

中醫藥委員會

中醫藥年報

第十四期第二冊



行政院衛生署中醫藥委員會編印
中華民國八十五年五月出版

中醫藥委員會

中醫藥年報

第十四期第二冊

行政院衛生署中醫藥委員會編印
中華民國八十五年五月出版

中醫藥年報第十四期第二冊

目 錄

1. 補中益氣湯對單向抑制性被動避暗學習反應之 影響.....	謝明村.....	1
2. 眼科用中藥枸杞子決明子生物活性的探討.....	張由美.....	25
3. 中藥致突變性作用之測定(V) 知母等三十種藥材.....	廖志飛.....	37
4. 活血化瘀中藥對低密度脂蛋白氧化的抑制效果.....	洪傳岳.....	67
5. 台灣產樟科及番荔枝科藥理 活性成分之研究(Ⅲ).....	吳永昌.....	115
6. 中藥及臺灣產天然物抗病毒抗癌及 抗血栓之研究(Ⅲ).....	杜昌益.....	125
7. 評估中藥中有化學預防肝癌成分之方法(Ⅲ).....	劉宗榮.....	139
8. 延胡索成分四氫巴馬汀對癲癇之影響.....	林茂村.....	185
9. 川芎有效成份tetramethylpyrazine 對犬基底 動脈血管反應性作用機轉之研究.....	顏茂雄.....	197
10. 抗癌中藥之研究(I) 中藥對拓模酶活性抑制之分析.....	林榮耀.....	213
11. 牛蒡子指標成分之製備.....	孫昌民.....	249
12. 台灣民間常用及具研發潛力的藥用植物調查與 編寫.....	歐潤芝.....	265
13. 中藥材之鑑定研究.....	陳忠川.....	301
14. 當歸指標成分製備.....	張淑貞.....	361

序

目前科技雖然發達，但現階段對生命科學的認識仍然有限，因此在持續現代醫學研究之餘，加強中醫藥的研究發展是現階段醫學研究的重心，期望透過研究，充分理解及發揮幾千年來先賢在醫藥方面所累積的許多寶貴經驗與傳承。

中醫中藥是我國傳統文化中的瑰寶，政府向極重視，早期於內政部衛生司就設有中醫藥委員會之諮詢單位，民國六十年行政院衛生署成立後，中醫藥委員會仍負責中醫藥有關之諮詢業務。由於各界對中醫中藥的日益重視，民國七十六年七月二十九日修正「行政院衛生署組織法」第十七條，明訂中醫藥委員會掌理中醫中藥各項行政事務，而依此規定所研擬之「行政院衛生署中醫藥委員會組織條例」草案，則於民國七十六年十一月二十一日送請立法院審議。在中醫藥界之敦促與關心中醫、中藥之立法委員大力支持下，於民國八十三年十二月十五日經立法院三讀通過，同年十二月三十日由總統公布實施。歷經十個月的籌備，八十四年十一月一日正式成立行政院衛生署中醫藥委員會，成為行政院的衛生署所屬之獨立機關。

加強中醫藥的研究發展，是行政院衛生署的重要業務之一，因此衛生署近年來每年均寬籌經費來進行中醫藥研究，七十八年度研究經費約為一千萬元，進行二十四項研究，七十九年度進行三十項研究，八十年度進行六十九項研究，八十一年度進行六十六項研究，而研究預算逐漸增加至八十二年度之四千七百餘萬元，進行七十四項研究，近年來研究預算緊縮為三千餘萬元，不過八十三年度仍進行了六十四項研究，八十四年度則進行了六十一項研究計畫。至於所進行之中醫藥研究計畫，其研究成果輪流在中華民國醫藥學院、台北醫學院、高雄醫學院舉辦研究成果發表會，使國人瞭解國內中醫藥研究發展情形，同時也提供國內中醫藥從業人員繼續教育、吸收新知識的機會。每年的

研究成果也均刊載於行政院衛生署中醫藥年報，以提供國內外學者專家之參考，自民國七十年出版年報第一期，迄今已出版至第十一期，由於去年籌備本會的成立，人事繁雜，致八十二及八十三年度的成果報告未能及時出版，而於今年併同八十四年度的成果報告，同時出版年報第十二、十三、十四期，未來每年將能配合年度研究成果報告定期出版年報一期，以提供各界之參考。

新成立的中醫藥委員會設有中醫組、中藥組、研究發展組及資訊典籍組四個組，在中醫組的業務，未來將加強與中醫界的連繫與溝通，輔導進行的醫師繼續教育，提昇中醫醫療服務的水準；在中藥組的業務方面，則將加強中藥藥品查驗與管理，中藥廠的輔導與獎勵，以提升中藥製藥工業水準，促進中藥科學化；在研究發展組方面，未來將加強中醫藥與針灸的基礎與臨床的研究，加強中醫診斷儀器的開發，配合野生動物保育進行有關保育類動物性中藥材代用品的研究。以往中醫藥的研究發展，係以鼓勵學術界進行中醫藥研究為導向，民國七十七年以前，每年進行不到七十項的研究，近年來每年申請中醫藥研究計畫者約有一百二十項，同意委託辦理約六、七十項，足見從事中醫藥研究者確實大幅增加；由於國人十大死因中的心臟疾病、糖尿病、高血壓性疾及氣喘等疾病的，現代醫學目前並無治癒的適當療法，因此未來中醫藥的研究將以這些疾病為導向進行研究，希望中醫藥的研究能在慢性疾病方面有進一步的貢獻；資訊典籍組主要業務係由中醫藥典籍的電腦化，建立中醫藥典籍查詢系統，屆時醫藥學界的使用者，藉著電腦連線作業，即可順利查詢到所需要的中醫藥相關資料；期望未來在本會四個組的配合下，使中醫藥行政與研究能密切配合，加速中醫的現代化與中藥的科學化，爰為序

主任委員 蘇 貫 中 謹誌

中華民國八十五年五月一日

補中益氣湯對單向抑制性被動避暗 學習反應之影響

謝明村

中國醫藥學院 中國藥學研究所

摘 要

補中益氣湯始載於元·李東垣之脾胃論，係由黃耆、人參、柴胡、升麻、白朮、炙甘草、陳皮、當歸八味方藥所組成，主治脾胃氣虛、中氣下陷者。在現代的臨床藥理研究報告中指出補中益氣湯具有鎮靜作用，然其機轉並未見有探討；另外日本山本的研究報告指出補中益氣湯治療健忘及老年痴呆也有效。據初步研究，本方一次給藥顯示有鎮靜作用，連續給藥一週則顯示有興奮作用。因此本研究之目的除了探討本方一次給藥之鎮靜作用機轉及連續給藥一週之興奮作用機轉之外，亦探討其是否能改善學習記憶。另外本研究依君臣佐使藥性之不同將補中益氣湯分為三組，比較其方劑組成之意義，以促進中醫藥之科學化。獲致結果如下：

一次給藥組之 A、B、C 三組在大劑量時皆明顯延長由 hexobarbital 所誘發之睡眠時間；連續給藥組之三組在大劑量時皆明顯縮短睡眠時間。連續給藥組之 C 組大劑量時對 scopolamine 給藥後之 step-through latency (STL) 有明顯延長作用，而 A、B、C 三組對 cycloheximide 給藥後之 STL 有明顯延長作用。在自發運動量的試驗中，採用 C 組 (1.0g/kg) 來探討其鎮靜作用機轉，結果顯示一次給藥後可降低由 apomorphine、PCPA 所誘發之運動量興奮作用，加強由 α -MT、5-HTP haloperidol 所誘發之運動量抑制

作用；連續給藥後可加強由 apomorphine、PCPA 所誘發之運動量興奮作用，拮抗由 α -MT、5-HTP、haloperidol 所誘發之運動量抑制作用。

綜合以上之研究結果，顯示元·李東垣脾胃論之補中益氣湯在一次給藥（大劑量）後具有鎮靜作用，連續給藥（大劑量）後具有興奮作用。全方（C 組）在大劑量連續給藥後對於記憶之獲得、鞏固有明顯之改善，顯示其改善學習記憶障礙之作用機轉可能與增強中樞 cholinergic system 及 protein synthesis 之活性有關，而 A、B 組則可能與增強 protein synthesis 之活性有關。此外，全方（C 組）之鎮靜作用機轉可能與降低中樞 catecholaminergic system 之活性、增強 serotonergic system 之活性有關；而全方（C 組）之興奮作用機轉可能與增強中樞 catecholaminergic system 之活性、降低 serotonergic system 之活性有關。

前 言

現今之社會由於競爭激烈、工作繁忙，造成人們情緒緊張、精神狀態不穩，因此導致了罹患心神不寧及失眠焦慮等患者之激增。在臨床上多使用西藥 Barbiturates 或 Benzodiazepines 治療，但此類藥物常令患者發生思睡、疲倦、耐藥性、反應遲鈍、蓄積及進行性健忘症⁽¹⁾、學習記憶障礙⁽²⁾⁽³⁾等嚴重副作用，更使得阿耳滋海默氏症(Alzheimer's disease)及老年痴呆症(senile dementia of Alzheimer's type, SDAT)之發生比率增加，增添了更多的社會問題。故尋找治療失眠症且不影響學習記憶之理想藥物實為目前刻不容緩的工作。

著者因此進行本研究，藉以找出可治療失眠症且不影響學習記憶之中藥方劑，而從中藥典籍中選用主治“脾胃氣虛、中氣下陷者”之補中益氣湯進行研究。補中益氣湯首載於元·李東垣之脾胃論，係由黃耆、人參、升麻、柴胡、白朮、陳皮、當歸、炙甘草等八味藥所組成。現代藥理學實驗對補中益氣湯多偏重於胃腸機能之實驗研究，雖有報告指出補中益氣湯具有鎮靜作用且日本山本的研究報告指出補中益氣湯治療健忘及老年性痴呆症也有效，然其機轉皆未見有探討。故著者擬以現代行為藥理學相關實驗方法，如 hexobarbital 誘發睡眠時間、自發運動量與避暗學習反應等試驗，來探討其鎮靜及改善學習記憶障礙方面之藥理作用及其作用機轉。

實驗依君臣佐使藥之作用，將補中益氣湯分為三組以比較其方劑組成之意義，促進中醫藥之科學化。(1)升陽益氣組(即 A 組)：黃耆、人參、升麻、

柴胡。(2)健脾和中組(即 B 組):白朮、陳皮、炙甘草、當歸。(3)補中益氣湯組(即 C 組):黃耆、人參、升麻、柴胡、白朮、陳皮、炙甘草、當歸。本研究冀能自我國傳統醫藥寶庫中篩選出治療失眠症與促進學習記憶能力之中藥方劑，並藉現代行為藥理實驗方法予以探討、研究其對中樞神經系統的作用。

材料與方法

一、實驗藥材：

補中益氣湯各藥材來源為：

1. 黃耆：為豆科(Leguminosae)植物黃耆*Astragalus membranaceus* (FISCH.) BGE 的乾燥根。
2. 人參：為五加科(Araliaceae)植物人參*Panax ginseng* C.A. MEYER 的乾燥根。
3. 當歸：為繖形科(Umbelliferae)植物當歸*Angelica sinensis* (OLIVER) DIELS. 的乾燥根。
4. 白朮：為菊科(Compositae)植物白朮*Atractylodes macrocephala* KOIDZ. 的乾燥根莖。
5. 甘草：為豆科(Leguminosae)植物甘草*Glycyrrhiza ulensis* FISCHER et Dc.的乾燥根及根莖。
6. 陳皮：為芸香科植物橘*Citrus reticulata* BLANCO. 的乾燥成熟果皮。
7. 升麻：為毛茛科(Ranunculaceae)植物大三葉升麻*Cimicifuga heracleifolia* KOM.的乾燥根莖。
8. 柴胡：為繖形科植物柴胡*Bupleurum chinense* Dc.的乾燥根。

本實驗將補中益氣湯分成下列三組及其比率如下：

(1)升陽益氣組：黃耆：人參：升麻：柴胡 = 5：3：3：3

(2)健脾和中組：白朮：陳皮：炙甘草：當歸 = 3：2：5：1

(3)補中益氣湯組：黃耆：人參：升麻：柴胡：白朮：陳皮：

炙甘草：當歸 = 5：3：3：3：3：2：5：1

將上述三組藥材分別依比率配製後，再以水抽取→濃縮→乾燥，即得各組之粗提取物。

二、實驗試藥：

Hexobarbital，Scopolamine HBr，Cycloheximide (Sigma)，
Haoperidol，5-hydroxytryptophan(5-HTP)，Apomorphine，
dl-p-chlorophenylalanine(PCPA)， α -methyl-p-tyrosine methyl
ester HCl(α -MT)

三、實驗動物：

(1) ICR系雄性小鼠，體重18~25公克。

(2) Sprague-Dawley系雄性大鼠，體重180-250公克。

四、實驗步驟：

(一)對Hexobarbital誘發的睡眠時間之影響：

補中益氣湯三組藥材粗提取物分給以不同劑量口服給藥，實驗分一次給藥組及一週連續給藥組，一次給藥組於口服一小時後(一週連續給藥組則每天給藥一次連續給一週，於第八天給藥60分鐘後)，腹腔注射Hexobarbital (100 mg/kg)，誘發睡眠，觀察記錄從注射Hexobarbital 後至小白鼠之正向反射(righting reflex)消失時間(onset)及從正向反射消失至恢復的時間(sleeping time, duration)。對照組給saline。

(二)對大鼠自發運動量之影響：

運動量之測定是使用動物運動量測定裝置 (MK-ANIMEX Activity Meter Model SE, Muromachi Kikai Co., Ltd. Japan), 敏感度定為 $35 \mu A$, 記錄大鼠經口服給予補中益氣湯三組藥材粗抽取物後之各種活動行為變化 (包括走動、站立、整飭、啜鼻等)。實驗分一次給藥組及一週連續給藥組, 一次給藥組於口服不同劑量之補中益氣湯三組藥材粗抽取物55分鐘後 (一週連續給藥組則每天給藥一次, 連續給一週, 於第八天給藥55分鐘後), 放入測定裝置內適應5分鐘再開始記錄, 觀察並連續記錄 2小時, 每組 6隻。實驗從上午八時至下午六時。對照組給saline。

(三)對改變腦中樞神經傳遞物質所引起自發運動量之影響：

同方法二, 實驗分一次給藥組及一週連續給藥組, 一週給藥組於口服不同劑量之補中益氣湯三組藥材粗抽取物55分鐘後 (一週連續給藥組則每天給藥一次, 連續給藥一週, 於第八天給藥55分鐘後), 再與下述物質分別併用, 于測定前5分鐘將大鼠放入測定裝置內適應5分鐘再開始記錄, 觀察並連續記錄2小時, 每組6隻。實驗從上午八時至下午六時。對照組給saline。

本實驗所使用於改變腦內monoaminergic system物質之劑量及時間分別為:
 α -MT(50 mg/kg, i.p.)2小時前給藥, apomorphine(0.3 mg/kg, s.c.)10分鐘前給藥, haloperidol(0.01 mg/kg, i.p.)30分鐘前給藥, 5-HTP(50 mg/kg, i.p.)5分鐘前給藥, PCPA(200 mg/kg, i.p.)21小時前給藥。

(四)對大鼠單向性被動避暗學習反應：

本實驗是使用「條件反應測定裝置」(Muromachi Kikai Co. Ltd. Japan), 此裝置分成兩部份: 實驗箱(Shuttle Box)係為一經中間閘門分隔為相同大小二室($48 \times 20 \times 30$ cm)的箱子及其控制器 (MCU -101 Controller, Muromachi Kikai Co. Ltd. Japan); 在實驗裝置處置上, 於相同大小二室之

其中一室上方置一20W之電燈泡，將相同大小二室區分為明暗二室，中以門閘控制；而於實驗步驟上，先將大鼠置入明室，同時開啓閘門，以大鼠在90秒內進入暗室者，供做本實驗。

訓練期：將篩選過之大鼠，置入明室，同時開啓閘門，待大鼠進入暗室後，關閉閘門，同時於底板通以電流(1mA, 2sec)，待電刺激後5秒，自暗室取出大鼠，歸回飼養籠。

測定期：於訓練後24小時，再將大鼠置入明室，同時並開啓閘門，記錄大鼠在明室之滯留時間(step-through latency, STL)。當於明室之滯留時間大於5分鐘(300秒)時，則稱大鼠之學習記憶能力正常⁽¹³⁾。

(五) 對誘發單向抑制性被動避暗學習反應障礙物質之影響：

實驗分一次給藥組及一週連續給藥組，一次給藥組則將補中益氣湯三組藥材粗抽取物於訓練前1小時以不同劑量口服給予，再與下述誘發學習障礙物質併用，依前法(方法四)，將大鼠放入明室，於進行訓練後，歸回飼養籠；待24小時後，將大鼠再次置入明室，進行測定，記錄大鼠於明室之滯留時間。一週連續給藥組則每天分別給補中益氣湯三組藥材粗抽取物一次，連續給一週，於最後一次口服給藥後1小時進行訓練，且與下述之誘發學習障礙物質併用，依前法(方法三)，將大鼠放入明室，於進行訓練後，歸回飼養籠；待24小時後，將大鼠再次置入明室，進行測定，記錄大鼠於明室之滯留時間。病理對照組給予下述之誘發學習記憶障礙物質。而空白對照組則給予saline。

本實驗所使用於誘發大鼠學習記憶障礙物質之劑量及時間分別為：Scopolamine HBr(1mg/kg, i.p.)於訓練前30分鐘給藥⁽¹⁴⁾(膽鹼接受器組斷劑)，cycloheximide (2.5mg/kg, s.c.)於訓練後立刻給藥⁽¹⁵⁾(蛋白質生合成抑制劑)。

(六) 熱板法⁽¹⁶⁾：

本試驗之目的為探討藥物對避暗學習反應有影響是否與痛閥的提升有關⁽¹⁷⁾。本試驗使用體重18-25公克之ICR雄性小鼠，將小鼠放置於實驗箱的定溫板上($55 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)，外罩以透明壓克力圓筒。實驗前，首先測出給藥前之反應時間(reaction time)，經5分鐘後，再測之，二次反應時間差在5秒以內者篩選做此項實驗。

(七) 統計學分析：

本實驗所得之數據，均以one-way ANOVA法，統計並分析其間差異之顯著性，凡P值小於0.05以下時，則認為有統計意義。

實 驗 結 果

一、急性毒性試驗

如 Table 1. 所示，小白鼠不論經由口服或腹腔給予補中益氣湯(Pu-Chmg-I-Chi-Tang, PCT)各組萃取物，雖可見其活動量明顯增加，但其LD₅₀均大於10 g/kg，故顯示補中益氣湯各組萃取物之毒性極小甚或無毒性。

Table 1. Acute toxicity of PCT extracts in mice.

Drugs	Routes	LD ₅₀ (g/kg)
Group A	P.O.	>10
	I.P.	>10
Group B	P.O.	>10
	I.P.	>10
Group C	P.O.	>10
	I.P.	>10

(1) A組君臣藥(升陽益氣粗)：黃耆、人參、升麻、柴胡

(2) B組佐使藥(健脾和中組)：白朮、陳皮、當歸、甘草

(3) C組補中益氣湯組：黃耆、人參、升麻、柴胡、白朮、陳皮、當歸、甘草

二、對Hexobarbital所誘發睡眠時間之影響

如 Table 2.所示，對Hexobarbital所誘發之睡眠時間，一次給藥實驗組中C組(1.0 g/kg)之onset時間縮短，在小劑量(0.1 g/kg)下三組之sleeping time均有縮短現象，在大劑量(1.0 g/kg)下三組之 sleeping time 均有顯著延長現象。連續給藥實驗組在小劑量(0.1 g/kg)下A組對onset時間無影響，其餘二組有延長onset時間之作用。在大劑量(1.0 g/kg)下三組對onset時間有明顯延長現象；而三組對sleeping time有明顯縮短現象。

Table 2. Effect of PCT extracts on the Hexobarbital-induced hypnosis in mice.

Drugs	Dose(g/kg)P.O.	Onset(min)	Sleeping time (min)
Single			
Control		4.2±0.1	47.8±0.6
Group A	0.1	4.3±0.2	40.1±0.1*
	1.0	4.0±0.4	57.2±0.2**
Group B	0.1	4.2±0.3	40.0±0.1*
	1.0	4.1±0.1	55.2±0.3**
Group C	0.1	4.0±0.2	40.3±0.1*
	1.0	3.8±0.1*	60.6±0.3**
One week			
Control		4.3±0.3	43.8±0.6
Group A	0.1	4.2±0.2	46.9±0.1
	1.0	6.2±0.3**	26.6±0.2**
Group B	0.1	4.1±0.3*	46.4±0.2
	1.0	6.3±0.2**	26.9±0.2**
Group C	0.1	4.1±0.2*	49.3±0.4
	1.0	6.4±0.1**	27.4±0.3**

(1)A組君臣藥(升陽益氣粗): 黃耆、人參、升麻、柴胡

(2)B組佐使藥(健脾和中組): 白朮、陳皮、當歸、甘草

(3)C組補中益氣湯組: 黃耆、人參、升麻、柴胡、白朮、陳皮、當歸、甘草

Values are expressed as mean±SEM for six rats.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang

Onset: time from drug injection to righting reflex disappear.

Sleeping time: time from onset to righting reflex recovery.

*p < 0.05, **p < 0.01, compared with control group (ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple range test).

三、鎮痛試驗

如 Table 3. 所示，各組萃取物在小劑量(0.1 g/kg)下均無鎮痛作用，而在大劑量(1.0 g/kg)下，一次給藥實驗中，A組在給藥60分鐘、B組在給藥30及60分鐘、C組在給藥30，60及90分鐘均有鎮痛作用。連續給藥實驗中，A、B及C三組均無鎮痛作用。

Table 3. Analgesic effect of PCT extracts in mice.

Drugs	Dose(g/kg)P.O.	30 min	60 min	90 min
Single				
Control		-10.6±4.3	-33.5±6.7	-22.6±4.1
Group A	0.1	-14.9±8.5	-33.9±10	-28.0±4.7
	1.0	-1.9±6.5	-10.7±5.3	-8.1±6.2
Group B	0.1	-13.0±11.4	-22.0±15.3	-29.6±12.6
	1.0	-2.38±2.7*	-9.8±4.2*	-23.9±5.9
Goup C	0.1	-13.2±7.8	-14.3±10.5	-36.3±8.1
	1.0	-44.5±1.6*	-55.2±3.9*	-55.9±2.4**
One week				
Control		-12.9±6.5	-19.3±3.7	-22.6±5.7
Group A	0.1	-37.2±9.1	-27.0±10.3	-59.3±10.5
	1.0	-11.8±2.5	-11.2±5.7	-17.3±6.3
Group B	0.1	-7.0±6.1	-15.0±7.0	-37.6±5.1
	1.0	-24.8±8.0	-7.7±4.7	-26.7±9.0
Group C	0.1	-29.2±7.2	-21.8±5.6	-40.3±5.2
	1.0	-10.0±3.2	25.3±3.6	-35.3±1.2

Values are expressed as mean±SEM for six rats.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang

Time of postadministration - Time of Preadministration

Mean = $\frac{\text{Time of postadministration} - \text{Time of Preadministration}}{\text{Time of Preadministration}} \times 100\%$

*p < 0.05, **p < 0.01, compared with control group (ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple range test).

四、對誘發單向抑制性被動避暗學習反應障礙物質之影響

如 Table 4. 所示，一次給藥實驗中，在較大劑量下，A、B及C三組對 scopolamine 誘發之 step-through latencies (STL) 均有明顯延長作用。連續給藥實驗中，在較大劑量下，A及B組對 scopolamine 誘發之 step-through latencies (STL) 均有明顯縮短作用；而C組則有延長作用。

Table 4. Effect of PCT extracts on scopolamine-induced impairment of inhibitory passive avoidance in rats.

Drugs	Dose(g/kg)P.O.	Step-through latencies (sec)
Single		
Control		>300
Scopolamine		6.8±0.5
Group A	0.1	7.4±0.5
	1.0	12.4±0.6**
Group B	0.1	8.3±2.0
	1.0	10.5±0.6**
Group C	0.1	8.4±1.3
	1.0	11.1±0.4**
One week		
Control		>300
Scopolamine		17.2±0.3
Group A	0.1	16.5±0.4
	1.0	11.4±1.1**
Group B	0.1	16.9±0.1
	1.0	10.7±0.8**
Group C	0.1	16.5±0.2
	1.0	183.6±9.6**

Values are expressed as mean±SEM for six rats.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang

*p < 0.05, **p < 0.01, compared with control group (ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple range test).

如 Table 5.所示，一次給藥實驗中，在較大劑量下，A、B及C三組對 cycloheximide誘發之step-through latencies (STL) 均無影響。連續給藥實驗中，在較大劑量下，A、B及C三組對cycloheximide誘發之STL 均有明顯延長作用。

Table 5. Effect of PCT extracts on cycloheximide-induced impairment of inhibitory passive avoidance in rats.

Drugs	Dose(g/kg)P.O.	Step-through latencies (sec)
Single		
Control		>300
Cycloheximide		10.9±0.2
Group A	0.1	11.1±0.3
	1.0	10.5±0.4
Group B	0.1	11.0±0.3
	1.0	12.2±1.0
Group C	0.1	12.8±0.7
	1.0	11.5±0.3
One week		
Control		>300
Cycloheximide		13.2±0.6
Group A	0.1	12.8±0.5
	1.0	51.7±0.4**
Group B	0.1	12.6±0.7
	1.0	29.6±0.8**
Group C	0.1	16.5±0.2
	1.0	66.6±1.1**

Values are expressed as mean±SEM for six rats.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang

*p < 0.05, **p < 0.01, compared with control group (ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple range test).

五、補中益氣湯粗提取物對自發運動量之影響

如圖一所示，以補中益氣湯 C 組(1.0 g/kg)一次口服給予大鼠後，可使大鼠之自發運動量顯著降低($p < 0.01$)；然補中益氣湯(1.0 g/kg/day, p.o.)連續給予大鼠一週後，卻使大鼠之自發運動量顯著增加($p < 0.01$)。

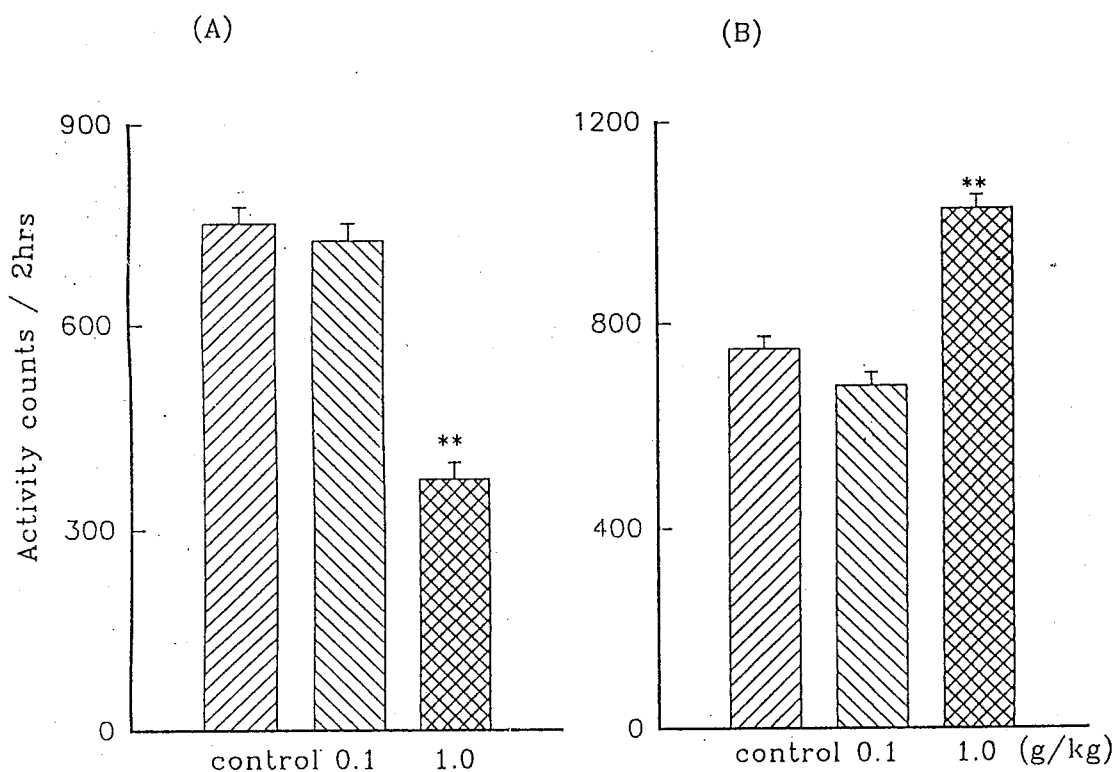


Fig.1. Effect of PCT on locotor activity in rats.

(A) The activity was measured 1 hr after single dose of PCT.

(B) The activity was measured 1 hr after the last dose of 1-week consecutive administration of PCT.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang.

* $p < 0.01$ as compared with the control group. $N=6$ (ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple range test)

六、補中益氣湯粗萃取物對改變腦內之物質所引起自發運動量之影響

(1)如圖二所示，單獨給予 α -MT(50 mg/kg, i.p.)後，可降低大鼠之自發運動量。當補中益氣湯(1.0 g/kg, p.o.)併用 α -MT後，可使大鼠之自發運動量降低($p<0.05$)；然補中益氣湯(1.0 g/kg/day, p.o.)連續給予大鼠一週後，再併用 α -MT，卻能拮抗上述大鼠運動量降低之現象($p<0.01$)。

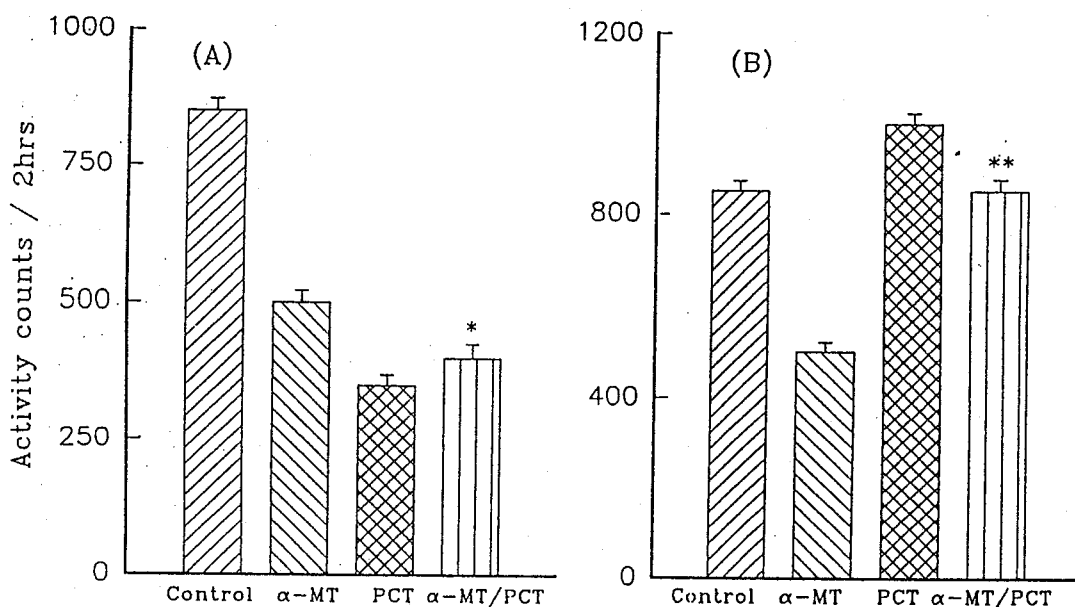


Fig. 2. Effect of PCT on the changes in locomotor activity induced by α -MT in rats.

(A) The activity was measured 1 hr after single dose of 1.0 g/kg PCT.

(B) The activity was measured 1 hr after the last dose of 1-week consecutive administration of 1.0 g/kg/day PCT.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ as compared with α -MT group. N=6. (ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple ranges test)

(2)如圖三所示，單獨給予 apomorphine(0.3 mg/kg , s.c.)後，可增加大鼠之自發運動量。當補中益氣湯(1.0 g/kg , p.o.)併用後，可拮抗上述大鼠運動量增加之現象($p<0.05$)；然補中益氣湯(1.0 g/kg/day , p.o.)連續給予大鼠一週後，再併用 apomorphine，卻能增強上述大鼠運動量增加之現象($p<0.01$)。

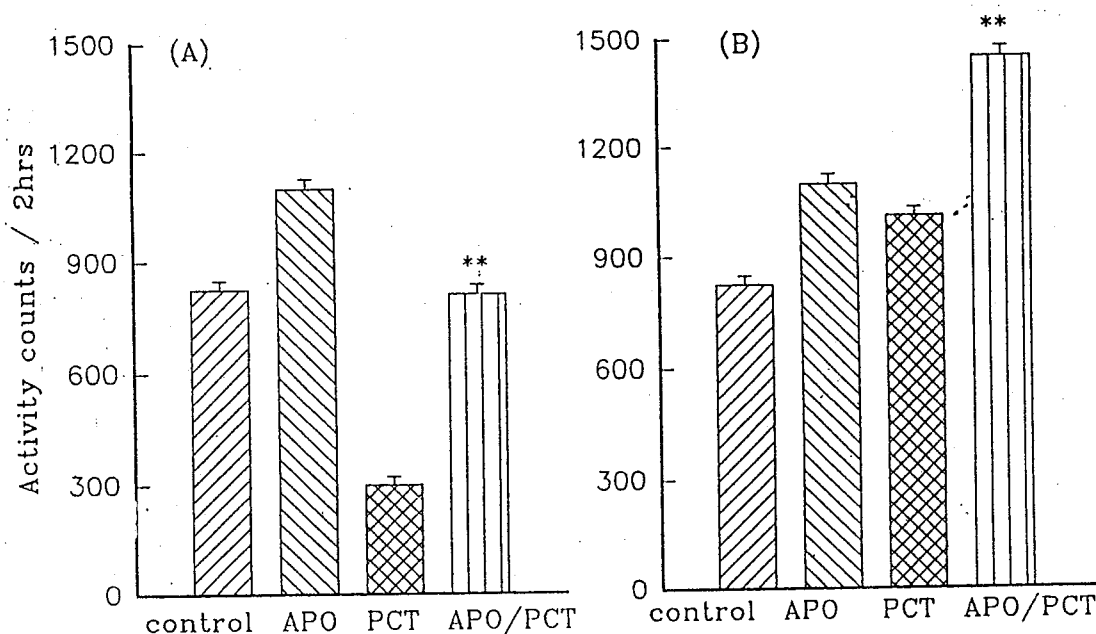


Fig. 3. Effect of PCT on the changes in locomotor activity induced by apomorphine in rats.

(A) The activity was measured 1 hr after single dose of 1.0 g/kg PCT.

(B) The activity was measured 1 hr after the last dose of 1-week consecutive administration of 1.0 g/kg/day PCT.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang.

** $p<0.01$ as compared with APO. group(ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple ranges test)

(3) 如圖四所示，單獨給予 haloperidol(0.01 mg/kg , i.p.)後，可降低大鼠之自發運動量。當補中益氣湯(1.0 g/kg , p.o.)併用 haloperidol 後，可使大鼠之自發運動量降低($p<0.01$)；然補中益氣湯(1.0 g/kg/day , p.o.)連續給予一週後，再併用 haloperidol，卻能拮抗上述大鼠運動量降低之現象($p<0.01$)。

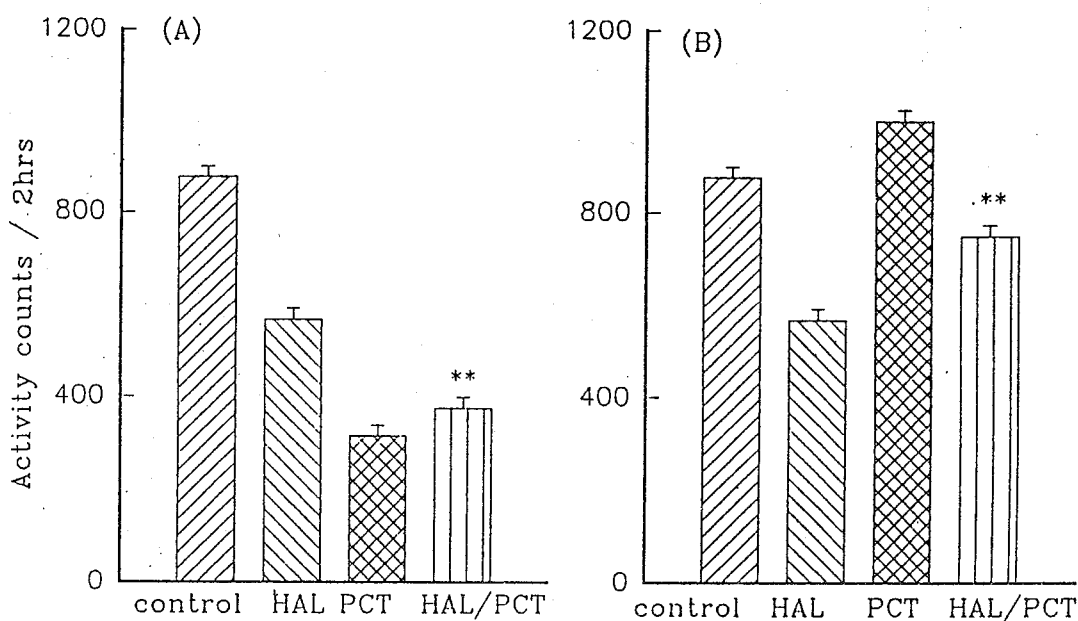


Fig. 4. Effect of PCT on the changes in locomotor activity induced by haloperidol in rats.

(A) The activity was measured 1 hr after single dose of 1.0 g/kg PCT.

(B) The activity was measured 1 hr after the last dose of 1-week consecutive administration of 1.0 g/kg/day PCT.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang.

** $p<0.01$ as compared with HAL. group. N=6.(ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple ranges test)

(4)如圖五所示，單獨給予 5-HTP(50 mg/kg , i.p.)可降低大鼠之自發運動量。當補中益氣湯(1.0 g/kg , p.o.)併用 5-HTP 後，可使大鼠之自發運動量降低($p<0.01$)；然補中益氣湯(1.0 g/kg/day , p.o.)連續給予一週後，再併用 5-HTP，卻能拮抗上大鼠運動量降低之現象($p<0.01$)。

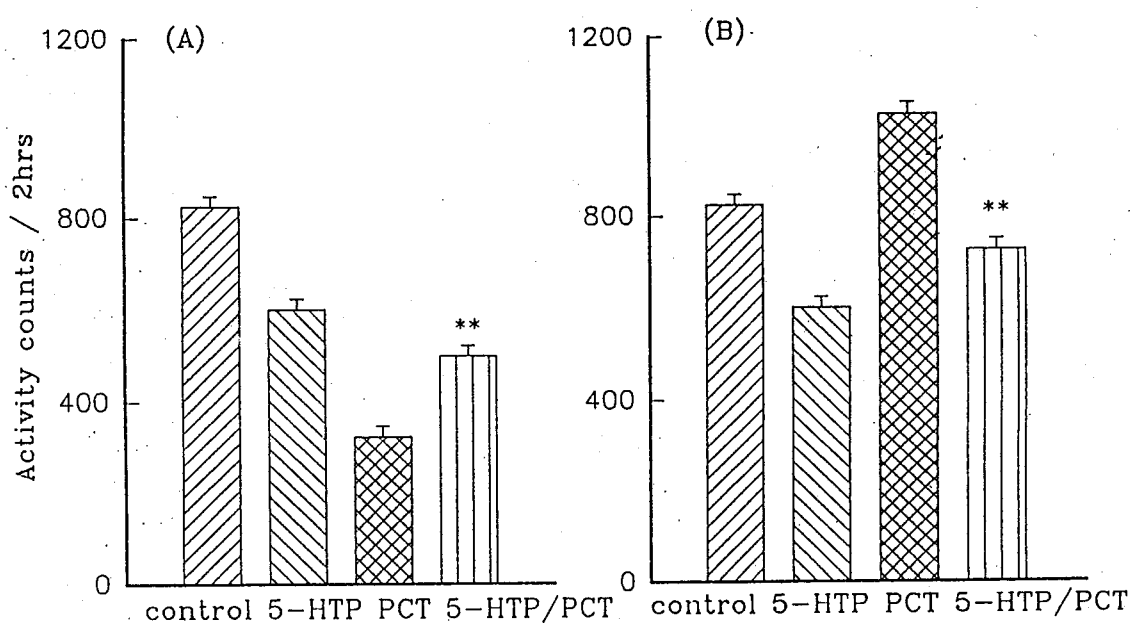


Fig.5. Effect of PCT on the changes in locomotor activity induced by 5-HTP in rats.

(A) The activity was measured 1 hr after single dose of 1.0 g/kg PCT.

(B) The activity was measured 1 hr after the last dose of 1-week consecutive administration of 1.0 g/kg/day PCT.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang.

• ** $p<0.01$ compared with 5-HTP group. $N=6$. (ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple ranges test)

(5)如圖六所示，單獨給予 PCPA(200 mg/kg , i.p.)可增加大鼠之自發運動量。當補中益氣湯(1.0 g/kg , p.o.)併用 PCPA 後，可拮抗上述自發運動量增加之現象($p<0.01$)；然補中益氣湯(1.0 g/kg/day , p.o.)連續給予一週後，再併用 PCPA，卻能增強上述大鼠運動量增加之現象($p<0.01$)。

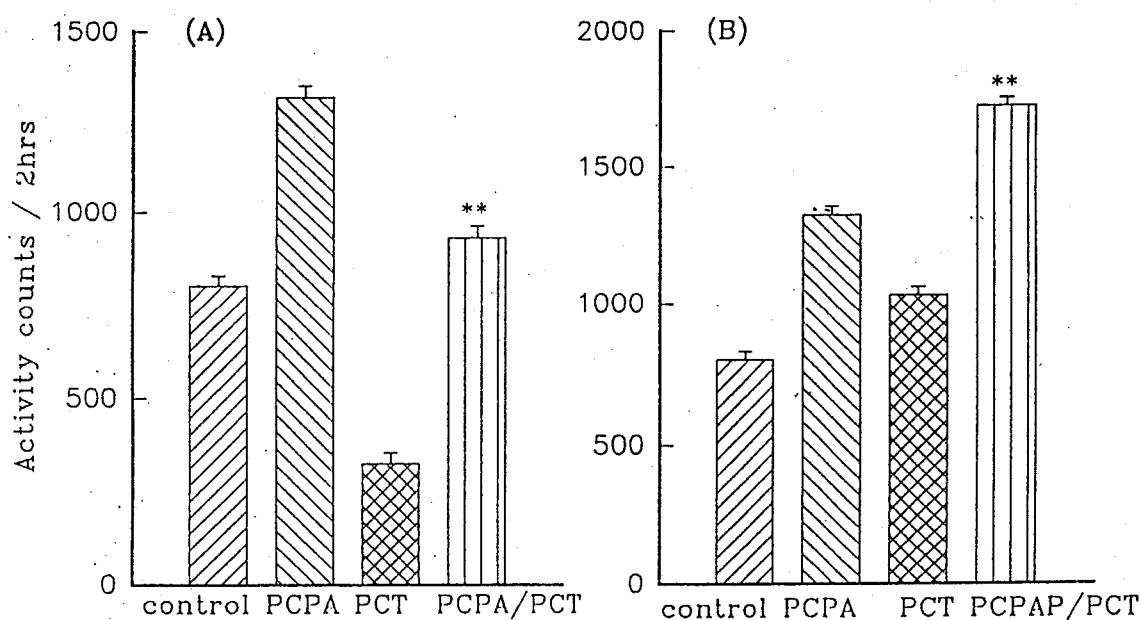


Fig.6. Effect of PCT on the changes in locomotor activity induced by PCPA in rats.

(A)The activity was measured 1 hr after single dose of 1.0 g/kg PCT.

(B)The activity was measured 1 hr after the last dose of 1-week consecutive administration of 1.0 g/kg/day PCT.

PCT: Pu-Chung-I-Chi-Tang.

** $p<0.01$ compared with PCPA group. $N=6$. (ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple ranges test)

討 論

在現代的臨床藥理研究報告中指出，補中益氣湯具有鎮靜作用；根據初步研究，補中益氣湯一次給藥顯示有鎮靜作用，連續給藥一週顯示有興奮作用。爲探討補中益氣湯是否具有鎮靜作用，本研究以hexobarbital誘發睡眠時間及測定大鼠之自發運動量來探討補中益氣湯之鎮靜作用，結果顯示一次給予較高劑量(1.0 g/kg)時以C組可顯著延長hexobarbital誘發之睡眠時間；而連續一週給藥後，三組皆可顯著縮短hexobarbital誘發之睡眠時間。又在補中益氣湯(C組，1.0 g/kg)對大鼠自發運動量之影響的研究結果顯示，一次給藥後能顯著降低大鼠之自發運動量；而連續給藥一週後，則可顯著增加大鼠之自發運動量。綜合以上結果顯示，補中益氣湯一次給藥具有鎮靜作用，連續一週給藥具有興奮作用。

中樞神經傳遞物質如norepinephrine、dopamine、serotonin等與動物行爲之關係，在近幾十年來已被廣泛地研究及討論。補中益氣湯C組(1.0 g/kg)於一次及連續一週給藥後，分別具有鎮靜及興奮作用，故取此劑量併用一些能改變中樞神經傳遞物質而引起自發運動量變化之物質，藉以闡述補中益氣湯之鎮靜及興奮作用機轉。首先探討補中益氣湯與中樞catecholaminergic system之關係，併用apomorphine、haloperidol、 α -methyl-p-tyrosine(α -MT)，以探討補中益氣湯之鎮靜及興奮機轉。Apomorphine爲dopamine接受器之致效劑，可使大鼠自發運動量明顯增加⁽¹⁸⁾。當補中益氣湯與apomorphine併用，於一次給藥後，能顯著抑制apomorphine所誘發之自發運動量興奮作用；於連續一週給藥後，則能明顯增加apomorphine所誘發之自發運動量興奮作用。Haloperidol爲接受器之拮抗劑，可使大鼠自發運動量明顯降低⁽¹⁹⁾。當補中益氣湯與haloperidol併用，於一次給藥後，對haloperidol所誘發之自發運動量抑制作用有明顯增強現象；於連續給藥一週後，對haloperidol所誘發

之自發運動量抑制作用有顯著之拮抗現象。 α -MT爲tyrosine hydroxylase，能阻斷 tyrosine 轉化 dopa 爲而干擾 catecholamines(norepinephrine、dopamine)之生合成，使大鼠自發運動量減少⁽²⁰⁾。當補中益氣湯與 α -MT併用，於一次給藥後，能顯著增加 α -MT所誘發之自發運動量抑制現象；於連續一週給藥後，能拮抗 α -MT所誘發之自發運動量抑制現象。由以上結果顯示，補中益氣湯(C組)一次給藥之鎮靜作用機轉，可能與減弱catecholaminergic system之活性有關；而連續一週給藥之興奮作用機轉，則可能與增強catecholaminergic system之活性有關。

其次爲探討補中益氣湯(C組，1.0 g/kg)與中樞serotonergic system之關係，故併用5-hydroxytryptophan(5-HTP)、dl-p-cholorophenylalanine(PCPA)。5-HTP爲serotonin之前驅物，能提高中樞之serotonin含量，使自發運動量減少⁽²¹⁾。當補中益氣湯與5-HTP併用，於一次給藥後，對5-HTP所誘發之自發運動量抑制作用有顯著增強現象；於連續一週給藥後，對5-HTP所誘發之自發運動量抑制作用則有拮抗現象。PCPA爲serotonin合成途徑中tryptophan hydroxylase之抑制劑⁽²²⁾。當補中益氣湯與PCPA併用，於一次給藥後，能顯著抑制PCPA所誘發之自發運動量興奮作用；於連續一週給藥後，則能顯著增強PCPA所誘發之自發運動量興奮作用。由以上結果顯示，補中益氣湯一次給藥之鎮靜作用，可能與增強中樞serotonergic system之活性有關，而連續一週給藥之興奮作用，可能與減弱serotonergic system之活性有關。

爲探討補中益氣湯是否具有改善學習記憶之作用，本研究以避暗學習反應法來探討補中益氣湯抽取物對scopolamine、cycloheximide所誘發學習記憶障礙之影響。Scopolamine爲cholinergic muscarinic receptor之抑制劑。當投予scopolamine後可使腦內cortex、hippocampus、striatum等區域之acetylcholine的濃度減少，降低cholinergic system之活性，造成學習記

憶障礙，且其影響主要在學習記憶獲得階段⁽²³⁾。在記憶之鞏固及長期記憶之形成上，蛋白質合成爲一必需之因素，本研究用cycloheximide(蛋白質合成抑制劑)造成記憶損害現象⁽²⁴⁾。當補中益氣湯與scopolamine併用後，一次給藥組各組在較大劑量下有明顯改善scopolamine所誘發之學習記憶障礙；但對cycloheximide所誘發之學習記憶障礙均無改善。連續給藥組之C組(1.0 g/kg)對scopolamine、cycloheximide所誘發之學習記憶障礙有明顯改善，A組及B組(1.0 g/kg)對cycloheximide所誘發之學習記憶障礙亦有明顯改善。又根據鎮痛實驗得知，一次給藥組各組具鎮痛作用，顯示出一次給藥組各組之改善學習記憶障礙可能是因其具有鎮痛作用所引起；而連續給藥組各組均無鎮痛作用，顯示出連續給藥組各組對scopolamine、cycloheximide所誘發之學習記憶障礙可能是因其改善學習記憶能力所致。

綜合以上結果顯示，補中益氣湯全方(C組)在大劑量(1.0 g/kg)一次給藥後，有鎮痛作用，其機轉可能與降低catecholaminergic system之活性及增強中樞serotonergic system之活性有關；而連續一週給藥後，具有增加大鼠自發運動量及改善學習記憶障礙之作用，其作用機轉可能與增強catecholaminergic system、cholinergic system及protein synthesis之活性及降低中樞serotonergic system之活性有關。此外，A組及B組對於增強protein synthesis之活性亦不容忽視，經由本研究之探討，可爲補中益氣湯在臨床上的使用提供了新的建議與依據。

參考文獻

1. Rall T.W. : Hypnotic and Sedatives : ethanol. In : The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. (Gilman A.G. , Rall T.W. , Nies A.S. and

- Taylor P.) Macmillan Publishing Co. , Inc. New York , pp.345~382 , 1990.
- 2.Decker M. W. , Tran T. and McGaugh J. L. : A comparison of the effects of scopolamine and diazepam on acquisition and retention of inhibitory avoidance in mice *Psychopharmacology* 100 : 515~521 , 1990.
- 3.Arolfo M. P. and Brioni J. D. : Diazepam impairs place learning in the Morris water maze *Behav. Neural Biol.* 1991 55 : 131~136.
- 4.Brioni J.D. and Arolfo M.P. : Diazepam impairs retention of spatial information without affection retrieval or cue learning *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41 : 1~5 , 1991.
- 5.Ghoneim M.M. , Hinrichs J.V. and Mewaldt S.P. : Dose-response analysis of the behavioral effects of diazepam : I.Learning and memory *Psychopharmacology* 82 : 291~295 , 1984.
6. 元·李東垣著，清·吳勉學校詮：東垣十種醫書，脾胃論卷中，2頁，五洲出版社，台北台灣，1984.
7. 沈自尹：中醫基礎理論研究進展，中醫雜誌 23 : 73 , 1982.
8. 馮庚端：脾陽虛患者胃形態和運動功能的觀察分析，中醫雜誌 21 : 32 , 1980.
9. 朱自平等：中成藥研究 12 : 36 , 1982.
- 10.王汝俊等：中藥藥理與臨床 4 : 16 , 1988.
- 11.鄧文隆：中醫方劑的藥理與應用，682-705頁。重慶出版社，大陸四川1990.
- 12.山本岩：漢方研究 11 : 2 , 1982.
- 13.Worms P. , Gueudet C. , P'erio A. and Soubri'e P. : Systemic injection of pirenzepine induces a deficit in passive avoidance learning in rats

- Psychopharmacology 98 : 286~288, 1989.
14. Elrod K. and Buccafusco J.J. : An evaluation of the mechanism of scopolamine-induced impairment in two passive avoidance protocols Pharmacol. Biochem. Behav. 29 : 15~21, 1988.
 15. Ogren S.O. : Central serotonin neurons in avoidance learning : Interaction with noradrenaline and dopamine neurons Pharmacol. Biochem. Behav. 23 : 107~123, 1985.
 16. Woolfe G, MacDonald A.O.: The elevation of analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol) J Pharmacol Exp Ther 120:52-57, 1944.
 17. Voigt J.P. and Morgenstern: Comparative effects of carbamazepine, phentoin, diazepam and clonazepam on inhibitory avoidance learning in mice. 108:131-135, 1992.
 18. Montanaro N , Vaccheri A , Dall'Olio R , Gandolfi O: Time course of rat motility response to apomorphine: A simple model for studying preferential blockade of brain dopamine receptors mediating sedation. Psychopharmacology 1983;81:214-19.
 19. Wadenber ML , Ablenius S: Effect of raclopride and haloperidol on spontaneous motor activity and on conditioned behavior in rats: A comparison of potency , efficacy and time-course of action. Arzneimittel-Forschung 1991;41:692-95.
 20. Spector S , Sjoerdsma A , Udenfriend S: Blocked of endogenous norepinephrine synthesis by α -methyl-tyrosine , an inhibitor of tyrosine hydroxylase. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1965;147:86-95.
 21. Everett GM: Effect of 5-hydroxytryptophan on brain levels of dopamine , serotonin , norepinephrine in mice. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 1974;10:261-2.
 22. Koe BK , Weissman A: p-Chlorophenylalanine: A specific depletor of brain

serotonin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1966; 154(3); 499-516.

23. Worms P, Gueudet C, P'erio A, Soubri'e: Systemic injection of pirenzepine induces a deficit in passive avoidance learning in rats. Psychopharmacology 1989; 98: 286-8
24. Beninger R.J.: Dissociating the effects of altered dopaminergic function on performance and learning Brain Res. Bull. 23: 365-371 1989

眼科用中藥枸杞子決明子 生物活性的探討

張由美

陽明醫學院

摘 要

糖尿病眼內新生血管的生成常易造成病人視力的逐漸喪失而最後導至失明，根據最近的報告指出，網膜色素上皮細胞 (Retinal Pigment Epithelial Cells) 可以釋放出一些不明的新生血管抑制因子來抑制網膜新生血管的形成，而造成老人失明最大原因的眼內黃斑部變性 (Mac ular Degeneration) 即為形成脈絡膜新生血管薄膜 (Choroidal neovascular membrane) 所至，最近的報告指出，其可能為網膜色素上皮細胞 (RPE) 的退化 (Dysfunction) 所造成。

我們選定網膜色素上皮細胞 (RPE) 作為標的 (target)，探討其生長及吞吃的機能，我們選了常用眼科中藥決明子、枸杞子民間眼科藥為研究對象，我們證實了決明子這種眼科用中草藥對網膜色素上皮細胞 (RPE) 的調節作用，尤其在乙酸乙酯層區分中，YZ5B 在 1 μ g/ml, YZ5F 在 0.1 μ g/ml 對網膜色素上皮細胞吞吃作用有明顯的促進網膜色素上皮細胞吞吃作用，我們相信在如此低濃度下有生物活性，決明子在眼科中藥所扮演的角色應可得到良好的佐證，網膜色素上皮細胞多樣的功能與視力的維持息息相關，傳統中藥對眼睛視力的維護可以說得到了科學的印證，至於何種成份使它具大這種活性則有待今後進一步證實。

1. 研究目的：

眼睛為靈魂之窗，在逐漸老年化的現代社會中，視力的保健和維護愈形受到重視。在升學主義的壓力下，學童及年輕人視力的普遍不良已成為國內特殊的問題。而在目前西方所發展的眼科藥物中，只有治療用抗生素及固醇類何爾蒙，所謂保健用僅止于維他命類點眼藥。加以國人傳統上有使用中藥及民間藥的習慣，復經報章雜誌喧嚷，有一些藥效不明的民間藥普遍被用來作為視力保健或治療。在這樣的社會背景下，我們認為有必要結合國內研究人員來探討及評估其藥效及作用機轉。

我們選定網膜色素上皮細胞(RPE)作為探討的標的(target)。網膜色素上皮細胞(RPE)位於網膜的最外層，和視神經細胞相接，和視神經功能的運作，有相當密切的相關。網膜色素上皮細胞(RPE)一般被認為和光的吸收，維他命A的儲藏，rhodopsin的合成，視細胞養分及代謝產物的輸送，吞吃桿細胞外節(rod outer segments, ROS)，供給ROS再生(renewal)時所須的物質，subretinal一些多糖類extracellular matrix的合成，提供physical或chemical barrier以阻止subretinal內皮細胞的侵入，形成網膜的接著力等機能有關。

在增殖性網膜病變(proliferative vitreoretinopathy, PVR)所導至網膜剝離的過程中，活的網膜色素上皮細胞(RPE)的游離進入vitreous cavity而逐漸的附著在網膜上被認為是發病的起始步驟。根據最近的報告顯示，網膜色素上皮細胞(RPE)可能分泌一些生長因子(growth factors)，來促進網膜色素上皮細胞(RPE)，astrocyte，及角膜纖維芽細胞(corneal fibroblast)之生長，而造成增殖性網膜病變。

此外，糖尿病眼內新生血管的生成常易造成病人視力的逐漸喪失而最後導至失明。根據最近的報告指出，網膜色素上皮細胞(Retinal Pigment Epithelial Cells)可以釋放出一些不明的新生血管抑制因子來抑制網膜新生血管的形成。而造成老人失明最大原因的眼內黃斑部變性(Macular Degeneration)即為形成脈絡膜新生血管薄膜(Choroidal neovascular membrane)所至。最近的報告指出，其可能為網膜色素上皮細胞(RPE)的退化(Dysfunction)所造成。

網膜色素上皮細胞具有具有免疫細胞的特性，可以表現 HLA-DR

antigen, 在實驗性 自体免疫葡萄膜炎 experimental autoimmune uveitis 可以觀察到 Ia antigen 的表現, 具有 phagocytic 機能類似 macrophage 的性質, 和一些眼內葡萄膜炎 (uveitis) 的發生亦可能有密切的相關. 因此, 我們相信眼科用 民間藥經由調節此細胞之機能而達到其效果的可能性很大. 我們選了常用眼科中藥決明子, 枸杞子等民間眼科藥為研究對象.

決明子在《本經》:"治青盲, 目淫膚赤白膜, 眼赤痛, 淚出, 久服益經光." 在《湖南藥物誌》:"明目, 利尿. 治昏眩, 腳氣, 浮腫, 肺癰, 胸痺.[異名]:草決明、羊明、羊角、馬蹄決明、還瞳子、馬屎豆、假綠豆、馬蹄子、千里光、芹決、羊角豆、野青豆、豬骨明、豬屎藍豆、細葉豬屎豆、夜拉子、羊尾豆.[原植物]:決明 《本經》 Cassia tora L., 又名:夜闌門、羊觸足、假羊角菜、假花生、夜合草、野花生.[成分]:新鮮種子含大黃酚 (Chrysophanol)、大黃素 (Emodin)、蘆薈大黃素 (Aloe-emodin)、大黃酸 (Rhein)、大黃素葡萄糖苷、大黃素蒽酮、大黃素甲醚 (Physcion)、決明素 (Obtusin, 即 1, 6, 7-三甲氧基 - 2, 8 -二羥基-3-甲基蒽琨)、橙黃決明素 (Aurantio-obtusin, 即 1, 7 -二甲氧基 -2, 6, 8 -三羥-3-甲基蒽琨), 以及新月孢子菌玫瑰色素 (Rubrofusarin)、決明松 (Torachryson)、決明內酯 (Torolactone). 尚含維生素 A.

枸杞子 Lycium chinense Mill., 功用主治:滋腎, 潤肺, 補肝, 明目, 治肝腎陰虧, 腰膝酸軟, 頭暈, 目眩, 目昏多淚, 虛勞咳嗽, 消渴, 遺精. "藥性論": "能補益精諸不足, 易顏色, 變白, 明目, 安神." "綱目": "滋腎, 潤肺, 明目" "本草經疏": "枸杞子, 潤而滋補, 兼能退熱, 而專於補腎、潤肺、生津、益氣, 為肝腎真陰不足、勞乏內熱補益之要藥. 老人陰虛者十之八九, 故服食家為益精明目之上品. 昔人多謂其能生精益氣, 除陰虛內熱明目者, 蓋熱退則陰生, 陰生則精血自長, 肝開竅於目, 黑水神光屬腎, 二臟之陰氣增益, 則目自明矣." "枸杞雖為益陰除熱之上藥, 若病脾為薄弱, 時時泄瀉者勿入, 須先治其脾胃, 俟泄瀉已止, 乃可用之. 即用, 尚須同山藥、蓮肉、車前、茯苓相兼, 則無潤腸之患矣."

以上民間藥由陽明大學生物藥學研究所吳榮燦教授提供製作粗萃物或部份純化區分及純化物, 眼科方面之有關生物活性則由本研究室負責探討.

2. 研究方法及進行步驟.

a. 網膜色素上皮細胞 (Retinal Pigment Epithelial Cell) 組織培養

網膜色素上皮細胞 (RPE) 的初代培養

新鮮牛眼自屠宰場取得或自7-9天雞胚胎取出整眼，解剖後除去水晶体。玻璃体。sensory retinal 後，剩餘的 posterior cup將其分切成細塊，以 0.02% EDTA/PBS 在室溫處理40-60分鐘，RPE 細胞層可以由脈絡膜毯 (Tapetum) 脫離，將其用 0.5% Trypsin/PBS在37℃處理 15 分鐘，以吸管輕吸幾次後即可得單一分散的 RPE 細胞。放入含有 10% 胎牛血清的 Eagle's MEM培養基中在37℃中，5% CO₂ 培養箱，每隔2-3 換新培養基。

b. 牛眼網膜桿細胞外節的製備

Preparation of Bovine Retinal Rod Outer Segment

- ↓ 20 frozen bovine retinas
- ↓ shake with 45% sucrose ,0.1M phosphate buffer(PH=7)
- ↓ pass through 300#mesh
- ↓ The suspension is centrifuged in an TL100.3 rotor (Beckman) for 31 min at 30Krpm and 4° C.
- ↓ phosphate buffer resuspended
- ↓ pass through 300# mesh
- ↓ The suspension is centrifuged in a TL100.3 rotor for 85min at 23000rpm and 4° C.
- [SS-34 rotor (Sorvall) for 20 min at 15000rpm and 4° C]
- ↓ resuspended in 40% sucrose phosphate buffer
- ↓ pass through 300# mesh
- ↓ TL100.3 rotor for 85 min at 23000rpm and 4° C
- ↓ resuspended in phosphate buffer
- ↓ pass through 300# mesh
- ↓ pass through 55# mesh
- ↓ store in 40% sucrose in phosphate buffer -20° C

c. 牛眼網膜桿細胞外節的螢光染色

- ↓ 將 Ros-FITC= 1:1/1000 (w/w) 在 4 °C 染 1.5 hr in Borate buffer+ 10% sucrose pH8.0
- ↓ Wash 4 times with Tris-acetate+20% sucrose pH7.2 (12000 rpm 10min

d. 網膜色素上皮細胞 FITC-ROS 吞吃機能的測定.

Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cell

- ↓ RPE cell 5×10^4 /ml in DMEM + 2% FCS 180ul/well
- ↓ 37°C overnight
- ↓ drug 20ul/well with 2%FCS
- ↓ 37°C overnight
- ↓ Labelling Ros (FITC-ROS) 1×10^7 /ml 50ul/well
- ↓ 37°C 3hr
- ↓ washed 4 times with PBS+2.5% sucrose
- ↓ Cyto-Fluorometer reading EX Filter 485/20nm , Em Filter 530/25nm

e. 中藥標品製作:

決明子 450 克經 methanol 抽取後分水層及 ethylacetate 層, 分別製成 1mg/ml. ethylacetate 層再經 Silica gel chromatography, 分別以 3%MeOH, 7%MeOH, 50%MeOH 流出, 得下列數個區分.

YZ5A 3%MeOH/CHCl ₃	YZ5D 7%MeOH/CHCl ₃
YZ5B 3%MeOH/CHCl ₃	YZ5E 50%MeOH
YZ5C 3%MeOH/CHCl ₃	YZ5F 50%MeOH

分別製成 1mg/ml, 進行進一步生物活性檢定.

3. 進度及成果.

決明子 (Cato) 對網膜色素上皮細胞吞吃作用 (FITC-ROS) 的影響.

我們將決明子以 methonal 抽取分為 H₂O layer, Ethyl acetate layer. Cato H₂O layer 抽取物在 1000ug/ml 至 1ug/ml 濃度 對 RPE cell Phagocytosis 抑制作用. Cato Ethyl acetate layer 抽取物在 1000 ug/ml 時具抑制作用, 而在 10ug/ml, 1ug/ml 中卻明顯的促進 RPE 細胞 Phagocytosis (Table 1). 決明子乙酸乙酯層區分中, YZ5B 在 1ug/ml 對網膜色素上皮細胞吞吃作用有明顯的促進 RPE 細胞 Phagocytosis (Table 2). 決明子乙酸乙酯層區分中, YZ5F 在 0.1ug/ml 對網膜色素上皮細胞吞吃作用有明顯的促進 RPE 細胞

Phagocytosis (Table 3). 我們正進一步配合以 silica chromatography 將其活性成份分離出較大量標品，進行化學鑑定。

Table 1. 決明子 (Cato) 粗萃物對網膜色素上皮細胞吞吃作用的影響。

Conc.	Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.	

Ctrl	1	101.33	10.23	0.10	1.00	0.00 A	
	2	91.17	6.62	0.07	0.90	2.04 C	
Cato (H2O)							
1000 ug/ml	3	86.17	5.04	0.06	0.85	3.26 F*	
100 ug/ml	4	79.33	11.29	0.14	0.78	3.54 F*	
10 ug/ml	5	70.67	17.50	0.25	0.70	3.71 F*	
1 ug/ml	6	67.17	9.58	0.14	0.66	5.97 G*	
Cato (Ethyl acetate)							
1000 ug/ml	7	78.67	13.47	0.17	0.78	3.28 F*	
100 ug/ml	8	96.17	4.22	0.04	0.95	1.14 B	
10 ug/ml	9	127.83	19.30	0.15	1.26	-2.97 E*	
1 ug/ml	10	126.67	11.91	0.09	1.25	-3.95 F*	

T Prob.:	A	B	C	D	E	F	G
	1.00>p>	0.50>p>	0.10>p>	0.05>p>	0.02>p>	0.01>p>	0.001>p>

Table 2. 決明子 (Cato) 乙酸乙酯層區分對網膜色素上皮細胞吞吃作用的影響.

Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.		

Ctrl	1508.33	146.65	0.10	1.00	0.00	A	
	1463.67	205.78	0.14	0.97	0.43	A	
(ug/ml)							
YZ5A 100	1085.83	82.97	0.08	0.72	6.14	G*	
10	1162.67	274.32	0.24	0.77	2.72	D*	
1	1457.50	203.71	0.14	0.97	0.50	A	
0.1	1626.67	200.02	0.12	1.08	-1.17	B	
YZ5B 100	1512.17	373.15	0.25	1.00	-0.02	A	
10	1530.67	405.02	0.26	1.01	-0.13	A	
1	2321.83	486.72	0.21	1.54	-3.92	F*	
0.1	1779.33	192.42	0.11	1.18	-2.74	D*	
YZ5C 100	1030.00	205.05	0.20	0.68	4.65	G*	
10	1541.50	216.37	0.14	1.02	-0.31	A	
1	1779.83	192.18	0.11	1.18	-2.75	D*	
0.1	1811.00	363.58	0.20	1.20	-1.89	C	

T Prob.:	A	B	C	D	E	F	G
	1.00>p>	0.50>p>	0.10>p>	0.05>p>	0.02>p>	0.01>p>	0.001>p>

Table 3. 決明子 (Cato) 乙酸乙酯層區分對網膜色素上皮細胞吞吃作用的影響.

Group		MEAN	STD	%	Index	T Prob.	

Ctrl		1169.83	204.56	0.17	1.00	0.00 A	
		1165.33	181.83	0.16	1.00	0.04 A	
(ug/ml)							
YZ5D	100	776.40	28.64	0.04	0.66	4.23 F*	
	10	1060.83	183.33	0.17	0.91	0.97 B	
	1	1493.33	453.20	0.30	1.28	-1.59 B	
	0.1	1236.67	225.58	0.18	1.06	-0.54 A	
YZ5E	100	952.00	155.64	0.16	0.81	2.08 C	
	10	1092.17	73.06	0.07	0.93	0.88 B	
	1	1320.00	177.58	0.13	1.13	-1.36 B	
	0.1	1361.67	182.63	0.13	1.16	-1.71 B	
YZ5F	100	901.20	142.61	0.16	0.77	2.47 D*	
	10	1245.83	219.68	0.18	1.06	-0.62 A	
	1	1338.20	124.27	0.09	1.14	-1.60 B	
	0.1	1930.60	154.37	0.08	1.65	-6.83 G*	

T. Prob.:	A	B	C	D	E	F	G
	1.00>p>	0.50>p>	0.10>p>	0.05>p>	0.02>p>	0.01>p>	0.001>p>

4. 結論：

經由本研究得知，由決明子乙酸乙酯層對網膜色素上皮細胞機能的作用初步證實了民間眼科用中藥確實對視力的維護有其科學的根據存在。尤其水層抽取物在 1000ug/ml 至 1ug/ml 濃度對 RPE cell Phagocytosis 有抑制作用，而在決明子乙酸乙脂層區分中，YZ5B 在 1ug/ml，YZ5F 在 0.1ug/ml 對網膜色素上皮細胞吞吃作用有明顯的促進網膜色素上皮細胞吞吃作用，我們相信在如此低濃度下有生物活性，決明子在眼科中藥所扮演的角色應可得到良好的佐証。我們期望在得到純化物後，能進一步探討其對網膜色素上皮細胞多采多姿的調節作用。

而本年度中雖對枸杞子未能進行探討，但我們對石斛開光明眼丸所含石斛，及枸杞子正進行以超臨界流体萃取其成份，希望在下年度中能繼續加以研究。由於網膜色素上皮細胞多方的功能與視力的維持息息相關，傳統中藥對眼睛視力的維護可以說得到了科學的印證，至於何種成份使它具有這種活性則有待今後進一步證實。我們可以初步的了解一些眼科用民間藥對 RPE 細胞的確有相當強的調節作用，希望對因 RPE dysfunction 的眼科臨床治療上有所幫助。

根據最近 Reh 在 Nature (1987) 的報告顯示，網膜色素上皮細胞 (RPE) 在 laminin 的存在下，可以被 transdifferentiation 成為 neurons，換言之，網膜色素上皮細胞 (RPE) 提供一個非常好的網膜再生 (regeneration) 時新 neurons 的來源。因此，我們認為，網膜色素上皮細胞 (RPE) 的機能及決明子中之調節因子，有待我們進一步去廣汎而深入的探討其作用機轉。

參考文獻

1. Glaser, B.M., P.A. Campochiaro, J.L. Davis and M. Sato, Retinal pigment epithelial cells release an inhibitor of neovascularization. Arch. Ophthalmol, 103: 1870-1875, 1985.
2. JR, B.N., D. Armstrong, R.D. Stratton, W.W. Dawson, K.K. Kelley, A. Ellis and A.I. Webb, Culture of retinal pigment epithelium from chorio-retinal biopsies. Acta. Ophthalmol. 63: 129-134, 1985.

3. Hayashi, M., K. Asayama and S. Ueno, Tissue culture of the retinal pigment epithelial cells. *Acta. Ophthalmol.* 56: 83-94, 1978.
4. Campochiaro, P.A. and B.M. Glaser, Endothelial cells release a chemoattractant for retinal pigment epithelial cells in vitro. *Arch. Ophthalmol.* 103: 1876-1880, 1985.
5. Essner, E., J.R. Roszka and J.H. Schreiber, Phagocytosis and surface morphology in cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 17: 1040-1048, 1978.
6. Mayerson, P.L. and M.O. Hall, Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro. *J Cell Biol.* 103: 299-308, 1986.
7. Chan, C.C., J.J. Hooks, R.B. Nussenblatt and B. Detrick, Expression of Ia antigen on retinal pigment epithelium in experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res*, 5: 325-330, 1986.
8. Vollmer, G. and P.G. Layer, Reaggregation of chick retinal and mixtures of retinal and pigment epithelial cell, *Neurosci Lett*, 63: 91-95, 1986.
9. Boulton, M., J. Marshall and H.C. Wong, The generation of dense granules within cultured human retinal pigment epithelial cells at senescence. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 224: 106-109, 1986.
10. Wiedemann, P., S.J. Ryan, P. Novak and N. Sorgente, Vitreous stimulates proliferation of fibroblasts and retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 41: 619-628, 1985.
11. Weiter, J.J., F.C. Delori, G.L. Wing and K.A. Fitch, Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 27: 145-152, 1986.
12. Campochiaro, P.A. and B.M. Glaser, Endothelial cells release a chemoattractant for retinal pigment epithelial cells in vitro. *Arch Ophthalmol*, 103: 1876-1880, 1985.
13. Boulton, M. and J. Marshall, Repigmentation of human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Exp Eye Res*, 41: 209-218, 1985.

14. Mayerson, P.L., M.O. Hall, V. Clark and T. Abrams, An improved method for isolation and culture of rat retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 26: 1599-1609, 1985.
15. Rosenbaum, J.T., L. O'Rourke, G. Davies, C. Wenger, L. David and J.E. Robertson, Retinal pigment epithelial cells secrete substances that are chemotactic for monocytes. Curr Eye Res 6: 793-800, 1987.
16. Burke, J.M. and S.S. Twining, Vitreous macrophage elicitation : generation of stimulants for pigment epithelium in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci, 28: 1100-1107, 1987.
17. Schweigerer, L., B. Malerstein, G. Neufeld and D. Gospodarowicz, Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 143: 934-940, 1987.
18. Williams, D.S. and S.K. Fisher, Prevention of rod disk shedding by detachment from the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, 28: 184-187, 1987.
19. Boulton, M. and J. Marshall, Effects of increasing numbers of phagocytic inclusions on human retinal pigment epithelial cells in culture: a model for aging. Br J Ophthalmol, 70: 808-815, 1986.
20. Miller, H., B. Miller and S.J. Ryan, The role of retinal pigment epithelium in the involution of subretinal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci, 27: 1644-1652, 1986.

中藥致突變性作用之測定 (V)

知母等三十種藥材

Mutagenicity testing of Chinese drugs (V)
Anemarrhenae Rhizoma and other 29 Chinese drugs

廖志飛

國立陽明醫學院藥理學科暨藥理學研究所

摘 要

爲了評估中藥是否具有致突變性，本計畫就「中華民國中藥典範」中具有清熱瀉火、清熱涼血、清熱解毒或清熱解暑，如知母、黃蘗、龍膽草、穀精草、苦參、秦皮、赤芍藥、生地黃、玄參、紫草、金銀花、忍冬、連翹、蒲公英、山豆根、射干、敗醬、青黛、蘆薈、荷葉等二十種中藥及在文獻中已被報導可能具有致突變潛力，如紫蘇葉、柴胡、丁香、益智仁、茵陳蒿、土茯苓、紅花、莪朮、黃耆、淫羊藿等十種中藥，製備其熱水抽提物，以沙門菌回復突變測試法 [Salmonella/microsome (Ames) test] 及活體外非排定 DNA 合成測定法 [in vitro unscheduled DNA synthesis (UDS) assay] 做致突變性測定。於測試之劑量或濃度下，結果顯示黃蘗、穀精草、山豆根、荷葉、益智仁、紅花、莪朮於 Ames test 具有致突變性；於 UDS assay 則未檢出有作用之中藥。以活體小白鼠小核仁測試法 [in vivo micronucleus test in mice] 之致突變性測試法測試黃蘗、穀精草、苦參、荷葉及黃耆，結果顯示藥物以腹腔注射至 ICR 小白鼠 48 小時後，於股骨之骨髓中發現黃蘗 (2、5 g/kg)、穀精草 (2、5g/kg)、苦參 (1、2、5g/kg)、荷葉 (2、5g/kg) 及黃耆 (1、2、5g/kg) 會增加小核仁出現率。

ABSTRACT

To evaluate whether Chinese drugs have mutagenicity, the water extracts of 30 Chinese drugs such as *Anemarrhenae Rhizoma*, *Phellodenri Cortex* (PhC), *Gentianae Scabra Radix*, *Eriocauli Herba* (ErH), *Sophorae Radix*, *Fraxini Cortex*, *Paeoniae Veitchii Radix*, *Rehmanniae Radix et Rhizoma*, *Scrophulariae Radix*, *Lithospermi Radix*, *Lonicerae Flos*, *Lonicerae Caulis et Folium*, *Forsythiae Fructus*, *Taraxaci Herba*, *Menispermi Rhizoma* (MeR), *Belamcandae Rhizoma*, *Patriniae Herba*, *Indigo Pulverata*, *Aloe*, *Nelumbinis Folium* (NeF), *Perillae Folium*, *Bupleuri Radix*, *Caryophylli Flos*, *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* (AIOF), *Artemisiae Capillaris Herba*, *Smilacis Glarae Rhizoma*, *Carthami Flos* (CaF), *Zedoariae Rhizoma* (ZeR), *Astragali Radix*, and *Epimedii Herba* were tested with the *Salmonella*/microsome (Ames) test and the in vitro unscheduled DNA synthesis (UDS) assay. In the Ames test, PhC, ErH, MeR, NeF, AIOF, CaF, and ZeR exhibited mutagenic activity. In the UDS assay, none of above mentioned Chinese drugs increased UDS. Using the in vivo micronucleus test in mice, PhC, ErH, SoR, NeF, and AsR were further evaluated. The results showed that PhC (2, 5 g/kg), ErH (2, 5 g/kg), SoR (1, 2, 5 g/kg), NeF (2, 5 g/kg) and AsR (1, 2, 5 g/kg) significantly increased the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes in the bone marrow 48 hr after intraperitoneal injection of test drugs into the ICR mice.

前 言

歐、美、日等國家對於醫療系統內藥物(或稱西藥)之登記或新藥之申請，除必須提供有關藥效性與藥劑學品質評估數據外，亦需有安全性（特別是毒理

學)之評估數據(1)。而在我國對廣為應用之藥用天然物(或稱中藥)則未有此種規定，亦未建立有關毒理學試驗之準則。自 77 年度起陽明醫學院藥理研究所陳介甫教授於執行衛生署之「常用中藥毒性及生物活性之評估」五年計畫中，已陸續就衛生署所編「中華民國中藥典範」(2)中所列之常用中藥，做解熱、抗驚厥、降血壓、鎮痛及急性毒性之藥理評估。爲了配合此類急性毒性評估之計畫及探討中藥是否具有不可逆之遺傳學毒性 (genetic toxicity)。全程五年計畫(八十至八十四年度)已就「中華民國中藥典範」第一輯醫師處方常用 400 種中藥中，每年選取相關之 30 種中藥，製備其 50% 乙醇或熱水抽提物以沙門菌回復突變測試法 [Salmonella/microsome (Ames) test] 及活體外非排定 DNA 合成測定法 [in vitro unscheduled DNA synthesis (UDS) assay] 做致突變性毒理測定，並就經上述兩種測定後，懷疑有致突變潛力之中藥再以活體小白鼠小核仁測試法 [in vivo micronucleus test in mice] 之致突變性毒理測定來確認。第一年(八十年度，DOH-CD21)先建立 Ames test 及 UDS assay 評估法；並就如表一所列 29 種對心臟血管有作用之中藥做評估，結果顯示地骨皮、吳茱萸、夏枯草、馬兜鈴、菊花及黃芩等之 50% 乙醇抽提物及黃連之熱水抽提物具有致突變能力(3,4)。第二年計畫(八十一年度，DOH81-CM-064)繼續就如表二所列具有抗驚厥或鎮痛之 29 種中藥水抽提物做相似之致突變性測試，並建立活體小白鼠小核仁測試法，來確認上述在第一年經 Ames test 或 UDS assay 測試具有致突變性之 7 種中藥是否在活體內亦有致突變性作用；結果顯示木通、仙鶴草、白芷、白附子、延胡索、漢防己及馬兜鈴於 Ames test 具有致突變活性，而丹參、地骨皮及雞血藤會增加 UDS，另外夏枯草率馬兜鈴之 50% 乙醇抽提物於相當高劑量下會稍爲增加小核仁之出現率(5)。第三年(八十二年度，DOH82-CM-062)就如表三所列藥材爲乾燥果實或種子之 29 種中藥做類似之致突變性測試及確認；結果顯示女貞子、地膚子、柏子仁、菟絲子、葶藶子、蓮子及薏仁於 Ames test 具有致突變活性，而大風

子、葶藶子、蓮子及薏仁會增加 UDS，另外上計畫之馬兜鈴及漢防己於相當高劑量下會增加小核仁之出現率（6）。第四年（八十三年度，DOH83-CM-018）繼續就如表四對呼吸系統有作用之 29 種中藥之熱水抽提物做相似之測試，結果顯示旋覆花於 Ames test 具有致突變性；而百合及川貝母會增加 UDS。以活體小白鼠小核仁測試法之致突變性測試法測試旋覆花、百合及前計畫之大風子、女貞子、地膚子、柏子仁、菟絲子、葶藶子、蓮子、薏仁，結果顯示於腹腔注射 5 g/kg（旋覆花為 0.5 g/kg）至 ICR 小白鼠 48 小時後，於股骨之骨髓中發現柏子仁、菟絲子、蓮子及薏仁會增加小核仁出現率（7）。本年度（八十四年度，DOH84-CM-003）繼續就如表五於「中華民國中藥典範」（2）中具有清熱瀉火、清熱涼血、清熱解毒或清熱解暑如知母等二十種中藥及在文獻中（8,9）已被報導可能具有致突變潛力如紫蘇葉等十種中藥，製備其熱水抽提物做相似之測試，並以活體小白鼠小核仁測試法來確認具有致突變潛力之中藥在活體內是否具有致突變作用。

實驗方法與材料

I. 被測藥材

選用之藥材（如表五所示）乃「中華民國中藥典範」（2）中具有清熱瀉火、清熱涼血、清熱解毒或清熱解暑如知母等二十種中藥及在文獻中（8,9）已被報導可能具有致突變潛力，如紫蘇葉等十種中藥共三十種藥材。購自臺北市中藥行之藥材取適量以五倍量之二次水煮沸 60 分鐘後取抽提液，如此反覆抽提三次。把抽提液經 Whatman 1 號濾紙過濾後經 60 °C 加熱濃縮至約 500 毫升後冷凍，再經冷凍真空乾燥以製得粉末狀水抽提物。取適量之水提取物以適量之 DMSO 或二次水配成之溶液用於致突變性之測試。

II. 致突變性測試

A. Ames test 與 UDS assay

使用於已執行之「中藥毒理作用之測定」計畫中所建立之 *Salmonella*/microsome (Ames) test 與 *in vitro* unscheduled DNA synthesis (UDS) assay 測試法 (3,4), 進行有關之致突變性實驗。

Ames test 可測試被測之中藥提取物中是否能致使此種鼠傷寒桿菌之 genome 產生鹽基對置換 (base pair substitution) 或框構位移 (frame-shift) 之突變 (10)。此測試法是什麼微生物測試中最有效的, 是優先被考慮用在任何遺傳學毒性篩試系統中 (11)。

所建立之 Ames test 測試法採用直接平板混合法 (direct plate incorporation method)。使用之菌種係 *Salmonella typhimurium* TA98 及 TA100, 是由美國加州大學 Dr. Bruce N. Ames 供給, 可分別測定引起框構位移及鹽基對置換之突變物質 (10)。測法簡述如下: 於 2 ml 上層培養基 (45 °C) 中依序加入 0.1 ml 被測樣品, 0.1 ml *Salmonella typhimurium* TA98 或 TA100 菌種懸浮液, 視需要加入 0.5 ml microsomal S9 mix, 均勻搖盪後傾倒覆蓋於底層培養基平板上, 於 37 °C 培養箱中培養 48 小時, 然後計算 his^+ 逆突變 (his^+ revertant) 菌落數。TA98 菌株之自然突變數為 22-38 (不含 S9) 及 37-46 (含 S9); 而 TA100 為 99-147 (不含 S9) 及 116-181 (含 S9)。若被測之樣品引起逆突變菌落數超過上述自然突變菌落數二倍以上, 即視為該樣品具有致突變能力 (12)。陽性對照組於 TA98 使用 2-aminofluorene (10 µg/plate, 含 S9) 與 picrolonic acid (250 µg/plate, 不含 S9); 而於 TA100 使用 2-aminofluorene (10 µg/plate, 含 S9) 與 4-nitorquinoline-N-oxide (1 µg/plate, 不含 S9), 與往年一樣分別有 150、20、60 及 50 倍增加突變數。

大白鼠肝臟微粒體活化酵素之 S9 混合液之製備如下 (13): 大白鼠腹腔注

射 Aroclor 1254 (500 mg/kg) 五天後取其肝臟，加入 0.5 M KCl 緩衝液以 Potter-Elvehjem 均質機均勻磨碎，以 9000 x g (Beckman JA20) 離心 10 分，所得上層液即為 S9 懸浮液。其主要成份為微粒體 (microsomes)，所含之混合加氧酵素 (mixed-function oxygenase) 能使間接致突變劑 (indirect mutagen) 活化為具有致突變能力的終致突變劑 (ultimate mutagen)。每 1 ml S9 混合液中含有 0.1 ml S9 懸浮液，8 μ mol MgCl₂，23 μ mol KCl，5 μ mol glucose-6-phosphate，4 μ mol NADP 及 100 μ mol sodium phosphate，pH 7.4。

UDS assay 測試培養細胞之 DNA 被致突變劑破壞後之修護能力，亦是短期遺傳學毒性測試群中重要之一種方法。很明顯地 UDS 方法比 Ames test 與所謂之安全性評估更有關係 (11)。所建立之 UDS assay 採用液相閃爍計數 (LSC) 測定法。使用之細胞株係人類成纖維細胞 (human fibroblast cells, CRL1508)，是由中研院生醫所李德章博士供給。其測法簡述如下：取大約 $8-14 \times 10^4$ 細胞種殖於 6-well 之培養皿 (2 ml Dulbecco's modified Eagle medium 中含 10% fetal bovine serum, 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 及 0.37% sodium bicarbonate) 中，於第四天細胞達群集 (confluence) 時 (每皿含 $10-24 \times 10^4$ 細胞) 才開始測試實驗。測試時依序加入 10 mM hydroxyurea (以阻斷細胞進入 S phase (14,15))，視需要加入代謝性活化劑 S9 mix (0.2 ml)，被測樣品，及 8 μ Ci/ml [methyl-³H]thymidine ([³H]TdR, 68 Ci/mmol, ICN Biomedicals, Inc)，於培養箱 (10% CO₂, 37°C) 培養 3 小時後，置於冰上以冰冷之 150 mM NaCl 溶液沖洗二次，加入 1 ml 冰水後存於 -30°C 冷凍箱過夜。隔天取出解凍，把 cell lysate 移至試管中，加入 1 ml 冰冷之 20% trichloroacetic acid (TCA) 溶液於冰浴中靜置 45 分後，以冰冷之 5% TCA 溶液稀釋並立即於真空抽氣下以 GF/C 玻璃濾片收集 TCA 不溶之沉澱物，並以冰冷之 5% TCA 溶液沖洗濾片一

次 (16)。濾片以 10 ml 閃爍計數液 Ready Safe (Beckman) 或 Ecoscint (National Diagnostics) 測 β 放射性。

B. 活體小白鼠小核仁測試法

活體小白鼠小核仁測試法可測試被測之中藥提取物中是否會破壞染色體或絲狀分裂器 (mitotic apparatus)。此測試法已被日本選用為評估醫用及工業用化學物致突變性之測試群中必備之一種,用於經 Ames test 等 in vitro 測試法檢出有致突變潛力之物質的後續確認測試法 (12)。其測法步驟大致如下:原則上取 5 隻公與 5 隻母 ICR 小白鼠為一處理組 (本次實驗僅使用 3 隻為一組)。實驗包括一陰性對照組、一陽性對照組、三個不同劑量之中藥處理組 (1、2、5 g/kg)。陽性對照組使用 cyclophosphamide (17)。每隻實驗動物以水或藥物處理後,經 48 小時後犧牲取左腿股骨,取出骨髓與胎牛血清混和均勻後平塗在 3 片載玻片上,經絕對甲醇固定 5 分後以 May-Grunwald 與 Giemsa-staining 混合染色法 (18) 染色。以 1000 倍顯微鏡觀看,每隻實驗動物骨髓樣品至少觀看 3 x 500 個 polychromatic erythrocytes (PCE) 並檢出其中有多少個含小核仁 (micronuclei) 及算出其百分比。實驗數據整理後以 Student's t test 或 one way ANOVA 統計分析。

C. 藥物測試濃度或劑量

依各種藥材水抽提物之溶解度,於 Ames test 以不同量之 DMSO 配製含 0.1 克粉狀水抽提物之最高溶液當起試劑量;於 UDS assay 及活體小白鼠小核仁測試法中則以二次過濾水配製每毫升溶液含相當 0.5 克之原被測藥材之儲藏溶液,依需要而以二次水稀釋至所需之濃度。在活體小白鼠小核仁測試法中,動物依 10 g 體重由腹腔給予 0.1 ml 之藥物溶液給藥。

結果與討論

A. 中藥水抽提物

因中藥水抽提物溶液比較符合國人服用中藥方劑之煎煮藥湯，所以本計畫以水抽提物來評估。表六顯示 30 種中藥材經熱水抽提後所得之粉狀水抽提物之重量與原藥材重量之百分比（即抽提率）。其中以 19. 蘆薈最高(65.9 %)，而以 3. 穀精草最低 (2.3 %)。由於中藥每次抽提之程度一定會有差異，爲了標準化所以本研究測試結果之劑量或濃度均以原藥材重量計，而不是以水抽提物之重量計。

B. Ames Test

TA98 菌株之自然突變數爲 49 ± 3 (含 S9) 與 30 ± 2 (不含 S9)，而 TA100 爲 138 ± 5 (含 S9) 與 144 ± 4 (不含 S9)。30 種中藥水抽提物 (其中 6. 秦皮水抽提物漏測) 先以單劑量測試其致突變能力，結果如表七所示。此單劑量之選定係以 1-3 毫升 DMSO 配製 0.1 g 被測藥材之粉狀水抽提物成溶液當起試劑量，而表中所列劑量係經抽提率換算而以原藥材重量表示。如以所測定樣品引起逆突變菌落數增爲自然突變菌落數之二倍以上即判定該樣品具有致突變能力 (12)，則於 TA98 中有 4. 穀精草 (+S9 & -S9)、20. 荷葉 (+S9)、24. 益智仁 (-S9)、27. 紅花 (-S9) 及 28. 莢朮 (-S9)；於 TA100 中則有 2. 黃蘗 (+S9)、4. 穀精草 (+S9 & -S9)、15. 山豆根 (-S9)、20. 荷葉 (+S9)。由表七知 2. 黃蘗 (30 mg/plate) 對 TA98 有顯著之致突變能力，於 S9 mix 存在下則消失，但於 S9 mix 存在下反而對 TA100 有明顯作用。當 2. 黃蘗之劑量減半則這些致突變能力就消失 (表八)。4. 穀精草 (351 mg/plate) 不管有無 S9 mix 存在下，對於 TA98 及 TA100 均有顯著之致突變能力 (表七)；當劑量減半則於 S9 mix 存在下還有致突變能力，但劑量再減半則作用消失 (表八)。20. 荷

葉 (88 mg/plate) 要在 S9 mix 存在下才對 TA98 或 TA100 有顯著之致突變能力 (表七)；當劑量減半則於 S9 mix 存在下還對 TA98 有致突變能力，但劑量再減半則作用消失 (表八)。15. 山豆根 (70 mg/plate) 對 TA100，而 24. 益智仁 (29 mg/plate)、27. 紅花 (50 mg/plate) 及 28. 莪朮 (71 mg/plate) 均對 TA98 有致突變作用，但於 S9 mix 存在下均消失 (表七)，因預測其作用在劑量減半後會消失，因此沒有進一步評估。19. 蘆薈 (30 mg/plate) 可殺死 TA98 與 TA100，當劑量降至 1/5 才無作用 (表八)。

上述表七有關 Ames test 之結果有 18 種中藥如 1. 知母、2. 黃蘗、3. 龍膽草、5. 苦參、10. 紫草、12. 忍冬、13. 連翹、15. 山豆根、19. 蘆薈、21. 紫蘇葉、22. 柴胡、23. 丁香、24. 益智仁、25. 茵陳蒿、26. 土茯苓、27. 紅花、29. 莪朮、30. 淫羊藿已被 Morimoto 等人 (8) 同樣評估過，而有 14 種中藥如 1. 知母、2. 黃蘗、3. 龍膽草、5. 苦參、6. 秦皮、7. 赤芍藥、13. 連翹、14. 蒲公英、22. 柴胡、25. 茵陳蒿、27. 紅花、28. 莪朮、29. 黃耆、30. 淫羊藿亦被 Yin 等人 (9) 同樣評估過，由實驗結果之比較發現有些吻合，有些不吻合，將分別討論如下。至於為何有不吻合之原因則未明，有待進一步之探討。至於其他 8 種中藥如 4. 穀精草、8. 生地黃、9. 玄參、11. 金銀花、16. 射干、17. 敗醬、18. 青黛、20. 荷葉之測試結果則為本研究首度報導，其中以 4. 穀精草及 20. 荷葉檢出有致突變能力，值得參考與注意。

由於 Morimoto 等人 (8) 之報導中所用之劑量以抽提物重量計 (最高至 10 mg/plate)，為比較方便暫以表六所述之水抽提率換算成原藥材重量一併列出。Morimoto 等人 (8) 報導 2. 黃蘗 (65 mg/plate) 不管有無 S9 mix 存在下對 TA98 均有致突變作用，但對 TA100 則有殺菌作用；而 Yin 等人 (9) 則報導其 (5-40 mg/plate) 對 TA98、TA100 均無致突變作用；而本研究發現 2. 黃蘗 (30 mg/plate) 對 TA98 有作用，於 S9 mix 存在下則消失，但於 S9 mix 存在下反而對 TA100 有明顯作用。Morimoto 等人 (8) 報導 3. 龍膽草

(32 mg/plate) 不管有無 S9 mix 存在下對 TA98 及 TA100 均有致突變作用，但本研究 (32 mg/plate) 及 Yin 等人 (9) (40 mg/plate) 均發現無作用。Morimoto 等人 (8) 報導 12. 忍冬 (91-182 mg/plate) 不管有無 S9 mix 存在下對 TA98 及 TA100 均有致突變作用，但本研究 (122 mg/plate) 發現無作用。本研究發現 15. 山豆根 (70 mg/plate) 對 TA100 有作用，而 Morimoto 等人 (8) 則報導無作用 (52 mg/plate)，但其甲醇之抽提物則對 TA100 有作用。Morimoto 等人 (8) 報導 22. 柴胡 (86 mg/plate) 對 TA100 有作用，但於 S9 mix 存在下則消失；本研究 (86 mg/plate) 則未發現無作用。本研究發現 24. 益智仁 (29 mg/plate)、27. 紅花 (50 mg/plate) 及 28. 莪朮 (71 mg/plate) 均對 TA98 有致突變作用，而 Morimoto 等人 (8) 則報導 24. 益智仁 (73 mg/plate)、27. 紅花 (50 mg/plate)、28. 莪朮 (106 mg/plate) 無作用，而 Yin 等人 (9) 則報導 27. 紅花 (5-40 mg/plate)、28. 莪朮 (5-40 mg/plate) 無作用。Yin 等人 (9) 報導 29. 黃耆 (5-40 mg/plate) 於 S9 mix 存在下對 TA98 有明顯致突變作用，但於本研究 (23 mg/plate) 則未見作用。於 Ames test 均一致發現其水抽提物無致突變性者有：1. 知母 (5-40 mg/plate)、5. 苦參 (5-85 mg/plate)、7. 赤芍藥 (5-40 mg/plate)、10. 紫草 (46-231 mg/plate)、13. 連翹 (5-126 mg/plate)、14. 蒲公英 (5-41 mg/plate)、19. 蘆薈 (15-30 mg/plate)、21. 紫蘇葉 (39-58 mg/plate)、23. 丁香 (65 mg/plate)、25. 茵陳蒿 (5-57 mg/plate)、26. 土茯苓 (30 mg/plate)、30. 淫羊藿 (48-96 mg/plate)。但其中除 1. 知母、7. 赤芍藥、10. 紫草及 14. 蒲公英外，其餘不是其甲醇抽提物於 Ames test 有致突變性，就是於其它致突變測試中發現有致突變性 (8,9)。例如其水抽提物於 *Bacillus subtilis* rec-assay 中有致突變性者有 19. 蘆薈 及 23. 丁香 (8)，而 5. 苦參腹腔注射至小白鼠會導致骨髓細胞染色體迷亂 (chromosomal aberrations) 及增加小核仁出現率 (9)。

許多中草藥之水抽提物包括 10. 紫草、14. 蒲公英 (19) 在 Ames test 已被報導具有抗突變能力，因此於本研究中未檢出有致突變能力之中藥並不能排除其未含有致突變能力之物質。

C. UDS Assay

因非排定 DNA 合成 (UDS) 係測定 [^3H]TdR 併入不在 cell cycle S phase 之培養細胞的 DNA 內，所以常用 hydroxyurea 來阻斷細胞進入 S phase 及阻斷複製性的 DNA 合成 (14-15)。先前之研究 (3,4) 已知 10 mM hydroxyurea 可抑制 96-98% 之 [^3H]TdR 併入細胞之 DNA。因原凍存之 CRL1508 細胞不慎被丟棄，去年度再度向中研院生醫所李德章博士要新一批 CRL1508 細胞來檢測。經以在 10 mM hydroxyurea 存在之情況下 (可抑制 80-88% 之 [^3H]TdR 併入細胞之 DNA)，測試 10^{-6} M NQO 及 3×10^{-6} M NQO，結果顯示分別有 $73 \pm 6\%$ ($n=3$) 及 $98 \pm 27\%$ ($n=5$) 之增加 UDS。本年度取用此批凍存之細胞經解凍後再培養來檢測，由種下之細胞數目與第四天做測試時之細胞數目比較知細胞之增殖於第四天時不似以前多，因此於實驗狀況下細胞之 [^3H]TdR 併入值比往年低 (1500-2400 dpm vs. 4000-6000 dpm)，但於 10 mM hydroxyurea 存在下其 [^3H]TdR 併入值與往年差不多 (1000-1600 dpm vs. 1200-1400 dpm)，相較下 10 mM hydroxyurea 就只有 22-35% 抑制 [^3H]TdR 併入細胞之 DNA ($n > 10$)。由表九知 NQO (10^{-6} 、 3×10^{-6} 、 10^{-5} M) 可與濃度有關地抑制 [^3H]TdR 併入細胞之 DNA，而於 10 mM hydroxyurea 存在下之 [^3H]TdR 併入值 (即所謂之 UDS) 則分別有 62%、36% 之增加及 -10% 之變化，後者之減少可能與其毒性加大有關，因於 10^{-5} M NQO 處理三小時後細胞之形狀已明顯之變化。基於此類毒理測試常見倒 V 型之濃度作用圖，因此本實驗如往年一樣，儘量測試不同濃度之中藥水抽提物以增加檢出之機會，其結果經整理表示於表十。實驗中發現某些中藥於所示之濃度下，如 1. 知母 (5

mg/ml)、6.秦皮 (20 mg/ml)、7.赤芍藥 (5 mg/ml)、10.紫草 (40 mg/ml)、12.忍冬 (40 mg/ml)、13.連翹 (40 mg/ml)、14.蒲公英 (40 mg/ml)、19.蘆薈 (5 mg/ml)、20.荷葉 (20 mg/ml)、21.紫蘇葉 (20 mg/ml)、22.柴胡 (20 mg/ml)、23.丁香 (10 mg/ml) 及 24.益智仁 (20 mg/ml)，可能會對細胞造成傷害，因於處理三小時後可見細胞之形狀改變或脫離培養皿底，其中以 1.知母於加藥後 30 分內即見細胞之形狀改變或脫離培養皿底，最為特別。由表十知所有測試之中藥水抽提物 (1-40 mg/ml) 中除 26.土茯苓、28.莪朮、30.淫羊藿外，均呈現與濃度有關地抑制 [^3H]TdR 併入 DNA，其中以 19.蘆薈之作用較強。於 10 mM hydroxyurea 存在下之 [^3H]TdR 併入 (即 UDS) 則未見有任何中藥水抽提物有意義地增加之；其中除 9.玄參、26.土茯苓、28.莪朮、30.淫羊藿外，其餘之中藥亦均呈現與濃度有關地抑制 UDS (表十)。

與往年一樣，在 UDS 測試中亦添加在 Ames test 中廣為使用之標準代謝性活化劑 S9 mix 以檢驗是否有會受其活化之致突劑出現。雖然實驗數據與表十之數據比較時有些差異，但由表十一知於選用之濃度下，除 4.穀精草 (20 mg/ml) 外，未見有增加 UDS 之中藥。添加 S9 mix 使對照組之 [^3H]TdR 併入明顯降低，而使 6.秦皮、7.赤芍藥、12.忍冬、13.連翹、24.益智仁、25.茵陳蒿與此對照組比較時呈現有意義地增加 [^3H]TdR 併入，但如其與未添加 S9 mix 之對照組比較時，則均無明顯變化 (表十一)。添加 S9 mix 很明顯增加 2.黃蘗、9.玄參、18.青黛抑制 [^3H]TdR 併入之作用，但降低 25.茵陳蒿抑制 [^3H]TdR 併入之作用。有趣的是先前未檢出有增加 UDS 之 4.穀精草於此實驗竟出現顯著地增加 UDS；由去年之經驗知原配製之藥物溶液可能已有變化，於是重新配製並做比較實驗。由表十二知，老舊之 4.穀精草可與濃度有關地增加 [^3H]TdR 併入 DNA，而於 hydroxyurea (10 mM) 存在下亦未見此種增加有明顯地改變；新配製之 4.穀精草則無論有無 hydroxyurea 存在下均可與濃度有關地抑制 [^3H]TdR 併入 DNA。此種差異性雖可能是 4.穀精草中有促進及抑制

[^3H]TdR 併入 DNA 之成份並存，而抑制之成份因較不穩定，於儲藏一段時間會被破壞，此時使促進之成份顯出其作用。但檢驗細胞培養皿時，發現經老舊之 4. 穀精草處理 3 小時後之細胞與細胞間有東西沉積且不易洗去，因此是否是這些物質引致之增加，則有待進一步之探討。

D. 活體小白鼠小核仁測試法

參照 Salamone 等人 (17) 之報導，ICR 小白鼠經腹腔注射陽性對照藥物 cyclophosphamide (50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 48 小時後犧牲，取股骨內骨髓塗片 (每隻動物製 3 片)，經固定及染色後，以 1000 倍顯微鏡觀看抹片中至少各 500 個 polychromatic erythrocytes (PCE)，發現小核仁 (micronuclei) 之數目有明顯增加 (表十三)，但隨劑量加大有減少趨勢。本次研究發現處理 cyclophosphamide 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 48 小時，動物股骨內骨髓塗片中鮮見 PCE。經以所能配製之最高劑量 (5 g/kg) 再二倍稀釋共三個劑量來評估 2. 黃蘗、4. 穀精草、5. 苦參、20. 荷葉及 29. 黃耆，其結果如表十三所示。除 5. 苦參之作用隨劑量增加有漸減趨勢外，其餘 4 種中藥之作用均隨劑量增加而漸增。其中以 20. 荷葉 (5 g/kg) 增加小核仁之出現率最高。

Yin 等人 (9) 報導 5. 苦參 (0.5-2.0 g/kg)、13. 連翹 (3.4 g/kg)、27. 紅花 (2.0-4.0 g/kg) 及 29. 黃耆 (1-10 g/kg) 會增加小核仁之出現率，但未發現 2. 黃蘗會增加小核仁之出現率。上述 5 種中藥除 29. 黃耆外，於 Ames test 均未發現有致突變性 (9)。本研究證實 5. 苦參 (1-5 g/kg) 及 29. 黃耆 (1-5 g/kg) 會增加小核仁之出現率，但卻發現 2. 黃蘗 (2-5 g/kg) 會增加小核仁之出現率，此與本研究之 Ames test 中檢出 2. 黃蘗於 S9 mix 存在下對 TA100 有致突變性 (表七)，似有些吻合。另外，於本研究之 Ames test 中 (表七) 檢出有致突變性之 4. 穀精草 (+S9 & -S9) 及 20. 荷葉 (+S9) 亦會增加小核仁之出現率 (表十三)。

建 議

經文獻檢索知某些中藥所含之黃酮類化合物 (20) 或 isoquinoline 生物鹼 (21) 具有致突變能力；而四種含槲皮素之醫用植物乙醇抽提物製劑已被報導具有致突變性 (22)。五年來之計畫實驗結果亦顯示某些中藥具有致突變潛力，而日本 Morimoto 等人 (8) 及大陸 Yin 等人 (9) 亦已報導某些中藥具有致突變潛力。雖然各家結果有些差異，但可肯定的是某些中藥具有致突變潛力，因此有關中藥之遺傳學毒性研究值得繼續進行，其成果除可提供中藥安全性之依據外，對於那些經各類評估而被確認具有不可逆遺傳學毒性之中藥則應宣導少用或不用。至於有致突變潛力之中藥是否其所含成份有致突變劑，或其成份不含致突變劑但受環境之致突變劑污染所致，均有待進一步探討。

誌 謝

本計畫承蒙國立中國醫藥研究所所長 陳介甫教授啓發與鼓勵，國立陽明醫學院生化學學科 張勝祺副教授協助 Ames test 之執行，行政院衛生署麻醉藥品經理處處長 李志恆博士建議使用人類成纖維細胞，中央研究院生物醫學科學研究院 李德章博士供應人類成纖維細胞株，及行政院衛生署中醫藥委員會提供研究經費 (DOH-CD21、DOH 81-CM-064、DOH 82-CM-062、DOH83-CM-018 及 DOH 84-CM-003)之補助，在此一併誌謝。

參 考 文 獻

1. Inveresk Research International. Regulatory Guidelines, Number

- 1-5, 1990 & 1991.
2. 行政院衛生署. 中華民國中藥典範, 1985.
3. Liao, J.F., Chang, S.C., and Chen, C.F. Mutagenicity testing of the crude extracts of 30 Chinese drugs. *Journal of Chinese Medicine* 3: 73-85, 1992.
4. 廖志飛. 中藥毒理作用之測定. 行政院衛生署中醫藥年報, 第十期, 第二冊, 296-316 頁, 1993。
5. 廖志飛. 中藥致突變性作用之測定 (2) 川烏頭等三十種藥材. 行政院衛生署中醫藥年報, 第十一期, 第二冊, 539-564 頁, 1994。
6. 廖志飛. 中藥毒理作用之測定 (3). 行政院衛生署中醫藥年報, 第十二期, 1995 (編印中)。
7. 廖志飛. 中藥致突變性作用之測定 (4) 苦杏仁等三十種藥材. 行政院衛生署中醫藥年報, 第十三期, 1996 (編印中)。
8. Morimoto, I., Watanabe, F., Osawa, T., Okitsu, T.: Mutagenicity screening of crude drugs with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Mutation Research* 97: 81-102, 1982.
9. Yin, X.J., Liu, D.X., Wang, H., Zhou, Y.: A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine. *Mutation Research* 260: 73-82, 1991.
10. Maron, D. M. and Ames, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113: 173-215, 1983.
11. Ray, V.A. Application of microbial and mammalian cells to the assessment of mutagenicity. *Pharmacological Reviews* 30: 537-554, 1979.

