

計畫編號：CCMP96-RD-048

行政院衛生署中醫藥委員會 96 年度

研究計畫成果報告

中藥方劑奈米化技術開發及安全性研究

**Study on Development and Safety
Evaluation of Nanosizing Chinese Medicine
Prescription**

執行機構：中國醫藥大學藥學系

計畫主持人：張淑貞

研究人員：張淑貞、林文川、鍾景光、王國禎

執行期限：96年12月6日至97年12月31日

** 本研究報告僅供參考，不代表本會意見，依合約之規定：如對媒體發布研究成果應事先徵求本會同意

**

目 錄

	頁碼
目錄 -----	i
表目錄 -----	ii
圖目錄-----	v
中文摘要-----	1
英文摘要-----	2
壹、 前言-----	3
貳、 實施方法-----	6
參、 結果-----	17
肆、 討論-----	24
伍、 結論與建議-----	29
陸、 參考文獻-----	31
柒、 圖、表-----	35
捌、 附錄-諮詢會議紀錄-----	92

表目錄

		頁碼
表 1	小柴胡湯檢品之指標成分含量 -----	35
表 2	四逆散檢品之指標成分含量 -----	39
表 3	小柴胡湯血漿檢品 saikosaponin D 之 HPLC 定量分析-----	43
表 4	四逆散血漿檢品 saikosaponin D 之 HPLC 定量分析-----	44
表 5	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物急性毒性 試驗對小鼠體重變化的影響-----	45
表 6	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物 28 天餵食 對小鼠體重的影響-----	45
表 7	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物 28 天餵食 對小鼠血漿生化值的影響-----	46
表 8	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物 28 天餵食 對小鼠血漿生化值的影響-----	46
表 9	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物 28 天餵食 對小鼠肝臟及脾臟重量的影響-----	47
表 10	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物 28 天餵食 腎臟及睪丸重量的影響-----	48
表 11	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物 28 天餵食 對小鼠腎臟、脾臟及肝臟組織病理評估-----	49
表 12	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物小鼠週邊 血微核數目的影響-----	48
表 13	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl ₄ 誘發小鼠慢性肝損傷體重的影響-----	50
表 14	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl ₄ 誘發慢性肝損傷血漿 GPT 值的影響-----	50
表 15	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl ₄ 誘發小鼠慢性肝損傷肝臟及脾臟重量的影響-----	51
表 16	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl ₄ 誘 發小鼠慢性肝損傷肝臟蛋白質及 hydroxyproline 含量的影響--	51
表 17	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl ₄ 誘 發小鼠慢性肝損傷肝臟脂質過氧化及 glutathione 含量的影響--	52

表 18	小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl ₄ 誘發小鼠慢性肝炎肝臟組織的影響-----	52
表 19	四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水萃物急性毒性試驗對小鼠體重變化的影響-----	54
表 20	四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水萃物 28 天餵食對小鼠體重的影響-----	54
表 21	四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水萃物 28 天餵食對小鼠血漿生化值的影響-----	55
表 22	四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水萃物 28 天餵食對小鼠血漿生化值的影響-----	55
表 23	四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水萃物 28 天餵食對小鼠肝臟及脾臟重量的影響-----	56
表 24	四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水萃物 28 天餵食對小鼠腎及睪丸重量的影響-----	57
表 25	四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水萃物 28 天餵食對小鼠腎臟、脾臟及肝臟組織病理評估-----	58
表 26	四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水萃物及 cyclophosphamide 小鼠週邊血微核數目的影響-----	59
表 27	四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl ₄ 誘發小鼠慢性肝損傷體重的影響-----	60
表 28	四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl ₄ 誘發慢性肝損傷血漿 GPT 值的影響-----	61
表 29	四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl ₄ 誘發慢性肝損傷肝臟及脾臟重量的影響-----	62
表 30	四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl ₄ 誘發慢性肝損傷肝臟蛋白質及 hydroxyproline 含量的影響-----	63
表 31	四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl ₄ 誘發慢性肝損傷肝臟脂質過氧化程度及 glutathione 含量的影響-----	64
表 32	四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl ₄ 誘發慢性肝損傷肝臟纖維化的影響-----	65
表 33	小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對小鼠體重變化的影響-----	68

表 34	BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 NK cell activity (%)-----	70
表 35	BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 CD 3 之影響(%)-----	71
表 36	BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 CD 19 之影響 (%)-----	72
表 37	BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 CD 11 之影響(%)-----	73
表 38	BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 Mac-3 (%)-----	74
表 39	BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之周邊血巨噬細胞吞噬活性 (%)-----	75
表 40	四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散水草物對小鼠體重變 化的影響-----	76
表 41	BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 NK cell activity (%)-----	78
表 42	BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 CD 3 之影響(%)-----	79
表 43	BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 CD 19 之影響(%)-----	80
表 44	BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 CD 11 之影響(%)-----	81
表 45	BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 Mac-3 之影響(%)-----	82
表 46	BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之周邊血巨噬細胞吞噬活性 (%)-----	83
表 47	四逆散噴霧造粒及澱粉造粒對小鼠體重變化的影響-----	84
表 48	BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之 CD 3 之 影響(%)-----	86
表 49	BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之 CD 19 之 影響(%)-----	87
表 50	BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之 CD 11 之 影(%)-----	88
表 51	BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之 Mac-3 之 影響(%)-----	89
表 52	BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之周邊血巨 噬細胞吞噬活性(%)-----	90

圖目錄

	頁碼
圖 1 標準品 baicalin (BA) 之 HPLC 圖-----	35
圖 2 標準品 saikosaponin A (SA) 之 HPLC 圖-----	35
圖 3 小柴胡湯奈米粉分析 baicalin 之 HPLC 圖-----	36
圖 4 小柴胡湯奈米粉分析 saikosaponin A 之 HPLC 圖-----	36
圖 5 小柴胡湯粗粉分析 baicalin 之 HPLC 圖-----	36
圖 6 小柴胡湯粗粉分析 saikosaponin A 之 HPLC 圖-----	36
圖 7 標準品 baicalin 的檢量線-----	37
圖 8 標準品 saikosaponin A 的檢量線-----	37
圖 9 標準品 paeoniflorin (PA) 的檢量線-----	38
圖 10 標準品 glycyrrhizic acid 的檢量線-----	38
圖 11 標準品 paeoniflorin 之 HPLC 圖-----	39
圖 12 標準品 glycyrrhizic acid 之 HPLC 圖-----	39
圖 13 四逆散奈米粉分析 paeoniflorin 之 HPLC 圖-----	39
圖 14 四逆散粗粉分析 paeoniflorin 之 HPLC 圖-----	39
圖 15 四逆散顆粒劑分析 paeoniflorin 之 HPLC 圖-----	40
圖 16 四逆散濃縮粉末分析 paeoniflorin 之 HPLC 圖-----	40
圖 17 四逆散奈米粉分析 glycyrrhizic acid(GA)之 HPLC 圖-----	40
圖 18 四逆散粗粉分析 glycyrrhizic acid(GA)之 HPLC 圖-----	40
圖 19 四逆散顆粒劑分析 glycyrrhizic acid (GA)之 HPLC 圖-----	41
圖 20 四逆散濃縮粉末分析 glycyrrhizic acid (GA)之 HPLC 圖-----	41
圖 21 四逆散奈米粉分析 saikosaponin A (SA)之 HPLC 圖-----	41
圖 22 四逆散粗粉分析 saikosaponin A (SA)之 HPLC 圖-----	41
圖 23 四逆散顆粒劑分析 saikosaponin A (SA)之 HPLC 圖-----	42

圖 24	四逆散濃縮粉末分析 saikosaponin A (SA)之 HPLC 圖-----	42
圖 25	小柴胡湯血中濃度 saikosaponin D 經時變化-----	43
圖 26	四逆散中的 saikosaponin D 的血中濃度經時變化-----	44
圖 27	小柴胡湯水萃物對 CCl ₄ 誘發小鼠肝臟損傷的病理檢察-----	53
圖 28	四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl ₄ 誘發慢性 肝損傷肝臟損傷的影響 (HE 染色) -----	66
圖 29	四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl ₄ 誘發慢性 肝損傷肝臟纖維化的影響 (sirius red 染色) -----	67
圖 30	小柴胡湯各種製劑對小鼠體重之影響-----	69
圖 31	小柴胡湯奈米製劑、飲片與粗粉對小鼠自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性之影響-----	70
圖 32	小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血 T 細胞(CD3+)之影響-----	71
圖 33	小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血 T 細胞(CD 19+)之影響-----	72
圖 34	小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血單核球細胞(CD 11b+)族群之影響-----	73
圖 35	小柴胡湯奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠周邊血 Mac-3 之影響-----	74
圖 36	小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血巨噬細胞吞噬活性之影響-----	75
圖 37	四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散水萃物對小鼠體重變 化的影響-----	77
圖 38	四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠 自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性之影響-----	78
圖 39	四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠 周邊血 T 細胞(CD 3+) 之影響-----	79
圖 40	四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠 周邊血 T 細胞(CD 19+)之影響-----	80
圖 41	四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠 周邊血單核球細胞(CD 11b+)族群之影響-----	81

圖 42	四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠 周邊血 Mac-3 之影響-----	82
圖 43	四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠 周邊血巨噬細胞吞噬活性之影響-----	83
圖 44	四逆散噴霧造粒與澱粉造粒對小鼠體重變化的影響-----	85
圖 45	四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血 T 細 胞(CD3+)之影響-----	86
圖 46	四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血 T 細胞 (CD19+)之影響-----	87
圖 47	四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血 (CD11b+)族群之影響-----	88
圖 48	四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血之 Mac-3 之影響-----	89
圖 49	四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血巨噬細 胞吞噬活性 (%)-----	90
圖 50	小柴胡湯粒徑分佈圖-----	91
圖 51	四逆散粒徑分佈圖-----	91

中藥方劑奈米化技術開發及安全性研究

張淑貞¹、林文川¹、鍾景光¹、王國禎²

¹中國醫藥大學，²中興大學

摘要

研究目的

奈米技術已成為 21 世紀的關鍵技術之一，可應用於醫學、藥學、中草藥等醫療用途。有關微（奈）米中藥的粒徑大小，將直接影響物性、藥效、用藥安全及品質評估。爰此，衛生署中醫藥委員會為建立中草藥微奈米化之各項背景依據，以作為制定政策之參考，特於 96 年度「建構中藥用藥安全環境計畫」項下推行中藥與微（奈）米化技術之安全性研究。

研究方法

本整合型研究進行「中藥方劑奈米化技術開發及安全性研究」，分項計畫包括：奈米化中藥方劑之指標成分分析及藥物動力學研究(子計畫一)，奈米化中藥方劑之動物安全性及功能性研究(子計畫二)，奈米化中藥方劑之細胞毒性試驗及免疫調節功能研究(子計畫三)及奈米化中藥方劑之製程開發與粒徑分析研究(子計畫四)。

結果與討論

本研究完成小柴胡湯與四逆散微（奈）米化技術開發與安全性研究。小柴胡湯奈米粉平均粒徑為 145.4 ± 1.81 nm，四逆散奈米粉平均粒徑為 148.8 ± 1.88 nm。利用 HPLC 分析指標成分，結果顯示為小柴胡湯、四逆散之指標成分奈米粉均比粗粉含量高；動力學亦顯示奈米粉血中濃度含量比粗粉高且存留時間較長。小柴胡湯、四逆散之奈米粉、粗粉及水草物對於動物沒有急、慢性毒性，也無細胞毒性。

本計畫的結果可作為未來中草藥微奈米化製程開發之參考，並據以開發保肝中藥資源為目標。

關鍵詞：微奈米化中藥方劑，HPLC 分析，安全性評估，細胞毒性

Study on Development and Safety Evaluation of Nanosizing Chinese Medicine Prescription

**Shu-Jen Chang¹, Wen-Chuan Lin¹, Jing-Gung Chung¹ and
Gou-Jen Wang²,**

¹China Medical University, ²National Chung Hsing University,

ABSTRACT

Aim

Nanotechnology stands for an important position in the 21th century. It can be applied in medicine, pharmacy and Chinese herb medicine. However, the influence of nanoparticles in physical property, efficiency, safety, and quality control must be considered. In this integrated project, nanosizing process and safety evaluation was investigated. We compare the difference between traditional and nano-scaled Chinese herb medicine prescription.

Method

In this study, the particle size, HPLC analysis, safety evaluation and cytotoxicity of nano-scaled and traditional herb Xiao-Chai-Hu-Tang and Si-Ni-San were investigated. The raw materials are dried first following by grinding with nano grinding machine to produce nano-scaled herbal powders. The distributions of the diameters of the nano-size particles are examined by the nano characteristization equipments such as TEM and SEM.

Results & Discussion

Nano-scaled technology development and safety evaluation of Xiao-Chai-Hu-Tang and Si-Ni-San were finished in 2008. In the first project, to establish HPLC analysis method and pharmacokinetic study for nano-scaled Chinese prescription, and to integrate the results of four projects were considered.

Form the experimental results indicated that the average particle size of Xiao-Chai-Hu-Tang and Si-Ni-San are 145.4 ± 1.81 nm and 148.8 ± 1.88 nm respectively. Analysis of marker components showed that the content of nano-scaled materials are higher than coarse particles. Safety evaluation results indicate no acute and chronic toxic to animal test as well as cell test.

This project integrates the results for establishing methods for preparing nano-scaled Chinese medicine prescription, quality control, safety evaluation. All results will be provided to CCMP for future reference.

Keywords : Nano-scaled Chinese medicine prescription, HPLC analysis,
Safety evaluation, Cytotoxicity

壹、前言

中草藥是中華民族的智慧結晶，在中醫藥長期對抗疾病的過程中，已累積了相當豐富的經驗與知識。在近代尖端科學儀器之協助下，中草藥之成分與藥理活性機轉日趨清楚，行政院衛生署中醫藥委員會為建立高品質、可信且符合國際規範之中藥臨床試驗環境，自九十年起迄今輔導國內教學醫院成立 15 家中藥臨床試驗中心¹⁻⁵。為提升國人之用藥安全^{6,7}，最近並在中醫藥委員會之「建構中藥用藥安全環境五年計畫」推動與宣導下，自 94 年 3 月 1 日起，國內全面實施中藥 GMP（優良藥品製造作業規範）⁸，使中醫藥邁向品質保證的一大里程碑。

由於產官學界對近代科學研究的重視，使得中草藥在治病與保健發揮極大的效用，尤其對於慢性疾病，在長期服用西藥有副作用之疑慮下，由中醫師實施辨證論治服用中藥的確有明顯改善，已完成之研究報告顯示中草藥具有抗過敏性鼻炎⁹、抗發炎^{10,11}、抗病毒¹¹、免疫力增強^{11,12}、抗老化¹²、降血糖¹³、保肝^{14,15}、抗癌^{15,16}、抗愛滋病毒¹⁶與抗 SARS¹⁷⁻²¹效果。

肝病為特有的「國病」，目前在西藥中並無特效藥，且有副作用。雖然如此，中國古代醫書中卻記載著許多對肝臟有調理效能的中草藥。近年來有關中草藥保肝功效或抗肝纖維化或治療肝硬化之文獻報導日益增加，因而這幾年來本整合型研究均選擇具保肝作用之常用中藥或方劑為研究的標的，95 年度的三黃瀉心湯，96 年度的柴胡，及 96-97 年度的小柴胡湯、四逆散等為一系列相關研究，作為奈米化的研究標的。選擇保肝中藥做為研究主體的目的係因臨床上已發現這些中藥具有肝臟保護或治療肝病²²⁻³⁰作用，此與中國醫藥大學中醫系主任高尚德教授³¹以中醫觀點建議之保肝中藥或治療肝病常用的中醫方劑相符。

本研究運用最新科技，進行中草藥微奈米化的製程技術開發、指標成分之分析、動物安全性與功能性及肝細胞毒性評估。探討並比較其與傳統中藥方劑的差異，作為開發保肝中藥的新劑型，並據以充分應用中藥資源為目標。並且希望延續前面之研究，試圖由一系列保肝中藥或方劑之奈米化製程開發的研究累積成果，找出保肝藥物奈米化之變化趨勢。

新興奈米技術已成為先進國家決戰 21 世紀的重要技術，跨國企業與頂尖研究單位莫不投入大筆研發經費，企圖在奈米領域中佔領一席之

地。奈米技術由於其獨特的小尺寸效應及表面或界面效應，在生物合成及生物製程中可以表現出比傳統成分更加優異、嶄新的功效。若將奈米技術運用到中草藥的加工，預期可令藥效大幅度提高，並具有高吸收率、劑量低、降低副作用、毒性等特點。因而本研究的目的在於結合中醫藥與尖端的奈米技術，期望能突破傳統醫藥之瓶頸，發揮最佳療效、降低劑量及減少副作用。

有關微（奈）米中藥的粒徑大小，將直接影響物性、藥效、用藥安全及品質評估。爰此，衛生署中醫藥委員會為建立中草藥微奈米化之各項背景依據，以作為制定政策之參考，特於 96 年度「建構中藥用藥安全環境計畫」項下，徵求中藥品質管制類，研究重點 1-3：中藥與微（奈）米化技術之安全性研究，研究目的：應用最新科技如奈米技術對中藥藥理毒理之影響探討中藥及單方濃縮製劑奈（微）米化後對其物理性、有效性及毒性等影響之研究。

