學系
日　　期：民國一〇一年九月一日（星期六）
地　　點：明道大學伯苓大樓 5 樓良知堂
報名日期：即日起～101 年 8 月 17 日（星期五）

研討會議程

時　間	內　容	主講者
08：30～09：00	報 到	
09：00～09：10	開幕致詞	
09：10～09：40	臺灣中藥市場概況與展望	中醫藥委員會 黃林煌主委
09：40～10：10	臺灣中藥有機 GAP 栽培	明道大學 陳世雄校長
10：10～10：30	茶敘	
10：30～11：20	中藥材採購與品管	必安研究所 莊武璋副所長
11：20～11：50	綜合座談	陳世雄校長
11：50~12：10	參觀紫蘇與薑黃有機及 GAP 栽培試驗田 團體合照	陳世雄校長
	散會/賦歸	

(二)觀摩會執行情況與新聞稿

行政院衛生署中醫藥委員會長期致力於推動中草藥用藥安全及照顧國人健康，並補助學者進行中草藥研究。有鑒於薑黃、莪朮、金絲鬱金、板藍根、半夏與柴胡等珍貴中藥材，具有抗癌、抗氧化、保肝、提升免疫力與改善心血管疾病等廣泛的生物活性。多年來中醫藥委員會委託明道大學精緻農業學系陳世雄講座教授進行臺灣

中藥有機與GAP栽培研究。已成功建立中藥材有機栽培與優良農業操作規範（GAP）模式。

明道大學於101年9月1日召開「臺灣紫蘇與薑黃之有機及GAP栽培觀摩研討會」，陳世雄校長與其指導之中興大學農藝學系謝瑞裕博士生，公開發表近年來成功開發薑黃、莪朮、金絲鬱金、板藍根、半夏、柴胡、馬藍、香椿與紫蘇等珍貴中藥材有機栽培與GAP模式，可望於臺灣生產栽培珍貴有機中藥材。相關技術及品系目前已開始申請專利，並辦理技術轉移，預估每年可為臺灣帶來產值超過10億元有機中藥材市場。

臺灣紫蘇與薑黃之有機及GAP栽培觀摩研討會，除邀請邀請中醫藥委員會黃林煌主委演講「臺灣中藥市場概況與展望」，必安研究所 莊武璋 博士講解「中藥材採購與品管」，並由明道大學陳世雄校長發表「紫蘇與薑黃之有機及GAP栽培研究成果」。會後由博士生助理謝瑞裕引導參觀紫蘇與薑黃有機及GAP栽培示範田，及數十種具發展潛力之珍貴中藥基原植物，包括霍山石斛、川芎、丹參、北柴胡、半夏、板藍根、地黃、魚腥草、夏枯草、清華桂、黃精、羅漢果…等植物。

此次中醫藥委員會委託明道大學辦理「臺灣紫蘇與薑黃之有機及GAP栽培觀摩研討會」，報名太過踴躍，只得提前結束報名，許多後來者向隅。當天有多達350多位產官學各界中藥材從業人員齊聚參與盛會，彼此交流相關中藥材栽培生產技術。行政院衛生署中醫藥委員會黃林煌主委除親臨發表演講，更鼓勵相關中藥材從業人員，期許大家一起為臺灣中藥產業來努力！

觀摩會問題綜合討論

Q1：兩品系薑黃皆有種植，目前尚未碰到病蟲害，希望可以大量種植，並得到指導。因為不知道大量種植會碰到怎樣的情況，希望專家能把會碰到的問題先告訴我們。另外則是兩年生和一年生的品質、功效差別在？

A1：如果需要謝瑞裕博士幫忙看一下是沒什麼問題的。目前協會已經在推廣出一個薑黃協會，進而產銷，並和廠商合作，改變國人的飲食習慣。將建立一平台，讓大家互相參考，並技術轉移。

Q2：農民將這些紫蘇、薑黃或藥草量產後，協會有無辦法輔導農民，配合

順天堂或其他的大藥廠來銷售，如果種出來沒有銷售、利潤，則為可惜。

A2：第一探討的就是「臺灣到底能否種藥材」，產銷不適合，會產生問題，得到利益的非農民。薑黃用在藥品來說並不多，好的品系可以用在其他地方，舉例而言，現在價目品系也是一大問題，種薑黃的情況大家都知道，中國大陸沒有農藥的薑黃在雲南一帶，臺灣的工作部份，九月底才有日本大藥廠來察視臺灣的薑黃田，薑黃在日本其實蠻多的，藉此機會向日本介紹臺灣薑黃可食用，澳洲地區也相當重視，如何取得沒有農藥的薑黃，是必須盡力做的工作。

Q3：大家依舊很在意栽培的速度，影響藥用品質的好壞，如何的思維對作物的成長，不是最多而是最好的品質，但是成本也是一大問題。藥用植物栽培的重要，希望農委會多加強，臺灣的農藝多一些可以栽培的植物。

A3：將來在辦理中醫藥人才培育的企劃時，請各位上官網參考相關辦法。

Q4：在座的農友，種出來的東西要如何銷售，法規上是否允許做銷售，如果銷售則會不會有觸法的問題，在法規上是不容許藥食同源的，如果不協調的結果則是，大家大量種植，卻銷售不出去，要留著自己食用?

A4：基本上當作食品來販售，中醫藥委員會不太會管的。今天請廚師來設計菜單，開發中藥新料理產品，就是為了改變消費者的習慣。不應該用人工的色素添加在食物裡頭，人不應該吃一大堆化學藥品，假設說我們自己可以生產足夠的薑黃，添加在咖哩裡，再兩三倍，甚至十倍的農民來生產都不是問題，將來生產的薑黃還可外銷，如若各位有興趣將來可建立一平台讓大家交流。錯誤的休耕政策，每年花兩、三百億，讓百分之二十的農地休耕，導致糧食自給率降到百分之三十，其他百分之七十的糧食從外國進口如此飄洋過海來台，教育部的節能省碳若能推到全國，讓國內自產糧食，省下運輸的能源費用，方為上策，所以需要大家的共識來影響政府，影響消費者。如黃色四號的色來源，正是現在我方必須推動的薑黃所需，如糖尿病患者在冬天時食用薑黃，手腳冰冷獲得改善。

Q5：現在種的這些東西有可能會分成三個種類，第一食品，第二藥品，第

三化妝品，現在薑黃則是若非屬食品則是歸類為藥品，薑黃進口零關稅，若在場農民都要求技轉，產量過多，農民如何競爭，不能一直做，而是必須想一想，生產的目標，必須先規劃好後路，今天缺乏一個平台，若此平台有四種語言，讓大家在此平台上做交易，如果要走中藥的路線，是賺不到錢。

肆、結論與建議

一、紫蘇*Perilla frutescens*經由植物組織切片與TLC鑑定為紫蘇正品基原，並含有高量產量與迷迭香酸及紫蘇醛成分。因此評估紫蘇為適宜生產蘇葉與蘇梗之品系。

二、薑黃：橙黃種薑黃其薑黃素含量為 58.10 mg/g，其鬱金薑黃素含量為 3.95 mg/g。而鮮黃種薑黃其薑黃素含量為 7.25 mg/g，其鬱金未檢出薑黃素含量。橙黃種薑黃其薑黃素含量為 8 個種原中最高，薑黃素含量為鮮黃種的 8 倍、莪术的 138 倍，其薑黃素更為市售薑黃藥材的 1.62 倍，其鬱金薑黃素含量為市售鬱金的 14.6 倍。故薑黃橙黃種為值得進行栽培與推廣種植之藥用薑黃品系，鮮黃種為適合做為食用薑黃之品系。蓬莪术、日本紫鬱金與溫鬱金根莖產量高，另外生長有高產量塊根，可做為生產莪术與綠絲鬱金之品系。

三、以牛糞堆肥 4,000 Kg/ha 與 8,000 Kg/ha 處理之紫蘇生長產量最高，乾紫蘇葉產量分別為 3,839 Kg/ha 與 3,748 Kg/ha，乾紫蘇梗產量分別為 15,425 Kg/ha 與 15,057 Kg/ha。以化學肥處理之產量最低。但紫蘇醛含量會隨有機肥料施用量之提高紫蘇醛含量逐漸降低，其中以牛糞堆肥 2,000 Kg/ha 處理之紫蘇葉片紫蘇醛含量最高為 1.85 mg/g。以牛糞堆肥 8,000 Kg/ha 處理之紫蘇醛含量最低為 1.11 mg/g。故紫蘇栽培宜施用腐熟堆肥，以有機肥施用量 2,000~4,000Kg/ha 為最佳，可獲得高產量之紫蘇葉與成分含量。

四、增加薑黃種植根莖重量可提升其產量，若單株種植 4~5 個第 3 分生子莖亦可獲得高產，因此薑黃種植時，宜種植重量較高之種莖或提升單株種莖重量，以提升薑黃產量，種植種莖產量依序為母莖＞第一分生子莖＞第二分生子莖。二年生橙黃種(A2Y)與鮮黃種(B2Y)產量分別為 1 年生橙黃種（AS1）與鮮黃種(BS1)薑黃產量的 2.27 與 3.3 倍，因此建議薑黃一年種植採收模式，亦可調整為二年採收，以降低生產成本提高產量。

五、有機肥施用可以提升薑黃產量，4000~8000Kg/ha 有機肥施用量可以獲得較高薑黃產量。薑黃種植時施用有機肥料可以提升薑黃產量，但需注意有機肥施用方式與施用量，以避免雞母蟲危害。

六、薑科作物栽培常受連作障礙所困擾，薑黃有機栽培連作產量並沒有減少，反而因為肥力的累積，造成產量上升。因此建議，薑黃可以採用

有機連作栽培其有機肥建議施用量為 6,000 ~8000Kg/ha。

七、臺灣紫蘇與薑黃之有機及 GAP 栽培觀摩研討會中許多學員表示希望相關學術研究單位，可多舉辦相關中藥有機栽培技術研討會或訓練班，以提升臺灣中藥材產業能量！並希望相關部會協助建立中藥行銷通路或平台，協助藥農進行中藥材與產品銷售，以促進臺灣農業之轉型與多元化發展。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP100-RD-101 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. 中華民國行政院農業委員會。2003。有機農業法規。行政院農業委員會。臺灣。台北。pp.1。
2. 中華民國衛生署中醫藥委員會。1999。中藥材品質管制組織型態學鑑定。行政院衛生署中醫藥委員會。臺灣。台北。pp. 1-2、63-64、101-102、281-282。
3. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2002。臺灣原住民藥用植物彙編。行政院衛生署中醫藥委員會。臺灣。台北。pp. 330-332。
4. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2004。臺灣中醫藥防治 SARS 關鍵成果報告彙編(一)。行政院衛生署中醫藥委員會。臺灣。台北。pp.205-211。
5. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2004。中華中藥典。行政院衛生署中醫藥委員會。臺灣。台北。pp. 157-189。
6. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2004。易混淆及誤用藥材之鑑別(Ⅱ)。行政院衛生署中醫藥委員會。臺灣。台北。pp. 276-282。
7. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2009。中草藥產業年鑑 2009。行政院衛生署中醫藥委員會。臺灣。台北。pp.7~18、77~96。
8. 王家葵、王佳黎、賈君君。2007。中藥材品系沿革及道地性。中國醫藥科技出版。北京。pp.10-232。
9. 安徽中醫學院。2009。亳州藥用植物資源與栽培加工。安徽大學出版社。pp.1~266。
10. 余懋群。2006。藥用植物資源評價及品系選育。中國醫藥科技出版。北京。pp.3-324。
11. 吳銳、梁勇。2007。中藥材 GAP 管理系統與軟件開發。中國醫藥科技出版。北京。pp.1-267。
12. 邱年永。1973。藥用植物栽培法，大學圖書出版社。台北。pp.261-263、435-439。
13. 邱善美、劉慧瑛、朱戩良。1993a。薑黃之生長與發育 Ⅰ.根莖之形成及各次位分生子莖之成分分析。中華農業研究 42：154-161。
14. 邱善美、呂秀英、劉慧瑛。1993b。薑黃之生長與發育 Ⅱ.氮鉀肥用量對薑黃生育、產量及品質之影響。中華農業研究 42：370-379。
15. 邱勝雄。2008。紫蘇不不同品質種及生長季節之抗氧化能力與酚類物質的探討，國立屏東科技大學農園生產系。

16. 林依霈。2009。紫錐菊花藥及小孢子培養與根尖染色體鏡檢之研究，國立中興大學農藝系研究所。
17. 胡敏夫、邱善美、劉慧瑛、賴明信、劉新裕。1996。植期與密度對薑黃產量與薑黃素含量之影響。中華農業研究 45：164-173。
18. 胡敏夫、蔡淑珍、張愛華、劉新裕。2003。施用雞糞堆肥配合化學肥料對薑黃產量及品質之影響。中華農業研究 52：334-340。
19. 高木敬次郎。1992。和漢藥物學，國立中國醫藥研究所。台北。pp.231-232、243-246。
20. 秦玲、張簡懿芬、陳榮斌、黃成禹、林哲輝。2006。中藥材中黃麴毒素污染之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報。24 : 143-150。
21. 童承福、何玉玲、蔡輝彥、張永勳。1999。臺灣市售易誤用、混用中藥品系之調查，中國醫藥學院雜誌。台中；8 (1)：35-46。
22. 國際中醫藥學會。2005。中藥顯微鑑別圖鑑，遼寧科學技術出版社。中國瀋陽。pp.144-316。陳康、李敏。2006。中藥材種植技術。中國醫藥科技出版。北京。pp.1-437。
23. 陳世雄、謝瑞裕，2007，板藍根與中草藥的好農業，科學發展月刊：26-35。
24. 黃璐琦、郭蘭萍。2007。中藥資源生態學研究，上海世紀出版股份有限公司。中國上海。pp.1-226。黃璐琦、王永炎。2008。藥用植物種質資源研究，上海世紀出版股份有限公司。中國上海。pp.1-309。
25. 張德慈。1997。植物遺傳資源-未來植物生產的關鍵。臺灣省農業試驗所。台中霧峰。pp.1-98。
26. 秦玲、張簡懿芬、陳榮斌、黃成禹、林哲輝。2006。中藥材中黃麴毒素污染之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報。24 : 143-150。
27. 許博文。2002。藥用植物動物之栽培與飼養，九州圖書文物有限公司。台北。pp.16-449。
28. 許詩穎。2005。氮肥及栽培密度對馬藍產量與生物活性之影響，國立中興大學農藝系研究所。
29. 楊惠雯。2007。滲調處理對紫蘇種子發芽之探討，國立屏東科技大學農園生產系。
30. 蔡淑華。1975。植物組織切片技術綱要，茂昌圖書有限公司。台北。pp.30-46。
31. 麼厲、程惠珍、楊智。2006。中藥材規範化種植（養殖）技術指南。中

國農業出版社。中國北京。pp.1~1521。
32. 劉明哲。1988。藥用植物栽培技術，五洲出版社。台北。pp.1-347。
33. 劉新裕、林俊義、張成國。2002。藥用植物專輯，行政院農委會農業試驗所。台中。pp. 1-218。
34. 劉芃孜。2004。臺灣栽培蒙古黃耆（Astragalus mongholicus）與多序岩黃耆(Hedysarum polybotrys)之鑑別研究,國立中興大學農藝系研究所。
35. 劉新裕、林俊義、林宜信、謝伯舟。2005 藥用植物資源之開發與利用，行政院農委會農業試驗所。台中。pp.3-8、428-431。
36. 謝明村。1988。中國藥材學。正中書局股份有限公司。台北。pp.3-434。
37. 謝瑞裕。2005。菘藍之引種與 GAP 模式之研究，國立中興大學農藝系研究所。
38. 謝瑞裕、陳世雄、林宜信。2006。菘藍之引種與 GAP 模式之研究。中華農藝學會 95 年年會論文宣讀研討會，臺中。
39. Antonios S. Mellidis and Vassilios P. Papageorgiou., 1987, Lipids from Roots of Onosma Heterophylla. Phytochemistry. 26（3）：842-843。
40. Akamine, H., M. A. Hossain, Y. Ishimine, K. Yogi, K. Motomura, Y. Iraha and Y. Aniya. 2007. Effects of application of N, P and K alone or in combination on growth, yield and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa* L.). Plant Prod. Sci. 10:151-154.
41. Bo-Yang Yu, Yasuaki Hirai, Junzo Shoji, and Guo-jun Xu, 1990. Comparative Studies on the Constituents of Ophiopogonis tuber and Its Congeners. Ⅵ. Studies on the Constituents of the Subterranean Part of Liriope spicata var. prolifera and L. muscari. Chem Pharm Bull, 38 (7), 1931-1935.
42. Bodyl, A. 1999. Evolutionary pathway of the apicomplexan plastids and its implications. Microbiology 7:266-267.
43. Delwche. C.F. and J.D. Palmer. 1996. Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco gene in eubacteria and plastids. Mol. Biol. Evol. 13:873-882.
44. Fang XC., Yu BY, Xiang BR, and An DK., 1990. Application of pyrolysis-high-resolution gaschromatography-pattern recognition to the idntification of the Chinese traditional medicine Mai Dong. Journal of Chromatography. 514 (2), 287-92。

45. Ge, S., A. Li, B.R. Lu, S.Z. Zhang and D.Y. Hong. 2002. A phylogeny of the rice *Oryzeae* (Poaceae) based on *mat*K sequence data. Am. J. Bot. 89:1967-1972.
46. Green,C. E., S. L. Hibbert,Y. A. Bailey-Shaw, L. A. D. Williams,S. Mitchell and E. Garraway. 2008. Extraction, processing, and storage effects on curcuminoids and oleoresin yields from *Curcuma longa* L. grown in Jamaica. J. Agric. Food Chem. 56: 3664-3670.
47. Gernandt, D.S., A. Liston and D. Piñero. 2003. Phylogenetics of *Pinus* subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* inferred from cpDNA sequences. Systematic Bot. 28: 657-673.
48. Hossain, M. A., Y. Ishimine, H. Akamine and K. Motomura. 2005a. Effects of seed rhizome size on growth and yield of turmeric (*Curcuma longa* L.). Plant Prod. Sci. 8 : 86-94.
49. Hossain, M. A., Y. Ishimine, K. Motomura and H. Akamine. 2005b. Effects of planting pattern and planting distance on growth and yield of turmeric (*Curcuma longa* L.). Plant Prod. Sci. 8 : 95-105.
50. Hossain, M. A and Y. Ishimine. 2005c. Growth, yield and quality of turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivated on dark-red soil, gray soil and red soil in Okinawa, Japan. Plant Prod. Sci. 8 : 482 -486.
51. Hossain, M. A and Y. Ishimine. 2007. Effects of farmyard manure on growth and yield of turmeric (*Curcuma long* L.) cultivated in dark-red soil, red soil and gray soil in okinawa, japan.Plant Prod. Sci. 10:146-150.
52. Hossain, M. A., H. Akamine, Y. Ishimine, R. Teruya, Y. Aniya and K. Yamawaki. 2009. Effects of relative light intensity on the growth, yield and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. Plant Prod. Sci. 12:29-36.
53. Hossain, M. A. 2010. Effects of harvest time on shoot biomass and yield of turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. Plant Prod. Sci. 13: 97-103.
54. Ishimine, Y., M. A. Hossain, K. Motomura, H. Akamine and T. Hirayama. 2004. Effects of planting date on emergence, growth and yield of turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa Prefecture, Southern Japan. Jpn. J. Trop. Agr. 48:10-16.

55. Kandiannani, K and K. K. Chandaragir. 2006. Influence of varieties, dates of planting, spacing and nitrogen levies on growth, yield and quality of turmeric (*Curcuma longa*). *Indian J. Agri. Sci.s* 76: 432-434.
56. Li, R., C. Xiang, M. Ye, H. F. Li, X. Zhang and D. A. Guo. 2011. Qualitative and quantitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from *Curcuma* species. Food Chem. 126：1890-1895.
57. Nalawade S. M. and H. S. Tsay. 2004. In vitro propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage. In vitro cell. Dept. Biol.-Plant 40:143-154.
58. Nalawade S. M., A. P. Sagare, C. Y. Lee, C. L. Kao and H. S. Tsay. 2003. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. Bot. Bull. Acad. Sin. 45:143-147.
59. Paramasivam, M., R. Poi, H. Banerjee and A. Bandyopadhyay. 2009. High-performance thin layer chromatographic method for quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma longa* germplasm. Food Chem. 113:640-644.
60. Takayuki. A., Tetsuya M, Yasuaki H, and Junzo S., 1993. Comparative Stsdies on Constituents of Ophiopogonis Tuber and Its Congegers. VII. Studies on the Homoisoflavonoids of the Subterranean Part of Ophiopogon japonicus KER-GAWLER cv. Nanus.(1).Chem. Pharm. Bull. 41(2), 391-3.
61. Takayuki. A., Tessuya M.，Yasuaki H. and Junzo S., 1993. Comparative Stsdies on Constituents of Ophiopogonis Tuber and Its Congegers. VIII. Studies on the Glycosides of the SubterraneanPart of Ophiopogon japonicus KER-GAWLER cv. Nanus.（2）.Chem. Pharm. Bull. 41（3）,566-70.
62. Xiang, Q.Y., D.E. Soltis and P.S. Solits. 1998. Phylogenetic relationships of Cornaceae and close relatives inferred from *mat*K and *rbc*L sequences. Am. J. Bot. 85: 285-297.

編號：CCMP100-RD-105

痤瘡外用方劑之應用開發(2-2)

王靜瓊
臺北醫學大學

摘　要

研究目的：

本研究以痤瘡為主題，建置中醫藥的實證醫學方法，根據第一年之抗痘相關基礎實驗，篩選出安全有效治療痤瘡之方劑-溫清飲，繼而開發成為抗痤瘡產品-溫清飲凝膠，使中藥方劑之應用更為廣泛並提高其經濟價值。

研究方法：

利用建立之痤瘡療效之篩選平台及痤瘡桿菌誘導大鼠耳朵痤瘡發炎反應動物模式等實驗方法，評估溫清飲之萃取物及凝膠之抗痤瘡活性。再以 HPLC 分析溫清飲萃取液及凝膠中 berberine 及 paeonflorin 成分之含量及移行率，作為未來產品之品質管制標準。再利用體外細胞毒性試驗、動物皮膚毒性評估方法，檢測產品之生物相容性。

結果與討論：

檢測溫清飲中 geniposide、baicalein、berberine、ferulic acid 和 paeoniflorin 之成分抗菌效果，其中以 berberine 抗痤瘡桿菌能力最強，次之為 paeoniflorin，因此以此作為活性指標成分。以 50%酒精萃取之溫清飲浸膏，20%浸膏混入三仙膠中製成凝膠，其具最顯著抑制大鼠耳朵發炎腫脹的情形，且經生物相容性試驗，該處方不會對大鼠皮膚產生紅腫或過敏之刺激性。因此推測本計劃開發之含 20%溫清飲浸膏之凝膠，具有抗痤瘡之功能且不具皮膚刺激性，未來可以進一步進入臨床試驗，評估溫清飲之新用藥途徑。

關鍵詞：外用方劑、痤瘡、溫清飲

Number: CCMP100-RD-105

Chinese Prescriptions for External Application in Acne (2-2)

Ching-Chiung Wang
Taipei Medical University

ABSTRACT

Aims:

Uen-Ching-Yiin, which is a traditional Chinese medicine of heat clearing formula, has been used for acne, eczema, psoriasis, disorder of sweat glands, menopause-syndrome, neurological symptoms and others by oral administration. The aim of study was to develop Uen-Ching-Yiin application in anti-acne cosmetics.

Methods:

Uen-Ching-Yiin was extracted with 50% ethanol and boiling water. The two extracts of Uen-Ching-Yiin were evaluated by *in vitro* anti-*Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) assay, *P. acnes*-induced RAW 264.7 cell and rat ear inflammation assay. In toxic assay, skin irritation of Uen-Ching-Yiin was analyzed on rat.

Results & Discussion:

The results showed the water and 50% ethanol extracts were not significantly difference in anti-*P.acnes* effects. However, NO inhibition effects of 50% ethanol extract was significantly stronger than water extract in *P.acnes* induced RAW 264.7 cells. Furthermore, 50% ethanol extract of Uen-Ching-Yiin could suppress *P.acnes*-induced ear inflammation and did not induced skin irritation. The above results showed that the 50% ethanol extract of Uen-Ching-Yiin could has great potential to be the anti-acnes contain in the cosmetics. In this study, we firstly found Uen-Ching-Yiin could be used as a topical ointment for acne, not only effective by oral administration. We provided the Uen-Ching-Yiin in new clinical practical method.

Keywords: External TCM prescription, acne, Uen-Ching-Yiin

壹、前言

近日中藥新用途及新劑型相繼開發，在化粧品的領域中，最常使用於美白、抗痘及抗老化等用途，而臨床上則是以青春期時之痤瘡治療應用最廣，因此本研究將選定抗痤瘡之外用方劑作為本研究之主題。中藥外用的優點很多，總括有：療效迅速、安全、副作用少、對胃腸道無損傷、對肝腎刺激小、操作簡便取材容易。

目前市面上有許多中藥抗痘之清潔產品，但其有效性與毒性，往往需要一連串的動物試驗檢測，測試完成後才可以上市販賣。但用在消費者的身上，除無過敏性外，用途仍屬有限。本研究將利用中醫藥之經驗醫學的優勢，以現代實證醫學之評質分析、健保資料庫痤瘡用藥探勘及相關資料庫文獻搜尋，統整後建製『**痤瘡外用方劑之實證醫學評估平台**』，再利用此平台尋找出具抗痤瘡潛力之中藥方劑。

經由第一年研究計畫中建立之『痤瘡療效之篩選平台』及『痤瘡外用方劑之實證醫學評估平台』，交集篩選出具有良好抗菌及抗發炎效果之中藥方劑－**溫清飲**。溫清飲由黃連解毒湯及四物湯所組成，同時具有清熱解毒與活血化瘀之療效，目前於臨床上經常口服治療皮膚發炎之相關疾病。本計劃之第二年，將開發此方劑為外用凝膠，應用於痤瘡之病症。

首先探討最佳溶媒萃取條件：水或 50%酒精萃取溫清飲，比較抗菌及抗發炎之療效，經實驗結果顯示 50%酒精萃取之溫清飲具有較好之抗菌及抗發炎活性，因此本研究委託 GMP 製藥廠以 50%酒精萃取溫清飲浸膏，再經由本實驗室冷凍乾燥成粉末後，進行 HPLC 指標成分之分析及抗痤瘡活性之動物實驗，發現 30%之溫清飲親水軟膏具有良好之抗痤瘡療效，並且不具動物皮膚刺激性。確認溫清飲具有開發成為抗痤瘡凝膠之潛力後，委託某生醫科技有限公司製作 10%和 20%之溫清飲凝膠產品，進行產品之抗痤瘡動物試驗、皮膚毒性試驗及品質規範檢測，確認產品之有效性及安全性，期待未來繼續進行臨床試驗，驗證溫清飲外用凝膠在人體上也能達到良好之抗痤瘡效果。

貳、材料與方法

一、實驗材料

(一)中藥材料：

第二年之研究計畫使用之中藥方劑：清上防風湯(荊芥、黃連、薄荷、枳殼、甘草、梔子、黃芩、川芎、連翹、防風、白芷、桔梗)、黃連解毒湯(黃連、黃芩、黃柏、梔子)及溫清飲(黃連、黃芩、黃柏、梔子、當歸、川芎、白芍、熟地黃)，其配方組成依照中醫藥委員會之規定，購於台北市中藥行。

(二)化學試劑：

1. Acetonitrile (HPLC grade, Merck, Germany)
2. Acetone (Merck, Germany)
3. Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Germany)
4. Ethanol (Merck, Germany)
5. Isopropanol (Merck, Germany)
6. Methanol (HPLC grade, Merck, Germany)
7. Sodium Bicarbonate (Merck, Germany)
8. Trifluoroacetic acid (HPLC grade, Merck, Germany)

(三)化學試藥：

1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT, Sigma, USA)
2. Baicalein (Nacalai Tesque, Japan)
3. Berberine (Sigma, USA)
4. Catapol (Nacalai Tesque, Japan)
5. Clindamycin (Sigma, USA)
6. Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM, Gibco, UK)
7. Fetal Bovine Serum (Gibco, USA)
8. Ferulic acid (Sigma, USA)
9. Geniposide (Nacalai Tesque, Japan)
10. L-Glutamine (Gibco, USA)
11. *N*,*N*,*N’*,*N’*-tetraethylenediamine (Sigma, USA)
12. Paeoniflorin (Nacalai Tesque, Japan)
13. Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA)

14. Tryptic soy broth (TSB) (Difco, Sparks, MD, USA)
15. Tryptic soy agar (TSA) (Difco, Sparks, MD, USA)
16. Trypan blue (Sigma, USA)

二、最適中藥方劑萃取方法

(一)中藥方劑之製備

1. 熱水萃取：

將清上防風湯、黃連解毒湯或溫清飲之藥材剪碎後，加入 20 倍量二次去離子水，以啞巴媳婦加熱一小時以上，煎煮至煎煮液為原加入水之一半量之湯液，再用雙層紗布過濾，濾液濃縮後，進行冷凍乾燥得其粉末備用。

2. 50%酒精萃取：

將清上防風湯、黃連解毒湯或溫清飲之藥材剪碎後，加入 10 倍量 50%酒精於 60 ℃下進行回流萃取，萃取兩小時後，再加入 10 倍量 50%酒精回流萃取兩小時，萃取完畢後以雙層紗布過濾萃取液，將濾液濃縮後，進行冷凍乾燥得其粉末備用。

(二)抑制痤瘡桿菌生長之活性：

1. 試驗藥材：

以水或 50%酒精萃取之清上防風湯、黃連解毒湯及溫清飲。

2. 試驗菌株：

本實驗所用之菌株為痤瘡桿菌(*Propionibacterium acnes*, ATCC 6919)購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

3. 試驗方法：瓊脂井化擴散試驗(Agar Well Diffusion Test)

將 40 g tryptic soy agar (TSA)溶於 1 L 之二次去離子水後攪拌均勻，以血清瓶分裝置於高壓滅菌鍋中以溫度 121 ℃，壓力 1.2 kg/cm^2 下滅菌一小時，利用 tryptic soy broth (TSB)將痤瘡桿菌調整成 McFarland 4 濁度標準 (1.2×10^9 CFU/mL)，再以 1:9(菌液：TSA)比率製備出 *P. acnes* 培養液，於尚未凝固時以每 10 mL 分裝於培養皿中，待第一層含菌瓊脂培養基冷卻後，於含菌瓊脂上放置直徑 8 mm 之不銹鋼圓環，再平鋪第二層不含菌之瓊脂使井化之，接著將欲試驗之清上防風湯、黃連解毒湯及溫清飲，換算其劑量用溶媒(10% DMSO)充分溶解後

以體積 50 μL 滴入完成之凹井內，於 37℃恆溫厭氧培養 24 小時，觀察其抑菌圈以評估對痤瘡桿菌的抑菌效能。各試驗藥物依照不同劑量與細菌直接作用，利用抑菌圈評估抗菌活性，本研究將可觀察之最小抑制圈(minimum inhibitory concentration 以下簡稱 MIC)生長之劑量定義為最低有效劑量，每次實驗皆以 clindamycin 紙錠(10 U)作為正對照組，試驗藥物之抑菌圈直徑與 clindamycin 抑菌圈直徑之比值，做為比較抗菌活性之依據。

Ratio % = (實驗組之抑菌圈/clindamycin 之抑菌圈)×100

(三)抑制熱處理痤瘡桿菌(HPA)誘導 RAW 264.7 巨噬細胞之發炎反應：

1. 試驗藥材：

以水或 50%酒精萃取之清上防風湯、黃連解毒湯及溫清飲萃取物。

2. 試驗細胞株：

RAW 264.7 巨噬細胞(ATCC 25923)，購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

3. 試驗方法：

取 200 μL 之 RAW 264.7 巨噬細胞懸浮液(數目 4.0×10^5 cell/mL)植入於 96 孔盤，24 小時後加入清上防風湯、黃連解毒湯或溫清飲萃取物與 HPA 100 μg/mL 培養 18 小時，取出上清液 100 μL 並加入 Griess reagent 100 μL，以 ELISA reader 530 nm 為 NO 之吸光值測試。抑制百分比 (Concentration of Inhibition ，IC %)：IC % = (1－(實驗組之 O.D.值/對照組之 O.D.值))×100。

(四)抑制痤瘡桿菌誘導之大鼠耳朵發炎作用：

試驗動物：6~8 週 Wistar 雄性大鼠共 12 隻

(分為四組：清上防風湯組、黃連解毒湯組、溫清飲組，空白對照組，每組三隻大鼠)

1. 試驗方法：

將痤瘡桿菌以 Phosphate buffered saline (PBS)配製成 1.2×10^{10} CFU/mL 之溶液，施打 20 μL 菌液於大鼠左耳背，使其產生腫脹發炎之情形；而右耳背則注射 20 μL PBS 溶液當作溶劑對照組，確定 PBS 溶液不會對老鼠耳朵產生發炎腫脹的情形。

隔日，以微量卡尺測量大鼠耳朵腫脹發炎的厚度，確認已造成大鼠耳朵腫脹發炎後，再將約含 30%清上防風湯、黃連解毒湯、溫清飲萃取液(50%酒精萃取)或空白溶液塗於大鼠左耳背表面進行治療，連續觀察四~五天，記錄耳朵厚度或腫脹體積之變化。

2. 統計學分析：

實驗結果皆以實驗次數之平均值±標準誤差(mean ± S.D.)表示。根據 Student's *t*- test 作為統計分析，若 $p<0.05$，則表示有意義的差異。

(五)動物皮膚毒性試驗 (參考 ISO10993-10)

1. 動物品種：6~8 週 Wistar 雄性大鼠 5 隻
2. 檢測樣品：
   (1) 治療組：10 mg/mL 清上防風湯、黃連解毒湯或溫清飲萃取液
   (2) 溶劑對照組：10% DMSO 溶液
3. 實驗方法及步驟：

將 Wistar 大鼠於測試前將背部之毛髮剔除。剔毛 24 小時後，先行檢測皮膚是否完整無過敏現象，再將 10 mg/mL 清上防風湯、黃連解毒湯或溫清飲萃取液塗抹於老鼠背上，每處塗抹面積為 2.5 × 2.5 cm^2 之正方形，塗藥時觀察大白鼠是否有異狀，並先測量塗藥前大鼠皮膚的基礎顏色，每種藥物皆進行三重複。待塗藥後 24 和 48 小時拍照及觀察大鼠皮膚是否有紅腫或過敏之現象，並參考 Draize-FHSA scoring System(表一)評估每隻測試動物之皮膚過敏反應程度。紅斑與紅腫的發生頻率與程度可藉由與空白組比較加以評估。

(六)溫清飲萃取物活性指標含量分析

1. 樣品製備：

將 2.5 mg 之溫清飲萃取物溶於 1 mL 50% EtOH，以超音波震盪萃取一小時。取其上清液並利用 0.45 μm 之 syringe filter 過濾後備用。

2. 標準品製備：

取 1 mg 之溫清飲標準品(geniposide, baicalein, berberine, ferulic acid, paeoniflorin)溶於 1 mL MeOH 後備用。

3. Berberine 及 paeoniflorin 之檢量線配置

以 HPLC 級甲醇溶解 berberine 及 paeoniflorin 後，等倍稀釋成 1 mg/mL~0.03125 μg/mL 共 6 個濃度。以標準品為 X 軸，利用 HPLC 分析得到之積分面積值為 Y 軸，計算出線性迴歸方程式。

4. HPLC 分析系統：

(1) Pump system：LC-10AVP liquid chromatography pump system
(2) Injection：SIL-9A auto-injector
(3) Detection：SPD-10A UV-VIS detector
(4) Recorder：C-R8A chromatopac recorder
(5) Oven：CTO-10A column oven
(6) 管柱條件：TSK gel ODS-80 Ts (particle size, 5 μm; 4.6 mm i.d. x 150 mm, Tosoh Co., Tokyo, Japan)。
(7) 移動相條件：

A：0.05% TFA；B：Acetonitrile

0~5 分鐘，A：B = 90：10；5~7 分鐘，A：B = 80：20；7~17 分鐘，A：B = 80：20；17~20 分鐘，A：B = 70：30；20~40 分鐘，A：B = 70：30；40~50 分鐘，A：B = 0：100；50~60 分鐘，A：B = 0：100。

(8) 偵測波長：UV 250 nm
(9) 流速：1 mL/min
(10) 管柱溫度：40℃

5. 分析方法之確效：

(1) 同日內分析：

將溫清飲萃取樣品，利用 HPLC 於同日內重複分析三次，統計出三次結果之平均值及標準差，並計算其變異係數。

(2) 異日內分析：

將溫清飲萃取樣品，利用 HPLC 於三日內重複分析三次，統計出三次結果之平均值及標準差，並計算其變異係數。

三、GMP 藥廠生產之溫清飲浸膏之抗菌效果及品質分析

(一) 溫清飲浸膏製備：

委託 GMP 藥廠以 50%酒精萃取溫清飲之浸膏，確保 GMP 藥廠製造之規格品質。

(二) 溫清飲浸膏之抑制痤瘡桿菌試驗

1. 樣品製備：

將 GMP 製藥廠以 50%酒精萃取之溫清飲浸膏進行冷凍乾燥得其粉末，取 10 mg 溫清飲粉末溶解於 1 mL 10% DMSO 溶液中備用。取 1 mg 溫清飲之標準品(catalpol, geniposide、baicalein、berberine、ferulic acid 和 paeoniflorin)溶解於 1 mL 之甲醇溶液中備用。

2. 抑制痤瘡桿菌試驗評估：培養液稀釋法(Broth Microdilution test)

將痤瘡桿菌以 TSB 溶液調配至 Mcfarland 濁度 4 後，再稀釋 1000 倍種於 96 well 盤中，每個 well 加入 180 μL 菌液，再添加 20 μL 之待測藥物溶液或空白溶劑當作對照組，並且以 1 μL/mL 之 clindamycin 當作正對照組，以上皆做三重複取其平均值。儲存在厭氧箱中於 37℃下培養 36 小時後，在波長 600 nm 之下觀察其 OD 值之變化。

3. 抑制痤瘡桿菌誘導大鼠耳朵痤瘡發炎反應評估

此實驗方法同前

(三) 體外細胞毒性試驗

1. 細胞株：

MRC-5 人類肺纖維細胞(BCRC-60023)，購置財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。培養於 90% Minimum essential medium Modification(MEM) 培養液並外加 4 mM L-glutamine、0.1 mM non-essential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate penicillin-10000 μg/mL streptomycin 及 10 % fetal bovine serum，於 37 ℃含 5 % CO_2 的培養箱中培養。

2. 細胞毒性分析步驟：

將細胞種至 24-well plate 之底層，培養隔夜待細胞生長形成 monolayer，倒掉舊培養液，加入新鮮之培養液及待測物。置於培養箱中 24 小時後，倒掉舊培養液及待測物，以 PBS 清洗細胞後加入 MTT reagent，在 37 ℃下培養 4 小時，使形成紫色結晶；吸掉上清液後再加入含 0.04 N 鹽酸之異丙醇將結晶溶解，最後以 ELISA reader 在波長 570 nm 下測其吸光度 (O.D.

值)。

3. 細胞毒性百分比(Cytotoxicity Index , CI%)：

CI% = {1－(實驗組之 O.D.值/對照組之 O.D.值)}×100

(四) 動物皮膚毒性試驗(參考 ISO10993-10)

1. 動物品種：6~8 週 Wistar 雄性大鼠 5 隻

2. 檢測樣品：

(1)治療組：10%或 30%溫清飲浸膏

(2)空白組：10% DMSO 軟膏

實驗方法及步驟同前

(五) 指標成分規格制定

1. 樣品製備：

將溫清飲浸膏凍乾得其粉末，取 2.5 mg 溶於 1 mL 50% EtOH，以超音波震盪萃取一小時後。取其上清液並利用 0.45 μm 之 syringe filter 過濾後備用。

2. 標準品製備：

取 1 mg 之溫清飲標準品(geniposide, baicalein, berberine, ferulic acid, paeoniflorin)溶於 1 mL MeOH 後備用。

3. HPLC 分析條件

實驗方法及步驟同前

三、溫清飲凝膠配方之抗痤瘡效果及品質分析

(一) 處方之組成與製備

1. 將 GMP 藥廠以 50%酒精萃取之溫清飲浸膏進行冷凍乾燥得其粉末，再將粉末或是浸膏混入 PEG-40 Hydrogenated Castor oil、Dimethicone Crosspolymer、Polyglyceryl-10 Stearate 和 Sclerotium Gum，由於溫清飲易使凝膠之結構瓦解及不安定，難以混進 30%溫清飲凝膠，因此配成 10%或 20%之溫清飲四種凝膠產品。

(二) 抑制痤瘡桿菌誘導大鼠耳朵痤瘡發炎反應評估

(三) 動物皮膚毒性試驗

檢測樣品：

治療組：10%或 20%之溫清飲四種凝膠產品；

空白組：不含溫清飲之空白凝膠。

以上實驗方法同前

(四) 溫清飲凝膠品質規格檢測

1. 凝膠產品之製備：

取 10 mg 之 20%溫清飲凝膠(浸膏)溶於 1 mL 之甲醇溶液，以超音波震盪萃取一小時後，離心取其上清液，以 0.45 μm 濾膜過濾，進行 HPLC 之定量分析。

2. HPLC 分析條件

實驗方法及步驟同前

(五) 安定性試驗：

1. 將溫清飲凝膠儲存於室溫或是 45 ℃之烘箱，並測量 pH 值、黏度及微生物含量等基本數據。
2. 耐熱試驗：將產品放入 45℃之烘箱，72 小時後觀察外觀性狀。
3. 耐寒試驗：將產品放入 4℃之冰箱，72 小時後觀察外觀性狀。
4. 離心試驗：將產品於 1500 轉下離心 30 分鐘，觀察外觀性狀。

四、舉辦『抗痤瘡方劑外用之新劑型及安全性評估』之專家會議

第一次專家會議

目的：針對選定之方劑開發之劑型與組成，及制定之指標成分標準，聘請專家針對本計畫之執行中的困難或成效給予建議。

議題：抗痤瘡外用產品之劑型選擇、新劑型之指標成分選擇及產品添加防腐劑之選擇。

第二次專家會議

目的：針對開發之產品的功效性及安全性評估結果，聘請專家針對本計畫之執行中的困難或成效給予建議。

議題：凝膠產品發展之歸屬、凝膠產品之有效性及安全性

參、結果

一、最適中藥方劑萃取方法：

(一) 中藥方劑對痤瘡桿菌生長之抑制能力：

將清上防風湯、黃連解毒湯及溫清飲以水及 50%酒精萃取，再檢測其抗菌效果，結果如表二所示，水或 50%酒精萃取物對抑菌效果，並無顯著差異，而三個處方以黃連解毒湯與溫清飲效果較強。

(二) 中藥方劑對痤瘡桿菌誘導 RAW 264.7 細胞發炎之抑制作用：

由表三中得知：50%酒精萃取物比水萃物更具抑制發炎反應，其中以黃連解毒湯之作用能力最強，其次為溫清飲。

(三) 中藥方劑對痤瘡桿菌誘導大鼠耳朵發炎之抑制能力：

利用痤瘡桿菌菌液誘導大鼠左耳背發炎之動物模式，檢測 30%清上防風湯、黃連解毒湯及溫清飲(50%酒精萃取物) 塗於大鼠左耳背表面，連續觀察四天，記錄耳朵厚度之變化。結果顯示：溫清飲 50%酒精萃取物具有明顯的抑制作用，其次是黃連解毒湯（如圖一）。

(四) 中藥方劑之動物皮膚毒性試驗結果：

以 10 mg/mL 之清上防風湯、黃連解毒湯和溫清飲之 50%酒精萃取物，塗於大鼠皮膚，48 小時內皆不會產生皮膚刺激性（如圖二），以 Draize-FHSA scoring system 評估無紅腫及浮腫現象，所以刺激值為 0。

(五) 溫清飲萃取物活性指標含量分析：

1. 將溫清飲萃取物以 HPLC 分析其活性指標成分，其指紋圖譜如圖三 A 所示：geniposide 之滯留時間為 14.394 分鐘；paeoniflorin 之滯留時間為 16.468 分鐘；ferulic acid 之滯留時間為 20.166 分鐘；berberine 之滯留時間為 37.412 分鐘；baicalein 之滯留時間為 44.516 分鐘。
2. 分析方法之確效性：

本研究針對同日內差異、異日內差異進行分析方法之確效。如表四所示：Berberine 同日內差異之 RSD 為 1.547%；Berberine 異日內差異之 RSD 為 2.965%，RSD 小於 5%代表此分析方法之一致性及再現性良好。

3. Berberine 之含量：

Berberine 的檢量線如圖四，以內插法進行含量計算，溫清飲中含 27.969 ±0.625 mg/g berberine。

綜合體內、體外之抗菌抗發炎及皮膚刺激性結果，發現以 50% 酒精萃取溫清飲且富含有 berberine 及 paeoniflorin 之萃取物，具有開發之潛力，因此以此作為本次實驗之主要抗痤瘡組成。

二、GMP 藥廠生產之 50%酒精萃取之溫清飲浸膏抗菌效果及品質分析

(一) 溫清飲浸膏抑制痤瘡桿菌之能力：

50%酒精萃取溫清飲浸膏之抗菌效果與正對照組 0.1 μg/mL clindamycin 相比，其 MIC 為 1 mg/mL，IC_{50} 值為 2.32 mg/mL，具有良好之抗菌效果（如表五）。

(二) 指標成分抑制痤瘡桿菌生長之能力：

評估溫清飲浸膏中 catalpol, geniposide、baicalein、berberine、ferulic acid 和 paeoniflorin 之指標成分抗菌效果，發現 berberine 之抑菌能力最強(如表六)。因此以 berberine 當作溫清飲 HPLC 定量之主要活性指標成分。

(三) 溫清飲浸膏對痤瘡桿菌誘導大鼠耳朵發炎之抑制能力：

將溫清飲浸膏，混入親水軟膏中，進行痤瘡桿菌菌液誘導大鼠左耳背發炎之動物模式評估。結果顯示：30% 溫清飲浸膏於第一天即能有效抑制大鼠耳朵腫脹發炎的現象，而 10% 溫清飲浸膏則是在第二天起即能持續明顯地抑制大鼠耳朵腫脹發炎之情形(如圖五)。

(四) 溫清飲浸膏之體外細胞毒性試驗結果：

如表七所示，500 μg/mL 之溫清飲浸膏對 MRC-5 細胞無細胞毒性，細胞之存活率皆大於 90%以上。

(五) 溫清飲浸膏之動物皮膚毒性試驗結果：

由圖六所示，10%或 30%之溫清飲浸膏皆不會對大鼠皮膚產生刺激性，以 Draize-FHSA scoring system 評估無紅腫及浮腫現象，所以刺激值為 0。

(六) 溫清飲浸膏之活性指標含量分析：

將溫清飲浸膏以 HPLC 分析其活性指標成分，其指紋圖譜如圖三 B 所示。其浸膏內含 26.121±0.482 mg/g berberine。

綜合上述顯示 GMP 藥廠協助生產之 50%酒精萃取之溫清飲

浸膏功效與品質，與實驗室萃取之 berberine 相差小於 10%，具有一致性。因此以此原料作為抗痤瘡凝膠之主要活性組成。

三、溫清飲凝膠配方之抗痤瘡及品質評估結果

(一) 溫清飲凝膠之配方組成：

如表八及表九所示：將 GMP 藥廠以 50% EtOH 萃取之溫清飲浸膏或粉末混入 PEG-40 Hydrogenated Castor oil、Dimethicone Crosspolymer、Polyglyceryl-10 Stearate 和 Sclerotium Gum 等乳化劑和增稠劑，配置成 10%~20%之溫清飲四種凝膠產品。

(二) 溫清飲凝膠抑制痤瘡桿菌誘導大鼠耳朵痤瘡發炎之能力：

將 10%和 20%之溫清飲凝膠(粉末或浸膏)，進行抑制大鼠耳朵發炎之療效評估，結果顯示如圖七及圖八，其中以 20%溫清飲凝膠(浸膏)，具有顯著之抗痤瘡活性，其他皆無效果。

(三) 溫清飲凝膠之動物皮膚毒性結果：

連續兩天塗抹以浸膏製成之 10%及 20%之溫清飲凝膠(浸膏)於大鼠之背部皮膚，並未發現任何紅腫或過敏之現象，可以確定溫清飲凝膠之安全性(如圖九)，以 Draize-FHSA scoring system 評估無紅腫及浮腫現象，所以刺激值為 0。

(四) 溫清飲凝膠之 HPLC 指紋圖譜：

如圖五 C 所示，與圖五 A、B 之 HPLC 指紋圖譜相似。

(五) 20%溫清飲凝膠(浸膏)中 berberine 之含量：

將 20%溫清飲凝膠以 HPLC 分析其活性指標成分，其指紋圖譜如圖三 C 所示，且凝膠內含 6.624±0.18 mg/g berberine，證實溫清飲凝膠之品質相當良好。

(六)溫清飲凝膠之安定性試驗結果

結果如表十、表十一和表十二，每個月抽樣檢測一次產品之安定性，經過耐熱、耐寒以及離心試驗後，產品之外觀性狀皆無明顯變化，微生物檢測及黏度檢測也在基準以內，可以確定產品之穩定性良好。

肆、討論

溫清飲是由黃連解毒湯和四物湯所組成，原意為一溫一清，故以溫清為名。黃連解毒湯具有清熱、瀉火、解毒之功效，可用來治療許多發炎性的疾病，於學術論文中常提到它可抑制 iNOS 或 COX-2 的表現，減少發炎介質的產生，具有良好的抗發炎效果，可用來治療痤瘡等皮膚疾病；而四物湯在之前的預實驗中，沒有任何抗菌及抗發炎之效果，但在之前的計畫(CCMP99-RD-058)中發現四物湯可活化 aromatase 使 testosterone 降低，可減少油脂分泌過多而引起痤瘡之情形。另外在過去中的文獻也提到四物湯具有活血化瘀及調解荷爾蒙的功效，而溫清飲同時具備這兩種方劑之優勢，能更有效的治療痤瘡或是皮膚炎等疾病。

經由 HPLC 分析溫清飲萃取物，得知其主要成分為 berberine，比較兩者抑制痤瘡桿菌的能力，經實驗結果發現溫清飲之 MIC 為 0.25 mg/mL；berberine 為 2.5 μg/mL。0.25 mg 之溫清飲萃取物含有 berberine 6.99 μg，而 5 μg/mL 之 berberine 還具有 75.09%抑制痤瘡桿菌的能力，由以上得知單獨使用 berberine 比使用溫清飲更能抑制痤瘡桿菌的生長。然而缺乏 G6PD 酵素之病人會對 berberine 有嚴重性溶血及黃疸之副作用，因此若改用溫清飲即能降低 berberine 所產生之毒性，增加產品的安全性並且提升中藥方劑之經濟價值。

以溫清飲浸膏製作凝膠時，難以混入 30%之溫清飲，因為溫清飲容易使凝膠之結構瓦解以及不安定，因此只能製作 10%和 20%之溫清飲凝膠進行抗痤瘡試驗。

伍、結論與建議

從第一年研究計畫的痤瘡外用方劑之實證醫學評估平台及痤瘡療效之篩選平台，我們選出了最具抗痤瘡潛力的中藥方劑-溫清飲，接著於第二年的研究計畫進行了許多抗痤瘡活性以及生物相容性試驗，確認溫清飲的確具有抗痤瘡療效後，決定將此原料開發成為新產品。本實驗測試了不同濃度及製程方式製作溫清飲凝膠，並且進行產品功效性、毒性及安定性試驗，發現以溫清飲之浸膏調配成 20%溫清飲凝膠最具有抗痤瘡的療效，並且不具有細胞或動物皮膚毒性，而產品本身除了具有安定性以外，在品質管控上也很穩定，期待未來放大製程時一樣能維持相同成效，提高中草藥於產界應用之經濟價值。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP100-RD-105 供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

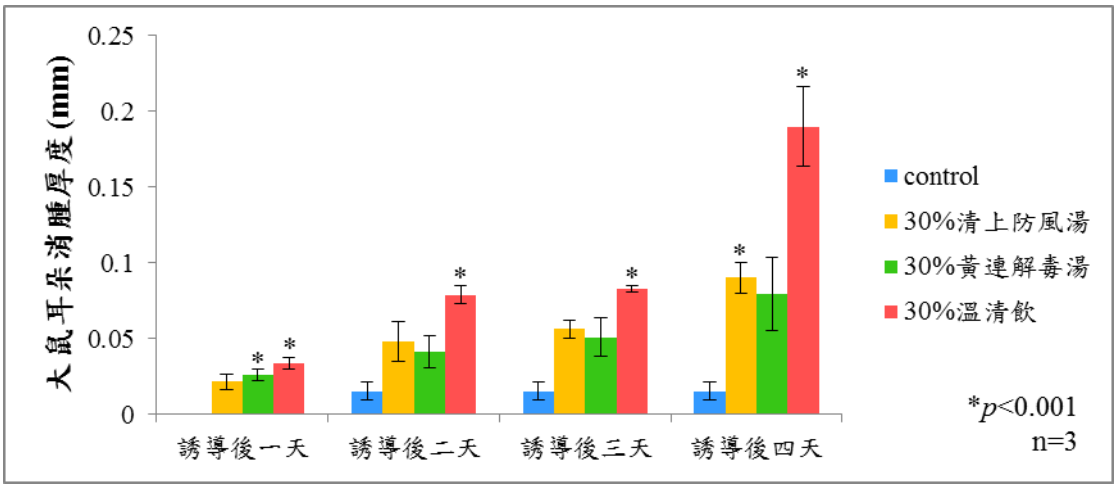
1. Collier CN, Harper JC, Cafardi JA, et al. The prevalence of acne in adults 20 years and older. *J Am Acad Dermatol*, 2008;58:56-9.
2. Gloor M, Reichling J, Wasik B, Holzgang HE. Antiseptic effect of a topical dermatological formulation that contains Hamamelis distillate and urea. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 2002;9:153-9.
3. Deters A, Dauer A, Schnetz E, Fartasch M, Hensel A. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from Hamamelis virginiana bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*, 2001;58:949-58.
4. Prabjone R, Thong-Ngam D, Wisedopas N, Chatsuwan T, Patumraj S. Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* on leukocyte-endothelium interaction in the gastric microcirculation of Helicobacter pylori-infected rats. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006;35:359-66.
5. Vazquez B, Avila G, Segura D, Escalante B. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *J Ethnopharmacol*, 1996;55:69-75.
6. Jain A, Basal E. Inhibition of *Propionibacterium acnes*-induced mediators of inflammation by Indian herbs. *Phytomedicine*, 2003;10:34-8.
7. Ramadan M, Goeters S, Watzer B, et al. Chamazulene carboxylic acid and matricin: a natural profen and its natural prodrug, identified through similarity to synthetic drug substances. *J Nat Prod*, 2006;69:1041-5.
8. Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa H. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines. *J Ethnopharmacol*, 2003;88:175-9.
9. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*, 2000;56:3-12.
10. Moon Y, Lee M, Yang H. Involvement of early growth response gene 1 in the modulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 by epigallocatechin gallate in A549 human pulmonary epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, 2007;73:125-35.

11. Nag Chaudhuri AK, Karmakar S, Roy D, Pal S, Pal M, Sen T. Anti-inflammatory activity of Indian black tea (*Sikkim variety*). *Pharmacol Res*, 2005;51:169-75.
12. Lee JH, Shim JS, Lee JS, et al. Inhibition of pathogenic bacterial adhesion by acidic polysaccharide from green tea (*Camellia sinensis*). *J Agric Food Chem*, 2006;54:8717-23.
13. Bandyopadhyay D, Chatterjee TK, Dasgupta A, Lourduraja J, Dastidar SG. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial action of tea: the commonest beverage of Asia. *Biol Pharm Bull*, 2005;28:2125-7.
14. Chung JH, Han JH, Hwang EJ, et al. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB J*, 2003;17:1913-5.
15. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*, 2001;480-481:243-68.
16. Atsumi T, Tonosaki K. Smelling lavender and rosemary increases free radical scavenging activity and decreases cortisol level in saliva. *Psychiatry Res*, 2007;150:89-96.
17. Sosa S, Altinier G, Politi M, Braca A, Morelli I, Della Loggia R. Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 2005;12:271-7.
18. Darshan S, Doreswamy R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytother Res*, 2004;18:343-57.
19. Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J Ethnopharmacol*, 2003;89:67-71.
20. D'Auria FD, Tecca M, Strippoli V, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against Candida albicans yeast and mycelial form. *Med Mycol*, 2005;43:391-6.
21. Edwards-Jones V, Buck R, Shawcross SG, Dawson MM, Dunn K. The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*, 2004;30:772-7.

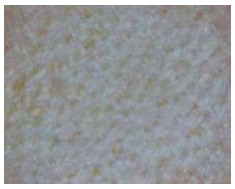
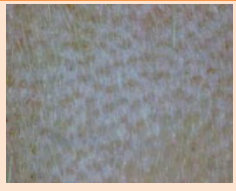
22. Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J Food Prot*, 2004;67:1252-6.
23. Schempp CM, Schopf E, Simon JC. Plant-induced toxic and allergic dermatitis (phytodermatitis). *Hautarzt*, 2002;53:93-7.
24. Kong B, Wang J, Xiong YL. Antimicrobial activity of several herb and spice extracts in culture medium and in vacuum-packaged pork. *J Food Prot*, 2007;70:641-7.
25. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med*, 2006;6:39.
26. al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol*, 1999;37:124-30.
27. Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 2006;77:279-85.
28. Golab M, Skwarlo-Sonta K. Mechanisms involved in the anti-inflammatory action of inhaled tea tree oil in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007;232:420-6.
29. Caldefie-Chezet F, Fusillier C, Jarde T, et al. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytother Res*, 2006;20:364-70.
30. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev*, 2006;19:50-62.
31. Gupta AK, Nicol K, Batra R. Role of antifungal agents in the treatment of seborrheic dermatitis. *Am J Clin Dermatol*, 2004;5:417-22.
32. Caldefie-Chezet F, Guerry M, Chalchat JC, Fusillier C, Vasson MP, Guillot J. Anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radic Res*, 2004;38:805-11.
33. Koh KJ, Pearce AL, Marshman G, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *Br J Dermatol*,

2002;147:1212-7.
34. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res*, 2000;49:619-26.
35. Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother Res*, 2005;19:643-6.
36. Furuhashi I, Iwata S, Shibata S, Sato T, Inoue H. Inhibition by licochalcone A, a novel flavonoid isolated from liquorice root, of IL-1beta-induced PGE_2 production in human skin fibroblasts. *J Pharm Pharmacol*, 2005;57:1661-6.
37. Choi EM. The licorice root derived isoflavan glabridin increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol*, 2005;70:363-8.
38. Li L, Zeng H, Shan L, Yuan X, Li Y, Liu R, Zhang W. The different inhibitory effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang on cyclooxygenase 2 and 5-lipoxygenase. *J Ethnopharmacol*, 2012;143(2):732-9.
39. 秦長智、史繼山. 溫清飲治療異位性皮膚炎的臨床研究 中外醫療期刊 2008; 27(12):55-56

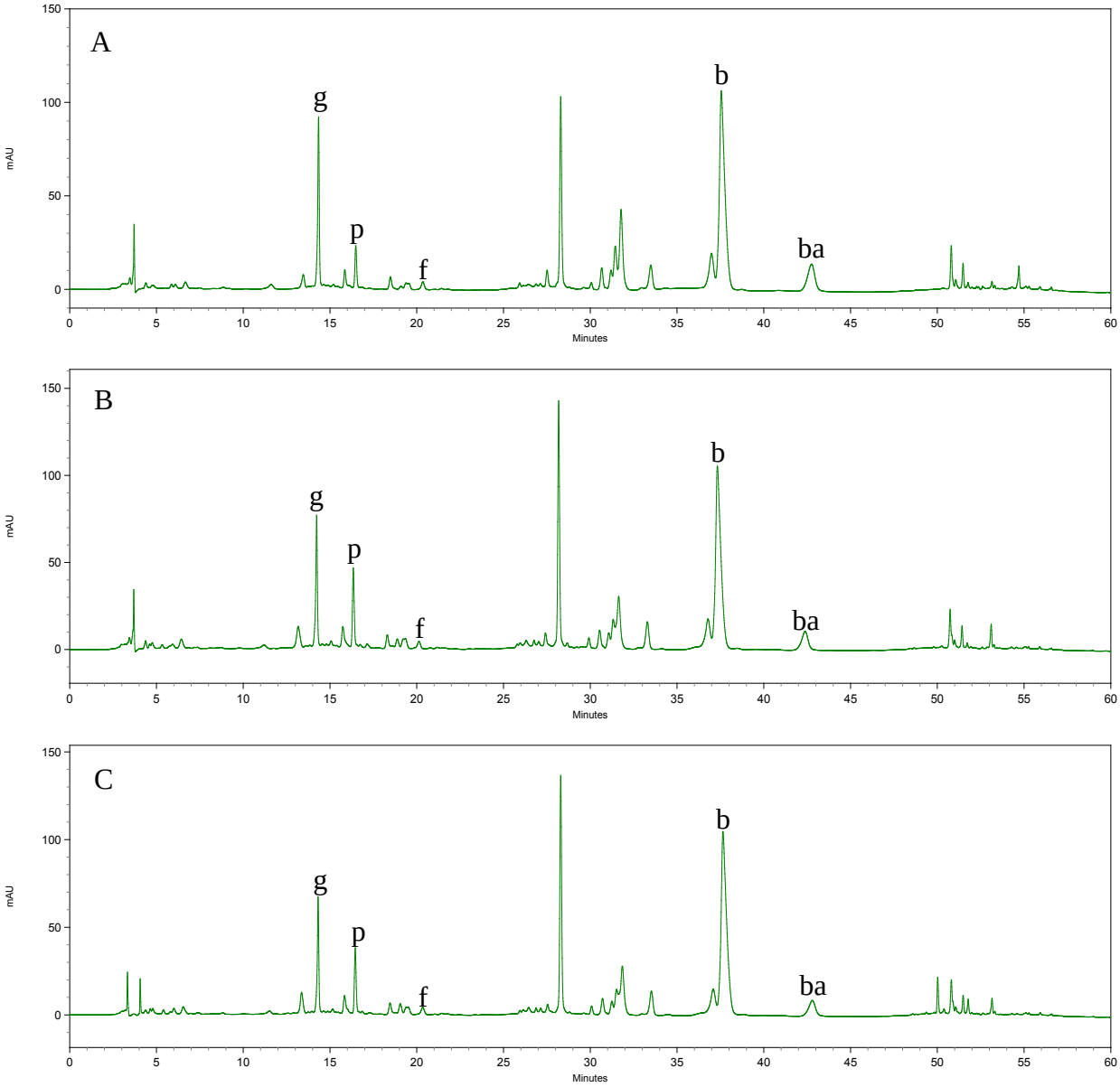
柒、圖、表



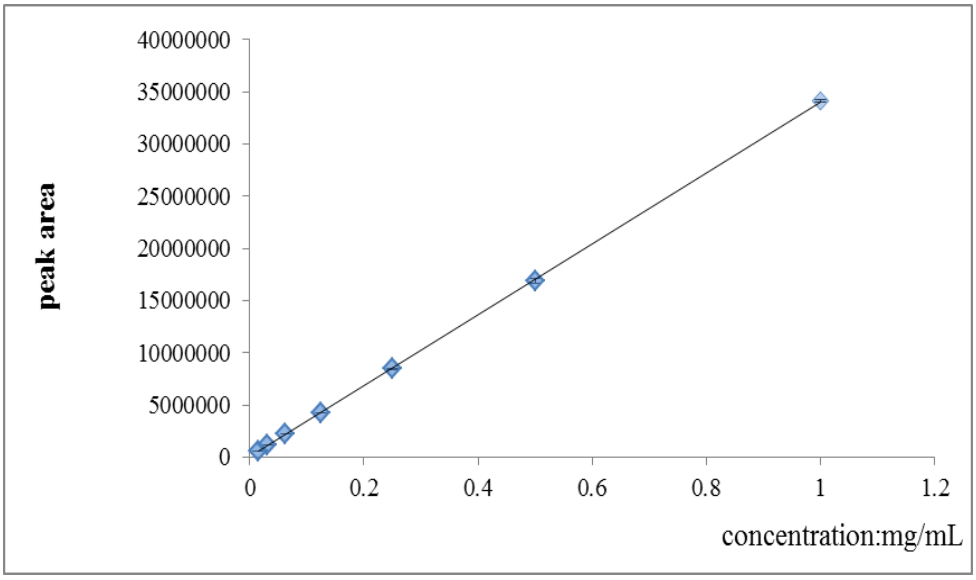
圖一、中藥方劑之 50%酒精萃取物對痤瘡桿菌誘導之大鼠耳朵抑制發炎之作用

10 mg/mL	清上防風湯	黃連解毒湯	溫清飲	Control (10% DMSO)
治療前				
治療後 24 hrs				
治療後 48 hrs				

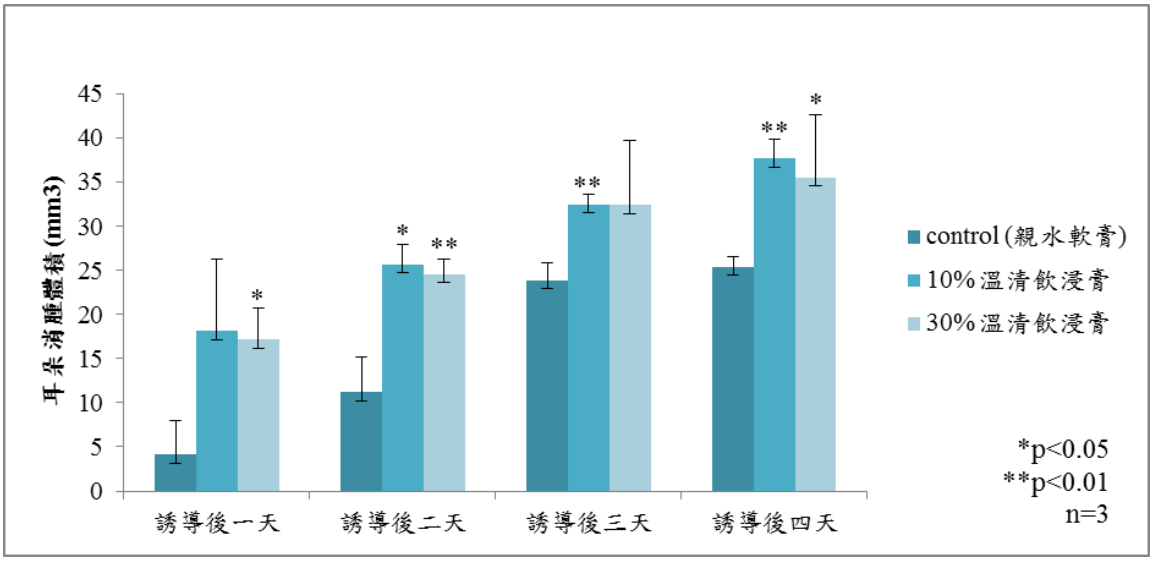
圖二、中藥方劑之 50%酒精萃取物之動物皮膚毒性試驗結果



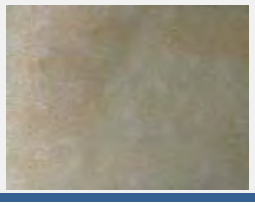
圖三、A：溫清飲萃取物之 HPLC 指紋圖，B：溫清飲浸膏之 HPLC 指紋圖譜，C：20%溫清飲凝膠(浸膏)之 HPLC 指紋圖譜，g: geniposide；p: paeoniflorin；f: ferulic acid；b: berberine；ba: baicalein，檢測波長：250 nm，濃度：2.5 mg/mL(A、B)，10 mg/mL(C)



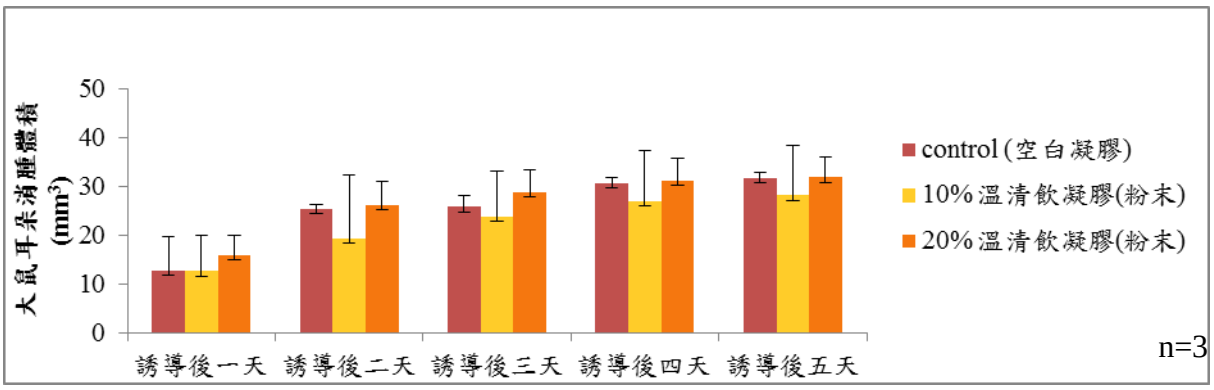
圖四、Berberine 之檢量線(y=34014914.9472x + 26480.5156, R^2=0.9999)



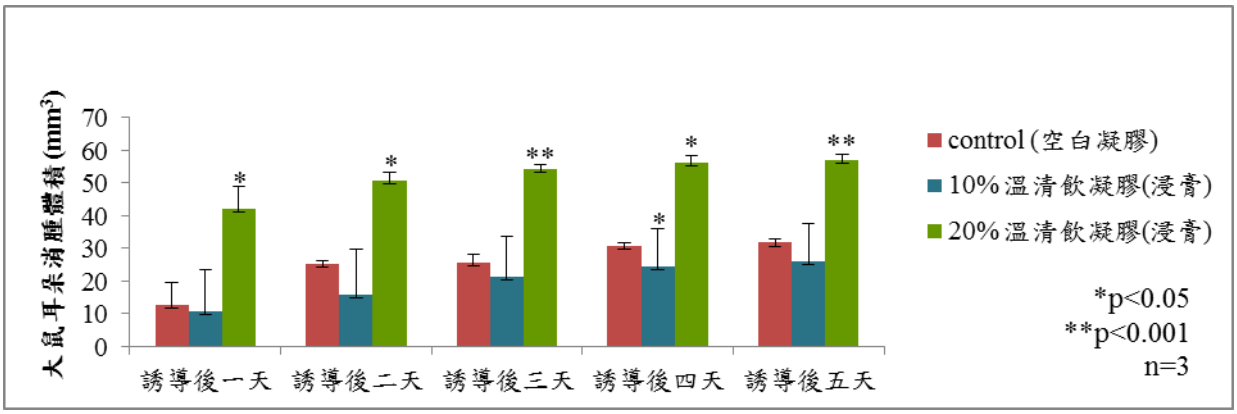
圖五、溫清飲浸膏對大鼠耳朵腫脹發炎之抑制能力

老鼠正常皮膚	塗藥前	塗藥後 24 小時	塗藥後 48 小時
10% 溫清飲軟膏			
30% 溫清飲軟膏			
Control 親水軟膏			

圖六、溫清飲浸膏之動物皮膚毒性試驗結果



圖七、溫清飲凝膠(粉末)對痤瘡桿菌誘導大鼠耳朵發炎之抑制作用



圖八、溫清飲凝膠(浸膏)對痤瘡桿菌誘導大鼠耳朵發炎之抑制作用

老鼠正常皮膚	塗藥前	塗藥後 24 小時	塗藥後 48 小時
10% 溫清飲凝膠			
20% 溫清飲凝膠			
control			

圖九、溫清飲凝膠(浸膏)之動物皮膚毒性試驗結果

表一、Draize-FHSA scoring system 皮膚紅腫評分表

Skin reaction (皮膚反應)	Value (刺激值)
Erythema and Eschar Formation (紅斑及痂皮生成)	
No Erythema (無紅斑)	0
Very slight erythema (剛可辨認之輕微紅斑)	1
Well-defined erythema (明顯紅斑)	2
Moderate to severe erythema (中至強度紅斑)	3
Severe erythema (injuries in depth) (強度紅腫及輕微痂皮生成)	4
Necrosis (death of tissue) (組織壞死)	+N
Eschar (sloughing or scab formation) (痂皮生成)	+E
Edema Formation (浮腫形成)	
No edema (無浮腫)	0
Very slight edema (barely perceptible) (剛可辨認之輕度浮腫)	1
Slight edema (edges of area well-defined by definite raising) (與周圍可明顯區別之浮腫)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm definite raising) (中至強度浮腫約 1 mm 左右之浮腫)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond the area of exposure) (超過 1 mm 且擴散至周圍區域之浮腫)	4

表二、中藥方劑不同溶媒萃取物對痤瘡桿菌抑制作用

健保資料庫使用排序	中藥方劑	萃取溶媒	抑菌百分比[a](%)	
			10 mg/mL	5 mg/mL
1	清上防風湯	熱水煎煮	-	-
		50%酒精	27.24± 2.98	-
4	黃連解毒湯	熱水煎煮	45.32± 1.83	34.3± 0.09
		50%酒精	43.05± 0.72	35.85± 2.2
8	溫清飲	熱水煎煮	30.83± 2.3	26.52± 1.25
		50%酒精	34.94± 0.59	30.44± 3.58

[a]: 抑制痤瘡桿菌之活性，數值為與正對照組 clindamycin（10U）之 Ratio %
Ratio % = (實驗組之抑菌圈/clindamycin 之抑菌圈)×100

[b]: 中藥方劑對痤瘡桿菌之最小抑制濃度

表三、中藥方劑不同溶媒萃取物對痤瘡桿菌誘導 RAW 264.7 細胞發炎之抑制作用

健保資料庫使用排序	中藥方劑	萃取溶媒	抗發炎能力		
			NO 抑制作用		PGE_2 抑制率 [b]
			NO 抑制率 [a]	IC_{50}(μg/mL)	
1	清上防風湯	熱水煎煮	-	-	-
		50%酒精	83.18± 2.93	43.96	-
4	黃連解毒湯	熱水煎煮	19.36± 6.55	-	-
		50%酒精	88.94± 0.8	5.913	31.52
8	溫清飲	熱水煎煮	10.81± 0.5	-	-
		50%酒精	90.78± 1.38	11.826	25.71

[a]：中藥方劑之劑量為 200 μg/mL

[b]：中藥方劑之劑量為 50 μg/mL

表四、溫清飲中 berberine 分析方法之同日內差異與異日內差異

	同日內差異		異日內差異	
	Mean±S.D[a]	RSD(%)	Mean±S.D[a]	RSD(%)
溫清飲萃取物 Berberine	28±0.433	1.547	27.937±1.255	2.965
溫清飲浸膏 Berberine	26.422±0.09	0.344	25.9±0.607	2.345
溫清飲凝膠 Berberine	6.812±0.034	0.494	6.436±0.105	1.633

[a]: μg/mL

表五、50%酒精萃取之溫清飲對痤瘡桿菌之抑制作用

	抗菌活性				
	抑菌百分比[a](%)			MIC[b] (mg/mL)	IC_{50} 值 (mg/mL)
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL		
溫清飲萃取物	60.784±6.541	91.319±0.476	91.597±1.259	0.25	0.956
溫清飲浸膏	19.608±2.972	50.14±1.716	80.952±1.166	1	2.32

[a]:抑制痤瘡桿菌生長之能力，數值為與正對照組 0.1 μg/mL clindamycin 之比值%。

[b]: 溫清飲浸膏對痤瘡桿菌之最小抑制濃度

表六、溫清飲之標準品對痤瘡桿菌之抑制能力

中藥材	指標成分	抑菌百分比[a] (%)			MIC (μg/mL)
		5 μg/mL	10 μg/mL	20 μg/mL	
黃連/黃柏	berberine	45.58±2.92	75.09±1.91	98.16±1.44	2.5
黃芩	baicalein	-	12.19±8.81	79.28±3	10
白芍	paeoniflorin	-	-	15.65±4.48	20
梔子	geniposide	-	-	49.89±3.17	20
當歸/川芎	ferulic acid	-	-	1.48±4.22	20
熟地黃	catalpol	-	-	0.42±12.56	20

[a]:抑制痤瘡桿菌生長之能力，數值為與正對照組 0.1 μg/mL clindamycin 之比值%。

表七、溫清飲浸膏對 MRC-5 細胞之細胞毒性百分比

細胞毒性百分比(%)						
溫清飲劑量 (μg/mL)	15.625	31.25	62.5	125	250	500
CI(%)	0.42±2.00	0.47±1.60	0.69±1.14	1.33±1.59	4.52±1.21	8.33±1.65

Cytotoxicity Index , CI% = {1－(實驗組之 O.D.值/對照組之 O.D.值)}×100

表八、溫清飲凝膠(粉末)之配方組成

全成分表			
中文成分	INCI 名稱	10% 溫清飲凝膠 (w/w%)	20% 溫清飲凝膠 (w/w%)
去離子水	Aqua	84.1	74.2
乳化劑	PEG-40 Hydrogenated Castor oil	1	1
乳化劑	Dimethicone Crosspolymer	1	1
乳化劑	Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	0.5	0.5
乳化劑	Polyglyceryl-10 Stearate	0.5	0.5
乳化劑	Polypropylene Terephthalate	0.3	0.3
增稠劑	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP copolymer	0.25	0.25
增稠劑	Xanthan Gum	0.25	0.35
增稠劑	Sclerotium Gum	0.3	0.35
增稠劑	Carbomer	0.3	0.35
甘草酸鉀	Dipotassium Glycyrrhizinate	0.2	0.2
蘆薈萃取	Aloe extract	0.1	0.1
溫清飲	Herb extract	10	20
薰衣草香精	*Lavendula angustifolia* fragrance	0.5	0.5
防腐劑	Chlorphenesin	0.2	0.2
防腐劑	Methylisothiazolinone	0.2	0.2
酸鹼中和劑	KOH	微量	微量

表九、溫清飲凝膠(浸膏)之配方組成

全成分表			
中文成分	INCI 名稱	10%溫清飲凝膠 (w/w%)	20%溫清飲凝膠 (w/w%)
去離子水	Aqua	45.4	0
乳化劑	PEG-40 Hydrogenated Castor oil	1	1
乳化劑	Dimethicone Crosspolymer	1	1
乳化劑	Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	0.5	0.5
乳化劑	Polyglyceryl-10 Stearate	0.5	0.5
乳化劑	Polypropylene Terephthalate	0.3	0.3
增稠劑	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP copolymer	0.25	0.25
增稠劑	Xanthan Gum	0.25	0.25
增稠劑	Sclerotium Gum	0.3	0.3
增稠劑	Carbomer	0.3	0.3
甘草酸鉀	Dipotassium Glycyrrhizinate	0.2	0.2
蘆薈萃取	Aloe extract	0.1	0.1
溫清飲浸膏	Herb extract	49	94.4
薰衣草香精	*Lavendula angustifolia* fragrance	0.5	0.5
防腐劑	Chlorphenesin	0.2	0.2
防腐劑	Methylisothiazolinone	0.2	0.2
酸鹼中和劑	KOH	微量	微量

表十、溫清飲凝膠(粉末)之安定性檢驗報告(第一個月和第二個月)

檢驗項目	10%溫清飲凝膠	20%溫清飲凝膠
外觀、色澤	深黃褐色	深黃褐色
性狀	凝霜	凝霜
pH 值	4.6	4.6
黏度	17500	18200
微生物檢測	<10 bacterial/g	<10 bacterial/g
耐熱測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化
耐寒測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化
離心測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化

表十一、溫清飲凝膠(浸膏)之安定性檢驗報告(第一個月)

檢驗項目	10%溫清飲凝膠	20%溫清飲凝膠
外觀、色澤	深黃褐色	深黃褐色
性狀	凝霜	凝霜
pH 值	4.65	4.65
黏度	17000	17500
微生物檢測	<10 bacterial/g	<10 bacterial/g
耐熱測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化
耐寒測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化
離心測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化

表十二、溫清飲凝膠(浸膏)之安定性檢驗報告(第二個月)

檢驗項目	10%溫清飲凝膠	20%溫清飲凝膠
外觀、色澤	深黃褐色	深黃褐色
性狀	凝霜	凝霜
pH 值	4.65	4.6
黏度	19500	19500
微生物檢測	<10 bacterial/g	<10 bacterial/g
耐熱測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化
耐寒測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化
離心測試	外觀性狀無明顯變化	外觀性狀無明顯變化

編號：CCMP100-RD-120

建立中藥抗流感病毒之篩選平臺-藥效及作用機制之評估(2-2)

陳志豪
中山醫學大學

摘　要

研究目的：

評估山楂、山茱萸、木香、荊芥及紫蘇葉等 5 種中藥，以不同萃取方法(水萃、熱水萃、乙醇萃、酸乙醇萃、甲醇萃)情況下對抗流感病毒的成效及成份分析。

研究方法：

首先，將 5 種中藥分別以水萃、熱水萃、乙醇萃、酸乙醇萃及甲醇萃處理，各萃取液則以 MDCK 細胞測定其細胞毒性(CC50)及針對 A 型及 B 型流感病毒在不同感染前、中、後期間定出 50%抑制濃度(IC50)，最後利用高效能液態色層分析法(HPLC)來分析不同萃物的成份差異。

結果與結論：

在細胞毒性方面，水萃物之毒性普遍低於各種酒精萃取物。在測試藥物添加於病毒感染中之實驗，各中藥之水萃物皆有抗 A 型流感病毒之效果。相反地，除了荊芥之酸乙醇萃取物對抗 A 型流感病毒有少許效果外，其餘各種酒精萃取物皆對 A 型流感病毒無效。然而，除了木香之各種酒精萃取物及紫蘇葉之甲醇萃取物外，其他萃取物皆對 B 型流感病毒表現不同程度之抑制效果。在病毒感染前先加藥或在病毒感染後再加藥的實驗中，亦可發現某些中藥之萃取物具有抗流感之活性。在 HPLC 分析中，可發現各種中藥之水萃取物及各種酒精萃取物之成份有明顯差異。綜合以上結果，再次證明上述中藥具有抗流感之活性，特別對 B 型流感有很好之抑制功效。未來應可與現在已上市之抗流感藥物一同配合使用。

關鍵詞：流感病毒、傳統中藥、高效能液態色層分析

Number: CCMP 100-RD-120

Establishment of Screening Platform of Chinese Herbal Medicine for Anti-influenza: Evaluation of the Effect and Mechanism (2-2)

Chan Chi-Ho
Chung Shan Medical University

ABSTRACT

Aim:

To evaluate the effect of different fractions of traditional Chinese medicine (TCM) including *Crataegus pinnatifida*, *Cornus officinalis*, *Aucklandia lappa*, *Schizonepeta tenuifolia*, and *Perilla frutescens*, against influenza viruses.

Method:

Two aqueous (cold and hot water) and three alcoholic (ethanol, acidic ethanol and methanol) extracts of the above TCMs were produced simultaneously. Totally twenty-five fractions of the crude extracts were obtained. The cytotoxicity (CC50) of each fraction was determined in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell. Next, the effect of TCMs against influenza A and B viruses on MDCK cells were also performed during infection, pre-infection, and post-infection. Finally, all extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

Results & Conclusion:

In general, the cytotoxicity of aqueous extracts was less than those of alcoholic extracts. By adding the individual extract along infection, all aqueous fractions showed various degrees of anti-virus activities against influenza A virus. In contrast, mostly alcoholic fractions had no effect against influenza A virus, except acidic ethanol fractions of *Schizonepeta tenuifolia*, which showed slight antivirus activities. However, almost extracts (except the alcoholic fractions of *Aucklandia lappa* and the methanol fraction of *Perilla frutescens*) showed various degrees of antiviral activities

against influenza B virus when the individual extract was treated to the cell during infection. For pre- and post-infection experiments, only some fractions of the five TCMs exhibited anti-influenza activities. For HPLC analysis, there were obvious distinct fingerprints between aqueous fractions and alcoholic fractions of the TCMs. In conclusion, our tested TCMs showed more or less anti-influenza activities, especially on influenza B virus. It would be acted as a complementary prescription with the present anti-influenza drug.

Keywords: influenza virus, traditional Chinese medicine, high performance liquid chromatography

壹、前言

流感病毒的特性及流行狀況：

流感為重要的呼吸道疾病，除了引起嚴重的呼吸道症狀外，甚至會造成全世界大流行及死亡。流感病毒屬正黏液病毒科(Family Orthomyxoviridae)，為單股負鏈的 RNA 病毒，外層包膜上散布三種蛋白突起，分別為血球凝集素(Hemagglutinin, HA)、唾液酸酶(Neuramindase, NA)、M2 蛋白。中層為基質蛋白(Matrix protein, M1)形成的球形蛋白殼，有著維持病毒外形及保護核衣殼的作用。病毒的最內層為由單股負鏈 RNA 和核蛋白(Nucleocapsid protein, NP)組成的核醣核蛋白(Ribonucleoprotein, RNP)，含有三種 RNA 聚合酶(PB2, PB1, PA)。依照其核蛋白的不同，可將流感病毒分成 A 型、B 型、C 型三種主要的病毒型。A 型流感病毒可依其血球凝集素和唾液酸酶的不同來區分亞型，到目前為止，共有 16 種血球凝集素(H1 ~ H16) (Fouchier et al., 2005)和 9 種唾液酸酶(N1 ~ N9)，除了人類外，A 型流感病毒不同抗原型別還可自然感染豬、馬、貂、海豹及家禽、水鳥等，且可能發生跨物種間的傳播及重組，禽類可感染 A 型流感病毒所有亞型，而人類則較易受到 H1 及 H3 亞型的感染。

依據疾管局「定點醫師監測通報系統」的資料可見，每一流感季（自每年7月1日至次年6月30日），類流感病例自11月開始逐漸增加，12月至隔年3月份達到流行高峰，甚至可能持續至4月間。另外，依據「病毒性合約實驗室監測系統」統計資料顯示，B型流感病毒在2004-2005及2006-2007流感季為主要流行病毒株，2005-2006及2007-2008流感季則以A/H1N1病毒為主，A/H3N2除了在2003-2004流感季流行外，之後這幾年期間幾乎全年皆可分離到A/H3N2病毒株，是造成夏季流感之主要病毒。進一步由疾病管制局基因體實驗室流感基因收件定序結果報告分析可知2007-2008流感季流感株主要為A/Brisbane/59/2007(H1N1)-like ， A/Brisbane/10/2007(H3N2)-like 及B/Florida/4/2006。另外，我們可以發現臺灣的病毒株約早歐美1-2年流行，因為WHO預測下一年度的流感流行株多早已在一年前即在臺灣流行過了(Shih et al., 2005)，這現象一直到2008年都沒改變。

有關流感併發重症疫情的方面，則依據「法定傳染病個案通報管理系統」資料可見，自 2002-2003 至 2006-2007 流感季，流感併發重症通報病例數共計 385 例，確定病例數共計 112 例，其中死亡病例數為 30 例，致死率為 26.79 %。若依各年齡層分析資料，小於 5 歲及大於(含) 65 歲族群發生率較

高，分別為 0.36 ~ 1.20/100,000 及 0.24 ~ 0.32/100,000；至於死亡率部分，小於 5 歲年齡層之死亡率為 0.40 ~ 0.80/100,000，≧65 歲年齡層之死亡率為 0.09/100,000。

截至 2008 年 4 月 30 日止，2007-2008 年流感季全國各醫療院所共通報 81 例流感併發重症病例，19 例確定 (其中檢出 5 例 A、4 例 A/H1、4 例 A/H3、6 例 B)，其中 1 例確定病例死亡。

預防及治療方法：

雖然接種流感疫苗是目前全世界預防流感的主要方法，但因為流感病毒的突變率高，因此，疫苗株的選擇每年必須重新檢討及製造，才能維持其高保護力。另外，流感疫苗成本高並長期依賴國外進口，對接種者會產生如注射位置疼痛、發燒、甚至會出現與自然感染相似的症狀，因此，民眾接受度並不佳。

目前流感抗病毒藥物主要包含兩大類(Nicholson et al., 2003)，一種為 M2 蛋白抑制劑，其中包含 Amantadine 與 Rimantadine。可預防與治療 A 型流感病毒感染症。其作用機制為阻斷氫離子進入病毒的 M2 蛋白離子通道，進而抑制病毒於細胞內複製。另一類則為 Neuraminidase 抑制劑，主要包括 Zanamivir (Relenza®)與 Oseltamivir (Tamiflu®)兩種。可用來治療 A、B 型流感病毒感染症。其作用為將阻止子代病毒從感染細胞表面釋放，防止病毒的擴散。Zanamivir 為噴劑，由口吸入，使用上需要技術且不宜使用於氣喘等病患，Oseltamivir 為口服藥。在副作用方面，Amantadine 較 Rimantadine 易引發中樞神經系統之副作用， 如焦慮、憂鬱、失眠等副作用，若是血清中濃度過高，甚可引發妄想與抽搐等症狀。Zanamivir 與 Oseltamivir 則會另少數人產生如噁心及嘔吐等輕微的副作用。除此之外，已有不少關於流感病毒對現有抗病毒藥物漸漸產生抗藥性病毒株報告報導，大部份 H1N1 亞型對 Amantadine 已產生抗藥性。甚至臺灣也有對 Oseltamivir 產生抗藥性的 H1N1 新型流感(Hurt et al., 2006; Handel et al., 2007; Sheu et al., 2008; Cheng et al., 2009；CDC, USA, 2009; Gulati et al., 2009; Hungnes et al., 2009; Vicente et al., 2009)。

SARS 發生以來，臺灣進行中藥抗病毒的研究：

自 SARS 發生以來，臺灣對若干常見的病毒亦進行中藥抗病毒的研究。在單味藥方面，蓮子(Seeds of Nelumbo nucifera)的萃取物中 NN-B-5 具有抑制第一型單純疱疹病毒(Herpes simplex virus type 1; HSV-1)在 HeLa 細胞複製的功效，其作用機制與抑制早期轉錄 ICP0 及 ICP4 mRNA 有關(Kuo et al.,

2005)。另外，香椿(Toona sinensis Roem)嫩葉的萃取物則有抗 SARS-CoV 的作用(Chen et al., 2008)，而蘆薈大黃素(Aloe-emodin)則被發現同時對腸病毒七十一型及日本腦炎病毒具有抗病毒活性，其作用機制可能與蘆薈大黃素可誘發細胞產生干擾素有關(Lin et al., 2008)。在複方方面，茵蔯蒿湯(Yin Chen Hao Tang)被發現對 HSV-1 及 HSV-2 均有抑制的功效，但對抗 HSV-2 複製的效果較強(Cheng et al., 2008)。升麻葛根湯(Sheng Ma Ge Gen Tang)則對腸病毒七十一型的複製有抑制作用(Chang et al., 2008)。又以實證醫學之觀點,發現以天然中藥對 SARS 病人作輔助治療可縮短恢復期之效果(Hsu et al., 2008)。

抗流感中藥發展：

以往抗流感的中藥及食用植物中已經有不少報告，如板藍根 (Radix Isatidis)之水萃物(Chen et al., 2006; Alleva et al., 2010)。岩膠薔薇(Cistus incanus)葉則為歐洲國家流行之一種花茶的飲料，其萃取物，在細胞實驗及小白鼠試驗中皆發現對鼻病毒(Rhinovirus)及各型流感病毒，甚至具有高病原性的禽流感病毒都具有不同程度之抗病毒效果，估計與其含有大量多酚(Polyphenols)之成份有關(Droebner et al., 2007; Ehrhardt et al., 2007; Serkedjieva et al., 2007)。北蟲草(Cordyceps militaris)亦有抗流感之報告，不過其作用並非直接與病毒作用，而是其含有之酸性多醣體(Acidic polysaccharide)使宿主體內免疫系統產生 TNF-α and IFN-γ,活化巨噬細胞並增加其殺病毒能力(Ohta et al., 2007)。其他如日本李(Japanese plum)之濃縮果汁(Yingsakmongkon et al., 2008)、木瓜 (Chaenomeles sinensis) (Sawai et al., 2008)、蜂膠 (Propolis) (Shimizu et al., 2009)、野壩子(Elsholtzia rugulosa)之有效成份為 Flavonoid 類複合物(Liu et al., 2008)、蘇木(Caesalpinia sappan) (Liu et al., 2009)、Clinacanthus siamensis 之葉子萃取物(Wirotesangthong et al., 2009)及甘草酸(Glycyrrhizin)等(Wolkerstorfer et al., 2009)，皆具有不同程度抗流感之功效。另外，日常食用的海帶(Seaweeds)，其萃取物中具有抗病毒之作用。在複方方面，含有桔梗、咖啡因、遠志、冰片、苦杏仁、五倍子、甘草等成份之痰咳淨片具有抗流感之功效(Jiang et al., 2009)。

雖然從現代科學文獻中已經證實有多種有中藥及食用植物具有抗流感病毒的功效，但都是個別報導為多，究竟不同中藥間何者之抗流感病毒的功效較高仍沒有相關研究報導，更少有從大規模中藥篩選抗流感病毒及效果比較的研究。在 99 年度研究計畫中，我們以雞胚胎接種病毒及細胞感染病毒等方法，從 333 種中藥之水萃物中，篩選出山楂、山茱萸、木香、荊

芥及紫蘇葉等 5 種同時對 A 型及 B 型流感病毒病毒有效之中藥。本(100)年度研究計畫，則針對該 5 種中藥，以水萃、熱水萃、乙醇萃、酸乙醇萃及甲醇萃處理後，再評估各萃取物抗流感活性及以 HPLC 作成份分析。結果顯示，各中藥之水萃物皆對抗 A 型及 B 型流感病毒皆有不同程度之抑制作用。相對地，大部份各種酒精萃取物祇對 B 型流感病毒有抑制作用，對 A 型流感病毒之抑制效果則較不明顯。除此之外，HPLC 作成份分析顯示個別中藥之水萃取物之圖譜與其各種酒精萃取物之圖譜有明顯差異。

貳、材料與方法

一、病毒株來源：

A/Taiwan/80102/2008 (H1N1)、B/Taiwan/80141/2008 為本實驗室分離株。

二、細胞株來源：

Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞株(ATCC CCL-34)則購自美國ATCC 細胞庫。

三、中藥來源：

所提供的中藥皆由中藥商依照中華中藥典建議之種源，其每批有一定之 GMP 流程規範進行採買及萃取，以確保藥效之再現。

四、中藥萃取方式

由中國醫藥大學侯庭鏞教授實驗室所提供的萃取技術並依照以下各種萃取方式所得(1)水浸液萃取：取 40g 的單味藥粉浸入 200ml，浸泡過夜，主要可萃取出胺基酸、蛋白質等；(2)熱水浸液萃取物：將 40 g 的單味藥粉浸入 200 ml 水中，浸泡過夜，再置於 60℃加熱 10 分鐘，主要可萃取出糖、有機酸、皂、酚、鞣質、水溶性生物鹼等；(3)中性醇萃取物：將 40 g 的單味藥粉浸入 200ml 的 95%乙醇，浸泡過夜，主要可萃取出黃酮類、香豆精、揮發油類、甾體等；(4)酸性醇萃取物：將 40 g 的單味藥粉浸入 200 ml 的 0.5%鹽酸酒精中，浸泡過夜，主要可萃取出生物鹼類物質；(5)甲醇萃取物：將 40 g 的單味藥粉浸入 200 ml 的 100%甲醇，浸泡過夜，主要可萃取出兼具水浸液及乙醇萃取物等物質。最後將各種萃取物取出適量來做冷凍乾燥，並秤其乾重後，將萃取液放置-80℃保存，以方便進行日後藥效評估。

五、流感病毒經細胞增殖

取出 4℃冰箱的培養液、PBS、Trypsin- EDTA 置於 37℃水浴槽回溫。再將 MDCK 細胞自液態氮桶內取出，迅速置於 37 ℃水浴中解凍。把細胞懸浮液加入 10 ml 培養液(DMEM + 10%FCS)中，置於 25 T Flask 37 ℃培養箱（含 5% CO2）中培養。細胞培養 1~2 天左右，以倒立顯微鏡觀察細胞是否已長成單層細胞(monolayes)。細胞長滿後，將細胞培養盒(Flask)內培養液吸掉，加入 10 ml PBS 緩衝液沖洗細胞表面，再將 PBS 儘量完全吸掉。再加入 1 ml Trypsin-EDTA（以能覆蓋細胞表面為原則），置入 37 ℃細胞培養箱 15 分鐘，單層細胞會從培養角瓶面脫落，並於倒立顯微鏡下確認細胞變

成圓形，脫離細胞培養盒(Flask)表面。確認後加入 2 ml 生長培養液，以吸管上下沖打細胞，使細胞打散為單一細胞。再取 1 ml 細胞懸浮移至內含 10 ml 生長培養液的 75 T Flask，並置於 37 ℃含 5% CO_2 培養箱培養。將長滿 MDCK 細胞之 Flask 內培養液取出，再加入 10 ml PBS 緩衝液沖洗細胞表面，再將 PBS 吸出。從-80℃取出流感病毒病毒液，經解凍後，取 200μl 病毒液接種於 MDCK 細胞，37℃ 5% CO_2 培養箱培養作用 1 小時。作用 1 小時後，再加入 10 ml DMEM (內含 2μl/ml TPCK-trypsin 的 DMEM) 中。將 Flask 置入 37℃ 5% CO_2 培養箱培養。當細胞倍病毒感染時，會產生細胞病變的情形，故每日以倒立顯微鏡觀察 Flask 內的細胞病變。當 Flask 內 8~9 成細胞被病毒感染而產生細胞病變，即可以血球凝集試驗來加以確認。血球凝集試驗若為陽性，又產生細胞病變則可以將病毒液收集，將收集的病毒液於-80℃保存。

六、半數細胞培養物感染劑量 $TCID_{50}$ (50% tissue culture infectious dose)

在血清瓶中將病毒液以不含胎牛血清，但含 2μg/ml TPCK trypsin 培養液，作連續 10 倍的稀釋，從 10^{-1}-10^{-8} 稀釋完後置於冰上備用。當 96 培養盤孔洞中的細胞養滿後，吸取出內含胎牛血清的培養液，再以不含胎牛血清之培養液清洗細胞。取出稀釋好的病毒接種到 96 孔微量培養盤中，每一稀釋濃度接種一縱排共 8 孔，每孔接種 100μl。並於兩側縱排為正常細胞對照組（100μl 不含胎牛血清培養液；含 2μg/ml trypsin），逐日以顯微鏡觀察其細胞病變(Cytopathic effect)並記錄結果，觀察 2 天後再依照 Reed- Muench 法計算結果。

七、細胞毒性試驗

先將細胞消化後，以 DMEM（含 10% FBS）稀釋到適當體積，再均勻的接種到 96-well plate 中，每 well 接種 $2*10^4$。並在盤面外圍四周加入 100 μl 無菌的 PBS。再將細胞移入 37℃培養箱，培養 16~18 小時。藥物處理組的部份，先吸掉 100 μl 培養液，再加入 100 μl 已稀釋過的藥物。細胞對照組的部分，為吸掉 100 μl 培養液，再加入 100 μl DMEM。最後將細胞移入 37℃培養箱，培養 16 小時。培養後吸掉孔洞中培養液，再以不含胎牛血清 DMEM 清洗。在每個孔洞再加入不含胎牛血清 DMEM 培養液 100 μl。再加入 5 μl 的 WST-1 至每個測試的孔洞，加完後輕拍培養盤，使 WST-1 混合均勻。WST-1 作用一個半小時後以酵素免疫分析儀(ELISA reader; TECAN®)測其 450 nm 之吸光值(OD)並以 690 nm 為參考波長來判讀其結果。

細胞毒性百分比(CC%)計算公式如下：

$$\frac{OD_{\text{mock average}} - OD_{\text{herb OD}}}{OD_{\text{mock average}}} \times 100\% \quad = CC\%$$

八、抗流感病毒藥物 50%抑制濃度(IC50)

細胞消化後，以 DMEM（含 10% FBS）稀釋到適當體積，再均勻的接種到 96-well plate 中，每 well 接種 $2*10^4$，並在盤面外圍四周加入 100 μl 無菌的 PBS，再將細胞移入 37℃培養箱，培養 16~18 小時。在依照實驗的需求，分為以下感染前、中、後的條件進行。

(一) 感染前：首先將調配稀釋完的藥物取出 100μl/well 跟細胞作用 2 小時後，去除上清液，加入每 well 含有 100μl 的 50 $TCID_{50}$ 病毒液作用 1 小時,再利用 PBS 清洗一次後加入 100μl/well 含有 2μg/ml TPCK trypsin 培養 48 小時，再以 WST-1 測量細胞存活率，代入以下的公式。

(二) 感染中：將調配稀釋完的藥物取出 100μl 跟細胞作用 1 小時後再加入含有 50 $TCID_{50}$ 病毒液 100μl 一起作用，培養 48 小時，再以 WST-1 測量細胞存活率，代入以下的公式。

(三) 感染後：首先將細胞加入 100μl/well 的 50 $TCID_{50}$ 病毒液作用 2 小時去除上清液,加入調配稀釋完的藥物 100μl/well 作用 48 小時，再以 WST-1 測量細胞存活率，代入以下的公式。

抑制半數細胞感染濃度百分比 (IC_{50}%)計算公式如下：

$$\frac{OD_{\text{herb OD}} - OD_{\text{virus average OD}}}{OD_{\text{mock average}} - OD_{\text{virus average OD}}} \times 100\% \quad = IC_{50}\%$$

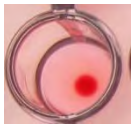
九、紅血球凝集試驗

將人類 O 型血液置於含抗凝劑 Alsever solution (Glucose 2.05g；Na-citrate 0.8g；Citric acid 0.055g；NaCl 0.42g；DDW 100 ml；pH 6.1)中；血與抗凝劑(1:1)。再將血球放入 50 ml 離心管，以 PBS 800G；10 分鐘離心清洗，此述動作重複 3 次。取清洗後的血球，利用 PBS 稀釋成 0.75%紅血球懸浮液，4℃存於備用。

取 U 型底 96 孔盤(BD Falcon®)，加入 50μl 待測病毒培養液後，各別加入 0.75%紅血球懸浮液 50μl，靜置於室溫 60 分鐘判讀。若孔洞底部紅血球凝集分部均勻，判讀為 HA 陽性結果；若孔洞底部紅血球正常沉降呈現為光滑圓型，判讀為 HA 陰性。



陽性



陰性

十、HPLC 分析

(一)機器型號：Auto sampler: SIMADZU SIL-20，Pump: SHIMADZULC-20AT，Detector: SHIMADZU SPD-M20A，wavelength: 190-800nm Oven: SHIMADZU CTO-20A，Column: COSMOSIL, 5C18-AR-II,Waters (20 x 250 mm)、Supelco (HS-C18, 4.6 x 250 mm, 5 l)

(二) 沖提條件：

山楂：Flow rate: 0.7 min/mL; eluting method: 0-20 min [H_2O (0.1% TFA): MeOH (100:0)- H_2O (0.1% TFA): MeOH (96:4)], 20.01-100 min [H_2O (0.1% TFA): MeOH (96:4)- H_2O (0.1% TFA): MeOH (30:70)]

山茱萸：Flow rate: 1.0 min/mL; eluting method: 0-20 min [H_2O (0.1% TFA): MeOH (95:5)- H_2O (0.1% TFA): MeOH (92:8)], 20.01-80 min [H_2O (0.1% TFA):MeOH (92:8)- H_2O (0.1% TFA): MeOH (10:90)], 80-100 min [H_2O (0.1% TFA): MeOH (10:90)- H_2O (0.1% TFA): MeOH (0:100)]

木香：Flow rate: 1.0 min/mL; eluting method: 0-80 min [H_2O (0.1% TFA): MeOH (95:5)- H_2O (0.1% TFA):MeOH (0:100)], 80.01-100 min [H_2O (0.1% TFA): MeOH (0:100)]

荊芥：Flow rate: 1.0 min/mL; eluting method: 0-90 min [H_2O (0.1% TFA):MeOH (95:5)- H_2O (0.1% TFA): MeOH (0:100)]

紫蘇：Flow rate: 1.0 min/mL; eluting method: 0-60 min [H_2O (0.1% TFA): MeOH (95:5)- H_2O (0.1% TFA): MeOH (0:100)], 60.01-80 min [H_2O (0.1% TFA): MeOH (0:100)]

十一、統計分析

以上實驗數據之統計方法均以 Microsoft Excel 2010 軟體運算，所有數據皆以 mean±SD 表示。

參、結果

一、中藥萃取

為了解用不同方法萃取之中藥萃取物，其抗流感之活性有何不同，分別將中藥依照前述方法萃取之，並將各萃取物取出 1ml 來做冷凍乾燥後秤其乾重（表一）。而由不同萃取方法所獲得之粗萃取物，其顏色亦各不相同（圖一）。

二、中藥之細胞毒性試驗

進一步以 MDCK 細胞測試各中藥萃取物之細胞毒性。發現由水萃和熱水萃方式所萃取出來的中藥成份對細胞毒性較低，而由乙醇、酸乙醇及甲醇所得之萃取物對細胞毒性較高。以個別中藥來看，山茱萸的水萃和熱水萃細胞毒性極低，甚至比 oseltamivir 低了將近 40 倍左右。在各類酒精萃取物方面，以木香和紫蘇葉等具有較高的細胞毒性（表二）。

三、中藥各萃取物抗流感病毒試驗

為了解不同萃取方法所得的中藥萃取物對抗流感病毒的活性如何，各中藥萃取物分別以病毒感染細胞中同時加藥，或以病毒感染細胞前先加藥兩小時再把藥去除，或在病毒感染細胞後兩小時再加藥等 3 種方式來測試抗病毒活性。

在病毒感染細胞中同時加藥試驗，抗 A 型流感而言，各中藥只有水萃部份具有抗病毒活性。相對地，各種酒精萃取部份，除了酸乙醇萃取物外，不具有抗 A 型流感(H1N1)的活性（表三）（圖二）。在個別中藥萃取物中，又以山茱萸熱水萃抗 A 型流感效果較佳，其 IC50 和 SI 值分別為 0.28 mg/ml 和 137.43 mg/ml（表三）。對 B 型流感之抗病毒活性，除了木香之各種酒精萃取物及紫蘇葉的乙醇和甲醇萃取物，因具有高細胞毒性而不能做抗流感試驗外，其餘各中藥萃取物皆具有不同程度之抗 B 型流感病毒活性（表四）（圖三）。綜合而言，不論其細胞毒性，所有測試之中藥萃取物對抗 B 型流感病毒之效果比抗 A 型流感(H1N1)病毒較強。相反，oseltamivir 則對 A 型流感(H1N1)病毒比較有效(IC50=0.002 mg/ml)，對 B 型流感病毒則相對要用 3.5 倍之濃度(IC50=0.007 mg/ml)才有效（表三、表四）。

在病毒感染細胞前先加藥兩小時再把藥去除的試驗中，所有萃取物及 oseltamivir 皆不具有抗 A 型流感(H1N1)病毒之活性（表五）（圖二）。針對抗 B 型流感病毒而言，山楂除甲醇萃取物不具抗病毒活性外，其餘 4 種萃取物皆具抗 B 型流感病毒之活性（表六）（圖三）。另外，山茱萸及木香之

水萃及熱水萃皆具有抗 B 型流感病毒之活性。紫蘇葉則以乙醇萃及酸乙醇萃具有抗 B 型流感病毒之活性。相反地，荊芥之各萃取物則不具任何抗 B 型流感病毒之活性（表六）。

在病毒感染細胞後兩小時再加藥試驗，各中藥萃取物只有其水萃及熱水萃部份對 A 型流感(H1N1)病毒具有抗病毒活性，其餘以各酒精萃取物皆無抗病毒之活性（表七）（圖二）。針對抗 B 型流感病毒而言，山茱萸及木香之各種萃取物皆具有抗病毒之活性。山楂則除了甲醇萃取物外，其餘皆具抗病毒之活性。荊芥及紫蘇葉則只有水萃及熱水萃之部份具有抗 B 型流感病毒之活性（表八）（圖三）。值得注意的是，若和 oseltamivir 比較，三種木香的不同酒精萃取物之 IC50 值與 oseltamivir 接近，甚至更低（表八）。

四、HPLC 指紋分析

山楂之水浸液萃取物和熱水浸液萃取物對 A 型流感病毒(A/H1N1)顯示具有抗流感病毒活性作用，由化學指紋圖譜分析（圖四），在滯留時間(t_R)為 52.9 和 58.6 min 時，山楂水浸液萃取物和熱水浸液萃取物皆有相同的訊號峰，推測此兩個訊號峰可能為山楂之水浸液萃取物和熱水浸液萃取物對抗 A 型流感病毒作用的活性成分。山楂之不同的溶液萃取物對抗 B 型流感病毒都具有活性作用。乙醇萃取物、酸性乙醇萃取物和甲醇萃取物之抗 B 型流感病毒活性作用較強[IC_{50}= 0.11 mg/mL (EtOH)、IC_{50}= 0.11 mg/mL (EtOH-HCl)、IC_{50}= 0.14 mg/mL (MEtOH)]，由化學指紋圖譜分析（圖四），在滯留時間為 52.5、53.0、58.6、74.4 和 74.9 min 時，皆有此五個訊號峰。而圖四-A 和圖四-B 不具有 t_R = 74.4 和 74.9 min 的兩個訊號峰，其活性作用減弱 [IC_{50}= 0.58 mg/mL (H_2O)、IC_{50}= 0.58 mg/mL (HH_2O)]。因此，推測 t_R =52.5、53.0 和 58.6 min 訊號峰可能為抗 B 型流感病毒作用的活性成分，而兩個訊號峰(t_R =74.4 和 74.9 min)之成分可能有增加活性作用。

山茱萸水浸液萃取物和熱水浸液萃取物對 A 型流感病毒(A/H1N1)具有抗流感病毒活性作用[IC_{50}= 0.92 mg/mL (H_2O)、IC_{50}= 0.28 mg/mL (HH_2O)]，由化學指紋圖譜分析（圖五），在滯留時間為 43.2、54.0、57.2、64.7 min 時，有相同的訊號峰，推測此四個訊號峰可能為抗 A 型流感病毒作用的活性成分。山茱萸不同的溶液萃取物對抗 B 型流感病毒都具有活性作用。甲醇萃取物之抗流感病毒活性作用較強(IC_{50}= 0.08 mg/mL)，由化學指紋圖譜分析（圖五），在滯留時間為 34.4、36.7、37.6、43.2、53.5 和 56.9 min 時有六個訊號峰。其他具有活性作用的萃取物 [IC_{50}= 0.37 mg/mL (H_2O)、IC_{50}= 0.31 mg/mL (HH_2O) 、IC_{50}= 0.11 mg/mL (EtOH) 、IC_{50}= 0.09 mg/mL

(EtOH-HCl)]，皆和甲醇萃取物(圖五-E)的三個訊號峰(t_R = 36.7、37.6 和 43.2 min)相同，推測此三個訊號峰可能為抗 B 型流感病毒作用的相關活性成分之一。

木香水浸液萃取物和熱水浸液萃取物(39-2)對 A 型流感病毒(A/H1N1)具有抗流感病毒活性作用[IC_{50}= 0.39 mg/mL (H_2O)、IC_{50}= 0.37 mg/mL (HH_2O)]，由化學指紋圖譜分析（圖六），在滯留時間為 5.8、20.6、30.2、36.2 min 時，有相同的訊號峰，而且活性作用相近。其他溶劑的萃取物之中性乙醇萃取物和酸性乙醇萃取物無此四個訊號峰或在甲醇萃取物中為非主要訊號峰，顯示完全不具有抗 A/H1N1 流感病毒活性作用。因此，推測此四個訊號峰可能為抗 A 型流感病毒作用的活性成分（圖六）。

木香水浸液萃取物和熱水浸液萃取物對 B 型流感病毒顯示具有抗流感病毒活性作用[IC_{50}= 0.43 mg/mL (H_2O)、IC_{50}= 0.38 mg/mL (HH_2O)]，由化學指紋圖譜分析（圖六），在滯留時間為 5.8、20.6、30.2 和 36.2 min 時，有相同的訊號峰，而且活性作用相近。其他溶劑的萃取物之中性乙醇萃取物和酸性乙醇萃取物無此四個訊號峰或在甲醇萃取物中為非主要訊號峰，顯示完全不具有抗 A/H1N1 流感病毒活性作用。因此，推測此四個訊號峰可能為抗 B 型流感病毒作用的活性成分（圖六）。

荊芥水浸液萃取物和中性乙醇萃取物對 A 型流感病毒(A/H1N1)具有抗流感病毒活性作用[IC_{50}= 0. 98 mg/mL (H_2O)、IC_{50}= 0.23 mg/mL (EtOH)]，由化學指紋圖譜分析（圖七），在滯留時間為 27.5、40.2、51.3、53.4、56.8 和 63.8 min 時，有相同的六個訊號峰，推測此六個訊號峰為荊芥中性乙醇萃取物的主要活性訊號峰，而荊芥水浸液萃取物除了此六個訊主要號峰之外尚有其他微量的訊號峰存在，因此活性作用可能因此而減少。荊芥不同的溶液萃取物對 B 型流感病毒都具有抗流感病毒活性作用。中性乙醇萃取物之抗流感病毒活性作用活性強(IC_{50}= 0.05 mg/mL)，由化學指紋圖譜分析(圖七)，在滯留時間為 27.5、40.2、51.3、53.4、56.8 和 63.8 min 時，有六個主要訊號峰，而其他具有活性作用的萃取物[IC_{50}= 0.45 mg/mL (H_2O)、IC_{50}= 0.43 mg/mL (HH_2O)、IC_{50}= 0.08 mg/mL (EtOH-HCl)、IC_{50}= 0.10 mg/mL (MEtOH)]，皆和荊芥的乙醇萃取物含有相同的此三個訊號峰(t_R = 51.3、53.4 和 56.8 min)，因此，推測此三個訊號峰可能為抗 B 型流感病毒作用的活性成分。

紫蘇酸性乙醇萃取物對 A/H1N1 及 B 型流感病毒顯示具有抗流感病毒活性作用(IC_{50}= 0.02 mg/mL)，由化學指紋圖譜分析（圖八），在滯留時間為

42.3 min 時，有明顯的主要訊號，此訊號峰和其他不同萃取物的訊號無重覆，推測此訊號峰(t_R= 42.3 min)可能為主要活性成分之一。紫蘇水浸液萃取物和熱水浸液萃取物在抗流感病毒活性作用中，分別對 A/H1N1 [IC_{50}= 0.41 mg/mL (H_2O), IC_{50}= 0.44 mg/mL (HH_2O)]及 B 型流感病毒[IC_{50}= 0.26 mg/mL (H_2O), IC_{50}= 0.29 mg/mL (HH_2O)]皆具有有效的抗流感病毒活性作用。由化學指紋圖譜分析（圖八），在滯留時間為 26.6、29.0、29.4、30.4、32.4 min 時，皆有五個相同明顯的主要訊號峰，推測此五個訊號峰(t_R=26.6、29.0、29.4、30.4、32.4 min)之成分可能亦具有抗病毒之活性。

肆、討論

在 100 年度之計畫，我們選取山楂、山茱萸、木香、荊芥及紫蘇葉等五種中藥，再利用不同溶劑及不同條件來製備粗萃取物，然後再比較各萃取物對抗 A 型及 B 型流感病毒活性。結果顯示，各中藥萃取物普遍對抗 B 型流感病毒之活性較強，對抗 A 型(H1N1)亞型病毒之活性相對比較弱。尤其是木香，雖然對細胞之毒性頗高，但在病毒感染細胞後兩小時再加藥試驗中，其抗 B 型流感病毒之活性，甚至比 oseltamivir 還強。更有趣的是，當多個中藥萃取物，其中包括山楂(水萃、熱水萃、乙醇萃、酸性乙醇萃)、山茱萸(水萃、熱水萃)、木香(水萃、熱水萃)及紫蘇葉(乙醇萃、酸性乙醇萃)在病毒感染細胞前先加藥兩小時再把藥去除的試驗中，皆顯示出具有抗 B 型流感病毒的活性同時，oseltamivir 並不具有抗 B 型流感病毒的活性。究其原因應與 oseltamivir 之作用機制為抑制病毒的神經胺酸酶(neuraminidase)，而神經胺酸酶則在流感病毒複製中負責把新產生的病毒從細胞中釋放出去，此步驟屬病毒複製循環中之最後一步。因此，oseltamivir 在病毒感染細胞前先加入細胞中，無法使細胞本身產生抗病毒活性。另外，在本研究中更發現，oseltamivir 對 A 型流感病毒之抗病毒效果優於對 B 型流感病毒達 3.5 倍之多。相反地，我們測試的中藥則對抗 B 型流感病毒之活性相對較佳。此結果顯示測試的中藥可能可與 oseltamivir 作互補長短之用。

中藥除了具有抗病毒外，從許多研究顯示，某些中藥之特定成份還具有抗發炎之作用。譬如抑制一些引起發炎的細胞激素及抑制過氧化物從細胞中釋放等(Ling et al., 2012)，這些都可作為日後研究之題材。

近年來，由於創新的電腦科技發達，”Molecular docking”已經成為開發抗病毒新藥的一種方法，利用分子模擬結合之技術，可利用資料庫中已有的化合物分子結構，再與不同的病毒蛋白分子結構作配對，找出可能會抑制病毒活性之化合物(Chang et al., 2011)。另外，以相同技術，找出一種可同時與兩個病毒蛋白結合之化合物，來開發抗病毒藥物，則是一種新的思維(Chang et al., 2011)。在本研究中，除了荊芥外，其他四種中藥的萃取物皆同時在病毒感染細胞前先加藥兩小時再把藥去除的試驗中及在病毒感染細胞後兩小時再加藥試驗中顯示抗 B 型流感病毒之活性，表示我們篩選出之個別中藥中，亦含有不同抗病毒的活性成份，一種中藥可同時與多種病毒標的作用。

近年來亦有從數百種中藥稱選抗流感病毒中藥之報告，如 Tian 氏等(2011)之研究中，發現蛇莓(*Duchesnea indica*)之全株、 楓香(*Liquidambar formosana*)之果序、紫草(*Lithospermum*)之根皮、 川楝(*Melia toosendan*)之根皮及夏枯草(*Prunlla vulgaris*)之果棘等，皆具有抗流感病毒神經胺酸酶活性。在我們 99 年度之研究中，利用流感病毒感染雞胚胎蛋的實驗中於 333 種中藥中篩選抗流感之中藥，其中也包含了紫草及夏枯草等。然而，在我們的實驗結果中，上述兩種中藥並未出現抗流感病毒活性。探究其原因，可能與 Tian 氏所採取之實驗方法，是針對流感病毒神經胺酸 酶來作篩選平臺，而我們的實驗方法則以傳統病毒活體感染及細胞感染等實驗來篩選中藥。因此，造成不同研究單位會有不相同的實驗結果之發生。

未來可從多個不同方向中研究上述五種中藥，第一，隨著抗 oseltamivir 抗藥性病毒株之產生，可利用 oseltamivir-resistant strain 來評估中藥的抗病毒效果。第二，為增強抗流感病毒之功效，可利用上述中藥發展不同組合之複方，再評估其抗病毒之效果。第三，以質譜儀來鑑定及純化中藥抗病毒之活性成份。最後，需了解中藥抑制流感病毒之作用機制。以上皆為對於開發有效且專一的抗流感病毒之中藥之必要研究步驟。

伍、結論與建議

100 年度之研究中，以水、熱水、乙醇、酸乙醇及甲醇來萃取山楂、山茱萸、木香、荊芥及紫蘇葉等 5 種中藥。從細胞毒性試驗結果發現，發現由水萃和熱水萃方式所萃取出來的中藥成份對細胞毒性較低，而由乙醇、酸乙醇及甲醇所得之萃取物對細胞毒性較高。在病毒感染細胞中同時加藥試驗，各中藥只有水萃部份具有抗 A 型流感病毒活性。除了木香之各種酒精萃取物及紫蘇葉的乙醇和甲醇萃取物外，其餘各中藥萃取物皆具有不同程度之抗 B 型流感病毒活性。在病毒感染細胞前先加藥兩小時再把藥去除的試驗中，所有萃取物皆不具有抗 A 型流感病毒之活性，但山楂、山茱萸、木香及紫蘇葉等 4 種中藥之不同萃取物則具有抗 B 型流感病毒之活性。在病毒感染細胞後兩小時再加藥試驗，各中藥萃取物只有其水萃及熱水萃部份對 A 型流感病毒具有抗病毒活性，某些中藥萃取物對 B 型流感病毒亦具有抗病毒活性。綜合以上結果，各中藥之萃取物對 B 型流感之抗病毒活性相對比較強，這可與現今使用的 oseltamivir 作互補之用。本研究之成果可提供開發抗流感中樂提供很多數據。未來研究之方向甚多，已經在前段敘述，在此不再重複，建議可後續擴充研究，為找出新的抗流感中藥為目標。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP100-RD-120 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. 行政院衛生署中華藥典編修委員會，2006
2. 李時珍著，御史編譯。2008。 本草綱目。
3. Alleva LM, Cai C, and Clark IA: Using Complementary and Alternative Medicines to Target the Host Response during Severe Influenza. *Evid Based Complement Alternat Med* 2010; 7: 501-510.
4. Balls M, Riddell R., and Worden AN: Animals and alternatives in toxicity testing. 1983; Academic Press, London; New York.
5. Centers for Disease Control and Prevention: Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 1(58): 433-435.
6. Chang JS, Wang KC, and Chiang LC: Sheng-Ma-Ge-Gen-Tang inhibited Enterovirus 71 infection in human foreskin fibroblast cell line. *J Ethnopharmacol* 2008; 119: 104-108.
7. Chang SS, Huang HJ, Chen CY: Two birds with one stone? Possible dual-targeting H1N1 inhibitors from traditional Chinese medicine. *PLoS Comput Biol* 2011;7: e1002315.
8. Chen CJ, Michaelis M, Hsu HK, Tsai CC, Yang KD, Wu YC, Cinatl J Jr, and Doerr HW: Toona sinensis Roem tender leaf extract inhibits SARS coronavirus replication. *J Ethnopharmacol* 2008; 30: 108-111.
9. Chen ZW, Wu LW, Liu ST, Cai CP, Rao PF, and Ke LJ: Mechanism study of anti-influenza effects of Radix Isatidis water extract by red blood cells capillary electrophoresis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2006; 31: 1715-1719.
10. Cheng HY, Lin LT, Huang HH, Yang CM, and Lin CC: Yin Chen Hao Tang, a Chinese prescription, inhibits both herpes simplex virus type-1 and type-2 infections in vitro. *Antiviral Res* 2008; 77: 14-19.
11. Cheng PK, Leung TW, Ho EC, Leung PC, Ng AY, Lai MY, and Lim WW: Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1).*Emerg Infect Dis* 2009; 15: 966-968.
12. Droebner K, Ehrhardt C, Poetter A, Ludwig S, and Planz O: CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res* 2007; 76: 1-10.

13. Ehrhardt C, Hrincius ER, Korte V, Mazur I, Droebner K, Poetter A, Dreschers S, Schmolke M, Planz O, and Ludwig S: A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti-influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res* 2007; 76: 38-47.
14. Farage-Elawar, M: Development of esterase activities in the chicken before and after hatching. *Neurotoxicol Teratol* 1991; 13:147-152.
15. Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, and Osterhaus ADME: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; 79: 2814-2822.
16. Gaush, CR, and Smith TF: Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl Microbiol* 1968; 16: 588-594.
17. Gubareva, LV, Kaiser L, and Hayden FG: Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000; 355:827-835.
18. Gulati S, Smith DF, and Air GM: Deletions of neuraminidase and resistance to oseltamivir may be a consequence of restricted receptor specificity in recent H3N2 influenza viruses.*Virol J* 2009; 14: 6-22.
19. Handel A, Longini IM, and Jr, Antia R: Neuraminidase inhibitor resistance in influenza: assessing the danger of its generation and spread. *PLoS Comput Biol* 2007; 3: e240.
20. He G, Massarella J, and Ward P: Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clin Pharmacok* 1999; 37:471-484.
21. He J, Bose ME, Beck ET, Fan J, Tiwari S, Metallo J, Jurgens LA, Kehl SC, Ledeboer N, and Kumar S: Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (human), N1 (animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2009;47:2772-2778.
22. He Y, Gai Y, Wu X, Wan H: Quantitatively analyze composition principle of Ma Huang Tang by structural equation modeling. *J Ethnopharmacol* 2012; 143: 851-858.

23. Hsu CH, Hwang KC, Chao CL, Chang SG, Ho MS, Lin JG, Chang HH, Kao ST, Chen YM, and Chou P: An Evaluation of the Additive Effect of Natural Herbal Medicine on SARS or SARS-like Infectious Diseases in 2003: A Randomized, Double-blind, and Controlled Pilot Study. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 5: 355-362.
24. Hungnes O, and Dudman SG: Resistance in influenza viruses. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2008; 128: 2601-2606.
25. Hurt AC, Ho HT, and Barr I: Resistance to anti-influenza drugs: adamantanes and neuraminidase inhibitors. *Expert Rev Anti-infectiveTher* 2006; 4:795-805.
26. Ito T, Suzuki Y, Takada A, Kawamoto A, Otsuki K, Masuda H, Yamada M, Suzuki T, Kida H, and Kawaoka Y: Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J Virol* 1997; 71:3357-3362.
27. Jiang YN, and Mo HY: Anti-viral effects of Tankejing preparations against influenza virus A. *Zhong Yao Cai* 2009; 32: 29-32.
28. Katz JM, Naeve CW, and Webster RG: Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses. *Virology* 1987; 156: 386-395.
29. Kuo YC, Lin YL, Liu CP, Tsai WJ: Herpes simplex virus type 1 propagation in HeLa cells interrupted by Nelumbo nucifera. *J Biomed Sci* 2005; 12: 1021-1034.
30. Lin CW, Wu CF, Hsiao NW, Chang CY, Li SW, Wan L, Lin YJ, and Lin WY: Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 355-359.
31. Ling JX, Wei F, Li N, Li JL, Chen LJ, Liu YY, Luo F, Xiong HR, Hou W, Yang ZQ: Amelioration of influenza virus-induced reactive oxygen species formation by epigallocatechin gallate derived from green tea. *Acta Pharmacol Sin* 2012; doi:10.1038.
32. Liu AL, Liu B, Qin HL, Lee SM, Wang YT, and Du GH: Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant Elsholtzia rugulosa. *Planta Med* 2008; 74: 847-851.
33. Liu AL, Shu SH, Qin HL, Lee SM, Wang YT, and Du GH: In vitro

anti-influenza viral activities of constituents from Caesalpinia sappan. *Planta Med* 2009; 75: 337-339.

34. Nicholson KG, Wood JM, and Zambon M: Influenza. *Lancet* 2003; 362, 1733-1745.
35. Ohta Y, Lee JB, Hayashi K, Fujita A, Park DK, and Hayashi T: In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from Cordyceps militaris grown on germinated soybeans. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 10194-10199.
36. Peng H, Lv H, Wang Y, Liu Y, Li C, Meng L, Chen F, and Bao J: Clematis montana lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. *Peptides* 2009; 30: 1805-1815.
37. Sakagami H, Takeda M, Kawazoe Y, Nagata K, Ishihama A, Ueda M, and Yamazaki S: Anti-influenza virus activity of a lignin fraction from cone of Pinus parviflora Sieb. et Zucc. *In vivo (Athens, Greece)*. 1992; 6: 491-495.
38. Sauerbrei A, Haertl A, Brandstaedt A, Schmidtke M, and Wutzler P: Utilization of the embryonated egg for in vivo evaluation of the anti-influenza virus activity of neuraminidase inhibitors. *Med Microbiol Immunol* 2006; 195: 65-71.
39. Sawai R, Kuroda K, Shibata T, Gomyou R, Osawa K, and Shimizu K: Anti-influenza virus activity of Chaenomeles sinensis. *J Ethnopharmacol* 2008; 118: 108-112.
40. Schild G, Oxford J, De Jong J, and Webster R: Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature* 1983; 303: 706-709.
41. Serkedjieva J, Toshkova R, Antonova-Nikolova S, Stefanova T, Teodosieva A, Ivanova I: Effect of a plant polyphenol-rich extract on the lung protease activities of influenza-virus-infected mice. *Antivir Chem Chemother* 2007; 18: 75-82.
42. Shahat, AA, Cos P, De Bruyne T, Apers S, Hammouda FM, Ismail SI, Azzam S, Claeys M, Goovaerts E, and Pieters L: A ntiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from Crataegus sinaica. *Planta medica* 2002; 68: 539-541.
43. Sheu, TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA,

Butler EN, Wallis TR, Klimov AI, and Gubareva LV: Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimic Agents Chemother* 2008; 52: 3284-3292.

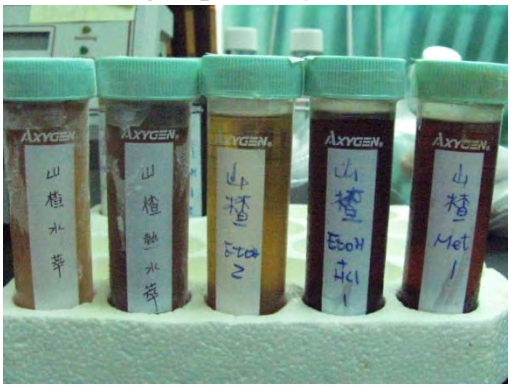
44. Shih SR, Chen GW, Yang CC, Yang WZ, Liu DP, Lin JH, Chiu SC, Chen HY, Tsao KC, Huang CG, Huang YL, Mok CK, Chen CJ, Lin TY, Wang JR, Kao CL, Lin KH, Chen LK, Eng HL, Liu YC, Chen PY, Lin JS, Wang JH, Lin CW, Chan YJ, Lu JJ, Hsiung CA, Chen PJ and Su IJ: Laboratory-based surveillance and molecular epidemiology of influenza virus in Taiwan. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43: 1651-1661.
45. Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, Park YK, Watanabe W, and Kurokawa M: Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemother* 2008; 19: 7-13.
46. Tian L, Wang Z, Wu H, Wang S, Wang Y, Wang Y, Xu J, Wang L, Qi F, Fang M, Yu D, Fang X: Evaluation of the anti-neuraminidase activity of the traditional Chinese medicines and determination of the anti-influenza A virus effects of the neuraminidase inhibitory TCMs in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 534-542.
47. Vicente D, Cilla G, Montes M, Mendiola J, and Pérez-Trallero E: Rapid spread of drug-resistant influenza A viruses in the Basque Country, northern Spain, 2000-1 to 2008-9. *Euro Surveill* 2009; 14: 19215.
48. Wang, X, Jia W, and Zhao A: Anti influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. *Phytother Res* 2006; 20: 335-341.
49. Watanabe W, Konno K, Ijichi K, Inoue H, Yokota T, and Shigeta S: MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo-and anti-paramyxoviral agents. *J Virol Meth* 1994; 48: 257-265.
50. Wirotesangthong M, Nagai T, Yamada H, Amnuoypol S, and Mungmee C: Effects of Clinacanthus siamensis leaf extract on influenza virus infection. *Microbiol Immunol* 2009; 53: 66-74.
51. Wolkerstorfer A, Kurz H, Bachhofner N, and Szolar OH: Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Res* 2009; 83: 171-178.
52. Woods J, Bethell R, Coates J, Healy N, Hiscox S, Pearson B, Ryan D,

Ticehurst J, Tilling J, and Walcott S: 4-Guanidino-2, 4-dideoxy-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro. *Antivir Chem Chemother* 1993; 37: 1473-1479.

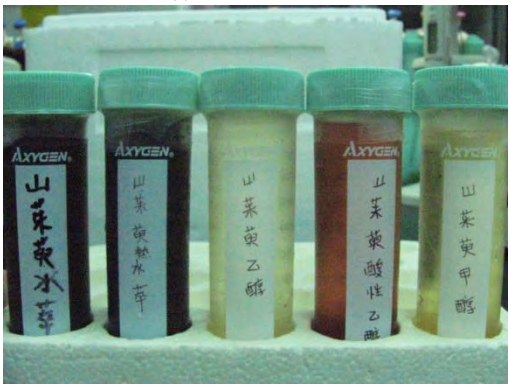
53. Wright K, Wilson G, Novosad D, Dimock C, Tan D, and Weber J: Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1180-1184.
54. Yingsakmongkon S, Miyamoto D, Sriwilaijaroen N, Fujita K, Matsumoto K, Jampangern W, Hiramatsu H, Guo CT, Sawada T, and Takahashi T: In vitro inhibition of human influenza A virus infection by fruit-juice concentrate of Japanese plum (Prunus mume SIEB. et ZUCC). *Biol Ph arm Bull* 2008; 31: 511-515.

柒、圖、表

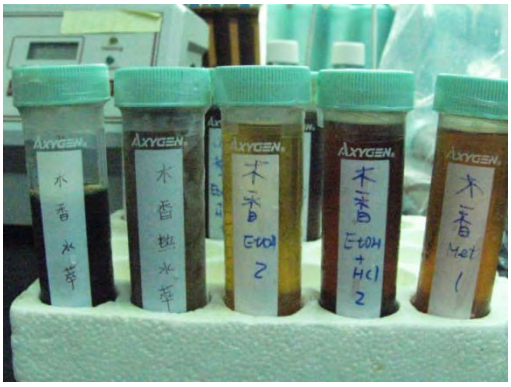
a. *Crataegus pinnatifida*



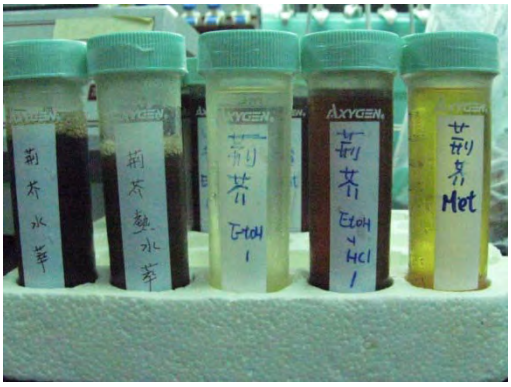
b. *Cornus officinalis*



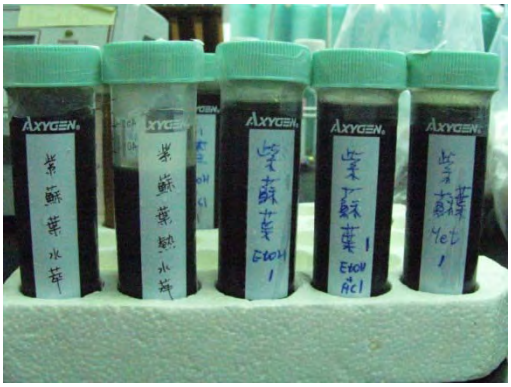
c. *Aucklandia lappa*



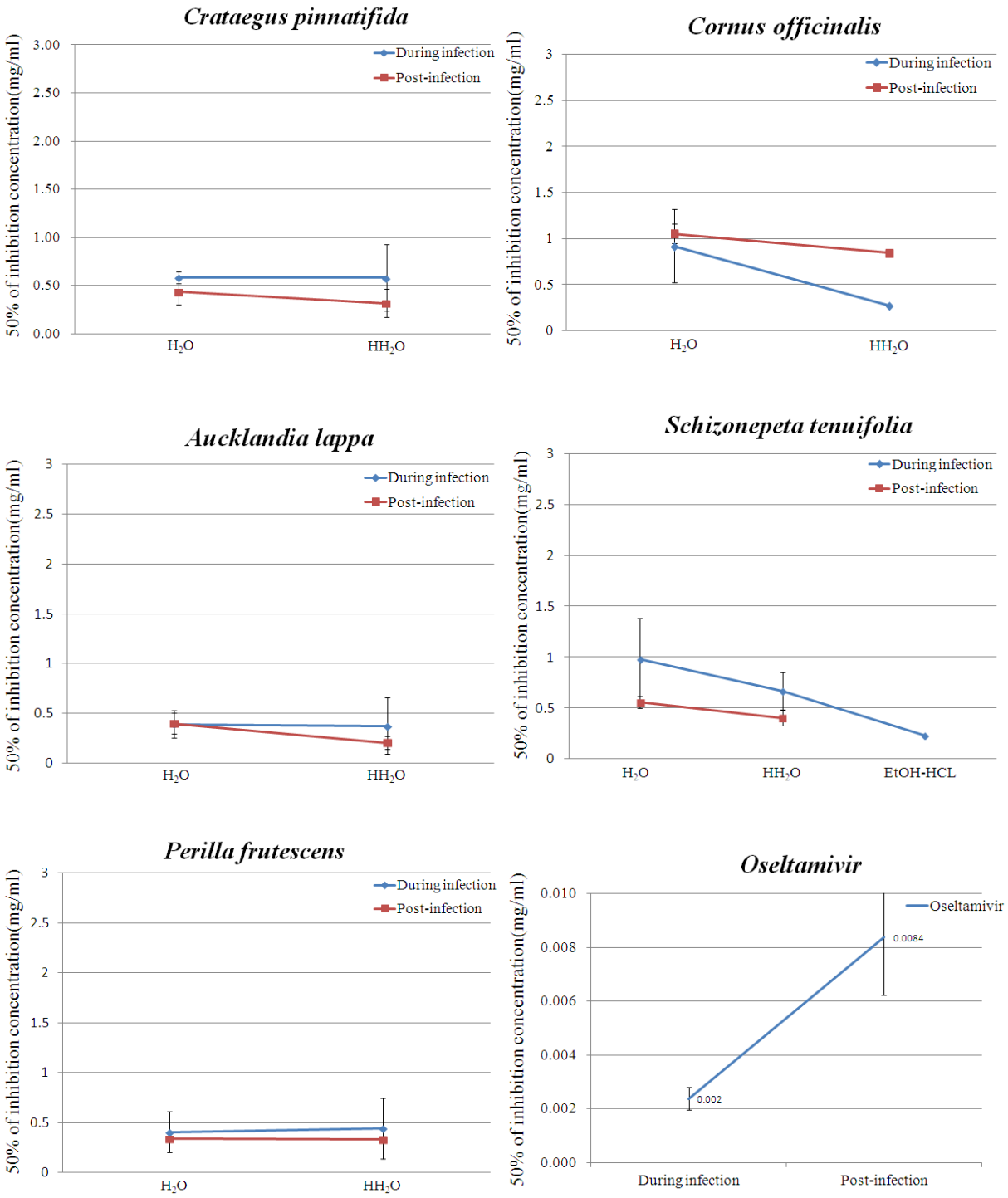
d. *Schizonepeta tenuifolia*



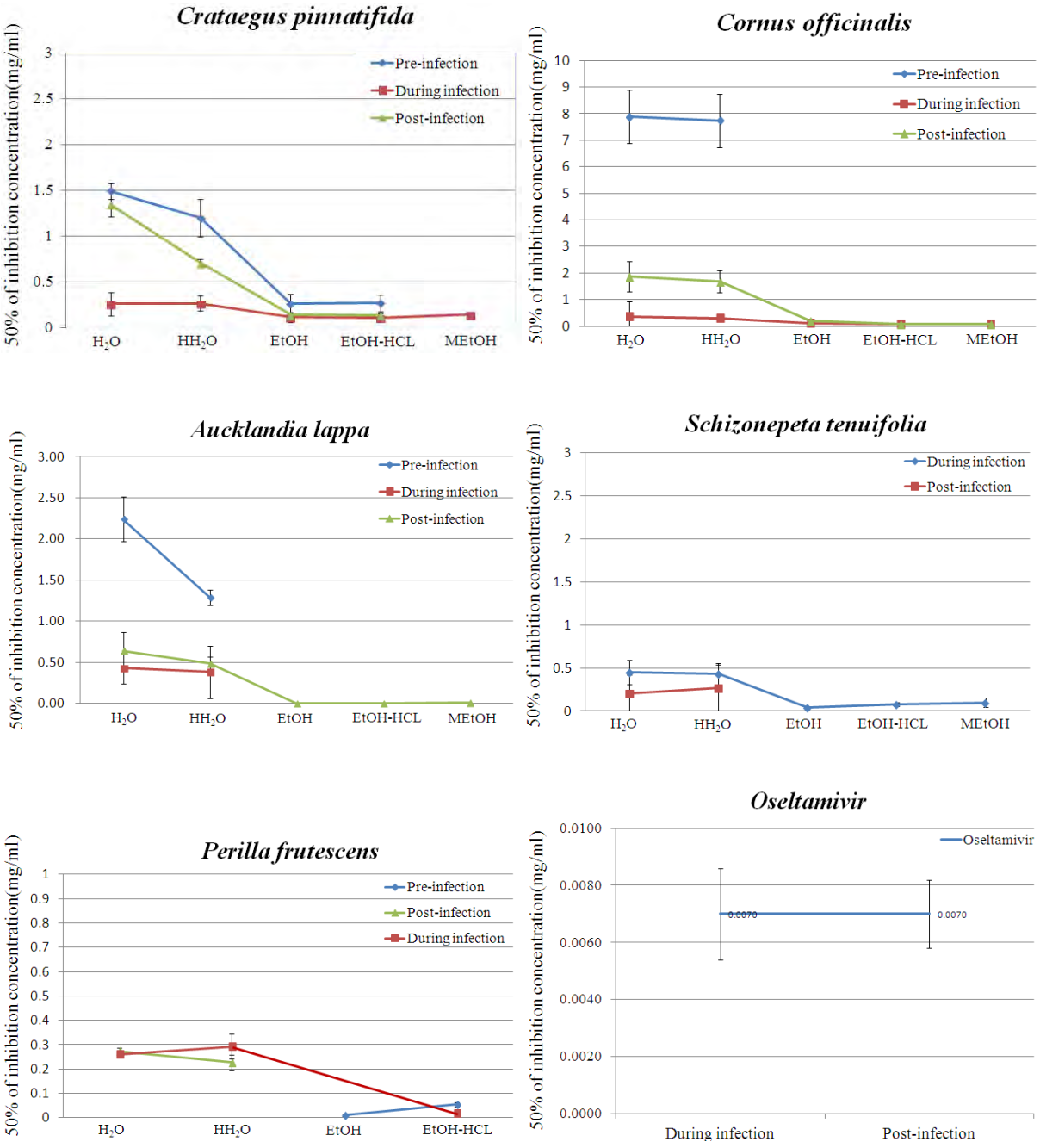
e. *Perilla frutescens*



圖一、待測中藥以五種不同方法萃取之萃取物，從左至右為水萃、熱水萃、乙醇萃、酸乙醇萃及甲醇萃

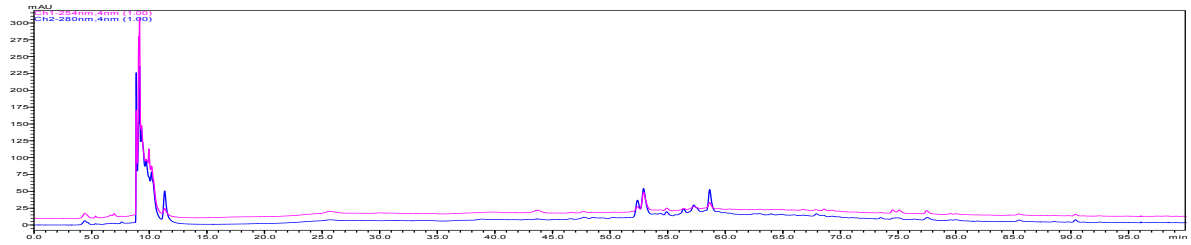


圖二、比較待測中藥以五種不同方法萃取之萃取物對抗 A 型流感病毒的活性：水萃(H_2O)、熱水萃(HH_2O)、乙醇萃(EtOH)、酸乙醇萃(EtOH-HCl)及甲醇萃(MEtOH)

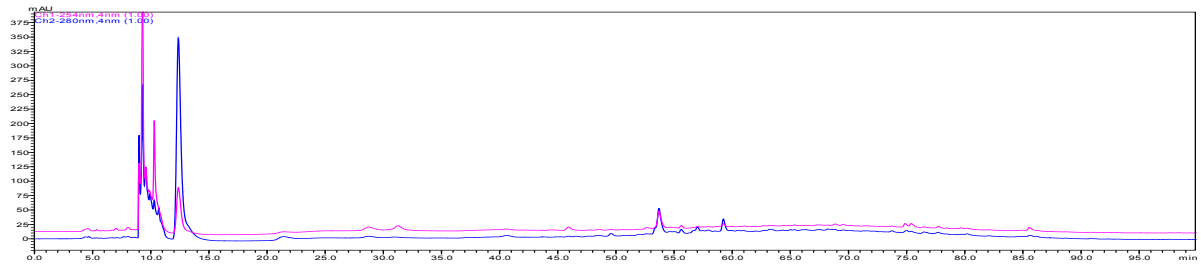


圖三、比較待測中藥以五種不同方法萃取之萃取物對抗 B 型流感病毒的活性：水萃(H_2O)、熱水萃(HH_2O)、乙醇萃(EtOH)、酸乙醇萃(EtOH-HCl)及甲醇萃(MEtOH)

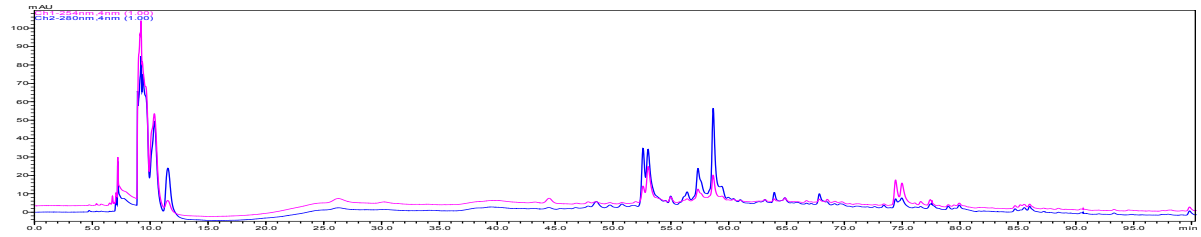
(A)



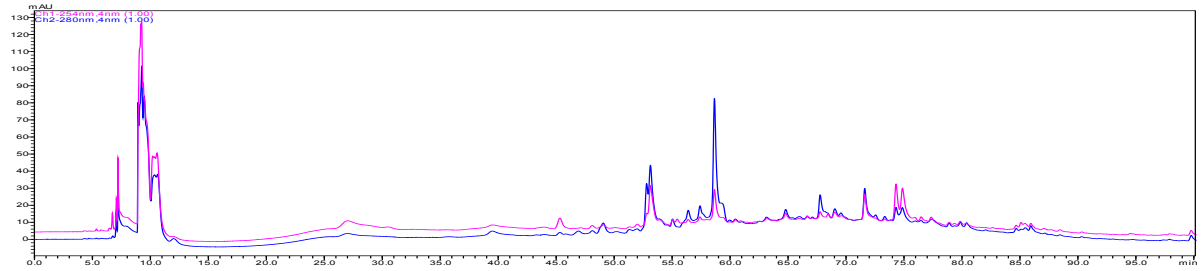
(B)



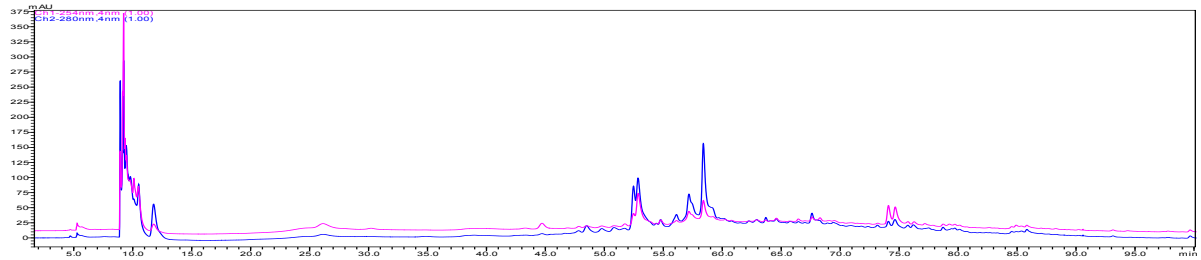
(C)



(D)

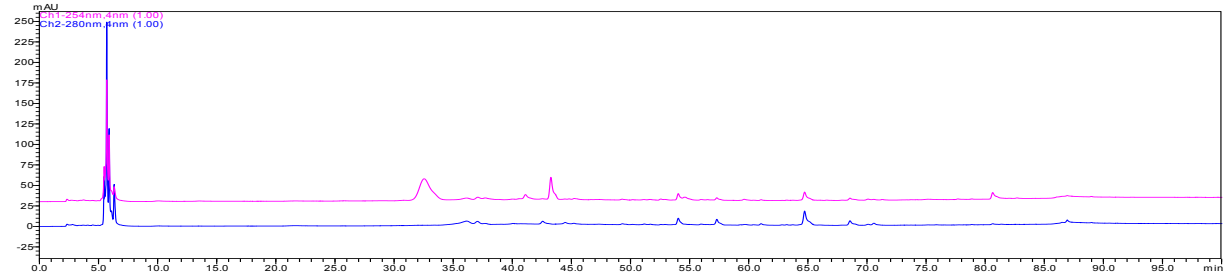


(E)

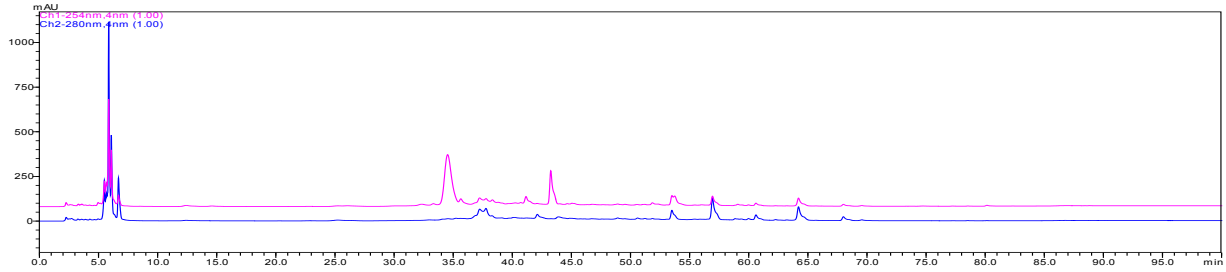


圖四、山楂之 HPLC 指紋圖譜：(A) 水萃，(B) 熱水萃，(C) 乙醇萃，(D) 酸乙醇萃，(E) 甲醇萃。流出物以 254 nm 及 280nm 之波長偵測。

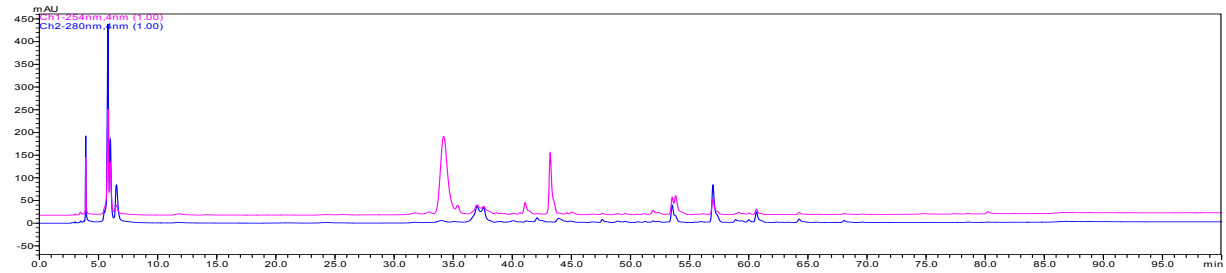
(A)



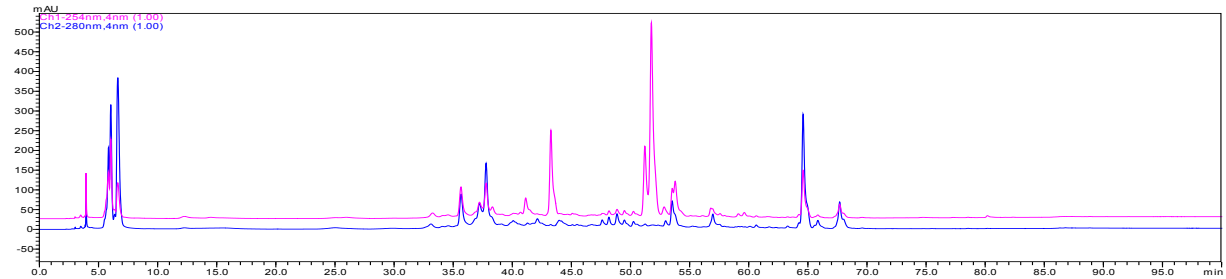
(B)



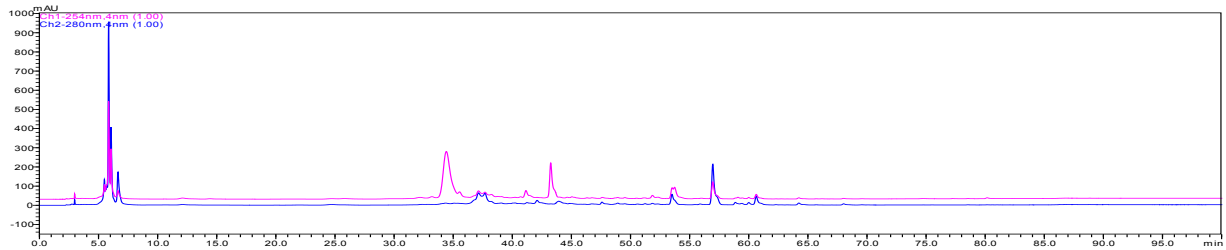
(C)



(D)

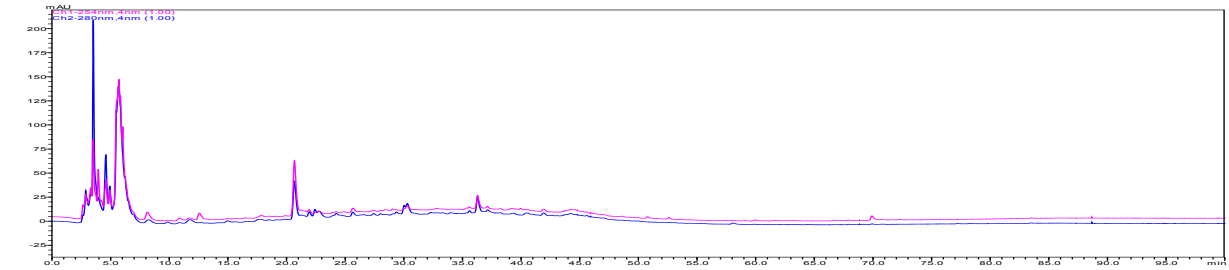


(E)

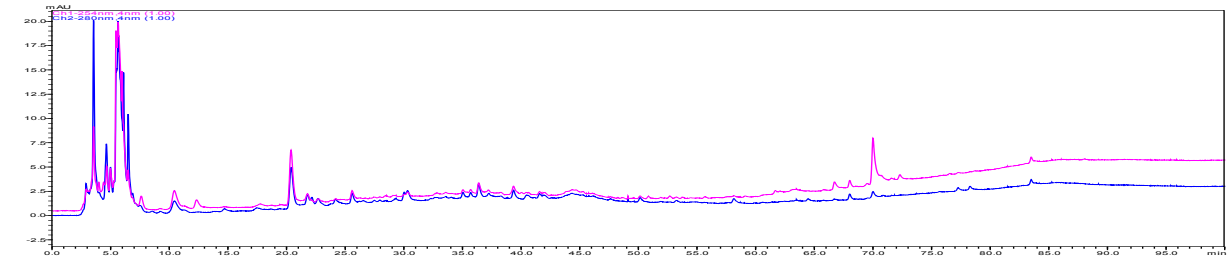


圖五、山茱萸之 HPLC 指紋圖譜：(A) 水萃，(B) 熱水萃，(C) 乙醇萃，(D) 酸乙醇萃，(E) 甲醇萃。流出物以 254 nm 及 280nm 之波長偵測。

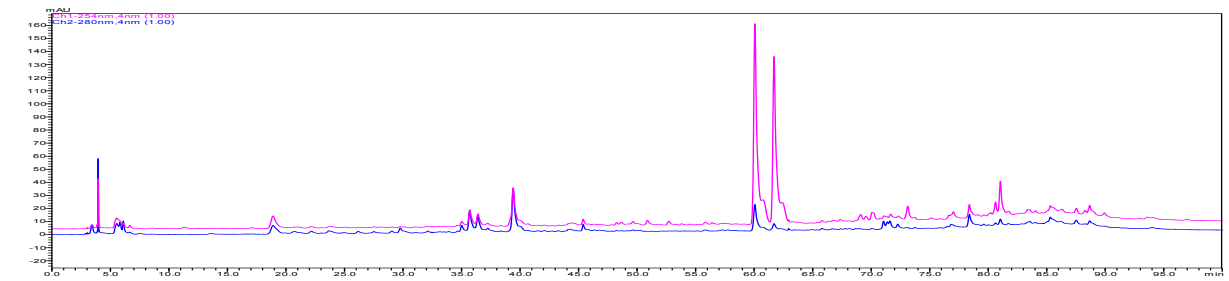
(A)



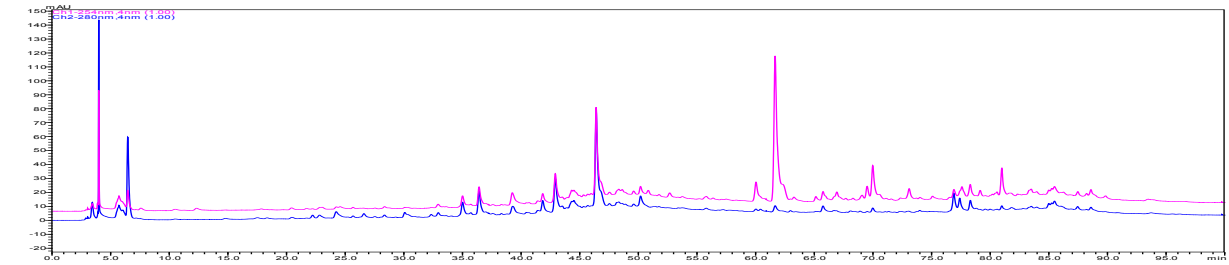
(B)



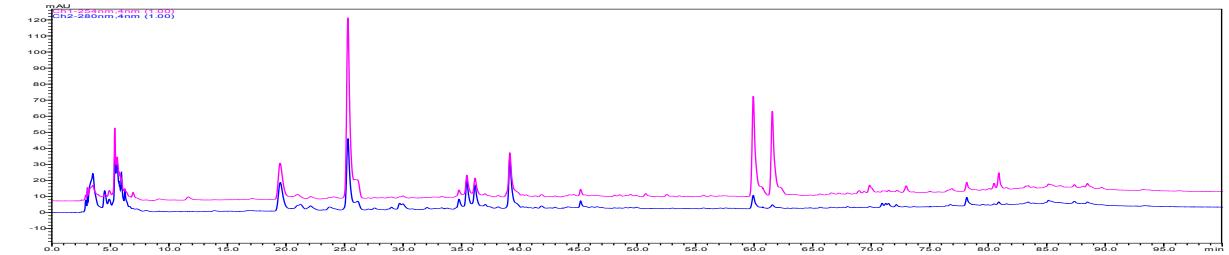
(C)



(D)

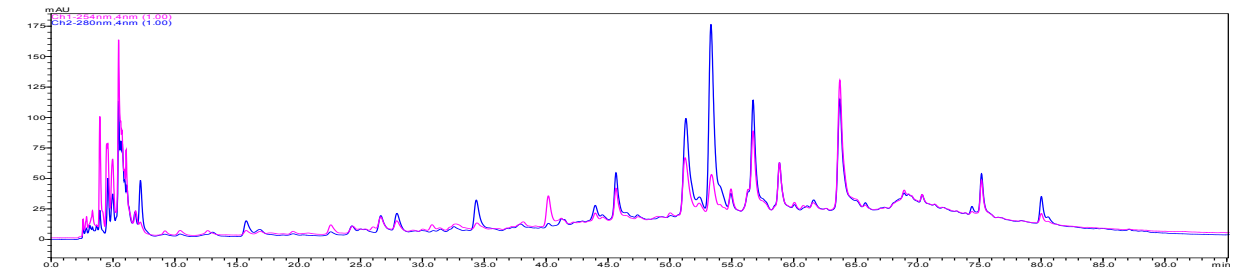


(E)

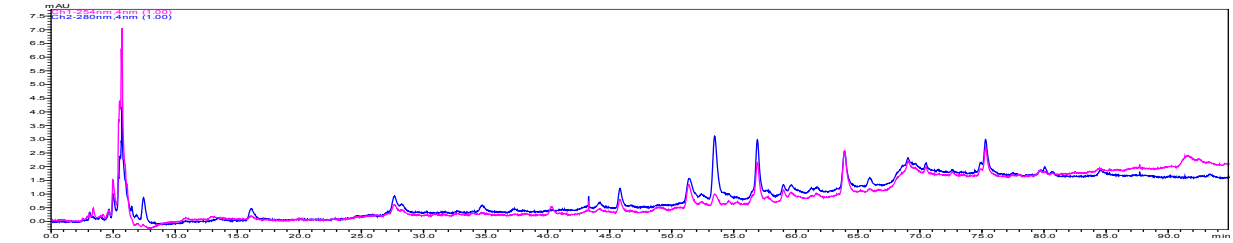


圖六、木香之 HPLC 指紋圖譜：(A) 水萃， (B) 熱水萃，(C) 乙醇萃，(D) 酸乙醇萃，(E) 甲醇萃。流出物以 254 nm 及 280nm 之波長偵測。

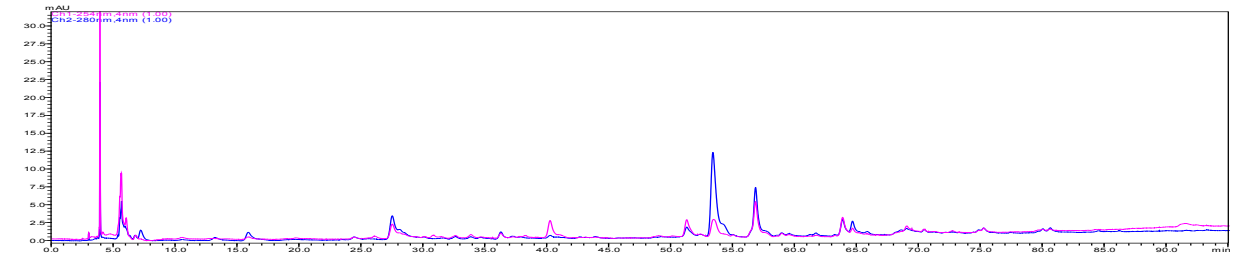
(A)



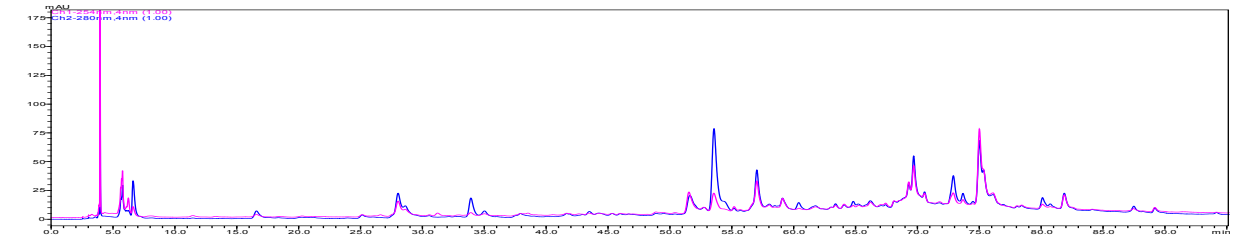
(B)



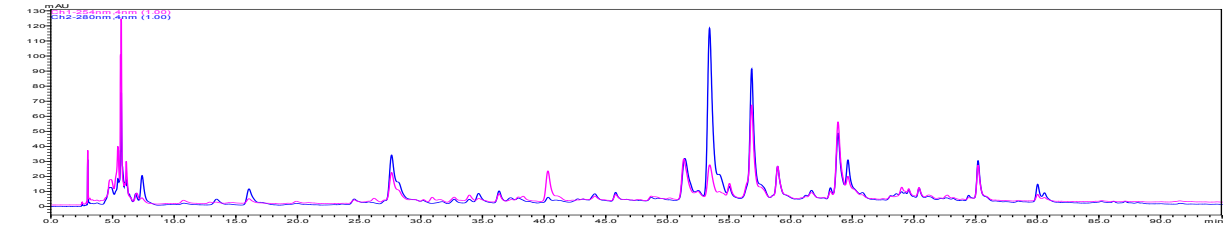
(C)



(D)

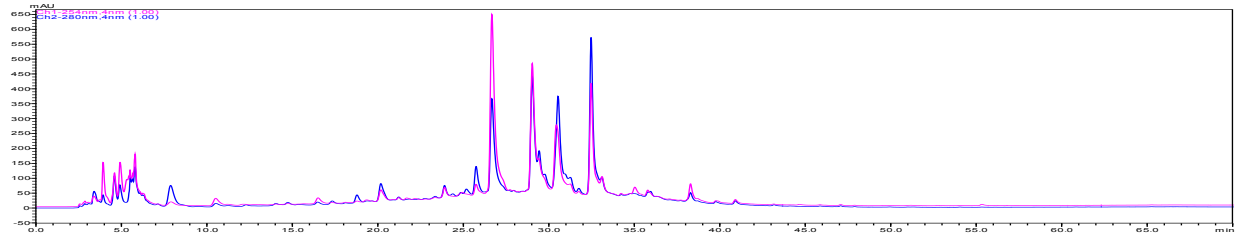


(E)

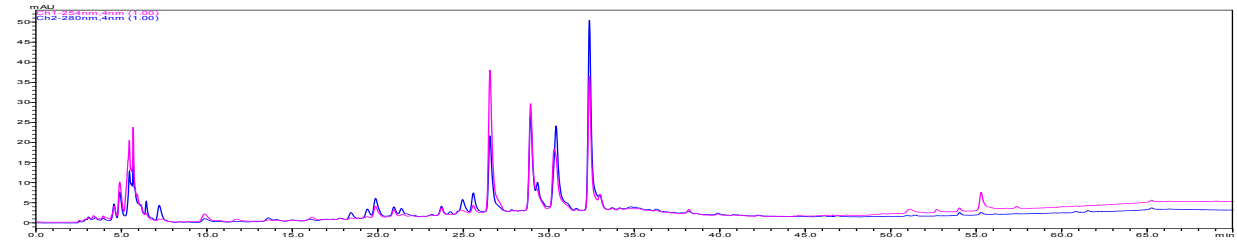


圖七、荊芥之 HPLC 指紋圖譜：(A) 水萃， (B) 熱水萃，(C) 乙醇萃，(D) 酸乙醇萃，(E) 甲醇萃。流出物以 254 nm 及 280nm 之波長偵測。

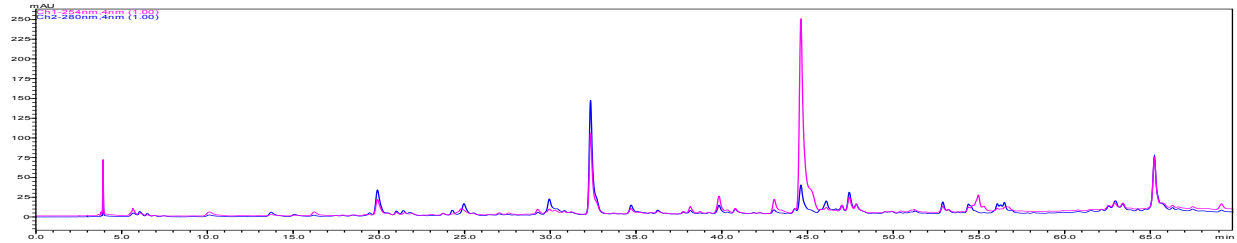
(A)



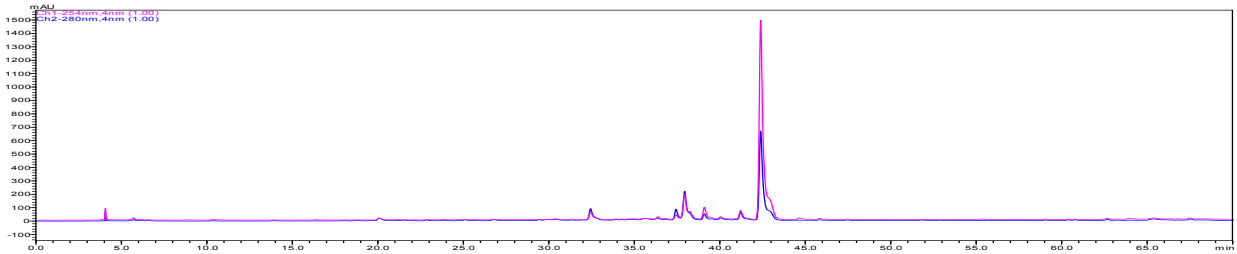
(B)



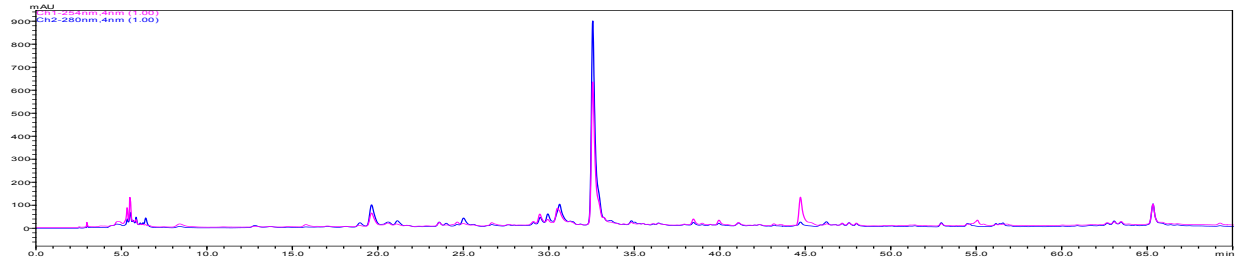
(C)



(D)



(E)



圖八、紫蘇葉之 HPLC 指紋圖譜：(A) 水萃， (B) 熱水萃，(C) 乙醇萃，(D) 酸乙醇萃，(E) 甲醇萃。流出物以 254 nm 及 280nm 之波長偵測。

表一、以不同萃取法獲得之各中藥粗萃取物淨重

TCMs	Extraction methods				
	H_2O	HH_2O	EtOH	EtOH-HCL	MEtOH
Crataegus pinnatifida	77	83	28	42.5	51
Cornus officinalis	115.5	110.5	38	36	19.5
Aucklandia lappa	112.5	52	10.5	15	22
Schizonepeta tenuifolia	101	95.5	5	13	12.5
Perilla frutescens	167.5	169.5	4.5	9.5	12
					(mg/ml)

H_2O: Water, room temperature, overnight; HH_2O: Water, 60 °C, 10 min; EtOH: 95% ethanol; EtOH-HCl: 95% ethanol+0.5% HCl; MEtOH: 100% Methanol

表二、各中藥在 MDCK 細胞中之平均細胞毒性(CC50)

TCMs	Extraction methods	Av.CC50 (mg/ml)
Crataegus pinnatifida	H_2O	10.23±1.62
	HH_2O	11.22±1.89
	EtOH	2.14±1.15
	EtOH-HCL	1.74±0.69
	MEtOH	0.75±0.31
Cornus officinalis	H_2O	35.50±2.31
	HH_2O	38.48±2.50
	EtOH	1.79±0.23
	EtOH-HCL	1.71±0.16
	MEtOH	2.10±0.23
Aucklandia lappa	H_2O	7.11±1.20
	HH_2O	5.52±1.53
	EtOH	0.02±0.01
	EtOH-HCL	0.03±0.01
	MEtOH	0.04±0.02
Schizonepeta tenuifolia	H_2O	10.16±1.18
	HH_2O	9.56±1.16
	EtOH	0.37±0.02
	EtOH-HCL	0.52±0.05
	MEtOH	2.67±1.14
Perilla frutescens	H_2O	4.65±0.99
	HH_2O	5.80±0.47
	EtOH	0.03±0.01
	EtOH-HCL	0.20±0.05
	MEtOH	0.10±0.04
Oseltamivir		0.97±0.00

表三、各中藥粗萃取物抗 A/H1N1 流感病毒之效果(感染中加藥)

TCMs	Extraction methods	CC_{50}(mg/ml)	IC_{50}(mg/ml)	SI
Crataegus pinnatifida	H_2O	10.23±1.62	0.58±0.06	17.64
	HH_2O	11.22±1.89	0.58±0.34	19.34
	EtOH	2.14±1.15	ND	ND
	EtOH-HCL	1.74±0.69	ND	ND
	MEtOH	0.75±0.31	ND	ND
Cornus officinalis	H_2O	35.50±2.31	0.92±0.40	38.59
	HH_2O	38.48±2.50	0.28±0.00	137.43
	EtOH	1.79±0.23	ND	ND
	EtOH-HCL	1.71±0.16	ND	ND
	MEtOH	2.10±0.23	ND	ND
Aucklandia lappa	H_2O	7.11±1.20	0.39±0.14	18.23
	HH_2O	5.52±1.53	0.37±0.28	14.92
	EtOH	0.02±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.03±0.01	ND	ND
	MEtOH	0.04±0.02	ND	ND
Schizonepeta tenuifolia	H_2O	10.16±1.18	0.98±0.40	10.37
	HH_2O	9.56±1.16	0.67±0.19	14.27
	EtOH	0.37±0.02	ND	ND
	EtOH-HCL	0.52±0.05	0.23±0.03	2.26
	MEtOH	2.67±1.14	ND	ND
Perilla frutescens	H_2O	4.65±0.99	0.41±0.21	11.34
	HH_2O	5.80±0.47	0.44±0.30	13.18
	EtOH	0.03±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.20±0.05	ND	ND
	MEtOH	0.10±0.04	ND	ND
Oseltamivir		0.97±0.00	0.002±0.0	485.00

表四、各中藥粗萃取物抗 B 型流感病毒之效果(感染中加藥)

TCMs	Extraction methods	CC_{50}(mg/ml)	IC_{50}(mg/ml)	SI
Crataegus pinnatifida	H_2O	10.23±1.62	0.26±0.13	39.35
	HH_2O	11.22±1.89	0.26±0.08	43.15
	EtOH	2.14±1.15	0.11±0.05	19.45
	EtOH-HCL	1.74±0.69	0.11±0.05	15.82
	MEtOH	0.75±0.31	0.14±0.02	5.36
Cornus officinalis	H_2O	35.50±2.31	0.37±0.12	95.95
	HH_2O	38.48±2.50	0.31±0.17	124.12
	EtOH	1.79±0.23	0.11±0.14	16.27
	EtOH-HCL	1.71±0.16	0.09±0.01	19.0
	MEtOH	2.10±0.23	0.08±0.03	26.25
Aucklandia lappa	H_2O	7.11±1.20	0.43±0.19	16.5
	HH_2O	5.52±1.53	0.38±0.32	14.53
	EtOH	0.02±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.03±0.01	ND	ND
	MEtOH	0.04±0.02	ND	ND
Schizonepeta tenuifolia	H_2O	10.16±1.18	0.45±0.14	22.58
	HH_2O	9.56±1.16	0.43±0.12	22.23
	EtOH	0.37±0.02	0.05±0.01	7.40
	EtOH-HCL	0.52±0.05	0.08±0.02	6.50
	MEtOH	2.67±1.14	0.10±0.06	26.70
Perilla frutescens	H_2O	4.65±0.99	0.26±0.01	17.88
	HH_2O	5.80±0.47	0.29±0.05	20.0
	EtOH	0.03±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.20±0.05	0.02±0.01	10.0
	MEtOH	0.10±0.04	ND	ND
Oseltamivir		0.97±0.00	0.007±0.00	138.57

表五、各中藥粗萃取物抗 A/H1N1 流感病毒之效果(感染前加藥)

TCMs	Extraction methods	CC_{50}(mg/ml)	IC_{50}(mg/ml)	SI
Crataegus pinnatifida	H_2O	10.23±1.62	ND	ND
	HH_2O	11.22±1.89	ND	ND
	EtOH	2.14±1.15	ND	ND
	EtOH-HCL	1.74±0.69	ND	ND
	MEtOH	0.75±0.31	ND	ND
Cornus officinalis	H_2O	35.50±2.31	ND	ND
	HH_2O	38.48±2.50	ND	ND
	EtOH	1.79±0.23	ND	ND
	EtOH-HCL	1.71±0.16	ND	ND
	MEtOH	2.10±0.23	ND	ND
Aucklandia lappa	H_2O	7.11±1.20	ND	ND
	HH_2O	5.52±1.53	ND	ND
	EtOH	0.02±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.03±0.01	ND	ND
	MEtOH	0.04±0.02	ND	ND
Schizonepeta tenuifolia	H_2O	10.16±1.18	ND	ND
	HH_2O	9.56±1.16	ND	ND
	EtOH	0.37±0.02	ND	ND
	EtOH-HCL	0.52±0.05	ND	ND
	MEtOH	2.67±1.14	ND	ND
Perilla frutescens	H_2O	4.65±0.99	ND	ND
	HH_2O	5.80±0.47	ND	ND
	EtOH	0.03±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.20±0.05	ND	ND
	MEtOH	0.10±0.04	ND	ND
Oseltamivir		0.97±0.00	ND	ND

表六、各中藥粗萃取物抗 B 型流感病毒之效果(感染前加藥)

TCMs	Extraction methods	CC_{50}(mg/ml)	IC_{50}(mg/ml)	SI
Crataegus pinnatifida	H_2O	10.23±1.62	1.49±0.09	6.87
	HH_2O	11.22±1.89	1.20±0.21	9.35
	EtOH	2.14±1.15	0.26±0.10	8.23
	EtOH-HCL	1.74±0.69	0.27±0.09	6.44
	MEtOH	0.75±0.31	ND	ND
Cornus officinalis	H_2O	35.50±2.31	7.88±0.56	4.51
	HH_2O	38.48±2.50	7.74±0.11	4.97
	EtOH	1.79±0.23	ND	ND
	EtOH-HCL	1.71±0.16	ND	ND
	MEtOH	2.10±0.23	ND	ND
Aucklandia lappa	H_2O	7.11±1.20	2.24±0.27	3.17
	HH_2O	5.52±1.53	1.29±0.09	4.28
	EtOH	0.02±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.03±0.01	ND	ND
	MEtOH	0.04±0.02	ND	ND
Schizonepeta tenuifolia	H_2O	10.16±1.18	ND	ND
	HH_2O	9.56±1.16	ND	ND
	EtOH	0.37±0.02	ND	ND
	EtOH-HCL	0.52±0.05	ND	ND
	MEtOH	2.67±1.14	ND	ND
Perilla frutescens	H_2O	4.65±0.99	ND	ND
	HH_2O	5.80±0.47	ND	ND
	EtOH	0.03±0.01	0.01±0.00	3.0
	EtOH-HCL	0.20±0.05	0.05±0.01	4.0
	MEtOH	0.10±0.04	ND	ND
Oseltamivir		0.97±0.00	ND	ND

表七、各中藥粗萃取物抗 A/H1N1 流感病毒之效果(感染後加藥)

TCMs	Extraction methods	CC_{50}(mg/ml)	IC_{50}(mg/ml)	SI
Crataegus pinnatifida	H_2O	10.23±1.62	0.43±0.13	23.79
	HH_2O	11.22±1.89	0.32±0.15	35.06
	EtOH	2.14±1.15	ND	ND
	EtOH-HCL	1.74±0.69	ND	ND
	MEtOH	0.75±0.31	ND	ND
Cornus officinalis	H_2O	35.50±2.31	1.05±0.10	33.81
	HH_2O	38.48±2.50	0.84±0.00	45.81
	EtOH	1.79±0.23	ND	ND
	EtOH-HCL	1.71±0.16	ND	ND
	MEtOH	2.10±0.23	ND	ND
Aucklandia lappa	H_2O	7.11±1.20	0.40±0.11	17.78
	HH_2O	5.52±1.53	0.20±0.06	27.6
	EtOH	0.02±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.03±0.01	ND	ND
	MEtOH	0.04±0.02	ND	ND
Schizonepeta tenuifolia	H_2O	10.16±1.18	0.56±0.06	18.14
	HH_2O	9.56±1.16	0.40±0.07	23.90
	EtOH	0.37±0.02	ND	ND
	EtOH-HCL	0.52±0.05	ND	ND
	MEtOH	2.67±1.14	ND	ND
Perilla frutescens	H_2O	4.65±0.99	0.34±0.03	13.68
	HH_2O	5.80±0.47	0.33±0.01	17.58
	EtOH	0.03±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.20±0.05	ND	ND
	MEtOH	0.10±0.04	ND	ND
Oseltamivir		0.97±0.00	0.008±0.002	121.25

表八、各中藥粗萃取物抗 B 型流感病毒之效果(感染後加藥)

TCMs	Extraction methods	CC_{50}(mg/ml)	IC_{50}(mg/ml)	SI
Crataegus pinnatifida	H_2O	10.23±1.62	1.34±0.13	7.63
	HH_2O	11.22±1.89	0.71±0.04	15.80
	EtOH	2.14±1.15	0.14±0.01	15.23
	EtOH-HCL	1.74±0.69	0.14±0.02	12.43
	MEtOH	0.75±0.31	ND	ND
Cornus officinalis	H_2O	35.50±2.31	1.86±0.57	19.09
	HH_2O	38.48±2.50	1.69±0.42	22.77
	EtOH	1.79±0.23	0.20±0.07	8.95
	EtOH-HCL	1.71±0.16	0.07±0.02	24.43
	MEtOH	2.10±0.23	0.09±0.00	23.33
Aucklandia lappa	H_2O	7.11±1.20	0.64±0.22	11.11
	HH_2O	5.52±1.53	0.49±0.08	11.27
	EtOH	0.02±0.01	0.004±0.001	5
	EtOH-HCL	0.03±0.01	0.006±0.000	5
	MEtOH	0.04±0.02	0.009±0.000	4.44
Schizonepeta tenuifolia	H_2O	10.16±1.18	0.62±0.21	16.39
	HH_2O	9.56±1.16	0.56±0.27	17.07
	EtOH	0.37±0.02	ND	ND
	EtOH-HCL	0.52±0.05	ND	ND
	MEtOH	2.67±1.14	ND	ND
Perilla frutescens	H_2O	4.65±0.99	0.27±0.01	17.22
	HH_2O	5.80±0.47	0.23±0.03	25.22
	EtOH	0.03±0.01	ND	ND
	EtOH-HCL	0.20±0.05	ND	ND
	MEtOH	0.10±0.04	ND	ND
Oseltamivir		0.97±0.00	0.007±0.001	138.57

附錄、HPLC之確效資料

為了確認此分析方法的精密度（precision）及準確度（accuracy），分別進行了同日內（intraday）及異日間（interday）之分析作為精確性比較。以木香酒精萃取物(S39-5)做為檢測樣品，結果如下。

一、木香酒精萃取物(S39-5)之HPLC分析

(一) 分析條件

1. 管柱：Supelco HS-C18，4.6 I.D. × 250 mm。
2. 移動相：使用梯度沖提，分別使用0.1% TFA水溶液 H_2O、MeOH作為移動相，比例如下:

Time (min)	0	80	100
MeOH	5	100	100
H_2O (0.1% TFA)	95	0	0

3. 注入量：20 μL。
4. 流速：1.0 mL/min。
5. 檢出波長：UV 254 nm。（經photodiarary 由波長190~370 nm 掃描，波長254 nm 時波峰最多）

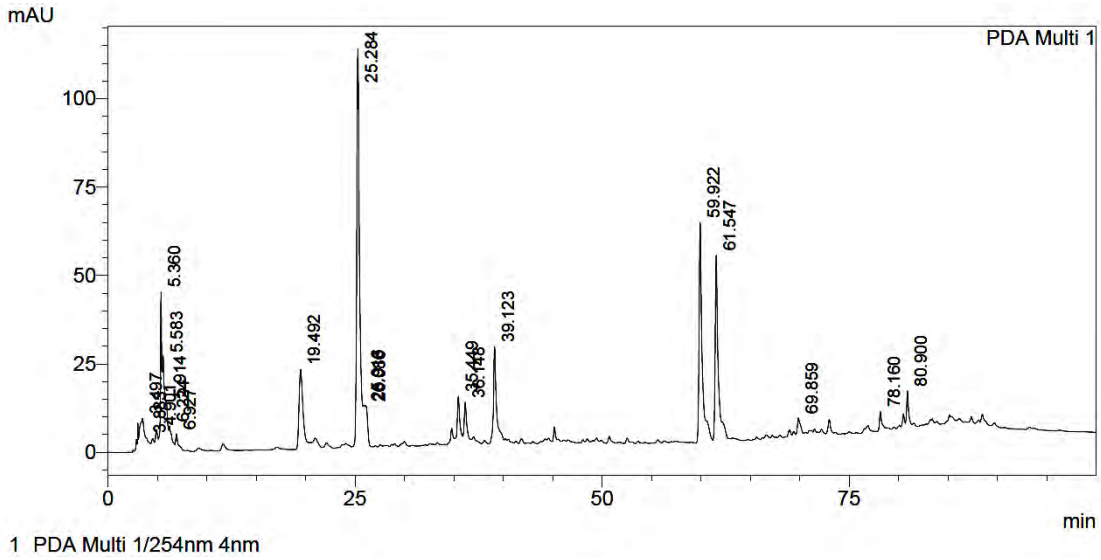
(二) HPLC之分離

S39-5層析如圖一所示。

(三)分析方法之確效試驗(validation)

為了確認此分析方法精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，分別進行了同日內(intraday)及異日間(interday)之分析作為精確性比較。

1. 同日內(intra-day)分析之差異：將S39-5在同日內作三次分析，計算主要訊號峰面積及保留時間其平均值及標準偏差，以評估其分析條件之穩定性及測量值之再現性(表一)。主要訊號峰面積及滯留時間的RSD 均小於5%，表明儀器性能良好，符合指紋圖譜的要求。
2. 異日間(inter-day)分析之差異：將S39-5在連續三日各作三次分析，計算其訊號峰面積及保留時間平均值及標準偏差，以評估其分析條件之穩定性及測量值之再現性(表二)。三個時間點檢測結果顯示主要面積及保留時間RSD均小於5 %，樣品在48 h內穩定性良好。



圖一、木香甲醇萃取物(S39-5)之 HPLC 指紋圖譜層析圖（254 nm 之波長偵測)

表一、木香甲醇萃取物(S39-5)之 HPLC 指紋圖譜其訊號峰滯留時間其平均值、標準偏差

	同日內(intra-day)分析(Ret. Time)		異日間(inter-day)分析(Ret. Time)	
訊號峰	mean±S.D	R.S.D	mean±S.D	R.S.D
1	19.485± 0.01	0.03	18.655± 0.88	4.72
2	25.280± 0.01	0.02	24.635± 0.66	2.67
3	35.444± 0.01	0.02	34.357± 0.96	2.80
4	36.144± 0.00	0.01	34.978± 1.05	3.02
5	39.121± 0.00	0.01	38.154± 0.90	2.35
6	59.898± 0.04	0.06	58.351± 1.48	2.54
7	61.468± 0.13	0.22	60.210± 1.68	2.79
8	69.563± 0.51	0.73	68.593± 1.49	2.18
9	77.763± 0.69	0.88	77.164± 1.12	1.45
10	80.482± 0.72	0.90	78.862± 1.84	2.33

表二、木香甲醇萃取物(S39-5)之 HPLC 指紋圖譜其訊號峰面積其平均值、標準偏差

	同日內（intra-day）分析(Area)		異日間（inter-day）分析(Area)	
訊號峰	mean±S.D	R.S.D	mean±S.D	R.S.D
1	570789± 22.14	0.00	570734± 88.39	0.02
2	2227418± 38.76	0.00	2227428± 26.46	0.00
3	275149± 8.72	0.00	275095± 76.00	0.03
4	254601± 6.08	0.00	254525± 96.70	0.04
5	729365± 19.55	0.00	729357± 39.00	0.01
6	1364080± 53.98	0.00	1364087± 36.59	0.00
7	1198681± 5.20	0.00	1198651± 53.15	0.00
8	132360± 6.00	0.00	132320± 65.29	0.05
9	95742± 6.56	0.01	95738± 8.89	0.01
10	166270± 16.46	0.01	166263± 18.08	0.01

編號：CCMP101-RD-011

開發具抗病毒及抗腫瘤活性之台灣本土中草藥並推廣其應用(2-1)

楊寧蓀
中央研究院農業生物科技研究中心

摘　要

本計畫主旨為開發具抗病毒及抗腫瘤活性之台灣本土可培種之中草藥，藉由我們所建立一系統化研究平台，包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並以具體細胞學/分子生物學的生物活性測試平台及動物實驗模式，以確定台灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分及生物活性，進而提升本土中草藥之應用價值及其生技應用之推廣。在台灣本土常用藥用植物基原鑑定研究上，我們完成選定的台灣本土中草藥之品種確認、組織切片鏡檢觀察及核醣體核酸基因(rDNA)序列分析之分子基原鑑定檢測。在體外抗發炎及免疫調節活性測試上，我們以評估樹突狀細胞細胞激素調控做為初步體外篩選平台。研究結果顯示，半枝蓮、山苦瓜、破布子及魚腥草冷水萃取物及大花咸豐草酒精萃取物可有效抑制細胞激素 IL-12 之表現。在乳癌切除動物模型中的抗腫瘤轉移活性上，結果顯示大花咸豐草酒精萃取物可顯著降低腫瘤轉移率及顯著提高老鼠存活率。進一步研究顯示大花咸豐草可有效抑制腫瘤產生之脾臟腫脹及有效抑制老鼠脾臟顆粒球細胞系骨髓衍生抑制細胞(Granulocytic MDSCs)族群的聚集。體外細胞研究顯示，大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制骨髓細胞由細胞激素(GM-CSF)刺激表現的細胞激素受體(G-CSF receptor)的表現量並且可以有效抑制骨髓細胞由 G-CSF 或是 M-CSF 刺激分化之骨髓衍生抑制細胞的數量。在抗病毒活性上，我們研究結果顯示，狗肝菜冷水萃取物，經過外敷的方式確實顯著地降低單純疱疹病毒(HSV-1)的病毒量。此外，包含半枝蓮、大花咸豐草與破布子三種萃取物也都有不同程度抗病毒的效果。由目前我們所得到的結果使我們相信此計畫所建立之研究篩選平台將有助於未來中草藥從種植、採收、品管到活性的垂直整合系統，產生一套能提供功效好且品質穩定之中草藥的標準化栽種生產程序，進而促使台灣本土中草藥能逐步具體地科學化，以確保民眾使用之安全，並有助於本土中草藥之發展。

關鍵詞：台灣本土中草藥、基原鑑定、抗腫瘤轉移、抗病毒活性

Number: CCMP101-RD-011

Develop Taiwan's Indigenously Grown Medicinal Plants that Confer Potent Anti-viral or/ and Anti-tumor Bio-activities, and Expand to Biotechnology Applications

Ning-Sun Yang
Agricultural Biotechnology Research Center

ABSTRACT

This study aimed to develop medicinal plants endemic to Taiwan that are purported to confer potent anti-viral and/or anti-tumor bio-activities, and expand their biotechnological applications, by using a combinational approach of morphological/anatomical analyses, followed by molecular marker authentication (e.g., DNA sequencing), and specific anti-inflammation, anti-tumor and anti-viral bio-activity assays. Our preliminary results documented the morphological and histological characteristics of these medicinal herbs, and analyzed their ribosomal DNA sequences. We also showed that a number of the cold water and ethanol extracts of these test medicinal herbs inhibited LPS-induced expression of IL-12 in mouse bone marrow derived dendritic cells. In a breast tumor resection mouse model, the ethanol extract of *Bidens pilosa* (BP-E) effectively suppressed mammary tumor metastasis and increased mouse survival. In addition, BP-E significantly decreased tumor-induced splenomegaly and the population of granulocytic bone marrow-derived suppressor cells (MDSCs) in test mice. BP-E also effectively inhibited G-CSF receptor expression in GM-CSF stimulated bone marrow cells and suppressed GM-CSF or G-CSF induced differentiation of MDSCs from bone marrow cells. We also showed that a number of herbal extracts especially the cold water extract of *Dicliptera chinensis* plants exhibited anti-herpes simplex virus-1 (HSV-1) viral activities in an HSV-1 virus infection mouse model. Taken together, we believe that our results and the systematic platform that we developed in the present study provide a useful approach for future biotechnology development of traditional herbal medicines in Taiwan.

Keywords: Taiwan’s indigenously grown medicinal plants, Authentication, Anti-metastasis, Anti-viral activity

壹、前言

由於現今互補、另類醫療(complementary and alternative medicine，CAM)於世界各地是廣泛受到重視與探討，這其中包括使用草藥的傳統療法，目前各種草藥產品可以健康食品(Health Food)、膳食補充品(Dietary Supplement)或藥方(Drug)等方式大量銷售；在草藥的銷售市場上，美國已大量將草本植物萃取物商品化，部分地區健保亦開始同意藥草給付；歐洲一直是世界草藥之巨大市場，在亞洲中國大陸、日本、台灣則有普遍長久使用中草藥藥材及複方產品之歷史。著眼於草藥之未來發展潛力，草藥的應用已成為國內外生技產業發展重要項目，許多美國卓越的醫藥研究機構包含 NIH、FDA 及美國哈佛、耶魯等主要醫學院也著手於草藥產品的研發與臨床的測試，美國 FDA 更在 2004 年 6 月 9 公告「植物新藥規範」(Guidance for Industry - Botanical Drug Products)，使得中草藥及植化藥物發展前景更加看好[2-4]。2006 年，由德國生技公司 MEDI-Gene 開發，成份為綠茶葉萃取物，用以治療人類乳突病毒所引起生殖器病變的外敷藥 Veregen，成為美國 FDA 按照植物新藥規範所批准植物新藥的第一例。分析 Veregen 植物新藥開發成功的因素包括：1. 使用單一、基原明確的植物；2. 良好的藥材控管，產地種植明確；3. 有效成分組成及製程管控明確；4. 完整的人體臨床測試[5]。由此顯示，美國 FDA 對於植物新藥審查仍然著重於藥品安全、確切療效、有效成分在不同批藥材之間的一致性。近年來，以科學方法解釋傳統用藥理論、探討中草藥療效的研究也日漸普遍地受到重視；然而，研究顯示由於中草藥種類紛雜、名稱混淆且經過加工炮製後會不易辨別其種類，因此極需加強中草藥的品種(variety/cultivar)或基原(germplasm)鑑定。此外，為數眾多的中草藥常被宣稱具多種功效。但是常用中草藥的"療效"，許多是經驗論的，常缺乏現代科學之佐證，所謂"療效"也經常被人們所誇大，其確切的生物活性及療效經常是沒有系統化的實證醫學來加以驗證。在台灣民間，被宣稱具有藥用功效之植物眾多，民眾也常有使用本土中草藥之習慣。然而，我們對於台灣本土常用藥用植物之確切物種、種植及食用並無明確的規範，因此時常有民眾誤用中草藥以至於發生中毒的情形產生。此外，台灣本土常用之中草藥的療效也經常被誇大，其確切的活性及療效並無系統化的實證醫學來加以驗證。中草藥一般多為 露天(即"田間"，而非溫室中）生長或種植，已知氣候及種植條件可能對藥材品質影響甚鉅，目前市售中草藥也

並無以化學指紋圖譜及活性指標分析等方法來定義規範中草藥之品質。中草藥品質的不穩定，不論是對草藥研究或生技產業相關應用及產品發展上，都已經是一大考驗。因此，為了使台灣本土中草藥能現代化，以期中草藥研發能符合植物新藥開發規範進而提升台灣中草藥在國際市場上的價值。本計畫乃利用包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並以具體細胞學/分生學的生物活性(bio-activity)測試平台及動物實驗模式來確定台灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分，並利用實證醫學驗證其活性，以提升本土中草藥之應用價值。

中草藥植物基原或品種鑑定乃根據個體間遺傳標記(genetic marker)的差異[4]，植物的遺傳標記一般可分為外觀或形態、細胞及分子標記等三層次。外觀或形態標記（如花色及果實形狀等）可經由肉眼觀察(macroscopic identification)而得；細胞遺傳標記乃藉由顯微鏡檢(microscopic identification)觀察染色體數目或植物較細微的組織結構之差異；分子遺傳標記方面，早期中草藥基原鑑定多以 PCR 方式選擇性大量複製 DNA 片段以供電泳分析；其鑑定基礎在於 不同中草藥基原具有不同的DNA 序列差異，因此造成 PCR 反應時，引子(primer)與分析樣品之 DNA 模版(template)互補黏合(annealing)之差異(即 primer 能否黏合)之差異。RAPD (random amplification of polymorphic DNA)即為應用此分析原理之鑑定方法之一,RAPD 分析是只利用 10 個鹼基長度之引子，此法易於學習、操作方便，所以此種技術很快被利用為早期作物品種鑑定工具。其他應用 PCR 反應產物作為基礎的 DNA 分子鑑定技術還包括有：將限制酵素技術（限制酵素能識別特定之 DNA 序列且有專一性之剪切位置）及 PCR 反應觀念綜合應用之 AFLP (amplified fragment length polymorphism)分子標誌技術；應用高等生物具有高比例的 DNA 重複序列之原理而產生的 SSR (sequence characterized amplified regions)分子標誌技術，由於不同物種間重複序列的數目會有很大差異，故 SSR 又可分為重複序列內之產物(intra-SSR)與重複序列間之產物(inter-SSR 或稱 ISSR)兩種類型，以後者較為常用。

近幾年中草藥基原鑑定則多以 DNA 序列比對，或綜合多種方法進行。所謂以 DNA 序列比對，係直接分析及比對染色體特定區域之 DNA 序列差異，做為不同基原或品種鑑定之依據。此鑑定方法的優點包括：一、僅分析一個或兩個 DNA 片段，即可獲得 500~1000 個鹼基序列供指紋鑑定；二、可在短時間內提供客觀而明確（以 A、T、C、G 判讀）之 DNA 指紋資料；三、不需使用 PCR 技術，故亦無分子標間相互競爭之問題；四、不需作為

對照的品種，可隨時針對未知樣品進 行分析。因此，以DNA 序列比對為基礎之鑑定技術在中草藥基原鑑定應用上具很大潛 力。依據所分析的DNA 區域所屬之基因體，又可分為細胞核內及核外（包括葉綠體及粒線體）的特定區域；細胞核內特定基因部分片段 DNA 定序分析常用的如 ITS (internal transcribed spacer)分析，此方法為目前植物基原鑑定最常用工具之一，是選擇細胞核內 18S 及 26S rDNA 間之 DNA 做為分析對象，此區域具有植物「屬」間及「種」間之高度 DNA 序列變異性。

中草藥研究除上述物種之基原鑑定工作外，若能再搭配中草藥之有效成分分析、化學指紋圖譜、生物活性平台等分析方法（此項工作在過去幾年中研院農生中心草藥組可說已做出很好的成果，也已獲得國際上多方面學術上之肯定），更能確實做到協助定義中草藥的「確效」。每種中草藥 都擁有獨特的植物二次代謝物、特殊的有效或主要成份，指紋圖譜便是一種類似於植物代謝學研究技術的鑑定手法，能夠將中藥所具主要或可能的有效成份組成量化，建立獨特的「鑑定分析」標準，作為未來品質管理的依據，從而能進一步確保每批中草藥產品質穩定，讓顧客對產品更具信心。常用的分析方法如 1. 色層分析法：如 TLC、HPLC 等；2. 光譜分析法：如 UV、IR、Near-IR 等；3. 其他：X-ray、NMR、GC-MS、LC-MS 等，也可以用來建立中草藥的「指紋圖譜」。其中，高效液相層析儀(HPLC)已發展成熟，並廣泛應用於各種化學分析的場合。HPLC 的分析能力強，再現性良好，系統穩定性高，樣品及溶媒的使用量少，偵測器 (detector)型式選擇多（如 UV、photodiode array、RI、ELSD…等），很適合用來建立中草藥化學指紋圖譜。且由財團法人醫藥工業技術發展中心（藥技中心）建立的「台灣中草藥網」中，便是將多批次的藥材以 HPLC 進行分析，並建立其化學指紋圖譜及雷達圖，至今已陸續建立三百多筆藥材的資料，並彙整成為資料庫中的一部份，以供比對 [9-11]。指紋鑒別技術對中藥產品推向國際市場應起重要影響，可促使中藥產品及其功效較能獲得國際認同，使中草藥中的有效成分被西方科學化方法解讀，再搭配生物技術分析其活性及作用機制，更有助於將中草藥應用於保健食品或植物新藥的開發。

本計畫乃延續我們在「建立台灣本土常用中草藥之基原鑑定與功效測試平台」計畫所建立之系統化研究平台，包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並以具體細胞學/分生學的生物活性(bio-activity)測試平台及動物實驗模式以確定台灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分並利用實證醫學驗證其活性，以提升本

土中草藥之應用價值。為確實提升台灣本土中草藥之應用價值，本計畫篩選約十餘種台灣民間常用之中草藥，包含狗肝菜、半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、桑黃、山苦瓜、狗尾草、破布子根、魚腥草、紫蘇葉、雞屎藤、大花咸豐草及狗肝菜等。在民間常以水煮紫蘇葉(*Perilla frutescens*)、雞屎藤(*Paederia foetida* L.)等中草藥作養身茶飲用；魚腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)、破布子 (*Cordia dichotoma* Forst, F.)、狗尾草(*Heliotropium indicum* L.)、山苦瓜(*Momordica charantia* Linn. var. abbreviata Ser)等草藥則以烹煮入菜之方式食用；另外，仙草*(Mesona procumbens Hemsl.*)、半枝蓮(*Scutellaria barbata* D. Don)、桑黃(*Phellinus linteus*)、白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa.* Willd.)為民間常用藥用植物。先前研究發現，仙草葉以碳酸氫鈉萃取後，其萃取物中的具有抗氧化能力[6]，而仙草中的酚酸類(phenolic acids)是執行抗氧化功效的主要成分，其中又以咖啡酸(caffeic acid)具有高度抗氧化之活性[7]，另外，仙草的水萃取物也具有保護人類淋巴球(lymphocyte)免於 UV-C 或是過氧化氫所引發的 DNA 受損[8]，以及可藉由抑制肝臟星狀細胞(hepatic stellate cells)的活化進一步防止四氯化碳(carbon tetrachloride)所引發的肝纖維化(liver fibrosis)[9]。近年來的研究中發現半枝蓮的水萃取物具有抗發炎抗氧化的效果，且可藉由調控 BCL-2 而抑制子宮平滑肌瘤細胞(uterine leiomyoma)的生長；另外，也被發現其 30%乙醇萃取物、甲醇萃取物、二氯甲烷萃取物對於肺癌[10]、血癌[11,12]、大腸癌細胞[13]可刺激細胞凋亡或是抑制細胞周期而減緩癌細胞生長的效果，而白花蛇舌草被研究發現，其水萃取物可抑制體內肉瘤生長和抗放射性治療傷害[14]、抗發炎和抑制肝毒素所造成的肝臟損害，並且其甲醇萃取物中的黃酮苷也具有抗氧化功能[15]。而桑黃也在許多研究中發現其體內含有多醣體、類三 (Triterpennoids)以及桑黃素(Meshimakobnol)等活性成分，其酒精萃取物中的酸性多醣體(acidic polysaccharide)可增進 NK 細胞、巨噬細胞、T 細胞的免疫功能[16]，70%乙醇萃取物可抑制血管新生(angiogensis)及抑制脂質氧化(lipid oxidation)[17]，其乙醇萃取物可抑制抗藥性金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)的生長[18]、可抗發炎以及抑制巴豆油(croton oil)所引發的小鼠耳朵水腫[19]。山苦瓜在過去研究發現其乙醇萃取物可抑制糖尿病所造成的高血糖和糖化血色素並在各種糖尿病老鼠模式中可減緩糖尿病[20-22]，而在山苦瓜葉的水、乙醇、甲醇萃取物也被發現在體外具有抑制大腸桿菌、傷寒沙門桿菌、痢疾桿菌等病原體的生長[23]，此外，其水萃取物也具有抗攝護腺癌[24]、淋巴癌[25]，甲醇萃取物中的地膚子皂苷(momordin)可在體外抑制多種癌

細胞生長[26]。在過去研究指出狗尾草成分中的 N-氧化大尾搖鹼(indicine N-oxide)可在人體中減緩急性血癌(acute leukemia)[27]，並且直接餵食大鼠狗尾草時，能抗急性和亞急性發炎以及減少角叉菜膠(carrageenin)所引發的足蹠腫脹(hind paw oedema)[28]，此外，狗尾草的水萃取物也可減少口服吲哚美辛(Indomethacin)所造成的胃潰瘍[29]，其乙醇萃取物也可在大鼠模式中促進傷口癒合[30]。研究中發現，紫蘇的成分中含有木犀草素(Luteolin)可抑制 TNF-α 之表現與免疫反應[31]，並且紫蘇成分中的三萜酸類(triterpene acids)可經由抑制 TPA 誘發之免疫反應，並可減緩二甲基苯蒽(7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene, DMBA)及佛波醇(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)等致癌劑所引發皮膚癌的發生[32]。而在紫蘇成分中的迷迭香酸(rosmarinic acid)也可減 LPS (lipopolysaccharide) 所引發肝受損動物模式中的表皮發炎反應[33]，除此之外，紫蘇葉的水萃取物也可預防並減緩卵白蛋白 (ovalbumin, OVA)所引起的過敏反應[34]。破布子種子的乙醇萃取物可抗發炎以及減少角叉菜膠(carrageenin)所引發的足蹠腫脹(hind paw oedema)[35]。破布子果實的乙醇萃取物也可抑制在大鼠中胃部幽門結紮(pyloric ligation)、阿斯匹靈(aspirin)、吲哚美辛(Indomethacin)所引起的胃潰瘍[36]也可在大鼠模式中促進傷口癒合[37]，並且破布子萃取物也可在體外減緩乳癌細胞的生長[38]。魚腥草的酸水解萃取物可抑制鹿角菜膠(carrageenan)所引起的胸腔發炎以及二甲苯(xylene)所引發的小鼠耳朵水腫[39]，而其熱水萃取物可抑制單純疱疹病毒活性(Herpes Simplex Virus)[40]、禽流感病毒(Influenza Virus)、人類免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)[41]。雞屎藤的水萃取物曾被研究發現具有抗氧化的功效[42]，而其葉子的甲醇萃取物可抑制大鼠模式中由棉球移植引發的肉芽腫形成(cotton-pellet granuloma)[43]，另外，雞屎藤的 90%乙醇萃取物可抑制小鼠中由蓖麻油(castor oil)以及硫酸鎂(magnesium sulphate)所引發的腹瀉(diarrhoea)[44]。雖然這些中草藥曾經被民間宣稱或在部分研究報告指出含有抗發炎或抗癌的功效，但尚需要更明確之系統性科學證據來驗證這些作用。因此，本計畫選定此十餘種民間常用中草藥，作為初步篩選具有免疫調節或抗發炎的對象，除了和舊有文獻相互對照印證外，更作進一步的研究，開發中草藥特有之化學成分及生物活性，以科學的方式加以佐證其療效，藉此經由實證醫學與系統性的分子細胞生物學等技術的驗證，使計劃成果能成為中草藥推廣及發展之助力。

在本計畫生物活性/功效性(Bio-activity/Functional activity)分析上，以體

內外生物活性/功效性測試系統，包含樹突狀細胞細胞激素調控以評估中草藥萃取物之體外抗發炎活性，在抗腫瘤體內活性測試上，我們以老鼠腫瘤摘除(tumor resection)動物模式評估中草藥萃取物之抗老鼠腫瘤轉移物活性。此外，在中草藥抗病毒活性測試上，由於第一型單純性皰疹病毒(Herpes Simplex Virus-1, HSV-1)是常見的人類病原體。與水痘病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)一樣，兩者都可以經過接觸或是飛沫途徑散播感染。雖然初次感染 HSV-1 時不會出現明顯的症狀，嬰幼兒感染水痘皰疹病毒後則會出現發燒、全身性的紅疹與水痘等臨床特徵。經過急性期的感染過程後，部分的病毒可以經過在皮膚上皮細胞複製後，從末梢神經進入感覺神經節造成潛伏性感染。當個體的免疫能力降低、老化或是處於免疫功能抑制的情況下，病毒因活化而被釋放並再次感染周邊的皮膚細胞，產生如 HSV-1 的唇皰疹或是 VZV 造成的帶狀皰疹[45-47]。個體的免疫活性包括第二型干擾素(IFN-β)與 CD8 毒殺性細胞的作用都是有效控制帶狀疱疹形成的主要因素。這樣的特性因此使得該病毒成為探討病毒與宿主的免疫系統之間的交互關係的重要研究模式之一。小鼠是常用來研究 HSV-1 致病機轉的動物模式。經表皮感染 HSV-1 後，可以在皮膚表面形成痂傷甚至沿著感覺神經節的末梢神經束造成帶狀疱疹的臨床症狀。有鑑於VZV 不具有感染小鼠的能力，而以 HSV-1 感染刮擦後的小鼠皮膚卻可以在短時間內形成如 VZV 在人類造成的帶狀疱疹[48-50]。因此，本計畫與台灣研究帶狀疱疹及簡單一型皰疹病毒之著名學者：台大醫學院免疫所顧家綺老師合作，以顧老師實驗室已建立 HSV-1 帶狀疱疹動物模式來評估台灣本土中草藥抗簡單一型疱疹病毒及帶狀疱疹病毒之生物活性。

在本計畫中，我們利用分子及細胞學生物技術及免疫學觀點測試系統，藉由樹突狀細胞細胞激素篩選平台，來對具有免疫調節及抗發炎等生物活性的本土中草藥進行篩選，進而藉由老鼠乳癌(4T1 mammary cancer)腫瘤摘除(tumor resection)動物模式評估中草藥萃取物之抗腫瘤轉移物活性；在抗病毒活性測試上，HSV-1 帶狀疱疹動物模式來評估台灣本土中草藥抗簡單一型疱疹病毒及帶狀疱疹病毒之生物活性。最後藉由樹突狀細胞、T 細胞、骨髓衍生抑制性細胞及基質細胞等系統性免疫學研究，以了解中草藥對於免疫調節、抗病毒及抗腫瘤活性的調控方式。對於本土常用之中草藥，可研究及開發其特有之植物代謝物化學組成或其生物活性，以科學化的實證方式加以辨證其可能之療效，以擴大本土中草藥的應用發展。我們希望藉此計畫將此研發能量提供於台灣本土常用中草藥的科學化研究中，

為台灣中醫藥界及生技產業界建立實用而有系統的中草藥應用與開發案例。

本計畫規劃為期二年，在 101 年度我們完成主要的具體目標有下列兩項：

具體目標一：確認多種台灣本土常用藥用植物的物種來源並進行基原鑑定。

台灣本土常用藥用植物包含有（如：狗肝菜、半枝蓮、一支香、白花蛇舌草、正台灣蒲公英、黃水茄、黃花或大白花咸豐草、仙草、白豬母乳、桑黃、山苦瓜、狗尾草、破布子根、魚腥草、紅紫蘇、紅骨雞屎藤、七星月桃……等）。本計畫乃根據國人常使用且無毒之台灣本土中草藥而設計。並且是依據行政院衛生署中醫藥委員會 101 年度推動傳統醫藥（材）生技研發類委託研究計畫之需求而選定。其中包含十餘種常用中（台灣）草藥材，包括半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、桑黃、山苦瓜、狗尾草、破布子根、魚腥草、紫蘇葉、雞屎藤等。我們認為這些選擇符合目前以重要台灣本土中草藥作為研究目標之決定。這些選擇也與中研院生物多樣性研究中心彭鏡毅研究員合作協商過，進行了品種確認、基原鑑定及生態環境之需求。鑑定方法包括肉眼觀察(macroscopic identification)、鏡檢（解剖及顯微鏡併用）及分子基原鑑定檢測三種。肉眼觀察是將新鮮植物全株與特定的型態及器官，包含花、果實、種子等，與證據標本比對，以初步判別物種，包括亞種及培育種(cultivars)；鏡檢是利用顯微鏡檢查植物較細微的構造（如腺毛、細胞型態或結晶等），並運用橫或直切面之組織切片的方式，檢查植物組織構造，如維管束排列。在分子標記鑑定層面，中草藥鑑定中最常被廣泛使用的方法是以核醣體核酸基因(rDNA)的內轉錄區(internal transcribed spacer, ITS)序列來鑑定物種的差別。我們會綜合以上的方法來鑑定本計畫選定之台灣本土中草藥，以避免中草藥未來的誤用或混用，以促進中藥使用上的安全。

具體目標二：以實證醫學健康上之“功能”分析，利用不同的生物活性/功效性(Bio-activity/Functional activity)測試平台，以協助定義或確認目標中草藥之“效用”，進而逐步落實中草藥科學化之目標。

實證醫學(Evidence Based Medicine, EBM)的定義是利用現有最佳醫療證據來為全民或特定族群的病人訂立治療計畫及提供醫療服務 (Sackett et al, 1966)，為一門特定方法學之學科。以實證醫學健康上之“功能”分析，可意指在現代分生/細胞/基因組學等實驗系統中，求證其生化/細胞/組織/器官

及大體生理功能，固可用 cell，tissue，organ，animal model 及 human clinical trials 來一系列研究西藥如此，中藥亦然。以實證醫學健康上之“功能”分析，利用不同的生物活性/功效性 (Bio-activity/Functional activity)測試平台，以協助定義或確認目標中草藥之“功能效用”，不僅可以進逐步落實中草藥科學化之目標，期望未來能對病患在臨床治療上帶來幫助。目前醫學研究及藥物發展上，藥物在臨床測試前，必須在細胞及動物等研究上，有充分的證據佐證其功效，進而才能進行各項臨床測試。本計畫在以協助定義或確認目標中草藥之“功能效用”的目標下，中草藥多元化地應用研究，就必須加強科學性 (Science-based)、實證性 (Evidence-based)之實驗室研究 (Laboratory studies)。尤其以今日分子生物學、生化學、化學和資訊學發達的時代，中草藥實證醫學研究，近年來常常都能有出人意表的新發現，產生所謂「古藥新用」的情形。因此，在這個前提之下，我們可利用「現今不同的 (非舊有或古籍所記載的)」生物活性平台，來評估「舊藥新用」的可能性，增加這類台灣本土常用之中草藥在健康促進和疾病治療上的應用範圍。本計畫以楊寧蓀實驗室多年來在免疫調節方面的研究努力，所成功建立的「樹突狀細胞細胞激素調控」研究平台，來評估目標中草藥在抗發炎及免疫調節活性的表現。體內試驗方面則以老鼠乳腺腫瘤摘除 (tumor resection) 小鼠模式來評估台灣本土中草藥抗腫瘤轉移活性之評估。此外，有鑑於用以治療人類乳突病毒所引起生殖器的外敷性植物新藥 (Veregen)開發的成功，以及台灣本土中草藥抗病毒活性研究亦為衛生署中醫藥委員會之台灣本土中草藥發展關注項目之一。因此，本計畫以 HSV-1 帶狀疱疹動物模式來評估台灣本土中草藥抗簡單一型疱疹病毒及帶狀疱疹病毒之生物活性。本計畫所建立之 老鼠原位乳癌動物模式 (4T1 orthotopic mammary tumor animal model)和腫瘤摘除 (tumor resection)模式及 HSV-1 帶狀疱疹動物模式，皆是在目前醫學研究上，分別用以研究乳癌轉移及帶狀疱疹之重要代表性動物模式 ，台灣本土中草藥在進行上述細胞動物模式評估後，將有助於未來臨床測試及應用之可行性。我們也期盼研究結果可應用於病人或一般人之防癌、抗癌上。

貳、材料與方法

一、確認台灣本土常用藥用植物的物種來源並進行基原鑑定。

1-1 肉眼觀察法。

利用植物全株與特定的型態及器官與證據標本比對，以初步判別物種。

1-2 顯微鏡檢查法。

利用顯微鏡檢查植物較細微的構造，例如：腺毛、細胞型態或結晶等；以及利用組織切片的方式，檢查及比較組織的構造。

1-3 以核醣體基因 Internal Transcribed Spacer (ITS)進行中草藥之基原鑑定。

取植株葉片 50-100mg 加入液態氮磨碎後，用 QIAGEN 公司生產之 DNeasy Plant Mini Kit 進行植物 DNA 萃取。Geniomic DNA 萃取完成後，利用設計在核醣體基因保留序列上的引子進行 PCR 後，使用 Fermentas 公司生產的 pJET1.2/blunt cloning vector 將 PCR 產物構築到載體上後，用 DNA 定序儀得到 ITS 序列。

二、利用不同的生物活性/功效性 (Bio-activity/Functional activity)測試平台，以協助定義或確認目標中草藥之“效用”，進而逐步落實中草藥現代化之目標。

2-1 草藥萃取物製備。

(1) 鮮品、乾品冷水萃法：將鮮品或乾品打碎後，以中草藥:冷萃水以 1:10 的比例浸泡兩個星期之後，收取萃取液。

(2) 鮮品、乾品熱水萃法：將鮮品或乾品切碎後以中草藥：水 1:10 的比例加熱至水含量剩 1/3 後，收取萃取液。

(3) 鮮品、乾品酒萃法：將鮮品或乾品切萃後以中草藥：95%酒精 1:10 的比例浸泡兩個星期之後，收取萃取液。將不同萃取法所得之萃取液用減壓濃縮機(Rotary Evaporator)及迴轉蒸發瓶增加蒸發面積，於低壓下，在水浴器內旋轉加熱，使溶液快速蒸發濃縮之後，再使用凍乾法(lyophilization)凍乾成粉末保存及使用。

2-2 樹突狀細胞細胞激素調控以評估中草藥萃取物之抗發炎活性。

樹突狀細胞之培養：以細胞激素 GM-CSF 與 IL-4 的方式培養老鼠骨髓細胞 6-7 天，可得到未成熟樹突狀細胞。再利用外加 *E. coli* 之 LPS 處理 1 天，可以促進為成熟樹突細胞轉變為成熟的樹突細

胞。其培養過程中可以加入中草藥萃取液，以評估其對免疫細胞的影響。

細胞激素表現分析：未成熟樹突狀細胞以 3 x 10^6/3ml 的濃度置於 6-well 的 Plate 中，加入 LPS (1 μg/ml)或加入 LPS 及中草藥萃取物。經過 24 小時的培養後，將上層液離心下來，以測定其淋巴介質製造的量。在取得足夠檢體以前，可將其他檢體先保存在-70℃，等到檢體足夠時再一起測試。細胞激素的測定是利用 sandwich-ELISA 法。先利一個細胞激素的抗體先覆蓋在 ELISA plate 上，在 4℃靜置一晚。

在進行實驗前先以 1% PBS-BSA 處理後清洗之。再將要處理的檢體加到 plate 上，置於室溫 2 小時後加入 biotin 聯結的抗細胞激素抗體。兩小時的室溫靜置後，加入 avidin 聯結過氧化酵素(avidin-linked peroxidase)，再靜置二個小時後加入受質以呈色。上述的裂殖素的濃度及刺激時間在實驗進行之前都應先測定其最適當的濃度，並以已知濃度的細胞激素作為對照。

2-3 老鼠原位乳癌(4T1 mammary cancer)動物模式評估草藥萃取物之抗腫瘤生成活性。

選擇六周大小的 BALB/c 為老鼠之品種，並將接種 4T1-luc2 乳癌細胞(5×10^5 細胞在 50μL PBS 裡)於第五對右邊乳房中，接種一周後，將不同本土中草藥萃取物以口服方式(100 mg/kg 萃取物在 200 μL 1% tween- 80 裡)給予乳癌小鼠，每周利用 IVIS system 測量老鼠的冷光酵素(luciferase)活性大小、每兩天測量腫瘤大小和老鼠體重，並記錄老鼠存活時間，餵食中草藥萃取物四周後，將老鼠犧牲，測量腫瘤及脾臟重量並拍照記錄，以及以 IVIS system 測量老鼠全身及胸腔的冷光酵素活性大小。並利用流式細胞儀(flow cytometry)、ELISA、化學免疫組織染色等技術分析腫瘤小鼠血液中的骨髓衍生免疫抑制細胞(MDSCs)細胞激素分泌的影響，以及利用細胞分離方式將 MDSCs 分離出來，再給予不同本土中草藥萃取物，藉由 ELISA、流式細胞儀等技術觀察兩種細胞在體外培養(*ex vivo*)以及體內情況(*in vivo*)下，測試比較中草藥萃取物對 MDSCs 的細胞數量及細胞激素分泌的影響。

2-4 腫瘤摘除(tumor resection)小鼠模式評估草藥萃取物之抗腫瘤轉移物活性。

選擇六周大小的 BALB/c 為老鼠之品種，並將接種 4T1-luc2 乳癌細胞(5×10^5 細胞) 21 天後，以手術方式將原位腫瘤摘除。摘除腫瘤後一天，利用 IVIS system 測量老鼠的冷光酵素(luciferase)活性以確認腫瘤清除乾淨並以不同本土中草藥萃取物(100mg/kg 萃取物在 200μL 1% tween- 80 裡)以口服方式給予乳癌小鼠，每周利用 IVIS system 測量老鼠的冷光酵素(luciferase)活性大小、每兩天測量腫瘤大小和老鼠體重，並記錄老鼠存活時間，餵食中草藥萃取物四周後，將老鼠犧牲，測量腫瘤及脾臟重量並拍照記錄，以及以 IVIS system 測量老鼠胸腔的冷光酵素活性大小；並利用流式細胞儀(flow cytometry)、ELISA、化學免疫組織染色等技術分析腫瘤小鼠血液中的 MDSCs 細胞激素分泌的影響，以及利用細胞分離方式將 MDSCs 分離出來，再給予不同本土中草藥萃取物，藉由 ELISA、流式細胞儀等技術觀察兩種細胞在體外培養(*ex vivo*)以及體內情況(*in vivo*)下，測試比較中草藥萃取物對 MDSCs 的細胞數量及細胞激素分泌的影響。

2-5 HSV-1 帶狀疱疹動物模式評估中草藥萃取物之抗簡單一型疱疹病毒及帶狀疱疹病毒活性。

為建立以帶狀疱疹的動物模式評估草藥萃取物之抗病毒生物活性，本計畫的實驗設計如下：C57BL/6 老鼠感染 HSV-1 後將以腹腔注射的方式分成給予中草藥的實驗組與空白溶劑的對照組。投藥的時間可以是在病毒感染前、病毒感染的同時以及病毒感染之後，以探討中草藥對於 HSV-1 抗病毒的預防性或是治療性的活性比較。小鼠皮膚感染後於第一天、第三天、第五天、第七天與第二週分別取下疱疹傷口的組織進行冷凍包埋或是收取組織研磨液(homogenate)。前者將進行組織病理變化的分析與免疫組織化學染色，後者將測量細胞激素與發炎反應相關因子蛋白量的檢測。實驗結果將從傷口外觀的變化、病理組織切片分析、免疫細胞浸潤的細胞群分布以及發炎因子產生等方面評估中草藥對於抗病毒的生物活性與療效。同時也將詳細紀錄實驗組與對照組小鼠形成帶狀疱疹的程度，探討中草藥對於提高個體免疫活性、抑制病毒活化的可能作用。

參、結果

一、物種來源及基原鑑定

在台灣本土常用藥用植物基原鑑定工作上，我們與中研院生物多樣性研究中心彭鏡毅研究員合作，有效進行了品種確認、基原鑑定及生態環境之需求。鑑定方法包括肉眼觀察(macroscopic identification)、鏡檢(解剖及顯微鏡併用)及分子基原鑑定檢測三種。

(一)外觀型態觀察：

1. 雞屎藤為茜草科(Rubiaceae)雞屎藤屬(Paederia)的植物，學名 *Paederia foetida*，別名為狹葉雞矢藤、雞矢藤(台灣植物誌)，為多年生草本植物，在台灣全島分佈於低、中海拔，可見於郊野山麓間，我們自台灣北部地區採集而得。雞屎藤的品種確認及肉眼觀察結果，以利用葉片外觀做確認，與圖鑑所描述葉片形態相似，如圖 1-1 所示，其葉外形呈卵形橢圓形、長圓形至披針形，葉對生且具葉柄，先端急尖或漸尖，基部寬楔形，兩面無毛或下面稍具短柔毛；葉片呈現紙質感，新鮮葉片揉之則有臭氣。
2. 山苦瓜，亦稱為葎草，為葫蘆科(Cucurbitaceae)苦瓜屬(Momordica)的植物，學名 *Momordica charantia*，別名為野苦瓜、野生苦瓜(台灣植物誌)，為蔓性一年生或多年生草本植物，分佈於台灣各地平野、低山帶，多見於廢耕地、果園附近或河流兩岸的開闊地，我們自台灣北部地區採集而得。山苦瓜的品種確認及肉眼觀察結果，以利用葉片外觀做確認，與圖鑑所描述葉片形態相似，如圖 1-2 所示，其葉為葉互生，具長柄，葉片輪廓心形或近於圓形，葉裂片為 5 至 7 片，其裂片為卵形或倒卵形，並具有不整齊疏鋸齒緣。
3. 半枝蓮，為唇形科(Lamiaceae)黃芩屬(Scutellaria)的植物，學名 *Scutellaria barbata*，別名為金挖耳，並頭草，四方草(台灣植物誌)，為多年生草本植物，分佈廣泛，主要分佈於中國華東、華南、西北及河北、山東、陝西南部、河南等省，以及台灣，我們自台灣北部地區採集半枝蓮。半枝蓮的品種確認及肉眼觀察結果，以利用葉片外觀做確認，與圖鑑所描述葉片形態相似，如圖 1-3 所示，其葉為葉對生，葉片呈卵狀披針形或三角狀卵

形，先端急尖或稍鈍，基部寬楔形或近截形，邊緣具疏生淺鈍齒，上面橄欖綠色，下面帶紫色，兩面近無毛或沿脈疏被平伏柔毛，側脈 2 至 3 對，與中脈在下面隆起。

4. 魚腥草為三白草科(Saururaceae)蕺菜屬(Houttuynia)的植物，學名為 *Houttuynia cordata*，別名為毛管菜，臭菜，臭輯，狗腥草，為多年生草本植物，分佈範圍廣泛，在台灣、日本及東南亞各國均有分佈，常見於於溝邊、溪邊及潮濕的疏林下，我們自台灣北部地區採集得魚腥草，並利用葉片外觀做品種確認，肉眼觀察結果與圖鑑所描述葉片形態相似，如圖 1-4 所示，其葉片為葉互生，薄紙質，有腺點，背面尤甚；托葉膜質，條形下部與葉柄合生為葉鞘，基部擴大，略抱莖；葉片卵形或闊卵形，先端短漸尖，基部心形，全緣，上面綠色，背面常呈紫紅色，兩面脈上被柔毛，掌狀葉脈 5 至 7 條。
5. 白花蛇舌草為茜草科(Rubiaceae)耳草屬(Hedyotis)的植物，學名為 *Hedyotis diffusa*，別名為二葉葎、蛇舌草(台灣植物誌)，為一年生草本植物，主要分佈於台灣台中縣市，生長於曠野田間、路旁、溝邊、草地我們自台灣北部地區採集得白花蛇舌草，並利用葉片外觀做品種確認，肉眼觀察結果與圖鑑所描述葉片形態相似，如圖 1-5 所示。其葉外觀為葉對生，無葉柄，葉片呈線形至線狀披針形，先端急尖，上面光滑，下面有時稍粗糙，側脈不明顯；托葉膜質，基部合生成鞘狀，先端芒尖。
6. 破布子根為紫草科(Boraginaceae)破布子屬(Cordia)植物的根部，學名為 *Cordia dichotoma*，別名破布木、破子、樹子仔（台灣植物誌），為小型落葉喬木，分佈於中國大陸南方沿海、台灣、南亞和東南亞等地的低海拔地區，在台灣的栽培為南部較多。我們自台灣南部栽培地區取得破布子根，而品種以利用葉片外觀做確認，肉眼觀察結果與圖鑑所描述葉片形態相似，如圖 1-6 所示。其葉片外觀為單葉互生，葉片卵形、卵圓形至卵心形，先端鈍，基部鈍或略呈心形，葉紙質，全緣或略呈波狀緣，表面呈有光澤的綠色，背面淡綠色；表面略粗糙而常有鱗痂，背面沿主脈有毛茸；中肋於表面略凹下而於背面隆起，側脈每邊 3 至 5 枚，細脈略明顯；葉柄有溝紋及毛茸。
7. 紫蘇，為唇形科(Lamiaceae)紫蘇屬(Perilla)的植物，學名為 *Perilla*

frutescens，別名為桂荏，赤蘇（台灣植物誌），為一年生草本植物，分佈於在中南部之低山區，如恆春半島與南仁湖沼澤區之稻田、池塘、湖沼及溼地，北部地區較少見，我們自台灣南部栽培地區取得紫蘇，而品種以利用葉片外觀做確認，肉眼觀察結果與圖鑑所描述葉片形態相似，如圖 1-7 所示。其葉外觀為葉對生，紫紅色或綠色，被長節毛，葉片闊卵形、圓形或卵狀三角形先端驟尖，基部圓形或寬楔形，邊緣具粗鋸齒，兩面紫色或僅下面紫色，上面被柔毛，下面被平伏長柔毛及細油腺點。

8. 狗尾草為豆科(Leguminosae)兔尾草屬(Uraria)的植物，學名為*Uraria crinita*，別為狗尾草、狗尾帶、狗尾射（台灣植物誌），為多年生亞灌木，台灣在台中、南投、嘉義、台南、高雄、屏東、台東乾燥之荒地有種植，我們自台灣南部栽培地區取得狗尾草，而品種以利用葉片外觀做確認，肉眼觀察結果與圖鑑所描述葉片形態相似。狗尾草葉外觀為奇數羽狀複葉，葉互生，有長柄；小葉 3 至 7 片，並且對生，葉片卵狀披針形或橢圓形，先端短尖，基部圓形或稍心形，全緣，上面無毛，背面被柔毛；托葉小。其根部型態也與圖鑑所描述型態相似，如圖 1-8 所示，根呈鬚狀。
9. 仙草，為唇形科(Lamiaceae)涼粉草屬(Mesona)的植物，學名為*Mesona chinensis*，別名為涼粉草，仙人草（台灣植物誌），為一年生草本植物，分佈於台灣海拔 1200 公尺以下之山麓，栽培地區廣及新竹縣、苗栗縣、嘉義縣、南投與東部台東縣、花蓮縣等地，我們在栽培地區取得仙草，而品種以利用葉片外觀做確認，肉眼觀察結果與圖鑑所描述葉片形態相似，如圖 1-9 所示。其葉外觀，為卵形至寬卵形，基部楔形至鈍形，先端漸尖至尾狀，鋸齒緣；被短毛或疏柔毛，背面被腺點。
10. 桑黃又稱桑臣、桑耳，為真菌門(Eumycophyta)之擔子菌、無褶菌類，屬於刺革菌科(Hymenochaetaceae)。桑黃分佈於大陸、台灣、日本以及韓國，野外僅生長在桑屬植物上。其外觀如圖 1-10 所示，它無柄，其黃褐色硬木質。

(二)組織切片鏡檢分析：

各植物組織切片及鏡檢結果顯示於圖 2。

1. 在雞屎藤的莖部橫切組織切片上，如圖 2-1 所示，外部呈類圓

形，我們可以明顯區分出表皮層、韌皮纖維、皮層、篩部、木部、髓部等部位以及其分布情形，其皮層由 4 到 6 層類方形或類圓形細胞組成，且髓部呈橢圓狀，佔據大約 1/2 的面積。

2. 山苦瓜在其莖部橫切的組織切片上，如圖 2-2 所示，外部呈星形，可明顯區分出腺毛、皮層、表皮層、木部、篩部、髓部等部位以及其分布情形，其皮層由 6 到 8 層類方形或類圓形細胞組成，並且髓部呈星形，由大型類長形柔細胞組成。
3. 半枝蓮在其莖部橫切的組織切片上，如圖 2-3 所示，外部呈四角形，可明顯區分出皮層、表皮層、木部、韌皮纖維、篩部、髓部等部位，並且在四角具有腺毛，其皮層由 3 到 4 層類方形或類圓形細胞組成，並且髓部呈四角形，由大型柔細胞組成，中央具有大型薄壁細胞，束周薄壁細胞含棕色物質。
4. 魚腥草在其莖部橫切的組織切片上，如圖 2-4 所示，外部呈六角形，可明顯區分出表皮層、韌皮纖維、皮層、篩部、髓部等部位，其皮層由 1 層類方形細胞組成，並且髓部呈類圓形，由大型柔細胞組成，佔據大約 2/3 的面積。
5. 白花蛇舌草在其莖部橫切的組織切片上，如圖 2-5 所示，可觀察到其外部呈類圓形，可分為表皮層、皮層、篩部、木部及髓部，內部維管束呈類圓形，皮層由 6 到 8 層類方形或類圓形細胞組成，並且其髓部佔據大約 2/3 的面積。
6. 破布子在其莖部橫切的組織切片上，如圖 2-6 所示，可觀察到其外部呈類五角形，可分為表皮層、皮層、韌皮纖維、篩部、木部及髓部，皮層由 4 到 6 層類方形或類圓形細胞組成，並且其髓部呈五角形，由大型柔細胞組成，佔據大約 1/3 的面積。
7. 紫蘇在其莖部橫切的組織切片上，如圖 2-7 所示，可觀察到其外部呈類正方形，可分為表皮層、皮層、韌皮纖維、篩部、木部及髓部，在周圍具有腺毛，皮層由 4 到 6 層類方形或類圓形細胞組成，並且其髓部呈類圓形，主要由大型類六角形柔細胞組成，佔據大約 3/4 的面積。
8. 在狗尾草的根部橫切組織切片上，如圖 2-8 所示，觀察到其外部呈類元形，可分為表皮層、皮層、木部、篩部、及髓部，皮層由 4 到 8 層類方形或類圓形細胞組成，並且其髓部成類圓形，由大型類圓形柔細胞組成，佔據大約 1/2 的面積。

9. 仙草的莖部橫切組織切片上，如圖 2-9 所示，觀察到其外部呈類正方形，可分為篩部、表皮層、皮層、木部及髓部，皮層由 4 到 6 層類方形或類圓形細胞組成，並且其髓部呈八角形，由大型類六角形柔細胞組成，佔據大約 2/3 的面積。
10. 桑黃組織切片，如圖 2-10 所示，觀察到基部為植物之木質部(xylum，藍色)，上半部可觀察到菌株之菌絲及孢子等構造。

(三)分子基原鑑定檢測：

在 DNA 分子序列分析上，我們採用目前植物及中草藥鑑定研究中最常被廣泛使用的核醣體核酸基因 (rDNA)序列包括 18S、5.8S、2.8S 基因及兩個內轉錄區 (ITS1 及 ITS2)的 DNA 序列作為鑑定中草藥分子親緣演化的標的。由於植物體內核醣體核酸基因可高達數百套不等的序列，因此為了確認中草藥植物體內之主要的核醣體核酸基因 (rDNA)序列，我們設計了一組廣泛性的 PCR 因子，以 PCR 方式盡可能將所有的核醣體核酸基因放大並將 PCR 產物構築到載體上後，再使用 DNA 定序儀得到了植物體內不同的核醣體核酸基因序列。

1. 雞屎藤之核醣體基因 Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖 3-1)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的 10 組 DNA 序列，並將其排序後，可以觀察到所有 ITS 序列皆完全相同(以序列 1-1 為代表)，並以此 DNA 序列作為雞屎藤核醣體核酸基因序列的代表。我們以核醣體核酸基因(rDNA)的內轉錄區(internal transcribed spacer，ITS)序列與美國美國國家生物技術信息中心(NCBI)之基因庫的相似序列比較，來鑑定雞屎藤之物種分類此序列，結果顯示與 *Paederia bojeriana* isolate aM92 之內轉錄區序列，相似性可達 92%。
2. 山苦瓜之核醣體基因 Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖 3-2)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的 10 組 DNA 序列，並將其排序後，可以觀察到所有 ITS 序列皆完全相同(以序列 2-1 為代表)，並以此 DNA 序列作為山苦瓜核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與 NCBI 基因庫中的 *Momordica charantia* voucher T0037 clone 2 之內轉錄區序列，相似性可達 99%。
3. 半枝蓮之核醣體基因 Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析

(圖 3-3)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的 10 組 DNA 序列，並將其排序後，可以觀察到所有 ITS 序列皆完全相同(以序列 3-1 為代表)，並以此 DNA 序列作為半枝蓮核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與 NCBI 基因庫中的 *Scutellaria barbata* CCMP94RD048-010 之內轉錄區序列，相似性可達 99%。

4. 白花蛇舌草之核醣體基因 Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖 3-4)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的 10 組 DNA 序列，並將其排序後，可以觀察到所有 ITS 序列皆完全相同(以序列 4-1 為代表)，並以此 DNA 序列作為白花蛇舌草核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與 NCBI 基因庫中的 *Hedyotis diffusa* 之內轉錄區序列，相似性可達 99%。
5. 紫蘇之核醣體基因Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖3-5)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的10組DNA序列，並將其排序後，可以觀察到所有ITS序列皆完全相同(以序列5-1為代表)，並以此DNA序列作為紫蘇核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與NCBI基因庫中的 *Perilla frutescens* isolate x089之內轉錄區序列，相似性可達 100%。
6. 狗尾草之核醣體基因Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖3-6)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的10組DNA序列，並將其排序後，可以觀察到其中有8組ITS序列皆完全相同 (以序列6-1為代表)，並以此DNA序列作為狗尾草核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與NCBI基因庫中的*Uraria crinita* voucher CMU-UC001之內轉錄區序列，相似性可達99%。
7. 仙草之核醣體基因Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖3-7)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的10組DNA序列，並將其排序後，可以觀察到所有ITS序列皆完全相同(以序列7-1為代表)，並以此DNA序列作為仙草核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與NCBI基因庫中的 *Mesona chinensis* cultivar Minxuan No.1之內轉錄區序列，相似性

可達99%。

8. 我們做了破布子之核醣體基因Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖3-8)。結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的5組DNA序列，並將其排序後，可以觀察到所有ITS序列皆完全相同(以序列8-1為代表)，我們因此以此DNA序列作為破布子核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較下，結果顯示與美國國家生物技術信息中心(NCBI)基因庫中的*Cordia dentate*之內轉錄區序列，相似性可達91%。
9. 魚腥草之核醣體基因Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖3-9)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的5組DNA序列，並將其排序後，可以觀察到所有ITS序列皆完全相同(以序列9-1為代表)，並以此DNA序列作為魚腥草核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與NCBI基因庫中的*Houttuynia cordata* 之內轉錄區序列，相似性可達99%。
10. 桑黃之核醣體基因Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖3-10)結果顯示，如以桑黃樣本DNA序列作為桑黃核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與NCBI基因庫中的*Porodaedalea sp.*之內轉錄區序列相較下，相似性可達99%。

另外，我們將本研究中 9 種草藥植物的序列與其最相四物種序列做親源演化分析，以親源演化樹狀圖(圖 4)顯示，本研究中 9 種草藥可分類成 6 大族群，分別為包含狗尾草在內的兔尾草屬(Uraria)；苦瓜屬(Momordica)；仙草、紫蘇及半枝蓮在內的唇形目(Lamiales)；白花蛇舌草和雞屎藤在內的茜草科(Rubiaceae)；魚腥草所屬的蕺菜屬(Houttuynia)及破布子所屬的破布木屬(Cordia)。

二、生物活性/功效測試

多種台灣本土常用中草藥，曾經被民間宣稱或在部分研究報告指出含有抗發炎或抗癌的功效。本計畫的目的之一，係從生物活性/功效性(Bio-activity/Functional activity)測試平台及實證醫學健康上之“功能”分析基礎上，利用動物體進一步地驗證這些中草藥之抗腫瘤及抗病毒作用，並且深入探討其免疫反應的分子機制進而提升本土中草藥之應用價值。本計畫在執行後，選定數種台灣本土常用藥用植物 (包含有：半枝蓮、魚腥草、

白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、狗尾草、破布子根、紫蘇、紅紫蘇、紅骨雞屎藤、大花咸豐草、狗肝菜)並以乙醇萃取獲得酒精萃取物。在體外活性篩選上，我們沿續上年度行政院衛生署中醫藥委員會100年度計畫 (建立台灣本土常用中草藥之基原鑑定與功效測試平台)所建立之樹突狀細胞細胞激素調控活性測試平台，測量了中草藥萃取物對樹突狀細胞細胞激素表現之影響。

(一) 中草藥萃取物對樹突狀細胞細胞激素表現之影響：

樹突狀細胞所表現的細胞激素是活化 T 細胞及調控免疫反應之重要因子，近年來研究顯示，在眾多樹突狀細胞表現之細胞激素中，以受刺激從基因表現的時間就前後可區分出包含早期 (TNF-α, IL-6)及後期 (IL-12, IL-10)兩類的細胞激素，這兩類細胞激素在免疫反應調控亦知會扮演著不同的角色。因此在本研究之測試項目中，我們是以細胞激素 IL-6 及 IL-12 作為前期及後期的代表以評估中草藥萃取物之抗發炎活性並依此將其分類。我們以細菌之脂多醣(LPS)作為促發炎試劑以刺激樹突狀細胞表現各項細胞激素。中草藥萃取物(作用濃度為 50, 25, 12.5 μg/ml)與 LPS 加入樹突狀細胞 24 小時後，將細胞培養液取出並以酵素免疫分析法(ELISA)測試法測試 IL-6 及 IL-12 表現活性以評估中草藥萃取物對於細胞激素 IL-6 及 IL-12 表現調控活性。研究結果顯示於表 1。我們研究結果顯示半枝蓮、山苦瓜、破布子及魚腥草冷水萃取物對於細胞激素 IL-12p40 很好抑制活性，平均抑制達活性可達 50%。大花咸豐草酒精及乙酸乙酯萃取物對於細胞激素 IL-12p40 亦有很好抑制活性，平均抑制達活性可達 50%。我們選取有較高抑制活性之中草藥萃取物包含半枝蓮、破布子冷水萃取物及大花咸豐草酒精萃取物，進行抗腫瘤及抗病毒活性之測試。此外，有鑑於藥典記載及民間常使用狗肝菜萃取物用以治療帶狀疱疹，狗肝菜亦為衛生署中醫藥委員會之台灣本土中草藥發展關注項目之一。我們亦選定狗肝菜萃取物進行抗簡單一型疱疹病毒 (簡稱 HSV-1)皮膚疱疹動物模式之抗病毒活性測試。

(二) 中草藥萃取物抗腫瘤活性之測試

近年來，許多研究顯示發炎在腫瘤生成及轉移扮演一非常重要的角色，許多研究結果顯示許多具有抗發炎活性的植物化合物在動物腫瘤模式中也具有抗腫瘤的活性。因此我們藉由一原位乳癌動物

模型來評估中草藥萃取物之抗腫瘤活性。

1. 原位乳癌細胞動物模型之建立

將帶有冷光基因(luciferase)的老鼠乳癌細胞4T1-Luc2 (5×10^5)植入BALB/c老鼠的第六對左側乳腺脂房墊裡，7天後則以活体即時冷光影像檢測系統非侵入方式偵測乳癌細胞生長情形，並以冷光強度作為量化腫瘤大小之依據。

2. 中草藥萃取物在原位乳癌動物模型中的抗腫瘤活性

在初步實驗中，我們先行評估半枝蓮、破布子的冷水萃取物之抗原位乳癌腫瘤生長之活性。我們將老鼠乳癌細胞4T1-Luc2植入BALB/c老鼠的乳房脂房墊裡，待1天後，每天開始餵食半枝蓮、破布子冷水萃取物劑量為100 mg/kg/day，實驗以餵食0.1% DMSO作為實驗對照組。每一週以活体即時冷光影像檢測系統測量腫瘤生長及轉移情形。實驗進行30天後，犧牲老鼠，並統計分析腫瘤之生長情形。實驗結果顯示出(圖5)，大花咸豐草之酒精萃取物、半枝蓮及破布子根冷水萃取物皆具有部分抑制腫瘤的生長的活性。

3. 中草藥萃取物在乳癌切除動物模型中的抗腫瘤轉移活性

在大花咸豐草酒精萃取物 (BP-E)在乳癌切除動物模型中的抗腫瘤轉移活性測試中，如圖5所示，我們將老鼠於接種乳癌細胞21天後，在切除腫瘤後開始每天餵食老鼠大花咸豐草酒精萃取物(100 mg/kg/day)。與實驗對照組相比大花咸豐草可顯著抑制腫瘤轉移，實驗P-value皆小於0.1 (圖6、A)；然而在老鼠存活率上顯示，大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)能有效維持老鼠的存活率P-value皆小於0.01 (圖6、B)，在實驗第八十天，控制組老鼠腫瘤轉移率達100%且皆已死亡，而餵食大花咸豐草酒精萃取物之老鼠，存活率達80%以上。由上述動物實驗結果顯示大花咸豐草酒精萃取物具有可抑制腫瘤細胞轉移的活性。

4. 大花咸豐草酒精萃取物對脾臟腫脹及骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)族群聚集之影響

我們分析老鼠脾臟腫脹(splenomegaly)之情形，實驗結果顯示出(圖7、A)，大花咸豐草酒精萃取物可有效抑制腫瘤產生之脾臟腫脹。分析脾臟細胞骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)族群之結果顯示於(圖7、B、C)。4T1老鼠乳癌細胞顯然可大量刺激脾臟

Granulocytic MDSCs族群的聚集，大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)可有效抑制老鼠脾臟Granulocytic MDSCs族群的聚集，抑制率可達50%。由於Granulocytic MDSCs主要是由腫瘤細胞分泌細胞激素(包含有G-CSF、GM-CSF)刺激骨髓細胞分化而成，我們因而將骨髓細胞體外分別加入G-CSF、GM-CSF並與不同濃度的BP-E共同培養5天後，以西方點墨法(Western blot)測量細胞表現G-CSF受體表現量並以流式細胞儀測量MDSCs的數量。研究結果顯示於圖8，(圖8、A)顯示BPE可以有效抑制骨髓細胞由GM-CSF刺激表現的G-CSF受體的表現量並且可以有效抑制由G-CSF或是M-CSF刺激表現骨髓衍生抑制細胞的數量(圖8、B、C)。

5. 大花咸豐草酒精萃取物之 HPLC 化學指紋圖譜分析

在大花咸豐草酒精萃取物HPLC化學指紋圖譜分析上，我們以Cosmosil C18分離管柱加以分析，結果顯示於圖9，大花咸豐草萃取物在波長235nm有數根主要吸收波。我們區分成4個分層，依序為F1至F4。

6. 大花咸豐草酒精萃取物及個別(F1 至 F4)分層對脾臟骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)產生活性氧化物質(ROS)的影響

我們目前分別收集並製備足夠的HPLC分層(F1至F4)，並進一步探討大花咸豐草酒精萃取物及個別(F1至F4)分層，各別對MDSCs產生活性氧化物質 (ROS)的影響。我們藉由抗MDSC標記分子(Gr-1)抗體，把MDSCs自帶有4T1腫瘤老鼠之脾臟分離出，再將大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)及個別分層(F1至F4)與MDSCs培養24小時後，最後以流式細胞儀偵測MDSCs表現ROS的表現量。我們實驗結果顯示於圖10。實驗的結果顯示大花咸豐草酒精萃取物可有效抑制MDSCs產生ROS，在個別分層中，F1具有顯著抑制ROS的產生，不管是對脾臟MDSCs表現ROS比例或是對脾臟MDSCs表現ROS的平均強度皆具有顯著的抑制活性。我們進一步對F1進行成分分析。我們藉由LC/MS分析，結果顯示於結果顯示於圖11。大花咸豐草酒精萃取物F1分層在波長254nm有數根主要吸收波，分別定為A、B、C、D、E及F (圖11、A)。藉由LC/MS分析及比對我們先前研究結果，我們發現大花咸豐草酒精萃取物F1分層含有數種

polyacetylenic gucoside的化合物(圖11、B)，其確切的化合物成分及含量，我們將進一步深入來探討。

(三) 中草藥萃取物抗HSV-1病毒活性之測試

1. 建立中草藥調控 HSV-1 抗病毒活性的皮膚疱疹動物模式:

(1) HSV-1 感染

實驗選用週齡六周以上的 C57BL/6 標準品系，進行 HSV-1 感染。進行方式如圖 12 所示：先以肌肉鬆弛劑麻醉後，剔除腹背處的毛髮後以 19 號針頭輕微地刮擦數下(A)。將適量的 HSV-1 ($1x10^6$ PFU/20μl) 滴在一張圓形的濾片上，以檢測過敏抗原的方式將該濾片貼在刮擦的皮膚上，以彈性繃帶固定後，於 48 小時移除(B, C)。大約經過 72~96 小時小鼠皮膚會出現黃褐色的疱疹傷口，並於 7-10 天內修復癒合(D)。

(2) HSV-1 感染後給予藥物處理

由於狗肝菜宣稱具有治療帶狀疱疹(俗稱皮蛇)的效果。民間對於該草藥的使用以外敷的方式達到解熱止痛的效用，本實驗將以塗抹外敷的方式給藥，與不給藥的對照組比較病毒感染後局部皮膚的病毒總量，同時比較分析中草藥萃取物對於皮膚感染 HSV-1 後的組織病理變化、免疫細胞浸潤現象以及與發炎反應相關的細胞激素表現強度。在前一次期中報告中，我們首先選用 90%乙醇萃取的狗肝菜來建立實驗系統，包括藥物使用的劑量、使用的方式、評估的時間點與測量等指標。實驗結果發現，小鼠的腹側皮膚感染 HSV-1 後 24 小時隨即塗抹狗肝菜萃取物一次，第五天時病毒量下降為未塗藥對照組的一半，連續塗二次的病毒量雖然沒有下降更多，但是對於 HSV-1 傷痂的癒合比其他實驗組更好。顯示，連續塗藥有更好的治療效果。狗肝菜萃取物似乎對於傷口的保護、促進皮膚修復與 HSV-1 傷痂的癒合都有明顯的效果。根據這項初步實驗結果，後續的實驗共選用了五種中草藥萃取物包括冷水萃取狗肝菜、熱水萃取狗肝菜、破布子根、半枝蓮以及大花咸豐草。所有的萃取物先回溶於 1X 磷酸緩衝液(BSS) (100 mg/ml)後，再用適當的凡士林(Vaseline)將藥物均勻回溶並且使藥物容易塗抹在皮膚表面，每次每塊皮膚組織

約塗抹 1mg 的藥物。實際的操作步驟如圖 11、B。

2. 各種中草藥對於 HSV-1 傷痂外觀的影響

(1) 狗肝菜酒精萃取物

小鼠經腹側感染 HSV-1 病毒 24 小時後，實驗組開始塗中草藥萃取物連續數次，並分別於感染後不同天數拍照記錄其傷口外觀的形成。僅做刮擦沒有病毒的感染的皮膚傷口淺且小，至第三天外觀上幾乎與正常皮膚無異。狗肝菜酒精萃取物也不會造成皮膚外觀明顯的不良反應，例如紅腫、發疹等現象。HSV-1 感染的皮膚與過去的實驗結果一致，在第三天有明顯的傷痂，到第五天的範圍變大。相較於未處理組，病毒感染後第一天隨即給予狗肝菜酒精萃取物處理後的傷口，第 3 天時比未處理者小而且有明顯的癒合現象，第五天的差異更為顯著。但是感染後 48 小時才塗藥的皮膚傷口，外觀上與未處理的病毒感染對照組差異不大(圖 13)。

(2) 狗肝菜冷、熱水萃取物

小鼠經腹側感染 10^6 PFU HSV-1 病毒 24 小時後塗抹狗肝菜萃取物每天一次，拍照記錄其傷口外觀變化，直到第五天小鼠犧牲為止。白色圓圈處標記為 HSV-1 傷痂形成之處。未塗藥前(1 dpi)皮膚外觀已經有明顯的傷痂形成，隨著感染後的天數增加逐漸變大。感染後第二天開始不論塗抹狗肝菜冷水或熱水萃取物對於傷痂的大小影響不大但是對於表皮結痂形成有促進的效果(圖 14)。

(3) 半枝蓮、破布子冷水萃取物及大花咸豐草酒精萃取物

小鼠經腹側感染 10^6 PFU HSV-1 病毒，24 小時後分別給予塗抹半枝蓮、大花咸豐草或破布子萃取物每天一次，拍照記錄其傷口外觀變化(圖 15)，直到第五天小鼠犧牲為止。白色圓圈處標記為 HSV-1 傷痂形成之處。未塗藥前(1 dpi)皮膚外觀已經有明顯的傷痂形成，隨著感染後的天數增加逐漸變大。從 HSV-1 感染皮膚後形成傷痂後的觀察結果發現: 大花咸豐草、狗肝菜酒精萃取物及半枝蓮冷水萃取物具有促進傷痂修復的效果。雖然給予狗肝菜冷、熱水萃取物對於抑制 HSV-1 傷痂的效果不顯著，但是對於皮膚修復

有促進的效果。破布子根不論是在傷痂形成或是修復，效果最為顯著。

3. 比較病毒總量

由於皮層細胞(keratinocyte)對於 HSV-1 有很高的感受性，是病毒複製繁殖的主要場所。為了比較狗肝菜酒精萃取物對於病毒複製是否有抑制的作用，小鼠感染後第五天取下局部的皮膚組織(面積大約 1x1 cm^2)，經過切碎、研磨的方式，釋出活病毒，進行病毒溶斑形成定量分析(Plaque Forming Assay)。實驗共分成三組進行。每組檢測三~五個皮膚樣本的病毒量。第一組，給予狗肝菜酒精萃取物；第二組，給予狗肝菜水(冷水或熱水)萃取物；第三組，分別給予半枝蓮、大花咸豐草或是破布子的萃取物。除了第一組給予一次或是二次的塗藥，第二組與第三組都是在病毒感染 24 小時候每天塗藥，連續四天，第五天分析病毒量。實驗結果整理如圖 16。從圖 16 可知，第一組感染 HSV-1 後第五天，未處理組的病毒平均效價大約 $1x10^5$ PFU。感染後 24 小時塗藥一次，平均病毒效價降為 $5x10^4$ PFU，其中有兩個樣本的病毒量下降到 5000 PFU 以下。連續兩天分別給藥一次的結果，雖然不若與塗藥一次的結果好，但是傷痂似乎有腳小的趨勢。是否有操作上的誤差，需要在未來的實驗再重複一次。狗肝菜水萃取物尤其是冷水萃取物，平均病毒效價比未處理組下降約為 85 倍(unpaired t test, $p<0.0001$)。雖然熱水萃取物的效果不若冷水明顯，病毒量下降沒有統計差異(unpaired t test, $p=0.02$)，但是有一塊組織的病毒量顯著降低。另外，病毒感染後 24 小時不論是給予半枝蓮、大花咸豐草或是破布子根，病毒量與未處理的對照組都有顯著的下降，並且具有統計的顯著差異(unpaired t test, p 值分別是 0.003, 0.0002, 和 0.008) (圖 16、B)。

4. 比較皮膚感染 HSV-1 後的組織病理變化與免疫細胞浸潤現象

病毒感染後的皮膚傷口組織切下後進行冷凍包埋或是石蠟包埋後切片(5 μm)，並以 Hematoxyline & Eosin (H & E)染色法分析其組織病理型態的變化(如圖 17)。第一組實驗，先比較感染 HSV-1 後的皮膚，HSV-1 感染後並在 24 小時塗抹狗肝菜酒精萃取物一次的皮膚病理變化。圖 17 的分析結果發現，與

正常對照組織相比較，HSV-1 感染皮膚後的病理現象包含了組織間細胞體積變大(cell ballooning)、表皮組織增生變厚、細胞崩解導致內容物外洩(reticular degeneration)、已壞死細胞的染色質聚集在一起呈現許多不規則的團塊狀(chromosome condensation)以及組織間到處可見空泡的形成(vesicle formation)。免疫細胞浸潤現象也清楚可見。狗肝菜酒精萃取物處理組雖然也有前述的皮病理變化，但是組織的完整性較好，角質層的堆疊厚度較小（代表細胞的增生與壞死較少），免疫細胞浸潤現象也很顯著。至於水萃取狗肝菜部分，塗抹一次冷水萃取的狗肝菜後(2 dpi)即顯著地影響皮膚角質的增生，同時伴隨著明顯的免疫細胞浸潤現象。到了第五天時，免疫細胞浸潤現象仍然持續，但是表皮細胞增生的現象不若未處理的對照組顯著，提示著病毒感染程度應下降。未來需要進一步地用免疫化學染色法分析 HSV-1 表現的強度。熱水萃取的狗肝菜同樣地也引起明顯的免疫細胞浸潤，表皮組織到第五也較未處理的對照組完整。與皮膚外觀上容易形成結痂的觀察結果一致。究竟這些皮膚浸潤的免疫細胞是哪一類的細胞，未來將作進一步地探討。大花咸豐草、半枝蓮與破布子根萃取物在維持皮膚組織的完整性上，比狗肝菜的效果更好(圖 17 B)。

我們進一步地用免疫化學染色法分析(Immunohistochemical staining)了 HSV-1 病毒蛋白在皮膚經過各種中草藥處理下的表現情形，我們發現:於未處理的對照皮膚中，HSV-1 感染後第二天雖然有明顯的組織被破壞的現象，病毒蛋白的表現並不明顯。但是到了第五天後 HSV-1 的病灶集中而且散布多處。病毒蛋白高度表現於狗肝菜（熱水與冷水萃取）與大花咸豐草處理後的皮膚；雖然在第二天表現 HSV-1 蛋白，然而病灶顯著變小，到第五天時已經檢測不到病毒蛋白的表現。破布子根處理的皮膚到第五天仍還有少量的病毒蛋白，但卻不像對照組，有多處且較大的 HSV-1 病灶。半枝蓮處理後的皮膚在感染後第二天與第五天的皮膚組織幾乎檢測不到病毒蛋白的表現，其抑制病毒的效果最好。

5. 比較皮膚感染 HSV-1 後與發炎反應相關的細胞激素表達情形

皮膚是生物體第一道防衛系統，具有物理性、化學性與生

物性的屏蔽功能，抵抗外來病原的入侵。因此，先天性免疫反應(innate immunity)成為皮膚細胞最重要的生物性防禦系統，具有產生多種與抗病毒、發炎反應相關的細胞激素(cytokine)與趨化激素(chemokine)的能力，以傳遞並誘導重要的免疫反應，控制病原的感染。前述實驗結果(圖 16)發現，在 HSV-1 感染後的皮膚給予酒精萃取與水萃取的狗肝菜後，不僅可能降低病毒的產量，同時在傷口修復有明顯的作用。H&E 的病理分析也發現，顯著的免疫細胞浸潤，似乎與皮膚在 HSV-1 感染的情形下的完整性有正相關性，因此利用定量 PCR (q-PCR)的實驗方法，針對特定的細胞激素基因進行處理組與未處理的對照組相關基因表達得比較。首先，選擇與中性白血球(neutrophil)浸潤有關的 KC (CXCL1)、與抗病毒活性有關的 IP-10、影響吞噬細胞趨化因子 MCP-1 (CCL2)、誘發發炎反應的 IL-1β，IL-6，TNF-α等六種基因，在各組皮膚組織的表達強度。各組樣本的 cDNA 含量均先以 house keeping β-actin 調整後，再利用各組基因的引子對(primer pair)進行聚合酶鏈鎖反應 PCR 擴增後，以 SYBR green 色劑進行量化分析。各基因在各組皮膚組織中的表現量，均與未感染的組織相比，所得的結果以倍數的增加來呈現 (如圖 18)。圖 18 的實驗結果說明，六種受測之中草藥都能誘發顯著的發炎基因的表達。HSV-1 感染後未作塗藥處理的對照組皮膚，比正常對照組的 HSV-1 誘發 KC、IL-1β、IL-6 與 TNF-α 之表現量，分別增加了 5.6、130、5、與 4 倍。比較三種不同狗肝菜萃取的處理二天後的結果發現:與正常對照組的皮膚比較起來，酒精與熱水萃取狗肝菜誘發較高的 KC (分別是 168 與 74 倍)與 IL-6 (分別是 89 與 23 倍)；而冷水萃取的狗肝菜則誘發較高的 KC (30 倍)與 IL-1 (260 倍)。雖然 KC 與 IL-6 的表現量不若酒精萃取的高，但是都較對照組要高。熱水萃取則較冷水萃取能誘發較高的發炎基因之表現。這些實驗結果與在 H & E 染色所見到的免疫細胞浸潤增加的觀察結果是一致的。

比較半枝蓮、大花咸豐草與破布子根萃取物的處理效果實驗中，我們發現：大花咸豐草傾向誘發 KC (45 倍)、IL-1β (343 倍)與 IL-6 (14 倍)的表現，而破布子根則顯著誘發 KC (19 倍)、

IL-1β (400 倍)、IL-6 (12 倍)與 TNF-α (16 倍)等四種與發炎反應相關的基因表現。半枝蓮雖然也能誘發 KC (23 倍)與 IL-1β (180 倍)基因的表現，增加的倍數與其他五種萃取物的比較下變化較小。總體來說，半枝蓮在抑制 HSV-1 病毒之感染皮膚的效果上是最好的，而且它也能維持病毒感染後的皮膚組織的完整性以及促進受損皮膚的修復。

肆、討論

一、物種來源及基原鑑定

本計畫是依據行政院衛生署中醫藥委員會 101 年度推動傳統醫藥(材)生技研發類委託研究計畫之需求而選定。其中包含十餘種常用 (台灣) 中草藥材，包括半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、狗尾草、破布子根、魚腥草、紫蘇、雞屎藤、桑黃、狗肝菜及大花咸豐草等作為研究材料，藉由我們所建立一系統化研究平台，包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並以具體細胞學/分子生物學的生物活性測試平台及動物實驗模式，以確定台灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分及生物活性，進而提升本土中草藥之應用價值。在基原鑑定研究上，除了桑黃外，包括半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、破布子、魚腥草、紫蘇、雞屎藤及狗肝菜。這些藥草植物，在外部型態上極容易辨認，故應不易有混用、誤用等情形的發生。本計畫中草藥植株皆採集自北部地區，我們有進行組織切片觀察及核醣核酸基因序列分析。在莖部切片上，各植物莖部組織皆呈現其特有構造。在序列分析上，雞屎藤、破布子與 NCBI 基因庫之最相近物種的相似度僅達 92%-91%，其餘上列中草藥植株樣本與其最相近物種序列皆達 99%以上。本次研究所使用之桑黃樣本，乃自中研院附近中藥行購得，核醣體核酸序列分析結果顯示，其最相似菌株為與桑黃(*Phellinus linteus*)同為刺革菌科(Hymenochaetaceae)的 *Porodaedalea* sp.，顯示市售的桑黃許多可能來自與桑黃相近之菌種，則或有誤用之可能。綜合中草藥植株外部形態觀察、組織切片鏡檢及核醣體核酸序列分析結果顯示，除了桑黃以外，本研究所採集的中草藥植株樣本皆為正確之物種。

二、中草藥萃取物對細胞激素調控活性

樹突狀細胞是一重要的免疫細胞，它在免疫系統中，扮演著中樞調節的角色。樹突狀細胞參與各項免疫反應，如及發炎反應、對抗外來病原體感染免疫反應、抗腫瘤免疫反應等反應。細胞激素的表現被認為是樹突狀細胞用以調節免疫反應之一重要因子。一些促發炎細胞激素如TNF-a、IL-6及IL-12等會活化其他免疫細胞及引發發炎反應。本計畫以樹突狀細胞所表現之細胞激素所建立的體外篩選平台，採用酵素免疫分析法來評估中草藥萃取物對於重要促發炎細胞激素之表現情形用以評估中草藥萃取物之抗發炎活性及免疫調節活性是合理且實用的策略。在評估各種中草藥冷水、熱

水萃取物發現對於IL-12細胞激素之表現情形，我們的研究結果顯示半枝蓮、山苦瓜、破布子及魚腥草冷水萃取物對於細胞激素IL-12很好抑制活性，然而上述中草藥熱水萃取物對於IL-12抑制能力則大大降低，這說明以冷熱水萃取上述中草藥所能獲得之不同植物化合物組成與其抑制活性有很大的關係。具抑制活性之中草藥萃取物其植物化合物之組成及其有效成份需待後續實驗加以分析。

三、中草藥萃取物抗腫瘤活性分析

在原位乳癌細胞動物模型中，老鼠4T1乳癌腫瘤細胞在西方醫學研究上，被認為是非常惡性及具高度轉移率之腫瘤細胞，因此，老鼠4T1乳癌腫瘤細胞及動物模式乃適合及廣泛被用於研究腫瘤轉移等相關實驗。在評估中草藥萃取物對抑制老鼠原位乳癌腫瘤生長活性上，我們實驗結果顯示出，大花咸豐草酒精萃取物、半枝蓮及破布子根冷水萃取物皆具有一定程度之抑制原位腫瘤的生長的活性。我們又進一步以乳癌切除動物模型，評估了中草藥萃取物抑制乳癌細胞轉移活性，我們實驗結果顯示大花咸豐草酒精萃取物具有強力抑制腫瘤轉移的活性能力及可延長老鼠的存活時間。我們亦觀察到原位腫瘤生長的大小與脾臟的腫脹程度及腫瘤細胞轉移的發生率有正向的關聯。另外以帶有CD11b或Gr1標記的骨髓衍生抑制細胞族群在脾臟的數量亦與腫瘤生成大小及腫瘤接種的天數成正相關並且予腫瘤轉移也很大的關聯。我們的研究結果顯示大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制腫瘤所引發的脾臟腫脹的情形，進一步分析顯示大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制脾臟的老鼠骨髓衍生抑制細胞族群。體外細胞實驗顯示大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制骨髓細胞G-CSF受體的表現量及骨髓衍生抑制細胞的分化，這些結果說明大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制老鼠乳腺腫瘤的轉移可能是藉由抑制骨髓衍生抑制細胞的分化有關。大花咸豐草抗乳癌轉移活性的作用機轉，我們認為與調控G-CSF受體表現的訊息傳導有所關聯，我們因而期待能在計畫第二年中，研究加以證實。

四、中草藥萃取物抗 HSV-1 病毒活性分析

HSV-1 與另一常見的水痘疱疹病毒(Varicella-zoster virus 之 VZV)同為人類 alpha 亞族疱疹病毒。二者的致病機制有多種相似之處，例如:主要以皮膚的皮層細胞(keratinocyte)為感染標靶細胞(target cells)。未經免疫的個體初次經過感染 HSV-1 後雖然沒有明顯的臨床症狀，幼童感染 VZV 約二周內全身皮膚即出現水痘等顯著的症狀。二種病毒經過急性期的感染後，多數的病毒雖然會被免疫反應所激活的 T 細胞清除，但是極少數的病毒量一旦

經過末端神經細胞進入感覺神經節後即可造成終身潛伏感染。當個體的免疫活性下降，或是使用免疫抑制藥物，就可大幅提高病毒復發感染的機會。例如臨床常見的 HSV-1 疱疹性角膜炎與 VZV 引起的帶狀疱疹等。

由於人類是 VZV 唯一的自然宿主，目前並無適當的小型動物實驗模式可供使用。HSV-1 具有感染小鼠的能力，但是呈現的症狀與小鼠的品系、病毒株、感染途徑與病毒量有關，與人類的症狀不盡相同。但是 HSV-1 感染小鼠腹側皮膚所出現的病理變化例如皮層細胞的增生現象、免疫發炎反應與免疫細胞浸潤、病毒複製與病毒蛋白的表現等等，與過去我們研究 VZV 感染轉殖在免疫缺失小鼠的異源皮膚(xenograft)或是水痘的病理組織(biopsies)非常的類似。因為要在活體中研究中草藥萃取物對於抗 VZV 疱疹病毒的生物活性/功效性有極高的侷限，本實驗選用 HSV-1 感染動物模式篩選特定藥物或是活性成分對於病毒感染引發的發炎反應調節效果是一個合理而且可行的替代方法。本實驗將利用 HSV-1 皮膚疱疹動物模式，從皮膚傷痂的外觀變化、HSV-1 病毒總量、皮膚病理變化、發炎反應與發炎反應相關的細胞激素表達變化等方面評估所選定的數種中草藥對於調節疱疹病毒感染的抗病毒作用。

伍、結論與建議

承蒙行政院衛生署中醫藥委員會核定本研究計畫，在本研究計畫核定後，我們即按照本計畫所擬定之研究目標及實驗規劃進行各項實驗。在本年度中，我們研究進度符合計畫所設定之本年度研究目標，我們亦獲得很好的研究成果。我們研究成果在基原鑑定上，我們完成半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、狗尾草、破布子、魚腥草、紫蘇葉、雞屎藤、桑黃、破布子及魚腥草中草藥之外部形態觀察、鏡檢及核醣核酸序列的分析工作。在分析中草藥萃取物對樹突狀細胞細胞激素表現之項目上，我們完成狗肝菜、半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、狗尾草、破布子、魚腥草、紫蘇葉、雞屎藤、桑黃、破布子及魚腥草，包括酒精、冷水、熱水三種萃取物以及大花咸豐草酒精萃取物之製備。我們亦完成上述中草藥萃取物對樹突狀細胞表現 IL-6 及 IL-12 細胞激素表現之影響，其中半枝蓮、山苦瓜、破布子、魚腥草及大花咸豐草萃取物對於抑制 IL-12 表現有顯著的抑制活性。在抗腫瘤活性分析上，我們進行半枝蓮、破布子根冷水萃取物在老鼠原位乳癌動物模式之抗腫瘤生長的研究項目，中草藥萃取物在乳癌切除動物模型中的抗腫瘤轉移活性上，我們完成大花咸豐草酒精萃取物抗腫瘤轉移的研究並獲得大花咸豐草酒精萃取物其有效分層及可能的化合物之組成。我們已初步完成大花咸豐草酒精萃取物抗腫瘤轉移之作用機轉。

本年度的計畫已經完成狗肝菜（包括酒精、冷水、熱水三種萃取方法）、半枝蓮、破布子根冷水萃取物與大花咸豐草酒精萃取物等四種中草藥對於抗疱疹病毒的活性與影響發炎反應相關的檢測。初步實驗結果發現，狗肝菜特別是冷水萃取的方法，經過外敷的方式確實顯著地降低 HSV-1 的病毒量，但是塗藥後的第一天似乎容易造成皮膚細胞的死亡的毒性，不過該作用在第五天就不顯著。相較之下，狗肝菜熱水萃取物不論對於 HSV-1 傷痂的形成與修復，或是皮膚病理、發炎反應等，都不若冷水萃取理想。所有四種萃取物都有不同程度抗病毒的效果。同時都能在感染 48 內引發顯著的免疫細胞浸潤，促進病毒感染組織後造成破損皮膚的修復。另外，半枝蓮、破布子冷水萃取物與大花咸豐草酒精萃取物對於傷痂的復原似乎也有正向的作用，同時也能顯著抑制病毒蛋白的表現量。雖然發炎反應是啟動適應性細胞免疫反應的前哨系統，中草藥萃取物的使用(如，狗肝菜酒精及水萃取物)引起較高度的發炎反應，在初期對於皮膚產生的毒性必須考慮。從本實驗結果發現不同中草藥萃取物在活體組織中所呈現的差異變化，提供未

來進一步探討該中草藥可能具有抗發炎、免疫調節的作用機制。各種中草藥中的主要活性成分，值得進一步地作分析研究。

本研究計畫在有限的時間內，完成多項研究結果，尤其是動物模型研究結果顯示，大花咸豐草酒精萃取物具抑制腫瘤轉移及包含狗肝菜冷萃取物等中草藥萃取物具抑制 HSV-1 病毒之活性。我們相信本計畫所建立之方法及研究成果將有助於台灣本土常用或傳統中草藥抗發炎、抗腫瘤及抗病毒活性之現代化研究及開發台灣本土常用中草藥未來潛在之應用價值。於本年度中，在抗腫瘤及抗病毒研究所獲得的成果，我們相信已足可申請至少兩項以上的研究專利，並可將成果於一年內發表於兩篇國際高質量(eg., IF> 4)之相關研究期刊。目前我們除了進行後續的研究工作外，我們也正積極同時準備專利申請及研究期刊之發表。除此之外，我們認為本研究計畫還有許多重要議題值得我們進一步釐清探討。本計畫在人才培育貢獻上，本研究計畫執行初至今已投入 8 位博士、碩士級研究人員及博士班、碩士班學生。我們認為這些研究人力未來將有助於台灣在中草藥研究及產業發展之推動。我們亦認為本計畫所建立之方法及研究成果亦將有助於幫助公共政策制定及推動。因此，我們認為本研究計畫很值得再深入進一步之探討及開發。我們誠摯希望衛生署中醫藥委員會能給予本計畫再次的支持，以完成後續全面及更完整的研究結果。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-11 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. Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med* **17**, 1217-1220 (2011).
2. Yuan, R. & Lin, Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacol Ther* **86**, 191-198 (2000).
3. Galloway, J.A. Everyday food may contain hidden health benefits. *Wadison State Journal,* (1998).
4. Gorman, C. Power sprouts: they're even better than broccoli at fighting cancer. *Time* (1997).
5. 柯逢年. Veregen®成功案例分析與植物新藥研發策略. *RegMed* **2**, 1-9 (2010).
6. Lai, L.S., Chou, S.T. & Chao, W.W. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (Mesona procumbens Hemsl) leaf gum. *J Agric Food Chem* **49**, 963-968 (2001).
7. Hung, C.Y. & Yen, G.C. Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from Mesona procumbens Hemsl. *J Agric Food Chem* **50**, 2993-2997 (2002).
8. Yen, G.C., Hung, Y.L. & Hsieh, C.L. Protective effect of extracts of Mesona procumbens Hemsl. on DNA damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide and UV irradiation. *Food Chem Toxicol* **38**, 747-754 (2000).
9. Shyu, M.H., Kao, T.C. & Yen, G.C. Hsian-tsao (Mesona procumbens Heml.) prevents against rat liver fibrosis induced by CCl(4) via inhibition of hepatic stellate cells activation. *Food Chem Toxicol* **46**, 3707-3713 (2008).
10. Yin, X., Zhou, J., Jie, C., Xing, D. & Zhang, Y. Anticancer activity and mechanism of Scutellaria barbata extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sci* **75**, 2233-2244 (2004).
11. Cha, Y.Y.*, et al.* Methylene chloride fraction of Scutellaria barbata induces apoptosis in human U937 leukemia cells via the mitochondrial signaling pathway. *Clin Chim Acta* **348**, 41-48 (2004).
12. Kim, E.K.*, et al.* Induction of G1 arrest and apoptosis by Scutellaria barbata in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int J Mol Med* **20**,

123-128 (2007).
13. Goh, D., Lee, Y.H. & Ong, E.S. Inhibitory effects of a chemically standardized extract from Scutellaria barbata in human colon cancer cell lines, LoVo. *J Agric Food Chem* **53**, 8197-8204 (2005).
14. Yang, J.J., Lin, C.C. & Hsu, H.Y. The possible use of Peh−Hue−Juwa−Chi−Cao as an antitumour agent and radioprotector after therapeutic irradiation. *Phytotherapy Research* **11**, 6-10 (1997).
15. Lin, C.C., Ng, L.T., Yang, J.J. & Hsu, Y.F. Anti-inflammatory and hepatoprotective activity of peh-hue-juwa-chi-cao in male rats. *Am J Chin Med* **30**, 225-234 (2002).
16. Kim, H.M.*, et al.* Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom Phellinus linteus. *Int J Immunopharmacol* **18**, 295-303 (1996).
17. Song, Y.S.*, et al.* Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom Phellinus linteus. *J Ethnopharmacol* **88**, 113-116 (2003).
18. Hur, J.M.*, et al.* Antibacterial effect of Phellinus linteus against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Fitoterapia* **75**, 603-605 (2004).
19. Kim, S.H.*, et al.* Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom Phellinus linteus. *J Ethnopharmacol* **93**, 141-146 (2004).
20. Jayasooriya, A.P.*, et al.* Effects of Momordica charantia powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *Journal of ethnopharmacology* **72**, 331-336 (2000).
21. Ahmed, I., Lakhani, M.S., Gillett, M., John, A. & Raza, H. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic Momordica charantia (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* **51**, 155-161 (2001).
22. Miura, T.*, et al.* Hypoglycemic activity of the fruit of the Momordica charantia in type 2 diabetic mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **47**, 340-344 (2001).
23. Omoregbe, R., Ikuebe, O. & Ihimire, I. Antimicrobial activity of some

medicinal plants extracts on Escherichia coli, Salmonella paratyphi and Shigella dysenteriae. *African journal of medicine and medical sciences* **25**, 373 (1996).

24. Claflin, A.J.*, et al.* Inhibition of growth and guanylate cyclase activity of an undifferentiated prostate adenocarcinoma by an extract of the balsam pear (Momordica charantia abbreviata). *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 989-993 (1978).
25. Takemoto, D.J., Dunford, C. & McMurray, M.M. The cytotoxic and cytostatic effects of the bitter melon (Momordica charantia) on human lymphocytes. *Toxicon* **20**, 593-599 (1982).
26. Lee, D.K.*, et al.* Momordins inhibit both AP-1 function and cell proliferation. *Anticancer research* **18**, 119-124 (1998).
27. Miser, J.S.*, et al.* Phase II trial of indicine N-oxide in relapsed acute leukemia of childhood. A report from the Childrens Cancer Study Group. *Am J Clin Oncol* **15**, 135-140 (1992).
28. Srinivas, K., Rao, M. & Rao, S. Anti-inflammatory activity of Heliotropium indicum linn. and Leucas aspera spreng. in albino rats. *Indian Journal of Pharmacology* **32**, 37-38 (2000).
29. Adelaja, A.A.*, et al.* Evaluation of the histo-gastroprotective and antimicrobial activities of Heliotropium indicum Linn (Boraginaceae). *Malaysian Journal of Medical Sciences* **15**, 22-30 (2008).
30. Reddy, J.S., Rao, P.R. & Reddy, M.S. Wound healing effects of Heliotropium indicum, Plumbago zeylanicum and Acalypha indica in rats. *J Ethnopharmacol* **79**, 249-251 (2002).
31. Ueda, H., Yamazaki, C. & Yamazaki, M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of Perilla frutescens. *Biological & pharmaceutical bulletin* **25**, 1197-1202 (2002).
32. Banno, N.*, et al.* Triterpene acids from the leaves of Perilla frutescens and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 85-90 (2004).
33. Osakabe, N.*, et al.* Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of Perilla frutescens, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radic Biol Med* **33**,

798-806 (2002).

34. Makino, T.*, et al.* Anti-allergic effect of Perilla frutescens and its active constituents. *Phytother Res* **17**, 240-243 (2003).
35. Sharma, U., Sharma, U., Sutar, N., Singh, A. & Shukla, D. Anti-inflammatory activity of Cordia dichotoma forst f. seeds extracts. *Int. J. Pharm. Analysis* **21**, 1-4 (2010).
36. Kuppast, I., Nayak, P.V., Prakash, K.C. & Kumar, K.V.S. Anti-ulcer effect of Cordia dichotoma Forst. f. fruits against gastric ulcers in rats. *The Internet Journal of Pharmacology* **7**(2009).
37. Kuppasta, I. & Nayak, P.V. Wound healing activity of Cordia dichotoma Forst. F. fruits. *Natural Products Radiance* **5**, 99-102 (2006).
38. Ojeswi, B., Khoobchandani, M., Arora, J., Hazra, D. & Srivastava, M. In vitro antibreast cancer efficacy of two indigenous plants on human cancer cell line MCF-7. *National Academy Science Letters* **32**, 105-109 (2009).
39. Lu, H.M., Liang, Y.Z., Yi, L.Z. & Wu, X.J. Anti-inflammatory effect of Houttuynia cordata injection. *J Ethnopharmacol* **104**, 245-249 (2006).
40. Chiang, L.C., Chang, J.S., Chen, C.C., Ng, L.T. & Lin, C.C. Anti-Herpes simplex virus activity of Bidens pilosa and Houttuynia cordata. *Am J Chin Med* **31**, 355-362 (2003).
41. Hayashi, K., Kamiya, M. & Hayashi, T. Virucidal effects of the steam distillate from Houttuynia cordata and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta medica* **61**, 237-237 (1995).
42. Osman, H., Rahim, A.A., Isa, N.M. & Bakhir, N.M. Antioxidant activity and phenolic content of Paederia foetida and Syzygium aqueum. *Molecules* **14**, 970-978 (2009).
43. De, S., Ravishankar, B. & Bhavsar, G.C. Investigation of the anti-inflammatory effects of Paederia foetida. *J Ethnopharmacol* **43**, 31-38 (1994).
44. Afroz, S.*, et al.* Antidiarrhoeal activity of the ethanol extract of Paederia foetida Linn. (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol* **105**, 125-130 (2006).
45. Nour, A.M.*, et al.* Varicella-zoster virus infection triggers formation of an interleukin-1beta (IL-1beta)-processing inflammasome complex. *J Biol Chem* **286**, 17921-17933 (2011).

46. Ku, C.C.*, et al.* Herpes simplex virus-1 induces expression of a novel MxA isoform that enhances viral replication. *Immunology and Cell Biology* **89**, 173-182 (2010).
47. Arvin, A.M.*, et al.* Varicella-zoster virus T cell tropism and the pathogenesis of skin infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **342**, 189-209 (2010).
48. van Lint, A.*, et al.* Herpes simplex virus-specific CD8+ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation. *The Journal of Immunology* **172**, 392 (2004).
49. Patel, A.R., Romanelli, P., Roberts, B. & Kirsner, R.S. Herpes simplex virus: a histopathologic study of the depth of herpetic wounds. *Int J Dermatol* **48**, 36-40 (2009).
50. Simmons, A. & Nash, A.A. Zosteriform spread of herpes simplex virus as a model of recrudescence and its use to investigate the role of immune cells in prevention of recurrent disease. *Journal of virology* **52**, 816 (1984).