12. Ishidate Jr., M. A proposed battery of tests for the initial evaluation of the mutagenic potential of medicinal and industrial chemicals. *Mutation Research* 205: 397-407, 1988.
13. Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31: 347-364, 1975.
14. Yarbrow, J.W., Kennedy, B.J., and Barnum, C.P. Hydroxyurea inhibition of DNA synthesis in Ascites tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.)* 53: 1033-1035, 1965.
15. Lieberman, M. W., Sell, S., and Farber, E. Deoxyribonucleoside incorporation and the role of hydroxyurea in a model lymphocyte system for studying DNA repair in carcinogenesis. *Cancer Research* 31: 1307-1312, 1971.
16. Williams, G.M. Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures. *Cancer Research* 37: 1845-1851, 1977.
17. Salamone, M., Heddle, J., Stuart, E., and Katz, M.: Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Research* 74: 347-356, 1980.
18. Adler, I.-D. Cytogenetic tests in mammals. In: *Mutagenicity Testing. A Practical Approach.* (Venitt, S. and Parry, J. M. eds.), IRL Press, Washington DC, pp. 275-306, 1984.
19. Lee, H. and Lin, J.-Y. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutation Research* 204: 229-

234, 1988.

20. MacGregor, J.T. Genetic toxicology of dietary flavonoids. In: Genetic Toxicology of the Diet (Knudsen, I. ed.), Alan R. Liss, New York, pp 33-43, 1986.
21. Nozaka, T., Watanabe, F., Tadaki, S., Ishino, M., Morimoto, I., Kunitomo, J., Ishii, H., and Natori, S. Mutagenicity of isoquinoline alkaloids, especially of the aporphine type. Mutation Research 240: 267-279, 1990.
22. Schimmer, O., Hafele, F., and Kruger, A. The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. Mutation Research 206: 201-208, 1988.

表一 八十年代測試之藥材

1. 人參 (Ginseng Radix) 爲五加科人參 [*Panax ginseng* C.A. MEYER] 去鬚根之乾燥根 (564)
2. 山楂 (Crataegi Fructus) 爲薔薇科山楂 [*Crataegus pinnatifida* BUNGE] 之乾燥成熟果實 (424)
3. 大薊 (Cirsii Japonici Herba) 爲菊科大薊 [*Cirsium japonicum* DC.] 之乾燥全草或根 (494)
4. 大棗 (Zizyphi Fructus) 爲鼠李科大棗 [*Zizyphus jujuba* MILL. var. *inermis* (BGE.) REHD.] 之乾燥成熟果實 (582)
5. 三七 (Pseudoginseng Radix) 爲五加科三七 [*Panax Pseudo-ginseng* WALL. var. *notoginseng* (BURKILL)] 之乾燥根 (500).
6. 仙茅 (Curculiginis Rhizoma) 爲石蒜科仙茅 [*Curculigo orchoides* GAERTNER] 之乾燥根莖 (627)
7. 白茅根 (Imperatae Rhizoma) 爲禾本科白茅 [*Imperata cylindrica* (L.) P. BEAUV. var. *major* (NEES) C. E. HUBB.] 去鬚根及膜質鞘之乾燥根莖 (489)
8. 地骨皮 (Lycii Radicis Cortex) 爲茄科枸杞 [*Lycium chinese* MILL.] 之乾燥根皮 (127)
9. 全蠍 (Scorpion) 爲蠍科昆蟲鉗蠍 [*Buthus martensi* KARSCH] 之乾燥蟲體 (336)
10. 牡丹皮 (Moutan Radicis Cortex) 爲毛茛科牡丹皮 [*Paeonia suffruticosa* ANDR.] 縱切剝除木部之乾燥根皮 (123)
11. 防風 (Saposhinkoviae Radix) 爲繖形科防風 [*Saposhinkovia divaricata* (TURCZ.) SCHISCHK.] 之乾燥根 (14)
12. 杜仲 (Eucommiae Cortex) 爲杜仲科杜仲 [*Eucommia ulmoides* OLIVER] 之乾燥樹皮 (610)
13. 決明子 (Cassiae Torae Semen) 爲豆科決明 [*Cassia torae* LINN.] 之乾燥種子 (91)
14. 車前子 (Plantaginis Semen) 爲車前科車前 [*Plantago asiatica* LINN.] 之乾燥種子 (249)

15. 吳茱萸 (*Evodiae Fructus*) 爲芸香科吳茱萸 [*Evodia rutaecarpa* (JUSS.) BENTH] 之乾燥果實 (184)
16. 青葙子 (*Celosiae Semen*) 爲莧科青葙 [*Celosia argentea* LINN.] 之乾燥成熟種子 (102)
17. 海帶 (*Laminariae Thallus*) 爲昆布科海帶 [*Laminaria japonica* ARESCH.] 之乾燥葉狀體 (396)
18. 桃仁 (*Persicae Semen*) 爲薔薇科桃 [*Prunus persica* (L.) BATSCH] 之乾燥成熟去果皮種仁 (530)
19. 桑寄生 (*Loranthi Ramulus*) 爲桑寄生科桑寄生 [*Loranthus parasiticus* (L.) MERR.] 之乾燥枝葉 (598)
20. 夏枯草 (*Prunellae Spica*) 爲唇形科夏枯草 [*Prunella vulgaris* LINN.] 之乾燥花序或果穗 (74)
21. 馬兜鈴 (*Aristolochiae Fructus*) 爲馬兜鈴科馬兜鈴 [*Aristolochia debilis* SIEB. et ZUCC.] 之乾燥果實 (415)
22. 鉤藤 (*Uncariae Ramulus et Uncus*) 爲茜草科鉤藤 [*Uncaria rhyncholphylla* (MIQ.) JACKS.] 之帶鉤枝藤 (740)
23. 側柏葉 (*Biotae Folium et Ramulus*) 爲柏科側柏 [*Biota orientalis* (L.) ENDL.] 之乾燥枝葉 (481)
24. 黃芩 (*Scutellariae Radix*) 爲唇形科黃芩 [*Scutellaria baicalensis* GEORGI] 之乾燥根 (77)
25. 黃連 (*Coptidis Rhizoma*) 爲毛茛科黃連 [*Coptis chinensis* FRANCH.] 除去鬚根之乾燥根莖 (80)
26. 黃精 (*Polygonati Rhizoma*) 爲百合科黃精 [*Polygonatum sibiricum* REDOUTE] 之乾燥根莖 (603)
27. 菊花 (*Chrysanthemi Flos*) 爲菊科菊 [*Chrysanthemum morifolium* RAMAT.] 之頭狀花序 (37)
28. 葛根 (*Puerariae Radix*) 爲豆科葛 [*Pueraria lobata* (WILLD.) OHWI] 之塊根除去栓皮乾燥而得 (40)
29. 當歸 (*Angelicae Sinensis Radix*) 爲繖形科當歸 [*Angelica sinensis* (OLIVER) DIELS] 之乾燥根 (595)
30. 稀薺 (*Siegesbeckiae Herba*) 爲菊科稀薺 [*Siegesbeckia orientalis* L. var. *pubescens* MAK.] 之乾燥全草 (319)

表二 八十一年度測試之藥材

1. 川烏 (*Aconiti Carmichaeli Radix*) 爲毛茛科川烏頭 [*Aconitum carmichaeli* DEBX.] 之乾燥塊根或子根 (305)
2. 丹參 (*Salviae Miltiorrhizae Radix*) 爲唇形科丹參 [*Salvia miltiorrhiza* BUNGE] 之乾燥根 (519)
3. 牛膝 (*Achyranthis Radix*) 爲莧科懷牛膝 [*Achyranthes bidentata* BLUME] 之乾燥根 (532)
4. 巴豆 (*Tiglii Semen*) 爲大戟科巴豆 [*Croton tiglium* LINN.] 之乾燥種子 (210)
5. 木瓜 (*Chaenomeles Fructus*) 爲薔薇科貼梗海棠 [*Chaenomeles lagenaria* (LOISEL.) KOIDZ.] 之乾燥果實 (296)
6. 木通 (*Akebiae Caulis*) 爲木通科白木通 [*Akebia trifoliata* (THUNB.) KOIDZ.] 去外皮之乾燥莖 (256)
7. 木防己 (*Cocculis Rhizoma*) 爲防己科木防己 [*Cocculus trilobus* (THUNB.) DC.] 之乾燥根 (298)
8. 升麻 (*Cimicifugae Rhizoma*) 爲毛茛科升麻 [*Cimicifuga foetida* LINN.] 之乾燥根莖 (46)
9. 天麻 (*Gastrodiae Rhizoma*) 爲蘭科天麻 [*Gastrodia elata* BLUME] 之乾燥根莖 (746)
10. 天南星 (*Arisaematis Rhizoma*) 爲天南星科天南星 [*Arisaema consanguineum* SCHOTT] 之乾燥塊莖 (356)
11. 五加皮 (*Acanthopanacis Cortex*) 爲五加科五加 [*Acanthopanax gracilistylus* W. W. SMITH] 之乾燥根皮 (294)
12. 仙鶴草 (*Agrimoniae Herba*) 爲薔薇科龍牙草 [*Agrimonia pilosa* LEDEB. var. *japonica* (MIQ.) NAKAI] 之乾燥全草 (496)
13. 甘草 (*Glycyrrhizae Radix*) 爲豆科甘草 [*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.] 之乾燥根及地下根狀莖 (585)
14. 石南葉 (*Photiniae Folium*) 爲薔薇科石南 [*Photinia serrulata* LINDL.] 之乾燥葉 (311)

15. 白芷 (Angelicae Dahuricae Radix) 爲繖形科白芷 [*Angelica dahurica* BENTH. et HOOK. var. *pai-chi* KIMURA, HAYATA et YEN]之乾燥根 (327)
16. 白蒺藜 (Tribuli Fructus) 爲蒺藜科蒺藜 [*Tribulus terrestris* LINN.]之乾燥果實 (323)
17. 白附子 (Aconiti Coreani Tuber) 爲毛茛科黃花烏頭 [*Aconitum coreanum* (LEVL.) RAP.]之乾燥塊根 (325)
18. 延胡索 (Corydalis Tuber) 爲罂粟科延胡索 [*Corydalis yanhusuo* W.T. WANG]之乾燥塊莖 (464)
19. 青蒿 (Artemisiae Apiaceae Herba) 爲菊科蒿 [*Artemisia apiacea* HANGE]之乾燥全草 (51)
20. 松節 (Pini Nodi Lignum) 爲松科油松 [*Pinus tabulaeformis* CARR.]之乾燥瘤狀節 (334)
21. 威靈仙 (Clematidis Radix) 爲毛茛科威靈仙 [*Clematis chinensis* OSBECK]之乾燥根及根莖 (292)
22. 海桐皮 (Erythrinae Cortex) 爲豆科刺桐 [*Erythrinae variegata* L. var. *orientalis* (L.) MERR.]之乾燥幹皮 (307)
23. 秦艽 (Gentianae Macrophyllae Radix) 爲龍膽科秦艽 [*Gentiana macrophylla* PALL.]之乾燥根 (301)
24. 草烏頭 (Aconiti Kusnezoffii Radix) 爲毛茛科北烏頭 [*Aconitum kusnezoffii* REICHB.]之乾燥塊根
25. 絡石藤 (Trachelospermi Caulis) 爲夾竹桃科絡石 [*Trachelospermum jasminoides* (LINDL.) LEM.]之乾燥帶葉莖枝 (316)
26. 遠志 (Polygalae Radix) 爲遠志科遠志 [*Polygala tenuifolia* WILLD.]除去木部之乾燥根皮 (735)
27. 漢防己 (Hanfangchi Radix) 爲馬兜鈴科漢中防己 [*Aristolochia heterophylla* HEMSL.]之乾燥根 (288)
28. 獨活 (Angelicae Tuhou Radix) 爲繖形科重齒毛當歸 [*Angelica pubescens* MAXIM. f. *biserrata* SHAN et YUAN]之乾燥根 (290)
29. 雞血藤 (Millettiae Caulis) 爲豆科香花岩豆藤 [*Millettia dielsiana* HARMS]之乾燥藤莖 (314)
30. 蒿本 (Ligusticum Sinensis Rhizoma et Radix) 爲繖形科蒿本 [*Ligusticum sinensis* OLIV.]之乾燥根莖及根 (330)

表三 八十二年度測試之藥材

1. 大風子 (Hydnocarpi Semen) 爲大風子科大風子 [*Hydnocarpus anthelmintica* PIER. ex LANESS.]之成熟種子 (799)
2. 女貞子 (Ligustri Fructus) 爲木犀科女貞 [*Ligustrum lucidum* AITON]之乾燥成熟果實 (661)
3. 牛蒡子 (Arctii Fructus) 爲菊科惡實 [*Arctium lappa* LINN.]乾燥成熟之果實 (35)
4. 五味子 (Schizandrae Fructus) 爲木蘭科五味子 [*Schizandra chinensis* (TURCZ.) BAILL.]之乾燥果實 (685)
5. 白芥子 (Sinapis Albae Semen) 爲十字花科白芥 [*Brassica alba* BOISS.]之成熟乾燥種子 (361)
6. 地膚子 (Kochiae Fructus) 爲藜科地膚 [*Kochia scoparia* (L.) SCHRAD.]之乾燥果實 (791)
7. 金櫻子 (Rosae Laevigatae Fructus) 爲薔薇科金櫻 [*Rosa laevigata* MICHX.]之乾燥果實 (698)
8. 使君子 (Quisqualis Fructus) 爲使君子科使君子 [*Quisqualis indica* LINN.]之乾燥成熟果實 (769)
9. 苦楝子 (Meliae Toosendan Fructus) 爲楝科川楝 [*Melia toosendan* SIEB. et ZUCC.]之乾燥成熟果實 (457)
10. 胖大海 (Sterculiae Semen) 爲梧桐科胖大海 [*Sterculia scaphigera* WALL.]之乾燥種子 (345)
11. 柏子仁 (Thujae Orientalis Semen) 爲柏科側柏 [*Thuja orientalis* LINN.]之乾燥種仁 (733)
12. 枸杞子 (Lycii Fructus) 爲茄科枸杞 [*Lycium chinense* MILL.]之乾燥成熟果實 (600)

13. 茺蔚子 (Leonuri Fructus) 爲唇形科益母草 [*Leonurus sibiricus* LINN.] 之乾燥果實 (554)
14. 梔子 (Gardeniae Fructus) 爲茜草科梔子樹 [*Gardenia jasminoides* ELLIS. var. *angustifolia* NAKAI] 之成熟乾燥果實 (65)
15. 牽牛子 (Pharbitidis Semen) 爲旋花科裂葉牽牛 [*Pharbitis nil* (L.) CHOISY] 之乾燥種子 (218)
16. 蛇床子 (Cnidii Monnieri Fructus) 爲繖形科蛇床 [*Cnidium monnieri* (L.) CUSSON] 之乾燥成熟果實 (789)
17. 紫蘇子 (Perillae Fructus) 爲唇形科皺紫蘇 [*Perilla frutescens* (L.) BRITT. var. *crispa* (THUNB.) HAND-MAZZ.] 之果實 (13)
18. 萊菔子 (Raphani Semen) 爲十字花科萊菔 [*Raphanus sativa* L. var. *hortensis* BACKER] 乾燥成熟種子 (422)
19. 菟絲子 (Cuscutae Semen) 爲旋花科菟絲子 [*Cuscuta chinensis* LAM.] 之乾燥成熟種子 (629)
20. 楮實 (Broussonetiae Fructus) 爲桑科楮(構) [*Broussonetia papyrifera* (L.) VENT.] 之乾燥果實 (649)
21. 葶藶子 (Lepidii Semen) 爲十字花科獨行菜 [*Lepidium apetalum* WILL.] 之乾燥種子 (372)
22. 蓖麻子 (Ricini Semen) 爲大戟科蓖麻 [*Ricinus communis* LINN.] 之乾燥成熟種子 (216)
23. 蒼耳子 (Xanthium Fructus) 爲菊科蒼耳 [*Xanthium strumarium* LINN.] 之乾燥果實 (30)
24. 蓮子 (Nelumbinis Semen) 爲睡蓮科蓮 [*Nelumbo nucifera* GAERTN.] 之乾燥果實 (692)
25. 蕤仁 (Prinsepiae Semen) 爲薔薇科小馬茄子 [*Prinsepia uniflora* BATAL.] 之乾燥成熟種仁 (671)
26. 蔓荊子 (Viticis Fructus) 爲馬鞭草科單葉蔓荊 [*Vitex rotundifolia* LINN.] 之乾燥成熟果實 (49)
27. 橄欖 (Canarii Fructus) 爲橄欖科橄欖 [*Canarium album* (LOUR.) RAEUSCH.] 之果實 (349)
28. 薔實 (Rosae Multiflorae Fructus) 爲薔薇科多花薔薇 [*Rosa multiflora* THUNB.] 之乾燥果實 (175)
29. 薏苡仁 (Coicis Semen) 爲禾本科薏苡 [*Coix lacryma-jobi* LINN.] 之種仁 (254)
30. 覆盆子 (Rubi Fructus) 爲薔薇科掌葉覆盆子 [*Rubus chingii* HU] 之乾燥未成熟果實 (694)

表四 八十三年度測試之藥材

止咳平喘

1. 苦杏仁 (Armeniaca Semen) 爲薔薇科杏 (*Prunus armeniaca* LINN.) 之乾燥成熟種子 (401)。
2. 紫菀 (Asteris Radix et Rhizoma) 爲菊科紫菀 (*Aster tataricus* L. f.) 之乾燥根及根莖 (403)。
3. 款冬花 (Farfarae Flos) 爲菊科款冬 (*Tussilago farfara* LINN.) 之乾燥花蕾 (405)。
4. 枇杷葉 (Eriobotryae Folium) 爲薔薇科枇杷 (*Eriobotrya japonica* (THUNB.) LINDL.) 之乾燥葉 (407)。
5. 桔梗 (Platycodi Radix) 爲桔梗科桔梗 (*Platycodon grandiflorum* (JACQ.) A. DC.) 除去外皮之乾燥根 (410)。
6. 桑白皮 (Mori Radicis Cortex) 爲桑科桑 (*Morus alba* LINN.) 之乾燥根內皮 (413)。
7. 百部 (Stemonae Radix) 爲百部科直立百部 (*Stemona sessilifolia* (MIQ.) FRANCH. et SAV.) 之乾燥塊根 (417)。
8. 白果 (Ginkgo Semen) 爲銀杏科銀杏 (*Ginkgo biloba* LINN.) 之乾燥種子 (420)。

潤燥化痰

9. 沙參 (Adenophorae Radix) 爲桔梗科輪葉沙參 (*Adenophora tetraphylla* (THUNB.) FISCH) 除去外皮之乾燥根 (340)。
10. 百合 (Lilii Bulbus) 爲百合科百合 (*Lilium brownii* F. E. BROWN var. *colchesteri* WILS.) 鱗莖之鱗葉 (343)。
11. 括樓根 (Trichosanthis Radix) 爲葫蘆科括樓 (*Trichosanthes kirillowii* MAXIM.) 之乾燥根 (347)。
12. 浙貝母 (Fritillaria Thunbergii bulbus) 爲百合科浙貝母 (*Fritillaria thunbergii* MIQ.) 之乾燥鱗莖 (351)。

溫化寒痰

13. 半夏 (Pinelliae Tuber) 爲天南星科半夏 (*Pinellia ternata* (THUNB.) BREIT.) 去外皮之乾燥根莖 (353)。
14. 白前 (Cynanchi Stauntoni Rhizoma et Radix) 爲蘿藦科柳葉白前 (*Cynanchum stauntoni* (DECNE.) HAND.-MAZZ.) 之乾燥根莖及根 (359)。
15. 旋覆花 (Inulae Flos) 爲菊科旋覆花 (*Inula britannica* L. var. *chinensis* (RUPR.) REGEL) 之乾燥頭狀花序 (363)。
16. 皂莢 (Gleditsiae Fructus) 爲豆科皂莢 (*Gleditsia sinensis* LAM.) 之乾燥果實 (366)。
17. 常山 (Dichroae Radix) 爲虎耳草科常山 (*Dichroa febrifuga* LOUR.) 之乾燥根 (368)。

清化熱痰

18. 前胡 (Peucedani Radix) 爲繖形科白花前胡 (*Peucedanum praeruptorum* DUNN) 之乾燥根 (370)。
19. 竹茹 (Bambusae Caulis in Taeniis) 爲禾本科淡竹 (*Phyllostachys nigra* MUNRO var. *henonis* STAPP ex ENDLE) 除去綠色表層，刮成薄帶或絲狀物 (375)。
20. 桔樓仁 (Trichosanthis Semen) 爲葫蘆科桔樓 (*Trichosanthes kirillowii* MAXIM.) 之乾燥種子 (389)。
21. 杜牛膝 (Carpesii Herba) 爲菊科天名精 (*Carpesium abrotanoides* LINN.) 之乾燥根及莖葉。
22. 川貝母 (Fritillariae Cirrhosae Bulbus) 爲百合科捲葉貝母 (*Fritillaria cirrhosa* D. Don) 之乾燥鱗莖 (398)。

行氣降氣

23. 大腹皮 (Arecae Pericarpium) 爲棕櫚科檳榔 (*Areca catechu* LINN.) 之乾燥成熟果皮 (436)。
24. 枳殼 (Aurantii Immaturus Fructus) 爲芸香科枳橘 (*Poncirus trifolia* (L.) RAF.) 之未成熟果實 (441)。
25. 烏藥 (Linderae Radix) 爲樟科烏藥 (*Lindera strychnifolia* (SIEB. et ZUCC.) F. VILLARS) 之乾燥根 (446)。
26. 香附子 (Cyperi Rhizoma) 爲莎草科莎草 (*Cyperus rotundus* LINN.) 之乾燥根莖 (452)。
27. 鬱金 (Curcumae Radix) 爲薑科鬱金 (*Curcuma aromatica* SALISB.) 之乾燥塊根 (455)。
28. 厚朴 (Magnoliae Cortex) 爲木蘭科厚朴 (*Magnolia officinalis* REHDER et WILSON) 之乾燥樹皮 (461)。
29. 延胡索 (Corydalis Tuber) 爲罂粟科延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W.T. WANG) 乾燥塊莖 (464)。
30. 柿蒂 (Kaki Calyx) 爲之柿科柿 (*Diospyros Kaki* L. f.) 果實上宿存花萼 (479)。

表五 八十四年度測試之藥材

清熱瀉火

1. 知母 (Anemarrhenae Rhizoma) 爲百合科知母 (*Anemarrhena asphodelopoea* BUNGE.) 之乾燥根莖 (62)
2. 黃蘗 (Phellodenri Cortex) 爲芸香科黃蘗 (*Phellodendron amurense* RUPRECHT.) 除去外表之乾燥樹皮 (84)
3. 龍膽草 (Gentianae Scabra Radix) 爲龍膽科龍膽 (*Gentiana scabra* BGE.) 之乾燥根或根莖 (89)
4. 穀精草 (Eriocauli Herba) 爲穀精草科穀精草 (*Eriocaulon buergerianum* KOERN) 之乾燥帶花梗之花序 (94)
5. 苦參 (Sophorae Radix) 爲豆科苦參 (*Sophora flavescens* AIT.) 之乾燥根 (98)
6. 秦皮 (Fraxini Cortex) 爲木犀科小葉白臘樹 (*Fraxinus bungeana* DC.) 之樹皮 (100)
7. 赤芍藥 (Paeoniae Veitchii Radix) 爲毛茛科川芍芍 (*Paeonia veitchii* LYNCH) 之乾燥根 (114)

清熱涼血

8. 生地黃 (Rehmanniae Radix et Rhizoma) 爲玄參科地黃 [*Rehmannia glutinosa* (GAERTN.) LIBOSCH.] 之乾燥根及根莖 (119)
9. 玄參 (Scrophulariae Radix) 爲玄參科玄參 [*Scrophularia ningpoensis* HEMSLE.] 之乾燥根 (121)
10. 紫草 (Lithospermi Radix) 爲紫草科紫草 [*Lithospermum erythrorhizon* SIEB. et ZUCC.] 之乾燥根 (133)

清熱解毒

11. 金銀花 (Lonicerae Flos) 爲忍冬科忍冬 [*Lonicera japonica* THUNB.] 之乾燥花蕾 (141)
12. 忍冬 (Lonicerae Caulis et Folium) 爲忍冬科忍冬 [*Lonicera japonica* THUNB.] 之乾燥帶葉莖枝 (144)
13. 連翹 (Forsythiae Fructus) 爲木犀科連翹 [*Forsythia suspensa* VAHL.] 之乾燥果實 (146)
14. 蒲公英 (Taraxaci Herba) 爲菊科蒲公英 [*Taraxacum mongolicum* HAND.-MAZZ.] 之乾燥全草 (150)
15. 山豆根 (Menispermi Rhizoma) 爲豆科廣豆根 [*Sophora subprostrata* CHUN et T. CHEN] 之乾燥根莖 (157)
16. 射干 (Belamcandae Rhizoma) 爲鳶尾科射干 [*Belamcanda chinensis* (L.) DC.] 之乾燥根莖 (159)
17. 敗醬 (Patriniae Herba) 爲敗醬科白花敗醬 [*Patrinia villosa* JUSS.] 之帶根全草 (161)
18. 青黛 (Indigo Pulverata) 爲爵床科馬藍 [*Baphieacanthus cusia* (NEES) BREM.] 之乾燥色素 (163)
19. 蘆薈 (Aloe) 爲百合科索哥德蘆薈 [*Aloe perryi* BAKER] 之葉片汁液經乾燥製成之塊體 (166)
20. 荷葉 (Nelumbinis Folium) 爲睡蓮科蓮 [*Nelumbo nucifera* GAERTN.] 之乾燥葉 (179)

其它

21. 紫蘇葉 (Perillae Folium) 爲唇形科皺紫蘇 [*Perilla frutescens* (L.) BRITT. var. *crispa* (THUNB.) HAND.-MAZZ.] 之乾燥葉 (或帶嫩枝) (8)
22. 柴胡 (Bupleuri Radix) 爲繖形科竹葉柴胡 (北柴胡) [*Bupleurum chinense* DC.] 之乾燥根 (43)
23. 丁香 (Caryophylli Flos) 爲桃金娘科丁香樹 [*Eugenia caryophyllata* THUNB.] 之乾燥花蕾 (189)
24. 益智仁 (Alpiniae Oxyphyllae Fructus) 爲薑科益智 [*Alpinia oxyphylla* MIQ.] 之乾燥成熟果實 (192)
25. 茵陳蒿 (Artemisiae Capillaris Herba) 爲菊科茵陳蒿 [*Artemisia capillaris* THUNB.] 之乾燥幼嫩莖葉 (259)
26. 桔梗 (Platycodi Radix) 爲桔梗科桔梗 [*Platycodon grandiflorum* (JACQ.) A. DC.] 除去外皮之乾燥根 (410)
27. 紅花 (Carthami Flos) 爲菊科紅花 [*Carthamus tinctorius* LINN.] 之乾燥花蕾 (527)
28. 莪朮 (Zedoariae Rhizoma) 爲薑科蓬莪朮 [*Curcuma zedoaria* (BERG.) ROSCOE] 之乾燥根莖 (539)
29. 黃耆 (Astragali Radix) 爲豆科內蒙黃耆 [*Astragalus mongholicus* BUNGE] 之乾燥根 (573)
30. 淫羊藿 (Epimedii Herba) 爲小蘗科淫羊藿 [*Epinedium grandiflorum* MORR.] 之乾燥地上部或全草 (625)

表六 中藥水抽提物之抽提率

藥材	抽提率 (%)*	藥材	抽提率 (%)
1. 知母	48.2	16. 射干	15.8
2. 黃蘗	16.8	17. 敗醬	12.9
3. 龍膽草	31.7	18. 青黛	3.8
4. 穀精草	2.3	19. 蘆薈	65.9
5. 苦參	11.8	20. 荷葉	11.4
6. 秦皮	11.6	21. 紫蘇葉	17.2
7. 赤芍藥	32.1	22. 柴胡	11.7
8. 生地黃	55.3	23. 丁香	15.4
9. 玄參	50.8	24. 益智仁	13.8
10. 紫草	4.3	25. 茵陳蒿	17.6
11. 金銀花	30.9	26. 土茯苓	33.3
12. 忍冬	5.5	27. 紅花	20.1
13. 連翹	8.0	28. 莪朮	9.5
14. 蒲公英	16.4	29. 黃耆	42.9
15. 山豆根	19.2	30. 淫羊藿	10.4

* 抽提率 (%) = (水抽提物重量 / 原藥材重量) x 100

表七 中藥水抽提物對沙門菌致突變性之測定

劑量 (mg/Plate)		Revertants/Plate			
		TA98		TA100	
		+S9	-S9	+S9	-S9
對照組		49±3#	30±2	138±5	144±4
1. 知母	17	67	34	160	154
2. 黃蘗	30	76	122*	322*	234
3. 龍膽草	32	62	33	182	179
4. 穀精草	351	116*	67*	588*	311*
5. 苦參	85	68	49	234	460*
6. 秦皮		-	-	-	-
7. 赤芍藥	31	43	53	198	177
8. 生地黃	24	43	58	186	171
9. 玄參	26	30	42	152	153
10. 紫草	46	63	29	137	143
11. 金銀花	32	46	42	172	174
12. 忍冬	122	43	57	179	211
13. 連翹	126	44	31	231	233
14. 蒲公英	41	39	46	142	161
15. 山豆根	70	64	38	188	322*
16. 射干	63	54	51	198	150
17. 敗醬	78	61	37	152	164
18. 青黛	5	87	34	188	125
19. 蘆薈	30	25	0	20	1
20. 荷葉	88	254*	43	298*	210
21. 紫蘇葉	39	46	30	191	157
22. 柴胡	86	55	54	178	163
23. 丁香	65	76	8	173	146
24. 益智仁	29	61	64*	166	148
25. 茵陳蒿	38	28	12	153	158
26. 土茯苓	30	61	38	169	155
27. 紅花	50	45	68*	155	157
28. 莪朮	71	74	68*	156	203
29. 黃耆	24	90	35	210	192
30. 淫羊藿	49	36	74	153	158

#：對照組以十次測定之平均值±標準誤差值表示，藥物組以兩次測定之平均值表示

*：表示突變菌落數大於兩倍對照組

-：表示未測定

表八 不同劑量之黃蘗、穀精草、荷葉、蘆薈水抽提物對沙門菌致突變性之測定

劑量 (mg/Plate)		Revertants/Plate			
		TA98		TA100	
		+S9	-S9	+S9	-S9
對照組		45±5#	32±5	139±7	137±4
2. 黃蘗	30	66	119*	290*	234
	15	40	52	213	134
4. 穀精草	351	94*	68*	289*	229
	176	104*	54	272*	217
	88	90	45	233	176
20. 荷葉	88	251*	-	304*	-
	44	127*	-	225	-
	22	90	-	-	-
19. 蘆薈	30	25	0	20	1
	6	32	34	159	190

#: 對照組以四次測定之平均值±標準誤差值表示，藥物組以兩次測定之平均值表示

*: 表示突變菌落數大於兩倍對照組

-: 表示未測定

表九 4-Nitroquinoline-N-oxide (NQO) 對 [³H]thymidine 併入人類成纖維細胞之影響

濃度 (mg/ml)		Control		Hydroxyurea (10 mM)		Hydroxyurea
		dpm/dish (% of Control)		dpm/dish (% of Control)		Control (%)
對照組		1434±150	(100±10)	1058±94	(100±9)	74
NQO	1 μM	1254±99	(87±7)	1709±187	(161±18)*	136
	3 μM	1079±41	(75±3)	1444±52	(136±5)	134
	10 μM	932±25	(65±2)	958±14	(90±1)	103

實驗數據以兩個測定值之平均值±標準誤差值表示

* p < 0.05, 藥物組 vs. 對照組

表十 不同濃度之中藥水抽提物對 [^3H]thymidine 併入人類成纖維細胞之影響

	-HU/+HU (% of control)					
	濃度 (mg/ml)					
	1	2	5	10	20	40
1. 知母	104/97	104/94	90/86	112/64	31/27	
2. 黃蘗	87/81		48/55	35/37	21/37	22/27
3. 龍膽草			105/83	93/80	76/88	59/74
4. 穀精草	105/110		97/95	81/82	62/79	63/83
5. 苦參	101/91		92/92	82/85	44/62	35/53
6. 秦皮	112/109		46/50	25/23	15/26	15/28
7. 赤芍藥	105/109	72/132	75/91	59/82	33/67	27/53
8. 生地黃			73/71	68/66	64/81	
9. 玄參			86/88	88/100	75/89	
10. 紫草			94/89	93/76	56/63	18/27
11. 金銀花	104/97		101/109	104/96	31/54	21/30
12. 忍冬	87/90		77/86	76/82	27/49	15/22
13. 連翹	76/93		68/91	55/94	26/40	16/27
14. 蒲公英			65/86	43/63	31/40	24/36
15. 山豆根			66/101	66/107	37/77	
16. 射干				49/85	39/63	31/51
17. 敗醬				56/78	45/69	37/62
18. 青黛				57/73	55/72	43/60
19. 蘆薈	84/101	26/53	23/50	20/47		
20. 荷葉	117/112		113/119	61/65	26/51	34/58
21. 紫蘇葉			53/75	38/50	25/32	18/23
22. 柴胡	101/117		100/103	98/102	67/81	45/74
23. 丁香	95/111		51/48	42/48	27/19	
24. 益智仁	100/106		102/118	78/96	55/76	30/51
25. 茵陳蒿	109/111		85/82	60/63	24/18	
26. 土茯苓				110/108	112/104	123/108
27. 紅花				83/95	67/74	47/60
28. 莪朮				111/101	108/100	90/103
29. 黃耆	101/89		88/77	90/84	80/78	63/76
30. 淫羊藿				107/113	109/122	86/91

實驗數據以兩個測定值之平均值表示

HU = hydroxyurea 10 mM

表十一 S9 mix 存在下中藥水抽提物對 UDS 之影響

		-S9		+S9		+S9/-S9 (%)
濃度		(mg/ml)		dpm/dish (% of Control)		
				dpm/dish (% of Control)		
對照組		631±34	(100±5)	458±8	(100±2)	73!!
1. 知母	5	583±5	(92±1)	509±5	(111±1)*	87!!
2. 黃蘗	10	516±12	(82±2)	364±1	(79±0.2)**	71!!
3. 龍膽草	20	737±21	(117±3)	499±18	(109±4)	68!
4. 穀精草	20	3474±18	(551±3)**	3261±87	(712±19)**	94
5. 苦參	20	579±18	(92±3)	469±11	(102±2)	81!
6. 秦皮	5	528±14	(84±2)	625±11	(136±2)**	118
7. 赤芍藥	5	665±14	(105±2)	627±12	(137±3)**	94
8. 生地黃	20	492±19	(78±3)	420±29	(92±6)	85
9. 玄參	20	502±5	(80±1)	385±20	(84±4)*	77!
10. 紫草	20	538±28	(85±4)	450±30	(98±7)	84
11. 金銀花	20	522±13	(83±2)	512±83	(112±18)	98
12. 忍冬	20	529±27	(84±4)	553±14	(121±3)*	105
13. 連翹	20	430±45	(68±7)	545±14	(118±3)*	127
14. 蒲公英	20	420±21	(67±3)*	519±79	(113±17)	124
15. 山豆根	20	558±20	(88±3)	507±12	(111±3)	91
對照組		672±10	(100±1)	447±13	(100±3)	67!!
16. 射干	20	474±15	(71±2)**	495±37	(111±8)	104
17. 敗醬	20	526±60	(78±9)	447±25	(100±6)	85
18. 青黛	20	533±13	(79±2)*	385±31	(86±7)	72!
19. 蘆薈	5	348±4	(52±1)**	397±53	(89±12)	114
20. 荷葉	10	667±58	(99±9)	696±104	(156±23)	104
21. 紫蘇葉	10	539±60	(80±9)	546±62	(122±13)	101
22. 柴胡	20	700±36	(104±5)	532±35	(119±8)	76
23. 丁香	5	383±47	(57±7)*	538±80	(120±17)	140
24. 益智仁	10	679±82	(101±12)	695±31	(155±7)*	102
25. 茵陳蒿	10	464±18	(69±3)**	551±1	(123±0.2)*	119!
26. 土茯苓	20	526±106	(78±15)	537±18	(120±4)	102
27. 紅花	20	460±15	(68±2)**	426±26	(95±6)	92
28. 莪朮	10	580±12	(86±2)*	515±21	(115±5)	89
29. 黃耆	20	442±35	(66±5)*	263±35	(59±8)*	60
30. 淫羊藿	20	524±51	(78±8)	580±36	(130±8)	111

實驗數據以兩個測定值之平均值±標準誤差值表示

* p < 0.05, ** p < 0.01, 藥物組 vs. 對照組

! p < 0.05, !! p < 0.01, +S9 vs. -S9

表十二 不同濃度之穀精草水抽提物對 [^3H]thymidine 併入人類成纖維細胞之影響

		Control		Hydroxyurea (10 mM)		Hydroxyurea
濃度						Control
(mg/ml)		dpm/dish	(% of Control)	dpm/dish	(% of Control)	(%)
對照組		1434 \pm 150	(100 \pm 10)	1058 \pm 94	(100 \pm 9)	74
4. 穀精草 (老)	10	2521 \pm 256	(176 \pm 18)*	2679 \pm 685	(253 \pm 65)*	106
	20	3358 \pm 93	(234 \pm 6)**	4347 \pm 613	(411 \pm 58)**	129
	40	5647 \pm 955	(394 \pm 67)**	6850 \pm 374	(647 \pm 35)**	121
4. 穀精草 (新)	10	1364 \pm 514	(95 \pm 13)	947 \pm 131	(90 \pm 12)	69
	20	1218 \pm 631	(85 \pm 9)*	733 \pm 146	(69 \pm 14)	60
	40	1064 \pm 256	(78 \pm 5)**	515 \pm 95	(49 \pm 9)*	48

實驗數據以兩個測定值之平均值 \pm 標準誤差值表示

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 藥物組 vs. 對照組

表十三 中藥水抽提物對小核仁出現率之影響

被測藥物				小時	小核仁#	小核仁出現率 (%)
對照組				48	0.44±0.18	0.09±0.04
Cyclophosphamide	50	mg/kg	48		2.78±0.68**	0.56±0.14**
	100	mg/kg	48		1.67±0.33**	0.33±0.07**
2. 黃蘗	1	g/kg	48		0.89±0.31	0.18±0.06
	2	g/kg	48		1.67±0.53*	0.33±0.01*
	5	g/kg	48		2.00±0.58**	0.40±0.11**
4. 穀精草	1	g/kg	48		1.00±0.24	0.20±0.05
	2	g/kg	48		1.89±0.45**	0.38±0.09**
	5	g/kg	48		1.89±0.45**	0.38±0.09**
5. 苦參	1	g/kg	48		1.89±0.39**	0.38±0.08**
	2	g/kg	48		1.67±0.41*	0.33±0.08*
	5	g/kg	48		1.11±0.26*	0.22±0.05*
20. 荷葉	1	g/kg	48		0.44±0.18	0.09±0.04
	2	g/kg	48		1.78±0.36**	0.36±0.07**
	5	g/kg	48		2.89±0.35**	0.58±0.07**
29. 黃耆	1	g/kg	48		1.44±0.29*	0.29±0.06*
	2	g/kg	48		1.67±0.47*	0.33±0.09*
	5	g/kg	48		1.78±0.52*	0.36±0.01*

#: 觀看 3 隻 ICR 小白鼠左腿股骨內骨髓抹片標本 (每隻 3 片), 每片觀看 500 個 polychromatic erythrocytes (PCE) 中出現之小核仁數目, 實驗數據以總共 9 片數據之平均值±標準誤差值表示。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 藥物組 vs. 對照組

編號 DOH84-CM-004

活血化瘀中藥對低密度脂蛋白氧化的 抑制效果

Effect of traditional Chinese medicine in the prevention of
low density lipoprotein oxidation.

洪傳岳

國立陽明大學傳統醫藥學研究所

一、計畫緣起

傳統中草藥之現代化研究，為我國當前醫藥研究之重要課題，因為（一）現代醫學對許多疾病之預防與治療，仍有未盡完美之處，（二）各國對傳統醫學普遍關注，尤其認為由中草藥發展新藥物極有潛力，（三）台海兩岸交流衍生中草藥管理等問題，極需加強對中草藥之進一步了解。

在中草藥當中，活血化瘀藥是極為重要的一部份。因為血滯、血瘀在中醫理論中佔有重要的角色，故活血化瘀是中醫的重要治則[1]。雖然中醫之血滯、血瘀不完全限於現代醫學之心血管病，而廣泛涉及腫瘤、免疫或婦科疾病，但心血管病仍是研究活血化瘀藥之最主要對象。而無論國內外，心血管病皆是現代人健康的最重大威脅，故活血化瘀藥在心血管病仍有極多可研究開發之處。

近年中國大陸、歐美、日本及我國學者對活血化瘀藥，如丹參、川芎、紅花、當歸、三七等，做了廣泛的研究[2]，包括化學成份、藥理性質、臨床療效等，在大陸甚至有許多主成份已製成注射或口服藥品，供臨床使用，特別是用於腦中風、冠心病，如『冠心方』、『腦血康』等。

我國在心臟血管病之診斷治療已有相當之水準，各醫學中心及醫學院有相當完善之研究及臨床之人力與設備。過去在心血管病之中藥藥理研究，如血小板凝固、降血壓、血管收縮等亦有相當之基礎[3]。但對心血管病之重要病理變化—動脈硬化仍缺乏有系統之中醫藥研究。由於近年發現血中低密度脂蛋白的氧化是動脈硬化的主要促發因素[4-7]。而我們過去數年曾對中藥抗氧化成份做過相當之研究[8,9]，民國 82 年 7 月至 83 年 6 月間主持之衛生署研究計畫，又發現有抗氧化作用之丹參水溶性部份，能減少高膽固醇血症家兔動脈硬化之效果，我們本年擬刪選對低密度脂蛋白氧化有更強抑制作用之中草藥成份，希能更提高抗動脈硬化之效果。

二、方法

一、高膽固醇血症家兔：

二公斤雄性紐西蘭家兔，先抽靜脈血測定血中脂肪後，餵以含 5% 玉米油及 1% 膽固醇之飼料十二週，由股靜脈導管抽血，測定血脂肪；注射 Heparin 防止凝血，再注射大量 pentobarbital。立刻由頸動脈導管注射含 Heparin 之生理食鹽水，直至由股動脈導管流出之液體澄清，將主動脈（由根部至上腸繫膜動脈分支處下一公分）剪下，冷凍於 -70°C ，做動脈硬化程度之判定。

二、血脂肪及低密度脂蛋白被氧化能力之測定：

總膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇，由常規生化檢驗室測定。低密度脂蛋白經超高離心分離後，以 $10\mu\text{M}$ CuSO_4 引發成氧化之低密度脂蛋白，並以 thiobarbituric acid reaction 來測定所產生氧

化低密度脂蛋白之量[11]。經有效藥物治療之家兔，其低密度脂蛋白應較不易氧化。

三、動脈硬化程度之判定[12]：

主動脈以 Sudan IV 染色後，在顯微鏡下觀察紅色反應之區域，並用微電腦所接 LV-2 Plus color image analyzer (Winhow, Taiwan)，判定動脈硬化區域之大小。

四、本年測試藥物為咖啡酸辛酯 Caffeic acid 1-octyl ester (CAO)。

咖啡酸為芸香科(檸檬)，薔薇科(山里紅)，毛茛科(升麻)，杜仲科(杜仲)之有效成份。其化學結構如圖一，選用CAO之理由係因初步之in vitro 研究，曾發現此CAO之體外抗氧化效果極佳(如圖二)。

五、分組：

第一組：正常飼料(五隻)。

第二組：高膽固醇飼料(七隻)。

第三組：高膽固醇飼料加降膽固醇藥Probucol(七隻)。

第四組：高膽固醇飼料加5%(w/w)丹參(七隻)。

第五組：高膽固醇飼料加0.5%(w/w)CAO(六隻)。

三、結果

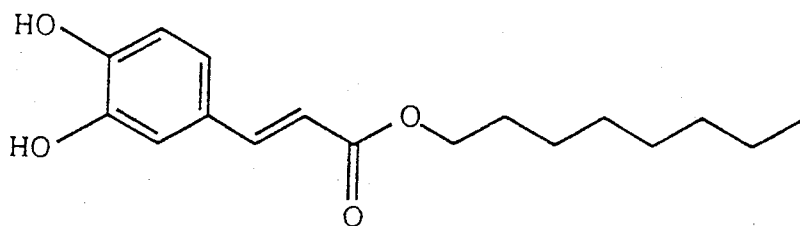
一、血中膽固醇變化：CAO降膽固醇效果不佳(圖三)。

二、低密度脂蛋白被氧化能力：CAO未減少低密度脂蛋白氧化(圖四)。

三、腹主動脈硬化面積：Probucol及丹參能降低，但CAO不能降低動脈硬化面積。

四、結論

CAO雖在體外有抗氧化作用，但體內降膽固醇及抗動脈硬化效果不佳，其原因可能是口服吸收不良。



CAO

圖 1 咖啡酸辛酯之結構

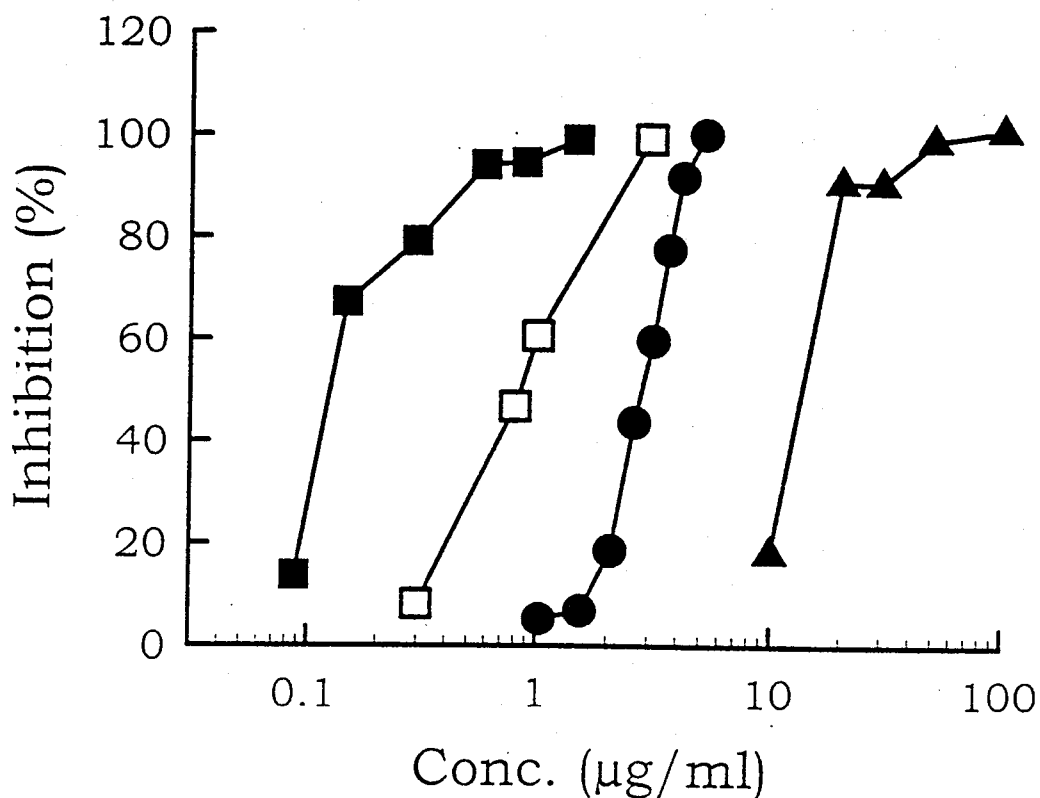


圖 2 丹參、CAO、丹參酚酸 B 及 probucol 之體外抗氧化效果

In vitro antioxidant effects of CAO (■), Sal B (□), Probuco (●) and S.M (▲) determined by inhibition of conjugated diene formation in $\text{Cu}^{++}/\text{O}_2$ induced. LDL lipid peroxidation.

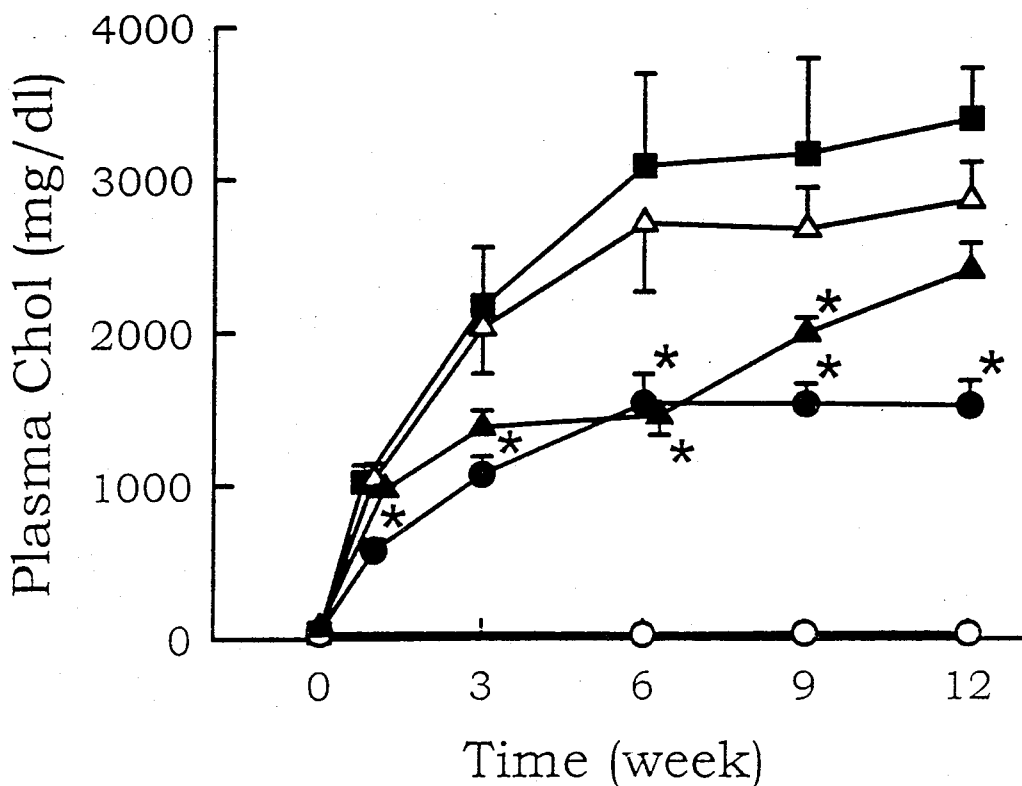


圖 3 血漿中膽固醇濃度變化

Changes of plasma cholesterol.

CAO (■), High Chol (△), S.M. (▲), Probucol (●) and Normal (○). Probucol vs. High Chol, two-way ANOVA, $p < 0.0001$; S.M. vs. High Chol, two-way ANOVA, $p < 0.005$; Probucol vs. S.M., two-way ANOVA, $p < 0.0001$; * vs. High Chol, $p < 0.05$. (CAO: Caffeic acid 1-octyl ester; High Chol: High cholesterol; S.M.: *Salvia miltiorrhiza*).

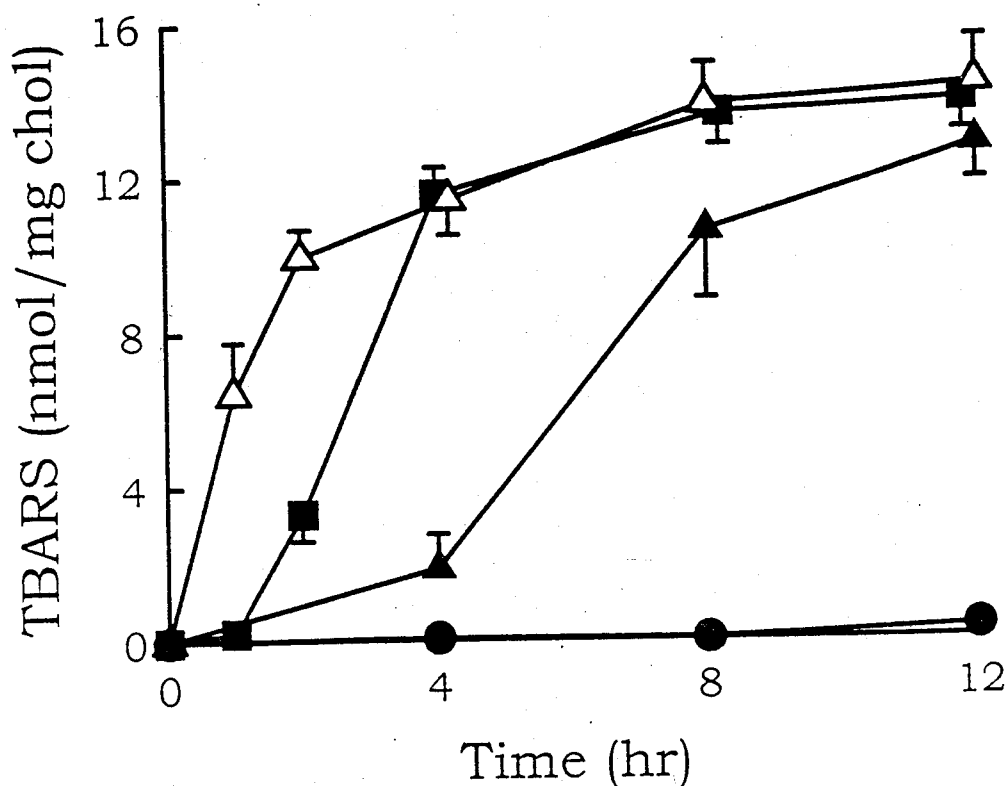


圖 4 白兔脂蛋白之離體氧化時程

Time course of oxidation of rabbit SLF *ex vivo*.

TBARS values were expressed as nmol of malondialdehyde equivalents per mg of SLF cholesterol. High Chol (n=7) - \triangle -, CAO (n=6) - \blacksquare -, S.M. (n=7) - \blacktriangle -, Probucol (n=7) - \bullet -. each measurement value adopted mean of triplicate. All datas were expressed as mean \pm SEM of each group. (SLF: special lipoprotein fraction -- $1.019 < d < 1.063$, High Chol: High cholesterol, CAO: Caffeic acid 1-octyl ester, S.M.: *Salvia miltiorrhiza*).

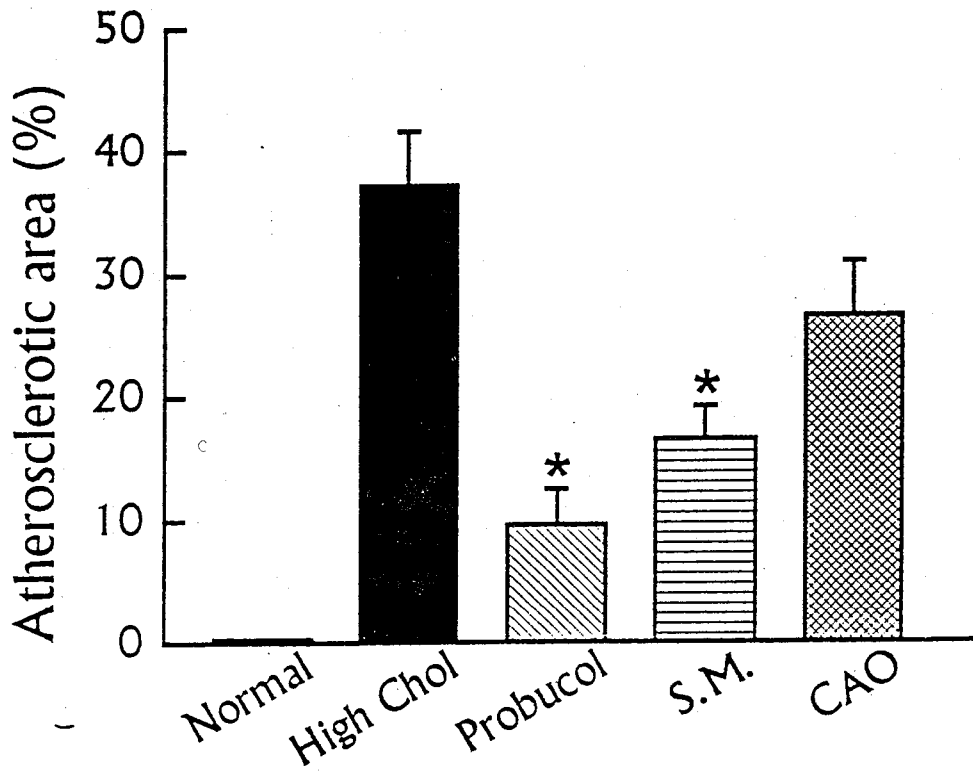


圖 5 腹主動脈粥狀硬化面積百分比

* vs. High Chol, $p < 0.005$. Probucol vs. S.M., $p > 0.1$.

REFERENCE:

1. 孫孝洪. 中醫治療學原理. 台北. 知音出版社. 1992.
2. Tang W. & Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin. Berlin: Springer-Verlag. 1992
3. Hong CY. Current cardiovascular drug research in Taiwan. Proceedings of Chinses American Academic and Professional Convention. New York, USA. 1990 P.129-31.
4. Carew TE, Schwenke DC & Steinberg D. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Proceeding of National Academic Science, USA. 1987; 84:7725-9.
5. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE & Witztum JL. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. New England Journal of Medicine. 1989; 320: 915-24.
6. Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. Atherosclerosis. 1993; 98:1-9.
7. Witztum JL & Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. Journal of Clinical Investigation. 1991; 38:1785-92.
8. Hong et al. Astragalus membranaceus and polygonum multiflorum protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. American Journal of Chinese Medicine, in press.
9. Lo YC et al. Magnolol and honokiol isolated from magnolia officinalis protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. Biochemical Pharmacology, in press.
10. Liu GT, Zhang TM, Wang BE & Wang YW. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. Biochemical Pharmacology. 1992; 43:147-52.
11. Sparrow CP, Doebber TW, Olszewski J & Wu MS. Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N'-diphenyl-phenylenediamine. Journal of Clinical Investigation. 1992; 89:1885-91.
12. Holman RL, McGill HC, Strong JP & Geer JC. Techniques for studying atherosclerotic lesions. Laboratory Investigation. 1958;7:42-7.

附

件

Protection of Lipoprotein from Oxidative Damage and Reduction of Atherosclerosis in Cholesterol-fed New

Zealand White Rabbits by An Antioxidant-rich Fraction of *Salvia Miltiorrhiza*

Yih-Jer Wu*, Ming-Shi Shiao[§], Shing-Jong Lin^{‡¶}, Paulin Wu[¶] and
Chuang-Ye Hong*

Institutes of *Traditional Medicine and [‡]Clinical Medicine, National
Yang-Ming University; Departments of [§]Medical Research and
[¶]Internal Medicine, Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan

Correspondence should be sent to Ming-Shi Shiao, Department of Medical
Research, Veterans General Hospital-Taipei, No. 201, Section 2, Shih-pai Road
Taipei, Taiwan, 112, R.O.C.

Tel: 886-2-8712121 ext 3363

FAX: 886-2-8751562

Abstract

Salvia Miltiorrhiza (SM) is a Chinese medicinal herb widely used for the
treatment of atherosclerosis-related disorders. We found that a water-soluble
fraction, which was rich in salvianolic acid B, can scavenge free radicals and

inhibit human LDL lipid peroxidation *in vitro*. Since antioxidants which prevent LDL from oxidative damage may interrupt the progression of atherosclerosis, we fed New Zealand white rabbits for 12 weeks with either a normal diet, a high cholesterol diet, a high cholesterol diet containing 5% water-soluble extract of SM or a high cholesterol diet containing 1% probucol. Both SM and probucol significantly reduced plasma cholesterol. Probucol also reduced plasma HDL level but SM did not. Lipoproteins collected from SM-treated rabbits were more resistant to oxidation. The vitamin E content in lipoproteins from SM group was higher than those collected from rabbits treated with high cholesterol diet only. SM treatment reduced the atherosclerotic area in abdominal aorta by 56% and cholesterol deposition in thoracic aorta by 50%. Since atherosclerosis area adjusted for cholesterol exposure was decreased by SM, inhibition of atherosclerosis by SM relied not only to its cholesterol lowering effect but also to its antioxidant activity. Endothelial damage evaluated by the leakage of Evans blue-albumin across endothelium showed that SM had an endothelium-protective effect. We concluded that SM contained potent water-soluble antioxidant which increased vitamin E content in lipoproteins, prevented lipoproteins from oxidative damage, reduced plasma cholesterol level, inhibited endothelial damage and slowed down the progression of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits.

Key Words: oxidized LDL, atherosclerosis, *Salvia miltiorrhiza*, antioxidant, endothelium, cholesterol

Introduction

The pathogenesis of atherosclerosis involves endothelium dysfunction, infiltration of monocytes, activation of monocytes into macrophages and smooth muscle cell proliferation (1-2). Many cytokines, growth factors and vasoregulatory molecules participate in the cascade. Oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) plays an important role in the initiation and progression of atherosclerosis (2-4). Several studies have demonstrated that oxidatively damaged LDL (oxLDL) is cytotoxic to endothelial cells (1-6). OxLDL is also a chemotactic agent for recruiting and activating monocyte-derived macrophages (2-3,5). Modified LDL is capable of inducing a number of gene expression in response to growth factors and cytokines (3,5), which may result in deterioration of atherogenic process. LDL is oxidatively modified by endothelial cells, macrophages, and smooth muscle cells (2,5). The formation of oxLDL is most likely enzyme-mediated (6-8) and takes place in the intimal layer of the vessel. OxLDL is readily taken by macrophages through the scavenger receptors (9). Deposition of oxLDL in macrophages gradually leads to the formation of foam cells and fibrous plaques (2). Immunochemical studies have demonstrated that oxLDL is present in the atherosclerotic lesions of human patients and

diseased animals (4,10,11). Vitamins E and C, which protect LDL from oxidative damage (12,13), decrease the morbidity of coronary heart disease (14-17). Probucol inhibits atherosclerosis in nonhuman primate (18) and rabbits (19). Recently, N,N'-diphenyl-phenylenediamine and butylated hydroxytoluene were demonstrated to reduce cholesterol-induced atherosclerosis in experimental animals (20,21). The effects of these compounds to prevent atherosclerosis are mainly due to their antioxidant activities (20-22).

Several Chinese medicinal herbs contain strong antioxidant activities. Many toxic chemicals, such as CCl₄ (23), PCB (24) and ethanol (25), induce hepatic injury by generating reactive oxygen metabolites. These oxygen radicals damage polyunsaturated fatty acids in cytoplasmic membrane and membranes of subcellular organelles. Some hepatic injuries of this type can be ameliorated by Chinese medicinal herbs that are rich in antioxidants (26-28). It is likely that these herbs, which showed protective effect in chemically induced hepatic injury, may behave as antioxidants to protect LDL from lipid peroxidation.

Salvia miltiorrhiza (SM) is a Chinese medicinal herb widely used for treatment of cardiovascular disorders. Its nonpolar extracts contain tanshinones, which inhibit platelet aggregation (29) and protect myocardium against ischemia-induced derangement (30). The aqueous extracts of SM contain many phenolic compounds which protect liver microsomes, isolated hepatocytes and erythrocytes against oxidative damage *in vitro* (31). Salvianolic acid B (Sal B) is one of the most potent antioxidant components in SM. The purpose of this

study is to evaluate the *in vitro* effect of SM to inhibit LDL oxidation as well as its *in vivo* effect to reduce the severity of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits.

Methods

Materials. Probucol was purchased from Merrell Dow Pharmaceuticals Inc. (Cincinnati, USA). Caffeic acid, 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP), cholesterol (95%), ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) (disodium salt), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), formalin (10%), bovine serum albumin (BSA), α -tocopherol (95%), retinyl acetate (90%), Evans blue, Sudan IV, and haematoxylin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Reference standard of Sal B was a gift from Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences at Beijing, China.

Acetate buffer contained acetate 100 mM at pH 5.5. Sudan IV solution was consisted of 0.5g Sudan IV, 50 ml 70% aqueous ethanol and 50 ml acetone. Evans blue albumin solution was consisted of Evans blue 560 mg and 20 ml of 200 mg/ml BSA in 0.85% NaCl.

Animals. New Zealand white (NZW) rabbits were obtained from and Animal Center, National Taiwan University Medical College. During the whole course of experiment, we adhered to the guidelines for care and use of laboratory animals of this hospital.

Preparation and characterization of the aqueous ethanolic extracts of Salvia miltiorrhiza. Plant materials were dried (45°C in darkness), ground, and extracted with 25% aqueous ethanol. The crude extracts were extensively concentrated by a rotary evaporator. The extracts were analyzed for the presence of Sal B by reversed phase HPLC (1090 series II/L, Hewlett-Packard, USA) equipped with a photodiode array detector (Model 1040 series II/M). Separation was achieved with a pre-packed Cosmosil 5C₁₈-AR column (5- μ m, 25x0.46-cm I.D.) from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan).

Free radical (DPPH) scavenging activity in vitro. According to the method of Blois (39), 10 ml of acetate buffer, 10 ml of ethanol and 5 ml of a 500 nM ethanolic solution of DPPH were first mixed, then 5 ml of an ethanolic solution of a tested compound was added. The change in absorption at 517 nm due to scavenging of the stable free radical of DPPH was determined.

Inhibition of human LDL oxidation in vitro. Blood samples were collected from healthy adults after overnight fasting. Sera were fractionated by ultracentrifugation (Beckman L8-80M; USA) with the density adjusted by NaBr. LDL was obtained from the fraction corresponding to ρ 1.019-1.063 (36). LDL was dialyzed extensively at 4°C/N₂ against phosphate buffer saline (PBS, 5 mM phosphate and 145 mM NaCl, pH 7.4) in darkness. LDL cholesterol (LDL-C) was determined enzymatically (37).

LDL was diluted with saline to 0.9 mg cholesterol/ml. In vitro assay of

LDL oxidation was carried out in a 96-well microtiter plate. 50 μ l of LDL was added to each well. LDL was pre-incubated with test compounds at 37°C for 1 hour. Probucol was used as a positive control. Aliquot of CuSO_4 solution was added to each well to induce lipid peroxidation. The final Cu^{++} concentration was 10 μ M. Microtiter plate was again incubated at 37°C for 2 hours. After incubation, 150 μ l EDTA (2 mM) was added to terminate lipid peroxidation. A 100 μ l aliquot from each well was transferred to a minivial. After adding with 0.9 ml 2-propanol, the mixture was centrifuged (12000 rpm, 8 min). Conjugated diene formation was determined by the UV absorption of supernatant at 232 nm.

Animals and treatments. Animals were randomly divided into four groups. Five rabbits in the normal group were fed with normal diet (High fiber rabbit chow, Purina Milling Inc., St. Louis, USA). Seven rabbits in the high cholesterol group (High Chol) were fed with high cholesterol diet containing 1% (w/w) probucol. Seven rabbits in the SM treated group were fed with a high cholesterol diet plus 5% (w/w) SM extract. The selection of SM dose was based on its antioxidant activity comparable to that of probucol as determined in the *in vitro* assay. Diets and drinking water were provided *ad libitum*. Animals were bled periodically for measurements of plasma cholesterol levels and liver function. The total feeding period lasted for 12 weeks.

Ex vivo assay of rabbit lipoprotein oxidation. Fasting blood samples were collected into vacutainers (0.1 ml 15% K_3EDTA) from rabbits after 9 weeks of

feeding. Special lipoprotein fractions (SLF) corresponding to ρ 1.019-1.063 were collected and dialyzed as described previously.

Assay was performed according to the procedure of Yagi with modification (35). The dialyzed SLF (0.9 mg cholesterol/ml, 500 μ l in each tube) was incubated with CuSO_4 (500 μ l, final conc. 25 μ M) at 37 °C to induce lipid peroxidation. The reaction was terminated by adding 1 ml trichloroacetic acid (20%, w/v) after incubation. The incubation mixture was added with 1 ml thiobarbituric acid (TBA) solution (0.6%, w/v) and heated at 100 °C for 45 min. Malonaldehyde (MDA) formation was determined as thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). After centrifugation, TBARS in the supernatant was measured by absorption at 532 nm. TMP was used for calibration.

Vitamin E contents in lipoproteins. A 200 μ l aliquot of lipoprotein (SLF) was added with 7.5 μ M retinyl acetate ethanolic solution 200 μ l as an internal standard. The mixture was then extracted with n-hexane containing BHT (0.4 g/100 ml) in darkness. The hexane layer (1.5 ml) was dried under nitrogen and re-suspended in 100 μ l mobile phase which was composed of acetonitrile/tetrahydrofuran (70/30, v/v). The extracts were analyzed by reversed-phase HPLC (Cosmosil 5C₁₈, 5 μ m, 25x0.46-cm I.D.) (37). A photodiode array detector was set at 326 nm for the first 6 min and at 292 nm for the remaining 6 min (37).

Cholesterol level and lipoprotein profile. Fasting plasma were obtained from

rabbits after 0, 6 and 12 weeks of feeding. Plasma cholesterol was measured enzymatically (33). Cholesterol exposure for each rabbit was calculated as the area under the curve of plasma cholesterol versus time. For lipoprotein analysis, an aliquot of plasma was pre-stained with Sudan black for 20 min. Electrophoresis (36) was performed on agarose gel (Lipofilm, Sebia; Paris, France). After drying, the gel was scanned by a densitometer (Preference-Red 1500, Sebia; Paris, France).

Analysis of extent of atherosclerosis. After 12 weeks of feeding, animals were sacrificed and the aortas (from aortic arch to iliac bifurcation) were collected and cleaned of adhering tissue. The abdominal aortas were stained with a Sudan IV solution to visualize the lesion area (38). Sudanophilic areas were photographed and quantitatively measured by computer-assisted planimetry (True Color Image Analyzer LV-2 Plus, Winstar Technology, Taipei, Taiwan). Thoracic aortas were weighted, finely minced, and extracted for total lipids. Aliquots of the lipid extracts were saponified in an aqueous potassium hydroxide solution. The released cholesterol was extracted in n-hexane layer and determined by a modified method of Abell and Kendall (39).

Determination of endothelial damage. Endothelial damage was evaluated on additional animals after 6 weeks of feeding, using Evans blue-albumin (EBA) conjugate as a macromolecular tracer (40). In brief, animals were anaesthetized by a mixture of ketamine and rompun solution. The right femoral artery, vein

and right carotid artery were cannulated. Fifteen ml of EBA solution was slowly injected into the femoral vein. Exactly 5 min after EBA injection, an overdose of pentobarbital was given. Shortly before euthanasia of the animal, heparin (5000 USP units) was injected intravenously through the femoral vein to prevent intravascular blood coagulation. The arterial system was perfused immediately with a heparinized saline solution (2 units/ml) via the right carotid artery (at a physiological pressure of 120 mmHg). When the fluid was drained from the femoral artery and the vein turned clear, the perfusate was then switched to a 10 % neutral-buffered formalin solution. Perfusion was continued at the same pressure for another 10 min for preliminary perfusion-fixation. The thoracic aorta was excised and immersed in 10% formalin solution for 1 hr for further fixation. The adventitial tissue and branches were carefully removed. The aortic specimen was cut longitudinally and dissected into 6 pieces (1 cm²/piece). The aortic specimens were stained with Harris' hematoxylin for 1 min. An epifluorescence microscope (Nikon Corp., Microphoto-FX; Tokyo, Japan) was used for detection and quantitation of EBA leaky foci. The EBA fluorescence was studied with a green excitation (wavelength 546 nm).

Plasma biochemical analysis. Blood samples were collected at the beginning and the end of the study for measurement of plasma Na⁺, K⁺, Cl⁻, triglyceride (TG), glucose, BUN, creatinine (Cr), AST and ALT. All measurements were performed by an Ektachem DT autoanalyzer (Eastman Kodak Co., Rochester,

USA). For SM group, additional blood analysis was carried out after 7 days of feeding for evaluation of acute toxicity.

Statistical analysis. Results were reported as mean \pm sem. The differences in number/density of EBA leaky foci between groups were analyzed by paired t test. The other statistical analysis were obtained by using unpaired t test or analysis of variance (ANOVA). A p value less than 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Free radical scavenging activity and inhibition of human LDL oxidation in vitro.

Figure 1 shows that the major antioxidant in the water-soluble extract of SM was Sal B. The content of Sal B in the extract SM was 4.44%. There was no detectable vitamin E, vitamin C or carotene in the extract of SM.

Table 1 shows that both SM extract and pure Sal B exhibited free radical scavenging activity in DPPH assay. SM and Sal B were also effective in preventing LDL from lipid peroxidation induced by Cu^{++} . Sal B was 4.4 times more potent than probucol in the former and 3.3 times more potent in the later assay. It could also be estimated that Sal B was account for up to 75% of antioxidant activity in SM extract, since Sal B was 17 times more potent than SM extract in both assays.

Oxidation of lipoproteins ex vivo. Figure 2 shows that lipoproteins collected

from SM and probucol treated rabbits were more resistant to oxidation than those from High Chol rabbits. Time required to achieve half maximal TBARS production was defined as antioxidativity. The antioxidativity of SM (6.2 ± 0.2 hr) was significantly higher than that of high cholesterol diet (1.1 ± 0.1 hr). The antioxidativity of probucol (34.8 ± 1.1 hr) was the highest one among these three groups.

Vit E content in lipoproteins. Figure 3 shows that vitamin E level in lipoprotein collected from SM-treated rabbits was 21.7 ± 2.1 nmol/ μ mol cholesterol. It was significantly higher than any other group.

Plasma cholesterol and lipoprotein profiles. All groups of rabbits gained weight during the 12 week feeding period. Normal, High Chol, Probucol and SM groups were started at 2.65 ± 0.04 kg, 2.58 ± 0.06 kg, 2.63 ± 0.04 kg, 2.52 ± 0.004 kg and ended at 2.90 ± 0.12 kg, 3.01 ± 0.06 kg, 2.94 ± 0.05 kg, 2.96 ± 0.07 kg, respectively. The differences in body weight among groups, both at the beginning and the end of the study, were not statistically significant.

Figure 4A shows that plasma cholesterol levels were increased during the study period in rabbits fed with a high cholesterol diet. Both SM and probucol attenuated the increase in plasma cholesterol. In figure 4B, cholesterol exposure for each rabbit was calculated from area under the curve of plasma cholesterol versus time. SM caused a 29% decrease and probucol caused a 44% decrease of cholesterol exposure as compared with high cholesterol diet.

Analysis of lipoprotein profiles showed that reduction of cholesterol by SM and probucol occurred predominantly in $\rho < 1.019$ fraction which is the rabbit equivalent of β -VLDL in human. Figure 5 shows that Probucol treatment significantly decreased plasma HDL-C level with time. However, such a decrease in HDL-C did not occur in SM group. Throughout the course, HDL-C levels of SM treated group were significantly higher than those of probucol group.

Effect on atherosclerosis. Cholesterol feeding resulted in severe atherosclerotic plaque formation at the luminal surface of aorta (Fig 6). The atherosclerotic area in abdominal aorta and cholesterol deposition in thoracic aorta of High Chol group were $37.2 \pm 4.4\%$ and $28.7 \pm 1.9 \text{ mg/g}$, respectively. SM caused a 56% decrease in atherosclerotic area and a 50% decrease in cholesterol deposition. Both changes were statistically significant. Probucol treatment also resulted in 74% and 56% decrease in these two atherosclerotic parameters, respectively. There was no significant difference between the anti-atherogenic effects of SM and probucol.

There was a linear correlation between atherosclerotic area and cholesterol deposition ($Y=1.224X-1.54$, $r^2=0.807$, $p<0.001$). It indicated that the extents of atherosclerosis in abdominal aorta and thoracic aorta exhibited the same trend, and the severity of atherosclerotic area foretold that of cholesterol deposition, and vice versa.

Cholesterol exposure is a well-known risk factor of atherosclerosis (41). To reveal the influences of factors other than cholesterol exposure on atherosclerosis, atherosclerotic area was normalized by its cholesterol exposure. Figure 7A shows that both SM and probucol significantly reduced atherosclerotic area per unit of cholesterol exposure and the difference between these two treatment was not statistically significant. Accordingly, it was concluded that the anti-atherosclerotic effects of SM and probucol relied not only on their cholesterol lowering effects but also their antioxidant activities.

OxLDL may induce endothelial damage. Table 2 shows that the number of EBA leaky foci in the thoracic aorta of rabbits fed with high cholesterol diet was significantly increased as compared with normal group, and such an increase can be partially prevented by SM and probucol.

Biochemical analysis. Table 3 shows that probucol, but not SM, caused slight but significant elevation of AST at the end of study. Hypertriglyceridemia and hyperglycemia occurred in all animals fed with high cholesterol diet; neither probucol nor SM significantly prevented the elevation of serum triglyceride and glucose. As for electrolytes and renal functions, there was no abnormalities noticed through the study.

Discussion

This study showed that SM, a Chinese medicinal herb widely used for the treatment of cardiovascular diseases, is a potent antioxidant with cholesterol lowering and antiatherosclerotic effects. One of its water soluble component, Sal B, scavenged free radicals and inhibited LDL lipid peroxidation in vitro. Lipoproteins collected from SM-fed rabbits contained more vitamin E and were more resistant to oxidation than those collected from rabbits fed with high cholesterol diet only. SM feeding also reduced the severity of atherosclerotic plaque formation and endothelial damage in cholesterol-fed rabbits. The content of SM extract in rabbit chow was 5%. However, our SM extract contained only 4.44% of Sal B, so the concentration of Sal B in rabbit chow was 0.22%, much lower than that of probucol.

The scavenger activity of antioxidants assayed with a DPPH test was dependent on the capacity of their functional groups. Water soluble antioxidants such as Sal B exerted their free radical scavenger activity well in DPPH test. However, the antioxidant activity tested in a LDL solution was dependent not only the capacity of the functional group but also the interaction of antioxidants with LDL particles. Lipophilic antioxidants such as probucol which bound to LDL augmented their effect in a LDL solution. It was interesting that the relative potency of Sal B to SM remained unchanged in both assay system. This was an

indirect evidence that the antioxidant activity of SM predominantly came from Sal B.

Being water soluble, SM are removed during dialysis. How could it protect lipoproteins from oxidation in the ex vivo experiment? Besides, a water-soluble antioxidant can hardly be bound to lipoproteins. The mechanism for the antioxidant activity of SM could be a recycling of vitamin E in LDL (43). Jill et al showed that vitamin C, a water soluble antioxidant, can preserve the endogenous lipophilic antioxidants in LDL (44). Since we showed that vitamin E content in lipoproteins of SM group was 2.3 folds higher than that of high cholesterol group and the extract of SM contained no vitamin E, we postulated that SM indirectly protected lipoproteins from oxidation by preventing the loss of vitamin E or other endogen lipophilic antioxidants in lipoprotein.

Lipoproteins collected from hypercholesterolemic rabbits are more susceptible to oxidation than those from normolipidemic rabbits (45). Although there is no direct evidence to prove that the cholesterol-fed animals produce free radicals in their blood stream, several reports showed that higher amounts of TBARS are present in the blood of hyperlipidemic and atherosclerotic patients (46-48). These arguments support our hypothesis that SM scavenged free radicals in hypercholesterolemic rabbits and spared vitamin E in the lipoprotein from being oxidized by free radicals. On the other hand, both our data and previous reports (49,50) show that probucol can not preserve vitamin E in LDL.

Decrease of cholesterol predominantly occurred in $\rho < 1.019$ fraction of lipoprotein and this fraction is corresponding to β -VLDL. This is mainly due to the fact that in cholesterol-fed rabbits elevation of β -VLDL is the major event (51). That probucol treatment decreases HDL-C level is a well known adverse effect since HDL-C is inversely correlated with the incidence of atherosclerosis (52). However, such a decrease in HDL-C did not occur in SM treated group. The transient elevation of HDL-C is believed to be due to the formation of cholesterol ester enriched HDL (52) while the subsequent subsidence is an inhibition of HDL synthesis caused by high cholesterol feeding (53).

For determining the impact of cholesterol exposure and antioxidativity on atherosclerosis, we performed a multiple regression analysis and obtained the best-fitting equation as following: atherosclerotic area = $36.8 + (0.0014 \pm 0.041) \times (\text{cholesterol exposure}) - (4.07 \pm 1.02) \times (\text{antioxidativity}) + (0.092 \pm 0.025) \times (\text{antioxidativity})^2$. Only antioxidativity and $(\text{antioxidativity})^2$ were significant variables while cholesterol exposure was not. As shown in figure 7B, atherosclerotic areas under similar amount of cholesterol exposure were less in SM- and probucol-treated rabbits than that of high cholesterol group. The antioxidant activity of SM and probucol is therefore more important than cholesterol exposure in the prevention of atherosclerosis.

Endothelial cell injury was suggested as an initiating factor in the pathogenesis of atherosclerosis (54). It was also demonstrated that oxLDL is

cytotoxic to endothelial cells (1,2,5). Antioxidants including vitamin E (55) and probucol (56) were found to restore endothelial functions in cholesterol-fed animals. We evaluated the protective effect of SM and probucol on endothelial cells based on the study of morphological and functional integrity. We found that SM protected endothelial cells more effectively than probucol. This observation implied that SM, being a water soluble antioxidant, may on one hand scavenge free radicals in blood stream and reduce their direct injury to endothelial cells, while on the other hand preserve lipophilic antioxidants such as vitamin E in lipoproteins to resist oxidative stress in the subendothelial space.

We concluded that SM contained potent water soluble antioxidant which increased vitamin E content in lipoproteins, prevent lipoproteins from oxidative damage, reduced plasma cholesterol level, inhibited endothelial damage and slowed down the progression of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. The potential of SM and Sal B in the treatment of hypercholesterolemic patients need further studies.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. L.-N. Li, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences at Beijing, China and Prof. Y. S. Kuo, Department of Chemistry, National Taiwan University for providing reference standards. This study was kindly supported by National Science Council (NSC82-0412-B075-023) and Department of Health (DOH83-CM-019).

References

1. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. *Nature* 362:801-809.
2. Steinberg, D., S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo, and J.L. Witztum. 1989. Beyond cholesterol: modification of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320:915-924.
3. Parthasarathy, S., D. Steinberg, and J.L. Witztum. 1992. The role of oxidized low-density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu. Rev. Med.* 43:219-.
4. Yla-Herttuala, S., W. Palinski, M. Rosenfeld, S. Parthasarathy, T.E. Carew, S. Butler, J. Witztum, and D. Steinberg. 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 84:1086-1095.
5. Lusis, A.J., and M. Navab. 1993. Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall. New opportunities for pharmacological intervention in atherosclerosis. *Biochem. Pharmacol.* 46:2119-2126.
6. Sparrow, CP., S. Parthasarthy, and D. Steinberg. 1988. Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A₂ mimics cell mediated oxidative modification. *J. Lipid Res.* 29:745-753.

7. Labeque, R., C.J.P. Mullon, J.P.M. Ferreira, R.S. Lees, and R. Langer. 1993. Enzymatic modification of plasma low density lipoprotein in rabbits: a potential treatment for hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3476-3480.
8. Esterbauer, H., J. Gebicki, H. Puhl, and G. Jurgen. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Bio. Med.* 13:341-390.
9. Henriksen, T., E.M. Mahoney, and D. Steinberg. 1981. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cell: recognition by receptor for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6499-6503.
10. Palinski, W., M.E. Rosenfeld, S. Yla-Herttuala, G.C. Gurthier, S.A. Socher, S.W. Butler, S. Parthasarathy, T.E. Carew, D. Steinberg, and J.L. Witztum. 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:1372-1376.
11. Yla-Herttuala, S., W. Palinski, S.W. Butler, S. Picard, D. Steinberg, and J.L. Witztum. 1994. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb.* 14:32-40.
12. Babi, A.V., J.M. Gebicki, and D.R. Sullivan. 1990. Vitamin E content and low density lipoprotein oxidizability induced by free radicals. *Atherosclerosis* 81:175-182.

13. Jialal, I., G.L. Vega, and S.M. Grundy. 1990 Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 82:185-191.
14. Stampfer, M.J., C.H. Hennekens, J.E. Manson, G.A. Golditz, B. Rosner, and W.C. Willett. 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N. Engl. J. Med.* 328:1444-1449.
15. Rimm, E.B., M.J. Stampfer, A. Ascherio, E. Giovannucci, G.A. Colditz, and W.C. Willett. 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med.* 328:1450-1456.
16. Enstrom, J.E., L.E. Kanim, and M.A. Klein. 1992. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology* 3:194-202.
17. Riemersma, R.A., D.A. Wood, C.C.A. Macintyre, R.A. Elton, K.F. Gey, and M.F. Oliver. 1991. Risk of angina pectoris and plasma concentration of vitamin A, C and E and carotene. *Lancet* 337:1-5.
18. Sasahara, M., E.W. Raines, A. Chait, T.E. Carew, D. Steinberg, P.W. Wahl, and R. Ross. 1994. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. *J. Clin. Invest.* 94:155-164.
19. Daugherty, A., B.S. Zweifel, and G. Schonfeld. 1989. Probucol attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Br. J.*

Pharmacol. 98:612-618.

20. Sparrow, C.P., T.W. Doebber, J. Olszewski, M.S. Wu, J. Ventre, K.A. Stevens, and Y.S. Chao. 1992. Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N'-diphenyl-phenylenediamine. *J. Clin. Invest.* 89:1885-1891.
21. Bjorhem, I., H.F. Anna, O. Breuer, U. Diczfalusy, L. Berglund, and P. Henriksson. 1991. The antioxidant butylated hydroxytoluene protects against atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.* 11:15-22.
22. Carew, T.E., D.C. Schwenke, and D. Steinberg. 1987. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypopcholesterolemic effect: evidence that antioxidants *in vivo* can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7725-7729.
23. Berger, M.L., H. Bhatt, B. Combes, and R.W. Jestabrook. 1986. CCl₄-induced toxicity in isolated hepatocytes: the importance of direct solvent injury. *Hepatology* 6:36-?.
24. Satio, M. 1990. Polychlorinated biphenyl-induced lipid peroxidation as measured by thiobarbituric acid-reactive substances in liver subcellular fractions of rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1046:301-?.

25. Situnayake, R.D., B.J. Crump, D.I. Thurnham, J.A. Davies, J. Gearty, and M. Davis. 1990. Lipid peroxidation and hepatic antioxidants in alcoholic liver disease. *Gut*. 31:1311-.
26. Visen, P.K.S., B. Shukla, G.K. Patnaik, S. Kaul, N.K. Kapoor, and B.N. Dhawan. 1991. Hepatoprotective activity of picroliv, the active principle of *Picrorhiza kurrooa*, on rat hepatocytes against paracetamol toxicity. *Drug Develop. Res.* 22:209-.
27. Sassa, H., Y. Takaishi, and H. Terada. 1990. The triterpene celastrol as a very potent inhibitor of lipid peroxidation in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 172:890-.
28. Kiso, Y., M. Tohkin, and H. Hikino. 1983. Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Medica* 49:222-.
29. Onitsuka, M., M. Fujiu, N. Shinma, and H.B. Maruyama. 1983. New platelet aggregation inhibitors from Tan-Shen; radix of *Salvia miltiorrhiza* bunge. *Chem. Pharm. Bull.* 31:1670-1675.
30. Yagi, A., K. Fujimoto, K. Tanonaka, K. Hirai, and S. Takeo. 1989. Possible active components of Tan-Shen (*Salvia miltiorrhiza*) for protection of myocardium against ischemia-induced derangements. *Planta Medica* 55:51-54.
31. Liu, G.-T., T.-M. Zhang, B.-E. Wang, and Y.-W. Wang. 1992. Protective

- action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem. Pharmacol.* 43:147-152.
32. Havel, R.F., H.A. Eder, and J.H. Bragdon. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoprotein in human serum. *J. Clin. Invest.* 34:1345-1353.
33. Allian, C.C., L.S. Poon, C.S.G. Chan, W. Richmond, and P.C. Fu. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20:470-475.
34. Blois, M.D. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
35. Yagi, K. 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15:212-216.
36. Mackness, M.I., and P.N. Durrington. 1992. Lipoprotein separation and analysis for clinical studies. In *lipoprotein Analysis: a practical approach*. C.A. Converse, and E.R. Skinner, editors. IRL Press, Oxford. 1-42.
37. Bui, M.H. 1994. Simple determination of retinal, α -tocopherol and carotenoids (lutein, all-trans-lycopene, α - and β -carotenes) in human plasma by isocratic liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 645:129-133.
38. Holman, R.L., H.C. McGill Jr., J.P. Strong, and J.C. Geer. 1958. Technics for studying atherosclerotic lesions. *Lab. Invest.* 7:42-47.
39. Abell, L.L., B.B. Levy, B.B. Brodie, and F.E. Kendall. 1952. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* 152:357-366.

40. Lin, S.J., C.Y. Hong, M.S. Chang, B.N. Chang, and S. Chien. 1992. Long-term nicotine exposure increases aortic endothelial cell death and enhances transendothelial macromolecular transport in rats. *Arterioscler. Thromb.* 12:1305-1312.
41. Kannel, W.B., W.P. Castelli, and T. Gordon. 1979. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann. Intern. Med.* 90:85-91.
42. Mao, S.J.T., M.T. Yates, N.E. Rechten, R.L. Jackson, and W.A. Van Sickle. 1991. Antioxidant activity of probucol and its analogues in hypercholesterolemic Watanabe rabbits. *J. Med. Chem.* 34:298-302.
43. Kagan, V.E., E.A. Serbinova, T. Forte, G. Scita, and L. Packer. 1992. Recycling of vitamin E in human low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 33:385-397.
44. Jialal, E., and S.M. Grundy. 1991. Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification. *J. Clin. Invest.* 87:597-601.
45. Nenseter M.S., O. Gudmundsen, K.E. Malterud, T. Berg, and C.A. Drevon. 1994. Effect of cholesterol feeding on the susceptibility of lipoproteins to oxidative modification. *Biochim. Biophys. Acta* 1213:207-214.
46. Yalcin, A.S., N. Sabuncu, A. Kilinc, G. Gulcan, and K. Emerk. 1989. Increased plasma and erythrocyte lipid peroxidation in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis* 80:169-170.

47. Szczeklik, A., and R.J. Gryglewski. 1980. Low density lipoproteins (LDL) are carriers for lipid peroxides and inhibit prostacyclin (PGI₂) biosynthesis in arteries. *Artery* 7:488-495.
48. Ledwozyw, A., J. Michalak, A. Stepień, and A. Kadziolka. 1986. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipid and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* 155:275-284.
49. Gotoh, N., K. Shimizu, E. Komuro, J. Tsuchiya, N. Noguchi, and E. Niki. 1992. Antioxidant activities of probucol against lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1128:147-154.
50. Demacker, P.N.M., A.G.M. Hijmans, H.A. Kleinveld, and A.F.H. Stalenhoef. 1993. Indications for the presence of circulating peroxidized low density lipoproteins in WHHL rabbits treated with antioxidants. *Atherosclerosis* 102:69-77.
51. Gudmundsen, O., T. Berg, N. Roos, and M.S. Nenseter. 1993. Hepatic uptake of β -VLDL in cholesterol-fed rabbits. *J. Lipid Res.* 34:589-600.
52. Johnson, W.J., F.H. Mahlberg, G.H. Rothbalt, and M.C. Phillips. 1991. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1085:273-298.
53. Roth, R.I., J.W. Gaubatz, A.M. Gotto Jr., and J.R. Patsch. 1983. Effect of cholesterol feeding on the distribution of plasma lipoproteins and on the metabolism of apolipoprotein E in the rabbit. *J. Lipid Res.* 24:1-11.

54. Ross, R., and L. Harker. 1976. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 193:1094-1100.
55. Keaney, J.F. Jr., J.M. Gaziano, A. Su, B. Frei, J. Curran-Celentano, G.T. Shwaery, J. Loscalzo, and J.A. Vita. 1994. Low-dose α -tocopherol improves and high-dose α -tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *J. Clin. Invest.* 93:844-851.
56. Simon, B.C., C.C. Haudenschild, and R.A. Cohen, J. Palacino. 1993. Preservation of endothelium-dependent relaxation in atherosclerotic rabbit aorta by probucol. *J. Cardiovasc. Pharm.* 21:893-901.

Table I. EC₅₀ values and relative potency of Sal B, probucol, and SM for DPPH radical scavenging and against oxidation of LDL.

Compounds	Scavenging activity			Antioxidant activity		
	EC ₅₀	Relative		EC ₅₀	Relative	
	(µg/ml)	potency		(µg/ml)	potency	
Sal B	12.0	17	4.4	0.848	17	3.3
Probucol	53.0	3.8	1.0	2.79	5.2	1.0
SM	100	1.0	-	14.4	1	-

EC₅₀ values were obtained from HP concentration-response curves. Each value represents the mean of duplicated determinations. Decrease in absorption at 517 nm after 90 min of incubation of each test compound with DPPH was taken as a measure of the radical scavenging activity (left column). Antioxidant activities were determined by inhibition of conjugated diene formation in Cu⁺⁺/O₂ induced LDL lipid peroxidation (right column). For relative activity the equivalent concentration of SM or probucol was set as 1.0.

Table II. Endothelial damage determined by leakage of Evans blue-albumin.

	Normal	High Chol	Probucol	SM
	(foci/mm ²)			
S1	0.75	2.19	0.8	1.11
S2	0.76	2.31	1.75	2.21
S3	0.87	3.31	2.23	2.23
S4	0.86	3.62	2.83	2.34
S5	0.91	4.74	2.49	2.59
S6	0.86	8.44	6.03	3.68
Mean ± SEM	0.835 ± 0.03	4.10 ± 0.95	2.69 ± 0.73	2.36 ± 0.34
p (vs Normal)	-	< 0.01	< 0.05	< 0.01
p (vs High Chol)	-	-	< 0.01	< 0.05

S1~S6 denoted the segments (1 cm²/segment) of thoracic aorta from distal end (diaphragm) to proximal end (ligamentum arteriosum). Paired t test was used for statistical analysis.

Table III. Plasma concentrations of AST, ALT, BUN and Cr.

Group	AST (U/l)			ALT (U/l)		
	0 wk	1 wk	12 wk	0 wk	1 wk	12 wk
Normal	23 ± 4	-	25 ± 3	62 ± 7	-	58 ± 8
High Chol	22 ± 4	-	36 ± 5	65 ± 6	-	50 ± 8
Probucof	25 ± 3	-	59 ± 9*†	63 ± 5	-	77 ± 10
SM	21 ± 6	13 ± 5	10 ± 4†	70 ± 4	44 ± 5*	67 ± 10
Group	BUN (mg/dl)			Cr (mg/dl)		
	0 wk	1 wk	12 wk	0 wk	1 wk	12 wk
Normal	17 ± 2	-	20 ± 2	0.94 ± 0.02	-	1.32 ± 0.09
High Chol	16 ± 1	-	21 ± 3	1.03 ± 0.07	-	1.31 ± 0.06
Probucof	20 ± 1	-	21 ± 1	1.09 ± 0.04	-	1.07 ± 0.06†
SM	12 ± 1	8.7 ± 0.6	17 ± 1	0.97 ± 0.05	0.87 ± 0.03	1.13 ± 0.06†

vs. 0 wk, p<0.05; † vs. High Chol, p<0.05.

Legends

Fig 1. *Liquid chromatographic profile illustrating the presence of Sal B in the 25% aqueous ethanolic extraction of Salvia Miltiorrhiza.*

The extracts were chromatographed on a reversed-phase column (Cosmosil 5C₁₈-AR, 25 x 0.46 cm, 5 µm). The mobile phase was composed of solvent A (water:acetic acid = 97:3, v/v) and solvent B (methanol:acetic acid = 97:3, v/v). Solvent A was set at 75% for the first 6 min. It was reduced to 65% A linearly in the next 4 min and maintained isocratically for another 5 min. The ratio of solvent A was further reduced to 60% linearly in the next 5 min and kept constant for the final 20 min. The whole elution time was 35 min.

Fig 2. *Time course of lipoprotein oxidation ex vivo.*

Lipoproteins corresponding to ρ 1.019-1.063 (SLF) were collected for the assay. TBARS values were expressed as nmol of MDA/mg of SLF cholesterol. High Chol (n=7) - Δ -, SM (n=7) - \blacktriangle -, Probucol (n=7) - \bullet -. Each value represents mean \pm SEM of three determinations.

Fig 3. *The concentration of α -tocopherol in the specific lipoprotein fraction.*

The values were expressed as nmol of α -tocopherol/SLF cholesterol. Each data represents mean \pm SEM of each animal group (* vs High Chol or Probucol, $p < 0.005$).

Fig 4. *Changes of plasma cholesterol concentration (A) and cholesterol exposure (B).*

High Chol (Δ), SM (\blacktriangle), Probucol (\bullet), Normal (O). Plasma cholesterol concentrations were lower in SM and probucol-treated groups as compared with High Chol (2-way ANOVA, $p < 0.005$). * vs High Chol, $p < 0.05$. Cholesterol exposure was defined as area under the curve of plasma cholesterol with time. (* vs High Chol, $p < 0.05$; ‡ $p < 0.005$; § vs SM, $p < 0.05$).