招標之研究內容為探討中藥及單方濃縮製劑奈（微）米化後對其物理性、有效性及毒性等影響之研究，以礦物類中藥材，如：珍珠..等為優先。

1.在微奈米化研究部分：

a.探討中藥微（奈）米化的方法、粒徑大小分佈、物理性變化、劑量與藥材療效間的關係。

b.利用微（奈）米儀器（如：TEM、SEM、AFM...等）進行精確的粒徑分析以及品質控制管理。

2.在安全性研究部分：

a.分析中藥之指標成分、活性成分分析以及 HPLC 等之物理化性分析。

b.針對微（奈）化的中藥進行吸收、細胞之毒性試驗（如 MTT test）以及藥效測試（如免疫力增強測試）...等。

本研究依據上述招標重點，進行「中藥方劑奈米化技術開發與安全性研究」之整合型計畫，分別由中藥化學分析、動物試驗、細胞培養、機械製程等不同專業領域之研究人員，組合成跨領域的研究團隊，同心協力共同執行本計畫，期望藉由各研究團隊之專業知識，分別由四項子計畫共同完成達成中藥製程開發技術之目標，建立中草藥奈米製程產品之評估與技術平臺。

進行步驟為將常用中藥方劑—小柴胡湯、四逆散經低溫乾燥後，以乾式研磨方式奈米化，比較奈米化前、後各項物化性及指標成分、動物

安全性、肝細胞毒性、免疫調節功能研究，以評估奈米化之可行性與實用性，並進一步探討微奈米化中藥之藥物動力學，作為未來臨床用藥之參考。

總計畫與各子計畫之規劃如下：

總計畫：中藥方劑奈米化技術開發及安全性研究，由中國醫藥大學藥學系張淑貞副教授執行，負責中藥材之文獻蒐集、採購與鑑定、研究規畫、進度追蹤、結果整合及子計畫間之聯繫、報告彙整等。

子計畫一：奈米化中藥方劑之指標成分分析及藥物動力學研究，並與第二、三、四子計畫建立三組間樣品之分析結果整合，此子計畫由中國醫藥大學藥學系張淑貞副教授執行。

子計畫二：奈米化中藥方劑之動物安全性及功能性研究，包括急性毒性試驗(LD₅₀)，肝、腎毒性試驗，骨髓細胞微核試驗、抗肝纖維化試驗等項目。此子計畫由中國醫藥大學醫學系林文川教授執行。

子計畫三：奈米化中藥方劑之細胞毒性試驗及免疫調節功能研究，包括肝細胞毒性測試，以比較傳統與奈米製程中藥方劑產品之活性及免疫調節功能研究。此子計畫由中國醫藥大學生物科技學系主任鍾景光教授執行。

子計畫四：奈米化中藥方劑之製程開發與粒徑分析研究，包括不同中藥方劑之奈米化製程開發、粒徑分析等，此子計畫由中興大學機械工程學系王國禎教授執行。

本研究將比較傳統與微（奈）米化兩者間之差異，選擇常用中藥方劑小柴胡湯、四逆散作為微奈米化的標的物，經過微奈米化後進行粒徑分析、指標成分分析、動物安全性與功能性(保肝作用)及細胞毒性試驗與免疫調節功能研究，並據以開發保肝中藥資源為目標。本計畫將整合四項子計畫之成果，建立中藥微（奈）化製程產品之參考資訊，建立中草藥微（奈）製程產品之評估與技術開發平臺，提供未來臨床用藥之參考資訊。

貳、實施方法

本研究使用的中藥方劑為小柴胡湯與四逆散，兩者組成依據漢·傷寒論。小柴胡湯組成為柴胡 8.0 g、半夏 5.0 g、黃芩、人參、炙甘草、生薑各 3.0 g、大棗 2.0 g。四逆散組成為柴胡 6.0 g、白芍 6.0 g、枳實 6.0 g、甘草 6.0 g。將採購的中藥材經建定後依上述比例組成方劑，經奈米化最適製程後分裝成每瓶 100 克，充填氮氣密封，於零下 80°C 冷凍櫃冷藏，供四個子計畫進行實驗。粗粉採用打粉機研製，另外由 GMP 中藥廠提供四逆散顆粒(添加澱粉)、四逆散濃縮粉末(噴霧乾燥)，作為參考對照，一起進行實驗。

一、子計畫一：奈米化中藥方劑之指標成分分析及藥物動力學研究

主持人：中國醫藥大學藥學系 張淑貞副教授

HPLC 儀器設備：

1.層析管(Column)	LiChrospher®100 RP-18 (5 µm) (Merck)
2.保護管柱(Pre-column)	LiChrospher®100 RP-18
3.幫浦(Pump)	Perkin Elmer series 200
4.偵測器(Detector)	Perkin Elmer 785A
5.積分軟體	Quick Chrom (訊華公司)
6.自動取樣儀(Autosampler)	Perkin Elmer USA
7.印表機(Printer)	HP Laser Jet 1022n

(一)中藥方劑之指標成分分析

1.樣品的處理：

(1)顆粒化製程：使用傳統研粉機粉碎中藥材所得的粒徑範圍，約 3 mm (參考中華中藥典³²附錄 p.14)。

(2)奈米化製程：將原藥材於低溫下研磨至粒徑 300 nm 以下。

2. HPLC 分析步驟

(1)配製標準品溶液

(A)Baicalin 標準溶液

精稱 baicalin 標準品 0.6 mg 置入 10 mL 容量瓶以甲醇定容至 10 mL，超音波震盪後，作為標準品儲備母液(600 µg/mL)。

(B) Saikosaponin A 標準溶液

精稱 saikosaponin A 標準品 0.2 mg 置入 5 mL 容量瓶以甲醇定容至 5 mL，超音波震盪後，作為標準品儲備母液 (200 µg/mL)

(C) Paeoniflorin 及 glycyrrhizic acid 標準溶液

精稱 paeoniflorin 及 glycyrrhizic acid 標準品各 0.4 mg 置入 10 mL 容量瓶以甲醇定容至 10 mL，超音波震盪後，作為標準品儲備母液 (400 µg/mL)。

(2) 檢品溶液配製

精稱奈米化及粗粉小柴胡湯方劑檢品各 1 克，置入 50 mL 三角瓶中，加入 20 mL 之 70% 乙醇溶液，以超音波震盪萃取 15 分鐘，過濾，殘渣再加入 20 mL 之乙醇溶液，重覆 2 次，將濾液合併，吸取上清液過濾至容量瓶，以 70% 乙醇定容至 50 mL，製成貯備檢品溶液，經 0.45 µm 濾膜過濾後作為定量之檢液，供 HPLC 分析。

精稱方劑四逆散奈米粉、粗粉檢品、四逆散顆粒、四逆散濃縮粉末各 1 克分別置於 50 mL 三角瓶中，加入 20 mL 之 70% 乙醇溶液，以超音波震盪萃取 15 分鐘，過濾後殘渣再加入 20 mL 之 70% 乙醇溶液，重覆 2 次，將濾液合併至容量瓶以 70% 乙醇定容至 50 mL；另將四逆散濃縮粉末溶液取 1 mL 定容至 2 mL，將四種檢品溶液以 0.45 µm 過濾膜過濾後，供 HPLC 分析。

(3) 檢量線製作

以微量吸管 (micropipet) 精確量取適量的 baicalin、saikosaponin A、芍藥苷 (paeoniflorin) 及甘草酸 (glycyrrhizic acid) 等標準品儲備母液，以甲醇稀釋之，baicalin 濃度為 600、300、150、75、37.5 µg/mL，saikosaponin A 濃度為 200、100、50、25、12.5 µg/mL，芍藥苷濃度為 400、200、100、50、25、12.5 µg/mL，與甘草酸濃度為 400、200、100、50、25 µg/mL，取 10 µL 溶液，以 HPLC 分析測定。由所得標準品之波峰面積和標準品濃度作線性迴歸以製作檢量線。

(4) HPLC 定量分析條件如下

a. 小柴胡湯方劑檢品 之 HPLC 定量分析

Baicalin

檢測波長： 276 nm

流 速： 1 mL/min
移 動 相： A：ACN；B：0.11% H₃PO₄ sol'n (pH=2.08)，
梯度沖提：0~25m in 乙腈-0.11% H₃PO₄ (29：
71)，25~ 40 m in 乙腈由29% 升為40%，40~
45 m in. 乙腈由40%升為55%。

分析時間： 43 min.

注 入 量： 10 μL

Saikosaponin A

檢測波長： 210 nm

流 速： 1 mL/min.

移 動 相： MeOH：Milli Q = 72：28

分析時間： 45 min.

注 入 量： 30 μL

b. 四逆散方劑檢品之 HPLC 定量分析

芍藥苷 (paeoniflorin)

檢測波長： 230 nm

流 速： 1 mL/min.

移 動 相： A：ACN；B：0.11% H₃PO₄ solution (pH=2.08)

分析時間： 45 min.

注 入 量： 10 μL

梯度分析之程式：

時間(min.)	CH ₃ CN (%)	0.11% PA (%)
0	18	82
20	18	82
20	36	64
5	50	50

甘草酸 (glycyrrhizic acid)

檢測波長： 250 nm

流 速： 1 mL/min.

移 動 相： A：ACN；B：0.11% H₃PO₄ sol'n (pH=2.08)

A : B = 36 : 64

分析時間： 60 min.

注 入 量： 10 μ L

Saikosaponin A

檢測波長： 210 nm

流 速： 1 mL/min.

移 動 相： MeOH : Milli Q = 72 : 28

分析時間： 30 min.

注 入 量： 30 μ L

3. HPLC 結果整理比較

奈米化前後小柴胡湯、四逆散之指標成分含量比較。

(二)中藥方劑之藥物動力學研究

1.動物

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠每組 8 隻，體重介於 450 ~ 550g，實驗前禁食 24 小時。

2.給藥及採血

依大白鼠體重，實驗設計採交叉試驗模式，將大白鼠分成二組，第一組給予奈米中藥小柴胡湯、第二組給予小柴胡湯粗粉，每公斤給予相當4克方劑粉末，即8 mL/kg 之溶液劑（0.5克/mL），經胃管灌食給藥，採血時間點為給藥前(blank)及給藥後5，15，30，60，120，180，240，300分鐘，眼窩採血，每次採血量為0.4 mL，將檢品離心(9860 g)15分鐘，取上層血清，並保存於 -80 $^{\circ}$ C，待HPLC分析，

3.血漿檢品前處理

精取血漿檢品 100 μ L 置入試管中，加入 200 μ L 之乙腈溶液，以震盪器震盪 20 秒，使蛋白質沉澱，再以 8000 rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液至另一試管中，以氮氣噴吹至乙腈完全逸離，以甲醇 100 μ L 溶解之，以 HPLC 分析。

4.檢量線之製作

精取 100 μ L 空白血漿加入 100 μ L 不同濃度之 saikosaponin D 標準溶

液，配製成濃度為 100.0、50.0、25.0、12.5、6.25、3.125、1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之標準血漿溶液，再加入 100 μL 之乙腈溶液，震盪 20 秒，使蛋白沉澱，以 8000 rpm 離心 5 分鐘，以氮氣吹至乙腈完全逸離後，加入甲醇 100 μL 溶解之，以 HPLC 分析之，由所得之 saikosaponin D 之波峰面積與濃度作線性迴歸以製作檢量線。

5. HPLC 分析條件

Saikosaponin D

檢測波長： 210 nm

流 速： 1 mL/min.

移 動 相： MeOH：Milli Q = 72：28

分析時間： 30 min.

注 入 量： 40 μL

6. HPLC 結果整理比較

小柴胡湯、四逆散之動力學指標成分含量比較。

二、子計畫二：奈米化中藥方劑之動物安全性及功能性研究

主持人：中國醫藥大學醫學系 林文川教授

本研究之目的為比較粗粉和奈米粉的中藥方劑試驗材料對小鼠的毒作用及抗肝纖維化作用。小柴胡湯與四逆散之實驗方式相同，以小柴胡湯為例說明如下：

(一) 實驗材料

1. 試驗物質

奈米化小柴胡湯及粗粉以 0.5% CMC 配製成適當濃度的懸浮液，投與體積為 0.2 mL/10 g 小鼠體重。奈米化小柴胡湯使用劑量為 6、3、1 及 0.33 g/kg。小柴胡湯粗粉過 100 目篩，殘留纖維佔 30%，因此相對於奈米化小柴胡湯的劑量為 4.2、2.1、0.7 及 0.23 g/kg。小柴胡湯水萃物的製備使用小柴胡湯飲片 100 公克加水 20 公升，煮沸 90 分鐘，重覆 3 次，共萃出 45.7 公克 (46%)。小柴胡湯水萃物相對於奈米化小柴胡湯的劑量是 2.8、1.4、0.45 及 0.15 g/kg。柴胡水萃物同樣懸浮於 0.5% CMC

配成適當濃度，投與體積為 0.2 mL/10 g 小鼠體重。

2. 動物

ICR 雄性小鼠五週齡，購自樂斯科生技公司。飼養室溫度控制在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，明、暗各十二小時，使用福壽牌老鼠塊狀飼料，給水經 RO 逆滲透處理。

(二) 實驗方法

1. 急性毒性試驗

使用體重 22-25 公克小鼠，試驗前禁食 6 小時，經口投與試驗物質，20 分鐘內投與兩次，投與體積為 0.2 mL/10 g。觀察中毒症狀，及 14 天內死亡情形。以 Litchfield 及 Wilcoxon³³ 二氏的方法計算出一半致死劑量(LD₅₀)及 95%可信賴限(confidence limits)。

2. 連續餵食 28 天肝、腎毒性試驗

ICR 小鼠 100 隻，分成十組。奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物三種材料，每種材料分成三個劑量組。奈米化小柴胡 3、1、0.3 g/kg，小柴胡湯粗粉使用劑量為 2.1、0.7 及 0.23 g/kg(去除 30%無法餵食之粗纖維)。柴胡水萃物的劑量為 1.4、0.45 及 0.15 g/kg(萃出物換算為方劑等量藥材量)。試驗物質經口投與，連續投與 28 天。投與終了，在乙醚麻醉下，由腹腔靜脈採血，供血漿生化學檢查。取出肝臟、腎臟、脾臟、睪丸稱重後，肝臟、腎臟、脾臟浸於 10%中性福馬林溶液。高劑量組及對照組的臟器固定後進行石臘包埋及切片製作，以蘇木青與伊紅染色法(HE; hematoxylin and eosin stain)染色，供病理檢查。發現有病裡變化的該組織，中劑量組及低劑量組的組織全部進行病理切片檢查。病理檢驗委託國立中興大學獸醫學院動物疾病診斷中心進行。

血漿生化學檢查使用生化自動分析儀(Roche Cobas plus)及市售試劑(Roche)。以測定項目為麩氨酸丙氨基轉氨酶(GPT)、麩氨酸草 乙酸轉氨酶(GOT)、白蛋白(albumin)、總蛋白(total protein)、血中尿素氮(BUN)、肌酸甘(creatinine)。

3. 週邊血細胞微核試驗

使用 ICR 雄性小鼠，體重 25 ~ 30 g。奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粉及小柴胡湯水萃物三種材料，每種材料分成兩個劑量組。奈米化小柴胡湯使用劑量為 6、3 g/kg，小柴胡湯粉使用劑量為 4.2、2.1 g/kg，小柴胡湯水萃物的劑量為 2.8、1.4 g/kg。陽性對照藥物使用 cyclophosphamide (100 mg/kg, i.p.)，對照組經口投與 0.5% CMC。給藥後 48 小時後，由眼

眶採血。使用 Prototype MicroFlow Mouse Micronucleus Analysis kit (FITC-anti CD71、propidium iodide)，以流式細胞儀(Becton Dickinson FASCScan)進行計數 1000 個多染性紅血球(polychromatic erythrocytes); 計算微核(micronuclei)發生的數目及多染性紅血球佔全部紅血球的比例^{34,35}。

4.保肝試驗-抗肝纖維化試驗

ICR 小鼠 80 隻分成八組。奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物三種材料，每種材料分成兩個劑量組。奈米化小柴胡湯用劑量為 0.33、1.0 g/kg，小柴胡湯粗粉使用劑量為 0.23、0.70 g/kg，小柴胡湯水萃物的劑量為 0.47、0.15 g/kg，另兩組為控制組及四氯化碳加 0.5% CMC 組。小鼠肝纖維化之誘導：ICR 小鼠每週兩次投與四氯化碳(10% 溶於橄欖油；0.1 mL/10 g)，為期 5 週。試驗物質每天投與為期 5 週。於四氯化碳投與後滿一、三週由眼窩採血供 GPT 測定。投與終了，小鼠在乙醚麻醉下，由腹腔靜脈採血，供血漿生化值測定。迅速取下肝臟及脾臟，以冰冷生理食鹽水洗淨、吸乾水分後稱重。肝臟分成四分，分別浸於 10% 中性福馬林功病理切片用，在 100°C 烘乾供臟纖維化程度測定，儲存於 -80°C 供脂質過氧化測定。

血液取得後，靜置待其凝固後，以 4700 rpm 離心 15 分鐘，取血漿供 GPT 檢驗，GPT 檢驗使用市售檢驗試劑(Roche)，以血清生化自動分析儀測定(COBAS MIRA)。

肝組織的脂質過氧化測定依據 Ohkawa et al.³⁶ 的方法，肝組織均質液和 thiobarbituric acid 溶液加熱反應，以 n-butanol、pyridine (15:1) 混合液萃取，在 532 nm 測吸光度。脂質過氧化的程度以 nmol malondialdehyde /mg protein 表示之。蛋白質測定依照 Lowry et al.³⁷ 的方法測定，以牛血漿蛋白為標準品。