柒、圖、表

圖1-1

雞屎藤之葉片外觀

正面　　背面



圖1-2

山苦瓜之葉片外觀

正面　　背面



圖1-3

半枝蓮之葉片外觀

正面　　背面



圖1-4

魚腥草之葉片外觀

正面



背面



圖1-5

白花蛇舌草之葉片外觀

正面



背面



圖1-6

破布子之葉片外觀

正面



背面



圖1-7

紫蘇之葉片外觀

正面



背面



圖1-8

狗尾草之根部外觀

根部部分



根部部分



圖1-9

仙草之葉片外觀

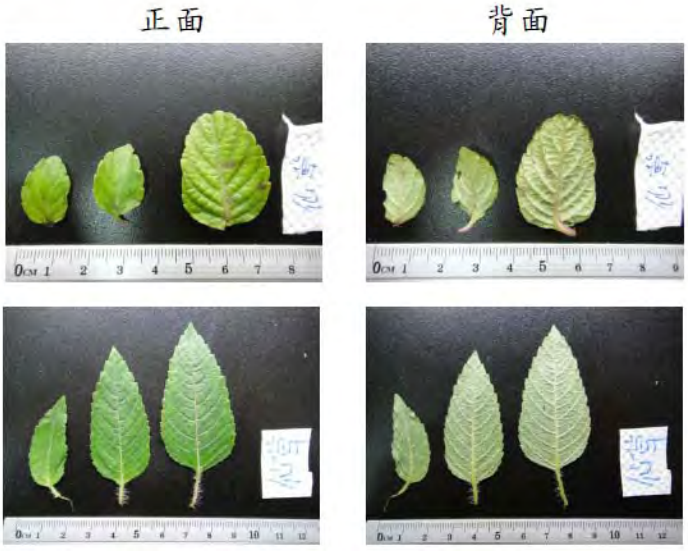


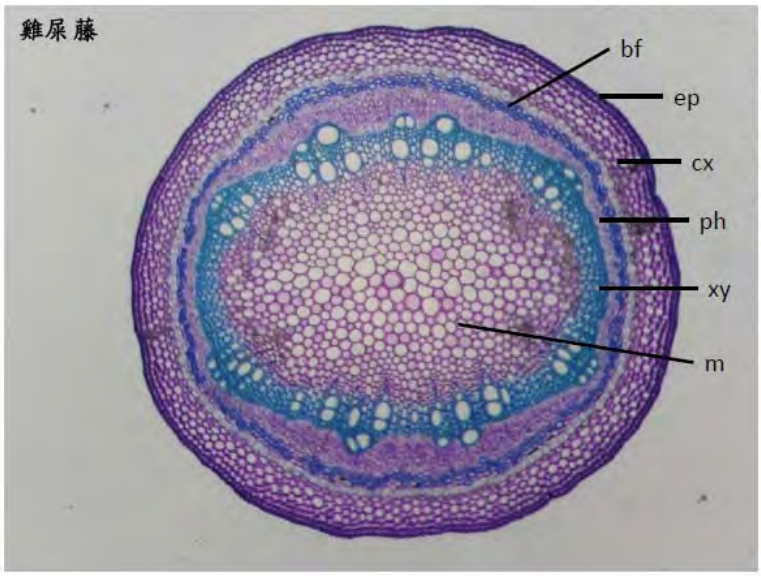
圖1-10

桑黃之外觀



圖2-1

雞屎藤莖部組織之橫切面



- 皮層(cortex, cx)
- 表皮(epidermis, ep)
- 毛(hair, hg)
- 髓(mark, m)
- 篩部(phloem, ph)
- 木部(xylem,xy)

圖2-2

山苦瓜莖部組織之橫切面

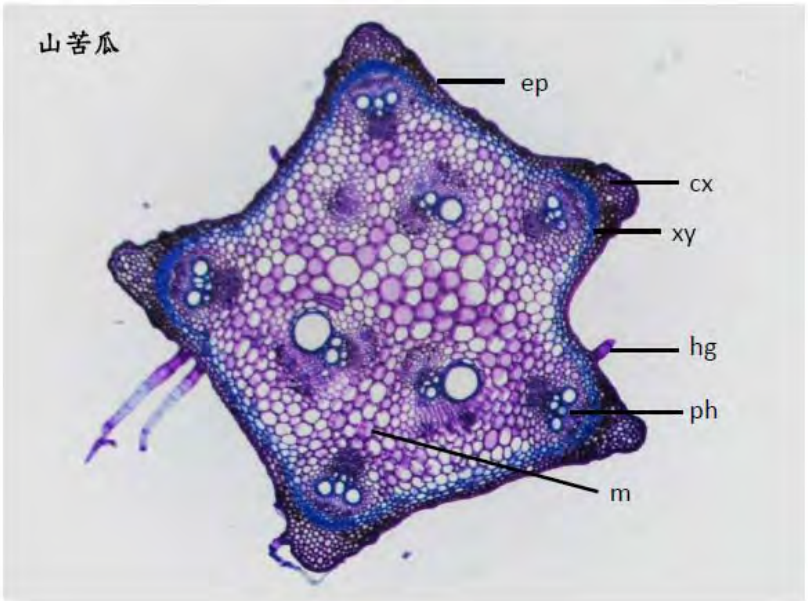


圖2-3 半枝蓮莖部組織之橫切面

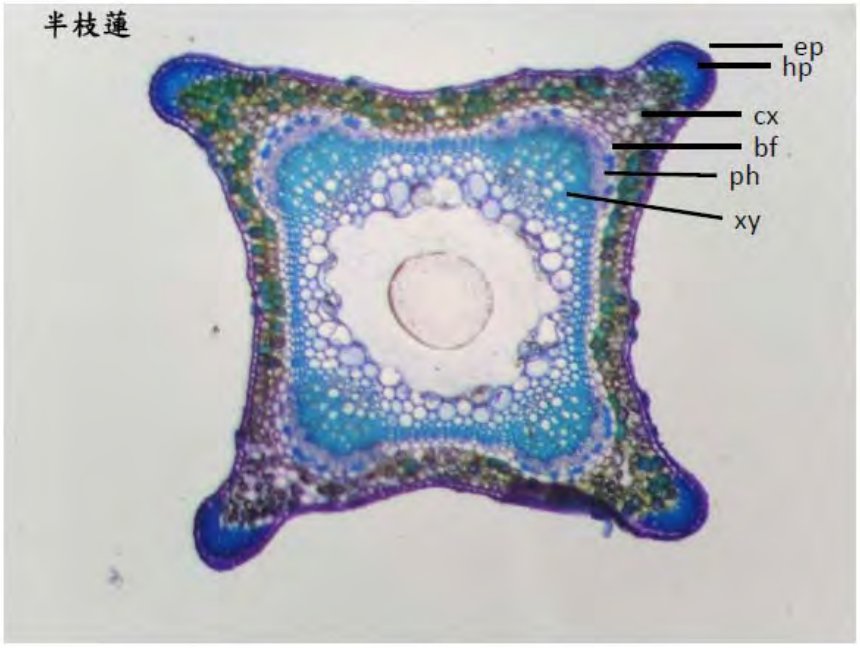


圖2-4 魚腥草莖部組織之橫切面

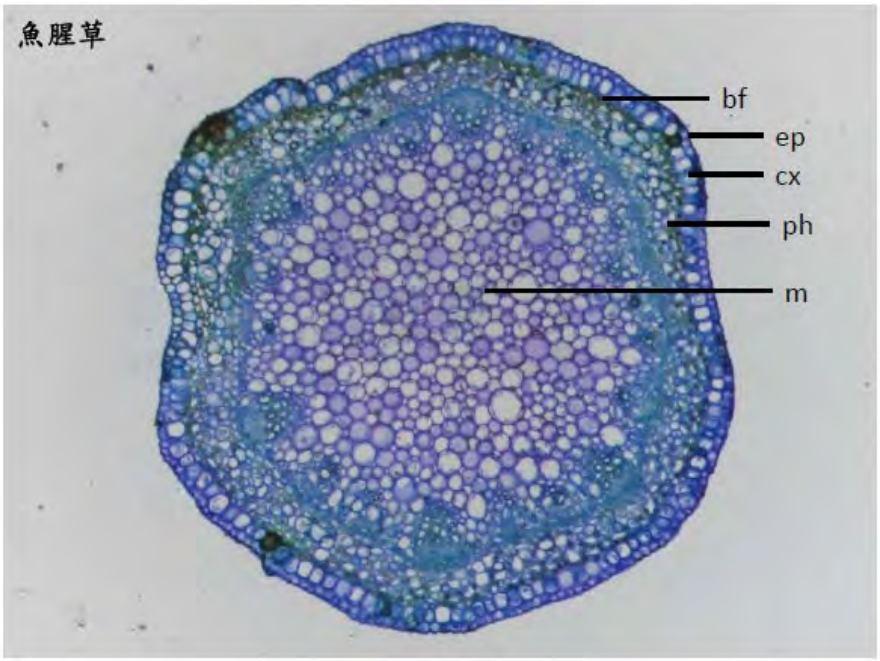


圖2-5 白花蛇舌草莖部組織之橫切面

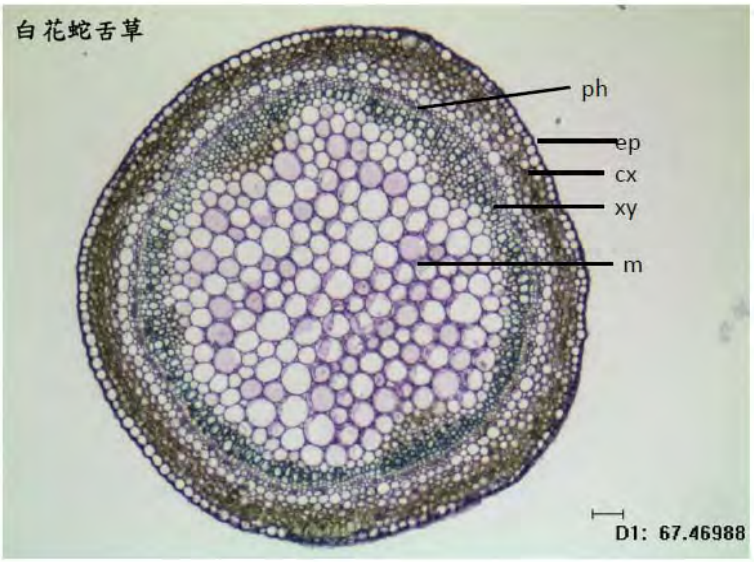


圖2-6 破布子莖部組織之橫切面

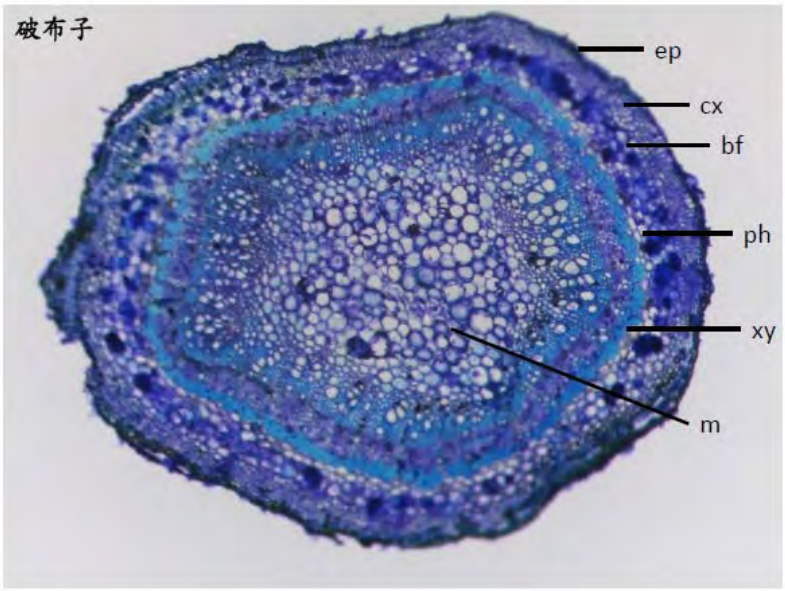


圖2-7

紫蘇莖部組織之橫切面

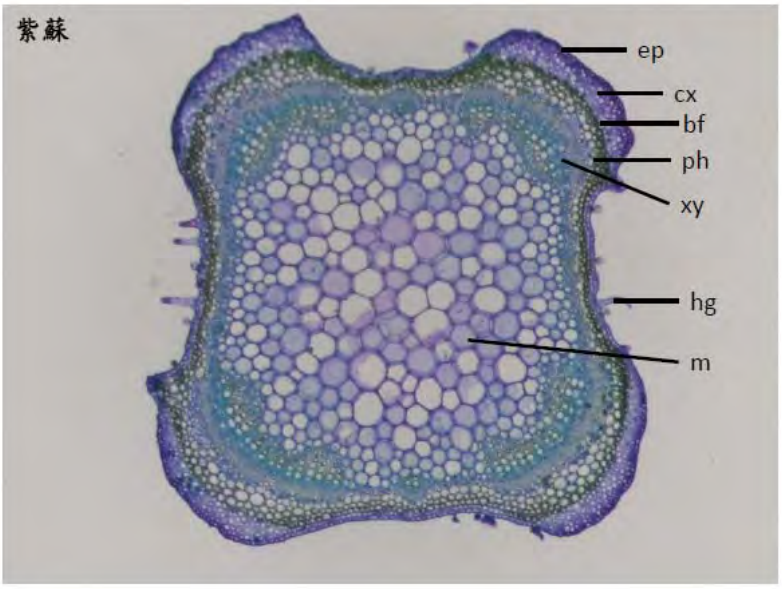


圖2-8

狗尾草根部組織之橫切面

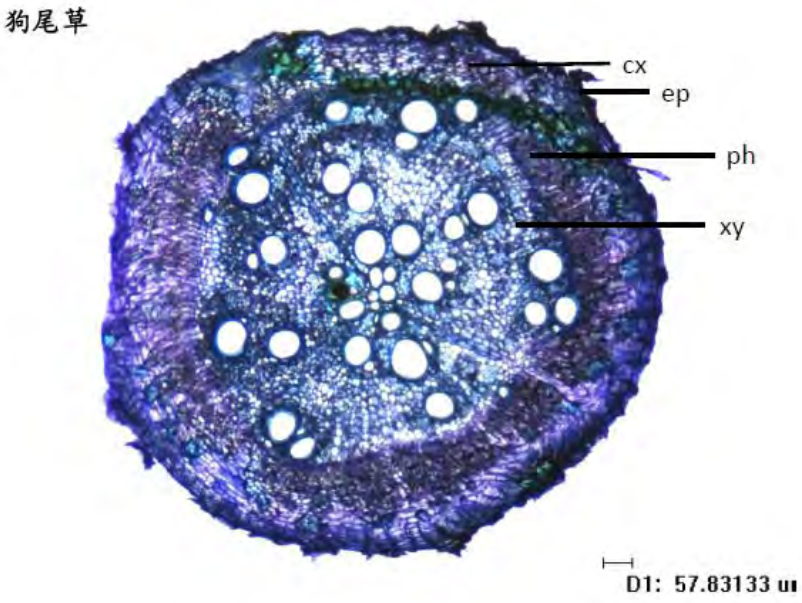


圖2-9

仙草莖部組織之橫切面

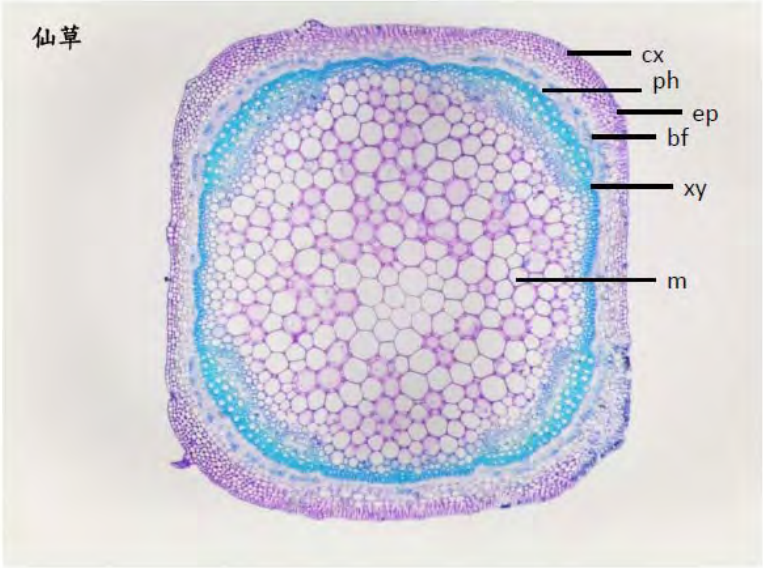


圖2-10

桑黃組織之橫切面

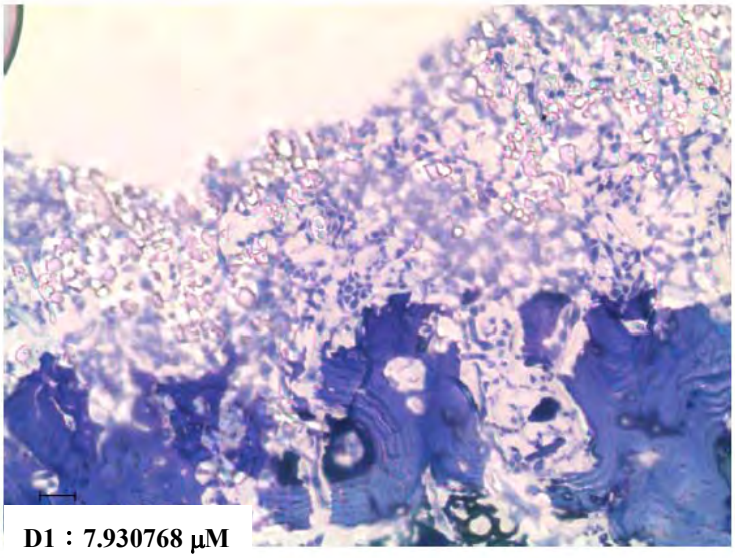


圖3-1

雞屎藤核醣體核酸序列

```
5     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
6     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
7     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
10    CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
3     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
2     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
8     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
1     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
9     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
4     CAAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
      ************************************************************
```

序列1-1

AGTGTTCGGATTGCGGCGACGTGAGCGGTTCGCCGCCCGCGACGTCGCAAGAAGTCCACTGA
ACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG
ATCATTGTCGTATCCTGCGAACCACCGCGAACGCGTTAACCAAACCGCCGGGGCGCCCCAGG
GCGCCTCGGCCCCAAACGAACTCCCCGGCGCGAGAAGCGCCAAGGACCACTTGAAACGGACC
GCCCGCCCCTCCCGCGGATTCCGCGGGGGGGAGCGACGGCGTCTGAGTTGTAACAAAAACGAC
TCTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT
GTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAG
GCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCTCGTCGCCACCCCCTCCCTCCCCCCTCGCG
GGACTCGGACGGGGGCGGCGGAGGATGGCCCCCCGTGCCACTCGGCGCGGCCGGCCCAAAC
GAGAGTCCCCGGCGCAGGACGCCGCGACGATGTGGTGGTTGAACTCCTCAGCACGATCGACG
TCGCGGCCCGGCCCGGCGGAACGCCGAGACCCCGAGGCCTCAGGGCCCCTCGAACGCGACCC
CAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG

圖3-2

山苦瓜核醣體核酸序列

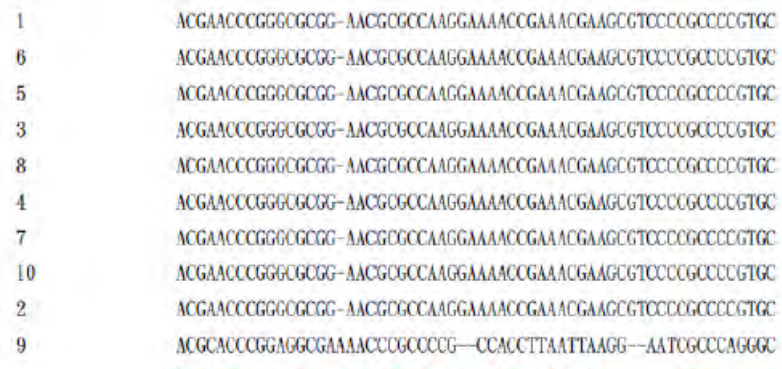
```
1     GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
2     GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
4     GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
10    GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
5     GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
8     GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
9     GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
7     GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
6     GTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
3     GTGGGGTGAAGTCCTTG--GATTTATTTTTTAGGG---GGAGATTCGGGATCGGTTTATA
      ** * *:******:    .. **** :*****.*  *****:  * *:*.. *:*.
```

序列2-1

TGTTCGGATCGCGGCGACGTGGGCGGTTCGCTGCCCGCGACGTCGCGAGAAGTCCACTGAAC
CTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGATGCCTAAAACATCAAACGACCCGCGAACGCGTTTCACGAAACGTCCGTGCTCGT
GTCGGGGGGGGCCTCGGTTTGGTGGGCTCTCGCCCCCATGCCGCCCTCCGGCGCGCACGGACC
CAAACAAAACCCCGGCGCAGGTCGCGCCAAGGAACTCCAACGAATTTGCCCGCCCCTCGCCCC
GGTCTCGGCGTGCGGGGGGCGGAGCATTCTTGTCGTATGAACGTATTATTCACAACGACTCTC
GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTG
AATTGCAGGATCCCGCGAACCACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGGAGCCATCTGGCC
GAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCCCCTCGCAACCCCTTTGTTGGTTGCT
GTGGGCGGGGGCACACGCTGGCCTCCCGTGCGCACCGTCGCGCGGATGGCTTAAATCCGAGT
CCTCGGCGCCTGTCGTCGCGACGCTACGGTGGTTGATCAAACCTCGGTACCGCGTCGCGCCCC
CAGCCAACGTGCCTCCTCTCGCTCGCGAGGGAAGAGCCGACGAGGCCACTCAGACCGACCCTT
CGAACGTCGTCCCGAAATGGAGGCGATGCTCTCGACGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACC
CGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG

圖3-3

半枝蓮核醣體核酸序列



序列3-1

AGTGTTCGGATCGAGGCGACGTGGGCGGTTCGCCGCCCGCGACGTCGCGAGAAGTCCACTGA
ACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG
ATCATTGTCGAAACCTGCGAAAGCAGACCCGCGAACACGTGTCTTCACGACAAAAACAACGCC
CGCGAGGCCGGCGCGAGAGCGTCGCAACCCGCGGGCTAACGAACCCGGGCGCGGAACGCGC
CAAGGAAAACCGAAACGAAGCGTCCCCGCCCCGTGCGTCCCGTCCGCGGATCGCGCGCGGGG
TGGCCGGACGTCGATCGAATGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGT
CTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGC
ATCGCGTCGCCCCCCGCACGCATCGCCTCGAGCGACGCCGATGTCGGGGGGCGGAGATTGGC
CTCCCGTGCGCCCCGGCGCGCGGCCGGCCCAAATGCGATCCCCCGGCGACGCACGCCCCGAC
AAGTGGTGGTTGAGCCTTCAACTCGCGTGCTGTCGGGCGCCAAGGCGTCGTCCGTTCGGGAG
AAACACATCGATCGATGTTGGACCCAACGGCCCTTAATAGAGCCATCGACCGCGACCCCAGGT
CAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG

圖3-4

白花蛇舌草核醣體核酸序列



序列4-1

TAGTGTTCGGATTGCGGCGACGTGAGCGGTTCGCCGCCCGCGACGTCGCAAGAAGTCCACTGA
ACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG
ATCATTGTCGAATCCTGCAAACCACCGCGAACACGTTTTAAAAACCAGCGGGCTGCGGGCGGA
CAGCCGTCTGCCAGCACCCGCGCCCAACAAACTTCCGGCGCGGAAAGCGCCAAGGACTACTCA
AACGGATCGTCCGCGTCCCCCCTGCGGGTTCCGCGGGGCGGGCGCCGGTCTTCTGAATCGTAA
CCAATACGACTCTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCG
AAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCAACGTCGCCACCCCCTCGCCTCG
CGCCTGCGCGTCGAGTCGGGCGGCGGAAGCTGGCCTCCCGTGTCCGCAGGGCGCGGCCGGCC
TAAATCCGAGTCCTCCGTTCGGGACGTCACGACAAGTGGTGGTTGAAAACTTCAACTCGATCGT
AGCCGTGACCGAGAACGCATGGTAGGCCTCTAAAGACCCTGGAGCCTCCGGGCCCTCGACCAT
GACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG

圖3-5

紫蘇核醣體核酸序列

```
1    AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTT
9    AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTT
4    AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTT
2    AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTT
8    AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTT
6    AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTT
10   AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTT
3    AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTT
     ************************************************************
```

序列5-1

```
TGTTCGGATCGAGGCGACGTGGGCGGTTCGCCGCCCGCGACGTCGCGAGAAGTCCACTGAACCT
TATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT
GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAACATCATCGGACACGGCGTGGGGGAG
ACTCCCGTCGTGCACCGCTCCCGCCGGAGTGCGCCCTCGGGCGTCGCACCGTGCGGGCTAACGA
ACCCCGGCGCGGCAAGCGCCAAGGAAAACAAAATTTAGCGCCCGCCTTCCGCATCCCGTTCGCG
GGGTGTGCGGGGGGAATGGACGTCTATCGAATGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG
CTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAA
CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGC
GTCACGCATCGCGTCGCCCCCCTCCCCGCGCTGAGCGCTCGTGAGGGGGGCGGATATTGGCCCC
CCGTGCGCCCTGGCGTGCGGTCGGCCCAAATGCGATCCCTCGACGACTCGTGTCGCGACTAGTG
GTGGTTGAATAGCTCAATCTCGTGTCTTGTCGTGCTACCGCGTCGTCCGAATGGGAATCGAACAA
CGACCCAACGGTGTTCGTGCGTTACCGCACCGCACCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGA
TTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG
```

圖3-6

狗尾草核醣體核酸序列

```
4    GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTT
6    GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTT
10   GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTT
9    GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTT
2    GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTT
3    GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTT
5    GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTATGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTT
7    GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTT
1    GAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
8    GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
     ***** ***.********** *..*.************ *.***** ******.****
```

序列6-1

```
TGTTCGGATTGCGGCGACGTGGGCGGTCCGCTGCCCGCGACGTTGTGAGAAGTCCACGTGAACCTT
ATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT
CGATATCTCGCAATCAGTTTGACCGGCGAACATGTTTATCTGACCCGGCGGGGTTGGCATGATCTC
ATCCTCCCCGCGTCGAGGGGTTGGCACGTGTGCGGCGCGGCTTCCCCTCGACAAACACAAACCCCG
GCGCCTCGTGCGCCAAGGAATCCCAAAAATTGTTGAGTGCGGCCCCCCGGGAGTTGGAGACAACG
TCCCGCGGGTCCCGTCACCACACACGAAAAAGAAATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTTG
CATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGA
GTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCATGCCTGCCTGGGTGTCACACAC
TGTTACCCTCACGCAAAGGTCCACCCGTTGGCCGGCGCGTGGCGGTGTACGCTGACCTCCCGCGAG
CGGTGTCTCGTGGTTGGTTGAAAATCGAGTTCACGGTCGAGTGCGCCGTGATAAAATGGTGGACG
GGCAGATGCCCGAGACCGATCACGCGCGACGCTGTCCGGTGTGACCCTCGGACCCCTGCGGCGTCT
TCGGATGCCCTTCTAGCGAGACCTCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATA
AGCG
```

圖3-7

仙草核醣體核酸序列

```
1     GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
6     GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
7     GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
10    GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
9     GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
3     GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
4     GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
2     GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
5     GCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT
      ************************************************************
```

序列7-1

```
ATGTTCGGATCGAGGCGACGTGAGCGGTTCGCCGCCCGCGACGTCGCGAGAAGTCCATTGAA
CCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGTGAACACGTGTTTAACGAATCTCCAACCGTCGTGCGC
GCATTCGTGCGCCGCGATGTGCTGGCTAACGAACCCCGGCGCGGCATGCGCCAAGGAATACTT
AACGTAGCGTCAGCCCCCGGCATCCCGTTCGCGGGTCTTGGCGGGGTGCGGGCGTCTATCAAT
GTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATG
CGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCC
GAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCCTCACCGC
GCACTGCCACGGGGATGGGGACGGATATTGGCCTCCCGTGCGTCCATGCGTGCGGTTGGCCC
AAATACGATCCCTCGGCGACTCGTGTTGCGACAAGTGGTGGTTGAAAATCTCAATCTCGCGTCT
GGTCGTGGCACCGAGTCGTCCGTAAGGTCATCGAACTAAGACCCAACGGCGTAGTAGGCCTA
GCCTCTGCGCTCTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCA
ATAAGCG
```

圖3-8

破布子核醣體核酸序列

```
1     AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAATCCTACAACACAAACGACCAGCGAACCTGT
5     AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAATCCTACAACACAAACGACCAGCGAACCTGT
2     AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAATCCTACAACACAAACGACCAGCGAACCTGT
4     AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAATCCTACAACACAAACGACCAGCGAACCTGT
3     AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAATCCTACAACACAAACGACCAGCGAACCTGT
      ************************************************************
```

序列8-1

```
TGTTCGGATCGCGGCGACGTGGGCGGTCCGCTGCCTGCGACGTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCAT
TTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAATCCTAC
AACACAAACGACCAGCGAACCTGTTGAACAACACGGGTACCGGTGGCAGCGATGCTGCCCGTCTCCCACC
GAAGTCGGGGCGCAAGCCTCGCAAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAATACTGAAAAAAGG
GTGCCATCTTCTCCCCGTCCCGTTCGCGGAGCGCGGGGCGAGACAGTGGACACGTATTTGATTCAAAAAC
GACTCTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTCGCATCGATGAAGGACGTAGTGAAATGCGATACTTGGTGTGA
ATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTTAGGCCGAGGGCAC
GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCACGCTCCCCACCCTCCTCGGGCGCGGAAGATCGTGCGT
GGGGGCGGACTGTGGCCTCCCGTGCCCCCTTTGCGACGCGGCTGGCCGAAATGCGAGTCCGGGGCGAAG
GACGTCACGACAAGTGGTGGTTGGATCTCAACTCTCGTGATGTCGTGCCGTGTCCTATCGCTGACGGGGA
CTGACGAGACCCTAAAGCGCTTGCCTCTTCCCGACGGGATGAGCCACGCGTTACGACCGCGACCCCAGGT
CAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG
```

圖3-9

魚腥草核醣體核酸序列

1	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
5	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
4	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
2	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
3	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
	**********

序列9-1

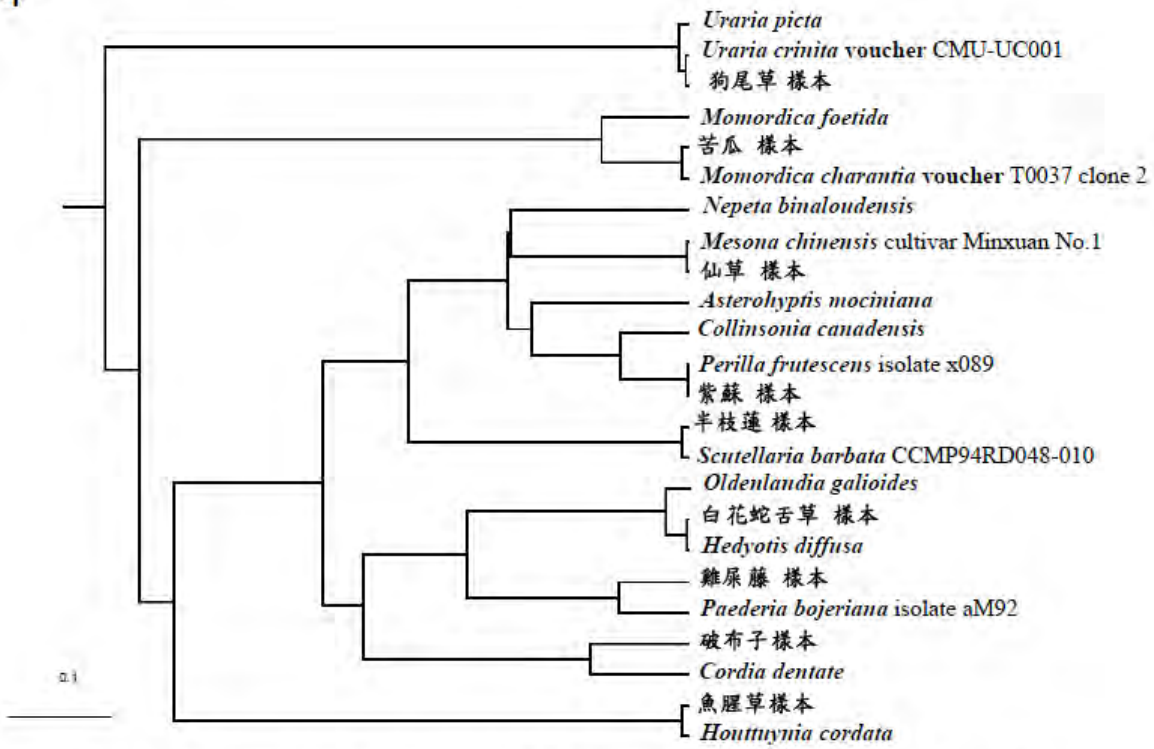
TGTTCGGATCGCGGCGACGTGGGCGGTTCGCTGCCGGCGACGTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCAT
TTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTA
CCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAACATGTGACCCCTTGTTCTTTGCTTTCGTGCGAGGATTGCCGTCTCG
GTGGCTCTCCGAGCGCGTCGGGCACCAACGAACAAAATCCCGGTGCAGTCCGCGCCAAGGAATTTTCTTA
ATTGATTGTGGCGGTCTCGTCGCCCGTTTGCGCCTCGTGCGTCGGCGGGTGCGAGTTGGCGCATCAAACT
ATAATGTCAATACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCG
ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTTT
AGGTTGAGGGCACATCTGCTTGGGCGTCAAACATCACGTCGCTCCCCACACCACTGCCCAACGGGCAGAC
AAGGATGGGTTTGCGGAGATTGGCCGTCCGAGTGCCTCGAGCACGCGGTTGGCTGAAAAGCTCTGGCCTT
TGGTTGCATGCGGCTCAACAAGTGGTGGTTGTGGGCTCTCTTGGGCCGCGATTGTCGGGATGTTGTGTCG
TGCTTTGCCCGTGTTGGCCAGCGAGGACCCTATTCGATCGGCCTCCGCACTCCGGAGGCACGAATCAGATT
GCGACCCCAAGTCAGGTGGGATCACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCG

圖3-10

桑黃核醣體核酸序列

CAAGATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCT
GATTTGAGGTCAAAGAGTCAAGAAGGCTGTTAAAGACCTTGTCCGAAGACCATTAGAAGCAGACCCATTAGGCAAGCGAT
TGGTGAATAAACTATTACACCGACACGCAGACCAAAGTCCAGCTAATCCATTTAAGAGGAGCCGACAGCCGACAATGAAG
CAGGCCGGCACAAACCTCCAAATCCAAGCCCCGAGCCTTTACAAGCAAGGGGCTTGATGTTAACATGACACTCAAACAGG
CATGCCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT
ATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTATTTCATTTCGCCCACAAG
GAGCATTACATTCTACAAGACAATTAAAGTGTGTATGATGAAGTCAAAGTGCTCGCCGATCCCAGCCAAGGCCGACCATA
TTTTCGCGTCGAAACACTACTAACAAAGTCAACCCCGGCGGCTCCAACTAAGGAGGAAAGACTACTAACTTCGATAAGGT
GCACAGGTGTTGAGTGGATTAAGCACGAAAGGCCGAGCACAGTGCGCGTTTCCACGCCAGCATCAAGCCCCCGATTTTAA
AAACTCGATAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGACTATCTT

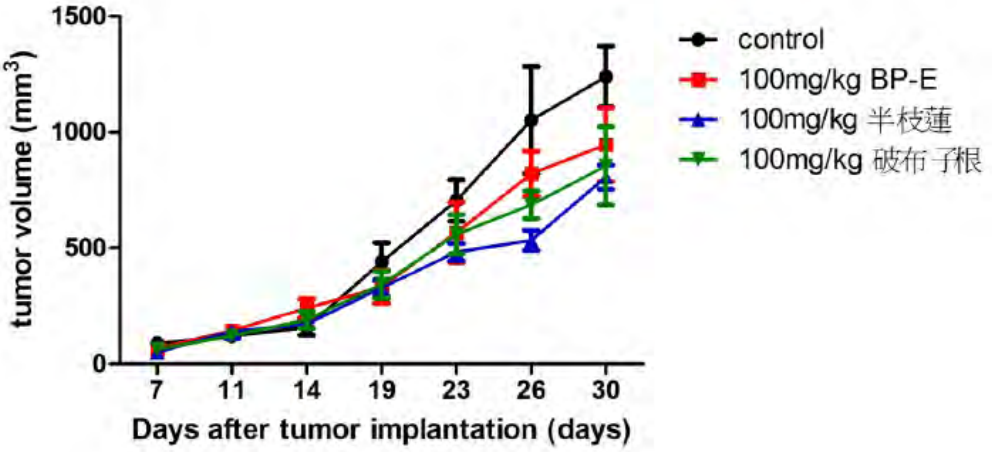
圖4



台灣本土中草藥與最相近物種ITS序列，以NJ法所得之rooted phylogenetic tree. *Bryodrilus ehlersi* 為群外物種(outgroup)，圖中短線長度為比例尺，代表0.1unit演化距離。

圖5

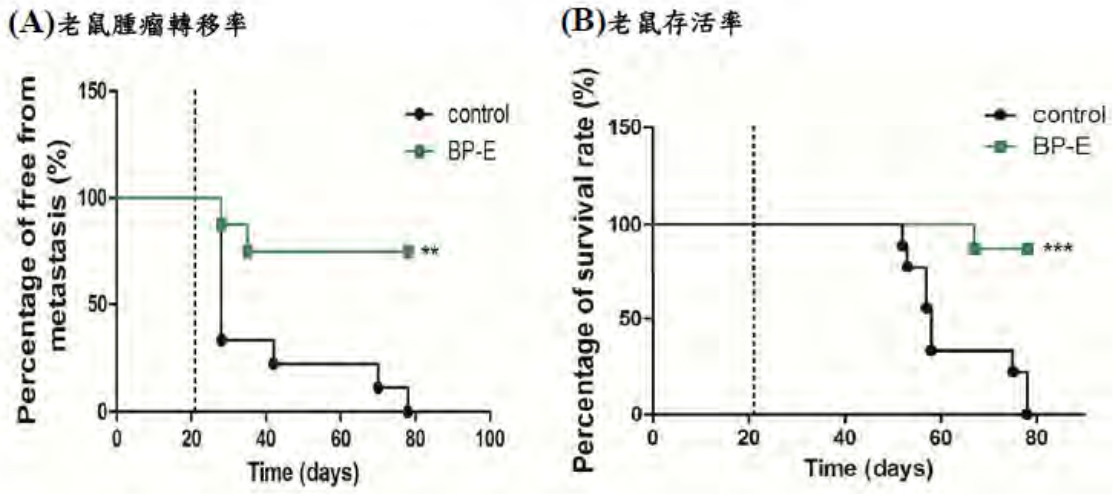
中草藥萃取物對原位老鼠乳癌細胞生長之影響



老鼠乳癌細胞 4T1-Luc2 (5×10^5)植入 BALB/c 老鼠的第六對左側乳腺脂肪墊裡，老鼠於接種乳癌細胞 1 天後，每天餵食老鼠中草藥萃取物，餵食量為(100 mg/kg/day)並測量腫瘤大小。

圖6

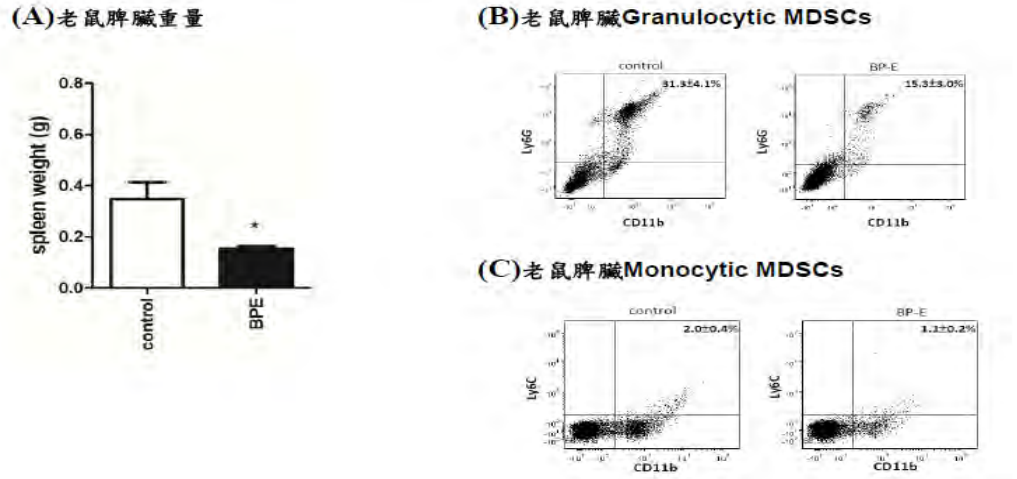
大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)對乳癌細胞轉移活性之影響



將帶有冷光基因(luciferase)的老鼠乳癌細胞 4T1-Luc2(5×10^5)植入 BALB/c 老鼠的第六對左側乳腺脂肪墊裡，老鼠於接種乳癌細胞 21 天後，在切除腫瘤後開始每天餵食老鼠大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)，餵食量為(100 mg/kg/day)。以活體即時冷光影像檢測系統非侵入方式偵測乳癌細胞轉移情形(A)並且記錄老鼠存活天數。

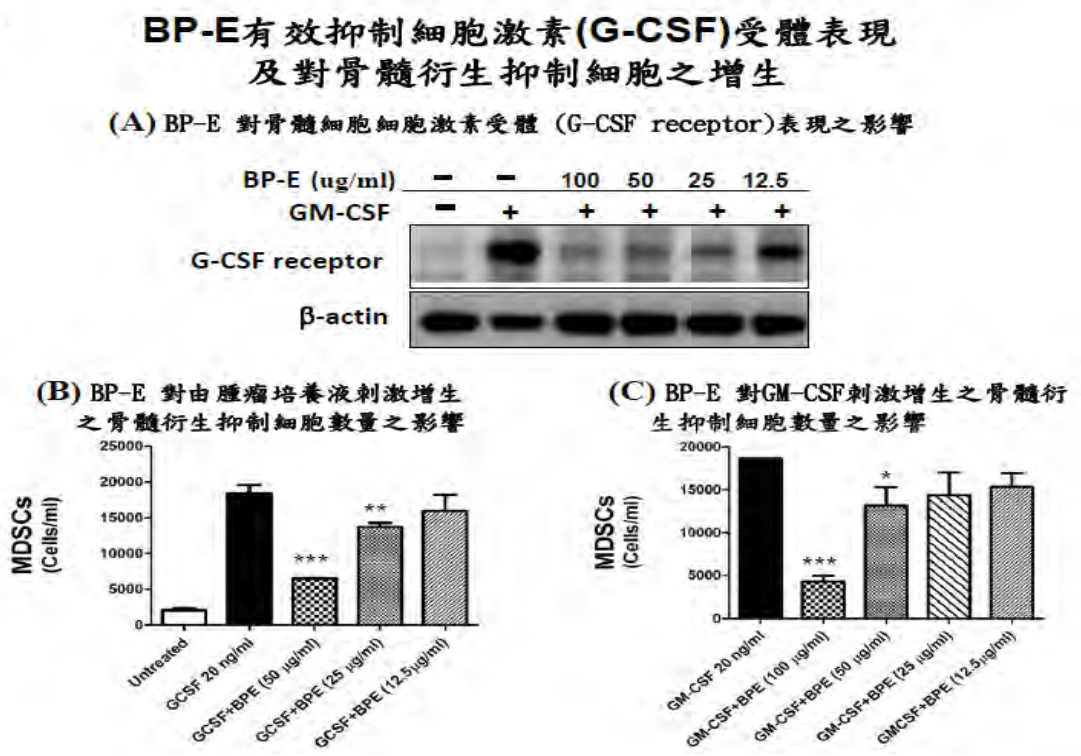
圖7

BP-E對脾臟腫脹及骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)族群聚集之影響



將帶有冷光基因(luciferase)的老鼠乳癌細胞 4T1-Luc2(5×10^5)植入 BALB/c 老鼠的第六對左側乳腺脂肪墊裡，老鼠於接種乳癌細胞 21 天後切除腫瘤，隨後開始每天餵食大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)，餵食量為(100 mg/kg/day)。在植入腫瘤 80 天後犧牲老鼠，測量老鼠脾臟重量(A)並以流式細胞儀搭配 anti-CD11b 及 anti-Ly6G(B)或是 Ly6C(C)抗體標定脾臟之不同骨髓衍生抑制細胞族群。

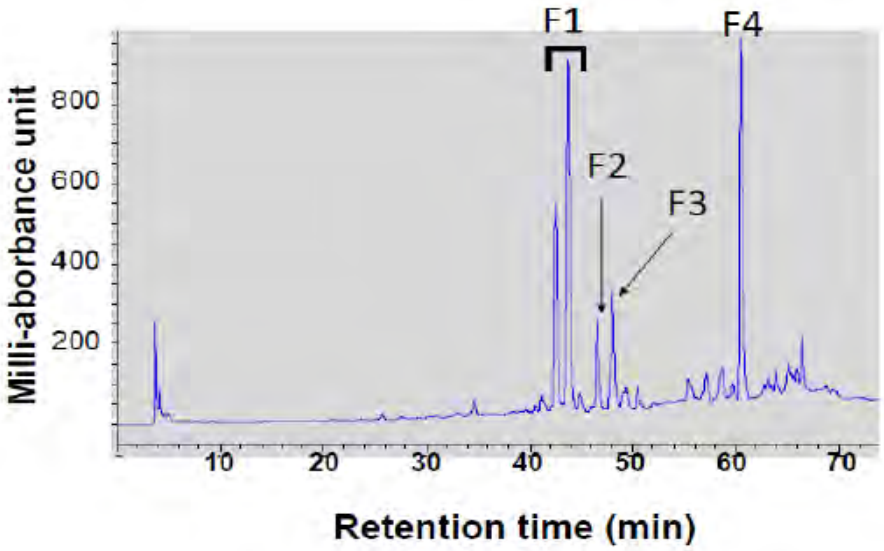
圖8



骨髓細胞於體外分別加入細胞激素 G-CSF (20 ng/ml)或是 GM-CSF (20 ng/ml)並與不同濃度的 BP-E 共同培養 5 天後，以西方點墨法(Western blot)測量細胞表現 G-CSF 受體表現量(A)並以流式細胞儀測量骨髓衍生抑制細胞的數量(B)、(C)。

圖9

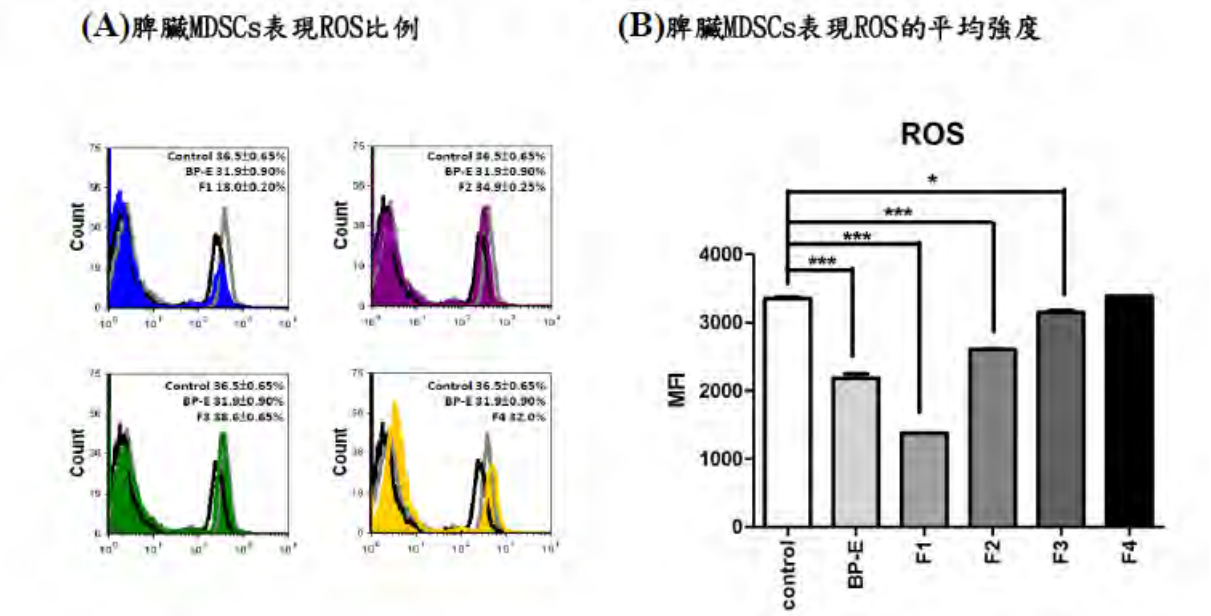
大花咸豐草酒精萃取物HPLC化學指紋圖譜



大花咸豐草萃取物以 Cosmosil C18 分離管柱加以分析，在波長 235nm 有數根主要吸收波。分別區分成 F1 至 F4 4 個分層。

圖10

大花咸豐草酒精萃取物及個別(F1至F4)分層對脾臟骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)產生活性氧化物質(ROS)的影響

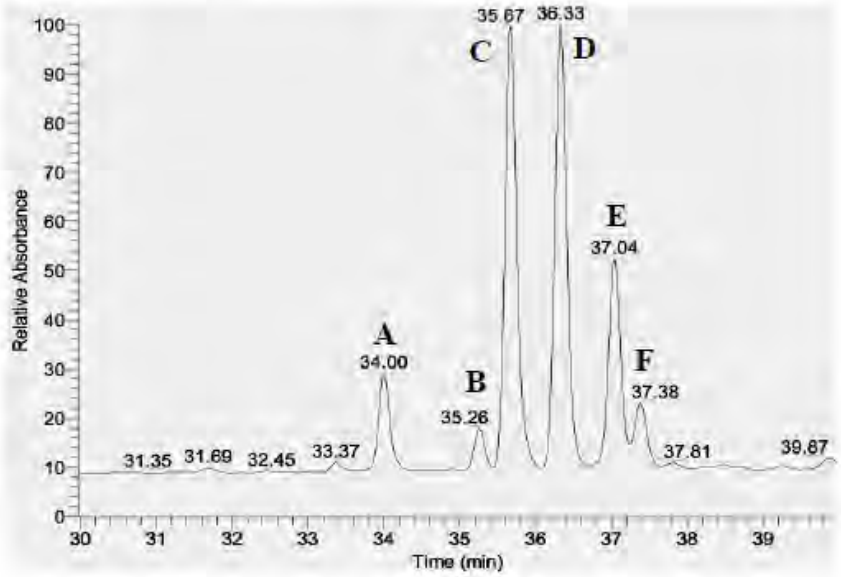


我們以 anti-Gr-1 microbeads 分離出脾臟骨髓衍生幹細胞，再將 10^6 顆脾臟骨髓衍生幹細胞在 12 孔盤中與 100μg/mL 的大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)或 10μg/mL 的 BP-E 分層物(F1 至 F4)共同培養 24 小時後，收取細胞，加入 20μM ROS 偵測劑(H_2DCFDA)放置於 37 度 30 分鐘，以流式細胞儀偵測表現 ROS (reactive oxygen species)細胞的數量(A)及表現強度(B)。

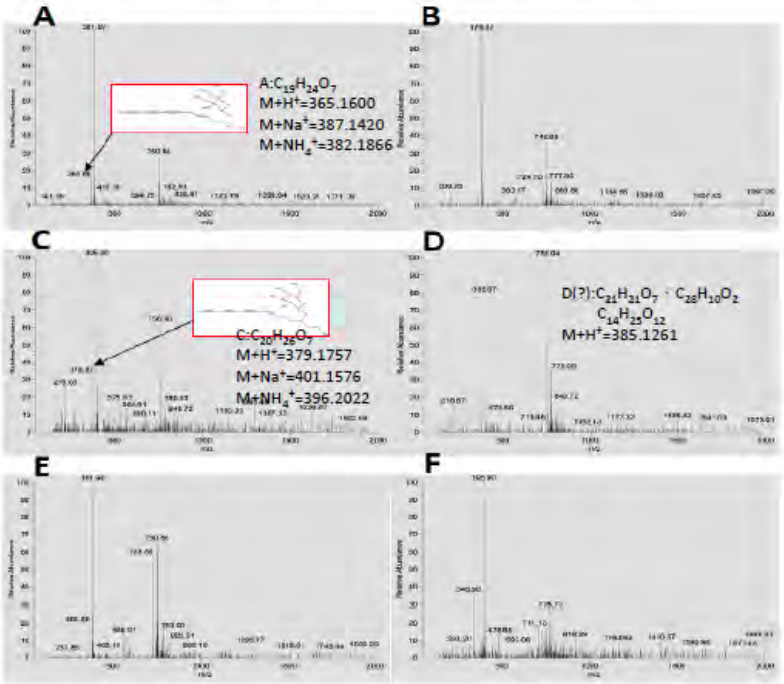
圖11

大花咸豐草酒精萃取物F1分層LC/MS之化學指紋圖譜

(A) F1分層254 nm 吸收波



(B) F1分層LC/MS之化學指紋圖譜

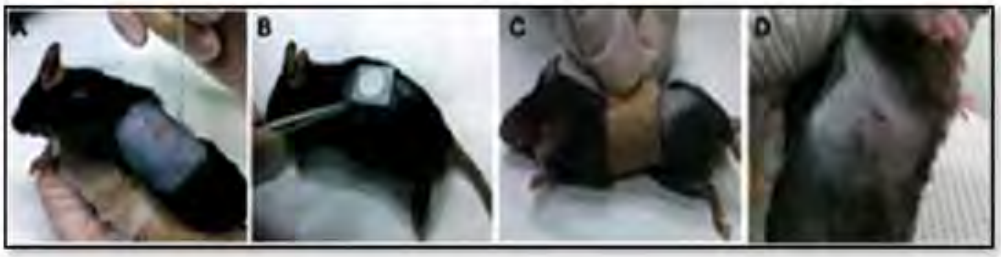


1.依MS/MS資料分析，A～F可分為三組：
A、B為同分異構物
C、E、F為同分異構物
D為未知物

圖12

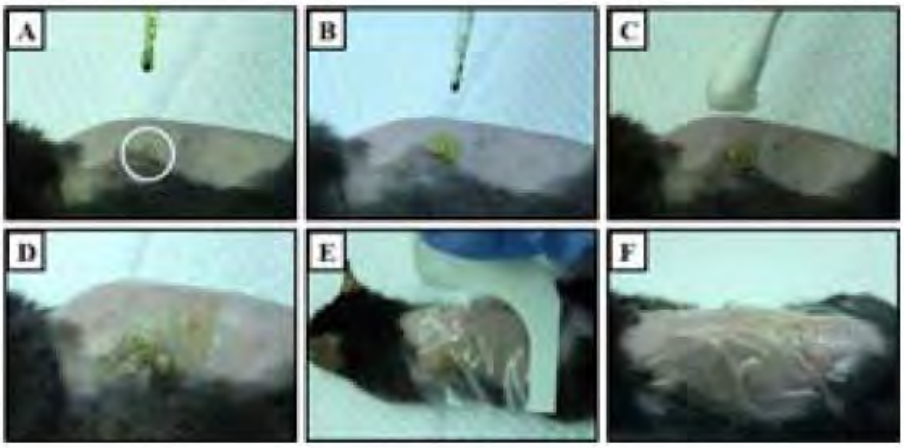
HSV-1感染小鼠皮膚動物模式之建立

(A) HSV-1感染小鼠腹側皮膚的動物模式



先以肌肉鬆弛劑麻醉後，剔除腹背處的毛髮後以 19 號針頭輕微地刮擦數下(A)。將適量的 HSV-1 ($1x10^6$ PFU/20μl)滴在一張圓形的濾片上，以檢測過敏抗原的方式將該濾片貼在刮擦的皮膚上，以彈性繃帶固定後，於 48 小時移除(B, C)。大約經過 72~96 小時小鼠皮膚會出現黃褐色的疱疹傷口，並於 7-10 天內修復癒合 (D)。

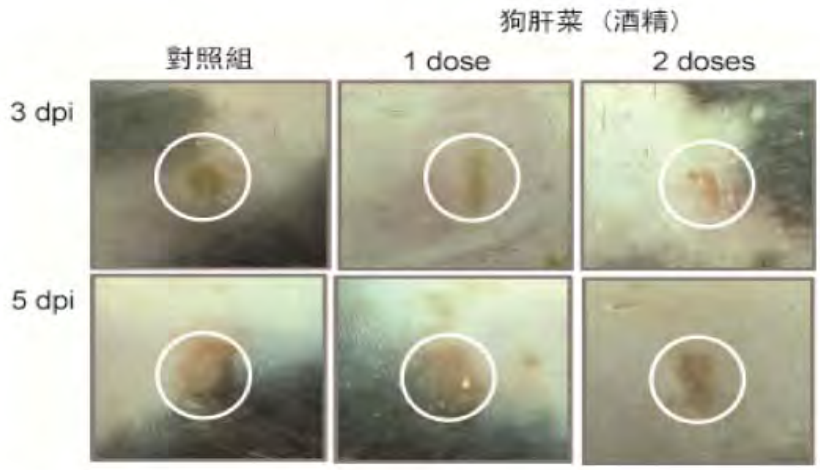
(B) 中草藥物的給藥方式



將 1 mg (10 μl)的藥物放在病毒感染的局部部位 (A, B)，再以無菌棉棒沾上凡士林油均勻塗抹於表面 (C, D)，並覆以 3M 膠膜以固定並增加藥物的吸收作用 (E, F)。第二次以上直接塗藥不用膠膜，連續四次，直到第五天小鼠犧牲為止。

圖13

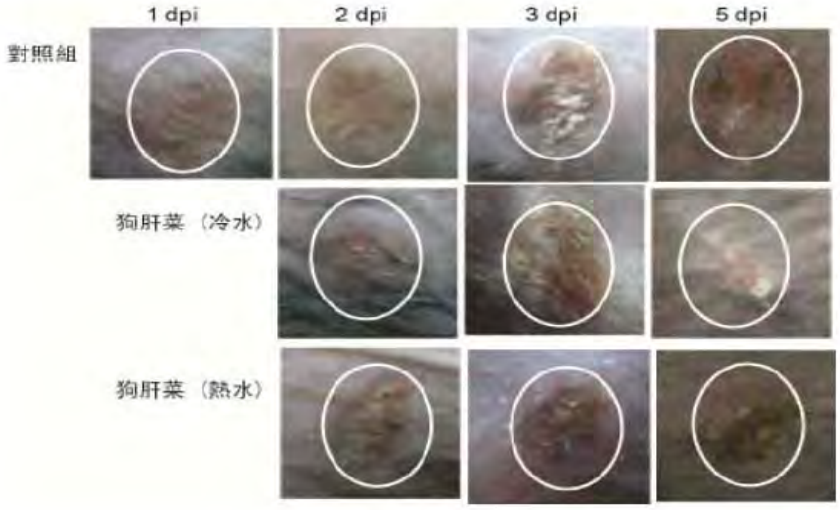
塗抹酒精萃取狗肝菜對於小鼠皮膚腹側感染HSV-1後之傷痂大小影響



小鼠經腹側感染 10^6 PFU HSV-1 病毒 24 小時後塗抹狗肝菜一次(1 dose)或連續二次(2 doses)，於感染後第三天(3 dpi)或第五天(5 dpi)拍照記錄其傷口外觀變化。白色圓圈處標記為 HSV-1 傷痂形成之處。

圖 14

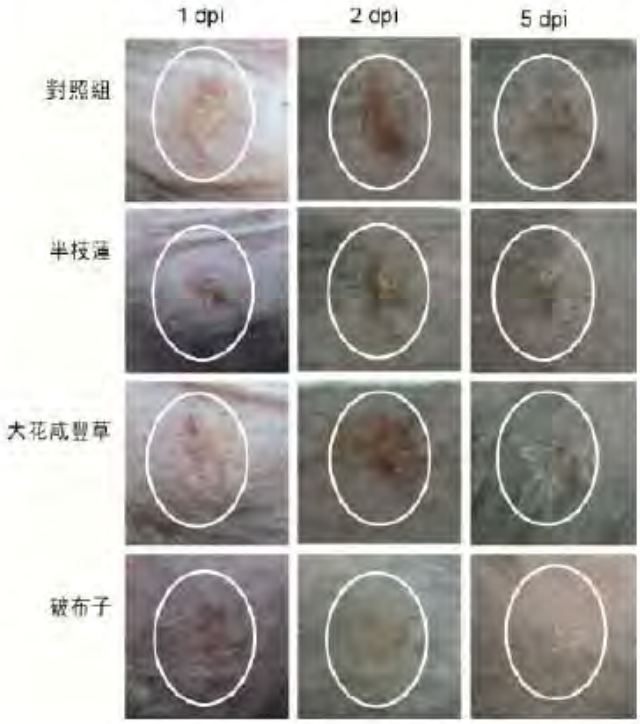
塗抹水萃取狗肝菜對於小鼠皮膚腹側感染HSV-1後之傷痂大小影響



小鼠經腹側感染 10^6 PFU HSV-1 病毒 24 小時後塗抹狗肝菜每天一次，拍照記錄其傷口外觀變化，直到第五天小鼠犧牲為止。白色圓圈處標記為 HSV-1 傷痂形成之處。未塗藥前(1 dpi)皮膚外觀已經有明顯的傷痂形成，隨著感染後的天數增加逐漸變大。感染後第二天開始不論塗抹狗肝菜冷水或熱水萃取物對於傷痂的大小影響不大，但是對於表皮結痂形成有促進的效果。

圖15

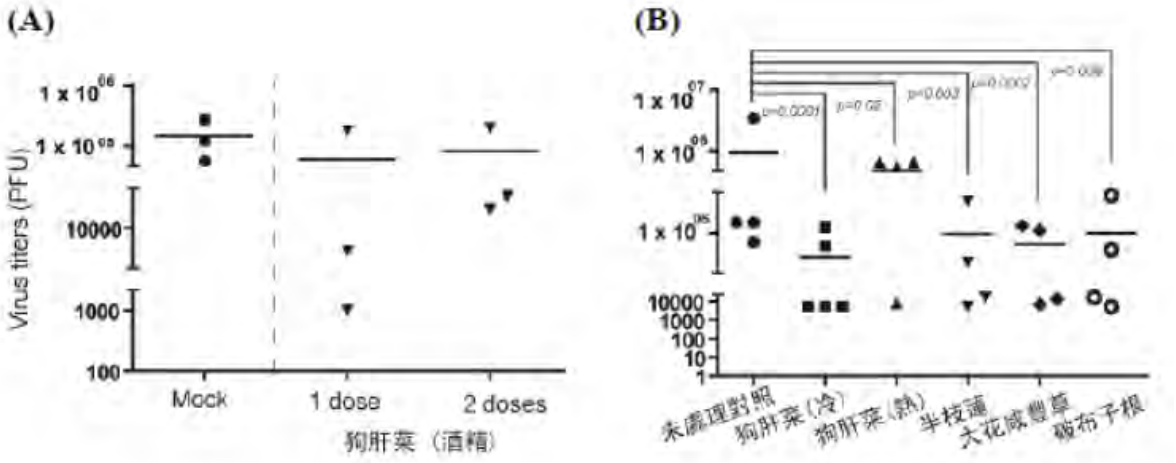
塗抹半枝蓮、大花咸豐草與破布子對於小鼠皮膚腹側感染HSV-1後之傷痂大小影響



感染 10^6 PFU HSV-1 病毒，24 小時後分別給予塗抹半枝蓮、大花咸豐草或破布子每天一次，拍照記錄其傷口外觀變化，直到第五天小鼠犧牲為止。白色圓圈處標記為 HSV-1 傷痂形成之處。未塗藥前 (1 dpi) 皮膚外觀已經有明顯的傷痂形成，隨著感染後的天數增加逐漸變大。感染後第二天開始塗抹不同中草藥萃取物發現，破布子根不容易形成病毒的傷痂；而半枝蓮、大花咸豐草對於傷痂形成後有明顯的癒合效果。

圖16

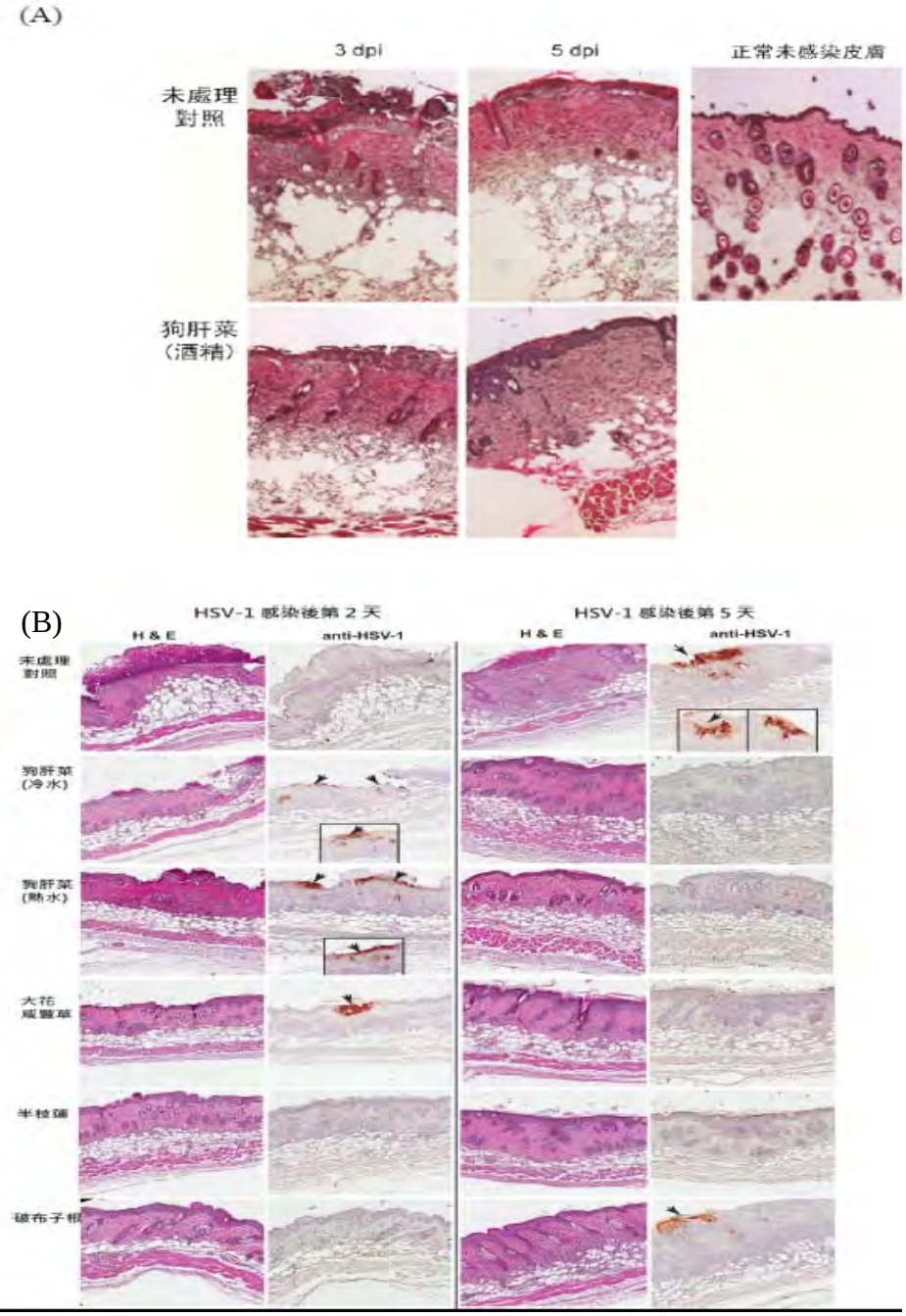
不同方法萃取的狗肝菜對皮膚感染HSV-1後病毒效價的影響



小鼠經腹側感染 10^6 PFU HSV-1 病毒 24 小時後分別塗抹狗肝菜酒精萃取物一次(1 dose)或是二次(2 doses) (A)或是每天分別塗抹五種不同的藥物，連續四天(B)，並於感染後第 5 天犧牲，取下皮膚組織(每組實驗各取 3 塊組織)(每一平方公分)後，以機械性破壞和超音波震盪的方式釋放出組織中的 HSV-1 病毒，並在 Vero cells 中執行病毒溶斑形成定量分析。病毒溶斑大約在感染 Vero cells 24 小時開始形成，至 72 小時達高峰。該細胞則於 72 小時以 4% paraformaldehyde 固定，並在 Vero cells 中執行病毒溶斑形成定量分析。以 anti-HSV-1 抗體進行免疫化學方法染色並計數所得的溶斑數，以獲得其病毒效價。圖中縱軸代表每 1 平方公分面積的皮膚組織所獲得的病毒量，橫條 (bar)為該組數據的平均值。左圖的實驗，每組有三個皮膚樣本，右圖的實驗，每組有 2~5 個皮膚樣本。未處理的對照組共進行二次，總計有 10 個樣本。

圖17

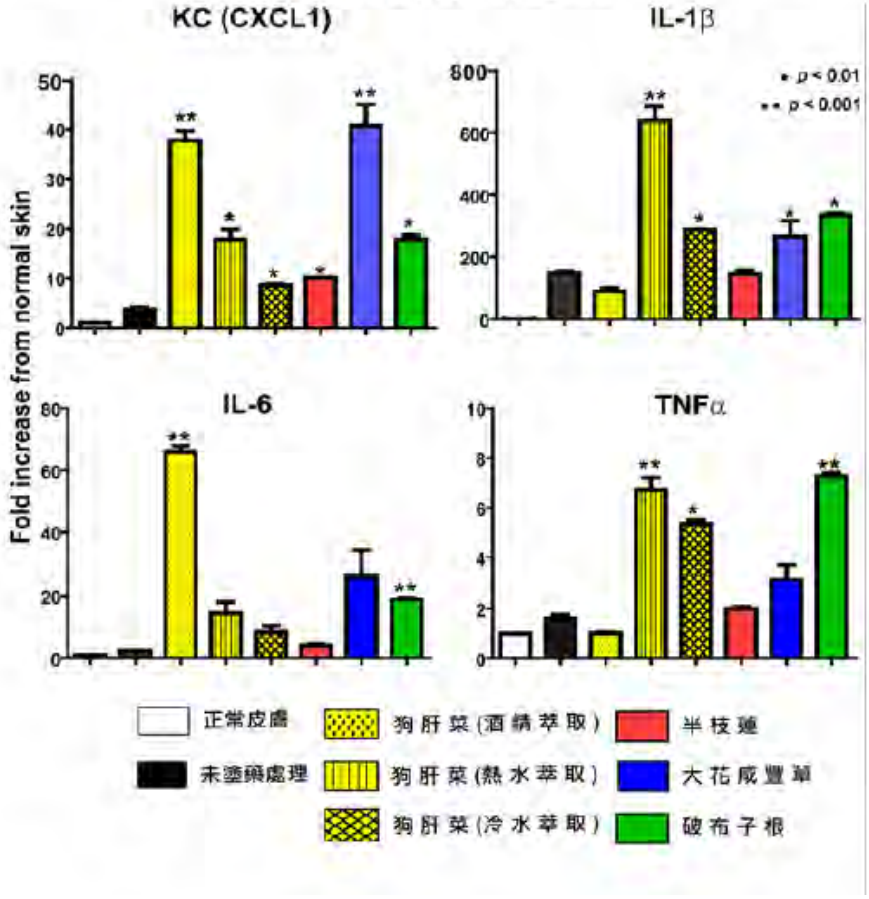
不同萃取方法製備的狗肝菜影響HSV-1感染皮膚後的病理變化分析



小鼠經 HSV-1 腹側感染後 24 小時給予(A)酒精萃取或是(B) 水萃取狗肝菜、大花咸豐草、半枝蓮與破布子根處理，感染後於第 2 -3 天與第 5 天取下感染局部的皮膚組織，經過切片與 Hematoxyline & Eosin 染色後分析中草藥處理組與未處理對照組皮膚組織病理變化。 圖(B)的組織切片經過脫蠟後，以抗 HSV-1 抗體處理，經過生物素(biotin)標定、Horseradish peroxidase 免疫化學染色分析 HSV-1 病毒蛋白的表現 (棕色箭號標示處)。(A) 是冷凍切；(B) 是石蠟切片 (100X 放大倍率)。

圖18

小鼠皮膚經HSV-1腹側感染後之細胞激素定量PCR的分析結果



未經處理以及分別經過六種不同中草藥處理一次後的小鼠皮膚在HSV-1 感染後第二天取得 RNA 後，並合成其 cDNA，以即時定量PCR(real-time PCR)測量小鼠皮膚中特定細胞激素 mRNA 之表現程度。以β-actin 作為內部校正點(internal control)，並以正常小鼠皮膚皮膚(normal)作為基準點，再將各實驗組與基準點作比較，以得到目標基因表現量的倍數變化(Fold increases)。各組樣品，每種檢測基因都有二重複的數據。長條圖的高度為平均值，誤差線為標準差 (unpaired t 檢定* p< 0.01, ** p< 0.001)。

表 1　藥用植物萃取物對樹突狀細胞細胞激素IL-6及IL-12表現之影響

中草藥種類	雞屎藤								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度(μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	-3.991	1.085	4.999**	-12.59	-12.65	-5.73	14.62**	8.328*	8.228*
SEM (%)	1.916	1.493	0.7294	0.4199	1.006	1.219	0.1644	0.6555	0.7164
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	-5.261	-3.73	-0.1081	-67.77	-29.03	97.60**	44.25**	29.06*	29.23*
SEM (%)	0.7214	1.409	2.284	11.63	4.487	6.407	0.4554	1.580	3.332

中草藥種類	山苦瓜								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	-3.991	1.085	4.999*	18.80**	1.200	-16.73	18.80*	1.200*	-16.73
SEM (%)	1.916	1.493	0.7294	1.159	1.882	3.408	1.159	1.882	3.408
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	-5.261	-3.73	-0.1081	17.26**	29.69**	31.24**	56.04	77.33**	11.39*
SEM (%)	0.7214	1.409	2.284	0.6217	0.6900	1.750	14.97	1.817	2.208

中草藥種類	半枝蓮								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	-3.991	1.085	4.999	17.63**	8.633*	6.567*	14.62**	8.328*	8.228*
SEM (%)	1.916	1.493	0.7294	0.7424	0.8570	0.3180	0.1644	0.6555	0.7164
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	17.84**	14.52**	13.64**	53.20*	11.30**	-162.1	77.39***	71.00***	77.56***
SEM (%)	1.342	3.478	0.5723	22.36	24.42	84.42	0.9140	0.2973	0.3433

中草藥種類	魚腥草								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	33.99**	33.07**	26.43**	3.667*	9.700*	7.100	28.15**	21.54**	28.03**
SEM (%)	1.091	5.222	3.258	2.017	0.5686	0.5508	0.7164	0.8511	1.655
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	9.459*	13.08*	5.297	-148.4	50.00*	-6.433	49.08**	56.51**	78.25***
SEM (%)	3.841	2.513	1.685	84.52	8.410	5.028	1.207	1.198	0.3002

中草藥種類	白花蛇舌草								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	37.74**	31.21**	31.51**	-3.233	10.47**	2.800*	12.89**	-0.8710	8.152*
SEM (%)	1.857	0.7873	2.091	1.386	0.7881	0.8505	0.7879	0.3743	0.9435
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	14.2*	16.99*	12.68*	-141.1	37.10*	8.867	52.88***	26.82**	49.43***
SEM (%)	4.342	3.015	0.6197	48.24	6.407	7.174	1.303	5.199	0.4554

中草藥種類	破布子根								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	0.155	5.677*	9.301*	0.1667	0.733	1.733**	36.73**	26.95*	28.15**
SEM (%)	0.4101	0.5874	1.69	0.5897	1.543	0.4333	1.033	1.559	0.6730
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	-1.838	0.4684	4.883*	19.37*	6.433	21.80*	85.85***	84.29***	80.84***
SEM (%)	0.9614	2.03	1.539	10.85	4.487	7.032	1.505	0.6217	1.195

中草藥種類	紫蘇								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	26.24***	16.39*	23.15*	11.33*	12.00*	17.30*	-6.110	-3.904	-2.199
SEM (%)	1.08	0.1848	3.254	2.090	1.365	1.250	0.6684	1.156	0.5264
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	15.41**	16.43**	20.22**	-87.90	-281.4	-86.30	30.96*	25.78*	30.96*
SEM (%)	1.123	1.772	1.422	63.63	32.15	71.81	4.861	3.540	2.035

中草藥種類	狗尾草								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	14.51*	-1.628	12.83*	5.733*	6.667*	18.17**	-3.428	-0.1441	3.741*
SEM (%)	0.3919	1.394	1.385	1.974	1.068	0.9821	1.116	1.884	1.141
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	-3.676	0.1622	6.198*	-115.3	-95.17	-10.50	23.71**	27.68**	42.87**
SEM (%)	1.804	1.44	1.368	72.46	91.98	85.12	1.412	1.750	2.100

中草藥種類	仙草								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	23.06**	19.96**	16.61**	10.47***	6.233***	8.967***	28.15*	16.83*	24.09**
SEM (%)	1.398	0.3201	0.6913	0.3180	0.3180	0.2728	0.3049	1.265	0.8033
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	-4.901	-1.532	-0.7027	-27.43	47.60*	-128.2	75.15***	59.78**	68.42**
SEM (%)	0.7335	2.164	2.46	55.46	8.900	59.69	0.5976	0.9597	3.165

中草藥種類	桑黃								
萃取方式	酒精			熱水			冷水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	40.91***	29.25 ***	29.97*	6.46	1.81	-2.25	11.92**	8.66	5.70
SEM (%)	0.99	2.60	3.19	2.64	5.43	5.40	0.82	2.10	1.02
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	64.07***	54.92***	40.00***	-24.75*	-15.93*	-29.83 **	11.53	14.24	2.03
SEM (%)	0.59	9.87	7.68	17.97	8.13	9.22	5.38	7.49	2.11

中草藥種類	大花咸豐草								
萃取方式	酒精			乙酸乙酯			熱水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	27.01**	19.39**	15.25*	37.34**	26.58*	21.2*	9.877*	12.22*	11.87*
SEM (%)	1.624	1.115	2.239	1.485	1.631	4.671	3.519	4.782	4.305
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	81.36**	68.54**	70.9**	80.01**	68.53**	58.07*	-48.62	-53.34	-23.3
SEM (%)	3.223	2.681	3.893	6.087	2.341	5.74	12.07	7.146	19.13

中草藥種類	狗肝菜								
萃取方式	酒精			乙酸乙酯			熱水		
萃取物濃度 (μg/mL)	50	25	12.5	50	25	12.5	50	25	12.5
IL-6 抑制平均比例 (%)	75.21**	34.95**	32.64**	28.76**	26.18**	25.32**	25.54**	23.81**	22.35**
SEM (%)	8.897	0.5435	1.092	0.9728	0.9378	0.7489	0.7424	0.6376	0.7048
IL-12p40 抑制平均比例 (%)	82.71***	26.33*	5.74	50.3**	42.54**	33.08*	-82.04	-69.21	-44.9
SEM (%)	0	2.365	3.651	3.507	0.3367	2.027	2.434	2.108	0

編號：CCMP101-RD-015

臺灣本土藥用植物闊葉麥門冬與臺灣油點草之研究與開發(2-1)

吳永昌
中國醫藥大學

摘　要

本研究選用臺灣本土藥用植物闊葉麥門冬(*Liriope platyphylla*)與臺灣油點草(*Tricyrtis formosana*)，以生物活性導引分離法，利用管柱層析與高效能液相層析儀等分離技術，搭配現有之細胞毒殺、鎮痛、抗發炎與抗 B 型肝炎病毒等篩選平臺，尋找具有上述生物活性之有效成分；對於瀕臨絕種之油點草屬亦嘗試組織培養方式復育。經初步活性篩選後發現闊葉麥門冬根部之 70 %乙醇水溶液層具有顯著的細胞毒殺與抗發炎活性，故選定此層做進一步之成分分離。共分離得到二十六個化合物，其中五個新化合物，包含二個 dihydrobenzofuroisocoumarins：(+)-platyphyllarins A (1) and B (2)、一個 butanoate：ethyltributanoate (3)、二個 homoisoflavanones：(−)-liriopeins A (4) and B (5)與二十一個已知化合物，包含六個 homoisoflavonoids、一個 chalcone、六個 amides、一個 lignan、一個 fatty acid、一個 alkaloid、三個 bezenoids，以及二個 steroids。抗癌研究方面，化合物 (−)-liriopein B (5) 、(3*R*)-3-(4′-Hydroxybenzyl)-5,7-dihydroxy-6- methyl-chroman-4-one (7) 、(3*R*)-3-(4′-Hydroxybenzyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-6- methylchroman-4-one (10) 與 3-(4′-Hydroxybenzylidene)-5,7-dihydroxychroman-4-one (11) 針對 HepG2 、Hep3B、A549、MCF-7 與 MDA-MB-231 癌細胞株各有不同程度的抑制活性。另臺灣油點草依據活性分離導引法之結果，選擇二氯甲烷層進一步分離，其中 DCM-12~14 抗一氧化氮合成酶作用最佳，而 DCM-13~17 抗 B 型肝炎病毒表面抗原活性最好，由該部分純化物繼續細分，得到六個酚類與兩個植物固醇，其中具抗一氧化氮合成酶活性之純化合物 4-hydroxybenzldehyde，而 4-hydroxybenzoic acid methyl ester 對 B 型肝炎表面抗原選擇指數最高。在植物組織培養部分，蒐集臺灣油點草及高山油點草之植株材料，切取單莖節為初始培植體於不含生長調節劑的 MS 培養基中誘導成苗。5 cm 高之臺灣油點草瓶苗約可切取得到 3-4 個節芽(含頂芽)，培養在添加 0.5 mg/l BA 或是同時添加 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 之培養基中，平均單個芽體可增殖至 1.8 個，單芽最多則可產生 3 個芽體。高山油點草芽體培養在含有 2.0 mg/l BA 或是同時含有 2.0 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 培養基中，則可產生 2-3 個芽體，繼代培養至不含生長調節劑之培養基中，芽體可順利抽長成苗。瓶苗移植至網室栽培，可順利長成植株，部分臺灣油點草植株並已產生花苞。2 種油點草材料於組培過程中皆觀察到試管內開花現象。並已完成臺灣油點草種子無菌播種、瓶苗建立及出瓶栽培之生產系統。

關鍵詞：百合科、闊葉麥門冬、臺灣油點草、中草藥、細胞毒殺、抗發炎、B 型肝炎病毒

Number: CCMP101-RD-015

Studies and developments on Formosan endemic medicinal plants, *Liriope platyphylla* and *Tricyrtis formosana* (2-1)

Yang-Chang Wu
China Medical University

ABSTRACT

This research project focuses on finding active compounds of cytotoxic, anti-inflammatory, analgesic and anti-hepatitis B virus activities from *Liriope platyphylla* and *Tricyrtis formosana via* bioassay-guided fractionation by using column chromatography and HPLC. Tissue culture to the rare species will be also initiated and made comparison between different *Tricyrtis* species in chemical composition. The 70% EtOHaq layer of *L. platyphylla* extract shown significant cytotoxic and anti-inflammatory activities, and was investigated on column chromatograph by bioactivity-guided fractionation and isolation to afford five new compounds, including two unusual new dihydrobenzofuroisocoumarins, (+)-platyphyllarin A (1) and B (2), one new butanoate, ethyltributanoate (3), and two new homoisoflavanones, (―)-liriopein A (4) and B (5), along with 21 known compounds including six homoisoflavonoids, one chalcone, six amides, one lignan, one fatty acid derivative, one alkaloid, three bezenoids, and two steroids. In the cytotoxicity assay, (−)-liriopein B (5), (3*R*)-3-(4′-Hydroxybenzyl)-5,7-dihydroxy-6-methyl-chroman-4-one (7), (3*R*)-3-(4′-Hydroxybenzyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-6-methylchroman-4-one (10) and 3-(4′-Hydroxybenzylidene)-5,7-dihydroxychroman-4-one (11) were active against HepG2, Hep3B, A549, MCF-7, and/or MDA-MB-231 cancer cell-lines. The methanolic extract of *T. formosana* was partitioned to give DCM, *n*-butanol and aqueous layers. The active DCM layer was purified to give 18 fractions from whcih 12-14 and 13-17 were most against NO synthase and HBsAg, respectively. Six phenolics and two common phytosterol and corresponding glucosides were obtained after purifiation. 4-Hydroxybenzaldehyde and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester is the most potent against NO synthase and HBsAg, respectively. In plant tissue culture, we collected *T. formosana* and *T. ravenii* and used the nodal bud as primary explants. After one month of culturing, 5 cm plantlet could cut into 3-4 buds (including terminal bud) for shoot proliferation. Buds of *T. formosana* were cultured on the medium only added 0.5 mg/l BA or both 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA, the single buds increased to an average 1.8 and a single bud can produce up to three buds. *T. ravenii* buds cultured on the medium supplemented with 2 mg/l BA or medium contained 2 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA can proliferated to 2 or 3 buds. Shoots were subcultured to new medium without plant growth regulators and then grown into whole plantlets. Plantlets

were transferred to shade house and part of *T. formosana* plants produce flower buds. In vitro flowering was observed in both species. We also established the sterile seed sowing procedure, seedling culture and cultivation system.

Keywords: Liliaceae, *Liriope platyphylla*, *Tricyrtis formosana*, Chinese herbal medicines, Cytotoxicity, Anti-inflammatory, Hepatitis B virus.

壹、前言

本研究發現臺灣原生百合科(Liliaceae)藥用植物-闊葉麥門冬(*Liriope platyphylla*)和臺灣油點草(*Tricyrtis formosana*)對於細胞毒殺、鎮痛、抗發炎與抗 B 型肝炎病毒等活性具有顯著的表現，且尚未有相關深入研究報導。故選定該兩株百合科植物為本計畫研究之材料，針對其天然藥物化學及藥理活性機轉等進行研究。

闊葉麥門冬為麥門冬屬(*Liripoe*)植物，過去文獻中所報導之化學成分，主要分為 benzofurans，例如 2-(4′-hydroxybenzyl)-5,6- methylenedioxy-benzofuran、2-(4′-hydroxybenzoyl)-5,6-methylenedioxy- benzofuran[1]；homoisoflavonoids，例如 methylophiopogonanone B、ophiopogonanone B[2]；sesquiterpenes glycoside，例如 liriopeoside A、ophiopogonoside A[3]，與 steryl glycosides 及其 aglycone，例如 ruscogenin、lirigramosides A、lirigramosides B、lirioproliosode A、*β*-sitosterol-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside、25(*S*)-ruscogenin-1-*O*-*β*-*D*-xylopyranoside-3-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranoside[1,4,5] 等等。

藥理活性方面，粗萃物或純化合物皆有相關活性研究。同屬植物 *L. graminifolia* 中分離之化合物 3-*O*-{*β*-*D*-xylopyranosyl-(1→3)-*α*-L-arabinopyranosyl-(1→2)-[*α*-L-rhamno-pyranosyl-(1→4)]-*β*-*D*-glucopyranosyl-(25*S*)-spirost-5-ene-3*β*,17*α*-diol、1-*O*-*β*-*D*-xylopyranosyl-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(25*S*)-ruscogenin 及 methylophiopogonanone B 具有中等強度的抗癌活性[6]。從 *L. muscuri* 取得之 1-*O*-[*β*-D-glucopyranosyl(1→2)][*β*-D-xylopyranosyl(1→3)]-*β*-D-fucopyranoside (LMC)，可有效的抑制小鼠腫瘤之生長[6]；自植物 *L. muscari* 中分離得到之化合物 25(*R*)-ruscogenin-1-yl-*β*-D-xylo-pyranosyl-(1→3)-[*β*-D-glucopyranosyl- (1→2)]-*β*-D-fucopyranoside (Lm3)，具有抗發炎和免疫功能的活性[7]，2002 年進一步證實化合物 Lm-3 是藉由干擾 protein kinase C，阻斷淋巴細胞附著在細胞外基質，減少 cytokines、chemokines 等因子，進而減少發炎反應的產生[8]；自植物 *L. spicata* var. *prolifera* 分離出之化合物 2-(4′-hydroxybenzyl)-5,6-methylenedioxy-benzofuran 和 2-(4′-hydroxybenzoyl)- 5,6-methylenedioxy-benzofuran 能有效抑制 neutrophil 釋放 superoxide anion 且被認為具有抗發炎活性；由 *L. platyphylla* 塊根的水萃物，能抑制 asthma 小鼠經由 OVA (ovalbumin)所誘導的呼吸道與支氣管發炎反應[9]。

此外，治療糖尿病方面也有相當多的研究。過去的報導中，植物 *L.*

spicata var. *prolifera* 的水萃物及其多醣體可藉由提高第二型糖尿病鼠對於胰島素敏感度，而達到降血糖的效果[10]。從 *L. spicata* 中所分離出之多醣化合物 LSP1 及 LSP2，可顯著降低第二型糖尿病鼠的空腹血糖值和改善其對葡萄糖之耐受性[11]。自 *L. platyphylla* 70%甲醇水溶液粗萃物中分離得到 homoisoflavone-enriched 的 fraction，藉由影響 PI_3-kinase 路徑而能有效增加 fibroblasts 細胞對胰島素的敏感度[12]。於 2004 的研究中發現 *L. platyphylla* 的 butanol 萃取物能誘導 C6 及星形膠質細胞分泌神經生長因子，進而促使 PC12 神經細胞的軸突生長，而被認為具有治療阿茲海默症的功能[13]。*L. platyphylla* 總皂苷(total saponins)能改善 aging mice 因 D-galactose 所引發之學習記憶障礙，所以被認為具有抗衰老的作用[5]。其他活性方面，發現 *L. platyphylla* 塊根的乙酸乙酯萃取物能經由抑制微生物表面蛋白質 Sortase，而達到顯著的抑菌效果[14]。而自 *L. muscari* 中分離得到之化合物 Lm-3 和 ruscogenin 發現能藉由阻斷淋巴細胞滲透至肝臟，改善肝損傷，進而達到保肝作用[15]。**綜合上述，迄今大部分此屬植物研究鮮少著墨於闊葉麥門冬，僅有少數韓國學者報導其萃取物相關藥理研究，並無具體化學、活性成分之探討。**

臺灣油點草為油點草屬(*Tricyrtis*)植物，化學成分分析目前僅由花部位分離三種花青素之 C-glycoside，具有特殊性[16,17]。臺灣油點草(*T. formosana* Baker)為最早由 Baker 於 1879 年所發表，但本種並非臺灣之特有種，琉球之西表島亦產之，更有學者懷疑菲律賓之菲律賓油點草(*T. imeldae* Gutierrez)可能即為臺灣油點草，但由於材料取得之不易，仍沒有一致之結論。油點草屬植物為多年生草本植物；根據 Flora of Taiwan 第二版的記載，本屬有 2 種 3 變種[18]，而 Peng et al. 發表一新種高山油點草(*Tricyrtis ravenii* Peng & Tiang)[19]，其外表略似臺灣油點草，但其花部特徵、習性及海拔分佈等則兩者間有明顯差異。臺灣產本屬植物多生長於中低海拔之林下較為陰暗潮濕之處，其中最特別者為鈴木氏油點草(*T. suzukii* Masam.)僅生長於東部之石灰岩地形，為稀有植物；毛果油點草(*T. lasiocarpa* Marsum.)分布於中南部低中海拔山區，冬季具休眠性，秋冬時節地上部即乾枯，待來年春天方重新生長新的地上部。臺灣油點草廣泛分布於臺灣全島中低海拔山區，多生長於林下或林緣較為陰暗潮濕的環境中，具有發達之走莖，在野外常可看到成片的生長，主要花期約為每年的 8-11 月，屬秋冬開花之草本植物，開花結果後不休眠，直至來年生長新生的莖葉。關於油點草植物特性與組織培養

之研究，包括有植物特性及分類、種子發芽特性研究、癒傷組織再生小苗及其變異偵測、農桿菌轉殖系統等。Fukai 以電子顯微鏡觀察油點草雜交種之花芽初始及發育過程，以瞭解其花朵發育關鍵時期[20]。Kojiro 則調查在自然環境下，多種油點草植物之種子發育過程及是否具有休眠特性，並以此些調查結果進行植物分類[21]。油點草種子受光線影響其發芽率，*Tricyrtis hirta* 及 *T. formosana* 種子在照光環境促進其種子發芽率[21]。油點草組織培養方面的研究，主要集中在以花絲為初始培植體，6 種油點草材料在含有 4.5 μM 2, 4-D 及 0.45 μM TDZ 的 1/2 MS 培養基中誘導癒傷組織產生，移入不含生長調節劑培養基中可直接生成體胚，體胚可長根形成小苗，移植出瓶 6 個月後進行染色體及多倍體檢測，證明其體胚苗與母株無變異產生[22]。然而，癒傷組織持續繼代培養 1 年以上誘導產生的體胚苗，隨機選取的 37 株小苗中，有 9 株再生株為四倍體植株，雖然多項性狀顯示具有更佳的花卉特性，如葉片變厚、株高變高及花朵增大等[22]，但就種苗繁殖目的而言，透過癒傷組織再生體胚之體系屬於較不穩定的繁殖系統。油點草屬除了花型特殊具有花卉發展潛力以外，更重要的是全草可供藥用。在發展成經濟生產的藥用產品之前，需多量的植物進行藥用成份分析及功效試驗，但目前尚無其大量繁殖種苗之系統，限制了此種臺灣原生藥用植物資源的發展及應用。**綜合上述，迄今大部分此屬植物鮮少著墨於臺灣油點草之相關研究，並無具體化學、活性成分之探討。且由於該類植物瀕臨絕種，因此建立其健康種苗繁殖體系，並針對該種子進行短期及超低溫保存以維持其種源，同時兼顧本土藥用植物開發應用及資源保存，有其必要性。**

闊葉麥門冬於南臺灣民間中用來治療血癌之用藥，初步篩選該植物地下部萃取物對血癌細胞株 HL-60 毒殺活性 IC_{50} 小於 20 μg/mL；而濃度 10 μg/mL 下對 neutrophile 釋放 superoxide anion 達 97%以上抑制率且對抑制 elastase 釋放更達 98 %以上之優異抗發炎活性；而其地上部萃取物對血癌細胞株 HL-60 毒殺活性 IC_{50} 小於 25 μg/mL；濃度 10 μg/mL 下對 neutrophile 釋放 superoxide anion 幾近 100%抑制率且對抑制 elastase 釋放亦達 96 %以上。臺灣油點草萃取物於抗發炎篩選顯示具有抑制一氧化氮合成酶作用之活性(活性排序為：TF-DCM > TF-B > TF-MeOH > TF-Aq.-ext > TF-Aq.-layer)；其中又以 TF-DCM (100 μg/mL)的抑制效果最強(E_{max} 可達 95.1 ± 0.3%)，值得進一步研究其活性成分。TF-MeOH、TF-B 及 TF-Ag-layer 萃取物處理劑量大於 160 μg/mL 才會對肝癌細胞造成毒性，而 TF-DCM 萃

取物在處理劑量大於 40 μg/mL 即具有細胞毒性，TF-Ag-ext 萃取物即使處理劑量達到 320 μg/mL 還是未造成細胞毒性。抗 B 型肝炎病毒方面，TF-MeOH 在未造成細胞毒性之不同濃度下，只對 HBsAg 抗原有抑制作用，對 HBeAg 則無抑制效果；TF-DCM 則明顯抑制 HBsAg 抗原之表現與分泌，但對 HBeAg 抗原表現則只有輕微影響；TF-B 與 TF-Ag-Layer 萃取物皆可明顯抑制 HBsAg 抗原表現與分泌，但不影響 HBeAg 抗原之表現；而 TF-Ag-Ext 萃取物對 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 接只有輕微的抑制作用。

篩選之初步結果，顯示上述兩株植物呈現多樣之生物活性，為具有高度開發潛力之臺灣本土藥用植物。唯目前尚未有上述國人疾病相關之研究驗證。本計畫擬將闡明闊葉麥門冬與臺灣油點草之活性組成物與其活性化合物，並確認其藥效機轉以達實踐中醫藥轉譯醫學之宗旨。

貳、材料與方法

一、研究主題之大量植物採集與萃取及劃分：

(一)闊葉麥門冬(*L. platyphylla*)：

本計畫所使用之材料闊葉麥門冬係採自台南，將取得之闊葉麥門冬以清水洗淨後陰乾，將地下部與地上部分別以 95 %乙醇於室溫下浸泡萃取，再經減壓濃縮後得地下部與地上部之乙醇萃取物。並由高雄醫學大學天然藥物研究所顏銘宏副教授進行基原鑑定工作。同時保留部分之植物樣品以作為留存之標本。

(二)臺灣油點草(*T. formosana*)：

將臺 14 甲(海拔 2000 公尺以上)採集之臺灣油點草蔭乾後切成小片並磨粉，以甲醇浸泡得甲醇萃取物。物種由國立中興大學森林系曾彥學副教授鑑定。

二、活性組成物、有效成分分離與其結構解析：

(一)萃取物之分離與純化：

此二種粗萃物均以水與乙酸乙酯(EtOAC)進行第一次的分配萃取，其中乙酸乙酯層經減壓濃縮後再以正己烷(*n*-hexane)與 70 %乙醇水溶液進行分配萃取（隨即減壓濃縮），而水層則與正丁醇(*n*-BuOH)進行分配萃取，最終得正己烷層、乙酸乙酯層、正丁醇層與水層等各四層。將不同之四層萃取物分別進行活性測試。依照活性分離導引法，利用柱層與薄層分析法，經由矽膠(Silica gel；Kiesilgel 60, 70-230 mesh 及 230-400 mesh, Merck.)、活性碳(Active carbon)、分子篩(Sephadex LH-20, Pharmacia)、碳 18 等材質做為固定相，配合簡易快速紫外光色譜分離系統(Biotage SP1™ Purification System)、高效液相層析儀(HPLC)等儀器進行分離純化，期望獲得活性成分。

(二)化學結構鑑定：

純化合物以 1-D/2-D NMR 光譜鑑定結構為主，輔以測量紅外線光譜(IR)鑑定官能基、紫外光-可見光譜(UV-Vis)鑑定發色團、液相層析-質譜得到分子離子峰或斷裂片以鑑定結構資訊、旋光度(optical rotation)鑑定光學活性、圓二色光譜(circular dichroism)鑑定立體結構。必要時進行化學反應(如 Mosher’s method)決定立體化學或培養單晶以 X-ray 繞射以鑑定其結構或相對立體化學結構。

三、細胞毒殺實驗及機轉研究：

(一)細胞培養：

人類肝癌(HepG2, Hep3B)、乳癌(MCF-7, MDA-MB-231)、肺癌(A-549)及口腔癌(Ca9-22)…等細胞株培養於 minimal essential medium 培養液中，其中含 10 %胎牛血清(fetal calf serum)及含 100 units/mL penicillin 與 100 μg/mL streptomycin，培養條件為 5 % CO_2、37 ℃及含飽和水蒸氣之環境。每三天 更換一次培養基溶液。當生長至培養瓶單層約八分滿時便作繼代培養。以血球計數器計算細胞數目，再取適當細胞數目做分析。

(二)細胞存活率試驗：

此實驗為利用 MTT 染色法(Microculture Tetrazolium Assay)，原理為活細胞中的粒線體酵素可將 MTT(黃色)轉變為不可溶的 formazan 紫色結晶，再以有機溶劑將 formazan 溶出，經由吸光值之檢測，換算後進而得知細胞存活率。取 5×10^3~1×10^4 cells/well 種於 96-well 的培養盤中，培養於 95 % O_2、5 % CO_2 之培養箱中。再加入不同濃度之藥物，培養 72 小時後，加入 MTT (0.5 mg/mL) 染色 1 小時，吸除上清液後加入 DMSO。利用酵素免疫分析儀(ELISA reader)，於波長 550 nm 下，測定其吸光值。

(三)細胞凋亡與細胞週期相關反應路徑之蛋白質及基因表現之探討。

四、抗 B 型肝炎病毒的複製及繁殖之基因調控機制：以 HuH7 穩定轉染細胞株或 HepG2.2.15 肝癌細胞株培養為模式。

(一)轉染細胞株培養：

HuH7 穩定轉染 B 型肝炎病毒基因細胞株(stable transfectant)之天然物篩選平台建立本部分採用 HuH7 hepatoma 細胞株經由 lipofectamine 2000 (Invitrogen)轉染(transfect) pHBsAg 由實驗室過去已建構之表現質體 DNA (plasmid) 48 小時後，再以 G418 (300 g/mL)進行培養篩選，經過 14 天之 clonal expansion 篩選後，以酵素免疫分析法(ELISA)追蹤測定經病毒基因轉染後之 HuH7 細胞株表現肝炎病毒表面抗原(HBsAg)之效價，當其表現量達到穩定階層(stable expression)，即可用來當作天然物抗肝炎病毒基因表現之篩選與機制分析平台。

(二)分析天然萃取物對 B 型肝炎病毒 DNA 複製的影響(病毒複製)：

本部份採用肝癌細胞株 HepG2.2.15，此株肝癌細胞在培養中可自然產生 B 型肝炎病毒顆粒釋放到培養基，因此可以當作病毒感染模式，可作為所萃取天然物之活性測試評估；將 B 型肝炎病毒 genomic DNA 從肝癌細胞株純化出來，經由南方墨點技術(Southern blot)分析；首先，病毒 DNA 從細胞內核心顆粒(core particles)，此實驗中，5×10^6 個細胞培養在 10 公分的培養皿中，經過不同濃渡之天然萃取物處理 72 小時後，將細胞收取打破離心分離出 capsid-associated viral DNA，以 1 %瓊膠/1XTAE 緩衝液進行電泳，再轉漬到 Hybond N^+ nitrocellular membrane (Amsham Biosciences UK)，進行南方墨點分析，轉漬到 membrane 上的 B 型肝炎病毒 DNA 由 ^{32}P 標定的 B 肝病毒 DNA 探針(probe)進行雜化(hybridization)(此病毒探針由 HBV2 質體經 *EcoRI* 限制酶切取純化)、清洗及自動放射性底片(X-ray film)感光，底片感光所呈現之病毒 DNA 量再經由儀器掃瞄定量分析。

(三)北方墨點法分析天然萃取物對病毒轉錄之 RNA (Northern blot)表現量影響：

除了分析 B 型肝炎病毒之 DNA 複製情形，另一方面也探討所萃取天然物對病毒基因轉錄的影響，病毒 RNA 可利用純化試劑組(extraction kit)純化出來，然後取 25 μg 以 formaldehyde 將 RNA denature，經過 1 %瓊膠電泳分離轉漬到 nylon membrane，再以標定的 B 型肝炎病毒 DNA 探針(50 ng)進行雜化(北方墨點，Northern blot)，接著自動感光在 X-ray film，病毒所表現的 precore/pregenomic, preS/S 及 X mRNA 經由定量分析。

(四)細胞均值液之製備：

製備全細胞均質液(whole cell lysate)分析天然萃取物對肝癌細胞內病毒表面蛋白(HBsAg)產生的影響培養後之細胞收集在 PBS 緩衝液清洗三次，離心下來後溶在 RIPA (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 5 nM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, and 0.25 % Deoxycholate, 1 mM PMSF, 25 ng/ml aprotinin, 5 ng/mL leupeptin)緩衝液，再用微量分注器抽吸幾次，以 14,000 rpm 離心 20 分鐘，所得到上清液即為細胞均質液。

(五)西方墨點分析(Western blot)：

天然萃取物對 B 型肝炎病毒表面蛋白(HBsAg)表現的影響經過蛋白質電泳後，然後轉漬到 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amershan biosciences, UK)上面，然後以 4 %脫脂奶粉溶液(in PBST buffer, PBS buffer with 0.05 % Tween-20)於室溫下 block 1 小時，之後以病毒表面抗原蛋白抗體血清(anti-preS, anti-preS2 or anti-major S)作用反應 1 小時，用 PBST 清洗 membrane 3 次(5 分鐘/次)，再以 donkey anti-rabbit IgG 或 sheep anti-mouse IgG (Amershan Biosciences, UK)等二次抗體作用反應 40 分鐘，之後以 PBST 緩衝液清洗 5 次，之後用 ECL detection kit 作用反應，直接曝光在 X-ray film，再以 chemiluminescence image analyzer (FLA1000 system; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)定量分析蛋白質表現量。

(六)放射性免疫分析法(Radioimmunoassay, RIA)：

分析天然萃取物對培養基病毒表面蛋白量釋放量的影響肝癌細胞處理天然萃取物之培養培養基(culture supernatants)收集起來，以 RIA assay kit (General Biologicals Corp., Industrial Park, Hsin Chu, Taiwan)分析量化。

(七)天然萃取物對肝癌細胞生長及毒殺性影響(MTS assay)：

將肝癌細胞培養在 96-well 培養盤[同時以 HuH7(human hepatoma cell line)、胃癌細胞為實驗對照組]，經不同天然萃取物之處理，培養 72 小時後，將培養置換，再加入 20 μL/well MTS 溶液(promega)，培養在 37 ℃暗室 3 小時，接著取 75 μl 的培養液以 12,000 rpm 速度離心 5 分鐘，然後加上 50 μL/well 0.04 M HCl/isopropanol 混和均勻在 O.D.595 的吸光波長下測得數值，再進一步計算細胞生長抑制比例：

抑制生長百分比=控制組平均吸收數值/1-實驗組平均吸收數值×100

(八) Transfection and luciferase activity assay：

HuH7 或 HepG2 cell 為培養模式，將 6×10^4 cells/well (24 well plate)或是 3×10^5 cells/well (35mm 培養皿)培養在 plate 或培養皿 18 小時後，以 lipofectamine 2000 (Invitrogen)進行 DNA 轉染(transfection)將含病毒基因啟動子(promoter)之 luciferase reporter construct 送到細胞內表現，經過 48 小時後，以不同濃度之天然萃

取物處理 24 小時候，再以試劑套組(promega)分析細胞中 luciferase 活性用以評估啟動子活性是否受到天然萃取物處理的影響。

五、鎮痛活性評估及機轉研究：

(一)周邊疼痛模式：醋酸扭體模式

本實驗使用 ICR 雄性小鼠，體重約 21-25 公克。將天然萃取物(0.1、0.5、1 g/kg)以口服方式投予，在給藥後 55 分鐘由腹腔注射 1%醋酸溶液，誘發扭體反應，將小鼠置於觀察箱中，5 分鐘後開始觀察並以計數器紀錄注射醋酸後第 5 到 15 分鐘，共 10 分鐘內，小鼠的扭體次數，並以 indomethacin (10 mg/kg, i.p.)作為正對照組，於注射醋酸前 25 分鐘給藥。

(二)周邊疼痛模式：角叉菜膠誘導發炎疼痛

本實驗採用 SD (Spraque-Dawley)大白鼠，重 200-250 克，腳掌刺激儀測得，並使其達穩定狀態。等待動物穩定後，誘導前天然萃取物(0.1、0.5、1g/kg)以口服方式投予，並於 60 分鐘後再給予腳掌注射 carrageenan (1 mg/paw)，隨後每 1 小時測定大白鼠的縮腿時間，總共測量 5 小時。並以 indomethacin (10 mg/kg, i.p.)作為正對照組，於誘導前 30 分鐘給藥。

(三)中樞及周邊疼痛模式：福馬林舔足試驗

本實驗採用 Dubuisson 及 Dennis 修飾後的方法，將不同劑量之天然萃取物(0.1、0.5、1 g/kg)以口服方式投予，在給藥後 60 分鐘，用微量注射器以 27 號針頭，在小鼠右後足蹠，皮下注射 20 μL 的 5%福馬林溶液，立即將小鼠置入觀察箱中觀察，記錄早期及晚期反應時間，共紀錄 30 分鐘。其中，第 0 到 5 分鐘之累積舔蹠秒數稱為早期(early phase)之痛覺反應時間；第 20 到 30 分鐘之累積舔蹠秒數稱為晚期(late phase)之痛覺反應時間。並以 indomethacin (10 mg/kg, i.p.)作為正對照組，於注射福馬林前 30 分鐘給藥。

(四)冷熱痛覺：小鼠冷熱痛覺測試(Hot/Cold Plate Test)

Ugo Basile Hot/Cold Plate 35100 為本實驗採用機型，其溫度範圍 2-66℃(加熱範圍 18-66℃、降溫範圍 24-2℃)、調溫速度最高 2.5℃/min。實驗時選擇 55℃的條件進行測試。本機搭配開關踏板即時開始/停止計時，此電子計時系統可有效減少人為誤差。將不同劑量之臺灣油點草萃取物(0.1、0.5、1 g/kg)以口服方式投予，在給

藥後 60 分鐘，以 55℃誘導傷害，依縮足反應時間評估痛覺閾值的變化並以 indomethacin (10 mg/kg, i.p.)作為正對照組。

(五)中樞疼痛：電子式馮佛雷纖維細絲測試(Electronic Von Frey Test)

IITC Electronic Von FreyAnesthesiometer 2392 為本實驗採用機型，內含特殊附件如：RigidTip 可藉單次刺激直接測得痛覺閾值，Super Tip 為 15 根附有尖端纖毛，重量 0.1 - 65g 之套件。有別於傳統式 Von Frey 套組，本電子設備可自動偵測並紀錄機械性痛覺閾值，因而提高測量正確性並有效縮短實驗時間。

(六)中樞疼痛：疼痛閃尾測試(Tail-Flick Test)

Ugo Basile Tail Flick Unit 37360 為本實驗採用機型，利用紅外線光源(50 瓦燭光)產生輻射熱，此能量強度可調整。尾部閃躲時可自動偵測並停止計時，可有效減少人為誤差。將不同劑量之天然萃取物(0.1, 0.5, 1 g/kg)以口服方式投予，在給藥後 60 分鐘進行實驗。利用紅外線光源(50 瓦燭光)產生輻射熱，此能量強度可調整。尾部閃躲時可自動偵測並停止計時，以 indomethacin (10 mg/kg, i.p.)作為正對照組。

六、抗發炎活性評估及機轉研究：

(一)細胞訊息傳遞：

1. 細胞存活率測定：

將細胞種在組織培養盤，lipopolysaccharide (LPS)及受試藥物處理後，加入 alamaBlue 試劑(10%)，培養 3 小時，用 automatic microplate reader 測波長 570 nm、595 nm 的吸光值，並計算二者的差值。

2. 西方墨點分析法：

(1) 細胞蛋白質之抽取：

細胞經 LPS 及受試藥物處理後，以蛋白質溶解液萃取，離心(3000 rpm, 20 min, 4 ^{o}C)後，製備細胞均質液，再以蛋白質分析套組定量蛋白質的濃度。

(2) 西方墨點分析：

取適量蛋白質以蛋白質凝膠電泳(7.5% SDS-PAGE)分離，再以轉印裝置轉漬於硝化纖維濾紙。取出硝化纖維濾紙，先以 Ponceau S 染劑觀察轉印效果，再經 blocking、一

級抗體、二級抗體處理後，加入 ECL 試劑，並以冷光顯相。感光底片經掃瞄後，以 Labscan 軟體處理定量。

3. 細胞訊息傳遞蛋白質之基因表現 (RT-PCR, Real-time PCR)：

(1) 細胞 RNA 之抽取：

細胞經 LPS 及受試藥物處理後，以 TRIzol 將細胞刮下。加入 chloroform/TRIzol，振搖後以 12,000 g 4℃離心 15 分鐘，將含有 RNA 部分之上層取出，與 iospropyl alcohol TRIzol 混合，以 12,000 g 4℃中離心 10 分鐘，沉澱物以 75% ethanol/TRIzol 沖洗後，以 7,000 g 4℃中離心，其沉澱物再以 75% ethanol 沖洗。待 ethanol 揮發後，以 DEPC-H_2O 回溶，再以 57℃加熱 10 分鐘。利用光譜分析儀以 OD_{260}、OD_{280} 分析總核醣核酸(total RNA)的濃度及品質，其 Ratio 必須介於 1.7~2.0 之間。

(2) 基因表現分析：

設計標的基因及 GAPDH 的引子，總核醣核酸使用 0.2 μg 進行反應，以誘導型一氧化氮合成酶(iNOS)為例，RT 部分條件為：50℃，30 分鐘；94℃，2 分鐘；PCR 定為 30 個循環，分別為：94℃，15 秒；55℃，30 秒；68℃，40 秒；最後以 68℃，7 分鐘反應後，維持在 4℃。實驗結果以 agarose/TBE buffer 進行電泳。Real-time PCR 實驗，採用與 RT-PCR 相同的方式純化總核醣核酸，並以上述的引子進行實驗。將總核醣核酸轉為 cDNA 後以 LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green 1 進行。cDNA 分別以 x1, x5, x25, x125, x625 及不含 cDNA 的溶液進行相對定量的檢量線，以便求出標的基因及 GAPDH 之 mRNA 的表現量。

4. Small interfering RNA (siRNA)：

將短片段的雙股 RNA 送入細胞，藉由 RNA-induced silence complex (RISC)，使特定的 mRNA 分解，專一性的抑制特定之 RNA 轉譯成蛋白質。取適量雙股 RNA (以 SiFind 軟體設計其序列；http://g4.sbl.bc.sinica.edu.tw/sirna/)與 OPTI-MEM1 混合，並與 LipofecTAMINE 2000 及 OPTI-MEM1 之混合液緩緩混合，於室溫靜置 25 分鐘，6 小時後加入細胞培養液，將細胞溶解與蛋

白質定量後，以西方墨點法觀察特定細胞訊息基因產物。

(二)功能性分析：

1. 嗜中性白血球與內皮細胞的黏附作用：

(1) 螢光標誌的白血球分析：

白血球以 PBS 清洗離心後，加入 Diluent A。在流式細胞儀中將嗜中性白血球圈選出來，並設定收集 10000 個細胞，以單色螢光直方圖來表現其螢光強度。

(2) 嗜中性白血球與內皮細胞黏附之共同培養(coculture)模式：

將內皮細胞培養在 coverslip 上，當細胞長滿後加入 LPS6 小時後，將標誌過非專一性螢光染劑 PKH2 的嗜中性白血球與內皮細胞共同培養後，以螢光顯微鏡觀察及記錄細胞的黏附情形。並計數未黏附的嗜中性白血球，間接得知白血球與內皮細胞黏附的情形。

2. 細胞增殖之測定：

(1) 細胞之製備：

細胞種在 24 孔培養盤，置二氧化碳培養箱培養。48 小時後，換成含 0.4 % FCS 之培養液，再培養 48 小時，加入 ^{3}H-thymidine (0.2 mCi/孔)標記細胞。

(2) 細胞增殖之測定：

細胞以 ^{3}H-thymidine 標記，24 小時後加入 0.5% trypsin，置室溫 30 分鐘。用細胞收穫機將細胞收集在濾紙上，再以液體閃爍計數器測定。細胞增殖時 ^{3}H-thymidine 併入(incorporation) DNA 進行複製，以放射活性(β粒子)表示細胞的數目，用每分鐘計數(CPM)表示四孔之平均值。

3. 酵素免疫沉澱分析(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)：

利用抗體與抗原間之免疫專一性結合，再以標示連接酵素的受質(substrate)與其作用物尖專一性反應而呈色。在固定波長測定吸光值與濃度的換算。

4. 誘導型一氧化氮合成酶分析實驗：

藉由分析其代謝產物(nitrite)進行篩選。將細胞種於 24-well 培養盤，給予 LPS 及受試藥物。24 小時後收集上清液進行 nitrite

之測定。Nitrite 的測定是以 Griess 試劑進行呈色反應，細胞上清液加入同體積之 1：1 混合之 1% sulfanilamide 及 0.1% naphthylenediamine (in 5% phosphoric acid)，10 分鐘後，用 ELISA microplate reader 在波長 550 nm 進行吸光值測定與濃度的換算。以 $NaNO_2$ (0~100 M)做一濃度標準檢量曲線。

5. 蛋白質陣列(protein array)分析：

(1) 細胞的準備與前處理：

蛋白質陣列加入 2 ml blocking buffer，置室溫 30 分鐘，加入 1 ml 待測樣品液於室溫與蛋白質陣列雜化 1 至 2 小時，於室溫加入一次抗體(Biotin-Conjugated Anti-Cytokines) 1 至 2 小時，再加入 HRP-conjugated streptavidin 2 小時。

(2) 樣品偵測：

加入預先混合之偵測緩衝溶液於室溫 2 分鐘，將蛋白質陣列用 X-光片(Kodak x-omat AR film)曝光適當之時間，儲存於-20~-80°C。

(三)實驗動物模型：

1. 已建立之實驗動物包括自發性高血壓大白鼠(SHR)及對照鼠(WKY)，ApoE 基因剔除之基因轉殖鼠、以 streptozotocin 誘發之糖尿病小鼠。

2. 從動物模型培養初代細胞

(1) 分離及培養心室肌細胞(cardiomyocytes)：

大鼠斷頭犧牲後，迅速取出心臟，用灌流含 hyaluronidase type II、trypsin IX、L-carnitine 之 Joklik-modified Eagle's medium，分離之心室肌細胞置於 MEM、$NaHCO_3$、HEPES、BSA、Ca^{2+}溶液中，以 2x10^5 密度種在培養皿，置於二氧化碳培養箱。

(2) 分離及培養血管內皮細胞(vascular endothelial cells, ECs)：

將大鼠胸主動脈剪成 1-2 公釐長之血管環放在培養基上，加入適量含 20 %胎牛血清及含內皮細胞生長激素之 RPMI-1640 培養液，置於二氧化碳培養箱(5 % CO_2 & 95 % 室內空氣，37 ^{o}C)。

(3) 分離及培養巨噬細胞 (macrophages)：

大鼠注射 thioglycolate medium 7 天後，以 MEM 灌流腹腔，收集腹腔液離心(1200 rpm, 10 min)，沉澱部分以磷酸緩衝液沖洗，再以 trypan blue 染色觀察存活率。另用 anti-rat CD11b IgG-FITC 及 streptavidin RPE (STAR4A/B)標記，細胞(2.5 x10^6)以流式細胞儀分析鑑定。分離之巨噬細胞以含 10 %胎牛血清 DMEM 為培養液。

3. 離體心臟功能測定：

大白鼠犧牲後迅速取出心臟，將主動脈連接於 Langendorff 定壓設備，灌流含氧 37 ±0.5^{o}C 的 Locke 溶液，探討受試藥物對心臟之收縮/舒張功能，包括：冠狀動脈流速、心跳、peak left ventricular pressure (peak LVP)、left ventricular end diastolic pressure (LVEDP)、±dp/dt 等的影響。

4. 離體血管張力實驗：

大鼠經 LPS 及受試藥物處理後，主動脈環用 Z 形白金鉤將之懸掛在組織浴器，多功能生理記錄器記錄張力的改變。給予基礎張力 1.8 g，每 15 分鐘更換 Krebs'溶液，穩定 60 分鐘。以 phenylephrine 引起血管穩定收縮後，加入 acetylcholine，確認內皮細胞之完整性。進行舒張、收縮反應及作用機制探討。

七、植物組織培養：

(一)材料蒐集與鑑定：植物材料之採集與鑑定由中興大學森林學系曾彥學副教授及其博士班學生趙建棣先生協助進行。

(二)無菌播種及瓶苗建立：油點草之種子量多且細小，為良好的繁殖材料。蒐集油點草種子進行無菌播種，除了建立瓶苗材料外，亦可觀察紀錄油點草發芽型態。種子以 1%次氯酸鈉溶液加入 1 滴展著劑(Tween 20)滅菌 10 分鐘，無菌水清洗 3 次，播種於 MS 基礎培養基，於 25±1℃、光周期 12 小時之培養室內進行培養[23]。

(三)組織培養：油點草為多年生草本植物，開花結果至種子成熟後，部分種類之地上部會全草枯萎致使植物材料會有一段時間無法取得，或是因採集不易使材料來源受到限制。因此利用組織培養技術建立油點草健康種苗生產體系，以穩定且安全地供應植物材料，為必須且重要的工作。

1. 初代培養：

以油點草成熟植株之莖節為初始培植體，切成適當長度，75%酒精擦拭表面後，置入含有 3%次氯酸鈉及 1 滴 Tween 20 之滅菌液中，手動搖晃 20 分鐘，在無菌操作台中以無菌水清洗培植體 3 次，直插入 MS 基礎培養基，培養於 25±1℃、光週期 12 小時的培養室中。

2. 繼代培養及成苗：

初代培養產生之側芽，待其生長至 4-5 cm 長，含有 3-4 莖節時，切取含有單芽的節段，移入增殖培養基測試其叢生芽產生效率。基礎培養基為 MS 基礎鹽類，100 mg/l myo-inositol，30 g/l sucrose，8 g/l agar，酸鹼值調整至 5.7。並測試 BA(0、0.5、1.0、2.0 mg/l)及 NAA (0、0.5 mg/l)組合對芽體增殖之影響。培養 1 個月後，計算單個芽體產生之新芽數，並將之繼代至新的 MS 培養基，觀察紀錄其發根情況。

3. 移植出瓶：

瓶內小苗長至 6-7 cm，經馴化後，將瓶苗移植出瓶至網室栽培。栽培介質為泥炭土，容器為紅色硬盆。

參、結果

一、材料鑑定、大量萃取、成分分離與結構鑑定

(一)闊葉麥門冬：

採集得闊葉麥門冬 6 公斤，由高雄醫學大學天然藥物研究所顏銘宏副教授鑑定。將地上部與地下部(根部)分開後，得根部 3.5 公斤，將根部於室溫下以 95%乙醇浸泡並連續萃取三次，其萃取液經減壓濃縮乾後得到 654.5 g (LPR)萃取物，此粗萃物再經分配萃取後依極性劃分為正已烷層(LPRP-H)、70%乙醇水溶液層(LPRP-Et)、正丁醇層(LPRP-B)與水層(LPRP-W)。

利用以矽膠(silica gel)、分子篩(Sephadex LH-20)、製備型矽膠薄層色層分析法(pre-TLC)，及 Biotage SP1™ Purification System 和高效能液相層析分析儀(HPLC)等儀器，配合有機溶媒沖提，進行 70%乙醇水溶液層(LPRP-Et)成分分離與純化。首先，以 open column 梯度沖提的方式，溶媒系統為 *n*-hexane：CH_2Cl_2=10：1→ *n*-hexane：CH_2Cl_2 =5：1→ *n*-hexane：CH_2Cl_2 =1：1→ pure CH_2Cl_2→ CH_2Cl_2：MeOH =60：1→ CH_2Cl_2：MeOH =40：1→ CH_2Cl_2：MeOH =20：1→ CH_2Cl_2：MeOH =10：1→ CH_2Cl_2：MeOH =5：1→ CH_2Cl_2：MeOH =4：1 為沖提溶媒系統，依矽膠薄層色層分析法(TLC)判斷，共分成 19 個 fractions (LPRP-Et-1~19)。測試此 19 個 fractions 細胞毒殺活性，發現 Fr. 9, 10, 15~17 具有細胞毒殺活性，故將以上數層進行分離純化之工作。

分離得到之純化合物經 NMR、MS、UV、IR 與旋光等光譜解析後，確定其結構，共得到 26 個化合物(圖一&圖二)，分別為二個新型 dihydrobenzofuroisocoumarins 化合物：(+)-platyphyllarins A (**1**) and B (**2**)、一個新型 butanoate 化合物：ethyltributanoate (**3**)、二個新的 homoisoflavanones：化合物：(−)-liriopeins A (**4**) and B (**5**)，以及六個 homoisoflavonoids 化合物：
(3*R*)-3-(4′-hydroxybenzyl)-5,7-dihydroxyl- chroman-4-one (**6**)、
(3*R*)-3-(4′-hydroxybenzyl)-5,7-dihydroxy-6-methyl- chroman-4-one (**7**)、(3*R*)-3-(2′,4′-dihydroxybenzyl)-5,7-dihydroxychroman- 4-one (**8**)、(3*R*)-3-(2′,4′-dihydroxybenzyl)-5,7-dihydroxy-6-methyl-chroman-4-one (**9**)、(3*R*)-3-(4′-hydroxybenzyl)-3,

5-dihydroxy-7-methoxy- 6-methylchroman-4-one (**10**)與 3-(4′-hydroxybenzylidene)-5,7-dihydroxy- chroman-4-one (**11**) [24,25]，一個 chalcone 化合物： isoliquiritigenin (**12**) [26]，六個 amides 化合物：(*S*)-*N*-*trans*-feruloyltyramine (**13**)、(*S*)-*N*-*cis*-feruloyltyramine (**14**)、 (*S*)-*N*-*trans*-*p*-coumaroyloctopamine (**15**)、(*S*)-*N*-*cis*-*p*-coumaroyloctopamine (**16**)、*N*-*trans*-feruloyl tyramine (**17**)與 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl] acrylamide (**18**) [27,28]，一個 lignan 化合物：(−)-syringaresinol (**19**)[29]，一個 fatty acid derivative 化合物：hexadecanoic acid-2′,3′-dihydroxypropyl ester (**20**)[10]，一個 alkaloid 化合物：indole-3-carboxylic acid (**21**)[30]，三個 bezenoids 化合物：4-hydroxybenzaldehyde (**22**)、vanillin (**23**)與 4-hydroxy-benzoic acid methyl ester (**24**)[10,31]，一個 steryl 的混合物：*β*-sitosteryl-*β*-*D*-glucoside (**25**)與 stigmasteryl-*β*-*D*-glucoside (**26**)。

(二)臺灣油點草：

2011 年 6 月 3 日於南投霧社採集臺灣油點草，於實驗室洗淨蔭乾磨粉後得 586.66 克，剪碎後以甲醇萃取四次，每次 4 小時，萃取液合併以減壓濃縮得 67.35 克之甲醇萃取物(TF-MeOH)。再以 1000 ml 之水與二氯甲烷(dichloromethane)分配三次後得到 8.85 克之二氯甲烷層(TF-DCM)；接著以水層與正丁醇(Butanol)分配三次後得到 7.26 克的正丁醇層(TF-BuOH)及 45.20 克的水層(TF-Aq layer)。再分別將各層進行抗發炎活性試驗及抗 B 型肝炎活性試驗，其中抗發炎活性測試以 TF-DCM 最有活性。依據活性趨勢，二氯甲烷層(TF-DCM)取 8.48 克以矽膠管柱分離純化，管柱外徑 6 cm，高度 39 cm，425 克，流速 22 ml/40 sec, tube，從正己烷-乙酸乙酯(98:2)增加至乙酸乙酯-甲醇(80:20)，至最後甲醇(100 %)，每次體積為 400 ml，以 TLC 檢測合併得到 1-18 部分混合物，命名為 TF-DCM-1 至 TF-DCM-18，再以抗發炎與抗 B 型肝炎病毒(表一)活性當作指標，以 TF-DCM-12-18(圖三、四)為活性較好之混合物，其中 TF-DCM-13 (527.2 mg)再以矽膠管柱分離純化得到 17 部分混合物，其中 TF-DCM-13-10(71.4 mg)接著以 Sephadex LH-20 進一步純化得到 6 部分混合物，最後以 HPLC 分離純化

TF-DCM-13-10-5 (6 mg)得到 7 部分混合物，又以 TF-DCM-13-10-5-5 (1.7 mg)測定後發現為 4-hydroxybenzaldehyde。此外，TF-DCM-11 (174.1 mg)經 HPLC 分離得到 vanillin 與β-sitosterol 與 stigmasterol 混合物。TF-DCM-17 (1649.5 mg)以 Sephadex LH-20 進一步純化得到 10 部分混合物，接著以矽膠管柱層析與 HPLC 分離純化得到 *p*-coumaric acid methyl ester, ferulic acid methyl ester, 4-hydroxybenzoic acid methyl ester, 4-hydroxy-3-methylbenzoic acid methyl ester, β-sitosterol 與 stigmasterol glucoside。

二、生物活性測試

(一)細胞毒殺活性測試

1. 闊葉麥門冬

將闊葉麥門冬根部粗萃物與分配萃取所劃分之四層分別進行初步細胞毒殺活性試驗，發現 LPRP-Et 濃度為 20 μg/mL 時，對於 Ca9-22 細胞株生長抑制率達 90.21 % (表二)。將 LPRP-Et 進行分離後，依矽膠薄層色層分析法(TLC)判斷，共分成 19 個 fractions (LPRP-Et-1~19)，測試此 19 個 fractions 細胞毒殺活性，在濃度 20 μg/mL 時發現 Fr. 9 對 Hep G2、Hep 3B、MCF-7 與 Ca9-22 細胞株有廣效的抑制活性，Fr. 10 對 Hep 3B 與 Ca9-22 具有中等程度的抑制效果，Fr. 15 與 16 對 Ca9-22 細胞株有顯著的毒殺活性，而 Fr. 17 則對 MCF-7 細胞株有細胞毒殺活性(表三)。

將分離純化得到的化合物 **1-11**、**13-16** 與 **20** 送測細胞毒殺活性，發現化合物(-)-liriopein B (**5**)對 Hep G2、Hep 3B、MCF-7、MDAMB-231 與 A-549 細胞株均有毒殺活性，其 IC_{50} 值分別為 15.34、11.59、19.02、16.77 與 13.00 μg/mL；化合物 (3*R*)-3-(4′-hydroxybenzyl)-5,7-dihydroxy-6-methyl-chroman-4-one (**7**)對 Hep 3B 與 A-549 細胞株有抑制效果，其 IC_{50} 值分別為 8.12 及 19.36 μg/mL；化合物 (3*R*)-3-(4′-hydroxybenzyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-6-methylchroman-4-one (**10**)則對 Hep 3B 細胞株有專一性抑制活性，IC_{50} 值為 17.46 μg/mL；化合物

3-(4′-hydroxy- benzylidene)-5,7-dihydroxy-chroman-4-one (**11**)對 Hep G2 細胞株有專一性抑制作用，IC_{50} 值為 9.58 μg/mL (表三)。

2. 臺灣油點草

從本研究所採用之臺灣油點草及闊葉麥門冬之萃取物及化合物分析中，臺灣油點草計有 18 個 DCM 部分純化物，針對部分純化物進行肝癌毒性及抗 B 型肝炎病毒活性之分析。TF-DCM-1~6, 9, 10 等 8 個部分純化物對 HpeG2 2.2.15 細胞並沒有明顯之肝癌細胞毒性（IC_{50}>320 μg/ml）（表一），其中 TF-DCM-16 對肝癌細胞毒性最強（相較於毒性對照組 5-FU: Fluorouracil 之細胞毒性結果 IC_{50}=28.2 μg/ml），其 IC_{50} 為 36.46 μg/ml。再針對純化合物進行對 HpeG2 2.2.15 細胞毒性測試。

(二)抗發炎活性測試

1. 闊葉麥門冬

將根部、地上部粗萃物與其個別分配萃取所得之劃分層分別進行抗發炎活性試驗，根部 70 %乙醇水溶液層(LPRP-Et)與地上部 70 %乙醇水溶液層(LPLP-Et)濃度在 10 μg/mL 下均能有效抑制人類白血球中性細胞 superoxide anion 的產生，抑制率分別為達 97.01 %與 101.18 %，並抑制酵素 elastase 的釋放分別達 98.08 %與 96.80 % (表四)，具有顯著之活性表現。經分離後所得之各個 fractions 及其純化合物，其抗發炎活性尚待測試。

2. 臺灣油點草

臺灣油點草之 DCM 層之抗一氧化氮合成酶之活性最強，遂將此層進一步以矽膠管柱層析分離得到 18 個部分純化物。再進行活性測試，顯示 TF-DCM-10-18 活性最強。再針對此部分進行純化，得到酚類化合物與植物固醇，其活性如圖五所示，其中以 4-hydroxybenaldehyde 對一氧化氮合成酶之活性最佳，其抑制作用顯示具有劑量相關效應，如圖六所示。

(三)抗 B 型肝炎病毒活性

1. 闊葉麥門冬

而在闊葉麥門冬抗 B 型肝炎病毒部分，目前已從所萃取之三個純化合物進行抗 B 型肝炎病毒試驗（表五），結果顯示純化合物編號 7 及 10 較具有細胞毒性（IC_{50} 分別為 22.57 及

26.06），但進一步將這兩個化合物進行非細胞毒性之濃度處理，其具有明顯之抑制 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之表現活性，處理這兩個化合物對 B 型肝炎病毒 DNA 複製也具有相當之抑制活性（SI 分別為 3.99 及 2.07）。

2. 臺灣油點草

在抗 B 型肝炎病毒活性部分，台灣油點草 TF-DCM-6, 13~18 等 7 個分液層萃取物對 B 型肝炎 HBsAg 及 HBeAg 抗原表現之抑制效果較為明顯（表一），而在抑制 B 型肝炎 DNA 複製方面，台灣油點草 TF-DCM-6, 13~18 等 7 個分液層萃取物之處理解有明顯抑制病毒 DNA 表現之效果。再針對分離得到之純化合物再進行抗 B 型肝炎病毒活性，發現化合物具有活性，如表六所示，顯示 4-hydroxybenzaldehyde 活性最強。

因此，從抗 B 型肝炎病毒活性分結果顯示，臺灣油點草及闊葉麥門冬具有抗 B 型肝炎病毒活性之成分，其中闊葉麥門冬之兩個純化合物可以進一步分析其抗病毒之分子機制，以釐清其作用方式。

三、臺灣油點草與與高山油點草之組織培養

臺灣油點草成熟蒴果開裂，其內種子呈淡褐色(圖七 a)，無菌播種於 MS 培養基 7-10 天後，胚根開始抽出，而後長出子葉(圖七 b)，繼代培養至相同培養基後可順利成苗(圖七 c、七 d)，株高 4-5 cm 瓶苗含有 3-4 節，可切取單芽進行繁殖，或是移植出瓶至網室栽培，皆能順利存活(圖七 e)。在植物組織培養部分，以 3 個採集地採得之台灣油點草(*T. formosana* Baker)單株及 2 個採集地之高山油點草(*T. ravenii* Peng & Tiang)單株做為初始材料，切取單莖節為初始培植體，採集地點及初代汙染率詳見表七。臺灣油點草地上部(圖八 a)去除葉片並切取單節芽體(圖七 b)垂直插入不含生長調節劑之 MS 培養基中進行培養 1 周後，芽體開始抽長(圖八 c)，一個月後，節芽可順利展葉發根形成完整小苗(圖八 d)，但單個芽體形成 1 顆小苗；瓶苗移植出瓶，以泥炭土為栽培介質(圖八 e)，小苗可順利生長，形成完整植株(圖八 f)。部分植株在培養 3 個月後形成花苞，正持續觀察其開花特性。

高山油點草單節芽體同樣培養在不含生長調節劑之基礎培養基，芽體抽長所需時間較臺灣油點草來得長，約需 2-3 周，部分芽體可直接發根(圖九 a)，繼代培養可順利成苗(圖九 b)，移植出瓶存活並生長良好(圖九 c、九

d)。

接著進行臺灣油點草芽體增殖條件測試，以達到大量繁殖種苗之目的。測試 BA (0, 0.5, 1 及 2 mg/l)及 NAA (0, 0.5 mg/l)兩種生長調節劑組合對芽體增殖之效率。結果顯示，5 cm 高之瓶苗約可切取得到 3-4 個節芽(含頂芽)，培養在不添加生長調節劑之培養基中，芽體大多直接抽葉形成小苗，並未有芽體增殖(圖九 a)；培養在添加 0.5 mg/l BA 或是同時添加 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 之培養基中，平均單個芽體可增殖至 1.8 個，單芽最多則可產生 3 個芽體(表八)，頂芽及莖節單芽皆可誘導新芽產生(圖十 b、十 c 及十 d)；培養在添加 2 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 之培養基，單芽平均可產生 2 個新芽，但生長速度較慢，培養 1 個月後芽體尚未完全抽長展葉(表八及圖十 e)。芽體發根率則隨著 BA 濃度提高而減少，培養在單獨添加 1-2 mg/l BA 培養基之芽體僅產生新芽而未有發根現象(表八)。高山油點草芽體培養在單獨添加 2.0 mg/l BA 或是同時含有 2 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 培養基中，則可產生 2-3 個芽體，繼代培養至不含生長調節劑之培養基中，芽體可順利抽長成苗。於臺灣油點草及高山油點草芽體誘導增殖過程，兩者皆觀察到有試管內開花(in vitro flowering)現象。臺灣油點草芽體培養在含有 BA 培養基，有 1 管芽體頂端產生花苞，肉眼可見雄雌蕊，但未能完整開放(圖十一 a)。2 個採集點搜集之高山油點草單株，經切取單節芽體進行培養，有 4 個培植體產生試管內花芽(圖十一 b、十一 c)，可見雄雌蕊(圖十一 d)，於顯微鏡下觀察到花粉型態，但花朵未完全開放即枯萎。

肆、討論

闊葉麥門冬：

本研究中發現，闊葉麥門冬根部粗萃物分配萃取之 70%乙醇水溶液層具有顯著的細胞毒殺與抗發炎活性表現，故將該層進行分離與純化工作，並進一步將分離出之純物質測試細胞毒殺以及抗發炎之活性。

闊葉麥門冬根部分離出之 26 個化合物包括十種骨架，分別為 2 個 dihydrobenzofuroisocoumarins、8 個 homoisoflavonoids、6 個 acid amides、1 個 ethyl butanoate、1 個 fatty acid、1 個 lignan、1 個 chalcone、1 個 alkaloid、3 個 benzonoids，以及 2 個 steroids 的混合物。其中包含了首次分離出之新化合物(+)-platyphyllarins A (**1**)與 B (**2**)、ethyltributanoate (**3**)、(−)-liriopeins A (**4**)與 B (**5**)，另外化合物 **6-14**、**16** 與 **18-21** 則是首次自 *Liriope* 屬分離出來，homoisoflavonoids 類化合物為主要成分，此與文獻報導中麥門冬屬植物之主要化合物 steryl glycosides 有所不同，推測乃是所針對之分劃層不同所致。新化合物 (+)-platyphyllarins A (**1**) 與 B (**2**) 屬於 dihydrobenzofuroisocoumarins 化合物，此骨架於 1909 年在 *Journal of the Chemical Society* 首次發表[32]，於 1995 年在 *Journal of Heterocyclic Chemistry* 發表相似之骨架 benzofuroisocoumarins[33]，此二篇均為藥物合成之論文，且無完整之結構鑑定分析，至此之後亦無其他相關文獻可供參考，我們首次從天然物中分離得到 dihydrobenzofuroisocoumarins 化合物，對於該兩個化合物(**1** 與 **2**)後續可建立完整之相關光譜資料，以為標準品研究用；Ethyl butanoate 化合物 ethyltributanoate (**3**)為丁酸之衍生物，其立體構型有待進一步的確定。(−)-Liriopeins A (**4**)與 B (**5**)則屬於 homoisoflavonoids，此類化合物於天然物中之發現亦屬少數。闊葉麥門冬根部 70%乙醇水溶液層之化學輪廓(標示各 fractions 中主要化合物與類別)如圖二所述。

抗癌研究方面，闊葉麥門冬分離出之化合物 **1-11**、**13-16** 與 **20** 中，化合物 **5** 對五株細胞株(HepG2、Hep3B、MCF7、MDA-MB-231 與 A549)有廣效的抑制作用，化合物 **7** 與 **10** 對於 Hep3B 之生長有抑制性，化合物 **11** 則對於 HepG2 有專一性的抑制活性。由以上結果顯示 homoisoflavonoid 類化合物應具有發展潛力，往後能以此類骨架為方向，搭配藥物化學進行一系列成分合成與修飾，冀以研究強效之抗癌之先導藥物。整體而論，所有測試之化合物皆無強效毒殺效果，因此推測對於正常細胞可能亦無毒性，對於此部份需進一步試驗，以驗證闊葉麥門冬在食用上乃為安全無虞的。

臺灣油點草：

臺灣油點草根據臺灣民間用藥為清熱利尿、解毒消腫、治感冒發燒與咽喉腫痛，但尚未有系統性與嚴謹之植物化學與藥理機制之探討。本研究根據臺灣油點草全草甲醇粗萃物之二氯甲烷層具有顯著的抗 B 型肝炎病毒與抗發炎活性表現，故將該層進行分離與純化工作，根據活性導向分離純化，並進一步將分離出之純物質測試細胞毒殺以及抗發炎之活性。結果發現具有活性之部分純化物為簡單酚類與植物固醇類，其中活性較強為 4-hydroxybenzaldehyde，已有文獻報導具有抗發炎活性[34]，但抗 B 肝病毒表面抗原活性為本研究首次發現，具有進一步探討作用機制之必要。Vanillin 與 4-hydroxybenzaldehyde 結構差異性為於苯環上鄰位為甲氧基，而抗發炎與抗病毒作用減低，而相較於此二化合物之醛基，其餘化合物為對位兩個碳之雙鍵甲酯、或單純為苯環上接有甲酯，但活性較弱。若為臺灣油點草在民間為青草茶之保健食品，其抗發炎與抗 B 肝病毒作用屬弱與中等強度，因此可謂毒性較弱，此發現與民間用藥方法符合，可以推廣為化學預防肝炎與慢性發炎導致癌症之健康食品，值得進一步研究。再者，是否為協同作用(synergistic effect)，而常見之植物固醇類為主要成分，是否為必要? 其中活性成分 4-hydroxybenzaldehyde 與 4-hydroxybenzoic acid methyl ester 之比例為何？需要進行定量分析。我們提出以水萃取物冷凍乾燥後以模擬胃液之 pH 值與胃排空時間，於實驗室內進行水解，接續以有機溶劑抽取脂溶性化合物後，與分離得到之化合物比對，即可釐清是否真為活性物質，並且可提供 PK 與 PD 之研究之用。若上述物質已不存在，則持續分離其中物質。然而，持續針對部分純化物之其餘種類化合物之分離與鑑定仍為必須，根據國立清華大學化學系陳秋明教授實驗室之研究，臺灣油點草含有生物鹼、sesamin、scopoletin 等，但以 LC-MS 以標準品與 SIM 模式偵測比對後，並未於活性部分純化物內發現存在，且以上述標準品進行抗發炎與抗 B 型肝炎病毒測試後亦無活性。未來將持續進行微量成分之分離，以釐清是否有其他活性成分。

利用組織培養繁殖生產藥用植物種苗，以無菌方式加以保存，可提供做為化學分析及醫藥研究、減少對野外種源採集壓力，並可利於國際間交流。在油點草組織培養方面之研究，Nakano 等人以 6 種油點草之花絲為初始培植體，在含有 4.5 μM 2, 4-D 及 0.45 μM TDZ 的 1/2 MS 培養基中誘導癒傷組織、體胚形成並發育成苗。之後研究指出，持續繼代培養 1 年以上癒

傷組織誘導產生之體胚苗，37 株小苗中有 9 株再生株產生多倍體化[35]。一般認為，經由芽體增殖方式有較低之變異率，本研究以 2 種油點草材料之單節芽體進行增殖，臺灣油點草所需之 BA 濃度(0.5 mg/l)較高山油點草(2.0 mg/l)低，且生長較為迅速，移植存活率亦高；高山油點草誘導芽體增殖後，移至不含生長調節劑培養基中培養，可順利發根成苗，由此可知，利用莖段上單節芽體進行增殖培養為油點草植物良好之繁殖工具。印度地區瀕危之藥用植物 Ceropegia bulbosa Roxb.同樣可應用莖節作為初始培植體，建立完整有效的大量繁殖系統[36,37]。

Britto 等人建立 *Ceropegia bulbosa* Roxb. var. *bulbosa* 大量繁殖系統，培養在含有 0.5 mg/l BA 及 1 mg/l GA3 培養基中可觀察到試管內開花現象，開花率達 76%，並可形成種子，種子萌發率達 65%[36]。本研究中，觀察到 2 種油點草材料皆有試管內開花現象，其中高山油點草材料產生比率較高，且在顯微鏡下觀察其花藥，內有花粉產生。針對高山油點草或其他稀有種油點草材料，若能建立其試管內開花，甚或試管內授粉系統，對其形態觀察或是種子蒐集極為有利。

伍、結論與建議

本計畫預計以生物活性導引分離法完成兩株臺灣本土百合科藥用植物闊葉麥門冬與臺灣油點草之活性成分分離與結構鑑定，並針對有潛力之活性組成物與有效成分進行藥理機轉研究，以開發作為健康食品及植物新藥研發。

闊葉麥門冬可供作民間藥用以及作為造景觀賞植物，而於中華本草中記載其具有養陰生津、潤肺清火等功效。雖然闊葉麥門冬與中藥麥門冬之基原乃為不同植物，但文獻記載其地下部可代用之，況且近年來人們興起崇尚天然植物保健的潮流觀念，全球對中草藥產品的需求量大增、中草藥貨源不穩定與品質良莠不齊之前提下，台灣藥用植物的開發與應用深具潛力，甚至可發展出能取代原中國產中藥之材料。因此，本研究所分離之 26 個闊葉麥門冬純物質，可以應用於闊葉麥門冬根部之 HPLC 化學成分指紋圖譜分析，以利進行闊葉麥門冬與麥門冬之成分比對，使其完成台灣原生植物取代中國產中藥材之遠景，或者利用其指紋圖譜將闊葉麥門冬成分進行品質管控，以作為發展健康食品或藥物開發之基石。

臺灣油點草在民間為清熱利尿、解毒消腫、治感冒發燒與咽喉腫痛之用，但仍缺乏系統性與全面性之藥理與植物化學物質之探討，且油點草屬植物為東亞特有植物，具有地域特殊性，因此值得發展成為保健食品，但其活性物質、作用機制與毒性評估值得進一步探索。此研究分離得到之酚類物質，其定量分析亦為必要，方可提供藥材品質管控之根據。本研究所分離之 8 個純物質，可應用於化學成分指紋圖譜分析，以進行其餘稀有油點草屬植物之成分比對，而組織培養之植株，其中成分是否與野生種有差異，有效成分之差異為何？此外，真正有效物質之確認，仍需第二年之模擬胃液水解後，並且進行結構確認，將來進行血清藥物學實驗，以釐清代謝物與代謝途徑。

本研究已建立臺灣原生油點草植物之無菌播種及組織培養系統，並觀察到試管內開花現象。將持續蒐集其他種油點草材料，並建立其種苗繁殖系統。為了確認種苗穩定性，將針對臺灣油點草及高山油點草移殖出瓶植株，進行其外表性狀、生長開花習性及染色體之觀察紀錄。並持續進行增殖及栽培，提高後續種苗數量以供化學成分分析之用。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-015 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. Hu ZF, Chen LL, Qi J, Wang YH, Zhang H, Yu BY. Two new benzofuran derivatives with anti-inflammatory activity from *Liriope spicata* var. *prolifera*. *Fitoterapia* 2011; **82**: 190-192.
2. Wang KW, Zhang H, Shen LQ, Wang W. Novel steroidal saponins from *Liriope graminifolia* (Linn.) Baker with anti-tumor activities. *Carbohydr Res* 2011; **346**: 253-258.
3. Cheng ZH, Wu T, Bligh SW, Bashall A, Yu BY. *cis*-Eudesmane sesquiterpene glycosides from *Liriope muscari* and *Ophiopogon japonicus*. *J Nat Prod* 2004; **67**: 1761-1763.
4. Jiang T, Tang XY, Wu JS, Wang LQ, Huang M, Qin LP. Study on chemical constituents of the root of *Liriope platyphylla*. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 2011; **34**: 1537-1539.
5. Jiang T, Huang B, Zhang Q, Han T, Zheng H, Qin L. Effect of *Liriope platyphylla* total saponin on learning, memory and metabolites in aging mice induced by D-galactose. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2007; **5**: 670-674.
6. Boyang Y, Xia Y, Zuyuan R, Timo Y, Chunhong Z, Guojun X. Biological activities of ruscogenin 1-*O*- [*β*-D-glucopyranosyl (1→2)] [*β*-D-xylopyranosyl (1→3)]-*β*-D-fucopyranoside from tuberous roots of *Liriope muscari* (Decne.) Bailey. *J Chin Pharmaceut Univ* 1994; **25**: 286-288.
7. Liu M, Yu B, Hui Y. First total synthesis of 25(*R*)-ruscogenin-1-yl*β*-D-xylopyranosyl-(1→3)-[*β*-D-glucopyranosyl-(1→2)]-*β*-D-fucopyranoside, an ophiopogonis saponin from the tuber of *Liriope muscari* (Decne.). *Tetrahedron lett* 1998; **39**: 415-418.
8. Liu J, Chen T, Yu B, Xu Q. Ruscogenin glycoside (Lm-3) isolated from *Liriope muscari* inhibits lymphocyte adhesion to extracellular matrix. *J Pharm Pharmacol* 2002; **54**: 959-966.

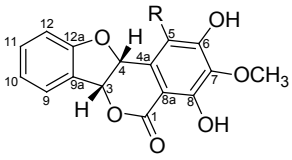
9. Lee YC, Lee JC, Seo YB, Kook YB. Liriopis tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *J Ethnopharmacol* 2005; **101**: 144-142.
10. Bai X, Chen X, Liu Y, Tian L, Zhou Q, Liu S, Fang J, Chen J. Effects of water extract and crude polysaccharides from *Liriope spicata* var. *prolifera* on InsR/IRS-1/PI_3K pathway and glucose metabolism in mice. *J Ethnopharmacol* 2009; **125**: 482-486.
11. Chen X, Liu Y, Bai X, Wen L, Fang J, Ye M, Chen J. Hypoglycemic polysaccharides from the tuberous root of *Liriope spicata*. *J Nat Prod* 2009; **72**: 1988-1992.
12. Choi SB, Wha JD, Park S. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. *Life Sci* 2004; **75**: 2653-2664.
13. Hur J, Lee P, Kim J, Kim AJ, Kim H, Kim SY. Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biol Pharm Bull* 2004; **27**: 1257-1260.
14. Kim SW, Chang IM, Oh KB. Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; **66**: 2751-2754.
15. Wu F, Cao J, Jiang J, Yu B, Xu Q. Ruscogenin glycoside (Lm-3) isolated from *Liriope muscari* improves liver injury by dysfunctioning liver-infiltrating lymphocytes. *J Pharm Pharmacol* 2001; **53**: 681-688.
16. Saito N, Tatsuzawa F, Miyoshi K, Shigihara A, Honda T. The first isolation of C-glycosylanthocyanin from the flowers of *Tricyrtis formosana*. *Tetrahedron lett* 2004; **44**: 6821-6823.
17. Tatsuzawa F, Saito N, Miyoshi K, Shinoda K, Shigihara A, Honda T. Diacylated 8-C-glucosylcyanidin 3-glucoside from the Flowers of *Tricyrtis formosana*. *Chem Pharm Bull* 2004; **52**: 631-633.
18. Ying SS: Liliaceae. In Boufford DE, Hsieh CF, Hung TC, Kuoh CS, Ohashi H, and Su HJ (eds): Flora of Taiwan, 2nd Edition. Vol. 5. Editorial Committee of Flora of Taiwan, Department of Botany, National Taiwan University, Taipei 2000; pp. 35-71.

19. Peng C I, Tiang CL, and Hsu TW: Tricyrtis ravenii (Liliaceae), a New Species from Taiwan. *Botanical Studies* 2007; **48**:357-364.
20. Fukai, S: Floral Initiation and Development of Tricyrtis Hybrida. *Tech. Bull.Fac. Agr. Kagawa Univ*. 2009; **61**:21-26.
21. Kojiro, S: Difference of light reaction on the seed germination of two Tricyrtis species and Scilla scilloides in Liliaceae. *Journal of Agricultural Science, Tokyo Nogyo Daigaku* 2000; **45**: 210-216.
22. Nakano M, Mizunashi K, Takana S, Godo, Nakata M, and Saito H: Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of Several Species in the Genus Tricyrtis. In Vitro Cell. *Dev. Biol.-Plant* 2004; **40**:274-278.
23. Murashige T, and Skoog F: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 1962; **15**: 473-497.
24. Mutanyatta J, Matapa BG, Shushu DD, Abegaz BM. Homoisoflavonoids and xanthones from the tubers of wild and *in vitro* regenerated *Ledebouria graminifolia* and cytotoxic activities of some of the homoisoflavonoids. *Phytochemistry* 2003; **62**: 797-804.
25. Nguyen AT, Fontaine J, Malonne H, Duez P. Homoisoflavanones from *Disporopsis aspera*. *Phytochemistry* 2006; **67**: 2159-2163.
26. Yahara S, Ogata T, Saijo R, Konishi R, Yamahara J, Miyahara K, Nohara T. Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. I. *Chem Pharm Bull* 1989; 37: 979-987.
27. Mühlenbeck U, Kortenbusch A, Barz W. Formation of hydroxycinnamoylamides and α-hydroxyacetovanillone in cell cultures of *Solanum khasianum*. *Phytochemistry* 1996; **42**: 1573-1579.
28. Lee C, Kim J, Lee H, Lee S, Kho Y. Two new constituents of *Isodon excisus* and their evaluation in an apoptosis inhibition assay. *J Nat Prod* 2001; **64**: 659-660.
29. Ito A, Kasai R, Yamasaki K, Duc NM, Nham NT. Lignan glycosides from bark of *Albizzia myriophylla*. *Phytochemistry* 1994; **37**: 1455-1458.
30. Tan J, Bednarek P, Liu J, Schneider B, Svatoš A, Hahlbrock K. Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in

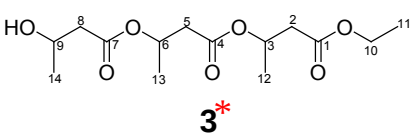
infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry* 2004; **65**: 691-699.

31. Wu XF, Darcel C. Iron - catalyzed one - pot oxidative esterification of aldehydes. *European J Org Chem* 2009; **8**: 1144-1147.
32. Perkin WH, Robinson R. Brazilin, haematoxylin, and their derivatives. Part X. The constitution of trimethylbrazilone, of α- and β-anhydrotrimethylbrazilone, and of the corresponding haematoxylin derivatives. *J Chem Soc, Trans* 1909; **95**: 381-407.
33. Yamaguchi S, Uchiuzoh Y, Sanada K. The synthesis of benzofuroquinolines. IX. A benzofuroisoquinolinone and a benzofuroisocoumarin. *J Heterocyclic Chem* 1995; **32**: 419-423.
34. Lim E-J, Kang H-J, Jung H-J, Kim J, Lim C-J, Park E-H. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of 4-hydroxybenzaldehyde. *Biomol Ther* 2008; **16**: 231-236.
35. Nakano M, Nomizu T, Mizunashi K, Suzuki M, Mori S, Kuwayama S, Hayashi M, Umehara H, Oka E, Kobayashi H, Asano M, Sugawara S, Takagi H, Saito H, Nakata M, Godo T, Hara Y, and Amano J: Somaclonal Variation in Tricyrtis hirta Plants Regenerated from 1-year-old Embryogenic Callus Cultures. *Scientia Horticulturae* 2006; **110**: 366-371.
36. Britto SJ, Natarajan E, and Arockiasamy DI: In vitro flowering and shoot multiplication from nodal explants of Ceropegia bulbosa Roxb. var. bulbosa. *Taiwania* 2003; **48**: 106-111.
37. Goyal D, and Bhadauria S: In vitro propagation of Ceropegia bulbosa using nodal segments. *Indian J. Biotech*. 2006; **5**: 565-567.

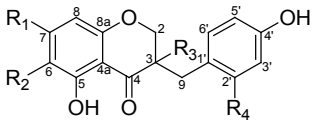
柒、圖、表



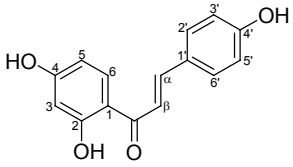
	R
1*	H
2*	OCH_3



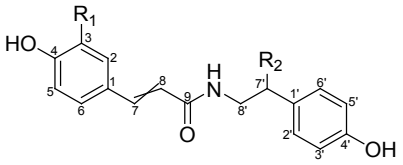
3*



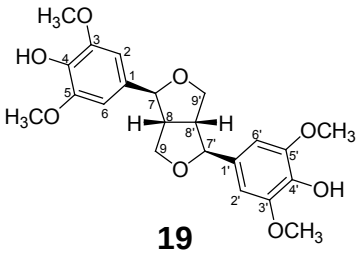
	R_1	R_2	R_3	R_4
4*	OCH_3	CH_3	α-H	H
5*	OCH_3	CH_3	α-H	OH
6	OH	H	α-H	H
7	OH	CH_3	α-H	H
8	OH	H	α-H	OH
9	OH	CH_3	α-H	OH
10	OCH_3	CH_3	β-OH	H
11	OH	H	$\Delta_{3,9}$	H



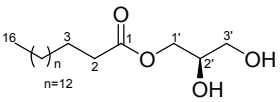
12



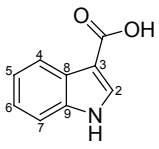
	R_1	R_2	*E*/*Z* form
13	OCH_3	α-OH	*E*
14	OCH_3	α-OH	*Z*
15	H	α-OH	*E*
16	H	α-OH	*Z*
17	OCH_3	H	*E*
18	OCH_3	β-OCH_3	*E*



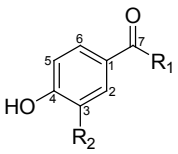
19



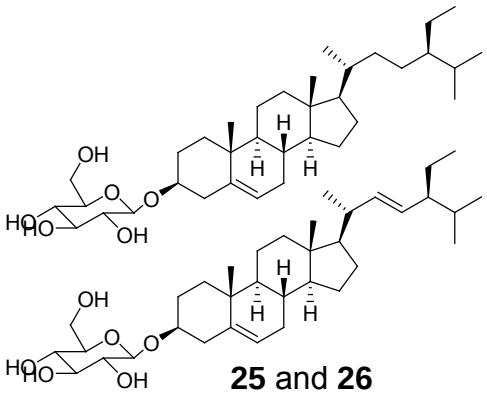
20



21



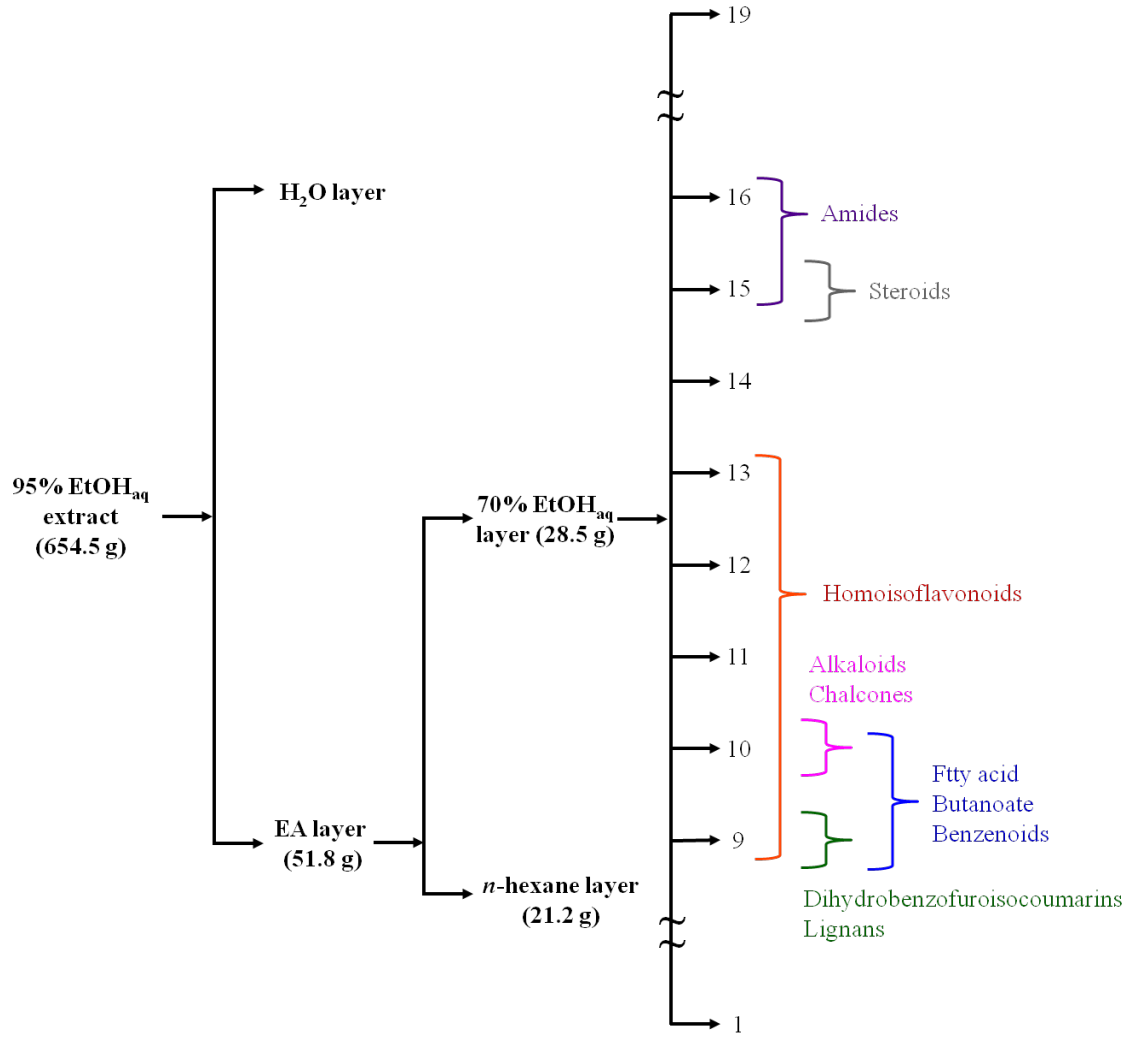
	R_1	R_2
22	H	H
23	H	OCH_3
24	OCH_3	H



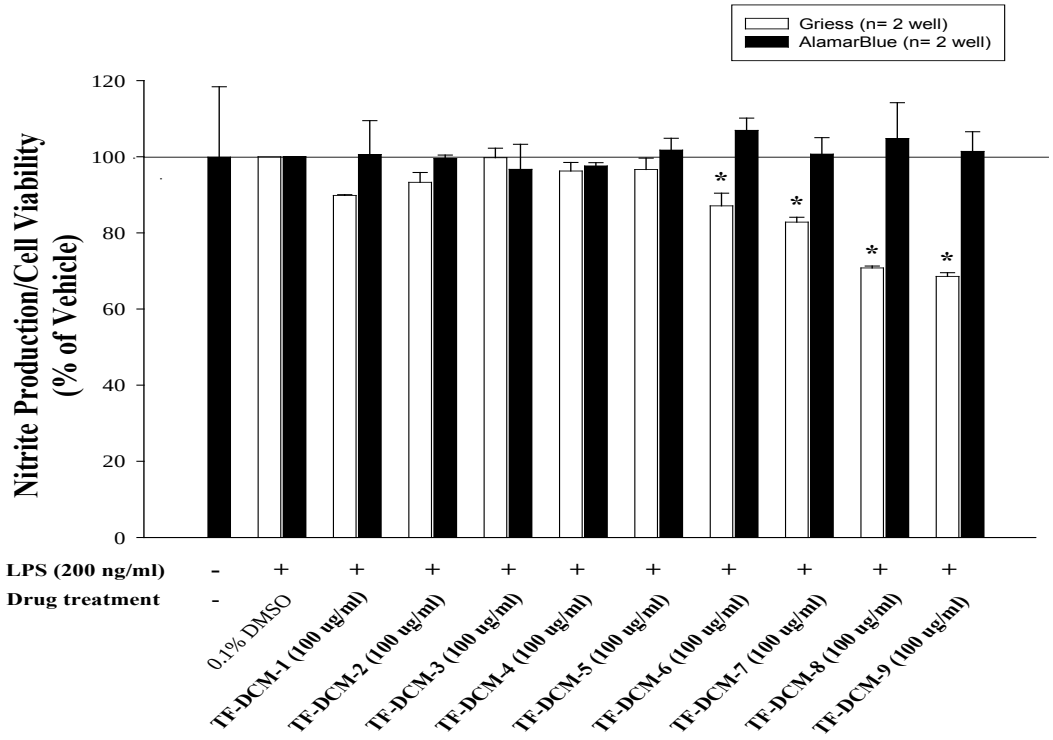
25 and **26**

* New Compound

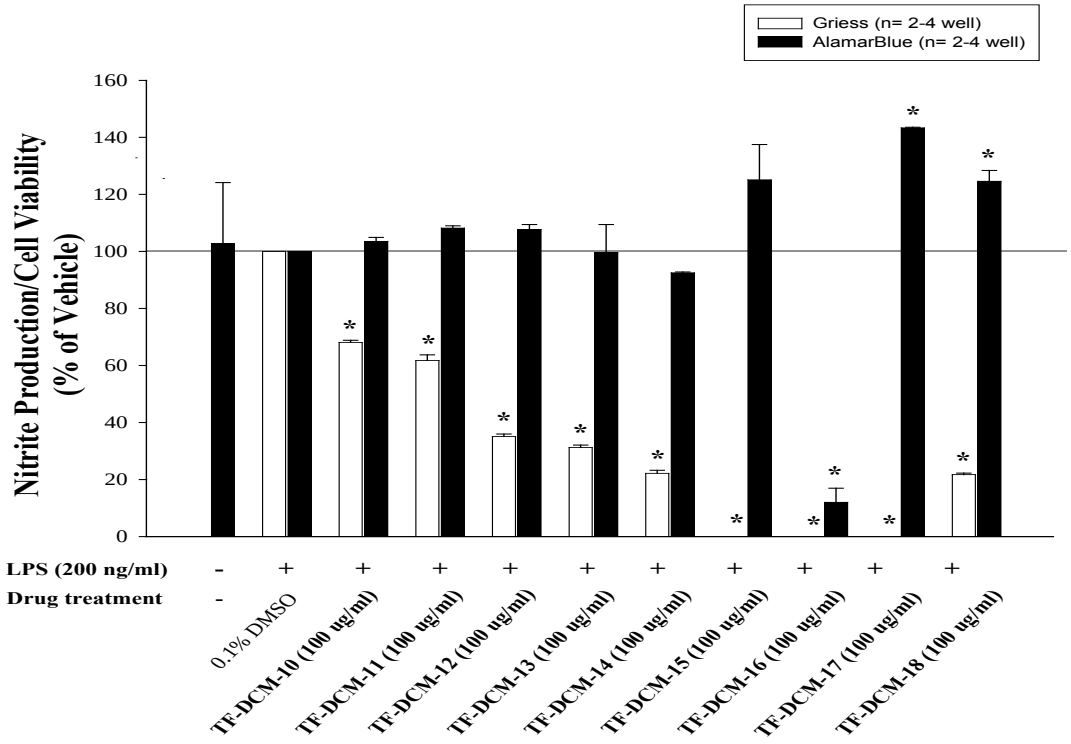
圖一、闊葉麥門冬化合物 **1-26** 之結構



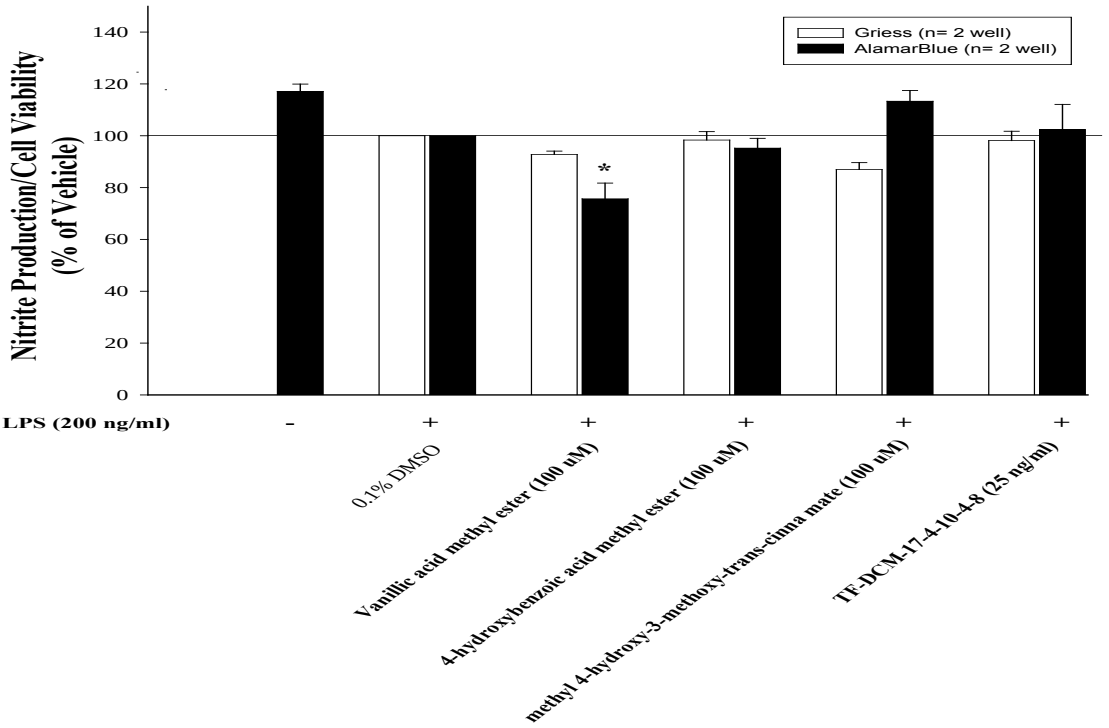
圖二、闊葉麥門冬根部 70%乙醇水溶液層之化學輪廓



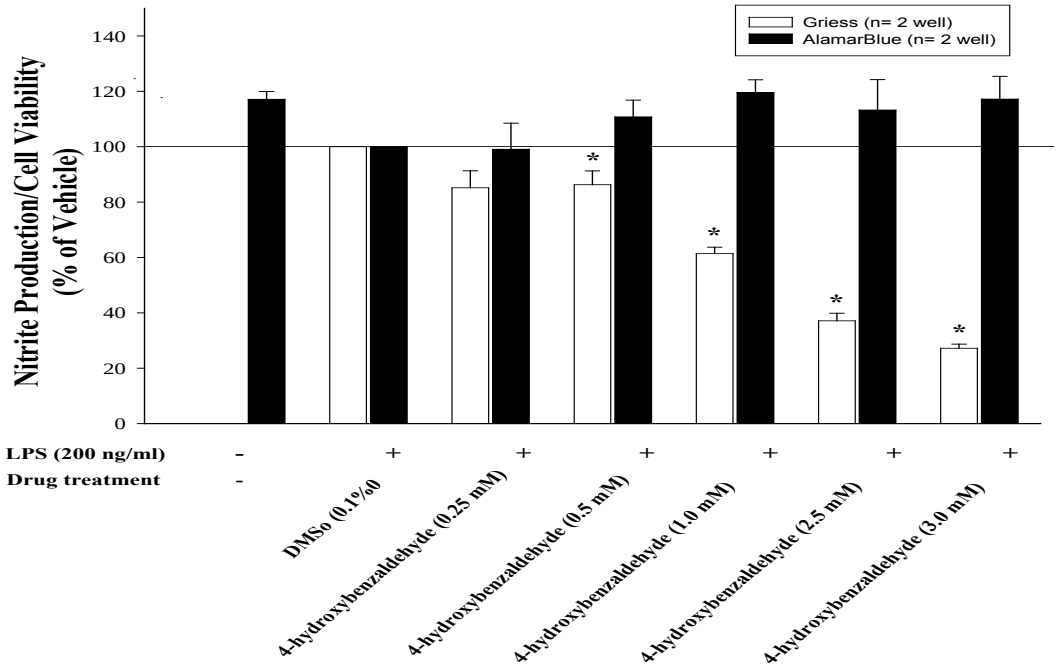
圖三、臺灣油點草 DCM 層(1-9)部份純化物對一氧化氮合成酶之抑制作用
(* $p < 0.05$ 與對照組 0.1% DMSO 比較)



圖四、臺灣油點草 DCM 層(10-18)部份純化物對一氧化氮合成酶之抑制作用
(* $p < 0.05$ 與對照組 0.1% DMSO 比較)



圖五、臺灣油點草分離得到之酚類化合物之抗一氧化氮合成 酶之活性



圖六、臺灣油點草分離得到 4-hydroxybenzaldehyde 之抗一氧化氮合成酶之活性，顯示具有劑量相關效應

(* $p < 0.05$ 與對照組 0.1% DMSO 比較)



圖七、臺灣油點草種子無菌播種、發芽、瓶苗建立及出瓶栽培

a. 臺灣油點草開裂蒴果及成熟種子

b. 種子無菌播種 7-10 天，胚根及子葉抽出

c. 繼代培養之種子苗持續生長

d. 4-5 cm 之種子苗，生長良好

e. 瓶苗移植出瓶，並以泥炭土為栽培介質



圖八、臺灣油點草初代培養、芽體增殖、移植出瓶及網室栽培

a. 臺灣油點草野外採集植株地上部

b. 初代培養之莖節培植體

c. 芽體抽長生長

d. 葉片展開、長根形成完整植株

e. 瓶苗移植出瓶

f. 出瓶 6 個月後植株生長良好



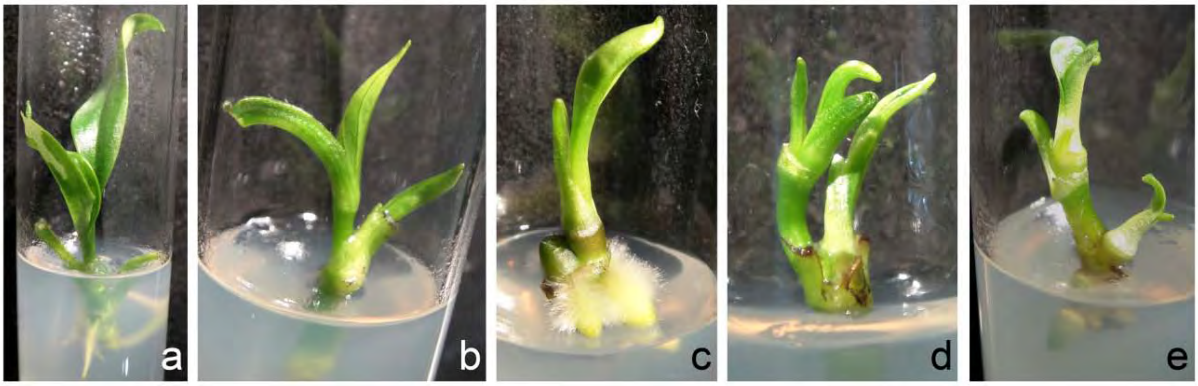
圖九、高山油點草初代培養、芽體增殖、移植出瓶及網室栽培

a. 芽體培養在不含生長調節劑之培養基上，可抽長展葉並直接發根

b. 繼代培養後，芽體直接形成完整植株

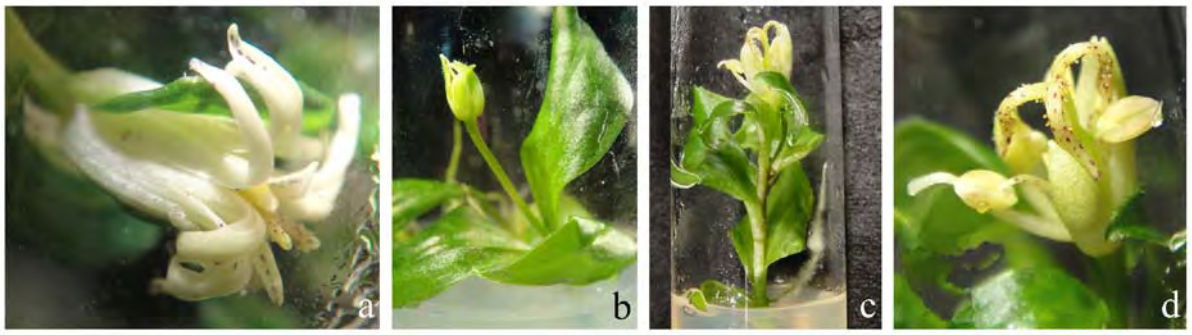
c. 瓶苗移植出瓶

d. 植株培養在泥炭土介質，生長良好



圖十、臺灣油點草單節芽體培養及增殖

a. 芽體培養在未添加生長調節劑之培養基，直接抽葉長根形成小苗
b. 頂芽培植體培養於含有 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 培養基，芽體增殖並抽葉生長
c. 莖節培養於含有 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 培養基，芽體抽長且有多量粗根產生
d. 頂芽培植體培養於含有 1.0 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 培養基，僅有芽體增殖
e. 頂芽培植體培養於含有 2.0 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 培養基，芽體生長較慢



圖十一、臺灣油點草及高山油點草試管內開花

a. 臺灣油點草瓶苗產生之試管花，可見有雄雌蕊
b. 高山油點草抽出之試管花，花朵小且尚未完整發育
c. 高山油點草瓶苗頂端產生之試管花
d. 高山油點草試管花，可見雄雌蕊及明顯花藥

表一、臺灣油點草萃取物對肝癌細胞（HepG2 2.2.15）毒性暨抗 B 型肝炎病毒活性分析：（Treated period: 3 days）

Extracts	TC_{50} (μg/ml)	HBsAg IC_{50} (μg/ml)	SI (TC_{50}/IC_{50})	HBeAg IC_{50} (μg/ml)	SI(TC_{50}/IC_{50})	Inhibition of HBV DNA replication IC_{50} (μg/ml)	SI(TC_{50}/IC_{50})
TF-DCM-1	>320	256.16	>1.25	–	–	-	-
TF-DCM-2	>320	176.91	>1.81	1692.18	>0.19	-	-
TF-DCM-3	>320	181.03	>1.77	310.57	>1.03	96.51	>3.31
TF-DCM-4	847.16	136.46	6.21	384.19	2.21	92.75	9.13
TF-DCM-5	>320	263.91	>1.21	555.36	>0.58	102.71	>3.11
TF-DCM-6	>320	215.95	>1.48	272.97	1.17	107.24	>2.98
TF-DCM-7	343.39	152.9	2.25	168.02	2.04	59.34	5.79
TF-DCM-8	266.05	70.53	3.78	153.12	1.73	20.55	12.95
TF-DCM-9	844.09	183	4.6	382.69	2.21	62.4	13.53
TF-DCM-10	850.69	174.27	4.88	244.37	3.48	73.5	11.57
TF-DCM-11	175.1	–	–	–	–	-	-
TF-DCM-12	125.15	–	–	70.66	1.77	-	-
TF-DCM-13	165.76	12.84	12.91	14.98	11.07	**16.97**	**9.77**
TF-DCM-14	147.88	11.39	12.98	14.31	10.33	**20.82**	**7.1**
TF-DCM-15	191.3	5.17	37	6.17	31	**10.04**	**19.05**
TF-DCM-16	36.46	2.62	13.92	3.06	11.92	**5.08**	**7.18**
TF-DCM-17	151.87	8.16	18.61	10.83	14.02	**11.24**	**13.51**
TF-DCM-18	200.58	36.53	5.49	50.7	3.96	**38.4**	**5.22**
5-FU*	28.2	–	–	–	–	–	–
Lamivudine (3TC) *	461.54	–	–	–	–	0.48	961.54

"–"：表示無活性

*5-FU: Fluorouracil, is the positive control of cytotoxicity
Lamivudine (3TC) is the positive control of anti-HBV

表二、闊葉麥門冬根部粗萃物之細胞生長抑制率(%) (20 μg/mL)

Cell-line sample	Hep G2	Hep 3B	MCF-7	MDAM B-231	A-549	Ca9-22
LPR	3.01	-6.32	0.86	0.86	-5.96	7.03
LPRP-H	13.27	5.09	-0.48	-0.48	-6.74	14.66
LPRP-Et	4.05	11.85	18.28	18.28	1.12	**90.18**
LPRP-B	2.08	1.99	4.63	4.63	-8.12	12.44
LPRP-W	15.62	3.44	0.19	0.188	-1.70	19.27
LPRP-Et-1	－4.61	1.06	6.82	4.95	14.80	12.53
LPRP-Et-2	－9.79	－3.46	3.06	3.81	15.86	6.78
LPRP-Et-5	－9.61	22.36	11.47	5.07	7.22	21.07
LPRP-Et-6	－18.60	1.15	2.72	5.52	9.34	－0.31
LPRP-Et-7	－19.05	－18.77	1.55	8.55	12.74	6.94
LPRP-Et-9	**58.70**	**89.69**	**71.21**	17.89	24.14	**65.98**
LPRP-Et-10	25.64	**54.85**	19.37	7.54	19.40	**55.34**
LPRP-Et-11	0.93	28.15	14.10	9.11	17.20	28.38
LPRP-Et-12	－28.59	18.53	28.06	10.82	14.02	8.66
LPRP-Et-13	1.02	0.76	25.65	20.92	22.79	40.09
LPRP-Et-14	－9.42	2.23	21.78	21.93	21.17	27.68
LPRP-Et-15	－12.06	－1.20	12.20	39.16	5.03	**89.24**
LPRP-Et-16	0.66	－2.09	34.28	47.24	4.53	**93.48**
LPRP-Et-17	18.88	－7.22	**68.08**	47.33	24.51	-
LPRP-Et-18	0.03	10.59	11.01	－3.75	－21.32	-
LPRP-Et-19	－19.19	5.06	-1.95	－9.90	－19.84	-
Doxo[a]	0.22	0.49	0.67	0.74	0.81	0.16

[a]: Postive control: Doxorubicin (IC_{50}, μg/mL)

表三、闊葉麥門冬根部純化合物之細胞毒殺活性(IC_{50}，μg/mL)

Cell-line / sample	Hep G2	Hep 3B	MCF-7	MDAMB-231	A-549	Ca9-22
1	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
2	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
3	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
4	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
5	**15.34**	**11.59**	**19.02**	**16.77**	**13.00**	-
6	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
7	NA[b]	**8.12**	NA	NA[b]	19.36	-
8	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
9	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
10	NA[b]	**17.46**	NA	NA[b]	NA[b]	-
11	**9.58**	-	-	NA[b]	NA[b]	-
13、14	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
15、16	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
20	NA[b]	-	-	NA[b]	NA[b]	-
Doxo.[a]	0.31	0.4	0.68	1.32	1.33	0.15

"-": no tested

[a]: Postive control: Doxorubicin (IC_{50}, μg/mL)

[b]: Inactive at 20 μg/mL

表四、闊葉麥門冬粗萃物之抗發炎活性

Compounds	Superoxide anion (Inh %)		Elastase release (Inh %)	
LPR	(11.20 ± 5.82)		(18.94 ± 6.77)	
LPRP-H	(29.79 ± 5.60)	**	(85.64 ± 3.95)	***
LPRP-Et	**(97.01 ± 0.97)**	***	**(98.08 ± 6.65)**	***
LPRP-B	(26.69 ± 6.65)	*	(42.57 ± 7.92)	*
LPRP-W	(4.88 ± 5.57)		(-4.66 ± 2.52)	
LPL	(44.47 ± 6.42)	***	(22.00 ± 3.97)	
LPLP-H	(30.66 ± 6.06)		(60.15 ± 3.31)	***
LPLP-Et	**(101.18 ± 1.26)**	***	**(96.80 ± 3.80)**	***
LPLP-B	(59.92 ± 4.45)	***	(48.79 ± 2.00)	***
LPLP-W	(-0.03 ± 0.74)		(6.57 ± 7.10)	

Percentage of inhibition (Inh %) at 10 μg/ml concentration.
Results are presented as mean ± S.E.M. (n = 3-4).
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with the control value.

表五、闊葉麥門冬純化合物對肝癌細胞（HepG2 2.2.15）毒性暨抗 B 型肝炎病毒活性分析：（Treated period: 3 days）

Compound	TC_{50} (μg/ml)	HBsAg IC_{50} (μg/ml)	SI (TC_{50}/IC_{50})	HBeAg IC_{50} (μg/ml)	SI(TC_{50}/IC_{50})	Inhibition of HBV DNA replication IC_{50} (μg/ml)	SI(TC_{50}/IC_{50})
7	22.57	8.97	2.52	9.97	2.26	**5.65**	**3.99**
10	26.06	34.31	0.76	11.29	2.31	**12.57**	**2.07**
15	403.52	76.96	5.24	-	-	-	-
5-FU*	28.2	–	–	–	–	–	–
Lamivudine (3TC) *	461.54	–	–	–	–	0.48	961.54

"–"：表示無活性

*5-FU: Fluorouracil, is the positive control of cytotoxicity
Lamivudine (3TC) is the positive control of anti-HBV

表六、臺灣油點草純化物暨標準品對肝癌細胞（HepG2 2.2.15）毒性暨抗 B 型肝炎病毒活性分析：（Treated period: 3 days）

Compound	TC_{50} (μg/ml)	HBsAg IC_{50} (μg/ml)	SI (TC_{50}/IC_{50})	HBeAg IC_{50} (μg/ml)	SI (TC_{50}/IC_{50})	Inhibition of HBV DNA replication IC_{50} (μg/ml)	SI (TC_{50}/IC_{50})
Vanillinic acid methyl ester	341.26	48.94	6.97			N/A	N/A
4-Hydroxybenzoic acid methyl ester	372.2	37.91	**9.82**	**175.46**	2.12	N/A	N/A
4-Hydroxy-3-methoxy-*trans*-cinnamate methyl ester	166.12	36.77	4.52	104.48	1.59	N/A	N/A
p-Coumaric acid methyl ester	–	–	–	–	–	N/A	N/A
4-Hydroxybenzaldehyde	111.96	23.54	4.76	–	–	N/A	N/A
Vanillin	125.88					–	–
5-FU*	28.2	–	–	–	–	–	–
Lamivudine (3TC) *	461.54	–	–	–	–	0.48	961.54

"–"：表示無活性

*5-FU: Fluorouracil, is the positive control of cytotoxicity
Lamivudine (3TC) is the positive control of anti-HBV

表七、臺灣油點草及高山油點草野外採集點及初代培養汙染率

種類	採集點	初代培養汙染率(%)
臺灣油點草	金瓜寮溪	37.5
臺灣油點草	蘭嶼	16.7%
臺灣油點草	南橫初來	66.7%
高山油點草	思源啞口	75%
高山油點草	合歡山	87.5%

表八、BA 及 NAA 組合對臺灣油點草芽體增殖之影響

BA (mg/l)[z]	NAA (mg/l)[z]	No. shoot/explant[y]	Rooting (%)[y]
0.0	0.0	0.8	83.3
0.5	0.0	1.8	33.3
1.0	0.0	1.5	0.0
2.0	0.0	0.5	0.0
0.0	0.5	0.3	66.7
0.5	0.5	1.8	50.0
1.0	0.5	1.8	33.3
2.0	0.5	2.0	33.3

[z] Basal medium contained MSsalts, 100 mg/l myo-inositol, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar and pH 5.7.

[y] Six explants per treatment and counted shoot numbers and rooting percentage after 1 month of culturing.

編號：CCMP101-RD-017

中草藥抗肝癌轉移之研究

林榮耀
國立臺灣師範大學

摘　要

中草藥被視為具有預防腫瘤的能力。最近研究證明中草藥藉由促進抗癌藥物的毒殺能力、減少化學療法的毒性及抑制癌細胞之侵犯與轉移而可能作為治療腫瘤療法之一。然而，中草藥中的有效組成分仍然缺少系統性的分析。我們最近的篩選發現川山椒的水萃物具有抗癌活性，其能明顯抑制癌細胞的爬行與侵犯能力。基於這些初步的研究成果，我們證明川山椒水萃物可藉由抑制血管內皮新生因子接受器-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)，並進而影響 VEGFR-2/FAK/Rac-1 訊息路徑而減少 actin filaments 的形成，進而抑制癌細胞爬行。川山椒與抗癌化療藥物交互作用研究顯示其可與 cisplatin、taxol 及 5-fluorouracil 產生協同作用，對肝癌細胞產生協同之毒殺作用，顯示川山椒可做為癌症輔助療法。此外，我們於動物模式進行川山椒抗癌活性驗證，確認於活體模式中能夠有效抑制癌細胞之轉移與生長。本計畫成果預期將發表於 SCI 期刊申請專利與技轉於國內生技製藥公司，並申請試驗中新藥以進入臨床試驗，期能通過人體試驗而發展為癌症治療輔助用藥。

關鍵詞：中草藥、川山椒、血管內皮新生因子接受器-2、癌症輔助療法

Number: CCMP101-RD-17

Investigating Anti-metastatic Mechanism of Chinese Herbal Medicine to Hepatocellular Carcinoma Cells

Jung-Yaw Lin
National Taiwan Normal University

ABSTRACT

Chinese herbal medicines (CHMs) have been considered as important sources for cancer prevention worldwide. Recent reports demonstrated that CHMs have the potential to be one kind of cancer chemotherapies by enhancing the efficacy of anticancer drugs, reducing chemotherapy toxicity and inhibiting invasion and metastasis of cancer cells. However, it needs to perform systematical identification of the effective components of CHMs. We recently identified *Zanthoxylum bungeanum* (ZB) as the potential anticancer CHMs to suppress cancer cell migration and invasion. Based on these preliminary results, we chose ZB for further investigation of the anticancer mechanism *in vitro* and efficiency evaluation *in vivo*. We found that ZB suppressed the expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2), and disrupted the formation of actin filament through modulating VEGFR-2/FAK/Rac1 pathway. The combination of ZB with cisplatin, taxol or 5-fluorouracil could synergistically enhance the cytotocicity to hepatocellular carcinoma Hep3B cells, implying ZB could be the adjuvant chemotherapy of cancers. The mouse xenograft experiments showed that the treatment of ZB significantly suppressed pulmonary metastasis and tumor growth. The results of this project will be used to publish on SCI journals, to apply for the intellectual property and the technique transfer to biomedical company in Taiwan, which will be developed to investigational new drug in the near future.

Keywords: Chinese herbal medicine, *Zanthoxylum bungeanum*, Vascular endothelial growth factor receptor-2, Adjuvant chemotherapy of cancers

壹、前言

癌症為我國十大死因之首，其發生為一連串基因體的變化，如基因突變或是基因表現的改變，致使正常細胞轉化為具有癌細胞之無限制生長、血管新生、上皮間質轉換（Epithelial-Mesenchymal Transition，EMT）、移行（migration）、侵犯（invasion）與轉移（metastasis）等相關能力(1-3)。儘管目前癌症研究旨在發掘細胞癌化成因與機轉，以及增進目前的治療效果，但其成效相當有限。肝細胞癌位居癌症致死率之第二位(4)；流行病學調查與分子細胞學研究指出肝癌好發於男性，且性激素活化之訊息傳遞路徑與肝癌之性別差異有極大關聯(5)。引發肝細胞癌的因素主要為 B 型及 C 型肝炎感染、長期酗酒與長期攝入受黃麴毒素所汙染的食物(6)。目前肝癌的治療方式以手術切除及化學治療（化療）為主，其中手術切除主要針對原發性肝癌，轉移性或是無法手術切除腫瘤的患者，則須採用其他療法。化療利用抑制癌細胞快速分裂與生長之藥物治療癌症，但會同時殺死正常組織細胞而引發副作用，造成疲勞、噁心、嘔吐與腎臟毒性等不適症狀(7)，再加上療效有限與費用昂貴，使得患者放棄療程，尋求互補性或替代療法（Complementary and Alternative therapy）。

中草藥醫療即為現行廣泛使用的互補性或替代療法之一。自古以來中草藥的治療多以病症表徵來判斷用藥，因此多以經驗傳承，但隨著生物醫學的進步，許多中草藥的療效在細胞以及活體動物模式中得到了實證，並且得以了解其作用機轉與活性成分(8)，有些中草藥或其成分甚至經臨床實驗後已商品化，用以治療疾病。其中，抗癌機轉的實證研究佔了中草藥研究的極大部分。越來越多的研究顯示中草藥的防癌及抗癌能力，甚至與化療藥物合併使用時具有協同作用，可加乘療效並減少副作用的發生(9,10)。我們最近即發現官真癀（*Aeginetia indica* Linn.）水萃物具有抑制癌細胞增生與轉移的能力；且可與 5-fluorouracil（5-FU）產生協同作用(11)。我們近期篩選了十種中草藥的抗癌活性，發現川山椒（*Zanthoxylum bungeanum Maxim*）水萃物可有效抑制肝癌細胞株生長、移行與侵犯能力。川山椒廣布於中國，其生長快速，約三年即熟成，為長久以來所使用的辛香料之一(12)。最近的研究指出川山椒可抑制 macrophage 因 lipopolysaccharide 刺激所產生的 iNOS mRNA 表現(13)，但川山椒的抗癌能力則是缺乏研究，因此本研究進一步於細胞及動物實驗研究其抗癌功效。

貳、材料與方法

中草藥萃取液之製備

中草藥萃取液由民間的藥廠股份有限公司提供。藥材以每 1 公克萃取成 1ml 的無菌包裝。農藥或重金屬等檢驗將提請該民間藥廠提供以做為安全衛生之檢驗。

細胞培養（Cell culture）

人類肝癌細胞株 Hep3B、HepG2 與 Huh7 培養於含有 10% fetal bovine serum（FBS）(Hyclone, Logan, Utah)、2 mM L-glutamine、100 U /ml penicillin 與 100 U /ml streptomycin 之 RPMI（Invitrogen）培養液，並置於 37℃及 5% CO_2 之培養箱中。

MTT assay

Hep3B 細胞以不同濃度之中藥處理 24 小時後，移除舊 medium，將 100 μl 含 MTT（0.5 mg/ml）之 medium 加入各 well，於 37℃培養 4 小時，加入 100 μl 含 10%SDS 與 0.01N HCl 的溶液作用，以 ELISA reader 測定其在波長 570 nm 的吸光度。其 IC_{50}-C 即代表藥物能抑制 50%癌細胞生長之毒殺濃度。

細胞移行能力分析（Transwell cell mobility assay）

細胞 migration 能力以 Transwell Boyden Chamber（BD Biosciences）測定。經中草藥處理之細胞以不含 FBS 之 medium 接種於 transwell chamber 並培養 12 小時後，以 10% formaldehyde/PBS 固定及 0.5%結晶紫染色，再以倒立顯微鏡觀察並記錄移行至 transwell chamber 底部的細胞。

細胞侵犯能力分析（Matrigel invasion assay）

侵犯能力分析進行之前，先於 transwell chamber 先覆蓋 Matrigel (Colaborative Biomedical)。懸浮 1×10^6 細胞於不含 FBS 之 medium 並接種至覆蓋 Matrigel 之 transwell chamber 中培養 18 小時，以 10% formaldehyde/PBS 固定及 0.5%結晶紫染色，再以倒立顯微鏡觀察並記錄侵犯至 transwell chamber 底部的細胞。

以 Tumor cell xenograft mice 分析中草藥抗癌作用

抑制腫瘤轉移之分析

5×10^5 Hep3B 細胞經尾靜脈注射於 NOD-SCID mice 體內，並以口服給予川山椒水萃物(3.45g/kg)，每日記錄小鼠體重。經 45 天後，犧牲小鼠取其肝臟與肺臟進行觀察是否有發生腫瘤轉移，經福馬林固定後進行組織切片

染色以觀察藥物是否可抑制腫瘤轉移與生長。

本計畫之動物實驗遵照國立臺灣大學醫學院與國立臺灣師範大學實驗動物中心管理辦法並經實驗動物管理委員會核准。

即時聚合酶連鎖反應定量分析（Quantitative real-time PCR analysis）

細胞之 total RNA 以 TRIzol™（Invitrogen）試劑萃取並以 RNase-free DNase I (Takara)處理以去除 DNA，RNA 再以 SuperScript™ II Reverse Transcriptase kit 反轉錄成 cDNA。即時 PCR 反應以 iCycler iQ Real-time PCR detection system (Bio-Rad)進行。其反應條件為：95℃ 15 分鐘、40 個循環的 95℃ 10 秒，之後為 60℃ 45 秒，最後並進行 dissociation procedure 以確認 PCR 增幅之引子專一性。GAPDH 基因表現量將做為 internal control。相對基因表現量以$-\Delta Ct = (Ct_{gene} - Ct_{GAPDH})$呈現，而基因表現變化量則以$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$計算之。

西方轉漬分析（Western blot analysis）

經中草藥處理之細胞先以 PBS 清洗後，再以 RIPA buffer （含 1% Nonidet P-40、0.1% SDS、0.5% sodium deoxycholate、5 mM EDTA 與 Roche protease inhibitor）溶解。以 bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce)測定蛋白質濃度後，進行 SDS-PAGE 並轉漬至 PVDF membrane，經 blocking 後加入一級抗體並於 4℃反應 18 小時，接以 TBST 清洗 PVDF membrane 三次。之後加入適當之二級抗體於室溫反應 1 小時，再以 TBST 清洗三次。最後，利用 enhanced chemiluminescence（ECL）系統與二級抗體上所結合之 Horseradish peroxidase 進行反應產生冷光，並以 FUJIFILM 冷光影像分析系統觀察記錄。

Rac-1 活性分析（Rac-1 activity assay）

Hep3B 細胞以中草藥處理 24 小時並清洗後，以 lysis buffer （含有 50 mM Tris pH 7.6、150 mM NaCl、1%Triton X-100、0.5 mM $MgCl_2$ 與 Roche protease inhibitor）溶解。取 600 μg 總蛋白質與接有 Rac binding domain of p21 activated kinase 1 protein（PBD domain）之 GST beads 混合作用隔夜後清洗三次，並以 western blot 分析所結合具活性之 Rac-1 量。

藥物協同作用分析

藥物協同作用分析將採用 Chou 與 Talalay 所發展之研究方法以計算 combination index （CI）(14)。按中效方程式（median-effect equation）計算出不同抑制率時兩種藥物單獨與合併使用的濃度，公式如下：$D = Dm [f_a/(1 - f_a)]^{1/m}$；公式中 D 為藥物濃度，Dm 為中效濃度，fa 為細胞增生抑

制率，m 為斜率。兩種藥物合併使用之 CI 計算公式如下：CI ＝ (D) 1/(Dx) 1 ＋ (D) 2/(Dx) 2 其中(Dx) 1 和(Dx) 2 分別為兩種藥物單獨使用時產生某一抑制效果 fa 時的濃度，(D) 1 和(D) 2 則是兩種藥物合併使用時產生相同效果 fa 時各自所需的濃度。如果 CI<1，兩種藥物合併使用時為協同作用（Synergism），CI=1 為加成作用（Additive effect），而 CI>1 則為拮抗作用（Antagonism）。

高效液相色層分析（High-performance liquid chromatograghy，HPLC）

川山椒水萃物採用 Agilent Series 1100 (Agilent, Wilmington, Germany) 系統進行 HPLC 分析。樣品以 Hypersil ® ODS (C18)管柱(250x4.6mm, 5μm)進行成分分離。mobile phase 組成為(A) Acetonitrile 與(B)水。(A)/(B)在四十分鐘裡從 20/80 線性增加為 90/10。管柱流速為 0.5ml/min，進樣量為 2μl。檢測波長為 210nm。

資料分析（Statistics analysis）

實驗所得結果將以平均值±標準差顯示，並利用 SigmaPlot 統計軟體進行統計分析，當 $p<0.05$ 表示具顯著差異。

參、結果

川山椒抑制 Hep3B 細胞 Proliferation、Migration 及 Invasion，及 VEGFR2 與 EGFR 活化

我們由十種中草藥篩檢出川山椒具低毒性與高抑制肝癌細胞 Hep3B 移行（migration）與侵犯（invasion）能力（圖一）。因細胞骨架之變化與癌細胞移行侵犯能力相關，故進一步利用 phalloidin 染色並以共軛焦顯微鏡觀察 actin filament 之形成，結果顯示川山椒處理 Hep3B 後明顯地抑制 actin filament 之形成，顯示川山椒藉由影響 actin filament 而抑制 Hep3B 之移行侵犯（圖二）。先前的研究顯示受體型酪胺酸激脢，如 vascular endothelial growth factor receptors （VEGFRs）與 epidermal growth factor receptor（EGFR），其不正常表現或活化經常出現在癌症形成過程中，因此我們研究該受體是否與 FAK 的活性降低有關，進而抑制癌細胞的爬行。本研究以川山椒水萃物處理肝癌細胞 Hep3B 後，確實造成 VEGFR-2 與 EGFR 表現量降低（圖三）。

川山椒透過抑制 FAK/Rac-1 抑制 Actin Filament 的形成

前述川山椒處理 Hep3B 後明顯地抑制 actin filament 形成（圖二），為了更深入研究其相關機轉，我們檢測參與 actin filament 調控的相關分子。我們發現川山椒抑制 FAK 的活性（磷酸化降低）（圖四（A））。我們更進一步確認 Rho GTPase family 是否參與其中，發現川山椒水萃物對於 Rac-1 活性的影響。利用 GST-PBD pull down assay 分析川山椒水萃物的處理是否影響 Rac-1 與 GTP 的結合，我們發現川山椒水萃物並不影響 Rac-1 蛋白的表現量，但顯著地抑制其活性，因而使得結合至 GTP 的 Rac-1 量減少（附圖四（B））。此外，actin 聚合（G actin/F actin ratio）分析顯示川山椒抑制 F actin 的形成（圖四（C））。以上的結果顯示川山椒藉由抑制 VEGFR-2/FAK/Rac-1 訊息傳遞而影響 actin filament 的形成，進而抑制細胞移行與侵犯。

川山椒抑制 Akt 與 NF-κB 的活化

本研究進一步探討川山椒水萃物是否可以影響細胞內訊息傳遞分子，我們發現川山椒水萃物抑制 Hep3B 細胞中 Akt 的磷酸化（圖五）。Akt 為細胞內重要的訊息傳遞分子，與細胞存活、增生及血管新生等有重要關連性。此外，川山椒水萃物亦降低 IκB 的磷酸化（圖五），NF-κB 為 Akt 下游所影響的轉錄因子，而其平時在細胞質與 IκB 結合，受到上游的刺激後 IκB 被磷酸化而與 NF-κB 分離，使得 NF-κB 得以進入細胞核活化下游基因。

川山椒抑制 Hep3B 細胞於 NOD-SCID 小鼠之轉移

為了探究川山椒於活體是否亦具有抗癌功效，我們於 NOD-SCID 免疫缺陷小鼠尾靜脈注射肝癌細胞建立異種移植（xenograft）小鼠模式，並以食道餵管餵食川山椒水萃物（3.45g/kg）45 天。餵食川山椒水萃物並未造成小鼠死亡或是體重降低，顯示所使用之劑量其對於小鼠並未造成毒性反應。由圖六顯示，給予小鼠川山椒水萃物有效地抑制癌細胞轉移至肺部及其生長。

川山椒與 cisplatin、taxol 及 5-FU 協同抑制 Hep3B 細胞之生長

近來有許多的研究指出中草藥療法可做為現行癌症化學治療之輔助療法（15-17），可加乘化療藥物之療效或降低副作用。因此本研究選擇了 taxol、adriamycin、cisplatin 及 5-FU 等藥物，分析川山椒與這些藥物是否具協同作用。我們所採用的分析方法為 Chou 與 Talalay 所發展的 combination index（CI）（14），是目前使用於探討藥物間交互作用的分析方法，當 CI<1、CI=1 或 CI>1 分別表示藥物間具有協同（synergy）、加成（additive）或拮抗作用(antagonism)。由圖七與表一顯示，川山椒與 taxol、cispatin 或 5-FU 具有協同作用，且川山椒與 cisplatin 之交互作用在所使用的濃度中皆具有協同作用，而與 taxol 或 5-FU 也在廣泛的濃度範圍內具有協同作用，綜上所述，川山椒與 taxol、cispatin 或 5-FU 具協同作用，將來可進一步於小鼠活體模式中證實其輔助抗癌功效，並期待進入臨床試驗發展為抗癌藥物。

川山椒活性成分分析

為了找尋川山椒水萃物中抗肝癌轉移的有效成分，我們利用高效液相色層法分離其中的化合物。結果顯示大部分的極性化合物在最初的十分鐘即被洗提沖出，而非極性化合物幾乎無法偵測其存在。過去的研究指出川山椒揮發油成分含有多種羥基甲位山椒醇（hydroxy-a-sanshool），其中含本實驗使用之芳樟醇（Linalool），其在吸收波長為 210nm 與過去結果相吻合，且滯留時間所洗提的非極性分子與川山椒水萃物結果相似，因此可作為標準進一步佐證川山椒水萃物的成分。

肆、討論

近來的研究證明中草藥藉由促進抗癌藥物的毒殺能力、減少化學療法的毒性及抑制癌細胞之侵犯與轉移，而可做為抗癌藥物，因而促使中草藥抗癌研究之興盛。然而，中草藥中的有效組成分仍缺乏系統性的分析。本研究發現川山椒水萃物具低毒性與高抑制肝癌細胞 Hep3B 移行與侵犯能力，進一步分析顯示川山椒透過抑制 VEGFR-2/FAK/Rac-1 訊息路徑抑制 actin filament 形成，而減少癌細胞的轉移（圖九）。此一現象亦於活體小鼠模式得到驗證，餵食川山椒水萃物之異種移植小鼠，其肺部並未發現腫瘤的形成。延伸此一研究，我們探討川山椒做為現行化療藥物輔助療法之可行性，發現川山椒與 cisplatin、taxol 及 5-FU 合併使用具有協同作用。綜上所述，川山椒為一具潛力之抗癌藥物。

轉移為癌症惡化的關鍵指標，且是造成患者死亡的主要原因，而癌細胞的移轉與侵犯能力在此過程中扮演重要角色。其中 VEGFR-2 的過度活化或表現在許多的惡性腫瘤中皆可發現。VEGFR family 包含三個 receptor tyrosine kinases－VEGFR-1、VEGFR-2 與 VEGFR-3，在胚胎與腫瘤血管新生時扮演重要的角色（18）。在之前的研究中已顯示 FAK 與 VEGFR-2 所調控的細胞移行有關（19），且 VEGFR-2 可透過活化 Rac-1 而影響細胞移行（20）。此外，活化的 VEGFR-2 可調控 PI3K，造成下游 Akt 的活化（21,22）。Akt 為細胞內重要的 kinase，其負責葡萄糖代謝、細胞增生、apoptosis 與細胞移行等功能，且其下游透過 NF-κB 等轉錄因子活化基因的表現。本研究發現川山椒可抑制 VEGFR-2 及上述受其調控之分子的活化，顯示川山椒對此路徑有較強的抑制能力，但詳細的機轉仍需更多實驗數據佐證。對於 VEGFR-1 與 VEGFR-3 本研究亦進行分析，初步結果顯示川山椒對於 VEGFR-1 並不具抑制作用，但減少了 VEGFR-3 的表現量（結果未顯示）。VEGFR-3 與淋巴管形成有關（23），且參與腫瘤細胞侵襲至淋巴結(24,25)，因此腫瘤轉移中亦扮演重要角色，進一步訊息調控路徑如 ERK1/2 路徑將更深入研究。

中草藥的抗癌研究除了著重於毒殺癌細胞與抑制轉移外，近來亦興起輔助性療法之功效研究。如 curcumin 或 paeonol 分別皆可與 cisplatin 產生協同作用（15,26,27），提高癌細胞對於化療藥物的敏感性，使得化療藥物在臨床使用降低劑量的可行性提高。本研究探討川山椒與 taxol、adriamycin、cisplatin 及 5-FU 等藥物合併使用時是否具有協同作用，結果顯示川山椒與

cisplatin 合併使用時，在廣泛的濃度範圍造成不同程度細胞生長抑制的狀況下，兩者之間皆具有協同作用；此外，川山椒與 taxol 或 5-FU 亦具協同作用，但這兩種藥物皆在較高的作用濃度時失去與川山椒的協同作用。根據文獻指出，抗腫瘤藥物之間通常在較高的作用濃度（Fa > 0.8）具有較佳的協同作用（28），但 taxol 或 5-FU 在此作用濃度下與川山椒皆不具協同作用（圖七與表一），反觀 cisplatin 與川山椒合併使用時，無論在高或低作用濃度皆具有協同作用，顯示此兩種藥物在合併使用時，濃度有較廣泛之選擇性，因此在將來進一步深入探究協同作用時，應先採用川山椒與 cisplatin 進行分析。輔助性療法研究顯示川山椒與 taxol、cispatin 或 5-FU 具協同作用，將來若有機會可就其相關機轉，如 cisplatin 結合至 DNA 造成後續 DNA damage 的狀況是否在共同處理川山椒後使其更嚴重等更深入研究，以釐清其協同作用之機制。

川山椒水萃物的成分具有高極性，一般高效液相色層法常用的腈（Acetonitrile）/水的流動相無法有效的分離各個化合物，極性差異更高的流動相如磷酸（Phosphoric acid）/三乙胺（Triethylamine）可提高敏感性，達到分離的效果。唯獨應釐清水萃物成分是否可與磷酸/三乙胺均勻混溶並且不發生化學變化。目前研究指出川山椒之成分多為 essential oil，含有多種羥基甲位山椒醇（hydroxy-a-sanshool）如芳樟醇（linalool）等（29），另同為香料的山葵（wasabi，*Wasabia japonica*）之主要具療效之成分為異硫氰酸丙烯酯(allyl isothiocyanate)，如 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate 與 6-(methylthio)hexyl isothiocyanate（30），故兩者之成分在本質上不同，其對於細胞的效應應也不同，但在進一步分析時可同時進行比較分析。

伍、結論與建議

我們的研究成果顯示川山椒水萃物可於 *in vitro* 與 *in vivo* 透過 VEGFR-2/FAK/Rac-1 或是 Akt 訊息傳遞路徑，抑制肝癌細胞的生長與轉移。此外，川山椒與 cisplatin、taxol 及 5-FU 合併使用具有藥物間協同作用，具有做為輔助性療法之潛力。

惟本計畫受限於時程僅約九個月，川山椒之抗癌機轉調控研究未臻完善，若能延續本研究，可就其細胞內調控機轉做更深入之研究，並於活體模式驗證其輔助效療效。相當感謝行政院衛生署中醫藥委員會及評審委員給予我們一個機會，得以將中草藥的抗癌功效進行實證分析，也期盼本研究成果可以再延伸，發展為具改善癌症患者健康與生活品質之中草藥，並提升台灣相關生技產業。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-017 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

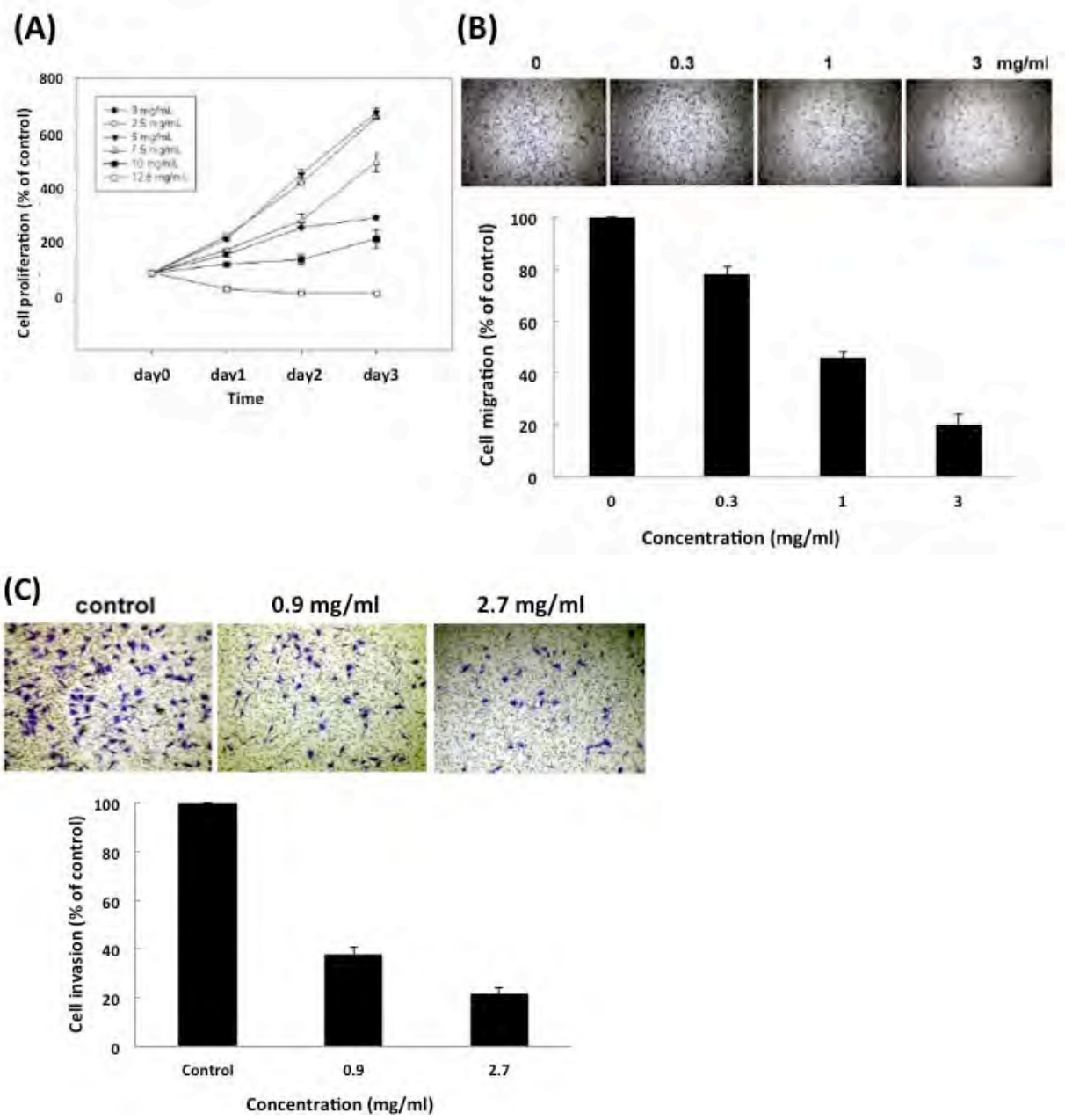
陸、參考文獻

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
2. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009;9:265-73.
3. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*;10:9-22.
4. 行政院衛生署統計室2009年死因統計，2011年12月7日取自行政院衛生署統計公佈欄 (http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_2.aspx?now_fod_list_no=11962&class_no=440&level_no=4)
5. Yeh SH, Chen PJ. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. Oncology. 2010;78:172-9.
6. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127(5 Suppl 1):S5-S16.
7. Redmond K. Advances in supportive care. *Eur J Cancer Care (Engl)*1996; 5:1-7.
8. Konkimalla VB, Efferth T. Evidence-based Chinese medicine for cancer therapy. *J Ethnopharmacol* 2008;116:207-210.
9. Cui Y, Shu XO, Gao Y, Wen W, Ruan ZX, Jin F, Zheng W. Use of complementary and alternative medicine by chinese women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;85: 263-270.
10. Richardson MA, Sanders T, Palmer JL, Greisinger A, Singletary SE. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. *J Clin Oncol* 2000;18:2505-2514.
11. Liu YH, Li ML, Hsu MY, Pang YY, Chen IL, Chen CK, Tang SW, Lin HY, Lin JY.2012. Effects of a Chinese Herbal Medicine, Guan-Jen-Huang (Aeginetia indica Linn.), on Renal Cancer Cell Growth and Metastasis. Evid Based Complement Alternat Med. [Epub ahead of print]
12. Yang FX, Su YQ, Li XH, Zhang Q, Sun RC. Studies on the preparation of biodiesel from Zanthoxylum bungeanum Maxim seed oil. J Agric Food Chem. 2008; 56:7891-6.

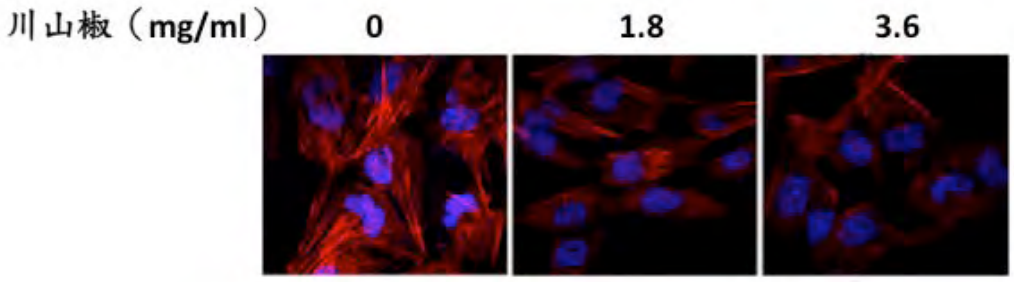
13. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of Zanthoxylum bungeanum. J Ethnopharmacol. 2001; 77:209-17.
14. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Advances in Enzyme Regulation. 1984; 22:27-55.
15. Chanvorachote P, Pongrakhananon V, Wannachaiyasit S, Luanpitpong , Rojanasakul Y, and Nimmannit U: Curcumin sensitizes lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through superoxide anion-mediated Bcl-2 degradation. Cancer Invest 2007; 27: 624-635.
16. Liu Y, Ling Y, Hu W, Xie L, Yu L, Qian X, Zhang B, and Liu B: The Herb Medicine Formula 'Chong Lou Fu Fang' Increases the Cytotoxicity of Chemotherapeutic Agents and Down-regulates the Expression of Chemotherapeutic Agent Resistance-related Genes in Human Gastric Cancer Cells In Vitro. Evid Based Complement Alternat Med 2009
17. Matsui Y, Watanabe J, Ikegawa M, Kamoto T, Ogawa O, and Nishiyama H: Cancer-specific enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity with triptolide through an interaction of inactivated glycogen synthase kinase-3beta with p53. Oncogene 2008; 27: 4603-4614.
18. Olsson A, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling-in control of vascular function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7:359-371.
19. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. J Biol Chem. 1997; 272:15442–15451.
20. Hart MJ, Callow MG, Souza B, Polakis P. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. EMBO J. 1996; 15:2997–3005.
21. Dayanir V, Meyer RD, Lashkari K, Rahimi N. Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. J Biol

Chem. 2001; 276:17686–17692.
22. Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. J Biol Chem. 1999; 274:16349–16354.
23. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. Am J Pathol. 2000; 156:1499–1504.
24. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. EMBO J 2001; 20:672–682.
25. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med 2001; 7:186–191.
26. Xu SP, Sun GP, Shen YX, Peng WR, Wang H, and Wei W: Synergistic effect of combining paeonol and cisplatin on apoptotic induction of human hepatoma cell lines. Acta Pharmacol Sin. 2007; 28: 869-878.
27. Wan XA, Sun GP, Wang H, Xu SP, Wang ZG, and Liu SH: Synergistic effect of paeonol and cisplatin on oesophageal cancer cell lines. Dig Liver Dis. 2008; 40: 531-539.
28. Chou TC: Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Research. 2010; 70: 440-446.
29. Wei S, Zhang H, Wang Y, Wang L, Li X, Wang Y, Zhang H, Xu X, and Shi Y. Ultrasonic nebulization extraction-heating gas flow transfer-headspace single drop microextraction of essential oil from pericarp of Zanthoxylum bungeanum Maxim. J Chromatogr A. 2011; 1218:4599-4605.
30. Nomura T, Shinoda S, Yamori T, Sawaki S, Nagata I, Ryoyama K, and Fuke Y. Selective sensitivity to wasabi-derived 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate of human breast cancer and melanoma cell lines studied in vitro. Cancer Detect Prev. 2005; 29:155-60.

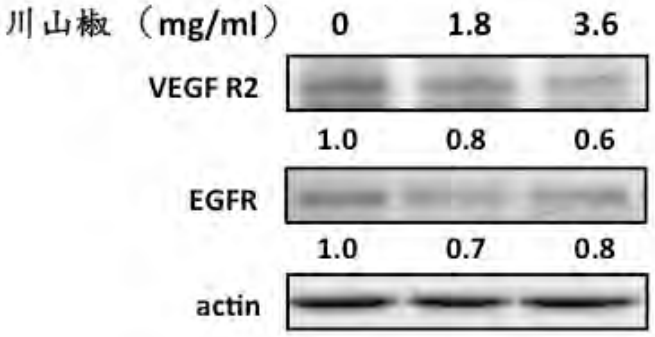
柒、圖、表



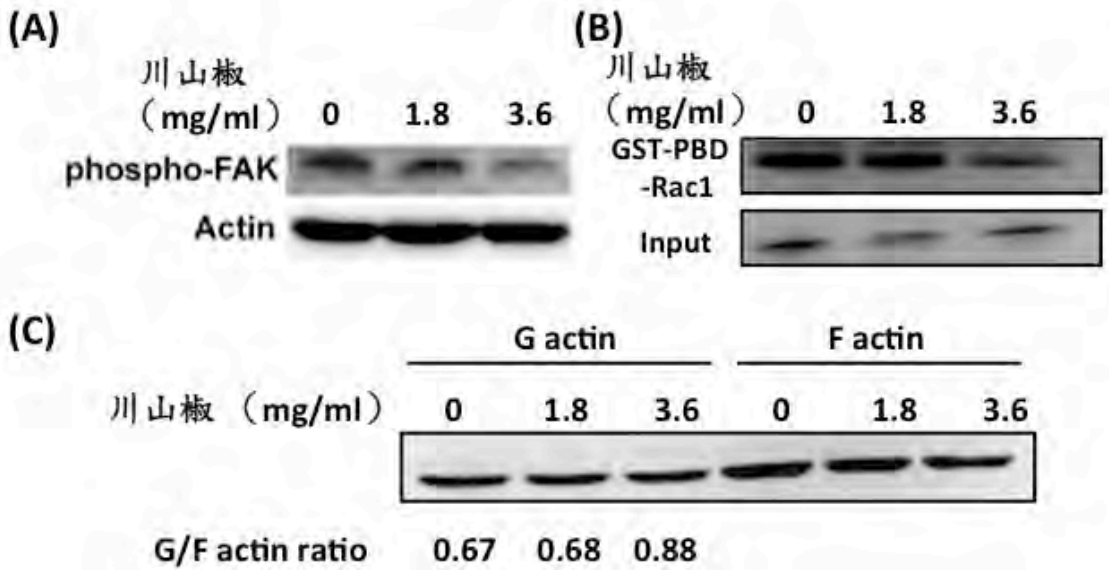
圖一、川山椒對於肝癌細胞 Hep3B 之 Proliferation、Migration 及 Invasion。（A）以 MTT assay 分析川山椒抑制肝癌細胞 Hep3B 之生長。（B）接種 5×10^4 Hep3B 細胞於 transwell chamber 中，並以 0.3、1 或 3 mg/ml 之川山椒處理 12 小時。固定與染色移行至 transwell chamber 底部之細胞後，以光學顯微鏡觀察並計數其數量，決定其移行能力。（C）接種 5×10^4 Hep3B 細胞於 matrigel transwell chamber 中，並以 1X（0.9 mg/ml）或 3 X IC_{50}M（2.7 mg/ml）之川山椒處理 12 小時。固定與染色移行至 transwell chamber 底部之細胞後，以光學顯微鏡觀察並計數其數量，決定其侵犯能力。



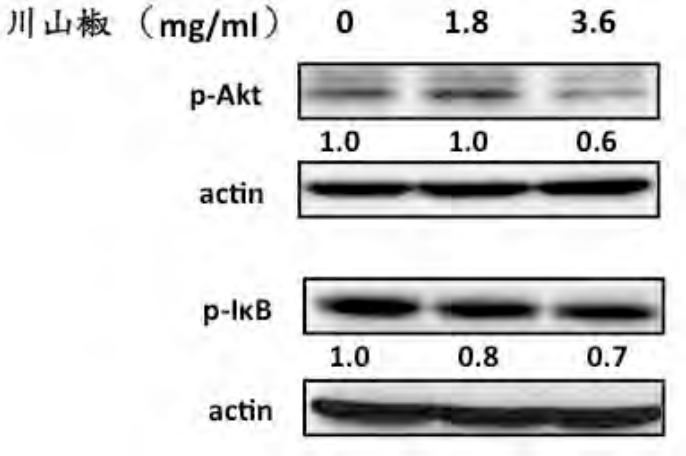
圖二、**川山椒抑制肝癌細胞 Hep3B 之 Actin Filament 的形成。**（A）2×10^5 Hep3B 細胞以 2X（1.8 mg/ml）或 4 X IC_{50}M（3.6 mg/ml）之川山椒處理 12 小時後，分別以 Phalloidin（紅色）及 Hoechst（藍色）染色並以 confocal microscope 觀察 Actin Filament 及細胞核。



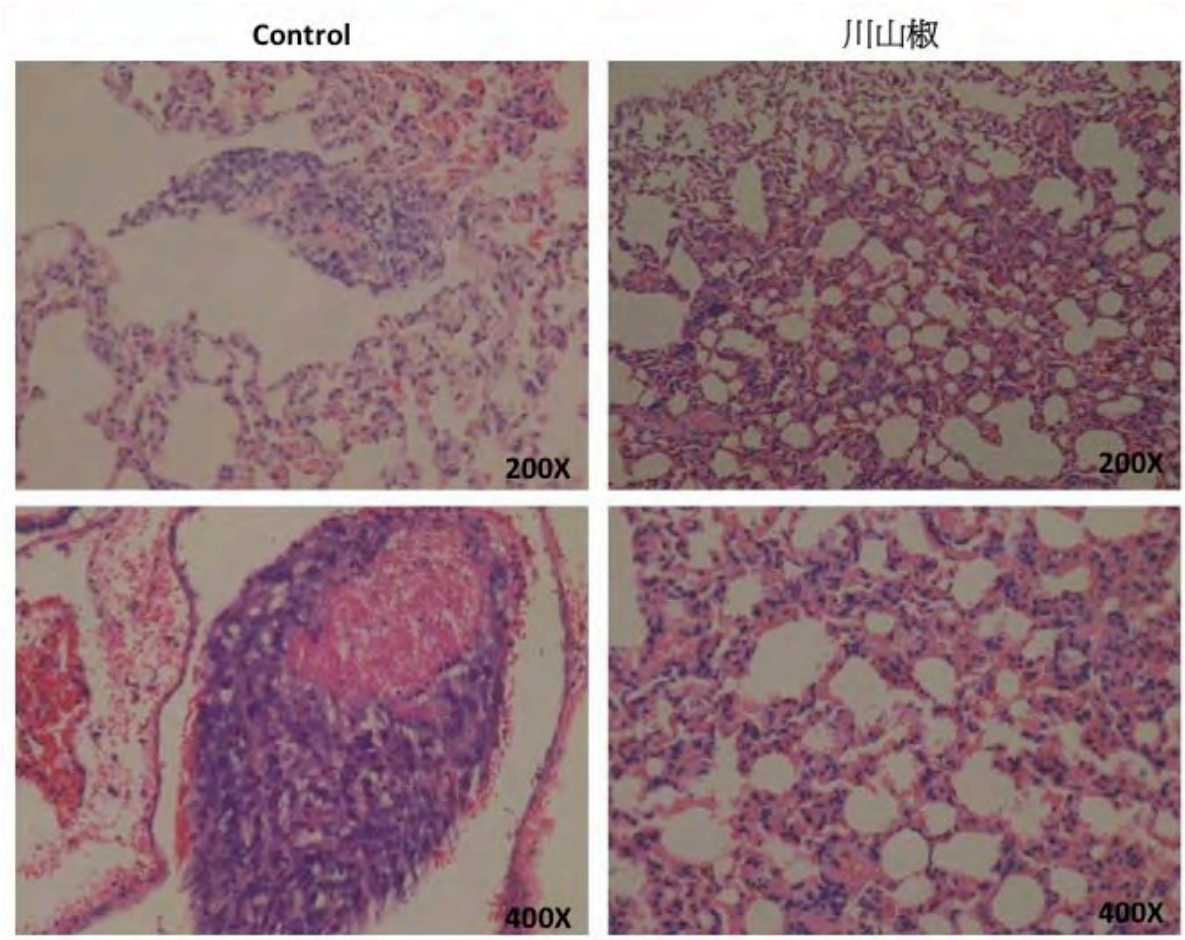
圖三、**川山椒水萃物對於 VEGFR-2 與 EGFR 受體型酪胺酸激脢的抑制作用。**Hep3B 細胞株在經川山椒水萃物處理後進行免疫轉漬法分析 VEGFR-2 與 EGFR。actin 為 loading control。



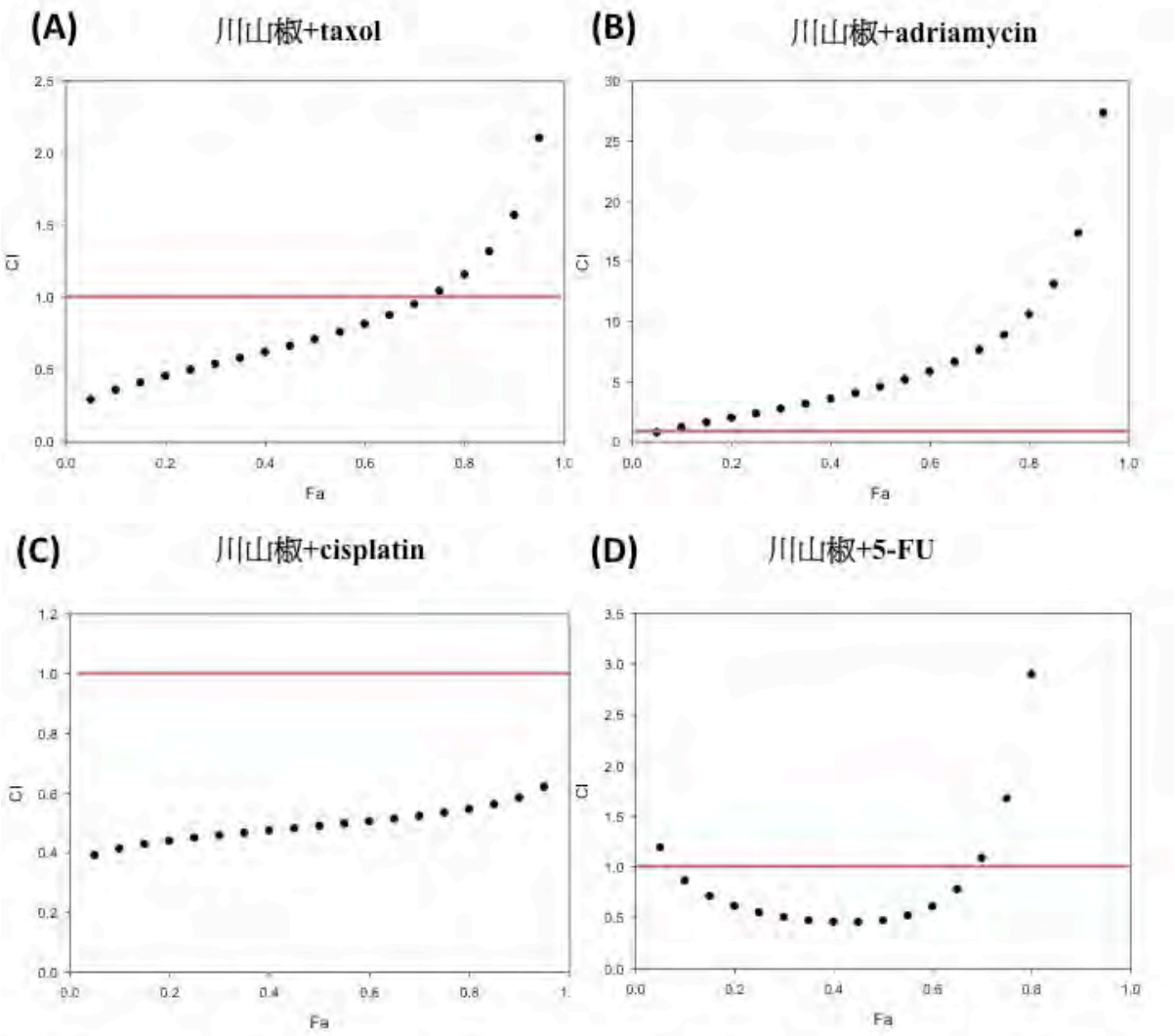
圖四、（A）Hep3B 細胞以川山椒處理後，以 western blot 分析川山椒對於 FAK 磷酸化之影響。（B）Hep3B 細胞在經川山椒處理後進行 GST-PBD pull down assay 以檢測與 GTP 結合之 Rac-1 蛋白的量。（C）Hep3B 細胞以川山椒處理後，利用 Phalloidin 分離 G-actin 與 F-actin 並進行相對比例分析（G/F ratio）。



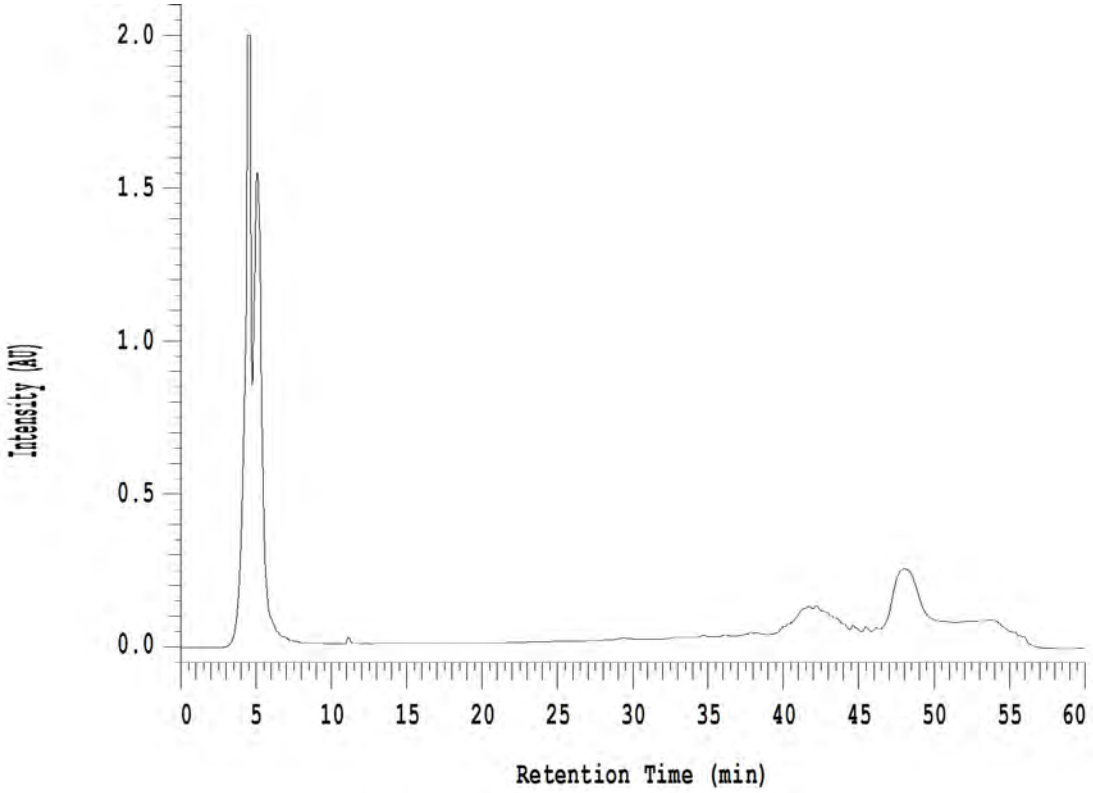
圖五、**川山椒水萃物對於 Akt 訊息傳遞路徑的影響**。Hep3B 細胞株在經川山椒水萃物處理後進行免疫轉漬法分析 Akt 與 IκB 磷酸化程度。IκB 受到 Akt 磷酸化後與 NF-κB 分離，使得 NF-κB 得以進入細胞核活化下游基因。actin 為 loading control。



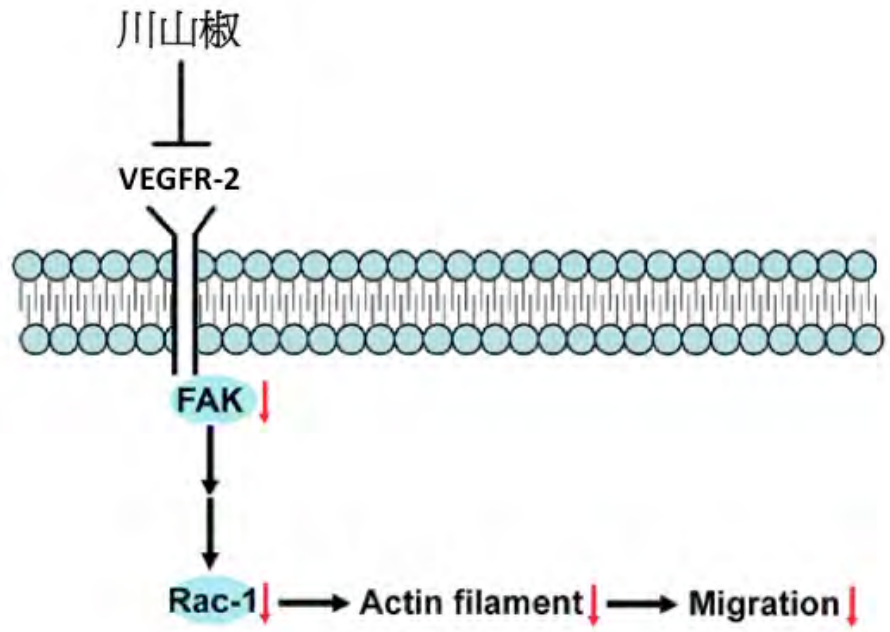
圖六、川山椒抑制異體移植肝癌細胞之生長。5×10^5 Hep3B 細胞經尾靜脈注射於 NOD-SCID mice 體內，並以口服給予川山椒水萃物(3.45g/kg)。經 45 天後，犧牲小鼠取其肺臟並經福馬林固定後進行組織切片染色以觀察腫瘤轉移與生長。



圖七、川山椒與化療藥物之交互作用。川山椒分別與（A）taxol、（B）adriamycin、（C）cisplatin 與（D）5-FU 處理細胞，並以 MTT assay 分析細胞存活率。Fa 為藥物抑制細胞增生之比例，0 為未處理藥物之細胞生長狀態。紅線下的點顯示為藥物間有協同作用。



圖八、川山椒成分分析。以 HPLC 分析川山椒水萃物之成分，但大部分的極性化合物在最初的十分鐘即被洗提沖出，而非極性化合物幾乎無法偵測其存在。



圖九、川山椒抑制肝癌細胞移行的可能機轉。

表一、川山椒與不同藥物合併使用時，在抑制細胞存活 20%、30%、50%、70%與 80%時之 CI 值

	藥物合併使用抑制細胞存活百分比時之 CI 值				
	20%	30%	50%	70%	80%
川山椒＋taxol	0.45	0.54	0.71	0.95	1.16
川山椒＋adriamycin	1.96	2.72	4.55	7.61	10.57
川山椒＋cisplatin	0.44	0.46	0.49	0.52	0.55
川山椒＋5-FU	0.61	0.50	0.47	1.08	2.90

編號：CCMP102-RD-005

以動物及細胞實驗評估蛇床子與蛇床子素對血管內皮前驅細胞作用之研究(2-1)

侯文琪、李泰霖、呂岳霖、黃群耀
臺北醫學大學

摘　要

蛇床子為中國傳統藥材，主要用於殺蟲止癢、溫腎壯陽。其活性主成分為蛇床子素，具有降血壓、抗糖尿病、抗胰島素抗性與抗發炎等活性。本計劃將探討蛇床子抽取物及蛇床子素對於內皮前驅細胞之影響，並餵食小鼠蛇床子抽取物與蛇床子素，評估是否會增加周邊血液之內皮前驅細胞數目。蛇床子藥材進行一般成分分析與蛇床子含量符合臺灣中藥典（第二版）規範；同時進行藥材組織切片與鑑定，確定購買之藥材無誤。以乙醇抽取物（約 6%產率）進行區分萃取得到乙酸乙酯區分物、正丁醇區分物與水層區分物，產率介於 0.32% （最低）～4.65%（最高）；其蛇床子素含量最高達 30.69%，最低為 0.66%。分別以熱水、不同濃度乙醇與甲醇、丙酮所得之各別抽取物的產率介於 1.63%（最低）～8.6%（最高）；抽取物蛇床子素含量最高達 31.26%，最低為 0.66%。在區分物與抽取物細胞毒性分析，區分物部分：乙酸乙酯區分物在 62.5 μg/mL；正丁醇區分物在 125 μg/mL；水層區分物在>1000 μg/mL 以下（含）無明顯毒性；抽取物部分：熱水抽取物在 500 μg/mL；乙醇抽取物在 62.5 μg/mL；甲醇抽取物在 125 μg/mL；丙酮抽取物在 62.5 μg/mL 以下（含）無明顯毒性。抽取物與區分物在正常培養環境下對於內皮前驅細胞的增生並沒有明顯促進作用；對於部分抽取物或區分物在低濃度下有促進內皮前驅細胞生成一氧化氮。抽取物與區分物進行管柱形成試驗結果顯示，皆有促進內皮前驅細胞的管柱形成，其中乙醇抽取物具有濃度相關(1~40 μg/mL)活性。抽取物與區分物對於內皮前驅細胞移行活性並無明顯促進活性。小鼠餵食四周後，以流式細胞儀分析血管內皮前驅細胞群，結果顯示餵食蛇床子有增加血管內皮前驅細胞的細胞數量。

關鍵詞：蛇床子、蛇床子抽取物、血管內皮前驅細胞、管柱形成

Number: CCMP102-RD-005

Functional Evaluation of Cnidii Fructus and Osthole on Endothelial Progenitor Cells by Animal and Cell Models (2-1)

Wen-Chi Hou, Tai-Lin Lee, Yeh-Lin Lu, Chun-Yao Huang
Taipei Medical University

ABSTRACT

Common Cnidium Fruit is a traditional Chinese medicine that used externally to kill worms and relieve itching. And internally, it was used mainly on warming the kidney. Osthole, the main active component in Common Cnidium Fruit, is found to exhibit biological activities, including anti-hypertension, anti-diabetes, anti-insulin resistance, anti-inflammation et al. The aim of this project in this year is to investigate the effects of extracts of Common Cnidium Fruit and osthole on human endothelial progenitor cells (EPCs) in vitro and oral administration toward normal mice in vivo to check the changes of EPC numbers. The Common Cnidium Fruit is firstly checked to pass the standard of the Taiwan Herbal Pharmacopeia (the second edition) for the general compositions, osthole contents and tissue identification. Then, each Common Cnidium Fruit is extracted by ethyl alcohol and then partitioned into ethyl acetate fraction, n-butanol fraction and water fraction (the recovery is ranged from 0.32% to 4.65%; the osthole content is ranged from 0.66% to 30.69% by using LC-MS/MS technique) or extracted either by hot water, ethyl alcohol, methanol, or acetone (the recovery is ranged from 1.63% to 8.6%; the osthole content is ranged from 0.66% to 31.26%). The different extracts or fractions show different levels of cytotoxicity, NO productions, tube formations in EPCs, however, no stimulatory activity on EPC proliferations. The ethyl alcohol extracts show dose-dependent (1 to 40 μg/mL) stimulatory activity on tube formations and migrations. Each fraction and extract do not show significantly stimulatory activities on EPC migration. It is found that the oral administrations of Common Cnidium Frui for 4-weeks can stimulate the increases of EPC populations checked by flow cytometry.

Keywords: Common Cnidium Fruit, extracts of Common Cnidium Fruit, endothelial progenitor cells (EPCs), tube formation

壹、前言

依據歷年衛生署之死亡統計報告[1]，心血管相關疾病長期以來均名列於國人十大死因排行榜之前茅，其死亡率總和，甚至僅略低於均位居於榜首之癌症，死亡之人數也逐年攀升。國民醫療會計帳之統計資料也顯示，近五年來，循環系統疾病之醫療開銷，均佔個人醫療開銷之 10%以上，在總額方面，其醫療費用從 94 年度的 697 億元不斷上升至超過 800 億元[2]，顯示國人心血管系統疾病不斷的增加，亦顯示此類疾病之預防與治療仍具有相當之開發空間。以年齡來看，相關開銷自 50 歲開始劇增，大於 60 歲後，甚至均超過 15%，相較於腫瘤隨著年齡增加反而有劇減之趨勢來看，循環系統疾病隨年齡增加穩定維持高度開銷之原因，勢必與其疾病之發展進程較慢有關，也因此，發展相關預防性或治療性保健品或藥品相對來說將具有較大之臨床與商業利益。

動脈粥狀硬化(atherosclerosis)為一種動脈血管系統慢性發炎之疾病，發生之過程相當的複雜，由多種細胞（包括巨噬細胞、內皮細胞與平滑肌細胞…等）、組織與器官（肝、肥胖組織...等）間交互作用而成，其中並有數千種分子參與[3]。整個疾病的進程可分為數個階段，起先，血管內皮經由損傷或其他刺激造成活化，大量的細胞黏附分子(cell adhesion molecule)表現於內皮細胞表面，加上部分刺激因子之分泌，使得巨噬細胞浸潤，浸潤之巨噬細胞吞噬了低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)並加以氧化形成氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, oxLDL)，在無法經由高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)有效去除之情況下，大量 oxLDL 累積在巨噬細胞內形成泡沫細胞(foam cell)，其釋放更多的發炎物質，促使周邊血管發炎反應加劇，進而導致更多白血球之累積、平滑肌細胞之移行與增生、細胞外基質之重組以及細胞內脂質不斷的累積，泡沫細胞與平滑肌細胞在過程中會不斷壞死，形成一個壞死中心(necrotic core)，斑塊(plaque)就此成形[4, 5]。動脈粥狀硬化相關的疾病包括冠狀動脈性心臟病(coronary heart disease)、頸動脈疾病(carotid artery disease)、周邊血管疾病(peripheral arterial disease, PAD)與慢性腎臟疾病(chronic kidney disease)。周邊血管性疾病之廣義定義為一條或多條動脈血管因動脈粥狀硬化而造成部分或全部之阻塞之疾病，臨床上則多指下肢末梢血管之疾病狀態[6~9]。動脈粥狀硬化相關之血管疾病，危險因子均為高齡、高血壓、高血脂、抽煙與糖尿病...等，其中糖尿病與抽煙史更是誘發動脈粥狀硬化與促使病程推進之最高危險因

子。治療上，戒煙被視為絕對必須之要素，其次為生活、飲食習慣之改變與危險因子之控制，如血壓、血脂、血糖之控制；再者，抗血栓與抗血小板藥物之投予，可進一步預防疾病之惡化與再發；或需考慮以外科手術或心導管手術對栓塞之部位進行處理 [10, 11]。

血管內皮前驅細胞(endothelial progenitor cells, EPCs)為一具有能力進一步分化為內皮細胞之細胞群體，由骨髓所生成，可於周邊血液與臍帶血中分離獲得，到目前為止，其來源與特性，尚未有統一之定義[12~15]。過去，科學家認為血管內皮細胞之修復以及血管新生倚靠的是已成熟的血管內皮細胞之複製及分化，不過仍有部分證據顯示，源自於骨髓且流動於周邊血液中之單核球，亦可能具有此種功能。直到西元 1997 年，Asahara 等人[16]自人體周邊血單核球群體中，分離出細胞表面帶有 CD34 表面抗原之細胞，此類細胞可以在體外以及體內的實驗中分化成為成熟的血管內皮細胞，並在動物下肢缺血的實驗中證實能促進並參與微小血管之新生，血管內皮前驅細胞之存在才得以獲得初步證實。由於功能上為增殖、分化為血管內皮細胞，目前認為，血管內皮前驅細胞在身體內主要參與血管修復、血管新生(angiogenesis)與動脈生成(arteriogenesis)等血管相關工作[13, 14]。一般的生理狀態下，血管內皮前驅細胞會移動到血管內皮受傷之部位，對血管進行修補；當局部區域需要較多血流而發生血管新生與動脈生成時，血管內皮前驅細胞亦受刺激移動於此進行分化。不過近年來部分研究發現，血管內皮前驅細胞受到腫瘤組織缺血下釋放之物質所吸引與刺激，亦會協助腫瘤組織之新血管生成(neovascularization)與血管新生，使腫瘤可以吸取更多的營養而增長[17, 18]，此一發現仍有爭議，目前仍繼續探討中。

血管內皮前驅細胞源自於骨髓，但其作用位置位於周邊的組織，因此，調控血管內皮前驅細胞於骨髓之中之增殖、其啟動至周邊血液循環中與接續將其趨化至需要修復或新生血管之處，則受到許多系統調控[12~14, 18]。目前已知，纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor, FGF)、基質細胞衍生因子(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、顆粒球–單核球聚落刺激因子(granulocyte monocyte-colony stimulating factor, GM-CSF)、以及血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)…等類泌素(paracrine)活化骨髓中的 MMP-9 (matrix metalloproteinase 9)活性；將 membrane-crossing Kit ligand (mKitL)轉為 solubility Kit ligand (sKitL)進而自骨髓中將血管內皮前驅細胞釋放，同時這些類泌素之濃度梯度也將扮演誘導之角色，使血管內皮前驅細胞移動至缺血處；缺血組織所大量表現出之貼附分子，如

P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)、β1 和β2 integrins…等，會與血管內皮前驅細胞上之相關受器與分子相互作用，使細胞停留或移行至所需位置，協助血管修補、生成與新生之進行。近年來累積之研究資料顯示，在不同疾病、生活狀態與藥物使用下，血管內皮前驅細胞之數量與功能性會有不同之改變[12, 19, 20]，有時血液分析的數量呈現增加之狀態，但細胞活性卻呈現明顯之下降情況，吸菸就是明顯的例子。也因此，對於血管內皮前驅細胞之相關藥物或功能性食品開發，必須考量到有效化學物質對微小環境之作用是否足以讓血管內皮前驅細胞保有其功用，而非單純僅考慮其影響數量之增加。

蛇床子（Common Cnidium Fruit，生藥名為 Cnidii Fructus）為一年生繖形科草本植物蛇床[*Cnidium monnieri* (L.) Cusson]之乾燥成熟果實，性溫，味辛苦，有小毒。入腎、脾經。外用燥濕殺蟲止癢，內服溫腎壯陽,祛風燥濕[21]。蛇床子之化學成分組成主要為香豆素類化合物(coumarins)，其中蛇床子素(osthole)為含量最高者，約為藥材乾重之 1.67-2.88% [22]；此外還有色酮類(chromones)以及苯並呋喃類(benzofurans)化合物。揮發油之含量約為 1.3%，其中倍半萜類化合物(sesquiterpenes)約佔 85%，酯類約佔 7%，萜類化合物(terpenoids)則約佔 2% [23]。藥理活性方面，蛇床子具有止癢[24, 25]、降血壓[26, 27]、抗過敏[28]、抗發炎[29]、抗菌[30]、抗病毒[23]、抗骨質疏鬆[31]、抗腫瘤[32, 33]與肝臟保護[34, 35]等作用，且其作用幾乎均與蛇床子素相關。此外，以蛇床子素進行的研究尚包括抗血小板凝集[36]、抑制平滑肌細胞生長[37]、降血糖[38]、改善胰島素抗性[39]、調控神經傳導物質釋放[40]與保護神經[41]等作用。本實驗室進行的初步篩選結果，我們認為蛇床子與蛇床子素對血管內皮前驅細胞於各種微環境下，可能有其調控之能力，深具開發之潛力。期能以此計畫能對蛇床子與蛇床子素於血管疾病之預防與治療上，建立基礎，為後續臨床研究鋪路。

貳、材料與方法

一、蛇床子之採購與鑑定：

委託購買蛇床子藥材。一般檢定包括乾燥減重（5008）、總灰分與酸不溶性灰分（5004）、水抽提物與稀乙醇抽提物（5006）分別依照臺灣中藥典（第二版）之方法 5008, 5004, 5006 測定；另委請 TAF 認證之中藥廠協助蛇床子藥材組織切片與基原鑑定。

二、蛇床子區分物與抽取物之製備與蛇床子素定量：

(一)區分物之製備

1.8 公斤蛇床子加入 12 公升之 95%酒精，加熱迴流 6 小時(80℃水浴)。重複萃取 2 次過濾，合併浸膏共 106.60 g。加入乙酸乙酯與正丁醇分別萃取，得乙酸乙酯層、正丁醇層與水層的區分物，減壓濃縮，定量。

(二)抽取物之製備

蛇床子各 480 克，分別加入 10 倍體積溶劑(100％丙酮、50%與 95％酒精、50%與 100％甲醇、水)，於 65℃下，進行迴流加熱抽取 2 小時。抽取液減壓濃縮，定量。

(三)蛇床子素定量

依據臺灣中藥典（第二版），配製蛇床子素(第 228 頁)標準溶液與檢測樣品配製；建立 LC-MS/MS 方法測定原料、區分物與抽取物中蛇床子素含量。

三、血管內皮前驅細胞試驗

使用的血管內皮前驅細胞是由臺北醫學大學附設醫院心臟內科黃群耀醫師實驗室，自孕婦臍帶血內分離取得單核細胞，利用培養之方法，驅使貼附性單核細胞分化為類內皮前驅細胞，其具有攝取 Dil-acLDL 的特性，並含有 CD31、CD34、KDR、VE-cadherin 與 vWF 五種表面抗原之表現。

(一)細胞存活率試驗

血球計數器計算其細胞數，並將細胞數調整為 $1x10^4$ cells/well，以 50 μL/well 加入細胞培養用 96 孔盤，輕微晃動使細胞均勻散布後，放入細胞培養箱培養 3 小時，待細胞貼於底部後，分別加入 50 μL 已配好所需濃度之欲檢測樣品，輕微晃動使其混合均勻。放入細胞培養箱培養24小時。達到欲藥物作用的時間後，加入100 μL之 1.76 mM resazurin，使其最終濃度為 880 μM。放入 37˚C 含 5%

二氧化碳且充滿水氣的細胞培養箱約 50 分鐘後，將其取出，並以螢光微盤測定儀以激發波長 560 nm 搭配發散波長 590 nm 濾片測量螢光強度。

(二)細胞增生試驗

使用 BrdU 嵌入試驗進行測試。將細胞懸浮於低培養基補充物之培養基中，於96孔細胞培養盤之每個孔洞中加入1×10^4個細胞，移至二氧化碳培養箱中，於 37℃、5%二氧化碳與高濕度下培養 24 個小時進行同步，移除培養基並更換為含 5%培養基補充物之培養基，同時加入待測樣品，於培養箱中培養 72 個小時。達最終培養時間前 12 小時，加入 BrdU 試劑於各培養孔中繼續培養，待試驗完成後，加入固定液進行固定，完成固定後，以沖洗液進行沖洗，加入 BrdU 偵測抗體，靜置於 4℃冰箱中過夜。隔日，移除 BrdU 偵測抗體，以沖洗液沖洗後，加入呈色用二次抗體，室溫反應 60 分鐘後，移除二次抗體，完成清洗後，加入呈色受質，避光反應 30 分鐘，加入停止液停止呈色反應，以多孔讀盤機進行偵測（偵測波長為 450 nm，參考波長為 550 nm）。

(三)管柱形成試驗

於細胞培養用 96 孔盤中逐格加入 50 μL/well Matrigel，輕微晃動使均勻分布，放入細胞培養箱 30 分鐘使 Matrigel 硬化，加入 50 μL 含樣品之細胞培養液。同時，加入 2 μg/mL Calcein AM 至長有約九分滿細胞的培養皿中，放入細胞培養箱 30 分鐘。待時間到達後，分別加入 100 μL 已配好所需濃度之欲檢測的待測物於已加有 Matrigel 的細胞培養用 96 孔盤。同時，移除加有 Calcein AM 的培養液，並沿培養皿壁緣緩慢加入 3 mL DPBS 洗滌。移除 DPBS 後，加入 1 mL Accutase，輕微晃動使細胞皆浸潤其中，以倒立式顯微鏡觀察，待細胞呈圓粒狀且會從底部滑動後，旋轉並輕拍培養皿邊緣使細胞脫落。加入 5 mL 培養液，混和均勻後，以血球計數器計算其細胞數，並將細胞數調整為 $8x10^3$ cells/mL 或 $3x10^4$ cells/mL。以 100 μL/well 之體積將細胞懸浮液加入各個格子中，輕微晃動使細胞均勻散布並與藥品充分混合均勻後，放入細胞培養箱培養 6 小時。以倒立螢光顯微鏡觀察，並拍照進行分析。

(四)模擬壓力環境下之管柱形成試驗

於細胞培養用 96 孔盤中逐格加入 50 μL/well Matrigel，輕微

晃動使均勻分布，放入細胞培養箱 30 分鐘使 Matrigel 硬化。同時，加入 2 μg/mL Calcein AM 至長有約九分滿細胞的培養皿中，放入細胞培養箱 30 分鐘。待時間到達後，分別加入 100 μL 已配好所需濃度之欲檢測的待測物於已加有 Matrigel 的細胞培養用 96 孔盤。同時，移除加有 Calcein AM 的培養液，並沿培養皿壁緣緩慢加入 3 mL DPBS 洗滌。移除 DPBS 後，加入 1 mL Accutase，輕微晃動使細胞皆浸潤其中，以倒立式顯微鏡觀察，待細胞呈圓粒狀且會從底部滑動後，旋轉並輕拍培養皿邊緣使細胞脫落。加入 5 mL 培養液，混和均勻後，以血球計數器計算其細胞數，並以含有樣品之培養液將細胞數調整為 $8x10^3$ cells/mL 或 $3x10^4$ cells/mL，放入培養箱靜置 1 小時，並於半小時後先於含有硬化 Matrigel 之 96 孔盤中，加入 50 μL 含環境壓力物質（high concentration glucose）之細胞培養液。待細胞與樣品預先反應時間到達，以 100 μL/well 之體積將細胞懸浮液加入各個格子中，輕微晃動使細胞均勻散布並與藥品充分混合均勻後，放入細胞培養箱培養 6 小時。以倒立螢光顯微鏡觀察，並拍照進行分析。

(五)移行試驗

將 culture-insert 置入 24 孔盤。用新鮮細胞培養液將細胞配製成適當濃度的細胞懸浮液，加入 insert 的 well 內（70 μL/well)。待 12 小時後細胞貼底，取出 insert，以新鮮的細胞培養液清洗細胞。於 well 內加入不同濃度藥物的新鮮培養液。於 37℃細胞培養箱培養適當時間後以顯微鏡下照相觀察。

(六)一氧化氮生成試驗

於細胞培養用 96 孔盤中加入 $3x10^4$ cells/well，輕微晃動使細胞均勻散布後，放入細胞培養箱培養 3 小時。待細胞貼於底部後，分別加入已配好所需濃度之欲檢測樣品，輕微晃動使其混合均勻。放入細胞培養箱培養 24 小時。達到藥物作用時間前 30 分鐘時，加入 10 μM DAF-2 DA，重新放入細胞培養箱繼續培養 30 分鐘。移除加有 DAF-2 DA 的培養液後，加入 150 μL DPBS，並以螢光微盤測定儀以激發波長 495 nm 搭配發散波長 515 nm 濾片測量螢光強度。

四、動物試驗

六十隻五週齡 C57BL/6J 雄鼠，購自國家實驗動物中心。放置一般飼料

與水瓶自由飲食穩定一週後，隨機分組開始進行試驗。除飼料給予外，每日於相同時間管灌餵食樣品乙次，共計四週，每週監控動物體重至少二次。分別於管餵樣品後四週進行活體採血以流式細胞儀測定同時具有 CD34 與 Flk-1 標定之群組視為血管前驅細胞群。取 300 μL 全血加入 fluorescein isothiocyanate (FITC)標定之 anti-mouse CD34 抗體與 phycoerythrin (PE)之 anti-mouse Flk-1 抗體，以 Isotype-identical antibodies 作為對照組，混合反應 30 分鐘。隨後加入 PharmLyse 溶解紅血球，室溫下避光反應 15 分鐘，以 200 x g 離心 5 分鐘，除去上清液，加入含 1%熱處理去活性 FBS 之 PBS 溶液(PBS-FBS)，再次離心，去除上清液後加入 0.5 mL 含 2%甲醛之 PBS 固定液，重新懸浮細胞後進行流式細胞儀分析。同時具有 CD34 與 Flk-1 標定之群組視為血管前驅細胞群。

五、統計分析

所有動物實驗之數據以 One-way ANOVA 及 post hoc Tukey's test 分析。在 $P < 0.05$ 情況下視為有意義。細胞實驗則以 Student's *t*-test 進行組與組間差異分析，$P < 0.05$ 情況下視為有意義，在 $P < 0.01$ 下視為極度有意義。

參、結果

一、一般檢定與基原鑑定：

蛇床子藥材一般檢定包括乾燥減重（5008）、總灰分與酸不溶性灰分（5004）、水抽提物與稀乙醇抽提物（5006）分別依照臺灣中藥典（第二版）之方法 5008, 5004, 5006 測定，結果如表 1。乾燥減重 6.4%；總灰分含量 12.8%與酸不溶性灰分含量 3.74%；水抽提物含量 18.4%與稀乙醇抽提物含量 11.38%。委託 TAF 認證之製藥研發中心實驗室進行基原鑑定（報告編號 SC011020303），包括藥材圖（圖一），性狀鑑別結果為本品呈精圓形，為雙懸果，長約 2～4 mm，直徑約 1～2 mm，灰黃色，部分頂端有 2 枚向外彎曲的宿存花柱基；分果背面略隆起，有突起的脊線 5 條，接合面平坦，有 2 條棕色略突起的縱線，其中有一條淺色的線狀物；果皮鬆脆，搓揉易脫落；種子細小，灰棕色，有油性；氣香，味辛，嚼之有麻舌感。組織鑑別（圖二～圖七），以顯微鏡鏡檢本品果實之橫切面(圖二)，具有兩個分果；分果略呈五角形，具 5 條翅狀果稜；外果皮為 1 列表皮細胞，常皺縮;外被角質層;中果皮為數列薄壁細胞,其間夾雜有條狀網紋細胞(圖三)，以維管柱(圖四)內側為多；分果油管(圖五)共 6 個，在接合面 2 個，果稜間各具 1 個油管，油管扁長圓形，內含黃棕色油脂，果成熟時油管壁僅為深棕色角質層；維管束柱位於果稜中部，木質部導管類圓形或多角形，並伴有少數纖維，韌皮部位於束柱兩側；種皮為 1 列淡棕色細胞;胚乳細胞含脂肪油及澱粉粒，澱粉粒中尚有細小簇晶(圖六)；胚圓形，位於胚乳中間，由薄壁細胞組成，含少量澱粉粒(圖七)。

二、蛇床子素含量測定

建立液相層析串聯質譜儀配合標準品進行定量蛇床子素含量（圖八）。由圖八(C)可知蛇床子素（1~1000 ng/mL）可在兩分鐘內被定量出來。本次蛇床子藥材及各別溶劑抽取物或區分物之蛇床子素含量如表 2。本次蛇床子藥材所含蛇床子素為 3.2%；酒精抽取物之各區分物之蛇床子素含量為(1-1)水層，0.66%；(1-2)乙酸乙酯層，30.69%；(1-3)正丁醇層，8.73%；各抽取物之蛇床子素含量為(2-1)100%丙酮，31.03%；(2-2)95%乙醇，31.26%；(2-3)50%乙醇，18.6%；(2-4)100%甲醇，14.2%；(2-5)50%甲醇，16.16%；(2-6)水，0.66%。

三、區分物與抽取物之回收率

本次蛇床子藥材之酒精抽取物區分物或各別溶劑抽取物之回收率如表

2。以酒精抽取物（約 6%產率）進行區分萃取得到乙酸乙酯區分物、正丁醇區分物與水層區分物，產率介於 0.32%（最低）～4.65%（最高）。分別以熱水、不同濃度乙醇與甲醇、丙酮所得之個別抽取物的產率介於 1.63%（最低）～8.6%（最高）。

四、內皮前驅細胞存活試驗

在區分物與抽取物細胞毒性分析（圖九），區分物部分：乙酸乙酯區分物在 62.5 μg/mL；正丁醇區分物在 125 μg/mL；水層區分物在>1000 μg/mL 以下（含）無明顯毒性。抽取物部分：熱水抽取物在 500 μg/mL；乙醇抽取物在 62.5 μg/mL；甲醇抽取物在 125 μg/mL；丙酮抽取物在 62.5 μg/mL 以下（含）無明顯毒性。區分物與抽取物在 62.5 μg/mL 濃度下皆有八成以上的存活率。

五、內皮前驅細胞增生試驗

以 BrdU 嵌入評估細胞增生試驗，在各區分物與抽取物無細胞毒性濃度下(低於 62.5 μg/mL)，顯示區分物(乙酸乙酯區分物與正丁醇區分物)與抽取物(100%丙酮抽取物、95%乙醇抽取物、50%乙醇抽取物、100%甲醇抽取物、50%甲醇抽取物)對於內皮前驅細胞的增生並沒有明顯促進作用(圖十)。

六、管柱形成試驗

在各區分物與抽取物無細胞毒性濃度下(低於 62.5 μg/mL)，首先評估正常培養環境對於內皮前驅細胞管柱生成活性影響，結果如圖十一。抽取物與區分物進行管柱形成試驗結果顯示，皆有促進內皮前驅細胞的管柱形成活性，其中 95%乙醇抽取物與 50%乙醇抽取物在測試條件下具有濃度相關(1~40 μg/mL)促進管柱生成活性。

七、模擬壓力環境下之管柱形成試驗

95%乙醇抽取物與 50%乙醇抽取物在無細胞毒性濃度下(低於 62.5 μg/mL)，繼續評估 15 mM 葡萄糖培養環境對於內皮前驅細胞管柱生成活性影響，結果如圖十二。對比於正常培養環境（blank），高糖培養環境明顯抑制內皮前驅細胞管柱生成(control)。加入 95%乙醇抽取物或 50%乙醇抽取物明顯可以增加內皮前驅細胞管柱生成活性，且具濃度相關促進活性。

八、內皮前驅細胞移行試驗

以 95%乙醇抽取物或 50%乙醇抽取物或蛇床子素進行測試內皮前驅細胞 12 小時移行活性，結果如圖十三。結果顯示，測試物對於內皮前驅細胞移行活性並無明顯促進活性，唯蛇床子素有濃度相關促進活性。

九、一氧化氮生成試驗

抽取物與區分物對於血管內皮前驅細胞生成一氧化氮，並無顯著性促進一氧化氮生成活性(圖十四)。

十、動物餵食試驗

五週齡 C57BL/6J 雄鼠，購自國家實驗動物中心。隨機分成九組開始進行試驗，劑量組分為高、低劑量。有關劑量餵食之換算[42]所述體表面積（body surface area, BSA）標準化如下：

蛇床子藥材 3~10g，若提供給 60 公斤成人服用(50 mg/Kg ~ 167 mg/Kg)，則餵食小鼠劑量（藥材粉末）應為：

Formula for Dose Translation Based on BSA

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{Animal dose (mg/kg)} \text{ multiplied by } \frac{\text{Animal } Km}{\text{Human } Km}$$

Figure 1. Formula for dose translation based on BSA.

TABLE 1. *Conversion of animal doses to HED based on BSA*

Species	Weight (kg)	BSA (m^2)	K_m factor	
Human				
Adult	60	1.6	37	⇦
Child	20	0.8	25	
Baboon	12	0.6	20	
Dog	10	0.5	20	
Monkey	3	0.24	12	
Rabbit	1.8	0.15	12	
Guinea pig	0.4	0.05	8	
Rat	0.15	0.025	6	
Hamster	0.08	0.02	5	
Mouse	0.02	0.007	3	⇦

(一) 50= $animal_{low}$ ×3/37 ⇒$animal_{low}$=616.7 mg/Kg (取 500 mg/Kg)

167= $animal_{high}$ ×3/37 ⇒$animal_{high}$=2060 mg/Kg (取 2000 mg/Kg)

(二) 蛇床子 powder 中 osthole 含量 3.2%，以 osthole 含量為各組換算標準

1. $Osthole_{low}$ 500 mg/Kg ×3.2%=16 mg/Kg

   $Osthole_{high}$ 2000 mg/Kg ×3.2%=64 mg/Kg

2. 95 % $EtOH_{low}$　16 mg/Kg÷31.26%（表二）=51.2 mg/Kg

　95 % $EtOH_{high}$　64 mg/Kg÷31.26%（表二）=205 mg/Kg

3. 50 % $EtOH_{low}$　16 mg/Kg÷18.6%（表二）=86 mg/Kg

　50 % $EtOH_{high}$　64 mg/Kg÷18.6%（表二）=344 mg/Kg

經過四週餵食後，以流式細胞儀測定血管內皮前驅細胞變化，其中以蛇床子素與 50%酒精抽取物高劑量餵食明顯促進血管內皮前驅細胞的數量，並與對照組呈現顯著性差異（圖十五）。

肆、討論

一、一般檢定與基原鑑定：

經過性狀鑑別與組織鑑別，確認材料為蛇床子，基源無誤。其一般檢定，包含乾燥減重不得超過 12% (實際 6.4%)、總灰份不得超過 13% (實際 12.8%)、酸不溶性灰份不得超過 5% (實際 3.74%)、水抽提物不得少於 10% (實際 18.4%)、稀乙醇抽提物不得少於 9% (實際 11.38%)，均符合臺灣中藥典（第二版）標準；另蛇床子素經過液相層析串聯質譜儀定量為 3.2%，符合臺灣中藥典（第二版）標準不得少於 1.0%。

二、區分物與抽取物之回收率與蛇床子素含量：

1.8 公斤蛇床子加入 12 公升之 95%酒精，加熱迴流 6 小時(80℃水浴)。重複萃取 2 次過濾，合併浸膏共 106.60 g (總產率為 5.92%)。區分物中，乙酸乙酯層區分物回算原藥材產率 0.57% (蛇床子素 30.69%，含量最高)、正丁醇層區分物回算原藥材產率 4.65% (產率最高) (蛇床子素 8.73%)、水層區分物回算原藥材產率 0.32% (蛇床子素 0.66%)。不同溶劑抽取產率次序為 50%甲醇(8.6%) > 50%乙醇(6.19%) > 100%甲醇(5.08%) > 95%乙醇(3.75%) > 100%丙酮(2.29%) > 水(1.63%)；蛇床子素含量分別為：50%甲醇(16.16%)、50%乙醇(18.6%)、100%甲醇(14.2%)、95%乙醇(31.26%)、100%丙酮(31.03%)、水(0.66%)。這些區分物與抽取物之蛇床子素含量將作為動物試驗劑量換算標準。

三、區分物與抽取物對於內皮前驅細胞活性評估

區分物與抽取物在 62.5 μg/mL 濃度下皆有八成以上的存活率，因此相關細胞實驗都在 62.5 μg/mL 以下進行。以 BrdU 嵌入評估細胞增生試驗，在各區分物與抽取物無細胞毒性濃度下(低於 62.5 μg/mL)，顯示區分物與抽取物對於內皮前驅細胞的增生並沒有明顯促進作用，而乙酸乙酯層區分物、100%丙酮抽取物、95%乙醇抽取物在 62.5 μg/mL 濃度下具有抑制 BrdU 嵌入，因此後面細胞試驗將維持在 40 μg/mL 濃度下進行。部分抽取物（100%丙酮抽取物、95%乙醇抽取物、50%乙醇抽取物、100%甲醇抽取物）在低濃度下有促進內皮前驅細胞生成一氧化氮，惟顯著性差異並不明顯；其他則無明顯促進一氧化氮生成活性。內皮前軀細胞管柱形成是修護內皮細胞功能之一，因此區分物與抽取物首先在 1, 5, 10, 20, 40 μg/mL 濃度下評估管柱生成能力，抽取物與區分物進行管柱形成試驗結果顯示，皆有促進內皮前驅細胞的管柱形成活性，其中以 95%乙醇抽取物與 50%乙醇抽取物在測

試條件下具有濃度相關(1~40 μg/mL)促進管柱生成活性。接下來評估 15 mM 葡萄糖培養基之模擬壓力環境下（糖尿病）之 95%乙醇抽取物與 50%乙醇抽取物管柱形成試驗。結果顯示兩者在 5, 10, 20, 40 μg/mL 濃度下可以，在模擬壓力環境下（15 mM 葡萄糖培養基）皆有促進管柱生成能力；95%乙醇抽取物在 5 μg/mL 或是 50%乙醇抽取物在 10 μg/mL，可以回復如同正常培養基下之管柱生成能力，兩抽取物之 osthole 含量相差將近 1.7 倍，因此推論蛇床子抽取物含有與蛇床子素協同作用促進內皮前驅細胞管柱生成能力。在內皮前驅細胞進行移行試驗，95%乙醇抽取物與 50%乙醇抽取物促進活性並不明顯；唯蛇床子素具濃度相關促進活性。

四、動物餵食

有關樣品之選定，依照蛇床子中藥材常用之人體使用量(3~10g)換算成小鼠餵食劑量。在 *in vitro* 試驗中，乙醇抽取物在正常與模擬壓力環境下其管柱形成能力在無細胞毒性下具濃度相關促進活性，因此被選定進行動物餵食，並以蛇床子素含量為標準進行抽取物間的劑量調整。雖然，中藥材以煎煮為主，此次動物餵食將比較粉末、乙醇抽取物與蛇床子素之間對於正常小鼠的內皮前驅細胞數量的改變，結果顯示蛇床子素與 50%酒精抽取物高劑量餵食明顯促進血管內皮前驅細胞的數量，並與對照組呈現顯著性差異。這樣的結果將申請專利，並準備作為第二年度糖尿病鼠餵食的準備。

伍、結論與建議

本次實驗發現蛇床子區分物或抽取物中的 95%乙醇抽取物或是 50%乙醇抽取物在正常環境與模擬壓力環境（15 mM 葡萄糖）具有增加血管內皮前驅細胞之管柱形成活性；配合之前我們發現蛇床子素可增加血管內皮前驅細胞之管柱形成活性，因此我們認為抽取物具有其他協同作用之化合物存在。動物餵食顯示 50%乙醇抽取物與蛇床子素，可以增加周邊血液之血管內皮前驅細胞數目。未來第二年之重點在於蛇床子是否有能力在疾病之相關壓力下維持血管內皮前驅細胞之功能性，且將以小鼠後肢缺血試驗，測試蛇床子是否於體內試驗仍具有促進血管新生之能力，這些結果將同時進行專利申請。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部中醫藥司計畫編號 CCMP102-RD-005 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. 行政院衛生署九十二～九十九年度死因統計。
2. 行政院衛生署九十三～九十九國民醫療保健支出統計。
3. Ramsey SA, Gold ES, and Aderem A: A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol Med* 2010; 2: 79-89.
4. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, and Sedding DG: Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002; 8: 1249-1256.
5. Libby P, Ridker PM, Hansson GK: Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317–325.
6. Is Peripheral Arterial Disease? http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/pad/, National Heart Lung and Blood Institute.
7. Jude EB, Eleftheriadou I, Tentolouris N: Peripheral arterial disease in diabetes--a review. *Diabet Med* 2010; 27: 4-14.
8. Lau JF, Weinberg MD, Olin JW: Peripheral artery disease. Part 1: clinical evaluation and noninvasive diagnosis. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 405-418.
9. Shanmugasundaram M, Ram VK, Luft UC, Szerlip M, Alpert JS: Peripheral arterial disease--what do we need to know? *Clin Cardiol* 2011; 34: 478-482.
10. Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, Golzarian J, Gornik HL, Halperin JL, Jaff MR, Moneta GL, Olin JW, Stanley JC, White CJ, White JV, Zierler RE: Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Interventional Radiology; Society for Vascular Medicine; Society for Vascular Surgery. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 2020-2045.
11. Weinberg MD, Lau JF, Rosenfield K, Olin JW: Peripheral artery disease. Part 2: medical and endovascular treatment. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 429-441.

12. Alaiti MA, Ishikawa M, Costa MA: Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy. *Transl Res* 2010; 156: 112-129.
13. Napoli C, Hayashi T, Cacciatore F, Casamassimi A, Casini C, Al-Omran M, Ignarro LJ: Endothelial progenitor cells as therapeutic agents in the microcirculation: an update. *Atherosclerosis* 2011; 215: 9-22.
14. Siddique A, Shantsila E, Lip GY, Varma C: Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist? *J Angiogenes Res* 2010; 22: 2-6.
15. Yoder MC: Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006692.
16. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
17. Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, Kielczewski JL, Moldovan NI, Grant MB. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvasc Res* 2010; 79: 207-216.
18. George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Mittelman A, Tiwari RK: Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 24 (doi: 10.1186/ 1756-8722-4-24).
19. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS: Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci* 2011; 120: 263-283.
20. Devaraj S, Jialal I: Dysfunctional endothelial progenitor cells in metabolic syndrome. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 585018.
21. 江蘇新醫學院，中藥大辭典，2001，上海科學技術出版社。
22. [Wu YT, Tang QY, Shen XK: Determination of osthole in *Cnidium Monnieri* L. Cusson from different sources. *Liaoning J Tradit Chin Med* 2007; 34: 800-801.
23. Chen Y, Zhang GG, Yu ZP: The advancement in the chemical and pharmacological study of the fruits of *Cnidium monnieri*. *Shenyang Yao Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 23: 256-260.
24. Basnet P, Yasuda I, Kumagai N, Tohda C, Nojima H, Kuraishi Y, Komatsu

K: Inhibition of itch-scratch response by fruits of *Cnidium monnieri* in mice. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 1012-1015.

25. Tohda C, Kakihara Y, Komatsu K, Kuraishi Y: Inhibitory effects of methanol extracts of herbal medicines on substance P-induced itch-scratch response. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 599-601.
26. Chiou WF, Huang YL, Chen CF, Chen CC: Vasorelaxing effect of coumarins from Cnidium monnieri on rabbit corpus cavernosum. *Planta Med* 2001; 67: 282-284.
27. Ogawa H, Sasai N, Kamisako T, Baba K: Effects of osthol on blood pressure and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 26-31.
28. Chen ZC, Duan XB, Liu KR: The anti-allergic activity of osthole extracted from the fruits of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson. *Yao Xue Xue Bao* 1988; 23: 96-99.
29. Liu J, Zhang W, Zhou L, Wang X, Lian Q: Anti-inflammatory effect and mechanism of osthole in rats. *Zhong Yao Cai* 2005; 28: 1002-1006.
30. Wang CM, Guan W, Fang S, Chen H, Li YQ, Cai C, Fan YJ, Shi ZQ: Antifungal activity of the osthol derivative JS-B against Phytophthora capsici. *J Asian Nat Prod Res* 2010; 12: 672-679.
31. Zhang Q, Qin L, He W, Van Puyvelde L, Maes D, Adams A, Zheng H, De Kimpe N: Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity. *Planta Med* 2007; 73: 13-19.
32. Chou SY, Hsu CS, Wang KT, Wang MC, Wang CC: Antitumor effects of osthol from *Cnidium monnieri*: an in vitro and in vivo study. *Phytother Res* 2007; 21: 226-230.
33. Yang D, Gu T, Wang T, Tang Q, Ma C: Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 1430-1434.
34. Sun F, Xie ML, Zhu LJ, Xue J, Gu ZL: Inhibitory effect of osthole on alcohol-induced fatty liver in mice. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 127-133.
35. Zhang J, Xue J, Wang H, Zhang Y, Xie M: Osthole improves alcohol-induced fatty liver in mice by reduction of hepatic oxidative stress. *Phytother Res* 2011; 25: 638-643.

36. Teng CM, Ko FN, Wang JP, Lin CN, Wu TS, Chen CC, Huang TF: Antihaemostatic and antithrombotic effect of some antiplatelet agents isolated from Chinese herbs. *J Pharm Pharmacol* 1991; 43: 667-669.
37. Guh JH, Yu SM, Ko FN, Wu TS, Teng CM: Antiproliferative effect in rat vascular smooth muscle cells by osthole, isolated from *Angelica pubescens*. *Eur J Pharmacol* 1996; 298: 191-197.
38. Liang HJ, Suk FM, Wang CK, Hung LF, Liu DZ, Chen NQ, Chen YC, Chang CC, Liang YC: Osthole, a potential antidiabetic agent, alleviates hyperglycemia in db/db mice. *Chem Biol Interact* 2009; 181: 309-315.
39. Qi Z, Xue J, Zhang Y, Wang H, Xie M: Osthole ameliorates insulin resistance by increment of adiponectin release in high-fat and high-sucrose-induced fatty liver rats. *Planta Med* 2011; 77: 231-235.
40. Wang SJ, Lin TY, Lu CW, Huang WJ: Osthole and imperatorin, the active constituents of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, facilitate glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem Int* 2008; 53: 416-423.
41. Ji HJ, Hu JF, Wang YH, Chen XY, Zhou R, Chen NH: Osthole improves chronic cerebral hypoperfusion induced cognitive deficits and neuronal damage in hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2010; 636: 96-101.
42. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N: Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2007; 22: 659–661.

柒、圖、表

表 1、本研究所使用蛇床子藥材之一般檢定

項目	測試結果	臺灣中藥典（第二版）標準
乾燥減重	6.4%	不得超過 12%
總灰分	12.80%	不得超過 13%
酸不溶性灰份	3.74%	不得超過 5%
水抽提物	18.40%	不得少於 10%
稀乙醇抽提物	11.38%	不得少於 9%

表 2、以液相層析串聯質譜儀定量藥材、區分物與抽取物蛇床子素含量

1. 蛇床子藥材中 osthole 含量 3.2%

2. 區分物之製備

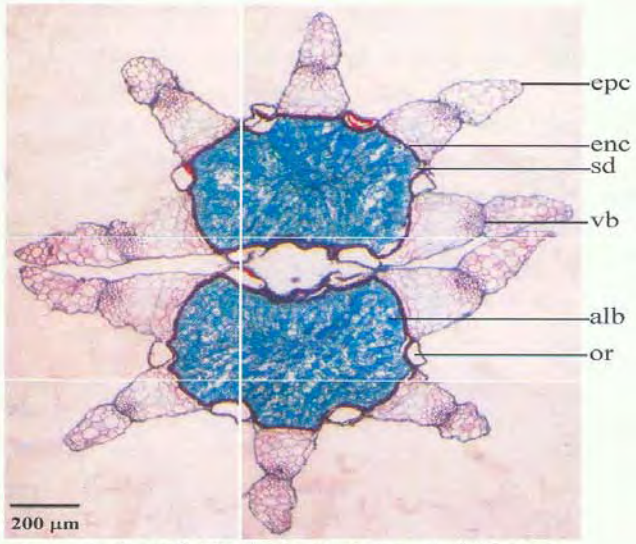
提取層	重量 (g)	產率 (%)	Osthole (%)
1-1. 水	5.82	0.32	0.66
1-2. EA	10.22	0.57	30.69
1-3. Butanol	83.51	4.65	8.73

3. 抽取物之製備

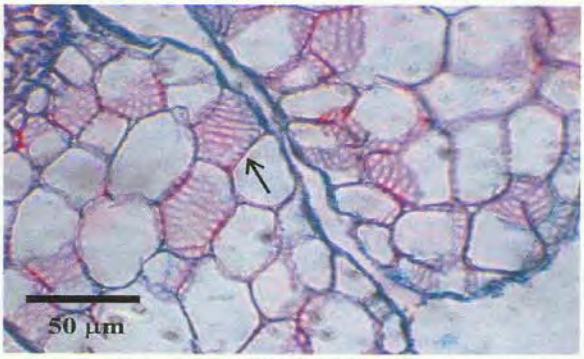
溶劑	重量 (g)	產率 (%)	Osthole (%)
2-1. 100 % Acetone	11.01	2.29	31.03
2-2. 95 % EtOH	18.00	3.75	31.26
2-3. 50 % EtOH	29.69	6.19	18.60
2-4. 100 % MeOH	24.40	5.08	14.20
2-5. 50 % MeOH	41.28	8.60	16.16
2-6. water	7.80	1.63	0.66



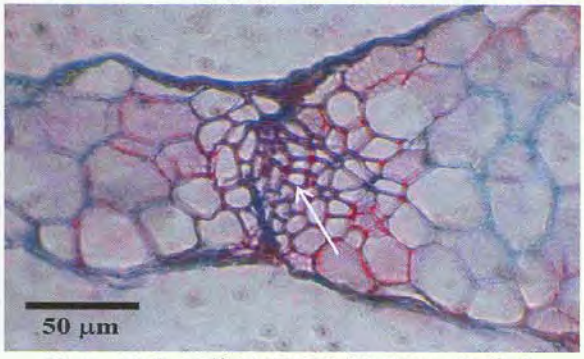
圖一、蛇床子藥材（T102-03-01）與鑑別



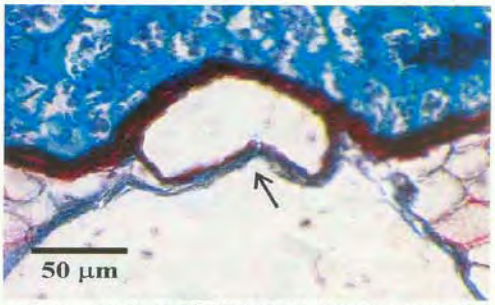
圖二 蛇床子藥材(T102-03-01)之果實橫切面



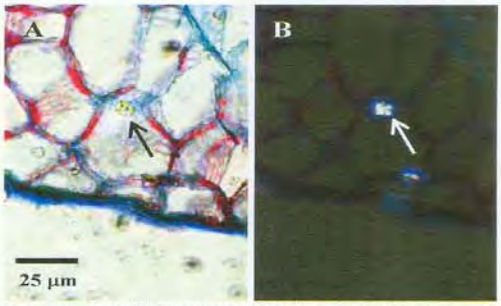
圖三 蛇床子藥材(T102-03-01)之網紋細胞



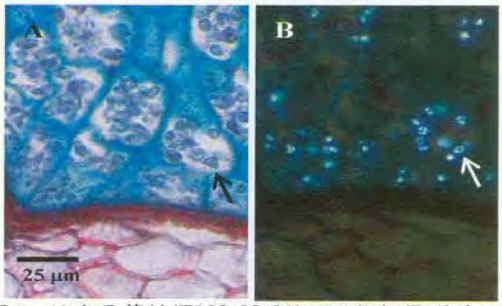
圖四 蛇床子藥材(T102-03-01)之維管束



圖五 蛇床子藥材(T102-03-01)之油管



圖六 蛇床子藥材(T102-03-01)之簇晶(B 偏光下)



圖七 蛇床子藥材(T102-03-01)之澱粉粒(B 偏光下)

略字表

alb	albumen	胚乳
enc	endocarp	內果皮
epc	epicarp	外果皮
or	oil reservoir	油室(油管)
sd	seed coat	種皮
vb	vascular bundle	維管束

(A)儀器參數：

1. HPLC：Agilent Technologies 1290 infinity
2. Detector：Agilent Technologies 6410B
3. Column：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MG II, 2.0*150mm, 3μm
4. Auto Sample：Agilent Technologies 1290 ALS
5. Injection volume：5μL
6. Mobile phase：梯度條件：

Time(min)	H_2O + 50mM Ammonium formate + 0.1%FA	MeOH + 50mM Ammonium formate + 0.1 %FA	Flow rate (mL /min)
0	20	80	0.5
1	20	80	0.5
2	0	100	0.5
3	0	100	0.5
4	20	80	0.5
7	20	80	0.5

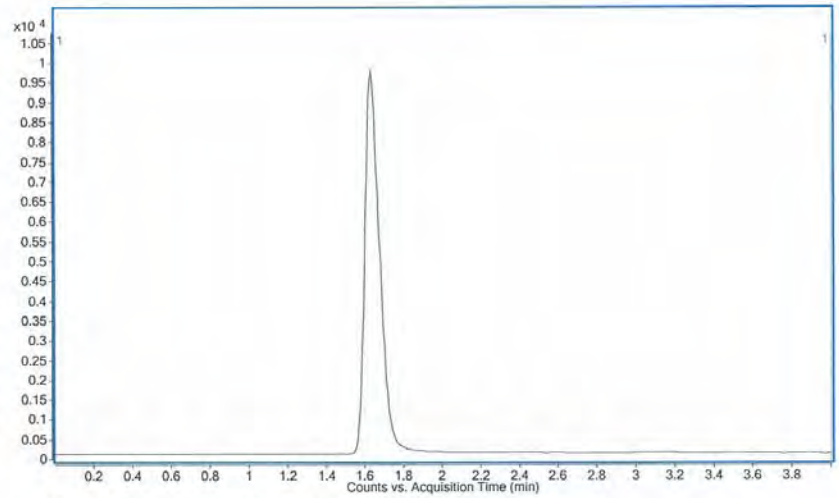
7. LC-MS/MS mode：MRM

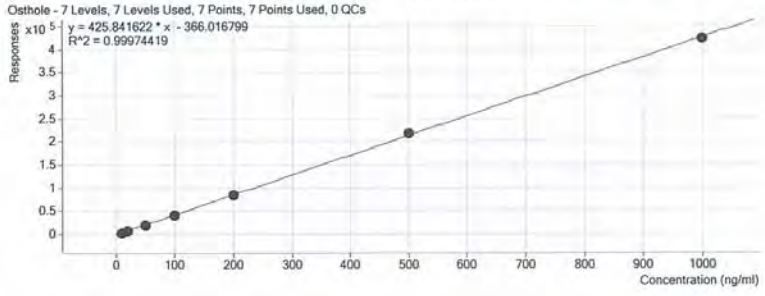
(B)標準溶液配製：

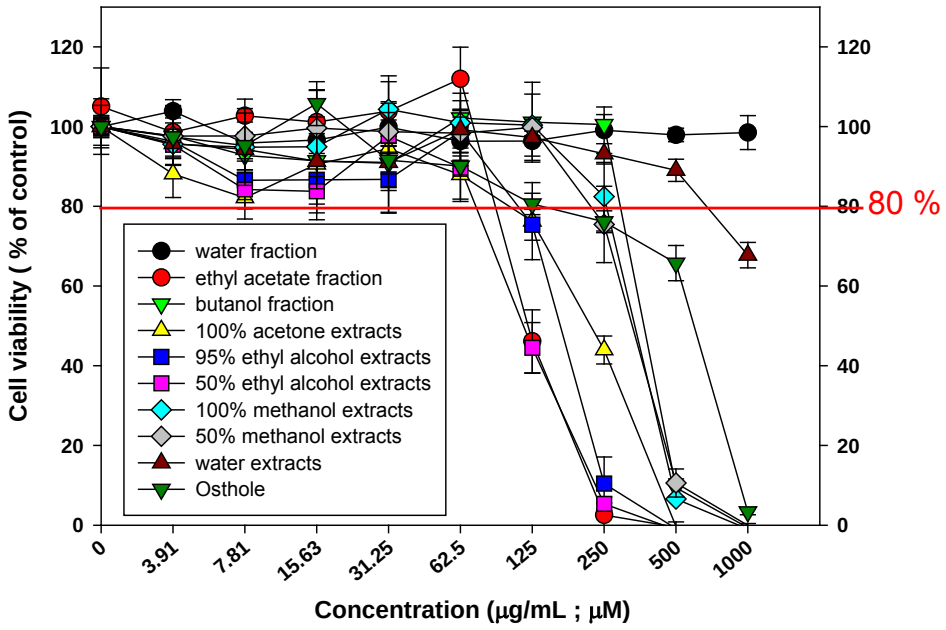
1.精秤 **Osthole** 1.0 mg 加 Methanol 溶解定容至 10.0 ml (100 μg /mL)，此溶液為 stock solution。取出適量體積，按下表配製檢量線濃度梯度溶液(此處濃度為個別成分最終濃度)：

	Concentration (ng /mL)	S/N Ratio
Std01	1	37.1
Std02	5	
Std03	10	
Std04	20	
Std05	50	
Std06	100	
Std07	200	
Std08	500	
Std09	1000	

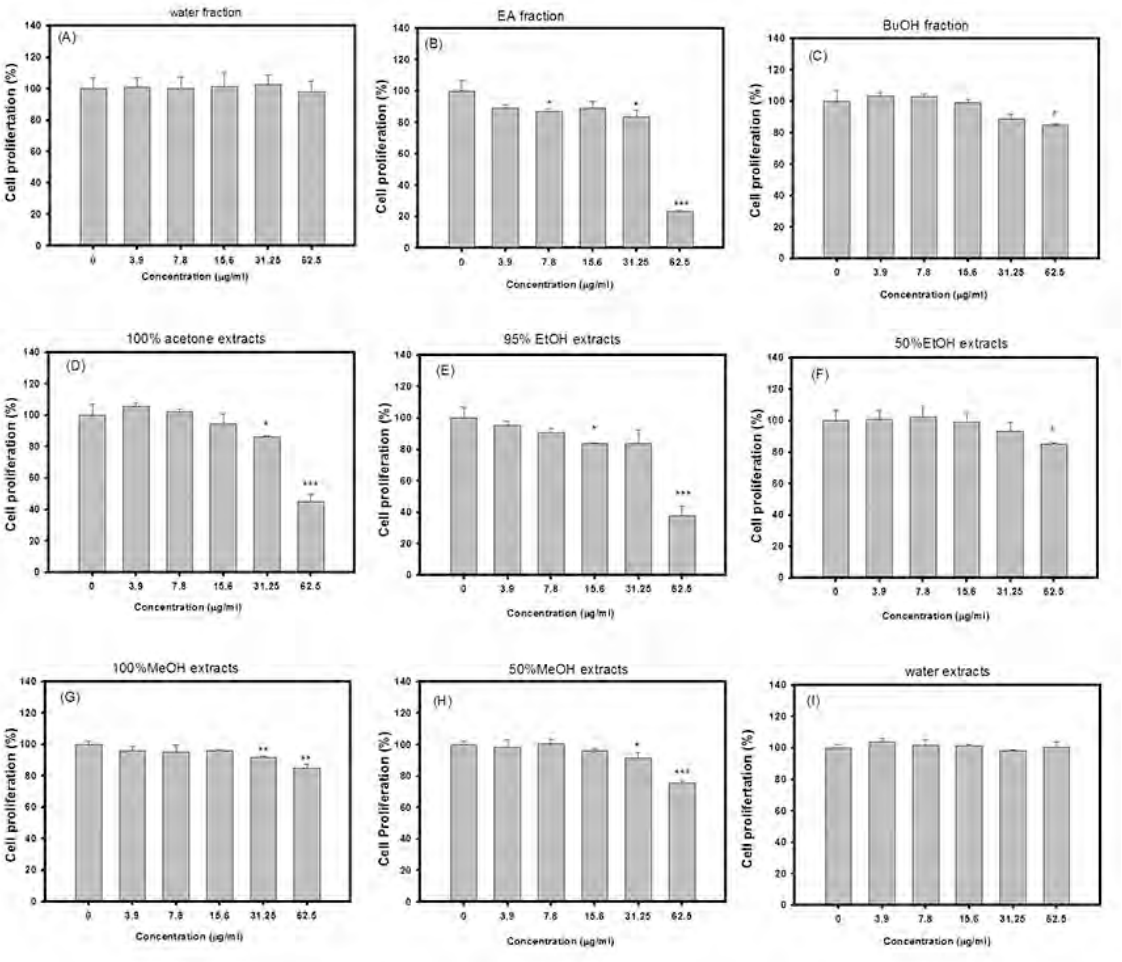
(C)液相層析串聯質譜儀進行定量蛇床子素含量



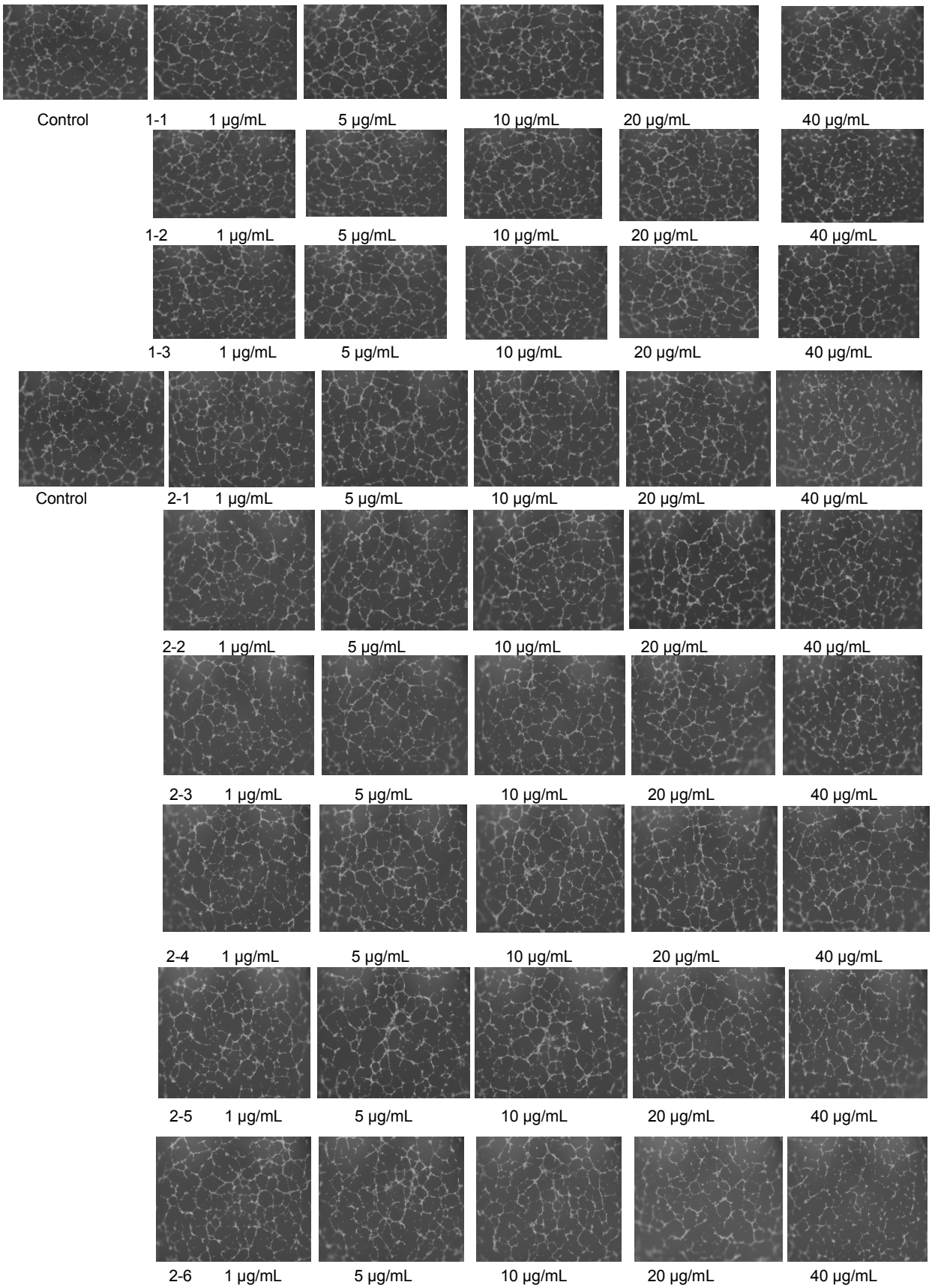




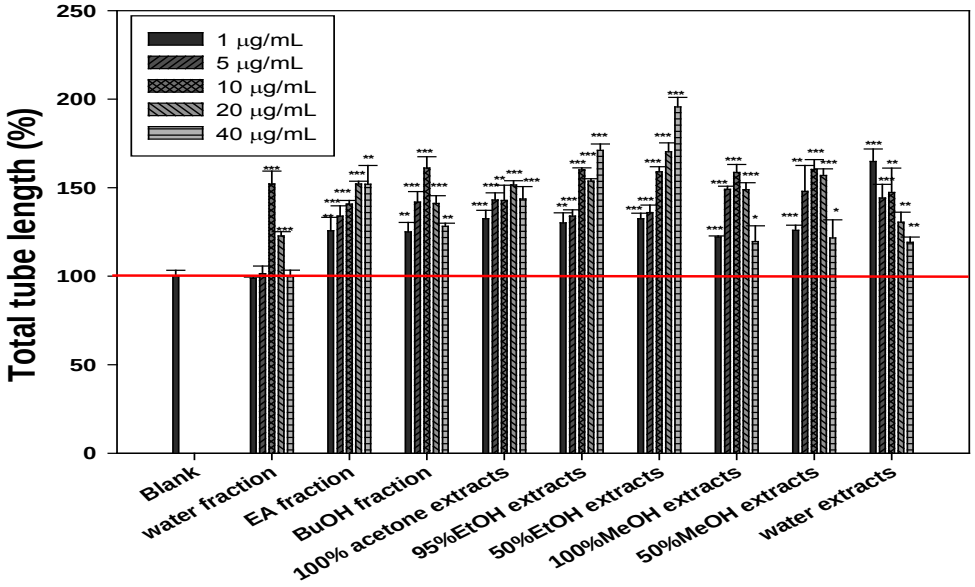
圖八、建立液相層析串聯質譜儀配合標準品進行定量蛇床子素含量。(A)儀器參數；(B)標準品配製；(C)定量蛇床子素含量



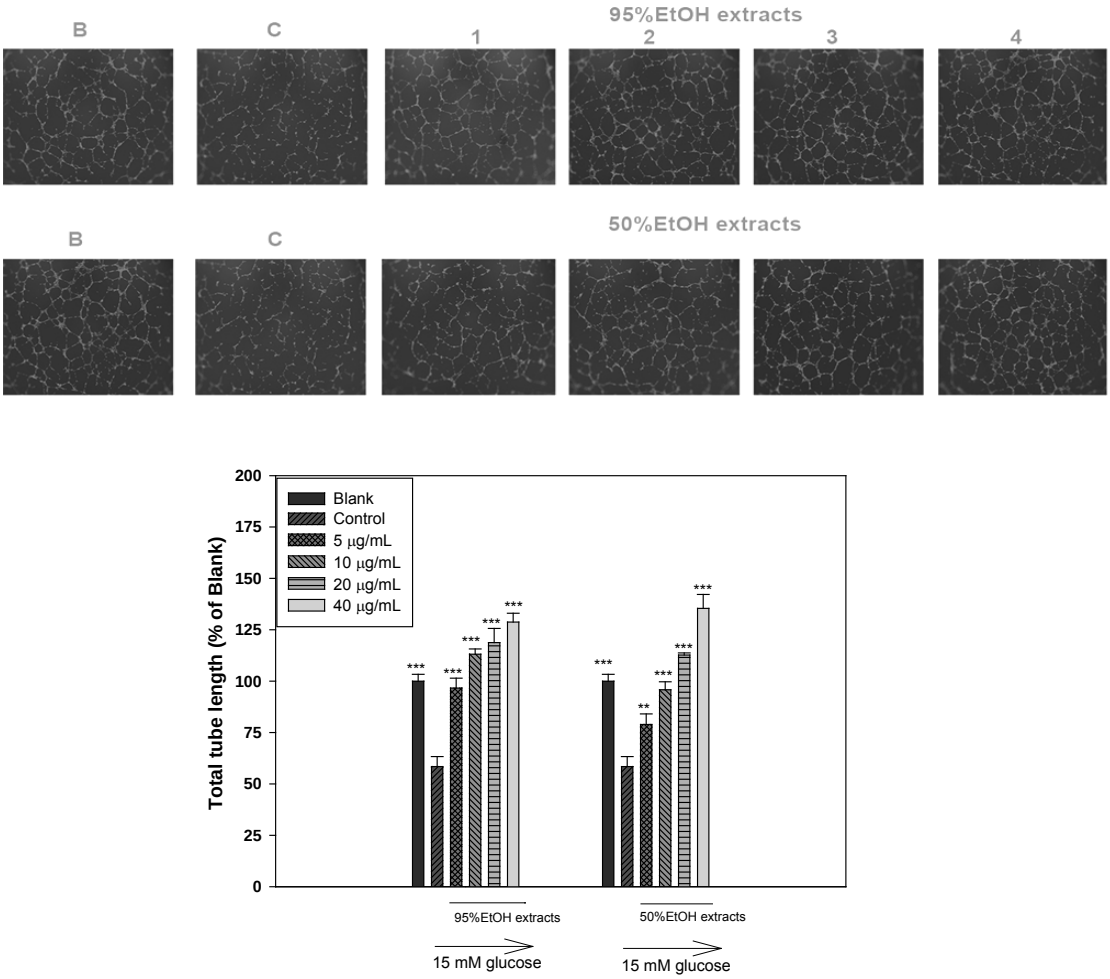
圖九、各區分物或抽取物對於內皮前驅細胞之細胞毒性



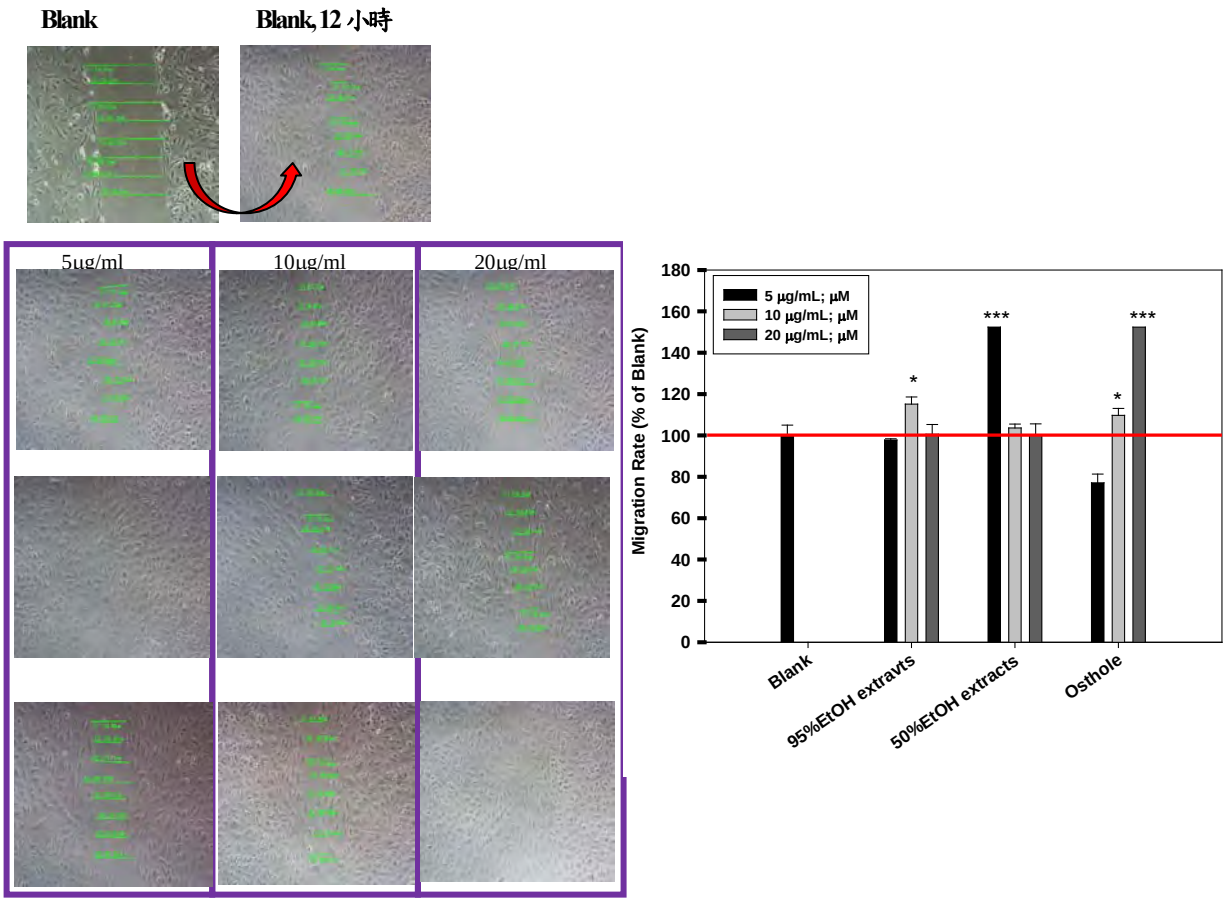
圖十、各區分物或抽取物在無細胞毒性下（3.9～62.5 μg/mL）對於內皮前驅細胞之增生活性 (treatments vs. blank; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)



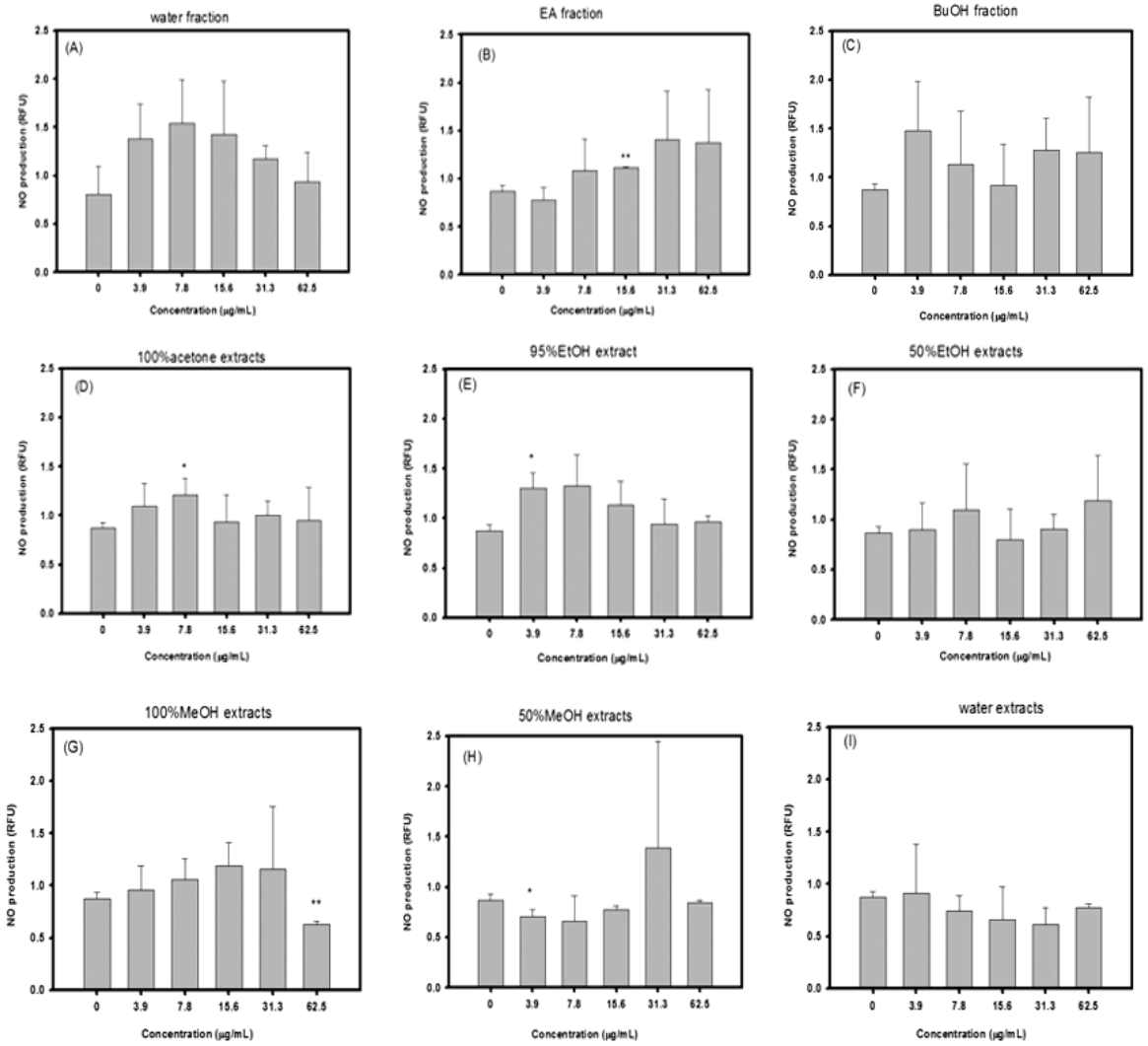
圖十一、各區分物或抽取物在無細胞毒性下，正常環境對於內皮前驅細胞之管柱生成活性(treatments vs. blank; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)



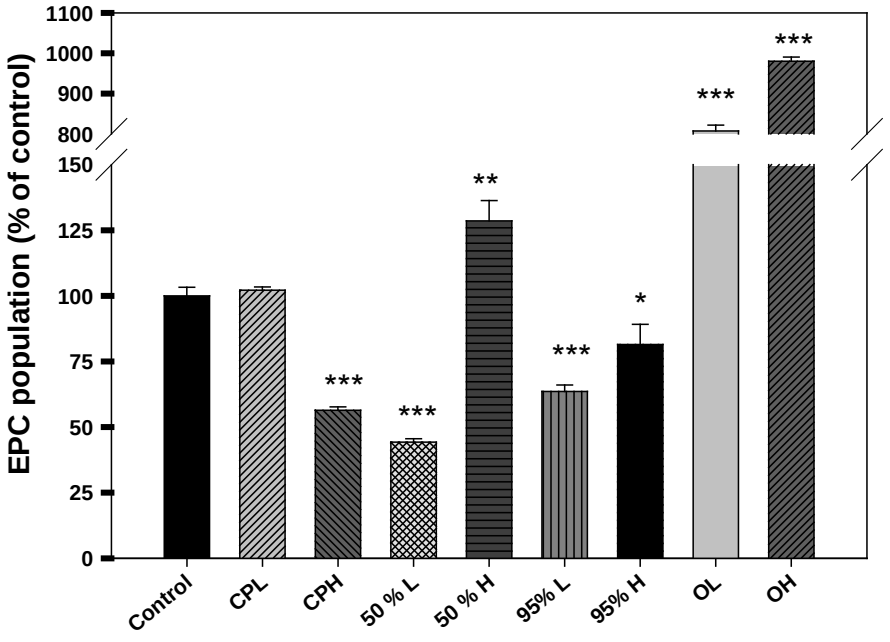
圖十二、乙醇抽取物在無細胞毒性下，15mM 葡萄糖培養環境下對於內皮前驅細胞之管柱生成活性之圖像與定量分析圖。B，正常培養基；C，含 15 mM 葡萄糖培養基(treatments vs. blank; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)



圖十三、各區分物或抽取物在無細胞毒性下，正常環境對於內皮前驅細胞之移行活性(treatments vs. blank; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)



圖十四、各區分物或抽取物在無毒性下對於內皮前驅細胞產生一氧化氮活性(treatments vs. blank; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)



圖十五、動物餵食四週後，取小鼠全血以流式細胞儀測定血管內皮前驅細胞群變化。Control：對照組；CPL：蛇床子粉末低劑量；CPH：蛇床子粉末高劑量；50 % L：50 % EtOH 抽取物低劑量；50 % H：50 % EtOH 抽取物高劑量；95 % L：95 % EtOH 抽取物低劑量；95 % H：95 % EtOH 抽取物高劑量；OL：蛇床子素低劑量；OH：蛇床子素高劑量(treatments vs. control; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

編號：CCMP102-RD-008

以高黏度浸膏系統探討中(草)藥造粒新製程及抗結塊技術研發

江伯源
國立中興大學

摘　要

「中醫藥」在人類醫療史上已超過千年，近年更逐漸在全世界各大醫學研究中心及醫藥市場風行，全球相關中草藥產值近 1000 億美元，每年以 10%速率快速成長，其中「科學濃縮中藥」更是市場之主流產品。然而中(草)藥高黏度浸膏藥方十分難以造粒，甚至在造粒後其粒子容易吸濕、結塊，問題總結如下：1. 黏度高、輸送難、流速慢；2. 易爆管、汙染、難清洗；3. 黏度高、造粒不均、易塌床(失敗)；4. 造粒粒子沾黏性高、易吸濕、結塊。如何輸送、防止粒子吸濕及結塊等問題是許多藥廠一直被困惑及待克服之技術。

本計畫擬以"枸杞及熟地黃萃取、濃縮—高黏度浸膏"為藥材，模擬中草藥高黏度藥材造粒機制，建立控制因子評估、新造粒核心技術、抗結塊技術研發及其品質修飾評估，希盼能建立高黏度浸膏造粒技術、提升包覆率、粒子成型性及品質安定性。本計畫藉由(1)不同環境條件改變浸膏高黏度、(2)流動床造粒條件最佳化、(3)麥芽糊精及澱粉糊液添加於黏著劑、(4)果膠粉末添加於賦形劑及(5)二次造粒(包覆)製程等，透過改變表面物質玻璃轉換溫度、吸濕性及水活性等，不同造粒新製程對高黏度黏著劑系統產生降低表面沾黏性的影響。

實驗結果如下：添加不同金屬離子隨濃度增加，黏度下降效果越顯著，而三價鋁離子效果又優於二價鈣離子及一價鈉離子；pH 值則以弱酸(pH = 5)及弱鹼(pH = 8)黏度下降效果最佳；溫度則越高黏度下降越低。以多孔性纖維粉體為賦形劑，其流動床造粒機最佳操作條件如下：以果膠為黏著劑則最佳濃度為 4%(可以此黏度換算其它膠體濃度)、多孔性纖維賦形劑入料量為 500g、風門壓力為 0.5 kg / cm2、入風口溫度為 70 ℃、黏著劑流速 5 ~ 7 rpm。將麥芽糊精加於黏著劑，隨著濃度提高可以有效提升粉體表面玻璃轉換溫度及降低吸濕性(77.31、96.26、94.41 及 94.74 °C；10.12、8.35、7.66 及 7.01 %)。果膠粉末添加於賦形劑，隨著添加濃度提高流動性有下降的趨勢(31.48、29.30 及 29.24)，顯示能有效改善表面沾黏性，達到抗結塊的效果。二次造粒(包覆)後，玻璃轉換溫度有顯著的提高(52.55、40.85、52.27 及 82.58°C)，流動性及休止角也隨二次造粒時間延長，有下

降的趨勢(42.98、33.43、30.26 及 23.57；27.65、28.58、18.81 及 18.05 °)，如此可防止沾黏區(stickiness)的產生，達到抗結塊的效果。

於本研究中發現，在傳統製程之熱水萃取液中，適度改變浸膏酸鹼性及其帶電性可降低其黏度及乾燥後粉體的沾黏性；另傳統流動床造粒機並無入料液加熱裝置及保溫輸送管，若改善此點，可降低高黏度入料液黏滯系數。枸杞浸膏機能性成分至今尚無一個定論，只知大方向為枸杞多醣蛋白質複合物的分子量，然其分子量於各篇文獻中又不一致，(1.92×10^6、5.3×10^4 Da 及 2.25×10^6 Da 等族繁不及備載)，希盼能有機會再深研這一部分。另希盼中藥司是否有適合之廠商，可以有互動探討的機會，以證實本研究之核心技術及理論，也讓本研究成果可以提供相關產、官、學、研單位研究及多元化利用的參考。

關鍵字：中草藥、流動床造粒、抗結塊、枸杞及熟地黃、黏度、沾黏性

Number: CCMP102-RD-008

Study on Development of New Chinese Herbal Medicine Formulation and Anti-caking Technology with High Viscosity System

Po-Yuan Chiang
National Chung-Hsing University

ABSTRACT

Chinese herbal medicine has been used for thousands of years in human medical history. In recent years, Chinese herbal medicine has received importance from medical research centers and large pharmaceuticals all over the world. The value of Chinese herbal medicine is about hundred billions with a growth rate of 10% every years. The "concentrated herbal extracts" is the mainstream product in the global market. But it is hard to granulation with high viscosity Chinese herbal medicine extracts. Even it can be granulated. The product still has many troubles such as hygroscopicity and caking. These trouble list in the following. A. High viscosity results in hard to transportation in granulator and low inlet rate. B. Easy to jam the inlet pipe results to pollution and be hard to clean. C. High viscosity results to be hard to dry and block the inlet air. D. High stickiness of powder results to wetting and caking. Because of these troubles, how to deal with the high viscosity and stickiness becomes an big issue.

This research uses the Lycium barbarium and Rehmannia glutinosa as high viscosity extracts. We try to use them to simulation and figure out the mechanism of high viscosity system granulation. It will help us to establish the control factors, granulation technology of high viscosity system, caking technology and better quality. This research takes apart to five topic. The first is decreasing the viscosity of extracts with different conditions. Second is the optimization of fluid bed granulation factors. Third is studying on quality of granulation by mixing maltodextrin or gelatinized starch solution in binder. Fourth is studying on quality of granulation with adding

different concentration of pectin into excipient. Fifth is studying on effect of glass transition temperature, hygroscopicity, water activity and powder quality with twice granulation, coating, processing. It will raise the glass transition temperature and decrease the stickiness of surface.

The research results showed that viscosity of extract was decreasing with increasing concentration of different metal ions. The pH value result showed that the weak acid about 5 pH value and weak base about 8 pH value have the lowest extract viscosity. Temperature result showed that increasing temperature resulted in decreasing viscosity of extract. Moreover, we used porous-rich fiber powder as excipient. The optimization of fluid bed granulation factors listed in the following. The best optional parameters of binder were 4% pectin and 5 ~ 7 rpm inlet rate. The excipient optional parameters was 500 g initial porous-rich fiber powder. The other parameters, such as inlet air temperature and pressure, were 70°C and 0.5 kg/cm^2. Moreover, mixing more maltodextrin into binder raised glass transition temperature (77.31, 96.26, 94.41 and 94.74 °C) and decreased hygroscopicity (10.12, 8.35, 7.66 and 7.01 %). Mixing more pectin into excipient decreased the Carr's index (31.48、29.30 and 29.24). It showed that mixing pectin into excipient decreased stickiness on surface and achieved anti-cking. Most importantly, twice granulation (coating) significantly increased glass transition temperature (52.55, 40.85, 52.27 , 82.58 °C) and decreased Carr's index (42.98, 33.43, 30.26 and 23.57) and repose angle (27.65, 28.58, 18.81 and 18.05 °). These results showed that these new processing could prevent product from caking by decreasing stickiness on the surface.

According to this research, we will suggest that adjusting the pH value and its charged can decrease the stickiness. Moreover, traditional fluid bed granulator has no heater and warm keeping equipment. If we can improve that, these equipment can decrease the viscosity coefficient of high viscosity extract. This research has a trouble about the functional properties of Lycium barbarium. We collect and arrange many literatures. It shows the functional properties of Lycium barbarium is the molecular weight of glycoproteins. But they all talk about different molecular weight (1.92×10^6, 5.3×10^4, 2.25×10^6 Da and so on). It is hoped that having a chance to continue to study on it and the research results can be used as research references for the multiple applications in the food and medicine industry.