Fig 5. *Cholesterol contents in lipoprotein fractions corresponding to $p < 1.019$ (VLDL) (A), $1.019 < p < 1.063$ (SLF) (B), and $p > 1.063$ (HDL) (C).*













 Normal;  High Chol;  Probucol;  SM. (A) * vs High Chol, $p < 0.05$; ‡ $p < 0.0005$; (B) * vs Probucol, $p < 0.05$; ‡ Probucol 0 week vs 12 weeks, $p < 0.0001$.

Fig 6. *Atherosclerotic area percentage of abdominal aorta (A) and cholesterol deposition in thoracic aorta (B).*

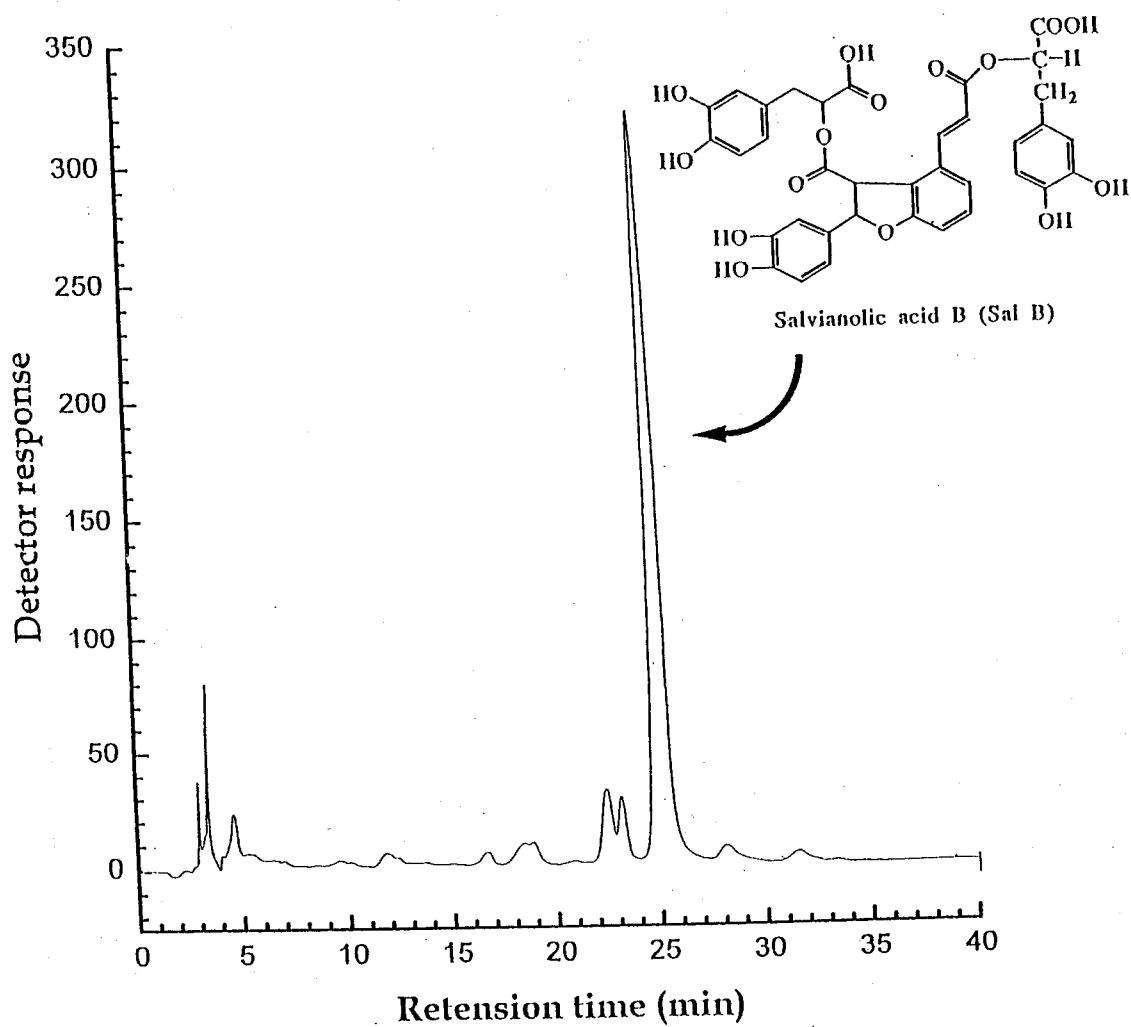
 Normal;  High Chol;  Probucol;  SM. In (A), the aortas were stained with Sudan IV solution and sudanophilic areas were measured by computer-assisted planimetry. The atherosclerotic areas were expressed as % of total. Normal, $0.31 \pm 0.06\%$; High Chol, $37.2 \pm 4.4\%$; Probucol, $9.60 \pm 2.94\%$; SM, $16.5 \pm 2.7\%$. (* vs High Chol, $p < 0.005$; Probucol vs SM, $p > 0.1$). In (B), total lipids in the thoracic aorta were extracted for saponification.

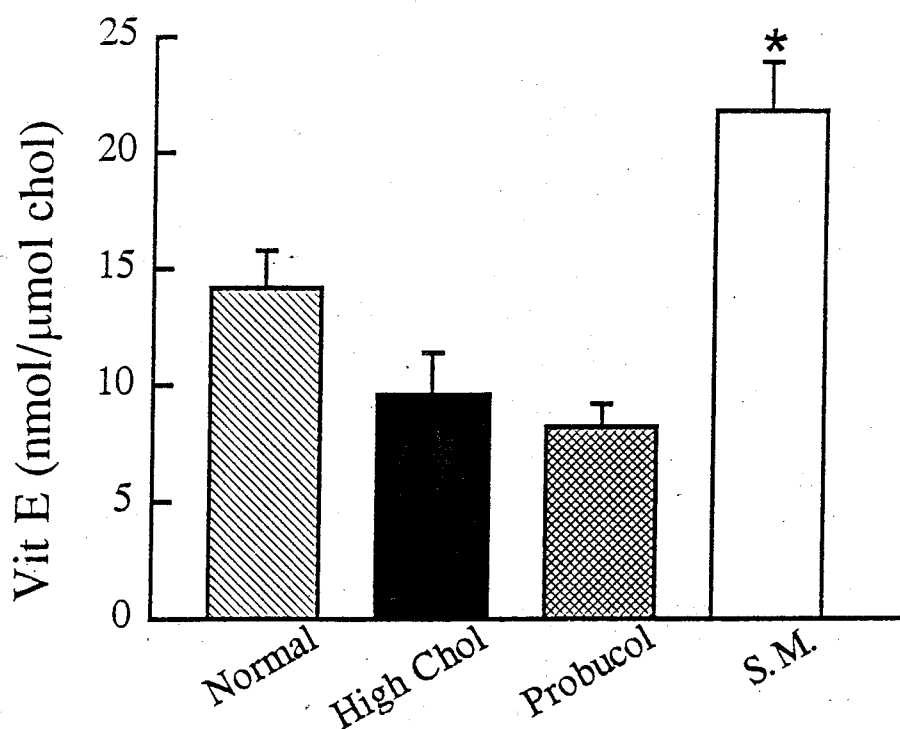
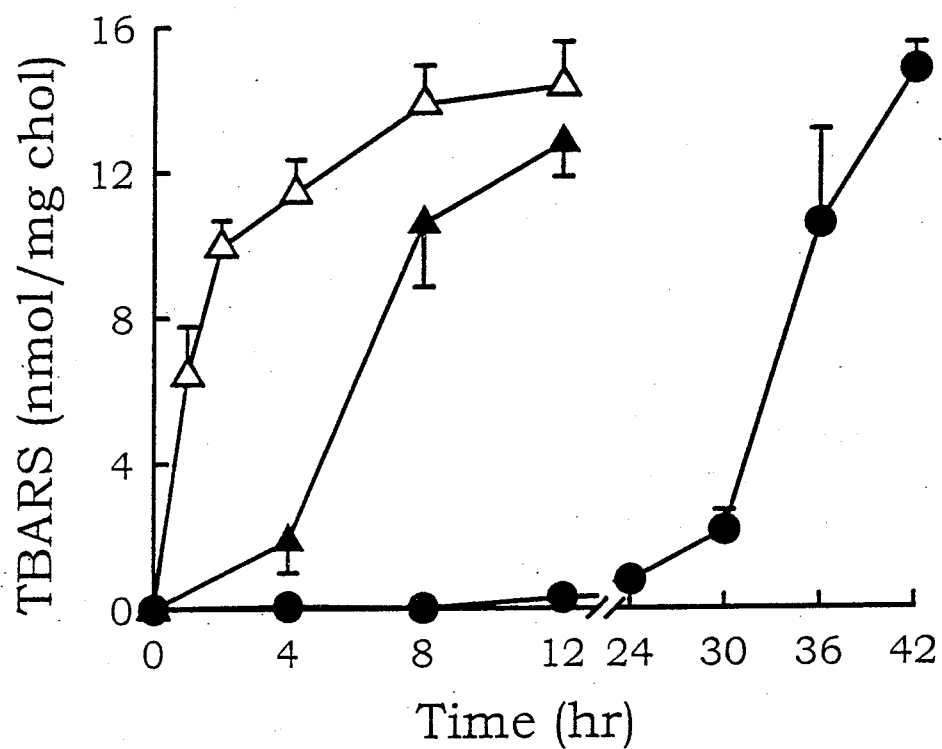
Cholesterol was extracted into a n-hexane layer and determined by a modified method of Abell and Kendall. Normal, 0.63 ± 0.03 mg/g; High Chol, 28.9 ± 1.9 mg/g; Probucol 12.7 ± 3.3 mg/g; SM, 14.3 ± 1.9 mg/g. (* vs High Chol, $p < 0.005$; ‡ $p < 0.0005$).

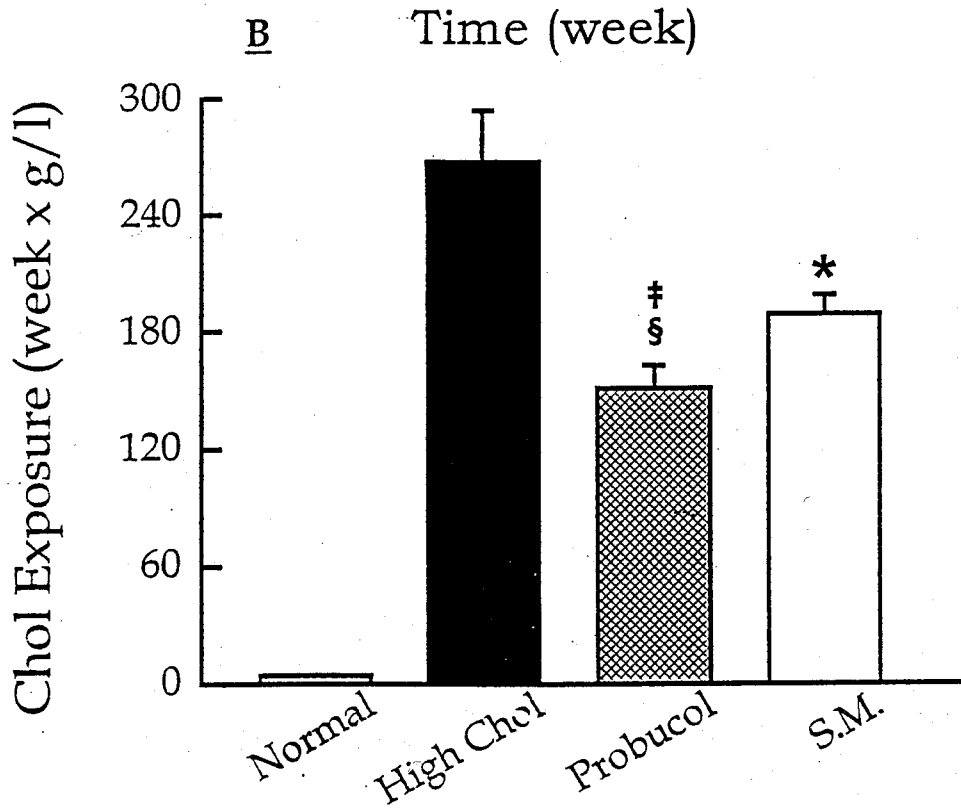
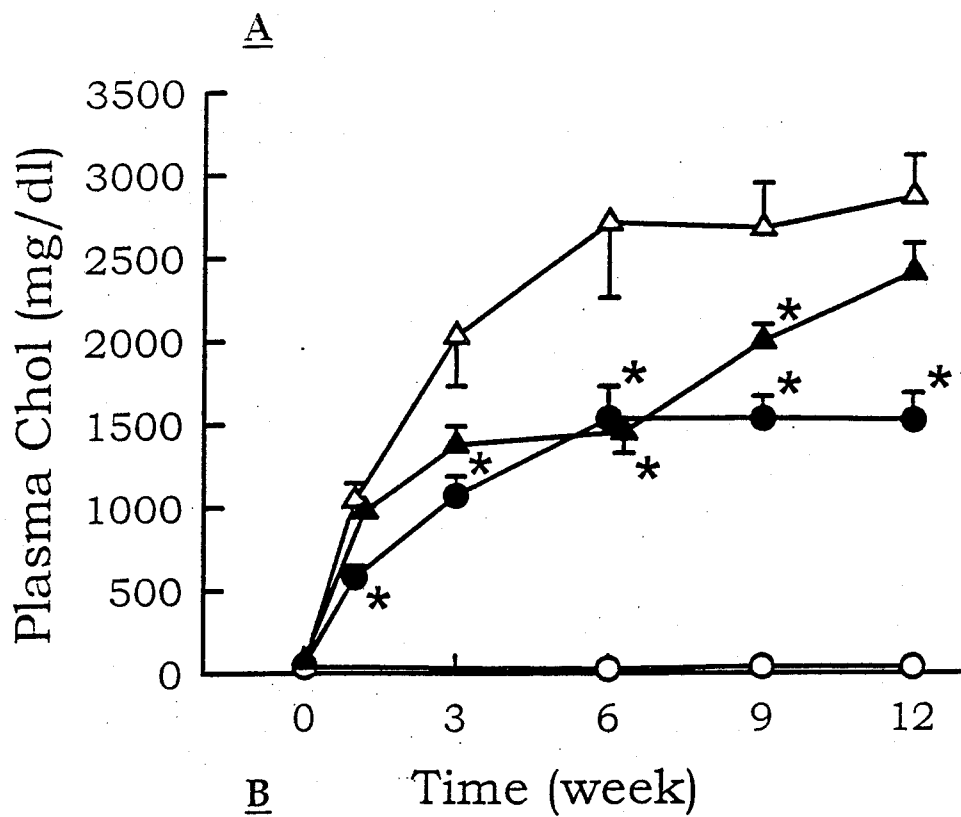
Fig 7. *Atherosclerotic area percentage as a result of cholesterol exposure (A). and Plot of cholesterol deposition in relation to cholesterol exposure (B).*

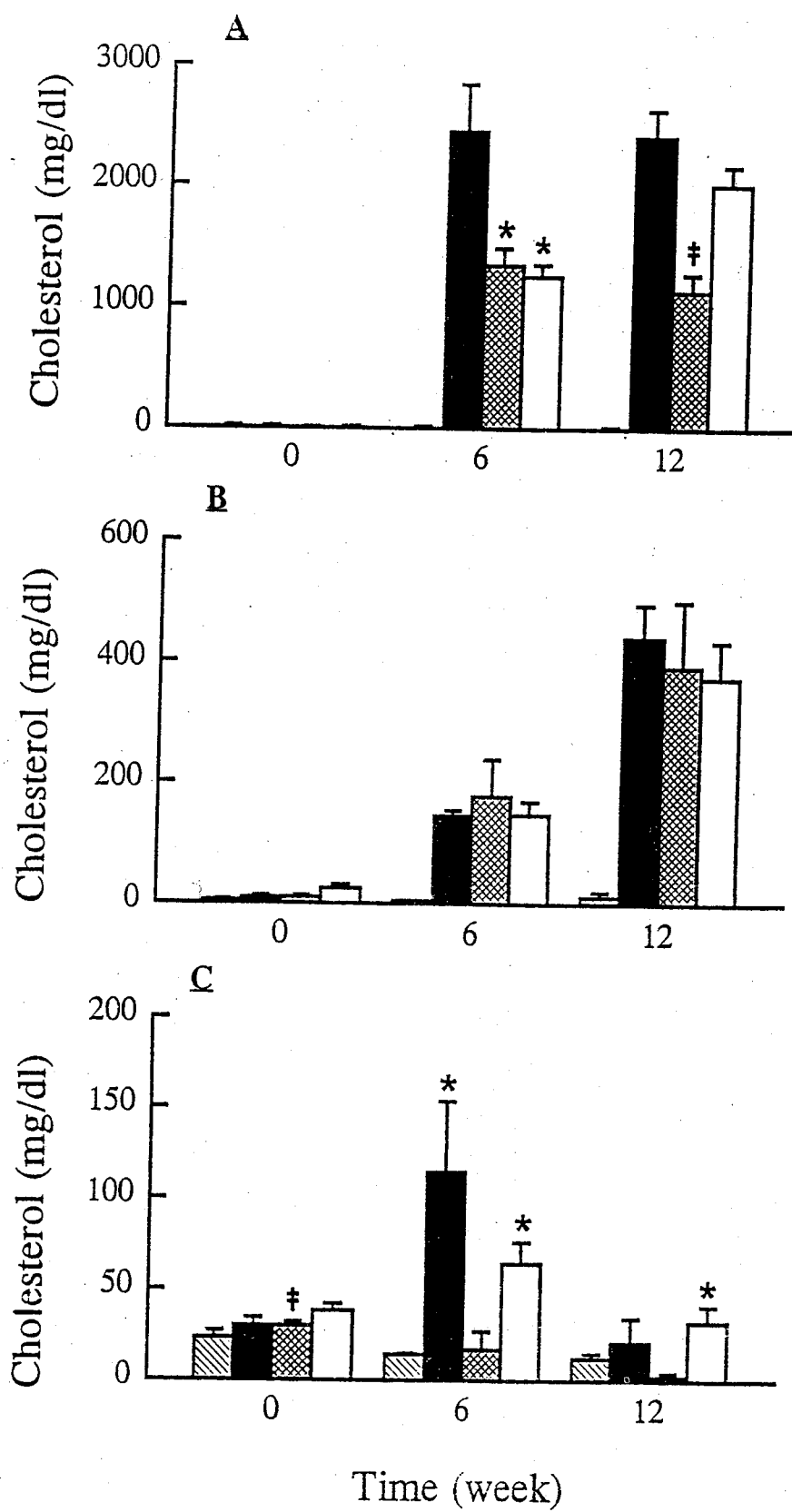
(A)  Normal;  High Chol;  Probucol;  SM.

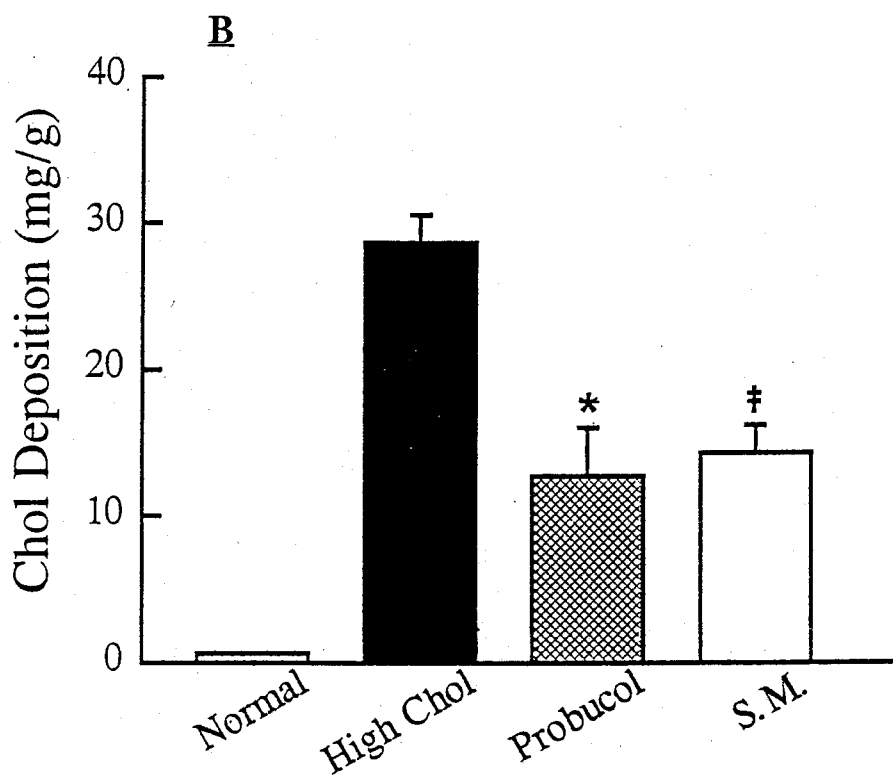
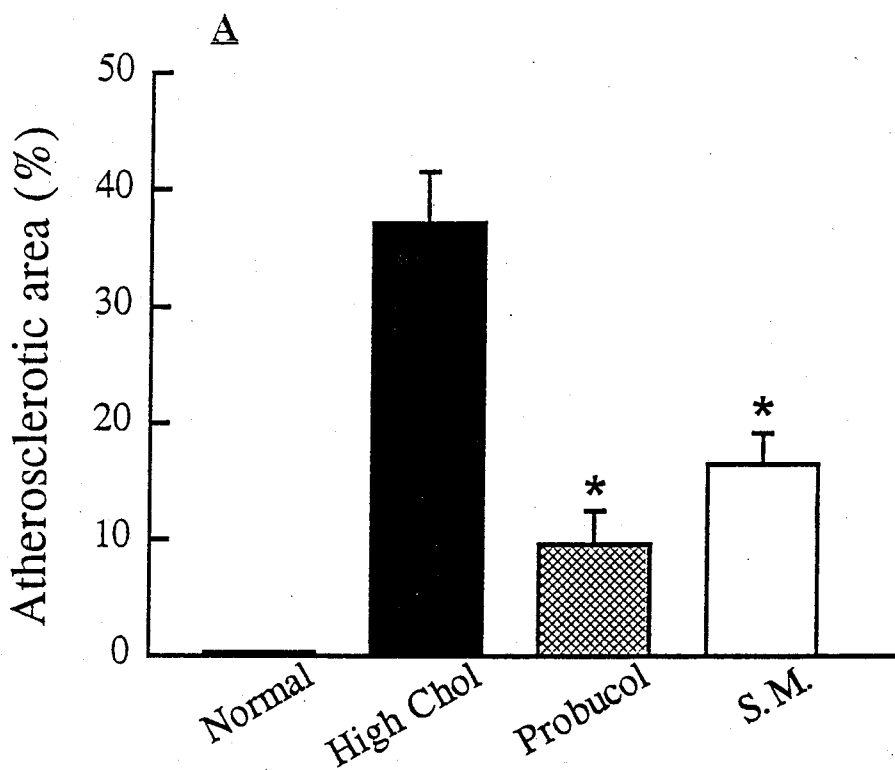
The results were obtained by normalization of atherosclerotic area (%) with cholesterol exposure. The scale adopted here was arbitrary. (* vs High Chol, $p < 0.05$; Probucol vs SM, $p > 0.1$). (B) Normal (○), High Chol (Δ), SM (▲), Probucol (●). Groups supplemented with antioxidants appeared in the lower part of the plot in spite of similar cholesterol exposure. Poor correlation ($r^2 = 0.528$) indicated that additional confounder (antioxidants existed).

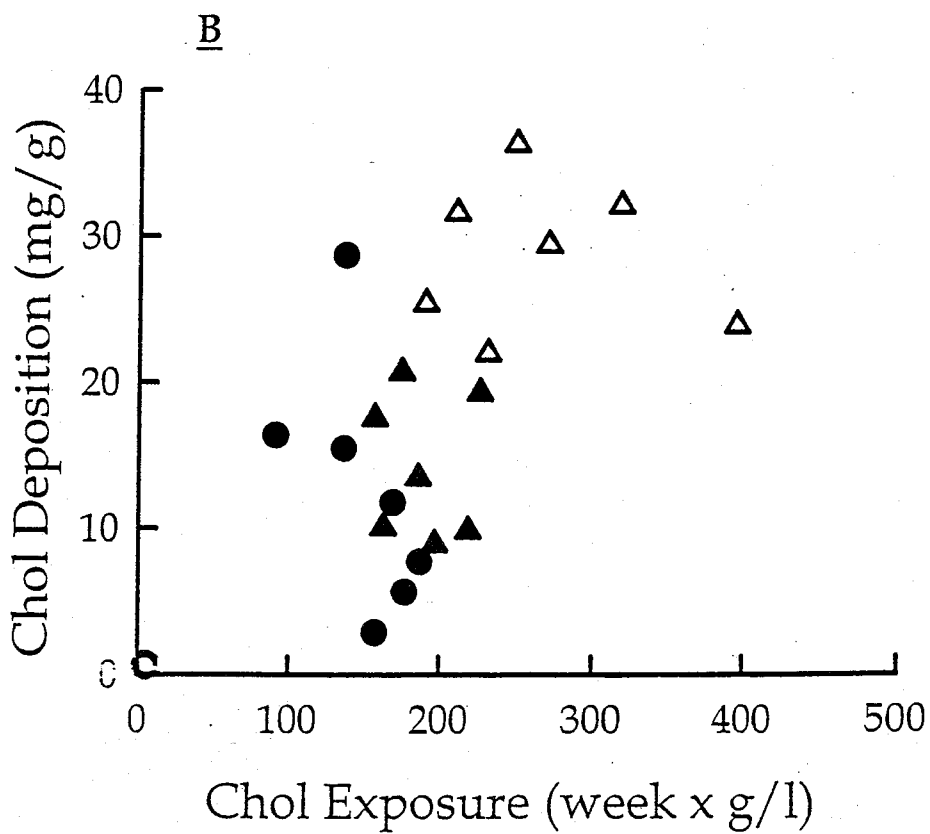
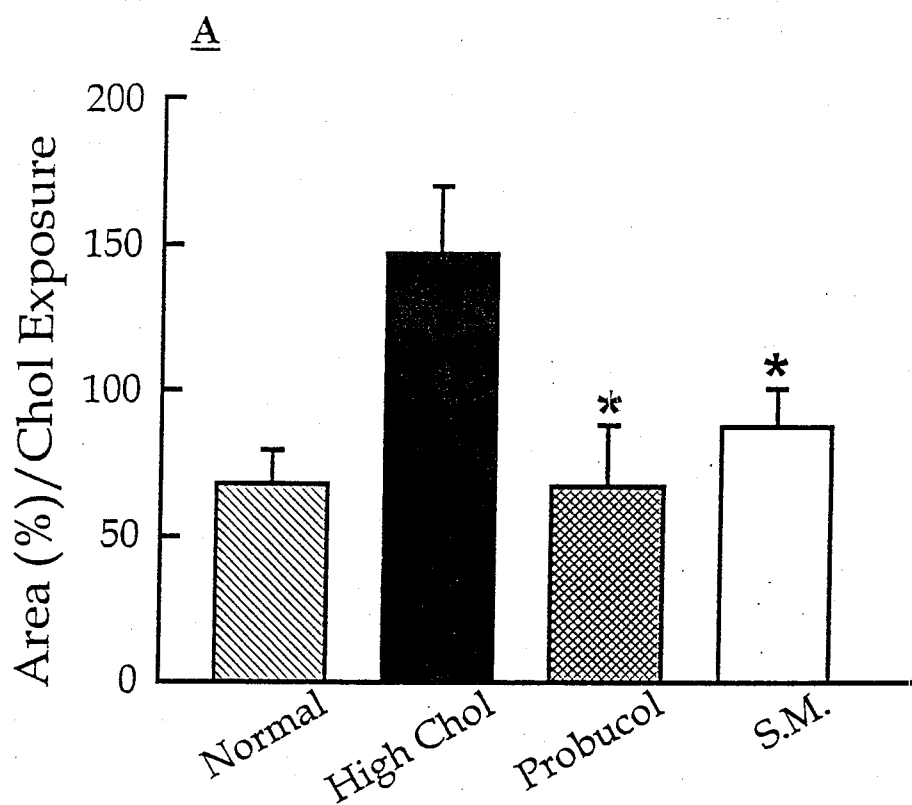












台灣產樟科及番荔枝科藥理活性 成分之研究(Ⅲ) —山胡椒之抗血之板凝集作用

吳永昌

高雄醫學院天然藥物研究所

摘 要

依抗血小板凝集篩檢法，從山胡椒〔*Litsea cubeba* Persoon〕樹材部得到六個生物鹼類化合物，分別為 isocorydine (1), N-methylaurotetanine (2), boldine (3), liriotalipiterine (4), reticuline (5) 及 litebamine (6)。其中 Aporphine 1 對於 ADP, Collgen 及 PAF 所引起的血小板凝集，有選擇性的抑制效果。Aporphine 2 則對於 ADP, AA, Collgen 所引起的血小板凝集效果有明顯之抑制，對於 PAF 所引起的血小板凝集則較無效果。Aporphine 3 對於 AA, Collgen 所引起的血小板凝集效果有明顯之抑制效果。至於屬於 Benzylisoquinoline 類的化合物 5 則對 AA 所引起的血小板凝集效果有明顯之抑制，對 ADP 所引起的血小板凝集效果則次之。由以上明顯之藥理結果顯示本植物值得進一步探討，所發現之化合物，亦具有藥物豆究開發之潛力。

(一)、前言：

「中藥」——我國幾千年來一直在使用，而且在人類「疾病與營養補品」中扮演著相當份量的天然資源，不分國內、外，最近有更多研究人員著手於此方面之研究，可謂「全球草藥熱」，據載英國皇家地理學會已經在北亞馬遜河流域推動一項熱帶雨林研究計畫，目前已經發現兩百五十幾種有用的植物，其中包括一種樹內含有生物鹼，未來可能提煉出防止愛滋病的疫苗。熱帶雨林潛藏之藥用資源無限，一些大藥廠已經投入這個龐大的自然資源市場，準備開發草藥生劑。臺灣地處亞熱帶雨林區，同樣孕涵有豐富的藥用資源，包括司治何杰今氏病、心臟病，及避孕藥皆可從熱帶花卉種源之中提煉。而樟科番荔枝科植物自古以來即被用來治療膿瘍、咳嗽、驅蟲、腹瀉、癲癇、腫瘤、健胃、強心等民間之用藥。而且最近國科會的生命科學簡訊第四卷、第七期、第六頁的報導指出，樟科植物大香葉樹之一生物鹼成分 "Dicentrine" 具有抗心律不整與抗血小板凝集之作用。同時，國外之 "Asia Pacific Journal of Pharmacology (1989); 233-248" 報導天然物（分離自藥用植物者），具有 Dopamine agonists 及 antagonists 之治療上之發展，此類之天然物大多為 isoquinoline 之生物鹼。而樟科、番荔枝科中草藥所含之主要成份——生物鹼，亦大多屬於 isoquinoline 類之生物鹼。包括 aporphine, benzyloisoquinoline, protoberberine, berberine.....等型。

基於上述，筆者擬以五年時間為全程計畫，逐年分項的篩選，分離活性之物質，研究其作用之機轉 以探討此類中草藥抗心臟血管疾病方面之藥效，而作為藥物開發之基礎。

據甘偉松教授所著之「藥用植物學」記載，樟科植物主要分佈於熱帶，約45屬1500種，我國入藥者計7屬，約27種，番荔枝科主要產於熱帶約95屬、1200種，我國入藥者計5屬，約8種。而根據臺灣植物誌所載，在臺灣生長的植物（包括本產與外來栽培者），樟科與番荔枝科分別有12屬66種與6屬14種。

本計畫之主要目的，是擬於此五年之全程計畫內篩選並探究其主要作用（具有抗心臟血管疾病作用者）之成分並研究其作用的機轉，以期了解此類中草藥真正在心臟、血管疾病有關之藥理活性，解開其在「中藥」上使用未能了解其真正作用之謎，進行製備有活性成分的衍生物，探討其 Structure-Activity Relationship (S.A.R.)，以作為藥物開發之基源。

本計畫擬於分成五年進行，其預期完成之工作項目及具體之成果分述如下：

- 一、第一年：採集中草藥材如樟科之 *Cryptocarya*（厚殼桂）、*Cassytha*（無根草）、*Dehassia*（腰果楠）、*Litsea*（木薑子）、*Lindera*（釣樟）、*Machilus*(*Persea*)（楨楠）、*Neilitsea*（新木薑子）與 *Phobe*（雅楠）等屬及番荔枝科 *Fissitigma*（瓜馥木）與 *Goniothalamus*（哥納香）與 *Annona* 及 *Artabotrys* 屬等植物加以篩選。
- 二、第二年：選取第一年内篩選有效之材料數種加以萃取分離、純化，找出有作用之物質（配合藥理活性作用追蹤之）。
- 三、第三年：如第二年之工作項目。

四、第四年：探討有作用之活性物質之作用機轉，以便了解其藥理作用的真正機構。

五、第五年：製備衍生物，以配合Structure-Activity Relationship 的研究，尋找藥物開發之材料。

(二) 研究材料與方法

樟科植物山胡椒是一落葉性灌木或小喬木，分布於中國長江流域以至於印度及爪哇，於台灣混生於中海拔闊葉林內，全株具刺激性之薑辣香味。葉發生於花開之後，膜質，線狀披針型，中肋紫褐色，表面暗綠色，初時密被縮毛，後則平滑，長 5-15 公分，寬 1.3 公分。雌雄異株，繖形花序有花四至五朵，腋出，總苞四片；雄花具完全雄蕊九枚，藥四室，全屬內向；雌花徑約兩公厘。漿果球形，徑五公厘。

其藥理作用，根據甘偉松教授所著之藥用植物學記載，有治腳氣、霍亂等功用。根據江蘇新醫學院所編之中藥大辭典，記載其果實對黏膜有局部刺激作用，並能吸收，對泌尿道及呼吸道亦有刺激作用，且口服其揮發油，對尿路有防腐作用，亦記載有殺蟲防蚊之功效。將山胡椒材部粗萃取物做抗血小板凝集試驗之篩選，顯示具有明顯地抗血小板凝集作用，因此，我們探討其作用的成分，以作為藥物開發之基礎。

1991 年二月在屏東縣三地鄉德文村尾寮山採得山胡椒樹材 12 Kg，利用甲醇溫浸萃取，濃縮後除去甲醇，經水、 CHCl_3 、酸鹼處理之後得生物鹼部份，再經各種分離儀器及光譜解析，分離純化所分離得到的純物質。得到之生物鹼如表一所示。

生物鹼	產率	
	克	百分率%
isocorydine (1)	0.10	0.000083
N-methyl laurotetanine (2)	0.09	0.000075
boldine (3)	0.52	0.000433
liriotulipiterine (4)	0.02	0.000017
reticuline (5)	0.07	0.000058
litebamine (6)	0.03	0.000025

1. 本研究計畫主要是探討前述中草藥抗心臟、血管疾病之作用，然後進一步篩選出可能之有效成分，材料之採集、濃縮抽取及各成分之分離、純化、衍生物之製備等由本實驗室依照天然物之routine方法負責，而藥理作用則由台大藥理所邱哲明教授擔任。其實驗方法歸納如下：
2. 血小板凝集試驗：platelet-rich plasma, platelet suspension 採用本實驗室之方法，依透光法以Chrono-log之血小板凝集測定器記錄。全血凝集則採用impedance方法以Whole-blood Aggregmeter測定。
3. 血小板釋放反應：利用luciferase-luciferim與ATP 產生螢光之方法，並以標準之ATP矯正其值。
4. Thromboxane B₂, C-AMP在血小板之形成：加入agonists 6分鐘後以EDTA(2mM)及indomethacin(50 μ M)中止反應。離心後，適當稀釋其上清液後，以RIA測TXB₂含量。C-AMP之測法，則在agonists作用6分鐘，加熱中止反應。冷凍乾燥，以0.1ml溶解後，用RIA方法測定之(以上均採用Amersham之RIA kits)。
5. fibrinogen binding與對抗之探討。除了以凝集法測定與中藥之濃度—抑制曲線外，並以Schstch plot方法測定¹²⁵I-fibrinogen與中藥成分競爭之方式。
6. 細胞內鈣離子濃度之測定：血小板懸浮液或平滑肌細胞以quin-2AM或fura-2AM loading以後，觀察在各種條件下，細胞內鈣離子濃度增加與quin-

2或fura-2結合而產生螢光之增加(Ex339nm, Em 492nm)。

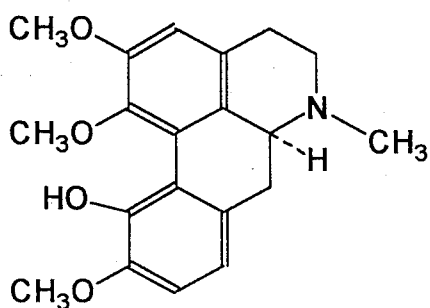
7. Phosphoinositides breakdown: 血小板或平滑肌細胞以75 μ Ci之 $[3H]$ inositol溫浴2hr, 洗淨後做成懸浮液。加藥反應後以TCA 中止並以乙醚抽取TCA, 水層通過Dowex-1做離子交換色層分析, 並以LiCl中止InsP. Phosphatase之反應。瀝液收集測定IP₃, IP₂及IP之含量。(擬購置分割收集器收集瀝液)
8. 血管平滑肌之細胞之培養: 取大白鼠之胸大動脈, 除去內膜細胞後, 剝離之平滑肌以Eagle minimal essential medium(MEM)加上10% calf serum(10%)培養, 以5-10代之培養細胞做實驗材料。
9. 胸大動脈血管之收縮: 血管分離後, 以norepinephrine引起持續性收縮或在高鉀(60mM)下, 以cumulative方式加入鈣離子, 引起一階梯式收縮, 觀察中藥先加或後加之放鬆作用。
10. 血管內膜細胞之重要性: 若中藥成分具有放鬆血管之活性, 則除去血管內膜, 觀察抑制作用是否消逝。亦可定案resting或以arachidonic acid 溫浴時PGI₂之含量變化(RIA kits, amersham)。有關EDRF 之參與, 則探討hemoglobin(10 μ M)或methylene blue(20 μ M)能否抑制間接證明之。亦可測C-GMP增加之情形判斷之。
11. $^{45}Ca^{++}$ influx之測定: 觀察靜止或norepinephrine存在下, $^{45}Ca^{++}$ influx之量可否受中藥成分之影響, 以證明是否為一種 Ca^{++} -channel之blockers (Receptor-linked)。若以抑制高鉀下之 Ca^{++} -influx則為 blockers for voltage-dependent Ca^{++} channel。
12. Ca^{++} -mobilization: 測定caffeine-induced contracture及IP₃-induced contraction(saponin treated)則可了解中藥成分是否抑制細胞內鈣之移動。
13. 微循環抗血栓活性: 將以顯微鏡照相設備觀察以endotoxin 或其他方式造成血栓, 評估上述對血小板有凝集及血管放鬆之中藥成分能否預防血栓產生或溶解血栓。
14. 急性血栓試驗: 以ADP, AA或collagen 注入小白鼠之尾靜脈, 可引起急性

血栓而死亡。觀察中藥成分口服或腹腔注射後，能否降低死亡率。

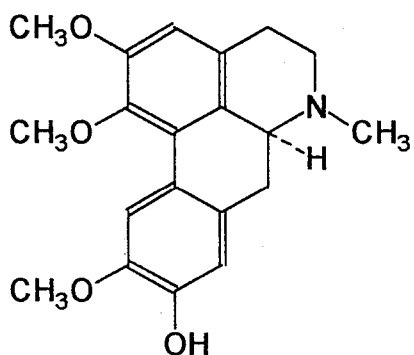
15. 藥物對心跳及收縮力之影響：利用離體心臟以Tyrodes 溶液經由冠狀動脈灌流給藥，記錄生藥濃縮液及各成份對心室收縮力及心跳頻率之影響。
16. 藥物對心臟傳導、興奮性之影響：以兔子或大白鼠心臟固定於保溫水槽經冠狀動脈灌流，將右心房切開一小隙縫，以細銀絲藉顯微鏡導引下於喜氏束附近測定心電圖（此心電圖包含心房、喜氏束、及心室興奮時之波形訊號），其訊號經放大器顯示於示波器或劃於記錄紙上(Klitznax and Roberts, 1983)，另外以銀絲線電極在右心房給予固定頻率之連續刺激，在此連續刺激後之不同時間間隔內再給予早熟性刺激(premature Stimulation, S2)。以此方式可找出心房心室傳導下反應期亦可找出心房不反應期，另外亦可以同樣方式刺激心室找出不反應期，利用此方式可了解藥物對心房、房室節、喜氏束及心室傳導可能之影響。此方法可作為藥物對心臟作用之初步評估，如鈉管道、抑制劑可能會使H-V 傳導變慢，鈣管道抑制劑會抑制A-H 傳導，而第三類抗心律不整藥物則會延長心房或心室不反應期，但對H-V傳導不影響。
17. 藥物對不整律之防止及抑制：利用狗右冠狀動脈結紮以引起早發性及遲發性心室不整律，早發性不整律於結紮後30分鐘出現，而遲發性不整律則於結紮後4-8 小時出現，可持續三天，利用藥物前處理看其是否對不整律之發生，有防止作用，利用藥物後處理看其是否對已發生之不整律有抑制作用。
18. 藥物對心肌細胞膜電位，動作電位及膜電流之影響，在單一心肌細胞膜之鈉電流，鉀電流及鈣電流之影響以了解藥物作用之離導子機轉。細胞分離採用Mitra and Morad (1985)發表之方法以含collagenase Type I及protease Type II之溶液分離，膜電流測定則採用Hamill(1981)發表之單一吮吸電極膜電位鉗定法測定之。
19. 藥物對細胞之鈣離子濃度之影響：雖然藥物可直接影響細胞膜中鈣電流進而改變細胞內游離鈣之濃度，但是某些藥物亦可經由其他次級傳導物質 (Second messenger) 之產生而影響細胞內鈣離子之釋放、吸收、進而影響細胞內游離鈣之測定。本實驗是以Fura-2作為探針來測定細胞內游離鈣之濃度(callewriert et al, 1989)。

三、研究結果與討論

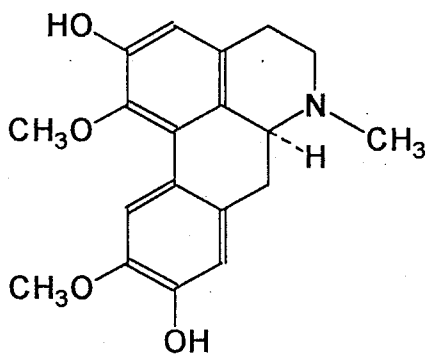
1991 年二月在屏東縣三地鄉德文村尾寮山採得山胡椒樹材 12 Kg，利用甲醇溫浸萃取，濃縮後除去甲醇，經水、 CHCl_3 、酸鹼處理之後得生物鹼部份，以 Si gel，活性碳，Sephadex LH-20 等分離方式得到六種生物鹼 isocorydine (1)、N-methyl laurotetanine (2)、boldine (3)、liriotulipiterine (4)、reticuline (5)、litebamine (6)。其化學結構式如下：



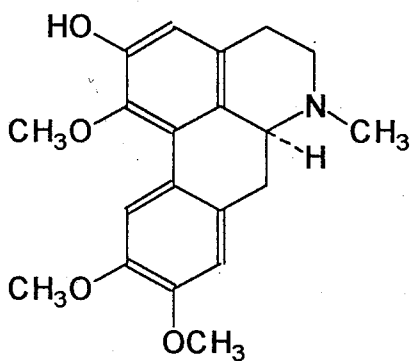
(1)



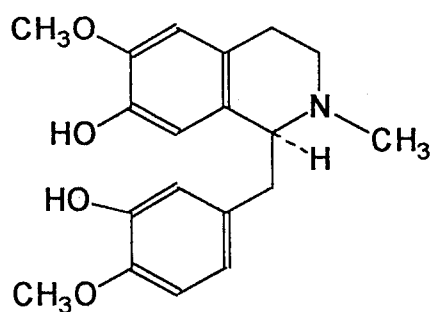
(2)



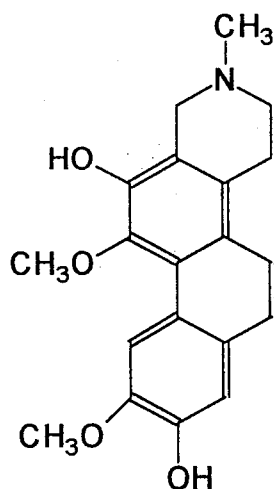
(3)



(4)



(5)



(6)

其中是 1、2、3 及 4 屬於 aporphine 類化合物，5 是屬於 benzyloisoquinoline 類結構，而 6 則是由本實驗室所發現的新骨架化合物 litebamine，由本實驗室第一次所分離得到之新化合物 6 特別的骨架，已由國外論文收錄並依據本實驗室之命名，定名為 litebamine 骨架。上述數個純化合物依二項之研究方法進行藥理作用之篩檢，其抗血小板凝集之活性如表二所示：

表二、Antiplatelet effect % aggregation (Mean±S.E.(n))

compound (100 µg/ml)	ADP (20 µM)	AA (100 µM)	Col (10 µg/ml)	PAF (2 ng/ml)
control	78.8±1.8(4)	88.4±1.1(5)	88.5±0.4(5)	90.5±1.1(5)
<u>1</u>	30.2±9.1(3)***	77.5±5.1(3)*	47.3±14.5(4)*	25.1±14.0(3)***
<u>2</u>	0.0±0.0(3)***	0.0±0.0(3)***	0.0±0.0(3)***	68.1±6.2(3)**
<u>3</u>	61.0±4.6(3)**	0.0±0.0(3)***	20.1±9.5(3)***	75.7±8.22(3)
<u>5</u>	58.7±3.0(3)**	39.2±19.6(4)***	84.2±1.5(3)	85.9±2.0(3)

*:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001.

由上表所示，可知由 SAR 的角度而言，aporphine type 的生物鹼 1、2 及 3 對於 ADP、AA、Collagen 及 PAF 引起之血小板凝集之拮抗試驗的結果，呈現差異很大之選擇性及良好之活性。benzylisoquinoline 類化合物 reticuline 對 AA 引起之血小板凝集具有拮抗作用。以上這些豐碩的藥理成果，值得更進一步探討，以做為藥物開發之基源。

四、參考文獻

1. 『生命科學簡訊』，國科會發行第四卷第七期，p. 6 (1990) .
2. N. Baindur and J. L. Neumeyer, *Asia Pacific Journal of Pharmacology*, 233-248 (1989).
3. 甘偉松著，『藥用植物學』，國立中國醫藥研究所出版，p 246 (1979).
4. 『台灣植物誌』，第二卷 p. 392~427 (1976).
5. F. N. Ko, T. S. Wu, S. T. Lu, Y. C. Wu, T.F. Huang and C. M. Teng, *Thrombosis Research*, 56, 289-298 (1998).
6. Y. C. Wu, J. Y. Liou, C. Y. Duh, S. S. Lee and S. T. Lu, *Tetrahedron Letter*, 32, 4169-4170 (1991).
7. S. S. Lee, Y. J. Lin, M. Z. Chen, Y. C. Wu, C. H. Chen, *Tetrahedron Letter*, 33, 6309-6310 (1992).
8. H. Guinaudeau, M. Lebceuf and A. Cave, *J. Nat. Prod.*, 57, 1114-1115 (1994).

中藥及臺灣產天然物抗病毒抗癌及 抗血栓之研究(Ⅲ)

杜昌益

國立中山大學 海洋資源所

摘 要

癌症為全國十大死因排行榜，另由病毒引起之疾病亦有逐年增加之趨勢，化學療法在上述疾病之治療是非常重要的。過去由傳統中藥及天然物衍生而來之藥物，往往具有特殊之化學結構及藥理作用機轉，是一般合成藥物無法比擬的。我國承襲傳統中藥之精華，且臺島地處亞熱帶，天然資源甚豐，是開發新藥之寶庫。本計畫以美國 NIH 之抗癌及抗病毒篩選方法來篩選傳統中藥。在抗癌活性方面，我們以多種人類癌細胞配合 MTT 分析方法，來篩選傳統中藥及其成分。在抗病毒活性方面，我們以簡單型疱疹病毒型 1 (Herpes simplex virus type 1, HSV-1) F Strain，簡單型疱疹病毒型 2 (HSV-2) G Strain，細胞巨大性病毒 (Cytomegalovirus) AD-169 及 Davis Strains 及以上三種病毒低代的臨床分離株 (low passage clinical isolates) 配合病斑減少法 (plaque reduction assay) 及 DNA-DNA 雜交法，來篩選傳統中藥及其成分。有活性之中藥繼續以活性為導向分離出活性成分，活性成分以化學、光譜及 X-Ray 單晶繞射等方法來解析化學結構。今年之計畫中，我們從臺灣樹蘭之莖皮部分離到兩個具有 cytotoxicity 之成分：Dehydroodorin 及 Rocaglamide。

Abstract

Cancer is the leading death cause in Taiwan. Virus-related diseases also increased rapidly in recent years. Chemotherapy plays an important role in treating cancer and virus infected patients. Most clinically useful anticancer and antiviral agents from traditional herbs and natural sources usually possessed novel structures and mechanism of actions. In this project, we used multiple human tumor cell lines to screen traditional chinese herbs and their chemical constituents for anticancer activities and HSV-1, HSV-2, as well as CMV virus for antiviral activities. *Aglaia formosana* (Hayata) Hayata (Meliaceae) was selected for study when a chloroform extract of the stem bark was found to display significant cytotoxicity in A-549 (human lung adenocarcinoma), HT-29 (human colon adenocarcinoma), KB (human epidermoid carcinoma) and P-388 (mouse lymphocytic leukaemia) cell culture systems when assessed using standard protocols [1-2]. Bioactivity-guided chromatographic fractionation led to the isolation and characterization of two cytotoxic constituents, dehydroodorin and rocaglamide.

INTRODUCTION

As part of continuing search for tumour inhibitor from natural sources. *Aglaia formosana* (Hayata) Hayata (Meliaceae) was selected for study when a chloroform extract of the stem bark was found to display significant cytotoxicity in A-549 (human lung

adenocarcinoma), HT-29 (human colon adenocarcinoma), KB (human epidermoid carcinoma) and P-388 (mouse lymphocytic leukaemia) cell culture systems when assessed using standard protocols [1-2].

RESULTS AND DISCUSSION

Bioactivity-guided chromatographic fractionation led to the isolation and characterization of two cytotoxic constituents, 1 and 2. Compound 1 was obtained as colorless needles, mp 167-168°, and exhibited a molecular formula of $C_{18}H_{22}O_2N_2$ as determined by high resolution mass spectrometry. Presence of a cinnamoyl moiety was indicated by the appearance of mass peaks at m/z 131 (PHCH=CHCO) and 103 (PHCH=CH), by IR bands (KBr) at 1660, 1620, 1520, 1415, and 990 cm^{-1} and substantiated by the presence in the 1H NMR spectrum ($CDCl_3$) of characteristic lowfield signal at δ 7.69 (1H, *d*, $J = 15.4$ Hz, H-3"), 6.94 (1H, *d*, $J = 15.4$ Hz, H-2"), and 7.20-7.50 (5H, *m*, aromatic protons). 1H - 1H COSY experiment yielded the following assignments: δ 1.72 (3H, *d*, $J = 7.0$ Hz, H-4), 1.82 (3H, *d*, $J = 1.2$ Hz, H-7), 1.70-1.98 (2H, *m*, H-4'), 1.90-2.25 (2H, *m*, H-3'), 3.20-3.56 (2H, *m*, H-5'), 6.08-6.18 (1H, *m*, H-2'), 6.48-6.60 (1H, *m*, H-3), 7.48 (1H, *m*, NHCO). The presence of this amide amino group was also reflected by an IR band at 3270 cm^{-1} . The foregoing evidence

led to the conclusion that **1** represented the structure of the cytotoxic diamide, and this was supported by its ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3): δ 170.1 (s, C-1), 167.3 (s, C-1"), 143.8 (d, C-3"), 136.2 (s, C-2), 132.8 (d, C-3), 131.0 (d, C-7"), 130.1 (d, C-6",8"), 129.4 (d, C-5",9"), 119.5 (d, C-2"), 64.1 (d, C-2'), 46.8 (t, C-5'), 34.8 (t, C-3'), 21.9 (t, C-4'), 14.3 (q, C-7), 12.5 (q, C-4). The relative configuration of **1** was determined by X-ray diffraction analysis (Figure 1).

The assignment of the ^{13}C NMR chemical shift of **1** and **2** was achieved by the application of ^1H - ^{13}C hetero-nuclear shift correlated two dimensional experiments (Figure 2 and 3) [3].

EXPERIMENTAL

Mps: uncorr. ^1H NMR (200 MHz): CDCl_3 . MS: 70eV direct inlet. UV: MeOH. IR: KBr. Chromatographic sepns were carried out on silica gel G. TLC spots were detected under UV (254 and 365 nm) and heating the plates to 100° after spraying with 60% H_2SO_4 .

Plant material. *A. formosana* was collected in Man-Chou, Ping-Tong County in January 1991. Voucher specimens are kept in the Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung Medical College, Kaohsiung, Taiwan.

Extraction and fractionation. Air-dried, milled stem bark (3.5 kg) were extracted repeatedly with MeOH. After removal of solvent

in vacuo, the MeOH-sol. residue was partitioned between H₂O and CHCl₃. The dried CHCl₃ extract (250 g) was found to exhibit cytotoxicity in A-549 (human lung adenocarcinoma), HT-29 (human colon adenocarcinoma), KB (human epidermoid carcinoma) and P-388 (mouse lymphocytic leukaemia) cell culture systems when assessed using standard protocols [1-2]. CC of the CHCl₃ extract was undertaken using CHCl₃ and CHCl₃-MeOH mix. of increasing polarity. A total of 102 frs (200 ml) was collected. Elution with CHCl₃ afforded frs containing compound 1. Further purification by CC with n-hexane-EtOAc (1:1) as eluent solvent afforded 1. Elution with CHCl₃-MeOH (19:1) afforded frs containing compound 2. Further purification by CC with n-hexane-EtOAc (1:3) as eluent solvent afforded 2.

Dehydroodorin (1). Obtained from MeOH as needles (120 mg), m.p. 167-168°, $[\alpha]_D^{18} +42.5^\circ$ (CHCl₃, c 0.01), UV λ_{\max} nm (log ϵ): 282 (4.82), IR ν_{\max} cm⁻¹: 3270, 1660, 1620, 1520, 1415, 990 cm⁻¹; MS *m/z* (rel.int.): 298, [M⁺], 281 (0.4), 265 (0.2), 256 (0.3), 243 (0.1), 236 (0.2), 229 (0.6), 215 (15), 200 (4), 199 (21), 167 (35), 151 (6), 131 (100), 103 (59), 85 (52), 83 (44), 77 (28), 70 (15).

X-ray analysis of 1. The essential detail of single crystal data measurement and the refinement is given in Table 1. Atomic parameters are given in Table 2. Bond distances and angles are listed in Table 3. The molecular structure is depicted in Figure 1.

Rocaglamide (2). Obtained from MeOH as needles (120 mg), m.p. 118-119°, $[\alpha]_D^{20}$ -98° (CHCl₃, c 0.1), UV λ_{\max} nm (log ϵ): 215 (4.36), 234 (sh, 3.92), 274 (2.94); MS m/z (rel.int.): 505 [M⁺], 487 (5), 443 (5), 390 (70), 300 (82), 285 (34), 205 (30), 176 (100), 135 (14).

Cytotoxicity Testing

KB and P-388 cells were kindly provided by Prof. J.M. Pezzuto, University of Illinois at Chicago; A-549 (human lung adenocarcinoma) and HT-29 (human colon carcinoma) were purchased from ATCC.

The P-388 cells were cultured in Fisher's medium supplemented with 10% heat-inactivated (56° for 30 min) fetal calf serum (FCS). The KB cells were maintained in Basal Medium Eagle (BME) containing 10% heat-inactivated FCS. The A-549 cell line was cultured in Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) containing Earle's salts and supplemented with 0.1 mM of nonessential amino acids and 10% heat-inactivated FCS. The HT-29 cell line was maintained in Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium containing 10% heat-inactivated FCS. All the cell lines were maintained in an incubator at 37° in humidified air containing 5% CO₂.

The cytotoxic activities of tested compounds against P-388, KB, A-549, and HT-29 were assayed with modification of the MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric method. For P-388 cells, 200 μ l of culture was established at 1500 cells/well in 96-well tissue culture plates (Falcon). Tested compounds

were dispensed subsequently to the established culture plate at eight concentrations each with three repeats. After three days of incubation, P-388 cells were enumerated with MTT.

To measure the cytotoxic activities of purified compounds against KB, A-549, and HT-29, each cell line was initiated at 1,000 cells/well in 96-well microtiter plates. Eight concentrations encompassing a 128-fold range were performed on each cell line. KB, A-549, and HT-29 cells were enumerated using MTT after the exposure to tested compounds for 3, 6, and 6 days, respectively. Fifty μ l of 1 mg/ml MTT was added to each well, and plates were incubated at 37° for a further 5 h. Formazan crystals were redissolved in DMSO (Merck) for 10 min with shaking, and the plate was read immediately on an enzyme-linked immunosorbant assay reader (Titertek Mutiskan, Flow) at a wavelength of 540 nm. The ED₅₀ was defined as 50% reduction of absorbance in the MTT assay. Cytotoxicity of 1 and 2 was shown in Table 4.

REFERENCES

1. Geran, R.I., Greenberg, N.H., Macdonald, M.M., Schumacher, A.M., and Abbott, B.J. (1972) *Cancer Chemother. Rep.* 3, 1.
2. Wang, S.-K., Duh, C.-Y., Wu, Y.-C.; Wang, Y., Cheng, M.-C., Soong, K., and Fang, L.-S., (1992) *J. Nat. Prod.* 55, 1430.

3. Bax, A. and Morris, G.A. (1981) *J. magn. Reson.* 42, 501.
4. Gabe, E.J., Le Page, Y., Charland, J.-P., and Lee, F.L., White, P.S (1989) *J. Appl. Cryst.* 22, 384.

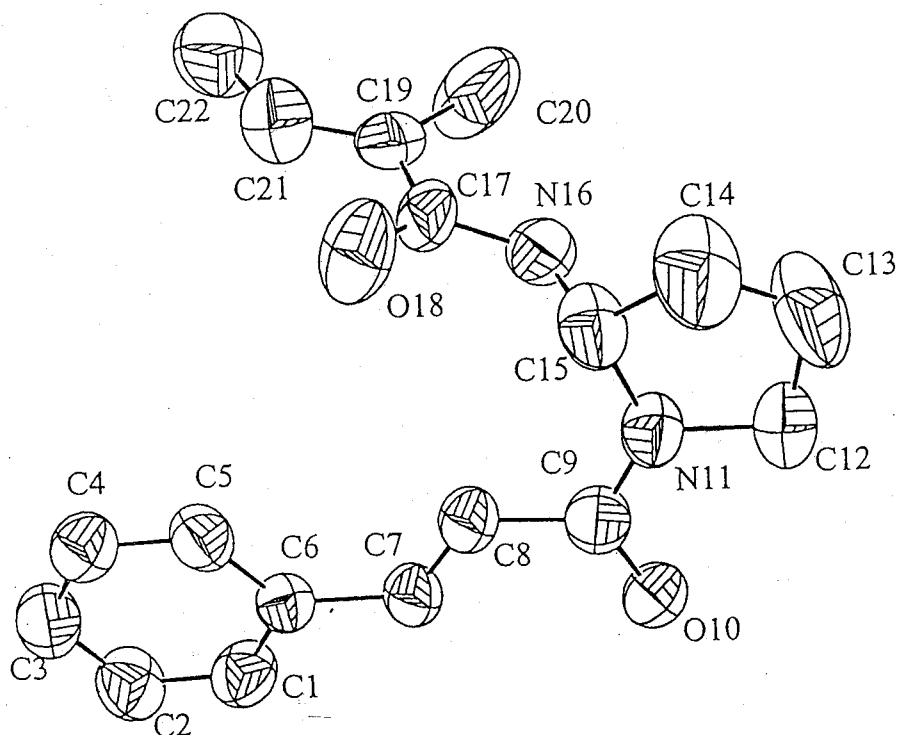
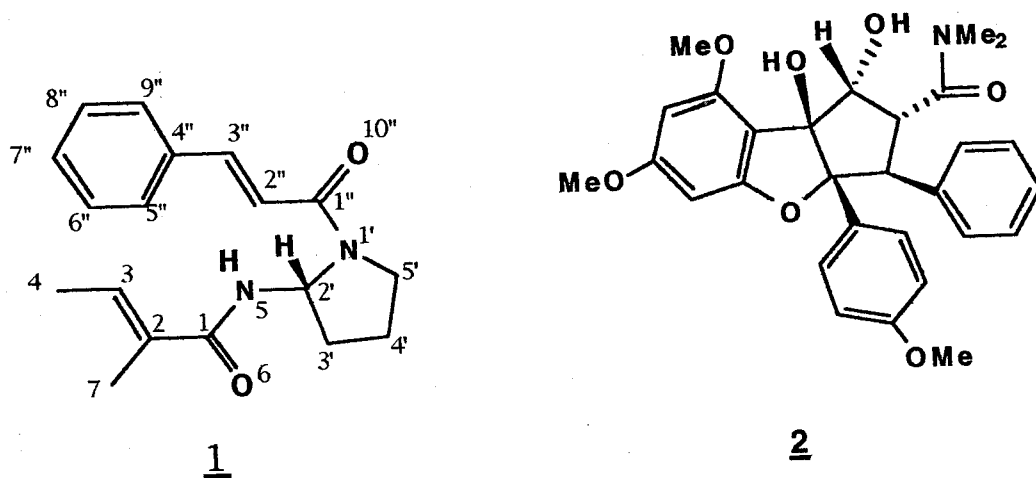


Figure 1. Molecular structure of dehydroodorin (1)





Table 1 Crystal Data

Formula	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂
Formula weight	298.38
Diffractionmeter used	CAD4
Space group	P 2 ₁ /c
a, Å	8.044(1)
b, Å	12.061(3)
c, Å	17.419(3)
β(°)	96.16(2)
V, Å ³	1680.2(16)
Z	4
D(calcd), g.cm ⁻³	1.180
λ(Mo Kα), Å	0.71069
F(000)	640
Unit cell detn (No., θ range)	24, 9-12°
Scan type	θ /2θ
2 θ scan width, deg	2(0.8 + 0.35 tanθ)
2 θ range, deg	2-50
μ(Mo Kα), cm ⁻¹	0.7
Crystal size, mm	0.15x0.25x0.35
Temperature (K)	298
No. of meas reflns	2955
No. of obs reflns(I > 2σ(I))	931
R*	0.060
R _w **	0.059
Refinement program	NRCVAX***
No. of refined params	200
Minimized function	Σw F _o -F _c ²
Weighting scheme	counting-statistics
g(second. ext. coeff.)x10 ⁴	0.13(3)
(Δ/σ)max	0.042
(Δρ)max, min (e.Å ⁻³)	0.22,-0.19

$$*R = [\sum |F_o - F_c| / |F_o|]$$

$$**R_w = [\sum w(|F_o - F_c|^2 / \sum w(F_o^2))]^{1/2}; w = 1/\sigma^2(F_o)$$

*** ref 4

Table 2. Atomic paramerters x, y, z and Beq.* of dehydroodorin (1).

E. S. Ds. refer to last digit printed.

	x	y	z	Beq
C1	0.4799(12)	0.7832(7)	0.2100(5)	5.4(5)
C2	0.5479(12)	0.8823(9)	0.2368(5)	6.2(6)
C3	0.5883(12)	0.9618(8)	0.1847(6)	6.1(6)
C4	0.5612(12)	0.9403(8)	0.1075(6)	5.9(6)
C5	0.4964(11)	0.8397(8)	0.0804(5)	5.1(5)
C6	0.4542(10)	0.7589(7)	0.1318(5)	4.3(5)
C7	0.3818(10)	0.6520(7)	0.1058(5)	4.7(5)
C8	0.3320(11)	0.6224(7)	0.0343(5)	4.8(5)
C9	0.2569(12)	0.5120(8)	0.0174(6)	5.1(6)
O10	0.2509(8)	0.4413(5)	0.0683(4)	6.2(3)
N11	0.1916(9)	0.4930(6)	-0.0556(5)	5.2(4)
C12	0.1234(11)	0.3831(7)	-0.0795(6)	6.0(6)
C13	0.0639(16)	0.3988(11)	-0.1621(7)	10.3(8)
C14	0.1494(18)	0.4948(10)	-0.1891(6)	10.6(9)
C15	0.1859(14)	0.5722(9)	-0.1213(5)	6.2(6)
N16	0.0658(9)	0.6605(7)	-0.1145(4)	5.5(4)
C17	0.1096(15)	0.7686(8)	-0.1215(5)	5.7(6)
O18	0.2550(9)	0.7932(6)	-0.1281(4)	8.1(4)
C19	-0.0275(13)	0.8515(9)	-0.1147(5)	5.8(6)
C20	-0.2040(14)	0.8162(9)	-0.1168(8)	12.4(9)
C21	0.0181(13)	0.9550(9)	-0.1092(6)	6.9(6)
C22	-0.0876(15)	1.0550(9)	-0.1019(6)	8.7(7)
H1	0.457	0.724	0.251	6.0
H2	0.558	0.904	0.295	6.6
H3	0.642	1.035	0.204	6.8
H4	0.587	1.000	0.067	7.2
H5	0.482	0.823	0.020	6.1
H7	0.357	0.593	0.146	5.1
H8	0.358	0.680	-0.009	5.4
H12A	0.211	0.323	-0.070	6.3
H12B	0.028	0.363	-0.048	6.3
H13A	-0.062	0.404	-0.169	8.6
H13B	0.094	0.328	-0.191	8.6
H14A	0.241	0.471	-0.217	9.8
H14B	0.058	0.531	-0.231	9.8
H15	0.303	0.607	-0.127	6.5
H16	-0.055	0.632	-0.109	6.4
H20A	-0.263	0.838	-0.067	11.7
H20B	-0.283	0.845	-0.162	11.7
H20C	-0.212	0.732	-0.118	11.7
H21	0.139	0.976	-0.111	7.9
H22A	-0.179	1.063	-0.146	8.5
H22B	-0.147	1.053	-0.052	8.5
H22C	-0.023	1.129	-0.098	8.5

$$* \text{ Beq} = 3/4 \sum_i \sum_j \beta_{ij} a_i a_j$$

Table 3. Bond distances (Å) and angles (°) in dehydoodorin (1).

C(1)-C(2)	1.375(14)	N(11)-C(15)	1.487(13)
C(1)-C(6)	1.387(13)	C(12)-C(13)	1.478(16)
C(2)-C(3)	1.384(15)	C(13)-C(14)	1.450(18)
C(3)-C(4)	1.363(15)	C(14)-C(15)	1.510(14)
C(4)-C(5)	1.384(14)	C(15)-N(16)	1.451(15)
C(5)-C(6)	1.390(13)	N(16)-C(17)	1.359(13)
C(6)-C(7)	1.466(13)	C(17)-O(18)	1.224(14)
C(7)-C(8)	1.317(14)	C(17)-C(19)	1.502(17)
C(8)-C(9)	1.478(14)	C(19)-C(20)	1.479(15)
C(9)-O(10)	1.234(12)	C(19)-C(21)	1.302(15)
C(9)-N(11)	1.343(13)	C(21)-C(22)	1.489(16)
N(11)-C(12)	1.477(11)		

C(2)-C(1)-C(6)	122.0(8)	C(12)-N(11)-C(15)	112.4(7)
C(1)-C(2)-C(3)	119.5(8)	N(11)-C(12)-C(13)	103.3(8)
C(2)-C(3)-C(4)	119.5(8)	C(12)-C(13)-C(14)	107.7(9)
C(3)-C(4)-C(5)	121.2(8)	C(13)-C(14)-C(15)	107.4(8)
C(4)-C(5)-C(6)	120.3(8)	N(11)-C(15)-C(14)	101.0(8)
C(1)-C(6)-C(5)	117.6(8)	N(11)-C(15)-N(16)	112.0(7)
C(1)-C(6)-C(7)	120.1(8)	C(14)-C(15)-N(16)	116.3(9)
C(5)-C(6)-C(7)	122.3(8)	C(15)-N(16)-C(17)	121.0(8)
C(6)-C(7)-C(8)	126.9(8)	N(16)-C(17)-O(18)	120.0(10)
C(7)-C(8)-C(9)	120.6(8)	N(16)-C(17)-C(19)	115.6(10)
C(8)-C(9)-O(10)	121.8(9)	O(18)-C(17)-C(19)	124.3(9)
C(8)-C(9)-N(11)	116.8(9)	C(17)-C(19)-C(20)	121.2(9)
O(10)-C(9)-N(11)	121.4(9)	C(17)-C(19)-C(21)	116.1(10)
C(9)-N(11)-C(12)	121.0(8)	C(20)-C(19)-C(21)	122.7(11)
C(9)-N(11)-C(15)	126.6(8)	C(19)-C(21)-C(22)	128.6(10)

Table 4. Cytotoxicity of compounds 1-2

Compound	ED ₅₀ (μg ml ⁻¹)			
	A-549	HT-29	KB	P-388
1	4.38	7.24	12.63	3.86
2	0.0025	0.013	0.022	0.0086

評估中藥中有化學預防 肝癌成分之方法(Ⅲ)

劉宗榮

台北榮總教研部

摘 要

肝癌(HCC)佔台灣目前男性癌症死亡第一位。早期發現及手術切除是最有效之治療法。肝癌對化學療法之癒後不好，故我們嚐試以化學預防法來防止肝癌而此化學預防法亦是美國癌症學會(NCI)之重點研究項目一。

欖仁葉是近年來民間用於治療肝病的生藥，但有關其治肝病的機轉目前並不清楚。本研究是希望從化學預防製劑(chemopreventive agent)方面來探討欖仁葉在體外及體內的作用，在此我們藉由一致癌物(Mitomycin C)來誘發基因毒性，看欖仁葉的水萃取液是否可以抑制或減低這致癌劑產生的基因毒性現象。

在體外之實驗是利用中國倉鼠卵巢細胞當作實驗的對象，以兩種不同的給藥方式，一是同時給予欖仁葉的水萃取液(TCE)以及 mitomycin C (MMC) 一起反應；另一種方式是先給予 TCE，反應6小時後再加入 MMC。兩組實驗結果發現 TCE 在 75 和 150 μ g/ml 的濃度下皆可明顯的抑制 MMC 所誘發之微核作用($P < 0.05$)且呈劑量反應的關係。然而在 300 μ g/ml 的高濃度下沒有抑制作用，反而產生細胞毒性。進一步利用脂質 π L 氧化(TBARS)來看 TCE 的抗氧化能力，發現 TCE 可以有效的抑制 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 所產生的脂質過氧化情形，而這個抑制作用是呈正向的劑量反應關係。

在體內之實驗方面，則是以胃管的方式給予 TCE 4.8 mg/day 以及 24.1 mg/day，這濃度相當於 0.05g 以及 0.25g 的原來葉重，連續餵予 6 天以及 14 天，發現不論是 6 天或 14 天都不會誘發鼯鼠血中的微核產生，即表示此劑量下 TCE 對鼯鼠沒有遺傳毒性，在腹腔注射 MMC 之後，則先前餵予不同濃度 (4.8 mg/0.3ml, 24.1mg/0.3ml) 不同時間 (6 天, 14 天) 的 TCE 的鼯鼠皆能抑制 ($P < 0.05$) MMC 所誘發的微核的 θq 。

利用 HPLC 圖譜分析冷凍乾燥後的 TCE 的成分，發現其中含有 1.5 % 之 punicalin 及 0.27 % 之 punicalagin，及一些尚未被確認的成分。

由整個實驗的結果獲得以下結論：TCE 具有發展為化學預防製劑的能力，因為在 *in vitro* 及 *in vivo* 皆可抑制 MMC 所誘發的遺傳毒性 (MN 的產生)。而這種抗遺傳毒性的作用機轉可能有一部份是因為 TCE 中含有抗氧化的成分，而減少了其毒性的傷害。

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the leading cause of male cancer death in Taiwan. Early diagnosis and surgical removal is still the most effective treatment against HCC. Due to HCC is not responsive to chemotherapy, we have tried to develop chemopreventive agents in preventing HCC formation. Chemoprevention is happen to be one of the major research areas in National Cancer Institute (NCI) of USA.

Terminalia catappa L. is a commonly used herbal drug in the treatment of liver related diseases in Taiwan, yet the mechanism remains elusive. In this study, we investigated the chemopreventive potential of *T. catappa* L. by the *in vitro* and *in vivo* methods.

The leaves of *T. catappa* L. were extracted by water, filtered and lyophilized. We tested the effect of water extract of *T. catappa* L. (TCE) on the frequencies of micronuclei (MN) induced in cytochalasin-B blocked binucleated Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) by a bifunctional alkylating agent, mitomycin C (MMC), *in vitro*. Two different treatment protocols, simultaneous treatment of the clastogen, MMC, and the TCE, and pretreatment of TCE then MMC were used. The results showed that the TCE significantly decreased ($p < 0.05$) the frequencies of MMC-induced MN at 75 $\mu\text{g/ml}$ and 150 $\mu\text{g/ml}$ in both protocols. At high dose 300 $\mu\text{g/ml}$, the TCE incued cytotoxicity in CHO-K1 cells and hence the MMC-induced MN was not observed.

TCE-induced Fe^{+2} -, H_2O_2 -induced thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) in rat liver microsomes with a IC_{50} of $6.9 \mu\text{g/ml}$.

In vivo treatment of TCE at 24.1 mg (original 0.25 g) and 4.8 mg (original 0.05 g) per mouse per day for 6 and 14 consecutive days did not induced MN in male ICR mice. This treatment protocol significantly ($p < 0.05$) reduced MMC (1 mg/kg , ip)-induced peripheral blood MN.

The TCE was analyzed by HPLC and demonstrated to have punicalin (1.5%) punicalagin (0.27%) and other unidentified compounds.

These results demonstrated that TCE might be a useful agent for chemoprevention of cancer and has anticarcinogenic potential in vitro and in vivo. The inhibition of MMC-induced MN may be related to the antioxidative constituents in TCE.

一、前言

欖仁樹 (*Terminalia catappa* L.) 為使君子科 (Combretaceae) 的植物，外觀如 Fig. 1 (A)，廣泛的分佈在熱帶及亞熱帶的海邊。在本省以南部的高雄、屏東、恆春半島以及蘭嶼為主要分佈的地點 (1)。本植物在印度、馬來西亞、菲律賓、印尼、巴拿馬、巴西等許多國家皆為民間用藥，利用其部位的不同如：葉、果實、種子、樹皮等而有不同的治療用途，可當作止瀉、解熱、止血、收斂等藥用 (2~4)。然近年來台灣則是使用其乾枯的落葉，用於肝病的治療，其方例是將樹葉二~三片煎水作茶飲，或與茶葉合用泡開水服用 (5, 6)。

有關欖仁樹葉部成分的研究報告發現其含有許多加水分解型鞣質 (hydrolyzable tannin)，如 punicalagin, punicalin, terflavins A and B, tergallagin, tercatein, chebulagic acid, geraniin 等 16 種鞣質 (7, 8)。其中以 punicalagin 含量最多 (0.48%)，而 punicalin (0.055%) 及 terflavins A (0.058%) 次之

(Table 1)(8)。這些加水分解型鞣質有許多藥理作用，Nonaka 等人研究指出 punicalin 及 punicalagin 可以抑制 H9 淋巴球中 Human Immunodeficiency Virus (HIV) 之複製，且 punicalin 可以抑制純化之 HIV 反轉酵素 (reverse transcriptase)，其 ID₅₀ 為 8 μ M (9)。而 Weaver 等人也發現 punicalin 可以阻斷 HIV rgp 120 與正常細胞接受器 CD4 的結合 (10)。在 1993 年 Satomi 等人針對一些 ellagitannins，其中也包括了 punicalin 以及 punicalagin 這二種成分，進行研究後發現這些成分可以抑制 carbonic anhydrase (CA) 的活性，而 punicalagin 的抑制能力 (IC₅₀) 與對照的 Acetazolamide 比較，幾乎相當，而 punicalin 的抑制能力較差，約為 Acetazolamide 的 1/5 倍 (11)。

除了 punicalin 及 punicalagin 這兩個成分外，Kashiwada 等人亦發現 chebulagic acid 及 geraniin 這兩種在欖仁葉成分中佔有 0.0055% 及 0.018% 含量的鞣質可以有選擇性的對 PRMI-7951 melanoma 細胞產生毒性，因而可能有抗癌 (antitumor) 的作用，其 ED₅₀ 分別為 0.8 μ g/ml 以及 0.35 μ g/ml (12)。

由以上的實驗報告顯示欖仁葉中有些成分可抑制 HIV 及抗癌的作用，但是其作用機轉至今仍不清楚。欖仁葉與人類肝病方面的研究也尚未有相關的文獻報導。在此我們希望藉以一種由化學預防作用的角度來看欖仁葉在保肝或化學預防遺傳毒性 (chemoprevention against chemically-induced genetic damage) 上所扮演的角色。

化學預防癌症藥物 (chemopreventive drugs) 是目前癌症藥物發展中極具潛能的一類，主要是期望在使用了一些藥物後能對身體產生保護作用，因而抑制或反轉癌症起源的過程，抑制了 promotion 作用，因而達到避免或降低癌症的發生率。一般針對的方向有：避免經由代謝而產生活性的致癌產物，像一些 酵素抑制劑 (Enzyme inhibitor) 如：cytochrome P450 inhibitor，可以用來減少致癌物質因代謝作用而形成活性的代謝產物；另一方面則是藉由增加排除來避免掉一些能致癌的化學物質或經 phase I 酵素代謝後所產生的致癌產物，如 phase II 酵素的誘導劑 (Enzyme inducer)，增加 phase II 的酵素來加速致癌物從體內排除，這些都能抑制癌症的起動 (initiation)(13)。

而目前廣為流行的抗氧化劑 (Antioxidants) 如：Vitamin E 及 β -carotene 已被証實可以保護因一些致癌物 (carcinogens) 造成的傷害或是降低致癌劑誘發癌症的產生 (14~ 17)。而綠茶中之多酚類 (Green tea polyphenol; GTP)，可以有效的抑制一些致癌劑，像紫外光 (Ultraviolet light), TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 和 benzo[a]pyrene (B[a]P) 等等所造成的皮膚腫瘤、肺腫瘤或胃腫瘤的產生 (18, 19)，而針對酵素方面的研究，也發現 GTP 可以明顯的增加 glutathione S-transferase 以及 catalase 等酵素在小腸及胃的含量 (20)。以 HPLC 分析 GTP，發現多半的成分都含有 catechin 的結構，如：(-)epicatechin (EC), (-) epigallo-catechin (EGC), (-) epicatechin-3-gallate (ECG) 和 (-) epigallocatechin-3-gallate

(EGCG)，而其中以 EGCG 含量最高，約佔全部總量的一半 (21, 22)，利用這些已分離的成分進行研究，發現其可抑制由 TPA 所造成對鼯鼠的傷害 (edema of mouse ears)(21)，以及對 B[a]P, aflatoxin B₁ 等致沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 和 TA98 的突變 (mutation) 有抑制作用，而這些抑制的能力強弱又以 EGCG 的效果最強 (21, 23)。以上這些都是目前化學預防癌症製劑的發展上廣被研究的類型 (24, 25)。欖仁葉的水萃取液是否也有類似茶葉作用，有能力成為一化學預防劑，對於一些遺傳毒物有抑制的作用？這將是本研究最想了解及欲探討之方向。

本實驗是利用 micronucleus assay 來當作實驗主要觀察的指標，micronucleus assay 產生的原理是細胞在進行有絲分裂的後期 (anaphase)。已對分之兩組子染色體會沿紡錘絲 (spindle fibers) 各向兩極星體 (asters) 移動，如果染色體斷裂 (chromatid breakage) 或染色體迷亂 (chromosome aberration)，則會產生染色體的斷片 (chromosome fragment)，而游離在細胞質中，此斷片即稱為微小核 (micronucleus)，此時利用特殊的染劑來染細胞，即可由顯微鏡下觀察到這 micronucleus (MN) 的形成。目前 micronucleus assay 廣被用於人類遺傳毒物 (genotoxins) 的偵測，它對於環境中的一些遺傳毒物的檢測十分靈敏 (26)。許多文獻均報導證明 micronucleus test 是一個靈敏、可靠且簡單方便的方法，更是用來判斷 DNA damage 很有效的工具之一 (26~28)。因此在本實驗我們給予一致癌劑 - mitomycin C (MMC) 來誘導其 MN 的生成，再探討欖仁葉在 *in vitro* 及 *in vivo* 兩方面是否有對抗

遺傳毒性的作用 (Antigenotoxic effect)。

二、材料與方法

(一) 動物

- 雄性 ICR 鼯鼠，25~30 克，購自陽明大學動物中心。
- 雄性 SD (Sprague-Dawley) 大白鼠，約 300 克，購自台灣大學醫學院動物中心。

動物養在溫度、濕度控制的動物房內，日照時間為 12 小時，飼料 (Purina Lab. Chow., St. Louis, MO., U. S. A.) 及水無限制供應。

(二) 細胞株

CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cells) 由中研院動物所詹崑源老師提供。

養在 McCoy's 5A 培養液中，培養液中含 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamin, penicillin G/streptomycin sulfate (100 U/0.1 mg/ml) 以及 3.7 g/l 之 sodium bicarbonate，實驗用的繼代為 14~20 代之間

(三) 藥品與試劑

欖仁葉 (*Terminalia catappa* L.) 購自高雄市三鳳宮前草藥市場。

所有其它試藥均購自 Sigma (USA)

(四) 欖仁葉水萃取液的製備 (Water extract of *Terminalia catappa* L.) :

將購得的欖仁葉〔如 Fig. 1(B) 左〕自然陰乾〔如 Fig. 1 (B) 右〕。稱取陰乾後的枯葉 100.15 克，以 1500 毫升之二次蒸餾水煮沸十分鐘，處理二次，收集二次的抽提液，過濾，並以迴轉式蒸發機濃縮至少量，然後進行冷凍乾燥，進而得到欖仁葉水萃取的乾燥粉末，此粉末放置於 4℃ 冰箱保存，依實驗的需要再以二次水配置成所需的濃度。此欖仁葉水萃取液簡稱 TCE。

(五) 綠茶水萃取液的製備 (Water extract of green tea)

秤取綠茶 100 克，以 1,000 毫升的二次水煮沸十分鐘，處理二次，收集二次抽提液，過濾，則其他濃縮除去水分的步驟同 TCE 的方法。此綠茶水萃取液簡稱 GTE。

(六) 體外微小體試驗 (In vitro micronucleus assay) :

本實驗參考 Salvadori 等人 (29) 及 Fenech (26) 所發表的方法加以修飾而成。CHO-K1 培養於 McCoy's 5A 培養液作繼代培養 (passage)，培養條件為 37℃ 恆溫，5% CO₂ 之飽和濕度的培養箱中。種 CHO-K1 細胞 1×10^4 cells/60 mm dish，置於培養箱中過夜。第二天給予不同濃度的 TCE 及 1 μ M 的 mitomycin C (MMC)，反應一小時後，將培養液吸掉，以 HBSS 洗兩次，加入 0.5 μ g/ml 之 cytochalasin-B，反應 18 小時後再將培養液吸掉，用冰的 PBS 洗兩次，加 0.5% KCl 反應十分鐘後吸掉 KCl，以 20:1 的甲醇和醋酸固定細胞，風乾再以 Giemsa 染劑進行染色，十分鐘後洗掉染料，空氣陰乾後，於 400 倍的顯微鏡下數 1,000 個雙核細胞 (binucleated cells) 中含有

多少個含微小核的細胞 (MNBN/1000 BN)(Fig. 2)。

另一種的給藥方式是先給予不同濃度的 TCE，反應六小時後，以 HBSS 洗淨二次，再加入 $1\mu\text{M}$ 的 MMC，反應一小時，再以 HBSS 洗淨二次，之後其他步驟則如同前所述。

(七) 細胞存活率試驗

1×10^4 cells/60 mm dish CHO-K1 細胞，置於培養箱中過夜。給藥方式有 2 種：(1) 給予不同濃度 75, 150, 300 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCE，反應 1 小時或 6 小時；(2) 同時給予 MMC 及不同濃度的 TCE，反應 1 小時，後以 HBSS 洗掉，加入新的培養液，置於培養箱中 19 小時，後以 TEG (Trypsin-EDTA-Glucose) 處理細胞，利用 trypan blue 染色，再於血球計數器下數細胞數目，計算其存活率，此值用於判定 TCE 是否有細胞毒性作用。

$$\text{存活率 (survival ratio)} : \frac{\text{活細胞}}{\text{總細胞數 (活細胞 + 死細胞)}}$$

(八) 體外脂質過氧化試驗 (Lipid peroxidation test in vitro):

1. 微粒體層的製備 (microsomal fraction preparation)

此方法是依照 Snell 及 Mullock 於 1987 年所發表的方法 (30)。將 SD 大白鼠以乙醚麻醉，解剖取出肝臟，以冰冷的 1.15% KCl 清洗多次後，秤取約 1 g 的肝臟，以下均在冰上操作：將肝臟剪碎，加入 4 毫升冰冷的 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH7.4)，放入研磨管中，以均質機

(homogenizer) 研磨後，得肝臟的均質液，將此均質液倒入離心管中，於 4°C ， $9,000 \times g$ 下離心二十分鐘，所得上清液再以超高速離心機在 4°C ， $100,000 \times g$ 離心六十分鐘，所得的沈澱物即是微粒體，將此沈澱移至研磨管加入 1 毫升的 0.1M 磷酸緩衝液，研磨均勻，即為 microsomal fraction。保存於 -70°C 低溫冰箱，使用前先移至 -20°C 冰箱，再移至冰上進行實驗。

2. 蛋白質含量測定 (protein content test)

在作脂質過氧化的試驗前需先測微粒體層中蛋白質的含量。以 bovine serum albumin (BSA) 為標準品，利用 Bio-Rad 蛋白質染劑測定，於 595 nm 波長下，在分光光度計測吸光值，求出標準曲線，再測量微粒體的蛋白質濃度，即可比對出其蛋白質在微粒體層中的含量。

3. 脂質過氧化測定 (Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)

此方法是依照 Ohkawa 等人 (31) 及 Nagababu 和 Lakshmaiah (32) 所發表的方法加以修飾而成。

取每毫升含 500 mg protein 的微粒體均質液 2 毫升，加入 $200 \mu\text{M}$ FeSO_4 ， $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 以及 0.15 M NaCl 在 37°C 下，反應六十分鐘，之後加入 1 毫升 20% 的 TCA 和 2 毫升 0.67% (w/v) 的 TBA，在沸水中煮十分鐘。靜置室溫數分鐘後離心，取上清液于 532 nm 下測 TBARS 的螢光物質含量，則可以以下公式求出其脂

質過氧化的情形。

$$\text{濃度 (C)} = \frac{\text{吸光密度 (OD)}}{0.156 \times \text{mg protein}} (\text{n mol MDA/mg protein})$$

實驗中欲看 TCE 及 GTE 的抗脂質過氧化情形，則於給予 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 試劑前 5 分鐘加入不同濃度的 TCE 或 GTE，則其他步驟與方法同上所述。

(九) 體內微小體試驗 (In vivo micronucleus assay) :

此方法是參考 Hayashi 等人於 1990 及 Wang 等人於 1992 所發表的方法 (33, 18)

1. 動物及處理

購得的 ICR 鼯鼠於動物房適應一週之後，隨機分為對照組與實驗組。對照組以胃管方式每天給予 0.3 毫升之二次水，而實驗組則每天分別以 4.8 及 24.1 mg/0.3 ml H_2O 的 TCE，連續餵予 6 天以及 14 天後，於次日以腹腔注射 MMC 1 mg/kg。注射前以及注射 MMC 後 48 小時亦各由鼯鼠尾部採血一次。

2. Acridine orange (AO)-coated glass slides

AO 溶於二次水，配成濃度 2 mg/ml 之溶液。將洗淨泡於甲醇中的玻片放於 70°C 的熱板 (hot plate) 上預熱。取 10 μl 的 AO 均勻塗佈於玻片上，置於黑暗通風處陰乾備用。

3. 周邊血液之染色

從鼯鼠尾部採血約 5 μ l 一滴於已處理過 AO 的玻璃片上，蓋上蓋玻片，以塑膠袋密封，再置於 4°C 冰箱，靜置數小時或過夜，使其染色完全。

4. 螢光顯微鏡 (Flouorescent microscopy)

於螢光顯微鏡下利用 blue excitation (450~ 490 nm) 及 barrier filter (520 nm)，激發後可見 reticulocyte (RET) 中之 reticulum 呈橘紅色螢光，而產生的 micronucleus 則呈綠色螢光 (Fig. 3)，以每 1,000 個完整的 reticulocyte 中含有多少個 micronucleated reticulocyte (MNRET) 為實驗判定的指標。

(十) HPLC 分析 TCE 之成份

HPLC 設置條件如下：

管柱 (column)：Waters 5C18-AR，(4.0 x 250 mm)

移動相 (mobile phase)：0.1% TFA (Trifluoroacetic acid)-H₂O

波長：254 nm

	<u>流速</u>	<u>時間</u>
條件 A		
	1 ml/min	0~ 20 min
	0.9 ml/min	20.1~ 60 min
條件 B		
	0.6 ml/min	0~ 10 min
	0.5 ml/min	10.1~ 20 min

0.4 ml/min	20.1 ~ 30 min
0.3 ml/min	30.1 ~ 40 min
1 ml/min	40.1 ~ 50 min

以條件 A 分析 TCE 中之 punicalagin，配製 punicalagin 標準品 10, 50, 100 以及 200 $\mu\text{g/ml}$ 四個濃度，以 HPLC 分析圖譜，經積分儀積分得波峰下面積，即可畫出其標準曲線 (standard curve)，再將 20 μl 之 punicalagin (1 mg/ml) 與 80 μl 之 TCE (3.34 mg/ml) 混合，以 HPLC 分析其圖，此圖譜與單獨的 TCE 圖譜比對，即可確知 TCE 中是否含有 punicalagin。而 punicalagin 的含量計算則利用已知的標準曲線再代入單獨的 TCE 圖譜中經比對確知為 punicalagin 的曲線面積即可計算出其在 TCE 中的含量。以條件 B 分析 punicalin 及 TCE。punicalin 的確定與含量計算如上所述。

TCE 之圖譜並與新鮮綠色的欖仁葉水萃液（萃取方式與 TCE 之方法相同，產率為 5.85%）和欖仁葉落葉水萃取液（萃取方式為 60 $^{\circ}\text{C}$ ，加熱 3 小時，產率為 9.80%）在相同條件之 HPLC 下分析之圖譜比較，並也算出新鮮綠葉和落葉中 punicalin 與 punicalagin 兩成分之含量。

三、研究結果

（一）TCE 的產量

100 克欖仁葉經前述方法處理，得冷凍乾燥粉末 9.64 克

，其產率為 9.64%。

(二) GTE 的產量

100 克茶葉經前述方法處理，得冷凍乾燥粉末 26.4 克，其產率為 26.4%。

(三) 體外 TCE 對 MMC 所誘發 micronucleus 的抑制作用

A. 同時給予 TCE 及 MMC，反應一小時之結果

當單獨給予 MMC 時，所誘導的 micronuclei 量為 87.0 ± 2.2 MNBN/1000 BN，給予不同濃度的 TCE, 75 $\mu\text{g/ml}$ 及 150 $\mu\text{g/ml}$ 有明顯的抑制作用 (68.6 ± 1.0 ; 59.2 ± 6.5 , $P < 0.05$)，與對照組比較，其抑制百分比分別為 21% 及 32%，但是當濃度高達 300 $\mu\text{g/ml}$ 時，卻反而沒有抑制 MN 的產生，而其 MN 的數目與對照組相當為 91.5 ± 2.6 (Fig. 4)。

B. 先給予 TCE 反應 6 小時後，再加 MMC 之結果

本組實驗結果與同時給予 TCE 及 MMC 的結果相似。當給予 75 $\mu\text{g/ml}$ 及 150 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCE 可以抑制由 MMC 所誘導的 MN 的形成。其值由 100.3 ± 0.7 MNBN/1000 BN 降低至 80.3 ± 3.4 及 74.9 ± 1.6 ($P < 0.05$)，抑制百分比分別為 20% 以及 25%。當濃度高達 300 $\mu\text{g/ml}$ 時，其 MN 的數目為 98.9 ± 0.8 與對照組相當，反而沒有抑制的作用 (Fig. 5)。

(四) TCE 對細胞的毒性作用

由以上的實驗結果發現，當 TCE 高劑量時 (300 $\mu\text{g/ml}$)，無法像低劑量 (75, 150 $\mu\text{g/ml}$) 對 MMC 誘發的 MN 有抑制作用，故有興趣想看 TCE 本身，對細胞是否有毒性作用？實驗的結果發現分別給予 75 及 150 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCE 反應 1 小時以及 6 小時並不會造成細胞存活率的降低，然而當濃度為 300 $\mu\text{g/ml}$ 卻發現細胞的死亡數目有明顯的增加，尤其在反應 6 小時的情況下，其存活率降低約只有對照組的 60% 左右 (Fig. 6,7)。如果同時給予 MMC 及不同濃度的 TCE 反應 1 小時，則發現對照組與高濃度的 TCE (300 $\mu\text{g/ml}$) 會降低細胞存活率，而在 75 與 150 $\mu\text{g/ml}$ 兩濃度下，細胞反而有一保護作用，其存活率與沒有加入 MMC 約相當 (Fig. 6b)。

(五) 體外 TCE 抗脂質過氧化的作用

在 *in vitro* 下，給予 $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 後，每毫克的微粒體層蛋白質有約 8 nmol 的 malonaldehyde (MDA) 產生，當給予 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 等不同濃度的 TCE 及 GTE，發現其抑制 MDA 的產生是呈正向的劑量關係。且在 10 $\mu\text{g/ml}$ 就有好的抗脂質過氧化的效果，當濃度增加至 1000 $\mu\text{g/ml}$ ，則有高達 96% 的抑制作用 (Fig. 8)。而 TCE 和 GTE 的 IC_{50} 分別為 6.9 $\mu\text{g/ml}$ 及 4.6 $\mu\text{g/ml}$ 。

(六) 體內 TCE 對 MMC 所誘發的 MN 之抑制作用

以胃管方式給予小鼠 TCE 4.8 mg/day 及 24.1 mg/day 連續六天，發現此抽提液不具致突變性，並不會誘發 MN

的產生，在第七天以腹腔注射 MMC 的 48 小時之後，對照組的鼯鼠被誘發的 MN 為 28.0 ± 0.7 MNRET/1,000 RET，而 4.8 mg/day 的 TCE（相當於 0.05 g 之原欖仁葉重）給予鼯鼠可以將 MN 降至 21.5 ± 1.0 ($P < 0.01$)，抑制百分比為 23%，當 TCE 濃度提升 5 倍後，即餵予 24.1 mg/day 的 TCE（相當於 0.25 g 之原欖仁葉重），其抑制作用有明顯增加 (18.1 ± 1.3 ; $P < 0.01$)，抑制百分比為 35% (Fig. 9)。

當提高 TCE 餵予的時間，連續餵予 14 天（每連續 6 天之後，休息一天，共餵 14 天）後，則 TCE 並無誘發 MN 的產生，給予 MMC 後的老鼠其 MN 的產生有因給予不同濃度 4.8 mg/day 及 24.1 mg/day 的 TCE 而有明顯的減少 ($P < 0.05$)，由 29.3 ± 1.7 降至 23.2 ± 1.7 及 18.8 ± 1.6 , $P < 0.05$ ，其抑制的百分比為 21% 以及 36% (Fig. 10)。

（七）以 HPLC 分析 TCE 之結果

以 A 條件分析 TCE，圖譜如 Fig. 12，分析 punicalagin 標準品，圖譜如 Fig. 13 將 punicalagin 與 TCE 混合一起，以 HPLC 分析圖譜，發現在 10.635 分鐘的波峰有明顯的增加，比對之後，確定 TCE 之分析圖譜中 10.635 分鐘的波峰即為 punicalagin，並計算出其在冷凍乾燥後的 TCE 中含量百分比為 0.27%。將 punicalin 與 TCE 混合以 HPLC 分析其圖譜，發現圖譜中一部分 peak 會重疊，分的不好，於是改以 B 條件分析。Punicalin 標準品可於 27.495 分鐘時有波峰出現同條件下與 TCE 之分析圖譜比

對，確定在 26.738 分鐘時的波峰，即為 punicalin，其在冷凍乾燥後的 TCE 中的含量百分比為 1.5% (Fig. 14, 15)。由此判定在本實驗所研究的 TCE 中含有 punicalin 及 punicalagin 這兩種可加水分解型的鞣質。

新鮮綠色的欖仁葉水萃取液其圖譜如 Fig. 16 與 TCE 之圖譜比較其成分與含量確實有所不同，求得其 punicain 及 punicalagin 之含量分別為 0.79% 以及 0.075%。而落葉水萃取液之圖譜如 Fig. 17，其成分較前二者要來得少，且無法計算 punicalin 及 punicalagin 之含量，可能因為其含量過少之緣故。

四、討 論

欖仁葉於民間的使用是利用其乾枯的落葉，以水煎服使用，本實驗為了和一般的使用方式相近，亦是以沸水來煮欖仁葉陰乾後的葉片，而得到所謂的欖仁葉水萃取液 (TCE)，發現此萃取液在針對 MMC 所誘發的微小核 (MN) 產生，不論是在體外或體內均有抑制的作用。

MMC 的致細胞毒性機轉是因為其結構中含有一個 quinone 的化合物，在經一個電子的還原後會形成一個 Semiquinone 的不穩定結構，此時易與氧分子作用，而有 superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) 或是 hydroxyl radical ($\cdot OH$) 等活性氧化物 (Reactive oxygen species;

ROS) 的產生 (34~36)，目前已知 ROS 會對 DNA 造成許多氧化性的傷害 (37)，如 DNA 單股或雙股的斷裂 (Strand breakage) (38, 39) 或是修飾性鹼基 (Modified bases) 的產生 (40)，而對於癌症發生過程中的 initiation 及 promotion 有促進的作用 (41~44)。而另一機轉是 MMC 在代謝過程中會有一 Aziridine 環的產生，此環易與 DNA 行烷基化反應 (Alkylation)，而形成鍵結物 (DNA monoadduct 或 DNA biadduct)(34, 45)，進而對細胞造成傷害。

由以上得知，TCE 抑制 MMC 誘發的 MN 形成，可能因為抑制了此二機轉，減少 ROS 的產生及阻止其 DNA 的鍵結。

在體外 TCE 抑制 MMC 所誘發的 MN 產生，我們由結果發現 TCE 在濃度為 75 $\mu\text{g/ml}$ 以及 150 $\mu\text{g/ml}$ 的時候對於 CHO-K1 細胞有明顯的抑制作用 ($P < 0.05$) (Fig. 4, 5)，但當濃度高達 300 $\mu\text{g/ml}$ 則有細胞毒性作用，造成細胞存活率降低 (Fig. 6a,7)，在 Micronuclei assay 中也發現在 300 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度下，其兩核細胞 (binucleated cells) 跟對照組比較起來有較少的趨向，而其 MN 數卻與對照組相當而沒有抑制的作用 (Fig. 4, 5)。推測其原因，認為可能的機轉為 TCE 在低劑量 (75, 150 $\mu\text{g/ml}$) 時當做一個抗氧化劑 (Antioxidant)，而減低 MMC 對細胞誘發 MN 產生的能力，但當高濃度 (300 $\mu\text{g/ml}$) 時卻反而轉變為一助氧化劑 (Pro-oxidant)，對細胞造成傷害，因為我們已知 TCE 中所含的鞣質其結構中含有許多的多酚類化合物 (Polyphenols), Laughton 等人發現在許多酚類化合物中，如：

quercetin; myricetin 等既可為抗氧化劑亦同時又為助氧化劑 (46)，此現象在 hydroxychavicol 這一單酚化合物亦被証實具備此一雙重的抗氧化及助氧化的能力 (47)。而 TCE 在代謝之後是否會水解而形成單酚類化合物以致於亦擁有如上所說的抗氧化及助氧化的功能，或 TCE 本身即具備了此一功能？為了更進一步了解其可能機轉，我們以脂質過氧化作用來看 TCE 在體外抗氧化的情形。因為茶葉的多酚類化合物已被証實具有抗脂質過氧化的能力 (48)，故在此我們以茶葉的水萃取液 GTE 當作對照組，並以 HPLC 分析 GTE 中 EGCG 的含量，發現此水萃液中含有 14% 的 EGCG 比較其與 TCE 的抗氧化能力為何？由 Fig. 8 可以看出當 TCE 濃度大於 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的劑量即有抑制脂質過氧化的能力，當濃度高達 1 mg/ml 時，其抑制作用則高達九十幾個百分比，與 GTE 比較，其抑制的能力略差，但在高劑量時是相當的。由這個結果証實 TCE 確實具有抗氧化的能力。

鞣質已被証實有抑制脂質過氧化的作用，而其中又以 ellagitannins 的效果最強，一般認為它是一個自由基的清除者 (radical-scavenger)，而這能力與其結構中含有的 hexahydroxydiphenolyl group (HHDP) 有很大的相關性 (49)。欖仁葉中含有的加水分解型鞣質亦有許多皆含有 HHDP 的結構，像：punicalin; punicalagin; geraniin; chebulagin acid; corilagin 等等。以 HPLC 分析 TCE 的圖譜証實其中確實含有 punicalin 及 punicalagin，含量分別為 1.5% 及 0.27%，此含量與文獻報導的 punicalin 含量為 0.055%，punicalagin 0.48% 不

符合，主要原因是因為文獻上所使用萃取的方式是以 80% 的丙酮當溶劑，而本實驗則直接以水來萃取成分。由此可以發現在本實驗所使用的 TCE 中確定含有與一般文獻發表相同的成分 (8)，但因為這些成分的各別標準品取得不易，故無法更進一步去分析其存於欖仁葉中的含量或進一步証實這些各別的成分的抗氧化能力，然而除了氧化作用造成在高劑量下的 TCE 抑制能力缺乏的可能性外，有沒有其他因素使得 300 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度喪失了其抑制 MN 生成的作用呢？