肝臟組織膠原蛋白(hydroxyproline)含量測定參照 Neuman and Logan³⁸ 的方法。肝臟乾組織水解後加 H₂O₂ 氧化，再以 p-dimethylaminobenzaldehyde 呈色，於 540 nm 測吸光值。Hydroxyproline 量以 mg / g tissue 表示之。

肝臟組織經福馬林固定後，進行石臘包埋及切片製作，使用兩種染色法，一為一般的 HE 染色，另一種為膠原蛋白的特殊染色即 Sirius Red stain。使用影像分析系統 (Image-Pro Plus version 5.1; Media Cybernetics, MD, USA) 分析算出纖維化面積佔肝臟面積的百分率。

5.統計方法

本實驗所得之數據，以單尾變異數分析(one-way analysis of variance)，並進行 Dunnet 測試，以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

四逆散之實驗步驟與方法與小柴胡湯相同。

三、子計畫三：奈米化中藥方劑之細胞毒性與免疫調節功能研究

主持人：中國醫藥大學生物科技學系主任鍾景光教授

本研究之目的為比較奈米化和顆粒化的中藥試驗材料對肝細胞的毒性作用及免疫調節作用，實驗方法依照衛生署健康食品之免疫調節功能評估方法進行。

(一)實驗方法

1.動物實驗

實驗動物：建議選用小鼠，常用的 Balb/c 小鼠皆可，6-8 週大，雄鼠或雌鼠皆可，每組隻數為單一性別至少 10 隻。

(1) MTT test：

MTT的測定方法基本上是利用細胞本身的酵素對受質的作用，產生顏色的變化，再進一步測定其吸光值。如果細胞受到細胞裂殖素的刺激，增生越多，則活的細胞愈多，酵素的活性就會較高，可以測到較高的吸光值。利用此一原理，也可以來測定細胞的增殖反應。

(2)螢光流體計數儀來測定DNA的染色：

利用螢光染色的方法來分析細胞是否受到刺激，細胞核內的 DNA 是否有任何變化，可以利用 propidium iodide (PI) 及 bromodeoxyuridine (BrdU) 的方法來染色。PI 可以在染色後直接利用螢光流體計數儀加以分析，但是 BrdU 的方法則需要再加上一個抗 BrdU 的單株抗體加上螢光，才能利用螢光流體計數儀來加以分析。為了進一步分析是那些細胞的 DNA 有增加的變化，可以同時對這些細胞進行表面標記的分析。如利用抗 CD3 及抗 B220 抗體先行染色，再將細胞加以固定，然後進行 DNA 的染色。對細胞的表面標記及細胞內的 DNA 螢光使用不同波長的螢光，以便能夠在儀器上能對這兩群不同的細胞進行分析。如果能夠達到此一目的，便能夠不需要將細胞分離出就可以知道是那些細胞受到活化。

2.抗體分泌實驗

血液中免疫球蛋白濃度：目前測定血清內免疫球蛋白的濃度，最常利用到的方法為 Radio immunodiffusion (RID) 法，此種方法在使用上較為方便，只要將血清放入培養孔中，靜置 24 至 48 小時後，再測量其直徑大小，與標準值對照，便可以算出免疫球蛋白濃度。

3. 細胞激素分泌實驗

將分離出的淋巴球以 2×10^6 /mL 的濃度置於 24-well 的 plate 中，利用已經定量過的 Con A 或抗 CD3 抗體來刺激這些淋巴球。經過 24 到 48 小時的培養後，將上層液離心下來，以測定其淋巴介質製造的量。在取得足夠檢體以前，可將其它檢體先保存在 -70°C ，等到檢體足夠時再一起測試。淋巴介質的測定是利用 sandwich-ELISA 法。先利用一個抗淋巴介質的抗體先覆蓋在 ELISA plate 上，在 4°C 靜置一晚。在進行實驗前先以 1% PBS-BSA 處理後清洗之。再將要處理的檢體加到 plate 上，置於室溫 2 小時後加入 biotin 聯結的抗淋巴介質抗體。兩小時的室溫靜置後，加入 avidin 聯結過氧化酵素 (avidin-linked peroxidase)，再靜置二個小時後加入受質以呈色。上述的裂殖素的濃度及刺激時間在實驗進行之前都應先測定其最適當的濃度，並以已知濃度的淋巴介質作為對照。

4. 分離脾臟細胞及表面標記分析：

利用頸椎脫臼法分別犧牲老鼠，將脾臟取出並製備成單一細胞懸浮液，更進一步利用 Tris-Ammonium chloride 緩衝液將紅血球懸浮，而白血球則利用 Hank's 溶液清洗三次後再進行下一步的實驗。將單一白血球分離出後，利用 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 Phycoerythrin (PE) 染色的單株抗體來計算不同表面標記的比例及數目。這些細胞表面標記的測定將利用於 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) 分析法。

5. 自然殺手細胞活性：

為要測定實驗動物之自然殺手細胞的活性，可以先培養自然殺手細胞的標的細胞 (YAC-1 細胞株)。原則上也是將 YAC-1 細胞與 ^{51}Cr 先在一起培養約 4 小時，再將殘餘在試管中而未移除的 ^{51}Cr 除去。此時再加入不同數目的單核球 (monocyte) 與 ^{51}Cr 培養過的標的細胞一起培養，在培養一段時間後取出上清液，放入 γ -counter 內計算其放射強度。在實驗的過程中，利用 NP-40 或是 HCl 將細胞破壞，以取得 ^{51}Cr 的最高釋放值。

$$\text{計算公式} = \frac{\text{實驗值} - \text{背景值}}{\text{最高釋放值} - \text{背景值}} \times 100\%$$

6. 吞噬細胞活性：

吞噬細胞可以分別測定單核球(monocyte)或是中性白血球的吞噬能力，目前可以分別利用吞噬細菌如 E. coli、yeast 等方法來加以測定，也可以利用已標記好的 E. coli(如螢光)，在細胞吞噬後利用螢光流體計數儀來加以分析。

四、子計畫四：常用中藥微（奈）米化之製程開發與粒徑分析

主持人：中興大學王國禎教授

所謂「中草藥奈米化」，就是將基原藥用植物原物料經過特殊前段處理加工後，再以一貫化超微處理製程，將中藥材以奈米粉或超微粉(Super Micro Powder, 簡稱 SMP)呈現。不同質地之藥材研磨之製程也不相同。

研究方法及步驟如下：

(一) 奈米化研磨技術

在微奈米化過程，如果希望仍能保留成分，則必須採取(由大到小)的方式，將藥材經乾燥、切割、粉碎、研磨等流程處理，本計畫預計以乾式研磨方式進行。因設備較昂貴，規劃與廠商合作進行，以分子碰撞方式來粉碎，將各藥材進行乾式研磨至奈米級，再充氮氣密封，由 95 年的研究經驗發現，奈米化之產品保存於-80℃ 冷凍櫃即可效防止粒子團聚問題。

(二) 試驗步驟及觀察

初期先將藥材研磨至奈米級，記錄並觀察其穩定性及變化，確認有無物理性變化，必須針對每一個不同尺度的研磨產物作紀錄及觀察。初期之目的在於探討藥材在微奈米化過程中的穩定性控制條件及藥性保留條件。待確認穩定性變數後，分別研磨不同的藥材，交由其他子計畫進行指標成分分析、動物或細胞評估，以評估其安全性。

(三) 檢定分析及品質控制管理

針對微奈米化後的藥材進行平均粒徑分析，利用 SEM 及 TEM 等奈米級檢測儀器，除了可以做粒徑分析之外，亦可拍攝到奈米化後的

藥材形貌，有助於觀察研磨品質，進行研磨粒徑的品質控制管理。TEM 觀測步驟如下：取一定量的水，放些許分散劑（阿拉伯膠）充分攪拌，再放入欲觀測標的，配成濃度為 1/300、1/500 之溶液，再滴入鍍碳膜銅網試片上，將試片放置抽氣櫃中加熱板上，將其抽氣且烘乾。

本研究之小柴胡湯及四逆散奈米化檢品分別委託中興大學及清華大學測量粒徑，奈米化後立即於中興大學進行粒徑測量，及清華大學，送件申請後完成檢測。

參、結果

一、子計畫一：常用中藥微（奈）米化之指標成分分析研究

（一）高效液相層析法定量指標成分之結果

以 70%乙醇溶液萃取，小柴胡湯奈米粉之指標成分含量，每公克方劑之 baicalin 為 19.00 ± 0.08 mg 及 saikosaponin A 為 7.41 ± 0.14 mg，而小柴胡湯粗粉之指標成分含量，每公克方劑 baicalin 為 15.47 ± 0.25 mg 及 saikosaponin A 為 7.87 ± 0.07 mg，如表 1 所示，由 HPLC 圖譜，即圖 1-圖 2 為指標成分之 HPLC 圖，圖 3-圖 6 為樣品之 HPLC 分析圖，可知此分析方法於指標成分所在位置無溶媒之干擾，且 HPLC 定量小柴胡之指標成分標準品之波峰面積與各指標成分濃度經線性迴歸所得之檢量線（圖 7-圖 8）顯示，baicalin 於 $37.5 \sim 600$ $\mu\text{g/mL}$ 及 saikosaponin A 於 $12.5 \sim 200$ $\mu\text{g/mL}$ 濃度間均有良好線性關係（ r^2 值分別為 0.9999 及 0.9992）。

四逆散之三種指標成分定量結果為每公克奈米方劑含量：paeoniflorin 為 2.20 ± 0.01 mg，glycyrrhizic acid 為 9.68 ± 0.12 mg，saikosaponin A 為 22.46 ± 0.13 mg。粗粉之含量，每公克方劑分別為 paeoniflorin 為 1.00 ± 0.08 mg，glycyrrhizic acid 為 3.58 ± 0.04 mg，saikosaponin A 為 10.76 ± 0.21 mg。傳統四逆散顆粒（添加澱粉）每公克方劑含量：paeoniflorin 為 0.73 ± 0.01 mg，glycyrrhizic acid 為 1.43 ± 0.01 mg，saikosaponin A 為 2.74 ± 0.09 mg，經水萃取噴霧乾燥之四逆散濃縮粉末每公克方劑含量：paeoniflorin 為 0.36 ± 0.003 mg，glycyrrhizic acid 0.71 ± 0.01 mg，saikosaponin A 2.88 ± 0.12 mg，結果如表 2 及圖 9-圖 24 所示。Paeoniflorin 於 $25 \sim 400$ $\mu\text{g/mL}$ 濃度間具有良好線性關係， $r^2=0.9998$ 。Glycyrrhizic acid 於 $12.5 \sim 400$ $\mu\text{g/mL}$ 濃度間具有良好線性關係， $r^2=0.9999$ 。

（二）動力學研究—血漿檢品 HPLC 定量分析

奈米化的中藥在給藥後，由 5 分鐘至 300 分鐘定時採血，前處理之血漿經 HPLC 分析，監測指標成分之變化，發現奈米粉在血中存留時間較久且濃度也較高，saikosaponin D 在 120 分鐘時為血中濃度最高，小柴胡湯奈米粉為 8.17 $\mu\text{g/mL}$ ，四逆散奈米粉為 7.41 $\mu\text{g/mL}$ ，直到 300 分鐘仍然可以測得。小柴胡粗粉只維持至 120 分，180 分鐘以後已測不到，四逆散粗粉之血中濃度自史至終均無法偵測到。結果如表 3、圖 25 及表 4、圖 26 所示。

二、子計畫二：常用中藥微（奈）米化之動物安全性與功能性研究

(一) 安全性試驗

1. 急性毒性試驗

ICR 小鼠單一劑量投予奈米化小柴胡湯 (3、6 g/kg)、小柴胡湯粗粉 (2.1、4.2 g/kg)、或小柴胡湯水萃物(1.4、2.7 g/kg)，沒有死亡發生，14 天內體重也沒有明顯變化 (表 5)。

2. 連續餵食 28 天肝、腎毒性試驗

(1) 體重變化

小鼠投與高劑量奈米化小柴胡湯(3 g/kg)，第三週及第四週體重明顯下降，下降比率分別為正常組的 10.7% 及 11.6% (表 6)。同樣的，小鼠投與高劑量奈米化小柴胡湯(1 g/kg)，使第四週體重明顯下降，下降比率為正常組的 9.7% (表 6)。小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對小鼠體重沒有影響。

(2) 血漿生化值

小柴胡湯粗粉 (0.23 g/kg) 小柴胡湯水萃物 (0.47 g/kg) 使血漿 GPT 值下降，但不具用量關係(表 7)。三種劑型對血漿 GOT、albumin、globulin、total protein 值沒有影響。小柴胡湯粗粉和小柴胡湯水萃物使血漿 BUN 及 creatinine 值下降(表 8)，奈米化小柴胡湯(3 g/kg) 使血漿 BUN 值下降。

(3) 臟器重量變化

小鼠投與奈米化小柴胡湯 (1、3 g/kg)、小柴胡湯粗粉(2.1 g/kg) 及小柴胡湯水萃物(0.15、0.47、1.40g/kg)使肝臟絕對及相對重量明顯下降(表 9)，但對脾臟、睪丸的絕對及相對重量沒有影響(表 9 及表 10)。奈米化小柴胡湯(3 g/kg)使腎臟絕對重量下降，但對相對重量沒有影響(表 10)。

(4) 病理檢驗

肉眼病理判讀結果：肉眼病理檢查對照組、奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物之腎臟、肝臟、脾臟等均無因試驗物質引起毒性肉眼病理變化。

組織病理判讀結果：對照組、高劑量組的奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物之肝臟、腎臟及脾臟等均無因試驗物質引起毒

性組織病理病變(表 11)。對照組、高劑量組的奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物處理組部分小鼠肝臟出現瀰漫性、極微至中度、肝細胞肝醣浸潤。肝臟有肝醣堆積現象，為一生理性變化，推測小鼠犧牲前，未有足夠時間禁食有關，常見於一般小鼠，為一非特異性病變。

3.週邊血細胞微核試驗

cyclophosphamide 使多染性紅血球比例下降，微核明顯增加(表 12)，顯示 cyclophosphamide 具基因毒性。奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物對多染性紅血球與正紅血球比例及微核數目沒有影響(表 12)。

(二)保肝試驗

1.體重變化

四氯化碳 (CCl₄)誘導小鼠慢性肝損傷，第一至第五週小鼠體重有減輕的傾向(表 13)。小柴胡湯水草物(0.47 g/kg) 投與的小鼠體重在第三至第五週較 CCl₄ + CMC 組低。其餘的處理小鼠對體重沒有影響(表 13)。

2.血漿生化值

CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，第一、三及第五週血漿 GPT 值明顯高於控制組。在第一週，三種小柴胡湯劑型能抑制 CCl₄ 所提升的血漿 GPT 值(表 14)。在第三及第五週，僅奈米化小柴胡湯 (1.0g/kg) 能降低 CCl₄ 所提升血漿 GPT 值(表 14)。

3.肝臟及脾臟重量

CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，最終肝臟及脾臟重量明顯高於控制組。小柴胡湯水草物可以減輕肝臟絕對和相對重量，對脾臟相對重量沒有影響(表 15)。奈米化小柴胡湯及小柴胡湯粗粉對肝臟及脾臟重量沒有影響(表 15)。

4.肝臟蛋白質、hydroxyproline、脂質過氧化及 glutathione 含量

CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，最終肝臟蛋白質含量明顯低於控制組，小柴胡湯三種劑型對 CCl₄ 所減少的小鼠肝臟蛋白質含量沒有影響(表 16)。CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，最終肝臟產生明顯纖維化(hydroxyl-proline)。僅奈米化小柴胡湯 (1.0 g/kg) 及小柴胡湯水草物(0.47 g/kg)能降低 CCl₄ 所引起的小鼠肝臟 hydroxyproline 含量(表 16)。

CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，最終肝臟脂質過氧化(malondialdehyde)

明顯高於控制組。小柴胡湯三種劑型對 CCl₄ 所增加肝臟脂質過氧化程度沒有影響(表 17)。CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，對肝臟 glutathione 含量沒有影響，小柴胡湯三種劑型對肝臟 glutathione 含量也沒有影響(表 17)。

5. 病理檢查

HE 染色，CCl₄ 組呈現嚴重肝細胞壞死情形，奈米化小柴胡湯 (1.0 g/kg) 的肝細胞壞死情形較 CCl₄ 組輕(圖 27)，小柴胡湯水草物效果不明顯。Sirius Red 染色，CCl₄ 組呈現明顯肝纖維化產生，奈米化小柴胡湯 (1.0 g/kg) 及小柴胡湯水草物(0.47 g/kg) 組的肝臟纖維化較 CCl₄ 組輕(表 18、圖 27)。

四逆散之結果如下：

(一) 安全性試驗

1. 急性毒性試驗

ICR 小鼠單一劑量投予四逆散奈米粉 (3、6 g/kg)、四逆散粗粉(2.6、5.1 g/kg)、或四逆散水草物(0.8、1.6 g/kg)，沒有死亡發生，14 天內體重也沒有明顯變化 (表 19)。

2. 連續餵食 28 天肝、腎毒性試驗

(1) 體重變化

小鼠每天投與四逆散奈米粉 (0.33、1.00、3.00 g/kg)、四逆散粗粉(0.29、0.87、2.60 g/kg)、或四逆散水草物(0.08、0.26、0.78 g/kg)，連續 28 天，沒有死亡發生，28 天內小鼠體重也沒有明顯變化 (表 20)。