Keywords: Chinese herbal medicine, fluid bed granulation, anti-caking, Lycium barbarium and Rehmannia glutinosa, viscosity, stickiness

壹、前言

「中醫藥」在人類醫療史上已超過千年，近年更逐漸在全世界各大醫學研究中心及醫藥市場風行，全球相關中草藥產值近 1000 億美元，每年以 10%速率快速成長，其中「科學濃縮中藥」更是市場之主流產品。「台灣」是全世界「科學中藥」之發源地之一，「粉」、「粒」、「液」、「膠囊」等劑型是市場主要銷售型態，由於國內中醫師用藥習慣及全民健保中醫藥給藥型式，以「科學濃縮—粉、粒」為主，在製藥技術及品質、安全性享譽國際，近年在中醫藥委員會及廠商共同努力下，正努力推動成為全球之「中草藥科技島」。台灣目前中藥材料大都以進口為主，大陸是全世界最大中藥材生產地；由於全球中藥材需求量大增、對岸之經濟快速成長，以致中藥材之成本大增；加上國內「科學中藥」之供藥、給藥、服藥量是根據中華藥典—藥方規定之基本製程，「有效成分」及「劑量」更是品質管制重點，以致製造成本增加，造成各藥廠之經營壓力及市場競爭力日減。「提高有效成分萃取」、「濃縮、包覆率提升」、「造粒成功率、品質安定」是國內 GMP 中藥廠一直努力的目標，藉製備技術提升、有效管理得以增加市場競爭力，但效果日益減少，如何開創台灣中醫藥產業新發展方向、增加競爭力式產、官、學、研當前重要之使命及待突破之瓶頸。

枸杞為多年生落葉灌木植物，屬於茄科(Solanaceae)，茄族(Solanales Reichb.)，枸杞亞族(Lycium L)(Gan et al., 2004; Luo et al., 2004)，全世界枸杞種類約有 100 種(王，2008)，分佈於美洲、歐洲、日本、韓國等(Qian et al., 2004)，中國為主要生產地，其生產有七個種及北方枸杞等三個變異種，主要分布於寧夏、新疆、青海、內蒙古、山西、河北等地(江，2004；張等，2008)，血枸杞(Lycium chinense Miller)及寧夏枸杞(Lycium barbarium Linnaeus)為較常見之種類，其中又以寧夏枸杞最為頗負盛名，產量亦為最大宗，又有西洋枸杞之稱，其外觀較血枸杞較為細長(劉，2001；陳，2003)，主要做為藥用品種(陳，2008)。枸杞全株可高達二~三尺，根系發達叢生生長，樹枝細長，果實呈卵形、鮮紅色或暗紅色，其內含有 25~30 粒種子，於夏、秋二季採收，去除果柄乾燥後，乾燥成熟之果實稱為枸杞子，質地柔嫩、果肉厚、帶有黏性，即成為國人常使用之傳統中草藥之一，除果實外，乾燥後之根皮稱為地骨皮，含大量酚類物質，枸杞葉富含粗蛋白，全株皆可食用(中醫藥委員會，2012；何，2007)，具有明目、補氣、潤肺等功效，根據《本草綱目》記載：「主內邪氣，熱中消渴，周痺風濕，久服堅筋

骨，輕身不老，耐寒暑」，並且在《神農本草經》中將枸杞列為上品之中藥材，故枸杞有紅寶之稱。

寧夏枸杞果實富含許多營養成分，如下表(陳，2008)，除了碳水化合物(57.82%)、粗蛋白(12.10%)、粗脂肪(7.14%)、粗纖維(7.78%)、灰分(3.16%)、水分(12%) (齊等，1986)外，亦含有甜菜鹼、多酚類如類黃酮、維生素、類胡蘿蔔素、生物鹼、礦物質(詹，2007)及含量約為 7.09%的多醣(王，1991)，學者亦從枸杞多醣分離出六種單醣及十七種胺基酸((Luo et al., 2004; Qian et al., 2004)，其種子本身含有多種胺基酸(李等，1990)外，亦含油約 18%，有大量不飽和脂肪酸、磷脂質等(潘等，2000；張等，2008)，一般而言牛磺酸(taurine)主要存在於動物體內，枸杞含有約 0.449~0.689%的牛磺酸，目前文獻中唯一具有此成分的特殊植物(王和王，1999；朱，1996)，上述各種成分含量因其枸杞產地、環境有所差異。

枸杞具有調節免疫、抑制腫瘤、防止癌細胞突變(張等，2008)、抗衰老、降低血脂及血糖(苟等，2012)、保肝、抗氧化、明目作用(詹，2007)等功效，故常做為國民食補之中藥材。枸杞多醣(Lycium barbarium polysaccharide, LBP)為枸杞主要有效活性成分(Gan et al., 2004)，被證實可抗脂質過氧化及提高 SOD 活性，達到延緩老化(李與張，1993)，降低 DNA 突變機率，降低體細胞病變(王，2007)，增加吞噬細胞功能、脾細胞抗體的形成、T cell 增殖及毒殺功能(Gan et al., 2004)，降低糖尿病兔的血清中的總膽固醇(total cholestrol,TC)及三酸甘油脂(triglycerides, TG)(Luo et al., 2004)，及降血糖、保肝等功能(白，1999)。甜菜鹼在以四氯化碳誘導動物造成肝損傷試驗中，可降低受試動物血清中的丙胺酸轉胺酶含量，在肝臟減緩因為四氯化碳造成脂質變化，達到護肝功能(Murakami et al., 1998；王 2007)。枸杞類胡蘿蔔素中的玉米黃質對以光照誘導視網膜損傷之大鼠，具有減緩、保護之功能(Liu et al., 1995)。枸杞中之多酚類、類胡蘿蔔素、VitC 等具有清除自由基、抑制 DPPH、還原力等抗氧化作用(陳，2008；Le et al., 2007; 梁 2002; Kosar and others 2003; Qian and others 2004)。牛磺酸則可增進代謝、心臟及肝臟功能(陳，2008)。枸杞籽油由於含大量不飽和脂肪酸，具有降低膽固醇、抑制血栓形成功能(張等，2008)。

評估枸杞品質指標為枸杞多醣、甜菜鹼、總醣含量，其中多以枸杞多醣為主(苟，2012)，枸杞多醣為多醣-蛋白質複合物，以 D-阿拉伯糖(arabinose)、D-葡萄糖(glucose)、D-鼠李糖(rhamnose)、D-甘露糖(mannose)、D-木醣(xylose)、D-半乳糖(galactose)以上六種中性糖及半乳醣醛酸

(galacturonic acid)混合 17 種胺基酸形成酸性雜多醣與多肽或蛋白質的複合醣(何和張，1995)，中性糖之間以 β-醣苷鍵形成糖鏈(Li et al., 2007)，而糖鏈以 Glycan-O-Serine 與胺基酸形成糖肽結構(Gan et al., 2004)。枸杞多醣溶於熱水等極性溶劑，不溶於乙醇丙酮等有機溶劑(張和趙，2005)，平均分子量約為 24132(Li et al., 2007)。

田(2003)將枸杞粗多醣以離子交換管柱層析，洗脫出 Lbp1~Lbp5 區分物，接著再以膠體過濾、離子交換管柱層析分離純化出 LbGp1~LbGp5 複合糖(glycoconjugate)，測得複合糖其理化性質與胺基酸組成，以 酶降解及化學降解得到糖鏈分子分別為 LbGp1-OL~LbGp5-OL，以 GC/MS、NMR、GC 等方法測定其糖鏈重複單元結構，如圖，研究發現其糖鏈部份可能是枸杞多醣主要免疫活性結構，LbGp4-OL 是糖鏈中分子量對大的，其免疫活性及抗氧化能力亦是最高的。多醣結構複雜性高，其生理活性如抗氧化、降血脂、降血糖、增強免疫等與其分子量大小分佈、分支程度、水溶性、周圍蛋白質有關，雖然可藉由總糖含量、紅外線光譜、核磁共振分析多醣(王，2007)，但是多醣功效通常與其分子量有密切相關(高，2006)，故許多文獻中仍以測定分子量為主。由於多醣結構的複雜，即使其只含單一種單糖，也會因不同鍵結方式即產生不同結構之多醣，依多醣中糖的立體結構、鏈的長度與鏈間交互作用形成二級結構(梁，2002)，造成分析多醣時困難度及不確性，且除了枸杞之產地、品種外，製備枸杞粗多醣方法差異，皆會造成分析結果重複性不高。

依據中醫藥品查驗登記審查須之暨其有關規定中之中藥濃縮製劑基準，濃縮製劑其乾燥浸膏與賦形劑之比例，以 1 比 1 為參考原則。然而與許多中藥製劑或相關廠商討論之後發現，部份含醣類成分較多(例如枸杞、熟地、生地、麥冬、天門冬等)的中藥在製程上會有一些困難，條列如下：

1. 濃縮後液體黏度過高，不易於流動床造粒製程(輸送不易，甚至塌床)；
2. 噴乾或造粒後沾黏性極高，易於形成結塊(caking)，導致貯存品質受到影響。

基於上述之問題，了解結塊機制、降低入料液黏度及抗結塊(anti-caking)技術就是中(草)藥粉粒劑型的一個重要研究課題。另“高黏度浸膏”藥材之造粒技術是全世界中(草)藥廠共同待突破之技術，有關抗結塊改善更是業者及需之技術，如能有效開發此等技術，藥廠均表示可領先其他國家，具有創新中醫藥產業之發展及競爭力。然而沾黏性(stickiness)及黏度(viscosity)在根

本上有著極大的差異，卻鮮少研究對其定義清楚，甚至針對其特性去做深入研究。黏度(viscosity) 主要影響流體輸送及霧化特性，其影響因子有(分子量、濃度、分子構型、溫度及 pH 值，而沾黏性(stickiness)主要影響液體乾燥成粉體後的沾黏性，其分類如下，一為無黏性(non-sticky)物質，如麥芽糊精、膠類及蛋白質等；二為黏性(sticky)物質，其中以富含糖類(sugar-rich)物質及富含酸類(acid-rich)物質為代表，其主要原因為單糖及有機酸的低玻璃轉換溫度，富含糖類物質如果醣、半乳醣、蔗醣等，富含酸類物質則有檸檬酸蘋果酸及酒石酸等。故本計畫擬以國人十分熟悉且具食療、保健、中藥功效、富含寡醣類及有機酸之枸杞及熟地黃為藥材，經萃取、濃縮成高黏度之浸膏溶液、色澤呈褐黃色、黏稠，中藥廠商做為調配劑方或將之製備成粉、粒，由於具有高濃度、黏度高，十分不易造粒，且粒子易吸濕、結塊，嚴重影響其製程、包覆率及品質安定性。本團隊擬針對高黏度造粒機制、技術研發並針對抗吸濕、結塊對品質變異評估及進行改善相關研究，未來作為中醫藥製藥中，相似高黏度浸膏造粒技術及藥品開發之參考。

貳、材料與方法

一、實驗材料

(一)實驗藥材及前處理

枸杞、熟地及其浸膏於購自 GMP 藥廠。原料藥材先經過選別、清理並混合均勻後，分別以每 1 公斤/包進行分裝、密封，並置 4℃(枸杞及熟地)冷藏庫及-20℃(枸杞及熟地浸膏)冷凍庫中，以備各項實驗分析及檢測。

(二)市售科學濃縮中藥

枸杞、生地黃、熟地黃及六味地黃丸等藥材購自國內 GMP 藥廠，貯存於 4 ℃下備用，並進行各項實驗分析及檢測。樣品先前處理(清洗、篩選、秤量)，以固液比為 1：7 之熱水(100 oC)萃取 2 次，每次萃取 40 分鐘。再 4.濃縮至適當黏度後取出(目前為濃縮至 1/5 重量)，貯存於 4 ℃下備用。

(三)食用膠及澱粉

玉米澱米、樹薯澱粉購自食品有限公司。食用膠：羧甲基纖維素(CMC)、果膠，購自食品有限公司，均屬食品級。

(四)枸杞及熟地黃萃取、濃縮

枸杞及熟地黃，取中藥材 300g 以固:液比=1:7(w/w)，在 100℃下進行第一次加熱萃取，萃取液經過濾(100mesh)，藥渣再以固:液比 1:7(w/w)進行第二次加熱萃取，萃取液過濾(100mesh)並與第一次萃取液混合均勻，利用減壓濃縮濃縮(Rotavapor，R-200，BÜCHI，Switerland；Heating Bath，B-490，BÜCHI，Switerland)。

二、機具

1. 流動床造粒機(HT - 02A，鴻道公司，台灣)
2. 示差掃描熱分析儀(DSC 822, Mettler-Toledo Gmdh, Analytical, Switzerland)
3. 快速黏度分析儀分析(rapid viscosity analyzer, RVA)
4. 物性測定儀(texture profile analyzer)
5. 界面張力儀(FACE Automatic Surface Tensiometer, Kyoua Interface Science Co., Ltd., Japan)
6. Color Meter ZE-2000 型色差計(Nippon Denshoku Industries Co., Ltd., Tokyo, Japan)

7. 分光光度計(Hitachi，Model U-2000，spectrophotometer，Tokyo，Japan)
8. pH meter (SARTORIUS BASIC pH Meter，Sartorius AG，PB-20，Germany)
9. 解剖式光學顯微鏡(Eclipse E-400, Nicon, Japan)
10. 雷射粒徑分析儀(Fritsch analysette 22, Germany)
11. 掃描式電子顯微鏡(ABT-150S, Topon Corp., Japan)
12. 高效能液相層析分析儀器(L-6000, Hitachi, Japan)
13. X – ray 繞射儀（Rigaku D / MAX-IIIA, Rigaku Keisoku Co., Ltd., Japan）

三、中(草)藥流動床造粒技術

流動床造粒製備使用流動床造粒機(HT - 02A，鴻道公司，台灣)，依據蘇(2012)之最適條件修改，故選定以下操作條件如下：

噴頭：二流體噴頭

噴霧 On：1 秒

噴霧 Off：1 秒

風門壓力：1.0 kg / cm2

外噴壓力：2.0 kg / cm2

內噴壓力：2.0 kg / cm2

控制組的造粒條件如下：

粉體：多孔性膳食纖維粉及一般玉米澱粉

粉體初始入料量：500 g (多孔性膳食纖維)

噴霧液流速：5、7、9 rpm

入風口溫度：70 ℃

四、品質及理化性質分析

(一) 粒徑大小(Particle size)

取適量樣品，以 75 %之酒精作為分散劑，放入雷射粒徑分析儀(Fritsch analysette 22, Germany)之攪拌槽中，其懸浮液流過鏡面使雷射光產生繞射，並以此繞射程度計算粒徑分佈及相關粒徑參數，其測定條件為遮蔽率 8 ~12 %、pump 85 %、stirrer 25 %。其結果以 analysette 22 及 Sigmaplot 軟體分析並紀錄。

(二) 黏度測定(viscosity)

參考陳(2013)方法修改，以黏度計 (Model DVⅡ, Brookfield

Engineering Laboratories, Inc., USA)測試膠體黏度，每次取 0.5 mL 樣品，使用 CP- 40 椎盤式探頭，以轉速 20 rpm 讀取 6 秒(轉五圈)後之黏度值，黏度數值以 c. P 表示，經 3 重覆後分析測得其平均黏度。

(三) 快速黏度測定儀分析(rapid viscosity analyzer, RVA)

依 Ito et al. (2007)之方法進行修改，依總重為 28 g 溶液換算不同濃度之乾重粉末置於鋁製測定杯中，再加入去離子水至 28 g，攪拌均勻後靜置 30min，放入攪拌槳後以快速黏度儀(Ezi, rapid viscosity analyzer, RVA, Australia)測定，條件如下：

1. 初始溫度設定 35℃(設備降溫極限)。
2. 槳葉攪拌速度 960 rpm 維持 10 秒，使樣品均勻分散。
3. 槳葉攪拌速度降為 160 rpm 直到結束。
4. 維持 35℃下恆溫 3min。
5. 以 10℃/ min 升溫速度到 95℃。
6. 於 95℃維持 3min。
7. 以 10℃/ min 降溫速度到 35℃。
8. 於 35℃下維持 8min，全程 26 min。

(四) 膠體硬度與沾附性

參考蘇(2012)將經過快速黏度測定儀糊化的樣品 28 g 倒至 9 cm 培養皿上，以物性測定儀(Model TA-XT2, Stable microsystems, Lodon, England)進行 5 重複之物性分析，測定參數設定如下：

Probe：35mm perspex cylinder probe (P / 35P)

Mode：Return to Start

Distance Format： strain：95 %

Pre- Test Speed：0.5 mm / sec

Test Speed：1.0 mm / sec

Post- Test Speed：1.0 mm / sec

Trigger Force：Auto - 3 g

探頭(P/ 35P)下壓樣品後，觸碰到樣品所產生的阻力參數為硬度(Hardness)，而探頭沾附膠體後離開液面所產生的拉力參數即為沾附性(stickiness)。

(五) 色澤分析(Color analysis)

造粒後樣品 5 g 放入載台，以 Color Meter ZE-2000 型色差計

（Nippon Denshoku Industries Co., Ltd Tokyo, Japan）之反射（reflectance）方式測定其 L、a、b 值，並由 L、a、b 值計算白色度(white index;W.I.)。L 值：100 為全白，0 為全黑；a 值：正為紅，0 為灰，負為綠；b 值：正為黃，0 為灰，負為藍；W.I. 值愈大，表示顏色愈白。標準板：x = 92.02。y = 94.01，z = 110.59。白色度(W.I.)及 Chroma(彩度)的計算公式如下：

$$W.I. = 100 - 【(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}】^{1/2}$$

$$Chroma = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

(六) 光學解剖顯微鏡

取粉體樣品於載玻片上，利用穿透式光學顯微鏡(Eclipse E-400,NiKon, Japan)並配合照相機(Nikon FDX-35)，觀察凝膠球粒外觀成型並照相。

(七) 掃描式電子顯微鏡(SEM)

依據 Lee et al (2002)方法並加以修飾，將粉體樣品於 35℃乾燥 24hr 後，所得樣品以碳膠(carbon tape)黏於鋁檯 (aluminum stab, Topon corp, Japan) 真空狀態下，覆上金膜 (gold coating) 90 秒，然後以掃描式電子顯微鏡 (ABT-150S, Topon corp, Japan) 觀察並照相。藉 SEM 來觀測各種不同製備條件對粉體樣品的影響。

(八) 示差熱掃描分析(Differential scanning calorimetry, DSC)

稱取 1 mg 樣品至 40μl 一般鋁製坩鍋中，於坩鍋蓋邊緣打洞，並將蓋緣與坩鍋密封，通入氮氣 80 ml/min、空氣 200 ml/min，以示差掃描熱分析儀(DSC 822, Mettler-Toledo Gmdh, Analytical, Switzerland)進行測定，並以 STARe Evaluation Software 軟體進行數據分析，條件如下：以升溫速率 20℃/ min 從 0℃加熱至 400℃，以空坩鍋(crucible)作為對照組，測定其玻璃轉換溫度(glass transition temperature, Tg)及各溶融與結晶之初始溫度 (onset temperature, To)、尖峰溫度 (peak temperature, Tp)、終止溫度(conclusion temperature, Tc)值及其熱焓值(enthalpy of gelatinization, ΔHgel)。

五、粉體造粒品質評估

(一) 水活性(water activity)測定

以水活性測定儀 AQUA-LAB Series 3TE (Decagon Devices, Inc. UAS)進行檢測，溫度設定 25 ℃，進行 3 重複平均，得知粉

體經流動床造粒後之水活性含量。

(二) 粉體玻璃轉化溫度(glass transition temperature)

參考蘇(2012)進行修改，秤取 2 mg 膠體或膠體乾燥膜至 40μl 一般鋁製坩鍋中，於坩鍋蓋邊緣打洞，並將蓋緣與坩鍋密封，通入氮氣 80 mL/ min、空氣 200 mL/ min，以示差掃描熱分析儀(DSC 822, Mettler- Toledo Gmdh, Analytical, Switzerland)進行測定，並以 STARe Evaluation Software 軟體進行數據分析，條件如下：

流動床粉體以升溫速率 20 ℃/ min 從 25 ℃加熱至 120 ℃先去除水分干擾，再以降溫速率 10 ℃/ min 從 120 ℃降溫至 0 ℃，並再次以升溫速率 20 ℃/ min 從 0 ℃加熱至 120 ℃，以空坩鍋(crucible)作為對照組，於第三段加熱取得玻璃轉化溫度(glass transition temperature, Tg)。

(三) 粉體假密度(bulk density)

將造粒後粉體輕灑於 12 mL 之容器中，容器重 W0，高於容器邊緣部分粉體以紙片輕輕刮除，再與容器一起進行秤重，進行 5 重複測定。

$$\text{bulk density (g/ mL)} = (W1 - W0)/12\text{mL}$$

(四) 粉體震實密度(tapped density)

將造粒後粉體置於秤重後的 10 mL 量筒(W0)中，一邊將粉體加入量筒中，一邊輕敲至樣品高度維持在 10mL 處不再下降，秤取粉體加量筒重量(W1)，進行 3 重複測定。

$$\text{tapped density (g/ mL)} = (W1 - W0)/(10\text{ mL})$$

(五) 流動性Carr's index (CI %)

參考 Carr (1965)之公式，以 bulk density 與 tapped density 預測粉體的流動性質：

$$\text{CI \%} = \frac{\text{tapped density} - \text{bulk density}}{\text{tapped density}} \times 100\ \%$$

Carr’s index(CI)流動性對照表：

CI %	流動性
<15	非常好
15-20	佳
20-35	普通
35-45	差
>45	極差

(六) 休止角(angle of repose)

參考 Frączek et al. (2007)之方法，以不鏽鋼漏斗固定玻璃漏斗開口直徑 90 mm，底部直徑 5 mm，調整離底座距離 3cm，每次秤取樣品量 1 g，以數位相機(Digital camera, Canon, power shot S90, Japan)進行三重複拍攝，以圖像分析軟體 MAGEJ v. 1.46r software (National Institutes of Health, USA)，進行休止角分析。

Angle of repose (˚)對照表(Carr, 1965)：

˚	流動性
<30	非常好
31-35	佳
36-45	普通
46-55	差
>56	極差

(七) Image J粒徑分析

取適量造粒粉體樣品黑色平台上，以解剖立體顯微鏡 SM Z-800 Nikon model C- PS (Nikon, Japan)及數位單眼相機(digital single lensreflex camera, Canon, 450D, Japan)觀察外觀並紀錄資料，並以 Helicon forcus(Helicon soft Ltd., version 5.1.6. X64, Ukraine)軟體進行立體顯相，分散取 5 點影像進行圖像分析，並記錄同等倍率下的顯微鏡校正刻度玻片，以作為校正。

圖像分析參考 Dacanal and Menegalli (2010)使用 MAGEJ v. 1.46r software (National Institutes of Health, USA)。固定條件如下：

比例尺: 0.456 pixel /μm

Threshold color: B& W

Color space: HSB

Analyze particles size: 40-infinity

Analyze particles Circularity: 0.00- 1.00

(八) 統計分析

使用統計分析系統進行變異數分析(ANOVA，analysis of variance)與 Duncan's multiple range test 分析，顯著差異為 α=0.05 比較其差異顯著性，結果以平均值表示。

參、結果與討論

傳統中草藥製程：藥材選材、清洗、飲片加工、炮製等處理步驟，耗時且劑效有限。近年“科學濃縮中藥”，萃取、濃縮、造粒是重要程序，如何精緻化製程，提升其品質或應用性，並評估製程技術改良後對吸收、物性、化性、安全性及毒性等之影響，成為重要研究課題及中草藥業者急需克服之瓶頸。「粉劑」及「粒劑」是國內科學中藥常用之劑型，其主要將中(草)藥濃縮液，配合澱粉、乳糖及多醣增黏劑作為賦型劑進行造粒(granulation)；比較常用之造粒方式有流動層（fluidized bed）造粒，噴霧乾燥（spray drying）造粒及壓縮（compression）造粒，其主要目的在提高品質安定性及提供更多附加價值。

一、枸杞機能性成分及不同操作模式處理枸杞浸膏對其物性變化之影響

枸杞(Lycium barbarum L.)富含許多生理活性，而其主要有效成分為枸杞多糖，也可從其基本成分分析中看出碳水化合物佔了總成分的 73.64 %(表一)，另蛋白質佔了 14.18 %，亦造成了其萃取物—枸杞浸膏(熱水萃取、濃縮之產物)富含醣類及有高黏度的特性，導致在進行噴霧乾燥或流動床造粒過程中易發生輸送不易、噴嘴堵塞及塌床等狀況，然枸杞熱水萃取物仍含有許多醣類以外之機能性成分及不錯抗氧化能力 (如表三)；但地黃僅噴乾後之粉末會產生沾黏性，在浸膏中仍保有較佳之流動性，故本研究僅以枸杞為原料，經萃取、濃縮得到浸膏，藉由不同操作處理改變浸膏 pH 值(4、6、8)、加熱處理(50℃、70℃、90℃)及添加金屬離子(NaCl、CaCl2、AlCl3；分別添加 5%、10%、15%)後進行黏度、成膜特性、外觀分析，並評估上述處理對浸膏流動性之影響。實驗結果如下：改變浸膏 pH 值，會產生大量氣泡使體積大幅增加，調整 pH 值至 6 時，其黏度、扭力、沾黏性、硬度具該組處理之最大值(如圖一(B))，故調整 pH 值對於降低浸膏黏度是有初步的效果；隨著濃度降低、加熱溫度升高、陽離子價數及添加量增加可降低黏度(圖一)、扭力(表四、五、六)、沾黏性(圖二)、硬度，本實驗結果可知上述處理對流動性與物性變化，期盼未來可提供作為枸杞加工、造粒處理之基礎研究。

二、流動床造粒操作參數模式系統化建立及操作參數評估

多孔性膳食纖維粉及枸杞、地黃浸膏以實驗室之設備大量製備不易，故先以玉米澱粉為賦形劑，果膠為黏著劑作為替代實驗，玉米澱粉亦常應用於藥品和食品工業上。本試驗以不同粉體入料量、黏著劑濃度、黏著劑

入料流速及入風口溫度等操作參數探討其造粒的機制、時間及品質，多孔性膳食纖維粉造粒成核於 35 ~ 37 μm (圖三)，與玉米澱粉(35 ~ 37 μm) (圖四)相同，顯示主要影響成核後粒徑的因素主要為噴霧液滴粒徑，可推知本實驗之系統應屬於噴霧液滴粒徑大於粉體粒徑，為浸泡(immersion mechanism)模組(圖五)，並隨著造粒時間增加，粒徑分佈趨向於呈現尖峰 260 ~ 270 μm 及 490 ~ 500 μm 的兩大波峰段直至平衡(圖三、四)；不同粉體入料量則以入料量 700 g 最快(圖六)；不同黏著劑濃度則以 4 %較佳(圖七)，且需以黏著劑理論液滴穿透時間為參考指標，而非單純考慮其黏度或黏著性；不同黏著劑流速則以 15 rpm 為最佳(圖八)，流速的提高有助於更佳的黏著濟穿透與擴散；不同入風口溫度則以 70 ℃有最好的效果(圖九)，以上結果與 DSC 熱分析結果相同，再根據以上條件針對多孔性膳食纖維粉及枸杞、地黃浸膏現場操作情形修改條件如下：多孔性膳食纖維粉因密度過低(容易被吹入布管)及製備不易，以相同流動層層高為準，調整入料粉末為 500 g 及風門壓力為 0.5 kg / cm^2；因枸杞浸膏濃縮後之高黏性，若以黏著劑流速 15 rpm 操作流動床造粒會導致塌床及爆管(如圖十)，故調整黏著劑流速 5 ~ 7 rpm。

三、模擬黏度系統評估流動床造粒之黏著效應及吸濕性

流動床造粒技術常應用於科學中藥及粉粒食品製備中，其中麥芽糊精在許多文獻及作業中常作為補捉香氣成分的賦形劑，甚至其高吸濕性可能達到提高玻璃轉換溫度及抗結塊的效果；而黏著劑於浸泡機制中扮演粉體粒徑增大的重要因子，除業界常用高黏度的羧甲基纖維素(CMC)外，某些澱粉糊液亦具有高回凝性(能產生高黏度)，故本研究擬以台中秈糯 1 號穀粉(TCSW)與玉米澱粉等高回凝性之糊化漿作為黏著劑，檢測其糊化特性，並探討分別添加麥芽糊精(MD)混合物黏度及成膜特性差異，作為評估應用於流動床造粒黏著劑之參考。實驗結果如下: 將麥芽糊精(MD)應用在黏著劑的添加，須先了解 MD 本身與添加於黏著劑後的黏度特性影響，進行評估使用量或對產品的影響預測，MD 的黏度特性如表七所示，MD 添加量小於 20 %時，對於黏度、膠體硬度、膠體沾附性影響皆低，而超過 40 %後溶解度稍為不佳，使其黏度、膠體硬度、膠體沾附性數值較高，應證 Loret et al.(2004)指出 MD 添加量超果 40%會不利於膠體的分布，但不同濃度 MD 對於黏度特性的影響與不同濃度黏著劑相比，MD 濃度影響較低，故評估適合流動床造粒膠體黏度將先以不同濃度黏著劑進行黏度特性評估，選取適當濃度黏著劑再另行添加不同濃度 MD(10、20、30 %)觀察 MD 對於黏著劑之影響。TCSW 與玉米澱粉以不同黏度測定快速黏度測定儀其圖譜如圖十

一所示，TCSW 糊化起始溫度約為 68 ℃，玉米澱粉糊化起始溫度為 73 ℃，玉米澱粉糊化溫度較 TCSW 糊化溫度高；而玉米澱粉黏度較 TCSW 略高，可能因 TCSW 為穀粉，成分中澱粉的比例較玉米澱粉低，或是玉米澱粉之直鏈澱粉含量高，造成回凝所致。

參考 Wang and Zhou (2012)與 Jouquand et al. (2004)之研究以 20 %麥芽糊精進行保護成分並提高玻璃轉化溫度(Tg)，將不同濃度之黏著劑分別添加 20 %麥芽糊精(MD)進行黏度評估，添加 MD 相較澱粉濃度對於黏度之影響較低，如圖十二所示：添加 20 % MD 於 TCSW 黏度有略微提升，如 TCSW 4 %黏度添加 20 % MD 後黏度從 163.67 c. P 上升至 214.00 c. P，而 20 % MD 添加於 corn starch 濃度小於 3 %下，添加 MD 較未添加 MD 有較高的黏度，但若添加 corn starch 濃度大於 3 %則有稍微降低的情況，Christianson et al. (1981)和 Shi and BeMiller (2002)中指出當澱粉與膠在糊化前或糊化期間會形成複雜的交互作用而溶出直鏈澱粉分子，可能因此而使高濃度的玉米澱粉黏度下降；另添加 MD 會使 TCSW、corn starch 黏度尖峰的時間略微往後，代表 MD 提高澱粉糊化所需的溫度；MD 的添加對於 CMC 之黏度有明顯的上升，於 Buliga et al. (2002)的專利中指出 CMC 與 MD 混合時，MD 為具有分散性的屏障，保留 CMC 的膠體特性，致使黏度明顯上升。

添加 MD 後膠體硬度與沾附性上升(表八)，且加熱黏著劑觀察其吸熱熱焓值(表九)，顯示 MD 添加可以明顯降低熱焓值($p< 0.05$)，加速黏著及乾燥效果，尤以玉米澱粉未添加 MD 之熱焓值 1679.85 J/ g，在添加 30% MD 後降至 385.28 J/ g，而添加 MD 後乾膜吸濕性降低，其中以 CMC 水溶性佳吸濕性較高，經由添加 30% MD 後吸濕性由 10.122 %降至 7.014 %，且添加 MD 使玻璃轉化溫度上升，玉米澱粉由 80.75℃上升至 108.66℃，顯示可以有效降低結塊的發生。

四、模擬流動床造粒腔室溫度之黏度系統成膜特性

將黏著劑模擬流動床腔室內之產品溫度約 55℃進行乾燥後，進行成膜特性檢測，成膜吸濕性如表十所示，未添加 MD 的黏著劑吸濕性皆較添加 MD 後的吸濕性略高，而 CMC 本身吸濕性強，添加 MD 後吸濕性有下降趨勢($p< 0.05$)，吸濕性從 10.122 %降至添加 30 % MD 的 7.01 %，於 TCSW 和 corn starch 添加不同比例 MD 後吸濕性的趨勢較不明顯。成膜後的吸濕性下降，等於表面物質的玻璃轉換溫度提升，減少沾黏性的產生，就能達到抗結塊的效果產生。

玻璃轉化溫度(Tg)常作為評估不定型食品是否易結塊的指標，當溫度超

過產品的玻璃轉化溫度，則容易形成名為“sinter”的凝聚橡膠態(Descamps et al., 2009)，使粉體彼此凝結且形成高硬度的結塊(Fitzpatrick et al., 2010)，造成使用上的不便，而不同黏著劑之玻璃轉化溫度如表十一所示，添加 MD 後皆有效使黏著劑玻璃轉化溫度上升，惟添加不同濃度 MD 變化不大，然皆可使黏著劑的玻璃轉化溫度大於 92 ℃，顯示在一般貯藏情況下不易造成結塊。由此可知，麥芽糊精添加於黏著劑，無論在減少吸濕性及提高玻璃轉換溫度都有不錯的表現，相信麥芽糊精定能提供一定程度的抗結塊效果。

成膜後的黏著劑在電子顯微鏡(SEM)觀察下(圖十四)，TCSW 與 corn starch 膜表面具有凝膠時的紋路，尤其是 corn starch 直鏈澱粉含量高，故發生回凝而使表面形成皺褶(圖十四(c))，經添加 MD 形成光滑表面；而 CMC 原本表面平滑，經添加 MD 後可能因為 Buliga et al. (2002)提到 MD 會保護 CMC 的黏度效應，而導致表面形成紋路(圖十四(e)、(f))，未添加膠體的 MD 添加 40 %時表面有些許結晶狀，顯示過度的添加 MD 可能會造成溶解不全(圖十四(h))。

五、新型造粒技術評估與修飾

根據以上實驗，除了乾混型的抗結塊劑(例如二氧化矽)，其他於黏著劑添加的高分子量膠體都存在一個根本的問題，當黏著劑本身已處於高黏度系統的情形下，除了麥芽糊精(20%濃度以下)黏度效益不顯著以外，再添加膠體進黏著劑已經不太可能，故本實驗擬以蘇(2012)實驗中，試驗出較高玻璃轉換溫度的果膠及玉米澱粉作為賦形劑，配合流動床造粒最佳操作條件(浸泡模式)，一來可以其作為阻隔劑(沾黏性高的萃取液外圍包覆不會黏的澱粉及果膠)，二來是果膠會於外層溶解形成薄膜包覆，以此來減少沾黏性的產生。探討不濃度果膠添加於賦形劑及黏著劑的效果，並評估其可行性。實驗結果如下:水分含量隨著造粒時間的增加，並沒有顯著的改變，說明黏著劑隨著造粒時間增加而黏附越多於粉體上時，並沒有增加粉體的吸濕性(表十二)；流動性的結果如表十三所示，隨著造粒時間增加，流動性皆有顯著下降，代表粉體顆粒間的沾黏性減少，果膠添加於粉體中效果不如添加於黏著劑中顯著，可能原因果膠添加於粉體中無法有效的分散及成膜時間不足，導致其流動性降低效果沒有添加於黏著劑好，若能分批適時補充果膠粉末，應能再提升其效果。粒徑分析結果如表十四所示，果膠添加於粉體中相對於控制組，粒徑仍有增加的效果，惟相對於果膠添加於黏著劑中效果並不顯著，但此一問題於高黏度系統時，則相對較無此問題存在，高

黏度系統本身黏著劑即有高黏度，果膠添加只須扮演成膜及抗結塊的效果即可；另觀其粒徑分佈(圖十五)，果膠添加於粉體有效改善粒徑的均一性，顆粒大小有增加，且更趨向一致性，可減少成品檢收的浪費及降低白粒的產生，反觀果膠添加於黏著劑，粒徑分佈範圍較大，參差不齊的粉體顆粒可能會導致品質均一性受到影響。

六、抗結塊技術研發與改善

枸杞(Lycium barbarum L.)富含許多生理活性，其主要活性成分為枸杞多糖，為國人常使用的中草藥之一，科學中藥發展下，將其製成粉末後，常有結塊現象發生，故本研究擬以流動床造粒，以多孔性纖維為賦形劑，噴入枸杞萃取液—枸杞浸膏進行第一次造粒(30、60、90、120 分鐘)，接著使用 0.5%CMC 為黏著劑進行二次造粒(30、60、90、120 分鐘)，針對不同造粒階段、時間所製成之粉末產品之外觀、色澤、玻璃轉換溫度、吸濕性、Bulk density、Tapped density、休止角、水活性、流動性分析及以解剖顯微鏡觀察其結構評估。實驗結果如下：第一階段造粒過程中，隨時間增加，休止角、流動性皆有下降的趨勢(表十五)，依據(Carr, 1965)休止角的參考數值，休止角越低越好，以枸杞浸膏造粒後的粉末無法偵測到休止角，顯示其表面沾黏性太高，導致其無法順利通過漏斗，經過第二次包覆後，休止角有顯著的降低，甚至包覆 120 分鐘後，休止角已低於 30，已達到非常好的狀態；流動性結果顯示於第二次包覆初期(30 及 60 min)仍有上升的趨勢，推測可能尚未包覆完全，90 分鐘後即顯著下降至 18.8、18.0，根據 Carr (1965)之表格顯示流動性已達佳的狀態，說明此一製程能有效改善粉體表面的沾黏性，進而達到抗結塊的效果。

第二階段造粒(包覆)，以 CMC 為黏著劑造粒，除提高產品玻璃轉換溫度外，亦希望可在粉體外圍形成一層薄膜，減少產品結塊發生，隨造粒時間增加至 120 分鐘，其 Carr's index(18.0518 %)、Bulk density(0.1304 g/ ml)、Tapped density(0.1592)、紅色度(a 值)(4.8325)、吸濕性(7.8218 g/ ml)具有該組最低值。尤其以玻璃轉換溫度的結果如表十六顯示:單以枸杞浸膏流動床造粒可以發現，隨著造粒時間延長，浸膏於粉體上含量提高時，玻璃轉換溫度亦不斷降低(55.56、45.68、40.58、33.54 及 39.54°C)，此一現象對粉體品質有不良的影響，表面的能量經運送、彼此摩擦或貯存溫度提高時，容易使表面產生較高的沾黏性，進而產生結塊；然於二次造粒(包覆)後，玻璃轉換溫度有顯著的提高(52.55、40.85、52.27 及 82.58°C)，如此可防止沾黏區(stickiness)的產生，達到抗結塊的效果。本實驗結果可知藉由二次包覆造

粒技術可改善對粉體流動性、提高 Tg，期盼未來可提供作為枸杞加工、造粒抗結塊處理之基礎研究。

熟地黃浸膏以多孔性纖維為賦形劑進行流動床造粒，其品質結果如表十七所示：休止角及流動性接隨造粒時間延長而降低，休止角為 43.91、39.80、37.08 及 32.98，流動性為 40.99、46.01、19.76、31.61 及 18.50，根據 Carr (1965) 之參數來判斷，皆已達到佳的狀態，由此可知以多孔性纖維為賦形劑之製程已可解決熟地黃浸膏造粒粉末的表面沾黏性及結塊現象。

肆、結論與建議

一、結論：

本研究以枸杞及熟地黃取萃取、濃縮液為藥材，進行高黏度浸膏流動床造粒可行性探討及品質改善之研究，藉由(一)不同環境條件改變浸膏高黏度、(二)流動床造粒條件最佳化、(三)麥芽糊精及澱粉糊液添加於黏著劑、(四)果膠粉末添加於賦形劑及(五)二次造粒(包覆)製程等，透過改變表面物質玻璃轉換溫度、吸濕性及水活性等，不同造粒新製程對高黏度黏著劑系統產生降低表面沾黏性的影響。

(一) 不同環境條件改變浸膏高黏度：

以入料液輸送而言，扭力是重要的參考因子，實驗結果中，添加不同金屬離子隨濃度增加，黏度下降效果越顯著，而三價鋁離子效果又優於二價鈣離子及一價鈉離子；pH 值則以弱酸(pH = 5)及弱鹼(pH = 8)黏度下降效果最佳；溫度則越高黏度下降越低。

(二) 流動床造粒條件最佳化：

以多孔性纖維粉體為賦形劑，其流動床造粒機(HT - 02A，鴻道公司，台灣)最佳操作條件如下：以果膠為黏著劑則最佳濃度為4%(可以此黏度換算其它膠體濃度)、多孔性纖維賦形劑入料量為500g、風門壓力為 0.5 kg / cm^2、入風口溫度為 70 ℃、黏著劑流速 5 ~ 7 rpm。

(三) 麥芽糊精及澱粉糊液添加於黏著劑：

一般傳統製程會將麥芽糊精及澱粉添加於賦形劑中，僅作為稀釋劑或乾混型抗結塊劑，但若將麥芽糊精及澱粉糊液添加於黏著劑可以有效提升粉體表面玻璃轉換溫度及降低吸濕性，且若為高黏度系統，一來麥芽糊精於 20%濃度以下黏度效益不顯著，但已能有效提高玻璃轉換溫度，二來澱粉糊液若能搭配前端入料液升溫裝置及保溫輸送管路，即可解決輸送問題，亦可提供大分子量不易於乾燥後產生沾黏性的效果。

(四) 果膠粉末添加於賦形劑：

果膠粉末添加於賦形劑可解決高黏度浸膏(黏著劑)已無法再添加膠類的問題，同時亦能於表面形成膠膜表面，提供膠類乾燥後不易產生沾黏性的特性，其粉體流動性及休止角亦有顯著的改善。

(五) 二次造粒(包覆)製程：

在沒有前端加熱裝置及輸送管路保溫裝置的情況下，以二次造粒(包覆)技術處理，可以發現二次造粒(包覆)後，玻璃轉換溫度有顯著的提高(52.55、40.85、52.27 及 82.58°C)，如此可防止沾黏區(stickiness)的產生，達到抗結塊的效果。

二、建議：

(一) 適度改變浸膏酸鹼性及其帶電性可降低其黏度及乾燥後粉體的沾黏性。

(二) 入料液系統設置升溫裝置及保溫輸送管，可降低入料液黏滯系數。

(三) 枸杞浸膏機能性成分至今尚無一個定論，只知大方向為枸杞多醣蛋白質複合物的分子量，然其分子量於各篇文獻中又不一致，如 Zhu 等(2013)以 LBP-s-1 (1.92×10^6 Da)、Ke 等(2011)以 LBP-F5 (5.3×10^4 Da)及 Zou 等(2010)以 LBP-1 (2.25×10^6 Da)，希盼能有機會再深研這一部分。

(四) 希盼中藥司是否有適合之廠商，可以有互動探討的機會，以證實本研究之核心技術及理論。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-008 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. 林宜信主編，2004，建構臺灣中藥用藥安全環境。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。
2. 林宜信主編，2005，建構台灣中草藥用藥安全規範系列叢書(Ⅲ)-中藥用藥安全與實務。行政院衛生署中醫藥委員會。台中。
3. 孔憲鐸，2000，中藥現代化。科學知識第 51 期：53~65。
4. 謝秀珠，“中藥新製劑研發與應用”。*人民衛生出版社*，北京，中國，1994。
5. 柴瑞霽，中醫概論，知音出版社，台灣，台北，2002。
6. 劉新裕，2000，藥用植物資源之開發與利用（5～4），行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫，計畫編號：CCMP89-RD-050。
7. 謝秀珠，1994，中藥新製劑研發與應用，人民衛生出版社，中國、北京。
8. 魏嘉伶，2004，中藥材中重金屬含量限量標準訂定（草案）之研究計畫，中醫藥年報，22(6)：141-170。
9. 王杰。1991。濟南枸杞子化學成分分析。中國藥學雜誌。26: 269-270。
10. 王金童、王秀娟。1999。枸杞子的化學成分和藥理研究概況。天津藥學。11(3): 14-16。
11. 王嘉麒。2007。枸杞中類黃酮素、多醣體與類胡蘿蔔素的製備及抗氧化活性評估。輔仁大學食品科學系碩士論文。
12. 白壽寧。1999。超臨界 CO2 萃取枸杞油及枸杞色素研究。糧食與油脂。4: 12-16。
13. 朱蔚。1996。近年來枸杞的化學研究概況。中藥材。19(5): 260-262。
14. 江詩文。2004。植物多糖萃取物對肝癌與 T 淋巴癌細胞增殖之影響。台北醫學大學保健營養學系碩士論文。
15. 行政院衛生福利部台灣中藥典編修委員會。2012。台灣藥典。163。
16. 何進、張聲華。1995。枸杞及枸杞多糖研究(Ⅰ)。食品科學。16(2): 14-21。
17. 李春生、杜桂芝、趙全成、安鳳敏、王路宏。1990。枸杞子化學成分的研究。中國中藥雜誌。15: 43-44
18. 苟春林、苟金萍、張豔、王曉菁、薑瑞。2012。枸杞多糖的提取分離及其組成研究。宁夏农林科技。89(5): 90-92。
19. 張雲霞、王萍、劉敦華。2008。枸杞活性成分的研究進展。農業科學研究。29 (2): 79-82.
20. 梁雅婷。2002。枸杞之抗氧化與抗致突變性質及其多醣組成分析。國立

中興大學食品暨應用生物科技所碩士論文。
21. 陳泳辰。2008。枸杞多醣萃取條件及生物活性之探討。輔仁大學食品科學系碩士論文。
22. 陳勁君。2003。氮肥種類及用量對枸杞生長及生理營養的影響。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
23. 詹雅婷。2007。奈米/次微米化枸杞懸浮液抗氧化性及安全性之探討。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
24. 齊宗紹、李淑芳、吳繼平、曲蓉、楊玉芳、張麗娟、楊曉萍。1986。枸杞子和枸杞葉化學成分的研究。中藥通報。11(3): 41-43。
25. 劉淑鈴。2001。枸杞子及其成分東莨菪素對家兔之藥動學與藥效學研究。中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文。
26. 蘇柏駿。2012。以粉體及黏著劑之操作參數探討流動床造粒機制及品質修飾效果。國立中興大學食品暨應用生物科技所碩士論文。
27. Adom K. K. and Liu R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. J. Agric. Food. Chem. 50: 6182-6187.
28. Augs-Burger L. L. and Vuppala M. K. 1997. Theory of granulation, in ”Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology” Ed. D. M. Parikh, PP. 7-23. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
29. Awang D. V. C. and Kindacl D. G. 1991. Herbal medicine Echinacea. Can. Pharmaceutical J. 124: 512-515.
30. Carr R. L. 1965. Evaluating flow properties of solids, Chemical Engineer. 72:163-168.
31. Chau C. F., Wen Y. L. and Wang Y. T. 2006. Effects of micronisation on the characteristics and physicochemical properties of insoluble fibres. Journal of the Science of Food and Agriculture. 86: 2380-2386.
32. Frączek J., Złobecki A. and Zemanek J. 2007. Assessment of angle of repose of granular plant material using computer image analysis. Journal of Food Engineering. 83:17-22.
33. Gan L., Zhang S. H., Yang X. L. and Xu H. B. 2004. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum. Int Immunopharmacol. 4: 563-569.
34. Hu C. and Kitts D. D. 2000. Studies on the antioxidant of Echinacea root extract. J. Agric. Food Chem. 48: 1466-1472.

35. Ito M., Ohta K., Nishio Z., Tabaki T., Hashimoto N., Funatsuki W., Miura H. and Yamauchi H. 2007. Quality evaluation of Yellow Alkaline Noodles Made from the Kitanokaori Wheat Cultivar. Food Science and Technology Research. 13(3): 253-260.
36. Kosar M., Altintas A., Kirimer N. and Baser K. H. C. 2003. Determination of the free radical scavenging activity of Lycium extracts. Chem Nat Compd. 39:531-535.
37. Le K., Chiu F. and Ng K. 2007. Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii. Food Chem. 105: 353-363.
38. Li X. M., Li X. L. and Zhou A. G. 2007. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from Lycium barbarum fruits in vitro. Eur Polym J. 43: 488-497.
39. Liu N., Li Z. and Tso M. 1995. A rerysearch of Lycium barbarum L. in rescue of retain from photic injury in rats. China Academic Journal Electronic Publishing House. 11: 31-33.
40. Luo Q., Cai Y., Yan J., Sun M. and Corke H. 2004. Hypoglycemic and hypolipodemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from Lycium barbarum. Life Sci. 76: 137-149.
41. Qian J. Y, Liu D. and Huang A. G. 2004. The efficiency of flavonoids in polar extracts of Lycium Chinese Mill fruits as radical scavenger. Food Chem. 87: 283-288.
42. Wang Y. J. and Jhuang Y. S., 1995. Preparation and application of microcapsules. Bioindustry. 6(3): 27–31.
43. Yeom C. K., Lee S. H. and Lee J. M. 2000. Effect of the ionic characteristics of charged membranes on the permeation of anionic solutes in reverse osmosis. Journal of Membrane Science. 169:237-247.

陸、圖、表

表一、枸杞基本成分分析

Components	Content (%)
moisture	10.76 ± 0.64
dry matter	89.24 ± 0.53
crude ash	5.14 ± 0.21
crude protein	14.18 ± 0.32
crude lipid	2.42 ± 0.21
crude fiber	3.17 ± 0.16
carbohydrate	73.64 ± 0.41

1. Each value represents mean±SD (n=3).

表二、枸杞熱水萃取物之單醣組成

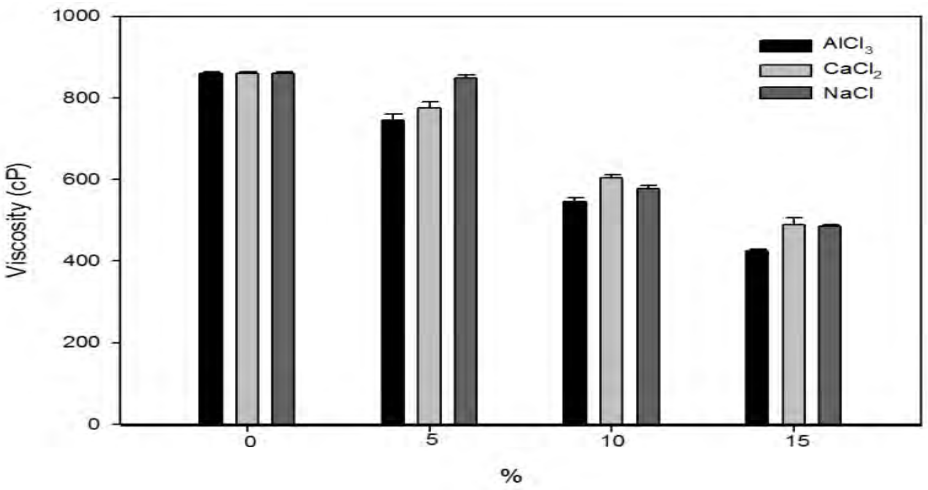
Components	枸杞熱水萃取物 (mg/g sample)
arabinose	61.23 ± 3.20
galatose	26.31 ± 1.17
glucose	201.32 ± 29.38
mannose	0.14 ± 0.22
rhamnose	7.62 ± 2.94
xylose	6.84 ± 1.17
glucosamine	2.06 ± 0.22

表三、枸杞熱水萃取物機能性成分及抗氧化特性分析

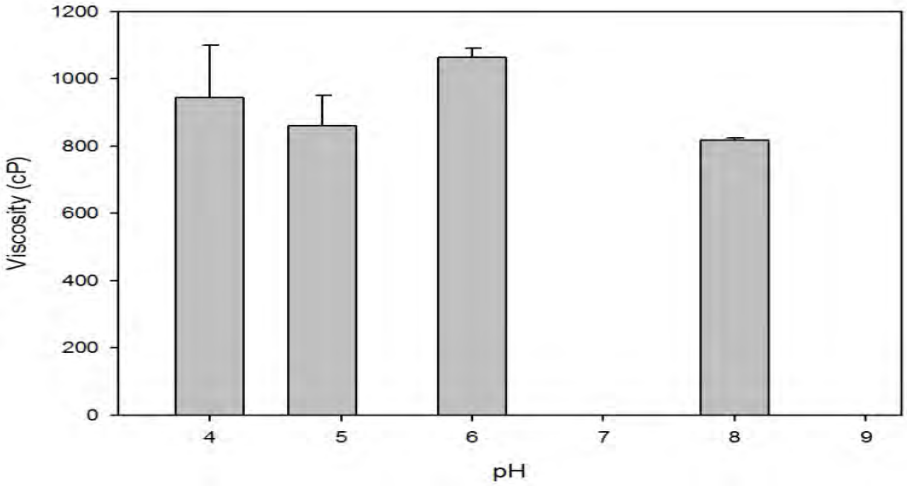
	content
total phenol	14.76 ± 0.32
flavonoid	1.58 ± 0.13
total carotenoids	0.32 ± 0.08
β-carotene	0.03 ± 0.01
亞鐵離子 (EC50)	0.72 ± 0.06
螯合亞鐵離子 (EC50)	2.76 ± 0.08
DPPH (EC50)	0.56 ± 0.12

1. mg gallic acid eguivalent/g of dry weight
2. mg catechin eguivalent/g of dry weight
3. mg β-carotene of dry weight
4. Each value represents mean±SD (n=3).

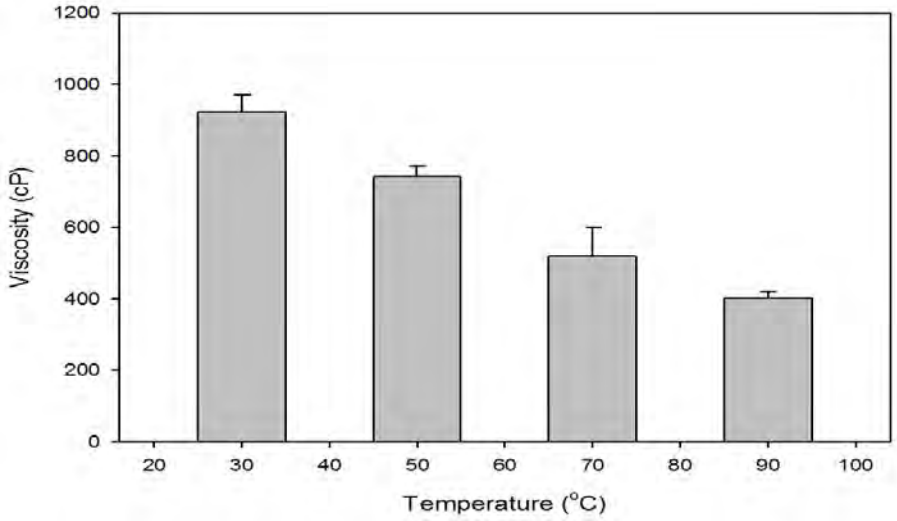
(A)



(B)



(C)

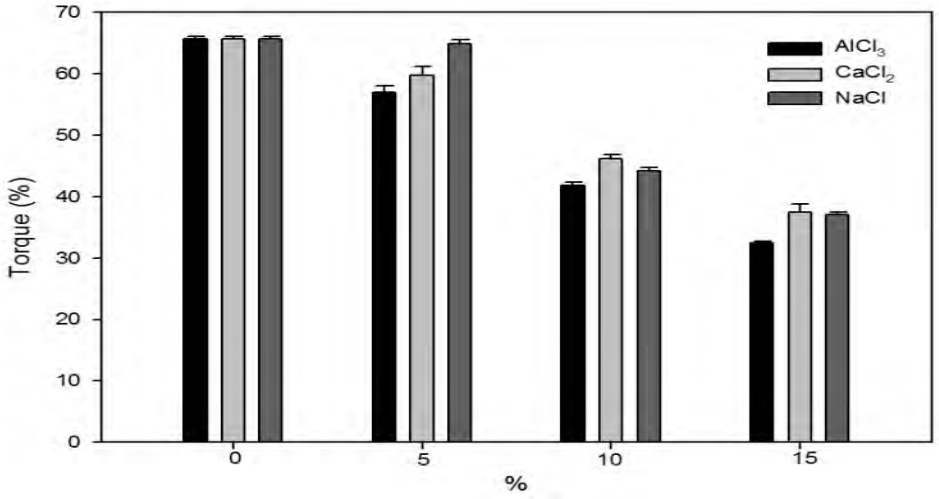


圖一、不同處理條件下浸膏之黏度值

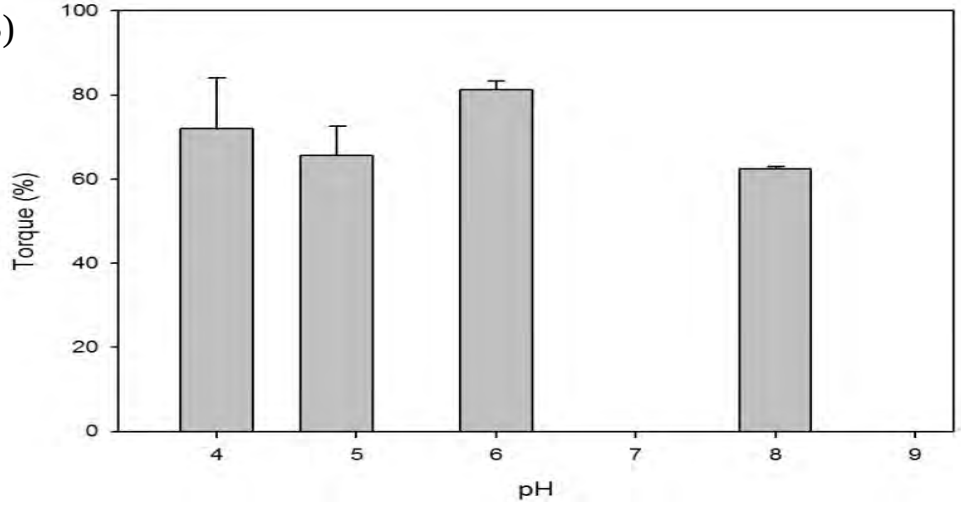
(A) 添加不同金屬離子 Na^{+}、Ca^{2+}、Al^{3+}(分別添加 5、10、15%)

(B) pH(4、6、8)　(C)溫度(50、70、90℃)

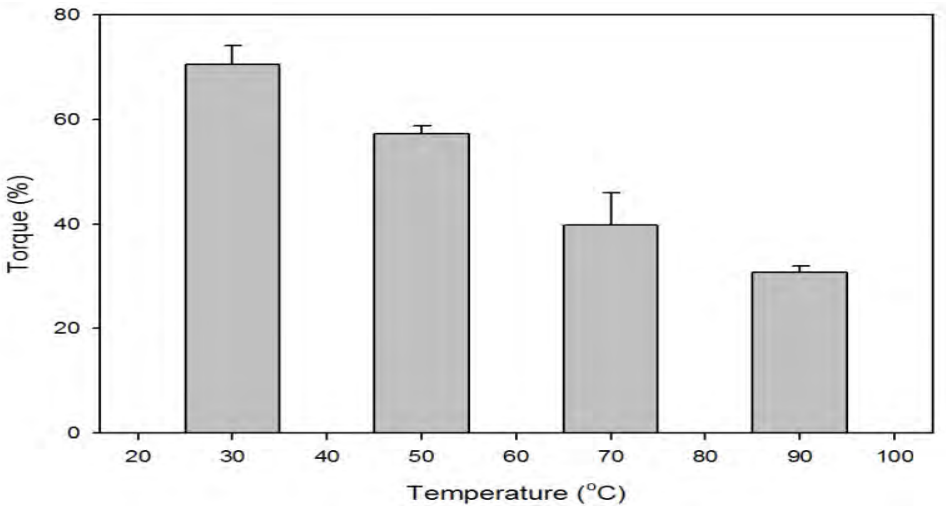
(A)



(B)



(C)



圖二、不同處理條件下浸膏之扭力

(A) 添加不同金屬離子 Na^{+}、Ca^{2+}、Al^{3+}(分別添加 5、10、15%)

(B) pH(4、6、8)　(C)溫度(50、70、90℃)

表四、改變枸杞浸膏 pH 值 (4、6、8)下之硬度及沾黏性

	Hardness (g)	Stickiness (g)
Blank	$59.91^{b} \pm 4.09$	$38.36^{a} \pm 3.00$
pH = 4	$55.33^{b} \pm 1.09$	$19.05^{b} \pm 2.69$
pH = 6	$65.59^{a} \pm 1.24$	$38.20^{a} \pm 0.54$
pH = 8	$31.78^{c} \pm 1.49$	$12.43^{b} \pm 1.38$

Each value represents mean±SD (n=3).

Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

表五、改變枸杞浸膏溫度(50、70、90℃)下之硬度及沾黏性

	Hardness (g)	Stickiness (g)
Blank	$35.91^{a} \pm 4.05$	$17.14^{a} \pm 4.82$
50℃	$26.23^{a} \pm 18.26$	$15.78^{a} \pm 6.34$
70℃	$26.39^{a} \pm 6.79$	$10.22^{a} \pm 2.94$
90℃	$38.90^{a} \pm 12.67$	$17.49^{a} \pm 6.52$

Each value represents mean±SD (n=3).

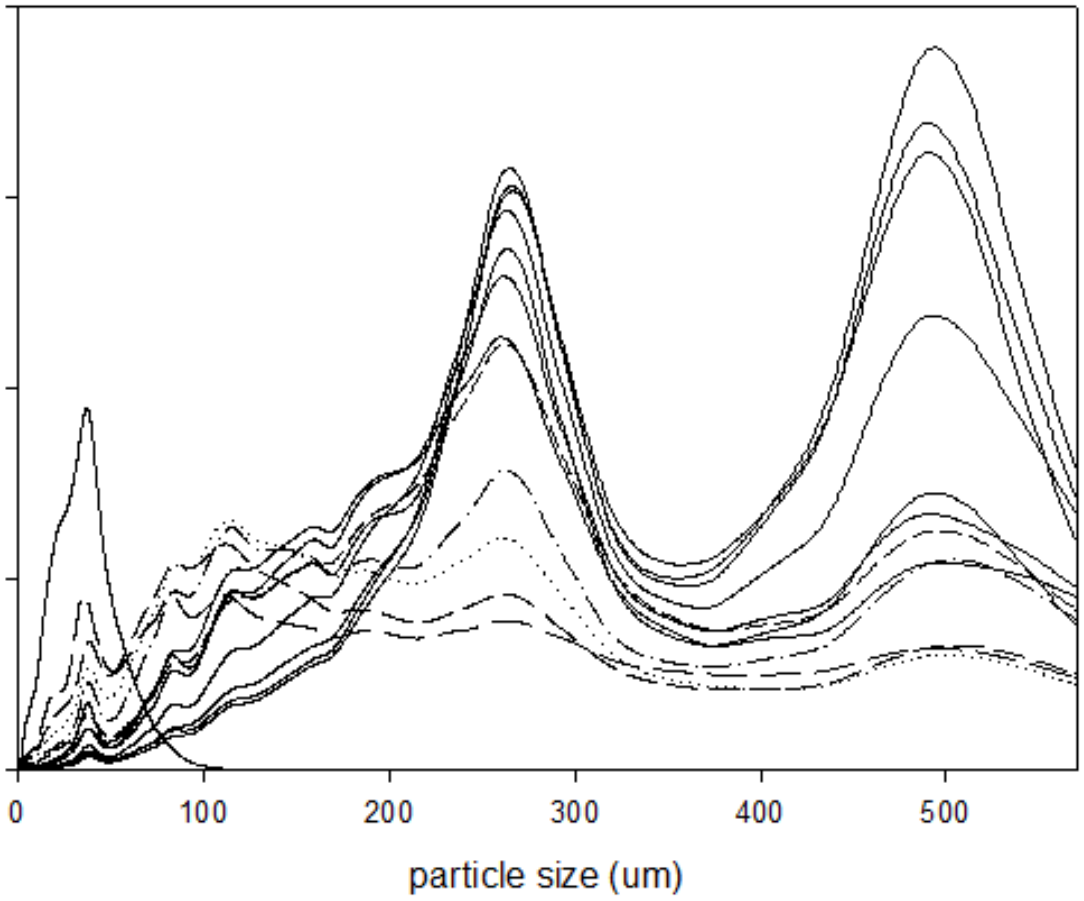
Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

表六、添加不同金屬離子 Na^{+}、Ca^{2+}、Al^{3+} (分別添加 5、10、15%)枸杞浸膏之硬度及沾黏性

	Hardness (g)	Stickiness (g)
$AlCl_3$ 0.05%	$120.96^{a} \pm 37.44$	$85.06^{a} \pm 33.06$
$AlCl_3$ 0.10%	$82.77^{cd} \pm 36.74$	$55.51^{cd} \pm 29.38$
$AlCl_3$ 0.15%	$67.09^{cd} \pm 17.33$	$44.27^{de} \pm 16.30$
$CaCl_3$ 0.05%	$108.35^{ab} \pm 30.23$	$73.47^{ab} \pm 25.21$
$CaCl_3$ 0.10%	$85.66^{cd} \pm 34.00$	$55.81^{cd} \pm 27.79$
$CaCl_3$ 0.15%	$56.31^{de} \pm 16.20$	$32.98^{e} \pm 14.35$
NaCl 0.05%	$132.33^{a} \pm 57.81$	$90.84^{a} \pm 44.18$
NaCl 0.10%	$111.46^{d} \pm 82.19$	$74.64^{bc} \pm 72.08$
NACl 0.15%	$49.70^{e} \pm 13.92$	$28.93^{e} \pm 12.03$

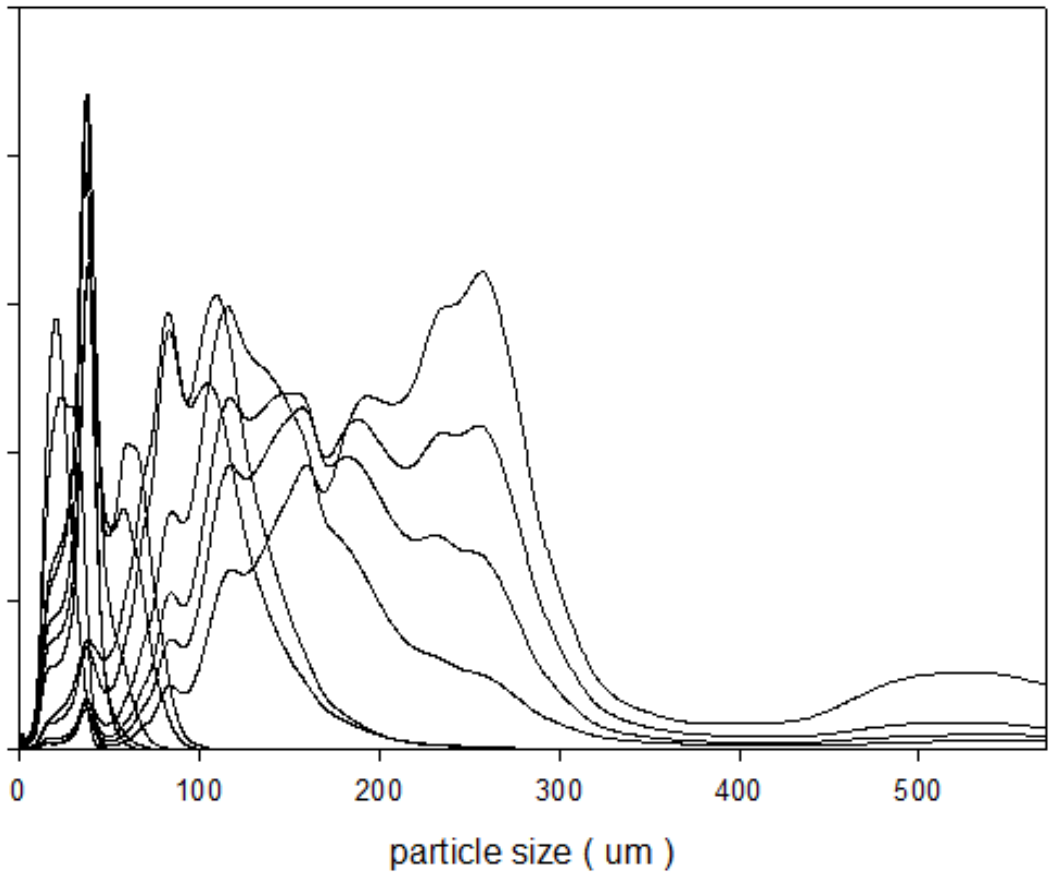
Each value represents mean±SD (n=3).

Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.



nucleation peak

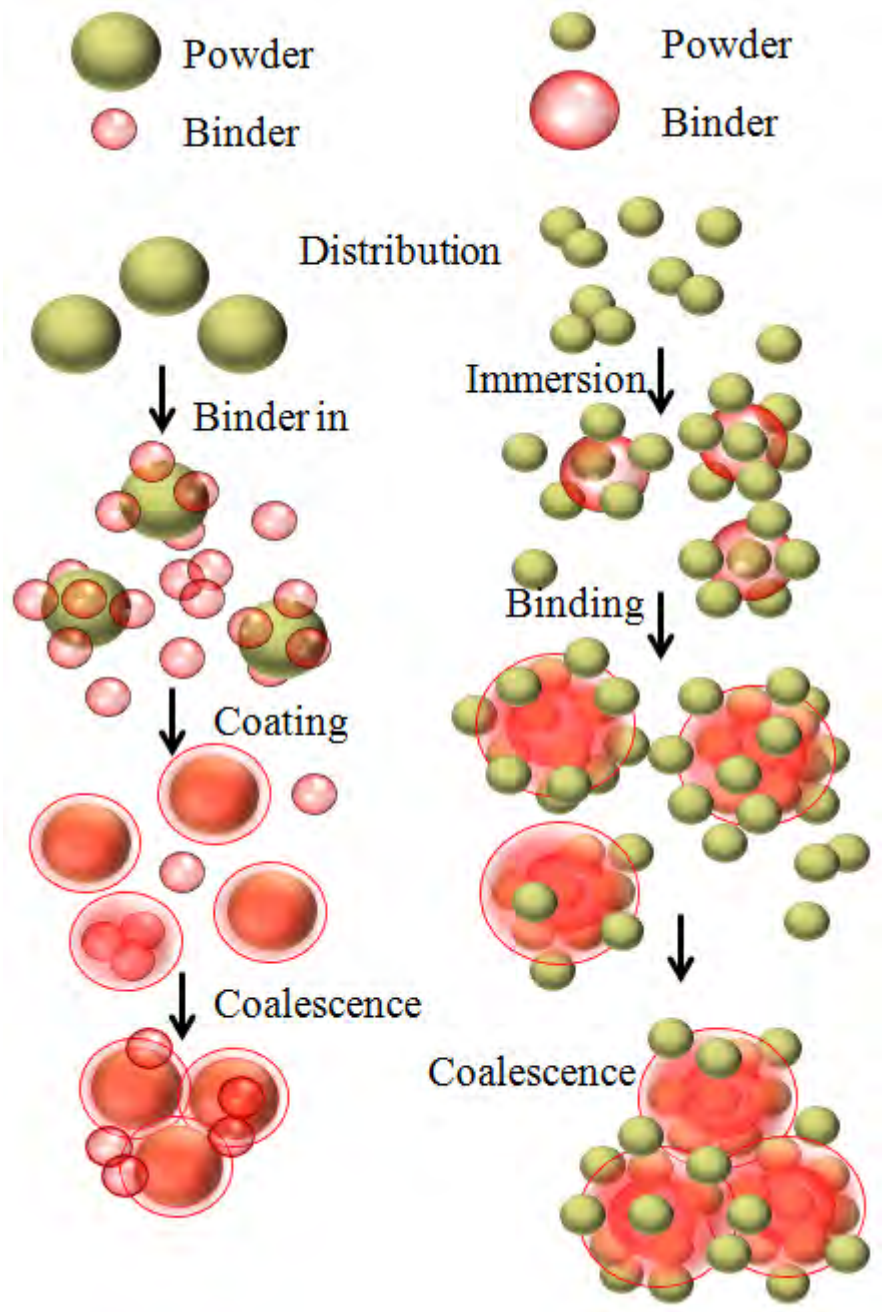
圖三、多孔性膳食纖維粉參考組的粒徑分佈圖



nucleation peak

圖四、玉米澱粉的粒徑分佈圖

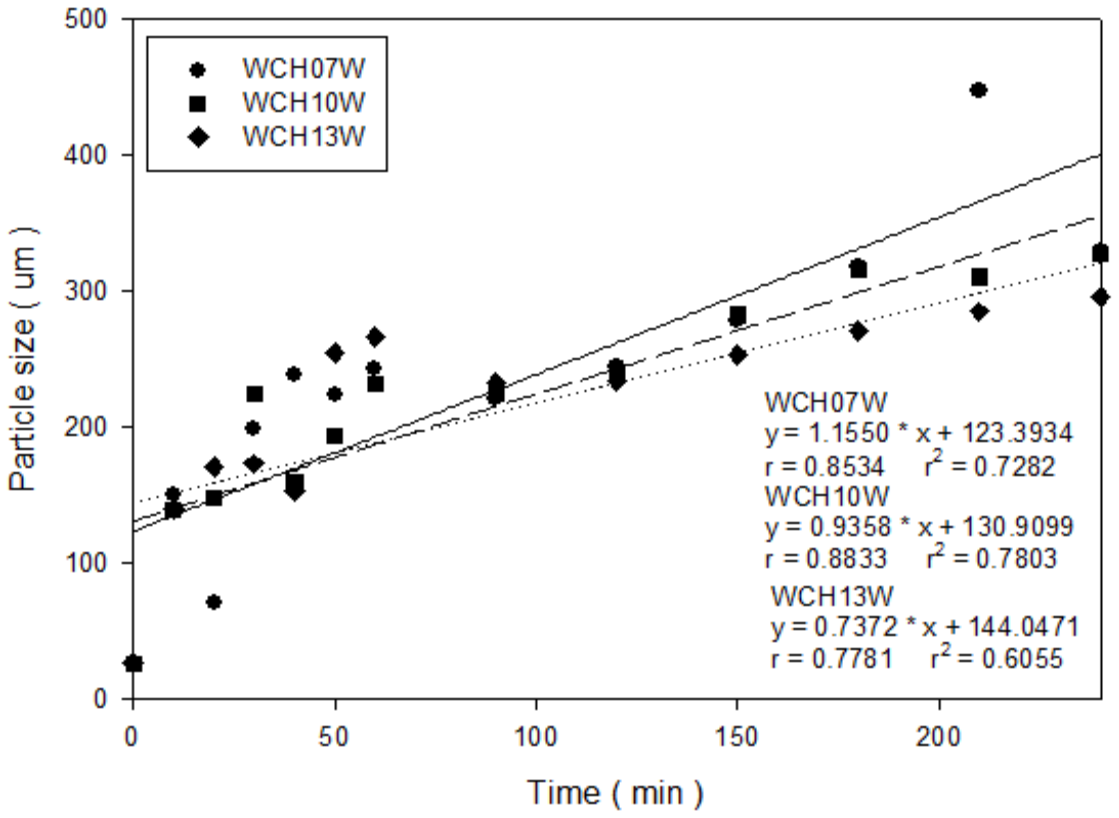
(A) Distribution (B) Immersion



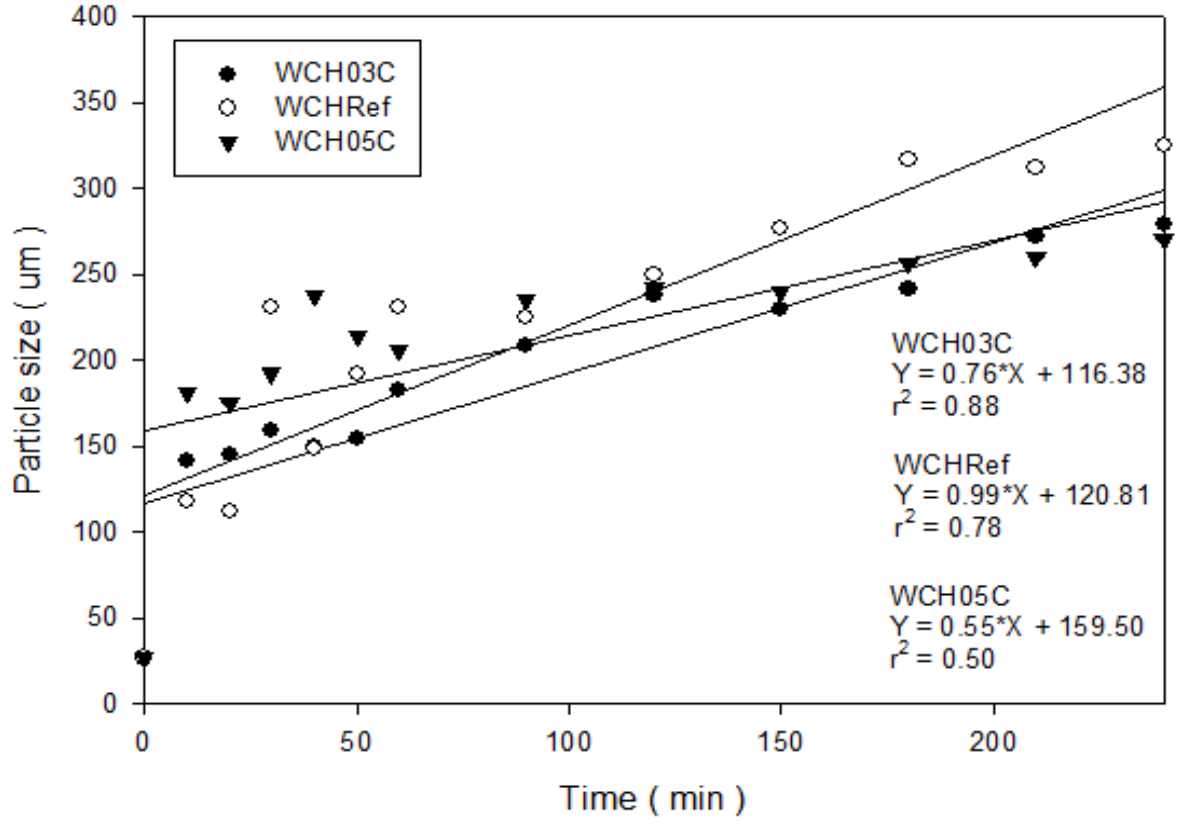
參考蘇柏駿(2012)

圖五、黏著劑與粉體粒徑相對大小的成核機制：

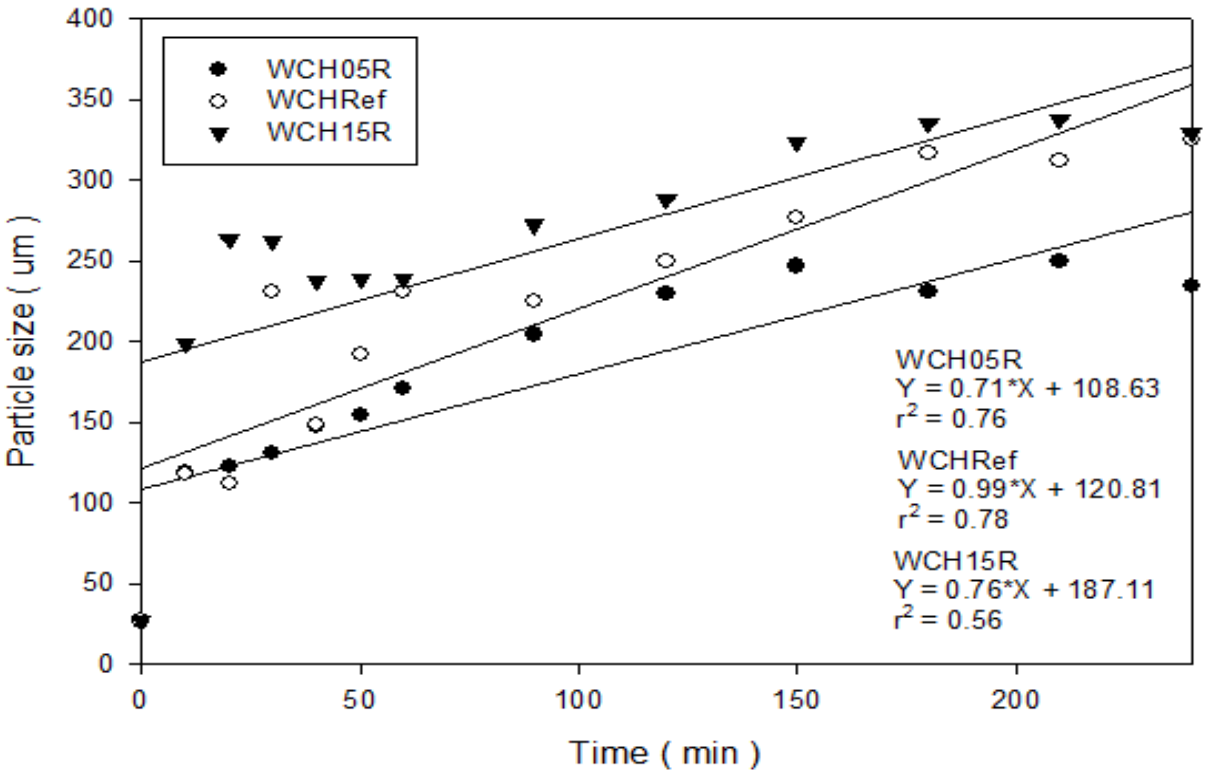
(A) 分散機制、(B) 浸泡機制



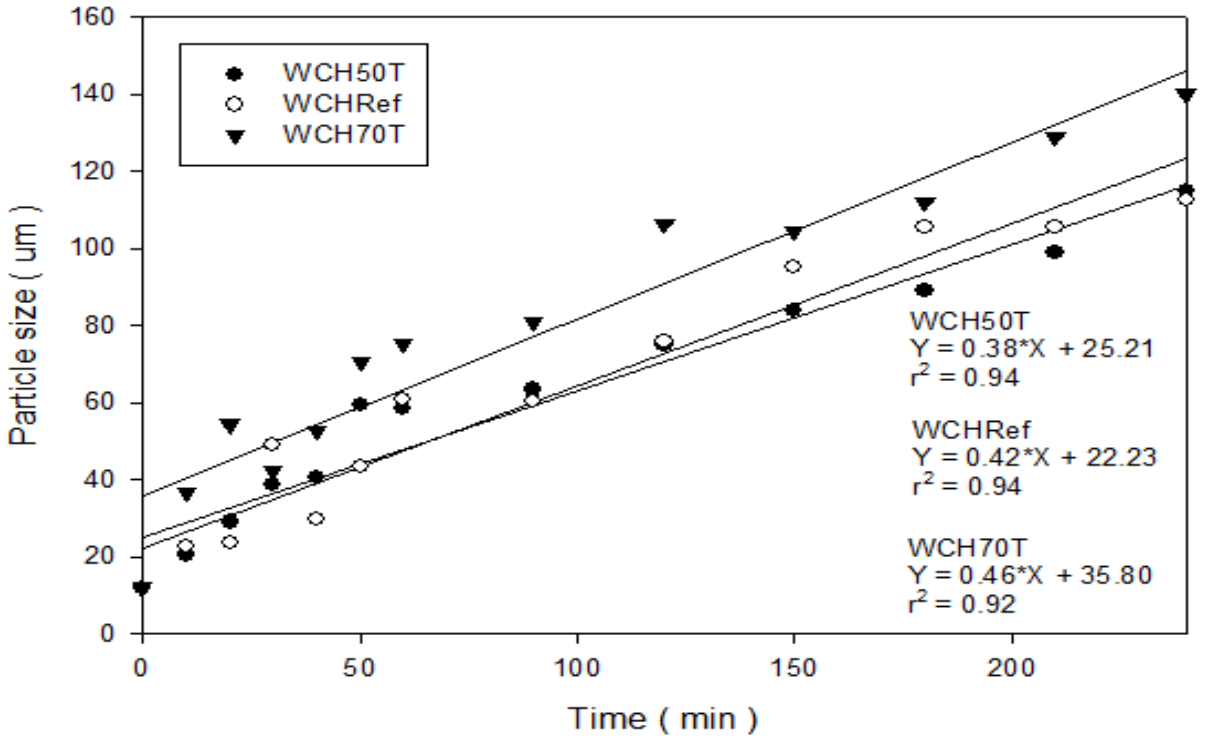
圖六、不同粉體入料量的粒徑圖



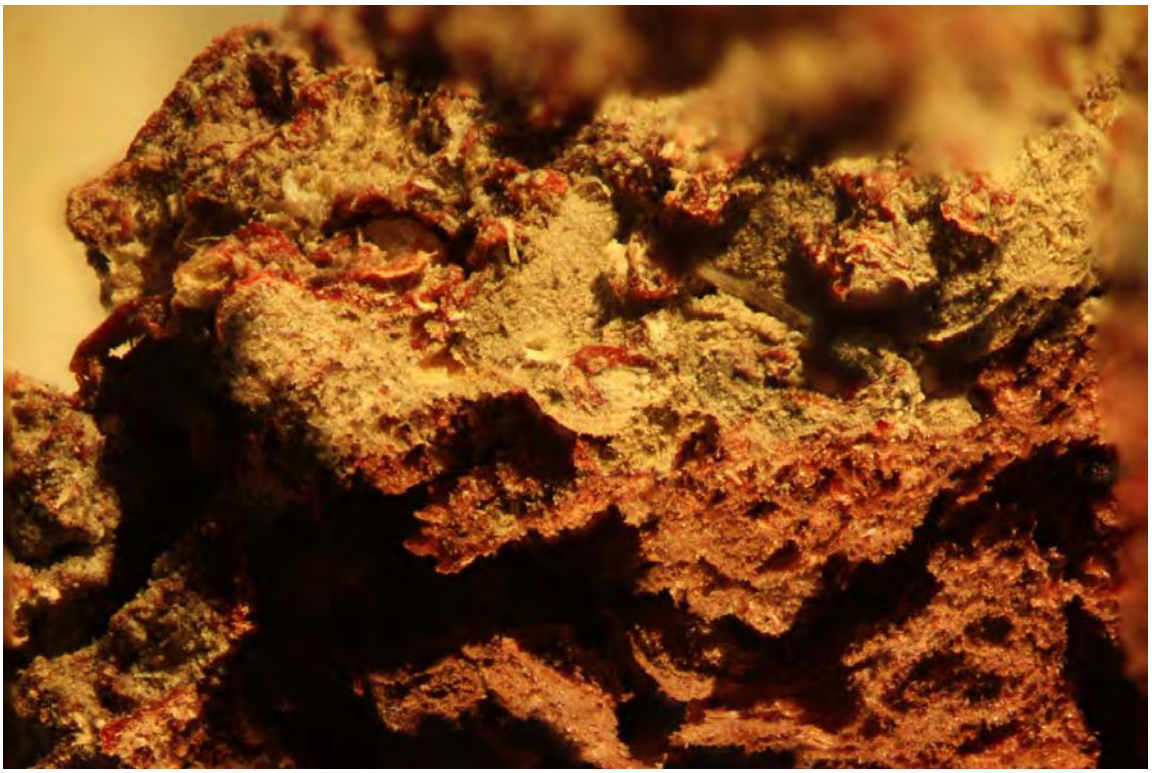
圖七、不同黏著劑濃度的粒徑圖



圖八、不同黏著劑流速的粒徑圖



圖九、不同腔室溫度的粒徑圖



圖十、流動床造粒塌床結塊圖

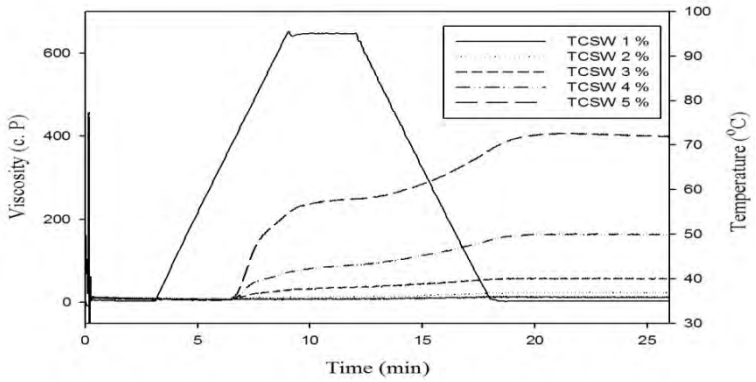
表七、不同麥芽糊精濃度之黏度特性

maltodextrin (MD) concentration (%)	RVA final viscosity(c.P)	Brookfield viscosity (c. P)	Hardness (g)	Stickiness (g)
5	9.67^{d}± 1.53	1.92^{c} ± 1.68	6.70^{c}± 1.00	6.36^{c}± 0.54
10	11.00^{d}± 1.00	2.61^{c} ± 1.81	6.28^{c}± 0.65	6.30^{c}± 0.17
20	16.67^{c}± 1.53	4.19^{c} ± 0.00	6.60^{c}± 1.17	6.74^{c}± 0.38
30	35.33^{b}± 2.08	17.97^{b} ± 1.70	38.80^{b}± 2.54	27.48^{b}± 2.71
40	73.33^{a}± 3.06	79.00^{a} ± 1.00	61.76^{a}± 3.31	44.22^{a}± 3.61

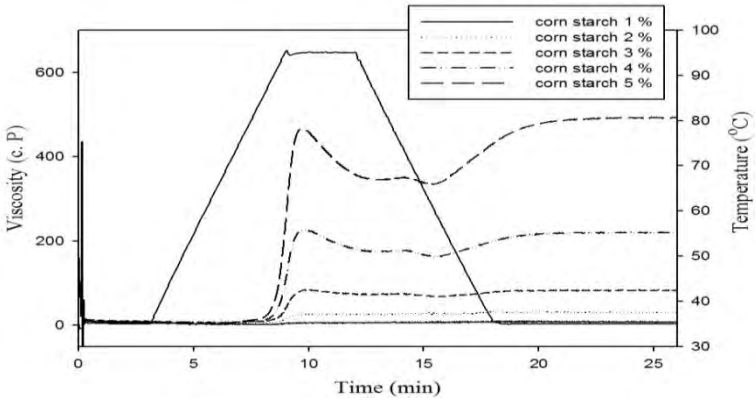
Each value is expressed as mean ± standard deviation (n= 3)

Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

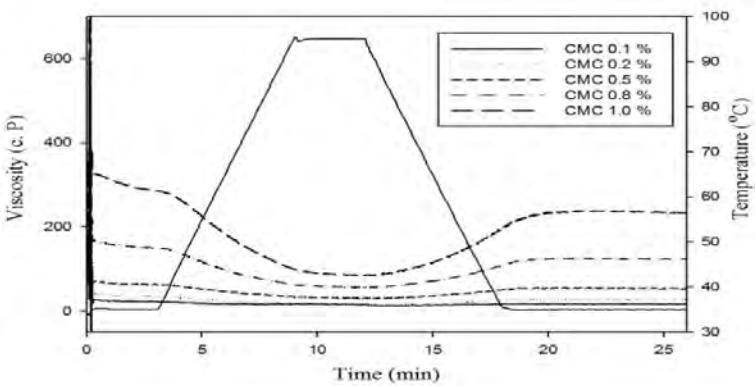
(a)



(b)



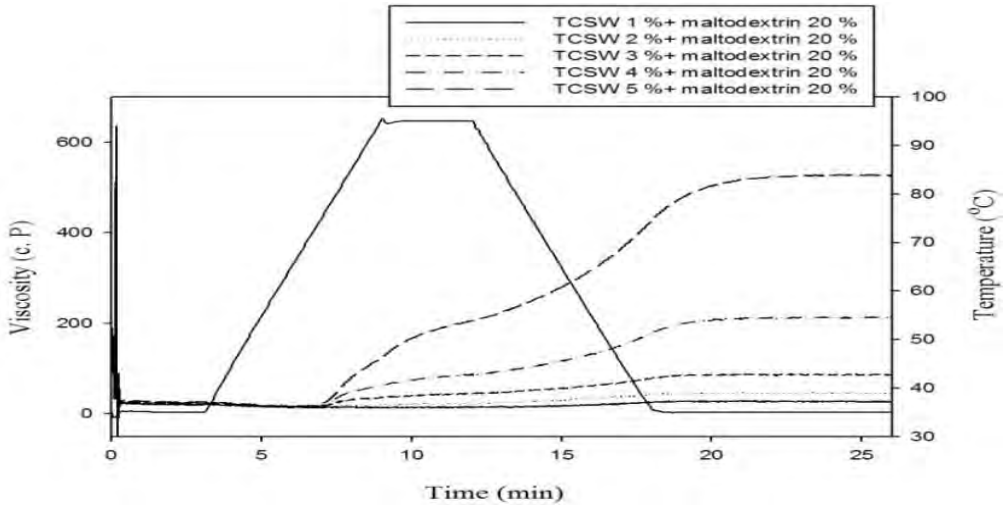
(c)



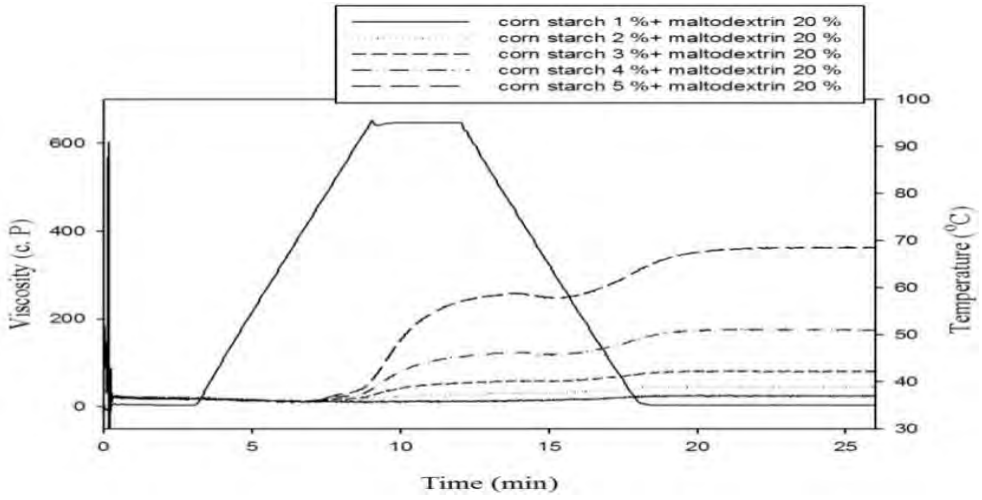
圖十一、不同濃度黏著劑之快速黏度測定儀分析圖譜

(a) 台中秈糯 1 號穀粉, (b) 玉米澱粉, (c) 羧甲基纖維素

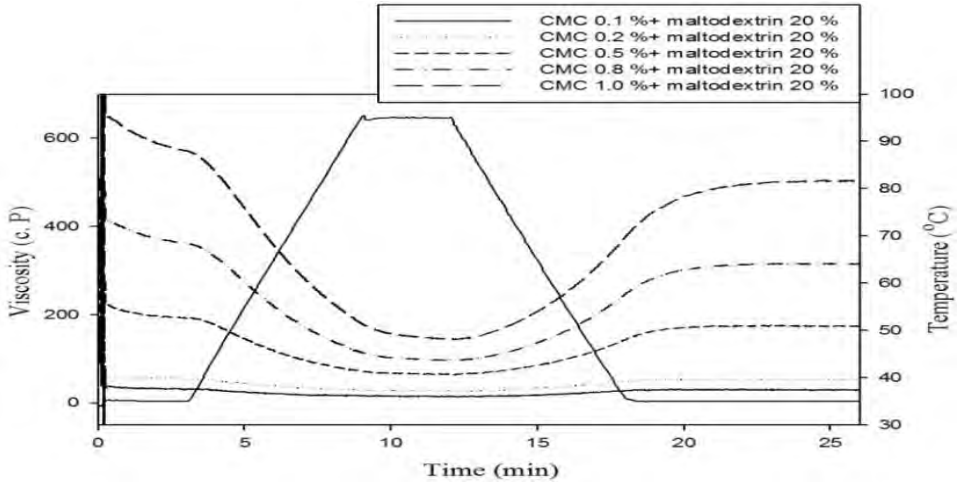
(A)



(B)

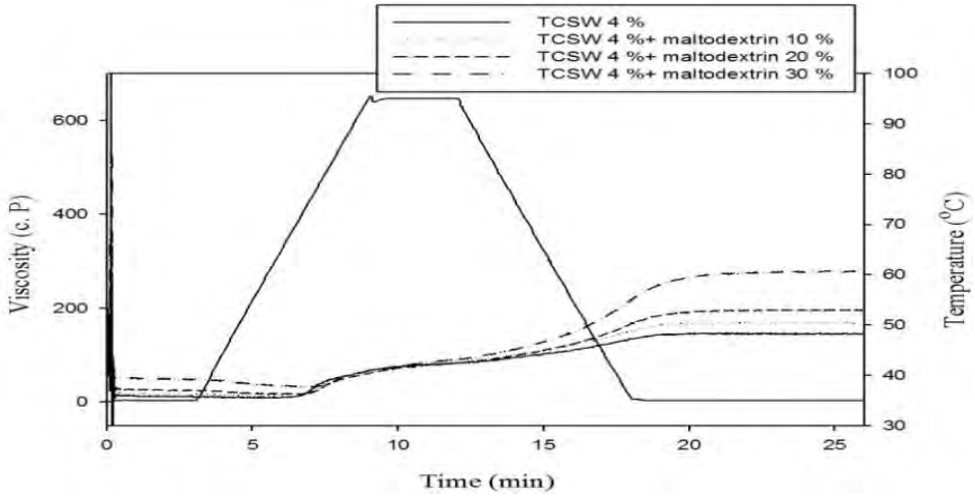


(C)

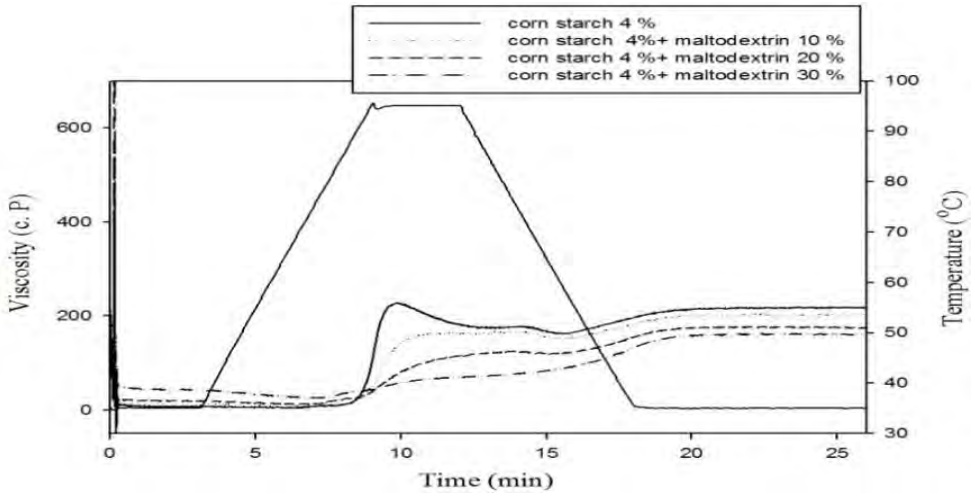


圖十二、不同濃度黏著劑添加 20 %麥芽糊精之快速黏度測定儀分析圖譜 (a) 台中秈糯 1 號穀粉, (b) 玉米澱粉, (c) 羧甲基纖維素

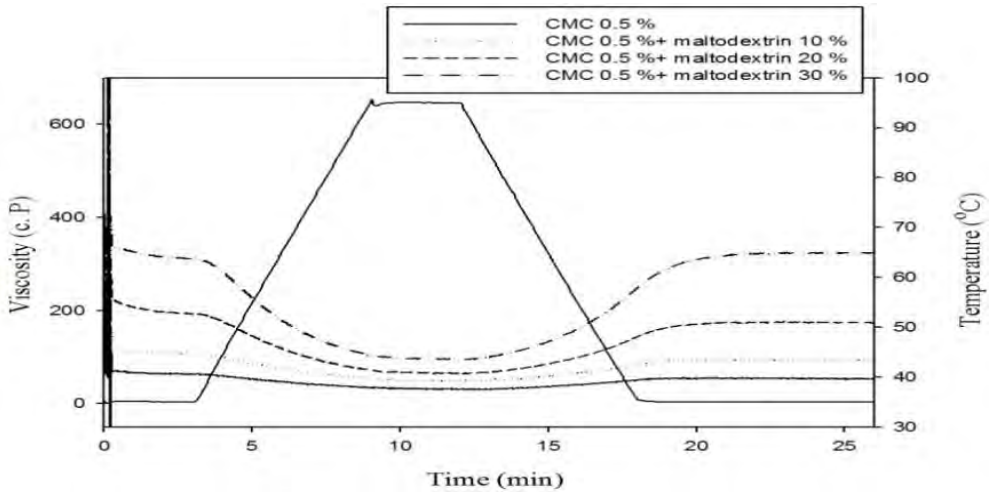
(A)



(B)



(C)



圖十三、不同黏著劑添加不同比例麥芽糊精之快速黏度測定儀分析圖譜 (a) 台中秈糯 1 號穀粉, (b) 玉米澱粉, (c) 羧甲基纖維素

表八、不同濃度黏著劑添加不同比例麥芽糊精之硬度及沾附性

Hardness (g)			
maltodextrin concentration (%)	TCSW 4%	Corn starch 4%	CMC 0.5%
0	24.54 ^{g} ± 1.16	53.76 ^{e} ± 3.85	58.28 ^{de} ± 4.37
10	28.80 ^{g} ± 2.17	81.12 ^{b} ± 3.21	60.24 ^{d} ± 2.50
20	36.20 ^{f} ± 3.47	79.02 ^{b} ± 3.71	83.08 ^{b} ± 4.91
30	67.56 ^{c} ± 4.45	68.58 ^{c} ± 2.78	143.34 ^{a} ± 6.89
Stickiness (g)			
maltodextrin concentration (%)	TCSW 4%	Corn starch 4%	CMC 0.5%
0	12.00 ^{h} ± 0.85	25.02 ^{f} ± 0.88	42.98 ^{e} ± 4.72
10	16.54 ^{g} ± 1.04	55.84 ^{c} ± 3.73	42.44 ^{e} ± 1.30
20	21.58 ^{f} ± 3.04	55.44 ^{c} ± 4.05	60.92 ^{b} ± 2.54
30	47.70 ^{d} ± 3.19	45.58 ^{de} ± 1.76	104.28 ^{a} ± 4.70

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=5)

Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

表九、黏著劑添加不同濃度麥芽糊精之熱分析

maltodextrin (MD) concentration (%)	To (℃)	Tp (℃)	Tc (℃)	Enthalpy,△H (J/g)
	TCSW 4 %			
0	93.50^{a} ± 2.97	100.14^{a} ± 1.77	102.08^{abc} ± 1.57	1566.11^{c} ± 18.66
10	64.80^{b} ± 8.29	85.95^{cd} ± 6.75	89.59^{bc} ± 7.36	953.92^{e} ± 37.53
20	69.96^{b} ± 3.88	91.63^{c} ± 3.06	97.90^{abc} ± 3.67	933.06^{e} ± 11.29
30	68.69^{b} ± 7.38	88.06^{cd} ± 3.21	94.16^{abc} ± 0.17	428.42^{g} ± 1.23
	corn starch 4 %			
0	95.51^{a} ± 1.85	103.43^{a} ± 0.12	106.12^{a} ± 0.17	1679.85^{b} ± 66.73
10	86.63^{a} ± 3.98	100.52^{a} ± 1.14	104.35^{ab} ± 0.93	1168.62^{d} ± 11.08
20	64.44^{b} ± 0.24	82.56^{d} ± 1.01	88.06^{c} ± 1.82	636.61^{f} ± 14.16
30	69.97^{b} ± 3.06	89.40^{cd} ± 4.54	97.76^{abc} ± 4.96	385.28^{g} ± 21.75
	CMC 0.5 %			
0	96.08^{a} ± 4.12	100.73^{a} ± 1.22	103.40^{ab} ± 2.38	1874.93^{a} ± 53.00
10	86.90^{a} ± 8.32	99.03^{ab} ± 3.66	101.99^{abc} ± 3.51	1126.79^{d} ± 33.99
20	71.45^{b} ± 7.18	92.81^{bc} ± 5.06	108.14^{a} ± 9.68	976.72^{e} ± 27.53
30	66.13^{b} ± 0.88	88.99^{cd} ± 1.07	95.93^{abc} ± 2.21	702.29^{f} ± 8.48

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=5)

Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

表十、黏著劑添加不同濃度麥芽糊精之成膜吸濕性

Film hygroscopicity (%)			
maltodextrin (MD) concentration (%)	TCSW 4 %	corn starch 4 %	CMC 0.5 %
0	8.25 ^{bc} ± 0.60	8.35 ^{b} ± 0.39	10.12 ^{a} ± 1.26
10	7.15 ^{d} ± 0.47	6.97 ^{d} ± 0.23	8.35 ^{b} ± 0.44
20	7.39 ^{cd} ± 0.19	7.08 ^{d} ± 0.25	7.66 ^{bcd} ± 0.24
30	7.75 ^{bcd} ± 0.20	8.22 ^{bc} ± 0.13	7.01 ^{d} ± 0.27

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3)

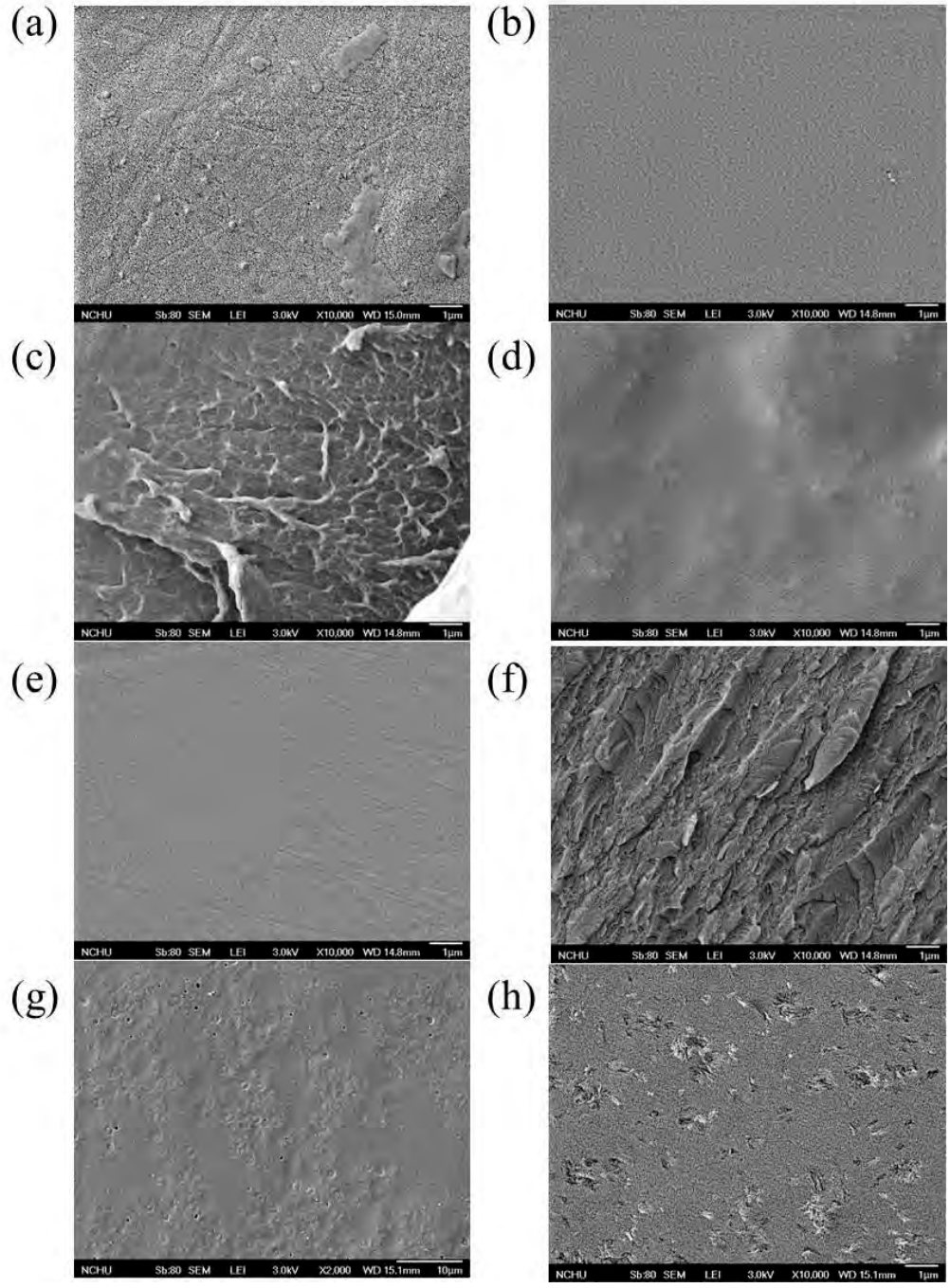
Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

表十一、黏著劑添加不同濃度麥芽糊精之成膜玻璃轉化溫度

Glass transition temperature (℃)			
maltodextrin concentration (%)	TCSW 4 %	corn starch 4 %	CMC 0.5 %
0	80.19 ^{e} ± 3.84	80.75 ^{e} ± 0.10	77.31 ^{e} ± 1.40
10	98.72 ^{bcd} ± 2.30	108.53 ^{a} ± 5.88	96.26 ^{cd} ± 5.55
20	92.60 ^{d} ± 2.69	105.14 ^{ab} ± 6.04	94.41 ^{cd} ± 6.97
30	100.83 ^{bc} ± 5.84	108.66 ^{a} ± 1.88	94.74 ^{cd} ± 4.22

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3)

Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.



圖十四、黏著劑添加麥芽糊精前後之微細構造

(a) TCSW 4 %film, (b)TCSW 4 % +MD20 film, (c)corn starch 4% film, (d)corn starch 4 %+MD 20 film, (e)CMC 0.5 % film, (f)CMC 0.5 % film, (g)MD 20 %, (h)MD 40 %

表十二、不同濃度果膠添加於粉體與黏著劑的水分含量

sample / time	Control	5 % (powder)	10 % (powder)	5 % (binder)
0min	$7.03^{a} \pm 0.32$	$5.80^{a} \pm 0.40$	$6.12^{a} \pm 0.11$	$7.03^{a} \pm 0.32$
60min	$6.67^{a} \pm 0.19$	$6.22^{a} \pm 0.25$	$6.60^{a} \pm 0.33$	$6.31^{a} \pm 0.05$
120min	$6.46^{a} \pm 0.45$	$6.13^{a} \pm 0.23$	$6.26^{a} \pm 0.47$	$6.60^{a} \pm 0.41$
180min	$6.44^{a} \pm 0.34$	$6.40^{a} \pm 0.54$	$6.72^{a} \pm 0.08$	$6.98^{a} \pm 0.47$
240min	$6.45^{a} \pm 0.07$	$6.32^{a} \pm 0.15$	$6.78^{a} \pm 4.56$	$6.64^{a} \pm 0.59$

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3)

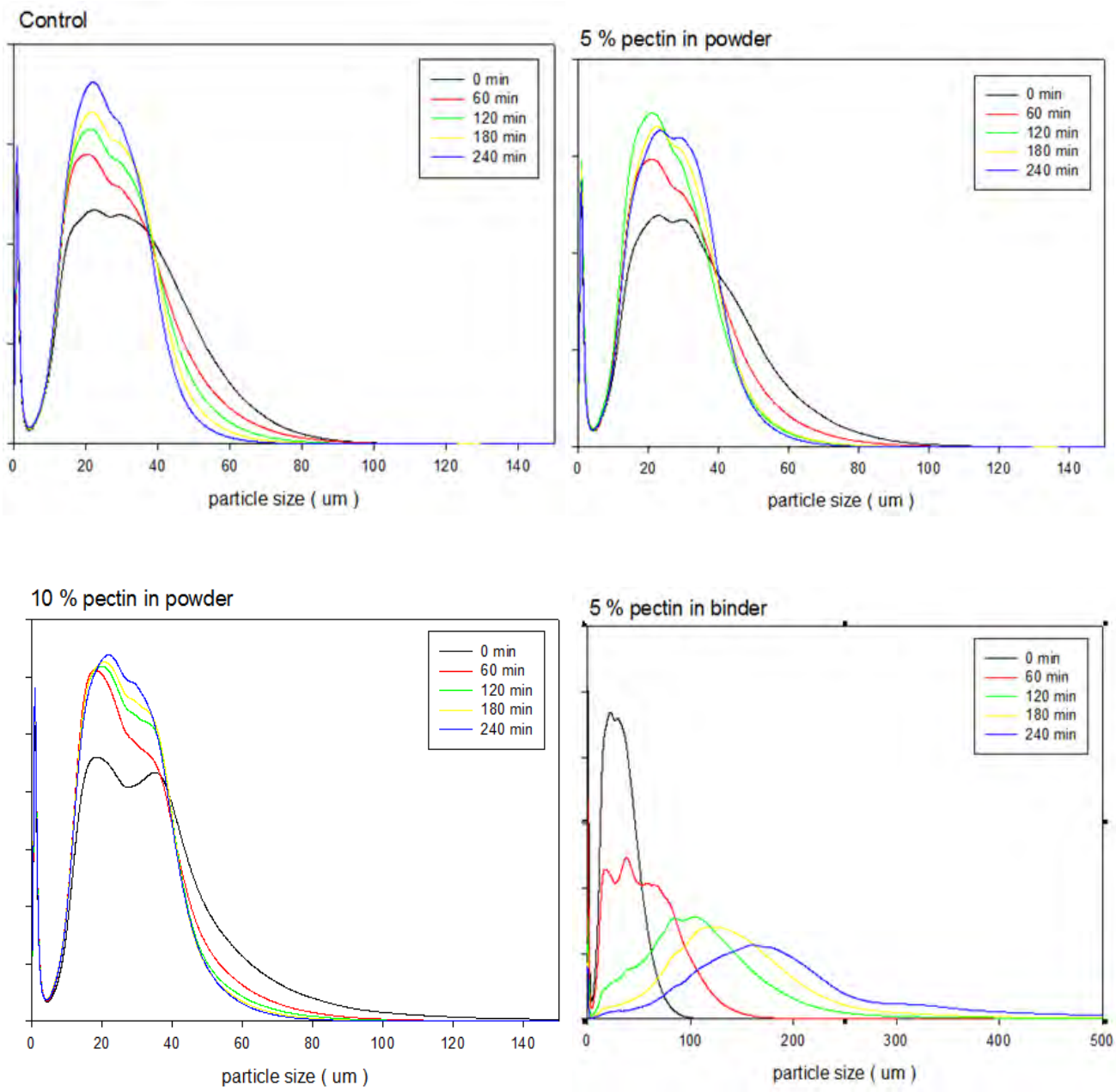
表十三、不同濃度果膠添加於粉體與黏著劑的流動性

sample / time	Control	5 % (powder)	10 % (powder)	5 % (binder)
0min	33.92	31.04	29.86	33.92
60min	25.87	33.93	34.39	31.85
120min	31.52	32.50	31.98	26.71
180min	32.91	32.92	31.35	21.61
240min	31.48	29.30	29.24	20.27

表十四、不同濃度果膠添加於粉體與黏著劑的粒徑分析

sample / time	Control	5 % (powder)	10 % (powder)	5 % (binder)
0min	$32.72^{a} \pm 0.27$	$35.91^{a} \pm 1.16$	$36.02^{a} \pm 1.49$	$32.72^{a} \pm 0.27$
60min	$28.84^{b} \pm 1.23$	$30.58^{b} \pm 1.99$	$29.36^{b} \pm 0.77$	$58.69^{b} \pm 2.27$
120min	$27.20^{c} \pm 0.73$	$27.43^{c} \pm 1.16$	$28.33^{bc} \pm 1.05$	$119.66^{c} \pm 6.29$
180min	$26.76^{cd} \pm 0.57$	27.56c ± 0.39	$26.56^{c} \pm 0.66$	$153.25^{d} \pm 3.72$
240min	$25.74^{d} \pm 0.06$	27.88c ± 1.04	$26.72^{c} \pm 0.46$	$193.79^{e} \pm 11.01$

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n=3)



圖十五、不同濃度果膠添加於粉體與黏著劑的粒徑分佈圖

表十五、枸杞浸膏流動床造粒後之休止角及流動性

	Time (min)	repose angle	Carr's index
step1	0	ND	40.9938
	30	ND	22.0545
	60	ND	22.9010
	90	ND	24.8408
	120	ND	25.0392
step2	30	$42.9843^{a} \pm 5.1173$	27.6521
	60	$33.4303^{b} \pm 5.2926$	28.5755
	90	$30.2551^{c} \pm 5.8143$	18.8127
	120	$23.5669^{d} \pm 3.6160$	18.0518

1. Each repose angle value represents mean±SD (n=3).

表十六、枸杞浸膏流動床造粒後之玻璃轉換溫度

	Time (min)	Tg
step1	0	$53.9933^{b} \pm 3.1024$
	30	$49.2433^{bc} \pm 3.4075$
	60	$39.8333^{cd} \pm 5.9850$
	90	$33.4400^{d} \pm 0.1249$
	120	$37.1233^{d} \pm 5.7308$
step2	30	$48.1233^{bc} \pm 6.5655$
	60	$47.5800^{bc} \pm 7.7151$
	90	$52.9867^{b} \pm 0.7101$
	120	$77.0000^{a} \pm 5.9609$

表十七、熟地浸膏流動床造粒後之休止角及流動性

Time (min)	repose angle	Carr's index
0	ND	40.9938
60	$43.9147^{a} \pm 3.2011$	46.0098
120	$39.8008^{bc} \pm 5.0077$	19.7579
180	$37.0781^{ab} \pm 8.1903$	31.6098
240	$32.9755^{ab} \pm 5.6470$	18.5011

1. Each repose angle value represents mean±SD (n=3).

粉體造粒製程及標準作業程序		
流程	操作條件	指標
1. 暖機	1. 空壓機啟動 2. 冷凝水啟動 3. 風車啟動(入風溫度如下)： 1) 50°C 維持 5 min， 2) 60°C 維持 5 min， 3) 70°C 維持至目標溼度。	1. 流動床造粒機腔室內濕度須降低至 20 %以下(約 30 min)。
2. 粉體乾燥	1. 達暖機條件後停機，並放入粉體(賦形劑)。	1. 流動床造粒機腔室內濕度須降低至 20 %以下(約 30 min)。
3. 黏著劑入液	1. 達粉體乾燥條件後，並輸入黏著劑，條件如下： 1) 1 rpm 維持 3 min， 2) 3 rpm 維持 3 min， 3) 5 rpm 維持 3 min， 4) 以此類推至目標流速。 2. 流動床造粒機機械參數如下： 1) 噴頭：二流體噴頭， 2) 噴霧 On：1 秒， 3) 噴霧 Off：1 秒， 4) 風門壓力：1.0 kg / cm^2， 5) 外噴壓力：2.0 kg / cm^2， 6) 內噴壓力：2.0 kg / cm^2。	1. 隨時監測流動床造粒腔室內是否有結塊情形。 2. 隨時監測床造粒機腔室內濕度是否高於 27 %。
4. 取樣	1. 於流動床造粒機取樣口取樣，並於取樣同時暫停黏著劑輸入，避免取樣口之擾流干擾造粒粉體乾燥效果。 2. 按所需造粒時間取樣。	
5. 貯存	1. 取樣後之樣品置於乾燥箱(室溫下)貯存、待測。	
6. 清洗、停機	1. 取出樣品，並清洗機器。 2. 重新啟動機器，以熱風 50°C 使機器乾燥。	

	3. 風車關閉。 4. 空壓機及冷水機關閉	

*此條件僅適用於實驗型頂噴式流動床造粒機。

以下截錄自衛生福利部食品藥物管理署

(http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?id=10082&chk=ad834e25-9707-4453-b5b8-f06ef121b4e4)

食品藥物管理署持續輔導業者並研修含鋁食品添加物使用標準

【發布日期：2013-08-02】

針對今日消費者文教基金會發布「4 成 3 的樣品含鋁 恐傷及腦部」新聞乙事，食品藥物管理署說明如下：

含鋁食品添加物為聯合國食品法典委員會(Codex)、美國、歐盟及日本等國際間准用之食品添加物，但國際間對於含鋁食品添加物之規定不一，食品法典委員對於不同產品使用含鋁添加物之殘留量訂為 40-1,600 mg/kg 不等，美國、日本並無制定使用限量，歐盟將不同產品之含鋁添加物殘留量訂為 30-1,000 mg/kg，中國大陸則將產品中鋁殘留量訂為 100 mg/kg 以下。

有關鋁是否導致阿茲海默症，依現有之科學研究仍未能定論。經查聯合國糧農組織及世界衛生組織聯合之食品添加物專家委員會(JECFA)2011 年之報告，將鋁之每週可容許攝取量暫定每人每公斤體重為 2 mg；歐盟則訂為 1 mg。食品藥物管理署為推動安心食品政策，已於 101 年辦理「國人由膳食攝入鋁之暴露風險調查」計畫，除評估國人由飲食中攝入鋁之風險外，亦設計發送無鋁配方食譜乙份，並於全國北、中、南共辦理三場次業者說明會，向業者宣導減少使用含鋁食品添加物。

食品藥物管理署將持續輔導業者減少使用含鋁食品添加物，同時參考國際規範，依據國人膳實習慣及暴露風險，研議修正含鋁食品添加物使用標準。食管署並提醒消費者，良好的飲食習慣是健康的基礎，鼓勵國人均衡攝取各類食物，適當運動維持正常體重，多喝開水，多攝取天然蔬菜水果，減少精緻加工食品之攝取，以確保身體健康，遠離疾病之風險。

編號：CCMP102-RD-013

健全中醫藥管理體制與法規環境(2-1)

陳憲堂
中華民國藥事品質改革協會

摘　要

本計畫為維護民眾中藥使用安全，建置有效的法規諮詢系統及作業平台，建構中醫藥衛生產業發展優勢環境，提昇中醫藥產業之全球競爭力。本計畫組織「中醫藥法規諮詢小組」，建置法規諮詢作業平台，由具醫藥實務經驗之執業律師、法學教授及專業人員，就中醫藥司所交議及業界所提出有關中醫藥之 39 件法律問題，提供法律見解及諮詢服務，並分類彙編，提供政策及執行參考。

本計畫檢視各項有關中醫藥之行政規章及解釋令函共計 76 筆，蒐集、整理世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關中醫藥法律規章計 15 篇，就中醫藥組織變革、中藥產品分類分級使用管理機制、與國際接軌之法規協合等方向，研擬藥事法及其子法規修正草案及適當法律位階之中醫藥管理法規，邀集中醫、中藥、法學相關公、學、協會及消費者團體等共同座談研討「中藥材管理」及「中藥製劑管理」等法規架構，整合所得法律見解及研討結果，提請中醫藥司作政策考量。

關鍵詞：管理體制、法規諮詢、組織變革、法規協合

Number: CCMP102-RD-013

Study on Building an Intact Management System and Regulatory Environment for Chinese Medicines (2-1)

Hsien-Tang Chen
Quality Improvement for Pharmaceutical Affairs Association, Taiwan

ABSTRACT

The purpose of this project is to maintain the safety for the Chinese medicine usage through an effective regulatory advisory system and construct a predominant environment following the enhancement of the global competitiveness for the Chinese medicine industry. A task force of consultation regarding regulations of TCM from different backgrounds including medical, pharmaceutical and legislation specialists is formed and offers legal opinions and consulting corresponding to legal 39 cases that CCMP submits and legal issues related to TCM that proposed by the industry.

In this study, we collected and sorted out 76 regulations and explanations related to TCM of Taiwan and 15 TCM regulations of the USA, European Union, Japan and Mainland China. Appropriate regulations and amendment will be proposed to CCMP for policy-making reference based on the organization reform, categorized/graded applications of products, and harmonization of international regulations.

The draft of framework for management of Chinese medicinal materials and preparations were established and reviewed in a public seminar involved with Chinese medical, pharmaceutical, legislation experts, consumer societies and relative associations. The draft amendment clauses are formulated and then made recommendations to CCMP.

Keywords: management system, regulation consulting, reorganization, regulation harmonization

壹、前言

中醫藥委員會(現為中醫藥司)以中醫藥研究為任務導向，目標在促進中醫現代化、中藥科學化及中醫藥國際化，以提供中醫藥管理政策之實證依據及重要醫藥衛生問題之解決對策，建構中醫藥醫療保健服務之優質環境。

面對人民期待品質優良安全有效之中藥產品，以及業界期待建構穩固基礎推動中藥產業發展，中藥產業應即建置良好的管理與輔導機制，並依循以追求高品質高服務以及高利潤的產業經濟共構下，將社會需求與經濟市場價值，透過法律的過程，將成為實現穩定成長的力量[(1)]。

中醫藥之臨床經驗已為國際間公認在治療人類疾病上有許多發展空間，尤其是尋求臨床發展之主要目標，惟中藥成分複雜，有效成分不明，內含物質變異性大，方劑中常含有不純物及雜質，作用效果欠缺統計方法的確立，以及藥品安定性不易確定等之特性。

世界衛生組織及歐洲議會皆認為 CAM（Complementary and Alternative Medicine）的重要性與日俱增，醫藥政策不容忽視，必須保證病人足以獲得經過適當訓練的最佳專業人員，以及具有可靠品質（quality）、安全（safety）及療效（efficacy）的藥物[(2)]，歐洲議會認為必須評估中草藥具有臨床安全性及有效性[(3)]，並應公開聲明各草藥產品有關的風險[(4)]。

根據 2008 年第六十一屆世界衛生大會以 WHA61.21 號決議通過的「公共衛生、創新和智慧財產權全球戰略和行動計畫」，在研究與創新基礎上進一步發展傳統醫學，要求各國政府有責任保障本國人民的健康，應制定國家政策、法規和標準，作為國家綜合衛生體系的一部分，以確保傳統醫學的適當、安全和有效使用[(5)]。

WTO 及世界主要接受中草藥國家，皆以藥品之安全、有效、品質三個方向，建立法規基準，以保護消費者。世界各國在傳統醫藥組織分工上，多以獨立機關執行政策法規。例如中國大陸，國家食品藥品監督管理局（由衛生部管理），負責藥品、醫療器械註冊和監督管理，其中包括負責制定中藥、民族藥監督管理規範並組織實施，擬訂中藥、民族藥品質標準，組織制定中藥材生產品質管制規範、中藥飲片炮製規範並監督實施，組織實施中藥品種保護制度。國家中醫藥管理局（亦由衛生部管理）負責擬訂中醫藥政策法規，承擔中醫醫療、預防、保健、康復及臨床用藥等的監督管理責任。擬訂有關中西醫結合管理規範和技術標準，中藥資源的保護、開發和合理利用，中醫藥科學研究、技術開發規劃，指導中醫藥科研條件和能

力建設，管理國家重點中醫藥科研項目，促進中醫藥科技成果的轉化、應用和推廣。歐盟則以 EFCAM (the European Federation for Complementary and Alternative Medicine)作為 CAM 促進整體健康（holistic and integrated health care）的一個合作平台，以提供民眾於需要時選擇之傳統醫療保健方式[6]。

中藥由動、植、礦物等農作物形式存在的中藥材原料，進行加工炮製成為飲片，再經過藥廠在 GMP 的條件下製成製劑，其製造發展的過程中，每一個環節皆須科技政策與法規的介入。例如在中藥材原料部分，對於基原研發鑑定技術，以農業技術與管理投入中藥植物栽培，發展檢驗技術檢測主成分、生菌數與農藥重金屬殘留；在炮製的過程中，分析古方炮製方法研訂炮製規範，並比對炮製前後之成分與療效；對於飲片，則以放射線技術研發儲存方法，以及包裝技術；製劑部分，則研發製藥技術增進品質的均一性，以生物技術參與指標成分、有效成分之定量比對。中藥飲片之炮製方法，以及其減毒增效之效益，為我國文化資產，且具特殊性，除中國大陸以外，為世界各國所無。

由於中草藥成分複雜，有效成分不明，內含物質變異性大，方劑中常含有不純物及雜質，作用效果欠缺統計方法的確立，以及藥品安定性不易確定等之特性，故在專利保護上常有不易掌握的問題。中草藥產品如果以新療效（新適應症）作為專利保護的標的時，常會與西藥一樣，因為侵權行為常發生於藥商供應藥品的對象，致不易對其要求損害賠償，而產生盲點。專利法所規範的新發明，需具備未曾公開或無相同前案之「新穎性」，非為熟悉該項技術者所能輕易完成之「進步性」，以及具統計學意義及再現性之「產業利用性」三個要件。中草藥之新藥開發，可以申請專利法中有關「發明」標的，請求專利保護 20 年。例如新物質純化物或混合物，可以化學結構圖譜申請「物的發明」，可以新製造方法或新製造過程申請「方法的發明」，以及可以效能增加或新療效新適應症申請「用途的發明」。重要的是，必須打破對於中藥藥名的迷失，重新命名抽提物，以嶄新的複合物方式申請專利，才能真正的達到保護智慧財產的目的[7]。

現行中藥藥事相關法律規章[8]，在實務執行上與國際法及現代科技管理未能相容契合，亦有不明確之處致執行時多有窒礙難行。為使中藥產品有效安全，製造行銷符合經濟市場規模，研發資源充分有效利用，中藥流通正確符合消費者對健康的期待，必須制定周延的法令規範[9]予以配合，明確有效執行。故持續更新法規資料庫之內容，供業界及時查詢最新之法規資料，並依保護消費者用藥安全，以及維護業界生存發展空間，鬆綁法

規擬具修正意見，方能達到提升我國中醫藥產業競爭力之目的。

與中藥製造與流通有關之法律規章，包括藥事法、藥師法、全民健康保險法、全民健康保險醫療辦法、全民健康保險藥價基準、健康食品管理法、藥師從事中藥製劑之製造、供應及調劑須修習中藥課程標準、藥師執行中藥業務管理辦法、植物抽取新藥臨床試驗基準、成藥及固有成方製劑管理辦法、行政院衛生署處理民間中藥驗方實施要點、藥品查驗登記審查準則、藥物樣品贈品管理辦法、藥品優良臨床試驗準則、藥物委託製造及檢驗作業辦法、藥物製造工廠設廠標準、藥物科技研究發展獎勵辦法、藥物製造業者檢查辦法。其中與業界經營發展最相關者，為攸關業界產能產值及成本效益之「藥物製造工廠設廠標準」，獎勵提昇品質經濟效益之「藥物科技研究發展獎勵辦法」，整合中藥藥食同源產品效能標示之「健康食品管理法及施行細則」，簡便快速審查機制之「藥品查驗登記審查準則」，適合中藥新藥臨床試驗之「藥品優良臨床試驗準則」及「植物抽取新藥臨床試驗基準」等。

法，載舟覆舟也，尤其對製藥工業等生技產業更如是。政府倘未能定出適時、適法、適用的法律規章，對產業的長足進步將有所妨害。世界各先進工業國都把生技產業列為 21 世紀的重點科技項目，因屬新興產業，有遠見的創新法規將可成為我國立法或修法時之參酌。我國中醫藥法規應與國際相關法規接軌，以利台灣產業國際發展[10]。

中藥相關法規為保護消費者的法律，同時亦應在保護消費者之前提下，促進產業的發展。為因應現行中藥法規在實務上可能產生諸多適用上的問題，故宜儘速建立一個具有雙向溝通功能的互動模式，有效的法規諮詢平台，俾順利及時處理現行法規或解釋令函是否符合法制環境，以及是否符合業界需求，與世界各國相關法規系統比較分析，研擬一個適合中藥環境的整合管理機制，以及研擬修正適當的法規條文，提供中醫藥司作修法政策方向。

貳、材料與方法

一、於中華民國藥事品質改革協會組織「中醫藥法規諮詢小組」，建置有效的法規諮詢系統。

(一) 遴選具醫藥實務經驗之執業律師、法學教授及專業人員，組織「中醫藥法規諮詢小組」。

(二) 原則每月集會一次，必要時臨時召集，邀請中醫藥司指導，必要時邀請食品藥物管理局指導，就中醫藥司所交議之法規諮詢案件，以及業界透過法規諮詢平台系統所詢問有關中醫藥法規問題，作成議案（預估每月三件），討論提供法律諮詢意見。

(三) 平時就中醫藥司同仁在工作上或業界所詢問之一般中醫藥法規案件，由專任助理接受後，交主持人或協同主持人依法律原理原則回復，或徵詢小組成員審議後，作成法律諮詢意見回復。

二、採互動方式，建置有效的中醫藥法規諮詢作業平台。

(一) 建置中醫藥法規諮詢作業平台，協助中醫藥司就業界提問有關之中醫藥法規問題，回復諮詢結果意見或相關資訊。

(二) 如需審議，提報每月召開之「中醫藥法規諮詢小組」審議完成後，陳報中醫藥司。

三、定期彙編中醫藥法規諮詢案件審議結果，提供各相關公、學、協會參考。

(一) 每月彙整「中醫藥法規諮詢小組」審議完成之案件，以及業界提問之諮詢結果意見，依「產品製造管理」、「產品查驗登記管理」、「藥事專業人員法律行為管理」及「藥事機構管理」之類別，分類整理。

(二) 每三月將分類整理之審議諮詢結果意見，整理成冊，交中醫藥司作為法規實務使用，並提供電子檔案供參。

四、檢視現行之行政規章及解釋令函，比較世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關之法律規章。

(一) 購買或上網查詢世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關中醫藥之相關法律規章資料。

(二) 每月檢視我國現行之行政規章及解釋令函，與世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關之法律規章比較分析。

(三) 分析結果提報每月召開之「中醫藥法規諮詢小組」審議。

(四) 就攸關政策面之各國有關中藥製造與流通管理具有參考價值部分，提供中醫藥司參考。

(五) 所查得之法規及判解資料，依中醫藥司已建置之「中醫藥資訊網」資訊系統格式，於第 5 月及第 11 月二次提供更新資料庫。

五、以消費者保護為宗旨，扶植中藥製藥產業為目標，評估分析現行與中藥藥事相關之法規，依中醫藥司指示政策方向，研擬修正草案及因應法律授權之藥事法修正草案。

(一) 評估分析現行藥事法、藥物製造工廠設廠標準、藥物科技研究發展獎勵辦法、成藥及固有成方製劑管理辦法、健康食品管理法等法規，提出法律見解。

(二) 依中醫藥司指示政策方向，研擬「中藥材管理」及「中藥製劑管理」等法規草案。

六、請中醫、中藥、法學相關公、學、協會及消費者團體等，推薦專家學者，共同座談研討所擬具之「中藥材管理」及「中藥製劑管理」等法規草案，整合所得法律見解及研討結果，提請中醫藥司作政策考量。

(一) 請中醫、藥學、法學相關公、學、協會及消費者團體等，推薦專家學者，舉辦座談會。

(二) 座談研討所擬具之「中藥材管理」及「中藥製劑管理」等法規草案及因應法律授權之藥事法修正草案。

(三) 整合所得法律見解及研討結果，提請中醫藥司作政策考量。

七、提具總結報告。

(一) 彙編「中醫藥法規諮詢小組」針對中醫藥法規諮詢案件審議結果。

(二) 彙整各項分析資料，提出具體之法律整編內容，詳細敘明資料來源、理由及法律見解。

(三) 各項法案依其修正內容、目的，執行人權及性別分析，包括女性參與，規範內容未區別對象，執行方式無性別、性傾向或性別認同有不同差異。

參、結果

一、於中華民國藥事品質改革協會組織「中醫藥法規諮詢小組」，建置有效的法規諮詢系統。

(一) 組織「中醫藥法規諮詢小組」，成員，進行諮詢議題之審查及討論。

(二) 就中醫藥司所交議之法規諮詢案件，以及業界透過法規諮詢平台系統所詢問有關中醫藥法規問題，作成議案，討論提供法律諮詢意見。另有關中醫藥司同仁在工作上或業界所詢問之一般中醫藥法規案件，由主持人或協同主持人依法律原理原則回復，或徵詢小組成員審議後，作成法律諮詢意見回復。

(三) 於民國 102 年 3 月 6 日召開中醫藥法規諮詢小組第一次會議，共計審議 6 個議案，議題及結論摘要如下：

1. 某藥向 TFDA 依植物抽取新藥臨床試驗基準申請核准第二期臨床試驗完成後，是否得向 CCMP 依中藥新藥臨床試驗基準申請執行第三期臨床試驗？

結論摘要：

「植物抽取新藥」與「中藥新藥」申請臨床試驗，所依據之法規不同，定義及規範內容有異，惟其臨床試驗之目的或有相同。藥事法第 44 條規定「試驗用藥物，應經中央衛生主管機關核准始得供經核可之教學醫院臨床試驗」，故臨床試驗之主管機關為行政院衛生署，TFDA 及 CCMP 皆屬其業務機關，皆得受理臨床試驗之申請，各依申請者所定產品屬性（植物抽取新藥或中藥新藥），依相關法規公告審查。惟並未規定已向 TFDA 依植物抽取新藥臨床試驗基準申請核准第二期臨床試驗完成後，是否得向 CCMP 依中藥新藥臨床試驗基準申請執行第三期臨床試驗。倘本案該藥原依植物抽取新藥臨床試驗基準向 TFDA 申請核准執行完成第二期臨床試驗，又再檢據第二期臨床試驗之資料，向 CCMP 申請執行第三期臨床試驗，CCMP 自無不予受理之理由，但得依中藥新藥臨床試驗基準之規定審查，倘所附資料不符第三期臨床試驗之要求，即得否准其請，或請其回復第二期或第一臨床試驗。

2. TFDA 職掌「藥物人體試驗之審查與監督」，其「藥物」是否包含中藥？

結論摘要：

「中藥」與「中草藥」、「植物藥」屬性雖極為相似，惟法律名詞不同，其規範之法規亦不同，於法即難謂相同，其主管機關自有不同。行政院衛生署食品藥物管理局組織法規定該局掌理事項，即將西藥、管制藥品、醫療器材三者統稱為「藥物」。行政院衛生署食品藥物管理局處務規程規定藥品及新興生技藥品組掌理事項為「西藥（含中草藥新藥）管理、計畫及法規之研擬。」及「西藥人體試驗之審查及監督。」，故 TFDA 職掌「藥物人體試驗之審查與監督」，其「藥物」應不包含中藥。行政院衛生署中醫藥司組織條例第 2 條規定中醫藥司掌理「中醫中藥各項行政事務及研究發展工作。」，應包含所有中藥各項行政事務及研究發展事項，自亦包括中藥新藥臨床試驗及查驗登記之審查業務。惟未來中醫藥司在衛生福利部成為醫政管理局或醫政管理司之後，中藥人體試驗方予歸屬食品藥物管理局轄下。綜上，依現行法規，倘產品經認定為「中藥」（依法認定或廠商認定送件），即應由中醫藥司管轄，非中藥則應由食品藥物管理局管轄。

3. 行政院衛生署 98 年 7 月 31 日署授藥字第 0980001980 號函釋有關藥事法 103 條第三項規定，係「為應個別消費者需要始得為之」之法律依據為何？

結論摘要：

查藥事法 103 條第三項所定第二項中藥販賣業務範圍有關「不含毒劇中藥材或依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹、及煎藥」，係以應特定消費者所需，而依固有成方調配傳統丸、散、膏、丹及煎藥而成者，亦即先有需求，方得供應。倘非應特定消費者所需，即應依同法第 39 條之規定，申請中央衛生主管機關查驗登記發給藥品許可證。故，行政院衛生署 98 年 7 月 31 日署授藥字第 0980001980 號函以「為應個別消費者需要始得為之」，尚符法理。

4. 藥品許可證持有者藥商自動向行政院衛生署申請藥品許可證註銷，完成註銷相關程序，業者收到註銷函後又向地方衛生局申請藥品許可證移轉，地方衛生局亦出具公文同意已註銷之藥品許可證移出，業者將相關文件送達中醫藥司辦理移轉變更，

則本案藥品許可證是否仍然有效？中醫藥司應否受理業者所送移轉案？

結論摘要：

藥事法有關藥品許可證之法定註銷之原因有「藥商申請歇業不繳銷所領藥物許可證時由原發證照之衛生主管機關註銷」（第 27-1 條第二項）、「藥物許可證屆期未申請或不准展延者由中央衛生主管機關註銷其許可證」（第 47 條第一項但書）及「許可證污損或遺失申請換發或補發未將原許可證同時繳銷而由核發機關公告註銷」（第 47 條第二項）三種。本件註銷藥品取可證之處分應屬合法之廢止處分，而使原藥品許可證失其效力，又業者嗣後再向中醫藥司辦理移轉變更，由於移轉變更須以原登記核准事項及許可證字號存在為前提，然因本件業者先前已有註銷藥品許可之廢止處分存在，而於業者辦理移轉變更時，並無任何原登記核准事項及許可證字號可資附麗，亦即辦理移轉變更之準備文件尚未齊全，故中醫藥司不得受理業者所送移轉案。惟若業者欲向中醫藥司申請許可證，由於原藥品取可證早已失效，建議另外向中醫藥司重新申請許可。又業者倘以自動申請藥品許可證註銷為非法定原因，以行政訴訟法第 273 條第一項第一款「適用法規顯有錯誤」之理由，依行政程序法第 128 條第一項第三款「具有相當於行政訴訟法所定再審事由且足以影響行政處分」之情形，向行政機關申請撤銷原已註銷之行政處分，中醫藥司亦得審酌撤銷原核准註銷許可證之行政處分，即得受理業者所送移轉案

5. 藥事法第 103 條條文於 87 年 6 月 24 日修正公布實施，當時係相關團體透過立法委員逕自提案，且在未經充分討論下，倉促完成三讀程序，以致修正後之條文未盡周延，諸如：第二項「列冊人員」究係日出或日落條款。案經行政院衛生署法規會 90 年決議認為依修法原意，應為「日落」條款。惟再經該會於 102 年重新討論，決議為時間點由中醫藥司再行研議。則對於法規會二次不同決議，行政主管機關是否有法律問題或應考量、注意之事項。

結論摘要：

行政院衛生署法規會 90 年決議認為依修法原意，應為

「日落」條款，與行政院衛生署 88 年 7 月 5 日衛署中會字第 88036704 號公告「中藥從業人員繼續經營中藥販賣業務登記換照作業事宜」，係依據藥事法第 103 條第二項所稱「八十二年二月五日前」，以八十二年二月五日為終點，亦即行政院衛生署以解釋方式，認定藥事法第 103 條第二項應屬日落條款之意旨相合。法規會第二次決議，似未完全否認 90 年決議，則中醫藥司倘變更行政院衛生署 88 年 7 月 5 日衛署中會字第 88036704 號公告之時間點，宜提具足以推翻前公告之充分理由。又藥事法第 103 條有關列冊中藥商問題，係因法律文字及立法意旨之疑義，建議仍宜以修法解決。

6. 為遵行個人資料保護法實施，中醫藥司於計畫書中要求計畫主持人依各研究計畫案內容填寫與該項計畫相關之個資保護方式，本會草擬個人資料保護方法及步驟(如附件 1)，提請專家學者協助檢視內文是否恰當?此外，中醫藥司於計畫徵求作業中要求計畫主持人及相關計畫人員(含研究助理)，於計畫投標時接需填具資訊保密協定(附件 2)，提請專家學者協助檢視該協定內容與用語是否適宜?

   結論摘要：

   個人資料保護所指之個人資料保護範圍第 2 項特種資料，建議以粗體標示提醒。「資訊安全保密切結書(個人)」與「公務(機密)資料保密」所指資料範圍不同，若涵蓋過廣將造成無人願意參與計畫，故有必要明定，建請中醫藥司先行確認需保密資料之範圍。「同受法律關於公務員之行為規範」建議下修懲處標準，以鼓勵與他人(專家)合作。

(四) 於民國 102 年 5 月 14 日召開中醫藥法規諮詢小組第二次會議，共計審議 4 個議案，議題及結論摘要如下：

1.「個人資料保護」與「資訊安全保密切結書」修正內容。

結論摘要：

參酌個人資料保護法第 2 條有關處理及利用之法條文字內容酌修。

2. 有關社會科學所定問卷調查，是否仍需依人體研究法之規定，提交人體試驗委員會（IRB）審查通過？

結論摘要：

行政院衛生署依據人體研究法第 5 條第一項之規定，於 101 年 7 月 5 日以衛署醫字第 1010265075 號公告訂定「得免倫理審查委員會審查之人體研究案件範圍」，以研究案件非以未成年人、收容人、原住民、孕婦、身心障礙、精神病患及其他經審查會訂定或判斷受不當脅迫或無法以自由意願做決定者為研究對象，且符合五項情形之一，得免送倫理審查委員會審查或由倫理審查委員會核發免審證明。其中有關「使用已合法公開週知之資訊，且資訊之使用符合其公開週知之目的」，倘使用不合法之公開資訊，或資訊之使用不符合其公開週知之目的，尚無法釐清是否即應送審。故社會科學所定問卷調查，倘符合「於公開場合進行之非記名、非互動且非介入性之研究，且無從自蒐集之資訊辨識特定之個人」、「使用已合法公開週知之資訊，且資訊之使用符合其公開週知之目的」、「公務機關執行法定職務委託專業機構進行之公共政策成效評估研究」、「於一般教學環境中進行之教育評量或測試、教學技巧或成效評估之研究。」四者，應得免送倫理審查委員會審查；其餘建議送請倫理審查委員會核發免審證明。惟究應全部送請倫理審查委員會審查決定後，如屬免送者予以不受理退件，或屬受理後審查核發免審證明；或由計畫主持人自行決定依該公告情形免送倫理審查委員會審查；仍無法釋明。又如有使用不合法公開週知之資訊，或資訊之使用不符合其公開週知之目的，應依人體研究法第 22 條第一項第一款之規定處辦。爰建議修正該公告文字。

3. 機關向國外期刊資料庫（例如電子書）購買一定期間之使用下載全文文獻權限，期間機關委託學者（委託計畫主持人）以下載之相關文獻與國內研究成果資料結合，建置新的資料庫例如「中藥交互作用資料庫」供國人公開使用。若購買權限期滿後，所建置新的資料庫倘仍提供國人使用，是否有智慧財產權問題？

結論摘要：

機關向國外期刊資料庫（例如電子書）購買一定期間之使用下載全文文獻權限，應於購買契約中議定雙方權利義務，包括使用對象（機關內部或經委託之機關外部）、下載及

使用方式、利用之條件（例如可否公開發表）及利用時間限制。機關委託學者（委託計畫主持人）以下載之相關文獻與國內研究成果資料結合，建置新的資料庫供國人公開使用，亦應於委託契約中議定雙方權利義務，且應將已購買國外期刊資料庫之約定內容納入。機關委託學者執行計畫，利用機關所購買之國外期刊資料庫一定期間之使用下載全文文獻權限，所作成新的資料庫，成果歸屬政府所有。機關於購買國外期刊資料庫權限期滿後，所建置新的資料庫，倘仍需提供國人使用，仍應符合原於購買契約中所議定之權利義務。倘逾越原定契約範圍，仍應重新與國外期刊資料庫議定新約。

4. 若機關向國外期刊資料庫購買使用下載權限，研究者係以摘錄所需文獻內容之方式引用（citation），並於段落後引註出處，編製新資料庫供國人公開使用。若購買權限期滿後，所建置新的資料庫倘仍提供國人使用，是否有智慧財產權問題？

結論摘要：

引用（citation）其他資料庫文獻內容，標明出處，作成論述文章，與智慧財產權相關規範無違，尚屬適法。購買國外期刊資料庫使用下載權限，權限期滿後，所建置引用其他資料庫文獻內容並標明出處之新的資料庫，倘仍公開提供國人使用，尚無違智慧財產權相關規範。

(五) 於 102 年 7 月 10 日召開中醫藥法規諮詢小組第三次會議，共計審議 9 個議案，議題及結論摘要如下：

1. 申請國產中藥查驗登記，是否必須檢附外盒、標籤、仿單黏貼表？業者如說明包裝標示與標籤相同，市售品只貼標籤與附仿單，是否仍須要求有外盒包裝？業者如說明仿單內容與標籤相同，市售品未附仿單，是否仍須要求有仿單嗎？業者如說明仿單內容、包裝標示與標籤相同，市售品只貼標籤，是否仍須要求有仿單與外盒包裝嗎？

結論摘要：

「標籤」及「仿單」皆屬該藥品之最重要揭露資訊事項。即使仿單內容與標籤相同，市售品仍認應依法附有仿單，惟標籤可予簡化。

2. 業者將仿單整疊置於箱子裡(外盒裡)，是否適法？

結論摘要：

仿單係消費者最重要資訊，交付藥品之醫藥人員亦無義務將藥品與仿單結合，而仿單與最小包裝藥品結合，係藥廠依藥物優良製造準則第八節包裝及標示管制所要求制定製造管制標準書，故應由藥廠負責為之。業者將仿單整疊置於箱子裡(外盒裡)，如非屬最小包裝，其容易脫離藥品而無法確知藥品資訊，與法目的不合，應非適法。

3. 業者將仿單內容印刷於外盒內，是否適法？

結論摘要：

於最小包裝之外盒印製所核定之仿單內容，尚難認非屬適法，惟其外盒仍應經查驗核准。

4. 行政院衛生署 79 年 2 月 8 日衛署藥字第 857252 號公告「GMP 藥廠利用原有劑型兼製類似藥品劑型之食品、化妝品、一般商品辦理程序」。地方衛生局近來發現部分中藥廠未經主管機關核備，即擅自利用原有設備製造一般商品(如貼布)，並在市面上販售。則中藥廠未經核備生產食品或一般商品，是否有違反藥事法相關法規? 或另有裁罰規定依據? 相關事實要如何認定之?

結論摘要：

中藥廠未經主管機關核備，即擅自利用原有設備製造一般商品(如貼布)，生產食品或一般商品，並在市面上販售，無法依藥物優良製造準則第 9 條第八項之規定查核，即有違反藥事法第五十七條第二五項之規定，應依第 92 條第一項之規定，處新臺幣三萬元以上十五萬元以下罰鍰，並得依同條第三項之規定，中央衛生主管機關得公布藥廠或藥商名單，並令其限期改善，改善期間得停止其一部或全部製造、輸入及營業；屆期未改善者，不准展延其藥物許可證，且不受理該製造廠其他藥物之新申請案件；其情節重大者，並得廢止其一部或全部之藥物製造許可。相關事實之認定，除得依藥物優良製造準則第 9 條第八項規定，依中藥廠是否利用原有設備兼製食品、化粧品或一般商品、有無避免交叉污染、有無完成確效等之構成要件，依所為行為及事實判定之外，亦得

查核其事實是否依藥事法第 57 條第二項之規定，經中央衛生主管機關檢查合格判斷。

5. 行政院衛生署 101 年 4 月 30 日函頒「傳統整復推拿人員執業管理要點」，並於同年 5 月 29 日修正發布「民俗調理之管理規定事項」，供該等從業人員遵循；為進一步維護民眾健康，行政院消費者保護委員會已於 101 年 10 月 17 日指定衛生署擔任民俗調理業之中央目的事業主管機關。按 97 年 10 月 31 日司法院院台大二字第 0970023522 號令公布本院大法官議決釋字第六四九號解釋:「中華民國九十年十一月二十一日修正公布之身心障礙者保護法第三十七條第一項前段規定:「非本法所稱視覺障礙者，不得從事按摩業。」（九十六年七月十一日該法名稱修正為身心障礙者權益保障法，上開規定之「非本法所稱視覺障礙者」，經修正為「非視覺功能障礙者」，並移列為第四十六條第一項前段，規定意旨相同）與憲法第七條平等權、第十五條工作權及第二十三條比例原則之規定不符，應自本解釋公布之日起至遲於屆滿三 年時失其效力。」。有關勞委會研擬廢止「視覺功能障礙者從事按摩或理療按摩資格認定及管理辦法」，亦即，視障按摩從業人員係經訓練、考試及格，始得從事該職業。倘該辦法廢止後，明眼人亦得從事該職業，惟是否應參加視障按摩檢定考試，始得從業？

結論摘要：

釋字第 649 號解釋之重點為身心障礙者保護法第三十七條第一項前段「按摩之定義與界定範圍並不明確，導致執行標準不一」及「非視覺功能障礙者（明眼人）不得從事按摩業，不符平等權、工作權及比例原則」，限期失效後，僅係發生明眼人得從事按摩業之效果，故與是否廢止「視覺功能障礙者從事按摩或理療按摩資格認定及管理辦法」之場所與作業內容之鼓勵無關。視障者之疑義在於非視障者未有相關之管理辦法，故勞委會仍應另行制定「非視覺功能障礙者從事按摩或理療按摩資格認定及管理辦法」，以區別視障者及非視障者之管理，以消弭紛爭。至行政院衛生署 101 年 4 月 30 日函頒「傳統整復推拿人員執業管理要點」，並於同年 5 月 29 日修正發布「民俗調理之管理規定事項」，係屬職權命令，因

各該行為多認定屬商業行為，非屬醫療行為，仍宜儘速於職業訓練法中明定相關管理辦法，俾予法源，以符法律保留原則。

6. 某公司 92 年成立，為台資，販賣業藥商執照之營業項目含有中藥零售業，98 年因大陸地區人民來臺投資許可辦法開放服務業/藥品批發，加入陸資，惟原開放項目已有中藥零售一項，能否於陸資加入後，要求辦理變更營業項目為「中藥批發業」？

結論摘要：

本案原販賣業藥商執照之營業項目為「中藥零售業」，98 年開放大陸地區人民來臺投資加入陸資，其於陸資加入後，要求辦理變更營業項目為「中藥批發業」，依藥事法第 15 條及藥事法施行細則第 9 條第一項第二款之規定，批發、零售、調劑、輸入及輸出皆為中藥販賣業者「營業項目」之藥商登記事項，自屬適法。至業者倘不遵行，應依臺灣地區與大陸地區人民關係條例處辦。

7. 大陸地區人民來臺投資許可辦法有關中藥業僅開放中藥批發業未含零售業，針對所領有之販賣業藥商許可執照「營業項目」，得否依其限制特別註明為「中藥批發業」？記事欄位得否加註？(如：依據經濟部 98 年 7 月 3 日經審字第 09802085685 號令發布定自 98 年 6 月 30 日施行，投資業別項目-服務業/4571 藥品及醫療用品批發業)

結論摘要：

中藥業依大陸地區人民來臺投資許可辦法僅開放中藥批發業未含零售業，其所領有之販賣業藥商許可執照「營業項目」，自得依其限制，特別註明為「中藥批發業」。於目前藥商許可執照格式中之記事欄予以加註，自屬適法。

8. 大陸地區人民來臺投資許可辦法有關中藥業僅開放中藥批發業未含零售業，申請人若未表明為大陸人民投資，辦理為藥商時，衛生局依據藥事法施行細則第 10 條第 1 項第 2 款規定，自該公司組織章程影本，能否得知相關訊息？能否加以限制？

結論摘要：

章程係公司之內部法律關係（公司法第 42 條參照），公司法第 101 條有關公司章程應載明事項，並未強制要求需記載大陸人民投資。故依據藥事法施行細則第 10 條第 1 項第 2 款之規定，由公司組織章程影本，尚無法得知相關訊息。惟大陸地區人民來臺投資許可辦法之主管機關為經濟部（第二條），公司法之主管機關亦為經濟部（公司法第 5 條），基於行政（政府）一體，則經濟部於核准大陸人民投資時，自應依法通報各目的事業主管機關，方屬正辦。

9.現行藥商許可執照格式無法明列營業項目，應如何修正以符法治？

結論摘要：

建議修正藥商許可執照「執照名稱」為「中藥販賣業藥商許可執照」；於內文加上業別「中藥販賣」、「西藥販賣」；於營業項目列舉「批發、零售、輸入、輸出」。

(六) 於 102 年 9 月 4 日召開中醫藥法規諮詢小組第四次會議，共計審議 7 個議案，議題及結論摘要如下：

1. 某列冊中藥商停業，未依藥事法之規定辦理藥商停業登記，惟向經濟發展局辦理商業停業登記，案經衛生主管機關普查發現該址無經營事實予以公告註銷其藥商許可執照，則該列冊中藥商可否回復原藥商登記？

結論摘要：

倘得確認該列冊中藥商有逕向經濟發展局辦理停業登記之事實，宜認屬過失未申請藥商停業登記，主管機關查明事實，自得撤銷原公告註銷之處分，回復原來藥商狀態。惟該列冊中藥商其停業未依藥事法之規定，自事實發生之日起十五日內，向原核准登記之衛生主管機關申請辦理停業變更登記，核有違反藥事法第 27 條第一項後段之規定，應依同法第 92 條第一項之規定，處新臺幣三萬元以上十五萬元以下罰鍰。

2. 藥事法第 103 條第三項業務範圍為「...不含毒劇中藥材或依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹及煎藥。」，其中「丸、散、膏、丹及煎藥」之範圍是否僅限於「丸、散、膏、丹及煎藥」五種製劑，不能涵蓋其他傳統劑型，例如膠劑(龜鹿二仙膠)？

結論摘要：

丸、散、膏、丹、煎藥（液劑）、露劑、酒劑、膏滋劑及膠劑原係傳統調配之成方，其依古調配製之方法，未聞有太大管理上之差異，又查散劑、丸劑及中藥液劑、露劑、酒劑、膏滋劑、膠劑等，分別為藥物製造工廠設廠標準所規範，雖係為中藥製造業所定，惟亦要求遵古調製。由於倘屬單純列舉，其處罰之結果差異甚大，則限縮僅為「傳統丸、散、膏、丹及煎藥」，似無必要。建議參照憲法第 7 條平等權之例示列舉，建請主管機關作成例示列舉解釋。

3. 藥事法第 103 條第三項業務範圍有關依「固有成方」調配，主管機關是否得解釋為「固有典籍記載」皆屬「固有成方」？

結論摘要：

「固有成方」應以中央衛生主管機關選定公告具有醫療效能之傳統中藥處方為原則。製造中藥製劑，方得以固有典籍之處方作為依據。藥事法第 103 條第三項業務範圍有關依「固有成方」調配，主管機關倘解釋為「固有典籍記載」皆屬「固有成方」，尚有不宜。倘主管機關認有必要解釋為「固有典籍記載」皆屬「固有成方」，建議分析整理固有典籍醫宗金鑑、醫方集解、本草綱目、本草拾遺、本草備要、中國醫學大辭典及中國藥學大辭典所記載之處方，依藥事法第 10 條之規定予以公告。或修正成藥及固有成方製劑管理辦法第 5 條，納入固有典籍記載之處方。

4. 配合 102 年 7 月 23 日衛生福利部成立，原中醫藥司改制為衛生福利部中醫藥司，所有採購作業相關流程改依衛生福利部作業模式，惟因雙方(中醫藥司與衛服部)原訂契約規範及相關要求不同，其後續履約管理之處理方式，提請討論。

結論摘要：

本案既係機關組織法律變更之情事變更，承受機關即應繼受，概括承受原契約，履行義務。倘另涉及契約內容變更，則應徵求對方同意，修正契約，履行修正後之義務。

5. 配合 102 年 7 月 23 日衛生福利部成立，原中醫藥司改制為衛生福利部中醫藥司，惟原衛生署中醫藥司已取得之專利及商標權應以讓與或移轉方式辦理所有權人變更？

結論摘要：

機關改制後，應以情事變更之理由，原衛生署中醫藥司已取得之專利及商標權，應向經濟部智慧財產局申請變更專利及商標權所有權人。

6. 承議題五，原已取得之專利及商標權，變更後之所有權人宜以衛生福利部或衛生福利部中醫藥司，提請討論。

結論摘要：

原衛生署中醫藥司已取得之專利及商標權，因中醫藥司為衛生福利部之業務單位，尚無法作為行為主體，仍應以衛生福利部為專利及商標權所有權人。

7. 辦理專利權變更須檢附機關整併證明文件，可否以衛生福利部中醫藥司秘書處制式契約換約函稿作為證明文件？

結論摘要：

建議以法律變更之事實作為證明，由衛生福利部行文變更，並宜請相對人回復同意，免生後續可能發生之問題。

(七) 於 102 年 10 月 24 日召開中醫藥法規諮詢小組第五次會議，共計審議 13 個議案，議題及結論摘要如下：

1. 中藥材依邊境管制輸入後，於市售品檢驗其重金屬或農藥殘留不合格，依法應如何處理？

結論摘要：

中藥材輸入後，於市售品檢驗其重金屬或農藥殘留不合格，應屬藥事法第 21 條所稱劣藥，應由輸入之業者依規定期限回收，限期退運出口。

2. 以中藥材輸入後，供應食品（醬油或藥膳包）原料，因藥材規格與食品規格不同，最終產品不符食品規格，輸入之藥材商應否歸責？

結論摘要：

藥商依中藥材所定規格檢驗合格，輸入後供應食品（醬油或藥膳包）原料，只要無限制或禁止加入食品原料事項，應屬適法。倘市售品不符食品規格，其應歸責於食品製造廠商，自無從對輸入之藥材商究責。

3. 中藥材合格輸入後，供應藥廠作為濃縮製劑原料，所製造之濃縮製劑於市售檢驗農藥殘留不合格，其責任歸屬為何？

結論摘要：

藥商依中藥材所定規格檢驗合格，輸入後供應藥廠作為濃縮製劑原料，市售品檢驗農藥殘留不合格，其應歸責於藥廠，與輸入之藥材商無涉。

4. 自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，則輸入商、分裝商及販賣商之責任歸屬為何？

結論摘要：

自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，輸入商、分裝商及販賣商應各依所訂勞務及買賣契約條款履行賠償責任。

5. 自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，倘消費者求償，則輸入商、分裝商及販賣商之責任如何分配？

結論摘要：

自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，各該輸入商、分裝商及販賣商皆屬消費者保護法所定「企業經營者」，應依消費者保護法第 7-1 條之規定，就其主張符合當時科技或專業水準可合理期待之安全性之事實負舉證責任。未能舉證者，即應負責賠償或連帶賠償。

6. 自大陸輸入中藥材，倘有買賣契約爭議，如何保護台灣廠商？

結論摘要：

依臺灣地區與大陸地區人民關係條例之規定，臺灣地區人民與大陸地區人民間之民事糾紛事件，係依臺灣地區之法律處理；而關於債之契約係屬特別規定，依次以當事人約定、訂約地、履行地訴訟或仲裁地檢核認定。倘兩岸人民就民事紛爭不論係在臺灣地區或大陸地區提起訴訟或仲裁救濟，於該等地區作成之裁判或仲裁判斷，均得向各該地區法院聲請裁定認可或為執行名義。中藥材輸入之買賣契約，應明確訂定品質是否均一而無瑕疵，倘有違約情事，是否有懲罰性賠償或其他具體賠償約定事項，就雙方權利義務明確約定，或設計相關履約保證機制。為保護台灣廠商自大陸輸入中藥材

之買賣契約爭議，建議中藥商公會協助輸入中藥商所訂契約，納入於大陸或第三地（例如香港）之仲裁機制，方得確保得以求償。

7. 內政部於民國 56 年 9 月所選定之「中國國藥固有成方選輯」是否即屬藥事法及相關法規所稱「固有成方」？

結論摘要：

內政部於民國 56 年 9 月出版「中國國藥固有成方選輯」所列載二至丸等之 137 方，認應係民國 62 年 4 月 11 日行政院衛生署發布成藥及固有成方製劑管理辦法第 5 條所定之「固有成方」。建議衛生福利部補行公告內政部「中國國藥固有成方選輯」所列載二至丸等之 137 方，或另行研議檢討原方並納入新方，依法公告。

8. 單味中藥材磨粉係以原料藥及「調劑調配專用」散劑（製劑）二類並存核給許可證，是否有適用疑義？

結論摘要：

「調劑調配專用」無法律分類之基礎，倘政策上認確需訂定「調劑調配專用」類別，則應將區別實益(理由)列明，修正明列於藥事法中予以規範分類，方屬適法。

9. 重金屬及農藥殘留等限量，得否依學理修正為每日限量或療程限量？

結論摘要：

重金屬及農藥殘留等限量，係由行政院衛生署以公告方式為之，其位階屬行政規則，倘依學理認以每日限量或療程限量足可證明其安全性，自得由衛生福利部就學理審核，依行政規則所定程序，修正公告。

10. 中藥材飲片如採低度查驗核給許可證（或許可文件），是否適法？

結論摘要：

中藥材飲片屬藥事法第 6 條規定之藥品原料藥，其查驗與西藥顯有不同，如採低度查驗如基源或重金屬或農藥殘留等後，核給許可證或許可文件，尚屬適法。

11. 藥劑生依據現行藥事法、藥師法及醫療法等相關法規之規定，得否執行中藥調劑業務？

結論摘要：

中藥材飲片屬藥事法第 6 條規定之藥品原料藥，其查驗與西藥顯有不同，如採低度查驗如基源或重金屬或農藥殘留等後，核給許可證或許可文件，尚屬適法。

12. 若依現行規定，藥劑生倘不能執行中藥調劑業務，而政策如欲規劃使藥劑生得執行中藥調劑業務，則應修正之法規為何？

結論摘要：

政策如欲規劃使藥劑生得執行中藥調劑業務，則應列舉理由，修正藥事法第 37 條後，再修正藥劑生資格及管理辦法第 13 條。

13. 中醫藥司所擬具「按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項」(草案)，其行政程序應如何進行？

結論摘要：

中醫藥司所擬具「按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項」(草案)，其性質屬法規命令，其法制作業程序，應依行政程序法所定之相關程序為之，並應依行政院發布各機關依行政程序法修訂主管法規之參考原則有關法規命令之相關程序辦理。

(八) 部分議題較緊急或較為單純，先以 e-mail 方式回覆，必要時提報中醫藥法規諮詢小組討論，計有 6 個議題，其回覆摘要如下：

1. 提問：劉泓志醫師提起之行政訴訟案，在起訴狀第 1 頁下方有提到依行政訴訟法第 8.9 條提起公益訴訟，請問這項應該是針對健保局，對中醫藥司應該是告偽造文書？另外，本案劉醫師亦提國賠協商書，擬回復內容：「依國家賠償法第 2 條第 2 項規定『公務員於執行職務行使公權力時，因故意或過失不法侵害人民自由或權利者，國家應負損害賠償責任。公務員怠於執行職務，致人民自由或權利遭受損害者亦同。』。案內 臺端所提有關中醫師調劑乙事，經查並沒有公務員於執行職務時因故意或過失不法侵害人民自由或權利，抑或怠於執行職務，致人民自由或權利遭受損害之情事，不符國家賠償要件，爰依國家賠償法施行細則第 19 條規定拒絕賠償。」。至於醫療機構設置標準於 102 年 1 月 4 日有修正，惟經與醫事處確認如下：「102

年 1 月 4 日修正之『醫療機構設置標準』，有關中醫醫療院所執行中藥調劑業務之人員資格並未修正」。劉醫師一直以來一直訴求中醫師不可自行調劑中藥，本會皆以署函回復，內容如下：「依 102 年 1 月 4 日修正之『醫療機構設置標準』，第 6 條『中醫醫院設置標準表』與第 9 條『診所設置標準表』之規定，中醫醫療院所執行中藥調劑業務之人員資格，包括中醫師、修習中藥課程達適當標準之藥師、藥事法第 103 條第 1 項所定人員等三類。故該三類人員，依法均得從事中藥調劑業務。」。以上案件，中醫藥司在答辯時，有需要特別注意的嗎？回覆意見：

(1) 本件為行政訴訟，訴訟標的為「要求修正 102 年全民健康保險支付標準，廢除中醫師親自調劑給付之藥費及調劑（藥事服務）費」，偽造文書僅是理由之一，與偽造文書刑事訴訟無關。

(2) 本件訴訟係以藥師法第 15 條「藥品調劑為藥師業務」及第 24 條「非藥師不得執行藥師業務」為依據。惟中醫師調劑係屬藥事法第 37 條第四項「中藥之調劑，除法律另有規定外，應由中醫師監督為之。」，該條文未排除中醫師親自為之；又醫療法授權訂定之「醫療機構設置標準」亦依藥事法第 37 條第四項之規定，定有「中醫醫療院所執行中藥調劑業務之人員資格，包括中醫師、修習中藥課程達適當標準之藥師、藥事法第 103 條第 1 項所定人員等三類」（102 年 1 月 4 日修正之「醫療機構設置標準」第 6 條及第 9 條參照）；全民健康保險支付標準即依前開條文定有「中醫師或修習中藥課程達適當標準之藥師」支付之規定。（應提具法條證據）

(3) 本件訴訟並未提國賠（依所附內容應係原告向嘉義縣政府請求國賠，經高等法院台南分院駁回）（該人有 20 多筆國賠訴訟如下，多遭駁回）可查司法院網頁 http://jirs.judicial.gov.tw/Index.htm

序號	裁判字號(檔案大小)	裁判日期	裁判案由
1	101,上國易,17 (9K)	1020104	國家賠償
2	101,上國易,15 (13K)	1011120	國家賠償
3	101,上國易,14 (11K)	1011101	國家賠償
4	101,上國易,12 (8K)	1011030	國家賠償
5	101,再國易,8 (7K)	1011024	國家賠償
6	101,抗,128 (3K)	1011022	聲明異議
7	101,上國易,10 (10K)	1010918	國家賠償
8	101,再國易,7 (2K)	1010905	國家賠償
9	101,再國易,2 (3K)	1010822	國家賠償
10	101,上易,151 (17K)	1010821	損害賠償
11	101,上國易,5 (12K)	1010731	國家賠償
12	101,上國易,10 (1K)	1010731	國家賠償
13	101,再國易,3 (1K)	1010720	損害賠償
14	101,再國易,4 (2K)	1010718	國家賠償
15	101,再國易,3 (1K)	1010705	損害賠償
16	101,再國易,4 (1K)	1010704	國家賠償
17	101,上國易,7 (8K)	1010613	國家賠償
18	100,上國易,12 (18K)	1010522	國家賠償
19	101,上國易,2 (8K)	1010522	國家賠償
20	101,上國易,1 (15K)	1010515	國家賠償

2. 提問：某甲向監察院檢舉，行政院來函要逕復陳情人並副知監察院暨行政院。將如下擬稿回覆，敬請指教。

擬稿：

主旨：台端陳訴，本署未依藥事法第 103 條規定積極協助中醫師檢定考試及格者取得中藥師證照乙案，復請查照。

說明：

(1) 依據行政院 102 年 3 月 13 日院臺衛字第 1020013526 號函轉監察院 102 年 3 月 4 日院台業三字第 1020160706 號函送親民黨立法院黨團 102 年 1 月 21 日親立選服字第 1020019 號簡便行文函送台端 101 年 12 月 26 日陳訴書辦理。

(2) 依據專門職業及技術人員高等暨普通考試醫事人員考試規則規定，目前並無包含中藥師項目，先予敘明。

(3) 專門職業及技術人員高等暨普通考試醫事人員考試規則第 2 條規定，高等考試包含：藥師、醫事檢驗師、醫事放射師、護理師、助產師、物理治療師、職能治療師。第 15 條規定，本考試及格人員，由考選部報請考試院發給考試及格證書，並函行政院衛生署查照。與「藥品」相關之專門職業及技術人員目前僅有「藥師」乙項，而藥師考試及其業務項目乃專門職業及技術人員考試法、藥師法及藥事法明定事項。

(4) 藥品之製造與販售攸關國民健康與生命安全，故法律明定應由專業人員執行前開業務與律定專業人員養成制度並納入國家考試。

(5) 藥師法第 1 條規定，中華民國人民經藥師考試及格者，得充藥師。第 2 條規定，公立或立案之私立大學、獨立學院或符合教育部採認規定之國外大學、獨立學院藥學系畢業，並經實習期滿成績及格，領有畢業證書者，得應藥師考試。藥師法第 15 條規定，藥師業務如下：1、藥品販賣或管理。2、藥品調劑。3、藥品鑑定。4、藥品製造之監製。5、藥品儲備、供應及分裝之監督。6、含藥化粧品製造之監製。7、依法律應由藥師執行之業務。8、藥事照護相關業務。中藥製劑之製造、供應及調劑，除依藥事法有關規定辦理外，亦得經由修習中藥課程達適當標準之藥師為之。

(6) 考選部 101 年 5 月 28 日選規二字第 1010002894 號曾回復台端函，即清楚明確敘明，憲法第 86 條第 2 款規定：「專門職業及技術人員執業資格，應經考試院依法考選銓定

之。」司法院釋字第 453、655 號解釋意旨，憲法第 86 條規定辦理之專門職業及技術人員執業資格考試，其屬性尚須審酌具備以下事項：「（一）具備經由學校正規教育及訓練之培養過程獲得特殊學識或技能。（二）所從事業務與公共利益或人民之生命、身體、財產等權利有密切相關。（三）執行業務具自主性、獨立性、自律性及專屬不可代替性。（四）具執業資格者對他人具有排他性與壟斷性。（五）紛爭責任鑑定具高度專業性與困難度。」是以，專門職業及技術人員考試及格人員所從事業務或提供服務與公共利益或人民之生命、身體、財產等權利有直接重大密切相關，應須經完整正規學校養成教育及相當期間之實習訓練，並具執業資格始得執行業務以保障國民。因此舉行專門職業及技術人員考試係屬考試院權責，藥事法第 103 條第 5 項亦明示，前項考試，由考試院會同行政院定之。

(7) 本署 101 年 9 月 17 日署授藥字第 1010004275 號曾函復台端，即明白說明「中醫師檢定及格者」身分定位法源，係規定在專門職業及技術人員特種考試中醫師考試規則第 6 條：「中華民國國民，經中醫師檢定考試及格者，得應本考試」，因此中醫師檢定考試及格者，僅具參加中醫師特考之應考資格，並無其他附帶條件。亦告知台端如擬開設中藥房，可依藥事法第 27 條之規定向當地衛生主管機關申請中藥販賣業藥商許可執照。並依藥事法第 28 條第 2 項之規定，聘請專任中醫師或修習中藥課程達適當標準之藥師或藥劑生駐店管理。

(8) 關於人民之權利、義務者，應以法律定之，中央法規標準法第 5 條第 1 項第 2 款定有明文。查藥事法第 103 條，係該法附則章所為特別規定。該條文雖規定中藥商等人員經國家考試及格之後，得執行中醫師處方藥品調劑工作，但未明文授權中央主管機關得對相關事項訂定管理辦法，事涉人民權利義務事項，仍需依前揭中央法規標準法第 5 條規定辦理。

(9) 本署對於中藥調劑人員所需具備資格之立場，在藥事法

87 年修正時，即明示應「回歸正規教育體制之教、考、用原則」。又國內各大學院校藥學系之畢業生，均得應試藥師考試；取得藥師執照並修畢中藥學分，始得執行中藥相關業務，藥師法定有明文。而任何專門職業及技術人員皆需符合法定教、考、用原則始可取得執行該專業業務之資格，這是我國既定之專門職業技術人員資格授予規定政策及共識。截至 100 年 12 月止意統計合法資格藥師已達 33,000 人，已足敷目前社會要求。

(10) 本署依據回歸正規教育體制之教考用原則，於 87 年起至 100 年期間，均努力與相關團體召開會議協商「藥事法第 103 條相關條文修正事宜」，希促成藥事法第 103 條對該類人員之考試及合法管理之依據，基於其未符合專技人員屬性，擬議刪除該條文第 5 項「前項考試，由考試院會同行政院定之」文字，惟因涉及層面廣泛，各界團體始終難以達成共識，故擬俟有共識時，再行修正。

(11) 醫事人員專門職業證照制度業已建立多年，藥事專業業務係屬專門職業及技術人員之職權，並非人人可為，本署認為仍應回歸教、考、用之專業養成制度。如何建立管理制度，本署一向甚為重視，就長期之規劃而言，倘各界能達成共識，亦可朝向教考用原則規劃，再行培育中藥藥事專業人員。

(12) 就台端所提問題，本署已經多次回函說明，依據行政程序法 173 條規定，將不再重複回復。

回覆意見：

(1) 行政院函要求回復陳情人，副知行政院及監察院。所擬之回文，建議刪除「12.就台端所提問題，本署已經多次回函說明，依據行政程序法 173 條規定，將不再重複回復。」，因為要副知行政院及監察院。

(2) 第二件回復監察院說明一所詢事項，副知行政院。建議回復監察院下列事項：

a. 考選部函請衛生署修正事宜（應有制式文稿），應加上相關處理是否妥適？

b.（1010003436 函）藥事法無規定，是否有其他法律規

定？（可引所擬說明 3.4.5.6 各段）

c. 本案是否符合藥商許可執照申請條件？（可引藥事法第 27 條及 88 年列冊登記條件）

d. 檢考及格人數、業務內容及工作權？（以前應有已答覆資料，可加上 103 條第四項經考試及格後之業務）

3. 提問：新竹市衛生局詢案：「某產品於 100 年 9 月 22 日經法務部調查局臺南縣調查站扣押在案，新竹市衛生局又於 101 年 7 月 3 日配合該處抽驗該產品，刻正已送驗中；桃園縣政府衛生局 100 年 12 月 16 日於該轄查獲同產品之品名及成分涉與原查驗登記不符之情事，移至新竹市衛生局辦理，本案是否於司法機關刑事案件為裁判前，不宜先科處罰鍰？抑或依違反藥事法第 75 條及 92 條之規定予以處罰？」。此案同時涉刑罰及行政罰處分，雖然法令依據不同，並無先罰後罰之虞，但回復時是否需使用法律專業用語，回復內容：「刑罰與行政罰屬不同之法令依據，尚無先罰後罰之虞，對於行政罰部分，仍請貴局依查察事實認定核處。」，敬請指導。

回覆意見：

(1) 請問調查站係以何名義扣押產品（偽藥？）

(2) 如係以偽藥扣押，行政機關即需舉證認定為偽藥（調查站仍會詢問行政機關），即依 78 條處置（與偽藥罪移送分別處理）。

(3) 回復內容建議修正為「刑罰與行政罰分屬不同之法律系統，依法主管機關應分別依職權處辦（刑事移送司法機關偵查，行政機關依法執行行政裁罰），並無先後程序之分，對於行政罰部分，仍請貴局依所查事實認定適用法條核處。」。

4. 提問：敬請指導針對「列冊逕自到臺北縣經濟發展局辦理停業被衛生局註銷欲復業」之擬稿如下：

主旨：有關列冊中藥商歇業乙案，復請查照。

說明：

(1) 復貴局 102 年 6 月 24 日北衛食藥字第 1022098635 號暨許致嘉君 102 年 6 月 27 日陳情函。

(2) 列冊中藥商之停業、歇業或復業登記，藥事法第 27-1 條

定有明文，而該列冊中藥商逕向經濟發展局辦理停業登記乙事，請貴局查明事實本於權責處理。

(3) 列冊中藥商之停業未依藥事法第 27 條之 1 第 1 項規定辦理停業登記，業已違反藥事法第 92 條規定。

回覆意見：

由於不知來文內容，僅以您所告知之內容，建議修正如下。

主旨：所詢列冊中藥商歇業乙案，復請查照。

說明：

(1) 復貴局 102 年 6 月 24 日北衛食藥字第 1022098635 號暨許致嘉君 102 年 6 月 27 日陳情函。

(2) 查藥商之停業、歇業或復業登記，藥事法第 27-1 條定有明文。

(3) 本案列冊中藥商之停業，未依規定辦理停業登記，核有違反藥事法第 27-1 條第一項之規定，應依同法第 92 條之規定處辦。

(4) 至該列冊中藥商逕向貴市經濟發展局辦理停業登記乙事，宜認屬過失未申請藥商停業登記，得撤銷原公告註銷之處分，請貴局查明事實，本於權責處理。

5. 提問：敬請指導說明，臺中市政府衛生局所詢中醫診所調劑相關問題，關於所謂由中醫師監督中藥之調劑，「監督」該如何認定？

回覆意見：

所謂「監督」，係指於中醫師的觀察、指導和督促下執行中藥之調劑。監督的主體（監督人）是中醫師，客體（受監督人）是確具中藥基本知識及鑑別能力人員，監督內容是中藥調劑之執行，監督標準是依據藥品優良調劑作業準則。

6. 提問：關務署基隆關同時予本司及食品藥物管理署之通關疑義答覆聯絡單內容詢問貨物(中藥或西藥)進儲物流中心「保稅區」，是否為藥事法所稱之「輸入」？於進儲時是否應檢具藥品輸入許可證？

本司回復內容：是依據「加值型及非加值型營業稅法」第五條之規定：

貨物有下列情形之一，為進口：

＊貨物自國外進入中華民國境內者。但進入保稅區之保稅貨物，不包括在內。

＊保稅貨物自保稅區進入中華民國境內之其他地區者。

故進入保稅區之保稅貨物不視為進口，故無須符合我國藥事法規範。

食品藥物管理署回復內容：

依據最高法院 71 年度台上字第 8219 號判例，略以：「藥物藥商管理法...所稱之輸入，係指自國外將物品輸進入我國領土而言，至所謂我國領土則已固有之領域為範圍。」準此，藥品應依藥事法第 39 條申請查驗登記，經核准發給藥品許可證後，使得輸入，而藥品一旦進入我國固有領域，及該當輸入之要件，至於是否進儲保稅倉庫則在所不問。

但經查此判例於民國 102 年 1 月 8 日經最高法院 102 年度第 1 次刑事庭會議決議不再援用，並於 102 年 2 月 8 日由最高法院依據最高法院判例選編及變更實施要點第 6 點規定以台資字第 1020000129 號公告之。

不再援用理由：台灣地區與大陸地區人民關係條例第四十條第一項另有明文，本則判例不合時宜，不再援用。

本司與食品藥物管理署見解不同，敬請指導說明，是否在法規條文引用或認知上有所錯誤？

回覆意見：

最高法院 71 年度台上字第 8219 號判例，不予援用之原因為兩岸關係條例已就大陸進口如何判定明文規定，惟「輸入，係指自國外將物品輸進入我國領土而言，至所謂我國領土則已固有之領域為範圍。」仍屬有效。

通常藥品尚未出海關者，倘其運輸方式為我國籍航空器或船舶，視為我國領土，則自上該航空器或船舶，即屬輸入，國內法（藥事法）即得管轄。倘其運輸方式非我國籍航空器或船舶，則尚未出海關者，仍非進入國土，國內法（藥事法）尚無管轄權，並非適用。

「加值型及非加值型營業稅法」第 5 條規定「進入保稅區之保稅貨物不視為進口」，係屬稅法之規定，仍需以特別法藥事法為優先適用。

二、採互動方式，建置有效的中醫藥法規諮詢作業平台

(一)中醫藥司於 100 年 3 月 15 日以衛中會研字 1000002962 號行文各相關公會

(二)各相關公會提出有關之中醫藥法規問題計有 6 件，議題及結論摘要如下。

1. 中藥材依邊境管制輸入後，於市售品檢驗其重金屬或農藥殘留不合格，依法應如何處理？

   結論摘要：

   中藥材輸入後，於市售品檢驗其重金屬或農藥殘留不合格，應屬藥事法第 21 條所稱劣藥，應由輸入之業者依規定期限回收，限期退運出口。

2. 以中藥材輸入後，供應食品（醬油或藥膳包）原料，因藥材規格與食品規格不同，最終產品不符食品規格，輸入之藥材商應否歸責？

   結論摘要：

   藥商依中藥材所定規格檢驗合格，輸入後供應食品（醬油或藥膳包）原料，只要無限制或禁止加入食品原料事項，應屬適法。倘市售品不符食品規格，其應歸責於食品製造廠商，自無從對輸入之藥材商究責。

3. 中藥材合格輸入後，供應藥廠作為濃縮製劑原料，所製造之濃縮製劑於市售檢驗農藥殘留不合格，其責任歸屬為何？

   結論摘要：

   藥商依中藥材所定規格檢驗合格，輸入後供應藥廠作為濃縮製劑原料，市售品檢驗農藥殘留不合格，其應歸責於藥廠，與輸入之藥材商無涉。

4. 自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，則輸入商、分裝商及販賣商之責任歸屬為何？

   結論摘要：

   自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，輸入商、分裝商及販賣商應各依所訂勞務及買賣契約條款履行賠償責任。

5. 自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於

市售品檢驗不合格，倘消費者求償，則輸入商、分裝商及販賣商之責任如何分配？

結論摘要：

自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，各該輸入商、分裝商及販賣商皆屬消費者保護法所定「企業經營者」，應依消費者保護法第 7-1 條之規定，就其主張符合當時科技或專業水準可合理期待之安全性之事實負舉證責任。未能舉證者，即應負責賠償或連帶賠償。

6. 自大陸輸入中藥材，倘有買賣契約爭議，如何保護台灣廠商？

結論摘要：

依臺灣地區與大陸地區人民關係條例之規定，臺灣地區人民與大陸地區人民間之民事糾紛事件，係依臺灣地區之法律處理；而關於債之契約係屬特別規定，依次以當事人約定、訂約地、履行地訴訟或仲裁地檢核認定。倘兩岸人民就民事紛爭不論係在臺灣地區或大陸地區提起訴訟或仲裁救濟，於該等地區作成之裁判或仲裁判斷，均得向各該地區法院聲請裁定認可或為執行名義。中藥材輸入之買賣契約，應明確訂定品質是否均一而無瑕疵，倘有違約情事，是否有懲罰性賠償或其他具體賠償約定事項，就雙方權利義務明確約定，或設計相關履約保證機制。為保護台灣廠商自大陸輸入中藥材之買賣契約爭議，建議中藥商公會協助輸入中藥商所訂契約，納入於大陸或第三地（例如香港）之仲裁機制，方得確保得以求償。

三、定期彙編中醫藥法規諮詢案件審議結果，提供各相關公、學、協會參考。

(一)彙整「中醫藥法規諮詢小組」審議完成之案件，以及業界提問之諮詢結果意見，依「產品製造管理」、「產品查驗登記管理」、「藥事專業人員法律行為管理」及「藥事機構管理」之類別，分類整理。

(二)將召開的中醫藥法規諮詢小組之審議結論加以整理，匯整中醫藥法規諮詢小組第一次至第五次會議共 39 個議題，並將議題分為「產品製造管理相關案件」、「產品查驗登記管理相關案件」、「藥事專業人員法律行為管理相關案件」、「藥事機構管理相關案件」、「法

律爭訟事件」、及「其他相關案件」六類，製作「中醫藥法規諮詢小組 102 法案彙編」，如附件一。

四、檢視現行之行政規章及解釋令函，比較世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關之法律規章。

(一)每月檢視我國現行之行政規章及解釋令函，與世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關之法律規章比較分析，分析結果提報「中醫藥法規諮詢小組」審議。

(二)就世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關下列中藥藥事相關法律資訊網頁查詢：

1.世界衛生組織 WHO Collaborating Centres for Traditional Medicine(http://www.who.int/medicines/areas/traditional/collabcentres）

2.美國 FDA 之 Botanical Review Team (BRT)（http://www.fda.gov/cder/Offices/ODE_V_BRT）及 Government Printing Office（GPO）（http://www.gpoaccess.gov）

3.歐盟 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)（http://www.emea.europa.eu/htms/general/contacts/HMPC）

4.日本厚生勞働省（http://www.mhlw.go.jp）

5.中華人民共和國國家食品藥品監督管理局（http://www.sda.gov.cn）及國家中醫藥管理局（http://www.satcm.gov.cn）

(三)定期上網，以關鍵字：世界衛生組織-Traditional Medicine；美國-botanical、herbal；歐盟-Traditional Herbal Medicinal Products（THMP）及 herbal；日本-漢方；中國大陸-中药，蒐集、整理與我國中藥相關流通管理法令規章比較分析，提交「中醫藥法規諮詢小組」報告分析結果。

(四)蒐集、整理各國中藥流通管理與相關事件之最新法律規章解釋令函等資訊，共計收集 15 篇，分別以 102 年 6 月 5 日(102)藥改字第 102021 號函及 102 年 10 月 31 日(102)藥改字第 102055 號函陳中醫藥司參考：

1. 歐盟（EMA 及 HMPC）8 篇：

(1) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2013 年發布之「Regulatory Q&A on herbal medicinal products (Rev.2)」，為常見中草藥問答集

2013 年修正二版，修正一版於 2011 年發布。

(2) 歐盟 EMA 於 2013 年發布之「Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP)Module VII–Periodic safety update report (Rev 1)」,內容為良好藥物安全監測指南(GVP)-定期安全性更新報告，本篇為修正一版，原版於 2012 年 6 月發布。

(3) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2013 年發布之「Guideline on the use of the CTD format in the preparation of a registration application for traditional herbal medicinal products (Final)」,本文件為使用通用技術文件(CTD)格式進行 THMP 註冊申請的指導原則，本篇為修訂後最終版本。

(4) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2013 年發布之「Reflection paper on quality of essential oils as active substances in herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products (Draft)」,內容為對以精油作為活性物質的草藥產品/傳統草藥產品品質之回饋意見草案。

(5) 歐盟 EMA 於 2012 年發布之「Questions and Answers to support the implementation of the Pharmacovigilance legislation - UPDATE, NOVEMBER 2012」,提供關於新的藥物安全監測法規的問答。

(6) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2012 年發布之「Guidance for companies seeking scientific support and advice on traditional herbal medicinal products」,提供尋求關於 THMP 的科學支援與建議的公司的指引。

(7) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2013 年 5 月 14 日發布之「Questions & answers on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products」修正二版，為草藥或傳統草藥產品之品質問答，原版於 2010 年發布。

(8) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2013 年發布之「Reflection paper on quality of essential oils as active substances in herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products (Draft)」,內容為關於以精油為活性物質之草藥或傳統草藥產品之回饋意見草案。

2. 日本厚生勞働省 2 篇：

(1) 日本厚生勞動省医薬食品局審査管理課於平成24年8月30日發布之「一般用漢方製剤承認基準の改正について」，內容為一般用漢方製剤審查標準的修訂。

(2) 厚生勞働省醫藥食品局於平成 25 年（2013 年）8 月 6 日發行之「醫藥品、醫療機器等安全性情報」中「使用上 の注意の改訂について（使用上修改注意事項）」，其中修訂三項漢方製剤資訊。

3. 中國國家食品藥品監督管理局 5 篇：

(1) 中國國家食品藥品監督管理總局於 2013 年 4 月 22 日發布「关于修订黄芪注射液说明书的公告」，根據不良反應評估結果，為進一步保障公眾安全用藥，國家食品藥品監督管理總局決定對黃芪注射液的說明書進行修訂。

(2) 中國國家食品藥品監督管理局安監司於2013年1月25日發布「关于拟淘汰部分中药注射剂品种征求意见的函」，按照《關於做好中藥注射劑安全性再評價工作的通知》(國食藥監辦〔2009〕359 號)要求，國家局相關技術單位組織有關專家對中藥注射劑品種進行了篩選和評價，篩選出了柴辛感冒注射液等 11 個臨床使用少、安全性及有效性資料不充分、現有標準難以保證產品品質均一性的中藥注射劑品種名單。根據相關技術單位及專家意見，國家局擬淘汰柴辛感冒注射液等 11 種中藥注射劑。徵求轄區內相關藥品生產、經營和使用單位意見。

(3) 中國國家食品藥品監督管理局安監司於 2012 年 11 月 17 日發布「关于征求新修订药品GMP医用氧及中药饮片附录意见的函」，為進一步加強對醫用氧及中藥飲片生產企業的監督管理，在《藥品生產品質管制規範（1998 年修訂)》醫用氧及中藥飲片 GMP 補充規定的基礎上，國家局組織起草了新修訂藥品 GMP 醫用氧及中藥飲片附錄，徵求組織轄區內相關企業進行認真研究，提出書面修改意見。

(4) 中國國家食品藥品監督管理總局、工業和資訊化部、農業部、商務部、國家衛生計畫育生委員會、國家工商行政管理總局、國家林業局、國家中醫藥管理局於 2013 年 10 月 9

日食藥監〔2013〕208 號發布「食品藥品監管總局等部門關於進一步加強中藥材管理的通知」，要求各省、自治區、直轄市人民政府充分認識加強中藥材管理的重要性、強化中藥材管理措施、加強組織保障。

(5) 國家食品藥品監督管理總局辦公廳於 2013 年 6 月 26 日食藥監辦藥化管〔2013〕28 號發布「關於嚴格中藥飲片炮製規範及中藥配方顆粒試點研究管理等有關事宜的通知」,要求各省、自治區、直轄市食品藥品監督管理局(藥品監督管理局)及新疆生產建設兵團食品藥品監督管理局嚴格中藥飲片炮製規範、嚴格中藥配方顆粒試點研究管理、嚴格藥品註冊審評審批。

4. 各項法規資訊詳細內容，如附件二。

(五)查得中醫藥相關法規及判解更新資料，計行政函釋 1 筆、法規 18 筆及裁判書 57 筆，以 102 年 6 月 4 日(102)藥改字第 102022 號及 102 年 10 月 31 日(102)藥改字第 102054 號函陳中醫藥司，供中醫藥司作更新法規資料庫之用。

五、以消費者保護為宗旨，扶植中藥製藥產業為目標，評估分析現行與中藥藥事相關之法規，依中醫藥司指示政策方向，研擬修正草案及因應法律授權之藥事法修正草案。

(一) 評估藥事法第 103 條有關列冊中藥商問題，係因法律文字及立法意旨之疑義，建議仍宜以修法解決。

(二) 為遵行個人資料保護法實施，中醫藥司於計畫書中要求計畫主持人依各研究計畫案內容填寫與該項計畫相關之個資保護方式，協助檢視中醫藥司草擬之個人資料保護方法及步驟內文是否恰當。協助檢視中醫藥司於計畫徵求作業中要求計畫主持人及相關計畫人員(含研究助理),於計畫投標時接需填具資訊保密協定之內容與用語是否適宜。建議參酌個人資料保護法第 2 條有關處理及利用之法條文字內容酌修。

(三) 評估有關社會科學所定問卷調查，是否仍需依人體研究法之規定，提交人體試驗委員會（IRB）審查通過。行政院衛生署依據人體研究法第 5 條第一項之規定，於 101 年 7 月 5 日以衛署醫字第 1010265075 號公告訂定「得免倫理審查委員會審查之人體研究案件範圍」，以研究案件非以未成年人、收容人、原住民、孕婦、身

心障礙、精神病患及其他經審查會訂定或判斷受不當脅迫或無法以自由意願做決定者為研究對象，且符合五項情形之一，得免送倫理審查委員會審查或由倫理審查委員會核發免審證明。其中有關「使用已合法公開週知之資訊，且資訊之使用符合其公開週知之目的」，倘使用不合法之公開資訊，或資訊之使用不符合其公開週知之目的，尚無法釐清是否即應送審。爰建議修正該公告文字。

(四) 評估現行藥商許可執照格式無法明列營業項目，建議修正藥商許可執照「執照名稱」為「中藥販賣業藥商許可執照」；於內文加上業別「中藥販賣」、「西藥販賣」；於營業項目列舉「批發、零售、輸入、輸出」，以符法治。

(五) 經中醫藥司、臺灣製藥工業同業公會及本會研議有關「台灣濃縮中藥配合兩岸衛生協議試辦計畫政策草案」如下：

法規	**中國大陸**	**台灣**
製造標準	工藝質量	GMP
製造方法	水＋水酒（萃取）	水（萃取）
飲片（原料）	配方顆粒（單方）	飲片（中藥材）
製劑		濃縮中藥（單方）

策略	**內容**	**執行方式**
試錯機制 （試點） （國務院同意）	原則：一中架構（國格）產業發展（平等互惠）	
	特定地點	三甲醫院中醫部門(例如廈門)
	特定對象（人）	閩、台
	特定對象（藥）	配方顆粒（單方）＋濃縮中藥（單方）
	特定服務	當地民眾用藥習性→藥事服務
專案開發	專案中藥局	濃縮中藥（複方） →for 台商→for 健保
	專案保健食品	濃縮中藥（單方）(藥食同療) →for 20-30 品種 →for 3-4 家台灣中藥廠 →for 審批

(六) 建立中藥材之管理機制

1. 現行管理機制

<u>藥事法</u>

第 104-3 條

各級衛生主管機關於必要時，得將藥物抽查及檢驗之一部或全部，委任所屬機關或委託相關機關（構）辦理；其委任、委託及其相關事項之辦法，由中央衛生主管機關定之。

第 104-4 條

中央衛生主管機關得就藥物檢驗業務，辦理檢驗機構之認證；其認證及管理辦法，由中央衛生主管機關定之。

前項認證工作，得委任所屬機關或委託其他機關（構）辦理；其委任、委託及其相關事項之辦法，由中央衛生主管機關定之。

<u>輸入藥物邊境抽查檢驗辦法</u>(依藥事法第七十一條之一第二項規定訂定之)

(1) 查驗：指對輸入藥物於輸入許可前所為之抽查與檢驗。(第 2 條)

(2) 檢驗：指於實驗室內進行感官、化學、生物或物理性之檢驗。(第 2 條)

(3) 報驗義務人：指輸入藥物之業者。(第 2 條)

(4) 輸入經公告應施查驗之藥品，應由報驗義務人檢具中央衛生主管機關公告認可之檢驗實驗室，或符合藥物優良製造準則之藥廠，或出口國主管機關所出具之檢驗證明文件，向查驗機關申請查驗。經互惠免驗優待輸出國主管機關發給檢驗合格證明者，或為因應國家緊急情況，或增進公益，經中央衛生主管機關專案核准免查驗者，免予查驗。（第 3 條、第 7 條）

(5) 查驗機關對輸入之藥品實施查驗，除審核前條規定應檢具之文件外，並得就下列方式擇一或合併為之：(第 4 條、第 8 條)

逐批檢驗：對各批次輸入之中藥材均予檢驗。

抽批檢驗：按百分之二至百分之五十之抽查率為之。

現場查核：於產品之堆置地點執行品目核對、包裝外觀及標示項目之檢查。

(6) 輸入中藥材，不得改變原藥材或其飲片之形態，並應於標籤或包裝標示品名、批號、藥商之名稱及地址。（第 6 條）未依規定標示之情形者，得通知報驗義務人限期補正後，再行複查。（第 9 條）

(7) 輸入藥物有下列情形之一，中央衛生主管機關得要求報驗義務人限期提供書面資料，說明不合格原因與改善計畫及其預防措施：（第 12 條）

同一報驗義務人申請屬逐批檢驗之同一輸入藥物，經二次輸入檢驗不合格者。

同一許可證字號之藥物，自發生查驗不合格日起一百八十日內，查驗不合格達三次者。

同產地或國家相同輸入貨品分類號列之中藥材，自發生查驗不合格日起一百八十日內，查驗不合格達三次者。

(8) 查驗機關對於在貨櫃場取樣困難、檢驗時間超過五日、產品容易腐敗、變質或其安全功效穩定性不足之藥物，得於報驗義務人書立切結書表明負保管責任後，簽發輸入藥物先行放行通知書，供其辦理先行通關。前項先行放行藥物，報驗義務人切結之存置地點與實際不符或於核發輸入許可通知之前即擅自啟用者，查驗機關得自發現日起一百八十日內，暫停受理該報驗義務人先行放行申請。（第 18 條）

(9) 輸入藥物經查驗合格者，查驗機關應核發輸入許可通知予報驗義務人；報驗義務人亦得向查驗機關申請核發書面之許可通知書。報驗義務人應自收受許可通知之次日起十五日內，憑取樣憑單領取餘存樣品。逾期未經領取或樣品之性質不適合久存者，得由查驗機關逕行處理。（第 19 條）

(10) 輸入藥物查驗不合格者，查驗機關應核發輸入不合格之通知予報驗義務人。報驗義務人於收受前項通知之次日起十五日內，得向查驗機關申請複驗，但以一次為限，複驗時由查驗機關就原抽取餘存樣品為之。（第 20 條）

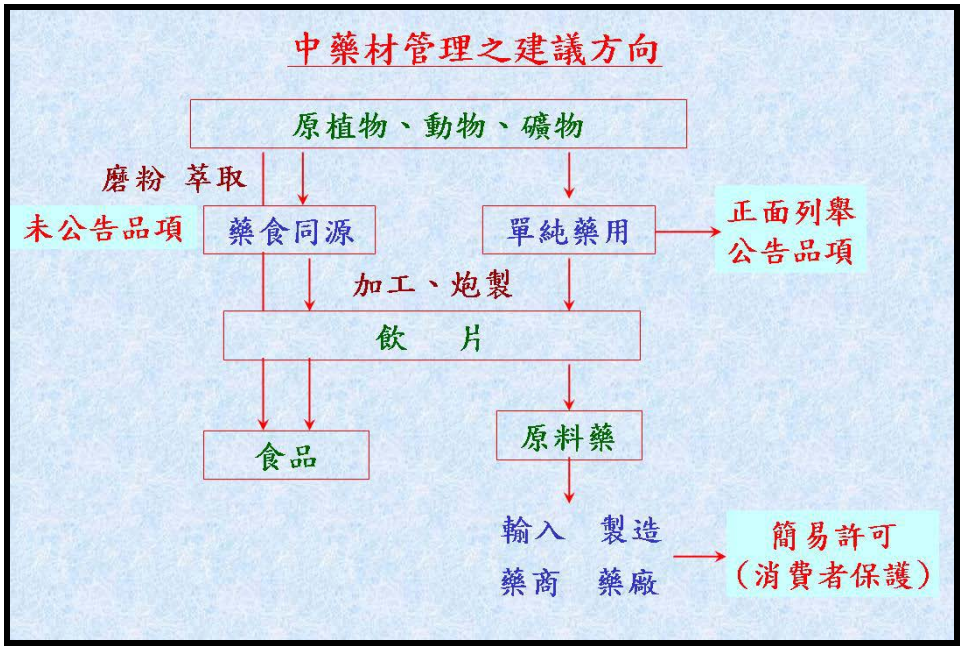
(11) 輸入藥物查驗不合格者，該產品除法律另有規定者外，由

報驗義務人辦理退運或銷毀之。前項不合格之藥物，如經具結先行放行，查驗機關應命報驗義務人回收之，並依前項規定辦理。（第 21 條）

(12)檢驗機構，指具有藥物檢驗能力之專業實驗室。檢驗機構，得依本辦法向中央衛生主管機關申請認證。（藥物檢驗機構認證及管理辦法第 2 條）

2. 研議管理機制

(1) 中藥材管理建議方向



(2) 藥事法所定之「中藥材」是否即為傳統所稱「飲片」？如不一定，還包括何種解釋？

(3) 依藥事法第 6 條之規定，中藥材屬藥品，列為原料藥品管理，依同法第 39 條之規定，應申請查驗登記核發許可證，由輸入商或製藥廠為之，保障民眾消費安全。目前未實施查驗登記制度，如依藥事法之規定以簡易程序快速核發許可證，是否可行？

(4) 其他管理方式建議

(七) 建立中藥製劑之管理機制

1. 現行管理機制

	西藥製劑	中藥製劑
分類	處方藥 指示藥　成藥	處方藥　調劑專用 指示藥　成藥 固有成方製劑（目前無）
分類原則	成分含量 風險程度	濃縮（科學中藥） 非濃縮（傳統中藥）
原料藥 管理原則	無劑型劑量 原則不入藥	飲片 原則入藥（丸散膏丹煎藥）

2. 研議管理機制

(1)中藥「調劑專用」之類別欠缺法律依據，是否刪除類別，修正為單方處方藥？

i. 現行藥事法第 8 條將製劑定義為「以原料藥經加工調製，製成一定劑型及劑量之藥品」，分為「醫師處方藥品」、「醫師藥師藥劑生指示藥品」、「成藥」及「固有成方製劑」，同法施行細則第 3 條再將處方藥品分為「須由醫師處方使用」及「限由醫師使用」二類。

ii. 「調劑專用」類別分別出現於 68 年及 88 年衛生署所定之「藥品查驗登記審查準則」中。衛生署於民國 68 年公布之「藥品查驗登記審查準則」，將「調劑專用」藥品（製劑）納入分類，定義為「(1)中藥單味製劑。(2)尚需經過調劑始能使用者」。民國 88 年「藥品查驗登記審查準則」則僅將「調劑專用」定義為「尚需經過調劑始能使用者」，取消中藥單味製劑，因不再含中藥，故以西藥為主。

iii. 衛生署於 94 年依藥事法第 39 條授權公告之「藥品查驗登記審查準則」，條文已無「調劑專用」之類別。依法律位階之適用規定，母法中既無「調劑專用」類別，子法「藥品查驗登記審查準則」亦無「調劑專用」類別，則再沿用民國 88 年「藥品查驗登記審查準則」之「調劑專用」類別，顯已超越母法之藥事法。

iv. 另查「藥品優良調劑作業準則」第 3 條定義「調劑」為「藥

事人員受理處方箋至病患取得藥品間，所為之處方確認、處方登錄、用藥適當性評估、藥品調配或調劑、再次核對、確認取藥者交付藥品、用藥指導等相關之行為」，故「調劑專用」之文義即為應具備處方箋方得調劑，與需經醫師處方藥品類別之定義相同。

v. 觀諸「調劑專用」藥品定義「(1)中藥單味製劑。(2)尚需經過調劑始能使用者」，應係為「調劑專用之類別包含中藥單味製劑」，而非將「中藥單味製劑必須列入調劑專用」，且單味藥中如斑蝥因毒性過大，當然需經醫師診斷處方方可調劑，可由醫師及藥事人員保障民眾之安全，但亦有安全性高之單味藥如甘草，完全不需高度注意其安全性，則其歸類於調劑專用，與處方藥等類別以安全性作為區別基礎，即有扞格。

vi. 「調劑專用」既無法律分類之基礎，且「調劑專用」與「醫師處方藥品」亦無區別實益，宜依現行法制，將「調劑專用」類別回歸「醫師處方藥品」。倘政策上認確需訂定「調劑專用」類別，則應將區別實益(理由)列明，修正明列於藥事法中予以規範分類，方屬適法。如未修法增列「調劑專用」類別前，建議現行已有之「調劑專用」類別應逕行變更為「醫師處方藥品」，再儘速依安全性程度，進行處方藥、指示藥品及成藥之再分類。

(2) 法定「固有成方」之實益與建議修正條文？

i. 藥事法第 10 條規定「固有成方製劑，係指依中央衛生主管機關選定公告具有醫療效能之傳統中藥處方調製 (劑) 之方劑」，屬總則規定。

ii. 依成藥及固有成方製劑管理辦法第 5 條前段規定「固有成方係指我國固有醫藥習慣使用，具有療效之中藥處方，並經中央衛生主管機關選定公佈者而言」，其與母法相同，對於「固有成方」仍以中央衛生主管機關選定公告者為準。

iii. 查主管機關迄未依藥事法第 10 條所規定之「固有成方製劑」選定公告，行政院衛生署雖曾公告 222 個基準方，惟係依據藥品查驗登記審查準則第 75 條第一項第第一款規定「中藥應以中央衛生主管機關公告之基準方為處方依據，其劑

型、處方內容，應與基準方所載者相同應符合」為查驗登記目的所公告，則該基準方與藥事法第 10 條所規定之「固有成方」仍非相同。

iv. 查藥品查驗登記審查準則第 75 條第一項第第二款規定「固有典籍，係指醫宗金鑑、醫方集解、本草綱目、本草拾遺、本草備要、中國醫學大辭典及中國藥學大辭典。」，則固有典籍所載之處方，係為查驗登記之目的，得為製造中藥製劑之處方依據，故該「固有典籍」與「固有成方」仍屬不同。

v. 藥事法第 103 條之規定，係規範第一項確具人員及第二項列冊人員等專業人員之來源及其業務，故有關該條文之文義倘無特別規定，仍應回歸總則條文之文義，亦即藥事法第 103 條第三項有關「固有成方」，仍應回歸總則第 10 條之規定，由中央衛生主管機關選定公告具有醫療效能之傳統中藥處方。

vi. 建議主管機關分析整理固有典籍醫宗金鑑、醫方集解、本草綱目、本草拾遺、本草備要、中國醫學大辭典及中國藥學大辭典所記載之處方，依藥事法第 10 條之規定予以公告。

(3) 按風險程度進行再分類是否可行？是否建立中藥製劑處方藥及非處方藥審查基準？

六、請中醫、中藥、法學相關公、學、協會及消費者團體等，推薦專家學者，共同座談研討所擬具之「中藥材管理」及「中藥製劑管理」等法規草案，整合所得法律見解及研討結果，提請中醫藥司作政策考量。

(一) 於 102 年 10 月 15 日召開「研議中藥材及中藥製劑之管理機制及法規修正建議座談會」，邀請中華民國中醫師公會全國聯合會、台灣醫事法學會、中華民國中藥商業同業公會全國聯合會、臺灣製藥工業同業公會、臺灣區中藥工業同業公會、台北市進出口商業同業公會、高雄市進出口商業同業公會，與本會中醫藥法政小組討論。結論重點如下：

1. 中藥材之管理機制

(1)中藥是藥還是食品，只能從藥事法裡面界定是藥，各國目前也沒有中藥藥事法，無法離開藥事法去規定。在法律上，沒特別經過像化粧品、毒化物管制條例等特殊管制的藥，

會回歸藥事法管理。另外，在判決上，依照消費者管理條例第 7、10 條是授權給法官決定，法律就是有標準看標準，沒標準由法官去看，所以建議中藥還是基礎性的客觀標準對大家有保護。

(2)建議中藥材管理，以「純藥」、「藥食同源」兩項區分，以正面列舉公告純藥用中藥，沒列舉之中藥即可用於其他用途。建議對中藥材辦理簡易許可，以控管中藥品質，惟應如何執行?假設不要辦理許可，又應如何管控品質？

(3)中藥材中飲片佔有率最高，但因中藥材屬植物性，受地質、氣候、人等影響，其均一性無法等同濃縮中藥，造成許可證領取困難。且標準設高，可能造成中藥材無法進購，沒有藥用。「藥食同源」的中藥也是藥品，用正面列舉純藥，其他就屬於「藥食同源」的管理辦法，會不會出來問題？建議提出適合的法條，對業主及消費者是雙向的保護，中藥與西藥不同，管理辦法、製程不同，沒辦法用同一個標準去設定藥事法，希望與會長官可以提出合適的法規。假若不用 HPLC 檢驗，以「認證」取代「許可」標示，可以考量。（中華民國中藥商業同業公會全國聯合會朱溥霖理事長建議）

(4)同意中藥材辦理簡易許可，以控管中藥品質。我們也希望給好的藥材 CI 認證，也具公信力。法規修正建議一定要聽業界的聲音，有滿多法規問題，讓產業難以發展。中藥材 90% 從大陸來，用台灣的標準去進口大陸藥品，造成大陸進口的比例減少，沒有藥材使用，如何保護台灣消費者？歐盟最近也關閉很多中藥製劑，造成中藥產業發展被抑制，法規上是不是可以注意這些抑制中藥產業發展的法規，我們希望有中藥藥事法。除了法律問題，目前中藥材可供食品用的，中醫藥司 226 公告，在 TFDA 公告的大概有 874 種，中央主管公告的不一樣，這樣用哪個標準？也是個問題。（臺灣區中藥工業同業公會張朝霖理事長建議）

2.中藥製劑之管理機制

(1)單味中藥材無直接用藥，爲了讓中藥房、醫師調劑使用，有「調劑調配專用」。例如黃耆磨粉後可以申請兩許可證，一

種是原料藥可以用原料使用，另外一種可以散劑許可證，核發類別叫做「調劑調配專用」。目前中藥調劑在非濃縮部分有「調劑調配專用」之散劑許可證，給 103 條法定調劑人員調配，原則應該先定義藥材之屬性，而不是藥材磨成粉是什麼？提本會中醫藥法政小組討論，再供中醫藥司參考。

(2)現行中藥製劑管理，建議取消「調劑專用」、「固有成方製劑」兩類。因「調劑專用」即為處方藥(單方)，而目前並無「固有成方製劑」。

(3)內政部於民國 40、50 年代所定「固有成方選輯」，是否即屬藥事法及相關法規所稱「固有成方」？省衛生處就有中藥固有成方，是從中國醫藥大辭典、醫宗金鑑...等書整理，目前許可證幾乎都是固有成方的許可證。中藥 222 方，藥中有方的方是「固有成方」，是查驗登記準則的依據，但類別沒有「固有成方製劑」這個詞，而這六個字是法律名稱，所以我們建議在拿掉。另外，「固有成方選輯」是否即屬藥事法及相關法規所稱「固有成方」會提本會中醫藥法政小組討論。

(4)目前越貴的藥材參雜越多東西，大概有 7:3 參雜萃取物在源藥品中。源頭管制很好，但也造成價格上漲，對業者是很大的問題。另外，現在有些藥的藥性和以前不同，過去是野生，現在是養殖，這是因為經濟發展造成，到底重金屬多少對人有害，在設定標準的時候是否也該參考市面上流通的中藥材，可以先以低標準去規範 30%的中藥材，再提高標準。否則沒藥可用對中醫發展也是個問題。建議現行中藥檢驗限制嚴格，造成中藥材進口受限，是否在檢驗標準上有更好的標準可依循?

3.業界實務面臨之法規議題

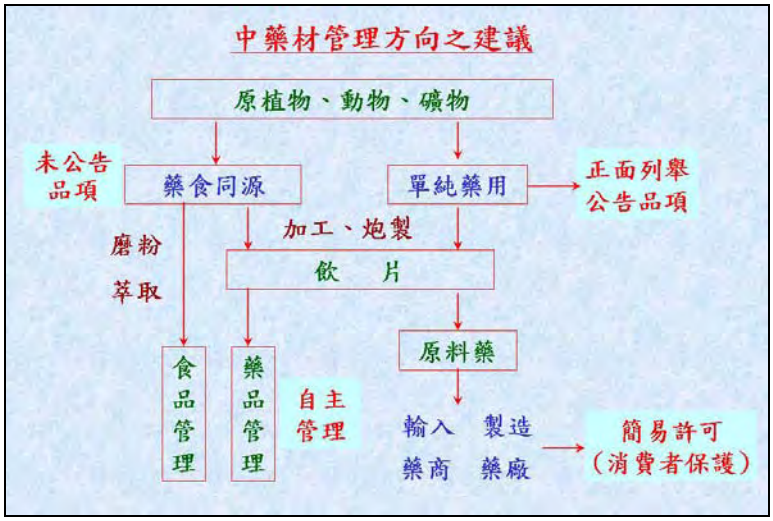
(1)從大陸輸入中藥材，取得大陸那邊的檢驗報告合法進口，經分裝後，於市售品檢驗不合格，輸入商、分裝商及販賣商之責任歸屬，與大陸買賣契約爭議將提本會中醫藥法政小組研議，另外衍生「中藥材依邊境管制輸入後，於市售品檢驗其重金屬或農藥殘留不合格，依法應如何處理？」、「中

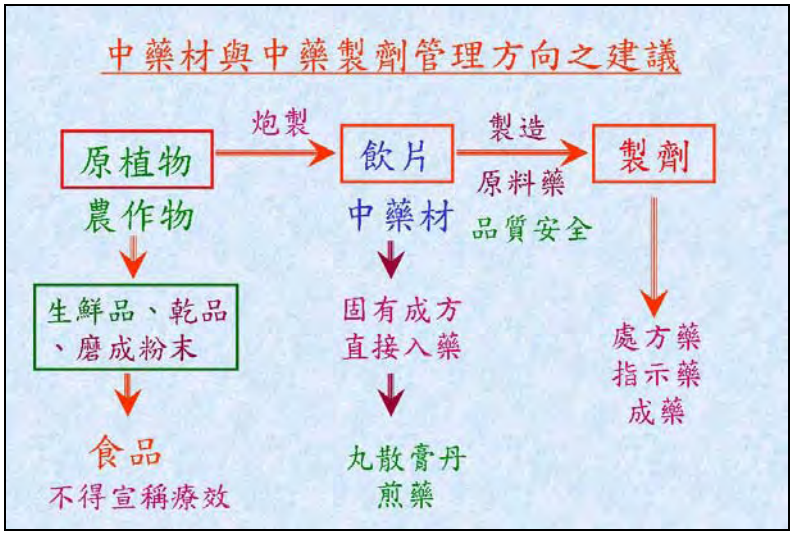
藥材合格輸入後，供應藥廠作為濃縮製劑原料，所製造之濃縮製劑於市售檢驗農藥殘留不合格，其責任歸屬為何？」之議題一併討論。

(2)原料商供應中藥材給下游廠商後，下游廠商分裝以食品(如藥膳包)販售，檢驗不符合食品標準，其責任歸屬問題，原則抽驗藥膳包有問題，責任歸屬在於誰去包那個藥膳包？以民法探究當我賣給你，又沒辦法再歸責到前端，就由你負責。建議中藥材還是要有認證，並建立一追朔系統。

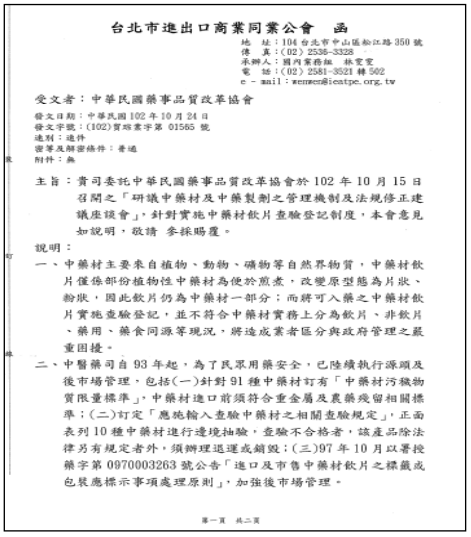
(3)中醫師覺得管理造成藥的來源在使用有問題，有些藥品沒辦法取得。如果像重金屬含量限制，改成一天限制口服劑量多少？是不是中藥可以往藥品代謝率、風險管理的方向？中醫師提出的方法，以日劑量放大限量，改善中藥商採購的問題，若能釐清在學理以每日限量或療程限量的可行性，在日限量的情況下，標註本處方日數，若給藥大於七天則是歸責醫師。

(二) 建議中藥材與中藥製劑管理架構如下：





(三)中華民國中藥商業同業公會全國聯合會及台北市進出口商業同業公會對中藥材飲片依法查驗，分別以 102 年 10 月 22 日全中藥秘字第 102082 號函及 102 年 10 月 24 日貿琮業字第 01565 號函，提供意見如下：



台北市進出口商業同業公會　函

地　址：104 台北市中山區松江路 350 號
傳　真：(02) 2536-3328
承辦人：國內業務組　林寶寶
電　話：(02) 2581-3521 轉 502
e - mail：wenwen@icatpe.org.tw

受文者：中華民國藥事品質改革協會

發文日期：中華民國 102 年 10 月 24 日
發文字號：(102)貿琮業字第 01565 號
速別：速件
密等及解密條件：普通
附件：無

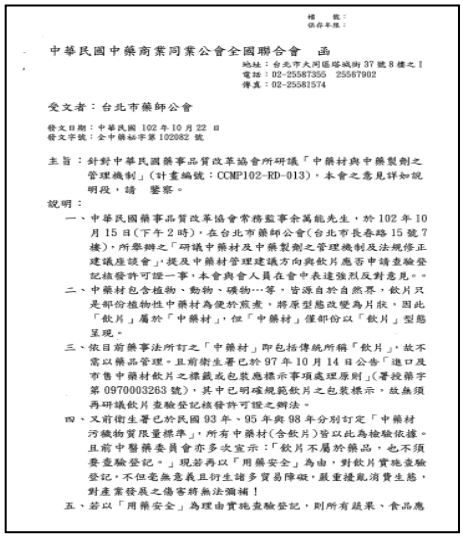
主旨：貴司委託中華民國藥事品質改革協會於 102 年 10 月 15 日召開之「研議中藥材及中藥製劑之管理機制及法規修正建議座談會」，針對實施中藥材飲片查驗登記制度，本會意見如說明，敬請 參採賜覆。

說明：

一、中藥材主要來自植物、動物、礦物等自然界物質，中藥材飲片僅係部份植物性中藥材為便於煎煮，改變原型態為片狀、粉狀，因此飲片仍為中藥材一部分；而將可入藥之中藥材飲片實施查驗登記，並不符合中藥材實務上分為飲片、非飲片、藥用、藥食同源等現況，將造成業者區分與政府管理之嚴重困擾。

二、中醫藥司自 93 年起，為了民眾用藥安全，已陸續執行源頭及後市場管理，包括(一)針對 91 種中藥材訂有「中藥材污穢物質限量標準」，中藥材進口前須符合重金屬及農藥殘留相關標準；(二)訂定「應施輸入查驗中藥材之相關查驗規定」，正面表列 10 種中藥材進行邊境抽驗，查驗不合格者，該產品除法律另有規定者外，須辦理退運或銷毀；(三)97 年 10 月以署授藥字第 0970003263 號公告「進口及市售中藥材飲片之標籤或包裝應標示事項處理原則」，加強後市場管理。

第一頁　共二頁



檔　號：
保存年限：

中華民國中藥商業同業公會全國聯合會　函

地址：台北市大同區塔城街 37 號 8 樓之 1
電話：02-25587355　25587902
傳真：02-25581574

受文者：台北市藥師公會

發文日期：中華民國 102 年 10 月 22 日
發文字號：全中藥秘字第 102082 號

主旨：針對中華民國藥事品質改革協會所研議「中藥材與中藥製劑之管理機制」(計畫編號：CCMP102-RD-013)，本會之意見詳如說明段，請　鑒察。

說明：

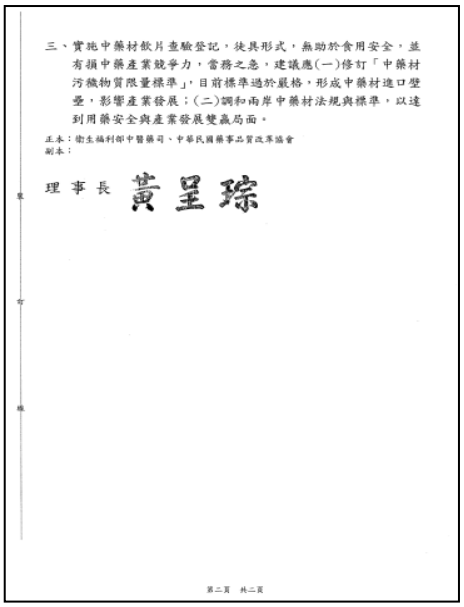
一、中華民國藥事品質改革協會常務監事余萬能先生，於 102 年 10 月 15 日(下午 2 時)，在台北市藥師公會(台北市長春路 15 號 7 樓)，所舉辦之「研議中藥材及中藥製劑之管理機制及法規修正建議座談會」，提及中藥材管理建議方向與飲片應否申請查驗登記核發許可證一事，本會與會人員在會中表達強烈反對意見。。

二、中藥材包含植物、動物、礦物…等，皆源自於自然界，飲片只是部份植物性中藥材為便於煎煮，將原型態改變為片狀，因此「飲片」屬於「中藥材」，但「中藥材」僅部份以「飲片」型態呈現。

三、依目前藥事法所訂之「中藥材」即包括傳統所稱「飲片」，故不需以藥品管理。且前衛生署已於 97 年 10 月 14 日公告「進口及市售中藥材飲片之標籤或包裝應標示事項處理原則」(署授藥字第 0970003263 號)，其中已明確規範飲片之包裝標示，故無須再研議飲片查驗登記核發許可證之辦法。

四、又前衛生署已於民國 93 年、95 年與 98 年分別訂定「中藥材污穢物質限量標準」，所有中藥材(含飲片)皆以此為檢驗依據。且前中醫藥委員會亦多次宣示：「飲片不屬於藥品，也不須要查驗登記。」現若再以「用藥安全」為由，對飲片實施查驗登記，不但毫無意義且衍生諸多貿易障礙，嚴重擾亂消費生態，對產業發展之傷害將無法彌補！

五、若以「用藥安全」為理由實施查驗登記，則所有蔬果、食品應

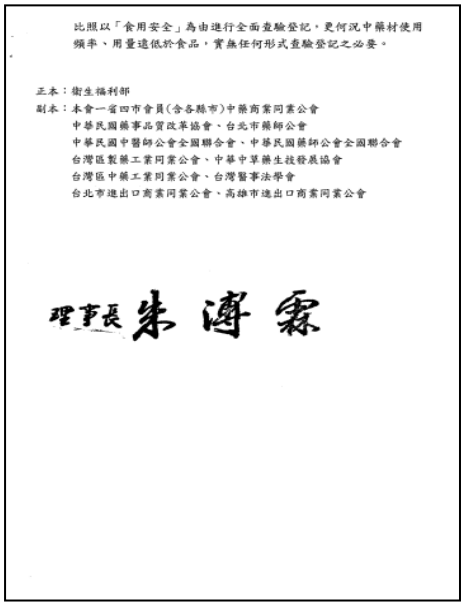


三、實施中藥材飲片查驗登記，徒具形式，無助於食用安全，並有損中藥產業競爭力，當務之急，建議應(一)修訂「中藥材污穢物質限量標準」，目前標準過於嚴格，形成中藥材進口壁壘，影響產業發展；(二)調和兩岸中藥材法規與標準，以達到用藥安全與產業發展雙贏局面。

正本：衛生福利部中醫藥司、中華民國藥事品質改革協會
副本：

理事長　黃呈琮

第二頁　共二頁



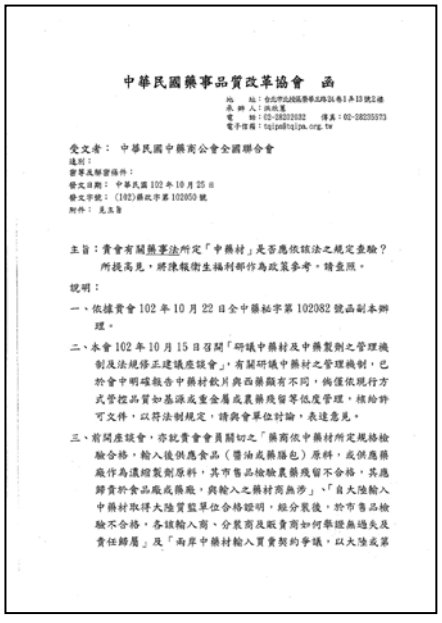
比照以「食用安全」為由進行全面查驗登記，更何況中藥材使用頻率、用量遠低於食品，實無任何形式查驗登記之必要。

正本：衛生福利部
副本：本會一省四市會員(含各縣市)中藥商業同業公會
中華民國藥事品質改革協會、台北市藥師公會
中華民國中醫師公會全國聯合會、中華民國藥師公會全國聯合會
台灣區製藥工業同業公會、中華中草藥生技發展協會
台灣區中藥工業同業公會、台灣醫事法學會
台北市進出口商業同業公會、高雄市進出口商業同業公會

理事長　朱溥霖

(四)本計畫回復，貴會有關藥事法所定「中藥材」是否應依該法之規定查驗？所提高見，將陳報衛生福利部作為政策參考。請查照。

1. 本會 102 年 10 月 15 日召開「研議中藥材及中藥製劑之管理機制及法規修正建議座談會」，有關研議中藥材之管理機制，已於會中明確報告中藥材飲片與西藥顯有不同，倘僅依現行方式管控品質如基源或重金屬或農藥殘留等低度管理，核給許可文件，以符法制規定，請與會單位討論，表達意見。
2. 前開座談會，亦就貴會會員關切之「藥商依中藥材所定規格檢驗合格，輸入後供應食品（醬油或藥膳包）原料，或供應藥廠作為濃縮製劑原料，其市售品檢驗農藥殘留不合格，其應歸責於食品廠或藥廠，與輸入之藥材商無涉」、「自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，各該輸入商、分裝商及販賣商如何舉證無過失及責任歸屬」及「兩岸中藥材輸入買賣契約爭議，以大陸或第三地（例如香港）之仲裁機制納入於買賣契約，方得保護台灣廠商，確保得以求償」等議題充分討論，本會藥法專家學者並積極提供法律見解，以充分保護貴會會員，特此敘明。
3. 貴會所提高見，將陳報衛生福利部作為政策參考。
4. 函文如下：



中華民國藥事品質改革協會　函

地　址：台北市北投區泰平路326巷1弄1號2樓
承 辦 人：洪純慧
電　話：02-28320332　傳真：02-28235573
電子信箱：tqip@tqip.org.tw

受文者：　中華民國中藥商公會全國聯合會
速別：
密等及解密條件：
發文日期：　中華民國 102 年 10 月 25 日
發文字號：（102）藥改字第 102050 號
附件：　見主旨

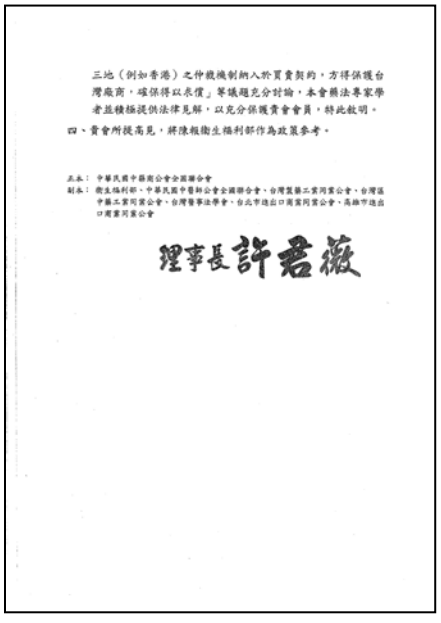
主旨：貴會有關藥事法所定「中藥材」是否應依該法之規定查驗？所提高見，將陳報衛生福利部作為政策參考，請查照。

說明：

一、依據貴會 102 年 10 月 22 日全中藥秘字第 102082 號函副本辦理。

二、本會 102 年 10 月 15 日召開「研議中藥材及中藥製劑之管理機制及法規修正建議座談會」，有關研議中藥材之管理機制，已於會中明確報告中藥材飲片與西藥顯有不同，倘僅依現行方式管控品質如基源或重金屬或農藥殘留等低度管理，核給許可文件，以符法制規定，請與會單位討論，表達意見。

三、前開座談會，亦就貴會會員關切之「藥商依中藥材所定規格檢驗合格，輸入後供應食品（醬油或藥膳包）原料，或供應藥廠作為濃縮製劑原料，其市售品檢驗農藥殘留不合格，其應歸責於食品廠或藥廠，與輸入之藥材商無涉」、「自大陸輸入中藥材取得大陸質監單位合格證明，經分裝後，於市售品檢驗不合格，各該輸入商、分裝商及販賣商如何舉證無過失及責任歸屬」及「兩岸中藥材輸入買賣契約爭議，以大陸或第



三地（例如香港）之仲裁機制納入於買賣契約，方得保護台灣廠商，確保得以求償」等議題充分討論，本會藥法專家學者並積極提供法律見解，以充分保護貴會會員，特此敘明。

四、貴會所提高見，將陳報衛生福利部作為政策參考。

正本：　中華民國中藥商公會全國聯合會
副本：　衛生福利部、中華民國中醫師公會全國聯合會、台灣製藥二業同業公會、台灣區中藥工業同業公會、台灣醫事法學會、台北市進口商業同業公會、高雄市進口商業同業公會

理事長 許君薇

七、各項法案依其修正內容、目的，執行人權及性別分析，包括女性參與，規範內容未區別對象，執行方式無性別、性傾向或性別認同有不同差異。

(一)條文修正草案及管理辦法草案，對人權及性別影響層面之評估，皆符合憲法維護人性尊嚴及尊重人格自由發展等之要求。

(二)分析如下：

1. 修正草案內容涉及健康、醫療領域，有女性參與，受益對象未以特定性別、性傾向或性別認同為規範對象，規範內容未區別對象，執行方式無性別、性傾向或性別認同有不同差異。
2. 修正草案目的係基於憲法平等權之規定，採行一定方式，未來執行結果，對於不同性別、性傾向或性別認同者無所為之不必要差別待遇；無刻意針對不同性別、性傾向或性別認同者予以必要之協助；無預防或消除性別或性傾向刻板印象與性別隔離；無提升不同性別、性傾向或性別認同者平等獲取社會資源機會，營造平等對待環境應無因性別、性傾向或性別認同而有不同。
3. 經評估法律案之內容，符合憲法平等權及其他基本人權（如維護人性尊嚴及尊重人格自由發展等）之要求，不違背我國憲法之誡命。

肆、討論

一、中藥材（飲片）係屬藥事法所規範，建立管理辦法賦予定義及常規性之管理方式，並修正藥事法相關授權法條，以保護消費者使用安全，至屬重要。惟中藥商似對查驗登記許可制度有誤解，應加強溝通。

二、為使中藥產品有效安全，製造行銷符合經濟市場規模，研發資源充分有效利用，中藥流通正確符合消費者對健康的期待，建立一個有效中藥管理架構，進而制定符合中藥業界期待，亦能滿足民眾用藥品質安全需求的「中藥」專章或專法，本計畫認為應予重視。

三、為遵行個人資料保護法實施，中醫藥司於計畫書中要求計畫主持人依各研究計畫案內容填寫與該項計畫相關之個資保護方式，及計畫徵求作業中要求計畫主持人及相關計畫人員(含研究助理)，於計畫投標時接需填具資訊保密協定，協助修正「個人資料保護修正文字對照表」及「資訊安全保密切結書修正文字對照表」。

四、社會科學所定問卷調查，是否仍需依人體研究法之規定，提交人體試驗委員會（IRB）審查通過？101 年 7 月 5 日衛署醫字第 1010265075 號公告，列舉五項情形得免送倫理審查委員會審查或由倫理審查委員會核發免審證明。建議修正該公告文字，符合下列情形之一者，免送倫理審查委員會審查：

(一) 於公開場合進行之非記名、非互動且非介入性之研究，且無從自蒐集之資訊辨識特定之個人。

(二) 使用已合法公開週知之資訊，且資訊之使用符合其公開週知之目的。

(三) 公務機關執行法定職務，自行或委託專業機構進行之公共政策成效評估研究。

(四) 於一般教學環境中進行之教育評量或測試、教學技巧或成效評估之研究。

前項第二款如有使用不合法公開週知之資訊，或資訊之使用不符合其公開週知之目的，應依人體研究法之規定處辦。

五、現行藥商許可執照格式無法明列營業項目，建議修正藥商許可執照「執照名稱」為「中藥販賣業藥商許可執照」。建議於內文加上業別「中藥販賣」、「西藥販賣」，建議於營業項目列舉「批發、零售、輸入、輸出」，建議修正藥商許可執照。

六、藥事法第 103 條第三項業務範圍為「…不含毒劇中藥材或依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹及煎藥。」為使法條更臻明確，建議修正藥事法第 103 條第三項有關「依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹及煎藥」業務。

藥事法第 103 條修正草案條文對照表

修正條文	現行條文	說　明
第 103 條 本法公布後，於六十三年五月三十一日前依規定換領中藥販賣業之藥商許可執照有案者，得繼續經營第十五條之中藥販賣業務。 八十二年二月五日前曾經中央衛生主管機關審核，予以列冊登記者，或領有經營中藥證明文件之中藥從業人員，並修習中藥課程達適當標準，得繼續經營中藥販賣業務。 前項中藥販賣業務範圍如左： 一、中藥材及中藥製劑之輸入、輸出及批發。 二、中藥材及非屬中醫師處方藥品之零售。 三、不含毒劇中藥材依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹、及煎藥等劑型。 上述人員、中醫師檢定考試及格或在未設中藥師之前曾聘任中醫師、藥師及藥劑生駐店管理之中藥商期滿三年以上之負責人，經修習中藥課程達適當標準，領有地方衛生主管機關證明文件；並經國家考試及格者，其業務範圍如左： 一、中藥材及中藥製劑之輸入、輸出及批發。 二、中藥材及非屬中醫師處方藥品之零售。	第 103 條 本法公布後，於六十三年五月三十一日前依規定換領中藥販賣業之藥商許可執照有案者，得繼續經營第十五條之中藥販賣業務。 八十二年二月五日前曾經中央衛生主管機關審核，予以列冊登記者，或領有經營中藥證明文件之中藥從業人員，並修習中藥課程達適當標準，得繼續經營中藥販賣業務。 前項中藥販賣業務範圍包括：中藥材及中藥製劑之輸入、輸出及批發；中藥材及非屬中醫師處方藥品之零售；不含毒劇中藥材或依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹、及煎藥。 上述人員、中醫師檢定考試及格或在未設中藥師之前曾聘任中醫師、藥師及藥劑生駐店管理之中藥商期滿三年以上之負責人，經修習中藥課程達適當標準，領有地方衛生主管機關證明文件；並經國家考試及格者，其業務範圍如左： 一、中藥材及中藥製劑之輸入、輸出及批發。 二、中藥材及非屬中醫師處方	第三項有關第二項之「丸、散、膏、丹、及煎藥」修正為例示列舉文字，並修正以款列方式，以臻明確。

修正條文	現行條文	說　明
三、不含毒劇中藥材或依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹、及煎藥。 四、中醫師處方藥品之調劑。 前項考試，由考試院會同行政院定之。	藥品之零售。 三、不含毒劇中藥材或依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹、及煎藥。 四、中醫師處方藥品之調劑。 前項考試，由考試院會同行政院定之。	

七、藥事法第 103 條第三項業務範圍有關依「固有成方」調配，主管機關是否得解釋為「固有典籍記載」皆屬「固有成方」？倘主管機關認有必要解釋為「固有典籍記載」皆屬「固有成方」，建議分析整理固有典籍醫宗金鑑、醫方集解、本草綱目、本草拾遺、本草備要、中國醫學大辭典及中國藥學大辭典所記載之處方，依藥事法第 10 條之規定予以公告。或修正成藥及固有成方製劑管理辦法第 5 條，納入固有典籍記載之處方如下：

成藥及固有成方製劑管理辦法第 5 條修正草案條文對照表

修正條文	現行條文	說　明
第 5 條 本辦法所稱固有成方，係指我國固有醫藥習慣使用，具有療效，經中央衛生主管機關選定公布之中藥處方，或醫宗金鑑、醫方集解、本草綱目、本草拾遺、本草備要、中國醫學大辭典及中國藥學大辭典所列載之處方。 依固有成方調製 (劑) 成之丸、散、膏、丹等稱為固有成方製劑。	第 5 條 本辦法所稱固有成方係指我國固有醫藥習慣使用，具有療效之中藥處方，並經中央衛生主管機關選定公佈者而言。依固有成方調製 (劑) 成之丸、散、膏、丹稱為固有成方製劑。	一、固有成方之定義，增列醫宗金鑑、醫方集解、本草綱目、本草拾遺、本草備要、中國醫學大辭典及中國藥學大辭典所列載之處方。 二、文字修正。

八、依現行規定，藥劑生尚不能執行中藥調劑業務，而政策如欲規劃使藥劑生得執行中藥調劑業務，則應修正藥事法第 37 條後再修正藥劑生資格及管理辦法第 13 條如下：

藥事法第 37 條修正草案條文對照表

修正條文	現行條文
第 37 條 藥品之調劑，非依一定作業程序，不得為之；其作業準則，由中央衛生主管機關定之。 前項調劑應由藥師為之。但不含麻醉藥品者，得由藥劑生為之。 醫院中之藥品之調劑，應由藥師為之。但本法八十二年二月五日修正施行前已在醫院中服務之藥劑生，適用前項規定，並得繼續或轉院任職。 中藥之調劑，除法律另有規定外，應由中醫師、修習中藥課程達適當標準之藥師或藥劑生為之。	第 37 條 藥品之調劑，非依一定作業程序，不得為之；其作業準則，由中央衛生主管機關定之。 前項調劑應由藥師為之。但不含麻醉藥品者，得由藥劑生為之。 醫院中之藥品之調劑，應由藥師為之。但本法八十二年二月五日修正施行前已在醫院中服務之藥劑生，適用前項規定，並得繼續或轉院任職。 中藥之調劑，除法律另有規定外，應由中醫師監督為之。

藥劑生資格及管理辦法第 13 條修正草案條文對照表

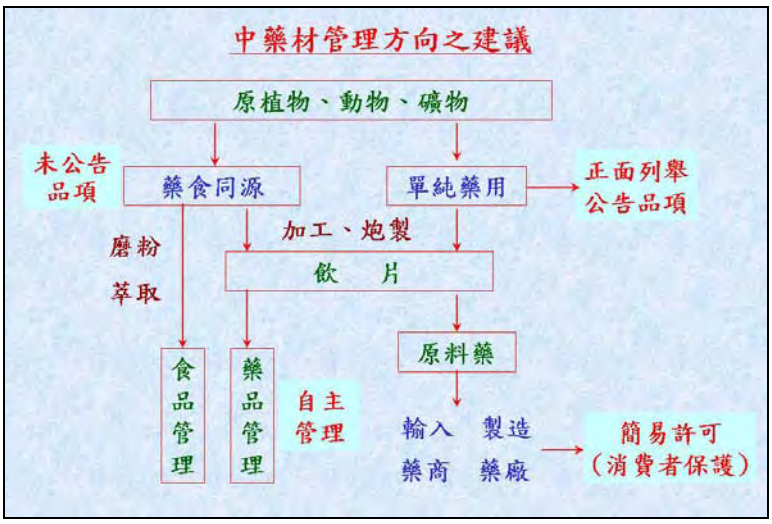
修正條文	現行條文
第 13 條 藥劑生業務如下： 一、依藥事法第二十八條第一項但書所定得由專任藥劑生管理之藥品買賣。 二、依藥事法第三十七條第二項及第四項但書所定得由藥劑生為之之藥品調劑。 三、依藥事法第二十八條第二項所定中藥販賣業者之藥品及其買賣。 四、前三款相關之藥品安全監視、給藥流程評估、用藥諮詢及其他依法得由藥劑生執行之業務。 藥劑生得販賣或管理一定等級之醫療器材之範圍及種類，準用藥師法相關規定。	第 13 條 藥劑生業務如下： 一、依藥事法第二十八條第一項但書所定得由專任藥劑生管理之藥品買賣。 二、依藥事法第三十七條第二項但書所定得由藥劑生為之之藥品調劑。 三、依藥事法第二十八條第二項所定中藥販賣業者之藥品及其買賣。 四、前三款相關之藥品安全監視、給藥流程評估、用藥諮詢及其他依法得由藥劑生執行之業務。 藥劑生得販賣或管理一定等級之醫療器材之範圍及種類，準用藥師法相關規定。

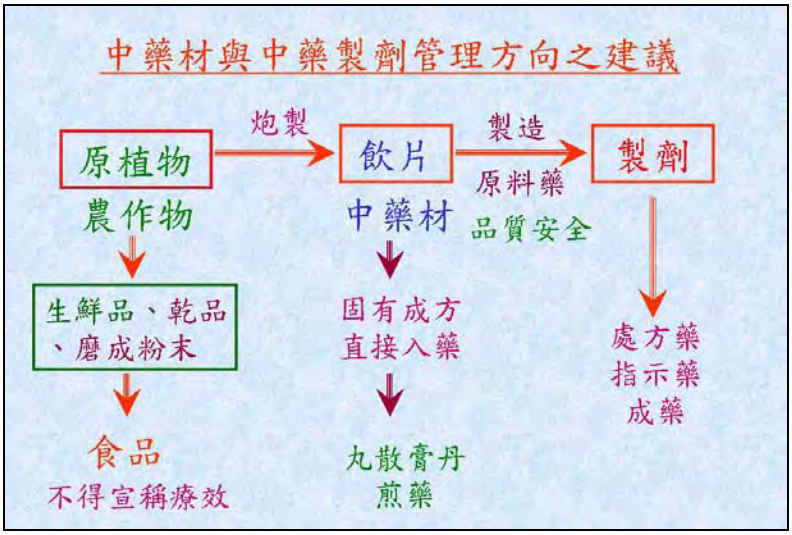
九、經中醫藥司、臺灣製藥工業同業公會及本會研議有關「台灣濃縮中藥配合兩岸衛生協議試辦計畫政策草案」如下：

法規	中國大陸	臺灣
製造標準	工藝質量	GMP
製造方法	水＋水酒（萃取）	水（萃取）
飲片（原料）	配方顆粒（單方）	飲片（中藥材）
製劑		濃縮中藥（單方）

策略	內容	執行方式
試錯機制（試點）（國務院同意）	原則：一中架構（國格）產業發展（平等互惠）	
	特定地點	三甲醫院中醫部門（例如廈門）
	特定對象(人)	閩、台
	特定對象(藥)	配方顆粒（單方）＋濃縮中藥（單方）
	特定服務	當地民眾用藥習性→藥事服務
專案開發	專案中藥局	濃縮中藥（複方）→for 台商→for 健保
	專案保健食品	濃縮中藥(單方)(藥食同療)→for20-30品種→for3-4 家台灣中藥廠→for 審批

十、 建議中藥材與中藥製劑管理架構如下：




中藥材與中藥製劑管理方向之建議
原植物
炮製
飲片
製造
製劑
農作物
原料藥
品質安全
中藥材
生鮮品、乾品
、磨成粉末
固有成方
直接入藥
處方藥
指示藥
成藥
食品
不得宣稱療效
丸散膏丹
煎藥

伍、結論與建議

一、本計畫已完成定期蒐集、整理美國、歐盟、日本及中國大陸有關中藥藥事法律規章解釋令函；由「中藥法政諮詢小組」具法學及藥學執業實務背景之研究人員定期審議相關法律諮詢案件；蒐集法務部及司法院有關中藥之法規資訊、司法判解、判解函釋及裁判書等相關法律資料更新，將所彙集之資料，納入中醫藥司資訊平台查詢更新，提供政府及業界諮詢。

二、「中藥法政諮詢小組」法規諮詢案件來源，計有中醫藥司所交議之法規案件，業界所提出之實務適法性問題，每月蒐集所得之各國中藥法規最新資訊。所研議之有關中藥法律案件之實務與法規見解，可協助政府及業界解決法規適用問題。

三、本計畫計完成 6 件即時及 39 件詳細法律諮詢服務案件，除即時提供政府官員適法性簽核意見，爭取時效外，案件彙編分類依事實、法條適用、推論及結論理由，提供政府及業界方便查閱，諮詢之官員多認滿意，並鼓勵支持。

四、定期整理更新司法院、法務部及行政機關有關中藥之法規資訊、司法判解、行政函釋及裁判書等相關法律資料，有助政府有關機關及中藥業界快速查詢法規、判例及行政解釋。

五、中藥材（飲片）既屬藥事法所規範，依法應賦予定義及常規性之管理方式，以保護消費者使用安全。中藥商公會似對查驗登記許可制度有所誤解，宜加強溝通。

六、為使中藥產品有效安全，製造行銷符合經濟市場規模，研發資源充分有效利用，中藥流通正確符合消費者對健康的期待，建立一個有效中藥管理架構，進而制定符合中藥業界期待，亦能滿足民眾用藥品質安全需求的「中藥」專章或專法，至屬重要。

本計畫依據研究結果，作成下列建議：

一、中藥材（飲片）產品屬性特殊，有其歷史文化背景，與西藥截然不同，建議加速制定相關管理辦法，俾儘早落實品質管制及專業管理機制。

二、中藥材（飲片）既屬藥事法所規範，依法應賦予定義及常規性之管理方式，以保護消費者使用安全。建議採低度管理對策，依現行政策管控基源及污穢物質限量，給予許可文件，以保障消費者最低限度之品質，以及可供追溯的廠商來源。

三、中藥商公會誤認藥事法有關查驗登記許可制度係與製劑管理同嚴，而有所誤解必須執行 HPLC 等檢驗，建議加強溝通說明藥事法有關原料藥管控低度管理之基本概念。

四、「中藥法規諮詢彙編」係所有法政小組專家學者之心血及智慧結晶，提供政府充分利用，並繼續累積案例，作為執法之參考。

五、「中藥法政諮詢小組」提供法規專業諮詢之平台，建議中醫藥司充分利用此平台功能，協助適法性之行政行為。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部中醫藥司計畫編號 CCMP102-RD-013 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. 中草藥產業技術教學資源中心：中草藥產業技術與研發。92 年 12 月出版。P.414。
2. WHO and CoE Policy on CAM。
3. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products。
4. Guideline on the assessment of clinical safety and efficacy in the preparation of community herbal monographs for well-established and of community herbal monographs/entries to the community list for traditional herbal medicinal products/substances/preparations（EMEA/HMPC/104613/05）。
5. 世界衛生組織 2008 年 11 月 8 日傳統醫學大會北京宣言。
6. 歐盟法律系統資料庫 http://www.pharmalaw.org
7. 行政院衛生署：民間部門醫療保健支出統計。2008/12/11。
8. 全國法規資料庫 http://law.moj.gov.tw。
9. 行政院衛生署：藥事法解釋彙編。行政院衛生署 87 年 9 月出版。
10. 陳櫻琴等著：醫療法律。五南圖書出版股份有限公司 2005 年 11 月三版。
11. 中醫藥司：101 年招標公告。

其他參考資料：

1. 中醫藥司：台灣建置中草藥臨床試驗環境計畫成果摘要暨管理法規彙編。98 年 8 月，第 3 頁。
2. 中醫藥司：推動中醫藥之發展十年有成---行政院衛生署中醫藥司十週年會慶系列活動（中醫藥司 94.10.18 發布新聞）
3. 行政院衛生署：透過兩岸搭橋計畫，加強中草藥合作機制（行政院衛生署 2008/12/19 發布新聞）
4. 行政院衛生署:加速中醫藥之科學化與現代化(行政院衛生署 2008/06/20 發布新聞）

相關網頁：

1. WHO http://www.who.int/medicines
2. 立法院法律系統資料庫 http://lis.ly.gov.tw/lgcgi/lglaw

中藥法規相關研究：

1. 財團法人醫藥品查驗中心：加強藥品審核機制與法規協合化。
2. 財團法人醫藥品查驗中心：建立健全之中藥新藥法規環境。

3. 財團法人中華景康藥學基金會：我國製藥業智財權與衛生法規整合性服務與相關機制。
4. 國防醫學院藥品製造研究所：藥物法規國際化的評估。
5. 台灣區製藥工業同業公會：中醫藥法律規章適用及執行查緝宣導教育計畫。
6. 行政院衛生署中醫藥司：歐洲地區中醫藥法規暨科技管理交流計畫。

編號：CCMP102-RD-016

羌活之固體分散製劑開發(2-1)

余建志
中國醫藥大學

摘　要

本計劃以羌活為模式藥物。將羌活藥材打碎為 40~60 mesh 粗粉，投入超臨界 CO_2 流體萃取裝置的 1 L 萃取釜中，添加無水乙醇作為夾帶劑，先靜置 60 mins，在萃取溫度為 60-70℃、萃取壓力為 200～600 bar、CO_2 流量為 20～30 L/h 的條件下萃取 120～180 mins，即為羌活之超臨界抽提物，配合固體分散技術水溶性載體(如洋菜膠，PVP 和 beta 環糊精)，經過噴霧乾燥後，使中藥分子分布於載體中，最後製成超臨界固粉分散加壓顆粒。提高低極性藥物溶解度具體可行。

中藥浸膏進口可行性評估有其必要性。中藥浸膏若可做為原料藥使用，等同將濃縮製劑前段製程外包，將可以減除前段的打碎，萃取，濃縮等製程，可以大幅降低原料，設備與人力成本，甚至讓廠商專注在技術和品質的提升，優點不少。但目前所收集的資料與訪談結果似乎都不支持以浸膏入藥，主要是憂慮品質與管理困難。

關鍵詞：羌活、超臨界抽提、固體分散技術、中藥浸膏進口可行性評估

Number: CCMP102-RD-016

The Solid Dispersion Formulations Development of *Notopterygii Rhizoma et Radix* (2-1)

Chien-Chih Yu
China Medical University

ABSTRACT

This project takes qiang huo (*Notopterygii Rhizoma et Radix*) as model drug. Cut the qiang huo herbal to 40~60 meshes pieces. Put the pieces into 1 L superfluid extract container, with the anhydrous ethanol used as the modifier, and then stand for 60 minutes. Extract under the temperature of vessel 60-70℃, pressure 200-600 bars and CO_2 flow rate 20~30 L/hr for 120~180 minutes to get the superfluid extract (SFE) of qiang huo. Treating the SFE of qiang huo.with the water carrier (such as agar, PVP and beta-cyclodextrin) of solid dispersion technique, and then dry it with spray dryer to make the Chinese medicine molecule disturb in the carrier, then pressurize the powder to be granule. Improve the solubility of low polarity drug is feasible.

It is necessary to estimate the feasibility of importing Chinese herbal extract (CHE). If CHE is allowed to be used as API, which make the front-end process of concentrated engineering of preparations outsource, then the manufacturing process like pieces, extraction and concentration before granule can be cut out. It will lead to the cost down of raw material, instruments and labor, and maybe induce the better control and upgrade of skill of the manufacturers, which provides a lot of advantages. But from the latest data and results of interview, do not seem to support the use of importing CHE, due to the quality assurance and the difficulty of controlling mainly.

Keywords: qiang huo, superfluid extract, solid dispersion, feasibility of importing Chinese herbal extract

壹、前言

依據行政院衛生署中醫藥委員會 102 年度中醫藥政策管理暨消費者使用安全類委託研究計畫需求說明書(1)；研究重點 4-4：中醫藥產業創新發展，目的在於深入瞭解國內中醫藥相關產學之生技發展情形，提昇國際競爭優勢，促進產業發展。符合研究內容第 5 項中藥製程技術創新相關性研究。估探討利用現代化製藥技術，提高藥品效能，使中藥精緻化，探討是否可以將中藥製劑精緻化，成品量縮小，以達服藥簡便化。

目前市場的中藥製劑還是停留在傳統製劑與濃縮中藥，各廠家製程大同小異，也很少見到有關劑型與製程提升，雖然有識之士大聲疾呼，重視中藥開發與創新，但進展十分緩慢，本計畫結合超臨界抽提和固體分散技術(包合技術)，對中藥製劑科學化與品質的提升應有所助益。

超臨界 CO_2 萃取技術(SFE)進行中藥研究開發及產業化，和中藥傳統方法相比，它的優點如下：1. SFE 能夠比較完好地保存中藥有效成分不被破壞或分解，適於提取對於熱敏感、易氧化的成分。2.透過 SFE 條件設定，可使中藥有效成分純度與萃取率提高，可以簡化標準品製備手續。3. SFE 可直接快速從單方或複方中藥中提取不同部位或直接提取浸膏進行藥理篩選，開發新藥。4.動態 SFE 啟動即可抽提，不需浸泡與濃縮步驟。一般 SFE 操作不超過 4 小時。5. SFE 抽提物品質穩定。缺點是中低極性的 SFE 抽提物和傳統水煎煮抽提的高極性有效成分段不相同，致使產生使用上的安全疑慮。超臨界的使用極有能為中藥使用開拓另一塊中低極性領域，為中藥的未來提供可能性。

固體分散技術是將藥物高度分散在載體中形成的固體混合物，由於難溶性藥物的增溶是十分重要的研究課題，提高藥物的分散度是提高溶出速率的最重要手段之一，增加難溶性藥物的溶解度和溶出速率，從而提高藥物的生體可利用率控制藥物釋放；該技術還可以製備藥物釋控劑型；利用載體的包埋作用，可延緩藥物的水解和氧化；掩蓋藥物的不良味道和刺激性及使液體藥物固體化等。目前市場上熱賣的複方丹參製劑(滴丸)即是使用固體分散技術使難溶的主成分丹參素(danshensu)、原兒茶醛(protocatechuic aldehyde)和丹酚酸 B(salvianolic acid B) 轉化成易溶的型態，以提升其療效。

本計劃以羌活為模式藥物，抽提超臨界萃取物，製成固體分散製劑，使用水溶性載體材料(如 PVP 或 beta 環糊精)，加入濃縮液中，再經過噴霧乾燥，使中藥分子分布在水溶性載體材料中，藉以提高藥物溶出速度。

中藥浸膏進口可行性評估有其必要性。中藥浸膏若可做為原料藥使用，等同將濃縮製劑前段製程外包，將可以減除前段的打碎，萃取，濃縮等製程，可將製程限縮在後段噴霧造粒加工的部份，應該可以大幅降低原料，設備與人力成本，甚至讓廠商專注在技術和品質的提升，優點不少。應收集產業結構面、經濟效益、社會責任及管理層面…等資料，尤其是探討日本和大陸對此管理模式，值得深入了解。以利政府做出適當的決策。

貳、材料與方法

一、材料

於市場上購入羌活，經生藥學組織切片與化學鑑別，確定其相關基原無誤後，於陰冷乾燥處保存待用。

二、儀器與試藥

藥材：

羌活藥材其基本品質應符合台灣中藥典第二版的要求。

羌活指標成分：Isoimperatorin(異歐前胡素)及 Notopterol (羌活醇)。

試藥：

絕對酒精（Absolute alcohol），HPMC，MC，PVP，beta-糊精。LC 級甲醇、氰甲烷與水。其它試藥均為 GR 級。洋菜膠，beta-糊精，PVP 均為藥品級。空氣及二氧化碳為工業級。

儀器與設備：

微量分析天平：XS105 Dual Range balance , USA, Mettler-Toledo company

HPLC：高效率液相層析儀，Japan, Shimadzu company

等溫吸濕曲線測定儀：Aquasorp, USA

水活性測定儀：AquaLab Series 3TE, USA, Decagon company

超臨界抽提裝置：SFE-2 Applied Separation, U.S.A

噴霧乾燥機：Ella Company, Japan,

真密度測定儀：Mulit-pycnometer, Japan

比表面積分析儀：SSA-3500, USA

流動性分析儀：Micrometritics Flowsor 拍擊密度測定儀：Vanderkamp Bulk Density Apparatus, Germany

流動性分析儀：Micrometritics Flowsorb II 2300, Germany

b II 2300, Germany

標準篩粒度分析儀：Retsch AS200, Germany

三、執行方法

1. 基原與品質

以組織切片法與化學鑑別法確認藥材相關基原正確。基本品質應符合台灣中藥典第二版的要求。

2. 製程探討(每次以羌活飲片 100 公克為比較基準。)

2.1 精油抽提評估

2.1.1 精油回收製備方法

使用超臨界抽提，水蒸氣蒸餾與傳統水萃取時伴隨精油回收裝置三個操作技術，進行不同來源精油之抽提。

2.1.1.1 超臨界抽提

200 公克羌活藥材打碎為 40~60 mesh 粗粉，投入超臨界 CO2 流體萃取裝置的 1 L 萃取釜中，添加無水乙醇作為夾帶劑，先靜置 60 mins，在萃取溫度為 60-70℃、萃取壓力為 200～600 bar、CO2 流量為 20～30 L/h 的條件下萃取 120～180 mins，得到萃取物；所述夾帶劑與所述羌活粉末的體積品質比為 1:5～1:15。

2.1.1.2 水蒸氣蒸餾

以水蒸氣蒸餾裝置蒸餾收集相關精油。

2.1.1.3 精油回收裝置

以萃取濃縮機上的精油冷凝管回收。

2.1.2 檢測方法(不同來源精油比較)

2.1.2.1 揮發油含量：依中國藥典揮發油測定法(附錄 X D)測定。

2.1.2.2 Notopterol (羌活醇)及 Isoimperatorin(異歐前胡素)依中國藥典[9]高效液相色譜法(附錄VID)測定。

2.1.2.2.1 檢液的製備：使用甲醇將精油稀釋至 1 %並將之過濾後，備用。必要時，得再稀釋。

2.1.2.2.2 對照品溶液的製備：取 Notopterol (羌活醇)對照品、Isoimperatorin(異歐前胡素)對照品適量，精密稱定，加甲醇製成每 1 mL 含 Notopterol (羌活醇)60μg、Isoimperatorin(異歐前胡素) 30μg 的混合溶液，即得。

2.1.2.2.3 色譜條件與系統適用性試驗:以十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑；以乙腈:水(44：56)為流動相；檢測波長為 310nm。理論板數按羌活醇峰計算應不低於 5000。

2.1.2.2.4 測定法：分別精密吸取對照品溶液 5 μL 與檢液 5 μL，注入液相色譜儀。

2.1.2.3 GCMS 成分分析

Agilent GCMS: 7890A-5975C

Column: HP-INNOWAX, 30 mx0.25 mm, 0.25 μm (強極性管柱)

Column: HP-5MS, 30 mx0.25 mm, 0.25 μm (低極性管柱)

樣品前處理：取 5 μl 羌活萃取物以 95%酒精作 200 倍稀釋

層析溫度：80℃（hold 5 min），10℃/min → 140℃，

140℃ → hold 15 min，5℃/min → 260℃，260℃ → hold 15 min

檢出器溫度：230℃

汽化管溫度：280℃

注入方式：不分流(splitless)

攜帶氣體：He 流速：1.0 mL/min

離子化模式：電子撞擊

電子游離能：70 eV

偵測模式：Scan (50~550 amu)

Library: NIST11.L、wiley7n.l

2.2 精油定香與回存顆粒之探討。

精油有三個來源，分別是超臨界抽提，水蒸氣蒸餾與精油回收法，以不同比例(1~5%) HPMC，5%PVP，5%MC 與 5%環糊精(β-CD)等增稠劑作為定香劑。

2.2.1 精油定香製備方法

2.2.1.1 噴霧法

將顆粒置於糖衣鍋中，定速轉動，將已定香之精油用適量酒精溶解，用噴槍噴附於顆粒表面。

2.2.1.2 壓力鍋法

將顆粒置於可以翻轉的壓力鍋中，加入已定香的精油，將鍋子密閉，微升溫到 60℃，時時翻轉，20 分鐘，緩緩降溫回到室溫，置入冰箱 30 分鐘。使精油完全被吸收。

2.2.2 檢測方法

2.2.2.1 重量經時變化

於室溫下放置 72 小時，取六個時間點，各做一次檢測。

2.2.2.2 揮發油含量：依中國藥典揮發油測定法(附錄 X D)測定。

2.2.2.3 Notopterol (羌活醇)及 Isoimperatorin (異歐前胡素)依中國藥典高效液相色譜法(附錄VID)測定。

2.2.2.3.1 檢液的製備:使用甲醇將精油稀釋至 1%並將之過濾後，備用。必要時，得再稀釋。

2.2.2.3.2 對照品溶液的製備：取 Notopterol (羌活醇)對照品、Isoimperatorin (異歐前胡素)對照品適量，精密稱定，加甲醇製成每 1 mL 含 Notopterol (羌活醇) 60 μg、Isoimperatorin (異歐前胡素) 30 μg 的混合溶液，即得。

2.2.2.3.3 色譜條件與系統適用性試驗:以十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑；以乙腈：水(44：56)為流動相；檢測波長為 310 nm。理論板數按羌活醇峰計算應不低於 5000。

2.2.2.3.4 測定法:分別精密吸取對照品溶液 5 μL 與檢液 5 μL，注入液相色譜儀。

2.2.2.4 五官辨識法；用嗅覺判定相關差異。

2.3 羌活固體分散技術之賦形劑探討

2.3.1 製備方法

以超臨界萃取物加入不同乾浸膏賦形劑比例(1:1)之洋菜膠，beta-糊精與 PVP，等水溶性載體材料，加水完全溶化後，噴霧乾燥造粒後比較其性質。

2.3.2 檢測方法

2.3.2.1 藥物安定檢視：室溫觀察 7 天，以目視法判別外觀是否變化，是否有吸潮，結塊，發霉等現象。

2.3.2.2 乾減、稀醇與水抽提率：採用台灣傳統藥典或日本藥典的規定進行上述實驗，同時採用分析天平進行即時水分變化監控至少 24 小時。

2.3.2.3 等溫吸濕曲線與水活性：採用等溫吸濕曲線測定儀建立等溫吸濕曲線，並以水活性儀測試其水活性。採用冷卻鏡技術之露點測試（AOAC method 978.18）偵測溫度 25±0.5 ℃。使用前校正：以原廠校正標準品 0.5 molal 氯化鉀溶液(0.984± 0.003)及 6.0 molal 氯化鈉溶液(0.760± 0.003）校正之。將藥粉適量（不超過樣品盒的 1/2，約 7mL）置於水活性分析儀（Aqua Lab Series 3TE 具溫度補償功能，USA），直接讀取水活性數值。

2.3.2.4 粉體性質測試；依中華藥典規定，測試其流動性，真密度，假密度，顆粒均勻度等粉體性質參數。

2.4 噴霧乾燥加壓顆粒

2.4.1 製備方法

取前述三種噴霧乾燥粉末，以無水酒精所含微量水分為黏著劑，以 200 磅/平方英吋加壓後粉碎成碎片。

2.4.2 檢測方法

2.4.2.1 藥物安定檢視：以目視法判別外觀是否變化，是否有吸潮，結塊，發霉等現象。

2.4.2.2 硬度：以萬用壓力計測試。

2.4.2.3 比表面積及孔隙度 (Specific surface area)

2.4.2.3.1 除氣

將試管精確稱重並記錄之，將檢品倒入管內(約八分滿)，置於真空乾燥機中，以 80 ℃ 16 小時抽氣。關閉馬達後，充入氮氣，待內外壓力平衡，取出試樣管，立刻封閉管口，置於無水乾燥器中備用。

2.4.2.3.2 測表面積之步驟：

a. 重開機及校正

(a)打開 Flowsorb II 2300 之氣閥。

(b)打開氦氣及氮氣開關，將氦氣及氮氣壓力調至 12 psi 設定流量控制，使含氦氣 70 %，氮氣 30 %之混合氣體，以每分鐘 16 cc 流量，供應 Flowsorb II 2300。

(c)打開 Flowsorb II 2300 電源，熱機 30 分鐘。

(d)30 分鐘後，將 Cold Trap 之杯中加入液態氮。

(e)抽 1 cc 氮氣由 Septum 注入 Flowsorb II。根據當時之室溫及氣壓決定校正值。

b. 表面積之測定：

(a)先將待測檢品置於 Flowsorb II 2300 之 Degas 位置，30 分鐘後，換至 Test 位置。

(b)將檢品試樣管浸在液態氮中，待吸附完全清除吸附之表面積值。

(c)移去液態氮，換以室溫下的水，使檢品溫度很快回復至室溫，開始去附。

(d)去附完全，記錄表面積值。

(e)取下檢品稱重，減去試樣管重量，得淨檢品重量，每個檢品重覆 a-d 步驟三至五次，求其平均值及標準偏差。比表面積 =(表面積值/檢品重) (m^2/g)

2.4.2.4 揮發油含量：依中國藥典揮發油測定法(附錄 X D)測定。

2.4.2.5 含量測定：Notopterol (羌活醇)及 Isoimperatorin (異歐前胡素)依中國中藥典高效液相色譜法(附錄VID)測定。

2.4.2.5.1 檢液的製備：使用甲醇將精油稀釋至 1%並將之過濾後，備用。必要時，得再稀釋。

2.4.2.5.2 對照品溶液的製備：取 Notopterol (羌活醇)對照品、Isoimperatorin (異歐前胡素)對照品適量，精密稱定，加甲醇製成每 1 mL 含 Notopterol (羌活醇) 60 μg、Isoimperatorin (異歐前胡素) 30 μg 的混合溶液，即得。

2.4.2.5.3 色譜條件與系統適用性試驗:以十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑；以乙腈:水(44：56)為流動相；檢測波長為 310 nm。理論板數按羌活醇峰計算應不低於 5000。

2.4.2.5.4 測定法：分別精密吸取對照品溶液 5 μL 與檢液 5 μL，注入液相色譜儀。

3. 收集日本與兩岸三地之浸膏藥物相關規定，並提出初步可行性評估報告。進行初步資料收集解讀與產官學訪談，包括：產業結構面、經濟效益、社會責任及管理層面...等，另探討日本對此管理模式。提出初步可行性評估，供中醫藥委員會作為施政參考。

參、結果

一、羌活藥材經外觀檢視，薄層層析定性檢查與組織切片(圖一)可以證實本計畫所使用的羌活基原正確無誤，一般檢驗成績(表一)符合台灣藥典第二版要求。

二、使用超臨界抽提，水蒸氣蒸餾與傳統水萃取時伴隨精油回收裝置三個操作技術，進行不同來源精油之抽提(圖二)。三個不同來源精油的檢驗成績(表二)顯示，精油抽提率順序是超臨界抽提>水蒸氣蒸餾>精油回收。超臨界抽提同時可以抽提出大量羌活醇(Notopterol)與異歐前胡素(Isoimperatorin)(圖三、圖四與圖六)，水蒸氣蒸餾與精油回收兩者具有同質性，可檢出少量之羌活醇(Notopterol)，但未發現異歐前胡素(Isoimperatorin)。

三、羌活醇(Notopterol)與異歐前胡素 (Isoimperatorin)之檢量線線性結果令人滿意(圖五與圖七)，高效液相層析圖譜具有高解析度，可以準確判別(圖八)並定量。

四、GCMS 資料顯示(圖九)超臨界抽提物低極性圖譜分析共 56 peaks，鑑定出 52 種化合物。高極性圖譜分析共 41 peaks，鑑定出 38 種化合物(13 個交集，77 化合物)。氣化物佔 32.67%，主要是烯類(17.6%)和醇類(3.24%)。GCMS 詳細成分鑑定如表三。

五、GCMS 資料顯示(圖九)水蒸氣蒸餾和精油回收之低極性圖譜共 28 peaks ，鑑定出 25 種化合物。高極性圖譜分析共 17 peaks，鑑定出 16 種化合物 (9 個交集，32 化合物)。氣化物佔 98.42%，主要是烯類(90%)和醇類(6.33%)烯類中蒎烯佔一半以上。GCMS 詳細成分鑑定如表四。

六、將超臨界抽提物和水蒸氣蒸餾和精油回收之成分交叉比對，發現超臨界抽提物和水蒸氣蒸餾和精油回收之成分有極大的差異。和傳統觀念上，超臨界抽提物應包含水蒸氣蒸餾和精油回收之成分，有極大差異。(圖十)

七、定香效果經時研究發現，6 個增稠劑都有穩定主成分的作用，72 小時的經時變化，成分含量變化不大(圖十一)。香味的回存研究採用噴霧法與壓力鍋法，結果顯示壓力鍋法產生的顆粒味道較為濃厚，含量也較高，回存較為完整。表示壓力鍋法效果較佳，壓力鍋的大小和吸附結果成反比。(表五)

八、固體分散技術採用洋菜膠，beta-糊精與 PVP 作為水溶性載體材料，初步性質顯示符合製劑上的要求，由水抽提率可以得知本技術確實可以增加難溶性的超臨界抽提物的溶解度(表六)。

九、加壓製粒後，表面緻密使比表面積大幅下降，降低與外界接觸的表面積，可以提高顆粒的安定性。硬度提高及吸潮效應下降，使顆粒可以穩定存在(表七)。

十、收集日本與兩岸三地之浸膏藥物相關規定，並提出初步可行性評估報告(表八，表九與附錄一)。

肆、討論

一、使用超臨界抽提，水蒸氣蒸餾與傳統水萃取時伴隨精油回收裝置三個操作技術，進行不同來源精油之抽提(圖二)。三個不同來源精油的檢驗成績(表二)顯示，精油抽提率順序是超臨界抽提>水蒸氣蒸餾>精油回收。超臨界抽提同時可以抽提出大量羌活醇(Notopterol)與異歐前胡素(Isoimperatorin) (圖三、圖四與圖六)，水蒸氣蒸餾與精油回收兩者具有同質性，可檢出少量之羌活醇(Notopterol)，但未發現異歐前胡素(Isoimperatorin)。這個結果可能和超臨界狀態下，CO_2 對不同溶質的溶解能力差別很大，這與溶質的極性、沸點和分子量密切相關，親脂性、低沸點成分可在低壓萃取(104Pa)，如揮發油、烴、酯等。化合物的極性基團越多，就越難萃取。化合物的分子量越高，越難萃取。水蒸氣蒸餾與精油回收的成分則取決於沸點，兩者之原理截然不同。

二、GCMS 資料顯示(圖十)超臨界抽提物共鑑別出 77 種化合物。水蒸氣蒸餾和精油回收共鑑別出 32 種化合物，其中交集的僅有 18 種化合物。可見超臨界抽提物和水蒸氣蒸餾與精油回收所收集的抽提物並不完全相同(表三與表四)。兩者的差別在於，超臨界抽提物收集物應該是偏向中低極性的化合物，而水蒸氣蒸餾與精油回收的收集物是以沸點低於 100℃來判定所致。故不可一廂情願認為精油均為中低極性的化合物，或是中低極性的化合物沸點均低於 100℃。應該超臨界抽提物和水蒸氣蒸餾與精油回收的收集物視為不同物質。

三、超臨界 CO_2 萃取技術(SFE)進行中藥研究開發及產業化，和中藥傳統方法相比，它的優點如下：1. SFE 能夠比較完好地保存中藥有效成分不被破壞或分解，適於提取對於熱敏感、易氧化的成分。2. 透過 SFE 條件設定，可使中藥有效成分純度與萃取率提高，可以簡化標準品製備手續。3. SFE 可直接快速從單方或複方中藥中提取不同部位或直接提取浸膏進行藥理篩選，開發新藥。4. 動態 SFE 啟動即可抽提，不需浸泡與濃縮步驟。一般 SFE 操作不超過 4 小時。5. SFE 抽提物品質穩定。缺點是中低極性的 SFE 抽提物和傳統水煎煮抽提的高極性有效成分段不相同，致使產生使用上的安全疑慮。超臨界的使用極有能為中藥使用開拓另一塊中低極性領域，為中藥的未來提供可能性。

四、經由定香效果的經時研究發現，6 個增稠劑都有穩定主成分的作用，72 小時的經時變化，成分含量變化不大(圖十一)，顯示只要適當提高黏度

均可有助於羌活主成分之定香效果。香味的回存研究採用噴霧法與壓力鍋法，結果顯示壓力鍋法產生的顆粒味道較為濃厚，含量也較高，回存較為完整。表示壓力鍋法效果較佳，可能和噴霧過程會造成成分逸散，同時加熱亦會使成分揮發。壓力鍋法則在密閉條件下，沒有成分損失產生。實驗中也發現壓力鍋大小會影響成分吸附的效果，壓力鍋的大小和吸附結果成反比。(表五)

五、固體分散技術是將藥物高度分散在載體中形成的固體混合物，由於難溶性藥物的增溶是十分重要的研究課題，提高藥物的分散度是增加難溶性藥物的溶解度和提高溶出速率的最重要手段之一。本計畫採用洋菜膠，beta-糊精與 PVP 作為水溶性載體材料，初步性質顯示符合製劑上的要求，水抽提率顯示本技術可以增加難溶性的超臨界抽提物的溶解度(表六)。

六、加壓製粒後，表面緻密使比表面積大幅下降，降低與外界接觸的表面積，可以提高顆粒的安定性。硬度提高及吸潮效應下降，使顆粒可以穩定存在(表七)。

七、收集日本與兩岸三地之浸膏藥物相關規定，並提出初步可行性評估報告(表八，表九與附錄一)。進行初步資料收集與解讀，發現中藥浸膏若可做為原料藥使用，等同將濃縮製劑前段製程外包，確實將可以減免前段的打碎，萃取與濃縮等製程，可將製程限縮在後段噴霧造粒加工的部份，應該可以大幅降低原料，設備與人力成本，甚至讓廠商專注在技術和品質的提升，優點不少。目前所收集的資料與訪談結果似乎都不支持以浸膏入藥，主要是憂慮品質與管理困難。

伍、結論與建議

一、超臨界固體分散製劑，使用水溶性載體材料(如 PVP 或 beta 環糊精)，加入濃縮液中，再經過噴霧乾燥，使中藥分子分布在水溶性載體材料中。提高藥物溶解度具體可行，相關製劑值得進一步開發。

二、中藥浸膏進口可行性評估有其必要性。中藥浸膏進口做為原料藥似乎有其優點,但目前所收集的資料與訪談結果似乎都不支持以浸膏入藥，品質憂慮與管理困難為最大疑慮。

誌謝

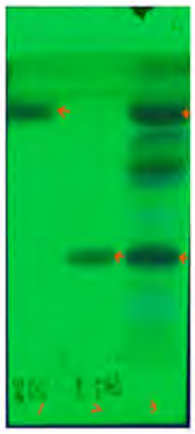
本研究計畫承蒙衛生福利部中醫藥司計畫編號 CCMP102-RD-016 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 行政院衛生署中醫藥委員會，102 年健全中藥審查法規及強化中藥製程安全委託研究計畫投標作業手研委託究計畫需求說明書冊，2013，pp.13，衛生署中醫藥委員會，台北
2. 進藤精一，石川達雄，安部郁夫，吸著 の科學，2005，第二版，東京，日本
3. Tadeusz Kudra, Arun S. Mujumdar, Advanced Drying Technologies, 2005, Marcel Dekker, New York, USA
4. Georg-Wilhelm Oetjen, Peter Haseley, Freeze-Drying, 2006, second, completely revised and extended edition, WILEY-VCH, New York, USA
5. Raymond Rowe, Paul Sheskey and Sian Owen, Handbook of pharmaceutical excipients, 2003, fifth Ed.
6. 陳建海，藥用高分子材料與現代藥劑，2005，科學出版社，北京，中國，
7. 林山陽、蘇坤波、林山珍、洪尚文：微粒膠囊，台灣科學 1980，第 34 卷， P58~P90
8. J. A. Bakan and J. L. Anderson：in “The Theory and Practice of Industrial Pharmacy”，Edited by Leon Lachman and J. L. Kanic，Lea & Febriger，1970, 384
9. 國家藥典委員會，中華人民共和國藥典，第一卷，2010，p.170，中國醫藥科技出版社，北京中國
10. 行政院衛生署，台灣中藥典，2013，p.140，第二版，衛生署中醫藥委員會，台北
11. Remington, The science and practices of pharmacy, 21st ed., 2005, pp. 828t, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, USA

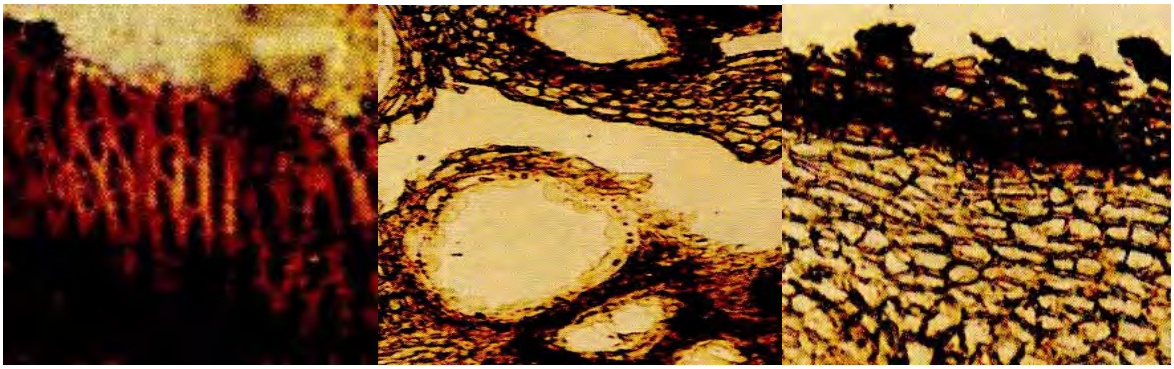
柒、圖、表





品名：異歐前胡素及羌活醇
薄層層析板：silica gel 60 F254
展開溶媒：石油醚.乙醚(2:3)
展開距離： 5 cm
檢液點注量：各5ul
檢出方法：U.V lamp254nm
結果：標準品溶液與3.羌活藥材檢液於Rf值約 0.70及0.25處有相同暗褐色斑點。

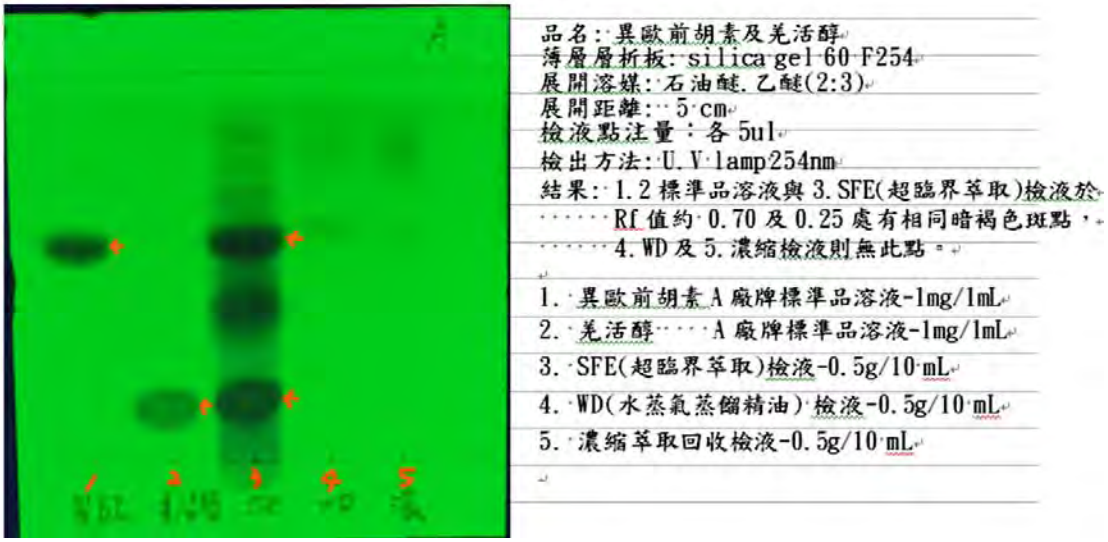
1. 異歐前胡素A廠牌標準品溶液-1mg/1mL
2. 羌活醇A廠牌標準品溶液-1mg/1mL
3. 羌活藥材檢液



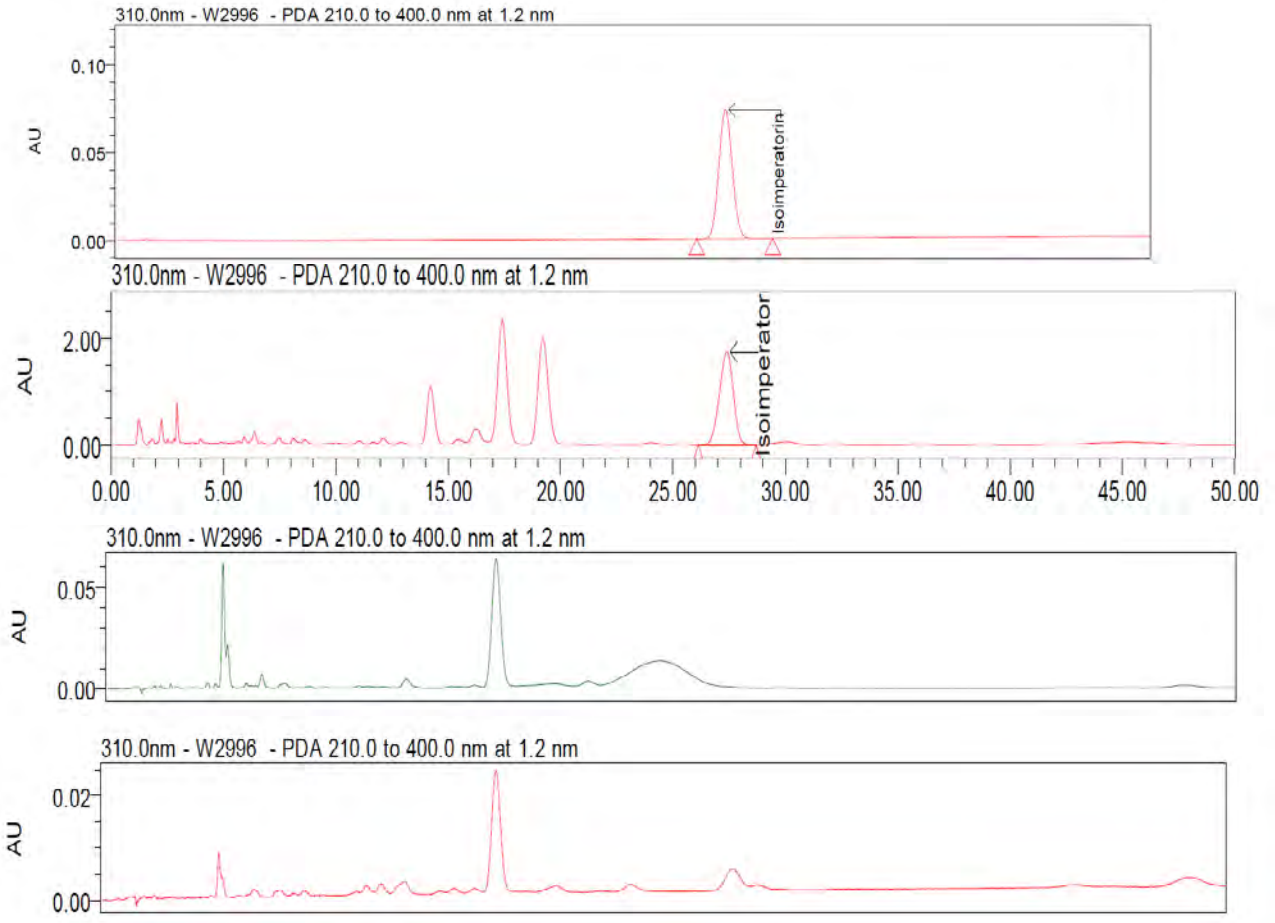
圖一、羌活鑑別 a.外觀 b.薄層層析 c-1 導管(40X) c-2 泌油細胞(40X) c-3 栓皮組織(40X)



圖二、羌活抽出物 a.超臨界抽提 b.水蒸氣蒸餾 c.精油回收



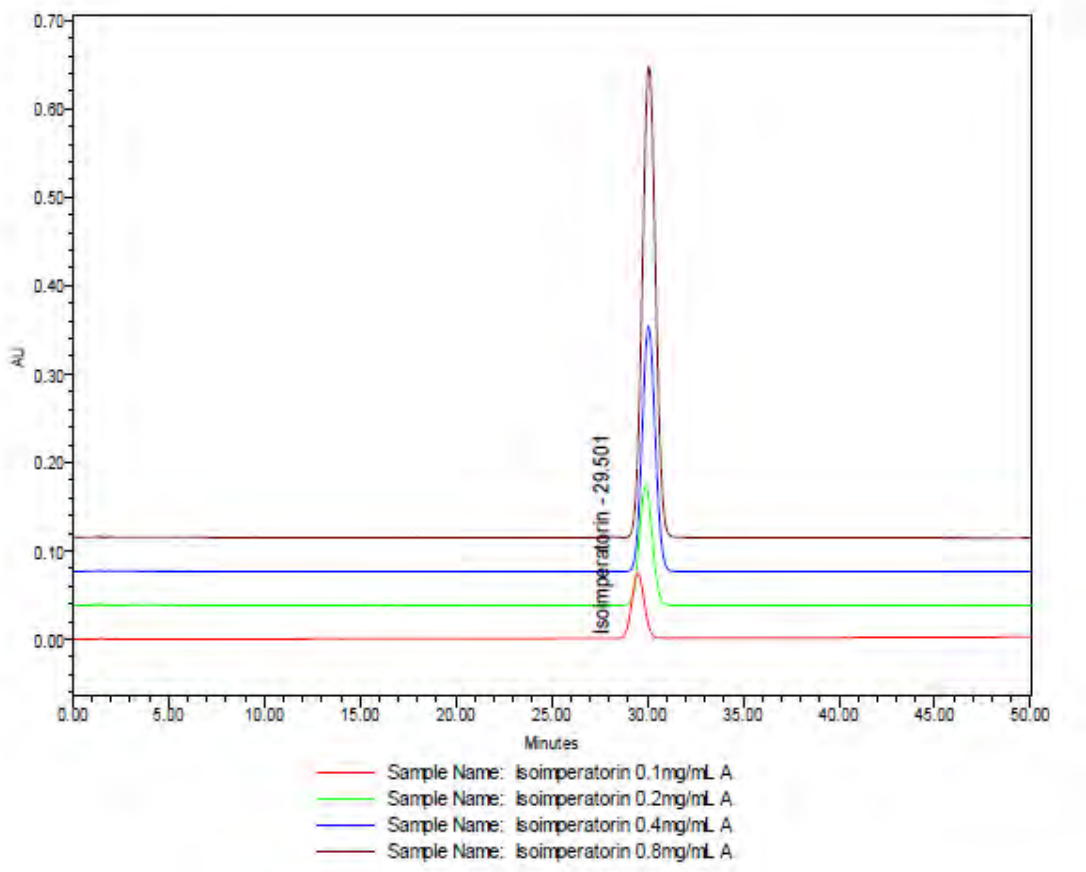
圖三、羌活三種不同來源抽出物之薄層層析圖

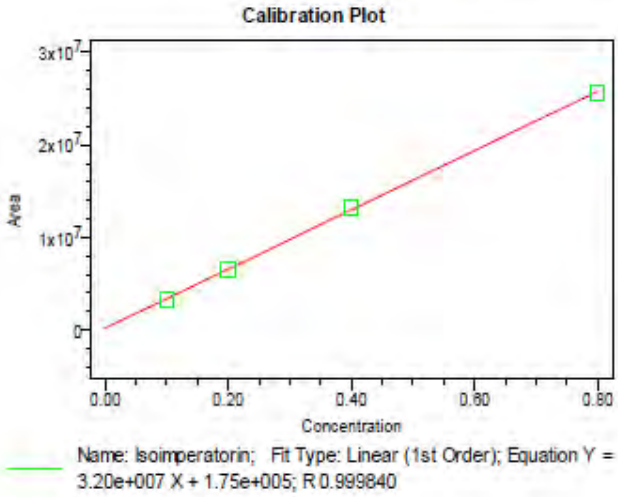


圖四、異歐前胡素(Isoimperatorin)之 HPLC 圖譜

a. 異歐前胡素標準品 b. 羌活超臨界抽提物 b. 羌活水蒸氣蒸餾

c. 羌活精油回收

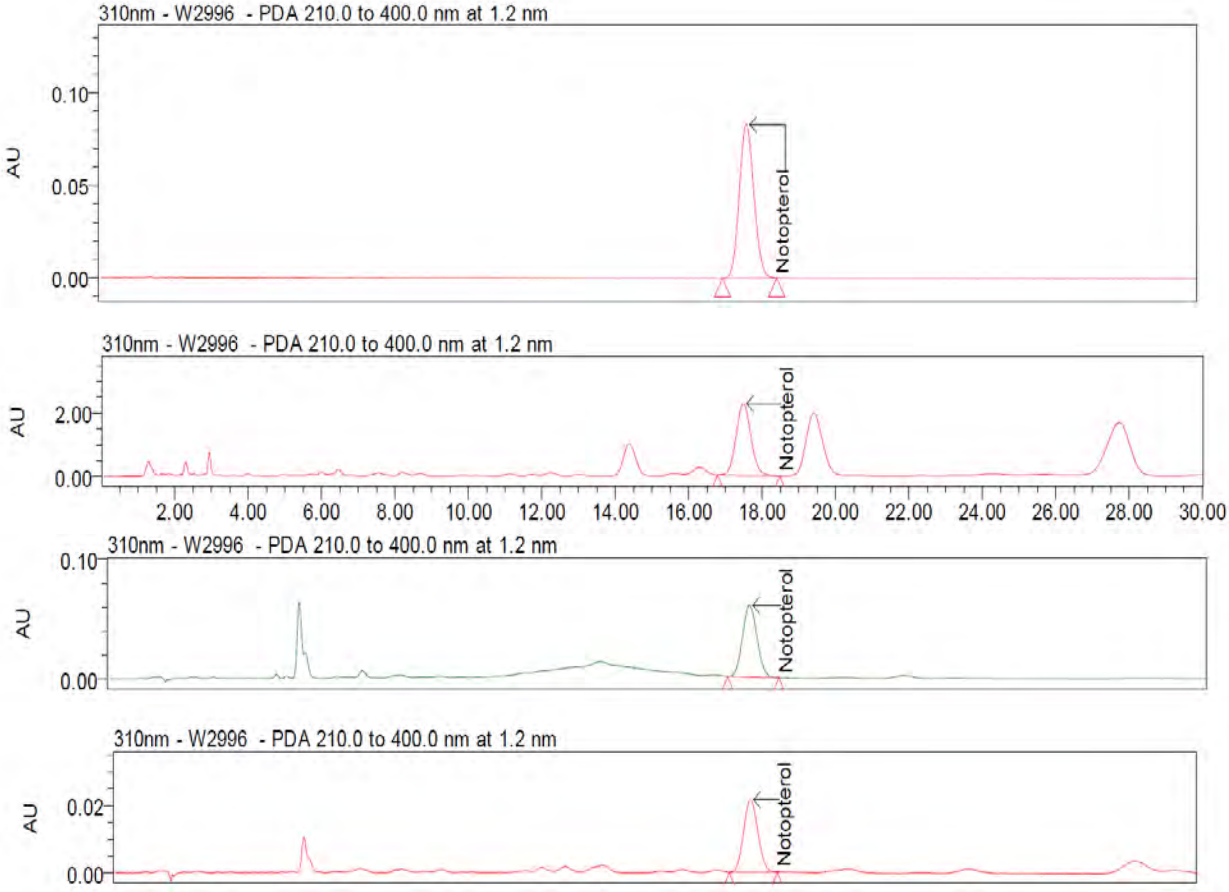




Peak: Isoimperatorin

	Name	X Value	Response
1	Isoimperatorin	0.100000	3334609.5
2	Isoimperatorin	0.200000	6453800.0
3	Isoimperatorin	0.400000	13243396.5
4	Isoimperatorin	0.800000	25695477.5

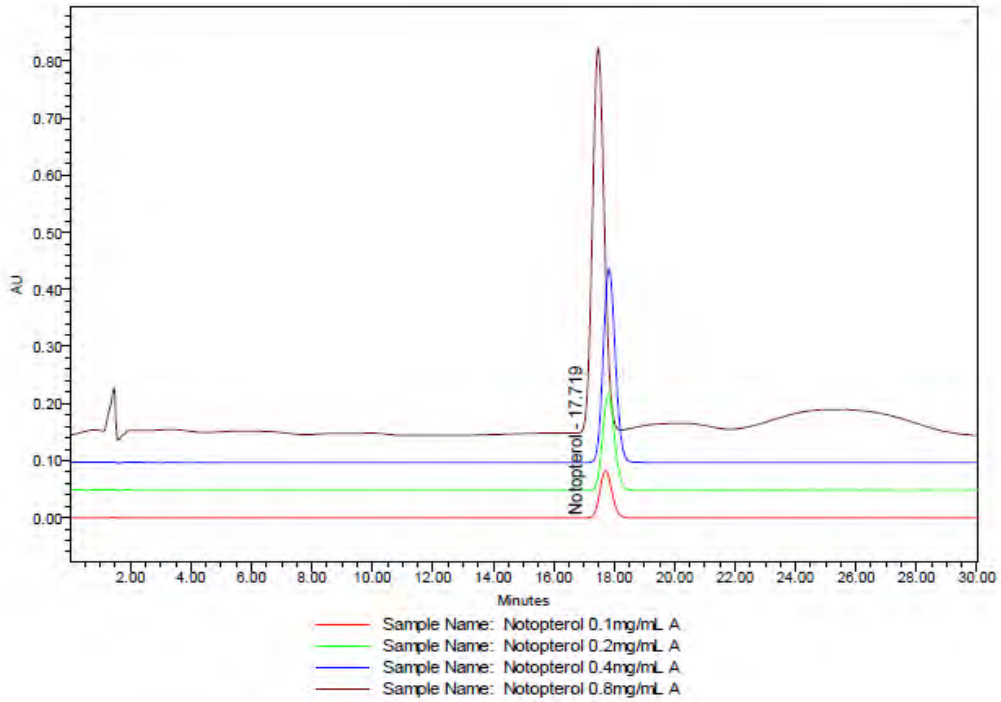
圖五、異歐前胡素(Isoimperatorin)之檢量線及線性

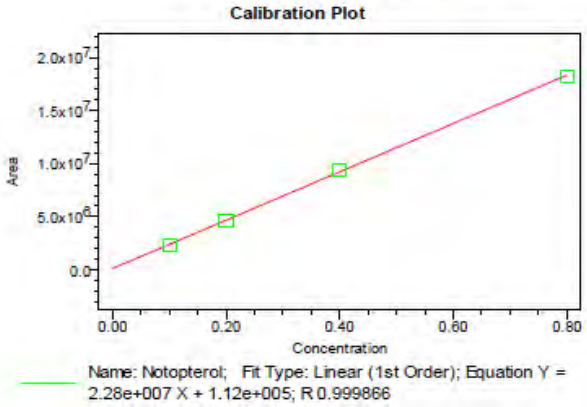


圖六、羌活醇(Notoperterol)之 HPLC 圖譜

a. 羌活醇標準品 b. 羌活超臨界抽提物 b. 羌活水蒸氣蒸餾

c. 羌活精油回收

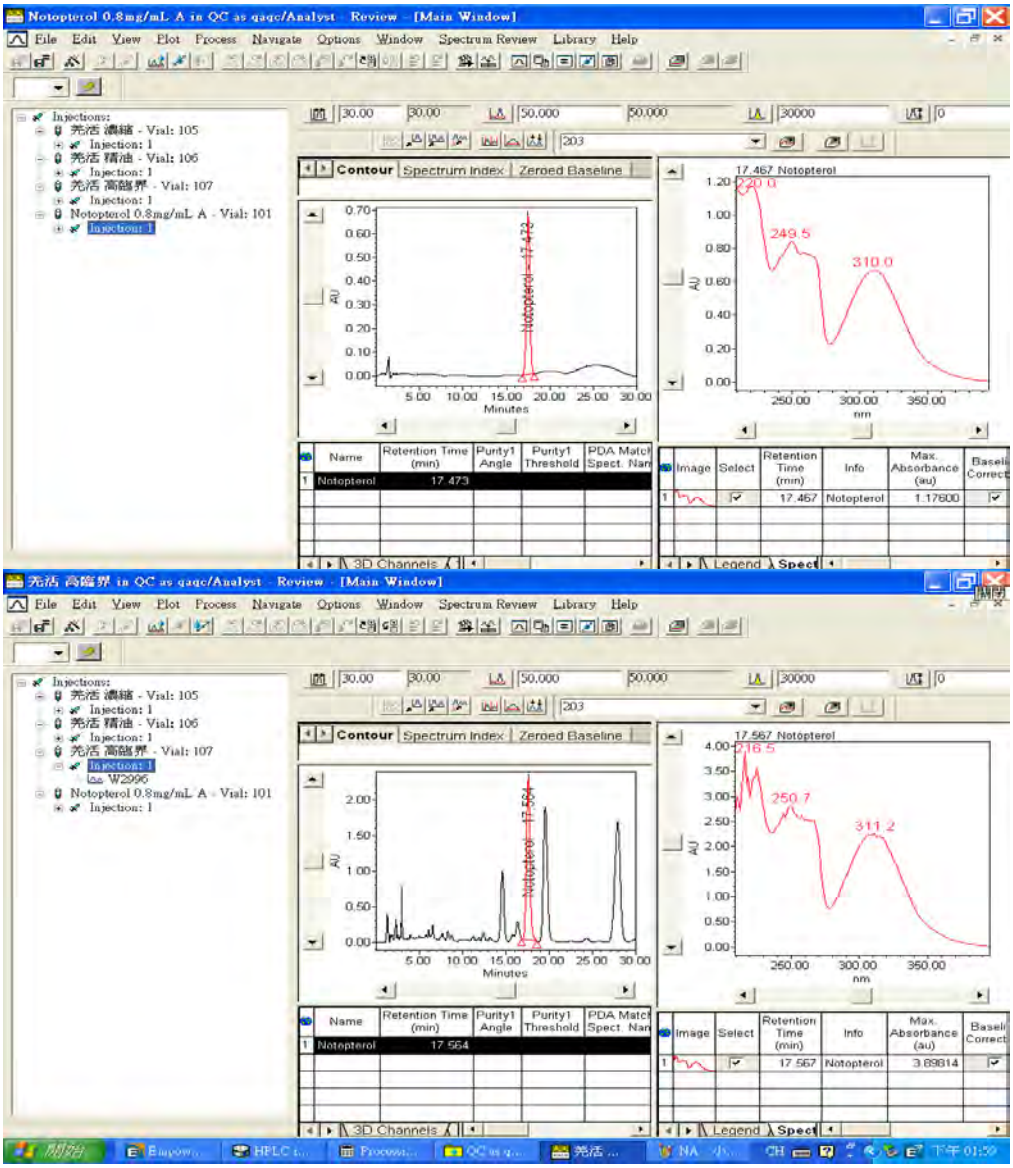




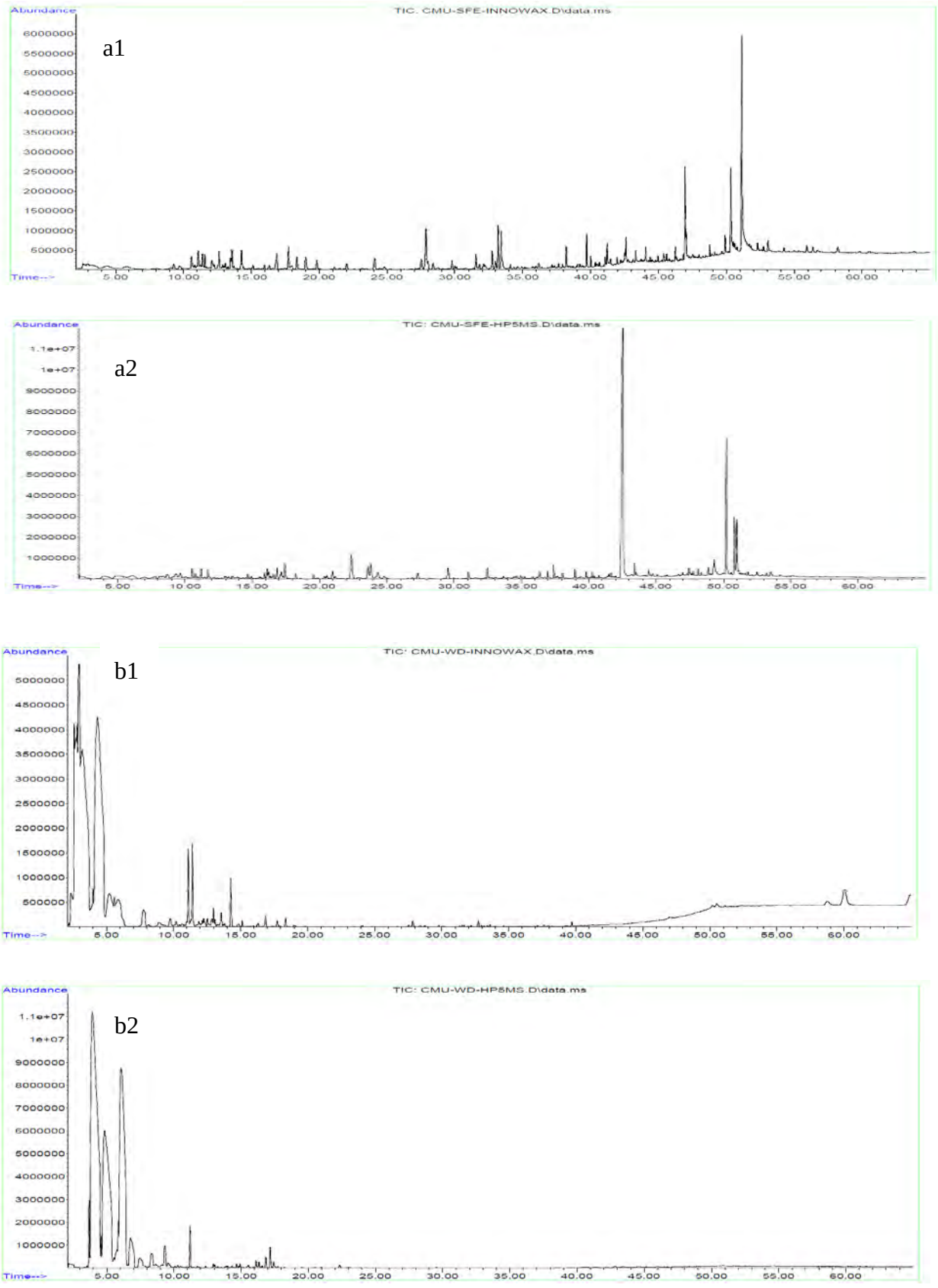
Peak: Notopterol

	Name	X Value	Response
1	Notopterol	0.100000	2307847.0
2	Notopterol	0.200000	4647737.0
3	Notopterol	0.400000	9386954.0
4	Notopterol	0.800000	18255578.1

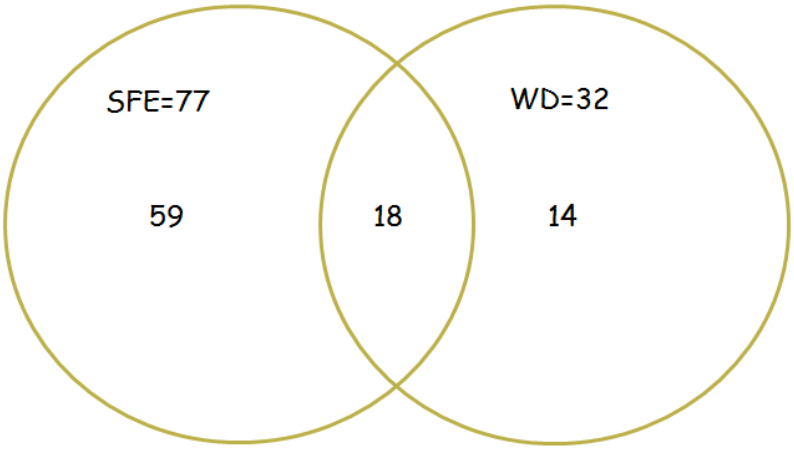
圖七、羌活醇(Notoperterol)之檢量線及線性



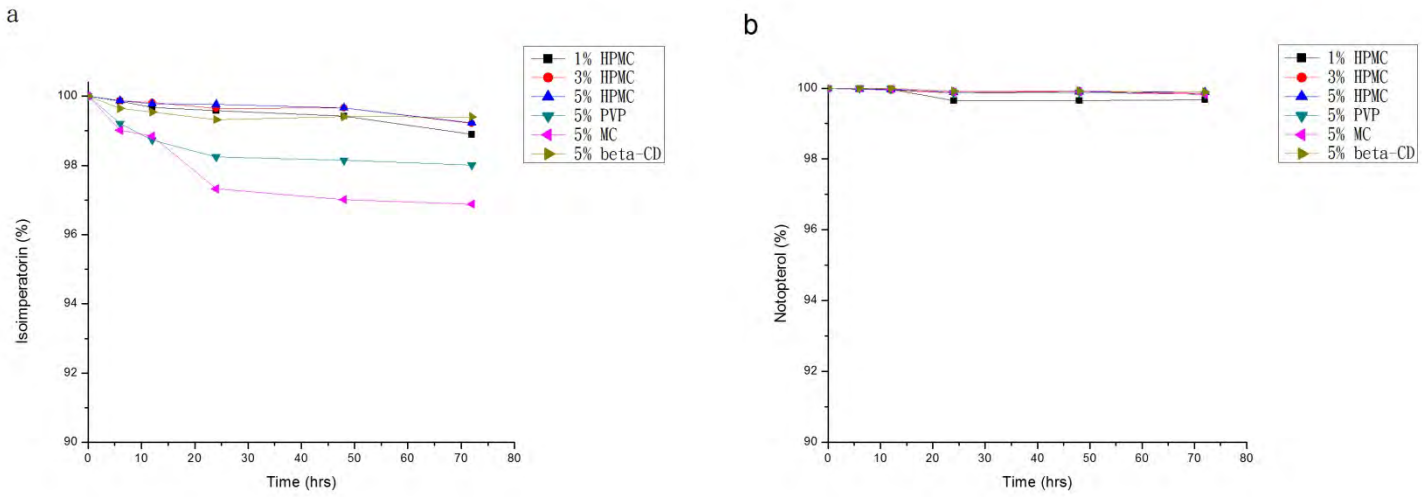
圖八、羌活醇(Notoperterol)之 PDA 鑑別



圖九、羌活抽提物之質譜分析 a1.超臨界抽提(強極性管柱) a2.超臨界抽提(弱極性管柱) b1.水蒸氣蒸餾與精油回收(強極性管柱) b2 水蒸氣蒸餾與精油回收(弱極性管柱)



圖十、超臨界抽提物與水蒸氣蒸餾之成分差異示意圖(SFE ≠ WD)



圖十一、定香效果經時比較 a.異歐前胡素(Isoimperatorin)
b.羌活醇(Notoperterol)

表一、羌活原料檢驗報告

1. 性狀	本品呈類圓形、不規則形橫切或斜切片，表皮棕褐色至黑褐色，切面外側棕褐色，木部黃白色，有的可見放射狀紋理。體輕，質脆。氣香，味微苦而辛。	pass
2. 薄層層析法	檢品溶液、對照藥材溶液及對照標準品溶液所呈現斑點之 Rf 值及色調均一致。	陽性反應
3. 乾燥減重	減重不得超過 14.0%	8.2%
4. 總灰分	不得超過 6.0%	3.1%
5. 酸不溶性灰分	不得超過 3.0%	1.22%
6. 重金屬	不得超過 10.0 ppm。	pass
7. 砷(As)	限量 5.0 ppm	ND
8. 水抽提物	不得少於 15.0%	23.4%
9. 稀醇抽提物	不得少於 18.0%	26.2%
10.揮發油	不得少於 0.8% (v/w)	1.24%

表二、不同抽提方法之比較

提取方法	提取時間 (hrs)	提取得油率 (%)	異歐前胡素 (%)	羌活醇 (%)	性狀
SFE	4	7.5~8.5	2.36	2.79	淡棕紅色半透明油狀物
WD	10	3.4~3.85	ND	0.067	深黃色油狀物
REC	6	1.2~1.3	ND	0.02	深黃色油狀物

ps. SFE:超臨界抽提; WD:水蒸氣蒸餾; REC:濃縮回收; REC:每次操作以 100 公克藥材為準(N=3)

表三、超臨界抽提 GCMS 成分鑑別

	Coumn: HP-5MS（低極性）		Coumn: HP-INNOWAX（強極性）
編號	名稱	編號	名稱
1	.alpha.-Pinene	1	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, cis-
2	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	2	.alpha.-Cubebene
3	D-Limonene	3	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, cis-
4	.gamma.-Terpinene	4	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate, (1S-endo)-
5	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, cis-	5	Terpinen-4-ol
6	Phenylethyl Alcohol	6	2,7-Octadien-4-ol, 2-methyl-6-methylene-, (S)-
7	Carveol	7	1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol
8	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-	8	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethylidene)-, (4aR-trans)-
9	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-	9	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-
10	2-Decenal, (E)-	10	(-)-Myrtenol
11	Bornyl acetate	11	Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl)-, (R)-
12	2-Methoxy-4-vinylphenol	12	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-
13	Copaene	13	6-Epishyobunone
14	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-	14	Isoshyobunone
15	Vanillin	15	6-Epishyobunone
16	(-)-Aristolene	16	Phenylethyl Alcohol
17	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-	17	6-epi-shyobunol
18	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,3,3a,4,5,6,7b-octahydro-1,1,3a,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,3a.alpha.,7b.alpha.)]-	18	Heptanoic acid

	Coumn: HP-5MS（低極性）		Coumn: HP-INNOWAX（強極性）
編號	名稱	編號	名稱
19	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4a.alpha.,7.alpha.,8a.beta.)]-	19	12-Oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene, 1,5,5,8-tetramethyl-, [1R-(1R*,3E,7E,11R*)]-
20	Shyobunone	20	Octanoic acid
21	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	21	Guaiol
22	.beta.-Bisabolene	22	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-
23	6-Epishyobunone	23	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, 1-methylethyl ester
24	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	24	.gama.-eudesmol
25	Isoshyobunone	25	Agarospirol
26	Cyclohexanemethanol, 4-ethenyl-.alpha.,.alpha.,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,3.alpha.,4.beta.)]-	26	Nonanoic acid
27	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	27	2-Methoxy-4-vinylphenol
28	Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,7.alpha.,8a.alpha.)]-	28	5-Azulenemethanol, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-.alpha.,.alpha.,3,8-tetramethyl-, [3S-(3.alpha.,3a.beta.,5.alpha.)]-
29	1,5-Cyclodecadiene, 1,5-dimethyl-8-(1-methylethylidene)-, (E,E)-	29	2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetramethyl-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-
30	Guaiol	30	2-Naphthalenemethanol, decahydro-.alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-

	Coumn: HP-5MS（低極性）		Coumn: HP-INNOWAX（強極性）
編號	名稱	編號	名稱
31	3-Cyclohexen-1-carboxaldehyde, 3,4-dimethyl-	31	Isocalamendiol
32	Dehydroxy-isocalamendiol	32	Methyl 10-trans,12-cis-octadecadienoate
33	Alloaromadendrene	33	Vanillin
34	2-Naphthalenemethanol, decahydro-.alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	34	2-Naphthalenemethanol, decahydro-.alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-
35	2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetramethyl-, (2R-cis)-	35	Pentadecanoic acid
36	1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-,[1aR-(1a.alpha.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	36	n-Hexadecanoic acid
37	Longifolenaldehyde	37	Octadecanoic acid
38	Isocalamendiol	38	Octadecanoic acid
39	2-(4-Methoxyphenyl)-N,N,2-trimethyl-1-pyrrolamine $$ 1H-Pyrrol-1-amine, 2-(4-methoxyphenyl)-N,N,5-trimethyl-(CAS)	39	Oleic Acid
40	2H,8H-Benzo[1,2-b:5,4-b']dipyran-2-one, 8,8-dimethyl-	40	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-
41	Falcarinol	41	18,18'-Bi-1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclononadecane
42	7H-Furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one, 4-methoxy-		
43	2H,8H-Benzo[1,2-b:5,4-b']dipyran-2-one, 8,8-dimethyl-		
44	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester		
45	Phenol, 4-(3,7-dimethyl-3-ethenylocta-1,6-dienyl)-		
46	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester		
47	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, 2-phenylethyl ester		
48	圖譜有化學式但分數不高		
49	2-Hydroxy-1-naphthalenepropanol		
50	2-(1-Hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihyd		

	Coumn: HP-5MS（低極性）		Coumn: HP-INNOWAX（強極性）
編號	名稱	編號	名稱
	rofuro[3,2-g]chromen-7-one		
51	Octadecanoic acid		
52	Benzenamine, N-(1-methylethyl)-		
53	N-(4-Methoxyphenyl)-2-hydroxyimino-acetamide		
54	圖譜有化學式但分數不高		
55	圖譜有化學式但分數不高		
56	Pregnenolone		

表四、WD&REC GCMS 成分鑑別

	Coumn: HP-5MS（低極性）		Coumn: HP-INNOWAX（強極性）
編號	名稱	編號	名稱
1	.alpha.-Pinene	1	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene
2	(1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	2	D-Limonene
3	.beta.-Pinene	3	.gamma.-Terpinene
4	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	4	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
5	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	5	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate, (1S-endo)-
6	D-Limonene	6	Terpinen-4-ol
7	.gamma.-Terpinene	7	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-carboxaldehyde, 6,6-dimethyl-
8	2-Carene	8	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-(1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)]-
9	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	9	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-
10	Terpinen-4-ol	10	.alpha.-Terpineol
11	L-.alpha.-Terpineol	11	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-
12	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-	12	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-
13	Bornyl acetate	13	6-Epishyobunone
14	.alpha.-Cubebene	14	Isoshyobunone
15	Copaene	15	6-Epishyobunone
16	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-	16	Dehydroxy-isocalamendiol
17	.gamma.-Muurolene	17	2-Methoxy-4-vinylphenol
18	Caryophyllene		
19	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,7.alpha.,7a.alpha.,7b.alpha.)]-		
20	Humulene		

	Coumn: HP-5MS（低極性）		Coumn: HP-INNOWAX（強極性）
編號	名稱	編號	名稱
21	.gamma.-Muurolene		
22	6-Epishyobunone		
23	.alpha.-Muurolene		
24	.beta.-Bisabolene		
25	.gamma.-Muurolene		
26	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-		
27	Isoshyobunone		
28	Dehydroxy-isocalamendiol		

表五、噴霧法與壓力鍋法比較

	五官辨識	Isoimperatorin(%)	Notopterol(%)
噴霧法	味道較淡	0.14%	0.15%
壓力鍋法	味道濃厚	0.42%	0.53%

ps. 壓力鍋大小與吸附結果呈反比

表六、噴霧乾燥粉末性質

	洋菜膠	beta-糊精	PVP
藥物安定檢視	沒有變形、吸潮與結塊等現象。	沒有變形、吸潮與結塊等現象。	沒有變形、吸潮與結塊等現象。
乾減	5.1%	3.6%	3.5%
稀醇	95.32%	96.24%	95.32%
水抽提率	82.64%	87.32%	85.64%
水活性	0.32	0.28	0.35
粉體性質			
拍擊密度	84%	82%	88%
顆粒均勻度	80 分	80 分	80 分

表七、濃縮顆粒性質

	洋菜膠顆粒	β-糊精顆粒	PVP 顆粒
藥物安定檢視	沒有變形、吸潮與結塊等現象。	沒有變形、吸潮與結塊等現象。	沒有變形、吸潮與結塊等現象。
微孔表面積(m^2/g)	0	0	0
比表面積 BET(m^2/g)	2.32	2.10	2.44
含量測定			
Isoimperatorin(%)	0.98%	1.02%	0.97%
Notopterol(%)	1.12%	1.32%	1.03%

p.s. 未加壓前，粉末微孔表面積 13.4 m^2/g；粉末比表面積約 32.68 m^2/g

表八、台灣使用浸膏做為原料藥 SWOT

台灣使用浸膏做為原料藥 SWOT	
Strength (優點) 1. 無藥材管控成本,轉嫁給浸膏廠商。 2. 免除打碎，萃取，濃縮製程(不需買前段設備，精簡人力成本) 3. 可以縮短製程時間 4. 4.省電，少汙染	Weak (缺點) 1. 浸膏進貨還是有檢驗成本。 2. 浸膏廠商藥材來源無法追蹤。 3. 無原藥材存查，無法追朔藥材品質。 4. 無法得知浸膏中是否有其他添加物(防腐劑，安定劑等等)。 5. 液態到半固態，需冷藏保存。且較不穩定，有品質疑慮。 6. 藥典未收載，沒有驗收基準。 7. 批次之間的差異可能存在。
Opportunity (機會) 1. 台灣生產技術優於中國。 2. 品牌口碑接受度高。 3. 人員素質與觀念也較佳。 4. 研發能量優於中國。	Treat (威脅) 1. 大陸掌握藥材和浸膏來源,台灣處於被動。 2. 浸膏的成本和藥材一樣,都是大陸比較低。(在地生產) 3. 最終成品的成本結構,還是大陸佔優勢。(考慮原物料，人力，設備)

表九、中藥浸膏進口可行性評估初步整理

NO.	內容
1	中國大陸到目前為止，仍禁止使用浸膏直接入藥。雖然市場上可以買到中藥浸膏，但抽提方法，溶媒，條件等都由廠商自訂，沒有一套完整的管理方法。目前六家配方顆粒廠均不採用。(中藥檢)
2	日本津村的浸膏來自上海津村，不使用外來不知來源成分的浸膏。上海津村製藥有限公司的任務是為日本株式會社津村生產醫療用漢方製劑的中間體浸膏粉末，並從中國向日本出口。(自做自用)(網路資料)
3.	浸膏組成添加物可能不明，品質是最大疑慮。(製藥公會)
4.	日本法規顯示，浸膏和原料的管理層次是不同的，法理上看是允許有浸膏廠製備浸膏，但濃縮製劑廠生產濃縮製劑要自備濃縮單元+製劑單元，意即使用的浸膏是自家所生產，所以，還是沒有直接外購用浸膏做為原料藥直接生產的案例。(中村)
5	在確保浸膏品質的前提下，可以直接用浸膏做為原料藥。(中國)
6	浸膏如果這麼好，就不會出現濃縮細粒了。(康仁堂)
7	依許可證處方，藥材如何換算成浸膏就是一個問題。
8	浸膏應視同藥品，以許可證列管。生產產家應具備 GMP 認證。

附錄一、漢方製劑，生藥製劑的製造管理有關的自主基準
74 (594)　平成 19 年 5 月 21 日(2007.05.21) 藥物公報　(第三種郵便物認可)
第 2092 號

1.關於漢方製劑，生藥製劑的製造管理有關的自主基準

關於漢方製劑和生藥製劑的製造，適用於「有關醫藥品及醫藥部外品的製造管理及品質管理的基準省令」(平成 16 年 12 月 24 日厚生勞動省令第 179 號)，現在，日本漢方生藥製劑協會別添的「關於漢方製劑，生藥製劑的製造管理有關的自主基準」已完成，於平成 19 年 5 月 1 日開始實施，之前與你聯絡曾經提到在適用日之前應以從前的為準，因此，我把這條文提供給你做為業務的參考。

別添

關於漢方製劑，生藥製劑的製造管理有關的自主基準

謹啟 此協會是伴隨著平成 17 年 4 月的藥事法的全面實施，以漢方藥劑生藥製劑更上一層樓的品質確保和品質向上為目標，將現在的 GMP 中的「醫療用漢方提取製劑的製造管理和品質管理有關的自主基準（日本漢方生藥製劑協會自主標準)」以及「一般用漢方.生藥製劑的製造管理有關的自主基準（日本漢方生藥製劑協會自主標準)」有關的附件資料顯示改定的自主基準加以設定，於平成 19 年 5 月 1 日開始實施，在適用日之前應以從前的為準，有問題請與我們聯絡。

請充分理解本自主基準的設定趣旨，今後也請多加指導，合作。

還有，有關於本自主基準，請與以下的團體聯絡，謝謝你的合作。

敬具

記

1.附件

1) 漢方.生藥製劑的製造管理和品質管理有關的自主基準
2) 漢方.生藥製劑的製造管理和品質管理有關的自主基準的 Q&A
3) 附表　漢方.生藥製劑的製造管理和品質管理有關的自主基準的適用項目
4) 附圖　漢方.生藥製劑的製造管理和品質管理有關的自主基準的適用範圍

2.聯絡團體

日本製藥團體聯合會，東京醫藥品工業協會，大阪醫藥品協會，日本大眾

藥工業協會，日本藥品直販生產廠家協議會，全國家庭藥協議會，全國配置要協議會，日本生藥聯合會，東京生藥協會

關於漢方製劑，生藥製劑的製造管理以及品質管理有關的自主基準

（日本漢方生藥製劑協會自主基準）

為了使以生藥為原料的漢方製劑和生藥製劑的品質能夠確保，關於提取醫療用漢方製劑，想考慮化學藥品不同的特性憑藉所謂 GPM「醫療用漢方提取製劑的製造管理和品質管理有關的自主基準（日本漢方生藥製劑協會自主標準）」定義，於昭和 63 年 8 月 1 月實施。關於一般用漢方.生藥製劑「一般用漢方.生藥製劑的製造管理有關的自主基準（日本漢方生藥製劑協會自主標準）」定義，於平成 5 年 4 月 1 日實施。

現在，於平成 17 年 4 月 1 日施行的醫藥品等市場責任的一層明確化等目的「藥事法及採血及供血調解業取締法的一部將之改正之法律」，有關醫藥品的藥事法規定會成為一直以來作為基本的製造業的許可制度體系到作為基本的製造業和製造販賣業體系以後的事情，同時作為修正法第 21 條的 2 的第一號規定的製造販賣業的許可要件有關醫藥品等的品質管理的方法的基準「有關醫藥品，醫藥部外品，化裝品以及醫療機器的品質管理的基準的省令（平成 16 年厚生勞動省令第 136 號）」公布，於平成 17 年 4 月 1 日開始實施。

伴隨平成 17 年 4 月修正藥事法的實施，改正醫藥品 GMP 省令也開始實施，但是 GMP 的要求事項的主旨在改正後亦無改變，在修正法實施後製造業的許可要件的 GPM 也會成為承認要件，會進行作為承認要件的 GMP 適合性調查。

今年的製造販賣制度，GMP(品質管理的基準)等的引進，也為了現在的科學水準，回應社會的要求，追加 GMP 中「有關醫療用漢方提取製劑的製造管理以及品質管理基準（日本漢方生藥製劑協會自主基準）（昭和 62 年 8 月 5 日，藥監第 72 號）」以及「有關一般用漢方.生藥製劑的製造管理及品質管理的自主基準（日本漢方生藥製劑協會自主基準）」（平成 4 年 3 月 31 日，藥監第 23 號）施行改訂，確保並為了更上一層的品質努力。

本基準於平成 19 年 5 月 1 日起實施。施行日之前請按照從前的基準。

1.總則

（目的）

本基準是有關漢方製劑，生藥製劑「有關醫藥品及醫藥部外品的製造管理及品質管理的基準省令（平成 16 年 12 月 24 日厚生勞動省令第 179 號）（以下稱為「GMP 省令」。）以及「藥局等構造設備規則」（昭和 36 年 2 月 1 日昭和 36 年厚生省令第 2 號）等，定義對於生藥管理及製造工程有關的製造管理及品質管理的事項，以謀求有關的品質確保為目的，追加 GMP 省令。

（適用範圍）

本基準適用於有關應對漢方製劑，生藥製劑及生藥的製造所等業務的條項（但是，本基準在要是法施行令第二十條之四中定義的生藥粉末，另外只進行切細工程製造所除外）

（定義）

本基準使用的術語是「日本藥局方」以及「GMP 省令」、「藥局等構造設備規則」定義的用語。

另外的則以以下定義之。

生藥：從動植物，礦物等天然物得到，用於漢方製劑和生藥製劑的製造中使用的原料。

漢方提取，生藥提取：漢方製劑.生藥製劑的原料提取。

2.生藥管理的責任者

（責任者）

本基準適用的生藥（全形，切斷，粉末）處理的製造者等是製造所連同品質部門必須安排一個生藥管理的責任者。

1） 生藥管理責任者必須滿足再來的（1）以及（2）的資格要件

（1）有關於生藥的專門知識，俱備生藥品質鑑定能力。

（2）比起實務經驗要熟知生藥處理方法。

2)為了有關生藥品質的確保事項實際的管理其次的業務由責任者自行執行，或必要時由相應的指定的人進行。

（1）關於生藥檢體的採取方法事項。

（2）生藥的試驗檢查中，鑑別（含形態學的品質）有關結果的評價事項。

（3）生藥處理的負責人的教育訓練實施的相關事項。

（4）另外的生藥品質確保相關的事項

3.生藥的製造管理及品質管理

（適用範圍）

於生藥採納作為全形、切斷、粉末生藥的產品出貨的製造所（以後稱

為「全形，切斷，粉末生藥製造所」)，製造提取原料的製造所（以後稱為「提取原料藥製造所」)，接受將生藥分成小份包裝等製造所（以後稱為「生藥最終製品製造所」)，製造使用粉末生藥的生藥末製劑的製造所（以後稱為「生藥磨製劑製造所」）適用。

（產品標準書）

產品標準書為以下事項訂定之。

1） 製造步驟相關之事項

記載在全形、切斷、粉末生藥製造所方面生藥的切細以及粉末等加工條件。

2） 規格及試驗方法相關事項

(1)成份和特性的確認方法及基準

(2)切斷生藥的粒度試驗

(3)鑑別試驗

(4)其他認為必要的試驗

3） 委託生藥的切細及粉末加工的情況的注意事項

(1)委託之前，加工前生藥品質的確認對於委託者的責任。

(2)訂定接受切細以及粉末加工品的基準，接受時施行試驗檢查。

4） 買進切斷以及粉末生藥的情況之注意事項

接受切斷以及粉末生藥的情況下，確認全形生藥的品質。

5） 輸送相關的事項

(1)容器以及包裝的材質、形態

(2)考慮注意防止輸送過程中品質的惡化

（製造管理）

製造管理基準書以以下的事項訂定之。

1) 批次管理相關事項

比起產地、捆綁包裝形態、生藥的外觀等的差異，管理批次。

2) 保管管理相關的事項

(1)妥善保管使不產生發霉、被昆蟲、老鼠等汙染以及品質惡化情況者、適切的設備、方法以及條件並管理之。

(2)進行燻蒸的情況下，都根據日局生藥總則，取其記錄。

（品質管理）

品質管理基準書以以下的事項訂定之。

1) 檢體採取方法相關之注意事項

為了試驗檢查的檢體採取需訂定每項生藥的性質，考慮例如產地、外

型、流通、捆綁包裝形態等，個別以必要的方法將以訂定。

2) 有必要再次試驗檢查的情況的處理之相關事項

生藥長期保管的情況下，為應映其特性，以再次試驗訂定之。

3) 生藥參考品的保管的相關事項

4) 紀錄保管相關事項

4.漢方提取、生藥提取的管理製造以及品質管理

（適用範圍）

適用於原料藥提取製造所。

（產品標準書）

產品標準書以以下事項訂定之。

1) 製造步驟相關事項

(1)製造規模（標準的放入量）

(2)生藥的混合順序

(3)抽提率、溶媒

(4)升溫速度

(5)抽出速度

(6)抽出時間

(7)抽出回數

(8)固液分離方式

(9)濃縮方式

(10)乾燥方式

(11)標準收率

(12)使用其他特殊方法的情況的詳細說明

2) 工程的收量以及收率的相關事項

關心原料用生藥、製造規模等，訂定收量及收率範圍。

3) 規格以及試驗方法相關事項

（製造管理）

遵守在製造工程方面「GMP 省令」和「藥局等構造設備規則」，同時自生藥、漢方提取.生藥提取物中取出易滋生微生物的相關成分，進行特別考慮對於微生物的汙染防止的製造管理。

自生藥到漢方提取、生藥提取的製造管理狀況都明確地瞭解者來整理記錄。同時將記錄事項相關的「GMP 省令」的記錄事項充分考慮，特別追加以下事項。

(1)秤量抽取

(2)抽出工程
抽出的機體編號、放入量、抽出溶媒量、升溫時間、抽出溫度、抽出時間
(3)濃縮工程
濃縮的機體編號、濃縮溫度、濃縮時間
(4)乾燥工程
乾燥的機體編號、乾燥溫度、乾燥時間、乾燥提取量
(5)其他製造管理必要的事項

（品質管理）
除了承認書中記載的規格以及實驗方法外，設定必要的相應的品質管理項目，進行品質的保證。
1) 以承認書記載的規格以及實驗方法以外設定的理想的試驗項目為例，列舉出以下幾個項目。
（1）重新進行成為管理可能的成分的定量試驗
（2）微生物試驗
（3）物性試驗
2）漢方提取、生藥提取參考品的保管相關事項

5.漢方製劑、生藥製劑的製造管理以及品質管理
（適用範圍）
適用於生藥的最終產品製造所、生藥末製劑製造所，以及製造漢方提取、生藥提取有關最終製劑的主劑之產品製造所（稱為「提取製劑製造所」）。
（製造管理以及品質管理）
遵守在製造工程方面「GMP 省令」和「藥局等構造設備規則」，同時自生藥、漢方提取.生藥提取物中取易滋生微生物的相關成分，進行特別考慮對於微生物的汙染防止的製造管理。
除了承認書中記載的規格以及實驗方法外，設定必要的相應的品質管理項目，進行品質的保證。

1) 以承認書記載的規格以及實驗方法以外設定的理想的試驗項目為例，列舉出以下幾個項目。
（1）重新進行成為管理可能的成分的定量試驗
（2）微生物試驗
（3）物性試驗
（4）其他

有關漢方製劑、生藥製劑的製造管理以及品質管理相關的制主基準的問答

1 總則			
	NO	問題	回答
目的	1	此處所說的漢方製劑是指什麼？	指厚生省藥物局監督修訂的「一般用漢方處方的引導」（藥業時報社）中記載的處方等，現在我國普遍、經常使用的成書中記載的處方為基準的製劑。
	2	此處所說的生藥製劑是指什麼？	只有由生藥組成的製劑或是以生藥做為主劑的製劑。
	3	「生藥的管理」到底是怎樣的一件事呢？	由於生藥是天然物，其外觀、性狀、成分等容易產生批次間的偏差。因此為了確保以生藥當作原料的製劑的品質安全，在自原料到最終製品的製造管理以及品質管理層面，與合成原料不同的處理上必須有所注意。
適用範圍	4	可適用且被接受的製造所，具體來講是怎樣的製造所呢？	適用於具有漢方製劑、生藥製劑以及生藥的製造所等的 GMP 省令的製造所（包括外國的製造所）將本基準加以使用。（附圖、附表的製造所（①②③④⑤適用） 再者，進行切細、粉末加工的製造所不適用於此應用
	5	本基準於漢方製劑、生藥製劑的進口情況也適用嗎？	應該要與國內品有同樣的品質保證。
	6	為了製造調配生藥提取的醫藥品，對於從生藥提取製造業者處購買的生藥提取物的製造業者，可否理解成其並不適用於本基準？ 另外，上述的情況中，不是生藥提取物，而是使用	生藥提取物或是當粉末生藥為最終製劑的主劑的情況皆適用。

		於自原料批發商購買粉末生藥的情況時應如何考慮呢？	
2 負責生藥管理的責任者			
責任者	7	生藥的管理者是如何判斷並任命的呢？	充分考慮資格要件之後，GMP省令中訂定的醫藥品的製造管者、製造部門的責任者、和品質部門的責任者一樣，考慮能力、資格等資格要件作出是切的判斷並任命之。
	8	生藥管理的責任者是否在所有使用本基準的製造所都是必須的呢？	無論採用全形、切細、粉末任一種處理方式，對於使用本基準的製造所都是必要的。提取製劑的最終製劑的製造業者（附圖、附表的製造所⑥）並沒有直接處理到生藥所以沒有設置也無妨。另外，只有進行將生藥末製劑細分的製造所也不需要。
	9	同一法人有多個處理生藥的製造所的情況下，分別負責的責任者是必要的嗎？	同一法人有多個處理生藥的製造所的情況下，收進生藥的製造所是必要的，但是只有收進已完成生藥的製造所沒有也無妨。可以舉出以下例子： 對於製造所 A 收進生藥並進行切細、粉末加工，這對於 B 製造所來說，製造最終製品的情況下，B 製造所並沒有設置責任者的必要。 對於製造所 A 收進生藥並進行切細、粉末加工，將這作為原料而 B 製造所進行提取的情況下，B 製造所並沒有設置責任者的必要。
	10	這裡的生藥品質鑑定能力為何？	生藥鑑別試驗、理化學試驗，生藥正確來源的鑑定，以及能夠給予品質評價的能力。

	11	實務經驗具體來說是怎麼樣的呢？	從事生藥或漢方製劑、生藥製劑的製造管理或是品質管理上相關的業務，直接接觸、處理生藥的實務（品質管理、保管、加工等），原則上大概要具備 3 年以上的經驗的程度。只是，對於生藥的研究、栽培、購買或販賣若是有 2 年以上的經驗者，若有 1 年以上的上述經驗也沒問題。
	12	是否可認為生藥管理的責任者進行對生藥試驗檢查中鑑別結果的相關評價相關的適合與否的判定，生藥品質的總和判斷是由品質部門進行的？	可以。只是務必要尊重生藥管理責任者的判定。
	13	生藥管理的責任者為了將生藥品質確保的相關事項實際的管理，而接著自行進行訂定的業務，並在必要時按照指定者來行動，指定者是否有這樣的資格要件？	特別是沒有資格要件，生藥管理的責任者和或是同程度者以是否有知識或經驗來看待。
	14	對於外國製造所生藥品質管理也是必要的嗎？	即使是在外國製造所的，其製造也必須由滿足資格者負責該業務。
	15	生藥處理負責人是？	對於品質試驗業務、原料保管業務、製造業務，為直接處理生藥的特定負責人（2 人以上）。
	16	有關教育訓練的實施，具體的內容由各公司訂定可以嗎？	是的。只是定期地實施。另外需留下記錄。
	17	其他作為生藥的品質確保相關的事項，舉例來說是如何的呢？	作為生藥管理責任者的業務，本自主基準的 3 生藥製造管理以及品質管理相關業務會成為目標，各公司請按照實際情況訂定。

3 生藥的製造管理以及品質管理			
產品標準書	18	作為製造順序相關事項，其他又有什麼樣的工程？	選別工程、篩過工程、乾燥工程、滅菌工程等。
製造管理	19	即使有「訂定確認成分或特性的方法和基準」，但是成分或特性的確認方式以及基準具體來說是怎麼樣的呢？	確認成分或特性的方法：為了原料品質的確保，進行我們認為有效的生藥的確認試驗、定量試驗、外觀試驗等。另外，各公司可獨自設定有關基準。
	20	切斷生藥的粒度試驗為何？	為了自生藥的提取物抽出率安定化切斷生藥的粒度規格由各公司訂定、記載於產品標準書，按照切斷生藥的形狀設定並實施不同的實驗方式。
	21	鑑別試驗是指什麼？	日局和局外原規定中記載的每種生藥之來源、異物試驗作為基本。特別是官能試驗、形態學的檢查是重要項目。
	22	在鑑別試驗方面，切斷生藥（切細）的情況具體來說是如何的程度的實施？	以全形生藥的鑑別試驗為準。
	23	其他必要的試驗具體來講是怎麼樣的試驗呢？	例如說，根據生藥個別的狀況，可以考慮進行以下的試驗： 1. 日局、局方外原規定、承認書別紙規格以外的成分、提取物含量、乾燥減量、灰分以及酸不溶性灰分試驗等。 2. 生藥的處理法和炮製法的檢查。 3. 依據生藥個別的特性的試驗（馬兜鈴酸、殘留農藥試驗、微生物限度試驗）等。
	24	「確認生藥的品質」是如何的一件事呢？而且，切細以及粉末加工的接受基準的訂定是怎樣的事？	品質的確認即是委託者將全形生藥的品質加以確認。接受基準的訂定則是，3 生藥的製造管理以及品質管理（產品標準書）2）按照規格以及實驗方法，在各公

			司責任的方面認為必要的接受的試驗檢查等的基準的設定。
	25	全形生藥的品質的確認是如何的一件事呢？	儘可能地取得全形生藥的成績書。再者，如果能夠確認生藥切片得到的全形生藥之品質，那麼以切斷生藥的試驗成績書來代替也可以（包含接受試驗）。
	26	全形生藥和切斷生藥的批次不一定要是同一批，新批次的發生是否可能？	自切斷生藥的批次若能夠追蹤到全形生藥的批次則可能。
	27	有適切的設備、方法、條件的訂定以及管理嗎？各公司採用獨自的方法可以嗎？	有不會造成品質惡化的管理方式的話，各設獨自的事物也可以。
	28	進行燻蒸的情況下，遵照日局生藥總則好嗎？再者，燻蒸的紀錄保存是否是按照醫藥品 GMP？	進行燻蒸的情況下，遵照日局生藥總則。另外，記錄的保存參考 GMP 省令第 22 條。
	29	生藥的保存通常放入密閉容器中保存嗎？那全形生藥的情況下呢？	不論切斷、全形生藥的保存通常都是以放入密閉容器中保存作為原則。再者，生藥的品質保持上通常使用的麻袋、草蓆等也得到讚賞。
	30	生藥的檢體採取方法具體來說是怎樣的方法？	參考日局生藥試驗法，能夠保證植物的部位（藥、根、根莖、果實等）連同的特性對應的物性的抽樣方法。
	31	長期保管是指什麼程度？	雖然對於保管方法不可一概而論，自生藥的生育以及供給循環考慮，指大約做過一年以上。
	32	相應這些特性是怎樣的事？	生藥為天然物，和合成物不同，即便是乾燥品仍是天然的，雖然有些經過一段時間仍幾乎沒有變化，不同物品組織、形態的含有成分可能有所變化。例如說，考慮植物的各部位，即草、根、

			木、皮、種子、葉的話，葉子部分的生藥的精油成份、水分等容易散失，雖然根據不同的保管條件也會有所差異，但仍應是再試驗時必須考慮的項目。 另外，切斷生藥的保管應該要特別的考慮變化相關的事項。其他，容易產生發霉、被昆蟲、老鼠等汙染以及品質惡化相關，應考慮在試驗基準的設定。
	33	生藥參考品的適切保管條件為何？	以日局生藥總則為準，放入密閉容器，避免濕氣以及蟲害等地加以保管。再者，請參考日局解說書、生藥總則的注釋。
	34	保管生藥參考品時，為避免影響到試驗檢查，是否可適當地使用防蟲、防霉劑呢？	只要可以進行全形生藥的品質確認即可。
	35	生藥參考品的形狀不是全形可以嗎？	若仍能夠確認全形生藥的品質則可以。
	36	生藥參考品的保管要如何進行？	參考 GMP 省令第 21 條來設定之。
	37	品質管理的記錄的保存期間是多少年？	參考 GMP 省令第 21 條來設定之。再者，從原料到最終製劑的來歷，設定最理想的保存時間。
4 漢方提取、生藥提取的製造以及品質管理			
製造管理	38	將事先混合好的生藥作為原料使用的情況產生新的批次，關於混合好的生藥 1 回的試驗檢查就可以了嗎？	進行在使用中所有的批次之試驗是必要的，混合後，造成新批次的原料，進行所有必要的試驗。
	39	抽出時間是否包含進行固液分離的次工程的時間？	不包含。
	40	其他在製造管理上必要的事項具體來說為何？	過篩條件、混合時間、洗淨、製造用水、秤量器的編號等。
品質管	41	物性試驗具體來說是怎樣	漢方提取、生藥提取的色調比較

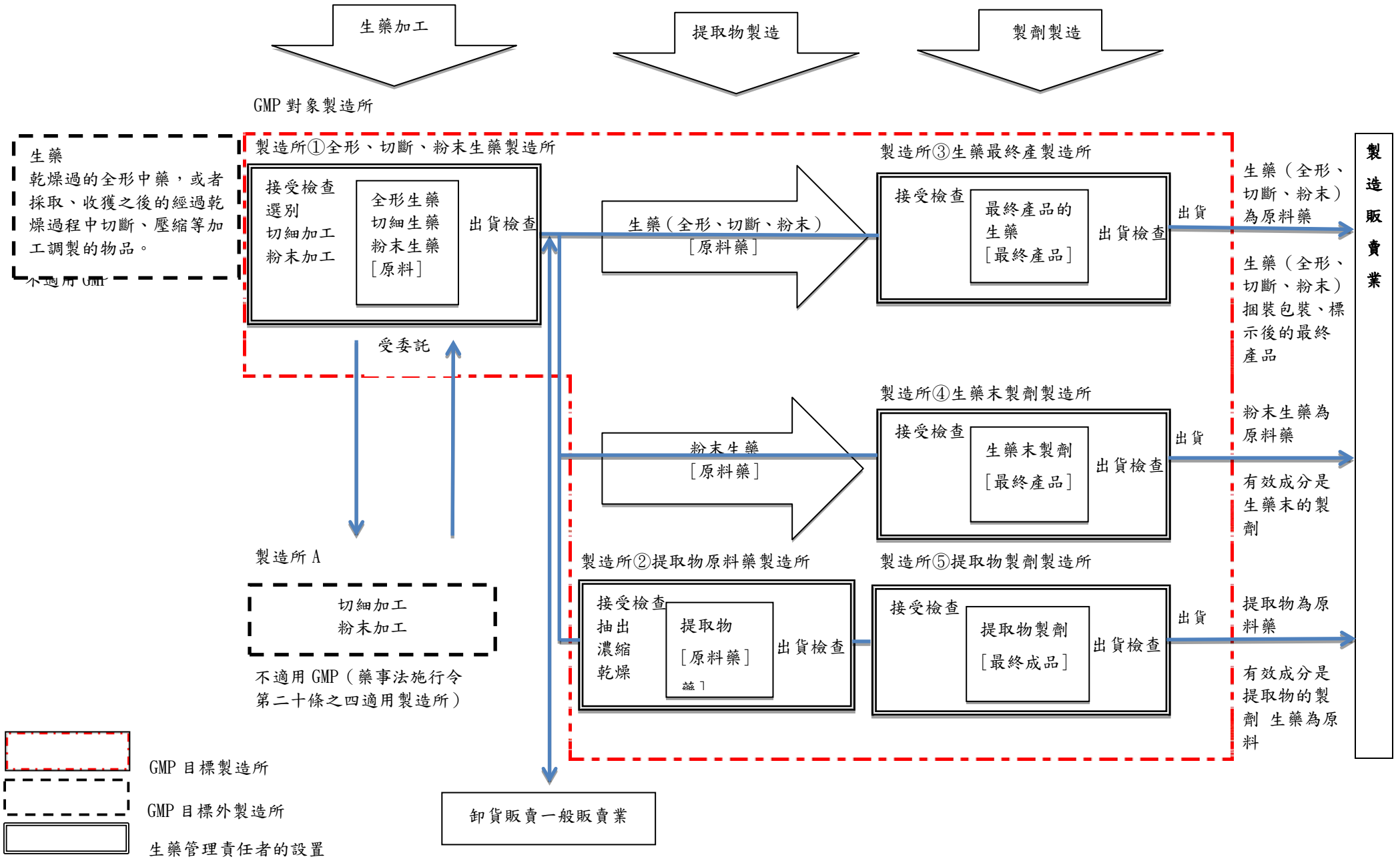
理		的試驗？	試驗、容積密度測定等。
	42	參考品的保管是如何進行的？	參考 GMP 省令第 21 條來設定之。
5 漢方製劑、生藥製劑的製造管理以及品質管理			
製造管理以及品質管理	43	可能成為管理可能的新成分？	必要時設定相應的（自主設定定量成分），期定量法以及含有量的基準在標準書中有記載。以下所示的為可以者。 指標成分（昭和 60 年 5 月 31 日藥審二地 120 在「醫療用漢方提取製劑的處理相關」所示，為了與承認申請時的標準湯劑比較而採用的成分）以外，後來要求追加的承認書設定的定量成分。 為了生藥、漢方提取物、生藥提取物、最終產品的管理，公司本身設定的定量成分。
	44	作為理想試驗項目的最終製劑的設定所例示的微生物試驗，微生物試驗的內容是否可以應映各公司的實際狀況對試驗實施管理？	微生物試驗的內容請參考衛生試驗法注解以及醫藥品、化妝品的微生物試驗（倉田浩、石關忠一、宇田川俊一著（講談社））等設定之。 再者，有關菌數的限度，在日局參考情報 12.非無菌醫藥品的微生物學的品質特性中定義生藥以及配合生藥的製劑得微生物限度基準值的限度作為目標來努力。
	45	物性實驗具體來說是怎樣的實驗？	漢方製劑、生藥製劑（顆粒劑、散劑、錠劑等）的色調比較試驗、顆粒劑、散劑等的容積密度測定以及錠劑的硬度試驗等。
	46	其他具體來說要考慮怎樣的試驗？	漢方製劑、生藥製劑的殘留農藥相關的自主基準為基礎的試驗等。

漢方製劑、生藥製劑的製造管理以及品質管理相關的自主基準的適用項目

自運用項目 主基準 適用的製造所	生藥管理責任者的配置	自主基準的適用項目		
		生藥的製造管理以及品質管理	漢方提取、生藥提取的製造管理以及品質管理	漢方製劑、生藥製劑的製造管理以及品質管理
製造所① 全形、切斷、粉末生藥製造所	×	○	×	×
製造所② 提取製造所	○	○	○	×
製造所③ 生藥最終製品製造所（原料藥：生藥（全形、切斷、粉末))	○	○	×	○
製造所④ 生藥末製劑製造所(原料藥：粉末生藥)	○	○	×	○
製造所⑤ 提取物製材製造所(原料藥：提取物)	×	×	×	○

O：適用 X：不適用

日本漢方製劑、生藥製劑的製造管理及品質管理相關的自主基準的適用範圍



編號：CCMP102-RD-019

台灣特有種藥用植物—阿里山十大功勞改善高脂飲食誘導非酒精性脂肪肝小鼠之代謝體及保健功效研究(2-1)

彭文煌
中國醫藥大學

摘　要

本計畫主要目的，擬以高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝之模式，應用代謝體學研究理論，釐清阿里山十大功勞對脂肪肝的保健功效，並系統化瞭解藥材品質對其功效的相關性。本團隊已建立基於質譜及核磁共振完整之代謝體分析平台，以期完成阿里山十大功勞改善脂肪肝之保健功效開發，並有效建立其品質管制方法。

阿里山十大功勞藥材大量收集及成分萃取皆已完成，藥材產地皆為嘉義縣山區，採集日期及時間皆為同一批次，皆有進行植物標本建立。動物實驗預計將於103 年三月底完成動物實驗。

小蘗鹼、巴馬汀、黃連鹼、藥根鹼、表小蘗鹼、甲基黃連鹼、非洲防己鹼、木蘭花鹼與芸香苷 9 種指標成分之“一測多評”法之分析方法建立部分，目前除了非洲防己鹼標準品純度較低外，其他化合物皆利用 HPLC 完成測定其純度，並收集 NMR 圖譜。部分化合物已完成分析條件之測試，目前標準品皆能在 HPLC 上分開，正在建立以藥材中某一典型成分(小蘗鹼)為對照物，建立該成分與其他成分間的相對相應因子，完成一測多評分析方法建立，本研究建立之方法具有快速、穩定之特色。

關鍵詞：阿里山十大功勞、代謝體學、非酒精性脂肪肝、代謝疾病、中藥品質管制

Number: CCMP102-RD-019

Metabolomics and Health Function Study of *Mahonia oiwakensis* on High-Fat Diet Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Mice (2-1)

Peng, Wen-Huang
Department of Chinese Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine Resources, College of Pharmacy, China Medical University

ABSTRACT

This study was intended to investigate the effect of *Mahonia oiwakensis* (MO) using the proteomics and metabolomics on high-fat diet-induced NAFLD model in mice. This research was categorized into three axes: (1) Quantitative analysis of multi-components using a single marker (QAMS) to simultaneously measure the content of the marker components in the Chinese medical material *MO*. Based on the simultaneous measurements of the eight major alkaloids and one flavonoid of *MO*, we established a QAMS investigation model and verify the feasibility of the measurement. (2) Research on the mice fed a high fat diet to induce NAFLD used metabolomics to explore how the molecular mechanism of *MO* improved fat deposits in livers. Based on fat metabolic disorders of mice triggered by a high-fat diet, this research used a NMR-based metabolomics strategy to analyze metabolic changes in different biological samples of blood, urine, and liver tissue. We also used biological information software to establish the metabolic path of *MO*.