Bhimani 等人將茶葉中鞣質含量最高的 EGCG 及由五味子生藥中所抽提出的鞣質 penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG) 用來探討其對 TPA 所產生的 H_2O_2 的抑制，發現當兩成分的劑量分別為 $\text{EGCG} \leq 25 \mu\text{M}$ 及 $\text{PGG} \leq 10 \mu\text{M}$ 時有一劑量反應關係的抑制曲線，但當濃度升高至 $\text{EGCG} \geq 50 \mu\text{M}$; $\text{PGG} \geq 50 \mu\text{M}$ 時，其作用反而不如在 25 μM 及 10 μM 時那般，而 H_2O_2 的產量反而較多，作者認為這是鞣質共有的特性，在低劑量及高劑量有兩種不同的作用情形，低劑量可以抑制 TPA 所誘發的 ROS 的產生而減低腫瘤形成的機率，對於 DNA 的傷害也相對的減少，但在高劑量下反而會藉由氧化還原互替的循環 (Redox cycling) 而有附加的 ROS 產生，或是會促使其他細胞的氧化作用 (24)。Imanishi 等人在針對茶葉的鞣質研究上也証實了鞣質因劑量的不同而有不同的作用，當作者以 MMC 及 UV 來誘發 CHO 細胞 sister-chromatid exchanges (SCE) 和 chromosome aberrations (CA) 的產生，發現 EGCG; ECG; theaflavin digallate (TFDG); theaflavin monogallate A (TFmgA) 及 theaflavin

digallate B (TFmgB) 等成分在低劑量時 ($\leq 6.7 \mu\text{g/ml}$) 有明顯的抑制 SCE 及 CA 的能力，但當其劑量升高至 $20 \mu\text{g/ml}$ 時則 SCE 及 CA 的產生反而增加得比對照組還要多(50)。

由以上這些文獻的報導，推測在本實驗中高劑量的 TCE 之所以沒有抑制 MMC 所誘發的 MN 產生，其可能原因之一是否與上面文獻的推論一般，是屬於鞣質的一項特質，但機轉為何卻沒有合適的解釋可以來說明它。值得重視的是有關這些實驗的操作都是在體外試驗，如果以體內模式進行實驗是否也有類似狀況產生？我們以口服的方式給予 TCE，來看其對 MMC 所誘發 MN 產生的抑制情形。

以胃管方式餵予兩個不同劑量： 4.8 mg/day 及 24.1 mg/day 的 TCE，這濃度相當於 0.05 g 及 0.25 g 的原來葉重，若換算成每日鼯鼠飲用 5 ml 的水，則需配製成 1% 以及 5% 的飲水溶液。此劑量是與文獻中所用來抑制腫瘤發生的茶葉濃度 1.25% 相類似 (18)。1% 是一個正常的飲用量，5% 則是一個較高的劑量，在此之所以以胃管方式給予是為避免以水瓶方式飲用時造成的實驗誤差或防止 TCE 成分在水中氧化變性等因素。

由這兩種不同濃度的給予來看 TCE 抑制 MMC 作用的能力，在連續餵予 6 天及 14 天後，發現 TCE 本身對鼯鼠不會造成 MN 的產生，表示欖仁葉本身在此劑量下並沒有致基因毒性的作用，之後分別在第 7 天及第 15 天以 MMC 誘發其 MN 的產生，發現先前餵予 TCE 的鼯鼠其 MN 產生的量有減少的趨向 ($P < 0.05$) (Fig. 9, 10)。在螢光顯微鏡下隨機計數五個視野下未成

熟的網狀細胞 (reticulocytes)，發現在餵予不同濃度的 TCE 14 天之後，其 reticulocyte 數目與對照組比較並沒有減少的情況發生 (Fig. 11)，這表示 TCE 在長時間給予高劑量 (14 天，24.1 mg)，並不會對骨髓造成毒性傷害，而減少其血球的生成，另一方面由老鼠的體重觀察，也發現老鼠體重沒有顯著的下降。因此由本實驗中確定 TCE 在此高劑量的給予並沒有毒性作用產生，且對 MMC 所誘發的 MN 有抑制的能力。比較特殊的是 TCE 的給予並沒有因為時間的增長而提高其抑制的作用，也就是說在連續餵予 6 天以及 14 天之後其抑制 MN 的生成的百分比幾乎相同，可能的原因為：TCE 對 MMC 產生 MN 的抑制有一定程度的限制；或是因為餵予的時間相差不是很久，所以無法看得到一個較高的抑制作用。

綜合以上所言，我們發現 TCE 在 *in vitro* 及 *in vivo* 兩方面皆有一抑制 MMC 誘發 MN 產生的能力，而這種抑制 MMC 誘發基因毒性的發生機轉與其抗氧化能力的作用應該有關。

五、結論與建議

欖仁葉是民間常用治肝炎草藥，我們在此發現此抽取物可預防致癌物所誘發之微核，即有預防基因毒性之作用。

至於其更進一步之作用機轉及有效成份則有待進一步之研究。

參考文獻

1. 邱年永,張光雄著(1987) 原色台灣藥用植物圖鑑(1)南天書局,台北,pp.129
2. Esposito-Avella, M., Brown. P., Tejeira, I., Buitrago, R., Barrios, L. and Sanchez, C. (1985) Pharmacological screening of Panamanian medicinal plants. Part 1. Int. J. Crude Drug Res. 22: 17-25
3. Holdsworth, D. K. (1984) Phytomedicine of the Madang province, Papua New Guinea. Part I. Karkar island. Int. J. Crude Drug Res. 22: 111-119
4. Holdsworth, D. K. (1991) Traditional medicinal plants of Rarotonga, Cook islands. Part II. Int. J. Pharmacog. 29: 71-79
5. Lin. C.C. and Kan, W.S. (1990) Medicinal plants used for the treatment of hepatitis in Taiwan. Am. J. Chin. Med. 18: 35-43
6. 高木村著(1992) 台灣民間藥(2)南天書局,台北,pp.113
7. Chen, T., Liu, M. C., Chen, Z. S. and Chen, Z. T. (1993) Study on the constituents of leaves of *Terminalia catappa* L. The 8th symposium on Natural Products, Koahsiung, Taiwan, 61
8. Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. (1986) Tinnins

- and related compounds. XLII. Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavins A and B, tergallagin and tercatain from the leaves of *Terminalia catappa* L. Chem. Pharm. Bull. 34: 1039-1049
9. Nonaka, G. I., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C. and Lee, K. H. (1990) Anti-AIDS agents, 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. J. Nat. Prod. 53: 587-595
 10. Weaver, J. L., Pine, P. S., Dutschman, G., Cheng, Y. C., Lee, K. H. and Aszalos, A. (1992) Prevention of binding of rgp 120 by anti-HIV active tannins. Biochem. Pharmacol. 43: 2479-2480
 11. Satomi, H., Umemura, K., Ueno, A., Hatano, T., Okuda, T. and Noro, T. (1993) Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. Biol. Pharm. Bull. 16: 787-790
 12. Kashiwada, Y., Nonaka, G. I., Nishioka, I., Chang, J. J. and Lee, K. H. (1992) Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. J. Nat. Prod. 55: 1033-1043

13. Bertram, J. S., Kolonel, L. N. and Meyskens, F. L. (1987) Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. *Cancer Res.* 47: 3012-3031
14. Cook, M. G. and McNamara, P. (1980) Effect of dietary vitamin E on dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. *Cancer Res.* 40: 1329-1331
15. Summerfield, F. W. and Tappel, A. L. (1984) Vitamin E protects against methyl ethyl ketone peroxide-induced peroxidative damage to rat brain DNA. *Mutat. Res.* 122: 113-120
16. Raj, A. S. and Katz, M. (1985) β -carotene as an inhibitor of benzo[a]pyrene and mitomycin C induced chromosomal breaks in the bone marrow of mice, *Can. J. Gene. Cytol.* 27: 598-602
17. Salvadori, D. M. F., Ribeiro, L. R., Oliveira, M. D. M., Pereira, C. A. B. and Becak, W. (1992) The protective effect of β -carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 265: 237-244
18. Wang, Z. Y., Huang, M. T., Ferraro, T., Wong, C. Q., Lou, Y. R., Reuhl, K., Iatropoulos, M., Yang, C. S. and Conney, A. H. (1992) Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-

tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice.
Cancer Res. 52: 1162-1170

19. Wang, Z. Y., Agarwal, R., Khan, W. A. and Mukhtar, H. (1992) Protection against benzo[a]pyrene- and N-nitrosodiethylamine-induced lung and forestomach tumorigenesis in A/J mice by water extracts of green tea and licorice. Carcinogenesis 13: 1491-1494
20. Khan, S. G., Katiyar, S. K., Agarwal, R. and Mukhtar, H. (1992) Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice : possible role in cancer chemoprevention. Cancer Res. 52: 4050-4052
21. Huang, M. T., Ho, C. T., Wang, Z. Y., Ferraro, T., Finnegan-Olive, T., Lou, Y. R., Mitchell, J. M., Laskin, J. D., Newmark, H., Yang, C. S. and Conney, A. H. (1992) Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. Carcinogenesis 13: 947-954
22. Wang, Z. Y., Huang, M. T., Ho, C. T., Chang, R., Ma, W., Ferraro, T., Reuhl, K. R., Yang, C. S. and Conney, A. H. (1992) Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. Cancer Res. 52: 6657-6665

23. Wang, Z. Y., Cheng, S. J., Zhou, Z. C., Athar, M., Khan, W. A., Bickers, D. R. and Mukhtar, H. (1989) Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutat. Res.* 223: 273-285
24. Bhimani, R. S., Troll, W., Grunberger, D. and Frenkel, K. (1993) Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res.* 53: 4528-4533
25. Fujiki, H., Kobayashi, H., Wattenberg, L. W., Boone, C. W. and Kelloff, G. J. (1994) Current strategies of cancer chemoprevention: 13th sapporo cancer seminar. *Cancer Res.* 54: 3315-3318
26. Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285: 35-44
27. Hayashi, M., Kodama, Y., Awogi, T., Suzuki, T., Asita, A. O. and Sofuni, T. (1992) The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C and cyclophosphamide-treated rats. *Mutat. Res.* 278: 209-213
28. Jaylet, A., Depais, P., Ferrier, V., Grinfeld, S. and Siboulet, R. (1986) A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutat. Res.* 164: 245-257

29. Salvadori, D. M. F., Ribeiro, L. R. and Natarajan, A. T. (1994) Effect of β -carotene on clastogenic effects of mitomycin C, methyl methanesulphonate and bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 9: 53-57
30. Snell, K. and Mullock, B. (1987) Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: Lake, B. G. *Biochemical Toxicology a Practical Approach*, chapter 8, pp. 183-215
31. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358
32. Nagababu, E. and Lakshmaiah, N. (1992) Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Biochem. Pharm.* 43: 2393-2400
33. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate Jr, M. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245: 245-249
34. Cummings, J., French, R. C. and Smyth, J. F. (1993) Application of high-performance liquid chromatography for recognition of covalent nucleic acid modification with anticancer drugs. *J. Chromatogr.* 618: 251-276

35. Dusre, L., Rajagopalan, S., Eliot, H. M., Covey, J. M. and Sinha, B. K. (1990) DNA interstand cross-link and free radical formation in a human multidrug-resistant cell line from mitomycin C and its analogues. *Cancer Res.* 50: 648-652
36. Bachur, n. R., Gordon, S. L. and Gee, M. V. (1978) A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agent to free radicals. *Cancer Res.* 38: 1745-1750
37. Imlay, J. A. and Linn, S. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* 240: 1302-1309
38. Birnboim, H. C. (1982) DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumor promoter, phorbol myristate acetate. *Science.* 215: 1247-1249
39. Lesko, S. A., Lorentzen, R. J. and Ts'o, P. O. P. (1980) Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. *Biochemistry.* 19: 3023-3028
40. Kasai, H. and Nishimura, S. (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acid Res.* 12: 2137-2145
41. Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Oxygen radicals and degenerative disease.*

Science. 221: 1256-1264

42. Feig, D. I., Reid, T. M. and Loeb, L. A. (1994) Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* 54: 1890s-1894s
43. Troll, W. and Wiesner, R. (1985) The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 509-528
44. Cerutti, P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science.* 227: 375-381
45. Schwartz, H. S., Sodergren, J. E. and Philips, F. S. (1963) Mitomycin C: Chemical and biological studies on alkylation. *Science.* 142: 1181-1183
46. Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J. and Hoult, J. R. S. (1989) Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.* 38: 2859-2865
47. 陳秋蘭 (1994) 碩士論文, 檳榔嚼塊中所產生"活性氧化物"之研究, 國立陽明醫學院, 藥理學研究所, 台北
48. Ucida, S., Ozaki, M., Suzuki, K. and Shikita, M. (1992) Radioprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-O- gallate (green tea tannins) in mice. *Life Sci.* 50: 147-152

49. Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T. (1989) Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Medica*. 55: 117-122
50. Imanishi, H., Sasaki, Y. F., Ohta, T., Watanabe, M., Kato, T. and Shirasu, Y. (1991) Tea tannin components modify the induction of sister-chromatid exchange and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice. *Mutat. Res.* 259: 79-87

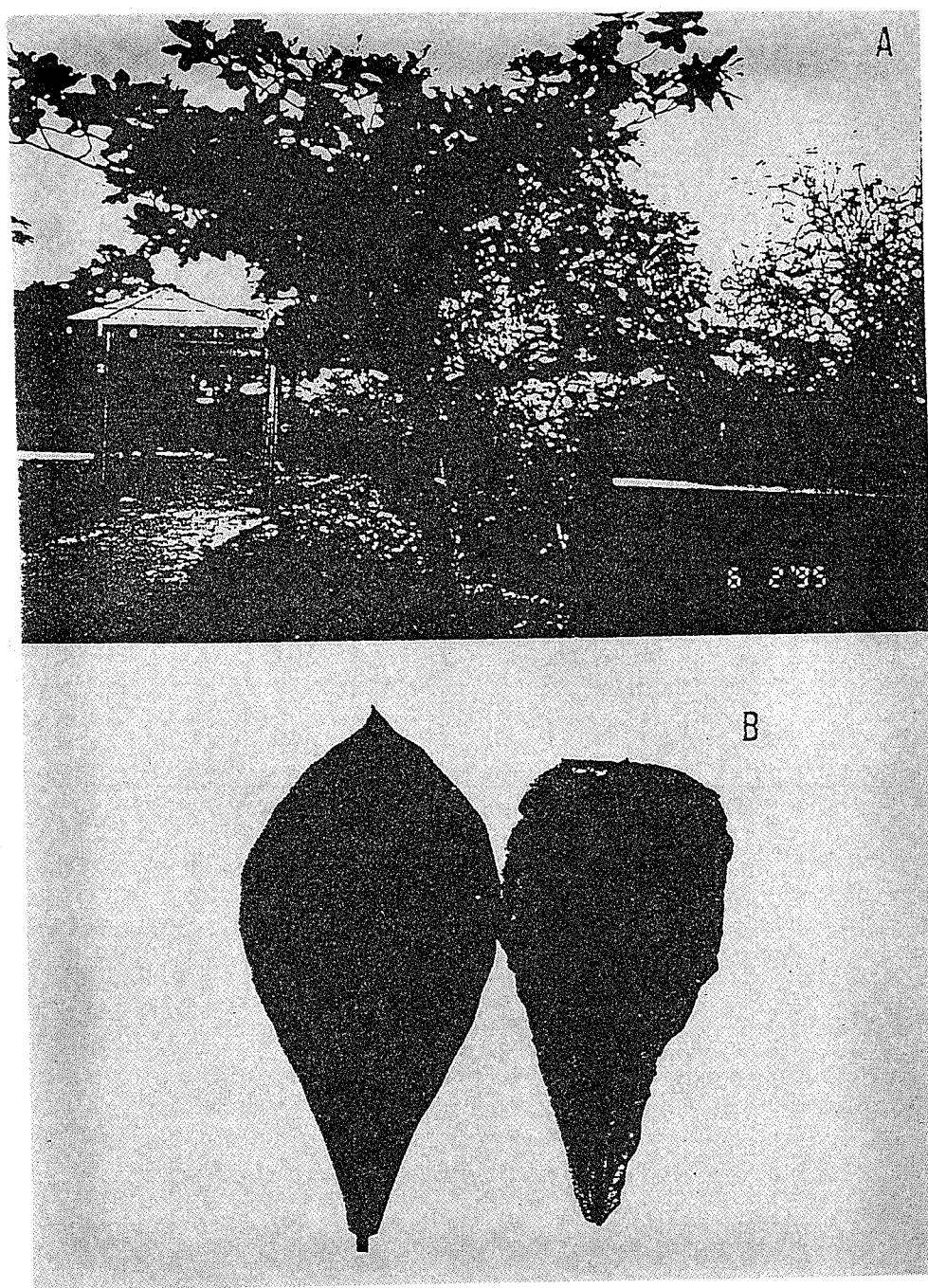


Fig. 1. (A) 檳仁樹外觀；(B) 檳仁葉外觀：新鮮葉片(左)；
陰乾葉片(右)。

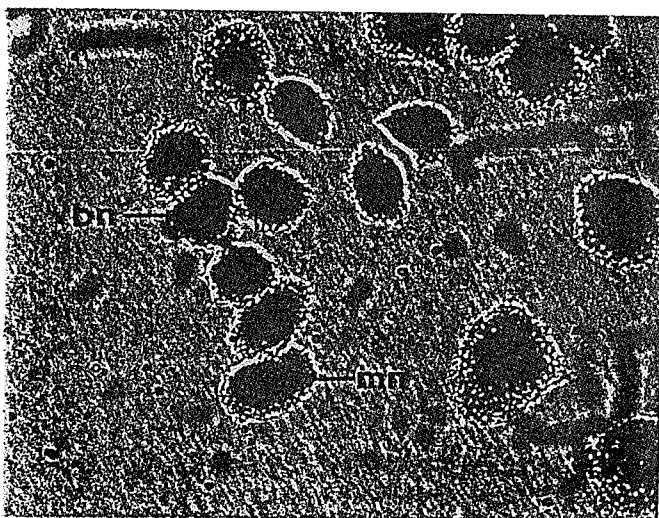


Fig. 2. The picture of micronuclei in CHO-K1 cells.

bn: binucleated cells

mn: micronuclei

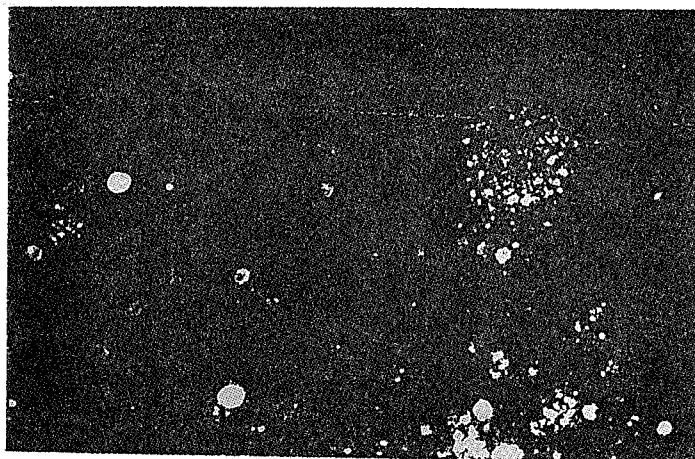


Fig. 3. Fluorescent microphotograph of mouse peripheral blood cells using the in vivo acridine orange staining technique for micronuclei.

ret: reticulocyte

mnret: micronuclei reticulocyte

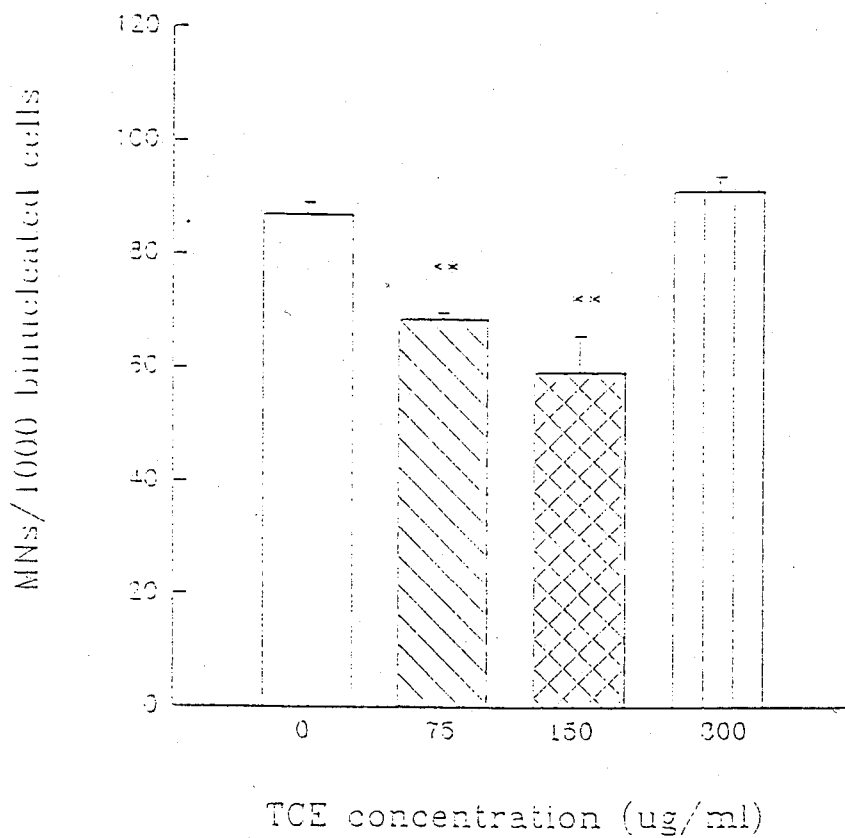


Fig. 4. Effect of simultaneous treatment of TCE on MMC-induced MN in CHO-K1 cells. Data are the mean \pm SE from two experiments (n = 4).

** : p < 0.01 when compared with control.

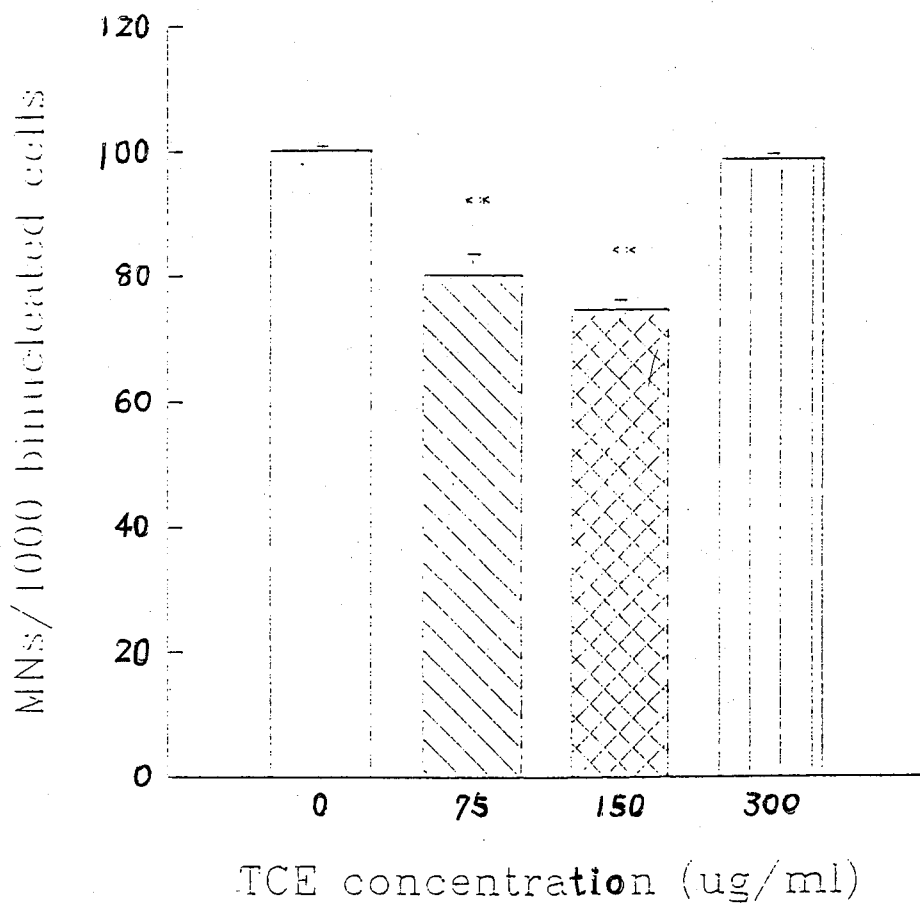


Fig. 5. Effect of pre-treatment of TCE on MMC-induced MN in CHO-K1 cells. Data are the mean \pm SE from two experiments (n = 4).
** : $p < 0.01$ when compared with control.

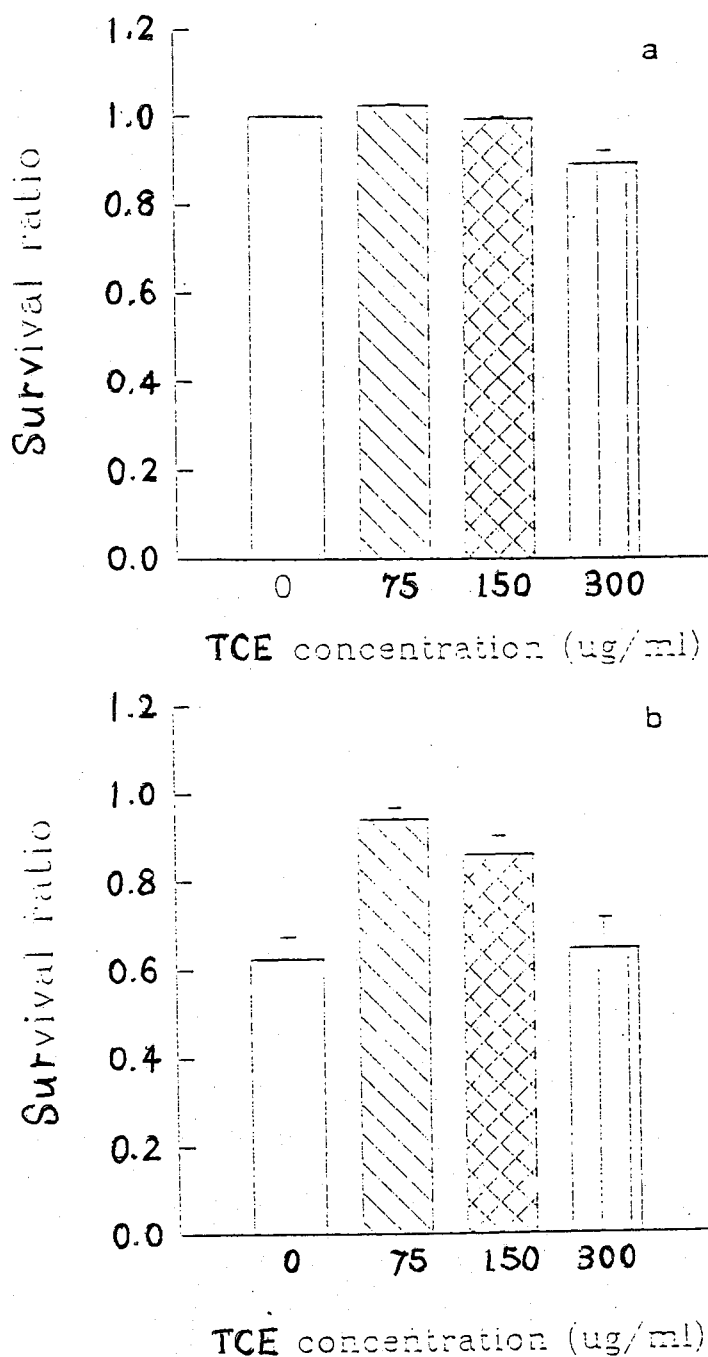


Fig. 6. Effect of TCE of cytotoxicity of CHO-K1 cells following 1 hr exposure: (a) without MMC; (b) with MMC. Data are the mean \pm SE from three experiments (n = 4).

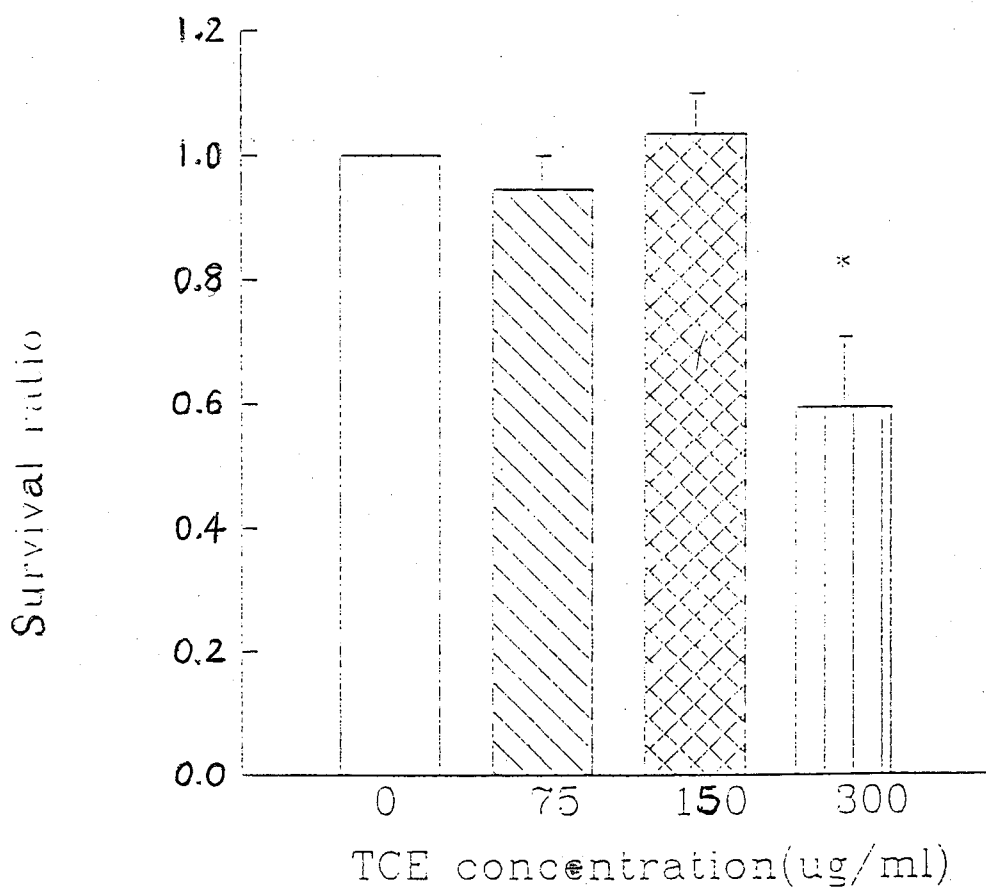


Fig. 7. Effect of TCE on cytotoxicity of CHO-K1 cells following 6 hrs continuous exposure. Data are the mean \pm SE from three experiments ($n = 4$).
*: $P < 0.05$ when compared with control.

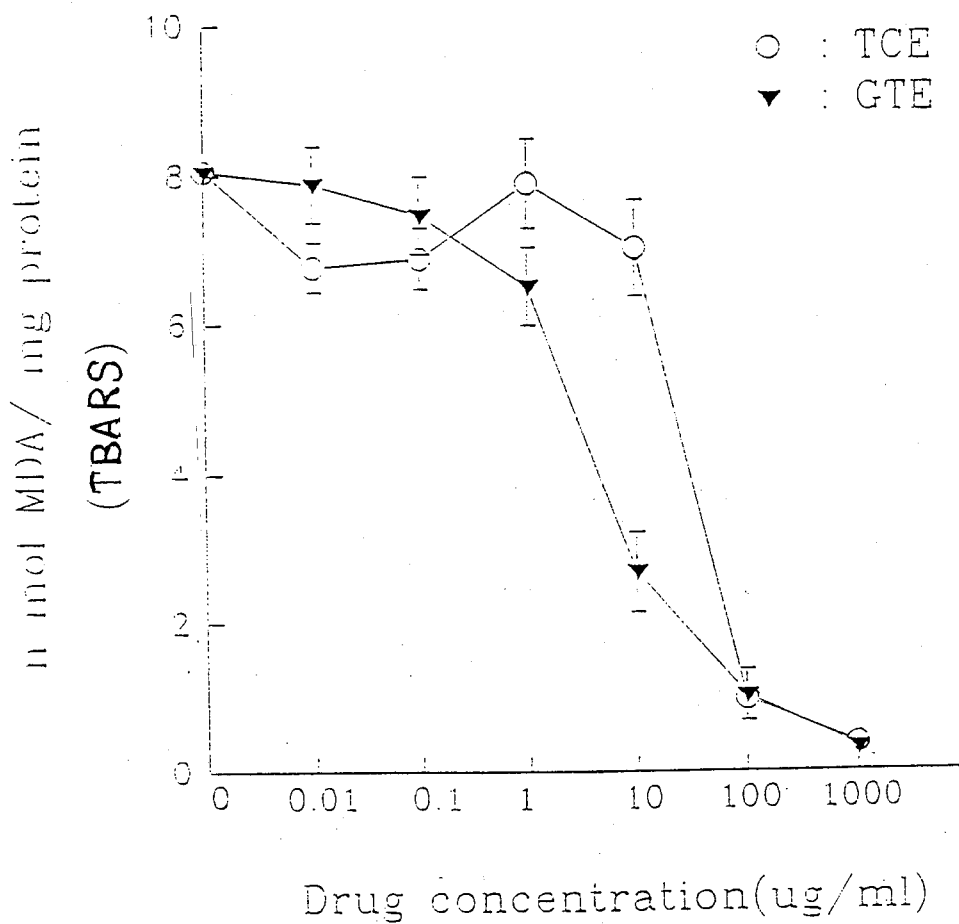


Fig. 8. Effects of TCE (○) and GTE (▼) on Fe^{2+} - H_2O_2 -dependent peroxidation in rat liver microsomes. Data are the mean \pm SE from three experiments.

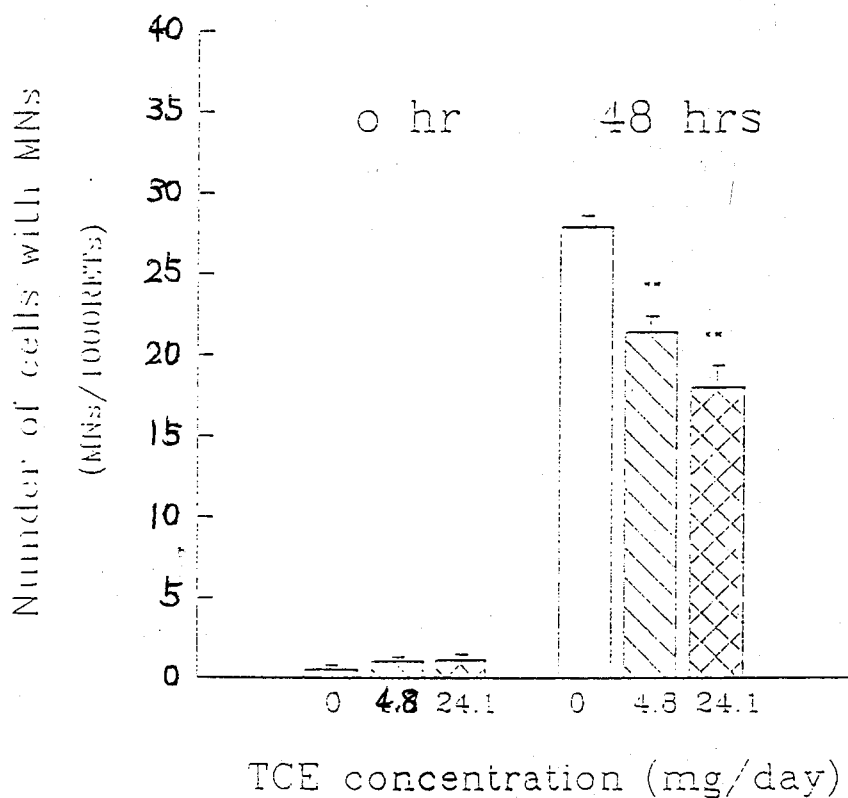


Fig. 9. Inhibitory effect of gavage administration of TCE for 6 days on MMC-induced MN in mice peripheral blood cells of mice. Data are the mean \pm SE from two experiments ($n = 5$).
 ** : $p < 0.01$ when compared with control.

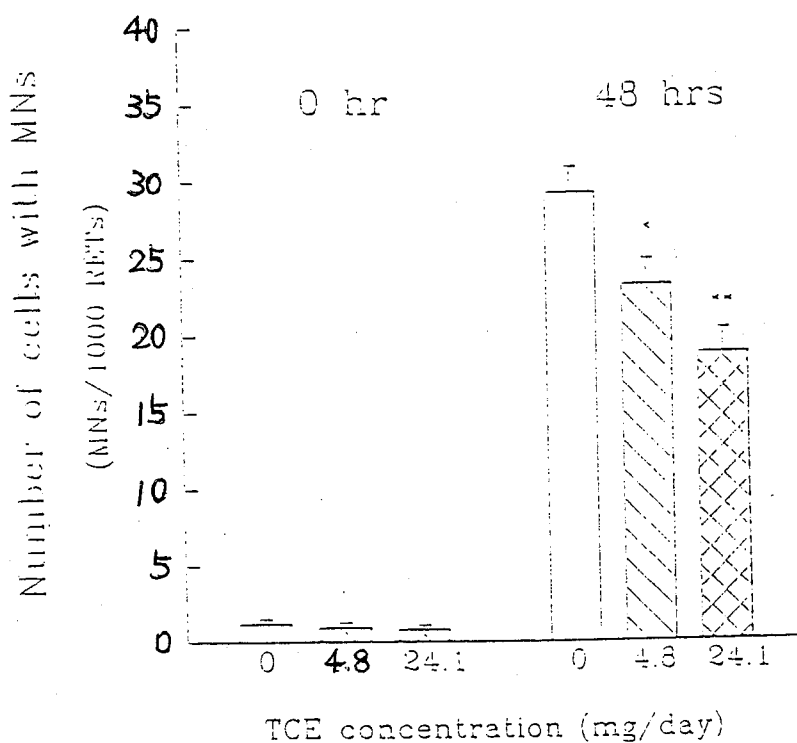


Fig. 10. Inhibitory effect of gavage administration of TCE for 14 days on MMC-induced MN in mice peripheral blood cells. Data are the mean \pm SE from two experiments ($n = 5$).

* : $P < 0.05$ when compared with control.

** : $P < 0.01$ when compared with control.

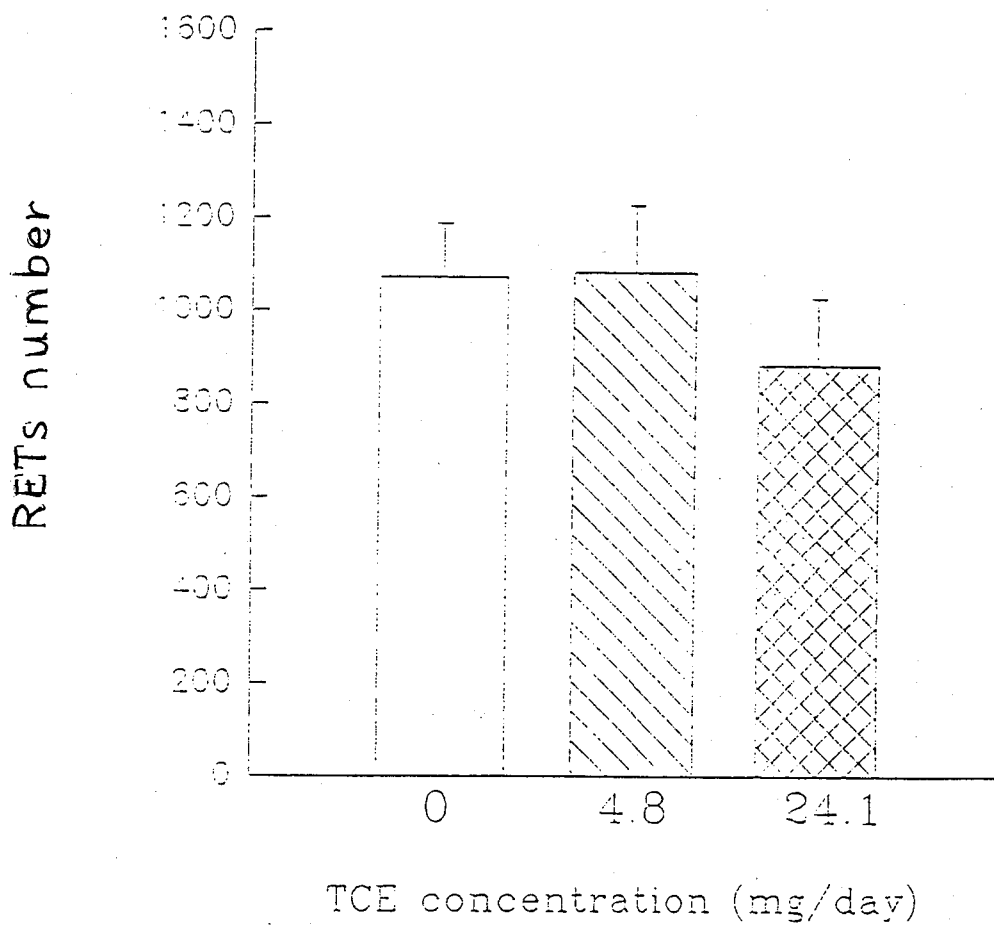


Fig. 11. Number of reticulocytes of mice peripheral blood on-gavage administration of TCE for 14 days ($n = 5$).

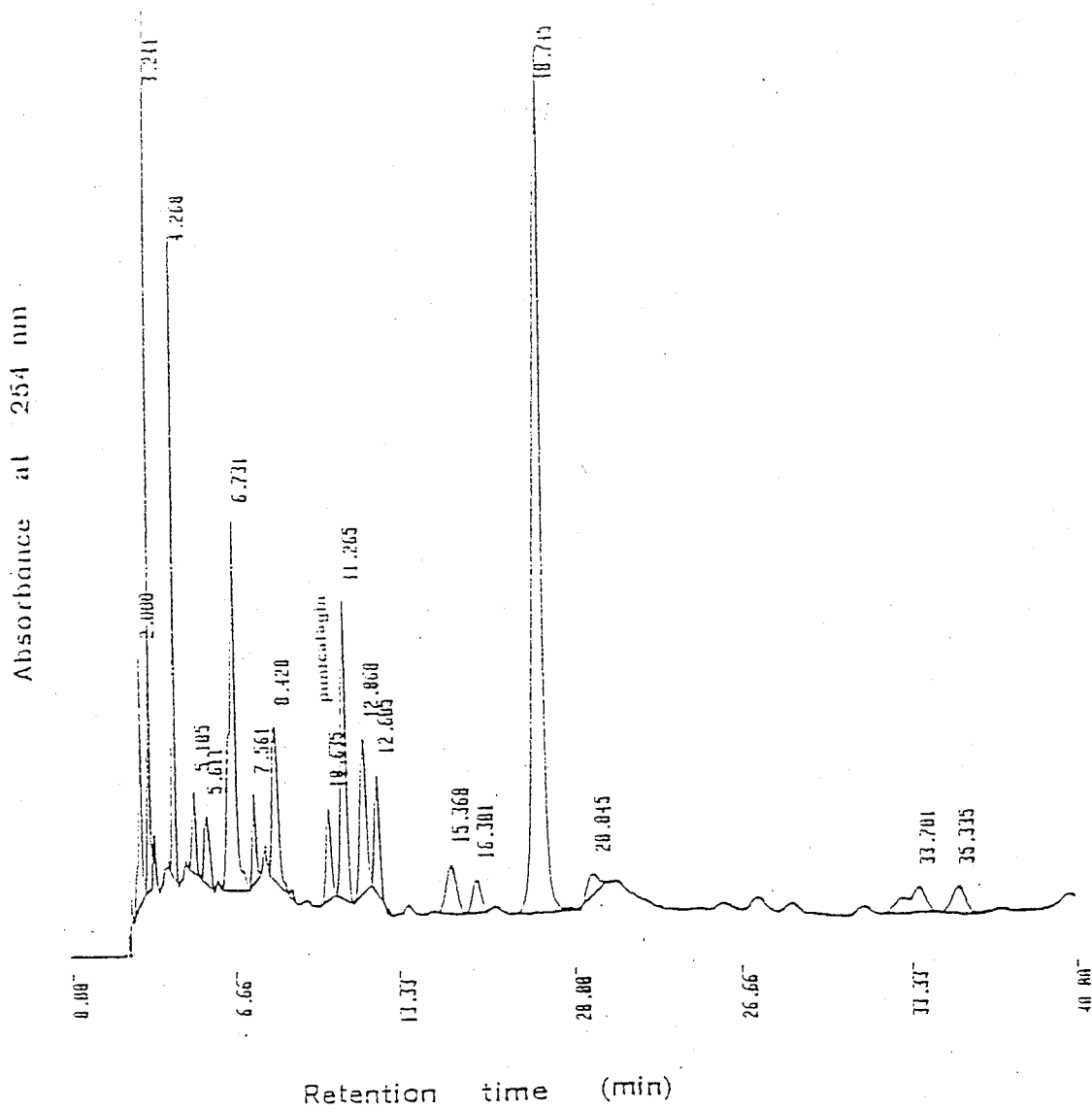


Fig. 12. The HPLC chromatogram of TCE.

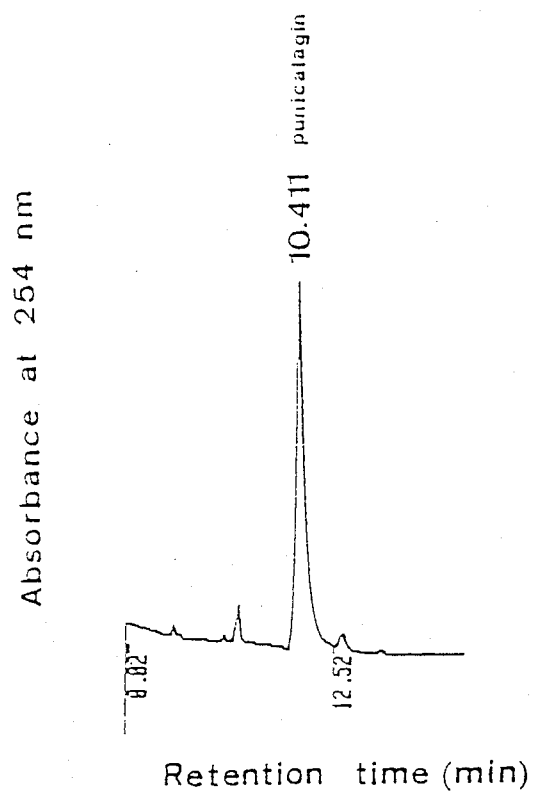


Fig. 13. The HPLC chromatogram of punicalagin standard.

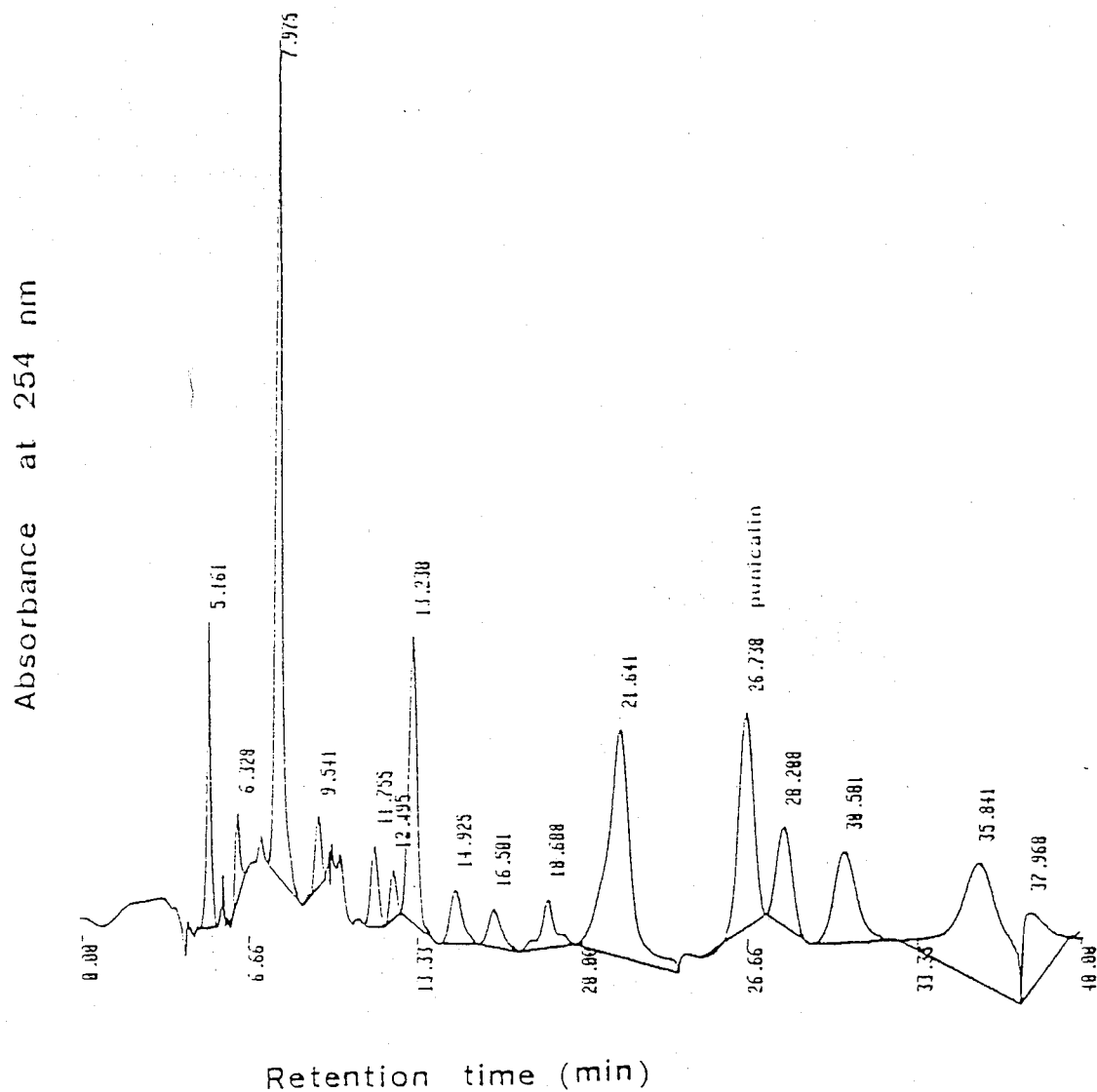


Fig. 14. The HPLC chromatogram of TCE.

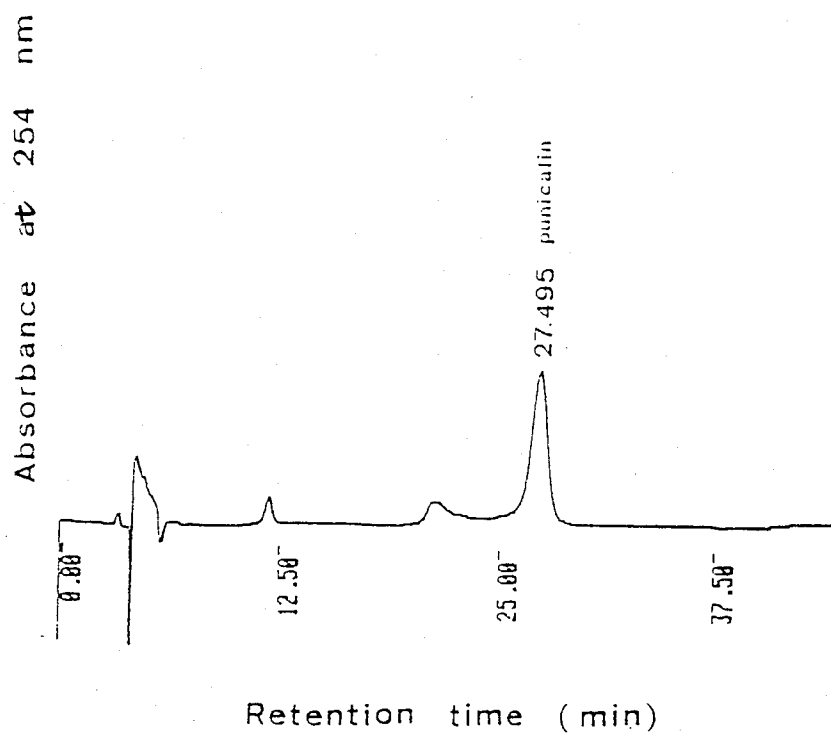


Fig. 15. The HPLC chromatogram of punicalin standard.

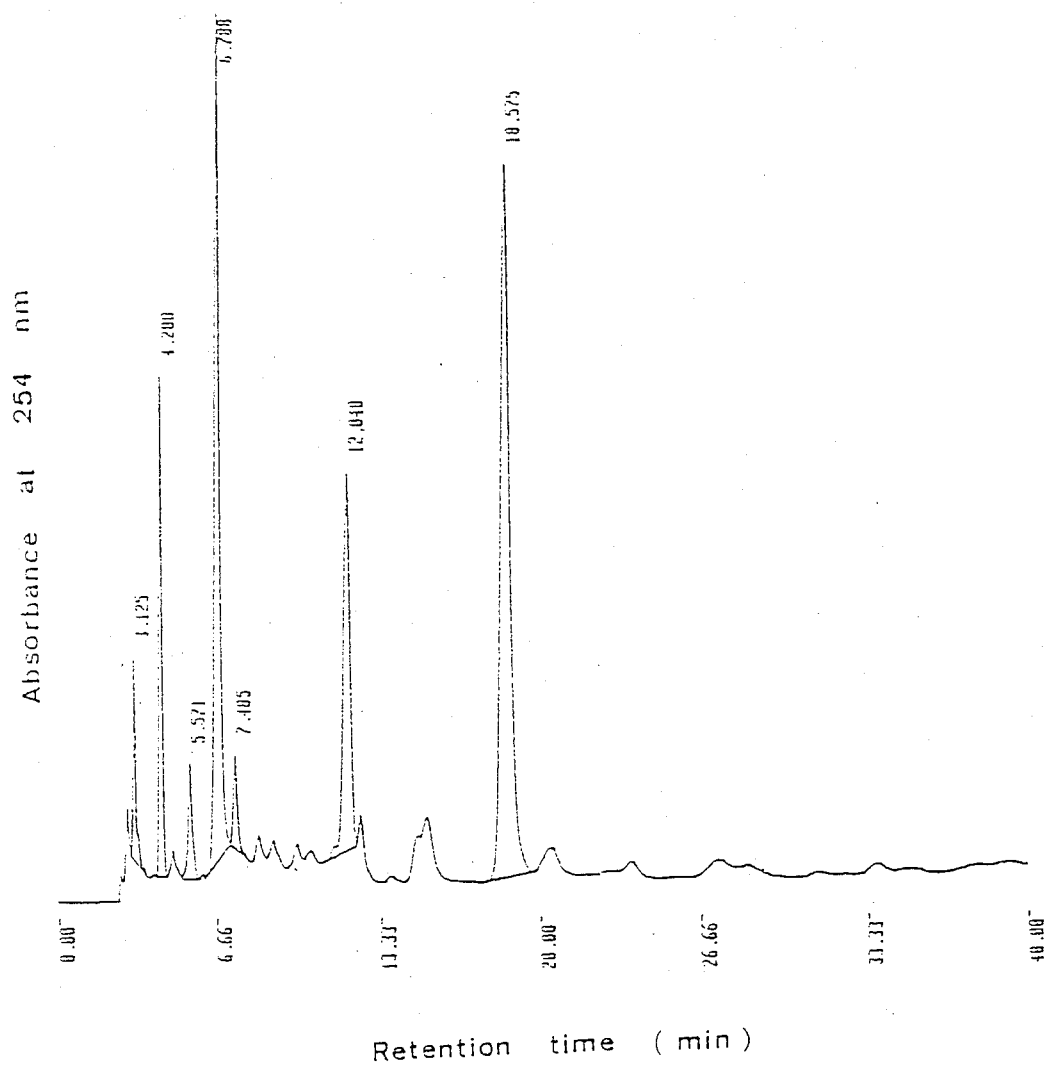


Fig. 16. The HPLC chromatogram of *T. catappa* L. (落葉)。

延胡索成分四氫巴馬汀對癲癇之影響

林茂村 褚自芳、關甫予

國立成功大學

摘 要

本研究旨在探討四氫巴馬汀 (THP) 對於癲癇發作動物模式之影響。癲癇發作之誘發採用皮下注射 picrotoxin 與杏仁核內刺激二種模式。我們利用自行開發的紅外光矩陣式與超音波式行為量測系統來分析大鼠癲癇發作時行為變化並作為癲癇發作之量化標準。我們發現化學性或電氣性誘發癲癇時，大鼠之 tremor, myoclonia, turnings 與 locomotor activity 均顯著地增加。同時，我們也偵測到大鼠癲癇發作伴隨有動脈血壓昇高的現象。四氫巴馬汀之給予不僅可降低 tremor, myoclonia, turnings 與 locomotor activity 的基本值，而且可降低大鼠的動脈壓及心跳率。我們更發現 THP 或 haloperidol (一種 dopamine D_2 型受體抑制劑) 可以抑制 picrotoxin 或電刺激誘發癲癇發作時所表現的行為增強與動脈血壓昇高的現象。由本實驗結果推論：延胡索成分四氫巴馬汀可能經由作用于 dopamine D_2 型受體之阻斷而抑制大鼠的癲癇發作。有關 THP 之心血管系統的作用已被雜誌接受刊出 (pharmacology, 1995) ※。

※ Chueh, F.Y., M.T. Hsieh, C.F. Chen, and M.T. Lin DL-Tetrahydropalmatine-produced hypotension and bradycardia in rats through the inhibition of central nervous dopaminergic mechanisms, Pharmacology (in press), 1995.

計畫緣起

延胡索為罂粟科植物之乾燥塊莖，最早著錄於開寶本草，性味辛苦、溫、歸肝、胃經。本草綱目記載：「活血、利氣、止痛」，自古用於淨血、鎮痛、鎮痙。（李明珍，1990）。

延胡索的成分已被分離出五種生物鹼：(1)(-)-tetrahydrocoptisine, (2)(+)-corydaline, (3)(±)-tetrahydropalmatine, (4)(-)-tetrahydrozatrarrhizine, (5)(±)-palmatine。其中dl-tetrahydropalmatine(THP)具有鎮靜、催眠、鎮痛(Liu et al. 1982)降壓（金國章等1958）。抗心律不整（趙東科等1958）及抗甲狀腺機能亢進症（謝明村、吳龍源等1990）。劉國卿等人（Liu 1983; Liu et al. 1982）認為THP經由作用於腦部單胺傳遞物質例如Norepinephrine, dopamine或5-HT之代謝而達到鎮靜及催眠作用。最近彭文煌、謝明村、蔡輝彥、林茂村等人（1992）也證明THP可明顯抑制大鼠的自發運動量及增強鼠腦紋狀多巴胺釋放。另一方面的證據指出癲癇之發作以及常用癲癇藥物之藥效均與腦中單胺神經傳遞物質之變化有關。因此，THP是具有強大的抗癲癇作用是個極有趣味的課題。

實施方法及進行步驟

動物

雄性大白鼠(250-300 克重)困於鼠籠並餵之以食物及飲水(隨時供應)。室溫維持在攝氏23°C左右，採12小時光明及12小時黑暗。

癲癇發作動物模式

第一種模式：採用Gean等人(1993)及 Thomas(1990)方法(Chemical Kindling)化學激發癲癇：

每次實驗要使用剛準備好的picrotoxin(sigma)，皮下注射 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 mg/Kg，最少1小時內，觀察癲癇症狀。其症狀隨劑量大小而變，分成MYO (myoclonic 肌肉抽搐)和 GTC (General Tonic and Clonic 全身僵直且抽搐) MYO指快速的全身顫動，GTC指喪失平衡，兩側前腳強力伸直，且頭部前後異動，伴隨全身顫抖和間歇的抽搐。

第二種模式：採用wahnschaffe and löscher(1991)方法。雙極電極埋在杏仁核，手術後二周，用連續電流刺激，電量500微安培，1毫秒，方形脈衝波，頻率每秒50次，刺激時間1秒，每天刺激1次，直到達到5階段癲癇，可能需數天至數周。

癲癇激發的5階段：

1. 不動，閉眼，鼻毛和臉部抽搐。
2. 點頭伴隨有更多的臉部抽搐。
3. 一隻前腳抽搐。

4. 站起，常伴隨有二前腳抽搐。
5. 站起接著喪失平衡倒下，並且有全身性的抽搐。

實驗藥材之製備：

本實驗所使用之藥材經鑑定為罂粟科 *Papaveraceae* 植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wuc 的塊莖。

並由氯仿-B 層以管柱層析法 (Column Chromatograph) 分離出 protoberberine type alkaloids，經純化得 dl-tetrahydropalmatine (THP) 供作本實驗，實驗材料以磷酸 10 % (V/V) 與蒸餾水 (1:9) 混合製備，以 1 N 氫氧化鈉調至 pH 值 4.5。

紅外光矩陣式動物行為量測系統

目前此套紅外光矩陣式動物行為量測系統如圖 2 的描述 (Yang, Li & Lin, 1993)。

第一部份是動物行為動作上的參數，包括：

(1) 水平小動作的時間 (Horizontal fine movement time, HFMT)，以秒為單位。被定義為大鼠身體在每一個電腦取樣移動為小距離的動作，即 0 到 1.6 cm 之間的水平小動作。

(2) 水平大動作的時間 (Horizontal gross movement time, HGMT)，以秒為單位。若大鼠身體移動的距離，超過前述小動作設定的判斷距離 1.6 cm，稱為水平大動作的時間。

(3) 垂直方向動作的時間 (Vertical motion time, VMT)，以秒為單位。被定義為大鼠在實驗時從事站立所花費的時間。

(4) 休息時間 (Freezing time, FT)，以秒為單位。為大鼠在實驗時休息的時間總合。

(5) 動物活動的總距離 (Total distance travelled, TDT)，以公分為單位。被定義為大鼠在某一時間內移動的總距離，而這裡所謂的移動是指前述水平大動作，即移動距離必須大於 1.6 cm。

(6) 順時針轉向次數 (Clockwise turning, CT)，以次數為單位。被定義為大鼠在運動箱內移動軌跡呈圓弧順時針轉向行為。

(7) 反時針轉向次數 (Anticlockwise turning, ACT), 以次數為單位。按定義為大鼠在運動箱內移動軌跡呈圓弧反時針轉向行為。

活體清醒大鼠腦內單胺電位化學變化

將單一碳纖維 (直徑 12 μm , AVCO, Lowell, MA) 插入已拉成形的玻璃微滴管 (pipette, 20-25 公釐長度) 之內。使用精細的剪刀切除 pipette 的頂口, 纖維輕輕的接合玻璃頂口的內部, 然後將炭纖維由 pipette 頂口拉出, 內灌銀漿使纖維通電。pipette 的頂和鈍的尾端用 cyanoacrylate (超著膠) 黏著劑封口, 整個表面均為厚約 12 μm , 長約 500 μm 的 pyrolytic 炭纖維表面。

為了改良碳纖維對於單胺的敏感性及選擇性, 電極須依 Gonon 及其研究同仁發表的白皮書改良的方法作電的前處理 (Gonon et al. 1984)。

經過上述前處理碳纖維電極, 把電極的頂端浸入 Nafion 溶液中 (5 % 溶液 10 μl , Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wis. USA) 之內 3 分鐘。然後將覆蓋上一層 Nafion 的碳纖維電極在攝氏 60 度乾燥 20 秒, 重複乾燥 3 次, 再將黏附好 Nafion 之電極置於 3 M 氯化鈉溶液中, 測其電容及電阻, 只有電容值約等於 0.039 μF , 而電阻值在 200-400 歐姆的電極才可供實驗使用 (Lin & Su 1992; Lin et al., 1992)。

將重 250~300 公克的雄性 Sprague-Dawley 大鼠以 urethane (1.5 g/kg, 腹腔注射) 麻醉, 將其頭部固定於立體定位儀上, 依照 Paxinos 和 Watson 座標, 將塗上一層 nafion 的碳纖維電極植入層狀體 (A/P: bregma 往前 0.2 mm, M/L: 中線左、右旁開 3.0 mm, D/V: 骨表面下 5.5 mm) 及附加的參考

(Ag/AgCl) 電極置於皮質骨腔壁區域的硬膜 (dura) 表面上。差異脈衝電位面 (voltammograms) 每 0.2 秒自動地記錄, 在每個實驗結束, 拿出電極後, 必須校準一次。若欲確認電極位置正確與否, 可供應一連續的 5 伏特直流電 3 秒鐘, 執行電極損害。通過電極的電流大約 0.4 nA。再將腦解剖, 冰凍並保持在零下 20 度, 腦幹切成 20 μm 冠狀的薄切片, 收集第三節作 Nissl's 染色。在碳纖維位置附近的損害面積大約直徑 200 μm 和長約 500 μm 。當碳纖維電極在活體實驗後被標化, 植入另一電極於相同位置作電的破壞。

THP 將以腹腔內注入 1-20 mg/ml/Kg 之量投予動物體。

結論與討論

表一指出皮下注射 picrotoxin (3-4 mg/kg) 可誘發大鼠之癲癇發作。紅外光矩陣式行為偵測系統也顯示出 picrotoxin 注射後伴隨著有下列行為之變化：水平動作時間增加、垂直動作時間增加、休息時間減短、動物活動總距離增加、順時針轉向次數增加以及反時針轉向次數增加。以上所述的癲癇發作與行為表現均與藥物給予劑量呈相關性。

表一也指出腹腔內給予四氫巴馬汀(THP, 10-30 mg/kg)，除了可些微降低動物的多種行為指數，更能顯著地抑制 picrotoxin 所誘發之癲癇發作與行為指數變化。

表二指出不論是自大鼠的側腦室或腹腔內注射一種妥巴胺受體拮抗劑，例如 Haloperidol 除了可些微讓動物之行為變得鎮靜下來，更可顯著地抑制 picrotoxin 所誘發之癲癇發作與行為指數變化。

表三指出腹腔內給予四氫巴馬汀後可以導致大鼠的平均動脈壓降低、心率降低以及紋狀體妥巴胺釋放增加，但是並不影響動脈血氧及二氧化碳濃度以及體內酸鹼度。

表四指出腹腔內給予 Haloperidol 也可導致大鼠的平均動脈壓降低、心率降低以及紋狀體妥巴胺釋放增加。同時，表四中也指出安非他命可以抑制四氫巴馬汀所引發的動脈壓下降及心率下降之作用。

在本研究中，癲癇發作之誘發採用皮下注射 picrotoxin 與杏仁核內

刺激二種模式。以上二種模式均隨伴著有動物行為指標之變化：水平動作時間增長、垂直動作時間增加、休息時間減少、動物活動總距離增加、順時針轉向次數增加以及反時針轉向次數增加。上述癲癇發作及動物行為指標變化均可被腹腔注射四氫巴馬汀或腹腔內或腦腔內注入 Haloperidol 所抑制。事實上，許多的證據均指出動物行為的指標變化均與腦內妥巴胺系統息息相關(Randrup and Munkvad, 1970)。生化及行為實驗結果也指出四氫巴馬汀和 Haloperidol 一樣具有妥巴胺 D2 受體拮抗劑的作用(Jin et al., 1983; Jin et al., 1985; Xu et al., 1985)。

由以上敘述可見癲癇發作時可能腦內妥巴胺系統產生興奮現象。以四氫巴馬汀或 Haloperidol 來抑制腦內妥巴胺 D2 受體則可以抑制癲癇發作。我們更發現 THP 或 haloperidol 可以抑制 picrotoxin 所表現的動脈壓升高及心率增加之作用。至於癲癇發作時是否隨伴有腦內妥巴胺系統興奮現象，我們將在第二年的計劃中進行探討二種模式誘發癲癇發作時腦內海馬迴或杏仁核中妥巴胺釋放率之變化。

重要參考文獻

明·李時珍：本草綱目，卷 13，山草類下，pp. 467-468，隆泰書局，台北·台灣，1990。

Liu G.Q., Alergi S. and Garattini S.: DL-tetrahydropalmatine as monoamine depletor. Archives Internationales De Pharmacodynamiae Et De Therapie, 258(1): 39-50, 1982.

- 全國章, 陳瑞庭, 王道范, 胥彬: 延胡索的藥理研究IV: 延胡索素乙和三對循環和呼吸的影響。藥學學報, 6: 26, 1958。
- 趙東科, 趙更生, 邱培倫: 四氫巴馬汀對實驗性心率失常的作用。西安醫學院學報, 6:322, 1985。
- 謝明村, 吳龍源: 延胡索有效成分對於大鼠甲狀腺機能之影響。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文集, 1990。
- Liu G. Q.: Influence of pargyline on depletion of catecholamines in the rat brain caused by dl-tetrahydropalmatine. Yao Hsueh Hsueh Pao-Acta Pharmaceutica Sinica, 8(6): 472-474, 1983.
- Peng WH, Hsieu MT, Tsai HY, Lin MT. Effects of dl-tetrahydropalmatine on the behavioral and electrochemical changes in rats. Ph.D. Dissertation. China Medical college, Taichuang, Taiwan, ROC, 1992.
- Gean PW, Lin JH, Huang CC, Kuo JR. Anticonvulsant effects of Dizocilpine against Picrotoxin-induced seizure activity in vivo and in vitro. J Formosa Med Assoc 92:1-7, 1993.
- Thomas J. The effect of Nimodipine on picrotoxin-induced seizures. Brain Res. Bull. 24:11-15, 1990.
- Wahnschaffe U, Loscher W. Anticonvulsant effects of ipsilateral but not contralateral microinjection of the dopamine D-2 agonist LY 171555 into the nucleus accumbens of amygdala-kindled rats. Brain Res 553:181-187, 1991.
- Young MS, Li YC, Lin MT. A modularized infrared light system with high resolution for measuring animal behaviorals. Physiol Behav 53:545-551, 1993.
- Gonon F, Buda F, Pujol JF. Treated carbon fiber electrodes for measuring catecholamines and ascorbic acid. In: Marsden CA (ed), Measurement of

Neurotransmitter Release in Vivo. John Wiley, Chichester, pp. 153-171, 1984.

Lin, MT, Su CF. Spinal 5-HT pathways and the antinociception induced by intramedullary clonidine in rats. N. S. Arch Pharmacol. 346:333-338, 1992.

Lin MT, Ho MT, Young MS. Stimulation of the nigrostriatal dopamine system inhibits both heat production and heat loss mechanisms in rats. N S Arch Pharmacol 346:504-510, 1992.

Table 1. Effects of picrotoxin on different locomotor activities of vehicle-treated rats and THP-treated rats during a period of 30 min following picrotoxin injection.

Treatment	HMT(s)	VMT(s)	CT(counts)	ACT(counts)	TDT(cm)	FT(s)
Rats treated with vehicle (ml/kg i.p.)						
Saline (0.9% s.c.)	6±1	9±3	2±1	2±1	16±2	8955±13
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	37±8*	419±80*	7±1*	8±2*	402±55*	8386±51*
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	58±7*	557±92*	14±2*	15±2*	486±63*	8042±48*
Rats treated with THP (10 mg/kg i.p.)						
Saline (0.9% s.c.)	1±1#	1±1#	0	0	1±1#	8969±45
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	12±3*#	73±12*#	2±1#	2±1#	286±60*#	8796±20*#
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	22±4*#	85±15*#	3±2#	2±1#	301±45*#	8814±15*#
Rats treated with THP (30 mg/kg i.p.)						
Saline (0.9% s.c.)	2±1#	1±1#	0	0	1±1#	8970±52
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	2±1#	0#	0#	0#	3±2#	8968±20#
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	1±1#	0#	0#	0#	3±2#	8971±21#

Values are means ± SEM (n=8 for each group). HMT, horizontal motion time; VMT, vertical motion time; CT, clockwise turning; ACT, anticlockwise turning; TDT, total distance travelled; FT, freezing time.

* Significance of difference from the corresponding control values (saline injection in vehicle-treated group or in THP-treated group) : P < 0.05 (ANOVA).

Significance of difference from the corresponding control values (vehicle-treated group) : P < 0.05 (ANOVA).

Table 2. Effects of picrotoxin on different locomotor activities of vehicle-treated rats and THP-treated rats during a period of 30 min following picrotoxin treatment.

Treatment	HMT(s)	VMT(s)	CT(counts)	ACT(counts)	TDT(cm)	FT(s)
Rats with vehicle (ml/kg i.p.) treatment						
Saline (0.9% s.c.)	7±2	10±2	2±1	2±1	18±2	8951±12
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	41±7*	408±69*	8±2*	9±2*	399±44*	8364±35*
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	60±8*	562±75*	15±2*	14±2*	497±56*	8025±31*
Rats with haloperidol (10 mg/kg i.p.) treatment						
Saline (0.9% s.c.)	2±1#	1±1#	0	0	8±3#	8960±7
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	2±1#	0#	0#	0#	2±1#	8969±8#
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	3±2#	6±3#	0#	0#	9±5#	8961±4#
Rats with haloperidol (5 µg i.c.v.) treatment						
Saline (0.9% s.c.)	1±1#	1±1#	0	0	2±1#	8968±10
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	11±5**	15±6**	0#	0#	31±14**	8942±11#
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	33±9**	36±11**	1±1#	2±1#	95±25**	8895±17#

Values are means ± SEM (n=8 for each group).

* Significance of difference from the corresponding control values (saline injection in vehicle-treated group or in haloperidol-treated group) : $P < 0.05$ (ANOVA).

Significance of difference from the corresponding control values (vehicle-treated group) : $P < 0.05$ (ANOVA).

3.

Table 3. Maximal changes in mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and striatal DA release produced by intravenous injection of THP in rats under urethane anesthesia

Treatment	Δ MAP mm Hg (n = 8)	Δ HR beats/min (n = 8)	Δ PaCO ₂ mm Hg (n = 8)	Δ PaO ₂ mm Hg (n = 6)	Δ pH (n = 6)	Δ Striatal DA release n/mol (n = 8)
0 mg/kg	4.8 ± 1.2	-2.6 ± 0.5	-2.5 ± 0.5	-7.0 ± 2.1	-0.03 ± 0.01	3 ± 2
1 mg/kg	-13.8 ± 2.2*	-11.3 ± 2.3*	-3.1 ± 0.5	-5.3 ± 1.4	-0.04 ± 0.01	61 ± 7*
5 mg/kg	-20.6 ± 3.1*	-27.5 ± 5.3*	-3.4 ± 0.3	-6.2 ± 1.3	-0.03 ± 0.02	122 ± 11*
10 mg/kg	-29.4 ± 3.6*	-42.5 ± 6.5*	-3.6 ± 0.4	-6.1 ± 0.9	-0.03 ± 0.01	168 ± 14*

Values are mean ± SEM for the number of rats given in parentheses. The control values for MAP, HR and striatal DA are 97 ± 10 mm Hg, 410 ± 16 beats/min, and 209 ± 19 nmol/l, respectively. Δ = Difference between control values before and 10 min after the start of THP injection.

* p < 0.05, significantly different from control values (0 mg/kg group), ANOVA.

4.

Table 4. Effects of intravenous injection of saline, amphetamine, apomorphine, haloperidol or THP on MAP, HR and striatal DA release in rats

Treatments	Δ MAP mm Hg	Δ HR beats/min	Δ Striatal DA release nmol/l
0.9% Saline	4 ± 2 (n = 7)	-3 ± 1 (n = 7)	-4 ± 2 (n = 2)
<i>Amphetamine</i>			
0.5 mg/kg	32 ± 4 (n = 8)	42 ± 5 (n = 8)	55 ± 6 (n = 8)*
1.25 mg/kg	48 ± 6 (n = 8)*	71 ± 7 (n = 8)*	186 ± 22 (n = 8)*
<i>Apomorphine</i>			
0.5 mg/kg	-33 ± 5 (n = 6)*	-66 ± 8 (n = 6)*	-72 ± 9 (n = 6)*
1.25 mg/kg	-54 ± 6 (n = 6)*	-105 ± 14 (n = 6)*	-128 ± 13 (n = 6)*
<i>Haloperidol</i>			
0.5 mg/kg	-13 ± 2 (n = 7)*	-15 ± 2 (n = 7)*	85 ± 9 (n = 7)*
1.25 mg/kg	-47 ± 5 (n = 8)*	-62 ± 6 (n = 8)*	288 ± 32 (n = 8)*
0.9% saline + THP 10 mg/kg	-31 ± 3 (n = 6)	-43 ± 6 (n = 6)*	162 ± 15 (n = 6)
Amphetamine 0.5 mg/kg + THP 10 mg/kg	3 ± 2 (n = 6)**	4 ± 2 (n = 6)**	221 ± 27 (n = 6)**

Values are mean ± SEM for the number of rats given in parentheses.

* p < 0.05, significantly different from corresponding control values (saline group), ANOVA.

** p < 0.05, significantly different from corresponding control values (saline + THP group), ANOVA.

川芎有效成份 tetramethylpyrazine 對犬基底動脈血管反應性 作用機轉之研究

顏茂雄

國防醫學院藥理學科

摘 要

川芎有效成份 tetramethylpyrazine 對犬基底動脈血管反應性之探討

本論文旨在探討川芎有效成份 tetramethylpyrazine (TMP) 對犬基底動脈對 serotonin(5-HT) 引起收縮反應之影響。實驗結果顯示：TMP 對血管內皮完整與去內皮腦血管之舒張反應兩者並無差別。TMP 之舒血管作用類似 theophylline 但兩者均不被 propranolol 所阻斷，同時合併 TMP 與 theophylline 對腦血管之舒張反應具協同作用。此外，TMP 可增加血管組織細胞內 c-AMP 含量。另外，TMP 如同其它血管舒張劑，TMP 對 5-HT 引起之血管收縮之兩相反應影響不同；TMP 在低劑量下主要抑制 5-HT 引起之 phasic responses，然在大劑量下，則對 5-HT 引起之兩相收縮反應均具抑制作用。綜合以上結果顯示：TMP 具舒張腦血管作用，其可能作用機轉認為增加細胞內 c-AMP 及阻斷鈣自肌漿網膜之釋放所致。

英文摘要

The vasodilation of isolated canine basilar artery by tetramethylpyrazine (TMP) was studied by examining its effect on serotonin (5-HT)-induced contraction. We found no difference between the effects on intact and on endothelium-denuded preparations. The effect of TMP was similar to theophylline because propranolol did not block the vasodilation. Also, there was a summation effect when the pyrazine was combined with theophylline. Furthermore, like that due to theophylline, the vasodilation was accompanied by an increase in cyclic AMP. The pyrazine, as do other dilators, affected differently the two separate phases (phasic and tonic) of the contractile response elicited with either 5-HT or high potassium. The drug predominately suppressed the phasic responses but both the phasic and tonic phases could be inhibited significantly if the concentration of pyrazine was high enough. The present results suggest that intracellular accumulation of cyclic AMP and blockade of the release of calcium from internal stores may be important elements of the mechanism by which TMP reduces the development of tension in canine basilar artery.

Key Words: tetramethylpyrazine, 5-HT, basilar artery

前言

Tetramethylpyrazine (TMP) 是中藥川芎有效成份之一，抽取自 *Ligustici Wallichii* 植物根莖部，於中國大陸廣用於治療心絞痛及腦缺血症狀 (1-4)。TMP 也被發現於 *Bacillus subtilis* 菌種之代謝產

物 (5)。曾有文獻報導 TMP 對蛙心臟具強心作用。Kosugs、Ho 及 Dai 等人 (6-8) 也曾報告 TMP 可增加大白鼠冠狀血流。以上結果說明：TMP 具有舒張全身及冠狀動脈作用。

自從 1980 年 Furchgott 等 (9) 首先發現 acetylcholine 是一種血管內皮依賴性舒張劑，隨後也陸續發現其它血管活性物質如 substance P 及鈣離子打開劑等之舒張作用也需具有完整內皮存在 (10,11)。最近我們也曾發現 adenosine 之舒血管部份也依賴內皮之存在 (12)。根據以上報導本實驗想進一步瞭解有關 TMP 之舒血管作用是否也是內皮依賴性，並進一步探討 TMP 影響腦血流之機轉。因此，本實驗之目的有二：一、探討 TMP 對離體犬基底動脈血管之反應性。二、探討 TMP 對上述作用之可能作用機轉。由以上初步結果將提供臨床治療參考及中藥醫學新知。

實驗方法

一、離體血管製備：

動物由腹腔注射 pentobarbital (30 mg/kg) 麻醉後隨即由心臟放血，並立即以電鋸鋸開頭蓋骨，迅速取出腦，並置於充有 95% O₂ 及 5% CO₂ 混合氣之 Krebs 氏溶液 (單位為 mM，NaCl 118、KCl 4.7、NaHCO₃ 25、KH₂PO₄ 1.2、MgCl₂ 1.2、CaCl₂ 2.5 及 glucose 11)，自腦剪下基底動脈，並去除血管周圍結締組織及脂肪，剪取一小段作組織切片，另取二小段每段約 3-4 毫米長血管環，其中一段去除血管內膜，另一段血管內膜保持完整。於血管環管腔內置入二之白金乙鈎，其中一端固定於離體組織恆溫槽，另一端連接於 Grass FT03C 力轉能器。動脈環懸掛於含 20 毫升充有 95% O₂ 及 5% CO₂ 混合氣之 Krebs 氏溶液組織恆溫槽中，溫度維持 37 °C。血管張力經由 Grass

FT03C 力轉能器，將訊號傳送到 Grass Model 7D 生理多相記錄儀。實驗前將血管之張力調節為 0.8 克，並使其在恆溫槽中穩定約 60-90 分鐘才進行實驗。血管內膜完整性鑑定方法如下：(1) 以 ACh (10^{-7} - 10^{-5} M) 加入離體血管，內膜如果去除完全，則 ACh 引起之腦血管收縮反應會消失。(2) 用掃描式電子顯微鏡鑑別。本實驗之收縮—劑量反應曲線之獲得及給藥方法是採用累加方式；而血管舒張現象是以 5-HT (10^{-7} M) 先引起血管收縮，待穩定後，再採藥物累加方式，觀察舒張劑之劑量反應曲線。每當一種藥物試驗完畢後，以 20 毫升之 Krebs 氏溶液沖洗至少三次以上，直至血管達穩定後 (約 30-60 分鐘) 再進行另一藥物試驗。

三、c-AMP 之測定：

將收集 20 mg 之基底動脈置於含 1.0 ml 之 10% trichloroacetic acid (TCA) 於 4°C 下用馬達帶動玻璃研磨機研磨。研磨後經 $2500\times g$ 速度離心 15 分鐘，將離心上清液倒入 25 ml 錐形離心管並加入 5 ml 以水飽和乙醚。將瓶蓋蓋住，振盪 1 min。將水層與乙醚層分開，將乙醚層吸取去除。以乙醚三次重複洗水層。將最後以乙醚清洗溶液置於 80°C 水浴蒸發 5 分鐘以完全除去乙醚，取 0.5 ml 水層液儲存於 -70°C ，將 0.5 ml 樣品溶於 0.05 M sod. acetate, pH=6.2 並利用 radioimmunoassay Kit 測定 c-AMP (13)。蛋白質測定利用 Lowry 方法 (14)。

四、收縮相之區別：

根據 Bohr (15) & Hurwitz (16) 等描述收縮相之快反應相是指收縮反應最初之快速相與時間成直線關係。快速相之收縮時程約 20 秒

而剩餘收縮反應稱之為慢速相約持續 5 min 鐘。本實驗以 5-HT 及高鉀收縮反應觀察 TMP 對此而收縮稜引起之快速與慢速反應相之影響。

五、材料

5-HT, Isoproterenol, propranolol, theophylline 及 Carbachol 均購 Sigma Co. (St.Louis, U.S.A.), Tetramethylpyrazine 購置 Aldrich chemical Company (Milwaukee, WI) Radioimmunoassay Kit for c-AMP 購置 N.E.N (Boston, U.S.A.) .

六、統計分析

收縮力以每 1 mg 濕重組織所引起 mg 收縮力表示，資料代表平均值±標準誤差。利用 Student's "t" test 表示統計意義 ($P < 0.05$)。

實驗結果

1. TMP 對內皮完整與去內皮情況下之舒張反應：

圖一 (A) 顯示 TMP 對 5-HT (10^{-7} M) 在完整與去內皮血管收縮反應情形。TMP 在劑量範圍 (5×10^{-5} - 2×10^{-3} M) 時產生劑量相關性舒張反應。然而 TMP 對內皮完整與否其舒張反應並無差異，可見 TMP 引起腦血管舒張反應是一種內皮非依賴性舒張劑圖一 (B)。TMP 抑制 5-HT 之收縮達 86% 所需劑量為 2 mM。

2. TMP 對 c-AMP 之影響：

TMP 引起血管舒張及改變細胞內 c-AMP，並與已知化合物

isoproterenol 與 theophylline 作比較。以內皮完整基底動脈對 5-HT (10^{-7} M) 收縮觀察舒張劑作用達 8 分鐘作為觀察之 end-point。表一顯示 TMP 如同其他已知化合物增加細胞內 c-AMP，所增加的 c-AMP 約為對照組之兩倍。而 5-HT 本身並不影響 c-AMP，因此細胞的 c-AMP 增加完全是由於舒張劑之結果。

3. TMP 對 5-HT 引起兩收縮相之結果。

5-HT 可引起兩收縮相變化如圖二。TMP 在 0.5 及 1 mM 下 ($P < 0.05$) 抑制 5-HT 引起快速相相較，TMP 在 1 mM 下抑制慢速相 (圖二B)。由以上結果認為 TMP 對快速收縮相抑制作用較明顯。

4. TMP 對高鉀引起收縮之結果

圖三 表示 TMP 對高鉀引起兩相收縮之濃度曲線。結果顯示 TMP (10^{-3} - 2×10^{-3}) 濃度下可明顯抑制高鉀引起雙相收縮。然 TMP (10^{-3} M) 濃度下只抑制高鉀快速相對慢速相無影響，除非濃度高達 2×10^{-3} 或更高時之慢速相才具有抑制作用。

討論

本實驗顯示 TMP 引起腦血管舒張反應是一種非內皮依賴性舒張作用。因此對基底動脈而言 TMP 之舒張作用是一種非內皮舒張抑制劑 (圖一 A 及 B)。以上結果有助於闡查 TMP 舒張反應作用之可能作用機轉。

一般認為增加細胞內 c-AMP 或 c-GMP 均可引起血管舒張。由本實驗結果認為 TMP 之舒血管作用是經由增加細胞內 c-AMP 所致，初步結果發現對 c-GMP 並無明顯影響。同時初步實驗也發現

methylen blue (一種 guanyl cyclase 抑制劑) 並不影響 TMP 之舒張反應。表二顯示 propranolol 可阻斷 isoproterenol 引起之舒張及抑制 c-AMP 增加但不影響 theophylline 及 TMP 之舒張反應。此外, Theophylline 與 TMP 可產生相加作用。由以上結果更加說明 TMP 之舒血管作用是經由增加細胞內 c-AMP 所致。

進一步觀察 TMP 對 final common pathway 鈣運轉之影響。本實驗以經由受體鈣管道 (5-HT) 及電位依賴性鈣管道 (高鉀) 評估 TMP 對兩者之影響, 結果顯示, 5-HT 引起兩相反應, 其中快速相代表內質網釋放鈣, 慢速相代表鈣自外內流(15,16)所致。至於高鈣引起雙相代表兩種不同型之鈣自外內流(17,18)。圖 2 結果顯示 TMP (5×10^{-4} M) 對快速相之抑制作用明顯較抑制慢速相 (10^{-3} M) 來得敏感。由此結果說明 TMP 之血管舒張作用主要經由抑制鈣內流。此外, 高鈣引起收縮雙相反應可被 verapamil (10^{-5} M) 所抑制 (12), 由此結果說明高鈣引起雙相收縮完全來自鈣內流。由圖三顯示 TMP (10^{-3} M) 主要抑制 fast phase, 當劑量加大 (2×10^{-3} M) 同時可抑制 slow phase 由此結果暗示 TMP 對 (rapid-activated Ca^{2+} channel) 有不同作用。因此說明 TMP 對抑制鈣自肌漿網膜作用較抑制鈣內流來得敏感。由以上結果更加認為 TMP 之舒血管作用主要經由抑制鈣自肌漿網膜釋放。

結論

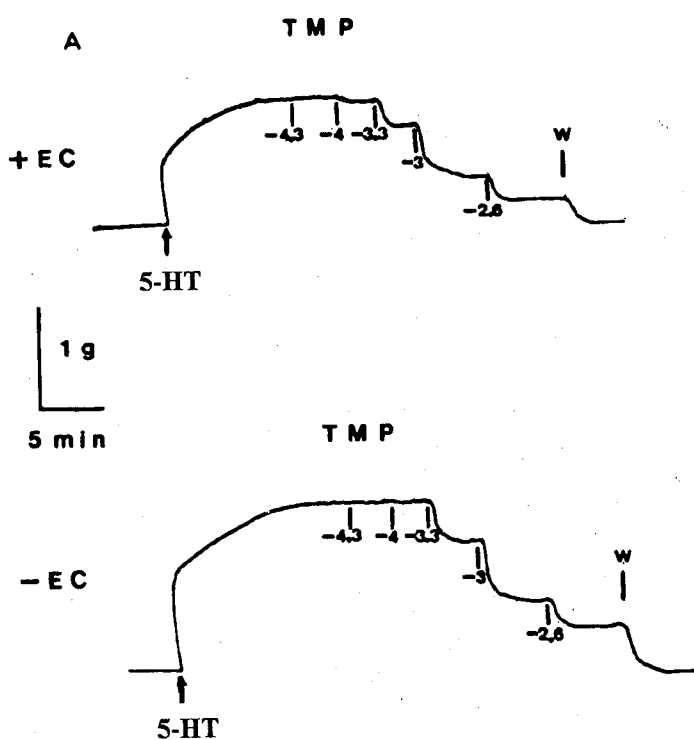
· TMP 具有舒張腦血管作用, 此舒張作用可增加腦血流, 因此可能可以改善腦缺血後遺症。至於舒血管作用機轉由實驗結果認為主要經由抑制鈣自肌漿網膜釋放所致。

參考文獻

1. Koberstein, R.C., D.E. Pittman and F.J. Klocke, 1969, Right artial admixture in coronary venous blood, Am. J. Physiol. 216, 531.
2. Lui Chuong, Z.E., 1978, Simplified review of the effects of Chinese medical herbals on the cardiovascular system (original in Chinese), Clin. Med. Res. 4, 24.
3. Lu, C.S., H.M. Yin, Y.H. Hung, C.Pao and C.F. Sung, 1978, Radix salviae miltiorrhizae and Rhizoma ligustici wallichii in coronary heart disease, Chin. Med. J. 4, 43.
4. Ho, W.K.K., H.L. Wen and C.M. Lee, 1977, Clinical trials of tetramethylpyrazine (original in Chinese), Clin. Herbals J. 8, 105.
5. Kosuqe, T. and H. Kamiya, 1963, Biological activities of air bacteria. I. Studies on the product of Bacillus subtilis, Yakuzai gaku 23, 243.
6. Kosuqe, T. and H. Kamiya, 1962, Discovery of a pyrazine in a natural product: tetramethylpyrazine from cultures of a strain of Bacillus subtilis, Nature 193, 776.
7. Ho, W.K.K., H.L. Wen and C.M. Lee, 1978, Pharmacological study on tetramethylpyrazine, Chin. Med. J. 4, 319.
8. Dai, X.Z. and R.J. Bache, 1985, Coronary and systemic hemodynamic effect of tetramethylpyrazine in the dog, J. Cardiovasc. Pharmacol. 7, 841.
9. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, 1980, The obligatory of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, Nature 288, 373.

10. Zawadzki, J.V., R.F. Furchgott and P. Cherry, 1981, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance P, *Fed. Proc.* 40, 689.
11. Singer, H.A. and M.J. Peach, 1983, Endothelium dependent relaxation of rabbit aorta II. Inhibition of relaxation stimulated by methacholine and A23187 with antagonists of arachidonic acid metabolism, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226, 796.
12. Yen, M.H., C.C. Wu and W.F. Chiou, 1988, Partially endothelium-dependent vasodilator effect of adenosine in rat aorta, *Hypertension* 11, 514.
13. Brooker, G., J.F. Happer, W.L. Terasaki and R.D. Moylan, 1979, Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP, *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 10, 1.
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265.
15. Bohr, D.F., 1963, Dual effects of calcium, *Science (Washington, DC)* 139, 597.
16. Hurwitz, L., L.J. McGuffee, S. A. Little and H. Blumberg, 1980, Evidence for two distinct types of potassium-activated calcium channels in an intestinal smooth muscle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 574.
17. Deth, R. and C. Van Breemen, 1974, Relative contributions of Ca^{2+} release during drug induced activation of the rabbit aorta, *Pflugers Arch.* 348, 13.

18. Scarborough, N.L. and G.O. carrier, 1984, Nifedipine and alpha-adrenoceptors in rat aorta. I Role of extracellular calcium in alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction, J. Pharmacol. Exp. Ther. 231,597.



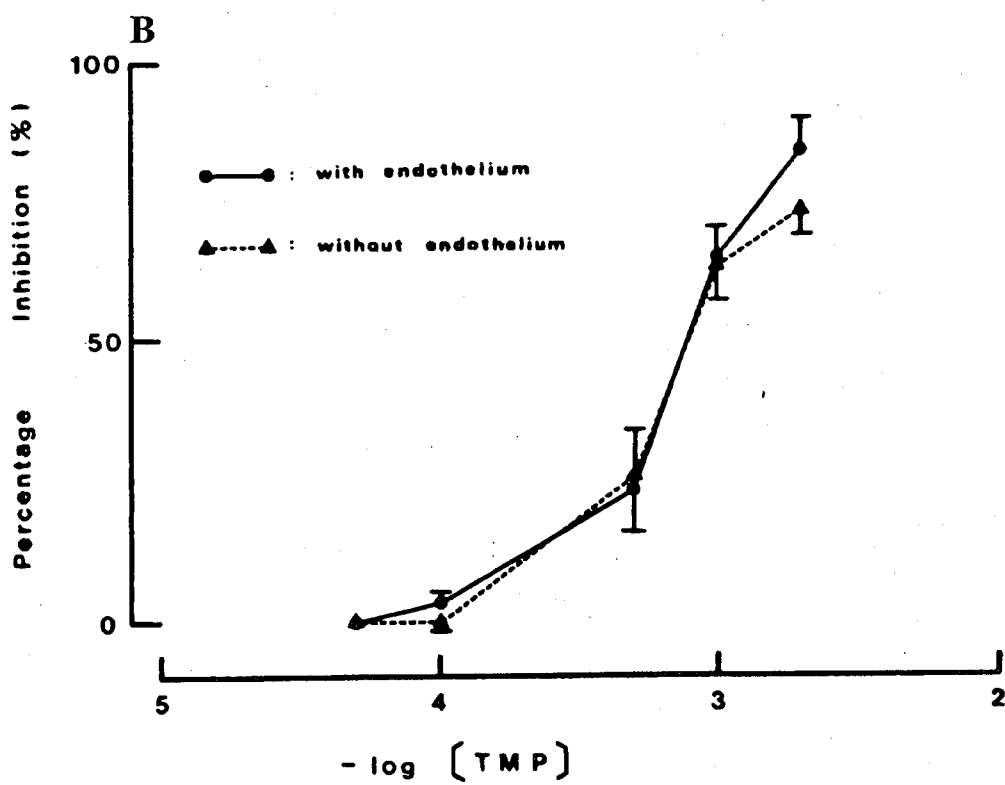
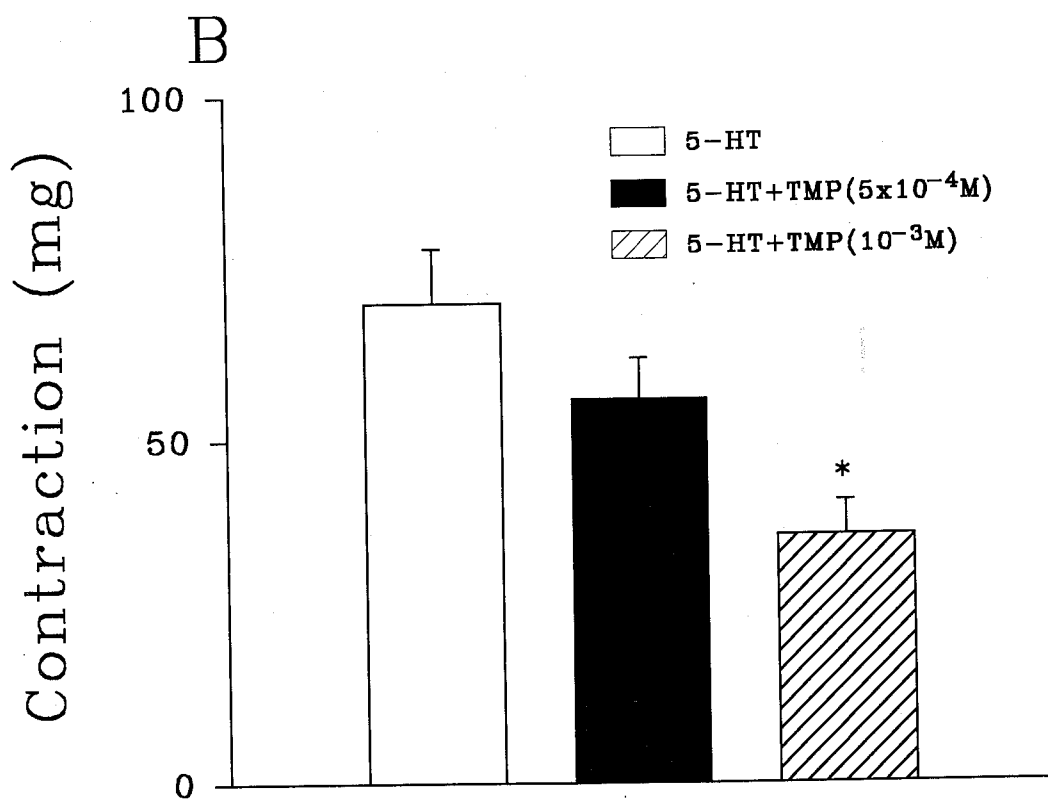
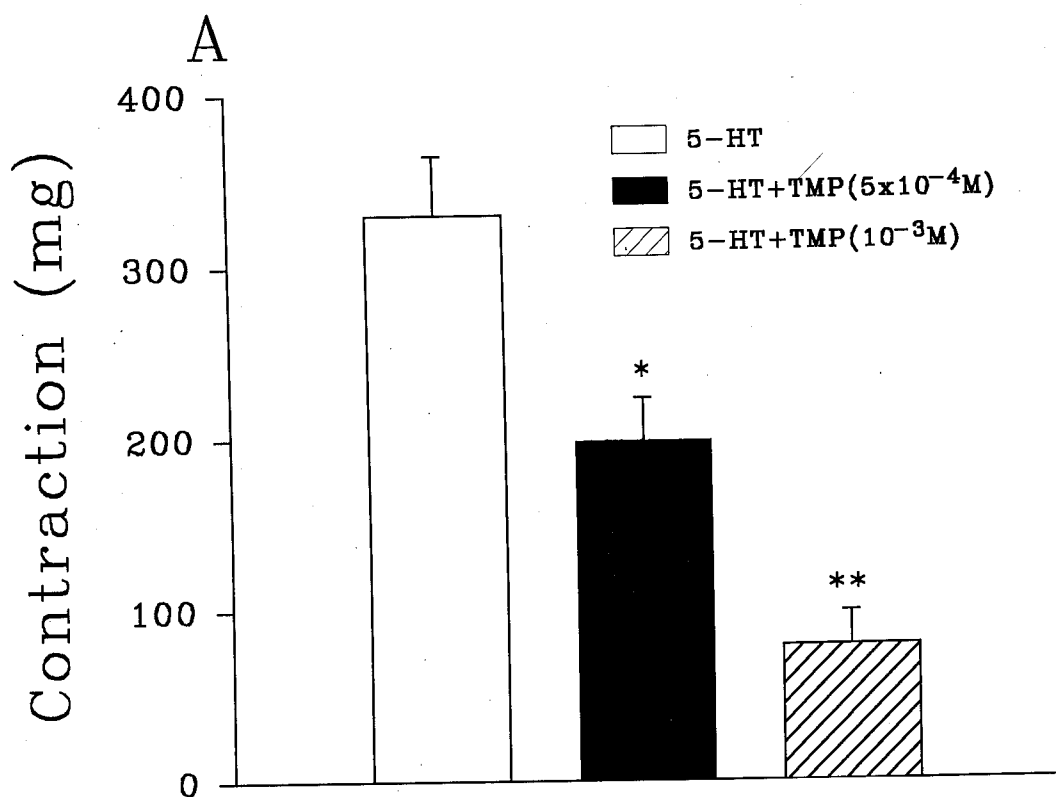


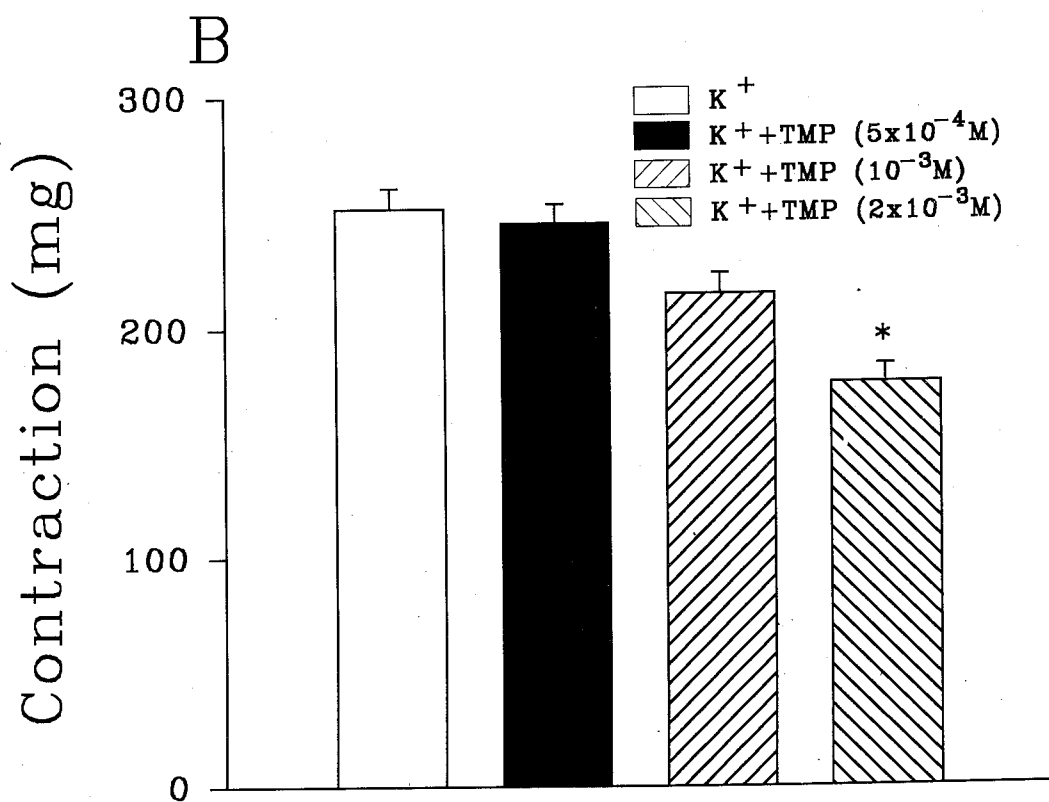
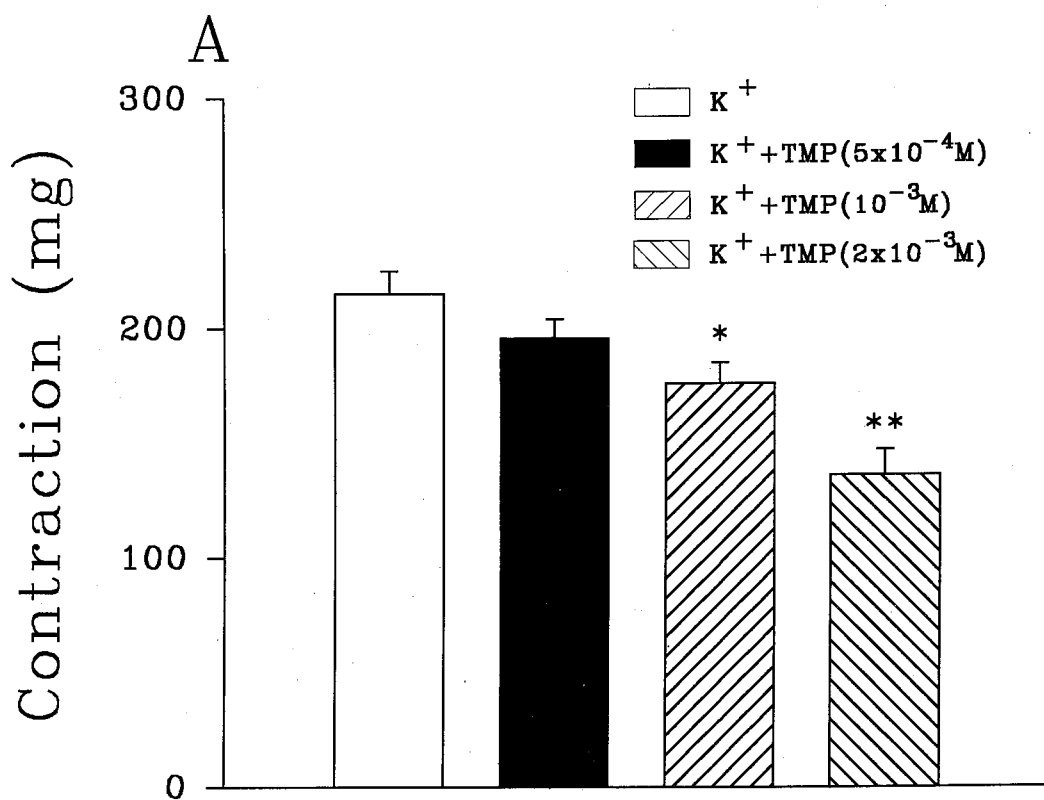
Table 1 Comparison of the effect of TMP, isoproterenol and theophylline on the cyclic nucleotide levels of intact aortic rings. Values are means \pm S.E.. Significantly different ($P < 0.01$). Control and test rings were contracted with 5-HT. The test rings were exposed to dilators for the times indicated.