(2) 血漿生化值

四逆散三種劑型對小鼠血漿 GPT、GOT、total protein、albumin、globulin 及 creatinine 的活性或濃度沒有影響 (表 21 及表 22)。四逆散奈米粉 (1.00 g/kg)、四逆散粗粉(0.29、0.87、2.60 g/kg) 和四逆散水草物 (0.08、0.26 g/kg) 使血漿 BUN 濃度降(表 22)。

(3) 臟器重量變化

四逆散三種劑型對對肝臟、脾臟、腎臟、睪丸的絕對及相對重量沒有影響(表 23 及表 24)。

(4) 病理檢驗

病理委由中興大學獸醫學院廖俊旺副教授判讀。四逆散三種劑型高劑量之肝臟、腎臟及脾臟等均無因試驗物質引起毒性組織病理病變(表 25)。

3. 週邊血細胞微核試驗

cyclophosphamide 使多染性紅血球比例下降，微核明顯增加(表 26)，顯示 cyclophosphamide 具基因毒性。四逆散三種劑型對多染性紅血球與

正紅血球比例及微核數目沒有影響(表 26)。

(二)保肝試驗

1.體重變化

四氯化碳 (CCl₄)誘導小鼠慢性肝損傷，CCl₄投與滿三週起小鼠體重較控制組輕(表 27)。四逆散三種劑型的處理對小鼠體重沒有影響(表 27)。

2.血漿生化值

CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，第一、三及第五週血漿 GPT 值明顯高於控制組。四逆散奈米粉(1.5 g/kg)、四逆散粉末(0.9 g/kg) 及四逆散顆粒劑(1.35 g/kg)能降低 CCl₄所提升的第五週血漿 GPT 值，但對第一、三週血漿 GPT 值沒有影響(表 28)。

3.肝臟及脾臟重量

CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，最終肝臟、及脾臟重量明顯高於控制組，三種劑型的四逆散對 CCl₄所誘導的肝、脾腫大沒有影響(表 29)。

4.肝臟蛋白質、hydroxyproline、脂質過氧化及 glutathione 含量

CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，最終肝臟蛋白質含量明顯低於控制組，三種劑型的四逆散對 CCl₄所減少的小鼠肝臟蛋白質含量沒有影響(表 30)。CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，最終肝臟脂質過氧化(malondialdehyde)明顯高於控制組。三種劑型的四逆散對 CCl₄所提升的肝臟脂質過氧化程度沒有影響(表 31)。CCl₄ 誘導小鼠慢性肝損傷，對肝臟 glutathione 含量沒有影響，三種劑型的四逆散高劑量能增加肝臟 glutathione 含量 (表 31)。

5.病理檢察

HE 染色，CCl₄ 組呈現嚴重肝細胞壞死情形，三種劑型的四逆散高劑量的肝細胞壞死情形較 CCl₄ 組輕(圖 28)，中、低劑量沒有明顯減輕作用。Sirius Red 染色，CCl₄ 組呈現明顯肝纖維化，三種劑型的四逆散高劑量對 CCl₄ 引起的肝臟纖維化有抑制的傾向，未有統計上的意義(表 32、圖 28、29)。

三、子計畫三：奈米化中藥方劑之細胞毒性與免疫調節功能研究

(一)小柴胡湯部分

1.小鼠餵食小柴胡湯奈米製劑組、粗粉組及飲片組體重，與控制組比較並無顯著變化，見表 33、圖 30。

2.小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性之影響，如表 34、圖 31 示，奈米製劑組、粗粉組及飲片組能增加自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性，其中以奈米製劑組最為顯著。

3.小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血 T 細胞(CD3+)之影響，如表 35、圖 32 所示。對 B 細胞 (CD19+) 族群之影響，如表 36、圖 33 所示。飲片組 0.1 g/kg 能影響周邊血 T 細胞 (CD3+) 族群，奈米製劑組及飲片組均有提升周邊血 B 細胞(CD19+) 族群。

4.小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對小鼠周邊血單核球細胞族群之影響，如表 37、圖 34 所示。奈米製劑組劑量為 0.1 g/kg 及粗粉組中劑量為 1 g/kg 有顯著地增加周邊血單核球細胞(CD11b+)族群。

5.小柴胡湯奈米製劑及低劑量之小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血 Mac-3 之影響不顯著，如劑量為 1 g/kg 的小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片組均能影響周邊血巨噬細胞 (Mac-3+) 族群表現上升，如表 38、圖 35 所示。

6.小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對小鼠周邊血巨噬細胞吞噬活性之影響，如表 39、圖 36 所示。飲片劑量為 1 g/kg 及粗粉劑量為 0.1 g/kg 有顯著地增加周邊血巨噬細胞吞噬活性。

(二)四逆散部分

(甲)四逆散原藥材部分

1.小鼠餵食四逆散奈米製劑組、粗粉組及飲片組，其體重並無顯著變化，如表 40、圖 37 所示。

2.四逆散奈米製劑組、粗粉組及飲片組均能增加自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性，其中以奈米製劑組劑量為 0.1 g/kg 及粗粉劑量為 1 g/kg 最為顯著，如表 41、圖 38 所示。

3.四逆散奈米製劑組、粗粉組及飲片組均不影響周邊血 T 細胞 (CD3+) 族群(如表 42、圖 39 所示)與周邊血 B 細胞 (CD19+) 族群(如表 43、圖 40 所示)

4.四逆散小柴胡湯奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對小鼠周邊血單核球細胞族群之影響，如表 44、圖 41 所示。奈米製劑組劑量為 0.1 g/kg 及粗粉組劑量為 1 g/kg 有顯著地增加周邊血單核球細胞(CD11b+)族群。

5. 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠周邊血 Mac-3 之影響不顯著，如表 45、圖 42 所示。

6.四逆散奈米組及飲片組，均有增加周邊血巨噬細胞吞噬的能力，其中以奈米製劑組餵食 0.33 g/kg 之組別最為顯著，如表 46、圖 43 所示。

7.綜合以上結果，我們推論四逆散奈米製劑對 BALB/c 小鼠是具有增加周邊血巨噬細胞吞噬能力與增加自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性的免疫調節作用。

(乙) GMP 廠四逆散商品部份

1.小鼠餵食四逆散濃縮粉末(噴霧造粒)與顆粒製劑(澱粉造粒)，其體重並無顯著變化，如表 47、圖 44 所示。

2.四逆散噴霧造粒與澱粉造粒均能引起周邊血 T 細胞 (CD3+) 族群增加，如表 48、圖 45 所示。四逆散噴霧造粒與澱粉造粒均能引起周邊血 B 細胞 (CD19+) 族群表現降低，如表 49、圖 46 所示。

3.四逆散噴霧造粒與澱粉造粒均不影響周邊血單核球細胞 (CD11b+) 族群，如表 50、圖 47 所示。

4.四逆散噴霧造粒 0.19 g/kg 與澱粉造粒均 0.106 g/kg 影響周邊血巨噬細胞 (Mac-3) 族群表現上升，如表 51、圖 48 所示。

5.四逆散噴霧造粒具有增加周邊血巨噬細胞吞噬的能力，其中以餵食 0.19 g/kg 與 0.57 g/kg 之四逆散噴霧造粒組最為顯著，如表 52、圖 49 所示。

6.綜合以上結果，我們推論噴霧造粒與澱粉造粒對 BALB/c 小鼠是具有增加周邊血 T 細胞 (CD3+) 族群的免疫調節作用。此外，噴霧造粒能使周邊血巨噬細胞 (Mac-3) 族群與巨噬細胞吞噬活性上升以增強免疫功能。

四、子計畫四：常用中藥微(奈)米化之製程開發與粒徑分析

本研究之奈米化製程之粒徑由清大自強基金會測定，小柴胡湯平均粒徑為 145.4 ± 1.81 nm；四逆散平均粒徑為 148.8 ± 1.88 nm。其粒徑分佈圖如圖 50-圖 51。

肆、討論

一、子計畫一：中藥方劑奈米化之指標成分分析與動力學研究

本實驗之目的在比較小柴胡湯及四逆散奈米粉與粗粉的指標成分含量，並與市售商品噴霧乾燥顆粒劑型及傳統濃縮中藥比較，小柴胡湯或四逆散之指標成分含量均以奈米粉為最高。

子計畫一之目的在比較粒徑大小對指標成分釋出率之影響，由表 1、表 2 的實驗數據顯示奈米化之指標成分較容易萃取出來，指標成分之含量較高，另由動力學之數據顯示，奈米粉之經時血中濃度較高且在體內滯留時間長，用藥劑量與頻率宜依比例降低。

二、子計畫二：中藥方劑奈米化米化之動物安全性與功能性研究

(一)小柴胡湯

1.安全性試驗

本實驗之目的在比較小柴胡湯奈米化、粗粉及水草物的毒性。粗粉投與劑量不計無法過 100 目篩的纖維，水草物的劑量以相對小柴胡湯飲片可萃出的量進行。

藥物一半致死劑量(LD₅₀)是指單一劑量投與試驗物質引起一半受試動物死亡的劑量。在本試驗由於受到餵管管徑所限，能投與的奈米化小柴胡湯最高濃度約為 150 mg/mL，單一劑量投與藥物劑量太低。因此方法加以修飾，小鼠在 20 分鐘內投與兩次，投與體積為 0.2 mL/10 g 體重，劑量可達 6 g/kg。小鼠投與奈米化小柴胡湯 3 或 6 g/kg、小柴胡湯粗粉 4.2 或 2.1 g/kg，或小柴胡湯水草物 2.7、1.4 g/kg 沒有死亡情形，兩週內的體重也無明顯變化。奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物的小鼠 LD₅₀ 分別大於 6、4.2、2.7 g/kg。

28 天連續投與毒性試驗，僅奈米化小柴胡湯使小鼠體重減輕，小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物對小鼠體重沒有影響。但小柴胡湯三種劑型皆使肝藏的絕對和相對重量減輕，推測使肝臟重量減輕是小柴胡湯實質作用，非來自體重的減輕。肝臟重量減輕以水草物最明顯，此與預期的奈米化會有較強的作用不合。顯示小柴胡湯奈米化過程中的化學變化與水草物煎煮 90 分鐘不同，因此最後投與的產物性質有很大的差異。

28 天連續投與毒性試驗，奈米化小柴胡湯對腎臟絕對重量減輕，但相對重量沒有減輕，腎臟絕對重量的減輕應與體重減輕有關。小柴胡湯三種劑型對小鼠的脾臟、睪丸絕對重量及相對重量沒有影響。臟器外觀及病理組織的檢察未發現有特殊病變產生，小柴胡湯三種劑型對肝藏、

脾臟、腎臟無毒性反應相關之病理變化。

血中尿素氮(BUN)是腎臟功能檢查的主要項目之一，腎炎會使血中BUN上升，血中BUN下降常見於妊娠婦女、低蛋白攝取物、及肝臟疾患³⁹。小柴胡湯三種劑型使血中BUN下降，與肝臟重量減輕類似，這之間是否有關連性有待進一步解明。

Creatinine由腎絲球過濾排出體外，血中creatinine之滯留是腎功能不佳所致。在尿毒症、急慢性腎機能不全與尿道阻塞病人血中creatinine量會增高³⁹。28天連續投與毒性試驗，小柴胡湯粗粉及水萃物雖使小鼠的血漿creatinine下降，但一般認為血中creatinine偏低無臨床特別意義³⁹。

當肝細胞受損傷時，肝細胞中的GPT酵素會釋放到血中，因此GPT是臨床上肝損傷檢驗的指標⁴⁰。小柴胡湯粗粉及水萃物使血漿中GPT值下降，顯示其有肝細胞保護作用，但因不具用量—反應關係，此肝細胞保護作用有待肝細胞的實驗來證實。

小鼠週邊血液微核試驗是測試試驗物質頭與後48小時後，觀察其是否具有破壞遺傳物質之現象。若試驗物質能破壞遺傳物質，則會造成染色體的損傷，可在週邊血的多染性紅血球觀察到微核，且會影響動物體內多染性紅血球生成的比率。微核的產生主要是在細胞有絲分裂後期染色體有規律進入子細胞形成細胞核時，仍留在細胞質中的染色體或染色體的無著絲片斷或環之現象。正對照藥物cyclophosphamide (100 mg/kg, i.p.)投與後48小時明顯出現多染性紅血球與正常紅血球比值下降，微核率增加，說明了其具有骨髓抑制作用及染色體損傷作用。奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物的處理對多染性紅血球與正常紅血球比值沒有差異，顯示不具髓抑制作用毒性。微核率與控制組間也沒有差異，亦即不具染色體損傷作用。

2.保肝試驗

肝臟受到傷害，肝細胞內的GPT會漏出，使血漿中的GPT活性上升，是最常用的肝臟損傷生化指標⁴⁰。在本試驗使用四氯化碳造成肝損傷，血漿中GPT的活性明顯上升。奈米化小柴胡湯、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物三種劑型能抑制第一週血漿GPT活性，但對第三、五週，僅奈米化小柴胡湯具抑制作用，即奈米化小柴胡湯有保肝臟保護作用。另兩種劑型效果不佳。

肝臟纖維化，使血流進入肝臟受到阻力，引起門脈高壓，連帶影響到脾臟的血流，會使脾臟腫大⁴¹。在本試驗四氯化碳誘發慢性肝炎，最後出現脾腫大的情形。小柴胡湯三種劑型皆無法減輕脾臟重量，顯示小柴胡湯三種劑型對門脈高壓的改善效果有限。

肝臟受到損傷時會有發炎的情形，會啟動再生的功能⁴²，因此肝臟重量增加⁴³。本實驗四氯化碳組最後出現肝腫大的情形，僅小柴胡湯水草物能減輕肝臟的絕對和相對重量。小柴胡湯水草物能使小鼠體重減輕，因此能使肝臟絕對重量下降，但對相對重量也有改善作用(此與安全性試驗結果相合)，可推測小柴胡湯水草物有實質減輕肝臟損傷的功能，雖然在血漿生化值表現不出來。奈米化小柴胡湯也有減輕肝臟重量的趨勢。

慢性肝炎會引起肝臟纖維化，即結締組織增生。結締組織主要由膠原蛋白構成，hydroxyproline 是膠原蛋白特有的成分，測定 hydroxyproline 的量可以反應膠原蛋白的量，可用來表示纖維化的程度⁴⁴。在本試驗四氯化碳誘發慢性肝炎，其肝臟 hydroxyproline 含量明顯增加，奈米化小柴胡湯及小柴胡湯水草物能使肝臟 hydroxyproline 含量減少，顯示其可以減輕肝臟纖維化的作用。此作用在組織病理檢驗得到進一步證實。

已知四氯化碳引起慢性肝炎造成肝臟纖維化，與自由基的傷害造成脂質過氧化有密切關係⁴⁵。在本試驗四氯化碳誘發慢性肝炎，肝臟組織的脂質過氧化程度明顯上升，肝臟損傷會降低肝臟蛋白質的合成，因此肝臟蛋白質含量下降。小柴胡湯三種劑型對脂質過氧化程度及蛋白質含量的影響雖沒有達到統計上的差異，但奈米化小柴胡湯及小柴胡湯水草物有改善的趨勢，是可部分減弱自由基的傷害。

Glutathione 參與很多肝臟細胞功能，諸如解毒、清除自由基及調節細胞週期⁴⁶⁻⁴⁸。在本試驗中，四氯化碳對肝臟的 Glutathione 含量沒有影響，小柴胡湯三種劑型的處理對肝臟 glutathione 含量也沒有影響。

奈米化小柴胡湯有明顯的肝臟保護作用，因此能降低四氯化碳引起的肝臟纖維化。小柴胡湯水草物沒有明顯的肝臟保護作用，但仍然可以減輕四氯化碳引起的肝臟纖維化，依據文獻⁴⁹，推測可能的作用機轉是經由活化膠原蛋白的分解。

(二)四逆散

1.安全性試驗

本實驗之目的在比較奈米化四逆散、四逆散粗粉、或四逆散水草物的毒性。粗粉投與劑量不計無法通過 100 目篩的纖維，水草物的劑量以相對四逆散飲片可萃出的量進行。

藥物一半致死劑量(LD₅₀)是指單一劑量投與試驗物質引起一半受試動物死亡的劑量。在本試驗由於受到餵管管徑所限，能投與的四逆散奈米粉最高濃度約為 150 mg/mL，單一劑量投與藥物劑量太低。因此方法加以修飾，小

鼠在 20 分鐘內投與兩次，投與體積為 0.2 mL/10 g 體重，劑量可達 6 g/kg。小鼠投與四逆散奈米粉 3 或 6 g/kg、四逆散粗粉 2.6 或 5.1 g/kg，或四逆散水草物 0.8、1.6 g/kg 沒有死亡情形，兩週內的體重也無明顯變化。四逆散奈米粉、四逆散粗粉、或四逆散水草物的小鼠 LD₅₀ 分別大於 6、5.1、1.6 g/kg。

28 天連續投與毒性試驗，四逆散三種劑型對小鼠體重、臟器(肝臟、脾臟、腎臟、睪丸)的絕對和相對重量皆沒有影響。病理檢驗也沒有顯著病變產生。血漿生化學測定方面，三種劑型對血漿 GOT、GPT、total protein、albumin、globulin 及 creatinine 的活性或濃度也沒有影響。