We have finished the collection and extraction of MO. The animal study had been started at 31 Aug and will be finished the induction of NAFLD and treatment of MO at 31 Dec. The measurements of liver tissue, serum and metabolomics will be finished at 28 Feb 2014. We have established a QAMS investigation model and verify the feasibility of the measurement. We further used principal components analysis (PCA) to obtain data to establish the standard plot of the optimal harvest time for *MO*. The research results serve as a reference for regulating the quality control guidelines of *MO,* and possessed rapid and stable properties.

Keywords: *Mahonia oiwakensis,* nonalcoholic fatty liver disease, metabolomics, quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS), quality control

壹、前言

轉譯醫學(translation medicine)在藥物的研發過程中，注重將基礎研究的成果轉化成臨床上的治療方法，即強調從基礎到臨床，再從臨床回到基礎(Bench to Beside & Bedside to Bench, B-B-B)的雙向連接模式。故從這一角度來講，中藥新藥的開發和研究思路，即遵循從**臨床**到**基礎**再回到**臨床**的模式和路線。因此，中醫藥之研究可說是天然藥物的轉譯醫學研究。

在臺灣，近年來隨著經濟的發展以及飲食習慣的西化，肥胖、糖尿病以及高血脂症的人口越來越多，流行病學研究指出，一般人口中非酒精性脂肪肝病的盛行率約為 12-37%，已成為臺灣肝病領域中重要之疾病，但目前臨床上尚未有良好之治療方式，因此我們希望從中草藥的寶庫中，開發安全有效之植物性抗脂肪肝用藥。

在我們的先期研究中發現，阿里山十大功勞具有減輕四氯化碳誘導的肝臟脂肪變性，降低血清中 AST、ALT、三酸甘油脂及膽固醇含量。我們合理的推測此藥物可能具有減輕非酒精性脂肪性肝病之能力，即改善肝臟脂肪堆積，降低肝臟脂肪浸潤。此外，我們針對阿里山十大功勞化學成分進行初步分析，**阿里山十大功勞主要的有效部分**為**生物鹼**及**黃酮類**，且其**抗氧化、抗發炎**及**保肝**效果相當顯著(此結果已發表在 *International Journal of Molecular Sciences*, accepted. 18 October, 2012，且目前正在申請臺灣(案號：102103459)及中國大陸專利(案號：201310034208.0))。根據**民間使用經驗、先前的研究報告**及今年度預**試驗結果顯示，我們合理的推測，此本土藥用植物具有相當高的後續研究與開發價值。**

美國 FDA 尚未批准專門針對非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的治療藥物，且目前臨床上僅針對改善週邊組織胰島素抗性[1]和降低氧化壓力[2]為臨床上的主要治療策略。許多臨床研究報告指出，目前治療方案無法顯著改善 NASH 在肝臟中的病理變化，合併治療將成為未來臨床研究的趨勢[3]。我們希望能從臺灣本土藥用植物中，尋找一安全又有效之藥用植物，作為治療或預防該疾病的方法。

研究指出阿里山十大功勞含有的已知活性成分(生物鹼類及黃酮類)具有降血脂與改善代謝疾病的作用[4, 5]，有些具有胰島素增敏劑(insulin sensitizer)的活性[5, 6]，有些則有降低氧化壓力的作用[7, 8]，為天然的抗氧化物。**但更不同的是，阿里山十大功勞萃取物中**，具有**植物藥中"有效部位"及"有效部位群"的概念**。所謂**有效部位，是從植物中提取一類相近之化學**

性質、具有活性的化學成分，其較之原藥材更富集了有效成分，同時也**保留植物藥用藥特色(多成分、多標靶、多層次的協同作用)**。其作用機制和路徑表現為**多向性、多層面、多靶點**的**藥理特點**，有著單一化合物所不可比擬的優勢。因此，在我們的研究中，我們將以阿里山十大功勞的**單獨給予不同的有效部位(生物鹼、黃酮類等不同層)**，或者**將不同活性部位配伍組合合併給予(生物鹼、黃酮類最佳組合配伍)**，進行改善脂肪肝的藥理研究，如此**保留植物藥的特性**，研發中藥新藥或者是植物藥新藥為主要目標。

阿里山十大功勞(*Mahonia oiwakensis* Hayata)為臺灣特有種，主要分佈於阿里山一帶，乾燥葉、果實、莖及根皆可入藥。全年均可採集，除去粗梗及雜質，曬乾或陰乾。民間用於病毒性肝炎、類風濕關節炎，腸炎等發炎性疾病，用法皆為浸泡藥酒使用[9]。我們研究團隊研究阿里山十大功勞已邁入第三個年頭，主持人彭文煌教授發現，利用阿里山十大功勞的根部的酒精萃取物，能預防四氯化碳所造成的急性肝損傷。此外，我們也發表有關阿里山十大功勞鎮痛、抗發炎及降低化學性肝損傷的 SCI 文獻三篇於國際期刊 [10, 11, 12]。

共同主持人鄭皓元助理教授在 99 年的國科會計劃中研究發現，**阿里山十大功勞主要的有效部分**為**生物鹼**及**黃酮類**，且其抗發炎及保肝效果相當顯著。**根據民間使用經驗、再加上先前研究報告及預試驗結果，顯示此本土藥用植物具有相當高的開發價值。**

研究指出阿里山十大功勞含有的單體活性成分(生物鹼類及黃酮類)具有降血脂與改善非酒精性脂肪肝的作用[4, 5, 13, 14, 15, 16, 17]。**但不同的是，阿里山十大功勞萃取物中**，具有**植物藥中"有效部位"及"有效部位群"的概念**，所謂**有效部位，是從植物中提取一類相近之化學性質、具有活性的化學成分**，其較之原藥材更富集了有效成分，同時也**保留了植物藥的用藥特色(多成分、多標靶、多層次的協同作用)**。其作用機制和途徑表現為**多向性、多層面、多靶點**的**藥理特點**，有著單一化合物所不可比擬的優勢。

本研究依循著中醫藥轉譯醫學的思路(臨床→基礎→臨床)，繼續研究阿里山十大功勞萃取物中有效部位配伍，將可減少服用劑量，提高療效。也讓我們對於萃取物的質量評價及品質管控更趨完善，以確定臺灣特有種之藥用植物阿里山十大功勞之基原鑑定，最後，並利用實證醫學驗證其活性及安全性，進行阿里山十大功勞中藥藥理學、蛋白質體學與代謝體學之基礎研究，以提升臺灣民間本土中草藥之應用價值。並依健康食品與植物新藥等相關管理法規，進行臨床前試驗，開發臺灣特有種藥用植物成為健康

食品與植物新藥。

阿里山十大功勞(*Mahonia oiwakensis* Hayata)為臺灣特有種，主要分佈於阿里山一帶，乾燥葉、果實、莖及根皆可入藥。全年均可採集，除去粗梗及雜質，曬乾或陰乾。民間用於病毒性肝炎、類風濕關節炎，腸炎等發炎性疾病，皆為浸泡藥酒使用[9]。

該屬植物世界上有 100 多種，臺灣約有三種[9]。十大功勞屬植物含有大量的生物活性物質，主要有效成分是生物鹼。原小蘗鹼(proberberine, PB)型生物鹼有小蘗鹼(berberine)、巴馬汀(palmatine)和藥根鹼(jatrorrhizine)，雙卞異喹林(bisbenzyl-isoquinoline, BBIQ)型生物喊有小蘗胺(berbamine)、尖刺喊(oxyacanthine)和異粉防己鹼(isotetrandrine)，阿朴啡型(aporphine, Apo)型生物喊有木蘭花鹼(magnoflorine)。我們研究也發現，阿里山十大功勞中含有相當高的黃酮類成分，是其抗氧化作用的來源。藥理研究部分也指出，阿里山十大功勞對於肺癌也有相當顯著的抑制作用，能有效的促進癌細胞凋亡[18]。我們在 99 年以及 100 年前半段的國科會計畫中執行結果亦顯示，阿里山十大功勞其抗發炎及保肝效果相當顯著。再加上根據民間使用上的經驗、以及各方面的研究報告以及本研究的預試驗結果，顯示臺灣特有種阿里山十大功勞具有相當高的藥用植物開發價值。

本計畫的主要目的為開發阿里山十大功勞改善脂肪肝保健功效，以期能成為臺灣本土特色保健食品：阿里山十大功勞對高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝的代謝體學研究。本研究計畫中，將以代謝體學研究平台為核心，針對”**藥用植物品質管制**”及”**藥用植物作用機制**”兩個層面，分別針對阿里山十大功勞的保健功效以及品質管制著手，開發臺灣特有種藥用植物。

貳、材料與方法

第一部分：一測多評法同步測定阿里山十大功勞藥材中多種指標成分的含量分析

一、一測多評法原理

近年來，有關這方面的研究報導逐漸增多 [13-19]，且在2010 版中國藥典一部中，已經收錄利用該法測定部分藥材的品質管控。“一測多評”法(quantitative analysis of multi-components by singlemarker, QAMS) 與校正因數法原理基本一致，並且提出利用相對保留時間(Retention time, RT) 差和峰形判斷目標峰的位置。

在一定的範圍內(線性範圍內)成分的量(品質或濃度)與檢測器偵測回應成正比，即W=*fA*。在進行阿里山十大功勞藥材多成分品質管制時，以藥材中某一典型成分(有對照品供應者)，我們利用小蘗鹼(berberine)為內標，建立小蘗鹼與其他成分(巴馬汀(palmatine)、黃連鹼(coptisine)、藥根鹼(jatrorhizine)、表小蘗鹼(epiberberine)、甲基黃連鹼(worenine)、非洲防己鹼(columbamine)、木蘭花鹼(magnoflorine))之間的相對校正因子，通過校正因子計算其他成分的含量。只測定一個成分(標準品可得到者)，來實現多個成分(標準品難以得到或難供應)的同步測定。

一測多評法其原理如下：

假設某樣品中含有i個成分:

$$\frac{W_i}{A_i} = f_i (i = 1, 2, \cdots, k, \cdots, m)$$

式中A_i為成分峰曲線下麵積；W_i為成分濃度。選取其中一成分k為內標，建立成分k與其他成分m之間的相對校正因數 (RCF)。

$$f_{km} = \frac{f_k}{f_m} = \frac{W_k \times A_m}{W_m \times A_k}$$

由此可推導出定量計算公式：

$$W_m = \frac{W_k \times A_m}{W_m \times A_k}$$

式中A_k為內標峰曲線下麵積，W_k為內標成分濃度。Am 為其他成分m峰曲線下麵積，W_m為其他成分m濃度。

二、藥材採集

將採集之藥材經陰乾後進行分析。阿里山十大功勞之實驗藥材產地為臺灣嘉義縣阿里山鄉奮起湖，鑑定者為本系郭昭麟主任及鄭皓元助理教授。

三、對照品溶液的製備

取小蘗鹼、巴馬汀、黃連鹼、藥根鹼、表小蘗鹼、甲基黃連鹼、非洲防己鹼、木蘭花鹼與芸香苷9種指標成分，精密稱定，分別為6.00、5.68、1.78、0.66、6.27、4.44、4.64、0.64和1.94mg置於5mL定量瓶中、用70%甲醇定容。於4℃保存備用。

四、供試品溶液的製備

精密稱定阿里山十大功勞藥材粉末1g，置於100mL定量瓶中，加入甲醇-鹽酸(100: 1) 50 mL，超音波震盪30min，吸取25mL於圓底燒瓶，回收溶劑，用70%甲醇溶解並定量轉移至5mL容量瓶中，過0.22 μm濾膜，即得。

五、分析方法確效(validation)

線性：吸取上述混合對照品溶液20、15、10、5、1、0.8、0.6和0.4μL，進樣分析，每個濃度進樣3次，取平均值。以進樣量對峰面積積分值進行回歸處理，得各成分的標準曲線。

校正因子計算：取混合對照品溶液，進樣20、15、10、5、1、0.8、0.6及0.4 μL測定，按公式以小蘗鹼(berberine)為對照成分，分別計算巴馬汀、黃連鹼、藥根鹼、表小蘗鹼、甲基黃連鹼、非州防己鹼、木蘭花鹼與芸香苷的相對校正因子。

精密度:精密吸取同一供試品溶液40 μL連續進樣5次,記錄峰面積; 精密吸取同一供試品溶液40 μL連續進樣3 d，每天3次，記錄標準品曲線下麵積，分別計算日內(intraday)和日間(interday) RSD。

穩定性：精密吸取同一供試品溶液40 μL，分別於配製後的0、2、4、8、12、24、48和72 h測定面積積分值，計算RSD。

加樣回收率：精密稱取適量已知含量的阿里山十大功勞粉末(藥材60目) 6份,加入一定量的混合對照品溶液,按供試品溶液處理方法製備樣品，測定、外標法計算加樣回收率。

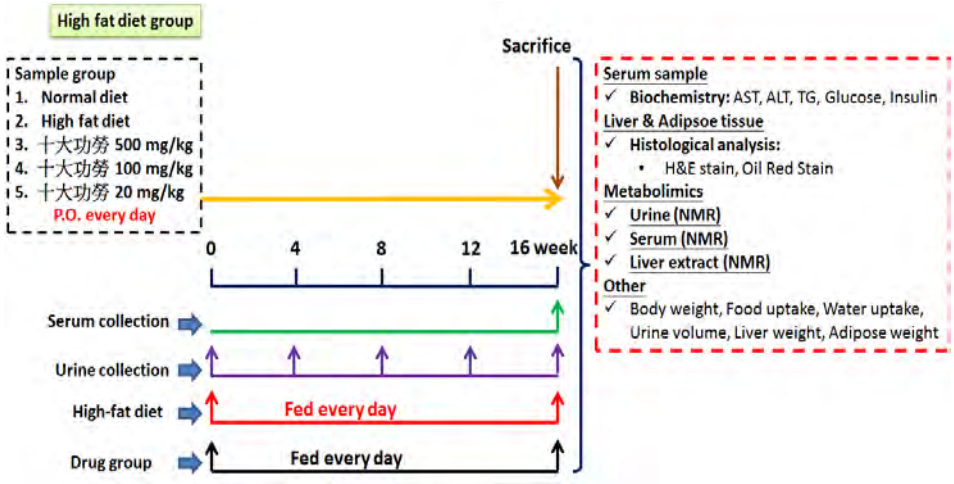
統計學方法：一測多評法與常規法的結果比較，採用t檢驗。

第二部分：阿里山十大功勞對高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝的藥效學研究

一、藥材萃取

將採集之藥材經陰乾後，磨碎並以50%乙醇冷浸、萃取，減壓濃縮後得到粗萃取物。所有藥材均採自同月份，藥材產地為臺灣嘉義縣阿里山鄉奮起湖、鑑定者為本系郭昭麟主任及鄭皓元助理教授。

二、動物實驗進行



動物實驗流程圖

本研究選用♂C57BL6/J 小鼠週齡約 7~8 週，體重 20-25 g，購於樂思科生物科技有限公司。高脂肪飼料(60% fatty acid, D12492)進口之 Research Diet，飼料為無限制。藥物為阿里山十大功勞 50%酒精萃取物 (500, 100, 20 mg/kg)，給藥途徑為經口給予，分別於給藥後於第 16 週犧牲動物。取下脂肪組織、肝組織進行傳統病理檢查方式 (H&E 及 Oil Red O 染色) 診斷脂肪肝之情況。

三、血清生化值分析

血清檢體利用傳統生化檢驗評估：AST、ALT、Triglyceride、Glucose 在血中活性，Insulin 含量測定利用 ELISA kits 測定。

四、組織病理學分析

觀察慢性肝損傷時，肝細胞的受損、脂肪堆積、壞死或是否有纖維化等變化，將肝組織做 H&E 染色以便評估肝脂肪堆積程度，並以冷凍切片 Oil-Red O 染色觀察脂肪油滴的堆積與否。評估標準如下：

脂肪肝	脂肪(脂質油滴)堆積於肝臟中比例
正常	0%
輕微	<10%
中度	10~33%
嚴重	33~66%
極嚴重	66~100%

五、生物樣品採集

尿液及血液採集時間點為 0、4、8、12 及 16 周，以便進行代謝軌跡分析(metabolic trajectory analysis)，肝臟組織則於動物犧牲時採取。

尿液：給藥後採集 12 小時尿液記錄尿液體積，尿液置於離心管中，以 15000 rpm/min 離心 10 分鐘，取上清液，-80℃冷凍保存待分析測定。

血液：使用麻醉劑進行麻醉後，眼窩取血，將血液放入採血管內，搖勻，使抗凝劑與血液充分結合，靜置 2h，5000rpm/min 離心 10 分鐘，去除紅血球等物質。採集上層無色血漿至微離心管中。進行二次高速低溫離心(轉速:15000 rpm/min；時間:10 分鐘；溫度:4)℃。採集上清液，放入 EP 管內。分組標號，加蓋密封，-80℃冰櫃內保存。

肝組織：在冰上取肝，然後置於冰生理鹽水洗淨，置於液態氮中冷凍後，存於-80℃冰箱。

六、生物樣本前處理：尿液

冰水混合溶液解凍尿液樣品，取尿液 500 μL 於微離心管中，加入 PBS 磷酸鹽緩衝溶液 50 μL（81:19 v/v，包含 0.2 M Na_2HPO_4 和 0.2 M NaH_2PO_4；pH7.4），加入 10%的重水進行磁場鎖定和 0.03%的 TSP 作為化學位移內標，之後轉入微離心管中，4℃，13000 rpm，離心 20min，取上清液 500 μL 於內徑 5mm 的 NMR tube 中。

七、生物樣本前處理：血液

根據血清自身的內穩性及實驗操作的方便性，我們參考之前研究[20]，修正方法為：冰水混合溶液解凍血清樣品，取血清 250 μL 於微離心管中，加入 350 μL D2O，4℃，13000 rpm，離心 20min，取上清液 500 μL 於內徑 5mm 的 NMR tube 中。

八、生物樣本前處理：肝臟組織萃取方法，兩相提取法[20]

組織 50mg→10ml 玻璃離心管→1.5ml 蒸餾水+1.5ml 甲醇+3ml 氯仿→加蓋渦旋 1min→超音波提取 25min→離心 25min（3500rpm，室溫）→分別移至 25 ml 茄形瓶→減壓濃縮機乾燥→得到兩項萃取物。

(一)有機相→1ml MeOD 溶解→2 ml 離心管→13000 rpm 離心 10 min→800 μl→NMR tube。

(二)水相→750 μl MeOD+750 μl Buffer→2ml 離心管→13000rpm 離心 10 min→800 μl→NMR tube。

第三部分：阿里山十大功勞對高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝的代謝體學研究 (NMR平臺部分)

一、NMR 分析條件

NMR 儀器使用部分將於中研院高磁場核磁共振中心進行分析。因實際實驗情況不同，預試驗實驗條件參考 Nicholson [20]等人發表論文修正，以

下實驗條件為實際操作條件。

(一) 尿液部分

溫度 25℃，600MHz (Bruker AVANCE 600 AV，中研院高磁場核磁共振中心)，序列：1D NOESY (RD-90º-t1-90º-tm-90º-acquire)，檢測光譜寬為 8 kHz，混合時間(mixing period，tm) 0.15 s，延遲時間(recycling delay, RD) 2 s，自由感應衰減(free induction decay, FID)信號累加次數為 64 次，採樣點為 32 k。線寬 0.5Hz，FID 信號經過傅立葉變換為一維 NMR 譜圖。

(二)血液部分

使用不同的核磁序列對血漿中代謝物進行測定，包括：NOESY 序列壓制水峰的同時檢測血漿中全部代謝物；CPMG 序列可以壓制水峰和大分子物質的信號，從而檢測血漿中的小分子代謝物；擴散編輯序列（LED-BPP 序列）則可以去掉小分子物質，測定血漿大分子代謝物。我們進行的實驗**以 CPMG 序列及擴散編輯序列**為主。

Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG)脈衝序列：自旋弛豫延遲為 320 ms，自由感應衰減為 64K 資料點，譜寬為 8000 Hz，掃描次數：64 次。

血漿擴散編輯實驗使用的是雙極脈衝對縱渦流延遲脈衝序列（bipolar pulse pair-longitudinal eddy current delay pulse sequence，LED_BPP）進行，梯度振幅設置為 76.5G/cm，擴散弛豫時間為 200 ms。資料點為 32K，譜寬為 8000 Hz，掃描次數：128 次。

(三)組織萃取物部分

針對組織樣本中不同的提取成分，選擇合適的 NMR 試驗。

水相提取物需要一個特殊的水峰壓制，故應選擇 1D NOESY-presat，當然也可選擇 CPMG presat 序列進行水峰壓制，以便消弱一些殘餘蛋白的 NMR 信號；脂類提取物不需要水峰壓制，故可選擇普通的脈衝序列。普通脈衝序列採用簡單的 90°脈衝，弛豫時間為 2 s，資料點為 32K，譜寬為 20 ppm，掃描次數：64 次，獲得時間為 1.36 s。Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG)脈衝序列：自旋弛豫延遲為 320 ms，自由感應衰減為 32K 資料點，譜寬為 20 ppm，掃描次數：64 次，獲得時間為 1.36 s，自旋回波延遲時間為 400 ms。

二、NMR 圖譜處理

採用 MestReNova NMR 處理軟體對所有 NMR 圖譜進行傅立葉轉換並進行相位、基線調整，同時以 TSP (NMR 水層萃取物分析內標，若是有機層則使用 TMS 作為內部標準品)的化學位移(0.0 ppm)為標準對譜圖進行化學位移的校正。以 0.04ppm 為單位，對δ0.5-10.0ppm 區域的圖譜進行等寬度分割，共分成 238 個小的區域，將 4. 5～6.0 區間的譜峰強度設置為零，以消除殘留的水峰及對分析結果的影響。然後對圖譜進行分段積分，即得到與化學位移值段相對應的積分值，將資料保存在 EXCEL 檔案中，並進行標準化(normalization)。採用**面標準化(normalization)法**，將資料標準化處理，使資料集中在 0-1 範圍內，用於多變數統計分析。

三、代謝物指認

我們利用 1D H-NMR 圖譜，結合每個代謝物的化學位移(chemical shift)，裂峰情況(Multiplicity)及偶合常數(J-Coupling Constants)，主要指認依據參照文獻(尿液部分[20]；血液部分[20-22]；肝臟組織部分[20, 23])。為了更進一步進行代謝物的結構確定，我們將有疑問的代謝圖譜或代謝物，使用 2D NMR 方法，1H-1H 相關光譜(COSY)、全相關光譜(TOCSY)、J-分辨光譜、1H-13C 異核單量子相關光譜(HSQC)以及異核多鍵相關光譜(HMBC)等。從圖譜中指認了 20 種化合物，包括氨基酸，有機酸等。這些內源性代謝物存在於多個生化過程中，如氨基酸代謝、能量代謝和脂類代謝。

第四部分：阿里山十大功勞對高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝的代謝體學研究(GC-MS平臺部分)

採用 GC/MS 對所得生物樣本進行方法建立，並採用標準品和 NIST 資料庫對所得圖譜進行指認。得到的 TIC 圖譜借助 XCMS 軟體進行預處理，資料標準化後採用 SIMCA-P 套裝軟體對所有組進行主成分分析(PCA)、偏最小二乘法-顯著性分析(PLS-DA)，所得標誌物通過已有的代謝體學資料庫，對其生理生化作用以及代謝途徑進行分析。

一、血液分析方法的建立

樣品製備

血漿：解凍樣品，取上清液 100μl 加入 250μl 乙腈，4℃10000g 條件下離心 10min，取上清液 150ul，30℃真空乾燥 12 小時。加入 30ul 甲氧胺(15mg/ml)吡啶溶液，70℃反應 1h。加入 50μlMSTFA，40℃反應 90min。加入 700μl 正庚烷(0.1mg/ml 二十四烷)，vortex。

肝臟組織：

肝組織：切去一定量肝組織，稱量，置於均質機中，加入 2 倍(ml/g)超純水，均質 30s 至無組織碎塊，取 200ul 勻漿置於小離心管中，加入 150μl 氯仿，450μl 甲醇，冰浴超音波震盪 10min，取上清液 150μl 於進樣瓶中，氮吹乾燥。加入 30μl(15mg/ml) 鹽酸甲氧胺吡啶溶液，70℃反應 1h，再加入 50μlMSTFA(含 1%TMCS)，40℃反應 90min，最後加入 500μl 正庚烷(內含 0.1mg/ml 二十四烷)，vortex 1min。

二、GC-MS 分析條件

DB-5MS 色譜柱 (5% 二苯基 -95% 二甲基聚矽氧烷，30m×0.25mm×0.25um)；進樣口溫度 260℃，無分流進樣，進樣量：1ul；載氣：氦氣；載氣流速：1.0ml/min;程式升溫條件：60℃ 3min7℃/min 140℃ 4min5℃/min 180℃ 6min5℃/min 280℃ 2min EI 離子源：溫度，200℃；電子能量，70eV；全掃描模式，掃描範圍 m/z 50-650；傳輸線溫度：280℃。

三、資料格式的轉換

將所要分析的 GC/MS raw 格式檔導入 Xcalibur(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham, Ma, USA)，轉換為 NetCDF 格式，轉化方法為：打開 Xcalibur 介面，進入 Tools 中 File converter 功能表中，選擇原資料的格式和存放位置，點擊 Add Jobs，選擇預轉換的資料格式（cdf）和存放位置, 點擊 convert 即可。

四、數據的預處理

導入 XCMS 軟體中(http://metlin.scripps.edu/download/)進行峰對齊、切割。軟體設置參數：full width at half-maximum: fwhm =4; S/N cutoff value: snthresh = 10, max =20), group (bw = 10)，將軟體所生成 txt 檔導入 Excel 軟體中進行歸一化處理。歸一化方式：面歸一化。

五、利用 Xcalibur 軟體結合 NIST 資料庫進行指認

Xcalibur 為 Thermo Finnigan 工作軟體，與 NIST 或 Wiley 質譜資料庫連結，，本方法主要針對單峰及比較純的峰，優點是方便，快捷。

六、利用 AMDIS 自動解卷積處理軟體及 NIST 資料庫進行指認

原理：採集每個離子的品質色譜圖，將所有保留值和形狀相同的品質色譜峰的離子組合成一張質譜圖。

七、代謝路徑分析

此部分實驗我們將利用 Ingenuity Pathways Analysis(IPA)生物資訊學軟體分析代謝路徑，將研究中脂肪肝小鼠給予藥物後內源性代謝物之變化，

利用生物資訊學軟體評估可能影響之代謝路徑與訊息路徑。IPA 為一商品化套組，已可運用在許多不同”體學”研究，並且能將受改變之訊息路徑網路以圖的方式呈現。IPA 中已有模組可分析代謝路徑，其相關資料庫為國外著名之代謝體資料庫(HMDB, CAS, PubChem CID, KEGG identifiers)。

八、化學計量學分析及統計學分析

運用 SIMCA-P^{+}13.0 軟體將積分資料進行中心化和規格化後（centering and scaling），進行主成分分析（principal component analysis ,PCA）。以主成分向量為坐標軸作圖(二維，稱為 scores 圖)，可以反映類別間的差異。資料的主成分 loading 圖的分析與得分圖對應的主成分載荷圖能夠反映導致類別間差異的主要元素。

資料以平均值 ± 標準差（mean±SD）表示。運用 SPSS 15 軟體，採用獨立樣本 T 檢驗進行統計分析，以 $p<0.05$ 作為具有統計學意義的界限

參、結果

第一部分：一測多評法同步測定阿里山十大功勞藥材中多種指標成分的含量分析

一、產地調查及藥材鑑定

主持人彭文煌教授於今年六月期間帶領研究團隊成員前往嘉義縣阿里山區進行阿里山十大功勞的產地調查，針對阿里山十大功勞的棲息地做一考察，調查結果發現阿里山十大功勞多生長於闊葉林和山坡(Figure 1)，嘉義縣仍然有相當豐富的藥用植物資源。

團隊亦前往奮起湖區之中興苗圃進行考察及拜訪(Figure 2)，針對將來阿里山十大功勞 GAP 生產基地的合作計畫做一前期規劃，圖中顯示阿里山十大功勞有以種子發芽方式做育苗方法。在本計劃結案後我們將會進行綜合評估，考慮將繼續進行阿里山十大功勞 GAP 生產基地之建構計畫。

針對阿里山十大功勞之基原鑑定部分，我們收集了臺灣產十大功勞屬中的三種植物，對其葉片外型做鑑定(Figure 3)，結果發現，臺灣產三種十大功勞屬的植物，其葉片外型明顯不同，我們並請團隊成員李孟修老師以 DNA barcoding 方式再行確認(data not shown)，其結果與外型鑑定結果一致，因此可以確認我們所採集之藥材為阿里山十大功勞正品。

二、一測多評法

藥材萃取方法及供試品製備：參照中國藥典中黃連之分析方法修正，如材料方法中所述，同時實驗亦分析動物用之萃取物中生物鹼含量。分別取黃連藥材及阿里山十大功勞藥材粉末（過 40 目篩）100mg 及 200mg，精密稱定，置於 50 mL 錐形瓶，精密加入甲醇-鹽酸（100:1）的混合液 50 mL，稱重，超音波震盪 30 min，冷卻後加甲醇-鹽酸（100:1）的混合液補足重量，過濾，取續濾液過 0.45 μm 濾膜，10 μL 進樣。

HPLC 色譜條件建立：我們利用兩種不同長度的 HPLC 分離管柱：1. Kinetex 5μ C_{18} column (150 × 4.6 mm, 5.0 mm) (Phenomenex) 及 2. Kinetex 5μ C_{18} column (250 × 4.6 mm, 5.0 mm) (Phenomenex)，以下列分離條件做分析：移動相以 0.05 mol/L KH_2PO_4-ACN (54:36) (3 g SDS/L, pH=4) 等梯度 (Isocratic) 沖提，流速 1 mL/min，分析時間 70 分鐘，柱溫 28 °C，注入量 10 μL，檢測波長為 345 nm 及 250 nm。

由於 Kinetex 5μ C_{18} column (250 × 4.6 mm, 5.0 mm)在此條件中能達到分離程度較好之圖譜 (Figure 4 及 5)，我們選此管柱搭配上述條件，建立一

測多評之方法學開發。圖中顯示，在黃連藥材中，Worenine 成分並未檢出，而其他生物檢出封順序如以下：木蘭花鹼 (magnoflorine) 、非洲防己鹼(columbamine)、藥根鹼(jatrorrihzine)、表小蘗鹼 (epiberberine)、黃連鹼(coptisine)、巴馬汀(palmatine)、小蘗鹼(berberine)。其中，Magnoflorine 為 250 nm 波長下才可檢出；在阿里山十大功勞藥材中，木蘭花鹼(magnoflorine) 、非洲防己鹼(columbamine)、藥根鹼(jatrorrihzine) 巴馬汀(palmatine)、小蘗鹼(berberine)為含量較高之生物鹼。

三、方法學確效(method validation)：

目前我們已經完成方法學的確效(method validation)，此部分會再 12/15 號結果中完整呈現，目前已將報告格式完成，將會把數值填入。

(一)線性關係考察

(二)偵測極限 (limits of detection (LOD))

(三)定量極限 (limits of quantification (LOQ))

(四)校正因子計算

(五)準確度 (precision (Intraday and Interday))

(六)重複性 (repeatability)

(七)穩定度 (stability)

(八)回收率(accuracy (recovery))

(一)線性關係 (Table 1**)：**精密吸取上述混合對照品溶液 20、15、10、5、1、0.8、0.6 和 0.4μL，進樣分析，每個濃度進樣 3 次，取平均值。以進樣量對峰面積積分值進行回歸處理，得各成分的標準曲線，並計算回歸方程：小蘗鹼 (berberine): y = 36881x + 13435，巴馬汀(palmatine): y = 40736x + 9123.6，藥根鹼 (jatrorrihzine): y = 46349x + 7796.8，黃連鹼 (coptisine): y = 35439x + 1362.3、表小蘗鹼(epiberberine): y = 32257x + 73.302、非洲防己鹼(columbamine): y = 10173x + 1684.6、木蘭花鹼 (magnoflorine): y = 45547x + 6889.4。實驗結果表明小蘗鹼在 0.98-125 μg、巴馬汀在 0.98-125 μg、藥根鹼在 0.98-62.5 μg、黃連鹼在 0.98-62.5 μg、表小蘗鹼在 0.78-25 μg、非洲防己鹼在 3.90-125 μg、木蘭花鹼在 0.98-62.5 μg 線性關係良好。

(二)偵測極限 (Limits of detection (LOD))：偵測極限如 **Table 1** 所述。

(三)定量極限 (Limits of quantification (LOQ))：定量極限如 **Table 1** 所述。

(四)校正因子計算：取混合對照品溶液，進樣 20、15、10、5、1、0.8、

0.6 及 0.4 μL 測定，按公式以小蘗鹼(berberine)為對照成分，分別計算巴馬汀(palmatine，簡稱 P)、黃連鹼(coptisine，簡稱 Çop)、藥根鹼(jatrorrhizine，簡稱 J)、表小蘗鹼(epiberberine，簡稱 E)、非洲防己鹼(columbamine，簡稱 Col)、木蘭花鹼(Magnoflorine，簡稱 M)的相對校正因子 (**Table 2**)。

(五)精密度 (precision)：

1. 日內(intraday)精密度：精密吸取黃連或阿里山十大功勞同一供試品溶液 100 μL 連續進樣 6 次，記錄標準品色譜峰面積。黃連供試品中小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼、黃連素、表小蘗鹼、非洲防己鹼和木蘭花鹼峰面積日內精密度的 RSD 分別如 **Table 3** 所述。
2. 日間(interday)精密吸：精密吸取取黃連或阿里山十大功勞同一供試品溶液 100 μL 連續進樣 3 天，每天 3 次，記錄標準品連連連色譜峰面積。小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼、黃連素、表小蘗鹼、非洲防己鹼和木蘭花鹼，以上七個成分峰面積的日間精密度如 **Table 3** 所述，以上數據均表明儀器較為穩定。

(六)重複性 (repeatability)：

分別稱取黃連藥材粉末(40 目) 100 mg 及阿里山十大功勞藥材粉末(40 目) 200mg，兩種藥材粉末各取 6 份，精密稱定，依照“藥材萃取方法及供試品製備”條件，製備供試品。測定黃連藥材中小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼、黃連素、表小蘗鹼、非洲防己鹼和木蘭花鹼的平均含量分別為 54.80、10.56、2.75、19.32、9.81、16.07、和 4.74 μg/g，RSD 如 **Table 3** 所述，以上數據均表明本實驗具有良好重複性。

(七)穩定性 (stability)：精密吸取同一供試品溶液 100 μL，分別於配製後的 0、2、4、8、12、24、48 和 72 h 測定面積積分值，計算 RSD。黃連中小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼、黃連素、表小蘗鹼、非洲防己鹼和木蘭花鹼穩定性的 RSD 如 **Table 3** 所述，表明處理後的供試樣品在 48 小時內穩定。

(八)加樣回收率：精密稱取適量已知含量的阿里山十大功勞粉末(藥材 60 目) 6 份，加入一定量的混合對照品溶液，按供試品溶液處理方法製備樣品，測定、外標法計算加樣回收率。加樣回收率結果如 **Table 3** 所述。

(九)一測多評法與常規法結果比較研究

分別精密吸取供試品溶液各 10 μL 注入 HPLC。採用外標法和一測多評法計算黃連藥材及阿里山十大功勞藥材中七種生物鹼的含量 (Table 4)。

第二部分：基於核磁共振的代謝體學平臺運用於阿里山十大功勞藥材研究

目前利用 ^{1}H-NMR 代謝體學技術分析阿里山十大功勞藥材萃取物的分析方法已經建立(Figure 6)，且已經從圖譜中鑑定出近 40 種初級代謝產物(Table 5)，目前針對藥材中次級代謝物做一鑑定，並利用不同 2D-NMR 圖譜：全相關譜(total correlation spectroscopy, TOCSY)、相關譜(correlation spectroscopy, COSY)、異核單量子相關譜(又稱"近程碳氫相關譜")(heteronuclear single quantum coherence, HSQC)，異核多鍵相關譜 (又稱"遠程碳氫相關譜") (heteronuclear multiple bond coherence, HMBC)，將所鑑定出之代謝產物確認(Figure 7, Figure 8, Figure 9, and Figure 10)。

第三部分：阿里山十大功勞對高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝的藥效學研究

阿里山十大功勞之實驗藥材產地為臺灣嘉義縣阿里山鄉奮起湖，鑑定者為本系郭昭麟主任及鄭皓元助理教授。我們將藥材烘乾至恆重打粉並秤重，共得到 1107 克莖部乾品藥材，以 50 % 乙醇浸泡七天，將萃取液減壓濃縮，重複以上過程共四次，最後將浸膏以 40 °C 烘箱烘乾，共得萃取物 60 克，藥材浸膏萃取率為 5.42 %。我們並分析阿里山十大功勞 50%酒精萃取物中生物鹼含量(**Table 6**)，結果發現，阿里山十大功勞的酒精萃取物中，小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼和木蘭花鹼的含量百分比分別為 5.91 %、2.24 %、2.04 %和 1.14 %，萃取物中含有一定量之生物鹼，因此，生物鹼可能為阿里山十大功勞的指標成分之一。

我們接著用體外抗氧化試驗來評估比較此次藥材萃取物與之前發表之萃取物是否有相關性，如表所述(Table 7)，阿里山十大功勞 50%酒精萃取物具有相當的抗氧化作用。

針對體液及組織萃取物的代謝體學研究方法，我們利用正常之小鼠，已經完成初步方法學開發，利用核磁共振方法從血液中鑑定出近 40 種代謝物(Figure 11)，尿液部分由於 pH 變化較大，我們目前採用多點校正方式處理圖譜。肝臟萃取物部分脂肪層的 NMR 圖譜終能清楚看見不同之大分子訊號 (Figure 12)，能準確定量肝臟中不同大類脂質之含量。GC-MS 部分血液方法學目前也已完成，鑑定出之代謝物如表所述(No Table **9**)。

動物實驗部分目前仍在進行中，第二年會完成，如圖所述(Figure 13)，藥物

給予組小鼠體重較高脂肪飼料誘導組小鼠為低，但沒有統計上差異，預計再觀察 4 周後，體重部分有統計上之顯著差異。

肆、討論

近年來中藥質量控制的方法學上有長足的進步，最常見的例子為 HPLC 化學指紋圖譜技術在中藥質量控制中廣泛的應用。此方法主要利用以下兩個特性：“物種色譜特徵的唯一性”和“種內樣品間的相似性”，來反映出中藥材中複雜的化學成分資訊。此外，近年來興起的一測多評法(QAMS)，主要為測定藥材中數個指標成分來表徵藥材質量的控制方法，其指標成分關注的多為次生代謝產物(secondary metabololites)。但其中的問題就是缺乏其中的一些對照品，例如黃連中的表小檗堿(epiberberine) (純化難度極大)和黃連鹼(coptisine)，因而限制了常規的方法來進行多指標成分的質量控制。因此，我們在本計畫中開發了多種生物鹼的一測多評法(QAMS)，來解決標準品缺乏的問題，即只測定其中一個成分（如小蘗鹼），求得小蘗鹼與其餘待測成分間的內在函數關係，建立一測多評的品管方法，並且與傳統定量分析法做分析比較。

實驗中我們以黃連作為對照藥材，開發多種生物鹼的一測多評法，原因如下：阿里山十大功勞與黃連皆為含生物鹼豐富之藥材，因此選擇其為對照藥材；此外，黃連分析方法開發較為完善，可借用黃連在品質管制的研究思路；再者，黃連為大品種且具名氣之藥材之一，若將來放入阿里山十大功勞研究當中，進行比較性研究，可將臺灣本土特有種藥用植物推廣至國際。

計畫中的數據顯示，我們所開發的生物鹼分析方法，均表明較為穩定之方法，在第一年計劃結束後，我們將繼續完成在不同儀器及不同管柱上分析方法的再現性，將數據整理，運用於十大功勞類藥材、黃連類藥材，以及黃連相關之方劑中生物鹼的含量測定，將此分析方法以及應用範圍發表於分析方法之相關期刊。

然而此兩種方法仍然有一定的缺陷性，尤其是忽略了初級代謝產物(primary metabolites)。近年來已有相當之研究指出，一次代謝物在中藥藥效上也扮演重要角色，雖然單獨給予此一次代謝產物，並非藥效學活性成分，但是此類成分對於中藥中的活性成分往往發生在藥物動力學層次，或者是藥效學層次的協同作用。因此，為了補足我們在研究計畫裡開發的品質管制方法的不足，我們決定進一步採用能反映出藥材化學成分整體性(holistic view)、系統性的(systems) ^{1}H-NMR 代謝體學技術來評價阿里山十大功勞的品質。此方法不僅能全面檢測分析藥材中的初生代謝產物(如糖類

(carbohydrate)、氨基酸類成分)和次生代謝產物(如生物鹼類(alkaloids)、黃酮類(flavonoids)、三萜類(triterpenoids)成分)，而且結合多變量統計分析(Multivariate Statistical Analysis)，例如：主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判別分析 (PLS-DA)等化學計量學方法，可應用於不同產地、不同品種、不同採收期藥材的質量控制和評價。因此，我們研究團隊在討論後，也決定在今年的計畫中先行開發 ^{1}H-NMR 代謝體學技術來分析阿里山十大功勞藥材中的化學成分。目前，我們已經完成了阿里山十大功勞 50%酒精萃取物的一維以及二維之核磁共振圖譜，我們從萃取物中鑑定出四十種一次代謝物，還包含五種生物鹼，此結果並用 GC-MS 以及二維 NMR 光譜做確認。此結果可運用於第二年度之不同採收期間之方法分析。

動物部分目前仍然在陸續進行中，預計能在第二年度計畫中完成，若依照實驗預期成果，阿里山十大功勞應有一定的改善脂肪肝及降血脂功效。

伍、結論與建議

本計畫預期將開發阿里山十大功勞改善脂肪肝、降血脂的保健功效，使之成為具有特色之臺灣本土藥用植物，我們也將針對其活性成分的藥理作用機轉做深入探討。此外，對於阿里山十大功勞可能遇到的質量控制問題，計畫中也開發一系列不同品質管制方法，希望將來能在不同批次萃取物的一致性評估上能發揮作用。

本計畫為多工具及多方法研究，經費部分相當緊張，人力部分亦相當缺乏，希望中醫藥司能夠繼續給予支持，開發本土藥用植物。

方法的再現性是以重複測量分析來評估，分析的再現性是以同一標準品製備中注射六次來檢測，滯留時間的 RSD 及各成分含量用來估算再現性，結果如表三所示，8 個阿里山十大功勞成分滯留時間及各成分含量的 RSD 均小於 3%，可符合定量分析，8 個阿里山十大功勞成分的滯留時間及各成分含量的 RSD 呈現差異，前者可能導因於各成分的含量不同，後者可能是樣品製備上的誤差。

阿里山十大功勞對高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝的體重變化，高脂飼料餵食小鼠至第十週後發現，高劑量阿里山十大功勞萃取物干預後，第九週以後體重已有差異(如圖 4)，目前動物實驗仍然在進行中，待實驗完成後，會將阿里山十大功勞對高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝的代謝體學資料補上，將可知道阿里山十大功勞對高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝的代謝路徑。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部中醫藥司計畫編號 CCMP102-RD-019 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. Mazza, A., et al., *The role of metformin in the management of NAFLD.* Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 716404.
2. Madan, K., et al., *Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).* J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(10): p. 930-5.
3. Corey, K.E. and N. Chalasani, *Should combination therapy be the paradigm for future nonalcoholic steatohepatitis clinical trials?* Hepatology, 2011. **54**(5): p. 1503-5.
4. CoCMa, P., *Medical plant resources in Taiwan*. 2003, Taipei: Department of Health, Executive organ.
5. Chao, J., et al., *Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanol root extract of Mahonia oiwakensis in mice.* J Ethnopharmacol, 2009. **125**(2): p. 297-303.
6. Chao, J., et al., *Hepatoprotective effect of shidagonglao on acute liver injury induced by carbon tetrachloride.* Am J Chin Med, 2009. **37**(6): p. 1085-97.
7. Chao, J., et al., *Antioxidant, Analgesic, Anti-Inflammatory, and Hepatoprotective Effects of the Ethanol Extract of Mahonia oiwakensis Stem.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(2): p. 2928-45.
8. Hu, Y. and G.E. Davies, *Berberine inhibits adipogenesis in high-fat diet-induced obesity mice.* Fitoterapia, 2010. **81**(5): p. 358-66.
9. Yang, Q.H., et al., *Effect of berberine on expressions of uncoupling protein-2 mRNA and protein in hepatic tissue of non-alcoholic fatty liver disease in rats.* Chin J Integr Med, 2011. **17**(3): p. 205-11.
10. Wei, W., et al., *A clinical study on the short-term effect of berberine in comparison to metformin on the metabolic characteristics of women with polycystic ovary syndrome.* Eur J Endocrinol, 2012. **166**(1): p. 99-105.
11. Wu, C.H., et al., *Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation via reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells.* J Food Sci, 2011. **76**(2): p. T65-72.
12. Yokoyama, A., et al., *Quercetin metabolites and protection against peroxynitrite-induced oxidative hepatic injury in rats.* Free Radic Res, 2009.

43(10): p. 913-21.
13. 于霄, et al., *一測多評法測定淫羊藿中朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C及淫羊藿苷的含量.* 中國中藥雜志, 2010(24): p. 3310-3313.
14. 王智民, et al., *“一測多評”法中藥質量評價模式方法學研究.* 中國中藥雜志, 2006(23): p. 1925-1928.
15. 朱晶晶, et al., *一測多評法同步測定人參和三七藥材中多種人參皂苷的含量.* 藥學學報, 2008(12): p. 1211-1216.
16. 宋亞芳, et al., *一測多評法測定吳茱萸中吳茱萸內酯、吳茱萸堿及吳茱萸次堿的含量.* 中國中藥雜志, 2009(21): p. 2781-2785.
17. 馮偉紅, et al., *一測多評法測定秦皮藥材與飲片中香豆素類成分的含量.* 中國中藥雜志, 2011(13): p. 1782-1789.
18. 黃山君, et al., *一測多評法測定白芍中芍藥苷與芍藥內酯苷的含量.* 中國中藥雜志, 2011(06): p. 780-783.
19. 黃帥, et al., *一測多評法同步測定柴胡藥材中3種皂苷的含量.* 時珍國醫國藥, 2010(04): p. 838-840.
20. Beckonert, O., et al., *Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts.* Nat Protoc, 2007. **2**(11): p. 2692-703.
21. Wu, Q., et al., *1H NMR-based metabonomic study on the metabolic changes in the plasma of patients with functional dyspepsia and the effect of acupuncture.* J Pharm Biomed Anal, 2010. **51**(3): p. 698-704.
22. Tang, H., et al., *Use of relaxation-edited one-dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma.* Anal Biochem, 2004. **325**(2): p. 260-72.
23. Vinaixa, M., et al., *Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease.* J Proteome Res, 2010. **9**(5): p. 2527-38.

柒、圖、表

Table 1 黃連及阿里山十大功勞藥材中所含生物鹼標準曲線

The calibration curves, linear range, LOD and LOQ of investigated components in *Coptis chinensis* Franch.

Analytes	Regression equation	R^2	LOD (g/mL)[a]	LOQ (g/mL)[b]	Linear range (g)
Berberine	y = 36881x + 13435	0.9999	0.30	0.98	0.98-125
Palmatine	y = 40736x + 9123.6	0.9999	0.26	0.98	0.98-125
Jatrorrihzine	y = 46349x + 7796.8	0.9999	0.29	0.98	0.98-62.5
Coptisine	y = 35439x + 1362.3	0.9999	0.28	0.98	0.98-62.5
Epiberberine	y = 32257x + 73.302	0.9999	0.18	0.78	0.78-25
Columbamine	y = 10173x + 1684.6	0.9999	0.98	3.90	3.90-125
Magnoflorine	y = 45547x + 6889.4	0.9996	0.31	0.98	0.98-62.5

[a] LOD: limits of detection

[b] LOQ: limits of quantification

Table 2 黃連及阿里山十大功勞藥材中所含生物鹼相對校正因子(relative correcting factors (RCFs) of alkaloids)

Injection volumn (μL)	Values of RCFs					
	$f_{B/P}$	$f_{B/J}$	$f_{B/Cop}$	$f_{B/E}$	$f_{B/Col}$	$f_{B/M}$
20 ul	1.105	1.282	0.938	0.871	1.34	1.223
15 ul	1.107	1.280	0.947	0.862	1.35	1.203
10 ul	1.099	1.270	0.934	0.825	1.35	1.206
5 ul	1.102	1.250	0.920	0.849	1.33	1.208
2 ul	1.062	1.189	0.901	0.866	1.20	1.205
Mean	1.095	1.254	0.928	0.855	1.31	1.209
RSD (%)	1.711	3.079	1.902	2.191	2.38	0.666

RCFs: relative correcting factors

RSD: relative standard variation

B: berberine

P: palmatine

J: jatrorrihzine

Cop: coptisine

E: epiberberine

Col: columbamine

M: magnoflorine

Table 3 準確度(加樣回收率)、精密度、重複性與穩定性

Results of accuracy, presicion, repeatability and stability

Analyte	Presision (RSD, %, n=6)				Repeatability (RSD, %, n=6)			Stability (RSD, %, n=8, 48 h)		Recovery (RSD, %,n=6)
	Intra-day		Inter-day		Concentration (mg/g)	RSD		T_R [a]	PA [b]	
	T_R [a]	PA [b]	T_R [a]	PA [b]		T_R [a]	PA [b]			
Berberine	0	1.91	0	2.92	54.80	0	1.26	0	1.26	96.5
Palmatine	0.23	1.23	0.66	1.88	10.56	0.26	2.22	0.20	1.53	98.9
Jatrorrihzine	0.36	1.28	1.16	2.98	2.75	0.28	2.32	0.28	1.78	100.5
Coptisine	0.32	2.04	0.29	3.67	19.32	0.08	1.16	0.18	1.11	97.3
Epiberberine	0.33	3.27	0.9	4.89	9.81	0.21	0.97	0.21	1.89	101.2
Columbamine	0.37	0.88	1.22	2.75	16.07	0.27	2.05	0.30	1.61	99.2
Magnoflorine	0.46	0.55	3.6	2.40	4.74	0.53	1.04	1.06	1.09	102.5

[a] Refers to retention time (berberine).

[b] Refers to peak area.

RSD: relative standard variation

Table 4 外標法(external reference method)和一測多評法(QAMS)測定黃連及阿里山十大功勞藥材中生物鹼含量的比較

(Contents of alkaloids by external standard method and QAMS, n=3)

	Berberine[a]		Palmatine			Jatrorrihzine			Coptisine			Epiberberine			Columbamine			Magnoflorine		
No.	ERM	QAMS	ERM	QAMS	RE%b	ERM	QAMS	RE%	ERM	QAMS	RE%	ERM	QAMS	RE%	ERM	QAMS	RE%	ERM	QAMS	RE%
1[c]	53.914		10.441	10.645	1.917	2.819	2.936	4.004	18.915	19.370	2.351	9.751	10.276	5.115	15.923	16.554	3.963	4.694	4.929	4.762
2[c]	55.718		10.798	11.004	1.871	2.814	2.9318	4.035	19.394	19.865	2.367	9.886	10.421	5.135	16.527	16.985	2.771	4.815	5.053	4.707
3[c]	54.042		10.117	10.322	1.985	2.678	2.798	4.290	19.166	19.627	2.350	9.611	10.130	5.117	15.971	16.541	3.569	4.693	4.928	4.764
4[c]	55.101		10.747	10.952	1.873	2.791	2.910	4.071	19.455	19.925	2.359	9.970	10.509	5.128	16.741	17.213	2.819	4.785	5.022	4.719
5[c]	54.786		10.542	10.747	1.908	2.631	2.752	4.399	19.388	19.856	2.356	9.846	10.377	5.125	15.687	16.321	4.042	4.710	4.946	4.762
6[c]	55.249		10.717	10.923	1.880	2.779	2.897	4.097	19.577	20.050	2.360	9.811	10.341	5.130	15.571	16.135	3.622	4.722	4.958	4.760
7[d]	20.891		9.711	9.813	1.033	8.153	8.095	0.726										9.710	9.925	2.174
8[d]	19.805		9.485	9.580	0.993	7.914	7.855	0.759										9.579	9.784	2.102
9[d]	20.376		9.376	9.478	1.070	8.003	7.945	0.731										9.639	9.850	2.142

ERM: external reference method

QAMS: quantitative analysis multi-components by single marker

RE: relative error

[a] Concentration (mg/ml)

[b] Relative error (%) = $\left|$(content determined by QAMS − content determined by ERM) / content determined by QAMS × 100$\right|$.

[c] 1-6 黃連藥材

[d] 7-9 阿里山十大功勞萃取物

Table 5 基於核磁共振(NMR-based)代謝體學平臺於阿里山十大功勞藥材提取液中鑑定出之代謝物

Compound	NMR Chemical shift, ppm (peak multiplicity, *J* value)
Amino acids	
Isoleucine	1.03 (d, *J* = 7.0)
Valine	1.01 (d, *J* = 7.1) 1.06※(d, *J* = 7.1)
Lysine	1.39-1.54 (m), 1.68-1.73 (m), 1.84-1.93 (m), 3.03※(t)
Alanine	1.49 (d, *J* = 7.2)
Arginine	1.62-1.69 (m), 1.69-1.77 (m), 1.87-1.97 (m), 3.24※(t)
4-Aminobutyrate (GABA)	1.89 (m), 2.30 (t), 3.01
Proline	1.95-2.06 (m), 2.06-2.11※(m), 2.32-2.38 (m), 3.32-3.36 (m), 4.11 (m)
Glutamate	2.01-2.07 (m), 2.09-2.15 (m), 2.29-2.39 (m)
Glutamine	2.10-2.19※(m), 2.42-2.50 (m)
Aspatate	2.63※(dd, J_1 = 17.4, J_2 = 9.5), 2.81 (dd, J_1 = 17.3, J_2 = 3.6)
Asparagine	2.82 (dd, J_1 = 16.9, J_2 = 8.2), 2.95※(dd, J_1 = 16.9, J_2 = 3.9)
Glycine	3.55 (s)
Tyrosine	6.85※(d, J = 8.5), 7.18 (d, J = 8.5)
Tryptophan	7.13-7.15 (m), 7.20-7.20 (m), 7.29 (s), 7.47 (d, *J* = 8.2), 7.47※(d, *J* = 7.9)
Histidine	3.12-3.16 (m), 7.10 (s), 7.87※(d, *J* = 1.3)
Phenylalanine	7.33※(m), 7.38 (m), 7.41(m)
Kynurenine	7.37-7.41 (m), 7.52-7.55※(m), 7.80-7.82 (m)
Organic acids	
Butyrate	0.88※(t) 1.55 (m), 2.11 (t)
Lactate	1.34 (d, *J* = 6.8)
Glutarate	1.75-1.80 (m), 2.17※(t)
Acetic acid	1.92 (s)
Malate	2.38 (dd), 2.68※(dd, J_1 = 15.25, J_2 = 3.47), 4.33 (m)
Succinate	2.39 (s)
Citrate	2.71 (d, *J* = 16.4), 2.58 (d, *J* = 16.3)
Malonate	3.14 (s)
Gluconate	3.73-3.76※(m), 4.02-4.03 (m), 4.08 (m)
Guanidoacetate	3.8 (s)
Fumarate	6.53 (s)
Benzoate	7.81 (m), 7.39 (m), 7.54※(m)
Formate	8.47 (s)

Compound	NMR Chemical shift, ppm (peak multiplicity, *J* value)
Sugars	
α-Glucose	5.19 (d, *J* = 3.8)
β-Glucose	4.58 (d, *J* = 7.9)
Fructose	4.03※(dd , J_1 = 12.7, J_2 = 1.3), 4.09 (t), 3.96 (br)
Sucrose	5.41※(d, *J* = 3.9), 4.17 (d, *J* = 8.6), 4.05 (t)
Xylose	4.55※(d, *J* = 7.7), 5.17 (d, *J* = 3.9)
Purines	
Xanthine Adenosine	7.94 (s)
Adenosine	6.02 (d, *J* = 6.6), 8.23 (s), 8.35 (s)
Others	
Butanone	0.98 (t), 2.22※(s), 2.57 (dd)
Choline	3.22 (s)
Glucitol	3.60-3.67 (m), 3.72-3.78 (m), 3.82-3.85※(m)

Table 6 阿里山十大功勞 50%酒精萃取物生物鹼含量測定

	Alkaloids	Concentration (mg/g crude extract)	Percentage
354 nm	Berberine	40.72 ± 1.09	4.07 %
	Palmatine	19.05 ± 0.34	1.90 %
	Jatrorrihzine	16.05 ± 0.24	1.61 %
250 nm	Magnoflorine	19.29 ± 0.13	1.93 %
Sum			9.5 %

Table 7 阿里山十大功勞 50%酒精萃取物抗氧化力分析

	Total phenols (mg gallic acid equivalent/g)	Total flavonoids (mg guercentin equivalent/g)	ABTS scavenging activity (TEAC, μg/mg)	DPPH scavenging activity (EC_{50}, μg/mL)
阿里山十大功勞 50%酒精萃取物	17.94 ± 0.30	22.18 ± 0.33	162.83	236.5

Table 8 基於核磁共振 (NMR-based)代謝體學平臺於血液中鑑定出之代謝物

No.	Metabolites	Assignments	δ ^{1}H (ppm), coupling constant, multiplicity [a]	Observed	Biofluids[b]
1	HDL	$CH_3(CH_2)_n$	0.86 (m)	CPMG, NOESY, BPP-LED, p-J resolved	S
2	Isoleucine	γCH_3, δCH_3	1.01※(d, J=7.0 Hz), 0.94(t)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
3	leucine	δCH_3 + $\delta' CH_3$	0.97 (t)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
4	Valine	γCH_3, $\gamma' CH_3$	0.99(d, J=7.0 Hz), 1.04※(d, J=7.0 Hz)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
5	Isobutyrate	βCH_3	1.14(d)	CPMG	S
6	3-hydroxybutyrate	γCH_3	1.20 (d, J=7.0 Hz)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
7	Lipid (triglycerides and fatty acid)	$CH_3(CH_2)_n$, $(CH_2)_n$ CH_2—C=C, CH_2 CH_2—C=O	1.24 (m), 1.28※(m), 2.04 (m), 2.24 (m)	CPMG, BPP-LED	S
8	Lactate	αCH, βCH_3	4.11※(q), 1.33 (d, J=7.0 Hz)	CPMG, NOESY, BPP-LED, p-J resolved	S
9	Alanine	αCH, βCH_3	1.47※(d, J=7.0 Hz), 3.77 (q)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
10	Lysine	βCH_2, γCH_2, δCH_2, εCH_2	1.73 (m), 1.89 (m), 1.47 (m), 3.03※(t)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
11	Arginine	αCH, βCH_2, γCH_2, δCH_2	3.76 (t), 1.89 (m) 1.66 (m), 3.25※(t)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
12	Ornithine	βCH_2, γCH_2, δCH_2	1.95(m), 1.82 (m), 3.06※(t)	CPMG, NOESY	S
13	Acetate	CH_2—C=O	1.92 (s)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
14	N-acetyl-glycoprotein	CH_3—C=O	2.04 (s)	CPMG, NOESY, BPP-LED	S
15	O-acetyl-glycoprotein	CH_3	2.14 (s)	CPMG, NOESY, BPP-LED	S

No.	Metabolites	Assignments	δ ^{1}H (ppm), coupling constant, multiplicity [a]	Observed	Biofluids[b]
16	Glutamate	βCH_2, γCH_2	2.08 (m), 2.36※(m)	CPMG, NOESY	S
17	Glutamine	αCH, βCH_2, γCH_2	3.68 (t), 2.15 (m), 2.45※(m)	CPMG, NOESY	S
18	Acetoacetate	CH_3, CH_2	2.29※(s), 3.49(s)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
19	Pyruvate	βCH_3	2.37 (s)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
20	Succinate	α, βCH_2	2.40 (s)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
21	Citrate	half CH_2, half CH_2	2.53 (d, J=15.8 Hz), 2.69 (d, J=15.8 Hz)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
22	Polyunsaturated fatty acid	=C—CH_2—C=	2.75(m)	CPMG, NOESY, BPP-LED	S
23	Albumin	Lysyl- CH_2	3.02	BPP-LED	S
24	Creatine	N- CH_3, CH_2	3.04※(s), 3.93 (s)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
25	Choline	$N(CH_3)_3$	3.21 (s)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
26	Phospho-choline	$N(CH_3)_3$	3.23 (s)	CPMG, NOESY, p-J resolved, BPP-LED	S
27	TMAO	CH_3	3.26 (s)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
28	Glucose	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H6’	4.65 (d, J=8.0 Hz), 3.24※(dd), 3.49 (t) 3.42(t), 3.47 (m), 3.90 (dd), 3.72 (dd) 5.24※(d, J=3.7 Hz), 3.53 (dd), 3.69 (t), 3.39 (t), 3.81 (m), 3.71(dd), 3.73 (dd)	CPMG, NOESY, p-J resolved, BPP-LED	S
29	Glycine	CH_2	3.56 (s)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S

No.	Metabolites	Assignments	δ ^{1}H (ppm), coupling constant, multiplicity [a]	Observed	Biofluids[b]
30	Unsaturated fatty acid (UFA)	—CH=CH—	5.29 (m)	CPMG, NOESY, BPP-LED	S
31	Tyrosine	CH, CH	6.90※(d, J=8.0), 7.20 (d, J=8.0)	CPMG, NOESY, p-J resolved	S
32	1-Methyhistidine	4-CH, 2-CH	7.06※(s), 7.77 (s)	CPMG	S
33	Phenylalanine	2, 6-CH, 3,5-CH, 4-CH	7.33※(m), 7.38 (m), 7.42(m)	CPMG, NOESY	S
34	Formate	CH	8.46 (s)	CPMG, p-J resolved	S

Table 9　GC-MS 代謝體學平臺於血液中鑑定出代謝物

1	9.36	Lactic acid
2	10.30	Alanine
3	11.55	3-hydroxybutyric acid
4	12.68	valine
5	13.60	urea
6	13.80	glycerol
7	13.91	phosphoric acid
8	14.27	isoleucine
9	14.43	proline
10	14.51	glycine[a]
11	14.83	butanedioic acid
12	14.98	2,3-dihydroxy-propanoic acid
13	15.68	serine
14	16.30	threonine
15	19.73	malic acid
16	20.90	4-hydroxyproline
17	21.10	glutamine
18	21.25	2,3,4-trihydroxybutanal acid
19	23.78	glutamic acid
20	24.02	phenylalanine
22	28.57	1,4-benzenedicarboxylic acid
23	29.10	citric acid
24	30.21	deoxyglucose
25	30.60	frucose
26	31.03	frucose
27	31.14	galactose
28	31.66	glucose
29	32.41	glucose
30	34.01	tyrosine
31	34.48	turanose

32	37.75	hexadecanoic acid
33	38.15	myo-inositol
34	41.68	tryptophan
35	41.79	linoleate
36	41.91	oleate
37	42.49	octadecanoic acid
38	51.49	monostearin
39	53.71	cholesterol



Figure 1 阿里山十大功勞嘉義縣產地實地考察。圖中顯示出阿里山十大功勞生長棲地之環境。



Figure 2 中興苗圃針對阿里山十大功勞育種之考察

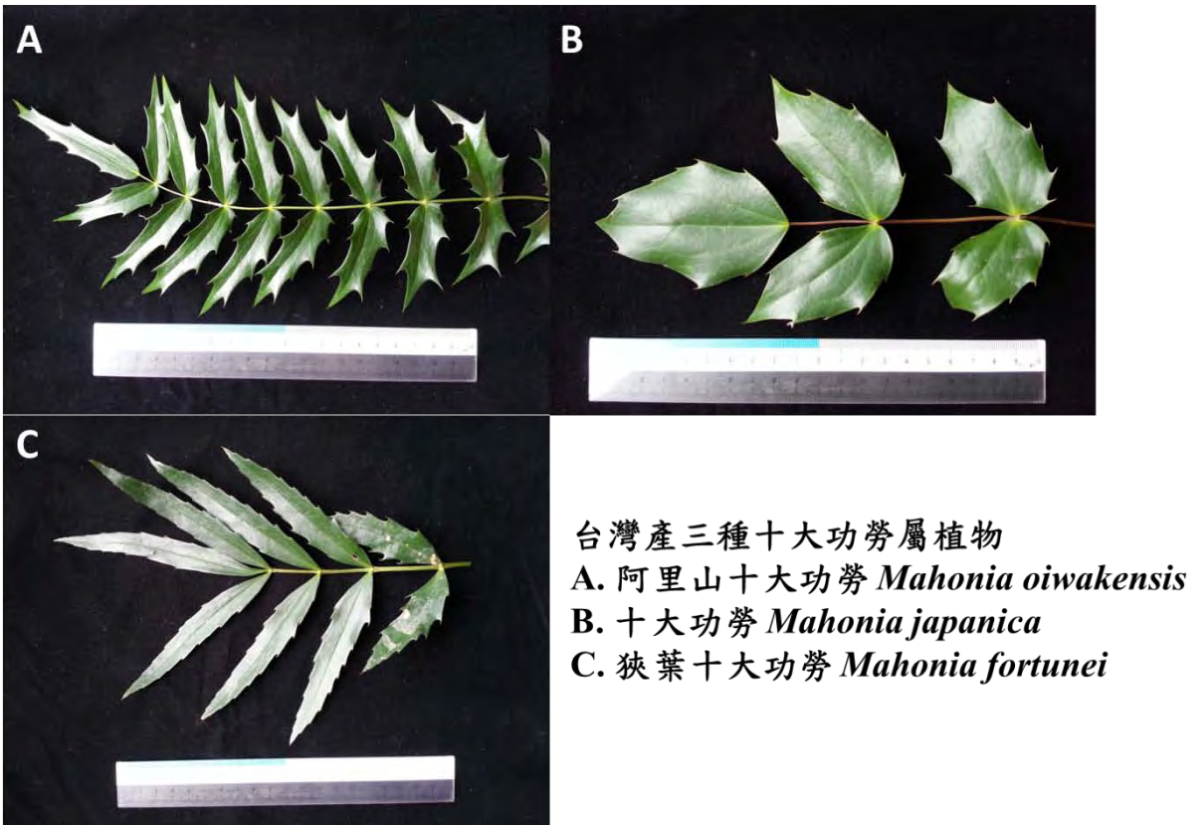


Figure 3 阿里山十大功勞葉部外型鑑定圖

345 nm

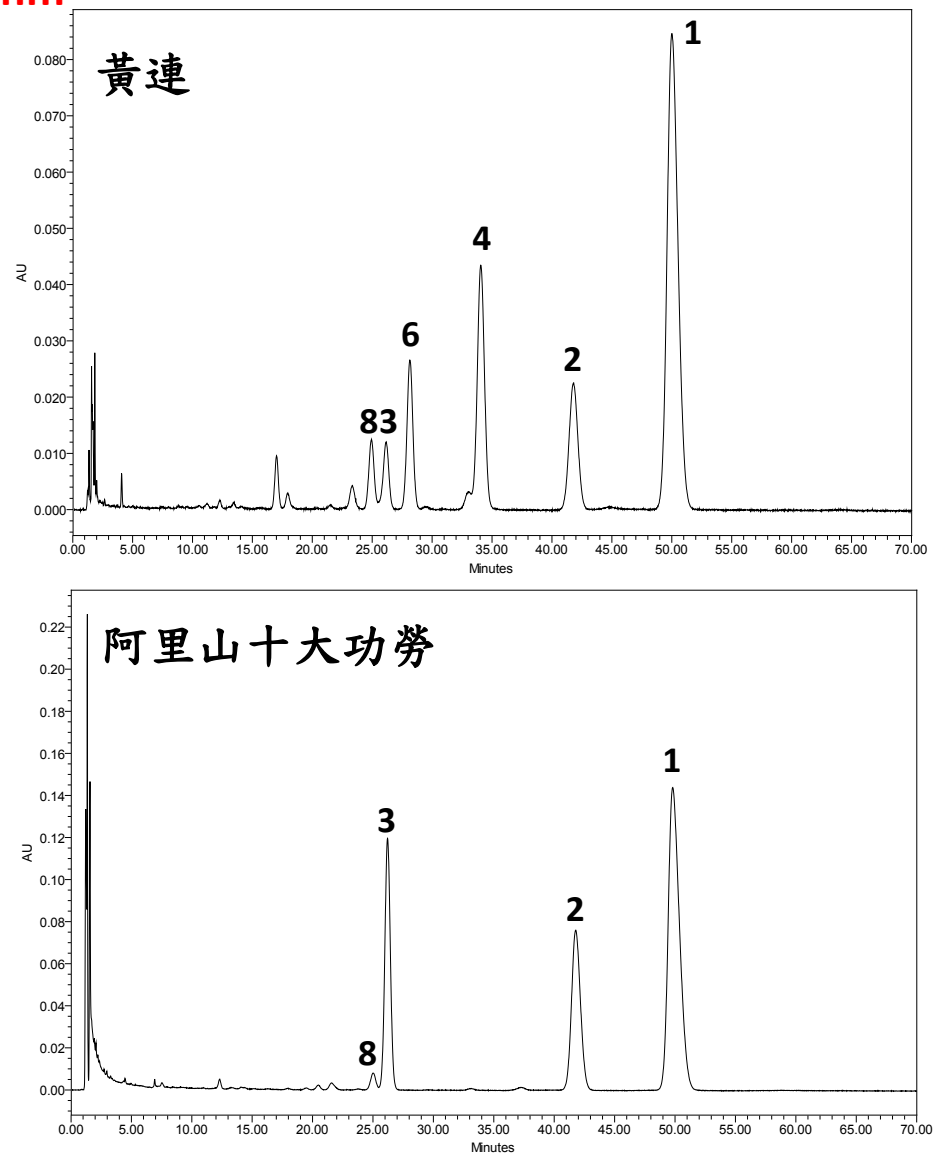


Figure 4 黃連藥材及阿里山十大功勞藥材 HPLC 色譜分離圖 (350 nm)

222 nm

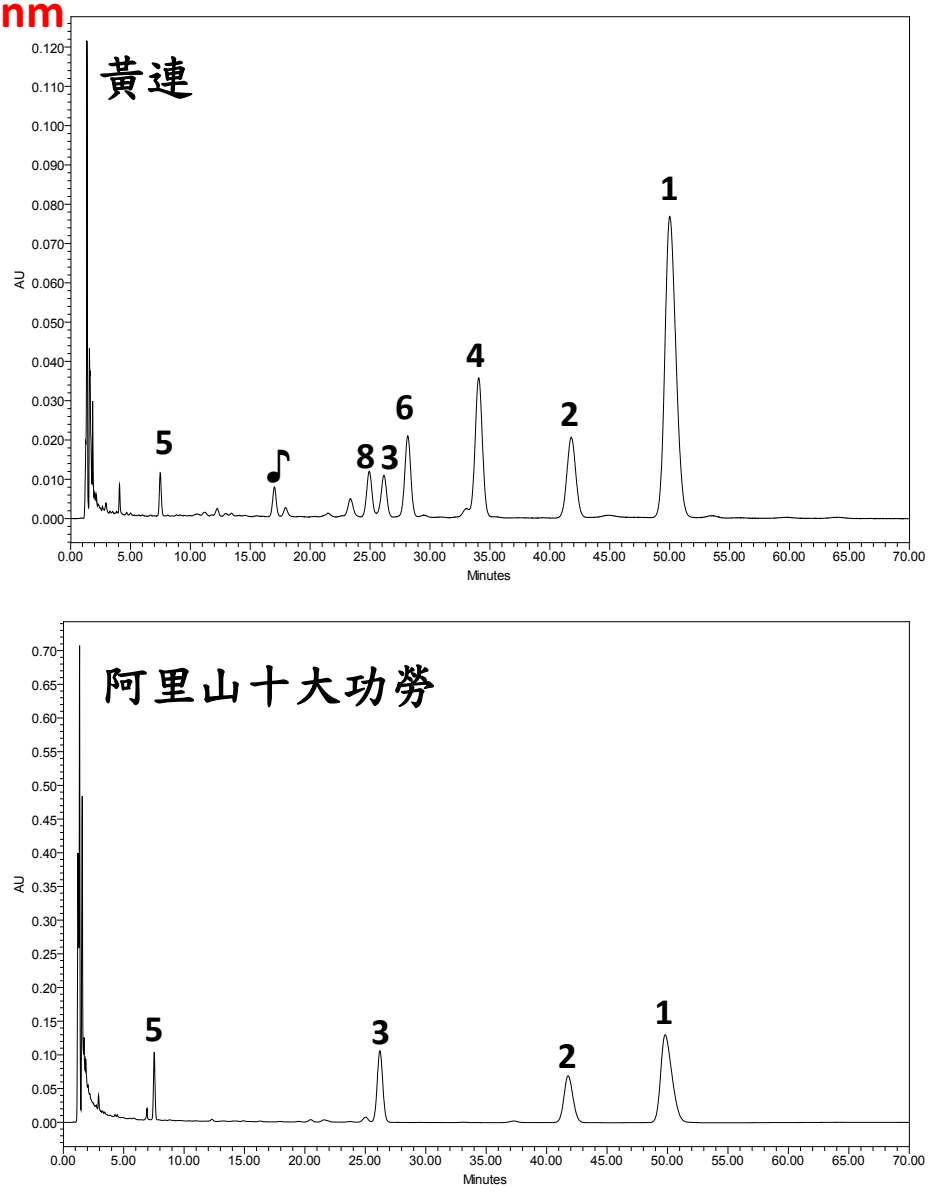


Figure 5 黃連藥材及阿里山十大功勞藥材 HPLC 色譜分離圖 (250 nm)

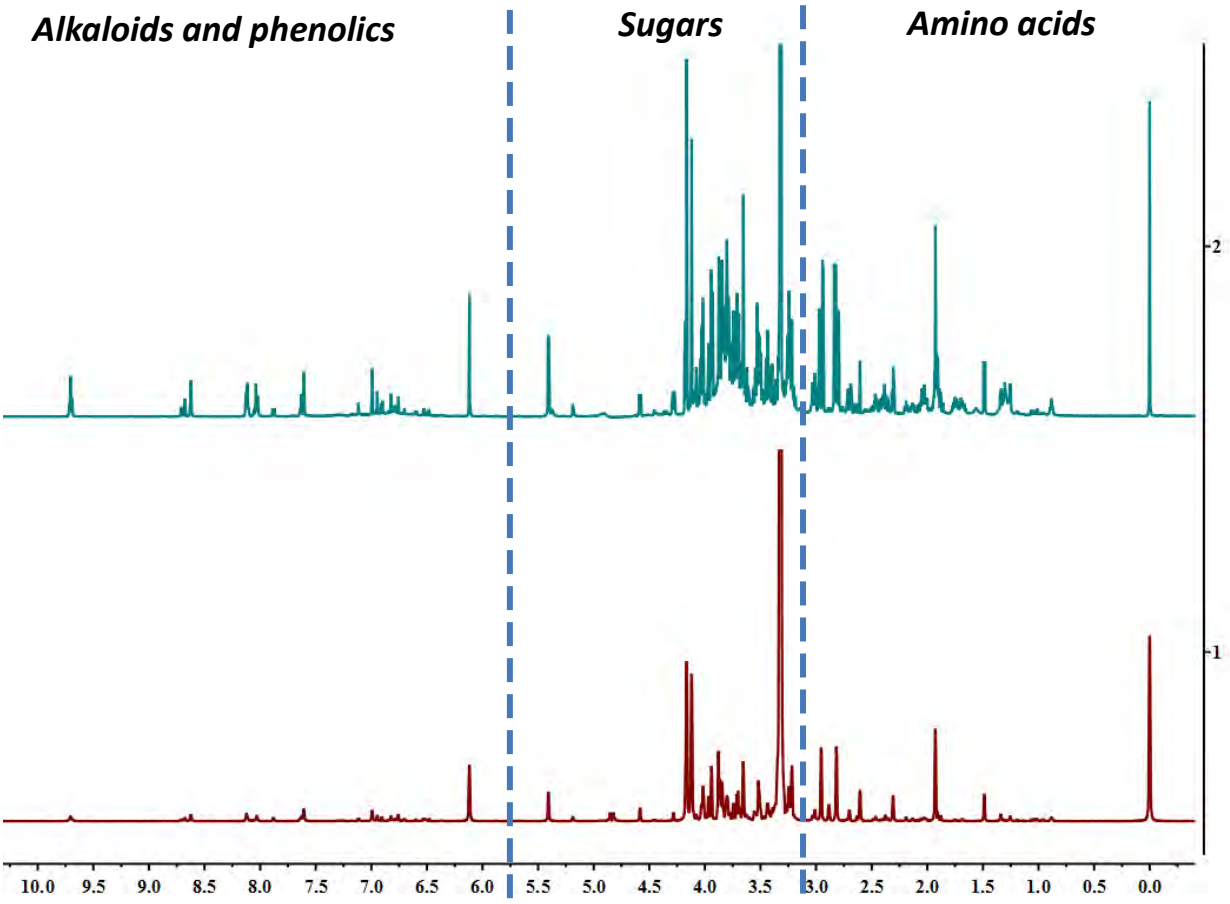


Figure 6 阿里山十大功勞藥材 50%酒精萃取物之 1D 核磁共振圖譜。
上圖：NOESY 譜，下圖：p-J resolved 譜。

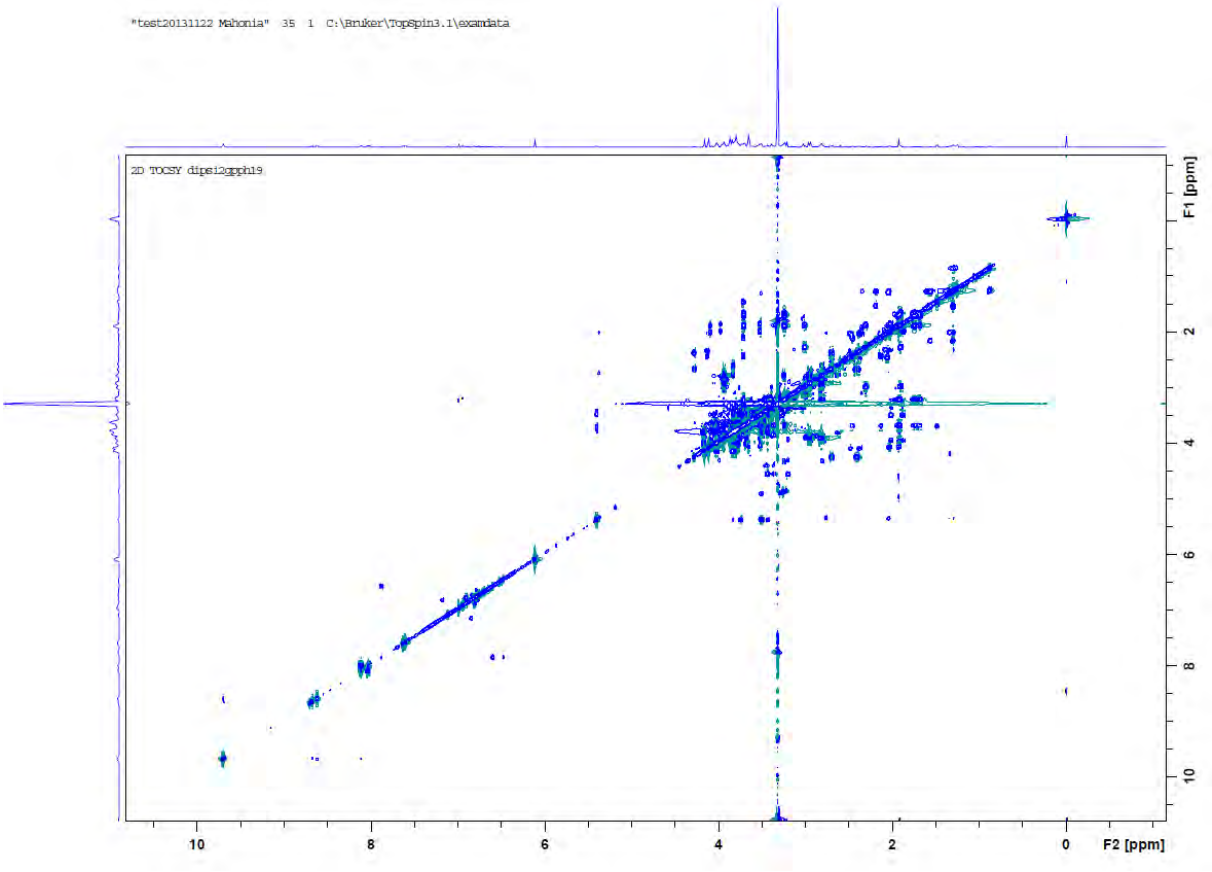


Figure 7 阿里山十大功勞藥材 50%酒精萃取物之 2D 核磁共振圖譜 (TOCSY)。

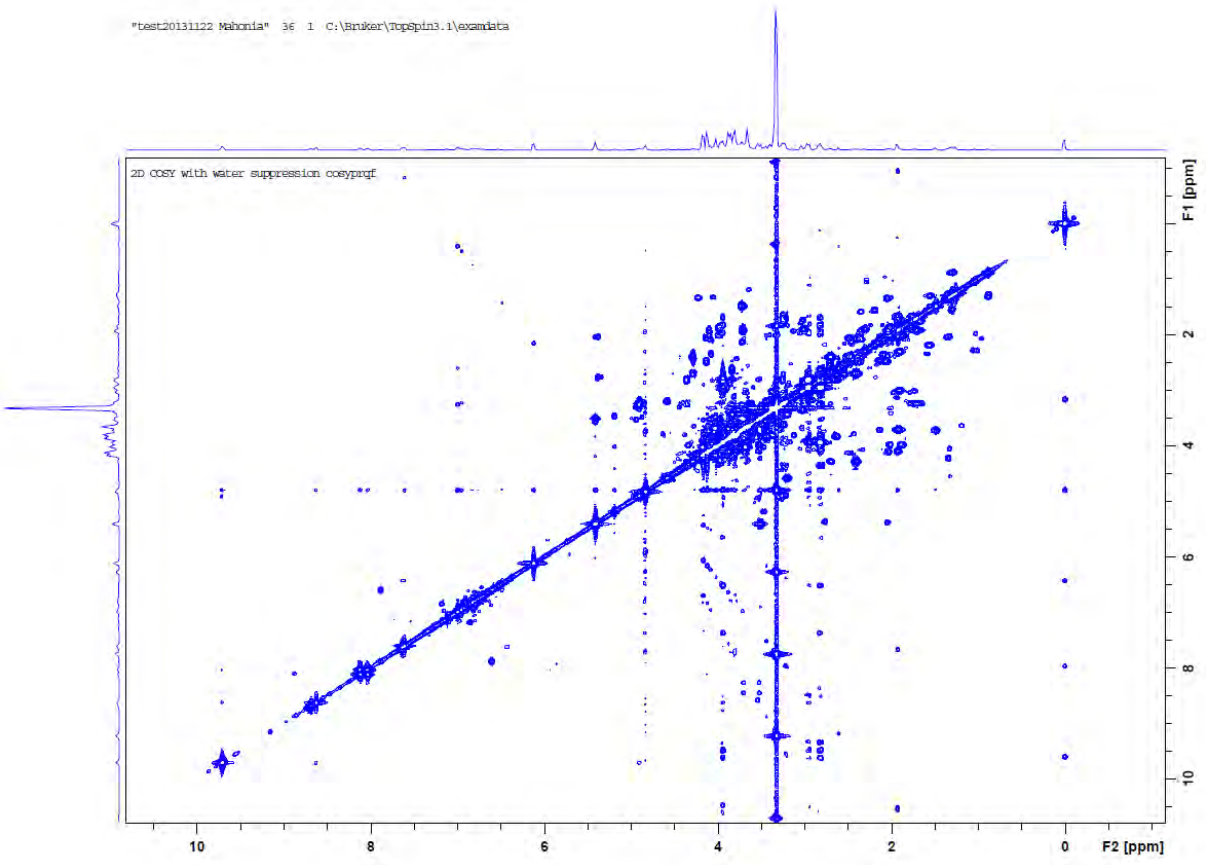


Figure 8 阿里山十大功勞藥材 50%酒精萃取物之 2D 核磁共振圖譜 (COSY)。

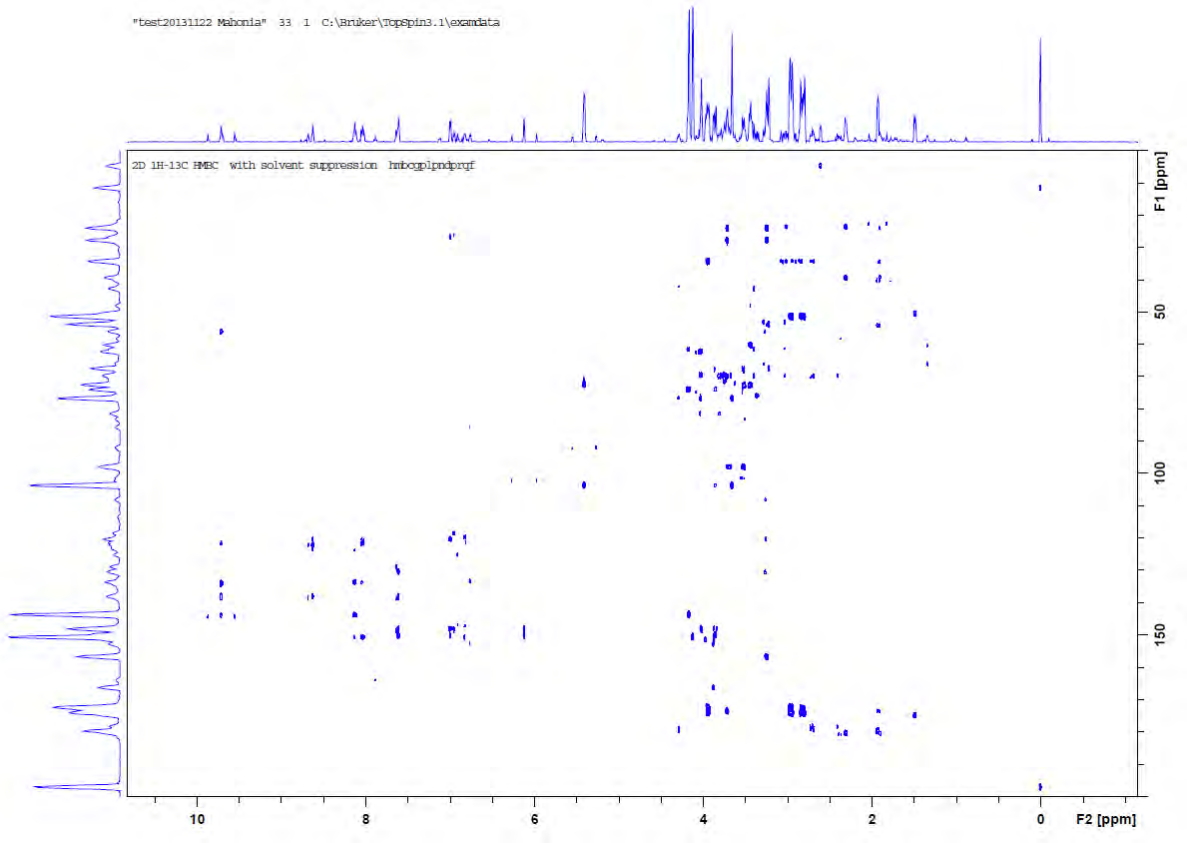


Figure 9 阿里山十大功勞藥材 50%酒精萃取物之 2D 核磁共振圖譜 (HMBC)。

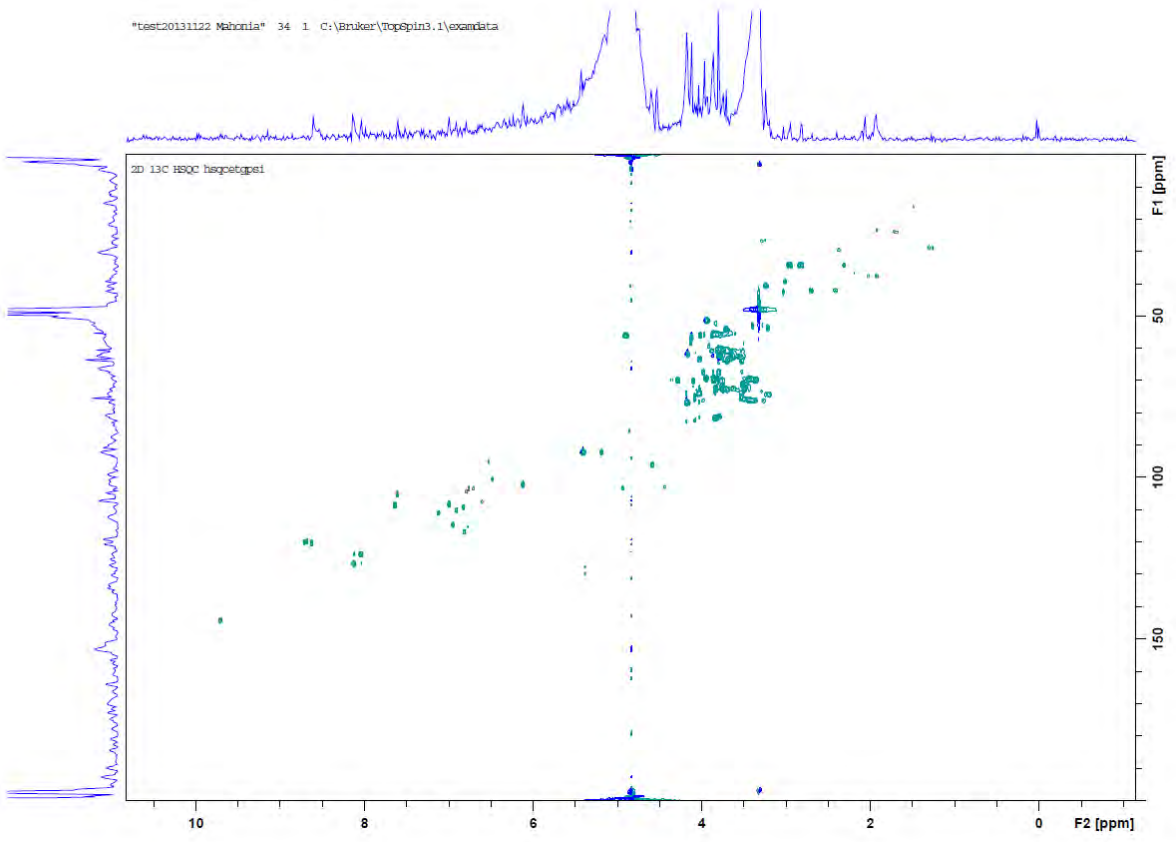
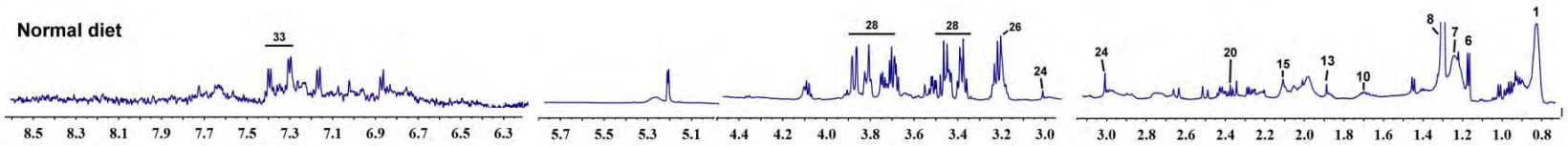


Figure 10 阿里山十大功勞藥材 50%酒精萃取物之 2D 核磁共振圖譜 (HSQC)。

A CPMG (serum)



B LED-BPP (serum)

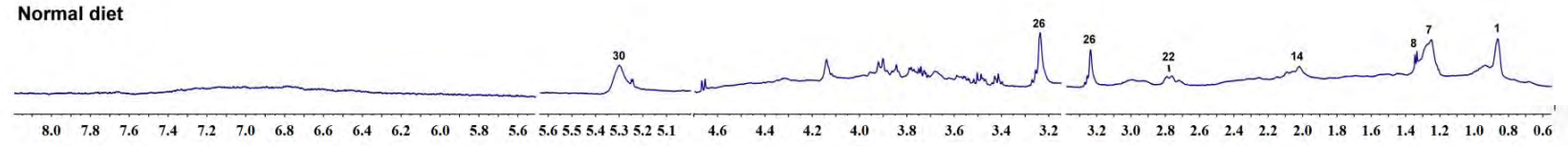


Figure 11 正常小鼠血液 600 MHz NMR 氫譜

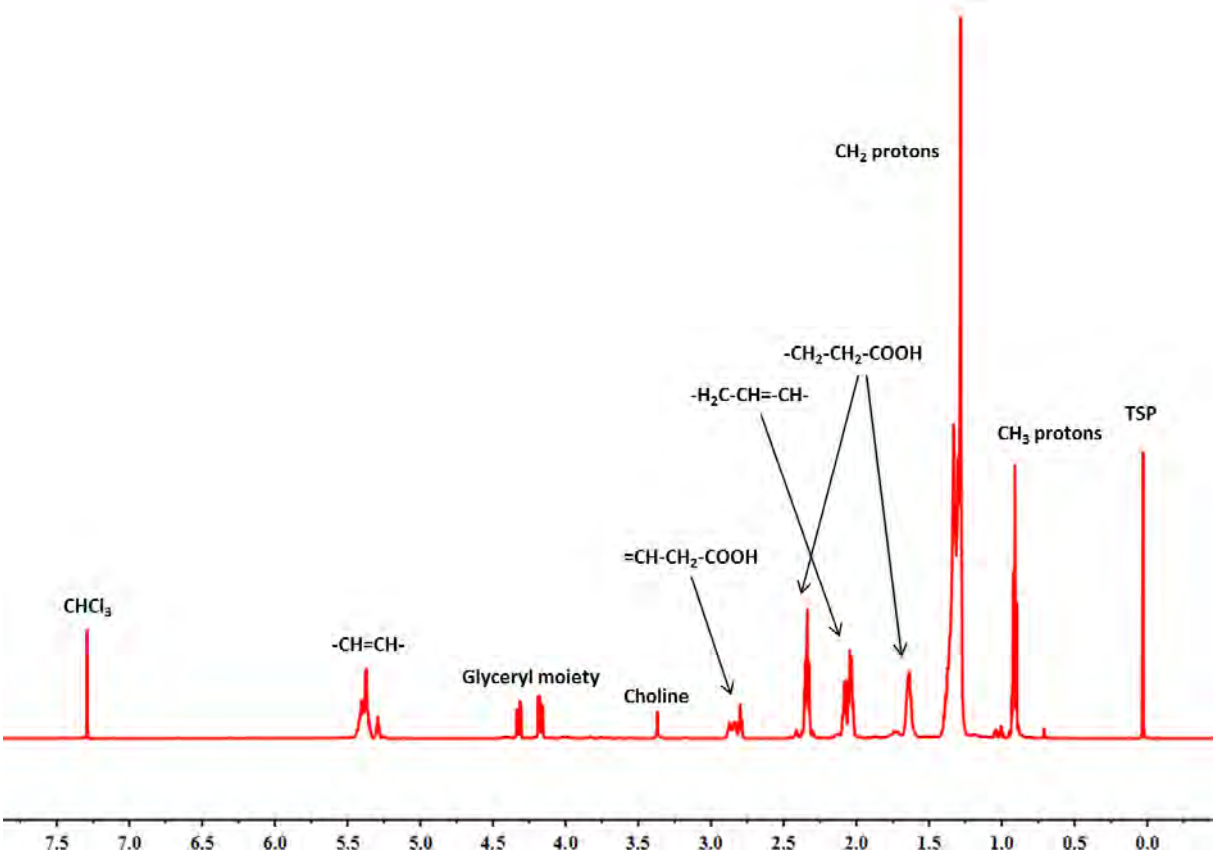


Figure 12　600 正常小鼠肝臟組織萃取物脂肪層 600 MHz NMR 氫譜

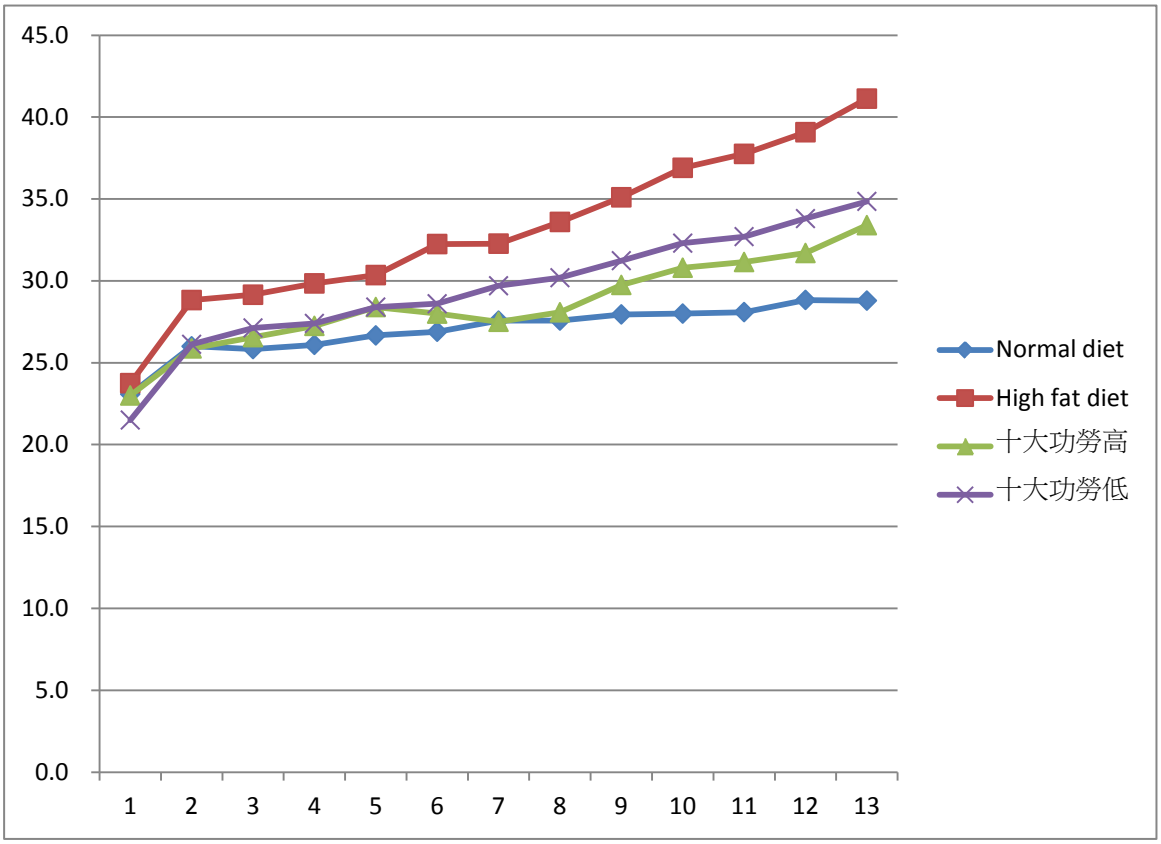


Figure13 體重變化圖。藍：正常飼料；紅：高脂飼料；綠：500 mg/kg 萃取物；紫：100 mg/kg 萃取物。

編號：CCMP102-RD-115

開發具抗病毒及抗腫瘤活性之台灣本土中草藥並推廣其應用(2-2)

楊寧蓀
中央研究院農業生物科技研究中心

摘　要

本計畫主旨為開發具抗病毒及抗腫瘤活性之台灣本土可培種之中草藥，此舉欲藉由我們所建立一系統化實驗平台（包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並以具體細胞學/分子生物學的生物活性測試平台及動物實驗模式），以確定台灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分及生物活性。在目前已具初步成果後，我們正進而提升本土中草藥之應用價值及其生技應用之推廣。在 101 年度中，我們完成選定了 10 種台灣本土中草藥之基原鑑定檢測，並完成其不同萃取物之體外抗發炎及免疫調節活性測試。近來我們以乳癌切除動物模型之抗腫瘤轉移活性測試正進一步篩選，證實大花咸豐草酒精萃取物可顯著降低腫瘤轉移率及顯著提高老鼠存活率。體內及體外作用機轉研究顯示，大花咸豐草酒精萃取物可有效抑制顆粒狀細胞激素之受體(G-CSF receptor)的表現量，並抑制老鼠脾臟顆粒球細胞系骨髓衍生抑制細胞(Granulocytic MDSCs)族群的聚集。在抗病毒活性上，實驗結果顯示包含狗肝菜、半枝蓮、大花咸豐草與破布子萃取物，可顯著地降低單純疱疹病毒(HSV-1)的感染病毒量或是其他不同程度抗病毒的效果。在 102 年度中，我們完成了大花咸豐草酒精萃取物 F1 活性分層之化學組成分析，我們測得不同地區，不同季節及不同後製方法採集及處理的大花咸豐草之 F1（BP/F1）分層的基本含量及特殊組成。我們並完成了大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層之抗腫瘤轉移之活性測定，對其作用機轉進行了系統研究。在抗病毒活性測試上，我們完成大花咸豐草酒精萃取物及其 F1 等分層，對於病毒效價分析、皮膚病理與病毒蛋白表現之分析、皮膚抗病毒基因表現之分析及皮膚發炎反應及免疫細胞浸潤等分析工作。由上述我們所得到的結果使我們相信此計畫已建立之研究篩選平台將有助於未來中草藥從種植、採收、品管到活性的垂直整合系統，創建一套能提供功效好且品質穩定之中草藥的標準化栽種生產程序，進而促使台灣本土中草藥能逐步具體地科學化，以確保民眾使

用之安全，並有助於本主中草藥之發展。我們正以研究成果申請兩項專利及兩篇論文。

關鍵詞：台灣本土中草藥、基原鑑定、抗腫瘤轉移、抗病毒活性

Number: CCMP102-RD-115

Develop Taiwan's Indigenously Grown Medicinal Plants that Confer Potent Anti-viral or/ and Anti-tumor Bio-activities, and Expand to Biotechnology Applications (2-2)

Ning-Sun Yang
Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica

ABSTRACT

This study aimed to develop medicinal plants endemic to Taiwan that are purported to confer potent anti-viral and/or anti-tumor bio-activities, and expand their biotechnological applications. This task is being pursued by using a combinational approach of morphological/anatomical analyses, followed by molecular marker authentication (e.g., DNA sequencing), and then by specific anti-inflammation, anti-tumor and anti-viral bio-activity assays. For the first-year study of the project (2012), our results documented the verification of the authenticity of various selected medicinal herbs, and we evaluated their effects on cytokine expression in mouse dendritic cells. In a breast tumor resection mouse model, the ethanol extract of *Bidens pilosa* (BP-E) was found to effectively suppress mammary tumor metastasis and increase mouse survival. In addition, BP-E significantly decreased the population of granulocytic MDSCs in test mice. BP-E also effectively inhibited G-CSF receptor expression and suppressed the G-CSF induced differentiation of MDSCs. We further showed that a number of herbal extracts, including the cold water extract of *Dicliptera chinensi* and BP-E, exhibited appreciable anti-herpes simplex virus-1 (HSV-1) activities in a HSV-1 infection mouse model. For the second-year study (2013), we showed that BP/F1 (F1 fraction of BPE) can exhibit strong anti-tumor metastasis and identified its chemical composition. Anti-tumor metastatic activity of BP/F1 was further confirmed by a mammary tumor resection mouse model. We then determined

and compared the yield of the BP/F1 faction of BP-E from plants grown out and collected at different areas, different seasons and different post-harvest treatments/preparations. With anti-viral activity assay, we evaluated the effect of BP-E and BP/F1 on viral infection titer, dermatopathology and virus-induced dermatitis, the expression of viral proteins, and the expression of infection-associated genes and leukocyte infiltration in test mice. Taken together, we believe that our results and the systematic platform that we developed in the present study is providing a useful approach for future biotechnology development of evidence-based, traditional herbal medicines in Taiwan.

Keywords: Taiwan’s indigenously grown medicinal plants, Authentication, Anti-metastasis, Anti-viral activity

壹、前言

由於現今互補、另類醫療(complementary and alternative medicine，CAM)於世界各地是廣泛受到重視與探討，這其中包括使用草藥的傳統療法，目前各種草藥產品可以健康食品(Health Food)、膳食補充品(Dietary Supplement)或藥方(Drug)等方式大量銷售；在草藥的銷售市場上，美國已大量將草本植物萃取物商品化，部分地區健保亦開始同意藥草給付；歐洲一直是世界草藥之巨大市場，在亞洲中國大陸、日本、台灣則有普遍長久使用中草藥藥材及複方產品之歷史。著眼於草藥之未來發展潛力，草藥的應用已成為國內外生技產業發展重要項目，許多美國卓越的醫藥研究機構包含 NIH、FDA 及美國哈佛、耶魯等主要醫學院也著手於草藥產品的研發與臨床的測試，美國 FDA 更在 2004 年 6 月 9 公告「植物新藥規範」(Guidance for Industry - Botanical Drug Products)，使得中草藥及植化藥物發展前景更加看好[2-4]。2006 年，由德國生技公司 MEDI-Gene 開發，成份為綠茶葉萃取物，用以治療人類乳突病毒所引起生殖器病變的外敷藥 Veregen，成為美國 FDA 按照植物新藥規範所批准植物新藥的第一例。分析 Veregen 植物新藥開發成功的因素包括：1. 使用單一、基原明確的植物；2. 良好的藥材控管，產地種植明確；3. 有效成分組成及製程管控明確；4. 完整的人體臨床測試[5]。由此顯示，美國 FDA 對於植物新藥審查仍然著重於藥品安全、確切療效、有效成分在不同批藥材之間的一致性。近年來，以科學方法解釋傳統用藥理論、探討中草藥療效的研究也日漸普遍地受到重視；然而，研究顯示由於中草藥種類紛雜、名稱混淆且經過加工炮製後會不易辨別其種類，因此極需加強中草藥的品種(variety/cultivar)或基原(germplasm)鑑定。此外，為數眾多的中草藥常被宣稱具多種功效。但是常用中草藥的"療效"，許多是經驗論的，常缺乏現代科學之佐證，所謂"療效"也經常被人們所誇大，其確切的生物活性及療效經常是沒有系統化的實證醫學來加以驗證。在台灣民間，被宣稱具有藥用功效之植物眾多，民眾也常有使用本土中草藥之習慣。然而，我們對於台灣本土常用藥用植物之確切物種、種植及食用並無明確的規範，因此時常有民眾誤用中草藥以至於發生中毒的情形產生。此外，台灣本土常用之中草藥的療效也經常被誇大，其確切的活性及療效並無系統化的實證醫學來加以驗證。中草藥一般多為 露天(即"田間"，而非溫室中)生長或種植，已知氣候及種植條件可能對藥材品質影響甚鉅，目前市售中草藥也並

無以化學指紋圖譜及活性指標分析等方法來定義規範中草藥之品質。中草藥品質的不穩定，不論是對草藥研究或生技產業相關應用及產品發展上，都已經是一大考驗。因此，為了使台灣本土中草藥能現代化，以期中草藥研發能符合植物新藥開發規範進而提升台灣中草藥在國際市場上的價值。本計畫乃利用包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並以具體細胞學/分生學的生物活性(bio-activity)測試平台及動物實驗模式來確定台灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分，並利用實證醫學驗證其活性，以提升本土中草藥之應用價值。

中草藥植物基原或品種鑑定乃根據個體間遺傳標記(genetic marker)的差異[4]，植物的遺傳標記一般可分為外觀或形態、細胞及分子標記等三層次。外觀或形態標記(如花色及果實形狀等)可經由肉眼觀察(macroscopic identification)而得；細胞遺傳標記乃藉由顯微鏡檢(microscopic identification)觀察染色體數目或植物較細微的組織結構之差異；分子遺傳標記方面，早期中草藥基原鑑定多以 PCR 方式選擇性大量複製 DNA 片段以供電泳分析；其鑑定基礎在於不同中草藥基原具有不同的DNA 序列差異，因此造成 PCR 反應時，引子(primer)與分析樣品之 DNA 模版(template)互補黏合(annealing)之差異(即 primer 能否黏合)之差異。RAPD (random amplification of polymorphic DNA)即為應用此分析原理之鑑定方法之一，RAPD 分析是只利用 10 個鹼基長度之引子，此法易於學習、操作方便，所以此種技術很快被利用為早期作物品種鑑定工具。其他應用 PCR 反應產物作為基礎的 DNA 分子鑑定技術還包括有：將限制酵素技術(限制酵素能識別特定之 DNA 序列且有專一性之剪切位置)及 PCR 反應觀念綜合應用之 AFLP (amplified fragment length polymorphism)分子標誌技術；應用高等生物具有高比例的 DNA 重複序列之原理而產生的 SSR (sequence characterized amplified regions)分子標誌技術，由於不同物種間重複序列的數目會有很大差異，故 SSR 又可分為重複序列內之產物(intra-SSR)與重複序列間之產物(inter-SSR 或稱 ISSR)兩種類型，以後者較為常用。

近幾年中草藥基原鑑定則多以 DNA 序列比對，或綜合多種方法進行。所謂以 DNA 序列比對，係直接分析及比對染色體特定區域之 DNA 序列差異，做為不同基原或品種鑑定之依據。此鑑定方法的優點包括：一、僅分析一個或兩個 DNA 片段，即可獲得 500~1000 個鹼基序列供指紋鑑定；二、可在短時間內提供客觀而明確(以 A、T、C、G 判讀)之 DNA 指紋資料；三、不需使用 PCR 技術，故亦無分子標間相互競爭之問題；四、 不需作為對照

的品種，可隨時針對未知樣品進 行分析。因此，以DNA 序列比對為基礎之鑑定技術在中草藥基原鑑定應用上具很大潛 力。依據所分析的DNA 區域所屬之基因體，又可分為細胞核內及核外(包括葉綠體及粒線體)的特定區域；細胞核內特定基因部分片段DNA 定序分析常用的如ITS (internal transcribed spacer)分析，此方法為目前植物基原鑑定最常用工具之一，是選擇細胞核內 18S 及 26S rDNA 間之 DNA 做為分析對象，此區域具有植物「屬」間及「種」間之高度 DNA 序列變異性。

中草藥研究除上述物種之基原鑑定工作外，若能再搭配中草藥之有效成分分析、化學指紋圖譜、生物活性平台等分析方法(此項工作在過去幾年中研院農生中心草藥組可說已做出很好的成果，也已獲得國際上多方面學術上之肯定)，更能確實做到協助定義中草藥的「確效」。每種中草藥　都擁有獨特的植物二次代謝物、特殊的有效或主要成份，指紋圖譜便是一種類似於植物代謝學研究技術的鑑定手法，能夠將中藥所具主要或可能的有效成份組成量化，建立獨特的「鑑定分析」標準，作為未來品質管理的依據，從而能進一步確保每批中草藥產品質穩定，讓顧客對產品更具信心。常用的分析方法如(1)色層分析法：如 TLC、HPLC 等；(2)光譜分析法：如 UV、IR、Near-IR 等；(3)其他：X-ray、NMR、GC-MS、LC-MS 等，也可以用來建立中草藥的「指紋圖譜」。其中，高效液相層析儀(HPLC)已發展成熟，並廣泛應用於各種化學分析的場合。HPLC 的分析能力強，再現性良好，系統穩定性高，樣品及溶媒的使用量少，偵測器(detector)型式選擇多(如 UV、photodiode array、RI、ELSD…等)，很適合用來建立中草藥化學指紋圖譜。且由財團法人醫藥工業技術發展中心(藥技中心)建立的「台灣中草藥網」中，便是將多批次的藥材以 HPLC 進行分析，並建立其化學指紋圖譜及雷達圖，至今已陸續建立三百多筆藥材的資料，並彙整成為資料庫中的一部份，以供比對[9-11]。指紋鑒別技術對中藥產品推向國際市場應起重要影響，可促使中藥產品及其功效較能獲得國際認同，使中草藥中的有效成分被西方科學化方法解讀，再搭配生物技術分析其活性及作用機制，更有助於將中草藥應用於保健食品或植物新藥的開發。

本計畫乃延續我們在「建立台灣本土常用中草藥之基原鑑定與功效測試平台」計畫所建立之系統化研究平台，包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並以具體細胞學/分生學的生物活性(bio-activity)測試平台及動物實驗模式以確定台灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分並利用實證醫學驗證其活性，以提升本

土中草藥之應用價值。為確實提升台灣本土中草藥之應用價值，本計畫篩選約十餘種台灣民間常用之中草藥，包含狗肝菜、半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、桑黃、山苦瓜、狗尾草、破布子根、魚腥草、紫蘇葉、雞屎藤、大花咸豐草及狗肝菜等。在民間常以水煮紫蘇葉(*Perilla frutescens*)、雞屎藤(*Paederia foetida* L.)等中草藥作養身茶飲用；魚腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)、破布子 (*Cordia dichotoma* Forst, F.)、狗尾草(*Heliotropium indicum* L.)、山苦瓜(*Momordica charantia* Linn. var. abbreviata Ser)等草藥則以烹煮入菜之方式食用；另外，仙草*(Mesona procumbens Hemsl.*)、半枝蓮(*Scutellaria barbata* D. Don)、桑黃(*Phellinus linteus*)、白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa.* Willd.)為民間常用藥用植物。先前研究發現，仙草葉以碳酸氫鈉萃取後，其萃取物中的具有抗氧化能力[6]，而仙草中的酚酸類(phenolic acids)是執行抗氧化功效的主要成分，其中又以咖啡酸(caffeic acid)具有高度抗氧化之活性[7]，另外，仙草的水萃取物也具有保護人類淋巴球(lymphocyte)免於 UV-C 或是過氧化氫所引發的 DNA 受損[8]，以及可藉由抑制肝臟星狀細胞(hepatic stellate cells)的活化進一步防止四氯化碳(carbon tetrachloride)所引發的肝纖維化(liver fibrosis)[9]。近年來的研究中發現半枝蓮的水萃取物具有抗發炎抗氧化的效果，且可藉由調控 BCL-2 而抑制子宮平滑肌瘤細胞(uterine leiomyoma)的生長；另外，也被發現其 30%乙醇萃取物、甲醇萃取物、二氯甲烷萃取物對於肺癌[10]、血癌[11,12]、大腸癌細胞[13]可刺激細胞凋亡或是抑制細胞周期而減緩癌細胞生長的效果，而白花蛇舌草被研究發現，其水萃取物可抑制體內肉瘤生長和抗放射性治療傷害[14]、抗發炎和抑制肝毒素所造成的肝臟損害，並且其甲醇萃取物中的黃酮苷也具有抗氧化功能[15]。而桑黃也在許多研究中發現其體內含有多醣體、類三 (Triterpennoids)以及桑黃素(Meshimakobnol)等活性成分，其酒精萃取物中的酸性多醣體(acidic polysaccharide)可增進 NK 細胞、巨噬細胞、T 細胞的免疫功能[16]，70%乙醇萃取物可抑制血管新生(angiogensis)及抑制脂質氧化(lipid oxidation)[17]，其乙醇萃取物可抑制抗藥性金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)的生長[18]、可抗發炎以及抑制巴豆油(croton oil)所引發的小鼠耳朵水腫[19]。山苦瓜在過去研究發現其乙醇萃取物可抑制糖尿病所造成的高血糖和糖化血色素並在各種糖尿病老鼠模式中可減緩糖尿病[20-22]，而在山苦瓜葉的水、乙醇、甲醇萃取物也被發現在體外具有抑制大腸桿菌、傷寒沙門桿菌、痢疾桿菌等病原體的生長[23]，此外，其水萃取物也具有抗攝護腺癌[24]、淋巴癌[25]，甲醇萃取物中的地膚子皂苷(momordin)可在體外抑制多種癌

細胞生長[26]。在過去研究指出狗尾草成分中的 N-氧化大尾搖鹼(indicine N-oxide)可在人體中減緩急性血癌(acute leukemia)[27]，並且直接餵食大鼠狗尾草時，能抗急性和亞急性發炎以及減少角叉菜膠(carrageenin)所引發的足蹠腫脹(hind paw oedema)[28]，此外，狗尾草的水萃取物也可減少口服吲哚美辛(Indomethacin)所造成的胃潰瘍[29]，其乙醇萃取物也可在大鼠模式中促進傷口癒合[30]。研究中發現，紫蘇的成分中含有木犀草素(Luteolin)可抑制 TNF-α 之表現與免疫反應[31]，並且紫蘇成分中的三萜酸類(triterpene acids)可經由抑制 TPA 誘發之免疫反應，並可減緩二甲基苯蒽(7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene, DMBA)及佛波醇(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)等致癌劑所引發皮膚癌的發生[32]。而在紫蘇成分中的迷迭香酸(rosmarinic acid)也可減 LPS (lipopolysaccharide)所引發肝受損動物模式中的表皮發炎反應[33]，除此之外，紫蘇葉的水萃取物也可預防並減緩卵白蛋白(ovalbumin, OVA)所引起的過敏反應[34]。破布子種子的乙醇萃取物可抗發炎以及減少角叉菜膠(carrageenin)所引發的足蹠腫脹(hind paw oedema)[35]。破布子果實的乙醇萃取物也可抑制在大鼠中胃部幽門結紮(pyloric ligation)、阿斯匹靈(aspirin)、吲哚美辛(Indomethacin)所引起的胃潰瘍[36]也可在大鼠模式中促進傷口癒合[37]，並且破布子萃取物也可在體外減緩乳癌細胞的生長[38]。魚腥草的酸水解萃取物可抑制鹿角菜膠(carrageenan)所引起的胸腔發炎以及二甲苯(xylene)所引發的小鼠耳朵水腫[39]，而其熱水萃取物可抑制單純疱疹病毒活性(Herpes Simplex Virus)[40]、禽流感病毒(Influenza Virus)、人類免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)[41]。雞屎藤的水萃取物曾被研究發現具有抗氧化的功效[42]，而其葉子的甲醇萃取物可抑制大鼠模式中由棉球移植引發的肉芽腫形成(cotton-pellet granuloma)[43]，另外，雞屎藤的 90%乙醇萃取物可抑制小鼠中由蓖麻油(castor oil)以及硫酸鎂(magnesium sulphate)所引發的腹瀉(diarrhoea)[44]。雖然這些中草藥曾經被民間宣稱或在部分研究報告指出含有抗發炎或抗癌的功效，但尚需要更明確之系統性科學證據來驗證這些作用。因此，本計畫選定此十餘種民間常用中草藥，作為初步篩選具有免疫調節或抗發炎的對象，除了和舊有文獻相互對照印證外，更作進一步的研究，開發中草藥特有之化學成分及生物活性，以科學的方式加以佐證其療效，藉此經由實證醫學與系統性的分子細胞生物學等技術的驗證，使計劃成果能成為中草藥推廣及發展之助力。

在本計畫生物活性/功效性(Bio-activity/Functional activity)分析上，以體

內外生物活性/功效性測試系統，包含樹突狀細胞細胞激素調控以評估中草藥萃取物之體外抗發炎活性，在抗腫瘤體內活性測試上，我們以老鼠腫瘤摘除(tumor resection)動物模式評估中草藥萃取物之抗老鼠腫瘤轉移物活性。此外，在中草藥抗病毒活性測試上，由於第一型單純性疱疹病毒(Herpes Simplex Virus-1, HSV-1)是常見的人類病原體。與水痘病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)一樣，兩者都可以經過接觸或是飛沫途徑散播感染。雖然初次感染 HSV-1 時不會出現明顯的症狀，嬰幼兒感染水痘疱疹病毒後則會出現發燒、全身性的紅疹與水痘等臨床特徵。經過急性期的感染過程後，部分的病毒可以經過在皮膚上皮細胞複製後，從末梢神經進入感覺神經節造成潛伏性感染。當個體的免疫能力降低、老化或是處於免疫功能抑制的情況下，病毒因活化而被釋放並再次感染周邊的皮膚細胞，產生如 HSV-1 的唇疱疹或是 VZV 造成的帶狀疱疹[45-47]。個體的免疫活性包括第二型干擾素(IFN-β)與 CD8 毒殺性細胞的作用都是有效控制帶狀疱疹形成的主要因素。這樣的特性因此使得該病毒成為探討病毒與宿主的免疫系統之間的交互關係的重要研究模式之一。小鼠是常用來研究 HSV-1 致病機轉的動物模式。經表皮感染 HSV-1 後，可以在皮膚表面形成痂傷甚至沿著感覺神經節的末梢神經束造成帶狀疱疹的臨床症狀。有鑑於VZV 不具有感染小鼠的能力，而以 HSV-1 感染刮擦後的小鼠皮膚卻可以在短時間內形成如 VZV 在人類造成的帶狀疱疹[48-50]。因此，本計畫與台灣研究帶狀疱疹及簡單一型疱疹病毒之著名學者：台大醫學院免疫所顧家綺老師合作，以顧老師實驗室已建立 HSV-1 帶狀疱疹動物模式來評估台灣本土中草藥抗簡單一型疱疹病毒及帶狀疱疹病毒之生物活性。

在本計畫中，我們利用分子及細胞學生物技術及免疫學觀點測試系統，藉由樹突狀細胞細胞激素篩選平台，來對具有免疫調節及抗發炎等生物活性的本土中草藥進行篩選，進而藉由老鼠乳癌(4T1 mammary cancer)腫瘤摘除(tumor resection)動物模式評估中草藥萃取物之抗腫瘤轉移物活性；在抗病毒活性測試上，HSV-1 帶狀疱疹動物模式來評估台灣本土中草藥抗簡單一型疱疹病毒及帶狀疱疹病毒之生物活性。最後藉由樹突狀細胞、T 細胞、骨髓衍生抑制性細胞及基質細胞等系統性免疫學研究，以了解中草藥對於免疫調節、抗病毒及抗腫瘤活性的調控方式。對於本土常用之中草藥，可研究及開發其特有之植物代謝物化學組成或其生物活性，以科學化的實證方式加以辨證其可能之療效，以擴大本土中草藥的應用發展。我們希望藉此計畫將此研發能量提供於台灣本土常用中草藥的科學化研究中，

為台灣中醫藥界及生技產業界建立實用而有系統的中草藥應用與開發案例。

本計畫規劃為期二年，在 102 年度我們完成主要的具體目標有下列兩項：

具體目標一：確認多種台灣本土常用藥用植物的物種來源並進行基原鑑定。

台灣本土常用藥用植物包含有(如：狗肝菜、半枝蓮、一支香、白花蛇舌草、正台灣蒲公英、黃水茄、黃花或大白花咸豐草、仙草、白豬母乳、桑黃、山苦瓜、狗尾草、破布子根、魚腥草、紅紫蘇、紅骨雞屎藤、七星月桃……等)。本計畫乃根據國人常使用且無毒之台灣本土中草藥而設計。並且是依據行政院衛生署中醫藥委員會 101 年度推動傳統醫藥(材)生技研發類委託研究計畫之需求而選定。其中包含十餘種常用中(台灣)草藥材，包括半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、桑黃、山苦瓜、狗尾草、破布子根、魚腥草、紫蘇葉、雞屎藤等。我們認為這些選擇符合目前以重要台灣本土中草藥作為研究目標之決定。這些選擇也與中研院生物多樣性研究中心彭鏡毅研究員合作協商過，進行了品種確認、基原鑑定及生態環境之需求。鑑定方法包括肉眼觀察(macroscopic identification)、鏡檢(解剖及顯微鏡併用)及分子基原鑑定檢測三種。肉眼觀察是將新鮮植物全株與特定的型態及器官，包含花、果實、種子等，與證據標本比對，以初步判別物種，包括亞種及培育種(cultivars)；鏡檢是利用顯微鏡檢查植物較細微的構造(如腺毛、細胞型態或結晶等)，並運用橫或直切面之組織切片的方式，檢查植物組織構造，如維管束排列。在分子標記鑑定層面，中草藥鑑定中最常被廣泛使用的方法是以核醣體核酸基因(rDNA)的內轉錄區(internal transcribed spacer, ITS)序列來鑑定物種的差別。我們會綜合以上的方法來鑑定本計畫選定之台灣本土中草藥，以避免中草藥未來的誤用或混用，以促進中藥使用上的安全。

具體目標二：以實證醫學健康上之“功能”分析，利用不同的生物活性/功效性（Bio-activity/Functional activity）測試平台，以協助定義或確認目標中草藥之“效用”，進而逐步落實中草藥科學化之目標。

實證醫學(Evidence Based Medicine, EBM)的定義是利用現有最佳醫療證據來為全民或特定族群的病人訂立治療計畫及提供醫療服務(Sackett et al, 1966)，為一門特定方法學之學科。以實證醫學健康上之“功能”分析，可意指在現代分生/細胞/基因組學等實驗系統中，求證其生化/細胞/組織/器官

及大體生理功能，固可用 cell，tissue，organ，animal model 及 human clinical trials 來一系列研究西藥如此，中藥亦然。以實證醫學健康上之“功能”分析，利用不同的生物活性/功效性(Bio-activity/Functional activity)測試平台，以協助定義或確認目標中草藥之“功能效用”，不僅可以進逐步落實中草藥科學化之目標，期望未來能對病患在臨床治療上帶來幫助。目前醫學研究及藥物發展上，藥物在臨床測試前，必須在細胞及動物等研究上，有充分的證據佐證其功效，進而才能進行各項臨床測試。本計畫在以協助定義或確認目標中草藥之“功能效用”的目標下，中草藥多元化地應用研究，就必須加強科學性(Science-based)、實證性(Evidence-based)之實驗室研究(Laboratory studies)。尤其以今日分子生物學、生化學、化學和資訊學發達的時代，中草藥實證醫學研究，近年來常常都能有出人意表的新發現，產生所謂「古藥新用」的情形。因此，在這個前提之下，我們可利用「現今不同的 (非舊有或古籍所記載的)」生物活性平台，來評估「舊藥新用」的可能性，增加這類台灣本土常用之中草藥在健康促進和疾病治療上的應用範圍。本計畫以楊寧蓀實驗室多年來在免疫調節方面的研究努力，所成功建立的「樹突狀細胞細胞激素調控」研究平台，來評估目標中草藥在抗發炎及免疫調節活性的表現。體內試驗方面則以老鼠乳腺腫瘤摘除(tumor resection)小鼠模式來評估台灣本土中草藥抗腫瘤轉移活性之評估。此外，有鑑於用以治療人類乳突病毒所引起生殖器的外敷性植物新藥(Veregen)開發的成功，以及台灣本土中草藥抗病毒活性研究亦為衛生署中醫藥委員會之台灣本土中草藥發展關注項目之一。因此，本計畫以 HSV-1 帶狀疱疹動物模式來評估台灣本土中草藥抗簡單一型疱疹病毒及帶狀疱疹病毒之生物活性。本計畫所建立之 老鼠原位乳癌動物模式(4T1 orthotopic mammary tumor animal model)和腫瘤摘除(tumor resection)模式及 HSV-1 帶狀疱疹動物模式，皆是在目前醫學研究上，分別用以研究乳癌轉移及帶狀疱疹之重要代表性動物模式 ，台灣本土中草藥在進行上述細胞動物模式評估後，將有助於未來臨床測試及應用之可行性。我們也期盼研究結果可應用於病人或一般人之防癌、抗癌上。

貳、材料與方法

一、藥用植物來源、炮製萃取與及結構分析：

本研究之藥用植物「大花咸豐草（Bidens pilosa）」採集自嘉義、苗栗、新北市與台北市等台灣數個地點。依粗萃物及植化物分層層析物回收率之高低，選取前兩產地再行測試不同產季與炮製方式之產出量。炮製方式則依據傳統中草藥店製作方式，分為新鮮使用、曬乾（烘乾）及陰乾等三種方式。不同產地、季節及乾燥方式之大花咸豐草，以 1:10 方式利用 95%食品/藥品及酒精萃取方式，（如 200g 草藥加 2000ml 酒精）浸泡三天後過濾。過濾液經減壓濃縮後，凍乾三天。再將粗萃物以 MeOH 稀釋，並以 MPLC（管柱：KP-C18-HS, Biotage SNAP Cartridge, 系統：Isolera One, Biotage）方式分離出 F1（主要之具生物活性/功效性層析物），再將濃度為 500mg/ml 之 F1 層析物以 HPLC（管柱：C-18：4.6x250mm， Cosmosil，系統： Agilent 1100, Agilent Technologies）分離並純化 F1 內所含之各層析物，以利用 LC/MS（Waters SYNAPT G1 HDMS System）進行初步結構分析。

二、利用不同的生物活性/功效性 (Bio-activity/Functional activity)測試平台，確認目標中草藥之“效用”。

2-1：腫瘤摘除(tumor resection)小鼠模式評估草藥萃取物之抗腫瘤轉移物活性：

選擇六周大小的 BALB/c 為老鼠之品種，單獨接種 4T1-luc2 老鼠乳癌細胞(5×10^5 細胞在 50L PBS 裡)，或是同時接種 4T1-luc2 及骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)於老鼠第五對乳腺的皮下組織。在接踵後第 18 天，將生長於乳腺上的腫瘤切除並縫合後，開始每天餵食大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層(5mg/kg/day)。每周利用 IVIS system 測量老鼠的冷光酵素(luciferase)活性大小、每兩天測量腫瘤大小和老鼠體重，並記錄老鼠存活時間。餵食中草藥萃取物四周後，將老鼠犧牲，測量腫瘤及脾臟重量並拍照記錄，以及以 IVIS system 測量老鼠胸腔的冷光酵素活性大小。

2-2：大花咸豐草酒精萃取物 F1 與紫杉醇(Taxol)抗腫瘤轉移活性測試及比較：

選擇六周大小的 BALB/c 為老鼠之品種，單獨接種 4T1-luc2 老鼠乳癌細胞(5×10^5 細胞在 50L PBS 裡)，或是同時接種 4T1-luc2 及骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)於老鼠第五對乳腺的皮下組織。老鼠於接種乳癌細胞 21 天後，切除腫瘤並開始每天餵食老鼠大花咸豐草酒精萃取物 F1(5 μg/kg/day)與紫

杉醇(Taxol)，每周利用 IVIS system 測量老鼠的冷光酵素(luciferase)活性大小以持續偵測腫瘤轉移情形，並每兩天測量腫瘤大小和老鼠體重與記錄老鼠存活時間。

2-3：大花咸豐草酒精萃取物 BP-E 及 F1 分層對骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)中磷酸化 STAT3 及磷酸化 STAT1 之影響：

常啟動的信號轉導和轉錄啟動子 3 (STAT3)的活化和細胞的惡性轉型與腫瘤進展中息息相關。而 STAT1 則被認為可以促進細胞凋亡並且活化一些發炎相關的免疫反應。因此，由脾臟中分離出的骨髓衍生抑制細胞分別與 BPE 及不同濃度之 F1 共同培養 1 天後，以西方墨點法(Western Blot)測量細胞中磷酸化 STAT3 及磷酸化 STAT1 的活性。

2-4：HSV-1 帶狀疱疹動物模式評估中草藥萃取物之抗簡單一型疱疹病毒及帶狀疱疹病毒活性：

A.檢測中草藥萃取物在細胞培養中抑制 HSV-1 的活性：

將培養在 24 孔盤培養皿的 Vero 或是 HELF 細胞($1x10^5$/孔)，以序列稀釋中草藥萃取物，包括狗乾菜、半枝蓮與大花咸豐草(原倍濃度約為 100 mg/ml，連續 10 倍序列稀釋至 100000 倍)預先處理 24 小時。再分別感染 $1x10^5$ PFU (MOI=1)、$1x10^4$ PFU (MOI=0.1)、$1x10^3$ PFU (MOI=0.01)的 HSV-GFP，並且在感染後 24 與 48 小時收集上清液，進行病毒定量分析。<u>HSV-1 病毒定量實驗:</u> 先在 24 孔盤中放入 1 x 10^5 Vero 細胞，並以 1 ml 的 10 % MEM 培養液培養 24 小時。將上述所收集的各組細胞培養的上清液，分別經過連續 10 倍序列稀釋至 100000 倍後，隔天，將 100 μl 的病毒液加進各孔盤的細胞。每個稀釋濃度皆作三重複後，置於 37 ℃培養箱培養 1 個小時後移除病毒液並加入 1 ml 的 1.25 % CMC (Carboxymethylcellulose) 以利病毒溶斑的形成。置於 37 ℃培養箱中培養 24~72 小時，待病毒溶斑形成後，小心吸除 CMC 培養液，並以 1 ml 的 PBS 緩衝液清洗每個孔洞兩次，再加入 4 % 的 paraformaldehyde (PFA)固定細胞並以磷酸緩衝液(PBS)清洗後，在螢光顯微鏡下計數螢光溶斑的數目，最後以溶斑形成單位(plaque forming unit)換算出病毒的效價。

B.檢測大花咸豐草在小鼠皮膚抑制 HSV-1 感染的活性的可能活性組分

將小鼠(C57/BL6)分成五組，每組 4 隻。分別在腹背側兩側皮膚感染 HSV-KOS ($1x10^6$ PFU)，24 小時後分別塗抹大花總萃取(1 mg/dose)、高劑量大花 F1 (0.1 mg/dose)、低劑量大花 F1 (0.01 mg/dose)以及 DMSO 溶劑為對照處理。為了解該中草藥萃取物本身對於皮膚的刺激情形，一組的小鼠皮

膚經過除毛、刮擦處理後，分別進行相同要物塗抹處理。小鼠皮膚分別在感染後第二天與第五天收取後，進行病理變化、細胞激素表達以及病毒效價分析。

參、結果

抗腫瘤活性分析：

本計畫是沿續 101 年度行政院衛生署中醫藥委員會計畫(開發具抗病毒及抗腫瘤活性之台灣本土中草藥並推廣其應用(2-1))之研究成果。在 101 年度裡，我們進行了半枝蓮、破布子根冷水萃取物在老鼠原位乳癌（primary tumor）動物模式之抗腫瘤生長的研究項目。在有關中草藥萃取物在 4T1 乳癌切除（Tumor resection）動物模型中的抗腫瘤轉移活性上，我們完成了大花咸豐草酒精萃取物對於抗腫瘤轉移的研究，結果豐盛。我們獲得了大花咸豐草酒精萃取物中的有效分層（fraction）。我們已初步完成大花咸豐草酒精萃取物抗腫瘤轉移之作用機轉。在本年度，我們藉由 HPLC、LC/MS(MS1)、MS/MS（MS2）及 NMR 等有機生化分析法，進行了大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層之化學組成分析，我們測得不同地區，不同季節及不同後製方法採集及處理的大花咸豐草之 F1 分層的基本含量及特殊組成。我們並完成了大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層之抗腫瘤轉移之活性測定，對其作用機轉進行了系統研究，其研究結果依序加以說明如下：

一、大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層之化合物組成

大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層在波長 235 nm 具有數根主要吸收波，我們分別名定為 A、B 及 C 。經由 HPLC 分析再藉由 LC/MS(MS1)與 MS/MS（MS2）及 NMR 分析並比對我們先前研究之結果顯示，大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層(A、B 及 C)皆為 polyacetylenic gucoside 的化合物(圖一)。這一結果非常重要，因此為一組植化物群，且具有未來專利申請之條件。

二、大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層與骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)對腫瘤轉移的影響

我們將 4T1 老鼠乳癌細胞接種於老鼠第五對乳腺的皮下組織，或是同時接種 4T1 及骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)於老鼠乳腺皮下組織。在接踵後第 18 天，將生長於乳腺上的 orthotropic 腫瘤切除並縫合後，開始每天餵食大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層(5mg/kg/day)。在實驗第 28 天，我們以活體即時冷光影像檢測系統(IVIS: In Vivo Imaging System)來偵測腫瘤轉移情形(圖二)。實驗結果顯示出骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)會促進腫瘤的轉移(圖二)，而餵食大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層可以有效地抑制由骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)刺激而產生的腫瘤轉移這個作用(圖二，請比較小鼠身上藍色螢光之多少)。

三、大花咸豐草酒精萃取物 F1 與化療藥物(Docetaxel)在抗腫瘤轉移活性之測試及比較

在大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層之抗腫瘤轉移活性測試中，我們將老鼠於接種乳癌細胞 21 天後，切除腫瘤並開始每天餵食老鼠大花咸豐草酒精萃取物 F1 (5 μg/kg/day)。與實驗對照組相比，F1 餵食可顯著抑制腫瘤轉移，所測得之 P-value 皆小於 0.05（圖三、A）。以使用活體影像分析系統進行老鼠腫瘤螢光表現量分析結果顯示，與實驗對照組比較，F1 和化療藥物 Docetaxel 均能抑制腫瘤轉移（圖三、B），而大花咸豐草組具有更顯著之差異，P-value 小於 0.01（圖三、C）。此結果顯示餵食 F1 植化物群顯然具強而有效之抗腫瘤轉移之功效。

四、大花咸豐草酒精萃取物對於脾臟腫脹及骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)族群聚集之影響

我們分析老鼠之三種組織，實驗結果顯示出(圖四、A)，大花咸豐草酒精萃取物 F1 與 Docetaxel 在對 $Ly6G^+$細胞群均有顯著抑制作用，這結果顯示了 gMDSC，而不是 mMDSC 群細胞參與轉移之作用。在使用活體影像系統來分析老鼠肺、肝、脾腫瘤轉移的螢光表現量，我們之結果也顯示大花咸豐草酒精萃取物 F1 與化療藥物 Docetaxel 均能抑制腫瘤轉移(圖四、B)。這些實驗有效地說明 F1 與 Docetaxel 具有很類似之抗腫瘤轉移之功能，為本研究提供未來可藥品畫及商品化之機會。

五、大花咸豐草酒精萃取物 BP-E 及 F1 分層對骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)中磷酸化 STAT3 及磷酸化 STAT1 之影響

我們進一步做了分生學上研究機轉之研究。由脾臟中分離出的骨髓衍生抑制細胞分別與 BPE 及不同濃度之 F1 共同培養 1 天後，以西方墨點法(Western Blot)測量細胞中磷酸化 STAT3 及磷酸化 STAT1 分子的活性。結果顯示 BPE 及 F1 可顯著抑制磷酸化 STAT3，但對於磷酸化 STAT1 的抑制則無顯著的影響(圖五)。先前研究顯示 STAT3 的活化參與 gMDSC 活化及幫助腫瘤轉移作用，而我們的研究結果顯示 F1 可阻止此一效果。我們比較大花咸豐草、F1 及 docetaxel 抗癌活性之各項結果於表一。

六、不同產地之大花咸豐草所含 F1 分層及其回收率之比較

收集不同產地、季節及乾燥方式之大花咸豐草，以 1:10 方式利用 95% 食品/藥品及酒精萃取方式，(如 200g 草藥加入 2000ml 酒精）浸泡三天後過濾。過濾液經減壓濃縮後，凍乾三天。再將粗萃物以 MeOH 稀釋，並以 MPLC 方式分離出 F1（樣品濃度為 1500mg)，再經由濃縮凍乾後，推算其

回收率。我們之研究結果顯示（見表二）：新北市金山及淡水、台北市天母及苗栗通霄採集的大花咸豐草，其 F1 分層佔大花咸豐草酒精萃取物之含量（以 MPLC 回收計）大約介於 1~2%間。自嘉義水上及溪口取得之樣本，F1 的含量則降至 0.15-0.16%。這些地理分布對未來種植農作之運用很重要。

七、不同採集地獲得之大花咸豐草粗萃物 profiling 與 F1 分層回收率比較

將不產地、處理方式之大花咸豐草，以上述工序萃取後，我們以 HPLC 測試此批大花咸豐草粗萃物之圖譜，測試條件如下：濃度：10mg/ml，注射量:50ul，管柱：C-18：4.6x250mm，Cosmosil，溶劑：MeOH & ddH_2O。測試結果顯示於表三。由 HPLC 粗萃物之圖譜來比較，F1 回收率與 F1 分層在 HPLC 圖譜之波峰與積分面積為正相關。表二 HPLC 圖譜的結果也印證了以 MPLC 方法分離 F1 分層所獲得之結果可吻合(表二)。

八、不同產地、不同後製方式之大花咸豐草（八月）F1 分層回收率比較：:

我們比較新北三芝與台北天母兩地同月份採收的大花咸豐草，利用不同乾燥方式處理後,如上述工序萃取後,並以 MPLC 方式分離出 F1 分層(樣品濃度為 1500mg)，再經由濃縮凍乾後，推算其回收率。我們之研究結果（表四）顯示，兩地所採收的大花咸豐草經過日曬或陰乾之乾燥方式內含 F1 分層之含量（以 MPLC 回收計)，皆比新鮮植物體直接酒精萃取後之產量為高。尤其以日曬方式處理後，新北三芝採集之大花咸豐草 F1 分層的回收率可高達 7%以上，約為其他方式之 5 倍以上，此結果有助於未來生技產業化之運用。

九、分析大花咸豐草 F1 分層所含化合物所含比重

大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層在波長 235 nm 有數根主要吸收波，分別定名為 A、B 及 C。我們分別收集了此三個層析物並分析 F1 各層析物回收之純度（10 ng/inj.）及所佔比例詳見圖六。化合物 polyacetylenic gucoside (A)、(B)及(C)所含比例分別為 17.5%、25%及 46.5%。三種化合物比例總和高達 F1 總值的 89.25%。

抗病毒活性之分析：

在 101 年度之中草藥萃取物抗病毒活性分析上，我們完成了狗肝菜、半枝蓮、破布子根與大花咸豐草酒精萃取物等四種中草藥對於抗疱疹病毒的活性與影響發炎反應相關的檢測。初步實驗結果顯示，狗肝菜、半枝蓮、破布子冷水萃取物與大花咸豐草酒精萃取物能顯著地抑制病毒蛋白的表現量或是對於傷痂的復原也有正向的作用，其中尤其以大花咸豐草酒精萃取物尤其顯著。在本年度中，我們因而針對大花咸豐草酒精萃取物及以及其

特定分層作了更深入的探討，其研究結果依序加以說明：

十、建立 HSV-GFP 感染後的細胞：

HSV-GFP 與原型 HSV-1 KOS strain 感染 Vero 細胞後的病毒效價介於 0.5-21 x 10^8 PFU/ml。感染後 24 小時可開始表現出綠色螢光，到了 48 小時形成典型的病毒溶斑 (圖七)。計數綠色螢光的溶斑數目與用 anti-HSV-1 Ab 免疫組織染色所得到的病毒定量結果為一致。因此，利用計算綠色螢光數可以直接對應病毒效價。

十一、以細胞培養檢測中草藥萃取物抗病毒活性實驗結果

(一)在 Vero 細胞方面：

雖然狗肝菜在 1 mg/ml 濃度下表現綠色螢光的細胞減少，但是死亡的細胞數也很多。這說明在該濃度下它對於細胞有明顯毒性。雖然半枝蓮在相同濃度下不會造成細胞死亡，但也未顯著減少螢光數目。可見未具有直接抑制 HSV-1 的效果。大花咸豐草酒精萃取物在 1 mg/ml 濃度下具有顯著抑制病毒溶斑的形成，但在 0.1 mg/ml 的濃度就沒有抑制的效果（圖八）。

(二)在 HELF 細胞中方面：

配合楊寧蓀博士實驗室已經完成從大花咸豐草酒精萃取物分離得到的四群組分，分別稱為 F1, F2, F3 與 F4 分層，我們也將此四種組份分別進行 HSV-1 抑制實驗。經過至少三次的實驗檢測我們發現：雖然高濃度的大花 F2 與 F3 (500μg/ml)對於細胞沒有毒性，但是 F1 在 18-500 μg/ml 濃度以及 F4 在 500 μg/ml 濃度下，顯著可造成細胞死亡的毒性。大花咸豐草酒精萃取物必須要在 333 μg/ml 濃度以下才不會造成細胞毒性。

病毒溶斑試驗後的結果發現：大花 F2 與 F3 並沒有抑制 HSV-1 的作用，此數據未列入圖九中。狗肝菜與大花咸豐草全萃取分別在 1000 μg/ml 與 100 μg/ml 濃度下有顯著的抑制病毒能力 (但比未處理組下降約 10 倍* $p<0.05$)。但是抑制 HSV-1 感染細胞的程度仍比不上第一型干擾素的抑制效果(比未處理組下降約 1000 倍 * $p<0.05$)。

從以上的實驗結果說明，之前我們在動物實驗發現的中草藥萃取物對於調節 HSV-1 感染皮膚的作用機制，極有可能不是通過直接抑制 HSV-1 複製的作用，而是通過促進個體的免疫防衛機制而達到控制病毒的效果。我們原來希望能藉由**細胞實驗**

平台建立篩選本土中草藥抗病毒活性的構想即可能有很大的限制。

十二、檢測大花咸豐草在小鼠皮膚抑制 HSV-1 感染的活性的可能活性組分

大花咸豐草酒精萃取物在 100 μg/ml 濃度下在 HELF 中具有抑制 HSV-1 感染的效果。雖然大花 F1 在 10 μg/ml 濃度下沒有顯著的抑制效果，但是從楊寧蓀博士研究團隊在抗癌實驗的初步結果顯示大花具有此活性之成分應該在 F1 分層中。

為了直接檢測大花 F1 組分在活體內的抗病毒活性，我們初次實驗選用 HSV-GFP 感染小鼠皮膚後塗藥。第一次的實驗結果在未處理組部分並未出現預期應該有的至少 90%的感染率。經過重複的結果也無法獲得過去理想的結果。由於所有的實驗條件除了 HSV-GFP 外，其餘都維持不變。我們推論該具基因重組 GFP 之病毒雖然仍具有感染細胞的能力，但是也卻有可能影響了動物皮膚的致病性。雖然初步構想希望可利用該重組病毒進行日後大量篩檢抗病毒活性中草藥活性組分，甚至進一步探討該組份抑制病毒生長、擴散的分子機制，但是在皮膚感染力的問題未獲解決之前，我們以下的實驗仍維持採用原來的 HSV-1 KOS strain，以期維持一定的研究進度。

(一)病毒效價分析

小鼠皮膚感染後第五天，各組的病毒效價分析（結果如圖十）與過去的實驗結果是一致的，與未處理組 HSV-1 感染的皮膚相比，經過大花咸豐草酒精萃取物處理的小鼠皮膚顯著的抑制 HSV-1 的複製 p=0.02)。大花 F1 不論是高劑量或是低劑量，對於 HSV-1 的病毒效價雖然一致的比未處理組的病毒量略低，但是並沒有達到統計上的顯著的差異(p=0.17 和 p=0.13)。

(二)皮膚病理與病毒蛋白表現分析

病毒感染後的皮膚傷口組織切下後經過固定液固定與石蠟包埋後切片(5 μm)，並以 Hematoxyline & Eosin (H &E)染色法分析其組織病理型態的變化(圖十一)。測試中，我們亦同時保留各組經過除毛與刮擦處理後塗藥但是未感染 HSV-1 組(mock)作為皮膚對藥物反應的比較。從圖十一的結果可知，大花咸豐草酒精萃取物或是其 F1 分層對於小鼠皮膚沒有明顯的刺激作用(day 5, mock)。而未塗藥但經過 HSV-1 感染皮膚後第二天後，皮膚有明顯的細胞浸潤現象。到了第五天，皮膚的病理現象顯著包含了組織間細胞體積變大(cell ballooning)、表皮組織增生變厚、細胞崩解(reticular

degeneration)、已壞死細胞的染色質聚集在一起呈現許多不規則的團塊狀(chromosome condensation)以及組織間到處可見空泡的形成(vesicle formation)。免疫細胞浸潤現象也清楚可見。而塗抹了大花咸豐草酒精總萃取物 HSV-1 感染的皮膚，雖然在第二天時在皮膚的基層組織(basal layer)有出現細胞空泡，但到第五天時傷痂已經有較好的修復，免疫細胞浸潤的現象也不若未處理組明顯。然而，不論是塗抹高劑量或是低劑量 F1 分層的小鼠皮膚，經過 HSV-1 感染後對於皮膚組織的破壞仍顯著、免疫細胞浸潤的數量很高，與未處理組相比並沒有明顯差別。因此，就皮膚的病理變化來看，雖然大花咸豐草對於 HSV-1 感染的皮膚有部分保護的效果，相較而言狗肝菜酒精萃取物處理組織的完整性則較好，表示大花 F1 分層似乎容易造成對皮膚細胞的毒性。這個分析結果與感染 HSV-1 後皮膚外觀傷痂的變化很一致。

相同組織連續切片經過anti-HSV-1抗體的免疫化學染色分析結果（如圖十二）顯示，雖然在感染後第二天 HSV-1 病毒蛋白的表現在該處幾乎測不到，但是在未處理組第五天的組織切片上卻明顯可見。相較之下，塗抹大花咸豐草酒精總萃取物的皮膚，HSV-1 病毒蛋白的表現明顯減少，並且侷限在表皮層的較上層細胞。塗抹 F1 分層的皮膚，HSV-1 病毒蛋白的表現在多處，染色的強度較未處理組低。綜合與病毒效價分析之結果，大花 F1 分層可能具有抗病毒的活性。但是，它對於皮膚組織也具毒性，可故應用上需要考慮其副作用。

(三)大花萃取物對於皮膚抗病毒基因表現分析

為了探討大花咸豐草酒精萃取物是否能誘發細胞抗病毒基因的表現，我們對經過 HSV-1 感染並經過各組大花萃取物處理後的小鼠皮膚組織進行了 *Ifit1* 及 *Oas2* 基因表現量之分析。這兩個基因所轉譯的蛋白是已知具有抑制病毒 RNA 合成的功能。實驗結果於圖十三。

與未處理組相較，大花咸豐草酒精萃取物與低劑量 F1 分層在感染後第二天可以增加 *Ifit1* 和 *Oas2* 基因之表現。而高劑量之 F1 分層反而對於這兩個抗病毒基因的表現沒有提高，表示作用不強或不穩定。因此，雖然大花咸豐草之酒精萃取物具有抗 HSV-的作用，但是大花咸豐草酒精萃取物之具有抗病毒活性的有效成分很可能

並不是在 F1 分層。

(四)嗜中性白血球浸潤分析

從 H & E 染色組織的病理分析發現，經過塗抹 F1 分層以及 HSV-1 感染的皮膚，在皮下組織有明顯的嗜中性白血球浸潤。我們知道過多的嗜中性白血球浸潤容易造成組織的破壞(immunopathology)。為了在我們系統中研究這個現象，相同在組織連續切片經過 anti-Ly6G 抗體(嗜中性白血球的特定表面抗原)的免疫化學染色分析後並且計算細胞總數的變化。實驗結果整理如圖十四。

我們已知 HSV-1 感染會誘引嗜中性白血球之浸潤。如圖十四 A，未處理組的皮膚感染 HSV-1 後有顯著的嗜中性白血球浸潤，但是到了第五天會開始減少。經大花咸豐草酒精萃取物處理後，嗜中性白血球浸潤不論是第二天或是第五天都比未處理組較少。但是不論是高劑量或是低劑量，在經 F1 分層處理後，嗜中性白血球浸潤的數量卻逐漸增加。細胞數量化分析結果具有統計上的顯著差異(如圖十四 B)。這些結果顯示，大花咸豐草 F1 不適合使用於此一 HSV 感染作用中，或許大花咸豐草酒精總萃取物有可應用價值。

(五)皮膚發炎反應分析

為了進一步了解經 F1 分層處理後的感染皮膚引起顯著的嗜中性白血球浸潤是否會影響此系統之發炎反應，我們將各組的小鼠感染局部皮膚於感染後第 2 天與第 5 天分別抽取其組織 RNA，並合成其 cDNA，再以即時定量 PCR(real-time PCR)測量小鼠皮膚中發炎基因(*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*) mRNA 表現程度。從圖十五的結果明顯可見，與未處理組的皮膚相較，大花咸豐草酒精萃取物對於發炎激素 IL-1β與 IL-6 的表達影響不大，但是 F1 分層則可顯著提高這兩種發炎激素的基因表現，表示有特異性之促發炎之作用，而各種處理對於 TNF-α的影響則不大。

(六)皮膚受激後的發炎反應分析

受不同類激後的皮層細胞已知能分泌多種細胞激素(cytokines)或是化學趨化激素(chemokines)，造成皮膚組織的不同之多樣的發炎反應。因此我們也進一步檢測及分析了各種大花咸豐草萃取物在處理皮膚後，其對於嗜中性白血球浸潤相關的基因 *Cxcl1, Cxcl10, Ccl2* 與 *G-csf* 之表現。如圖十六所示，低劑量 F1 分層對於 *Cxcl1* 與

Ccl2 mRNA 量有最顯著的增加。高劑量 F1 分層則是對於 *Cxcl10* 的影響最大。成功大學陳舜華教授最近的研究結果指出，Cxcl10 是嗜中性白血球的驅化因子，她們指出在 Cxcl10 缺失鼠（knock out mice）有更嚴重的疱疹性角膜炎 (Shen 等)，本實驗結果則指出過多的 Cxcl10 亦會造成皮膚組織嗜中性白血球浸潤過多，可能容易造成病理破壞。

最後，我們也將部分皮膚組織研磨並抽取其總蛋白萃取液(total protein lysate)進行蛋白定量分析，實驗結果顯示在圖十七。雖然各組皮膚在感染後第二天不論是在 CXCL1 或是 G-CSF 的產量均極低，到了第五天後除了大花咸豐草總萃組織外，其餘各組在 CXCL-1 有明顯提高。特別是高劑量 F1 分層的結果更顯著 ($p<0.05$)。另外，在測試會影響嗜中性白血球從骨髓中成熟並且釋放到血流中的 G-CSF 中，不論是在高劑量或是低劑量 F1 分層處理組，其表達量都比大花咸豐草酒精萃取物為高。本實驗結果再次說明 F1 分層對於皮膚細胞的毒性，除了造成細胞死亡之外，還有可能刺激皮層細胞產生更高的發炎激素的表現，甚至誘發更多的嗜中性白血球浸潤皮膚組織。

肆、討論

一、物種來源及基原鑑定

本計畫是依據行政院衛生署中醫藥委員會 101 年度推動傳統醫藥(材)生技研發類委託研究計畫之需求而選定。其中包含十餘種常用中(台灣)草藥材，包括半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、狗尾草、破布子根、魚腥草、紫蘇、雞屎藤、桑黃、狗肝菜及大花咸豐草等作為研究材料，藉由我們所建立一系統化研究平台，包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並以具體細胞學/分子生物學的生物活性測試平台及動物實驗模式，以確定台灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分及生物活性，進而提升本土中草藥之應用價值。在基原鑑定研究上，除了桑黃外，包括半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、破布子、魚腥草、紫蘇、雞屎藤及狗肝菜。這些藥草植物，在外部型態上極容易辨認，故應不易有混用、誤用等情形的發生。本計畫中草藥植株皆採集自北部地區，我們有進行組織切片觀察及核醣核酸基因序列分析。在莖部切片上，各植物莖部組織皆呈現其特有構造。在序列分析上，雞屎藤、破布子與 NCBI 基因庫之最相近物種的相似度僅達 92%-91%，其餘上列中草藥植株樣本與其最相近物種序列皆達 99%以上。本次研究所使用之桑黃樣本，乃自中研院附近中藥行購得，核醣體核酸序列分析結果顯示，其最相似菌株為與桑黃(*Phellinus linteus*)同為刺革菌科（Hymenochaetaceae）的 *Porodaedalea* sp.，顯示市售的桑黃許多可能來自與桑黃相近之菌種，則或有誤用之可能。綜合中草藥植株外部形態觀察、組織切片鏡檢及核醣體核酸序列分析結果顯示，除了桑黃以外，本研究所採集的中草藥植株樣本皆為正確之物種。

二、中草藥萃取物對細胞激素調控活性

樹突狀細胞是一重要的免疫細胞，它在免疫系統中，扮演著中樞調節的角色。樹突狀細胞參與各項免疫反應，如及發炎反應、對抗外來病原體感染免疫反應、抗腫瘤免疫反應等反應。細胞激素的表現被認為是樹突狀細胞用以調節免疫反應之一重要因子。一些促發炎細胞激素如 TNF-a、IL-6 及 IL-12 等會活化其他免疫細胞及引發發炎反應。本計畫以樹突狀細胞所表現之細胞激素所建立的體外篩選平台，採用酵素免疫分析法來評估中草藥萃取物對於重要促發炎細胞激素之表現情形用以評估中草藥萃取物之抗發炎活性及免疫調節活性是合理且實用的策略。在評估各種中草藥冷水、熱

水萃取物發現對於 IL-12 細胞激素之表現情形，我們的研究結果顯示半枝蓮、山苦瓜、破布子及魚腥草冷水萃取物對於細胞激素 IL-12 很好抑制活性，然而上述中草藥熱水萃取物對於 IL-12 抑制能力則大大降低，這說明以冷熱水萃取上述中草藥所能獲得之不同植物化合物組成與其抑制活性有很大的關係。具抑制活性之中草藥萃取物其植物化合物之組成及其有效成份需待後續實驗加以分析。

三、中草藥萃取物抗腫瘤活性分析

在原位乳癌細胞動物模型中，老鼠 4T1 乳癌腫瘤細胞在西方醫學研究上，被認為是非常惡性及具高度轉移率之腫瘤細胞，因此，老鼠 4T1 乳癌腫瘤細胞及動物模式乃適合及廣泛被用於研究腫瘤轉移等相關實驗。在評估中草藥萃取物對抑制老鼠原位乳癌腫瘤生長活性上，我們實驗結果顯示出，大花咸豐草酒精萃取物、半枝蓮及破布子根冷水萃取物皆具有一定程度之抑制原位腫瘤的生長的活性。我們又進一步以老鼠乳腺腫瘤切除動物模型，評估了中草藥萃取物抑制乳癌細胞轉移活性，我們實驗結果顯示大花咸豐草酒精萃取物具有強力抑制腫瘤轉移的活性能力及可延長老鼠的存活時間。我們亦觀察到原位腫瘤生長的大小與脾臟的腫脹程度及腫瘤細胞轉移的發生率有正向的關聯。另外以帶有 CD11b 或 Gr1 標記的骨髓衍生抑制細胞族群在脾臟的數量亦與腫瘤生成大小及腫瘤接種的天數成正相關並且予腫瘤轉移也很大的關聯。我們的研究結果顯示大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制腫瘤所引發的脾臟腫脹的情形，進一步分析顯示大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制脾臟的老鼠骨髓衍生抑制細胞族群。體外細胞實驗顯示大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制骨髓細胞 G-CSF 受體的表現量及骨髓衍生抑制細胞的分化，這些結果說明大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制老鼠乳腺腫瘤的轉移可能是藉由抑制骨髓衍生抑制細胞的分化有關。大花咸豐草抗乳癌轉移活性的作用機轉，我們認為與調控 G-CSF 受體表現的訊息傳導有所關聯。

四、大花咸豐草酒精萃取物活性分層之測試

我們以 Cosmosil C18 分離管柱分析大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)之 HPLC 化學指紋圖譜並偵測出波長 235nm 有數根主要吸收波。我們區分成 4 個分層(F1 至 F4)。由於我們已知道 BP-E 可以有效抑制老鼠乳腺腫瘤的轉移可能是藉由抑制骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)的功能及分化有關。因此，為了確認 BP-E 之活性分層，我們體外測試 BP-E 及個別分層(F1 至 F4)對於 MDSCs 表現 ROS 的影響。結果顯示 BP-E 可有效抑制 MDSCs 產生 ROS，

在個別分層中，F1 具有顯著抑制 ROS 的產生，因此我們認為 F1 分層可能是 BP-E 活性分層。我們另外藉由 G-CSF 細胞激素刺激骨髓細胞分化出 MDSCs 的實驗也測得 F1 至 F4 分層之中，以 F1 分層最能有效抑制 MDSCs 的分化。藉由抑制 MDSCs 的分化及產生 ROS 的功能，我們認為 F1 分層為 BP-E 的有效分層。

五、大花咸豐草酒精萃取物活性分層之測試

為了確認 F1 分層為 BP-E 的活性分層，我們以老鼠 4T1 乳腺腫瘤切除動物模型來評估 F1 分層之抗腫瘤轉移的活性。我們老鼠每日餵食 5mg/kg 的劑量，可以發現 F1 分層是可以有效抑制老鼠 4T1 乳腺腫瘤的轉移並且可抑制 MDSCs 在血液、脾臟及肺臟器官的蓄積。因而可以確認 F1 分層為 BP-E 抗腫瘤轉移之活性分層。

六、F1 分層化合物結構鑑定及含量測定

經由 HPLC 分析再藉由 LC/MS (MS1)與 MS/MS (MS2)及 NMR 分析並比對我們先前研究之結果顯示，大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層(A、B 及 C)皆為 polyacetylenic gucoside 的化合物(圖一)。而且化合物 polyacetylenic gucoside (A)、(B)及(C)所含比例分別為 17.5%、25%及 46.5%。三種化合物比例總和高達 F1 總值的 89.25%。顯示化合物 polyacetylenic gucoside 極有可能是 BP-E 及 F1 分層之抗腫瘤轉移的有效成分。以化合物 polyacetylenic gucoside 在 F1 分層高達 89.25%，我們認為 BP-E 及 F1 分層未來極有潛力朝植物新藥方向研究發展。

七、比較不同季節、產地及製備方法對F1分層在BP-E含量之影響

我們比較不同地區不同季節採集的大花咸豐草發現，苗栗通霄以北採集的大花咸豐草，其 F1 分層佔大花咸豐草酒精萃取物之含量（以 MPLC 回收計）大約介於 1~2%間。然而比較不同處理大花咸豐草方法，以日曬可以得到最高的 F1 的含量（可高達 7%）。未來我們將固定以採集自新北三芝地區的大花咸豐草並以日曬方法製備，以獲得穩定高產率之 F1 分層以供後續研究使用。

八、中草藥萃取物抗 HSV-1 病毒活性分析

HSV-1 與另一常見的水痘疱疹病毒(Varicella-zoster virus 之 VZV)同為人類 alpha 亞族疱疹病毒。二者的致病機制有多種相似之處，例如：主要以皮膚的皮層細胞(keratinocyte) 為感染標靶細胞(target cells)。未經免疫的個體初次經過感染 HSV-1 後雖然沒有明顯的臨床症狀，幼童感染 VZV 約二周內全身皮膚即出現水痘等顯著的症狀。二種病毒經過急性期的感染後，多數

的病毒雖然會被免疫反應所激活的 T 細胞清除，但是極少數的病毒量一旦經過末端神經細胞進入感覺神經節後即可造成終身潛伏感染。當個體的免疫活性下降，或是使用免疫抑制藥物，就可大幅提高病毒復發感染的機會。例如臨床常見的 HSV-1 疱疹性角膜炎與 VZV 引起的帶狀疱疹等。

由於人類是 VZV 唯一的自然宿主，目前並無適當的小型動物實驗模式可供使用。HSV-1 具有感染小鼠的能力，但是呈現的症狀與小鼠的品系、病毒株、感染途徑與病毒量有關，與人類的症狀不盡相同。但是 HSV-1 感染小鼠腹側皮膚所出現的病理變化例如皮層細胞的增生現象、免疫發炎反應與免疫細胞浸潤、病毒複製與病毒蛋白的表現等等，與過去我們研究 VZV 感染轉殖在免疫缺失小鼠的異源皮膚(xenograft)或是水痘的病理組織(biopsies)非常的類似。因為要在活體中研究中草藥萃取物對於抗 VZV 疱疹病毒的生物活性/功效性有極高的侷限，本實驗選用 HSV-1 感染動物模式篩選特定藥物或是活性成分對於病毒感染引發的發炎反應調節效果是一個合理而且可行的替代方法。本實驗將利用 HSV-1 皮膚疱疹動物模式，從皮膚傷痂的外觀變化、HSV-1 病毒總量、皮膚病理變化、發炎反應與發炎反應相關的細胞激素表達變化等方面評估所選定的數種中草藥對於調節疱疹病毒感染的抗病毒作用。

伍、結論與建議

承蒙行政院衛生署中醫藥委員會核定本研究計畫，在本研究計畫核定後，我們即按照本計畫所擬定之研究目標及實驗規劃進行各項實驗。在 101 年度中，我們研究進度符合計畫所設定之本年度研究目標，我們亦獲得很好的研究成果。我們研究成果在基原鑑定上，我們完成半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、狗尾草、破布子、魚腥草、紫蘇葉、雞屎藤、桑黃、破布子及魚腥草中草藥之外部形態觀察、鏡檢及核醣核酸序列的分析工作。在分析中草藥萃取物對樹突狀細胞細胞激素表現之項目上，我們完成狗肝菜、半枝蓮、白花蛇舌草、仙草、山苦瓜、狗尾草、破布子、魚腥草、紫蘇葉、雞屎藤、桑黃、破布子及魚腥草，包括酒精、冷水、熱水三種萃取物以及大花咸豐草酒精萃取物之製備。我們亦完成上述中草藥萃取物對樹突狀細胞表現 IL-6 及 IL-12 細胞激素表現之影響，其中半枝蓮、山苦瓜、破布子、魚腥草及大花咸豐草萃取物對於抑制 IL-12 表現有顯著的抑制活性。在抗腫瘤活性分析上，我們進行半枝蓮、破布子根冷水萃取物在老鼠原位乳癌動物模式之抗腫瘤生長的研究項目，中草藥萃取物在乳癌切除動物模型中的抗腫瘤轉移活性上，我們完成大花咸豐草酒精萃取物抗腫瘤轉移的研究並獲得大花咸豐草酒精萃取物其有效分層。在抗病毒活性上，在 101 年度中我們已完成狗肝菜(包括酒精、冷水、熱水三種萃取方法)、半枝蓮、破布子根冷水萃取物與大花咸豐草酒精萃取物等四種中草藥對於抗疱疹病毒的活性與影響發炎反應相關的檢測。初步實驗結果發現，狗肝菜特別是冷水萃取的方法，經過外敷的方式確實顯著地降低 HSV-1 的病毒量，但是塗藥後的第一天似乎容易造成皮膚細胞的死亡的毒性，不過該作用在第五天就不顯著。相較之下，狗肝菜熱水萃取物不論對於 HSV-1 傷痂的形成與修復，或是皮膚病理、發炎反應等，都不若冷水萃取理想。所有四種萃取物都有不同程度抗病毒的效果。同時都能在感染 48 內引發顯著的免疫細胞浸潤，促進病毒感染組織後造成破損皮膚的修復。另外，半枝蓮、破布子冷水萃取物與大花咸豐草酒精萃取物對於傷痂的復原似乎也有正向的作用，同時也能顯著抑制病毒蛋白的表現量。在 102 年度中，我們在中草藥抗腫瘤轉移活性成果上，我們確認大花咸豐草酒精萃取物(BP-E)有效分層(F1 分層)，並且利用動物模式再次確認 F1 分層抗腫瘤轉移活性及其可能作用機轉。我們更進一步鑑定出 F1 分層的化學組成及其含量。此外，我們比較不同地區不同季節及不同採收處理之大花咸豐草其 F1 分層含量的差異。

我們更進一步確認最適生產的條件。在抗病毒活性測試上，我們已完成多項研究結果，尤其是利用 HSV-1 皮膚疱疹動物模式本研究已經初步完成數種選定的本土中草藥對抗 HSV-1 活性分析。尤其對於大花咸豐草以及特定的活性組分有更深入的探討。雖然該活性分層(F1)對於抗腫瘤形成與轉移有顯著的效果，但是在本動物實驗中顯示其對於皮膚組織的可能毒性，以及造成更嚴重的發炎反應。這個現象與抗癌和發炎反應常有相牴觸的免疫作用機制似乎是個有趣的相關。然而，天然的中草藥總萃對於皮膚組織所呈現的溫和卻有效的抗病毒反應，說明中草藥中本身具有多種的成分共同調節與激活免疫反應。釐清不同成分的作用機制可能是未來值得作進一步研究的方向。我們相信本計畫所建立之方法及研究成果將有助於台灣本土常用或傳統中草藥抗發炎、抗腫瘤及抗病毒活性之現代化研究及開發台灣本土常用中草藥未來潛在之應用價值。本計畫在抗腫瘤及抗病毒研究所獲得的成果，我們相信已足可申請至少兩項以上的研究專利，並可將成果於一年內發表於兩篇國際高質量(eg., IF> 4)之相關研究期刊。目前我們除了進行後續的研究工作外，我們也正積極同時準備專利申請及研究期刊之發表。除此之外，我們認為本研究計畫還有許多重要議題值得我們進一步釐清探討。本計畫在人才培育貢獻上，本研究計畫執行初至今已投入 8 位博士、碩士級研究人員及博士班、碩士班學生。我們認為這些研究人力未來將有助於台灣在中草藥研究及產業發展之推動。我們亦認為本計畫所建立之方法及研究成果亦將有助於幫助公共政策制定及推動。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-115 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. Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med* **17**, 1217-1220 (2011).
2. Yuan, R. & Lin, Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacol Ther* **86**, 191-198 (2000).
3. Galloway, J.A. Everyday food may contain hidden health benefits. *Wadison State Journal,* (1998).
4. Gorman, C. Power sprouts: they're even better than broccoli at fighting cancer. *Time* (1997).
5. 柯逢年. Veregen®成功案例分析與植物新藥研發策略. *RegMed* **2**, 1-9 (2010).
6. Lai, L.S., Chou, S.T. & Chao, W.W. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (Mesona procumbens Hemsl) leaf gum. *J Agric Food Chem* **49**, 963-968 (2001).
7. Hung, C.Y. & Yen, G.C. Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from Mesona procumbens Hemsl. *J Agric Food C hem* **50**, 2993-2997 (2002).
8. Yen, G.C., Hung, Y.L. & Hsieh, C.L. Protective effect of extracts of Mesona procumbens Hemsl. on DNA damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide and UV irradiation. *Food Chem Toxicol* **38**, 747-754 (2000).
9. Shyu, M.H., Kao, T.C. & Yen, G.C. Hsian-tsao (Mesona procumbens Heml.) prevents against rat liver fibrosis induced by CCl(4) via inhibition of hepatic stellate cells activation. *Food Chem Toxicol* **46**, 3707-3713 (2008).
10. Yin, X., Zhou, J., Jie, C., Xing, D. & Zhang, Y. Anticancer activity and mechanism of Scutellaria barbata extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sci* **75**, 2233-2244 (2004).
11. Cha, Y.Y.*, et al.* Methylene chloride fraction of Scutellaria barbata induces apoptosis in human U937 leukemia cells via the mitochondrial signaling pathway. *Clin Chim Acta* **348**, 41-48 (2004).
12. Kim, E.K.*, et al.* Induction of G1 arrest and apoptosis by Scutellaria barbata in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int J Mol Med* **20**,

123-128 (2007).
13. Goh, D., Lee, Y.H. & Ong, E.S. Inhibitory effects of a chemically standardized extract from Scutellaria barbata in human colon cancer cell lines, LoVo. *J Agric Food Chem* **53**, 8197-8204 (2005).
14. Yang, J.J., Lin, C.C. & Hsu, H.Y. The possible use of Peh−Hue−Juwa−Chi−Cao as an antitumour agent and radioprotector after therapeutic irradiation. *Phytotherapy Research* **11**, 6-10 (1997).
15. Lin, C.C., Ng, L.T., Yang, J.J. & Hsu, Y.F. Anti-inflammatory and hepatoprotective activity of peh-hue-juwa-chi-cao in male rats. *Am J Chin Med* **30**, 225-234 (2002).
16. Kim, H.M.*, et al.* Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom Phellinus linteus. *Int J Immunopharmacol* **18**, 295-303 (1996).
17. Song, Y.S.*, et al.* Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom Phellinus linteus. *J Ethnopharmacol* **88**, 113-116 (2003).
18. Hur, J.M.*, et al.* Antibacterial effect of Phellinus linteus against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Fitoterapia* **75**, 603-605 (2004).
19. Kim, S.H.*, et al.* Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom Phellinus linteus. *J Ethnopharmacol* **93**, 141-146 (2004).
20. Jayasooriya, A.P.*, et al.* Effects of Momordica charantia powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *Journal of ethnopharmacology* **72**, 331-336 (2000).
21. Ahmed, I., Lakhani, M.S., Gillett, M., John, A. & Raza, H. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic Momordica charantia (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* **51**, 155-161 (2001).
22. Miura, T.*, et al.* Hypoglycemic activity of the fruit of the Momordica charantia in type 2 diabetic mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **47**, 340-344 (2001).
23. Omoregbe, R., Ikuebe, O. & Ihimire, I. Antimicrobial activity of some

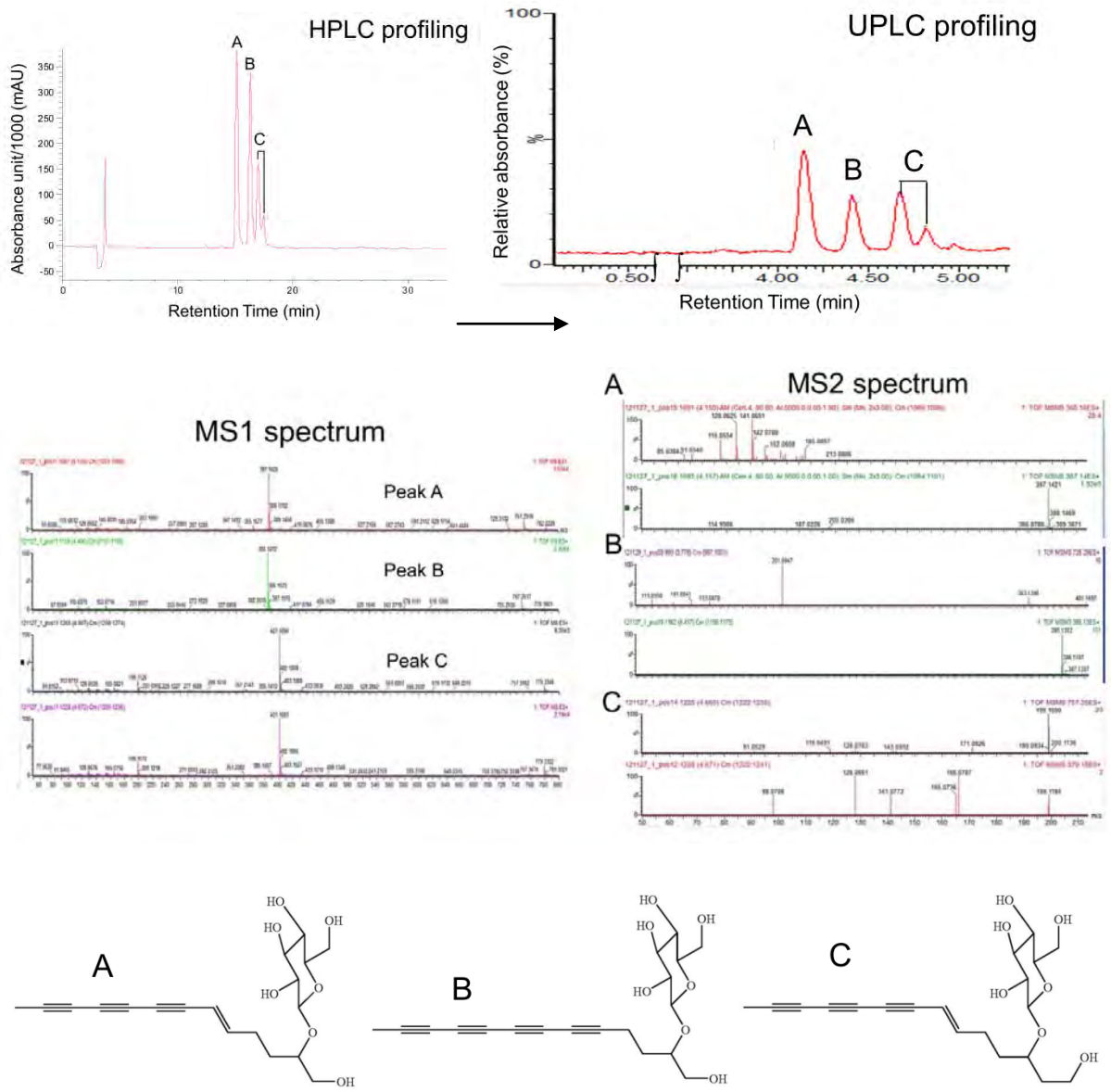
medicinal plants extracts on Escherichia coli, Salmonella paratyphi and Shigella dysenteriae. *African journal of medicine and medical sciences* **25**, 373 (1996).

24. Claflin, A.J.*, et al.* Inhibition of growth and guanylate cyclase activity of an undifferentiated prostate adenocarcinoma by an extract of the balsam pear (Momordica charantia abbreviata). *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 989-993 (1978).
25. Takemoto, D.J., Dunford, C. & McMurray, M.M. The cytotoxic and cytostatic effects of the bitter melon (Momordica charantia) on human lymphocytes. *Toxicon* **20**, 593-599 (1982).
26. Lee, D.K.*, et al.* Momordins inhibit both AP-1 function and cell proliferation. *Anticancer research* **18**, 119-124 (1998).
27. Miser, J.S.*, et al.* Phase II trial of indicine N-oxide in relapsed acute leukemia of childhood. A report from the Childrens Cancer Study Group. *Am J Clin Oncol* **15**, 135-140 (1992).
28. Srinivas, K., Rao, M. & Rao, S. Anti-inflammatory activity of Heliotropium indicum linn. and Leucas aspera spreng. in albino rats. *Indian Journal of Pharmacology* **32**, 37-38 (2000).
29. Adelaja, A.A.*, et al.* Evaluation of the histo-gastroprotective and antimicrobial activities of Heliotropium indicum Linn (Boraginaceae). *Malaysian Journal of Medical Sciences* **15**, 22-30 (2008).
30. Reddy, J.S., Rao, P.R. & Reddy, M.S. Wound healing effects of Heliotropium indicum, Plumbago zeylanicum and Acalypha indica in rats. *J Ethnopharmacol* **79**, 249-251 (2002).
31. Ueda, H., Yamazaki, C. & Yamazaki, M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of Perilla frutescens. *Biological & pharmaceutical bulletin* **25**, 1197-1202 (2002).
32. Banno, N.*, et al.* Triterpene acids from the leaves of Perilla frutescens and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 85-90 (2004).
33. Osakabe, N.*, et al.* Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of Perilla frutescens, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radic Biol Med* **33**,

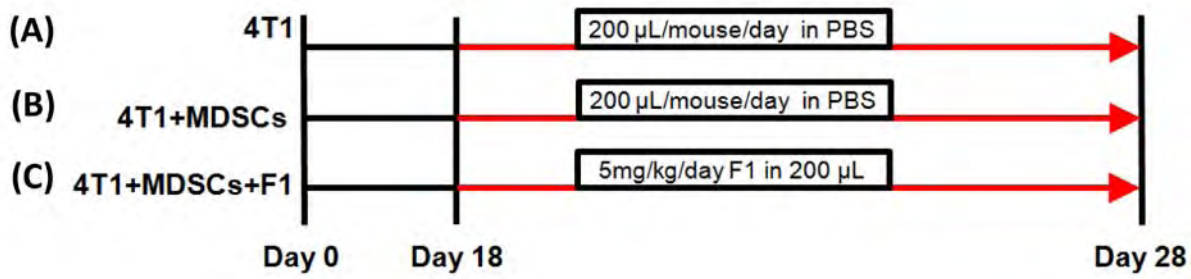
798-806 (2002).
34. Makino, T.*, et al.* Anti-allergic effect of Perilla frutescens and its active constituents. *Phytother Res* **17**, 240-243 (2003).
35. Sharma, U., Sharma, U., Sutar, N., Singh, A. & Shukla, D. Anti-inflammatory activity of Cordia dichotoma forst f. seeds extracts. *Int. J. Pharm. Analysis* **21**, 1-4 (2010).
36. Kuppast, I., Nayak, P.V., Prakash, K.C. & Kumar, K.V.S. Anti-ulcer effect of Cordia dichotoma Forst. f. fruits against gastric ulcers in rats. *The Internet Journal of Pharmacology* **7**(2009).
37. Kuppasta, I. & Nayak, P.V. Wound healing activity of Cordia dichotoma Forst. F. fruits. *Natural Products Radiance* **5**, 99-102 (2006).
38. Ojeswi, B., Khoobchandani, M., Arora, J., Hazra, D. & Srivastava, M. In vitro antibreast cancer efficacy of two indigenous plants on human cancer cell line MCF-7. *National Academy Science Letters* **32**, 105-109 (2009).
39. Lu, H.M., Liang, Y.Z., Yi, L.Z. & Wu, X.J. Anti-inflammatory effect of Houttuynia cordata injection. *J Ethnopharmacol* **104**, 245-249 (2006).
40. Chiang, L.C., Chang, J.S., Chen, C.C., Ng, L.T. & Lin, C.C. Anti-Herpes simplex virus activity of Bidens pilosa and Houttuynia cordata. *Am J Chin Med* **31**, 355-362 (2003).
41. Hayashi, K., Kamiya, M. & Hayashi, T. Virucidal effects of the steam distillate from Houttuynia cordata and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta medica* **61**, 237-237 (1995).
42. Osman, H., Rahim, A.A., Isa, N.M. & Bakhir, N.M. Antioxidant activity and phenolic content of Paederia foetida and Syzygium aqueum. *Molecules* **14**, 970-978 (2009).
43. De, S., Ravishankar, B. & Bhavsar, G.C. Investigation of the anti-inflammatory effects of Paederia foetida. *J Ethnopharmacol* **43**, 31-38 (1994).
44. Afroz, S.*, et al.* Antidiarrhoeal activity of the ethanol extract of Paederia foetida Linn. (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol* **105**, 125-130 (2006).
45. Nour, A.M.*, et al.* Varicella-zoster virus infection triggers formation of an interleukin-1beta (IL-1beta)-processing inflammasome complex. *J Biol Chem* **286**, 17921-17933 (2011).

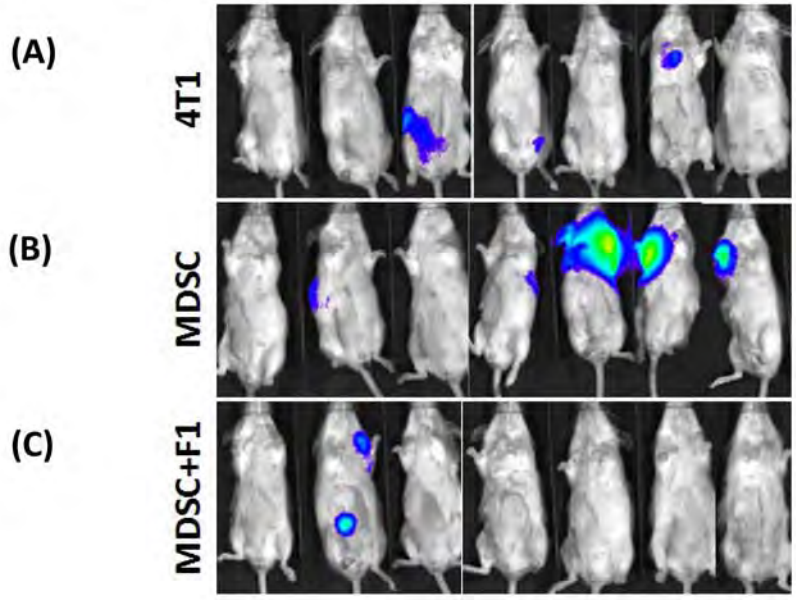
46. Ku, C.C.*, et al.* Herpes simplex virus-1 induces expression of a novel MxA isoform that enhances viral replication. *Immunology and Cell Biology* **89**, 173-182 (2010).
47. Arvin, A.M.*, et al.* Varicella-zoster virus T cell tropism and the pathogenesis of skin infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **342**, 189-209 (2010).
48. van Lint, A.*, et al.* Herpes simplex virus-specific CD8+ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation. *The Journal of Immunology* **172**, 392 (2004).
49. Patel, A.R., Romanelli, P., Roberts, B. & Kirsner, R.S. Herpes simplex virus: a histopathologic study of the depth of herpetic wounds. *Int J Dermatol* **48**, 36-40 (2009).
50. Simmons, A. & Nash, A.A. Zosteriform spread of herpes simplex virus as a model of recrudescence and its use to investigate the role of immune cells in prevention of recurrent disease. *Journal of virology* **52**, 816 (1984).
51. 柯逢年. Veregen®成功案例分析與植物新藥研發策略. *RegMed* **2**, 1-9 (2010).
52. Whitley, R. J., and Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *The Lancet* **357**, 1513-1518.
53. Arvin, A.M.*, et al.* Varicella-zoster virus T cell tropism and the pathogenesis of skin infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **342**, 189-209 (2010).
54. Ku, C.C.*, et al.* (2004). Varicella-zoster virus transfer to skin by T cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferin-α. *Journal of Experimental Medicine, 200(7):917-925.*
55. Ku, C.C.*, et al.* Herpes simplex virus-1 induces expression of a novel MxA isoform that enhances viral replication. *Immunology and Cell Biology* **89**, 173-182 (2010).
56. Nour, A.M.*, et al.* Varicella-zoster virus infection triggers formation of an interleukin-1beta (IL-1beta)-processing inflammasome complex. *J Biol Chem* **286**, 17921-17933 (2011).
57. Shen FH, et al. (2013) Absence of CXCL10 aggravates herpes stromal keratitis with reduced primary neutrophil influx in mice. *J Virol. 2013 Aug;87(15):8502-10. doi: 10.1128/JVI.01198-13. Epub 2013 May 29.*

柒、圖、表

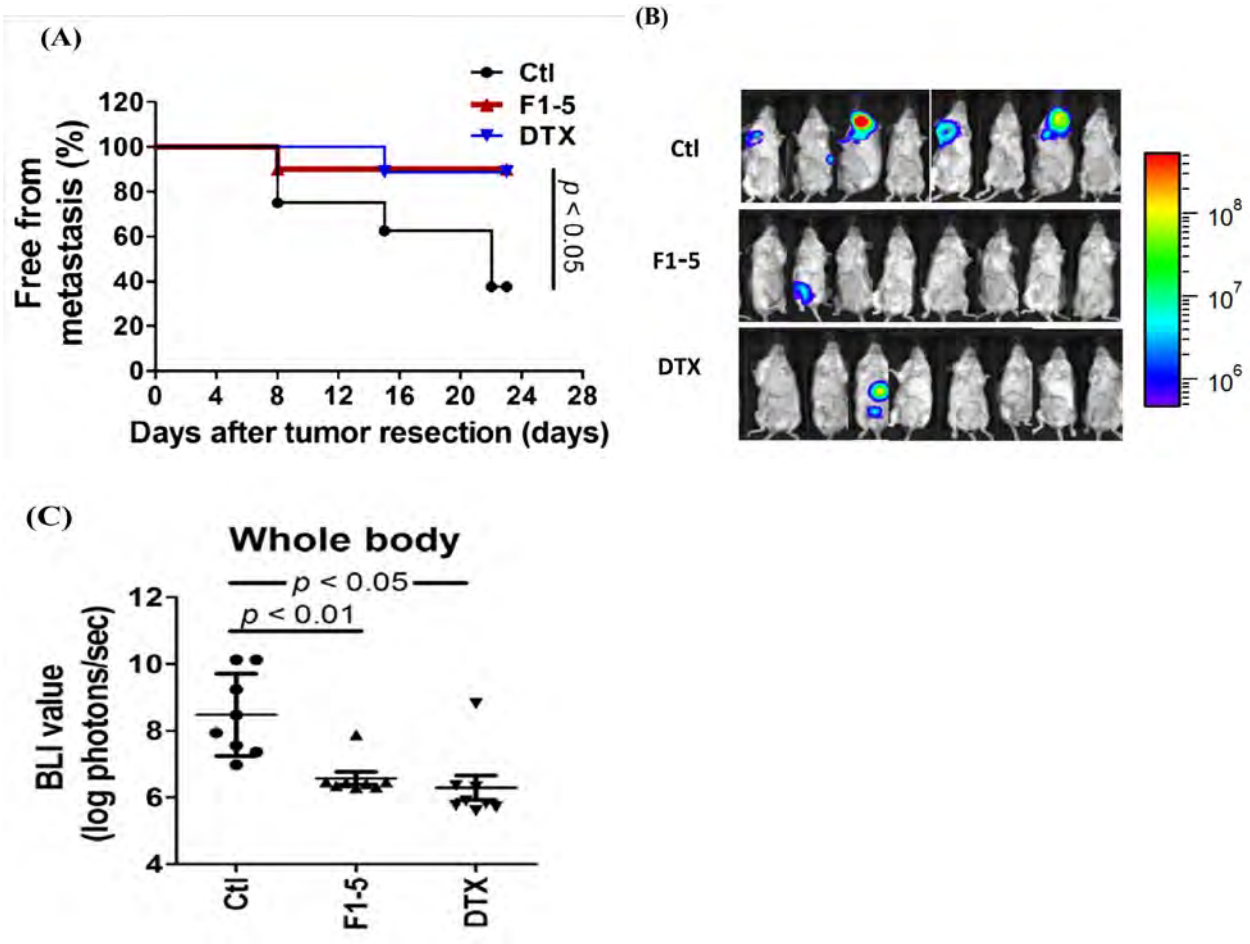


圖一、大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層之結構分析

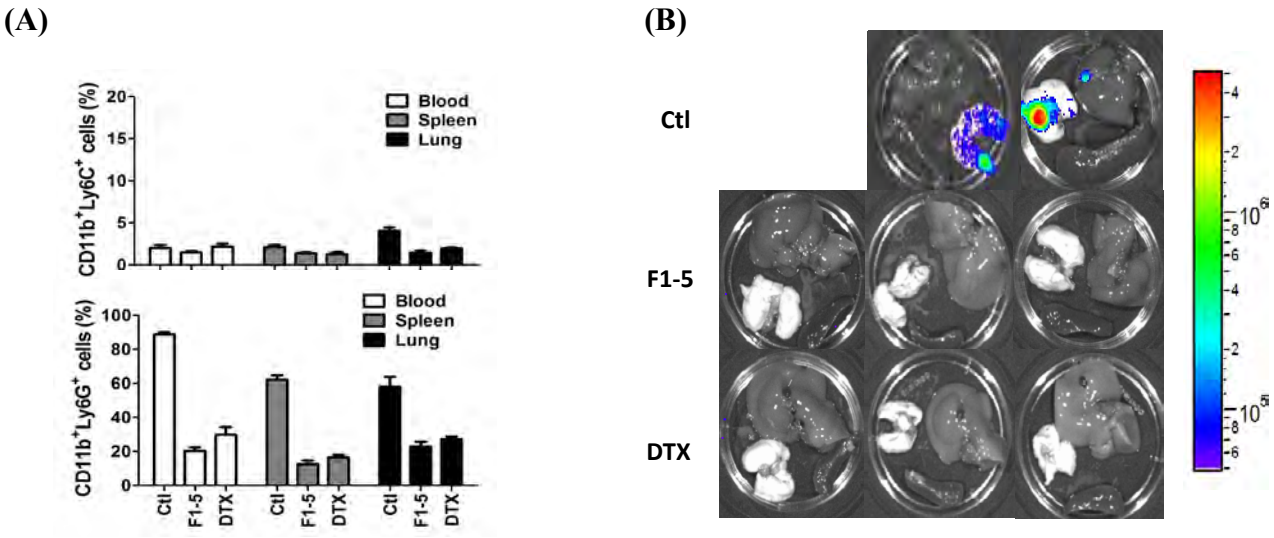




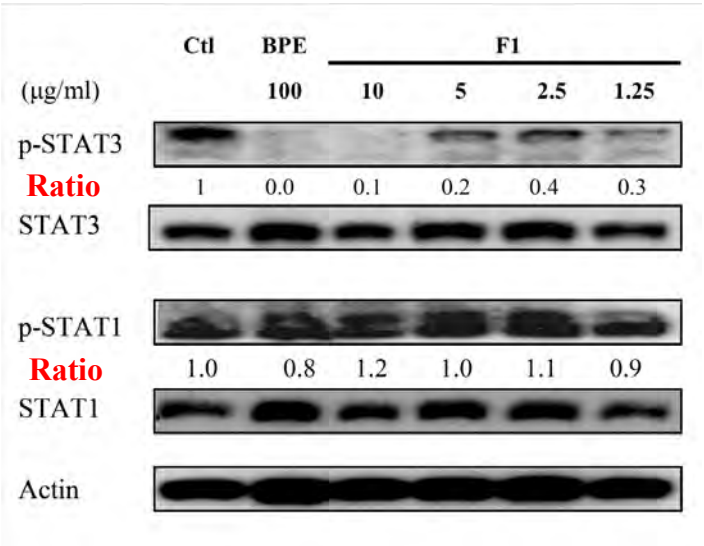
圖二、大花咸豐草酒精萃取物 F1 分層（BP/F1）與骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)對 4T1 腫瘤轉移的影響



圖三、大花咸豐草 F1（BP/F1）與紫杉醇(Docetaxol)在抗腫瘤轉移活性之功效及比較



圖四、BP/F1 對脾臟腫脹及骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)族群聚集之影響



圖五、大花咸豐草酒精萃取物 BP-E 及 BP/F1 分層對骨髓衍生抑制細胞(MDSCs)中磷酸化 STAT3 及磷酸化 STAT1 表達之影響

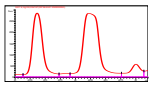
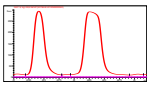
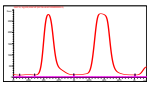
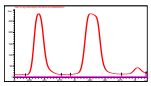
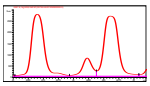
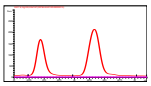
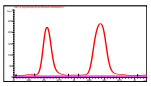
表一、大花咸豐草、F1 及 docetaxel 抗癌活性之比較

	BP-E	F1	Doceotaxel
Disease-free rate (%)	75	88.9	88.9
Survival rate (%)	87.5	100	100
Reduction of splenomegaly (%)	56±4.6	65.0±1.2	66.7±3.7
Inhibition of spleen gMDSCs (%)	56.7±16.7	59.8±20.5	47.1±15.1
Inhibition of lung gMDSCs (%)	N.S.	77.0±6.0	66.5±16.1
Inhibition of blood gMDSCs (%)	N.S.	60.8±14.5	53.0±8.6

表二、不同採集地出產之大花咸豐草 BP/F1 之回收率比較

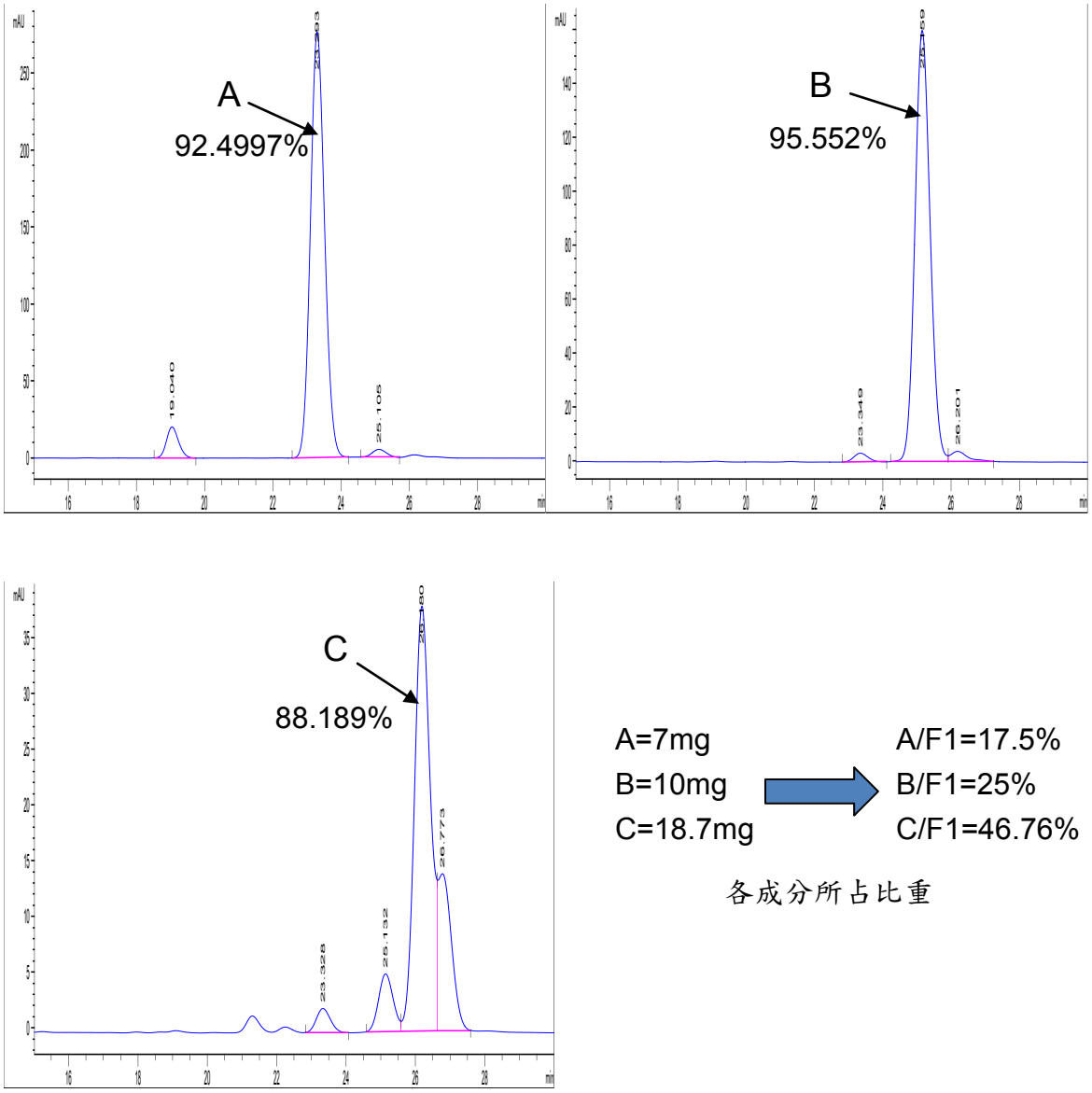
產地	台北天母	新北金山	新北淡水	苗栗通霄	嘉義水上	嘉義溪口
代號	TM	KS	DS	TS	WU	CK
產期	五月	五月	五月	四月	四月	四月
狀態	新鮮	新鮮	新鮮	乾燥	乾燥	乾燥
後製方式	陰乾	陰乾	陰乾	曬乾	曬乾	曬乾
粗萃物回收率	2.65%	2.9%	2.58%	2.3%	2.4%	3.6%
F1 回收重量	27.7mg	16.5mg	18.1mg	19.5mg	2.5mg	2.3mg
回收率	1.85%	1.1%	1.21%	1.3%	0.16%	0.15%
備註	MPLC 回收 （樣品濃度為 1500mg，此方式將用於未來之產量放大）					

表三、大花咸豐草粗萃物 profiling 與 BP/F1 回收率比較

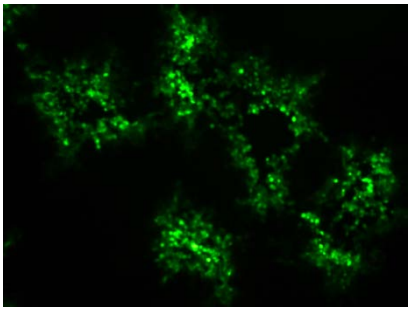
產地	新北 三芝	台北 天母	新北 金山	新北 淡水	苗栗 通霄	嘉義 水上	嘉義 溪口
代號	SJ	TM	KS	DS	TS	WU	CK
產期	五月	五月	五月	五月	四月	四月	四月
狀態	新鮮	新鮮	新鮮	新鮮	乾燥	乾燥	乾燥
後製 方式	陰乾	陰乾	陰乾	陰乾	曬乾	曬乾	曬乾
粗萃物 profiling							
Area	87914.6	94211.5	86764.1	84530.1	94674.1	48797	56782.2
F1 回收率	1.49%	1.85%	1.1%	1.21%	1.3%	0.16%	0.15%

表四、兩採集地所獲及以不同炮製方式所萃取之八月大花咸豐草 BP/F1 回收率之比較

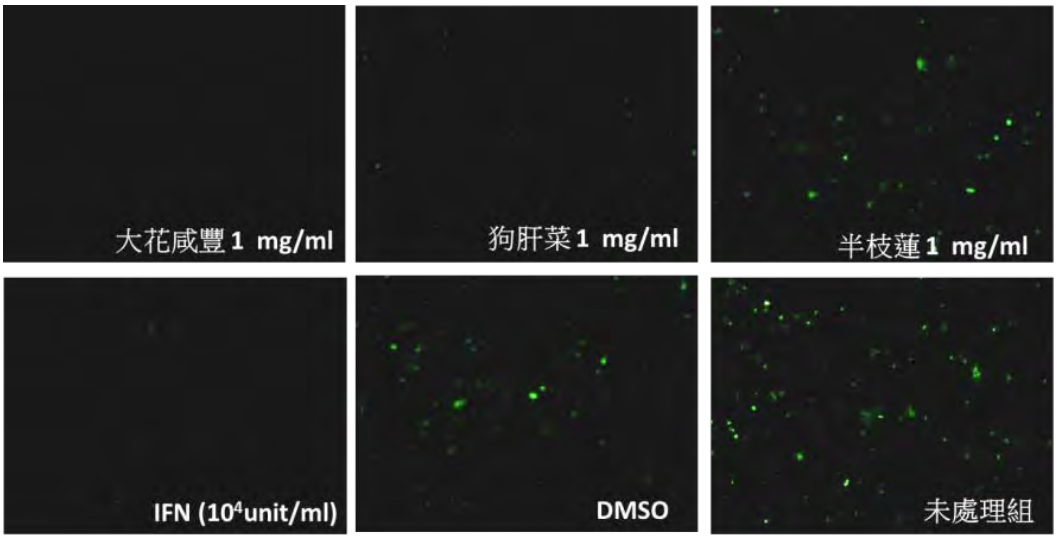
產地	新北三芝	新北三芝	新北三芝	台北天母	台北天母	台北天母
代號	SJ-F	SJ-S	SJ-M	TM-F	TM-S	TM-M
產期	八月	八月	八月	八月	八月	八月
後製方式	新鮮	日曬	陰乾	新鮮	日曬	陰乾
粗萃物回收率	1.55%	2.99%	2.91%	1.289%	3.3%	3.08%
F1 回收重量	15.1mg	114.6mg	74.1mg	26.9mg	54.6mg	45.7mg
回收率	1%	7.64%	4.94%	1.79%	3.64%	3.05%



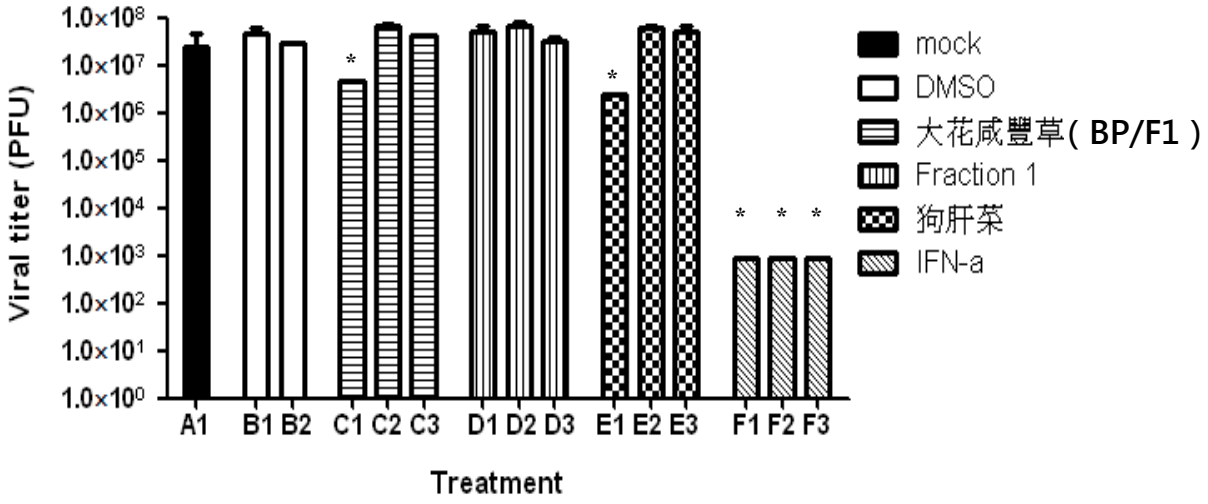
圖六、大花咸豐草(新北三峽) BP/F1 層析物中 A、B 及 C 之回收純度與所佔比重



圖七、HSV-GFP 在 Vero 細胞中形成綠色螢光病毒溶斑。Vero 細胞經過 HSV-GFP 感染約 48 小時後，在螢光顯微鏡下可清楚看見其綠色螢光的病毒溶斑。



圖八、各種中草藥萃取物在 Vero 細胞中抑制 HSV-1 的實驗結果。Vero 細胞在經過藥物處理後再分別感染 HSV-GFP，處理 48-72 小時後，在螢光顯微鏡下觀察病毒蛋白表現情形。綠色螢光表示受病毒感染的細胞。



圖九、各種中草藥萃取物在 HELF 細胞中抑制 HSV-1 的實驗結果。各種測試之中草藥萃取物如圖利所示。

作用濃度如下：

A1,未處理對照

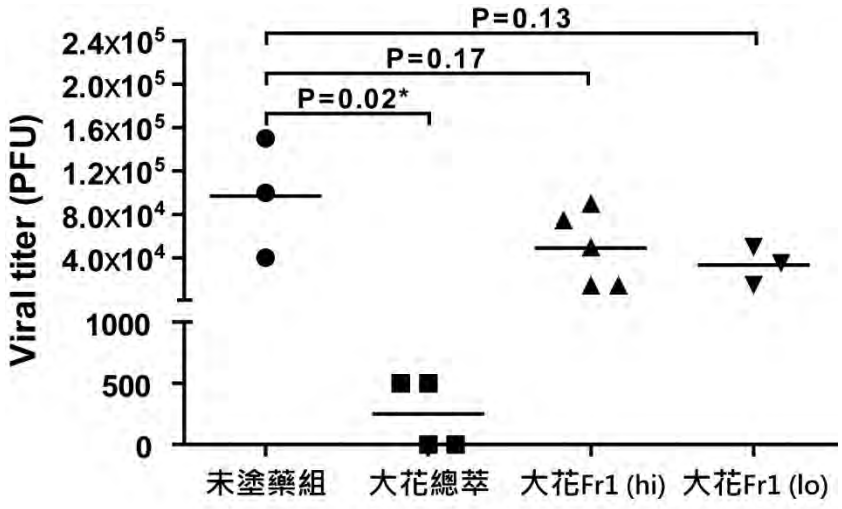
B1, 1:1000　B2, 1:3000

C1 100 μg/ml　C2 33 μg/ml　C3 11 μg/ml

D1 10 μg/ml　D2 3.3 μg/ml　D3 1.1 μg/ml

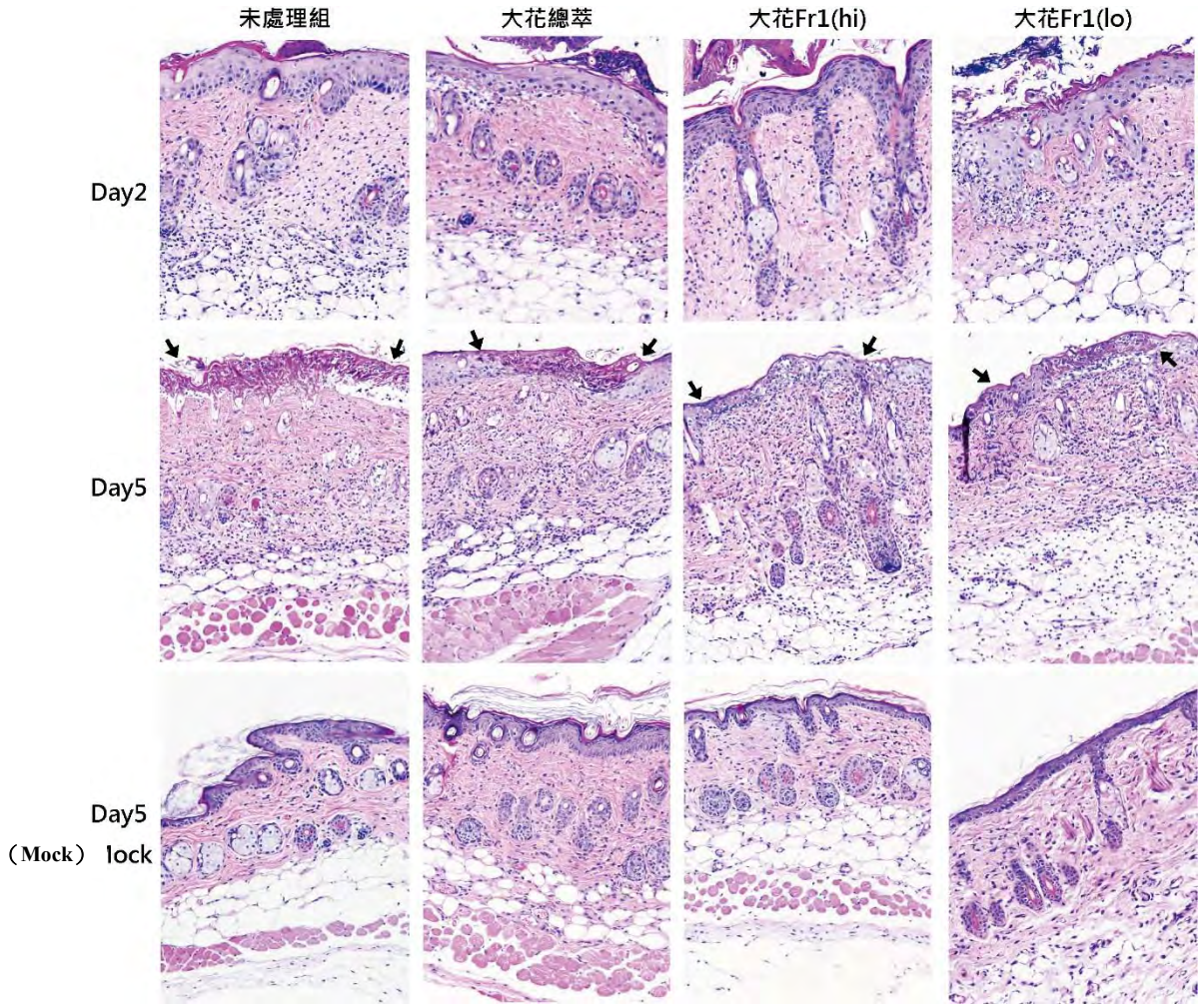
E1 1000 μg/ml　E2 333 μg /ml　E3 111 μg/ml

F1 $3X10^4$ U/ml　F2 $1X10^4$ U/ml　F3 $3X10^3$ U/ml



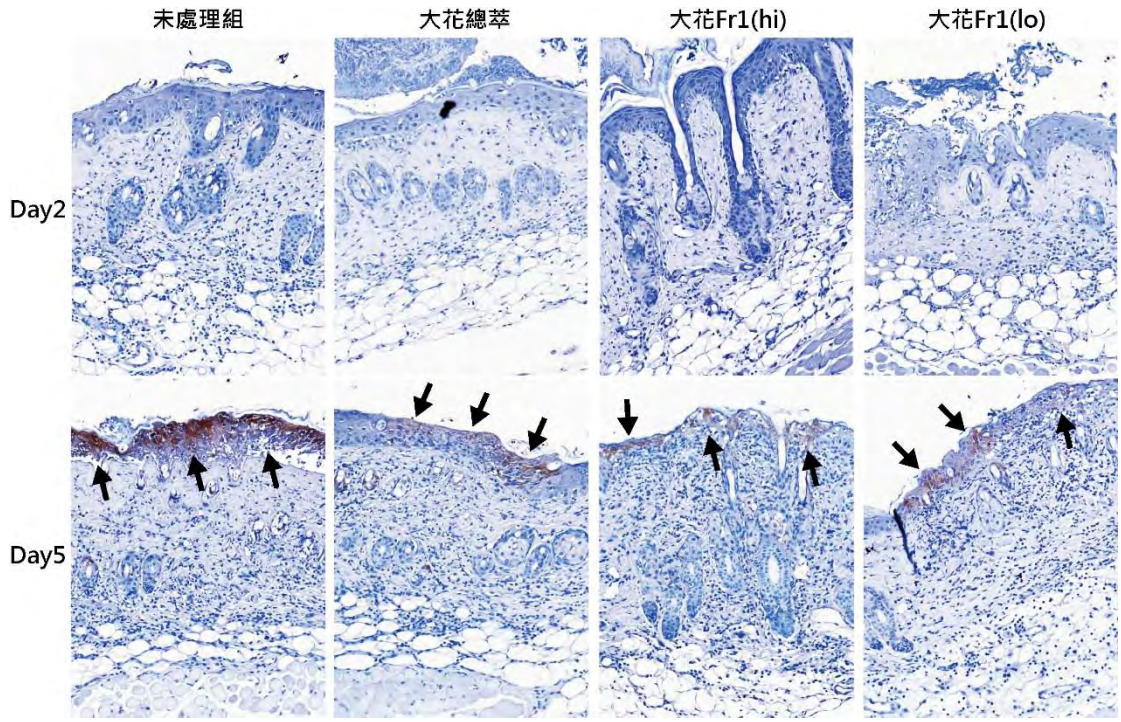
圖十、大花咸豐草酒精萃取物、BP/F1 分層在高劑量與低劑量對皮膚感染 HSV-1 後病毒效價的影響

小鼠經腹側感染 10^6 p.f.u HSV-1 病毒 24 小時後每 2 天分別塗抹大花咸豐草酒精萃取物、高劑量 BP/F1 分層(大花 Fr1(hi)) 與低劑量 F1 分層(大花 Fr1(lo))，小鼠於感染後第 5 天犧牲，取下感染皮膚組織(1 cm^2)，研磨後釋可放出組織中的 HSV-1 病毒。再在 Vero cells 中執行病毒溶斑形成作定量分析。病毒溶斑大約在感染 Vero cells 24 小時開始形成，至 72 小時達高峰。該類細胞則於 72 小時以 4% paraformaldehyd 固定，並在 Vero cells 中執行病毒溶斑形成定量分析。以抗 HSV-1 抗體進行免疫組織化學方法染色並計數所得的溶斑數，以獲得每組的病毒效價。圖中縱軸代表每 1 平方公分面積的皮膚組織所獲得的病毒量，橫條(bar)為該組數據的平均值。每組實驗有 3~5 個皮膚樣本，使用 unpaired student *t* 檢定(*$p < 0.05$)。



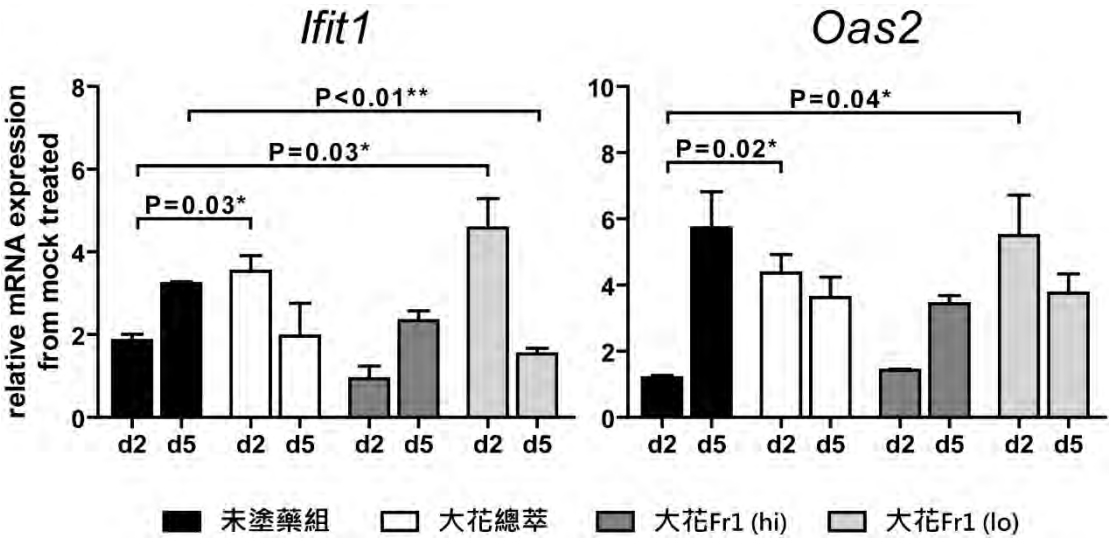
圖十一、大花咸豐草酒精萃取物、高劑量與低劑量 BP/F1 分層對皮膚感染 HSV-1 後組織病理變化之分析

小鼠經腹側感染 10^6 p.f.u HSV-1 病毒 24 小時後每 2 天分別塗抹**大花咸豐草酒精萃取物**、F1 分層高劑量與大花 Fr1 低劑量，於感染後第 2 天與第 5 天取下感染局部的皮膚組織，經過石蠟包埋、切片與 Hematoxyline & Eosin 染色後分析中草藥處理組與未處理對照組皮膚的組織病理變化。各組經過除毛與刮擦處理後塗藥，以但是未感染 HSV-1 組(mock)作為皮膚對藥物反應的比較。每組實驗有 3 個皮膚樣本。



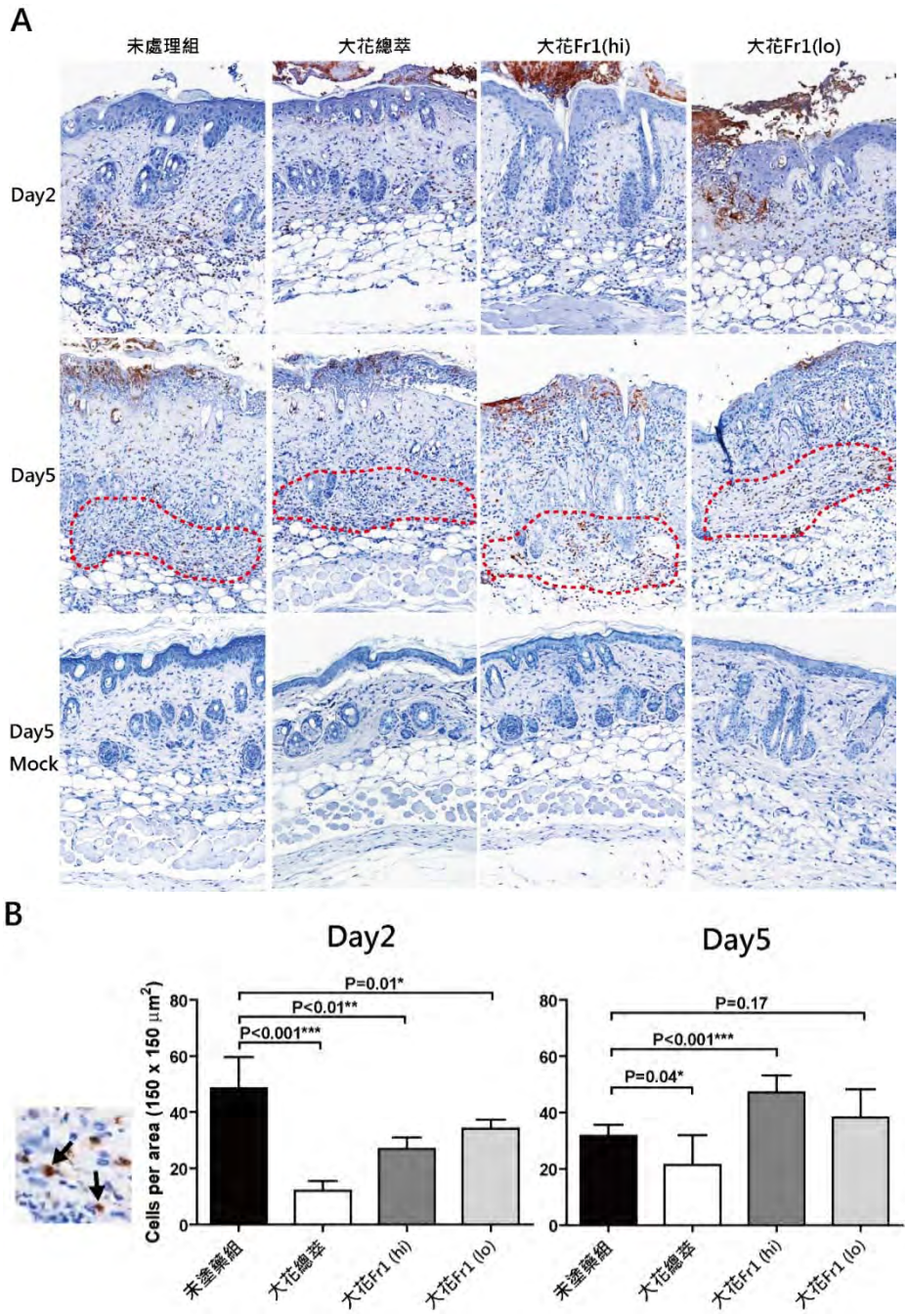
圖十二、大花咸豐草酒精萃取物、高劑量與低劑量 BP/F1 分層對皮膚感染 HSV-1 後病毒蛋白表現分析

小鼠經腹側感染 10^6 p.f.u HSV-1 病毒 24 小時後每 2 天分別塗抹大花咸豐草酒精萃取物、F1 分層高劑量與大花 Fr1 低劑量，於感染後第 2 天與第 5 天取下感染局部的皮膚組織，經過石蠟包埋、切片與免疫化學組織染色後分析中草藥處理組與未處理對照組皮膚的 HSV-1 感染情形。組織切片經過脫蠟後，以抗 HSV-1 抗體處理，經過生物素(biotin)標定，經過 Horseradish peroxidase 與 DAB 呈色分析 HSV-1 病毒蛋白的表現(棕色，箭號標示處)。每組實驗有 3 個皮膚樣本。



圖十三、小鼠皮膚經 HSV-1 腹側感染後之抗病毒基因(*Ifit1*、*Oas2*)mRNA 之表達（以定量 PCR 分析）

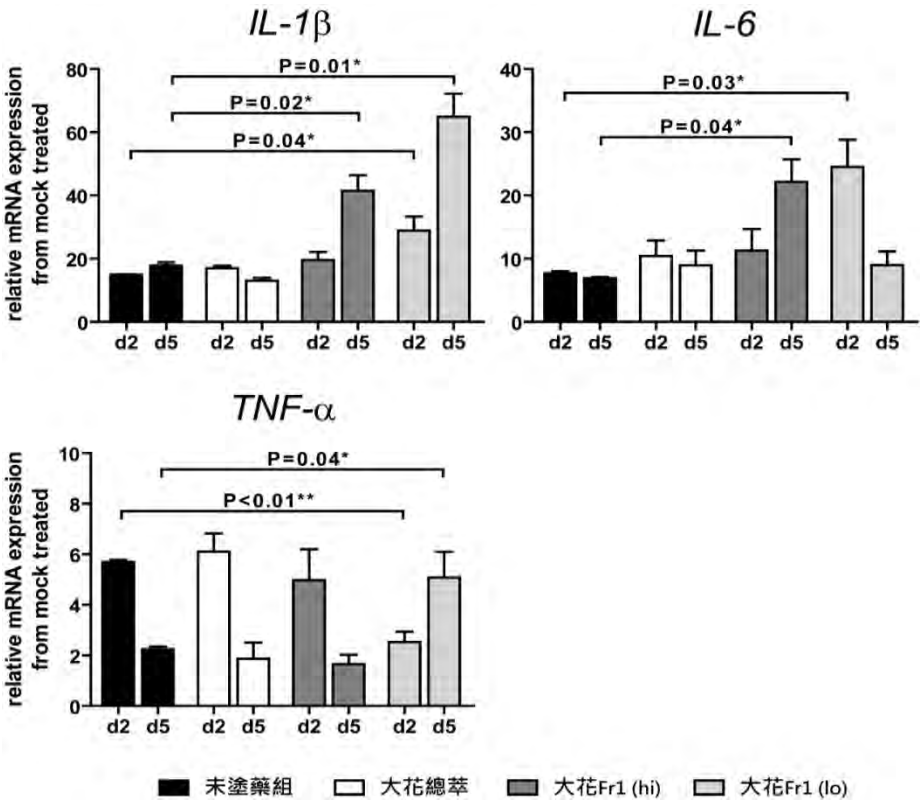
小鼠經腹側感染 10^6 p.f.u HSV-1 病毒 24 小時後每 2 天分別塗抹大花咸豐草酒精萃取物、F1 分層高劑量與大花 Fr1 低劑量，於感染後第 2 天與第 5 天抽取感染局部的皮膚組織 RNA，並合成其 cDNA，以即時定量 PCR(real-time PCR)測量小鼠皮膚中抗病毒基因(*Ifit1*、*Oas2*) mRNA 表現程度。以 β-actin 作為內部校正(internal control)，並以各實驗組的塗藥未感染組(mock treated)作為基準點進行比較，而得到目標基因表現量的相對基因表現變化(relative mRNA expression)。每實驗組有 2 個樣本，每個基因二重複檢測。長條圖高度為平均值，誤差線為標準差，使用 unpaired student *t* 檢定 (*p< 0.05, ***p< 0.001)。



圖十四、大花咸豐草酒精萃取物、高劑量與低劑量 BP/F1 分層對皮膚感染 HSV-1 後嗜中性白血球浸潤性之分析

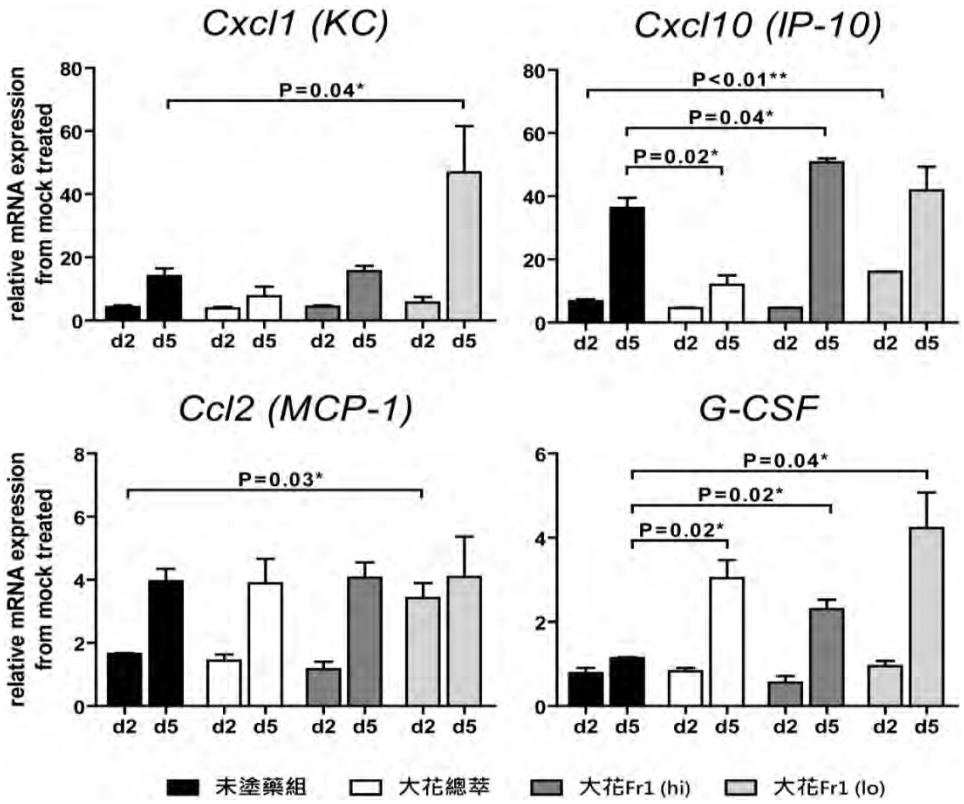
小鼠經腹側感染 10^6 p.f.u HSV-1 病毒 24 小時後每 2 天分別塗抹大大花咸豐草酒精萃取物、高劑量或低劑量 F1 分層，於感染後第 2 天與第 5 天取下感染局部的皮膚組織，以及各實驗的塗藥未感染組(mock)，經過石蠟包埋、切片與免疫化學組織染色後分析中草藥處理組與未處理對照組皮膚的嗜中性白血球浸潤現象(紅色虛線圈出區) (A)，以及細胞計數(B)。圖(A)的組織切片經過脫蠟後，以抗 Ly6-G 抗體處理，經過 Horseradish peroxidase 與 DAB 呈色 (棕色)；圖(B)分別由每塊組織選取 150x150 μm^2 的區域，根

據真皮層的 Ly6-G 陽性細胞進行計數(棕色，箭號標示處)。每組實驗有 3 個皮膚樣本，長條圖高度為平均值，誤差線為標準差，使用 unpaired student *t* 檢定(*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001)。



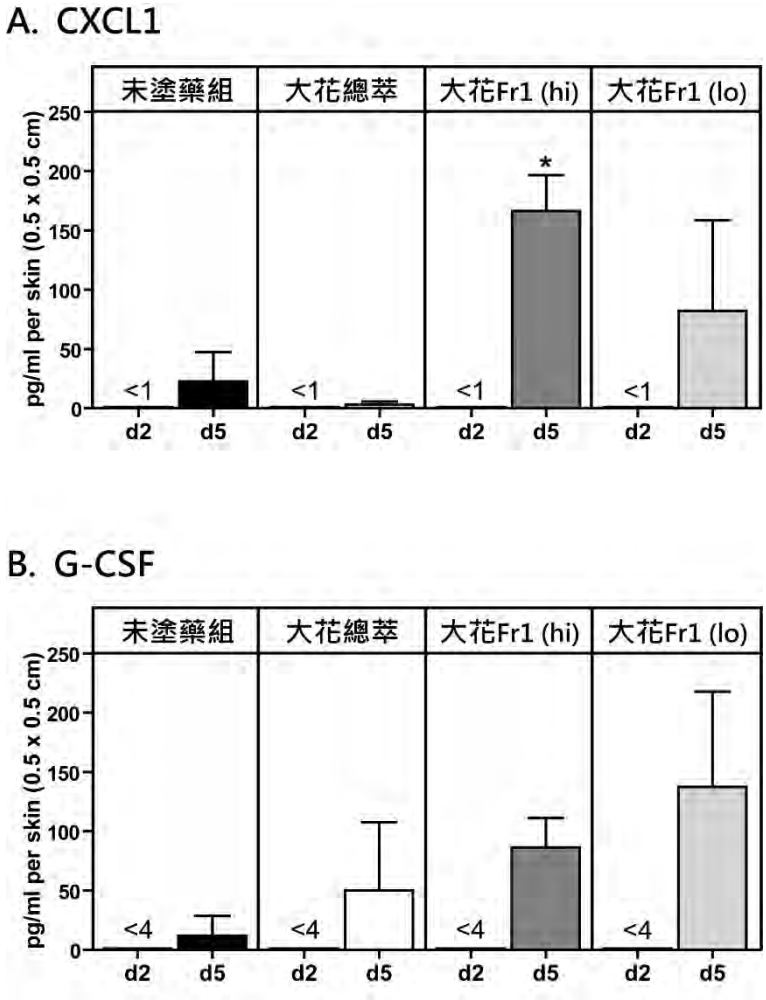
圖十五、小鼠皮膚經 HSV-1 腹側感染後之發炎基因(*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*) mRNA 之表達（以定量 PCR 分析）

小鼠經腹側感染 10^6 p.f.u HSV-1 病毒 24 小時後每 2 天分別塗抹大花咸豐草酒精萃取物、F1 分層高劑量與大花 Fr1 低劑量，於感染後第 2 天與第 5 天抽取感染局部的皮膚組織 RNA，並合成其 cDNA，以即時定量 PCR(real-time PCR)測量小鼠皮膚中發炎基因(*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*) mRNA 表現程度。以 β-actin 作為內部校正(internal control)，並以各實驗組的塗藥未感染組(mock treated)作為基準點進行比較，而得到目標基因表現量的相對基因表現變化(relative mRNA expression)。每實驗組有 2 個樣本，每個基因二重複檢測。長條圖高度為平均值，誤差線為標準差，使用 unpaired student *t* 檢定(*p< 0.05, *p< 0.01)。



圖十六、小鼠皮膚經 HSV-1 腹側感染後之細胞激素基因(*Cxcl1*、*Cxcl10*、*Ccl2*、*G-CSF*) mRNA 之表達（以定量 PCR 分析）

小鼠經腹側感染 10^6 p.f.u HSV-1 病毒 24 小時後每 2 天分別塗抹大花咸豐草酒精萃取物、F1 分層高劑量與大花 Fr1 低劑量，於感染後第 2 天與第 5 天抽取感染局部的皮膚組織 RNA，並合成其 cDNA，以即時定量 PCR(real-time PCR)測量小鼠皮膚中細胞激素基因(*Cxcl1*、*Cxcl10*、*Ccl2*、*G-CSF*) mRNA 表現程度。以 β-actin 作為內部校正(internal control)，並以各實驗組的塗藥未感染組(mock treated)作為基準點進行比較，而得到目標基因表現量的相對基因表現變化(relative mRNA expression)。每實驗組有 2 個樣本，每個基因二重複檢測。長條圖高度為平均值，誤差線為標準差，使用 unpaired student *t* 檢定(*p< 0.05, *p< 0.01)。



圖十七、小鼠皮膚經 HSV-1 腹側感染後之細胞激素蛋白(CXCL1、G-CSF)之表達（以 ELISA 分析分析）

小鼠經腹側感染 10^6 p.f.u HSV-1 病毒 24 小時後每 2 天分別塗抹大花咸豐草酒精萃取物、F1 分層高劑量與大花 Fr1 低劑量，於感染後第 2 天與第 5 天取下感染局部的皮膚(0.25 cm^2)，冷凍後進行磨碎，再將此組織均質物溶於 PBS 中，以酵素免疫分析法(ELISA)測量小鼠皮膚中細胞激素蛋白 CXCL1 (A)與 G-CSF (B)的表現程度。每實驗組有 2 個樣本，每個基因二重複檢測。長條圖高度為平均值，誤差線為標準差，使用 unpaired student *t* 檢定(*$p< 0.05$)。

編號：CCMP102-RD-116

臺灣本土藥用植物闊葉麥門冬與臺灣油點草之研究與開發(2-2)

吳永昌
中國醫藥大學

摘　要

本計畫選用臺灣本土藥用植物闊葉麥門冬與臺灣油點草，以生物活性導引分離法，希望尋找具有細胞毒殺、抗 B 型肝炎病毒與抗發炎生物活性之有效成分並進行相關機轉研究。對於瀕臨絕種之油點草屬將以組織培養的方式復育，並且比對成分差異；闊葉麥門冬與中藥用麥門冬亦會進行成分比較，以期能用本土藥材取代現用之中藥材。

延續第一年之研究成果，在細胞毒殺方面，由闊葉麥門冬中找出 LPRP-9 fraction 與其活性物(−)-liriopein B 具有顯著的癌細胞生長抑制活性，並進一步完成其抗癌機轉的研究；抗 B 型肝炎病毒方面，從臺灣油點草所分離出之 TF-DCM-15、16、17 三個主要粗分物及闊葉麥門冬 LPRP-Et-97543 及 LPRP-Et-95462 等兩個純化合物經研究顯示具有抗 B 型肝炎病之活性，相關機制探討已初步完成，顯示前述之粗分物及純化合物可經由 NF-κB 活化途徑之抑制作用以達到抑制 B 型肝炎病毒基因表現及複製之功能。蒐集臺灣北中南三地之市售中藥麥門冬藥材，與闊葉麥門冬進行抗 B 型肝炎病毒活性成分 HPLC 指紋圖譜比較，初步成果已建立；在油點草屬方面，蒐集臺灣油點草(霧社)、高山油點草(合歡山)與毛果油點草(臺中太平)之野生種與其同源之組培苗植株進行初步萃取與建立指紋圖譜比對研究發現組培種內含天然物或活性分子與野生種比較，其種類與含量都相對較少，但高山油點草較高。植物組織培養部分，已蒐集上述三株油點草屬之植株材料，以單莖節為初始培植體培養長出芽體移入不含生長調節劑培養基可順利成苗並移植出瓶。再生苗經染色體數目檢測與野外植株相符。三株油點草材料之再生植株移入網室皆可順利生長或開花。結合組織培養技術及後續網室植株扦插作業，可穩定且持續生產材料以進行成份及藥理分析。

關鍵詞：百合科、闊葉麥門冬、臺灣油點草、細胞毒殺、抗發炎、B 型肝炎病毒、指紋圖譜、組織培養

Number: CCMP102-RD-116

Studies and Developments on Formosan Endemic Medicinal Plants, *Liriope Platyphylla* and *Tricyrtis Formosana*

Yang-Chang Wu
China Medical University

ABSTRACT

This research project focuses on finding active compounds of cytotoxic, anti-inflammatory and anti-hepatitis B virus activities and underlying mechanisms from *Liriope platyphylla* and *Tricyrtis formosana* via bioassay-guided fractionation by using column chromatography and HPLC. We plan to restore the endangered *Tricyrtis* species through tissue culture techniques and comparing with their compositions. The components between *L. platyphylla* and *L. spicata* from TCM markets will also be made.

From the research result in the first year, an active fraction LPRP-9 fraction and its active pure compound, (−)-liriopein B were found. The cytotoxic mechanisms of LPRP-9 fraction and (−)-liriopein B were also investigated in the present year. In anti-hepatitis B virus analysis, three subfraction, TF-DCM-15, 16 and 17 and two pure compound LPRP-Et-97543, 95462 isolated from *T. formosana* and *L. platyphylla* showed anti-viral effects, respectively. The anti-viral mechanism revealed regulation of NF-kB signaling pathway in addition to the inhibition of HBV viral expression and replication were involved. To compare *L. platyphylla* with *L. spicata* (TCM), three *L. spicata* samples from the different locations were collected. Wild type/tissue culture of three *Tricyrtis* genus were also collected and analyzed. The results showed that relative amounts are fewer for tissue culture than wild types except for *T. ravenii*. In plant tissue culture, we collected *T. formosana*, *T. ravenii* and *T. lasiocarpa* as materials. The nodal buds were used as primary explants and cultured on the medium. Shoots were proliferated, subcultured to new medium without plant growth regulators and then grown into whole plants. Regenerants of three kind *Tricyrtis* were transferred in shade house and some of them can flower at time. Combined with plant tissue culture

and subsequent cutting technique in shade house, we could produce materials stably for chemical composition and pharmacological analysis.

Keywords: Liliaceae, *Liriope platyphylla*, *Tricyrtis formosana*, Cytotoxicity, Anti-inflammatory, Hepatitis B virus, Fingerprinting profile, Tissue culture.

壹、前言

臺灣擁有豐富的生物多樣性，為開發藥用植物來源之一大優勢。以臺灣藥用植物中具有療效者做為先導材料，確定物種及基原再配合生物活性導向，針對尚未深入研究開發之植物做為本計畫之主題，以實證醫學驗證其藥理作用，除可開發為植物新藥亦可發展為健康食品，以提升本土中草藥之應用價值。

本研究計畫針對臺灣產藥用植物進行多種活性篩選，發現臺灣原生百合科(Liliaceae)藥用植物-闊葉麥門冬(*Liriope platyphylla*)和臺灣油點草(*Tricyrtis formosana*)對於細胞毒殺、鎮痛、抗發炎與抗 B 型肝炎病毒等活性具有顯著的表現，且尚未有相關深入研究報導。故選定該兩株百合科植物為本計畫研究之材料，針對其天然藥物化學及藥理活性機轉等進行研究。

闊葉麥門冬為麥門冬屬(*Liripoe*)植物，過去文獻中所報導之化學成分，主要分為 benzofurans，例如 2-(4′-hydroxybenzyl)-5,6- methylenedioxy-benzofuran、2-(4′-hydroxybenzoyl)-5,6-methylenedioxy- benzofuran1；homoisoflavonoids，例如 methylophiopogonanone B、ophiopogonanone B (Wang et al., 2011)；sesquiterpenes glycoside，例如 liriopeoside A、ophiopogonoside A (Cheng et al., 2004)，與 steryl glycosides 及其 aglycone，例如 ruscogenin、lirigramosides A、lirigramosides B、lirioproliosode A、*β*-sitosterol-3-*O*-*β*-D-glucopyranoside、25(*S*)-ruscogenin-1-*O*-*β*-D-xylopyranoside-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside (Hu et al., 2011; Jiang et al., 2011; Jiang., 2007)等等。藥理活性方面，粗萃物或純化合物皆有相關活性研究。同屬植物 *L. graminifolia* 中分離之化合物 3-*O*-{*β*-D-xylopyranosyl-(1→3)-*α*-L- arabinopyranosyl-(1→2)-[*α*-L-rhamno-pyranosyl-(1→4)]-*β*-D-gluco-pyranosyl-(25*S*)-spirost-5-ene-3*β*,17*α*-diol、1-*O*-*β*-D-xylopyranosyl-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(25*S*)-ruscogenin 及 methylophiopogonanone B 具有中等強度的抗癌活性(Boyang et al., 1994)。從 *L. muscuri* 取得之 1-*O*-[*β*-D-glucopyranosyl(1→2)][*β*-D-xylopyranosyl(1→3)]-*β*-D-fucopyranoside (LMC)，可有效的抑制小鼠腫瘤之生長(Boyang et al., 1994)；自植物 *L. muscari* 中分離得到之化合物 25(*R*)-ruscogenin-1-yl-*β*-D-xylo-pyranosyl-(1→3)-[*β*-D-glucopyranosyl-(1→2)]-*β*-D-fucopyranoside (Lm3)，具有抗發炎和免疫功能的活性(Liu et al., 1998)，2002 年進一步證實化合物 Lm-3 是藉由干擾 protein kinase C，阻斷淋巴細胞附著在細胞外基質，減少 cytokines、

chemokines 等因子，進而減少發炎反應的產生(Liu et al., 2002)；自植物 *L. spicata* var. *prolifera* 分離出之化合物 2-(4′-hydroxybenzyl)-5,6-methylenedioxy-benzofuran 和 2-(4′-hydroxybenzoyl)-5,6-methylenedioxy-benzofuran 能有效抑制 neutrophil 釋放 superoxide anion 且被認為具有抗發炎活性；由 *L. platyphylla* 塊根的水萃物，能抑制 asthma 小鼠經由 OVA (ovalbumin)所誘導的呼吸道與支氣管發炎反應(Lee et al., 2005)。此外，治療糖尿病方面也有相當多的研究。過去的報導中，植物 *L. spicata* var. *prolifera* 的水萃物及其多醣體可藉由提高第二型糖尿病鼠對於胰島素敏感度，而達到降血糖的效果(Bai et al., 2009)。從 *L. spicata* 中所分離出之多醣化合物 LSP1 及 LSP2，可顯著降低第二型糖尿病鼠的空腹血糖值和改善其對葡萄糖之耐受性(Chen et al., 2009)。自 *L. platyphylla* 70%甲醇水溶液粗萃物中分離得到 homoisoflavone-enriched 的 fraction，藉由影響 PI3-kinase 路徑而能有效增加 fibroblasts 細胞對胰島素的敏感度(Choi et al., 2004)。於 2004 的研究中發現 *L. platyphylla* 的 butanol 萃取物能誘導 C6 及星形膠質細胞分泌神經生長因子，進而促使 PC12 神經細胞的軸突生長，而被認為具有治療阿茲海默症的功能(Hur et al., 2004)。*L. platyphylla* 總皂苷(total saponins)能改善 aging mice 因 D-galactose 所引發之學習記憶障礙，所以被認為具有抗衰老的作用[5]。其他活性方面，發現 *L. platyphylla* 塊根的乙酸乙酯萃取物能經由抑制微生物表面蛋白質 Sortase，而達到顯著的抑菌效果(Kim et al., 2002)。而自 *L. muscari* 中分離得到之化合物 Lm-3 和 ruscogenin 發現能藉由阻斷淋巴細胞滲透至肝臟，改善肝損傷，進而達到保肝作用(Wu et al., 2001)。

關於油點草屬植物化學成分，文獻檢索發現日本學者針對臺灣油點草之花部進行分離與結構鑑定，報導少見的碳-糖化花青素(C-glycosylanthocyanins)(Saito et al., 2003; Tatsuzawa et al., 2004)，此外由清華大學陳秋明教授實驗室與高雄醫學大學吳永昌教授實驗室針對全草進行分離與結構鑑定(李世軍，2002; 周眉君，2006)，其中正己烷與丙酮層粗萃取物發現具有抑制人類肝癌細胞株(Hep G2)的生長，其 IC_{50} 值分別為 17.76 μg/ml 與 16.74 μg/ml，但並未有發現其活性物質。油點草屬植物其分類較為困難，已有許多許多研究針對其外部型態與分子生物學的方法進行分類，另有許多族群遺傳方面的報告。臺灣油點草在民間為治療感冒、發燒、喉嚨痛與扁桃腺炎，但其活性物質尚未有報導。另有民間認為對肝癌具有一定的療效，但未有系統性的研究。因此本計畫已以三種臺灣特有油點草屬植物為目標，比對野生種與組培種之成分差異。油點草屬植物為多年生草

本植物;根據 Flora of Taiwan 第二版的記載,本屬有 2 種 3 變種(Ying, 2000),而 Peng 等人(2007)發表一新種高山油點草(*T. ravenii* Peng & Tiang),其外表略似臺灣油點草,但其花部特徵、習性及海拔分佈等則兩者間有明顯差異。臺灣產本屬植物多生長於中低海拔之林下較為陰暗潮濕之處,其中最特別者為鈴木氏油點草(*T. suzukii* Masam.)僅生長於東部之石灰岩地形,為稀有植物;毛果油點草(*T. lasiocarpa* Marsum.)分布於中南部低中海拔山區,冬季具休眠性,秋冬時節地上部即乾枯,待來年春天方重新生長新的地上部。臺灣油點草(*T. formosana* Baker)廣泛分布於臺灣全島中低海拔山區,多生長於林下或林緣較為陰暗潮濕的環境中,具有發達之走莖,在野外常可看到成片的生長,主要花期約為每年的 8-11 月,屬秋冬開花之草本植物,開花結果後不休眠,直至來年生長新生的莖葉。關於油點草植物特性與組織培養之研究,包括有植物特性及分類、種子發芽特性研究、癒傷組織再生小苗及其變異偵測、農桿菌轉殖系統等。Fukai (2009)以電子顯微鏡觀察油點草雜交種之花芽初始及發育過程,以瞭解其花朵發育關鍵時期。Kojiro (1999)則調查在自然環境下,多種油點草植物之種子發育過程及是否具有休眠特性,並以此些調查結果進行植物分類。油點草種子受光線影響其發芽率,*Tricyrtis hirta* 及 *T. formosana* 種子在照光環境促進其種子發芽率(Kojiro, 2000)。油點草組織培養方面的研究,主要集中在以花絲為初始培植體,6 種油點草材料在含有 4.5 μM 2, 4-D 及 0.45 μM TDZ 的 1/2 MS 培養基中誘導癒傷組織產生,移入不含生長調節劑培養基中可直接生成體胚,體胚可長根形成小苗,移植出瓶 6 個月後進行染色體及多倍體檢測,證明其體胚苗與母株無變異產生(Nakano et al., 2004)。然而,癒傷組織持續繼代培養 1 年以上誘導產生的體胚苗,隨機選取的 37 株小苗中,有 9 株再生株為四倍體植株,雖然多項性狀顯示具有更佳的花卉特性,如葉片變厚、株高變高及花朵增大等(Nakano et al., 2006),但就種苗繁殖目的而言,透過癒傷組織再生體胚之體系屬於較不穩定的繁殖系統。一般來說,油點草屬植物的染色體為 2n=2x=26 (Ying, 2000; Nakano et al., 2004；Li et al., 2003),透過再生植株的染色體觀察可確認其繁殖體系是否穩定。油點草屬除了花型特殊具有花卉發展潛力以外,更重要的是全草可供藥用。在發展成經濟生產的藥用產品之前,需多量的植物進行藥用成份分析及功效試驗,前一年度已建立臺灣油點草及高山油點草莖節大量繁殖系統,本年度將應用其研究成果於毛果油點草之大量繁殖,並且觀察此些油點草植株移植出瓶後之生長特性,藉由染色體數量觀察來確認繁殖體系之穩定性,同時針對其種子進行

短期保存來維持其種源，以達到兼顧本土藥用植物開發應用及資源保存之目的。

本計畫預計以生物活性導引分離法完成兩株臺灣本土百合科藥用植物闊葉麥門冬與臺灣油點草之活性成分分離與結構鑑定，並針對有潛力之活性組成物與有效成分進行藥理機轉研究，並建立品管控制條件，以開發作為健康食品及植物新藥研發。

貳、材料與方法

一、研究主題之大量植物採集與萃取及劃分：

植物之採集與萃取及劃分已於去年度(101 年)完成：

(一)闊葉麥門冬(*L. platyphylla*)：參閱 101 年度成果報告。

(二)臺灣油點草(*T. formosana*)：參閱 101 年度成果報告。

二、活性組成物、有效成分分離與其結構解析：已於前年度(101 年)完成：

(一)萃取物之分離與純化參閱：參閱 101 年度成果報告。

(二)化學結構鑑定：參閱 101 年度成果報告。

另外於新竹內灣採集另一批之臺灣油點草，全株蔭乾後切成小片並磨粉(經中興大學森林系曾彥學副教授協助鑑定)，得 TF 磨碎之粉體約 5.8 公斤，分兩次各以 5 公升 95%乙醇浸泡得乙醇萃取物(以下簡稱 TF-EtOH-ext)。其過程各萃取六次，每次浸泡天數為兩天。將 TF-EtOH-ext 過濾濃縮秤重後共得 251.09 公克。此外另取 83.71 公克 TF 乾粉以 100℃之水萃取得水萃取物，做為日後實驗之用。TF-EtOH-ext 以水與二氯甲烷(DCM)進行第一次分配(partition) (水：DCM=2800 ml：2800 ml)，抽取三次，得二氯甲烷層抽出物（TF-DCM）114.79 g。再將水層以正丁醇(n-BuOH)進行第二次分配(水：n-BuOH=2800 ml：2800 ml，其中 *n*-BuOH 先以二次水飽和)。依據實驗前所述，本計畫主要針對 TF-DCM 進行活性成分的純化與篩選。先將 TF-DCM 層之微量檢品以薄層分析法（TLC）找尋適當之移動相後利用柱層分析法以矽膠為固定相，以正己烷為起始沖提溶劑。並將 TF-DCM 樣品 114.79 g 與 173 g 矽膠以 dry sampling 方式添加至管柱上方，以正己烷與乙酸乙酯沖提，逐漸增加乙酸乙酯之比例，固定時間收集管柱所沖提出之沖提液，檢測 TF-DCM 層中之化合物分離情況，得到 18 fractions，其中第 7 部分抗發炎活性最強，命名為 TF-NW-DCM-7。

三、細胞毒殺實驗及機轉研究：

(一)人類肝癌 (HepG2, Hep3B)、乳癌 (MCF-7, MDA-MB-231)、肺癌 (A-549) 及口腔癌 (Ca9-22) 等細胞株培養於 minimal essential medium 培養液中，其中含 10 %胎牛血清(fetal calf serum)及含 100 units/mL penicillin 與 100 μg/mL streptomycin，培養條件為 5 % CO_2、37 ℃及含飽和水蒸氣之環境。每三天 更換一次培養基溶液。當生長至培養瓶單層約八分滿時便作繼代培養。以血球計數器計算細胞數目，再取適當細胞數目做分析。

(二)此實驗為利用 MTT 染色法(Microculture Tetrazolium Assay)，原 理為活細胞中的粒線體酵素可將 MTT(黃色)轉變為不可溶的 formazan 紫色結晶，再以有機溶劑將 formazan 溶出，經由吸光值之檢測，換算後進而得知細胞存活 率。取 5×10^3~1×10^4 cells/well 種於 96-well 培養盤中，培養於 95 % O_2、5 % CO_2 之培養箱中。再加入不同濃度之藥物，培養 72 小時後，加入 MTT (0.5 mg/mL)染色 1 小時，吸除上清液後加入 DMSO。利用酵素免疫分析儀(ELISA reader)，於波長 550 nm 下，測定其吸光值。

(三)細胞凋亡與細胞週期相關反應路徑蛋白質及基因表現之探討。

四、抗 B 型肝炎病毒的複製及繁殖之基因調控機制：以 Huh7 細胞株穩定轉染 HBV genome 之培養為模式。

(一)以轉染 B 型肝炎病毒基因之 Huh7 細胞株(transfectant)作為天然物篩選平台：本部分採用 Huh7 hepatoma 細胞株經由 lipofectamine 2000 (Invitrogen)轉染(transfect) pHBV1.2 表現質體（由實驗室過去已建構之表現質體 DNA） 24 小時後，再經由天然化合物之處理，即可用來當作天然物抗肝炎病毒基因表現之篩選與機制分析平台。

(二)分析天然萃取物對 B 型肝炎病毒 DNA 複製的影響(病毒複製)

本部份採用病毒基因轉染之 Huh7 肝癌細胞株為模式；將 B 型肝炎病毒 genomic DNA 從肝癌細胞株純化出來，經由南方墨點技術(Southern blot)分析；首先，病毒 DNA 從細胞內病毒顆粒(virion particles)，此實驗中，5x106 個細胞培養在 10 公分的培養皿中，經過不同濃渡之天然萃取物處理 48 小時後，將細胞收取打破離心分離出 capsid-associated viral DNA，以 1 %瓊膠/1xTBE 緩衝液進行電泳，再轉漬到 Hybond N+ nitrocellular membrane (Amsham Biosciences, UK)，進行南方墨點分析，轉漬到 membrane 上的 B 型肝炎病毒 DNA 由 DIG (Roche)標定的 B 肝病毒 DNA 探針(probe)進行雜化(hybridization)(此病毒探針由 HBV2 質體經 EcoRI 限制酶切取純化)、清洗及自動放射性底片(X-ray film)感光，底片感光所呈現之病毒 DNA 量再經由儀器掃瞄定量分析。

(三)北方墨點法分析天然萃取物對病毒轉錄之 RNA (Northern blot)表現量影響

除了分析 B 型肝炎病毒之 DNA 複製情形，另一方面也探討所萃取天然物對病毒基因轉錄的影響，病毒 RNA 可利用純化試劑組

(extraction kit)純化出來，然後取 25 μg 以 formaldehyde 將 RNA denature，經過 1 %瓊膠電泳分離轉漬到 nylon membrane，再以 DIG 標定的 B 型肝炎病毒 DNA 探針(50 ng)進行雜化(北方墨點，Northern blot)，接著自動感光在 X-ray film，病毒所表現的 precore/pregenomic, preS/S 及 X mRNA 經由定量分析。

(四)製備全細胞均質液(whole cell lysate)分析天然萃取物對肝癌細胞內病毒表面蛋白(HBsAg)產生的影響培養後之細胞收集在 PBS 緩衝液清洗三次，離心下來後溶在 RIPA(10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 5 nM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, and 0.25 % Deoxycholate, 1 mM PMSF, 25 ng/ml aprotinin, 5 ng/mL leupeptin)緩衝液，再用微量分注器抽吸幾次，以 14,000 rpm 離心 20 分鐘，所得到上清液即為細胞均質液。

(五)西方墨點分析(Western blot)天然萃取物對 B 型肝炎病毒表面蛋白(HBsAg)表現的影響經過蛋白質電泳後，然後轉漬到 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amershan biosciences, UK)上面，然後以 4 % 脫脂奶粉溶液(in PBST buffer, PBS buffer with 0.05 % Tween-20)於室溫下 block 1 小時，之後以病毒表面抗原蛋白抗體血清(anti-preS, anti-preS2 or anti-major S)作用反應 1 小時，用 PBST 清洗 membrane 3 次(5 分鐘/次)，再以 donkey anti-rabbit IgG 或 sheep anti-mouse IgG (Amershan Biosciences, UK)等二次抗體作用反應 40 分鐘，之後以 PBST 緩衝液清洗 5 次，之後用 ECL detection kit 作用反應，直接曝光在 X-ray film，再以 chemiluminescence image analyzer (FLA1000 system; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)定量分析蛋白質表現量。

(六)酵素免疫分析法(Enzyme Immunoassay, EIA)分析天然萃取物對培養基病毒表面蛋白量釋放量的影響肝癌細胞處理天然萃取物之培養培養基(culture supernatants)收集起來，以 EIA assay kit (Johnson and Johnson, Skillman, NJ, USA)分析量化。

(七)天然萃取物對肝癌細胞生長及毒殺性影響(MTS assay)

為排除處理成分抗 B 型肝炎病毒之有效性主要是對細胞之毒殺所致，因此將肝癌細胞培養在 96-well 培養盤[同時以 Huh7 (human hepatoma cell line)、胃癌細胞為實驗對照組]，經不同天然萃取物之處理，培養 72 小時後，將培養置換，再加入 20 L/well MTS

溶液(promega)，培養在 37 ℃暗室 3 小時，接著取 75 l 的培養液以 12,000 rpm 速度離心 5 分鐘，然後加上 50 μL/well 0.04 M HCl/isopropanol 混和均勻在 O.D.595 的吸光波長下測得數值，再進一步計算細胞生長抑制比例：

抑制生長百分比=控制組平均吸收數值/1-實驗組平均吸收數值x100

經由分析成分對肝癌細胞之毒殺效果後，以評估後續抗病毒處理之非細胞毒殺濃度進一步處理分析抗病毒之效用。

(八) Transfection and luciferase activity assay

以 HuH7 為培養模式，將 6x104 cells/well (24 well plate)或是 3 x105 cells/well (35mm 培養皿)培養在 plate 或培養皿 18 小時後，以 lipofectamine 2000 (Invitrogen)進行 DNA 轉染(transfection)將含病毒基因啟動子(promoter)之 luciferase reporter constructs 送到細胞內表現，經過 48 小時後，以不同濃度之天然萃取物處理 24 小時候，再以試劑套組(promega)分析細胞中 luciferase 活性用以評估啟動子活性是否受到天然萃取物處理的影響。

(九)以電泳膠片推移分析法（EMSA）分析影響病毒基因表現之轉錄因子與 DNA 之結合活性：本實驗將合成並以 DIG 標定之 NF-B 結合核苷酸寡鏈（ oligonucleotide ）（ 5’-TACAGGCGGGGTTTTT CTTGTTG-3’）與經由處理細胞萃取之核蛋白（nuclear protein）進行結合反應，然後以 8% acrylamide gel 進行電泳，在以 X-ray film 進行曝光以分析經結合所推移之蛋白質/DNA 複合體條帶（band）之定量分析，以評估轉錄因子結合 DNA 之活性。

配合抗 B 型肝炎病毒之研究方法(如上述)，將進行以下之抗病毒機制探討：

1. 探討臺灣油點草 3 個部份純化物及闊葉麥門冬 2 個具明顯抗病毒之萃取物所純化之化合物經處理後對 B 型肝炎病毒各基因表現之直接影響。利用西方墨點法(Western blot)分析 HBsAg (preS, major S)等表面抗原蛋白質、HBcAg 核蛋白質及 HBeAg 蛋白質之表現情形。
2. 探討臺灣油點草及闊葉麥門冬具明顯抗病毒之部份純化物或純化合物其抑制 B 型肝炎病毒 DNA 複製之影響。本實驗將以這些化合物處理 3~9 天後 HBV 轉染之肝癌細胞株 Huh7 收集並萃取 intracellular extrachromosomal viral DNA 連同所收集培養基

並純化之 viral DNA 以南方墨點(Southern blot)方法（分析不同型式之病毒 DNA 中間產物）或是利用 Real-time PCR 方式偵測並分析 HBV genomic DNA 含量以評估病毒 DNA 複製之情形，再從中篩選最具抑制活性之臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取化合物進行下一步之機制探討。此外，以北方墨點(Northern blot)方法分析同樣處理化合物後之各種病毒基因（Core、X、S、preS 等）下游 RNA 表現情形，因此，此部分主要在探討成分對 B 型肝炎病毒 DNA 複製及基因表現活性之影響。

3. 針對找到最具抑制活性之臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取化合物主要作用之 B 型肝炎病毒基因，將進一步以基因重組方式分離出四種（Core、X、S、preS）病毒基因之啟動子 DNA 序列以製備成啟動子活性報導基因(promoter-reporter construct)進行一系列之基因活性分析，並找出可能影響病毒基因啟動子受到臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取化合物所作用之細胞轉錄因子(transcription factor)，再分析臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取化合物影響病毒基因活性是主要來自影響轉錄因子的結合還是直接影響轉錄因子在細胞的表現。
4. 針對臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取化合物抑制肝炎病毒 DNA 複製之機制以探討是否透過細胞訊息傳遞路徑以達到作用。依據相關文獻之探討以選用相關訊息傳遞抑制劑以分析臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取化合物抑制 B 型肝炎病毒之 DNA 複製機制是經由那些可能之訊息傳遞路徑。

五、麥門冬與闊葉麥門冬指紋圖譜分析方法

已從臺灣北中南三地各收集市售麥門冬藥材共三項(如下圖)，均分別以 95 %乙醇浸泡並連續萃取三次，其萃取液經減壓濃縮乾再經分配萃取依極性劃分為正已烷層、70 %乙醇水溶液層、正丁醇層與水層，以供後續 HPLC 指紋圖譜分析之用。



市售麥門冬藥材(台北)



市售麥門冬藥材(台中)



市售麥門冬藥材(高雄)

臺灣北中南收集之市售麥門冬藥材照片

HPLC 定性分析條件如下：

(一) Detetor: JASCO UV-970 Intelligent UV/VIS Detector

(二) Pump: JASCO UV-980 Intelligent HPLC Pump

(三) Column: Waters, Cosmosil, 4.6 x 250 mm, 5C_{18}-MS-II

(四) Mobile phase:

1. 5 min, H_2O: MeCN(70:30)
2. 30 min H_2O: MeCN(15:85)
3. 35 min: MeCN
4. 40 min: MeCN
5. Rate: 1.00 mL/min

(五)樣品注射量- 萃取物：0.1 mg/ 10 μL；標準品：0.005 mg/ 0.5 μL

六、油點草屬組織培養與指紋圖譜

(一)植物採集：臺灣油點草採集自南投霧社，毛果油點草採集自臺中太平南國港，高山油點草採集自南投合歡山。

乾燥與萃取方法：植株採取葉部，於室溫乾燥後剪碎，取 200 mg 以 4 ml 之絕對酒精於室溫下攪拌萃取四次，每次 24 小時，萃取液過濾後合併，減壓濃縮。

(二)分析方法：取 2 mg 之萃取物，加入 HPLC 級甲醇，超音波震盪後，離心，取上清液 5 μl 以 HPLC-MS 分析。管柱：Phenomenex Prodigy ODS(2), 5 μ, 532610-1, 2.0 mm×150 mm，流速 250 μl/min，solvent A 為 H_2O (+0.1 % FA)+5 % ACN (+0.1 % FA)，solvent B 為 ACN (+0.1 % FA)。沖提梯度為：0 min: 2 % B, 13 min: 60 % B, 16-21 min: 95 % B, 21-25 min: 2 % B。

(三)分析儀器：Bruker HCT Ultra Ion Trap MS spectrometer，正負離子偵

測模式。

(四)組織培養部份：

1. 材料蒐集與鑑定：植物材料之採集與鑑定由中興大學森林學系曾彥學副教授及其博士班學生趙建棣先生協助進行。
2. 無菌播種及瓶苗建立：油點草之種子量多且細小，為良好的繁殖材料。蒐集油點草種子進行無菌播種，除了建立瓶苗材料外，亦可觀察紀錄油點草發芽型態。
3. 油點草種子短期儲存及發芽力測試：收獲野外種子或栽培材料自花授粉結果獲得之種子進行短期儲存。儲存方式為將成熟種子以秤藥紙包好，置於含有矽膠的 eppendrof 中，冷藏保存於 5℃冰箱，並定期取出進行無菌播種以確認其活性。
4. 毛果油點草莖節增殖及培養：毛果油點草為多年生草本植物，開花結果至種子成熟後，地上部會全草枯萎致使植物材料會有一段時間無法取得，或是因採集不易使材料來源受到限制。因此利用前一年度已建立之組織培養技術建立毛果油點草健康種苗生產體系。

   以毛果油點草成熟植株之莖節為初始培植體，切成適當長度，75%酒精擦拭表面後，置入含有 2%次氯酸鈉及 1 滴 Tween 20 之滅菌液中，手動搖晃 15 分鐘，在無菌操作台中以無菌水清洗培植體 3 次，直插入誘導培養基中，培養於 25±1℃、光週期 12 小時的培養室中，以誘導側芽抽出。培養基成份(TF55)為半量 MS 鹽類，100 mg/l myo-inositol，30 g/L sucrose，0.5 mg/L BA，0.5 mg/L NAA，8 g/L agar，pH 5.7。瓶內抽出之小苗可再切取其莖節進行增殖。芽體抽長至 3-4 cm 時，可分成單芽移入不含生長調節劑之 MA 培養基誘導成苗，待小苗長至 6-7 cm，經馴化後，將瓶苗移植出瓶至溫室栽培，觀察其生長及開花特性。
5. 染色體觀察：切取瓶苗或溫室栽培之油點草根尖(約 0.5 cm)，置入含有預處理藥劑[1 ml DI、2 µl BrNa (1-Bromnaphthalin)及 2.5 µl DMSO]之 eppendrof 中，避光處理 7 hr 後，移除預處理液並加入固定液(95%酒精：冰醋酸=3：1)，處理 overnight。移除固定液，以 1 N HCl、60℃軟化 10 分鐘。移除 1N HCl 並清洗根尖，加入 50 µl Feulgen 染劑，室溫下避光處理 1 hr。移除 Feulgen 染劑並以蒸餾水清洗兩次，加入 10 µl 酵素液，室溫下黑暗處理 1 小時，以蒸餾水清洗後進行壓片觀察。

參、結果

一、細胞毒殺活性–闊葉麥門冬

承前年度之研究，闊葉麥門冬地下部 95%乙醇粗萃物之 70%乙醇水溶液萃取層(代號 LPRP)對前述之癌細胞均有抑制效果，故抗癌藥理機轉選定以闊葉麥門冬地下部萃取物與其劃分層及其活性化合物為題目進行研究。利用活性導引初步分離 LPRP，其 subfraction LPRP-9 有顯著的癌細胞生長抑制活性(圖一 A)。針對 Huh-7 與 MCF-7，LPRP-9 於濃度 20 μg/mL 下與 5μM 之 doxorubicin 有相似之抑制效果(圖一 B)。機轉研究實驗中以 Huh-7 與 MCF-7 兩株癌細胞株為材料，利用 Western blot 觀察數個抗癌相關機轉路徑上重要 key points 蛋白質之表現，發現 LPRP-9 能減少經由 mTORC2 與 PI3 K/PDK1 所介導之 AKT Ser^{473} 與 Thr^{308} 磷酸化，且呈現 dose-dependent fashion。亦會減少 FoxO3a Ser$^{318/321}$ 磷酸化(圖二 A)，而 FoxO3a 是 ERK1/2 的 mediated target，屬於 Ras-MAPK oncogenic pathway 成員，故 MAPK pathway 也是研究重點：LPRP-9 減少 ERK1/2 Thr^{202}/Tyr^{204} 磷酸化，亦會增加 JNK Thr^{183}/Tyr^{185} and p38 Thr^{180}/Tyr^{182} 磷酸化(圖二 B)。上述結果顯示 LPRP-9 能抑制癌細胞生長並同時促使癌細胞走向死亡(cell death)。為了要了解 LPRP-9 促使癌細胞死亡過程中之機制，antiapoptotic 之調節因子 Bcl-2、Bcl-XL 與 apoptosis 抑制因子 survivin，以及 prodeath 之調節因子 Bid、Bad 與 Bax 均被評估。發現在 MCF-7 中，LPRP-9 能減少 Bcl-2、Bcl-XL 與 survivin 之表現，同時促進 Bid 轉化為活化態之 tBid，但不影響 Bad 與 Bax 之表現；而在 Huh-7 中，這些因子之表現均顯著的減少(圖三)。該些訊息決定性地顯示 LPRP-9 促使 MCF-7 細胞死亡之機制。探討癌細胞死亡之 apoptosis 或 autophagy 機制實驗中，LPRP-9 能增加 apoptotic markers 中 caspase-8 及 caspase-9 之表現，進而促進 DNA fragmentation 的增加，且亦能增加 caspase-3 及 caspase-7 之 PAPR 的 cleavage。於 high dose 下，MCF-7 中，LPRP-9 可促使 autophagy marker LC3-I 轉變為 LC3-II (但在 Huh-7 中則會減少 LC3 protein 的表現也不會增加 LC3-I 轉換為 LC3-II)。為更進一步確認，於藥物處理時加入 Z-VAD-FMK (pan-caspase inhibitor) 以及 3-methyladenine (3-MA; autophagy inhibitor)，其結果證明 LPRP-9 於 MCF-7 中，可以走 apoptosis 與 autophagy 兩路徑，而於 Huh-7 中則傾向經由 apoptosis 而促進癌細胞死亡(圖四)。實驗結果顯示，LPRP-9 引起的癌細胞死亡機轉，會因為不同的癌細胞類型而不同。p53 在細胞存活與進入死亡過程中扮演相

當重要的角色，也與細胞 DNA damage 反應有很大的關聯，故 p53 的表現與活化亦為重要的研究目標。於 MCF-7 處理低濃度之 LPRP-9 能促使增加 p53 Ser15 的磷酸化，但在 Huh-7 則不顯著。進一步加入 p53 抑制劑 pifithrin-α 能有效抑制因 LPRP-9 造成之細胞死亡，故可證明 LPRP-9 能促使 p53 的活化而達到抗癌作用(圖五)。為尋找 LPRP-9 之活性來源，我們從中分離得到新化合物(−)-liriopein B，其具有 moderate toxicity 且呈現 dose-dependent effect。在低濃度即可促使 AKT Ser^{473}、Thr^{308} 與 FoxO3a $Ser^{318/321}$ 去磷酸化，且遠低於毒性濃度下，該化合物亦具有 inactivate PI3K/AKT and activate FoxO3a 的能力(圖六)。由此可見，(−)-liriopein B 為 LPRP-9 中貢獻抗癌活性的成份之一。以上成果已發表於國際期刊 ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2013, Article ID 857929: 10 pages.**

(一)抗 B 型肝炎病毒活性–闊葉麥門冬、臺灣油點草

經由去年兩株植物萃取物或純化合物之抗 B 型肝炎病毒篩選，本年度計畫將針對臺灣油點草抗病毒活性較為明顯之 TF-DCM-15、16 及 17 三個部分純化物(subfractions)以及闊葉麥門冬之代號 LPRP-97543 及 LPRP-95462 兩個純化合物進行抑制肝炎病毒機制探討。本實驗利用 Huh7 肝癌細胞轉染 HBV 病毒基因組(genome)為模式，再以 TF-DCM-7、15、16 及 17 萃取物及 LPRP-97543、95462 等化合物經由非細胞毒性濃度處理 HBV genome 轉染的 Huh7 細胞株，然後收集培養基以測定細胞釋放之病毒表面抗原及 e 抗原（HBsAg 及 HBeAg），結果顯示臺灣油點草的四個萃取物與闊葉麥門冬兩個純化合物皆具有抑制病毒抗原表現之現象(圖七~十一)，再以北方墨點分析這些化合物對肝炎病毒基因表現是否受到影響，從實驗結果顯示，除了 TF-DCM-7 及 LPRP-Et-95462 兩個化合物外，經由這些化合物處理劑量增加，皆明顯抑制病毒 RNA 表現(圖十二~十五)，並且從 Real-Time PCR 分析細胞內肝炎病毒 DNA 顯示這該些萃取化合物(TF-DCM-15, 16, 17)與純化合物(LPRP-97543)具有抑制細胞內 HBV 病毒 DNA 複製之功能(圖十六)。再進一步以分離之肝炎病毒四個主要基因（Core, X, preS, S）啟動子建構之 luciferase 報導基因進行細胞轉染並處理上述之四個測試藥物(TF-DCM-15, 16, 17 與 LPRP-97543)，結果顯示病毒 Core, S 及 PreS 基因啟動子被抑制現象較為明顯(圖十七~二十)，而 LPRP-95462 的處理下，對病毒 RNA 之表現並沒有明顯

處理差異性(圖二十一)。在此同時，為了瞭解抑制病毒活性較為明顯之闊葉麥門冬 LPRP-97543 化合物抑制病毒複製之劑量效應，因此，實驗中處理不同劑量之 LPRP-97543 化合物，再以南方墨點（Southern blot）分析病毒 DNA 之複製量以評估此化合物對病毒 DNA 複製之影響，實驗結果顯示，經由 LPRP-97543 化合物處理兩種劑量下，隨著處理劑量增加，可以明顯抑制複製之病毒 DNA (圖二十二)，其在處理劑量為 10 μg/ml 之抑制活性跟處理 3TC（lamivudine）已知抗病毒抑制藥劑在劑量為 5 μg/ml 之活性相當(圖二十二)。在抗病毒之細胞訊息機制方面，本研究利用已建構之 pAP1-Luc, pAP2-Luc, pISRE-Luc 及 pNF-κB-Luc 等四個主要訊息傳遞路徑反應基因啟動子進行細胞轉染並處理以上四個測試藥物(TF-DCM-15, 16, 17 與 LPRP-97543)以檢測並篩選影響之基因啟動子活性進而評估這些化合物抑制病毒之機制主要經由哪些細胞訊息傳遞路徑，在實驗結果中，NF-κB 反應基因啟動子之活性都受到這四個測試藥物(TF-DCM-15, 16, 17 與 LPRP-97543)抑制的效應(圖二十三~二十六)。而本計畫已取用臺灣油點草 TF-DCM-15 萃取物及 LPRP-97543 純化合物以進行 HBV 轉染 Huh7 細胞之處理並進一步分析其抗病毒之機制，在萃取細胞總蛋白以進行病毒蛋白或具有調控之 NF-κB 蛋白質表現之西方墨點分析方面，由實驗結果顯示，TF-DCM-15 萃取物及 LPRP-97543 純化合物之處理明顯抑制肝炎病毒 LHBs, MHBs 及 SHBs 等三種病毒表面蛋白之表現，病毒核心蛋白表現也有抑制作用(圖二十七、二十九)，而此抗病毒機制可能影響之 p65 及 p50 之 NF-B 蛋白也明顯被 TF-DCM-15 萃取物或 LPRP-97543 純化合物處理下而被抑制，相對的，IκBα 蛋白之表現有增加的趨勢(圖二十八、三十)。此外，為了瞭解其中抑制病毒較為明顯之純化合物 LPRP-97543 對病毒基因表現及複製作用是否經由影響 NF-κB 因子與啟動子 DNA 結合之活性，本研究進行電泳遷移變動分析（Electrophoretic mobility shift assay, EMSA）以分析其結合活性，由實驗結果顯示，經由 LPRP-97543 化合物之處理劑量增加，NF-κB 與 DNA 結合之活性有明顯下降之趨勢(圖三十一)。

(二)指紋圖譜建立與分析比對部份

1. 麥門冬與闊葉麥門冬

自臺灣北中南三地各收集市售麥門冬藥材共三項，均分別以 95 %乙醇浸泡萃取，其粗萃物再經分配萃取依極性劃分為正已烷層、70 %乙醇水溶液層、正丁醇層與水層，與闊葉麥門冬地下部乙醇粗萃物具有生物活性之 70 %乙醇水溶液層進行化學指紋圖譜比較，以自闊葉麥門冬地下部所分離得到之二種活性化合物(3*R*)-3-(4′-hydroxy-benzyl)-5,7- dihydroxy-6-methyl-chroman-4-one 與(3*R*)-3-(4′-hydroxy-benzyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-6-methyl-chroman-4-one 作為標準品。

經 HPLC profile 分析後發現(圖三十二、三十三)，闊葉麥門冬地下部萃取物之 70 %乙醇水溶液層能明顯看到具有(3*R*)-3-(4′-hydroxy-benzyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-6-methyl-chroman-4-one 的存在，顯示此化合物於闊葉麥門冬中應具有相對較高的含量，反觀(3*R*)-3-(4′-hydroxy-benzyl)-5,7-dihydroxy-6-methyl-chroman-4-one 則無法明顯辨別。市售麥門冬藥材萃取物之 70 %乙醇水溶液層(圖三十四~三十六)則均無法明顯辨別此二標準品之存在，推測可能原因為：藥材所含成分複雜，須進一步修改分析條件以達最佳化，或是藥材中含量極微，難以 HPLC 分析。

另一方面，比較闊葉麥門冬與市售麥門冬之 HPLC 圖譜可明顯發現，兩者應該部分化合物相似或是具有類似之骨架，但整體而言，差異性頗大，難以將兩者合併討論之。就臺灣北中南三地之藥材比較，三項樣品之主成分均雷同，惟含量略有差異，未來若欲建立藥材品質管制時，應可就主成分含量與分析條件為課題進行研究。

2. 油點草屬

在指紋圖譜建立與分析比對部分，分離自臺灣油點草的成分:4-hydroxybenzaldehyde (MW 122)滯留時間為 8.7 分鐘，vanillin (MW 152)滯留時間為 9.2 分鐘，ferulic acid methyl ester (MW 208)滯留時間為 12.9 分鐘，vanillic acid methyl ester (MW 182)滯留時間為 11.2 分鐘，4-hydroxybenzoic acid methyl ester (MW 152)滯留時間為 11.0 分鐘，p-coumaric acidmethyl ester 滯留時間為 12.5 分鐘，vanillin (MW 152)滯留時間為 9.2 分鐘。採用 extracted ion chromatography (EIC)方式找出具有相同分子離

子峰與斷裂片之成分峰(peak)，發現正離子偵測模式成分峰較高。採集至霧社的臺灣油點草(WS-W)之指紋圖譜如圖三十七所示；相同來源之組培苗的指紋圖譜(TG07)如圖三十八所示，其內容成分皆相對較少。採集至合歡山的高山油點草(KG03)之指紋圖譜如圖三十九所示；相同來源之組培苗的指紋圖譜(KSC)如圖四十所示，4-hydroxybenzaldehyde 含量，組培苗較野生種多，ferulic acid methyl ester 含量幾乎相同。採集自臺中太平的毛果油點草(MG05)之指紋圖譜如圖四十一所示；相同來源之組培苗的指紋圖譜(MG05-T)如圖四十二所示。在建立組織培養條件方面，已採集臺灣 3 種原生油點草種源-臺灣油點草、高山油點草及毛果油點草，其採集點條列於表 1，其中臺灣油點草及高山油點草已在前一年度建立其無菌播種及莖節培養增殖系統，本年度則將其培養條件應用在毛果油點草之莖節繁殖。野外生長之毛果油點草(圖四十三 a)，採集地上莖段去除葉片之單莖節為初始培植體(圖四十三 b)，經表面滅菌後培養於含有 0.5 mg/l BA 和 0.5 mg/l NAA 之 1/2 MS 培養基中，1 個月後增殖之芽體抽長展葉(圖四十三 c)，分成單芽後移至不含生長調節劑之培養基中，芽體可順利發根(圖四十三 d)，待其生長至 4-5 cm 時，瓶苗移植出瓶至含有泥炭土之紅色塑膠盆中，於網室栽培可持續生長(圖四十三 e)。選取移植苗之新根進行染色體觀察，其數目為 2n=26，與已知的數目相符，顯示組培苗未有染色體數目上之變異(圖四十三)。

前一年度移植至網室之臺灣油點草及高山油點草植株，在當年度即可順利開花，但高山油點草並無法順利透過人工雜交而得到種子，推測因平地氣溫較高所致。臺灣油點草部分植株產生花苞並順利開花(圖四十四 a)，花形花色皆正常，經人工授粉後，其著果率約 10% (圖四十四 b)。授粉後 5 週可見其褐色種子形成，但果實上未乾燥開裂。待其完全乾燥後，收穫其種子(圖四十四 c)並以秤藥紙包覆後，存放含有矽膠的 eppendrop 中，於 5℃冰箱冷藏。亦自野外採及成熟果實及種子，以相同方式低溫存放於冰箱。無菌播種 1 個月後計算其發芽率(圖四十四 d)，生長至完整植株後，移植至網室栽培(圖四十四 e)。植株經染色體檢測，其數目為 2n=26，與已知數目相符(圖四十四 f)。種子經

低溫冷藏後 3 個月，其種子無菌播種發芽率為 94%；冷藏至 8 個月時，其發芽率仍可維持在 85.2%；種子冷藏至 1 年，其發芽率尚達 54%。顯示油點草種子經低溫儲存後，配合無菌播種，可穩定持續供應材料(圖四十五)。

利用油點草莖節培養技術，可針對藥用成分含量高的單株個體或是數量稀少的種類在短時間進行大量增殖，但若能配合田間栽培繁殖以獲得成熟植株，對於萃取成分所需的材料供應可達到較高的效益。因此，利用網室栽培之油點草組培苗進行扦插試驗，以獲得完整繁殖系統。臺灣油點草之單莖節(不含頂芽)直插入介質或橫放於介質上，2 週後觀察其存活狀況，30 個直插處理有 11 個莖節抽出葉片，30 個橫放處裡則有 7 個莖節抽出葉片；培養 3 個月後，21 個直插莖節存活且長出多片新葉，15 個橫放莖節存活且生長良好，但單個莖節皆僅長成一株完整植株(圖四十六 a)。臺灣油點草之頂芽去除多餘葉片直接扦插於含有泥炭土介質的紅色硬盆，亦可順利長成完整植株(圖四十六 b)。

(三)抗發炎活性部分：臺灣油點草

臺灣油點草之 DCM 層之抗一氧化氮合成酶之活性最強，遂將此層進一步以矽膠管柱層析分離得到 18 個部分純化物。再進行活性測試，顯示 TF-NW-DCM-7 活性最強。再針對此部分進行純化，得到酚類化合物與植物固醇，包括：caffeic acid, p-coumaric acid, p-coumaric acid methyl ester, ferulic acid, 4-hydroxybenaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid methyl ester, methyl 4-hydroxy-3-methoxy-trans-cinnamate, scopoletin, sesamin, β -sitosterol & stigmasterol, β -sitosteryl-3-O-β-D-glucoside & β -sigmasteryl-3-O- β -D-glucoside, vanillic acid, vanillic acid methyl ester, vanillin。在小鼠巨噬細胞株(RAW264.7)處理細菌內毒素(LPS 200 ng/ml) 24 後，一氧化氮合成酶產物及細胞存活率。一氧化氮合成酶產物以 Griess 試劑定量細胞上清液中一氧化氮之含量，作為評估臺灣油點草抗發炎活性之初步篩選。臺灣油點草之部分化合物的抗發炎活性。

所有化合物中以 4-hydroxybenaldehyde 對一氧化氮合成酶之抑制活性最佳，其抑制作用顯示具有劑量相關效應，當濃度為 3.0 mM 時，仍不具有細胞毒性。考量部分純化物中各成分可能具有加成或

協同作用，因此選擇 3 個活性最好的化合物同時處理，觀察其抑制活性。圖四十七為臺灣油點草之化合物β-sitosterol β-D-glucoside (sito), vanillic acid methyl ester (VAME), 4-hydroxylbenzoic acid methyl ester (4-OH BAME) 之抗一氧化氮合成酶的濃度與活性關係，顯示具有劑量相關效應。圖四十八為合併處理β-sitosterol β-D-glucoside (sito), vanillic acid methyl ester (VAME), 4-hydroxylbenzoic acid methyl ester (4-OH BAME) 之抗一氧化氮合成酶的濃度與活性關係。當單獨處理β-sitosterol β-D-glucoside (167 μM), vanillic acid methyl ester (3 mM), 4-hydroxylbenzoic acid methyl ester (3 mM)時，分別產生最大抑制作用。但合併使用時，可能因影響細胞等張性，而造成細胞毒性。若將濃度降低為β-sitosterol β-D-glucoside (167 μM), vanillic acid methyl ester (1 mM), 4-hydroxylbenzoic acid methyl ester (1 mM)合併處理時，無細胞毒性，抑制一氧化氮的活性與單獨使用 vanillic acid methyl ester (3 mM), 4-hydroxylbenzoic acid methyl ester (3 mM)時相近。部分純化物(TF-NW-DCM-7)的作用仍為最強，由質譜分析得知其中組成種類多，說明其中某些活性成分可能產生交互之加成或協同作用，使部分純化物的活性最好。因此接續生物活性實驗以部分純化物進行。

圖四十九為臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)之抗一氧化氮合成酶基因表現分析(RT-PCR)的濃度與表現關係。圖五十為此部分純化物(TF-NW-DCM-7)之抗一氧化氮合成酶與環氧合酶(COX-2)蛋白質表現分析(Western blotting)的濃度與表現關係。其功能性作用則以 SD 大鼠離體主動脈預處理細菌內毒素(LPS 200 ng/ml)6 小時，由血管收縮劑 phenylephrine (1 nM-100 μM)刺激血管環產生之收縮張力作為評估。臺灣油點草之部分純化物(TF-NW-DCM-7)改善細菌內毒素因產生一氧化氮合成酶所造成之 SD 大鼠主動脈血管收縮張力降低，此作用呈濃度與功能性關係，如圖五十一所示。

在 SD 大鼠以交叉菜膠引起發炎性足腫之動物模型，可見臺灣油點草之部分純化物(TF-NW-DCM-7)產生保護作用，如圖五十二，呈現濃度與作用關係。當腹腔注射劑量為 0.6 mg/kg 時，抑制足腫的作用與正對照組(Indomethacin；Indo)相當，當劑增加為 2.5

mg/kg 與 5.0 mg/kg 時，抑制足腫的作用顯著改善，約在 3 小時後復至正常足掌之體積。交叉菜膠引起大鼠血漿一氧化氮濃度增加，此作用可被 TF-NW-DCM-7 以劑量關係呈抑制作用，如圖五十三。交叉菜膠引起大鼠血漿中前列腺素(PGE_2)增加的作用，亦可被 TF-NW-DCM-7 呈劑量關係抑制，如圖五十四所示。

TF-NW-DCM-7 產生抑制發炎的作用機制，以足掌之訊息傳遞作為探討，圖十五之 MAPK (ERK, JNK, p38)及 NFkB (IKBα, p65)訊息為一氧化氮之上游路徑。TF-NW-DCM-7 明顯抑制多重引起發炎之細胞素，如圖五十六、圖五十七、圖五十八、圖五十九所示，作用校正對照組(Indo)更好。圖六十為 TF-NW-DCM-7 明顯改善交叉菜膠引起大鼠足掌之發炎性組織腫脹、水腫及嗜中性白血球細胞浸潤之病理表現，亦呈劑量關係。

肆、討論

一、闊葉麥門冬成分與其細胞毒殺：

於前一年度研究中發現，闊葉麥門冬根部粗萃物分配萃取之 70 %乙醇水溶液層具有顯著的細胞毒殺與抗發炎活性表現，故將該層進行分離與純化工作，並進一步將分離出之純物質測試細胞毒殺以及抗發炎之活性。自根部分離出之 26 個化合物包括十種骨架，分別為 2 個 dihydrobenzofuroisocoumarins、8 個 homoisoflavonoids、6 個 acid amides、1 個 ethyl butanoate、1 個 fatty acid、1 個 lignan、1 個 chalcone、1 個 alkaloid、3 個 benzonoids，以及 2 個 steroids 的混合物。其中包含了首次分離出之新化合物(+)-platyphyllarins A 與 B、ethyltributanoate、(−)-liriopeins A 與 B，homoisoflavonoids 類化合物為主要成分，此與文獻報導中麥門冬屬植物之主要化合物 steryl glycosides 有所不同。以上成分分離與結構鑑定及其相關成果，已發表至國際學術期刊 *Food Chemistry* 2013, *140*, 305-314。

另一方面，分離出之化合物中，(−)-liriopein B 對五株癌細胞株(HepG2、Hep3B、MCF7、MDA-MB-231 與 A549)有廣效的抑制作用，並進一步研究其抗癌機轉，發現此化合物對 Huh-7 與 MCF-7 兩株癌細胞株具有 moderate toxicity 且呈現 dose-dependent effect。在低濃度即可促使 AKT Ser^{473}、Thr^{308} 與 FoxO3a $Ser^{318/321}$ 去磷酸化，且遠低於毒性濃度下，該化合物亦具有 inactivate PI3K/AKT and activate FoxO3a 的能力。以上成果已發表於國際期刊 *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2013, Article ID 857929: 10 pages. 未來本研究會加入現有西藥 tyrosine kinase 抑制劑如蕾莎瓦(Sorafenib)，與(−)-liriopein B 做比較。

二、抗 B 型肝炎活性(兩株植物)

由本部分實驗結果顯示，臺灣油點草 TF-DCM-15、16、17 三個萃取物（subfraction）與闊葉麥門冬 LPRP-97543 及 LPRP-95462 兩個純化合物可以抑制 B 型肝炎病毒之基因表現（抑制病毒蛋白及 RNA 表現量），並且會影響病毒之複製（抑制病毒 DNA 生成量），由此可預知這些萃取化合物具有相當之病毒抑制活性，進一步分析其抑制機制中，也發現，NF-κB 轉錄因子之活化作用為病毒利用宿主細胞執行病毒本身基因表現及複製調控中，為必須之訊息傳遞路徑，本研究發現在處理這些化合物後，明顯抑制了 NF-κB 轉錄因子 p65 及 p50 兩種次單元蛋白之表現，再者，具抑制功能之 IκB 表現量也明顯增加，由此結果顯示臺灣油點草及闊葉麥門冬抗病毒

天然物可能經由調節 NF-κB 及 IκB 之表現及與基因啟動子 DNA 序列結合活性以達到對 B 型肝炎病毒之抑制效果。

三、抗發炎活性：臺灣油點草

臺灣油點草之部分純化物確實具有抗發炎之活性，我們亦證實其機轉，目前此部分已撰寫並投稿當中。

四、油點草屬分析&組培

在指紋圖譜建立與分析比對方面，經由以上分析發現野生種之二次代謝物與組培苗相比，其種類與相對量一般而言較少，但高山油點草之 4-hydroxybenzaldehyde 與 ferulic acid methyl ester，在組培植株中發現含量較高，而 4-hydroxybenzaldehyde 為具抗發炎與抗 B 型肝炎病毒活性之成分，未來可以針對高山油點草進行組培。而我們亦進行種子繁殖，將來也可以分析其二次代謝物之含量，而高山油點草之野外植株較少，可以做為復育之參考。指紋圖譜之建立與比對，因為考慮萃取出大部分之成分，同時也會萃取出許多微量物質，在利用質譜為目前靈敏度最高之分析儀器，可以偵測大部分之成分。但亦由於微量物質帶來的基質效應(matrix effect)，會壓抑電噴灑游離(ESI)介面之游離效率，致使許多峰不容易看見。我們採用 EIC 的方式找出成分峰，並比對其分子離子峰與斷裂片，其正確鑑定仍需進一步確認。此外，我們將採用液-液分配的方式，將成分依照分配係數集中，可以去除其他物質的干擾，並且不會有成分的損失，這可能是解決此問題的方法之一。

利用組織培養繁殖生產藥用植物種苗，以無菌方式加以保存，可提供做為化學分析及醫藥研究、減少對野外種源採集壓力，並可利於國際間交流(蔡等人, 2003)。在植物組織培養方面，Nakano 等人(2004)將 6 種油點草之花絲培養在含有 4.5 μM 2, 4-D 及 0.45 μM TDZ 的 1/2 MS 培養基中，誘導出癒傷組織而後再生形成體胚並發育成苗，之後研究指出，持續繼代培養 1 年以上癒傷組織誘導產生之體胚苗，37 株小苗中有 9 株再生株產生多倍體化，此些多倍體化植株具有較大花朵、植株變大等特性，可用在選種及花卉作物開發(Nakano et al., 2006)。若以大量繁殖藥用植物為目的，經由芽體增殖方式有較低變異率，可穩定供應材料做為成分分析及萃取。印度地區瀕危之藥用植物 *Ceropegia bulbosa* Roxb.應用莖節作為初始培植體，建立完整有效的大量繁殖系統(Britto et al., 2003；Goyal et al., 2006)。藥用植物-大薊野外採集種子經無菌播種後生成小苗，再以瓶苗之莖節進行增殖、發根及移植，可順利建立大量繁殖系統，大薊再生苗經染色體檢測與野生植株

數目相符，認為再生苗應可與野生植株等同使用(陳及葉, 2010)。本研究在前一年度已建立臺灣由點草及高山油點草之莖節培養繁殖系統，本年度應用其培養條件至毛果油點草，將其單莖節培養於含有 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 之 1/2 MS 培養基中，可誘導產生 2-3 個芽體，再移至不含生長調節劑之培養基中，可發根成苗。高山油點草經過持續繼代培養，降低初代誘導使用 BA 濃度(2 mg/l)至 0.5 mg/l，其芽體增殖率未隨之下降，因此為了避免長期繼代在高含量生長調節劑所造成之變異，3 種油點草材料在後續繼代培養皆以 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 組合之培養基進行增殖。檢測 3 種油點草再生植株之根尖，其細胞染色體數皆為 2n=26，結果得知油點草再生植株的染色體數與前人研究相同(Ying, 2000; Peng et al., 2007; Li et al., 2003)，顯示再生植株應可與野生植株等同使用。再生植株移至溫室再配合扦插作業，可持續繁殖並減少瓶內生長調節劑之影響。因此，透過組織培養技術可針對藥用成分高的特殊單株進行增殖，獲得足夠數量之後，移植出瓶再配合扦插作業，可穩定生產油點草材料；或是進行人工授粉及低溫儲藏，結合無菌播種技術在瓶內建立材料，瓶苗可直接移出或是再以瓶內莖節進行增殖。經 2 年的繁殖及栽培，觀察到油點草植株在夏季栽培時，較常出現蚜蟲危害，且常發生在新葉，可透過移除病株或是摘除頂端部位來減少蟲害。

伍、結論與建議

本計畫完成生物活性導引分離法完成兩株臺灣本土百合科藥用植物闊葉麥門冬與臺灣油點草之活性成分分離與結構鑑定；另外，也完成兩株植物之相關化學指紋圖譜比較分析與組織培養等技術，以開發作為健康食品及植物新藥研發。

組培苗之二次代謝物之成分種類與量較野生種一般而論較少，而高山油點草之活性成分，組培苗反而較多。其精確量需要進一步進行定量分析確認，並且採集更多植株進行組培，使用不同部位，探討那一部分成分較高。此外，其作用機制亦值得深入探討。鈴木氏油點草的野生植株亦越來越難發現，我們將針對此物種進行組培，提供將來復育此物種之依據。本研究已蒐集並進行 3 種臺灣原生油點草之莖節增殖試驗，大量繁殖藥用植物材料進行成分萃取、分析及藥理試驗，並透過染色體檢測確認其再生植物無變異產生。透過組織培養系統、扦插繁殖、人工授粉獲得種子及種子冷藏，可針對成分活性高的單株個體進行大量繁殖，亦可保存並維持種源的豐富性，做為未來產品開發的基礎。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-116 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. 陳景明、葉茂生.藥用植物大薊組織培養大量繁殖與其染色體數之研究. 植物種苗 2010; 12(2):33-47.
2. 周眉君，印度紫檀與臺灣油點草之化學成分及生物活性之研究，高雄醫學大學天然藥物研究所碩士論文，中華民國九十四年六月。
3. 李世軍，臺灣產藥用植物（臺灣油點草、水蕨）及生藥材（油茶粕、琥珀）之成分研究，國立清華大學化學系博士論文，中華民國九十一年八月。
4. Bai X, Chen X, Liu Y, Tian L, Zhou Q, Liu S, Fang J, Chen J. Effects of water extract and crude polysaccharides from *Liriope spicata* var. *prolifera* on InsR/IRS-1/PI3K pathway and glucose metabolism in mice. *J Ethnopharmacol* 2009; 125: 482-486.
5. Boyang Y, Xia Y, Zuyuan R, Timo Y, Chunhong Z, Guojun X. Biological activities of ruscogenin 1-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2)][β-D-xylopyranosyl(1→3)]-β-D-fucopyranoside from tuberous roots of *Liriope muscari* (Decne.) Bailey. *J Chin Pharmaceut Univ* 1994; 25: 286-288.
6. Britto SJ, Natarajan E, and Arockiasamy DI: In vitro flowering and shoot multiplication from nodal explants of *Ceropegia bulbosa* Roxb. var. *bulbosa*. *Taiwania* 2003; 48(2): 106-111.
7. Chen X, Liu Y, Bai X, Wen L, Fang J, Ye M, Chen J. Hypoglycemic polysaccharides from the tuberous root of *Liriope spicata*. *J Nat Prod* 2009; 72: 1988-1992.
8. Cheng ZH, Wu T, Bligh SW, Bashall A, Yu BY. *cis*-Eudesmane sesquiterpene glycosides from *Liriope muscari* and *Ophiopogon japonicus*. *J Nat Prod* 2004; 67: 1761-1763.
9. Choi SB, Wha JD, Park S. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. *Life Sci* 2004; 75: 2653-2664.
10. Fukai, S. Floral Initiation and Development of *Tricyrtis* Hybrida. Tech. Bull.Fac. Agr. Kagawa Univ., 2009; 61:21-26.
11. Goyal D, and Bhadauria S: In vitro propagation of *Ceropegia bulbosa* using nodal segments. I*ndian J. Biotech.* 2006; 5: 565-567.