Treatment	N	c-AMP (pmol/mg protein)	% relaxation
control	4	2.03 ± 0.10	
5-HT (10^{-7} M, 8 min)	5	2.02 ± 0.11	
5-HT +Isop. (3×10^{-8} M)	5	4.02 ± 0.24	63 ± 7
5-HT +Theop. (5×10^{-4} M)	5	3.68 ± 0.16	62 ± 8
5-HT +TMP (10^{-8} M)	5	3.77 ± 0.22	67 ± 8

Table 2 Comparison of vasodilator effect of TMP and theophylline on contraction induced by 5-HT. The data are expressed as means \pm S.E. The relaxation induced by each relaxant is expressed as a percentage of the 5-HT-induced contraction.

Drugs	N	% relaxation	
Isop. (3×10^{-8} M)	10	62 ± 4	
TMP (10^{-3} M)	8	65 ± 5	
5-HT+Isop. (3×10^{-8} M, 1 min)	5	4.02 ± 0.24	63 ± 7
5-HT+Theop. (5×10^{-4} M, 3 min)	5	3.68 ± 0.16	62 ± 8
5-HT+TMP (10^{-3} M, 3 min)	5	3.77 ± 0.22	67 ± 8





抗癌中藥之研究 (I)

中藥對拓樸酶活性抑制之分析

林榮耀 劉昭麟

國立台灣大學醫學院

摘 要

拓樸酶在細胞染色體的複製，轉錄以及 DNA 修復上扮演很重要的角色，超螺旋 DNA 在進行複製時，需把這種纏繞的結構鬆開才能進行下去，這個工作就靠拓樸酶來完成，拓樸酶一般可分為二大類，第一型拓樸酶 (topoisomerase I) 切斷單股 DNA 以解除過度纏繞的壓力；而第二型拓樸酶 (topoisomerase II) 則是利用切斷雙股來完成此工作，兩者都是利用 Tyrosine 和 DNA 進行共價結合。

近年來陸續發現很多抑制 DNA 複製作用的抗癌藥，這類嵌入性結合的藥物會穩定拓樸酶與 DNA 共價結合所造成的缺口，使 DNA 複製失敗，比較這類藥物的結構發現大多為多酚類化合物。

本計畫採用中藥所萃取出來的多酚類化合物單離成份進行拓樸酶活性的抑制分析，以洋菜凝膠電泳做定性分析，並用 Densitymeter 定量，求出各種中藥單離成份對拓樸酶活性抑制的 IC_{50} ，並比較有效成份的共通結構以及立體化學上的相關位置，期能作為發展抗癌新藥的基礎。

英文摘要

Topoisomerases play an important role in DNA replication, transcription and repairing. Two types of DNA topoisomerases have been identified, topoisomerase I introduces transient single strand DNA, and Topoisomerase II are capable of passing DNA double strands via enzyme bridged breaks. Both of the enzymes are covalently linked to broken DNA.

Mammalian DNA topoisomerases are common targets for a number of anticancer drugs. These drugs block the rejoining reaction by stabilizing a cleavable complex between DNA and DNA topoisomerases, and may be the cause of cytotoxicity. Comparing structures between these drugs, most of them carry polyphenolic group.

In this investigation, we screen the polyphenolic compounds from Chinese herbs for stimulating bleavage of DNA by DNA topoisomerase and compare the relationship between their structure and activity. Then, we can find the common structure between the drugs that contain higher anti-tumor activity.

緒論

自 1953 年 Watson 及 Crick 由 X-ray 數據及鹼基配對特性, 推導出 DNA 模型之後, 生化學家及物化學家便不斷對 DNA 構造深入研究, 首先是由遺傳學上基因之 recombination 的研究, 推論記錄基因之大腸菌 DNA 可能為環形結構, 及由 exonuclease 無法水解 ϕ X174 phage DNA 之結果推論 ϕ X1774 DNA 為 circular form. 到目前為止我們所知之 phage DNA, virus DNA 絕大部分為環形構造; 染色體外 DNA 如 plasmid 及真核生物之 mitochondria DNA; 植物之 chloroplast DNA, 亦均為環形. 雖然真核生物之 chromosomal DNA 為直線形, 然而此巨大之 DNA 分子仍然 anchor 在 chromatin scaffold 或 nucleus matrix 上, 形成一個個之 loops, 因此 DNA 之具環形構造應是一個規則.

1965 年 Vinograd et al. 首先提出 DNA 超螺旋之概念, 引入拓樸學

上的定義來給予 DNA 超螺旋定義:

$$\tau = \alpha - \beta$$

其中 α (topological winding number) 定義成: 將 DNA duplex 之一股固定在一平面上, 另一股相對第一股所環繞的圈數. β (the duplex winding number) 係指 DNA 分子不受外力限制之下 (unconstrained), DNA duplex 中之一股相對該 DNA duplex 之中心軸所環繞之圈數. 而 τ (the superhelix winding number) 則指 DNA duplex 對本身之超螺旋軸所環繞之圈數.

α : linking number (LK)

β : twisting number (Ts)

τ : wristing number (Wr)

由 DNA 超螺旋構造之研究, 王倬博士推斷細胞中應存在著改變 DNA LK 之酵素存在, 並首先從 E.coli 中得到可以使 supercoil form DNA relax 成 relax form DNA 之酵素. 到 1976 年 Gellert et al. 得到新的酵素可以消耗 ATP 而使 supercoil form DNA 變成 relax form DNA. 此新 enzyme 命名為 gyrase. 其含兩種各兩條之 MW(105kDa) α 及 (95kDa) β polypeptides. α 和 DNA binding; 而 β 和 ATP 水解有關. 真核細胞之 relaxing enzyme (topo I) 也跟著被純化出來, 分子量約為 100-110kDa. 真核細胞中另一種須要 ATP 當 cofactor 之 DNA relaxing enzyme (拓樸異構酵素 II) 也在快速分裂之細胞核中被分離出來. 是為 homodimer, 每一 polypeptides 之分子量約為 170kDa, 其 N 端 a.a. sequence 和 gyrase 之 α subunit 的 a.a. sequence 相似; 而 C 端和 gyrase 之 β subunit 的 a.a. sequence 相似. 經過多年之研究, DNA 拓樸異構酵素已知牽涉細胞核中有關 DNA 複製, RNA 之轉譯, 甚至於 DNA 的三度構形均有很大之關係. 有關拓樸異構酵素之詳細諸元, 請見表(一).

目前已知 DNA Topoisomerase 在原核及真核生物中，根據使 supercoil form DNA 變為 relax form DNA 的機制差異，可分為 Topoisomerase I 及 Topoisomerase II 兩種(Ref 1-4)。Top I 可造成一單股 DNA 斷裂之中間產物，之後再行接合，以達到解旋之目的。而 Top II 則是先造成一雙股 DNA 斷裂之中間產物，而後在 ATP 之存在下，藉著水解 ATP 獲得能量，以達到接合之目的。而以上之作用機制，我們可藉著加入蛋白質變性劑(如 SDS) 於拓樸異構酵素和 supercoil form DNA 混合之溶液後，可得到斷裂之 DNA 中間產物而獲得證明(見圖一)。

早期所發現之一些臨床上之抗癌用藥及抗生素，如 (Camptothecin, doxorubin, actinomycin D, epipodophylotoxins, VP-16(etoposide), 及 VM26(teniposide)(詳細結構見附錄1)。其造成癌細胞數目大量被抑制之原因，在早期並不是很清楚，但在目前已確知這些藥物可分別針對 Topoisomerase I 及 II，抑制其重新接合 DNA 之功能，當細胞核內之 DNA 進行複製或轉譯前和 Topoisomerase 作用之時，產生大量 DNA 片斷之中間產物，而達到殺死細胞之目的(見圖二)。

於是由眾多中藥中所純化出的化合物，篩選出具有明顯抑制 DNA 拓樸異構酵素活性者，並更進一步嘗試作為新一代之抗癌藥物，變成為本實驗最大之目的，本實驗收集包括山茶科，忍冬科，壺斗科，蕃荔枝科等植物，並從中分離出中藥單離成份，以由小麥芽中所抽取之 DNA Topoisomerase I 作為測試酵素，以 supercoil form plasmid PBR322 作為受酵質，以 1% agarose gel 作為分 supercoil form 和 relax form DNA 之工具，經過照像後，底片以 density meter 掃描，觀察兩種 form DNA 量之相對比值，藉此來定性及定量酵素活性，並因而找出可能具抑制 DNA Topoisomerase 活性之中藥單離成分。

實驗材料

1. 從鐵觀音茶, 金銀花花蕾, 火燒考葉等植物中分離出中藥單離成份係由台北醫學院藥學所徐鳳麟教授惠賜.
2. 從牛梨心葉和果實中分離出之單離成份係由高雄醫學院藥化所吳永昌所長所提供.
3. 從錫蘭葉下珠莖葉中分離出中藥單離成份係由台大醫學院藥學所陳瓊雪所長惠賜.

4. 藥品:

- (1) Topoisomerase I, pBR322 plasmid DNA 購自 promega 公司, Proteinase K 購自 BRL 公司.
- (2) Tris, KCl, MgCl₂, EDTA, SDS, DTT, Acetylated BSA, EtBr 購自 sigma 公司.
- (3) Agarose I 購自 BRL 公司.
- (4) 拍立得底片型號 665, 購自康谷公司.

實驗方法

一. 中藥單離成份與其相關物之製備:

各類中藥單離成份與其相關之粉末在乾燥之室溫下存放, 分析時將粉末以 100 % DMSO 溶解, 存於 -20 度下儘速分析.

二 Topoisomerase I 酵素稀釋溶液之配製:

稀釋溶液內含有 300 mM Potassium Phosphate (pH 7.5), 5mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.2 mg/ml acetylated BSA, 50 % (v/v) glycerol. 將外購濃度為 10 unit/ul 之 Topoisomerase I 加入 80 ul 之稀釋溶液而使最終濃度為 2

unit/ul.

三 Topoisomerase I 活性分析之方法:

1. 本實驗最主要是根據 K.F. Bastow (Ref 10) 之方法. 取 40.5 ul 之緩衝溶液 (50 mM Tris, pH7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA). 加入 2 ul (0.125 ug/ul) 之 pBR322, 0.5 ul 之中藥單離成份 (溶於 100 % DMSO 中). 最後加入 1.5 ul (2 unit/ul) Topoisomerase I, 在 37 度下反應 30 分鐘.

2. 加入 5 ul 11 % SDS (溶於 50 mM Tris-HCl, pH7.5) 停止反應, 並隨即加入 2.5 ul Proteinase K (25 mg 溶於 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 20 % (v/v) glycerol 之中), 並在 37 度下反應 30 分鐘.

3. 跑不含 EtBr 之 1 % agarose gel, 電壓 100 V, 跑完後, 再以含 EtBr 之水溶液染色之.

4. 選用拍立得 665 之底片, 快門: B, 光圈: 4.5, 時間: 2 分鐘, 並將底片浸於 40 g/500ml 之亞硫酸鈉水溶液中, 除去藥劑, 烘乾, 並以 densitometer 定性及定量之.

5. 中藥單離成分抑制活性之方法:

酵素殘存活性: 100 % - (S-A) %

S: 為實驗組在 agarose gel 上 supercoil form 所佔之百分比比例.

A: 為對照組在 agarose gel 上 relaxed form 所佔之百分比比例.

抑制能力以 IC₅₀ (50 % inhibitory concentration) 表示.

6. 山茶科中單離抑制 topoisomerase I 成分:

取樣品 6 公斤, 於室溫下以 70 % 丙酮萃取七次, 將萃取液減壓濃縮後, 經由 celite-545 管柱處理以去除臘及油脂等一些雜質, 並以丙酮沖提得到酚類混合物; 經過濃縮, 取丙酮可溶部份通入 sephadex LH-20 管柱, 並以乙醇沖提得到三種餾出物: 分別標識為 1, 2, 3; 第 1 種餾出物經

由sephadex LH-20管柱和80 %甲醇水溶液沖提處理後, 再進一步經過MCI-gel CMP-20P管柱及30 %甲醇沖提得到(-)-Epicatechin; 第2種餾出物經由sephadex LH-20管柱和甲醇沖提得到(-)-epicatechin-3-O-gallate; 第3種餾出物先經由MCI-gel CHP-20P管柱以30 %甲醇水溶液沖提, 再經由sephadex LH-20以乙醇沖提後得到(-)-epigallocatechin及(-)-epigallocatechin-3-O-gallate. 所有的化合物都經過物理和光譜分析證實其化學結構, 其結構示見附錄2.

7. 忍冬科單離抑制topoisomerase I成分:

本實驗所用之忍冬科單離成分, 係由台北醫學院藥學所提供. 其分離步驟及方法如Ref 12: 自台北市中藥店市售購買忍冬(*Lonicera japonica* Thunb., 或稱金銀花)花蕾6公斤, 先以n-Hexane浸泡脫脂, 除去n-hexane浸泡後所殘留之藥材, 於室溫下以甲醇萃取, 將萃取液於40度下減壓濃縮後, 經由celite管柱處理, 依序以丙酮, 甲醇沖提, 並分別予以減壓濃縮, 得丙酮可溶及甲醇可溶兩部份(圖三A).

經分割所得之丙酮部份, 先以sephadex LH-20管柱, 溶媒為水-甲醇層析分離, 得到A1, A2, A3三部份, 再分別利用MCI gel 及ODS管柱及不同比例之甲醇-水層析分離, 從A1分離得到LJ-1(protocatechuic acid), A2得到LJ-4(methyl chlorogenate), A3得到LJ-3(chlorogenic acid), LJ-9(luteolin), LJ-10(rutin), LJ-11(4,5-di-O-caffeoylquinic acid); 在丙酮部份, 共分離得到LJ-1, LJ-2, LJ-3, LJ-9, LJ-10, LJ-11等六種成份(圖三B). 而甲醇部份, 亦經sephadex LH-20管柱及甲醇-水溶媒層析分離而得M1, M2兩部份; M1經由MCI gel及sephadex LH-20管柱, 以60 %甲醇和乙醇為溶媒, 層析分離得到LJ-5(3,5-di-O-caffeoylquinic acid), 及LJ-6(methyl 3,5-di-O-caffeoylquinic acid); M2則經過ODS管柱及甲醇-水為溶媒, 層析分離得到LJ-2(methyl caffeate), LJ-7(3,4-di-O-caffeoylquinic

acid), LJ-8(methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic acid); 在甲醇部份, 共分離得到LJ-2, LJ-5, LJ-6, LJ-7, LJ-8共五種成份(圖三B)。

從金銀花花蕾中甲醇萃取物分離所得之十一種化合物, 可歸類成三類: phenolic acid(LJ-1, LJ-2), flavonoid(LJ-9, LJ-10), caffeoylquinic acid(LJ-3, LJ-8, LJ-11); 以caffeoylquinic acid及flavonoid類化合物產率較高, 忍冬花主要成份。從此甲醇萃取物分離所得之產率較高之化合物中, 選取caffeoylquinic acid及flavonoid類(LJ-4除外)來作抗反轉錄酵素活性分析。所有的化合物都經過物理和光譜分析證實其化學結構, 其結構式示見附錄3。

8. 壺斗科單離抑制topoisomerase I成份:

本實驗所用之火燒栲(*castanopsis hystrix*, 或稱栲樹)單離成份, 係由台北醫學院藥學研究所提供。其分離步驟及方法如Ref 13-16: 從台灣林務局埔里森林實驗站中取得新鮮栲樹葉子10.5公斤, 在室溫下用80 % 丙酮萃取, 隨後將萃取液減壓濃縮後, 經由sephadex LH-20管柱處理, 以甲醇-水為溶媒, 層析分離得到六部份; 將第1部份通入MCI gel管柱以水-甲醇作溶媒得到4-O-galloyl-(-)-shikimic acid和5-O-galloyl-(-)-shikimic acid; 第2部份分別通入MCI gel管柱以水-甲醇作溶媒, cosmosil 140 C18管柱以水-甲醇作溶媒及toyopearl HW-40以水-甲醇作溶媒得到5-O-galloylquinic acid, 3-O-galloyl-(-)-shikimic acid, 3,5-di-O-galloylquinic acid; 結構式見附錄4。

9. 番荔枝科單離抑制topoisomerase I成份: (Ref 17,18)

本實驗是取番荔枝科的牛心梨之葉及果實, 其結構見附錄5,6。

10. 罌粟科單離抑制topoisomerase I成份: (Ref 20)

本實驗是取罌粟科的罌粟單離成份, 係由高雄醫學院天然藥物研究所提供, 結構式見附錄6。

11. 大戟科單離抑制topoisomerase I成份：本實驗是取大戟科的錫蘭葉下珠單離成份，係由台大醫學院藥學所提供，其後單離過程見圖5，結構式見附錄7..

實驗結果及討論

1. 山茶科鐵觀音茶中單離成份與其相關成分抑制 Topoisomerase I 活性之分析：

由鐵觀音茶分離出：(-)Epicatechin, (-)Epicatechin-3-O-gallate, (-)Epigallocatechin及(-)Epigallocatechin-3-O-gallate, 其抑制強度與濃度之關係(見圖6), 並可由其中求得其各別之 IC_{50} (見表2), 分別為 1.06 μM , 1.85 μM , 2.5 μM , 3.2 μM , 並和結構對照可知: R2位置保持H之效果要比-OH基要強, 同時在R2官能基相同之情況下, R1上有-OH基之效果要比galloyl基強.

2. 忍冬科金銀花花蕾中單離成份之抑制分析：

濃度和抑制效果(見圖7)可求得其各別之 IC_{50} 值(見表3). 對照其各別之結構可知: 在R1上存有caffeoyl group時, 另一caffeoyl group位於R4之效果要比在R3位置強. 此外, R4上之carboxyl group似乎是另一重要之官能基, 當被甲基所佔據後, 抑制效果將大為下降.

3. 壺斗科火燒考葉中單離成份之抑制活性分析：

抑制曲線及 IC_{50} 值(見圖8及表4), 結果發現: (1)以shikimic acid為本體之效果要遠優於同數目取代基而以quinic acid為主體結構者. (2)在相同主體結構之情況下, 取代基數目愈多, 則抑制效果愈佳. (3)在相同數目取代基之情況下, galloyl group在R1上有較佳之抑制效果.

4. 番荔枝科牛心梨葉中之單離成份抑制分析：

抑制曲線及 IC_{50} 值(見圖9,表5),經對照結構後發現: C5上之氧原子及C10上之氧原子被乙烯化對於抑制效果將可大大被提升。

5.番荔枝科牛心梨果實中之8種及大戟科錫蘭葉下珠莖中之6種單離成份,在最高濃度10 ug/ml之情形下,抑制效果均無法達到10 %以上(見表6)。

Reference

- 1.Cozzarelli N.R.(1980) Science 207, 953-960.
- 2.Gellert.M.(1981)Annu. Rev. Biochem.50, 879-910.
- 3.Wang,J.C.(1985) Annu. Rev.Biochem.54 665-679.
- 4.Liu,L.F.(1983) CRC Rev. Biochem.15, 1-24
- 5.Chen.G.L. and Liu.L.F.(1986) Ann. Rep. Med. Chem. 21, 257-262.
- 6.Bodley,A.L.andLiu,L.F.(1988) Biotechnology 6, 1315-1319.
- 7.Rose,K.M.(1988) FASEB J. 2, 2474-2478.
- 8.Hancock,R andpepin,N.(1989)Pharmacology &Therapecutics 30, 1134-1139
- 9.Liu,L.F.(1989) Annu. Rev. Biochem. 58, 351-375.
- 10.K.F.Bastow and I.D.Bori.(1992) Planta Med. 59 240-245.
- 11.Nonaka G.I. and Nishiosk I.(1983) Chem.Pharm.Bull. 31, 3906-3914.
- 12.Chang,W.(1990)Studies on the phenolic compounds from Lonicera japonica School of Medicine Taipei Medical college.
- 13.Nishimura,H. and Nishioka I.(1984) Phytochemistry 23, 2621-2623.
- 14.Nonaka,G and Nihioaka I.(1985) Chem. Pharm. Bull. 33, 96-101.
- 15.Ishimaru,K Phytochemistry(1987) 26, 1501-1504.

16. Iisuka, H. (1989) Master of thesis, Kyushu Univ, Japan.
17. Chang, F.R. and Wang, S.K. (1993) J. Nat. Prod. 56, 1688-1694.
18. Wu, Y.U. and Chang, F.R. (1992) Heterocycle 34, 667-673.
19. Chang K.G. (1993) Nucleic Acids Res. 14, 1719-1726
20. Mistudy, H. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7096-7100.

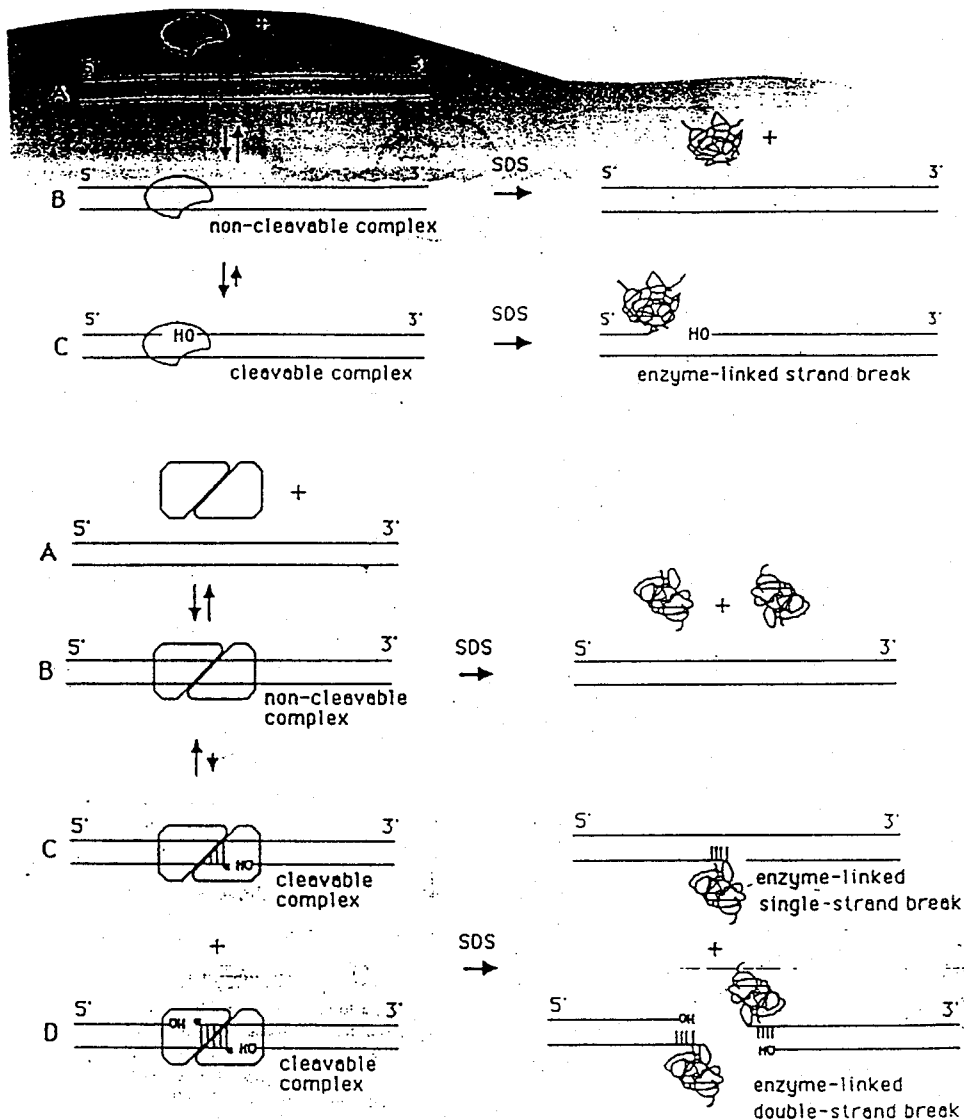


Fig. 1. Models for the initial steps in the strand-passing reactions of eukaryotic topoisomerases I and II and for the formation of enzyme-linked strand breaks (adapted from Ref. 62). Top: Topoisomerase I. (A) Topoisomerase I and substrate DNA. (B) Enzyme bound to DNA in noncleavable complex. (C) Enzyme bound to DNA in the cleavable complex. Treatment of the cleavable complex with SDS or alkali can result in single strand-break in which the 3' end of the broken DNA strand is linked to denatured enzyme. Bottom: Topoisomerase II. (A) Topoisomerase II homodimer and substrate DNA. (B) Enzyme bound to DNA in noncleavable complex. (C and D) Enzyme bound to DNA in the cleavable complex. Treatment of the cleavable complex with SDS or alkali can result in a single- (C) or double-strand break in which each 5' broken DNA strand is linked to denatured enzyme.

Fig 1.The Mechanism of Topoisomerase I & II Binding with Supercoil DNA

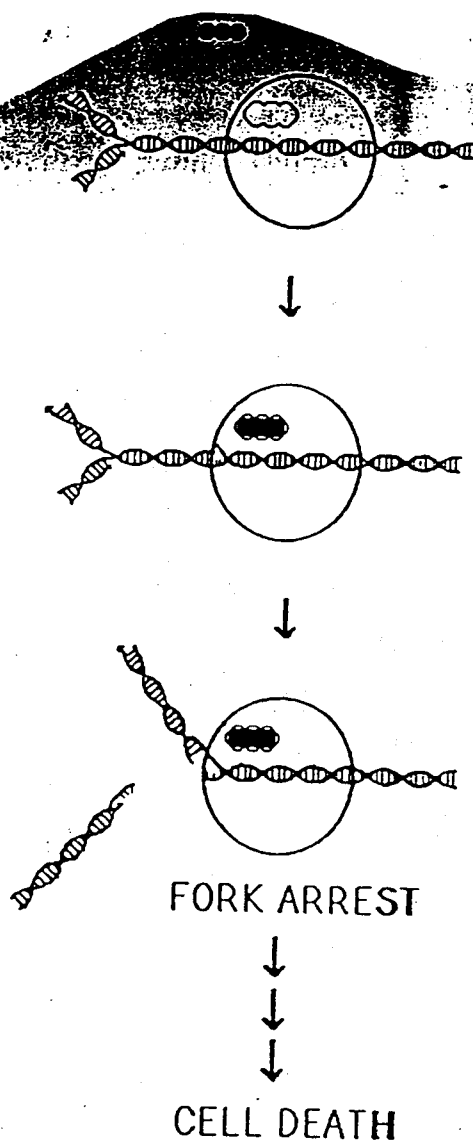


Fig. 2. Schematic diagram of a possible mechanism of camptothecin-induced cytotoxicity. Camptothecin and its binding site on topoisomerase I are represented. The cleavable complex is trapped when camptothecin is bound to the enzyme. Interaction of the trapped cleavable complex with the replication fork results in replication arrest and fork breakage, which lead to cell death.

Fig 2. Schematic Diagram of a Possible Mechanism of Camptothecin-Induced Cytotoxicity.

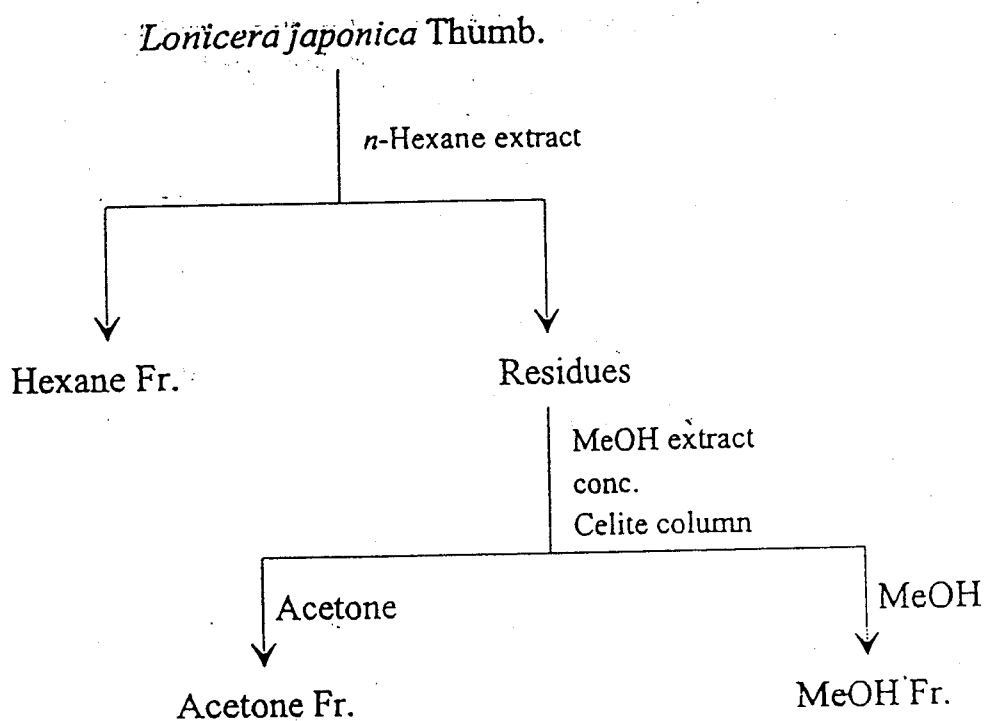


Fig. 3A. Fractionation of the extracts from the flower buds of *Lonicera japonica* Thumb.

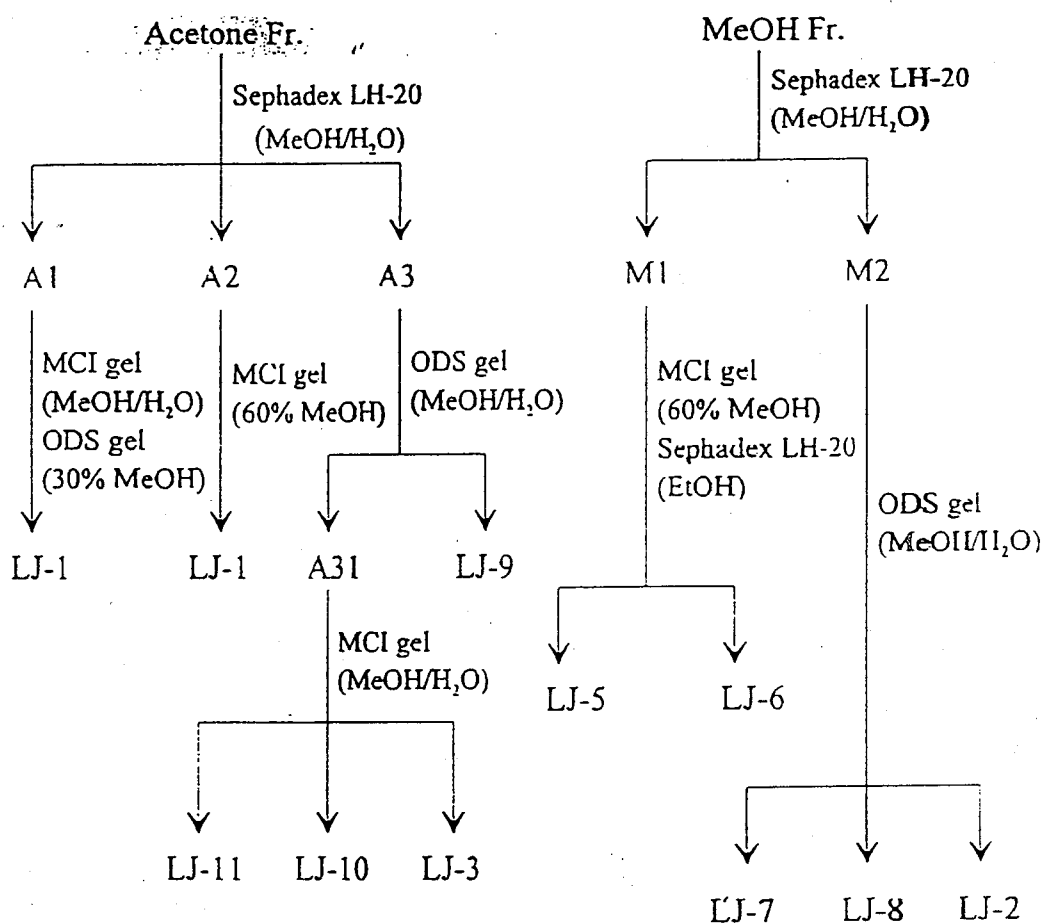


Fig. 7B. Further fractionation of acetone and methanol fractions from Fig. 7A.

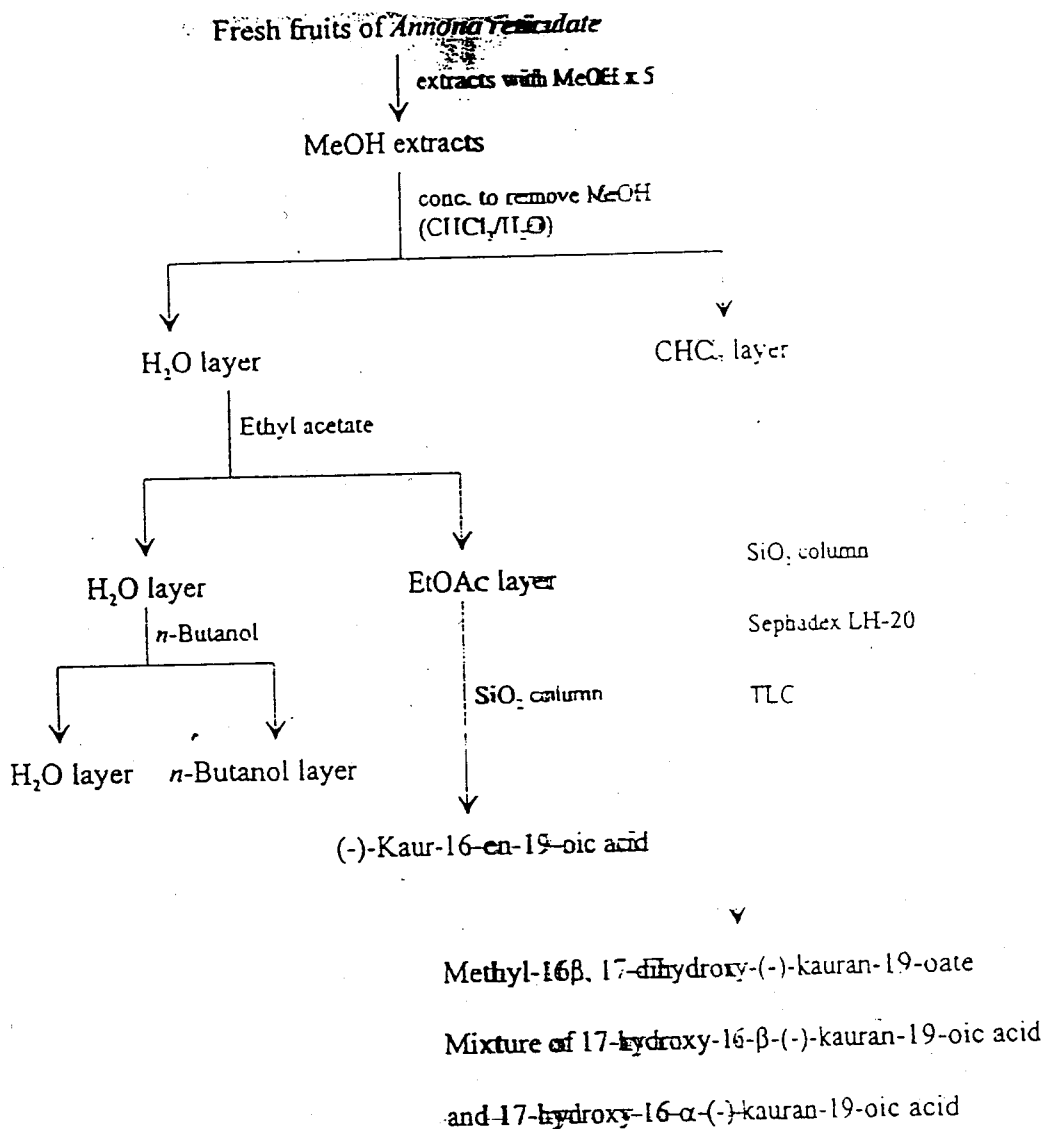


Fig. 4A The flow chart of isolation of kauranes from the fruits of *Annona reticulata*.

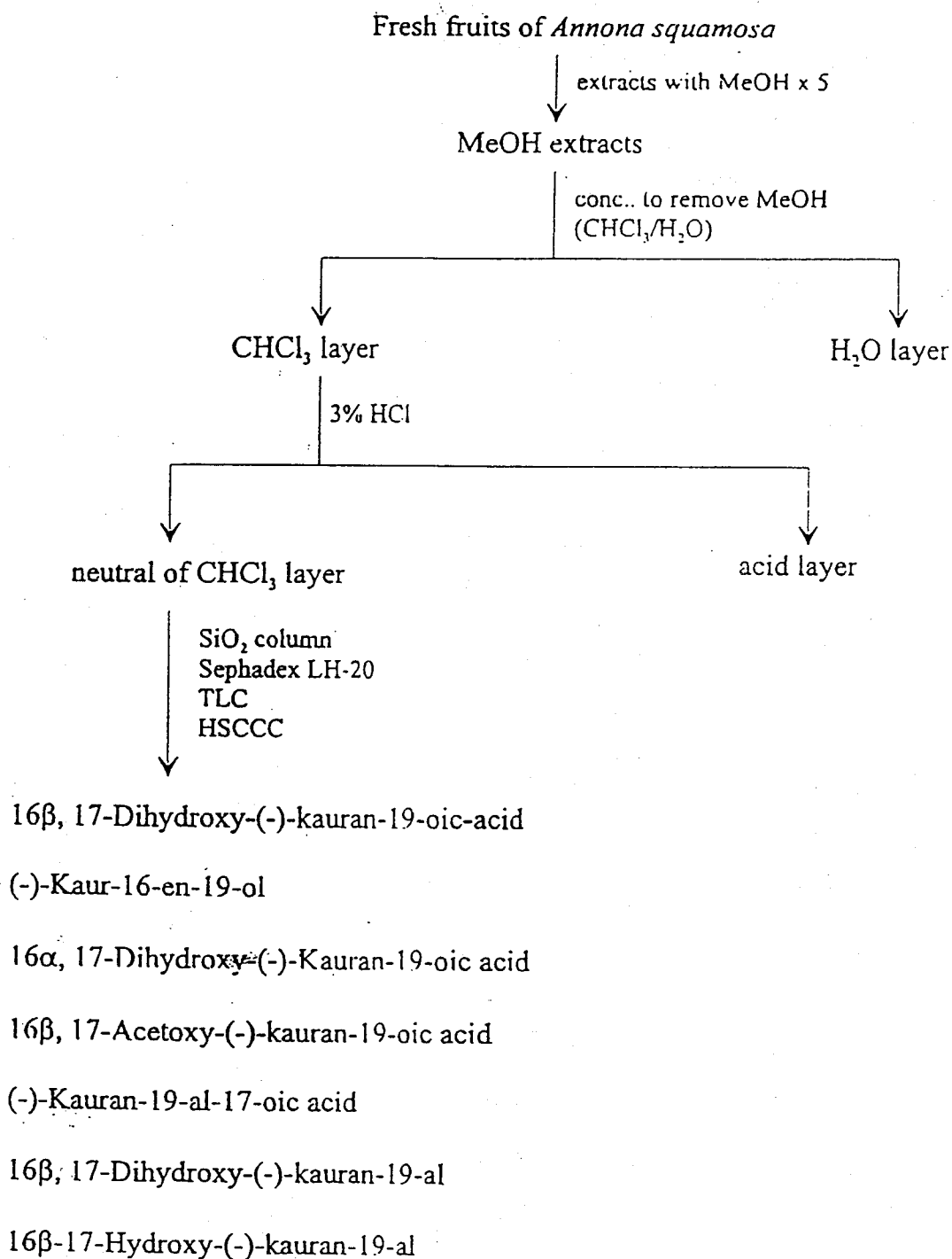


Fig. 4.8 The flow chart of the isolation of kauranes from the fruits of *Annon squamosa*.

Stems and leaves of *Phyllanthus myrtifolius* Moon.

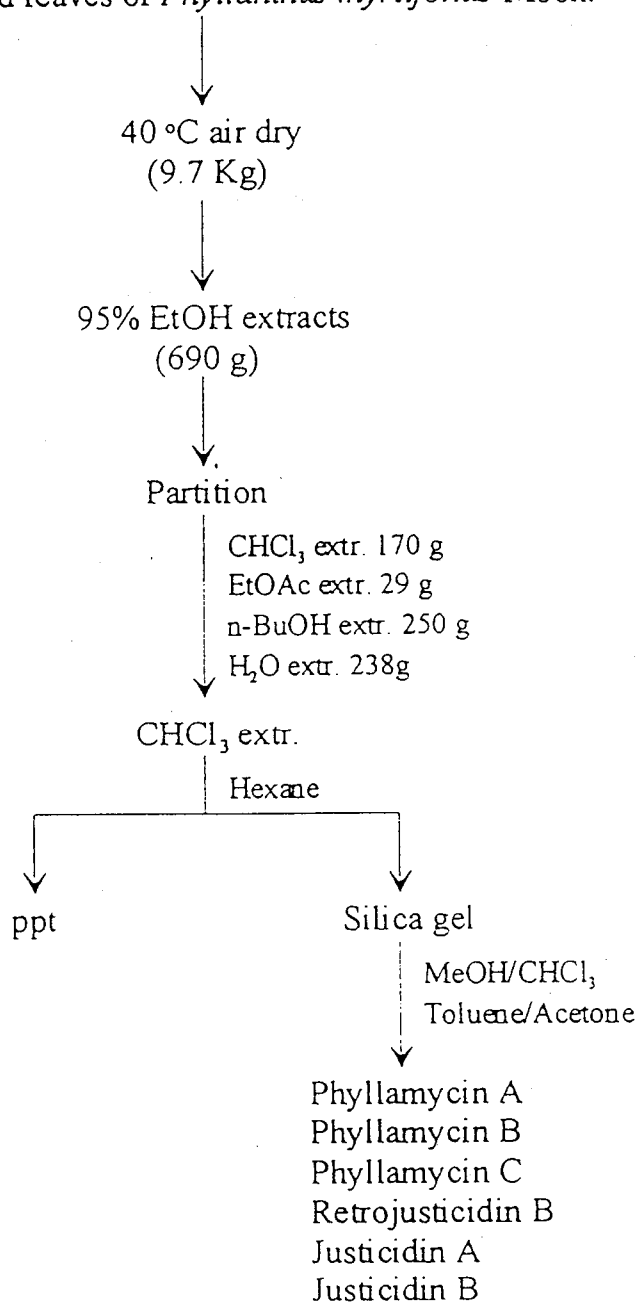


Fig. 5. The flow chart of isolation of lignans from the stems and leaves of *Phyllanthus myrtifolius* Moon.

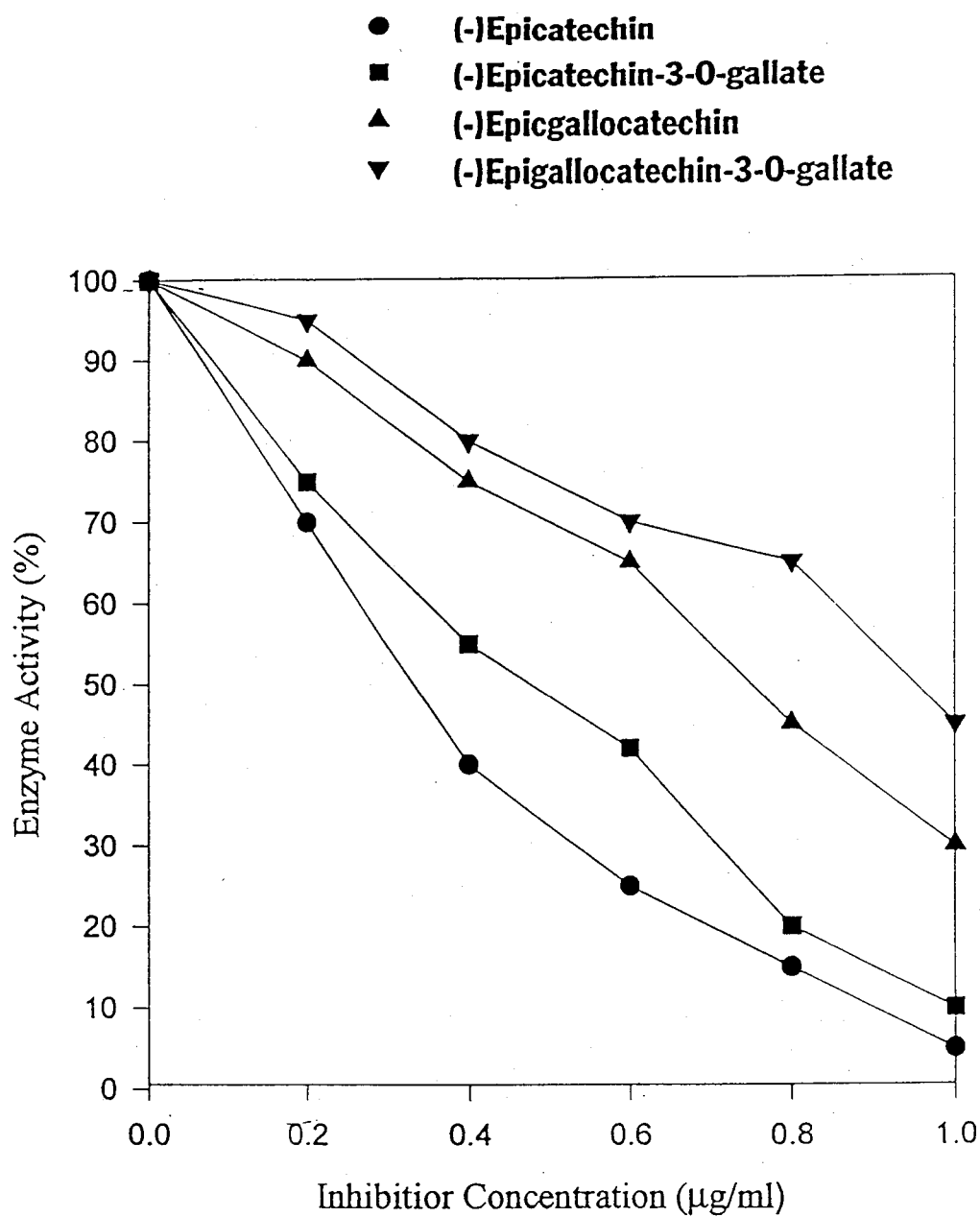


Fig 6. The Inhibitory Effects of Epicatechine and It's Derivatives on Topoisomerase I.

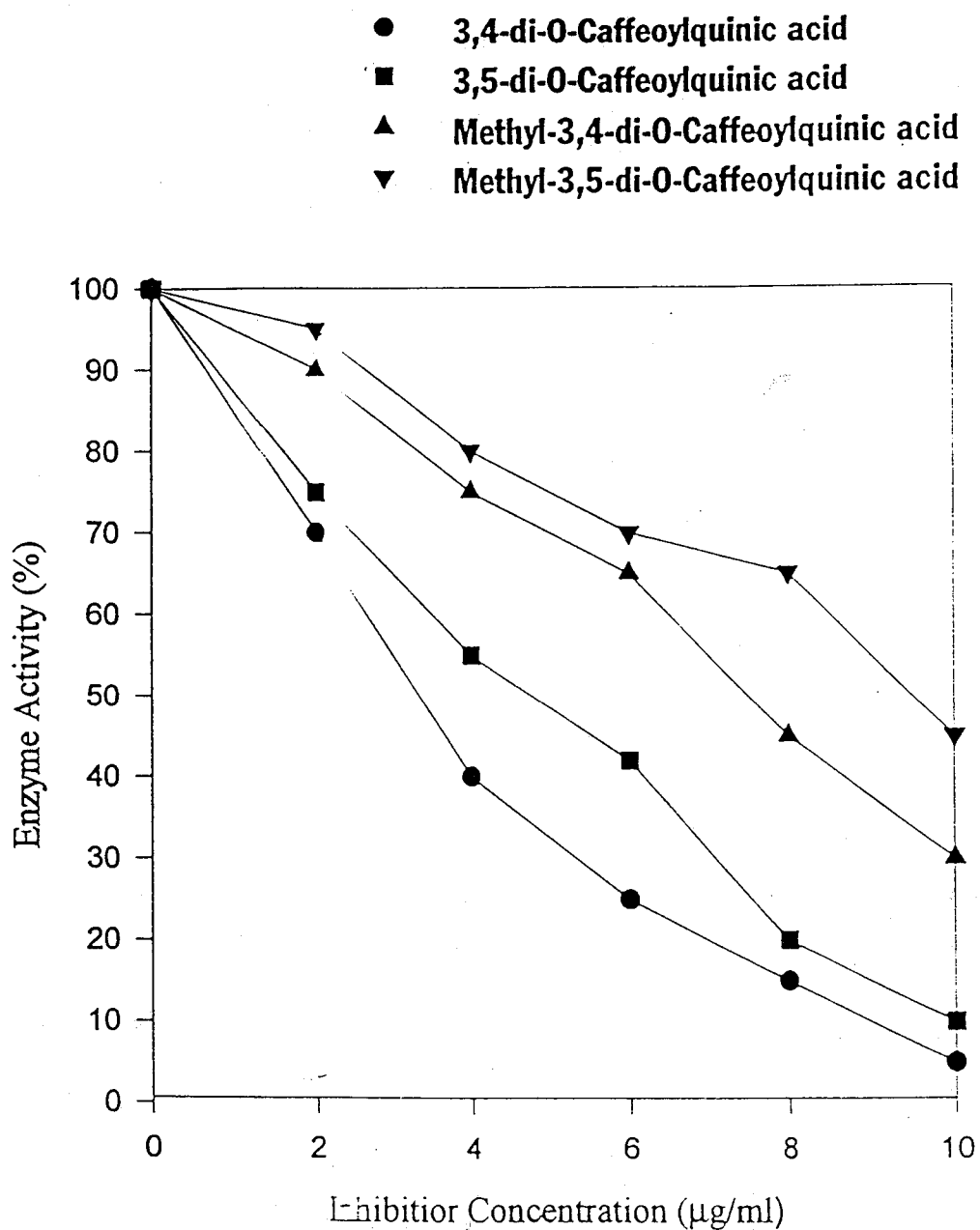


Fig 7. The Inhibitory Effects of Caffeoylquinic Acid and Its Derivatives on Topoisomerase I.

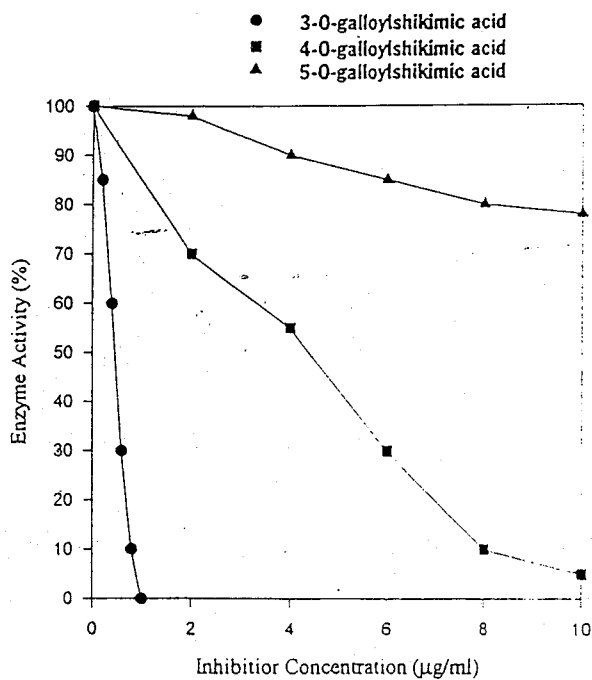
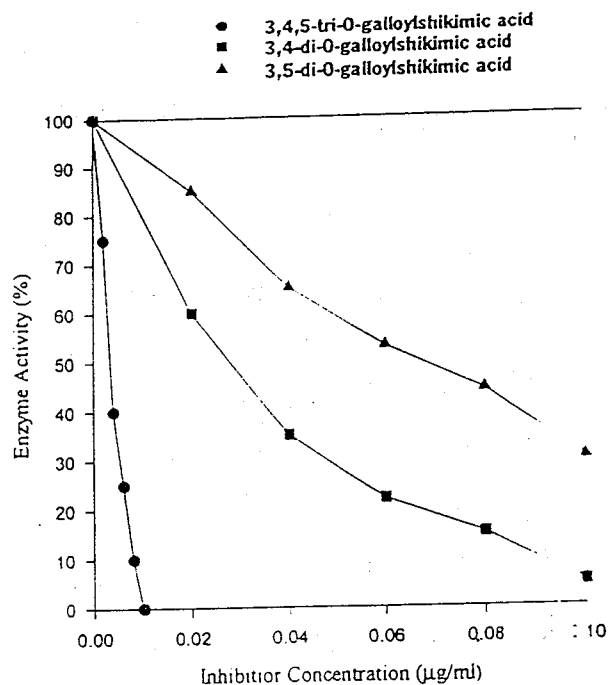
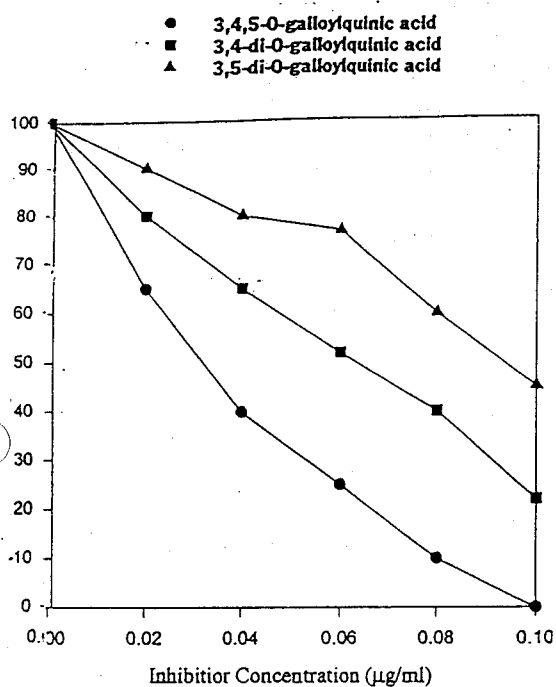


Fig 8. The Inhibitory Effects of Shikimic Acid and Quinic Acid on Topoisomerase I.

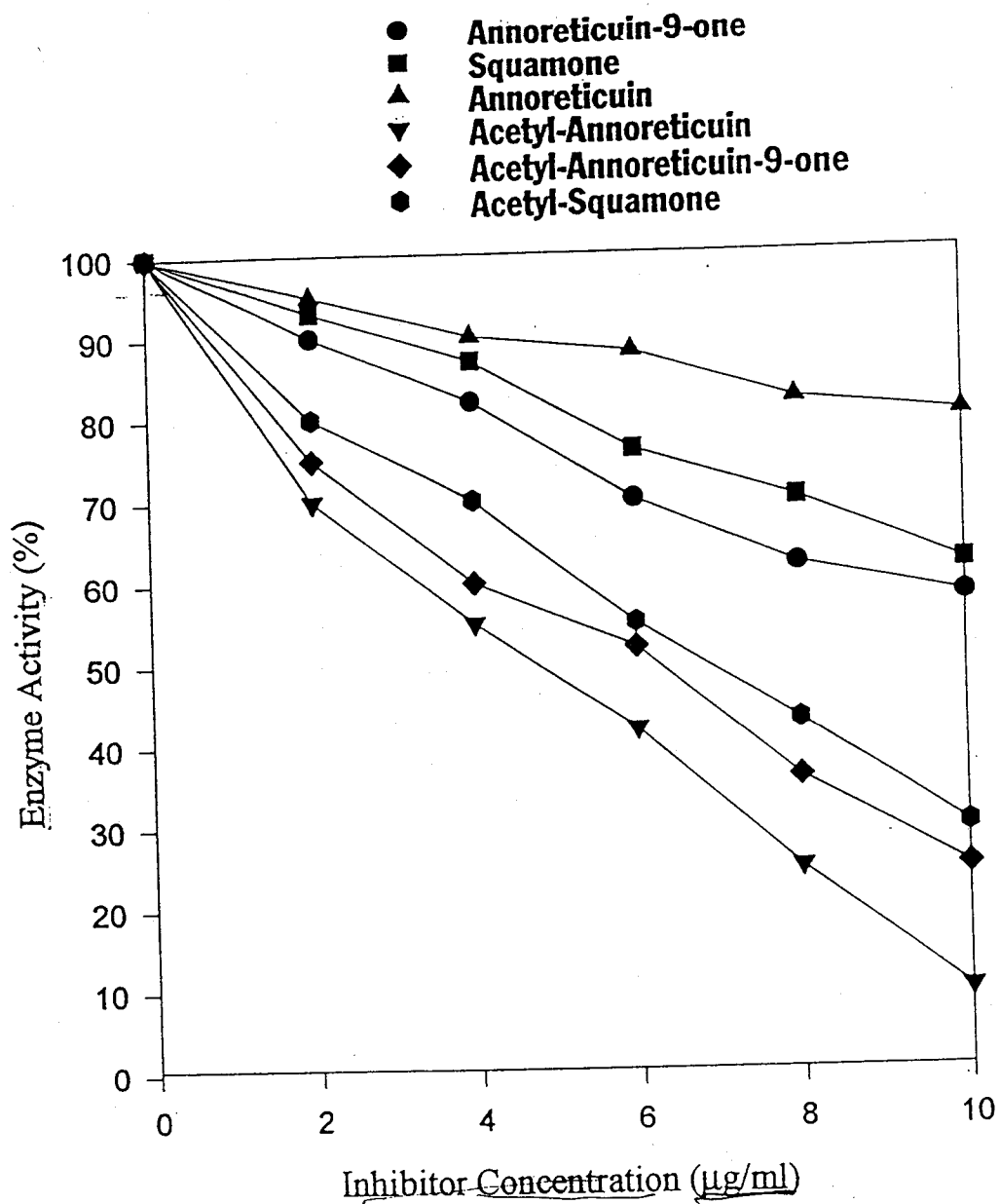


Fig 9. The Inhibitory Effects of Squamone and It's Derivatives on Topoisomerase I.

Table I
DNA topoisomerases of various sources

Characteristics	Prokaryotic		Eukaryotic	
	Topo I	Topo II (gyrase)	Topo I	Topo II
Mr (kdt)	100	gyaA 105 gyaB 95	110	170
Composite	monomer	tetramer	monomer	dimer
Mg ²⁺	required	required	activated	required
K ⁺	required	required	required	required
Na ⁺ to substitute K ⁺	yes	no	yes	yes
spermidine	not needed	required	not needed	not needed
ATP	not needed	required for negative supercoiling	not needed	required
Inhibitor		gyaA: nalidixic acid oxolinic acid gyaB: novobiocin coumermycin A1	camptothecin	mAMSA VM26 VP16 WA red-120
direction of supercoiling	- to 0	- to 0 (ATP-) 0 to - (ATP+)	- to 0 + to 0	- to 0 + to 0
linkage to DNA	3' OH tyr-5'p	3' OH tyr-5'p	5' OH tyr-3'p	3' OH tyr-5'p

Compound	IC ₅₀ (μ M)
(-)-Epicatechin	1.06
(-)-Epicatechin-3-O-gallate	1.85
(-)-Epigallocatechin	2.5
(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate	3.2

Table 2. The IC₅₀ of (-)-Epicatechin and Its Derivatives .

Compound	IC ₅₀ (μ M)
3,4-di-O-Caffeoylquinic acid	5.88
3,5-di-O-Caffeoylquinic acid	8.85
Methyl-3,4-di-O-Caffeoylquinic acid	8.90
Methyl-3,5-di-O-Caffeoylquinic acid	15.4

Table 3. The IC₅₀ of 3,4-di-O-Caffeoylquinic Acid.

Compound	IC ₅₀ (μ M)
3-O-galloylshikimic acid	1.25
4-O-galloylshikimic acid	4.25
5-O-galloylshikimic acid	>10
3,4-di-O-galloylshikimic acid	0.058
3,5-di-O-galloylshikimic acid	0.13
3,4,5-tri-O-galloylshikimic acid	0.015

Compound	IC ₅₀ (μ M)
3-O-galloylquinic acid	>10
5-O-galloylquinic acid	>10
3,4-di-O-galloylquinic acid	0.128
3,5-di-O-galloylquinic acid	0.254
3,4,5-tri-O-galloylquinic acid	0.053

Table 4. The IC₅₀ of Shikimic Acid and It's Derivatives.

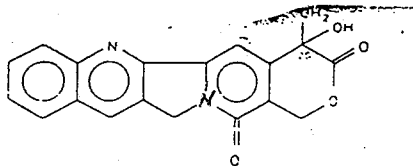
Compound	IC ₅₀ (μ M)
Annoreticuin-9-one	>10
Squamone	>10
Annoreticuin	>10
Acetyl-Annoreticuin	6.31
Acetyl-Annoreticuin-9-one	8.10
Acetyl-Squamone	9.20

Table 5. The IC₅₀ of Squamone and it's Derivatives.

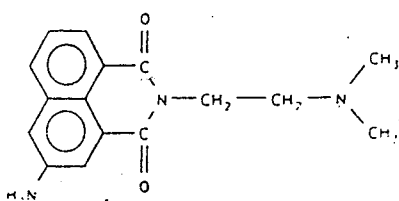
Compound	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Inibition (%)
Methyl-16 β ,17-Diacetoxy-(-)-Kauran-19-oate	10	<10
(-)-Kaur-16-en-19-oic acid	10	30
Methyl-16 β ,17-Dihydroxy-(-)-Kauran-19-oate	10	<10
Methyl-16 β -Hydroxy-17-Acetoxy-(-)-Kauran-19-oate	10	<10
Methyl-(-)-Kaur-16-en-19-oate	10	<10

Compound	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)
Phyllamycin A	10	<10
Phyllamycin B	10	<10
Phyllamycin	10	<10
Retrojusticidin B	10	<10
Justicidin A	10	<10
Justicidin B	10	<10

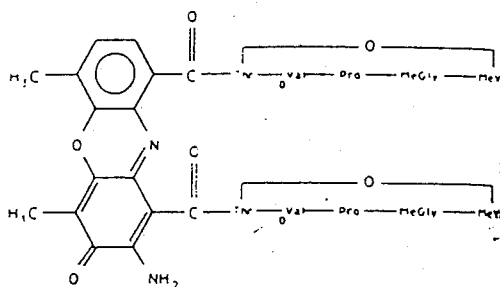
Table 6. The Inhibitory Effects of Kauran and Phyllamycine on Topoisomerase I.



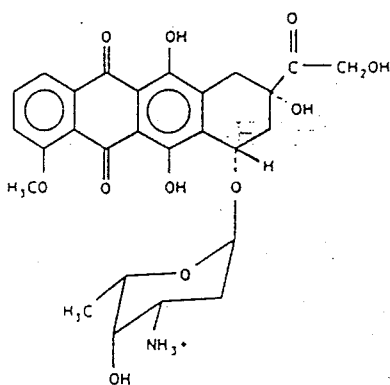
Camptothecin



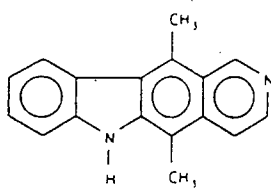
Amonafide



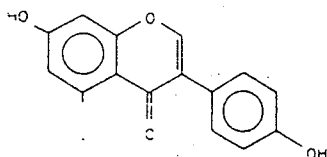
Actinomycin D



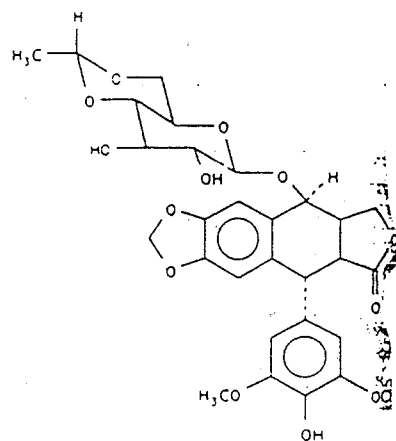
Adriamycin



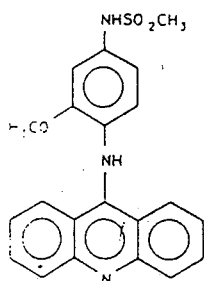
Ellipticine



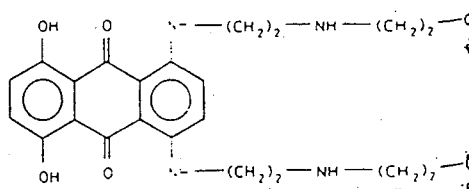
Genistein



Etoposide

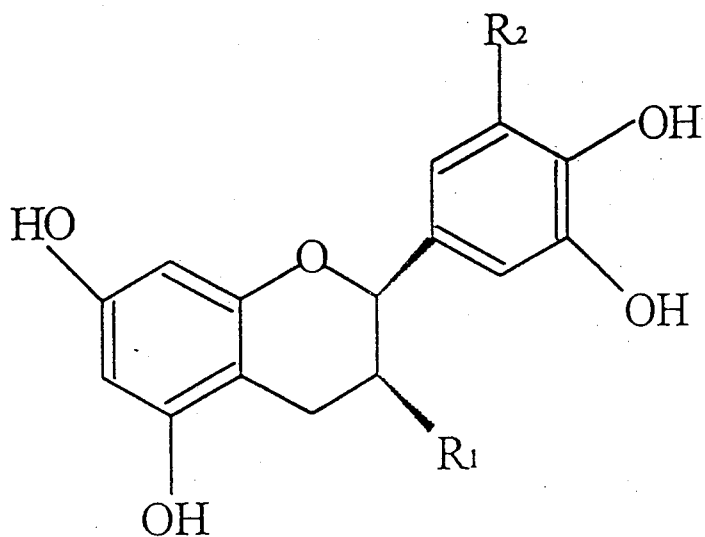


m-AMSA



Mitoxantrone

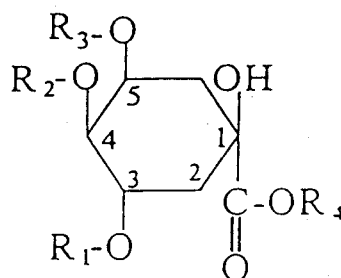
Appendix 1. The Structures Of Antitumor Drugs



	R ₁	R ₂
(-)-Epicatechin OH	H
(-)-Epigallocatechin OH	OH
(-)-Epicatechin-3-O-gallate O-galloyl	H
(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate O-galloyl	O

Appendix. 2 Structure formulae of isolated polyphenolic compounds from *Camellia sinensis*.

Caffeoylquininate



Monocaffeoylquininate

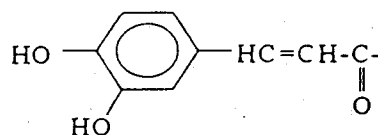
Chlorogenic acid

R_1	R_2	R_3	R_4
Caf	H	H	H

Dicaffeoylquininate

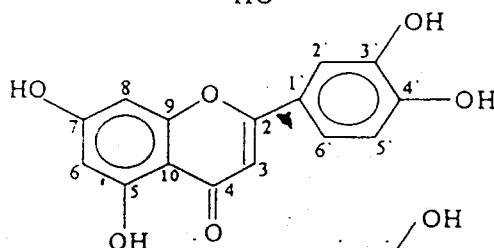
3,4-di-O-caffeoylquinic acid	Caf	Caf	H	H
3,5-di-O-caffeoylquinic acid	Caf	H	Caf	H
4,5-di-O-caffeoylquinic acid	H	Caf	Caf	H
Methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic acid	Caf	Caf	H	CH ₃
Methyl 3,5-di-O-caffeoylquinic acid	Caf	H	Caf	CH ₃

Caf: Caffeoyl group

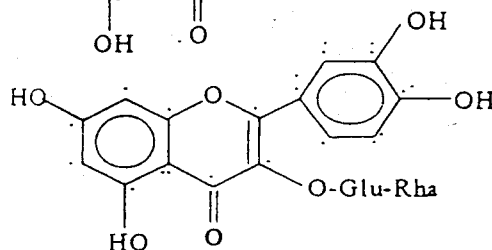


Flavonoid

Luteolin

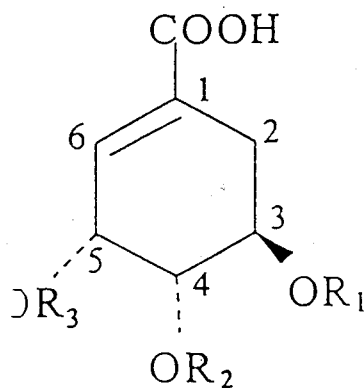


Rutin

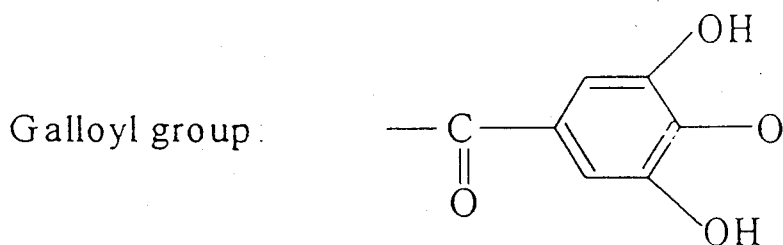


Appendix. 3 Structure formulae of isolated phenolic compounds from flowers of *Lonicera japonica* Thunb.

Galloylshikimic acid



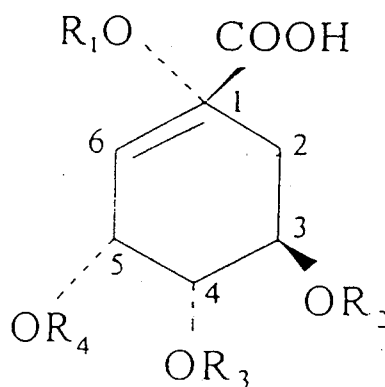
	R1	R2	R3
3-O-galloylshikimic acid	G	H	H
4-O-galloylshikimic acid	H	G	H
5-O-galloylshikimic acid	H	H	G
3,4-di-O-galloylshikimic acid	G	G	H
3,5-di-O-galloylshikimic acid	G	H	G
3,4,5-tri-O-galloylshikimic acid	G	G	G



Appendix. 4 Structure formulae of isolated phenolic compounds from leaves of *Castanopsis hystrix*.

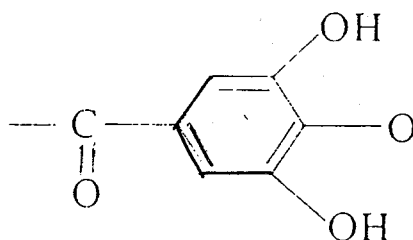
(continued Appendix. 4)

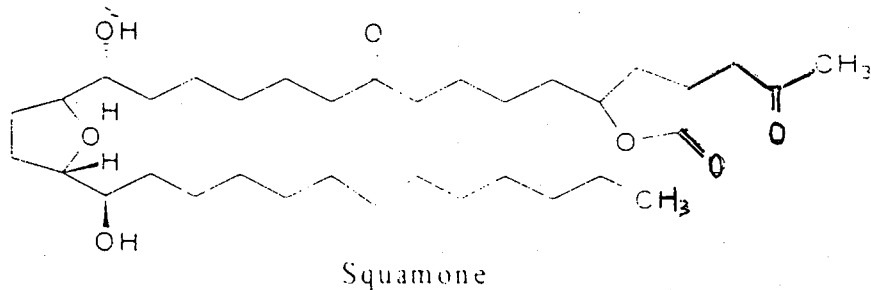
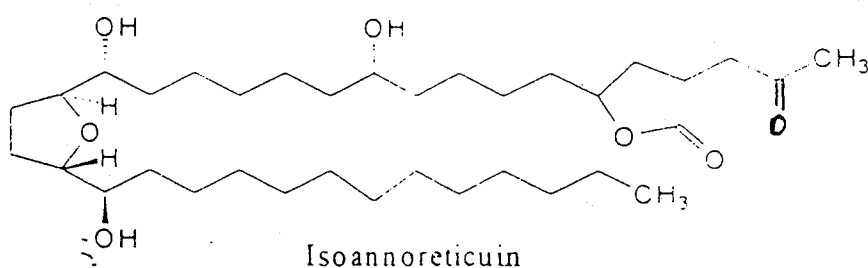
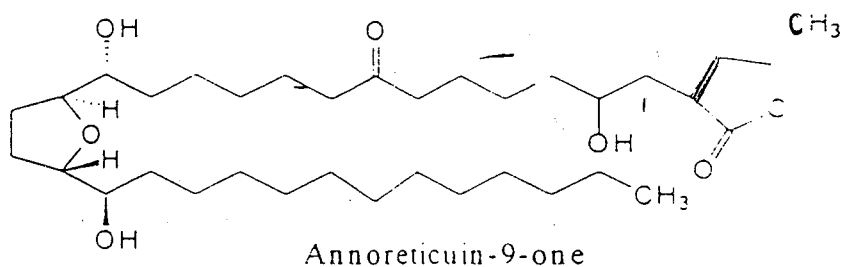
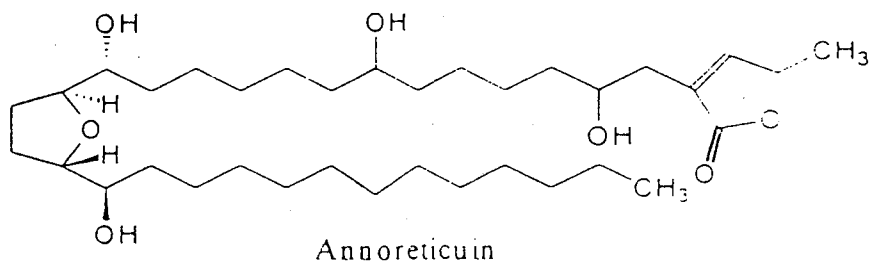
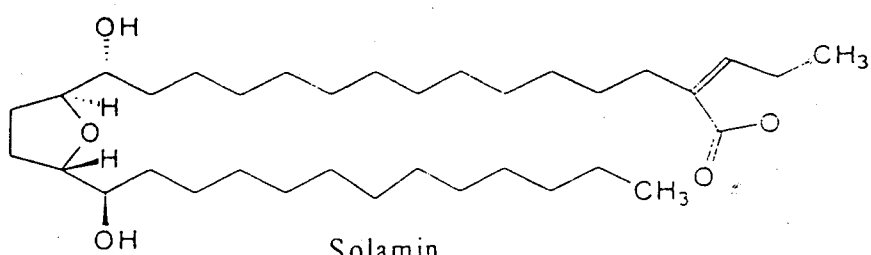
Galloylquinic acid



	R1	R2	R3	R4
3-O-galloylquinic acid	H	G	H	H
5-O-galloylquinic acid	H	H	G	H
3,4-di-O-galloylquinic acid	H	G	G	H
3,5-di-O-galloylquinic acid	H	G	H	G
3,4,5-tri-O-galloylquinic acid	H	G	G	G

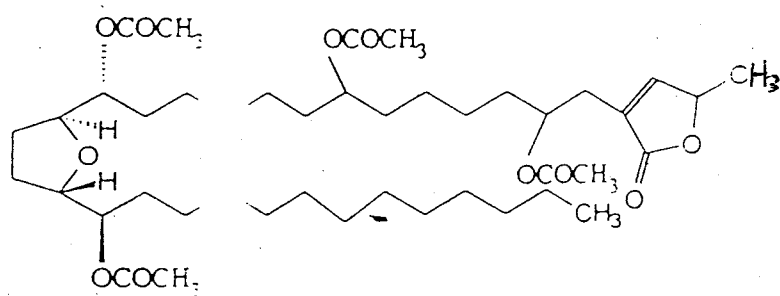
Galloyl group:



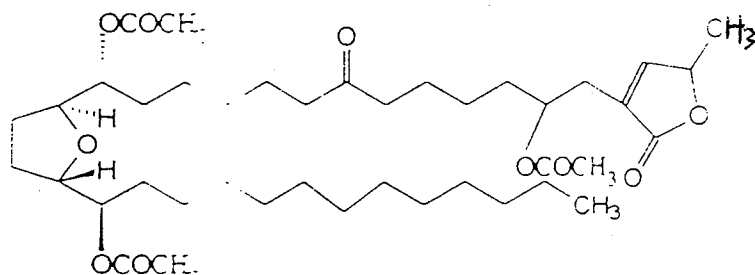


Appendix. Structure formulae of isolated polyketides from leaves of *Annona reticulata*.

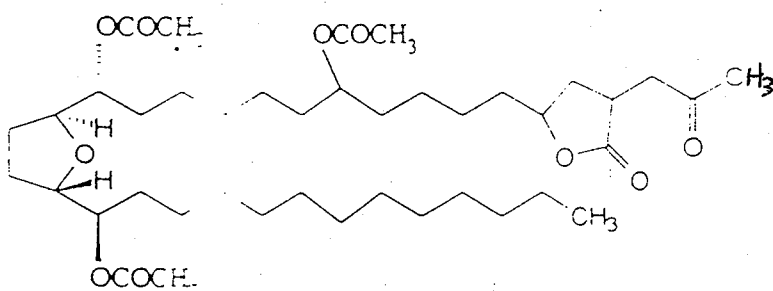
(continued Appendix 5)



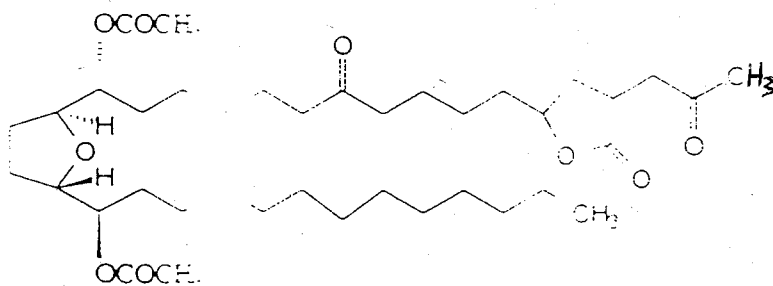
Acetylation of Anoreticuin



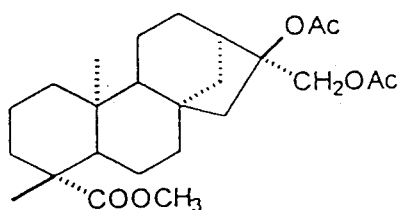
Acetylation of Anoreticuin-9-one



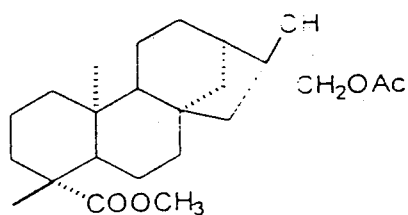
Acetylation of Isoanoreticuin



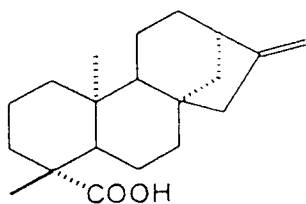
Acetylation of Squamone



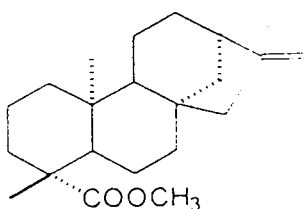
Methyl-16 β ,17-Diacetoxy
(-)-Kauran-19-oate



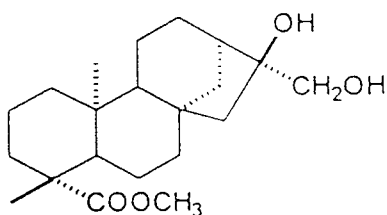
Methyl-16 β -Hydroxy
17-Acetoxy-(-)-Kauran-19-oate



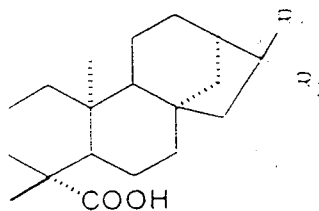
(-)-Kaur-16-en-19-oic acid



Methyl-(-)-Kaur-16-en-19-oate



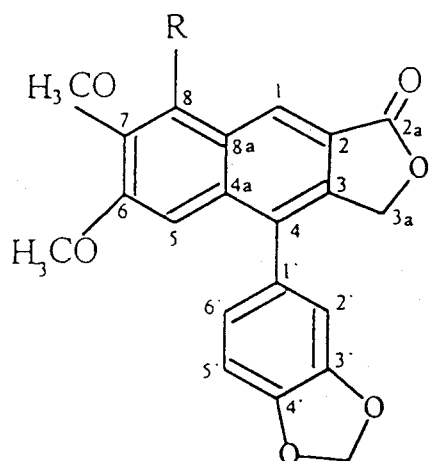
Methyl-16 β ,17-Dihydroxy
(-)-Kauran-19-oate



R ₁	R ₂
H	CH ₂ OH
CH ₂ OH	H

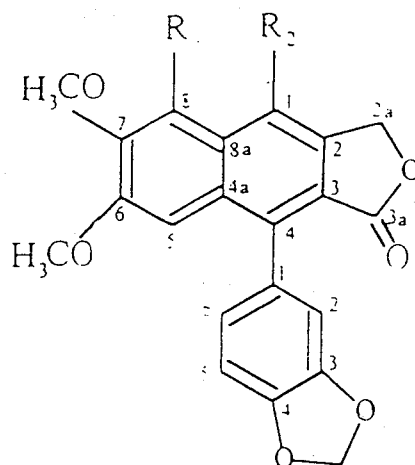
Mixture of 16 β ,17-Hydroxy-(-)
-Kauran-19-oic acid and 16 α ,17-Hydroxy-(-)-Kauran-19-oic acid

Appendix. *b* Structure formulae of isolated kauranes from fruits of *Annona reticulata*.



1. $R = OCH_3$

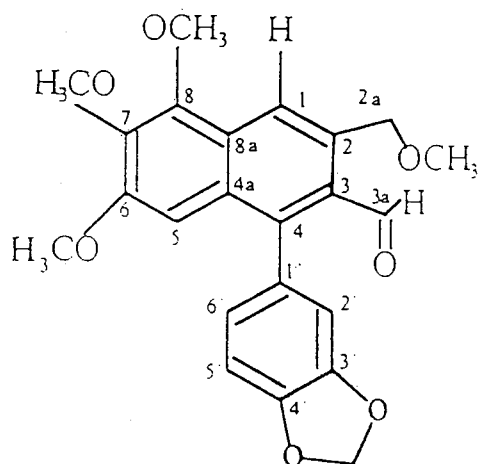
4. $R = H$



3. $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

5. $R_1 = H, R_2 = OCH_3$

6. $R_1 = H, R_2 = H$



2

- 1. Phyllamycin A
- 2. Phyllamycin B
- 3. Phyllamycin C
- 4. Retrojusticidin B
- 5. Justicidin A
- 6. Justicidin B

Appendix. 7. Structure formulae of isolated lignans from roots and stems of *Phyllanthus myrtifolius* Moon.

牛蒡子指標成分之製備

孫昌民

國立中國醫藥研究所

摘 要

本計畫的目的是從生藥牛蒡子中，制備指標成分 Arctiin 和 Arctigenin，以提供衛生署藥檢局使用。本實驗的方法是先以丙酮萃取打碎過的牛蒡子，濃縮後、再除去牛蒡子的油脂層。水層中的指標成分再以氯仿和正丁醇萃取出來。濃縮氯仿及正丁醇萃取液至乾，合併後，置於矽膠柱層層析管柱上，進行分離，可快速得到二粗指標成分。此等指標成分可再以矽膠柱層層析管細分，然後以再結晶的方式，獲得高純度之標準品。每種樣品五公克，繳予衛生署。

Abstract:

The aim of this project is to isolate the components of arctiin and arctigenin from the seed of *Arctium lappa*. These components are used as standards to detect the contents of the extract of the Chinese medicine for the De-

partment of Health, Executive Yuan.

The method was to blend the seeds with water and then the mixtrue was extracted with hot acetone three times. The extract was concentrated to 15 liters and the oil layer was removed by separatory funnel. The aqueous layer was basified and extracted with chloroform. Arctigenin was dissolved in basic aqueous layer due to phenol group. The arctiin was also remained in the aqueous layer due to its high polarity. After the acidification, the aqueous solution was extracted with chloroform and n-butanol. After removal of the extracts, the residue were subjected on Silica gel column chromatography. The two crude products were eluted from the column, which were rechromatographed with the same methods. The above products were further purified by multiple recrystallization. Five grams of each component are submitted to the Government.

前言：

當今國內中藥廠林立，紛紛製造各種的科學中藥、濃縮中藥等藥品，販諸於世。衛生署基於該類藥品安全性之考量，於是加強對於該類藥品的檢定工作，以確認該類藥品標示的成分是否正確，而達到維護國人之健康。

至於目前藥檢局和少數中藥廠的標準品之來源，仍有許多是向國外購買。因為在當前部分標準品之價格懸殊和多數標準品猶

未商品化的情況下，於是擬出本計畫，製備藥檢局所需之標準品，以提供該局使用。

本計畫的目的是製備目前仍未商品化，而且是藥檢局即需的標準品：牛蒡子的指標成分 Arctiin 和 Arctigenin。

材料與方法：

生藥材牛蒡子購於台北市迪化街之中藥房；

果汁機；

矽膠： Silica gel 60 (70-230 mesh), Merck；

TLC： Silica gel 60 F254, Merck；

NMR： Gemini 200；

MS： Finigan Mat TSQ-46C；

HPLC Column： 5C-18 (4.6 x 250 mm), J.T.Baker；

取生藥牛蒡子(30 公斤)、加水用果汁機打碎後，置於大型萃取槽內，以丙酮(100 公升、攝氏 50 度)萃取三次。丙酮萃取液濃縮至 15 公升後，以 10 % 碳酸鈉水溶液鹼化後，將上層的油脂層除去。水層鹼液則以醋酸酸化至 pH 4.0，再分別以氯仿和正丁醇萃取。將氯仿萃取液以無水硫酸鈉乾燥後，以真空鹼壓濃縮機濃縮；正丁醇萃取液濃縮至乾。濃縮後所得到的萃取物合併後、分三次、以拌樣方式置於矽膠層析管柱(100 x 10 cm)上，以 5% 甲醇/氯仿 為流動相，並逐漸增加甲醇的比例至 10%，進行粗分。先行流出層析管柱者為 Arctigenin，稍候流出者為帶有一葡萄糖基的 Arctiin。該二種化合物在 TLC 上、以磷目

酸試劑噴灑加熱時，會呈現出淡黃色，再轉為淺藍色。上述得到的 Arctigenin 和 Arctiin 兩種粗分離物，分別以 30% 丙酮/正己烷和 5% 甲醇/氯仿 為流動相，於矽膠層析管柱 (100 x 5 cm) 上、進行細分。得到的兩種分離物，再分別以多次再結晶的方式，進行純化。

結果：

Arctigenin 在 TLC 上，以 10% 乙酸乙酯/氯仿 或 60% 乙酸以酯/正己烷 展開時，其 $R_f = 0.4$ ；而 Arctiin 以 20% 乙醇/氯仿 展開時，其 $R_f = 0.5$ 。Arctigenin 可從正己烷-乙酸乙酯中結晶出來，為白色塊狀晶体；而 Arctiin 可從甲醇-乙酸乙酯中結晶出來，為白色針狀晶体。各重 5 公克，分別繳予衛生署。

所分得的 Arctigenin 和 Arctiin 之光譜圖和文獻報告的數值相吻合(1, 2)。其 HPLC 的分析條件如下：

樣品 1: Arctiin
管柱: 5C-18 (0.46 x 25 cm)
流動相: 45% 甲醇/水
流速: 0.5 ml/min
紫外線波: 230 nm
滯留時間: 13.60 min

樣品 2: Arctigenin
管柱: 5C-18 (0.46 x 25 cm)

流動相： 45% 甲醇/水

流速： 0.5 ml/min

紫外線波： 230 nm

滯留時間： 38.45 min

參考文獻：

1. Rahman MMA, Dewick PM, Jackson DE, et al: Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* 1990;29:1971-80.
2. Nishibe S, Chiba M, Hisada S: Studies on the Chinese crude drug "*Forsythiae Fructus*." II. *Syoyakugaku Zasshi* 1977;31:131-5.

附錄：

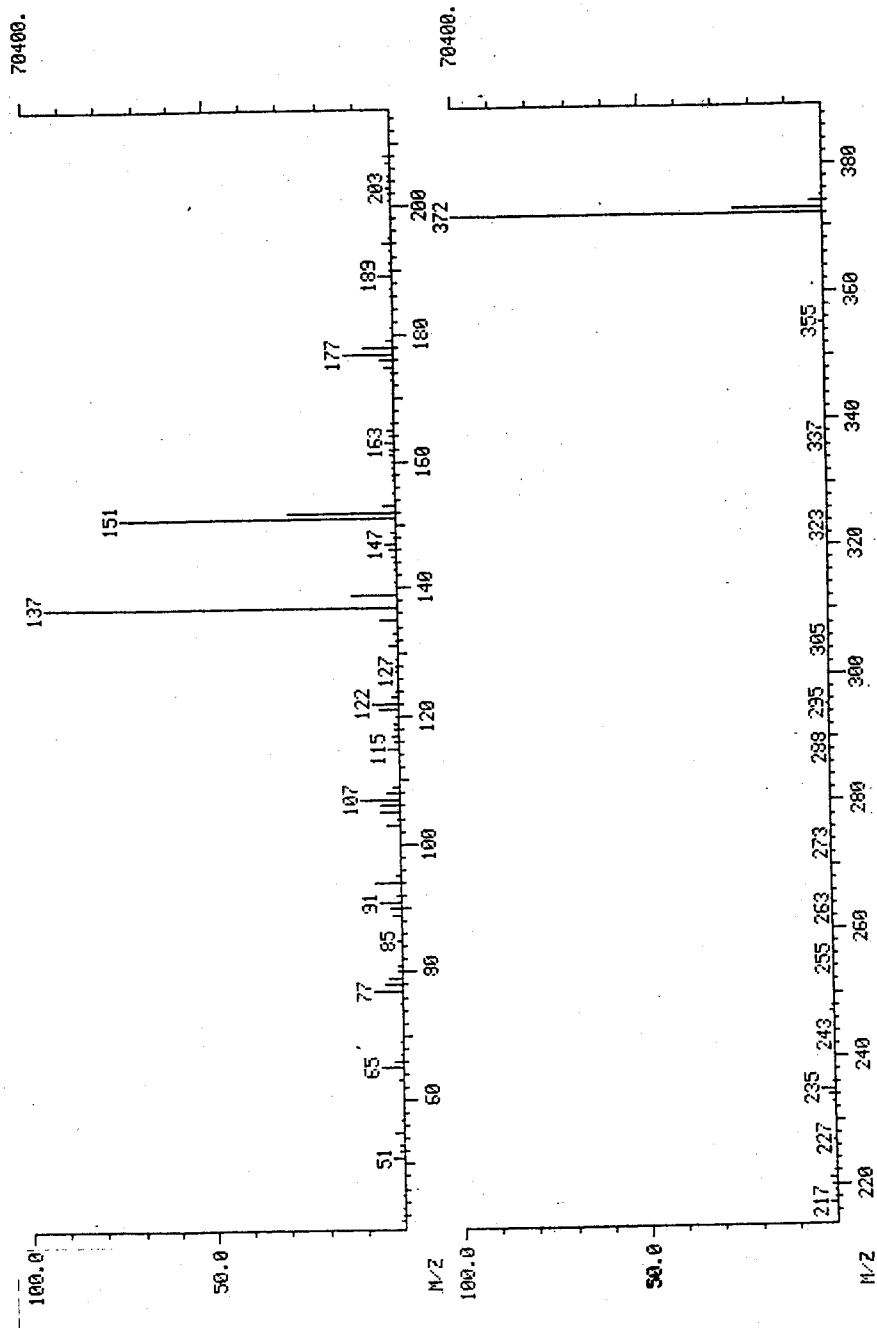
1. Arctigenin 之質譜圖
2. Arctiin 之質譜圖
3. Arctigenin 之氫光譜圖
4. Arctigenin 之碳-13 光譜圖
5. Arctigenin 之 DEPT 光譜圖
6. Arctiin 之氫光譜圖
7. Arctiin 之碳-13 光譜圖
8. Arctiin 之 DEPT 光譜圖
9. Arctigenin 之 HPLC 圖譜
10. Arctiin 之 HPLC 圖譜

MASS SPECTRUM
09/15/94 14:19:00 + 2:07
SAMPLE: YZ-8-A

DATA: 94091509 #127
CALI: 09120001 #1

BASE M/Z: 372

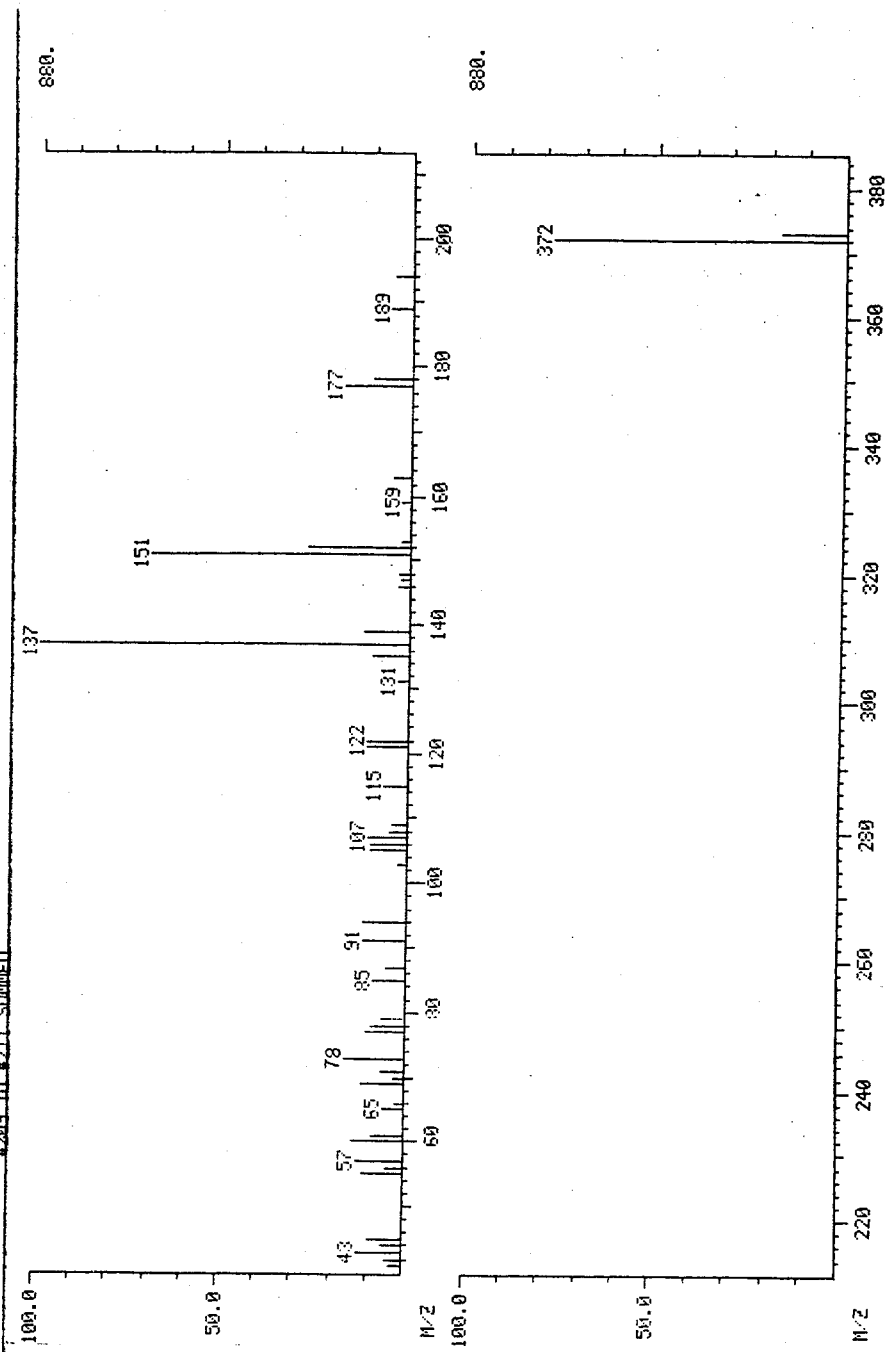
RIC: 389120.



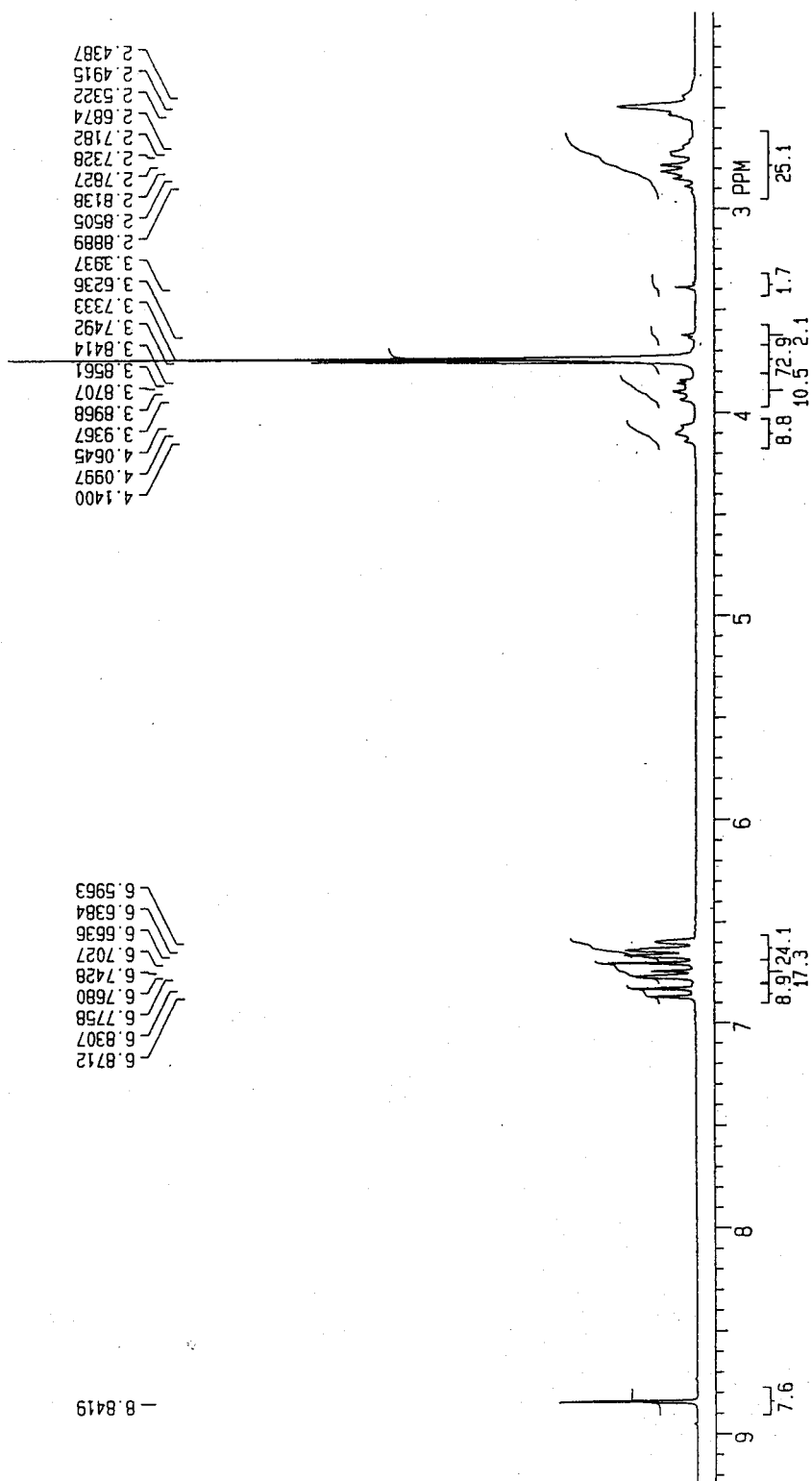
附錄 1. Mass spectrum of arctigenin measured at 70 ev.