四逆散三種劑型使血中 BUN 下降，以粗粉較為顯著，奈米粉及水草物兩種劑型的作用不具用量—反應關係。由於三種劑型對肝功能都沒有影響，可能的因素來自攝食量，此推論有待進一步證實。

四逆散奈米粉、四逆散粗粉、或四逆散水草物的處理對多染性紅血球與正常紅血球比值沒有差異，顯示不具髓抑制作用毒性。微核率與控制組間也沒有差異，亦即不具染色體損傷作用。

2. 保肝試驗

本試驗所使用的部分材料與安全性評估不同，四逆散奈米粉、四逆散粉末及四逆散顆粒。四逆散粉末為萃取濃縮液直接噴霧造粒，四逆散顆粒為萃取濃縮液加賦型劑造粒而成。

三種劑型的四逆散高劑量能降低四氯化碳投與後第五週血漿中 GPT 的活性，顯示其能減輕四氯化碳對肝臟的傷害。組織病理檢驗(HE 染色)也顯示其損傷較輕。

三種劑型的四逆散對脾、肝腫大及肝臟 hydroxyproline 含量沒有改善作用。即三種劑型的四逆散對肝臟纖維化進展的延緩效果不佳，此在組織病理檢驗(Sirus Red 染色)得到進一步證實。

四氯化碳造成肝損傷會影響合成功能，使肝臟蛋白質含量下降。三種劑型的四逆散對四氯化碳誘發肝臟組織蛋白質含量減少及脂質過氧化程度上升沒有減輕作用。

在本試驗，四氯化碳的處理，肝臟 glutathione 含量有增加的傾向，但未達統計意義。三種劑型的四逆散高劑量不能減少肝臟 glutathione 含量，反而更提升肝臟 glutathione 含量。此作用意義有待進一步探討。初步推測，此作用應與四逆散三種劑型的高劑量減輕肝損傷有關。

三種劑型的四逆散高劑量是有減輕肝臟損傷的作用，但無法延緩肝臟纖維化的進展。在減輕肝臟損傷方面，四逆散粉末及顆粒兩種劑型的有效劑量相對於奈米化的劑型需要較高的劑量。

三、子計畫三：奈米化中藥方劑之細胞毒性與免疫調節功能研究

小柴胡湯與四逆散奈米製劑均不具細胞毒性，但各種劑型之免疫調節作用機轉並不相同，小柴胡湯奈米製劑具免疫調節作用，對 BALB/c 小鼠是具有增加自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性，與增加周邊血細胞 B 細胞族群及單核球細胞族群的免疫調節作用。

四、子計畫四：中藥方劑奈米化之製程開發與粒徑分析

本製程的粒徑分佈介於 100 nm-200 nm 間，小柴胡湯平均粒徑為 145.4 ± 1.81 nm；四逆散平均粒徑為 148.8 ± 1.88 nm。達成粒徑 300 nm 以下之預期目標。本研究之諮詢會議委員提供之意見為以奈米藥物在人體之應用之最佳粒徑範圍為 80-200 nm。奈米化小柴胡湯與四逆散之粒徑亦符合最佳粒徑範圍。

伍、結論與建議

結論：

一、子計畫一：常用中藥微（奈）米化之指標成分分析研究

奈米化製程可增進小柴胡湯、四逆散有效成分之釋出，進一步以分析血中濃度及存留時間均以奈米粉高於粗粉，可以作為未來訂定奈米中藥方劑劑量之參考。

二、子計畫二：常用中藥微（奈）米化之動物安全性與功能性研究

1. 安全性方面

小柴胡湯奈米粉、粗粉及水草物的小鼠 LD₅₀ 分別大於 6 g/kg、4.2 g/kg、2.7 g/kg。28 天連續投與毒性試驗，小柴胡湯奈米粉、粗粉及水草物對肝臟、脾臟、腎臟無實質病變產生。血漿生化學測定，小柴胡湯粗粉、水草物使血漿 BUN 及 creatinine 值下降，小柴胡湯奈米粉使血漿 BUN 下降，原因不明。小柴胡湯奈米粉、粗粉及水草物對小鼠週邊血微核反應沒有影響，不具基因毒理作用。

四逆散奈米粉、粗粉及水草物的小鼠 LD₅₀ 分別大於 6 g/kg、5.1 g/kg、1.6 g/kg。四逆散奈米粉、粗粉及水草物對肝臟、脾臟、腎臟無實質病變產生。但會使血漿 BUN 下降，四逆散奈米粉、粗粉及水草物對小鼠週邊血微核反應沒有影響，不具基因毒理作用。

2. 保肝效果

小柴胡湯奈米粉及水草物之肝纖維化較 CCl₄ 輕。高劑量之四逆散奈米粉、粗粉及水草物對 CCl₄ 引起之肝纖維化有抑制傾向。

三、子計畫三：奈米化中藥方劑之細胞毒性與免疫調節功能研究

小柴胡湯奈米製劑對 BALB/c 小鼠是具有增加自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性，與增加周邊血細胞 B 細胞族群及單核球細胞族群的免疫調節作用。四逆散奈米製劑組、粗粉組及飲片組均能增加自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性，奈米製劑組低劑量(0.1 g/kg)即有效，而粗粉則需高劑量(1 g/kg)才有顯著效果

四、子計畫四：中藥方劑奈米化之製程開發與粒徑分析

奈米化小柴胡湯與四逆散的製程開發已經成功開發完成，平均粒徑分佈在 150 nm 左右，並無嚴重凝聚現象。

建議：

1.整合四項子計畫的結果，奈米化小柴胡湯與四逆散的製程已可以成功開發，也可增進小柴胡湯與四逆散有效成分之釋出，沒有明顯的動物之急、慢性毒性或染色體損傷作用，也不具細胞毒性。動力學初步數據顯示具值得進一步再以動力學探討生體可用率印證，但由實驗結果顯示不同機轉之免疫調節作用。

2.中藥奈米製劑之規範尚未制訂，宜參考各國現況召開產官學會議取地共識，以因應未來發展成新劑型，讓產業界有所遵循。

3.研究限制：

本研究之免疫調節部份，雖然多數呈現奈米製劑有較顯著的效果，但仍有少數為粗粉或飲片較佳，由於組裝之測試試劑(Kit)昂貴，無法反覆印證，老鼠之動力學與人體試驗仍有差異，未來在奈米中藥之規範制定後仍需進行人體的動力學試驗，較能掌握正確之動力學數據。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會（計畫編號：CCMP96-RD-048）提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

- 1.林宜信，張永賢，台灣中草藥臨床試驗環境與試驗法規(二版一刷)，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北，2004。
- 2.行政院衛生署中醫藥委員會學術暨臨床應用研討會成果會彙編(2002-2003)，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北，2004。
- 3.林宜信，行政院衛生署中醫藥委員會學術暨臨床應用研討會成果彙編(第五冊)，衛生署中醫藥委員會，臺北，2005。
- 4.林宜信，謝伯舟，中藥用藥安全現況與展望—從農藥、重金屬等污穢物談起，中藥用藥安靜之建構研討會，行政院衛生署中醫藥委員會，p. 1-22，臺中，2008。
- 5.林宜信，謝伯舟，中藥用藥安全環之建構與展望，中草藥發展與檢驗實務研討會，行政院衛生署中醫藥委員會，p. 70-104，臺中，2008。
- 6.林宜信，建構臺灣中藥用藥安全環境，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北，2004。
- 7.林宜信，中藥用藥安全與實務，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北，2005。
- 8.林宜信，中藥 GMP 飲片廠暨中藥商實務，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北，2004。
- 9.許昇峰，林育德，林宜信，何威德，過敏性鼻炎之歷代典籍研究，行政院衛生署中醫藥委員會，台北，2004。
- 10.楊寧蓀，中草藥之抗發炎與免疫增強活性的系統生物學研究中草藥之抗發炎與免疫增強活性的系統生物學研究，CCMP93-RD-002，CCMP94-RD-027，2004-2005。
- 11.李連滋，抗病毒及抗發炎中草藥研發及現代化技術平台之建立，四年計畫，經濟部技術處補助，執行期間 9401 - 9712。
- 12.吳瑞鈺，免疫調節與抗老化中草藥產品開發四年計畫，經濟部技術處補助，執行期間 9001 - 9312。
- 13.鄭瑞棠，中草藥可供糖尿病治療的有效成份之研究，行政院國家科學委員會，執行期間 8808 - 8907。
- 14.李連滋，肝病及氣喘中草藥新藥開發四年計畫，經濟部技術處補助，執行期間 9001 - 9312。
- 15.郭曜豪，台灣中草藥抗肝炎及抗癌成份之研究，行政院國家科學委會補助，執行期間 9008 - 9207。
- 16.張芳榮，抗癌與抗愛滋病毒中(草)藥之開發研究(III)-薊罌粟、夏枯

- 草、紫草，行政院國家科學委員會補助，執行期間 9008 – 9307。
- 17.張建國，治療嚴重型急性呼吸道症候群中草藥之開發(總計畫)，行政院國家科學委員會補助，2004。
 18. Zhang Ting, Chen Daofeng, Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS, *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 351-361, 2008.
 19. Laua Kit-Man, Leea Kin-Ming, Koona Chi-Man, et al., Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata*, *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 79–85, 2008.
 20. Wu Taixiang, Yang Xunzhe, Zeng Xiaoxi, Poole Phillipa, Traditional Chinese medicine in the treatment of acute respiratory tract infections *Respiratory Medicine*, 102(8), 1093-1098, 2008.
 21. Chen Chung-Jen, Michaelis Martin, Hsu Hseng-Kuang, Tsai Chin-Chuan, Yang Kunder D., Wu Yang-Chang, Jindrich Cinatl Jr., Wilhelm Hans Doerr, *Toona sinensis* Roem tender leaf extract inhibits SARS coronavirus replication, *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1), 108-11130, 2008.
 - 22.夏瑾瑜，李澤望，中草藥保肝作用機理的研究概況，中西醫結合肝病雜誌，第 4 卷，第 4 期，50-51，1994。
 - 23.程力敏，劉超英，趙雅茹，常用保肝中藥的研究進展，中醫藥信息，第 13 卷，第 2 期，15-16，1996。
 - 24.蒲昭和，保肝中藥 20 味，首都醫藥，第 11 卷，第 23 期，47-48，2004。
 - 25.楊錯，邢立國，劉玉蘭，柴胡對小鼠肝再生及膽汁分泌作用的研究，中醫藥學刊，第 23 卷，11 期，2066-2067，2005。
 26. Yoshikawa M, Murakami T, Hirano K, Inadzuki M, Ninomiya K and Matsuda H, Scorzonerosides A, B, and C, novel triterpene oligoglycosides with hepatoprotective effect from Chinese Bupleuri Radix, the roots of *Bupleurum scorzonerifolium* Willd., *Tetrahedron Letters*, 38(42), 7395-7398, 1997.
 27. Chiang LC, Ng LT, Liu LT, Shieh DE, Lin CC, Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from *Bupleurum* species. *Planta Medica*, 69(8), 705-709, 2003.
 28. Wang BJ, Liu CT, Tseng CY, Wu CP, Yu ZR, Hepatoprotective and antioxidant effects of *Bupleurum kanoi* (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO₂ on CCl₄ induced liver damage. *Food & Chemical Toxicology*, 42(4), 609-617, 2004.

- 29.高琳，謝鳴，柴胡-黃芩合煎與分煎液的保肝作用比較，中成藥，第26卷，第1期，942-943，2004。
- 30.Joanna Thompson Coon and Edzard Ernst, Complementary and alternative therapies in the treatment of chronic hepatitis C:a systematic review, *Journal of Hepatology*, 40(3), 491-500, 2004.
- 31.高尚德，中草藥之肝傷害-中醫觀點，參見
http://www.sim.org.tw/article/A92/%B1%D0%A8|_32.pdf
- 32.陳建仁主編，中華中藥典，行政院衛生署，臺北，2004。
- 33.Litchfield JT, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113, 1949.
- 34.Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245, 245-249. 1990.
- 35.吳禮字，吳岳文，施純青，柯裕仁，林文川，台灣金線連和闊葉大豆(金門產一條根)之初步基因毒性試驗，中醫藥雜誌，12，173-178，2001。
- 36.Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2), 351-358, 1979.
- 37.Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 262-275, 1951.
- 38.Neuman RE., Logan MA., The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* 184(1), 299-306, 1950.
- 39.吳龍源 臨床常見疾病檢驗手冊。台北市中醫師公會，1990。
- 40.Sturgill, M.G., Lambert, G.H., Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin. Chem.* 43, 1512-1526, 1997.
- 41.Gill, M.A. and Kircbain, W.R., Alcoholic liver disease. In: *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach*. Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yee, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G. and Poser, L.M. (Eds), Appleton & Lange, Stamford, third edition, pp. 785-800, 1997.
- 42.Yamada, Y. and Fausto N., Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am. J. Pathol.* 152, 1577-1589, 1998.
- 43.Tamayo, R.P., Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, 3, 112-120, 1983.

44. Hanauske-Abel, H.M., Not a slippery slope or sudden subversion: German medicine and National Socialism in 1933, *BMJ*, 313(7070), 1453-1463, 1996.
45. Camps, J., Bargallo, L., Gimenez A., Alie, S., Caballeria, J., Pares, A., Joven, J., Masana, L. and Rodes, J., Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats. *Clin. Sci.* 83, 657-700, 1992.
46. Deleve, L., Kaplowitz, N., Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmac. Ther.* 52, 287-305, 1991.
47. Huang, Z.Z., Li, H., Cai, J., Kuhlenkamp, J., Kaplowitz, N., Lu, S.C., Changes in glutathione homeostasis during liver regeneration in the rat. *Hepatology*, 27, 147-153, 1998.
48. Huang, Z.Z., Chen, C., Zeng, Z., Yang, H., Oh, J., Chen, L., Lu, S.C. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB*, 15, 19-21, 2001.
49. Sakaida I., Hironaka K., Kimura T., Terai S., Yamasaki T., Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increase expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) in rats stellate cell. *Life Sci.* 74, 2251-2263, 2004.

柒、圖表

表 1 小柴胡湯檢品之指標成分含量

樣品	指標成分含量(mg/g)	
	Baicalin	Saikosaponin A
小柴胡湯奈米粉	19.00 ± 0.08	7.41 ± 0.14
小柴胡湯粗粉	15.47 ± 0.25	7.87 ± 0.07

All values are means ± SD(n=3)