12. Hu ZF, Chen LL, Qi J, Wang YH, Zhang H, Yu BY. Two new benzofuran derivatives with anti-inflammatory activity from *Liriope spicata* var. *prolifera*. *Fitoterapia* 2011; **82:** 190-192.
13. Hur J, Lee P, Kim J, Kim AJ, Kim H, Kim SY. Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1257-1260.
14. Jiang T, Tang XY, Wu JS, Wang LQ, Huang M, Qin LP. Study on chemical constituents of the root of *Liriope platyphylla*. *J Chin Med Mater* 2011;34: 1537-1539.
15. Jiang T, Huang B, Zhang Q, Han T, Zheng H, Qin L. Effect of *Liriope platyphylla* total saponin on learning, memory and metabolites in aging mice induced by D-galactose. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2007; 5: 670-674.
16. Kim SW, Chang IM, Oh KB. Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 2751-2754.
17. Kojiro, S..Studies on the habit of multiplication and migration of Japanese Liliaceous plants. (1). Seed germination habit. *Journal of Phytogeography and Taxonomy* 1999; 47(2):111-120.
18. Kojiro, S.. Difference of ligh reaction on the seed germination of two *Tricyrtis* species and *Scilla scilloides* in Liliaceae. Journal of Agricultural Science, *Tokyo Nogyo Daigaku* 2000; 45:210-216.
19. Lee YC, Lee JC, Seo YB, Kook YB. Liriopis tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *J Ethnopharmacol* 2005; 101: 144-142.
20. Li, S. F., B. Li, and Qi, H.. Study on cytology of some species in Liliaceae from *Qinling mountain*. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin*. 2003; 23(11):1949-1955.
21. Liu M, Yu B, Hui Y. First total synthesis of 25(*R*)-ruscogenin-1-yl-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-fucopyranoside, an ophiopogonis saponin from the tuber of *Liriope muscari* (Decne.). *Tetrahedron lett* 1998; 39: 415-418.
22. Liu J, Chen T, Yu B, Xu Q. Ruscogenin glycoside (Lm-3) isolated from *Liriope muscari* inhibits lymphocyte adhesion to extracellular matrix. *J*

Pharm Pharmacol 2002; 54: 959-966.

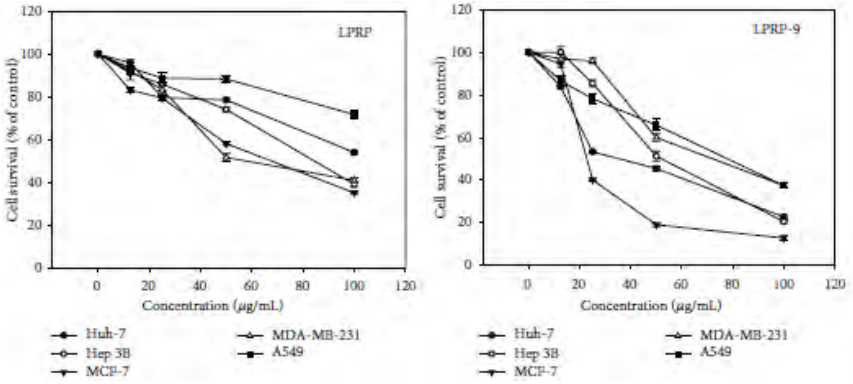
23. Maki M, Morita H, Oiki S and Takahashi H: The effect of geographic range and dichogamy on genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis* section *Flavae. Mol Ecol Notes* 2007; 7: 1299-1301.
24. Nakano, M,M T. Nomizu, K. Mizunashi, M. Suzuki, S. Mori, S. Kuwayama, M. Hayashi, H. Umehara, E. Oka, H. Kobayashi, M. Asano, S. Sugawara, H. Takagi, H, Saito, M. Nakata, T. Godo, Y. Hara and J. Amano.. Somaclonal Variation in *Tricyrtis hirta* Plants Regenerated from 1-year-old Embryogenic Callus Cultures. *Scientia Horticulturae* 2006; 110:366-371.
25. Nakano, M., K. Mizunashi, S. Takana, T, Godo, M. Nakata and H. Saito.. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of Several Species in the Genus *Tricyrtis*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-plant* 2004; 40:274-278.
26. Peng, C. I., C. L. Tiang and T. W. Hsu.. *Tricyrtis ravenii* (Liliaceae), a New Species from Taiwan. *Botanical Studies* 2007; 48:357-364.
27. Peruzzi L, Leitch IJ and Caparelli KF: Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. *Ann Bot* 2009; 103: 459-475.
28. Saito N, Tatsuzawa F, Miyoshi K, Shigihara A, Honda T: The first isolation of C-glycosylanthocyanin from the flowers of *Tricyrtis formosan*a. *Tetrahedron Lett* 2004; 44: 6821-6823.
29. Tatsuzawa F, Saito N, Miyoshi K, Shinoda K, Shigihara A and Honda T: Diacylated 8-C-glucosylcyanidin 3-glucoside from the flowers of *Tricyrtis formosana*. *Chem Pharm Bu*ll 2003; 52: 631-633.
30. T. C. Huang, In: Flora of Taiwan, 2nd edition, vol. 5, pp. 67, Department of Botany, National Taiwan University, Taipei, 2000.
31. Ying, S. S. 2000. Liliaceae. In D. E. Boufford, C. F. Hsieh, T. C. Hung, C. S. Kuoh, H. Ohashi, and H. J. Su (eds), Flora of Taiwan, 2nd Edition. Vol. 5. Editorial Committee of Flora of Taiwan, Department of Botany, National Taiwan University, Taipei, pp. 35-71.
32. Y-S Chang, In: Compendium of Medicinal Plants used by the Indigenous People of Taiwan, pp. 88-89, Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Ministry of Health and Welfare, Executive Yuan, R. O. C., 2003.
33. Wu F, Cao J, Jiang J, Yu B, Xu Q. Ruscogenin glycoside (Lm-3) isolated

from *Liriope muscari* improves liver injury by dysfunctioning liver-infiltrating lymphocytes. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 681-688.

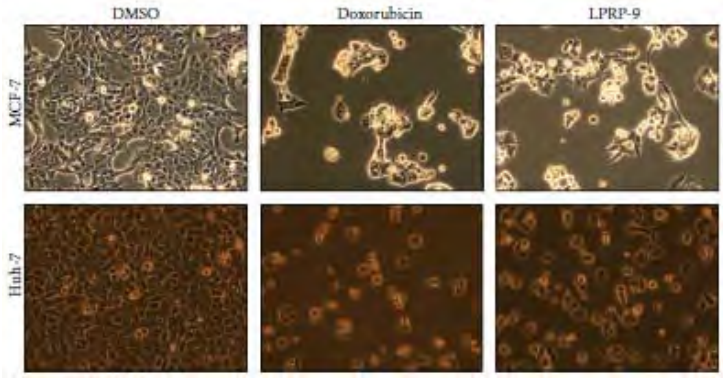
34. Wang KW, Zhang H, Shen LQ, Wang W. Novel steroidal saponins from *Liriope graminifolia* (Linn.) Baker with anti-tumor activities. *Carbohydr Res* 2011; 346: 253-258.

柒、圖、表

A

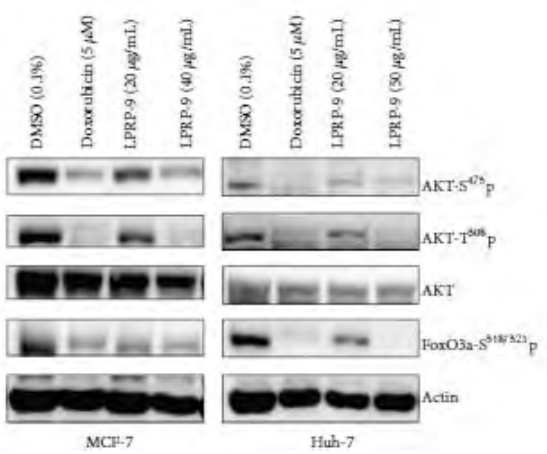


B

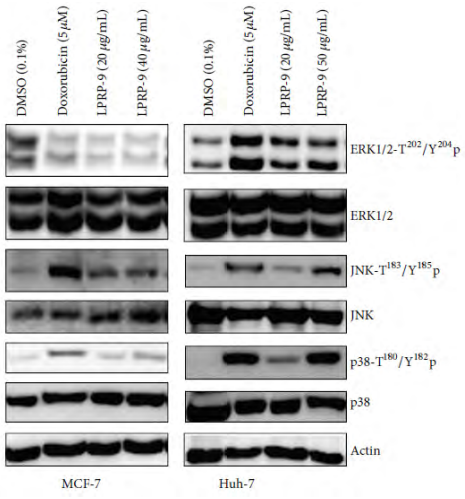


圖一、闊葉麥門冬地下部萃取物之癌細胞生長抑制結果

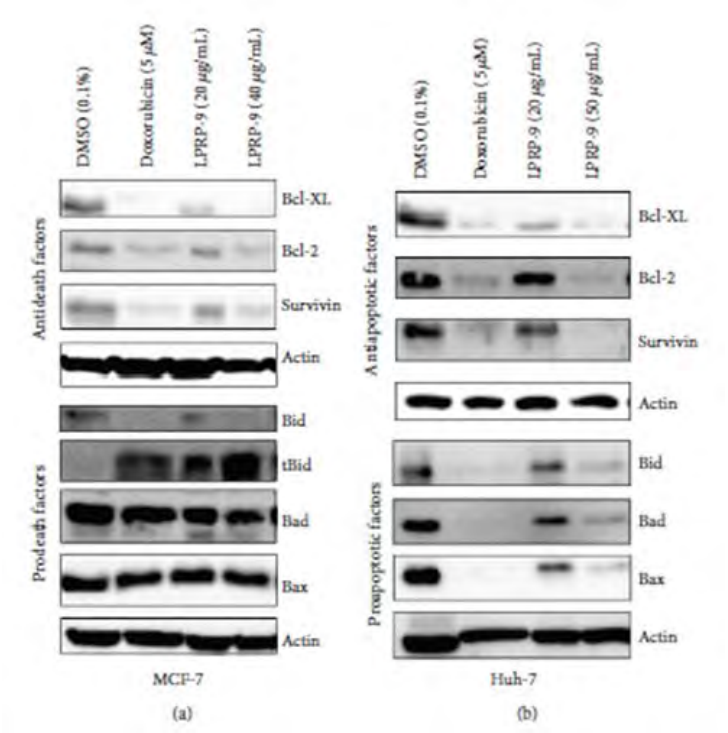
A



B

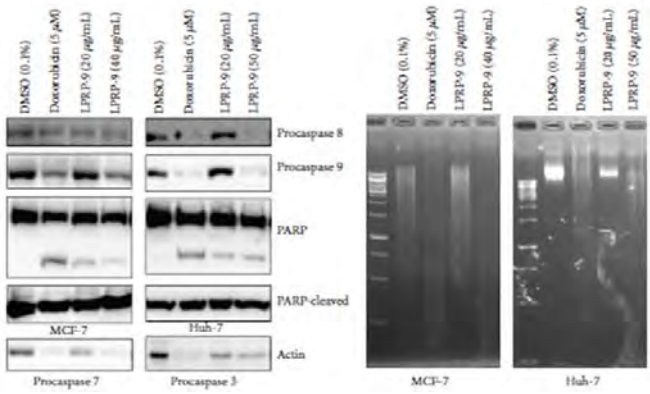


圖二、LPRP-9 對癌細胞 PI3K/AKT/FaxO 以及 MAPK 路徑之影響

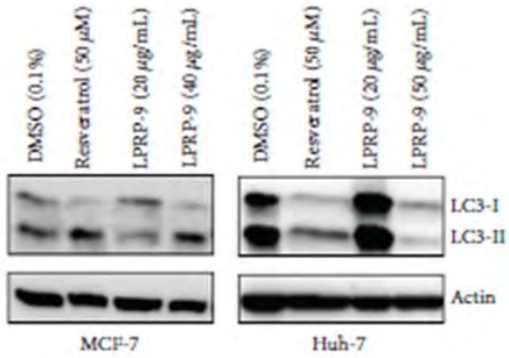


圖三、LPRP-9 對 pro-與 antideath factors 表現之影響

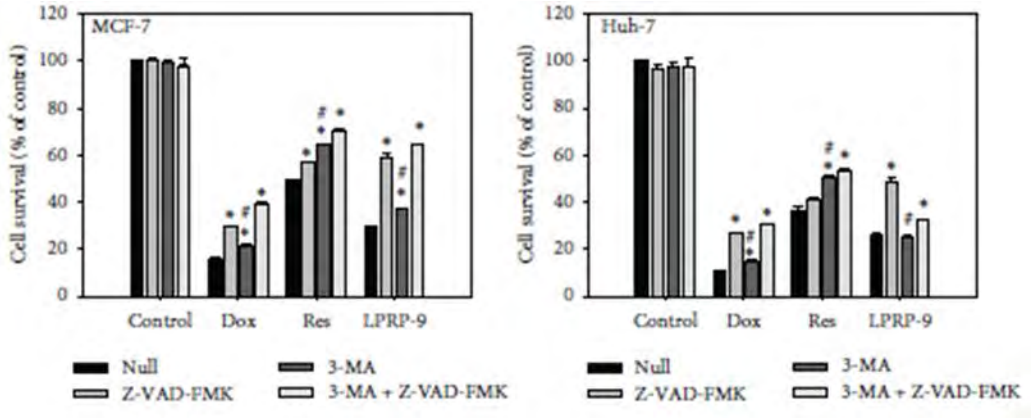
A



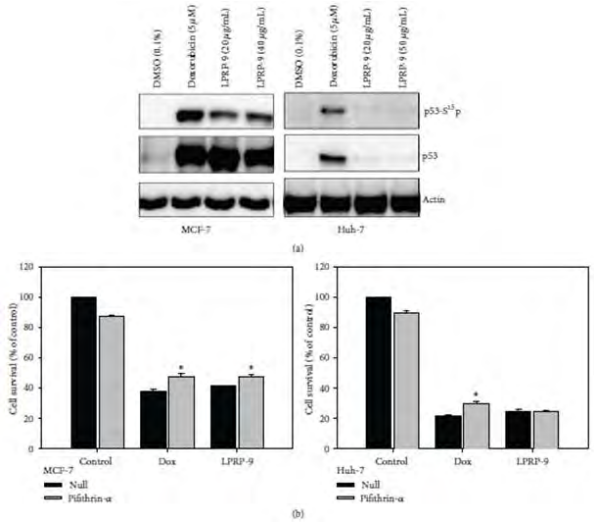
B



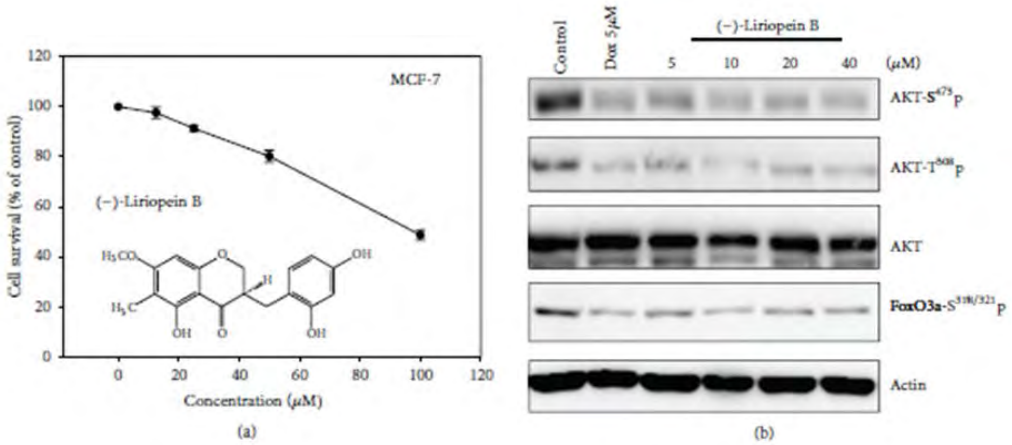
C



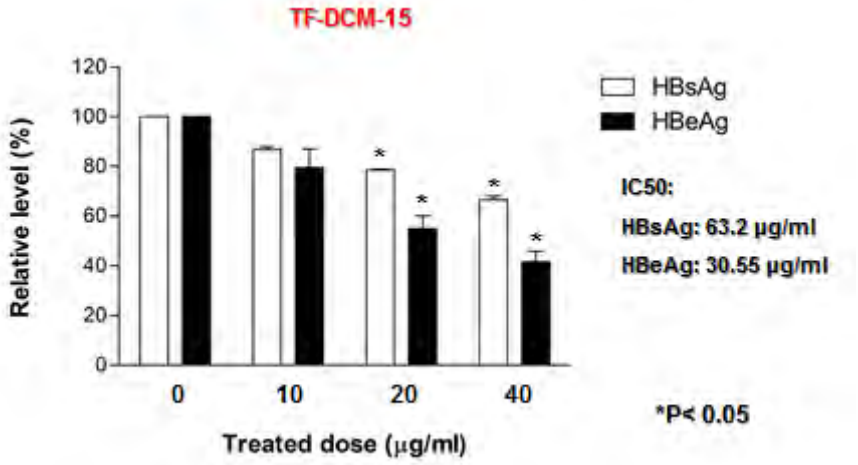
圖四、LPRP-9 促使癌細胞 apoptotic 與 autophagic death 之證明



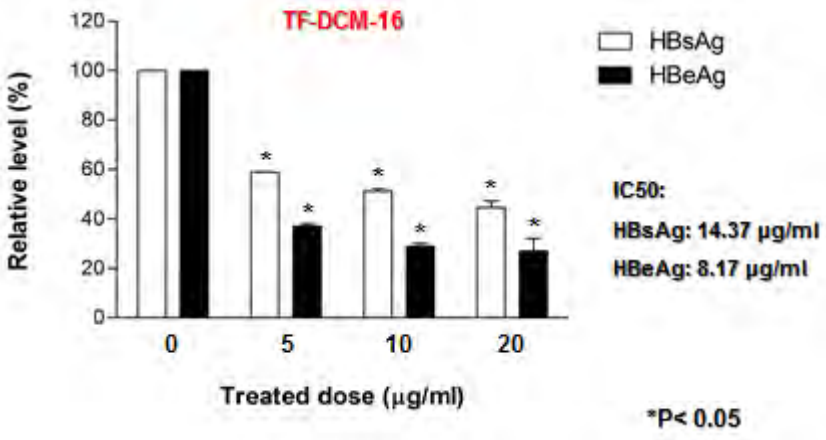
圖五、LPRP-9 能透過調節 p53 誘使 MCF-7 細胞凋亡



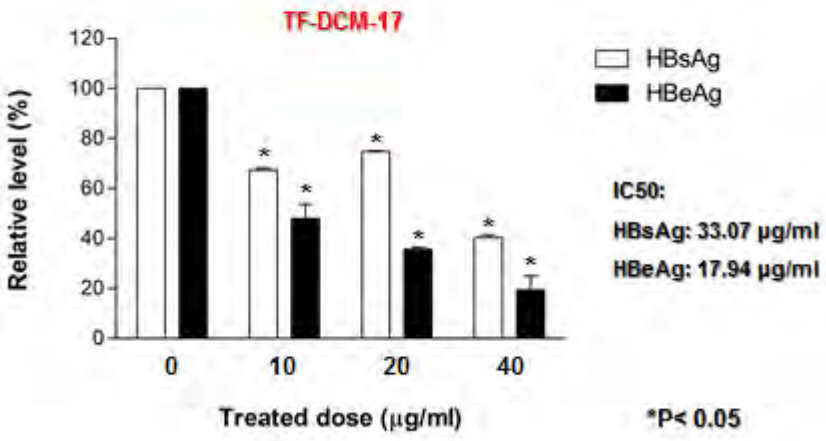
圖六、純化合物(−)-Liriopein B 能抑制 AKT 之活化



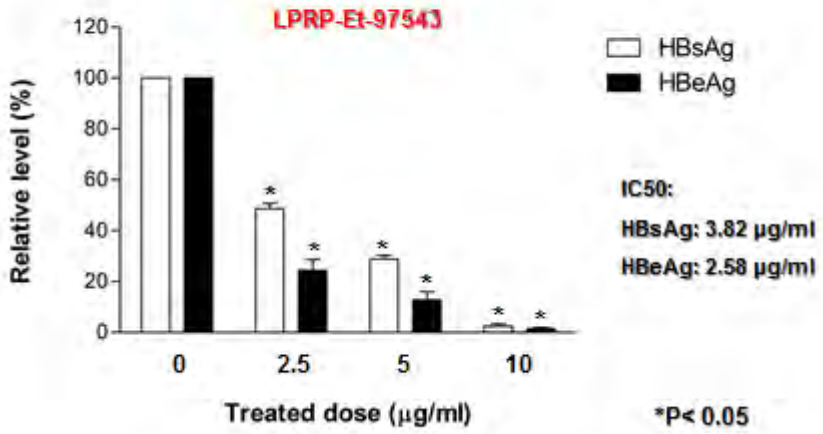
圖七、臺灣油點草 TF-DCM-15 萃取物對 B 型肝炎病毒抗原表現之影響



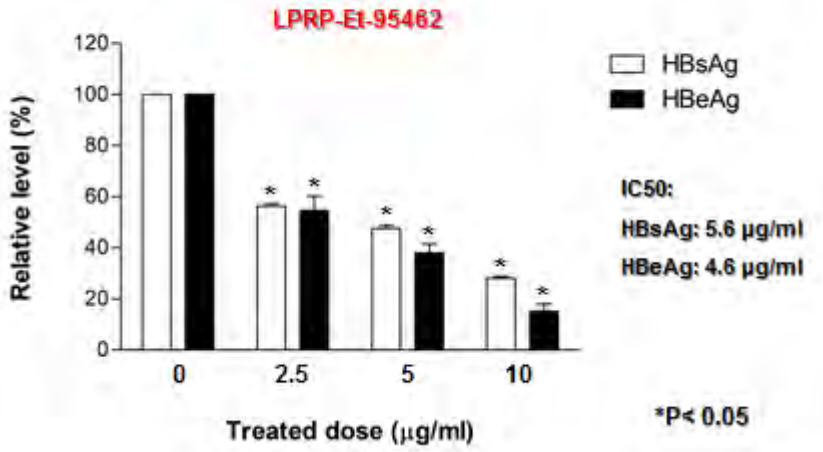
圖八、臺灣油點草 TF-DCM-16 萃取物對 B 型肝炎病毒抗原表現之影響



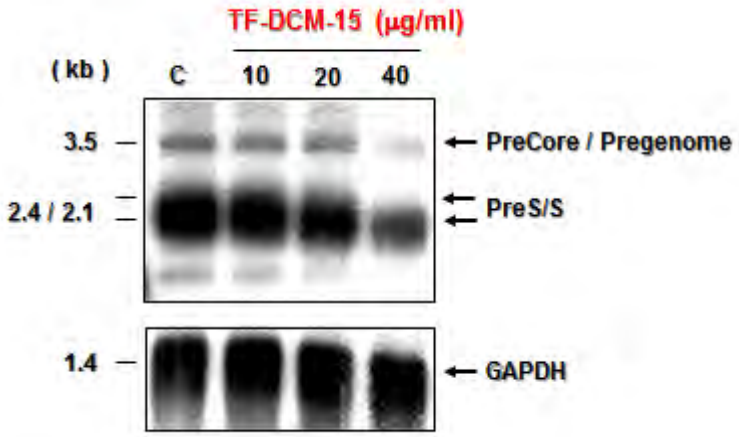
圖九、臺灣油點草 TF-DCM-17 萃取物對 B 型肝炎病毒抗原表現之影響



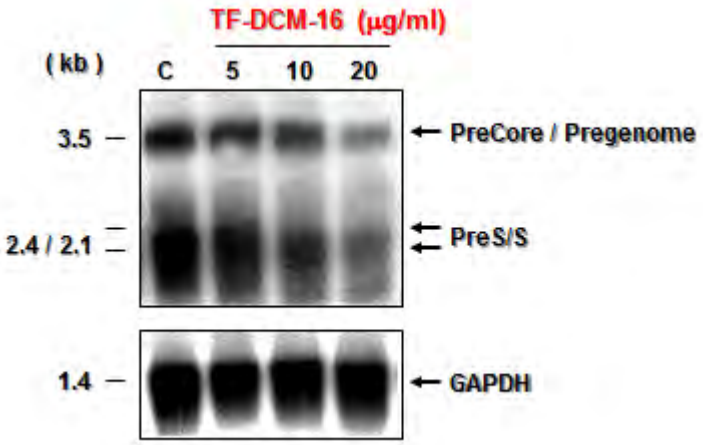
圖十、闊葉麥門冬 LPRP-Et-97543 純化合物對 B 型肝炎病毒抗原表現之影響



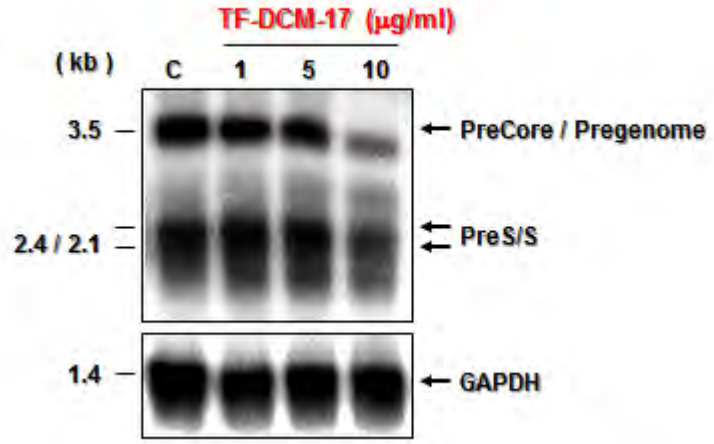
圖十一、闊葉麥門冬 LPRP-Et-95462 純化合物對 B 型肝炎病毒抗原表現之影響



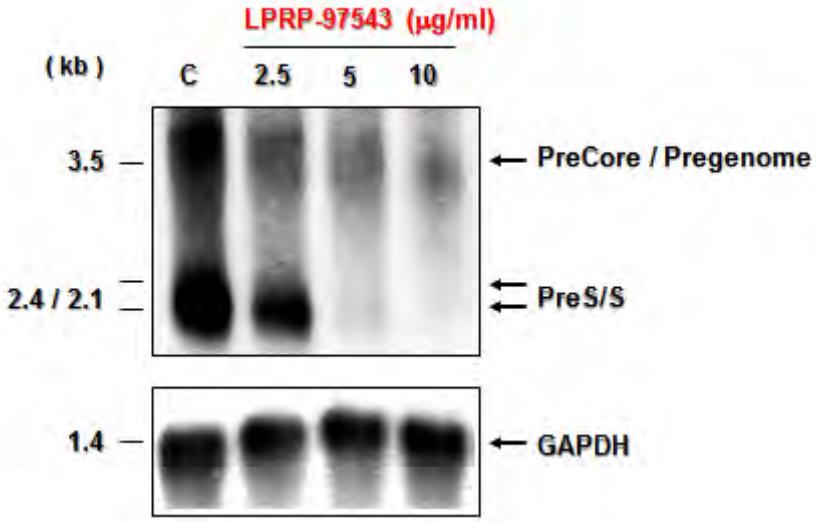
圖十二、臺灣油點草 TF-DCM-15 萃取物對 B 型肝炎病毒 RNA 表現之影響



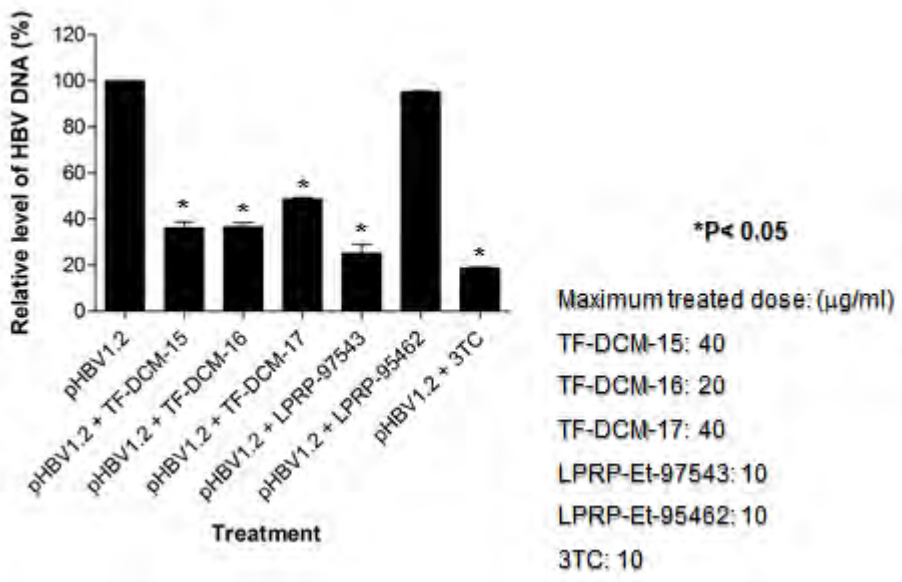
圖十三、臺灣油點草 TF-DCM-16 萃取物對 B 型肝炎病毒 RNA 表現之影響



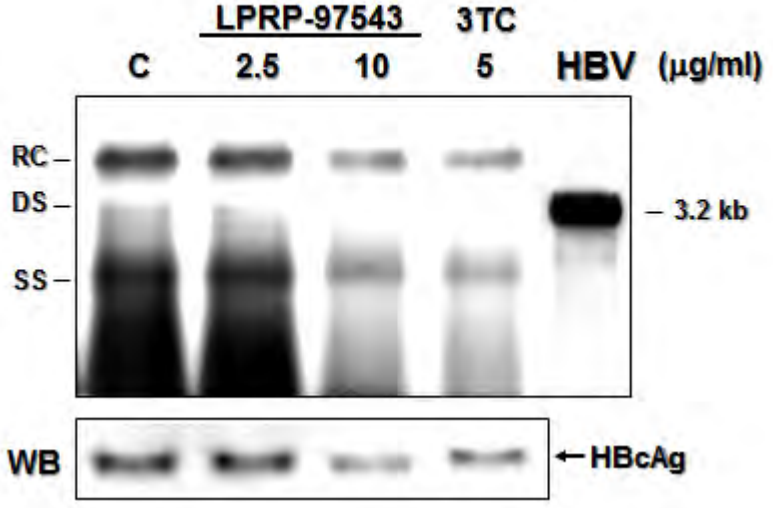
圖十四、臺灣油點草 TF-DCM-17 萃取物對 B 型肝炎病毒 RNA 表現之影響



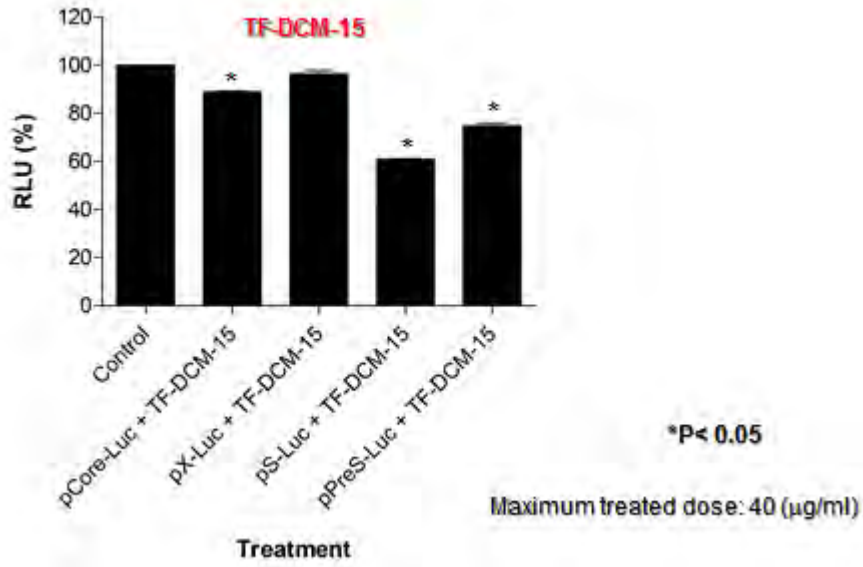
圖十五、闊葉麥門冬 LPRP-Et-97543 純化合物對 B 型肝炎病毒 RNA 表現之影響



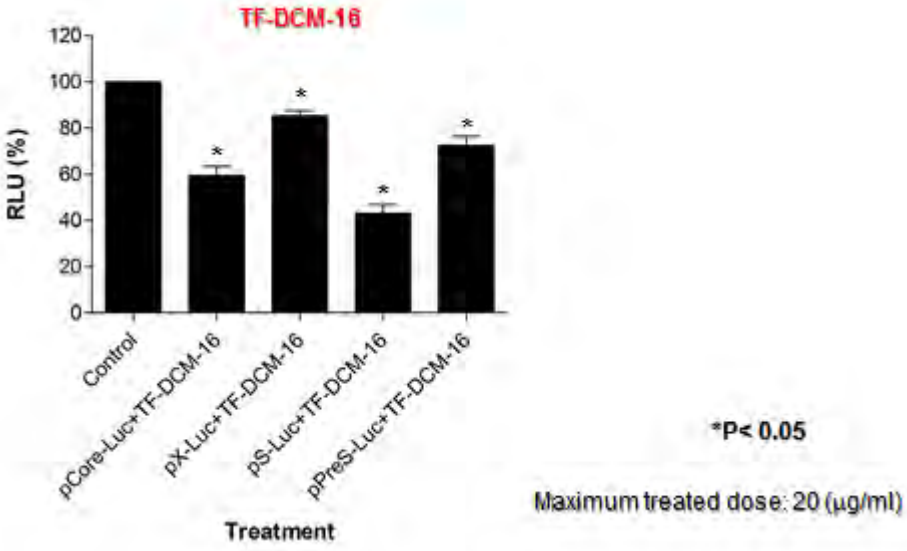
圖十六、臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取物對 B 型肝炎病毒 DNA 複製之影響



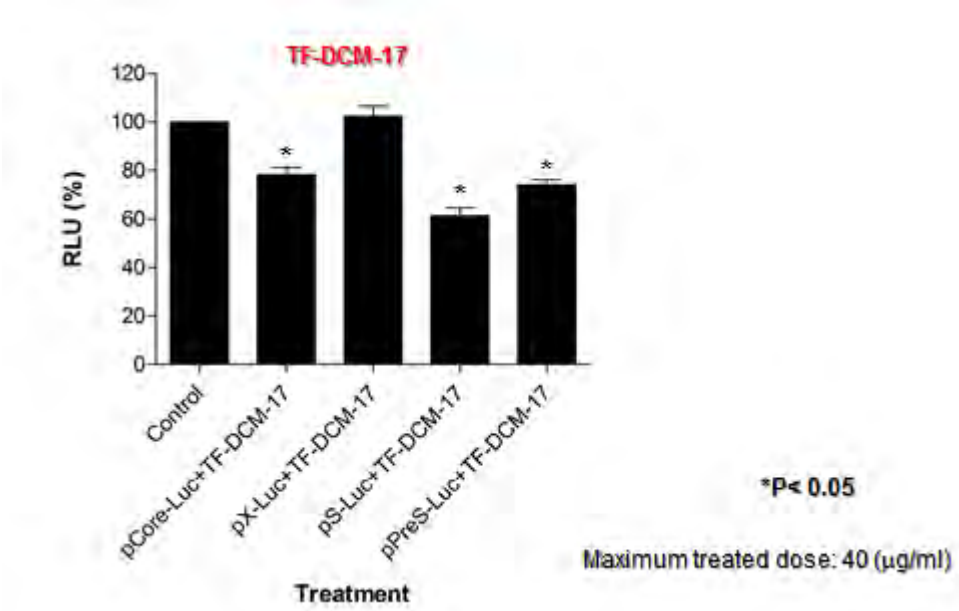
圖十七、闊葉麥門冬 LPRP-Et-97543 純化合物對肝癌細胞內 B 型肝炎病毒 DNA 複製之影響



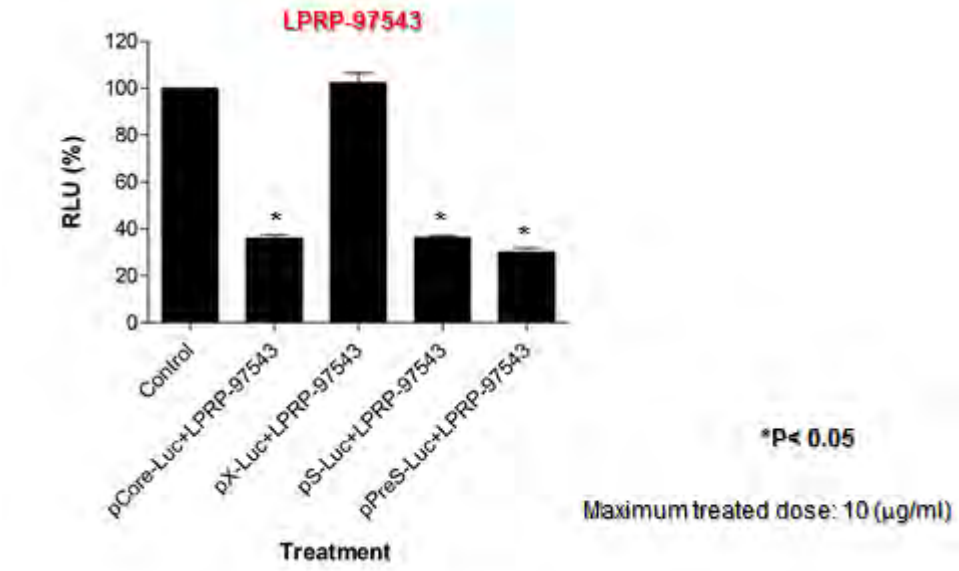
圖十八、臺灣油點草 TF-DCM-15 萃取物對 B 型肝炎病毒基因啟動子活性之影響



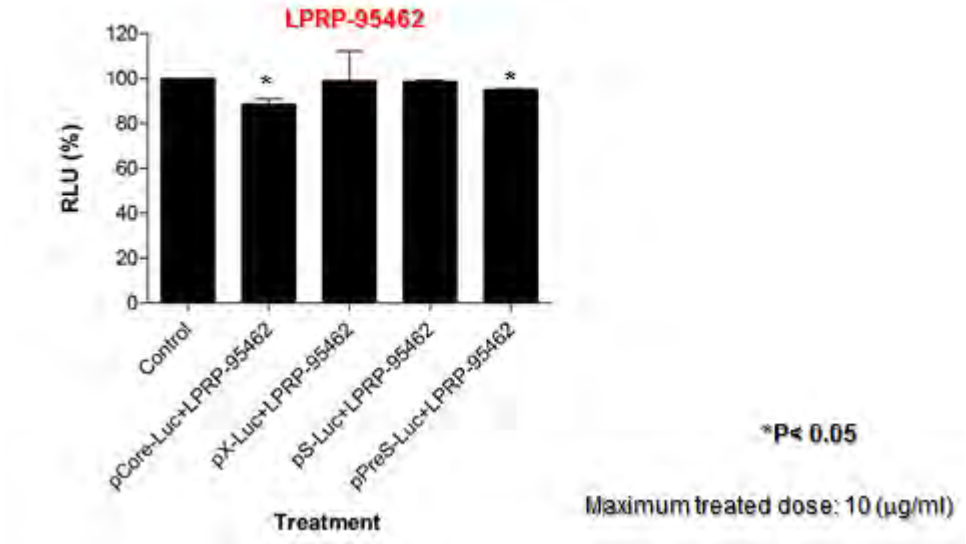
圖十九、臺灣油點草 TF-DCM-16 萃取物對 B 型肝炎病毒基因啟動子活性之影響



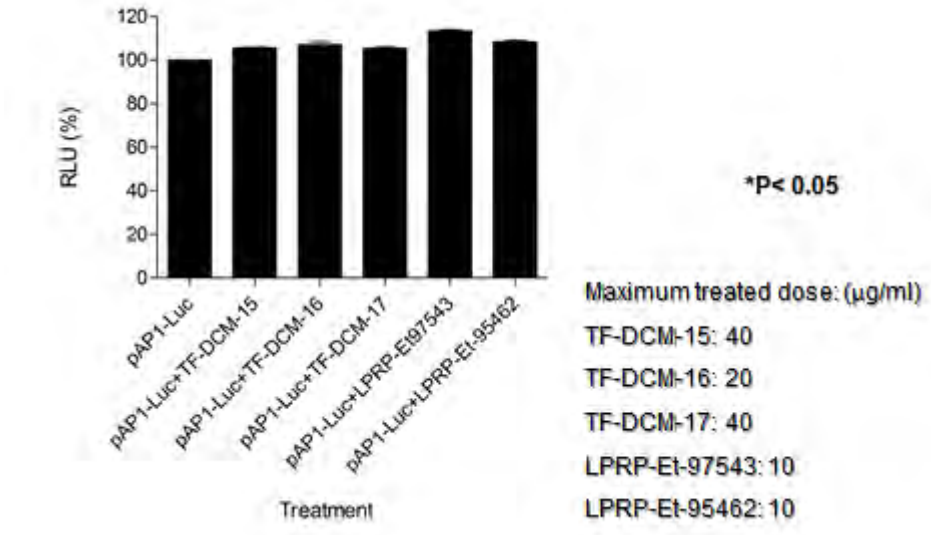
圖二十、臺灣油點草 TF-DCM-17 萃取物對 B 型肝炎病毒基因啟動子活性之影響



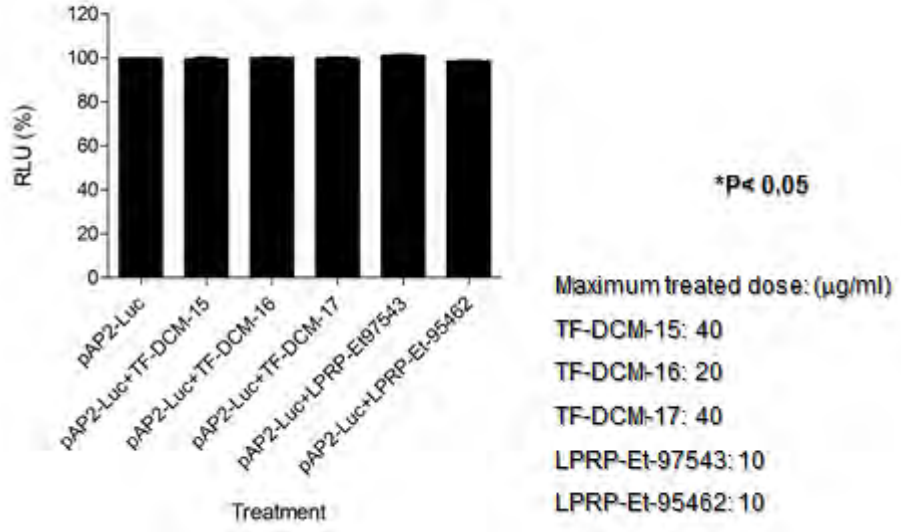
圖二十一、闊葉麥門冬 LPRP-Et-97543 純化合物對 B 型肝炎病毒基因啟動子活性之影響



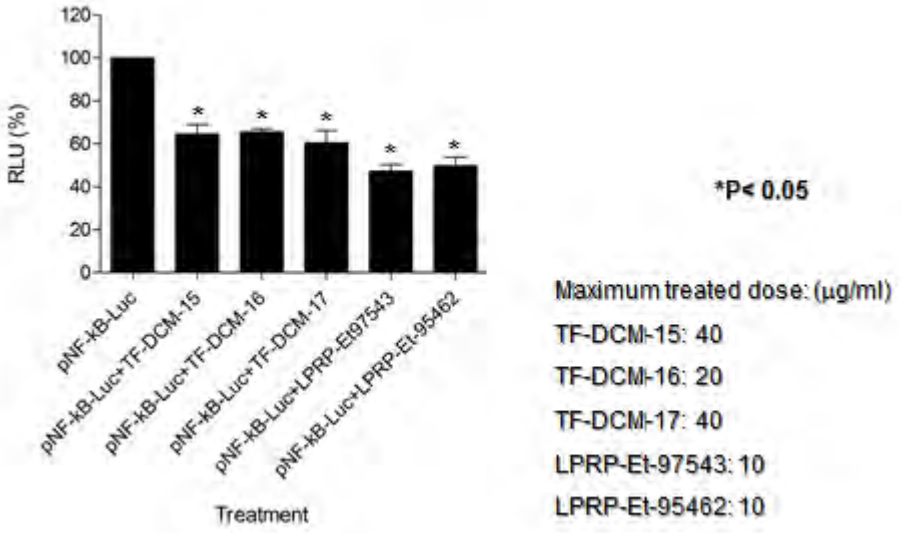
圖二十二、闊葉麥門冬 LPRP-Et-95462 純化合物對 B 型肝炎病毒基因啟動子活性之影響



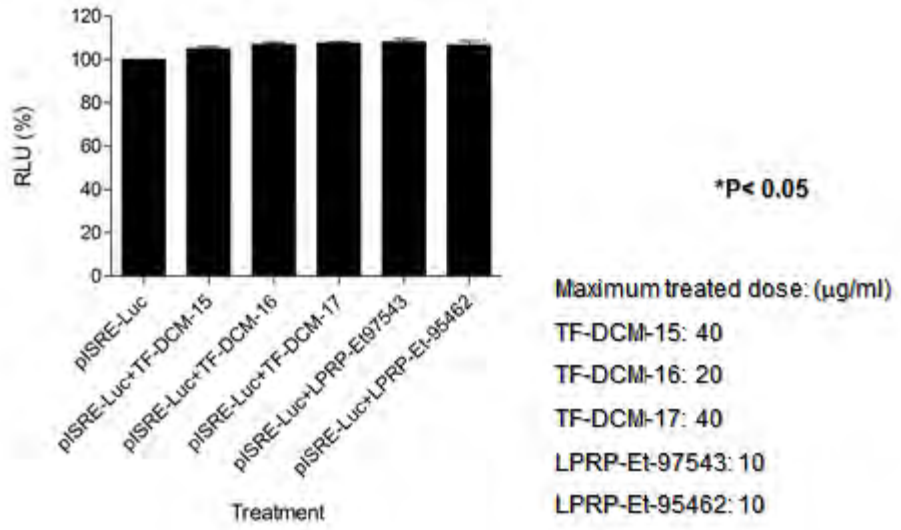
圖二十三、臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取物對 AP1 細胞訊息傳遞反應基因啟動子活性之影響



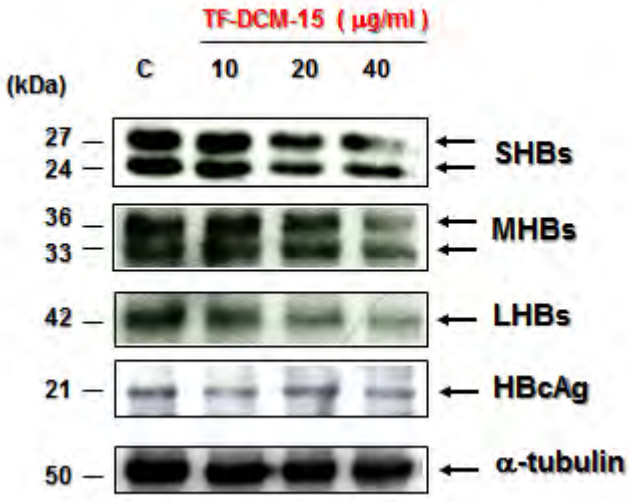
圖二十四、臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取物對 AP2 細胞訊息傳遞反應基因啟動子活性之影響



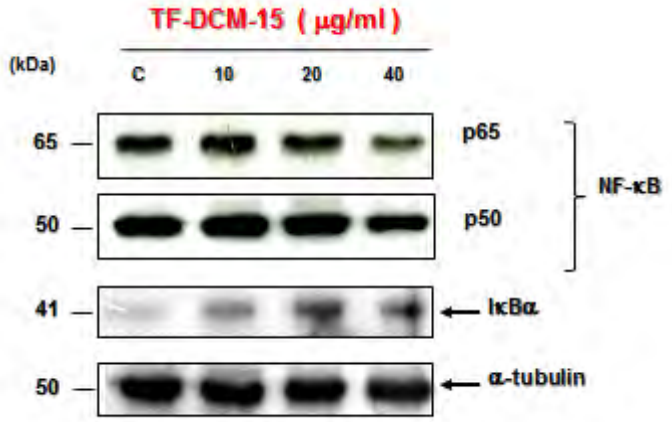
圖二十五、臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取物對 NF-kB 細胞訊息傳遞反應基因啟動子活性之影響



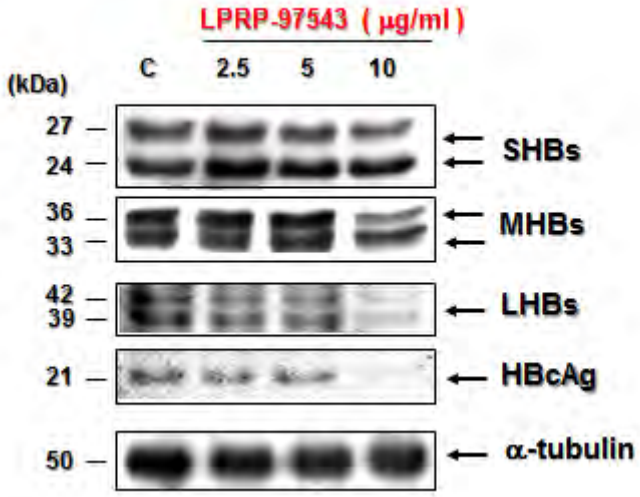
圖二十六、臺灣油點草及闊葉麥門冬萃取物對 SRE 細胞訊息傳遞反應基因啟動子活性之影響



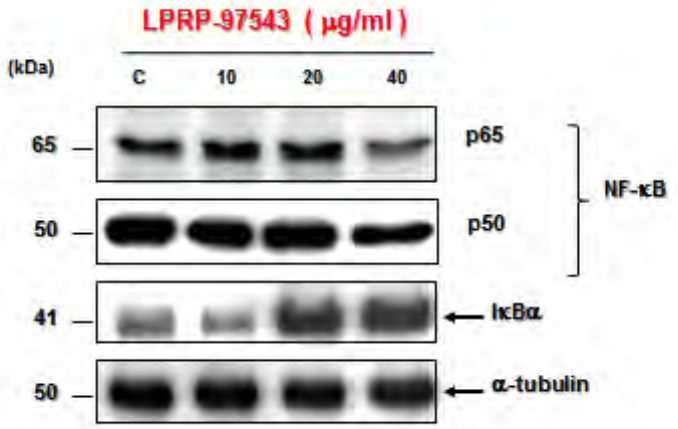
圖二十七、臺灣油點草 TF-DCM-15 萃取物對 B 型肝炎病毒蛋白質表現之影響



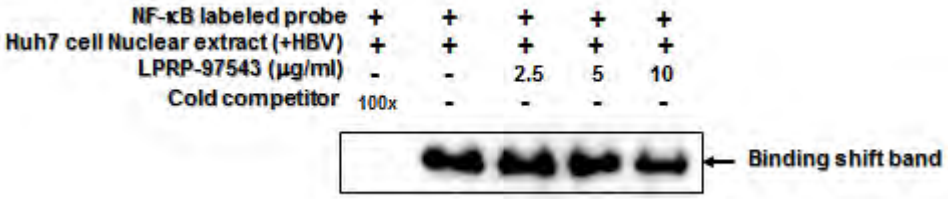
圖二十八、臺灣油點草 TF-DCM-15 萃取物對 NF-kB、IkB 蛋白質表現之影響



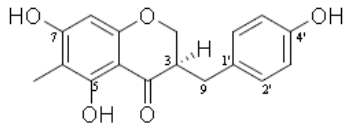
圖二十九、闊葉麥門冬 LPRP-Et-95462 純化合物對 B 型肝炎病毒蛋白質表現之影響



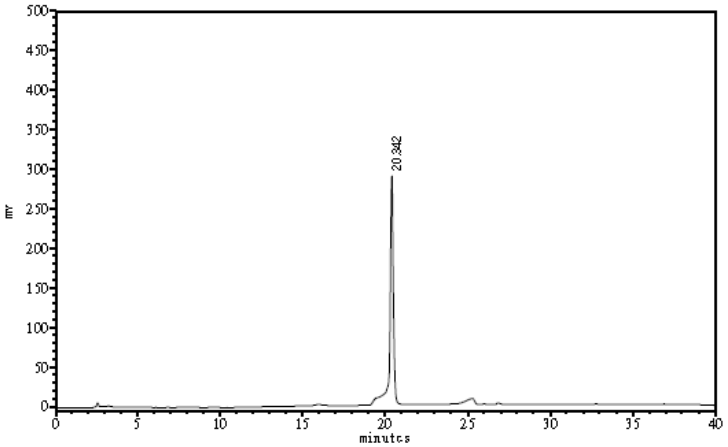
圖三十、闊葉麥門冬 LPRP-Et-97543 純化合物對 NF-kB、IkB 蛋白質表現之影響

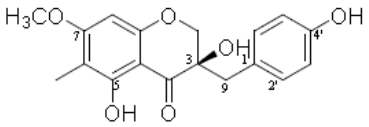


圖三十一、闊葉麥門冬 LPRP-Et-97543 純化合物對 NF-kB 轉錄因子與 DNA 結合活性之影響

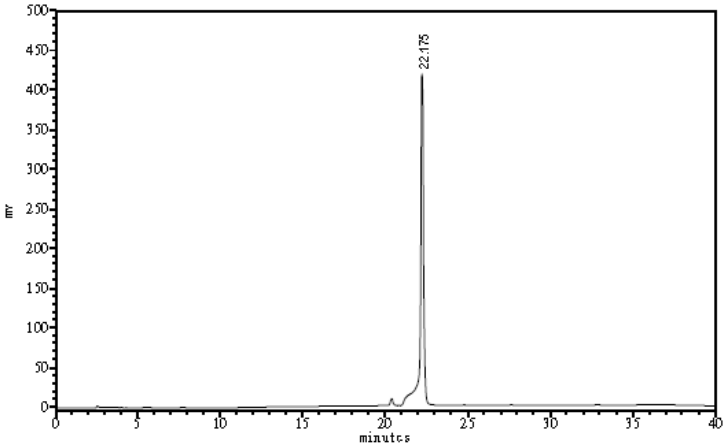


(3*R*)-3-(4'-Hydroxy-benzyl)-5,7-dihydroxy-6-methyl-chroman-4-one

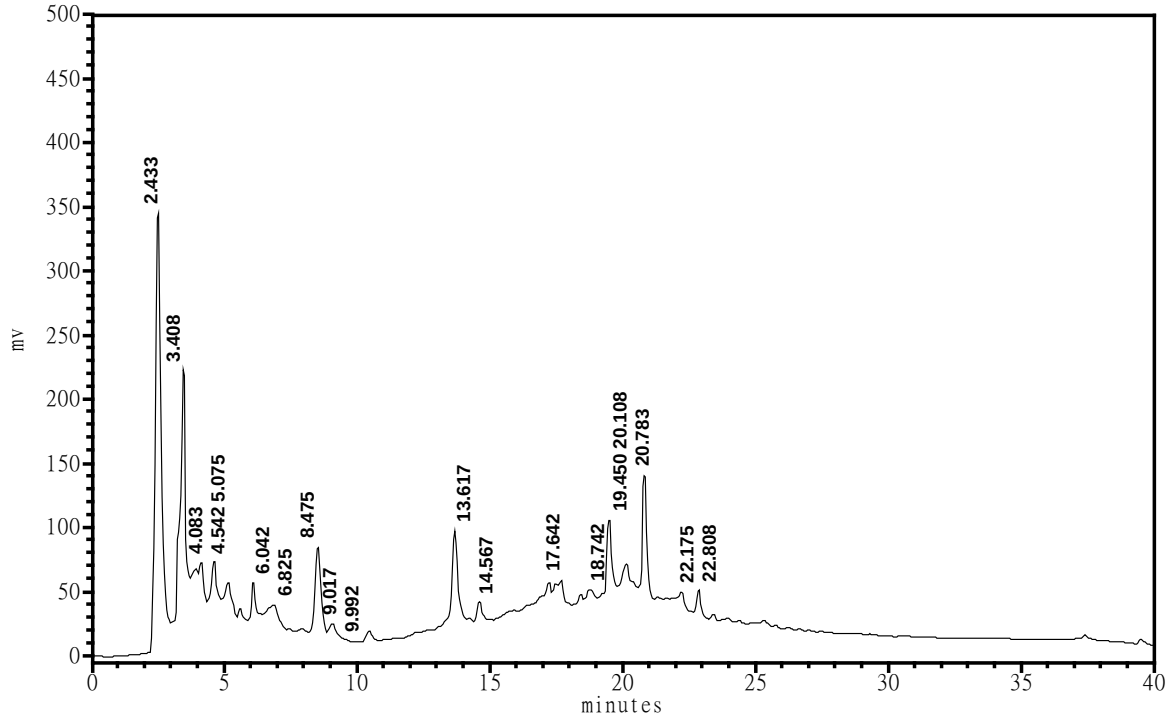




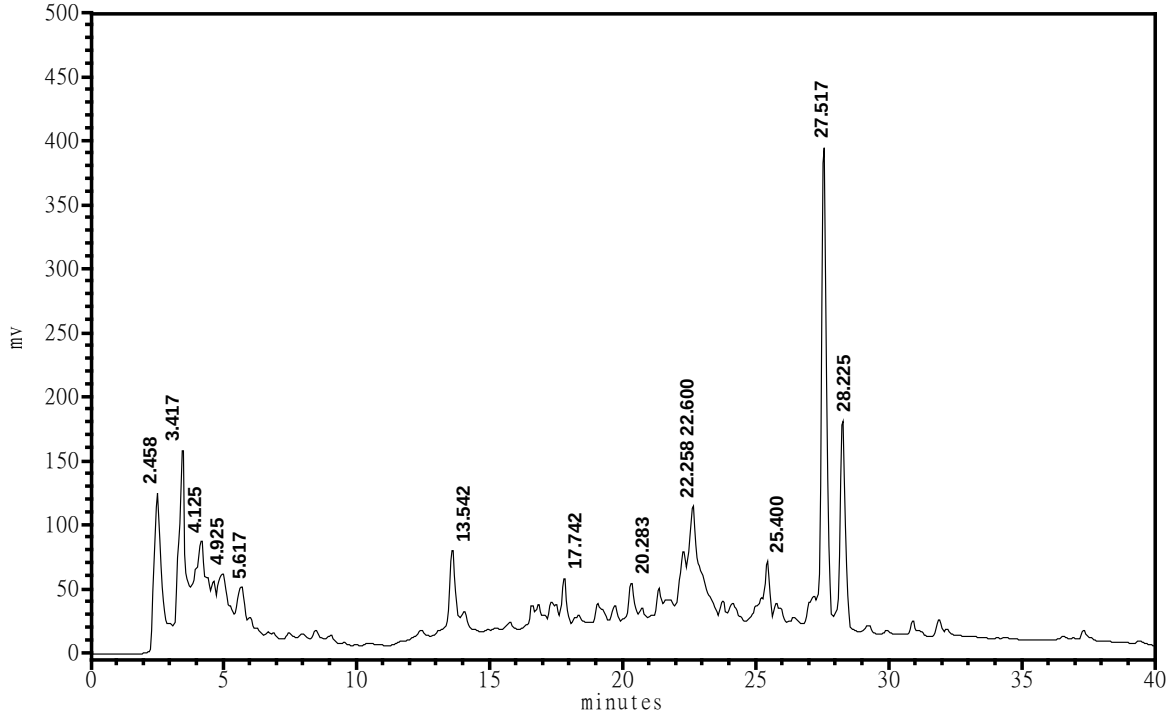
(3*R*)-3-(4'-Hydroxy-benzyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-6-methyl-chroman-4-one



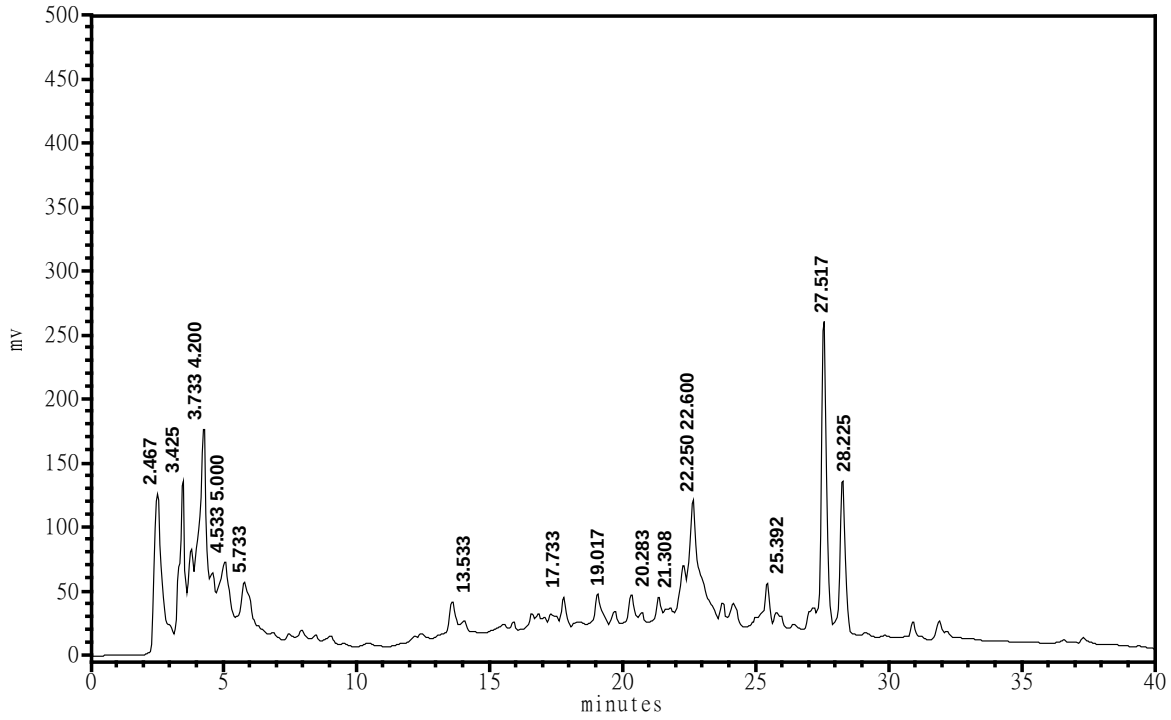
圖三十二、二種標準品化合物化學指紋圖譜



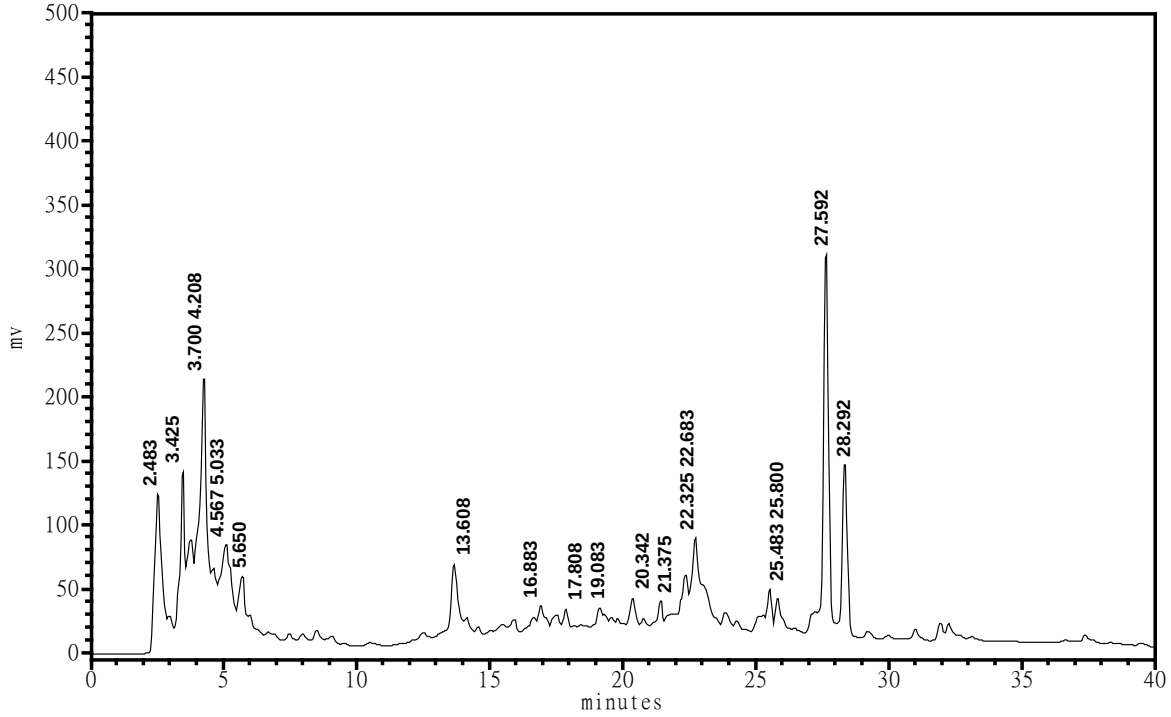
圖三十三、闊葉麥門冬地下部 70%乙醇水溶液層化學指紋圖譜



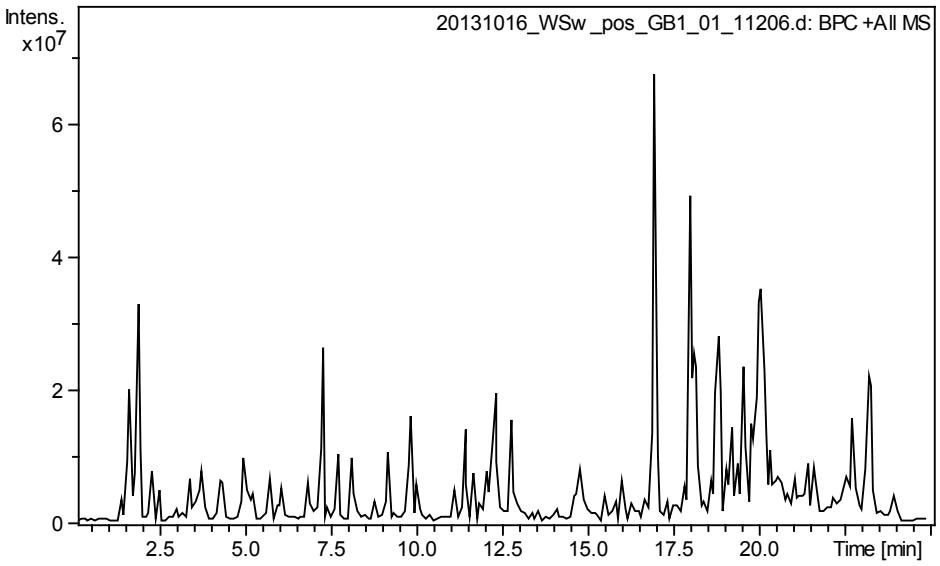
圖三十四、臺灣台北市售麥門冬 70%乙醇水溶液層化學指紋圖譜



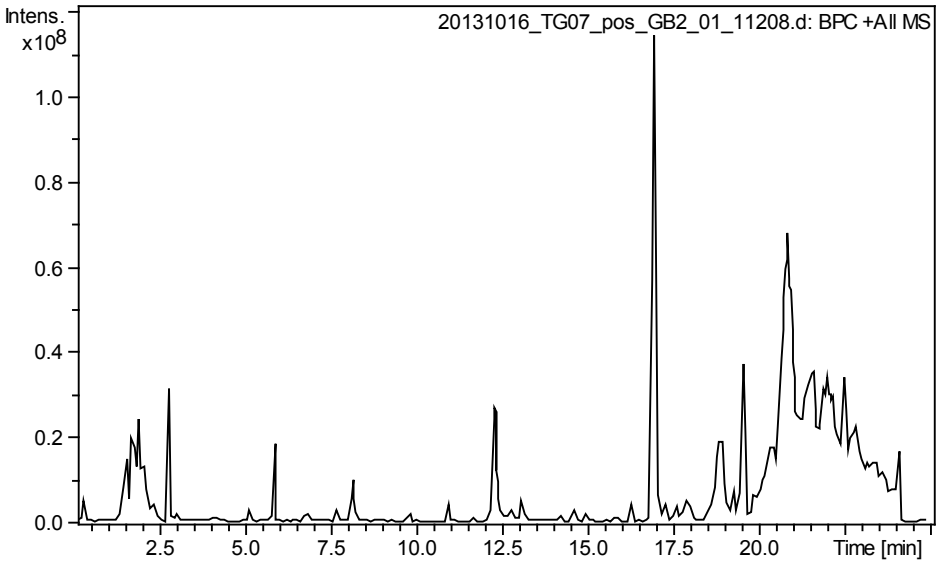
圖三十五、臺灣台中市售麥門冬 70%乙醇水溶液層化學指紋圖譜



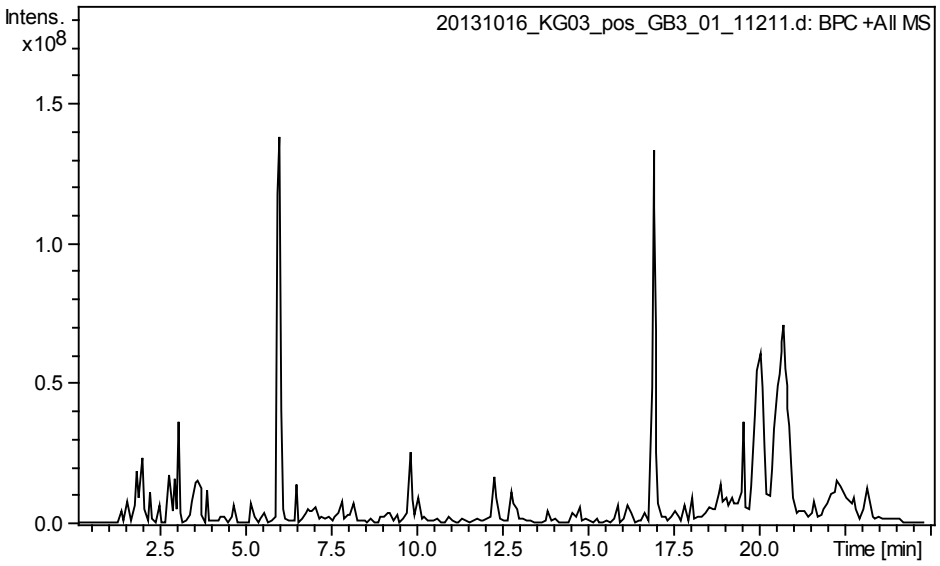
圖三十六、臺灣高雄市售麥門冬 70%乙醇水溶液層化學指紋圖譜



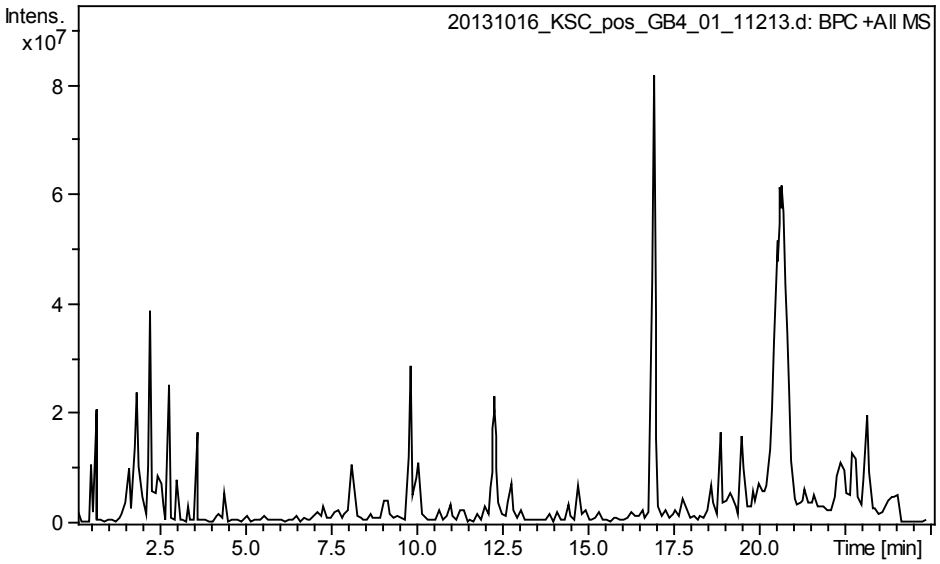
圖三十七、採集自霧社之臺灣油點草野生種萃取物指紋圖譜



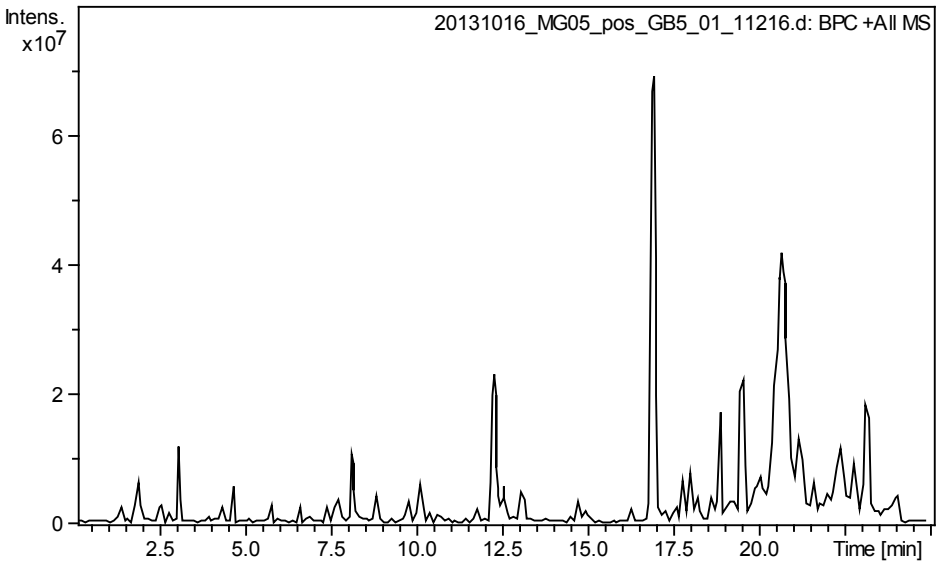
圖三十八、採集自霧社之臺灣油點草組織培養萃取物指紋圖譜



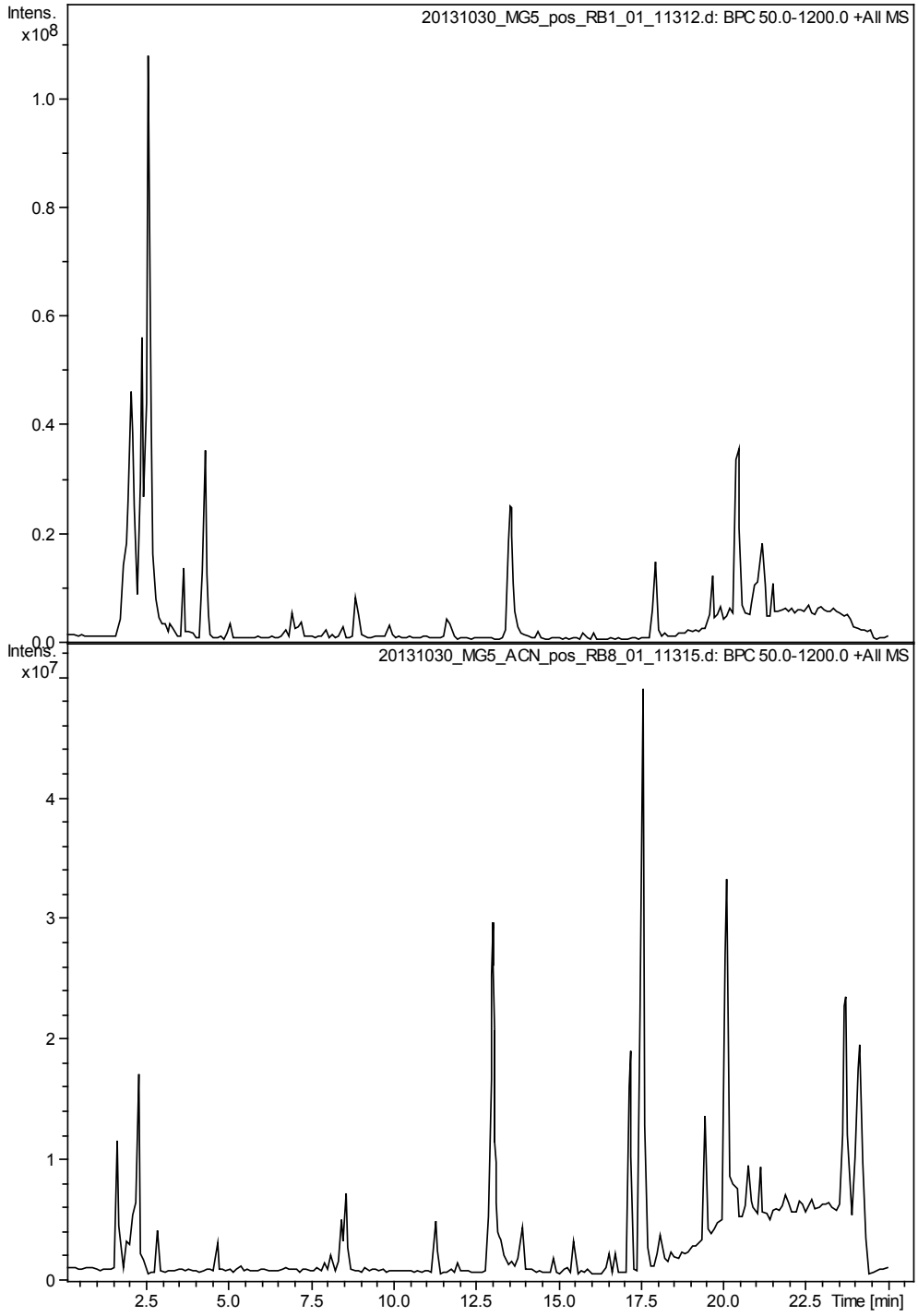
圖三十九、採集自合歡山之高山油點草野生種萃取物指紋圖譜



圖四十、採集自合歡山之高山油點草組織培養萃取物指紋圖譜



圖四十一、採集自臺中太平之毛果油點草野生種萃取物指紋圖譜

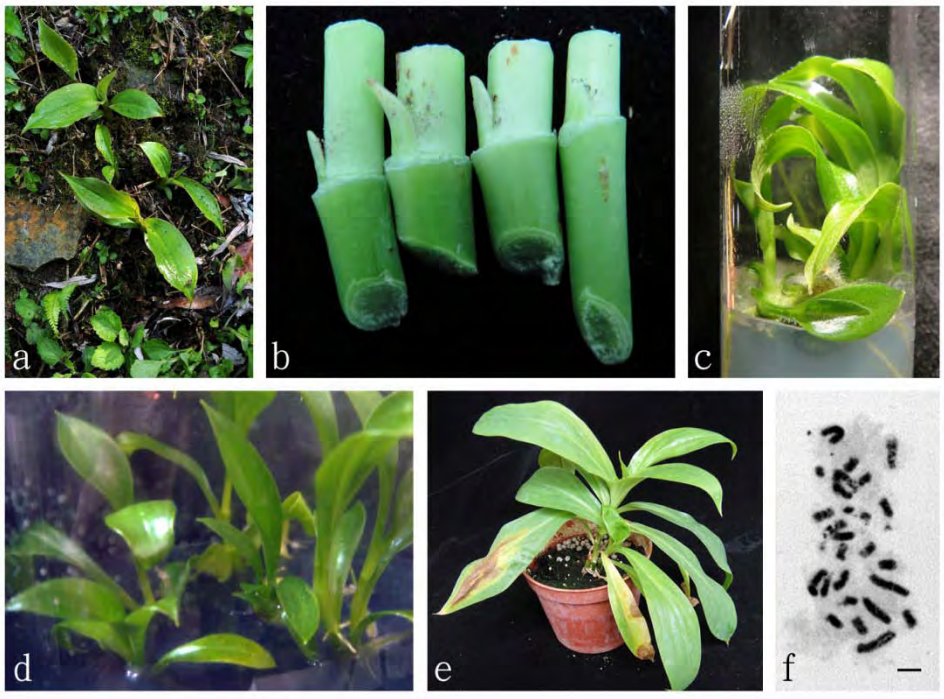


圖四十二、採集自臺中太平之毛果油點草組織培養萃取物指紋圖譜，因溶解度不佳，上圖為上清液，下圖為沉澱物以 70% CAN 溶解後分析。

表一、臺灣原生 3 種油點草野外採集位置

Table 1. The collection location of three native species of *Tricyrtisin* in Taiwan

種類	採集點
臺灣油點草	金瓜寮溪、蘭嶼、南橫初來、霧社
高山油點草	思源啞口、合歡山
毛果油點草	龍崎烏龍水、太平南國港、十八羅漢山



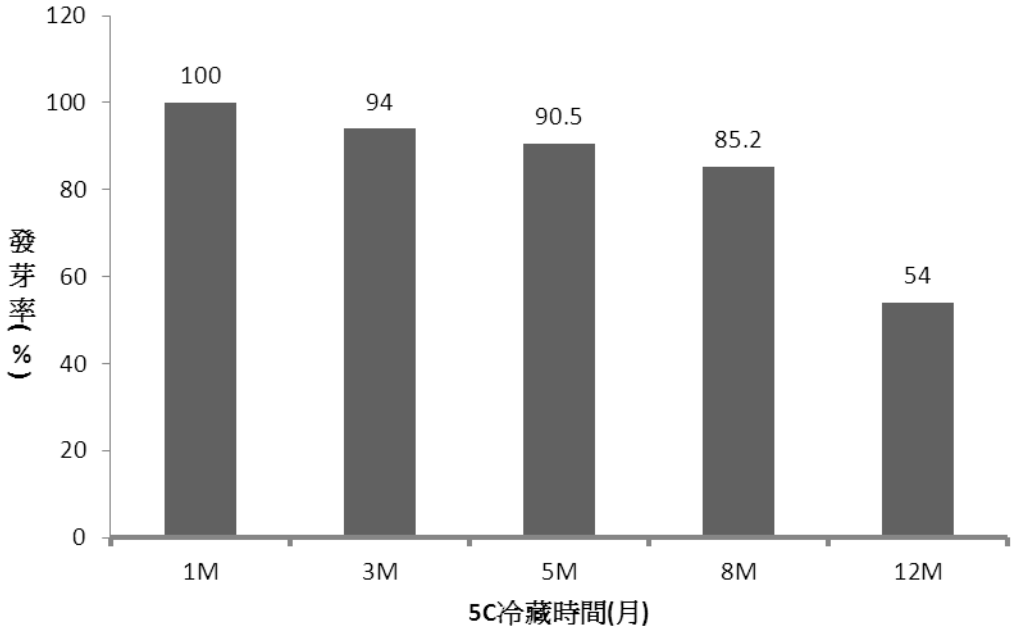
圖四十三、毛果油點草莖節培養及染色體檢測

a. 毛果油點草野外植株生長情形
b. 毛果油點草單莖節做為組織培養初代培養之培植體
c. 單莖節培養於含有 BA 及 NAA 之增殖培養基，可增殖、抽長並展葉
d. 增殖芽體移至不含生長調節劑之培養基中可順利發根生長
e. 瓶苗出瓶栽培在以泥炭土為介質之紅色硬盆
f. 毛果油點草組培苗之染色體數目正常，為 2n=26 (bar=2 μm)



圖四十四、臺灣油點草組培苗後續生長開花、著果、種子發芽及後代植株染色體檢測

a. 臺灣油點草組培苗移植至網室栽培，植株生長及開花型態
b. 經人工授粉後著果情形
c. 果實乾燥開裂，成熟種子種皮為褐色，種子薄且輕
d. 種子無菌播種 1 個月後，種子發芽之情形
e. 種子苗移植出瓶後，於網室可順利生長
f. 種子苗之染色體數目正常，為 2n=26 (bar=2 μm)



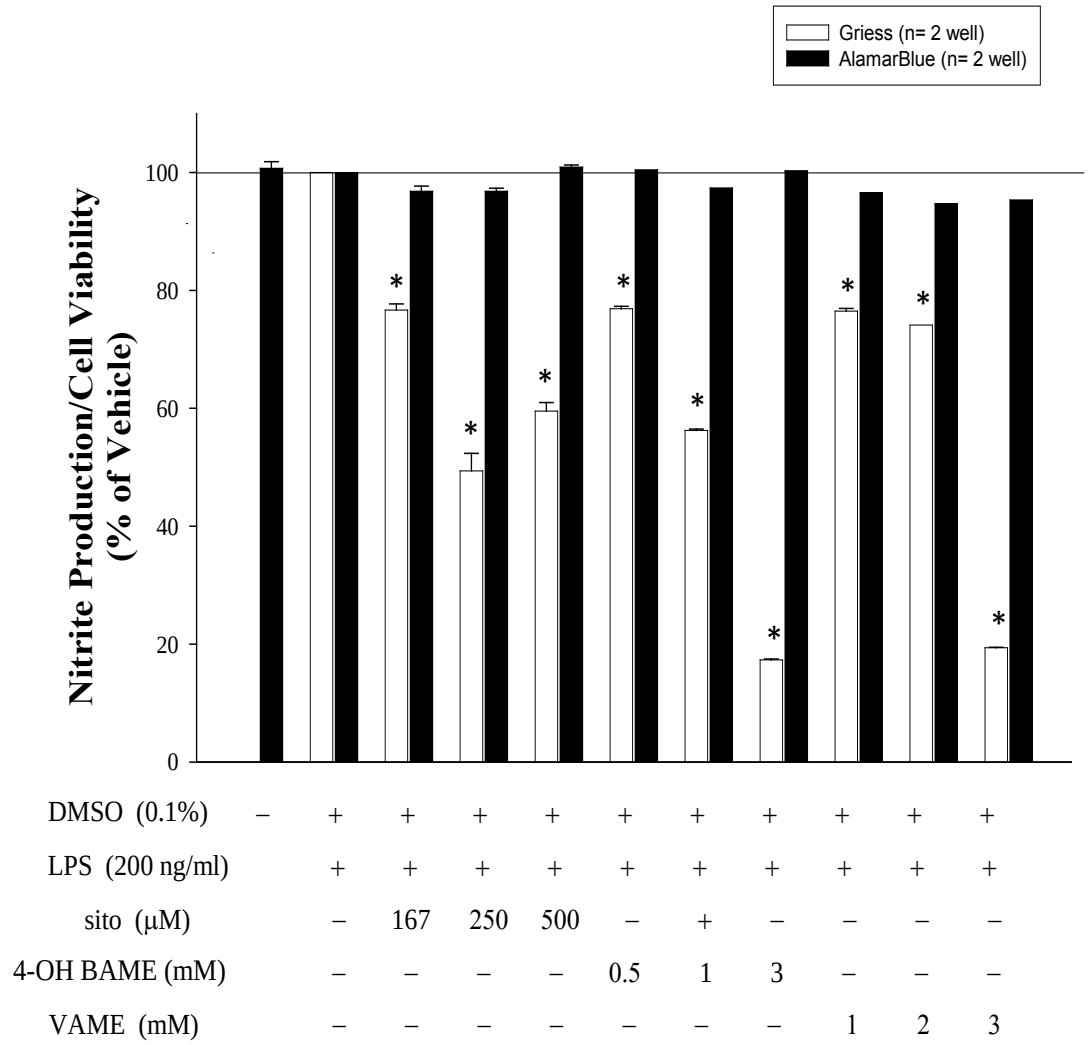
圖四十五、臺灣油點草種子經 5℃低溫冷藏後，進行無菌播種後 1 個月之種子發芽率



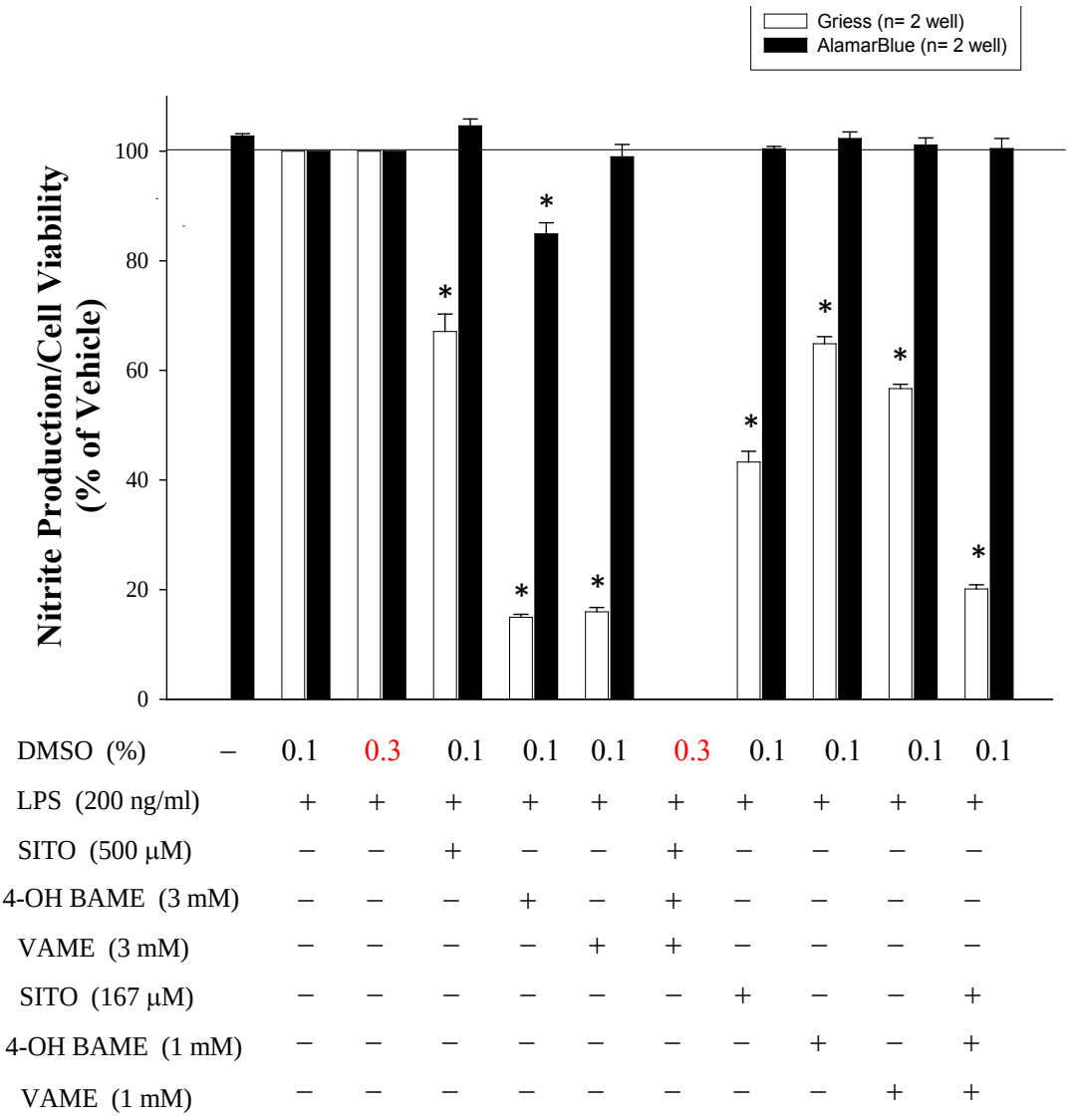
圖四十六、臺灣油點草單莖節及頂芽於網室扦插之情形

a. 單莖節扦插於含有泥炭土之穴盤中，其葉片展開並生長順利

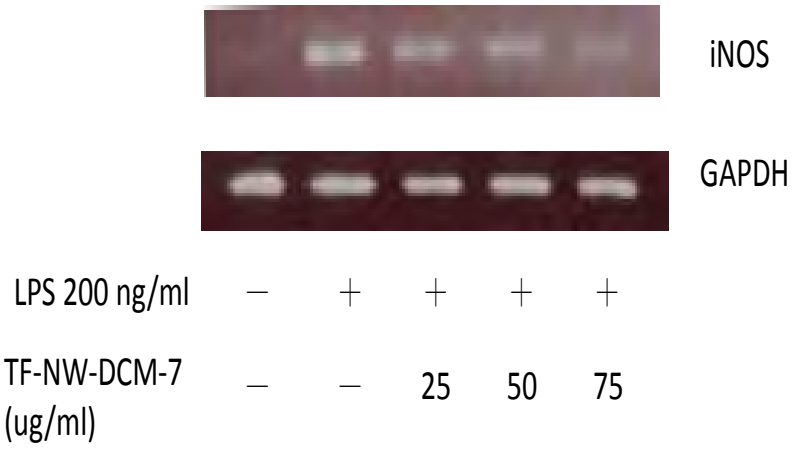
b. 頂芽扦插於含有泥炭土之紅色硬盆，新葉抽出且生長良好



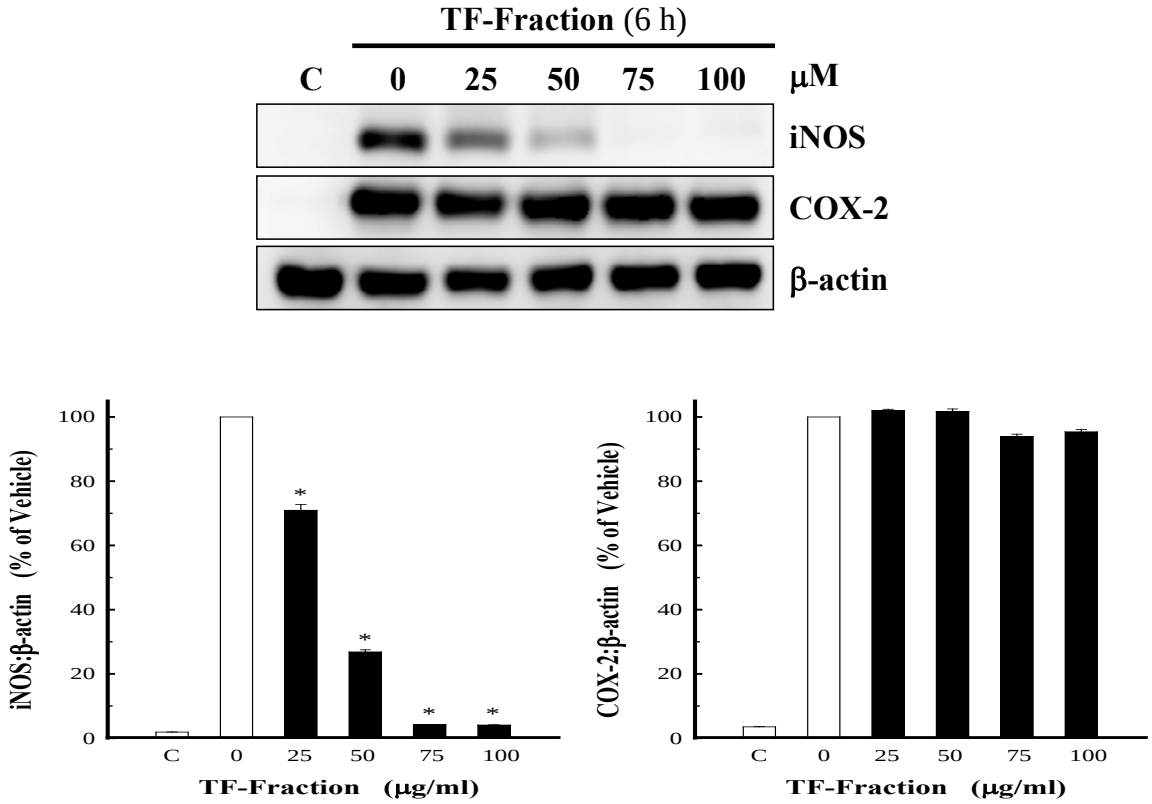
圖四十七、臺灣油點草分離得到β-sitosterol β-D-glucoside (sito), vanillic acid methyl ester (VAME), 4-hydroxylbenzoic acid methyl ester (4-OH BAME)之抗一氧化氮合成酶的濃度與活性關係，顯示具有劑量相關效應(* $p < 0.05$ 與對照組 0.1% DMSO 比較)



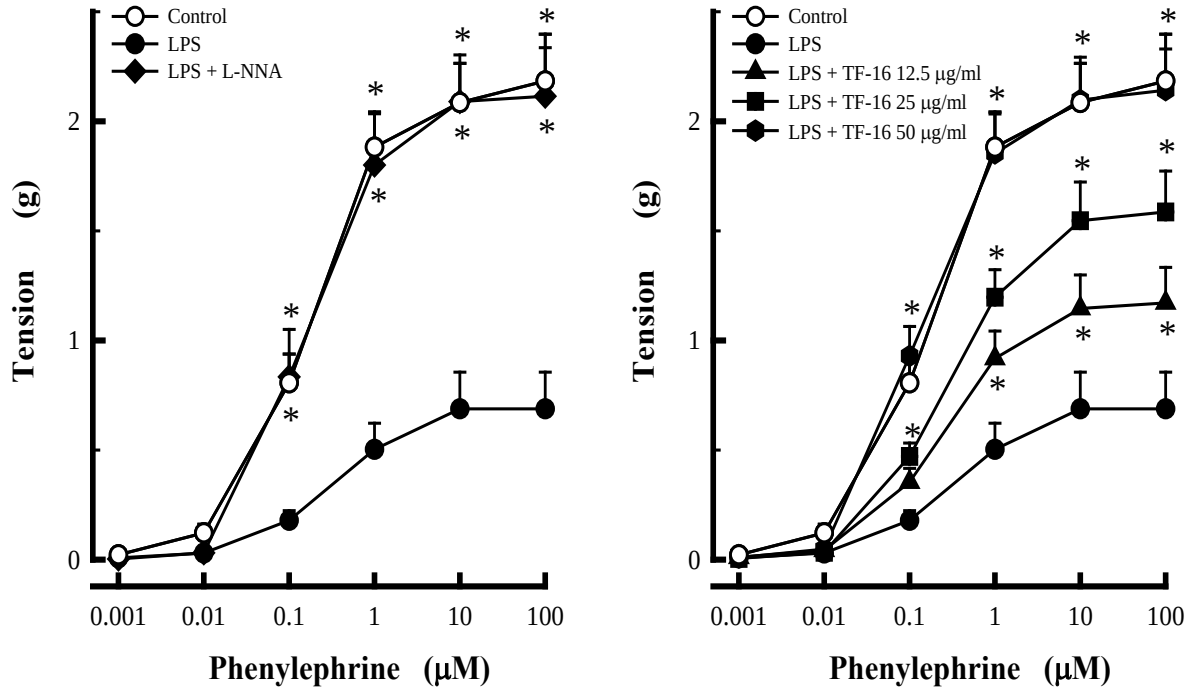
圖四十八、臺灣油點草分離得到β-sitosterol β-D-glucoside (sito), vanillic acid methyl ester (VAME), 4-hydroxylbenzoic acid methyl ester (4-OH BAME)合併使用之抗一氧化氮合成酶的濃度與活性關係，顯示具有劑量相關效應 (* $p < 0.05$ 與對照組 0.1% DMSO 比較)



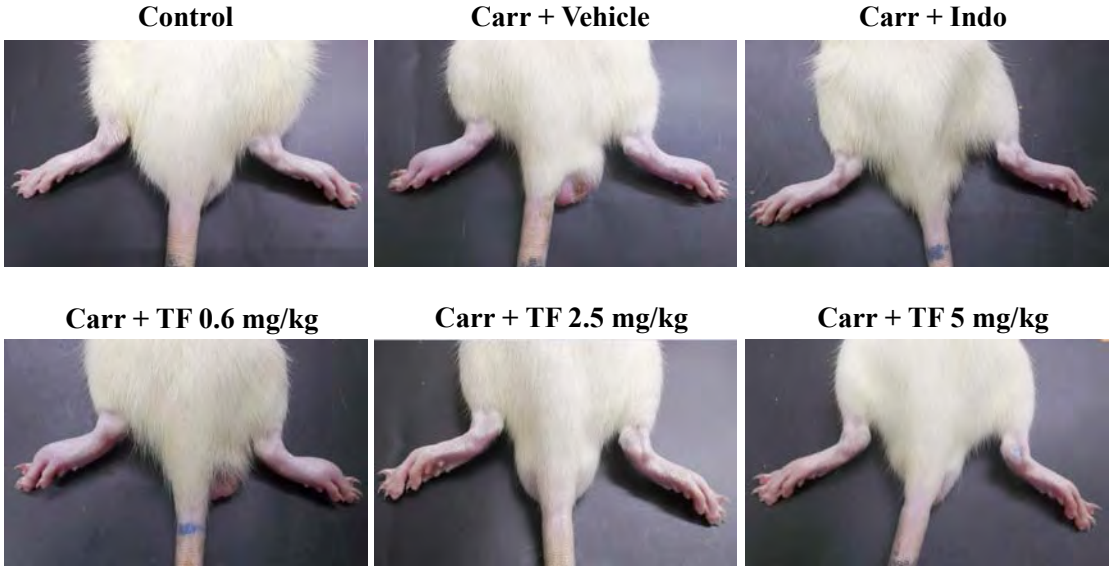
圖四十九、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)之抗一氧化氮合成酶基因表現分析(RT-PCR)的濃度與表現關係。

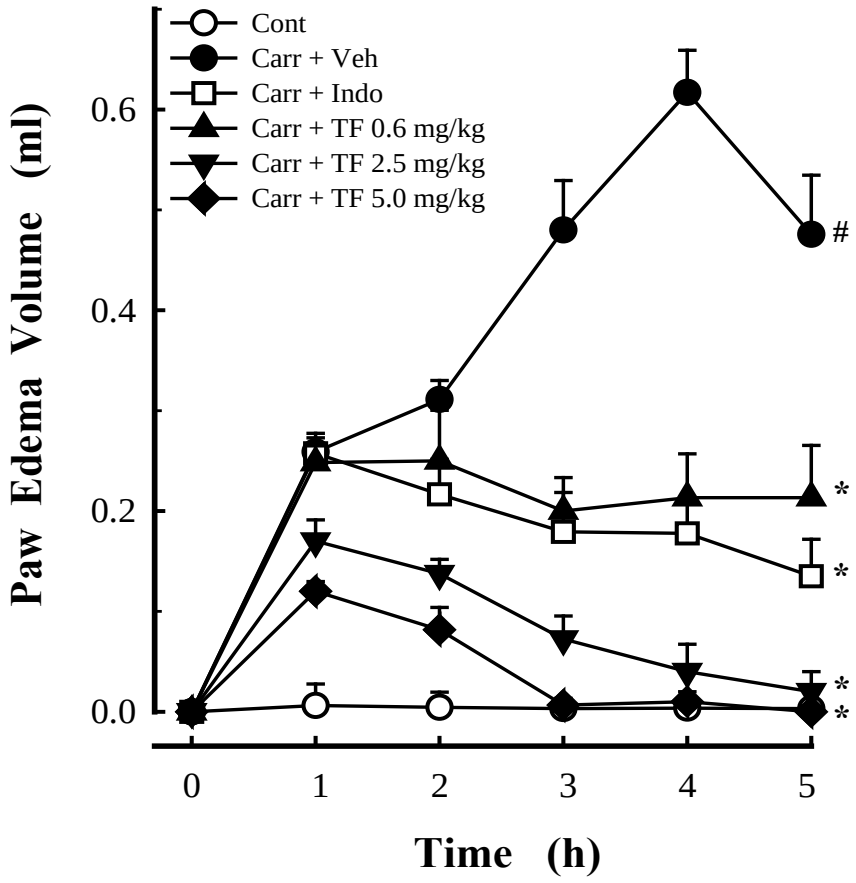


圖五十、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)之抗一氧化氮合成酶與環氧合酶(COX-2)蛋白質表現分析(Western blotting)的濃度與表現關係。

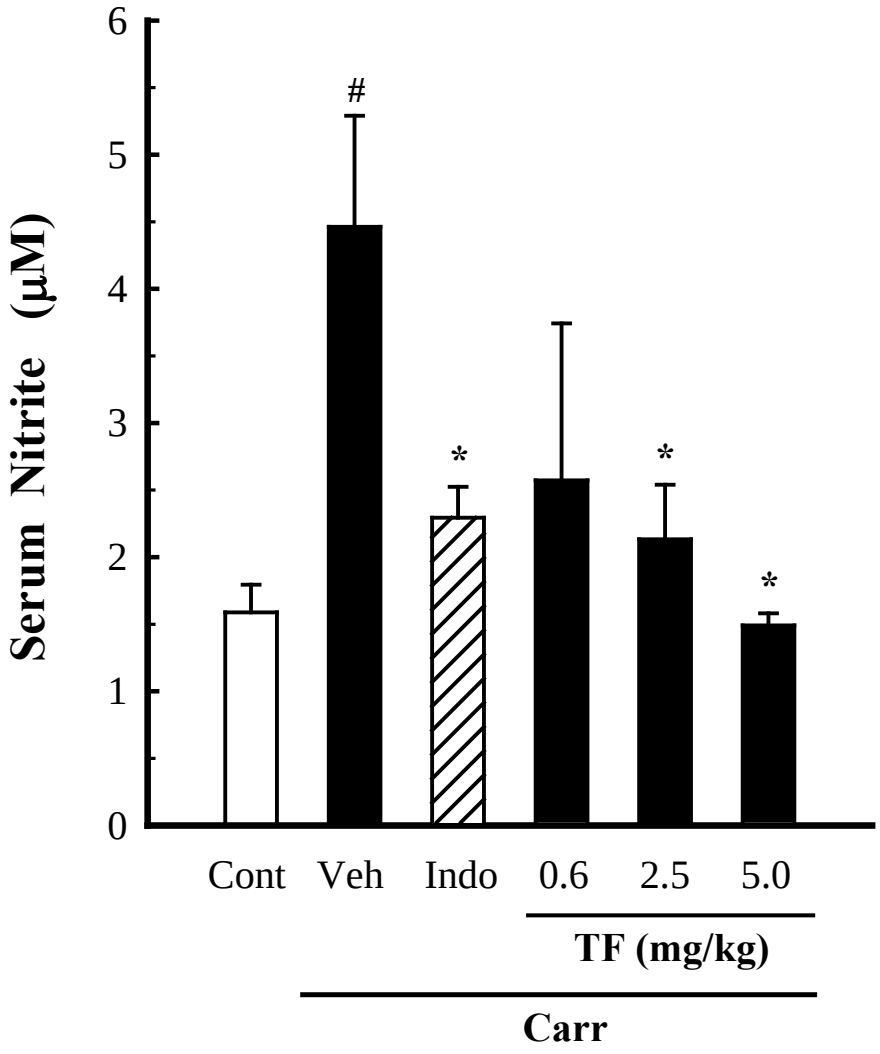


圖五十一、臺灣油點草分離得到部分純化物 (TF-NW-DCM-7) 改善細菌內毒素產生一氧化氮合成酶所造成之 SD 大鼠主動脈血管收縮張力降低之的濃度與功能性關係。

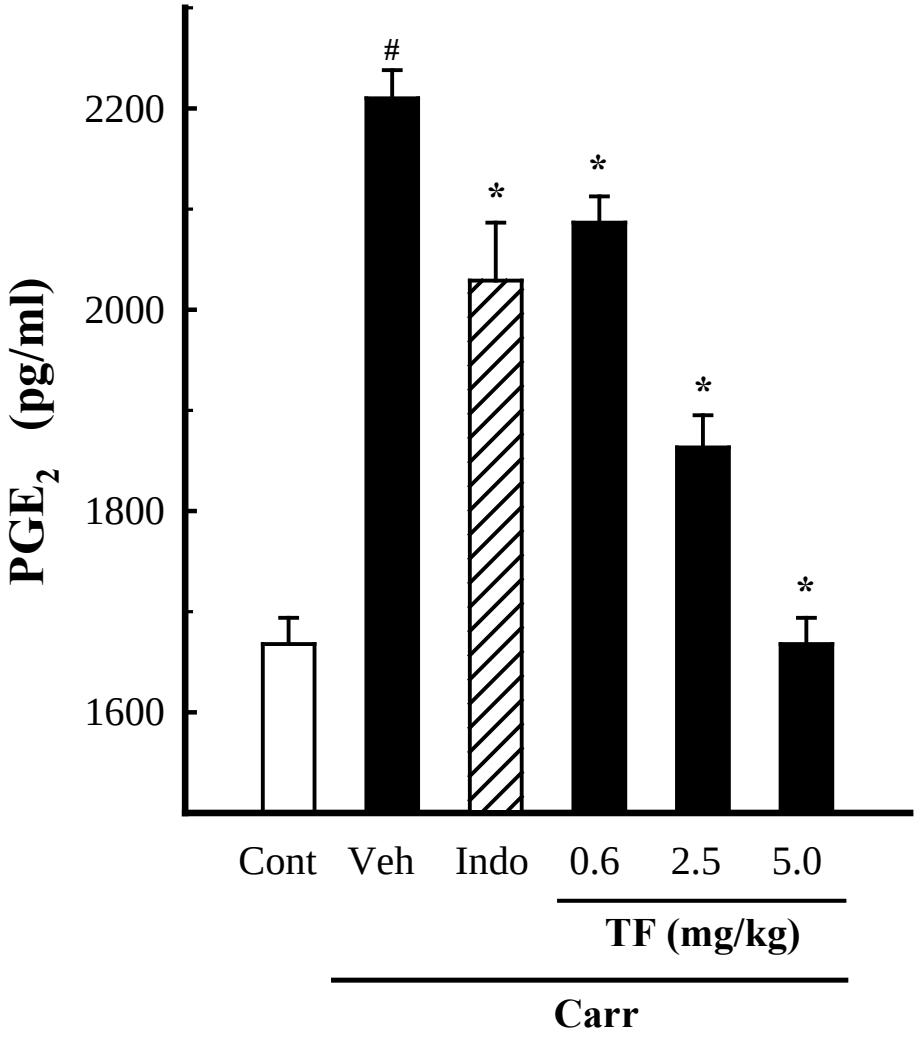




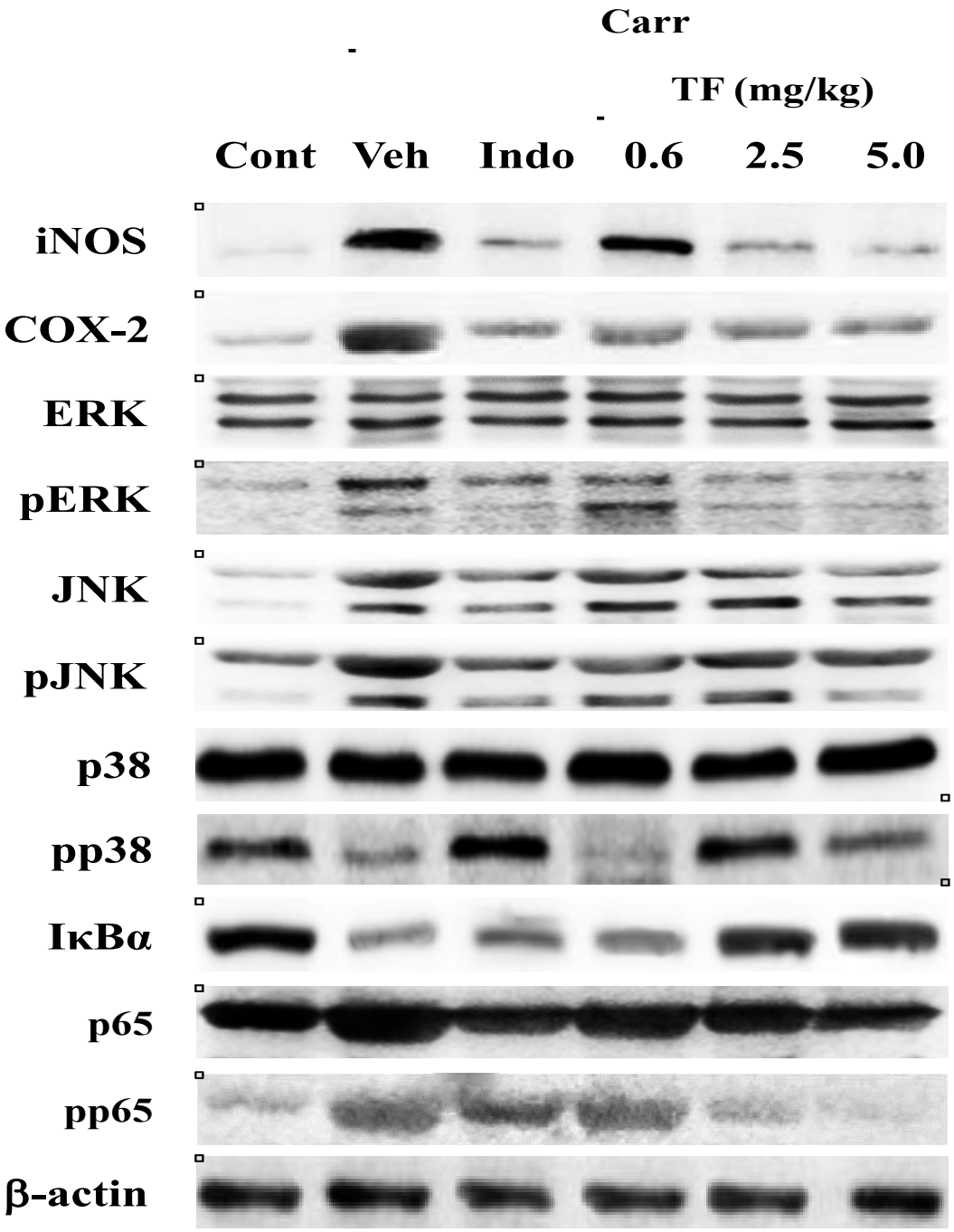
圖五十二、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠產生之 SD 大鼠之發炎性足腫具有保護作用的濃度與功能性關係。



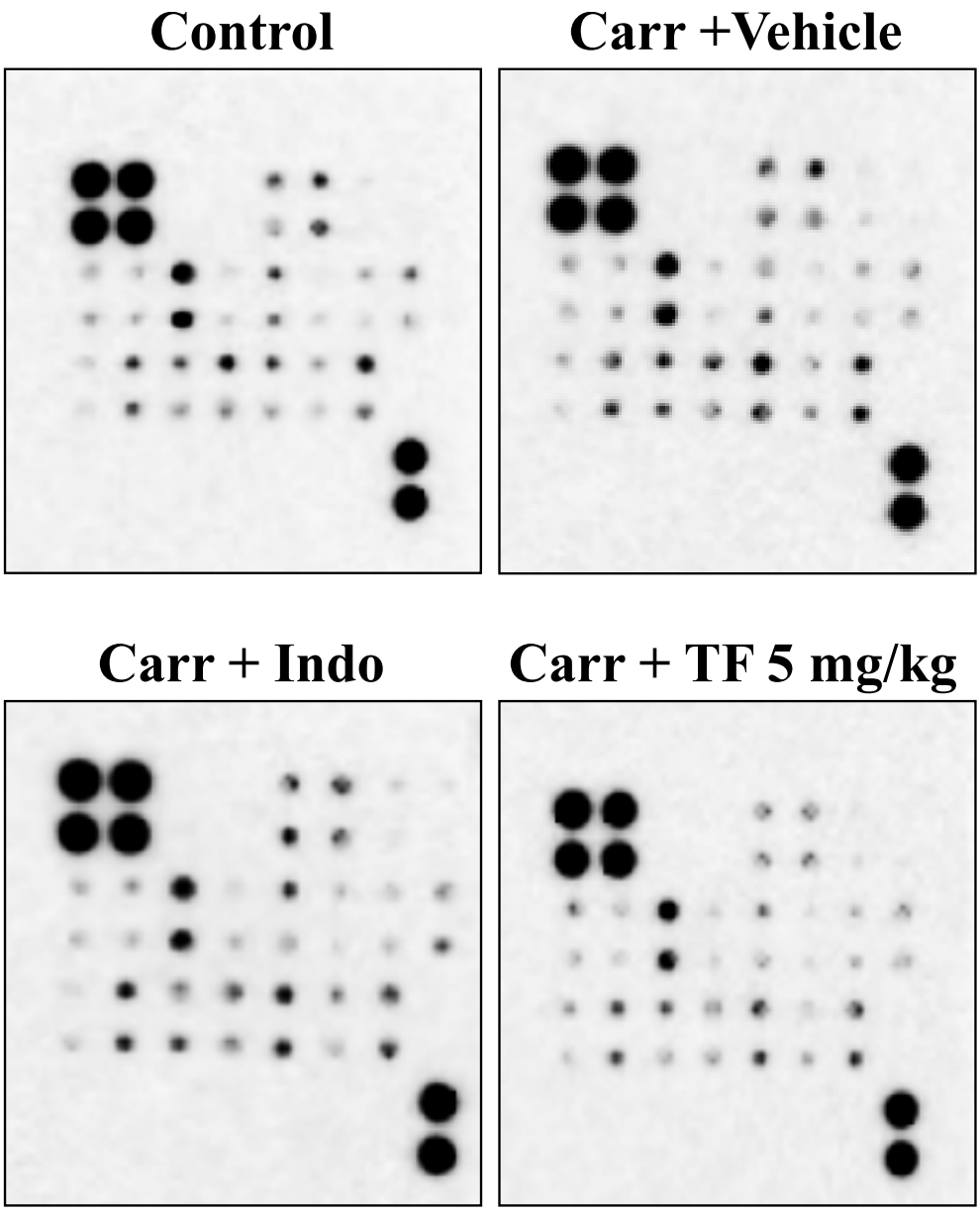
圖五十三、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠產生之 SD 大鼠之發炎性足腫模型抑制血漿一氧化氮濃度的濃度與作用關係。



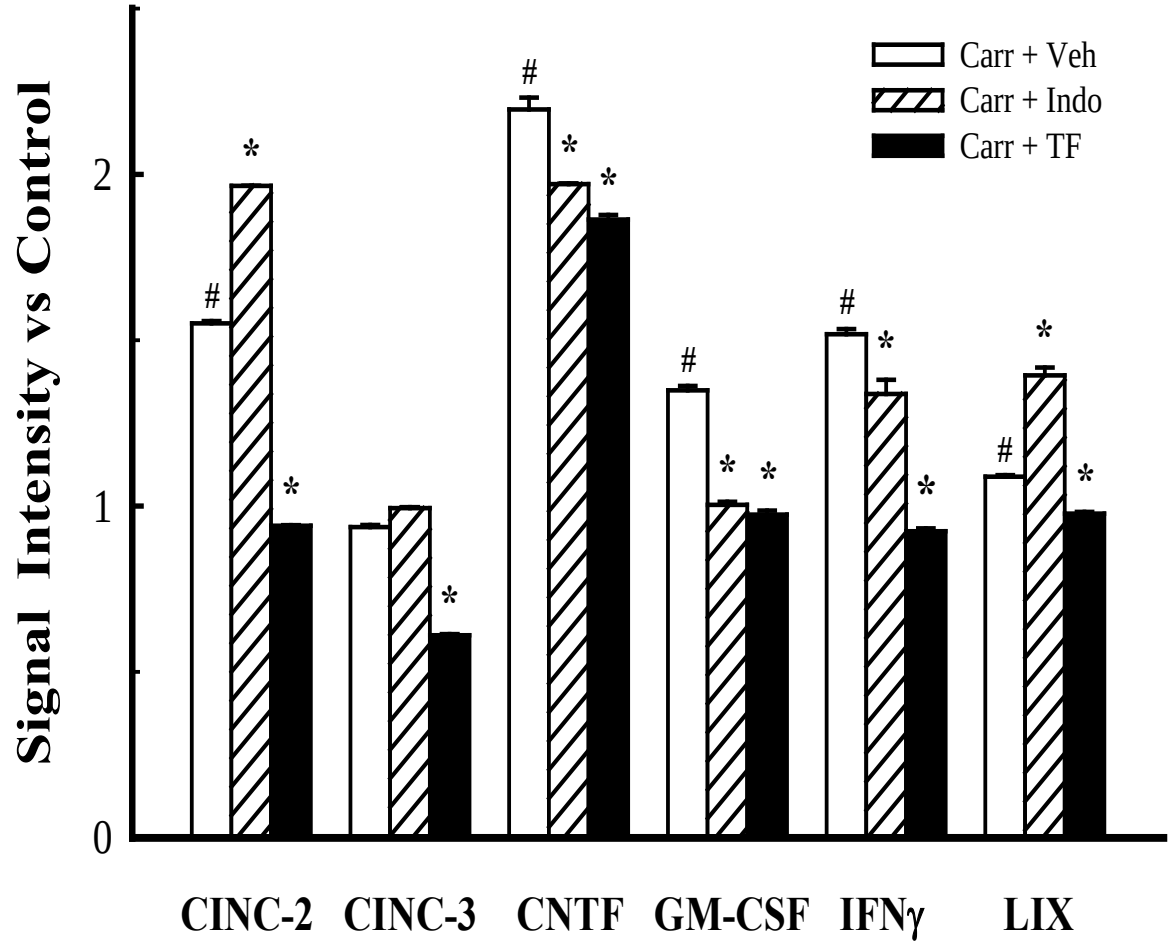
圖五十四、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠產生之 SD 大鼠之發炎性足腫模型抑制血漿前列腺素(PGE_2)的濃度與作用關係。



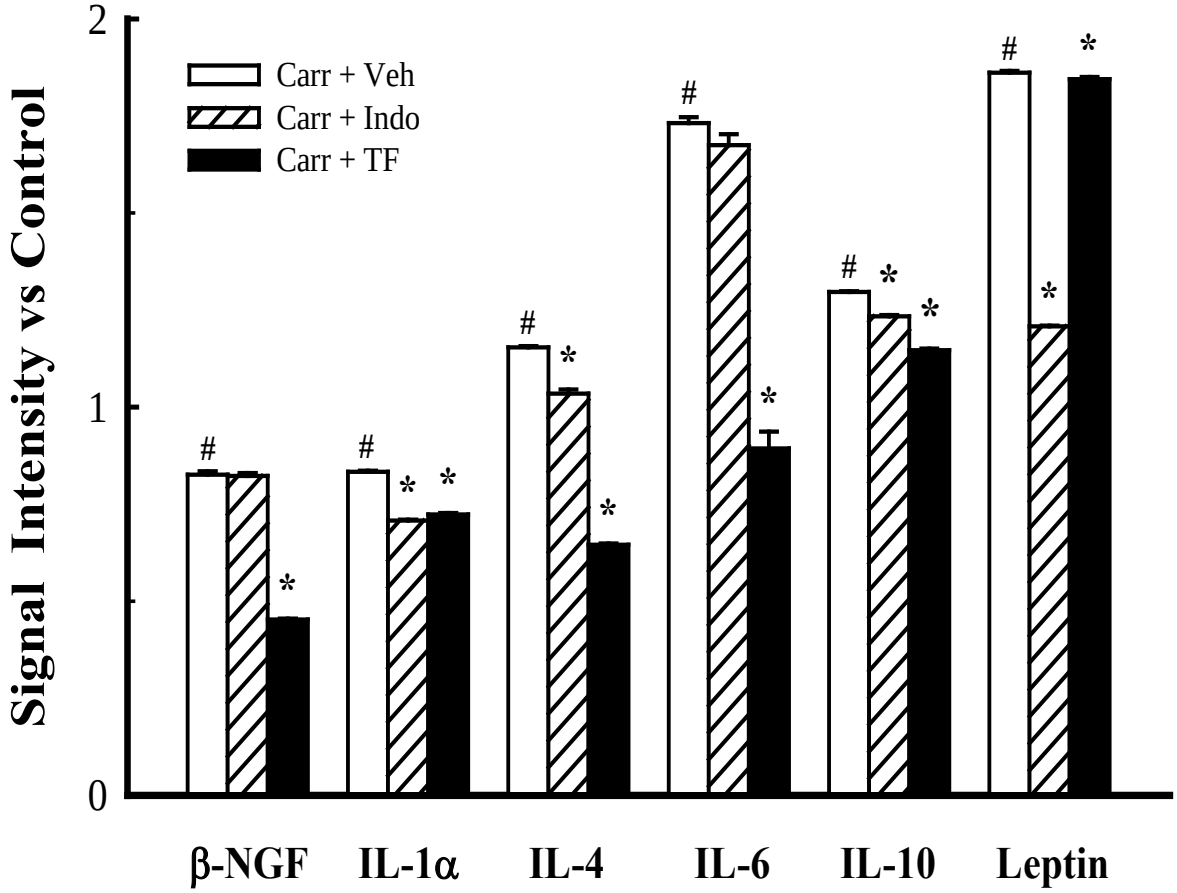
圖五十五、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠產生之 SD 大鼠之發炎性足腫模型調節足掌之一氧化氮與前列腺素上游之 MAPK 與 NFkB 訊息傳遞作用。



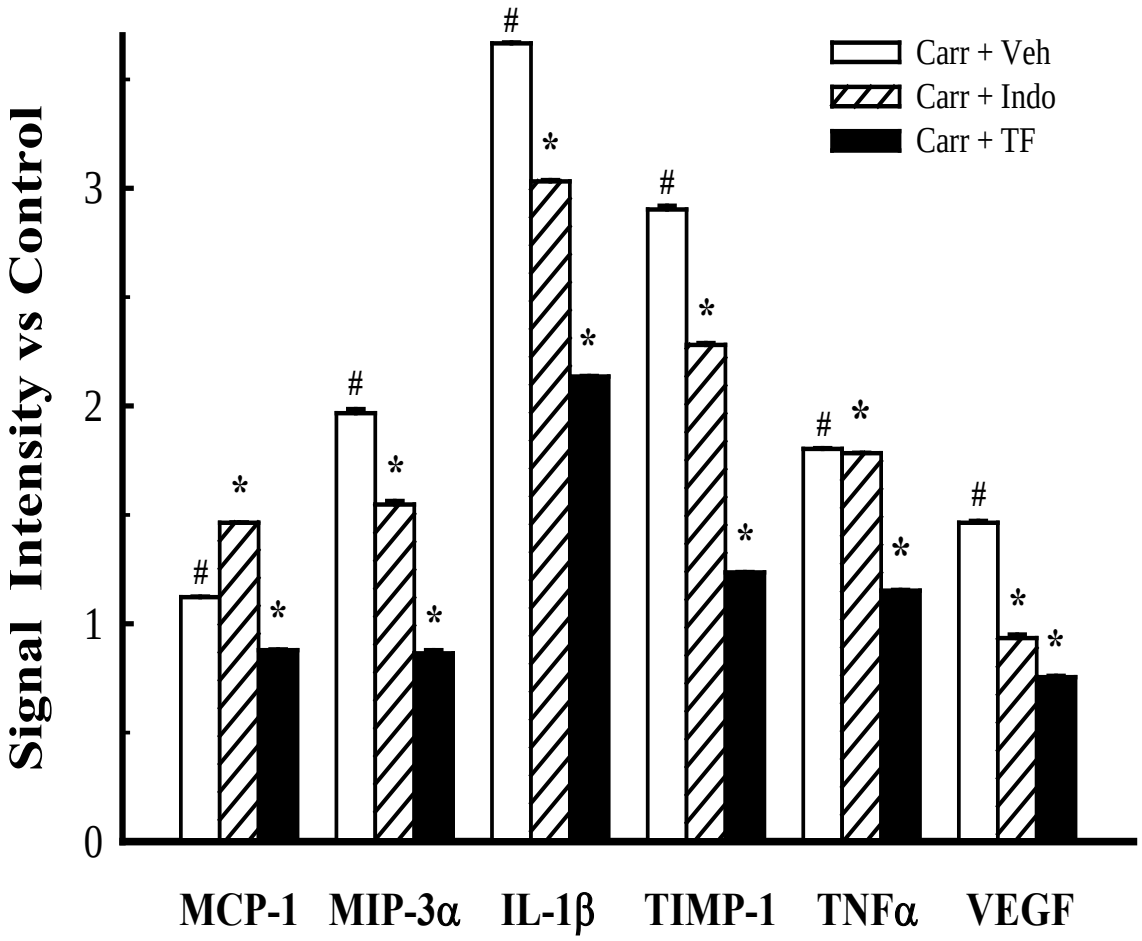
圖五十六、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠產生之 SD 大鼠之發炎性足腫模型調節足掌之發炎性細胞素之蛋白質(protein array)表現。



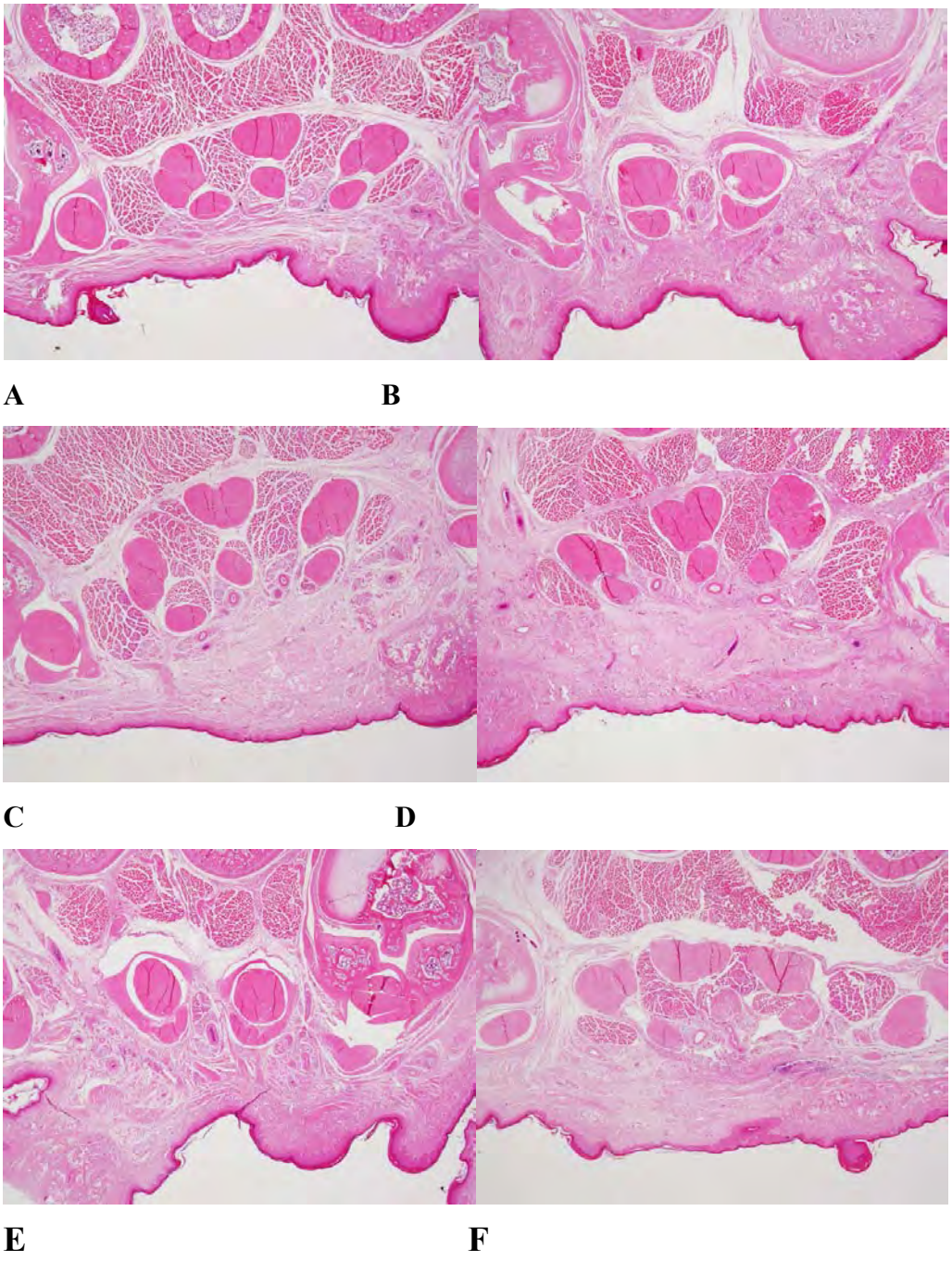
圖五十七、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠產生之 SD 大鼠之發炎性足腫模型調節足掌之發炎性細胞素之蛋白質(protein array)表現。



圖五十八、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠產生之 SD 大鼠之發炎性足腫模型調節足掌之發炎性細胞素之蛋白質(protein array)表現。



圖五十九、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠產生之 SD 大鼠之發炎性足腫模型調節足掌之發炎性細胞素之蛋白質(protein array)表現。



圖六十、臺灣油點草分離得到部分純化物(TF-NW-DCM-7)對角叉菜膠(Carr)產生之 SD 大鼠之發炎性足腫模型改善足掌之皮下組織腫脹、水腫及嗜中性白血球細胞浸潤之病理表現。(A: Control; B: Carr+Vehicle; C: Carr+Indomethacin; D: Carr+TF 0.6 mg/kg; E: Carr+TF 2.5 mg/kg; Carr+TF 5.0 mg/kg) H&E, 20x.

編號：MOHW103-CMAP-M-114-112424

利用腫瘤摘除動物模式,以研發合併食用中草藥於控制乳腺腫瘤細胞轉移與復發之治療策略

楊寧蓀
中央研究院農業生物科技研究中心

摘　要

中草藥及其萃取植化物在癌症治療上之應用上目前正廣泛受到重視，因為某些傳統中草藥(如黃芩湯)在合併臨床醫療策略(如化療)後有益於病人之存活、免疫調節及手術後提高生命品質。我們計畫之宗旨為利用腫瘤摘除動物模式，研發合併食用草藥於抑制乳腺腫瘤細胞轉移與復發之治療策略，進而開發具抗腫瘤活性之臺灣本土可培種之中草藥。我們的研發策略，包含藉由標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成分分析，並佐以具體細胞學/分子生物學的生物活性測試平台及動物實驗模式，以確定臺灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成分及生物活性，最後期望可進而提升本土中草藥之應用價值及其生技應用之推廣。在 103 年度中，我們完成選定了三種臺灣本土中草藥之基原鑑定檢測，包括品種確認、組織切片鏡檢觀察及核醣體核酸基因(rDNA)序列分析之分子基原鑑定檢測。在老鼠乳腺切除動物模型之抗腫瘤轉移活性測試，我們完成三種臺灣本土中草藥酒精萃取物之抗腫瘤轉移活性分析。我們的研究結果顯示黃花蜜菜酒精萃取物(WCE)及大花咸豐草酒精萃取物(BPE)可顯著降低腫瘤轉移率及顯著提高老鼠存活率，魚腥草酒精萃取物則無顯著效果。我們希望在 104 年度中，能完成我們所設定的研究目標。我們相信此計畫結果，將有助於未來中草藥從種植、採收、品管到活性的垂直整合系統，創建一套能提供功效好且品質穩定之中草藥的標準化栽種生產程序，進而促使臺灣本土中草藥能逐步具體地科學化，以確保民眾使用之安全，並有助於本主中草藥之發展。我們正以研究成果申請兩項專利及兩篇論文。

關鍵詞：臺灣本土中草藥、基原鑑定、抗腫瘤轉移

Number: MOHW103-CMAP-M-114-112424

Developing an Oral Herbal Medicine Approach for Control of Tumor-Metastasis and –Recurrence: Using a Mouse Mammary Tumor-Resection Model

Ning-Sun Yang
Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica

ABSTRACT

Medicinal herbs and their derivative phytocompounds are being increasingly recognized as useful complementary or adjuvant treatments for cancer, as number of herbal medicines have been shown or be beneficial for the survival, immune modulation, and the general health and quality of life (QOL) of cancer patients, when they are used in combination with conventional (e.g., chemotherapy) treatment. Our goal in this study is 1) to establish a therapeutic strategy against the metastasis of mammary carcinoma, hopefully via oral feeding of specific traditional Taiwanese medicinal herbs and 2) to develop medicinal plants that are endemic to Taiwan and have been reported to confer potent anti-tumor bio-activities, and expand their biotechnological applications. This task is being pursued by using a combinational approach of morphological/anatomical analyses, followed by molecular marker authentication (e.g., DNA sequencing), and then by specific anti-tumor bio-activity assays.

For the first-year study of the project (2014), our results documented the verification of the authenticity of three selected medicinal herbs including identification of the morphological and histological characteristics and the polymorphic ribosomal DNA sequences ribosomal DNA sequences of three medicinal herbs.

In a breast tumor resection mouse model, the ethanol extract of *Bidens pilosa* (BP-E) and *Wedelia chinensis* (WCE) were found to effectively suppress mammary tumor metastasis and increase mouse survival. Taken together, we believe that our results in the present study are providing a useful approach for future biotechnology

development of evidence-based, traditional herbal medicines in Taiwan.

Keywords: Taiwan’s indigenously grown medicinal plants, Authentication, Anti-metastasis

壹、前言

著眼於草藥未來發展潛力，草藥的應用已成為國內外生技產業發展重要項目，許多美國卓越的醫藥研究機構包含 NIH、FDA 及美國哈佛、耶魯等主要醫學院也著手於草藥產品的研發與臨床的測試，美國 FDA 在 2004 年 6 月 9 公告「植物新藥規範」(Guidance for Industry - Botanical Drug Products)，促使了過去十年中草藥及植化藥物研發展 1-3。由德國生技公司 MEDI-Gene 開發，成份為綠茶葉萃取物，用以治療人類乳突病毒所引起生殖器的外敷藥的 Veregen；以及龍血樹(Dragon Blood Dracaena cinnabari)萃取物，用以治療 AIDS 病患之止腹瀉藥，分別成為美國 FDA 按照植物新藥規範所批准植物新藥的第一及第二例。另一方面，美國 FDA 近年也通過 Medical Food 之規範，屬於植物藥與保健食品的”中間”產物，中文可譯為醫療食品。前提為以”可食用物”為來源，且”可以針對特定疾病具療效”來研發上市分析以上這些植物新藥或醫療食品開發成功的因素包括：1. 使用單一、基原明確的植物；2. 良好的藥材控管，產地種植明確；3. 有效成份組成及製程管控明確；4. 完整的人體臨床測試或臨床研究(clinical studies)。由此顯示，美國 FDA 對於植物新藥審查仍然著重於藥品種源安全、確切療效、有效成份在不同批藥材之間的一致性。據調查，臺灣中草藥市場已達 250 億元新台幣以上，同時中草藥製成之相關商品已經廣泛地被當作營養補充品或藥品使用。然而目前國內中草藥市場中，許多中草藥植株因氣候、地理位置不同、成本高等因素而不易在臺灣栽種，故目前多數中草藥藥材皆由大陸方面輸入。在品管不易掌握情況下，因而時有進口之中草藥材品系不實或含有農藥、重金屬殘留的事件發生。臺灣本土產中草藥也正在民間進一步在推廣為使用中，不少藥材常被誇大宣傳，常宣稱具有抗癌或可調節免疫的療效，且稱與傳統之中草藥複方具相類似的療效，但其確實”療效”卻常為經驗論，且常被人們所誇大而失信。由於近年來傳統草藥療法或歐美國家所謂的「輔助及另類療法」(complementary and alternative medicine，CAM）已經越來越能夠為中/西方社會大眾所接受，因此以科學方法解釋傳統用藥理論、探討中草藥療效的研究也逐漸地受到重視。我們在研究之學術研討會中亦發現，由於中草藥種類紛雜、名稱混淆且經過加工炮製後會不易辨別其種類，因此極需加強中草藥的品種（variety/cultivar）或基原（germplasm）作鑑定。有別於一般中草藥之露天（即“田間”，而非溫室中）生長或種植，本實驗室因了解氣候及種植條

件可能對藥材品質影響甚鉅，在過去五年已建立一系統化研究平台，包括標的藥用植物之基原鑑定、化學指紋圖譜分析及指標成份分析，並以具體細胞學/分生學的生物活性(bio-activity)測試平台及動物實驗模式以確定臺灣本土常用之藥用植物之物種、化學指紋圖譜、活性指標成份並利用實證醫學驗證其活性，以提升本土中草藥之應用價值。

目前臺灣對於草藥方面的生技研究，由於國內產、官、學研界（包括各學術研究及政府機構單位，如中國醫藥研究所、中國醫藥大學、衛福部中醫藥司、中研院農生中心等）努力推動中草藥研究及開發，同時亦在政府推動中藥現代化、中藥科學化及中醫藥國際化等三大目標下，使得中草藥發展成為國內生技產業發展重點項目。在 2012 年行政院生技鑽石計畫及”總體檢”會議中，亦將中草藥研究列入國內生物技術研究重點之一，呼籲利用加強品質管制與研究發展，以引領臺灣成為全球具有指標性的中醫藥發展國家，帶動臺灣成為廿一世紀之生物科技島及中草藥科技島。

目前多數中草藥主要採集自野生物種或由野生物種馴化栽培，且多數中草藥基原(germplasm)並未實施正規之育種選拔，導致會有因為同一中草藥基原內植株之遺傳變異過大，而故無法供應品質穩定之藥材的現象產生。此外，也常發生同一物種(species)的中草藥卻有多種俗名或不同“品系/亞種”之“混用”，或者多個不同物種的草藥但具有相同商品名稱之現象，且中草藥在加工炮製（如乾燥或切片）後，藥材外觀易混淆，往往不易分辨其正確種類，因而誤用，影響藥效及危害人體健康。例如俗稱「黃耆」之中藥便可涵蓋十個以上之物種，但是其中僅有一物種(Stephania tetrandra)具有肌肉鬆弛作用之成份。另一方面，由於大量採集或販售輸出會造成草藥遺傳資源之流失，因此歐美各國已逐漸重視草藥之品種改良，並且投入人力及研究資源於草藥的育種。所以，為了穩固臺灣中草藥長期發展之根基，我們學界需加強進行中草藥的基原及品種鑑定，以保護臺灣原生種、稀有種及“可耕種”之改良種，並確實保護育種專家之智慧財產權。另一方面，亦協助發展高附加價值農業。

因生技進步很快，近幾 年中草藥基原鑑定則已經多以DNA 序列比對，或綜合多種方法進行。所謂以 DNA 序列比對，係直接分析及比對染色體特定區域之 DNA 序列差異，做為不同基原或品種鑑定之依據。此鑑定方法的優點包括：(一) 僅分析一個或兩個 DNA 片段，即可獲得 500~1000 個鹼基序列供指紋鑑定；(二) 可在短時間內提供客觀而明確（以 A、T、C、G 判讀）之 DNA 指紋資料；(三) 不需使用 PCR 技術，故亦無分子標間相互競

爭之問題；(四) 不需作為對照的品種，可隨時針對未知樣品進行分析。因此，以 DNA 序列比對為基礎之鑑定技術在中草藥基原鑑定應用上具很大潛力。依據所分析的 DNA 區域所屬之基因體，又可分為細胞核內及核外（包括葉綠體及粒線體）的特定區域；細胞核內特定基因部分片段 DNA 定序分析常用的如 ITS (internal transcribed spacer)分析，此方法為目前植物基原鑑定最常用工具之一，是選擇細胞核內 18S 及 26S rDNA 間之 DNA 做為分析對象，此區域具有植物「屬」間及「種」間之高 度DNA 序列變異性。細胞核外特定基因部分片段 DNA 定序分析常用的如葉綠體 DNA 序列，常分析之區域如 rbcL (large subunit of rubulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase，Rubisco)等部份， 葉綠體DNA 序列分析常可偵測物種間之 DNA 序列變異，或數個鹼基（base pair）之插入或遺失。在基原鑑定技術方面，我們實驗室已經與中研院生多中心彭鏡毅實驗室合作，利用此基原鑑定之技術將臺灣常見的蟛蜞菊屬植物完成其基原鑑定，並已經將此一結果投稿至草藥學重要期刊(Journal of Ethnopharmacology)，目前仍在審稿中。

中草藥研究除上述物種之基原鑑定工作外，若能再搭配中草藥之有效成份分析、化學指紋圖譜、生物活性平台等分析方法（此項工作在過去幾年中研院農生中心草藥組可說已做出很好的成果，也已獲得國際上多方面學術上之肯定），更能確實做到協助定義中草藥的「確效」。每種中草藥 都擁有獨特的植物二次代謝物、特殊的有效或主要成份，指紋圖譜(metabolome 或 metabolic profiling)便是一種類似於植物代謝學研究技術的鑑定手法，能夠將中藥所具主要或可能的有效成份組成圖譜化及量化，建立獨特的「鑑定分析」標準，作為未來品質管理的依據，從而能進一步確保每批中草藥產品質穩定，讓科研者及顧客對樣本或產品更具信心。常用的分析方法如（1）色層分析法：如 GC、HPLC、TLC 等；（2）光譜分析法：如 UV、IR、Near-IR 等；（3）其他：GC-MS、LC-MS、NMR、X-ray 等，也可以用來建立中草藥的「指紋圖譜」。其中，高效液相層析儀（HPLC）已發展成熟，並廣泛應用於各種化學分析的場合。HPLC 的分析能力強，再現性良好，系統穩定性高，樣品及溶媒的使用量少，偵測器（detector）型式選擇多（如 UV、photodiode array、RI、ELSD…等），很適合用 來建立中草藥化學指紋圖譜。且由財團法人醫藥工業技術發展中心（藥技中心）建立的「臺灣中草藥網」中，便是將多批次的藥材以 HPLC 進行分析，並建立其化學指紋圖譜及雷達圖，至今已陸續建立數百筆藥材的資料，並彙整成為資料庫中的一部份，以供比對。指紋鑒別技術對中藥產品推向國際市場應起重要影

響，可促使中藥產品及其功效較能獲得國際認同，使中草藥中的有效成份被西方科學化方法解讀，再搭配生物技術分析其活性及作用機制，更有助於將中草藥應用於保健食品或植物新藥的開發。本研究室設置於中研院農生中心，它新近延攬了陳逸然及楊玉良兩位傑出之年輕學者，是以上領域之專家，已與我們合作兩年，將協助本計畫進行。

本計畫乃希望能延續我們在「建立臺灣本土常用中草藥之基原鑑定與功效測試平台」計畫所建立之系統化研究平台，包括(1)標的藥用植物之基原鑑定；(2)化學指紋圖譜分析及指標成份分析；(3)具體的細胞學/分生學的生物活性（bio-activity）測試平台；及(4)先進動物實驗模式。根據這些我們可有效確定臺灣本土常用之藥用植物之物種，其化學指紋圖譜，它的活性指標成份，並利用實證醫學驗證其生物活性及抗癌功能。我們將可有效探討臺灣本土常用中草藥在控制乳腺腫瘤細胞轉移與復發之活性，藉此提升本土中草藥之應用價值。為確實提升臺灣本土中草藥之應用價值，本計畫特別選擇幾種臺灣民間常用之中草藥，大花咸豐草(Bidens pilosa L.)，魚腥草(Houttuynia cordata Thunb.)與黃花蜜菜(Wedelia chinensis)作為戶可對比之研究目標。這三種草藥為臺灣青草茶常用之中草藥，魚腥草更是大陸雲南各族人幾乎每日食用之「沙拉型」生菜，用以「清熱解毒」，此為本文 PI 與中研院院士鄭永齊等前往參訪之集體經驗。

前人的研究已指出，大花咸豐草具有調節免疫與抗發炎的活性，大花咸豐草的丁醇萃取物可以調節輔助型 T 細胞的分化，抑制第一型補助 T 細胞的分化並促進促進第二型補助 T 細胞的分化 6,7；而由大花咸豐草中分離出來的植化物 cytopiloyne，在小鼠的動物模式中更被發現可藉由抑制 CD4+ T 細胞增生來達到預防第一型糖尿病的發生 8。大花咸豐草的甲醇萃取物也被發現可以減少 zymosan 所誘發的發炎反應所造成的淋巴結腫脹 9。而在 in vitro 實驗中，大花咸豐草的萃取物更被發現對於多種不同的癌細胞具有毒殺性 10,11。而根據臺灣植物誌 12 的記載，在臺灣總共有六種鬼針屬的物種，包括鬼針（Bidens bipinnata L.）、鬼針舅（Bidens biternata）、小白花鬼針（Bidens pilosa L. var. minor）、白花鬼針（Bidens pilosa L. var. pilosa L.）、大花咸豐草（Bidens pilosa L. var. radlata Sch. Bip.）及狼把草（Bidens tripartita）。其中，根據我們在 NCBI 核苷酸資料庫上的調查結果顯示，此屬其中之一的鬼針（Bidens bipinnata L.）尚未作過基原鑑定。又因大花咸豐草在國內外已有許多關於生物活性、指標成分及 HPLC 指紋圖譜分析 13。目前臺灣全島以大花咸豐草最為常見，在此計畫中，我們將針對大花咸豐草

在不同地區及不同季節栽種下，其生物活性、指標成分及 HPLC 指紋圖譜分析上的差異，進行研究。

在先前研究已發現魚腥草熱水萃取物可在體外有效抑制五種不同血癌細胞生長(L1210, U937, K562, Raji, P3HR1) 14；並且，魚腥草中植化物魚腥草素(Houttuyninum)可有效藉由抑制 HER2/neu 蛋白受體酪氨酸激酶的磷酸化進而抑制 BT474 及 N87 過度表現 HER2/neu 蛋白受體酪氨酸激酶之人體乳癌細胞於小鼠異種移植模型之腫瘤生長 15。研究發現魚腥草具有抗發炎之作用，如魚腥草精油可藉由抑制促發炎因子 COX-2 活性而抑制 LPS 所引發小鼠巨噬細胞產生的 PGE2，並且也被發現其可抑制專一性抑制促發炎因子 COX-2 的 mRNA 及蛋白表現量，此抑制現象類似於非類固醇抗發炎藥(NSAID)之藥理作用但更具專一性 16。在魚腥草基原鑑定研究上，中興大學農藝學系胡澤寬教授 利用植株性狀及 RAPD 技術分析臺灣魚腥草(Houttuynia cordata Thunb.)之遺傳變異，經主成分及分群分析可將 10 個野生族群歸納成三個類群 17。在此計畫中，我們將針對不同類群魚腥草進行核醣體基因 Internal Transcribed Spacer (ITS)等更進一步分析研究。

黃花蜜菜(Wedelia chinensis)近年來更是中研院農生中心重點研究植物，楊寧蓀實驗室及蕭培文實驗室已發表多篇論文探討黃花蜜菜的抗發炎與抗癌活性。我們的研究結果顯示，黃花蜜菜不只是在體外(in vitro)系統下可以有效抑發炎性細胞激素(proinflammatory cytokine)的分泌，更可以減緩由葡聚醣硫酸鈉(Dextran Sodium sulfate, DSS)誘發的小鼠腸炎症狀 5； 而在攝護腺癌的研究中，黃花蜜菜的乙醇萃取物被發現可藉由抑制雄激素受體(androgen receptor)的訊息傳導，進而導致癌細胞的凋亡 18。除此之外，被廣泛使用於菜餚及香料的青蔥也可被作為中草藥使用來治療各種疾病，在過去研究發現青蔥可在小鼠巨噬細胞株 Raw 264.7 中清除自由基並有效抑制 LPS 所刺激產生的發炎因子 COX-2 及 iNOS 表現量 19；青蔥綠葉水萃取物也被發現可在小鼠體內減少角叉菜膠(carrageenin)所引發的足蹠腫脹(hind paw oedema)及血清中 NO 及促發炎因子 TNF-α 表現量 20。在我們實驗團隊先前研究中亦發現青蔥萃取物可藉由抑制腫瘤組織中發炎因子 COX-2 及 iNOS 表現量並抑制小鼠體內大腸癌 CT26 腫瘤生長 21，故青蔥亦可作為本研究之 reference plant。雖然這幾種中草藥曾經被民間宣稱或在部分研究報告指出含有抗發炎或抗癌的功效，但尚需要更明確之系統性科學證據來驗證這些作用。因此，本計畫選定以上這幾種民間常用中草藥，作為初步篩選具有免疫調節或抗癌的對象，除了和舊有文獻相互對照印證

外，更作進一步的研究，開發中草藥特有之化學成份及生物活性，以科學的方式加以佐證其療效，藉此經由實證醫學與系統性的分子細胞生物學等技術的驗證，使計劃成果能成為中草藥推廣及發展之助力。

在本計畫生物活性/功效性（Bio-activity/Functional activity）測試平台及實證醫學健康上之“功能”分析上，將以我們在已建立之臺灣本土常用中草藥之基原鑑定與功效測試平台來評估大花咸豐草，魚腥草與黃花蜜菜的體內外生物活性/功效性，包含它們對樹突狀細胞(dendritic cells)與骨髓衍生抑制性細胞(MDSC)之分化力的影響，以評估中草藥萃取物之體外免疫調節活性，在體內活性測試上，我們會以老鼠原位乳癌(4T1 mammary cancer)動物模式和人類乳癌細胞(MDA-MB231)老鼠異體移植模式(Xenograft model)來評估中草藥萃取物之抗腫瘤生成活性，再以腫瘤摘除(tumor resection)小鼠模式評估大花咸豐草，魚腥草與黃花蜜菜萃取物之抗腫瘤轉移活性。最後藉由樹突狀細胞、Treg 細胞、Th1 細胞、骨髓衍生抑制性細胞及基質細胞等系統性免疫學研究，以了解大花咸豐草，魚腥草與黃花蜜菜對於免疫調節及抗腫瘤活性的調控方式。本計畫規劃為期二年，主要的具體目標依序有下列四項：

具體目標一：確認三種臺灣本土常用及可大量栽種之藥用植物（大花咸豐草、魚腥草及黃花蜜菜）的物種來源並進行基原鑑定。

本計畫在挑選實驗材料時，乃根據國人常使用且無毒之臺灣本土中草藥而設計，特別以生長力旺盛，臺灣民間常用、且有文獻記載安全無虞之本土中草藥做為優先考量，以確實提升臺灣本土中草藥之應用價值，並且使本研究與社會民眾之所需能相符合。並且是依據行政院衛生署中醫藥委員會 101 年度推動傳統醫藥(材)生技研發類委託研究計畫之需求而選定。因此擬選定臺灣常見之大花咸豐草(Bidens pilosa L. var. radlata)、魚腥草(Houttuynia Cordata)兩種中草藥作為主研究目標，而以黃花蜜菜(Wedelia chinensis)為副。並加強與中研院生物多樣性研究中心彭鏡毅研究員之合作關係，進行品種確認、基原鑑定及生態環境之需求。鑑定方法包括肉眼觀察（macroscopic identification）、鏡檢（解剖及顯微鏡併用）及分子基原鑑定檢測三種。肉眼觀察是將新鮮植物全株與特定的型態及器官，包含花、果實、種子等，與證據標本比對，以初步判別物種，包括亞種及培育種（cultivars）；鏡檢是利用顯微鏡檢查植物較細微的構造（如腺毛、細胞型態或結晶等），並運用橫或直切面之組織切片的方式，檢查植物組織構造，如維管束排列。在分子標記鑑定層面，中草藥鑑定中最常被廣泛使用的方

法是以核醣體核酸基因（rDNA）的內轉錄區（internal transcribed spacer，ITS）序列來鑑定物種的差別；另外，由於近年來建立植物條碼（plant barcode）的趨勢日益漸增，已有許多關於以植物 DNA 條碼鑑定中草藥的論文陸續被發表，最常見且可精確鑑定出物種的基因序列有三個，分別是 matK、rbcL 及 trnH-psbA。以上三種基原鑑定法我們研究室已充分掌握了技術系統（見第 14 頁圖六，關於計畫主持人過去曾執行之相關計畫成果的描述）。因此，為了精確地鑑定出最具有效成份之草藥物種，我們會綜合以上的方法來鑑定不同品系之大/或小花咸豐草與魚腥草及黃花蜜菜，以避免中草藥未來的誤用或混用，以促進中藥使用上的安全。而活性指標成份之鑑定將有助於目標中草藥效用之確立，並有助於後續機轉相關研究之進行。

具體目標二：經由上述目標一之基原鑑定結果，優先比較大花咸豐草、魚腥草及黃花蜜菜中含有抗腫瘤細胞生長及腫瘤內發炎活性之分層或植物化合物含量；並利用小鼠活體動物實驗模型，比較分析草藥中特定成份於乳腺腫瘤切除後之抗腫瘤細胞轉移及腫瘤內發炎之效果。

實證醫學(Evidence Based Medicine; EBM)的定義是利用現有最佳醫療證據來為全民或特定族群的病人訂立治療計畫及提供醫療服務(Sackett et al, 1966)，為一門特定方法學之學科。以實證醫學健康上之“功能”分析，可意指在現代分生/細胞/基因組學等實驗系統中，求證其生化/細胞/組織/器官及大體生理功能，固可用 cell，tissue，organ，animal model 及 human clinical trials 之研究來一系列研究西藥，我們認為研發中藥亦然。應藉由實證醫學健康上之“功能”分析，利用不同的生物活性/功效性（Bio-activity/ Functional activity）之測試平台，以協助定義或確認目標中草藥之“功能效用”，不僅可以逐步落實中草藥科學化之目標，祈望未來能對病患在臨床治療上帶來幫助。目前醫學研究及藥物發展上，藥物在臨床測試前，必須在細胞及動物模式等研究上，有充分的證據佐證其功效，進而才能進行各項臨床測試。本計畫在以協助定義或確認目標中草藥之“功能效用”的目標下，中草藥多元化地應用研究，就必須加強科學性(Science-based)、實證性(Evidence-based)之實驗室研究(Laboratory studies)。在過去五年，本實驗室透過與本中心蕭培文研究原之合作，我們已經成功建構帶有冷光基因(luciferase)的小鼠乳癌細胞 4T1-Luc2。將此乳癌細胞(5×105)植入 BALB/c 小鼠的第五對左側乳腺脂肪墊(fat pad)裡，透過將小鼠接種乳癌細胞 16 天後進行腫瘤切除，我們能夠有效地比較分析不同組別中乳癌細胞在活體內

之轉移程度。在此研究的第一年，我們將會利用此依動物實驗模型比較大花咸豐草或魚腥草之萃取物，在原位腫瘤切除後之抗腫瘤復發/轉移效果。透過活體即時冷光影像檢測系統，我們可以用非侵入方式持續追蹤乳癌細胞轉移情形與記錄小鼠存活天數。我們確立了目標中草藥之效用或明確的生物活性。在此具體研究目標下，我們將利用 bioactivity-guided purification 方法， 逐步的將目標中草藥之有效植物化合物自有效萃取層分離出及結構之鑑定。活性指標成分之鑑定將有助於目標中草藥效用之確立，並有助於後續機轉相關研究之進行。

具體目標三：針對目標二所找出之草藥中具有抗腫瘤細胞轉移活性之分層或植物化合物，我們將進一步利用人類乳癌細胞(MDA-MD-231)於老鼠異種移植模型(xenograft model)中，探討其合併臨床抗癌藥物之抗腫瘤轉移效果；並用小鼠活體動物實驗模型檢測合併使用(combined use)之生物安全影響。

在具體目標二中，在我們我們確立了目標草藥之抗腫瘤細胞生長活性的分層或植化物以後，本研究將進一步探討這些有效成份於合併或輔助臨床抗癌藥物之使用可能性。利用小鼠乳癌細胞 4T1-Luc2 之動物實驗系統，我們將合併施打有效草藥成份與臨床抗癌用藥(如 Docetaxel 及 Doxorubicin 等)於實驗小鼠，借以比較草藥特定成份輔助臨床用藥之複合效果。另一方面，我們也會利用此一實驗模型，對魚腥草及大/小花咸豐草中有效成份之施打後作生物毒性、免疫細胞分化活性及藥物動力學分析。在我們過去的研究中發現，這些本土草藥之有效成份往往又具有抗氧化及抗發炎效果，我們因此相信此類草藥之有效抗腫瘤轉移成份在調控腫瘤微環境(tumor microenvironment)之應用層面，極具潛力。

為了將此類動物實驗結果更具臨床使用意義，本實驗室亦會利用我們所蕭培文老師近期所建立之人類乳癌細胞 MDA-MB-231-Luc2(可代表 triple-negative 人類強轉移性乳癌)之動物實驗系統進行研究。此一活體研究模型是利用疫體移植(Xenograft)的方式將帶有冷光基因(luciferase)的人類乳癌細胞 MDA-MB-231-Luc2 (1×105 cells/mice)，植入裸鼠的左側乳腺脂肪墊裡；透過將小鼠接種乳癌細胞 25 天後進行腫瘤切除，我們也能夠有效地比較分析不同草藥成份之作用，對人類乳癌細胞於活體內轉移活性之控制能力。我們相信，綜合 4T1-Luc2 與 MDA-MB-231-Luc2 二活體實驗系統所獲得之實驗結果，將更能有效地指出真正具有抗腫瘤細胞轉移活性成份，同時對往後之臨床測試提供重要之用要參考依據。

具體目標四：綜合比較及總結上述最佳之合併使用條件(結合與最佳化不同植化物之抗腫瘤細胞轉移效果)，以獲得最有效之治療方劑以應用於抑制腫瘤轉移或復發；此外將對其控制體內免疫抑制性細胞(Myeloid-derived suppressor cells)及 Treg 細胞之分化與增生活性進行定性分析。

在了解咸豐草、黃花蜜菜及魚腥草等目標中草藥之有效抗腫瘤成份後，本計畫之第二年將依據具體目標一分析結果選定單一品種草藥於不同採及地點進一步比較分析有效成份之含量，利用本所長期建立之化學指紋圖譜分析技術，利用諸如 HPLC (UPLC)、LC-MS、GC-MS 等精密分析儀器（在本中研院 ABRC 所內均設備齊全及運作中），即可測定並定量目標中草藥萃取物中之指標成份（包含文獻報導中證實或評估佔該中草藥組成中最大量或特有成份），經此有機分析以研究品系間的差異與指標成份之關係，使得選出具有高指標成份且品質穩定的中草藥品系加以栽種，供應生技業界使用。

植物新藥藥物臨床前研究，這包括植物性物種，原料及其已知化學成分分析、藥理、毒理、動物藥代動力學等研究。在本計畫在具體目標一，我們進行植物原料確定管控、具體目標二，進行化學成分分析及具體目標三及四在毒理及藥理研究上進行初步的探討，我們相信這些研究結果將對往後之臨床測試提供重要之用要參考依據。整體而言，本計畫著重自草藥的源頭，就開始系統性地以科學化方法加以定義（Define）規劃，進行品種確認、基原鑑定及栽種，品種間有效成份之差異，佐以化學指紋圖譜分析技術和抗發炎生物活性平台測試系統，期望能建立一自挑種、栽種、採收、品管到活性確效的垂直整合系統，促使咸豐草及魚腥草等目標草藥中之有效抗乳腺腫瘤轉移成份，其生產過程最佳化，提供日後本土中草藥研究方法之參考。我們相信以此利基將進行之抗癌研究，能將本土草藥之應用延伸至龐大之癌症治療市場，並帶動相關中草藥之研發市場。而這套中草藥現代化和標準化的種植、生產程序（Standard Operating Procedure）與嫁接臨床相關之活體試驗系統，亦值得好好地去國際上申請多項專利，以保護這個 know-how 和重要的中草藥品種，創造更大經濟價值；從而應用於生技產業，提升臺灣中草藥國際競爭力。

貳、材料與方法

目標一：確認三種臺灣本土常用及可大量栽種之藥用植物（大花咸豐草、魚腥草及黃花蜜菜）的物種來源並進行基原鑑定。

1.1 顯微鏡檢查法：

利用顯微鏡檢查藥草較細微的構造，例如：腺毛、細胞型態或結晶等；以及利用組織切片的方式，檢查及比較組織的構造。

1.2 肉眼觀察法：

利用植物全株與特定的型態及器官，包含花、果實、種子等，與證據標本比對，以初步判別物種。

1.3 以特定(DNA)之核醣體基因 Internal Transcribed Spacer（ITS）進行中草藥之基原鑑定。

取植株葉片 50-100mg 加入液態氮磨碎後，用 Quiagen 公司生產之 DNeasy Plant Mini Kit 進行植物 DNA 萃取。Geniomic DNA 萃取完成後，利用設計在特定核醣體基因保留序列上的引子(primer)進行 PCR 後，使用 Fermentas 公司生產的 pJET1.2/blunt cloning vector 將 PCR 產物構築到載體上後，用 DNA 定序儀得到 ITS 序列。而透過交叉比對此一保留序列之相似度，可以作為有效推測不同植物物種間基原關係之相近程度依據。

目標二：經由上述目標一之基原鑑定結果，優先比較大花咸豐草、魚腥草及黃花蜜菜中含有抗腫瘤細胞生長及腫瘤內發炎活性之分層或植物化合物含量；並利用小鼠活體動物實驗模型，比較分析草藥中特定成份於乳腺腫瘤切除後之抗腫瘤細胞轉移及腫瘤內發炎之效果。

2.1 草藥萃取物製備：

將鮮品或乾品切萃後以酒精或其他有機溶劑萃取以獲得不同萃取液。將不同萃取法所得之萃取液用減壓濃縮機（Rotary Evaporator)及迴轉蒸發瓶增加蒸發面積，於低壓下，在水浴器內旋轉加熱，使溶液快速蒸發濃縮之後，再使用凍乾法（lyophilization）凍乾成粉末保存及使用。

2.2 老鼠原位乳腺腫瘤(4T1 mammary tumor)動物模式評估草藥萃取物之抗腫瘤轉移活性：

選擇六周大小的 BALB/c 為老鼠之品種，並將接種 4T1-luc2 乳癌細胞(5×10^5 細胞在 50 μl PBS 裡)於第五對右邊乳房中，透過將小鼠接種乳

癌細胞 16 天後進行腫瘤切除與傷口縫合手術，手術三天後，將不同本土中草藥萃取物以口服方式(10-100 mg/kg 萃取物在 200 μL 1% tween-80 裡)給予腫瘤切除小鼠，並於手術後每七天利用 IVIS system 以螢光影像技術來測量老鼠體內的冷光酵素(luciferase)活性、每兩天測量老鼠體重，並記錄老鼠存活時間，部分老鼠於連續餵食中草藥萃取物四周後，即被犧牲用以收取被腫瘤轉移之組織及脾臟重量，以及以 IVIS system 測量老鼠全身及胸腔的冷光酵素活性大小；借以比較分析不同草藥成份作用，對乳腺腫瘤細胞於活體內轉移活性之控制能力。。因為在臨床上腫瘤切除仍然是處理原位癌之首要策略，我們相信透過此一實驗模型所提供之實驗數據與研究結果，更能有效地嫁接在將來對乳癌治療及預防轉移之臨床應用上。

2.3 利用老鼠乳腺腫瘤動物模式比對確認，找出中草藥中具有生物活性之分層、特定植物化合物群或單一化合物

2.3.1 利用溶劑分配層析、開放式管柱層析或中壓或高壓液相色層分析技術，配合動物活性模式，分離之生物活性分層。

2.3.2 利用開放式管柱層析或中壓或高壓液相色層分析技術，從生物活性分層分離，並鑑定可能活性植物化合物群，甚至單一化學成分。

2.3.3 以指標成分為分析標的，利用高效液相層析或高效液相層析串聯質譜建立適合草藥萃取物之指標成分最佳化分析條件。

目標三：針對目標二所找出之草藥中具有抗腫瘤細胞轉移活性之分層或植物化合物，我們將進一步利用人類乳癌細胞(MDA-MD-231)於老鼠異種移植模型(xenograft model)中，探討其合併臨床抗癌藥物之抗腫瘤轉移效果；並用小鼠活體動物實驗模型檢測合併使用(combined use)之生物安全影響。

3.1 利用老鼠原位乳腺腫瘤(4T1 mammary tumor)動物模式，評估草藥萃取物於合併臨床抗癌藥物之抗腫瘤轉移活性：

六周大小的 BALB/c 老鼠在接種 4T1-luc2 乳癌細胞(5×10^5 細胞)於乳房後，小鼠亦在接種乳癌細胞 16 天後進行腫瘤切除與傷口縫合手術，手術三天後，將不同本土中草藥萃取物以口服方式(10-100 mg/kg 萃取物溶解在 200 μL 1% tween- 80 裡)給予腫瘤切除小鼠，並於手術後每七天利用 IVIS system 測量老鼠體內的腫瘤冷光酵素/轉移之活性。每兩天測量老鼠體重，並記錄老鼠存活時間，此外部分實驗組之老鼠在口服中草藥萃取物的同時，亦同時給予臨床抗癌藥物(Docetaxel 或 Doxorubicin)

作為 combined use；借以比較分析草藥特定成份輔助臨床用藥之複合效果。

3.2 利用老鼠原位乳腺腫瘤(4T1 mammary tumor)動物模式，評估草藥萃取物於合併臨床抗癌藥物之生物安全性：

利用相同之 4T1 mammary tumor 實驗模型，我們將對魚腥草及大花咸豐草中有效成份在施打後作生物毒性、免疫細胞分化活性及藥物動力學分析。在此試驗中，部分實驗組之老鼠在口服中草藥萃取物的同時，亦同時給予西藥臨床用之抗癌化療物(chemotherapy drugs)，各實驗組中之部分老鼠於連續餵食四周後，即秤重與犧牲以收取血清。所收取之老鼠血清隨後將送往國家動物中心進行 24 項血液生化分析，基礎生化值分析，動物檢體將進行組織切片鏡檢分析及免疫染色分析(癌細胞 marker 檢測)，以了解草藥萃取物於單獨給藥及合併臨床抗癌藥物使用時之生物安全性。

3.3 利用人類乳癌細胞(MDA-MD-231)於老鼠異種移植模型(xenograft model)中，探討其合併臨床抗癌藥物之抗腫瘤轉移效果:

利用近期所建立之人類乳癌細胞 MDA-MB-231-Luc2 之動物實驗系統進行研究。此一活體研究模型是利用疫體移植(Xenograft)的方式將帶有冷光基因(luciferase)的人類乳癌細胞株 MDA-MB-231-Luc2(1×10^5 cells/mice)，植入裸鼠的左側乳腺脂肪墊裡；透過將小鼠接種乳癌細胞 25 天後進行腫瘤切除，此後於手術後每七天利用 IVIS system 測量老鼠體內的冷光酵素(luciferase)活性。每兩天測量老鼠體重，並記錄老鼠存活時間；部分實驗組之老鼠在口服中草藥萃取物的同時，亦同時給予臨床抗癌藥物(Docetaxel 或 Doxorubicin)；借以比較分析不同草藥成份作用，對人類乳癌細胞於活體內轉移活性之控制能力。我們相信，綜合 4T1-Luc2 與 MDA-MB-231-Luc2 二活體實驗系統所獲得之實驗結果，更能有效地指出真正具有抗腫瘤細胞轉移活性成份，同時對往後之臨床測試提供重要之用要參考依據。

目標四：綜合比較及總結上述最佳之合併使用條件(結合與最佳化不同植化物之抗腫瘤細胞轉移效果)，以獲得最有效之治療方劑以應用於抑制腫瘤轉移或復發；此外將對其控制體內免疫抑制性細胞(Myeloid-derived suppressor cells)及 Treg 細胞之分化與增生活性進行定性分析。

4.1 利用基原鑑定結果與成份分析選定草藥品系與最佳化草藥成份之製程

本計畫將依據具體目標一分析之結果選定出單一品種草藥，並於不同採及地點與季節進一步比較分析其有效成份之含量。利用本所長期建立之化學指紋圖譜分析技術，如 HPLC（UPLC）、LC-MS、GC-MS 等精密儀器分析，我們即可測定並定量目標中草藥萃取物中之指標或有效成份（包含文獻報導中證實或評估佔該中草藥組成中最大量或特有之成份），以研究品系間或栽種季節的差異與指標成份間之關係，進而選出具有高指標成份且品質穩定的中草藥品系，而後加以大量栽種；以獲得更多實驗需要之有效成份。

4.2 利用老鼠原位乳腺腫瘤(4T1 mammary tumor)動物模式，確立草藥萃取物與目標二所進一步分離之有效成份(群)之抗腫瘤轉移活性：

利用相同之 4T1 mammary tumor 實驗模型，小鼠在接種乳癌細胞 16 天後進行腫瘤切除與傷口縫合手術，手術三天後，將不同本土中草藥萃取物或進一步分離之有效成份(群)以口服方式(10-100 mg/kg 萃取物在 200 μL 1% tween- 80 裡)給予腫瘤切除小鼠，並於手術後每七天利用 IVIS system 測量老鼠體內的冷光酵素活性。每兩天測量老鼠體重，並記錄老鼠存活時間；借以比較分析不同草藥成份作用，對腫瘤細胞於活體內轉移活性之控制能力。

4.3 評估中草藥萃取物對數項免疫細胞之調控活性。

利用體外分化與培養樹突狀細胞(DC)及骨髓衍生免疫抑制細胞(MDSCs)技術，研究草藥萃取物或特定有效成份之免疫調活性，與其控制 MDSCs 增生或分化之影響。

4.3.1 樹突狀細胞之培養：以細胞激素 GM-CSF 與 IL-4 的方式培養老鼠骨髓細胞 6-7 天，可得到未成熟樹突狀細胞。再利用外加 E. coli 之 LPS 處理 1 天，可以促進為成熟樹突細胞轉變為成熟的樹突細胞。其培養過程中可以加入中草藥萃取液，以評估其對抗原呈現細胞(Antigen Presentation Cell)之分化與活性造成的影響。

4.3.2 細胞激素表現分析：未成熟樹突狀細胞以 3 x 10^6 /3ml 的濃度置於 6-well 的 Plate 中，加入 LPS (1 μg/ml)或加入 LPS 及中草藥萃取物。經過 24 小時的培養後，將上層液離心下來，以測定其淋巴介質製造的量。在取得足夠檢體以前，可將其他檢體先保存在 -70℃，等到檢體足夠時再一起測試。細胞激素的測定是利用 sandwich-ELISA 法，測定樹突狀細胞於不同草藥成份之刺激下所釋放之特定細胞激素(IL-2、IL-12p40、IL-8 及 IL-15)量，並以已

知濃度的細胞激素作為對照。

4.3.3 小鼠於接種乳癌細胞 21 天後切除腫瘤並在切除腫瘤 21 天後犧牲試驗小鼠，以流式細胞儀搭配 anti-CD11b 及 anti-Ly6G 抗體標定血液及脾臟中之顆粒球性骨髓衍生免疫抑制細胞族群(granulocytic MDSCs)比例。另一方面，骨髓(Bone marrow)細胞於體外分別加入細胞激素 GM-CSF (20 ng/ml)並與不同濃度的 BP-E 共同培養 5 天後，以流式細胞儀搭配 anti-CD11b，anti-Ly6C 及 anti-Ly6G 抗體測定與比較各實驗組之 MDSC 量，此外使用 anti-CD25 及 anti-Foxp3 抗體測定與比較各實驗組之 Treg 細胞量。另外，以西方墨點法(Western blot)測量細胞表現 G-CSF 受體表現量；以比較不同草藥成份之刺激對於 MDSCs 增生或分化之影響。

4.3.4 以 anti-Gr-1 microbeads 分離出小鼠脾臟骨髓所含有之 MDSCs，再與草藥萃取物或特定有效成份共同培養 24 小時後，加入 10 μM ROS 偵測劑(H2DCFDA)放置於 37 度 30 分鐘，以流式細胞儀偵測表現 ROS (reactive oxygen species)細胞的平均表現強度(MFI)；以比較不同草藥成份之刺激對於 granulocytic MDSCs 內 ROS 活性之抑制效果。

參、結果

本計畫乃藉由機原鑑定及先進動物實驗模式等研究，，來有效探討臺灣本土常用中草藥在物種來源、活性指標成份及控制乳腺腫瘤細胞轉移與復發之活性。藉此提升本土中草藥之應用價值。為此目的，本計畫特別選擇大花咸豐草(Bidens pilosa L.)，魚腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)與黃花蜜菜(*Wedelia chinensis*)三種臺灣民間常用且實惠之中草藥，作為研究對象，其研究結果依序加以說明：

一、物種來源及基原鑑定

在臺灣本土常用藥用植物基原鑑定工作上，我們與中研院生物多樣性研究中心彭鏡毅研究員合作，從而有效進行了品種確認、基原鑑定及生態環境之需求。鑑定方法包括肉眼觀察（macroscopic identification）、鏡檢（解剖及顯微鏡併用）及分子基原鑑定檢測三種。

(一)外觀型態觀察：

1. 黃花蜜菜

先前調查顯示，黃花蜜菜(蟛蜞菊)在臺灣有四個品種和兩個變種（表 1）（彭，1998 年）。本計畫我們採集來自地區臺灣北部和中南部縣市之蟛蜞菊並觀察其外觀，我們根據張永仁先生所出版的野花圖鑑所提供之例圖與描述(圖 1)，做了比較觀察，而後與中研院臺灣本土植物標本資料庫所收藏的標本(館號：20085；1992/4/22；採集地點：臺灣台北縣貢寮鄉)進行了觀察及標本比對，在中研院生物多樣性研究中心指導下，由中研院農生中心進行鑑種。在樣本確認無誤後，我們已可進行後續研究。結果顯示這些蟛蜞菊品種在外觀形態（圖 2A）類似；所有皆有承擔的黃色花朵（圖 2B）。舌狀花的數量各不相同：*W. trilobata* 有 8～14; *W. chinensis* 及 *W. biflora* 有 8～12；*W. prostrata* 及 *W. prostrata* var. *robusta* 有 8 個；*W. biflora* var. *ryukyuensis* 有 13 to 15。*W. chinensis* 及 *W. trilobata* 的子房具有杯狀的冠毛。*W. biflora, W. prostrata, W. prostrata* var. *robusta* 及 *W. biflora* var. *ryukyuensis* 則不具有冠毛或已退化成一個或兩個刷毛（圖 2B，（b）及（c）項）。*W. chinensis* 及 *W. trilobata* 子房的形狀相似而 *W. biflora, W. prostrata, W. biflora* var. *ryukyuensis* 及 *W. prostrata* var. *robusta* 有顯著相似形狀的子房

（圖 2B，（b）及（c））。*W. biflora, W. prostrata, W. biflora* var. *ryukyuensis* 及 *W. prostrata* var. *robusta* 的莖呈現深角結構與糙伏毛（圖 2C）。與此相反，*W. trilobata* 的莖的形狀是短柔毛的多邊形或圓形，*W. chinensis* 則呈現圓形並具有貼伏柔毛（圖 2C）。*W. chinensis* 的葉是線狀橢圓形並具有貼伏的柔毛; *W. trilobata* 的葉是三葉形有短柔毛的毛；*W. biflora* 及 *W. biflora* var. *ryukyuensis* 的葉是卵狀披針形與貼伏糙伏毛；*W. prostrata* 是長橢圓形密密麻麻的糙伏毛的毛；*W. prostrata* var. *robusta* 是卵形有貼伏糙伏毛（圖 2D＆E）。

2. 魚腥草

魚腥草為三白草科 (Saururaceae)蕺菜屬(Houttuynia)的植物，學名為 *Houttuynia cordata*，別名為毛管菜，臭菜，臭輯，狗腥草，為多年生草本植物，分佈範圍廣泛，在臺灣、日本及東南亞各國均有分佈，常見於於溝邊、溪邊及潮濕的疏林下，我們自臺灣北部地區採集得魚腥草，並利用葉片、花朵外觀做品種確認。我們根據張碧員等人所出版的臺灣野花 365 天所提供之例圖與描述(圖 3)，做了比較觀察，而與中研院臺灣本土植物標本資料庫所收藏的標本(館號: 46018; 1992/8/10; 採集地點：台北縣坪林鄉)進行了觀察及標本比對，在中研院生物多樣性研究中心指導下，由中研院農生中心進行鑑種。在樣本確認無誤後，進行後續研究。肉眼觀察結果與圖鑑所描述葉片形態相似，如(圖 4)所示，其葉片為葉互生，薄紙質，有腺點，背面尤甚；托葉膜質，條形下部與葉柄合生為葉鞘，基部擴大，略抱莖；葉片卵形或闊卵形，先端短漸尖，基部心形，全緣，上面綠色，背面常呈紫紅色，兩面脈上被柔毛，掌狀葉脈 5 至 7 條。

3. 大花咸豐草

臺灣總共有六種鬼針屬的物種，包括鬼針（*Bidens bipinnata* L.）、鬼針舅（*Bidens biternata*）、小白花鬼針（*Bidens pilosa* L. var. *minor*）、白花鬼針（*Bidens pilosa* L. var. *pilosa* L.）、大花咸豐草（*Bidens pilosa* L. var. *radlata* Sch. Bip.）及狼把草（*Bidens tripartita*）。大花咸豐草原為外來品種，因繁衍力強，它目前廣泛分佈於臺灣各地。其餘鬼針屬的物種則不易發現採集。我們

自新北市三芝地區及台北市中央研究院採集之大花咸豐草，我們根據張碧員等人所出版的臺灣野花 365 天所提供之例圖與描述(圖 5)，做了比較觀察，而與中研院臺灣本土植物標本資料庫所收藏的標本(館號: 18739; 1991/10/7; 採集地點：台北市南港)進行了觀察及標本比對，在中研院生物多樣性研究中心指導下，由中研院農生中心進行鑑種。在樣本確認無誤後，進行後續研究。結果顯示其外部型態皆皆相似，如(圖 6)所示，葉具長 1.5~5 公分無翅的柄，三出，小葉 3 枚，兩側小葉橢圓形或卵狀橢圓形，長 2~4.5 公分，寬 1.5~2.5 公分，先端銳尖，基部近圓形或闊楔形，有時偏斜，不對稱，具短柄，邊緣有鋸齒。

(二)組織切片鏡檢分析：

1. 黃花蜜菜

W. chinensis 莖的橫向組織截面為圓形的輪廓，*W. trilobata* 幾乎是多邊形的維管束交叉連接而 *W. biflora, W. prostrata, W. prostrata* var. *robusta* 及 *W. biflora* var. *ryukyuensis* 則是十字形的（圖 7A）。*W. chinensis* 及 *W. trilobata* 葉子的橫截面是非常相似的並且它們的葉子通常比其它物種的厚度薄。*Wedelia trilobata* 通常具有在中脈多種維管束而其它品系則具有單個維管束（圖 7B 和 7C）。*W. trilabata* 具有三葉形葉片；*W. chinensis* 的海綿和柵欄組織的安排類似於 *W. trilobata*；*W. biflorar* 接近於 *W. biflora* var. *ryukyuensis* 而 *W. prostrata* 則接近於 *W. prostrata* var. *robusta*（圖 7B 和 7C）。

2. 魚腥草

我們將魚腥草在莖部橫切的組織切片(圖 8)與文獻上之組織切片圖(圖 9)比較，結果顯示，魚腥草莖部在外部呈六角形，可明顯區分出表皮層、韌皮纖維、皮層、篩部、髓部等部位，其皮層是由 1 層類方形細胞組成，並且髓部呈類圓形，由大型柔細胞組成，佔據大約 2/3 的橫切面之面積；在維管束型態上，維管束周邊被纖維組織包圍，形成層可以分化形成少數木質部和韌皮部細胞。

3. 大花咸豐草

大花咸豐草在莖部橫切的組織切片(圖 10)與文獻上之組織切片圖(圖 11)比較，結果顯示，大花咸豐草莖外部呈四方形，

可明顯區分出表皮層、韌皮纖維、皮層、篩部、髓部等部位，髓部呈類圓形，由大型柔細胞組成；內皮層由 2-3 層薄壁細胞所組成，與內皮層相連的是澱粉鞘組織。

(三)分子基原鑑定檢測：

在 DNA 分子序列分析上，我們採用目前植物及中草藥鑑定研究中最常被廣泛使用的核醣體核酸基因(rDNA)序列包括 18S、5.8S、2.8S 基因及兩個內轉錄區(ITS1 及 ITS2)的 DNA 序列作為鑑定中草藥分子親緣演化的標的。由於植物體內核醣體(ribosome)核酸基因可高達數百套不等的序列，因此為了確認中草藥植物體內之主要的核醣體核酸基因(rDNA)序列，我們設計了一組廣泛性的 PCR 因子，以 PCR 方式盡可能將所有的核醣體核酸基因放大並將 PCR 產物構築到載體上後，再使用 DNA 定序儀得到了植物體內不同的核醣體核酸基因序列。

1. 黃花蜜菜(蟛蜞菊)

我們選定的蟛蜞菊品系內轉錄間隔區分析（ITS）區域，以介於 637 和 646 鹼基對(表 2)的長度進行測定。*W. biflora* ITS 序列（accession number JF934953），*W. biflora* var. *ryukyuensis*（accession number JF430396）和 *W. prostrata* var. *robusta*（accession number JF430395）已提交到 GenBank。和 *W. chinensis*, *W. trilobata* 及 *W. prostrate* 的 ITS 序列相同於先前提交於 GenBANK 序列 AY303442（*W. trilobata*），AY947415（*W. chinensis*）和 AY947412（W. prostrate）（表 2）。ITS 中的所有種類的 GC 含量測定為在 ITS1 約 53.2%，在 5.8S 約 53.4%，而在 ITS2 有 57.5%。我們發現 124 個變異位點在 ITS 區域，其中 76 個變異位點是在 ITS1 發現，在 5.8S 和 ITS243(圖 12A）5。最小的遺傳演化距離(0.002)是在 *W. biflora* 及 *W. biflora* var. *ryukyuensis* 之間而最大遺傳演化距離(0.161)是在 *W. prostrata* 及 *W. trilobata* 之間。根據鄰接樹分析，我們選定的蟛蜞菊品系可以分為兩個分支：一支是由 *W. prostrata, W. biflora, W. prostrata* var. *robusta* 及 *W. biflora* var. *ryukyuensis* 所組成。另一支是由 *W. chinensis* 及 *W. trilobata*（圖 12B）組成。

2. 魚腥草

魚腥草之核醣體(ribosome)之核酸基因 Internal Transcribed

Spacer (ITS)序列分析(圖 13)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的 5 組 DNA 序列，並將其排序後，可以觀察到所有 ITS 序列皆完全相同(以序列 9-1 為代表)，並以此 DNA 序列作為魚腥草核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與 NCBI 基因庫中的 *Houttuynia cordata* (accession number AY227048.1) 之內轉錄區序列，相似性可達 99%。

3. 大花咸豐草

大花咸豐草之核醣體(ribosome)之核酸基因 Internal Transcribed Spacer (ITS)序列分析(圖 14)結果顯示，在比較分析同生物樣品所增殖出的 2 組 DNA 序列，並將其排序後，可以觀察到所有 ITS 序列皆完全相同(以序列 2 為代表)，並以此 DNA 序列作為魚腥草核醣體核酸基因序列的代表。與最相似序列比較，結果顯示與 NCBI 基因庫中的 *Bidens pilosa* var. radiata voucher PS0593MT01 (accession number FJ980316)之內轉錄區序列，相似性可達 99%。

二、生物活性/功效測試

多種臺灣本土常用中草藥，曾經被民間宣稱或在部分研究報告指出含抗癌的功效。本計畫的目的之一，係從生物活性/功效性(Bio-activity/ Functional activity)測試平台及實證醫學健康上之“功能”分析基礎上，利用動物體進一步地驗證這些中草藥之抗腫瘤作用，並且深入探討其免疫反應的分子機制進而提升本土中草藥之應用價值。

(一)草藥萃取物製備：

將黃花蜜菜、魚腥草及大花咸豐草乾品以酒精萃泡製以獲得酒精萃取液。將三種草藥酒精萃取液用減壓濃縮機(Rotary Evaporator)及迴轉蒸發瓶增加蒸發面積，於低壓下，在水浴器內旋轉加熱，使溶液快速蒸發濃縮之後，再使用凍乾法（lyophilization）凍乾成粉末保存及使用。黃花蜜菜、魚腥草及大花咸豐草酒精萃取物英文代號分別 WCE，BPE 及 HCE。

(二)中草藥萃取物抗腫瘤活性之測試

近年來，許多研究顯示發炎在腫瘤生成及轉移扮演一非常重要的角色，許多研究結果顯示許多具有抗發炎活性的植物化合物在動物腫瘤模式中也具有抗腫瘤的活性。因此我們藉由一乳癌切除動物模型中來評估中草藥萃取物之抗腫瘤轉移活性。

1. 乳腺腫瘤動物模型之建立

將帶有冷光基因(luciferase)的老鼠乳腺腫瘤細胞4T1-Luc2 (5×10^5)植入BALB/c老鼠的第五對左側乳腺脂房墊裡，7天後則以活体即時冷光影像檢測系統非侵入方式偵測乳癌細胞生長情形，並以冷光強度作為量化腫瘤大小之依據。們將老鼠於接種乳癌細胞21天後，在手術切除腫瘤並加以縫合。腫瘤切除後，我們以活体即時冷光影像檢測系統非侵入方式偵測腫瘤轉移情形，並開始餵食中草藥酒精萃取物。

2. 中草藥萃取物在乳癌切除動物模型中的抗腫瘤轉移活性

我們將老鼠於接種乳癌細胞21天後，在切除腫瘤手術後，開始個別每天餵食老鼠黃花蜜菜(WCE)、魚腥草(HCE)及大花咸豐草(BPE)酒精萃取物(100 mg/kg/day)。(圖15)結果顯示，與實驗對照組相比，黃花蜜菜及大花咸豐草酒精萃取物(WCE及BPE)可顯著抑制腫瘤轉移(圖15A&B)。在腫瘤切除後的21天，實驗對照組轉移率高達80%，而BPE及WCE組可分別降至25%及40%。在老鼠存活率上，(圖15B)顯示，腫瘤切除後49天，實驗對照組老鼠存活率已降至37.5%，口服BPE及WCE的老鼠存活率仍可維持在87.5%及60%，此結果顯示大花咸豐草及黃花蜜菜酒精萃取物皆具有有效抑制老鼠乳腺腫瘤的活性。在魚腥草酒精萃取物(HCE)抗腫瘤轉移活性測試上，(圖16)結果顯示，口服HCE，老鼠在腫瘤轉移率及老鼠存活率皆與對照組相當類似，顯示老鼠美日口服HCE (100 mg/kg)劑量無法顯著抑制腫瘤轉移。故我們進一步將HCE細分為P1到P4個分層，我們進一步實驗結果顯示P1及P2具有部分抑制腫瘤轉移的活性(圖16A&B)，顯示魚腥草酒精萃取物仍具有抗乳腺腫瘤轉移的活性成分分子。我們在完成老鼠黃花蜜菜(WCE)、魚腥草(HCE)及大花咸豐草(BPE)酒精萃取物之抗腫瘤轉移初步活性測試後，考量其抗腫瘤轉移在程度上有差異，未來我們將優先進一步評估大花咸豐草(BPE)及黃花蜜菜(WCE)酒精萃取物之抗腫瘤轉移活性成分分析及後續抗腫瘤轉移相關研究工作。

肆、討論

一、物種來源及基原鑑定

本計畫中草藥植株採集自北部地區及部分中南部地區，採集過程中，我們根據已出版的圖鑑進行比對，之後再與中研院臺灣本土植物標本資料庫所收藏的標本進行標本比對。在樣本確認無誤後，進行莖部組織切片及ITS 序列比對。我們所選取的三種臺灣本土草藥，在外觀型態上皆可明確的與他種相似植物區別。在莖部切片上，各植物莖部組織皆呈現其特有構造。而在 ITS 序列分析上，我們採集的黃花蜜菜、魚腥草及大花咸豐草樣本與NCBI 基因庫之最相近物種的序列相似度皆可高達達 99%以上。因此，綜合中草藥植株外部形態觀察、組織切片鏡檢及核醣體核酸序列分析結果顯示，本研究所採集的中草藥植株樣本皆為正確之物種。

二、中草藥萃取物抗腫瘤活性分析

老鼠4T1乳腺腫瘤細胞在西方醫學研究上，被認為是非常惡性及具高度轉移率之腫瘤細胞，因此，老鼠4T1乳腺腫瘤細胞及動物模式乃適合及廣泛被用於研究腫瘤轉移等相關實驗。在評估中草藥萃取物對老鼠乳腺腫瘤切除動物模型之抗腫瘤轉移活性上，我們實驗結果顯示出，大花咸豐草酒精萃取物(BPE)、黃花蜜菜酒精萃取物(WCE)皆具有效抑制原位腫瘤的生長的活性。在老鼠乳腺腫瘤(4T1)動物模式中，我們觀察到原位腫瘤生長的大小與脾臟的腫脹程度及腫瘤細胞轉移的發生率有正向的關聯。我們亦觀察到帶有CD11b或Ly6G標記的骨髓抑制細胞族群在脾臟的數量亦與腫瘤生成大小及腫瘤接種的天數成正相關。此一現象亦在前人研究結果中得到類似之證實。我們後續實驗結果顯示大花咸豐草酒精萃取物(BPE)及黃花蜜菜酒精萃取物(WCE)骨髓衍生抑制細胞在脾臟的蓄積,這些結果說明大花咸豐草酒精萃取物可以有效抑制老鼠乳腺腫瘤的轉移可能是藉由抑制骨髓衍生抑制細胞族群有所有關。因此，大花咸豐草酒精萃取物(BPE)、黃花蜜菜酒精萃取物(WCE)抗乳腺腫瘤轉移活性之研究室值得進一步加以研究。

伍、結論與建議

承蒙行政院衛福部中醫藥司核定本研究計畫，在本研究計畫核定後，我們即按照本計畫所擬定之研究目標及實驗規劃進行各項實驗。我們研究進度符合計畫所設定之本年度研究目標，我們亦獲得很好的研究成果。我們研究成果在基原鑑定上，我們完成魚腥草、黃花蜜菜、大花咸豐草之外部形態觀察、鏡檢及核醣核酸序列的分析工作。在評估中草藥萃取物在乳腺腫瘤切除動物模型中的抗腫瘤轉移活性研究上，我們完成大花咸豐草酒精萃取物、黃花蜜菜酒精萃取物及魚腥草酒精萃取物抗腫瘤轉移的研究。我們接下來將釐清具抗腫瘤轉移活性之中草藥萃取物之成分及其作用機制。我們相信本計畫所建立之方法及研究成果將有助於臺灣本土常用或傳統中草藥在抗腫瘤轉移活性之現代化研究及開發臺灣本土常用中草藥未來潛在之應用價值。本計畫在抗腫瘤轉移研究所獲得的成果，我們相信將可在一年後發表於國際高質量(eg., IF> 4)之相關研究期刊。目前我們除了進行後續的研究工作外，我們也正積極同時準備專利申請及研究期刊之發表。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW103-CMAP-M-114-112424 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. Yuan, R. & Lin, Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacology & therapeutics* 86, 191-198 (2000).
2. Galloway, J.A. Everyday food may contain hidden health benefits. *Wadison State Journal,* (1998).
3. Gorman, C. Power sprouts: they're even better than broccoli at fighting cancer. *Time* (1997).
4. 柯逢年. Veregen®成功案例分析與植物新藥研發策略. *RegMed* 2, 1-9 (2010).
5. Huang, Y.T.*, et al.* Dietary uptake of Wedelia chinensis extract attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *PloS one* 8, e64152 (2013).
6. Chang, C.L.*, et al.* The distinct effects of a butanol fraction of Bidens pilosa plant extract on the development of Th1-mediated diabetes and Th2-mediated airway inflammation in mice. *Journal of biomedical science* 12, 79-89 (2005).
7. Chang, S.L.*, et al.* Polyacetylenic compounds and butanol fraction from Bidens pilosa can modulate the differentiation of helper T cells and prevent autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Planta medica* 70, 1045-1051 (2004).
8. Chang, C.L.*, et al.* Cytopiloyne, a polyacetylenic glucoside, prevents type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology* 178, 6984-6993 (2007).
9. Pereira, R.L., Ibrahim, T., Lucchetti, L., da Silva, A.J. & Goncalves de Moraes, V.L. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from Bidens pilosa L. *Immunopharmacology* 43, 31-37 (1999).
10. Kumari, P.*, et al.* A promising anticancer and antimalarial component from the leaves of Bidens pilosa. *Planta medica* 75, 59-61 (2009).
11. Kviecinski, M.R.*, et al.* Study of the antitumor potential of Bidens pilosa (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of ethnopharmacology* 117, 69-75 (2008).

12. 黃增泉. 臺灣植物誌第二版 (Flora of Taiwan, 2nd edition). *行政院國家科學委員會*, 1993-2003.
13. Chien, S.C.*, et al.* Anti-diabetic properties of three common Bidens pilosa variants in Taiwan. *Phytochemistry* 70, 1246-1254 (2009).
14. Chang, J.S.*, et al.* Antileukemic activity of Bidens pilosa L. var. minor (Blume) Sherff and Houttuynia cordata Thunb. *The American journal of Chinese medicine* 29, 303-312 (2001).
15. Zhou, N.N.*, et al.* Houttuyninum, an active constituent of Chinese herbal medicine, inhibits phosphorylation of HER2/neu receptor tyrosine kinase and the tumor growth of HER2/neu-overexpressing cancer cells. *Life sciences* 90, 770-775 (2012).
16. Li, W., Zhou, P., Zhang, Y. & He, L. Houttuynia cordata, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Journal of ethnopharmacology* 133, 922-927 (2011).
17. 胡澤寬, 張韋琮 & 蕭振杰. 藥用植物(魚腥草)之遺傳多樣性 *國際藥用植物產業發展研討會專刊* 115-135 (2004).
18. Tsai, C.H.*, et al.* Herbal extract of Wedelia chinensis attenuates androgen receptor activity and orthotopic growth of prostate cancer in nude mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 5435-5444 (2009).
19. Wang, B.-S., Chen, J.-H., Liang, Y.-C. & Duh, P.-D. Effects of Welsh onion on oxidation of low-density lipoprotein and nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. *Food Chemistry* 91, 147-155 (2005).
20. Wang, B.S., Huang, G.J., Lu, Y.H. & Chang, L.W. Anti-inflammatory effects of an aqueous extract of Welsh onion green leaves in mice. *Food Chem* 138, 751-756 (2013).
21. Arulselvan, P.*, et al.* Dietary administration of scallion extract effectively inhibits colorectal tumor growth: cellular and molecular mechanisms in mice. *PloS one* 7, e44658 (2012).
22. Wang, C.Y.*, et al.* Genomics and proteomics of immune modulatory effects of a butanol fraction of echinacea purpurea in human dendritic cells. *BMC Genomics* 9, 479 (2008).
23. Yin, S.Y.*, et al.* Stimulatory effect of Echinacea purpurea extract on the

trafficking activity of mouse dendritic cells: revealed by genomic and proteomic analyses. *BMC Genomics* 11, 612 (2010).

24. Chiu, S.C.*, et al.* Differential functional genomic effects of anti-inflammatory phytocompounds on immune signaling. *BMC genomics* 11, 513 (2010).
25. Su, P.F.*, et al.* Dioscorea phytocompounds enhance murine splenocyte proliferation ex vivo and improve regeneration of bone marrow cells in vivo. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2011, 731308 (2011).

柒、圖、表



圖 1、野花圖鑑所提供蟛蜞菊之例圖

Fig. 1



圖 2、臺灣蟛蜞菊品系之外部型態



蕺菜

花萼也無花瓣。花雖然不耀眼，但種子卻出奇的多，成熟時便四處彈放；而它的根莖還會在地下四處蔓延，生根長葉。由此可想而知爲何野外的蕺菜那麼多了。

春末之後是花期，盛夏至秋它向來枝葉繁茂，未知蕺菜的清涼退火味者，不妨嚐食一次。

蕺菜全身都有魚腥味，摘片葉輕揉一下便腥臭難聞。然而生鮮的蕺菜雖臭，水煮後卻反倒鮮美可口。民間有人愛在夏季用它來煮水飲用以解暑熱，可見其功效與甘美。

蕺菜開的是一串肉穗花序，那白白的4片是瓣狀總苞，它眞正的花既無

花穗上的每一朵花不具有花瓣

雄蕊 雌蕊 花穗 總苞片

蕺菜

科別：三白草科
學名：*Houttuynia cordata*
英名：pig thigh
別名：臭腥草、魚腥草
類型：多年生草本
植株大小：約15～30cm高
生育環境：低海拔林緣路旁潮濕處，群體生長
花期：5～7月
莖與葉片
莖的特徵：略帶紅紫色
葉的特徵：闊卵狀心形，葉柄多為紅色

花朵
著生位置：頂生，穗狀花序
苞片：總苞片4枚，白色倒卵形
類型：雌雄同株
大小：花穗1～3cm長
顏色：花淺黃色，瓣狀苞片白色
花莖：總花梗長2～3cm，小花無柄
花被：無花被
雄蕊：花藥淺黃色，雄蕊3枚
子房：3裂
果實
型態：蒴果，球形
種子：細小

5月11日 春

台灣野花365天 春夏篇

109

圖 3、臺灣野花 365 天所提供魚腥草之例圖

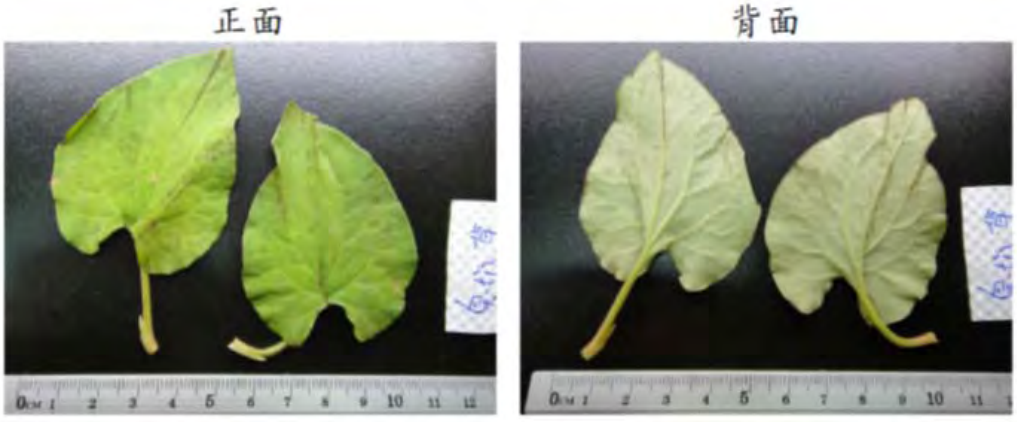


圖 4、魚腥草葉部之外部型態



大花咸豐草

大花咸豐草的瘦果（俗稱鬼針）上方有3條具逆刺的宿存萼片，非常容易附著在人畜身上。

還算容易區分。當初蜂農將大花咸豐草從琉球引入台灣，便是看上它四季開花，花粉產量大，可供蜜蜂採集利用。結果，強悍的繁衍力和設計精巧的種子傳播方式，使得大花咸豐草成爲平地、路邊野生植物的優勢族群，不妨仔細將它的瘦果（俗稱鬼針）上的倒鉤刺與野棉花（請見38頁）的傘狀倒鉤比較一下，看看究竟誰比較厲害。

大概很少人不認識大花咸豐草這種植物，特別是它那厲害無比的果實，只要一沾上身，總要花費許多工夫才能清理乾淨，無怪乎讓人又敬又怕的。

大花咸豐草與咸豐草（請見前頁）非常相似，只不過植株粗壯許多，頭狀花也大得多，而且大花咸豐草只分佈在平地至低海拔的平野，所以兩者

大花咸豐草
科別：菊科
學名：*Bidens alba*
英名：big bidens
別名：大白花鬼針
類型：一年生草本
植株大小：高130cm
生育環境：平地至低海拔草地、路旁、平原
莖與葉片
莖的特徵：莖直立，近方形，上部有稀疏褐毛，多分枝，具縱稜
葉的特徵：對生，2回羽狀裂，有3～11片小葉，葉柄長，小葉卵形或卵狀披針形
花朵
著生位置：腋生或頂生，呈繖房狀排列
苞片：7～8片
類型：雌雄同株
大小：徑3cm（頭狀花）
顏色：白色，中央黃色
花莖：3～10cm
花被：外圍舌狀花5～8枚，卵狀披針形，先端淺3裂；中央管狀花多數，5裂，裂片三角形
柱頭：2歧
果實
型態：瘦果，披針形，多數，4稜，有3～4個具逆刺的宿存萼片
種子：多數

冬 12月2日

台灣野花365天 秋冬篇

103

圖 5、臺灣野花 365 天所提供大花咸豐草之圖例

正面　　背面

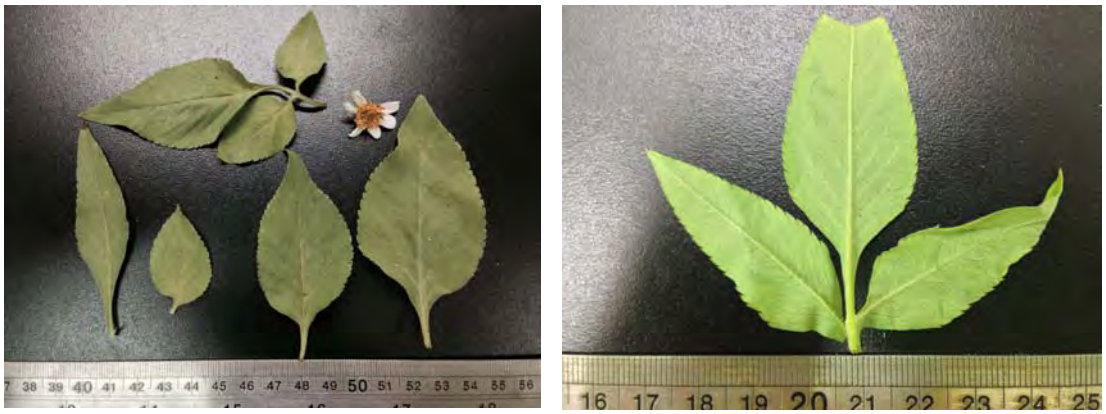


圖 6、大花咸豐草葉部之外部型態

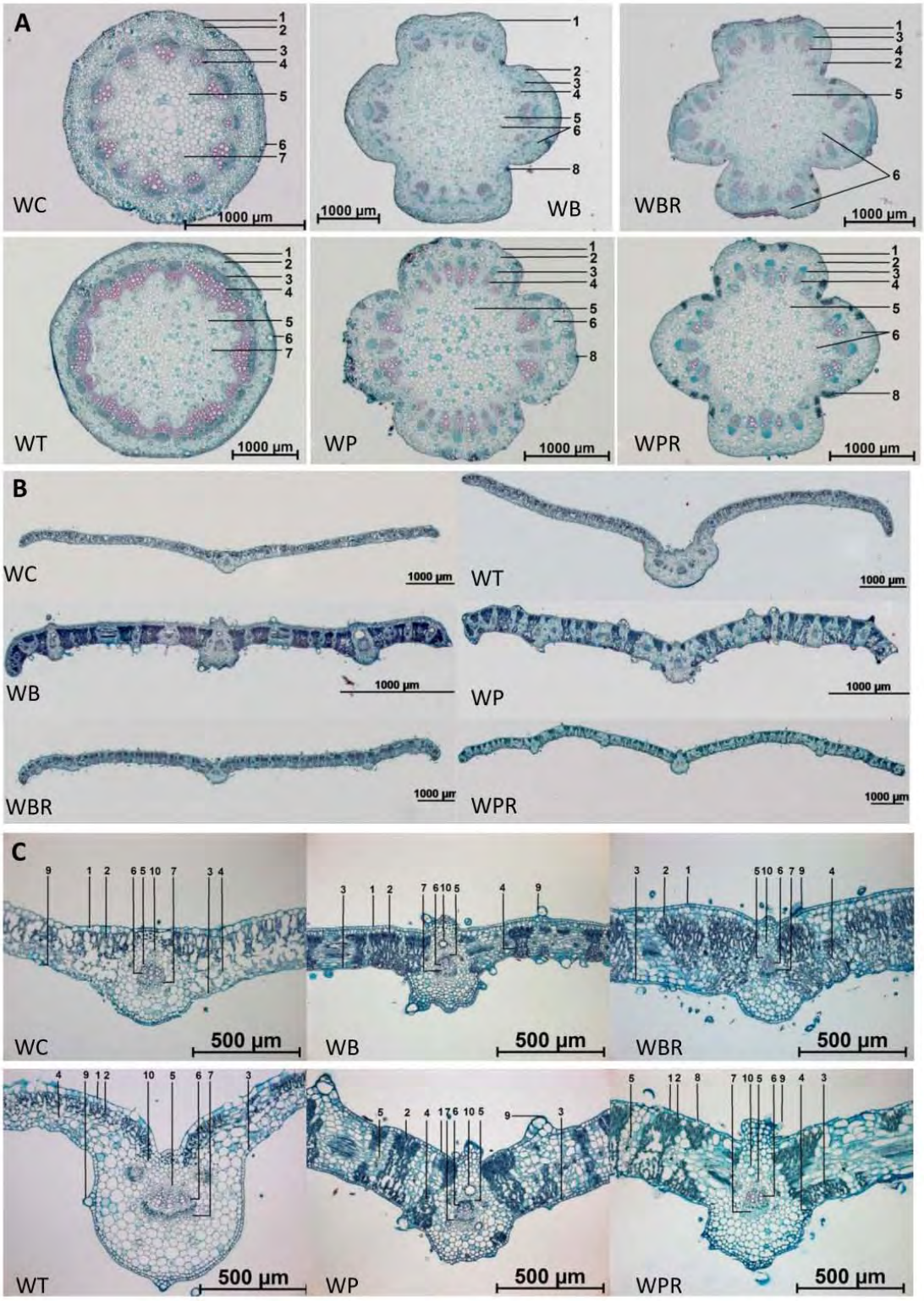


圖 7、黃花蜜菜品系組織切片圖

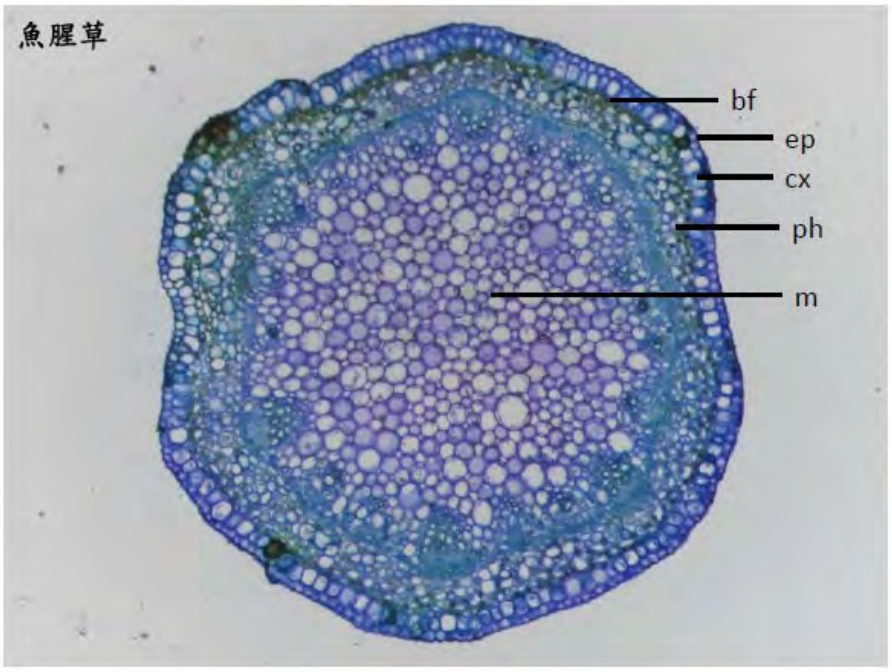


圖 8、魚腥草莖組織切片圖

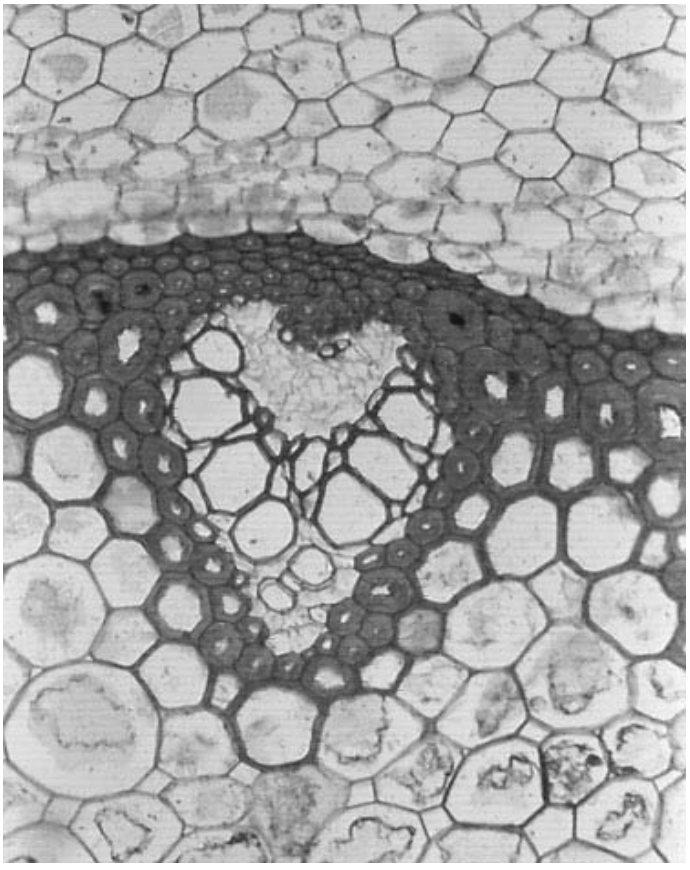


圖 9、文獻上魚腥草莖組織切片圖

(http://www.sherwincarlquist.com/primitive-dicot-woods.html)

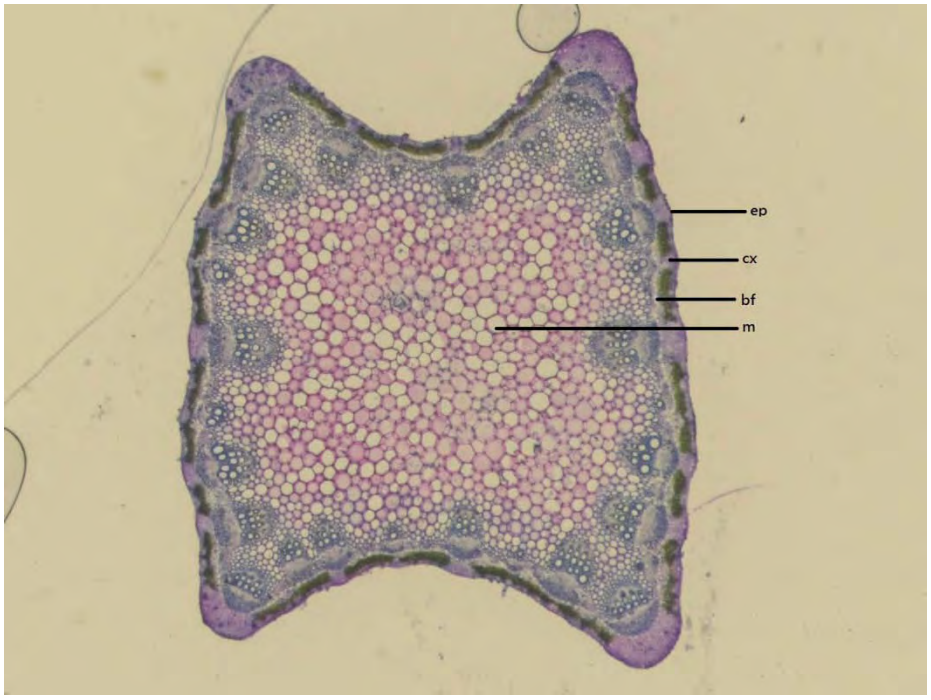
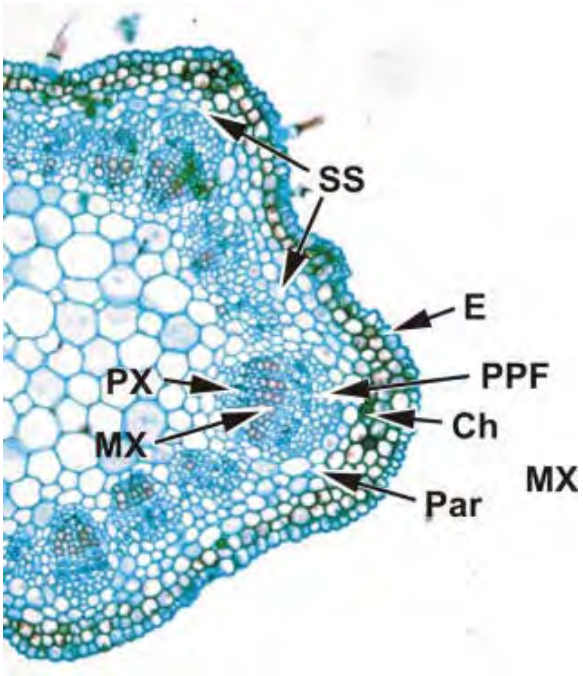


圖 10、大花咸豐草莖組織切片圖



PAR =實質，SS=澱粉鞘，PPF=初生韌皮纖維，PX=原生木質部，MX=後生木質部，CH =葉綠體，E =表皮

圖 11、文獻上大花咸豐草莖組織切片圖

(http://virtualplant.ru.ac.za/Main/ANATOMY/anatpr1bidensy.htm)

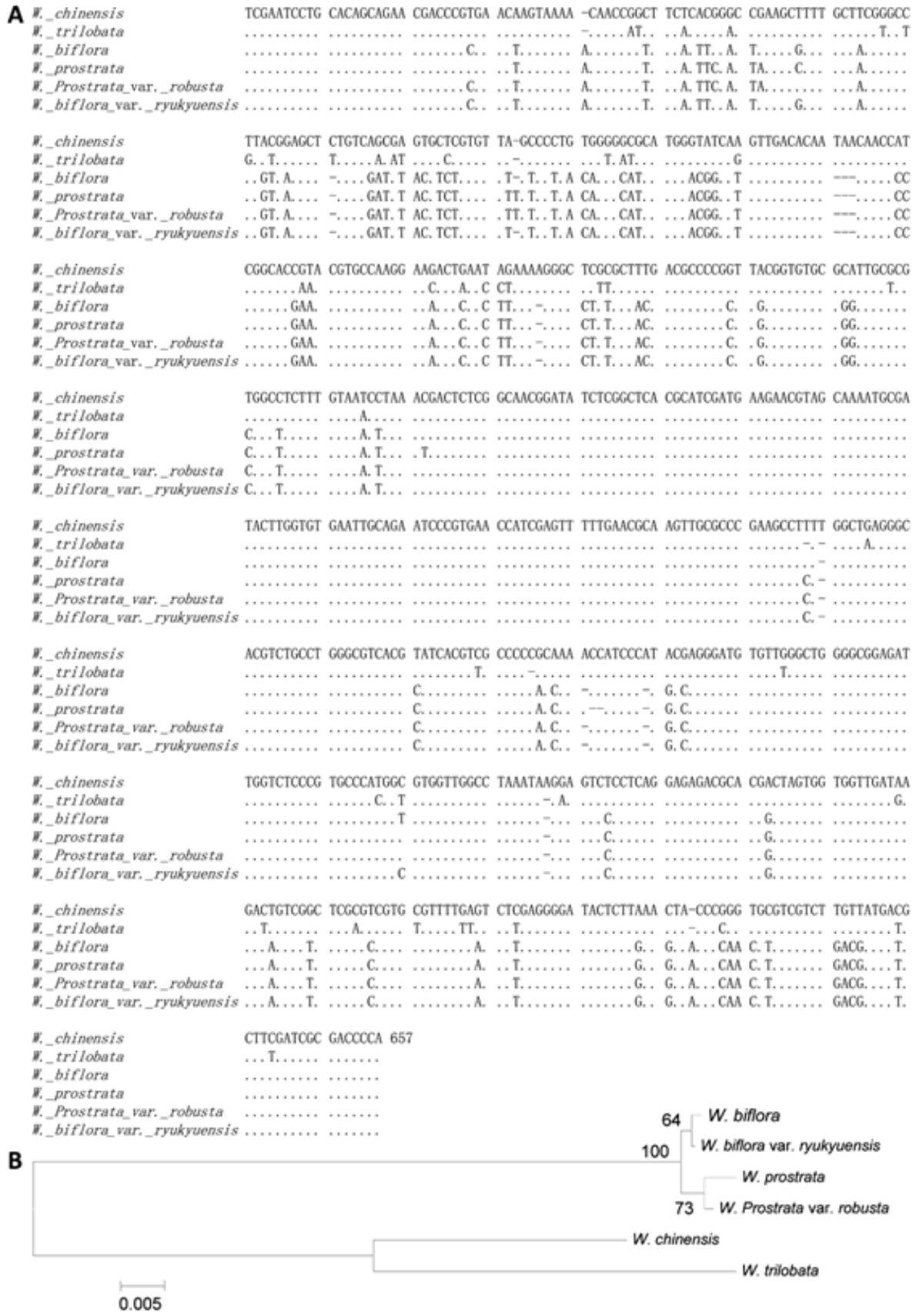


圖 12、蟛蜞菊序列分析及親緣演化圖

1	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
5	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
4	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
2	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
3	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTACCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAA
	**********

序列9-1

TGTTCGGATCGCGGCGACGTGGGCGGTTCGCTGCCGGCGACGTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCAT
TTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGATGCGTA
CCAAAACAAGATCGACCGAAGCGAACATGTGACCCCTTGTTCTTTGCTTTCGTGCGAGGATTGCCGTCTCG
GTGGCTCTCCGAGCGCGTCGGGCACCAACGAACAAAATCCCGGTGCAGTCCGCGCCAAGGAATTTTCTTA
ATTGATTGTGGCGGTCTCGTCGCCCGTTTGCGCCTCGTGCGTCGGCGGGTGCGAGTTGGCGCATCAAACT
ATAATGTCAATACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCG
ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTTT
AGGTTGAGGGCACATCTGCTTGGGCGTCAAACATCACGTCGCTCCCCACACCACTGCCCAACGGGCAGAC
AAGGATGGGTTTGCGGAGATTGGCCGTCCGAGTGCCTCGAGCACGCGGTTGGCTGAAAAGCTCTGGCCTT
TGGTTGCATGCGGCTCAACAAGTGGTGGTTGTGGGCTCTCTTGGGCCGCGATTGTCGGGATGTTGTGTCG
TGCTTTGCCCGTGTTGGCCAGCGAGGACCCTATTCGATCGGCCTCCGCACTCCGGAGGCACGAATCAGATT
GCGACCCCAAGTCAGGTGGGATCACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCG

圖 13、魚腥草 ITS 序列分析圖

序列 2

CAGTATTTTTTTCTCGCTTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGATCGAAGCATCG
TCACAGGACAACACAAGTGGGTTTAAAAGGAGTCAAGCCCGCATGAAACGAACGCACGACACGATACGACAGTCTTATCA
ACCACCACTAGTCGTGCGTCACTCATGAGGGGACTTCTATTTAGGCCAACCGTGCCATGGCACAGGAGACCAATCTCCGC
CCCACACCAAGTCCCTTGAAGGGATGGATGGTGGGGGCGACGTGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCAGA
AGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAAACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATTGCATTTTGCTA
CGTTCTTCATCGATGCGTGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTAGGGTTACAAAGAGGCCACGTGCAACACGCT
TGCCGTAAACGAGGCGTCATGGCACGGGCCCTTTATGTAATGTTTTCCTTGGCACGGGTTGTGCCGAATTGTTAGTTGTG
TCGACCTACATCCGGGACGCCCCAAGGGACGGCCCTAAACGCAGGTCAACAAGGCCTTACGAGGCTCAAAACAAGAGCTT
CGGTCCTCGCAATGCCAGGTTTAAGTACATGTTCACGAGTCGTTCTGCTGTTGCAGGGTTCGACAATGATCCTTCCGCAG

圖 14、大花咸豐草 ITS 序列

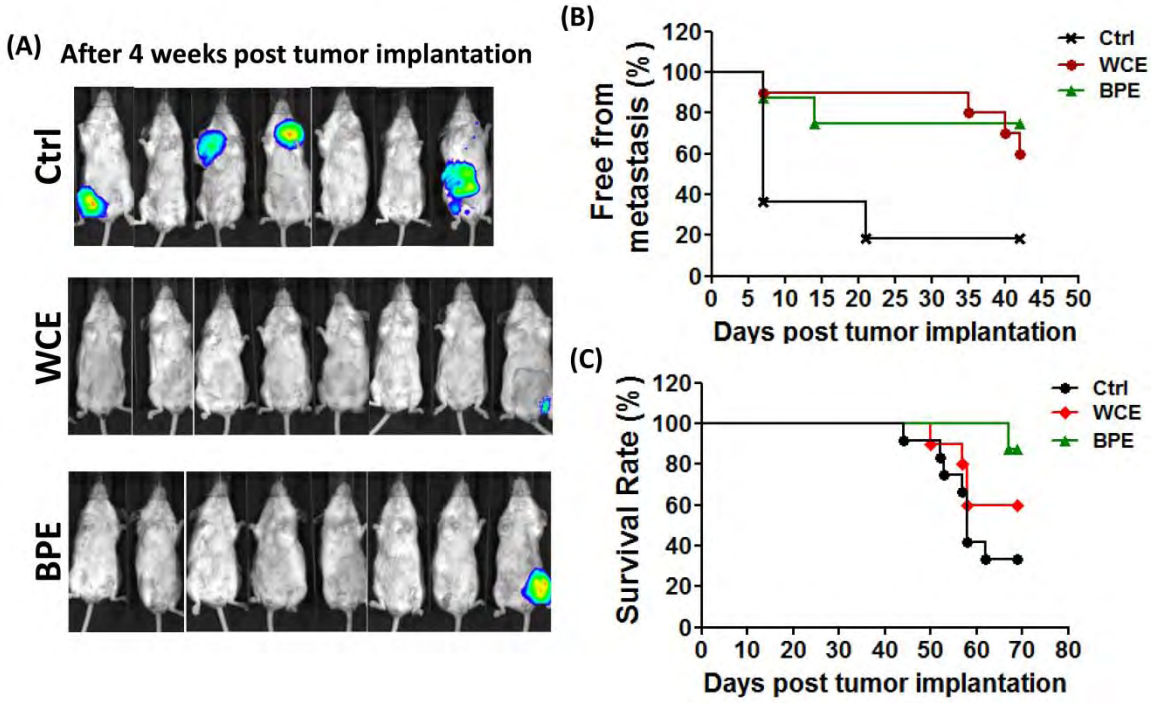


圖 15、黃花蜜菜及大花咸豐草酒精萃取物(WCE, BPE)抗腫瘤轉移活性圖

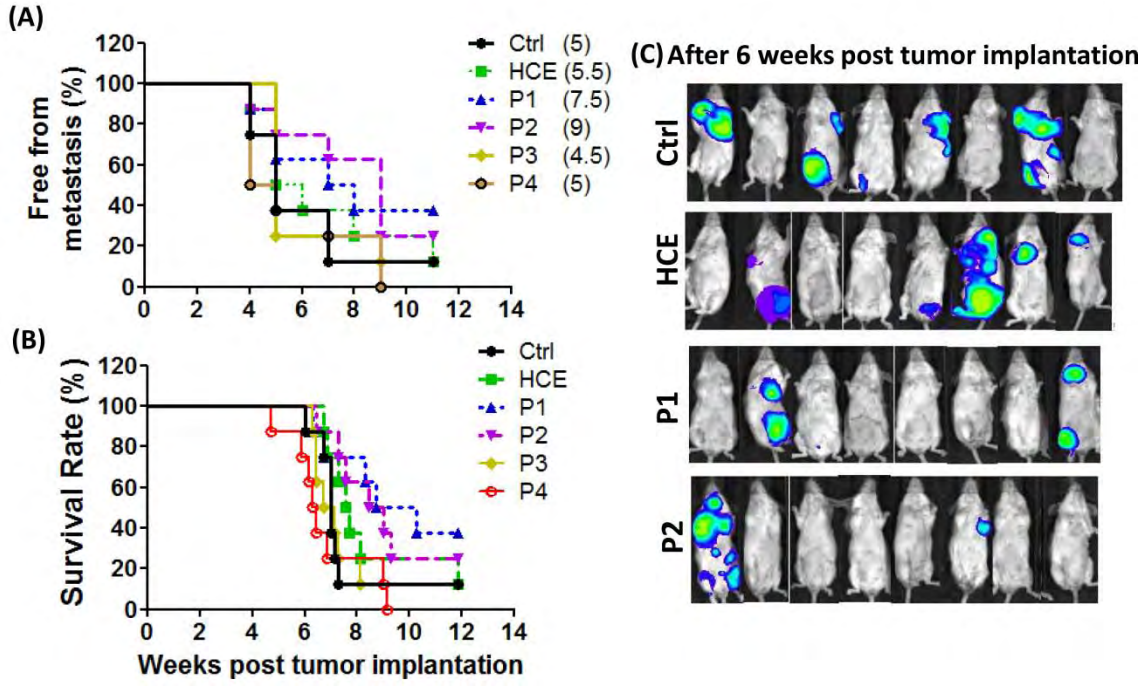


圖 16、魚腥草酒精萃取物(HCE)抗腫瘤轉移活性圖

表 1、分布在臺灣之蟛蜞菊品系

Species	Acronym	Additional Varieties	Acronym
Wedelia chinensis	WC		
Wedelia trilobata	WT		
Wedelia biflora	WB	*Wedelia biflora* var. *ryukyuensis*	WBR
Wedelia prostrate	WP	*Wedelia prostrata* var. *robusta*	WPR

表 2、分布在臺灣蟛蜞菊品系之 ITS 序列分析

Species	ITS regions (bp)				Accession number (NCBI database)
	ITS1	5.8S	ITS2	Total	
W. chinensis	254	164	228	646	AY947415[*1]
W. trilobata	256	162	218	636	AY303442[*2]
W. biflora	253	163	225	641	JF934953
W. prostrata	253	167	217	637	AY947412[*1]
W. biflora var. *ryukyuensis*	253	163	225	641	JF430396
Wedelia prostrata var. *robusta*	253	167	218	638	JF430395

*1 The sequences AY947415 and AY947412 were submitted to GenBank byYuan, C.I., Hsieh, Y.C. and Chiang, M.Y..

*2 The sequence AY303442 was submitted to GenBank by Dias de Moraes,M., Panero, J.L. and Semir, J..

編號：MOHW103-CMAP-M-114-122402

以動物及細胞實驗評估蛇床子與蛇床子素對血管內皮前驅細胞作用之研究(2-2)

侯文琪、李泰霖、呂岳霖、黃群耀
臺北醫學大學

摘　要

本年度將測試在模擬糖尿病或發炎壓力下，蛇床子素是否維持血管內皮前驅細胞之功能；以高脂飼料誘導小鼠肥胖與高血糖，介入蛇床子抽取物與純化物並進行後肢結紮缺血試驗，測試蛇床子是否於體內試驗仍具有促進血管新生之能力。細胞實驗結果顯示，含正常或是少量內皮生長因子（VEGF）濃度的 Martigel，以 10 μM 的蛇床子素及其結構衍生物處理人類內皮前驅細胞 24 小時後，蛇床子素及其多種結構衍生物可促進人類內皮前驅細胞的管柱生成；其中結構衍生物 No.11 的效果優於蛇床子素且在具有濃度依存性。以不同濃度的蛇床子素及其結構衍生物 No.11 處理人類內皮前驅細胞，可促進人類內皮前驅細胞一氧化氮的產生和內皮一氧化氮合成酶蛋白質的表現量，而且誘導人類內皮前驅細胞 ERK1/2、p38 MAPK、PI3K 蛋白質的表現量；在模擬慢性發炎條件下，以不同濃度蛇床子素及其結構衍生物反應 24 小時後，蛇床子素及其結構衍生物 No.11 可抑制人類內皮前驅細胞反應氧族的產生、抑制誘導型一氧化氮合成酶蛋白質與 COX-2 蛋白質的表現量。利用蛇床子素處理人類內皮前驅細胞，抽取 RNA，以基因晶片(gene chip)進行基因表現測定與分析，結果顯示，蛇床子素處理可以增加人類內皮前驅細胞 87 個與抑制 121 個基因表現。空白組於實驗期間餵食一般飼料。以高脂飼料先行誘導小鼠肥胖一個月後，同時餵食高脂飼料（控制組）與四種樣品高、低劑量，共九組介入 81 天。以流式細胞儀分析循環內皮前驅細胞量，其中蛇床子素（低劑量）、50%抽取物（高劑量）與蛇床子素類似物 No.11（高劑量）可以增加周邊血循環內皮前驅細胞數量($CD34^+/Flk\text{-}1^+$)。進行下肢股動脈結紮手術，並繼續介入高脂飼料與樣品，並以雷射都卜勒灌流影像儀器評估下肢血流狀況。結果顯示，蛇床子素（高劑量）與 50%抽取物（高劑量）在第一週、第二週與第三週與對照組呈現顯著性差異($P<0.05$)，血流由 3 成回復到 9 成以上。

關鍵詞：蛇床子、血管內皮前驅細胞、高脂飼料、下肢結紮缺血、雷射都卜勒灌流影像儀器、蛇床子素

Number: MOHW103-CMAP-M-114-122402

Functional Evaluation of Cnidii Fructus and Osthole on Endothelial Progenitor Cells by Animal and Cell Models

Wen-Chi Hou, Tai-Lin Lee, Yeh-Lin Lu, Chun-Yao Huang
Taipei Medical University

ABSTRACT

The aims of this project in this year are to investigate the effects of extracts of Common Cnidium Fruit and osthole on (1) the tube formations *in vitro* of human endothelial progenitor cells (EPCs) under the simulation of inflammatory conditions; (2) the improvements of blood flow *in vivo* of mouse ischemic hindlimb in high fat (HF) diet-induced obese mice. The osthole and its synthesized analogs are showed to stimulate EPC tube formations in matrigels of the normal or reduced VEGF growth factors, among which the No 11 analog showed the best one and dose-dependent manner. The osthole and No. 11 analog are showed to stimulate NO productions and eNOS protein expressions in treated-EPC. It is also found that osthole-treated EPC and No. 11 analog-treated EPC can stimulate ERK1/2, p38MAPK, and PI3K protein expressions compared to untreated ones. Under the simulation of chronic inflammatory conditions, the osthole and No. 11 analog are showed to inhibit ROS productions, iNOS and COX-2 protein expressions of treated-EPC compared to untreated ones. The isolated RNAs from osthole-treated and untreated EPC are further hybridized and analyzed by the human array chip (HOA 6.1) for genes associated with up-regulation or down-regulation compared to untreated ones（log2|Fold change|≧1 and P <0.05）and there are 87 up-regulated genes and 121 down-regulated genes after osthole treatments. For chronic inflammatory mouse experiments, the HF diet (the fat composition provide 60% of total calories) is pre-treated for one month, and then without (as a control) or with extracts of Common Cnidium Fruit, osthole and osthole derivative No.11 were intervened accompanying HF diet for 81 days. The mouse fed with standard mouse/rat chow was the blank group. It was found that the circulating EPC was elevated in groups of osthole (low dose), extracts of Common Cnidium Fruit

(high dose), and osthole derivative No.11 (high dose) by techniques of flow cytometry. After that, mouse in each group has been received an operative resection of one femoral artery for hindlimb ischemia, and subsequently for laser Doppler perfusion imaging. After surgery, mice in each group were received continuously the same sample intervention concurrent HF diet for one month to observe the blood flow recovery. It was found that the blood flow was recovered from 30% to above 90% and showed significantly different ($P<0.05$) at week-1, - 2, and -3.

Keywords: Common Cnidium Fruit, endothelial progenitor cells (EPCs), high fat diet, hindlimb ischemia, laser Doppler perfusion imaging, osthole

壹、前言

依據歷年衛生署之死亡統計報告[1]，心血管相關疾病長期以來均名列於國人十大死因排行榜之前茅，其死亡率總和，甚至僅略低於均位居於榜首之癌症，死亡之人數也逐年攀升。國民醫療會計帳之統計資料也顯示，近五年來，循環系統疾病之醫療開銷，均佔個人醫療開銷之 10%以上，在總額方面，其醫療費用從 94 年度的 697 億元不斷上升至超過 800 億元[2]，顯示國人心血管系統疾病不斷的增加，亦顯示此類疾病之預防與治療仍具有相當之開發空間。以年齡來看，相關開銷自 50 歲開始劇增，大於 60 歲後，甚至均超過 15%，相較於腫瘤隨著年齡增加反而有劇減之趨勢來看，循環系統疾病隨年齡增加穩定維持高度開銷之原因，勢必與其疾病之發展進程較慢有關，也因此，發展相關預防性或治療性保健品或藥品相對來說將具有較大之臨床與商業利益。

動脈粥狀硬化(atherosclerosis)為一種動脈血管系統慢性發炎之疾病，發生之過程相當的複雜，由多種細胞（包括巨噬細胞、內皮細胞與平滑肌細胞…等）、組織與器官（肝、肥胖組織…等）間交互作用而成，其中並有數千種分子參與[3]。整個疾病的進程可分為數個階段，起先，血管內皮經由損傷或其他刺激造成活化，大量的細胞黏附分子(cell adhesion molecule)表現於內皮細胞表面，加上部分刺激因子之分泌，使得巨噬細胞浸潤，浸潤之巨噬細胞吞噬了低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)並加以氧化形成氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, oxLDL)，在無法經由高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)有效去除之情況下，大量 oxLDL 累積在巨噬細胞內形成泡沫細胞(foam cell)，其釋放更多的發炎物質，促使周邊血管發炎反應加劇，進而導致更多白血球之累積、平滑肌細胞之移行與增生、細胞外基質之重組以及細胞內脂質不斷的累積，泡沫細胞與平滑肌細胞在過程中會不斷壞死，形成一個壞死中心(necrotic core)，斑塊(plaque)就此成形[4, 5]。動脈粥狀硬化相關的疾病包括冠狀動脈性心臟病(coronary heart disease)、頸動脈疾病(carotid artery disease)、周邊血管疾病(peripheral arterial disease, PAD)與慢性腎臟疾病(chronic kidney disease)。周邊血管性疾病之廣義定義為一條或多條動脈血管因動脈粥狀硬化而造成部分或全部之阻塞之疾病，臨床上則多指下肢末梢血管之疾病狀態[6~9]。動脈粥狀硬化相關之血管疾病，危險因子均為高齡、高血壓、高血脂、抽煙與糖尿病…等，其中糖尿病與抽煙史更是誘發動脈粥狀硬化與促使病程推進之最高危險因

子。治療上，戒煙被視為絕對必須之要素，其次為生活、飲食習慣之改變與危險因子之控制，如血壓、血脂、血糖之控制；再者，抗血栓與抗血小板藥物之投予，可進一步預防疾病之惡化與再發；或需考慮以外科手術或心導管手術對栓塞之部位進行處理[10, 11]。

血管內皮前驅細胞(endothelial progenitor cells, EPCs)為一具有能力進一步分化為內皮細胞之細胞群體，由骨髓所生成，可於周邊血液與臍帶血中分離獲得，到目前為止，其來源與特性，尚未有統一之定義[12~15]。過去，科學家認為血管內皮細胞之修復以及血管新生倚靠的是已成熟的血管內皮細胞之複製及分化，不過仍有部分證據顯示，源自於骨髓且流動於周邊血液中之單核球，亦可能具有此種功能。直到西元 1997 年，Asahara 等人[16]自人體周邊血單核球群體中，分離出細胞表面帶有 CD34 表面抗原之細胞，此類細胞可以在體外以及體內的實驗中分化成為成熟的血管內皮細胞，並在動物下肢缺血的實驗中證實能促進並參與微小血管之新生，血管內皮前驅細胞之存在才得以獲得初步證實。由於功能上為增殖、分化為血管內皮細胞，目前認為，血管內皮前驅細胞在身體內主要參與血管修復、血管新生(angiogenesis)與動脈生成(arteriogenesis)等血管相關工作[13, 14]。一般的生理狀態下，血管內皮前驅細胞會移動到血管內皮受傷之部位，對血管進行修補；當局部區域需要較多血流而發生血管新生與動脈生成時，血管內皮前驅細胞亦受刺激移動於此進行分化。不過近年來部分研究發現，血管內皮前驅細胞受到腫瘤組織缺血下釋放之物質所吸引與刺激，亦會協助腫瘤組織之新血管生成(neovascularization)與血管新生，使腫瘤可以吸取更多的營養而增長[17, 18]，此一發現仍有爭議，目前仍繼續探討中。

血管內皮前驅細胞源自於骨髓，但其作用位置位於周邊的組織，因此，調控血管內皮前驅細胞於骨髓之中之增殖、其啟動至周邊血液循環中與接續將其趨化至需要修復或新生血管之處，則受到許多系統調控[12~14, 18]。目前已知，纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor, FGF)、基質細胞衍生因子(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、顆粒球–單核球聚落刺激因子(granulocyte monocyte-colony stimulating factor, GM-CSF)、以及血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)…等類泌素(paracrine)活化骨髓中的 MMP-9 (matrix metalloproteinase 9)活性；將 membrane-crossing Kit ligand (mKitL)轉為 solubility Kit ligand (sKitL)進而自骨髓中將血管內皮前驅細胞釋放，同時這些類泌素之濃度梯度也將扮演誘導之角色，使血管內皮前驅細胞移動至缺血處；缺血組織所大量表現出之貼附分子，如

P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)、β1 和β2 integrins…等，會與血管內皮前驅細胞上之相關受器與分子相互作用，使細胞停留或移行至所需位置，協助血管修補、生成與新生之進行。近年來累積之研究資料顯示，在不同疾病、生活狀態與藥物使用下，血管內皮前驅細胞之數量與功能性會有不同之改變[12, 19, 20]，有時血液分析的數量呈現增加之狀態，但細胞活性卻呈現明顯之下降情況，吸菸就是明顯的例子。也因此，對於血管內皮前驅細胞之相關藥物或功能性食品開發，必須考量到有效化學物質對微小環境之作用是否足以讓血管內皮前驅細胞保有其功用，而非單純僅考慮其影響數量之增加。

蛇床子（Common Cnidium Fruit，生藥名為 Cnidii Fructus）為一年生繖形科草本植物蛇床[*Cnidium monnieri* (L.) Cusson]之乾燥成熟果實，性溫，味辛苦，有小毒。入腎、脾經。外用燥濕殺蟲止癢，內服溫腎壯陽，祛風燥濕[21]。蛇床子之化學成分組成主要為香豆素類化合物(coumarins)，其中蛇床子素(osthole)為含量最高者，約為藥材乾重之 1.67-2.88% [22]；此外還有色酮類(chromones)以及苯並呋喃類 (benzofurans)化合物。揮發油之含量約為 1.3%，其中倍半萜類化合物(sesquiterpenes)約佔 85%，酯類約佔 7%，萜類化合物(terpenoids)則約佔 2% [23]。藥理活性方面，蛇床子具有止癢[24, 25]、降血壓[26, 27]、抗過敏[28]、抗發炎[29]、抗菌[30]、抗病毒[23]、抗骨質疏鬆[31]、抗腫瘤[32, 33]與肝臟保護[34, 35]等作用，且其作用幾乎均與蛇床子素相關。此外，以蛇床子素進行的研究尚包括抗血小板凝集[36]、抑制平滑肌細胞生長[37]、降血糖[38]、改善胰島素抗性[39]、調控神經傳導物質釋放 [40]與保護神經[41]等作用。本實驗室進行的初步篩選結果，我們認為蛇床子與蛇床子素對血管內皮前驅細胞於各種微環境下，可能有其調控之能力，深具開發之潛力。期能以此計畫能對蛇床子與蛇床子素於血管疾病之預防與治療上，建立基礎，為後續臨床研究鋪路。

貳、材料與方法

一、蛇床子抽取物與蛇床子素結構類似物之製備：

蛇床子各 480 克，分別加入 10 倍體積溶劑(50%與 95%酒精)，於 65℃下，進行迴流加熱抽取 2 小時。抽取液減壓濃縮，定量。蛇床子素結構類似物以蛇床子素為原料，經過化學合成衍生共 18 種。

二、血管內皮前驅細胞試驗

使用的血管內皮前驅細胞是由臺北醫學大學附設醫院心臟內科黃群耀醫師實驗室，自孕婦臍帶血內分離取得單核細胞，利用培養之方法，驅使貼附性單核細胞分化為類內皮前驅細胞，其具有攝取 Dil-acLDL 的特性，並含有 CD31、CD34、KDR、VE-cadherin 與 vWF 五種表面抗原之表現。

(一)細胞存活率試驗

血球計數器計算其細胞數，並將細胞數調整為 $1x10^4$ cells/well，以 50 μL/well 加入細胞培養用 96 孔盤，輕微晃動使細胞均勻散布後，放入細胞培養箱培養 3 小時，待細胞貼於底部後，分別加入 50 μL 已配好所需濃度之欲檢測樣品，輕微晃動使其混合均勻。放入細胞培養箱培養 24 小時。達到欲藥物作用的時間後，加入 100 μL 之 1.76 mM resazurin，使其最終濃度為 880 μM。放入 37˚C 含 5%二氧化碳且充滿水氣的細胞培養箱約 50 分鐘後，將其取出，並以螢光微盤測定儀以激發波長 560 nm 搭配發散波長 590 nm 濾片測量螢光強度。

(二)管柱形成試驗

於細胞培養用 96 孔盤中逐格加入 50 μL/well Matrigel [BD Matrigel™ Matrix 或 BD Matrigel™ Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences)]，輕微晃動使均勻分布，放入細胞培養箱 30 分鐘使 Matrigel 硬化，加入 50 μL 含樣品之細胞培養液。同時，加入 2 μg/mL Calcein AM 至長有約九分滿細胞的培養皿中，放入細胞培養箱 30 分鐘。待時間到達後，分別加入 100 μL 已配好所需濃度之欲檢測的待測物於已加有 Matrigel 的細胞培養用 96 孔盤。同時，移除加有 Calcein AM 的培養液，並沿培養皿壁緣緩慢加入 3 mL DPBS 洗滌。移除 DPBS 後，加入 1 mL Accutase，輕微晃動使細胞皆浸潤其中，以倒立式顯微鏡觀察，待細胞呈圓粒狀且會從底部滑動後，旋轉並輕拍培養皿邊緣使細胞脫落。加入 5 mL 培

養液，混和均勻後，以血球計數器計算其細胞數，並將細胞數調整為 $8x10^3$ cells/mL 或 $3x10^4$ cells/mL。以 100 μL/well 之體積將細胞懸浮液加入各個格子中，輕微晃動使細胞均勻散布並與藥品充分混合均勻後，放入細胞培養箱培養 6 小時。以倒立螢光顯微鏡觀察，並拍照進行分析。

(三)模擬壓力環境下之管柱形成試驗

於細胞培養用 96 孔盤中逐格加入 50 μL/well Matrigel，輕微晃動使均勻分布，放入細胞培養箱 30 分鐘使 Matrigel 硬化。同時，加入 2 μg/mL Calcein AM 至長有約九分滿細胞的培養皿中，放入細胞培養箱 30 分鐘。待時間到達後，分別加入 100 μL 已配好所需濃度之欲檢測的待測物於已加有 Matrigel 的細胞培養用 96 孔盤。同時，移除加有 Calcein AM 的培養液，並沿培養皿壁緣緩慢加入 3 mL DPBS 洗滌。加入 5 mL 培養液，混和均勻後，以血球計數器計算其細胞數，並以含有樣品之培養液將細胞數調整為 $8x10^3$ cells/mL 或 $3x10^4$ cells/mL，放入培養箱靜置 1 小時，並於半小時後先於含有硬化 Matrigel 之 96 孔盤中，加入 50 μL 含環境壓力物質（葡萄糖，5～50 mM；TNF-α，0.5～50 nM）之細胞培養液。待細胞與樣品預先反應時間到達，以 100 μL/well 之體積將細胞懸浮液加入各個格子中，輕微晃動使細胞均勻散布並與藥品充分混合均勻後，放入細胞培養箱培養 6 小時。以倒立螢光顯微鏡觀察，並拍照進行分析。

(四)一氧化氮生成試驗

於細胞培養用 96 孔盤中加入 $3x10^4$ cells/well，輕微晃動使細胞均勻散布後，放入細胞培養箱培養 3 小時。待細胞貼於底部後，分別加入已配好所需濃度之欲檢測樣品，輕微晃動使其混合均勻。放入細胞培養箱培養 24 小時。達到藥物作用時間前 30 分鐘時，加入 10 μM DAF-2 DA，重新放入細胞培養箱繼續培養 30 分鐘。移除加有 DAF-2 DA 的培養液後，加入 150 μL DPBS，並以螢光微盤測定儀以激發波長 495 nm 搭配發散波長 515 nm 濾片測量螢光強度。

(五)西方墨點轉漬法與免疫染色

經過壓力與樣品處理之血管內皮前驅細胞以細胞裂解液溶解後，以高速離心去除不溶解之物質，將細胞溶解物中之蛋白質定

量後，進行 SDS-PAGE，隨後將蛋白轉漬至 PVDF 膜上，以抗體進行雜交反應（COX2 Antibody (#4842)，eNOS Antibody (#9572)，iNOS Antibody (#2977)，Phospho-PI3 Kinase p85(Tyr458)/p55(Tyr199) Antibody (#4228)，Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (#9101)，Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody (#9211)，購自 Cell Signaling Technology, Inc.）。雜交之結果以增效性冷光試劑進行呈色，以 Syngene GeneGnome5 冷光影像系統擷取影像，並以 ImageJ 進行影像分析。

(六)細胞內活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS)含量測定

血球計數器計算其細胞數，並將細胞數調整為 $1x10^4$ cells/well，以 50 μL/well 加入細胞培養用 96 孔盤，輕微晃動使細胞均勻散布後，放入細胞培養箱培養 3 小時，待細胞貼於底部後，分別加入 50μL 已配好所需濃度之欲檢測的樣品，輕微晃動使其混合均勻。放入細胞培養箱培養 24 小時。達到欲藥物作用的時間後，加入 10μM DCFH-DA，放入細胞培養箱繼續培養 30 分鐘後，移除全部培養液，以 DPBS 清洗後，加入 150 μL DPBS，並以螢光微盤測定儀以激發波長 485 nm 搭配發散波長 535 nm 濾片測量螢光強度。

三、蛇床子素處理血管內皮前驅細胞之有關基因變化

抽取經過蛇床子素處理之人類血管內皮前驅細胞與其未經處理之對照組的 total RNA，送交生技公司進行品質確認、基因放大與分析。利用 HOA6.1 全人類基因晶片分析差異基因，選取 log2 |fold change| ≧ 1 and P-value < 0.05 變化之基因進行分析。

四、動物試驗

本動物試驗經過臺北醫學大學動物實驗管理小組實質審查通過（LAC-101-0030）。

(一)高熱量飼料誘導肥胖小鼠下肢缺血試驗

五週齡 C57BL/6J 小鼠以自由餵食一般飼料穩定一週後，部分組別改以給予高油脂飼料(Research Diets D12492，脂肪量提供 60％總熱量)四週先行誘導肥胖。空白組為一般小鼠飼料。四週後，除高脂飼料（或空白組的一般小鼠飼料）繼續給予外，每日於相同時間管灌餵食樣品乙次，監控動物之體重，共計 81 天。抽血，測定血液生化指數（總膽固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、

三酸甘油酯、血糖）與分析循環內皮前驅細胞含量；之後，對小鼠進行麻醉，將小鼠固定並加以保溫後，去除後肢術部之毛髮後，進行後肢股動脈近側結紮手術。術後繼續維持至少 4 週之飼養、給藥與觀測。小鼠後肢血液灌流量於結紮手術前、結紮後與結紮完成後之每週，以雷射都卜勒灌流影像儀器(laser Doppler perfusion imager system，PeriScan PIM-II, Perimed Co.)進行測量。

(二)流式細胞儀分析

取 300 μL 全血加入 fluorescein isothiocyanate (FITC)標定之 anti-mouse CD34 抗體與 allophycocyanin (APC)之 anti-mouse Flk-1 抗體，以 Isotype-identical antibodies 作為對照組，混合反應 30 分鐘。隨後加入 PharmLyse 溶解紅血球，室溫下避光反應 15 分鐘，以 200 x g 離心 5 分鐘，除去上清液，加入含 1%熱處理去活性 FBS 之 PBS 溶液(PBS-FBS)，再次離心，去除上清液後加入 0.5 mL 含 2%甲醛之 PBS 固定液，重新懸浮細胞後進行流式細胞儀分析。每個樣品分析 10,000 個 events，同時具有 CD34 與 Flk-1 標定之群組視為血管前驅細胞群。

五、統計分析

以 Student t-test 分析細胞實驗兩組間差異，$*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$。動物實驗之數據以 One-way ANOVA 及 post hoc Tukey's test 分析，標示不包含相同字母則是 $P < 0.05$。

參、結果

一、體外管柱生成實驗：

加入含有 Calcein AM 的人類內皮前驅細胞貼附於含正常 VEGF 濃度的 Martigel，以 10μM 的 osthole 及其結構衍生物處理人類內皮前驅細胞 6 小時後，以倒立螢光顯微鏡觀察其血管新生的情形。結果顯示，在 osthole 及其結構衍生物於短時間內影響人類內皮前驅細胞增生不明顯的情形下(圖一 A)，osthole 及其結構衍生物 No.1、No.2、No.5、No.7、No.8、No.11、No.14、No.17 可促進人類內皮前驅細胞的血管新生，惟結構衍生物 No.11 促進血管新生的效果優於 osthole (圖一 B)。

二、訊息傳導路徑之探討與一氧化氮生成

以 1μM、5μM、10μM 及 25μM 的 osthole 及其結構衍生物 No.11 處理人類內皮前驅細胞 24 小時後，抽取細胞內蛋白質，以西方墨點轉漬法測定 ERK 1/2、p38 MAPK、PI3K 的蛋白質表現量。結果顯示，osthole 及其結構衍生物 No.11 具有濃度相關性促進人類內皮前驅細胞 ERK 1/2、p38 MAPK、PI3K 蛋白質磷酸化的表現量（圖二）。以 1μM、5μM、10μM 及 25μM 的 osthole 及其結構衍生物 No.11 處理人類內皮前驅細胞 24 小時後，以 DAF-2 DA 螢光檢測方法測定 NO 生成量和 eNOS 蛋白質表現量。結果顯示，osthole 及其結構衍生物 No.11 可促進人類內皮前驅細胞 NO 的產生和 eNOS 蛋白質的表現量，且具有濃度相關性(圖三)。

三、模擬發炎下內皮前驅細胞一氧化氮生成與誘導型一氧化氮生成酶表現量：

加入 1μM、5μM、10μM 及 25μM 的 osthole 及其結構衍生物 No.11 於預先以 0.5nM TNF-α 或 15mM D-glucose 處理 2 小時的人類內皮前驅細胞，反應 24 小時後以 DAF-2 DA 螢光檢測方法測定 NO 產率（圖四 A）和西方墨點轉漬法測定 iNOS 蛋白質表現量（圖四 B）。結果顯示，osthole 及其結構衍生物 No.11 處理可促進人類內皮前驅細胞 NO 的產生，但不具濃度相關性；osthole 及其結構衍生物 No.11 處理可具有濃度相關性抑制 iNOS 蛋白質的表現量。

四、模擬慢性發炎條件下內皮前驅細胞 COX-2 表現量

加入 1μM、5μM、10μM 及 25μM 的 osthole 及其結構衍生物 No.11 於預先以 0.5nM TNF-α 和 15mM D-glucose 處理 2 小時的人類內皮前驅細胞，反應 24 小時後，以西方墨點轉漬法測定 COX-2 蛋白質表現量。結果顯示，

osthole 及其結構衍生物 No.11 可抑制人類內皮前驅細胞 COX-2 蛋白質的表現量，且具有濃度依存性(圖五)。

五、模擬慢性發炎條件下內皮前驅細胞反應氧族生成量變化

加入 1μM、5μM、10μM 及 25μM 的 osthole 及其結構衍生物 No.11 於預先以 0.5nM TNF-α 和 15mM D-glucose 處理 2 小時的人類內皮前驅細胞，反應 24 小時後，以 DCFH-DA 螢光檢測方法測定反應氧族生成量變化。結果顯示，osthole 及其結構衍生物 No.11 可抑制人類內皮前驅細胞反應氧族的產生，且具有濃度依存性(圖六)。

六、基因晶片分析

利用蛇床子素處理人類內皮前驅細胞，抽取 RNA，以基因晶片(gene chip)進行基因表現測定與分析，圖七(A)選取標準為基因表現差異為 log2|Fold change|≥1 且 P <0.05（藍色點部分）；圖七(B)為差異基因群分類。結果顯示，蛇床子素處理人類內皮前驅細胞可以促進 87 個基因與抑制 121 個基因表現（圖七）。差異基因功能性分類(含重複基因分類)如下表所示之 67 群：

geneset name	# genes in geneset (K)	# genes in overlap (k)	k/K	p value
negative regulation of macromolecule metabolic process	734	18	0.025	0.000206
negative regulation of cellular biosynthetic process	561	15	0.027	0.000372
negative regulation of biosynthetic process	573	15	0.026	0.00046
positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	21	4	0.19	0.000767
regulation of nitric oxide biosynthetic process	27	4	0.148	0.00162
negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	512	13	0.025	0.0017
positive regulation of molecular function	586	14	0.024	0.00178
negative regulation of nitrogen compound metabolic process	519	13	0.025	0.0019
positive regulation of catalytic activity	520	13	0.025	0.00193
negative regulation of macromolecule biosynthetic process	547	13	0.024	0.00293
negative regulation of transcription	459	11	0.024	0.00682
cell cycle	776	15	0.019	0.00758
regulation of cellular protein metabolic process	474	11	0.023	0.00847
regulation of hormone levels	151	6	0.04	0.0103

geneset name	# genes in geneset (K)	# genes in overlap (k)	k/K	p value
regulation of protein kinase activity	345	9	0.026	0.0107
negative regulation of secretion	55	4	0.073	0.0122
negative regulation of gene expression	504	11	0.022	0.0127
regulation of kinase activity	357	9	0.025	0.0129
regulation of protein modification process	295	8	0.027	0.0147
regulation of transferase activity	372	9	0.024	0.0162
negative regulation of angiogenesis	23	3	0.13	0.0169
regulation of angiogenesis	63	4	0.063	0.0176
cell adhesion	700	13	0.019	0.019
negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	65	4	0.062	0.0191
anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	65	4	0.062	0.0191
biological adhesion	701	13	0.019	0.0192
regulation of endothelial cell migration	25	3	0.12	0.0199
negative regulation of protein modification process	119	5	0.042	0.0203
negative regulation of cellular protein metabolic process	180	6	0.033	0.0207
negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity	67	4	0.06	0.0207
negative regulation of ligase activity	67	4	0.06	0.0207
negative regulation of hormone secretion	26	3	0.115	0.0214
negative regulation of coagulation	26	3	0.115	0.0214
positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	68	4	0.059	0.0215
positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity	70	4	0.057	0.0232
negative regulation of protein metabolic process	187	6	0.032	0.0239
regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	71	4	0.056	0.0241
chordate embryonic development	331	8	0.024	0.0258
positive regulation of ligase activity	73	4	0.055	0.0259
regulation of locomotion	192	6	0.031	0.0264
negative regulation of protein ubiquitination	74	4	0.054	0.0268
embryonic development ending in birth or egg hatching	334	8	0.024	0.027

geneset name	# genes in geneset (K)	# genes in overlap (k)	k/K	p value
negative regulation of molecular function	334	8	0.024	0.027
enzyme linked receptor protein signaling pathway	342	8	0.023	0.0301
regulation of ubiquitin-protein ligase activity	78	4	0.051	0.0307
mitochondrial membrane organization	32	3	0.094	0.0316
steroid metabolic process	202	6	0.03	0.0319
regulation of secretion	202	6	0.03	0.0319
neural crest cell development	33	3	0.091	0.0334
neural crest cell differentiation	33	3	0.091	0.0334
regulation of ligase activity	81	4	0.049	0.0338
cell-cell adhesion	276	7	0.025	0.0338
regulation of cell size	206	6	0.029	0.0343
negative regulation of catalytic activity	277	7	0.025	0.0343
tonic smooth muscle contraction	4	2	0.5	0.0344
artery smooth muscle contraction	4	2	0.5	0.0344
negative regulation of transcription, DNA-dependent	356	8	0.022	0.0363
positive regulation of protein ubiquitination	84	4	0.048	0.037
negative regulation of RNA metabolic process	362	8	0.022	0.0391
cell-matrix adhesion	89	4	0.045	0.0428
regulation of mitotic cell cycle	152	5	0.033	0.044
positive regulation of protein kinase activity	223	6	0.027	0.0456
positive regulation of transport	223	6	0.027	0.0456
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	224	6	0.027	0.0464
organic acid biosynthetic process	155	5	0.032	0.0467
carboxylic acid biosynthetic process	155	5	0.032	0.0467
regulation of coagulation	41	3	0.073	0.0496

舉例說明如下：

(一)蛇床子素處理可以促進以下血管新生相關基因表現

GO:0045765~regulation of angiogenesis

Gene_symbol	Description	Entrez_gene	log2 (Ratio)	P-value
VASH1	vasohibin 1	22846	1.36	0.014394
EPHB4	EPH receptor B4	2050	1.07	0.02664
TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	7075	1.29	0.007571
ANGPT2	angiopoietin 2	285	1.44	0.027091

(二)蛇床子素處理可以促進與抑制細胞附著相關基因表現

GO:0007155~cell adhesion

Gene_symbol	Description	Entrez_gene	log2 (Ratio)	P-value
JUP	junction plakoglobin	3728	1.69	0.001257
CERCAM	cerebral endothelial cell adhesion molecule	51148	1.53	0.008742
ITGB4	integrin beta 4	3691	1.39	0.012402
PCDH12	protocadherin 12	51294	1.5	0.003299
ITGA6	integrin alpha 6	3655	1.23	0.010613
LAMB2	laminin beta 2 (laminin S)	3913	1.03	0.036726
MMRN1	multimerin 1	22915	1.05	0.025879
MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein	4240	-1.38	0.027894
LPXN	leupaxin	9404	-1.26	0.012161
ADAM9	ADAM metallopeptidase domain 9	8754	-1.7	0.00872
PCDHGA12	protocadherin gamma subfamily A 12	26025	-1.63	0.026293
LIMS1	LIM and senescent cell antigen-like domains 1	3987	-1.32	0.015228
PCDH20	protocadherin 20	64881	-2.55	0.010382

(三)蛇床子素處理可以促進與抑制內皮細胞遷移調控相關基因表現

GO:0010594~regulation of endothelial cell migration

Gene_symbol	Description	Entrez_gene	log2 (Ratio)	P-value
VASH1	vasohibin 1	22846	1.36	0.014394
PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide	5155	1.1	0.029824
EDN1	endothelin 1	1906	-1.28	0.00859

(四)蛇床子素處理可以促進與抑制細胞訊息傳導接受器相關酵素相關基因表現

GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway

Gene_symbol	Description	Entrez_gene	log2 (Ratio)	P-value
EIF2AK3	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	9451	1.1	0.041251
EPHB4	EPH receptor B4	2050	1.07	0.02664
PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide	5155	1.1	0.029824
TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	7075	1.29	0.007571
PTPN11	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11	5781	1.01	0.038227
ADAM9	ADAM metallopeptidase domain 9	8754	-1.7	0.00872
FST	follistatin	10468	-2.32	0.000429
NRG1	neuregulin 1	3084	-1.15	0.043252

七、動物餵食試驗與下肢結紮後血流評估

五週齡C57BL/6J雄鼠，購自國家實驗動物中心。小鼠空白對照組餵食標準飼料(脂肪含量提供12.137%總熱量)，其餘各組餵食高脂飼料（脂肪含量提供60%總熱量）。實驗餵食流程如圖八(A)。圖八(B)可區分為誘導期與樣品介入期，誘導期明顯看出餵食高脂飼料小鼠的體重高於餵食標準飼料(blank)小鼠。樣品介入期分為八組，配合同時餵食高脂飼料與只餵食高脂飼料一組（HF diet, control），高脂飼料組九組與標準飼料組一組繼續餵食81天。介入樣品試算如下：劑量組分為高、低劑量。有關劑量餵食之換算，依體表面積（body surface area, BSA）標準化[42]如下：蛇床子藥材臨床用藥劑量3~10g（臺灣中藥典第二版、中華本草、中華人民共和國藥典2010版），若提供給60公斤成人服用(50 mg/Kg ~ 167 mg/Kg)，則餵食小鼠劑量應為：

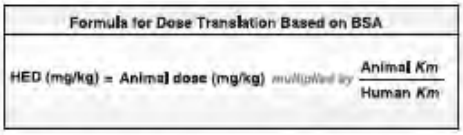


Figure 1. Formula for dose translation based on BSA.

TABLE 1. *Conversion of animal doses to HED based on BSA*

Species	Weight (kg)	BSA (m^2)	K_m factor
Human			
Adult	60	1.6	37 ⇦
Child	20	0.8	25
Baboon	12	0.6	20
Dog	10	0.5	20
Monkey	3	0.24	12
Rabbit	1.8	0.15	12
Guinea pig	0.4	0.05	8
Rat	0.15	0.025	6
Hamster	0.08	0.02	5
Mouse	0.02	0.007	3 ⇦

50= $animal_{low}$ ×3/37 ⇒$animal_{low}$=616.7 mg/Kg (原料粉末)

167= $animal_{high}$ ×3/37 ⇒$animal_{high}$=2060 mg/Kg (原料粉末)

蛇床子原料粉末中 osthole 含量 3.2%，以 osthole 含量為各組換算標準

1. $Osthole_{low}$ 500 mg/Kg ×3.2%=16 mg/Kg
   $Osthole_{high}$ 2000 mg/Kg ×3.2%=64 mg/Kg
   結構類似物 No.11 位食量比照蛇床子素
2. 抽取物中蛇床子素含量為 31.26%，因此
   95 % $EtOH_{low}$ 16 mg/Kg÷31.26%=51.2 mg/Kg
   95 % $EtOH_{high}$ 64 mg/Kg÷31.26%=205 mg/Kg
3. 抽取物中蛇床子素含量為 18.6%，因此
   50 % $EtOH_{low}$ 16 mg/Kg÷18.6%=86 mg/Kg
   50 % $EtOH_{high}$ 64 mg/Kg÷18.6%=344 mg/Kg

其中，各抽取物中蛇床子素含量經由 LC-MS/MS 定量而來（第一年成果告告）。圖八(C)為 0 天，21 天，40 天，61 天與 81 天高低劑量樣品介入後之小鼠體重。結果顯示，50%酒精高劑量在 40 天與 61 天介入後小鼠體重較低，並與高脂飼料組呈現顯著差異($P < 0.05$)； 50%酒精低劑量與蛇床子素結構類似物 No.11 高劑量在 61 天介入後小鼠體重較低，並與高脂飼料組呈現顯著差異($P < 0.05$)。其餘介入各組，在下肢結紮手術前(81 天)並沒有與高脂飼料組呈現顯著差異。

圖九為血清生化指數，總膽固醇(圖九 A)，低密度脂蛋白(圖九 B)，高密度脂蛋白(圖九 C)，總三酸甘油酯(圖九 D)與血糖（圖九 E）。餵食高脂飼料組，其總膽固醇(圖九 A)，低密度脂蛋白(圖九 B)，高密度脂蛋白(圖九

C)，總三酸甘油酯(圖九 D)與血糖(圖九 E)明顯高於一般飼料組。在總膽固醇部分(圖九 A)，介入組 50%酒精抽取物高劑量相較於 control 組有顯著性較低總膽固醇外，其餘介入組相較於 control 組有顯著性較高總膽固醇。在低密度脂蛋白部分(圖九 B)，介入組蛇床子素結構類似物 No.11 低劑量與高劑量相較於 control 組有顯著性較高的低密度脂蛋白；介入組 95%酒精抽取物高、低劑量與 50%酒精抽取物高劑量相較於 control 組有顯著性較低的低密度脂蛋白；其餘介入組與 control 組無顯著差異。在高密度脂蛋白部分(圖九 C)，介入組蛇床子素低劑量、蛇床子素結構類似物 No.11 低劑量與 50%酒精抽取物高劑量與 control 組無顯著差異外，其餘介入組相較於 control 組有顯著性較高的高密度脂蛋白。在總三酸甘油酯部分(圖九 D)，介入組 95%酒精抽取物低劑量、蛇床子素結構類似物 No.11 低劑量、蛇床子素高劑量相較於 control 組有顯著性較低的總三酸甘油酯；其餘介入組相較於 control 組無顯著差異。在血糖部分(圖九 E)，介入組 50%酒精抽取物高劑量與蛇床子素結構類似物 No.11 高劑量相較於 control 組有顯著性較低的血糖；其餘介入組相較於 control 組無顯著差異。

圖十為預先評估餵食五週齡正常小鼠蛇床子抽取物、蛇床子素及其結構類似物 No.11 一個月，取小鼠全血以流式細胞儀測定血管內皮前驅細胞群變化。(A)流式細胞儀代表圖；(B)循環型內皮前驅細胞含量變化。結果顯示，蛇床子素結構類似物 No.11 高與低劑量可明顯增加循環內皮前驅細胞含量。圖十一為以一般飼料（空白組）與高脂飼料誘導肥胖鼠與蛇床子抽取物、蛇床子素及其結構類似物 No11 介入之動物餵食試驗 81 天，取小鼠全血以流式細胞儀測定血管內皮前驅細胞群變化。(A)餵食組流式細胞儀代表圖；(B)循環型內皮前驅細胞含量變化。結果顯示，高脂飼料餵食控制組明顯有較低的循環內皮前驅細胞含量；高脂飼料餵食配合樣品介入後 81 天，蛇床子素低劑量、50%酒精抽取物高劑量與蛇床子素結構類似物 No.11 高劑量，相對於控制組可明顯增加循環內皮前驅細胞含量。

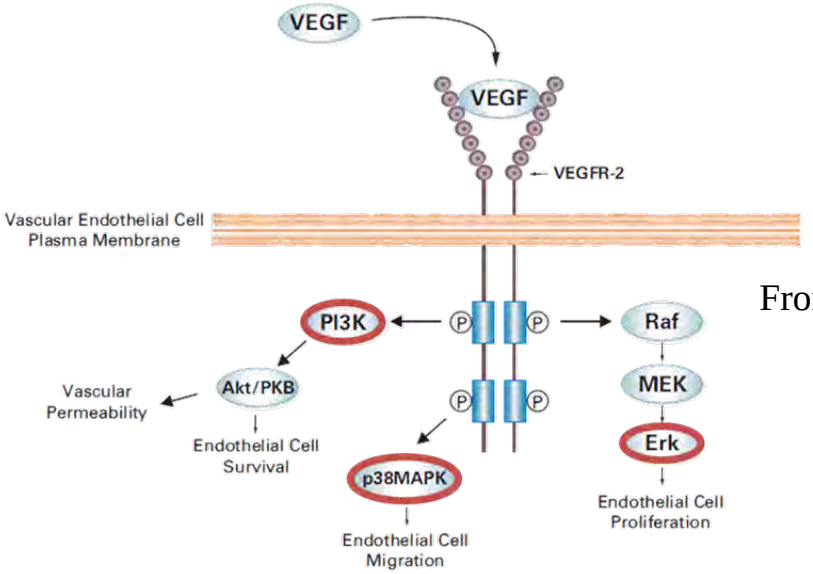
圖十二為雷射都卜勒灌流影像儀評估下肢血流恢復狀況的影像代表圖。所使用的機器外型及詳細操作配置圖請參考如圖十二 A 所示。圖十二 B 為手術後四週內不同樣品繼續介入的下肢血流影像。下肢右腳進行股動脈結紮，下肢左腳無手術，為正常對照組（為進行照相，頭朝上擺放，影像左右顛倒）。血流影像顏色：正常，紅色；缺血，黃綠色。手術前（Naïve）與手術後一天（hindlimb ischemia for one day）可以明顯看出手術後下肢缺血（圖示下肢左半邊都卜勒灌流影像儀為黃色：正常血流影像為紅色）。經

過樣品介入後，部分組別，在第二或第三週可以看到手術的下肢逐漸恢復血流。但餵食蛇床子素結構類似物 No.11 高劑量，因小鼠在第一週後下肢結紮手術之腿斷掉，因小鼠隻數不足無法進行統計評估而無圖示。圖十三為雷射都卜勒灌流影像儀評估下肢血流量化結果，圖十三(A)餵食低劑量組；圖十三(B)餵食高劑量組。血流比例(blood flow ratio, %)為（手術後下肢缺血側）/（未手術正常下肢側）×100%。手術前之各組下肢右腳/下肢左腳血流比例視為 100%，手術後第一天可明顯看到各組下肢右腳/下肢左腳血流比例降到 30~40%。餵食高脂飼料組，血流回復較差，血流回復曲線最低；餵食一般飼料組，血流回復略佳，曲線倒數第二，但與高脂飼料組無顯著差異。在樣品介入低劑量組方面，蛇床子素與 95%酒精抽取物介入組在第二週與高脂飼料組呈現顯著性差異($P < 0.05$)外，其餘組別無差異。在高劑量組方面，蛇床子素與 50%酒精抽取物介入組在第一、第二、與第三週與高脂飼料組呈現顯著性差異($P < 0.05$)，在第三週血流回復到 9 成以上。顯示，高劑量蛇床子素與抽取物具有回復高脂飼料誘導肥胖鼠下肢結紮血流功效。

肆、討論

一、細胞體外實驗：

血管內皮生長因子經由高親和力結合到其接受器，將血管新生的訊息傳遞到內皮細胞。其接受器 VEGFR-1 和 VEGFR-2 主要表現在血管內皮細胞，而 VEGFR-3 則表現在淋巴內皮細胞。其中在人體又稱為 KDR 的 VEGFR-2，屬於酪胺酸激酶類的接受器，在一般血管內皮細胞並不表現，但在新生血管的內皮細胞則表現增加，其在接受血管內皮生長因子後，會進一步發生自我磷酸化，活化下游訊息路徑，而影響內皮細胞生長及血管新生作用[43,44]。



From Rini and Small, 2005 [44]

血管內皮生長因子所調控的下游訊息傳遞為血管新生的關鍵步驟[44]，其透過調節各種不同的訊號傳遞，進而影響細胞增生、分化或是凋亡，如上圖。其中，細胞外訊號調節激酶路徑的活化分為三層：MAPKKK (Raf)、MAPKK (MEK)、MAPK (ERK 1/2)，其上游接受到訊息時，這些傳遞分子會依序產生磷酸化，將訊息繼續傳遞下去至細胞核，促進細胞生長與分化。而 p38 MAPK 可被許多蛋白質激酶活化，接著活化下游的其他蛋白質激酶，進行參與調節細胞功能。磷脂醯肌醇-3-磷酸激酶(PI3K)則位於細胞膜內側，會活化下游分子 Akt 造成訊息傳遞，引起細胞的代謝、生長、分化、運動、存活及胞內的運輸。結果顯示，蛇床子素及其結構類似物 No.11 對於促進內皮前驅細胞的增生及管柱生成是經由血管內皮生長因子所調控的下游訊息傳遞路徑。

細胞培養含有 15 mM 葡萄糖相當於 270 mg/dL 血糖濃度，模擬糖尿病慢性發炎條件下，蛇床子素及其結構衍生物 No.11 依舊可以維持內皮前驅

細胞的數量和管柱生成的功能，且會減少誘導型依氧化氮生成酶與第二型環氧化酶的表現和活性氧的生成，具有抗發炎和抗氧化的功效。

二、基因晶片分析：

差異基因選取標準為基因表現量差異為 log2|Fold change|≥1 且 P <0.05（藍色點部分）。結果顯示，蛇床子素處理人類內皮前驅細胞可以促進 87 個基因與抑制 121 個基因表現。依其歸類，大概可以將差異基因分類於 67 群。以下四群變化基因：

(一)蛇床子素處理可以促進以下血管新生相關基因表現

(二)蛇床子素處理可以促進與抑制細胞附著相關基因表現

(三)蛇床子素處理可以促進與抑制內皮細胞遷移調控相關基因表現

(四)蛇床子素處理可以促進與抑制細胞訊息傳導接受器相關酵素相關基因表現

Matsunaga 等人（2003）[45]提到 angiopoietins-1 及 angiopoietins-2 會經由 Tie 接受器磷酸化進行與血管新生有關，部分相關基因出現在 GO:0045765~regulation of angiogenesis 及 GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway。Gao 等人[2007][46]發現 follistatin 是 angiogenin 結合蛋白與血管新生有關，但負調控(down-regulation)出現於 GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway。Claffey [2002][47]指出血管新生過程可以分為四個階段，(1) endothelial cell activation; (2) stromal cell/matrix modulation; (3) proliferation expansion; (4) vascular morphogenesis/maturation。由本結果蛇床子素處理人類內皮前驅細胞顯示多項正調控基因出現於 GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway，包含 Tie-1, EPH B4, PDGF，如 Claffey [2002][47]指出血管新生過程正進入第四階段，(4) vascular morphogenesis/maturation，細胞停止增生。 Glienke 等人[2000][48] follistatin 是正調控表現於內皮細胞 proliferation 狀態，而負調控表現於生長停滯狀態，如同本結果。George 等人(2011)[49]指出 integrin 協助內皮前驅細胞遷移與細胞附著相關；Bouillot 等人(2011)[50]指出 protocadherin 可以經由 AMAD 酵素水解來調控細胞附著，部分相關基因出現在 GO:0007155~cell adhesion。Watanabe 等人(2004)[51]指出 vasohibin 是內皮衍生負回饋調控血管新生，部分相關基因出現在 GO:0010594~regulation of endothelial cell migration。未來還需要以 qRT-PCR 定量基因表現量與可能上下游蛋白質或基因表現以描繪可能的調控圖。

三、動物實驗：

代謝症候群是一群代謝異常的組合，符合代謝症候群的項目越多，發生心血管疾病及糖尿病的風險越高。血中脂肪含量異常、高血壓及高血糖，漸進式地使得血管內皮長期處於易於凝血，而且容易產生發炎反應的情況下，代謝症候群者發生動脈粥狀硬化心血管疾病的危險性是一般人的兩倍以上。而代謝症候群也是發展為第二型糖尿病的危險因子，且糖尿病患者罹患心血管疾病的機率為一般成人的 2-4 倍[52,53]。臨床上證據顯示，慢性血管病變是引致慢性疾病的重要原因，而慢性血管病變是由於長期血管發炎或氧化壓力過高所引起，其發生的關鍵結構是血管內皮細胞；內皮細胞位於血管壁最內層，介於血管壁和流動的血液之間，其功能的完整性被認為是維持血流與抗血栓能力的關鍵，因為血管內皮細胞會釋放許多負責調控血管收縮、舒張、血管生成、纖維蛋白溶解及活化與抑制血小板活性的因子。然而當內皮細胞因損壞而失去功能，此時若沒有新的內皮細胞來進行修復機制，便會致使血管病變疾病的產生[54]。有關樣品之選定，依照蛇床子中藥材常用之人體使用量(3~10g)換算成小鼠餵食劑量。配合第一年酒精抽取物體外促進內皮前驅細胞管柱生成，本年度蛇床子素及其結構類似物 No.11 模擬慢性發炎的狀況下，具有促進管柱生成。利用高脂飼料誘導肥胖，並介入相關抽取物與純化物。體重變化上，餵食高脂飼料明顯增加小鼠體重、總膽固醇、三酸甘油酯、與血糖；50％酒精抽取物高劑量可以降低體重、三酸甘油酯與血糖；蛇床子素結構類似物 No.11 高劑量可以降低三酸甘油酯與血糖；蛇床子素高、低劑量可以降低三酸甘油酯。而高脂飼料餵食控制組明顯有較低的循環內皮前驅細胞含量；高脂飼料餵食配合樣品介入後 81 天，蛇床子素低劑量、50％酒精抽取物高劑量與蛇床子素結構類似物 No.11 高劑量，相對於控制組可明顯增加循環內皮前驅細胞含量。由下肢結紮缺血實驗與雷射都卜勒灌流影像儀評估下肢血流恢復狀況的影像結果顯示，蛇床子素與 50%酒精抽取物介入高劑量組在第一、第二、與第三週與高脂飼料組呈現顯著性差異($P < 0.05$)，在第三週血流回復到 9 成以上。顯示，高劑量蛇床子素與抽取物具有回復高脂飼料誘導肥胖鼠下肢結紮血流功效。很可惜的是蛇床子素結構類似物 No.11 高劑量在第一週即為介入組回復效果最佳組別，並且與高脂飼料組呈現顯著性差異，因手術問題在第一週後下肢結紮手術之腿斷掉，因小鼠隻數不足無法進行統計評估。未來將進一步補齊相關數據。由樣品介入與血流恢復發現 50％酒精抽取物與循環內皮前驅細胞含量有相關，而蛇床子素（及其合成之結構類似

物）可以改善代謝症候群參數、增加周邊血循環內皮前驅細胞數量($CD34^+/Flk\text{-}1^+$)與改善下肢結紮血流，未來可以開發蛇床子運用於血管保健品開發。

伍、結論與建議

蛇床子為中國傳統藥材，神農本草經列名上品。主要用於殺蟲止癢、溫腎壯陽。其活性主成分為蛇床子素，含量可達藥材乾重之 2-3%。細胞試驗配合高脂飼料誘導肥胖鼠動物，顯示，蛇床子抽取物、蛇床子素可以改善代謝症候群參數、增加周邊血循環內皮前驅細胞數量($CD34^+/Flk\text{-}1^+$)與改善下肢結紮血流。蛇床子素結構類似物 No11 在細胞模式表現與增加周邊血循環內皮前驅細胞數量($CD34^+/Flk\text{-}1^+$)能力，優於蛇床子素；將補強肥胖鼠下肢缺血回復血流能力。蛇床子未來將可朝向於血管疾病的預防與治療。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW103-CMAP-M-114-122402 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. 行政院衛生署九十二～九十九年度死因統計。
2. 行政院衛生署九十三～九十九國民醫療保健支出統計。
3. Ramsey SA, Gold ES, and Aderem A. A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol Med* 2010; 2: 79-89.
4. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, and Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002; 8: 1249-1256.
5. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317–325.
6. What Is Peripheral Arterial Disease? http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/pad/, National Heart Lung and Blood Institute.
7. Jude EB, Eleftheriadou I, Tentolouris N. Peripheral arterial disease in diabetes--a review. *Diabet Med* 2010; 27: 4-14.
8. Lau JF, Weinberg MD, Olin JW. Peripheral artery disease. Part 1: clinical evaluation and noninvasive diagnosis. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 405-418.
9. Shanmugasundaram M, Ram VK, Luft UC, Szerlip M, Alpert JS. Peripheral arterial disease--what do we need to know? *Clin Cardiol* 2011; 34: 478-482.
10. Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, Golzarian J, Gornik HL, Halperin JL, Jaff MR, Moneta GL, Olin JW, Stanley JC, White CJ, White JV, Zierler RE. Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Interventional Radiology; Society for Vascular Medicine; Society for Vascular Surgery. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 2020-2045.
11. Weinberg MD, Lau JF, Rosenfield K, Olin JW. Peripheral artery disease. Part 2: medical and endovascular treatment. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 429-441.