MASS SPECTRUM
09/13/94 12:17:00 + 3:30
SAMPLE: Y2-7-C
CONDOS.: +E1-01 MASS SPECTRUM/DIRECT PROBE 70EV
#209 TO #211 SUMMED

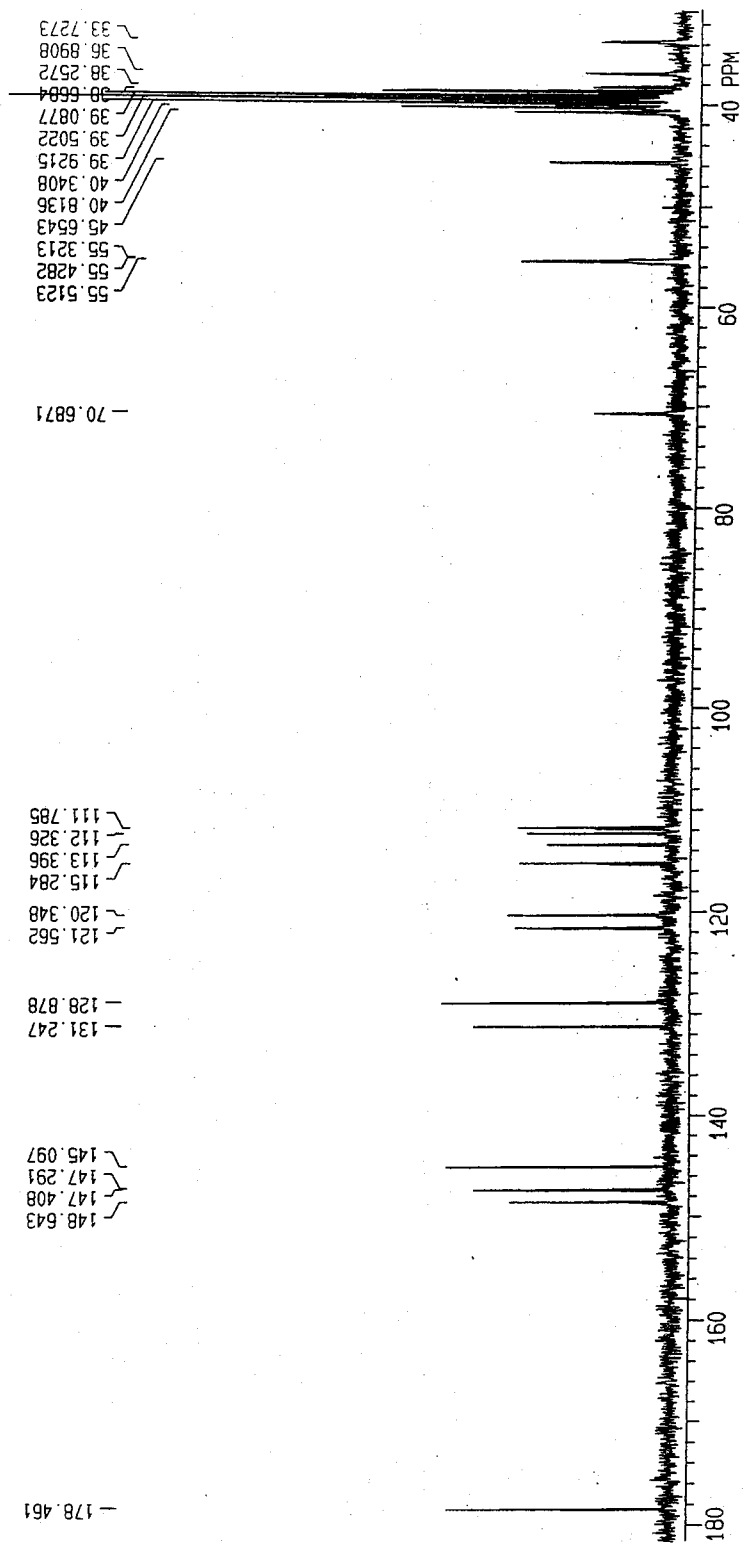
DATA: 94091307 #210
CALI: 091200001 #1
BASE M/Z: 137
RIC: 5640.



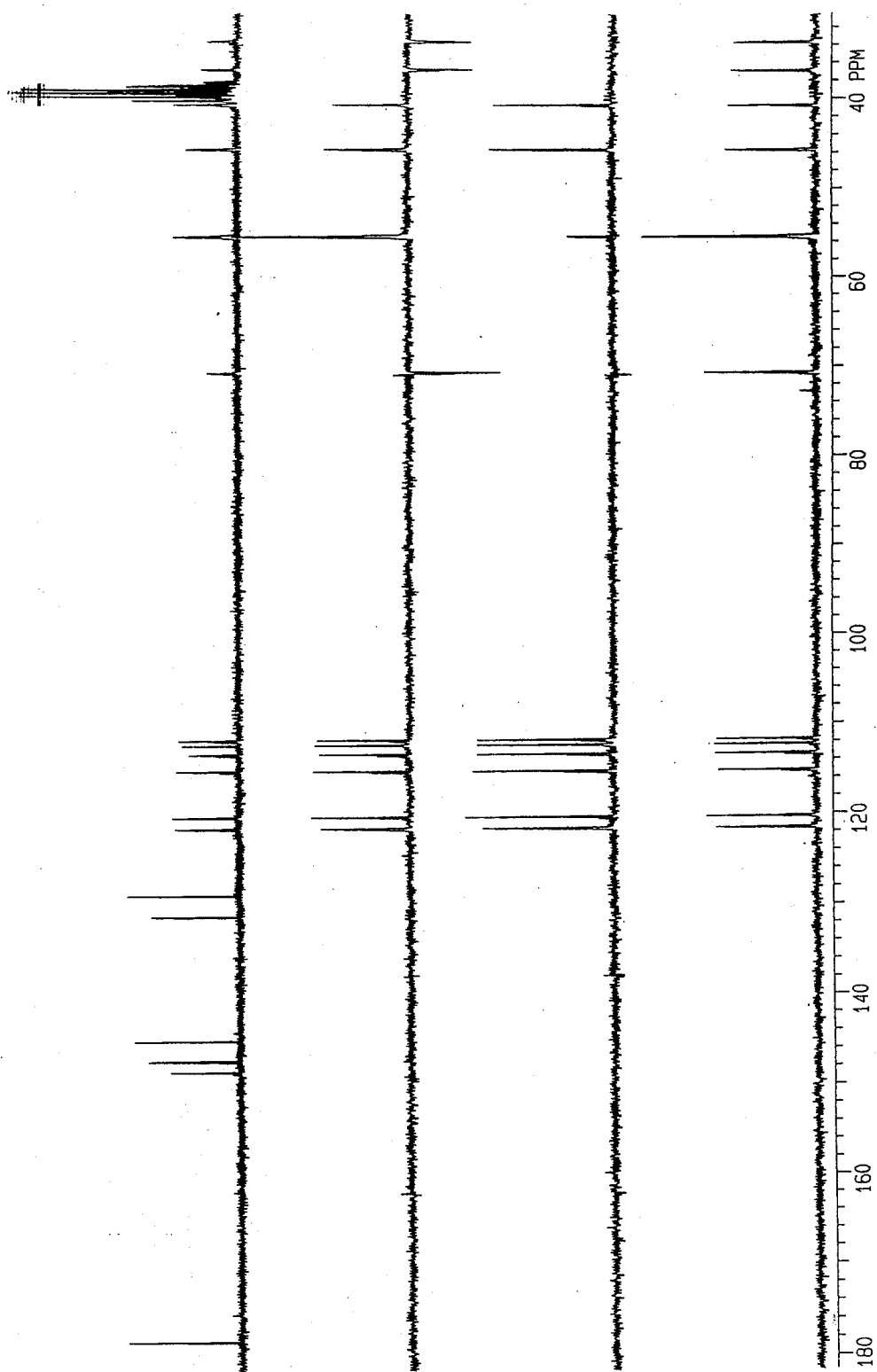
附錄 2. Mass spectrum of arctiin measured at 70 ev.



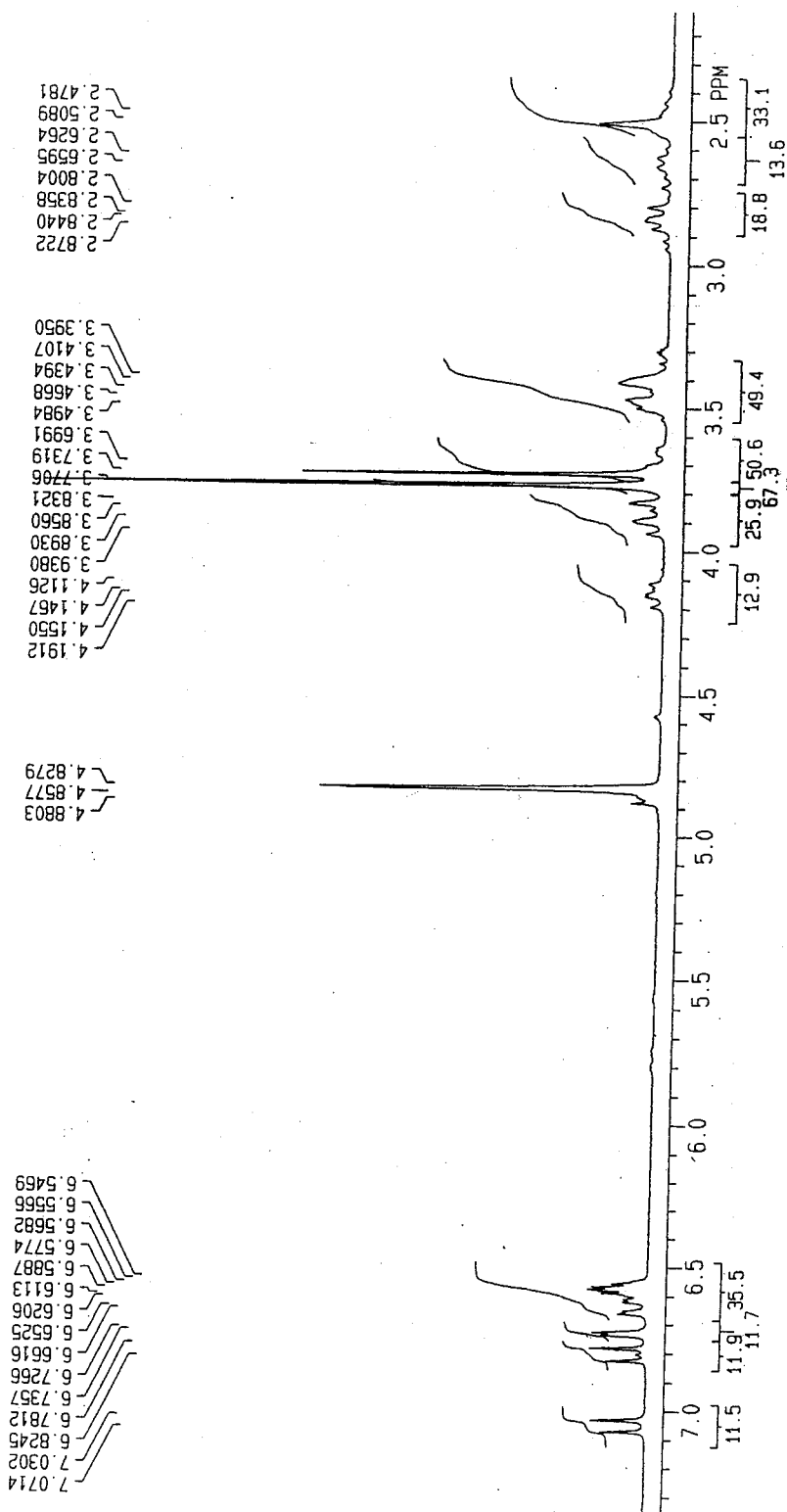
附錄 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of arctigenin in DMSO-d_6 .



附錄 4. ^{13}C -NMR spectrum of arctigenin in DMSO-d_6 .

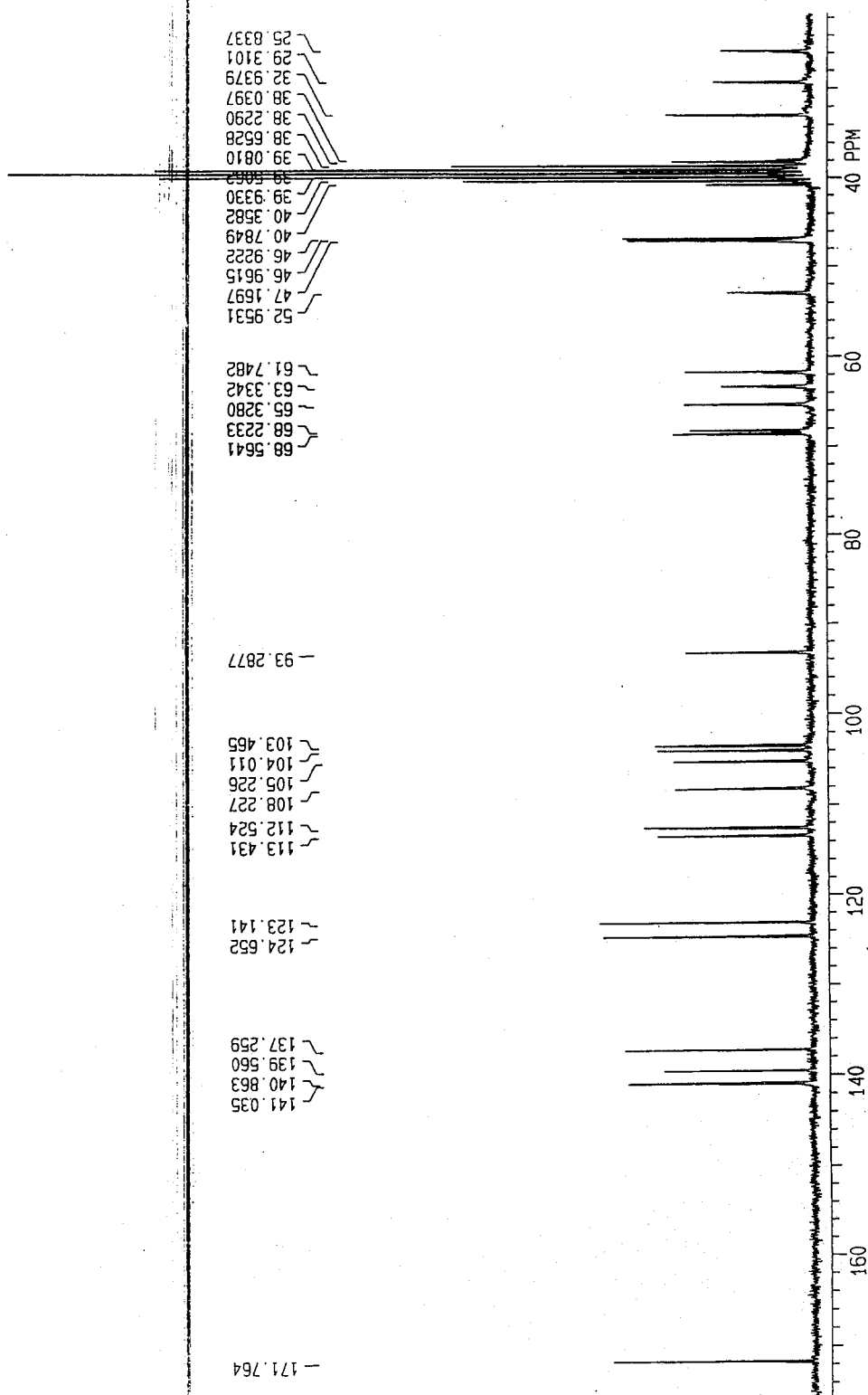


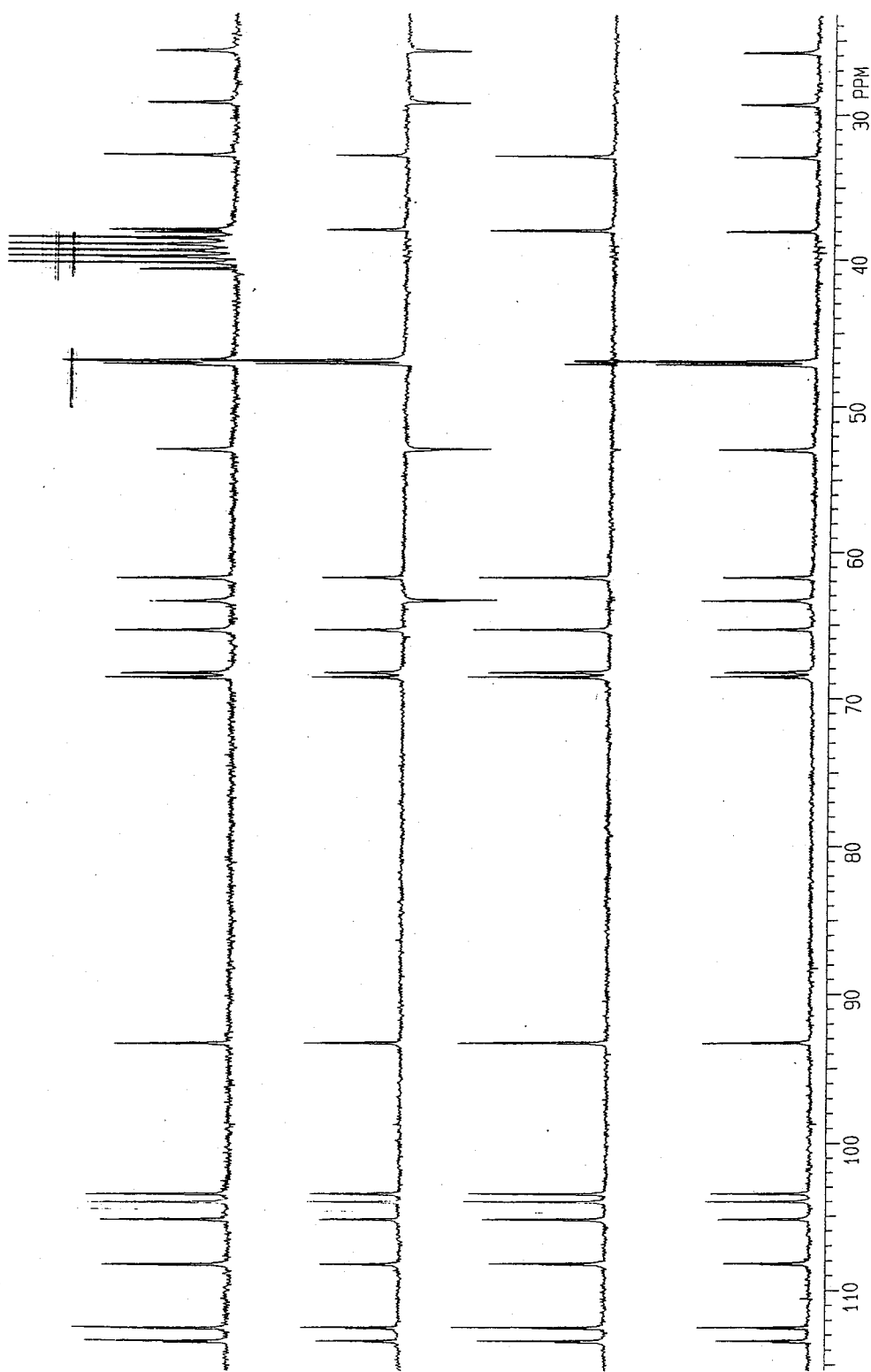
附錄 5. DEPT spectrum of arctigenin in DMSO-d₆.



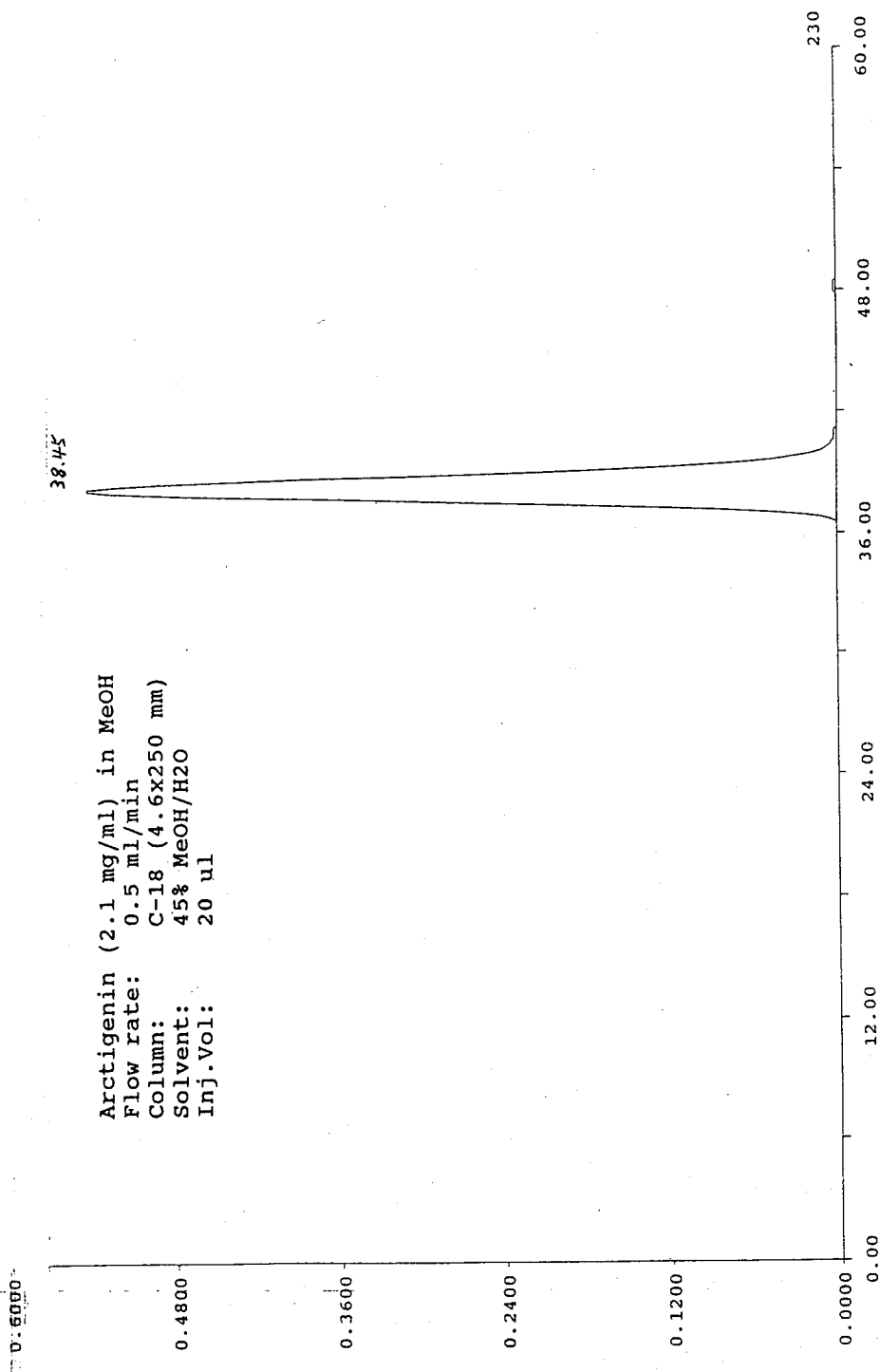
附錄 6. ¹H-NMR spectrum of arctiin in acetone-d₆.

附錄 7. ^{13}C -NMR spectrum of arctiin in acetone- d_6 .

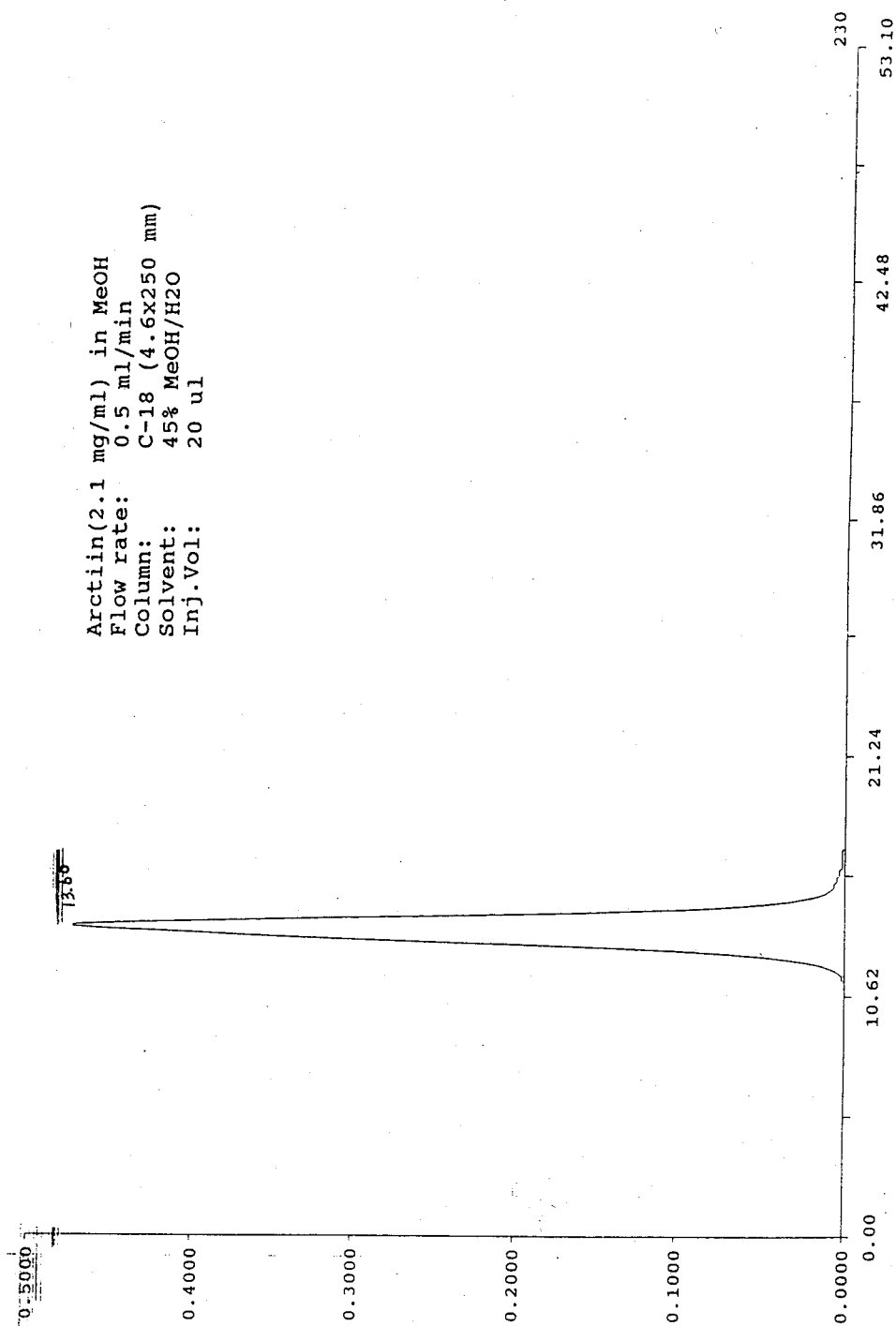




附錄 8. DEPT spectrum of arctiin in acetone-d₆.



附錄 9. HPLC spectrum of arctigenin.



附錄 10. HPLC spectrum of arctiin.

台灣民間常用及具研發潛力的 藥用植物調查與編寫

歐潤芝

國立中國醫藥研究所

壹、前言

七十年前(1924年)日本學者佐佐木舜一編著出版「綱要台灣民間藥用植物誌」乙書，開啓了台灣民間藥系統研究的先河。該書內容至今仍爲本省民間用藥的主要依據，亦爲台灣光復至今研究民間藥的重要參考資料之一。

本省種類，佐佐木氏當時收錄有 579 種民間藥。經70年的演進後，至今已將達2000種左右，其中部分藥材在臨床應用上確具某種程度上的療效，但亦有爲數頗多的民間草藥其療效仍存疑，甚至可能含有影響人體健康之毒性成分。

本研究計劃擬將原以日文書寫，數十年來對台灣民間藥演進深具影響之經典編著「綱要台灣民間藥用植物誌」譯成中文，每種藥用植物並加插彩色植物圖片，以彌補原書之不足。另預定以一年的時間做調查、訪問，並整理編列出當今中醫及民間臨床應用上，最具療效之民間草藥 100 種，供科學研究與臨床應用參考。

本年度已完成「綱要民間藥用植物誌」之中譯、植物學名、科屬分類之訂定及改正、彩色圖片之攝製，並將調查、訪問結果列出當今中醫及民間臨床應用上被認爲最具療效之民間草藥 231 種，較原訂目標多出三倍。

貳、實施方法及步驟

一、將1924年日人佐佐木舜一氏所著之「綱要台灣民間藥用植物誌」譯成中名。

二、藥用植物之排列仍依原著之順序。學名則以最新分類標準加以訂正。中文藥材名稱如有錯誤亦一拼修正。

三、該書共收載藥用植物 579 種，原書因無插圖一般民眾不易了解。本計劃將以價購或由參與執行之研究人員分赴各地拍攝方式搜集全部所需之彩色圖片，以補原著之不足。

四、調查，訪問台灣境內中醫師，青草藥業者有關民間草藥之使用情況與臨床療效等，整理編列出當今最具臨床療效的民間草藥 100 種，並拍攝該等植物的彩色幻燈片，供一般民眾及中醫藥界、科學研究人員參考。

參、結果

一、完成「綱要台灣民間藥用植物誌」之中譯工作（手稿樣張見附件一）。

二、補充原著中有關植物性狀敘述過簡之缺點。

三、完成植物科屬及學名之訂正。

四、攝製、收集藥用植物彩幻燈片 400 餘幀，餘下部分較難攝得之植物種類，現仍繼續努力補攝中。

五、完成台灣中醫及民間臨床應用上最具療效之民間草藥之調查（附件二）。

肆、中英文摘要

<中文摘要>

七十年前(1924年)日本學者佐佐木舜一編著出版「綱要台灣民間藥用植物誌」乙書，開啓了台灣民間藥系統研究的先河。該書內容至今仍為本省民間用藥的主要依據，亦為台灣光復至今研究民間藥的重要參考資料之一。

本省種類，佐木氏當時收錄有 579 種民間藥。經 70 年的演進後，至今已將達 2000 種左右，其中部分藥材在臨床應用上確具某種程度上的療效，但亦有為數頗多的民間草藥其療效仍存疑，甚至可能含有影響人體健康之毒性成分。

本研究計劃已將原以日文書寫，數十年來對台灣民間藥演進深具影響之經典編著「綱要台灣民間藥用植物誌」譯成中文，每種藥用植物攝製彩色植物圖片，以彌補原書之不足。本年度完成調查、訪問，經整理編列出當今中醫及民間臨床應用上，最具療效之民間草藥 231 種，可供科學研究與臨床應用參考。

<Abstract>

Survey and Compilation of Formosan Medicinal Plants

The first book of Formosan medicinal plants — "A Guide to Folk Medicinal Plants of Taiwan" was written and published in 1924 by a Japanese forester Sasaki Syun'iti. This book included 579 medicinal plants and still being the important reference for medicinal plant studies.

In the past 70 years, the number of medicinal plants in Taiwan increased year by year and reached a number of two thousand, estimately. Some of these folk remedy plants indicated clinical effect, but the actions of a majority are still uncertain.

The major works of this study are: (1) Complete the suplement and translation of Sasaki's "A Guide to Folk Medicinal plant of Taiwan" into Chinese; (2) Survey and compilation 231 most effective clinical used folk remedy plants in Taiwan; (3) Full colour photograph of each plants were added.

附 14 (-)

89		5-1
毛茛科	1. 威靈仙	
Ranunculaceae		
[學名]	<i>Clematis chinensis</i> Retz.	
	シシトフ・クンツウ	
(別名)	威靈仙、百條根、	
(效用)	根、水煎服治寒熱、淋病、	
(用法)	根、煎水服	

(形态):

攀援性藤本。根茎条状，丛生。茎具纵纹，嫩枝被毛。叶对生，羽状复叶，小葉3~5枚，卵形或卵状披针形，长2~6cm，先端尖，基部圆形或楔形，全缘，非脉腋处被毛，背面无毛，圆锥花序顶生或腋生，小花白色，苞片集状，萼4枚（稀5枚），花瓣片状，雄蕊多数，花丝扁平。雌蕊4~6枚。瘦果扁卵形，长约3mm，具短毛。

89

毛茛科

2. 串鼻龍 $\text{Clematis } \text{gouriana}$

5-1

Ranunculaceae

(学名) *Clematis gouriana* Roxb.

(效用) ~~根~~ 清热、祛风、止痛

(用法) 紫捣敷患处果止

(形态):

多年生蔓草。全株被毛。叶对生，~~叶~~ 三小叶，小葉卵状或椭圆形，卵形或卵状心形，先端急尖或短尖，基部楔形，全缘，呈脉腋处有短毛。花白色，多数，呈聚伞花序排列，萼4枚，花瓣片状，雄蕊多数，花丝扁平。瘦果头状，先端具白色长毛。

89

毛茛科

3. 毛茛 うまのあしかび

5-2

Ranunculaceae

(学名) *Ranunculus japonicus* Thunb.
(*Ranunculus actis* L.)

(别名) 毛茛

(效用): 治腫物、惡瘡、防蛇牙、果止血

(用法): 葉搗敷、果止血

(形态):

多年生草本。茎合株被柔毛。莖直立、高30~70cm。根生葉叢生，具長柄，葉片圓心形或五角形，長3-7cm，寬3-10cm。3深裂，中裂片倒卵狀楔形，3淺裂，粗齒緣或缺刻。側裂片2裂，兩面貼生柔毛。下部葉與根生葉相似，愈向上葉柄愈短，葉片亦愈小，3深裂，裂片披針形，有尖齒牙齒或再3裂；最上部葉片呈線形，全緣。花柄。聚繖花序，花多數。花徑約2mm。花藥5枚。倒卵狀圓形，聚合果近球形，徑約6mm，瘦果扁平，長約2mm，微短直或外彎。

89

毛茛科

4. 大本山并集 さつねのしらべ 5-2

Ranunculaceae

(学名) *Ranunculus sieboldii* Miq.
(Ranunculus langsdorffii Spreng)

(别名) 薔阿草

(效用) 消腫毒

(用法) 藥搗敷患處

[形態]:

一年生草本。莖直立，多分枝，高20~50cm，全株被白粗毛。根生葉長柄，3~5複葉，小葉倒卵形至廣卵形，長2.5~5cm，寬2~3.5cm，先端尖，2~3裂，邊緣粗鋸齒或缺刻，兩面密生粗毛。花莖短，頂生，長柄，葉5枚，卵形，花瓣5片，橢圓形或長橢圓形，較萼片略長。藥10枚，球形，徑約10mm，藥室倒卵形，扁平，喙稍彎曲。

97

番荔枝科(木犀科) 5. 鹰爪花 西貢氣味

S-3

Annonaceae

(学名) *Artabotrys uncinatus* (Lam.) Merr.
(*Artabotrys odoratissimus* R. Br.)

(别名)

(效用) 治瘰癧

(用法) 葉煎服

[形態]

攀援性灌木，高可達4公尺，殆无毛。葉
纸质，長圓形或廣披針形，長6-16cm，先端漸尖
或急尖，基部楔形，表面光滑，背面沿中脈被
疏毛或无毛。花淡綠色或淡黃色，具芳香，萼
片卵形，長約8mm，兩面被柔毛，花瓣長圓狀
披針形，長3~4.5cm，雄蕊長圓形，柱頭線狀長
橢圓形。果卵形，長約2.5cm，先端尖，數枚
聚生果托上。

93

木兰科

Magnoliaceae

6. 八角

L. 冬子

S-3

(学名) *Illicium philippinense* Merr.
(*Illicium anisatum* L.)

(别名)

(效用) 辟草、石桂、茵草、柏茴香、榕、梯。

麻痺、風濕、白朮、眼疾、乳癌、齒痛、解熱、
金痛跌打、腋臭、瘡。又作殺鼠、殺虫劑或
頭髮光澤劑。

(用法) 果實。

[形态]:

常綠中喬木。葉叢生枝端，具短柄，葉
橢圓形，先端尖頭，基部銳形，全緣，長約9cm，
寬約3cm，側脈不明顯。花白色，腋生或頂生，
花被像形至披針形。
12~20枚。
蒴果8~12枚，類厚。

93

木蘭科

Magnoliaceae

7. 紅骨蛇 さねわかず

5-4

(学名) *Kadsura japonica* L.

(别名) 南五味子、五味子、藤

(效用) 治毒蛇咬伤、陰痿、咳嗽、火熱、腫脹散大、

(用法) 根、葉半酒水煎服；葉搗敷患處

[特征]:

常綠藤本 全株平滑。葉薄革質，長橢圓形或卵形，長 7-11 cm，寬 3-5 cm，葉面淡綠略帶暗色，葉平展或微卷，葉柄長約 1 cm，基部具小苞數片。雌雄異株，花單生，腋生，下垂，長約 1.5 cm，花被 9~15 片，外側者較小，內側者大而呈瓣狀，雄花具多數雄蕊，雌花生多數心皮，呈頭狀排列。漿果淡紫色，多數圍生於肉質花托上。種子卵形，長約 5 mm。

92

8. 鐵甲入石

123 822 73 35 5-4

防己科

Menispermaceae

(学名) *Cocculus sarmentosus* Diels.

(别名)

(效用) 恢復疲勞、止渴、治癰疽瘰癧、打傷。

[药性]

具短柄

攀援小灌木，小枝被无茸。葉革質，頭小及柄狀多變化，橢圓狀披針形，線狀披針形至倒卵狀橢圓形，長3~6cm，寬0.5~2.5cm，先端銳形，突尖，圓形或微凹形，基部銳形，主脈3條，明瞭。花小，聚繖花狀，腋生，花梗長約1cm，被无茸。

92

防己科

Menispermaceae

9. 白山雷薯 西瓦つづらこ

5-5

(学名) *Cocculus trilobus* DC.

(别名) 防己、大防己、青藤、鼓儿藤、青藤香、小青藤、解离性、石解、房蛇、房慈、戴罪行。

(效用) 解热、治腹毒、疼痛、感冒、胃腸炎。

(用法) 根、煎水煎服。或水煎液患处。

[特征]:

攀缘小灌木 全株被短毛。茎厚纸质，互生，柄长1~3cm，卵形或三角状卵形，长5~8cm，宽0.5~2cm，先端钝或锐形，基部截形或近心形，全缘，但常作三浅裂。雌雄异株，花白色，小形，呈轮状排列着生腋间，小苞2枚，萼片6，椭圆形卵形，花瓣6片，长卵形，先端凹缺。核果近球形，径约7mm，黑熟。

92

防己科

10. 鋤底藤

はすのばかつら

5-5

Menispermaceae

(学名) *Stephania japonica* Miq.

(别名) 碎壁草、碎壁藤、千金藤、烏龜梢、金龜蓮草、金龜吊烏龜、地不容、解毒子。

(功用) 治毒蛇咬伤、打撲伤、腰痛、風邪、止痢。

(用法) 根煎水煎服、渣敷患處。

(形态)

常绿缠绕藤本，全株平滑。茎互生，具长柄，筒状着生，叶片卵形、椭圆形或心形，长4~8cm，宽3~7cm，基部近截形或圆形，先端钝或短尖，全缘，掌状脉2~9条，背面粉白绿。花单性，雌聚伞，聚伞花序腋生，穗梗长约4cm。花淡绿色，具小梗，雄花萼片6~8枚，卵形或倒卵形，花瓣3~5枚，倒卵形或近圆形，花丝细长呈柱状。雌花：萼片5，花瓣5，柱头3~4枚，柱头3~6裂，外弯。核果近球形，径约6mm，红熟。

92

防己科

Menispermaceae

11. 倒地拱 かんぽうお

5-6

(学名)

Stephania tetrandra Moore

(别名)

大田魂

(功用)

为胃肠药，治腹痛。

(用法)

根

形态：

多年生缠绕性落葉藤本。小枝纖細，具縱向溝紋。葉互生，具長柄，呈盾狀或掌狀着生，葉片三角狀卵形，長4-8cm，寬6-9cm，先端鈍形，基部楔形或心形，全緣，背面及緣或於白色兩面疏被短柔毛。花單性，雌雄異株，雄花序由多頭狀聚繖花排列成穗狀花序，總梗長可達10cm，雄花萼片3-5枚，花瓣4枚，雌花萼片、花瓣同數，花柱3枚。核果球形，徑約6mm，紅熟。

91

小檗科

12. 八角蓮 五加皮科

5-7

Berberidaceae

(学名) *Dysasma pleiantha* (Hance) Wooten
(*Podophyllum pleianthum* Hance)

(别名)

(别名) 治痛風、蛇伤

(用法) 地下茎水煎服治痛風、蛇伤半酒水煎服。

[形态]:

多年生草本。根茎横走，常有茎枯落枝之四方形
痕迹。株高20~40cm，茎常或分三叉，具长柄，
棱状，长约25cm，宽约30cm，6~10浅裂，裂
片广三角状卵形先端尖，细锯齿缘。嫩时
花序着生于茎顶两叉分叉处，花5~8朵，
暗红色，下垂。萼片6枚，椭圆形，长5~12
cm，花瓣6枚，内轮萼片3，外轮者椭圆形，
内轮者倒卵形。雄蕊6枚，花丝扁平，
花药与花丝约等长。核果圆形。

90

13. 正月

5-7

木通科 (小檗科)

トキソコノハ

Cardiobalanaceae

(学名) *Stauntonia hexaphylla* DC.

(别名) 假木瓜、假荔枝

(效用) 果止渴、利尿、促进血液循环, 明目、治糖尿病、淋病、通经、消肿胀压病气。

(用法) 水煎服

[形态]

常绿藤本。茎直立，具托柄，片掌状深裂。小茎3~7枚，裂片长圆形至椭圆形，长4~10cm，先端尾尖，基部圆形，全缘。茎面平滑，背面粉白色。花腋生，稀疏总状花序，3~7朵成簇。总梗细弱，花白色或淡绿色，径约2cm。雄花外轮萼片3枚，阔披针形；内轮萼片3枚，线形，雄蕊6。此雄花较大，雄花雄蕊6枚。蒴果卵形或长卵形，长6~10cm，熟时黄色或橘黄色。

85	14. 蓴	じゆんそい	5-8
睡蓮科			
Nymphaeaceae			
(学名)	<i>Brasenia schreberi</i> Gmel.		
(别名)	蓴菜、茆、蓴葵、水葵、馬蹄草。		
(效用)	瘰癧特效藥，多食傷脾胃。		
(用法)	葉搗敷患處。		

[形態]:

多年生水生草本。根莖匍行泥中。葉叢聚，長達1m以上。葉互生，具長25~40cm之長柄；葉片浮出水面，卵形或橢圓形，長5~12cm，全緣，表面綠色，有光澤，背面有褐色葉脈放射狀。花腋生，暗紫色，徑約2cm，萼片6，輪生，長線形，長約1cm，雄蕊12~18，輪生，被短毛。堅果短圓卵形。

水
睡蓮科

Nymphaeaceae

小. 芡實 おにじす

5-8

(学名) *Euryale ferox* Salisb.

(别名) 芡、雞頭、鴈喙

(效用) 治淋病及脾臟(疾患)

(用法) 糖水煎服

形態

葉三型

一年生大型水生草本。沉水葉箭形或橢圓腎形，長約10cm，葉背兩面及葉柄端生刺；浮水葉革質，橢圓腎形至圓形，直徑10~15cm，盾狀，表面綠色，背面紫色，全緣，兩面生葉脈分枝，長銳刺，葉柄長可達25cm，密生硬刺。花具長梗，長達25cm，密佈尖刺，萼片4枚，披針形，長約15cm，內面紫色，外面綠色，有刺。花瓣暗紫紅色，披針形，長約2cm，呈長輪排列，雄蕊多數，子房嵌入花托內。漿果球形，直徑5cm，暗紫紅色，外面密生硬刺，種子球形，長約10mm，神皮堅硬，黑色。

104

罂粟科

17. 罂粟 西さんげし

5-9

Papaveraceae

(学名)

Argemone mexicana L.

(别名)

[形态]

罂粟子实

一年生直立草本。全株被白色毛。高可达1m。茎多分枝，与柄，倒卵状椭圆形或倒卵状披针形，长2-2.5cm，宽2-8cm，基部抱茎，边缘呈不规则羽裂，裂片先端呈锐刺状。花单生枝端，花梗或长或短，花2-3枚，外面具锐刺，先端具刚毛状突起。花瓣4枚，黄色，倒卵形，长2-3cm。雄蕊多数，柱头圆盘状，5裂。蒴果长椭圆形，具纵棱，长约3cm，外被锐刺，内含多数种子。

十字花科
Cruciferae

18. 築 2 西 5" 3 7d

5-10

(M. G.) : *Brassica campestris* L. subsp. *napus* Hook. & Anders. var. *nippo-oleifera* Makino
(*Brassica campestris* L.)

形起:

一斗生或二斗生草本，全株光滑，高可达1m。基生葉及下部葉生葉珍狀分裂，長18-25cm，寬4~8cm，先端銳形，長卵圓形，其中部以上之葉片側卵形，先端銳形，基部心臟形，半抱莖，花黃白色，總狀花序，萼片4枚，綠白色；花瓣4枚，側卵形，網脈明顯，全緣，呈十字排列；雄蕊6枚。取每果長約4mm，先端具一長喙。種子多數，近圓球形，徑約3mm，暗紅至黑褐色。

106

十字花科

Cruciferae

19. 芜菁 かぶさ

5-10

(学名)

Brassica rapa L.(*Brassica campestris* L. var. *rapifera* Metz.)

[形態]

一年生或二年生草本，高可达90cm。块根肉质，球形、扁圆、长椭圆形皆有。茎直立，上部分枝。基生葉琴形，羽状深裂，表面疏生白色刺毛，叶面刺毛较密，茎上部葉短圆形或披针形，全缘或微抱茎。花小，鲜黄色，总状花序，萼片4，2列排列，花瓣4，十字形，长爪，雄蕊6枚，4强。角果圆柱形，长约6cm，稍细长。

106

十字花科
Cruciferae

20. 白菜子 おぼろし子

S-11

(浮名) *Brassica juncea* (L.) Cz. & D.

[形態]:

一年或二年生草本，高40~100cm。莖直立，多分枝，幼枝被微毛，老时光滑，稍被白粉。基生葉較大，琴形，長不齊狀分裂，先端之葉片特大，兩側葉片漸小，葉生葉較小，被斜狀不線形，鋸齒緣或全緣。總狀花序呈圓錐狀排列，花黃色，花瓣4枚，倒卵形或橢圓形，呈十字排列，萼片4枚，線狀披針形，雄蕊6枚，4強。長角果線形，長約4cm，光滑無毛，先端具不甚明顯之喙。

5-11

Capsella bursa-pastoris (L.) Medic.
(*Capsella bursapastoris* Moench.)

一年生草本。高可达40 cm。多分枝。根云簇生性，羽状深裂，羽片呈不规则卵形，顶端片三角状至卵状披针形；茎上簇生，先端尖，基部耳形抱茎，缺刻或钝齿缘。花白色，穗状花序；萼片3，卵形；花瓣4，倒卵形，先端钝或波状，基部短爪状；雄蕊6枚，4长2短。角果短倒三角状，先端凹，稍20~25粒，倒卵形。

106

十字花科

Cruciferae

22. 山芥菜 "如方" 3L

S-12

(学名):

Rorippa indica (L.) Hiern.(*Nasturtium indicum* DC.)

[形态]:

一年生草本。全株无毛，高30~40cm。茎粗大，多分枝。根为簇生，根稍圆形，不规则状。幼根簇生，根尖部，根斜形，较细。总状花序。小花黄色，花瓣线状长椭圆形，长约2.5mm，花瓣倒卵形，先端钝圆，比萼片略长，雄蕊4强。长角果线形，长约2cm。

106

十字花科
Cruciferae

23. 芜菁

C. sativus = L.

S-12

(别名): *Raphanus sativus* L. var. *radicula* DC.
(*Raphanus sativus* L.)

[形态]:

一年或二年生草本，高可达1m。根肉质，肥厚，形状、大小、颜色、表面各异。茎粗壮，多分枝。根生叶簇生，菱形，羽状分裂，高可达30cm，疏生粗毛；茎下部叶片菱形，长12-25cm，羽状分裂，顶端裂片最大，愈向下裂片愈小；茎上部叶片圆形或披针形，长3-5cm，全缘或浅锯齿状。总状花序生于分枝顶端，萼4枚，花瓣5，圆形；花瓣4，白色、淡紫或粉红色，具爪；雄蕊4，长。果实圆筒形，肉质，先端具尖嘴。

1st
白花菜科

24. 三脚别

5.18.72

S-13

Capparidaceae

(附存)

Crataeva adansonii DC. subsp. *formosensis*
(Jacob.)

(*Crataeva religiosa* Forst.)

[形态]:

落叶小乔木。小枝着生显著之皮孔。葉为
三出複葉，具长柄，互生而集生枝梢；小葉纸
质，卵状披针形，长 5-12 cm，宽 2.5-5 cm，
先端尖，背面及白色，微有花序顶生，花黄绿
色，具长梗。萼 4 片，椭圆形，长约 4 mm；花瓣
4 枚，倒卵形或匙形，长约 2 cm；雄蕊多数；
雄果球形至卵形，长 6-7 cm，果皮外面散佈
斑點。種子多数，扁圆形，径约 8 mm。

105

白花菜科

Capparidaceae

25. 白花菜根

5-3 5-5

5-13

(学名)

Cleome gyrandra L.(*Pedicularia pentaphylla* Sch.)

[形态]:

一年生草本。茎直立，高30~90cm，全株被腺毛。叶互生，具长柄，基生状复叶：小葉倒卵形，全缘；偶有锯齿。花白色，总状花序，花下有三基生状苞，花梗被腺毛；萼4枚，线状披针形；花瓣4枚，倒卵形，长约1.5cm；雄蕊6，基部联合。蒴果长圆形，长约10cm，种子椭圆形，黑色。

附件二

台灣最具臨床療效的民間草藥

1. 地蜈蚣 *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook.
2. 瓶爾小草 *Ophioglossum vulgatum* L.
3. 全緣貫眾 *Cyrtomium falcatum* (L.f.) Presl
4. 鐵角鳳尾草 *Asplenium trichomanes* L.
5. 金狗毛蕨 *Woodwardia japonica* (L.f.) Sm.
6. 大葉骨碎補 *Davallia divaricata* Blume
7. 海州骨碎補 *Davallia mariessii* Moore ex Bak.
8. 烏蕨 *Sphenomeris chusana* (L.) Copel.
9. 筋骨草 *Lycopodium cernuum* L.
10. 石松 *Lycopodium clavatum* L.
11. 石上柏 *Selaginella doederleinii* Hieron
12. 銀杏 *Ginkgo biloba* L.
13. 林投 *Pandanus odoratissimus* L.f. var. *sinensis* (Warb.) Kanch.
14. 薏苡 *Coix lacryma-jobi* L.
15. 牛筋草 *Eleusine indica* (L.) Gaertn.
16. 金絲草 *Pogonatherum crinitum* (Thunb.) Kunth.
17. 颱風草 *Setaria palmifolia* (Koen.) Stapf.
18. 水蜈蚣 *Kyllinga brevifolia* Rottb.
19. 檳榔 *Areca catechu* L.
20. 省藤 *Arenga engleri* Becc.
21. 蒟蒻 *Amorophallus konjac* K.Koch
22. 谷精草 *Eriocaulon cinereum* R.Br. var. *sieboldianum* (S.et Z.) T.Koyama
23. 鴨跖草 *Commelina communis* L.
24. 大葉竹仔菜 *Commelina paludosa* Blume
25. 對葉局部 *Stemona tuberosa* Lour.
26. 小麥門冬 *Liriope minor* (Maxim.) Makino

27. 麥門冬 *Liriope spicata* Lour.
28. 沿階草 *Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker-Gawler
29. 七葉一枝花 *Paris polyphylla* Smith. var. *chinensis*
(Franch.) Hara
30. 菝 *Smilax china* L.
31. 土茯苓 *Smilax glabre* Roxb.
32. 田薯 *Dioscorea alata* L.
33. 白薯莖 *Dioscorea hispida* Dennst.
34. 基隆山藥 *Dioscorea japonica* Thunb. var. *pseudo-japonica*
(Hay.) Yamam.
35. 芭蕉 *Musa bajoo* S. et Z.
36. 薑黃 *Curcuma longa* L.
37. 南薑 *Langua galanga* (L.) Stuntz
38. 金線連 *Anoectochilius formosanus* Hay.
39. 紫背一點廣 *Nervilia purpurea* (Hay.) Schltr.
40. 盤龍參 *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames.
41. 蕺 *Houttuynia cordata* Thunb.
42. 三白草 *Saururus chinensis* (Lour.) Baill.
43. 九節茶 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai
44. 楊梅 *Myrica rubra* S. et Z. var. *acuminata* Nakai
45. 朴樹 *Celtis sinensis* Persoon
46. 構樹 *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Herit.
47. 黃金桂 *Cudrania cochinchinensis* (Lour.) Kudo et Masam.
var. *gerontogea* (S. et Z.) Kudo et Masam.
48. 無花果 *Ficus carica* L.
49. 台灣天仙果 *Ficus formosana* Maxim.
50. 木苧麻 *Boehmeria densiflora* Hook. et Arn.
51. 苧麻 *Boehmeria nivea* (L.) Gaud.
52. 奶葉藤 *Gonostegia hirta* (Blume) Miq.
53. 咬人狗 *Laportea pterostigma* Wedd.
54. 桑寄生 *Scurrula parasitica* L.
55. 槲寄生 *Viscum alniformosonae* Hay.
56. 瓜葉馬兜鈴 *Aristolochia cucurbitifolia* Hay.

57. 辣蓼 *Polygonum barbatum* L.
58. 火炭母草 *Polygonum chinense* L.
59. 虎杖 *Polygonum cuspidatum* S. et Z.
60. 紅雞屎藤 *Polygonum hypoleucum* Ohwi
61. 扛板歸 *Polygonum perfoliatum* L.
62. 羊蹄 *Rumex crispus* L.
63. 土牛膝 *Achyranthes aspera* L. var. *indica* L.
64. 商陸 *Phytolacca acinosa* Roxb.
65. 粟米草 *Mollugo pentaphylla* L.
66. 馬齒莧 *Portulaca oleracea* L.
67. 菁芳草 *Drymaria cordata* willd.
68. 繁縷 *Stellaria media* Cyr.
69. 狹葉十大功勞 *Mahonia fortunei* (Lindl.) Fedde
70. 十大功勞 *Mahonia japonica* DC.
71. 翠峰十大功勞 *Mahonia oiwakensis* Hay.
72. 木防己 *Cocculus trilobus* (Thunb.) DC.
73. 金線吊烏龜 *Stephania cephalantha* Hay.
74. 千金藤 *Stephania japonice* (Thunb.) DC.
75. 白玉蘭 *Michelia alba* DC.
76. 阿里山北五味 *Schizandra arisanensis* Hay.
77. 樟 *Cinnamomum camphora* (L.) Sieb.
78. 山肉桂 *Cinnamomum pseudo-loureirii* Hay.
79. 山胡椒 *Litsea cubeba* Persoon
80. 蘿蔔 *Raphanus sativus* L. var. *acanthiformis* Mak.
81. 大返魂草 *Kalanchoe gracillis* Hance
82. 台灣七里香 *Pittosporum pendandrum* (Blanco) Merr.
83. 龍茅草 *Agrimonia pilosa* Ledeb.
84. 蛇莓 *Duchesnea indica* (Andr.) Forke
85. 翻白草 *Potentilla discolor* Bunge
86. 梅 *Prunus mume* S. et Z.
87. 小金英 *Rosa taiwanensis* Nakai
88. 雞母珠 *Abrus precatorius* L.
89. 金合歡 *Acacia farnesiana* (L.) willd.

90. 合歡 *Albizzia julibrissin* Durazz.
91. 菊花木 *Bauginia championi* Benth.
92. 羊蹄甲 *Bauhinia purpurea* L.
93. 黃槐 *Cassia glauca* Lam.
94. 決明 *Cassia tora* L.
95. 扁豆 *Dolichos lablab* L.
96. 榼藤 *Entada phaseoloides* (L.) Merr.
97. 山豆根 *Euchresta formosana* (Hay.) Ohwi
98. 銀合歡 *Leucaena glauca* (L.) Benth.
99. 昆明鵝血藤 *Millettia reticulata* Benth.
100. 含羞草 *Mimosa pudica* L.
101. 牌錢樹 *Phyllodum pulchellum* (Benth.) Desv.
102. 葛藤 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi
103. 台灣葛藤 *Pueraria montana* (Lour.) Merr.
104. 鹿藿 *Rhynchosia volubilis* Lour.
105. 槐樹 *Sophora japonica* L.
106. 酢漿草 *Oxalis corniculata* L.
107. 蒺藜 *Tribulus terrestris* L.
108. 檸檬 *Citrus liminia* Osbeck
109. 枸橼 *Citrus medica* L.
110. 佛手柑 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle
111. 過山香 *Clausena excavata* Burm. f.
112. 月橘 *Murraya paniculata* (L.) Jack.
113. 台灣黃蘗 *Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii*
(Hay. et Kaneh.) Chang
114. 食茱萸 *Zanthoxylum ailanthoides* S. et Z.
115. 崖椒 *Zanthoxylum nitidium* (Roxb.) DC.
116. 鴉膽 *Brucea javanica* (L.) Merr.
117. 橄欖 *Canarium album* (Lour.) Raeusch.
118. 楝 *Melia azedarach* L.
119. 重陽木 *Bischofia javanica* Blume
120. 七日葷 *Breynia officinalis* Hemsl.
121. 巴豆 *Croton tiglium* L.

122. 大飛揚草 *Euphorbia hirta* L.
123. 粗糠柴 *Mallotus philippinensis* (Lam.) Muell.-Arg.
124. 葉下珠 *Phyllanthus urinaria* L.
125. 烏 *Sapium sebiferum* Roxb.
126. 白飯樹 *Securingea virosa* (Roxb.) Pax et Hoffm.
127. 埔鹽 *Rhus semialata* Murr. var. *roxburghiana* DC.
128. 岡梅 *Ilex asprella* (Hook. et Arn.) Champ.
129. 野鴉椿 *Euscaphis japonica* (Thunb.) Kanitz
130. 無患子 *Sapindus mukorissi* Gaertn.
131. 鐵包金 *Berchemia lineata* (L.) DC.
132. 青皮貓 *Ventilago leiocarpa* Benth.
133. 山葡萄 *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv.
var. *hancei* (Lanch.) Li
134. 烏 莓 *Cayratia japonica* (Thunb.) Gagnep.
135. 白粉藤 *Cissus repens* Lam.
136. 三葉葡萄 *Tetrastigma dentatum* (Hay.) Li
137. 細本山葡萄 *Vitis thunbergii* S. et Z. var. *taiwaniana* Lu
138. 黃花風母 *Triumfetta bartramia* L.
139. 磨盤草 *Abutilon indicum* (L.) Sweet
140. 木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* L.
141. 蛇總管 *Sida acuta* Burm. f.
142. 賜米草 *Sida rhombifolia* L.
143. 虱母子 *Urena lobata* L.
144. 木棉 *Bombax malabarica* DC.
145. 獼猴桃 *Actinidia chinensis* Planch.
146. 台灣羊桃 *Actinidia callosa* Lindl. var. *formosana* Finet
et Gagnep.
147. 地耳草 *Hypericum japonicum* Thunb.
148. 元寶草 *Hypericum sampsonii* Hance
149. 仙人球 *Echinopsis multiflex* Preiff. et Otto
150. 曇花 *Epiphyllum Oxypetalum* (DC.) Haw
151. 梧 *Elaeagnus oldhami* Maxim.

152. 蒲桃 *Syzygium jambos* Alston
153. 野牡丹 *Melastoma candidum* D. Don
154. 三葉五加 *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.
155. 鵝掌柴 *Schefflera octophylla* Harms.
156. 通脫木 *Tetrapanax papyrifera* C. Koch
157. 老公根 *Centella asiatica* (L.) Urb.
158. 乞食碗 *Hydrocotyle nepalensis* Hook.
159. 烏面馬 *Plumbago zeylanica* L.
160. 柿 *Diospyros kaki* Thunb.
161. 山素英 *Jasminum hemsleyi* Yamamoto
162. 長春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don
163. 酸藤 *Ecdysanthera rosea* Hook. et Arn.
164. 蘿芙木 *Rauwolfia verficillata* (Lour.) Baillon
165. 山馬茶 *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br.
166. 馬蹄金 *Dichondria micrantha* Urb.
167. 馬鞍藤 *Ipomoea pes-caprae* (L.) Sweet subsp.
bresiliensis (L.) Oosst.
168. 牽牛 *Ipomoea nil* (L.) Roth.
169. 康復力 *Symphytum officinale* L.
170. 蘭香草 *Caryopteris incana* (Thunb.) Mig.
171. 大青 *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz.
172. 臭茉莉 *Clerodendrum philipinum* Schauer
173. 龍船花 *Clerodendrum paniculatum* L.
174. 白龍船 *Clerodendrum paniculatum* L. var. *albiflorum*
Hemsl.
175. 海州常山 *Clerodendrum trichotomum* Thunb.
176. 法氏海州常山 *Clerodendrum trichotomum* Thunb.
var. *fargesii* (Dode) Rehd.
177. 石莧 *Phyla nodiflora* (L.) Greene
178. 腐婢 *Premna microphylla* Turcz.
179. 長穗木 *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl.
180. 馬鞭草 *Verbena officinalis* L.

181. 黃荊 *Vitex negundo* L.
 182. 烏甜 *Vitex quinata* (Lour.) F.N. Will.
 183. 金瘡小草 *Ajuga pygmaea* A. Gray
 184. 香薷 *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hylander
 185. 金錢薄荷 *Glechoma hederacea* L. var. *grandis* (A.Gray)

Kudo

186. 白有骨消 *Hypfis rhomboides* Mart. et Gal.
 187. 白花益母草 *Leonurus sibiricus* L. var. *albiflora* Miq.
 188. 地 *Lycopus lucidus* Turcz. var. *formosana* Hay.
 189. 野薄荷 *Menthe canadensis* L.
 190. 羅勒 *Ocimum balsilicum* L.
 191. 到手香 *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng
 192. 台灣延命草 *Rabdosia laciocarpa* (Hay.) Hara
 193. 白花曼陀羅 *Dature metel* L.
 194. 苦 *Physalis angulata* L.
 195. 小顛茄 *Solanum aculeatissimum* Jacq.
 196. 白英 *Solanum lyratum* Thunb.
 197. 龍葵 *Solanum nigrum* L.
 198. 陰行草 *Siphonostegia chinensis* Benth.
 199. 釘地蜈蚣 *Torenia concolor* Lindl. var. *formasana*

Yamazaki

200. 尖尾鳳 *Gendarussa vulgaris* Nees
 201. 爵床 *Justicia procumbens* L.
 202. 伏牛花 *Damnacanthus indicus* Gaertn.
 203. 玉葉金花 *Mussaenda parviflora* Mett.
 204. 雞屎藤 *Paederia scandens* (Lour.) Merr.
 205. 毛鈎藤 *Uncaria hirsuta* Haviland.
 206. 絞股藍 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak.
 207. 桔樓 *Trichosanthes kirilowii* Maxim.
 208. 桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC.
 209. 銅錘玉帶草 *Pratia nummularia* (Lam.) A.Br. et asch
 210. 下田菊 *Adenostemma Lavenia* (L.) O.Kuntze
 211. 勝紅薊 *Ageretum conyzoides* L.

212. 惡實 *Arctium lappa* L.
213. 黃花蒿 *Artemisia annua* L.
214. 鬼針草 *Bidens bipinnata* L.
215. 咸豐草 *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Bl.) Scherff.
216. 走馬胎 *Blumea lanceolaris* (Roxb.) Druce
217. 毛將軍 *Blumea hieracifolia* (D. Don) DC.
218. 天名精 *Carpesium abrotanoidee* L.
219. 薊 *Cirsium japonicum* DC.
220. 蕪艾 *Crossostephium chinense* (L.) Mak.
221. 山防風 *Echinops grilisii* Hance
222. 鱧腸 *Eclipta prostrata* L.
223. 天芥菜 *Elephantopus scaber* L. subsp. *oblanceolata*
Kitamura
224. 野塘蒿 *Erigeron linifolius* Willd.
225. 山澤蘭 *Eupatorium formosanum* Hay.
226. 鼠麴草 *Gnaphalium affine* D. Don
227. 兔兒草 *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai
228. 稀荻 *Siegesbeckia orientalis* L.
229. 台灣蒲公英 *Taraxacum formosanum* Kitam.
230. 傷寒草 *Vernonia cinerea* (L.) Less
231. 黃花蜜菜 *Wedelia chinensis* Merr.

中藥材之鑑定研究

陳忠川 謝明村 邱平永 謝文全 關甫仙

中國醫藥學院

摘 要

本研究之目的在於辨明中藥之真偽與來源植物，利用顯微鏡以解剖藥材，觀察其內部構造、粉末特徵、繪圖，並敘述各藥材之內部，粉末組織之內容，並就市售中藥之來源植物，進行實際調集，綜合各方面之鑑定，以作為標準品提供中藥 GMP 之檢驗標準。

本年度完成下列 24 種中藥之研究，茲列舉其學名如下：

1. 紅骨蛇 *Kadsura japonica* (LINN.)DUNAL. (Schizandraceae)
2. 蓬莪朮 *Curcuma phaeocaulis* VAL. (Zingiberaceae)
3. 天麻 *Gastrodia elata* BIUME (Orchidaceae)
4. 何首烏 *Polygonum multiflorum* THUNBERG (Polygonaceae)
5. 龍船花 *Lerodendrum paniculataum* L. (Verbenaceae)
6. 珠貝 *Fritillaria verticillata* WILLD. var. *thunbergii* BAKER (Liliaceae)
7. 馬齒莧 *Portulaca oleracea* LINN.(Portulacaceae)
8. 番瀉葉 *Cassia acutifolia* DELILE (*Cassia senna* L.)(Leguminosae)
9. 山慈姑 *Tulipa edulis* BAKER(Liliaceae)
10. 石韋 *Pyrrosia petiolosa* (CHRIST)CHING (Polypodiaceae)
11. 生薑 *Zingiber officinale* Roscoe. (Zingibeaceae)
12. 紫菀 *Aster tataricus* L. f. (Compositae)

13. 豬 苓 *Polyporus umbellatus* PERSOON. PILAT.(Polyporaceae)
14. 茯 苓 *Poria cocos* WOLF.(Polyporaceae)
15. 知 母 *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE(Liliaceae)
16. 北劉寄奴 *Siphonostegia chinensis* BENTH(Scrophulariaceae)
17. 白頭翁 *Pulsatilla chinensis*(Ranunculaceae)
18. 五加皮 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. SMITH(Araliaceae)
19. 秦 皮 *Fraxinus bungeana* DC.(Oleaceae)
20. 延胡索 *Corydalis turtchaninovii* BEES.(Papaveraceae)
21. 蒺 藜 *Polygonum aviculare* Linn. var. *vegetum* LEDEBOUR. (Polygoaceae)
22. 夏枯草 *Plate bunella* (*Prunella vulgaris*)LINN.(Labiatae)
23. 穀精草 *Eriocaulon buergerianum* KOERNICKE(Eriocaulaceae)
24. 墨旱蓮 *Eclipta prostrata* L.(Compositae)

Pharmacognostical studies on Chinese Crude drugs

C.C. Chen, M.T. Hsieh, N.Y. Chiu, C.F. Yeh, W.C. Hsieh, T.H. Lin, Y.J. Lin,

C.W. Kuo, F.S Chuen

China medical college Taichung Taiwan R.O.C

This study identified the authenticity of the crude drugs and their plant origins. The inner structure of the crude drugs and their powder characteristics were examined by microscopic methods and the results were documented by hand drawing and photographic methods. Those documented figures were supplemented with the morphological descriptions of the inner structure of the crude drugs and the characteristics of the powders. A survey of the origins of each investigated crude drug on Taiwanese market was also included. Those results will provide authentic information for quality control standard for

implementing GMP practice on Chinese crude drugs preparations. This study selected 24 species from 360 species recorded in Chinese Crude Drugs Pharmacopeia published by Ministry of Health, Executive Yuan, Republic of China. Forty two species had been completed previously. The names of the 24 species completed in the current year project are listed below :

1. *Kadsura japonica* (LINN.) DUNAL. (Schizandraceae)
2. *Curcuma phaeocaulis* VAL. (Zingiberaceae)
3. *Gastrodia elata* BLUME (Orchidaceae)
4. *Polygonum multiflorum* THUNBERG (Polygonaceae)
5. *lerodendrum paniculataum* L. (Verbenaceae)
6. *Fritillaria verticillata* WILLD. var. *thunbergii* BAKER (Liliaceae)
7. *Portulaca oleracea* LINN. (Portulacaceae)
8. *Cassia acutifolia* DELILE (*Cassia senna* L.) (Leguminosae)
9. *Tulipa edulis* BAKER (Liliaceae)
10. *Pyrrosia petiolosa* (CHRIST) CHING (Polypodiaceae)
11. *Zingiber officinale* ROSCOE. (Zingibeaceae)
12. *Aster tataricus* L. f.(Compositae)
13. *Polyporus umbellatus* PERS. ER.(Polyporaceae)
14. *Poria cocos* WOLF. (Polyporaceae)
15. *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE (Liliaceae)
16. *Siphonostegia chinensis* BENTH (Scrophulariaceae)
17. *Pulsatilla chinensis* (Ranunculaceae)

18. *Acanthopanax gracilistylus* W. W. SMITH (Araliaceae)
19. *Fraxinus bungeana* Dc. (Oleaceae)
20. *Corydalis turtschaninovii* BEES. (Papaveraceae)
21. *Polygonum aviculare* LINN. var. *vegetum* LEDEBOUR. (Polygoaceae)
22. *Plate bunella* (*Prunella vulgaris*)LINN. (Labiatae)
23. *Eriocaulon buergerianum* KOERNICKE (Eriocaulaceae)
24. *Eclipta prostrata* L. (Compositae)

人力配置表

類別	姓名	現職	在本計劃內擔任具體工作性質項目內容
主持人	陳忠川	副教授	負責計劃之設計與推展
聯絡人	謝明村	所 長	負責衛生署聯絡與計劃之推展
研究人	謝文全	副教授	負責植物採集，原植物鑑定
研究人	邱年永	技 正	負責植物採集，原植物鑑定
工讀生	郭昭麟	研究生	實驗工作
工讀生	林敦生	研究生	實驗工作
工讀生	郭啓文	研究生	實驗工作
工讀生	林郁進	研究生	實驗工作
工讀生	闕甫心	研究生	實驗工作
工讀生	經 總	研究生	實驗工作

一、計劃摘要

本研究之目的在於辨明中藥之真偽與來源植物，利用顯微鏡以解剖藥材，觀察其內部構造，粉末特徵，繪圖，並敘述各藥材之內部，粉末組織之內容，並就市售中藥之來源植物，進行實際調察採集，綜合各方面之鑑定，以作為標準品提供中藥 GMP 之檢驗標準。

二、計劃緣起

目前臺灣各種藥商總計二萬餘家(包括中醫師、中藥廠、中藥商)，其所需中藥材數量甚大，而我國所使用之中國藥材種類繁多而複雜，其藥材之真偽與品質之優劣，關係到病人健康甚鉅，偽劣藥常遭致不良效果，為了藥材來源或真偽之鑑定，建立中藥品質評價資料。

臺灣市售中藥，經生藥學家調查研究，其結論簡述如下：(1)藥材來源單純，供應量充裕，售價便宜。(2)藥材之來源複雜，不同科屬之若干種植物，市場上均以同一種名稱出現。(3)本省所產與進口藥材均用代用品與偽藥。本研究依行政院衛生署編定中華民國中藥典範所載 360 種，其中 77、78、79、80、81、82、83 等七個年度共完成 144 種中藥材之鑑定研究，84 年度共完成 24 種，以期樹立未來中藥材 GMP 之檢驗及標準依據，確定藥材使用時之真偽並確保療效。

三、研究計劃報告

- 1.紅骨蛇之組織描述及組織圖、粉末構造
- 2.蓬莪朮之組織描述及組織圖、粉末構造
- 3.天 麻之組織描述及組織圖、粉末構造
- 4.何首烏之組織描述及組織圖、粉末構造
- 5.龍船花之組織描述及組織圖、粉末構造
- 6.珠 貝之組織描述及組織圖、粉末構造
- 7.馬齒莧之組織描述及組織圖、粉末構造
- 8.番瀉葉之組織描述及組織圖、粉末構造
- 9.山慈姑之組織描述及組織圖、粉末構造
- 10.石 韋之組織描述及組織圖、粉末構造
- 11.生 薑之組織描述及組織圖、粉末構造
- 12.紫 菀之組織描述及組織圖、粉末構造
- 13.豬 苓之組織描述及組織圖、粉末構造
- 14.茯 苓之組織描述及組織圖、粉末構造
- 15.知 母之組織描述及組織圖、粉末構造
- 16.北劉寄奴之組織描述及組織圖、粉末構造
- 17.白頭翁之組織描述及組織圖、粉末構造
- 18.五加皮之組織描述及組織圖、粉末構造
- 19.秦 皮之組織描述及組織圖、粉末構造
- 20.延胡索之組織描述及組織圖、粉末構造
- 21.篇 蓄之組織描述及組織圖、粉末構造
- 22.夏枯草之組織描述及組織圖、粉末構造
- 23.穀精草之組織描述及組織圖、粉末構造
- 24.墨旱蓮之組織描述及組織圖、粉末構造

研究計劃報告

紅骨蛇 (南五味子莖)

Kadsurae Caulis

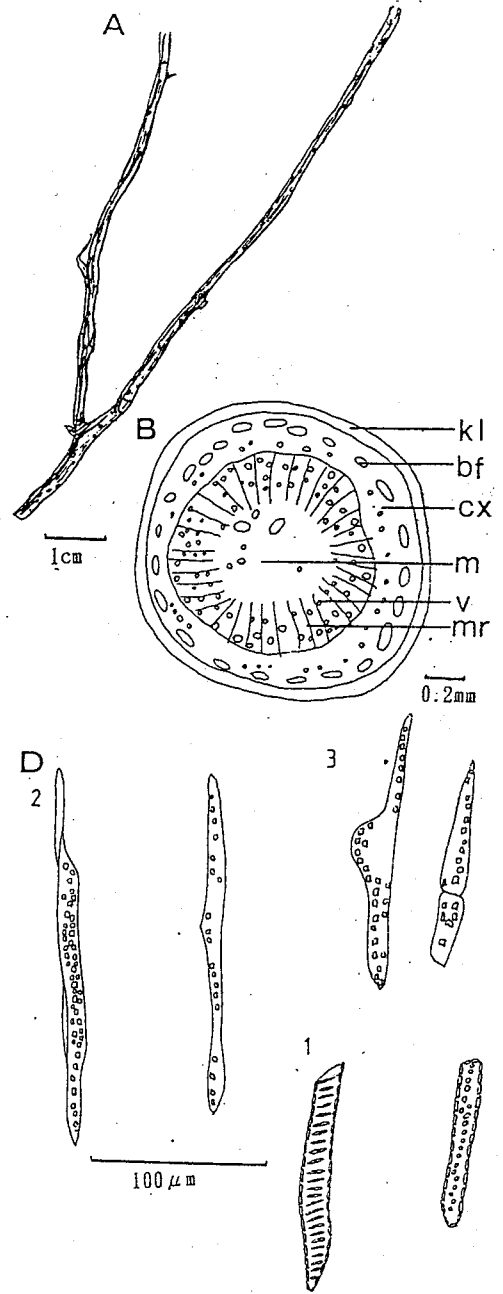
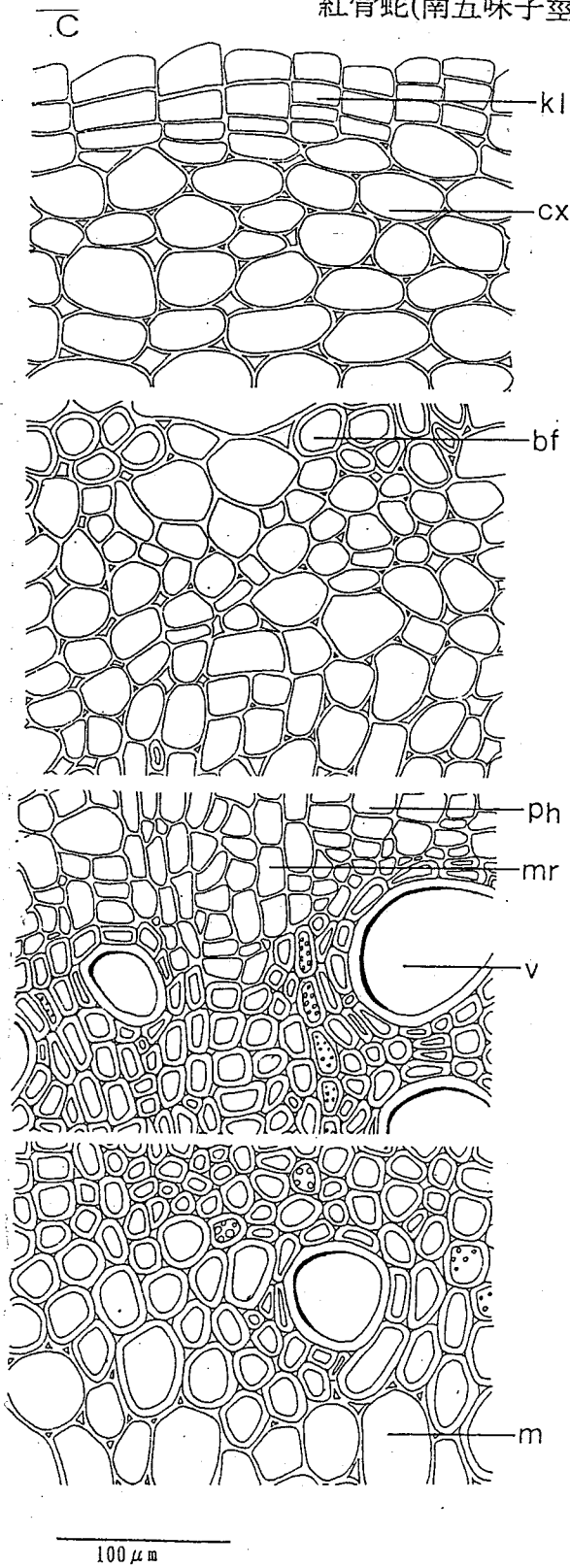
Kadsura japonica (LINN.) DUNAL. (Schizandraceae)

[組織鑑別]: 以顯微鏡檢視其莖之橫斷面, 最外緣為木栓層, 棕色, 2~4層, 排列整齊, 細胞壁薄, 細胞呈長方形、類長方形, 木化、木栓化。有的栓皮細胞往往含有黃褐色樹脂樣物質, 部分栓皮層脫落。其內側為皮層, 由8~12層柔細胞組成, 約佔1/5, 細胞呈類圓形、類橢圓形、長橢圓形, 有細胞間隙; 其中偶有少數1~2個柔細胞中含有紫紅色之色素。內皮部約佔皮層之2/3, 細胞較小, 細胞呈多角形、長多角形, 其中有較多的小型柔細胞中含有紫紅色之色素。皮層內散生單獨或連生之纖維群及異形石細胞, 斷續排列成環, 纖維1~3層, 細胞呈類圓形、類方形、不等徑性多角形, 縱切面呈長細紡錘形, 壁厚, 直徑5~25 μ m, 強木化, 其上有許多單晶出現, 直徑2~8 μ m, 異形石細胞膜孔及層紋明顯, 縱切面為不規則形。篩部由小型壁薄之篩管細胞組成, 排列緊密, 細胞呈類圓形、類方形、不規則形。形成層由1~2層細胞組成, 略成扁長方形。木質部廣闊, 約佔1/3, 由導管、木部纖維、木部柔細胞及髓線細胞組成; 導管, 單個散生或2~3個連生, 細胞呈類圓形、等徑性多角形, 直徑45~178 μ m, 壁厚, 強木化, 主為有緣孔紋, 偶見有網紋導管; 木部纖維呈類方形、長方形、等徑性多角形, 直徑7~25 μ m, 壁厚, 木化; 木部柔細

胞，呈放射狀排列，細胞呈三角形、類方形、類長方形或不規則形，木化或弱木化。髓線由2～3列細胞組成，細胞呈橢圓形、長橢圓形、長多角形，放射狀排列。中間髓部細胞呈類圓形、等徑性多角形、長多角形。

[粉末鑑別]：本品為淡紅棕色之粉末，氣微香而特異。木栓細胞及薄壁細胞含黃棕色或紅棕色物質。纖維及石細胞嵌有草酸鈣小方晶。導管為有緣孔紋導管，偶見有網紋導管。

紅骨蛇(南五味子莖)



A. 外形 B. 略圖 C. 橫切面

D. 解離要素

1. 導管 2. 嵌晶纖維 3. 異形石細胞

Kadsura japonica

Kadsura japonica (Schisandraceae)

蓬 莪 朮

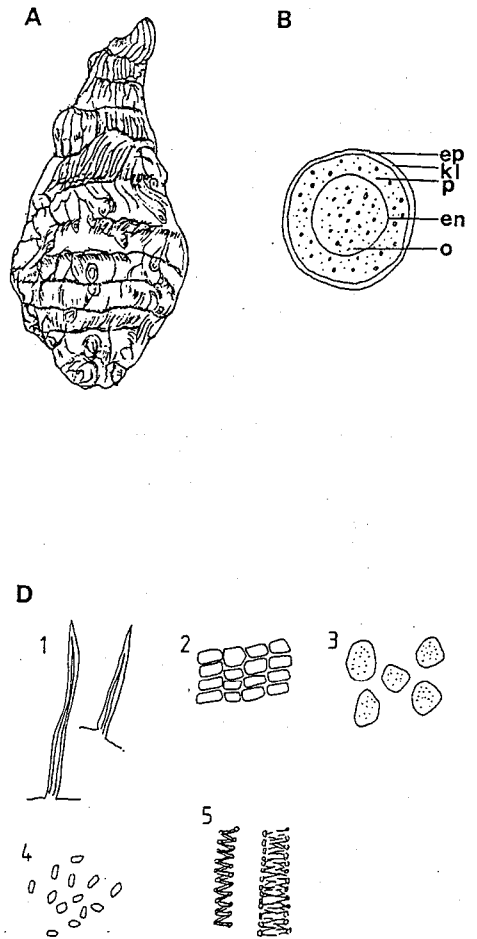
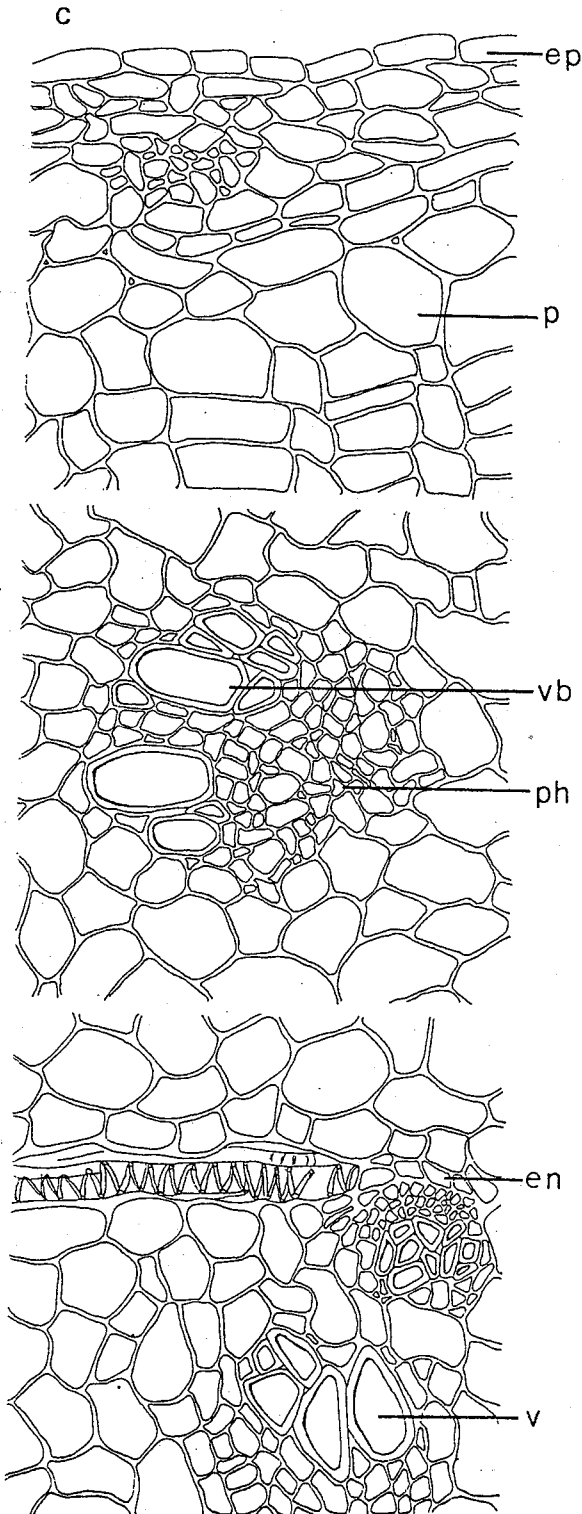
Curcumae phaeocaulis Rhizoma

Curcuma phaeocaulis VAL. (Zingiberaceae)

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其主根莖之橫斷面，最外緣為表皮，一層細胞呈長方形、類長方形。表皮細胞常附生壁厚、單細胞之非腺毛。其下為2～3層皮下細胞，細胞呈類圓形、不規則形。再內為木栓層由5～6層細胞組成，淡黃色～黃棕色，排列整齊，細胞壁薄，細胞呈長方形、類長方形，木化。其內側為皮層，廣闊，約佔半徑之1/5，細胞呈類圓形、類橢圓形，有細胞間隙；皮層柔細胞中含有澱粉粒及黃褐色樣分泌物；維管束散生，為外篩包圍維管束。內皮層由一層細胞組成，細胞呈長方形、類長方形，內皮層旁密生許多橫向生長之維管束，形成中柱與皮層間明顯之維管束環帶。中柱內維管束散生，為外篩包圍維管束；篩部由小型壁薄之篩管細胞組成，排列緊密，細胞呈類圓形、不規則形。導管單個散生或4～6個連生，細胞呈類橢圓形、不等徑性多角形，直徑40～50 μ m，壁厚，弱木化，主為螺紋及網紋導管。中柱薄壁細胞內亦含有澱粉粒。

[粉末鑑別]：本品為淡黃綠色之粉末，氣微香而特異。壁厚、頂端銳尖之單細胞非腺毛顯而易見。木栓細胞淡黃色～黃棕色，細胞呈長方形。皮層及中柱薄壁細胞含澱粉粒及黃褐色樣分泌物；澱粉粒呈短桿形或卵形，直徑20～30 μ m，層紋不明顯；油細胞呈類圓形，內有橘黃色油滴。導管弱木化，為螺紋、網紋及環紋導管。

蓬莪朮



- A. 外形 B. 略圖
C. 橫切面 D. 解離要素
1. 非腺毛 2. 栓皮細胞
3. 油滴 4. 澱粉粒 5. 導管

Curcuma phaeocaulis Rhizoma
Curcuma phaeocaulis (Zingiberaceae)

天 麻

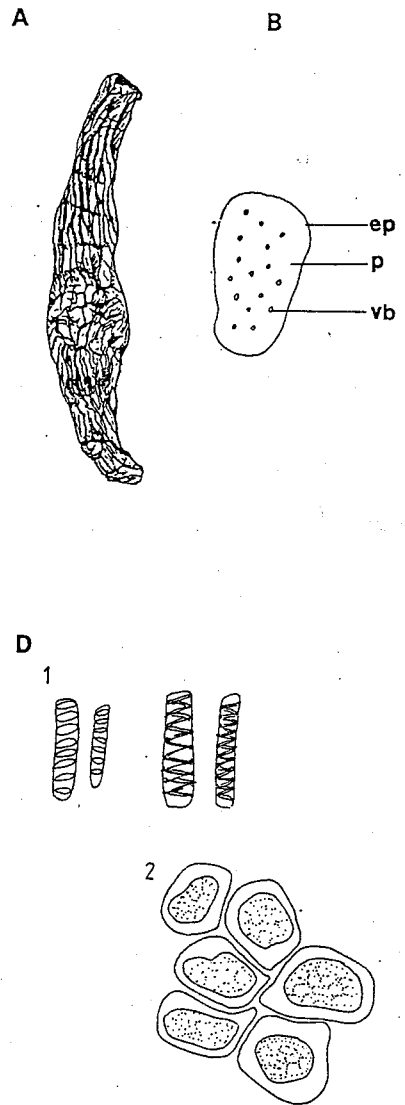
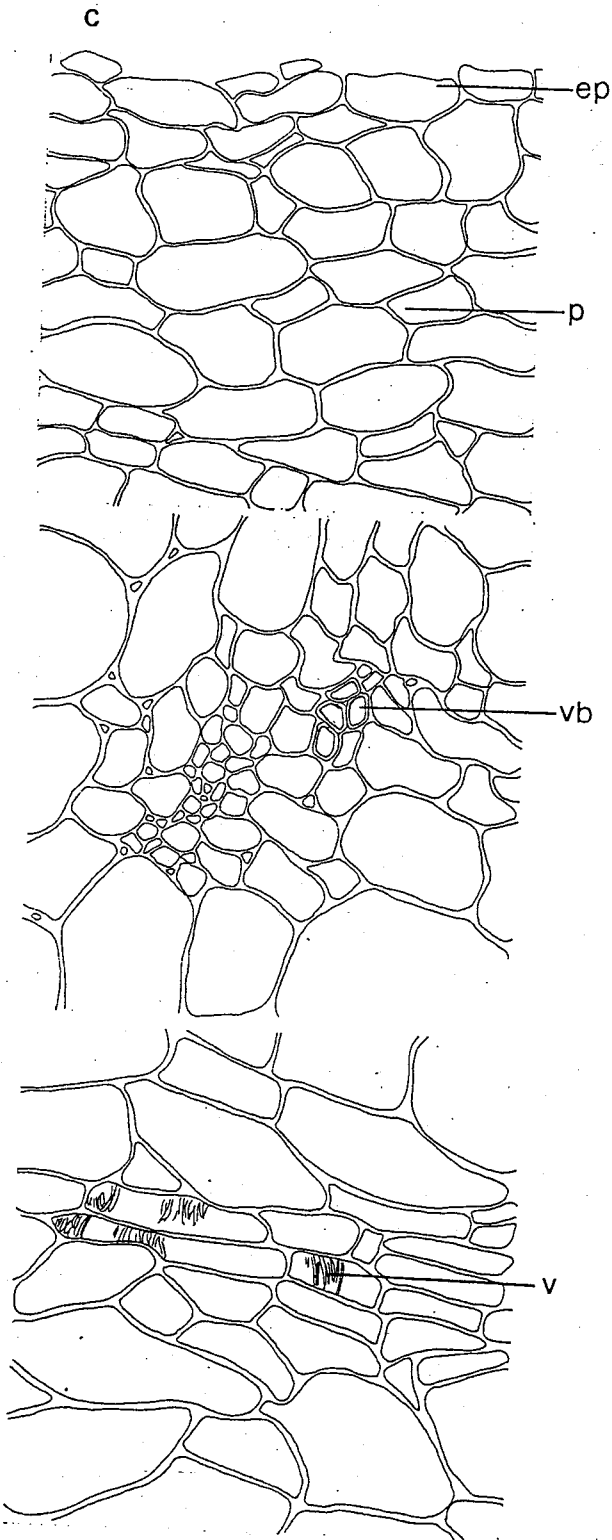
Gastrdiae Rhizoma

Gastrodia elata BLUME (Orchidaceae)

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其塊莖之橫斷面，最外緣為表皮，一層細胞呈類長方形、不規則形。其內側為皮層，廣闊，細胞呈類圓形、類橢圓形、不等徑性多角形，靠外側之1至數列皮層細胞壁稍增厚，中柱薄壁細胞較大，細胞呈類圓形或不等徑性多角形。維管束散生，為外篩包圍維管束；篩部由小型壁薄之篩管細胞組成，排列緊密，細胞呈不規則形；導管2至數個連生，細胞呈類圓形或多角形，直徑10～30 μm ，弱木化，主為螺紋導管，偶見有環紋導管。薄壁細胞內含有含有多糖類團塊狀物。

[粉末鑑別]：本品為淡黃棕色之粉末，味微甜。導管弱木化，為螺紋及環紋導管。

天麻



A. 外形 B. 略圖 C. 橫切面

D. 解離要素

1. 導管

2. 柔細胞中的多醣體

Gastrodiae Rhizoma
Gastrodia elata (Orchidaceae)

何首烏

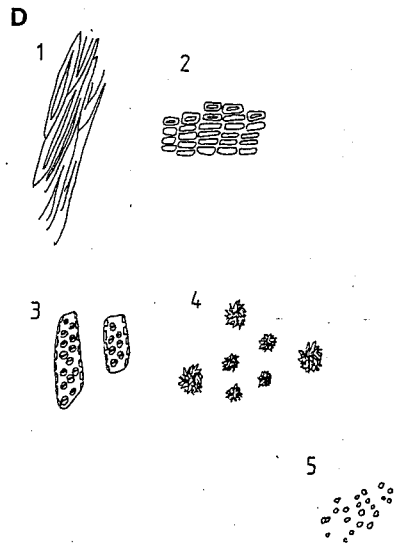
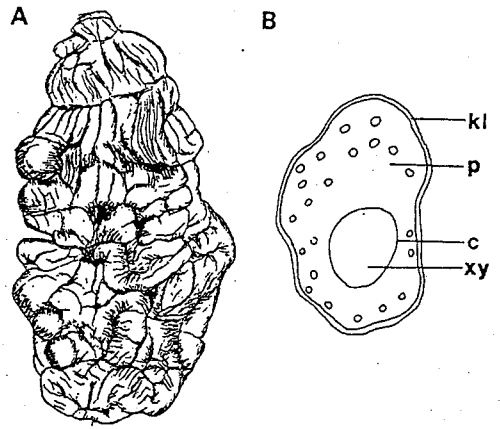
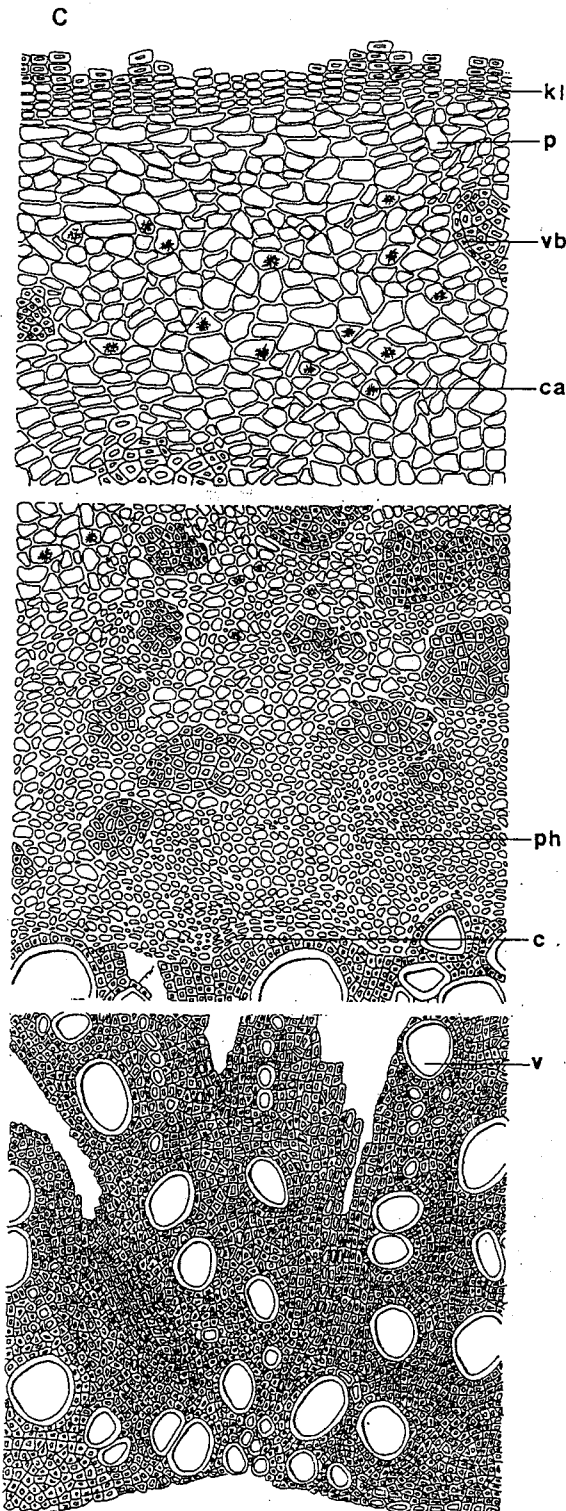
Polygoni multiflori Radix

Polygonum multiflorum THUNBERG (Polygonaceae)

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其塊莖之橫斷面，最外緣為木栓層，黃棕色，5～8層，排列整齊，細胞壁薄，細胞呈長方形、類長方形。有的栓皮細胞往往含有黃棕色內容物，部分栓皮層脫落。其內側為由柔細胞組成之皮層，細胞呈類圓形、橢圓形、類多角形，皮層細胞中散見草酸鈣簇晶，大小約20～75 μ ，及澱粉粒，大小約5～22 μ ；皮層中散有維管束，一種是單獨的維管束，一種是複合維管束，均為外韌型，篩部由小型壁薄之篩管細胞組成，排列緊密，細胞呈不規則形。形成層呈環狀。木部廣闊，約佔半徑之1/2，由導管、木部纖維組成，呈放射狀排列；導管，單個散生或2～3個連生，直徑20～180 μ m，細胞呈類圓形、橢圓形，愈往中心部分，導管口徑愈小，導管主為有緣孔紋導管；木部纖維呈類方形、略等徑性多角形，壁厚，具隔膜，木化。

[粉末鑑別]：本品為紅棕色之粉末，味微苦。木栓細胞長方形，呈黃棕色至紅棕色。皮層柔細胞含草酸鈣簇晶及澱粉粒；草酸鈣簇晶大小約20～75 μ m，澱粉粒單粒呈類球形或三角形，直徑5～22 μ m，小粒者成點狀，層紋不明顯。導管木化，主為有緣孔紋導管。

何首烏



A. 外形 B. 略圖 C. 橫切面

D. 解離要素

1. 纖維束 2. 栓皮細胞

3. 導管 4. 草酸鈣簇晶

5. 澱粉粒

Polygoni multiflori Radix
Polygonum multiflorum (Polygonaceae)

龍 船 花

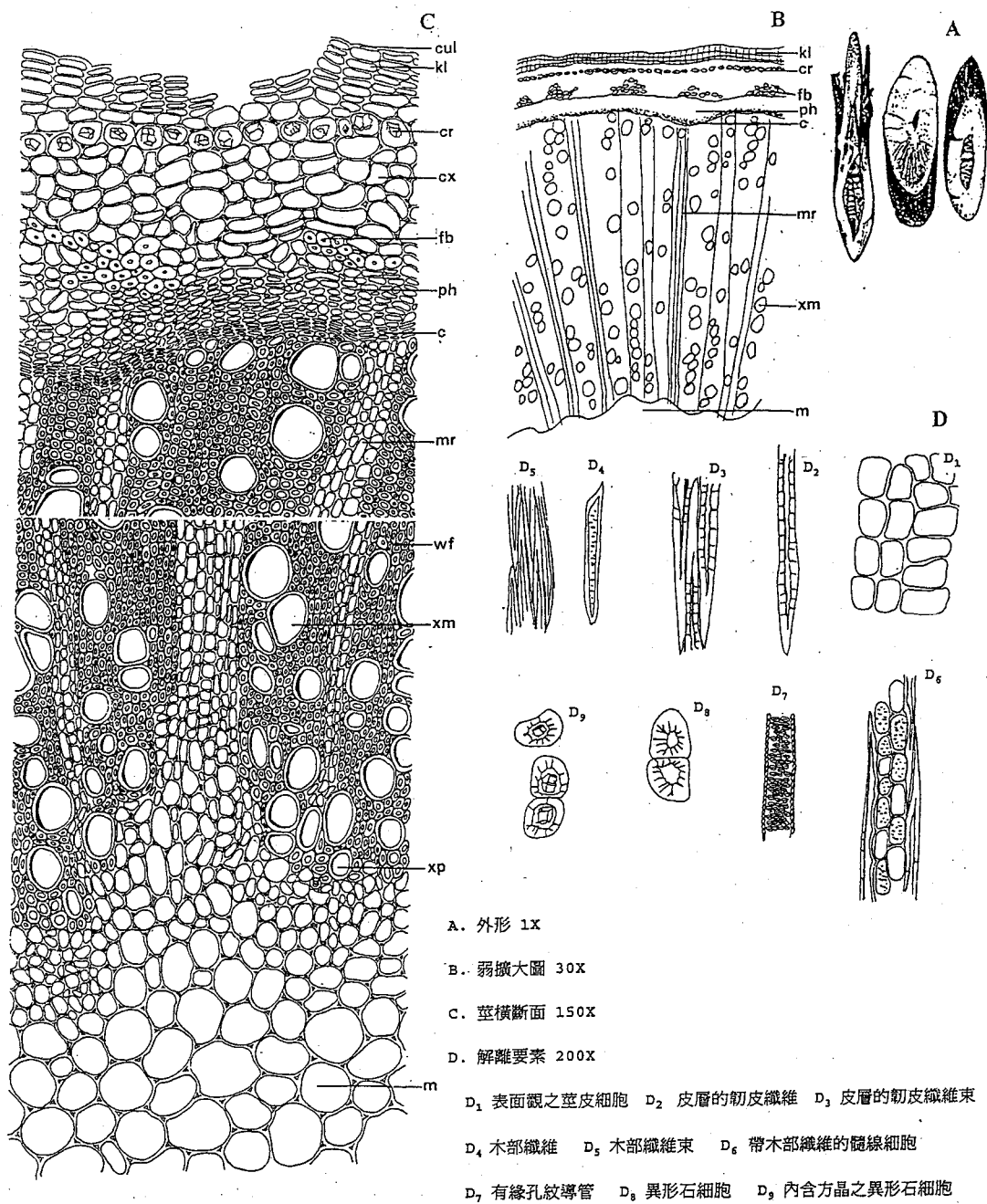
Clerodendri Caulis

Clerodendrum paniculatum L. (Verbenaceae)