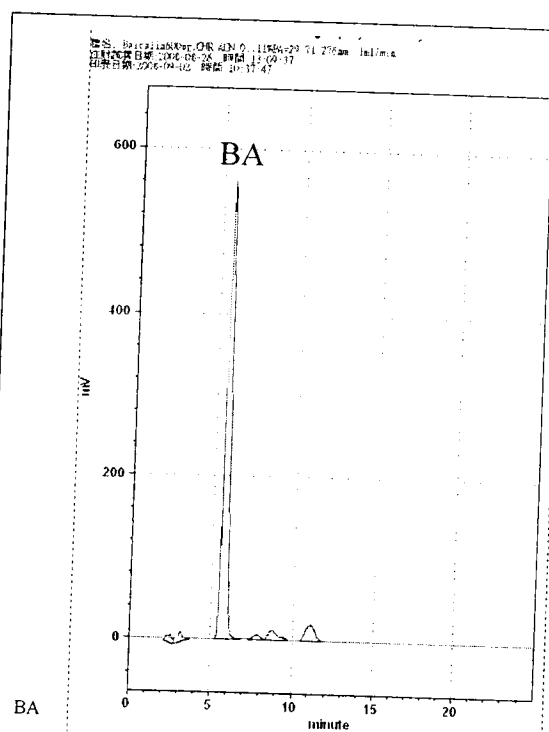


圖 1 標準品 baicalin (BA) 之 HPLC 圖

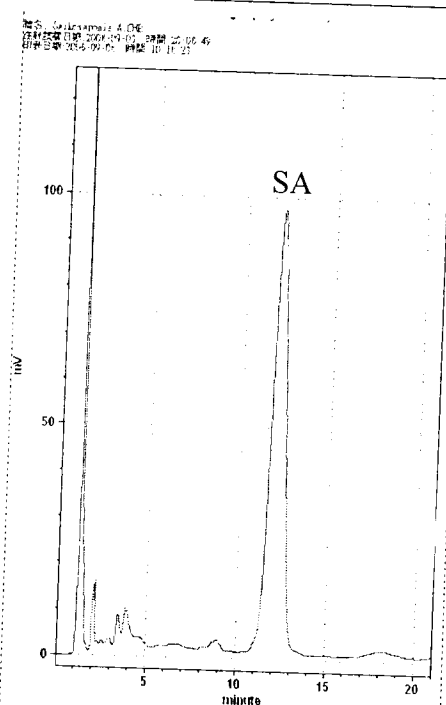


圖 2 標準品 saikosaponin A (SA) 之 HPLC 圖

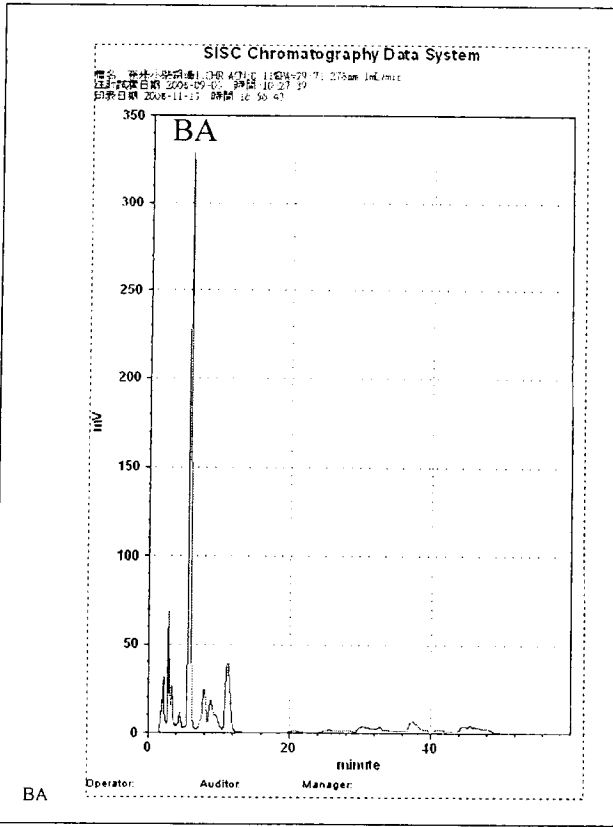


圖 3 小柴胡湯奈米粉分析 baicalin 之 HPLC 圖

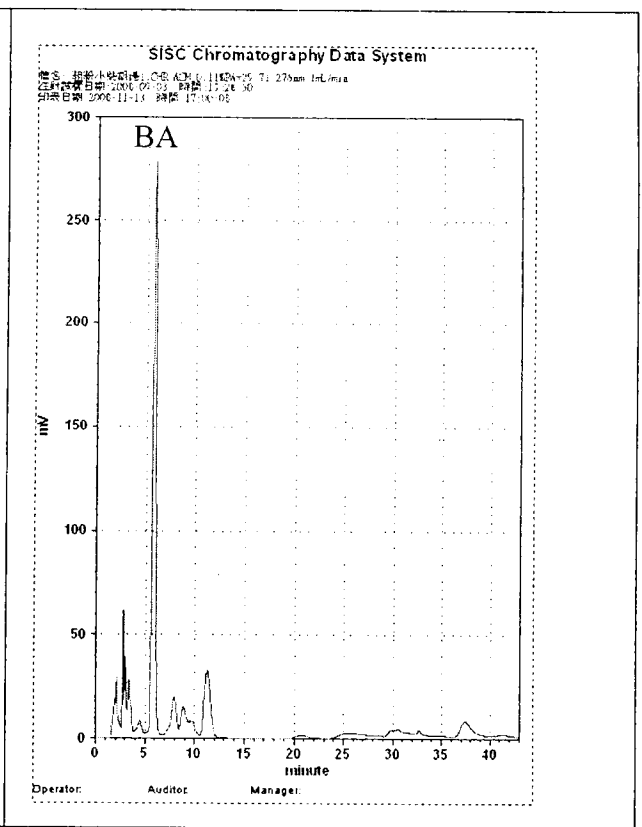


圖 4 小柴胡湯粗粉分析 baicalin 之 HPLC 圖

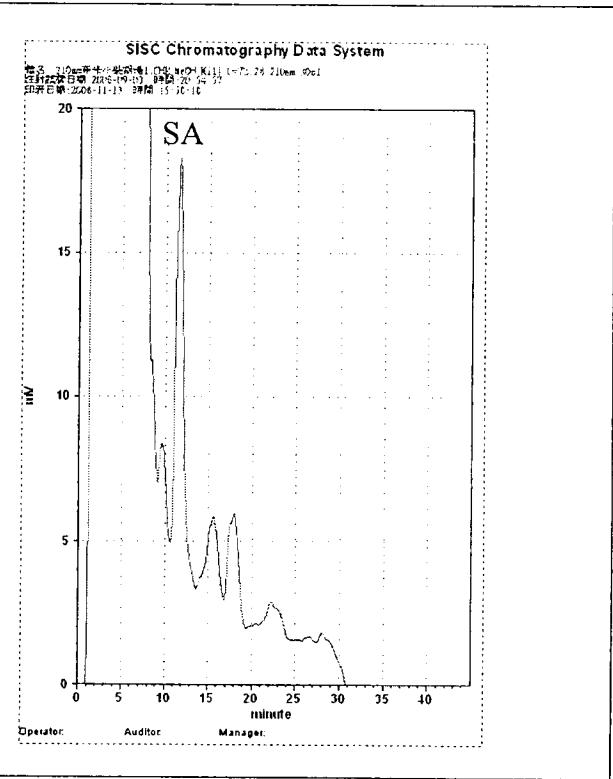


圖 5 小柴胡湯奈米粉分析 saikosaponin A 之 HPLC 圖

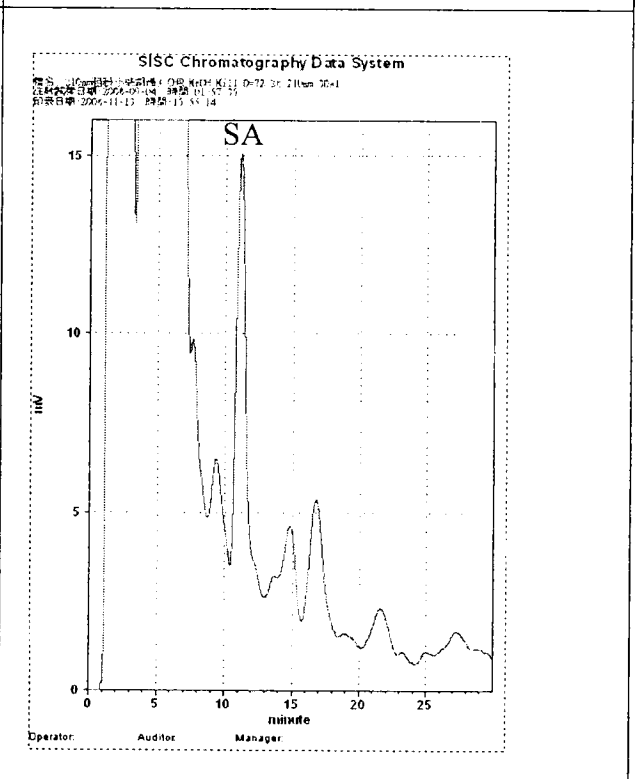


圖 6 小柴胡湯粗粉分析 saikosaponin A 之 HPLC 圖

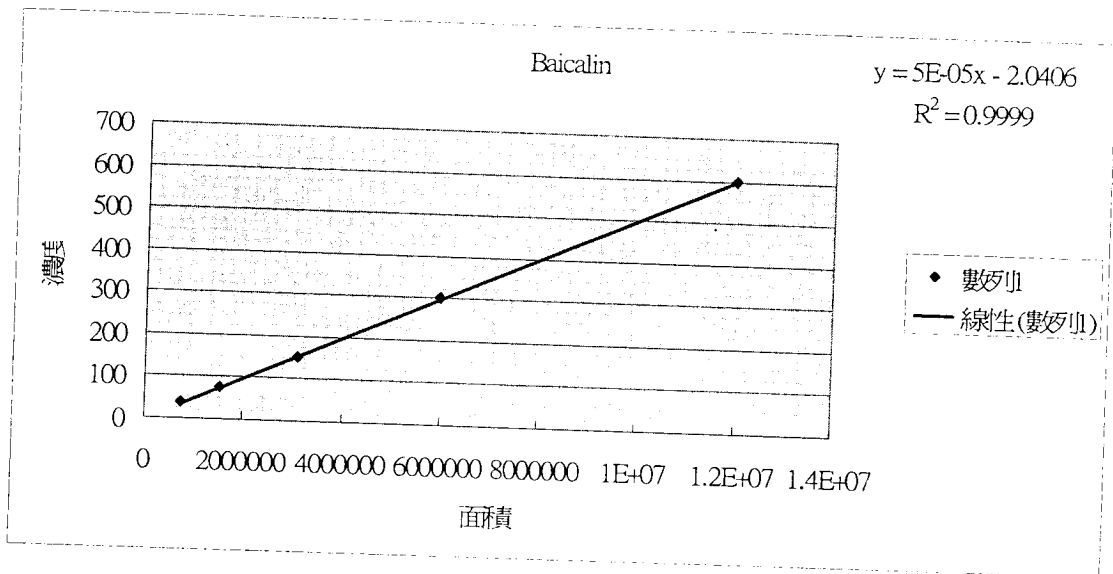


圖 7 標準品 baicalin 的檢量線

*Baicalin 於 37.5~600 $\mu\text{g/mL}$ 濃度間具有良好線性關係，($r^2 > 0.9999$)

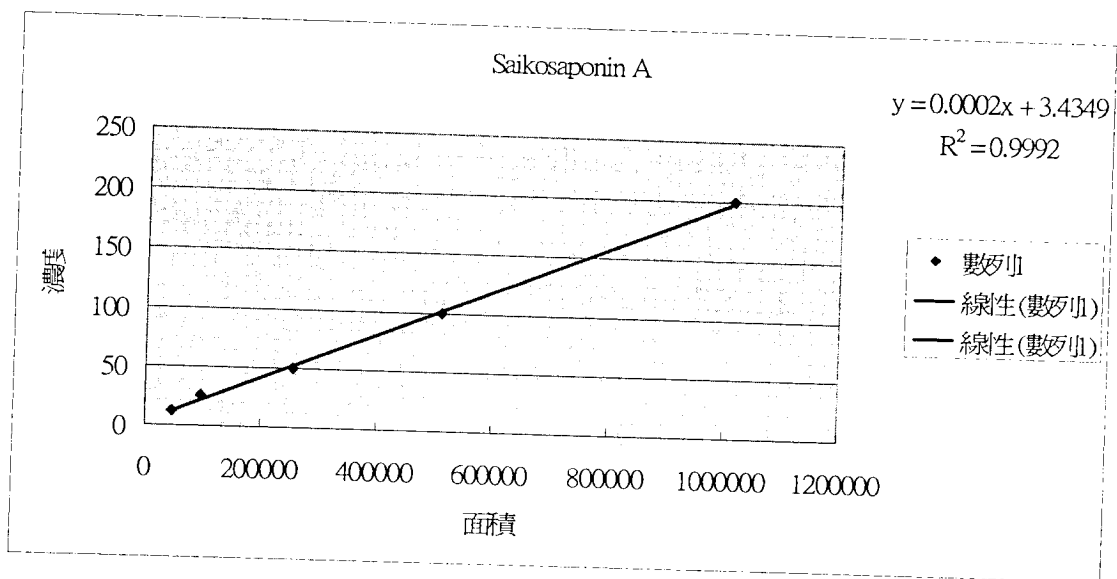


圖 8 標準品 saikosaponin A 的檢量線

*Saikosaponin A 於 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 濃度間具有良好線性關係，($r^2 > 0.9992$)

表 2 四逆散檢品之指標成分含量

樣品	指標成分含量(mg/g)		
	Paeoniflorin	Glycyrrhizic acid	Saikosaponin A
四逆散奈米粉	2.20 ± 0.01	9.68 ± 0.12	22.46 ± 0.13
四逆散粗粉	1.00 ± 0.08	3.58 ± 0.04	10.76 ± 0.21
四逆散顆粒*(STG)	0.73 ± 0.01	1.43 ± 0.01	2.74 ± 0.09
四逆散濃縮粉末**(STGS)	0.36 ± 0.003	0.71 ± 0.01	2.88 ± 0.12

*添加澱粉之傳統濃縮中藥顆粒劑；**噴霧乾燥之濃縮粉末

All values are means ± SD(n=3)

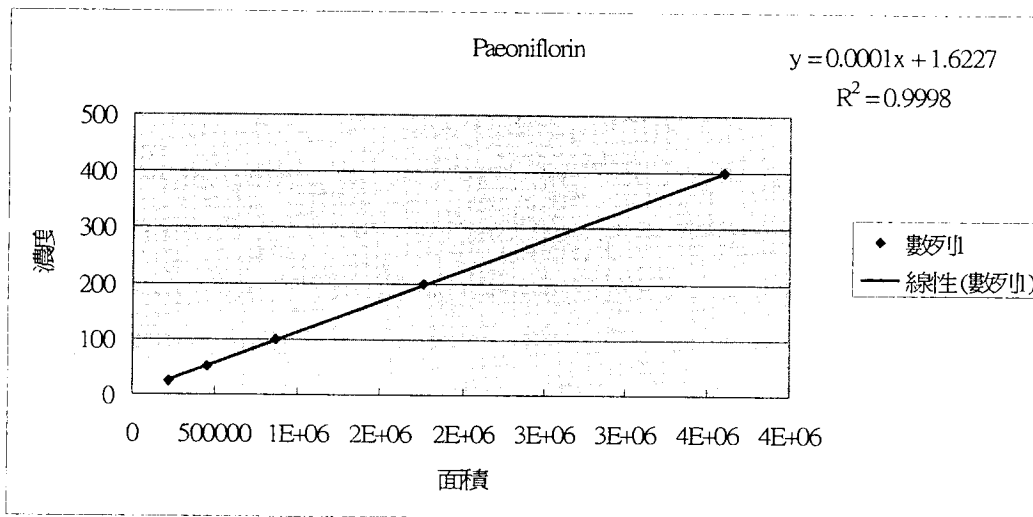


圖 9 標準品 paeoniflorin 的檢量線

*Paeoniflorin 於 25~ 400 μ g/mL 濃度間具有良好線性關係，($r^2 = 0.9998$)

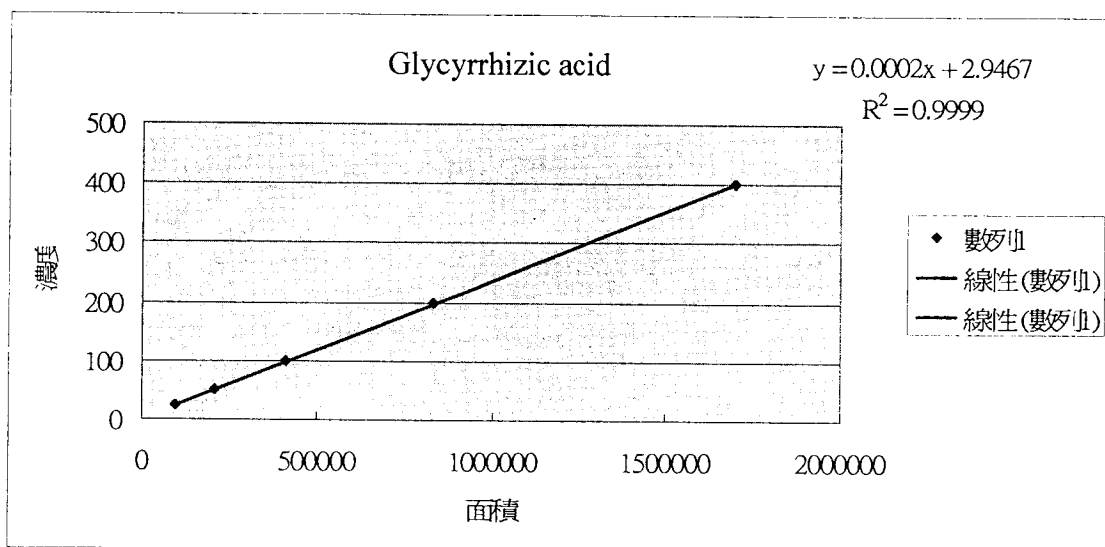


圖 10 標準品 glycyrrhizic acid 的檢量線

*Glycyrrhizic acid 於 12.5~ 400 μ g/mL 濃度間具有良好線性關係，($r^2 = 0.9999$)