12. Alaiti MA, Ishikawa M, Costa MA. Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy. *Transl Res* 2010; 156: 112-129.
13. Napoli C, Hayashi T, Cacciatore F, Casamassimi A, Casini C, Al-Omran M, Ignarro LJ. Endothelial progenitor cells as therapeutic agents in the microcirculation: an update. *Atherosclerosis* 2011; 215: 9-22.
14. Siddique A, Shantsila E, Lip GY, Varma C. Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist? *J Angiogenes Res* 2010; 22: 2-6.
15. Yoder MC: Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006692.
16. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
17. Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, Kielczewski JL, Moldovan NI, Grant MB. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvasc Res* 2010; 79: 207-216.
18. George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Mittelman A, Tiwari RK. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 24 (doi:10.1186/1756-8722-4-24).
19. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci* 2011; 120: 263-283.
20. Devaraj S, Jialal I. Dysfunctional endothelial progenitor cells in metabolic syndrome. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 585018.
21. 江蘇新醫學院，中藥大辭典，2001，上海科學技術出版社。
22. Wu YT, Tang QY, Shen XK. Determination of osthole in *Cnidium Monnieri* L. Cusson from different sources. *Liaoning J Tradit Chin Med* 2007; 34: 800-801.
23. Chen Y, Zhang GG, Yu ZP. The advancement in the chemical and pharmacological study of the fruits of *Cnidium monnieri*. *Shenyang Yao Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 23: 256-260.
24. Basnet P, Yasuda I, Kumagai N, Tohda C, Nojima H, Kuraishi Y, Komatsu

K. Inhibition of itch-scratch response by fruits of *Cnidium monnieri* in mice. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 1012-1015.

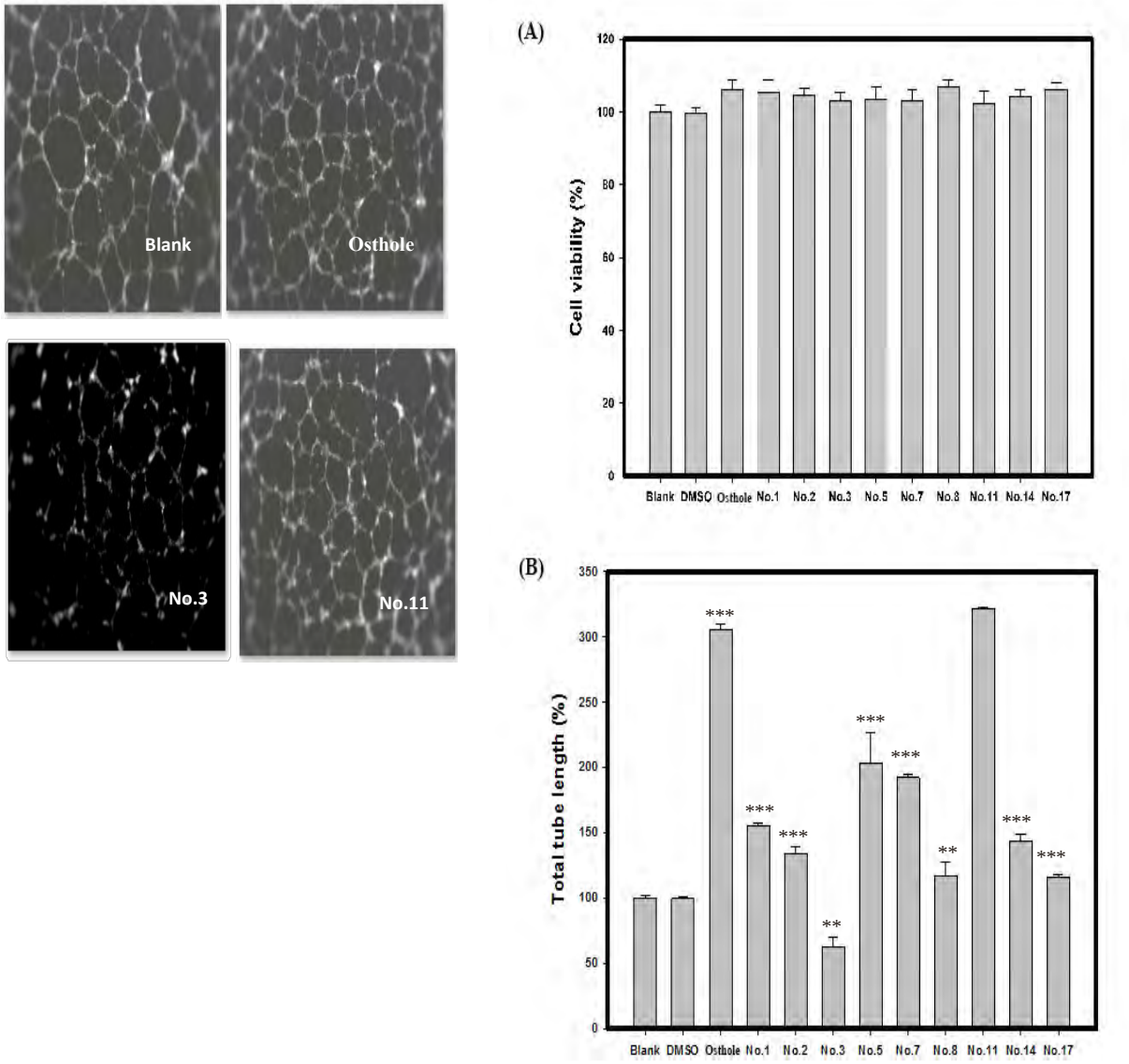
25. Tohda C, Kakihara Y, Komatsu K, Kuraishi Y. Inhibitory effects of methanol extracts of herbal medicines on substance P-induced itch-scratch response. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 599-601.
26. Chiou WF, Huang YL, Chen CF, Chen CC. Vasorelaxing effect of coumarins from Cnidium monnieri on rabbit corpus cavernosum. *Planta Med* 2001; 67: 282-284.
27. Ogawa H, Sasai N, Kamisako T, Baba K. Effects of osthole on blood pressure and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 26-31.
28. Chen ZC, Duan XB, Liu KR. The anti-allergic activity of osthole extracted from the fruits of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson. *Yao Xue Xue Bao* 1988; 23: 96-99.
29. Liu J, Zhang W, Zhou L, Wang X, Lian Q. Anti-inflammatory effect and mechanism of osthole in rats. *Zhong Yao Cai* 2005; 28: 1002-1006.
30. Wang CM, Guan W, Fang S, Chen H, Li YQ, Cai C, Fan YJ, Shi ZQ. Antifungal activity of the osthole derivative JS-B against Phytophthora capsici. *J Asian Nat Prod Res* 2010; 12: 672-679.
31. Zhang Q, Qin L, He W, Van Puyvelde L, Maes D, Adams A, Zheng H, De Kimpe N. Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity. *Planta Med* 2007; 73: 13-19.
32. Chou SY, Hsu CS, Wang KT, Wang MC, Wang CC. Antitumor effects of osthole from *Cnidium monnieri*: an in vitro and in vivo study. *Phytother Res* 2007; 21: 226-230.
33. Yang D, Gu T, Wang T, Tang Q, Ma C. Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 1430-1434.
34. Sun F, Xie ML, Zhu LJ, Xue J, Gu ZL. Inhibitory effect of osthole on alcohol-induced fatty liver in mice. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 127-133.
35. Zhang J, Xue J, Wang H, Zhang Y, Xie M. Osthole improves alcohol-induced fatty liver in mice by reduction of hepatic oxidative stress. *Phytother Res* 2011; 25: 638-643.

36. Teng CM, Ko FN, Wang JP, Lin CN, Wu TS, Chen CC, Huang TF. Antihaemostatic and antithrombotic effect of some antiplatelet agents isolated from Chinese herbs. *J Pharm Pharmacol* 1991; 43: 667-669.
37. Guh JH, Yu SM, Ko FN, Wu TS, Teng CM. Antiproliferative effect in rat vascular smooth muscle cells by osthole, isolated from *Angelica pubescens*. *Eur J Pharmacol* 1996; 298: 191-197.
38. Liang HJ, Suk FM, Wang CK, Hung LF, Liu DZ, Chen NQ, Chen YC, Chang CC, Liang YC. Osthole, a potential antidiabetic agent, alleviates hyperglycemia in db/db mice. *Chem Biol Interact* 2009; 181: 309-315.
39. Qi Z, Xue J, Zhang Y, Wang H, Xie M. Osthole ameliorates insulin resistance by increment of adiponectin release in high-fat and high-sucrose-induced fatty liver rats. *Planta Med* 2011; 77: 231-235.
40. Wang SJ, Lin TY, Lu CW, Huang WJ. Osthole and imperatorin, the active constituents of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, facilitate glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem Int* 2008; 53: 416-423.
41. Ji HJ, Hu JF, Wang YH, Chen XY, Zhou R, Chen NH. Osthole improves chronic cerebral hypoperfusion induced cognitive deficits and neuronal damage in hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2010; 636: 96-101.
42. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2007; 22: 659–661.
43. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors:review. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38: 258-268.
44. Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1028-1043.
45. Matsunaga T, Warltier DC, Tessmer J, Weihrauch D, Simons M, Chilian WM. Expression of VEGF and angiopoietin-1 and -2 during ischemia-induced coronary angiogenesis. Am J Physiol Heart Circ Ohysiol 2003; 285: H352-H358.
46. Gao X, Hu H, Zhu J, Xu Z. Identification and characterization of folliststin as a novel angiogenin-binding protein. FEBS Lett 2007; 581: 5505-5510.
47. Claffey KP. Molecular profiling of angiogenic markers. A step towards

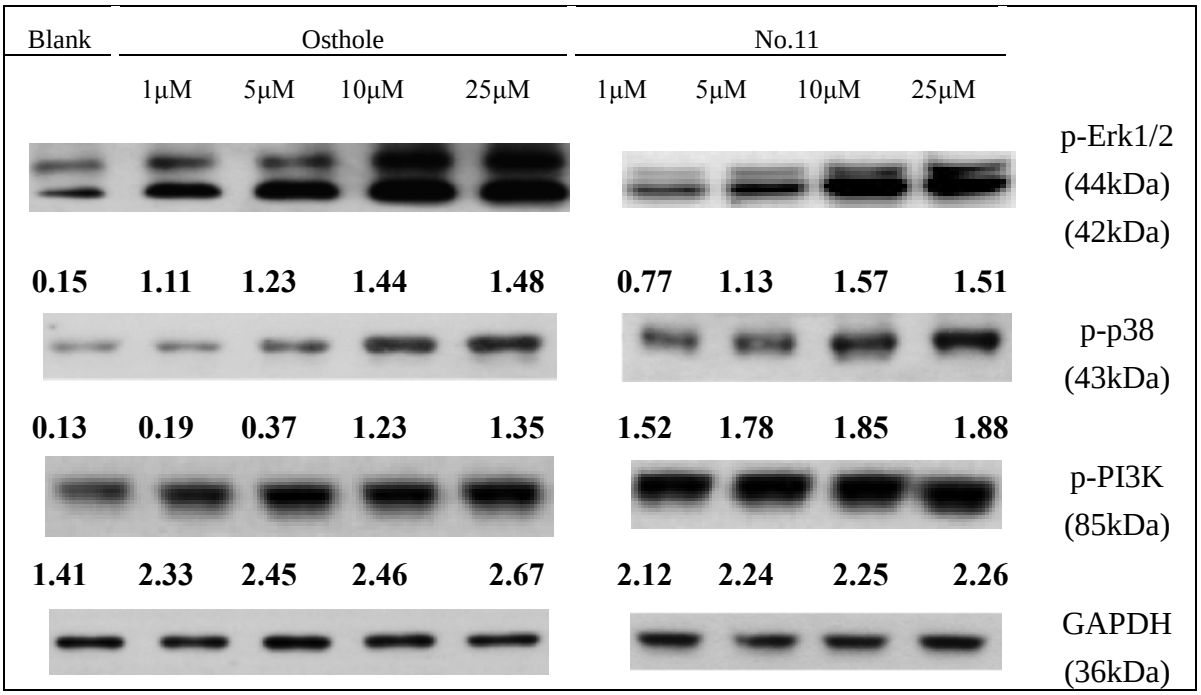
interpretive analysis of a complex biological function. Am J Pathol 2002; 161: 7-11.

48. Glienke J, Schmitt AO, Pilarsky C, Hinzmann B, Weiβ B, Rosenthal A, Thierauch KH. Differential gene expression by endothelial cells in distinct angiogenic ststes. Eur J Biochem 2000; 267: 2820-2830.
49. George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Mittelman A, Tiwari RK. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. J Hemat Oncol 2011; 4: 24.
50. Bouillot S, Tillet E, Carmona G, Prandini M, Gauchez AS, Hoffmann P, Alfaidy N, Cand F, Huber P. Protocadherin-12 cleavage is a regulated process mediated by ADAM10 protein. Ecidence of shedding up-regulation in pre-eclampsia. J Biol Chem 2011; 286: 15195-15204.
51. Watanabe K, Haseqawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, Abe M, Ohta H, Imagawa K, Hojo K, Maki H, Sonoda H, Sato Y. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. J Clin Invest 2004, 114: 898-907.
52. Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nature Rev Drug Discover* 2006;5: 295-309.
53. Jialal I. Endothelial progenitor cell status in metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 2010; 8: 193-195.
54. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 286-294.

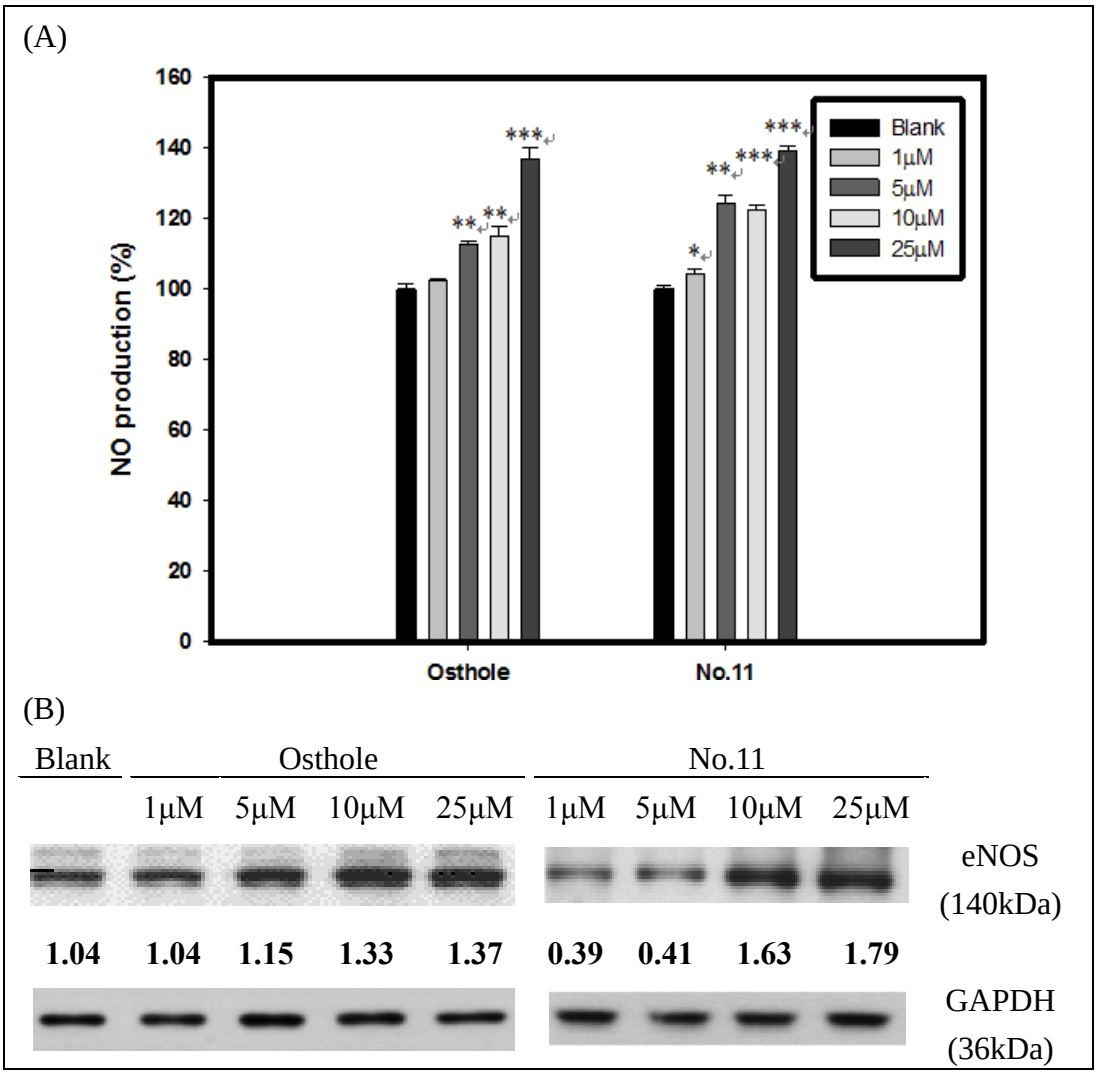
柒、圖、表



圖一、內皮前驅細胞經 10μM 的蛇床子素及其結構衍生物作用後細胞存活(A)及管柱生成(B)之情形。以 Student t-test 分析細胞實驗兩組間差異（treated sample vs. DMSO），*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$。

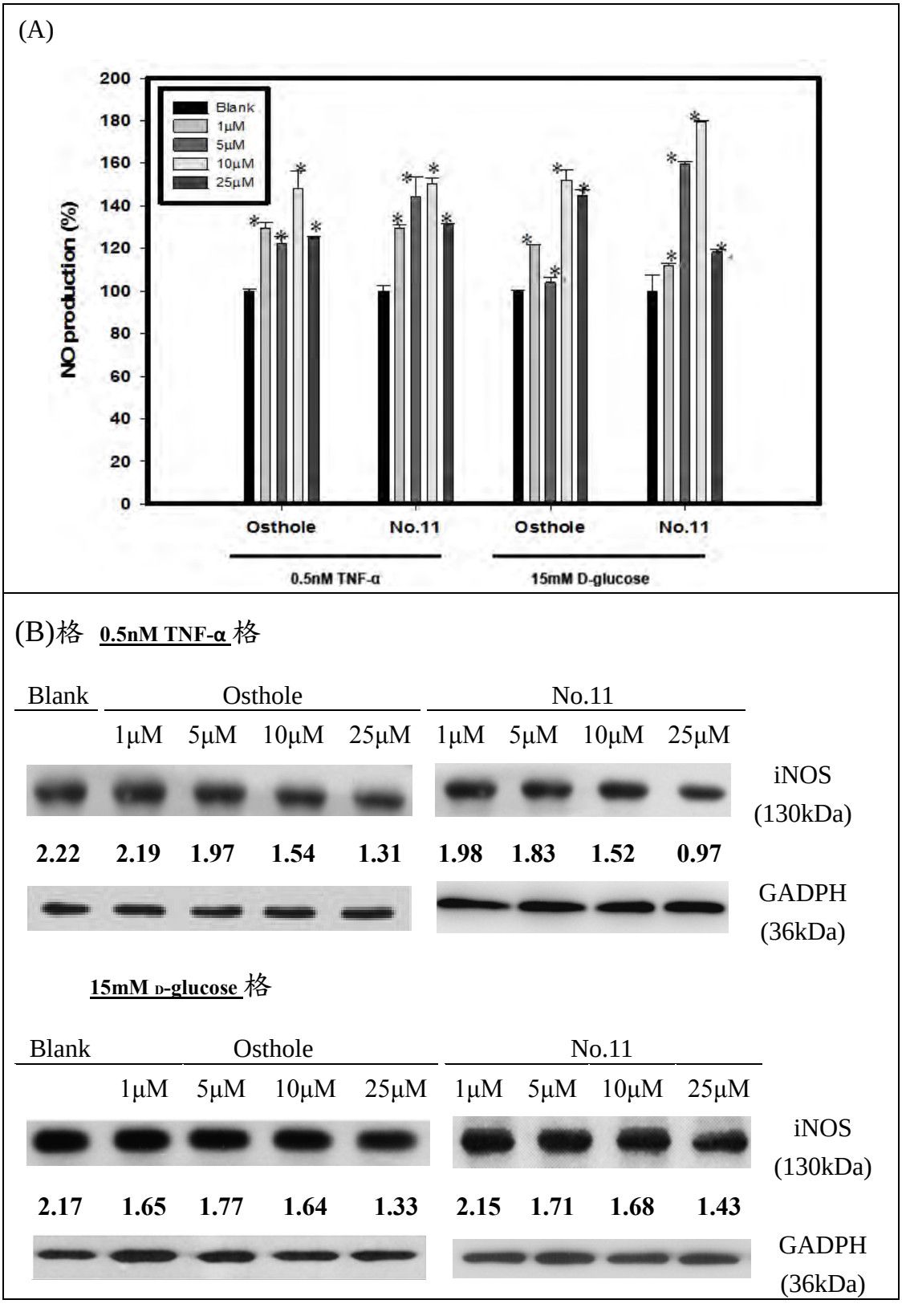


圖二、內皮前驅細胞經 24 小時不同濃度的蛇床子素及其結構衍生物 No.11 作用後，p-Erk1/2、p-p38MAPK 和 p-PI3K 磷酸化蛋白質表現量。



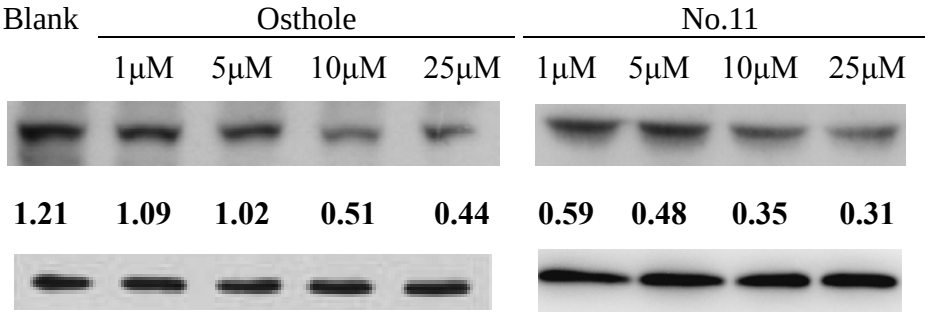
圖三、內皮前驅細胞經不同濃度的蛇床子素及其結構衍生物 No.11 作用後，NO 生成率(A)和 eNOS 蛋白質表現(B)。

以 Student t-test 分析細胞實驗兩組間差異（treated sample vs. blank），*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

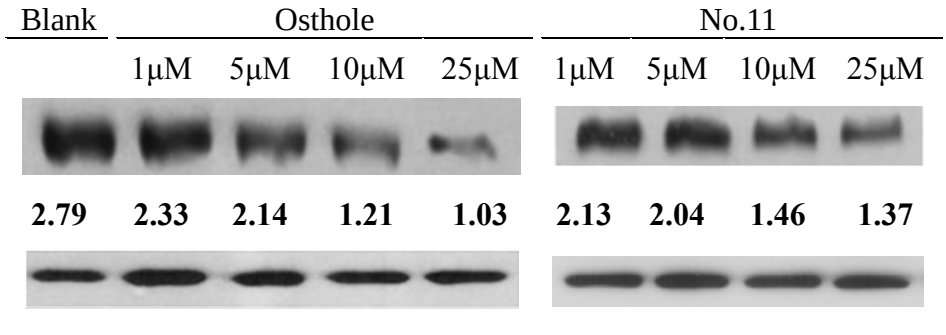


圖四、在模擬慢性發炎的情況下內皮前驅細胞不同濃度的蛇床子素及其結構衍生物 No.11 作用後 NO 生成率(A)和 eNOS 蛋白質表現(B)。以 Student t-test 分析細胞實驗兩組間差異(treated sample vs. blank)，*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

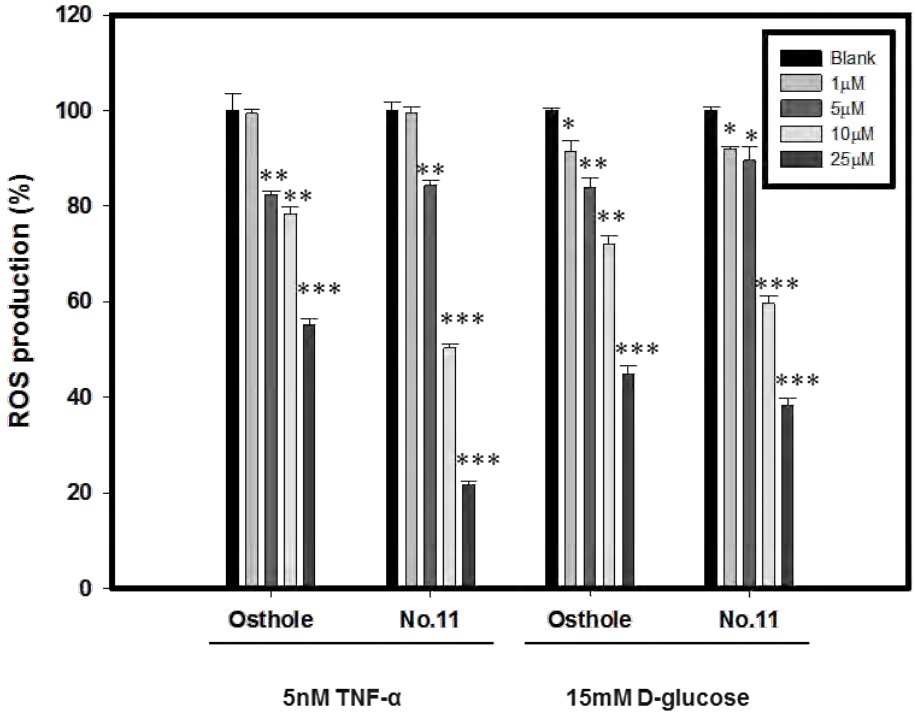
0.5nM TNF-α 格



15mM D-glucose 格

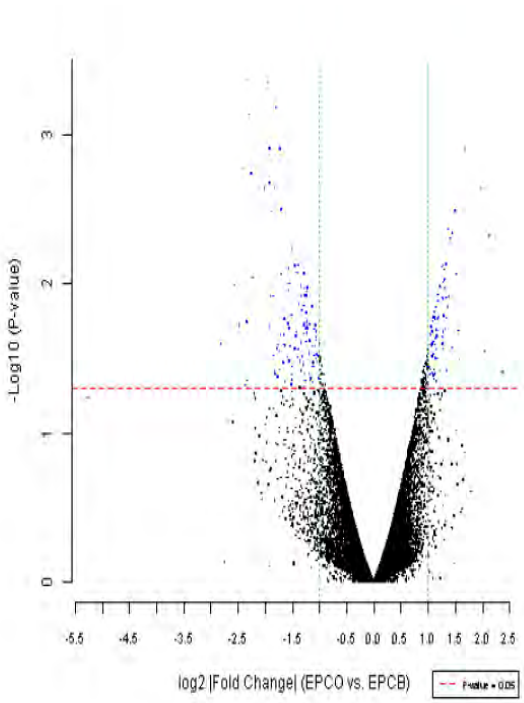


圖五、在模擬慢性發炎的情況下內皮前驅細胞不同濃度的蛇床子素及其結構衍生物 No.11 作用後 COX-2 蛋白、質表現量。

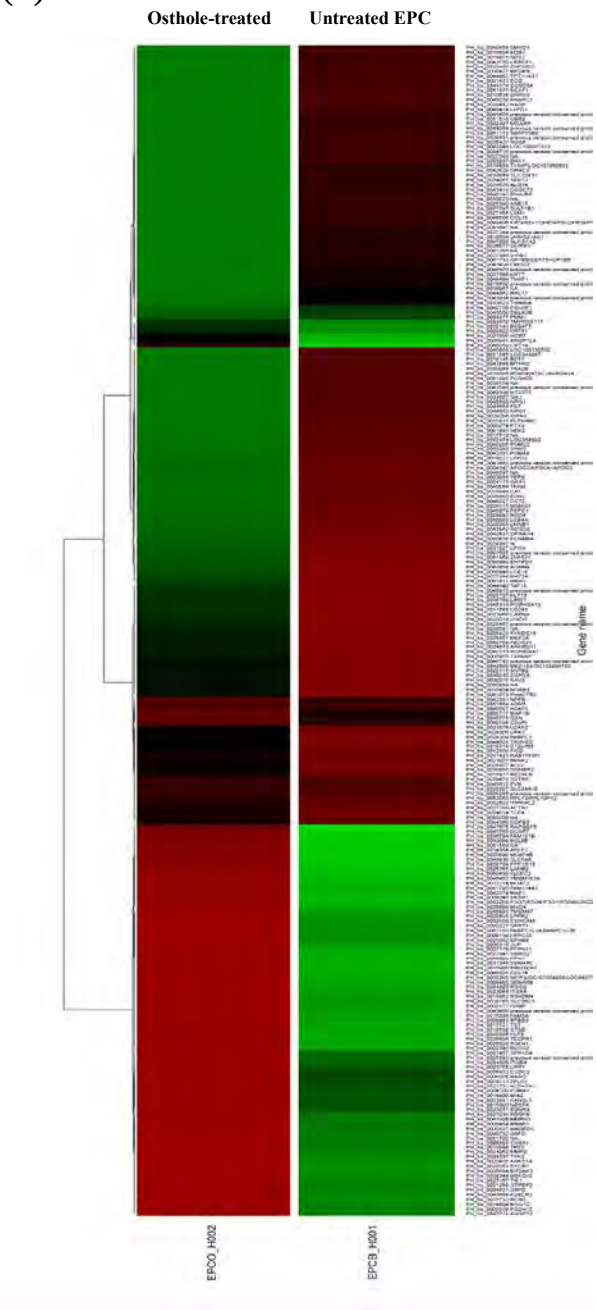


圖六、在模擬慢性發炎的情況下內皮前驅細胞不同濃度的蛇床子素及其結構衍生物 No.11 作用後反應氧族產率。以 Student t-test 分析細胞實驗兩組間差異（treated sample vs. blank），*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$。

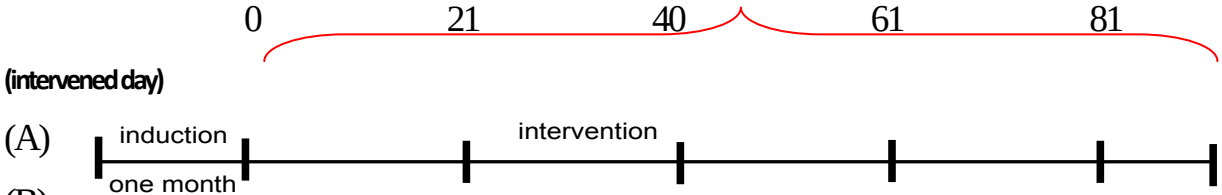
(A)



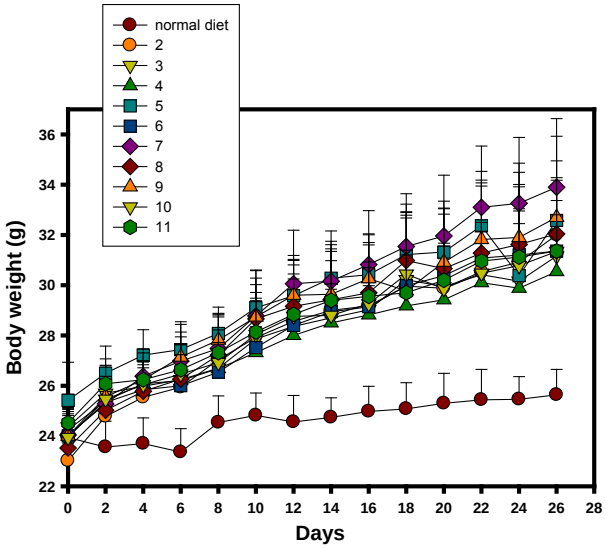
(B)



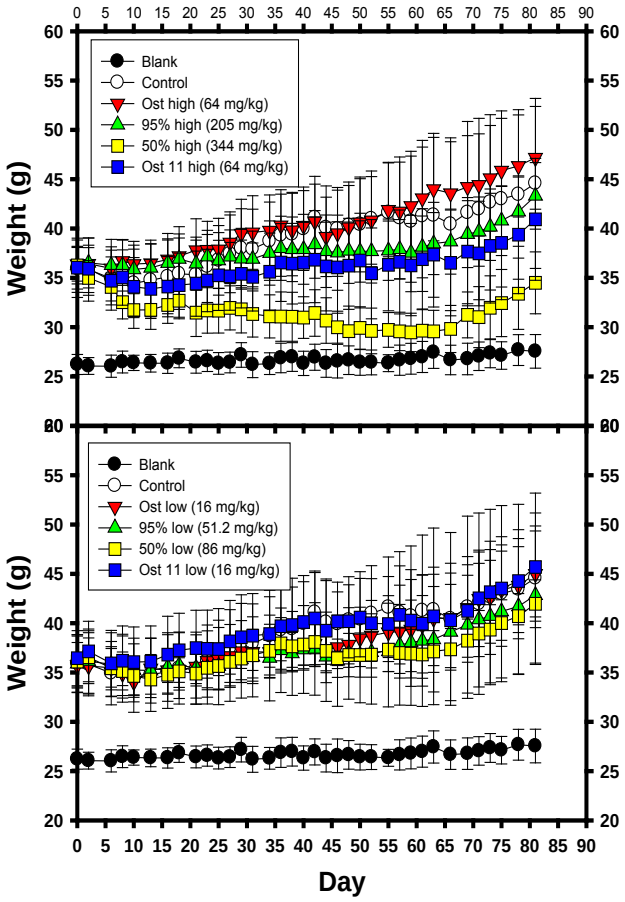
圖七、以基因晶片分析蛇床子素處理內皮前驅細胞後之差異基因分析。(A)選取標準為基因表現差異為 log2|Fold change|≥1 且 P <0.05（藍色點部分）；(B)差異基因群分類



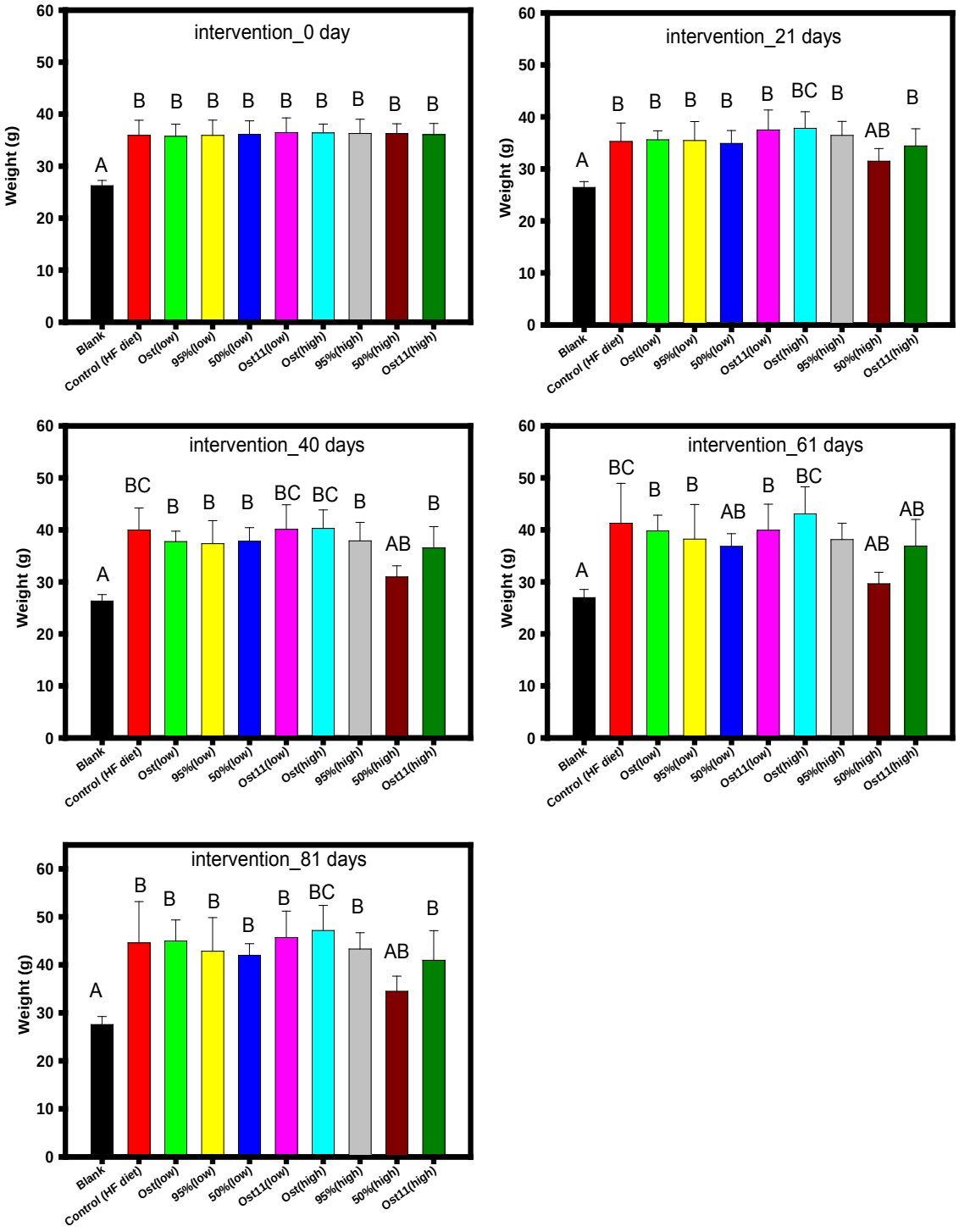
Induction period



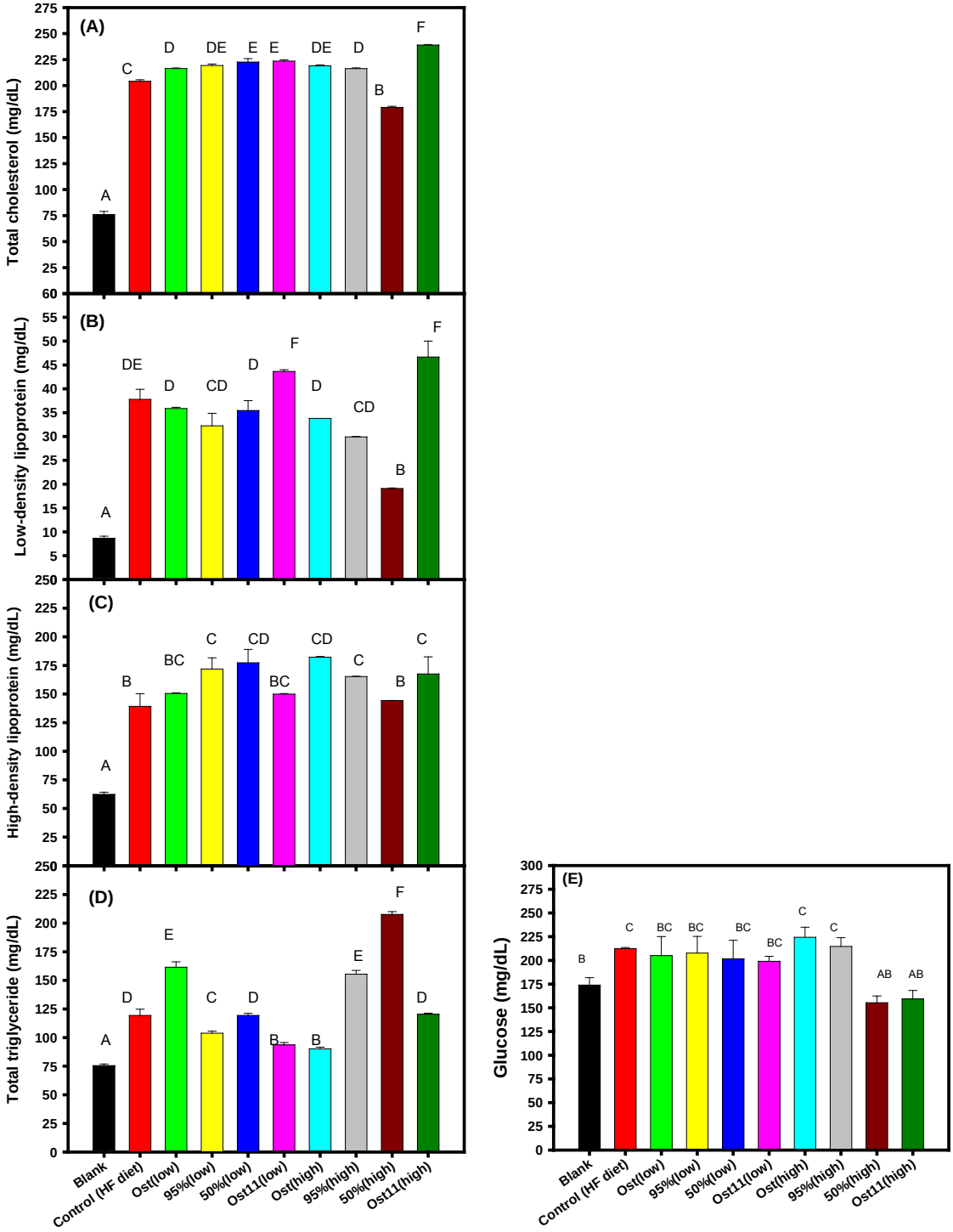
Intervened period



(C)

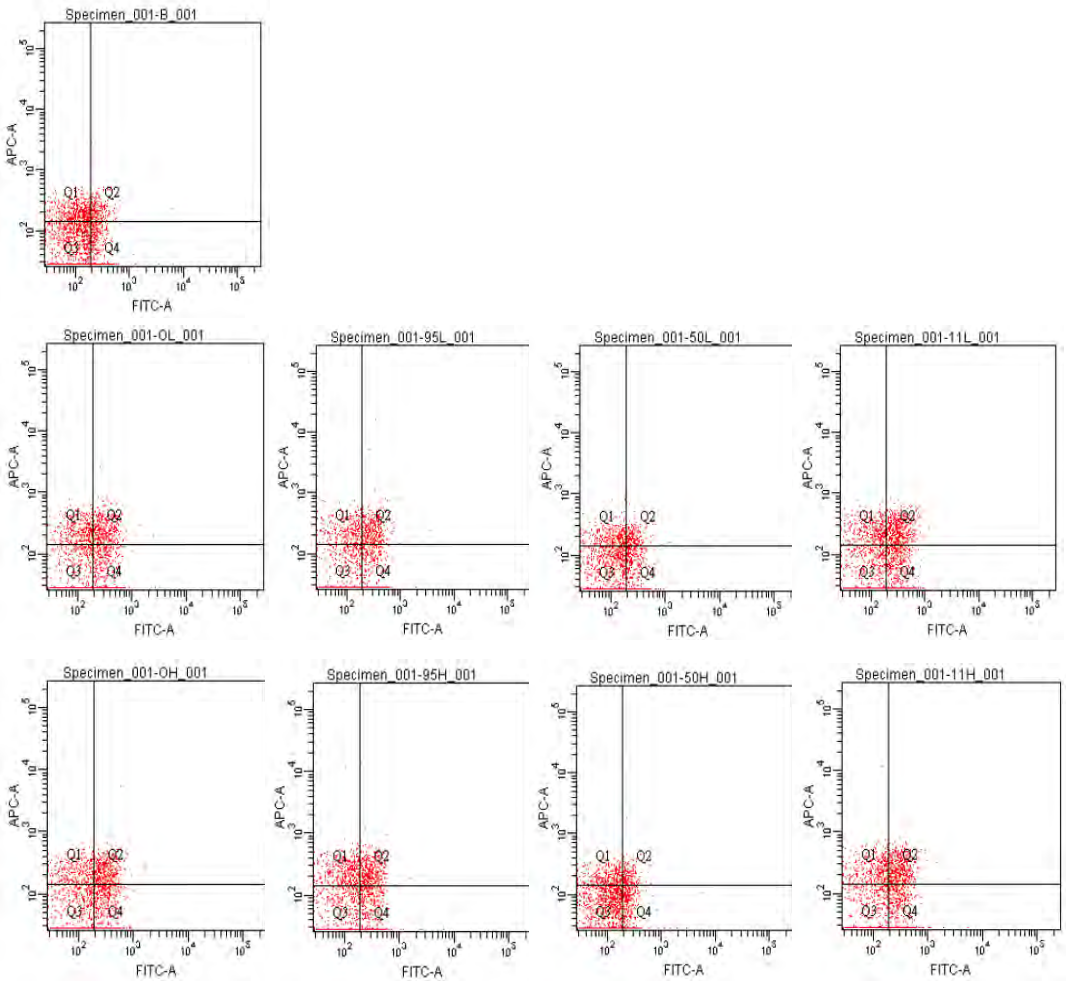


圖八、以一般飼料與高脂飼料誘導肥胖鼠與蛇床子抽取物、蛇床子素及其結構類似物 No11 介入之動物餵食試驗之體重變化。(A)餵食流程；(B)以蛇床子抽取物高劑量（上圖）及低劑量（下圖）介入之動物餵食試驗之體重變化；(C)以蛇床子抽取物高劑量及低劑量介入不同天數之動物體重變化。以 One-way ANOVA 及 post hoc Tukey's test 分析，標示不包含相同字母則是 $P < 0.05$。

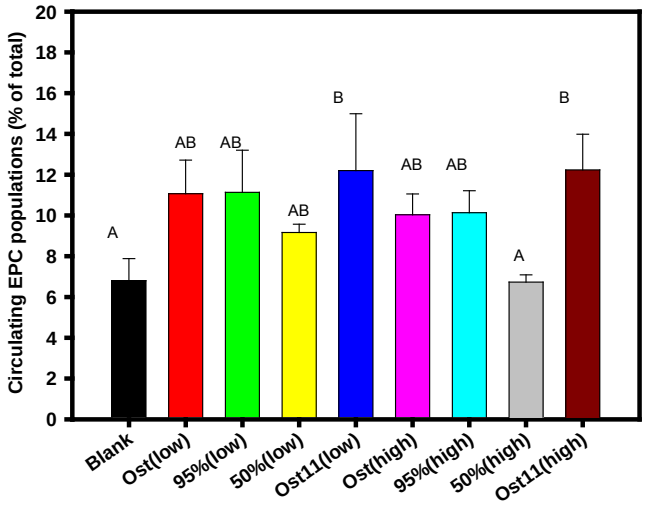


圖九、以一般飼料（空白組）與高脂飼料誘導肥胖鼠與蛇床子抽取物介入之動物餵食試驗之血液生化指數。(A)總膽固醇，(B)低密度脂蛋白，(C)高密度脂蛋白，(D)總三酸甘油酯，(E)血糖。以 One-way ANOVA 及 post hoc Tukey's test 分析，標示不包含相同字母則是 $P < 0.05$。

(A)

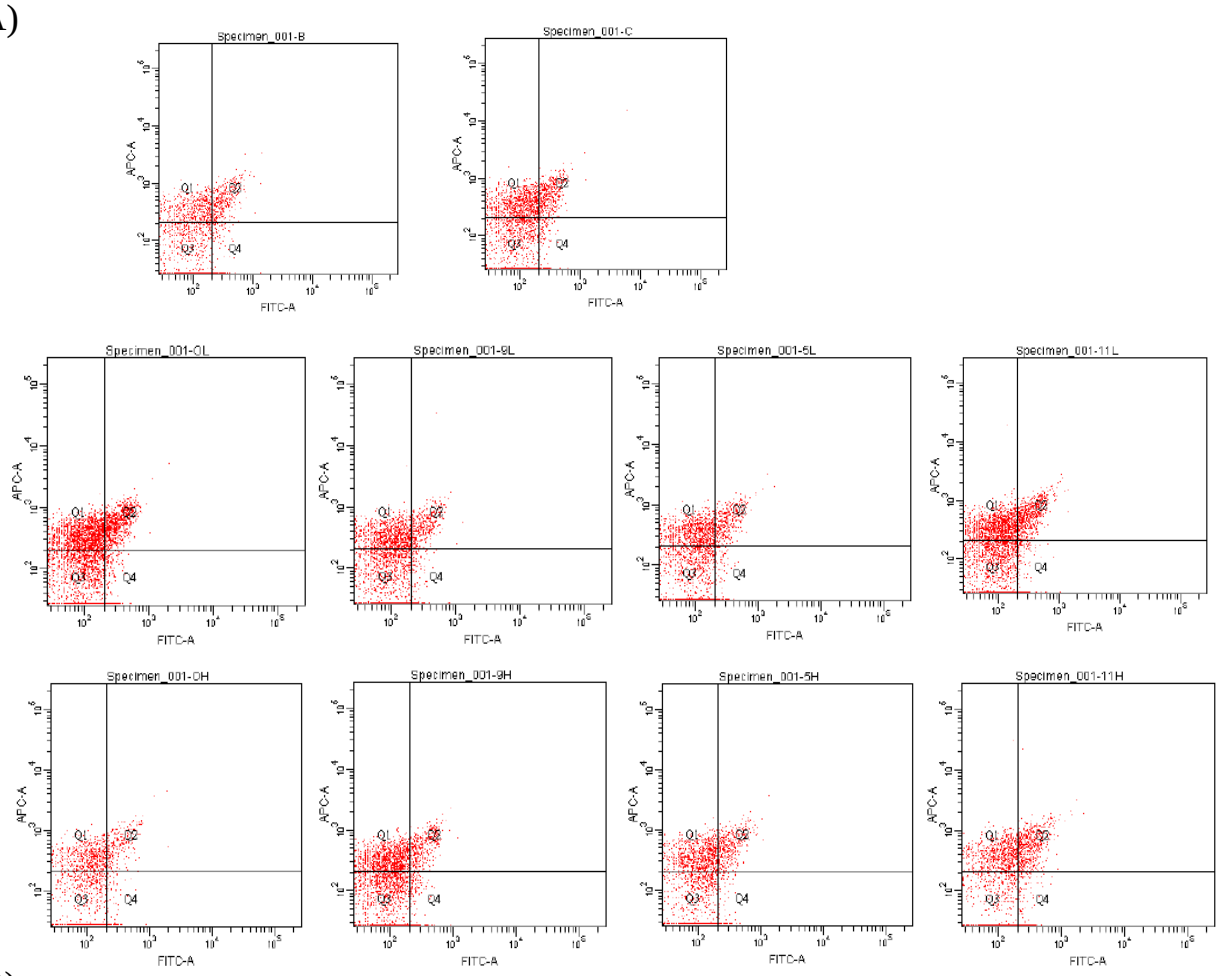


(B)

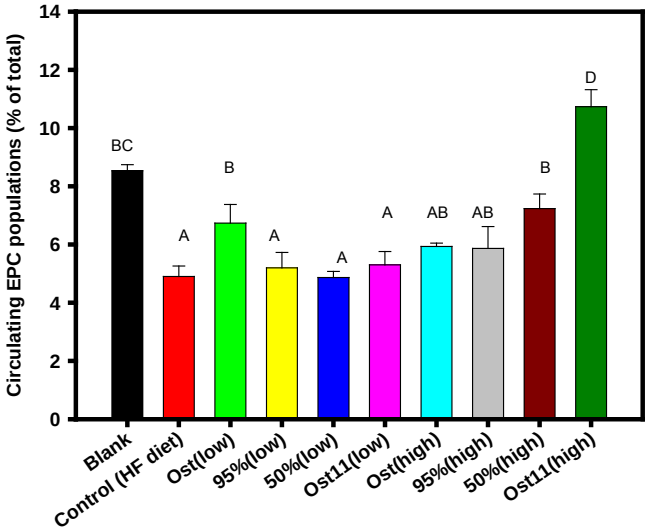


圖十、五週齡小鼠餵食蛇床子抽取物、蛇床子素及其結構類似物 No.11 一個月，取小鼠全血以流式細胞儀測定血管內皮前驅細胞群變化。(A)餵食組流式細胞儀代表圖；(B)循環內皮前驅細胞含量變化。以 One-way ANOVA 及 post hoc Tukey's test 分析，標示不包含相同字母則是 $P < 0.05$。

(A)



(B)

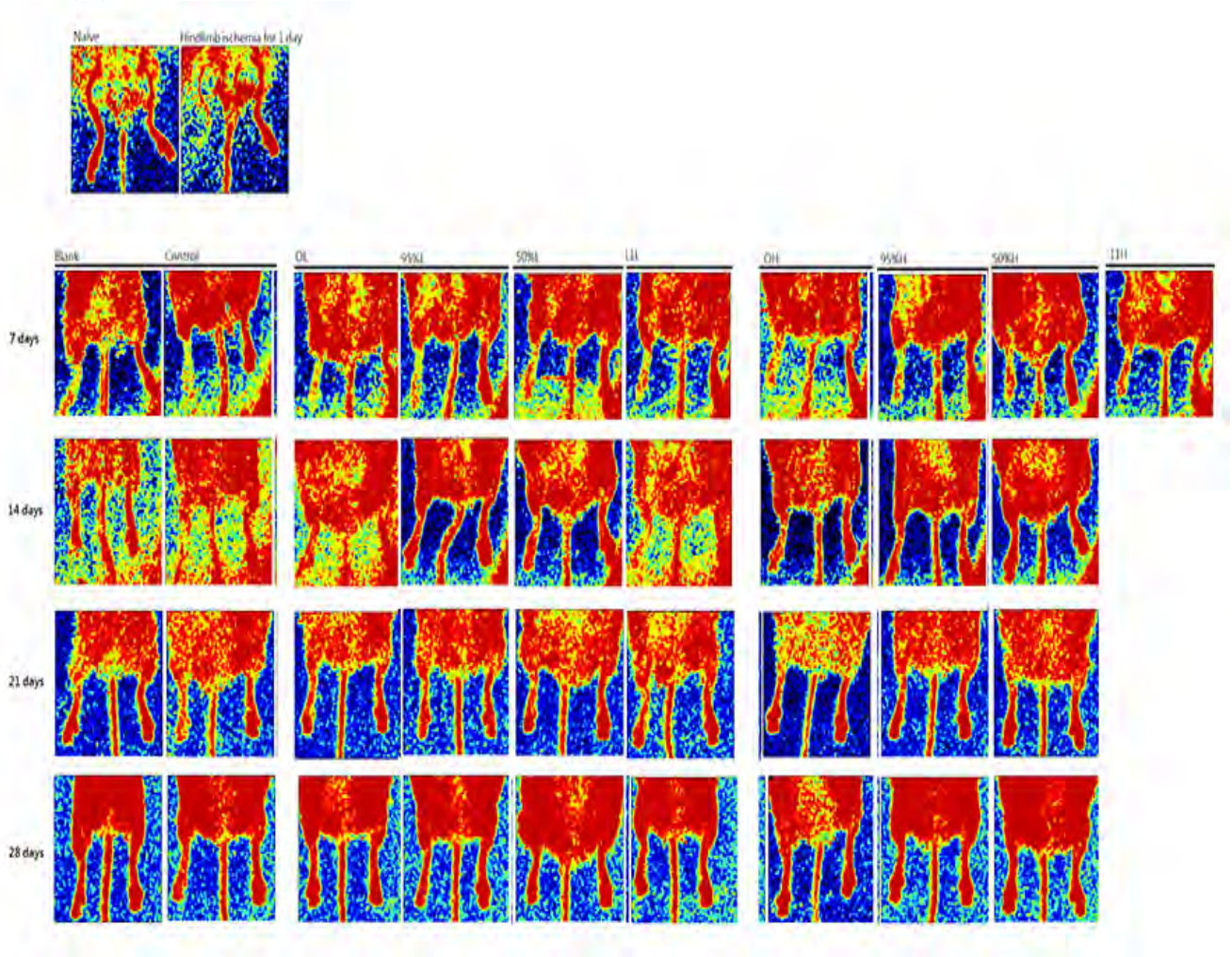


圖十一、以一般飼料（空白組）與高脂飼料誘導肥胖鼠與蛇床子抽取物、蛇床子素及其結構類似物 No11 介入之動物餵食試驗 81 天，取小鼠全血以流式細胞儀測定血管內皮前驅細胞群變化。(A)餵食組流式細胞儀代表圖；(B)循環內皮前驅細胞含量變化。以 One-way ANOVA 及 post hoc Tukey's test 分析，標示不包含相同字母則是 $P < 0.05$。

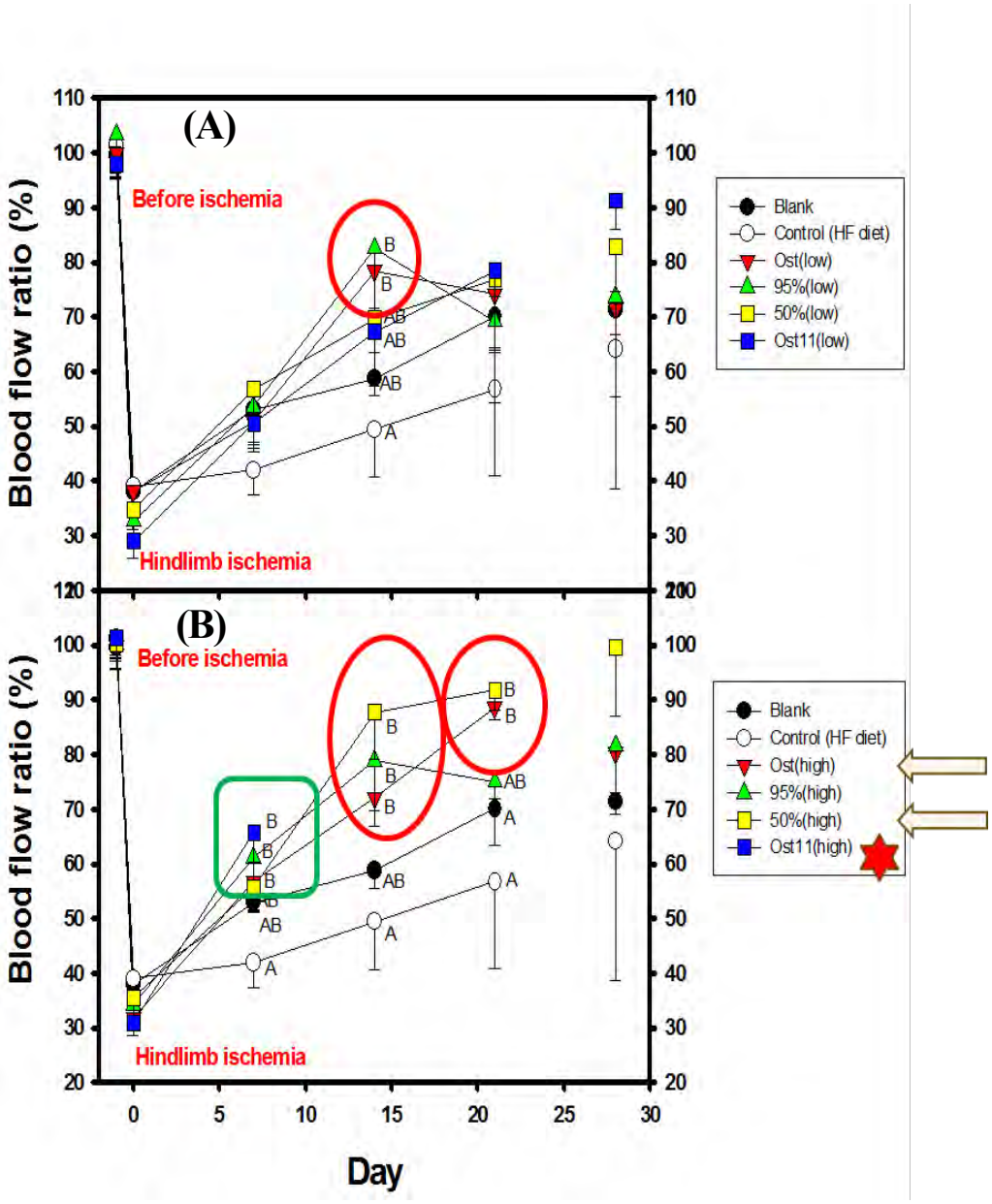
(A)



(B)



圖十二、以一般飼料（空白組）與高脂飼料誘導肥胖鼠與蛇床子抽取物、蛇床子素及其結構類似物 No11 介入之動物餵食試驗 81 天，進行下肢結紮，以雷射都卜勒灌流影像儀評估下肢血流恢復狀況。(A)雷射都卜勒灌流影像儀評估肥胖小鼠下肢血流恢復狀況；(B)雷射都卜勒灌流影像代表圖。分組：L，低劑量；H，高劑量；O，蛇床子素；11，蛇床子素結構類似物 No11。



圖十三、以一般飼料（空白組）與高脂飼料誘導肥胖鼠與蛇床子抽取物、蛇床子素及其結構類似物 No11 介入之動物餵食試驗 81 天，進行下肢結紮，以雷射都卜勒灌流影像儀評估四週期間下肢血流恢復狀況定量圖。(A)低劑量組；(B)高劑量組。血流比例(blood flow ratio, %)為（手術後下肢缺血）/（未手術正常下肢另一側）×100%。以 One-way ANOVA 及 post hoc Tukey's test 分析同一週各組血流，標示不包含相同字母則是 $P < 0.05$。

編號：MOHW103-CMAP-M-114-122404

健全中醫藥管理體制與法規環境(2-2)

陳憲堂
中華民國藥事品質改革協會

摘　要

本計畫為維護民眾中藥使用安全，建置有效的法規諮詢系統及作業平台，建構中醫藥衛生產業發展優勢環境，提昇中醫藥產業之全球競爭力。本計畫組織「中醫藥法規諮詢小組」，建置法規諮詢作業平台，由具醫藥實務經驗之執業律師、法學教授及專業人員，就中醫藥司所交議及業界所提出有關中醫藥之 39 件法律問題，提供法律見解及諮詢服務，並分類彙編，提供政策及執行參考。

本計畫檢視各項有關中醫藥之行政規章及解釋令函共計 22 筆，蒐集、整理世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關中醫藥法律規章計 12 篇，就中醫藥組織變革、中藥產品分類分級使用管理機制、與國際接軌之法規協合等方向，研擬藥事法及其子法規修正草案及適當法律位階之中醫藥管理法規，邀集中醫、中藥、法學相關公、學、協會及消費者團體等共同座談研討「中醫藥組織」及「中藥產品分類分級使用管理機制」等法規架構，整合所得法律見解及研討結果，提請中醫藥司作政策考量。

關鍵詞：管理體制、法規諮詢、組織變革、法規協合

Number: MOHW103-CMAP-M-114-122404

Study on Building an Intact Management System and Regulatory Environment for Chinese Medicines (2-2)

Hsien-Tang Chen
Quality Improvement for Pharmaceutical Affairs Association, Taiwan

ABSTRACT

The purpose of this project is to maintain the safety for the Chinese medicine usage through an effective regulatory advisory system and construct a predominant environment following the enhancement of the global competitiveness for the Chinese medicine industry. A task force of consultation regarding regulations of TCM from different backgrounds including medical, pharmaceutical and legislation specialists is formed and offers legal opinions and consulting corresponding to legal 39 cases that Department of Chinese Medicine and Pharmacy submits and legal issues related to TCM that proposed by the industry.

In this study, we collected and sorted out 22 regulations and explanations related to TCM of Taiwan and 12 TCM regulations of the USA, European Union, Japan and Mainland China. Appropriate regulations and amendment were proposed for policy-making reference based on the organization reform, categorized/graded applications of products, and harmonization of international regulations.

The draft of framework for TCM organizations and ategorized/graded applications of products were established and reviewed in a public seminar involved with Chinese medical, pharmaceutical, legislation experts, consumer societies and relative associations. The draft amendment clauses are formulated and then made recommendations to Department of Chinese Medicine and Pharmacy.

Keywords: management system, regulation consulting, reorganization, regulation harmonization

壹、前言

中醫藥司以中醫藥研究為任務導向，目標在促進中醫現代化、中藥科學化及中醫藥國際化，以提供中醫藥管理政策之實證依據及重要醫藥衛生問題之解決對策，建構中醫藥醫療保健服務之優質環境。

面對人民期待品質優良安全有效之中藥產品，以及業界期待建構穩固基礎推動中藥產業發展，中藥產業應即建置良好的管理與輔導機制，並依循以追求高品質高服務以及高利潤的產業經濟共構下，將社會需求與經濟市場價值，透過法律的過程，將成為實現穩定成長的力量[(1)]。

中醫藥之臨床經驗已為國際間公認在治療人類疾病上有許多發展空間，尤其是尋求臨床發展之主要目標，惟中藥成分複雜，有效成分不明，內含物質變異性大，方劑中常含有不純物及雜質，作用效果欠缺統計方法的確立，以及藥品安定性不易確定等之特性。

世界衛生組織及歐洲議會皆認為 CAM（Complementary and Alternative Medicine）的重要性與日俱增，醫藥政策不容忽視，必須保證病人足以獲得經過適當訓練的最佳專業人員，以及具有可靠品質（quality）、安全（safety）及療效（efficacy）的藥物[(2)]，歐洲議會認為必須評估中草藥具有臨床安全性及有效性[(3)]，並應公開聲明各草藥產品有關的風險[(4)]。

根據 2008 年第六十一屆世界衛生大會以 WHA61.21 號決議通過的「公共衛生、創新和智慧財產權全球戰略和行動計畫」，在研究與創新基礎上進一步發展傳統醫學，要求各國政府有責任保障本國人民的健康，應制定國家政策、法規和標準，作為國家綜合衛生體系的一部分，以確保傳統醫學的適當、安全和有效使用[(5)]。

WTO 及世界主要接受中草藥國家，皆以藥品之安全、有效、品質三個方向，建立法規基準，以保護消費者。世界各國在傳統醫藥組織分工上，多以獨立機關執行政策法規。例如中國大陸，國家食品藥品監督管理局（由衛生部管理），負責藥品、醫療器械註冊和監督管理，其中包括負責制定中藥、民族藥監督管理規範並組織實施，擬訂中藥、民族藥品質標準，組織制定中藥材生產品質管制規範、中藥飲片炮製規範並監督實施，組織實施中藥品種保護制度。國家中醫藥管理局（亦由衛生部管理）負責擬訂中醫藥政策法規，承擔中醫醫療、預防、保健、康復及臨床用藥等的監督管理責任。擬訂有關中西醫結合管理規範和技術標準，中藥資源的保護、開發和合理利用，中醫藥科學研究、技術開發規劃，指導中醫藥科研條件和能

力建設，管理國家重點中醫藥科研項目，促進中醫藥科技成果的轉化、應用和推廣。歐盟則以 EFCAM (the European Federation for Complementary and Alternative Medicine)作為 CAM 促進整體健康（holistic and integrated health care）的一個合作平台，以提供民眾於需要時選擇之傳統醫療保健方式[6]。

中藥由動、植、礦物等農作物形式存在的中藥材原料，進行加工炮製成為飲片，再經過藥廠在 GMP 的條件下製成製劑，其製造發展的過程中，每一個環節皆須科技政策與法規的介入。例如在中藥材原料部分，對於基原研發鑑定技術，以農業技術與管理投入中藥植物栽培，發展檢驗技術檢測主成分、生菌數與農藥重金屬殘留；在炮製的過程中，分析古方炮製方法研訂炮製規範，並比對炮製前後之成分與療效；對於飲片，則以放射線技術研發儲存方法，以及包裝技術；製劑部分，則研發製藥技術增進品質的均一性，以生物技術參與指標成分、有效成分之定量比對。中藥飲片之炮製方法，以及其減毒增效之效益，為我國文化資產，且具特殊性，除中國大陸以外，為世界各國所無。

由於中草藥成分複雜，有效成分不明，內含物質變異性大，方劑中常含有不純物及雜質，作用效果欠缺統計方法的確立，以及藥品安定性不易確定等之特性，故在專利保護上常有不易掌握的問題。中草藥產品如果以新療效（新適應症）作為專利保護的標的時，常會與西藥一樣，因為侵權行為常發生於藥商供應藥品的對象，致不易對其要求損害賠償，而產生盲點。專利法所規範的新發明，需具備未曾公開或無相同前案之「新穎性」，非為熟悉該項技術者所能輕易完成之「進步性」，以及具統計學意義及再現性之「產業利用性」三個要件。中草藥之新藥開發，可以申請專利法中有關「發明」標的，請求專利保護 20 年。例如新物質純化物或混合物，可以化學結構圖譜申請「物的發明」，可以新製造方法或新製造過程申請「方法的發明」，以及可以效能增加或新療效新適應症申請「用途的發明」。重要的是，必須打破對於中藥藥名的迷失，重新命名抽提物，以嶄新的複合物方式申請專利，才能真正的達到保護智慧財產的目的[7]。

現行中藥藥事相關法律規章[8]，在實務執行上與國際法及現代科技管理未能相容契合，亦有不明確之處致執行時多有窒礙難行。為使中藥產品有效安全，製造行銷符合經濟市場規模，研發資源充分有效利用，中藥流通正確符合消費者對健康的期待，必須制定周延的法令規範[9]予以配合，明確有效執行。故持續更新法規資料庫之內容，供業界及時查詢最新之法規資料，並依保護消費者用藥安全，以及維護業界生存發展空間，鬆綁法

規擬具修正意見，方能達到提升我國中醫藥產業競爭力之目的。

與中藥製造與流通有關之法律規章，包括藥事法、藥師法、全民健康保險法、全民健康保險醫療辦法、全民健康保險藥價基準、健康食品管理法、藥師從事中藥製劑之製造、供應及調劑須修習中藥課程標準、藥師執行中藥業務管理辦法、植物抽取新藥臨床試驗基準、成藥及固有成方製劑管理辦法、行政院衛生署處理民間中藥驗方實施要點、藥品查驗登記審查準則、藥物樣品贈品管理辦法、藥品優良臨床試驗準則、藥物委託製造及檢驗作業辦法、藥物製造工廠設廠標準、藥物科技研究發展獎勵辦法、藥物製造業者檢查辦法。其中與業界經營發展最相關者，為攸關業界產能產值及成本效益之「藥物製造工廠設廠標準」，獎勵提昇品質經濟效益之「藥物科技研究發展獎勵辦法」，整合中藥藥食同源產品效能標示之「健康食品管理法及施行細則」，簡便快速審查機制之「藥品查驗登記審查準則」，適合中藥新藥臨床試驗之「藥品優良臨床試驗準則」及「植物抽取新藥臨床試驗基準」等。

法，載舟覆舟也，尤其對製藥工業等生技產業更如是。政府倘未能定出適時、適法、適用的法律規章，對產業的長足進步將有所妨害。世界各先進工業國都把生技產業列為 21 世紀的重點科技項目，因屬新興產業，有遠見的創新法規將可成為我國立法或修法時之參酌。我國中醫藥法規應與國際相關法規接軌，以利臺灣產業國際發展[10]。

中藥相關法規為保護消費者的法律，同時亦應在保護消費者之前提下，促進產業的發展。為因應現行中藥法規在實務上可能產生諸多適用上的問題，故宜儘速建立一個具有雙向溝通功能的互動模式，有效的法規諮詢平台，俾順利及時處理現行法規或解釋令函是否符合法制環境，以及是否符合業界需求，與世界各國相關法規系統比較分析，研擬一個適合中藥環境的整合管理機制，以及研擬修正適當的法規條文，提供中醫藥司作修法政策方向。

貳、材料與方法

一、繼續運作「中醫藥法規諮詢小組」，有效執行所定法規諮詢系統。

(一) 繼續聘請醫藥實務經驗之執業律師、法學教授及專業人員，組織「中醫藥法規諮詢小組」。

(二) 原則每月集會一次，必要時臨時召集，邀請中醫藥司指導，必要時邀請食品藥物管理局指導，就中醫藥司所交議之法規諮詢案件，以及業界透過法規諮詢平台系統所詢問有關中醫藥法規問題，作成議案（預估每月三件），討論提供法律諮詢意見。

(三) 平時就中醫藥司同仁在工作上或業界所詢問之一般中醫藥法規案件，由專任助理接受後，交主持人或協同主持人依法律原理原則回復，或徵詢小組成員審議後，作成法律諮詢意見回復。

(四) 採互動方式，協助中醫藥司就業界提問有關之中醫藥法規問題，回復諮詢結果意見或相關資訊。

(五) 如需審議，提報「中醫藥法規諮詢小組」審議完成後，陳報中醫藥司。

二、定期彙編中醫藥法規諮詢案件審議結果，提供各相關公、學、協會參考。

(一) 每月彙整「中醫藥法規諮詢小組」審議完成之案件，以及業界提問之諮詢結果意見，依「產品製造管理」、「產品查驗登記管理」、「藥事專業人員法律行為管理」及「藥事機構管理」之類別，分類整理。

(二) 每三月將分類整理之審議諮詢結果意見，整理成冊，交中醫藥司作為法規實務使用，並提供電子檔案供參。

三、檢視現行之行政規章及解釋令函，比較世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關之法律規章。

(一) 購買或上網查詢世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關中醫藥之相關法律規章資料。

(二) 每月檢視我國現行之行政規章及解釋令函，與世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關之法律規章比較分析。

(三) 分析結果提報每月召開之「中醫藥法規諮詢小組」審議。

(四) 就攸關政策面之各國有關中藥製造與流通管理具有參考價值部分，提供中醫藥司參考。

(五) 所查得之法規及判解資料，依中醫藥司已建置之「中醫藥資訊網」資訊系統格式，於第 5 月及第 11 月二次提供更新資料庫。

四、以消費者保護為宗旨，扶植中藥製藥產業為目標，評估分析現行與中藥藥事相關之法規，依中醫藥司指示政策方向，研擬相關法規修正草案及因應法律授權之藥事法修正草案。

(一) 評估分析現行《藥事法》、藥品查驗登記審查準則、藥品優良臨床試驗準則、行政院衛生署處理民間中藥驗方實施要點等法規，提出法律見解。

(二) 依中醫藥司指示政策方向，研擬相關法規修正草案。

五、配合中醫藥司組織調整規劃，探討中藥產品分類分級使用管理機制，以及與國際接軌之法規協合等方向，分析研擬適合中醫藥環境之管理機制及法規修正方向。

(一) 配合中醫藥司組織調整規劃，參考中華人民共和國之國家食品藥品監督管理局與國家中醫藥管理局之分工，評估分析現行組織法規，提出法律見解。

(二) 探討中藥產品分類分級使用管理機制，參考歐盟分為許可、免除許可及食品添加劑之分類，以及食品管理法與健康食品管理法，評估分析現行中藥產品管理法規，提出法律見解。

(三) 參考世界衛生組織及歐盟對 CAM 在藥物品質、安全與療效基準，以及臨床試驗安全性及有效性風險評估的要求，評估分析與國際接軌之法規協合方向，提出法律見解，研擬適合中醫藥環境之管理機制及法規修正方向。

(四) 依中醫藥司指示政策方向，研擬「中醫藥組織」、「中藥產品分類分級使用管理機制」及「中藥不良反應」等法規修正草案。

六、邀請中醫、中藥、法學相關公、學、協會及消費者團體等，共同座談研討所擬具適合中醫藥環境之管理機制及適當法律位階之「中醫藥組織」及「中藥產品分類分級使用管理機制」等法規草案，整合所得法律見解及研討結果，提請中醫藥司作政策考量。

(一) 配合中醫藥司所委辦有關中醫藥有利發展條件之研究計畫成果，研擬適合中醫藥環境之管理機制及法規。

(二) 邀請中醫、中藥、法學相關公、學、協會及消費者團體等，舉辦座談會。

(三) 座談研討所擬具之「中醫藥組織」及「中藥產品分類分級使用管

理機制」等法規草案。

(四) 整合所得法律見解及研討結果，提請中醫藥司作政策考量。

七、提具總結報告。

(一) 彙編「中醫藥法規諮詢小組」針對中醫藥法規諮詢案件審議結果。

(二) 彙整各項分析資料，提出具體之法律整編內容，詳細敘明資料來源、理由及法律見解。

(三) 各項法案依其修正內容、目的，執行人權及性別分析，包括女性參與，規範內容未區別對象，執行方式無性別、性傾向或性別認同有不同差異。

參、結果

一、繼續運作「中醫藥法規諮詢小組」，有效執行所定法規諮詢系統。

(一) 組織「中醫藥法規諮詢小組」，進行諮詢議題之審查及討論。

(二) 就中醫藥司所交議之法規諮詢案件，以及業界透過法規諮詢平台系統所詢問有關中醫藥法規問題，作成議案，討論提供法律諮詢意見。另有關中醫藥司同仁在工作上或業界所詢問之一般中醫藥法規案件，由主持人或協同主持人依法律原理原則回復，或徵詢小組成員審議後，作成法律諮詢意見回復。

(三) 於民國 103 年 3 月 26 日召開中醫藥法規諮詢小組第一次會議，共計審議 7 個議案，議題及結論摘要如下：

1. 中藥材之法規定義及屬性為何？

結論摘要：

《藥事法》第 103 條係將中藥材及中藥製劑分別並列，《藥品查驗登記審查準則》將中藥材定為製劑之原料，《藥物製造工廠設廠標準》定義中藥飲片係經炮製而得，故中藥材及飲片並非中藥製劑。

2. 單味中藥材磨粉，其屬性為何？

結論摘要：

中藥材如屬原藥材，其磨成粉末，無劑型與劑量，仍屬原料藥。中藥材如屬飲片，其加工磨成粉末，成為粉劑或散劑，有劑型與劑量，即屬製劑。

3. 單味中藥材磨粉以原料藥及散劑（製劑）二類並存，是否產生適法性疑義？

結論摘要：

依《藥品查驗登記審查準則》之包裝規定，單味中藥材磨粉，得分別以原料藥及散劑（製劑）申請查驗登記，其二類並存尚無適法性之問題，但為達減少許可證總數過多所衍生藥證之管理問題，建議考量其區別實益。

4. 倘製造業藥商原址已無營業事實者，屆期不申請停業、歇業，後經衛生主管機關查核屬實者，由原發證照機關將其相關證照註銷，須注意哪些行政程序？

結論摘要：

《藥事法》第 27-1 條係以藥商申請停業後，屆期不申請停業、歇業或復業登記，或於停業期滿未經當地衛生主管機關核准繼續停業，再經查核發現原址已無營業事實，方得註銷其有關證照。故本案應注意之程序，應先確認是否已經申請或處分停業，次論是否屆期未申請歇業或復業登記，再論是否於停業期滿未經當地衛生主管機關核准繼續停業，最後經查核發現原址已無營業事實，方得註銷其有關證照。

5. 藥商申請停業與歇業後,如主管機關擔心無法與藥商聯繫上之疑慮，市面上之藥品是否須回收？

結論摘要：

藥商申請停業與歇業後，其市面上之藥品如需回收，應與《藥事法》第 80 條之構成要件相合，方屬適法。

6. 藥商持有藥品許可證如係委託製造，惟製造廠已歇業一段時間，藥商仍未覓妥委託製造廠辦理製造廠變更，則該藥品除不得製造外，藥證是否有效？

結論摘要：

本案藥商持有藥物許可證之存廢，應依第 47 條之規定，方屬適法，與受委託者是否歇業尚無關聯。

7. 依據《藥事法》第 57 條第 2 項規定「藥物製造，其廠房設施、設備、組織與人事、生產、品質管制、儲存、運銷、客戶申訴及其他應遵行事項，應符合藥物優良製造準則之規定，並經中央衛生主管機關檢查合格，取得藥物製造許可後，始得製造。」，中央主管機關倘清查目前領有中藥製造業藥商許可執照，但未符合 GMP 規定之業者，是否得以未能符合上開規定，廢止其所領有之製造業藥商許可執照？

結論摘要：

中藥製造業者既經依法領有中藥製造業藥商許可執照，無論其是否從事製藥行為，依《藥事法》第 27-1 條之規定，皆由藥商自主決定是否申請停業，尚無法強制其必須申請停業，故該商倘未申請停業，尚無《藥事法》第 27-1 條之適用。其未製造藥物，似得以違反《藥事法》第 57 條第一項前段「藥物製造工廠應依藥物製造工廠設廠標準設立」之規定，依同法第 92 條第一項之規定處罰。

(四) 於民國 103 年 5 月 7 日召開中醫藥法規諮詢小組第二次會議，共計審議 4 個議案，議題及結論摘要如下：

1.《藥事法》第 57 條第一項及第二項分別規定藥物製造工廠應依《藥物製造工廠設立標準》、藥物製造應符合《藥物優良製造準則》之規定，然若此二標準經法規變更，對已完成設立登記或取得製造許可之工廠，是否有適用？可否依據《藥事法》第 92 條相關規定對工廠進行相關裁罰？

結論摘要：

《藥事法》第 57 條所稱之「設立」，於文義解釋上較合理之解釋方式，應係指工廠申請設立之當下，應非指工廠於營業中皆須符合該設廠標準修正後之規範。其原因在於該藥物製造工廠設立標準中對於製藥工廠之事前管制，除設立登記核准外尚包含變更登記之核准，並列舉應申請變更登記之情況，故「設立」之概念應僅指工廠申請設立之時，乃「即成」（一經設立即已完成）而非一「繼續」（繼續不斷的設立）的概念。《藥物工廠設廠標準》雖似組織之即成條件，但《藥物優良製造準則》卻似行為條件，因《藥事法》第 92 條對第 57 條第一項定有罰鍰之規定，似又非即成概念，建議修正《藥事法》第 57 條第一項之規定，明確規定行為具持續性時應遵守之規範，以符實際。

2. 民眾向海關申請提領自國外郵寄少量自用藥品，衛生福利部得否准予海關，逕放行符合限量表之郵件貨品之適法性？

結論摘要：

衛生福利部對於民眾提領自國外郵寄少量自用中藥材，比照准駁，應屬適法。建議再擬函稿，依後法優於前法之法理加以適用。

3. 申請人蔡乙申請列冊中藥商登記，因「繼續經營」中藥業務證明文件疑義，事涉 96-98 年期間，申請地址遷入具藥商資格者許甲，且以原商號(○○○)向當地衛生局申請為負責人，切斷蔡乙原無照營業為負責人之繼續經營狀態，申請案亦據此遭到駁回。蔡乙陳情，蔡乙為○○○漢藥房之實際負責人，於 93 年 6 月遷入現址繼續經營中藥販賣業務，許甲於 96 年 3 月遷入後，蔡乙仍繼續經營未中斷，且二者之間為合夥關係，經

營中藥之出資、盈虧各半，非為僱傭關係，蔡乙據以主張自己為持續經營中藥販賣業務事實(未中斷)之負責人，惟是否符合申請規定中「負責人」之定義？

結論摘要：

同一商號，合夥者只有一人得申請列冊，民國 83 年列冊已有規定。96 年已完成列冊，再以合夥申請，自無法以負責人身分申請列冊。是否符合列冊條件，應向當地主管機關申請列冊查核。

4. 有關一般民眾網路販售藥品或乙類成藥乙節，適用《藥事法》第 27 條及同法罰則第 92 條或《成藥及固有成方製劑管理辦法》第 16、17 條及其罰則《藥事法》第 93 條第一項第一款(94 年 2 月 3 日衛中會藥字第 0940000183 號函釋)？倘主體為藥商是否也適用之？

結論摘要：

網路販賣藥品，符合《藥事法》第 24 條「利用傳播方法」(網路)，「宣傳醫療效能」(藥品本身)，以「達招徠銷售為目的」之行為構成要件，自屬藥品廣告。民眾販賣乙類成藥違反《商業登記法》之規定，於網路販賣乙類成藥，應依違反《藥事法》第 65 條「非藥商不得為藥物廣告」之規定處罰。藥商於網路販賣乙類成藥，應依違反《藥事法》第 66 條「應申請藥物廣告」之規定處罰。

(五) 於 103 年 6 月 25 日召開中醫藥法規諮詢小組第三次會議，共計審議 7 個議案，議題及結論摘要如下：

1. 主管機關邀請專家學者協助查核中藥廠，其為保障業者之權益，要求專家學者所簽「保密承諾書」之內容是否妥適？提請討論？

結論摘要：

主管機關邀請學者專家參與行使(查廠)公權力，屬行政契約，學者專家如有洩露受查廠之營業秘密，受查廠得依《國家賠償法》之規定向主管機關請求救濟；或依《刑法》第 318 條無故洩漏之規定提起告訴，並請求民事損害賠償；或依《營業秘密法》第 13-1 條知悉或持有營業秘密而洩漏該營業秘密之規定提起告訴，並請求民事損害賠償。

2. 廠外聘委員之「委任契約暨保密協定書」如何擬稿，提請討論。
結論摘要：

主管機關與受邀之學者專家訂定委任契約(含保密協定)，納入保密義務條款及違約責任。

3. 查廠外聘委員之「利益迴避聲明書」如何擬稿，提請討論。
結論摘要：

訂定利益迴避聲明書，每次查廠皆交由受邀之學者專家具名遵守。

4. 《藥物工廠設廠標準》似組織之即成條件，《藥物優良製造準則》似行為條件，因《藥事法》第 92 條對第 57 條第一項定有罰鍰之規定，似又非即成概念，應如何修正《藥事法》第 57 條第一項之規定，明確屬行為之持續性應遵守之規範，以符實際？
結論摘要：

《藥事法》第 57 條所稱之「設立」應係指工廠申請設立之當下，應非指工廠於營業中皆須符合該設廠標準修正後之規範。故「設立」乃「即成」（一經設立即已完成）而非「繼續」（繼續不斷的設立）的概念。為明確屬行為之持續性應遵守之規範，建議修正《藥事法》第 57 條第一項之規定。

5. 二人合夥經營中藥商，是否得認屬二人皆有繼續經營之事實？
結論摘要：

合夥為私法契約，與公權力行使認定繼續經營事實無涉。如需認定是否有《藥事法》第 103 條繼續經營之事實，仍應提具相關證據為之。

6. 藥商辭聘藥師，辦理停業期間，其所持藥品許可證擬移轉給另一藥商，是否需先聘請藥師加入公會申請復業後，方得辦理？
結論摘要：

前行政院衛生署函釋，藥商於停業期間如需移轉許可證，同意由雙方藥商提出申請，由該署行文當地衛生局將隨繳之藥品許可證交該署辦理。《藥事法》第 15 條規定藥商業務為批發、零售、調劑、輸入及輸出，第 28 條規定專任藥師駐店管理標的係藥品及其買賣，並未包含許可證之移轉業務，故尚無須先聘請藥師加入公會申請復業後，方得辦理，

以符比例原則。

7. 藥師法定執行中藥業務，卻無意願進入中藥職場，其可能的法律原因為何？

結論摘要：

建議政府宜檢討二十多年藥師未能進場服務以致供需失調之原因，規劃有效配套政策，包括現推行之藥學教育朝Pharm. D.制度，可增加其中藥專業課程，成為中西雙修兼容並濟之專業人員，加強或強制必修繼續教育有關中藥理論及實務課程，推動藥師中藥專科制度等等政策，是為可行方法。

(六) 於 103 年 9 月 12 日召開中醫藥法規諮詢小組第四次會議，共計審議 10 個議案，議題及結論摘要如下：

1. 列冊中藥商得否再聘藥師？

結論摘要：

《藥事法》所規範之中藥販賣業，有第 15 條之中藥商，以及第 103 條之列冊中藥商，其業務各自有別。本案列冊中藥商得否再聘藥師，法無明文限制，應無不可。

2. 列冊中藥商再聘藥師執業，於藥商許可執照如何登記？

結論摘要：

列冊中藥商依《藥事法》第 27 條之規定所核發之藥商許可執照，倘再聘藥師，得依《藥事法施行細則》第 10 條及第 11 條之規定，於藥商許可執照載明所聘人員之專門職業名稱（藥師）及姓名。

3. 列冊中藥商再聘之藥師，要否執業登記？

結論摘要：

列冊中藥商再聘之藥師，執行丸、散、膏、丹及煎藥等固有成方製劑之販賣及供應，既屬中藥製劑之一部分，其執行業務，自應依前揭《藥師法》第 7 條第一項之規定，申請執業登記，領有執業執照，始得執業。

4. 列冊中藥商再聘一位藥師，該藥師得否調(製)劑丸、散、膏、丹及煎藥？得否供應西藥指示藥？得否販賣西藥成藥？

結論摘要：

《民法》第 482 條規定「稱僱傭者，謂當事人約定，一方於一定或不定之期限內為他方服勞務，他方給付報酬之契

約。」則為他人服勞務之受僱人，其業務應以公法上所限定之業務範圍為限。本案列冊中藥商之業務，於公法（《藥事法》第 103 條第三項）上之業務既為「中藥材及中藥製劑之輸入、輸出及批發；中藥材及非屬中醫師處方藥品之零售；不含毒劇中藥材或依固有成方調配而成之傳統丸、散、膏、丹、及煎藥」，則所聘之藥師（受僱人）倘非依《藥事法》第 28 條受聘而為第 15 條中藥販賣業之管理人，自應於列冊中藥商（僱傭人）之業務範圍內執行，不得超過。另倘列冊中藥商係依《藥事法》第 28 條聘用藥師為藥品管理人，則需另行申請第 15 條之中西藥販賣業藥商許可執照後，其供應西藥指示藥及販賣西藥成藥，即屬適法。

5. 中藥販賣業者由專任中醫師駐店管理，有關其執業登記及繼續教育等執業管理方式之適法性？

   結論摘要：

   《醫師法》第 8 條所定應接受繼續教育之目的，應係保障民眾就醫用藥之權益，倘中醫師依《藥事法》第 37 條第四項及第 102 條之規定，執行處方調劑交付藥品之行為，應屬《醫療法》第 66 條所定業務，其雖非在醫療機構執行，似仍應認屬直接影響民眾就醫用藥權益之執業事項，其執業登記及繼續教育，建議以函示（職權命令）方式請比照醫療機構辦理，其《醫師法》所欠缺之非醫療機構之執業處所，建議伺機修正，以求法制完備。

6. 健保特約藥局得否依規定申報調劑中醫師處方之藥品調劑費？

   結論摘要：

   領有開業執照之藥局，係《全民健康保險醫事服務機構特約及管理辦法》第 3 條附表所定，得向保險人申請特約為保險醫事服務機構之醫事機構。《全民健康保險醫療服務給付項目及支付標準》第一部「總則」規定，給付項目及支付標準適用特約藥局。故健保特約藥局調劑中醫師處方箋，健保署支付健保特約藥局藥品調劑費及藥品費，應屬適法。

7. 健保是否給付中醫治療慢性疾病？

   結論摘要：

《全民健康保險醫療服務給付項目及支付標準》(以下簡稱支付標準) 第四部「中醫」，第二章藥費(編號 A21)每日藥費支付點數 30 點，指定之慢性病得最高給予三十日內之用藥量。故健保得給付中醫治療慢性疾病。

8. 修習中藥課程達適當標準之藥師親自主持之藥局，得否依中醫師處方，調劑丸、散、膏、丹及煎藥？

結論摘要：

中醫師處方之丸、散、膏、丹及煎藥，藥師依所交付之處方箋，據以依《藥師法》第 16 條及第 17 條之規定調劑，自屬適法。

9. 調劑中醫師處方，得否替代或更換所處方之藥品？

結論摘要：

調劑中醫師處方，依《藥師法》第 17 條之規定，僅得替代同成分、同含量、同劑量及同劑型之藥品，如需更換藥品，應通知原處方醫師請其更換。

10. 中藥材產品 DM (放置或張貼於診所)內容僅描述藥材之使用道地及符合法規檢驗，未宣稱醫療效能，是否應依《藥事法》第 66 條申請藥物廣告？

結論摘要：

本案中藥材產品 DM，係放置或張貼於診所，其內容僅描述藥材之使用道地及符合法規檢驗，未宣稱醫療效能，認與《藥事法》第 24 條之構成要件不合，應非屬藥物廣告，即無同法第 66 條事先申請藥物廣告許可之適用。惟廣告內容描述該廠藥材優勢，是否有《公平交易法》第 20 條及第 24 條涉及「比較廣告」之疑慮，建議請廠商卓處。

(七) 於 103 年 10 月 15 日召開中醫藥法規諮詢小組第五次會議，共計審議 11 個議案，議題及結論摘要如下：

1. 藥商將中藥製劑賣給非藥商，是否違法？

結論摘要：

最高行政法院既解釋《藥事法施行細則》第 33 條規定逾越《藥事法》第 49 條之規範範圍，而增加法律所無之限制，不得援為《藥事法》第 49 條之規定事項，作為裁罰處分之構成要件，則藥商將中藥製劑賣給非藥商，雖《藥事法施行細

則》第 33 條尚未修正，惟倘依違反《藥事法》第 49 條之規定處分，恐有被撤銷處分之虞。

2. 中藥製藥廠得否販售有藥品許可字號之單味粉末給食品廠作為食品原料？就現行法令是否有牴觸之處？如何解套？

結論摘要：

本案中藥製藥廠販售有藥品許可字號之單味粉末給食品廠作為食品原料，倘屬「可供食品使用之中藥材」或「可供食品使用原料彙整一覽表」之品項，依行政院衛生署民國 97 年 12 月 24 日署授藥字第 0970003947 號函釋，應認屬適法。

3. 中藥是否適用《藥害救濟法》？

結論摘要：

依行政院衛生署 89 年 6 月 20 日衛署藥字第 89034185 號公告，第一階段適用藥害救濟法之藥物範圍，限於《藥事法》第六條規定之製劑，但暫不含中藥。故中藥雖適用《藥害救濟法》，但第一階段尚未納入。

4. 中藥如需適用《藥害救濟法》，其相關法條如何適用？

結論摘要：

中藥如需適用《藥害救濟法》，依《藥害救濟法》第 3 條第一項第一款及第三款之規定，醫藥專業人員之指示或藥物標示，而正當使用藥品，卻因當時醫藥科技無法預見且預先防範所產生之不良反應，而致病人死亡、障礙或嚴重疾病，透過藥害救濟機制，得以保障消費者、醫療院所及製藥業者之權益。故臺灣的藥害救濟制度，係採取無過失責任，凡因正當使用合法藥物所生死亡、障礙或嚴重疾病之藥害，皆得請求主管機關予以救濟（《藥害救濟法》第 4 條之規定參照）。

5. 中藥目前適用《藥害救濟法》有否困難？

結論摘要：

中藥製劑成分為複合物（complex）或部分純化物（partial purify），與西藥單離成分（single compound）不同。政府核定中藥製劑之適應症，多為中醫適應症，其鑑定是否依當時醫藥科技無法預見且預先防範所產生之不良反應，尚有困難。中藥製劑成分為複合物或部分純化物，鑑定體內是否因該中藥製劑而產生死亡、障礙或嚴重疾病之藥害，其分類亦有困

難。判定中藥製劑之使用是否無過失，既有其困難，則申請藥害救濟之案件數及金額及難確定，其財務負擔及徵收金之比率，恐難預估，《藥害救濟法》第 4 條第三項既得考量藥害救濟基金財務狀況及救濟急迫程度而分階段實施，故第一階段未納入中藥，應屬其重要原因。倘中藥確有急迫需適用《藥害救濟法》，建議優先訂立「中藥藥害鑑定標準」，並與業界協商徵收金之比率及額度，較為恰當。

6. 藥師執行中藥調劑業務之法律條文依據為何？

結論摘要：

藥師執行中藥調劑業務之法律條文依據為《藥師法》第 15 條第二項，《藥師從事中藥製劑之製造、供應及調劑須修習中藥課程標準》，《藥事法》第 28 條、第 29 條及第 35 條等規定。

7. 依現行法令規定，得否強制藥師於繼續教育修習中藥相關課程？

結論摘要：

《藥師執業登記及繼續教育辦法》第 8 條第一項第九款規定，得採認為藥師執業應接受之繼續教育，有關中藥課程內容僅為「中藥、化粧品、健康食品、特殊營養食品有關課程。」，並未強制為必修。故依現行法令之規定，尚無法強制藥師必須於六年繼續教育一百五十點中修習中藥相關課程。

8. 目前藥師國家考試所需實習課程是否包含中藥調劑？

結論摘要：

目前藥師國家考試所需實習課程原則未包含中藥調劑，惟實習之醫院有中藥調劑之實習，其時數可併計於藥品調劑作業 6 週（240 小時）之內。

9. 如政策需強制藥師於繼續教育修習中藥相關課程，應如何修正法令規定？

結論摘要：

如政策需強制藥師於繼續教育修習中藥相關課程，建議修正增列《藥師執業登記及繼續教育辦法》第 8-1 條「藥師執行中藥調劑業務，於前條之規定，應接受下列之繼續教育課程內容至少○○點：一、中醫基礎理論；二、中醫藥物學；

三、中醫方劑學；……」。

10.《政府採購法》是否有契約年限之限制？

結論摘要：

《政府採購法》尚無契約年限之限制。惟採購之預算金額等之訂定，需依據《預算法》之年度預算編列程序規定，故機關之會審單位尚不願意同意訂定期間太長之契約。

11. 衛生福利部委託臺灣大學執行之「推動國內 SCI 國際中醫藥學術期刊」計畫，成立國際中醫藥電子學術期刊(Journal of Traditional and Complementary Medicine，JTCM)，其研究成果歸屬國家所有，鑑於本期刊目前正爭取 SCI 收錄，為規劃未來永續經營方式，需研議一長遠且合適之經營方案，如何研議該期刊未來運作及永續經營之適法方式？

結論摘要：

建議依《政府採購法》之規定，以承攬或委託方式公開徵求勞務採購，訂定設中止條件之長期契約。未來如有收費，依《衛生福利部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法》之相關規定，於契約訂定回饋國家之比率。

二、定期彙編中醫藥法規諮詢案件審議結果，提供各相關公、學、協會參考。

(一)彙整「中醫藥法規諮詢小組」審議完成之案件，以及業界提問之諮詢結果意見，依「產品製造管理」、「產品查驗登記管理」、「藥事專業人員法律行為管理」及「藥事機構管理」之類別，分類整理。

(二)將召開的中醫藥法規諮詢小組之審議結論加以整理，匯整中醫藥法規諮詢小組第一次至第五次會議共 39 個議題，並將議題分為「產品製造管理相關案件」、「產品查驗登記管理相關案件」、「藥事專業人員法律行為管理相關案件」、「藥事機構管理相關案件」、「法律爭訟事件」、及「其他相關案件」六類，製作「中醫藥法規諮詢小組 103 年法案彙編」，如附件一。

三、檢視現行之行政規章及解釋令函，比較世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關之法律規章。

(一) 每月檢視我國現行之行政規章及解釋令函，與世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關之法律規章比較分析，分析結果提報「中醫藥法規諮詢小組」審議。

(二) 就世界衛生組織、美國、歐盟、日本及中國大陸有關下列中藥藥事相關法律資訊網頁查詢：

1. 世界衛生組織 WHO Collaborating Centres for Traditional Medicine(http://www.who.int/medicines/areas/traditional/collabcentres）
2. 美國 FDA 之 Botanical Review Team (BRT)（http://www.fda.gov/cder/Offices/ODE_V_BRT）及 Government Printing Office（GPO）（http://www.gpoaccess.gov）
3. 歐盟 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)（http://www.emea.europa.eu/htms/general/contacts/HMPC）
4. 日本厚生勞働省（http://www.mhlw.go.jp）
5. 中華人民共和國國家食品藥品監督管理局（http://www.sda.gov.cn）及國家中醫藥管理局（http://www.satcm.gov.cn）

(三) 定期上網，以關鍵字：世界衛生組織-Traditional Medicine；美國-botanical、herbal；歐盟-Traditional Herbal Medicinal Products（THMP）及 herbal；日本-漢方；中國大陸-中药，蒐集、整理與我國中藥相關流通管理法令規章比較分析，提交「中醫藥法規諮詢小組」報告分析結果。

(四) 蒐集、整理各國中藥流通管理與相關事件之最新法律規章解釋令函等資訊，共計收集 12 篇，分別以 103 年 7 月 4 日(103)藥改字第 103031 號函及 103 年 11 月 14 日(103)藥改字第 103070 號函陳中醫藥司參考：

1. 世界衛生組織（WHO）1 篇：
   (1) 世界衛生組織（WHO）於 2013 年 12 月發布之「WHO traditional medicine strategy: 2014-2023」，為「世界衛生組織 2014-2023 年傳統醫學策略」，目的為掌握利用傳統醫學對健康、福祉和以人為本的衛生保健的潛在貢獻；對傳統醫學產品、技術服務提供者和實踐進行監管和研究，並酌情將其納入衛生系統、從而促進安全和有效地使用傳統和補充醫學。
2. 歐盟(EMA 及 HMPC) 5 篇：
   (1) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2014 年 8 月 12 日發布之「Questions

& answers on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products」修正四版，為草藥或傳統草藥產品之品質問答集，原版於 2010 年發布。

(2)歐盟 EMA 與 HMPC 於 2014 年 4 月 30 日發布之「Questions & answers on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products」修正三版，為草藥或傳統草藥產品之品質問答集，原版於 2010 年發布。

(3) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2014 年 3 月 25 日發布之「Questions & Answers on the EU framework for (traditional) herbal medicinal products, including those from a 'non-European' tradition」，為歐洲草藥或傳統草藥產品(包含非歐洲傳統產品)架構之問答集。

(4) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2013 年 12 月 3 日發布之「Reflection paper on the use of recovered/recycled solvents in the manufacture of herbal preparations for use in herbal medicinal products / traditional herbal medicinal products」，為關於使用回收溶劑製造之草藥製劑用於草藥或傳統草藥產品之回饋意見。

(5) 歐盟 EMA 與 HMPC 於 2014 年 1 月 28 日發布之「Reflection paper on microbiological aspects of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products (DRAFT)」，為關於草藥與傳統草藥產品的微生物觀點之回饋意見（草案）。

3. 日本厚生勞働省 1 篇：

(1) 厚生勞働省醫藥食品局於平成 26 年（2014 年）2 月 18 日發行之「醫藥品、醫療機器等安全性情報」中「使用上　の注意の改訂について（使用上修改注意事項）」，其中修訂一項漢方製剤資訊：抑肝散（医療用）。

4. 中國國家食品藥品監督管理局 5 篇：

(1) 中國國家食品藥品監督管理總局於 2013 年 11 月 4 日食藥監辦藥化管〔2013〕107 號發布「關於修訂含毒性中藥飲片中成藥品種說明書的通知」，為保障公眾用藥安全，根據國家食品藥品監督管理總局監測評價結果，現就含毒性中藥飲片中成藥說明書修訂有關事項通知。

(2) 中國國家食品藥品監督管理總局辦公廳於 2013 年 12 月 18 日食藥監辦藥化監〔2013〕539 號發布「關於加強中藥鱉甲品質監管嚴防病死甲魚骨流入藥用管道的通知」，按照藥品「兩打兩建」的工作部署，以及食品藥品監管總局等 8 部門《關於進一步加強中藥材管理的通知》（食藥監〔2013〕208 號）的工作要求，針對近期媒體報導個別地區病死甲魚骨通過地下產業鏈流入中藥材市場的現象，現將有關要求通知。

(3) 中國國家食品藥品監督管理總局於 2014 年 3 月 7 日通告「關於發佈中藥、天然藥物改變劑型研究技術指導原則的通告」，為指導和規範已上市中藥改變劑型研究，國家食品藥品監督管理總局組織制定了《中藥、天然藥物改變劑型研究技術指導原則》，現予發佈，供中藥研製相關機構和人員參考。

(4) 中國國家食品藥品監督管理總局於 2014 年 6 月 27 日發布「發佈《藥品生產品質管制規範（2010 年修訂）》中藥飲片等 3 個附錄的公告」，根據《藥品生產品質管制規範（2010 年修訂）》第三百一十條規定，現發佈中藥飲片、醫用氧、取樣等 3 個附錄，作為《藥品生產品質管制規範（2010 年修訂）》配套檔，自 2014 年 7 月 1 日起施行。

(5) 中國國家食品藥品監督管理總局於 2014 年 7 月 29 日食藥監辦藥化監〔2014〕135 號發布「食品藥品監管總局關於加強中藥生產中提取和提取物監督管理的通知」，中藥提取和提取物是保證中藥質量可控、安全有效的前提和物質基礎。近年來，隨著中藥生產的規模化和集約化發展，中藥提取或外購中藥提取物環節存在的問題比較突出，給中藥的質量安全帶來隱患。為加強中藥提取和提取物的監督管理，規範中藥生產行為，保證中成藥質量安全有效，現將有關規定通知。

表列本年度查詢各國中藥流通管理相關法規資料：

世界衛生組織（WHO）	歐盟 EMA 與 HMPC	日本厚生勞働省	中國國家食品藥品監督管理總局	臺灣
1.「WHO traditional medicine strategy: 2014-2023」（世界衛生組織 2014-2023 年傳統醫學策略）	1.Reflection paper on the use of recovered / recycled solvents in the- manufacture of herbal preparations for use in herbal medicinal products / traditional herbal medicinal products（關於使用回收溶劑製造之草藥製劑用於草藥或傳統草藥產品之回饋意見） 2.Reflection paper on microbiological aspects of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products (DRAFT)（關於草藥與傳統草藥產品的微生物觀點之回饋意見（草案）） 3.Questions & Answers on the EU framework for (traditional) herbal medicinal products, including those from a 'non-European' tradition（為歐洲草藥或傳統草藥產品(包含非歐洲傳統產品)架構之問答集）	1.「醫藥品、醫療機器等安全性情報」中「使用上の注意の改訂について（使用上修改注意事項）」，其中修訂一項漢方製剤資訊：抑肝散(医療用)。	1.食藥監辦藥化管〔2013〕107號發布「關於修訂含毒性中藥飲片中成藥品種說明書的通知」 2.食藥監辦藥化監〔2013〕539號發布「關於加強中藥鱉甲品質監管嚴防病死甲魚骨流入藥用管道的通知」 3.通告「關於發佈中藥、天然藥物改變劑型研究技術指導原則的通告」，國家食品藥品監督管理總局組織制定了《中藥、天然藥物改變劑型研究技術指導原則》，現予發佈，供中藥研製相關機構和人員參考。 4.發佈《藥品生產品質管制規範（2010 年修訂)》中藥飲片等 3 個附錄的公告	1.103 年 1 月 9 日衛生福利部公告訂定「膏滋劑及糖漿劑劑型之中藥成藥製劑外包裝及仿單加刊注意事項」，並自中華民國一百零三年七月一日起，生產之產品，均須符合本公告之規定。

世界衛生組織（WHO）	歐盟 EMA 與 HMPC	日本厚生勞働省	中國國家食品藥品監督管理總局	臺灣
	4.「Questions & answers on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products Rev.3」（草藥或傳統草藥產品之品質問答集修正三版） 5. Questions & answers on quality of herbal medicinal products / traditional herbal medicinal products Rev.4（草藥或傳統草藥產品之品質問答集修正四版）		5.食藥監辦藥化監〔2014〕135號發布「食品藥品監管總局關於加強中藥生產中提取和提取物監督管理的通知」	

(五) 查得中醫藥相關法規及判解更新資料，計行政函釋 3 筆及裁判書 19 筆，以 103 年 7 月 4 日(103)藥改字第 103032 號及 103 年 11 月 14 日(103)藥改字第 103069 號函陳中醫藥司，供中醫藥司作更新法規資料庫之用。

四、以消費者保護為宗旨，扶植中藥製藥產業為目標，評估分析現行與中藥藥事相關之法規，依中醫藥司指示政策方向，研擬修正草案及因應法律授權之藥事法修正草案。

(一) 主管機關邀請專家學者協助查核中藥廠，為其保障業者之權益，評估中醫藥司草擬之「保密承諾書」之內容是否妥適。協助檢視中醫藥司草擬之「保密承諾書」內文是否恰當，另草擬「委任契約暨保密協定書」及「利益迴避聲明書」供參，建議參酌《國家賠償法》、《刑法》第 318 條、《營業秘密法》第 13-1 條有關營業秘密而洩漏之罰則；《營業秘密法》第 12 條第二項有關損害賠償請求權之期限酌修。

(二) 評估《藥事法》第 57 條第一項之規定，應如何修正以符實際，屬行為之持續性應遵守之規範。係藥事法第 57 條法律文字疑義，建議仍宜以修法解決。

(三) 如政策需強制藥師於繼續教育修習中藥相關課程，建議修正增列《藥師執業登記及繼續教育辦法》第 8-1 條「藥師執行中藥調劑

業務，於前條之規定，應接受下列之繼續教育課程內容至少○○點：一、中醫基礎理論；二、中醫藥物學；三、中醫方劑學；……」。

(四) 分析中藥目前適用《藥害救濟法》之時機

1. 依《藥害救濟法》第 3 條第一項第一款及第三款之規定，醫藥專業人員之指示或藥物標示，而正當使用藥品，卻因當時醫藥科技無法預見且預先防範所產生之不良反應，而致病人死亡、障礙或嚴重疾病，透過藥害救濟機制，得以保障消費者、醫療院所及製藥業者之權益。故臺灣的藥害救濟制度，係採取無過失責任，凡因正當使用合法藥物所生死亡、障礙或嚴重疾病之藥害，皆得請求主管機關予以救濟。
2. 《藥害救濟法》第 4 條第一項規定，因正當使用合法藥物所生藥害，得依本法規定請求救濟。第三項規定，主管機關於必要時，得考量藥害救濟基金財務狀況，依藥害救濟急迫程度，分階段實施之。依行政院衛生署 89 年 6 月 20 日衛署藥字第 89034185 號公告，第一階段適用藥害救濟法之藥物範圍，限於《藥事法》第六條規定之製劑，但暫不含中藥。故中藥雖適用《藥害救濟法》，但第一階段尚未納入。
3. 依《藥害救濟法》第 7 條之規定，主管機關辦理藥害救濟業務，應設藥害救濟基金，其基金之來源，包括藥品供應業者繳納之徵收金、滯納金、孳息收入及捐贈收入等（《藥害救濟法》第 5 條之規定參照）。藥品供應業者繳納之藥害徵收金，則係依其前一年度藥品銷售額千分之一（基金總額達新臺幣三億元時於千分之零點二至千分之一範圍內調整）之一定比率，繳納徵收金至藥害救濟基金，如當年有造成藥害事件並依法為給付者，主管機關得調高其次年度徵收金之收取比率至千分之十。
4. 依《藥害救濟法》之精神，凡無第 13 條第一項各款之情事，因正當使用藥品，依當時醫藥科技無法預見且預先防範所產生之不良反應，而致病人死亡、障礙或嚴重疾病，即符合救濟要件。
5. 再依《藥害救濟法》第 17 條及第 18 條之規定，主管機關給付藥害救濟後，發現有基於同一原因事實取得其他賠償或補償，主管機關應請其返還所領取之藥害救濟給付；發現有依法應負藥害賠償責任者，得代位請求賠償。

6. 查《藥害救濟申請辦法》第 2 條規定，藥害救濟之請求權人申請藥害救濟時，應填具申請書，並檢附相關資料，向主管機關或其所委託之機關(構)、團體提出之。其申請藥害救濟應檢附之醫療相關資料，包括：
   (1) 藥害事件發生前之病史記錄(請說明藥害事件發生前曾就診之醫療院所名稱，可向原醫療院所申請病歷記錄含藥品處方)
   (2) 藥害事件發生後之就醫過程及記錄 (可向醫院申請病歷摘要)
   (3) 藥害事件發生後之醫療機構診斷證明書
   (4) 受害人藥害事件發生前健康狀況資料
   (5) 受害人因藥害事實申請嚴礙給付之身心障礙手冊證明影本或受害人因藥害事實申請死亡給付之死亡診斷證明影本
7. 依《行政院衛生署藥害救濟審議委員會審議辦法》第 3 條規定，審議委員會審議藥害救濟申請案件，於審議前，如有必要，得先送請二至四位相關之醫學或藥學專家，或委請國內外醫學中心或學術機構進行初審；審議委員會審議申請案件，由一至二位相關之醫學或藥學審議委員先行審查後，始召開審議會審議之；案件經初審者，審議時應考量初審意見，並得請初審之專家列席說明；審議委員會之審議結果，經主管機關核定後，函復申請人。同辦法第 5 條規定，審議委員會對於審議案件，認為有對受害對象複檢或訪查之必要時，得指定醫療機構或醫師予以複檢，或指派專人進行訪查。
8. 查中藥製劑成分為複合物（complex）或部分純化物（partial purify），與西藥單離成分（single compound）不同，其判定是否無過失之條件，有其困難如下：
   (1) 政府核定中藥製劑之適應症，多為中醫適應症，其鑑定是否依當時醫藥科技無法預見且預先防範所產生之不良反應，尚有困難。
   (2) 中藥製劑成分為複合物或部分純化物，鑑定體內是否因該中藥製劑而產生死亡、障礙或嚴重疾病之藥害，其分類亦有困難。
9. 故，判定中藥製劑之使用是否無過失，既有其困難，則申請藥

害救濟之案件數及金額及難確定，其財務負擔及徵收金之比率，恐難預估，《藥害救濟法》第 4 條第三項既得考量藥害救濟基金財務狀況及救濟急迫程度而分階段實施，故第一階段未納入中藥，應屬其重要原因。倘中藥確有急迫需適用《藥害救濟法》，建議優先訂立「中藥藥害鑑定標準」，並與業界協商徵收金之比率及額度，較為恰當。

五、配合中醫藥司組織調整規劃，探討中藥產品分類分級使用管理機制，以及與國際接軌之法規協合等方向，分析研擬適合中醫藥環境之管理機制及法規修正方向。

(一) 配合中醫藥委員會組織調整規劃，參考中華人民共和國之國家食品藥品監督管理局與國家中醫藥管理局之分工，評估分析現行組織法規，提出法律見解。

1. 行政院衛生署 102 年 7 月 21 日署授藥字第 1020003739a 號廢止《行政院衛生署中醫藥委員會組織規程》」，於《衛生福利部處務規程》第 5 條第一項第八款設置中醫藥司，分四科辦事，同規程第 13 條規定中醫藥司掌理事項如下：

(1) 中醫藥管理政策之規劃、推動及相關法規之研擬。

(2) 中醫醫事人員管理與醫事人力發展政策之規劃、推動及相關法規之研擬。

(3) 中醫醫事機構管理政策之規劃、推動及相關法規之研擬。

(4) 四、中藥(材)、植物性藥材之管理與品質促進政策之規劃、推動及相關法規之研擬。

(5) 其他有關中醫藥管理事項。

目前中醫藥司業務職掌如下：

(1) 中醫科

A. 中醫醫事人員管理政策之規劃與推動及相關法規之研訂。

B. 中醫醫事人員臨床訓練制度之規劃及推動。

C. 中醫醫事機構管理政策之規劃與推動及相關法規之研訂。

D. 中醫醫事團體之目的事業主管機關之監督、管理及輔導。

E. 關於中西醫學整合業務之規劃及推動 。

F. 關於中醫技術之促進及輔導。

G. 其他有關中醫醫政管理事項。

H. 民俗調理相關業務。

(2) 中藥藥事科

A. 中藥(材)、植物性藥材之管理與品質促進政策之規劃、推動及相關法規之研訂。

B. 中藥藥政業務之輔導及管理事項。

C. 中藥藥事服務機構與藥事服務品質推動、輔導及管理事項。

D. 中藥團體之目的事業主管機關監督、管理、輔導事項。

E. 其他有關中藥藥政管理事項。

(3) 中藥藥證科

A. 中藥藥物管理輔導政策之規劃、查驗登記審查標準之修訂及相關推動事項。

B. 中藥藥物之查驗登記、變更、移轉、展延登記等執行事項。

C. 中藥藥典之修訂及編撰事項。

D. 中藥廠 GMP 制度推動、輔導事項。

E. 其他有關中藥藥物管理事項。

(4) 政策發展科

A. 中醫藥人力培育、發展之研擬、策劃及推動事項。

B. 中醫中藥醫事人員繼續教育制度規劃與推動事項。

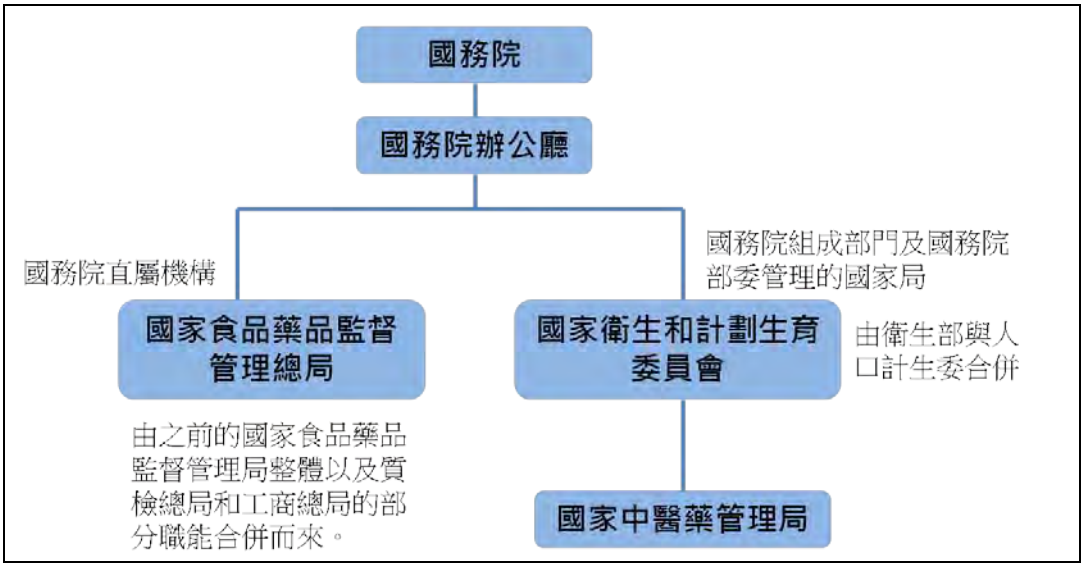
C. 中醫藥用藥安全、衛生教育方案之研擬、策劃及推動事項。

D. 中醫藥產業創新發展推動事項。

E. 國際與兩岸中醫藥事務規劃及推動。

F. 其他有關中醫藥政策規劃、業務發展事項。

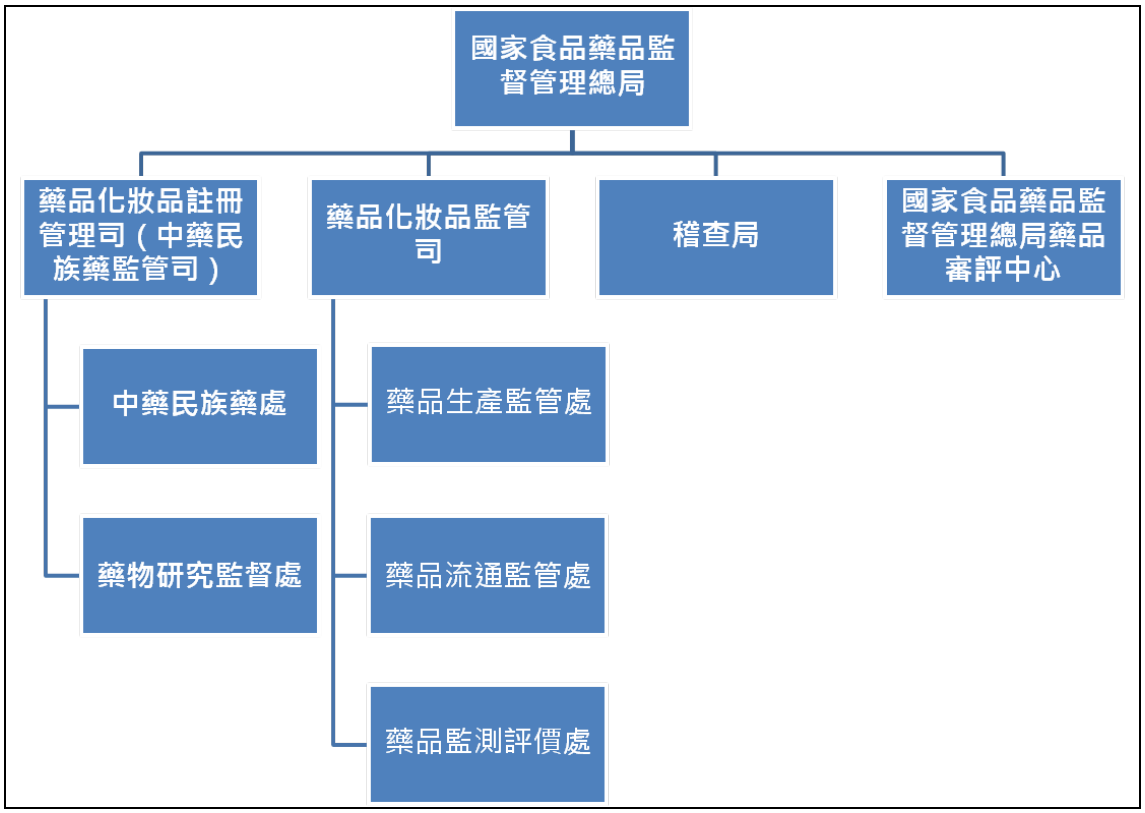
2. 中國大陸中藥管理主管機關之基本組織架構，係於國務院下設置國家食品藥品監督管理總局及國家衛生和計畫生育委員會，國家衛生和計畫生育委員會下設置國家中醫藥管理局。組織分工如下圖：



（資料來源：中華民國藥事品質改革協會繪圖）

中國大陸在傳統醫藥組織分工上，係以獨立機關執行政策法規，「國家食品藥品監督管理總局」，負責藥品、醫療器械註冊和監督管理，其中包括負責制定中藥、民族藥監督管理規範並組織實施，擬訂中藥、民族藥品質標準，組織制定中藥材生產品質管制規範、中藥飲片炮製規範並監督實施，組織實施中藥品種保護制度。「國家中醫藥管理局」負責擬訂中醫藥政策法規，承擔中醫醫療、預防、保健、康復及臨床用藥等的監督管理責任。擬訂有關中西醫結合管理規範和技術標準，中藥資源的保護、開發和合理利用，中醫藥科學研究、技術開發規劃，指導中醫藥科研條件和能力建設，管理國家重點中醫藥科研項目，促進中醫藥科技成果的轉化、應用和推廣。

國家食品藥品監督管理總局執行與中藥管理有關之業務單位暨相關單位，有「藥品化妝品註冊管理司」(亦稱中藥民族藥監管司)，「藥品化妝品監管司」及下設「中藥民族藥處」及「藥物研究監督處」，另設有「稽查局」及「藥品審評中心」，組織體系架構如下圖：

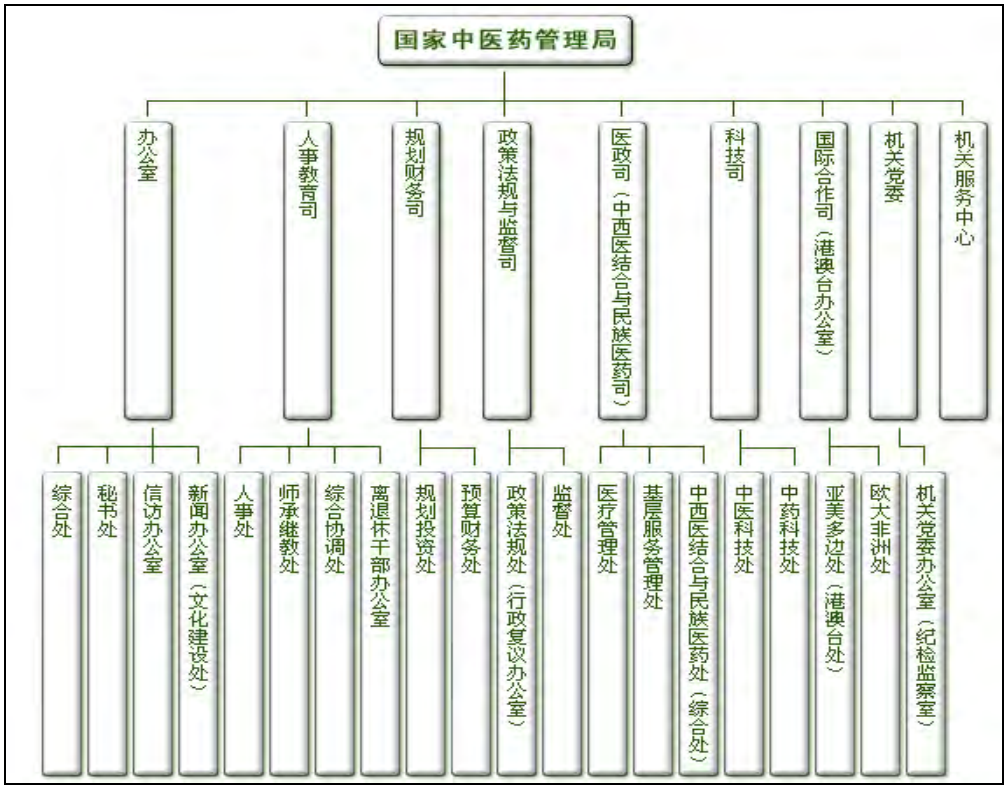


（資料來源：中華民國藥事品質改革協會繪圖）

3. 國家中醫藥管理局之組織及職權

國家衛生和計劃生育委員會改組後，只負責組織制定國家藥物政策和國家基本藥物制度，組織制定國家基本藥物目錄，擬訂國家基本藥物採購、配送、使用的管理制度，會同有關部門提出國家基本藥物目錄內藥品生產的鼓勵扶持政策建議，提出國家基本藥物價格政策的建議，參與制定藥品法典，指導制定中醫藥中長期發展規劃，並納入衛生和計劃生育事業發展總體規劃和戰略目標，管理國家中醫藥管理局。

國家中醫藥管理局於 1988 年成立，是國務院部委管理的國家局，負責管理中醫藥行業。國家中醫管理局組織架構如下圖：



（資料來源：大陸國家中醫藥管理局）

4. 建議參考大陸藥品監管體系，融合我國現存中西藥分隸制度，在不增加下級機關數目之原則下，將中醫藥司及國立中醫藥研究所合併成立「中醫藥管理署」，專管中醫藥政策法規之研擬及中藥查驗登記，與食品藥物管理署分立分工，以求中醫藥事權統一。

(二) 探討中藥產品分類分級使用管理機制，參考歐盟分為許可、免除許可及食品添加劑之分類，以及食品管理法與健康食品管理法，評估分析現行中藥產品管理法規，提出法律見解。

1. 歐盟分為許可、免除許可及食品添加劑之分類，中草藥名稱為「Traditional Herbal Medicinal Products（THMP）」，分為「Herbal products（as medicines）」及「Dietary supplements（as foods）」二類，「Herbal products（as medicines）」依 Commission E monograph 審查，「Dietary supplements（as foods）」准許標示 Soft claims,例如”增強免疫力 strengthening of immune system”。

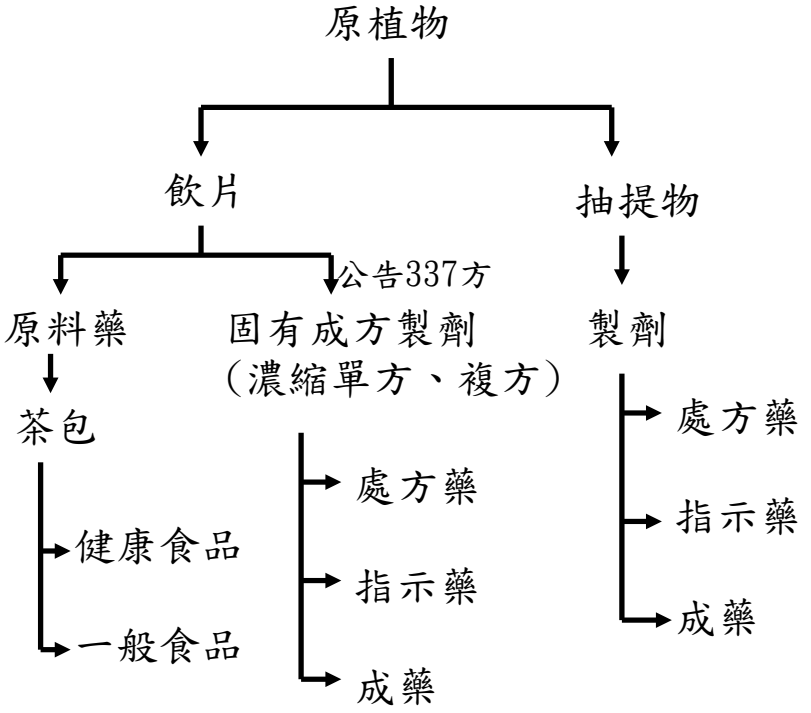
2. 《食品安全衛生管理法》將「食品」分為「一般食品」及「特殊營養食品」。「一般食品」係指供人飲食或咀嚼之產品及其原料，兒童常直接放入口內之玩具準用食品器具或容器。「特殊營養食品」係指嬰兒與較大嬰兒配方食品、特定疾病配方食品及

其他經中央主管機關許可得供特殊營養需求者使用之配方食品(調整蛋白質、胺基酸、脂肪或礦物質之食品及低減過敏性食品、控制體重、管灌用食品)。

3. 「健康食品」係以專法《健康食品管理法》規範「具有保健功效，並標示或廣告其具該功效之食品」，其保健功效以「增進民眾健康、減少疾病危害風險，且具有實質科學證據之功效，非屬治療、矯正人類疾病之醫療效能，並經中央主管機關公告者」為準，其保健功效表達方式限於
   (1) 攝取後，可補充人體缺乏之營養素時，宣稱該食品具有預防或改善與該營養素相關疾病之功效。
   (2) 攝取後，其中特定營養素、特定成分或該食品對人體生理結構或生理機能之影響。
   (3) 提出科學證據，以支持該健康食品維持或影響人體生理結構或生理機能之說法。
   (4) 敘述攝取某種健康食品後的一般性好處。
4. 依據中醫藥司之解釋，中藥材可供食品使用，以藥品管理；但食品藥物管理署則將使用於食品之原料(植物根、莖、葉、花、果實、種子)視為食品管理。
5. 建議建立「中藥產品分類分級使用管理機制」，另行制定「中藥材管理辦法」，其草案方向如下：
   (1)明定中藥材之分類及範圍，採正面列舉，屬藥食兩用者，可同時供食品使用，藥食兩用以註記方式公告。
   (2)中藥材採許可制分類管理。毒劇類中藥材得供中醫師處方使用者（如附子），核以調劑及原料用類別；不得供中醫師處方使用者（如鉛丹），則核以原料專用類別。
   (3)明定中藥材輸入查驗之檢驗項目。
   (4)明定中藥材製造及炮製方法之規定，以及中藥材包裝標示之規定。
   (5)明定中藥材不良反應及不良品之通報義務。

(三) 參考世界衛生組織及歐盟對 CAM 在藥物品質、安全與療效基準，以及臨床試驗安全性及有效性風險評估的要求，評估分析與國際接軌之法規協合方向，提出法律見解，研擬適合中醫藥環境之管理機制及法規修正方向。

1. 世界衛生組織及歐盟對 CAM 在藥物品質、安全與療效皆訂有明確基準，對於臨床試驗安全性及有效性風險評估亦有嚴格要求。
2. 研擬適合我國中醫藥環境之中草藥類別與適應症之管理機制建議如下：



3. 建議法規修正方向如下：

產品類別	現行管理方式及適應症	建議管理方式及適應症	備註
處方藥	新藥 IND、NDA 適應症依臨床試驗結果 學名藥 專利期中-同規模臨床試驗 專利過期-處方依據	新藥 IND、NDA 適應症依臨床試驗結果 學名藥 專利期中-同規模臨床試驗 專利過期-處方依據	新藥定義： A、收載於固有典籍之中藥方劑 1.新療效（新適應症） 2.新使用途徑（注射劑除外） B、未收載於固有典籍之中藥方劑 3.他國核准藥品（收載於國家藥典或核准藥品上市者）

產品類別	現行管理方式及適應症	建議管理方式及適應症	備註
			4.新藥材、藥材新藥用部位 5.新複方中藥方劑
調劑專用	中藥單味濃縮製劑 適應症依審查？	建議取銷此分類，儘速組成專家小組，依據安全性再分類為處方藥或指示藥或成藥。	
指示藥	審查基準（monograph）？	建議組成專家小組，依據安全性訂定審查基準（monograph）。	西藥係依指示藥相關基準（monograph）審查
成藥	依據成藥審查基準 固有丸散膏丹煎藥（基準方）	建議組成專家小組，依據安全性訂定審查基準（monograph）。	西藥係依低於指示藥基準，高於維生素基準審查
中藥材	不列藥品管理 限定品項包裝標示 廣告依本草綱目	建議建立飲片炮製基準。 飲片核發原料藥許可證。 效能標示依據本草綱目審查。	中醫主治效能
健康食品	健康食品申請許可辦法查驗登記，審查保健功效成分、產品之安全評估、保健功效評估、保健功效安定性試驗、製程概要審核	建議含中草藥成分者，如可提具可信及可考據之固有典籍資料（含功效），向中醫藥委員會申請審查核准劑型及效能。倘僅能提具傳統使用者，向食品處依現行健康食品申請許可辦法審查核准。	固有典籍： 醫宗金鑑、醫方集解、本草綱目、本草拾遺、本草備藥、中國醫學大辭典及中國藥學大辭典所載之處方
一般食品	食品與相關產品查驗登記及許可證管理辦法（國產食品產製前配方審查）。 輸入錠狀膠囊狀食品查驗登記，審查產品成分含量表、檢驗成績書、合法製售工廠之官方證明。	食品與相關產品查驗登記及許可證管理辦法（國產食品產製前配方審查）。 輸入錠狀膠囊狀食品查驗登記，審查產品成分含量表、檢驗成績書、合法製售工廠之官方證明。	未改變管理方式

4. 建議含中草藥成分之健康食品，應建立審查機制，如可提具可信及可考據之固有典籍資料（含功效），向衛生福利部（中醫藥司）申請審查，核准劑型及效能。倘僅能提具傳統使用者，可依現行健康食品申請許可辦法及健康食品申請許可辦法申請查驗登記，審查保健功效成分、產品之安全評估、保健功效評估、保健功效安定性試驗、製程概要。

(四) 建議中藥不良反應法制化

1. 隨著中藥的臨床應用日趨普及，在臨床使用過程中不斷發現中藥的一些不良反應。由於中藥的藥理活性成分複雜，組方藥材變化大，炮製方法各異，因此，如何全面客觀地評估中藥的不良反應與毒性作用，對中藥臨床應用及新藥開發十分重要。國內現有之『藥物不良反應通報系統』著重於西藥，在通報表內容、通報原則及評估方法等方面較難適用於中藥。有鑑於此，中醫藥委員會於九十年度開始委託財團法人長庚紀念醫院中醫分院張恆鴻副院長執行『中藥不良反應通報中心』計畫，針對『中藥』之特性，廣集中醫師、生藥學、流行病學及毒物學專家之意見，規劃全國中藥不良反應通報系統。

2. 『中藥不良反應通報中心』計畫之工作內容包括【資料來源：中醫藥司】：

(1) 接受中草藥不良反應之通報，包括誤用或亂服民間藥產生不良反應之個案收集。

(2) 建立藥物不良反應通報系統及通報原則，並制定通報、審查等相關表格。

(3) 建立個案醫療專家審查流程及成立專家顧問群。

(4) 彙整藥物不良反應個案，評估分析。

(5) 舉辦研討會，對相關醫療人員進行宣導教育。

(6) 中藥不良反應通報網頁之設計及建立。

3. 中藥不良反應通報原則

(1) 通報項目：

中藥不良反應的通報範圍包含中藥、青草藥及中醫使用之醫療器材。

(2) 有下列情形之嚴重的中藥不良反應，請務必通報：

導致死亡、危及生命、病人住院或延長病人住院時間、

造成永久性殘疾或先天性畸形、或需作處置以防止永久性傷害等。

(3) 通報的情況：

無論不良反應為嚴重或非嚴重個案，或不確定是由中醫藥品引起，或並未獲得所有的相關性資料之個案，仍需通報。

(4) 如有產品之相關性問題，例如：

懷疑有污染、懷疑藥品安定性有問題、產品不良、包裝或標示不佳等，請填於其他欄內。

(5) 如何取得通報表：

可自衛生署中藥不良反應通報網站上下載，或與各區中藥不良反應通報中心連絡。

(6) 通報方式：

每個病例使用一個表格，將填好之通報表以郵寄或傳真的方式，傳送至各區域之中藥品不良反應通報中心。

(7)機密性：

請務必填寫通報者的姓名、電話、服務機構、地址等，識別代號欄請填寫可供通報者確認追蹤病人之代號。除非通報者有特別要求，必要時廠商可以得知通報者之身份。衛生署及中藥不良反應通報中心有責任維護病人及通報者的權益，保持資料的機密性，不得擅自公開，亦不得作為醫療糾紛案件使用。

(8) 其他注意事項：

A. 請用黑色或深色原子筆填寫，各項資料請儘可能詳列。

B. 填表時，若遇該欄資料不明的況，請使用：

UNK：不知道，NA：不適用，

NI：填表時尚無資料(如檢查報告)，但往後可能會有資料

C. 供應者包括中醫診所/醫院、中藥舖、青草店、廟宇、廣告郵購、自行採集、大陸成藥…等；請詳細說明。

D. 如果表格欄位空間不夠時，可另用 A4 大小紙張繕寫，並請註明相關欄位編號及名稱。

4. 建議中藥不良反應法制化，通報範圍包含中藥、青草藥及中醫使用之醫療器材，將導致死亡、危及生命、病人住院或延長病人住院時間、造成永久性殘疾或先天性畸形、或需作處置以防

止永久性傷害等嚴重的中藥不良反應，納入通報。

六、邀請中醫、中藥、法學相關公、學、協會及消費者團體等，共同座談研討所擬具適合中醫藥環境之管理機制及適當法律位階之「中醫藥組織」及「中藥產品分類分級使用管理機制」等法規草案，整合所得法律見解及研討結果，提請中醫藥司作政策考量。

(一) 於 103 年 10 月 20 日召開「研議「中醫藥組織」及「中藥產品分類分級使用管理機制」座談會」，邀請中華民國中醫師公會全國聯合會、中華民國中藥商業同業公會全國聯合會、臺灣製藥工業同業公會、臺灣區中藥工業同業公會、臺中華中草藥生技發展協會，與本會中醫藥法政小組討論。結論重點如下：

1. 對於我國現行中醫藥管理組織之建議

(1) 臺灣應有與他國對等之中醫藥管理組織，以利在兩岸談判或與其他國國家交流，建議提升中醫藥提升管理層級。

(2) 建議在行政院組織體系下成立「中醫藥辦公室」，以提升中醫藥政策規劃及管理等權能。

(3) 建議食品藥物管理署及中醫藥司應仿造當初行政院衛生署時代之食品處與中醫藥委員會就含中藥食品管理機制之定期處會協調會，建立新的對話平台。

2. 對於我國現行中藥分類管理機制之建議

(1) 目前臺灣含中藥材之食品由食品藥物管理署管理，藥品則由衛生福利部(中醫藥司)管理，管理機制並不對稱。

(2) 中藥材目前有食品、藥食兩用、藥用的使用分類；建議應加強中藥食品的正常安全管控機制，例如動物性試驗等科學方法。

(3) 建議加強中藥邊境管制，即便是食品使用，也應管控藥材的「來源」、「產地」及「種類」。

(4) 建議政府應控管含中藥材之食品，其命名應與固有成方區隔(例如四物飲、生脈飲等)，避免民眾產生混淆。

(5) 建議加強中藥材邊境管制，嚴謹把關中藥材輸入品質，並加強查緝不法來源。

(6) 目前市面中藥材抽驗有 97.9%的通過率，進口藥材品質控管應屬良好。

(7) 建議食品藥物管理署在審核含中藥之健康食品，應會辦中醫

藥司，並在審核委員中加入中醫藥相關專業人員。

七、各項法案依其修正內容、目的，執行人權及性別分析，包括女性參與，規範內容未區別對象，執行方式無性別、性傾向或性別認同有不同差異。

(一)條文修正草案及管理辦法草案，對人權及性別影響層面之評估，皆符合憲法維護人性尊嚴及尊重人格自由發展等之要求。

(二)分析如下，：

1. 修正草案內容涉及健康、醫療領域，有女性參與，受益對象未以特定性別、性傾向或性別認同為規範對象，規範內容未區別對象，執行方式無性別、性傾向或性別認同有不同差異。
2. 修正草案目的係基於憲法平等權之規定，採行一定方式，未來執行結果，對於不同性別、性傾向或性別認同者無所為之不必要差別待遇；無刻意針對不同性別、性傾向或性別認同者予以必要之協助；無預防或消除性別或性傾向刻板印象與性別隔離；無提升不同性別、性傾向或性別認同者平等獲取社會資源機會，營造平等對待環境應無因性別、性傾向或性別認同而有不同。
3. 經評估法律案之內容，符合憲法平等權及其他基本人權（如維護人性尊嚴及尊重人格自由發展等）之要求，不違背我國憲法之誡命。

肆、討論

一、 依《藥品查驗登記審查準則》之包裝規定，單味中藥材磨粉，得分別以原料藥及散劑（製劑）申請查驗登記，其二類並存尚無適法性之問題，但為達減少許可證總數過多所衍生藥證之管理問題，建議考量其區別實益。

二、 《藥事法》第 57 條所稱之「設立」應係指工廠申請設立之當下，應非指工廠於營業中皆須符合該設廠標準修正後之規範。故「設立」乃「即成」(一經設立即已完成）而非「繼續」(繼續不斷的設立）的概念。為明確屬行為之持續性應遵守之規範，建議修正《藥事法》第 57 條第一項之規定。

三、 主管機關邀請專家學者協助查核中藥廠，其為保障業者之權益，要求專家學者簽「保密承諾書」，協助修正「委任契約暨保密協定書」及「利益迴避聲明書」，納入保密義務條款及違約責任。

四、 建議政府宜檢討二十多年藥師未能進場服務以致供需失調之原因，規劃有效配套政策，包括現推行之藥學教育朝 Pharm. D.制度，可增加其中藥專業課程，包含中醫基礎理論、中醫藥物學及中醫方劑學…等中藥理論，並輔以中藥調劑實務課程，成為中西雙修兼容並濟之專業人員，實際課程內容提綱建議主管機關與中藥教育學者專家詳為商榷後定義，加強或強制必修繼續教育有關中藥理論及實務課程，推動藥師中藥專科制度等政策。

五、 為保障民眾就醫用藥之權益，倘中醫師依《藥事法》第 37 條第四項及第 102 條之規定，執行處方調劑交付藥品之行為，應屬《醫療法》第 66 條所定業務，其雖非在醫療機構執行，似仍應認屬直接影響民眾就醫用藥權益之執業事項，其執業登記及繼續教育，建議以函示(職權命令）方式請比照醫療機構辦理，其《醫師法》所欠缺之非醫療機構之執業處所，建議伺機修正，以求法制完備。

六、 中藥是否適用《藥害救濟法》？因判定中藥製劑之使用是否無過失，既有其困難，則申請藥害救濟之案件數及金額及難確定，其財務負擔及徵收金之比率，恐難預估，《藥害救濟法》第 4 條第三項既得考量藥害救濟基金財務狀況及救濟急迫程度而分階段實施，故第一階段未納入中藥，應屬其重要原因。倘中藥確有急迫需適用《藥害救濟法》，建議優先訂立「中藥藥害鑑定標準」，並與業界協商徵收金之比率及

額度，較為恰當。

七、 如政策需強制藥師於繼續教育修習中藥相關課程，建議修正增列《藥師執業登記及繼續教育辦法》第 8-1 條「藥師執行中藥調劑業務，於前條之規定，應接受下列之繼續教育課程內容至少○○點：一、中醫基礎理論；二、中醫藥物學；三、中醫方劑學；……」。

八、 建議衛生福利部依《政府採購法》之規定，以承攬或委託方式公開徵求勞務採購，訂定設中止條件之長期契約，委託執行之「推動國內 SCI 國際中醫藥學術期刊」計畫，成立國際中醫藥電子學術期刊(Journal of Traditional and Complementary Medicine，JTCM)，其研究成果歸屬國家所有。未來如有收費，依《衛生福利部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法》之相關規定，於契約訂定回饋國家之比率。

九、 我國現行中醫藥管理組織應有與他國對等之中醫藥管理組織，以利在兩岸談判或與其他國國家交流，建議提升中醫藥提升管理層級，以提升中醫藥政策規劃及管理等權能。

伍、結論與建議

一、目前臺灣含中藥材之食品由食品藥物管理署管理，藥品則由衛生福利部(中醫藥司)管理，管理機制並不對稱。臺灣應有與他國對等之中醫藥管理組織，以利在兩岸談判或與其他國國家交流，應提升中醫藥提升管理層級。在行政院組織體系下考慮成立「中醫藥辦公室」，以提升中醫藥政策規劃及管理等權能，規劃中醫藥政策及相關法規。交由衛生福利部(中醫藥司)落實執行，值得研究促成。

二、中藥材目前有食品、藥食兩用、藥用的使用分類；應加強中藥食品的正常安全管控機制，例如動物性試驗等科學方法。

三、政府應加強中藥邊境管制，嚴謹把關中藥材輸入品質，並加強查緝不法來源，如以食品使用，也應管控藥材的「來源」、「產地」及「種類」。政府應控管含中藥材之食品，其命名應與固有成方區隔(例如四物飲、生脈飲等)，避免民眾產生混淆。

四、食品藥物管理署在審核含中藥之健康食品，應會辦中醫藥司，並在審核委員中加入中醫藥相關專業人員。食品藥物管理署及中醫藥司應仿造當初行政院衛生署時代之食品處與中醫藥委員會就含中藥食品管理機制之定期處會協調會，建立新的對話平台，值得繼續推動。

本計畫依據研究結果，作成下列建議：

一、建議參考大陸藥品監管體系，融合我國現存中西藥分隸制度，在不增加下級機關數目之原則下，將中醫藥司及國立中醫藥研究所合併成立「中醫藥管理署」，專管中醫藥政策法規之研擬及中藥查驗登記，與食品藥物管理署分立分工，以求中醫藥事權統一，並統一對中藥材之認定。

二、建議含中草藥成分之健康食品，應建立審查機制，如可提具可信及可考據之固有典籍資料（含功效），向衛生福利部（中醫藥司）申請審查，核准劑型及效能。倘僅能提具傳統使用者，可依現行健康食品申請許可辦法及健康食品申請許可辦法申請查驗登記，審查保健功效成分、產品之安全評估、保健功效評估、保健功效安定性試驗、製程概要。

三、建議中藥不良反應法制化，通報範圍包含中藥、青草藥及中醫使用之醫療器材，將導致死亡、危及生命、病人住院或延長病人住院時間、造成永久性殘疾或先天性畸形、或需作處置以防止永久性傷害等嚴重的中藥不良反應，納入通報。

四、面對民眾疾病，有以中醫治之，有以西醫治之，亦有以中西醫結合治之。未來政策上倘需培育中藥調劑人員執行中藥業務，需面對同時服用西藥之病人。如何進行調劑作業一併加以考量。中藥專業人員既屬執行調劑中藥等高度專業之產品及行為，未來如考量培育人才實施教育用制度，建議考試資格定為「大學有關中藥相關學系畢業實習期滿，成績及格者」。

五、「中藥法規諮詢彙編」係所有法政小組專家學者之心血及智慧結晶，提供政府充分利用，並繼續累積案例，作為執法之參考。

六、「中藥法政諮詢小組」提供法規專業諮詢之平台，建議中醫藥司充分利用此平台功能，協助適法性之行政行為。

七、建議持續協助加強其與其他國中醫藥組織之互動，以期協助建立整體的中醫藥管理體制與法規之國際接軌，並達到健全的中醫藥應用與安全。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW103-CMAP-M-114-122404 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. 中草藥產業技術教學資源中心：中草藥產業技術與研發。92 年 12 月出版。P.414。
2. WHO and CoE Policy on CAM。
3. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products。4.Guideline on the assessment of clinical safety and efficacy in the preparation of community herbal monographs for well-established and of community herbal monographs/entries to the community list for traditional herbal medicinal products/substances/preparations（EMEA/HMPC/104613/05）。
4. 世界衛生組織 2008 年 11 月 8 日傳統醫學大會北京宣言。
5. 歐盟法律系統資料庫 http://www.pharmalaw.org
6. 行政院衛生署：民間部門醫療保健支出統計。2008/12/11。
7. 全國法規資料庫 http://law.moj.gov.tw。
8. 行政院衛生署：藥事法解釋彙編。行政院衛生署 87 年 9 月出版。
9. 陳櫻琴等著：醫療法律。五南圖書出版股份有限公司 2005 年 11 月三版。
10. 中醫藥委員會：101 年招標公告。

其他參考資料：

1. 中醫藥委員會：臺灣建置中草藥臨床試驗環境計畫成果摘要暨管理法規彙編。98 年 8 月，第 3 頁。
2. 中醫藥委員會：推動中醫藥之發展十年有成---行政院衛生署中醫藥委員會十週年會慶系列活動（中醫藥委員會 94.10.18 發布新聞）
3. 行政院衛生署：透過兩岸搭橋計畫，加強中草藥合作機制（行政院衛生署 2008/12/19 發布新聞）
4. 行政院衛生署：加速中醫藥之科學化與現代化（行政院衛生署 2008/06/20 發布新聞）

相關網頁：

1. WHO http://www.who.int/medicines
2. 立法院法律系統資料庫 http://lis.ly.gov.tw/lgcgi/lglaw

中藥法規相關研究：

1. 財團法人醫藥品查驗中心：加強藥品審核機制與法規協合化。
2. 財團法人醫藥品查驗中心：建立健全之中藥新藥法規環境。

3. 財團法人中華景康藥學基金會：我國製藥業智財權與衛生法規整合性服務與相關機制。
4. 國防醫學院藥品製造研究所：藥物法規國際化的評估。
5. 台灣區製藥工業同業公會：中醫藥法律規章適用及執行查緝宣導教育計畫。
6. 行政院衛生署中醫藥委員會：歐洲地區中醫藥法規暨科技管理交流計畫。

編號：MOHW103-CMAP-M-114-122406

羌活之固體分散製劑開發(2-2)

余建志
中國醫藥大學

摘　要

本計劃以羌活為模式藥物。以羌活之超臨界抽提物，配合固體分散技術水溶性載體(如 Agar，PVP 和 β-環糊精)，經過噴霧乾燥，使中藥分子分布於載體中，最後製成超臨界固體分散技術粉末加壓成顆粒，提高中藥低極性成分溶解度具體可行。異歐前胡素(Isoimperatorin)與羌活醇(Notopterol)已被單離純化，純度均大於 98%，可做為對照標準品有助於品質監控。28 天餵食亞毒性試驗之結果以證明：二種「羌活之固體分散製劑」試驗物質在連續 28 天口服投予 0, 25, 100, 400 mg/kg 劑量後，可確定對 SD 品系大鼠並無任何亞急毒性反應發生！也顯示超臨界固體分散技術製劑的安全性，未來若能推廣到其他單複方，經濟效益將是巨大的。進口中藥浸膏做為原料藥似乎有其優點，但目前所收集的資料與訪談結果似乎都不支持以浸膏入藥，品質憂慮與管理困難為最大疑慮。

關鍵詞：羌活、超臨界抽提、固體分散技術、中藥浸膏進口可行性評估

Number: MOHW103-CMAP-M-114-122406

The Development of Solid Dispersions for Qiang Huo (Notopterygii Rhizoma et Radix) (2-2)

Chien-Chih YU
China Medicinal University

ABSTRACT

This project employed Qiang Huo (*Notopterygii Rhizoma et Radix*) as a model drug to prepare solid dispersions. The solid dispersion technology was used to produce a homogeneous suspension of supercritical extract mixture with water-soluble carriers (such as agar, PVP and β-cyclodextrin). In conjunction with spray drying, the produced supercritical solid dispersions were then further pressed into granules. The granulated powder derived from the SCF solid dispersion technology offers the possibility to improve solubility for highly hydrophobic molecules in TCM. The ingredients in Qiang Huo, including isoimperatorin and notopterol, have been isolated with purity greater than 98%. Both molecules can be specified as reference standards for quality control. In a repeated toxicity study using SD rats for 28 days, two different solid dispersion preparations of Qiang Huo at daily doses of 0, 25, 100 and 400 mg/kg were demonstrated to have no sub-acute toxicity. The results also support the safety of TCM prepared by the SCF-based solid dispersion technology and suggest that may be applied to other TCM preparations of single herb or combined formulas to generate substantial economic benefits. There are some advantages of importing TCM preparations made of herbal extracts; however, products made of TCM extracts are not favored or supported according the responses of interview survey, mainly due to the issues concerning quality and management.

Keywords: qiang huo, supercritical fluid, solid dispersion, feasibility of importing Chinese herbal extract

壹、前言

依據行政院衛生署中醫藥委員會 102 年度中醫藥政策管理暨消費者使用安全類委託研究計畫需求說明書(1)；研究重點 4-4：中醫藥產業創新發展，目的在於深入瞭解國內中醫藥相關產學之生技發展情形，提昇國際競爭優勢，促進產業發展。符合研究內容第 5 項中藥製程技術創新相關性研究。探討利用現代化製藥技術，提高藥品效能，使中藥精緻化，探討是否可以將中藥製劑精緻化，成品量縮小，以達服藥簡便化。

目前市場的中藥製劑還是停留在傳統製劑與濃縮中藥，各廠家製程大同小異，也很少見到有關劑型與製程提升，雖然有識之士大聲疾呼，重視中藥開發與創新，但進展十分緩慢，本計畫結合固體分散技術和超臨界抽提，對中藥製劑科學化與品質的提升應有所助益。

超臨界 CO2 萃取技術(SFE)進行中藥研究開發及產業化，和中藥傳統方法相比，它的優點如下：1. SFE 能夠比較完好地保存中藥有效成分不被破壞或分解，適於提取對於熱敏感、易氧化的成分。2. 透過 SFE 條件設定，可使中藥有效成分純度與萃取率提高，可以簡化標準品製備手續。3. SFE 可直接快速從單方或複方中藥中提取不同部位或直接提取浸膏進行藥理篩選，開發新藥。4. 動態 SFE 啟動即可抽提，不需浸泡與濃縮步驟。一般 SFE 操作不超過 4 小時。5. SFE 抽提物品質穩定。缺點是中低極性的 SFE 抽提物和傳統水煎煮抽提的高極性有效成分段不相同，致使產生使用上的安全疑慮。超臨界使用極有能為中藥使用開拓另一塊中低極性領域，為中藥的未來提供可能性。

固體分散技術是將藥物高度分散在載體中形成的固體混合物[2-8]，由於難溶性藥物的增溶是十分重要的研究課題，提高藥物的分散度是提高溶出速率的最重要手段之一，增加難溶性藥物的溶解度和加快溶出速率，從而提高藥物的生體可利用率控制藥物釋放；該技術還可以製備藥物釋控劑型；利用載體的包埋作用，可延緩藥物的水解和氧化；掩蓋藥物的不良味道和刺激性及使液體藥物固體化等。目前市場上熱賣的複方丹參製劑(滴丸)即是使用固體分散技術使難溶的主成分丹參素(danshensu)、原兒茶醛(protocatechuic aldehyde)和丹酚酸 B (salvianolic acid B)轉化成易溶的型態，以提升其療效。

本計劃以羌活為模式藥物，抽提超臨界萃取物，製成固體分散製劑，使用水溶性載體材料(如 agar, PVP 或 β-環糊精)，加入濃縮液中，再經過噴

霧乾燥，使中藥分子分布在水溶性載體材料中。具有劑量小、服用方便、溶出速度快和劑型穩定等特點。

本研究即依據行政院衛生署「健康食品管理法」中餵食 28 天之亞急性毒性試驗之規範，針對「羌活之固體分散製劑」經 28 天連續口服投予不同劑量至 SD 品系大鼠後，所可能引發之亞急性毒性變化進行試驗，以檢測「羌活之固體分散製劑」在亞急性毒性實驗之安全評估結果。

中藥浸膏進口可行性評估符合研究重點 4-4：中醫藥產業創新發展，研究內容第六項。中藥浸膏若可做為原料藥使用，等同將濃縮製劑前段製程外包，將可以減除前段的打碎，萃取，濃縮等製程，可將製程限縮在後段噴霧造粒加工的部份，應該可以大幅降低原料，設備與人力成本，甚至讓廠商專注在技術和品質的提升，對於中藥安全未必是壞事。中藥浸膏進口可行性評估有其必要性。

貳、材料與方法

一、材料

於市場上購入羌活，經生藥學組織切片與化學鑑別，確定其相關基原無誤後，於陰冷乾燥處保存待用。

二、儀器與試藥

藥材：

羌活藥材購自台中聯合中西藥局與高雄杏豪藥材貿易(股)公司，其基本品質應符合臺灣中藥典第二版[10]的要求。

羌活指標成分：異歐前胡素產品編號 110827，羌活醇產品編號 111820。購自中國食品藥品檢定研究院(Primary standard)，北京。

試藥：

絕對酒精(Absolute alcohol)購自臺灣菸酒公賣局，HPMC，EC，MC 購自臺灣惠民公司。LC 級甲醇、氯甲烷與水。其它試藥均為 GR 級。Agar，β-環糊精，PVP (K30, K60 及 K90)均為藥品級。

儀器與設備：

微量分析天平：XS105 Dual Range balance, USA, Mettler-Toledo company

HPLC：高效率液相層析儀，Japan, Shimadzu company

流動層噴霧造粒機：元成機械股份有限公司

等溫吸濕曲線測定儀：Aquasorp, USA

水活性測定儀：AquaLab Series 3TE, USA, Decagon company

SEM：電子顯微鏡

超臨界抽提裝置：SFE-2 Applied Separation, U.S.A

噴霧乾燥機：Ella Company, Japan,

真密度測定儀：Mulit-pycnometer, Japan

拍擊密度測定儀：Vanderkamp Bulk Density Apparatus, Germany

流動性分析儀：MSDometritics Flowsorb II 2300, Germany

比表面積分析儀：SSA-3500, USA

流動性分析儀：MSDometritics Flowsorb II 2300, Germany

標準篩粒度分析儀：Retsch AS200, Germany

動物：

動物品係：SD 大鼠，雄、雌兩性動物的數量相同。

來源：樂斯科生物科技股份有限公司

動物數量：每個劑量組使用大鼠至少 6 隻動物；若須進行試驗中期解剖或復原測試，動物數量須視解剖的次數適量增加。試驗終結需有足夠數量存活之動物以進行適當之毒性評估。

試驗開始週齡(性別)：5-6 週齡(SD)

飼養管理：

飼養室：中國醫藥大學動物中心

飼養環境：溫度：20~25℃，溼度：65~80%，照明時間：12 小時(6:00 開燈、18:00 關燈)，環境監測：溫度、溼度：每日監測

飼養籠與隻數：於馴化及試驗期間，SD 大鼠分別以 3 隻 1 籠，飼養於經高壓滅菌之塑膠飼養籠(46×25×20 cm)。

三、執行方法

1. 小批量試製&標準作業程序建立

1.1 超臨界抽提

200 公克羌活藥材打碎為 40~60 mesh 粗粉，投入超臨界 CO_2 流體萃取裝置的 1 L 萃取釜中，添加無水乙醇作為夾帶劑，先靜置 60 mins，在萃取溫度為 60-70℃、萃取壓力為 200～600 bar、CO2 流量為 20～30 L/h 的條件下萃取 120～180 mins，得到萃取物；所述夾帶劑與所述羌活粉末的體積品質比為 1:5～1:15。

1.2 固體分散技術

以 β-環糊精，PVP 與 Agar 做為水溶性載體材料，加水完全溶化後，噴霧乾燥，以無水酒精所含微量水分為黏著劑，以 200 磅/平方英吋加壓後粉碎成碎片。

1.3 固體分散技術製成品與市售品(分別取自臺灣與大陸各六家廠商)進行比較，完成最終產品與市場品比較。

比較項目如下：

1.3.1 性狀：五官辨識。

1.3.2 鑑別：薄層層析法進行定性檢驗。

1.3.3 溶化性：依中國中藥典溶化性測定。

1.3.4 水活性：

使用前校正：以原廠校正標準品 0.5 molal 氯化鉀溶液（0.984± 0.003）及 6.0 molal 氯化鈉溶液（0.760± 0.003）校正之。將藥粉適量（不超過樣品盒的 1/2，約 7mL）置

於水活性分析儀（Aqua Lab Series 3TE 具溫度補償功能，USA），直接讀取水活性數值。

1.3.5 含量測定

1.3.5.1 羌活指標成分異歐前胡素及羌活醇為自製經檢定的標準品。

1.3.5.2 依中國中藥典高效液相色譜法(附錄VID)測定。

檢液的製備：使用甲醇將精油稀釋至 1%並將之過濾後，備用。必要時，得再稀釋。

對照品溶液的製備：取羌活醇對照品、異歐前胡素對照品適量，精密稱定，加甲醇製成每 1ml 含羌活醇 60μg 與異歐前胡素 30μg 的混合溶液，即得。

色譜條件與系統適用性試驗：以十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑；以乙腈 ：水(44：56)為流動相；檢測波長為 310nm。理論板數按羌活醇峰計算應不低於 5000。

測定法：分別精密吸取對照品溶液 5μl 與檢液 5～10μl，注入液相色譜儀。

1.3.6 安定性

於 37℃ 75%RH 環境觀察 6 個月，觀察外觀與含量變化。

2. 由超臨界抽提物純化異歐前胡素和羌活醇

由於羌活的超臨界抽提顯示具有高含量的異歐前胡素和羌活醇，擬自試製備相關標準品，供本計畫實驗使用。未來亦可以考慮放大製程，提供中醫藥司建立標準品供應鏈。

2.1 超臨界抽提

200 公克羌活藥材打碎為 40~60 mesh 粗粉，投入超臨界 CO2 流體萃取裝置的 1 L 萃取釜中，添加無水乙醇作為夾帶劑，先靜置 60 mins，在萃取溫度為 60-70℃、萃取壓力為 200～600 bar、CO2 流量為 20～30 L/h 的條件下萃取 120～180 mins，得到萃取物；所述夾帶劑與所述羌活粉末的體積品質比為 1:5～1:15。

2.2 異歐前胡素純化流程

超臨界萃取液置於水浴中(85~90℃)，待其澄清後，於室溫下靜置自然結晶(2d～3d)；過濾，得到結晶物和濾液；所述結晶物經減壓乾燥後，再結晶後即得羌活異歐前胡素提取物。或通逆相管柱取得，溶劑系統為正己烷：乙酸乙酯：甲醇：水(1：0.4：1.1：0.5,V／V)。所得分離液經減壓乾燥後，再結晶後即得異歐前胡素提取物。

2.3 羌活醇純化流程

超臨界萃取液加水以乙酸乙酯萃取，取乙酸乙酯層抽乾，固體物加甲醇溶解，過濾溶解，過濾液。通逆相管柱取得，流動相為：乙腈-水溶液 V/V=44:56。所得分離液經減壓乾燥後，再結晶後即得羌活醇提取物。

2.4 純度比對

採用 HPLC.DAD,MS 對異歐前胡素及羌活醇進行了定性定量分析和結構鑑定。

2.4.1 羌活指標成分異歐前胡素及羌活醇購自中國食品藥品檢定研究院。

2.4.2 依中國中藥典高效液相色譜法(附錄VID)測定。

2.4.2.1 檢液的製備：使用甲醇將精油稀釋至 1%並將之過濾後，備用。必要時，得再稀釋。

2.4.2.2 對照品溶液的製備：取異歐前胡素及羌活醇對照品適量，精密稱定，加甲醇製成每 1ml 含羌活醇 60μg 與異歐前胡素 30μg 的混合溶液，即得。

2.4.2.3 色譜條件與系統適用性試驗：以十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑；以乙腈：水(44：56)為流動相；檢測波長為 310nm。理論板數按羌活醇峰計算應不低於 5000。

2.4.2.4 測定法：分別精密吸取對照品溶液 5μl 與檢液 5～10μl，注入液相色譜儀，測定，即得。

2.5 結構鑑定

2.5.1 紫外線光譜分析

2.5.2 紅外線光譜分析

2.5.3 質譜分析

2.5.4 核磁共振光譜分析

3. 28 天餵食毒性試驗(28-day feeding toxicity study)

28 天餵食毒性試驗之目的是測試試驗物質經重覆給予 28 天後對哺乳類動物可能產生之毒性影響，了解毒性變化之產生，同時測定無毒性顯示之劑量(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)。

3.1 動物品種及性別

SD 大鼠，雄、雌兩性動物的數量相同，給予試驗物質之週齡為 5-6 週。

3.2 動物數量

每個劑量組使用雄、雌至少各 6 隻動物；若須進行試驗中期解剖或復原測試，動物數量須視解剖的次數適量增加。試驗終結需有足夠數量存活之動物以進行適當之毒性評估。

3.3 試驗物質給予途徑

採用胃管經口餵食(gavage)，必要時得混入飼料或飲水中。採用胃管經口餵食時之餵食體積應在 10 ml/kg 動物體重以下，若餵食體積過高，可採多次餵食方式，但須在 6 小時內完成。

3.4 試驗物質給予期間

每天固定時間給予試驗物質，連續 28 天。

3.5 試驗物質、對照物質的投予

3.5.1 調製方法

試驗委託單位所提供之「羌活之超臨界抽提固體分散製劑」試驗物質，以無菌水配製成(0, 25, 100, 400 mg/10.0 ml/kg)。

3.5.2 投予方法

經過一週馴化適應後之 SD 品系大鼠,在連續 28 天口服(gavage)投予不同劑量之對照物質及「羌活之固體分散製劑」試驗物質後，再將全部實驗大鼠於犧牲前一晚禁食。

3.5.3 投予途徑選擇理由此投予途徑乃依照人體臨床適用之途徑進行。

3.5.4 試驗期間、投予劑量

於連續 28 天之試驗期間完成「羌活之固體分散製劑」試驗物質之投予，並根據當日投予前所測量之體重為準，

投予相對之低、中、高劑量(0, 25, 100, 400 mg/kg)，而投予之相對體積為 10.0 ml/kg。

3.6 投予試驗物質設

3.6.1 對照組：無菌水(10.0 ml/kg)

3.6.2 載體對照組：無菌水溶解載體對照組(10.0 ml/kg)

3.6.3 試驗組：羌活之固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg) (10.0 ml/kg)

3.7 試驗組別

cyclodextrin組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
cyclodextrin	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6

PVPK組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
載體PVPK	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6

3.8 動物分組及個體與組別之識別

3.8.1 動物分組：動物分組乃先依臨時編號，將動物增重後，隨機加以編號分組。

3.8.2 個體識別：以打耳洞作記號。

3.8.3 試驗組的識別：各試驗組飼養籠附上標示卡，標示有關室別、籠號、品系、性別、週齡、試驗編號、試驗名稱、入室日期、試驗期間及動物編號。

3.9 動物觀察及檢測項目

3.9.1 臨床症狀觀察(Clinical observations)

試驗期間每日二次(兩次時間間隔不得少於六小時)進行臨床觀察，並記錄動物是否有其他異常臨床症狀或死亡。例假日亦照常進行臨床症狀觀察。持續 28 天若發現死亡則將日期及所有異常症狀與程度，分別記錄在個別動

物臨床症狀觀察紀錄表。並將死亡動物進行剖檢，以找出可能死亡原因。

3.9.2 體重測定(Body weighing)

試驗動物於試驗開始給予試驗物質前，測量動物體重；試驗期間每週至少測量一次。

3.9.3 食物消耗量(Food consumption)

試驗期間動物飼料攝取量每週以電子天平測一次。並計算飼料消耗量。

3.9.4 臨床病理檢驗

試驗期間死亡的動物須儘快進行解剖，肉眼檢查器官與組織之變化。若許可，主要臟器分別稱重並進行組織病理檢查，以尋求死亡的原因及毒性變化的性質(如嚴重程度)。

3.9.5 器官重量(Organ weighing)試驗結束，大鼠進行犧牲觀察臟器外觀後取下 liver、adrenals、kidneys、gonad 等臟器分別稱重記錄。

3.9.6 血液檢驗(Hematology)

試驗動物須在試驗結束前採樣以進行血液檢驗，一般而言,全部動物均須進行血液檢驗,但可因實際情形考量，嚙齒類動物每個劑量組至少選擇 10 隻動物進行檢測。血液檢驗項目常包括：Hematocrit、Hemoglobin、Erythrocyte count、total and differential Leukocyte counts 及凝血因子 Platelet count 等之測量。

3.9.7 血清生化檢驗(Serum Biochemistry examination)

試驗動物須在試驗結束前採樣以進行血清生化檢驗。一般而言，可因實際情形考量，選擇大鼠實驗動物進行檢測。其血清生化檢測項目包含 alkaline phosphatase、alanine minotransferase、aspartate aminotransferase、gamma-glutamyl transferase、albumin、bilirubin (total)、creatinine、urea nitrogen 、glucose、phosphorus、calcium、chloride、potassium、sodium、protein (total)等。

3.9.9 組織切片檢驗(istopathology)

一般器官與組織的病理檢驗之項目可依試驗性質之特性及肉眼檢查發現之異常變化而有所增減，其鏡檢測項目包含 Adrenals、Heart、Kidneys、Liver、Spleen。最高劑量組與對照組須進行組織病理檢驗，若最高劑量組中某種器官及/或組織發現病變現象，則全部動物的該器官及/或組織，及其他劑量組中發現任何組織病變，均應進行組織病理檢驗。

3.9.10 統計分析

本試驗數據以實驗結果之平均值(mean)±標準誤(Standard Error, S.E.M.)來表示。體重、攝食量等數據，採用 one-way ANOVA 加以統計分析，各組間的相關血清生化指數變化之統計方法，則採用 Duncan test 加以統計分析，p 值小於 0.05 將被判定具有實驗上之意義。

4. 中藥浸膏進口可行性評估部分將彙整兩岸三地及日本等地專家意見，參考臺灣區製藥工業同業公會、臺灣區中藥工業同業公會與其它中藥相關公會進行意見彙整與調查，將針對進口中藥浸膏之製造、檢測、品管、運輸及輸入等分項進行討論。

參、結果

一、固體分散技術採用 Agar，β-環糊精與 PVP 作為水溶性載體材料，結果顯示符合製劑上的要求，由水抽提率可以得知本技術確實可以增加難溶性的超臨界抽提物的溶解度。加壓製粒後，表面緻密使比表面積大幅下降，降低與外界接觸的表面積，可以提高顆粒的安定性。硬度提高及吸潮效應下降，使顆粒可以穩定存在(表一&表二)。

二、安定性試驗顯示，六個月 37℃ 75%RH 的安定性試驗顯示相關超臨界抽提固體分散技術製劑是安定的，架儲期保守估算超過 36 個月(圖一)。

三、比較市售的羌活濃縮製劑，共收集臺灣廠家 9 家，大陸 6 家與本計畫之固體分散技術製劑進行比較，發現固體分散技術製劑所含之異歐前胡素及羌活醇的含量最高，異歐前胡素的部分，臺灣廠家有 4 家可以檢出(4/9)，大陸廠家則全數未檢出。羌活醇的部分，臺灣廠家有 6 家可以檢出(6/9)，大陸廠家則有 3 家可以檢出(3/6) (表三)。

四、異歐前胡素(99.71%)及羌活醇(98.68%)之純度測驗確認純度> 96%，結構鑑定確認為異歐前胡素及羌活醇無誤 (圖二~圖十，表四&表五)。

五、臨床症狀之觀察：試驗期間，對照組(純水 0.1 ml/10g 體重)、羌活藥物高劑量對照組(400 mg/kg)、及羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)之 SD 大鼠，皆無異常之臨床症狀發生。

六、動物死亡率方面：試驗期間，對照組(純水 0.1 ml/10g 體重)、羌活藥物高劑量對照組(400 mg/kg)、及羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)之 SD 大鼠均未發生死亡現象。

七、動物之體重變化：試驗期間，對照組(純水 0.1 ml/10g 體重)、羌活藥物高劑量對照組(400 mg/kg)、及羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg) 及羌活之 PVPK 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)之 SD 大鼠之體重，經統計分析後，並無顯著差異性。

八、飼料攝取量變化：試驗期間，對照組(純水 0.1 ml/10g 體重)、羌活藥物高劑量對照組(400 mg/kg)、及羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑試驗組

(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)之飼料攝取量，經統計分析後，並無顯著差異性。

九、動物之器官變化：實驗結束後，對照組(純水 0.1 ml/10g 體重)、羌活藥物高劑量對照組(400 mg/kg)、及羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg) SD 大鼠之器官重量，經統計分析後，並無顯著差異性。

十、動物之血清生化值檢測：實驗結束後，對照組(純水 0.1 ml/10g 體重)、羌活藥物高劑量對照組(400 mg/kg)、及羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg) SD 大鼠之血清檢測，經統計分析後，並無顯著劑量差異性。

十一、組織切片之病變：在實驗結束後，對照組(純水 0.1 ml/10g 體重)、羌活藥物高劑量對照組(400 mg/kg)、及羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg) SD 大鼠體內臟器之組織切片，均無明顯之病變發生。

十二、根據上述實驗之結果確證：在連續餵食 28 天對照組(純水 0.1 ml/10g 體重)、羌活藥物高劑量對照組(400 mg/kg)、及羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑試驗組(羌活藥物 0, 25, 100, 400 mg/kg)後，對 SD 品系大鼠並無任何亞急性毒性之反應發生。

十三、中藥浸膏進口可行性評估部分彙整兩岸三地及日本等地專家意見，參考臺灣區製藥工業同業公會、臺灣區中藥工業同業公會與其它中藥相關公會進行意見彙整與調查，將針對進口中藥浸膏之製造、檢測、品管、運輸及輸入等分項進行討論。結果是暫不可行(表十&表十一)。

肆、討論

一、固體分散技術是將藥物高度分散在載體中形成的固體混合物，由於難溶性藥物的增溶是十分重要的研究課題，提高藥物的分散度是增加難溶性藥物的溶解度和提高溶出速率的最重要手段之一。本計畫採用 Agar，β-環糊精與 PVP 作為水溶性載體材料，資料顯示符合製劑上的要求，水抽提率顯示本技術可以增加難溶性的超臨界抽提物的溶解度(表二)。

二、加壓製粒後，表面緻密使比表面積大幅下降，降低與外界接觸的表面積，可以提高顆粒的安定性。硬度提高及吸潮效應下降，使顆粒可以穩定存在(表二)。這可能是安定性架儲期可以提高的原因之一(圖一)。

三、進行比較的羌活濃縮製劑，共收集臺灣廠家 9 家，大陸 6 家與本計畫之固體分散技術製劑進行比較，發現固體分散技術製劑所含之異歐前胡素及羌活醇的含量最高，異歐前胡素的部分，臺灣廠家有 4 家可以檢出(4/9)，大陸廠家則全數未檢出。羌活醇的部分，臺灣廠家有 6 家可以檢出(6/9)，大陸廠家則有 3 家可以檢出(3/6) (表三)。推究未檢出的原因可以發現，異歐前胡素和羌活醇雖然是羌活的主要指標成分，但屬於較低極性的物質，對水的溶解度不好，所以，以臺灣法律規定水為唯一抽提溶媒，未檢出應該是合理的選項。其中有四家臺灣濃縮製劑中之異歐前胡素和羌活醇兩項均有檢出，可能跟國內中藥濃縮製劑習慣添加生藥粉末有關。至於只檢出羌活醇的幾家廠商，推想可能幾個原因，因為羌活醇的極性大於異歐前胡素，如果加入少量酒精幫助抽提，就有可能產生只有檢出羌活醇的現象發生，這個現象在大陸的製劑上更為明顯，可能跟大陸官方允許多樣的抽提方法有關，抑或是羌活內某些成分溶於水後會形成天然的乳化劑或助溶劑，幫助羌活醇的溶解現象。

四、異歐前胡素(99.71%)及羌活醇(98.68%)之純度測驗確認純度> 96%，結構鑑定確認為異歐前胡素及羌活醇無誤 (圖二~圖十，表四&表五)。

五、本試驗為測試羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)試驗物質，經連續 28 天口服投予低、中、高(0, 25, 100, 400 mg/kg)劑量至 SD 品系大鼠後，所可能引發之毒性病變。於實驗中將 SD 大鼠分成對照組(0.0 mg/kg)、高劑量羌活組(400 mg/kg)、羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑(0, 25, 100,

400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)，進行 28 天連續臨床症狀觀察。由實驗結果得知：試驗期間對照組與試驗組均無異常之臨床症狀發生；在死亡率方面，對照組與試驗組均未發生任何死亡現象。

六、動物犧牲後之各項檢測分析結果顯示：「羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)與 Control 組之動物體重分析，並無任何差異產生。

七、血清生化值檢測分析：羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)在各組與控制組間並無統計上之差異。

八、重量檢測分析：羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)在各組與控制組間亦無統計上之差異。

九、「羌活之固體分散製劑」在 400 mg/kg 高劑量組與 Control 組之心、肝、脾、腎及腎上腺組織切片分析，亦無任何病理症狀產生。故根據本試驗之結果可確證：

十、羌活之 cyclodextrin 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)及羌活之 PVPK 固體分散製劑(0, 25, 100, 400 mg/kg)試驗物質在連續 28 天口服投予，可確定對 SD 品系雌與雄性大鼠並無任何亞急毒性反應發生！

十一、收集日本與兩岸三地之浸膏藥物相關規定，並提出可行性評估報告(表十，表十一與附錄一)。中藥浸膏若可做為原料藥使用，等同將濃縮製劑前段製程外包，確實將可以減免前段的打碎，萃取與濃縮等製程，可將製程限縮在後段噴霧造粒加工的部份，應該可以大幅降低原料，設備與人力成本，甚至讓廠商專注在技術和品質的提升，優點不少。目前所收集的資料與訪談結果似乎都不支持以浸膏入藥，主要是憂慮品質與管理困難。

伍、結論與建議

一、超臨界抽提固體分散技術具有劑量小、服用方便、溶解速度快和劑型穩定等特點。同時對應的標準品也已純化，對品質監控上有極大助益。若能推廣到其他單複方，經濟效益將是巨大的。

二、試驗之結果可確證：三種「羌活之固體分散製劑」試驗物質在連續 28 天口服投予 0, 25, 100, 400 mg/kg 劑量後，可確定對 SD 品系大鼠並無任何亞急毒性反應發生！

三、超臨界抽提固體分散技術劑型屬於技術創新，擬進行技轉給需要的廠商。中醫藥司須有配套作業，認可超臨界抽提固體分散技術在中藥的運用，也同意相關許可證的申請。廠家才會有意願進行技轉，以提升國內製藥水準。

四、中藥浸膏進口做為原料藥似乎有其優點，但目前所收集的資料與訪談結果似乎都不支持以浸膏入藥，品質憂慮與管理困難為最大疑慮。

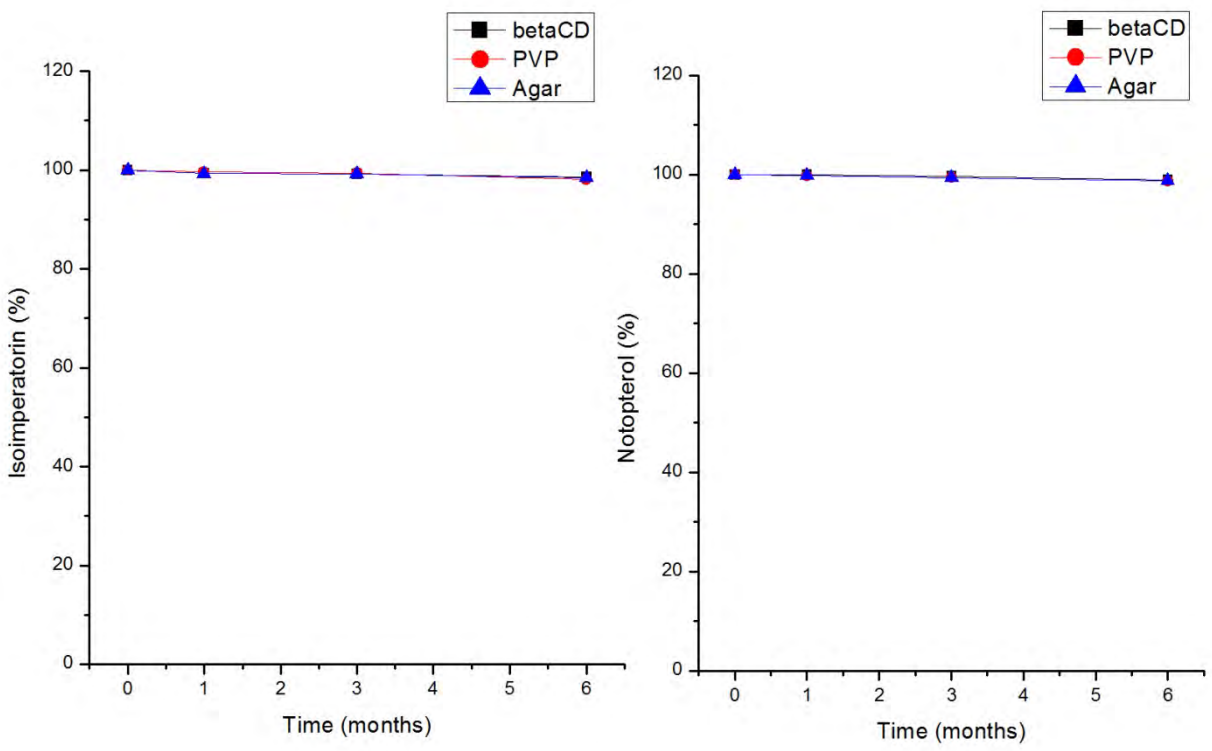
誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW103-CMAP-M-114-122406 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

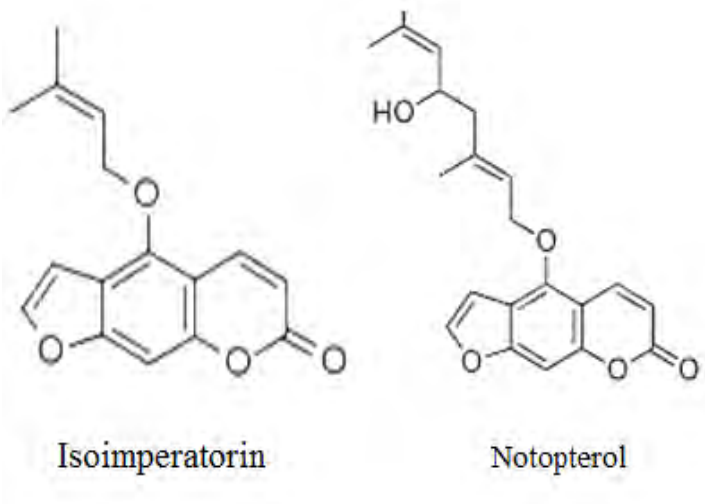
陸、參考文獻

1. 行政院衛生署中醫藥委員會，102 年健全中藥審查法規及強化中藥製程安全委託研究計畫投標作業手研委託究計畫需求說明書冊，2013，pp.13，衛生署中醫藥委員會，台北
2. 進藤精一，石川達雄，安部郁夫，吸著の科學，2005，第二版，東京，日本
3. Tadeusz Kudra, Arun S. Mujumdar, Advanced Drying Technologies, 2005, Marcel Dekker, New York, USA
4. Georg-Wilhelm Oetjen, Peter Haseley, Freeze-Drying, 2006, second, completely revised and extended edition, WILEY-VCH, New York, USA
5. Raymond Rowe, Paul Sheskey and Sian Owen, Handbook of pharmaceutical excipients, 2003, fifth Ed.
6. 陳建海，藥用高分子材料與現代藥劑，2005，科學出版社，北京，中國，
7. 林山陽、蘇坤波、林山珍、洪尚文：微粒膠囊，臺灣科學 1980，第 34 卷，P58~P90
8. J. A. Bakan and J. L. Anderson：in “The Theory and Practice of Industrial Pharmacy”，Edited by Leon Lachman and J. L. Kanic，Lea ＆ Febriger，1970, 384
9. 國家藥典委員會，中華人民共和國藥典，第一卷，2010，p.170，中國醫藥科技出版社，北京中國
10. 行政院衛生署，臺灣中藥典，2013，p.140，第二版，衛生署中醫藥委員會，台北
11. Remington, The science and practices of pharmacy, 21st ed., 2005, pp. 828t, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, USA

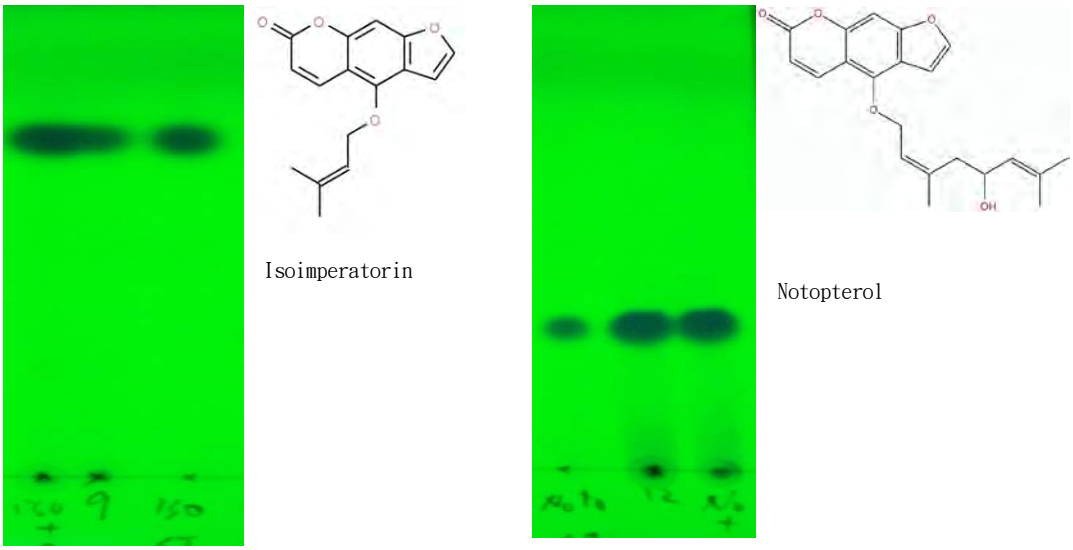
柒、圖、表



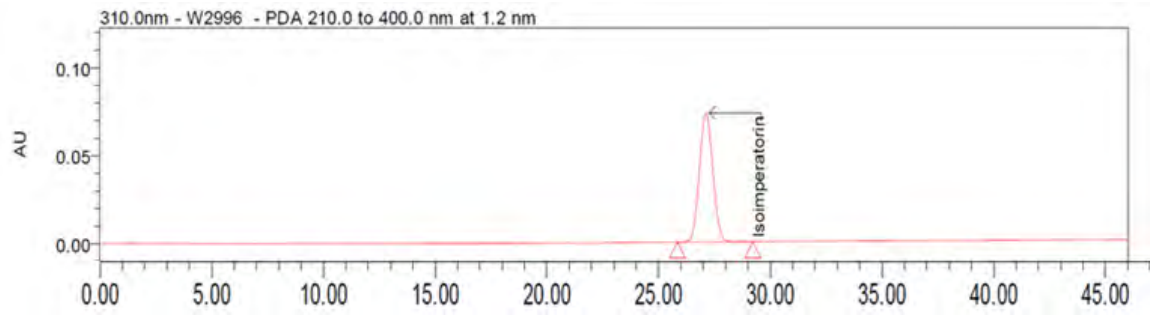
圖一、固體分散技術製劑安定性試驗



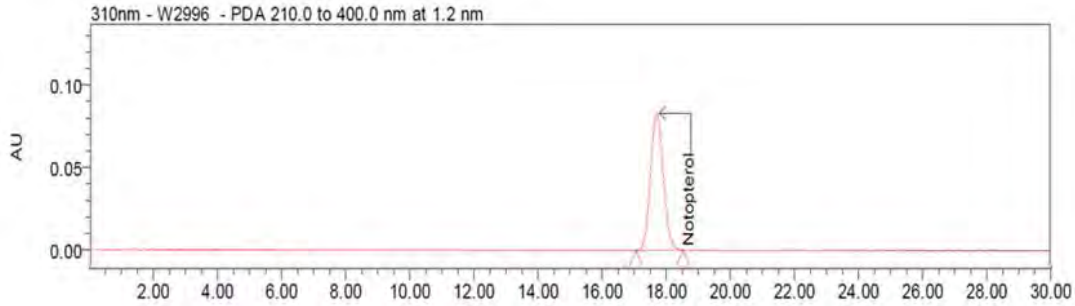
圖二、異歐前胡素(Isoimperatorin)及羌活醇(Notopterol)結構式



圖三、異歐前胡素及羌活醇之薄層層析圖

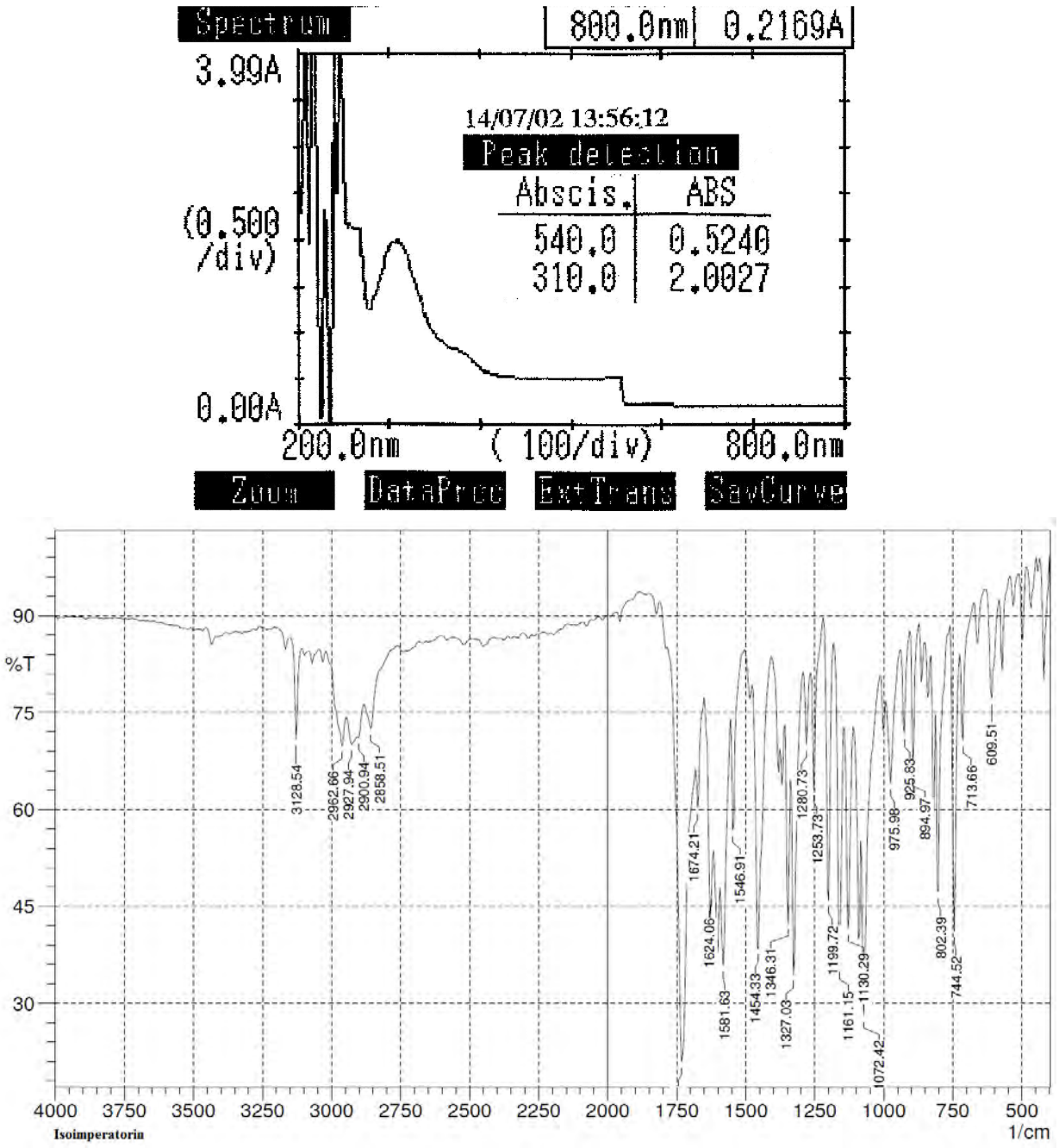


	Retention Time	Area	Height	Concentration
1	2.803	2098	419	0.08
2	3.684	5744	351	0.21
3	29.317	2704984	97001	99.71

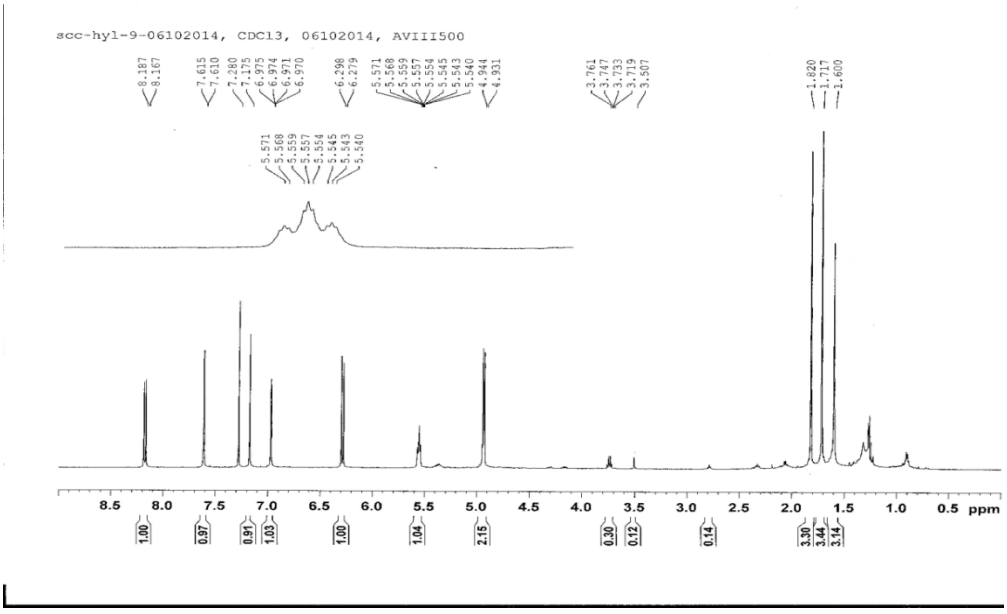


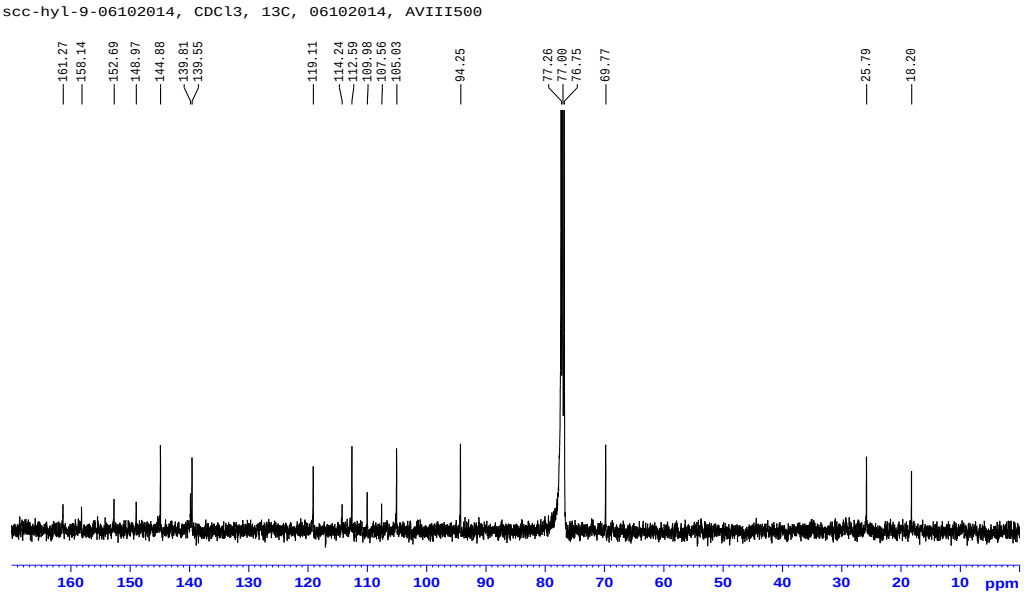
	Retention Time	Area	Height	Concentration
1	10.390	8920	645	0.03649
2	11.807	312933	22012	1.28
3	17.323	24120963	1512341	98.68

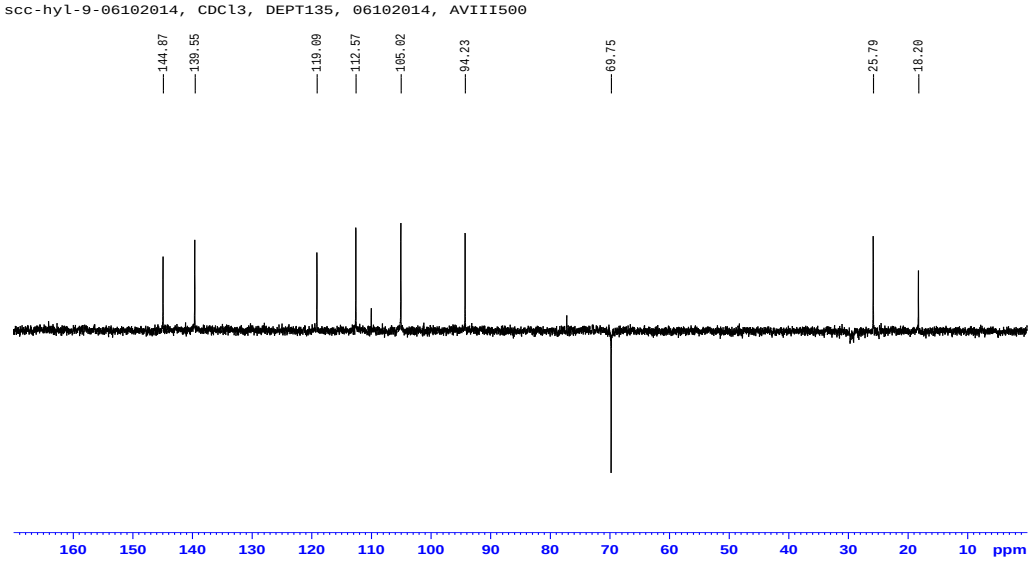
圖四、異歐前胡素及羌活醇之純度測試



圖五、異歐前胡素之紫外光譜和紅外光譜圖



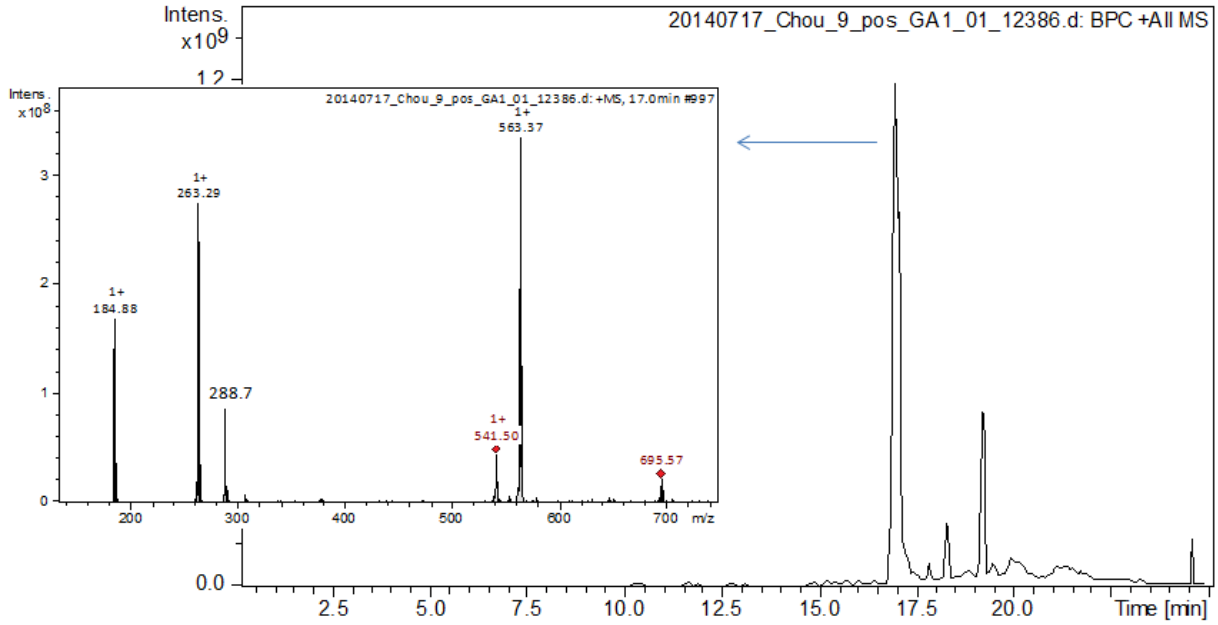




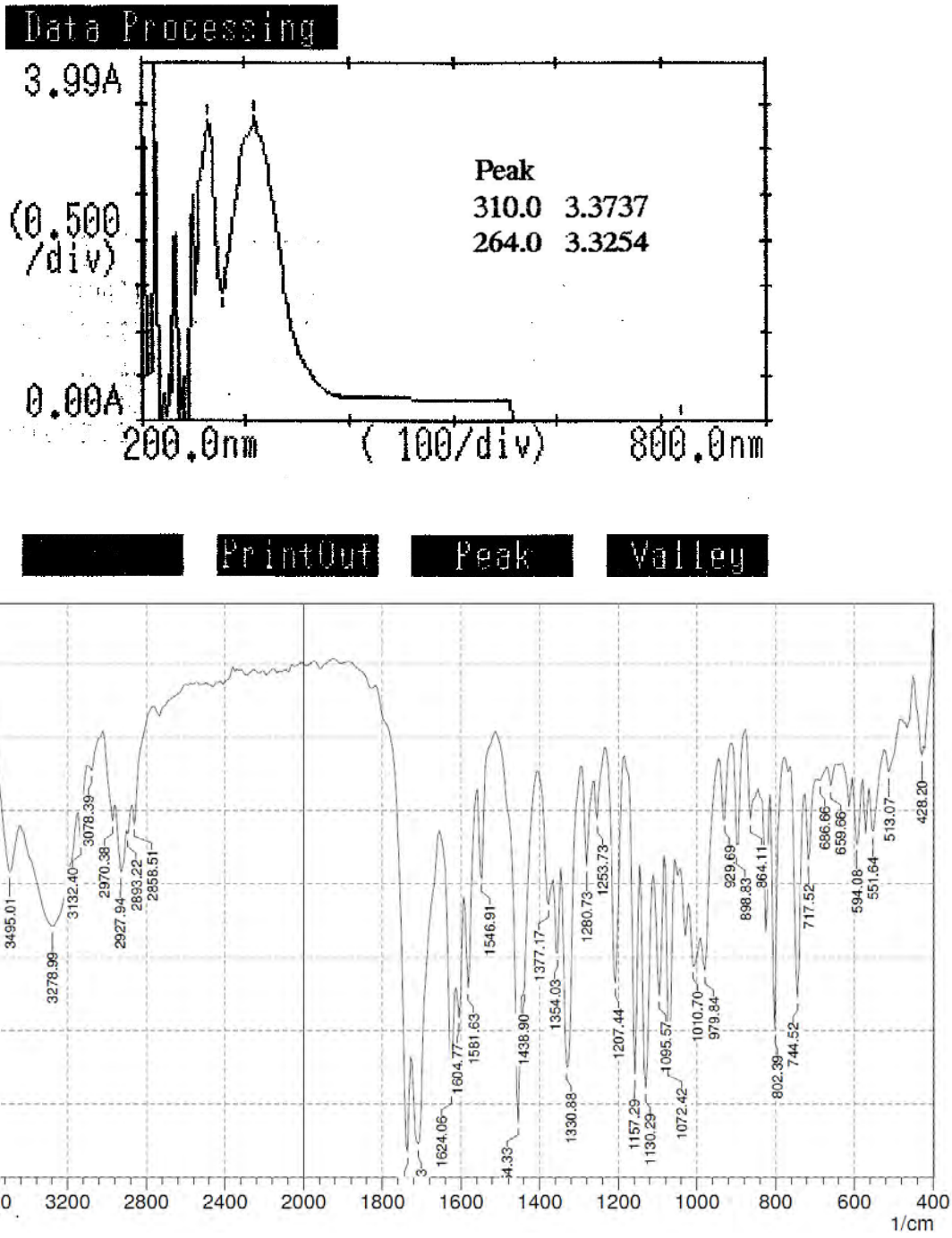
圖六、異歐前胡素之核磁共振光譜圖 a.H-NMR b. C13-NMR

正離子有顯著Peak,以正離子為主分析

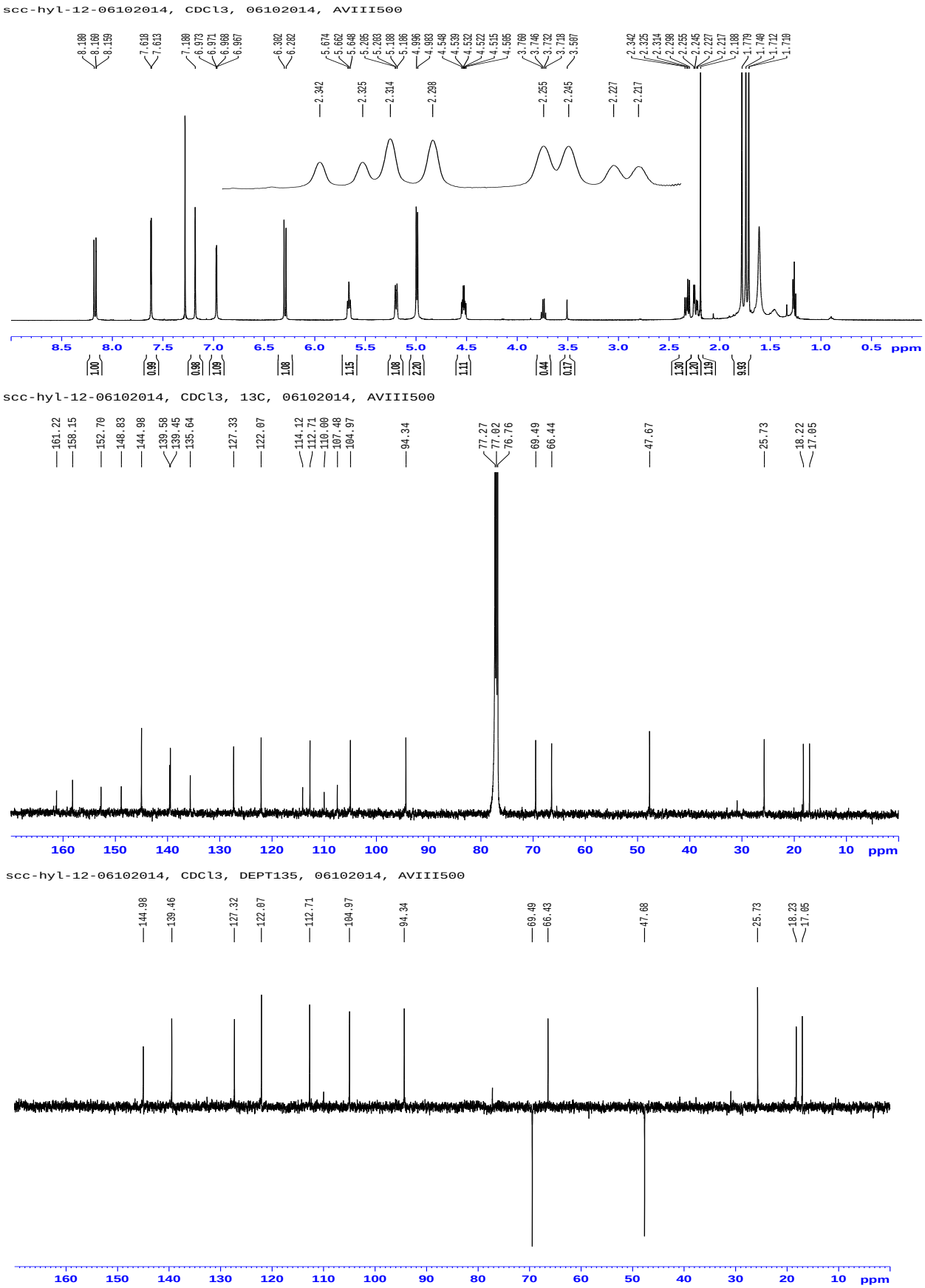
9_BPC_Pos



圖七、異歐前胡素之質譜光譜圖



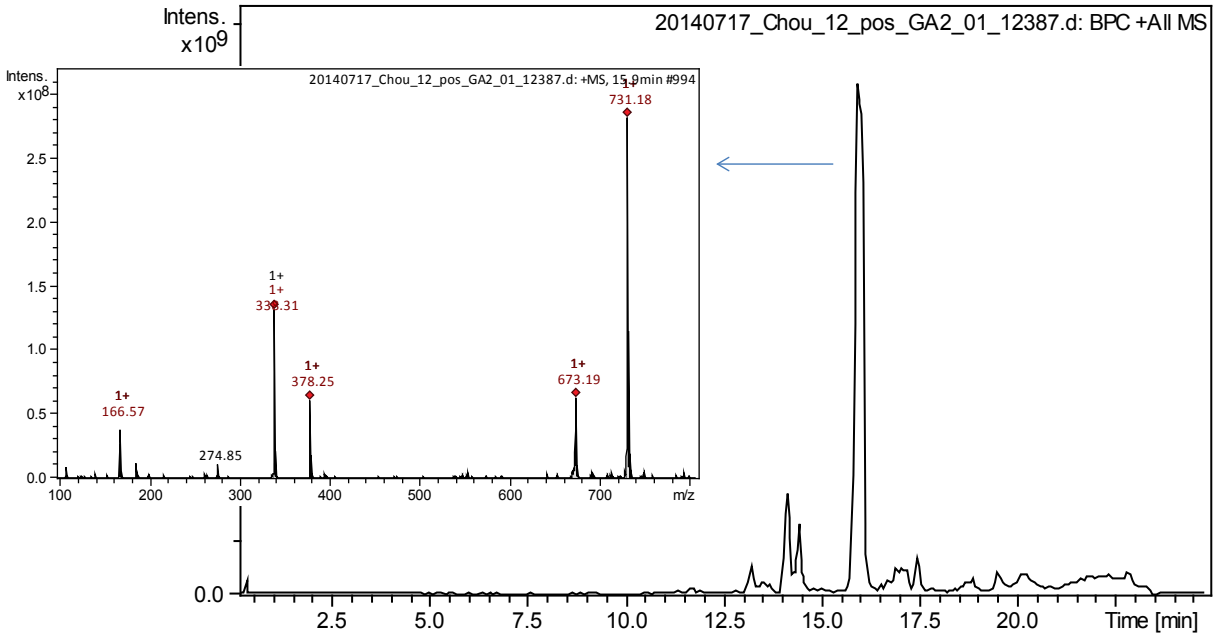
圖八、羌活醇之紫外光譜和紅外光譜圖



圖九、羌活醇之核磁共振光譜圖 a.H-NMR b.C13-NMR

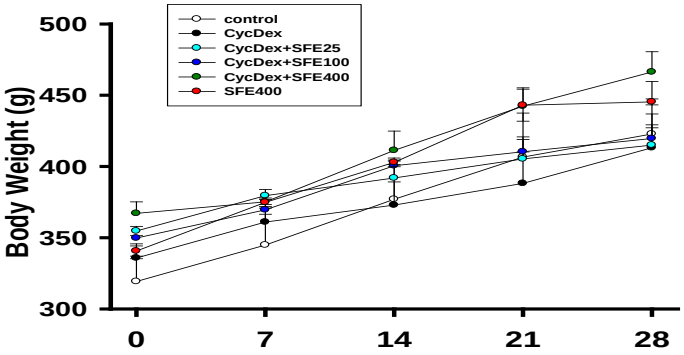
正離子有顯著Peak,以正離子為主分析

12_BPC_Pos

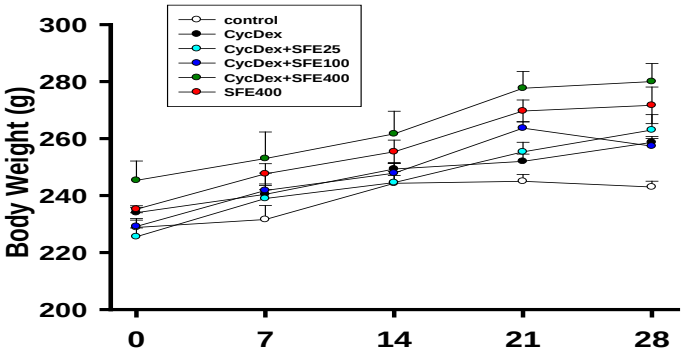


圖十、羌活醇之質譜光譜圖

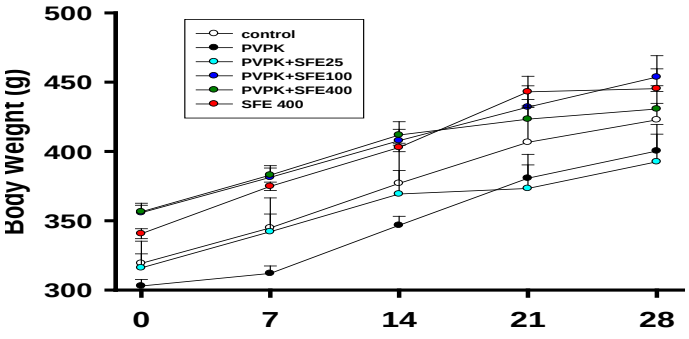
A. Cyclodextrin載體羌活藥物組(雄鼠)



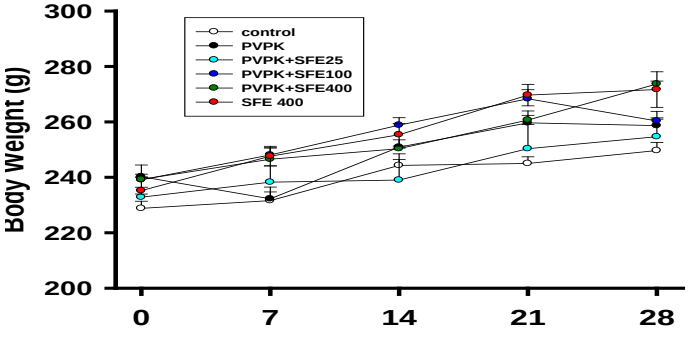
B. Cyclodextrin載體羌活藥物組(雌鼠)



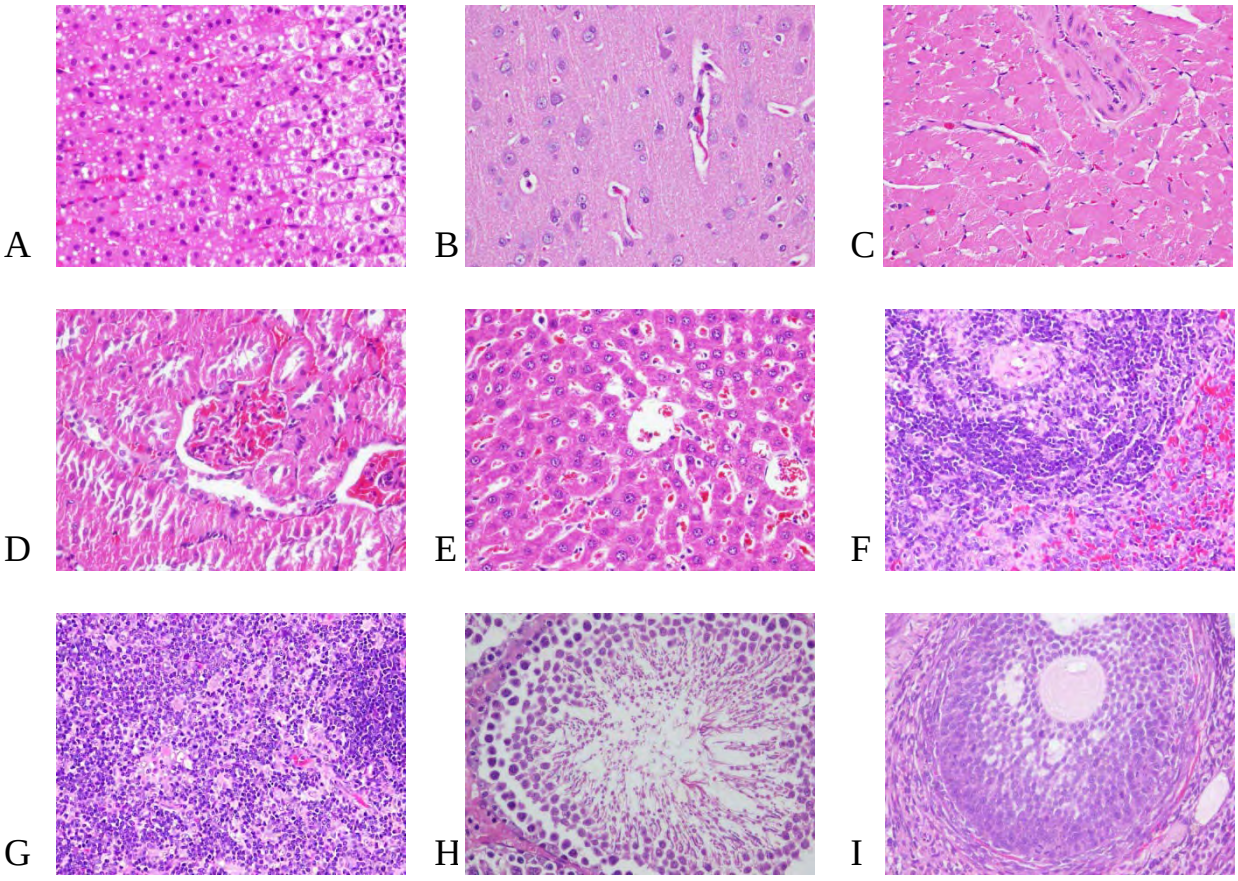
C. PVPK載體羌活藥物組(雄鼠)



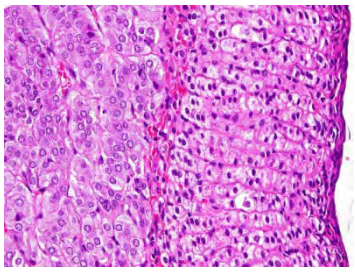
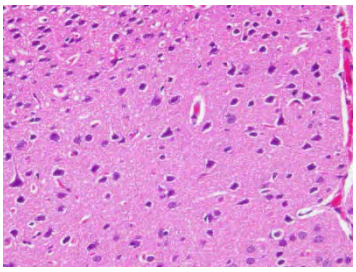
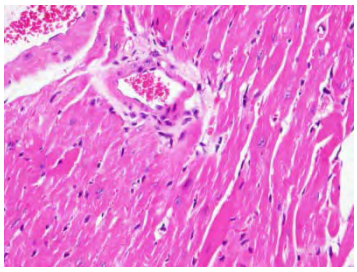
D. PVPK載體羌活藥物組(雌鼠)

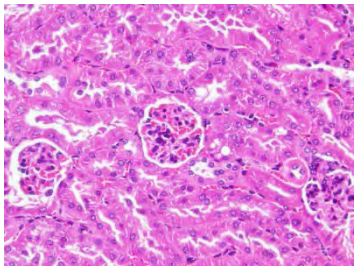
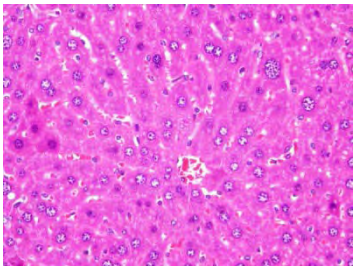
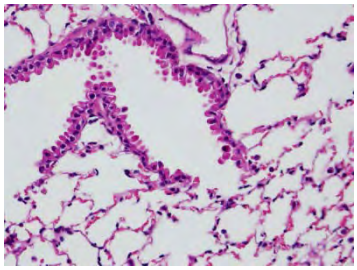


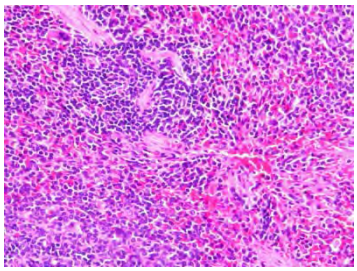
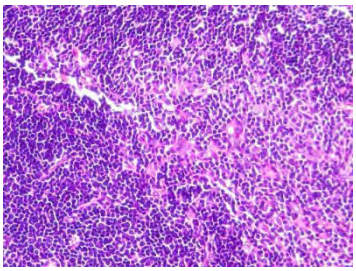
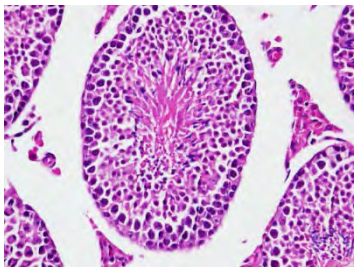
圖十一、羌活之固體分散製劑影響大鼠體重變化



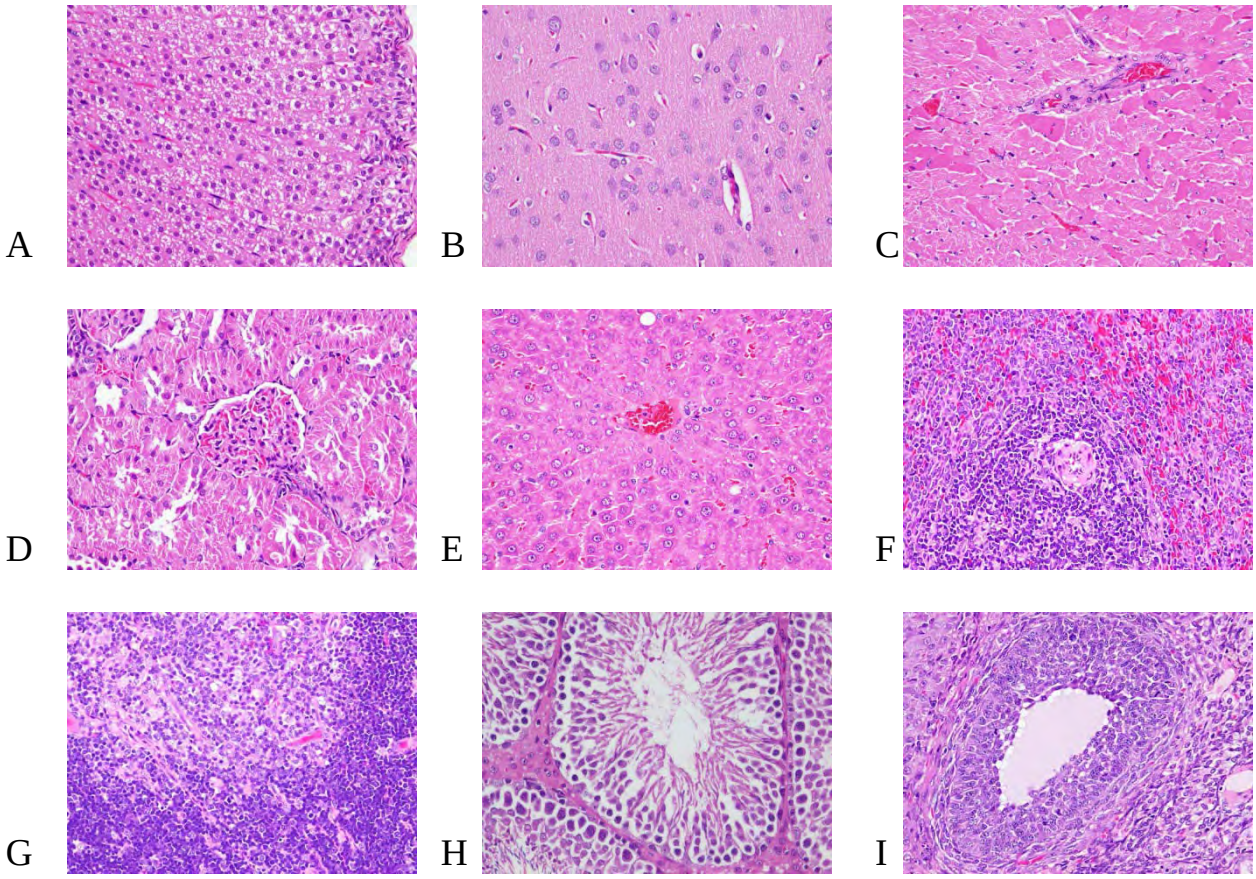
圖十二、羌活超臨界抽提固體分散製劑對大鼠 28 天餵食毒性試驗羌活 SFE (400mg/kg) 組腎上腺組之臟器無明顯組織病理變化。SFE (400mg/kg)組腎上腺(A)、腦(B)、心臟(C)、腎臟(D)、肝臟(E)、肺臟(F)、脾臟(G)、胸腺(H)、睪丸(I) (動物編號：S1M)等臟器無明顯組織病理變化。(HE stain, 400x)。

A  B  C 

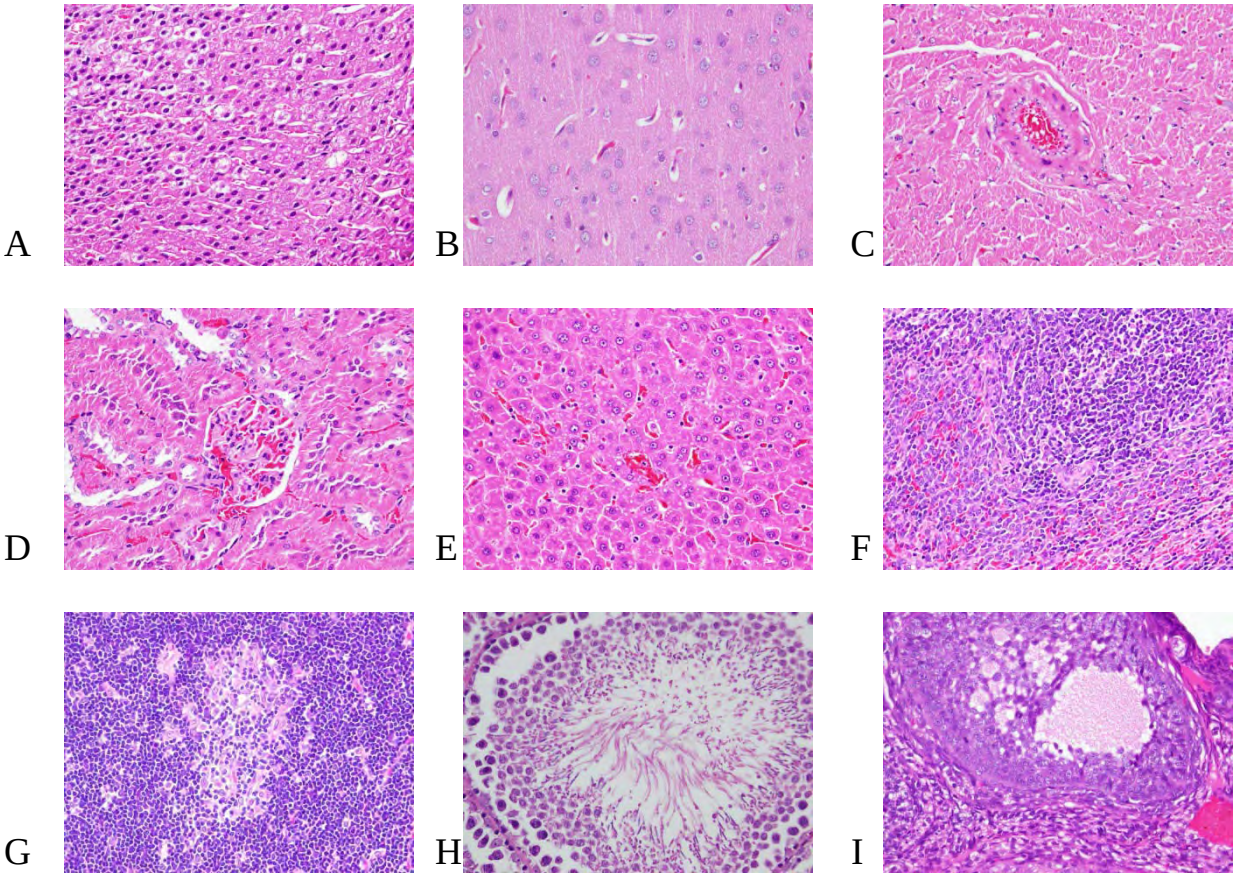
D  E  F 

G  H  I 

圖十三、羌活超臨界抽提固體分散製劑對大鼠 28 天餵食毒性試驗 20%Agar+SFE (400mg/kg)羌活之固體分散製劑組之臟器無明顯組織病理變化。20%Agar+SFE (400mg/kg)組腎上腺(A) (動物編號：BH9)、腦(B)、心臟(C)、腎臟(D)、肝臟(E)、肺臟(F)、脾臟(G)、胸腺(H)、睪丸(I) (動物編號：BH7)等臟器無明顯組織病理變化。(HE stain, 400x)。



圖十四、羌活之固體分散製劑 CycDex+SFE400 組對大鼠 28 天餵食毒性試驗 20% CycDex+SFE (400 mg/kg)組之臟器無明顯組織病理變化。腎上腺(A)、腦(B)、心臟(C)、腎臟(D)、肝臟(E)、脾臟(F)、胸腺(G)、睪丸(H) (動物編號：BH1M)及卵巢(I) (動物編號：BH3F)等臟器無明顯組織病理變化。(HE stain, 400x)。



圖十五、羌活之固體分散製劑 PVPK+SFE400 組對大鼠 28 天餵食毒性試驗 20% PVPK+ SFE (400 mg/kg)組之臟器無明顯組織病理變化。腎上腺(A)、腦(B)、心臟(C)、腎臟(D)、肝臟(E)、脾臟(F)、胸腺(G)、睪丸(H) (動物編號：CH2M)及卵巢(I) (動物編號：CH1F)等臟器無明顯組織病理變化。(HE stain, 400x)。

表一、噴霧乾燥粉末性質

	Agar	β-環糊精	PVP
藥物安定檢視	沒有變形、吸潮與結塊等現象。	沒有變形、吸潮與結塊等現象。	沒有變形、吸潮與結塊等現象。
乾減	5.1%	3.6%	3.5%
稀醇	95.32%	96.24%	95.32%
水抽提率	82.64%	87.32%	85.64%
水活性	0.32	0.28	0.35
溶化性	pass	pass	pass
粉體性質			
拍擊密度	84%	82%	88%
顆粒均勻度	80 分	80 分	80 分

表二、濃縮顆粒性質

固體分散載體	Agar 顆粒	β-環糊精顆粒	PVP 顆粒
藥物安定檢視	沒有變形、吸潮與結塊等現象。	沒有變形、吸潮與結塊等現象。	沒有變形、吸潮與結塊等現象。
微孔表面積(m^2/g)	0	0	0
比表面積 BET (m^2/g)	2.32	2.10	2.44
含量測定			
Isoimperatorin (%)	0.98%	1.02%	0.97%
Notopterol (%)	1.12%	1.32%	1.03%

表三、臺灣與大陸羌活濃縮製劑成分比較

	Isoimperatorin (mg/g)	Notopterol (mg/g)
T1	0.00	0.00
T2	0.00	0.00
T3	0.00	0.07
T4	0.00	0.00
T5	0.00	0.10
T6	0.77	1.70
T7	1.12	1.94
T8	1.19	2.44
T9	0.54	0.05
C1	0.00	0.00
C2	0.00	0.00
C3	0.00	0.05
C4	0.00	0.11
C5	0.00	0.00
C6	0.00	0.12
固體分散技術製劑	10.20	13.20

註：T 表臺灣廠家，C 表大陸廠家

表四、異歐前胡素(Isoimperatorin)結構鑑定光譜資料

1.紫外線光譜(UV)	UV (MeOH) λmax nm: 310,540
2.紅外線光譜(IR)	IR (KBr) νmax cm^{-1}: 1750, 1674,1547, 1454,1346
3.質譜(MS)	TOFMS : $[2M+Na]^+$ 563
4.核磁共振(NMR)	1H NMR（$CDCl_3$，400 MHz）：δ 8.15（d，J=9.8 Hz， 1H），7.60（d，J=2.3 Hz，1H），7.16（s，1H），6.96（d，J=2.3 Hz，1H），6.27（d，J=9.8 Hz，1H），5.54（m，1H），4.92（d，J=7.0 Hz，2H），1.80（s，3H），1.71（s，3H）

表五、羌活醇(Notopterol)結構鑑定光譜資料

紫外線光譜(UV)	UV (MeOH) λmax nm: 264,310
紅外線光譜(IR)	IR (KBr) νmax cm^{-1}: 3495, 3279,1740, 1624,1582,1547
質譜(MS)	TOFMS: $[M+Na]^+$ 378, $[M-H2O]^+$338
核磁共振(NMR)	1H NMR（$CDCl_3$，400 MHz）：δ 8.15（d，J=9.8 Hz，1H），7.59（d，J=2.3 Hz，1H），7.16（s，1H），6.95（d，J=2.3Hz，1H），6.27（d，J=9.8 Hz，1H），5.64（m，1H），5.17（m，1H），4.98（d，J=6.7 Hz，2H），4.51（m，1H），2.14（m，2H），1.75（s，3H），1.71（s，3H），1.69（s，3H）

表二、臨床異常症狀發生率

A. cyclodextrin組異常症狀發生率(雄鼠)

cyclodextrin組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
cyclodextrin	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6
異常	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

B. cyclodextrin組異常症狀發生率(雌鼠)

cyclodextrin組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
cyclodextrin	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6
異常	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

C. PVPK組異常症狀發生率(雄鼠)

PVPK組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
載體PVPK	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6
異常	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

D. PVPK組異常症狀發生率(雌鼠)

PVPK組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
載體PVPK	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6
異常	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

n/n: 個別項目動物隻數/每組動物數目

表三、試驗期間死亡率

A. cyclodextrin組死亡率(雄鼠)

cyclodextrin組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
cyclodextrin	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6
異常	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

B. cyclodextrin組死亡率(雌鼠)

cyclodextrin組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
cyclodextrin	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6
異常	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

C. PVPK組死亡率(雄鼠)

PVPK組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
載體PVPK	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6
異常	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

D. PVPK組死亡率(雌鼠)

PVPK組	對照組	羌活組	羌活之固體分散製劑			
載體PVPK	0	0	20%	20%	20%	20%
羌活(mg/kg)	0	400	0	25	100	400
動物隻數	6	6	6	6	6	6
異常	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

n/n: 個別項目動物隻數/每組動物數目

表四、羌活之固體分散製劑影響SD大鼠之器官重量

雄鼠	Brain	heart	liver	spleen	lung	Kidney	testis	AdrenalG	Thyroid G	pH	Coaggurative time
control	2.11	1.45	10.23	0.73	9.03	3.42	3.18	0.40	0.84	7.07	140.67
	0.15	0.24	1.23	0.22	6.01	0.71	0.51	0.29	0.11	0.21	123.29
SFE	2.20	1.49	12.40	0.73	7.96	3.42	3.61	0.08	0.77	7.33	154.33
	0.02	0.20	0.11	0.04	0.66	0.20	0.10	0.02	0.10	0.32	91.13
CD0	2.06	1.19	10.15	0.71	8.33	2.86	3.28	0.11	0.61	7.29	114.33
	0.07	0.07	0.46	0.10	1.69	0.42	0.21	0.04	0.06	0.47	50.14
CD25+SFE	2.10	1.39	11.10	0.72	7.62	3.10	3.38	0.09	0.81	6.37	85.67
	0.09	0.14	1.58	0.08	0.74	0.40	0.23	0.06	0.07	0.07	8.08
CD100+SFE	2.20	1.18	11.43	0.81	9.03	2.85	4.04	0.04	0.87	7.28	112.33
	0.09	0.02	2.09	0.18	1.49	0.13	0.96	0.01	0.01	0.60	7.09
CD400+SFE	2.15	1.56	13.80	0.79	7.42	3.55	3.35	0.10	0.89	6.75	109.00
	0.06	0.08	0.72	0.05	1.70	0.24	0.04	0.06	0.19	0.35	16.82
PV0	2.06	1.40	10.83	0.68	7.53	2.71	3.15	0.08	0.83	6.72	143.67
	0.06	0.11	0.41	0.07	0.43	0.16	0.20	0.02	0.03	0.57	13.50
PV25+SFE	2.10	1.16	9.54	0.55	8.60	2.61	3.22	0.07	0.79	6.69	193.33
	0.02	0.10	0.51	0.03	1.17	0.09	0.36	0.01	0.16	0.29	58.59
PV100+SFE	2.10	1.44	12.14	0.75	7.45	3.32	3.34	0.06	0.80	7.16	101.33
	0.14	0.04	0.54	0.11	1.14	0.06	0.20	0.01	0.09	0.67	22.81
PV400+SFE	2.24	1.37	12.46	0.65	7.22	3.07	3.66	0.06	0.93	7.49	159.33
	0.13	0.15	0.96	0.02	0.84	0.17	0.26	0.04	0.13	0.51	139.37

mean ± S.E.M.，n=6。2. a、b:各組組間經 Duncan 統計分析，$p<0.05$ 時之統計差異性。

雌鼠	Brain	heart	liver	spleen	lung	Kidney	testis	AdrenalG	Thyroid G	pH	Coaggurative time
control	1.98	0.90	6.50	0.51	8.74	1.83	0.96	0.07	0.67	6.77	72.67
	0.09	0.10	0.53	0.05	0.85	0.10	0.21	0.01	0.07	0.50	35.95
SFE	2.01	0.96	7.36	0.55	5.23	1.76	0.70	0.06	0.70	6.90	154.33
	0.08	0.04	0.84	0.02	0.21	0.20	0.05	0.01	0.21	0.48	91.13
CD0	1.98	0.94	7.04	0.53	7.44	1.90	0.83	0.06	0.61	6.36	99.00
	0.10	0.12	0.04	0.07	0.74	0.10	0.20	0.04	0.03	0.33	36.01
CD25+SFE	1.96	0.91	6.99	0.51	5.51	1.90	1.09	0.09	0.60	6.76	85.67
	0.08	0.11	0.69	0.03	0.84	0.18	0.46	0.00	0.13	0.84	8.08
CD100+SFE	1.98	0.86	7.59	0.51	6.10	1.81	0.85	0.10	0.58	6.62	77.00
	0.01	0.06	0.24	0.03	0.47	0.10	0.51	0.02	0.04	0.23	10.58
CD400+SFE	1.98	0.87	7.69	0.56	5.53	1.91	1.01	0.08	0.73	6.97	84.00
	0.01	0.02	0.23	0.03	0.61	0.12	0.19	0.01	0.03	0.14	7.81
PV0	1.97	0.90	8.15	0.72	7.78	2.14	0.66	0.11	0.77	6.43	75.33
	0.02	0.08	1.50	0.19	2.73	0.38	0.03	0.04	0.22	0.18	8.50
PV25+SFE	1.96	0.87	7.20	0.61	6.67	2.04	1.14	0.09	0.86	6.46	57.67
	0.32	0.05	0.76	0.14	2.78	0.29	0.45	0.02	0.18	0.74	11.72
PV100+SFE	2.09	0.95	7.95	0.67	6.87	2.00	0.65	0.45	0.74	6.64	70.00
	0.06	0.07	0.53	0.07	0.81	0.22	0.03	0.36	0.15	0.52	1.73
PV400+SFE	2.14	1.07	8.87	0.86	5.42	2.18	1.37	0.12	0.70	6.86	78.67
	0.04	0.10	0.17	0.21	1.35	0.01	0.53	0.09	0.05	0.01	2.89

mean ± S.E.M.，n=6。2. a、b:各組組間經 Duncan 統計分析，$p<0.05$ 時之統計差異性

表五、羌活之固體分散製劑影響SD大鼠連續餵食28天之血清分析

A. SD雄鼠生化值分析

Male	**GLU**	**GOT**	**GPT**	**TP**	**ALB**	**T-B**	**BUN**	**CRE**	**CA**
	mg/dl	U/L	U/L	g/dl	g/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
control	104.71	88.33	43.67	6.20	3.77	0.40	18.67	0.63	8.47
	12.10	10.69	3.06	0.26	0.06	0.00	1.15	0.15	0.32
SFE400	109.00	86.67	45.67	6.33	3.87	0.50	17.67	0.50	8.97
	5.20	12.34	6.66	0.49	0.38	0.00	2.08	0.00	1.00
CD0	105.33	71.67	42.33	5.83	3.47	0.17	13.67	0.50	9.90
	20.73	7.72	4.11	0.24	0.05	0.09	0.47	0.08	0.22
CD25+SFE	143.67	85.00	41.67	6.47	3.20	0.43	22.00	0.53	8.57
	51.86	4.36	14.36	0.64	0.10	0.06	1.00	0.06	0.12
CD100+SFE	109.67	77.33	44.33	6.57	3.43	0.10	15.67	0.57	10.50
	34.96	9.02	14.36	0.40	0.51	0.00	2.08	0.06	0.26
CD400+SFE	123.56	94.67	41.33	5.73	3.57	0.20	16.33	0.47	10.07
	30.86	29.14	3.21	0.15	0.31	0.00	1.53	0.15	0.23
PV0	105.33	78.33	41.67	5.87	3.73	0.23	12.33	0.47	9.80
	6.66	9.29	10.12	0.40	0.35	0.06	1.53	0.06	0.26
PV25+SFE	109.33	78.00	46.00	6.03	3.67	0.23	14.33	0.47	9.97
	15.57	5.29	5.29	0.57	0.15	0.06	0.58	0.06	0.31
PV100+SFE	103.67	82.67	36.67	6.53	3.53	0.10	21.33	0.53	9.03
	3.21	6.81	5.51	0.32	0.38	0.00	2.89	0.06	0.35
PV400+SFE	109.67	105.33	54.00	6.83	4.00	0.13	21.67	0.50	8.87
	8.74	42.16	28.93	0.21	0.17	0.06	1.15	0.00	0.50

mean ± S.E.M.，n=6。 2. a、b:各組組間經Duncan統計分析，$p<0.05$時之統計差異性。

B. SD雄鼠生化值分析

Male	**P**	**ALP**	**GGT**	**NA**	**K**	**CL**
	mg/dl	U/L	U/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
control	7.47	127.84	1.20	140.67	4.03	102.33
	1.02	15.44	0.80	2.52	0.65	2.31
SFE400	7.07	155.93	2.77	141.33	4.50	98.67
	0.42	7.50	0.30	2.08	1.13	0.58
CD0	7.43	119.49	6.66	137.00	4.73	103.00
	0.41	14.43	2.99	1.41	0.50	1.63
CD25+SFE	7.37	121.48	1.71	140.33	4.80	97.67
	1.51	6.22	1.94	1.15	0.79	1.53
CD100+SFE	8.63	117.59	1.18	143.67	5.37	101.33
	0.51	42.71	0.96	1.15	0.72	2.08
CD400+SFE	8.10	120.57	3.05	138.33	5.03	101.33
	1.01	14.77	3.64	0.58	1.53	1.53
PV0	8.43	139.27	5.26	140.33	4.73	102.33
	0.87	42.59	3.46	3.21	0.29	0.58
PV25+SFE	8.13	143.02	1.53	141.33	4.13	102.00
	0.87	23.24	1.72	2.08	0.29	1.00
PV100+SFE	7.37	136.26	3.25	141.33	4.20	101.33
	0.32	38.78	3.37	0.58	0.17	1.15
PV400+SFE	9.93	128.37	4.28	142.67	5.03	100.67
	3.97	13.63	3.12	1.15	1.05	2.08

mean ± S.E.M.，n=6。2. a、b:各組組間經Duncan統計分析，$p<0.05$時之統計差異性。

C. SD雄鼠血液值分析

Male	PT	APTT	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
	sec	sec	$x10^3$/ul	$x10^6$/ul	g/dl	%	fl	pg	g/dl	$x10^3$/ul
control	11.30	10.00	11766.67	7.91	16.73	43.70	55.50	21.27	38.30	901.00
	0.26	0.00	2538.37	0.70	0.25	1.45	3.25	1.63	0.70	304.15
SFE400	11.80	14.90	11500.00	8.22	16.93	44.40	54.07	20.63	38.17	1153.67
	0.56	4.33	3342.15	0.66	0.55	2.61	1.90	1.10	0.95	20.84
CD0	12.03	15.03	11466.67	7.80	16.60	41.70	53.47	21.30	39.80	1174.00
	1.09	3.63	1442.99	0.13	0.29	1.31	0.78	0.08	0.59	184.28
CD25+SFE	15.10	14.90	17133.33	8.82	17.93	46.73	53.07	20.37	38.40	1016.00
	1.51	6.93	6730.03	0.75	0.92	2.87	2.21	0.71	0.79	248.69
CD100+SFE	11.23	10.00	12100.00	7.57	16.73	40.83	53.97	22.13	41.00	1150.33
	1.12	0.00	1000.00	0.46	0.57	2.21	0.86	0.72	0.85	422.47
CD400+SFE	13.23	14.97	7666.67	6.75	14.70	36.63	54.03	21.77	40.30	656.33
	1.29	4.30	4404.92	1.50	3.39	9.23	1.88	0.25	1.21	517.57
PV0	12.07	14.73	12133.33	8.00	16.73	43.73	54.73	21.00	38.33	1053.00
	1.21	4.11	1171.89	0.65	0.40	3.02	1.64	1.21	1.70	241.03
PV25+SFE	11.90	10.00	10166.67	7.53	16.40	42.40	56.30	21.77	38.67	1020.67
	1.22	0.00	2214.35	0.34	1.04	2.38	1.22	0.51	0.35	192.37
PV100+SFE	12.17	10.00	11466.67	7.47	16.30	41.30	55.27	21.80	39.50	990.33
	1.23	0.00	1882.37	0.21	0.17	1.67	1.45	0.40	1.20	37.61
PV400+SFE	11.97	10.00	14833.33	7.96	16.77	42.10	52.93	21.10	39.83	1042.33
	1.12	0.00	6066.58	0.51	0.64	1.82	1.08	0.56	0.32	48.22

mean ± S.E.M.，n=6。 2. a、b:各組組間經Duncan統計分析，$p<0.05$時之統計差異性。

D. SD雌鼠生化值分析

Female	GLU	GOT	GPT	TP	ALB	T-B	BUN	CRE
	mg/dl	U/L	U/L	g/dl	g/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
control	120.00	116.33	40.00	6.40	3.53	0.37	20.67	0.70
	13.53	59.91	14.80	0.26	0.64	0.25	3.21	0.10
SFE400	159.33	106.00	36.00	6.73	4.20	0.67	23.33	0.70
	13.65	24.88	8.19	0.93	0.46	0.12	1.15	0.00
CD0	112.00	111.33	49.33	6.53	4.07	0.67	18.33	0.60
	27.22	31.37	9.29	0.75	0.55	0.15	2.31	0.10
CD25+SFE	103.67	95.67	32.33	6.37	4.20	0.70	17.67	0.70
	25.15	16.20	4.51	0.40	0.44	0.10	2.52	0.10
CD100+SFE	137.33	106.33	48.67	7.03	4.43	0.77	17.00	0.60
	35.50	30.99	6.03	0.59	0.75	0.06	3.61	0.00
CD400+SFE	122.00	69.00	37.00	6.00	4.00	0.90	21.00	0.50
	30.86	29.14	3.21	0.15	0.31	0.00	1.53	0.15
PV0	103.67	74.33	26.00	6.23	3.00	0.23	16.33	0.43
	7.64	30.17	2.00	0.55	0.75	0.15	1.15	0.15
PV25+SFE	112.67	101.33	30.33	6.37	3.67	0.23	16.33	0.50
	27.21	55.19	9.07	0.35	0.49	0.12	2.31	0.10
PV100+SFE	105.67	60.33	26.33	6.43	3.93	0.37	16.00	0.40
	14.01	9.07	7.09	0.31	0.12	0.06	1.00	0.10
PV400+SFE	98.00	76.00	27.00	6.35	4.05	0.70	19.00	0.70
	2.83	14.14	1.41	0.07	0.07	0.00	1.41	0.00

mean ± S.E.M.，n=6。 2. a、b:各組組間經Duncan統計分析，$p<0.05$時之統計差異性。

E. SD雌鼠生化值分析

Female	CA mg/dl	P mg/dl	ALP U/L	GGT U/L	NA mmol/L	K mmol/L	CL mmol/L
control	9.43	7.60	84.69	4.43	140.00	4.73	101.33
	0.93	1.04	42.10	4.77	0.00	1.05	2.08
SFE400	9.87	8.87	79.41	3.43	143.33	4.37	100.67
	0.64	0.12	9.39	1.63	1.53	0.86	0.58
CD0	9.60	8.33	75.08	3.15	139.33	6.50	98.67
	0.53	1.05	26.43	0.51	3.06	1.31	1.15
CD25+SFE	9.67	7.40	67.75	4.53	139.00	4.20	99.00
	0.06	0.44	14.12	0.85	1.00	0.00	1.00
CD100+SFE	9.83	9.37	83.17	1.63	141.67	6.67	101.00
	0.55	1.86	21.76	2.13	3.51	2.81	1.00
CD400+SFE	9.40	6.30	58.77	4.14	139.00	4.40	100.00
	0.23	1.01	14.77	3.64	0.58	1.53	1.53
PV0	10.63	8.10	139.34	6.33	137.00	5.23	100.67
	0.15	1.91	74.34	5.86	0.00	1.72	2.31
PV25+SFE	10.27	8.57	79.72	5.67	136.33	3.87	102.33
	0.42	0.81	13.06	5.51	1.53	0.15	1.53
PV100+SFE	10.63	6.80	76.10	6.04	138.00	3.77	99.00
	0.25	0.52	29.44	3.50	1.00	0.25	1.00
PV400+SFE	9.55	7.45	73.73	3.18	76.00	4.10	99.50
	0.21	1.20	22.14	0.81	87.68	0.71	0.71

mean ± S.E.M.，n=6。 2. a、b:各組組間經Duncan統計分析，$p<0.05$時之統計差異性。

F. SD雌鼠血液值分析

Female	PT	APTT	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
	sec	sec	/ul	$x10^6$/ul	g/dl	%	fl	pg	g/dl	$x10^3$/ul
control	9.80	10.00	7366.67	7.36	15.57	38.80	52.77	21.17	40.10	1204.33
	0.96	0.00	2081.67	0.74	1.50	2.95	1.23	0.12	0.78	94.31
SFE400	9.87	10.00	11366.67	7.35	16.27	40.37	54.93	22.13	40.33	985.33
	0.92	0.00	472.58	0.47	0.81	2.29	1.07	0.68	0.49	193.02
CD0	27.57	69.20	7533.33	5.97	14.63	32.97	55.50	25.17	45.17	423.00
	1.67	96.03	3231.61	1.21	0.40	5.47	2.46	5.05	6.97	394.00
CD25+SFE	26.83	66.67	9500.00	6.56	15.13	36.43	55.53	23.13	41.57	737.67
	3.24	98.15	3100.00	0.60	1.06	3.07	0.76	0.75	0.76	396.28
CD100+SFE	9.73	10.00	8100.00	7.58	16.70	41.53	54.77	22.07	40.27	1192.00
	0.95	0.00	1200.00	0.44	0.96	3.07	0.97	0.15	0.72	168.87
CD400+SFE	9.90	10.00	7700.00	7.01	15.70	38.30	54.60	22.40	41.00	871.00
	1.29	4.30	4404.92	1.50	3.39	9.23	1.88	0.25	1.21	517.57
PV0	9.63	10.00	13366.67	6.72	14.47	35.87	53.40	21.50	40.33	1170.00
	0.96	0.00	1871.72	0.05	0.23	0.76	0.87	0.17	0.55	134.21
PV25+SFE	9.77	10.00	7966.67	6.66	14.70	36.17	54.33	22.07	40.63	1206.33
	0.97	0.00	1650.25	0.28	0.53	1.22	0.42	0.21	0.21	67.14
PV100+SFE	9.73	10.00	8300.00	6.90	14.63	36.27	52.63	21.27	40.40	1276.00
	0.98	0.00	2851.32	0.38	0.06	0.87	1.85	1.21	0.95	173.25
PV400+SFE	9.65	10.00	9500.00	7.43	16.20	40.45	54.40	21.85	40.05	1027.50
	0.95	0.00	1272.79	0.28	0.57	2.19	0.85	0.07	0.78	91.22

mean ± S.E.M.，n=6。 2. a、b:各組組間經Duncan統計分析，$p<0.05$時之統計差異性。

表六、羌活之固體分散製劑影響SD大鼠連續餵食28天之尿液分析

Male	LEU	NIT	URO	pH	PRO	BLO	SG	KET	BIL	GLU
control	0.00	0.33	0.20	7.00	0.00	0.00	1.01	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SFE400	0.00	0.67	0.20	7.83	0.50	0.67	1.01	0.33	0.00	0.00
	0.00	0.58	0.00	0.29	0.71	1.15	0.00	0.58	0.00	0.00
CD0	0.00	0.33	0.13	7.67	1.00	0.33	1.01	0.33	0.33	0.00
	0.00	0.58	0.12	0.76	1.00	0.58	0.01	0.58	0.58	0.00
CD25+SFE	5.00	0.00	0.20	6.33	0.00	1.00	1.01	0.00	0.00	0.00
	0.86	0.00	0.00	0.29	0.00	1.73	0.00	0.00	0.00	0.00
CD100+SFE	0.33	1.00	0.07	7.67	1.33	0.00	1.01	0.33	0.67	0.00
	0.58	0.00	0.12	0.76	1.15	0.00	0.01	0.58	0.58	0.00
CD400+SFE	0.00	1.00	0.13	7.00	0.67	0.00	1.02	0.33	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.12	0.00	0.58	0.00	0.00	0.58	0.00	0.00
PV0	0.00	1.00	0.20	7.17	1.67	0.00	1.02	0.67	1.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.76	0.58	0.00	0.00	0.58	0.00	0.00
PV25+SFE	0.00	1.00	0.07	6.83	2.00	0.33	1.02	0.67	1.00	0.00
	0.00	0.00	0.12	0.29	0.00	0.58	0.01	0.58	0.00	0.00
PV100+SFE	0.00	1.00	0.13	7.50	0.67	1.00	1.01	1.00	0.33	0.00
	0.00	0.00	0.12	0.87	0.58	1.00	0.00	0.00	0.58	0.00
PV400+SFE	0.00	1.00	0.13	7.67	0.67	1.00	1.01	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.12	0.76	0.58	1.00	0.01	0.00	0.00	0.00

1. LEU : 0:+/-(15Leu/ul) 1+(70Leu/ul)
2. NIT :No nitrite in normal urine (0.075 mg/dl sensitivity)
3. URO :0.2-1.0 EU/dl in healthy urine (0.2 EU/dl sensitivity)
4. pH :Newborn: 5.0-7.0; There after: 4.5-8.0 ; Average: 6.0 (quantitative differentiation of values to one unit)
5. PRO :10-14 mg/dl may be excreted by the normal kidney (15 mg/dl sensitivity)
6. BLO :Ery/ul No blood in normal urine (0.015 mg/dl sensitivity)
7. SG :Random urine varies in specific gravity from 1.00301.040+(correlates within 0.005)
8. KET :No ketones in normal urine (5010 mg/dl sensitivity)
9. BIL :No bilirubin in normal urine (0.400.8 mg/dl sensitivity)

10. GLU :Concentrations as little 0.1 g/dl may be significantly abnormal if found consistently (100 mg/dl sensitivity)
11. mean ± S.E.M.，n=6。
12. 各組組間經 Duncan 統計分析，p<0.05 時之統計差異性。

G. SD雌鼠尿液值分析

Female	LEU	NIT	URO	pH	PRO	BLO	SG	KET	BIL	GLU
control	0.00	1.00	0.20	6.83	0.00	0.00	1.01	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.76	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
SFE400	0.00	0.67	0.13	7.17	0.00	0.67	1.01	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.58	0.12	0.76	0.00	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
CD0	0.00	0.67	0.13	6.33	0.67	0.00	1.02	0.00	0.67	0.00
	0.00	0.58	0.12	0.29	0.58	0.00	0.01	0.00	0.58	0.00
CD25+SFE	0.00	1.00	0.07	7.00	1.67	0.00	1.02	0.00	0.50	0.00
	0.00	0.00	0.12	1.32	1.53	0.00	0.01	0.00	0.71	0.00
CD100+SFE	0.00	1.00	0.20	6.67	0.00	0.00	1.02	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CD400+SFE	0.00	1.00	0.13	6.50	0.67	0.00	1.02	0.00	0.33	0.00
	0.00	0.00	0.12	0.50	1.15	0.00	0.01	0.00	0.58	0.00
PV0	0.00	1.00	0.20	6.33	1.67	0.67	1.02	0.00	0.50	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.29	1.15	0.58	0.01	0.00	0.71	0.00
PV25+SFE	0.00	1.00	0.10	6.33	1.33	0.00	1.02	0.00	1.00	0.00
	0.00	0.00	0.14	0.76	1.53	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
PV100+SFE	0.00	0.67	0.13	6.83	1.00	0.00	1.02	0.00	1.00	0.00
	0.00	0.58	0.12	0.58	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PV400+SFE	0.00	0.67	0.20	6.83	0.00	0.00	1.01	0.00	0.67	0.00
	0.00	0.58	0.00	0.29	0.00	0.00	0.01	0.00	0.58	0.00

1. LEU : 0:+/-(15Leu/ul) 1+(70Leu/ul)
2. NIT :No nitrite in normal urine (0.075 mg/dl sensitivity)
3. URO :0.2-1.0 EU/dl in healthy urine (0.2 EU/dl sensitivity)
4. pH :Newborn: 5.0-7.0; There after: 4.5-8.0 ; Average: 6.0 (quantitative differentiation of values to one unit)
5. PRO :10-14 mg/dl may be excreted by the normal kidney (15 mg/dl sensitivity)

6. BLO :Ery/ul No blood in normal urine (0.015 mg/dl sensitivity)
7. SG :Random urine varies in specific gravity from 1.00301.040+(correlates within 0.005)
8. KET :No ketones in normal urine (5010 mg/dl sensitivity)
9. BIL :No bilirubin in normal urine (0.400.8 mg/dl sensitivity)
10. GLU :Concentrations as little 0.1 g/dl may be significantly abnormal if found consistently (100 mg/dl sensitivity)
11. mean ± S.E.M.，n=6。各組組間經 Duncan 統計分析，p<0.05 時之統計差異性。

表十、臺灣使用浸膏可行性評估

探討項目	優缺點
製造	1. 免除打碎，萃取，濃縮製程(不需買前段設備，精簡人力成本) 2. 可以縮短製程時間 3. 省電，少汙染 4. 臺灣生產技術優於中國。
檢測	1. 無藥材管控成本，轉嫁給浸膏廠商。 2. 浸膏進貨還是有檢驗成本。
品管	1. 浸膏廠商藥材來源無法追蹤。 2. 無原藥材存查，無法追朔藥材品質。 3. 無法得知浸膏中是否有其他添加物(防腐劑，安定劑等等)。 4. 藥典未收載，沒有驗收基準。 5. 批次之間的差異可能存在。
運輸	1. 浸膏的成本和藥材一樣，都是大陸比較低。(在地生產，可以減免運輸成本) 2. 液態到半固態，需冷藏保存。且較不穩定。
輸入	1. 大陸掌握藥材和浸膏來源，臺灣處於被動。 2. 液態到半固態，需冷藏保存。且較不穩定，有品質疑慮。 3. 浸膏輸入法規不明確，是否應修法或規範浸膏的使用範圍。
其他	1. 最終成品的成本結構，還是大陸佔優勢。(考慮原物料，人力，設備) 2. 臺灣之品牌口碑接受度高。 3. 臺灣之人員素質與觀念也較佳。研發能量可能優於中國。

表十一、中藥浸膏進口可行性評估公協會意見整理

NO	內容
1	中國大陸到目前為止，仍禁止使用浸膏直接入藥。雖然市場上可以買到中藥浸膏，但抽提方法，溶媒，條件等都由廠商自訂，沒有一套完整的管理方法。目前六家配方顆粒廠均不採用。(中藥檢)
2	日本津村的浸膏來自上海津村，不使用外來不知來源成分的浸膏。上海津村製藥有限公司的任務是為日本株式會社津村生產醫療用漢方製劑的中間體浸膏粉末，並從中國向日本出口。(自做自用)(網路資料)
3.	浸膏組成添加物可能不明，品質是最大疑慮。(製藥公會)
4.	日本法規顯示，浸膏和原料的管理層次是不同的，法理上看是允許有浸膏廠製備浸膏，但濃縮製劑廠生產濃縮製劑要自備濃縮單元+製劑單元，意即使用的浸膏是自家所生產，所以，還是沒有直接外購用浸膏做為原料藥直接生產的案例。(中村)
5	在確保浸膏品質的前提下，可以直接用浸膏做為原料藥。(中國)
6	浸膏如果這麼好，就不會出現濃縮細粒了。(康仁堂)
7	依許可證處方，藥材如何換算成浸膏就是一個問題。
8	浸膏應視同藥品，以許可證列管。生產產家應具備 GMP 認證。
9	開放國內廠商自行製備浸膏產品做為原料輸出，增加廠商收入。因為流浸膏的使用者大部分是食品業者，甚至可以外銷，可以不用局限於自製自銷，可以開拓市場。
10	浸膏應視為半成品，而非產品。基本上如果視為半成品，關於製造、檢測、品管、運輸及輸入等方面，則由廠商負責相關的運作。政府可以授權給各公司進行運作，以提高執行的可行性。
11	中藥浸膏進口之可行性評估直接涉及生產成本。當然還是建議廠對廠，對方也應符合相關 GMP 規範，以免造成許多問題。
12	輸入的部分則要政府法規鬆綁，利弊應進行評估，希望是有條件的開放。中藥浸膏目前是無法進口的。
13	大陸官方有感於市售的藥材有效成分一直在下降，目前已發佈只有宣布的六家濃縮廠可以抽提，並進行強力管控，要求抽提和藥材比例應該相符。建議還是以品質為最高考量。
14	西藥廠使用的生藥浸膏原料(如桔梗，遠志&甘草的流浸膏)，藥政處准許西藥廠使用，但中醫藥司不允許中藥廠生產，政策又自相矛盾之處。

附錄一、專家會議會議紀錄

103年度衛生福利部中醫藥司委託研究計劃「中藥浸膏進口可行性初步評估」
專家會議會議紀錄

開會時間：103年7月14日(星期一)上午10:00

開會地點：衛福部(台北市忠孝東路六段488號2樓) 207會議室

主席：余建志 計畫主持人

案由、中藥浸膏進口之可行性評估，針對產品本身之製造、檢測、品管、運輸及輸入等面相，進行討論。

1. 浸膏應視為半成品，而非產品。基本上如果視為半成品，關於製造、檢測、品管、運輸及輸入等方面，則由廠商負責相關的運作。政府可以授權給各公司進行運作，以提高執行的可行性。
2. 浸膏進口則無法管控製造使用的溶媒和藥材是否適當，或是有外加的物質(如防腐劑)，浸膏的含水率和安定性有關，運送要考慮的事情也比較多，檢驗上可以使用fingerprint，如果是合資廠或是投資廠，也接受政府的GMP查核。自己做比較放心，也可以減少很多困擾。製造廠是否符合藥廠規範，很多浸膏廠比較像化工廠，也有用不知名的溶媒等等，在沒有明確規範之前，暫時不宜開放。
3. 中藥浸膏進口之可行性評估直接涉及生產成本。當然還是建議廠對廠，對方也應符合相關GMP規範，以免造成許多問題。檢測不是問題，目前國內廠商多具備相關能力，藥材和浸膏在運輸上的包裝和條件考量是不一樣的。輸入的部分則要政府法規鬆綁，利弊應進行評估，希望是有條件的開放。中藥浸膏目前是無法進口的。
4. 如果開放中藥浸膏進口，傳統製劑廠就都可以做濃縮製劑了，中國目前對濃縮製劑十分憂慮，有感於市售的藥材有效成分一直在下降，目前已發佈只有宣布的六家濃縮廠可以抽提，並進行強力管控，要求抽提和藥材比例應該相符。建議還是以品質為最高考量。
5. 濃縮製劑製造最大成本在於抽提萃取，佔成本50%。抽提萃取對最終產品的品質影響最大，浸膏的抽提影響深遠。西藥廠使用的生藥浸膏原料(如桔梗，遠志&甘草的流浸膏)，藥政處准許西藥廠使用，但中醫藥司不允許中藥廠生產，政策又自相矛盾之處。

6. 如果開放臺灣中藥廠抽提製造流浸膏，對中藥廠更有利，因為流浸膏的使用者大部分是食品業者，甚至可以外銷，可以不用局限於自製自銷，可以開拓市場。反正設備也都有了，不需要新增相關設備，製造技術也不是問題。
7. 有時候是官方太過保守或是太過屬地主義，廠商常常覺得處處受限。這個議題應該持續被討論。

編號：MOHW103-CMAP-M-114-122408

台灣特有種藥用植物—阿里山十大功勞改善高脂飲食誘導非酒精性脂肪肝小鼠之代謝體及保健功效研究(2-2)

彭文煌
中國醫藥大學

摘　要

研究目的：

以一測多評法及油酸誘導肝細胞脂肪堆積探討阿里山十大功勞對指標成分定量及抗脂肪肝分子機制。

研究方法與結果：

首先以一測多評法同步測定黃連及阿里山十大功勞藥材中多種指標成分的含量分析，針對八種不同生物鹼同步測定，計算七種生物鹼與小蘗鹼間相對校正因數，進行小蘗鹼以外成分的含量計算，並利用建立好的方法，分析阿里山十大功勞不同季節採集樣本之生物鹼含量變化，研究結果發現，不同季節採收之阿里山十大功勞，生物鹼含量上並無顯著差異。再以油酸誘導 HepG2 肝臟細胞脂肪酸及三酸甘油脂的堆積探討阿里山十大功勞及其活性成分小蘗鹼抗脂肪堆積之分子機制，阿里山十大功勞及小蘗鹼會降低油酸誘導肝臟細胞，減少 SCD-1，FAS 的基因表現，增加 PPARα及 CPT-1 的基因表現；小蘗鹼還會減少 SREBP-1c 及 ACC 的基因表現，並增加αAMPK 的蛋白及基因表現。

結論與建議：

上述結果顯示一測多評法是一種快速、省錢及可大量分析的方法，可用於含小蘗鹼複方的品質管制。阿里山十大功勞及小蘗鹼能改善油酸誘導之肝臟脂肪堆積，其分子機制可能與上調 AMPK 磷酸化及降低肝細胞脂質新生相關基因的表現(SREBP 磷酸化，FAS 表現)有關。

關鍵詞：阿里山十大功勞、一測多評法、油酸、脂肪堆積

Number: MOHW103-CMAP-M-114-122408

Metabolomics and Health Function Study of Mahonia Oiwakensis on High-fat Diet Induced Non-alcoholic Fatty Liver Mice

Wen-Huang Peng
China Medical University

ABSTRACT

Aims of study:

The aims of this study were intended to evaluate the components contents of *Mahonia oiwakensis* ethanol extract (ME) by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) and investigate anti-fatty liver mechanisms by proteins and mRNA expressions of oleic acid-induced fatty deposition in HepG2 cell.

Methods and Results:

We measured the contents of eight constituents of *Coptis japonicus* and ME by using QAMS method. We calculated the relative correction factor of the seven components to berberine and calculated the contents of the seven components according to this factor. We measured the alkaloids contents of ME during the four different seasons by using this method. There were no significant changes of the alkaloid contents in ME during the four different seasons. We also investigated the effect of ME and berberine on oleic acid-induced fatty disposition in HepG2 cell. ME and berberine were found to decreas the fatty disposition and gene expression of SCD-1 and FAS while increase gene expression of PPARαand CPT-1. In addition, Berberine was found to decreasing the gene expression of SREBP-1c and ACC while increasing gene expression of αAMPK, up-regulated AMPK expression and down-regulating the SREBP and FAS expressions.

Conclusion:

The above results indicated that the developed quality control method of this study is a rapid, economical, and robust method. This method could also be used in QC of berberine rich prescription. The anti- fatty disposition mechanisms of ME and berberine were related to upregulating AMPK phosphorylation and decreasing the lipogenesis genes (SREBP, FAS) expressions.

Keywords: *Mahonia oiwakensis*, Quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS), Oleic acid, Fatty deposition

壹、前言

轉譯醫學(translation medicine)在藥物的研發過程中，注重將基礎研究的成果轉化成臨床上的治療方法，即強調從基礎到臨床，再從臨床回到基礎(Bench to Beside & Bedside to Bench, B-B-B) 的雙向連接模式。故從這一角度來講，中藥新藥的開發和研究思路，即遵循從臨床到基礎再回到臨床的模式和路線。因此，中醫藥之研究可說是天然藥物的轉譯醫學研究。

在臺灣，近年來隨著經濟的發展以及飲食習慣的西化，肥胖、糖尿病以及高血脂症的人口越來越多，流行病學研究指出，一般人口中非酒精性脂肪肝病的盛行率約為 12-37%，已成為臺灣肝病領域中重要之疾病，但目前臨床上尚未有良好之治療方式，因此我們希望從中草藥的寶庫中，開發安全有效之植物性抗脂肪肝用藥。

本研究的先期研究中發現，阿里山十大功勞具有減輕四氯化碳誘導的肝臟脂肪變性，降低血清中 AST、ALT、三酸甘油脂及膽固醇含量。因此，我們推測此藥物可能具有減輕非酒精性脂肪性肝病之能力，即改善肝臟脂肪堆積，降低肝臟脂肪浸潤。此外，我們針對阿里山十大功勞化學成分進行初步分析，阿里山十大功勞主要的有效部分為生物鹼及黃酮類，且其抗氧化、抗發炎及保肝效果相當顯著(此結果已發表在 *International Journal of Molecular Sciences*, accepted. 18 October, 2012)。根據民間使用經驗、先前的研究報告及今年度預試驗結果顯示，我們合理的推測，此本土藥用植物具有相當高的後續研究與開發價值。

美國 FDA 尚未批准專門針對非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 的治療藥物，且目前臨床上僅針對改善週邊組織胰島素抗性[1]和降低氧化壓力[2]為臨床上的主要治療策略。許多臨床研究報告指出，目前治療方案無法顯著改善 NASH 在肝臟中的病理變化，合併治療將成為未來臨床研究的趨勢[3]。我們希望能從臺灣本土藥用植物中，尋找一安全又有效之藥用植物，作為治療或預防該疾病的方法。

阿里山十大功勞(*Mahonia oiwakensis* Hayata)為臺灣特有種，主要分佈於阿里山一帶，乾燥葉、果實、莖及根皆可入藥。全年均可採集，除去粗梗及雜質，曬乾或陰乾。民間用於病毒性肝炎、類風濕關節炎，腸炎等發炎性疾病，用法皆為浸泡藥酒使用[4]。我們研究阿里山十大功勞已邁入第三個年頭，發表有關阿里山十大功勞鎮痛、抗發炎及降低化學性肝損傷的 SCI 文獻三篇[5-7]。該屬植物世界上有 100 多種，臺灣約有三種[4]。十大功勞屬

植物含有大量的生物活性物質，主要有效成分是生物鹼。原小蘗鹼(proberberine)型生物鹼有小蘗鹼(berberine)、巴馬汀(palmatine)和藥根鹼(jatrorrhizine)，雙卞異喹林(bisbenzyl-isoquinoline)型生物喊有小蘗胺(berbamine)、尖刺喊(oxyacanthine)和異粉防己鹼(isotetrandrine)，阿樸啡型(aporphine, Apo)型生物喊有木蘭花鹼(magnoflorine)。

研究指出阿里山十大功勞含有的已知活性成分(生物鹼類及黃酮類)具有降血脂與改善代謝疾病的作用[8, 9]，有些具有胰島素增敏劑(insulin sensitizer)的活性[9, 10]，有些則有降低氧化壓力的作用[11, 12]，為天然的抗氧化物。但更不同的是，阿里山十大功勞萃取物中，具有植物藥中“有效部位”及“有效部位群”的概念。所謂有效部位，是從植物中提取一類相近之化學性質、具有活性的化學成分，其較之原藥材更富集了有效成分，同時也保留植物藥用藥特色(多成分、多標靶、多層次的協同作用)。其作用機制和路徑表現為多向性、多層面、多靶點的藥理特點，有著單一化合物所不可比擬的優勢。因此，在我們的研究中，我們將進行阿里山十大功勞改善脂肪肝的藥理學研究。

本計畫的主要目的：1. 建立阿里山十大功勞藥材品質管制方法，利用一測多評法同步定量藥材中生物鹼含量。2. 以油酸誘導 HepG2 肝臟細胞脂肪酸及三酸甘油脂的堆積探討阿里山十大功勞及其活性成分小蘗鹼抗脂肪堆積之分子機制。

貳、材料與方法

第一部分：一測多評法同步測定阿里山十大功勞藥材中多種指標成分的含量分析、抗氧化成分及能力分析

一、一測多評法原理

近年來，有關這方面的研究報導逐漸增多 [13-19]，且在2010 版中國藥典一部中，已經收錄利用該法測定部分藥材的品質管控。“一測多評”法(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 與校正因數法原理基本一致，並且提出利用相對保留時間(Retention time, RT) 差和峰形判斷目標峰的位置。

在一定的範圍內(線性範圍內)成分的量(品質或濃度)與檢測器偵測回應成正比，即W=*fA*。在進行阿里山十大功勞藥材多成分品質管制時，以藥材中某一典型成分(有對照品供應者)，我們利用小蘗鹼(berberine)為內標，建立小蘗鹼與其他成分(巴馬汀(palmatine)、黃連鹼(coptisine)、藥根鹼(jatrorhizine)、表小蘗鹼(epiberberine)、甲基黃連鹼(worenine)、非洲防己鹼(columbamine)、木蘭花鹼(magnoflorine))之間的相對校正因子，通過校正因子計算其他成分的含量。只測定一個成分(標準品可得到者)，來實現多個成分(標準品難以得到或難供應)的同步測定。

一測多評法其原理如下：

假設某樣品中含有i個成分：

$$\frac{W_i}{A_i} = f_i (i = 1, 2, \cdots, k, \cdots, m)$$

式中A_i為成分峰曲線下面積;W_i為成分濃度。選取其中一成分k為內標，建立成分k與其他成分m之間的相對校正因數 (RCF)。

$$f_{km} = \frac{f_k}{f_m} = \frac{W_k \times A_m}{W_m \times A_k}$$

由此可推導出定量計算公式：

$$W_m = \frac{W_k \times A_m}{W_m \times A_k}$$

式中A_k為內標峰曲線下面積，W_k為內標成分濃度。Am 為其他成分m峰曲線下面積，W_m為其他成分m濃度。

(一) 藥材採集

將採集之藥材經陰乾後進行分析。阿里山十大功勞之實驗藥材產地為臺灣嘉義縣阿里山鄉奮起湖，鑑定者為本校專家。

(二) 對照品溶液的製備

取小蘗鹼、巴馬汀、黃連鹼、藥根鹼、表小蘗鹼、甲基黃連鹼、非洲防己鹼、木蘭花鹼與芸香苷 9 種指標成分，精密稱定，分別為 6.00、5.68、1.78、0.66、6.27、4.44、4.64、0.64 和 1.94mg 置於 5mL 定量瓶中、用 70%甲醇定容。於 4℃保存備用。

(三)供試品溶液的製備

精密稱定阿里山十大功勞藥材粉末 1g, 置於 100mL 定量瓶中，加入甲醇-鹽酸(100: 1) 50 mL，超音波震盪 30 min，吸取 25 mL 於圓底燒瓶，回收溶劑，用 70%甲醇溶解並定量轉移至 5 mL 容量瓶中，過 0.22 μm 濾膜，即得。

(四) 分析方法確效(validation)

線性：吸取上述混合對照品溶液 20、15、10、5、1、0.8、0.6 和 0.4μL，進樣分析，每個濃度進樣 3 次，取平均值。以進樣量對峰面積積分值進行回歸處理，得各成分的標準曲線。

校正因子計算：取混合對照品溶液，進樣 20、15、10、5、1、0.8、0.6 及 0.4 μL 測定，按公式以小蘗鹼(berberine)為對照成分，分別計算巴馬汀、黃連鹼、藥根鹼、表小蘗鹼、甲基黃連鹼、非州防己鹼、木蘭花鹼與芸香苷的相對校正因子。

精密度：精密吸取同一供試品溶液 40 μL 連續進樣 5 次，記錄峰面積；精密吸取同一供試品溶液 40 μL 連續進樣 3 d，每天 3 次，記錄標準品曲線下面積，分別計算日內(intraday)和日間(interday) RSD。

穩定性：精密吸取同一供試品溶液 40 μL，分別於配製後的 0、2、4、8、12、24、48 和 72 h 測定面積積分值，計算 RSD。

加樣回收率：精密稱取適量已知含量的阿里山十大功勞粉末(藥材 60 目) 6 份，加入一定量的混合對照品溶液，按供試品溶液處理方法製備樣品，測定、外標法計算加樣回收率。

二、抗氧化能力評估

(一) 亞鐵離子螯合能力試驗[20]

測定原理：

金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質氧化的主要因素，藉由redox cycle 反應，只要少量的金屬離子便可以有效的產生自由

基，並加速脂質氧化的進行。在多種金屬離子中，Fe^{2+}經常是最具影響力的助氧化劑，其會促進脂質氧化作用的進行。利用Fe^{2+}與ferrozine的複合物在 562 nm 之呈色反應，可測得樣品對Fe^{2+}離子的螯合能力。當樣品螯合Fe^{2+}離子時，會造成 562 nm 吸光值的降低。

Ferrozine + Fe^{2+} → ferrozine-Fe^{2+} complex

(violet)

方法：

依據Haro-Vicente加以修改，取250 µL之待測物加入1 mL甲醇，經離心去除沉澱，再加入250 µL 2 mM FeSO4 和250 µL 5 mM ferrozine 於室溫下靜置反應10分鐘，之後測其A562 之吸光值，並以未添加藥物之反應作為空白對照組。

計算：亞鐵螯合能力(Chelating effect%)=[1-(Ab_{562} sample)/ Ab_{562} control]x100

(二) 還原力試驗[21]

測定原理：

藉由普魯士藍(Prussian blue, $Fe_4[Fe(CN)6]_3$)之生成量，來顯示反應物還原過氧化物的能力。當赤血鹽(potassium ferricyanide，$K_3Fe(CN)_6$)還原成黃血鹽($K_4Fe(CN)_6$)，即將Fe^{3+}還原成Fe^{2+}之亞鐵氰錯離子，再與Fe^{3+}形成亞鐵氰化鐵時(即所謂的普魯士藍Prussian blue，$Fe_4[Fe(CN)_6]_3$))，其在吸光值 700 nm下有著強力的吸光值。吸光值越高時，即代表其具有越佳之還原力，並以0.1 mg/ mL GSH為對照標準品。

方法：

依據Oyaizu的方法加以修飾，取200 µl 的石斛乙醇萃取液，加入200 µl pH6.6 之磷酸鈉緩衝溶液0.2 M 及200 µl 的1%赤血鹽，在50℃ 下水浴反應2 0分鐘後急速冷卻，加入1%三氯醋酸200 µl，於6000 rpm離心10 min，取上清液80 µl，再加去離子水80 µl ,及40 µl $FeCl_3 \cdot 6H_2O$(0.1 %)，均勻混合，靜置10分鐘以分光光度計檢測700 nm 吸光值。實驗組吸光值扣除空白對照組吸光值越高，計算值越高，表示樣品還原三價鐵離子能力性越強 。

計算：還原能力(%) = (A_{700} of Sample/A_{700} of 0.1 mg/ ml GSH) x 100%

三、抗氧化物含量分析

(一) 總多酚含量分析[22]

測定原理：

Folin-Ciocalteu's phenol reagent可與酚類化合物之OH基反應，並產生顏色之變化 (由黃變紫藍)，並於波長730 nm下有吸光。

方法：

採用Folin-Ciocalteu試驗法測定各項藥材乙醇粹取物之"總酚量"，並以沒食子酸(gallic acid)為標準對照試劑，並加以修改。將10 mg抽出物溶於1 mL水溶液中。量取0.5 mL抽出物溶液，與0.5 mL之Folin–Ciocalteu (50%)試液均勻混合。此混合液先靜置5 min，再加入1.0 mL $NaCO_3$ (10%)溶液。在室溫靜置10 min後，將溶液離心(1000 rpm) 8 min，取上層澄清液，使用分光光譜儀測量730 nm吸收值。總酚量以每g試樣中所含之mg "沒食子酸當量"簡稱GAE)表示。

(二) 類黃酮含量分析[23]

測定原理：

類黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物，並於波長415 nm下有吸光。

方法：

參考Jai等人之方法經修飾後進行。取樣品0.5 mL，加入1.5 mL ethanol、0.1 mL Al $(NO_3)_3$ (10%)、0.1 mL CH_3COOK (1M)及2.8 mL H_2O，混合後於室溫下靜置40分鐘，以分光光度計於415 nm測定其吸光值，並以quercetin之標準曲線對照，計算出樣品中類黃酮(flavonoids)之含量，結果以mg quercetin/g sample表示。

第二部分：阿里山十大功勞對油酸誘導的肝臟細胞分子機制研究

一、細胞mRNA及蛋白體分析

(一) 細胞預處理

方法：使用HepG2細胞[24]，將培養基的培養液去掉，用常溫PBS迅速清洗2次後，用胰酶在37度下消化，將lysis buffer加入培養基。用吸管吹洗，迅速轉移到15 mL錐形管中，沉澱迅速

用液氮保存。

(二) 肝臟細胞中代謝相關基因 mRNA 及蛋白表達的測定

用TRIzol試劑(BioFlux, Japan)抽出總RNA，DNase Ⅰ(TaKaRa, Japan)處理後用M-MLV反轉錄酶(TaKaRa, Japan)進行反轉錄。應用DNAStar 6.0軟體，根據GenBank中的基因序列，分別檢測內質網壓力相關指標GRP78、XBP1、CHOP、apoB100、SREBP-1c、ACCα及FAS的mRNA表現，使用Rotor-Gene 3000 Real-time PCR儀(Corbett Research)及Sybergreen Ⅰ試劑最適條件下擴增基因及內標。將每個目標基因的拷貝數與其相對應的β-actin基因的拷貝數相除，計算出目的基因的相對表達量。

細胞	$HepG_2$								
分組		Vehicle				FFA			
	Control	N	0.5% DMSO	十大功勞萃取物	小蘗鹼	N	0.5% DMSO	十大功勞萃取物	小蘗鹼
時間	24 hr								
分析	Western blot, Real-time RT-PCR, ELASA								
Marker	Steroid metabolism: AMPK, p-AMPK, SREBP-1(Lipogenesis), PPARr, CPT-1, ACC, SCD-1								

統計分析：一測多評法與常規法的結果比較，採用t檢驗。細胞實驗數據，以One-way ANOVA分析其變異數，再以Scheffe's multiple range test檢定其間差異之顯著性；凡*p*值小於0.05以下時，則認為其差異有統計意義。

參、結果

第一部分：一測多評法同步測定阿里山十大功勞藥材中多種指標成分的含量分析

一、產地調查及藥材鑑定

主持人彭文煌教授於六月期間帶領研究團隊成員前往嘉義縣阿里山區進行阿里山十大功勞的產地調查,針對阿里山十大功勞的棲息地做一考察，調查結果發現阿里山十大功勞多生長於闊葉林和山坡(Figure 1)，嘉義縣仍然有相當豐富的藥用植物資源。

團隊亦前往奮起湖區之中興苗圃進行考察及拜訪(Figure 2)，針對將來阿里山十大功勞 GAP 生產基地的合作計畫做一前期規劃，圖中顯示阿里山十大功勞有以種子發芽方式做育苗方法。在本計劃結案後我們將會進行綜合評估，考慮將繼續進行阿里山十大功勞 GAP 生產基地之建構計畫。

針對阿里山十大功勞之基原鑑定部分，我們收集了臺灣產十大功勞屬中的三種植物，對其葉片外型做鑑定(Figure 3)，結果發現，臺灣產三種十大功勞屬的植物，其葉片外型明顯不同，因此外型鑑定可以確認我們所採集之藥材為阿里山十大功勞正品。

二、一測多評法

藥材萃取方法及供試品製備：參照文獻中黃連之分析方法修正，如材料方法中所述，同時實驗亦分析萃取物中生物鹼含量。分別取黃連藥材及阿里山十大功勞藥材粉末（過 40 目篩）100 mg 及 200 mg，精密稱定，置於 50 mL 錐形瓶，精密加入甲醇-鹽酸（100:1）的混合液 50 mL，稱重，超音波震盪 30 min，冷卻後加甲醇-鹽酸（100:1）的混合液補足重量，過濾，取續濾液過 0.45 μm 濾膜，10 μL 進樣。

HPLC 色譜條件建立：我們利用兩種不同長度的 HPLC 分離管柱：1. Kinetex 5μ C_{18} column (150 × 4.6 mm, 5.0 mm) (Phenomenex) 及 2. Kinetex 5μ C_{18} column (250 × 4.6 mm, 5.0 mm) (Phenomenex)，以下列分離條件做分析：移動相以 0.05 mol/L KH_2PO_4-ACN (54:36) (3 g SDS/L, pH=4)等梯度(Isocratic)沖提,流速 1 mL/min,分析時間 70 分鐘,柱溫 28 °C,注入量 10 μL，檢測波長為 345 nm 及 250 nm。

由於 Kinetex 5μ C_{18} column (250 × 4.6 mm, 5.0 mm)在此條件中能達到分離程度較好之圖譜(Figure 4 及 Figure 5)，我們選此管柱搭配上述條件，建立一測多評之方法學開發。圖中顯示，在黃連藥材中，Worenine 成分並未

檢出，而其他生物檢出順序如下：木蘭花鹼(magnoflorine) 、非洲防己鹼(columbamine)、藥根鹼(jatrorrihzine)、表小蘗鹼(epiberberine)、黃連鹼(coptisine)、巴馬汀(palmatine)、小蘗鹼(berberine)。其中，Magnoflorine 為 250 nm 波長下才可檢出；在阿里山十大功勞藥材中，木蘭花鹼(magnoflorine)、非洲防己鹼(columbamine)、藥根鹼(jatrorrihzine)巴馬汀(palmatine)、小蘗鹼(berberine)為含量較高之生物鹼。

三、方法學確效(method validation)：

(一)線性關係(Table 1)：精密吸取上述混合對照品溶液 20、15、10、5、1、0.8、0.6 和 0.4μL，進樣分析，每個濃度進樣 3 次，取平均值。以進樣量對峰面積積分值進行回歸處理，得各成分的標準曲線，並計算回歸方程：小蘗鹼(berberine): y = 36881x + 13435，巴馬汀(palmatine): y = 40736x + 9123.6，藥根鹼(jatrorrihzine): y = 46349x + 7796.8，黃連鹼(coptisine): y = 35439x + 1362.3、表小蘗鹼(epiberberine): y = 32257x + 73.302、非洲防己鹼(columbamine): y = 10173x + 1684.6、木蘭花鹼 (magnoflorine): y = 45547x + 6889.4。實驗結果表明小蘗鹼在 0.98-125 μg、巴馬汀在 0.98-125 μg、藥根鹼在 0.98-62.5 μg、黃連鹼在 0.98-62.5 μg、表小蘗鹼在 0.78-25 μg、非洲防己鹼在 3.90-125 μg、木蘭花鹼在 0.98-62.5 μg 線性關係良好。

(二)偵測極限(Limits of detection (LOD))及定量極限(Limits of quantification (LOQ))：如 Table 1 所示，各成分偵測極限(LOD)在 0.18-0.98 g/mL，各成分定量極限(LOQ) 0.98-3.9 g/mL。

(三)校正因子計算：取混合對照品溶液，進樣 20、15、10、5、1、0.8、0.6 及 0.4 μL 測定，按公式以小蘗鹼(berberine)為對照成分，分別計算巴馬汀(palmatine，簡稱 P)、黃連鹼(coptisine，簡稱 Çop)、藥根鹼(jatrorrhizine，簡稱 J)、表小蘗鹼(epiberberine，簡稱 E)、非洲防己鹼(columbamine，簡稱 Col)、木蘭花鹼(Magnoflorine，簡稱 M)的相對校正因子(Table 2)。

(四)精密度(precision)：

1. 日內(intraday)精密度：精密吸取黃連或阿里山十大功勞同一供試品溶液 100 μL 連續進樣 6 次，記錄標準品色譜峰面積。黃連供試品中小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼、黃連素、表小蘗鹼、非洲防己鹼和木蘭花鹼峰面積日內精密度的 RSD 分別如 Table 3 所述。

2. 日間(interday)精密吸：精密吸取取黃連或阿里山十大功勞同一供試品溶液 100 μL 連續進樣 3 天，每天 3 次，記錄標準品連連連色譜峰面積。小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼、黃連素、表小蘗鹼、非洲防己鹼和木蘭花鹼，以上七個成分峰面積的日間精密度如 Table 3 所述，以上數據表明儀器較為穩定。

(五)重複性(repeatability)：

分別稱取黃連藥材粉末(40 目) 100 mg 及阿里山十大功勞藥材粉末(40 目) 200mg，兩種藥材粉末各取 6 份，精密稱定，依照“藥材萃取方法及供試品製備”條件，製備供試品。測定黃連藥材中小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼、黃連素、表小蘗鹼、非洲防己鹼和木蘭花鹼的平均含量分別為 54.80、10.56、2.75、19.32、9.81、16.07、和 4.74 μg/g，RSD 如 Table 3 所述，以上數據均表明本實驗具有良好重複性。

(六)穩定性 (stability)：精密吸取同一供試品溶液 100 μL，分別於配製後的 0、2、4、8、12、24、48 和 72 h 測定面積積分值，計算 RSD。黃連中小蘗鹼、巴馬汀、藥根鹼、黃連素、表小蘗鹼、非洲防己鹼和木蘭花鹼穩定性的 RSD 如 Table 3 所述，表明處理後的供試樣品在 48 小時內穩定。

(七)加樣回收率：精密稱取適量已知含量的阿里山十大功勞粉末(藥材 60 目) 6 份，加入一定量的混合對照品溶液，按供試品溶液處理方法製備樣品，測定、外標法計算加樣回收率。加樣回收率結果如 Table 3 所述，確校項目(準確度、精密度、重複性、穩定度)皆符合標準(<15%)，而各成分加樣回收率都在 96%以上。

(八)一測多評法與常規法結果比較研究

分別精密吸取供試品溶液各 10 μL 注入 HPLC。採用外標法和一測多評法計算黃連藥材及阿里山十大功勞藥材中七種生物鹼的含量(Table 4)。

(九)阿里山十大功勞 50%酒精萃取物生物鹼含量、抗氧化成分含量及活性分析

1. 不同月份阿里山十大功勞生物鹼含量

從 Table 5 結果可知阿里山十大功勞一、四、七、十月的小蘗鹼、巴馬丁、藥根鹼及木蘭花鹼的含量並無顯著差異，顯示一年四季阿里山十大功勞生物鹼含量變化不大，但生物鹼中以

小蘗鹼的含量最高。

2. 總多酚和類黃酮含量測定

從 Table 6 結果可知阿里山十大功勞 50%酒精萃取物在總多酚或類黃酮含量分別為 52.96 mg/g 及 77.25 mg/g，ABTS 清除活性及還原力分別為 11.4 umole/g 及 0.48 ug/mg，顯示阿里山十大功勞 50%酒精萃取物的自由基清除力弱，還原力較好，可能與所含總多酚或類黃酮含量有關。

第二部分：阿里山十大功勞對油酸誘導的肝臟細胞模型研究

首先探討阿里山十大功勞萃取物及小蘗鹼對於細胞的毒性劑量(Figure 6)，我們選擇對於 90%細胞存活的劑量作為往後實驗的劑量參考。

我們對於阿里山十大功勞是否能改善油酸誘導的脂肪酸堆積進行探討，結果發現(Figure 7)，無論是阿里山十大功勞或者是小蘗鹼，皆有改善油酸所誘導的脂肪酸堆積。

我們進一步的研究阿里山十大功勞改善脂肪堆積的機制為何，針對脂肪酸合成及脂肪分解代謝之基因表現做一探討，研究結果發現(**Table 7**)，阿里山十大功勞及其活性成分小蘗鹼會降低油酸誘導肝臟細胞，減少 SCD-1，FAS 的基因表現，增加 PPARα 及 CPT-1 的基因表現；小蘗鹼還可能會減少 SREBP-1c 及 ACC 的基因表現，並增加αAMPK 的基因表現。此結果顯示，可能因此增加了脂肪酸的分解代謝及抑制脂質生成。

為了驗證上述的結果，我們繼續針對蛋白表現量部分進行研究，希望能夠驗證基因表現數據，結果顯示(Figure 8, Figure 9)，在 Figure 8 中可以明顯發現十大功勞、小蘗鹼的加入，會使得 ACC 的磷酸化增加，這也代表十大功勞、小蘗鹼會使得 ACC 磷酸化增加，進而使脂肪合成減少。無論是阿里山十大功勞或是小蘗鹼，皆能夠促進 AMPK 之磷酸化，增加其活性。此酶能夠調控 SREBP-1c 之活性，進而影響其進核能力。阿里山十大功勞及小蘗鹼能夠增加 AMPK 磷酸化，影響 SREBP-1c 進核，進一步影響其下游基因之表現。

肆、討論

近年來中藥質量控制的方法學上有長足的進步，最常見的例子為 HPLC 化學指紋圖譜技術在中藥質量控制中廣泛的應用。此方法主要利用以下兩個特性：“物種色譜特徵的唯一性”和“種內樣品間的相似性”，來反映出中藥材中複雜的化學成分資訊。此外，近年來興起的一測多評法(QAMS)，主要為測定藥材中數個指標成分來表徵藥材質量的控制方法，其指標成分關注的多為次生代謝產物(secondary metabololites)。但其中的問題就是缺乏其中的一些對照品，例如黃連中的表小蘗鹼(epiberberine) (純化難度極大)和黃連鹼(coptisine)，因而限制了常規的方法來進行多指標成分的質量控制。因此，我們在本計畫中開發了多種生物鹼的一測多評法(QAMS)，來解決標準品缺乏的問題，即只測定其中一個成分（如小蘗鹼），求得小蘗鹼與其餘待測成分間的內在函數關係，建立一測多評的品管方法，並且與傳統定量分析法做分析比較。

實驗中我們以黃連作為對照藥材，開發多種生物鹼的一測多評法，原因如下：阿里山十大功勞與黃連皆為含生物鹼豐富之藥材，因此選擇其為對照藥材；此外，黃連分析方法開發較為完善，可借用黃連在品質管制的研究思路；再者，黃連為大品種且具名氣之藥材之一，若將來放入阿里山十大功勞研究當中，進行比較性研究，可將臺灣本土特有種藥用植物推廣至國際。

計畫中的數據顯示，我們所開發的生物鹼分析方法，均表明較為穩定之方法，我們將完成在不同儀器及不同管柱上分析方法的再現性，將數據整理，運用於十大功勞類藥材、黃連類藥材，以及黃連相關之方劑中生物鹼的含量測定，將此分析方法以及應用範圍發表於分析方法之相關期刊。

然而此兩種方法仍然有一定的缺陷性，尤其是忽略了初級代謝產物(primary metabolites)。近年來已有相當之研究指出，一次代謝物在中藥藥效上也扮演重要角色，雖然單獨給予此一次代謝產物，並非藥效學活性成分，但是此類成分對於中藥中的活性成分往往發生在藥物動力學層次，或者是藥效學層次的協同作用。因此，為了補足我們在研究計畫裡開發的品質管制方法的不足，我們決定進一步採用能反映出藥材化學成分整體性(holistic view)、系統性的(systems) ^{1}H-NMR 代謝體學技術來評價阿里山十大功勞的品質。此方法不僅能全面檢測分析藥材中的初生代謝產物(如糖類(carbohydrate)、氨基酸類成分)和次生代謝產物(如生物鹼類(alkaloids)、黃酮

類(flavonoids)、三萜類 (triterpenoids)成分)，而且結合多變量統計分析(Multivariate Statistical Analysis)，例如：主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判別分析(PLS-DA)等化學計量學方法，可應用於不同產地、不同品種、不同採收期藥材的質量控制和評價。因此，我們也開發 ^{1}H-NMR 代謝體學技術來分析阿里山十大功勞藥材中的化學成分。目前，我們已經完成了阿里山十大功勞 50%酒精萃取物的一維以及二維之核磁共振圖譜，我們從萃取物中鑑定出四十種一次代謝物。此方法能夠很好的描述阿里山十大功勞藥材提取物，提供將來的研究者有關成分的數據。

阿里山十大功勞及其活性成分小蘗鹼可降低油酸誘導 HepG2 肝臟細胞脂肪酸及三酸甘油脂的堆積，減少 SCD-1，FAS 的基因表現，增加 PPARα 及 CPT-1 的基因表現；小蘗鹼還會減少 SREBP-1c 及 ACC 的基因表現，並增加 αAMPK 的基因表現，肝臟脂質堆積主要是脂質新生及脂質代謝降低所致[25]，乙醯輔酶A (Aetyl-CoA)在乙醯輔酶A梭化酶(Aetyl-CoA carboxylase, ACC)及脂肪酸合成酶(faty acid synthase, FAS)及固醇去飽和酶(stearoyl-CoA desaturase 1, SCD-1)催化作用下形成脂肪酸及三酸甘油[26]，固醇調節元素結合蛋白-1c (sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1C)則會影響葡萄糖[27]因而造成脂質氧化形成脂化三酸甘油脂[28, 29]，腺苷單磷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)參與肝臟脂質新生的調節，可能是治療脂肪肝疾病的療效標的酶[30]，SREP-1c 會被 AMPK 調節[31]，CPT-1 及 PPARα 參與脂質代謝[32]，本研究結果發現油酸顯著增加 SREBP-1c, ACC, SCD-1 及 AMPK 基因表現，降低 CPT-1 及 PPARα 表現，因而導致脂肪堆積，阿里山十大功勞及小蘗鹼可逆轉脂質形成及代謝酶的基因表現，阿里山十大功勞及小蘗鹼因而降低肝臟細胞的脂肪堆積，其降低肝臟細胞的脂肪堆積的分子機制可能與上調 AMPK 磷酸化，並降低肝細胞脂質新生相關蛋白及基因的表現(SREBP 磷酸化，FAS 表現)有關。Table7 中看到油酸誘導後，FAS 基因表現量明顯增加，加入十大功勞與小蘗鹼(Ber)後，FAS 基因表現有下降的現象，但在 Fig 9 FAS 的蛋白質表現結果與基因表現結果有點不一致，原因有可能是基因表現是利用 real-time PCR 測量 mRNA 反轉錄的 cDNA，而從基因表現(mRNA expression)到蛋白質表現(protein expression)過程中常常存在許多調控機制，而這些機制也都可能去影響到蛋白質的表現，例如：mRNA 的穩定度、siRNA 的調控等，而在加入藥物(十大功勞、小蘗鹼)後，是否影響了這些調控機制，也是值得探討。另外也有可能是 mRNA 轉譯成蛋白質的實驗收取時間點需要再最佳化，或者是藥物影響了

FAS 蛋白質本身的穩定度，而也有可能是藥物影響其他細胞內的分子導致FAS 蛋白的表現。

伍、結論與建議

本計畫預期將開發阿里山十大功勞改善脂肪肝、降血脂的保健功效，使之成為具有特色之臺灣本土藥用植物，我們也將針對其活性成分的藥理作用機轉做深入探討。此外，對於阿里山十大功勞可能遇到的質量控制問題，計畫中也開發一系列不同品質管制方法，將來能在不同批次萃取物的一致性評估上能發揮作用。希望能將此研究成果推薦給業者，鼓勵業者開發阿里山十大功勞之改善血脂的保健功效，開發本土藥用植物。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW103-CMAP-M-114-122408 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. Mazza, A., et al., *The role of metformin in the management of NAFLD.* Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 716404.
2. Madan, K., et al., *Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).* J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(10): p. 930-5.
3. Corey, K.E. and N. Chalasani, *Should combination therapy be the paradigm for future nonalcoholic steatohepatitis clinical trials?* Hepatology, 2011. **54**(5): p. 1503-5.
4. CoCMa, P., *Medical plant resources in Taiwan*. 2003, Taipei: Department of Health, Executive organ.
5. Chao, J., et al., *Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanol root extract of Mahonia oiwakensis in mice.* J Ethnopharmacol, 2009. **125**(2): p. 297-303.
6. Chao, J., et al., *Hepatoprotective effect of shidagonglao on acute liver injury induced by carbon tetrachloride.* Am J Chin Med, 2009. **37**(6): p. 1085-97.
7. Chao, J., et al., *Antioxidant, Analgesic, Anti-Inflammatory, and Hepatoprotective Effects of the Ethanol Extract of Mahonia oiwakensis Stem.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(2): p. 2928-45.
8. Hu, Y. and G.E. Davies, *Berberine inhibits adipogenesis in high-fat diet-induced obesity mice.* Fitoterapia, 2010. **81**(5): p. 358-66.
9. Yang, Q.H., et al., *Effect of berberine on expressions of uncoupling protein-2 mRNA and protein in hepatic tissue of non-alcoholic fatty liver disease in rats.* Chin J Integr Med, 2011. **17**(3): p. 205-11.
10. Wei, W., et al., *A clinical study on the short-term effect of berberine in comparison to metformin on the metabolic characteristics of women with polycystic ovary syndrome.* Eur J Endocrinol, 2012. **166**(1): p. 99-105.
11. Wu, C.H., et al., *Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation via reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells.* J Food Sci, 2011. **76**(2): p. T65-72.

12. Yokoyama, A., et al., *Quercetin metabolites and protection against peroxynitrite-induced oxidative hepatic injury in rats.* Free Radic Res, 2009. **43**(10): p. 913-21.
13. 于霄, et al., *一測多評法測定淫羊藿中朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C及淫羊藿苷的含量.* 中國中藥雜志, 2010(24): p. 3310-3313.
14. 王智民, et al., *“一測多評”法中藥質量評價模式方法學研究.* 中國中藥雜志, 2006(23): p. 1925-1928.
15. 朱晶晶, et al., *一測多評法同步測定人參和三七藥材中多種人參皂苷的含量.* 藥學學報, 2008(12): p. 1211-1216.
16. 宋亞芳, et al., *一測多評法測定吳茱萸中吳茱萸內酯、吳茱萸堿及吳茱萸次堿的含量.* 中國中藥雜志, 2009(21): p. 2781-2785.
17. 馮偉紅, et al., *一測多評法測定秦皮藥材與飲片中香豆素類成分的含量.* 中國中藥雜志, 2011(13): p. 1782-1789.
18. 黃山君, et al., *一測多評法測定白芍中芍藥苷與芍藥內酯苷的含量.* 中國中藥雜志, 2011(06): p. 780-783.
19. 黃帥, et al., *一測多評法同步測定柴胡藥材中3種皂苷的含量.* 時珍國醫國藥, 2010(04): p. 838-840.
20. Oyaizu.M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucose amine. Jpn J Nutr 44:307-315.
21. JF H-V, C M-G, G R 2006. Optimization of *in vitro* measurement of available iron from different fortificants in citric fruit juices. Food Chem Toxicol 98:639-648.
22. Kujala TS, Loponen JM, Klika KD, Pihlaja K 2000. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. J Agric Food Chem 48(11):5338-5342.
23. Jia Z, Tang M, Wu J 1999. The determination of flavonoid contents in

mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry 64(4):555-559

24. Hong-Rui Yao, Jun Liu, Daniel Plumeri, Yong-Bing Cao, Ting He, Ling Lin, Yu Li, Yuan-Ying Jiang, Ji Li, Jing Shang. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. Am J Transl Res 2011; 3(3): 284-291.
25. Shimano, H.; Yahagi, N.; Amemiya-kudo, M.; Hasty, A.H.; Osuga, J.; Tamura, Y.; Shionoiri, F.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Harada, K.; *et al.* Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* 1999; *50:* 35832–35839.
26. Watson JA, Lowenstein JM. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. Fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria. *J Biol Chem* 1970; **245**: 5993-6002 [PMID: 5484459].
27. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005; 87: 81-86 [PMID: 15733741 DOI: 10.1016/ j.biochi.2004.11.008]
28. Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* 2008; **34**: 643-648 [PMID: 19195625 DOI: 10.1016/S1262-3636(08)74599-3]
29. Parks EJ, Skokan LE, Timlin MT, Dingfelder CS. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *J Nutr* 2008;138: 1039-1046 [PMID: 18492831]
30. Schimmack, G.; Defronzo, R.A.; Musi, N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab* 2006; *8:* 591–602.
31. Wakil, S.J.; Abu-Elheiga, L.A. Fatty acid metabolism: Target for metabolic syndrome. *J Lipid Res* 2009; *50:* S138–S143.

柒、圖、表

Table 1 阿里山十大功勞藥材中所含生物鹼標準曲線

The calibration curves, linear range, LOD and LOQ of investigated components in ME.

Analytes	Regression equation	R^2	LOD (g/mL)[a]	LOQ (g/mL)[b]	Linear range (μg)
Berberine	y = 36881x + 13435	0.9999	0.30	0.98	0.98-125
Palmatine	y = 40736x + 9123.6	0.9999	0.26	0.98	0.98-125
Jatrorrihzine	y = 46349x + 7796.8	0.9999	0.29	0.98	0.98-62.5
Coptisine	y = 35439x + 1362.3	0.9999	0.28	0.98	0.98-62.5
Epiberberine	y = 32257x + 73.302	0.9999	0.18	0.78	0.78-25
Columbamine	y = 10173x + 1684.6	0.9999	0.98	3.90	3.90-125
Magnoflorine	y = 45547x + 6889.4	0.9996	0.31	0.98	0.98-62.5

[a] LOD: limits of detection; [b] LOQ: limits of quantification.