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其莖之橫斷面，最外緣為外被角質層之木栓表皮細胞，一列，為破裂狀，細胞呈長方形、類長方形、類方形。栓皮層，淡棕色，5～7層，弱木化，細胞呈長方形、類長方形、類方形，已有部分脫落。皮層，狹窄，由一列含方晶之石細胞、數列柔細胞及皮部纖維束所組成；皮層第二列，有一列明顯含方晶之石細胞，細胞呈類方形、類圓形、類橢圓形；皮層柔細胞，細胞呈類方形、類圓形、類長方形、類多邊形、類橢圓形，具有細胞間隙；與韌皮部相接處，散見有淡黃色皮層纖維束群。維管束，由韌皮部、形成層及木質部組成。韌皮部，狹窄，細胞小呈類方形、類圓形、類長方形、類多邊形、類橢圓形及類扁長方形。形成層，明顯，三～四列，細胞小呈扁長方形。木質部，由導管、木部纖維及髓線細胞組成；導管，大型，徑40～160 μ m，細胞呈類方形、類圓形、類長方形、類多角形、類橢圓形及類卵圓形，強木化；木部纖維束群，徑6～20 μ m，木化。髓線，明顯，三～七行，細胞呈類長方形、類方形及類扁長方形。中央為髓部，除少部份與原生木部相接處，有部份殘留外，多已破損；髓部柔細胞，往內細胞愈大，細胞呈類方形、類圓形、類長方形、類多邊形、類橢圓形，具有明顯細胞間隙。

[粉末鑑別]：粉末淡黃褐色，氣微，味淡而特殊。以顯微鏡檢視其莖粉末，表面觀之木栓細胞，呈紅棕色，壁薄，微木化，細胞呈類長方形、類方形大小。縱面觀之皮部纖維，甚長，呈長紡錘形，多條成束狀，淡黃色，木化，具明顯膜孔。縱面觀之韌皮纖維，偶見有紋孔，多條成束，木化。縱面觀之韌皮纖維及髓線細胞，髓線細胞可見有明顯的紋孔。導管，徑40～160 μ m，或更大，主為有緣孔紋導管，偶見有網紋導管。含方晶之石細胞，細胞呈類方

形、類圓形、類橢圓形，具明顯的膜孔，淡黃色，木化，徑 45 ~ 100 μm 。



龍船花
Clerodendri Caulis
Clerodendrum paniculatum L. (Verbenaceae)

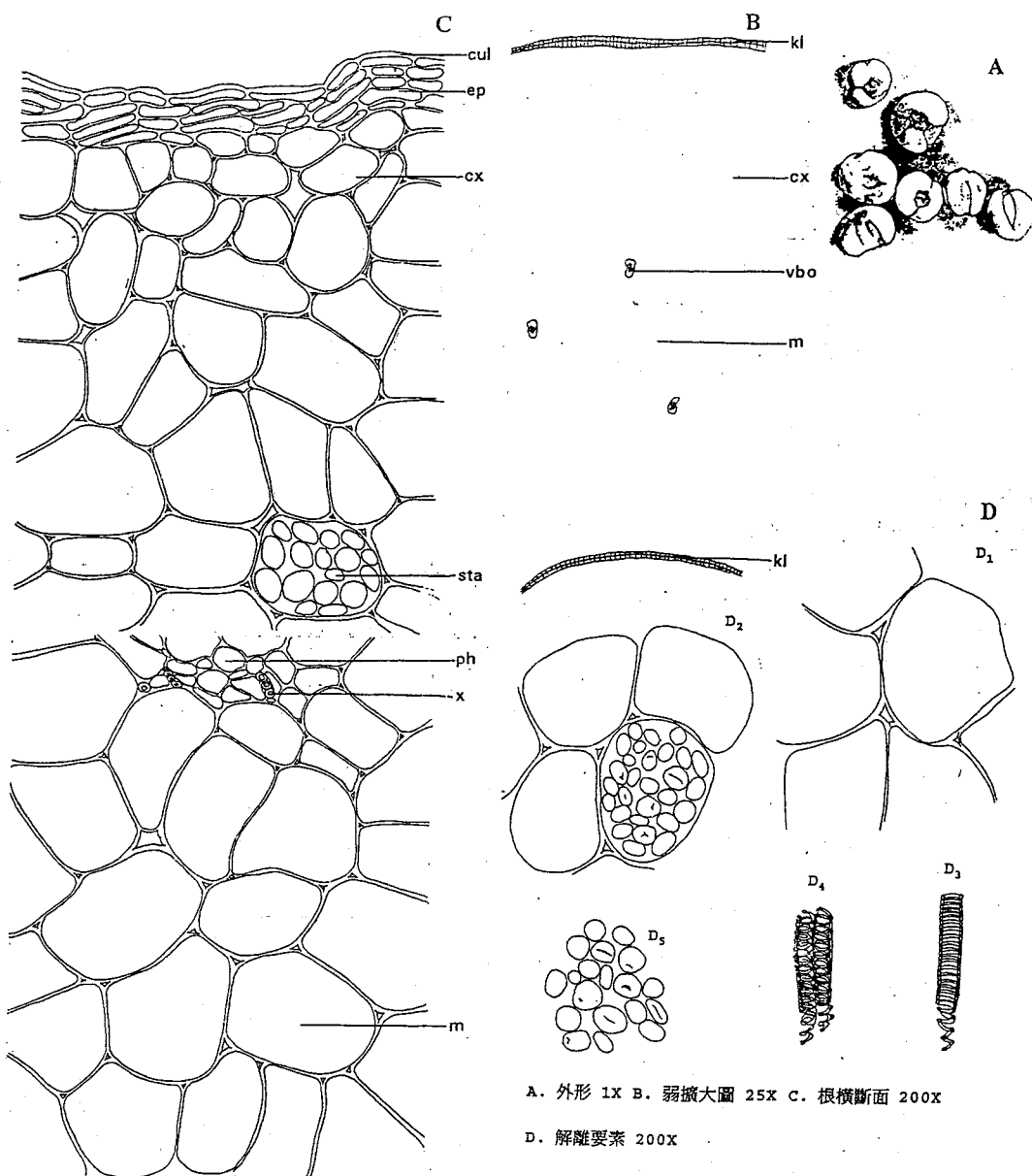
珠 貝

Thunbergii Fritillariae Bulbus

Fritillaria verticillata Willd. var. *thunbergii* Baker (Liliaceae)

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其未經加工去芽的乾燥鱗莖之橫斷面，最外緣為外被角質層之表皮細胞，一行，細胞呈長方形、類方形。栓皮層，3-4層，細胞呈長方形、類長方形。皮層，由含豐富澱粉之大型細胞組成向內漸大，細胞呈長方形、類長方形、類方形、類多邊形、類圓形，具有明顯的細胞間隙；偶見散生之有限外韌型維管束，維管束由導管、篩部柔細胞所組成，導管，單個散生或數個連生，徑 $10 \sim 18\mu\text{m}$ ，主由螺旋紋及環紋導管所組成，篩部柔細胞，小型，細胞呈類方形、類長方形、類圓形，內含豐富的澱粉。

[粉末鑑別]：粉末類白色，氣微，味略苦。以顯微鏡檢視其未經加工去芽的乾燥鱗莖粉末，大型皮層柔細胞，細胞呈類長方形、類多邊形、類圓形及類方形，具有明顯的細胞間隙，內含豐富的澱粉。縱面觀之表皮細胞及栓皮細胞，可見草酸鈣方晶或偶見梭形、棒形及簇形之草酸鈣結晶，大小約 $10 \sim 20\mu\text{m}$ 。導管，徑約 $10 \sim 18\mu\text{m}$ ，主由螺旋紋及環紋導管所組成，微木化。澱粉粒，極多，為粉末的來源；單個簇生，鮮有複生，呈長卵形、類卵形、類橢圓形、類圓形、類貝殼形及類燈泡形；臍點隱約可見，為點狀、短縫狀、人字狀及彎曲線狀；層紋，約略可見；大小不一，徑約 $6 \sim 60\mu\text{m}$ ，長約 $65\mu\text{m}$ 。



A. 外形 1X B. 弱擴大圖 25X C. 根橫斷面 200X

D. 解離要素 200X

D₁ 皮層柔細胞 D₂ 含澱粉之皮層柔細胞 D₃ 環紋導管

D₄ 螺旋紋導管 D₅ 澱粉

珠貝
Thunbergii Fritillariae Bulbus
Fritillaria thunbergii (Liliaceae)

馬 齒 莧

Portulacae Herba

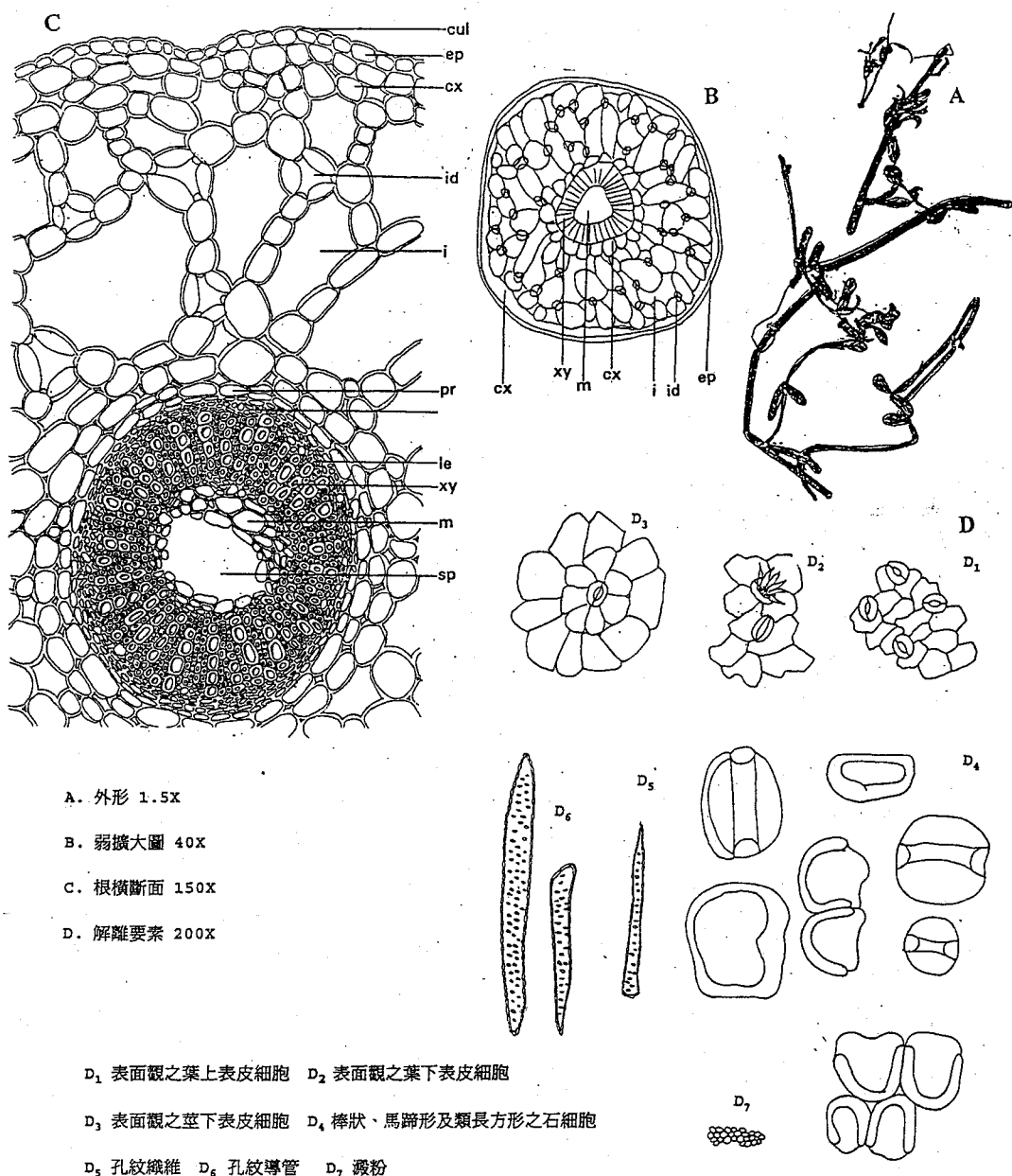
Portulaca oleracea LINN. (Portulacaceae)

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其莖之橫斷面，最外緣為外被厚角質層之表皮細胞，一列，細胞呈長方形、類長方形、類方形，顯紅～紫色；外緣表面偶見有氣孔。皮層約佔 2/3 廣，外緣及近維管束內緣，有一～四層柔細胞，細胞呈類圓形、長方形、類長方形、類方形、類多邊形、類橢圓形，具有明顯的細胞間隙；中間為含有類三角柱形之異形石細胞，淡黃白色，具大空隙之類海綿組織的柔細胞，細胞呈長方形、類長方形、類方形、類多邊形、類圓形，具有明顯的細胞間隙。內為外韌型維管束，環狀排列，韌部細胞，細小，細胞呈長方形、類長方形、類方形、類多邊形、類圓形；形成層，一～三列，明顯；木質部，約佔維管束 2/3，細胞呈類多角形、類長方形、類多邊形、類圓形，中央為髓部，常見裂隙，細胞呈長方形、類長方形、類方形、類多邊形、類圓形。柔細胞內含小粒澱粉。

[粉末鑑別]：粉末綠褐色～灰綠色，有刺激性臭氣，味略酸而淡。

以顯微鏡檢視其莖粉末，表面觀之葉的上表皮細胞，隔質，細胞呈類長方形、類多角形、類多邊形、不規則多角形，有多數腎形氣孔。表面觀之葉的下表皮細胞，細胞呈類長方形、類多角形、類多邊形、不規則多角形，有帶非腺毛之腎形氣孔。縱面觀之莖表皮細胞，隔質，細胞呈類長方形、類多角形、類多邊形、不規

則多角形，偶見有腎形氣孔。棒狀、馬蹄形及類長方形之異形石細胞。具孔紋之纖維。具孔紋之假導管，徑 $17 \sim 35\mu\text{m}$ 。



馬齒莧
Portulacae Herba
Portulaca oleracea LINN. (Portulacaceae)

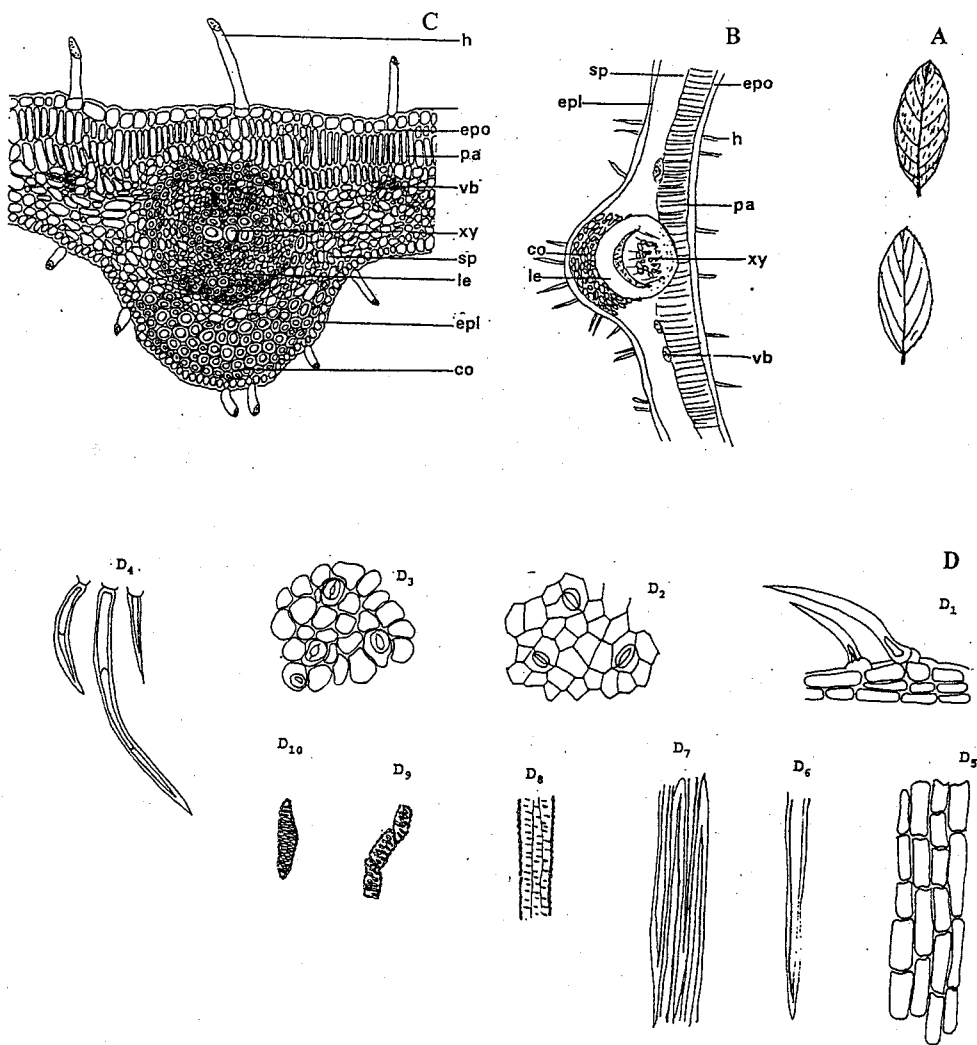
番 瀉 葉

Sennae Folium

Cassia acutifolia DELILE (*Cassia senna* L.) (Leguminosae.)

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其葉之橫斷面，最外緣為外被厚角質層之上表皮細胞，一行，細胞呈方形、類方形、類圓形；外部散見有單細胞非腺毛；表面偶見有氣孔；散含有粘液質，積聚於內壁。葉肉為兩面柵狀式，上表皮細胞為長條狀之柵狀組織，約 $140\mu\text{m}$ ；下表皮細胞為短狀或類方形之柵狀組織，約 $40 \sim 70\mu\text{m}$ ；中間為海綿組織，細胞呈類圓形，偶含有草酸鈣簇晶或方晶。中肋主脈維管束，上方有柵狀組織，下方有厚角組織，中間有；維管束呈放射狀排列，上方為微木化的中柱鞘纖維束，下方為韌部，細胞細小。兩側葉肉可見有小型維管束。

[粉末鑑別]：粉末綠褐色～淡棕色，氣微，味略甘微苦。以顯微鏡檢視其葉粉末，縱面觀之葉上含非腺毛之表皮細胞，細胞呈類長方形、扁長方形。表面觀之葉上表皮細胞，隔質，細胞呈類多角形、類方形，可見有腎形氣孔。表面觀之葉下表皮細胞，細胞呈類多邊形、類方形，可見有多數腎形氣孔。單細胞非腺毛，壁稍厚，有疣狀突起，基部稍彎曲，長 $85 \sim 380\mu\text{m}$ 或更長。縱面觀之柵狀組織，呈整齊長條狀排列。多數長條形的晶纖維。導管，徑 $10 \sim 20\mu\text{m}$ ，主由網紋、孔紋、有緣孔紋導管所組成。



A. 外形 1.5X B. 弱擴大圖 65X C. 根橫斷面 150X

D. 解離要素 200X

D₁ 縱面觀之帶非腺毛之葉表皮細胞 D₂ 表面觀之含氣孔葉上表皮細胞

D₃ 表面觀之含氣孔葉下表皮細胞 D₄ 縱面觀之葉表皮細胞非腺毛

D₅ 縱面觀之葉柵狀組織 D₆ 韌皮纖維 D₇ 韌皮纖維束

D₈ 孔紋導管 D₉ 有緣孔紋導管 D₁₀ 網紋導管

番瀉葉
Sennae Folium
Cassia acutifolia DELILE (Leguminosae)

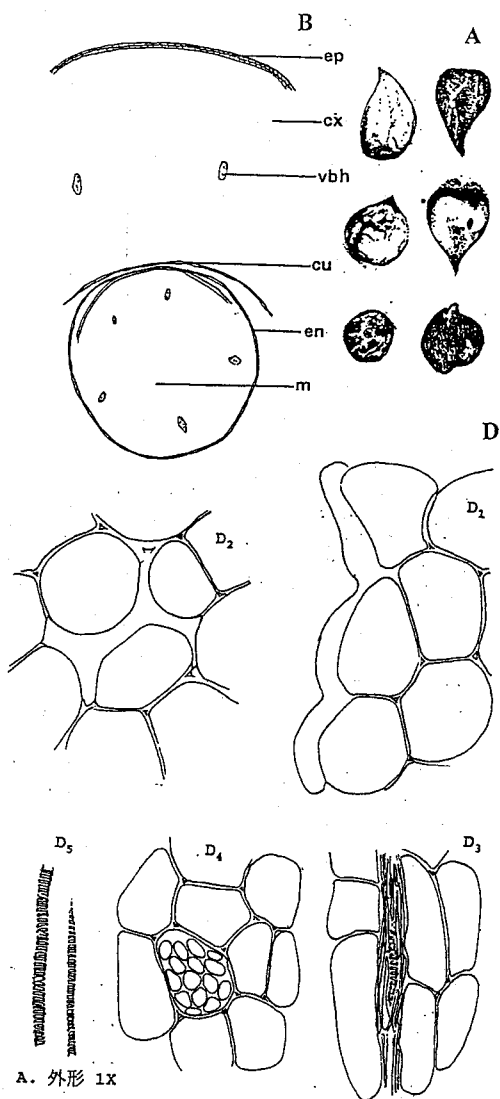
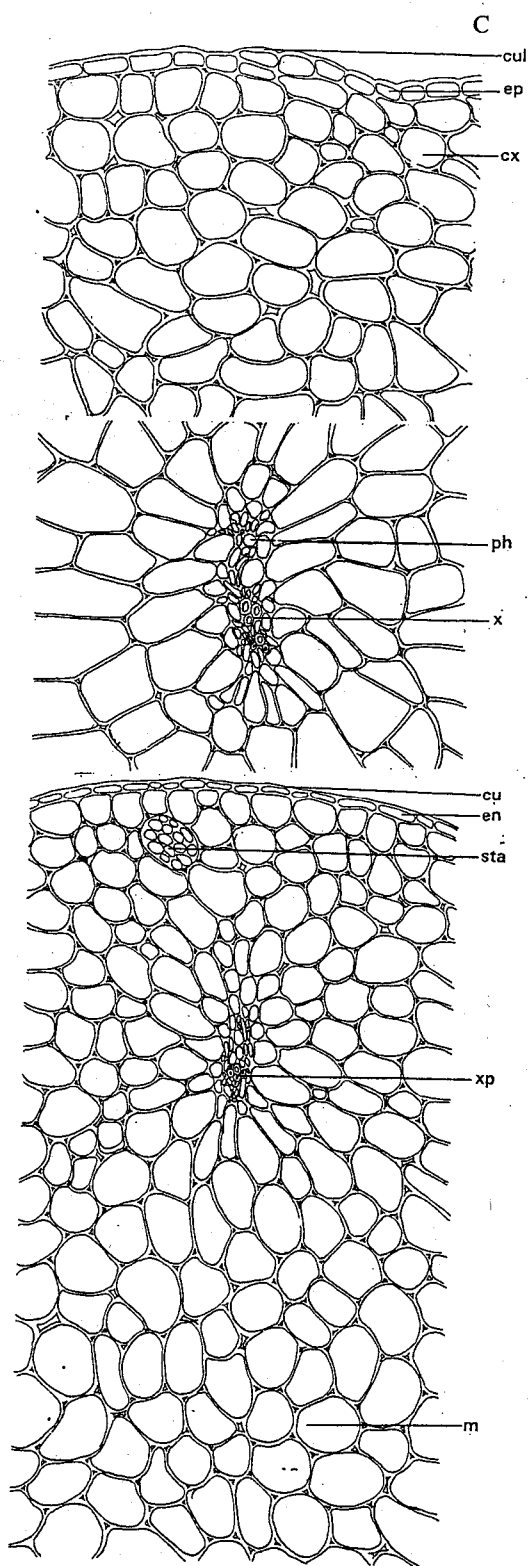
山慈姑

Santsigu Tuber

Tulipa edulis BAKER (Liliaceae)

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其乾燥塊狀根莖之橫斷面，最外緣為外被角質層之表皮細胞，一行，細胞呈長方形、類方形。皮層，約佔 2/3 廣，由含豐富澱粉之大型細胞組成向內漸大，細胞呈長方形、類長方形、類方形、類多邊形、類圓形，具有明顯的細胞間隙；偶見散生之有限外韌型維管束，維管束由導管、篩部柔細胞所組成，導管，單個散生或數個連生，徑 10~18 μ m，主由螺旋紋及環紋導管所組成，篩部柔細胞，小型，細胞呈類方形、類長方形、類圓形，內含豐富的澱粉。中間部，皮層與內皮層分離，內皮層，外緣為外被角質層之內皮細胞，一行，內為中柱鞘，約佔 1/3，由含豐富澱粉之細胞組成向髓部漸大，細胞呈長方形、類長方形、類方形、類多邊形、類圓形，具有明顯的細胞間隙；偶見散生之有限外韌型維管束，維管束由導管、篩部柔細胞所組成，導管，單個散生或數個連生，徑 10~18 μ m，主由螺旋紋及環紋導管所組成，篩部柔細胞，小型，細胞呈類方形、類長方形、類圓形，內含豐富的澱粉。

[粉末鑑別]：粉末淡黃白色~類白色，氣淡，味略帶麻辣。以顯微鏡檢視其乾燥塊狀根莖。縱面觀之含錯入角質的皮部大型柔細胞，表面觀之含錯入角質的皮部大型柔細胞，內含豐富澱粉。縱面觀之帶皮部柔細胞的維管束，導管，徑約 10~17 μ m，主由螺旋紋及環紋導管所組成，微木化。澱粉粒，極多，為粉末的來源；單個簇生，鮮有複生，呈長卵形、類卵形、類橢圓形、類圓形及類貝殼形；臍點隱約可見，為點狀、短縫狀、人字狀及彎曲線狀；層紋，約略可見；大小不一，徑約 6~50 μ m，長約 50 μ m。



A. 外形 1X

B. 弱擴大圖 15X

C. 根橫斷面 150X

D. 解離要素 200X

D₁ 縱面觀之鱗莖表皮細胞

D₂ 表面觀之鱗莖表皮細胞

D₃ 縱表面觀之皮層柔細胞及維管束

D₄ 含澱粉之皮層柔細胞

D₅ 環紋導管

山慈姑
Santsigu Tuber
Tulipa edulis BAKER (Liliaceae)

石 韋

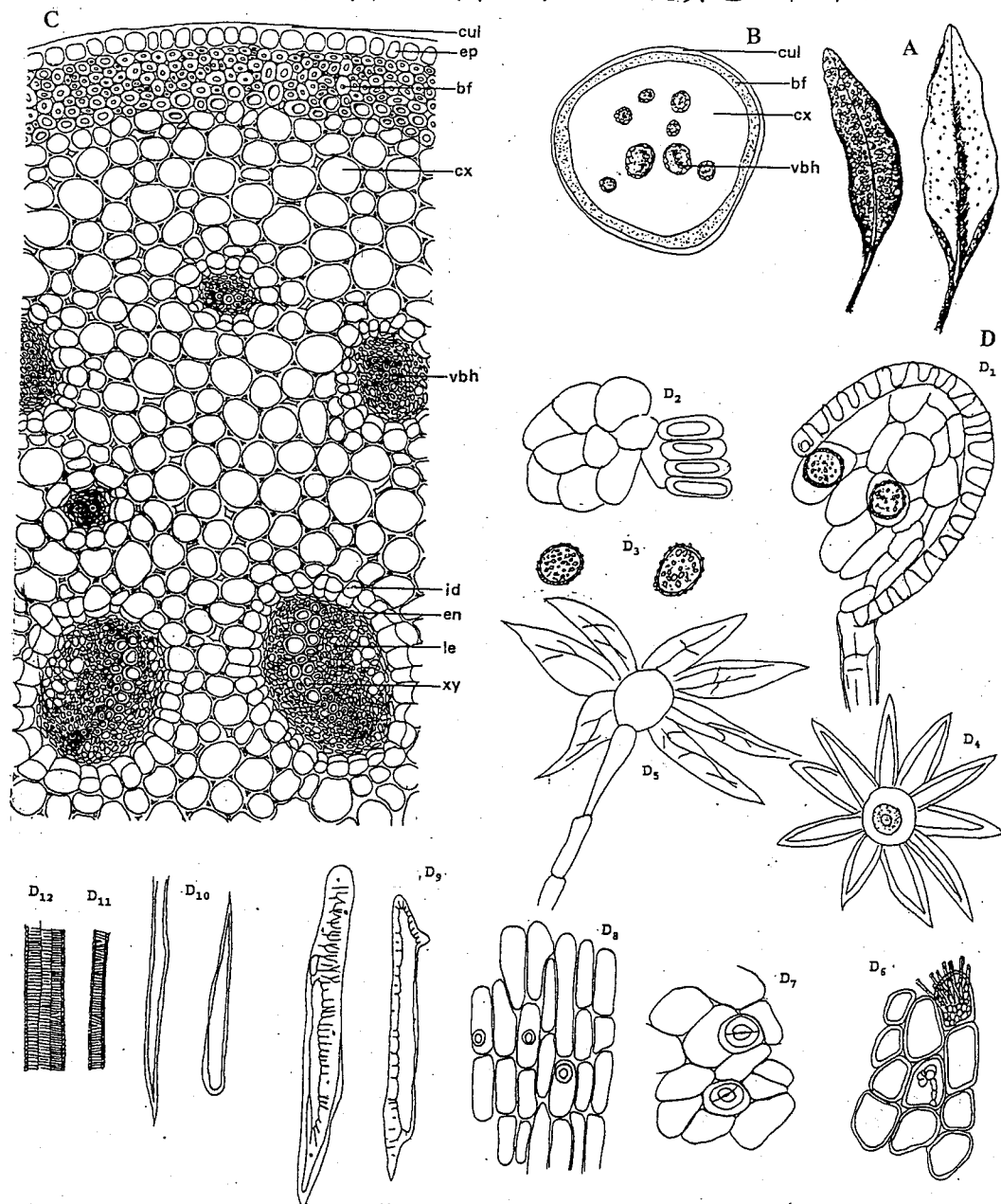
Pyrrosiae Herba

Pyrrosia petiolosa (CHRIST) CHING

[組織鑑別]：以顯微鏡檢視其下端葉柄之橫斷面，最外緣為外被厚角質層之表皮細胞，一行，細胞呈方形、類方形、類圓形，淡棕色。皮層之韌皮纖維，五～八列，木化，黃棕色，細胞呈類圓形、類方形、類卵圓形、類多角形。皮層，細胞呈類圓形、類橢圓形、類卵圓形、類長方形，類多邊形，具有明顯的細胞間隙；內含有二個卵圓形，大小相同之大形外篩包圍型維管束，外緣具異形石細胞之內皮，並約有六～七個卵圓形，較小形之外篩包圍型，維管束外緣亦具異形石細胞之內皮。外緣之異形石細胞，呈內厚外薄之類卵圓形，強木化，紅色～黃棕色。維管束，為外篩包圍型，由篩部柔細胞、導管及纖維組成；篩部柔細胞，外略大內細小，細胞呈類圓形、類橢圓形、類卵圓形；木質部，由導管及纖維組成，連生為微彎曲形，徑7～45 μ m。

[粉末鑑別]：粉末黃棕色，氣微，味微苦澀。以顯微鏡檢視其粉末，類卵圓形帶柄之孢子囊，其囊帶為紅色～黃棕色。孢子囊帶細胞，木化，縱面觀呈類長方形、類方形，側壁及內壁較厚，外壁薄；表面觀呈扁長方形，徑28～35 μ m，長36～80 μ m，中間較厚，四周較薄。孢子極多，橫面觀呈橢圓形，縱面觀呈類圓形、類豆形，大小寬36～48 μ m，長50～80 μ m，裂縫約為孢子的一半，外壁厚2～3 μ m，週壁有瘤狀突起物。星狀毛，極多，甚大，淡黃棕色，伴生有五～九個毛細胞，毛的長短懸殊，作輻射狀排列成上下兩輪，呈披針形，徑25～70 μ m，長160～290 μ m。表面觀之葉上表皮細胞，細胞呈類長多角形、類長方形，週壁略厚，外被有黃棕色非腺毛，易斷裂，基部有網狀痕跡。表面觀之葉下表皮細胞，細胞呈類多角形、類長方形，週壁較薄；氣孔甚多，呈類圓形，徑30～40 μ m，外有三～六個副衛細胞。葉柄縱面觀之表皮細胞，細胞呈扁長方形、類長方形，偶見有類圓形的氣孔。

異形石細胞，伴生於內皮，呈淡紅色～深紅色，徑20～75 μm ，具有明顯膜孔。皮部纖維，成束，長，呈淡黃色，微木化。



D. 解離要素 200X

A. 外形 1X B. 弱擴大圖 25X C. 根橫斷面 150X

D₁ 帶孢子之孢子囊 D₂ 破裂之孢子囊 D₃ 孢子 D₄ 葉片上正面觀之星狀毛

D₅ 葉片上側面觀之星狀毛 D₆ 表面觀之葉上表皮細胞

D₇ 表面觀之葉下表皮細胞 D₈ 表面觀之葉柄表皮細胞 D₉ 維管束外層之異形石細胞

D₁₀ 木部纖維 D₁₁ 階紋導管 D₁₂ 環紋導管

石韋

Pyrrosiae Herba

Pyrrosia petiolosa (christ) ching (Polypodiaceae)

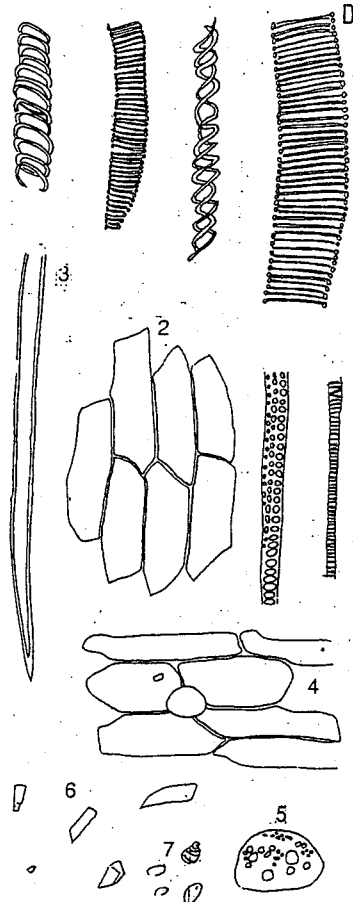
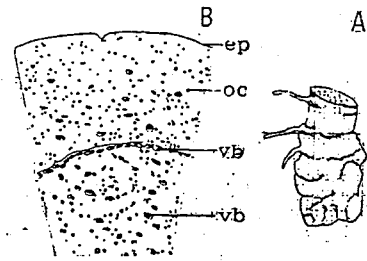
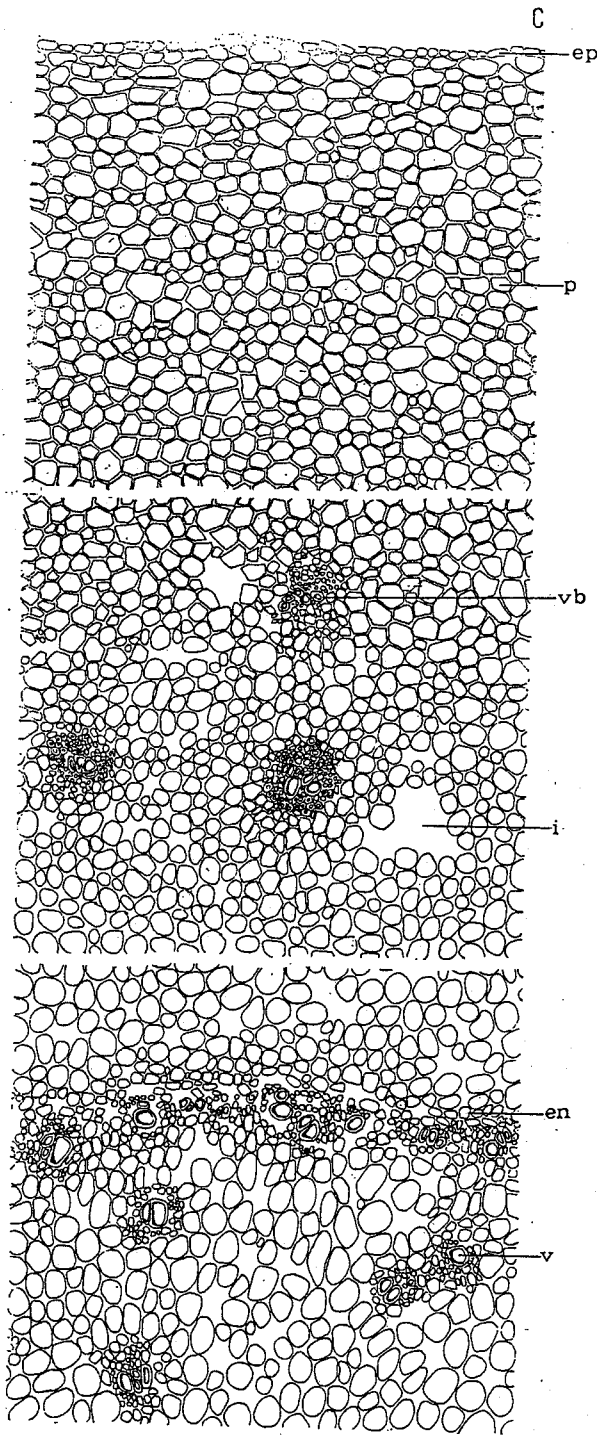
生薑

Zingiber Rhizoma

Zingiber officinale ROSCOE. (Zingibaceae)

[組織鑑別]：本品根莖的橫切面，栓皮層大部分除去，表皮為一層切線性延長的扁平細胞所組成。皮層細胞層數很多，散生有多數葉跡維管束，油細胞隨處可見；皮層外側柔細胞呈多角形，內側呈圓形、橢圓形、卵形。油細胞呈橢圓形或類橢圓形，壁較薄，胞腔內含淡綠黃色油滴。柔細胞內充滿澱粉，主要為單粒，甚少複粒，類卵形大小不一，有明顯的偏心性臍點，柔細胞內並含草酸鈣方晶。內皮層明顯。中心柱占根莖大部分，散列多數外韌型維管束。近中柱鞘處，維管束形狀較小，排列緊密成環狀。中柱內散生多數油細胞，木質部內側或周圍有非木化纖維，直徑 16 ~ 40 μ m。導管以階紋、環紋、螺旋紋、孔紋為主，弱木化，直徑 16 ~ 82 μ m。樹脂細胞常出現在維管束附近，呈類圓形、長圓形，內含紅棕色分泌物。

[粉末鑑別]：粉末淡黃棕色，有特異香氣、味辛辣。油細胞隨處散在，呈橢圓形或類圓形，壁薄，胞腔內含淡綠黃色油滴。澱粉粒極多，多為單粒，臍點細點狀，位於較小端。纖維成束或單個散離，較細長，非木化，直徑 16 ~ 40 μ m，胞腔寬大。導管以階紋，環紋，螺旋紋，孔紋為主，弱木化，直徑 16 ~ 82 μ m。木栓細胞呈長多角形、類長方，壁薄，淡黃色。草酸鈣方晶，少數、細小，呈方形或長方形。



A:外形1/2× B:略圖4× C:組織圖50×

D:粉末及內含物110×

1.導管 2.木栓細胞 3.纖維 4.油細胞

5.油細胞及內含物 6.草酸鈣方晶 7.澱粉粒

生薑

Zingiberis Rhizoma

Zingiber officinale Roscoe. (Zingibaceae)

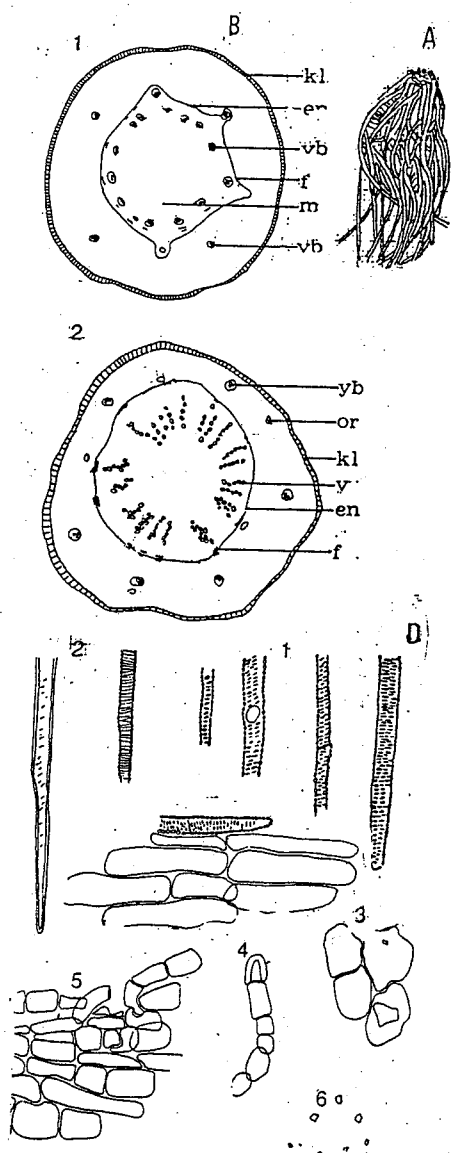
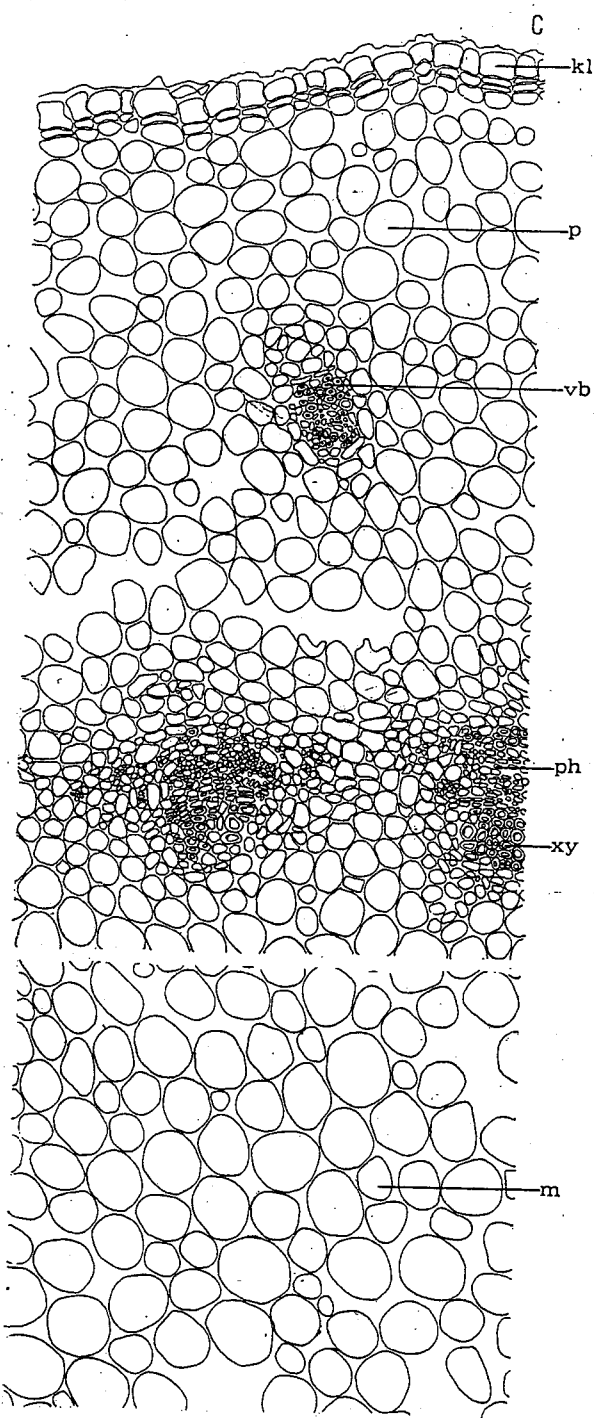
紫 菀

Asteris Radix

Aster tataricus L. f.(Compositae)

[組織鑑別]：本品鬚根的橫切面，最外層為 2 至 3 列木栓細胞，外層細胞呈類長方形、類方形或多角不規則形，外被角質層，呈黃棕色，其下 1 至 2 層細胞扁平，切線性延長，壁薄。皮層由約十餘層柔細胞組成，散生葉跡維管束 3 至 6 個，油室 4 至 6 個，柔細胞呈類圓形、卵圓形，壁厚，主根皮層柔細胞則呈不規則橢圓形或卵圓形，有細胞間隙及裂隙。內皮層明顯，有少數纖維或纖維束散生。中柱直徑約為根部直徑之半，在中柱鞘附近有十數個維管束成環狀排列，主根之維管束則成放射狀排列，髓線明顯，木部導管旁夾雜木部纖維，纖維斷面觀成多角形，纖維直徑 10 ~ 36 μm ，有斜孔紋，弱木化。導管以孔紋、階紋為主，直徑 12 ~ 55 μm ，木化。髓部大，柔細胞壁薄呈類圓形，主根柔細胞則呈不規則皺摺狀，有細胞間隙。

[粉末鑑別]：粉末黃棕色，殘留莖部之栓皮層外有非腺毛，約由 6 個細胞組成，壁薄。栓皮細胞表面觀呈扁長方形或不規則形。導管以孔紋、階紋為主，直徑 12 ~ 55 μm ，木化。纖維兩端尖銳，壁薄，直徑 10 ~ 36 μm ，有斜孔紋，木化。草酸鈣方晶存於栓皮層及柔細胞內。



A:外形1/2× B:1.鬚根略圖16× 2.主根略圖20×
C:組織圖110× D:粉末及內含物110×
1.導管 2.纖維 3.木栓細胞 4.非腺毛
5.木栓細胞及非腺毛 6.草酸鈣方晶

紫菀

Asteris Radix

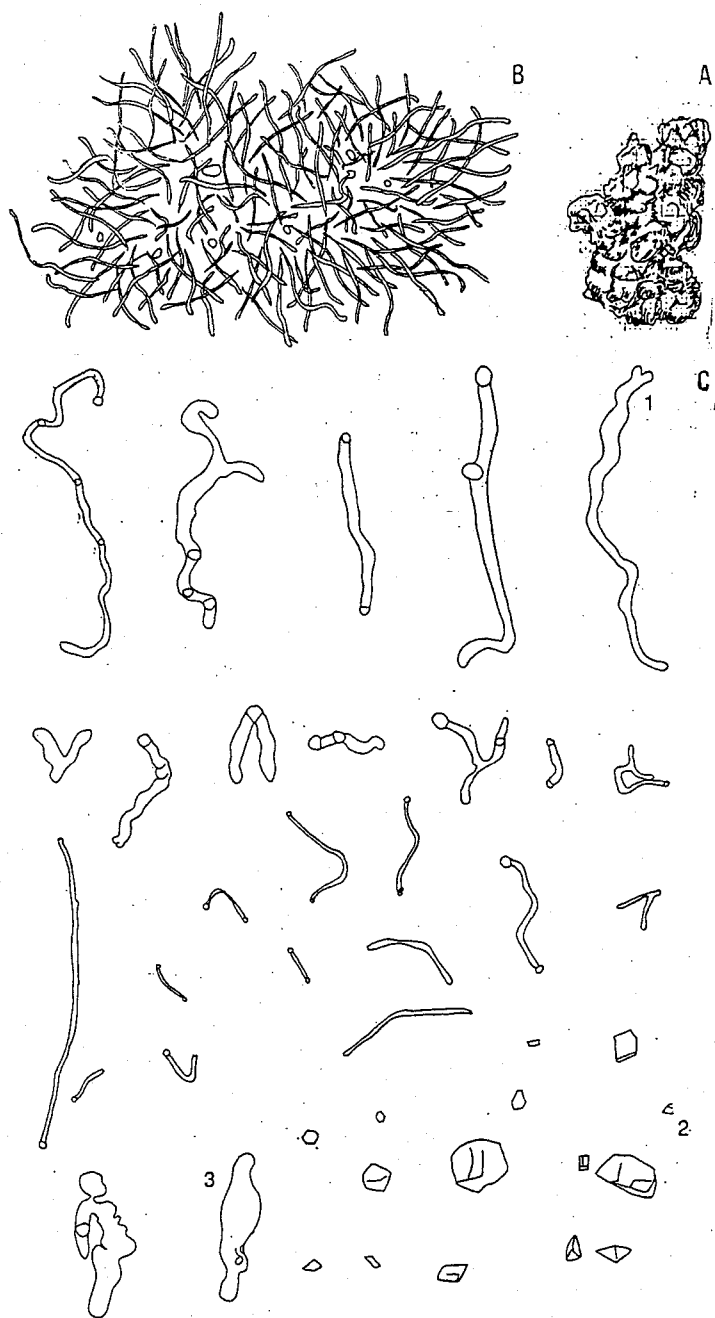
Aster tataricus L. f.(Compositae)

豬 苓

Polyporus

Polyporus umbellatus (PERSON.) PILAT (Polyporaceae)

[組織鑑別]：未經透化處理的切片，在內部只看到不規則的顆粒狀物，用 5 % 的氫氧化鉀溶液透化處理後，團狀即溶解，可顯露出菌絲，橫切面整體為菌絲緊密交織而成，菌絲彎曲，有分枝及結節狀膨大部分，菌絲團大多無色，少數棕色(外層菌絲)，直徑 2 ~ 14 μ m。草酸鈣結晶成不規則多面形、六角形，多角形。粉末中不含一般植物的組織或澱粉。



A:外形 B:略圖60×

C:解離要素 280×

1.菌絲 2.草酸鈣方晶 3.細胞團塊

猪苓

Grifola

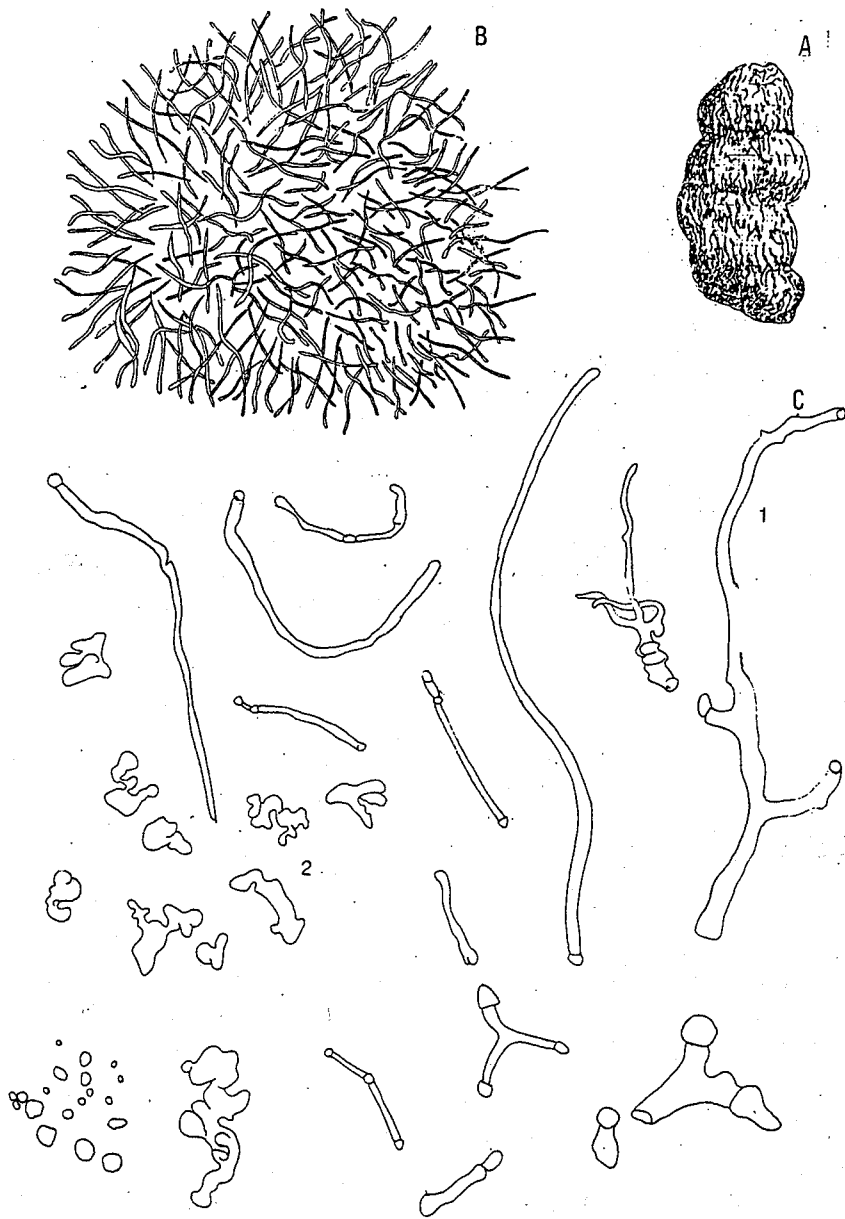
Grifola umbellatus PERS. ER. (Polyporaceae)

茯苓

Poria

Poria cocos WOLF. (Polyporaceae)

[組織鑑別]：未經透化處理的切片，在內部只看到多數類卵形或不規則的顆粒狀物，用5%的氫氧化鉀溶液透化處理後，團塊即溶解，顯露出菌絲。菌絲細長，稍彎曲，部分有分叉或分枝，末端膨大成球形或不整卵形顆粒狀，無色或帶棕色，少數棕色(外層菌絲)，直徑3~14 μ m。橫壁偶見。粉末中不含一般植物的組織、澱粉或草酸鈣結晶。



A:外形 B:略圖40× C:解離要素 200×

1.菌絲 2.細胞圍塊

茯苓

Poria

Poria cocos (SCHW). Wolf. (Polyporaceae)

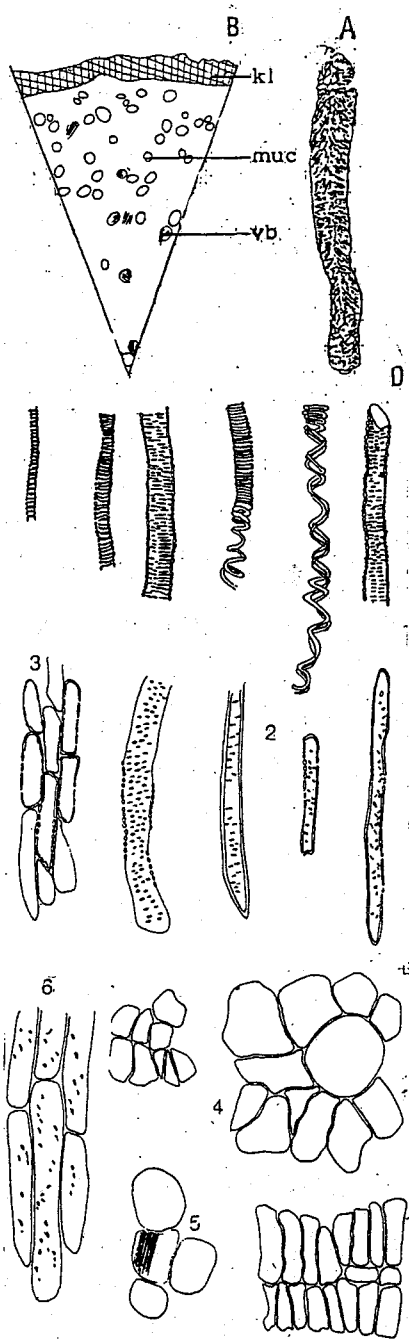
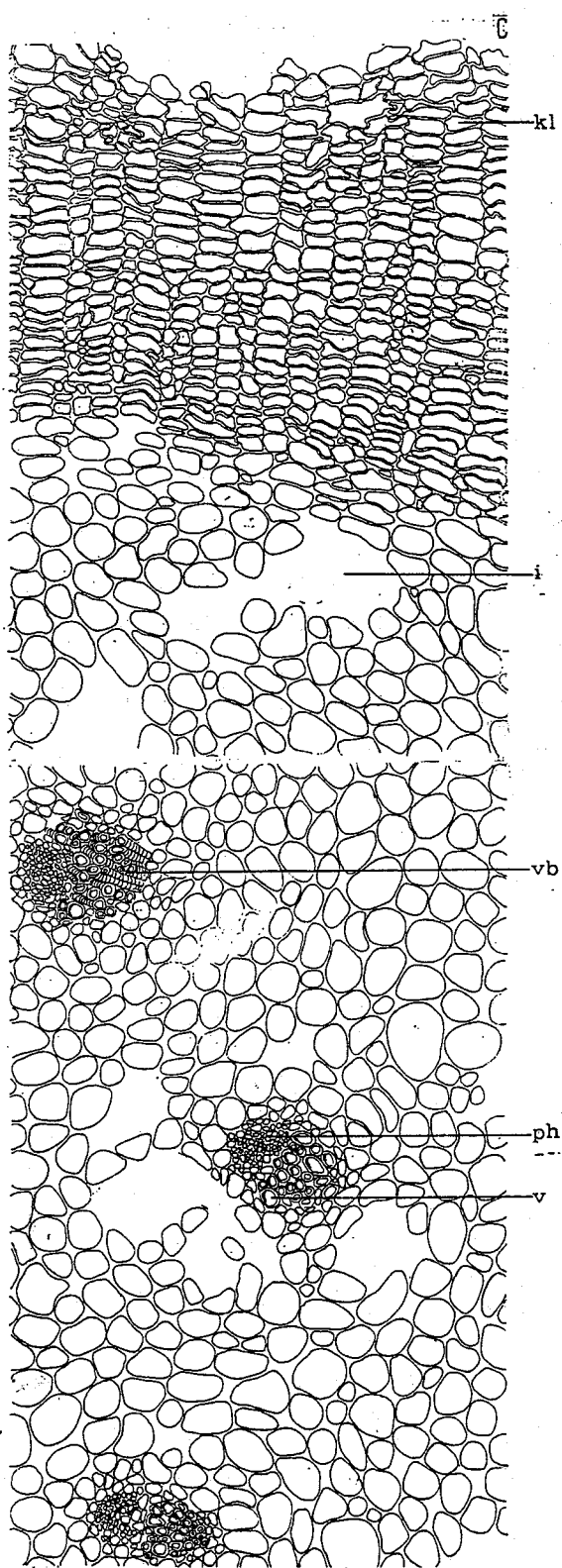
知 母

Anemarrhenae Rhizoma

Anemarrhena asphodeloides BUNGE (Liliaceae)

[組織鑑別]：本品根莖的橫切面，最外側為木栓層，木栓層由30多層細胞所組成，外側細胞呈不規則形，有的含有類棕色塊狀物質，中、內層木栓細胞排列整齊，呈切線性延長，細胞壁薄，弱木化且木栓化。皮層與中柱由薄壁細胞、黏液細胞和維管束組成。部份薄壁細胞具有細小的單紋孔，薄壁細胞間有細胞間隙。黏液細胞多數，內含草酸鈣針晶束。維管束為閉鎖性外韌型，導管以孔紋、螺旋紋、階紋為主，直徑10~50 μ m，強木化，纖維散生於導管周圍，壁稍厚，木化，直徑18~40 μ m，膜孔明顯，呈斜孔紋。

[粉末鑑別]：粉末米黃色，氣微，帶黏液性，木栓細胞表面觀形狀不一，壁薄，常有多層上下重疊，黏液細胞較多，含草酸鈣針晶束，細胞直徑60~186 μ m。纖維易察見，直徑18~40 μ m，壁稍厚，木化，膜孔明顯，呈斜孔紋，包腔寬大，導管以孔紋、螺旋紋、階紋為主，直徑10~50 μ m，強木化。



A:外形1/2× B:略圖10× C:組織圖100×

D:粉末及內含物

1.導管 2.纖維 3.厚化細胞

4.木栓細胞 5.黏液細胞及針晶束

6.木部柔細胞

知母

Anemarrhena Rhizoma

Anemarrhena asphodeloides Bunge (Liliaceae)

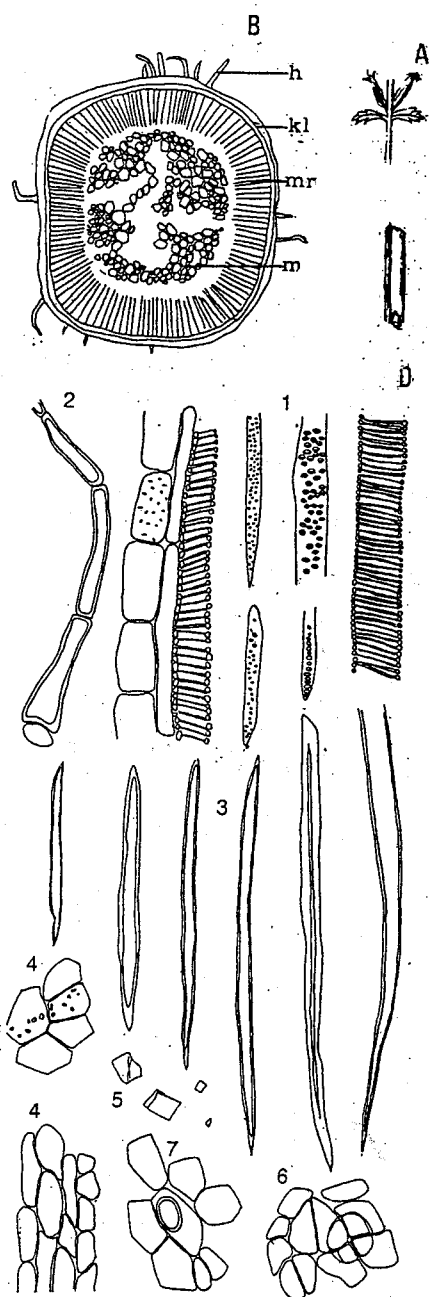
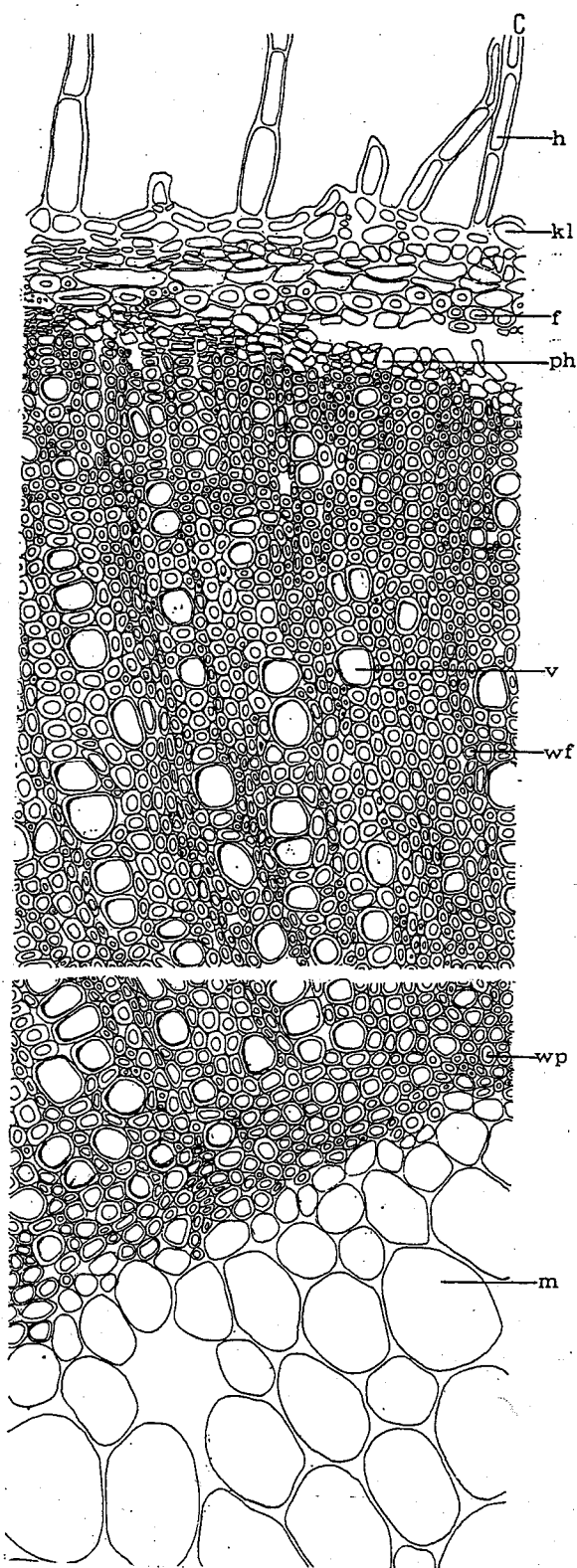
北 劉 寄 奴

Siphonostegiae Herba

Siphonostegia chinensis BENTH (Scrophulariaceae)

[組織鑑別]：本品根莖的橫切面，最外層為非腺毛，由數個細胞組成。表皮細胞呈切線性延長，細胞壁厚化，內含草酸鈣方晶，木栓化。下方由4～6層薄壁細胞組成，部分內含黃棕色物質。韌皮部較狹小，其外側由一圈1～3層之纖維圍繞，壁厚，包腔較小，木化，斷面呈多角形、類橢圓形。形成層不明顯。木質部發達，由數十層導管、木部纖維等組成，導管由髓腺隔開，髓腺明顯且木化，導管以階紋、有緣孔紋、孔紋為主，直徑10～50 μ m，強木化。纖維壁較厚，包腔較小，直徑9～27 μ m，強木化。髓部較大，髓部柔細胞大型，有許多大型細胞間隙存在。

[粉末鑑別]：粉末黃棕色。非腺毛由數個細胞組成，上部尖而彎曲。腺鱗，頭部類圓形，具有四個細胞。表皮細胞表面觀呈多角形，內含草酸鈣方晶。導管以階紋、有緣孔紋、孔紋為主，直徑10～50 μ m，強木化。纖維長短不一，多數呈兩端銳尖，部份則一端略呈斜截狀，壁較厚，包腔較小，直徑9～27 μ m，強木化。



A:外形1× B:略圖18×
C:組織圖160× D:粉末及內含物190×
1.導管 2.非腺毛 3.纖維 4.木栓細胞
5.草酸鈣方晶 6.腺鱗 7.非腺毛頭
北劉寄奴

Siphonostegia chinensis Benth

白 頭 翁

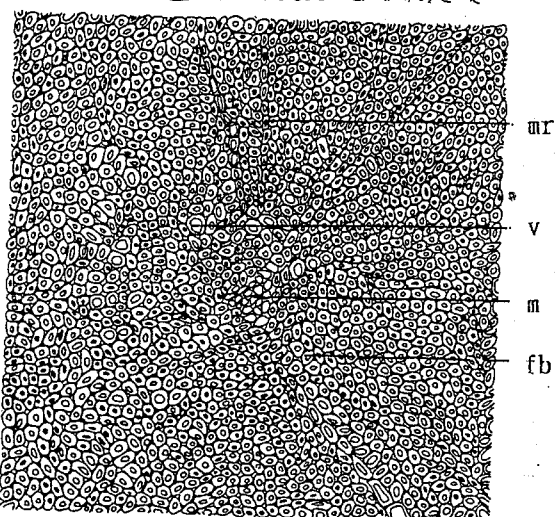
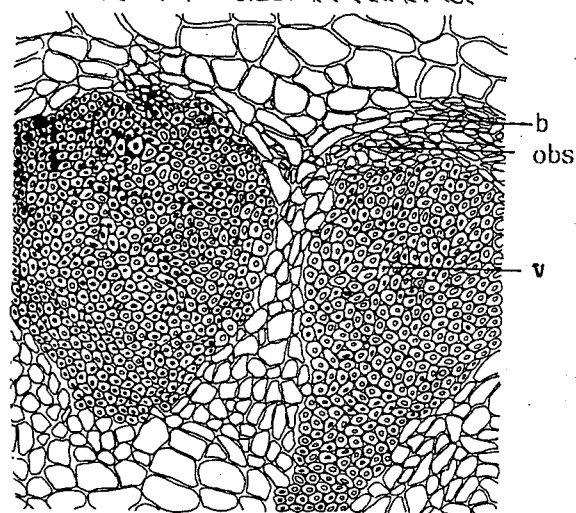
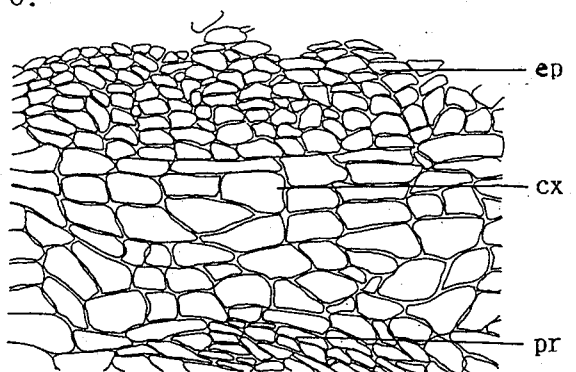
Pulsatillae Radix

Pulsatilla chinensis (Ranunculaceae)

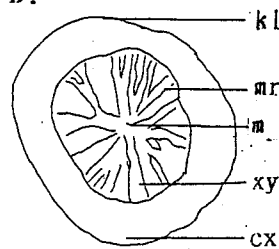
[組織鑑別]：表皮及皮層多脫落，殘留部份皮層及內皮細胞。韌皮部寬廣，外層略木栓化，韌皮纖維單個或數個散生，偶有石細胞，形成層成切線性研長，木質部具有射線及纖維。中央為薄壁髓細胞。

[粉末鑑別]：韌皮纖維成長梭型、或紡錘型，壁厚、木化，長 130 ~ 360 μm ，木部纖維壁稍厚，木化，長 220 ~ 300 μm ，與導管伴生，導管多網紋及少數螺紋。或可見管胞。偶具石細胞，成類長方形。

C.



B.



A.



D.

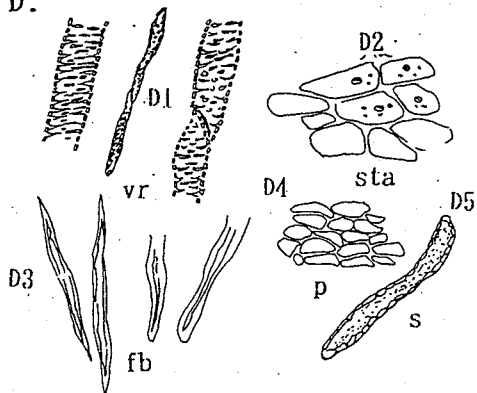


Plate *Pulsatilla chinensis* (白頭翁)

A. 外型 X 1

B. 略圖 X 30

C. 組織圖 X 250

D. 粉末及解離要素 X 200

D1: 網紋導管 D2: 澱粉粒 D3: 纖維 D4: 薄壁細胞

D5: 管胞

五 加 皮

Acanthopanax Corgtex

Acanthopanax gracilistylus W. W. SMITH (Araliaceae)

[組織鑑別]：木栓層由 4~8 列細胞呈切線性延長，壁薄，呈類方形、類長方形、類多角形具樹脂道，栓內層菲薄。韌皮部佔根皮大部份，柔細胞內含草酸鈣簇晶及澱粉粒。具射線，1~5 列。

[粉末鑑別]：木栓細胞多為淡黃色或淡黃棕色。偶有石細胞，單生或聚生，呈類長方形、類多角形。木化，不均勻增厚。韌皮纖維單個或 2~4 個成束散生，細胞內含有澱粉粒及黃色內容物。草酸鈣簇晶於薄壁細胞中散生。射線呈放射性延長，呈無色或淡黃色。

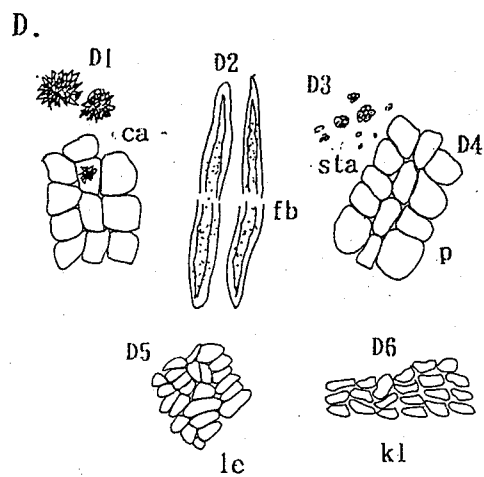
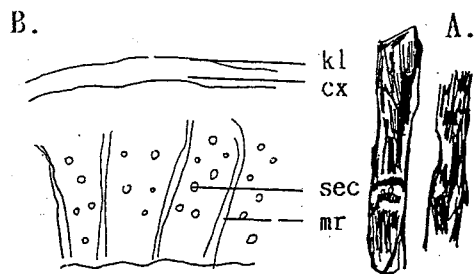
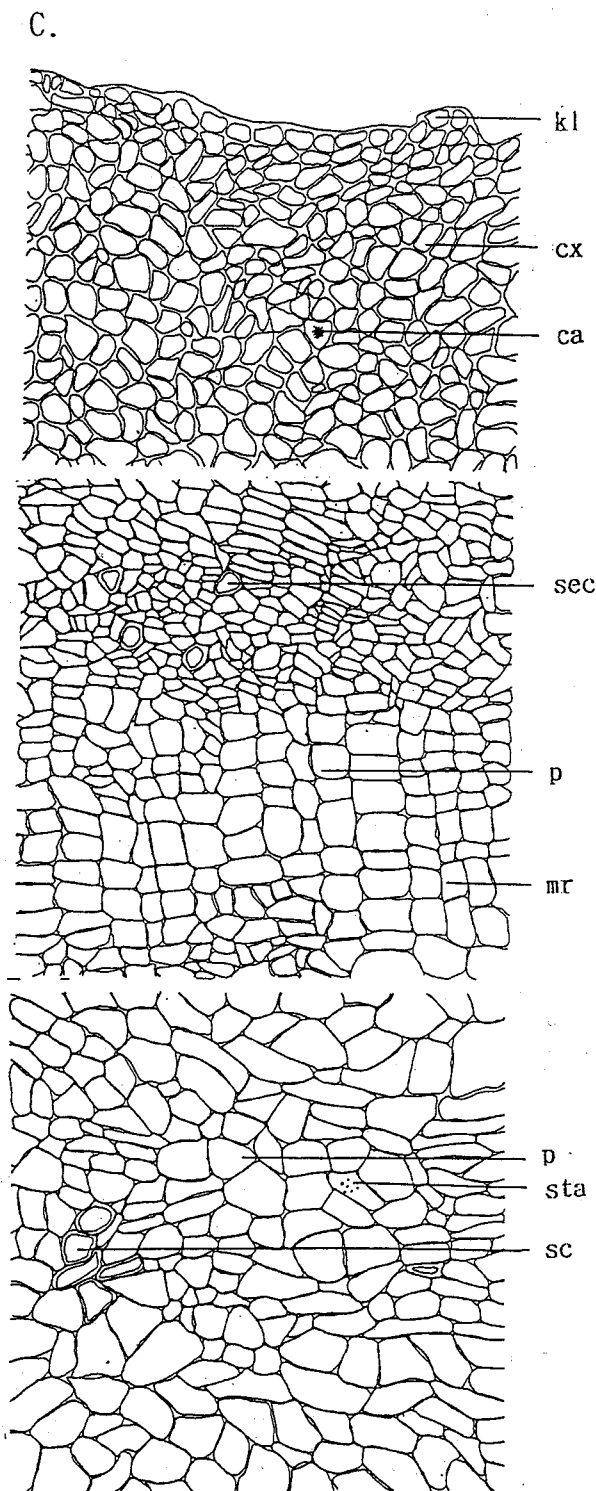


Plate *Acanthopanax gracilistylus*(五加皮)

A. 外型 X 1

B. 組織圖 X 30

C. 組織圖 X 250

D. 粉末及解離要素 X 200

D1: 簇晶 D2: 纖維 D3: 澱粉粒 D4: 柔細胞

D5: 篩部細胞 D6: 栓皮細胞

秦 皮

Fraxini Cortex

Fraxinus bungeana Dc. (Oleaceae)

[組織鑑別]：木栓層由數列細胞呈切線性延長，層薄。皮層薄壁細胞中散生石細胞及纖維束群。韌皮部佔大部份，射線1～2列細胞，韌皮纖維束多，壁厚、胞腔呈線形，細胞中具草酸鈣結晶。

[粉末鑑別]：木栓細胞呈類長方型、類橢圓形、類多角形，壁稍厚，木栓化或弱木栓化。纖維成束或散離，多數碎斷，壁厚，木化，胞腔線形，具不規則斜向或橫向紋理。石細胞數個或單個散離，呈類圓形、類方形，壁厚。射線1～2列，腔內具草酸鈣結晶。澱粉粒單個呈類球形或卵形。

C.

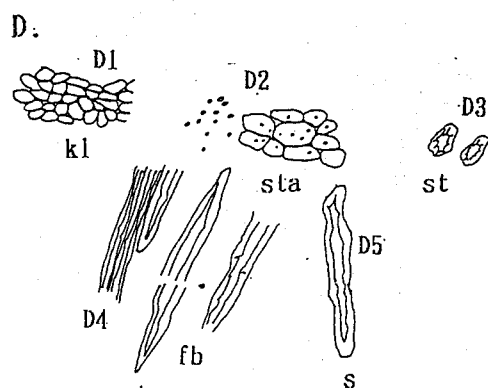
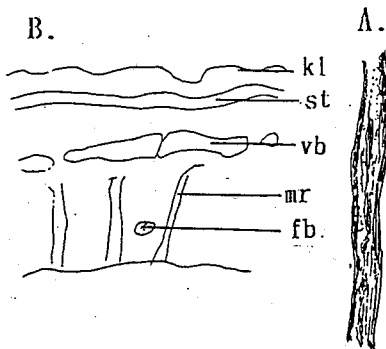
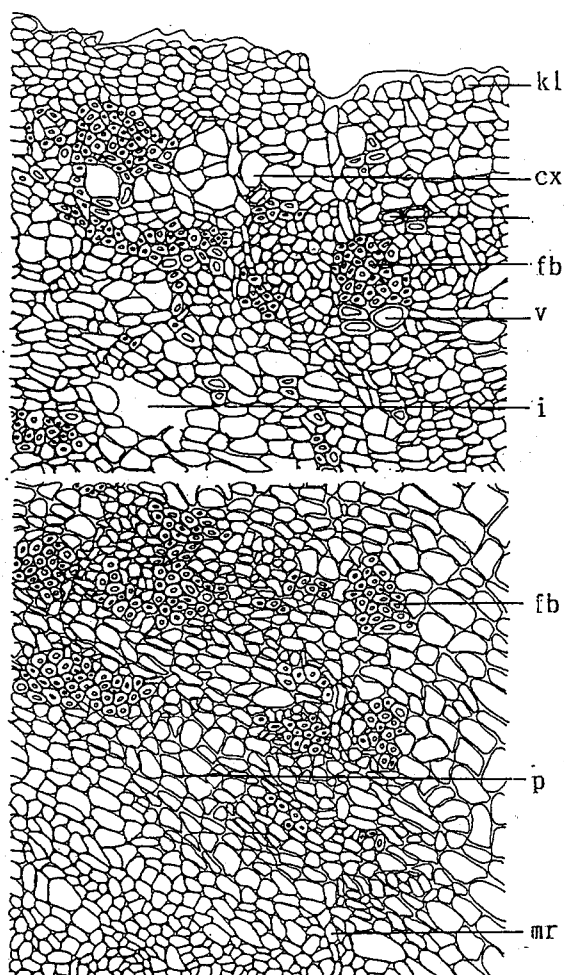


Plate *Fraxinus bungeana* DC. (秦皮)

A. 外型 X 1

B. 略圖 X 50

C. 組織圖 X 180

D. 粉末及解離要素 X 180

D1: 栓皮細胞 D2: 澱粉粒 D3: 石細胞 D4: 纖維

D5: 管胞

延 胡 索

Corydalis Tuber

Corydalis turtschaninovii BEES. (Papaveraceae)

[組織鑑別]：皮層細胞十餘列，含淡黃色內容物，扁平，細胞呈類方形、類長方形、類橢圓型、外側有2~3列厚壁細胞散生，具木化，韌皮部寬廣，細胞呈類圓形、類方形，切線性延長，具篩管及乳管。木質部導管細小，細胞呈切線性延長。中央為薄壁髓細胞。

[粉末鑑別]：含澱粉粒薄壁細胞，淡黃色或幾乎無色，呈類方形、類橢圓形、類長方形，徑長45~11 μ m。含下皮厚壁細胞，淡黃綠色，呈類方形、類橢圓形、類長方形、類多角形，可見連珠狀細胞壁，木化或弱木化。石細胞存於下皮組織，多單個散離或少數成群，淡黃綠色，細胞呈類方形、類長方形、類多角形。導管以螺旋紋導管為主，偶有環紋導管。

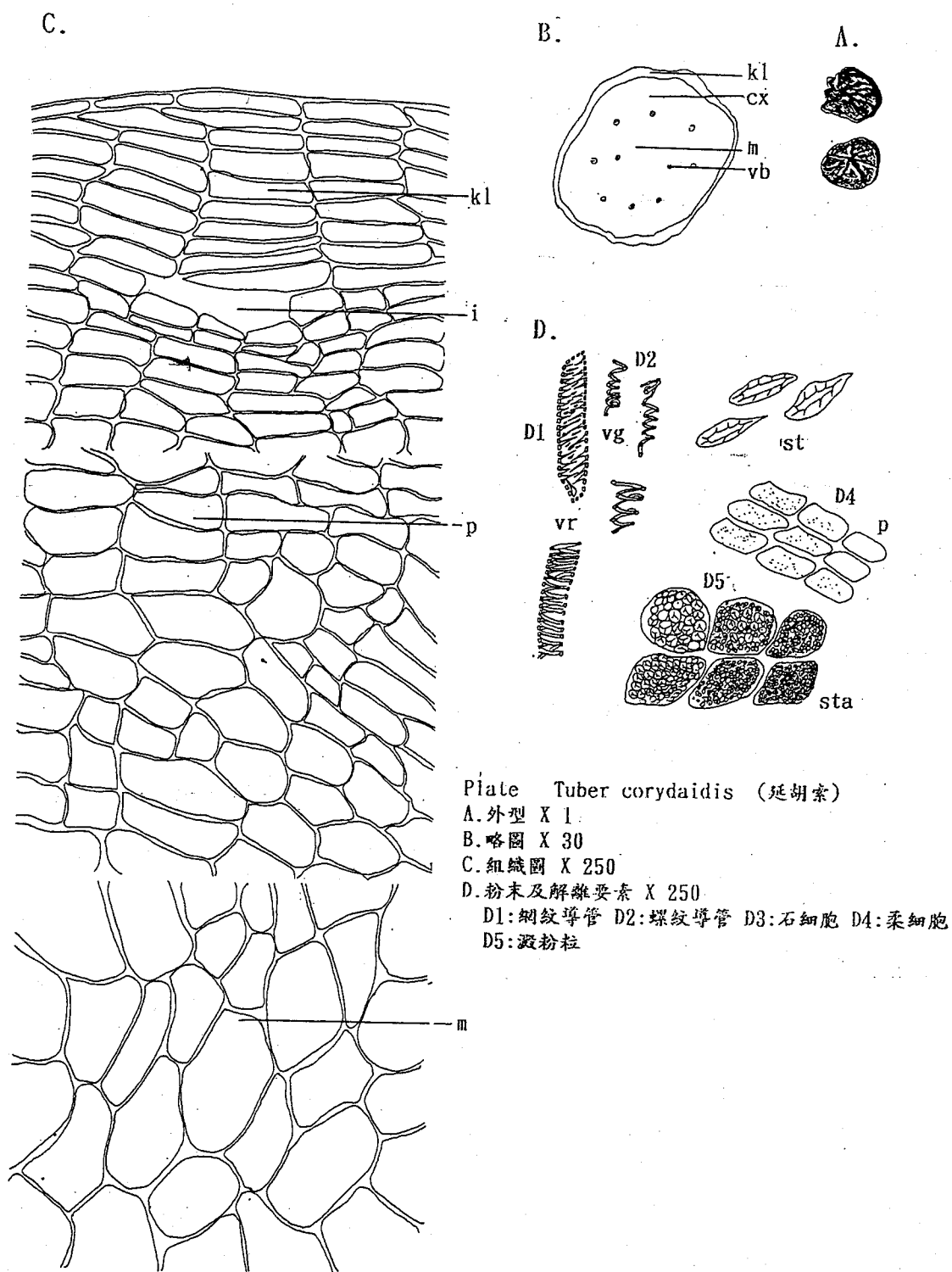


Plate *Tuber corydalis* (延胡索)

A. 外型 X 1

B. 略圖 X 30

C. 組織圖 X 250

D. 粉末及解離要素 X 250

D1: 網紋導管 D2: 螺旋導管 D3: 石細胞 D4: 柔細胞

D5: 澱粉粒

篇 蓄

Polygoni avicularis Herba

Polygonum aviculare LINN. var. *vegetum* LEDEB. (Polygoaceae)

[組織鑑別]：表皮細胞具角質層。皮層薄，由1～10列細胞薄壁細胞組成，細胞呈類方形、類長方形、類多角形。中柱鞘纖維成束，位於韌皮部外側，形成層呈切線性延長。髓部寬闊，由大型薄壁細胞組成，含澱粉粒。皮層及髓部薄壁細胞中含草酸鈣簇晶。

[粉末鑑別]：表皮細胞角質化，皮層柔細胞，由1～10薄壁細胞組成。纖維成束，細胞呈線形，形成層細胞呈類方形、類長方形、類多角形。髓部大型薄壁細胞組成，含澱粉粒。皮層及髓部細胞中含草酸鈣簇晶。

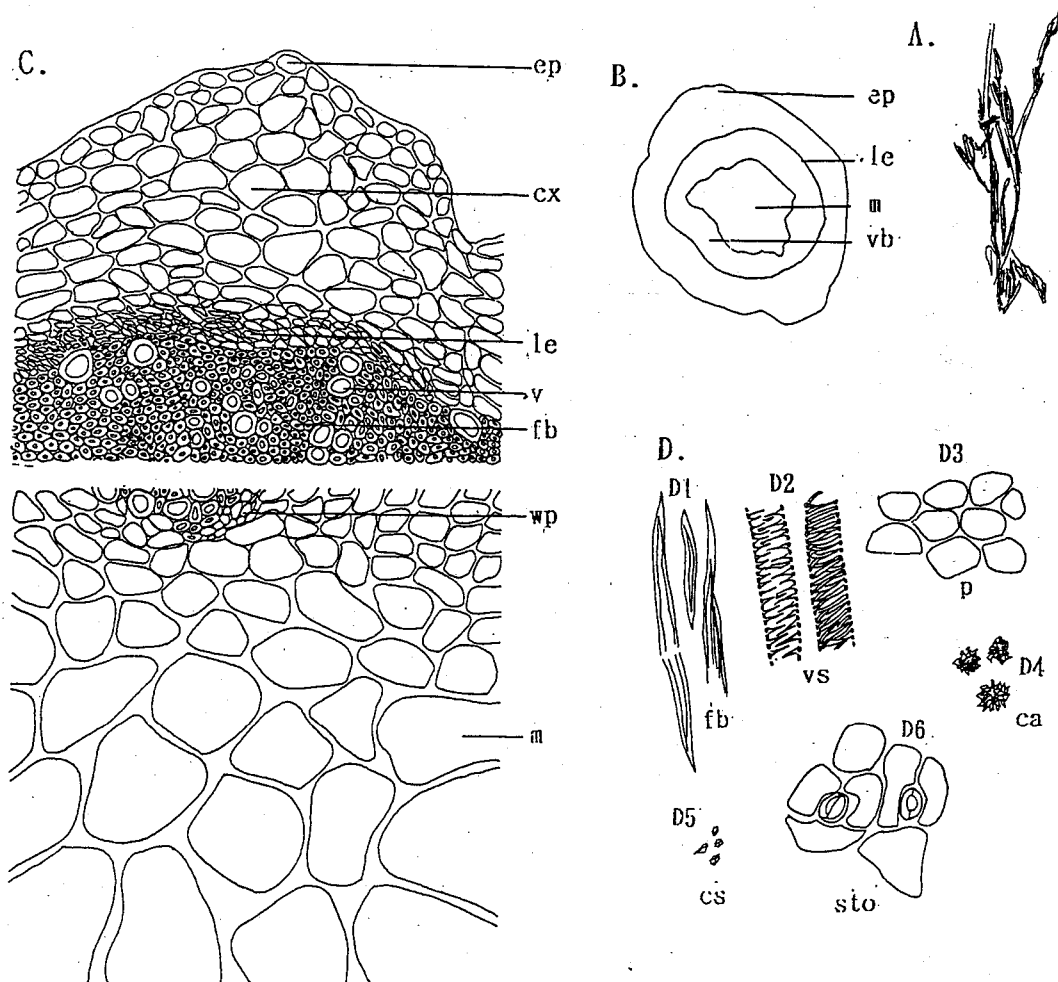


Plate *Polygonum aviculare* Linne var. (扁蓄)

- A. 外型 X 1
 B. 略圖 X 30
 C. 組織圖 X 250
 D. 粉末及解離要素 X 250
 D1: 纖維 D2: 導管 D3: 薄細胞 D4: 簇晶 D5: 單晶
 D6: 氣孔

夏 枯 草

Prunella cum fructu Flos

Plate bunella (Prunella vulgaris) LINN. (Labiatae)

[組織鑑別]：表皮細胞具角質層，非腺毛，由2～12個細胞組成，表皮上方2～7層厚角細胞。皮層由5～15層薄壁細胞組成。細胞呈類方形、類長方形、類多角形。木質部由木部纖維、導管、木化細胞組成，射線由1～2列細胞組成。

[粉末鑑別]：腺毛存於苞片及萼片表皮。頭部長圓形而扁，1～2列細胞單細胞者一邊延長成鉤狀。非腺毛多碎裂，可見多細胞或單細胞。表皮細胞具角質層。木部纖維多木化，導管以螺紋為主。

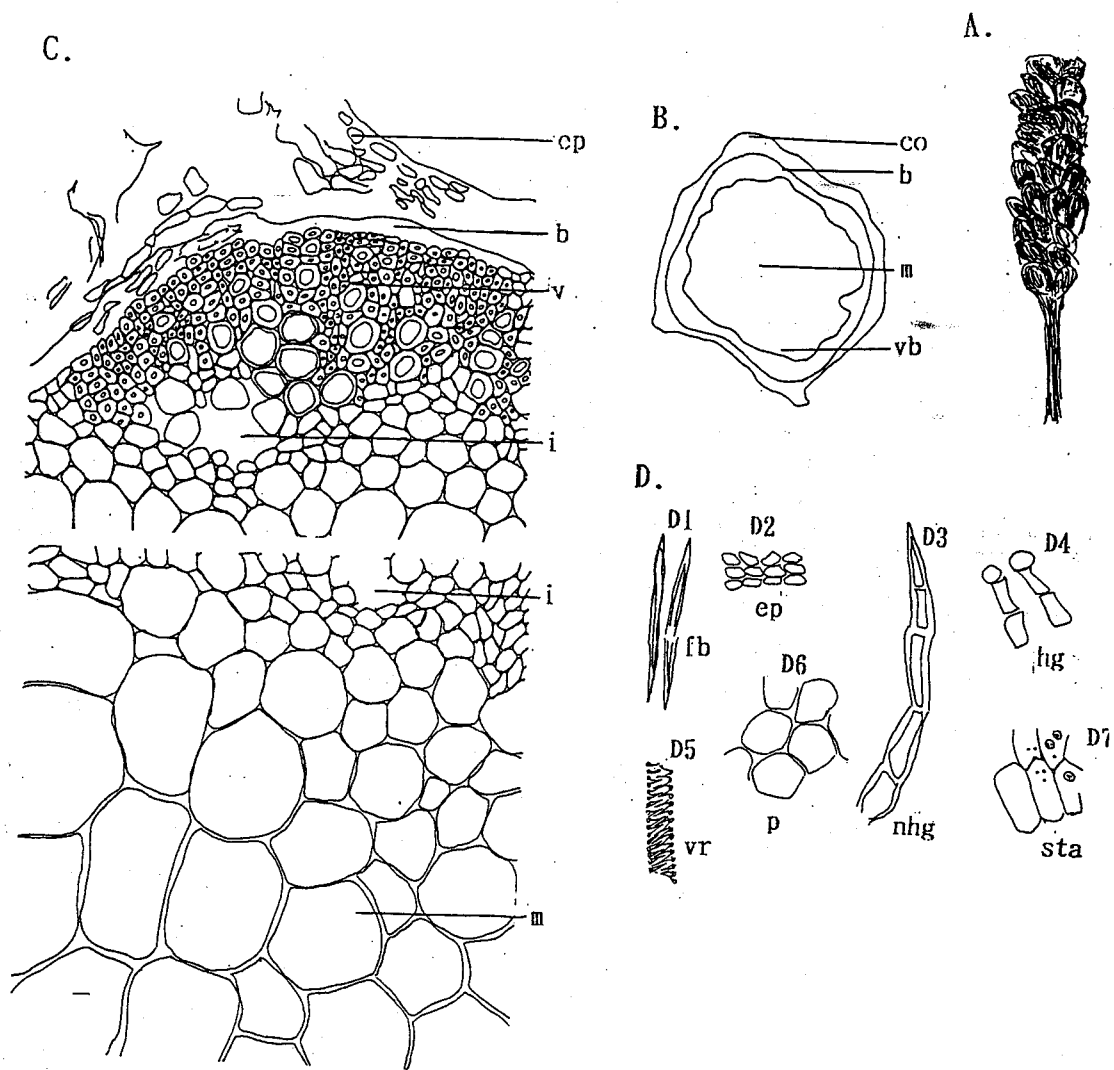


Plate *Brunella (Prunella) vulgaris* Linn. (夏枯草)

- A. 外型 X 1.5
 B. 略圖 X 30
 C. 組織圖 X 250
 D. 粉末及解離要素 X 200
 D1: 纖維 D2: 表皮細胞 D3: 非腺毛 D4: 腺毛
 D5: 螺旋導管 D6: 薄壁細胞 D7: 澱粉粒

穀 精 草

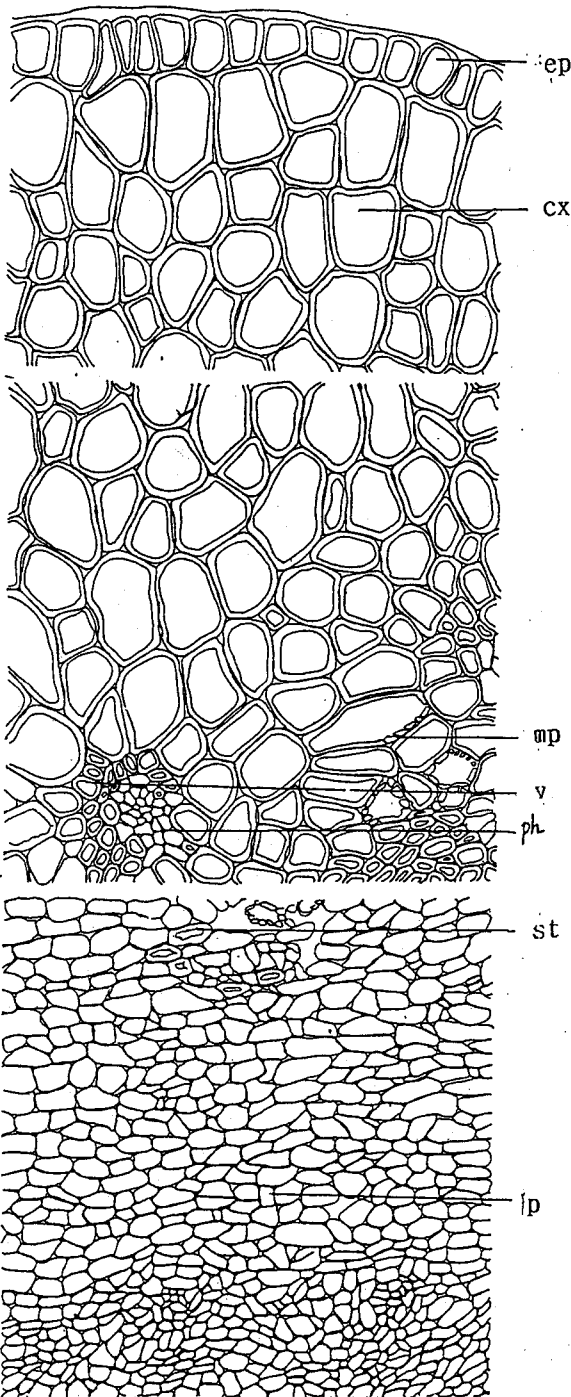
Eriocauli Scapus

Eriocaulon buergerianum KOERNICKE (Eriocaulaceae)

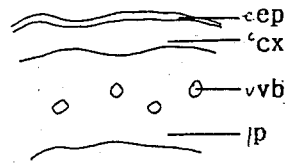
[組織鑑別]: 頭部細胞呈類長圓形或類長橢圓形，1~4列細胞，表面有網狀紋理。具非腺毛，頂端長壁厚。花莖表皮細胞成，呈長類條形、壁薄，表面有縱直角直線紋。纖維細胞壁厚、細長。具導管。

[粉末鑑別]: 頭部長圓形或長條形，1~4列細胞，表面有網狀紋理。具非腺毛，多撕裂，頂端長、壁厚。花莖表皮細胞成，呈長條形、壁薄，表面有縱直角直線紋。氣孔類長方形。保衛細胞腎形。纖維壁厚、細長。導管主以網紋導管。

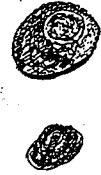
C.



B.



A.



D.