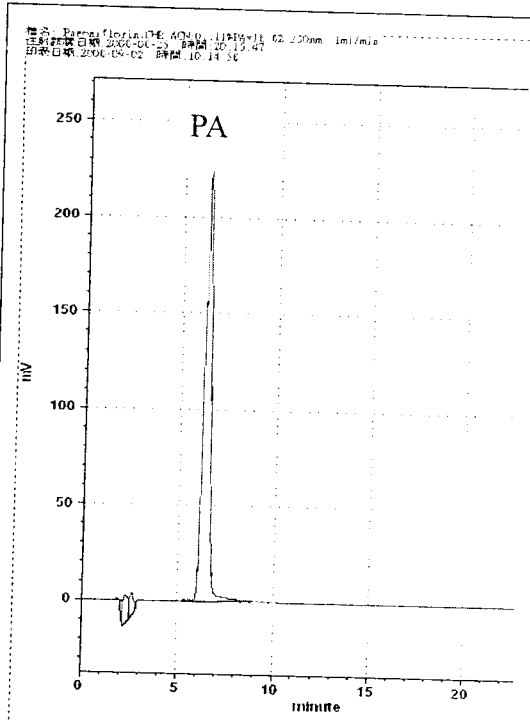


圖 11 標準品 paeoniflorin(PA)之 HPLC 圖

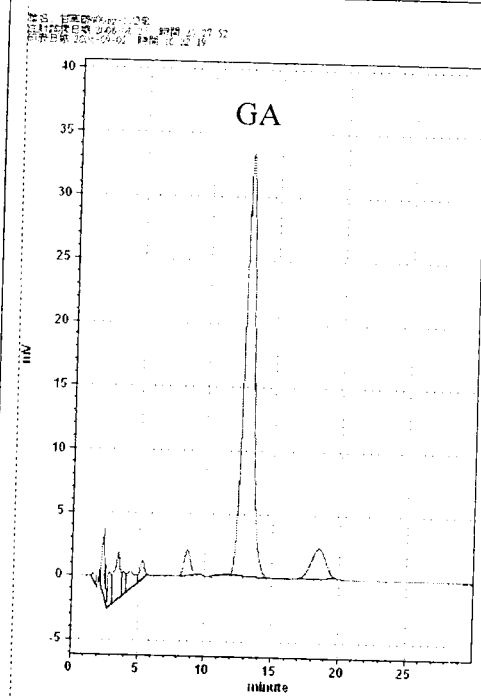


圖 12 標準品 glycyrrhizic acid(GA)之 HPLC 圖

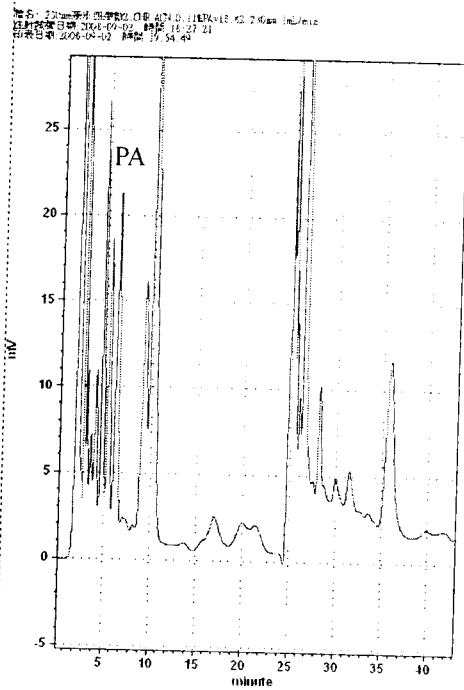


圖 13 四逆散奈米粉分析 paeoniflorin (PA)之 HPLC 圖

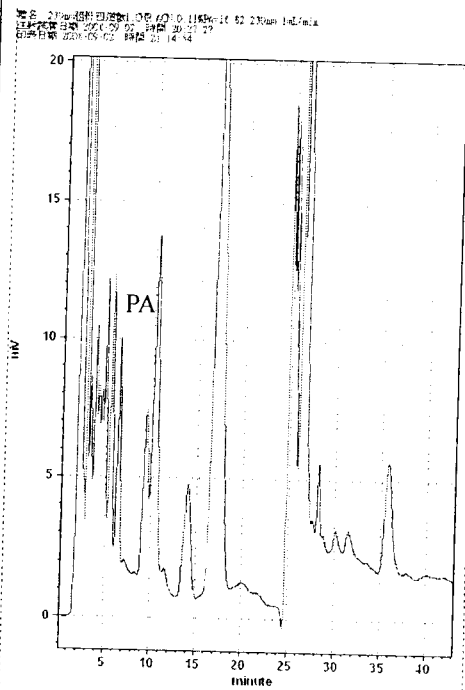


圖 14 四逆散粗粉分析 paeoniflorin(PA)之 HPLC 圖

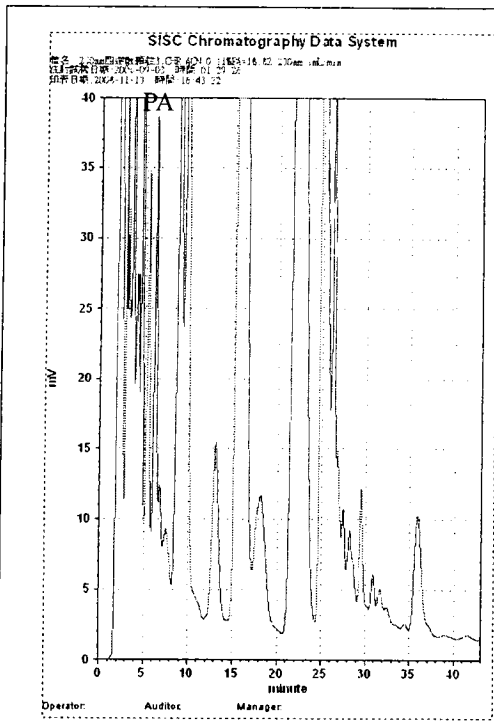


圖 15 四逆散顆粒劑分析 paeoniflorin (PA)之 HPLC 圖

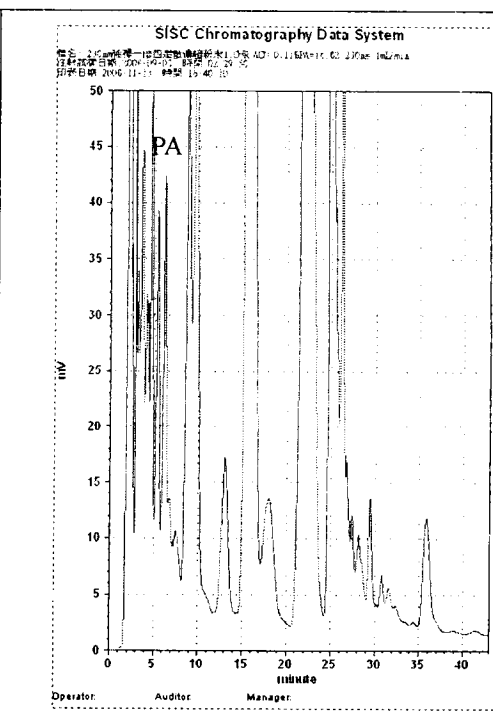


圖 16 四逆散濃縮粉末分析 paeoniflorin 之 (PA)HPLC 圖

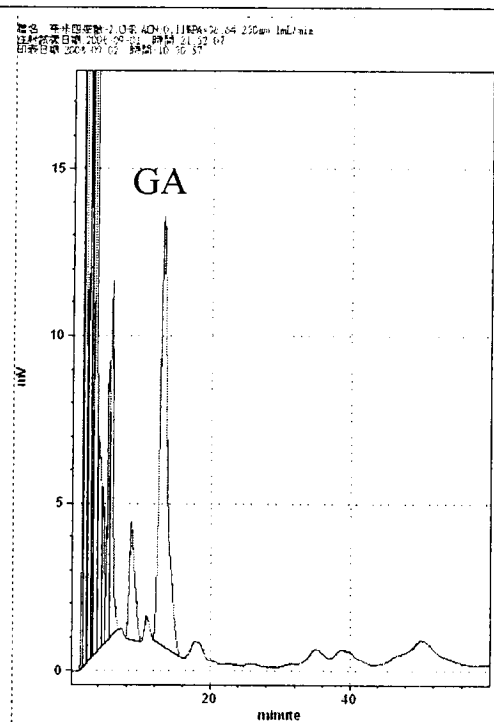


圖 17 四逆散奈米粉分析 glycyrrhizic acid(GA)之 HPLC 圖

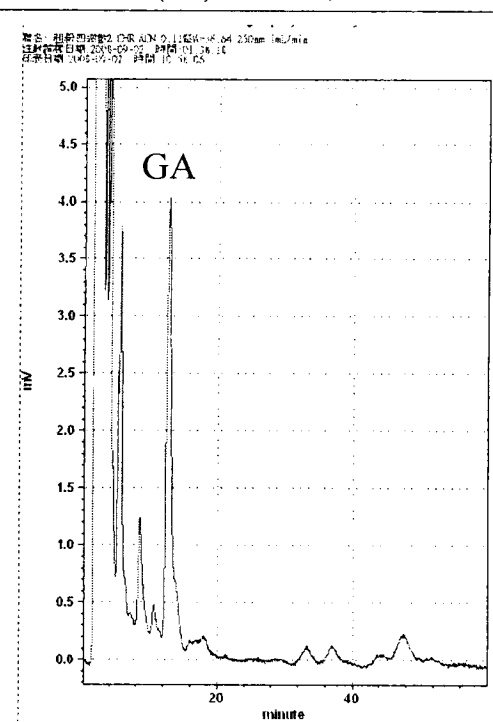


圖 18 四逆散粗粉分析 glycyrrhizic acid (GA)之 HPLC 圖

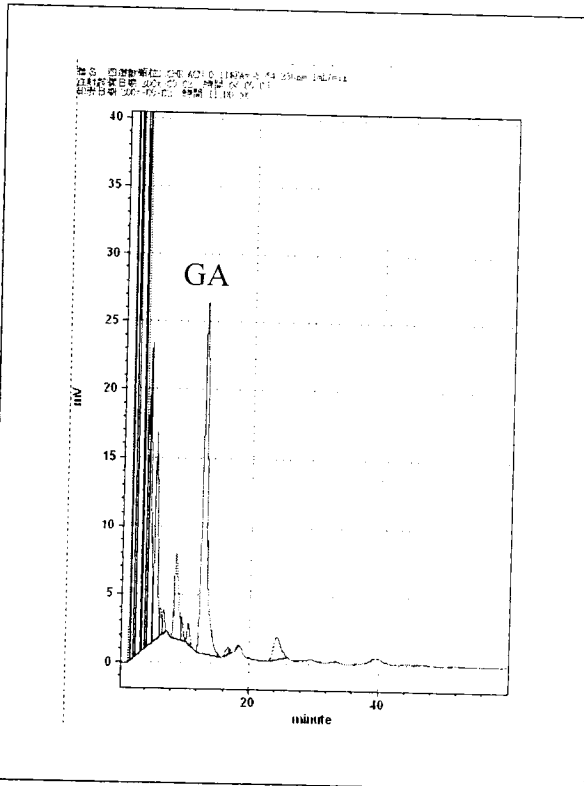


圖 19 四逆散顆粒劑分析 glycyrrhizic acid (GA)之 HPLC 圖

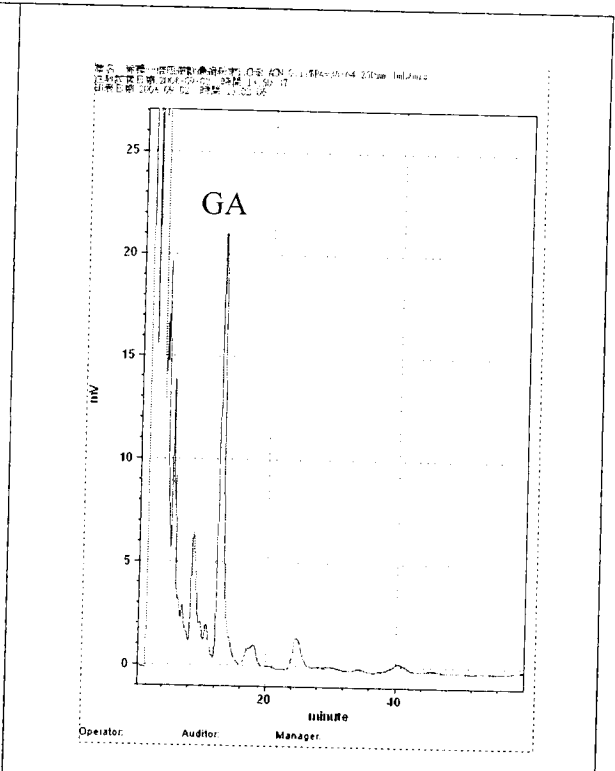


圖 20 四逆散濃縮粉末分析 glycyrrhizic acid (GA)之 HPLC 圖

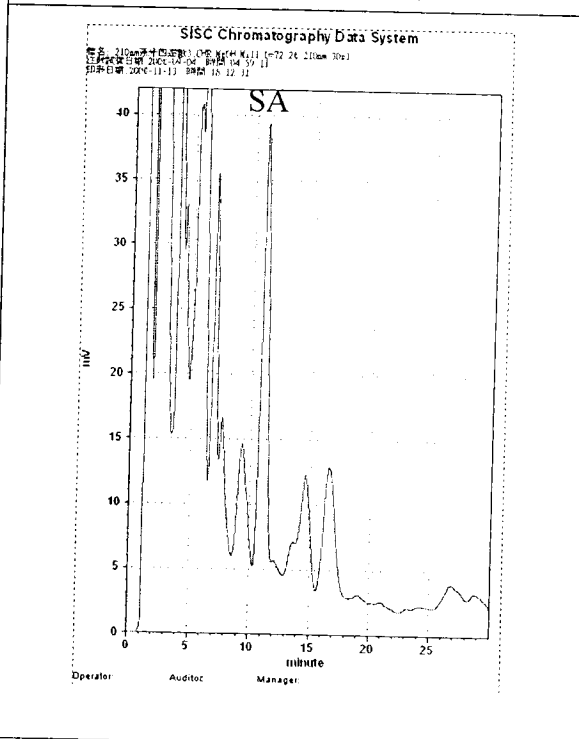


圖 21 四逆散奈米粉分析 saikosaponin A (SA)之 HPLC 圖

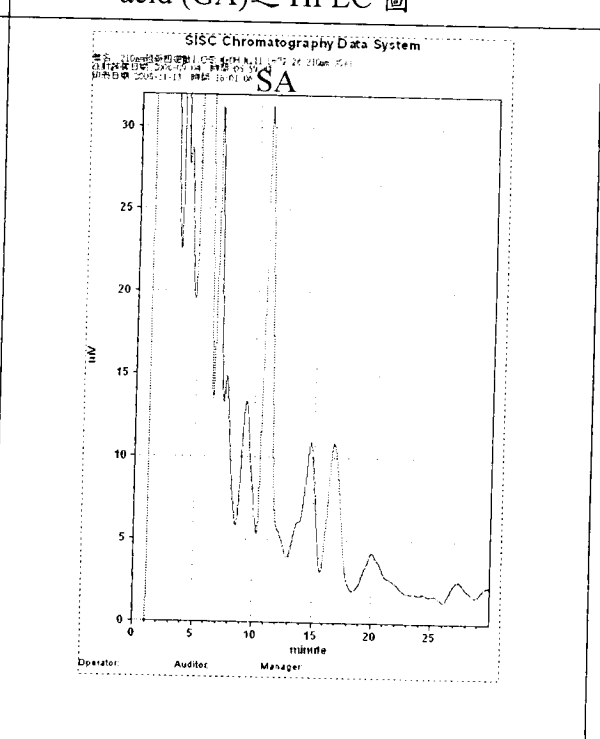


圖 22 四逆散粗粉分析 saikosaponin A (SA)之 HPLC 圖

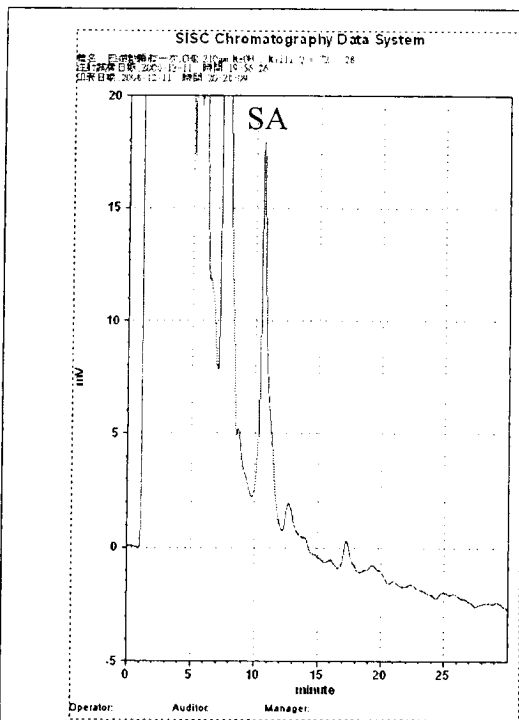


圖 23 四逆散顆粒劑分析 saikosaponin A (SA)之 HPLC 圖

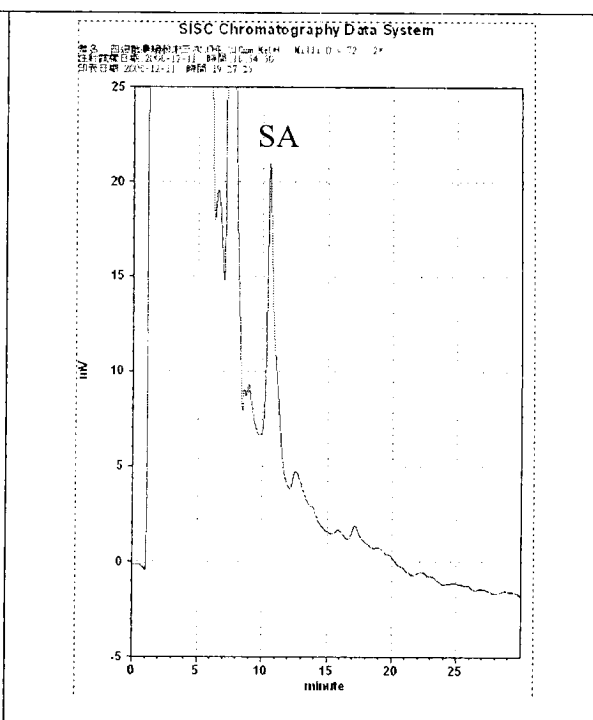


圖 24 四逆散濃縮粉末分析 saikosaponin A (SA)之 HPLC 圖

表 3 小柴胡湯血漿檢品 saikosaponin D 之 HPLC 定量分析

時間(分鐘)	Saikosaponin D 血漿中濃度($\mu\text{g/mL}$)	
	小柴胡湯奈米粉	小柴胡湯粗粉
5	1.71	2.74
15	1.96	3.00
30	0.89	2.27
60	1.31	0.96
120	8.17	1.49
180	3.72	N.D.
240	3.14	N.D.
300	4.66	N.D.