Table 2 黃連及阿里山十大功勞藥材中所含生物鹼相對校正因子(relative correcting factors (RCFs) of alkaloids)

Injection volumn (μL)	Values of RCFs					
	$f_{B/P}$	$f_{B/J}$	$f_{B/Cop}$	$f_{B/E}$	$f_{B/Col}$	$f_{B/M}$
20 ul	1.105	1.282	0.938	0.871	1.34	1.223
15 ul	1.107	1.280	0.947	0.862	1.35	1.203
10 ul	1.099	1.270	0.934	0.825	1.35	1.206
5 ul	1.102	1.250	0.920	0.849	1.33	1.208
2 ul	1.062	1.189	0.901	0.866	1.20	1.205
Mean	1.095	1.254	0.928	0.855	1.31	1.209
RSD (%)	1.711	3.079	1.902	2.191	2.38	0.666

RCFs: relative correcting factors

RSD: relative standard variation

B: berberine

P: palmatine

J: jatrorrihzine

Cop: coptisine

E: epiberberine

Col: columbamine

M: magnoflorine

Table 3 黃連生物鹼標準品準確度(加樣回收率)、精密度、重複性與穩定性

Analyte	Presision (RSD, %, n=6)				Repeatability (RSD, %, n=6)			Stability (RSD, %, n=8, 48 h)		Recovery (RSD, %,n=6)
	Intra-day		Inter-day		Concentration	RSD		T_R [a]	PA [b]	
	T_R [a]	PA [b]	T_R [a]	PA [b]	(mg/g)	T_R [a]	PA [b]			
Berberine	0	1.91	0	2.92	54.80	0	1.26	0	1.26	96.5
Palmatine	0.23	1.23	0.66	1.88	10.56	0.26	2.22	0.20	1.53	98.9
Jatrorrihzine	0.36	1.28	1.16	2.98	2.75	0.28	2.32	0.28	1.78	100.5
Coptisine	0.32	2.04	0.29	3.67	19.32	0.08	1.16	0.18	1.11	97.3
Epiberberine	0.33	3.27	0.9	4.89	9.81	0.21	0.97	0.21	1.89	101.2
Columbamine	0.37	0.88	1.22	2.75	16.07	0.27	2.05	0.30	1.61	99.2
Magnoflorine	0.46	0.55	3.6	2.40	4.74	0.53	1.04	1.06	1.09	102.5

[a] Refers to retention time (berberine).
[b] Refers to peak area. RSD: relative standard variation

Table 4 外標法(external reference method)和一測多評法(QAMS)測定黃連及阿里山十大功勞藥材中生物鹼含量的比較

(Contents of alkaloids by external standard method and QAMS, n=3)

	Berberine[a]		Palmatine			Jatrorrihzine			Coptisine			Epiberberine			Columbamine			Magnoflorine		
No.	ERM	QAMS	ERM	QAMS	RE%[b]	ERM	QAMS	RE%	ERM	QAMS	RE%	ERM	QAMS	RE%	ERM	QAMS	RE%	ERM	QAMS	RE%
1[c]	53.914		10.441	10.645	1.917	2.819	2.936	4.004	18.915	19.370	2.351	9.751	10.276	5.115	15.923	16.554	3.963	4.694	4.929	4.762
2[c]	55.718		10.798	11.004	1.871	2.814	2.9318	4.035	19.394	19.865	2.367	9.886	10.421	5.135	16.527	16.985	2.771	4.815	5.053	4.707
3[c]	54.042		10.117	10.322	1.985	2.678	2.798	4.290	19.166	19.627	2.350	9.611	10.130	5.117	15.971	16.541	3.569	4.693	4.928	4.764
4[c]	55.101		10.747	10.952	1.873	2.791	2.910	4.071	19.455	19.925	2.359	9.970	10.509	5.128	16.741	17.213	2.819	4.785	5.022	4.719
5[c]	54.786		10.542	10.747	1.908	2.631	2.752	4.399	19.388	19.856	2.356	9.846	10.377	5.125	15.687	16.321	4.042	4.710	4.946	4.762
6[c]	55.249		10.717	10.923	1.880	2.779	2.897	4.097	19.577	20.050	2.360	9.811	10.341	5.130	15.571	16.135	3.622	4.722	4.958	4.760
7[d]	20.891		9.711	9.813	1.033	8.153	8.095	0.726										9.710	9.925	2.174
8[d]	19.805		9.485	9.580	0.993	7.914	7.855	0.759										9.579	9.784	2.102
9[d]	20.376		9.376	9.478	1.070	8.003	7.945	0.731										9.639	9.850	2.142

ERM: external reference method

QAMS: quantitative analysis multi-components by single marker. RE: relative error

[a] Concentration (mg/ml)

[b] Relative error (%) = ｜(content determined by QAMS － content determined by ERM) / content determined by QAMS × 100｜.

[c] 1-6 黃連藥材

[d] 7-9 阿里山十大功勞萃取物

Table 5 不同月份阿里山十大功勞生物鹼測定

	一月 Concentration (mg/g crude extract)	四月 Concentration (mg/g crude extract)
小蘗鹼	48.72 ± 6.18	42.72 ± 5.19
巴馬丁	25.05 ± 3.88	27.33 ± 4.55
藥根鹼	17.28 ± 5.78	12.35 ± 6.22
木蘭花鹼	12.29 ± 8.15	17.12 ± 2.38
	七月 Concentration (mg/g crude extract)	十月 Concentration (mg/g crude extract)
小蘗鹼	51.72 ± 10.19	47.56 ± 8.22
巴馬丁	19.10 ± 8.89	28.78 ± 9.22
藥根鹼	10.10 ± 2.52	18.85 ± 3.58
木蘭花鹼	18.23 ± 3.65	21.24 ± 7.27

Table 6 阿里山十大功勞 50%酒精萃取物抗氧化成分及能力分析

	Total phenols (mg gallic acid equivalent/g)	Total flavonoids (mg guercentin equivalent/g)	ABTS scavenging activity (TEAC, μmole/mg)	Reducing power (μg ascorbate/mg)
阿里山十大功勞 50%酒精萃取物	52.96 ± 3.55	77.25 ± 8.37	11.40	0.48

Table 7 阿里山十大功勞對於油酸誘導 HepG2 脂肪堆積之代謝相關基因(相對於 GAPDH 的表現值)影響

	Control	油酸誘導	油酸誘導 + 十大功勞萃取物	油酸誘導 + 小蘗鹼
SREBP-1c	1.08 ± 0.8	1.22 ± 0.32# ↑	1.12 ± 0.12	0.72 ± 0.32* ↓
ACC	0.53 ± 0.17	1.21 ± 0.32## ↑	1.03 ± 0.42	0.82 ± 0.58* ↓
SCD-1	0.11 ± 0.04	1.31 ± 0.25 ### ↑	0.81 ± 0.55 *↓	0.92 ± 0.68 * ↓
αAMPK	0.79 ± 0.23	1.08 ± 0.08# ↑	1.01 ± 0.58	1.42 ± 0.26 * ↑
FAS	0.87 ± 0.18	1.35 ± 0.22# ↑	1.10 ± 0.32* ↓	0.75 ± 0.12 * ↓
PPARα	1.24 ± 0.22	0.94 ± 0.13# ↓	1.54 ± 0.18 * ↑	1.62 ± 0.26* ↑
CPT-1	5.32 ± 1.81	2.23 ± 0.21## ↓	3.01 ± 0.20 * ↑	5.23 ± 0.96 ** ↑

Data were expressed as mean ±SEM. #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 as compared with Control group. *P < 0.05, **P < 0.01 as compared with 油酸誘導組



Figure 1 阿里山十大功勞嘉義縣產地實地考察。圖中顯示出阿里山十大功勞生長棲地之環境。



Figure 2 中興苗圃針對阿里山十大功勞育種之考察

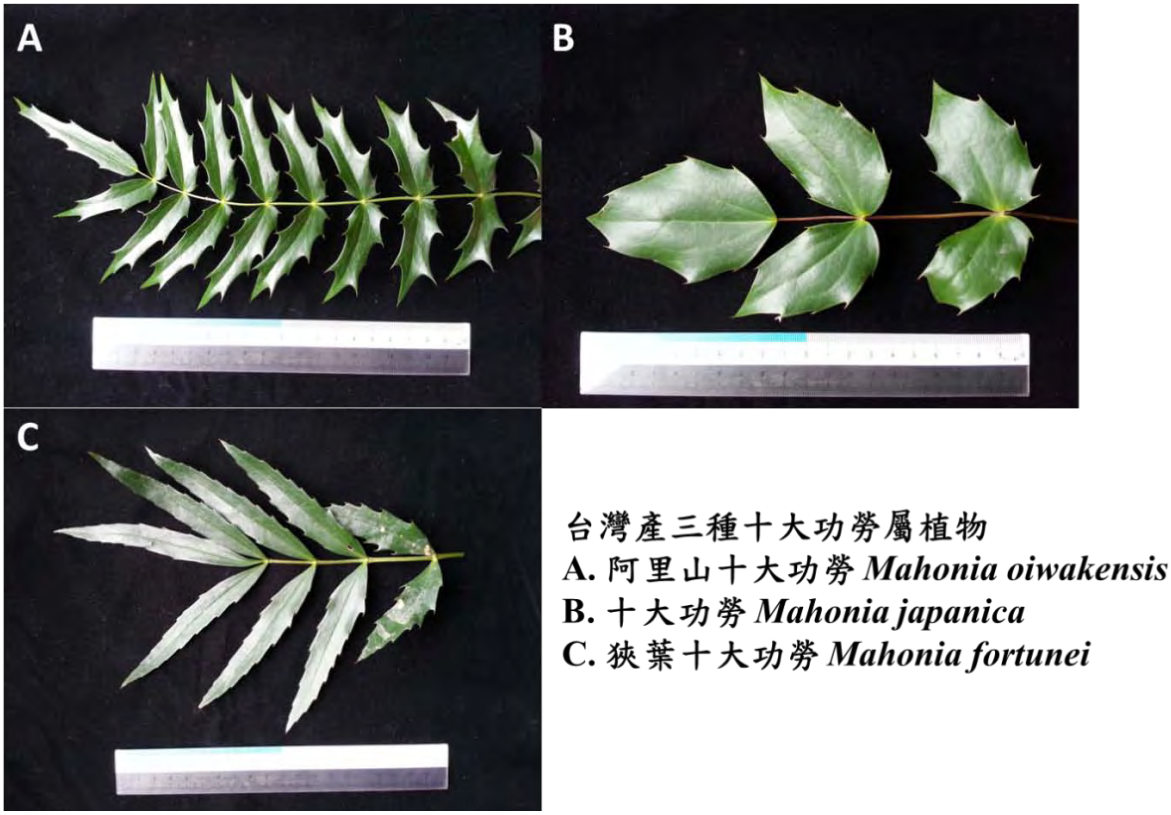


Figure 3 阿里山十大功勞葉部外型鑑定圖

222 nm

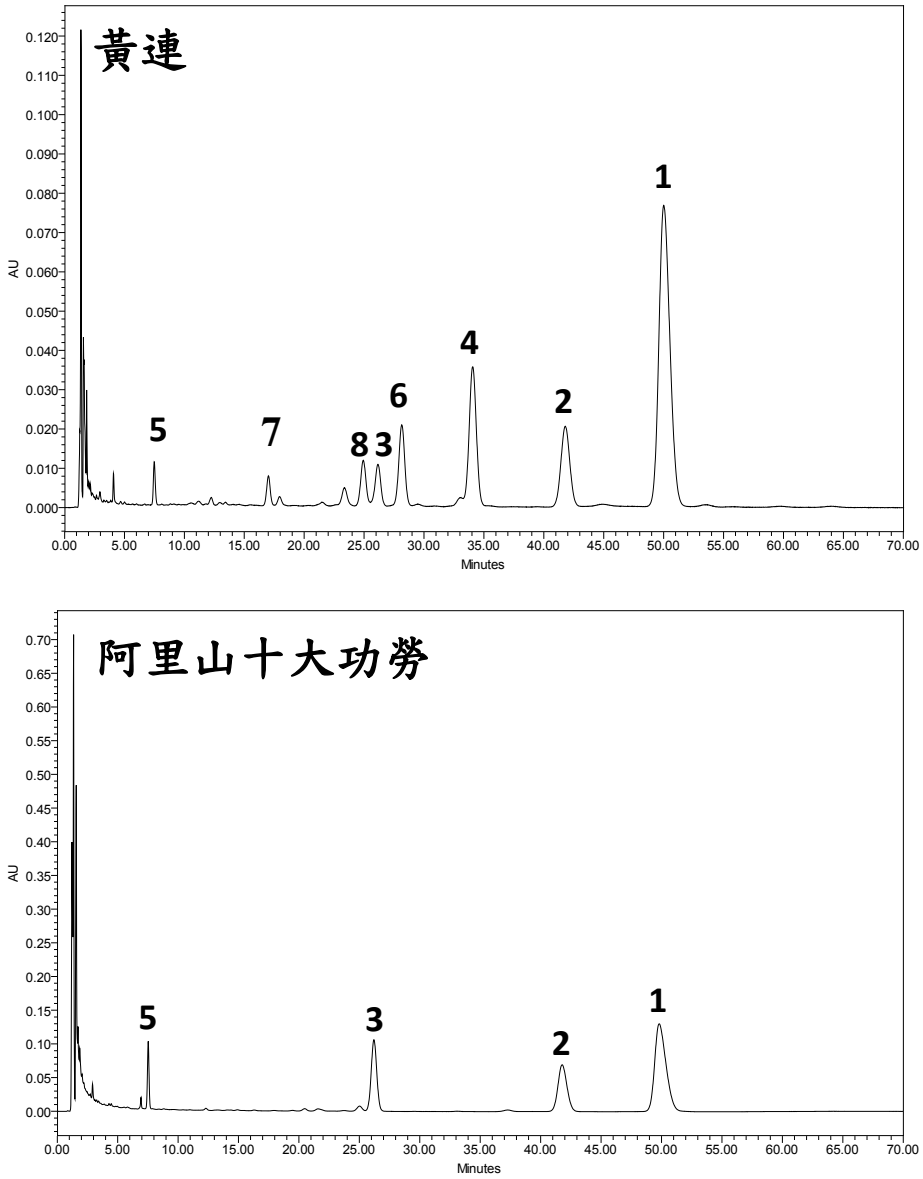
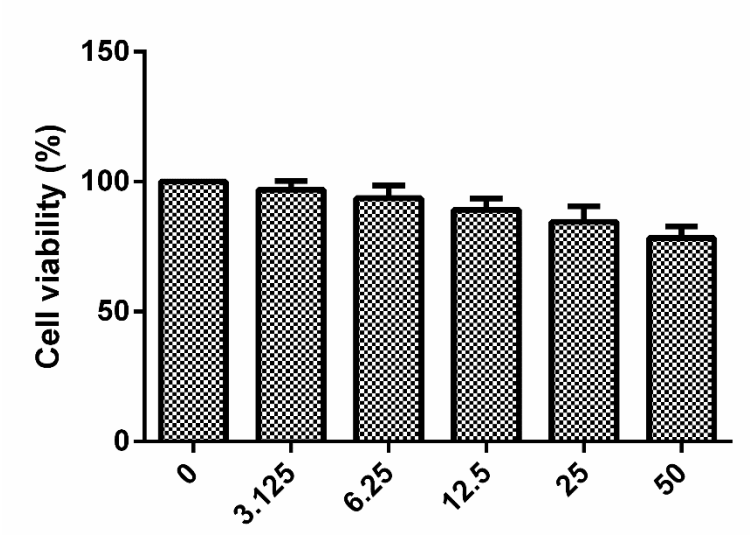


Figure 4 黃連藥材及阿里山十大功勞藥材 HPLC 色譜分離圖(250 nm)



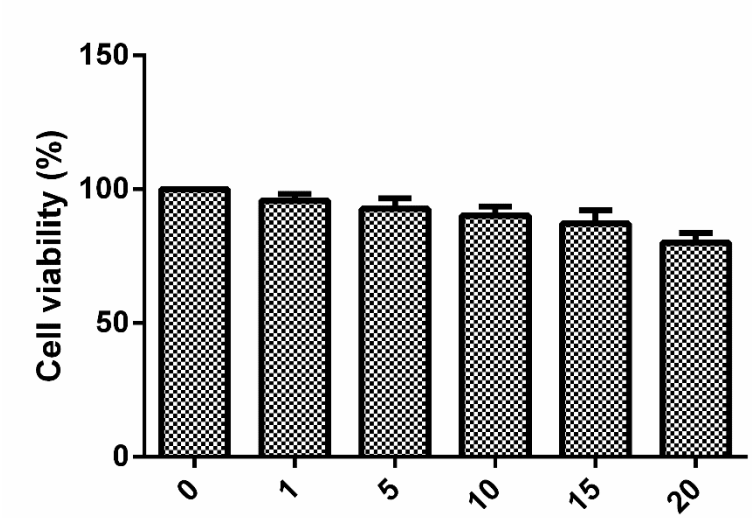


Figure 5 細胞存活率。上圖十大功勞(ME)，下圖小蘗鹼(Ber)。

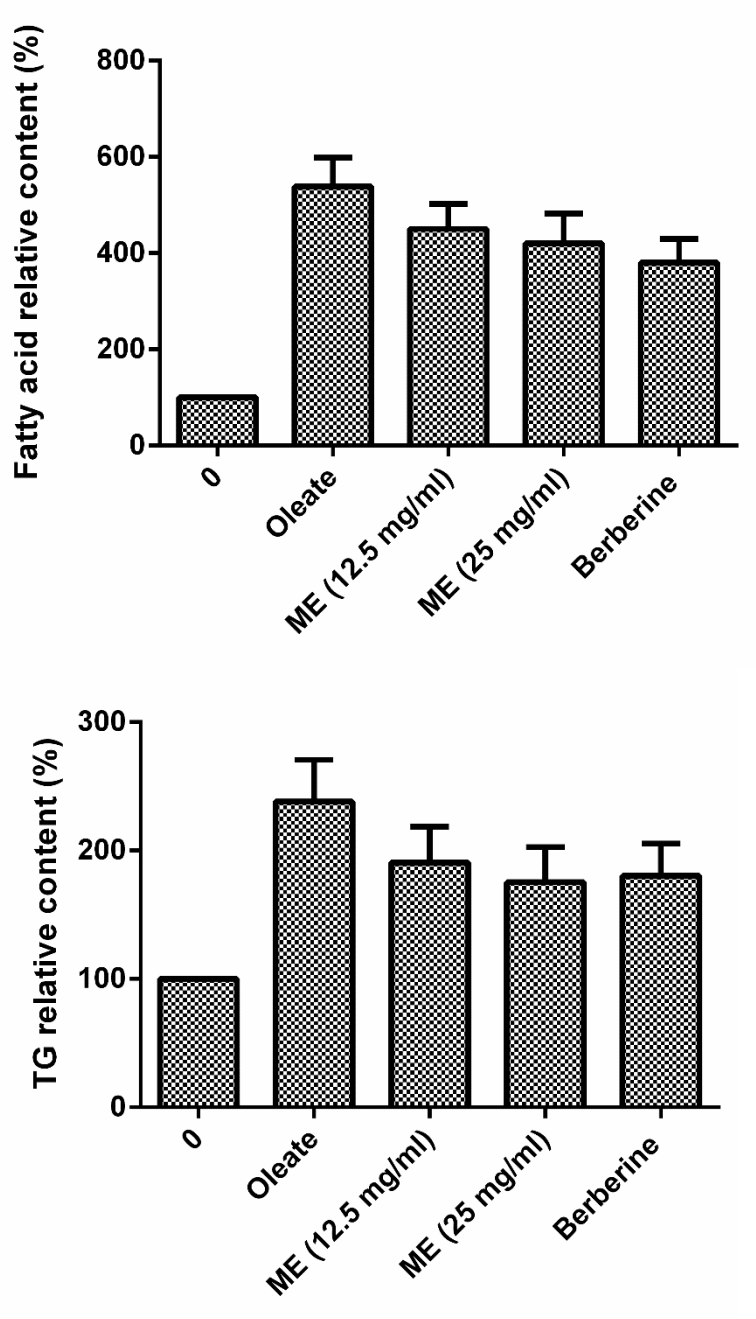


Figure 6 十大功勞對於油酸誘導肝臟脂質堆積之影響。

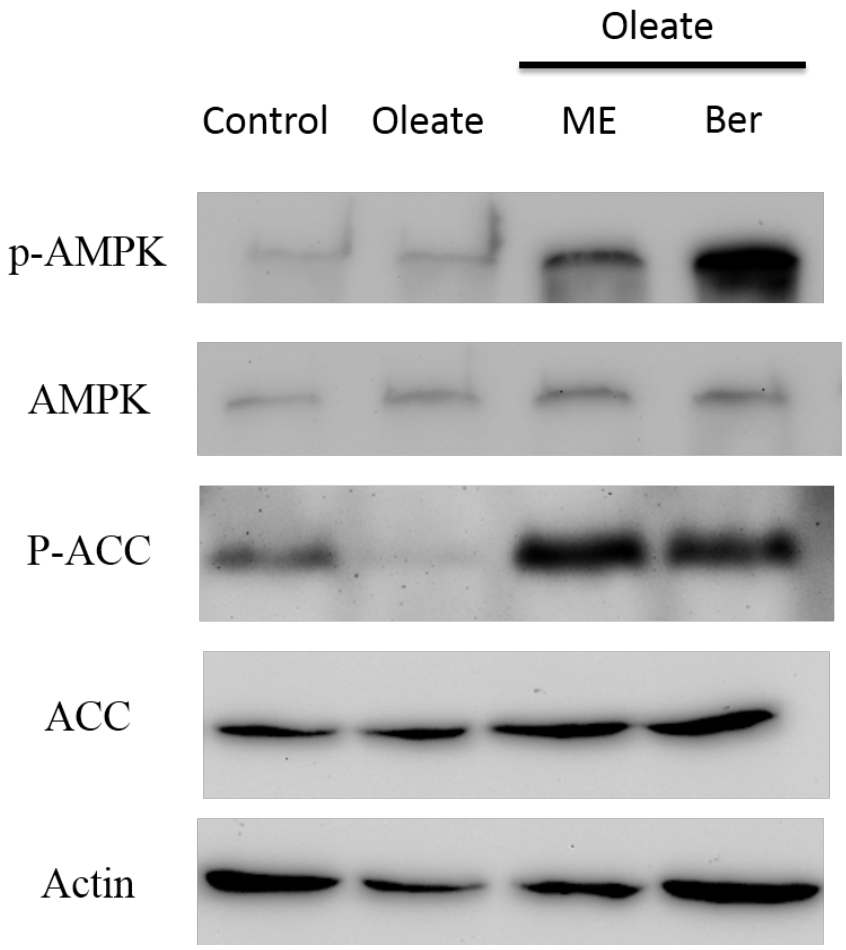


Figure 7 十大功勞對於 AMPK 蛋白活性之影響

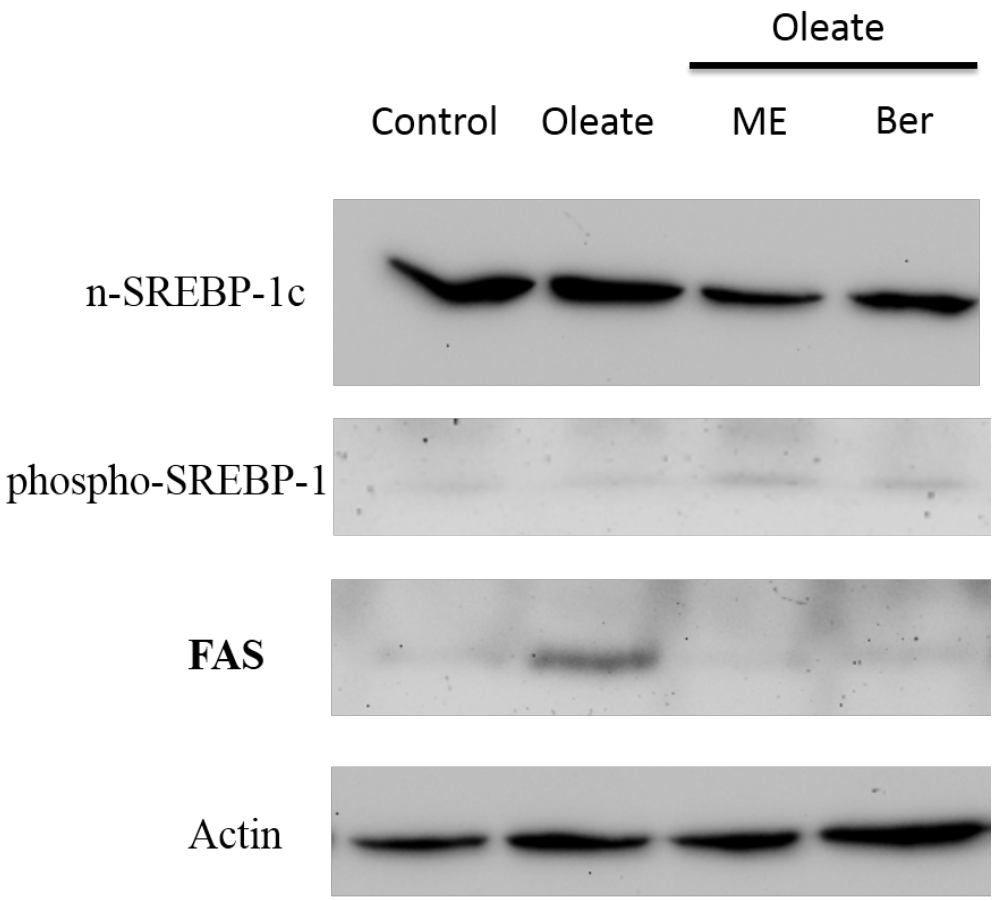


Figure 8 十大功勞對於 SREBP 及其標靶基因之蛋白表現影響

編號：MOHW103-CMAP-M-114-122411

全民健康保險對於濃縮中藥給付之合理性及對策研究(2-2)

鄭慧文
中華民國藥事品質改革協會

摘　要

本計畫目的為促進產業發展，維護民眾中藥使用安全，檢討分析全民健康保險對於濃縮中藥給付藥費及藥事服務費之合理性，成立專家規劃小組，調查分析全民健康保險支付制度有關中西醫門診藥費及藥事服務費給付規定之差異，就法規面探討中醫門診法定調劑人員之立法背景，以及參與調劑之比例及經濟面原因，實際調查分析中醫醫療機構門診處方箋使用濃縮中藥之製劑數目及處方日數，專業調劑中藥之合理時間及合理調劑量，推估藥事服務費及藥費之合理成本，並由處方調劑專業人員之獲得性，及藥事法管理之法制性，研議藥品製造供應及藥事服務之合理成本，規劃濃縮中藥合理健保給付藥費及藥事服務費之政策方案，與產官學座談研討規劃合理給付方案，提供中醫藥司政策參考。
本計畫發現，中醫健保藥事服務費遠低於西醫，是造成藥師不願進入中醫調劑最可能的原因。建議健保比照西藥粉劑作業加成給付之機制，合理調整給付中藥調劑價格，並規劃中醫健保給付分級管理制度之對策。

關鍵詞：濃縮中藥、全民健保、藥費、藥事服務費、成本分析

Number: MOHW103-CMAP-M-114-122411

Study on Developing Reasonable Payments of Concentrated Chinese Medicine for National Health Insurance (2-2)

Cheng, Hui-Wen
Quality Improvement for Pharmaceutical Affairs Association, Taiwan

ABSTRACT

The purpose of this project is to promote industrial development, maintain the safety for the Chinese medicine usage, and review if the payments of concentrated Chinese medicine and pharmaceutical service from National Health Insurance are reasonable. Survey and analysis on the payment system of National Health Insurance were conducted, and the legislative background of the statutory dispenser of Chinese medicine was also discussed through an effective regulatory advisory system. And an optimal cost of pharmaceutical service was evaluated through the analysis on preparation quantities, dispensing time and workloads, production cost of the pharmaceutical companies in accordance with availability of professionals, the legal system of pharmaceutical affairs. A policy on reasonable payment was discussed in workshops with industrial, governmental and academic experts and has been made recommendations to Department of Chinese Medicine and Pharmacy.

We have found that the dispensing fee of Chinese medicine being much lower than it of Western medicine may be the main reason that pharmacists do not want to step into Chinese medicine dispensing. A bonus payment system for medicine powder formulations like Western medicine payment system is suggested. And the dispensing fee for Chinese medicine could be adjusted reasonably, further more; a countermeasure for the classification management system of Chinese medical care in National Health Insurance could be schemed.

Keywords: concentrated Chinese medicine, National Health Insurance, prescription charge, pharmaceutical service fee, Cost Analysis

壹、前言

依醫療法及藥事法之規定，中藥之調劑，僅修習中藥課程達適當標準之藥師（藥師法）、中醫師（醫療法）得為之，藥事法 103 條第一項確具中藥基本知識及鑑別能力人員得在中醫師監督之下為之（1）。惟醫療機構認為，藥事法第 37 條第四項規定「中藥之調劑，除法律另有規定外，應由中醫師監督為之。」，係指「任何人在中醫師監督之下即可調劑」，且因健保支付費用不合理，因此，產生目前中醫醫療機構低價違法聘非藥事人員調劑之情事。

經查中醫門診健保給付藥事服務費每張 20 點（藥師）10 點（中醫師或其受監督者），藥費每日 30 元（最多 7 日）。目前中醫醫院有 18 家，中醫診所 3,217 家，合計 3,235 家。中醫門診總額約 200 億/年。99 年健保支付之藥事服務費，醫院平均 16.9 點/件，顯示部分未聘藥師；診所平均 8.4 點/件，顯示全部分未聘藥師，且部分未申報（2）。藥品費佔醫療費用 28.98%，醫院平均 292.0 點/件，顯示平均開十天份藥，惟因只給付七日則七日藥費每日 41.8 元，不足成本；診所 149.0 點/件，顯示平均開五天份藥（3）。

分析中醫健保每家每月獲利情形，中醫門診處方每日約 12,0777 張，健保支付醫院：藥費＋藥事服務費 82,0117 點/月，調劑：435 件/日，合理調劑量 70 張/日，應有藥事人員至少 6 人。健保支付診所藥費＋藥事服務費 3,3502 點/月。因為給付不合理，因此中醫醫療機構（尤其中醫診所）請正式藥事人員利益不足（4）。

自全民健保施行以來，在所有法源俱備之下，合格中藥調劑人力不足之問題一直無法獲得實務上的改善。雖然近年來衛生署加強各式持續教育，提升藥事人員的中藥調劑能力，但在中醫門診總額和中藥調劑費不足之情況下，中醫特約門診或特約藥局在調劑人力成本上，無法獲得同西醫門診的調劑費水準，聘用合格藥事人員成為基層的負擔，造成國家大量培育具有中藥專業能力之藥師，無法進入中醫藥領域服務。

依據全民健康保險支付標準之規定，藥品調劑費在西醫基層為一般處方給付（7 天以內）特約藥局 45 點，醫師親自調劑 11 點，聘藥師調劑 30 點。在中醫基層為「修習中藥課程達適當標準之藥師（A31/20 點）」及「中醫師親自調劑（A32/10 點）」（5），故僅「修習中藥課程達適當標準之藥師」或「中醫師親自調劑」始得申報調劑費。

現行藥事服務費點值計算方式，於醫院、牙醫門診及中醫門診總額，

維持以每點 1 元核算；於西醫基層總額，在社區藥局申報金額未超過 8 億元前，採每點 1 元核算，若金額超過 8 億元，則自當月份起改採浮動點值（6）。

中醫藥司以中醫藥研究為任務導向，目標在促進中醫現代化、中藥科學化及中醫藥國際化，以提供中醫藥管理政策之實證依據及重要醫藥衛生問題之解決對策，建構中醫藥醫療保健服務之優質環境。面對人民期待品質優良安全有效之中藥產品，以及業界期待建構穩固基礎推動中藥產業發展，中藥產業應即建置良好的管理與輔導機制，並依循以追求高品質高服務以及高利潤的產業經濟共構下，將社會需求與經濟市場價值，透過法律的過程，將成為實現穩定成長的力量（7）。

中藥相關法規為保護消費者的法律，同時亦應在保護消費者之前提下，促進產業的發展。為因應現行中醫藥費及藥事服務費在實務上可能產生諸多適用上的問題，故宜儘速分析評估問題癥結，建立一個符合業界合理需求之給付制度，研擬適合中藥調劑環境的整合管理給付機制，以及研擬修正適當的法規條文，提供中醫藥司及中央健康保險署作為改革修法政策方向，實屬刻不容緩。

貳、材料與方法

一、繼續於中華民國藥事品質改革協會組織「濃縮中藥健保藥價評估小組」，有效評估分析濃縮中藥健保給付問題，建立合理藥價及藥事服務費計算方式。

(一)由計畫主持人鄭慧文顧問、協同主持人余萬能、邀請中醫執業、中藥製造及調劑供應專家學者，組織「濃縮中藥健保藥價評估小組」。

(二)邀請中醫藥司及中央健康保險署醫療管理組及醫材藥品組主管官員指導，就濃縮中藥健保給付藥費及藥事服務費之合理性，處方調劑專業人員之獲得性及藥事法管理之法制性，研議藥品製造供應及藥事服務之合理成本，規劃濃縮中藥合理健保給付藥費及藥事服務費之政策方案，提供中醫藥司政策參考。

二、繼續調查分析全民健康保險支付制度有關中西醫門診藥費及藥事服務費給付規定之差異。

(一)繼續分析全民健康保險法及相關子法規有關中西醫門診醫療使用藥品之規定。

(二)繼續分析全民健康保險法及相關子法規有關中西醫門診藥品使用調劑供應所需藥費及藥事服務費之支付制度。

(三)繼續比較分析全民健康保險法及相關子法規有關中西醫門診藥品使用調劑供應所需藥費及藥事服務費支付制度之差異比較。

(四)繼續分析資料提交「濃縮中藥健保藥價評估小組」研議討論作為召開座談會研討會議資料。

三、調查分析中醫醫療機構使用濃縮中藥之品項數採購價格。

(一)訪查三家醫院使用濃縮中藥之品項數及採購價格。

1. 訪查三家醫院於 103 年 4 月之中醫門診量，及當月濃縮中藥之使用數量。
2. 瞭解上述三家醫院濃縮中藥採購作業流程，採購之品項(含製造廠商)、數量、價格(單價或批價)。

(二)訪查中醫診所使用濃縮中藥之品項數及採購價格。

訪查 40 家中醫診所於 103 年 4 月之中醫門診量及其處方箋釋出之比例，採購之品項(含製造廠商)、數量、價格(單價或批價)。

(三)依醫院、診所層級分別比較分析醫療機構使用濃縮中藥品項數及採購價格之差異及差異來源。

(四)分析資料提交「濃縮中藥健保藥價評估小組」研議討論作為召開座談會研討會議資料。

四、調查分析中醫醫療機構依法令專業調劑中藥之合理時間及合理調劑量，計算中藥調劑之藥事服務量，推估藥事服務費之合理成本。

(一)實際訪查三家醫院各 5 位藥師，依法定藥品優良調劑作業準則之規定，執行中醫師處方調劑交付藥品之全部時間。

調查三家醫院中醫調劑流程，實際訪查三間醫院各 5 位藥師。每位藥師訪查時間為一門診時段，是依各醫院中醫門診時間執行，紀錄當日中醫門診科別、該藥師調劑張數(不含飲片中藥)、單張處方箋藥品品項數、調劑一張濃縮中藥處方箋之全部時間。

(二)分析藥品品項數與調劑時間之差異。

(三)推估中醫師處方調劑時間成本。

(四)分析資料提交「濃縮中藥健保藥價評估小組」研議討論作為召開座談會研討會議資料。

五、調查分析中藥廠濃縮中藥之製造銷售成本，推估健保藥費之合理給付金額。

(一)實際訪查 5 家中藥製造廠，瞭解 GMP 製造過程及製造人力。

實際訪查中藥製造廠 GMP 製造過程，將實際執行現況與現行法規比較，並調查各中藥製造廠製造人力。

(二)問卷調查 5 家中藥製造廠原料成本及製造、運送成本。(所得資料依營業秘密方式由本計畫保密)。

1. 洽請接受調查之中藥製造廠提供近三年採購原料成本。
2. 就藥廠製造藥品品項、原料品項及成本、製造成本(包含硬體/人力/送驗)及運送成本(原料輸入)之四個重點設計問卷。

(三)洽詢會計師依固定成本及變動成本分析之會計原理，並依單方及複方分析合理成本。

(四)分析資料提交「濃縮中藥健保藥價評估小組」研議討論作為召開座談會研討會議資料。

六、邀請中央健康保險署及中醫藥司及專家學者與業界舉辦二場中藥調劑健保合理給付座談會或研討會。

(一)邀請中央健康保險署及中醫藥司參加二場中藥調劑健保合理給付座談會。

(二)「濃縮中藥健保藥價評估小組」及專家學者(包括中醫師、藥師及

中藥製造）與業界座談研討二場中藥調劑健保合理給付制度。

(三)第一場專家座談於藥師調劑中醫處方時間調查分析資料收集完成後召開，研討中醫處方調劑有關藥事服務費之健保合理支付標準。

(四)第二場專家座談於中藥濃縮製劑成本調查分析資料收集完成後召開，研討中藥濃縮製劑合理藥價及中醫處方調劑合理藥事服務費之健保合理支付標準，研議對策方案。

七、整合各界意見，規劃制定健保給付政策建議草案，提供中醫藥司作為建議中央健康保險署修正健保中藥藥費及藥事服務費支付制度，及修正法規政策參考。

(一)整合各界意見，規劃制定健保給付中藥濃縮製劑政策方案及替代方案草案，並就中醫藥組織變革及中藥產品分類分級使用管理機制，評估所擬方案之政策優先排序。

(二)提供中醫藥司作為建議中央健康保險署修正健保中藥藥費及藥事服務費支付制度。

(三)提供中醫藥司修正法規政策參考。

八、提具總結報告。

(一)彙報「中醫處方調劑藥事服務費支付費用建議」。

(二)彙報「中藥濃縮製劑成本分析及價格建議」。

(三)彙整所提出具體之法律修正內容，敘明修正理由及法律見解。

參、結果

一、繼續於中華民國藥事品質改革協會組織「濃縮中藥健保藥價評估小組」，有效評估分析濃縮中藥健保給付問題，建立合理藥價及藥事服務費計算方式。

(一)繼續組織「中藥濃縮製劑健保藥價評估小組」，由中醫執業、中藥製造及調劑供應專家學者組成進行濃縮中藥健保給付問題討論。

(二)於民國 103 年 4 月 2 日召開「中藥濃縮製劑健保藥價評估小組」第一次專家會議，評估計畫執行問卷初稿之專家效度，及訪查中醫醫院調劑中藥處方箋狀況之執行程序。結論重點如下(會議紀錄如附錄一)：

1. 為了解中醫醫療機構使用濃縮中藥狀況，以問卷調查調查方式，調查三家醫院，與北中南東各 10 間中醫診所。
2. 醫療機構基於財務機密，無法細項回答藥品單位採購價格，問卷改以詢問 4 月份與全年度藥品採購金額。
3. 增加藥事調劑所需其他成本如場租、硬體器材之成本問題。
4. 計畫調查三家醫院中醫調劑流程，實際訪查三間醫院各 5 位藥師實測調劑時間，並另問卷調查影響調劑時間之因素。先向醫院通知，現場隨機方式挑選藥師，一間醫院 5 位藥師，以不妨礙藥師調劑進行時間紀錄，完成實測後請藥師填寫問卷。
5. 製藥廠成本增加在原料藥材、運費、檢驗項目(包含重金屬、微生物、檢驗人員)以及人工平均薪資支出項目，但健保沒調動過。建議從原物料、製造成本、檢驗成本、人力薪資調查成本，計算各成本佔總成本之比例。
6. 評估未來濃縮中藥或藥材能否一個品項一個價錢，採核實申報的方式？惟需注意中藥有單方複方，每家廠商藥材來源不同，可能很難依同品項計價。
7. 計算中藥製造成本總幅度，向政府提請建議調整健保給付藥費之合理價格。
8. 建議參考西藥藥價調查機制。
9. 問卷依效度評鑑修正。

(三)於民國 103 年 8 月 13 日召開「中藥濃縮製劑健保藥價評估小組」第二次專家會議，評估計畫執行製藥廠問卷初稿之專家效度，並就

中醫醫院訪查結果進行討論。結論重點如下：(會議紀錄如附錄二)：

1. 為了解中藥製藥廠製造濃縮中藥成本現況，以問卷調查調查方式，調查 5 家製藥廠，另實際訪查各製藥廠濃縮中藥製作流程。
2. 中藥廠基於財務機密，無法回答初稿多項金額成本問題，建議以成本比例結構取代。
3. 建議計畫瞭解中藥廠近年為解決成本提升(藥材、檢驗成本)所做的改變，如機器代替人力減少人事費及增加製程效率...等，以反應給中央主管機關參考。
4. 計畫執行藥師調劑時間成本調查，所估每人每日合理調劑量與實際相符。
5. 因醫療院所每張處方開具天數資料取得不易，以及藥費採購成本屬營業秘密，故以「處方單張」估算；但中醫醫院購買藥材常以幾年一簽固定藥費，故計畫所估醫院單張處方箋藥費成本沒有反應藥費上漲，中醫診所則有增加。
6. 硬體設備成本佔總成本比例低，單張處方箋設備成本因醫院提供設備年限資料產生差異，另有設備維護費用沒列入估算。
7. 計畫所估成本屬健保合理給付之低標，然現行健保給付不敷所估成本，計畫結果提供主管機關做為提升健保給付標準之依據。
8. 問卷依效度評鑑修正。

二、繼續調查分析全民健康保險支付制度有關中西醫門診藥費及藥事服務費給付規定之差異。

(一)繼續分析全民健康保險法及相關子法規有關中西醫門診醫療使用藥品之規定。

1. 全民健康保險增進全體國民健康，為醫藥分工共同提供醫療服務。

「全民健康保險法」第 1 條第 2 項即明定本保險為強制性之社會保險，於保險對象在保險有效期間，發生疾病、傷害、生育事故時，依本法規定給與保險給付。保險醫事服務機構應依「全民健康保險法」第 40 條及第 42 條規定，當病人發生疾病、傷害事故或生育時，依訂定醫療辦法及病人醫療需求提供保險醫療服務。如醫療服務及藥物屬高危險、昂貴或有不當使用之虞者，應於使用前報經中央健康保險署審查同意，惟不限情況緊急者。

在「醫師法」第 12-1 條、第 13 條規定醫師專責診察、處置及處方決定治療病患使用之藥品，其治療方針、處置用藥及可能發生之不良反應，醫師應於治療時告知；開具處方時於處方箋載明病人姓名、年齡、藥名、劑量、數量、用法及處方年、月、日。同時，診療使用藥品處方及重大檢驗項目，應存放於健保卡內，病人得向醫療機構索取處方箋，交付保險醫事服務機構調劑、檢驗、檢查或處置 (「全民健康保險法」第 71 條,「全民健康保險醫療辦法」第 6 條第 1 項)，以保障病人被告知用藥內容與自由選擇調劑處所之權利。

藥師受理醫師所開處方後，應依「藥師法」第 16-18 條規定，盡確認處方義務，按照處方調劑，不得任意省略或代以他藥，其處方祇許調劑一次。在交付藥品給病人時，亦須確認病人身分及藥袋包裝應記明事項，說明藥品使用等正確用藥知識，並矯正民眾偏差的就醫行為與服藥觀念。

2. 全民健康保險給付藥品規定分析

醫事服務機構所使用之全民健康保險給付藥物，按「全民健康保險法」第 41 條第 2 項訂定於「全民健康保險藥物給付項目及支付標準」,所有給付藥品記載於該標準附件二藥品給付品項暨支付標準表、附件四中藥用藥品項表（單方）、附件五中藥用藥品項表（複方）。除醫療人員應依法規開立使用藥品外，其藥品使用需符合該標準之「藥品給付規定」方能申請給付，其中包含藥物使用之許可證登載適應症、處方合理之含量或規格、病患年齡等項目。

建議納入全民健康保險給付之藥品是依「全民健康保險藥物給付項目及支付標準」第 11 條規定：(一)主管機關核准通過查驗登記並取得藥品許可證之藥品。(二)醫師指示用藥依法不在全民健康保險給付範圍，原前公、勞保核准使用之指示用藥，經醫師處方暫予支付。(三)中藥藥品：1.依中藥新藥查驗登記須知之規定，依「藥品優良臨床試驗規範（GCP）」進行臨床試驗，且通過新藥查驗登記（NDA）各項審查作業，取得主管機關核發藥品許可證之新藥。2.主管機關核准經由 GMP 中藥濃縮廠製造之「調劑專用」及「須由醫師（中醫師）處方使用」之濃縮中藥為限；複方濃縮中藥並應列屬主管機關整編之「臨床常用

中藥方劑基準方」。

不列入保險給付範圍藥品，包含「全民健康保險法」第 51 條明定成藥及醫師藥師藥劑生指示用藥，及「全民健康保險藥物給付項目及支付標準」第 12 條規定，包含非屬醫療所必需如避孕用藥、預防接種所用之疫苗、經保險人認定，非屬醫療所必需或缺乏經濟效益者、不符「藥品給付規定」者、其他經主管機關公告不給付之藥品。

中西醫門診醫療使用藥品時，除按「藥品給付規定」使用，亦應符合「全民健康保險醫療辦法」第 22 條，醫師得按病患病情需要，每次開給七日以內之藥量，慢性疾病病患則得一次給予三十日以內之用藥量，以避免藥物濫用，前項慢性病範圍規定在「全民健康保險醫療辦法」第 14 條內。藥師在調劑時，亦須注意處方箋之有效期限，一般處方箋自處方箋開立之日起算三日（遇例假日順延），慢性病連續處方箋依各該處方箋給藥日數計，至多九十日；處方箋逾期者，保險醫事服務機構不得調劑(「全民健康保險醫療辦法」第 23 條)。

(二)繼續分析全民健康保險法及相關子法規有關中西醫門診藥品使用調劑供應所需藥費及藥事服務費之支付制度。

1. 全民健康保險醫療費用中西醫總額給付制度分析

全民健康保險是以總額支付制度控制醫療費用預算，法定由主管機關於年度開始六個月前擬訂其範圍，經諮詢全民健康保險會(健保會)，報行政院核定。健保會應於各年度開始三個月前，在行政院核定之醫療給付費用總額範圍內，協訂本保險之醫療給付費用總額及其分配方式，報主管機關核定；不能於期限內協議訂定時，由主管機關決定。該醫療給付費用總額，得按門診及住院費用分配比例，再依「醫院」、「西醫基層」、「中醫門診」、「牙醫門診」區分(「全民健康保險法」第 5 條、第 60 條、第 61 條)。

每年中西醫門診協訂總額設定公式如下(以 103 年為例)：

中醫門診：

103 年度中醫門診醫療給付費用總額=校正後 102 年度中醫門診一般服務醫療給付費用×(1＋103 年度一般服務成長率)＋103 年度專款項目經費

西醫基層：

103 年度西醫基層醫療給付費用總額＝校正後 102 年度西醫基層一般服務醫療給付費用×(1＋103 年度一般服務成長率)＋103 年度專款項目經費＋103 年度西醫基層門診透析服務費用：

103 年度西醫基層門診透析服務費用＝102 年度西醫基層門診透析服務費用×(1+成長率)

一般服務成長率包含：醫療服務成本及人口因素成長率（投保人口數年增率、人口結構改變率及醫療服務成本指數改變率）及協商因素成長率（醫療品質及保險對象健康狀況的改變、支付項目改變、其他醫療服務利用及密集度的改變、其他議定項目），專款項目由中央健康保險署會同醫院總額相關團體訂定後，依相關程序辦理，並送全民健康保險會備查。依照每年審議成長率結果，調整醫療費用給付總額。

2. 全民健康保險給付為醫藥分帳制度

全民健康保險醫療費用給付在依各領域制訂年度總額後，依「全民健康保險法」第 61 條第三項規定，門診醫療給付費用按醫藥分帳制度，分別設定醫師診療、藥事人員藥事服務及藥品費用分配比例。醫事服務機構在提供醫療服務之次月一日起六個月內得依「醫療服務給付項目及支付標準」、「藥物給付項目及支付標準」，向健保署申報藥費與藥事服務費(「全民健康保險法」第 62 條)。此外，同法第 64 條明列，經中央健康保險署核定不予給付之處方，若為醫師開立交於其他保險醫事服務機構調劑、檢驗、檢查或處置後，且可歸責於醫師時，該費用應自該醫師所屬之醫療機構申報之醫療費用核減之。

3. 中西醫門診藥費支付制度

中西醫藥費支付制度訂定於「藥物給付項目及支付標準」，是按「全民健康保險法」第 42 條第 2 項規定。西醫藥費給付得依「藥物給付項目及支付標準」第 80 條藥品給付品項暨支付標準表辦理，另有門診日劑藥費支付點數規定在「醫療服務給付項目及支付標準」第二部第一章第七節；中醫藥費則按「藥物給付項目及支付標準」第 11 條，訂定中藥藥品支付應依據「醫療服務給付項目及支付標準」(第四部第二章)規定辦理。其「醫

療服務給付項目及支付標準」中西醫藥費給付標準如表一、表二所示。

4. 中西醫門診藥事服務費支付制度

中西醫藥事服務費支付制度訂定於「醫療服務給付項目及支付標準」，是按「全民健康保險法」第 42 條規定。西醫規定於該標準第二部第一章第六節，中醫於第四部第三章。依「全民健康保險醫療辦法」規定一次領取二個月或三個月用藥量之慢性病連續處方箋案件，其藥事服務費得相對申報二次或三次(表三、表四)。

(三)繼續比較分析全民健康保險法及相關子法規有關中西醫門診藥品使用調劑供應所需藥費及藥事服務費支付制度之差異比較。

1. 全民健康保險中西醫門診藥費支付制度差異

「全民健康保險法」第 42 條規定中西醫門診藥費於「藥物給付項目及支付標準」。西醫門診藥費於該標準定以個別藥價支付，並有簡表每日藥費之規定；中藥藥費則被規範至「醫療服務給付項目及支付標準」以日計酬給付 30 點。現行中醫門診總額有關中藥調劑費之點值，維持以每點 1 元核算，尚不採浮動點值方式計算。

2. 全民健康保險中西醫門診藥事服務費支付制度差異

藥事服務費訂定於「醫療服務給付項目及支付標準」，依該標準第二部第一章第六節調劑通則第 2 點，藥事服務費之成本，包含處方確認、處方查核、藥品調配、核對及交付藥品、用藥指導、藥歷管理及藥品耗損、包裝、倉儲、管理等費用，比對藥師法對調劑之定義後，確認中西醫調劑行為並無差異。又「全民健康保險法」第 42 條第 1 項，規定「醫療服務給付項目及支付標準」應以相對點數反應各項服務成本及以同病、同品質同酬為原則，並得以論量、論病例、論品質、論人或論日等方式訂定之。在此法源依據下中西醫中醫門診藥事服務費卻不符合同病同酬原則，以下提出幾項差異。

(1) 醫療層級給付加成差異

西醫門診按醫療機構層級給予加成，中醫門診無。「全民健康保險法」第 43 條規定病人於不同層級醫療機構就醫時，需自行負擔門診或急診費用不同。在「全民健康保險醫

療服務給付項目及支付標準」第二部第一章第六節調劑通則第七點，規定調劑如超過各醫療層級所分別訂定之合理調劑量，藥事服務費超按支付點數之 50%支付。上述顯示醫療層級在健保支付具有差異，然西醫門診因此受醫療層級加成給付，中醫門診卻無。

(2) 藥量(慢性病處方)給付加成差異

西醫門診藥事服務費在醫院或診所皆因調劑慢性病處方之調劑天數進行加成。調劑天數長其需調劑藥量增加，並且延長調劑時間，就「全民健康保險法」第 42 條應予與加成，然西醫有中醫卻無。

(3) 小兒劑量給付加成差異

西醫門診藥事服務費得按小兒劑量加成，中醫無。以「優良藥品調劑作業規範 GDP」比較中西醫門診調劑之差異發現，中藥濃縮製劑係屬粉劑或散劑，與西藥多為錠劑或膠囊不同，其調劑過程幾與西藥兒科粉劑之調劑作業相同，並且成人所需劑量遠高於小兒劑量，顯示中醫調劑應比照西藥小兒劑量加成。

(4) 中西醫調劑差異

中醫調劑時產生大量粉塵，所需調劑設備及儲備空間皆高於西藥，但未能有比照西藥粉劑作業有加成給付之機制(表五)。

(四) 與中醫藥司洽議有關中藥調劑之法規問題，就中醫藥司提出之問題，由中華民國藥事品質改革協會之律師，提供法規諮詢計 6 件。

1. 未來濃縮中藥或藥材能否依品項定價，採核實申報方式？

結論：

(1) 開具一藥一張處方箋，符合先進國家「一藥一處方」之原則。

(2) 現行藥事及健保相關法規尚無相關規定，允宜同步思考政策，修正法規。

2. 西藥調劑費不同等級不同給付，中藥調劑費在醫學中心與一般診所皆為 20 元，實在是不同工同酬。醫學中心中藥科，必須負擔較多藥事服務，並且醫院會投入較多設備，在提升用藥安全及病患服務上，但藥事服務費與一般中醫診所相同，是屬不公平？

結論：醫學中心投入之人力物力及設備確具與一般中醫診所不同，則處方之調劑費皆相同，確屬不公平，建議比照處方調劑量分級方式為之。

3. 中藥局因調劑集塵排放之藥粉，其中藥味讓附近居民感到不適，中藥局應如何負責？

結論：「民法」第 793 條土地所有人於他人之土地、建築物或其他工作物有瓦斯、蒸氣、臭氣、煙氣、熱氣、灰屑、喧囂、振動及其他與此相類者侵入時，得禁止之。但其侵入輕微，或按土地形狀、地方習慣，認為相當者，不在此限。若評估中藥局產生之中藥味超過法定輕微，得依民法侵權之規定辦理。

4. 坊間有以中藥調理時間長的迷思，其法定在中西醫上慢性處方箋的定義一樣嗎？

結論：依據全民健康保險醫療辦法第 14 條及第 23 條之規定，保險對象罹患慢性病，經診斷須長期使用同一處方藥品治療時，除管制藥品管理條例所規定之第一級及第二級管制藥品外，醫師得開給慢性病連續處方箋。前項慢性病範圍，如附表 16 類 107 種。同一慢性病，以開一張慢性病連續處方箋為限。慢性病連續處方箋依各該處方箋給藥日數計，至多九十日。

5. 中醫診所沒請藥師調劑，發生藥品醫療糾紛時，如吃錯藥害死人、減肥療程的藥導致洗腎，該調劑人員與診所負責人應處哪些罰則？

結論：調劑人員依藥師法第 24 條規定，未取得藥師資格擅自執行第十五條第一項之藥師業務者，處新臺幣六萬元。診所負責人違反「醫療法」第 57 條，得以醫療法第 103 條處新臺幣五萬元以上二十五萬元以下罰鍰。

6. 一般販售添加中藥材食物業者如人參雞、當歸鴨等，常以產品加有中藥補身體之相關話術招攬客人，算是宣稱醫療效果嗎？

結論：品宣稱療效，違反藥事法第 69 條「非本法所稱之藥物，不得為醫療效能之標示或宣傳」之規定，違反第六十九條規定者，處新臺幣六十萬元以上二千五百萬元以下罰鍰，其違法物品沒入銷燬之。

三、調查分析中醫醫療機構使用濃縮中藥之品項數採購價格。

(一) 訪查 3 家醫院使用濃縮中藥之品項數及採購價格。

本計畫「103 年度中醫醫療機構(醫院)調劑濃縮中藥現況調查表」問卷是就中醫機構醫事人力、門診處方量、濃縮中藥使用及中醫處方調劑成本進行設計，做為醫療機構執業面與合理健保給付估算之參考。問卷初稿經專家效度分析，針對題目提問方式、措詞妥適性及問題與現況比較提出建議修正 (附錄一之中醫醫療機構問卷初稿專家效度評估建議)，向三家中醫醫院發放問卷調查(問卷詳見附錄三)。

三間中醫醫院問卷皆有回收，惟部份題目因營業秘密不便提供，其問卷結果分別以 A 醫院、B 醫院、C 醫院代號表示。

1. 中醫醫院基本資料

三間中醫醫院皆曾通過中醫評鑑合格，中醫門診處方量有逐年增加的趨勢，平均年門診處方量最低有 115,257 張(B 醫院)，就 103 年 4 月單月處方量最低有 9,697 張。在中醫醫事人員以 A 醫院聘請藥師比例最高，另兩家中醫醫院有聘請非藥師進行行政作業。

	A 醫院	B 醫院	C 醫院	平均
中醫師數	22	25	60	36
藥師	18	15	15	16
非藥師	0	6	5	6
100 年處方量	212,106	113,707	176,708	167,507
101 年處方量	224,970	115,567	182,463	174,333
102 年處方量	232,551	116,499	191,858	180,303
103 年 4 月處方量	25,268*	9,697	17,528	-

* A 醫院提供資料為門診量

2. 中醫醫院單張門診處方箋使用濃縮中藥數量

為了解中醫醫院在處方使用濃縮中藥數量，調查單張處方

箋開列藥品種類的比例，結果顯示處方普遍使用 5、6 種濃縮中藥進行調劑(處方含 5、6 種藥品的比例，A 醫院：40%~60%、B 醫院：20%~40%、C 醫院：20%~40%)。

3. 中醫醫院濃縮中藥採購作業流程，採購之品項(含製造廠商)、數量、價格(單價或批價)

(1)濃縮中藥採購價格

因醫院採購價格屬營業秘密，僅能調查年度總採購價格。調查結果 A 醫院因藥品費用採中西醫總額，無法個別計算濃縮中藥採購，故無法提供。B 醫院因採購價格屬營業秘密不便提供。僅 C 醫院提供：33,799,260 元(100 年)、35,040,552 (101 年)、35,612,184 (102 年)。

(2)採購作業流程

各家醫院在採購時為降低營運成本或受醫院定位(分院/總院)差異，本計畫調查三間中醫醫院採購濃縮中藥作業流程。其中 A、B 兩家醫院屬分院，C 醫院為總院；A、C 醫院是共同採購方式，B 醫院是各別採購。A 醫院在新藥申請採購時，得進行新藥申請、審查作業(圖一)；B 醫院在藥品增列或臨時採購需再進行申請作業(圖二)；C 醫院為總院其中藥藥品採購作業流程作業如圖三。

(3)濃縮中藥採購資料

因醫院採購相關資料屬營業秘密，單價價格及數量不便提供，以 103 年 4 月中醫醫院使用濃縮中藥現況做為調查。三間醫院採購濃縮中藥之前三大宗廠商各有不同，分別 A 醫院為國科、領先奈米製藥、天明製藥；B 醫院為勝昌製藥、順天堂、科達；C 醫院為順天堂、港香蘭、莊松榮。綜合三間醫院最常使用濃縮中藥有加味消遙散、溫膽湯、小柴胡湯、濟生腎氣丸、舒經活血湯，而醫院各別最常使用濃縮中藥單復方如下：

醫院	單/復方	濃縮中藥名稱
A 醫院	單方	丹參、茯神、柴胡、夏枯草、白术
	復方	加味逍遙散、小柴胡湯、溫膽湯、半夏瀉心湯、柴胡舒肝散
B 醫院	單方	黃芩、海螵蛸、丹參、牡蠣、黃柏
	復方	加味逍遙散、辛夷散、舒經活血湯、香砂六君子湯、酸棗仁湯
C 醫院	單方	地黃(生)、夜交藤、酸棗仁、鉤藤、丹參
	復方	加味消遙散、炙甘草湯、濟生腎氣丸、消風散、歸脾湯

4. 調劑設備成本分析

調查三家中醫醫院調劑所用設備，包含磨藥機、抽風機、集塵器、攪拌機、冰箱、秤、分包機、混合機、藥劑數粒機及吸塵器之數量、單價(仟元)及使用年限，估算調劑設備成本。

5. 三家中醫醫院調劑所用設備數量及單價：

設備	A 醫院		B 醫院		C 醫院	
	數量	單價*	數量	單價*	數量	單價*
磨藥機	0	0	3	17	2	7,5
抽風機	0	0	5	8	5	30
集塵器	1	600	12	3671	5	80
攪拌機	10	36	9	30	5	35
冰箱	13	50	2	50	3	90
秤	10	9	8	10	20	6
分包機	9	350	7	294	5	130
混合機	9	40	0	0	0	0
藥劑數粒機	0	0	1	90	0	0
吸塵器	0	0	0	0	15	2

*單價單位：仟元

6. 調劑設備成本分析

計算公式及成本如下：

(1)年平均調劑設備成本：(硬體設備數量 x 設備單價)/設備使用年限

(2)單張處方箋設備成本：年平均設備成本/總處方量(年)

A 醫院年平均調劑設備成本 968,250 元，102 年單張處方箋設備成本 4.16 元；C 醫院年平均調劑設備成本 151,500 元，102 年單張處方箋設備成本 0.79 元；B 醫院因無提供設備年限，無法計算。

其計算細項如下，A 醫院：集塵器(1x600,000/3)+攪拌機(10x36,000/5)+冰箱(13x50,000/8)+秤(10x9,000/5)+分包機(9x350,000/6)+混合機(9x40,000/5)。C 醫院：磨藥機(2x7,500/10)+抽風機(5x30,000/10)+集塵器(5x80,000/10)+攪拌機(5x35,000/15)+冰箱(3x90,000/15)+秤(20x6,000/10)+分包機(5x130,000/15)+吸塵器(15x2,000/3)。

(二) 中醫診所使用濃縮中藥之品項數及採購價格。

本計畫使用「103 年度中醫醫療機構(診所)使用濃縮中藥現況調查表」問卷調查中醫診所使用濃縮中藥現況，針對之 103 年 4 月中醫門診量採購之品項(含製造廠商)、數量、價格(單價或批價)進行問卷設計。問卷初稿經專家效度分析，針對題目提問方式、措詞妥適性及問題與現況比較提出建議修正，因採購價格屬營業秘密改以全年度採購價格詢問，另採購數量改同中醫醫院以使用濃縮中藥數量進行調查，依健保分區抽取北、中、南、東中醫診所發放問卷調查(問卷詳見附錄四)。

1. 中醫診所基本資料

共蒐集北、中、南、東 40 間中醫診所，中醫診所門診處方量有逐年增加的趨勢，103 年 4 月平均處方箋 1051 張/間(最多 3,644 張-最少 243 張)。其中，中醫診所申請藥事服務費的比例僅 32.5%，其中有聘請藥師之中醫診所 6 間。

2. 中醫診所單張門診處方箋使用濃縮中藥數量

為了解中醫診所在處方使用濃縮中藥數量，調查單張處方箋開列藥品種類的比例，結果顯示單張處方普遍使用 5、6 種濃縮中藥進行調劑。

3. 濃縮中藥採購資料

(1)濃縮中藥採購價格

因診所採購價格屬營業秘密，僅有 25 家診所提供調查年度總採購價格。100 年至 102 年平均總採購價格 2,003,645 元(100 年)、2,131,222 元(101 年)、2,239,689 元(102 年)。

(2)濃縮中藥採購資料

因診所採購相關資料屬營業秘密，單價價格及數量不便提供，以 103 年 4 月中醫診所使用濃縮中藥現況做為調查。中醫診所採購濃縮中藥之前三大宗廠商為科達、順天堂、勝昌。最常使用的濃縮中藥為溫膽湯、補中益氣湯、半夏瀉心湯、桂枝湯、疏經活血湯。

(三) 依醫院、診所層級分別比較分析醫療機構使用濃縮中藥品項數及採購價格之差異及差異來源。

1. 處方箋使用濃縮中藥藥品品項數

計畫調查之中醫醫院與問卷回收之中醫診所，單張處方使用濃縮中藥品項數皆是使用 5、6 種濃縮中藥進行調劑。

2. 濃縮中藥採購差異

因中醫醫院僅 C 醫院提供採購價格，故以 C 醫院作為醫院代表，而中醫診所是以有提供採購價格之 25 間診所資料進行差異比較。C 醫院年平均採購價格 34,817,332 元，三年採購價格總上漲 5.4%；中醫診所年平均採購價格 2,124,852 元，三年採購價格總上漲 11.8%，是相較高於中醫醫院採購。

3. 單張處方箋藥費成本

近一步比較中醫醫院與中醫診所單張處方箋藥費成本，計算公式為採購藥材費用(年)/總處方量(年)。結果發現中醫醫院 100 年至 102 年平均單張處方箋藥費成本為 189.6 元，相較高於中醫診所的 113.0 元。但中醫醫院 100 年至 102 年其單張處方箋藥費成本卻是下降；中醫診所單張處方箋藥費成本則是逐年增加，這是因為醫院在採購時與廠商簽訂固定藥費，故無反應藥價增加。

中醫醫療機構單張處方箋藥費成本

機構\年	100 年	101 年	102 年	平均
中醫醫院	191.3*	192.0	185.6	189.6
中醫診所	100.0	117.9	121.2	113.0

*單位：元/張

四、調查分析中醫醫療機構依法令專業調劑中藥之合理時間及合理調劑量，計算中藥調劑之藥事服務量，推估藥事服務費之合理成本。

(一) 實際訪查 3 家醫院各 5 位藥師，依法定藥品優良調劑作業準則之規定，執行中醫師處方調劑交付藥品之全部時間。

1. 調劑濃縮中藥現況訪視流程與實測記錄單設計

(1) 調劑濃縮中藥現況訪視流程

調劑濃縮中藥現況訪視流程依「藥品優良調劑作業準則」標準訂定。「藥品優良調劑作業準則」第 3 條定義調劑，係指藥事人員自受理處方箋至病患取得藥品間，所為之處方確認、處方登錄、用藥適當性評估、藥品調配或調製、再次核對、確認取藥者交付藥品、用藥指導等相關之行為。「藥品優良調劑作業準則」第 6 條調配，係指調劑作業過程中，依方取藥至包裝等過程之行為。

記錄員依此流程進行藥師調劑濃縮中藥訪視，調劑濃縮中藥現況訪視流程如下：

1. 訪視員於門診前至醫院藥局調劑處，隨機抽請一位藥師，並告知藥師進行濃縮中藥調劑實測。(含飲片之處方不列紀錄)
2. 訪視員在不影響藥師調劑下觀察。
3. 依照「濃縮中藥調劑實測記錄單」記錄各調劑行為時間，一張處方箋一張記錄單，惟再次核對時有詢問藥師/醫師，需修正調劑者，再取一張接續記錄再次調劑時間。
4. 自藥師取得處方箋資訊以碼表開始記錄(時:分:秒)、處方箋藥號。
5. 按下列步驟完成記錄。

(1)「確認處方義務」:

a. 處方沒問題進行調劑，即直接記錄調劑時間。

b. 有疑問詢問醫師，記錄詢問時間，待調劑藥師再次取得該處方箋，接續記錄。如藥師過程中進行其他處方調劑，即隨藥師動作，記錄其他處方調劑時間。

(2)「依方取藥義務-調劑」：記錄藥師開始調劑。

(3)「完成調劑」：記錄藥師完成調劑。

(4)「再次核對」：

a. 記錄核對/發藥藥師編號。

b. 記錄核對/發藥藥師取得藥包開始「再次核對」時間

c. 核對時如有疑慮，記錄詢問調劑臺/醫師的時間。

(a)重新調劑：另取一張記錄單，接續記錄調劑藥 師再次調劑時間。

(b)醫師回覆不需修正，即於原記錄單記錄醫師回覆時間，並接續記錄。

(c)「核對結束通知病患領藥」：紀錄核對結束通知病患領藥時間。

(d)「藥品交付」：自病人到領藥台開始記錄時間。確認核對/發藥藥師有進行三項義務打勾，如有其他影響發藥時間的事項於框框內註明。

e.「病人領藥離開」：病人離開領藥台的時間。

6. 處方箋資料拍照保存(塗去病人個資、醫師姓名、藥師姓名)

7. 實測記錄單

依訪視流程自藥師取得處方箋開始，紀錄各調劑行為之時間設計實測記錄單(附錄五)。另考量調劑時可能突發狀況，記錄員應於記錄單上記載影響事件，依調劑濃縮中藥現況訪視流程進行。

(二)分析藥品品項數與調劑時間之差異。

1. 實測結果描述性分析

共完成十五位藥師調劑時間實測，本計畫將調劑時間區分兩部分，調配時間：自藥師取得處方至包藥完成(「藥品優良調劑作業準則」第六條)。調劑時間：調配時間加病人至櫃檯領藥離開時間總合。藥品品項為實測處方箋調劑藥品品項數、藥量

為處方調劑總藥品重量(克)、包數為處方所開之總包數。平均調劑單張藥品品項有 8 種，調劑藥量 308.4g，調配時間為 456 秒，調劑時間達 523 秒。

訪視過程中，記錄三家醫院在調配與發藥作業之影響調劑時間之事項如下表：

	A 醫院	B 醫院	C 醫院
調配作業	1. 確認處方後刷條碼始調配 2. 藥品使用前後刷條碼紀錄 3. 秤紙調配完，均由攪拌機混合 4. 上包藥機前後以吸塵清理 5. 藥量大或藥包數量多時，需再次秤重分批上包藥機 6. 結束清理調劑台	1. 確認處方後刷條碼始調配 2. 清理調劑台 3. 藥品使用前後刷條碼紀錄 4. 劑量大時，用大塑膠袋裝藥，手動搖晃混合 5. 上包藥機前後以吸塵清理 6. 藥量大或藥包數量多時，需再次秤重分批上包藥機	1. 確認處方後刷條碼始調配 2. 無固定個人調劑台，調配於碗內(清理) 3. 劑量大時，用大塑膠袋裝藥，手動搖晃混合 4. 上包藥機前後以吸塵清理 5. 藥量大或藥包數量多時，需再次秤重分批上包藥機 6. 調劑包藥完，再次秤重核對，送輸送電梯，至 1 樓發藥窗口
發藥作業	1. 調劑台與發藥窗口屬同一空間，不須輸送設計 2. 單次叫號，領藥確認病人資料同時再次秤重核對 3. 病人平均年齡較長，需大聲或重	1. 調劑包藥完上輸送帶，平行輸出發藥窗口 2. 多號叫號領藥，確認病人資料，再次秤重核對 3. 有些病人年齡較長，需重複說明	1. 發藥藥師取藥袋後，多號叫號領藥 2. 確認病人資料後說明，於發藥電腦系統中可出示病人用藥，發藥藥師可就病人有

	複說明		中西藥合併服用、高不良反應做說明

2. 藥品品項數與調劑時間差異

為避免病人端之人為因素影響(如交付時，病人重聽需重覆說明)，本研究以調配時間(取得處方至包藥完成)，分析藥品品項數之時間差異。

分別分析藥品品項數、調劑克數、調劑包數與調配時間之相關係數，發現此三項變數與調配時間均呈正相關，其相關係數分別為 0.20 (藥品品項數)、0.88 (調劑克數)、0.91 (調劑包數)，表示隨著藥品的品項、調劑克數、調劑包數增加會延長調劑的時間，其中又以調劑包數最為相關。

這項結果可能歸因於當藥品調劑克數大時，需要再次分批秤重，依次上包藥機，增加調配時間；另外受限於包藥機一次包藥上限，當其處方箋包數多時，亦需分次包藥增加調配時間。因此，在相同藥品品項數之處方箋，可能因調劑克數、調劑包數不同造成時間差異。而相同藥品數目之處方箋在各家醫院可能受該醫院藥品櫃、調劑台動向影響調劑時間。

(三)推估中醫處方調劑時間成本。

實測藥師調劑結果平均調劑時間為 523 秒。依平均調劑時間粗估一位藥師調劑中醫師處方之每人每日合理調劑量，考量工作彈性休息時間，工作時數以 7 小時計算，使用公式：工作時數(7 小時) / 平均調劑時間，計算合理調劑量結果為 48.18 張。

每張處方箋時間成本以藥師年薪含年終(月薪 50,000 乘 13.5 個月)及勞基法工作日數(1 週五個工作天乘 52 週扣除國定假日 11 日 249 天)，粗估一張中醫師處方調劑時間成本，使用公式：藥師年薪(675,000 元) / (合理調劑量 48 張 x249 天)，計算單張調劑時間成本結果至少為 56.5 元。

(四)藥師調劑中醫處方其藥事服務費之專業成本。

藥師調劑時需確認處方義務再進行調劑，發藥時由發藥藥師與病人進行藥事衛教，確認病人用藥情況進行藥物使用說明，須

由具專業中西藥學基本技能且訓練完整的執業藥師進行，以維護民眾用藥安全，其藥師專業成本亦是藥事服務費需考量之一環。

在訪視過程中未發生需與醫師討論修改處方之情事；在發藥時，三間醫院均有向病人詢問用藥狀況、教導病人用藥，在 C 醫院可於發藥電腦系統檢視病人用藥，發藥藥師可就病人有中西藥合併服用、高不良反應做說明。向藥師詢問常見民眾中西藥併混用狀況，有兩種情況：一是有可能發生西藥不良反應導致的問題；另一個是中西藥交互作用的問題。

以一疑似濃縮中藥葛根湯引起之藥物不良反應實案例說明：病人因睡眠不佳及過敏性鼻炎就醫(具本態性高血壓病史)，當日所開處方中含葛根湯、抑肝散、杞菊地黃丸、白朮、黨蔘、麥門冬及薏苡仁，但回診時主訴服藥當晚即完全無法入睡、血壓升高，心悸狀況。經藥師判讀可能是處方內常做感冒藥使用之葛根湯，其成份含麻黃造成增加心悸，血壓上升風險，更改處方後即改善病患用藥不良反應用。

麻黃與中西藥交互作用可能產生的問題包含：

1. 與 epinephrine、norepinephrine、isoproterenol 併用會造成心悸、血壓升高，缺氧時會造成心律不整，甚至心跳停止。
2. 高血壓病人在服用降血壓藥物時，不能同時服用含麻黃成分之中藥(如麻黃湯)，麻黃會使血管收縮而產生高血壓，降低了降血壓藥之療效
3. 不宜與安眠藥使用(如 benzodiazepam)，會造成麻黃在體內無法分解，使血壓升高，心跳增加。
4. 不宜和服用 Digoxin 患者使用，因加強心肌收縮力，會造成心律不整。

面對民眾疾病，有以中醫治之，有以西醫治之，亦有以中西醫結合治之，依「醫療服務給付項目及支付標準」第二部第一章第六節藥事服務費之成本，包含處方確認及用藥指導，其中醫處方之調劑是需要具有學過中西藥學基本技能的藥師調劑，並且其專業成本是需被考慮至藥事服務費中。

五、調查分析中藥廠濃縮中藥之製造銷售成本，推估健保藥費之合理給付金額。

(一)實際訪查 5 家中藥製造廠，瞭解 GMP 製造過程及製造人力：

本研究於 103 年 10 月以(103)藥改字第 103055 號發函向各中藥製藥廠，惠予協助參訪，共參訪 4 家中藥廠，將實際執行現況與「藥物優良製造準則」比較，瞭解 GMP 製造過程及製造人力。

參訪 GMP 製造過程自中藥材原料進倉，進行原物料品質檢驗至製造製粒完成包裝，整體流程分「廠房設施及原料藥保存」、「原料取樣檢驗」、「員工作業衛生」及「品質管控、批次」，與「藥物優良製造準則」第 8-10、25、28、42-44 條比較，結果均是符合現行法規之規範。

而中藥濃縮製劑異常物質檢驗，查衛生福利部中醫藥司公告，有 97.09.15 署授藥字第 0970003102 號「中藥濃縮製劑加味逍遙散等 10 個處方含微生物限量」、97.09.15 署授藥字第 0970003085 號「中藥濃縮製劑含總重金屬之限量」、98.07.04 署授藥字第 0980001933 號「補中益氣湯等濃縮製劑含重金屬及砷含量之限量」、100.08.29 署授藥字第 1000002752 號修正「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」之適用範圍、102.12.26 衛部中字第 1021881313 號「天王補心丹等 22 項中藥傳統製劑含異常物質限量標準及其適用範圍」多次增加檢驗項目及限量。

在實際訪查時亦有參訪各製藥廠品管檢驗實驗室，發現有部分藥廠增加異常物質檢驗項目，並且每家廠商都有再申請國外 PIC/S 認證、TAF 認證、ISO9001 認證，提升品質檢驗之認定。

(二)問卷調查 5 家中藥製造廠原料成本及製造、運送成本：（所得資料依營業秘密方式由本計畫保密）

本計畫「103 年度中藥製藥廠濃縮中藥成本現況調查表」問卷是就製藥廠製造藥品品項、原料品項及成本、製造成本(包含硬體/人力/送驗)及運送成本(原料輸入)之四個重點設計問卷，做為中藥製藥廠執業成本與合理健保給付藥費之參考。問卷初稿經專家效度分析，針對題目提問方式、措詞妥適性及問題與現況比較提出建議修正(附錄二之中藥製藥廠問卷初稿專家效度評估建議)，向五家中藥製藥廠發放問卷調查(問卷詳見附錄六)。

1. 製藥廠問卷基本資料

共回收三間中藥製藥廠問卷，惟部份題目因營業秘密不便提供，其問卷結果分別以 A 製藥廠、B 製藥廠、C 製藥廠代號表示。三間製藥廠年濃縮中藥銷售量均在 500 千公斤以上，濃

縮中藥佔製藥廠營收比率均達 80%以上，102 年生產線及非生產線平均員工數有 128 人(最低 189 人，最多 284 人)。

2. 製藥廠製造成本

(1) 製造成本變動情形

調查製藥廠製造成本中原物料成本、人工成本及製造費用比率，並以 93 年為基準探討近十年來成本變動情形。在 A、B 兩製藥廠其原物料成本佔製造成本五成以上，C 製藥廠則是原物料成本、人工成本及製造費用各佔三成。比較近十年來成本變動結果，發現三家廠商均降低人工成本比率(6%~10%)，A 製藥廠增加製造費用比率 13%，B 製藥廠增加原物料比率 15%，C 製藥廠增加製造費用比率 7%。

(2) 原物料成本

調查原物料成本中藥材、輔料、包材及其他成本所佔比率，其中中藥材佔原物料成本五成以上比率，B、C 兩製藥廠更高達八成以上；其次為包材成本約佔一成比率。

(3) 人工成本

問卷將生產線定義項目含製造、加工及包裝，非生產線定義項目有品管、環境安全、管理及其他，以員工薪資、保險、獎金做人工成本調查。結果三間製藥廠在生產線及非生產線員工數皆各佔五成，而在人工成本比率中 A、B 兩製藥廠，生產線及非生產線所貨成本比率均佔五成，C 製藥廠生產線人工成本佔六成、非生產線四成。

(4) 製造費用成本

製造費用成本中以水電、折舊、燃料費及包裝為主要費用項目，近十年各調查項目所占比率相似。

3. 中藥材進價變動情形

調查製藥廠最常使用之中藥材進價，以 93 年為基準比較進價波動，而 C 製藥廠無 93 年資料以可追溯年 97 年為基準。以單方最常使用之甘草進價為例，102 年相較 93 年平均上漲六成，但相較 97 年則是下跌三成。復方最常使用之加味逍遙散，在 A、B 兩家製藥廠 102 年相較於 93 年進價上漲一倍，而 C 製藥廠 102 年相較於 97 年進價僅上漲 5%。雖然藥材進價有漲有跌，但以長期觀察(93 年為基準)中藥材進價大多是上漲。

4. 合理成本分析

三間製藥廠 100 年-102 年濃縮中藥銷貨成本比例，A、B 兩家製藥廠為 81-90%，C 製藥廠為 71-80%。洽詢會計師依固定成本及變動成本分析之會計原理，雖 A、B 製藥廠稅前獲利 19-10%、C 製藥廠稅前獲利為 21-20%，但需考量成本外之營業費用(管銷、研發)及繳稅金額，其實際獲利更低。

六、邀請中央健康保險署及中醫藥司及專家學者與業界舉辦二場中藥調劑健保合理給付座談會。

(一)於民國 103 年 9 月 5 日召開「研討中醫處方調劑有關藥事服務費之健保合理支付標準座談會」，結論摘要如下（會議紀錄如附錄七）：

1. 健保支付不合理，即便是中醫師調劑支付 10 元也不合理。希望讓有專業能力的人，在可以永續經營的環境下，進場中醫調劑。
2. 計畫想要解決健保同工不同酬的問題，西醫調劑費有 45 元，中醫調劑費才 20 元。中醫師處方怎樣調劑對民眾最好？業界很樂見中醫藥發展好。
3. 中醫也重視國民健康，但中醫請不到藥師，除給付偏低，藥師對中藥專業不足也是原因之一，修習 16 學分不足、缺乏臨床經驗，藥師考試時中醫題目的分數比例低恐怕不足。調劑包含調劑、交付、回應患者問題，中藥調劑不同於西藥，藥師專業能力受質疑，在未具有專業情況下貿然調劑，和我們請非藥師一樣。
4. 不排斥藥師可以調劑中藥，但是藥師團體也應支持中藥專業人員在專業情況下執行調劑。建議有中藥師，比較中國大陸、韓國有韓醫條款，學習他們的法治。
5. 藥師法第 15 條「亦得」經由修習中藥課程達適當標準之藥師為之，是有一個彈性空間。藥事法第 37 條第 4 項有關「監督」立法意旨為何？監督是否一定要兩眼所視，在這條之下，非藥師調劑是不是違法，有討論空間。
6. 中醫醫院藥事學程，除中藥學分還包含醫院實習，在中藥局有完整訓練，完整的調劑包含用藥服務、病人不良反應通報等。而藥局藥師訓練包含藥師、藥學系實習生、中醫系實習生、住院醫師，透過團體學習，醫師也有反應藥師幫忙很多。藥師學習能力上手很快，醫藥整體合作可以協助醫師共同維護病人用

藥權益

7. 醫院藥局滿兩年藥師負責訓練新進藥師，近年培訓具有專業知識可以教導的種子藥師現在有 300 位到 400 位，可以進行中醫藥推廣。
8. 用藥安全專業是一定要的,六年的藥學系應完整中藥調劑訓練。
9. 藥局承接中藥處方，有備藥問題。中藥單復方多，不同廠牌也不一樣，加上藥不可取代，備藥會是一大成本。當病患對處方有問題時，社區藥局藥師如何處理？應在不影響病患回診的情況下規劃。
10. 成本要再細分，包含專業知識成本。擔心怕藥師不能和中醫師的知識連結。在中醫界，病人來看病是因為相信醫師，不是因為藥師，服務費裡有很多是屬於中醫師的成本。
11. 計畫估的調劑費太低了，成本遠超過 50 元。坊間五萬元請不到藥師，並且一間診所不只請一位藥師；設備成本還要包含硬體維護等費用。評估的 40 間診所，可能是生意比較好的狀況，實際可能有出入。
12. 藥事服務費低估，要另外加上折舊及維護需列入報告說明。
13. 建議健保以專案方式外加，不影響總額。
14. 藥師公會全聯會是有合作精神，希望能和中醫師團體合作，維護民眾的用藥安全。
15. 建議向上級長官反應，為何中醫發展不像西醫，目前專業人員只有中醫師？

(二)於民國 103 年 11 月 11 日召開「中藥濃縮製劑合理藥價及中醫處方調劑合理藥事服務費之健保合理支付標準座談會」。研討中醫健保合理支付制度，結論摘要如下（會議紀錄如附錄八）：

1. 如何維持好的濃縮中藥品質，從製藥廠使用好的藥材製造，維持產品的均一性及有效性，讓中醫師使用達到好的醫療效果，提升中醫藥界價值，是需要中醫藥團體共同努力。
2. 健保藥費是醫療機構向健保局申請，包含在中醫健保總額中，藥費雖然沒有調過，但濃縮中藥的價格已經做多次調漲，和健保藥費不同。中醫師公會內部已討論健保藥費多次，建議仍維持藥費 30 元/天，因健保藥費是整體考量並非單一反應藥廠成本，還須考量中醫針灸科、傷科等科別健保給付問題。感謝教

授提供成本資訊，會再向中醫師全聯會內部相關委員會提出討論。

3. 除價格調漲外，濃縮中藥的藥性是中醫師更重視的，近期中醫師公會內部會對濃縮中藥進行有效濃度檢驗，支持優良廠商，希望讓中醫師及民眾使用到好的藥品，保護國民健康。
4. 藥費 30 元沒有調漲，而藥廠藥價的提高表示成本提升讓業界無法負擔。近五年藥材波動漲幅劇烈，以中國官方中藥材指數公開資料，2007 年為基準，2011 藥材漲 2 倍，即使價格回落仍是比之前高，並且藥廠藥價的漲幅是比藥材成本低的。成本負擔提高，製藥廠也不希望屈於成本使用較差的藥材，造成劣幣趨於良幣。讓中醫師使用好的藥也是讓中醫藥界提升品質的一環。
5. 藥品品質回歸基源，之前重視重金屬或黃麴毒素的安全問題，最近開始著重藥材均一性和含量效果。目前國內缺乏中藥指標成份標準品，需要向大陸購買，建議政府可以有相關的檢驗標準品。
6. 藥費包含在中醫總額內，藥費提升會壓迫到其他費用，建議考慮往「差額負擔」的方向思考，由很多單位共同向消費者團體遊說。另外，「差額負擔」的實施需要修健保法。
7. 中華民國藥事品質改革協會是站在消費者立場，從外圍協助提升醫療品質，希望中醫藥界能夠共同討論解決現有問題。本計畫所探討的合理健保藥事服務費及藥費，是希望建立在總額之外做提升，不影響總額。
8. 中醫師公會全聯會支持提升藥品品質，願意和各個團體共同努力說服付費者團體，爭取總額以外的經費。
9. 希望中醫藥各界共同把中醫藥總額增加，大陸在中醫藥 GDP 近 25%而我國才 4%，是需要讓國家重視中醫藥這一塊。贊同從總額之外提升藥費，業者期待健保藥費能夠做調整。
10. 建議藉由不同的管道向中央政府機關表達中醫藥健保給付需要調整，舉辦試辦計畫等方式增加總額外經費，透過每年逐步施行相關政策讓中醫藥界受到重視。
11. 建議讓「中藥」納入「藥品政策全國會議」，中藥也是藥應當要等同西藥有中藥品政策，讓中醫藥更進步。(臺灣製藥工業

同業公會附議，並表示有向「藥品政策全國會議」提出中醫藥司人力不足(含檢驗、查驗登記)的問題) 。

12. 醫療並非行銷，個人認為能由中醫藥司或客觀單位建立一個藥廠產品檢驗項目的公開平台，讓醫師查詢檢驗標準提供給民眾，或讓民眾選擇廠牌是今天提出建議中最重要的。
13. 醫院在採購濃縮中藥一定要求附檢驗報告，在院內教學訓練 PGY 中醫師時，會要求中醫師能夠看懂鑑驗報告，確定藥品安全性，比較各廠牌的優劣。
14. 藥品分級制度是可以嘗試，臺灣民眾拒絕使用不好的產品，如果能夠有公信力的認證向民眾說明，或許是可行的，這需要醫藥界共同努力。
15. 分級制度或許是個說服健保署提升藥價的方法，由中醫藥司和業界合作建立一個中立又有公信力的檢驗機構，提出分級制度的數據向健保署說明。向消費者說服品質需要成本，而要讓民眾感覺到品質差異，建構分級制度的平台是重要的；建議中醫師也能公開藥品使用資訊。
16. 建議中醫藥司公開近年有關中藥品的品質報告研究，讓大家瞭解到中藥有多少比例需要加強，認定中藥有一定品質。

七、整合各界意見，規劃制定健保給付政策建議草案，提供中醫藥司作為建議中央健康保險署修正健保中藥藥費及藥事服務費支付制度，及修正法規政策參考。

(一)整合各界意見，規劃制定健保給付中藥濃縮製劑應比照西藥「藥品費用支出目標制」(Drug Expenditure Target, DET)，以每年固定加成(例如 3%)政策方案，或採取「醫療科技評估」(Health Technology Assessment, HTA)運用於健保收載給付或支付價格調整之替代方案。提供中醫藥司作為建議中央健康保險署修正健保中藥藥費及藥事服務費支付制度。

(二)中醫藥組織變革方面，行政院衛生署 102 年 7 月 21 日署授藥字第 1020003739a 號廢止《行政院衛生署中醫藥委員會組織規程》」，於《衛生福利部處務規程》第 5 條第一項第八款設置中醫藥司，分四科辦事。建議參考大陸藥品監管體系，融合我國現存中西藥分隸制度，在不增加下級機關數目之原則下，將中醫藥司及國立中醫藥研究所合併成立「中醫藥管理署」，專管中醫藥政策法規之研擬及中

藥查驗登記，與食品藥物管理署分立分工，以求中醫藥事權統一。

(三)建議建立「中藥產品分類分級使用管理機制」如下，提供中醫藥司修正法規政策參考：

類別	現行管理方式	建議管理方式	備註
中藥新藥	新藥定義 1. 收載於固有典籍之中藥方劑 (1)新療效（新適應症） (2)新使用途徑（注射劑除外） 2.未收載於固有典籍之中藥方劑 (1) 他國核准藥品（收載於國家藥典或核准藥品上市者） (2)新藥材、藥材新藥用部位 (3)新複方中藥方劑	新藥 IND、NDA 適應症依臨床試驗結果 學名藥 專利期中-同規模臨床試驗 專利過期-處方依據	中藥新藥目前申請尚少(壽美降脂一號、化療漾)
濃縮中藥	依查驗登記審查準則第 86 條之規定	依風險程度再行評估分類	
調劑專用	屬中藥單味濃縮製劑專供調劑使用。	1. 建議取消此分類，儘速組成專家小組，依據安全性再分類為處方藥或指示藥或成藥。 2. 或修正藥品查驗登記審查準則，並增列單方濃縮調劑專用。	

肆、討論

在全民健康保險制度下，醫事服務是藉醫藥分工制度，使醫師於醫療、藥師於藥事，分工合作以服務病人，維護藥品安全及品質，提供病患最充分的用藥諮詢服務，得以雙層檢核為民眾用藥把關(「全民健康保險法」第62、64 條)。惟中醫藥事服務費遠低於西醫，可能造成低價聘用非藥事人員調劑；健保給付中醫門診藥費僅 30 元，其不足處可能由民眾自費負擔或改開立較便宜的藥。

從法律觀點，全民健康保險應對中醫給付具同病同酬及同工同酬之合理性，中西醫門診藥費及藥事服務費支付點數不同，中醫基層之藥事調劑費，如由修習中藥課程達適當標準之藥師調劑者，給付 20 點，遠低於西醫門診一般處方（7 天以內）由特約藥局調劑者，給付 45 點，醫師親自調劑者，給付 11 點，診所聘藥師調劑者，給付 30 點之規定。而本研究發現中醫醫院藥師調劑中醫處方調劑時間成本 56.5 元，即高於現行中醫健保支付藥師服務費，在此情況下，藥師可能考量其差異而選擇不進入中醫門診調劑，亦可能是中醫基層不足以支應聘請合格藥事人員之費用因素之一。

此外，中西醫門診健保藥事服務費，在醫療層級給付上具有支付差異。「全民健康保險醫療服務給付項目及支付標準」第二部第一章第六節調劑通則第七點，規定調劑如超過各醫療層級所分別訂定之合理調劑量，藥事服務費超按支付點數之 50%支付。相同的法源依據下西醫門診得不同醫療層級支付，但中醫門診無醫療層級加成給付。另外，中醫門診調劑濃縮中藥製劑係屬粉劑或散劑，與西藥多為錠劑或膠囊不同，其調劑過程幾與西藥兒科粉劑之調劑作業相同，並且成人所需劑量遠高於小兒劑量。然西醫門診藥事服務費得按小兒劑量加成，未能有比照西藥粉劑作業有加成給付之機制。建議在中醫門診總額品質保證保留款實施方案，比照西醫兒科磨粉支付費用專款專用。

現行健保支付中藥處方藥品調劑費用，係以醫療機構設置標準所認定之中藥調劑人員：中醫師、修習中藥課程達適當標準之藥師為支付對象，目前排除領有研習中藥課程證明書之藥劑生。藥師在六年的藥學系修習 16 學分，進入中醫職場後能快速熟悉，並且職後訓練(如中醫醫院藥事學程)，除中藥學分還包含醫院實習，在中藥局有完整訓練，完整的調劑包含用藥服務、病人不良反應通報等。而藥局藥師訓練包含藥師、藥學系實習生、中醫系實習生、住院醫師，透過團體學習，醫師也有反應藥師幫忙很多。

醫藥整體合作可以協助醫師共同維護病人用藥權益。

本研究以藥師調劑中醫處方調劑時間成本估算藥事服務費是屬低估，健保支付調劑費用，還應考量納入人、作業場所，設備、硬體維護、折舊、租金等費用。然於此低估的情況下，仍是高於現行健保支付標準，顯示應提升中醫健保支付藥事服務費。此外、由具中西藥學專業技能之藥師調劑中醫處方，能在給藥衛教時(包含西藥的藥理、中藥的藥性、食物的食性)，保障民眾中藥用藥安全；尤其，在中西醫整合門診中(中西癌症整合治療)，具中西藥學背景的藥師能瞭解為何醫師開立的目的，其專業成本亦是藥事服務費成本一環。希望專業藥事人員進行中醫服務，提升建備完整中醫醫療體制。

另外，目前健保給付中醫門診藥費僅 30 元，依中藥標準複方調劑為例（24~36 克/日），所需藥費必然超出 30 元，顯示健保給付中醫門診藥費不合理。並且自健保施行後，相關 GMP 中藥廠法規定訂，包含民國 99 年於「藥物製造工廠設廠標準」新增中藥規範及「藥物優良製造準則」，另有多項品管檢測之公告如 97.09.15 署授藥字第 0970003085 號「中藥濃縮製劑含總重金屬之限量」、102.12.26 衛部中字第 1021881313 號「天王補心丹等 22 項中藥傳統製劑含異常物質限量標準及其適用範圍」等提升中藥製藥廠製藥品質。現行中藥申請許可證需進行安全性、有效性等品質檢驗，導致製藥廠製造成本提高，進而影響醫院診所採購藥品之考量，建議應予調整中醫藥費支付標準。

根據中國大陸中藥材天地網(http://www.zyctd.com)所公佈中國藥材市場價格指數，該指數是以綜合 345 味中藥材進行量化測定，以 2007 年為基準，2011 藥材漲 2 倍，即使價格回落仍是比之前高，成本負擔提高，製藥廠也不希望屈於成本使用較差的藥材，造成劣幣趨於良幣。維持好的濃縮中藥品質，建議能提升健保藥費支付，從製藥廠使用好的藥材製造，維持產品的均一性及有效性，除重金屬或黃麴毒素的安全問題，著重藥材均一性和含量效果。建議建立中藥分級制度，由中醫藥司和業界合作建立一個中立又有公信力的檢驗機構，提出分級制度的數據向消費者說服品質需要成本。讓醫師能夠查詢檢驗標準提供給民眾，同時中醫師也應訓練鑑驗報告判讀能力，確定藥品安全性，比較各廠牌的優劣，各界共同維持優良中藥品質。

全民健康保險是以總額支付制度控制醫療費用預算，在總額制度下健保藥費及藥事服務費的提升是需整體考量並非單一反應藥廠成本及藥師薪

資，還須考量中醫針灸科、傷科等科別健保給付問題。故本研究所建議之藥事服務費與藥費是希望建立在總額之外做提升，不影響總額。建議藉由不同的管道向中央政府機關表達中醫藥健保給付需要調整，透過專案申請或試辦計畫等方式增加總額外經費，行有成效後再進行推廣施行相關政策，進而逐步提升健保支付費用，讓中醫藥界受到重視。

伍、結論與建議

一、中醫藥事服務費遠低於西醫，是造成低價聘用非藥事人員調劑最可能的原因。

二、中西醫健保藥事服務費就醫療層級給付不同、中醫調劑係屬粉劑或散劑，與西藥多為錠劑或膠囊不同，其調劑過程幾與西藥兒科粉劑之調劑作業相同，更因成人所需劑量遠高於小兒劑量，調劑時產生大量粉塵，所需調劑設備及儲備空間皆高於西藥，但未能有比照西藥粉劑作業有加成給付之機制。

三、以中醫醫院藥師調劑中醫處方調劑時間成本固算得 56.5 元，未考慮作業場所，設備、硬體維護、折舊、租金等費用以屬低估，建議主管機關應以限調整藥事服務費。

四、藥師調劑中醫處方可能因調劑克數、調劑包數不同造成時間差異。而相同藥品數目之處方箋在各家醫院可能受該醫院藥品櫃、調劑台動向影響調劑時間。

五、目前健保給付中醫門診藥費僅 30 元，依中藥標準複方調劑為例（24~36 克/日），所需藥費必然超出 30 元，並且本研究發現中醫醫院近三年採購價格總上漲 5.4%；中醫診所三年採購價格總上漲 11.8%。

六、100 年-102 中醫醫院單張處方箋藥費成本持平，可能是醫院透過大量採買或與廠商簽訂固定藥費，控制藥費成本，但在中醫診所，發現診所每年需負擔之單張處方箋藥費成本是逐年增加。

七、現行中藥申請許可證需進行安全性、有效性等品質檢驗，導致製藥廠製造成本提高，可能進而影響醫院診所採購藥品之考量。

八、除健保合理給付調劑價格調整外，另可規劃中醫健保給付分級管理制度之對策，如中藥品質分級制度，依製藥廠通過的認證項目、或產品檢驗品項，設定不同給付。

九、提高中醫藥費和藥品調劑費可在協商因素和非協商因素之外的品質提升方案，專案專款專用，可作為醫藥界共同努力的方向。

本計畫依據研究結果，作成下列建議：

一、建議健保給付中藥濃縮製劑費用，比照西藥「藥品費用支出目標制」(Drug Expenditure Target, DET)，或採取「醫療科技評估」(Health Technology Assessment, HTA)運用於健保收載給付或支付價格調整方案，修正健保中藥藥費及藥事服務費支付制度。

二、建議建立「中藥產品分類分級使用管理機制」，包括(複方)「處方藥」及(單方)「調劑專用」，提供中醫藥司修正法規政策參考。

三、中藥之用藥安全專業是必要的，建議藥師團體應評估中藥教育及教學之訓練課程時數、內容，六年的藥學系應完整中藥調劑訓練。

四、建議中醫界應發展專業藥業價值，以及中醫相較於西醫的價值，提升民眾對中醫的觀感。

五、建議健保署瞭解低估藥費之現況，站在健保法同工同酬的目的，思考如何讓中醫藥價格合理，中醫藥環境更進步提昇。

六、中醫醫院藥事學程，除中藥學分還包含醫院實習，在中藥局有完整訓練，完整的調劑包含用藥服務、病人不良反應通報等。

七、建議藉由不同的管道向中央政府機關表達中醫藥健保給付需要調整，舉辦試辦計畫等方式增加總額外經費，透過每年逐步施行相關政策讓中醫藥界受到重視。

八、建議讓「中藥」納入「藥品政策全國會議」，中藥也是藥應當要等同西藥有中藥品政策，讓中醫藥更進步。

九、建立一個藥廠產品檢驗項目的公開平台，讓醫院診所購買藥品可以進行比較，並考慮讓民眾可以自由選擇自己想要的中藥廠牌。

十、建議中藥依品質採取分級給付制度，依製藥廠通過的認證項目或產品檢驗品項，設定不同的給付額。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW103-CMAP-M-114-122411 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. 醫療機構設置標準。
2. 衛生福利部中央健康保險署：99 年全民健康保險醫療統計。
3. 中華民國藥事品質改革協會；中醫門診合理支付制度分析。
4. 中華民國藥事品質改革協會；中醫門診合理支付制度分析。
5. 全民健康保險支付標準。
6. 衛生福利部全民健康保險醫療費用協定委員會第 109 次會議決議。
7. 中草藥產業技術教學資源中心：中草藥產業技術與研發。92 年 12 月出版。P.414。

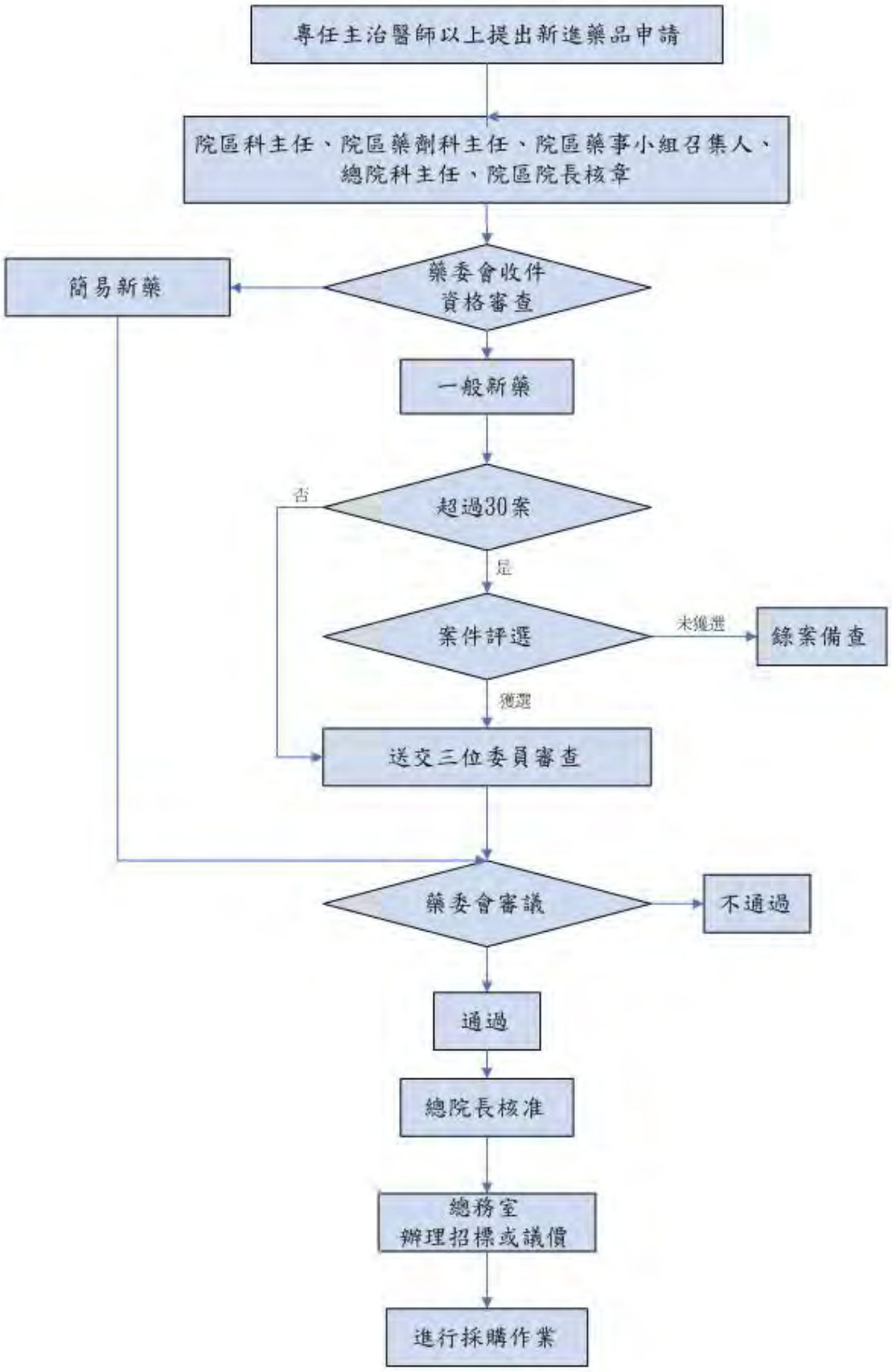
其他參考資料：

1. 衛生福利部：加速中醫藥之科學化與現代化（衛生福利部 2008/06/20 發布新聞）
2. 財團法人醫藥品查驗中心：建立健全之中藥新藥法規環境。
3. 臺灣區製藥工業同業公會：中醫藥法律規章適用及執行查緝宣導教育計畫

相關網頁：

1. WHO http://www.who.int/medicines
2. 立法院法律系統資料庫 http://lis.ly.gov.tw/lgcgi/lglaw

柒、圖、表



圖一、A 醫院新藥申請、審查作業流程。

藥品增列申請作業

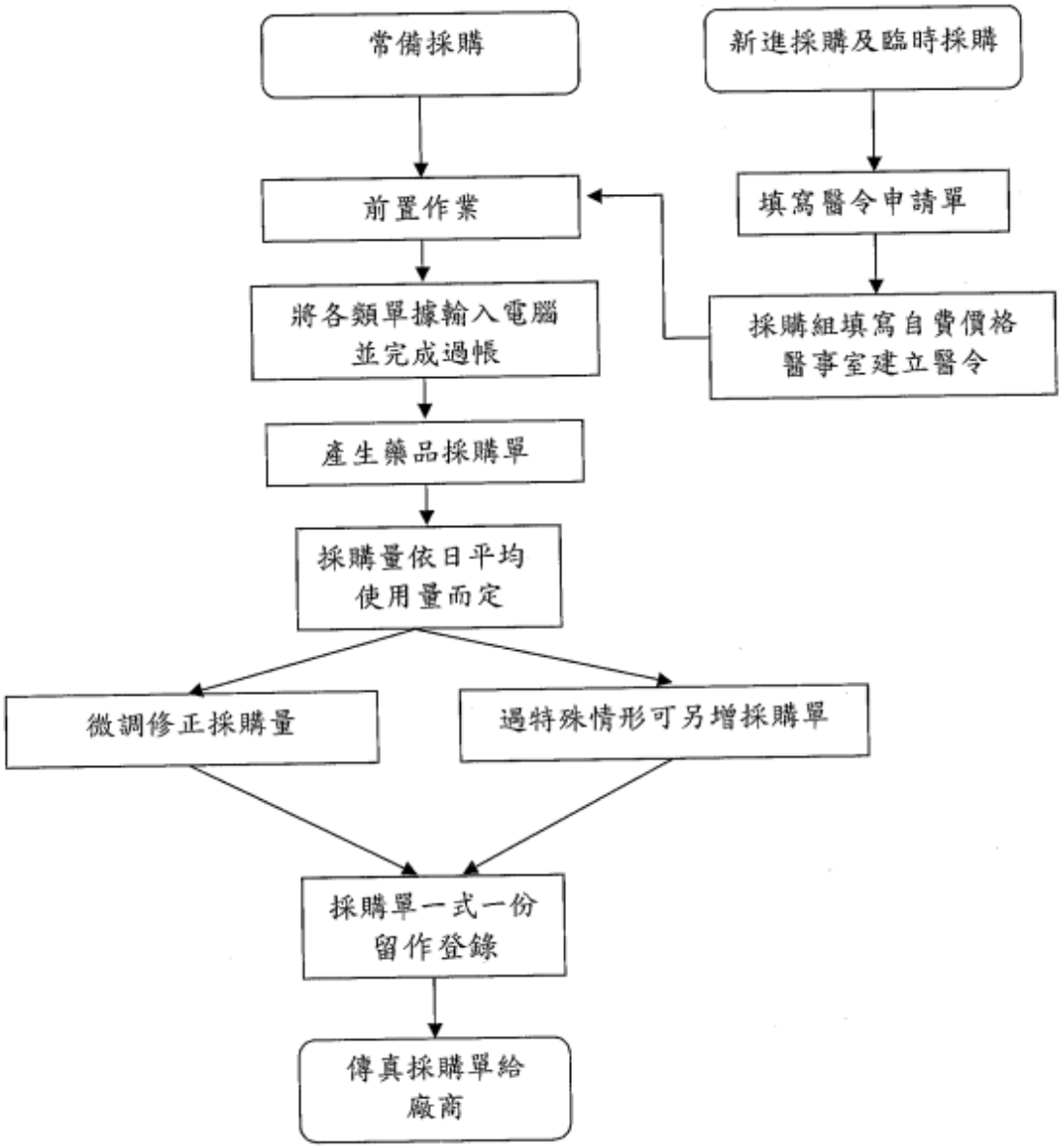
作業流程

1. 申請資料輸入
2. 申請立案及費用資料繳交
3. 收件立案及文件資料審查
4. 行政中心財務管理部行政審查
5. 藥學部專業審查
   (1)新藥審查
   (2)對抗品審查
6. 行政中心財務管理部綜合審查
7. 新藥議價訂約及編碼寄庫
8. 對抗品列入競標及合約採洽前通知報價

臨時採購藥品作業流程

1. 適用範圍：下列藥品須個案呈報主任委員核准後，始得辦理一般採購購入供特定病例使用。
   (1)未依本準則申請及呈准引進常備之藥品
   (2)因競標後停止使用或由其他常備藥取代之藥品，因有特殊病患之醫療使用時。
2. 使用申請
   (1)基於病患之特殊醫療必要而須使用非常備藥品時，應由主治醫師以簽呈依個案提出申請並經科主任同意後，轉送藥學部初審後，呈報藥委會主席複審及呈報主任委員核准。
   (2)簽呈應載明以下資料：
      A. 病患基本資料，包含姓名、病歷號碼及診斷。
      B. 現有常備藥不適用原因及必須使用非常備藥品之具體理由或文獻依據
      C. 申請藥品之品名規格與劑量
      D. 每次預計之處方劑量、使用期間及需要數量。
   (3)藥學部於接獲核准案件後，應於七天內開立請購單辦理一般採購。
3. 非常備藥品之收費檔使用期限依核准使用期間開放，已核准案例因故未於原訂期間使用完畢，需展延使用期間時，由藥學部提出展延申請。

圖二、B 醫院在藥品增列或臨時採購需再進行申請作業。



圖三、C 醫院在藥品增列或臨時採購需再進行申請作業。

表一、「醫療服務給付項目及支付標準」第二部第一章第七節 西醫門診藥費

診療項目	特約藥局	基層院所	支付點數
-門診日劑藥費(每日)			
12歲以上者及12歲（含）以下未處方原瓶包裝口服液劑者	v	v	22
12歲（含）以下處方原瓶包裝口服液劑者			
1種	v	v	31
2種	v	v	37
3種或3種以上	v	v	41

註：(1) 每件給藥日數不得超過3日。

(2)「健保用藥品項查詢－清單」之備註欄位，有「口服液劑（原瓶包裝）」註記者屬原瓶包裝口服液劑藥品。

表二、「醫療服務給付項目及支付標準」第四部第二章 中醫門診藥費

診療項目	支付點數
每日藥費	30

註：(1) 同一疾病或症狀之診治需連續門診者，不得每次只給一日份用藥否則將累計其給藥日數，僅支付第一次就醫之診察費。

(2) 除指定之慢性病得最高給予三十日內之用藥量外，一般案件給藥天數不得超過七日。

表三、「醫療服務給付項目及支付標準」第二部第一章第六節 西醫門診藥事服務費

診療項目	特約藥局	基層院所		地區醫院	區域醫院	醫學中心	支付點數
		醫師自調親劑	藥事人員調劑				
醫院部分							
一般處方給藥（7天以內）					v	v	47
				v			42
慢性病處方給藥13天以內					v	v	47
				v			42
慢性病處方給藥14-27天					v	v	59
				v			52
慢性病處方給藥28天以上					v	v	69
				v			64
診所及藥局部分（每人每日80件內；山地離島地區每人每日100件內）							
一般處方給付（7天以內）	v						45
			v				30
		v					11
慢性病處方給藥14-27天	v						56
			v				32
		v					21
慢性病處方給藥28天以上	v						66
			v				42
		v					32
診所及藥局部分（每人每日81-100件內；山地離島地區每人每日101-120件內）	v		v				15

表四、「醫療服務給付項目及支付標準」第四部第三章 中醫門診藥事服務費

診療項目	支付點數
藥品調劑費	
修習中藥課程達適當標準之藥師調劑	20
中醫師親自調劑	10

註：(1) 未開藥者不得申報藥品調劑費。

(2) 修習中藥課程達適當標準之藥師調劑者，須先報備，經證明核可後申報。

表五、中西醫門診調劑差異

優良藥品調劑作業規範（GDP）	西醫	中醫
第一章 總則 四、本規範所稱**調劑處所**，係指從事調劑處方箋、放置調劑藥品、調劑器具、設備及其他必要物品之場所。	▲	▲ 中藥調劑設備多，需要較大空間。
第一章 總則 五、本規範所稱**調配**，係指調劑作業過程中，依處方箋選取正確藥品、計數正確數量、書寫藥袋或貼標籤、包裝等過程之行為。	▲	▲▲ 中藥分包、包裝耗時更久，程序多。
第一章 總則 六、本規範所稱**調製**，係指調劑作業過程中，基於病患之個別需要，依醫師所開處方箋，改變劑型或配製新製品之行為。	▲	▲▲▲ 調製過程藥品的均勻混合，或是研製，耗時可比西藥兒科粉劑作業。
第三章 環境設施 十三、藥事作業處所設施及其他建築部分應該保持**清潔整齊**，並且能夠保護民眾及**工作人員之安全**。	▲	▲▲▲ 多為粉劑作業，粉塵場所易受潮沾黏，除加強清潔外，還有調劑藥事人員呼吸系統的職業工安危害。
第四章 調劑設備 二十四、調劑處所應視調劑作業需要，備有下列**設備及器具**： 〈一〉應有藥盤、藥匙、符合藥典規定之調劑用水、藥膏板、調藥刀、攪棒、杵、研缽、其他適當器皿、調劑用天平（秤）、量筒或量杯。	▲	▲▲▲ 多為粉劑作業，少量除了西藥的錠劑作業，幾乎悉數需要攪拌機、攪棒、研缽、天平，分包包裝機。
第五章 藥品保存 二十九、藥品之包裝或容器應包括下列各項： 〈一〉應依藥品性質使用適當**材質包裝或容器，避免受到濕氣與光線破壞**，以及傳送、使用當中所帶來的**機械性傷害**。	▲	▲▲ 中藥調劑包裝耗材等同西醫住院單一作業，每次服用量都需有耗材；而中藥又有容易受潮結塊變質特性，調劑耗損成本更多。

附錄一、「中藥濃縮製劑健保藥價評估小組」103 年第一次會議紀錄

中華民國藥事品質改革協會

「中藥濃縮製劑健保藥價評估小組」103 年第一次專家會議紀錄

一、時間：民國 103 年 4 月 2 日（星期三）下午 2 時

二、地點：典藏咖啡館（台北市大同區民權西路 7 號 4 樓）

三、主席：計畫主持人 鄭慧文教授

四、列席指導：衛生福利部中醫藥司游婉如科長、葉翠嵐技士、劉舜華技士

五、出席人員：余萬能常務監事、楊榮季主任、吳宗修主任、謝右文主任、于琳俐主任、王雪玲總經理、李威著總經理、張文靜常務理事、林鴻柱會計師

六、列席人員：洪欣蕙秘書

記錄：洪欣蕙

七、報告事項：

(一) 簡要說明「全民健康保險對於濃縮中藥給付之合理性及對策研究」第二年計畫。

(二) 計畫執行中醫醫療機構問卷初稿。

(三) 計畫訪查中醫醫院調劑中藥處方箋狀況之執行程序。

八、討論事項:

(一)案由：中醫醫療機構使用濃縮中藥問卷調查執行方式。

說明：為了解中醫醫療機構使用濃縮中藥狀況，計畫使用問卷調查調查三家醫院，與北中南東各 10 間中醫診所。

決議：1. 以公文附件問卷，函送三間醫院。

2. 診所部分可依據健保北中南東分區抽取 40 間診所依問卷填寫資料。

(二)案由：中醫醫療機構問卷初稿專家效度評估。

說明：請專家就中醫醫療機構問卷初稿提出建議，修正以符合計畫需求。

決議：1. 醫療機構基於財務機密，無法細項回答藥品單位採購價格，建議刪除，改以詢問 4 月份與全年度藥品採購金額。

2. 相關藥品採購品項數目調查，建議由醫院單位洽調 4 月

表單附於問卷後交回。

3. 增加藥事調劑所需其他成本如場租、硬體器材之成本問題。
4. 題幹直接列舉科別、硬體設備，改以填空方式設計以便填寫。
5. 各專家意見如附件(中醫醫療機構問卷初稿專家效度評估建議)，修正後於 103 年 5 月初發放。

(三)案由：如何調查濃縮中藥成本價格，以計算合理中藥健保給付藥費？

說明：濃縮中藥製造成本提高，健保卻未調整，計畫於期中後會對製藥廠進行製藥成本問卷調查，應調查哪些構面以反應中藥藥費成本？而用藥端調查濃縮中藥使用成本，在健保給付藥費一天 30 元之規定下，診所可能計算每張處方箋用藥量(克數)，收集之資料可能會顯示 30 元是足夠的。

決議：1. 製藥廠成本增加在原料藥材、運費、檢驗項目(包含重金屬、微生物、檢驗人員)以及人工平均薪資支出項目，但健保沒調動過。

2. 建議從原物料、製造成本、檢驗成本、人力薪資調查成本，計算各成本佔總成本之比例。
3. 分析一段時間內成本漲價幅度。以十年為例，從勞委會調查十年基本工時、勞健保支出之人工成本漲幅；中國大陸近年原物料上漲價格；十年內中醫藥司增加檢驗項目及廠商因應調整的檢驗成本。
4. 以上述數據計算中藥製造成本總幅度，向政府提請建議調整健保給付藥費之合理價格。

(四)案由：中醫醫院調劑中藥處方箋狀況之執行程序。

說明：計畫調查三家醫院中醫調劑流程，實際訪查三間醫院各 5 位藥師實測調劑時間，並另問卷調查影響調劑時間之因素。

決議：1. 訪查時間暫訂於 103 年 5 月下午時段，先向醫院通知，現場隨機方式挑選藥師，一間醫院 5 位藥師，以不妨礙藥師調劑進行時間紀錄，完成實測後請藥師填寫問卷。

2. 為感謝接受訪查的藥師配合，支領 1000 元。

九、臨時動議：

案由：未來濃縮中藥或藥材能否一個品項一個價錢，採核實申報的方式？

討論：1. 中藥有單方複方，每家廠商藥材來源不同，很難依同品項計價。

2. 可能改變醫師端用藥方式。

3. 建議參考西藥藥價調查機制。

十、散會（下午 16 時）

中醫醫療機構問卷初稿專家效度評估建議

編號	原題目(含題號)	專家建議
1	2.請問貴機構有幾位藥師？_____	診所會不會擔心填沒有藥師會犯法,所以不答？但我們要瞭解多少處方量需要的人力,建議藥師改成「調劑人員」。
2	4.請問貴機構年平均採買濃縮中藥之總額？	1.改成分年 100 年、101 年、102 年。 2.建議再調查藥材之外的成本，人力薪資、耗材、其他。
3	5.請問貴機構 103 年 4 月的中醫門診量及處方箋數？ 門診科別_____門診量_____ 處方箋數____ 門診科別_____門診量_____ 處方箋數_____ 門診科別_____門診量_____ 處方箋數____ 門診科別_____門診量_____ 處方箋數____ 門診科別_____門診量_____ 處方箋數_____	1.我們醫院科別很多，像中醫內科又可以再細分，我們怎麼填比較符合計畫需求？ 2.同意。並且三間醫院科別不同。 3.健保局都是 30 元不分科，分科的意義？ 4.分科可以呈現各科別的給付狀況。直接寫上主要的科別，再多一個其他。
4	6.請問貴機構 103 年 4 月濃縮中藥材總銷耗量(不含飲片)？ 中藥品項_____數量(單位)_____	1. A.只列六個中藥品項,一定超過使用種類，是怎麼決定填這

	進貨單價_____製造廠商_____ 中藥品項_____數量(單位)_____ 進貨單價_____製造廠商_____ 中藥品項_____數量(單位)_____ 進貨單價_____製造廠商_____ 中藥品項_____數量(單位)_____ 進貨單價_____製造廠商_____ 中藥品項_____數量(單位)_____ 進貨單價_____製造廠商_____ 中藥品項_____數量(單位)_____ 進貨單價_____製造廠商_____	六項？不然，大家都填最貴的。 B.單價調查可以找價目表加權平均數算價錢，例如蒐集 10 家藥廠的價錢平均，大約訂出藥品價錢。基本藥廠賣給診所 7 折，用量大，折扣可能到 6 折，這樣可能比較客觀。 2.藥廠大約給 7 折。另外，舉例來講，要是他簽訂一年，就算中間調漲，也是照賣，我們不做也不行。 3.「進貨單價」醫院恐怕不會給；使用的中藥品項一定超過，還有單方/複方要怎麼填？ 4.刪掉「進貨單價」，醫院部分建議是可以直接給使用藥的表單。
5	7. 請問貴機構中醫門診單張處方箋平均有多少藥品？ □ 1～3 種 □ 4～6 種 □ 7 種以上	同第 8 題，刪掉。
6	8.請問貴機構 103 年 4 月的處方箋平均使用幾種濃縮中藥？ □ 1～3 種 □ 4～6 種 □ 7 種以上	1：針灸科用的藥量少 我們以有到藥局的為主。 2：建議問一張處方箋的藥量，可能不會回答，但可以問看看。 3：中藥包量最大極限 6 公克。 4：診所可能會有總量限制，控制在 30 元以內，自我調整，這個我們可能就沒辦法瞭解。

		5：醫院病人多需求多，都是配合病人狀況。 6：這可能沒辦法提供，可能要資料收集後再除(總藥量/處方箋)。 7：醫院本於良心，還是會有超過成本的! 建議可以用四月資料放大到 12 個月份回推。
7	9.請問貴機構中醫門診處方箋開具藥品是否包含西藥？ □ 是 □ 否	1：中醫門診處方基本上就不會有西藥，就算是中西醫門診，有開西醫就是西醫處方。
8	10.請問貴機構含西藥之處方箋佔總中醫門診處方箋比例？_____	中醫門診沒有西藥，刪除。
9	11.請問貴機構 103 年 4 月的處方釋出率？	醫院沒有釋出。慢箋很少，就算給處方，也不知道他有沒有去抓。
10	12-2 貴機構在採購時有與他家醫療院所共同採購(如：分院、連鎖中藥診所)？ □ 是 □ 否	建議在「是」後面在標註「總院」、「分院」；像我們是總院一起買再出貨到分院。
11	12-3 貴機構如何設定濃縮中藥採購量？ □ 去年藥品實際使用量 □ 庫存量	建議刪除
12	13.請問貴機構今年採購濃縮中藥的數量、價格及製造廠商？ 13-1.中藥品項_____數量_____ 單價/單位_____製造廠商_____ 13-2.請問貴機構今年共計花費多少金額購買濃縮中藥？	建議刪除，採購資訊不太會給。
12	14.請問貴機構 103 年 4 月採購濃縮中藥的數量、價格及製造廠商？	建議刪除，採購資訊不太會給，14-2 題建議以調查全年度的金

	14-1. 中藥品項_____數量_____ 單價/單位_____製造廠商_____ 14-2. 請問貴機構 103 年 4 月共計花費多少金額購買濃縮中藥？_____	額。
13	15.請問貴機構如何決定同品項濃縮中藥材向哪些廠商採購? □價格 □藥品品質 □廠商經營狀況 □廠商生產能力 □廠商技術 □醫師用藥習慣	建議複選，並請排重要順序1234。
14	16.請問貴機構存放濃縮中藥的空間多大？_____	要加單位(平方公尺/坪數)；還有調劑空間可以調查。
15	17.請問貴機構投入中醫門診調劑使用之設備，如磨藥機、混合工具、包藥機有多少？ 設備品項_____數量_____ 設備品項_____數量_____ 設備品項_____數量_____ 設備品項_____數量_____	集思廣益，列舉調劑設備：磨藥機、抽風機、集塵器、攪拌機、冰箱、秤；另加其他由機構填寫。 1.加問設備價錢。 2.不清楚醫院買是買多少，可以和廠商問牌價。 3.建議寫牌價，以利如果以後推到社區藥局使用。 4.建議加上設備的耐用年限
16	18.請問中藥處方箋調劑所需其他如秤紙等成本，平均一年需投入多少金額？	建議再調查藥材之外的成本，人力薪資、耗材、其他。

附錄二、「中藥濃縮製劑健保藥價評估小組」103 年第二次會議紀錄

中華民國藥事品質改革協會

「中藥濃縮製劑健保藥價評估小組」103 年第二次專家會議紀錄

一、時間：民國 103 年 8 月 13 日（星期三）下午 2 時

二、地點：臺北醫學大學教學研究大樓 7 樓會議室 (臺北市信義區吳興街 250 號)

三、主席：計畫主持人 鄭慧文教授

四、列席指導：衛生福利部中醫藥司葉翠嵐技士

五、出席人員：余萬能常務監事、吳宗修主任、王雪玲總經理、李威著總經理、張文靜常務理事、林鴻柱會計師、王莉萱教授

六、列席人員：洪欣蕙秘書、林欣蓉秘書

記錄：洪欣蕙

七、報告事項：

(一) 中醫醫療機構調劑濃縮中藥成本分析結果。

1. 中醫門診處方箋使用濃縮中藥採購成本。
2. 中藥調劑硬體設備成本。
3. 中醫師處方調劑時間成本。

(二) 計畫執行中藥廠濃縮中藥成本問卷初稿。

八、討論事項：

(一)案由：計畫分析單張處方中濃縮中藥藥費、調劑硬體設備及藥師調劑時間成本，是否符合合理建保給付價格？提請討論。

說明：說明單張處方箋藥費成本、單張處方箋設備成本、處方調劑時間成本計算方式不同，研討估算結果是否合適？

決議：1. 中醫醫院與中藥廠購買藥材時，常會是幾年一簽固定藥費，所以藥費上漲沒有反應在醫院單張處方箋藥費成本，中醫診所有增加。

2. 硬體設備成本佔總成本比例低，單張處方箋設備成本因醫院提供設備年限資料產生差異，另有設備維護費用沒列入估算。

3. 藥師調劑時間成本所估每人每日合理調劑量與實際相符。

(二)案由：中醫醫療機構調劑濃縮中藥成本基準為何？

說明：計畫現已估算單張處方成本，但每張處方天數不同給付藥費不同，建議成本分析以「處方天數」為基準，會較「處方單張」適用。

決議：1. 因醫療院所每張處方開具天數資料取得不易，以及藥費採購成本屬營業秘密，故以「處方單張」估算。

2. 故計畫所估成本屬健保合理給付之低標，然現行健保給付不敷所估成本，計畫結果提供主管機關做為提升健保給付標準之依據。

3. 另以不計名方式，保密提供 2 間中醫醫療機構中藥處方箋成本，與計畫所蒐資料合併研討。

(三)案由：中藥廠濃縮中藥成本問卷初稿專家效度評估。

說明：請專家就中藥廠濃縮中藥成本問卷初稿提出建議，修正以符合計畫需求。

決議：1. 第 1-3 題與計畫無關建議刪除，金額與數量問題應加上單位。

2. 中藥廠基於財務機密，無法回答初稿多項金額成本問題，建議以成本比例結構取代。

3. 第 6 題所列藥品，建議改成醫院/診所問卷資料之最常用藥以及高價藥材，呈現中藥原料藥價格成長幅度。

4. 部分題目/詞彙(如品質管理)過於籠統，每間中藥廠可能定義不同難以分辨，建議製造以外之間接成本(品管、修繕、設備...等項)，須再考量本計畫目的斟酌是否列入問卷。

5. 建議計畫瞭解中藥廠近年為解決成本提升(藥材、檢驗成本)所做的改變，如機器代替人力減少人事費及增加製程效率...等，以反應給中央主管機關參考。

6. 各專家意見如附件(中藥廠濃縮中藥成本問卷初稿專家效度評估建議)。

九、散會（下午 16 時）

中藥廠濃縮中藥成本問卷初稿**專家效度評估建議**

原題目(含題號)	專家建議
1.請問貴廠於民國幾年通過GMP認證？	建議刪除。
2.請問貴廠通過GMP生產濃縮中藥品項數？	建議刪除。
3.請問貴廠是否利用原有設備兼製下列商品？ □ 否 □ 食品 □ 化粧品 □ 一般商品	建議刪除。
4.惠請提供近五年貴廠生產之濃縮中藥售價表。	「售價表」是標價，賣給醫院/診所時可能依量有不同的折扣。
5.請問近三年貴廠採購中藥材原料、輔料、包材總金額？	總金額要附單價單位(公斤/新臺幣)以及數量。 1. A.總金額可能不會回答，建議改成比例的方式。 B.輔料、包材建議列舉幾項，如澱粉、標籤、塑膠粒 2.輔料、包材有很多，可能很難回答總金額。
6.惠請提供貴廠近五年以下中藥材原料進口比例及金額(新臺幣千元/公斤) (紅棗、黃耆、當歸、甘草、地黃、川芎、茯苓、白芍、杜仲、枸杞子、涼粉草(仙草)、乾製山藥、檀香)	1. A.雖然這些是有管制的品項，可是像涼粉草(仙草)、檀香是食品使用多，中藥很少使用建議刪掉，其他項目可能要在考慮。 B.「比例」一般我們很難算，金額是單價嗎？要注意。 2.同意刪掉涼粉草(仙草)、檀香。建議可以用最常使用的幾個藥做調查，還有一些高價的藥材如人參、柴胡、酸棗仁、麻黃。這些都沒有調查到，可是影響很大。 3.用計畫調查中醫醫院最常使用

	的三種復方，請中藥廠回答制藥時會用到的藥材近五年的單價，這樣我們可以評估藥的一個漲幅。
7.請問近三年貴廠在濃縮中藥投入下列各項人事費用成本總金額？(製造產線(包含製造、加工、分裝、包裝)、製造產線員工數、品質管理部門人事費、品質管理員工數、環境安全管理建議刪除。人事費、環境安全管理員工數、其它)	
8.請問貴廠為符合GMP標準新配置之濃縮中藥製造硬體設備與成本？	建議刪除。
9.請問近三年貴廠在維護濃縮中藥製造硬體設備之修繕費？	建議刪除。
10.請問貴廠為符合 GMP 標準，在濃縮中藥品質管理上新配置之設備與成本？	建議刪除。
11.請問近三年貴廠製造原料藥委外進行檢驗之費用？	建議刪除。
12.請問近三年貴廠輸入中藥材原料運輸費用？	建議刪除。
13.請問貴廠進口輸入中藥材原料之國家包含 _____？	建議刪除。

附錄三、「103 年度中醫醫療機構(醫院)使用濃縮中藥現況調查表」

103 年度中醫醫療機構(醫院)使用濃縮中藥現況調查表

填表人資料

醫療院所名稱：_____

填表人姓名：_____單位/職稱：_____

聯絡電話：_____ ____ 傳真電話： _____ _ _____

敬請於**民國 103 年 5 月 31 日前置入所附回郵信封**寄回

一、基本資料

1. 請問貴院有幾位中醫師？ _____人

2. 請問貴院專任執行中醫師處方調劑之人員有幾位？

   藥師_____人；非藥師_____人

二、100-102 全年中醫門診量、總處方量？

	100 年	101 年	102 年
中醫門診量(人次)			
總處方量(張數)			

三、100-102 年投入在中醫處方調劑中，下列各成本之金額？

成本	100 年	101 年	102 年
藥品(濃縮中藥)費用			
人力(薪資)			
行政成本(水電、耗材)			
其它(如：_____)			

四、103 年 4 月各科中醫門診量及處方箋數？

科別	門診量	處方箋數
內科		
針灸科		
傷科		
婦兒科		
其它：_____		
其它：_____		

五、惠請提供貴院 103 年 4 月濃縮中藥總銷耗量(不含飲片)資料，資料內容請包含各濃縮中藥品項名稱、總銷耗量(單位)、製造廠商。

編號	濃縮中藥品項名稱	總消耗量(單位)	製造廠商
例	黃連粉	100g	XXXX
1			
2			
3			
4			
5			
6			

*表格不敷使用，請另表黏貼附後，謝謝。

六、中藥調劑作業現況

1. 請問下列幾種處方箋開列藥品種類的比例？

   說明：一個月 100 張處方，開 2 種藥的處方有 5 張(5%)，即[1、2 種]在 20%↓格打勾

藥品種類/單張處方箋	0	20%↓	40%↓	60%↓	80%↓	100%
1、2 種						
3、4 種						
5、6 種						
7、8 種						
9、10 種						
11 種以上						

2. 假設一張處方給付 100 元，您認為應如何合理的分配到各成本上？

藥品(濃縮中藥)費用	人力(薪資)	行政成本(水電、耗材)	其它(如：_____)
_____元	_____元	_____元	_____元

七、 濃縮中藥採購現況

1. 惠請提供貴院在採購濃縮中藥的標準作業流程(如：年度固定採購流程、臨時藥品請購程序等)。

2. 貴院在採購時是否有與其它醫療院所共同採購(如：分院、連鎖中藥診所)？
   □ 是 (貴院為 □總院 □分院) □ 否

3. 請問貴院是否依下列指標決定同一品項之濃縮中藥向該廠商採購？請依指標重要性評分：0 分為無，越高分表示越重要。

指標	0	1	2	3	4	5
價格						
藥品品質						
廠商經營狀況						
廠商生產能力						
廠商技術						
醫師用藥習慣						
其它_____						

4. 貴院中醫門診調劑使用之設備請填入下列表格。

設備名稱	數量	價格(牌價)	耐用年限
磨藥機			
抽風機			
集塵器			
攪拌機			
冰箱			
秤			
其它_____			
其它_____			

感謝您協助完成此份問卷調查，如對健保中藥給付有任何建議請於下方空白處填寫：

_____

_____

_____

_____

附錄四、「103 年度中醫醫療機構(診所)使用濃縮中藥現況調查表」

103 年度中醫醫療機構(診所)使用濃縮中藥現況調查表

診所資料

診所行政區為 □北臺灣 □中臺灣 □南臺灣 □東臺灣

北臺灣：臺北市、新北市、基隆市、桃園縣、新竹縣、新竹市、苗栗縣
中臺灣：台中市、彰化縣、南投縣、雲林縣、嘉義縣市
南臺灣：臺南市、高雄市、屏東縣
東臺灣：花蓮縣、臺東縣、宜蘭縣

一、基本資料

1. 請問診所有幾位中醫師？ _____人

2. 請問診所今年有申請藥事服務費嗎？

□ 有 □ 無

二、100-102 全年中醫門診量、總處方量？

	100 年	101 年	102 年
中醫門診量(人次)			
總處方量(張數)			

三、100-102 年投入在中醫處方調劑中，下列各成本之金額？

	100 年	101 年	102 年
藥品(濃縮中藥)費用			

四、103 年 4 月中醫門診量及處方箋數？

門診量(人次)：_____

處方箋數(張數)：_____

五、惠請提供診所 103 年 4 月濃縮中藥總銷耗量(不含飲片)資料，資料內容請包含各濃縮中藥品項名稱、總銷耗量(單位)、製造廠商。

編號	濃縮中藥品項名稱	總消耗量(單位)	製造廠商
例	黃連粉	100g	XXXX
1			
2			
3			
4			
5			
6			

*表格不敷使用，請另表黏貼附後，謝謝。

六、中藥調劑作業現況

1. 請問下列幾種處方箋開列藥品種類的比例？

說明：一個月 100 張處方，開 2 種藥的處方有 5 張(5%)，即[1、2 種]在 20%↓格打勾

藥品種類/單張處方箋	0	20%↓	40%↓	60%↓	80%↓	100%
1、2 種						
3、4 種						
5、6 種						
7、8 種						
9、10 種						
11 種以上						

感謝您協助完成此份問卷調查，如對健保中藥給付有任何建議請於下方空白處填寫：

_____

_____

_____

_____

附錄五、「實測記錄單」

1 醫院編號：B　調劑藥師編號：B-1　檯號：_____ 處方箋藥號：_____記錄員：_____ 日期：_____

103 年度中醫醫療機構(醫院)濃縮中藥調劑實測記錄單

受試門診時段：_____

※ 依序下列法定調劑行為記錄時間(時:分:秒)，於結束後拍照留存處方資料。
只實測濃縮中藥調劑，含飲片之處方不進行實測

取得處方箋　(時間:00:00:00)

確認處方義務 → *處方有疑問詢問醫師(時間:___:___:___)*

依方取藥義務-調劑　(時間:___:___:___)

完成調劑　(時間:___:___:___)

核對/發藥藥師編號：_____

再次核對　(時間:___:___:___)

配藥有疑問詢問藥師 (時間:___:___:___)

處方有疑問詢問醫師 (時間:___:___:___)

於另一張記錄單接續記錄調劑藥師取得處方箋重新調配時間，與本張合計。

醫師回覆 (時間:___:___:___)

核對結束通知病患領藥(時間:___:___:___)

藥品交付　(時間:___:___:___)

□藥袋標示義務

□確認領受人詢問義務

□充分說明義務

其它影響調劑時間之突發事件，於此記載：

病人領藥離開　(時間:___:___:___)

附錄六、「103 年度中藥製藥廠濃縮中藥成本現況調查表」

103 年度中藥製藥廠濃縮中藥成本現況調查表

填表人資料

中藥製藥廠名稱：_____

地　　址：_____

聯絡電話：_____；傳真電話：_____

填 表 人：_____填寫人單位/職稱：_____

一、貴廠員工數

項目/人數	93 年	100 年	101 年	102 年
生產線 (製造、加工、包裝)				
非生產線(品管、環境安全、管理、其他)				
合　　計				

二、貴廠原物料成本比率　(每年加總為 100%)

項目/佔比	93 年	100 年	101 年	102 年
中藥材 (主成分)				
輔料 (賦形劑、香料等)				
包材 (容器、包裝、標仿單)				
其他 (請填寫_____)				
合　　計	100 %	100 %	100 %	100 %

三、貴廠人工成本比率　(每年加總為 100%)

項目/佔比		93 年	100 年	101 年	102 年
生產線 (製造加工包裝)	薪資				
	保險				
	獎金				
非生產線 (品管檢驗環境安全)	薪資				
	保險				
	獎金				
合　　計		100%	100%	100%	100%

四、貴廠製造費用所佔比率　(每年加總為 100%)

項目/佔比	93 年	100 年	101 年	102 年
水電				
租金				
設備儀器修繕				
折舊				
運輸				
人事(不含第三項人工成本)				
其他 (請填寫占比 5%以上名稱_____)				
合計	100%	100%	100%	100%

備註：若「其他」項目所佔比率超過 5%請列明項目名稱，無者免填。

五、中藥材進價之增減幅

請列出貴廠最常使用之中藥材十種其進價，以民國 93 年為基準，各年與 93 年比較之增/減幅百分比。

品項/增減幅百分比	93 年	98 年	100 年	102 年
例：山楂	100	+20%	-15%	+105%
1.	100			
2.	100			
3.	100			
4.	100			
5.	100			
6.	100			
7.	100			
8.	100			
9.	100			
10.	100			

請列出貴廠最常生產(或生產數量最多)之複方濃縮中藥十種，以民國 93 年為基準，各年與 93 年比較之增/減幅百分比。

品項/增減幅百分比	93 年	98 年	100 年	102 年
例：加味逍遙散	100	+20%	-15%	+105%
1.	100			
2.	100			
3.	100			
4.	100			
5.	100			
6.	100			
7.	100			
8.	100			
9.	100			
10.	100			

六、貴廠製造成本

請問下列各項成本所佔比率　(每年加總為 100%)

項目/佔比	93 年	100 年	101 年	102 年
原物料成本				
人工成本				
製造費用				
合計	100%	100%	100%	100%

請勾選下列各項成本金額範圍

項目	金額	例：99 年	100 年	101 年	102 年
原物料成本	500 萬以下				
	501 萬-1,000 萬	V			
	1,001 萬以上				
人工成本	500 萬以下				
	501 萬-1,000 萬	V			
	1,001 萬以上				
製造費用	500 萬以下				
	501 萬-1,000 萬	V			
	1,001 萬以上				

七、貴廠濃縮中藥營業額

請勾選 100-102 年濃縮中藥佔貴廠營收比率

年\比率	20%以下	21-40%	41-60%	61-80%	80%以上
100 年					
101 年					
102 年					

請問 100-102 年貴廠濃縮中藥營業額

年	營業額
100 年	_____億_____千萬
101 年	_____億_____千萬
102 年	_____億_____千萬

請勾選 100-102 年貴廠濃縮中藥銷售量 (單位：千公斤)

年\銷售量	100 以下	100-300	300-500	500 以上
100 年				
101 年				
102 年				

八、貴廠濃縮中藥銷貨成本

請勾選 100-102 年濃縮中藥銷貨成本比率

年\比率	60%以下	61-70%	71-80%	81-90%	91%以上
100 年					
101 年					
102 年					

謝謝您協助完成此份問卷調查，如對健保中藥給付有任何建議請於下方空白處填寫：

附錄七、「研討中醫處方調劑有關藥事服務費之健保合理支付標準座談會」會議紀錄

中華民國藥事品質改革協會
103 年「研討中醫處方調劑有關藥事服務費之健保合理支付標準座談會」會議紀錄

一、時間：民國 103 年 9 月 5 日（星期五）下午 2 時

二、地點：衛生福利部 203 會議室 (臺北市南港區忠孝東路 6 段 488 號 2 樓)

三、主席：計畫主持人 鄭慧文教授

四、指導機關：衛生福利部中醫藥司

五、出席人員：中華民國中醫師公會全國聯合會
中華民國藥師公會
臺灣製藥工業同業公會
勝昌製藥廠股份有限公司
順天堂藥廠股份有限公司
臺北醫學大學
新北市立聯合醫院藥劑部
臺北市立聯合醫院藥劑部中藥組
瑞智聯合會計師事務所

六、列席人員：洪欣蕙秘書

記錄：洪欣蕙

七、討論主題：

(一) 中醫處方調劑之品質與成本。

(二) 研討中醫處方調劑之藥事服務費健保合理支付標準。

(三) 處方釋出至藥局是否得申報調劑中醫師處方之健保支付。

(四) 專家意見交流。

八、簡報：中醫師處方調劑資料收集及分析初步結論

九、討論重點：

(一) 1. 中醫也重視國民健康，但中醫請不到藥師，除給付偏低，藥師對中藥專業不足也是原因之一，修習 16 學分不足、缺乏臨床經驗；調劑包含調劑、交付、回應患者問題，中藥調劑不同於西藥，藥師專業

能力受質疑，在未具有專業情況下貿然調劑，和我們請非藥師一樣。

2. 不排斥藥師可以調劑中藥，但是藥師團體也應支持中藥專業人員在專業情況下執行調劑。
3. 藥局承接中藥處方，有備藥問題。中藥單復方多，不同廠牌也不一樣，加上藥不可取代，備藥會是一大成本。
4. 評估的 40 間診所，可能是生意比較好的狀況，實際可能有出入。
5. 中醫欠缺一個專業的環境，影響民眾對中醫的信賴度。錢還是必須來自於專業，藥師修習 16 學分後，沒有進入中醫執行業務，沒有使用自然生疏，即便再進場，其專業是質疑的。

(二) 1. 中醫醫院藥事學程，除中藥學分還包含醫院實習，在中藥局有完整訓練，完整的調劑包含用藥服務、病人不良反應通報等。
2. 藥局藥師訓練包含藥師、藥學系實習生、中醫系實習生、住院醫師，透過團體學習，醫師也有反應藥師幫忙很多。
3. 藥師在學校基礎有充足知識、實習。藥師學習能力上手很快，醫藥整體合作可以協助醫師共同維護病人用藥權益。
4. 在我們藥局滿兩年藥師負責訓練新進藥師，近年培訓具有專業知識可以教導的種子藥師現在有 300 位到 400 位，可以進行中醫藥推廣。

(三) 1. 健保支付不合理，即便是中醫師調劑支付 10 元也不合理。希望讓有專業能力的人，在可以永續經營的環境下，進場中醫調劑。
2. 建議健保以專案方式外加，不影響總額。
3. 就用藥安全專業是一定要的，六年的藥學系應完整中藥調劑訓練。
4. 藥事服務費低估，要另外加上折舊及維護，皆列入期末報告說明。

(四) 1. 計畫估的調劑費太低了，成本遠超過 50 元。坊間五萬元請不到藥師，並且一間診所不只請一位藥師；設備成本還要包含硬體維護等費用。
2. 藥師法第 15 條「亦得」經由修習中藥課程達適當標準之藥師為之，是有一個彈性空間。
3. 藥師對中藥不熟悉，是體制問題，修習 16 學分不足以讓藥師在臨床面對病患；藥師考試時中醫題目的分數比例低，這恐怕是不夠的。
4. 當病患對處方有問題時，社區藥局藥師如何處理？應在不影響病患回診的情況下規劃。

(五) 1. 藥事法第 37 條第 4 項有關「監督」立法意旨為何？監督是否一定要兩眼所視，在這條之下，非藥師調劑是不是違法，有討論空間。

2. 建議有中藥師，比較中國大陸、韓國有韓醫條款，學習他們的法治。

(六) 藥師公會全聯會是有合作精神，希望能和中醫師團體合作，維護民眾的用藥安全。

(七) 1. 建議向上級長官反應，為何中醫發展不像西醫，目前專業人員只有中醫師？

2. 中西醫整合不容易，醫師不能肯定建議民眾看中醫或西醫。我贊同因為現在的情況，所以執行這項計畫，但回歸中醫界、民眾的需求，中醫藥界需要是一個專業的人。

3. 成本要再細分，包含專業知識成本。我不擔心藥師會不會調劑，是怕藥師不能和中醫師的知識連結。在中醫界，病人來看病是因為相信醫師，不是因為藥師，服務費裡有很多是屬於中醫師的成本。

4. 建議中醫界建立一個醫藥知識平台，再討論社區藥局接中醫處方的成本。

(八) 1. 中醫師處方怎樣調劑給民眾會是最好？西醫調劑費有 45 元，中醫調劑費才 20 元。

2. 這個計畫是想要處理健保同工不同酬的問題，即便低估，還是高於現行狀況。

3. 如果中醫藥發展好，業界也是很樂見。

十、主管機關評論：

1. 政府一直在努力，怎麼在臺灣民眾健康的基礎上，讓中醫藥有個合理的功能和角色。

2. 今天的議題各個團體關注不同，任何課題都會有不同的衝擊，整體是希望大家能共同努力。

3. 中醫藥司希望讓民眾感受中醫藥的角色與專業性在進步，整個相關專業團體是互動多元。

十一、結論

1. 建議藥師團體應評估中藥教育及教學之訓練課程時數、內容。

2. 希望反映專業藥業價值，以及中醫相較於西醫的價值，提升民眾對中醫的觀感。

3. 本計畫服務費之評估，確實有低估情形，但係以起碼的作業人員條件為評估基礎，希望健保署瞭解現況，站在健保法同工同酬的目的，思考如何讓中醫藥更進步。

4. 所估成本偏低，會將仍需再進一步評估之項目，寫在報告裡。

5. 各位專家建議，列入本計畫建議事項，提供衛生福利部中醫藥司參考。

十一、散會（下午 16 時 40 分）

附錄八、「研議中藥濃縮製劑合理藥價及中醫處方調劑合理藥事服務費之健保合理支付標準座談會」會議紀錄

中華民國藥事品質改革協會
103 年「研議中藥濃縮製劑合理藥價及中醫處方調劑合理藥事服務費之健保合理支付標準座談會」會議紀錄

一、時間：民國 103 年 11 月 11 日（星期二）下午 2 時

二、地點：衛生福利部 207 會議室 (臺北市南港區忠孝東路 6 段 488 號 2 樓)

三、主席：計畫主持人 鄭慧文教授

四、指導機關：衛生福利部中醫藥司

五、出席人員：中華民國中醫師公會全國聯合會
中華民國藥師公會全國聯合會
臺灣製藥工業同業公會
勝昌製藥廠股份有限公司
順天堂藥廠股份有限公司
臺北醫學大學
臺北市立聯合醫院藥劑部中藥組
瑞智聯合會計師事務所

六、列席人員：洪欣蕙秘書、何欣蓉秘書

記錄：洪欣蕙

七、討論主題：

(一) 研議中藥濃縮製劑之品質與成本。

(二) 研議中醫健保合理藥費支付標準。

(三) 研議中醫處方調劑之藥事服務費健保合理支付標準。

(四) 專家意見交流。

八、簡報：中藥濃縮製劑品質與成本資料收集及分析初步結論

九、討論重點：

(一) 研議中藥濃縮製劑之品質與成本

1. 健保藥費是整體考量並非單一反應藥廠成本，還須考量中醫針灸科、傷科等科別健保給付問題。感謝教授提供成本資訊，會

再向中醫師全聯會內部相關委員會提出討論。

2. 中華民國藥事品質改革協會是站在消費者立場，從外圍協助提升醫療品質，希望中醫藥界能夠共同討論解決現有問題。
3. 中醫師公會內部已討論健保藥費多次，建議仍維持藥費 30 元/天，同意以總額外加的方式提升藥費。
4. 除價格調漲外，濃縮中藥的藥性是中醫師更重視的，近期中醫師公會內部會對濃縮中藥進行有效濃度檢驗，支持優良廠商，希望讓中醫師及民眾使用到好的藥品，保護國民健康。
5. 中醫師公會全聯會支持提升藥品品質，願意和各個團體共同努力說服付費者團體，爭取總額以外的經費。
6. 藥費 30 元沒有調漲，而藥廠藥價的提高表示成本提升讓業界無法負擔。
7. 藥品品質回歸基源，之前重視重金屬或黃麴毒素的安全問題，最近開始著重藥材均一性和含量效果。目前國內缺乏中藥指標成份標準品，需要向大陸購買，建議政府可以有相關的檢驗標準品。
8. 「中藥」現在是個法律用詞，當民眾從民間取得非衛生福利部合格廠商製程的中藥產生問題時，可能造成民眾對中藥的信心動搖。
9. 建議定義「濃縮」的意義，是指比飲片少還是便利的調劑系統？以確立濃縮中藥的定位。

(二) 研議中醫健保合理藥費支付標準

1. 健保藥費是醫療機構向健保局申請，包含在中醫健保總額中，藥費 30 元雖然沒有調過，但濃縮中藥的價格已經做多次調漲，和健保藥費是不同的。
2. 本計畫所探討的合理健保藥事服務費及藥費，是希望建立在總額之外做提升，不影響總額。
3. 近五年藥材波動漲幅劇烈，以中國官方中藥材指數公開資料，2007 年為基準，2011 藥材漲 2 倍，即使價格回落仍是比之前高，並且藥廠藥價的漲幅是比藥材成本低的。
4. 成本負擔提高，製藥廠也不希望屈於成本使用較差的藥材，造成劣幣趨於良幣。讓中醫師使用好的藥也是讓中醫藥界提升品質的一環。

5. 贊同從總額之外提升藥費，業者期待健保藥費能夠做調整。
6. 藥費包含在中醫總額內，藥費提升會壓迫到其他費用，建議考慮往「差額負擔」的方向思考，由很多單位共同向消費者團體遊說。另外，「差額負擔」的實施需要修健保法。
7. 業者能瞭解中醫總額給付是與西醫、牙醫等其他單位競爭，總額提升是間接影響藥廠。濃縮中藥的價錢在單味是隨藥材波動調降，不會一直維持在高價。

(三) 專家意見交流

1. 個人贊同中醫藥應被管理，但建議政策施行先將相關資料知會中醫師公會全國聯合會，由我們中醫師能夠適時地提出建議。
2. 同意中藥納入「藥品政策全國會議」，臺灣製藥工業同業公會有向該會議提出中醫藥司人力不足(含檢驗、查驗登記)的問題。
3. 醫療並非行銷，個人認為能由中醫藥司或客觀單位建立一個藥廠產品檢驗項目的公開平台，讓醫師查詢檢驗標準提供給民眾，或讓民眾選擇廠牌是今天提出建議中最重要的。
4. 藥品分級制度是可以嘗試，臺灣民眾拒絕使用不好的產品，如果能夠有公信力的認證向民眾說明，或許是可行的，這需要醫藥界共同努力，建議報告內容關「落實醫藥分業」的文字使用不用這麼對立。
5. 希望中醫藥各界共同把中醫藥總額增加，大陸在中醫藥 GDP 近 25%而我國才 4%，是需要讓國家重視中醫藥這一塊。
6. 分級制度或許是個說服健保署提升藥價的方法，由中醫藥司和業界合作建立一個中立又有公信力的檢驗機構，提出分級制度的數據向健保署說明。
7. 應當向消費者說服品質需要成本，而要讓民眾感覺到品質差異，建構分級制度的平台是重要的，同時也建議中醫師公開藥品使用資訊。
8. 提供部分意見參考，醫院在採購濃縮中藥一定要求附檢驗報告，在院內教學訓練 PGY 中醫師時，是要要求中醫師能夠看懂鑑驗報告，確定藥品安全性，比較各廠牌的優劣。

十、結論

1. 如何維持好的濃縮中藥品質，從製藥廠使用好的藥材製造，維持產品的均一性及有效性，讓中醫師使用達到好的醫療效果，

提升中醫藥界價值，是需要中醫藥團體共同努力。

2. 建議藉由不同的管道向中央政府機關表達中醫藥健保給付需要調整，舉辦試辦計畫等方式增加總額外經費，透過每年逐步施行相關政策讓中醫藥界受到重視。
3. 建議讓「中藥」納入「藥品政策全國會議」，中藥也是藥應當要等同西藥有中藥品政策，讓中醫藥更進步。
4. 建議中醫藥司公開近年有關中藥品的品質報告研究，讓大家瞭解到中藥有多少比例需要加強，認定中藥有一定品質。
5. 各位專家建議，列入本計畫建議事項，提供衛生福利部中醫藥司參考。

十一、散會（下午 15 時 30 分）

編號：MOHW104-CMAP-M-114-000417

「提升中醫醫療照護品質類」建立民俗調理業服務禮券管理模式委託辦理計畫

葉慶元
泰鼎法律事務所

摘　要

民國 99 年起不具醫療效能之傷科推拿整復以無須由中醫師親自實施；民國 100 年按摩業之視障者就業限制解除，社會上按摩服務等從事民俗調理行為之商家、業者如雨後春筍般冒出，為因應新型態之網路服務崛起，各商家亦紛紛推出新型式之商業手段，尤其又以服務（消費）禮券為大宗，社會上亦常見因禮券契約條款不符中央主管機關所訂規範，所衍生之消費糾紛。

依消費者保護法規定，中央主管機關得就各主管行業訂立「定型化契約之應記載事項及不得記載事項」，並得不定時查核落實情形，我國於民國 100 年以前，因法律限制按摩服務業，僅得由視障者從事之，勞委會亦曾就此訂立服務禮券定型化契約之應記載事項及不得記載事項，惟因大法官解釋認定按摩服務業僅得由視障者從事之規定不符憲法保障人權意旨使其全面開放，從而由勞委會針對視障者按摩所訂定公布之「按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項」已有重新訂定之必要，加以衛福部將不具醫療效能之按摩、推拿等行為均認定為民俗調理行為，觀之法令現況，實有必要訂立民俗調理業服務禮券定型化契約之應記載事項及不得記載事項，並就中央主管機關之查核、管理模式提出建議，以維消費者權益。

本所將透過文獻探討，整理我國學者專家發表文章、碩博士論文、判決及實務見解，自民事法、消保法角度，就定型化契約重要議題予以分析研究，摘要重點、結論與建議；並就各行業之目的事業主管機關所頒定之定型化契約應記載及不得記載事項予以彙整及類型化，進而歸納及分析各產業定型化契約之規範。是針對服務業禮券民俗調理業之特性，並透過召開審查會議及業界說明會，彙整專家學者及實務界業者之觀點及意見後，研擬「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項」，並建立民俗調理業服務禮券管理模式。

關鍵詞：民俗調理業、消費者保護法、定型化契約、服務（消費）禮券、應記載事項及不得記載事項

Number: MOHW104-CMAP-M-114-000417

The Improvement of Quality of Medical Care in Traditional Chinese Medicine

Chin-Yuan Yeh
Titan Attorneys-at-Law

ABSTRACT

In 2010, Chiropractic was no longer required to be performed by traditional Chinese physicians; similarly in 2011, the massage business was no longer restricted to the visually impaired.

As the competition became heated, new marketing methods were introduced to the business. Among them, gift certificates are the most popular way to promote business; unfortunately, this also resulted in many consumer disputes because the standard contract term are often not in line with government regulations.

According to the Consumer Protection Act, the competent authority of central government may promulgate mandatory and prohibitory provisions to be included in standard contracts, and supervise implement anytime. Before 2011, only those visually impaired could engage in massage business. The Ministry of Labor had promulgated mandatory and prohibitory provisions in standard contracts for massage service certificates in 2009 （“the regulations for certificates and managements persons with visual impairments engaging in massage or physical therapy massage.”）

The regulations for certificates and managements concerning persons with visual impairments engaging in massage or physical therapy massage provisions became invalid in 2011 because of two reasons:

1. The Judicial Yuan Interpretation No.649 ruled that “visually-impaired only” restriction violated the right to equality protected under the Constitution.
2. The Ministry of Health and Welfare also distinguished without medical efficacy, such as massage and naprapathy, shall not be considered as medical treatment.

We will review and analyze issues presented in periodicals, commentaries, judgments and practical insights, and provide suggestions based on, among others, the

Civil Code and Consumer Protection Act. In addition, we will categorize the sample standard contracts promulgated by competent authorities in order to analyze the regulation of standard contracts of various industries. Moreover, we will hold seminars and panel discussions to collect opinions from scholars, experts and industry representatives, then draft the regulation for “mandatory and prohibitory provisions to be included in standard contracts of service certificates of folk remedy industry”, and suggest a management model for service certificates of folk remedy industry.

Keywords: traditional physical management, Consumer Protection Act, standard contracts, goods (services) certifacates, mandatory and prohibitory provisions

壹、前言

一、背景

查「民俗調理」行為意指以紓解筋骨、消除疲勞為目的，單純運用手技對人施以傳統整復推拿、按摩、腳底按摩、指壓、刮痧、拔罐，或使用民間習用之青草泥、膏、液狀外敷料所為之非醫療行為。（參民俗調理業管理規範第 2 條）

其中，傳統整復推拿，常與具有一定醫療效能之傷科推拿整復混淆。依照醫師法規定，具有醫療效能之傷科推拿整復需由具醫師執照之中醫師為之。然而於民國 99 年監察院提出糾正案以前，實務上均默認於中醫院所內，依中醫師指示，再由不具醫師資格之推拿助理或技術員從事傷科推拿整復，實務運作上，便形成中醫師進行初步看診，後續即交由推拿技術員或助理獨立判斷推拿行為，實難以達到醫師把關之功能，是於 99 年監察院糾正後，行政院衛生署立即作出回應，要求傷科推拿整復僅限於醫療行為，由非醫師從事之非醫療行為宜退出診所，並建議改稱「按摩」或「民俗調理按摩」。[1]前者為醫療法上規定之醫療行為，得由具執照之醫師為之，後者則為不具醫療效能之民俗調理行為，須退出醫療院所，行政院衛生署並於 101 年將民俗調理行為限定於非醫療行為，明確劃分醫療行為與非醫療行為之民俗調理行為。

且最高法院於 92 年台上字第 1746 號民事判決認定醫療行為不適用消費者保護法之規定，將醫療行為限縮排除於消保法之適用範圍外，另依照醫療法第 61 條規定及行政院衛生署 94 年 3 月 17 日衛署醫字第 0940203047 號函內容，醫療行為不得以發行禮券方式招攬客人。依此，在行政院衛生署已明確劃分醫療行為與非醫療行為下，非醫療行為之民俗調理業當可發行禮券為招攬客戶。

而民俗調理業之前身「按摩業」，於民國 97 年以前，依照身心障礙者權益保障法（原身心障礙者保護法）規定僅限於由「視障行為者」從事，非視障者不得從事按摩行為。而當時行政院勞委會亦就此頒布「按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項」，此即為民俗調理業者服務禮券定型化契約規範之濫觴。惟 97 年司法院大法官釋字第 649 號解釋，認定該條款違反憲法平等權、工作權及比例原則而違憲，並命限期失效；立法院旋即通過修法，於 100 年 10 月 31 日開放非視障者亦得從事按摩業，至於

[1] 行政院院臺衛字第 0990022334 號函。

前所頒布之「按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項」亦隨之失效，導致目前並無針對按摩業或民俗調理業者發行之服務禮券定型化契約之規範，故為使民俗調理業者發行之服務禮券定型化契約能導入正軌，實有對該行業行為予以規範之必要。2

二、民俗調理業禮券定型化契約規範之現況

按主管機關得就管理事業訂立定型化契約之應記載及不得記載之事項，此消費者保護法第 17 條定有明文：「中央主管機關為預防消費糾紛，保護消費者權益，促進定型化契約之公平化，得選擇特定行業，擬訂其定型化契約應記載或不得記載事項，報請行政院核定後公告之。前項應記載事項，依契約之性質及目的，其內容得包括：一、契約之重要權利義務事項。二、違反契約之法律效果。三、預付型交易之履約擔保。四、契約之解除權、終止權及其法律效果。五、其他與契約履行有關之事項。（第一項）第一項不得記載事項，依契約之性質及目的，其內容得包括：一、企業經營者保留契約內容或期限之變更權或解釋權。二、限制或免除企業經營者之義務或責任。三、限制或剝奪消費者行使權利，加重消費者之義務或責任。四、其他對消費者顯失公平事項。（第二項）違反第一項公告之定型化契約，其定型化契約條款無效。該定型化契約之效力，依前條規定定之。中央主管機關公告應記載之事項，雖未記載於定型化契約，仍構成契約之內容。企業經營者使用定型化契約者，主管機關得隨時派員查核。（第三項）」同法施行細則第 15 條並進而規定：「定型化契約記載經中央主管機關公告應記載之事項者，仍有本法關於定型化契約規定之適用。中央主管機關公告應記載之事項，未經記載於定型化契約者，仍構成契約之內容。」

次按，中央主管機關針對各該行業頒定之定型化契約之應記載及不得記載之事項，其效力如同法規命令，縱業者未定於契約內，仍視同契約內容，其不得記載卻記載於條款內，則為無效，同法第 17 條及施行細則第 15 條定有明文，此並有法務部 95 年 9 月 21 日法律字第 0950035512 號函意旨可稽：「消費者保護法第 17 條第 1 項所定『定型化契約記載事項』屬行政程序法所稱『法規命令』。」

末按，主管機關得對各行業是否遵循主管機關所頒定之應記載事項及不得記載事項予以查核，受查核者若違反主管機關頒定之定型化契約條款內容，主管機關得處以罰鍰，若業者阻撓或規避、拒絕，亦得另為罰鍰，

[2] 參胡華泰，消費定型化契約條款之行政規制。

主管機關均得連續處罰，消費者保護法第 56 條之 1 及 57 條：「企業經營者使用定型化契約，違反中央主管機關依第十七條第一項公告之應記載或不得記載事項者，除法律另有處罰規定外，經主管機關令其限期改正而屆期不改正者，處新臺幣三萬元以上三十萬元以下罰鍰；經再次令其限期改正而屆期不改正者，處新臺幣五萬元以上五十萬元以下罰鍰，並得按次處罰。」「企業經營者拒絕、規避或阻撓主管機關依第十七條第三項、第三十三條或第三十八條規定所為之調查者，處新臺幣三萬元以上三十萬元以下罰鍰，並得連續處罰。」定有明文。若主管機關認為業者所提供之定型化契約內容已對消費者之生命、身體、健康等造成危害或有損害之虞，並得命其限期改善或採取必要措施，如拒絕主管機關之命令者，得處以罰鍰並連續處罰，此有消費者保護法第 58 條規定可稽：「企業經營者違反主管機關依第三十六條或第三十八條規定所為之命令者，處新臺幣六萬元以上一百五十萬元以下罰鍰，並得連續處罰。」

三、研究目的

依上，為健全傳統整復推拿、按摩及腳底按摩服務禮券之運用，及保障使用此類服務禮券之消費者權益，實有制定民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項，針對民俗調理業之特性，參照其他類似行業之定型化契約應記載與不得記載事項，彙整研析後擬定民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項來確保消費者之權益。本所將透過此報告達成下列兩項工作目標：

(一)擬定「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項」。

(二)建立民俗調理業服務禮券管理模式。

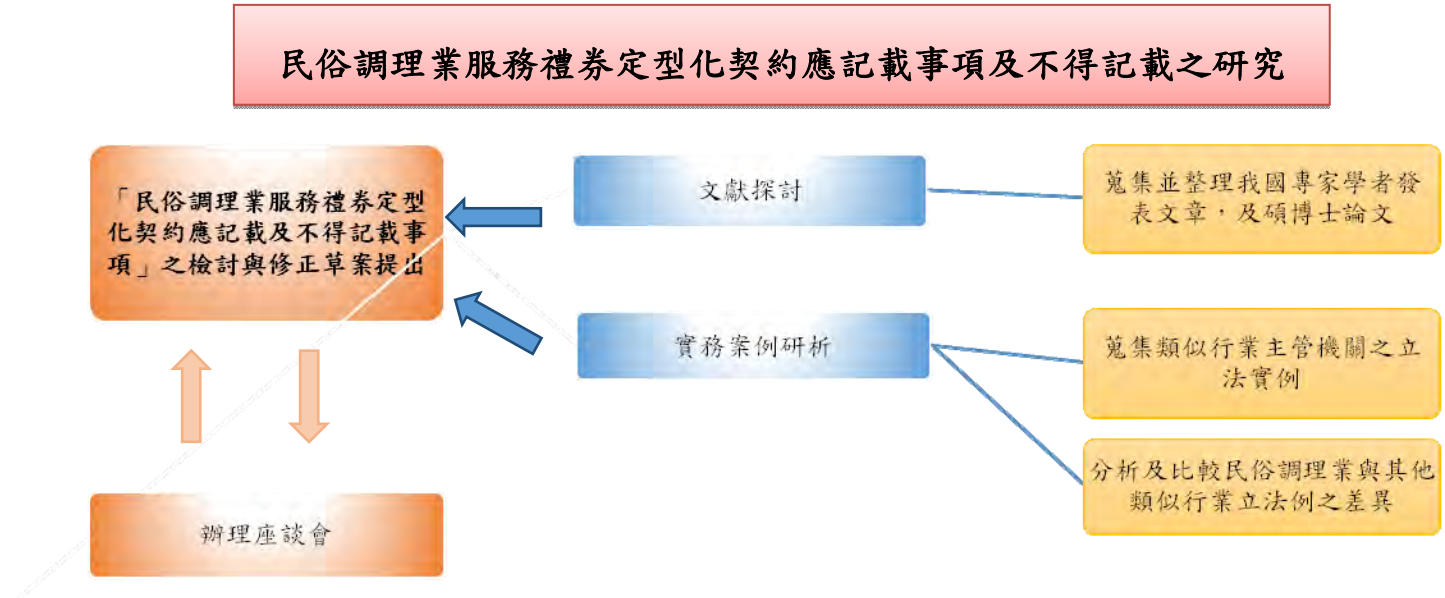
貳、材料與方法

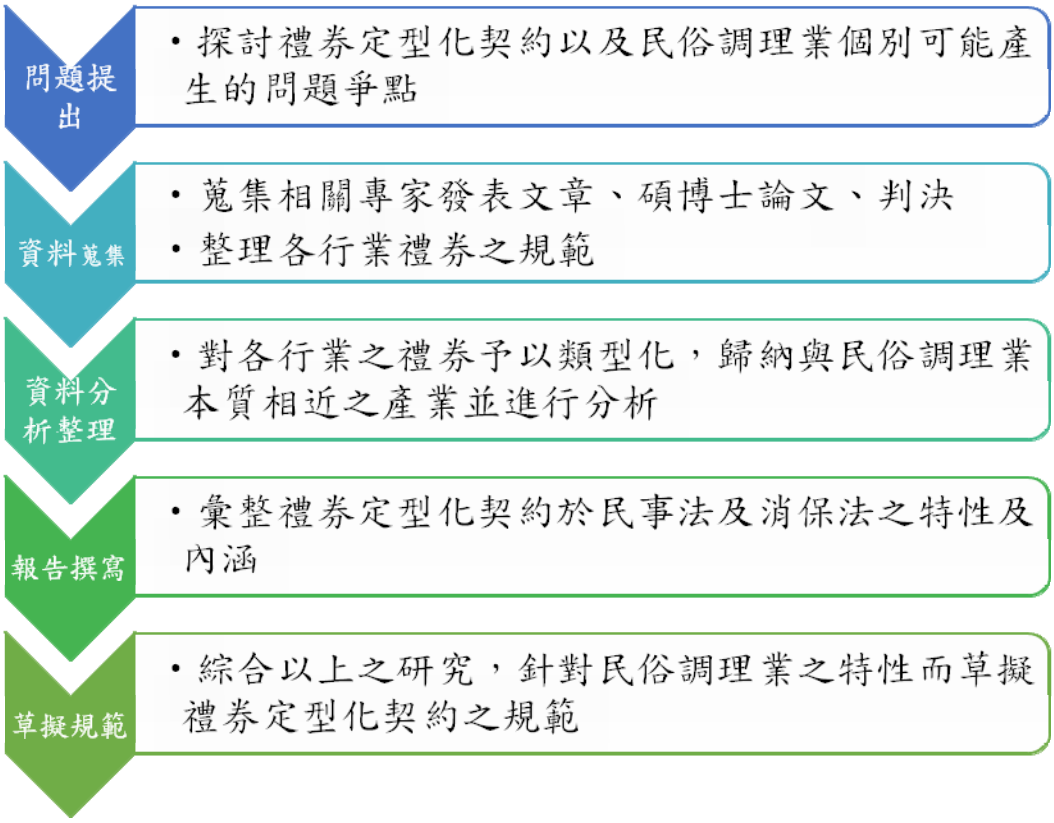
本所將透過文獻探討，整理我國學者專家之書籍、期刊論文、碩博士論文、與民法及消保法相關之判決及實務見解，自民事法、消保法實證之角度，就定型化契約及禮券等重要議題予以分析研究；另蒐集市面上流通之消費禮券，整理現有禮券之型態，以進一步釐清法律爭點。

本所並以各行業之目的事業主管機關所頒定之定型化契約應記載及不得記載事項予以彙整及類型化，透過對各產業歸納及分析，以針對民俗調理業之特性設計相關規範，研擬「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項」之草案。

本所並於草擬完成草案後，透過召開審查會議及業界說明會，彙整專家學者及實務界業者之觀點及意見，修正草擬內容，以建立民俗調理業服務禮券管理模式。(研究方法如下圖所示)

圖 2-1 民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項研究圖示




問題提出
• 探討禮券定型化契約以及民俗調理業個別可能產生的問題爭點
資料蒐集
• 蒐集相關專家發表文章、碩博士論文、判決
• 整理各行業禮券之規範
資料分析整理
• 對各行業之禮券予以類型化，歸納與民俗調理業本質相近之產業並進行分析
報告撰寫
• 彙整禮券定型化契約於民事法及消保法之特性及內涵
草擬規範
• 綜合以上之研究，針對民俗調理業之特性而草擬禮券定型化契約之規範

參、結果

經本所之研究並依專家審議會議及業者說明會各兩場當中所蒐集及彙整之意見，草擬民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項草案如下：

表 3-1　民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案）

草案條文	說明
前言： 本事項適用之行業別包含：傳統整復推拿、按摩以及腳底按摩等不具醫療效能之民俗調理業。 本事項所稱服務禮券，指發行人發行記載或圈存一定金額、項目或使用次數之憑證、晶片卡或其他類似性質之證券，而由持有人以提示、交付或其他方法，向發行人或其指定之第三人請求給付證券所載內容之服務。但不包括發行人無償發行之抵用券、折扣（價）券。 前項所稱服務禮券，不包括電子票證發行管理條例所稱之電子票證。 乙案： 本事項所稱服務禮券，指發行人發行記載或圈存一定金額、項目或使用次數之憑證、晶片卡或其他類似性質之證券，而由持有人以提示、交付或其他方法，向發行人請求給付證券所載內容之服務。但不包括發行人無償發行之抵用券、折扣（價）券。	一、依衛生福利部 104 年 5 月 12 日衛部中字第 1041860595 號公告「民俗調理業管理規範」之規定，所謂民俗調理，係「以紓解筋骨、消除疲勞為目的，單純運用手技對人施以傳統整復推拿、按摩、腳底按摩、指壓、刮痧、拔罐，或使用民間習用之青草泥、膏、液狀外敷料所為之非醫療行為。」，故本事項爰依循前開定義，不再逐項羅列民俗調理業者可得採行之行為態樣；此外，因傳統整復推拿、按摩以及腳底按摩等營業行為已有商業登記相關規範可資依循，爰明定本事項適用之行業別為傳統整復推拿、按摩以及腳底按摩等民俗調理業。 二、參照經濟部一百零三年十月十六日公布之「零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」，允許非實際提供服務者亦得發行禮券，爰將發行人指定第三人提供服務之情形，納入規範。 三、因服務禮券不得提供多用途支付使用、現金儲值卡（例如：悠遊卡）或其他具有相同性質之晶片卡屬「電子票證發行管理條例」之範疇，爰於本事項中排除。
民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項	

草案條文	說明
一、服務禮券應記載下列事項： (一)發行人名稱、地址、統一編號、負責人姓名及消費爭議處理申訴（客服）專線。（例如：電話.....；電子信箱.....；網址.....）。 (二)服務禮券之面額或得使用之服務項目、次數 (三)服務禮券發售編號。 (四)使用方式。如未明確記載優惠措施之限制、使用禮券之時間或地點等限制者，視為無限制。	一、為使消費爭議案件儘速獲致處理，爰明定服務禮券應記載發行人相關資訊以及消費爭議處理申訴（客服）專線，以協助消費者迅速處理爭議。 二、發行人應依禮券文義負責，爰明定禮券應記載面額或得使用之服務項目與次數，以臻明確。 三、爰參酌經濟部「零售業等等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」，明定服務禮券應記載事項並酌作文字調整。
二、服務禮券券面應載明履約保證機制，並依下列方式擇一提供消費者至少一年之履約保證： (一)本服務禮券所載金額（或與所載服務內容相當之金額新臺幣___元），已經○○金融機構提供足額履約保證。前開保證期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止。 (二)本服務禮券所載金額（或與所載服務內容相當之金額新臺幣___元），已存入發行人於○金融機構開立之信託專戶，專款專用；所稱專用，係指供發行人履行交付商品或提供服務義務使用。前開信託期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止。 (三)本服務禮券已加入由○商業同業公會或○職業工會辦理之○同業禮券	現行定型化契約應記載不得記載事項常見之履約保證措施為：(一)金融機構之足額履約保證；(二)同級同業之市佔率 5%以上互保；(三)金融機構信託專戶；(四)商業同業公會之同業禮券連帶保證協定之等值兌換；(五)其他經主管機關許可之履約保證方式。惟實務上因「市占率至少 5%以上」難以判定，爰不採行同業互保之履約保證機制，其餘則參酌經濟部「零售業等等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」並酌作文字修正。

草案條文	說明
聯合連帶保證協定，持本禮券可依禮券所載內容向加入本協定之業者請求給付等值之服務。前開連帶保證期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止。 (四)其他經衛生福利部及行政院消費者保護處許可之履約保證方式。(須敘明該履約保證方式內容，及公文字號)。	
三、服務禮券如因毀損或變形，而其重要內容（含主、副券）仍可辨認或可得依業者留存之資料加以確認者，得請求依禮券內容給付或換發新券；其約定收取換發新券費用者，紙券每次不得超過新臺幣五十元，磁條卡或晶片卡每次不得超過新臺幣一百元。	一、明定商品（服務）禮券如毀損或變形，但其重要內容（如：禮券發行人、券面金額、禮券編號或條碼等）仍可辨認者，應仍得請求依禮券記載內容給付或換發禮券。 二、因換發禮券所生費用，得約定由消費者負擔，惟為避免換發金額過高致損害消費者權益，爰明定換發費用之上限。
四、服務禮券為記名式者，如有遺失、被竊或滅失等情事，得申請補發；其約定收取補發新券費用（包括掛失費用、止付費用，以及重新設定等）者，紙券每次不得超過新臺幣五十元，磁條卡或晶片卡每次不得超過新臺幣一百元。	一、禮券為記名式者，遭冒用之風險甚微，如有遺失、被竊或滅失者，應許消費者補發，爰予明定。 二、因補發禮券所生費用，得約定由消費者負擔，惟為避免換發金額過高致損害消費者權益，爰明定換發費用之上限。
五、服務禮券應記載消費者終止或解除契約之退還禮券與返還價金程序與方式，如定有手續費用者，不得逾禮券價金百分之十；相關優惠措施，如需返還或折抵退還價金者，亦同。	一、按消費者保護法第 17 條第 2 項規定，應記載事項，依契約之性質及目的，其內容得包括契約之解除權、終止權及其法律效果；復以實務上禮券契約之終止或解除所生爭議，為消費爭議之大宗，爰明定應記載有關退還禮券與返還價金之

草案條文	說明
	程序與方式，以臻明確。 二、禮券之發行常伴隨一定之促銷行為，故於消費者終止或解除契約時應如何處理，均應事先揭露予消費者知悉，以免日後衍生爭議，爰明定發行人應記載相關程序以及其他優惠措施之處理方式。
六、發行人發行禮券而由第三人提供服務者，服務禮券券面應載明發行人實收資本額（不得低於新臺幣___元）及實際服務提供者之名稱、地址及聯絡電話。其履約保證機制，應依第二點第一款或第二款之方式為之。 乙案： 刪除本條	一、參考經濟部「零售業等等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」訂定並酌作文字修正。 二、為保障消費者權益，降低非實際提供服務者發行禮券之違約風險，爰明定若非實際提供服務者擬發行禮券時，其實收資本額須達一定金額以上始具發行資格，並應將其實收資本額記載於服務禮券，同時記載實際提供服務者之相關資訊。 三、發行人如非實際提供服務者，因其本身可能不具備依約履行之資格或能力，故其提供消費者履約保證機制，應僅限由金融機構提供足額履約保證，或將所發行之金額存入金融機構開立之信託專戶等二種之履約保證機制。
七、禮券因以磁條卡或晶片卡或其他電子方式發行，而難以完整呈現應記載事項者，得僅記載發行人、履約保證方式及消費服務專線之資訊，但發行人應以檢附使用說明或其他書面、簡訊、電子郵件或其他合理方式告知消費者其餘應記載事項，並使消費者得隨時查詢交易明細及餘款之方法。	一、因磁條卡或晶片卡形式之服務禮券可記載之區域有限，爰明定得以書面或其他合理方式（如簡訊、二維條碼等）揭露應記載事項，並應提供消費者查詢交易明細及餘款之功能。 二、發行人、履約保證方式及消費服務專線等資訊，涉及消費者知的權利甚鉅，爰明定不得省略。

草案條文	說明
民俗調理業服務禮券定型化契約不得記載事項	
一、不得記載發行人保留契約內容或期限之變更權或解釋權。	按消費者保護法第 17 條第 3 項第 1 款規定，定型化契約之不得記載事項，得包括「企業經營者保留契約內容或期限之變更權或解釋權」，爰於本應記載及不得記載事項予以明定。
一、不得記載限制或免除發行人之義務或責任： (一) 預先免除發行人之故意或大過失責任。 (二) 廣告僅供參考。 (三) 發行人以第三人為服務提供者時，不得記載消費者與提供服務之該第三人發生消費爭議時，免除自身責任之文字或類似意思之表示。 乙案： 二、不得記載限制或免除發行人之義務或責任： (一) 預先免除發行人之故意或大過失責任。 (二) 廣告僅供參考。	(一)按消費者保護法第 17 條第 3 項第 2 款規定，定型化契約之不得記載事項，得包括「限制或免除企業經營者之義務或責任」，爰於本應記載及不得記載事項予以明定，並就實務常見違失態樣與以例示性規範。 (二)禮券發行人由第三人提供服務者，仍應依禮券文義負責，故於消費者與服務提供者發生消費爭議時，不得預先以定型化契約免責，爰參考經濟部「零售業等等商品(服務)禮券定型化契約應記載及不得記載事項」不得記載事項第 11 點，予以明定。
三、不得記載限制或剝奪消費者行使權利，加重消費者之義務或責任： (一) 使用期限。 (二) 未使用之禮券餘額不得消費。 (三) 截角無效等不合理之限制。 (四) 較現金消費不利之條件或限制。 (五) 消費者請求退回禮券並返還價金時，須加收任何費用之文字或類	一、按消費者保護法第17條第3項第2款規定，定型化契約之不得記載事項，得包括「限制或剝奪消費者行使權利，加重消費者之義務或責任」，爰於本應記載及不得記載事項予以明定，並就實務常見違失態樣與以例示性規範。 二、本應記載及不得記載事項已排除無償發行之情形，故禮券消費不應有較現金消費

草案條文	說明
似意思之表示。	更為不利之條件或限制，爰參考經濟部「零售業等等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」不得記載事項第9點規定，訂定本點第5款。惟查，前開零售業等等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項第9點規定，僅適用於「發行人以第三方為實際商品（服務）之提供者」之情形，然為保障消費者使用有償取得禮券之權益不受損害，不應因提供商品或服務者為禮券發行人或第三人而有別，爰刪除「發行人以第三方為實際商品（服務）之提供者」之限制，俾便一體適用。
四、不得記載違反其他法律強制禁止規定或對消費者顯失公平事項。	一、按消費者保護法第17條第3項第2款規定，定型化契約之不得記載事項，得包括「其他對消費者顯失公平事項」，爰於本應記載及不得記載事項予以明定。 二、定型化契約記載如有違反消費者保護法以外之其他法律強行規定者，仍屬無效，爰明定不得記載違反其他法律強制禁止規定事項。 三、不得使人誤認有醫療行為。

表 3-2　民俗調理業服務查核表（草案）

民俗調理業服務查核表（草案）			
	檢查內容	檢查結果	備註
1	營業場所建築是否符合建築法	□是　□否	
2	營業場所消防設備是否符合消防法	□是　□否	
3	是否投保消費場所公共意外責任保險	□是　□否	
4	營業場所之環境是否符合各直轄市、縣（市）政府相關營業衛生自治法規	□是　□否	
5	營業場所之環境是否符合營業場所傳染病防治衛生管理注意事項	□是　□否	
6	營業場所如與醫療機構同一地址，是否有實體區隔、獨立門戶及市招	□是　□否	
7	是否將服務內容揭示於營業場所之明顯處所	□是　□否	
8	是否將收費標準揭示於營業場所之明顯處所	□是　□否	
9	是否將「民俗調理業人員工作倫理守則」揭示於營業場所之明顯處所	□是　□否	
10	是否將「公共意外責任保險投保證明書」揭示於營業場所之明顯處所	□是　□否	
11	營業場所之環境是否有適當遮蔽，男性女性服務空間是否有適當之分別或區隔	□是　□否	
12	是否有於營業場所陳列、推銷或販售藥品、醫療器材	□是　□否	
13	是否建立民俗調理業人員工作倫理守則	□是　□否	
14	從業人員是否於執行業務時配戴身分識別證	□是　□否	
15	從業人員提供服務時，是否給予消費者身體部位之必要覆蓋，是否告知調理之身體部位及方式	□是　□否	
16	發行之禮券是否記載「發行人名稱、地址、統一編號及負責人姓名」	□是　□否	
17	發行之禮券是否記載「消費爭議處理申訴客服專線」	□是　□否	
18	發行之禮券是否記載「發行人履約保障責任」	□是　□否	
19	發行之禮券是否記載退還禮券與返還價金程序與方式	□是　□否	

民俗調理業服務查核表（草案）			
	檢查內容	檢查結果	備註
20	發行之禮券是否有記載「發行人保留契約內容或期限之變更權或解釋權」	□是 □否	
21	發行之禮券是否有記載「限制或免除發行人之義務或責任」條款	□是 □否	
22	發行之禮券是否有記載「限制或剝奪消費者使用權利、加重消費者之義務或責任」之條款	□是 □否	
23	發行之禮券是否有記載使人誤為有療效功能	□是 □否	
24	發行之禮券是否給予消費者相當之審閱期間	□是 □否	
25	發行之禮券所記載之條款內容是否明確	□是 □否	
26	發行之禮券所記載之條款內容是否容易辨識	□是 □否	

肆、討論

一、民法及消費者保護法之定型化契約規範

(一)民法規範

1. 契約自由原則

按「當事人互相表示意思一致者，無論其為明示或默示，契約即為成立。」民法第 153 條第 1 項定有明文，是契約因當事人互相表示意思一致而成立，一方當事人自己受其拘束，並同時因此而拘束他方當事人。此種互相拘束乃建立在契約自由原則之上，即當事人得依其自主決定，經由意思合致而規律彼此間之法律關係。是契約自由係人民私法自治最重要之內容，受到憲法之承認與保護（參憲法第 7 條、第 11 條、第 15 條、第 22 條及第 23 條）。

民事私法自治原則以「契約自由」作為其核心，當事人就與誰、以何方式、契約內容及類型、是否變更或廢棄、以及締約與否等事項，當事人享有絕對之自由，他人無從強迫。其中，又以是否締約與私法自治之關係最為密切，其餘均屬其具體之實踐，以貫徹私法自治之原則。

契約自由原則之目的，乃在於因個人為自己利益最佳之維護者，契約既因當事人自由意思合致而訂定，則其內容妥當性當可因此而獲得保障，並得簡化、促進交易，且得使當事人間針對個案，量身訂定符合實際需求之契約。然契約內容是否「妥當」，根基於當事人「自由意志」得否實現，如一方當事人之實力不如另一方當事人而不得不屈服於另一方當事人意思之下時，將使強者假藉契約自由之名，行壓榨弱勢者之實。是契約自由實應受限制，屬當然之理，此即為契約正義之實踐。[3]

[3] 王澤鑑，債法原理（一）：基本理論、債之發生，第 69-70 頁，三民書局，民國 80 年 1 月 5 版；黃茂榮，債法總論（一），第 225 頁，自版， 2009 年 1 月 3 版；陳自強，契約之成立與生效，第 156 頁至 160 頁、第 163-164 頁，元照出版，2012 年 9 月 2 版。



圖 4-1、契約自由原則之內涵

2. 契約正義

契約正義以雙務契約為其主要適用對象，強調一方給付與他方對待給付之間，應具等值性。然客觀上價值是否相當，欠缺明確判斷標準，是現行民事法體系採取主觀等值原則，即當事人主觀上願以此給付換取對待給付，即為已足，客觀上是否相當，非法律或法院可得干涉之對象。

然法律對於私法自治事項，雖原則上享有前述之契約自由，得自由決定締約事宜，然為確保市場機能，維護交易安全、公平，必要時並照顧弱勢族群，特別是在市場機能已因市場結構之扭曲，不能適當發揮時，而於例外情形加以干預、限制，例如：

(1) 利用強制締約限制當事人締約自由；

(2) 為確保交易安全將某些契約規定為要式契約（例如物權契約）；

(3) 利用類型強制，限制其為達到一定之經濟目的得採取之契約類型；

(4) 酌減過高報酬或過高之違約金；

(5) 禁止差別待遇，限制其交易相對人之選擇自由或交易內容之

決定的自由。

民法上常見之規定並有：暴利行為（民法第 74 條）、行為能力（民法第 75 條至 85 條）、意思表示錯誤（民法第 86 條至 88 條）、詐欺脅迫行為（民法第 92 條）及定型化契約條款（民法第 247 條之 1）等。[4]

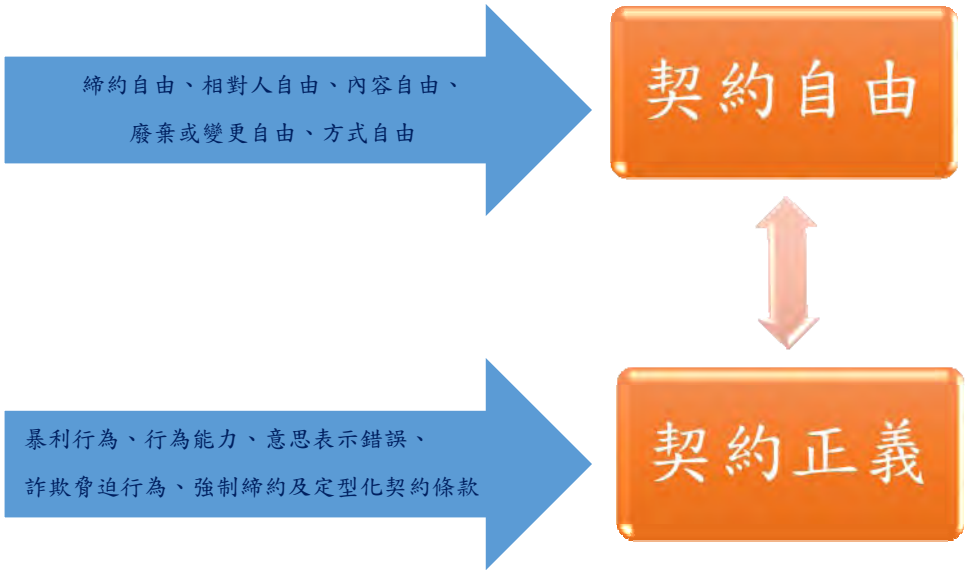


圖 4-2、契約自由與契約正義

3. 定型化契約條款之意義

按當事人訂立契約，基於契約自由原則，本須個別磋商、議定條款，然於現今之自由經濟社會，契約條款多由一方當事人（通常為企業廠商），為與多數人訂約而事先擬訂契約條款，再由相對人決定是否接受，我國稱之為定型化契約條款。

定型化契約條款乃係因應現代大量交易活動需求所生，交易條件的定型化，一方面促進企業合理經營，省卻個別商議契約所耗費之時間金錢及勞力，降低交易成本，另一方面，消費者亦無需耗費精神就交易條件討價還價，甚且得以填補於法律所定有名契約類型中所欠缺之無名契約類型，有助於改善商品品質及降低價格，對消費大眾甚為有利，亦有助於法律之法展。

然而，定型化契約之使用者（絕大多數為企業經營者）為

[4] 王澤鑑，同註 3，第 70-71 頁；黃茂榮，同註 3，第 225-226 頁；陳自強，同註 3，第 164-166 頁。

貫徹使用目的，多由法律專家預先擬定契約條款，而決定交易條件之際，經常利用其優越之經濟地位，制定有利於己，而不利於消費者之條款，對契約上之危險及負擔做不合理之分配（如免責條款、失權條款），一般人民或因不諳法律，或因字體細小不易察知，或因無暇閱讀，致使無從知悉，縱使知悉亦因地位懸殊不平等而無從協商個別條款，是對於此不合理之定型化契約條款，實有規致之必要，現行實務上係從五個面向為規範，以維護一般人民之權益：[5]

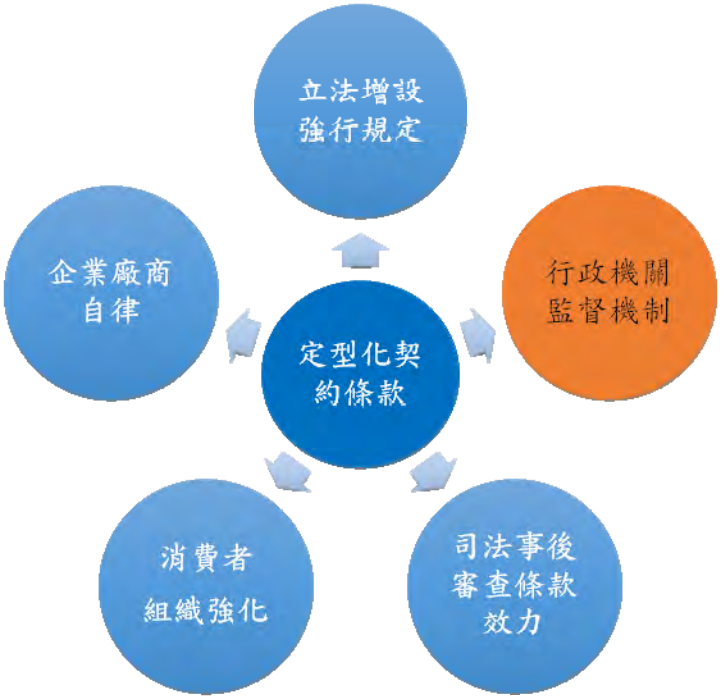


圖 4-3、定型化契約條文規範面向

4. 定型化契約條款之規範[6]

民法上對於定型化契約之規範，原則規範於民法第 247 條之 1，只要是一方為用於與多數不特定人之同類案件而預先擬定之契約，均為本條之規範。

另外，除民法第 247 條之 1 規定以外，尚包含對於一般契約條款之相關強制或衡平規定，茲謹就此類規定表列如下：

[5] 王澤鑑，同註 3，第 76 頁至 78 頁；陳自強，同註 3，第 203 頁至 212 頁。
[6] 王澤鑑，同註 3，第 80 頁至 82 頁。

表 4-1、民法上一般契約條款強制或衡平規定

條文	規定內容
第 71 條	法律行為，違反強制或禁止之規定者，無效。但其規定並不以之為無效者，不在此限。
第 72 條	法律行為，有背於公共秩序或善良風俗者，無效。
第 148 條	權利之行使，不得違反公共利益，或以損害他人為主要目的。 行使權利，履行義務，應依誠實及信用方法。
第 222 條	故意或重大過失之責任，不得預先免除。
第 247 條之 1	依照當事人一方預定用於同類契約之條款而訂定之契約，為左列各款之約定，按其情形顯失公平者，該部分約定無效： 一、免除或減輕預定契約條款之當事人之責任者。 二、加重他方當事人之責任者。 三、使他方當事人拋棄權利或限制其行使權利者。 四、其他於他方當事人有重大不利益者。
第 389 條	分期付價之買賣，如約定買受人有遲延時，出賣人得即請求支付全部價金者，除買受人遲付之價額已達全部價金五分之一外，出賣人仍不得請求支付全部價金。
第 609 條	以揭示限制或免除前三條所定主人之責任者，其揭示無效。
第 649 條	運送人交與託運人之提單或其他文件上，有免除或限制運送人責任之記載者，除能證明託運人對於其責任之免除或限制明示同意外，不生效力。
第 739 條之 1	本節所規定保證人之權利，除法律另有規定外，不得預先拋棄。

由上述條文可得知，民法對於契約自由雖採原則性保障，但於特殊場合或條件下，仍有例外條文規定來維持契約正義，藉以維護實質的交易安全。至於第 247 條之 1 更是規範定型化契約之內容，如有減輕定型化契約訂定人之責任、加重定型化契約對相對人之義務，或是使定型化契約相對人拋棄權利或限

制其行使權利、定型化契約內容對相對人有重大不利益，而造成顯失公平之狀態者，該部分之約定無效。只是上述民法條文規範仍無法完全保障弱勢之一般消費者權益，由其是現今社會之服務或販售方式，早已超過民法當初預想之範圍，許多服務或販售方式在民法上只能被當成無名契約，僅能用民法總則或民法債總之規定為適用或類推適用。如涉及專業領域，則更須訂定行政專法來規範，但行政專法大抵規範為業者之製造、服務行為之規範，交易的部分大都未加以規定，仍回歸民法之規定，對消費者保障仍有所不足，從而有消費者保護法來補其不足之處。

(二)消費者保護法規範

1. 消費者保護法於 83 年 1 月 11 日公布施行後,嗣於 92 年 1 月 22 日、94 年 2 月 5 日及 104 年 6 月 7 日經歷三次修正，對於定型化契約條款之限制越來越嚴謹，並授權主管機關得選定特定行業頒定該行業之定型化契約條款應記載及不得記載事項，違反者該條款無效，如屬應記載者而未記載，則仍構成契約內容。
2. 然查,104 年修正以前之消費者保護法第 17 條規定:「中央主管機關得選擇特定行業，公告規定其定型化契約應記載或不得記載之事項」,授權中央主管機關頒定特定行業之定型化契約應記載及不得記載事項，依照法務部 95 年 9 月 21 日法律字第 09500305512 號函釋意旨,此頒定係對多數不特定人民就一般事項所做抽象之對外發生法律效果之規定，屬實質意義之法規命令，違反者無效7，但此授權過於概括，顯然違反司法院大法官歷年來對於限制人民自由之法律授權事項之解釋，即授權明確性原則要求法律於授權條文中應就「授權目的」、「內容」及「範圍」具體明確規範，以避免概括授權之下，導致被授權機關逾越立法本意而過度侵害人民權益之情形發生，學術界對此亦迭有論述[8]。

是消費者保護法於 104 年 6 月 17 日修正相關法條並公布施

[7] 胡華泰，註 2，第 102 頁至 103。

[8] 參何瑞富，從消費者保護法第 17 條之規定論法律保留原則—以履約保證為中心，台灣大學國家發展研究所碩士論文；楊欣玲，定型化契約應記載及不得記載事項之行政規制合憲性─從預售屋買賣之實務判決觀察，中正大學法律研究所碩士論文。

行，針對定型化契約部份之修正重點條列如下：

(1) 修正定型化契約定義，以明確將實務上各類定型化契約納入消費者保護法之規範內。

(2) 過往依消費者保護法第 17 條規定授權主管機關得擇定特定行業公告定型化契約之應記載或不得記載事項，惟原條文並未就其授權目的、內容、範圍及法律效果予以明定，違反法律授權明確性原則，迭生爭議，是為避免爭議，乃於本次修正明定上開項目。

(3) 違反主管機關公告之定型化契約條款，過往消費者保護法並未明定罰則，實務上多以第 57 條規定處罰之，惟第 57 條需以企業有阻撓、規避等行為始得處罰，致使單純違反公告條款之企業難以處罰之，是於本次修正時就單純違反公告條款之企業增訂第 56 條之 1 罰則規定。

3. 以下謹就 104 年 6 月 7 日消費者保護法修正中有關定型化契約條款規定部份整理如下表：

表 4-2、消費者保護法 104 年 6 月 7 日公布修正條文重點摘要說明

消費者保護法規定		
修正條文	現行條文	**說明**
第二條 **本法所用名詞定義如下：** **七、定型化契約條款：指企業經營者為與多數消費者訂立同類契約之用，所提出預先擬定之契約條款。定型化契約條款不限於書面，其以放映字幕、張貼、牌示、網際網路、或其**	第二條 本法所用名詞定義如下： 七、定型化契約條款：指企業經營者為與不特定多數消費者訂立同類契約之用，所提出預先擬定之契約條款。定型化契約條款不限於書面，其以放映字幕、張貼、牌示、網際網	**一、第一款至第六款、第八款及第十二款未修正。** **二、按定型化契約條款係企業經營者為與消費者訂立契約之用所預先擬定之契約條款，不論係供不特定多數消費者或特定多數消費者使用，均應有本法定型化契約相關規範之適用，爰參**

消費者保護法規定		
修正條文	現行條文	說明
他方法表示者，亦屬之。	路、或其他方法表示者，亦屬之。	考德國民法第三百零五條規定，刪除第七款「不特定」之文字。
	第十一條 企業經營者在定型化契約中所用之條款，應本平等互惠之原則。定型化契約條款如有疑義時，應為有利於消費者之解釋。	未修正。
第十一條之一 企業經營者與消費者訂立定型化契約前，應有三十日以內之合理期間，供消費者審閱全部條款內容。 企業經營者以定型化契約條款使消費者拋棄前項權利者，無效。 違反第一項規定者，其條款不構成契約之內容。但消費者得主張該條款仍構成契約之內容。 中央主管機關得選擇特定行業，參酌定型化契約條款之重要性、涉及事項之多寡及複雜程度等事項，公告定型化契約之審閱期間。	第十一條之一 企業經營者與消費者訂立定型化契約前，應有三十日以內之合理期間，供消費者審閱全部條款內容。 違反前項規定者，其條款不構成契約之內容。但消費者得主張該條款仍構成契約之內容。 中央主管機關得選擇特定行業，參酌定型化契約條款之重要性、涉及事項之多寡及複雜程度等事項，公告定型化契約之審閱期間。	一、實務常見企業經營者於其所提供之定型化契約中，加註消費者自願拋棄契約審閱權之條款，此類型條款對消費者顯失公平，應屬無效，爰增訂第二項，以保護消費者審閱契約之權利。 二、第三項酌作文字修正。

消費者保護法規定		
修正條文	現行條文	說明
	第十二條 定型化契約中之條款違反誠信原則，對消費者顯失公平者，無效。定型化契約中之條款有下列情形之一者，推定其顯失公平： 一、違反平等互惠原則者。 二、條款與其所排除不予適用之任意規定之立法意旨顯相矛盾者。 三、契約之主要權利或義務，因受條款之限制，致契約之目的難以達成者。	未修正。
第十三條 企業經營者應向消費者明示定型化契約條款之內容；明示其內容顯有困難者，應以顯著之方式，公告其內容，並經消費者同意者，該條款即為契約之內容。 企業經營者應給	第十三條 定型化契約條款未經記載於定型化契約中者，企業經營者應向消費者明示其內容；明示其內容顯有困難者，應以顯著之方式，公告其內容，並經消費者同意受其拘束者，該條款即為契約之	一、定型化契約條款不論是否記載於定型化契約中，企業經營者均應向消費者明示或公告其內容，並經消費者同意，該條款始構成契約之內容，爰修正第一項。

消費者保護法規定		
修正條文	現行條文	說明
與消費者定型化契約書。但依其契約之性質致給與顯有困難者，不在此限。 定型化契約書經消費者簽名或蓋章者，企業經營者應給與消費者該定型化契約書正本。	內容。 前項情形，企業經營者經消費者請求，應給與定型化契約條款之影本或將該影本附為該契約之附件。	二、企業經營者應給與消費者定型化契約作為憑證。但就自動販賣機、自動購證停車場及大眾運輸契約等缺乏個別接觸之交易，或交易頻仍之大量契約，若企業經營者交付消費者定型化契約，有執行上之困難，可以公告之方式為之，爰修正第二項。 三、定型化契約書經消費者簽名或蓋章者，契約當事人有實際接觸，並無給與契約書之困難。為避免遇有爭議時，消費者無法舉證，爰增訂第三項。
	第十四條 定型化契約條款未經記載於定型化契約中而依正常情形顯非消費者所得預見者，該條款不構成契約之內容。	未修正。

消費者保護法規定		
修正條文	現行條文	說明
	第十五條 定型化契約中之定型化契約條款牴觸個別磋商條款之約定者，其牴觸部分無效。	未修正。
	第十六條 定型化契約中之定型化契約條款，全部或一部無效或不構成契約內容之一部者，除去該部分，契約亦可成立者，該契約之其他部分，仍為有效。但對當事人之一方顯失公平者，該契約全部無效。	未修正。
第十七條 中央主管機關為預防消費糾紛，保護消費者權益，促進定型化契約之公平化，得選擇特定行業，擬訂其定型化契約應記載或不得記載事項，報請行政院核定後公告之。 前項應記載事項，依契約之性質及目的，其內容得包括： 一、契約之重要權利義務事項。 二、違反契約之法	第十七條 中央主管機關得選擇特定行業，公告規定其定型化契約應記載或不得記載之事項。 違反前項公告之定型化契約，其定型化契約條款無效。該定型化契約之效力，依前條規定定之。 企業經營者使用定型化契約者，主管機關得隨時派員查核。	一、為使授權公告定型化契約應記載或不得記載事項之目的及程序更加明確化，爰修正第一項。 二、為使公告事項之內容及範圍更加明確化，爰參酌現行中央主管機關已公告事項之重要權利義務內容，增訂第二項及第三項有關應記載及不得記載事

消費者保護法規定		
修正條文	現行條文	說明
律效果。 三、預付型交易之履約擔保。 四、契約之解除權、終止權及其法律效果。 五、其他與契約履行有關之事項。 第一項不得記載事項，依契約之性質及目的，其內容得包括： 一、企業經營者保留契約內容或期限之變更權或解釋權。 二、限制或免除企業經營者之義務或責任。 三、限制或剝奪消費者行使權利，加重消費者之義務或責任。 四、其他對消費者顯失公平事項。 違反第一項公告之定型化契約，其定型化契約條款無效。該定型化契約之效力，依前條規定定之。 中央主管機關公告		項之規定，惟因應否記載內容，尚須依個別行業之契約性質及目的定之，故所定應否記載之內容得包括所列事項，而非必然包括全部事項。 三、現行條文第二項移列修正條文第四項，並酌作文字修正。 四、第五項新增。將本法施行細則第十五條第二項有關公告事項之效力規定，酌作文字修正，移列本法。 五、現行條文第三項移列修正條文第六項。

消費者保護法規定		
修正條文	現行條文	說明
應記載之事項，雖未記載於定型化契約，仍構成契約之內容。 企業經營者使用定型化契約者，主管機關得隨時派員查核。		
第十七條之一 企業經營者與消費者訂立定型化契約，主張符合本節規定之事實者，就其事實負舉證責任。		一、本條新增。 二、企業經營者與消費者訂立定型化契約前已提供合理審閱期間及已向消費者明示定型化契約條款之內容等遵守本節規定之事實，應由企業經營者負舉證責任，以保障消費者。
第五十六條之一 企業經營者使用定型化契約，違反中央主管機關依第十七條第一項公告之應記載或不得記載事項者，除法律另有處罰規定外，經主管機關令其限期改正而屆期不改正者，處新臺幣三萬元以上三十萬元以下罰鍰；經再次令其限期改		一、本條新增。 二、中央主管機關依第十七條第一項公告定型化契約應記載或不得記載事項，旨在預防消費糾紛，保護消費者權益，促進定型化契約之公平化，惟上開應記載或不得記載事項並無行政罰配

消費者保護法規定		
修正條文	現行條文	說明
正而屆期不改正者，處新臺幣五萬元以上五十萬元以下罰鍰，並得按次處罰。		套，難以貫徹施行。為落實應記載或不得記載事項之施行，爰增訂本條。 三、現行老人福利法、身心障礙者權益保障法、有線廣播電視法及電信法等就企業經營者之定型化契約已訂有相關管制及處罰規定。基於主管機關業務推動繼續性及整體性之考量，上開法律之相關罰則優先於本條之適用。
第五十七條 企業經營者規避、妨礙或拒絕主管機關依第十七條第六項、第三十三條或第三十八條規定所為之調查者，處新臺幣三萬元以上三十萬元以下罰鍰，並得按次處罰。	第五十七條 企業經營者拒絕、規避或阻撓主管機關依第十七條第三項、第三十三條或第三十八條規定所為之調查者，處新臺幣三萬元以上三十萬元以下罰鍰，並得連續處罰。	現行條文第十七條第三項已移列為修正條文第十七條第六項，爰配合修正，並酌作文字修正。

表 4-3、消費者保護法施行細則規定 104 年 6 月 7 日公布修正條文重點摘要說明

消費者保護法施行細則規定		
修正條文	現行條文	**說明**
	第十二條 定型化契約條款因字體、印刷或其他情事，致難以注意其存在或辨識者，該條款不構成契約之內容。但消費者得主張該條款仍構成契約之內容。	**未修正。**
	第十三條 定型化契約條款是否違反誠信原則，對消費者顯失公平，應斟酌契約之性質、締約目的、全部條款內容、交易習慣及其他情事判斷之。	**未修正。**
	第十四條 定型化契約條款，有下列情事之一者，為違反平等互惠原則： 一、當事人間之給付與對待給付顯不相當者。 二、消費者應負擔非其所能控制之危險者。 三、消費者違約時，應負擔顯不相當之賠償責任者。 四、其他顯有不利於消費者之情形者。	**未修正。**

消費者保護法施行細則規定		
修正條文	現行條文	說明
	第十五條 **定型化契約記載經中央主管機關公告應記載之事項者，仍有本法關於定型化契約規定之適用。中央主管機關公告應記載之事項，未經記載於定型化契約者，仍構成契約之內容。**	**未修正。**

二、禮券之法律性質與所受規範

近幾十年來業者透過禮券進行商品或服務之交易頗為常見，禮券面額從小到大、在各行各業中使用，所在多有。業者可透過禮券給予消費者特定的優惠，來刺激消費者購買意願；亦常見以禮券作為贈與他人之禮品，或因為使用方便等原因，使禮券成為日常生活中普遍的商業交易媒介之一。

然而，因禮券之頻繁使用，因禮券交易而產生的爭議也成等比例發生，更有惡性業者以惡性倒閉作為不法吸金之手段，或以不平等方式限制禮券之交易，導致侵害消費者之權益。也因此，為了保障禮券消費者之交易安全，禮券交易實需要更進一步之法制予以規範。

(一)禮券之法律定位

所謂的「商品（服務）禮券」，依消費者保護委員會委託行政院金融監督管理委員會所擬定之「零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」，係指「由發行人發行記載或圈存一定金額、項目或次數之憑證、晶片卡或其他類似性質之證券，而由持有人以提示、交付或其他方法，向發行人或其指定之人請求交付或提供等同於上開證券所載金額之商品或服務。」[9]。

又，禮券係由消費者取得禮券後，取代了貨幣之給付，持該禮券至禮券之發行人或指定處換取禮券上所載之範圍內之商品或服務，故商品（服務）禮券實為表彰財產權之有價證券。又，民法雖未對「有價證券」作出明確定義性之規定，然學界及實務通

[9] 零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項，經濟部 95 年 10 月 19 日經商字第 09502428980 號公告；經濟部 103 年 10 月 16 日經商字第 10302425520 號公告修正。

說均認此係指表彰具有財產價值之私權證券，其權利之發生、移轉或行使，須全部或一部依證券為之，係屬於預付型的權利證明。

一般市面上多數的禮券為無記名證券，未記載特定權利人，而以持有人為權利人，具有流通性，購買者不論自用或贈送他人使用均可，縱因遺失、被盜或其他非因自己之意思而流通者，發行人對於善意持有人仍應負責；且禮券屬於見票即付之無因證券，依民法第 720 條第 1 項規定：「無記名證券發行人，於持有人提示證券時，有為給付之義務。但知持有人就證券無處分之權利或受有遺失被盜或滅失之通知者，不得為給付。」因此只要持有人出示該禮券，即得向商品或服務提供者主張權利。依民法第 723 條第 1 項之規定：「無記名證券持有人請求給付時，應將證券交還發行人」，故持有人主張權利給付時，應將證券交付與他方。

至於消費者向發行人購買禮券，為買賣關係，而禮券上除了標示金額外，往往亦載有其他條款作為禮券之使用方法或限制，如禮券之使用期限、不得找零等限制，該些條款即為發行人單方面事先所擬定與不特定多數消費者訂立同類契約，作為禮券買賣契約之一部分，消費者對禮券之條款並無修改之權限，故禮券本身之性質為定型化契約。因此，應受到民法及消費者保護法下定型化契約條款的規定所限制。

(二)禮券之種類

禮券具有許多類別，可略分列如下：

1. 傳統禮券與電子禮券

經濟部認為，禮券固以紙張形式，直接表彰其價值為常態。不過當今開始出現許多以磁卡或晶片卡方式儲存價值之「電子禮券」，並無實體存在，而透過商家所闢之儲存空間存放儲值資料，消費者於使用禮券購物時，登入戶名及認證密碼組合，選擇以扣款方式結帳，亦屬於禮券。在「零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」之前言中，即指出「本事項所稱商品（服務）禮券，指由發行人發行記載或圈存一定金額、項目或次數之憑證、晶片卡或其他類似性質之證券」而肯定電子禮券。10不過前述所稱晶片卡不包括多用

[10] 同前註。

途現金儲值卡（例如：悠遊卡）或其他具有相同性質之晶片卡；發行人無償發行之抵用券、折扣（價）券，亦不適用本規範。

因此所謂的「禮券」，應無論裝載價值之工具為何，凡符合上開規定，足以表彰其價值之憑證均屬禮券範疇，不因裝載工具之不同而改變其為禮券之本質。 故縱使是電子禮券，也不變更其在民法及消費者保護法下之規範。其定型化契約下應記載，亦應使消費者知悉。「零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」規定應記載事項中即有規定：「禮券因以磁條卡、晶片卡或其他電子方式發行，而難以完整呈現應記載事項者，發行人應以書面或其他合理方式告知消費者應記載事項及得隨時查詢交易明細之方法。」[11]。



圖 4-4、101 電子禮券[12]

2. 商品禮券與現金禮券

依統一發票使用辦法第 14 條，將禮券區分為禮券上已載明憑券兌付一定數量之貨物的「商品禮券」，及禮券上僅載明金額，由持有人按禮券上所載金額，憑以兌購貨物者的「現金禮券」，並藉此作為開立統一發票時點的區分。前者應於出售禮券時開立統一發票，後者則應於兌付貨物時開立統一發票。

[11] 同前註。

[12] 本圖取自 101 網站：http://www.taipei-101.com.tw/service-detail.aspx?cid=130



圖 4-5、全聯社現金禮券[13]



圖 4-6、85 度 C 商品禮券[14]

3. 自家發行之禮券與第三方發行之禮券

禮券又得以發行人與交付商品或提供服務者是否為同屬一人，區分為「自家發行之禮券」或「第三方發行之禮券」。前者法律關係存在於禮券之發行人及持有人之間，屬於民法第 719 條以下的「無名證券」；後者則是發行人本身不提供商品或服務，因此禮券持有者須向指定之第三人請求履行債務，呈現三角的法律關係，屬於民法第 710 條以下的「指示證券」。

第三方發行之禮券的法律關係中，發行人雖不負給付商品或服務之義務，但並無法基於「債之相對性」而免除民法及消費者保護法之規定，若因可歸責於發行人之事由，而有致消費者權利受有損害，消費者應可向發行人主張不完全給付。且不

[13] 本圖取自全聯網站：http://www.pxmart.com.tw/px/customer_coupon.px
[14] 本圖取自 85 度 C 網站：http://www.85cafe.com/joinus_faq.php?data=4

得使消費者因禮券處於三角關係而處於較不利的地位。如「零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」所規定的不得記載事項中即有包括：「發行人以第三方為實際商品(服務)之提供者時,不得記載較現金消費不利之情形。」、「發行人以第三方為實際商品（服務）之提供者時，不得記載消費者要求退回禮券返還價金時，加收任何費用之文字或類似意思之表示。」、「發行人以第三方為實際商品（服務）之提供者時，不得記載消費者與實際商品（服務）提供者發生消費爭議時，免除自身責任之文字或類似意思之表示。」[15]

(三)禮券應記載及不得記載事項

1. 各類型禮券定型化契約主管機關所訂定之應記載及不得記載事項彙整說明：

承前所述，禮券之契約性質係為定型化契約，而依原消費者保護法第 17 條第 1 項規定：「中央主管機關得選擇特定行業，公告規定其定型化契約應記載或不得記載之事項。」故由法律授權中央主管機關制定應記載事項或不得記載事項之法規命令，對業者生拘束力。其目的是為了導正不當之交易習慣及維護消費者之正當權益。若有業者違反主管機關之法規命令，則該定型化契約條款無效 。行政院並指定經濟部依據本條之規定，於 95 年 10 月 19 日公告「零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」，並自 96 年 4 月 1 日施行。並由各主管機關依據消費者保護法授權，及參酌上開應記載及不得記載事項，本諸職權針對各行各業發行禮券之情形，公告特別的商品及服務的禮券定定型化契約應記載及不得記載事項，以維持禮券定型化契約之公平合理、至少具有最低公平標準，以維護消費者權益。

截至 104 年 7 月 1 日為止，目前已有 77 種商品或服務之定型化契約應記載及不得記載事項命令，其中包含數種禮券定型化契約。茲將各禮券定型化契約之名稱、適用範圍、公告及生效日期、主管機關彙整如下表格：

[15] 零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項，同註 9。

表 4-4、各類型禮券應記載及不得記載事項適用範圍及生效比較表

禮券應記載及不得記載事項適用範圍及生效比較表[16]				
禮券名稱	**適用範圍**	**公告日期**	**生效日期**	**主管機關**
零售業等商品(服務)禮券定型化契約應記載及不得記載事項	零售業，包括： 食品、服飾品、家庭電器及設備、電腦資訊設備、運動用品、百貨公司、超市、便利商店、量販店、加油站等 服務業，包括： 洗衣業、視聽歌唱業、一般浴室業、三溫暖業、理髮美髮業、K書中心、室內兒童遊樂園業等行業。	95/10/19	96/4/1	經濟部
		103/10/16 修正		
菸酒商品禮券定型化契約應記載及不得記載事項	菸酒商品零售業	95/10/30	96/4/1	財政部
		102/9/11 修正	103/3/1	
電影片禮券定型化契約應記載及不得記載事項	電影業	95/11/14	96/4/1	新聞局
		96/8/31 修正		
		103/1/13 修正		
觀光遊樂業商品(服務)禮券定型化契約應記載及不得記載事項	觀光遊樂業	95/11/16	96/4/1	交通部

[16] 本表引用「黃明陽，禮券消費者權益之探討」所附表格，本所並修正更新本表之內容。參黃明陽，禮券消費者權益之探討，消費者保護研究，第 14 輯，2009 年 3 月，頁 21；又文化部於 101 及 102 年公告「藝文表演票券定型化契約應記載及不得記載事項」及「藝文展覽票券定型化契約應記載及不得記載事項」，雖該票券性質同屬無因有價證券，惟消費者購買禮券通常係為數次消費、而該票券通常僅為一次消費，故習慣上兩者有別，規範內容也有較大不同，因而未列於此表格中。

禮券應記載及不得記載事項適用範圍及生效比較表[16]				
禮券名稱	**適用範圍**	**公告日期**	**生效日期**	**主管機關**
旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項	旅館業	95/11/16 99/11/5 修正	96/4/1	交通部
觀光旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項	觀光旅館業	95/11/16 99/1/14 修正	96/4/1	交通部
民宿商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項	民宿業	95/11/16 99/11/5 修正	96/4/1	交通部
路外停車場回數票禮券定型化契約應記載及不得記載事項	路外停車場業	95/11/24	96/4/1	交通部
圖書禮券定型化契約應記載及不得記載事項	圖書業	95/12/8	96/4/1	新聞局
休閒農場商品兌換券定型化契約應記載及不得記載事項	休閒農場業	95/11/1	95/11/1	行政院農業委員會
森林遊樂區商品服務券定型化契約應記載及不得記載事項	森林旅遊業	95/12/28	95/12/28	行政院農業委員會

禮券應記載及不得記載事項適用範圍及生效比較表[16]				
禮券名稱	適用範圍	公告日期	生效日期	主管機關
按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項	按摩業（指依身心障礙者權益保障法第四十六條、視覺障礙者從事按摩業或理療按摩資格認定及管理辦法，由視覺障礙者從事之按摩業，包含按摩及理療按摩。）	96/1/8	96/4/1	行政院勞工委員會
		98/9/21 廢止		內政部
體育場館業發行商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項	體育場館業，包括： （一）高爾夫球場業。 （二）競技及休閒體育場館業：依國民體育法規定，從事競技及休閒體育場館（包括各種練習場）之經營者。如撞球場、技擊館、體育館、拳擊館、排球場、沙灘排球場、健身中心、田徑場、足球場、滑雪場、滑草場、棒球場、網球場、手球場、羽球場、桌球館、射擊場、馬術場、溜冰場、壘球場、籃球場、游泳池、保齡球館、韻律（舞蹈）中心、賽車場、自	96/2/13	96/8/15	行政院體育委員會

禮券應記載及不得記載事項適用範圍及生效比較表[16]				
禮券名稱	適用範圍	公告日期	生效日期	主管機關
	由車場、曲棍球場、柔道館、跆拳道館、舉重館、滑冰館、空手道館、壁球場、合球場、高爾夫練習場、棒球打擊場、合氣道館、體育館、海水浴場、攀岩場、漆彈運動場等各種運動之場館經營業務。			
電信商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項	電信業	96/3/16	96/4/1	國家通訊傳播委員會
娛樂漁業禮券定型化契約應記載及不得記載事項	娛樂漁業（提供漁船，供以娛樂為目的者，在水上採捕水產動植物或觀光之漁業，前項所稱觀光，係指乘客搭漁船觀賞漁撈作業或海洋生物及生態之休閒活動）	96/9/12	96/9/12	行政院農業委員會
餐飲業等商品(服務)禮券定型化契約應記載及不得記載事項	餐飲、烘焙等行業	96/9/20	96/10/1	行政院衛生署
瘦身美容業商品（服務)禮券定型化契約應記載及不得記載事項	瘦身美容業	96/12/29	96/6/1	行政院衛生署

又 104 年 6 月 17 日，消費者保護法第 17 條修正，除了第 1 項仍保留對主管機關授權發布法律命令，以對定型化契約予以規範外，正式於法律條文中列舉定型化契約中「應記載」及「不得記載」之事項，其中應記載事項得包括：

(1) 契約之重要權利義務事項；

(2) 違反契約之法律效果；

(3) 預付型交易之履約擔保；

(4) 契約之解除權、終止權及其法律效果；

(5) 其他與契約履行有關之事項。

不得記載事項得包括：

(1) 企業經營者保留契約內容或期限之變更權或解釋權、限制或免除企業經營者之義務或責任；

(2) 限制或剝奪消費者行使權利；

(3) 加重消費者之義務或責任；

(4) 其他對消費者顯失公平事項（參閱第 2 章）。

2. 禮券定型化契約之應記載事項

應記載事項，係為了確保消費公平而應載於定型化契約中，作為雙方權利義務依據之契約重要是項。而該些應記載事項條款有逕行成為定型化契約內容之效力，亦即若發行人未記載經公告的應記載事項，該條款仍構成與消費者間的契約內容之一部分，消費者保護法第 17 條第 5 項可參。此外，應記載事項之規定並未排除發行人登載其他事項之可能，當事人在法令未禁止的情況下，仍可記載其他事項。

本委託案經彙整參酌上述 17 種商品及服務禮券所定之定型化契約應記載及不得記載事項中，應記載事項主要包括如下：

(1) 契約之重要權利義務事項：

此些條款可使消費者瞭解禮券契約之基本內容，提供消費者選擇判斷的機會，防免日後受騙之情形發生。

包括發行人名稱、地址、統一編號及負責人姓名；商品（服務）禮券之面額或使用之項目、次數；商品（服務）禮券發售編號；使用方式。

(2) 發行人之履約保證責任：發行人應依下列所列方式選擇一方

式負履約保證責任：

禮券發行人應就禮券之履約負最終責任，故發行人應將相關訊息記載於禮券上，以明示其履約責任，包括：

A. 本商品（服務）禮券內容表彰之金額，已經○金融機構提供足額履約保證，前開保證期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止（至少一年）。

B. 本商品（服務）禮券，已與○公司（同業同級，市占率至少百分之五以上）等相互連帶保證，持本禮券可依面額向上列公司購買等值之商品（服務）。上列公司不得為任何異議或差別待遇，亦不得要求任何費用或補償。前開相互連帶保證期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止（至少一年）。

C. 本商品（服務）禮券所發行之金額，已存入發行人於○金融機構開立之信託專戶，專款專用；所稱專用，係指供發行人履行交付商品或提供服務義務使用。前開信託期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止（至少一年）。

D. 本商品（服務）禮券已加入由○商業同業公會辦理之○同業禮券聯合連帶保證協定，持本禮券可依面額向加入本協定之公司購買等值之商品（服務）。前開連帶保證期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止（至少一年）。

E. 其他經經濟部許可之履約保證方式（須敘明該履約保證方式內容，及經濟部許可同意公文字號）。

(3) 消費爭議處理申訴（客服）專線（例如：電話……；電子信箱……；網址……）：

此以利於消費者尋求救濟管道，使爭議得以迅速獲得處理。

(4) 禮券毀損或滅失等原因換發禮券之規定：

分別規定禮券因毀損、變形，或記名式禮券遺失、被竊或滅失等情事，應如何補發，以及費用應如何由何方承擔之規定，包括：

A. 商品（服務）禮券如因毀損或變形，而其重要內容（含主、副券）仍可辨認者，得請求交付商品（服務）或補發；其補發費用紙券每次不得超過新臺幣五十元，磁條卡或晶片卡每張不得超過新臺幣一百元。

B. 商品（服務）禮券為記名式，如發生遺失、被竊或滅失等情事，得申請補發；其補發費用紙券每次不得超過新臺幣五十元，磁條卡或晶片卡每張不得超過新臺幣一百元。

(5) 發行人以第三方為實際商品（服務）之提供者時，應記載實收資本額（不得低於新臺幣三千萬元）及實際商品（服務）提供者之名稱、地址及聯絡電話。其履約保證機制，應依第二點第一款金融機構足額履約保證，或第二點第三款之存入金融機構開立信託專戶專款專用之方式為之：

此為保障消費者之權益，明定第三方發行禮券之義務，降低非實際提供服務者發行禮券之違約風險。

(6) 禮券因以磁條卡、晶片卡或其他電子方式發行，而難以完整呈現應記載事項者，發行人應以書面或其他合理方式告知消費者應記載事項及得隨時查詢交易明細之方法：

因磁條卡或晶片卡形式之服務禮券可記載之區域有限，故明定得以書面或其他合理方式揭露應記載事項，並應提供消費者查詢交易明細及餘款之功能。

3. 禮券定型化契約不得記載事項

定型化契約中不得記載事項則係為了防免發行人基於其經濟上優勢地位，任意訂立條款，不合理分配契約上負擔或危險，有損於消費者之權益，排除訂立不公平條款。若發行人違反規定仍將該條款定入契約之中，則應為無效。

參酌上述表列商品及服務禮券所定之定型化契約應記載及不得記載事項中，不得記載事項主要包括如下：

(1) 不得記載使用期限、未使用完之禮券餘額不得消費、免除交付商品或提供服務義務，或另行加收其他費用、限制使用地點、範圍、截角無效等不合理之使用限制；發行人以第三方為實際商品（服務）之提供者時，不得記載較現金消費不利之情形，不得記載消費者要求退回禮券返還價金時

加收任何費用之文字或類似意思之表示。

因禮券係屬預付消費性質，等同現金看待，故原則上於使用時不得有任何不合理之使用限制，然針對部分情形，經濟部有特別予以函釋排除上開原則之適用：「如百貨公司（含大賣場）部分商店或專櫃係以支付租金並開立自己之發票營業；或特殊精品專櫃商，其經營策略即不收取禮券。此種經營型態，倘於禮券之『使用方式』有明確、清楚記載不收受禮券之事項或範圍（如不收受禮券之商店或專櫃名稱應記載於正面、字體大小與顏色予以特別標示等），並於該等商店或專櫃充分揭露此等訊息，且符合消費者保護法之資訊充分揭露與定型化契約章節所定誠信公平與明示等原則，不致使消費者誤認其所持禮券得使用於所有商店或專櫃，影響消費判斷與權益者，尚無違反商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項相關規定。」

(2) 契約公平性之規範：

消保法第 17 條對定型化契約之規定，許多防免消費者與業者之間處與權利義務關係不對等之情況，包括：

A. 不得記載發行人得片面解約之條款。

B. 不得記載預先免除發行人故意或重大過失責任。

此條為民法第 222 條規定之重申，亦為消保法第 17 條第 3 項第 2 款規定之重申。

C. 不得記載違反其他法律強制禁止規定或為顯失公平或欺罔之事項。

D. 不得記載廣告僅供參考。

此條為消費者保護法第 22 條規定之重申，若發行人怠於履行廣告之內容，應承擔消費者保護法第 23 條第 1 項之責任。

(3) 發行人以第三方為實際商品（服務）之提供者時，不得記載消費者與實際商品（服務）提供者發生消費爭議時，免除自身責任之文字或類似意思之表示：此為確保第三方發行之禮券不會使消費者處於權利不對等之情形。

三、民俗調理業服務禮券之特性及其應有之對應規範

緣行政院指定經濟部依消費者保護法之規定，於 95 年 10 月 19 日公告

「零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」後，由各主管機關就個別商品及服務項目之性質，公布定型化規範之法規命令。而此些法規命令除了體現消費者保護法及民法下對定型化之規範目的，亦可能針對特定商品及服務之特性或參酌其他相關法令，而訂立特別之條文。如「菸酒商品禮券定型化契約應記載及不得記載事項」中規定應記載事項應包括：「不得提供予未滿十八歲之人」、「不得以折扣價格或其他優惠方式發行菸品禮券或以菸品禮券為贈品或獎品」，以求符合菸害防治法第 13 條第 1 項及同法第 9 條之規定。本委託案亦就民俗調理業服務特性，參酌其他定型化契約應記載及不得記載事項之規定為檢討，以作為擬定民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項之基礎。

(一)民俗調理業之規範

於擬定民俗調理業的禮券定型化契約應記載及不得記載事項規範之內容前，應先確認民俗調理業之性質及特殊性，再依據消費者保護法第 17 條以及參考可視為禮券規範總則條款之「零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項」之規定，輔以其他性質相近產業類型之禮物券規定。

行政院衛生署於 101 年 5 月 29 日衛署醫字第 1010206672 號令發布「民俗調理之管理規定事項」，而改制後衛生福利部又於 104 年 5 月 12 日以衛部中字第 1041860595A 號公告發布「民俗調理業管理規範」，並於同年 6 月 1 日起實施。此管理規範可視為民俗調理業的主要規範依據；另衛生福利部於 103 年所公布的「民俗調理人員工作倫理守則範本」，對民俗調理業者之予以規範。此二規則可作為認識民俗調理業經營方式的主要依據。

依「民俗調理業管理規範」第 2 條指出，所謂「民俗調理」，係「以紓解筋骨、消除疲勞為目的，單純運用手技對人施以傳統整復推拿、按摩、腳底按摩、指壓、刮痧、拔罐，或使用民間習用之青草泥、膏、液狀外敷料所為之非醫療行為。」此名詞之定義應於禮券之前言中予以明確揭示，以確認何種服務將落入此規範之射程範圍。

(二)民俗調理業與醫療行為

1. 實務常見紛爭：

本所蒐集近十年來，民俗調理業者於執行業務上常見之糾紛案件（如表 5-1），依照實務見解，未涉及接骨或交付內（服）

藥物之民俗調理業者均不得行使醫療行為，依照醫療法之規定，自不得為醫療內容之廣告，縱係影射、暗示有醫療效能者，亦在禁止之列。

然查，少數業者未能查覺本身經營之事業非屬醫療事業，開設之場所亦非醫療機構，往往於市招看版、網路、報紙或其他媒體登載具有醫療效能之廣告內容，使消費者有誤信民俗調理行為為醫療行為，且有醫療效能之虞，而遭受行政處罰。

再者，亦常見消費者或從業人員因進行推拿、按摩，而遭部分不肖從業人員之性騷擾，是此部分實有訂定相關查核規範之必要。

茲將法院實務判決有關民俗調理業之糾紛實務案例彙整如下表所示：

表 4-5、民俗調理業糾紛實務判決（由泰鼎法律事務所整理彙整）

項次	案件名稱	法院判決	違反法規	判決要旨
1	腰椎治療廣告案	最高行政法院96年裁字1744號裁定	醫療法第9、84、87、104條 醫療法施行細則第4條	行為人未取得合法醫師資格，所開設之機構亦非醫療機構（中國筋骨傷科），卻於網站及其營業場所玻璃門上刊登暗示或影射醫療業物之醫療廣告，依醫療法及施行細則規定，非醫療機構者，不得以傳播媒體或其他方式，達招攬患者為醫療，如廣告內容暗示或影射醫療業物者，視為醫療廣告。未涉及接骨或交付內（服）藥物之民俗調理行為非屬醫療行為，亦不得為醫療廣告，行為人違反上開法令，地方主管機關得處以罰鍰。
2	無藥治病廣告案	臺北高等行政法院98年簡字第539號判決	醫療法第84、87、104條	行為人未取得合法醫師資格，亦非開設醫療機構，卻於網站記載得以不用任何藥物之方式排除頭痛、失眠、乾眼症、高血壓等症狀，已涉及暗示或影射醫療業物，且廣告中刊有連絡電話及費用等資訊，顯為

項次	案件名稱	法院判決	違反法規	判決要旨
				醫療業物之宣傳，依醫療法規定，非醫療機構者，不得以傳播媒體或其他方式，達招攬患者為醫療，如廣告內容暗示或影射醫療業物者，視為醫療廣告，行為人所為，地方主管機關處以罰鍰並無違誤。
3	整脊醫療廣告案	臺北高等行政法院97年簡字第330號判決	醫療法第2、9、11、84、87、104條	行為人未取得合法醫師資格，卻以「○○脊骨神經科」之看版，暗示、影射其有經營脊骨、神經治療之醫療業務。再者，行為人之業務簡介，可之其行為目的在於矯正錯位之脊椎關節，使神經正常傳導，顯見其屬醫療行為，依醫療法規定，非醫療機構者，不得以傳播媒體或其他方式，達招攬患者為醫療，如廣告內容暗示或影射醫療業物者，視為醫療廣告。未涉及接骨或交付內（服）藥物之民俗調理行為非屬醫療行為，亦不得為醫療廣告，行為人既非合法醫師、亦未開設醫療機構，自不得為醫療廣告業務及從事醫療行為，依上開法令規定，地方主管機關處以罰鍰並無違誤。
4	國術整脊醫療廣告案	臺北高等行政法院96年簡字第965號判決	醫療法第2、9、84、104條	行為人為傳統整復國術館負責人，並非合法醫師，卻於網路刊登暗示、影涉醫療業務之廣告內容，依醫療法規定，非醫療機構者，不得以傳播媒體或其他方式，達招攬患者為醫療。未涉及接骨或交付內(服)藥物之民俗調理行為非屬醫療行為，亦不得為醫療廣告，依上開法令規定，地方主管機關處以罰鍰並無違誤。
5	盲人推拿醫療廣告	臺北高等行政法院94年簡字第1010號	醫療法第84、87、104條	1. 依醫療法規定，非醫療機構者，不得以傳播媒體或其他方式，達招攬患者為醫療，如廣告內容暗示或影射醫療業物者，視為醫療廣告。未涉及接骨

項次	案件名稱	法院判決	違反法規	判決要旨
	案	判決		或交付內（服）藥物之民俗調理行為非屬醫療行為，亦不得為醫療廣告，如有違反，處以罰鍰。 2. 行為人未取得合法醫師資格，其所設立之按摩中心亦非醫療機構，是行為人以廣告暗示、影射其有治療五十肩、頭痛、落枕等醫療業務，依上開法令規定，地方主管機關處以罰鍰並無違誤。
6	腳底按摩治療廣告案	臺北高等行政法院 94 年簡字第 626 號判決	醫療法第 2、9、11、84、87、104 條	1. 依醫療法規定，非醫療機構者，不得以傳播媒體或其他方式，達招攬患者為醫療，如廣告內容暗示或影射醫療業物者，視為醫療廣告。未涉及接骨或交付內（服）藥物之民俗調理行為非屬醫療行為，亦不得為醫療廣告，如有違反，處以罰鍰。 2. 行為人非合法醫師，開設者亦非醫療機構，卻於網路刊登暗示、影涉醫療業務之廣告內容，依上開法令規定，地方主管機關處以罰鍰並無違誤。
7	糖尿病氣功療法廣告案	臺中高等行政法院 96 年簡字第 393 號判決	醫療法第 9、84、87、104 條	1. 依醫療法規定，非醫療機構者，不得以傳播媒體或其他方式，達招攬患者為醫療，如廣告內容暗示或影射醫療業物者，視為醫療廣告。未涉及接骨或交付內（服）藥物之民俗調理行為非屬醫療行為，亦不得為醫療廣告，如有違反，處以罰鍰。 2. 行為人非合法醫師，開設者亦非醫療機構，卻於網路刊登暗示、影涉糖尿病治療等醫療業務之廣告內容，依上開法令規定，地方主管機關處以罰鍰並無違誤。

項次	案件名稱	法院判決	違反法規	判決要旨
8	排毒醫療廣告案	高雄高等行政法院94年簡字第285號判決	醫療法第9、11、84、87、104條 醫療法施行細則第4條	1. 依醫療法及施行細則規定，非醫療機構者，不得以傳播媒體或其他方式，達招攬患者為醫療，如廣告內容暗示或影射醫療業物者，視為醫療廣告。未涉及接骨或交付內（服）藥物之民俗調理行為非屬醫療行為，亦不得為醫療廣告，如有違反，處以罰鍰。 2. 行為人開設之「○○人生美容坊」非醫療機構，卻於報紙刊登調節自律神經、脊椎保健等顯有暗示、影涉影響人體生理機能等醫療業務之廣告內容，依上開法令規定，地方主管機關處以罰鍰並無違誤。
9	無人場所趁機猥褻案	臺灣臺北地方法院101年侵訴字第30號刑事判決	刑法第228條第2項	被告為「○○養生會館」之按摩師，於被害人至該處會館消費時，利用為替被害人按摩之機會，並趁店內無其他人之際，趁機碰觸被害人之私密部位，並造成被害人心理不適，係利用機會猥褻被害人，所為涉犯刑法第228條第2項之罪，處以有期徒刑。
10	包廂性騷擾案	臺灣臺北地方法院102年侵易字第17號刑事判決	性騷擾防治法第25條	被告為「○○○○養生會館」之按摩師，於被害人前往會館消費時，利用為其按摩之機會，趁機性騷擾被害人，違反性騷擾防治法第25條，然因雙方已達成調解，且被害人未提出告訴，是本件諭知不受理。
11	強制性交案	臺灣高等法院103年侵上訴字第58號刑事判決	刑法第221條	被害人為「○○○養生館」之按摩師，被告於會館消費時，經由店內安排由被害人為被告按摩，被告乃趁此機一再對被害人為猥褻行為，並進一步為強制性交行為，所為涉犯刑法第221條第1項行為，處以有期徒刑，尚屬合理，被告上訴駁回。

2. 再者，如第 1 章所述，過去實務運作上多由中醫師進行初步看診後，即交由推拿技術員或助理獨立進行推拿行為，使推拿按摩難以受到醫師把關，故 99 年監察院針對此情況提出糾正案，衛生署亦就此而要求傷科推拿整復僅限於醫療行為，依據醫療法之規定，由具執照之醫師為之；而屬於不具醫療效能、非醫療行為之推拿應宜退出診所，改稱「按摩」或「民俗調理按摩」。故從「民俗調理業管理規範」第 2 條之規定即可知，將民俗調理行為限定於非醫療行為者，明確將醫療行為與非醫療行為之民俗調理行為劃分開來。此後，民俗調理業者即不得在廣告上稱為「民俗『療』法」，調理行為也不能宣稱有「療效」。民俗調理除了在定義上明確指出為「非醫療行為」，在民俗調理業管理規範中也一再指出民俗調理業與醫療有別。同規範第 3 條規定：「民俗調理營業場所設置，如與醫療機構同一地址，應有實體區隔，且獨立門戶及市招。」第 4 條規定：「民俗調理營業場所不得陳列藥品、醫療器材。」第 10 條規定：「民俗調理人員不得為易讓人誤認具有醫療效能之建議或宣傳。」第 11 條規定：「民俗調理人員不得在醫療機構招攬客人。」第 12 條規定：「民俗調理人員執行業務，應配戴身分識別證，並不得對消費者從事下列行為：（一）醫療行為。（二）以口語或其他方式提供醫療或藥物諮詢建議。（三）自行調製藥品。（四）販賣藥品、醫療器材。」皆是規範將民俗調理與醫療區分脫鉤，防免消費者對民俗調理業以為可為醫療服務之誤解。

依「民俗調理人員工作倫理守則範本」第 3 條規定：「民俗調理人員應自我認知工作角色與職責，執行業務不逾越專門職業技術人員法規業務範圍。」該條立法說明中指出：「由於民俗調理與醫療服務內容，均涉及於人體上之手技操作，為避免消費者混淆，民俗調理人員應自我認知工作角色，且不得逾越從業範圍。」也是防免民俗調理人員從事相關服務時，行為涉及更高專業度的醫療行為。

最高法院於 92 年台上字第 1746 號民事判決認定，醫療行為並不適用消保法之規定，將醫療行為排除於消保法適用之外；又依衛生署 94 年 3 月 17 日衛署醫字 0940203047 號函中對醫療法第 61 條予以解釋，認為醫療行為不得以發行禮券方

式招攬客人。民俗調理業既然為非醫療行為，在無其他法律規範明文禁止情況下，即與其他服務業無異，故得發行禮券以招攬客人，且亦受民法及消保法之規範。是民俗調理業之禮券上亦應留意防免使消費者誤認為具有醫療行為，如透過應記載事項中特別敘明、或於不得記載事項中列入「不得使消費者誤為具醫療功能」等語之規定。

(三)其他商品（服務）禮券之特性

於確認民俗調理業得以發行服務禮券後，應可續為設計禮券規範之內容。就民俗調理業管理規範及民俗調理人員工作倫理守則範本中，除了強調與醫療行為之區別外，其他之條款主要與服務的進行方式、經營的環境有關。此些條款雖與消費者有關，惟係屬於契約之給付內容，較難以之作為記載於禮券上之定型化條款上。故宜再參酌各禮券定型化契約應記載事項予以擬定。

經參酌各禮券之規範之內容，茲將各類型禮券規範中應記載事項列表如下：

表 4-6、禮券定型化契約應記載事項比較表

禮券定型化契約應記載事項比較表											
禮券種類	發行人名稱、地址、統一編號及負責人姓名	商品（服務）禮券之面額或使用之項目、次數	商品(服務)禮券發售編號	使用方式	履約保證機制	消費爭議處理申訴(客服)專線	毀損或變形得請求交付商品（服務）或補發	記名式，如發生遺失、被竊或滅失等情事，得申請補發	第三方發行應記載事項	磁條卡、晶片卡或其他電子方式發行記載方式	其他
零售業等商品（服務）	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	X
菸酒商品禮券	○	○	○	○	僅列3項	○	○	○	○	○	不得提供予未滿十八歲之人。 不得以折扣價格或其他優惠方式發行菸品禮券或以菸品禮券為贈品或獎品。
電影片禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	○	X

觀光遊樂業商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
旅館業商品(服務)禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	履約保證內容應載於禮券正面明顯處、商品（服務）禮券之履約保證期間自發行日起算至少一年，期間屆滿後，禮券持有人仍得向發行人請求給付。
觀光旅館業商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	發行人委託第三人代為銷售所發行之禮券者，應於禮券同時載明受委託第三人名稱、委託銷售起迄日期及經

											目的事業主管機關同意備查之文號。
民宿商品（服務）禮券	○	○	○	○	僅列3項	○	X	X	禮券發行人委託第三人代為銷售所發行之禮券者，應載明受託人名稱及委託銷售起迄日期	X	履約保證內容應載於禮券正面明顯處、商品（服務）禮券之履約保證期間自發行日起算至少一年，期間屆滿後，禮券持有人仍得向發行人請求給付。
路外停車場回數票禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
圖書禮券	○	○	○	○	僅列3項	○	X	X	X	X	X
休閒農場商品兌換券	○	○	○	○	僅列1項	○	X	X	X	X	X

森林遊樂區商品服務券	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X	X
按摩業服務禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
體育場館業發行商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
電信商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
娛樂漁業禮券	○	X	○	○	僅列2項	○	X	X	X	X	注意及遵守事項
餐飲業等商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	x	X
瘦身美容業商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X

從上表可知，發行人名稱、地址、統一編號及負責人姓名、商品（服務）禮券之面額或使用之項目、次數、商品（服務）禮券發售編號、使用方式、履約保證機制、消費爭議處理申訴（客服）專線皆為各禮券必備之記載事項，也係為最基本的禮券條款，且並未與民俗調理業之特性有明顯衝突，故該命令中所載之應記載事項，應亦可適用於民俗調理業之禮券之中，無特別應予以排除之部分。

又自 102 年起，零售業等商品（服務）、菸酒商品業、電影片業禮券之規範先後修正，並定有毀損或變形得請求交付商品（服務）或補辦、記名式如發生遺失、被竊或滅失等情事得申請補發、磁條卡、晶片卡或其他電子方式發行記載方式等條款，故亦得列入民俗調理業服務禮券之規範。

此外，新修正之消保法第 17 條第 2 項所列舉應記載事項得包括之條款中，違反契約之法律效果、及契約解除權、終止權及法律效果，並未列於零售業等商品（服務）禮券定型化契約之應記載中，雖本項規定係「得」包括，主管機關仍有裁量權，惟為追求定型化契約之完整性，宜增列入之。

不過值得留意者，民俗調理業屬服務業，其所發行之禮券亦屬服務禮券，不得提供多用途支付使用、現金儲值卡（例如：悠遊卡）或其他具有相同性質之晶片卡。故民俗調理業之禮券應排除電子票證發行管理條例所稱之電子票證。

而各禮券定型化契約不得記載事項之比較如下表：

表 4-7、禮券定型化契約不得記載事項比較表

禮券定型化契約不得記載事項比較表												
禮券名稱	不得記載使用期限	不得記載「未使用完之禮券餘額不得消費」	不得記載免除交付商品或另行加收其他費用	不得記載限制使用地點、範圍、截角無效等不合理之使用限制。	不得記載發行人得片面解約之條款	不得記載預先免除發行人故意或重大過失責任	不得記載違反其他法律強制禁止規定或為顯失公平或欺罔之事項	不得記載廣告僅供參考	第三方發行不得記載較現金消費不利之情形	第三方發行不得記載消費者要求退回禮券返還價金時，加收任何費用之文字或類似意思之表示	第三方發行不得記免責條款	其他
零售業等商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	X
菸酒商品禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	本規範定有「不得記載無實際提供商品者為禮券發行人」，故無法由第三方發行			
電影片禮券	○；定有但書	○	X	○	○	○	○	○	X	X	X	X
觀光遊樂業商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X

旅館業商品(服務)禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
觀光旅館業商品（服務)禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
民宿商品（服務)禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
路外停車場回數票禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
圖書禮券	○	○	○	○；定有但書	○	○	○	○	X	X	X	X
休閒農場商品兌換券	X	X	X	X	○	○	○	○	X	X	X	X
森林遊樂區商品服務券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X

按摩業服務禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
體育場館業發行商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
電信商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
娛樂漁業禮券	○	X	○	○	○	○	○	○	X	X	X	不得為記名式之記載
餐飲業等商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
瘦身美容業商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X

從上表可知，各禮券規定不得記載事項幾乎都包括使用期限、未使用完之禮券餘額不得消費、免除交付商品或另行加收其他費用、限制使用地點、範圍、截角無效等不合理之使用限制、發行人得片面解約之條款、預先免除發行人故意或重大過失責任、違反其他法律強制禁止規定或為顯失公平或欺罔之事項、廣告僅供參考等規定，此與新修正之消保法第 17 條第 2 項所列舉不得記載事項得包括之條款規定上，並無二致。而新修正的零售業等（商品）禮券更針對第三方發行禮券予以規定。依民法之規定，縱使發行人不對消費者負有給付商品或服務之義務，惟對消費者仍負有買賣契約之義務，如消費者所持之禮券無法主張其應有之權利，發行人即負有不完全給付之責任。因此適於納為民俗調理業服務禮券規定之條款。

另，因民俗調理業係屬服務業，復買賣業與服務業具本質上之差異，為比較服務業禮券應記載事項及不得記載事項，予以歸納及類型化之，作為民俗調理業服務禮券應記載事項及不得記載事項應記載事項及不得記載事項之參考。

茲將各服務禮券規範中應記載事項及不得記載事項列表如下：

表 4-8、服務業別定型化契約應記載事項比較表

禮券定型化契約應記載事項比較表											
禮券種類	發行人名稱、地址、統一編號及負責人姓名	服務禮券之面額或使用之項目、次數	服務禮券發售編號	使用方式	履約保證機制	消費爭議處理申訴(客服)專線	毀損或變形得請求交付服務或補發	記名式，如發生遺失、被竊或滅失等情事，得申請補發	第三方發行應記載事項	磁條卡、晶片卡或其他電子方式發行記載方式	其他
零售業等商品（服務）	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	X
觀光遊樂業商品(服務)禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
旅館業商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	履約保證內容應載於禮券正面明顯處、商品(服務）禮券之履約保證期間自發行日起算至少一年，期間屆滿後，禮券持有人仍得

											向發行人請求給付。
觀光旅館業商品(服務)禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	發行人委託第三人代為銷售所發行之禮券者，應於禮券同時載明受委託第三人名稱、委託銷售起迄日期及經目的事業主管機關同意備查之文號。
民宿商品（服務）禮券	○	○	○	○	僅列3項	○	X	X	禮券發行人委託第三人代為銷售所發行之禮券者，應載明受託人名稱及委	X	履約保證內容應載於禮券正面明顯處、商品(服務）禮券之履約保證期間自發行日起算至少一

									託銷售起迄日期		年，期間屆滿後，禮券持有人仍得向發行人請求給付。
按摩業服務禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
體育場館業發行商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
電信商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X
餐飲業等商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	x	X
瘦身美容業商品(服務)禮券	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X	X

表 4-9、服務定型化契約不得記載事項比較表

禮券定型化契約不得記載事項比較表												
禮券名稱	不得記載使用期限	不得記載「未使用完之禮券餘額不得消費」	不得記載免除交付商品或另行加收其他費用	不得記載限制使用地點、範圍、截角無效等不合理之使用限制。	不得記載發行人得片面解約之條款	不得記載預先免除發行人故意或重大過失責任	不得記載違反其他法律強制禁止規定或為顯失公平或欺罔之事項	不得記載廣告僅供參考	第三方發行不得記載較現金消費不利之情形	第三方發行不得記載消費者要求退回禮券返還價金時,加收任何費用之文字或類似意思之表示	第三方發行不得記免責條款	其他
零售業等商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	X
觀光遊樂業商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
旅館業商品(服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
觀光旅館業商品（服務）	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X

禮券												
民宿商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
按摩業服務禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
體育場館業發行商品(服務)禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
電信商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
餐飲業等商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
瘦身美容業商品（服務）禮券	○	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X

自上二表可見，服務禮券與商品禮券不得記載事項之規範雖無太大差異；然就應記載事項之規範，服務禮券就「毀損或變形得請求交付服務或補發」、「記名式，如發生遺失、被竊或滅失等情事，得申請補發」、「第三方發行應記載事項」及「磁條卡、晶片卡或其他電子方式發行記載方式」等事項並無規範要求應載於定型化契約中，相較於商品禮券，對消費者而言保護較為不周，故宜在民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項草案中增列、規範，對消費者之保護以茲完備。

四、會議紀錄

為了更精確草擬出「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項」，並確切瞭解學界及業界之觀點，本研究先後召開「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項專家審議會議」及「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項業界說明會」各兩場，並整合專家學者及實務界執業者之意見及意見，供本所為撰擬草案之參考。

謹檢附各次會議紀錄內容，並彙整各次會議紀錄不同意見如下：

(一)「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項專家審議會議」會議紀錄

衛生福利部中醫藥司

104 年度「建立民俗調理業服務禮券管理模式」

委託研究計畫辦理「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項專家審議會議」會議紀錄

時間：104 年 9 月 14 日

主席致詞：（略）

受託單位報告：（詳簡報內容）

專家學者意見：（依發言順序）

教授甲	1. 建議參照其他禮券，將履約保證內容規定記載於禮券正面。 2. 條文中提及之其他經衛生福利部許可之履約保證方式，建議得加入中央消費者保護主管機關即行政院消保處。 3. 建議於不得記載事項之第三（三）點內，加入不得限制使用時間及但書規定（例如得載明於應記載事項明確記載者，不在此限）。 4. 建議於不得記載事項是否加入：(1) 發行人不得片面解約；(2) 不得預先免除發行人故意或重大過失；(3) 不得記載廣告僅供參考，或類此字樣等內容。
教授乙	1. 禮券如係記載服務項目及使用次數，可否轉換為等值之其他服務項目，如可轉換，建議應列入應記載事項內容中。 2. 禮券如採用晶片卡時，晶片卡之毀損，如為消磁、折斷，是否與紙本同樣仍得換發，建請再研究。 3. 禮券有無採記名式可能，建請再研究。 4. 禮券有哪些情形要終止、解除契約並負返還價金之義務，建請再研究。 5. 有關履約保證方式，建議納入履約保證期間。
教授丙	1. 因前言提及衛生福利部 104 年 5 月 12 日公告，內容有拔罐項目，建請再確認此次是否有含括拔罐項目。 2. 鑒於業別不同，民俗調理業有何特殊性，何以有此研究案之必要，受託單位應蒐集此業別過去相關紛爭案例，並分析得否加入定型化契約內防範，並研析其申訴機制。 3. 補發禮券為何需限於得辨識者，消費、購買資料雙方應都具備，何以僅要求消費者負舉證責任，請再研究敘明。
教授丁	1. 建議分析服務禮券範例上，區分商品、服務業別，因此二類業別性質不同，紛爭案例亦不相同。

	2. 建議於前言部分加入「不具醫療效能」等字眼，彰顯民俗調理業與醫療業之不同。 3. 有關終止、解除之規定應放在消費者與業者簽定之「服務內容」之定型化契約中，此處是處理「禮券」之定型化契約條款，故此處之條文應解釋為如得終止或解除服務契約，則後端之禮券應如何處理。 4. 晶片卡部分，其記載或通知方式，建議得採簡訊或電子郵件方式告知。 5. 不得記載事項第二（三）點，建議改成「不得記載消費者與該（或提供服務之該）第三人」。 6. 不得記載事項第三點，以下幾點意見： (1) 使用期限部分，鑒於消費社會快速之變化，建議應係記載合理之使用期限，方為對消費者最佳之保障。 (2) 得限制或不得限制使用地點之利弊，建請再研究。 7. 不得記載事項第四點之說明二，就不以消費者保護法為限之文字，建請再研究如何表達最能傳達意思。
專家甲	1. 因業界可能以悠遊卡作為電子票證，建議可參考電子票證定型化契約，對於使用方式有較細緻之規定。 2. 毀損、滅失部分應區分記名式及不記名式，前者當得提供掛失、補發服務，但後者於電子票證上則無法提供。 3. 毀損、滅失後產生之費用應不限於補發費用，尚包括掛失費用、止付費用、重新設定費用等等，建議文字再做修正。 4. 建議可參考悠遊卡之使用規則記載方式，係隨卡檢附使用手冊。
專家乙	1. 請確認本研究是否納入全部民俗調理業服務項目，如僅針對傳統整復推拿、按摩及腳底按摩，則建議改名稱為上開三項即可。 2. 提醒業者：如不符合本應記載或不得記載事項，主管機關會有限期改善之要求，不會直接開罰。

意見交流

中華民國傳統整復推拿職業全國聯合總會	民俗調理業賣的人的服務，非固定產品，且本行業普遍為抽成制，非固定薪水，請主管機關考量此產業特性，勿貿然實施。
中醫藥司	1. 承中華民國傳統整復推拿職業全國聯合總會所言，民俗調理業賣的是人的服務，也就是技師服務，如果消費者因特定技師而買禮券，若該特定技師離開該場所，消費者有何保障？ 2. 又，請承辦單位考量是否要就全部產業適用此條款。 3. 回應專家乙問題，因目前公告民俗調理行為與經濟部商業登記行業別有落差。
桃園事傳統整復推拿師工會	1. 發行人是否須為業界？資格有無限制（例如有限公司）？資本額有無限制？建議加入此發行條件。 2. 因本業別為技術服務業，如消費者不滿意服務又有使用時間限制時，得否轉讓？其客訴管道？應由發行人或店家負全責？
臺中市衛生局	提供臺中市法制局意見： 1. 本產業多為小型企業、組織，於尋求銀行履約保證時，恐遭遇門檻問題，請主管機關與金融機構溝通。 2. 公會辦理之聯保協定恐有問題，食品服務業禮券已刪除。 3. 申訴機制建議走消保程序。 4. 查核表建議由各權責機關自行訂定。
臺北市衛生局	1. 建請再斟酌目的事業主管機關。 2. 臺北市目前採聯合稽查，應如何使用查核表？ 3. 民俗調理業目前無法可管。
中華民國民俗調理全國聯合會	執行上有困難。
高雄市衛生局	民俗調理業非醫療機構，非可由衛生單位管理，建議回歸消保機制處理。

台灣傳統推拿整復產業工會	履約保證執行尚恐有困難，建請再考量，或可參酌旅遊品保責任基金，由此產業全體建立履約基金。
教授丁	1. 以上多數提及者，多非目前應解決問題，本案為民俗調理業如欲發行禮券時之應記載或不得記載事項之研究，核心在於如何保障購買禮券之消費者，剛才提及者多為履約問題，與本案無關。 2. 另外，地方衛生局一再提及民俗調理業非醫療機構，主管機關應回歸消保單位，但瘦身美容產業也不是醫療產業，也是由衛生單位管理，此乃相類似之產業，非可謂非醫療機構即不由衛生單位管理。
專家乙	1. 承上教授丁所述，本案為與發行禮券者應遵循之內容，非謂業者一定要發行，主管機關並無改變消費習慣之意圖。 2. 針對名稱問題，雖然商業登記只有三種，但因前言並未涵括所有公告服務項目，如欲含括所有類別，前言建議全部範圍都要明列。
專家甲	1. 履約保證金，信託需要成本，對於業者吸引力可能不大。 2. 如欲使用悠遊卡，不得販賣其他衍生性產品。
泰鼎法律事務所	研究單位補充報告： 1. 教授丙提醒之爭議類別，本所業已整理歸類，因多數與禮券無太大關係，是本所未於此次會議報告，但會於期末報告另外說明。 2. 有關同業互保部分，目前新修正之食品業禮券目前並無列入，但旅館業基於其特性有納入此條款，考量民俗調理業具高度屬人性，會再參酌食品業禮券予以修正。 3. 又，因民俗調理業具高度屬人性，有關使用時間、地點是否不得限制，會再研究。 4. 商業登記目前僅有此三類，但依主管機關向來立場，只要是民俗調理行為均應受管制，建議無須修正。

散會：17：00

(二)「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項專家第二次審議會議」會議紀錄

衛生福利部中醫藥司

104 年度「建立民俗調理業服務禮券管理模式」委託研究計畫辦理「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項專家第二次審議會議」會議紀錄

時間：104 年 10 月 8 日

主席致詞：(略)

受託單位報告：(詳簡報內容)

專家學者意見：(依發言順序)

專家甲	1. 前言部分，建議將「醫療效能」改為「醫療行為」。 2. 建議將「指壓」納入。 3. 因「刮痧」及「拔罐」非可經常性施作之保養項目，建議剔除。 4. 因民俗調理業性質為服務業，如透過第三方發行，依其特性，難以控管發行量，恐使實際提供服務者無法負擔，影響消費者權益，進一步言之，請研究單位研究如何起算鑑賞期？ 5. 履約保證部分： (1) 建議統一前後用語，修改前言部分：「……並依下列方式擇一提供消費者自出售日起至少一年……」。 (2) 因民俗調理業為服務業，建議將「給付」改為「提供」。 6. 因毀損滅失之補發費用，建議改為「每次」而非「每張」。 7. 解除或終止契約，建議酌定手續費用以及上限(10%以內)。 8. 建議將「使用手冊」改為「使用說明」。
教授甲	1. 有關服務禮券得否轉換為等值的服務項目，如禮券強調者票面金額，應無限制服務項目之必要；反之，如強調者為服務項目、使用次數，則應無轉換之問題。

	2. 行政院消費者保護處屬於業務單位，不宜放入。 3. 第三方發行部分因正反意見相當，建請研究單位兩案併呈給主管機關作政策性考量。 4. 返還價金部分，建請研究單位注意以下疑義： (1) 消費者以票面金額 9 折購買，是否得要求全額退還，如何舉證證明購買金額？ (2) 大量蒐集禮券兌換現金恐涉及洗錢防制法。 5. 履約保證部分，因牽涉銀行會計年度，如向銀行購買履約保證，技術上如何保障一年，如何規範？
教授乙	1. 使用期限應考量服務提供內容、企業經營方式而定之，此次修正尚屬合理。 2. 應記載事項第 3 點：「得依業者留存資料加以確認」之規定，技術上是否可行？
教授丙	1. 履約保證條款要求記載於正面、不得記載事項部分及使用期限之修正，尚屬合理。 2. 另外，前面曾提及是否剔除拔罐及刮痧，考量此行業仍在發展，將面臨其他業別之獨立，是目前前言涵括之範圍，應屬合理。

意見交流

國立台北護理健康大學中西醫結合護理研究所	因拔罐及刮痧具有較高之醫療性，建議不宜納入民俗調理業範圍內。
臺北市政府法務局消費者保護官室	1. 應記載事項第 2 點，所謂與服務相當之金額，意思不明，如與票面金額不符時，恐生爭議。 2. 退款手續費建議明定上限。 3. 優惠措施建請明定內容及規定，例如贈品不得扣除或以均價計之。 4. 應記載事項第 6 點第三方發行之規定，建議定明實收資本額。 5. 基於禮券為高風險性商品，且保護消費者，使用期限原則上均應為無限期，是否刪除不得限制使用期限規定之特殊性究竟何在？

專家甲	補充消保官之優惠措施及使用期限意見，鑑於禮券發行不應單由業者承擔風險，尤其是履約保證期間之成本，是如禮券係以較優惠價格發行，業者應得定明消費者經過一定期限方使用者，應承擔一定費用。
中華傳統民俗調理學會	1. 刮痧及拔罐不應剔除。 2. 建請主管機關儘快建立證照制度。
社團法人中華傳統整復協會	有關禮券發行部分，是否應建立禮券發行之官方網站，發行者是否應經主管機關認可？
中華民國傳統整復推拿師職業工會全國聯合總會	因業界多不理解發行有無條件限制以及責任何在，請於業界說明會上詳予說明。
臺灣傳統整復推拿員職業工會聯合總會	1. 禮券發行有無限制、條件？ 2. 是否 3. 會有管理制度？
專家甲	關於業界之問題我補充如下： 1. 同業保證部分，類似者有洗衣業，其工會亦承擔大部分責任。 2. 履約保證之適用範圍、如何提供，是施行後，主管機關之宣導期該作的，非應於本件處理。 3. 高度屬人性產業如准許第三方發行，將產生許多問題。
教授甲	1. 主管機關應審慎考量究竟是對行業規範還是對民俗調理行為規範。 2. 履約保證部分，因民俗調理業者多為技術經營，其有形資產較少，無形資產較多，是由銀行負責履約保證者，恐需負擔較高成本，是工會保證應為較佳方式。 3. 第三方發行為一商業行為，無庸限制，業界應會找到最佳平衡點。
教授甲	1. 建議禮券發行上，得將其再分割成更小面額，例如一千元禮券可以分成十張一百元使用。 2. 禮券之防偽、變造措施，應注意。 3. 禮券之終止、解除應如何解釋、操作？ 4. 退款時，可預先扣除必要費用。

社團法人中華傳統整復協會	建議將履約保證第(三)點之公會改為相關團體辦理即可。
中華傳統民俗調理學會	有關民俗調理業是否包括刮痧及拔罐應由主管機關定之。
教授乙	1. 本研究案係針對禮券之發行，至於民俗調理業本身該如何發展、規範，應與此無關。 2. 使用期間，考量業別，尤其是屬人性高的民俗調理業，是否無限期對消費者有利，可再思考。再者，商業行為係業者與消費者間之互動，於考量上當應顧及兩邊之發展。 3. 終止、解除部分應於業者與消費者間服務契約預先處理。 4. 拔罐、刮痧爭議，此為主管機關之行政管理、監督關係，與本案無關。
泰鼎法律事務所	研究團隊補充報告如下： 1. 是否第三方發行，中醫藥司採取開放態度，本所未來提出時會兩案併呈。 2. 消費者保護處部分，因其多認已於前期參與，故會於審查時刪除自身規定。 3. 履約保證部分因禮券可能僅記載服務項目，故宜載明與何服務項目等值。 4. 有關優惠措施之價值，如因贈品價值較高致退款困難，恐影響消費者權益，本所將依建議寫明。 5. 使用期限、地點將在作更細緻之規範。

散會：17：00

(三)「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項業界說明會」台北場會議紀錄

衛生福利部中醫藥司

104 年度「建立民俗調理業服務禮券管理模式」委託研究計畫辦理「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項業界說明會」會議紀錄

時間：104 年 10 月 30 日

主席致詞：(略)

受託單位報告：(詳簡報內容)

意見交流：(依發言順序)

臺北市按摩業職業工會	有以下兩個問題詢問： 1. 透過 YAHOO 或 PCHOME 販賣禮券是否屬於第三方支付？ 2. 是否可由視障團體聯合起來統一發行禮券？
泰鼎法律事務所	就臺北市按摩業職業工會所詢問題回答如下： 1. 第三方發行意指禮券發行人與提供服務者為不同人，是若提供服務者發行禮券但透過網拍業者販賣，仍為業者自行發行，非第三方發行。 2. 視障團體聯合起來統一發行禮券較為困難，有以下幾點應注意：第一，因各業者規模不同、提供服務人員不同，此該如何控管、消費者如何使用均有問題；第二，如由多數團體聯合透過協會或公司等組織發行，如係以協會或公司名義發行，仍屬第三方發行。
衛生福利部中醫藥司	因民俗調理業執業人員多為個人師傅，尤其養身館其可能涵蓋多樣民俗調理技法，此時該如何認定其發行人？
泰鼎法律事務所	依照消費者保護法規定，其適用對象為企業經營者，且養身館發行禮券仍係以該養身館作為發行主體，是其發行人應為其商業登記之負責人，非由各執業師傅為之。
泰鼎法律事務所	補充一點，民俗調理業經營方式大致可能有獨資、合夥或法人公司，其負責人應依法律規定定之並向主管機關登記，是禮券發行者應視業者經營方式定之。

中華傳統整復協會	養身館過往有包業問題，且有些與美容瘦身業有關，目前雖有做較明確之劃分限於民俗調理行為，然養身館仍應與民俗調理業做區隔。
衛生福利部中醫藥司	1. 目前民俗調理業著重於強調手勁之行業，但未來會隨各行業之發展增加之，例如美容 SPA 業。雖然目前美容瘦身業之管制與其使用之產品有關，例如使用精油經認定為藥品者，應受 TFDA 管制，若使用者僅為一般商品，未來仍應由本司管理。 2. 民俗調理業目前亦陸續有新的團體業別產生，例如鬆筋。
中華傳統整復協會	補充一點，目前仍有養身館從事不法色情交易，此該如何管理？是否不應劃入本業別，避免招致消費者誤會？
衛生福利部中醫藥司	回應中華傳統整復協會上開疑問，業者是否從事不法交易，此涉及行政管理，但不應該因為其從事不法，而將其剔除於管理之外，此僅會造成管理上之漏洞。
臺北市按摩業職業工會	請問旅行業之公會保證模式，得否適用於民俗調理業？
泰鼎法律事務所	旅行業公會保證有其客觀因素，例如業者執業年資、行程、景點、食宿等，屬於可客觀化之價值，在認定保證上較無疑問，然而本業屬人性較高，恐難參照旅行業設立公會擔保制度，不過未來可朝建立職能基準或標準化課程方向努力。

散會：11：00

(四)「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項業界說明會」台中場會議紀錄

衛生福利部中醫藥司

104 年度「建立民俗調理業服務禮券管理模式」委託研究計畫辦理「民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項及不得記載事項業界說明會」會議紀錄

時間：104 年 11 月 3 日

主席致詞：(略)

受託單位報告：(詳簡報內容)

意見交流：(依發言順序)

專家甲	1. 請問民俗調理業者是否一定要加入商業同業公會？如已加入職業工會，是否仍要加入？ 2. 商業同業公會有無權利要求地方政府查察、罰款？
泰鼎法律事務所	1. 依法律規定，如業者有做商業登記即應加入，就算有加入職業工會亦同。 2. 人民只要發現有違法情事，都有權利舉發，目前主管機關亦無裁量空間決定罰或不罰。
臺中民俗療法協會	1. 目前誰可以發行禮券？工會、公會、協會或學會？得否委由統一單位統籌印製？ 2. 目前主管機關為何？紛爭由誰處理？
臺中市傳統整負員	1. 禮券發行應由履保單位認可，避免發行單位胡亂發行，甚至倒閉，請主管機關妥善規劃管理及發行制度。 2. 有關毀損部分，因業者多為小型單位，且發行上可能就僅有書面紀錄，實難以要求業者負起資料保管責任。
專家乙	標案名稱是提昇中醫效能，屬於醫療行為，但本案之民俗調理業為商業行為，恐有矛盾。
台灣推拿協進會	職業工會及商業同業公會係非營利組織，可否及如何做擔保？
泰鼎法律事務所	統一回答上開問題： 1. 統一由某單位印製禮券，技術上可行，業者或可透過自己的印章分辨何人發行。

	2. 職業工會及商業同業公會雖屬非營利組織，但仍可保證，且保證並非無條件，工（公）會仍得透過限制業者條件或者要求業者提撥公積金發行保證，不一定要作保。 3. 毀損部分，如為電子記錄還容易回復，就算是紙本，因發行上仍須有禮券編號，此亦為記錄方式之一，且收回後可蓋註銷章或直接銷毀，避免有心人士透過其他管道取得後再度使用。 4. 糾紛部分，因此為商業行為且屬消保法範圍，目前應由消保機制解決。 5. 目前已知商業同業公會有在做履保，職業工會係初次加入，未來如何執行，可在研究。
中醫藥司	1. 回應蔡理事長問題，因此涉及機關預算編列問題，是雖然本案列在提升中醫效能項下，但此不影響本案效力。 2. 有關是否加入商業同業公會問題，因此確有壟斷問題，本司已在思考解決方式，至於公會得否舉發，目前仍應回歸法制面規定。
臺中市傳統整負員	希望能加入公（工）會保證之可負擔額度。
泰鼎法律事務所	有關是否發行禮券，得由業者自行決定，公（工）會是否擔保，亦應由公（工）會成員決定，非可由單一人員定之，本所會參考吳理事長意見再為考量。

散會：11：21

(五)專家學者審議會議不同意見彙整表

項次	議題	排序	發言內容
1	前言涵括之民俗調理項目。	(1)	請確認本研究是否納入全部民俗調理業服務項目，如僅針對傳統整復推拿、按摩及腳底按摩，則建議改名稱為上開三項即可。（104.9.14 審議會議）

項次	議題	排序	發言內容
		(2)	因「刮痧」及「拔罐」非可經常性施作之保養項目，建議剔除。（104.10.8 審議會議）
		(3)	因拔罐及刮痧具有較高之醫療性，建議不宜納入民俗調理業範圍內。
2	是否允許第三方發行。	(1)	因民俗調理業性質為服務業，如透過第三方發行，依其特性，難以控管發行量，恐使實際提供服務者無法負擔，影響消費者權益，且鑑賞期該如何起算？
		(2)	第三方發行部分因正反意見相當，建請研究單位兩案併呈給主管機關作政策性考量。
3	履約保證之其他方式要法納入行政院消費者保護處核定者	(1)	行政院消費者保護處屬於業務單位，不宜放入。

(六)業界說明會不同意見彙整表

項次	議題	單位	發言內容
1	養身館應否納入民俗調理業管理	中華傳統整復協會	1. 養身館過往有包業問題，且有些與美容瘦身業有關，目前雖有做較明確之劃分限於民俗調理行為，然養身館仍應與民俗調理業做區隔。（104.10.30 說明會） 2. 補充一點，目前仍有養身館從事不法色情交易，此該如何管理？是否不應劃入本業別，避免招致消費者誤會？（104.10.30 說明會）
2	工（公）會保證制度	臺灣推拿研究發展協進會	職業工會及商業同業公會係非營利組織，可否及如何做擔保？
		臺中市傳	因目前職業工會或商業同業公會之資產

項次	議題	單位	發言內容
		統整負員協會	不多，如要求工（公）會提供擔保，將造成工（公）會之負擔，建議應考量工（公）會可負擔之額度，訂定保證擔保額度。

伍、結論與建議

綜合上述可知，民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項之設計上，應如一般禮券規範之前言，本規範之前言中應明確說明民俗調理業之定義，以及禮券之定義，且排除電子票證發行管理條例所稱之電子票證，以確認本規範的適用範圍。

又應記載事項應包括發行人相關資訊、基本權利義務關係、履約保證、毀損或滅失等情事之效果、終止或解除之效果、第三人服務之保證、電子方式發行之說明條款等，且應特別註明本服務不帶有醫療功能。

不得記載事項應包括：發行人保留變更解釋權、發行人預先責任免除、廣告僅供參考、第三人發行之責任免除、使用期限或位使用之禮券餘額不得消費、使用地點及範圍等不合理限制。

本所即以上述基礎為架構，擬定民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項（草稿），使民俗調理業者發行之服務禮券定型化契約能導入正軌，並確保消費者之權益。同時並參酌「民俗調理人員工作倫理守則範本」及「民俗調理業管理規範」之規定，草擬「民俗調理業服務查核表」，將民俗調理業於服務時應注意事項，併同民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項（草稿）提供主管機關為監督管理之參考依據，同時亦能讓業者預知哪些項目或規定是應當遵守或不可逾越，期以讓業者能為自主管理，健全整個民俗調理業之服務機制。

表 5-1、民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項草案與其他服務型定型化契約之對照表

民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案）	
草案條文	對照條文
前言： 本事項適用之行業別包含：傳統整復推拿、按摩以及腳底按摩等不具醫療效能之民俗調理業。 本事項所稱服務禮券，指發行人發行記載或圈存一定金額、項目或使用次數之憑證、晶片卡或其他類似性質之證	前言之內容歸納自零售業等商品(服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項、餐飲業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、電信

民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案）	
草案條文	對照條文
券，而由持有人以提示、交付或其他方法，向發行人或其指定之第三人請求給付證券所載內容之服務。但不包括發行人無償發行之抵用券、折扣（價）券。 前項所稱服務禮券，不包括電子票證發行管理條例所稱之電子票證。 乙案： 本事項所稱服務禮券，指發行人發行記載或圈存一定金額、項目或使用次數之憑證、晶片卡或其他類似性質之證券，而由持有人以提示、交付或其他方法，向發行人請求給付證券所載內容之服務。但不包括發行人無償發行之抵用券、折扣（價）券。	商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、體育場館業發行商品(服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、民宿商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、瘦身美容業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光遊樂業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項等服務業禮券定型化契約應記載及不得記載事項之前言，並輔以「民俗調理業管理規範」之第 2 條對「民俗調理」之定義，所草擬之。
民俗調理業服務禮券定型化契約應記載事項	
一、服務禮券應記載下列事項： （一）發行人名稱、地址、統一編號、負責人姓名及消費爭議處理申訴（客服)專線。(例如：電話.....；電子信箱.....；網址.....)。 （二）服務禮券之面額或得使用之服務項目、次數 （三）服務禮券發售編號。 （四）使用方式。如未明確記載優惠措施之限制、使用禮券之時間或地點等限制者，視為無限制。	本條內容歸納自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項、森林遊樂區商品服務券定型化契約應記載及不得記載事項、餐飲業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、電信商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、體育場館業發行商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及

民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案）	
草案條文	對照條文
	不得記載事項、民宿商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、瘦身美容業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光遊樂業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項等服務業禮券定型化契約應記載及不得記載事項所制定。
二、服務禮券券面應載明履約保證機制，並依下列方式擇一提供消費者至少一年之履約保證： （一）本服務禮券所載金額（或與所載服務內容相當之金額新臺幣___元），已經○○金融機構提供足額履約保證。前開保證期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止。 （二）本服務禮券所載金額（或與所載服務內容相當之金額新臺幣___元），已存入發行人於○金融機構開立之信託專戶，專款專用；所稱專用，係指供發行人履行交付商品或提供服務義務使用。前開信託期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止。 （三）本服務禮券已加入由○商業同業公會或○職業工會辦理之○同業禮券聯合連帶保證協定，持本禮券可依禮券所載內容向加入本協定之業者請求給付等值之服務。	本條內容歸納自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光旅館業商品(服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、電信商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、體育場館業發行商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、民宿商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、瘦身美容業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光遊樂業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項等服務業禮券定型化契約應記載及不得記載事項所制定。

民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案）	
草案條文	對照條文
前開連帶保證期間自中華民國○年○月○日（出售日）至中華民國○年○月○日止。 （四）其他經衛生福利部及行政院消費者保護處許可之履約保證方式。（須敘明該履約保證方式內容，及公文字號）。	
三、服務禮券如因毀損或變形，而其重要內容（含主、副券）仍可辨認或可得依業者留存之資料加以確認者，得請求依禮券內容給付或換發新券；其約定收取換發新券費用者，紙券每次不得超過新臺幣五十元，磁條卡或晶片卡每次不得超過新臺幣一百元。	本條內容參照自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項所制定。
四、服務禮券為記名式者，如有遺失、被竊或滅失等情事，得申請補發；其約定收取補發新券費用（包括掛失費用、止付費用，以及重新設定等）者，紙券每次不得超過新臺幣五十元，磁條卡或晶片卡每次不得超過新臺幣一百元。	本條內容參照自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項所制定。
五、服務禮券應記載消費者終止或解除契約之退還禮券與返還價金程序與方式，如定有手續費用者，不得逾禮券價金百分之十；相關優惠措施，如需返還或折抵退還價金者，亦同。	
六、發行人發行禮券而由第三人提供服務者，服務禮券券面應載明發行人	本條內容參照自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載

民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案）	
草案條文	對照條文
實收資本額（不得低於新臺幣___元）及實際服務提供者之名稱、地址及聯絡電話。其履約保證機制，應依第二點第一款或第二款之方式為之。 乙案： 刪除本條	事項所制定。
七、禮券因以磁條卡或晶片卡或其他電子方式發行，而難以完整呈現應記載事項者，得僅記載發行人、履約保證方式及消費服務專線之資訊，但發行人應以檢附使用說明或其他書面、簡訊、電子郵件或其他合理方式告知消費者其餘應記載事項，並使消費者得隨時查詢交易明細及餘款之方法。	本條內容參照自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項所制定。
民俗調理業服務禮券定型化契約不得記載事項	
一、不得記載發行人保留契約內容或期限之變更權或解釋權。	
二、不得記載限制或免除發行人之義務或責任： （一）預先免除發行人之故意或大過失責任。 （二）廣告僅供參考。 （三）發行人以第三人為服務提供者時，不得記載消費者與提供服務之該第三人發生消費爭議時，免除自身責任之文字或類似意思之表示。	本條內容歸納自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光旅館業商品(服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、電信商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、體育場館業發行商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事

民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案）	
草案條文	對照條文
乙案： 三、不得記載限制或免除發行人之義務或責任： （一）預先免除發行人之故意或大過失責任。 （二）廣告僅供參考。	項、民宿商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、瘦身美容業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光遊樂業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項等服務業禮券定型化契約應記載及不得記載事項所制定。
三、不得記載限制或剝奪消費者行使權利，加重消費者之義務或責任： （一）使用期限。 （二）未使用之禮券餘額不得消費。 （三）截角無效等不合理之限制。 （四）較現金消費不利之條件或限制。 （五）消費者請求退回禮券並返還價金時，須加收任何費用之文字或類似意思之表示。	本條內容歸納自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光旅館業商品(服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、電信商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、體育場館業發行商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、民宿商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、瘦身美容業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光遊樂業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項等服務業禮券定型化契約應記載及不得記載事項所制定。
四、不得記載違反其他法律強制禁止規定或對消費者顯失公平事項。	本條內容歸納自零售業等商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、按摩業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光旅館業商品(服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、電信商品（服務）禮券定型化契

民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案）	
草案條文	對照條文
	約應記載及不得記載事項、體育場館業發行商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、旅館業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、民宿商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、瘦身美容業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項、觀光遊樂業商品（服務）禮券定型化契約應記載及不得記載事項等服務業禮券定型化契約應記載及不得記載事項所制定。

表 5-2、期中報告審查意見回應一覽表

審查意見	回覆或執行情形
未來辦理審查會議及業界說明會時，應有消費者代表（如消費者保護處、消保關及消費者文教基金會）參與，以期所訂內容能符合消費者需求，減少爭議。	感謝委員意見，本研究於後續所舉辦之審查會議及業界說明會，已按本意見辦理。
本計畫所訂「民俗調理業服務查核表（草案)」，其內容涵括各相關法規內容，惟遺漏消費者保護法相關規定，請補列。	感謝委員意見，已按本意見辦理於「表 6-1 民俗調理業服務禮券定型化契約應記載及不得記載事項訂定條文對照表（草案)」補列消費者保護法相關規定。
本計畫缺乏研究分析之說明，建議應蒐集過去民俗調理曾發生消費爭議案件進行分析，並與現實執行面之關連性作聯結。	感謝委員意見，已按本意見辦理於「表 4-1 民俗調理業糾紛實務判決」補列實務相關案例分析。
可對於有使用或曾使用民俗調理業服務禮券之消費者進行調查、分析，以利瞭解所訂之草案內容能符合消費者真正需求。	感謝委員意見，本研究於後續所舉辦之審查會議及業界說明會，已按本意見辦理。

表 5-3、期末報告審查意見回應一覽表

審查意見	回覆或執行情形
計畫格式請依引言、方法、結果及討論方式撰寫，表序排列錯誤宜修正。	感謝委員意見，已按本意見辦理。
各段落首行應空二格，以區隔段落，俾利審閱。	感謝委員意見，已按本意見辦理。
會議紀錄請依正式格式修正。	感謝委員意見，已按本意見辦理。
各會議紀錄記載發言內容詳細，為對於不同意見可列出，以作為未來主管機關督導管理參考。	感謝委員意見，已按本意見辦理。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW104-CMAP-M-114-000417 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

一、書籍

1. 王澤鑑，債法原理（一）：基本理論、債之發生，5 版。臺北，三民書局，1991: 69-82.
2. 黃茂榮，債法總論（一），3 版。臺北，自版，2009: 225-226.
3. 陳自強，契約之成立與生效，2 版。臺北，元照出版，2012: 156-212.

二、期刊論文

1. 胡華泰，消費定型化契約條款之行政規制，消費者保護研究 2013; 17: 102-103。
2. 黃明陽，禮券消費者權益之探討，消費者保護研究 2009; 14: 21。

三、學位論文

1. 何瑞富，從消費者保護法第 17 條之規定論法律保留原則—以履約保證為中心，台灣大學國家發展研究所碩士論文, 2008. 146p
2. 楊欣玲，定型化契約應記載及不得記載事項之行政規制合憲性─從預售屋買賣之實務判決觀察，中正大學法律研究所碩士論文, 2013. 125p

四、法院判決

大法官釋字第 649 號解釋。

最高法院於 92 年台上字第 1746 號民事判決。

最高行政法院 96 年裁字 1744 號裁定。

高雄高等行政法院 94 年簡字第 285 號判決。

臺中高等行政法院 96 年簡字第 393 號判決。

臺北高等行政法院 94 年簡字第 626 號判決。

臺北高等行政法院 94 年簡字第 1010 號判決。

臺北高等行政法院 96 年簡字第 965 號判決。

臺北高等行政法院 97 年簡字第 330 號判決。

臺北高等行政法院 98 年簡字第 539 號判決。

臺北地方法院 101 年侵訴字第 30 號刑事判決。

臺北地方法院 102 年侵易字第 17 號刑事判決。

臺灣高等法院 103 年侵上訴字第 58 號刑事判決。

五、行政機官解釋函令

行政院 99 年 5 月 6 日行政院院臺衛字第 0990022334 號函。

法務部 95 年 9 月 21 日法律字第 0950035512 號函。

經濟部 95 年 10 月 19 日經商字第 09502428980 號公告。

經濟部 103 年 10 月 16 日經商字第 10302425520 號公告修正。

衛生署 94 年 3 月 17 日衛署醫字第 0940203047 號函

衛生署於 101 年 5 月 29 日衛署醫字第 1010206672 號令。

衛生福利部又於 104 年 5 月 12 日以衛部中字第 1041860595A 號。

編號：MOHW104-CMAP-M-114-000422

中藥材基原內容編修與諮詢

劉崇喜
大仁科技大學

摘　要

現代醫學及傳統醫學可用於處理臺灣人口老化引起的慢性與老年相關疾病。要利用中藥，必須知道一些知識，一、大部分中藥材是來自於中國大陸栽植、初加工，再出口至臺灣。二、中華人民共和國藥典及臺灣中藥典所列的項目並不相同。三、二地區對於中藥的品質管制及要求也不盡相同。四、臺灣特有植物中藥也未能列入臺灣中藥典中。五、先協同化才能推展全球化，尤其臺灣中藥廠想將製品先推銷至中國大陸或其他地區。

在本計畫中，將邀請臺灣的中藥專家，進行專家小組四次會議討論及提供：一、如何訂定臺灣特有品種植物藥(基原)收載於臺灣中藥典之提案審核機制及辦法。二、依目前中藥材現況，對中藥典已收載中藥材之基原、藥用部位、生藥各部位再評估及提出修正意見。三、完成中藥材品項「基原」與「性狀」等內容，編修撰寫原則與格式規範。四、依據衛生福利部中醫藥司所提供 53 項中藥材擬新增之品項「基原」與「性狀」內容等之參考做修正及建議，將使未來再版之臺灣中藥更能符合國內產業界需求更完善、豐富。五、協助回覆中藥典相關基原之諮詢問題與意見，及協助相關基原提案之評估與建議。六、參與其他中藥典編修小組討論藥典編修整合工作。

經由基原小組會議，將臺灣中藥典與大陸藥典之整體架構內容做比較。國內第一版中華藥典於 92 年告，收載 200 種常用藥材品項等；第二版臺灣中藥典於 101 年完成編修，藥材收載品項增至 300 種，於 102 年 4 月 1 日實施。將於 108 年編修做增補版，110 年配合中華藥典做為合併。

關鍵詞：中藥、基原、臺灣中藥典

Number: MOHW104-CMAP-M-114-000422

Edition and Consultation on Originality of Herbal Drugs

Shorong-Shii Liou
TAJEN UNIVERSITY

ABSTRACT

Both modern medicine and traditional medicine can be adopted to treat chronic and other related diseases caused by (population) aging in Taiwan. Before using Chinese medicine, some relevant knowledge is required. First, most of the Chinese herbal medicine is planted, processed, and exported from Mainland China to Taiwan. Second, some items respectively listed in the pharmacopoeias of People's Republic of China and Taiwan are not exactly the same. Third, the regulations and standards of the quality in the [cross-strait countries] two areas are not quite the same as well. Fourth, Chinese herbs originated in Taiwan cannot be listed in Taiwan's pharmacopoeia. The Chinese medicine differences of the two areas have to assimilate before making it forward to the globe, especially when Taiwan's pharmaceutical factories want to sell their drug products to Mainland China or other areas.

In this project, experts of Taiwan's Chinese medicine are invited to discuss and offer suggestions in the four meetings as follows: First, how to set up the review mechanism and regulations so as to check the proposal for listing the Chinese herbs (botanical origin) originated in Taiwan Herbal Pharmacopoeia. Second, based on the present situation, we should review the botanical origins, applied body parts, and different parts of dried medicinal herbsof Chinese herbs listed in Taiwan's pharmacopoeia and propose suggestions on mending. Third, we should complete the contents, the principles of editing and writing, and the specifications of the formula of the "botanical origins" and traits of Chinese herbs. Fourth, as for the 53 items proposed by Department of Chinese Medicine, Ministry of Health and Welfare, we should mend the new added contents about "botanical origins" and "traits" and make suggestions so that in the future the new edition of Taiwan's pharmacopoeia will be more improved and meet the needs of the domestic industry. Fifth, they assist the replies for the questions about botanical origins in pharmacopoeia while helping

evaluate and advise on the botanical-origin-related proposals. Sixth, we should take part in other discussion groups to integrate the editing of pharmacopoeia.

The meetings of botanical origin groups decided to make comparison between China’s and Taiwan’s pharmacopoeias. The first edition of Taiwan Herbal Pharmacopoeias was published in 1993, containing 200 items of commonly used Chinese medicine. The second edition had been compiled in 2012, inclusive of 300 items, and became effective on April first, 2013. In 2019, the augmented edition will be completed and will be merged with Taiwan Herbal Pharmacopeia in 2021.

Keywords: Chinese herbal, originality, Pharmacopoeia

壹、前言

現代化國家，大部分五年就再版一次藥典。臺灣中藥典編修之速度，已慢於這標準。另一方面，臺灣與已開發國家一樣，面臨社會人口老化引起的慢性疾病及老年疾病增加的問題，而衝擊整個醫療系統及資源。為了如何應對這些問題，要利用中藥，必須知道一些現實，西方國家早就正視中醫藥(包括針灸)深度醫學、不同運動方法、氣功、音樂療法，不同地區所應用於的植物藥(基原)，而統稱為替代成輔助醫學，與現代醫學整合。在臺灣無疑的定期出版中藥典是重要的對應工作。

在編修臺灣中藥典有幾項事實，首先加敘說明，壹、臺灣所使用中藥材大部分在中國大陸種植加工再運送到臺灣。貳、大陸中藥典所列項目遠超過臺灣中藥典。參、兩岸中藥典對所列中藥的安全性及管理辦法亦不盡相同。肆、臺灣中藥典並未列入臺灣特有品種之藥用植物。伍、臺灣中藥廠製造科學中藥濃縮中藥已經有四十年以上歷史，對中藥品質管制的嚴謹態度其獲佳評。但臺灣市場不大，如何拓展產品的市場，必須與不同地區藥品管理法規同步化(hamonization)才有可能進一步全球化(globolization)。尤其同文、同種、同樣應用中醫藥之大陸市場，如何與大陸中藥典同步化，甚至使兩岸中藥典同步皆進，是以臺灣中藥製品來持續臺灣經濟的方法之一。

貳、材料與方法

籌組「中藥基原分小組」，由臺灣公私立大學、研究機構、財團法人之中藥專家學者與衛生福利部中醫藥司、國家中醫藥研究所幹部人員執行擔任（表 1），進行 4 場專家小組會議，協助督察編修委員會工作執行及進度提出解決方案，將中藥材品項之基原不同、藥材名稱不同、藥用部位不同、生藥名不同、性狀內容做修正及建議，其建立國內中藥材源頭品質、管制、技術、規格，能使未來再版的「臺灣中藥典」英文名稱為(Taiwan Herbal Pharmacopeia)，簡稱 THP。提昇國家標準更能符合國內產業界需求更完善、豐富。

一、中藥材規格研究：

(一)材料：

參考臺灣中藥典第二版、中華人民共和國藥典 2010、2015 年版一部、各國藥典籍、網路搜尋、文獻調查、中藥專家學者交流資訊。

(二)實施方法及進行步驟

1. 收藏臺灣特有品種：

   就臺灣特有藥用植物，已發展科學論文的化學生物活性、安全性等資料，及栽培環境、成本大量栽培之可能性，對環境的影響及大量生產是否可降低成本，對種植者的經濟收益，現有市場及拓展市場的可能性、藥廠投入，生產健康食品或藥物研發經費等因素，及現在中藥典對各項中藥的記載，制定將可能特有藥用植物列入中藥典的推薦、審核、制度。

2. 臺灣中藥典新增基原審核辦法(包括特有品種)。
3. 提案機制與須檢送審查文件(藥效指標、成分相關資料、檢驗規格之建議、本土栽種資料、參考文獻等)。
4. 對藥典已收載中藥材之基原、藥用部位、生藥各之適切性再評估及修正意見。
5. 協助編修新增 53 項中藥材品項「基原」與「性狀」等內容及後續校對工作。
6. 就前衛生署及衛生福利部茲執行相關計畫之報告對編修中藥典之意見，對照大陸中藥典及臺灣中藥典，全面對臺灣中藥典已

列入的各中藥品項及方劑的基原、名稱(包括生藥名)、用部提出建議。

7. 考慮是否列入新鮮藥材，敘明列入及不列入之優缺點。
8. 考慮是否今年9月12日中國福建省食品藥監局受國家委託處理臺灣使用超過 20 年之藥用植物列入中藥材管理案第一批管理案，第一批鎖定牛樟芝、金線蘭(金線蓮)與蔓莖葫蘆茶(一條根)等，這些中藥材放入臺灣藥典中。
9. 協助回覆藥典相關基原之諮詢問題與意見及協助相關基原提案之評估與建議。
10. 跨組參加「檢驗規格組」、「中藥製劑組」及「中醫臨床組」會議，及提供中藥基原分小組相關專業意見。
11. 討論藥典「基原」與「性狀」編修撰寫原則及格式規範。
12. 其他與前述相關工作項目之事務。如：
    (1) 如同品項，但基原不同之中藥，應檢驗標準相同者才並列，不然則分項列入。
    (2) 吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* 改為 *Euodia rutaecarpa*，則其成分 evodiamine dehydroevodiamin 是否也要改。
    (3) 中文名與拉丁名之意義要一致。
    (4) 建議臺灣中藥典宜簡要有一貫性，臺灣特點(如列入特有品種，保持中國文化；同一品項最多列入幾種基原)。
    (5) 與大陸藥典協同化之努力

    以上結果召開4場分小組專家會議，擬邀請臺灣學者，專家及產官學等團體加入專家會議，並且作出上面結果。

參、結果

一、本計畫執行期間共召開 4 場專家學者會議

(一)104 年 11 月 27 日於衛生福利部中醫藥司 3 樓第 304 會議室，召開第一次中藥基原分小組會議，主要議題包含討論有關新增基原審核辦法、送審所需的相關文件資料、臺灣特有種植物藥建議名單與修正藥典中部份之基原等，會議過中委員們討論熱烈，相關的會議詳細記錄如(附件 1)。議題與說明和決議內容如下表所示：

議題	說明	決議	執行情形
1. 研議藥典新增基原審核辦法（包括特有品種），提出相關建議提請討論	藥典中會詳述其藥材之外部形態、顯微鑑定、理化鑑別、指標成分、甚至是成分圖譜與藥理活性等，請委員討論新增基原之藥材上述相關的數據要有何種相關研究報告，才得以申請推薦列入新增基原審查。	新增之品種，請○委員○○及○委員○○提供意見。	有關開會提案，資料正在彙整中，待下次會議中討論。
2. 研議說明建制與須檢送審查文件(藥效指標、成分相關資料、檢驗規格之建議、本土栽種資料、參考文獻等)，提出相關建議，提請討論。	植物類栽培種，其藥效成分易受到氣候、土壤、環境的影響而有所變化，在訂定藥效指標時可能需要有不同產地、季節、至少連續追蹤幾年的藥效成分變化。透過科學化的藥效成分分析，才能進一步討論制定其相關的檢驗規格。	新增項目之審查文件，請○委員○○、○執行幹事○○提供意見。	有關開會提案，資料正在彙整中，待下次會議中討論。
3. 研議臺灣特有品種植物藥列入中藥	就臺灣特有藥用植物中，已有研究計畫或科學論文記載有關其基原、理化特性鑑	新增之特有品種，請○委員○○、○委員○○	有關開會提案，資料正在彙

議題	說明	決議	執行情形
典，請委員提出建議名單提請討論	別、化學物質生物活性、安全性等資料者，請委員討論哪些臺灣特有藥用植物可推薦列入臺灣中藥典。	提供意見。	整中，待下次會議中討論。
4. 研議修正中藥典已列入品項之基原、藥用用部、生藥之適切性再評估與提出相關規劃建議，提請討論。	依據張永勳教授研究兩岸中藥藥典差異評析研究專冊，內容中所提兩岸要點所羅列之藥材名稱不同、藥用部位不同、生藥名不同、基原不同的中藥材，提請委員討論提出其中那些藥才需要修訂。	1. 請○委員○○、○委員○○轉達○委員○○、○教授○○，提供相關建議。 2. 請○副所長○○及所裡專家，並請台大藥學院、國防醫學院藥學系提供意見。	有關開會提案，資料正在彙整中，待下次會議中討論。

(二)104 年 12 月 30 日於衛生福利部中醫藥司 2 樓第 209 會議室，召開第二次中藥基原分小組會議，主要議題包含張永勳委員研究“兩岸中藥藥典差異評析研究專冊”（表 2)建議是否修正與研議新增 53 項中藥材品項『基原』與『性狀』(表 3)內容以修正、核對兩議案，相關的會議詳細記錄如(附件 1)。議題與說明和決議內容如下表所示：

議題	說明	決議	執行情形
依據張永勳委員研究“兩岸中藥藥典差異評析研究專冊”(表 2)建議是否修正，擬請討論。	討論委員提出建議部分，擬請委員討論。	川木通等 17 種中藥材經由委員會會議通過的決議案	陸續尚由委員提供相關審查建議

議題	說明	決議	執行情形
研議新增 53 項中藥材品項『基原』與『性狀』(表 3)內容以修正、核對，提請討論。	依據衛生福利部中醫藥司所提供臺灣中藥典新增品項(目前提供已完成 34 種中藥材品項)，擬請委員討論那些藥材需要修正核對。	請中藥基原分小組以書面提案 34 種請在 1/15 前將提供，以利彙整，非常感謝中藥基原分小組的協助	資料已在陸續提供，待下次會議中討論論。

(三)105 年 1 月 22 日於衛生福利部中醫藥司 2 樓第 206 會議室，召開第三次中藥基原分小組會議，主要議題包含研議「臺灣中藥典收載臺灣特有種中藥材品項審查原則」草案、研議臺灣特有種中藥材列入臺灣藥典審核機制及須檢送審查文件、研議擬納入臺灣中藥典之臺灣特有種中藥材與續討論『兩岸中藥藥典差異評析研究專冊』(表 2)藥材基原建議修正事項等四項議案，相關的會議詳細記錄如(附件 1)。議題與說明和決議內容如下表所示：

議題	說明	決議	執行情形
1.研議『臺灣中藥典收載臺灣特有種中藥材品項審查原則』草案，提請討論。	臺灣特有藥用植物，已發展科學論文的化學生物活性、安全性等資料，及栽培環境、成本大量栽培之可能性，對環境的影響及大量生產是否可降低成本，對種植者的經濟收益，現有市場及拓展市場的可能性、藥廠投入，生產健康食品或藥物研發經費等因素，及現在中藥典對各項中藥的記載，制定將可能特有中藥材列入中藥典的推薦審核制度。	請各位委員提供相關書面建議，待下次會議中提請討論。	資料已在陸續提供，在本次會議中討論。

議題	說明	決議	執行情形
2.研議臺灣特有種中藥材列入臺灣藥典審核機制及須檢送審查文件(藥效指標、成分相關資料、檢驗規格之建議、本土栽種資料、參考文獻等),提出相關建議,提請討論。	臺灣中藥典對於特有種中藥材沒有具體審核機制,研擬將其列入中藥典部份藥典已有相關記載,但臺灣特有種尚未列入其中之一或是藥典尚未記載臺灣特有種中藥材需擬一套審核機制,於下次藥典編修時可考慮是否將其納入。	請各位委員提供相關書面建議,待下次會議中提請討論。	資料已在陸續提供,在本次會議中提出討論。
3.研議擬納入臺灣中藥典之臺灣特有種中藥材如:一條根、牛樟芝、臺灣白及、臺灣黃蘗、石(白)花益母草、民間山藥、金線蓮、阿里山五味子、高氏柴胡、黃花石斛、盤龍	近年來政府計畫資助許多臺灣特有種中藥材的科學研究部份,研究顯示這些品種具有很好的療效,而藥理、毒理、指標成份也有相關文獻的報告,此些臺灣特有中藥材是否可提出列入臺灣中藥典之申請。	待臺灣中藥典收載臺灣特有種中藥材品項審查原則及審核機制完成後,續討論收載品項。	有關開會提案,資料正在彙整中,待下次會議中討論。

議題	說明	決議	執行情形
參、蔓性千金拔、大和當歸等，部份藥典已有相關記載，但臺灣特有種尚未列入其種源之一或是藥典尚未記載臺灣特有種中藥材，提出相關建議，提請討論。			
4.續討論『兩岸中藥藥典差異評析研究專冊』(表 2)藥材基原建議修正事項。	依據 104 年 12 月 30 日召開第 2 次會議討論事項案由一，委員提出建議部分，請再討論及確認。	竹茹等 23 項中藥材基原修正詳見，另白芥子等 54 項中藥材基原依據張永勳委員『兩岸中藥藥典差異評析研究』專冊建議修正。	依會議通過決議案。

(四) 105 年 3 月 11 日於衛生福利部中醫藥司 3 樓第 302 會議室，召開第四次中藥基原分小組會議，主要議題包含研議「臺灣中藥典」收載臺灣特有種中藥材品項審查原則及審核機制(表 4、表 5、表 6)、研議新增 53 項中藥材品項「基原」與「性狀」(表 3)內容以修正、核對、研議新鮮藥材，敘明列入及不列入臺灣中藥典的優缺點、藥典「基原」與「性狀」(表 7)編修撰寫原則及格式規範草案與續討論『兩岸中藥藥典差異評析研究專冊』藥材基原建議修正事(表 2)項等五項議案，相關的會議詳細記錄如(附件 1)。議題與說明和決

議內容如下表所示：

議題	說明	決議	執行情形
1.「臺灣中藥典」收載臺灣特有種中藥材品項審查原則及審核機制，提請討論。(表4、表 5、表6)	臺灣中藥典對於臺灣特有種中藥材尚未有具體審核機制，本小組擬研議「臺灣特有種中藥材」與「已收載於臺灣中藥典藥材品項，但未收載臺灣特有種之中藥材」收載審查原則及制定審核機制。	1.依委員建議修改內容。 2. 請分小組於3/18 前提供書面意見，以利彙整。	
2.研議新增 53 項中藥材品項「基原」與「性狀」(表3) 內容以修正、核對提出建議，提請討論。	(1) 依據衛生福利部中醫藥司所提供 53 項中藥材擬新增之品項「基原」與「性狀」內容等之參考，透過本分小組第二次會議提出 34 項中藥材上冊提出修正建議，將使未來再版之臺灣中藥更能符合國內產業界需求更完善、豐富。 (2) 擬請討論拉丁科名(傳統科名與新科名是否要併列如：Labiatae (Lamiaceae)、Leguminosae (Fabaceae)，Cruciferae (Brassicaceae) (3) 擬請討論基原(藥材性狀)之描述及圖片置學名是否一致性。	藥典「基原」與「性狀」原則及格式規範草案依委員建議修改。	

	(4) 擬請討論組織顯微鑑別圖專有名詞術語建議是否一致性(臺灣或大陸專有詞彙混用，建議是否一致，如髓線與射線，假導管與管胞，階紋與梯紋...等)。 (5) 擬請討論 20 項中藥材下冊之品項「基原」與「性狀」內容等提出修正建議，擬請討論。		
3. 研議新鮮藥材，敘明列入及不列入臺灣中藥典的優缺點，擬請討論。	依據中國藥典及相關中藥典書籍，有列出新鮮藥材如：鮮地黃、生薑等藥材是否將這些新鮮藥材列入臺灣中藥典中。	依委員建議「鮮品」暫不納入臺灣中藥典。	
4. 擬請討論藥典「基原」與「性狀」(表 7) 編修撰寫原則及格式規範草案，提請討論。	依據「臺灣中藥典第二版」中藥材項目順序如：人參為例(1)基原(包含中文、生藥名、英文、拉丁學名及學名索引)、藥材基原包含：原植物的分類包括科、屬、種、及變種、藥用部位等。 (2)性狀：一般性狀(主要指藥材的外觀、顏色、質地、一般內部結構(包括斷面特徵)、氣味、味道等)、組織、粉末(組織顯微別指用顯微鏡對藥材組織、細胞或其內含物、粉末、表面製片的特徵進行鑑別。	1. 基原之藥用部位內容說明應一致性，應盡量避免重覆，五加皮等 34 項中藥材建議修改如。 2. 經由委員建議藥材均記載原植物，其所屬傳統科名與新科名前後一致性。 3. 植物的細胞組織進行描述應	

		要有一定順序如：根→莖→葉→花→果實；組織顯微鑑別圖：表皮→皮層→韌皮纖維→韌皮部→形成層→木質部→髓，由外而內。 4.藥材組織及組織顯微鑑別圖內容專有名詞，應符合臺灣中藥典專有名詞為準，應盡量避免使用大陸專有名詞。 5.毛冬青等 21 項中藥材修改。	
5.續討論『兩岸中藥藥典差異評析研究專冊』(表 2)藥材基原建議修正事項。	依據 104 年 12 月 30 日召開第 2 次會議討論事項案由一，委員提出建議部分，請再討論及確認。	依據張永勳委員『兩岸中藥藥典差異評析研究』專冊建議修正。	

二、各主題經過 4 次會議討論最後結論

(一) 藥典新增基原審核辦法(包括特有品種)

臺灣特有品種植物提出種類甚多，藥列入中藥典，預計在 105

年確定，表明要慎選。

(二) 建制與須檢送審查文件(藥效指標、成分相關資料、檢驗規格之建議、本土栽種資料、參考文獻等)

1. 需有國內大量栽培模式的物種。
2. 需有該物種的分布調查，稀有的部分暫不列入。
3. 需有一定質量的 SCI 論文，報導該物種的藥理及成份。
4. 需至少追蹤該物種一個生活史的藥效成份變化，以確定穩定性。
5. 需提出基原：包含外觀形態、顯微切片鑑定，可佐以分子鑑定如 RAPD、RFLP、ITS 序列…等)。 理化鑑別：醇抽出率、水抽出率、灰份含量等。指標成分：指標成分定量與分析方法。
6. 理化鑑別：醇抽出率、水抽出率、灰份含量等。
7. 指標成分：指標成分定量與分析方法。

綜合上述，依擬具之項次(一)與(二)合併為「臺灣中藥典」收載臺灣特有種中藥材品項審查原則及審核機制」，委員共識決議，其修正草案如下：

1. 臺灣中藥典收載臺灣本土或特有種中藥材品項審查原則(表 4)
   (1) 為強化具特色之本土或特有種中藥材納入臺灣中藥典暨其增補版(以下簡稱中藥典)，特訂定本審查「原則」，臺灣中藥典沒有法源根據，所以採用「原則」。
   (2) 第三條第一項臺灣中藥典有記載，但未納收臺灣特有種為「種源」之一修正為「基原」，中藥典記載基原。
   (3) 第五條第四項已發表有關本「物種」之毒理安全性報告、藥理療效及功效報告等，建議是否改名詞。
2. 臺灣中藥典收載臺灣本土或特有種中藥材品項申請書(表 5)
   (1) 中藥材尚未納入臺灣中藥典，將「生藥名稱」修正為「品項」。
   (2)「拉丁學名」，修正為「學名」，因為學名等於拉丁名。
   (3) 類別新增選項條文：
      a.「符合申請第三條第一款品項納入中藥典收錄者」。
      b.「符合申請第三條第二款品項納入中藥典收錄者」。
3. 臺灣中藥典收載臺灣本土或特有種中藥材品項審核許可作業流程圖(表 6)

衛生福利部收件至審核結果結束，預先評估 180 天，不包含正式納入中藥典時間。

（三）依據張永勳教授研究「兩岸中藥藥典差異評析研究」專冊(表 2)，內容中所提兩岸要點所羅列之藥材名稱不同、藥用部位不同、生藥名不同、基原不同的中藥材，經由 4 場會議進行討論後修正後資料如(表 8)所示。

(四)依據衛生福利部中醫藥司所提供五加皮等 53 項(表 3)中藥材擬新增之品項「基原」與「性狀」內容等，五加皮等 49 項(表 10)委員共識決議，其建議如下：

1. 「沙苑子」已收載在臺灣中藥典第二版（p.111）之中沙苑蒺藜 ASTRAGALI COMPLANATI SEMEN 本品為豆科 Leguminosae 植物扁莖黃耆 *Astragalus complanatus* R. Br. 的乾燥成熟種子。習稱「沙苑子」建議是否合併。
2. 「栝樓仁」已收載在臺灣中藥典第二版（p.212）之中栝樓仁 TRICHOSANTHIS SEMEN 本品為葫蘆科 Cucurbitaceae 植物栝樓 *Trichosanthes kirilowii* Maxim.或雙邊栝樓 *Trichosanthes rosthornii* Harms 之乾燥成熟種子，建議合併。
3. 「桂心」與臺灣中藥典第二版（p.99）肉桂 CINNAMOMI CORTEX 本品為樟科 Lauraceae 植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 之乾燥樹皮。習稱「桂皮」，建議是否合併。
4. 橘皮與臺灣中藥典第二版(p.230)之中陳皮 CITRIRETICULATAE PERICARPIUM 本品為芸香科 Rutaceae 植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培變種之乾燥成熟果皮。中藥材分為「廣陳皮」、「陳皮」。建議合併。
5. 「粉防己」上冊（p.35）基原：防己科 Menispermaceae 植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 之乾燥根;「防己」上冊(p.69)基原：本品為防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的乾燥根。秋季採挖，洗淨，除去粗皮，曬至半幹，切段，個大者再縱切，乾燥。是相同字句可做合併，但內容不一致，應做整合。
6. 基原之藥用部位內容說明應一致性，應盡量避免重覆。如：沙苑子、浮萍、淡竹葉、槐花、萯萸、薏仁等基原與藥材性狀描

述內容相同建議刪除重複字句。

7. 經由委員建議藥材均記載原植物，其所屬傳統科名與新科名應前後一致性。
8. 植物的細胞組織進行描述應要有一定順序如：根→莖→葉→花→果實；組織顯微鑑別圖：表皮→皮層→韌皮纖維→韌皮部→形成層→木質部→髓，由外而內。
9. 藥材組織及組織顯微鑑別圖內容專有名詞，應符合臺灣中藥典專有名詞為準，應盡量避免使用大陸專有名詞。如:「柵欄組織」修正為「柵狀組織」;「射線」修正為「髓線」;「柵欄細胞」修正為「柵狀細胞」;「梯紋」修正為「階紋」等。

肆、討論

所召開四次會議時委員們討論熱烈，因臺灣中藥典編修事宜茲事體大，委員們對於基原內容修正與新增基原審核辦法與文件，皆相當慎重而接近於逐字討論，後續有部分尚未取得共識的議案，將於第二年計畫中陸續完成。

伍、結論及建議

一、已完成張永勳委員研究『兩岸中藥藥典差異評析研究專冊』(表 2)中藥材基原、藥用部位、生藥各部位不同等以川木通等 59 項中藥材基原依會議決議(表 8)，另山豆根等 33 項中藥材基原依據『兩岸中藥藥典差異評析研究』專冊建議修正(表 9)。

二、已完成「臺灣中藥典」收載臺灣特有種中藥材品項審查原則及審核機制」草案(表 4、表 5、表 6)。

三、已完成衛生福利部中醫藥司所提供五加皮等 53 項(表 3)中藥材擬新增之品項「基原」與「性狀」內容等，基原之藥用部位內容說明應一致性，應盡量避免重覆、藥材組織及組織顯微鑑別圖內容專有名詞，應符合臺灣中藥典專有名詞為準，應盡量避免使用大陸專有名詞，五加皮等 49 項(表 10)中藥材依會議決議。

四、本計畫已完成制定臺灣中藥藥典「基原」與「性狀」編修撰寫原則及格式規範草案(表 7)。

誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW104-CMAP-M-114-000422 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. 行政院衛生署，臺灣中藥典(第二版)，龍讚裝訂股份有限公司，2013
2. 衛生福利部中醫藥司(計畫編號：MOHW103-CMAP-M-201-000001)張永勳委員「兩岸中藥藥典差異評析研究專冊」，2014
3. 行政院國家科學委員，臺灣植物誌第二版，2003
4. 行政院衛生署中醫藥委員會，臺灣常用植物圖鑑第一冊，2006
5. 行政院衛生署中醫藥委員會，臺灣藥用植物資源名錄第一版，2003
6. 行政院衛生署中醫藥委員會，臺灣常用植物圖鑑第二版，2010
7. 行政院衛生署，中華藥典第七版，行政院衛生署食品藥物管理局，2011
8. 國家藥典委員會，中華人民共和國藥典，2015
9. 趙中振，中藥粉末顯微鑑別彩色圖集第一版，1999
10. 李明亮，中華藥典第五版，庚霖興業有限公司，2000
11. 侯勝茂，中華藥典第六版，漢泰文化事業股份有限公司，2006
12. 楊志良，中華藥典第六版補篇，大光華印務部，2009
13. 浩云濤，薛軍，中華人民共和國藥典，中國醫藥科技出版社，2010
14. 厚生勞動省，日本藥局方，日本藥局方編輯委員會，1886

柒、圖、表

中藥材基原內容編修與諮詢

開第一次中藥材基原小組會議-104 年 11 月 27 日






召開第二次中藥材基原小組會議-104 年 12 月 30 日








召開第三次中藥材基原小組會議-105 年 1 月 22 日









召開第四次中藥材基原小組會議-105 年 3 月 11 日



編號：MOHW104-CMAP-M-114-000423

中藥濃縮製劑內容編修

彭文煌
中國醫藥大學

摘　要

因應國內中醫臨床診治疾病以複方濃縮製劑為主、單味為輔。本計畫擬研議臺灣中藥典中藥濃縮製劑規格及藥典新增收載品項。

中藥製劑品項、內容及撰寫格式，將優先以中藥複方濃縮製劑來研議其收載品項和內容等。並將由實際從事中藥濃縮製劑檢驗實驗室分析市售製劑成分含量，再由各領域專家學者委員們共同研議建立標準，提升臺灣中藥典收載內容的深度及廣度，未來有利於臺灣中藥產業界或主管機關之參閱和應用，讓臺灣中藥製劑產品更具國際競爭力。

關鍵詞：中藥典規格、中藥濃縮製劑品項、撰寫格式、指標成分

Number: MOHW104-CMAP-M-114-000423

Study on Pharmacopoeia Specifications - Chinese Medicine Concentrated Preparation

PENG WEN HUANG
China Medical University

ABSTRACT

Chinese medicine concentrated preparations were used to treat diseases by Traditional Chinese physicians in Taiwan. This project will discuss and draw up the Pharmacopoeia standards and items of Chinese concentrated preparations in Taiwan Herbal Pharmacopia.