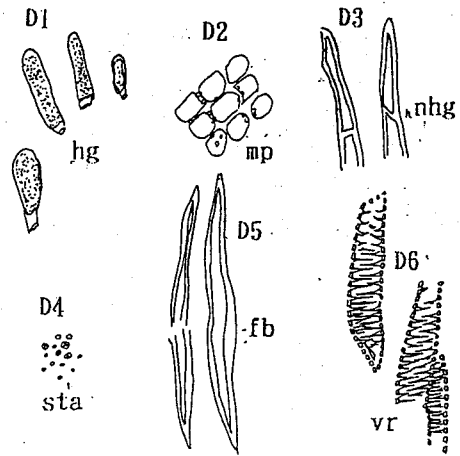


Plate *Eriocaulon buergerianum* koernicke
(殺精草)

A. 外型 X 1

B. 略圖 X 30

C. 組織圖 X 250

D. 粉末及解離要素 X 200

D1: 腺毛 D2: 珠孔 D3: 非腺毛 D4: 澱粉 D5: 纖維

D6: 網紋導管

墨 旱 蓮

Eclipta Herba

Eclipta prostrata L. (Compositae)

[組織鑑別]：表皮具非腺毛，皮層多間隙，皮層細胞呈厚膜狀切線性延長，呈類方形、類長方形、類多角形之薄壁細胞。木質部纖維，木化，單個或成束散生，中央為薄壁髓細胞。

[粉末鑑別]：表皮細胞呈類方形、類長橢圓形。具非腺毛。皮層多間隙，皮層細胞呈厚膜狀切線性延長，呈類方形、類長方形、類多角形之薄壁細胞。木質部纖維，木化，單個或成束散生，中央為薄壁髓細胞。

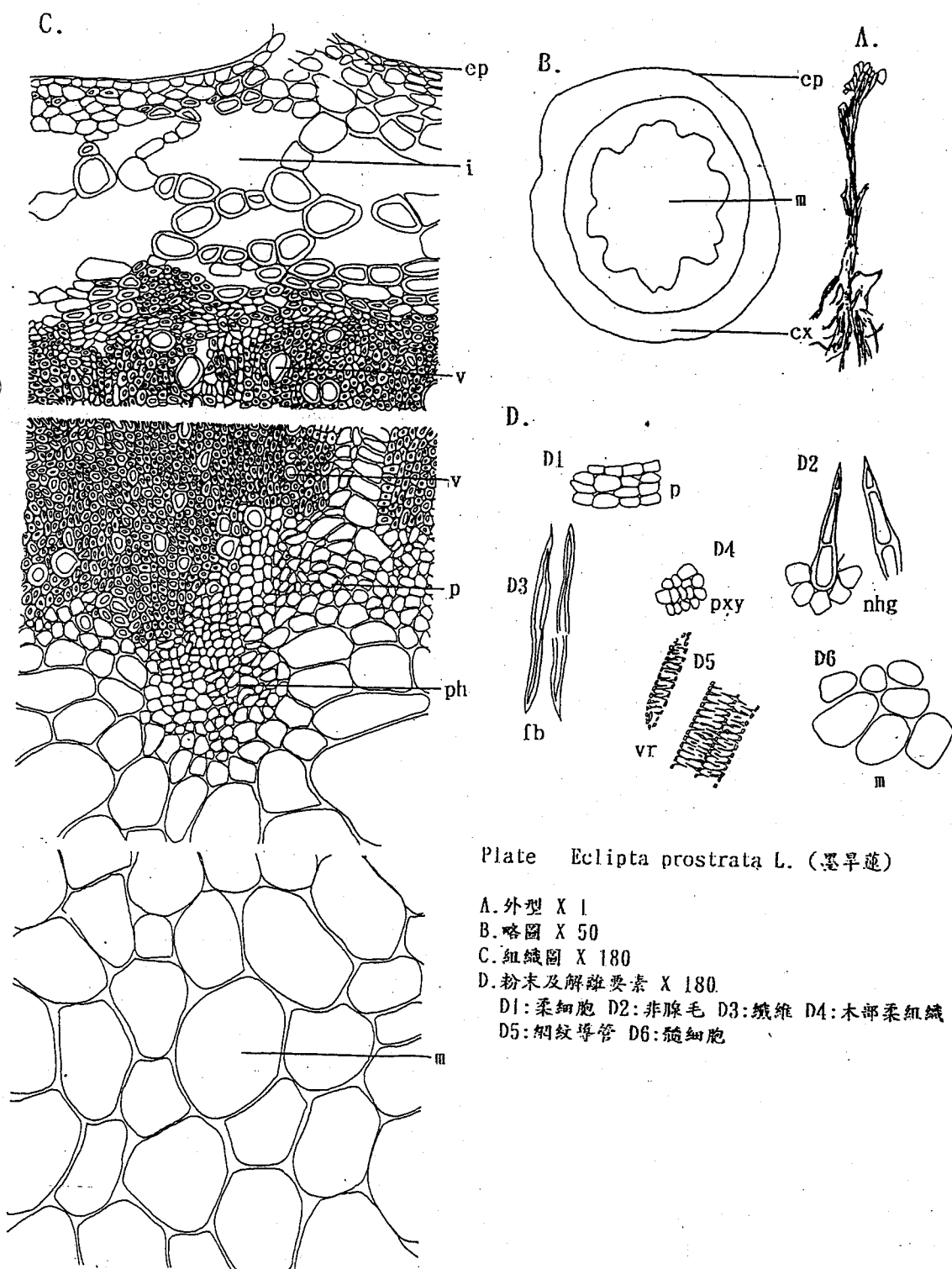


Plate *Eclipta prostrata* L. (墨旱莲)

A. 外型 X 1

B. 略圖 X 50

C. 組織圖 X 180

D. 粉末及解離要素 X 180

D1: 柔細胞 D2: 非腺毛 D3: 纖維 D4: 木部柔組織
D5: 網紋導管 D6: 髓細胞

四、生藥學術語之英語略字表

略號	術語	中文名
ag	aleurion grain	糊粉粒
alb	albumen	胚乳
b	bast	韌皮部
bf	bast fiber	韌皮纖維
bp	bast parenchyma	篩部柔組織
br	bract	苞葉
bs	vascular bundle sheath	維管束鞘
c	cambium	形成層
ca	clustered crystal	集晶，簇晶
cb	crystal bundle	束晶，針晶束
cd	crystal sand	沙晶
cf	crystal fiber	結晶纖維
clx	calyx	萼
cm	cell membrane	細胞膜
cn	needle crystal.raphid	針晶
co	collenchyma (tous) (cell)	厚角組織 (細胞)
cot	cotyledon	子葉
cr	crystal	結晶
cs	single crystal	單晶
cu	cuticle	角皮
cul	cuticular layer	角質層
cx	cortex	皮，皮部，皮層
cy	cystolith	鐘乳體
em	embryo	胚

略號	術語	中文名
en	endodermis	內皮
enc	endocarp	內果皮
eo	essential oil	精油
ep	epidermis	表皮
epc	epicarp	外果皮
epl	lower epidermis	下面表皮
f	fiber	纖維
fb	fiber bundle	纖維束
gs	glandular scale	腺鱗
gst	gelatinized starch	糊化澱粉
h	hair	毛
ha	hadrome	木部
hg	glandular hair	腺毛
hi	hilum	臍點
i	intercellular space	細胞間隙
id	idioblast	異形細胞
in	inulin	菊糖
k	cork, (cork cell)	栓皮(栓皮細胞)
kc	cork cambium (phellogen)	栓皮形成層
kl	cork layer	栓皮層
le	leptome	篩部
lt	latex tube	乳管
lv	lactiferous vessel	聯合乳管
m	mark, pith, medulla	髓
md	midrib, main nerve	主脈
mes	mesophyll	葉肉

略號	術語	中文名
mph	phloem medullary ray	篩部髓線
mr	medullary ray	髓線
muc	mucilage cell	粘液細胞
mxy	xylem medullary ray	木部髓線
o	oil drop	油滴
obs	obliterated sieve (portion)	退廢篩部
oc	oil cell	油細胞
or	oil (secreting) reservoir	油室
p	parenchyma (cell)	柔組織 (柔細胞)
pa	palisade parenchyma (tissue)	柵狀細胞 (組織)
pd	phelloderm (= cork cortex)	栓皮層
pg	phellogen (= cork cambium)	栓皮形成層
ph	phloem (= leptome)	篩部
pib	bordered pit	有緣膜孔
pph	phloem parenchyma	篩部柔組織
pr	pericycle	內鞘
pxy	xylem parenchyma	木部柔組織
rc	resin canal	樹脂道
s	sieve tube	篩管
sc	sclerenchyma (cell)	厚膜組織 (細胞)
sd	seed coat, spermoderm	種皮
sec	secetory cell	分泌細胞
sp	spongy tissue (parenchyma)	海綿狀組織
st	stone cell	石細胞
sta	starch grain	澱粉粒
ste	stele (= central cylinder)	中心柱
sto	stoma, stomata	氣孔

<u>略號</u>	<u>術 語</u>	<u>中文名</u>
str	striation	層紋
v	trachea, vessel	導管
vb	vascular bundle	維管束
vbb	bicollateral v. b.	兩立維管束
vbc	concentric v. b.	包圍維管束
vbcx	cortical v. b.	內層內維管束
vbh	hadrocentric v. b.	外篩維管束
vbl	leptocentric v. b.	內篩包圍維管束
vbn	open v. b.	開放維管束
vbo	collateral v. b.	並立維管束
vbr	radial v. b.	放射維管束
vbs	closed v. b.	閉鎖維管束
vc	scalariform vessel	階紋維管束
vd	bordered pit vessel	重緣孔導管
ve	vein	脈 (葉)
vg	ring vessel	環紋導管
vp	pitted vessel	孔紋導管
vr	reticulate vessel	網紋導管
vs	spiral vessel	螺旋紋導管
wf	wood fiber	木纖維
wp	wood parenchyma	木部柔細胞
x, xy	xylem	木部
xm	metaxylem	後生木部
xp	protoxylem	原生木部

當歸指標成分製備

張淑貞 林炯興 王仁邦 劉鳳樟 鄭霽榕

中國醫藥學院藥學系

摘 要

當歸是繖形科植物 *Angelica sinensis*(Oliv.)Diels 之乾燥根，爲重要的中藥材之一，主要用於抗發炎、平喘、抗血栓、補血與保護肝臟等。爲了推行中藥當歸及其方劑之品質管制工作，本研究分別由當歸之正己烷與甲醇抽出物，分離及純化兩個指標成分——藁本內酯與阿魏酸，每一指標成分各製備三克呈交行政院衛生署。

指標成分之薄層層析法、氣相層析法與高效液相層析法，也將在本文中一併討論。

關鍵字：當歸、藁本內酯，阿魏酸，指標成分

ABSTRACT

Dang-Gui is the dried root of an Umbelliferae plant, Angelica sinensis, which is one of the most important Chinese medicinal herbs used mainly for the treatment of diseases such as inflammation, asthma, thrombosis, gynecopathy and liver disorders.

In order to promote the quality control of Chinese medicinal herbs Dang-Gui and its preparations, this annual project was to establish the isolation and purification of two marker components ——— ligustilide and ferulic acid from the hexane and menthanol extract of Dang-Gui, respectively. Each marker component has been submitted three grams to the Department of Health, Executive Yuan.

In the present paper, TLC 、GC and HPLC analysis methods of marker components will also be discussed as well.

KEYWORDS: Angelica sinensis, ligustilide, ferulic acid, marker components.

第一章 前言

傳統之中國藥材乃是五千年來經驗知識累積的遺產，不論是中藥藥材或中藥製劑之應用，均日益普及，近年來政府對中醫藥醫療之推廣不遺餘力，如中醫醫院之設立，中醫勞保業務之推展。民國84年3月1日起政府開辦全民健保之醫療政策，中藥之使用數量急遽增加。

中藥材之真偽及其品質之優劣，往往影響療效，爲了確保國民健康及用藥安全，建立中藥品管體系是當前急務。然而中藥之品質管制受中藥材基原，產地及中藥化學成分複雜性之限制，品管工作甚爲艱難，在完整的品管方法尚未建立之前，利用薄層層析法¹⁻⁸，或高效液相層析法⁹⁻¹⁶，或毛細電泳層析法^{17,18}與指標成分對照，不失爲一種準確性頗高之檢驗方法。

指標成分目前多數自國外進口¹⁹⁻²²，不但價格昂貴且訂購費時，甚或買來的指標成分標準品有些純度不足無法使用，或者缺貨無法買到等諸多問題，嚴重地耽誤中藥之檢驗工作，因此長遠來看，國內應自行製備中藥之指標成分，才能達到自給自足之境界。

爲配合衛生署推動的中藥指標成分之供應業務，本計畫擬配合衛生署藥檢局所列之中藥材或中藥方劑檢驗時對照使用所需的指標成分，逐年製備尚未完成的各指標成分，並建立其分離與純化之方法，供各界對照使用及參考。

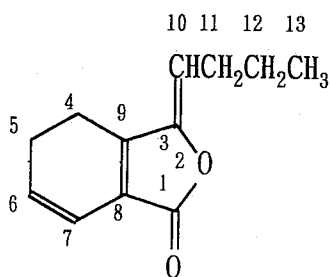
當歸爲繖形科植物 Angelica sinensis (Oliver)Diels 的乾燥根。類似藥材有日本產的大和當歸(A. acutiloba Kitagawa)、北海當歸(A. acutiloba Kitagawa var. sugiyamae Hikino)及韓國產的 A. koreana Max.。當歸爲臨床上常用藥材之一，具有補血、理血、

調經及鎮痛等功能^{23,24}，其化學成分除含有單萜類和倍半萜類的精油外，尚有藁本內酯(ligustilide)²⁵⁻²⁹，阿魏酸(ferulic acid)²⁶⁻²⁹，黃樟醚(safrole)³⁰及香豆素(coumarins)類化合物²⁸等，其中藁本內酯及阿魏酸爲當歸的活性成分之一，許多報告均以此兩類物質爲主。有關藥理作用之報導很多^{23,24}，如鎮痛、增加心臟血液供應、抗心律失常、降血壓、免疫功能增強等^{31,32}，至於各成分之生理活性如增強單核吞噬細胞系統功能³³、抗血小板凝集^{31,34}、平喘³⁵、抗潰瘍³⁶等均已完成研究。甚至於利用細胞懸浮培養³⁷大量且快速地商業產生，以供應當歸極大用量之需求。

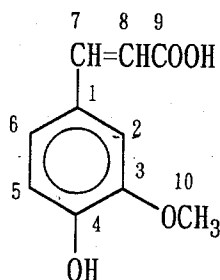
當歸方劑很多，常用的如四物湯、當歸四逆湯、當歸芍藥散、大防風湯、女神散、加味逍遙散、桔梗湯、補陽還伍湯及外用的紫雲膏等。

不論是單味藥或方劑中之當歸的品質管制，依行政院衛生署公告之指標成分爲阿魏酸與藁本內酯，與指標成分作對照，才能正確地評估其含量。阿魏酸與藁本內酯也是川芎等中藥之指標成分，此外阿魏酸也用作多種中藥方劑定量之指標成分^{8,11,12,15}。根據廠商的目錄，阿魏酸可以自國外申購，較易取得，然而藁本內酯卻沒有任何廠商供應，因此指標成分之製備爲刻不容緩之工作。

本計畫今年度擬製備當歸與川芎之兩種指標成分——藁本內酯(ligustilide)(1)與阿魏酸(ferulic acid)(2)。



Ligustilide (1)



Ferulic acid (2)

第二章 研究材料與方法

一. 研究材料：

當歸購自台中市欣隆藥行，並經生藥學教授陳忠川博士鑑定為繖形科植物 Angelica sinensis (Oliver)Diels 的乾燥根。

二. 儀器設備：

1. 氣相層析儀 (GC)

Hitachi GC 3000, FID, 毛細管柱 DBwax 30m x 0.53mm, 管柱溫度 50°C - 220°C, 每分鐘升溫 5°C, 載氣為氮氣, 流速為 4kgf/cm², 並用 Hitachi D-2100 積分儀記錄 GC 圖及積分各峰面積。

2. 氣相層析/質譜儀 (GC/MS)

① JEOL JMX-SX/SX 102A Tandem Mass Spectrometer (中興大學)

② HP5890II/VG Trio 2000 (淡江大學)

3. 高效液相層析儀 (HPLC):

Hitachi HPLC, 組件有 Hitachi L-6000 pump, Hitachi L-4200H UV-VIS detector, Hitachi AS-4000 Intelligent Auto Sampler 及 Hitachi D-2500 Chromato integrator。

4.核磁共振儀(NMR)

① Bruker ARX-300 (300MHz FT-NMR) (中國醫藥學院)

② VXR-300 (300MHz FT-NMR) (中興大學)

5.紅外線光譜儀

Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrometer (中國醫藥學院)

6.紫外光譜儀

Shimadzu UV-160A UV-Visible Recording Spectrometer

(中國醫藥學院)

7.微量熔點測定計

Yanaco micro melting point apparatus MP-500D, 溫度未校正。

8.烘箱: Eyela WF0-450ND

9.玻璃乾燥器

10.電子乾燥箱(保存TLC片)

11.電子天平: Mettler AJ100及Mettler Toledo PB 602

12.電熱板: Frano-Geratetechnik M 21/1

13.超音波振盪器: Branson 5200

14.蒸餾水製造器: Eyela Still Ace SA-27EI

15.紫外燈: Raytech Ultraviolet Equipment LS-88, 具254nm及366

nm 兩種波長

16.玻璃展開槽: 120mm x 150mm

17.粉碎機: 原泰奇傾倒式粉碎機D3V-B

18.低溫冷凍庫: 溫度可設定至零下25℃, 保存當歸抽物出及分離之

純品

19.電腦: Topnorch 486 DX-2 66, 雷射印表機(HP, Laser Jet 4L)

三. 標準品、試藥與溶媒：

1. 標準品

阿魏酸:Sigma Chemical Co.(李珮端教授惠贈)

2. 試藥

測紅外光譜的溴化鉀購自默克公司。試藥級的碳酸鈉、硫酸、鹽酸、硝酸等，購自島久藥品株式會社。檸檬酸購自和光純藥工業株式會社。硫酸配成10%溶液作為呈色劑。

3. 溶媒

正己烷、苯、氯仿、乙酸乙酯、甲醇等工業級溶媒，經重蒸餾後，用於浸泡中藥材及矽膠管柱層析之沖提溶媒。再結晶等純化過程則使用試藥級，乙醚、四氯化碳、二甲苯及LC級溶媒甲醇、氟甲烷等購自皓峰公司，磷酸購自Fisher公司，而醋酸則購自默克公司，測紫外光譜時則使用光譜級溶媒，如正己烷、氯仿、甲醇等，NMR光譜使用的溶媒，如 CDCl_3 、 CD_3OD 、 d_6 -DMSO等，均購自默克公司。

四. 層析材料：

Kieselgel 60 70-230 mesh 及 230-400 mesh (E. Merck)

Sephadex LH-20 (Pharmacia)

TLC — Kieselgel 60F₂₅₄ (E. Merck)

PTLC — Kieselgel 60F₂₅₄ S (E. Merck)

五. 研究方法：

1. 乾燥減重

精確稱取當歸粉末約10克，置於已知重量之蒸發皿中，於105℃乾燥5小時後，移入乾燥器內冷卻至室溫，精確稱重後，再反覆乾燥，每隔一小時稱重，直至恆量，以此減失重量計算乾燥減重百分比。

2. 萃取

當歸乾燥根25公斤，經粉碎後，以正己烷25升萃取5次，再用甲醇25升萃取5次，分別過濾、減壓濃縮，得正己烷抽出物297克，及甲醇抽出物970克(膏狀)。兩種抽出物保存於冷凍箱(零下15°C)中備用。

3. 指標成分之分離、純化及鑑定

當歸根的化學成分主要分為揮發油與水溶性成分兩大部分，根據文獻報導²⁸，揮發油含量變化約為0.15-0.75%²⁹。揮發油中的主成分是藁本內酯(ligustilide)，其含量約佔45-60%^{29,38}。水溶性部分的有效成分為阿魏酸，其含量約為0.042-0.091%²⁹。藁本內酯與阿魏酸具有多種藥理活性，兩者作為評價當歸及其方劑之指標成分有其重要意義。

依據文獻報導，藁本內酯與阿魏酸兩化合物可用薄層層析法快速檢查，即用兩種不同的溶媒系統展開後，在紫外燈下觀察。藁本內酯如以四氯化碳:二甲苯:氯仿:正己烷(4:3:2:0.5, v/v)展開後，在紫外燈波長366nm下觀察，呈淡藍螢光斑點³⁹。阿魏酸如以苯:氯仿:甲醇(2:2:0.6v/v)展開後，在紫外燈波長254nm下觀察，呈紫色斑點²⁹。

取少量正己烷及甲醇抽出物，點樣在矽膠薄層層析片上，利用上述兩種溶媒系統展開後觀察，經由初步薄層色層分析檢查結果，顯示正己烷抽出物含有大量的揮發油，甲醇抽出物則含有數量不多的阿魏酸。因此分別由正己烷與甲醇抽出物進行兩種指標成分之分離工作。

(1) 藁本內酯的分離

將正己烷抽出物分批放入矽膠管柱(70-230孔篩)層析分離，依

次用正己烷、苯、乙酸乙酯、甲醇梯度沖提，在50%-70%苯-正己烷溶媒系統沖出部分以TLC檢查發現含有強烈藍螢光點。合併濃縮後，再放入矽膠管柱層析(230-400孔篩)純化，以正己烷、苯梯度沖提，在50% 苯-正己烷溶媒系統沖出之分管50-5可得高純度黃色油狀液體，其NMR、MS、IR、UV等光譜數據(見圖1-圖7)均與薑本內酯文獻數據相符^{35,41}，確認此部分為薑本內酯(1)。

(2)阿魏酸的分離

甲醇抽出物加熱水溶解，水溶液經乙醚萃取數次，合併乙醚萃取液，以20%碳酸鈉溶液萃取，水層部份經鹽酸酸化後，再以乙醚萃取，經製備式TLC純化，以苯:氯仿:甲醇(2:2:0.6 v/v)溶媒系統展開後，在紫外燈波長254nm下觀察，刮下TLC之 R_f 值與阿魏酸標準品相同之色帶後，以甲醇萃取，即可得到阿魏酸。再用甲醇-水溶媒系統再結晶後，測其融點及進行各種光譜分析(見圖8-圖14)並與文獻數據^{27,42-46}比對，確認為反式阿魏酸(2)。

4. 薑本內酯和阿魏酸之TLC分析條件

在默克公司之矽膠薄層層析片(Art.No.5554)上將兩種指標成分的樣品溶液以毛細管點樣，薑本內酯以四氯化碳:二甲苯:氯仿:正己烷(4:3:2:0.5, v/v)溶媒系統展開³⁹，阿魏酸則用苯:氯仿:甲醇(2:2:0.6 v/v)溶媒系統展開²⁹，分別在紫外燈下觀察，薑本內酯在波長366nm下呈強烈藍色螢光點，而阿魏酸在波長254nm下呈紫色點。

5. 薑本內酯之GC分析條件

薑本內酯為當歸根與川芎根揮發油之主成分，文獻上多以氣相

層析法分析並定其含量^{47,48}，少數也有用薄層掃描測定法³⁹或高效液相層析法⁴⁹定量，本研究採用DBwax 0.53mm x 30m毛細管柱。管柱溫度由50℃升溫至220℃，每分鐘升溫5℃，載氣為氮氣，流速1 kgf/cm²，並以積分儀記錄GC圖譜及積分各峰面積。

6. 阿魏酸之HPLC分析條件

文獻上阿魏酸多以高效液相層析法定其含量^{11,12,15,38,50}。本研究之分析方法如下：精確稱取阿魏酸標準品及自當歸分離的檢品，加入LC級甲醇定容至濃度為10 μ g/ml的溶液，經微孔過濾後，各取10 μ l注入HPLC系統中，分析管柱為Lichrospher 100 PR-18，5 μ m，4 x 125 mm，移動相為：①水：氰甲烷：磷酸=70:30:0.5，流速每分鐘為0.6ml，②2%醋酸：甲酸=77:23，流速每分鐘為0.8ml，③檸檬酸溶液(pH 5.4)：甲醇(88:12)，流速每分鐘為0.8ml。檢出波長為320nm，並以積分儀記錄HPLC圖譜及積分各峰面積。

7. 薑本內酯的安定性試驗

根據文獻報導³⁹，薑本內酯在空氣中容易分解，如點樣在薄層層析板上，室溫下也只能維持2小時內穩定，超過2小時則薑本內酯的含量逐漸降低，點樣量越大，變化越顯著。為比較薑本內酯在空氣中與低溫保存下的分解情形，本研究利用氣相層析儀分析薑本內酯的含量。稱取10mg的薑本內酯溶於250 μ l的正己烷中，分別放在室溫下(約29-31℃)的空氣中與低溫(-15℃)的冷凍庫中保存，於固定時間間隔，各取1 μ l注入GC管柱中分析薑本內酯含量，以比較溫度對安定性之影響。

第三章 結 果

1. 乾燥減重

當歸根之粉末減品10克，於105℃乾燥至恆重後，所得乾燥減重為14.9%。

2. 光譜分析結果

當歸根正己烷抽出物經管柱層析法分離純化之化合物，經各種光譜分析鑑定，並與文獻數據比對，確認爲藁本內酯，共分得4.3克，裝於樣品瓶中，吹氮氣後密封置於零下15℃的冷凍庫保存。

另由甲醇抽出物分離的另一指標成分阿魏酸3克，置於乾燥槍中40℃乾燥兩天後裝在樣品瓶中。兩種指標成分呈送衛生署中藥委員會統一保管運用。以提供給各界作為中藥材或其方劑品質管制對照用。

當歸兩種指標成分藁本內酯與阿魏酸的結構鑑定，係利用NMR、IR、UV、MS等光譜數據及與文獻值比對，並配合GC、TLC、HPLC等加以鑑定。其光譜數據如下：

(1) 藁本內酯(Ligustilide)

$C_{12}H_{14}O_2$ ，黃色油狀液體。

EI-MS m/z (%): 190(M^+ , 95), 161(100), 148(95), 134(28),
133(28), 120(19), 106(71), 105(71), 91(32),
78(73), 77(56), 55(63)

1H -NMR($CDCl_3$): 見表一，圖 1

^{13}C -NMR($CDCl_3$): 見表一，圖 2

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3050(烯氫), 1763(內酯羧基), 1667, 1630(共軛雙鍵)

UV $\lambda_{\max}^{\text{nm}}$ (CHCl_3): 257(log ϵ 3.5), 245(3.6), 326(3.9)
 (Hexane): 314.8(log ϵ 3.88)

表一 薑本內酯(1)之 NMR 光譜數據

No	DEPT	本實驗數據*			文獻數據 ³⁶		
		$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$	J (Hz)	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$	J (Hz)
1	>C=O	167.6	-		167.6	-	
2	O	-	-		-	-	
3	4°C	148.5	-		149.0	-	
4	CH ₂	18.5	2.54		18.6	2.57 t	8.2
5	CH ₂	22.5	2.44 m		22.6	2.43 m	
6	CH	129.9	5.97 dt	9.6, 4.1	130.0	5.97 dt	9.5, 4.1
7	CH	117.0	6.25 dt	9.6, 4.1	117.4	6.25 dt	9.5, 4.1
8	4°C	147.1	-		147.2	-	
9	4°C	124.0	-		124.3	-	
10	CH	112.9	5.19 t	8.0	112.7	5.2 t	8.0
11	CH ₂	29.1	2.32 td	7.3, 8.0	28.2	2.34 td	7.3, 8.0
12	CH ₂	22.4	1.47 qt	7.3, 7.3	22.5	1.47 qt	7.3, 7.3
13	CH ₃	13.8	0.92 t	7.4	13.8	0.92 t	7.3

* 本實驗之NMR光譜數據依據 2D ^{13}C - ^1H COSY, 2D ^1H - ^1H COSY 而推定，
 四級碳則與文獻數據比對。

(2)阿魏酸(Ferulic acid)

$C_{10}H_{10}O_4$ ，白色針晶。

mp:169-170°C (甲醇再結晶)

EI-MS $m/z(\%)$:194(M^+ ,100), 179(32), 177(15), 161(9),
145(11),133(34), 105(19), 95(12), 89(21)
77(34), 55(13)

H-NMR(CD_3OD):見表二，圖8。

C-NMR($CDCl_3$):見表二，圖9。

IR $\nu_{max}(KBr)cm^{-1}$:3437.4(OH), 1689.7($>C=O$), 1666.6, 1620.3
1601.0(共軛雙鍵), 1277, 1150(C-O)。

UV λ_{max}^{nm} (MeOH):217.4(log ϵ 4.19), 260(3.7), 320.6(4.3)。

表 二 阿魏酸(2)之NMR光譜數據

No	DEPT	δ_{13C}	δ_{1H}	J (Hz)
1	4°C	145.1	-	
2	CH	107.4	7.16	d 1.83
3	4°C	146.2	-	
4	4°C	123.5	-	
5	CH	112.2	6.80	d 8.19
6	CH	119.7	7.05	dd 8.1, 6.1
7	CH	142.6	7.58	d 15.9
8	CH	111.6	6.30	d 15.9
9	C=O	166.8	-	
10	CH	52.1	3.88	s

3. 層析結果

(1) 薄層分析結果

薑本內酯與阿魏酸之薄層分析結果分別於表三。

表三 薑本內酯與阿魏酸之薄層層析結果

項 目	薑本內酯	阿魏酸
層 析 板	Silica gel 60 F ₂₅₄	同左
展開溶媒	四氯化碳:二甲苯:氯仿:正己烷 4 : 3 : 2 : 0.5	苯:氯仿:甲醇 2 : 2 : 0.6
展開距離	8.5 cm	8.5 cm
檢出方法	UV 366 nm	① UV 254nm ② 10% H ₂ SO ₄ 溶液 加熱 5-10 分
色 譜	淡藍色螢光	① 紫色點 ② 紅色點
R _f 值	0.42	0.41

(2) 氣相層析結果

文獻上薑本內酯以氣相層析方法或薄層掃描測定法定含量，前者為充填式管柱3米長，本研究採用毛細管柱 DBwax 30m，管柱溫度由50℃升至220℃，每分鐘上升5℃。由當歸正己烷抽出物分離純化的薑本內酯，其GC滯留時間為34.12分鐘，並由積分儀記錄之峰面積百分為99.11%。

(3) 高效液相層析結果

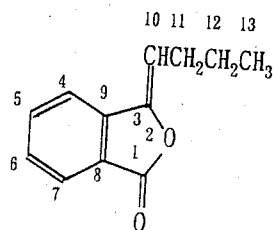
由當歸甲醇抽出物分離純化的阿魏酸，及其標準品之HPLC分析結果列於表四。阿魏酸之滯留時間均與標準品完全一致，並由積分儀記錄之峰面積百分比為100%。

表 四 阿魏酸之高效液相層析結果

阿 魏 酸	標 準 品	樣 品
層 析 管	Lichrospher 100 PR-18(4 x 125 mm)	
移 動 相	① 水 : 氯甲烷:磷酸 (70:30:0.05)	
	② 2%醋酸:甲醇(77:23)	
	③ 檸檬酸(pH=5.4):甲醇(88:12)	
檢 測 波 長	320 nm	
流 速	① 0.6 ml/min ② 0.8 ml/min ③ 0.8 ml/min	
滯留時間(分)	① 4.69	① 4.69
	② 10.28	② 10.27
	③ 9.93	③ 9.90
峰面積百分比	100	100
濃 度	10 μ g/ml	
注 入 量	① 10 μ l ② 10 μ l ③ 20 μ l	

(4) 薑本內酯之安定性試驗結果

薑本內酯於室溫中保存分解速率較快，經過七天後，發現室溫下保存之樣品，其GC、GC-MS 分析(見圖19)結果顯示，分解的主要產物為分子量188，基峰159的化合物，經與文獻比對確定為丁烯基酞內酯(butylidene phthalide, 3) ⁴¹。室溫下空氣中保存之薑本內酯於第16天即全部分解完畢，GC已偵測不到該化合物的訊號，如置於零下15℃冷凍庫中，16天後薑本內酯仍有97.5%，兩個月後仍有93.5%。



Butylidene phthalide(3)

第四章 討論

1. 藁本內酯(ligustilide)是當歸(Angelica sinensis)和歐當歸(Ligusticum officinale)根揮發油的主成分，其他的繖形科植物如川芎(Ligusticum chuanxiong)、白芷(Angelica dahuzica)、東當歸(Ligusticum acutifolium)、遼藁本(Ligusticum jeholense)等也含有藁本內酯，文獻上曾利用薄層掃描法比較各植物中的含量³⁹。因此藁本內酯也可以作為這些常用中藥或其方劑的指標成分。
2. 由藁本內酯之安定性試驗結果顯示此種指標成分必需保存在低溫的冷凍庫中，且以氮氣封存為佳。
3. 藁本內酯與丁烯基酞內酯，GC除可利用的滯留時間比較外(見圖19)也可利用薄層層析法比較，如以四氯化碳:二甲苯:氯仿:正己烷 4:3:2:0.5展開，藁本內酯在366nm下觀察為淺藍色強螢光點， R_f 值為0.31，而丁烯基酞內酯則不呈色點，如改用UV254nm觀察則呈紫色點， R_f 值0.39。由於兩個化合物的 R_f 值及在紫外燈下的顯色情況不同很容易區別。文獻上曾以薄層掃描法³⁹定量，本研究使用氣相層析法，並利用積分儀定其峰面積百分比，靈敏度比前者要高。
4. 由於藁本內酯放在室溫下易分解，因此在NMR光譜測定之時間範圍已有部分分解，氫譜上有 δ 7.14-7.32 ppm(圖1)為丁烯基酞內酯苯環上的H-4及H-5的吸收訊號。
5. 阿魏酸的HPLC分析條件，如以文獻上的三種不同的移動相作比較，發現以2%醋酸-甲醇溶液作移動相為最佳的選擇(圖17)。阿魏酸之滯留時間為(10.28分)與甲醇(標準品及檢品之溶媒)之滯留時間(1.69分)相差較長，較適合用於成分複雜的方劑之分析。
6. 阿魏酸為多種中藥與中藥方劑之指標成分，較易取得且價格便宜，建議直接購買。
7. 指標成分之分離耗費不少人力、物力、時間，因此有關指標成分保存與運用，應事先有完善規畫，以免浪費資源。

參考文獻

1. 中藥檢驗方法專輯(一)，行政院衛生署藥物食品檢驗局(1988)。
2. 中藥檢驗方法專輯(二)，行政院衛生署藥物食品檢驗局(1989)。
3. 中藥檢驗方法專輯(三)，行政院衛生署藥物食品檢驗局(1991)。
4. 中藥檢驗方法專輯(五)，行政院衛生署藥物食品檢驗局(1992)。
5. 中藥檢驗方法專輯(六)，行政院衛生署藥物食品檢驗局(1994)。
6. 中藥檢驗方法專輯(七)，行政院衛生署藥物食品檢驗局(1994)。
7. 中藥檢驗方法專輯(八)，行政院衛生署藥物食品檢驗局(1995)。
8. 張光雄，中藥方劑之定性與定量研究，明通醫藥雜誌社(1994)。
9. 林雲蓮，陳介甫，臺灣市售中藥HPLC圖譜之鑑定，行政院衛生署八十年度研究報告。
10. 孫慈悌，李珮端，中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十年度研究報告(DOH 80-50c)。
11. 孫慈悌，李珮端，中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十一年度研究報告(DOH 81-TD-062c)。
12. 孫慈悌，李珮端，中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十二年度研究報告(DOH 82-TD-014c)。
13. 程亦妮，許順吉，中藥方劑三黃及大黃黃連瀉心湯中黃連成分之定量研究，中醫藥雜誌，3(2)23-32(1992)。
14. 許順吉，吳碩傳，梁丕偉，陳鴻仁，呂瓊芳，中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十三年度研究報告(DOH 83-CM-012b)。
15. 孫慈悌，李珮端，徐素蘭，許馨娥，許嘉茹，中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十三年度研究報告(DOH 83-CM-012c)。
16. 孫慈悌，吳午龍，吳銀祝，中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十三年度研究報告(DOH 83-CM-012d)。

17. 許順吉，劉英玫，陳鴻仁，呂瓊芳，利用毛細電泳定量中藥製劑成分(一)，行政院衛生署八十三年度研究報告(DOH 83-CM-013)。
18. 許順吉，毛細電泳層析法中藥成分分析之應用，藥物食品學術研討會，論文摘要，p.19，台北(1994)。
19. 米山藥廠目錄
20. ROTH 公司目錄
21. SIGMA 公司目錄
22. FRUKA 公司目錄

*根據誠心堂化工有限公司之售價為

ferulic acid 10mg 820元

ligustilide 則無供應

23. 陳榮福編著，中藥藥理學，p.69，國立中國醫藥研究所出版(1991)。
24. 何志峰譯，和漢藥物學，p.110，國立中國醫藥研究所出版(1992)。
25. 方洪鉅等，藥學學報，14(10)，371(1979)。
26. 林茂等，當歸化學成分的研究，藥學學報，14(10)，529(1979)。
27. 呂瑞綿，林茂，劉鐵成，方起程，歐當歸化學的研究，中草藥，12(11)，485(1981)。
28. 李家仁，中國當歸化學成分的研究，中草藥，14(8)，377(1983)。
29. 侯家麟，李象新，孫亞琪，程松林，張慶康，蘇寶林，田燕聲，對中國藥典(77年版)當歸質量標準修改的探討，中草藥，16(3)，107(1985)。
30. 顏焜熒，王俊文，陳繼明，李沐勳，台灣藥學雜誌，18，16(1966)。
31. 梅其柄，陶靜儀，中國當歸藥理研究進展，中草藥，14(8)，379(1983)。
32. 查力，當歸對動物實驗性心律失常的影響，藥學通報，16(5)，259(1981)。
33. 徐理納，歐陽蓉，伊鍾洙，張凌雲，計嵐仙，當歸及其成分阿魏酸鈉對小鼠吞噬功能的影響，藥學學報，16(6)，411(1981)。

34. 伊鍾洙，張凌雲，徐理納，當歸及其成分阿魏酸對大鼠血小板聚集和5-HT釋放的影響，藥學學報，15(6)，321(1980)。
35. 陶靜儀，阮于平，梅其柄，劉深，田巧蓬，陳耀祖，張惠迪，段志興當歸成分薑本內酯平喘作用的實驗研究，藥學學報，19(8)，561(1984)。
36. Chemical Abstract, 117, 40033d(1993).
37. 陳忠川，謝明村，葉豐次，張淑貞，張永勳，邱年永，闕甫沁，蔡新聲，當歸細胞懸浮培養之研究，第三屆中華民國藥學聯合學術研討會，演講摘要集，p.52(1993)。
38. Y.C. Lee, C.Y. Huang, K.C. Wen and T.T. Suen, Determination of Paeoniflorin, Ferulic Acid and Baicalin in the traditional Chinese Medicinal Preparation Dang-Guei-San by High-Performance Liquid Chromatography, J. Chromatogr., 660, 299(1994).
39. 呂瑞綿，何麗一，方洪鉅，張秀琴，當歸和歐當歸中薑本內酯的薄層掃描測定法，藥學學報，15(6)，371(1980)。
40. 呂瑞綿，何麗一等，中草藥，11，395(1981)。
41. 王善普，高宣亮，福山愛保，菅原道治，中藥川芎的化學成分研究——五種內酯類化合物，中草藥，16(3)，137(1985)。
42. T. Aoki, K. Takagi, T. Hirata and T. Suga, Two Naturally Occurring Acyclic Diterpene And Norditerpene Aldehydes From Tetragonia tetragonoides, Phytochemistry, 21(6), 1361(1982).
43. Handbook of Proton-NMR Spectra and Data, vol. 4, p.48, No. 2491 Spectrum, Academic Press, Inc., Tokyo, New York(1985).
44. Sadtler Standard NMR Spectra, 16883.
45. Sadtler Standard Carbon-13 NMR Spectra, 8112.

46. 溫月笙，賀庄容，薛孔方，曹鳳銀，川芎化學成分的研究，中草藥，16(3)，122(1985)。
47. 關崎春雄，縣功，木春康一，Studies on the Variation of Ligustilide Content for Cultivating Process of Angelica acutiloba var. acutiloba Kitgawa，生藥學雜誌，38(4)，361(1984)。
48. 黃遠征，溥發鼎，川芎根莖揮發油化學成分的研究研究，藥學學報，23(6)，426(1988)。
49. 野呂征男，久田陽一，奧田和代，川村智子，石川育子，久井英二，田中俊弘，Pharmacognostical Studies of Angelicae Radix(1). Phthalide Content of Wild Angelica Strains，生藥學雜誌，43(1)，55(1989)。
50. 陳漢平，劉素香，李桂梅，李青華，高效液相色譜法測定當歸及其炮制品中阿魏酸的含量，中草藥，19(10)，447(1988)。

謝 辭

本研究之完成，非常感謝行政院衛生署之經費補助。衷心感激本院藥學系生藥學教授陳忠川博士惠予鑑定當歸之基源，李珮端教授惠贈阿魏酸標準品，劉正雄、江芙美、賴妙英、顏秀芳等四位老師惠予提供儀器設備，林炯興、王仁邦、劉鳳樟、鄭霈榕、劉偉德等五位同學鼎力相助，及各貴儀中心之操作員惠予協助測定各種光譜，使得本研究計畫能如期完成，在此一併致謝。

asdh-50-5 h1

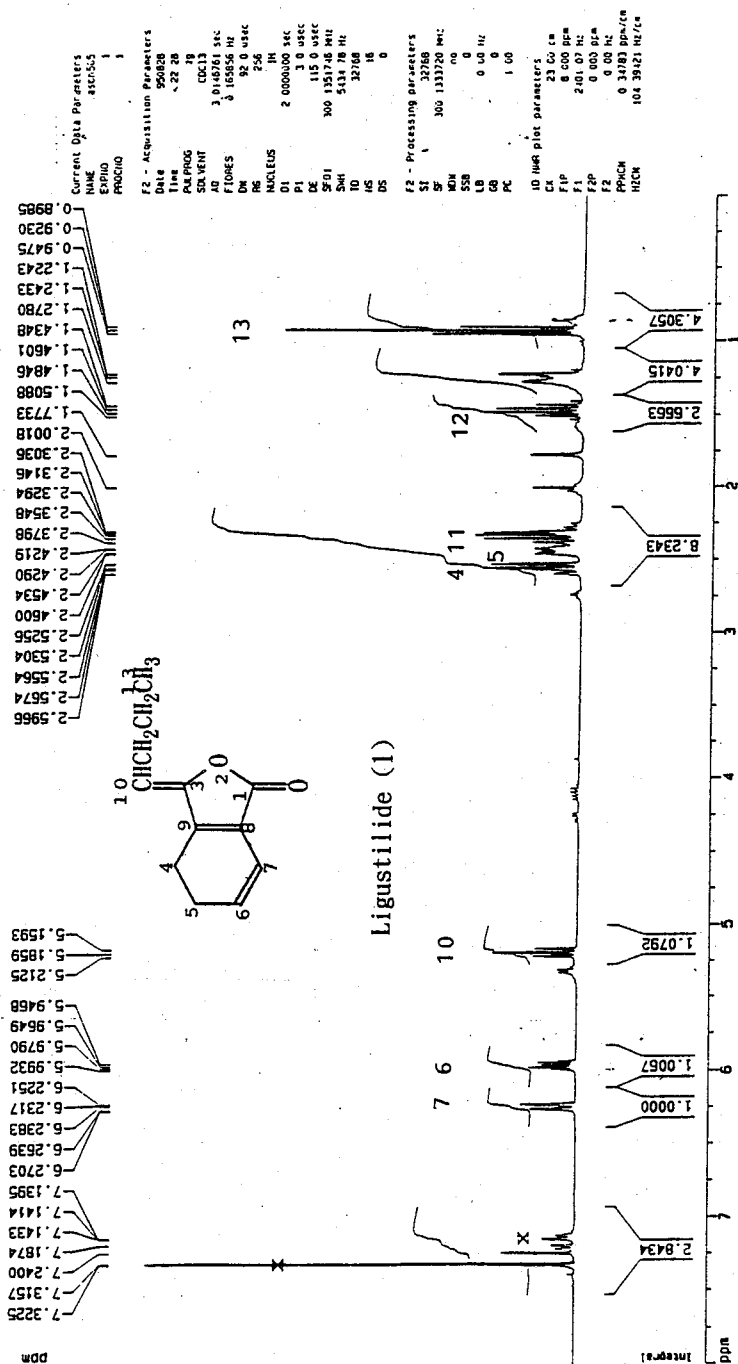


圖 1 薊本內酯 (1) 之氫譜圖 (300MHz)
x——impurity from butylidene phthalide

ashh-50-5 c13

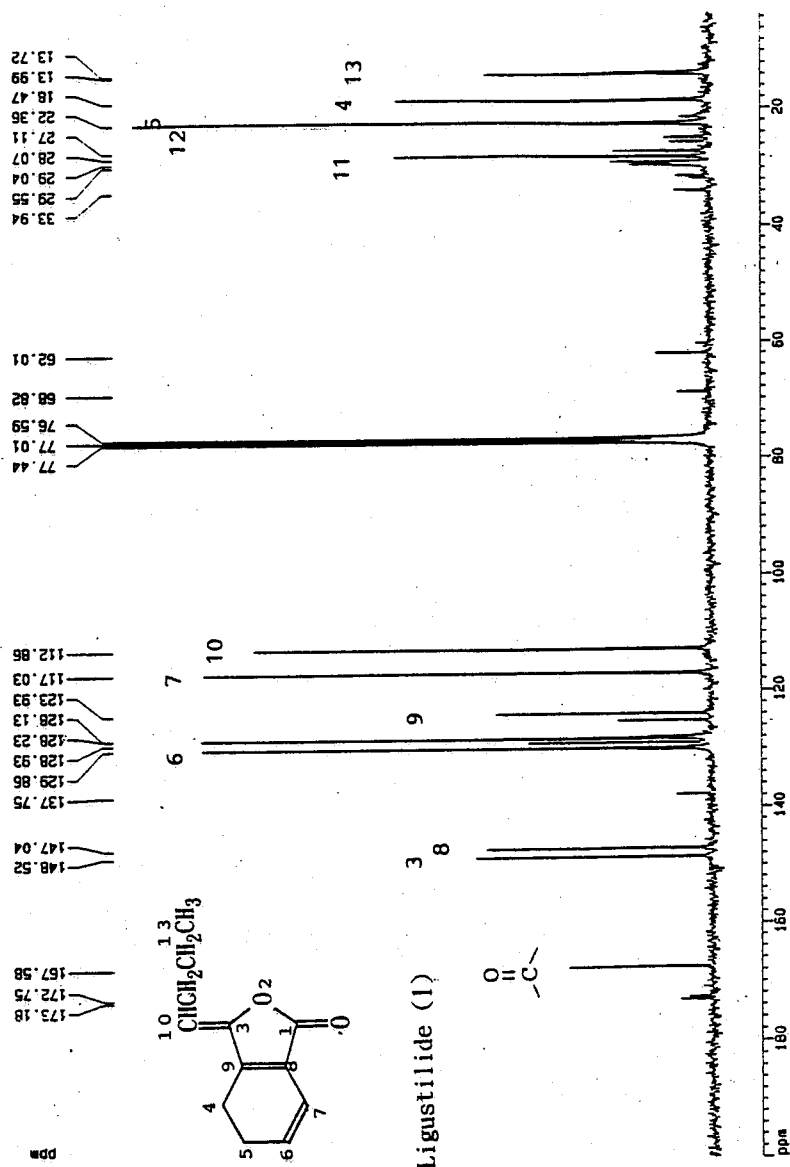


圖 2 藜本內酯 (1) 之碳譜圖 (300MHz)

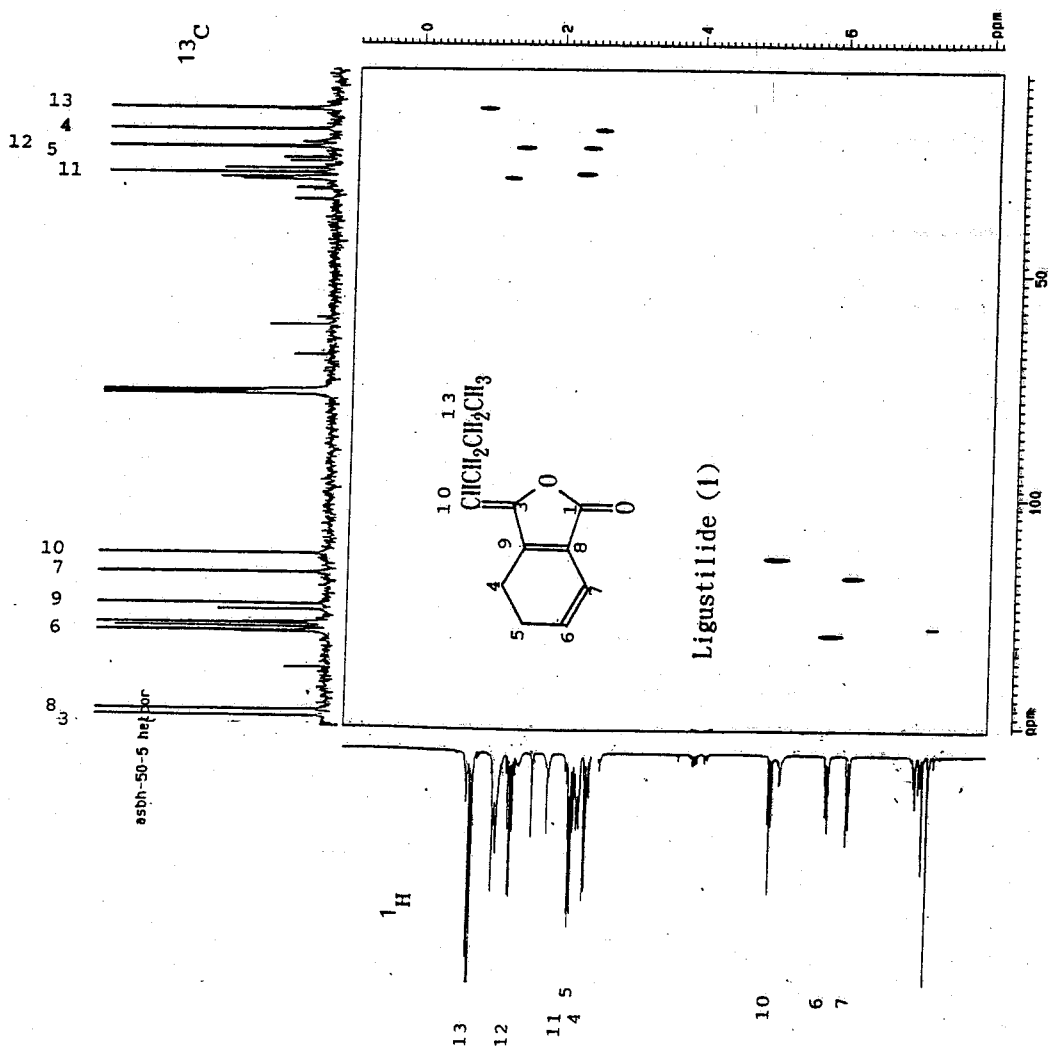


圖 3 薑本內酯 (1) 之 2D¹³C-¹H COSY 圖

Current Data Parameters
NAME: asbh55
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ : 990901
Time : 5.47
PULPROG : hrcd
SOLVENT : CDCl₃
AQ : 0.000200 sec
RG : 16.27001 Hz
DE : 2.000000 sec
RG : 32768
AQ : 0.000200 sec
RG : 1.30
HACQ : 0.000000 sec
D1 : 2.000000 sec
D2 : 0.000000 sec
P3 : 18.0 sec
SFO2 : 300.1351745 MHz
D4 : 0.000000 sec
D5 : 14.00 sec
P1 : 0.000000 sec
P2 : 7.0 sec
D3 : 0.000000 sec
D4 : 16.00 sec
SFO1 : 299.1351745 MHz
SFO2 : 299.1351745 MHz
SFO3 : 100.6261261 MHz
10 : 1024
11 : 1024
12 : 1024
13 : 1024
14 : 1024
15 : 1024
16 : 1024
17 : 1024
18 : 1024
19 : 1024
20 : 1024
21 : 1024
22 : 1024
23 : 1024
24 : 1024
25 : 1024
26 : 1024
27 : 1024
28 : 1024
29 : 1024
30 : 1024
31 : 1024
32 : 1024
33 : 1024
34 : 1024
35 : 1024
36 : 1024
37 : 1024
38 : 1024
39 : 1024
40 : 1024
41 : 1024
42 : 1024
43 : 1024
44 : 1024
45 : 1024
46 : 1024
47 : 1024
48 : 1024
49 : 1024
50 : 1024
51 : 1024
52 : 1024
53 : 1024
54 : 1024
55 : 1024
56 : 1024
57 : 1024
58 : 1024
59 : 1024
60 : 1024
61 : 1024
62 : 1024
63 : 1024
64 : 1024
65 : 1024
66 : 1024
67 : 1024
68 : 1024
69 : 1024
70 : 1024
71 : 1024
72 : 1024
73 : 1024
74 : 1024
75 : 1024
76 : 1024
77 : 1024
78 : 1024
79 : 1024
80 : 1024
81 : 1024
82 : 1024
83 : 1024
84 : 1024
85 : 1024
86 : 1024
87 : 1024
88 : 1024
89 : 1024
90 : 1024
91 : 1024
92 : 1024
93 : 1024
94 : 1024
95 : 1024
96 : 1024
97 : 1024
98 : 1024
99 : 1024
100 : 1024

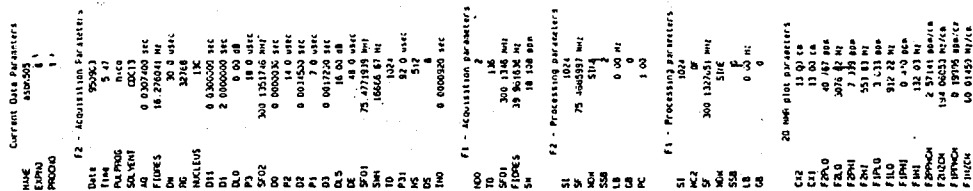


圖 3a 藁本內酯(1)之 $2D^{13}C-^1H$ COSY 之局部放大圖
($\delta: ^1H$ 0.5-3ppm; ^{13}C 0-40ppm)

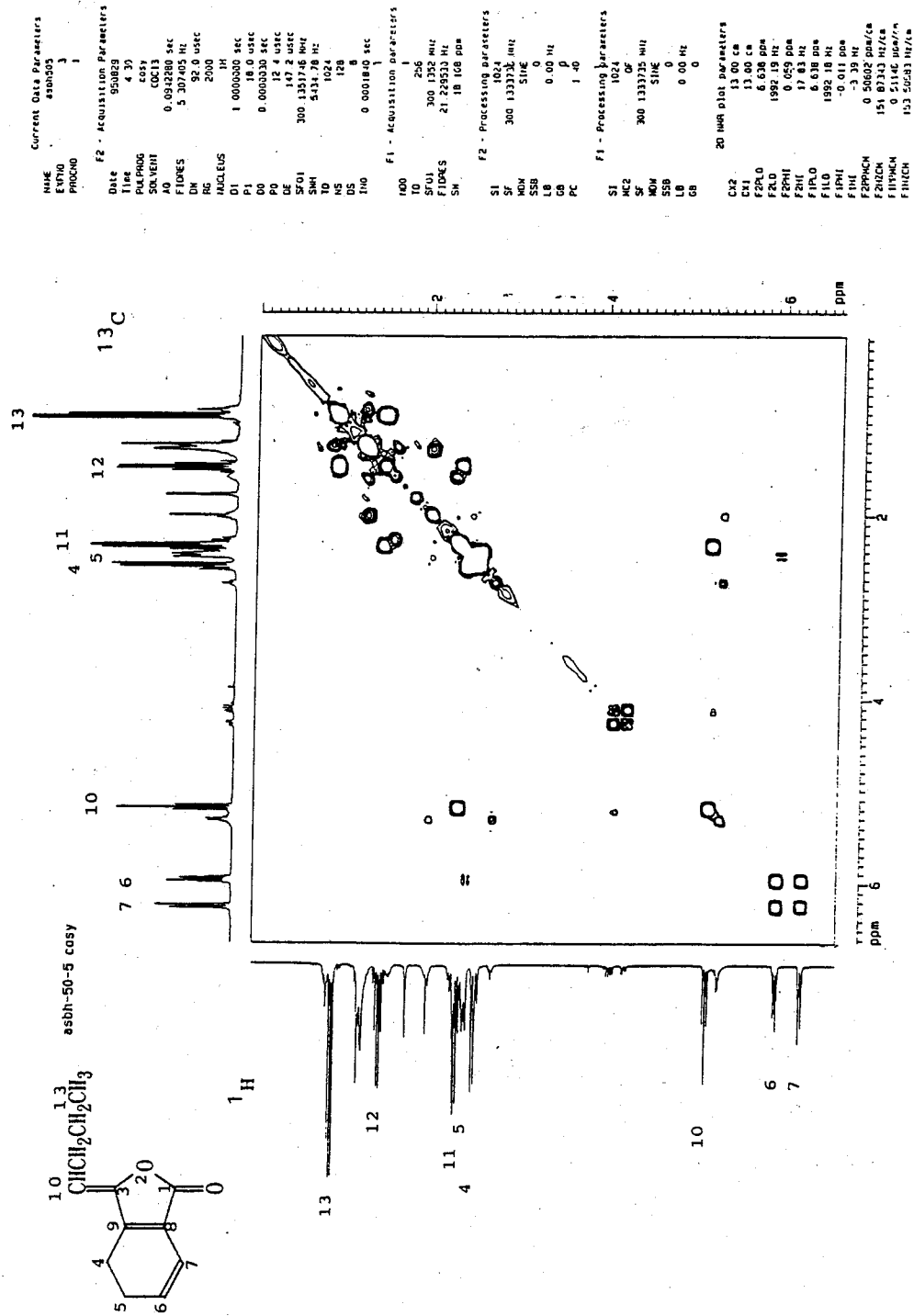


圖 4 薑本內酯 (1) 之 2D ¹H-¹H COSY 圖

Mass Spectrum]
 Data : L-EI-5455
 Sample: ASBH-70-1

Date : 14-Aug-95 13:57

Note : *

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.25 min

Scan# : 3

BP : m/z 161.0000

Int. : 1488.80

Output m/z range : 45.0000 to 304.3650

Temp : 13.1 deg.C

Cut Level : 0.10 %

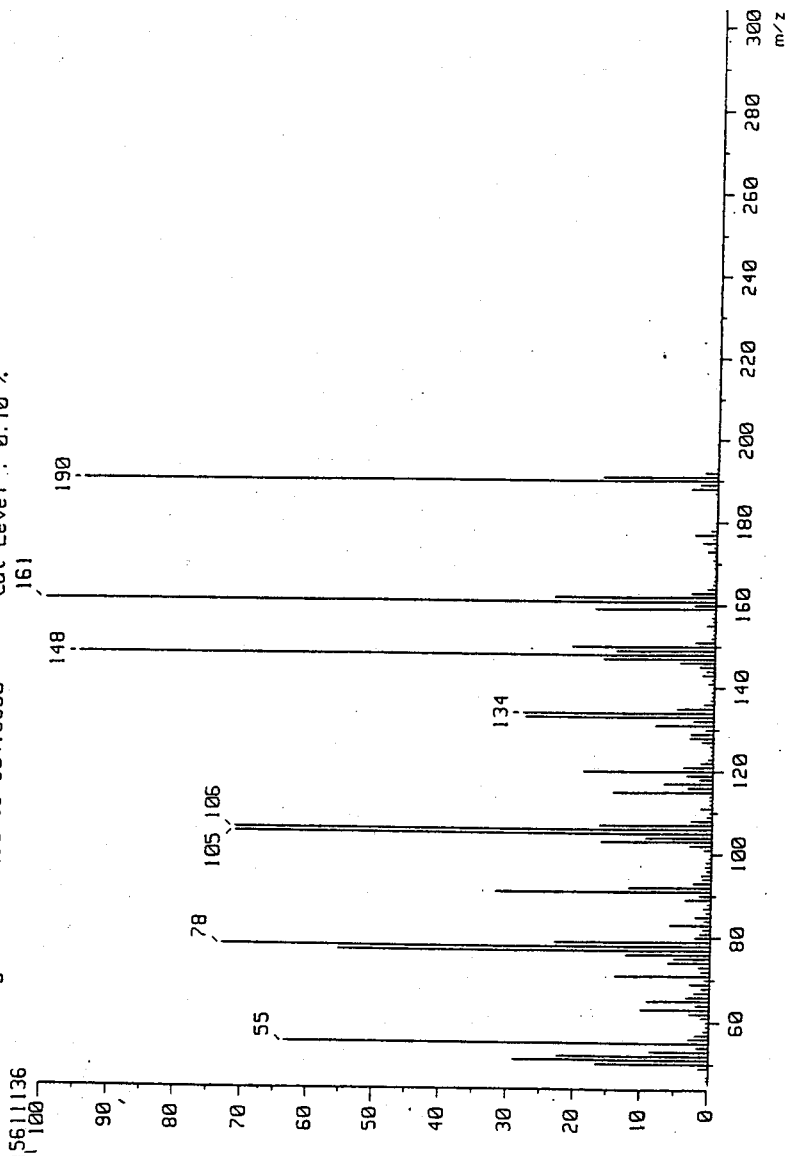


圖 5 薑本內酯 (1) 之質譜圖

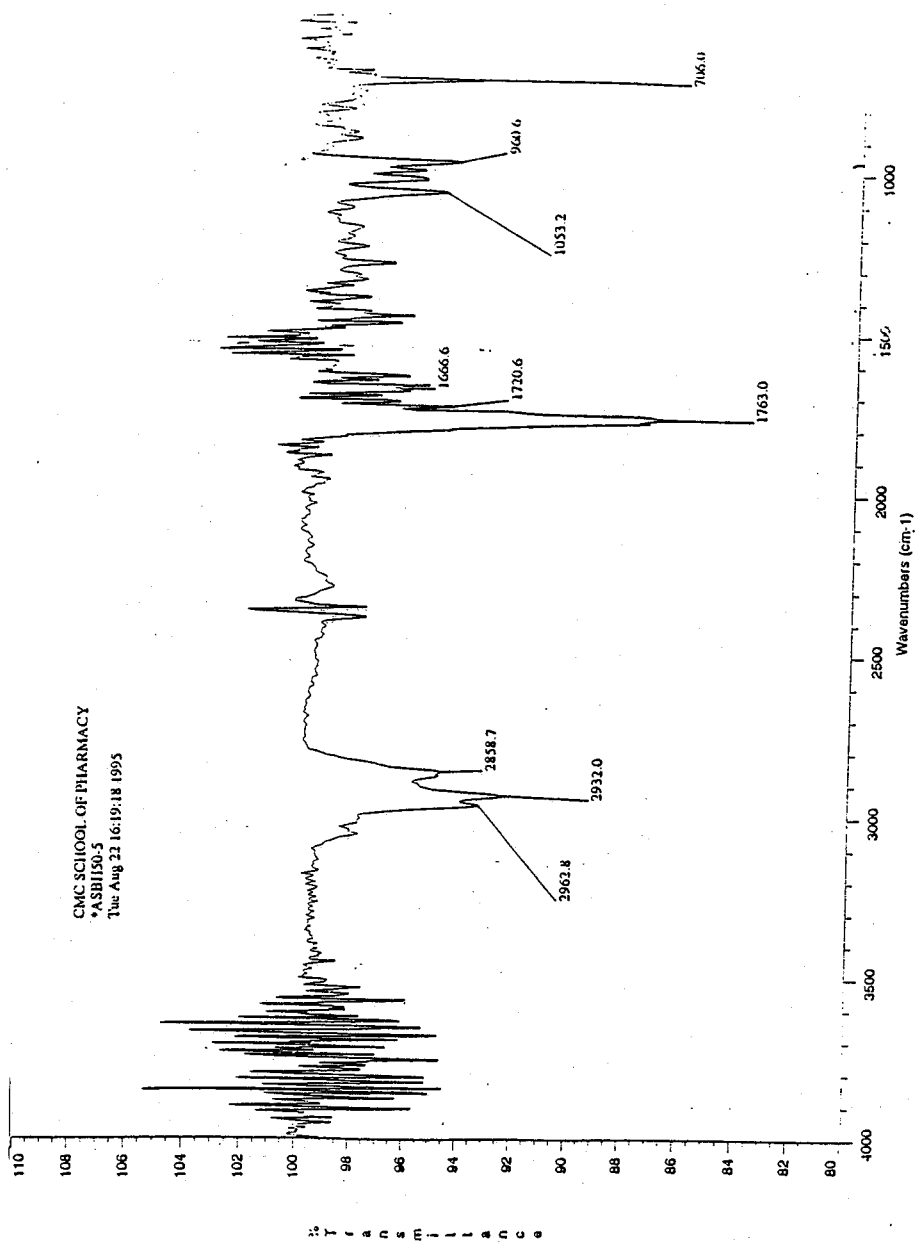


圖 6 乙酸甲酯 (1) 之紅外光譜圖

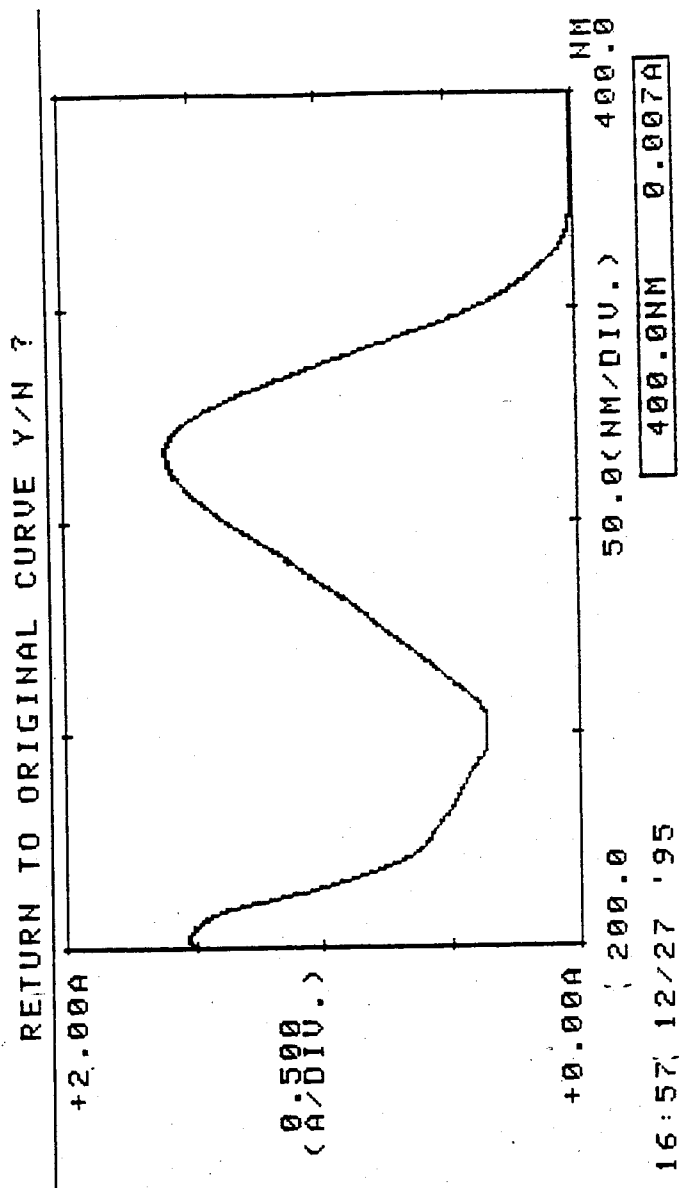


圖 7 黃本內酯(1)之紫外光譜圖

*** PEAK-PICK ***

-- PEAK --	λ	ABS
-- VALLEY --	λ	ABS
	314.0	1.624
	732.0	0.002
	251.0	0.367

asfa h1

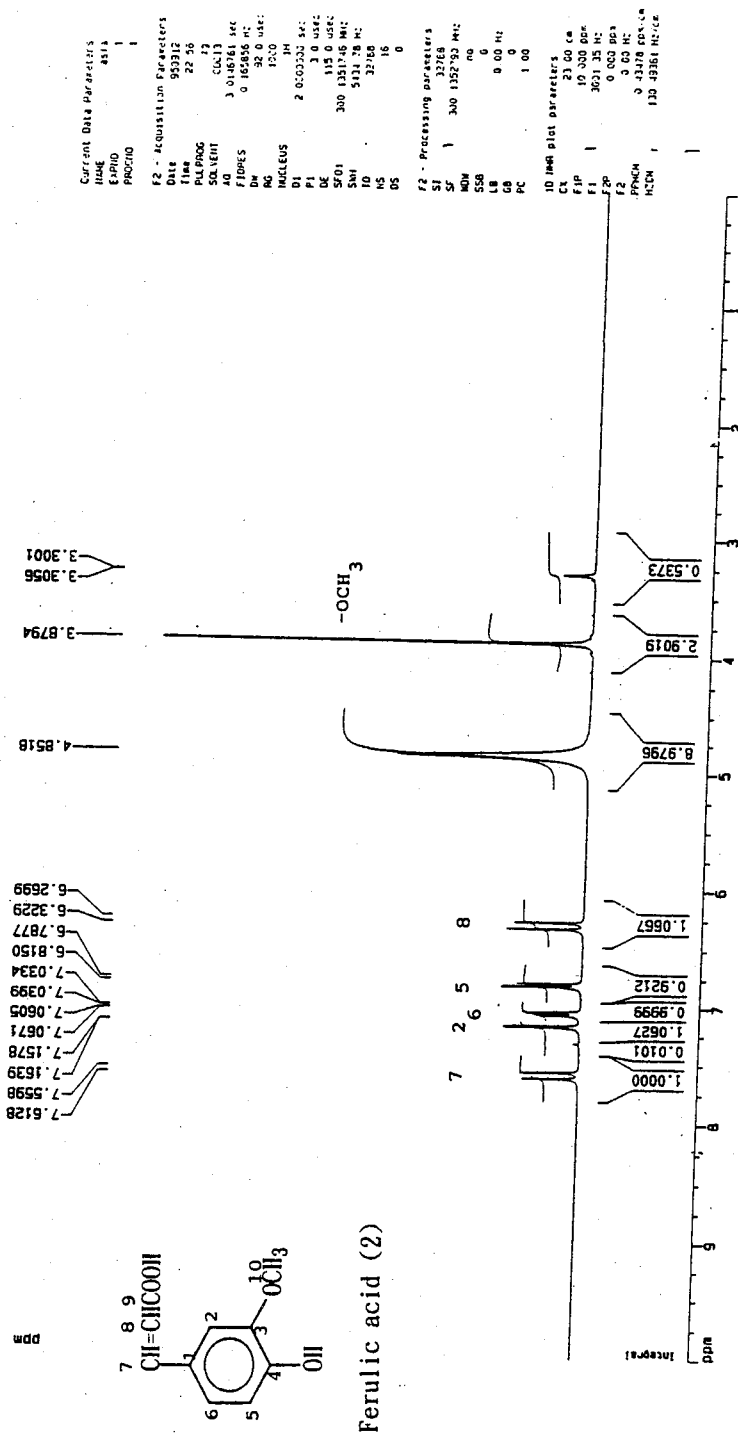
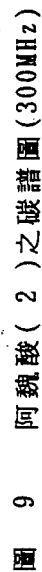
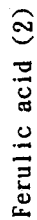


圖 8 阿魏酸 (2) 之氫譜圖 (300MHz)



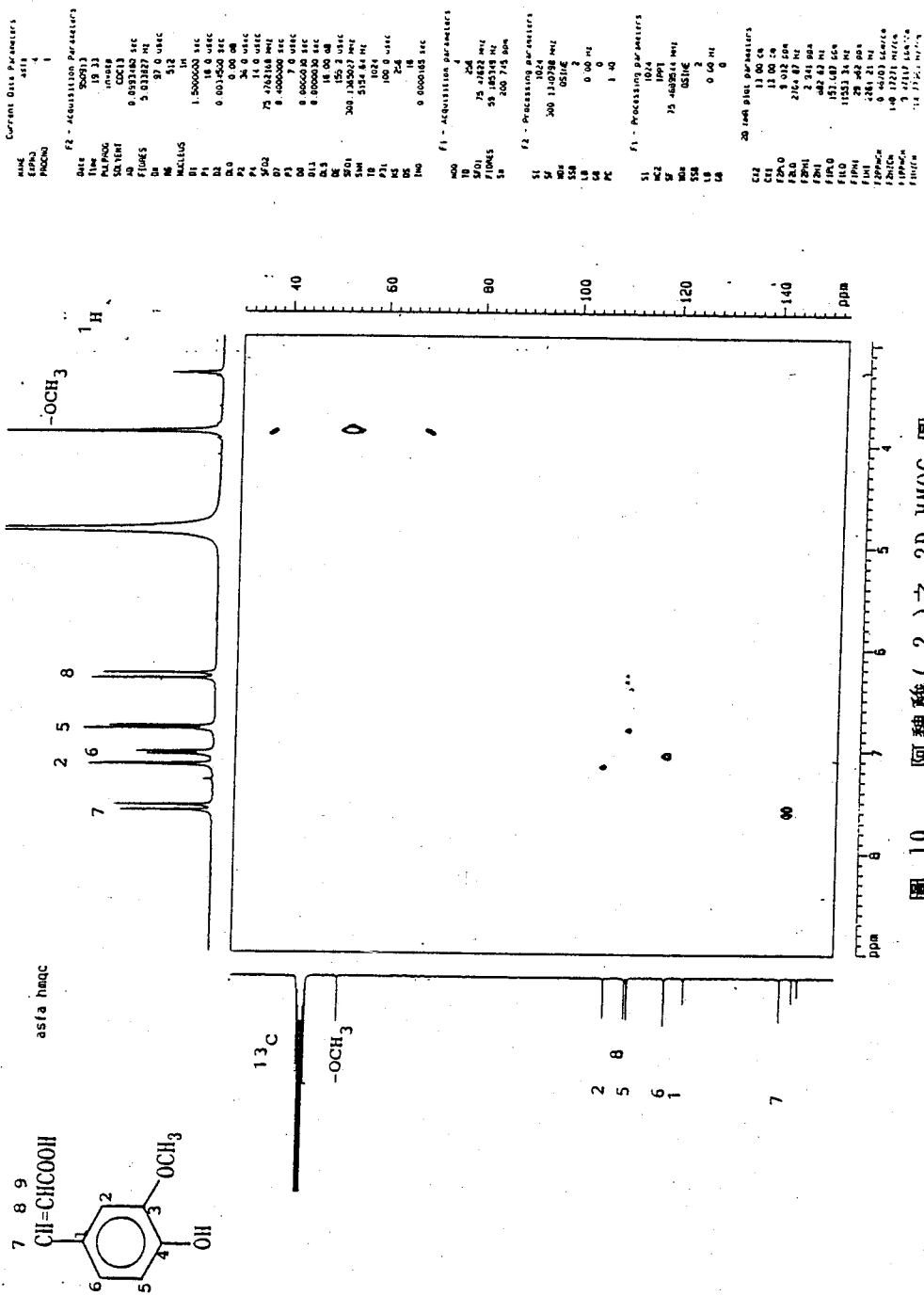


图 10 阿魏酸 (2) 之 2D HMQC 图

asfa-cos)

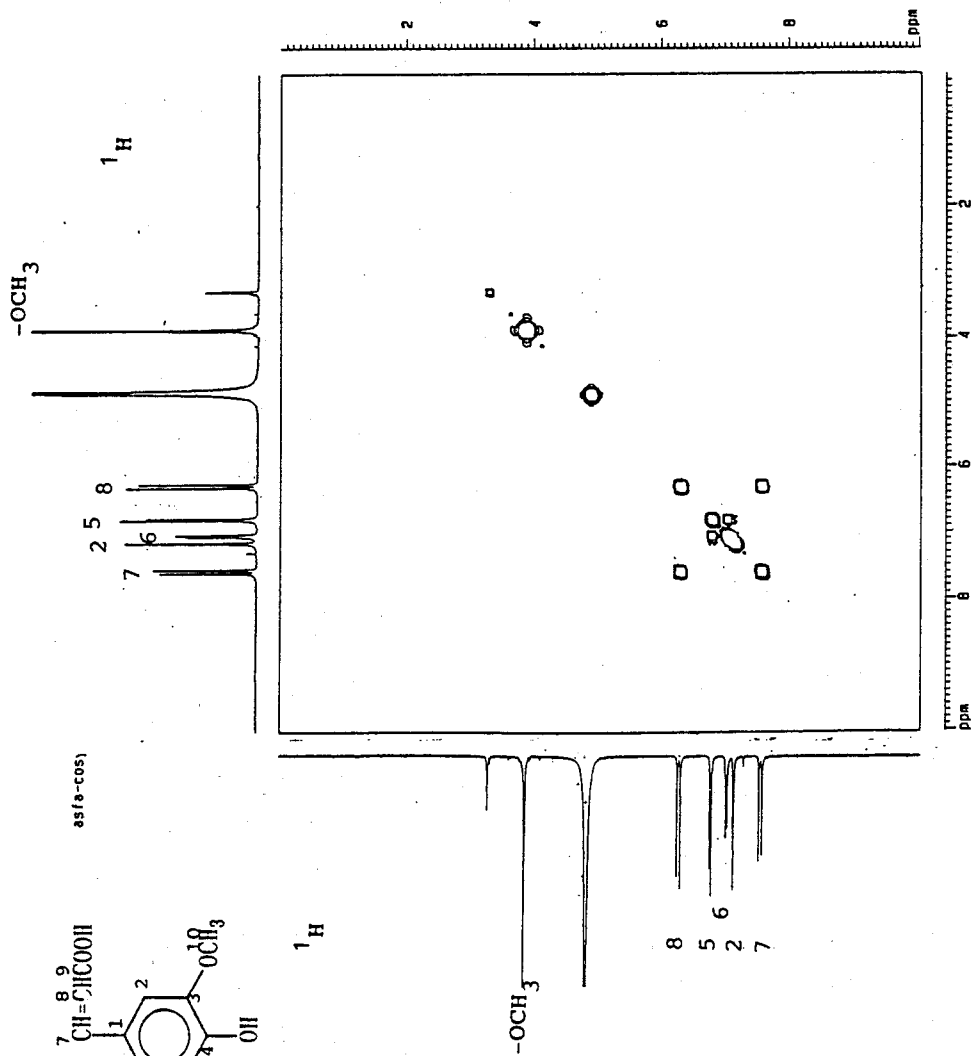


图 11 阿魏酸(2)之 $2D^1H-^1H$ COSY 图

Current Data Parameters	
NAME	051A
EXFNO	3
PROGNO	1

F2 - Acquisition Parameters

Date	Time	950913
PULPROG	12 43	
SOLVENT	CS2	
	MeOH	
AD	0.0951380 sec	
FIDRES	5.01382 Hz	
DA	97.0 usrc	
RG	2000	
NUCLEUS	1H	
D1	1.0000000 sec	
P1	18.2 usrc	
D2	0.0000000 sec	
P2	12.4 usrc	
DE	155.2 usrc	
SM	300.136502 MHz	
SF04	515.61 MHz	
	1024	
N5	128	
D5	0.0001940 sec	
IN0		

F1 - Acquisition parameters

NOO	1
TD	164
SFOI	300.1365 Hz
FIDGES	31.430914 Hz
SW	17.174 ppm

F2 - Processing Parameters.

SI	1024
SF	300.1340748 Hz
WDM	519E
SSB	0
L0	0.00 Hz
GB	0
PC	1.00

F1 - Processing parameters

S1	1024
MC2	OF
SF	300 1340746 MHz
MON	SIZE
SSB	0
LB	0.00 Hz
GB	0

20. IMA plot parameters

CX2	13.00 cm	13.00 cm
CX3	13.00 cm	13.00 cm
F2PQ	10.035 dm	10.035 dm
F2L	3011.82 Hz	3011.82 Hz
F2PH	0.005 dm	0.005 dm
F2H	1.81 Hz	1.81 Hz
F1FL	10.035 dm	10.035 dm
F1L	3011.83 Hz	3011.83 Hz
F1PH	0.005 dm	0.005 dm
F1H	1.80 Hz	1.80 Hz
F2PHCN	0.77151 dm/cm	0.77151 dm/cm
F2HCN	231.55513 Hz/c	231.55513 Hz/c
F1PHCN	0.77151 dm/cm	0.77151 dm/cm
F1HCN	231.55649 Hz/c	231.55649 Hz/c

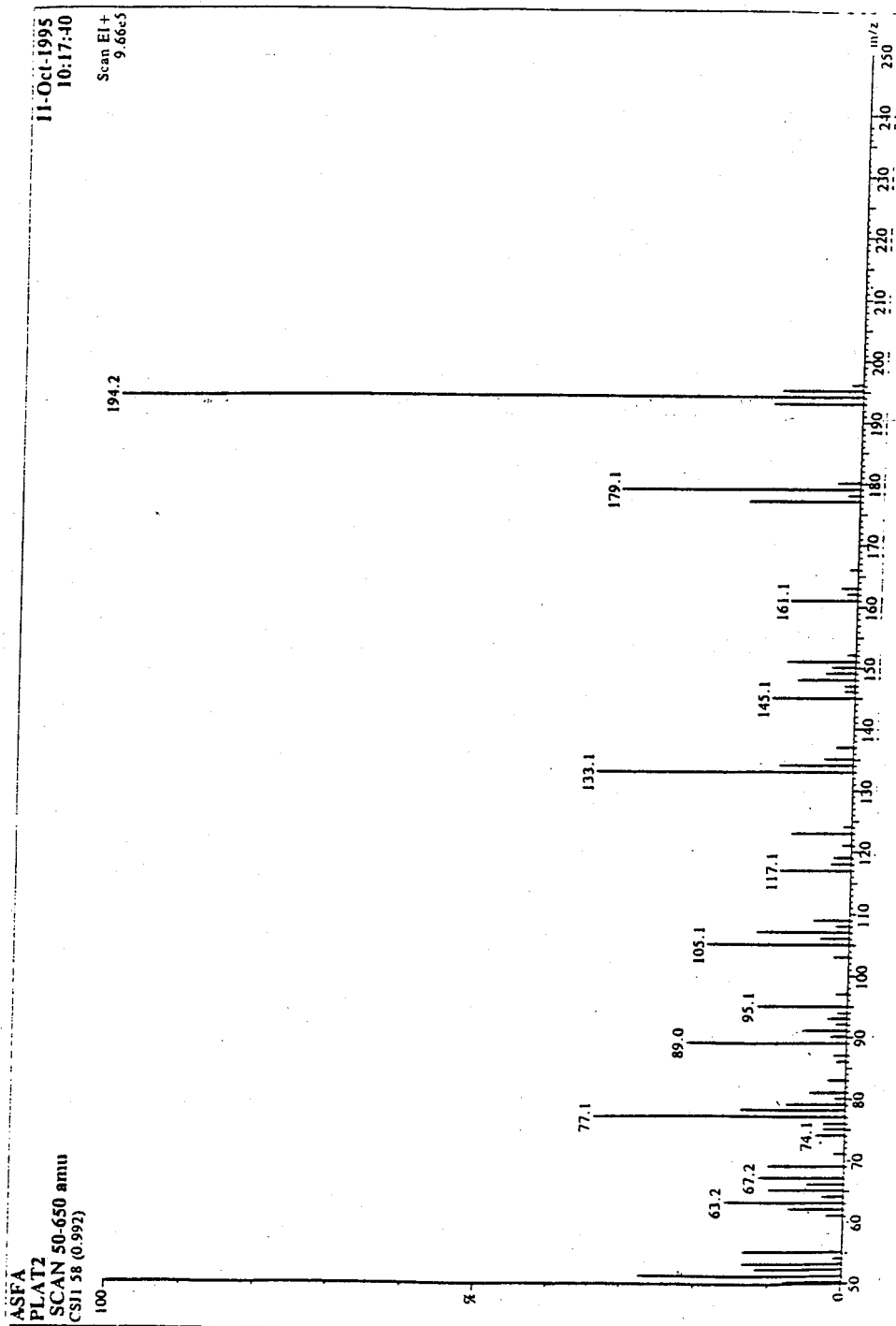


圖 12 阿魏酸 (2) 之質譜圖

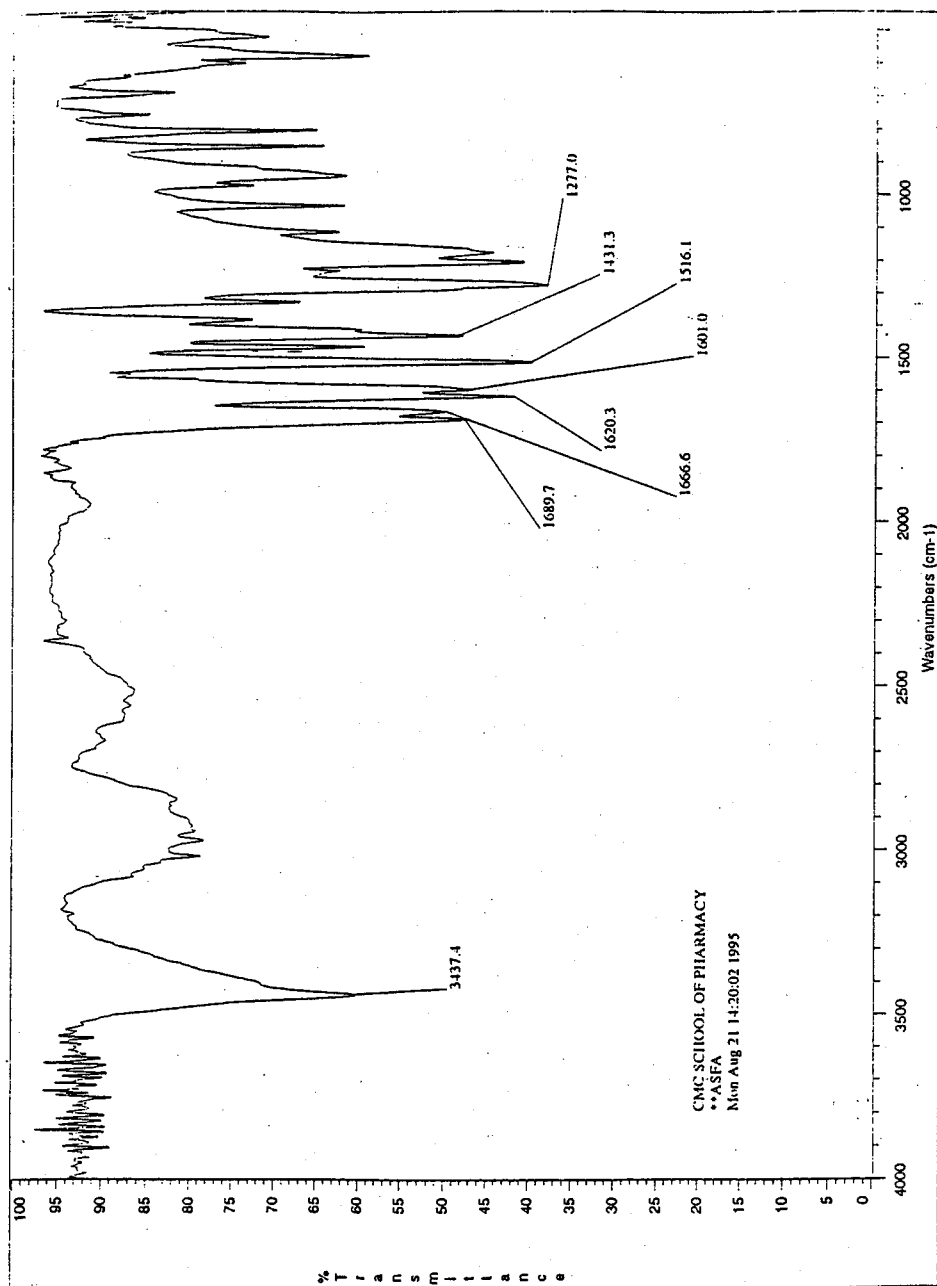


圖 13 阿魏酸(2)之紅外光譜圖

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
320.6	2.058	260.4	0.506
217.4	1.574		

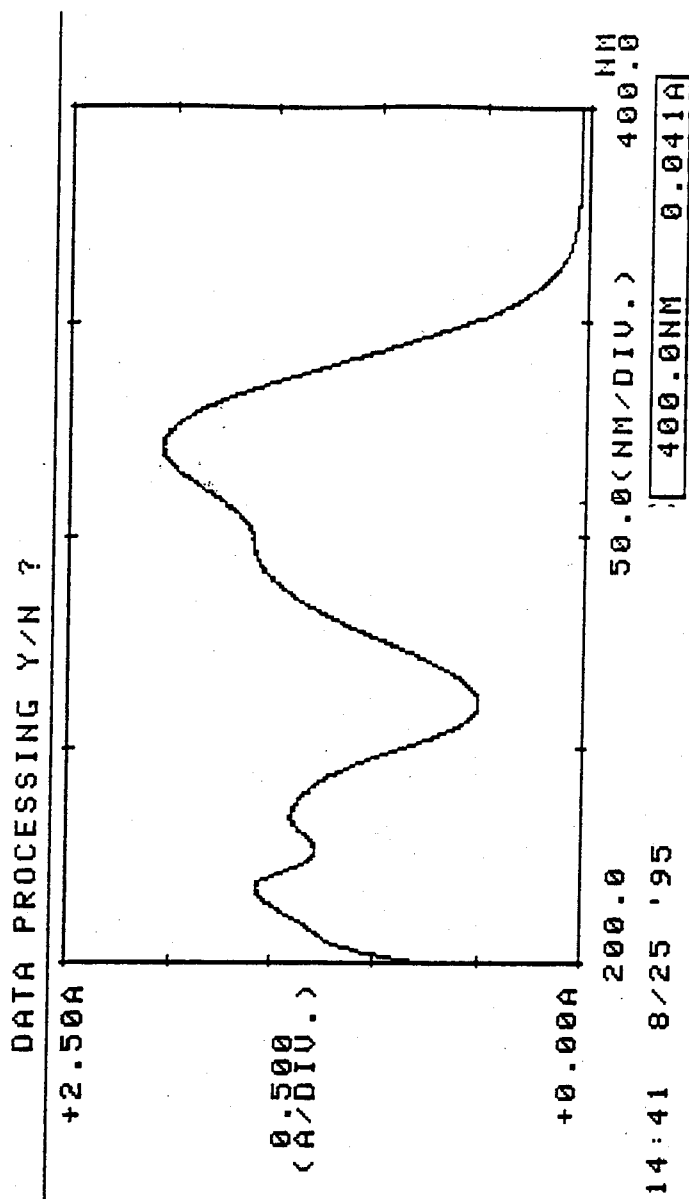
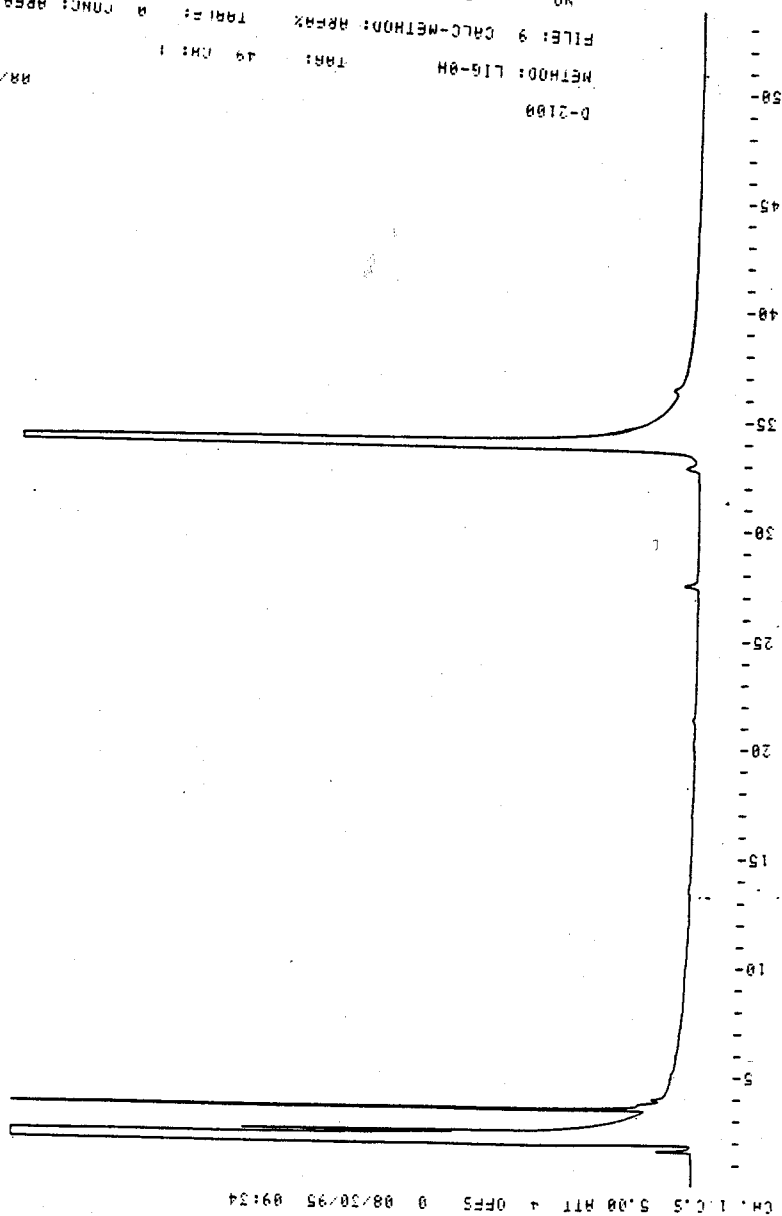


圖 14 阿魏酸(2)之紫外光譜圖

NO. 961-7501

CHART NO. 661-7501



0-2100
METHOD: LIG-04
FILE: 9 CALC-METHOD: AREA
TARI: 49 CH: 1
NO. RT AREA CONC RT
5 27.543 AREA
6 32.950 2923
7 34.123 650414
TOTAL 99.118
PEAK RET: 2000 650252 100.000
RR/10/95 09:14

圖 15 羧本內酯(1)之 GC 圖

分裝管柱: Lichrospher RP-18, 4 x 125 mm
 移動相: 水: 氯甲烷: 磷酸 = 73:30:0.05,
 流速: 0.6 ml/min
 檢出波長: 320nm

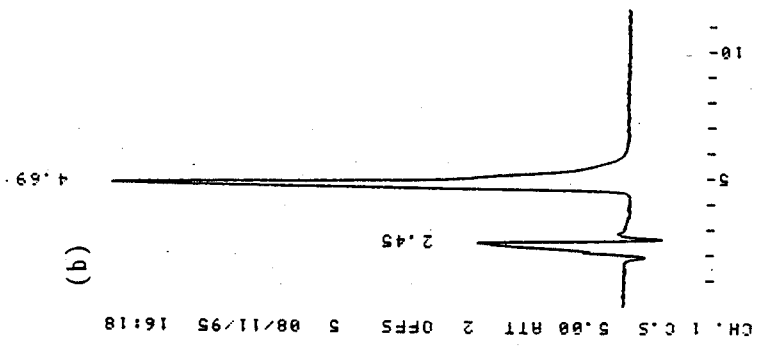
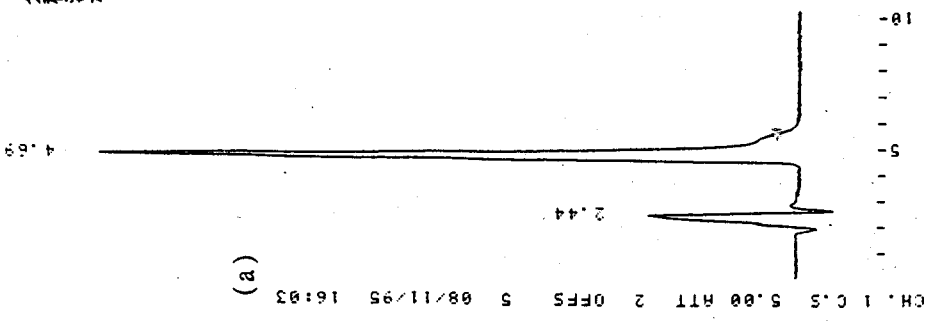
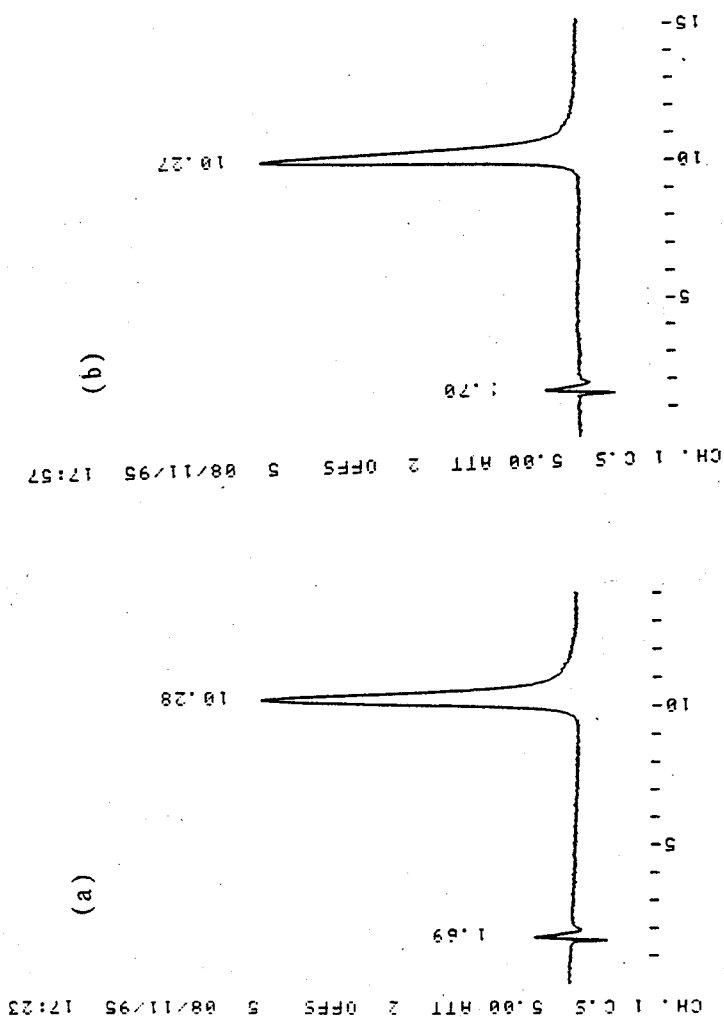


圖 16 阿魏酸(2)之 HPLC 圖 (a)標準品 (b)當歸分離之檢品

0-2500
 08/11/95 16:18
 METHOD: RS-FR TAG: 31 CH: 1
 FILE: 9 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA
 NO. RT AREA CONC BC
 2 4.69 50084 100.000 BB
 TOTAL 50084 100.000
 PEAK REF: 17800

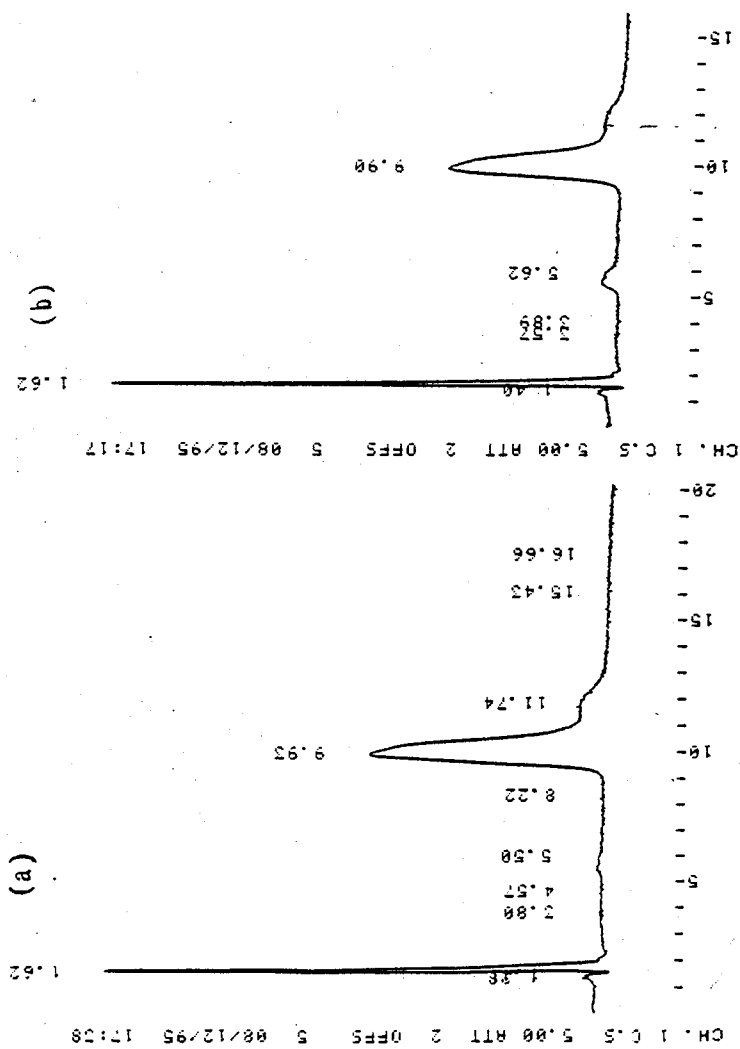
分 璃 管 柱 : Lichrospher RP-18, 4 x 125 mm
 移 動 相 : 2% 醋 酸 : 甲 醇 = 77:23
 流 速 : 0.8 ml/min
 檢 出 波 長 : 320nm



D-2500
 METHOD: MS-FH TAG: 39 CH: 1
 FILE: 9 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA
 NO. RT AREA CONC BC
 2 10.27 40207 100.000 88
 TOTAL 40207 100.000
 PEAK RET: 1500

圖 17 阿魏酸 (2) 之 HPLC 圖 (a)標準品 (b)當歸分離之檢品

分路管柱: Lichrospher RP-18, 4 x 125 mm
 移動相: 檸檬酸 (pH 5.4): 甲醇 = 88:12
 流速: 0.8 ml/min
 檢出波長: 320nm



D-2500 08/12/95 17:17
 METHOD: MS-FR TAG: 8 CH: 1
 FILE: 9 CALC-METHOD: AREA TABLE: 0 CONC: AREA
 NO. PT AREA CONC BC
 5 9.90 52001 100.000 BB
 TOTAL 52001 100.000
 PEAR RET: 21100

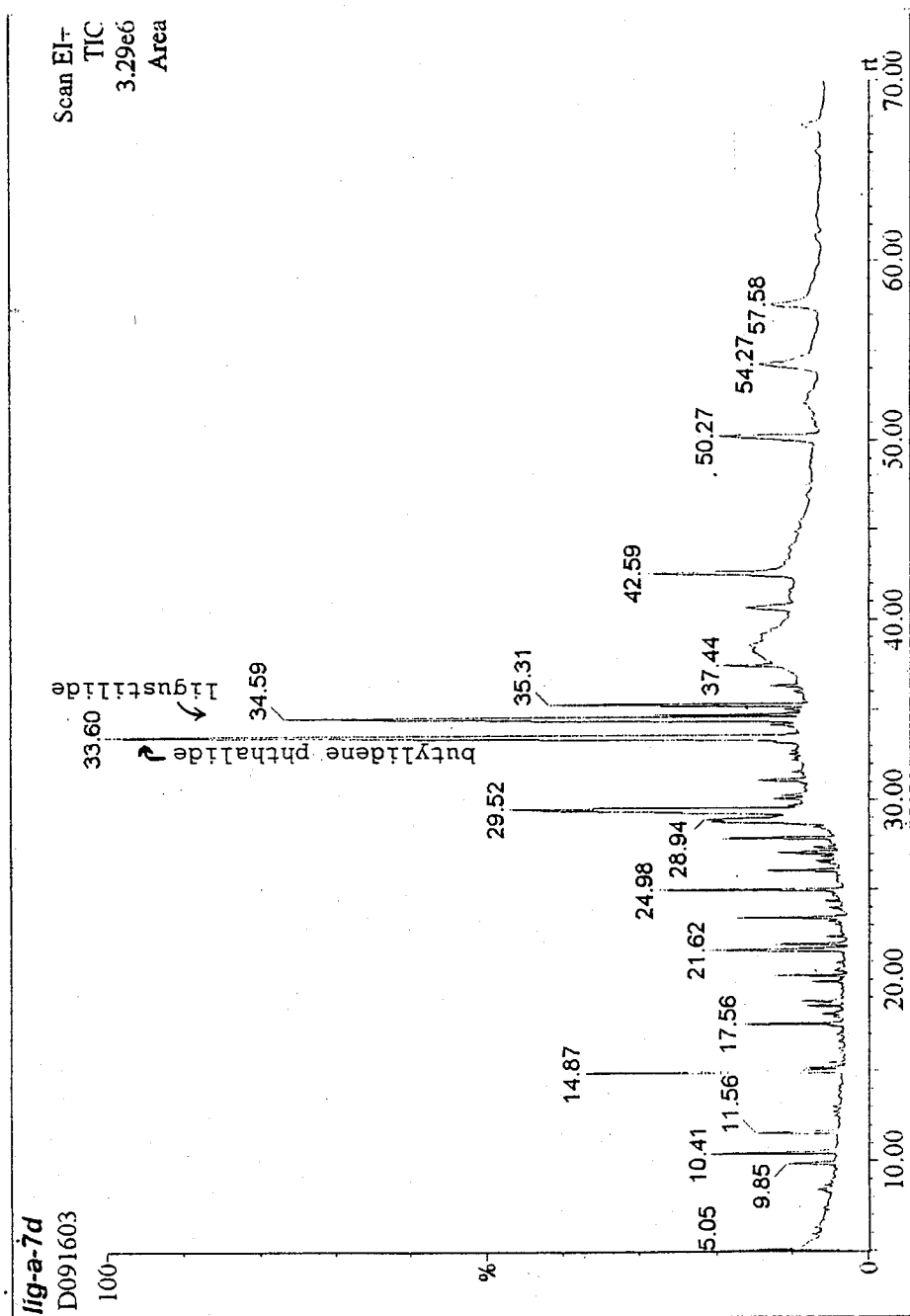


圖 19 薑本內酯分解產物之 GC 圖

中醫藥年報 第十四期第二冊

編者：行政院衛生署中醫藥委員會

發行人：蘇貫中

發行所：行政院衛生署中醫藥委員會

地址：台北市羅斯福路一段七號十樓

電話：(02)3967765

傳真：(02)3914900

印刷：匯鈞企業股份有限公司

地址：台北市信義路三段九九巷一號

電話：(02)755-2253

中華民國八十五年五月出版

統一編號

016204850085



健康是您的權利 保健是您的責任

ISBN 957-00-7318-7 (第二冊：平裝)