This project will discuss and draw up the items, content of item and writhing format after expert meeting for five times. The items of Chinese medicine concentrated preparations will be analyzed the contents of the reference standards by two or three constituents, then discussed the standardization. This study will elevate the depth and width of Taiwan Herbal Pharmacopia. The revised Taiwan Herbal Pharmacopia will be benefit for reviewing and applications by Traditional Chinese Medicine Industry and authorities in the world. Taiwan Chinese medicine products possess more international Competitiveness.

Keywords: Pharmacopoeia specifications, Chinese medicine concentrated preparations' items, writing format, reference standards

壹、前言

據 103 年 Industry & Technology Intelligence Service（IT IS, 產業技術知識服務計畫）統計資料，臺灣廠商所生產的中藥製劑以供給國內市場之需求為主，中成藥外銷占 16.7 %，近年來中藥製劑廠商成功拓展外銷市場至新加坡、美國、馬來西亞等國家，部分產品成功外銷到大陸，帶動中藥製劑產值的提高。102 年我國中藥製劑產值達 79.6 億元，相較前一年成長 4.2 %。

臺灣有八成以上藥材進口自中國大陸，仰賴進口的結果是藥材品質穩定性和價格等不易掌握，為提升產業競爭力，就必須掌握中藥產品品質和規格。雖臺灣中藥典第二版收載藥材品項已提升至 300 項，但仍不見中藥製劑。相較鄰近國家藥典，中國大陸藥典及日本藥局方皆早已將中藥製劑收入藥典。我國必須參酌各國藥典的長處，建立中藥製劑規格，規範中藥品質標準。

因應國內中醫臨床診治疾病以複方濃縮製劑為主、單味為輔。本計畫研議臺灣中藥典規格研究—中藥濃縮製劑新增收載中藥製劑品項、內容及撰寫格式，將優先以中藥複方濃縮製劑來研議其收載品項和內容等。並將由實際從事中藥濃縮製劑檢驗實驗室分析製劑成分含量，再由各領域專家學者們共同研議建立標準，提升臺灣中藥典收載內容的深度及廣度。因此臺灣中藥典新增收載中醫臨床常用中藥製劑品項，可規範中藥濃縮製劑產品之規格、品質及異常物質限量之訂定，有助於醫療保健，確保中醫臨床療效及安全，又有利於臺灣中藥產業界或主管機關之參閱和應用，讓臺灣中藥製劑產品更具國際競爭力。

貳、材料與方法

一、召開五場專家委員會議。

中藥濃縮製劑小組將由產官學研各界專家共同組成專家委員會議，產業界如國內 GMP 中藥廠代表、公會代表等，並邀請各界專家共同參與專家會議。預計 5 場專家委員會議，將分成二場小型專家委員會議、三場大型專家委員會議。

(一) 召開第一次大型專家委員會議，先行研議本計畫所要達成之目標及工作項目。

(二) 召開第二次小型專家委員會議，取得對計畫執行項目之共識，並研議相關議題。

(三) 召開第三次大型專家委員會議、第四次小型專家委員會議，將檢討執行情形，並將研議初步結論，如新增收載中藥製劑品項、內容及撰寫格式，中藥製劑之檢驗方法、成分含量標準及異常物質限量之訂定方法，提出建議。並將實驗數據予以分析、統計，作為制訂規格標準之參考。

(四) 召開第五次大型專家委員會議，審視並總結計畫之成果，供結案報告說明。

(五) 有關內容涉「鑑別」、「檢查」、「含量測定」及「異常物質限量」等，協請檢驗規格分小組編修。

(六) 有關內容涉「功能與主治」及「用法與用量」等，協請中醫臨床分小組編修。

二、研議是否收載已核發藥證之中藥新藥製劑，壽美降脂一號及化療漾內服液。

中藥是在傳統中醫藥理論下所使用的藥物，已有歷史悠久的臨床實踐，在整體使用經驗上可予以肯定，但因未能採用現代嚴謹的科學實驗方法驗證，其療效難被西方醫藥學相關工作者所信服。近年來臺灣也越發重視中藥的研究和中藥新藥的開發，從88年10月20日公告修正「中藥新藥查驗登記須知」[2]供中藥新藥臨床試驗遵循以來，至104年共有六家中藥臨床試驗中心[3]，提供中藥新藥臨床試驗場所。與時俱進推動臺灣中藥產業技術升級、加速申請中藥新藥臨床試驗，於97年特訂定「中藥新藥臨床試驗基準」，包括(一)新藥材、新藥用部位；(二)超過或未超過傳統使用經驗範圍之部分純化中藥；(三)超過或未超過傳統使用經驗範圍之新複方；(四)超過或未超

過傳統使用經驗範圍之固有方劑之新療效或新使用途徑；(五)前四款之一，已通過中藥新藥查驗登記之新使用途徑、新療效或新劑型[4]，以上皆應依本基準之規定向中醫藥司申請中藥新藥臨床試驗，透過財團法人醫藥品查驗中心進行初步的技術性審查和法規諮詢、輔導，加上專家諮詢和委外審查，來逐步完成中藥新藥查驗登記、獲得上市資格[5]。至103年資料統計，衛生署中醫藥委員會已陸續接獲22件國內研發之中藥新藥申請執行臨床試驗（IND），其中14件已通過審核准予執行，並有6件已完成第二期或第三期臨床試驗，其中2件已完成全程試驗[6]。

「中藥新藥」，透過嚴謹、實證的研發流程，達到現代法規、科學對品質、安全、療效的要求，開發出以西醫診斷所描述的適應症的治療新藥，已成為現代醫藥發展的一個新趨勢。經確實遵循藥品優良臨床試驗規範（Good Clinical Practice，GCP），我國已有2個中藥新藥產品成功上市：

(一) 壽美降脂一號：國內第一件經由IND & 新藥查驗登記(NDA)通過之中藥新藥，其主成分為紅麴，為一種米類的發酵物。由彥臣生技藥品股份有限公司委託國內GMP藥廠製造之紅麴膠囊製劑。本藥之中藥新藥查驗登記申請，經提交行政院衛生署藥物審議委員會審議通過，94年3月30日核發藥品許可證(衛署藥製047152)。
適應症為：「降低高膽固醇血症、高三酸甘油脂血症」，
效能為：「消食活血、健脾燥胃」[7,8]。

(二) 化療漾：國內第一件中藥新成藥，其主成分為有機大豆2.7公克之發酵液。由中天生物科技股份有限公司製造成內服液劑。101年10月15日行政院衛生署核發藥品許可證(衛署成製015926)，以「成藥」上市，不受限於醫院處方用藥，適應症為：「改善化學藥物治療之癌症病患的疲勞及食慾不振」[7,9]。

研議臺灣中藥典是否收載已核發藥證之中藥新藥製劑，其刊載內容、格式可參考中國大陸藥典做法，目前中國大陸藥典將通過審查的中藥新藥歸類在成方製劑和單方製劑內，其刊載項目依序為品名、來源、處方、製法、性狀、鑑別、檢查、含量測定、功能與主治、用法與用量、注意、規格、貯藏，對於涉及國家秘密技術和有特殊原因的，處方和製法從略；或只寫出部分藥味，不註明藥量；或寫出處方藥味和簡要製法，不註明藥量[10]。由於兩岸藥品審查法規標準不同，且對於新藥專利保護程度也不同，可參考中國大陸中藥管理及審評審批制度等經驗，應用兩岸中藥藥學專家專業知識並持續進行交流，做為未來編修之參考。

本計畫研議將請：

(一) 該產品廠商提出相關資料，如該產品原料之詳細加工或製造過程、規格及 90 天餵食毒性試驗數據等證明文件。

(二) 該產品是否有”注意事項”，如孕婦、哺餵母乳者之應注意事項。

(三) 仿單是否依衛生福利部部授食字第 1041404689 號公告：「藥品仿單應刊載賦形劑成分名或品名」

(四) 請依研擬之「臺灣中藥典收載濃縮製劑格式內容」草案撰寫相關資料。

綜合上述，將本項目列為專家會議的議題，予以討論是否納入臺灣中藥典收載品項。

三、研議藥典新增收載中藥製劑品項、內容及撰寫格式，提出相關規劃建議。(內容涉「鑑別」、「檢查」、「含量測定」及「異常物質限量」等，協請檢驗規格分小組編修；「功能與主治」及「用法與用量」，內容協請中醫臨床分小組編修)

(一) 研議藥典新增收載中藥製劑品項：

將收集中華藥典第七版、臺灣中藥典第二版、中國大陸藥典 2010 年版、日本藥局方第十六版與第一、二增補版所收載之製劑品項，於專家會議中討論，做為預定中藥製劑品項收載之清單。

1. 日本藥局方第十六改正版與第一及第二追補版所收載之中藥濃縮製劑(複方)有黃連解毒湯エキス、葛根湯エキス等 42 種。
2. 何玉玲副教授執行中複方中藥濃縮製劑有疏經活血湯等 20 方。
3. 中醫藥司公告中藥濃縮製劑(20 方指標成分)，目前國內已實施 20 方中藥濃縮製劑應依「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法規格注意事項」進行管理。20 方中藥濃縮製劑為葛根湯等。
4. 依 100 年 101 年及 102 年三年總和健保用量排行前 100 名複方中藥濃縮製劑供參考。
5. 大陸 2010 年藥典收載中藥成分製劑目錄供參考。

(二) 研議藥典新增收載中藥製劑內容及撰寫格式：

將收集上述藥典中相關浸膏與中藥製劑品項，如中華藥典第七版-「製劑通則與一般規定」之浸膏劑規範（4017），與正文中之甘草浸膏（p.1026）與龍膽浸膏（p.1011）二品項、臺灣中藥典第二版-川烏（p.26-28）與白芍（p.68-69）等二品項、中國大陸藥典 2010 年版-加味逍遙口服液（合劑）（p.666）與小青龍顆粒（p.505）、

日本藥局方第十六版-加味逍遙散エキス（p.1471-1473），與擬定之「臺灣中藥典收載濃縮製劑（複方）格式內容」草案一同比較。各國藥典格式內容及撰寫順序比較表如下頁，並於專家會議中討論確認，且以健保用量排行第一之加味逍遙散，擬訂內容與格式之範本。擬定之規範內容，若涉及「鑑別」、「檢查」、「含量測定」及「異常物質限量」等，將協請檢驗規格分小組編修；「功能與主治」及「用法與用量」，內容協請中醫臨床分小組編修。

表一、各國藥典格式內容比較表「∨」：表示該藥典於此項目有收載內容。

	研擬之「臺灣中藥典收載濃縮製劑（複方）格式內容」草案	中國大陸藥典 2010 年版一部 加味逍遙口服液（合劑）	中國大陸藥典 2010 年版一部 小青龍顆粒	臺灣中藥典 第二版 川烏、白芍	中華藥典 第七版 甘草浸膏	中華藥典 第七版 龍膽浸膏	日本藥局方 第十六改正 加味逍遙散エキス
指標成分	∨			∨	∨		∨
處方	∨	∨	∨				
製法	∨	∨	∨		∨	∨	∨製法處方
性狀	∨	∨	∨	∨	∨		∨
鑑別	∨	∨	∨	∨	∨	∨	確認試驗
異常物質檢查及其他規定	∨	檢查相對密度 其他	檢查無蔗糖顆粒 其他	雜質檢查及其他規定	一般檢查及 其他規定		純度試驗重金屬、砷 乾燥減重灰分
含量測定	∨	∨	∨	∨	∨		定量法
效能	∨	功能與主治	功能與主治				
適應症	∨						
用途分類	∨			∨	∨	∨	
用法與用量	∨	∨	∨	用量			
注意事項	∨	注意		∨			
包裝		規格	規格				
貯藏法	∨	貯藏	貯藏	∨	∨	∨	貯法

(三) 研議藥典新增收載中藥製劑之檢驗方法、成分含量標準及異常物質限量之訂定方法：

參考日本藥局方第 16 版、中國大陸藥典 2010 年版及臺灣中藥濃縮製劑現行法規公告，整理各國藥典相關之檢驗方法(表一)，並以加味逍遙散、小青龍湯與小柴胡湯(表二～表四)作為會議資料，待專家會議研議後，提出建議。

表二、各國藥典檢驗方法整理

<table>
<tr><th colspan="3">檢驗項目</th><th>日本藥局方
第 16 版</th><th>中國大陸藥典
2010 年版</th><th>臺灣中藥
典</th></tr>
<tr><td rowspan="5">五大項</td><td colspan="2">乾燥減重</td><td>通則 5.01</td><td>附錄 IX G 附錄 51</td><td>通則 5008</td></tr>
<tr><td colspan="2">總灰分</td><td>通則 5.01</td><td rowspan="2">附錄 IX K 附錄 53</td><td rowspan="2">通則 5004</td></tr>
<tr><td colspan="2">酸不溶性灰分</td><td>通則 5.01</td></tr>
<tr><td colspan="2">水抽提物含量</td><td>通則 5.01</td><td>附錄 X A 附錄 62</td><td>通則 5006</td></tr>
<tr><td colspan="2">乙醇抽提物含量</td><td>通則 5.01</td><td>附錄 X A 附錄 62</td><td>通則 5006</td></tr>
<tr><td rowspan="12">異常物質</td><td rowspan="5">重金屬</td><td>總重金屬</td><td>通則 1.07</td><td>附錄 IX E 附錄 50</td><td>通則 3005</td></tr>
<tr><td>砷</td><td>通則 1.11</td><td rowspan="4">附錄 IX D 附錄 67-69
附錄 IX E 附錄 69-70</td><td rowspan="4">通則 3049
通則 3050</td></tr>
<tr><td>鎘</td><td>-</td></tr>
<tr><td>鉛</td><td>-</td></tr>
<tr><td>汞</td><td>-</td></tr>
<tr><td rowspan="3">微生物</td><td>總生菌數</td><td>通則 5.02</td><td rowspan="3">附錄 XIII C 附錄
79-88</td><td>通則 7006</td></tr>
<tr><td>大腸桿菌</td><td>通則 5.02</td><td rowspan="2">通則 7007</td></tr>
<tr><td>沙門氏菌</td><td>通則 5.02</td></tr>
<tr><td rowspan="2">農藥</td><td>總 BHC</td><td>通則 5.01</td><td rowspan="2">附錄 IX Q 附錄 57-58</td><td rowspan="2">通則 3052</td></tr>
<tr><td>總 DDT</td><td>通則 5.01</td></tr>
<tr><td>黃麴毒素</td><td>G_1、G_2、B_1、B_2</td><td>-</td><td>附錄 IX V 附錄 61-62</td><td>通則 3053</td></tr>
</table>

表三、加味逍遙散檢驗比較

檢驗項目		日本藥局方 第 16 版	中國大陸藥典 2010 年版 (加味逍遙丸)	臺灣現行法規公告
含量測定	Paeoniflorin	28-84 mg	不得少於 1.9 mg/g	具生理活性之兩成分 由多批次原料藥材及標準湯劑訂定規格 [11-13]
	Geniposide	25-75 mg	-	
	Glycyrrhizin	12-36 mg (處方中甘草量 1.5 g) 16-48 mg (處方中甘草量 2.0 g)	-	
成分鑑別	TLC	當歸、芍藥、白朮、蒼朮、柴胡、牡丹皮、山梔子、甘草、薑、薄荷	當歸、牡丹皮、柴胡、白朮山梔子	除指定藥材外，自行選定藥材，總數應達處方二分之一以上 [14]
乾燥減重		9.0%以下＜ 通則 2.41＞	-	
總灰分		10.0%以下＜ 通則 5.01＞	-	
異常物質	總重金屬	30 ppm 以下＜ 通則 1.07＞	-	30 ppm 以下
	砷	3 ppm 以下＜ 通則 1.11＞	-	3 ppm 以下
	鎘	-	-	0.5 ppm 以下
	鉛	-	-	10 ppm 以下
	汞	-	-	0.5 ppm 以下
	總生菌數	-	微生物限量 依劑型而定 <附錄 XIII C 附錄 79-88>	10^5 cfu/g 以下
	大腸桿菌	-		不得檢出
	沙門氏菌	-		不得檢出

註 1. 中藥濃縮製劑指標成分定量相關公告：

(1)中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項；行政院衛生署八十四年五

月四日衛署字第八四 0 二四一六五號函

(2)葛根湯等十方濃縮製劑之國產及輸入新案藥品查驗登記及藥品許可證有效期間展延時，應檢附「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」；行政院衛生署八十九年七月二十四日衛署字第八九 0 四 0 二五六號公告

(3)「葛根湯」等十方濃縮製劑外，知柏地黃丸、龍膽瀉肝湯等十方濃縮製劑之國產與輸入藥品查驗登記新案申請及藥品許可證有效期限屆滿申請展延，應依「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」之規定，檢附相關資料；行政院衛生署九十一年十二月二十三日衛署中會字第 0 九一 00 七九一九一號公告

註 2. 申請中藥藥品查驗登記應檢附薄層層析檢驗資料；行政院衛生署七十五年十二月二十九日衛署字第六三六六六 0 號公告

表四、小青龍湯檢驗比較

檢驗項目		日本藥局方第 16 版	中國大陸藥典 2010 年版 (小青龍顆粒)	臺灣現行法規公告
含量測定	Ephedrine、(+)-Pseudoephedrine	10-30 mg	不得少於 4 mg/6 g	具生理活性之兩成分由多批次原料藥材及標準湯劑訂定規格 [11-13]
	Paeoniflorin	26-78 mg	不得少於 9 mg/6 g	
	Glycyrrhizin	17-51 mg	-	
成分鑑別	TLC	麻黃、芍藥、乾薑、生薑、甘草、肉桂、細辛、五味子	麻黃、芍藥、乾薑、甘草、五味子	除指定藥材外，自行選定藥材，總數應達處方二分之一以上 [14]
乾燥減重		10.0%以下＜通則 2.41＞	7.0%以下＜附錄 IX H 附錄 8＞	
總灰分		10.0%以下＜通則 5.01＞	-	
異常	總重金屬	30 ppm 以下＜通則 1.07＞	-	30 ppm 以下

物質	砷	3 ppm 以下＜通則 1.11＞	-	3 ppm 以下
	鎘	-	-	0.5 ppm 以下
	鉛	-	-	10 ppm 以下
	汞	-	-	0.5 ppm 以下
	總生菌數	-	微生物限量依劑型而定<附錄 XIII C 附錄 79-88>	10^5 cfu/g 以下
	大腸桿菌	-		不得檢出
	沙門氏菌	-		不得檢出

註 1. 中藥濃縮製劑指標成分定量相關公告：

(1)中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項；行政院衛生署八十四年五月四日衛署字第八四 0 二四一六五號函

(2)葛根湯等十方濃縮製劑之國產及輸入新案藥品查驗登記及藥品許可證有效期間展延時，應檢附「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」；行政院衛生署八十九年七月二十四日衛署字第八九 0 四 0 二五六號公告

(3)「葛根湯」等十方濃縮製劑外，知柏地黃丸、龍膽瀉肝湯等十方濃縮製劑之國產與輸入藥品查驗登記新案申請及藥品許可證有效期限屆滿申請展延，應依「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」之規定，檢附相關資料；行政院衛生署九十一年十二月二十三日衛署中會字第 0 九一 00 七九一九一號公告

註 2. 申請中藥藥品查驗登記應檢附薄層層析檢驗資料；行政院衛生署七十五年十二月二十九日衛署字第六三六六六 0 號公告

表五、小柴胡湯檢驗比較

檢驗項目		日本藥局方 第 16 版	中國大陸藥典 2010 年版(小柴胡顆粒)	臺灣現行法規公告
含量測定	Saikosaponin b_2	2-8 mg	-	-
	Baicalin	80-240 mg	不得少於 20 mg/袋	
	Glycyrrhizin	17-51 mg	-	
成分鑑別	TLC	柴胡、生薑、黃芩、人參、甘草	黃芩、甘草、柴胡	除指定藥材外，自行選定藥材，總數應達處方二分之一以上(註 1)
乾燥減重		10.0%以下 ＜通則 2.41＞	6.0%以下 ＜附錄 IX H 附錄 8＞	
總灰分		10.0%以下 ＜通則 5.01＞	-	
異常物質	總重金屬	30 ppm 以下 ＜通則 1.07＞	-	30 ppm 以下
	砷	3 ppm 以下 ＜通則 1.11＞	-	3 ppm 以下
	鎘	-	-	0.5 ppm 以下
	鉛	-	-	10 ppm 以下
	汞	-	-	0.5 ppm 以下
	總生菌數	-	微生物限量 依劑型而定<附錄 XIII C 附錄 79-88>	10^5 cfu/g 以下
	大腸桿菌	-		不得檢出
	沙門氏菌	-		不得檢出

註 1. 申請中藥藥品查驗登記應檢附薄層層析檢驗資料；行政院衛生署七十五年十二月二十九日衛署字第六三六六六 0 號公告

(四) 完成一項複方中藥濃縮製劑之指標成分含量分析：

預訂完成加味逍遙散濃縮製劑中芍藥與牡丹皮的芍藥苷(Paeoniflorin)、山梔子的梔子苷(Geniposide)等二個指標成分含量分析。隨機購買十家不同製造商生產之加味逍遙散濃縮製劑市售品各三瓶，以濃縮散、濃縮細粒、濃縮顆粒為優先採購劑型。每瓶分裝為五份盲樣，共五十份盲樣隨機分給五間實際從事中藥濃縮製劑檢驗實驗室，每間實驗室分得十個盲樣進行二個指標成分的三重覆分析。檢驗方法及檢驗項目於小型專家委員會議時予以討論。小型專家委員會議確認方法及檢驗項目後，將樣品與檢驗注意事項寄送至各實驗室，各實驗室分析完成後將結果填入表六，並回傳。收到各實驗室數據後，彙整各樣品分析結果，予以統計，並提出成分含量規格標準建議數值，交付大型專家委員會議討論。最後提出完美周全的建議。

1. 標準湯一批：分析結果以三重覆分析之平均值加減一個標準偏差表示；且每樣分析需執行注射三重複。

表六、標準湯分析結果

指標成份 / 取樣數	Paeoniflorin	Geniposide
1		
2		
3		
MEAN ±SD	_____ ± _____	_____ ± _____

2. 加味逍遙散濃縮製劑之乾燥減重與指標成分含量分析結果：

表七、乾燥減重分析結果（單位：w/w %）

樣品編號 / 取樣數	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1										
2										
3										
平均值										

表八、總灰分分析結果（單位：w/w %）

樣品編號 / 取樣數	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1										
2										
3										
平均值										

表九、芍藥苷(Paeoniflorin)含量以乾品計算之分析結果（單位：mg/g）

樣品編號 / 取樣數	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1										
2										
3										
平均值										

表十、梔子苷(Geniposide)含量以乾品計算之分析結果（單位：mg/g）

樣品編號 / 取樣數	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1										
2										
3										
平均值										

參、結果

一、 分別於 104/11/30、104/12/14、105/02/23、105/03/08、105/03/23 召開五場專家委員會議，研議本計畫所要達成之目標以及工作項目，會議議程及會議記錄詳附件。每次委員會議，出席委員均就其專業提供寶貴意見，未克出席的委員則事先提供意見表，委員所提供的寶貴意見皆於會議中提出討論，充分討論後獲得圓滿周全的共識。為使會議紀錄完整，出席委員會後提供發言條，以供紀錄使用。

二、 針對已核發藥證之中藥新藥製劑，壽美降脂一號及化療漾內服液，於第一次大型委員會議中提案討論，參酌大多數委員意見，暫不納入臺灣中藥典。

三、 研議藥典新增收載中藥製劑品項、內容及撰寫格式，提出相關規劃建議。

(一) 經過五次委員會議討論，於第五次會議通過收載項目如下：

1. 中文名
2. 英文名（漢語拼音、通用拼音）
3. 處方
4. 指標成分
5. 鑑別
6. 一般檢查及其他
   [1] 乾燥減重
   [2] 總灰分
7. 含量測定
   HPLC
8. 效能
9. 適應症
10. 注意事項

(二) 加味逍遙散濃縮製劑藥典撰寫格式草案如下：

加味逍遙散濃縮製劑 (草案)

Jaiwei Xiaoyao San Concentrated granules

Jiawei Siaoyao San Concentrated granules

出典：《證治準繩》

處方：

當歸 4.0 g　　炙甘草 2.0 g

白朮 4.0 g　　牡丹皮 2.5 g

白芍 4.0 g　　山梔子 2.5 g

柴胡 4.0 g　　煨薑　4.0 g

茯苓 4.0 g　　薄荷　2.0 g

（一日飲片量 33.0 g）

本品每日量含芍藥苷(paeoniflorin)不得少於，梔子苷(geniposide)不得少於。

鑑別：以當歸、白朮、白芍、柴胡、炙甘草、牡丹皮、山梔子及薄荷當作薄層層析之鑑別項目；以藥材或標準品當作對照藥材或對照標準品。

檢品溶液之配製——取本品粉末相當於一日飲片量之二分之一量，加甲醇 50 mL，於超音波震盪 30 分鐘後過濾，取濾液濃縮至快乾，加甲醇溶解並定容到 10 mL，作為檢品溶液。

1. 取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取當歸對照藥材 1.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照藥材溶液各 5 μL，按薄層層析法（通則 1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(80：20)混液為展開溶媒，層析之。俟溶媒頂端上升至距原點約 5~10 cm 時，取出層析板風乾後，於主波長 365 nm 之紫外燈照射下檢視之，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現主斑點之色調及 Rf 值均一致。
2. 取白朮藥材粉末 2.0 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液 10 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用正己烷:乙酸乙酯= 4:1 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 20 %稀硫酸之乙醇溶液，以 105 ℃加熱 3 分鐘，然後於 UV366nm 進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一螢光斑點的顏色及 Rf 值（約 0.4 處）與對照藥材溶液所顯現的藍白色螢光斑點相符合。
3. 取白芍藥材粉末 2.0 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，以甲醇定容至 10.0 mL，作為白芍對照藥材溶液。另取

牡丹皮藥材粉末 1.3 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，以甲醇定容至 10.0 mL，作為牡丹皮對照藥材溶液。分別取檢品溶液、白芍對照藥材溶液與牡丹皮對照藥材溶液各 5 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇= 2：1：2 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 Vanillin/ H_2SO_4 TS，以 105℃加熱 2~5 分鐘後進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值（約 0.68 處）與對照藥材溶液所顯現的紫色點相符合。

4. 取山梔子藥材粉末 1.3 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 5 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：4 N 氨水：乙醇= 2：1：2 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑香草醛/ 硫酸 TS，以 105 ℃加熱 2~5 分鐘後進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值（約 0.63 處）與對照藥材溶液所顯現的紫色色點相符合。
5. 取柴胡藥材粉末 2.0 g，加 70%甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以 70 %甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液 10 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用二氯甲烷：乙酸乙酯：甲基乙基酮：蟻酸：水= 5：3：1：1 下層液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 2 %對甲氧基苯甲醛/硫酸 TS，以 105 ℃加熱 3 分鐘後進行檢視，在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值(約 0.45 處)與對照標準品溶液所呈現的紫色色點相符合。
6. 取炙甘草藥材粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 10 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：甲基乙基酮：乙酸：水= 8：3：1：1 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，在 UV 254 nm 下檢視，Rf 值約 0.25 處有一深褐色吸收斑點，均勻噴灑對甲氧基苯甲醛/硫酸 TS，以 105 ℃加熱 3 分鐘後進行檢視，在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點的顏色及 Rf 值(約 0.25

處）與對照標準品(甘草酸 Glycrrhizic acid)溶液所顯現的紫色色點相符合。

7. 取薄荷藥材粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 5 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用己烷：乙酸乙酯= 2：5 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑對甲氧基苯甲醛/硫酸 TS，以 105 ℃加熱 3 分鐘後進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值（約 0.6 處）與對照藥材溶液所顯現的紫色色點相符合。

一般檢查及其他

1. 乾燥減重—本品以 105 ℃乾燥五小時，其減重不得超過____%。(通則 5008)
2. 總灰分—本品之總灰分不得超過____%。(通則 5004)

含量測定：

1. 芍藥苷(paeoniflorin)、梔子苷(geniposide) —

移動相溶媒—以 0.03 %磷酸溶液為移動相 A，以 0.03 %磷酸-乙腈為移動相 B；沖提流速為每分鐘 1.0 mL，按下表中規定進行梯度沖提。必要時可配合調整比例。

對照標準品溶液—分別精確稱取芍藥苷與梔子苷對照標準品適量，加 70 %甲醇製成濃度為芍藥苷 30 μg/mL、梔子苷 40 μg/mL 的溶液，即得。

檢品溶液—取本品粉末約 0.5 g，精確稱定；加入 35 mL 之 70 %甲醇，於超音波震盪器中震盪 30 分鐘，過濾；濾液加 70 %甲醇定容至 50.0 mL，混勻後以 0.45 μm 濾膜過濾，即得。

層析裝置—液相層析裝置，具波長為 245 nm 檢測器，4~6 mm × 15~25 cm 層析管，充填粒徑 5 μm、十八烷基矽烷鍵合矽膠管柱。層析管溫度保持在 40 ℃附近。另取對照標準品溶液層析之，記錄其波峰直，重複注入五次，波鋒面積之相對標準差不得大於 1.5 %。

測定法—分別精確吸取對照標準品溶液與檢品溶液各 20 μL，注入液相層析裝置，依以下層析條件層析之。測定，即得。

Time(min)	移動相 A%	移動相 B%
0 ~ 15	90 → 88	10 → 12
15 ~ 20	88	12
20 ~ 50	88 → 58	12 → 42
50 ~ 55	58 → 53	42 → 47
55 ~ 65	53 → 40	47 → 60
65 ~ 70	40 → 0	60 → 100
70 ~ 75	0	100

芍藥苷 (mg/day)＝ $\dfrac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T}$ × 每日使用量

A_T：檢品溶液之芍藥苷訊號峰的面積

A_S：標準品溶液之芍藥苷訊號峰的面積

M_S：芍藥苷標準品溶液之濃度(μg/mL)

W_T：檢品量(g) 以乾品計之

梔子苷 (mg/day)＝ $\dfrac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T}$ × 每日使用量

A_T：檢品溶液之梔子苷訊號峰的面積

A_S：標準品溶液之梔子苷訊號峰的面積

M_S：梔子苷標準品溶液之濃度(μg/mL)

W_T：檢品量(g)以乾品計之

2. 水抽提物－取本品按照生藥水抽提物測定法(通則 5006)測定之。
3. 稀乙醇抽提物－取本品按照生藥稀乙醇抽提物測定法(通則 5006)測定之。

效能：疏肝解鬱、清熱涼血。

適應症：肝鬱血虛發熱、月經不調、怔忡不寧。

注意事項：

(三) 製劑通則前言(草案)：

中藥濃縮製劑製劑通則前言(草案)

中藥濃縮製劑係由中藥材經煎煮或萃取、濃縮、乾燥，加工調製成各種劑型之製劑。依照藥材組成可分為單方製劑及複方製劑；依照劑型可分為散劑、顆粒劑、丸劑、錠劑、糖衣錠劑、膜衣錠劑、膠囊劑或其他衍生劑型等。

複方濃縮製劑以合併煎煮為原則。煎煮所抽出之浸膏，得以中華藥典收載之乳糖、澱粉等或經中央衛生主管機關核准之適當製劑輔助劑、賦形劑、及經抽提後所遺留之中藥乾燥殘渣、或製劑組成之部分中藥原末予以調製。濃縮製劑微生物、重金屬、農藥殘留之限量，應依中央衛生主管機關公告之規定。

四、 完成訂定臺灣中藥典中藥濃縮製劑加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)指標成分含量分析方法、TLC 鑑別方法、一般檢查及異常物質限量之原則；可供臺灣中藥典收載中藥濃縮製劑之參考。

(一)加味逍遙散濃縮製劑之指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)與梔子苷(Geniposide)之含量分析方法。

每一盲樣依下列條件三重複測定之：

1. 檢品溶液：取本品粉末約 0.5 g，精確稱定；加入 35 mL 之 70 %甲醇，於超音波震盪器中震盪 30 分鐘，過濾；濾液加 70 % 甲醇定容至 50.0 mL，混勻後以 0.45 μm 濾膜過濾，供作檢品溶液。
2. 對照標準品溶液：精確稱取 Paeoniflorin 與 Geniposide 對照標準品約 3.0 mg 與 4.0 mg，以 70 %甲醇溶解後定容至 10.0 mL，混勻；從中精確吸取 1.0 mL，移入 10 mL 之容量瓶，加入 70 %甲醇定容至刻度，混合均勻，作為對照標準品溶液。(濃度約為 Paeoniflorin 30 μg/mL、Geniposide 40 μg/mL)
3. 測定法：精確吸取對照標準品溶液與檢品溶液各 20 μL，注入液相層析裝置進行分析，依以下層析條件進行操作。對照標準品溶液重複注入六次，檢品溶液重複注入三次。
4. 檢測器：紫外光吸收波長為 245 nm
5. 層析管柱：十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑(粒徑 5 μm)之管

柱，管柱內徑 4~6 mm 及長度 15~25 cm。管柱溫度：保持在 40℃附近之恆溫

6. 移動相：以 0.03 % 磷酸水為移動相 A，以 0.03 %磷酸-乙腈為移動相 B；沖提流速為每分鐘 1.0 mL，按下表中規定進行梯度沖提。必要時可配合調整比例。

Time(min)	移動相 A%	移動相 B%
0 ~ 15	90 → 88	10 → 12
15 ~ 20	88	12
20 ~ 50	88 → 58	12 → 42
50 ~ 55	58 → 53	42 → 47
55 ~ 65	53 → 40	47 → 60
65 ~ 70	40 → 0	60 → 100
70 ~ 75	0	100

$$\text{Geniposide (mg/g)} = \frac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T}$$

A_T：檢品溶液之 Geniposide 訊號峰的面積

A_S：標準品溶液之 Geniposide 訊號峰的面積

Ms：Geniposide 標準品溶液之濃度(μg/mL)

W_T：檢品量(g)以乾品計之

$$\text{Paeoniflorin (mg/g)} = \frac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T}$$

A_T：檢品溶液之 Paeoniflorin 訊號峰的面積

A_S：標準品溶液之 Paeoniflorin 訊號峰的面積

Ms：Paeoniflorin 標準品溶液之濃度(μg/mL)

W_T：檢品量(g)以乾品計之

系統適合性—

系統性能：取標準品溶液 20 μL，注入層析裝置分析；得到的 Geniposide 與 Paeoniflorin 各訊號峰的理論板數不得少於

5000，及其不對稱因子(Asymmetry Factor)不得超過 1.5。

系統重複性：取標準品溶液 20 μL，重複六次注入層析裝置分析，得到的 Geniposide 與 Paeoniflorin 各訊號峰面積的相對標準偏差(RSD)不得超過 1.5%。

品質管制—

當連續層析超過 12 小時，每 12 小時及分析結束前需再注入一次對照標準品溶液，以確認其對應面積，與先前試驗得到的面積相對誤差值沒有超出± 5%。若超出± 5%時，應捨棄不符合的分析樣品，重新配製樣品及分析。

(二)加味逍遙散濃縮製劑分析結果

1. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之乾燥減重測定結果：

表十一、乾燥減重測定結果（單位：w/w%）

樣品編號 取樣數	樣品一	樣品二	樣品三	樣品四	樣品五	樣品六	樣品七	樣品八	樣品九	樣品十	
實驗室一	5.00	5.08	4.47	4.35	4.43	5.17	5.22	5.41	5.27	4.64	
實驗室二	4.37	4.47	4.14	4.11	4.04	4.55	4.80	4.88	4.56	4.37	
實驗室三	4.07	4.44	4.08	3.89	3.92	4.72	4.83	5.13	4.71	4.30	
實驗室四	3.41	3.33	3.21	3.42	3.47	4.21	4.4	4.03	3.96	3.62	
實驗室五	4.03	4.51	3.92	3.87	3.91	4.59	4.79	5.02	4.39	4.30	
Mean±SD	4.18 ±0.52	4.37 ±0.57	3.96 ±0.42	3.93 ±0.31	3.96 ±0.31	4.65 ±0.31	4.81 ±0.26	4.89 ±0.47	4.58 ±0.43	4.24 ±0.34	4.36 ±0.34

〈註〉本品以 105℃乾燥 5 小時，其減重不得超過 Mean+SD (4.7%)或 Mean+2SD(5.04%)。

2. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之總灰份測定結果：

表十二、總灰分分析結果（單位：w/w%）

樣品編號 取樣數	樣品一	樣品二	樣品三	樣品四	樣品五	樣品六	樣品七	樣品八	樣品九	樣品十	
實驗室一	4.18	4.98	4.35	5.16	4.40	2.69	3.72	5.64	2.83	4.69	
實驗室二	4.13	4.90	4.30	5.08	4.32	2.65	3.35	5.42	2.67	4.56	
實驗室三	4.41	5.26	4.55	5.36	4.58	2.86	3.89	5.84	2.95	4.94	
實驗室四	4.17	4.96	4.38	5.1	4.41	2.75	3.3	5.56	2.78	4.69	
實驗室五	4.17	4.92	4.29	5.05	4.35	2.58	3.32	5.55	2.72	4.60	
Mean±SD	4.21 ±0.10	5.00 ±0.13	4.38 ±0.09	5.15 ±0.11	4.41 ±0.09	2.70 ±0.09	3.52 ±0.24	5.60 ±0.14	2.79 ±0.10	4.70 ±0.13	4.25 ±0.92

〈註〉本品之總灰分不得超過 Mean+SD (5.17 %)或 Mean+2SD (6.09%)。

3. 標準湯：分析結果以三重覆分析之平均值加減一個標準偏差表示；且每樣分析需執行注射三重複。

表十三、標準湯分析結果 (Mean±SD)

指標成份	Paeoniflorin(mg/day)	Geniposide(mg/day)
實驗室一	69.62 ± 0.20	83.06 ± 0.24
實驗室四	77.85 ± 1.40	96.56 ± 1.52
實驗室五	116.1±1.25	**76.31±0.86**
國家中醫藥研究所 1	**58.67 ±1.04**	89.11 ± 0.93
國家中醫藥研究所 2	91.08 ±1.66	113.94 ± 0.81
國家中醫藥研究所 3	74.18 ±1.33	96.32 ± 0.64
Mean ± SD	81.25 ± 18.34	92.55 ± 11.93
標準湯劑下限值之 70%	**58.67x0.7=39.67**	**76.31 x 0.7= 53.42**
規格範圍	**39.67～119.01**	**53.42～160.26**

〈註〉依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》規定：

(1) 指標成分 Paeoniflorin 含量不得少於**標準湯劑下限值**之 70%

(2) 指標成分 Geniposide 含量不得少於**標準湯劑下限值**之 70%

4. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)每日量含量測定結果：

表十四、芍藥苷(Paeoniflorin)每日量含量測定結果（單位：mg/day）

樣品編號 / 取樣數	樣品一	樣品二	樣品三	樣品四	樣品五	樣品六	樣品七	樣品八	樣品九	樣品十	
實驗室一	39.34	32.05	59.04	88.25	85.64	84.64	86.94	95.19	35.24	47.10	
實驗室二	36.81	29.62	54.77	80.89	77.71	76.38	82.71	88.28	33.43	44.14	
實驗室三	37.10	29.88	53.76	79.45	78.96	75.40	87.92	88.17	31.76	43.88	
實驗室四	44.10	33.30	64.08	97.35	98.16	93.96	102.69	113.58	36.24	50.65	
實驗室五	39.80	32.93	62.22	90.80	96.28	86.40	84.07	97.17	33.08	42.96	
Mean ±SD	39.43 ±2.62	31.55 ±1.53	58.77 ±4.03	87.35 ±6.58	87.35 ±8.52	83.36 ±6.86	88.87 ±7.16	96.48 ±9.28	33.95 ±1.60	45.75 ±2.82	65.29 ±24.58

5. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之指標成分梔子苷(Geniposide)每日量含量測定結果：

表十五、梔子苷(Geniposide)每日量含量測定結果（單位：mg/day）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	62.16	36.83	67.29	74.55	82.80	36.00	104.58	53.55	48.04	115.09	
實驗室二	67.85	39.71	72.18	79.81	82.47	39.49	116.36	61.26	53.12	124.41	
實驗室三	63.98	38.75	72.15	79.25	81.80	37.96	111.16	57.99	51.92	118.96	
實驗室四	64.16	38.10	71.82	78.60	85.92	38.16	115.92	58.50	50.88	116.61	
實驗室五	64.89	37.73	68.58	74.65	78.08	34.04	104.09	54.33	47.16	113.44	
Mean ±SD	64.61 ±1.85	38.22 ±0.97	70.40 ±2.06	77.37 ±2.29	82.21 ±2.51	37.13 ±1.91	110.42 ±5.30	57.13 ±2.84	50.22 ±2.27	117.70 ±3.81	70.54 ±26.05

肆、討論

目前國內中藥濃縮製劑的檢驗標準主要依據為：查驗登記準則第三章（七十四條～一零九條）、「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」（衛署訴字第 84024165 號）、「『葛根湯』等十方濃縮製劑之國產及輸入新案藥品 查驗登記及藥品許可證有效期間展延時，應依『中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法規格注意事項』檢 附相關資料辦理」（衛署中會字第 89040256 號）、「增列知柏地黃丸等十方，其品管應執行處方中不同藥材共二種(或以上)指標成分之 HPLC 定量」（衛署中會字第 0910079191 號）、「中藥濃縮製劑加味逍遙散等 10 個處方含微生物限量」（署授藥字第 0970003102 號）、「中藥濃縮製劑加味逍遙散等 10 個處方含總重金屬及砷含量之限量」（署授藥字第 0970003101 號）、「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」（署授藥字第 0990003141 號）、「中藥濃縮製劑含總重金屬之限量」（署授藥字第 0970003085 號）等；可知目前我國對中藥濃縮製劑的規範並無一套獨立且完整的法令，相較於中國、日本已將中藥濃縮製劑收載於國家藥典且各項檢驗項目皆有明確規範，我國已大幅落後；同時，法令的不完備也限縮中藥濃縮製劑產業之發展，使得中藥濃縮製劑產業陷入眼前空有市場，卻無法發展的窘境。因此，此次研究主要目標為幫助中藥濃縮製劑標準化、規格化，改善中藥濃縮製劑品質，促進中藥濃縮製劑產業與國際接軌，拓展產業版圖。

此次研究的幾個目標討論如下：

一、製劑通則前言(草案)，現行法規將中藥濃縮製劑限縮於「湯劑」，只能用水萃取，對於賦形劑或是輔助劑的規範也不夠清楚，加上劑型種類眾多，歷經多次委員會議討論後才得到目前的草案，日後期能根據中藥濃縮製劑不同劑型制定通則。

二、草擬藥典收載格式，一般檢查項目中之總重金屬、個別重金屬、微生物等項目，總重金屬、個別重金屬、微生物等項目因已有公告規範現值，建議日後收載於製劑通則，不再於個別項目中記載，另外如水抽提物、稀醇抽提物等項目，並不適用於此次編寫的加味逍遙散中藥濃縮製劑(顆粒、細粒、散)，經多次委員會議討論，建議刪除；若編修藥典的同時，法令規章沒有同時進行修改，則編寫藥典就失去原本初衷；且藥典的法律地位模糊，當藥典與查驗登記準則並列，何者的法律地位較高？仍有待政府機關認定。

三、確立加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)與梔子苷(Geniposide)含量分析方法，並請國家中醫藥研究所進行確效，其結果之計算方式應以「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」（衛署訴字第 84024165 號）為依據，並以標準湯劑下限值之 70 % 為校正值，若標誌量 ± 50 % 的最低值低於標準湯劑下限值之 70 %，則以標準湯劑下限值之 70 % 乘以兩倍為標誌量。但是否應再增加柴胡主成分柴胡皂甘 B (Saikosaponin B)，有待斟酌。

四、確立加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)之 TLC 鑑別方法，並請國家中醫藥研究所進行確效，其中「煨薑」在市場上並無販售，且因炮製方法不同，不應與公告須進行 TLC 鑑別之藥材品項中的「生薑」混為一談，經多次委員會議討論，建議於 TLC 鑑別中刪除此項。

伍、結論與建議

一、此次研究案內容供臺灣中藥典撰寫格式參考。

二、藥典規格內容必須徵詢產業界意見，若有不同意者，應提出完整修正內容，供臺灣中藥典編修參考。

三、各檢驗項目，已有公告限值者，應列入製劑通則。

四、有關中藥濃縮製劑之英文譯名應採用何種拼音，國內曾使用的各種英文拼音有四種，其比較詳如表十六。

(一) 國音二式為西元 2001~2008 年高速公路地名使用，依此拼音，加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)的英文名為 Jiawei Shiauyau San。

(二) Wade-Gilos 羅馬拼音，為西元 2000 年以前護照人名及地名使用，部分地名與舊護照人名沿用至今，依此拼音，加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)的英文名為 Chiawei Hsiaoyao San。

(三) 通用拼音為部分縣市地名使用，依此拼音，加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)的英文名為 Jiawei Siaoyao San。

(四) 漢語拼音為國際通用的中文拼音，目前護照人名與地名鼓勵使用；另根據行政院院臺教字第 1000011159 號，為解決國內中文譯音使用版本紊亂，俾利使用者遵循，我國中文譯音除另有規定外，以漢語拼音為準。因此加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)的英文名為「**Jaiwei Xiaoyao San Concentrantes granules**」，建議使用國際通用之漢語拼音，以利產業國際化。

表十六、不同拼音對照表

中文名	加味逍遙散
注音(國音一式)	
1. 國音二式 西元 2001~2008 年高速公路地名曾經使用	Jiawei Shiauyau San

2. Wade-Gilos 羅馬拼音 又稱威妥瑪拼音、韋氏拼音、韋傑士拼音，西元 2000 年以前護照 人名及地名使用，部分地名與舊護照人名沿用至今。	Chiawei Hsiaoyao San
3. 通用拼音 部分縣市地名使用	Jiawei Siaoyao San
4. 漢語拼音 國際通用的中文拼音，為目前護照人名與地名鼓勵使用的拼音。	Jiawei Xiaoyao San

五、建議日後的計畫應將國家中醫藥研究所執行幹事改列專家或委員，以利計畫執行。

六、國家中醫藥研究所協助實驗方法確認，應支付其實驗耗材費用。

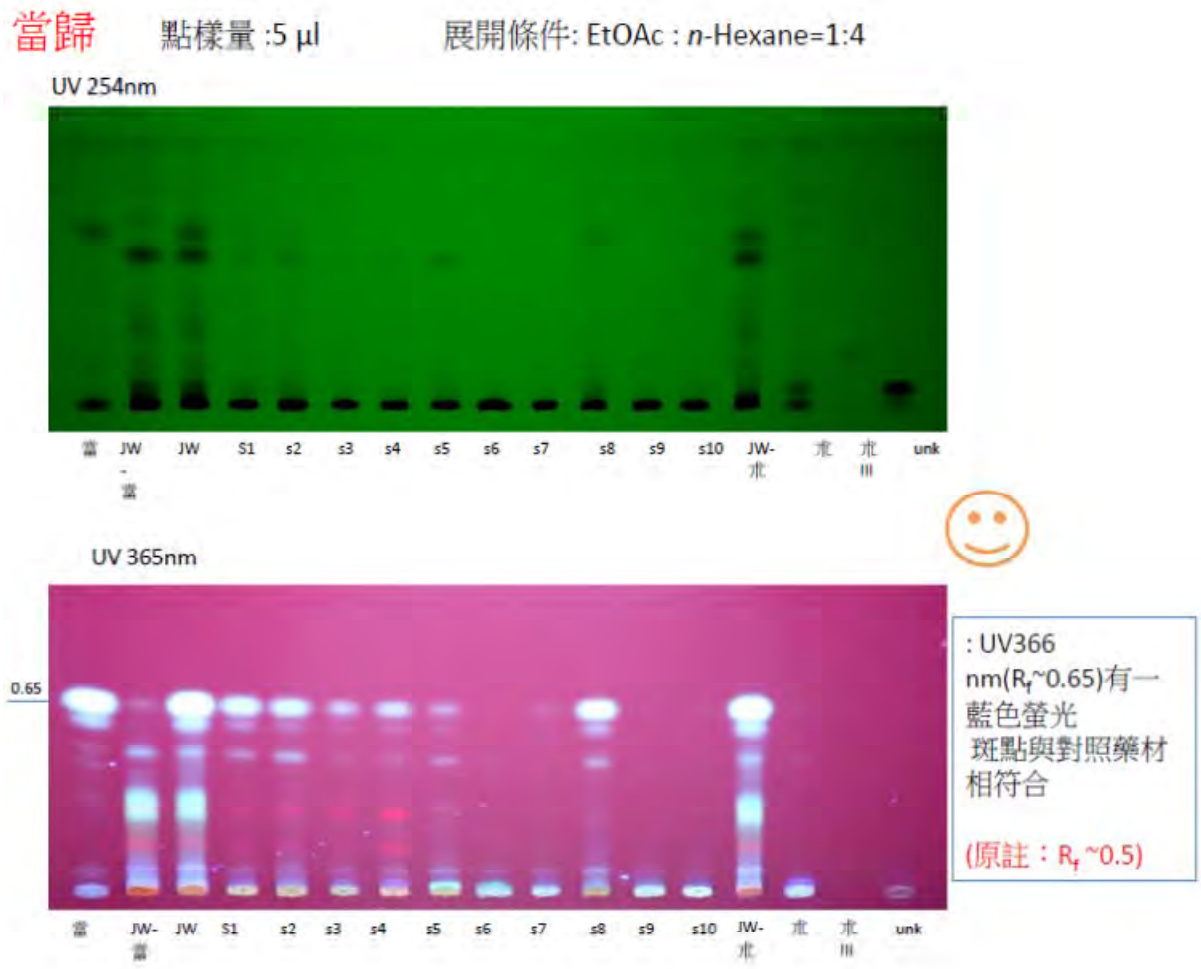
誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 MOHW104-CMAP-M-114-000423 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

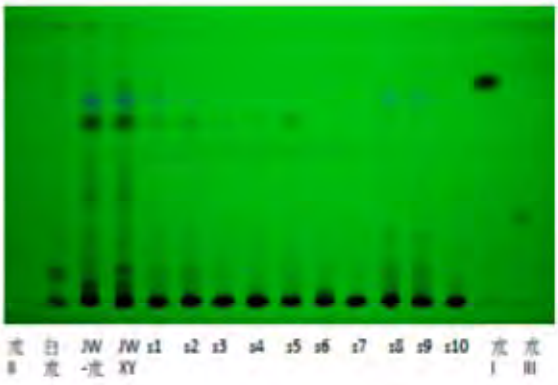
1. 製藥產業年鑑 2015，財團法人生物技術開發中心，頁 213-218。
2. 中藥新藥查驗登記須知(行政院衛生署：民國 88 年 10 月)。
3. 衛生福利部中醫藥司/中醫藥機關團體/中藥臨床試驗中心 http://www.mohw.gov.tw/CHT/DOCMAP/DM1_P.aspx?f_list_no=205&fod_list_no=3997&doc_no=30074。
4. 中藥新藥臨床試驗基準(行政院衛生署：民國 97 年 2 月)。
5. 衛生福利部中醫藥司/藥品管理及查驗登記區/一般規定及作業流程 http://www.mohw.gov.tw/CHT/DOCMAP/DM1_P.aspx?f_list_no=758&fod_list_no=3855&doc_no=29575。
6. 黃怡超等(民國 103 年)參與第十三屆中藥全球化聯盟研討會議及「兩岸中藥製劑查驗登記機制研究」考察出國報告。衛生福利部，頁 8-9。http://report.nat.gov.tw/ReportFront/report_detail.jspx?sysId=C10302869。
7. 衛生福利部中醫藥司/中藥藥品許可證查詢 http://www.mohw.gov.tw/CHT/DOCMAP/DM1.aspx?f_list_no=499。
8. 彥臣生技藥品股份有限公司/壽美降脂一號 http://www.naturewise.com.tw/page/70。
9. 中天生物科技股份有限公司/化療漾 http://www.chemoyoung.com.tw/product.php。
10. 中國大陸藥典 2010 年版一部，中國醫藥科技出版社，頁 XII-XIV
11. 中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項(行政院衛生署：民國 84 年 5 月)
12. 葛根湯等十方濃縮製劑之國產及輸入新案藥品查驗登記及藥品許可證有效期間展延時，應檢附「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」(行政院衛生署：民國 89 年 7 月)
13. 「葛根湯」等十方濃縮製劑外，知柏地黃丸、龍膽瀉肝湯等十方濃縮製劑之國產與輸入藥品查驗登記新申請案及藥品許可證有效期限屆滿申請展延，應依「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」之規定，檢附相關資料(行政院衛生署：民國 91 年 12 月)
14. 申請中藥藥品查驗登記應檢附薄層層析檢驗資料(行政院衛生署：民國 75 年 12 月)

柒、圖、表

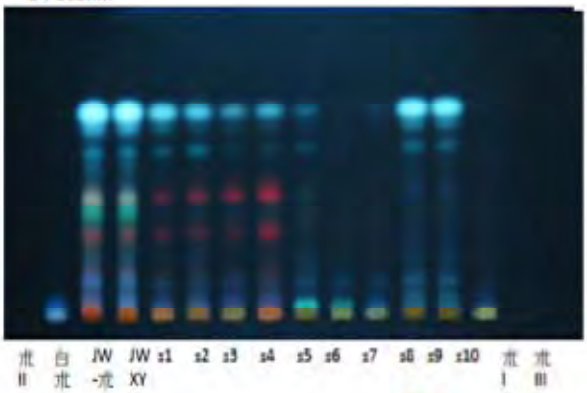

當歸
點樣量 :5 µl
展開條件: EtOAc : n-Hexane=1:4
UV 254nm
當
JW-當
JW
S1
s2
s3
s4
s5
s6
s7
s8
s9
s10
JW-朮
朮
朮III
unk
UV 365nm
0.65
: UV366 nm(Rf~0.65)有一藍色螢光
斑點與對照藥材相符合
(原註：Rf ~0.5)

白朮　點樣量 :10 μl　展開條件: EtOAc : n-Hexane=1:4

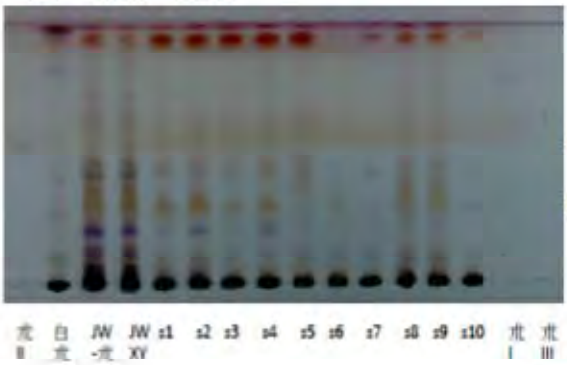
UV 254nm



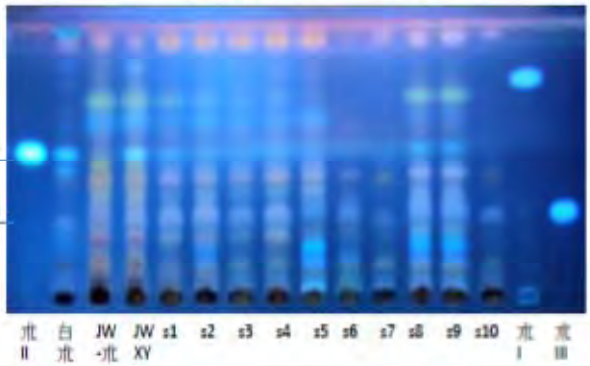
UV 365nm



20% H2SO4 /EtOH 顯色



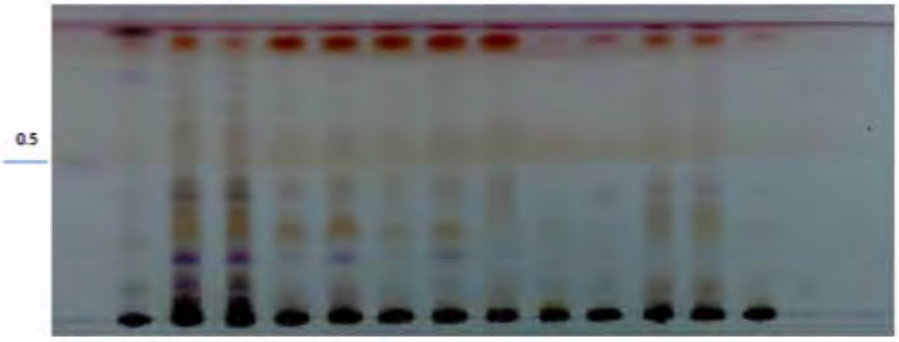
20% H2SO4 /EtOH 顯色後 UV 365 nm



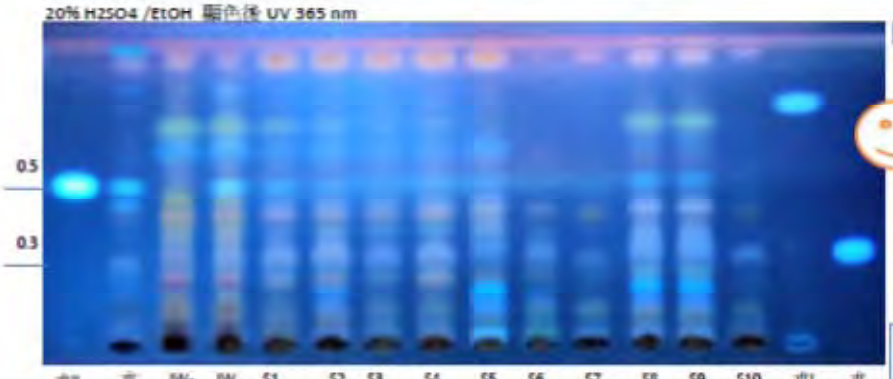
朮 II=白朮內酯 II ;朮 I =白朮內酯 I ;朮 III =白朮內酯 III

白朮　點樣量 :10 μl　展開條件: EtOAc : n-Hexane=1:4

20% H2SO4 /EtOH 顯色



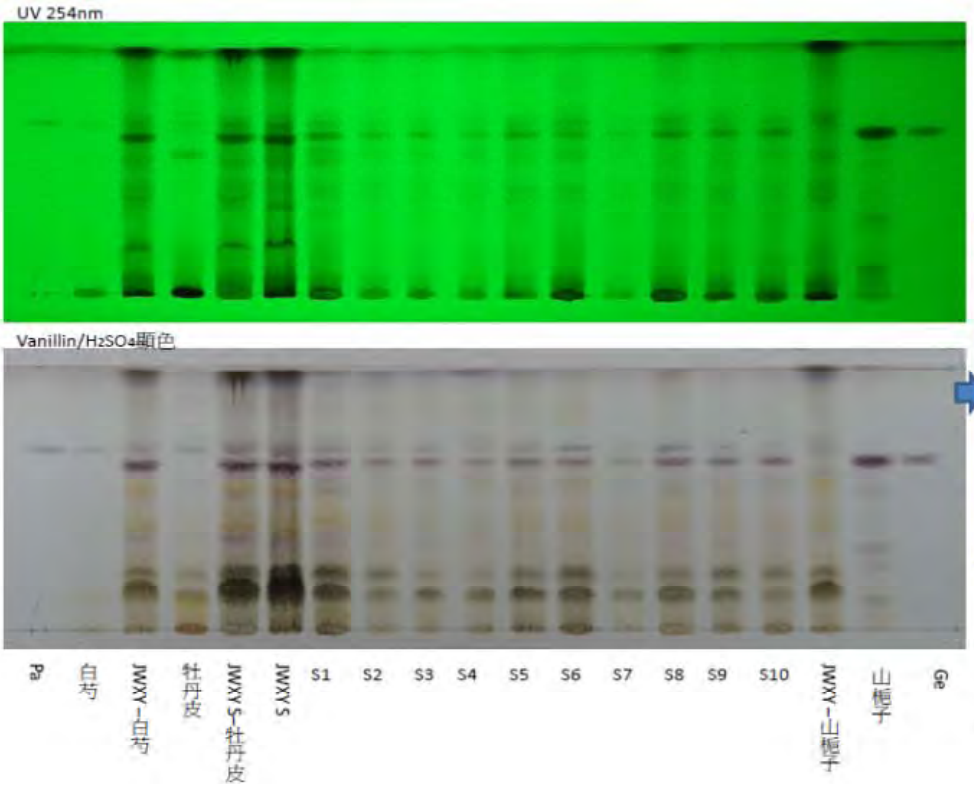
20% H2SO4 /EtOH 顯色後 UV 365 nm



白朮: 20% H_2SO_4 /EtOH 加熱→ UV 365 nm，有一螢光斑點的顏色及Rf值(約0.5處)與對照藥材溶液所呈現的藍白色螢光斑點相符合→ OK

朮I=白朮內酯 I (atractylenolide I)
朮II=白朮內酯II (atractylenolide I)
朮III=白朮內酯III (atractylenolide III)

白芍&牡丹皮&山梔子　點樣量 :5 μl　展開條件:EtOAc : 4N NH_4OH:EtOH=2:1:2



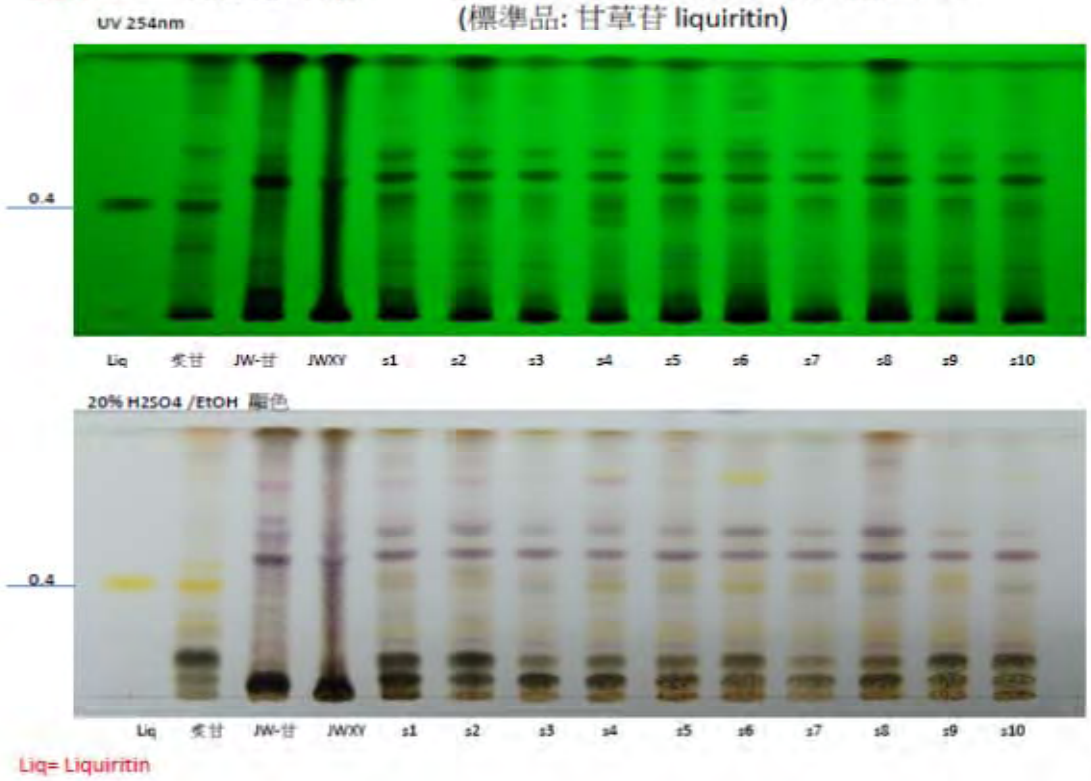
白芍&牡丹皮:
顯色後與對照藥材溶液所呈現的紫色色點(Rf~0.68)相符合

山梔子:
顯色後與對照藥材溶液所呈現的紫色色點(Rf~0.63)相符合

OK

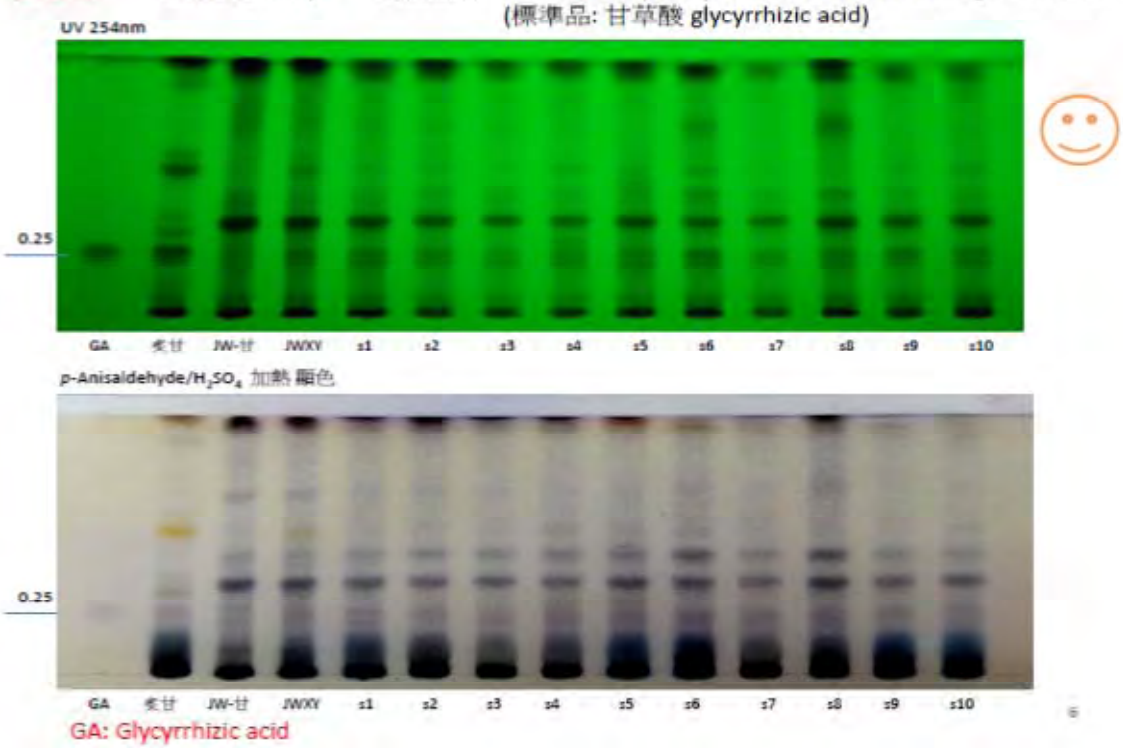
Pa: paeoniflorin
Ge:geniposide

炙甘草　點樣量 :10 μl　展開條件: EtOAc : 4N NH_4OH:EtOH=4:1:2
(標準品: 甘草苷 liquiritin)



Liq= Liquiritin

炙甘草　　點樣量 :10 μl　　展開條件: EtOAc : methyl ethyl ketone : formic acid : H_2O = 8:3:1:1
(標準品: 甘草酸 glycyrrhizic acid)

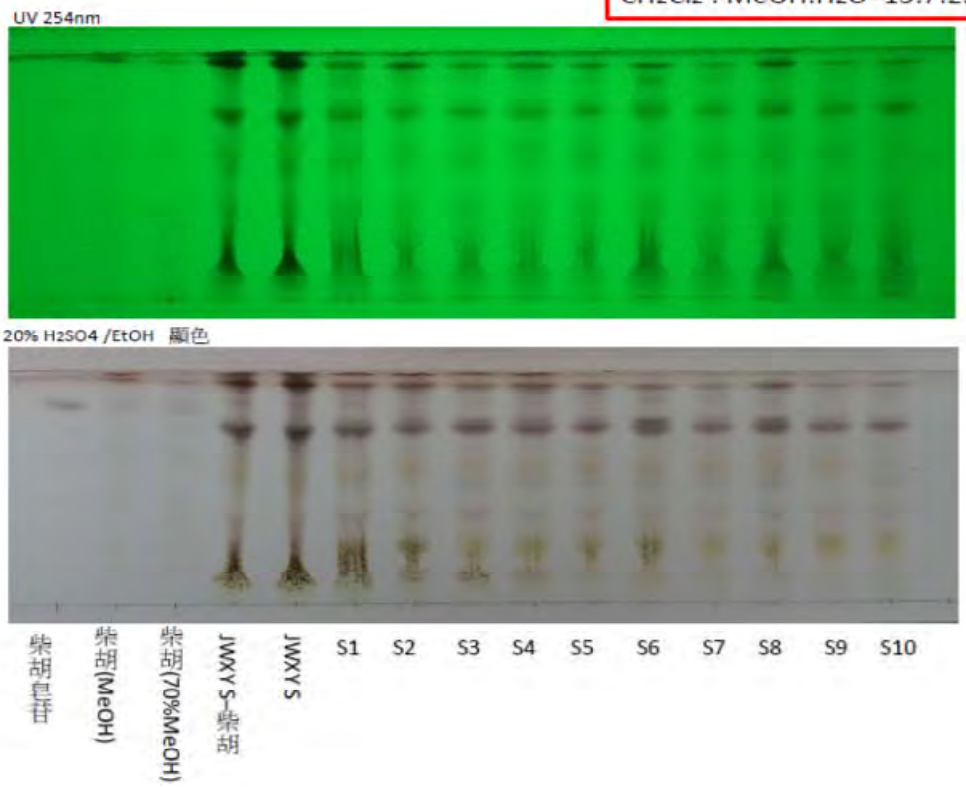


GA: Glycyrrhizic acid

柴胡　　點樣量 :5 μl

展開條件:
CH_2Cl_2 : MeOH:H_2O=13:7:2.5 (取下層展開)

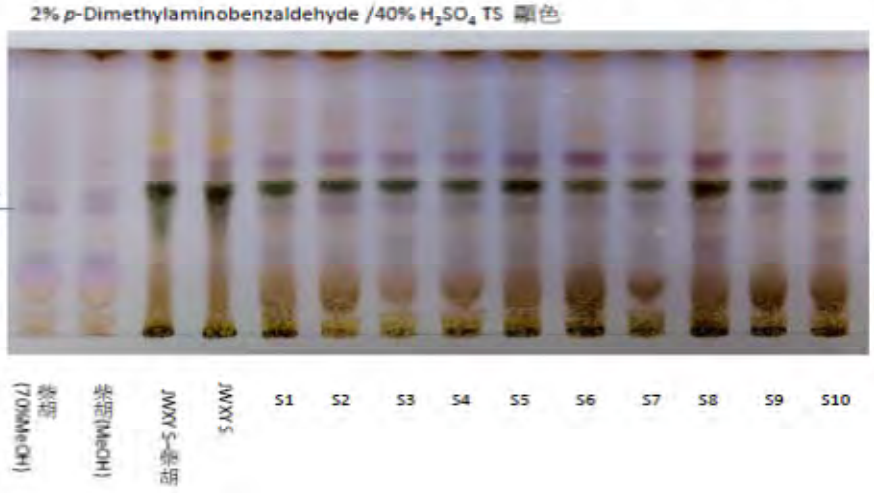
展開條件不穩定，展開結果時好時壞



柴胡　　點樣量 :10 μl

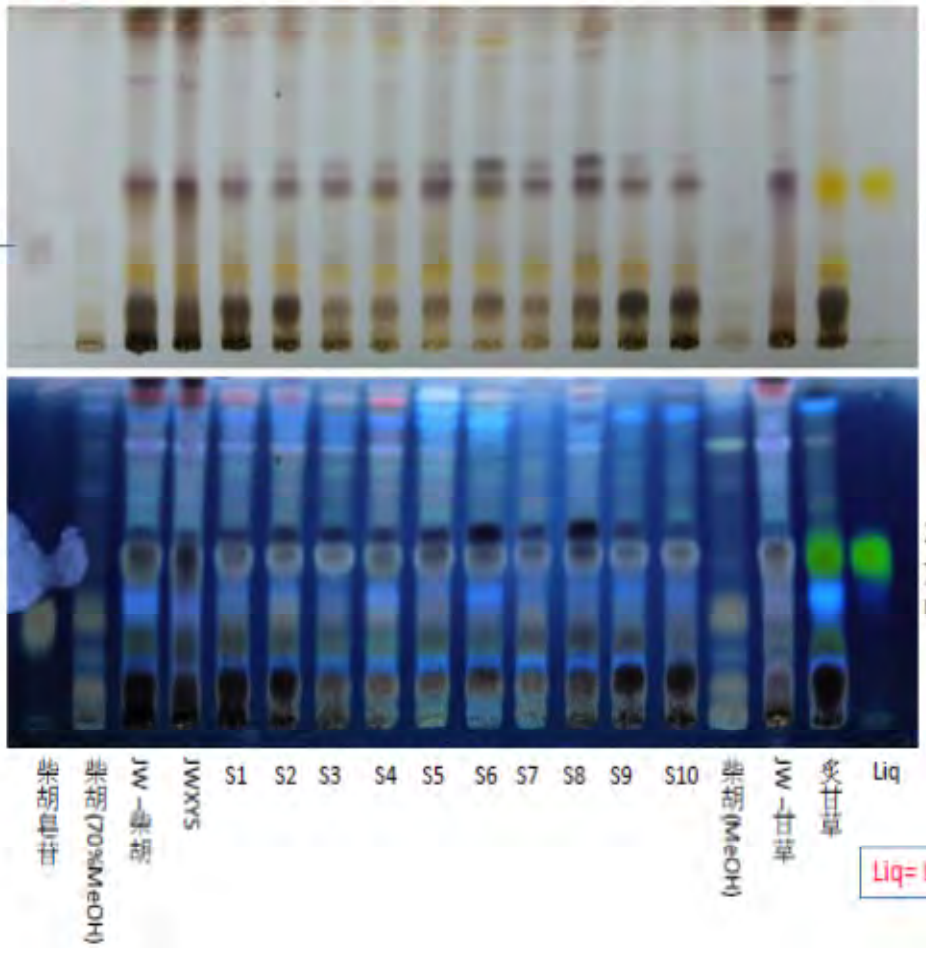
展開條件:先跑一次CH_2Cl_2 → EtOAc : methyl ethyl ketone :formic acid:H_2O=5:3:1:1

2% *p*-Dimethylaminobenzaldehyde /40% H_2SO_4 TS 顯色



註:顯色後在多個顯色點中有一紫色色點及Rf值(約0.45處)與對照藥材溶液所呈現的紫色色點相符合

柴胡&炙甘草　　點樣量 :10 μl　　展開條件:CH2Cl2:MeOH:H2O=7:1:0.1



20% H_2SO_4 /EtOH 加熱顯色

➢ 柴胡-MeOH與柴胡-70%MeOH,定性實驗看不出差異→柴胡-MeOH即可

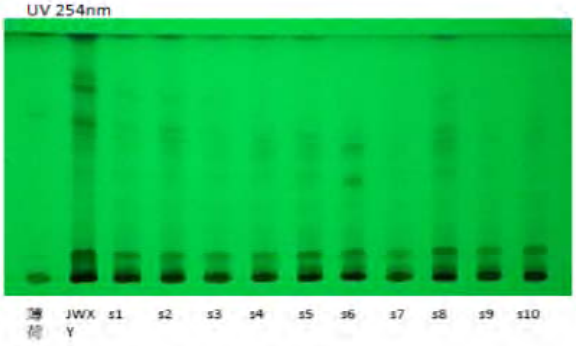
柴胡

20% H_2SO_4 /EtOH 加熱顯色後，UV 365 nm

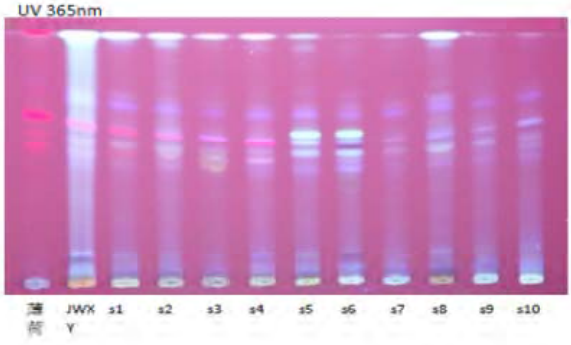
Liq= Liquiritin

薄荷　　點樣量 :5 μl　　展開條件: MeOH : CH_2Cl_2=1:9

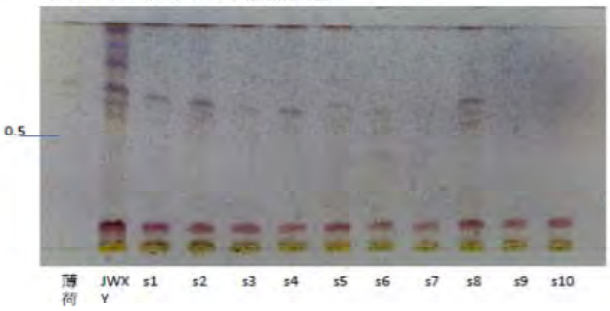
UV 254nm



UV 365nm



p-Anisaldehyde/H_2SO_4 加熱顯色

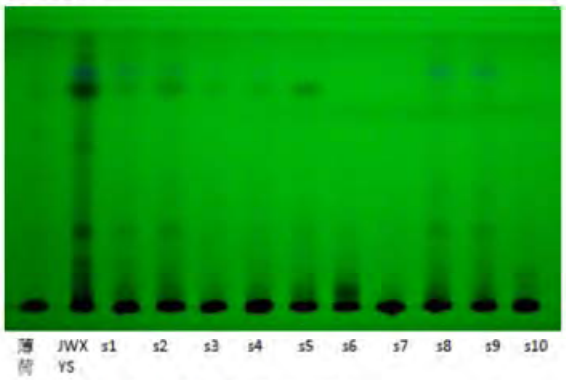


➡ 原註:顯色後在多個顯色點中有一藍色色點及Rf值(約0.5處)與對照藥材溶液所呈現的藍色色點相符合

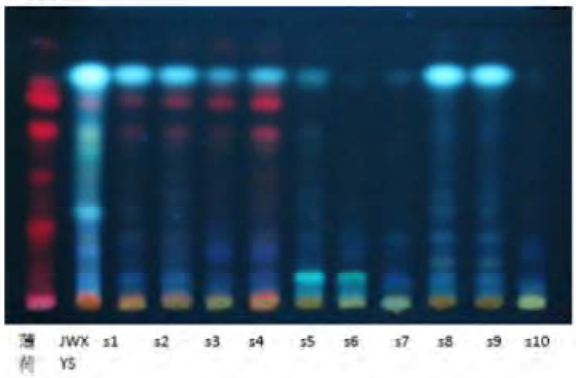
→ 不易辨識

薄荷　　點樣量 :10 μl　　展開條件: EtOAc: *n*-hexane = 2 : 5

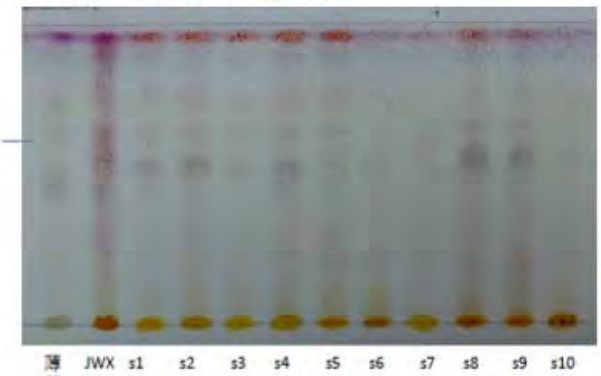
UV 254nm



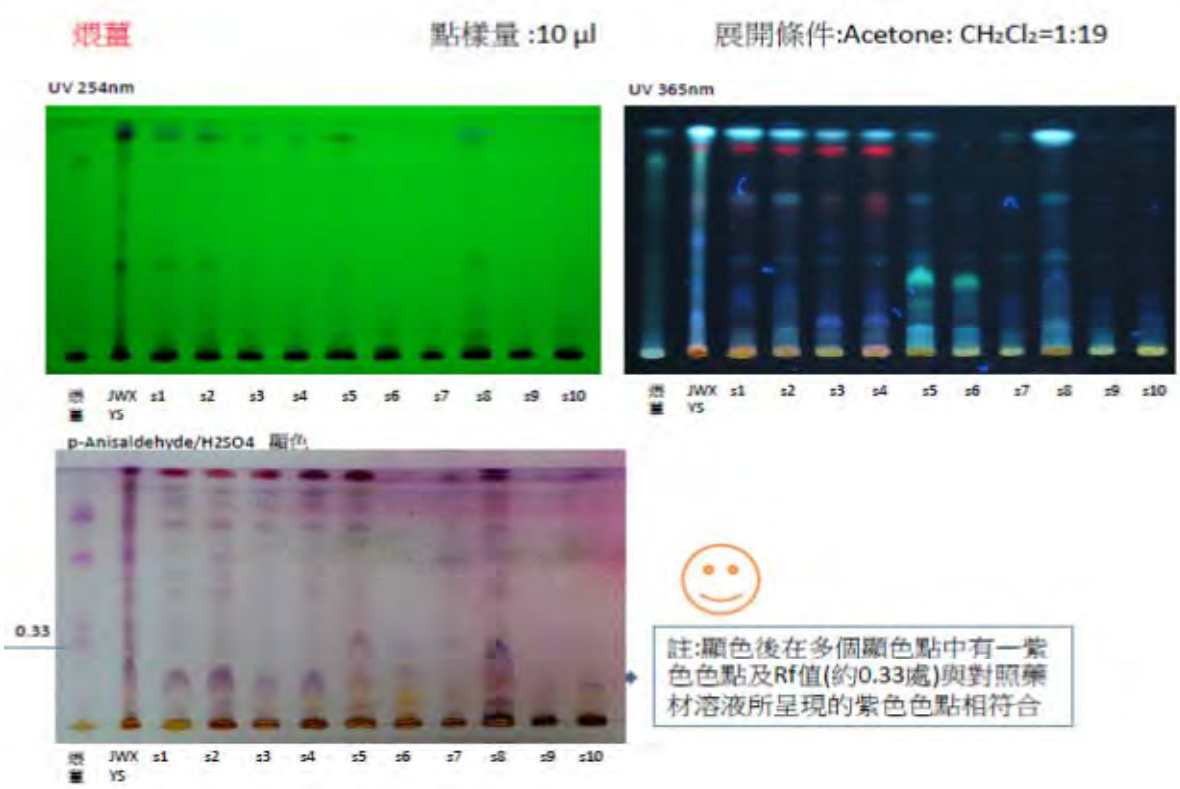
UV 365nm



p-Anisaldehyde/H_2SO_4 加熱顯色



➡ 註:顯色後在多個顯色點中有一紫色色點及Rf值(約0.6處)與對照藥材溶液所呈現的紫色色點相符合


烘蓋
點樣量 :10 μl
展開條件:Acetone: CH2Cl2=1:19
UV 254nm
UV 365nm
燒量 JWX YS s1 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9 s10
p-Anisaldehyde/H2SO4 顯色
0.33
註:顯色後在多個顯色點中有一紫色色點及Rf值(約0.33處)與對照藥材溶液所呈現的紫色色點相符合

104 年度衛生福利部

「中藥典規格研究-中藥濃縮製劑」計畫

第一次中藥製劑分小組委員會議會議紀錄

開會日期：中華民國 104 年 11 月 30 日(星期一)上午 10：00

開會地點：臺灣製藥工業同業公會

(臺北市大安區敦化南路二段 267 號 3 樓)

主席：謝明村　小組召集人

彭文煌　計畫主持人

一、主席報告：

1. 中藥濃縮製劑分小組工作內容說明：略。

2. 臺灣中藥典編修工作分小組會議召開原則及注意事項：略。

二、討論事項：

案由一：研議藥典新增收載中藥製劑品項中藥濃縮製劑(複方、單味)、中藥傳統製劑(丸、散、膏、丹)各收載多少品項，提出相關規劃建議，提請討論。

說明：1. 依 104 年度臺灣中藥典編輯工作小組第二次會議及臺灣中藥典第二版增補版編修工作大綱決議藥典新增收載中藥製劑品項。

2. 日本藥局方第十六改正版(2011 年)與第一追補版(2012 年)及第二追補版(2014 年)所收載之中藥濃縮製劑(複方)有黃連解毒湯エキス、葛根湯エキス等 28 種。

3. 副教授執行中複方中藥濃縮製劑疏經活血湯等 20 方。

4. 中醫藥司公告濃縮製劑(20 方指標成分)。

5. 100 年、101 年及 102 年三年總和健保用量排行前 100 名複方中藥濃縮製劑。

6. 大陸藥典自 1963 年版分一、二部，一部收載中醫常用中藥材 446 種和中藥成方製劑 197 種。今年 2015 年版一部收載品種 2598 種，其中新增品種 440 種、修訂品種 517 種、不收載品種 7 種。參閱其成方製劑和單味製劑目錄。

結論：

1. 先收載中藥濃縮製劑以複方為主，單方選常用者列入考量。

2. 中藥複方濃縮製劑收載品項以中醫藥司公告「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法規格注意事項」中藥複方濃縮製劑 20 方品項及增訂版草案中藥複方濃縮製劑 13 方品項等，納入臺灣中藥典收載優先考量。
3. 請○○○副教授提供執行複方中藥濃縮製劑 20 方品項，納入臺灣中藥典收載考量。
4. 請○○○委員提供中藥單方濃縮製劑品項，納入臺灣中藥典收載考量(會後○○○委員提出單方品項如發言條 14 所示)。
5. 中藥傳統製劑暫不討論。

案由二：研議藥典新增收載中藥製劑內容及撰寫格式提出相關規劃建議，提請討論。

說明：各國藥典中藥製劑格式內容及撰寫格式：

1. 中華藥典第七版「製劑通則與一般規定」之浸膏劑規範(4017)，以正文中之甘草浸膏(p.1026)為例：①中文名②拉丁名③指標成分(本品所含甘草素 glycyrrhizin 應在 4.5%以上)④製法⑤性狀⑥鑑別⑦一般檢查及其他規定⑧含量測定⑨貯藏法⑩用途分類。
2. 臺灣中藥典第二版以白芍為例：①中文名②拉丁學名③英文名指標成分④含量(所含芍藥苷 paeoniflorin 不得少於 1.0%)⑤性狀⑥鑑別⑦雜質檢查及其他規定(乾燥減重、總灰分、酸不容性灰分、總重金屬、鎘 Cd、鉛 Pb、汞 Hg、砷 As、銅 Cu) ⑧含量測定⑨貯藏法⑩用途分類⑪用量⑫注意事項(川烏)。
3. 大陸藥典 2015 年版成方製劑和單味製劑名稱不設拉丁名；以小青龍顆粒(p.567)為例：①中文名②漢語拼音名③處方指標成分④製法⑤性狀⑥鑑別⑦檢查(水分、無蔗糖顆粒) ⑧含量測定(每袋 6g 含白芍以以芍藥苷計，不得少於 9.0 mg)⑨功能與主治⑩用法與用量⑪注意⑫規格⑬貯藏。
4. 日本藥局方第十六版以加味逍遙散エキス(p.1471)為例：①漢字(漢方)名②英名③含量指標成分(本品含 paeoniflorin 28-84 mg, geniposide 25-75 mg, glycyrrhizic acid 12-36 mg 處方甘草量 1.5 g, 16-48 mg 處方中甘草量 2.0 g) ④製法⑤處

方⑥性狀⑦確認試驗⑧純度試驗(重金屬 30 ppm 以下,砷 3 ppm 以下) ⑨乾燥減重⑩灰分⑪定量法⑫貯法。

5. 中藥基準方，以六味地黃丸、加味逍遙散為例：①方名②出典③處方④效能⑤適應症⑥用量⑦注意事項。
6. 「臺灣中藥典收載濃縮製劑(複方)內容及撰寫格式(草案)」：①中文名②英文名(漢語拼音？、通用拼音？) ③指標成分含量④處方⑤製法⑥性狀⑦鑑別⑧異常物質檢查及其他規定？(雜質檢查及其他規定？) ⑨含量測定⑩效能⑪適應症⑫用途分類(是否列入？) ⑬用法用量？(用量？)⑭注意事項⑮貯藏法。
7. 各國藥典格式內容及撰寫順序比較。

結論：

1. 參考各國藥典格式內容及撰寫順序比較，請莊武璋委員彙整資料後提出規劃建議，供第二次會議討論
2. 有關「含量測定」，協請檢驗規格分小組編修。
3. 有關「效能」、「適應症」、「用途分類」，協請中醫臨床分小組編修。

案由三：研議藥典新增收載中藥製劑之檢驗方法、成分含量標準及異常物質限量之訂定方法，提出相關規劃建議，提請討論。

說明：1. 參考日本藥局方第十六版、中國大陸藥典 2015 年版、臺灣中藥濃縮製劑現行法規公告等檢驗方法(表一)。

2. 以加味逍遙散、小青龍湯及小柴胡湯(表二、表三、表四)為例，提出建議。

結論：請委員彙整資料後提出規劃建議，供第二次會議討論

案由四：研議完成加味逍遙散濃縮製劑之指標成分含量分析，提出相關規劃建議，提請討論。

說明：1. 加味逍遙散濃縮製劑是 100-102 年三年總和健保用量排名第一名。

2. 完成加味逍遙散濃縮製劑中芍藥與牡丹皮的芍藥苷(paeoniflorin)、山梔子的梔子苷(geniposide)及甘草的甘草酸(glycyrrhizic acid)等 3 個指標成分含量分析。

3. 撰寫加味逍遙散濃縮製劑之藥典格式範例。

結論：請顧問彙整資料後提出規劃建議，供第二次會議討論

案由五：研議藥典是否收載已核發藥證之中藥新藥製劑提出建議，提請討論。

說明：1. 請中藥新藥製劑產品提供：

(1) 產品原料之詳細加工或製造過程、規格及 90 天餵食毒性試驗數據等證明文件。

(2) 該產品是否有「注意事項」，如孕婦、哺餵母乳者之應注意事項。

(3) 仿單是否依衛生福利部授食字第 1041404689 號公告:「藥品仿單應刊載賦形劑成分名或品名」。

(4) 請提出一份依研擬之「臺灣中藥典收載濃縮製劑格式內容」①中文名②英文名③指標成分④處方⑤製法⑥性狀⑦鑑別⑧異常物質檢查及其他規定⑨含量測定⑩效能⑪適應症⑫用途分類⑬用法用量⑭注意事項⑮貯藏法。

2. 依民國 97 年訂定「中藥新藥臨床試驗基準」，已有二件中藥新藥產品完成全程試驗取得藥證。

(1) 壽美降脂一號：國內第一件經由申請新藥人體試驗(IND: investigational new drug)及申請新藥查驗登記(NDA: new drug application)通過之中藥新藥。其主成分為紅麴，為一種米類發酵物。效能為：「消食活血，健脾燥胃」。適應症為：「降低高膽固醇血症、高三酸甘油酯血症」。

(2) 化療漾內服液：國內第一件中藥新成藥。其主成分為有機大豆之發酵液。以「成藥」上市，不受限於醫師處方用藥。適應症為「改善化學藥物治療之癌症病患的疲勞及食慾不振」。

結論：參酌大多數委員意見，暫不納入臺灣中藥典。

三、臨時動議：無。

四、散會時間：下午 1 時 30 分。

104 年度衛生福利部

「中藥典規格研究-中藥濃縮製劑」計畫

第二次中藥製劑分小組委員會議會議紀錄

開會日期：中華民國 104 年 12 月 14 日(星期一)上午 10:00

開會地點：中國醫藥大學互助大樓十一樓 11A01 會議室

(台中市北區學士路九十一號)

主席：謝召集人明村/彭計畫主持人文煌　　記錄：陳運捷

一、主席報告：略。

二、討論事項：

案由一：購買中藥複方濃縮製劑之市售品代表性及樣品之盲樣測試檢驗數目，提請討論。

說明：

1. 依據中醫藥司資料，104 年 09 月止，國內通過 GMP 藥廠認證之家數計 97 家，其中 44 家有從事中藥複方濃縮製劑製造。
2. 中藥複方濃縮製劑購買之市售品代表性擬依台灣本島北、中、南三區藥廠中隨機購買 10 家。
3. 樣品之盲樣測試檢驗數目
   (1) 隨機購買 10 家不同製造藥廠生產之加味逍遙散濃縮製劑市售品同批號 200 公克各 3 瓶，以濃縮散、濃縮細粒、濃縮顆粒為採購劑型。每一家樣品分裝各 100 公克盲樣 5 份，分給 5 間實際從事中藥複方濃縮製劑檢驗實驗室，剩餘 100 公克由計畫主持人留樣。
   (2) 有關盲樣測試檢驗樣品，主持人應負保密義務，不得揭露與任何第三人，或為其本身或他人之利益而使用。
   (3) 每間實驗室分得 10 個盲樣進行芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide)2 個指標成分的三重覆分析，分析前需檢測乾燥減重。

結論：

1. 計畫主持人向中藥店隨機購買中藥複方濃縮製劑，優先以濃

縮顆粒為主，其次為濃縮細粒、濃縮散。

2. 購買後拆封→混合均勻→以新瓶分裝→重新編號，剩餘 100 公克由計畫主持人封口留樣。
3. 購買 10 家中藥複方濃縮製劑樣品寄給 5 家檢驗實驗室。
4. 提中藥製劑分小組第三次委員會議報告。

案由二：受委託之中藥複方濃縮製劑檢驗實驗室可信度，提請討論。

說明：受委託之中藥複方濃縮製劑檢驗實驗室應有被財團法人全國認證基金會(Taiwan Accreditation Foundation, TAF)認證認可，遵循 ISO 17025 的規範要求。

結論：

1. 計畫主持人依 TAF 及 ISO17025 規範認證認可之檢驗實驗室選擇 5 家。
2. 提中藥製劑分小組第三次委員會議報告。

案由三：加味逍遙散濃縮製劑指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide) HPLC 含量測定分析方法，提請討論。

說明：

1. 依中藥複方濃縮製劑分小組第一次會議結論提出討論。
2. 加味逍遙散濃縮製劑指標成分 HPLC 含量測定影響因素包括：
3. 樣品前處理方法。
4. 移動相、管柱的規格等。
5. 含量測定法要一致性，由協同主持人提出初步草案，如附件一，P.6~7。
6. 乾燥減重、總灰分及含量測定檢驗數據填寫格式表，如附件二，P.8
7. 購買芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide)標準品的製造廠商及純度要求。
8. 執行檢品含量測定之 HPLC 圖譜及檢量線分析圖。
9. 執行標準湯劑含量測定數據（附件三 p.9）、HPLC 圖譜及檢量線分析圖。

結論：

1. 含量測定方法經第二次中藥製劑分小組委員會議決議，請委員提供加味逍遙散濃縮製劑的樣品前處理、含量測定[芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide)]實驗方法，於 104 年 12 月 18 日前寄給協同主持人及 5 間分析實驗室負責人討論實驗步驟之可行性，彙整後送回計畫主持人，再請執行幹事以標準品進行分析後，確認實驗結果可以符合方法中的要求，最後由衛福部中醫藥司同意執行。

   再函寄給5間分析實驗室進行十家市售加味逍遙散濃縮顆粒劑產品之指標成分含量測定，如附件四，P.10~11。
2. 標準品芍藥苷(paeoniflorin)購自食管署、梔子苷(geniposide)購自 Chromadex 公司，純度均 98%以上。
3. 指標成分規範一日量之指標成分含量，以乾品計算。
4. 標準湯劑請各家檢驗實驗室所使用之藥材製備分析，計畫主持人統計五家資料後，再訂出含量最低限值。
5. 預定完成日期為 105 年 1 月底前將檢驗結果數據、HPLC 圖譜(紙本與 PDF 掃描檔)及層析圖寄給計畫主持人。
6. 提中藥製劑分小組第三次委員會議報告。

案由四：加味逍遙散濃縮製劑檢驗方法：鑑別、一般檢查及其他(乾燥減重、總灰分……)如何訂定，提請討論。

說明：

1. 依中藥複方濃縮製劑分小組第一次會議結論提出討論。
2. 其檢驗方法如下：
   (1) 成分含量(水抽提物含量、稀醇抽提物含量、指標成分)
   (2) 鑑別
   (3) 一般檢查及其他(乾燥減重、總灰分及微生物限量……)
   (4) 異常物質檢查

結論：

1. 因現有中藥複方濃縮製劑所添加之賦形劑標準不同，所以水抽提物及稀醇抽提物含量不列入規範。
2. 鑑別依規定進行中藥濃縮製劑內容藥材二分之一以上成分之 TLC，但加味逍遙散濃縮製劑組成藥材中有九味藥材必須進行 TLC 鑑定。

3. 請委員提出加味逍遙散濃縮製劑之鑑別方法，如附件五，P.12~14。
4. 中藥複方濃縮製劑微生物限量暫不訂定。
5. 異常物質檢查參考單味藥材標準訂定製劑之檢查標準。
6. 提中藥複方濃縮製劑分小組第三次委員會議報告。

案由五：中藥複方濃縮製劑之「製劑通則」如何訂定，提請討論。

說明：

1. 依中藥複方濃縮製劑分小組第一次會議結論提出討論。
2. 2015 大陸藥典、日本藥局方第 16 改正版及中華藥典第七版製劑通則等供參考，如附件六，P.14~17。
3. 2015 大陸藥典第四部製劑通則為中西藥通用之製劑通則，無單獨規範中藥複方濃縮製劑之製劑通則。
4. 日本藥局方第 16 改正版只有エキス製劑通則，並無加賦形劑後之漢方濃縮製劑通則。
5. 中華藥典第七版製劑通則為西藥製劑通則。
6. 臺灣中藥典收載中藥複方濃縮製劑有訂定中藥複方濃縮製劑通則之必要性。
7. 請協同主持人草擬「中藥複方濃縮製劑-製劑通則」(草案)，如附件七，P.18。

結論：

1. 「中藥複方濃縮製劑-製劑通則」(草案)，如附件七，P.18。經會議討論後呈報中醫藥司確認。
2. 提中藥複方濃縮製劑分小組第三次委員會議報告。

三、 臨時動議：

案由一：實驗數據應於何時交付彭計畫主持人文煌？

說　明：為能如期完成計畫進度，請各實驗室提出可交付實驗數據的日期。

決　議：實驗分析結果預定於 105 年 1 月底前送交彭計畫主持人文煌。

案由二：預計何時召開第三、五次大型委員會議？

說　明：105 年 2 月初適逢農曆春節假期，又本計畫將於 3 月底結案，請決議第三、五次大型委員會議的開會時間。

決　議：預定於 105 年 2 月 23 日(二)召開中藥製劑分小組第三次委員會議，105 年 3 月 22 日(二)召開中藥製劑分小組第五次委員會議。

四、散會：13 時 30 分。

附件一、加味逍遙散濃縮製劑指標成分含量測定法

1. 芍藥苷(Paeoniflorin)—

移動相溶媒—以水：乙腈：磷酸之混液(850：150：1)為移動相溶媒，必要時其配合比例可予調整。

對照標準品溶液—取芍藥苷對照用標準品 10 mg，精確稱定，加稀甲醇溶液(1→2)溶解並定容至 100 mL，即得。

檢品溶液—取本品粉末約 0.5 g，精確稱定，加稀甲醇溶液(1→2) 50 mL，超音波振盪混合十五分鐘，過濾，作為檢品溶液。

層析裝置—液相層析裝置，具波長 232 nm 檢測器，4~6 mm×15~30 cm 層析管，充填粒徑 5~10μm、十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑之管柱。層析管溫度保持 20℃左右，移動相溶媒流速調整至芍藥苷波峰滯留時間為約九分鐘。取對照標準品溶液 10L 層析之，記錄其波峰值，重複注入六次，芍藥苷波峰面積之相對標準差不得大於 1.5%。

另取芍藥苷標準品及芍藥內酯苷(albiflorin)標準品各 1mg，以稀甲醇溶液(1→2)溶解並定容至 10 mL。取此液 10μL，依上述條件操作時，會依序溶出芍藥內酯苷及芍藥苷，其分離度為 2.5 以上。

測定法—分別精確吸取對照標準品溶液與檢品溶液各 10 μL，注入層析裝置層析之，測定，即得。

2. 梔子苷(Geniposide)—

移動相溶媒—以水：乙腈：磷酸之混液 (900：100：1) 為移動相溶媒，必要時其配合比例可予調整。

對照標準品溶液—取梔子苷對照用標準品 10 mg，精確稱定，加稀甲醇溶液(1→2)溶解並定容至 100 mL，即得。

檢品溶液—取本品粉末約 0.5 g，精確稱定，加稀甲醇溶液(1→2)50 mL，超音波振盪混合十五分鐘，過濾，作為檢品溶液。

層析裝置—液相層析裝置，具波長 240nm 檢測器，4~6 mm×15~30 cm 層析管，充填粒徑 5~10μm、十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑之管柱。層析管溫度保持 40℃左右，移動相溶媒流速調整至梔子苷波峰滯留時間為約十分鐘。取對照標準品溶液 10μL 層析之，記

錄其波峰值，重複注入六次，梔子苷波峰面積之相對標準差不得大於 1.5%。取梔子苷標準品 10μL，依上述條件操作時，理論板數及對稱系數按梔子苷波峰計算各自於 5000 以上及 1.5 以下。

測定法—分別精確吸取對照標準品溶液與檢品溶液各 10μL，注入層析裝置層析之，測定，即得。

附件二、加味逍遙散濃縮製劑之乾燥減重與指標成分含量分析結果：

表一、乾燥減重分析結果（單位：w/w%）

樣品編號 / 取樣數										
1										
2										
3										
平均值										
RSD										

表二、總灰分分析結果（單位：w/w%）

樣品編號 / 取樣數										
1										
2										
3										
平均值										
RSD										

表三、芍藥苷(Paeoniflorin)含量以乾品計算之分析結果（單位：mg/g）

樣品編號 / 取樣數										
1										
2										
3										
平均值										
RSD										

表四、梔子苷(Geniposide)含量以乾品計算之分析結果（單位：mg/g）

樣品編號 / 取樣數										
1										
2										
3										
平均值										
RSD										

附件三、標準湯一批：分析結果以三重覆分析之平均值加減一個標準偏差表示；且每樣分析需執行注射三重複。

指標成份 / 取樣數	Paeoniflorin	Geniposide
1		
2		
3		
MEAN ±SD	_____ ± _____	_____ ± _____

加味逍遙散濃縮製劑指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)與梔子苷(Geniposide)之含量測定方法。

每一盲樣依下列條件三重複測定之：

1. 檢品溶液：

   取本品粉末約 0.5g，精確稱定；加入 35 mL 之 70%甲醇，於超音波震盪器中震盪 30 分鐘，過濾；濾液加 70%甲醇定容至 50.0 mL，混勻後以 0.45 μm 濾膜過濾，供作檢品溶液。

2. 對照標準品溶液：

   精確稱取 Paeoniflorin 與 Geniposide 對照標準品約 3.0 mg 與 4.0 mg，以 70%甲醇溶解後定容至 10.0 mL，混勻；從中精確吸取 1.0 mL，移入 10 mL 之容量瓶，加入 70%甲醇定容至刻度，混合均勻，作為對照標準品溶液。(濃度約為 Paeoniflorin 30 μg/mL、Geniposide 40 μg/mL)

3. 測定法：

   精確吸取對照標準品溶液與檢品溶液各 20 μL，注入液相層析裝置進行分析，依以下層析條件進行操作。對照標準品溶液重複注入六次，檢品溶液重複注入三次。

   檢測器：紫外光吸收波長為 245 nm

   層析管柱：十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑(粒徑 5 μm)之管柱，管柱內徑 4~6 mm 及長度 15~25 cm。

   管柱溫度：保持在 40℃附近之恆溫

   移動相：以 0.03%磷酸水為移動相 A，以 0.03%磷酸-乙腈為移動相 B；沖提流速為每分鐘 1.0 mL，按下表中規定進行梯度沖提。必要時可配合調整比例。

Time(min)	移動相 A%	移動相 B%
0 ~ 15	90 → 88	10 → 12
15 ~ 20	88	12
20 ~ 50	88 → 58	12 → 42
50 ~ 55	58 → 53	42 → 47
55 ~ 65	53 → 40	47 → 60
65 ~ 70	40 → 0	60 → 100
70 ~ 75	0	100
75 ~ 85	0 → 90	100 → 10
85 ~ 90	90	10

$$\text{Geniposide (mg/g)} = \frac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T}$$

A_T：檢品溶液之 Geniposide 訊號峰的面積

A_S：標準品溶液之 Geniposide 訊號峰的面積

Ms：Geniposide 標準品溶液之濃度(μg/mL)

W_T：檢品量(g) 以乾品計之

$$\text{Paeoniflorin (mg/g)} = \frac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T}$$

A_T：檢品溶液之 Paeoniflorin 訊號峰的面積

A_S：標準品溶液之 Paeoniflorin 訊號峰的面積

Ms：Paeoniflorin 標準品溶液之濃度(μg/mL)

W_T：檢品量(g)以乾品計之

系統適合性—

系統性能：取標準品溶液 20 μL，注入層析裝置分析；得到的 Geniposide 與 Paeoniflorin 各訊號峰的理論板數不得少於 5000，及其不對稱因子(Asymmetry Factor)不得超過 1.5。

系統重複性：取標準品溶液 20 μL，重複六次注入層析裝置分析，得到的 Geniposide 與 Paeoniflorin 各訊號峰面積的相對標準偏差(RSD)不得超過 1.5%。

品質管制—

當連續層析超過 12 小時，每 12 小時及分析結束前需再注入一次對照標準品溶液，以確認其對應面積，與先前試驗得到的面積相對誤差值沒有超出± 5%。若超出± 5%時，應捨棄不符合的分析樣品，重新配製樣品及分析。

附件五

1. 加味逍遙散複方製劑之 TLC 成分鑑別，依據現行衛生福利部食品藥物管理署(TFDA)規範之指定藥材作為訂定標準。以當歸、白芍、白朮、柴胡、牡丹皮、山梔子、炙甘草、煨薑及薄荷等藥材當作成分鑑別之項目；以上藥材以表格中之藥材或標準品當作對照藥材或對照標準品。

加味逍遙散複方製劑建議之 TLC 成分鑑別項目：

藥材	對照藥材或對照標準品	鑑別
當歸	當歸	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取當歸對照藥材1.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照藥材溶液各5 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(80：20)混液為展開溶媒，層析之。 俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm 時，取出層析板風乾後，於主波長365 nm之紫外燈照射下檢視之，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現主斑點之色調及R*f*值均一致。
白芍	Paeoniflorin	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。另取芍藥苷(Paeoniflorin)對照標準品1.0 mg，溶於甲醇1 mL，作為對照標準品溶液。取檢品溶液及對照標準品溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正丁醇：醋酸：水(70：10：20)為展開溶媒，層析之，俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm 時，取出層析板風乾後，以茴香醛/硫酸試液(*p*-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS)噴霧，105℃加熱三分鐘後，於可見光下檢視之。 檢品溶液及對照標準品溶液所呈現斑點之R*f* 值及色調均一致。

藥材	對照藥材或對照標準品	鑑別
白朮	白朮	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取白朮對照藥材1.0g，同法製成對照藥材溶液。 取檢品溶液及對照藥材溶液各5 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(80：20)為展開溶媒，層析之，俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm 時，取出層析板風乾後，以對-二甲胺基苯甲醛試液(*p*-Dimethylaminobenzaldehyde TS)噴霧，105℃加熱二分鐘後，於可見光下檢視之，檢品溶液及對照藥材溶液所呈現斑點之R*f* 值及色調均一致。
柴胡	柴胡	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。 取柴胡對照藥材2.0 g，同法製成對照藥材溶液。 取檢品溶液及對照標準品溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以三氯甲烷：甲醇：水(30：10：1)為展開溶媒，層析之。 俟溶媒頂端上升至距原點約5~10 cm 時，取出層析板風乾後，以2%對二甲氨基苯甲醛的40%硫酸試液噴霧，在105℃加熱至斑點顯色清晰，於可見光照射下檢視，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現斑點之R*f* 值及色調均一致。
牡丹皮	Peonol	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。 另取牡丹酚(Paeonol)對照標準品，加甲醇製成每1 mL含1 mg的溶液，作為對照標準品溶液。 取檢品溶液及對照標準品溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(4：1)為展開溶媒，層析之。

藥材	對照藥材或對照標準品	鑑別
		俟溶媒頂端上升至距原點約5~10 cm時，取出層析板風乾後，於主波長254 nm 之紫外燈照射檢視之。檢品溶液及對照標準品溶液所呈現斑點之R*f* 值及色調均一致。
山梔子	Geniposide	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。 另取梔子苷(Geniposide)對照標準品1.0 mg，加甲醇1mL 溶解，作為對照標準品溶液。 取檢品溶液與對照標準品溶液各5 μL，按薄層層析法（通則1010.3），點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以乙酸乙酯：甲醇：氨水(6：3：2)混液為展開溶媒，層析之。 俟溶媒頂端上升至距原點約5~10 cm時，取出層析板風乾後，以茴香醛/硫酸試液(*p*-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS)噴霧，105℃加熱五分鐘後，於可見光下檢視之，檢品溶液對照標準品溶液所呈現暗紫色色點之色調及R*f* 值均一致。
炙甘草	炙甘草	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。 取炙甘草對照藥材2.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照標準品溶液各5μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以三氯甲烷：甲醇：水(15：7：2)下層液為展開溶媒，層析之。俟溶媒頂端上升至距原點約5~10 cm時，取出層析板風乾後，以20 %硫酸(H_2SO_4)噴霧，105℃加熱五分鐘後，於可見光下檢視之，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現橘色色點之色調及R*f* 值均一致。
烺薑	烺薑	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。另取烺薑對照藥材2.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照藥材溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分

藥材	對照藥材或對照標準品	鑑別
		別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以三氯甲烷：丙酮(19：1)為展開溶媒，層析之。俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm 時，取出層析板風乾後，以茴香醛/硫酸試液(*p*-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS)噴霧，105℃加熱三分鐘後，於可見光下檢視之，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現斑點之色調與R*f*值均一致。
薄荷	薄荷	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取薄荷對照藥材2.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照藥材溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(4：1)為展開溶媒，層析之。俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm 時，取出層析板風乾後，以茴香醛/硫酸試液(*p*-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS)噴霧，於105℃加熱三分鐘，於可見光下檢視之，檢品溶液所呈現斑點與對照藥材溶液呈現斑點之色調及R*f* 值均一致。

2. 乾燥減重與總灰分規格的訂定，建議參考日本藥局方第 16 改正加味逍遙散エキス。乾燥減重為 9.0%以下，而總灰分為 10.0%以下；檢驗方法則建議依據台灣中藥典第二版之通則(5008)、通則(5004)。
3. 總重金屬及個別重金屬限量建議參考台灣中藥濃縮製劑現行法規之公告，總重金屬檢驗方法則建議依據台灣中藥典第二版通則(3005)，而個別重金屬檢驗方法則建議依據台灣中藥典第二版通則(3049)。
4. 指標成分含量之規範，待「案由一」盲樣測試完成後再做訂定。

較為緩慢。

在眼部組織能忍受之抗菌劑濃度情況下，上述諸種抗菌劑對若干種系之綠膿桿菌（*Pseudomonas Aeruginosa*）仍屬無效。綠膿桿菌能侵入受傷之角膜，造成角膜潰瘍及盲瞎等嚴重傷害。

眼用溶液如係供眼外科手術應用者，應不含抗菌劑，以免組織遭受刺激。

稠化劑——眼用溶液可含有適當之稠化劑，如藥典級之甲基纖維素（黏度為 25 厘泊時加 1%，4000 厘泊時加 0.25%）以增加其稠度，使藥品能與眼部組織有較長時間之接觸。其他如羥丙基甲基纖維素或聚乙烯醇等亦可使用，但此等加稠化劑之眼用溶液應保持適當之澄明度，切不可含有可覺察之質粒。

三、眼用懸液——眼用懸液為含均勻擴散之固體粒子於液體溶媒之液態滅菌製劑，其固體粒子均經微粒子化，以防止對眼球之刺激或磨擦，如發生結塊或凝結，即不可再供使用。

四、眼用條劑——螢紅鈉溶液須為滅菌，一次使用容器製品或為滅菌之浸藥紙條。此等條劑於接觸眼部時，可釋出適當量之藥品以供診斷異物或擦傷。此等條劑亦可以滅菌水或滅菌氯化鈉溶液洗出用於眼部，以避免條劑與眼部接觸。

（4027）滅菌法

滅菌法係指將藥物中之微生物或微生物芽胞，用一種適當方法消滅或除去而言，由於藥品與微生物等之性質不同，採用之滅菌法亦各異，通常所用之方法如下：

滅菌法 I——高壓蒸氣滅菌法

將溶液或製劑，置適當容器中封閉後，於高壓蒸氣滅菌器內加熱滅菌，以飽和蒸汽使溶液或製劑於 115～116° 受熱三十分鐘，亦可用其他

適當之溫度及加熱時限，如在 121° 受熱二十分鐘，或於 126° 受熱十五分鐘可得相同之滅菌效果，將溶液或製劑加熱至滅菌溫度所需之時間，與容器之大小、性質，及容器在滅菌器內之放置方式，與滅菌器之型態等均有密切關係。

注射劑如按照本法滅菌，其所需之溫度與加熱時間除另有規定外均按照本法操作。

滅菌法 II——過濾滅菌法

將溶液以適當之濾菌器過濾，並在無菌狀態下置於已滅菌之容器內封閉之。應用本法滅菌之溶液應符合滅菌檢查法之規定。此等溶液可含有適當之抑菌劑，以抑制微生物之生長。

經由本法滅菌且以無菌操作封入無菌容器內之溶液或製劑，應符合無菌試驗法之規定（通則 7001）。

滅菌法 III——油液或油質懸液滅菌法

將藥品用油或油酸乙酯製成溶液或懸液，置容器中封閉後（或暫行封閉）加熱滅菌，容器之內容物不超過 30mL 時，則在 150° 加熱一小時，如超過 30mL 則加熱時間須予延長，以使每一容器全部內容物之溫度保持 150° 達一小時為度。如係暫行封蓋之容器，則加熱後須封閉之。如溶液或懸液在 150° 加熱時發生變質者，可將油或油酸乙酯在 150° 先行加熱一小時，再在無菌狀態下製成溶液或懸液，置於已滅菌之容器內封閉之。

滅菌法 IV——容器之滅菌

容器須先經洗淨除去油脂，再以下列方法之一予以滅菌：

(1)加熱滅菌，使各容器保持於 160° 以上至少經一小時。

(2)以飽和蒸汽作高壓蒸汽滅菌，使容器於 115～116° 受熱三十分鐘以上，亦可用其他適當之溫度與加熱時限滅菌。

(3)以環氧乙烯滅菌。

(4)以其他適當之方法滅菌。

實施環氧乙烯滅菌法須由曾受專門訓練之人員操作。以塑膠或橡膠製成之容器及瓶塞，可以環氧乙烯予以滅菌；滅菌時須以不與環氧乙烯或藥品發生化學反應之氣體稀釋之，並予以適當之控制。滅菌時宜將 Bacillus subtilis Var.niger 之芽胞置於乾燥鋁箔上使受環氧乙烯之作用，以作參考。滅菌之效率與①滅菌器內環氧乙烯之濃度，②滅菌器內之溫度，③滅菌時限，④微生物帶水之多寡均有密切關係，故對於上述諸因素須作適當選定，始能獲得最有效之滅菌。沾附在任何器物表之微生物能直接與環氧乙烯接觸，則此等器物可因而滅菌；若此等器物之表面沾附固體物係因人畜體液或營養用肉汁或其他液質之乾涸而形成，則微生物可能包含其中，而不能直接受環氧乙烯之作用。是以除非另有妥善措施，否則不能完全滅菌。橡膠、塑膠及其他若干物質可吸收環氧乙烯，是以滅菌後，應俟環氧乙烯完全逸散後始可供用。環氧乙烯不但有毒，且在空氣中有強烈爆炸性，操作時應特別加以注意。

（4028）顆粒劑

顆粒劑為固體製劑之一種，係由藥品與適當之稀釋劑、黏合劑、崩散劑、潤滑劑、法定著色劑、芳香劑及甘味劑等調製而成，其處方及製造方法可參照錠劑（通則 4024）項下所述原則。顆粒劑之品質除應符合鑑別及含量測定項下規定外，並應符合粉末粗細度（通則 1015）、溶離度試驗法（通則 3015）及崩散度試驗法（通則 3014）等有關規定，其容許範圍或時間限制之規定，則列於各該品目正文規格中。

其為供配製口服液劑、懸液，而標誌容量不超過 250mL，且記明其所添加溶劑種類及用量以供調配投用者，並應符合可投藥容量測定法（通則 3038）之規定。

1-1-2. Chewable Tablets

(1) Chewable Tablets are tablets which are administered by chewing.

(2) Chewable Tablets must be in shape and size avoiding danger of suffocation.

1-1-3. Effervescent Tablets

(1) Effervescent Tablets are tablets which are quickly dissolved or dispersed with bubbles in water.

(2) Effervescent tablets are usually prepared using suitable acidic substances and carbonates or hydrogen carbonates.

1-1-4. Dispersible Tablets

(1) Dispersible Tablets are tablets which are administered after having been dispersed in water.

1-1-5. Soluble Tablets

(1) Soluble Tablets are tablets which are administered after having been dissolved in water.

1-2. Capsules

(1) Capsules are preparations enclosed in capsules or wrapped with capsule bases, intended for oral administration. Capsules are classified into Hard Capsules and Soft Capsules.

(2) Capsules are usually prepared by the following methods. Enteric-coated or extended-release capsules can be prepared by a suitable method. Coloring agents, preservatives, etc. may be added to the capsule bases.

(i) Hard Capsules: A homogeneous mixture of active substance(s) with diluents and other suitable excipients, or granules or formed masses prepared by a suitable method, are filled into capsule shells as they are or after slight compression.

(ii) Soft Capsules: Active substance(s) and suitable excipients (including solvents) are mixed, enclosed by a suitable capsule base such as gelatin plasticized by addition of glycerin, D-sorbitol, etc. and molded in a suitable shape and size.

(3) Unless otherwise specified, Capsules meet the requirements of Uniformity of Dosage Units <*6.02*>.

(4) Unless otherwise specified, Capsules meet the requirements of Dissolution Test <*6.10*> or Disintegration Test <*6.09*>.

(5) Well-closed containers are usually used for Capsules. For Capsules susceptible to degradation by moisture, a moisture-proof container or packaging may be used.

1-3. Granules

(1) Granules are preparations prepared by granulation, intended for oral administration. Effervescent Granules are included in this category.

(2) Granules are usually prepared by the following methods. Granules can be coated using suitable coating agents if necessary. Extended-release or enteric-coated granules can also be prepared by a suitable method.

(i) To powdery active substance(s) add diluents, binders, disintegrators, or other suitable excipients, mix to homogenize, and granulate by a suitable method.

(ii) To previously granulated active substance(s) add excipients such as diluents, and mix to homogenize.

(iii) To previously granulated active substance(s) add excipients such as diluents, and granulate by a suitable method.

(3) Among Granules, the preparations may be referred to as "Fine Granules" if, when Particle Size Distribution Test for Preparations <*6.03*> is performed, all granules pass through a No. 18 (850 μm) sieve, and not more than 10% of which remain on a No. 30 (500 μm) sieve.

(4) Unless otherwise specified, the Granules in single-dose packages meet the requirements of Uniformity of Dosage Units <*6.02*>.

(5) Unless otherwise specified, Granules comply with Dissolution Test <*6.10*> or Disintegration Test <*6.09*>. However, this provision is not to be applied to Effervescent granules, which are dissolved before use, and Disintegration Test <*6.09*> is not required for the Granules not more than 10% of which remain on a No. 30 (500 μm) sieve when the test is performed as directed under Particle Size Distribution Test for Preparations <*6.03*>.

(6) Among Granules, the particulate preparations may be referred to as "Powders" if, when the Particle Size Distribution Test for Preparations <*6.03*> is performed, all granules pass through a No. 18 (850 μm) sieve, and not more than 5% remain on a No. 30 (500 μm) sieve.

(7) Well-closed containers are usually used for Granules. For the preparations susceptible to degradation by moisture, a moisture-proof container or packaging may be used.

1-3-1. Effervescent Granules

(1) Effervescent granules are granules which are quickly dissolved or dispersed with bubbles in water.

(2) Effervescent granules are usually prepared using suitable acidic substances and carbonates or hydrogen carbonates.

1-4. Powders

(1) Powders are preparations in powder form, intended for oral administration.

(2) Powders are usually prepared by homogene-

三、硬胶囊可根据下列制剂技术制备不同形式内容物充填于空心胶囊中。

(1)将原料药物加适宜的辅料如稀释剂、助流剂、崩解剂等制成均匀的粉末、颗粒或小片。

(2)将普通小丸、速释小丸、缓释小丸、控释小丸或肠溶小丸单独填充或混合填充，必要时加入适量空白小丸作填充剂。

(3)将原料药物粉末直接填充。

(4)将原料药物制成包合物、固体分散体、微囊或微球。

(5)溶液、混悬液、乳状液等也可采用特制灌囊机填充于空心胶囊中，必要时密封。

四、胶囊剂应整洁，不得有黏结、变形、渗漏或囊壳破裂等现象，并应无异臭。

五、胶囊剂的微生物限度应符合要求。

六、根据原料药物和制剂的特性，除来源于动、植物多组分且难以建立测定方法的胶囊剂外，溶出度、释放度、含量均匀度等应符合要求。必要时，内容物包衣的胶囊剂应检查残留溶剂。

七、除另有规定外，胶囊剂应密封贮存，其存放环境温度不高于 30℃，湿度应适宜，防止受潮、发霉、变质。生物制品原液、半成品和成品的生产及质量控制应符合相关品种要求。

除另有规定外，胶囊剂应进行以下相应检查。

【水分】中药硬胶囊剂应进行水分检查。

取供试品内容物，照水分测定法(通则 0832)测定。除另有规定外，不得过 9.0%。

硬胶囊内容物为液体或半固体者不检查水分。

【装量差异】照下述方法检查，应符合规定。

检查法　除另有规定外，取供试品 20 粒(中药取 10 粒)，分别精密称定重量，倾出内容物(不得损失囊壳)，硬胶囊囊壳用小刷或其他适宜的用具拭净；软胶囊或内容物为半固体或液体的硬胶囊囊壳用乙醚等易挥发性溶剂洗净，置通风处使溶剂挥尽，再分别精密称定囊壳重量，求出每粒内容物的装量与平均装量。每粒装量与平均装量相比较(有标示装量的胶囊剂，每粒装量应与标示装量比较)，超出装量差异限度的不得多于 2 粒，并不得有 1 粒超出限度 1 倍。

平均装量或标示装量	装量差异限度
0.30g 以下	±10%
0.30g 及 0.30g 以上	±7.5%(中药±10%)

凡规定检查含量均匀度的胶囊剂，一般不再进行装量差异的检查。

【崩解时限】除另有规定外，照崩解时限检查法(通则 0921)检查，均应符合规定。

凡规定检查溶出度或释放度的胶囊剂，一般不再进行崩解时限的检查。

【微生物限度】以动物、植物、矿物质来源的非单体成分制成的胶囊剂，生物制品胶囊剂，照非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法(通则 1105)和控制菌检查(通则 1106)及非无菌药品微生物限度标准(通则 1107)检查，应符合规定。规定检查杂菌的生物制品胶囊剂，可不进行微生物限度检查。

0104　颗粒剂

颗粒剂系指原料药物与适宜的辅料混合制成具有一定粒度的干燥颗粒状制剂。

颗粒剂可分为可溶颗粒(通称为颗粒)、混悬颗粒、泡腾颗粒、肠溶颗粒、缓释颗粒和控释颗粒等。

混悬颗粒　系指难溶性原料药物与适宜辅料混合制成的颗粒剂。临用前加水或其他适宜的液体振摇即可分散成混悬液。除另有规定外，混悬颗粒剂应进行溶出度(通则 0931)检查。

泡腾颗粒　系指含有碳酸氢钠和有机酸，遇水可放出大量气体而呈泡腾状的颗粒剂。

泡腾颗粒中的原料药物应是易溶性的，加水产生气泡后应能溶解。有机酸一般用枸橼酸、酒石酸等。

肠溶颗粒　系指采用肠溶材料包裹颗粒或其他适宜方法制成的颗粒剂。肠溶颗粒耐胃酸而在肠液中释放活性成分或控制药物在肠道内定位释放，可防止药物在胃内分解失效，避免对胃的刺激。肠溶颗粒应进行释放度(通则 0931)检查。

缓释颗粒　系指在规定的释放介质中缓慢地非恒速释放药物的颗粒剂。

缓释颗粒应符合缓释制剂的有关要求(通则 9013)，并应进行释放度(通则 0931)检查。

控释颗粒　系指在规定的释放介质中缓慢地恒速释放药物的颗粒剂。

控释颗粒应符合控释制剂的有关要求(通则 9013)，并应进行释放度(通则 0931)检查。

颗粒剂在生产与贮藏期间应符合下列规定。

一、原料药物与辅料应均匀混合。含药量小或含毒、剧药的颗粒剂，应根据原料药物的性质采用适宜方法使其分散均匀。

除另有规定外，中药饮片应按各品种项下规定的方法进行提取、纯化、浓缩成规定的清膏，采用适宜的方法干燥并制成细粉，加适量辅料(不超过干膏量的 2 倍)或饮片细粉，混匀并制成颗粒；也可将清膏加适量辅料(不超过清膏量的 5 倍)或饮片细粉，混匀并制成颗粒。

二、凡属挥发性原料药物或遇热不稳定的药物在制备过程应注意控制适宜的温度条件，凡遇光不稳定的原料药物应遮光操作。

三、除另有规定外，挥发油应均匀喷入干燥颗粒中，密闭至规定时间或用包合等技术处理后加入。

四、根据需要颗粒剂可加入适宜的辅料，如稀释剂、黏合剂、分散剂、着色剂和矫味剂等。

五、为了防潮、掩盖原料药物的不良气味等需要，也可对颗粒进行包薄膜衣。必要时，包衣颗粒应检查残留溶剂。

六、颗粒剂应干燥，颗粒均匀，色泽一致，无吸潮、软化、结块、潮解等现象。

七、颗粒剂的微生物限度应符合要求。

八、根据原料药物和制剂的特性，除来源于动、植物多组分且难以建立测定方法的颗粒剂外，溶出度、释放度、含量均匀度等应符合要求。

九、除另有规定外，颗粒剂应密封，置干燥处贮存，防止受潮。生物制品原液、半成品和成品的生产及质量控制应符合相关品种要求。

除另有规定外，颗粒剂应进行以下相应检查。

【粒度】除另有规定外，照粒度和粒度分布测定法(通则 0982 第二法双筛分法)测定，不能通过一号筛与能通过五号筛的总和不得超过 15%。

【水分】中药颗粒剂照水分测定法(通则 0832)测定，除另有规定外，水分不得超过 8.0%。

【干燥失重】除另有规定外，化学药品和生物制品颗粒剂照干燥失重测定法(通则 0831)测定，于 105℃干燥(含糖颗粒应在 80℃减压干燥)至恒重，减失重量不得超过 2.0%。

【溶化性】除另有规定外，颗粒剂照下述方法检查，溶化性应符合规定。

可溶颗粒检查法 取供试品 10g(中药单剂量包装取 1 袋)，加热水 200ml，搅拌 5 分钟，立即观察，可溶颗粒应全部溶化或轻微浑浊。

泡腾颗粒检查法 取供试品 3 袋，将内容物分别转移至盛有 200ml 水的烧杯中，水温为 15～25℃，应迅速产生气体而呈泡腾状，5 分钟内颗粒均应完全分散或溶解在水中。

颗粒剂按上述方法检查，均不得有异物，中药颗粒还不得有焦屑。

混悬颗粒以及已规定检查溶出度或释放度的颗粒剂可不进行溶化性检查。

【装量差异】单剂量包装的颗粒剂按下述方法检查，应符合规定。

检查法 取供试品 10 袋(瓶)，除去包装，分别精密称定每袋(瓶)内容物的重量，求出每袋(瓶)内容物的装量与平均装量。每袋(瓶)装量与平均装量相比较[凡无含量测定的颗粒剂或有标示装量的颗粒剂，每袋(瓶)装量应与标示装量比较]，超出装量差异限度的颗粒剂不得多于 2 袋(瓶)，并不得有 1 袋(瓶)超出装量差异限度 1 倍。

平均装量或标示装量	装量差异限度
1.0g 及 1.0g 以下	±10%
1.0g 以上至 1.5g	±8%
1.5g 以上至 6.0g	±7%
6.0g 以上	±5%

凡规定检查含量均匀度的颗粒剂，一般不再进行装量差异检查。

【装量】多剂量包装的颗粒剂，照最低装量检查法(通则 0942)检查，应符合规定。

【微生物限度】以动物、植物、矿物质来源的非单体成分制成的颗粒剂，生物制品颗粒剂，照非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法(通则 1105)和控制菌检查法(通则 1106)及非无菌药品微生物限度标准(通则 1107)检查，应符合规定。规定检查杂菌的生物制品颗粒剂，可不进行微生物限度检查。

0105 眼用制剂

眼用制剂系指直接用于眼部发挥治疗作用的无菌制剂。

眼用制剂可分为眼用液体制剂(滴眼剂、洗眼剂、眼内注射溶液等)、眼用半固体制剂(眼膏剂、眼用乳膏剂、眼用凝胶剂等)、眼用固体制剂(眼膜剂、眼丸剂、眼内插入剂等)。眼用液体制剂也可以固态形式包装，另备溶剂，在临用前配成溶液或混悬液。

滴眼剂 系指由原料药物与适宜辅料制成的供滴入眼内的无菌液体制剂。可分为溶液、混悬液或乳状液。

洗眼剂 系指由原料药物制成的无菌澄明水溶液，供冲洗眼部异物或分泌液、中和外来化学物质的眼用液体制剂。

眼内注射溶液 系指由原料药物与适宜辅料制成的无菌液体，供眼周围组织(包括球结膜下、筋膜下及球后)或眼内注射(包括前房注射、前房冲洗、玻璃体内注射、玻璃体内灌注等)的无菌眼用液体制剂。

眼膏剂 系指由原料药物与适宜基质均匀混合，制成溶液型或混悬型膏状的无菌眼用半固体制剂。

眼用乳膏剂 系指由原料药物与适宜基质均匀混合，制成乳膏状的无菌眼用半固体制剂。

眼用凝胶剂 系指原料药物与适宜辅料制成的凝胶状无菌眼用半固体制剂。

眼膜剂 系指原料药物与高分子聚合物制成的无菌药膜，可置于结膜囊内缓慢释放药物的眼用固体制剂。

眼丸剂 系指原料药物与适宜辅料制成的球形、类球形的无菌眼用固体制剂。

眼内插入剂 系指原料药物与适宜辅料制成的适当大小和形状、供插入结膜囊内缓慢释放药物的无菌眼用固体制剂。

眼用制剂在生产和贮藏期间应符合下列规定。

一、滴眼剂中可加入调节渗透压、pH 值、黏度以及增加原料药物溶解度和制剂稳定的辅料，所用辅料不应降低药效或产生局部刺激。

二、除另有规定外，滴眼剂应与泪液等渗。混悬型滴眼剂的沉降物不应结块或聚集，经振摇应易再分散，并应检查沉降体积比。除另有规定外，每个容器的装量应不超

附件七、中藥複方濃縮製劑-製劑通則(草案)

中藥複方濃縮製劑係供內服之一種固體製劑，通常係由中藥材經煎煮或萃取、濃縮、乾燥，加工調製成各種劑型之製劑。依照藥材組成可分為單方製劑及複方製劑；依照劑型可分為濃縮散劑、濃縮顆粒劑、濃縮丸劑、濃縮錠劑、濃縮膜衣錠劑、濃縮膠囊劑等。

濃縮製劑以合併煎煮為原則。但原方為傳統丸、散者，得分別煎煮；阿膠、飴糖及其他不宜加入煎煮之中藥，不得合併煎煮。

煎煮所抽出之浸膏，除得以中華藥典收載之乳糖、澱粉等作為賦形劑外、或以不影響藥效之輔料等作為製劑補助劑。如原方依據為傳統丸、非煮散之傳統散、或其他特殊情形經中央衛生主管機關核准者，得以中藥原末調製之。

衛生福利部臺灣中藥典第二版增補版

「中藥製劑」分小組第三次會議紀錄

時間：中華民國 105 年 02 月 23 日(二)上午 10 時 00 分

地點：衛生福利部 2 樓 206 會議室(台北市南港區忠孝東路 6 段 488 號)

主席：黃司長怡超/謝召集人明村

壹、 主席致詞：(略)

貳、 確認第一次(104 年 11 月 30 日)及第二次（104 年 12 月 14 日）會議

一、 會議紀錄及追蹤辦理情形

第一次(104 年 11 月 30 日)

案由	決議	追蹤辦理情形
一、研議藥典新增收載中藥製劑品項中藥濃縮製劑(複方、單味)、中藥傳統製劑(丸、散、膏、丹)各收載多少品項。	1. 先收載中藥濃縮製劑以複方為主，單方選常用者列入考量。 2. 中藥複方濃縮製劑收載品項以中醫藥司公告「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法規格注意事項」中藥複方濃縮製劑 20 方品項及增訂版草案中藥複方濃縮製劑 13 方品項等，納入臺灣中藥典收載優先考量。 3. 請副教授提供執行複方中藥濃縮製劑 20 方品項及委員提供中藥單方濃縮製劑品項，納入臺灣中藥典收載考量。 4. 中藥傳統製劑暫不討論。	先收載中藥濃縮製劑以複方為主，單方選常用者列入考量。
二、研議藥典新增收載中藥製劑內容及撰寫格式提出相關規劃建議。	1. 參考各國藥典格式內容及撰寫順序比較，請委員彙整資料後提出規劃建議，供第二次會議討論。 2. 有關「含量測定」，協請檢驗規格分小組編修。 3. 有關「效能」、「適應症」、「用途分類」，協請中醫臨床分小組編修。	已完成加味逍遙散濃縮製劑之藥典格式，提第三次會議討論。

案由	決議	追蹤辦理情形
三、研議藥典新增收載中藥製劑之檢驗方法、成分含量標準及異常物質限量之訂定方法。	請委員彙整資料後提出規劃建議，供第二次會議討論。	已完成加味逍遙散濃縮製劑之鑑別方法及結果，提第三次會議討論。
四、研議完成加味逍遙散濃縮製劑之指標成分含量測定。	請顧問彙整資料後提出規劃建議，供第二次會議討論。	已完成加味逍遙散濃縮製劑之指標成分含量測定方法及結果，提第三次會議討論。
五、研議藥典是否收載已核發藥證之中藥新藥製劑。	參酌大多數委員意見，暫不納入臺灣中藥典。	已核發藥證之中藥新藥製劑暫不納入臺灣中藥典。

第二次（104 年 12 月 14 日）

案由	決議	追蹤辦理情形
一、中藥製劑購買之市售品代表性及樣品之盲樣測試檢驗數目。	1. 計畫主持人向中藥店隨機購買中藥複方濃縮製劑，優先以濃縮顆粒為主，其次為濃縮細粒、濃縮散。 2. 購買後拆封→混合均勻→以新瓶分裝→重新編號，剩餘 100 公克由計畫主持人封口留樣。 3. 購買 10 家中藥複方濃縮製劑樣品寄給 5 家檢驗實驗室。	已按第二次委員會議決議寄給 5 家檢驗實驗室。
二、受委託之中藥濃縮製劑檢驗實驗室可信度。	計畫主持人依 TAF 及 ISO17025 規範認證認可之檢驗實驗室選擇 5 家。	計畫主持人依 TAF 及 ISO17025 規範認證找到 5 家檢驗實驗室。

案由	決議	追蹤辦理情形
三、加味逍遙散複方製劑指標成分芍藥苷(paeoniflorin)及梔子苷(geniposide) HPLC 含量測定方法，提請討論。	1. 請委員提供加味逍遙散濃縮製劑的樣品前處理、含量測定[芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide)]實驗方法，給協同主持人及5間分析實驗室負責人討論實驗步驟之可行性，彙整後送回計畫主持人，再請幹事以標準品進行分析後，確認實驗結果可以符合方法中的要求，最後由衛福部中醫藥司同意執行。 2. 標準品芍藥苷（paeoniflorin）購自食管署、梔子苷（geniposide）購自Chromadex公司，純度均98%以上。 3. 指標成分規範一日量之指標成分含量，以乾品計算。 4. 標準湯劑請各家檢驗實驗室使用各自之藥材製備分析，計畫主持人統計五家資料後，再訂出含量最低限值。 5. 105 年 1 月底前將檢驗結果數據、HPLC 圖譜及層析圖寄給計畫主持人。	1. 含量測定方法已經衛福部中醫藥司認可同意執行。 2. 標準品、管柱已購買並寄給 5 家檢驗實驗室。 3. HPLC 等實驗數據已完成，提第三次會議討論。
四、中藥濃縮製劑之「製劑通則」如何訂定。	「中藥複方濃縮製劑-製劑通則」(草案)，如附件七，P.18。 經會議討論後呈報中醫藥司。	中藥複方濃縮製劑-製劑通則(草案)提第三次會議討論。
五、加味逍遙散複方製劑檢驗方法：含量測定、鑑別、一般檢查及其他(乾燥減重、總灰分……)如何訂定。	1. 因現有中藥複方濃縮製劑所添加之賦形劑標準不同，所以水抽提物及稀醇抽提物含量不列入規範。 2. 鑑別依規定進行中藥濃縮製劑內容藥材二分之一以上成分之TLC，但加味逍遙散濃縮製劑組成藥材中有九味藥材必須進行TLC鑑定。 3. 請委員提出加味逍遙散濃縮製劑之	1. TLC 鑑別已完成，提第三次委員會議討論。 2. 異常物質檢查提第三次委員會議討論。

案由	決議	追蹤辦理情形
	鑑別方法。 4. 中藥複方濃縮製劑微生物限量暫不訂定。 5. 異常物質檢查參考單味藥材標準訂定製劑之檢查標準。	

參、 討論事項：

提案一：有關中藥製劑通則草案，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第二次會議結論提出討論。

二、中藥複方濃縮製劑-製劑通則(草案)，已由協同主持人草擬完成，如附件一，P.8，提請討論。

決　議：

1. 將製劑通則修改為「中藥濃縮製劑-製劑通則」(草案)，其內容修改如附件一，P.8。
2. 請委員提供修正版本，修正後草案請委員於 105 年 3 月 2 日前以電子郵件方式寄回中國醫藥大學彭文煌實驗室。
3. 彙整委員意見後，提第四次委員會議討論。

提案二:有關市售加味逍遙散濃縮製劑含量測定方法及結果,提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第二次會議結論提出討論。

二、加味逍遙散濃縮製劑的樣品前處理、含量測定[芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide)]，如附件二，P.9-10。

三、含量測定結果如附件三，P.11-12。

決　議：

1. 標準湯劑指標成分之含量測定，加入國家中醫藥研究所測定之數據，合併已完成之三組數據作統計。
2. 市售加味逍遙散濃縮製劑指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide)含量測定結果換算成每日量含量

(mg/day)，如附件三，P.11-12。

3. 提第四次委員會議討論。

提案三：有關加味逍遙散濃縮製劑 TLC 鑑別方法及結果，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第二次會議結論提出討論。

二、依據衛署藥字 636660 號公告，中藥濃縮製劑 TLC 鑑別藥材數目應達處方中藥材數目二分之一以上成分之 TLC。

三、但加味逍遙散濃縮製劑組成藥材中有九味藥材為必須進行 TLC 鑑定。

四、加味逍遙散濃縮製劑 TLC 鑑別方法已由實驗室 A 及實驗室 B 提供，如附件四，P.13~17。

五、加味逍遙散濃縮製劑 TLC 鑑別結果已由實驗室 A 及實驗室 B 完成，如附件五，P.18~23。

決　議：

1. 刪除煨薑之 TLC 鑑別方法，因該藥材品質不一。
2. 請委員實驗室與委員實驗室提出 TLC 鑑別方法修正，然後請執行幹事實驗室進行確認。
3. 提第四次委員會議討論。

提案四：有關加味逍遙散濃縮製劑異常物質限量，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：加味逍遙散濃縮製劑異常物質限量已有公告，如附件六，P.24。

決　議：經委員會議討論，同意加味逍遙散濃縮製劑異常物質之限量，依現行公告限量規定。

提案五：有關中藥濃縮製劑收載規格格式及加味逍遙散濃縮製劑藥典收載規格內容，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第一次會議結論，中藥濃縮製劑收載規格格式內容暫定如下，其中「效能」、「適應症」、「用途分

類」待中醫臨床分小組提供建議。

1. 中文名
2. 英文名（漢語拼音）
3. 指標成分
4. 處方（出典）
5. 鑑別
6. 一般檢查及其他
   [1] 乾燥減重
   [2] 總灰分
7. 異常物質檢查
   [1] 總重金屬
   [2] 個別重金屬
8. 含量測定
9. 效能
10. 適應症
11. 用法用量
12. 注意事項

二、另衛生署於八十五年五月四日公告「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」規定之「中藥藥製劑規格及試驗方法必須記載之項目內容表」，如附件七，P.25。

三、依上述規定，加味逍遙散濃縮製劑原則上要記載項目有：性狀、重(容)量、差異試驗(崩散度試驗)、平均重(容)量、鑑別、乾燥減重、重金屬試驗、總灰分、酸不溶性灰分、水抽提物、稀醇抽提物。

決　議：

1. 建議刪除用法用量。
2. 修改後的格式(草案)如下：
   (1) 中文名
   (2) 英文名（漢語拼音）
   (3) 指標成分
   (4) 處方
   (5) 性狀
   (6) 鑑別

(7) 一般檢查及其他

i. 乾燥減重

ii. 總灰分

iii. 酸不溶性灰分

iv. 總重金屬

v. 個別重金屬

(8) 含量測定

i. 水抽提物

ii. 稀醇抽提物

(9) 效能

(10) 適應症

(11) 注意事項

肆、臨時動議：

提案一、加味逍散組或中的白芍中藥材要經由醋炙後具有入肝收斂，疏肝解鬱作用，但本濃縮製劑可以看出來沒有炮製的白芍，可能跟古書記戴有所不同。白芍經由醋炙後所含芍藥苷的成分是降低，本處方中用芍藥苷當指標成分，本人認為比較不可行，改用炮製後比較穩定成分當指標成分較為可行。

決　議：現有市售加味逍遙散濃縮製劑是使用未炮製之白芍。

伍、散　會：十三點三十分

附件一、中藥濃縮製劑-製劑通則(草案)

中藥濃縮製劑係供內服之一種固體製劑，通常係由中藥材經煎煮或萃取、濃縮、乾燥，加工調製成各種劑型之製劑。依照藥材組成可分為單方製劑及複方製劑；依照劑型可分為散劑、顆粒劑、丸劑、錠劑、膜衣錠劑、膠囊劑等。

濃縮製劑以合併煎煮為原則，煎煮所抽出之浸膏，除得以中華藥典收載之乳糖、澱粉等或經中央衛生主管機關核准之適當製劑輔助劑、或不影響藥效之賦形劑等為賦形劑予以調製。萃取濃縮製劑微生物、重金屬、農藥殘留之限量，應依中央衛生主管機關公告之規定。

加味逍遙散濃縮製劑指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)與梔子苷(Geniposide)之含量測定方法。

每一盲樣依下列條件三重複測定之：

1. 檢品溶液：

   取本品粉末約 0.5g，精確稱定；加入 35 mL 之 70％甲醇，於超音波震盪器中震盪 30 分鐘，過濾；濾液加 70%甲醇定容至 50.0 mL，混勻後以 0.45 μm 濾膜過濾，供作檢品溶液。

2. 對照標準品溶液：

   精確稱取 Paeoniflorin 與 Geniposide 對照標準品約 3.0 mg 與 4.0 mg，以 70%甲醇溶解後定容至 10.0 mL，混勻；從中精確吸取 1.0 mL，移入 10 mL 之容量瓶，加入 70%甲醇定容至刻度，混合均勻，作為對照標準品溶液。(濃度約為 Paeoniflorin 30 μg/mL、Geniposide 40 μg/mL)

3. 測定法：

   精確吸取對照標準品溶液與檢品溶液各 20 μL，注入液相層析裝置進行分析，依以下層析條件進行操作。對照標準品溶液重複注入六次，檢品溶液重複注入三次。

   檢測器：紫外光吸收波長為 245 nm

   層析管柱：十八烷基矽烷鍵合矽膠為填充劑(粒徑 5 μm)之管柱，管柱內徑 4~6 mm 及長度 15~25 cm。

   管柱溫度：保持在 40℃附近之恆溫

   移動相：以 0.03% 磷酸水為移動相 A，以 0.03%磷酸-乙腈為移動相 B；沖提流速為每分鐘 1.0 mL，按下表中規定進行梯度沖提。必要時可配合調整比例。

Time(min)	移動相 A%	移動相 B%
0 ~ 15	90 → 88	10 → 12
15 ~ 20	88	12
20 ~ 50	88 → 58	12 → 42
50 ~ 55	58 → 53	42 → 47
55 ~ 65	53 → 40	47 → 60
65 ~ 70	40 → 0	60 → 100
70 ~ 75	0	100
75 ~ 85	0 → 90	100 → 10
85 ~ 90	90	10

$$\text{Geniposide (mg/g)} = \frac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T}$$

A_T：檢品溶液之 Geniposide 訊號峰的面積
A_S：標準品溶液之 Geniposide 訊號峰的面積
Ms：Geniposide 標準品溶液之濃度(μg/mL)
W_T：檢品量(g) 以乾品計之

$$\text{Paeoniflorin (mg/g)} = \frac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T}$$

A_T：檢品溶液之 Paeoniflorin 訊號峰的面積
A_S：標準品溶液之 Paeoniflorin 訊號峰的面積
Ms：Paeoniflorin 標準品溶液之濃度(μg/mL)
W_T：檢品量(g)以乾品計之

系統適合性—

系統性能：取標準品溶液 20 μL，注入層析裝置分析；得到的 Geniposide 與 Paeoniflorin 各訊號峰的理論板數不得少於 5000，及其不對稱因子(Asymmetry Factor)不得超過 1.5。

系統重複性：取標準品溶液 20 μL，重複六次注入層析裝置分析，得到的 Geniposide 與 Paeoniflorin 各訊號峰面積的相對標準偏差(RSD)不得超過 1.5%。

品質管制—

當連續層析超過 12 小時，每 12 小時及分析結束前需再注入一次對照標準品溶液，以確認其對應面積，與先前試驗得到的面積相對誤差值沒有超出± 5%。若超出± 5%時，應捨棄不符合的分析樣品，重新配製樣品及分析。

附件二、加味逍遙散濃縮製劑分析結果

1. 標準湯一批：分析結果以三重覆分析之平均值加減一個標準偏差表示；且每樣分析需執行注射三重複。

(Mean±SD)

指標成份	Paeoniflorin(mg/day)	Geniposide(mg/day)
實驗室一	69.62 ± 0.20	83.06 ± 0.24
實驗室四	77.85 ± 1.40	96.56 ± 1.52
實驗室五	116.1±1.25	76.31±0.86
國家中醫藥研究所	74.65	99.79
Mean ± SD	84.56 ± 18.45	88.93 ± 9.62
平均值± 50%	42.48～126.84	44.47～133.395

〈註〉依規定，指標成分含量不得少於標準湯減 50%。

2. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之乾燥減重測定結果：

表一、乾燥減重測定結果（單位：w/w%）

樣品編號 取樣數	樣品一	樣品二	樣品三	樣品四	樣品五	樣品六	樣品七	樣品八	樣品九	樣品十	
實驗室一	5.00	5.08	4.47	4.35	4.43	5.17	5.22	5.41	5.27	4.64	
實驗室二	4.37	4.47	4.14	4.11	4.04	4.55	4.80	4.88	4.56	4.37	
實驗室三	4.07	4.44	4.08	3.89	3.92	4.72	4.83	5.13	4.71	4.30	
實驗室四	3.41	3.33	3.21	3.42	3.47	4.21	4.4	4.03	3.96	3.62	
實驗室五	4.03	4.51	3.92	3.87	3.91	4.59	4.79	5.02	4.39	4.30	
Mean ±SD	4.18 ±0.52	4.37 ±0.57	3.96 ±0.42	3.93 ±0.31	3.96 ±0.31	4.65 ±0.31	4.81 ±0.26	4.89 ±0.47	4.58 ±0.43	4.24 ±0.34	4.36 ±0.34

3. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之總灰份測定結果：

表二、總灰分分析結果（單位：w/w%）

樣品編號 取樣數	樣品一	樣品二	樣品三	樣品四	樣品五	樣品六	樣品七	樣品八	樣品九	樣品十	
實驗室一	4.18	4.98	4.35	5.16	4.40	2.69	3.72	5.64	2.83	4.69	
實驗室二	4.13	4.90	4.30	5.08	4.32	2.65	3.35	5.42	2.67	4.56	
實驗室三	4.41	5.26	4.55	5.36	4.58	2.86	3.89	5.84	2.95	4.94	
實驗室四	4.17	4.96	4.38	5.1	4.41	2.75	3.3	5.56	2.78	4.69	
實驗室五	4.17	4.92	4.290	5.050	4.350	2.580	3.320	5.550	2.720	4.600	
Mean ±SD	4.21 ±0.10	5.00 ±0.13	4.38 ±0.09	5.15 ±0.11	4.41 ±0.09	2.70 ±0.09	3.52 ±0.24	5.60 ±0.14	2.79 ±0.10	4.70 ±0.13	4.25 ±0.92

4. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)每日量含量測定結果：

表三、芍藥苷(Paeoniflorin)每日量含量測定結果（單位：mg/day）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	39.34	32.05	59.04	88.25	85.64	84.64	86.94	95.19	35.24	47.10	
實驗室二	36.81	29.62	54.77	80.89	77.71	76.38	82.71	88.28	33.43	44.14	
實驗室三	37.10	29.88	53.76	79.45	78.96	75.40	87.92	88.17	31.76	43.88	
實驗室四	44.10	33.30	64.08	97.35	98.16	93.96	102.69	113.58	36.24	50.65	
實驗室五	39.80	32.93	62.22	90.80	96.28	86.40	84.07	97.17	33.08	42.96	
Mean ±SD	39.43 ±2.62	31.55 ±1.53	58.77 ±4.03	87.35 ±6.58	87.35 ±8.52	83.36 ±6.86	88.87 ±7.16	96.48 ±9.28	33.95 ±1.60	45.75 ±2.82	65.29 ±24.58

5. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之指標成分梔子苷(Geniposide)每日量含量測定結果：

表四、梔子苷(Geniposide)每日量含量測定結果（單位：mg/day）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	62.16	36.83	67.29	74.55	82.80	36.00	104.58	53.55	48.04	115.09	
實驗室二	67.85	39.71	72.18	79.81	82.47	39.49	116.36	61.26	53.12	124.41	
實驗室三	63.98	38.75	72.15	79.25	81.80	37.96	111.16	57.99	51.92	118.96	
實驗室四	64.16	38.10	71.82	78.60	85.92	38.16	115.92	58.50	50.88	116.61	
實驗室五	64.89	37.73	68.58	74.65	78.08	34.04	104.09	54.33	47.16	113.44	
Mean ±SD	64.61 ±1.85	38.22 ±0.97	70.40 ±2.06	77.37 ±2.29	82.21 ±2.51	37.13 ±1.91	110.42 ±5.30	57.13 ±2.84	50.22 ±2.27	117.70 ±3.81	70.54 ±26.05

附件四、加味逍遙散複方製劑之 TLC 成分鑑別方法-實驗室 3

1. 加味逍遙散複方製劑之 TLC 成分鑑別，依據現行衛生福利部食品藥物管理署(TFDA)規範之指定藥材作為訂定標準。以當歸、白芍、白朮、柴胡、牡丹皮、山梔子、炙甘草、煨薑及薄荷等藥材當作成分鑑別之項目；以上藥材以表格中之藥材或標準品當作對照藥材或對照標準品。

加味逍遙散複方製劑建議之 TLC 成分鑑別項目：

藥材	對照藥材或對照標準品	鑑別
當歸	當歸	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取當歸對照藥材1.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照藥材溶液各5 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(80：20)混液為展開溶媒，層析之。 俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm時，取出層析板風乾後，於主波長365 nm之紫外燈照射下檢視之，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現主斑點之色調及R*f* 值均一致。
白芍	Paeoniflorin	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。另取芍藥苷(Paeoniflorin)對照標準品1.0 mg，溶於甲醇1 mL，作為對照標準品溶液。取檢品溶液及對照標準品溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正丁醇：醋酸：水(70：10：20)為展開溶媒，層析之，俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm 時，取出層析板風乾後，以茴香醛/硫酸試液(*p*-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS)噴霧，105℃加熱三分鐘後，於可見光下檢視之。檢品溶液及對照標準品溶液所呈現斑點之R*f* 值及色調均一致。
白朮	白朮	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取白朮對照藥材1.0g，同法製成對照藥材溶液。 取檢品溶液及對照藥材溶液各5 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(80：20)為展開溶媒，層析之，俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm時，取出層析板風乾後，以對-二甲胺基苯甲醛試液

藥材	對照藥材或對照標準品	鑑別
		(*p*-Dimethylaminobenzaldehyde TS)噴霧，105℃加熱二分鐘後，於可見光下檢視之，檢品溶液及對照藥材溶液所呈現斑點之R*f* 值及色調均一致。
柴胡	柴胡	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。 取柴胡對照藥材2.0 g，同法製成對照藥材溶液。 取檢品溶液及對照標準品溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以三氯甲烷：甲醇：水(30：10：1)為展開溶媒，層析之。 俟溶媒頂端上升至距原點約5~10 cm 時，取出層析板風乾後，以2%對二甲氨基苯甲醛的40%硫酸試液噴霧，在105℃加熱至斑點顯色清晰，於可見光照射下檢視，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現斑點之R*f* 值及色調均一致。
牡丹皮	Peonol	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。 另取牡丹酚(Paeonol)對照標準品，加甲醇製成每1 mL含1 mg的溶液，作為對照標準品溶液。 取檢品溶液及對照標準品溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(4：1)為展開溶媒，層析之。 俟溶媒頂端上升至距原點約5~10 cm時，取出層析板風乾後，於主波長254 nm之紫外燈照射檢視之。檢品溶液及對照標準品溶液所呈現斑點之R*f*值及色調均一致。
山梔子	Geniposide	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。 另取梔子苷(Geniposide)對照標準品1.0 mg，加甲醇1mL 溶解，作為對照標準品溶液。 取檢品溶液與對照標準品溶液各5 μL，按薄層層析法（通則1010.3），點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以乙酸乙酯：甲醇：氨水(6：3：2)混液為展開溶媒，層析之。 俟溶媒頂端上升至距原點約5~10 cm時，取出層析板風乾後，

藥材	對照藥材或對照標準品	鑑別
		以茴香醛/硫酸試液(*p*-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS)噴霧，105℃加熱五分鐘後，於可見光下檢視之，檢品溶液對照標準品溶液所呈現暗紫色色點之色調及R*f* 值均一致。
炙甘草	炙甘草	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。 取炙甘草對照藥材2.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照標準品溶液各5μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以三氯甲烷：甲醇：水(15：7：2)下層液為展開溶媒，層析之。俟溶媒頂端上升至距原點約5~10 cm 時，取出層析板風乾後，以20 %硫酸(H_2SO_4)噴霧，105℃加熱五分鐘後，於可見光下檢視之，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現橘色色點之色調及R*f* 值均一致。
烺薑	烺薑	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。另取烺薑對照藥材2.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照藥材溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以三氯甲烷：丙酮(19：1)為展開溶媒，層析之。俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm 時，取出層析板風乾後，以茴香醛/硫酸試液(*p*-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS)噴霧，105℃加熱三分鐘後，於可見光下檢視之，檢品溶液與對照藥材溶液所呈現斑點之色調與R*f* 值均一致。
薄荷	薄荷	取本品粉末5.0 g，加甲醇15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取薄荷對照藥材2.0 g，同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照藥材溶液各10 μL，按薄層層析法（通則1010.3），分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上，以正己烷：乙酸乙酯(4：1)為展開溶媒，層析之。俟溶媒頂端上升至距原點約5~10cm 時，取出層析板風乾後，以茴香醛/硫酸試液(*p*-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS)噴霧，於105℃加熱三分鐘，於可見光下檢視之，檢品溶液所呈現斑點與對照藥材溶液呈現斑點之色調及R*f* 值均一致。

加味逍遙散複方製劑之 TLC 成分鑑別方法-實驗室 4

2. 加味逍遙散複方製劑之 TLC 成分鑑別，依據現行衛生福利部食品藥物管理署(TFDA)規範之指定藥材作為訂定標準。以當歸、白芍、白朮、柴胡、牡丹皮、山梔子、炙甘草、煨薑及薄荷等藥材當作成分鑑別之項目；以上藥材以表格中之藥材或標準品當作對照藥材或對照標準品。

加味逍遙散複方製劑建議之 TLC 成分鑑別項目：

藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
當歸	當歸	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取當歸對照藥材 1.0 g，同法製成對照藥材溶液。 【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F_{254}，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm 展 開 溶 媒：n-Hexane：Ethylacetate = 5:2 檢 出 方 法：U.V. 366 nm 檢 出 結 果：R_f 值約 0.80，藍白色吸收斑點
白芍	芍藥苷 (Paeoniflorin)	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。另取芍藥苷(Paeoniflorin)對照標準品 1.0 mg，溶於甲醇 1 mL，作為對照標準品溶液。 【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F254，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm 展 開 溶 媒：Ethylacetate：Methanol：Water = 10:2:1 檢 出 方 法：p-Anisaldehyde /H2SO4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 檢 出 結 果：Rf 值約 0.65 處有紫色色點。
白朮	白朮	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取白朮對照藥材 1.0g，同法製成對照藥材溶液。

藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
		【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F_{254}，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm 展 開 溶 媒：n-Hexane：Ethylacetate = 5:2 檢 出 方 法：p-Anisaldehyde/H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 檢 出 結 果：R_f值約 0.83，紫色色點
柴胡	柴胡	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取柴胡對照藥材 2.0 g，同法製成對照藥材溶液。 【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F_{254}，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm 展 開 溶 媒：Ethylacetate：Methanol：Water = 10:2:1 檢 出 方 法：p-Dimethylaminobenzaldehyde spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 檢 出 結 果：R_f值約 0.50，粉紅色色點
牡丹皮	牡丹皮	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取牡丹皮對照藥材 2.0 g，同法製成對照藥材溶液。 【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F_{254}，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm 展 開 溶 媒：Ethylacetate：Methanol：Water = 10:2:1 檢 出 方 法：p-Anisaldehyde /H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 檢 出 結 果：R_f值約 0.59 處有紫色色點。

藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
山梔子	梔子苷 (Geniposide)	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。另取梔子苷(Geniposide)對照標準品 1.0 mg，加甲醇 1mL 溶解，作為對照標準品溶液。 【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F_{254}，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm 展 開 溶 媒：Ethylacetate：Methanol：Water＝10:2:1 檢 出 方 法：p-Anisaldehyde /H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 檢 出 結 果：R_f值約 0.50，紫色色點
炙甘草	炙甘草	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取炙甘草對照藥材 1.0 g，同法製成對照藥材溶液。 【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F_{254}，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm 展 開 溶 媒：Chloroform：Methanol：Water＝26:14:5 取下層液 檢 出 方 法：p-Anisaldehyde /H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 檢 出 結 果：R_f值約 0.33，黃色色點
烺薑	烺薑	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取烺薑對照藥材 1.0 g，同法製成對照藥材溶液。 【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F254，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm

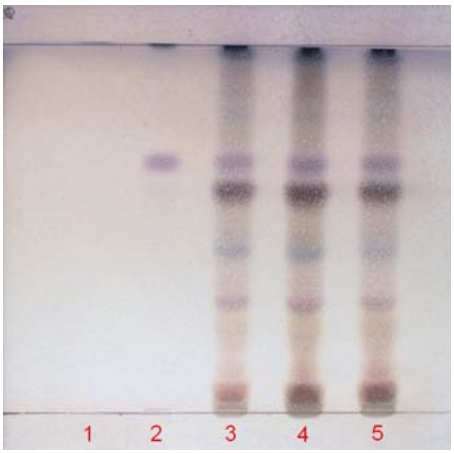
藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
		展 開 溶 媒：Isopropylether：Acetone＝5：2 檢 出 方 法：p-Anisaldehyde /H2SO4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 檢 出 結 果：Rf 值約 0.70，紫色色點
薄荷	薄荷	取本品粉末 5.0 g，加甲醇 15 mL，超音波振盪三十分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。取薄荷對照藥材 1.0 g，同法製成對照藥材溶液。 【條　件】 薄　層　板：Silicagel 60 F254，厚度：0.2 mm 點　注　量：5 μL 展 開 距 離：55 mm 展 開 溶 媒：n-Hexane：Ethylacetate = 5:2 檢 出 方 法：p-Anisaldehyde/H2SO4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 檢 出 結 果：Rf 值約 0.60，紫色色點

附件五、加味逍遙散複方製劑之 TLC 成分鑑別結果-實驗室 3

加味逍遙散濃縮顆粒三批樣品檢測

1. 白芍

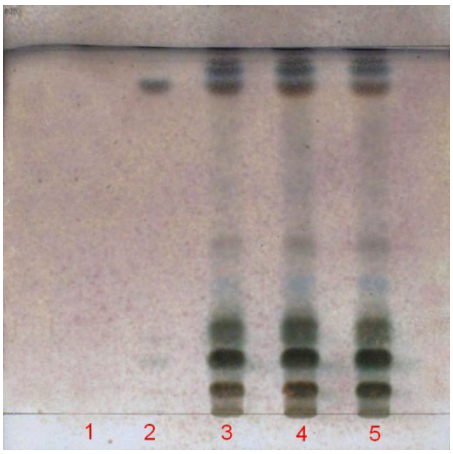
點標編號	樣品編號
1	Blank
2	Paeoniflorin (芍藥苷)
3	Sample 1
4	Sample 2
5	Sample 3



顯色後可見光薄層板

2. 山梔子

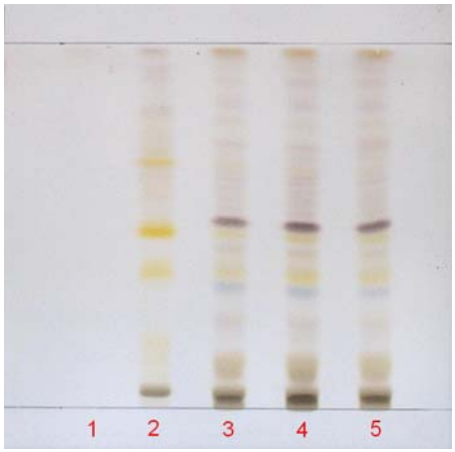
點標編號	樣品編號
1	Blank
2	Geniposide (梔子苷)
3	Sample 1
4	Sample 2
5	Sample 3



顯色後可見光薄層板

3. 炙甘草

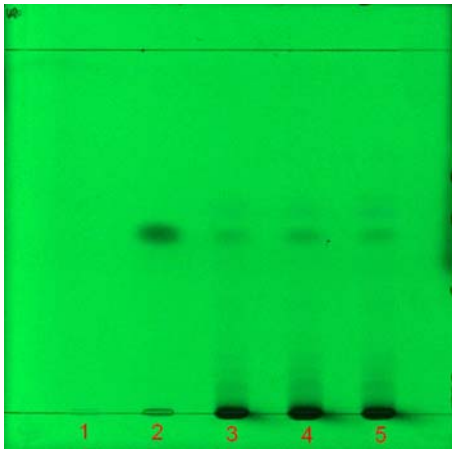
點標編號	樣品編號
1	Blank
2	炙甘草對照藥材
3	Sample 1
4	Sample 2
5	Sample 3



顯色後可見光薄層板

4.牡丹皮

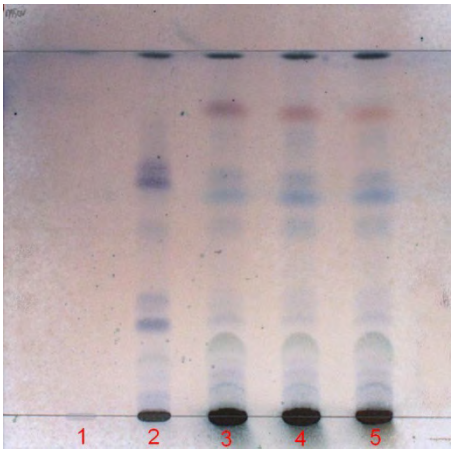
點標編號	樣品編號
1	Blank
2	Peonol (牡丹酚)
3	Sample 1
4	Sample 2
5	Sample 3



顯色後吸收光 254nm 薄層板

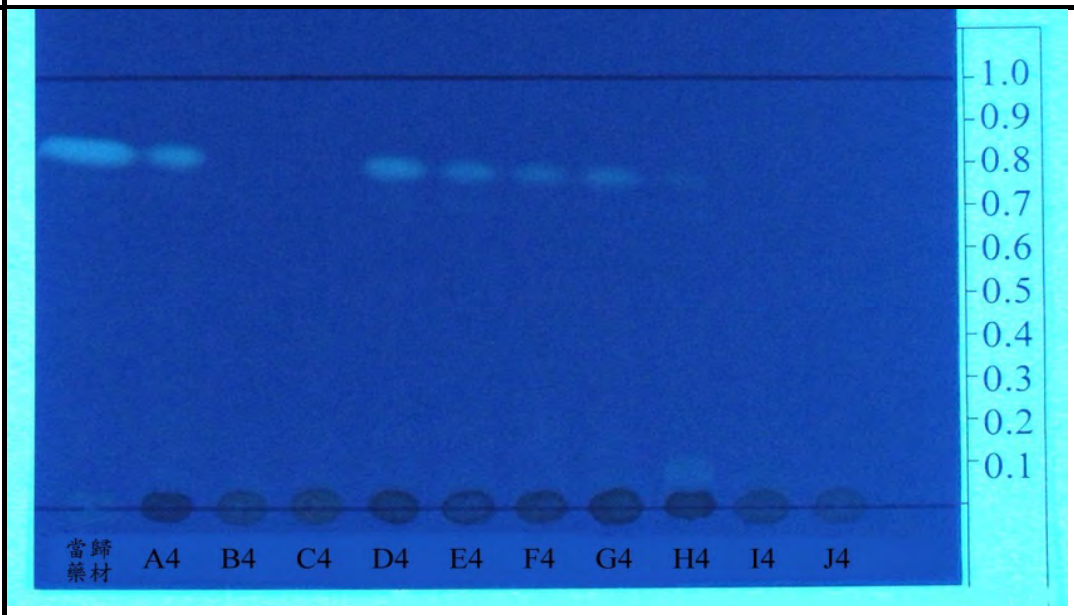
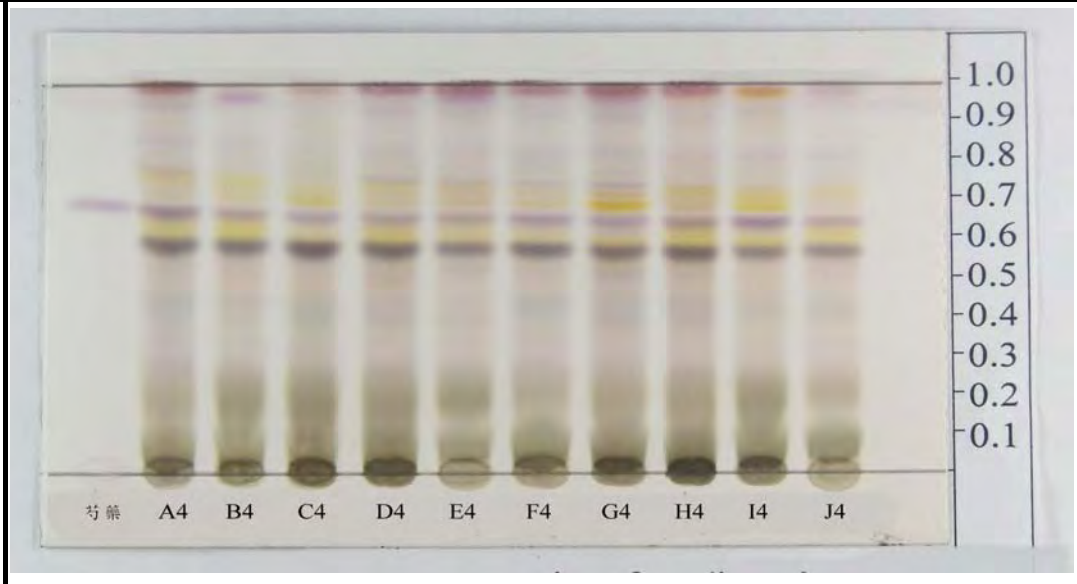
5. 煨薑

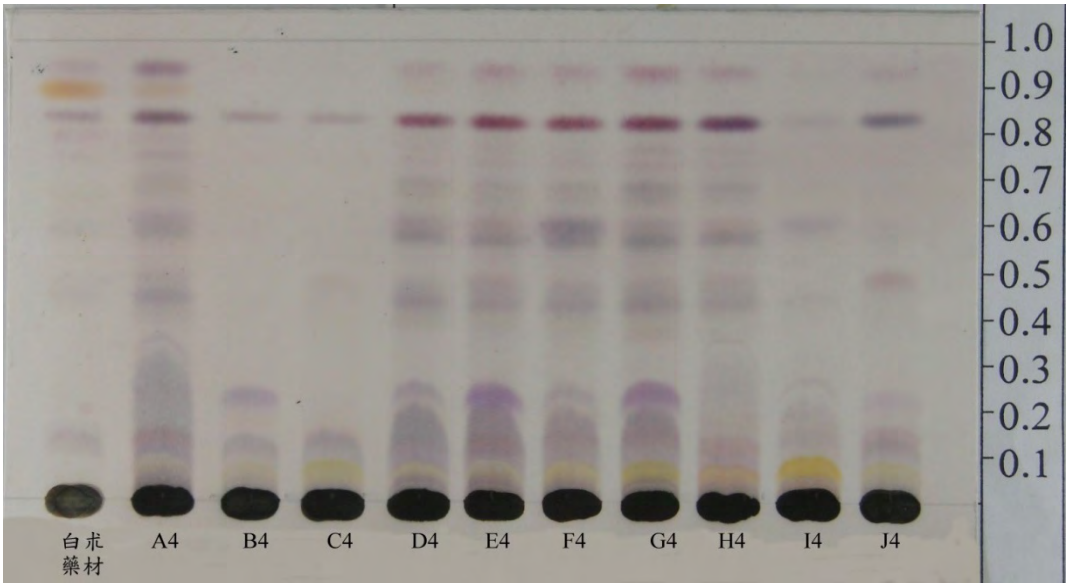
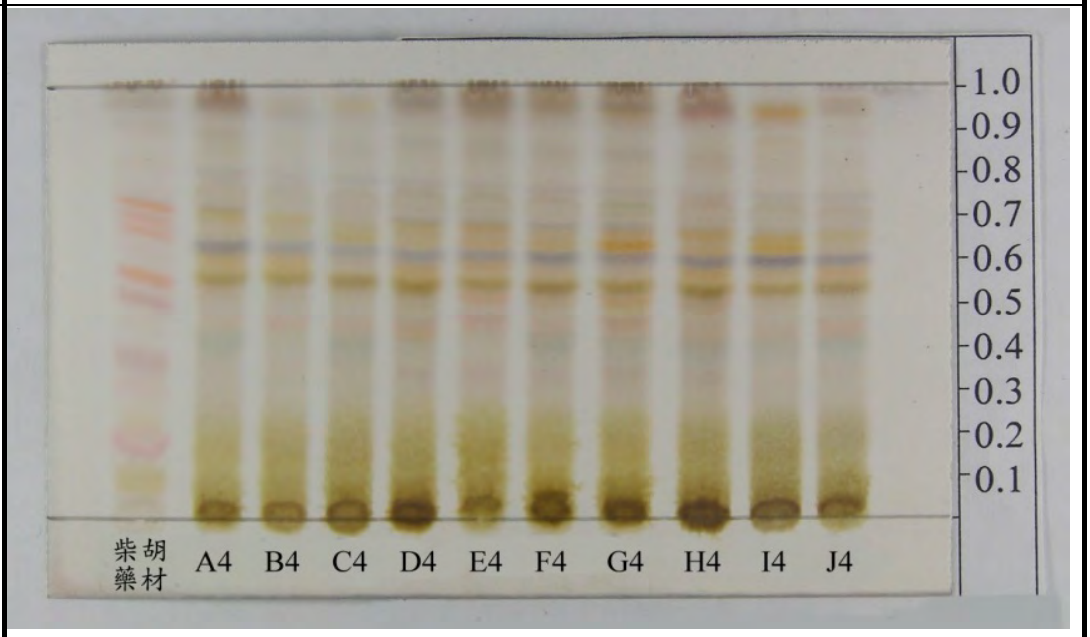
點標編號	樣品編號
1	Blank
2	煨薑對照藥材
3	Sample 1
4	Sample 2
5	Sample 3

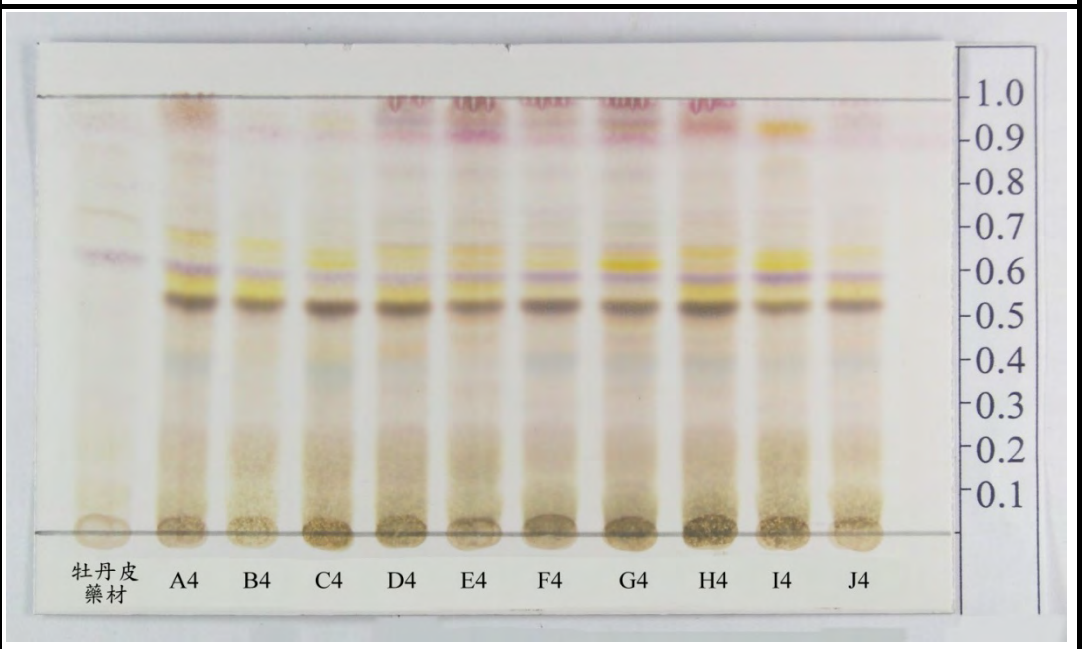
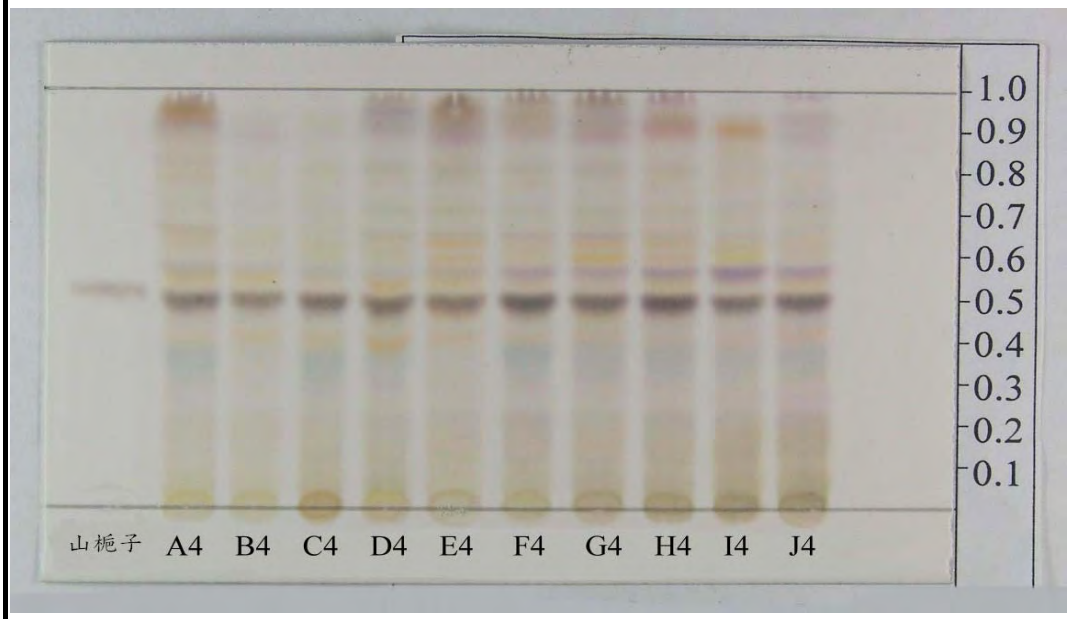


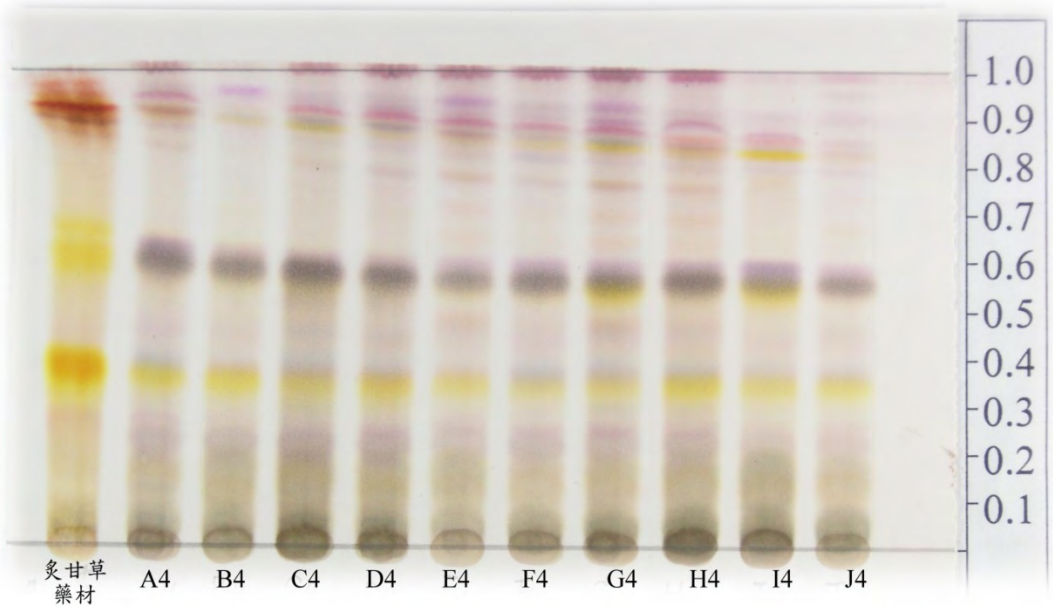
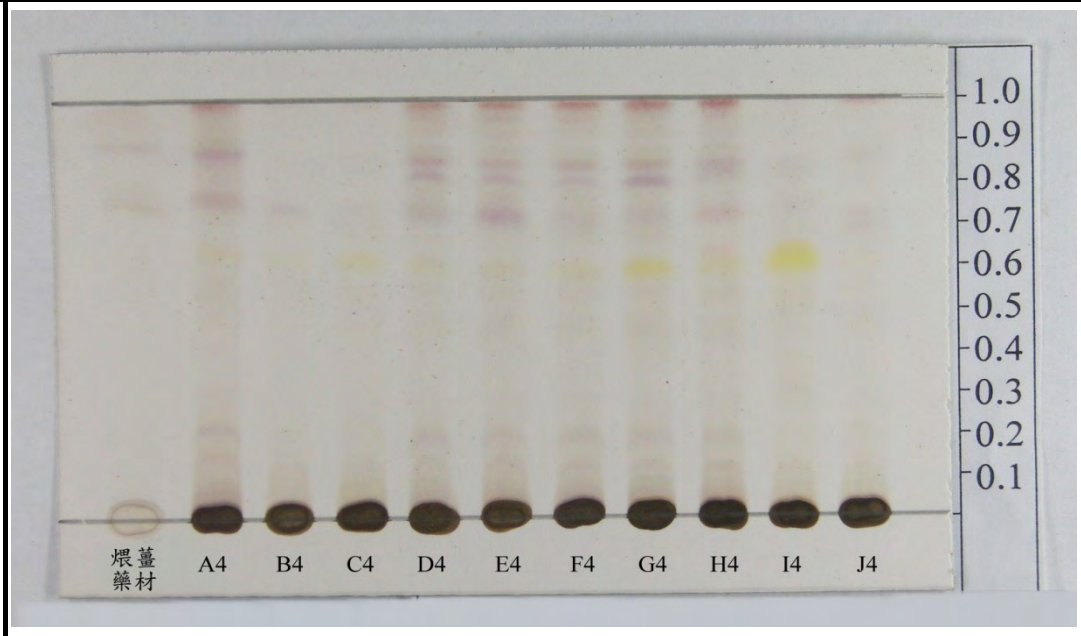
顯色後可見光薄層板

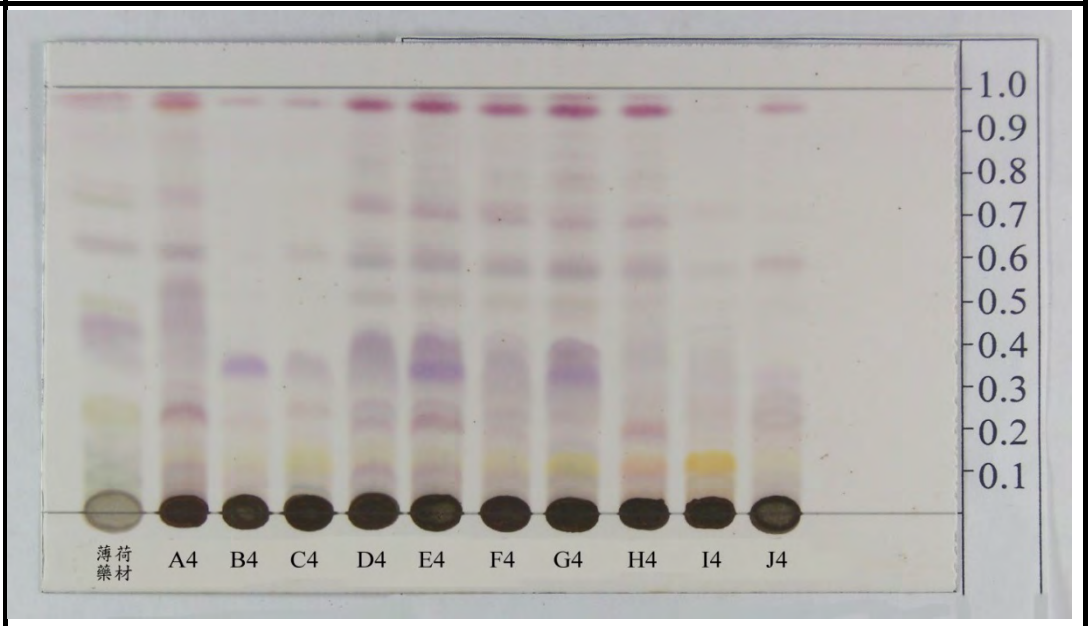
加味逍遙散複方製劑之 TLC 成分鑑別結果-實驗室 4

藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
當歸	當歸	
白芍	芍藥苷 (Paeoniflorin)	

藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
白朮	白朮	
柴胡	柴胡	

藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
牡丹皮	牡丹皮	
山梔子	梔子苷 (Geniposide)	

藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
炙甘草	炙甘草	
煨薑	煨薑	

藥材	對照藥材或 對照標準品	鑑別
薄荷	薄荷	

附件六、中藥濃縮製劑含異常物質之限量

異常物質	限量	適用範圍	檢驗方法	備考
總重金屬	30 以下 (ppm)	複方製劑,2 年內完成單味製劑	台灣傳統藥典、中華藥典、日本藥局方、歐洲藥典、美國藥典、中華人民共和國藥典或藥廠自行開發檢驗方法(需提依據)等，藥典以最新版本或前一版本為限。	一、特殊情形者，另行公告。 二、本限量將於實施六個月後檢討修正。
砷	3 以下 (ppm)	33 方[註]製劑，3 年內完成公告 200 基準方其餘製劑		
鎘	0.5 以下 (ppm)			
汞	0.5 以下 (ppm)			
鉛	10 以下 (ppm)			
微生物總生菌數	10^5 以下 (cfu/g)	複方製劑,2 年內完成單味製劑		
大腸桿菌	不得檢出			
沙門氏菌				

註：33 方中藥濃縮製劑包括：葛根湯、小青龍湯、**加味逍遙散**、桂枝湯、甘露飲、麻杏甘石湯、補中益氣湯、六味地黃丸、黃連解毒湯、獨活寄生湯、四逆散、血府逐瘀湯、杞菊地黃丸、辛夷清肺湯、定喘湯、知柏地黃丸、柴葛解肌湯、消風散、清心蓮子飲、龍膽瀉肝湯、炙甘草湯、八味地黃丸、川芎茶調散、逍遙散、藿香正氣散、香砂六君子湯、荊防敗毒散、疏經活血湯、止嗽散、濟生腎氣丸、防風通聖散、二陳湯、六君子湯。

附件七

中藥製劑規格及試驗方法必須記載之項目及內容表

劑型 / 必要性項目		丸劑	錠劑	散劑	膠囊劑	碎片	滋膏劑	糖漿劑	內服液劑	含藥酒劑	糖衣錠（丸）劑	外用膏藥劑	外用油膏劑	外用液劑	濃縮製劑：丸劑	濃縮製劑：散劑	濃縮製劑：顆粒（細粒）劑	濃縮製劑：錠劑	濃縮製劑：膜衣錠劑	濃縮製劑：糖衣錠（丸）劑	濃縮製劑：膠囊劑
性狀		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
一般檢查	重（容）量	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○
	差異試驗 崩散度試驗	○	○	×	○	×	×	×	×	×	○	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○
	平均重（容）量	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	PH 值	△	△	△	△	△	△	△	○	×	△	×	×	×	△	△	△	△	△	△	△
	比重	×	×	×	×	×	×	×	△	×	×	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×
	尺寸	×	×	×	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
類別		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
雜質檢查	乾燥減重	△	○	○	○	○	×	○	×	×	×	×	×	×	△	○	○	○	×	○	○
	重金屬試驗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○
	總灰分	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○
	酸不溶性灰分	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○
	其他	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△
含量測定	水抽提物	△	○	○	○	○	○	○	×	×	△	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○
	稀醇抽提物	△	○	○	○	○	○	○	×	×	△	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○
	含糖量測定	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×
	含醇量測定	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	其他	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△

○：原則上要記載

△：必要時記載（可予檢驗者記載之）

×：不必記

衛生福利部臺灣中藥典第二版增補版
「中藥製劑」分小組第四次會議紀錄

時間：中華民國 105 年 03 月 08 日(二)上午 10 時 30 分
地點：衛生福利部 3 樓 302 會議室(台北市南港區忠孝東路 6 段 488 號)
主席：黃司長怡超 / 謝召集人明村

壹、主席致詞：(略)
貳、上次會議紀錄確認及追蹤辦理情形：
一、

項次	討論提案	會議決議	執行情形
1	一、有關中藥製劑通則草案，提請討論。	中藥濃縮製劑通則彙整委員意見修正草案提第五次會議討論。	已送請中藥製劑分小組委員審閱，並於 105.03.18 前回覆修改建議。
2	二、有關市售加味逍遙散濃縮製劑指標成分含量測定方法及結果，提請討論。	市售加味逍遙散濃縮製劑指標成分含量測定結果，換算成每日量含量，及指標成分規格標示，提第四次會議討論。	已換算成十個樣品的每日量含量比較。
3	三、有關加味逍遙散濃縮製劑 TLC 鑑別方法及結果，提請討論。	有關加味逍遙散濃縮製劑 TLC 鑑別方法修正案，提第四次會議討論。	已請委員於 105.03.02 前回覆。
4	四、有關加味逍遙散濃縮製劑異常物質限量，提請討論。	加味逍遙散濃縮製劑異常物質之限量依現行公告限量規定。	依現行公告限量規定辦理。
5	五、有關加味逍遙散濃縮製劑藥典收載規格內容，提請討論。	加味逍遙散濃縮製劑藥典收載規格內容修正草案提第四次會議討論。	待中醫臨床分小組開會討論後，作最後定稿。

二、主席裁示

(一)第二、四項洽悉。

(二)第一、三、五項請續辦理。

參、討論事項：

案由一：有關中藥濃縮製劑通則修正草案，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第三次會議結論提出討論。

二、中藥濃縮製劑通則彙整委員意見，修正草案如附件一，P.6。

決　議：

一、製劑通則第二次修正內容草案如附件一，P.6。

二、提第五次委員會議討論。

案由二：有關市售加味逍遙散濃縮製劑乾燥減重、總灰分測定結果，指標成分含量測定結果換算成每日含量及指標成分規格標示，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第三次會議結論提出討論。

二、乾燥減重測定方法依照《臺灣中藥典》(第二版)通則5008，附件二，P.7－本品以105℃乾燥5小時，其減重不得超過4.36 %，附件四，P.9。

總灰分測定方法依照《臺灣中藥典》(第二版)通則5004，附件三，P.8─本品之總灰分不得超過4.25%，附件四，P.9。

三、加味逍遙散濃縮製劑指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide)含量測定結果換算成每日量含量。如附件四，P.10-11。

四、《中國藥典》規定加味逍遙散濃縮製劑指標成分含量規格標示：「加味消遙丸」每l g含白芍和牡丹皮以芍藥苷（$C_{23}H_{28}O_{11}$）計，不得少於1.9 mg，如附件五，P.12-13。

五、日本藥局方規定加味逍遙散濃縮製劑指標成分含量規格標示：

Kamishoyosan Extract contains not less than 28 mg and not more than 84 mg of peoniflorin ($C_{23}H_{28}O_{11}$: 480.46), not less than 25 mg and not more than 75 mg of geniposide, and not less than 12 mg and not more than 36 mg (for preparation prescribed 1.5 g of Glycyrrhiza) or not less than 16 mg and not more than 48 mg (for preparation prescribed 2 g of Glycyrrhiza) of glycyrrhizic acid ($C_{42}H_{62}O_{16}$: 822.93), per extract prepared with the amount specified in the Method of preparation.

Method of preparation (g)	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Japanese Angelica Root	3	3	3	3	3	3
Peony Root	3	3	3	3	3	3
Atractylodes Rhizome	3	—	3	—	3	3
Atractylodes Lancea Rhizome	—	3	—	3	—	—
Poria Sclerotium	3	3	3	3	3	3
Bupleurum Root	3	3	3	3	3	3
Moutan Bark	2	2	2	2	2	2
Gardenia Fruit	2	2	2	2	2	2
Glycyrrhiza	2	2	1.5	1.5	1.5	1.5
Ginger	1	1	1	1	1.5	0.5
Mentha Herb	1	1	1	1	1	1

Prepare a dry extract or viscous extract as directed under Extracts, according to the prescription 1) to 6), using the crude drugs shown above.

如附件六，P.14-17。

六、臺灣中藥典擬規定加味逍遙散濃縮製劑指標成分含量規格標示建議：

1. 依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》第五點，附件七，P.18。

2. 以三間實驗室及國家中醫藥研究所的標準湯劑指標成分含量平均值減百分之五十之最低數值為依據，芍藥苷(Paeoniflorin)每日服用量含量不得少於 42 mg/day (85-85*0.5)，梔子苷(Geniposide)每日服用量含量不得少 44 mg/day (89-89*0.5)。
3. 以三間實驗室及國家中醫藥研究所的標準湯劑指標成分含量平均值乘以 70%為依據，芍藥苷(Paeoniflorin)每日服用量含量不得少於 59 mg/day (85*0.7)，梔子苷(Geniposide)每日服用量含量不得少於 62 mg/day (89*0.7)。
4. 以三間實驗室及國家中醫藥研究所的標準湯劑指標成分含量下限值乘以 70%為依據，芍藥苷(Paeoniflorin)每日服用量含量不得少於 49 mg/day (70*0.7)，梔子苷(Geniposide)每日服用量含量不得少於 53 mg/day (76*0.7)。
5. 指標成分 Paeoniflorin 含量以成品平均值(65 mg/day)為標誌量，標誌量±50%為規格範圍(33~98 mg/day)，
   (1) 但標準湯劑下限值 70%為 49 mg/day，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(98 mg/day)，規格範圍須修正為 49~147 mg/day，不得少於 49 mg/day。
   (2) 但標準湯劑平均值 70%為 59 mg/day，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(118 mg/day)，規格範圍須修正為 59~177 mg/day，不得少於 59 mg/day。
6. 指標成分 Geniposide 含量以成品平均值(71 mg/day)為標誌量，標誌量±50%為規格範圍(36~107 mg/day)，
   (1) 但標準湯劑下限值 70%為 53 mg/day，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(106mg/day)，規格範圍須修正為 53~159 mg/day，不得少於 53 mg/day。
   (2) 但標準湯劑平均值 70%為 62 mg/day，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(124 mg/day)，規格範圍須修正為 62~186mg/day，不得少於 62 mg/day。

決　議：

一、中藥濃縮製劑的乾燥減重百分比，因不同劑型含水量不同而有所差異，加味逍遙散濃縮製劑市售品此次抽樣結果為 4.36% (如附件四，P.9)。日本藥局方規定加味逍遙散濃縮製劑乾燥減重比

率不得高於 9%，中國藥典製劑通則規定加味逍遙散濃縮製劑乾燥減重比率不得高於 8%，建議加味逍遙散濃縮製劑乾燥減重比率以不得高於 8%為標準。

二、中藥濃縮製劑的總灰分比率為 4.25% (如附件四，P.9)。因不同劑型所含鹽類的量不同而有所差異，建議依據各別製劑品項分別訂定。

三、臺灣中藥典收載加味逍遙散濃縮製劑指標成分含量規範值建議如下：

1. 標準湯劑須以符合《臺灣中藥典》指標成分規定且接近藥典規範值之藥材組成製作。
2. 加味逍遙散濃縮製劑指標成分含量規範值仍待再討論。

案由三：有關加味逍遙散濃縮製劑 TLC 鑑別方法修正案，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第三次會議結論提出討論。

二、加味逍遙散濃縮製劑 TLC 鑑別方法修正案請委員提出一個修正版本，並經執行幹事確認，如附件八，P.19-28。

決　議：

一、將 TLC 鑑別的樣品取樣量由「一日使用量」修正為「相當一日飲片量的二分之一」。

二、請執行幹事協助 TLC 鑑別方法之確認，並於 105 年 03 月 17 日前提供鑑別結果。

肆、散會：十三時三十分

附件一、中藥濃縮製劑-製劑通則(草案)修正內容對照表

第二次修正(第三次會議)	第三次修正(第四次會議)	說明
中藥濃縮製劑 -製劑通則(草案)	中藥濃縮製劑 -製劑通則前言	依第四次委員會議決議刪除部分文字
中藥濃縮製劑係由中藥材經煎煮或萃取、濃縮、乾燥，加工調製成各種劑型之製劑。依照藥材組成可分為單方製劑及複方製劑；依照劑型可分為散劑、顆粒劑、丸劑、錠劑、膜衣錠劑、膠囊劑等。	中藥濃縮製劑係由中藥材經煎煮或萃取、濃縮、乾燥，加工調製成各種劑型之製劑。依照藥材組成可分為單方製劑及複方製劑；依照劑型可分為散劑、顆粒劑、丸劑、錠劑、糖衣錠劑、膜衣錠劑、膠囊劑或其他衍生劑型等。	依委員建議增添並修改部分條文文字。
濃縮製劑以合併煎煮為原則，煎煮所抽出之浸膏，得以中華藥典收載之乳糖、澱粉等或經中央衛生主管機關核准之適當製劑輔助劑、及經抽提後所遺留之生藥殘渣細粉於 100℃乾燥為賦形劑予以調製。濃縮製劑微生物、重金屬、農藥殘留之限量，應依中央衛生主管機關公告之規定。	複方濃縮製劑以合併煎煮為原則。煎煮所抽出之浸膏，得以中華藥典收載之乳糖、澱粉等或經中央衛生主管機關核准之適當製劑輔助劑為賦形劑、及經抽提後所遺留之中藥殘渣、或製劑組成之部分中藥原末予以調製。濃縮製劑微生物、重金屬、農藥殘留之限量，應依中央衛生主管機關公告之規定。	1. 依第四次委員會議決議刪除部分條文文字。 2. 依委員建議增添並修改部分條文文字。

附件二

如爲重油，俟蒸餾完畢後，開啓集油器之活栓，將所得之油移至小量筒內，並將混有油滴之水液移置一小型分液器中，用乙醚 10 mL 洗滌集油器，乙醚液併入分液器中，振搖後靜置俟其分離，棄去分出之水液，將乙醚液用微溫蒸發至無乙醚臭爲止，殘留之油液併入量筒內，調節溫度至 25℃後測定其容積。如須測定揮發油之重量時，可取所得之油，加入少量無水硫酸鈉，徐徐振搖，靜置俟澄明後，將澄明油液傾出，於 25℃時測定其比重，計算檢品所含揮發油之重量百分率。

(5008) 乾燥減重測定法

取稱量瓶於 105℃乾燥一小時，置乾燥器內放冷，精確稱定。取檢品約 5.0 g，置稱量瓶中，再精確稱定。於 105℃乾燥五小時，置矽膠乾燥器內放冷，稱量之。繼續乾燥，每隔一小時稱量一次，直至先後二次之減重相差不超過 0.25%爲止，由減失重量計算檢品之乾燥減重百分率。乾燥器中所用之乾燥劑，應經常更換，以保持其乾燥效率。

(5009) 膨脹度測定法

膨脹度是藥品膨脹性質的指標，係指按乾燥品計算，每 1.0 g 藥品在水或其他規定溶劑中，在一定的時間與溫度條件下膨脹後所佔的體積(mL)。主要用於含黏液質、膠質和半纖維素類的天然品。

測定法——按各該品種項下的規定量取樣，必要時按規定粉碎。稱定重量，置膨脹度測定管中（全長 160 mm，內徑 16 mm，刻度部分長 125 mm，分度 0.2 mL），在 20~25℃條件下，加水或規定的溶劑 25 mL，密塞，振搖，靜置。除另有規定外，開始 1 小時內每 10 分鐘振搖一次，然後靜置四小時，讀取藥物膨脹後的體積(mL)，在靜置一小時，如上讀數，至連續兩次讀數的差異不超過 0.5 mL 時，即爲藥物膨脹後的體積。如藥物膨脹後的體積超過 125 mL，則用量筒繼續測定。

另取檢品三份，依上法測定，計算，求其平均數，即得供檢品的膨脹度（準確至 0.1）。

$$S=\frac{V}{W}$$

式中 S 爲膨脹度

V 爲藥物膨脹後的體積，mL；

W 爲供檢品案乾燥品計算的重量，g。

(5010) 組織切片鑑別法

（一）組織切片製作原理

由於植物之構造較繁雜，爲了達到在顯微鏡或放大鏡下觀察鑑別和研究的目的，組織切片是一項重要的步驟，亦是研究必要手段。觀察之確實與否，和切片的技術有很大的關係，學者研究植物性藥材組織的構造，最理想的材料無疑是植物體在其最自然之狀況下。大部分的植物細胞或植物細胞內的大部分地方在顯微鏡下常呈現出半透明狀或透明狀，因此染色法成爲一種重要的方法。由於上述原因，必須考慮在製作組織切片時如何能保存本來的植物細胞或組織，以利觀察。

植物性藥材製片法有臨時片和永久片兩做法。臨時片即以徒手切片法的切片製作，觀察後不保存者。而切片的永久保存法（永久製片法）是將植物藥材組織內的水分除去（脫水 Dehydration）而代之以樹膠、膠脂等物質，此外脫水後，亦可用一種或數種適當的染色劑染色以利觀察，並可保存作爲再次觀察之目的。

（二）固定

植物藥材組織必須經過多種的處理，第一個步驟得先將藥材固定，所謂固定(Fixation)就是把活的植物組織置於固定液(Fixatives)中，而固定植物組織，所以用於固定之液體，同時具有保存或防腐之作用。固定液亦須具快速滲透速度之性質，以期保留植物組織最接近的狀況。爲求滲透快速，材料大小也是重要因素之一，所以把材料放入固定液之前，應該先把材料切成適當的大小，以不大於 0.6 × 0.6 × 0.6 cm^3 爲宜。影響滲透作用爲植物材料的氣體，材料內氣體的存在，有礙於液體的滲入。排除氣體的方法最常用的有

附件三

生藥總件數與採樣件數表

生藥總件數	採樣件數
1~10	1~3
10~25	3~4
25~50	4~6
50~75	6~8
75~100	8~10
100 以上	10 以上

如生藥之總量在 10 kg 以內時，可依其多少分別按照上述方法採樣，所取量不得少於 125.0 g。

(5002) 檢品處理法

樣品在檢驗前應加處理，除另有規定外，可用下述方法處理之；按照檢驗之需要量，將所採之樣品依四等分法採取小樣，操作時需注意所採之樣品應足以代表其原樣為要。如原樣未經研細者應研成粉末，並用 20 號篩篩過；不能研粉之樣品，應設法盡量研成細末。樣品經研細後，放置紙上，混和均勻，平舖成薄層，按照上述四等分法採取需要之量，以備檢驗之用。

(5003) 夾雜物檢查法

生藥中混雜之夾雜物大致包括下述二種：(1)生藥原動植物之不合規定藥用部分。(2)與該生藥完全無關之其他動植物雜質，或其分泌物。檢查時可採樣 25.0~500.0 g，平舖成一薄層，用鑷子將所含夾雜物儘量剔出，稱其重量，計算其百分率即得。如為粗粒或體積較大之生藥，應取樣品 500.0 g 檢查之。

(5004) 灰分測定法

（一）總灰分——取坩堝於 550℃ 熾灼一小時，置乾燥器內放冷，精確稱定。取風乾之檢品 2.0~4.0 g，置坩堝中，再精確稱定，徐徐熾熱，注意避免燃燒，至完全碳化時，逐漸升溫至不超過 550℃ 熾灼四小時至碳分完全揮散，於乾燥器內放冷，稱定其重量，計算其灰分百分率。如碳分不能完全揮散時，可用熱水浸漬焦化物，以無灰濾紙過濾，並將殘渣及濾液置坩堝中，如上法熾灼至灰分呈白色或類白色，加入濾液，蒸乾，於不超過 550℃ 熾灼之。如仍不能使碳分完全揮散，可將坩堝放冷，加乙醇 15 mL，用玻璃棒研碎灰分，點火使乙醇燃燒揮散後，於不超過 550℃ 熾灼至達恆量，並計算檢品所含總灰分百分率。

（二）酸不溶性灰分——將上述熾灼所得之總灰分，加稀鹽酸 25 mL，煮沸五分鐘，用已知重量之古氏坩堝或無灰濾紙過濾，濾渣以熱水洗淨後，熾灼至達恆量，並計算檢品所含酸不溶性灰分百分率。

(5005) 水分測定法

檢品之處理——取樣品約 10.0 g，如未經研細者，須加以研碎使成約 3 mm 之碎粒。如為種子或 3 mm 以內之果實可壓碎之。處理檢品時應注意勿使水分損失，故宜避免使用高速磨粉機。所取檢品應能代表其原樣為要。

（一）不含揮發性成分之生藥水分測定法——取稱量瓶於 105℃ 乾燥一小時，精確稱定。取上述製備之檢品約 10.0 g，置稱量瓶中，再精確稱定。於 105℃ 乾燥五小時後，置乾燥器內放冷，稱量之。繼續乾燥，每隔一小時稱量一次，直至洗後二次之減重相差不超過 0.25% 為止，由減失重量計算檢品之水分百分率。

（二）含乙醚溶性揮發成分之生藥水分測定法——取檢品按照抽提物測定法四（通則 5006），測定檢品所含揮發性乙醚抽提物之百分率。自上述所得乾燥減重百分率中減去揮發性乙醚抽提物百分率，即檢品所含水分百分率。

生藥之水分測定亦可由甲苯蒸餾法測定之（通則 3010）。

(5006) 抽提物測定法

（一）乙醇抽提物——將製備之檢品置玻璃塞稱量瓶中，精確稱取 2.0 g，移置已知重量乾

附件四、加味逍遙散濃縮製劑分析結果

1. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之乾燥減重測定結果：

表一、乾燥減重測定結果（單位：w/w%）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	5.00	5.08	4.47	4.35	4.43	5.17	5.22	5.41	5.27	4.64	
實驗室二	4.37	4.47	4.14	4.11	4.04	4.55	4.80	4.88	4.56	4.37	
實驗室三	4.07	4.44	4.08	3.89	3.92	4.72	4.83	5.13	4.71	4.30	
實驗室四	3.41	3.33	3.21	3.42	3.47	4.21	4.4	4.03	3.96	3.62	
實驗室五	4.03	4.51	3.92	3.87	3.91	4.59	4.79	5.02	4.39	4.30	
Mean ±SD	4.18 ±0.52	4.37 ±0.57	3.96 ±0.42	3.93 ±0.31	3.96 ±0.31	4.65 ±0.31	4.81 ±0.26	4.89 ±0.47	4.58 ±0.43	4.24 ±0.34	4.36 ±0.34

〈註〉本品以 105℃乾燥 5 小時，其減重不得超過 Mean+SD (4.7%)或 Mean+2SD(5.04%)。

2. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之總灰份測定結果：

表二、總灰分分析結果（單位：w/w%）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	4.18	4.98	4.35	5.16	4.40	2.69	3.72	5.64	2.83	4.69	
實驗室二	4.13	4.90	4.30	5.08	4.32	2.65	3.35	5.42	2.67	4.56	
實驗室三	4.41	5.26	4.55	5.36	4.58	2.86	3.89	5.84	2.95	4.94	
實驗室四	4.17	4.96	4.38	5.1	4.41	2.75	3.3	5.56	2.78	4.69	
實驗室五	4.17	4.92	4.290	5.050	4.350	2.580	3.320	5.550	2.720	4.600	
Mean ±SD	4.21 ±0.10	5.00 ±0.13	4.38 ±0.09	5.15 ±0.11	4.41 ±0.09	2.70 ±0.09	3.52 ±0.24	5.60 ±0.14	2.79 ±0.10	4.70 ±0.13	4.25 ±0.92

〈註〉本品之總灰分不得超過 Mean+SD (5.17 %)或 Mean+2SD (6.09%)。

3. 標準湯一批：分析結果以三重覆分析之平均值加減一個標準偏差表示；且每樣分析需執行注射三重複。(Mean±SD)

指標成份	Paeoniflorin(mg/day)	Geniposide(mg/day)
實驗室一	**69.62 ± 0.20**	83.06 ± 0.24
實驗室四	77.85 ± 1.40	96.56 ± 1.52
實驗室五	116.1±1.25	**76.31±0.86**
國家中醫藥研究所	74.65	99.79
Mean ± SD	84.56 ± 18.45	88.93 ± 9.62
平均值- 50%	42.48	44.47

〈註〉依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》規定：

(1)指標成分 Paeoniflorin 含量不得少於**標準湯劑下限值**之 70% (70x0.7=49 mg/day)。

(2)指標成分 Geniposide 含量不得少於**標準湯劑下限值**之 70% (76x0.7=53 mg/day)。

4. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之指標成分芍藥苷(Paeoniflorin)每日量含量測定結果：

表三、芍藥苷(Paeoniflorin)每日量含量測定結果（單位：mg/day）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	39.34	32.05	59.04	88.25	85.64	84.64	86.94	95.19	35.24	47.10	
實驗室二	36.81	29.62	54.77	80.89	77.71	76.38	82.71	88.28	33.43	44.14	
實驗室三	37.10	29.88	53.76	79.45	78.96	75.40	87.92	88.17	31.76	43.88	
實驗室四	44.10	33.30	64.08	97.35	98.16	93.96	102.69	113.58	36.24	50.65	
實驗室五	39.80	32.93	62.22	90.80	96.28	86.40	84.07	97.17	33.08	42.96	
Mean ±SD	39.43 ±2.62	31.55 ±1.53	58.77 ±4.03	87.35 ±6.58	87.35 ±8.52	83.36 ±6.86	88.87 ±7.16	96.48 ±9.28	33.95 ±1.60	45.75 ±2.82	65.29 ±24.58

〈註〉依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》規定：

指標成分 Paeoniflorin 含量以成品平均值(65 mg/day)為標誌量，標誌量±50%為規格範圍(33~98 mg/day)，但標準湯劑下限值 70%為 49 mg/day (70*0.7)，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(98 mg/day)，規格範圍須修正為 49~147 mg/day，加味逍遙散濃縮製劑每日服用量 Paeoniflorin 含量不得少於 49 mg/day。(4 家低於 49 mg/day)

5. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之指標成分梔子苷(Geniposide)每日量含量測定結果：

表四、梔子苷(Geniposide)每日量含量測定結果（單位：mg/day）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	62.16	36.83	67.29	74.55	82.80	36.00	104.58	53.55	48.04	115.09	
實驗室二	67.85	39.71	72.18	79.81	82.47	39.49	116.36	61.26	53.12	124.41	
實驗室三	63.98	38.75	72.15	79.25	81.80	37.96	111.16	57.99	51.92	118.96	
實驗室四	64.16	38.10	71.82	78.60	85.92	38.16	115.92	58.50	50.88	116.61	
實驗室五	64.89	37.73	68.58	74.65	78.08	34.04	104.09	54.33	47.16	113.44	
Mean ±SD	64.61 ±1.85	38.22 ±0.97	70.40 ±2.06	77.37 ±2.29	82.21 ±2.51	37.13 ±1.91	110.42 ±5.30	57.13 ±2.84	50.22 ±2.27	117.70 ±3.81	70.54 ±26.05

〈註〉依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》規定：

指標成分 Geniposide 含量以成品平均值(71 mg/day)為標誌量，標誌量±50%為規格範圍(36~107 mg/day)，但標準湯劑下限值 70%為 53 mg/day (76*0.7)，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(106 mg/day)，規格範圍須修正為 53~159 mg/day，加味逍遙散濃縮製劑每日服用量 Geniposide 含量不得少於 53 mg/day。(3 家低於 53 mg/day)

附件五

动相；检测波长为 230nm。理论板数按芍药苷峰计算应不低于 3000。

对照品溶液的制备　取芍药苷对照品适量，精密称定，加 50%甲醇制成每 1ml 含 50μg 的溶液，即得。

供试品溶液的制备　精密量取本品 1ml，置 25ml 量瓶中，用 50%甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

测定法　分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10μl，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品每 1ml 含白芍和牡丹皮以芍药苷（$C_{23}H_{28}O_{11}$）计，不得少于 0.80mg。

【功能与主治】　舒肝清热，健脾养血。用于肝郁血虚、肝脾不和所致的两胁胀痛、头晕目眩、倦怠食少、月经不调、脐腹胀痛；更年期综合征见上述证候者。

【用法与用量】　口服。一次 10ml，一日 2 次。

【注意】　切忌气恼劳碌；忌食生冷油腻。

【规格】　(1)每支装 10ml　(2)每瓶装 100ml　(3)每瓶装 150ml

【贮藏】　密封，置阴凉干燥处。

注：〔规格(2)、(3)〕为合剂。

加味逍遥丸

Jiawei Xiaoyao Wan

【处方】

柴胡 300g	当归 300g
白芍 300g	白术(麸炒)300g
茯苓 300g	甘草 240g
牡丹皮 450g	栀子(姜炙)450g
薄荷 60g	

【制法】　以上九味，粉碎成细粉，过筛，混匀。另取生姜 100g，煎液泛丸，干燥，即得。

【性状】　本品为黄棕色的水丸；味甜。

【鉴别】　(1)取本品，置显微镜下观察：不规则分枝状团块无色，遇水合氯醛试液溶化；菌丝无色或淡棕色，直径 4～6μm（茯苓）。草酸钙簇晶直径 18～32μm，存在于薄壁细胞中，常排列成行，或一个细胞中含有数个簇晶（白芍）。纤维束周围薄壁细胞含草酸钙方晶，形成晶纤维（甘草）。种皮石细胞黄色或淡棕色，多破碎，完整者长多角形、长方形或不规则形，壁厚，有大的圆形纹孔，胞腔棕红色（栀子）。

(2)取本品 6g，研细，加乙醚 10ml，密塞，超声处理 15 分钟，滤过，滤液挥干，残渣加丙酮 1ml 使溶解，作为供试品溶液。另取当归对照药材 0.2g，同法制成对照药材溶液。再取丹皮酚对照品，加丙酮制成每 1ml 含 1mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（通则 0502）试验，吸取上述三种溶液各 5μl，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以环已烷-乙酸乙酯（10∶1）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光灯（365nm）下检视。供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点；喷以 5%三氯化铁乙醇溶液，供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

(3)取本品 6g，研细，加甲醇 20ml，超声处理 20 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加 2%氢氧化钠溶液 10ml，加热 30 分钟，放冷，加正丁醇 10ml 振摇提取，分取正丁醇提取液，蒸干，残渣加甲醇 2ml 使溶解，作为供试品溶液。另取柴胡对照药材 0.5g，同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法（通则 0502）试验，吸取上述两种溶液各 5μl，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-水（30∶10∶1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 2%对二甲氨基苯甲醛的 10%硫酸乙醇溶液，在 105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

(4)取本品 6g，研细，加石油醚（30～60℃）20ml，超声处理 20 分钟，滤过，滤渣备用，滤液挥干，残渣加三氯甲烷 1ml 使溶解，作为供试品溶液。另取白术对照药材 1g，同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法（通则 0502）试验，吸取上述两种溶液各 5μl，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以石油醚（60～90℃）-乙酸乙酯（12∶1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

(5)取〔鉴别〕(4)项下石油醚提取后的滤渣，挥干溶剂，加乙醇 20ml，超声处理 20 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加乙醇 1ml 使溶解，作为供试品溶液。另取栀子苷对照品，加乙醇制成每 1ml 含 4mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（通则 0502）试验，吸取上述两种溶液各 5μl，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水（5∶5∶1∶1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

【检查】　应符合丸剂项下有关的各项规定（通则 0108）。

【含量测定】　照高效液相色谱法（通则 0512）测定。

色谱条件与系统适用性试验　以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-0.05mol/L 磷酸氢二钠溶液（用 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液调节 pH 值至 7.4）（23∶77）为流动相；检测波长为 230nm。理论板数按芍药苷峰计算应不低于 5000。

对照品溶液的制备　取芍药苷对照品适量，精密称定，加稀乙醇制成每 1ml 含 60μg 的溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备　取本品研细，取约 1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入稀乙醇 50ml，密塞，称定重量，超声处理（功率 250W，频率 40kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用稀乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

测定法　分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10μl，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品每 1g 含白芍和牡丹皮以芍药苷($C_{23}H_{28}O_{11}$)计，不得少于 1.9mg。

【功能与主治】 舒肝清热，健脾养血。用于肝郁血虚，肝脾不和，两胁胀痛，头晕目眩，倦怠食少，月经不调，脐腹胀痛。

【用法与用量】 口服。一次 6g，一日 2 次。

【注意】 切忌气恼劳碌；忌食生冷油腻。

【规格】 每 100 丸重 6g

【贮藏】 密闭，防潮。

加味藿香正气软胶囊

Jiawei Huoxiang Zhengqi Ruanjiaonang

【处方】

广藿香	紫苏叶
白芷	炒白术
陈皮	半夏(制)
姜厚朴	茯苓
桔梗	甘草
大腹皮	生姜
大枣	

【制法】 以上十一味，姜厚朴用 60%乙醇提取三次，滤过，合并滤液，回收乙醇，浓缩成清膏Ⅰ；广藿香、紫苏叶、陈皮、炒白术、白芷水蒸气蒸馏提取挥发油，蒸馏后的水溶液滤过，滤液另器收集；药渣与半夏、茯苓、桔梗、甘草、大腹皮、生姜及大枣加水煎煮二次，合并煎液，与上述水溶液合并，滤过，滤液浓缩至适量，离心，上清液浓缩成清膏Ⅱ；合并清膏Ⅰ和Ⅱ，浓缩成稠膏，减压干燥，粉碎成细粉，过筛。加入挥发油及精制大豆油、蜂蜡及聚山梨酯 80，经胶体磨磨匀，压制成软胶囊 1000 粒，即得。

【性状】 本品为软胶囊，内容物为含少量悬浮固体粉末的棕褐色油状液体；气芳香，味苦。

【鉴别】 (1)取本品内容物 2g，置 500ml 圆底烧瓶中，加水 250ml，混匀，连接挥发油测定器，自测定器上端加水至刻度，并溢流入烧瓶中为止，再加入石油醚(60～90℃)1.5ml，连接回流冷凝管，加热至沸，并保持微沸 2 小时，放冷，分取石油醚层作为供试品溶液。另取广藿香油对照品，加石油醚(60～90℃)制成每 1ml 含 0.1ml 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502)试验，吸取上述两种溶液各 5μl，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以石油醚(60～90℃)-乙酸乙酯(10∶1)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 2%香草醛硫酸试液，热风吹至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

(2)取本品内容物 2g，加乙醚振摇提取 2 次，每次 20ml，弃去乙醚液，残渣挥尽乙醚，加水 40ml 使溶解，用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次，每次 30ml，合并正丁醇液，蒸干，残渣加甲醇 5ml 使溶解，作为供试品溶液。另取橙皮苷对照品，加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502)试验，吸取上述两种溶液各 2μl，分别点于同一聚酰胺薄膜上，以丙酮-水(1∶1)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 1%三氯化铝试液，置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色荧光斑点。

(3)取本品内容物 2g，加石油醚(60～90℃)30ml，超声处理 30 分钟，弃去石油醚液，药渣挥干，加三氯甲烷 25ml 和盐酸 2ml，置水浴上加热回流 1 小时，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 5ml 使溶解，作为供试品溶液。另取甘草次酸对照品，加甲醇制成每 1ml 含 0.2mg 的溶液，作为对照品溶液，照高效液相色谱法(通则 0512)试验，以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以乙腈-0.1%磷酸溶液(70∶30)为流动相，检测波长为 250nm，理论板数按甘草次酸峰计算应不低于 1000。分别吸取上述两种溶液各 10μl，注入液相色谱仪，测定。供试品色谱中应呈现与对照品色谱峰保留时间相同的色谱峰。

【检查】 应符合胶囊剂项下有关的各项规定(通则 0103)。

【含量测定】 照高效液相色谱法(通则 0512)测定。

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-水(75∶25)为流动相；检测波长为 294nm。理论板数按厚朴酚峰计算应不低于 3800。

对照品溶液的制备 取厚朴酚对照品、和厚朴酚对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含厚朴酚 30μg、和厚朴酚 25μg 的混合溶液，即得。

供试品溶液的制备 取装量差异项下的本品内容物，混匀，取 1g，精密称定，置 100ml 容量瓶中，加 60%乙醇适量，超声处理(功率 250W，频率 40kHz)45 分钟，放冷，加 60%乙醇至刻度，振摇，滤过，取续滤液，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20μl，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品每粒含厚朴以厚朴酚($C_{18}H_{18}O_2$)与和厚朴酚($C_{18}H_{18}O_2$)的总量计，不得少于 1.6mg。

【功能与主治】 解表化湿，理气和中。用于外感风寒，内伤湿滞证，症见头痛昏重、胸膈痞闷、脘腹胀痛、呕吐泄泻；胃肠型感冒见上述证候者。

【用法与用量】 口服。一次 3 粒，一日 2 次。

【规格】 每粒装 0.6g(相当于饮片 2.157g)

【贮藏】 密封，置阴凉干燥处。

孕康合剂(孕康口服液)

Yunkang Heji

【处方】

山药	续断
黄芪	当归

附件六

Column temperature: A constant temperature of about 40°C.

Mobile phase: A mixture of a solution of sodium lauryl sulfate (1 in 130), acetonitrile and phosphoric acid (650:350:1).

Flow rate: 1.0 mL per minute (the retention time of ephedrine is about 27 minutes).

System suitability—

System performance: Dissolve 1 mg each of ephedrine hydrochloride for assay and pseudoephedrine hydrochloride in diluted methanol (1 in 2) to make 10 mL. When the procedure is run with 10 μL of this solution under the above operating conditions, pseudoephedrine and ephedrine are eluted in this order with the resolution between these peaks being not less than 1.5.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the relative standard deviation of the peak area of ephedrine is not more than 1.5%.

(2) Peoniflorin—Weigh accurately about 0.5 g of the dry extract (or an amount of the viscous extract, equivalent to about 0.5 g of the dried substance), add exactly 50 mL of diluted methanol (1 in 2), shake for 15 minutes, and filter. Pipet 5 mL of the filtrate, flow through in a column packed with 2 g of polyamide for column chromatography, elute with water to make exactly 20 mL of eluate, and use this as the sample solution. Separately, weigh accurately about 10 mg of Peoniflorin RS (separately determine the water), and dissolve in diluted methanol (1 in 2) to make exactly 100 mL. Pipet 5 mL of this solution, add diluted methanol (1 in 2) to make exactly 20 mL, and use this solution as the standard solution. Perform the test with exactly 10 μL each of the sample solution and standard solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions, and determine the peak areas, A_T and A_S, of peoniflorin in each solution.

$$\text{Amount (mg) of peoniflorin } (C_{23}H_{28}O_{11}) = M_S \times A_T/A_S \times 1/2$$

M_S: Amount (mg) of Peoniflorin RS, calculated on the anhydrous basis

Operating conditions—

Detector: An ultraviolet absorption photometer (wavelength: 232 nm).

Column: A stainless steel column 4.6 mm in inside diameter and 15 cm in length, packed with octadecylsilanized silica gel for liquid chromatography (5 μm in particle diameter).

Column temperature: A constant temperature of about 20°C.

Mobile phase: A mixture of water, acetonitrile and phosphoric acid (850:150:1).

Flow rate: 1.0 mL per minute (the retention time of peoniflorin is about 9 minutes).

System suitability—

System performance: Dissolve 1 mg each of Peoniflorin RS and albiflorin in diluted methanol (1 in 2) to make 10 mL. When the procedure is run with 10 μL of this solution under the above operating conditions, albiflorin and peoniflorin are eluted in this order with the resolution between these peaks being not less than 2.5.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the relative standard deviation of the peak area of peoniflorin is not more than 1.5%.

(3) Glycyrrhizic acid—Weigh accurately about 0.5 g of the dry extract (or an amount of the viscous extract, equivalent to about 0.5 g of the dried substance), add exactly 50 mL of diluted methanol (1 in 2), shake for 15 minutes, filter, and use the filtrate as the sample solution. Separately, weigh accurately about 10 mg of Glycyrrhizic Acid RS (separately determine the water), dissolve in diluted methanol (1 in 2) to make exactly 100 mL, and use this solution as the standard solution. Perform the test with exactly 10 μL each of the sample solution and standard solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions, and determine the peak areas, A_T and A_S, of glycyrrhizic acid in each solution.

$$\text{Amount (mg) of glycyrrhizic acid } (C_{42}H_{62}O_{16}) = M_S \times A_T/A_S \times 1/2$$

M_S: Amount (mg) of Glycyrrhizic Acid RS, calculated on the anhydrous basis

Operating conditions—

Detector: An ultraviolet absorption photometer (wavelength: 254 nm).

Column: A stainless steel column 4.6 mm in inside diameter and 15 cm in length, packed with octadecylsilanized silica gel for liquid chromatography (5 μm in particle diameter).

Column temperature: A constant temperature of about 40°C.

Mobile phase: A mixture of diluted acetic acid (31) (1 in 15) and acetonitrile (13:7).

Flow rate: 1.0 mL per minute (the retention time of glycyrrhizic acid is about 12 minutes).

System suitability—

System performance: When the procedure is run with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the number of theoretical plates and the symmetry factor of the peak of glycyrrhizic acid are not less than 5000 and not more than 1.5, respectively.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the relative standard deviation of the peak area of glycyrrhizic acid is not more than 1.5%.

Containers and storage Containers—Tight containers.

Kamishoyosan Extract

加味逍遙散エキス

Kamishoyosan Extract contains not less than 28 mg and not more than 84 mg of peoniflorin ($C_{23}H_{28}O_{11}$: 480.46), not less than 25 mg and not more than 75 mg of geniposide, and not less than 12 mg and not more than 36 mg (for preparation prescribed 1.5 g of Glycyrrhiza) or not less than 16 mg and not more than 48 mg (for preparation prescribed 2 g of Glycyrrhiza) of glycyrrhizic acid ($C_{42}H_{62}O_{16}$: 822.93), per extract prepared with the amount specified in the Method of preparation.

Method of preparation

	1)	2)	3)	4)	5)	6)
Japanese Angelica Root	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
Peony Root	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
Atractylodes Rhizome	3 g	—	3 g	—	3 g	3 g
Atractylodes Lancea Rhizome	—	3 g	—	3 g	—	—
Poria Sclerotium	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
Bupleurum Root	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
Moutan Bark	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Gardenia Fruit	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Glycyrrhiza	2 g	2 g	1.5 g	1.5 g	1.5 g	1.5 g
Ginger	1 g	1 g	1 g	1 g	1.5 g	0.5 g
Mentha Herb	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g

Prepare a dry extract or viscous extract as directed under Extracts, according to the prescription 1) to 6), using the crude drugs shown above.

Description Kamishoyosan Extract occurs as a yellow-brown to blackish brown powder or viscous extract. It has slightly a characteristic odor, and a sweet, slightly hot, then bitter taste.

Identification **(1)** To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of water, shake, then add 5 mL of diethyl ether, shake, centrifuge, and use the supernatant liquid as the sample solution. Separately, dissolve 1 mg of (Z)-ligustilide for thin-layer chromatography in 10 mL of methanol, and use this solution as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography <2.03>. Spot 10 μL each of the sample solution and standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography. Develop the plate with a mixture of ethyl acetate and hexane (1:1) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Examine under ultraviolet light (main wavelength: 365 nm): one of the spot among the several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the bluish white fluorescent spot from the standard solution (Japanese Angelica Root).

(2) To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of water, shake, then add 5 mL of 1-butanol, shake, centrifuge, and use the supernatant liquid as the sample solution. Separately, dissolve 1 mg of albiflorin in 1 mL of methanol, and use this solution as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography <2.03>. Spot 10 μL each of the sample solution and standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography. Develop the plate with a mixture of ethyl acetate, methanol and ammonia solution (28) (6:3:2) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Spray evenly 4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid TS on the plate, heat at 105°C for 5 minutes, and examine under ultraviolet light (main wavelength: 365 nm): one of the spot among the several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the orange fluorescent spot from the standard solution (Peony Root).

(3) For preparation prescribed Atractylodes Rhizome—To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of water, shake, then add 5 mL of diethyl ether, shake, centrifuge, and use the supernatant liquid as the sample solution. Separately, dissolve 1 mg of atractylenolide III for thin-layer chromatography in 1 mL of methanol, and use this solution as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography <2.03>. Spot 10 μL each of the sample solution and standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography. Develop the plate with a mixture of ethyl acetate and hexane (1:1) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Spray evenly 1-naphthol-sulfuric acid TS on the plate, heat at 105°C for 5 minutes, and allow to cool: one of the spot among the several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the red spot from the standard solution (Atractylodes Rhizome).

(4) For preparation prescribed Atractylodes Lancea Rhizome—To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of water, shake, then add 25 mL of hexane, and shake. Take the hexane layer, add anhydrous sodium sulfate to dry, and filter. Evaporate the filtrate under reduced pressure, add 2 mL of hexane to the residue, and use this solution as the sample solution. Perform the test with the sample solution as directed under Thin-layer Chromatography <2.03>. Spot 20 μL of the sample solution on a plate of silica gel with fluorescent indicator for thin-layer chromatography, develop the plate with a mixture of hexane and acetone (7:1) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Examine under ultraviolet light (main wavelength: 254 nm): a dark purple spot is observed at an *Rf* value of about 0.4. The spot shows a greenish brown color after being sprayed 4-dimethylaminobenzaldehyde TS for spraying, heated at 105°C for 5 minutes, and allowed to cool (Atractylodes Lancea Rhizome).

(5) To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of sodium hydroxide TS, shake, then add 5 mL of 1-butanol, shake, centrifuge, and use the supernatant liquid as the sample solution. Separately, dissolve 1 mg of saikosaponin b_2 for thin-layer chromatography in 1 mL of methanol, and use this solution as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography <2.03>. Spot 10 μL of the sample solution and 2 μL of the standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography. Develop the plate with a mixture of ethyl acetate, ethanol (99.5) and water (8:2:1) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Spray evenly 4-dimethylaminobenzaldehyde TS on the plate: one of the spot among the several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the red spot from the standard solution (Bupleurum Root).

(6) To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of water, shake, then add 15 mL of diethyl ether, and shake. Take the diethyl ether layer, evaporate the layer under reduced pressure, add 1 mL of diethyl ether to the residue, and use this solution as the sample solution. Separately, dissolve 1 mg of peonol for thin-layer chromatography in 1 mL of methanol, and use this solution as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography <2.03>. Spot 10 μL each of the sample solution and standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography, develop the plate with a mixture of hexane and diethyl ether (5:3) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Spray evenly 4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid TS on the plate, and heat at 105°C for 5 minutes: one of the spot among the

several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the orange spot from the standard solution (Moutan Bark).

(7) To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of water, shake, then add 5 mL of 1-butanol, shake, centrifuge, and use the supernatant liquid as the sample solution. Separately, dissolve 1 mg of geniposide for thin-layer chromatography in 1 mL of methanol, and use this solution as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography *<2.03>*. Spot 10 μL each of the sample solution and standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography. Develop the plate with a mixture of ethyl acetate, methanol and ammonia solution (28) (6:3:2) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Spray evenly 4-methoxybenzaldehide-sulfric acid TS on the plate, and heat at 105°C for 5 minutes: one of the spot among the several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the purple spot from the standard solution (Gardenia Fruit).

(8) To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of water, shake, then add 5 mL of 1-butanol, centrifuge, and use the supernatant liquid as the sample solution. Separately, dissolve 1 mg of liquiritin for thin-layer chromatography in 1 mL of methanol, and use this solution as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography *<2.03>*. Spot 10 μL of the sample solution and 5 μL of the standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography. Develop the plate with a mixture of ethyl acetate, methanol and water (20:3:2) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Spray evenly dilute sulfuric acid on the plate, and heat at 105°C for 5 minutes: one of the spot among the several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the yellow-brown spot from the standard solution (Glycyrrhiza).

(9) To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of water, shake, then add 5 mL of diethyl ether, centrifuge, and use the supernatant liquid as the sample solution. Separately, dissolve 1 mg of [6]-gingerol for thin-layer chromatography in 1 mL of methanol, and use this solution as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography *<2.03>*. Spot 10 μL each of the sample solution and standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography. Develop the plate with a mixture of ethyl acetate and hexane (1:1) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Spray evenly 4-dimethylaminobenzaldehyde TS for spraying on the plate, heat at 105°C for 5 minutes, and allow to cool: one of the spot among the several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the blue-green spot from the standard solution (Ginger).

(10) To 2.0 g of the dry extract (or 6.0 g of the viscous extract) add 10 mL of diluted phosphoric acid (1 in 30), shake, then add 15 mL of ethyl acetate, shake, centrifuge, and use the supernatant liquid as the sample solution. Separately, shake 0.2 g of pulverized Mentha Herb with 10 mL of diluted phosphoric acid (1 in 30), add 15 mL of ethyl acetate, shake, centrifuge, and use the supernatant liquid as the standard solution. Perform the test with these solutions as directed under Thin-layer Chromatography *<2.03>*. Spot 10 μL each of the sample solution and standard solution on a plate of silica gel for thin-layer chromatography. Develop the plate with a mixture of ethyl acetate, water and formic acid (10:1:1) to a distance of about 10 cm, and air-dry the plate. Spray evenly vanillin-sulfuric acid TS on the plate, heat at 105°C for 5 minutes, and allow to cool: one of the spot among the several spots from the sample solution has the same color tone and *Rf* value with the red-purple spot (around *Rf* 0.6) from the standard solution (Mentha Herb).

Purity **(1)** Heavy metals *<1.07>*—Prepare the test solution with 1.0 g of the dry extract (or an amount of the viscous extract, equivalent to 1.0 g of the dried substance) as directed in the Extracts (4), and perform the test (not more than 30 ppm).

(2) Arsenic *<1.11>*—Prepare the test solution with 0.67 g of the dry extract (or an amount of the viscous extract, equivalent to 0.67 g of the dried substance) according to Method 3, and perform the test (not more than 3 ppm).

Loss on drying *<2.41>* The dry extract: Not more than 9.0% (1 g, 105°C, 5 hours).

The viscous extract: Not more than 66.7% (1 g, 105°C, 5 hours).

Total ash *<5.01>* Not more than 10.0%, calculated on the dried basis.

Assay **(1)** Peoniflorin—Weigh accurately about 0.5 g of the dry extract (or an amount of the viscous extract, equivalent to about 0.5 g of the dried substance), add exactly 50 mL of diluted methanol (1 in 2), shake for 15 minutes, filter, and use the filtrate as the sample solution. Separately, weigh accurately about 10 mg of Peoniflorin RS (separately determine the water), and dissolve in diluted methanol (1 in 2) to make exactly 100 mL, and use this solution as the standard solution. Perform the test with exactly 10 μL each of the sample solution and standard solution as directed under Liquid Chromatography *<2.01>* according to the following conditions, and determine the peak areas, A_T and A_S, of peoniflorin in each solution.

$$\text{Amount (mg) of peoniflorin } (C_{23}H_{28}O_{11}) = M_S \times A_T/A_S \times 1/2$$

M_S: Amount (mg) of Peoniflorin RS, calculated on the anhydrous basis

Operating conditions—

Detector: An ultraviolet absorption photometer (wavelength: 232 nm).

Column: A stainless steel column 4.6 mm in inside diameter and 15 cm in length, packed with octadecylsilanized silica gel for liquid chromatography (5 μm in particle diameter).

Column temperature: A constant temperature of about 20°C.

Mobile phase: A mixture of water, acetonitrile and phosphoric acid (850:150:1).

Flow rate: 1.0 mL per minute (the retention time of peoniflorin is about 9 minutes).

System suitability—

System performance: Dissolve 1 mg each of Peoniflorin RS and albiflorin in diluted methanol (1 in 2) to make 10 mL. When the procedure is run with 10 μL of this solution under the above operating conditions, albiflorin and peoniflorin are eluted in this order with the resolution between these peaks being not less than 2.5.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the relative standard deviation of the peak area of peoniflorin is not more than 1.5%.

(2) Geniposide—Weigh accurately about 0.5 g of the dry extract (or an amount of the viscous extract, equivalent to about 0.5 g of the dried substance), add exactly 50 mL of diluted methanol (1 in 2), shake for 15 minutes, filter, and use the filtrate as the sample solution. Separately, weigh accurately about 10 mg of geniposide for assay, previously dried in a desiccator (in vacuum, phosphorous (V) oxide) for 24 hours, dissolve in diluted methanol (1 in 2) to make exactly 100 mL, and use this solution as the standard solution. Perform the test with exactly 10 μL each of the sample solution and standard solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions, and determine the peak areas, A_T and A_S, of geniposide in each solution.

$$\text{Amount (mg) of geniposide} = M_S \times A_T/A_S \times 1/2$$

M_S: Amount (mg) of geniposide for assay

Operating conditions—

Detector: An ultraviolet absorption photometer (wavelength: 240 nm).

Column: A stainless steel column 4.6 mm in inside diameter and 15 cm in length, packed with octadecylsilanized silica gel for liquid chromatography (5 μm in particle diameter).

Column temperature: A constant temperature of about 40°C.

Mobile phase: A mixture of water, acetonitrile and phosphoric acid (900:100:1).

Flow rate: 1.0 mL per minute (the retention time of geniposide is about 10 minutes).

System suitability—

System performance: When the procedure is run with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the number of theoretical plates and the symmetry factor of the peak of geniposide are not less than 5000 and not more than 1.5, respectively.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the relative standard deviation of the peak area of geniposide is not more than 1.5%.

(3) Glycyrrhizic acid—Weigh accurately about 0.5 g of the dry extract (or an amount of the viscous extract, equivalent to about 0.5 g of the dried substance), add exactly 50 mL of diluted methanol (1 in 2), shake for 15 minutes, filter, and use the filtrate as the sample solution. Separately, weigh accurately about 10 mg of Glycyrrhizic Acid RS (separately determine the water), dissolve in diluted methanol (1 in 2) to make exactly 100 mL, and use this solution as the standard solution. Perform the test with exactly 10 μL each of the sample solution and standard solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions, and determine the peak areas, A_T and A_S, of glycyrrhizic acid in each solution.

$$\text{Amount (mg) of glycyrrhizic acid } (C_{42}H_{62}O_{16}) = M_S \times A_T/A_S \times 1/2$$

M_S: Amount (mg) of Glycyrrhizic Acid RS, calculated on the anhydrous basis

Operating conditions—

Detector: An ultraviolet absorption photometer (wavelength: 254 nm).

Column: A stainless steel column 4.6 mm in inside diameter and 15 cm in length, packed with octadecylsilanized silica gel for liquid chromatography (5 μm in particle diameter).

Column temperature: A constant temperature of about 40°C.

Mobile phase: A mixture of diluted acetic acid (31) (1 in 15) and acetonitrile (13:7).

Flow rate: 1.0 mL per minute (the retention time of glycyrrhizic acid is about 12 minutes).

System suitability—

System performance: When the procedure is run with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the number of theoretical plates and the symmetry factor of the peak of glycyrrhizic acid are not less than 5000 and not more than 1.5, respectively.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 10 μL of the standard solution under the above operating conditions, the relative standard deviation of the peak area of glycyrrhizic acid is not more than 1.5%.

Containers and storage Containers—Tight containers.

Keishibukuryogan Extract

桂枝茯苓丸エキス

Keishibukuryogan Extract contains not less than 0.6 mg and not more than 2.4 mg (for preparation prescribed 3 g of Cinnamon Bark) or not less than 0.8 mg and not more than 3.2 mg (for preparation prescribed 4 g of Cinnamon Bark) of (*E*)-cinnamic acid, not less than 30 mg and not more than 90 mg (for preparation prescribed 3 g each of Moutan Bark and Peony Root) or not less than 40 mg and not more than 120 mg (for preparation prescribed 4 g each of Moutan Bark and Peony Root) of peoniflorin ($C_{23}H_{28}O_{11}$: 480.46), and not less than 21 mg and not more than 63 mg (for preparation prescribed 3 g of Peach Kernel) or not less than 28 mg and not more than 84 mg (for preparation prescribed 4 g of Peach Kernel) of amygdalin, per extract prepared with the amount specified in the Method of preparation.

Method of preparation

	1)	2)
Cinnamon Bark	4 g	3 g
Poria Sclerotium	4 g	3 g
Moutan Bark	4 g	3 g
Peach Kernel	4 g	3 g
Peony Root	4 g	3 g

Prepare a dry extract or viscous extract as directed under Extracts, according to the prescription 1) using the crude drugs shown above, or prepare a dry extract by adding Light Anhydrous Silicic Acid to an extrative, prepared as directed under Extracts, according to the prescription 2), using the crude drugs shown above.

Description Keishibukuryogan Extract is a light brown to

附件七、法規名稱：中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項

時間：中華民國 084 年 05 月 04 日

一、配合促進中藥發展計畫，提升中藥製藥工業水準，及為確保中藥製劑品質之均一，中藥濃縮製劑依本署 79 年 12 月 3 日衛署藥字第九０一二六六號公告所規定之各檢驗項目外，必須制訂指標成分之定量法及規格。

二、指標成分係指為確保中藥濃縮製劑半製品、成品與標準湯劑具有同等性而做為定量指標之成分。指標成分之選擇以具有生理活性成分為原則，若其生理活性成分無法測定者，可另設定其他定量之成分。

三、標準湯劑係以處方一日量藥材加二十倍量水，煮沸 30 分鐘以上，直至煎煮液為原加入水之半量之湯液謂標準湯劑。

四、每一處方中應選擇來自不同原料藥材之二種以上指標成分予以定量。

五、一日量製劑之指標成分之規格範圍應為標誌量之±50%以內，且其**規格範圍之下限值不得低於標準湯劑下限值之 70%**。該值由業者依多批次原料藥材及標準湯劑之移行率自行設定之。

六、業者制定第五項所列之製劑規格範圍報本署時，應提出至少三組不同批次原料藥材所調製之標準湯劑及成品指標成分定量之數據及層析圖譜，每組數據係為分析三次之平均值。

七、指標成分定量方法及規格中應檢附之資料應包括下列各項：

(一) 檢液之分配製及計算式。

(二) 標準品溶液之配製法及標準曲線之製作（含線性迴歸方程式，Y＝mx＋b,及相關係數）。

(三) 高效液相層析條件（含層析管、移動相、流速、檢測器及注入量）。

(四) 高效液相層析圖譜（含標準湯劑，其對照空白湯劑及成品製劑）。

(五) 使用精確度類似之儀器時檢附資料比照上列項目。

八、 單味濃縮製劑亦應比照上列有關注意事項定量一種以上之指標成分，惟經本署認定可免除者不在此限。

附件八、加味逍遙散 濃縮顆粒(散)

【處方】

當歸 4.0g，白朮 4.0g，白芍 4.0g，柴胡 4.0g，茯苓 4.0g，炙甘草 2.0g，牡丹皮 2.5g，山梔子 2.5g，煨薑 4.0g，薄荷 2.0g (基準方 第 40 方)

【TLC 鑑別】

檢品溶液之配製——取相當於一日飲片量之二分之一本品粉末，加甲醇 50mL，於超音波震盪 30 分鐘後過濾，取濾液濃縮至快乾，加甲醇溶解並定容到 10mL，作為檢品溶液。

(1) 當歸：(參考 CSZ)

取當歸藥材粉末 2.0g，加甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液 10μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用正己烷：乙酸乙酯=4：1 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，於 UV366nm 進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一螢光斑點的顏色及 R_f 值（約 0.5 處）與對照藥材溶液所顯現的藍色螢光斑點相符合。

(2) 白朮：（參考 CSZ）

取白朮藥材粉末 2.0g，加甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液 10μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用正己烷：乙酸乙酯=4：1 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 20%稀硫酸之乙醇溶液，以 105℃加熱 2~5 分鐘，然後於 UV366nm 進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一螢光斑點的顏色及 R_f 值（約 0.3 處）與對照藥材溶液所顯現的藍白色螢光斑點相符合。

(3) 白芍及牡丹皮：(參考 ST)

取白芍藥材粉末 2.0g，加甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，以甲醇定容至 10.0 mL，作為白芍對照藥材溶液。另取牡丹皮藥材粉末 1.3g，加甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，以甲醇定容至 10.0 mL，作為牡丹皮對照藥材溶液。分別取檢品溶液、白芍對照藥材溶液與牡丹皮對照藥材溶液各 5μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇=2：1：2 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 Vanillin/ H_2SO_4 TS，以 105℃加熱 2~5 分鐘後進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 R_f 值（約 0.68 處）與對照藥材溶液所顯現的紫色點相符合。

(4) 柴胡：(參考 CSZ)

取柴胡藥材粉末 2.0g，加 70%甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以 70%甲醇定容至 10mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液 5μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用二氯甲烷：甲醇：水=13：7：2.5 下層液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 20%稀硫酸之乙醇溶液，以 105℃加熱 2~5 分鐘後進行檢視，在檢品溶液之多個顯色點中有一色點的顏色及 R_f 值（約 0.3 處）與對照標準品溶液所顯現的褐色色點相符合。

(5) 炙甘草：(參考 ST)

取炙甘草藥材粉末 1.0g，加甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 5μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇=4：1：2 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 20%稀硫酸之乙醇溶液，以 105℃加熱 2~5 分鐘後進行檢視，在檢品溶液之多個顯色點中有一黃色色點的顏色及 R_f 值（約 0.2 處）與對照標準品溶液所顯現的黃色色色點相符合。

(6) 山梔子：(參考 ST)

取山梔子藥材粉末 1.3g，加甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10.0 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 5μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇=2：1：2 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 Vanillin/ H_2SO_4 TS，以 105℃加熱 2~5 分鐘後進行檢

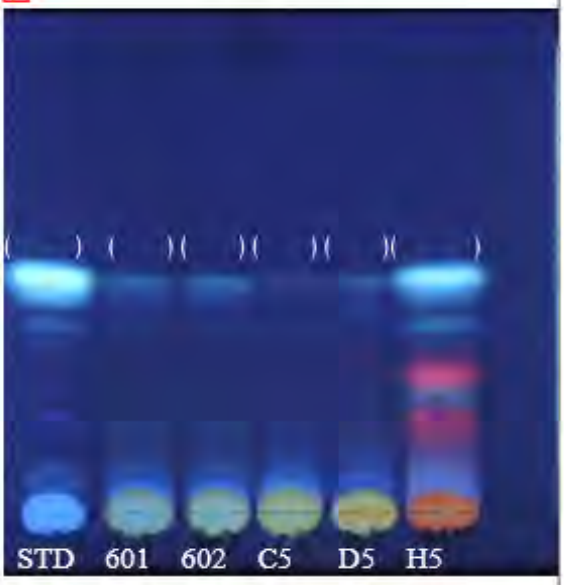
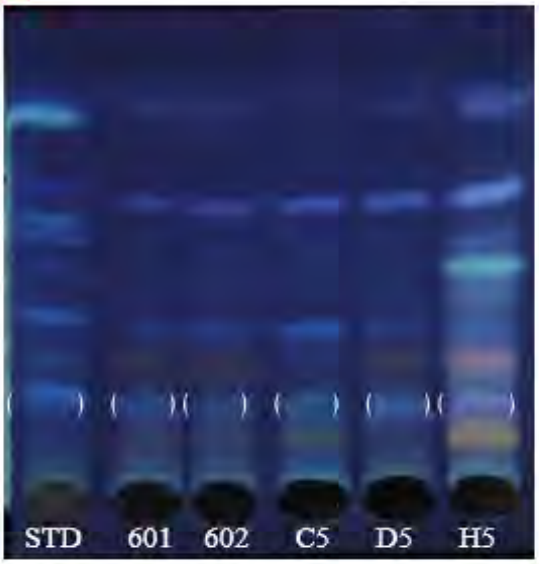
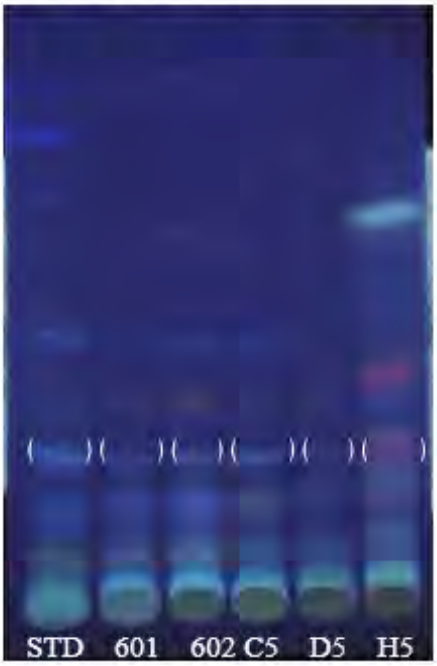
視；在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 R_f 值（約 0.63 處）與對照藥材溶液所顯現的紫色色點相符合。

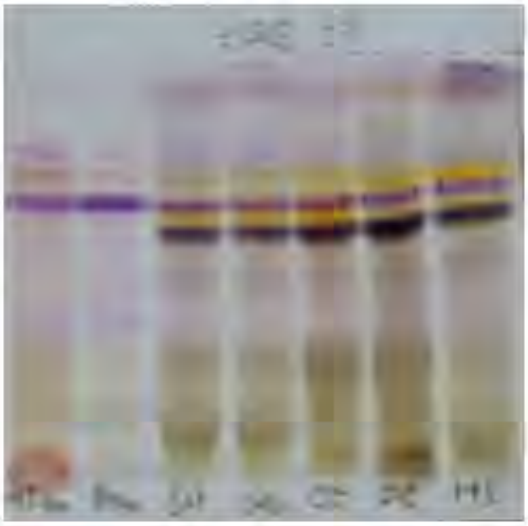
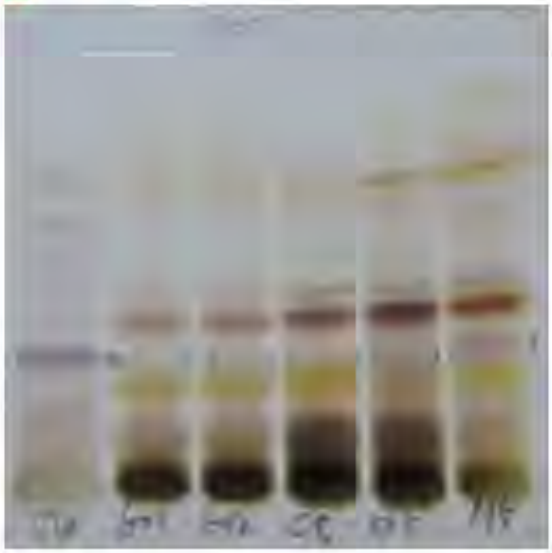
(7) 煨薑：(參考 CSZ)

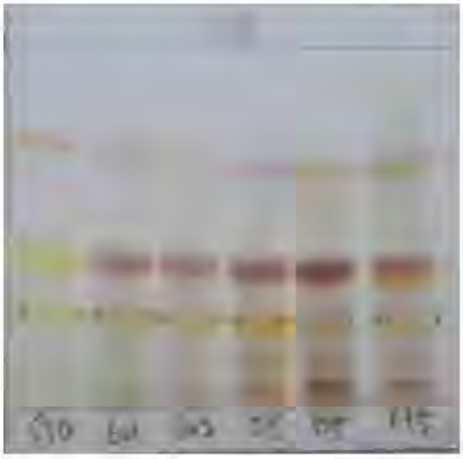
取煨薑藥材粉末 2.0g，加 70％甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以 70％甲醇定容至 10mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 10uL，點注於矽膠薄層層析板上；使用二氯甲烷：丙酮=9：1 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10cm 左右，取出風乾，均勻噴灑 Vanillin/ H_2SO_4 TS，以 105℃加熱 2~5 分鐘後進行檢視。在檢品溶液之多個顯色點中有一藍紫色點的顏色及 R_f 值（約 0.45 處）與對照藥材溶液所顯現的藍紫色色點相符合。

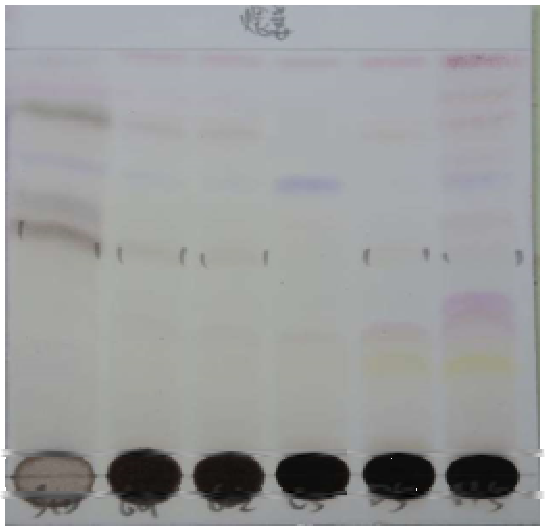
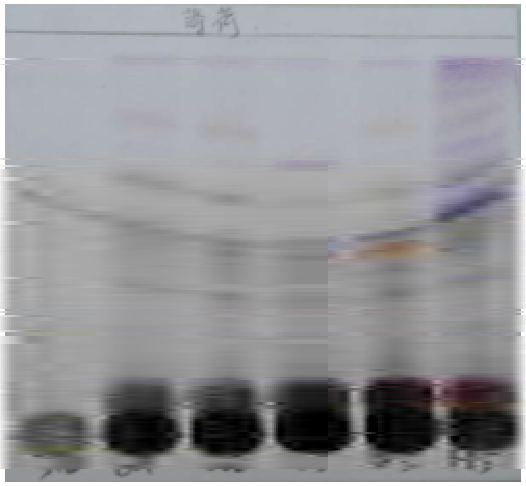
(8) 薄荷：(參考 CSZ)

取薄荷藥材粉末 1.0g，加甲醇 10mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10.0 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 5μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用二氯甲烷：甲醇=9：1 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 p-Anisaldehyde/ H_2SO_4 TS，以 105℃加熱 2~5 分鐘後進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一藍色色點及 R_f 值（約 0.5 處）與對照藥材溶液所顯現的藍色色點相符合。

	方法	方法
當歸	☑ 	
展開溶媒	正己烷：乙酸乙酯＝4：1	氯仿
檢出方法	UV 366nm	UV 366nm
規格	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.4 處有藍白色螢光斑點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.45 處有藍白色螢光斑點。
結果	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.52 處有藍白色螢光斑點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.52 處有藍白色螢光斑點。
白朮	☑ 	
展開溶媒	正己烷：乙酸乙酯＝4：1	正己烷：乙酸乙酯＝4：1
檢出方法	20% H_2SO_4/EtOH T.S. Spray 於 105℃加熱後照 UV 366nm	H_2SO_4/EtOH(1：1) spray reagent，105℃加熱一分鐘→UV 366nm
規格	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.3 處有藍白色螢光斑點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.31 處有藍白色螢光斑點。
結果	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.24 處有藍白色螢光斑點。 Sample H5 出現干擾。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.28 處有藍白色螢光斑點。 Sample H5 出現干擾。

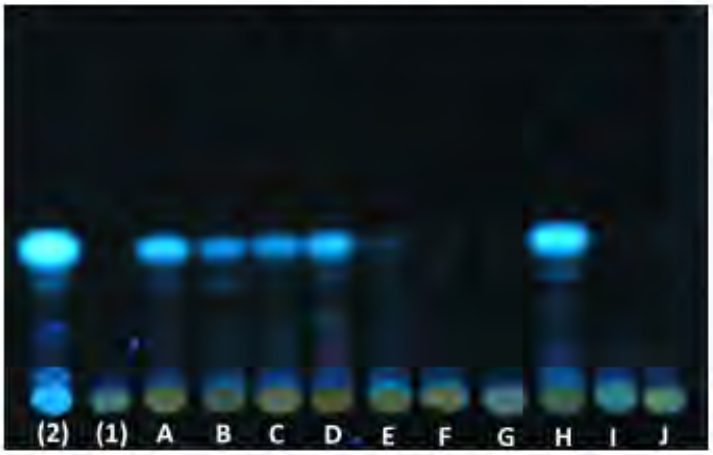
	方法	方法
牡丹皮、白芍		☑ 建議展開條件參照梔子 
展開溶媒	乙酸乙酯：甲醇：水＝8：2：1	正丁醇：4N 氨水：乙醇＝5：2：1
檢出方法	p-Anisaldehyde/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰。	Vanillin/H_2SO_4 (B) Spray reagent，105℃加熱兩分鐘。
規格	對照藥材溶液與檢品溶液 R_f 值約 0.5 處有紫色色點。	對照藥材溶液與檢液 R_f 值約 0.40 處有紫色色點。
結果	對照藥材溶液與檢品溶液 R_f 值約 0.68 處有紫色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液 R_f 值約 0.41 處有紫色色點。
柴胡	☑ 	
展開溶媒	二氯甲烷：甲醇：水＝13：7：2.5(下層液)	氯仿：甲醇：水＝30：10：1
檢出方法	20% H_2SO_4 /EOH T.S. spray 於 105℃加熱至顯色清晰。	p-Dimethylaminobenzaldehyde/H_2SO_4 T.S. spray，冷風吹乾。
規格	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.3 處有褐色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.39 處有粉紅色色點。
結果	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.31 處有褐色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.28 處有粉紅色色點。 此處粉紅色色點的位置與順天堂規格書

	方法	方法
炙甘草		☑ 
展開溶媒	二氯甲烷：甲醇：水＝13：7：2.5(下層液)	乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇＝4：1：2
檢出方法	Vanillin/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰。	20% H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱兩分鐘。
規格	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.3 處有橙黃色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.28 處有黃色色點。
結果	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.25 處有橙黃色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.17 處有黃色色點。
山梔子		☑ 
展開溶媒	乙酸乙酯：甲醇：水＝8：2：1	乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇＝2：1：2
檢出方法	p-Anisaldehyde/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰。	Vanillin/H_2SO_4 (B) Spray reagent，105℃加熱兩分鐘。
規格	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.4 處有暗紫色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.63 處有紫色色點。
結果	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.58 處有暗紫色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.64 處有紫色色點。

	方法	方法
烟薑 (建議刪除本項)		
展開溶媒	二氯甲烷：丙酮＝9：1	甲苯：丙酮＝4：1
檢出方法	Vanillin/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰。	Vanillin/H_2SO_4 (B) Spray reagent，105℃加熱兩分鐘。
規格	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.45 處有藍紫色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.4 處有藍色色點。
結果	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.5 處有藍紫色色點。 Sample C5 未出現此色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.45 處有藍色色點。
薄荷	☑ 	
展開溶媒	二氯甲烷：甲醇＝9：1	乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇＝4：1：2
檢出方法	p-Anisaldehyde/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰。	10% H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱兩分鐘→UV 366nm。
規格	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.5 處有藍色色點。	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.36 處有藍色螢光斑點。
結果	對照藥材溶液與檢品溶液於 R_f 值約 0.47 處有藍色色點。	對照藥材未出現此藍色螢光斑點，其餘於 R_f 值約 0.55 處有藍色螢光斑點。

加味逍遙散 TLC 分析結果比較

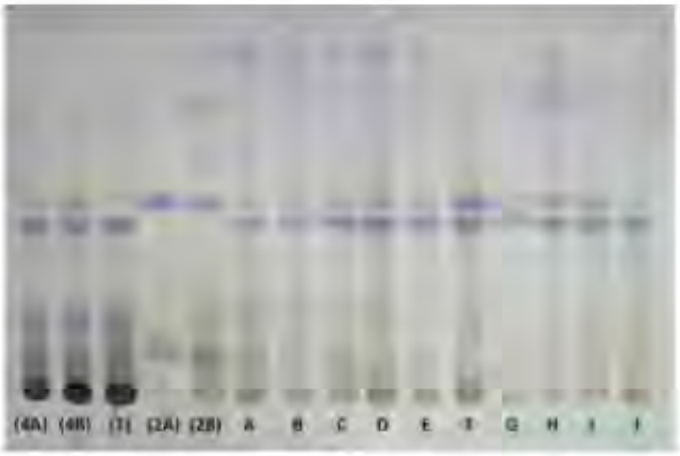
1. 當歸

分析條件	分析條件
	
氯仿	正己烷：乙酸乙酯＝4：1
UV 366nm	UV 366nm
對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.45 處有藍白色螢光斑點	對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.4 處有藍白色螢光斑點
代號說明: (1) 空白液　(2) 對照藥材　(3)　檢品　A~J 各家樣品	

2. 白朮

分析條件	分析條件
	
正己烷：乙酸乙酯＝4：1	
H_2SO_4/EtOH(1：1) spray reagent，105℃加熱一分鐘→UV 366nm	20% H_2SO_4/EtOH T.S. Spray 於 105℃加熱後照 UV 366nm
對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.31 處有藍白色螢光斑點	對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.3 處有藍白色螢光斑點
代號說明: (1) 空白液　(2) 對照藥材　(3)　檢品　A~J 各家樣品	

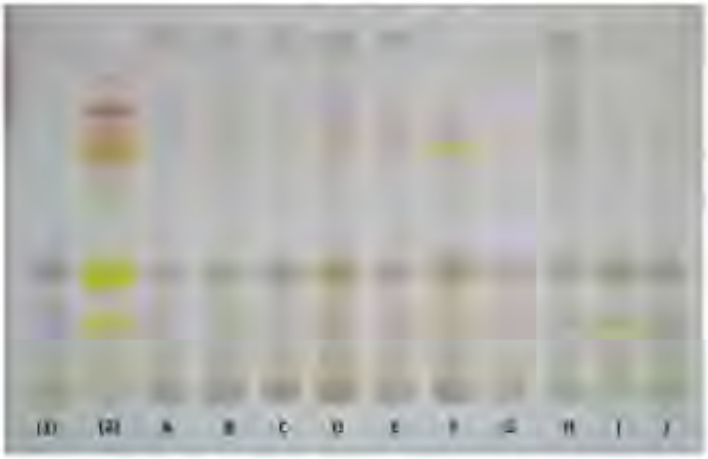
3. 白芍、牡丹皮

分析條件	分析條件
	
正丁醇：4N 氨水：乙醇＝5：2：1	乙酸乙酯：甲醇：水＝8：2：1
Vanillin/H_2SO_4 (B) Spray reagent，105℃加熱兩分鐘	*p*-Anisaldehyde/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰
對照藥材溶液與檢液 Rf 值約 0.40 處有紫色色點	對照藥材溶液與檢品溶液 Rf 值約 0.5 處有紫色色點
代號說明: (1) 空白液 (2A) 白芍藥材 (2B) 牡丹皮藥材 (3) 檢品 (4A) 去白芍 (4B) 去牡丹皮 A~J 各家樣品	

4. 柴胡

分析條件	分析條件
	
氯仿：甲醇：水＝30：10：1	二氯甲烷：甲醇：水＝13：7：2.5(下層液)
p-Dimethylaminobenzaldehyde/H2SO4 T.S. spray，冷風吹乾	*p*-Dimethylaminobenzaldehyde/H2SO4 T.S. spray 於 105℃加熱至顯色清晰
對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.39 處有粉紅色色點	對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.3 處有褐色色點
代號說明: (1) 空白液 (2) 對照藥材 (3) 檢品 A~J 各家樣品	

5. 炙甘草

分析條件	分析條件
	
乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇＝4：1：2	二氯甲烷：甲醇：水＝13：7：2.5(下層液)
20% H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱兩分鐘	Vanillin/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰
對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.28 處有黃色色點	對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.3 處有橙黃色色點
代號說明: (1) 空白液　(2) 對照藥材　(3)　檢品　A~J 各家樣品	

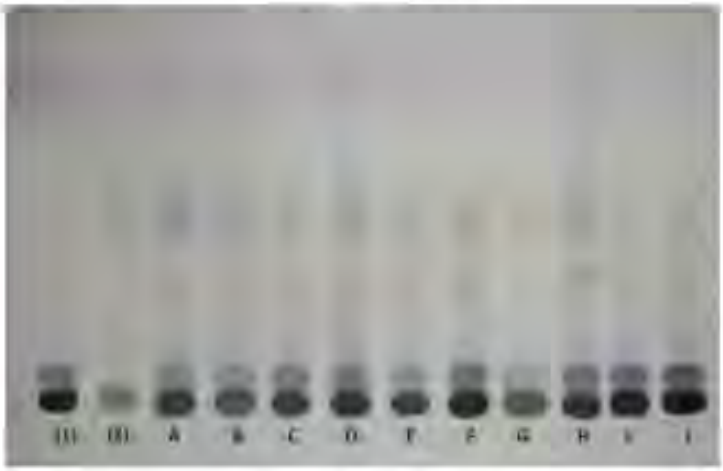
6. 山梔子

分析條件	分析條件
	
乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇＝2：1：2	乙酸乙酯：甲醇：水＝8：2：1
Vanillin/H_2SO_4 (B) Spray reagent，105℃加熱兩分鐘	*p*-Anisaldehyde/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰
對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.63 處有紫色色點	對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.4 處有暗紫色色點
代號說明: (1) 空白液　(2) 對照藥材　(3)　檢品　A~J 各家樣品	

7. 熾薑

分析條件	分析條件
	
甲苯：丙酮＝4：1	二氯甲烷：丙酮＝9：1
Vanillin/H_2SO_4 (B) Spray reagent，105℃加熱兩分鐘	Vanillin/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰
對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.4 處有藍色色點	對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.45 處有藍紫色色點
代號說明: (1) 空白液　(2) 對照藥材　(3)　檢品　A~J 各家樣品	

8. 薄荷

分析條件	分析條件
	
乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇＝4：1：2	二氯甲烷：丙酮＝9：1
10% H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱兩分鐘→UV 366nm。	*p*-Anisaldehyde/H_2SO_4 T.S. Spray 於 105℃加熱至顯色清晰
對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.36 處有藍色螢光斑點	對照藥材溶液與檢品溶液於 Rf 值約 0.5 處有藍色色點
代號說明: (1) 空白液　(2) 對照藥材　(3)　檢品　A~J 各家樣品	

衛生福利部臺灣中藥典第二版增補版

「中藥製劑」分小組第五次會議紀錄

時間：中華民國 105 年 03 月 22 日(二)下午 02 時 00 分

地點：衛生福利部 3 樓 302 會議室(台北市南港區忠孝東路 6 段 488 號)

主席：黃司長怡超 / 謝召集人明村

壹、主席致詞：(略)

貳、上次會議紀錄確認及追蹤辦理情形：

第四次(105 年 03 月 08 日)		
案由	決議	追蹤辦理情形
一、有關中藥濃縮製劑通則修正草案，提請討論。	中藥濃縮製劑通則前言彙整委員意見第三次修正草案提第五次會議討論。	提第五次會議討論
二、有關市售加味逍遙散濃縮製劑乾燥減重、總灰分測定結果，指標成分含量測定結果換算成每日含量及指標成分規格標示，提請討論。	一、建議加味逍遙散濃縮製劑乾燥減重比率以不得高於8%為標準。 二、建議加味逍遙散濃縮製劑總灰分依據個別製劑品項分別訂定。 三、標準湯劑須以符合《臺灣中藥典》指標成分規定且接近藥典規範值之藥材組成製作。 四、由五家認證實驗室以標準藥材組成加味逍遙散標準湯劑，每家實驗室以三批藥材各三重複，進行芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(Geniposide)每日量含量分析，並經國家中醫藥研究所確認，取得標準湯劑每日量之指標成分下限值及下限值之 70 %。 五、依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》第五點為依據，建立中藥濃縮製劑指標成分定量之標準操作程序，取得每日量平均值(標誌量)及其規格範圍(標誌量 ± 50 %)，如附件四，P.11-12，並將標誌量及其規格範圍與標準湯劑每日量指標成分下限值之 70 %比較，若標準湯劑每日量指標成分下限值之 70 %高於規格範圍之最低數值，則以標準湯劑每日量指標成分下限值之 70 %乘以兩倍為標誌量，標誌量 ± 50 %為規格範圍。	提第五次會議討論

三、有關加味逍遙散濃縮製劑TLC 鑑別方法修正案，提請討論。	一、將 TLC 鑑別的樣品取樣量由「一日使用量」修正為「相當一日飲片量的二分之一」。 二、請執行幹事協助 TLC 鑑別方法之確認，並於 105 年 03 月 17 日前提供鑑別結果。	提第五次會議討論

主席裁示：洽悉。

參、 討論事項：

案由一：有關臺灣中藥典收載加味逍遙散濃縮製劑指標成分規格標示，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第四次會議結論提出討論。

二、臺灣中藥典收載加味逍遙散濃縮製劑含量測定指標成分規格訂定原則：

三、製備標準湯劑使用之中藥材須符合《臺灣中藥典》指標成分規定之藥材製作。

四、由三家認證實驗室以標準藥材組成加味逍遙散標準湯劑，每家實驗室以三批藥材各三重複，進行芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(geniposide)每日量含量分析，並經國家中醫藥研究所確認，取得標準湯劑每日量之指標成分下限值及下限值之70 %，如附件一，P.8。

五、主持人自市售品購買十家廠商加味逍遙散市售濃縮製劑，盲樣分裝後送給五家認證實驗室進行芍藥苷(Paeoniflorin)及梔子苷(geniposide)每日量含量分析。最後依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》第五點(附件二，P.10)，建立中藥濃縮製劑指標成分定量之標準操作程序，取得每日量平均值(標誌量)及其規格範圍(標誌量 ± 50 %)，如附件一，P.8 - 9，並將標誌量及其規格範圍與標準湯劑每日量指標成分下限值之70 %比較，若標準湯劑每日量指標成分下限值之70 %高於規格範圍之最低數值，則以標準湯劑每日量指標成分下限值之70 %乘以兩倍為

標誌量，標誌量 ±50 %為規格範圍。計算方式舉例如下：

(一)指標成分 paeoniflorin 含量以成品平均值(65 mg/day)為標誌量，標誌量±50%為規格範圍(33~98 mg/day)，但標準湯劑下限值 70%為 49 mg/day，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(98 mg/day)，規格範圍須修正為 49 ~ 147mg/day (標誌量 ±50 %)。

(二)指標成分 geniposide 含量以成品平均值(71 mg/day)為標誌量，標誌量±50%為規格範圍(36~107 mg/day)，但標準湯劑下限值 70%為 53 mg/day，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(106 mg/day)，規格範圍須修正為 53~159 mg/day(標誌量 ± 50 %)。

決議：

一、 加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)標準湯劑指標成分含量分析結果，以三間實驗室以及國家中醫藥研究所數據取平均值，作為此次計畫的研究結果。

二、 製備標準湯劑所使用之藥材須符合《臺灣中藥典》規範。

三、 臺灣中藥典中藥濃縮製劑，以標準湯劑指標成分含量測定的下限值之 70 %為指標成分下限，為促進中藥製劑品質，不另訂定上限。

案由二：有關臺灣中藥典收載加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)乾燥減重及總灰分品質管制規範值，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、主持人自市售品購買十家市售廠商加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)，盲樣分裝後送給五家認證實驗室進行乾燥減重及總灰分測定，實驗結果如附件一，P.7。

二、中藥濃縮製劑的乾燥減重百分比，因不同劑型含水量不同而有所差異，加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)市售品此次抽樣結果為 4.36% (如附件一，P.7)。日本藥局方規定加味逍遙散浸膏乾

燥減重值不得高於 9.0%，中國藥典製劑通則規定加味逍遙散濃縮顆粒乾燥減重值不得高於 8%，建議加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)乾燥減重值以不得高於 8%為標準。

三、加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)的總灰分比率為 4.25 % (如附件一，P.7)。因不同劑型的組成不同而有所差異，建議依據各別製劑品項分別訂定。

決議：

一、加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散) 乾燥減重值，建議以不得高於 8%為標準，但仍需輔以水活性測定後再做定奪。

二、加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)總灰分比率會因賦形劑不同而改變，建議依不同製劑品項分別訂定。

案由三：有關臺灣中藥典收載加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散) TLC 鑑別方法修正案，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第四次會議結論提出討論。

二、加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散) TLC 鑑別方法修正案，請執行幹事協助確認，如附件三，P.11 - 13。

決議：

一、柴胡標準品柴胡皂苷 A (Saikosaponin A)容易於煎煮過程中變質，將標準品修改為柴胡皂苷 B2 (Saikosaponin B2)。

二、甘草標準品甘草苷(Liquiritin)含量會受到藥材品種及產地的影響，將標準品修改為甘草酸(Glycyrrhizic acid)。

三、「煨薑」有多種炮製方法：將生薑以綿紙包裹，水中浸透，置熱灰或滑石粉中煨至紙色焦黃去紙而得、或直接置於加熱的麥麩中而得。今臺灣市售品煨薑不易取得，且各藥廠要使用煨薑只能各司其法，標準不一。建議煨薑 TLC 檢驗刪除。

案由四：有關臺灣中藥典收載中藥濃縮製劑通則前言第三次修正草案，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、依中藥製劑分小組第四次會議結論提出討論。

二、中藥濃縮製劑通則前言第二次修正草案如附件四，P.14。

決議：整合委員建議，修改如附件四，P.14。

案由五：有關中藥濃縮製劑藥典收載規格內容，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：

一、 依中藥製劑分小組第三次會議結論，中藥濃縮製劑藥典收載格式內容如下：

1. 中文名
2. 英文名（漢語拼音、通用拼音）
3. 處方
4. 指標成分
5. 鑑別
6. 一般檢查及其他
   - [1] 乾燥減重
   - [2] 總灰分
   - [3] 酸不溶性灰分
   - [4] 總重金屬(放通則)
   - [5] 個別重金屬(放通則)
   - [6] 微生物限量(放通則)
7. 含量測定
   - [1] HPLC
   - [2] 水抽提物
   - [3] 稀乙醇抽提物
8. 效能
9. 適應症
10. 注意事項

決議：

一、中藥濃縮製劑的總重金金屬、個別重金屬、微生物檢測已有公告限值，建議於製劑通則中統一規範。

二、中藥濃縮製劑已是萃取產物，做水抽提物、稀醇抽提物含量測定的意義不明，建議刪除。

三、依中藥製劑分小組第五次會議結論，中藥濃縮製劑藥典收載格式內容如下：

1. 中文名
2. 英文名（漢語拼音、通用拼音）
3. 處方
4. 指標成分
5. 鑑別
6. 一般檢查及其他
   [1] 乾燥減重
   [2] 總灰分
7. 含量測定
   [1] HPLC
8. 效能
9. 適應症
10. 注意事項

案由六：有關臺灣中藥典收載加味逍遙散濃縮製劑規格內容，提請討論。

（提案單位：中藥製劑分小組）

說　明：臺灣中藥典收載加味逍遙散濃縮製劑規格內容草案如附件五，P.15 - 19。

決議：

一、中藥濃縮製劑的總重金金屬、個別重金屬、微生物檢測已有公告限值，建議於製劑通則中統一規範。

二、指標成分含量分析計算公式修改為每日量含量(mg/day)。

三、加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)英文名建議犯語拼音與通用拼音並列，修改如下：

1. 漢語拼音——Jaiwei Xiaoyao San Concentrantes granules
2. 通用拼音——Jiawei Siaoyao San Concentrantes granules

肆、 散會：十六點四十五分。

附件一、加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)分析結果

1. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之乾燥減重測定結果：

表一、乾燥減重測定結果（單位：w/w %）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	5.00	5.08	4.47	4.35	4.43	5.17	5.22	5.41	5.27	4.64	
實驗室二	4.37	4.47	4.14	4.11	4.04	4.55	4.80	4.88	4.56	4.37	
實驗室三	4.07	4.44	4.08	3.89	3.92	4.72	4.83	5.13	4.71	4.30	
實驗室四	3.41	3.33	3.21	3.42	3.47	4.21	4.4	4.03	3.96	3.62	
實驗室五	4.03	4.51	3.92	3.87	3.91	4.59	4.79	5.02	4.39	4.30	
Mean ±SD	4.18 ±0.52	4.37 ±0.57	3.96 ±0.42	3.93 ±0.31	3.96 ±0.31	4.65 ±0.31	4.81 ±0.26	4.89 ±0.47	4.58 ±0.43	4.24 ±0.34	4.36 ±0.34

〈註〉本品以 105℃乾燥 5 小時，其減重不得超過 Mean+SD (4.7 %)或 Mean+2SD(5.04 %)。

2. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之總灰份測定結果：

表二、總灰分分析結果（單位：w/w %）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	4.18	4.98	4.35	5.16	4.40	2.69	3.72	5.64	2.83	4.69	
實驗室二	4.13	4.90	4.30	5.08	4.32	2.65	3.35	5.42	2.67	4.56	
實驗室三	4.41	5.26	4.55	5.36	4.58	2.86	3.89	5.84	2.95	4.94	
實驗室四	4.17	4.96	4.38	5.1	4.41	2.75	3.3	5.56	2.78	4.69	
實驗室五	4.17	4.92	4.290	5.050	4.350	2.580	3.320	5.550	2.720	4.600	
Mean ±SD	4.21 ±0.10	5.00 ±0.13	4.38 ±0.09	5.15 ±0.11	4.41 ±0.09	2.70 ±0.09	3.52 ±0.24	5.60 ±0.14	2.79 ±0.10	4.70 ±0.13	4.25 ±0.92

〈註〉本品之總灰分不得超過 Mean+SD (5.17 %)或 Mean+2SD (6.09 %)。

3. 標準湯一批：分析結果以三重覆分析之平均值加減一個標準偏差表示；且每樣分析需執行注射三重複。(Mean±SD)

指標成份	Paeoniflorin(mg/day)	Geniposide(mg/day)
實驗室一	69.62 ± 0.20	83.06 ± 0.24
實驗室四	77.85 ± 1.40	96.56 ± 1.52
實驗室五	116.1±1.25	**76.31±0.86**
國家中醫藥研究所 1	**58.67 ±1.04**	89.11 ± 0.93
國家中醫藥研究所 2	91.08 ±1.66	113.94 ± 0.81
國家中醫藥研究所 3	74.18 ±1.33	96.32 ± 0.64
Mean ± SD	81.25 ± 18.34	92.55 ± 11.93
標準湯劑下限值之 70%	**58.67x0.7=39.67**	**76.31 x 0.7= 53.42**
規格範圍	**39.67～119.01**	**53.42～160.26**

〈註〉依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》規定：

(1)指標成分 paeoniflorin 含量不得少於**標準湯劑下限值**之 70 % (58.67x0.7=39.67mg/day)。

(2)指標成分 geniposide 含量不得少於**標準湯劑下限值**之 70 % (76x0.7= 53 mg/day)。

4. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之指標成分芍藥苷(paeoniflorin)每日量含量測定結果：

表三、芍藥苷(paeoniflorin)每日量含量測定結果（單位：mg/day）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	39.34	32.05	59.04	88.25	85.64	84.64	86.94	95.19	35.24	47.10	
實驗室二	36.81	29.62	54.77	80.89	77.71	76.38	82.71	88.28	33.43	44.14	
實驗室三	37.10	29.88	53.76	79.45	78.96	75.40	87.92	88.17	31.76	43.88	
實驗室四	44.10	33.30	64.08	97.35	98.16	93.96	102.69	113.58	36.24	50.65	
實驗室五	39.80	32.93	62.22	90.80	96.28	86.40	84.07	97.17	33.08	42.96	
Mean ±SD	39.43 ±2.62	31.55 ±1.53	58.77 ±4.03	87.35 ±6.58	87.35 ±8.52	83.36 ±6.86	88.87 ±7.16	96.48 ±9.28	33.95 ±1.60	45.75 ±2.82	65.29 ±24.58

〈註〉依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》規定：

指標成分 paeoniflorin 含量以成品平均值(65 mg/day)為標誌量，標誌量±50 %為規格範圍(33~98 mg/day)，但標準湯劑下限值 70 %為 39.67 mg/day (58.67x0.7)，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(79.34 mg/day)，規格範圍須修正為 39.67～119.01 mg/day，加味逍遙散濃縮製劑每日服用量 paeoniflorin 含量不 39.67 少於 49 mg/day。(3 家低於 39.67mg/day)

5. 加味逍遙散濃縮製劑市售十個樣品之指標成分梔子苷(geniposide)每日量含量測定結果：

表四、梔子苷(geniposide)每日量含量測定結果（單位：mg/day）

樣品編號 取樣數	樣品 一	樣品 二	樣品 三	樣品 四	樣品 五	樣品 六	樣品 七	樣品 八	樣品 九	樣品 十	
實驗室一	62.16	36.83	67.29	74.55	82.80	36.00	104.58	53.55	48.04	115.09	
實驗室二	67.85	39.71	72.18	79.81	82.47	39.49	116.36	61.26	53.12	124.41	
實驗室三	63.98	38.75	72.15	79.25	81.80	37.96	111.16	57.99	51.92	118.96	
實驗室四	64.16	38.10	71.82	78.60	85.92	38.16	115.92	58.50	50.88	116.61	
實驗室五	64.89	37.73	68.58	74.65	78.08	34.04	104.09	54.33	47.16	113.44	
Mean ±SD	64.61 ±1.85	38.22 ±0.97	70.40 ±2.06	77.37 ±2.29	82.21 ±2.51	37.13 ±1.91	110.42 ±5.30	57.13 ±2.84	50.22 ±2.27	117.70 ±3.81	70.54 ±26.05

〈註〉依《中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項》規定：

指標成分 geniposide 含量以成品平均值(71 mg/day)為標誌量，標誌量±50 %為規格範圍(36~107 mg/day)，但標準湯劑下限值 70 %為 53 mg/day (76*0.7)，因此標誌量須修正為標準湯劑下限值的兩倍(106 mg/day)，規格範圍須修正為 53~159 mg/day，加味逍遙散濃縮製劑每日服用量 geniposide 含量不得少於 53 mg/day。(3 家低於 53 mg/day)

附件二、法規名稱：中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項

中華民國 84 年 5 月 4 日行政院衛生署衛署訴字第 84024165 號

一、配合促進中藥發展計畫，提升中藥製藥工業水準，及為確保中藥製劑品質之均一，中藥濃縮製劑依本署 79 年 12 月 3 日衛署藥字第九0一二六六號公告所規定之各檢驗項目外，必須制訂指標成分之定量法及規格。

二、指標成分係指為確保中藥濃縮製劑半製品、成品與標準湯劑具有同等性而做為定量指標之成分。指標成分之選擇以具有生理活性成分為原則，若其生理活性成分無法測定者，可另設定其他定量之成分。

三、標準湯劑係以處方一日量藥材加二十倍量水，煮沸 30 分鐘以上，直至煎煮液為原加入水之半量之湯液謂標準湯劑。

四、每一處方中應選擇來自不同原料藥材之二種以上指標成分予以定量。

五、一日量製劑之指標成分之規格範圍應為標誌量之 ±50 %以內，且其規格範圍之下限值不得低於標準湯劑下限值之 70 %。該值由業者依多批次原料藥材及標準湯劑之移行率自行設定之。

六、業者制定第五項所列之製劑規格範圍報本署時，應提出至少三組不同批次原料藥材所調製之標準湯劑及成品指標成分定量之數據及層析圖譜，每組數據係為分析三次之平均值。

七、指標成分定量方法及規格中應檢附之資料應包括下列各項：

(一) 檢液之分配製及計算式。

(二) 標準品溶液之配製法及標準曲線之製作（含線性迴歸方程式，Y＝mx＋b,及相關係數）。

(三) 高效液相層析條件（含層析管、移動相、流速、檢測器及注入量）。

(四) 高效液相層析圖譜（含標準湯劑，其對照空白湯劑及成品製劑）。

(五) 使用精確度類似之儀器時檢附資料比照上列項目。

八、單味濃縮製劑亦應比照上列有關注意事項定量一種以上之指標成分，惟經本署認定可免除者不在此限。

附件三、加味逍遙散複方製劑建議之 TLC 成分鑑別項目 (105/03/29)

藥材	標準品	第 3 次會議		第 4 次會議	NRICM
		實驗室 A	實驗室 B	實驗室 C	實驗室 D
當歸	--	點注量: 5 µl 展開：EA: *n*-hex = 2：8 檢視: U.V. 366 nm	點注量: 5 µl 展開：EA：*n*-hex = 2：5 檢視: U.V. 366 nm →R_f值約 0.80，藍白色吸收斑點	點注量: 5 µl 展開：EA：*n*-hex = 1：4 檢視: U.V. 366 nm →R_f值約 0.5，藍白色吸收斑點 (同 lab A)	同 lab A 方法
白朮	白朮內酯 II (Atractylenolide II)	點注量: 5 µL 展開：EA：*n*-hex = 2：8 檢視： *p*-Anisaldehyde/H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘	點注量: 5 µL 展開：EA：*n*-hex = 2：5 檢視: 同 lab A →R_f值約 0.83，紫色色點	點注量: 5 µL 展開：EA：*n*-hex = 1：4 檢視: 20% H_2SO_4 /EtOH，105℃加熱 3 分鐘 →R_f值約 0.3，藍白色吸收斑點	同 lab C 方法 以標準品白朮內酯 II 標定 →R_f值約 0.4，藍白色吸收斑點
白芍	芍藥苷 (Paeoniflorin)	點注量: 10 µL 展開：*n*-BuOH：acetic acid：H_2O = 7：1：2 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘	點注量: 5 µL 展開：EA：MeOH：H_2O = 10：2：1 檢視: 同 lab A → R_f值約 0.65 處有紫色色點。	點注量: 5 µL 展開：EA：4N NH_4OH : EtOH = 2：1：2 檢視: Vanillin /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘 →R_f值約 0.68，有紫色色點	同 C 方法 以標準品芍藥苷標定
牡丹皮	芍藥苷 (Paeoniflorin)	點注量: 10 µL 展開：EA：*n*-hex = 1：4 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘	點注量: 5 µL 展開：EA：MeOH：H_2O = 10：2：1 檢視: 同 lab A → R_f值 0.59 處有紫色色點。	點注量: 5 µL 展開：EA：4N NH_4OH : EtOH = 2：1：2 檢視: Vanillin /H_2SO_4 spray reagent，105℃加熱 3 分鐘 →R_f值約 0.68，有紫色色點	同 C 方法 以標準品芍藥苷標定

藥材	標準品	第 3 次會議		第 4 次會議	NRICM
		實驗室 A	實驗室 B	實驗室 C	實驗室 D
山梔子	梔子苷 (Geniposide)	點注量: 5 μL 展開： EA：MeOH：氨水 = 6：3：2 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘	點注量: 5 μL 展開：EA：MeOH：H_2O = 10：2：1 檢視: 同 lab A→ R_f 值約 0.50，紫色色點	點注量: 5 μL 展開：EA：4N NH_4OH : EtOH = 2：1：2 檢視: Vanillin /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘 →R_f 值約 0.63，有紫色色點	同 C 方法 以標準品梔子苷標定
柴胡	--	點注量: 10 μL 展開：$CHCl_3$：MeOH：H_2O = 30：10：1 檢視: 2% *p*-Dimethylaminobenzaldehyde /40%H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘	點注量: 5 μL 展開：EA：MeOH：H_2O = 10：2：1 檢視: 同 lab A → R_f 值約 0.50，粉紅色色點	點注量: 5 μL 展開：CH_2Cl_2：MeOH：H_2O = 13：7：2.5 (下層液) 檢視: 20% H_2SO_4 /EtOH，105℃加熱 3 分鐘 →R_f 值約 0.3，有褐色色點	點注量: 10 μL 展開：先跑一次 CH_2Cl_2 → EtOAc : methyl ethyl ketone :formic acid:H_2O=5:3:1:1 檢視: 檢視: 2% *p*-Dimethylaminobenzaldehyde /40% H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘，顯色後在多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值(約 0.45 處)與對照藥材溶液所呈現的紫色色點相符合

藥材	標準品	第 3 次會議		第 4 次會議	NRICM
		實驗室 A	實驗室 B	實驗室 C	實驗室 D
炙甘草	甘草苷 (Liquiritin)	點注量: 5 μL 展開：$CHCl_3$：MeOH：H_2O = 15：7：2 取下層液 檢視: 20%H_2SO_4 /EtOH，105℃加熱 3 分鐘	點注量: 5 μL 展開： $CHCl_3$：MeOH：H_2O = 26：14：5 取下層液 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘 →R_f 值約 0.33，黃色色點	點注量: 5 μL 展開：EA：4N NH_4OH : EtOH = 4：1：2 檢視: 20% H_2SO_4 /EtOH，105℃加熱 3 分鐘 →R_f 值約 0.2，有黃色色點	以標準品甘草苷標定 點注量: 10 μL 展開：EA：4N NH_4OH : EtOH = 4：1：2 (同 C 方法) 檢視：1. UV 254 nm，R_f 值約 0.4，有一深褐吸收斑點 2. 20% H_2SO_4 /EtOH，105℃加熱 3 分鐘，R_f 值約 0.4，有黃褐色色點
	甘草酸 (Glycyrrhizic acid)				以標準品甘草酸標定 點注量: 10 μL 展開條件: EtOAc : methyl ethyl ketone :formic acid:H_2O=8:3:1:1 1. UV 254 nm，R_f 值約 0.25，有一吸收斑點 2. *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘，R_f 值約 0.25，有紫色色點
薄荷	--	點注量: 5 μL 展開：EA：*n*-hex = 1：4 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘	點注量: 5 μL 展開：EA：*n*-hex = 2：5 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘→R_f 值約 0.60，紫色色點	點注量: 5 μL 展開：CH_2Cl_2：MeOH= 9：1 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘→R_f 值約 0.5，有藍色色點	同 lab B 方法

藥材	標準品	第 3 次會議		第 4 次會議	NRICM
		實驗室 A	實驗室 B	實驗室 C	實驗室 D
煨薑	---	點注量: 10 μL 展開：$CHCl_3$：Acetone =19：1 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘	點注量: 5 μL 展開：Isopropylether：Acetone＝5：2 檢視: 同 lab A →R_f值約 0.70，紫色色點	點注量: 10 μL 展開：CH_2Cl_2：MeOH= 9：1 檢視: Vanillin/H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘 →R_f值約 0.5，有藍色色點	同 lab A 方法 展開：$CHCl_3$：Acetone =19：1 檢視: *p*-Anisaldehyde /H_2SO_4 TS，105℃加熱 3 分鐘，顯色後在多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值(約 0.33 處)與對照藥材溶液所呈現的紫色色點相符合

附件四、中藥濃縮製劑-製劑通則前言(草案)修正內容對照表

修正前(第四次會議)	修正後	說明
中藥濃縮製劑 -製劑通則前言(草案)	中藥濃縮製劑 -製劑通則前言(草案)	依第四次委員會議決議刪除部分文字
中藥濃縮製劑係由中藥材經煎煮或萃取、濃縮、乾燥，加工調製成各種劑型之製劑。依照藥材組成可分為單方製劑及複方製劑；依照劑型可分為散劑、顆粒劑、丸劑、錠劑、膜衣錠劑、膠囊劑等。	中藥濃縮製劑係由中藥材經煎煮或萃取、濃縮、乾燥，加工調製成各種劑型之製劑。依照藥材組成可分為單方製劑及複方製劑；依照劑型可分為散劑、顆粒劑、丸劑、錠劑、糖衣錠劑、膜衣錠劑、膠囊劑或其他衍生劑型等。	依委員建議增添並修改部分條文文字。
濃縮製劑以合併煎煮為原則，煎煮所抽出之浸膏，得以中華藥典收載之乳糖、澱粉等或經中央衛生主管機關核准之適當製劑輔助劑、及經抽提後所遺留之生藥殘渣細粉於 100 ℃乾燥為賦形劑予以調製。濃縮製劑微生物、重金屬、農藥殘留之限量，應依中央衛生主管機關公告之規定。	複方濃縮製劑以合併煎煮為原則。煎煮所抽出之浸膏，得以中華藥典收載之乳糖、澱粉等或經中央衛生主管機關核准之適當製劑輔助劑、賦形劑、及經抽提後所遺留之中藥乾燥殘渣、或製劑組成之部分中藥原末予以調製。濃縮製劑微生物、重金屬、農藥殘留之限量，應依中央衛生主管機關公告之規定。	1. 依第四次委員會議決議刪除部分條文文字。 2. 依委員建議修改增列中華藥典 4017 浸膏劑之規定部分條文。 3. 依委員建議增添並修改部分條文文字。

附件五、加味逍遙散濃縮製劑(顆粒、細粒、散)(草案)

Jaiwei Xiaoyao San Concentrated granules

Jiawei Siaoyao San Concentrated granules

出典:《證治準繩》

處方:當歸、白芍、白朮、茯苓、柴胡、煨薑各 4.0 g,牡丹皮、山梔子各 2.5 g,炙甘草、薄荷各 2.0 g,一日飲片量____。

本品以乾品計算,每日量含芍藥苷(paeoniflorin)不得少於____,梔子苷(geniposide)不得少於____。

鑑別:以當歸、白芍、白朮、柴胡、牡丹皮、山梔子、炙甘草、煨薑及薄荷等藥材當作成分鑑別之項目;以上藥材以表格中之藥材或標準品當作對照藥材或對照標準品。

檢品溶液之配製——取相當於一日飲片量之二分之一本品粉末,加甲醇 50 mL,於超音波震盪 30 分鐘後過濾,取濾液濃縮至快乾,加甲醇溶解並定容到 10 mL,作為檢品溶液。

加味逍遙散複方製劑建議之 TLC 成分鑑別項目:

當歸:

取本品粉末 5.0 g,加甲醇 15 mL,超音波振盪三十分鐘,過濾,取濾液作為檢品溶液。取當歸對照藥材 1.0 g,同法製成對照藥材溶液。取檢品溶液及對照藥材溶液各 5 μL,按薄層層析法(通則 1010.3),分別點注於含有螢光劑之矽膠薄層板上,以正己烷:乙酸乙酯 (80:20)混液為展開溶媒,層析之。

俟溶媒頂端上升至距原點約 5~10cm 時,取出層析板風乾後,於主波長 365 nm 之紫外燈照射下檢視之,檢品溶液與對照藥材溶液所呈現主斑點之色調及 Rf 值均一致。

白朮:

取白朮藥材粉末 2.0 g,加甲醇 10 mL,以超音波震盪 30 分鐘,過濾,

濾液以甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液 10 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用正己烷：乙酸乙酯 = 4：1 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 20%稀硫酸之乙醇溶液，以 105 ℃加熱 3 分鐘，然後於 UV 366 nm 進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一螢光斑點的顏色及 Rf 值（約 0.4 處）與對照藥材溶液所顯現的藍白色螢光斑點相符合。

白芍及牡丹皮：

取白芍藥材粉末 2.0g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，以甲醇定容至 10.0 mL，作為白芍對照藥材溶液。另取牡丹皮藥材粉末 1.3 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，以甲醇定容至 10.0 mL，作為牡丹皮對照藥材溶液。分別取檢品溶液、白芍對照藥材溶液與牡丹皮對照藥材溶液各 5μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：4N 氨水：乙醇 = 2：1：2 混合液作為展開溶媒，展開至 5~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 Vanillin / H_2SO_4 TS，以 105 ℃加熱 2 ~ 5 分鐘後進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值（約 0.68 處）與對照藥材溶液所顯現的紫色點相符合。

山梔子：

取山梔子藥材粉末 1.3 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 5 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：4 N 氨水：乙醇 = 2：1：2 混合液作為展開溶媒，展開至 5 ~ 10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑香草醛/ 硫酸 TS，以 105 ℃加熱 2 ~ 5 分鐘後進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值（約 0.63 處）與對照藥材溶液所顯現的紫色色點相符合。

柴胡：

取柴胡藥材粉末 2.0 g，加 70%甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以 70 %甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液 10 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用二氯甲烷➔乙酸乙酯：甲基乙基酮：蟻酸：水 = 5：3：1：1 下層液作為展開溶媒，展開至 5 ~10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑 2 %對甲氧基苯甲醛/硫酸 TS，以 105 ℃

加熱 3 分鐘後進行檢視，在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值(約 0.45 處)與對照標準品溶液所呈現的紫色色點相符合。

炙甘草：

取炙甘草藥材粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 10 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用乙酸乙酯：甲基乙基酮：乙酸：水 = 8：3：1：1 混合液作為展開溶媒，展開至 5 ~ 10 cm 左右，取出風乾，在 UV 254 nm 下檢視，Rf 值約 0.25 處有一深褐色吸收斑點，均勻噴灑對甲氧基苯甲醛 / 硫酸 TS，以 105 ℃加熱 3 分鐘後進行檢視，在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點的顏色及 Rf 值（約 0.25 處）與對照標準品(甘草酸 Glycrrhizic acid)溶液所顯現的紫色色點相符合。

薄荷：

取薄荷藥材粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，以超音波震盪 30 分鐘，過濾，濾液以甲醇定容至 10 mL，作為對照藥材溶液。分別取檢品溶液與對照藥材溶液各 5 μL，點注於矽膠薄層層析板上；使用己烷：乙酸乙酯=2：5 混合液作為展開溶媒，展開至 5 ~ 10 cm 左右，取出風乾，再均勻噴灑對甲氧基苯甲醛 / 硫酸 TS，以 105 ℃加熱 3 分鐘後進行檢視；在檢品溶液之多個顯色點中有一紫色色點及 Rf 值（約 0.6 處）與對照藥材溶液所顯現的紫色色點相符合。

一般檢查及其他

1. 乾燥減重---本品以 105 ℃乾燥五小時，其減重不得超過　　%。(通則 5008)
2. 總灰分---本品之總灰分不得超過　　%。(通則 5004)

含量測定：

1. 芍藥苷(paeoniflorin)、梔子苷(geniposide)—

移動相溶媒—以 0.03 %磷酸溶液為移動相 A，以 0.03 %磷酸-乙腈為移動相 B；沖提流速為每分鐘 1.0 mL，按下表中規定進行梯度沖提。必要時可配合調整比例。

對照標準品溶液—分別精確稱取芍藥苷與梔子苷對照標準品適量，加 70 % 甲醇製成濃度為芍藥苷 30 μg/mL、梔子苷 40 μg/mL 的溶

液，即得。

檢品溶液—取本品粉末約 0.5 g，精確稱定；加入 35 mL 之 70 %甲醇，於超音波震盪器中震盪 30 分鐘，過濾；濾液加 70%甲醇定容至 50.0 mL，混勻後以 0.45 μm 濾膜過濾，即得。

層析裝置—液相層析裝置，具波長為 245 nm 檢測器，4 ~ 6 mm × 15 ~ 25 cm 層析管，充填粒徑 5 μm、十八烷基矽烷鍵合矽膠管柱。層析管溫度保持在 40 ℃附近。另取對照標準品溶液層析之，記錄其波峰直，重複注入五次，波鋒面積之相對標準差不得大於 1.5 %。

測定法—分別精確吸取對照標準品溶液與檢品溶液各 20 μL，注入液相層析裝置，依以下層析條件層析之。測定，即得。

Time(min)	移動相 A%	移動相 B%
0 ~ 15	90 → 88	10 → 12
15 ~ 20	88	12
20 ~ 50	88 → 58	12 → 42
50 ~ 55	58 → 53	42 → 47
55 ~ 65	53 → 40	47 → 60
65 ~ 70	40 → 0	60 → 100
70 ~ 75	0	100

$$\text{芍藥苷 (mg/day)} = \frac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T} \text{ X 每日使用量}$$

A_T：檢品溶液之芍藥苷訊號峰的面積

A_S：標準品溶液之芍藥苷訊號峰的面積

M_S：芍藥苷標準品溶液之濃度(μg/mL)

W_T：檢品量(g) 以乾品計之

$$\text{梔子苷 (mg/day)} \quad \frac{\frac{A_T}{A_S} \times Ms \times 0.05}{W_T} = \text{X 每日使用量}$$

A_T：檢品溶液之梔子苷訊號峰的面積

A_S：標準品溶液之梔子苷訊號峰的面積

M_S：梔子苷標準品溶液之濃度(μg/mL)

W_T：檢品量(g)以乾品計之

2. 水抽提物－－取本品按照生藥水抽提物測定法(通則 5006)測定之。

3. 稀乙醇抽提物－－取本品按照生藥稀乙醇抽提物測定法(通則 5006)測定之。

效能：疏肝解鬱、清熱涼血。

適應症：肝鬱血虛發熱、月經不調、怔忡不寧。

注意事項：

刊　　名：中醫藥年報（光碟版）
副 刊 名：第六期
出版機關：衛生福利部
發 行 人：陳時中
編輯委員：黃怡超　褚文杰　林美智　蔡素玲　陳聘琪　陳昭蓉　游婉如
助理編輯：陳慧馨　黃彥豪　康靖華　謝采蓓　陳穎蓉　黃琮祐　蘇葎娟
地　　址：臺北市南港區忠孝東路六段 488 號
網　　址：http://www.mohw.gov.tw
電　　話：(02)8590-6666
傳　　真：(02)8590-7076
出版年月：2017 年 11 月
創刊年月：2012 年 10 月
期刊頻率：年刊
版　　次：第 1 版第 1 刷
其他類型版本說明：本刊另登載於中醫藥資訊網（網址為：http://www.mohw.gov.tw）
印製單位：尚暐文化事業有限公司
電　　話：(02)2958-6010
地　　址：220 新北市板橋區板新路 103 號 4 樓之 1
展 售 處：國家書店松江門市
地址：104 臺北市松江路 209 號 1 樓
電話：(02)2518-0207
http://www.govbooks.com.tw
五南文化廣場
地址：400 臺中市中山路 6 號
電話：(04)2226-0330 轉 821
http://www.wunanbooks.com.tw
定　　價：新臺幣 155 元整

GPN：4610202502　　ISSN：2305-087X

◎欲利用本光碟全部或部分內容者，須徵求衛生福利部同意或書面授權◎



衛 生 福 利 部
Ministry of Health and Welfare
促 進 全 民 健 康 與 福 祉

◎欲利用本書全部或部分內容者，須徵求衛生福利部同意或書面授權◎