N.D.: not detected

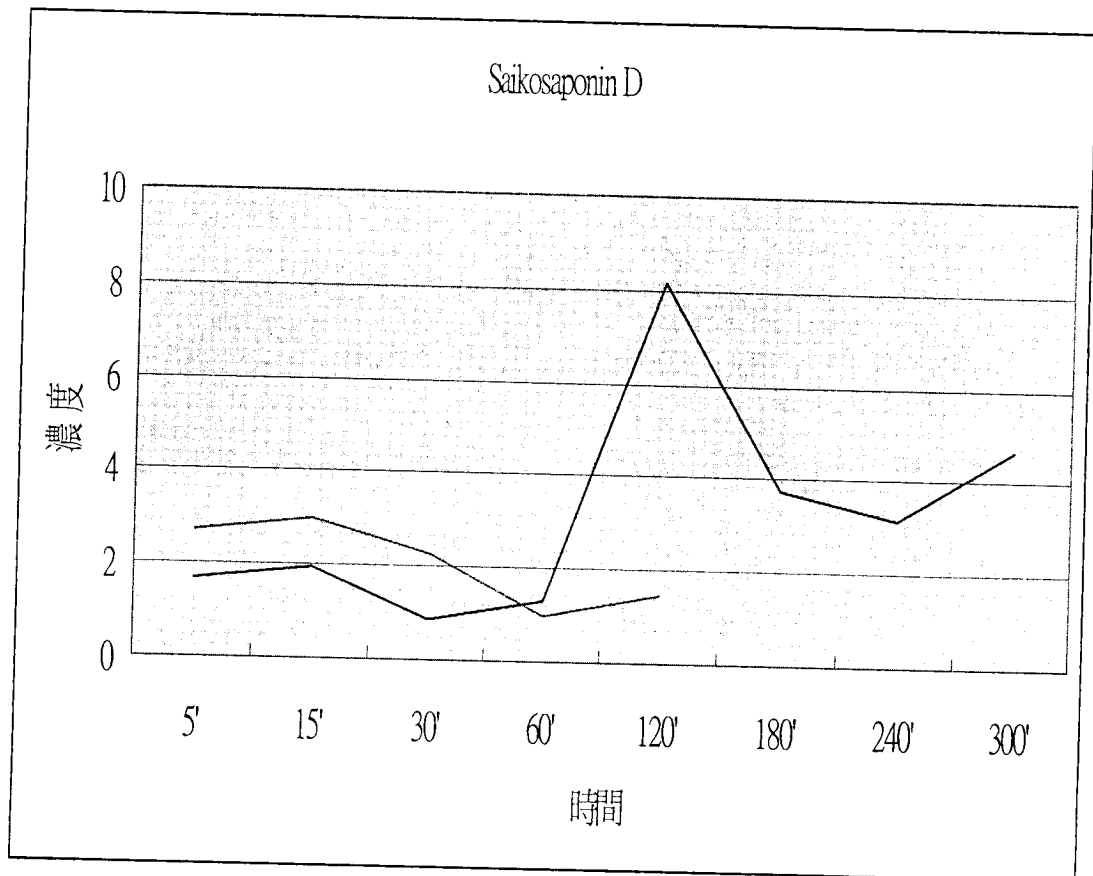


圖 25 小柴胡湯中 saikosaponin D 的血中濃度經時變化

—— 奈米粉 —— 粗粉

表 4 四逆散血漿檢品 saikosaponin D 之 HPLC 定量分析

時間(分鐘)	Saikosaponin D 血漿中濃度($\mu\text{g/mL}$)	
	四逆散奈米粉	四逆散粗粉
5	N.D.	N.D.
15	2.17	N.D.
30	2.58	N.D.
60	6.82	N.D.
120	7.41	N.D.
180	3.62	N.D.
240	2.85	N.D.
300	1.68	N.D.

N.D.: not detected

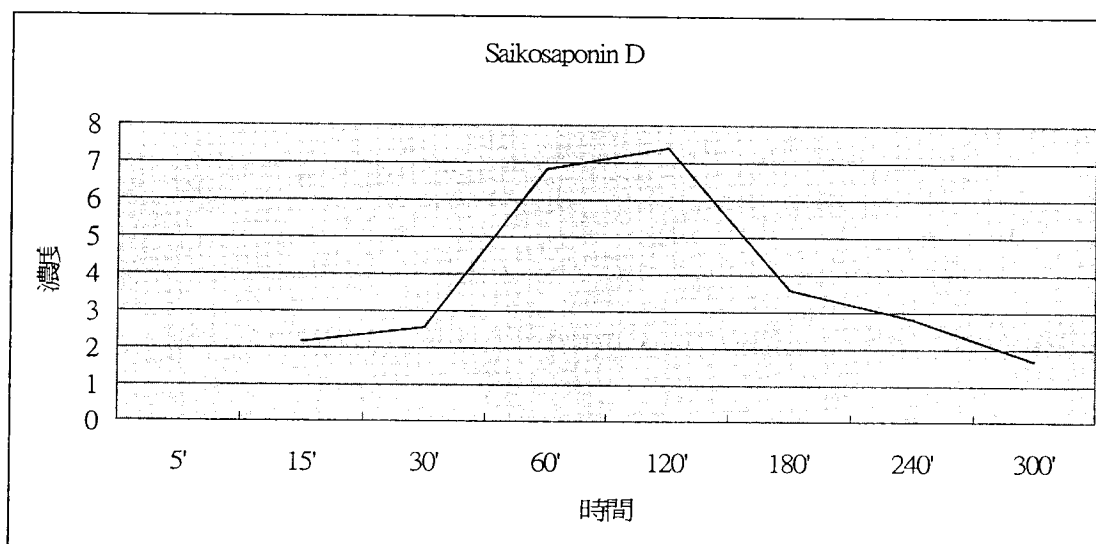


圖 26 四逆散中的 saikosaponin D 的血中濃度經時變化

— 奈米粉

表5 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水葦物急性毒性試驗對小鼠體重變化的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight				
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 7	Day 14
Control		27.4 ± 1.0	29.1 ± 1.5	29.7 ± 1.5	31.9 ± 1.1	33.1 ± 2.1
奈米粉	3.0	27.5 ± 1.0	28.7 ± 0.8	28.7 ± 1.0	31.3 ± 1.2	32.5 ± 1.0
	6.0	26.8 ± 1.5	29.0 ± 1.5	29.3 ± 1.4	31.5 ± 1.4	32.8 ± 2.6
粗粉	2.1	26.8 ± 1.5	27.0 ± 3.2	26.8 ± 4.1	30.0 ± 2.5	32.0 ± 2.4
	4.2	27.5 ± 1.5	28.7 ± 1.2	29.3 ± 1.5	31.0 ± 1.4	32.7 ± 0.8
水葦物	1.4	27.2 ± 1.2	28.3 ± 1.5	29.3 ± 1.4	30.8 ± 1.0	33.5 ± 1.9
	2.7	27.2 ± 1.0	28.3 ± 1.0	28.3 ± 1.9	31.0 ± 1.8	32.8 ± 2.7

All values are means ± SD (n = 6)

表6 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水葦物 28 天餵食對小鼠體重的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body Weight (g)				
		Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
Control		27.4 ± 1.6	33.1 ± 2.0	35.4 ± 2.2	37.5 ± 2.5	38.0 ± 2.2
奈米粉	0.33	27.0 ± 1.2	32.0 ± 1.8	34.1 ± 1.3	35.8 ± 1.9	35.9 ± 2.0
	1.00	26.3 ± 2.2	30.9 ± 2.9	32.3 ± 2.6	34.3 ± 3.4	34.3 ± 2.5*
	3.00	26.8 ± 2.3	32.6 ± 2.3	33.8 ± 1.9	33.5 ± 2.9*	33.6 ± 2.6**
粗粉	0.23	26.1 ± 2.2	31.3 ± 2.8	33.7 ± 3.1	35.9 ± 3.5	36.0 ± 3.6
	0.70	26.7 ± 1.9	32.2 ± 2.6	34.8 ± 2.8	36.1 ± 2.8	36.7 ± 2.3
	2.10	27.2 ± 1.5	32.2 ± 2.4	34.5 ± 3.4	36.5 ± 3.8	37.0 ± 3.9
水葦物	0.15	27.0 ± 1.4	32.2 ± 1.8	34.6 ± 2.2	35.7 ± 2.3	36.3 ± 2.0
	0.47	26.9 ± 2.1	31.5 ± 3.2	33.8 ± 3.4	35.3 ± 3.2	35.5 ± 3.4
	1.40	27.0 ± 1.8	31.4 ± 1.7	34.0 ± 2.2	35.5 ± 2.2	35.7 ± 2.4

All values are means ± SD (n = 10). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group at the same period.

表 7 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物 28 天餵食對小鼠血漿生化值的影響

Treatment	Dose (g/kg)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	Albumin (g/dL)	Gloublin (g/dL)
Control		35.2 ± 9.6	51.8 ± 6.6	3.45 ± 0.20	1.93 ± 0.19
奈米粉	0.33	31.0 ± 8.6	51.0 ± 10.0	3.48 ± 0.25	1.80 ± 0.21
	1.00	31.5 ± 9.6	51.8 ± 10.5	3.48 ± 0.25	1.64 ± 0.27
	3.00	30.8 ± 9.9	54.2 ± 14.3	3.51 ± 0.29	1.68 ± 0.38
粗粉	0.23	24.5 ± 3.8*	42.6 ± 6.2	3.23 ± 0.27	1.84 ± 0.19
	0.70	29.3 ± 6.2	49.8 ± 5.8	3.41 ± 0.25	1.80 ± 0.20
	2.10	25.9 ± 4.0	48.2 ± 4.7	3.39 ± 0.14	1.81 ± 0.19
水草物	0.15	27.3 ± 7.2	43.3 ± 6.0	3.29 ± 0.33	1.75 ± 0.39
	0.47	22.5 ± 3.2**	44.4 ± 4.4	3.43 ± 0.16	10.74 ± 0.37
	1.40	30.1 ± 11.2	45.7 ± 7.0	3.32 ± 0.23	1.74 ± 0.23

All values are means ± SD (n = 10). * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$ compared with control group

表 8 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物 28 天餵食對小鼠血漿生化值的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Total Protein (g/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Control		5.38 ± 0.28	28.1 ± 3.2	0.12 ± 0.02
奈米	0.33	5.28 ± 0.34	25.8 ± 5.1	0.11 ± 0.01
	1.00	5.12 ± 0.41	24.1 ± 2.8	0.11 ± 0.01
	3.00	5.19 ± 0.40	22.7 ± 5.5*	0.11 ± 0.01
粗粉	0.23	5.07 ± 0.28	22.5 ± 3.5**	0.10 ± 0.01*
	0.70	5.21 ± 0.32	21.4 ± 4.0**	0.11 ± 0.02*
	2.10	5.20 ± 0.28	21.8 ± 2.9**	0.10 ± 0.01*
水草物	0.15	5.04 ± 0.22	19.4 ± 3.6***	0.10 ± 0.01**
	0.47	5.17 ± 0.34	20.2 ± 2.3***	0.11 ± 0.01
	1.40	5.06 ± 0.23	20.2 ± 2.1***	0.09 ± 0.01***

All values are means ± SD (n = 10). * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group

表 9 小柴胡湯奈米、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物 28 天餵食對小鼠
肝臟及脾臟重量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Liver		Spleen	
		(g)	(g/100 g BW)	(g)	(g/100 g BW)
Control		2.21 ± 0.26	5.81 ± 0.49	0.14 ± 0.02	0.36 ± 0.05
奈米	0.33	1.99 ± 0.18	5.54 ± 0.38	0.14 ± 0.02	0.39 ± 0.05
	1.00	1.83 ± 0.24**	5.32 ± 0.40*	0.14 ± 0.04	0.42 ± 0.11
	3.00	1.79 ± 0.18**	5.32 ± 0.53*	0.13 ± 0.02	0.38 ± 0.07
粗粉	0.23	1.98 ± 0.27	5.48 ± 0.41	0.13 ± 0.02	0.37 ± 0.06
	0.70	1.94 ± 0.21	5.29 ± 0.35*	0.13 ± 0.02	0.34 ± 0.03
	2.10	1.88 ± 0.08**	5.09 ± 0.29**	0.13 ± 0.02	0.36 ± 0.06
水草物	0.15	1.78 ± 0.16***	4.91 ± 0.32***	0.13 ± 0.02	0.36 ± 0.04
	0.47	1.70 ± 0.17***	4.80 ± 0.23***	0.13 ± 0.02	0.35 ± 0.05
	1.40	1.73 ± 0.19***	4.84 ± 0.13***	0.13 ± 0.02	0.37 ± 0.04

All values are means ± SD (n = 10).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group

表 10 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物 28 天餵食對小鼠
腎臟及睪丸重量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Kidneys		Testes	
		(g)	(g/100 g BW)	(g)	(g/100 g BW)
Control		0.65 ± 0.07	1.72 ± 0.25	0.27 ± 0.06	0.70 ± 0.13
奈米粉	0.33	0.63 ± 0.08	1.74 ± 0.14	0.27 ± 0.03	0.74 ± 0.08
	1.00	0.57 ± 0.08	1.69 ± 0.14	0.26 ± 0.03	0.76 ± 0.10
	3.00	0.53 ± 0.11*	1.55 ± 0.29	0.25 ± 0.06	0.72 ± 0.14
粗粉	0.23	0.61 ± 0.11	1.70 ± 0.24	0.29 ± 0.05	0.81 ± 0.12
	0.70	0.65 ± 0.08	1.78 ± 0.20	0.26 ± 0.03	0.71 ± 0.07
	2.10	0.62 ± 0.07	1.65 ± 0.16	0.24 ± 0.02	0.64 ± 0.08
水草物	0.15	0.60 ± 0.09	1.68 ± 0.21	0.27 ± 0.04	0.74 ± 0.11
	0.47	0.61 ± 0.08	1.71 ± 0.12	0.27 ± 0.06	0.75 ± 0.17
	1.40	0.62 ± 0.05	1.73 ± 0.13	0.28 ± 0.03	0.80 ± 0.10

All values are means ± SD (n = 10). **P* < 0.01 compared with control group

表 11 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物 28 天餵食對小鼠
腎臟、脾臟及肝臟組織病理評估

Organ	Lesions	Control (0)	奈米粉 (3 g/kg)	粗粉 (2.1 g/kg)	水草物 (1.40 g/kg)
Kidney	Infiltration, mononuclear cell, focal	0/10	1/10	0/10	0/10
Spleen	Significant lesion observed	0/10	0/10	0/10	0/10
Liver	Infiltration, glycogen, diffuse, minimal to moderate necrosis, focal	8/10	8/10	3/10	2/10
		0/10	1/10	0/10	0/10

¹ Incidence: No of affected mice/ Total of examined mice.

表 12 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物小鼠週邊血微核數目的影響

Treatment	Dose (g/kg)	No. of PCE	% of MN in PCE	PCE/NCE (%)
Control		1021	3.2 ± 1.9	7.2 ± 0.9
奈米粉	3.0	1032	4.8 ± 0.6	4.8 ± 1.0*
	6.0	1031	4.6 ± 1.5	4.8 ± 1.7*
粗粉	2.1	1023	3.7 ± 0.8	5.0 ± 1.7
	4.2	1036	3.8 ± 0.9	5.0 ± 2.0
水草物	1.4	1011	3.1 ± 1.3	6.8 ± 1.8
	2.8	1022	3.6 ± 1.6	4.8 ± 1.0*
cyclophosphamide	0.1 ^a	1006	11.2 ± 2.4***	3.4 ± 0.6***

All values are means ± SD (n = 5). **P* < 0.05, ****P* < 0.001 compared with control group.

a: i.p.

PCE: polychromatic erythrocyte; NCE: normochromatic erythrocyte; MN: micronucleus

表 13 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl₄ 誘發小鼠慢性肝損傷體重的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight (g)			
		Week 0	Week 1	Week 3	Week 5
Control		31.0 ± 0.8	33.0 ± 1.4	37.8 ± 1.0	40.5 ± 1.7
CCl ₄ + CMC		29.9 ± 1.8	31.6 ± 1.8	34.9 ± 2.1	37.3 ± 3.3
+ 奈米粉	0.33	30.5 ± 1.5	30.3 ± 2.2	33.1 ± 2.9	34.7 ± 3.0
	0.10	29.5 ± 1.8	29.0 ± 1.5	33.1 ± 2.5	36.6 ± 3.2
+ 粗粉	0.23	30.1 ± 1.9	31.0 ± 2.2	33.5 ± 2.5	35.7 ± 3.5
	0.70	28.8 ± 1.6	29.0 ± 2.4	32.8 ± 2.5	35.1 ± 2.5
+ 水萃物	0.15	29.9 ± 2.0	29.8 ± 2.5	32.3 ± 3.2	35.2 ± 4.0
	0.47	30.5 ± 2.3	30.2 ± 2.6	31.4 ± 2.4*	32.6 ± 1.7*

All values are means ± SD (n = 10). *P < 0.05 compared with CCl₄ + CMC group.

表 14 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl₄ 誘發慢性肝損傷血漿 GPT 值的影響

Treatment	Dose (g/kg)	GPT (U/L)		
		Week 1	Week 3	Week 5
Control		32.7 ± 7.7	34.0 ± 3.1	433.1 ± 1.9
CCl ₄ + CMC		495.3 ± 183.8 ^{###}	2539.9 ± 1133.0 ^{###}	2428.9 ± 1077.1 ^{###}
+ 奈米粉	0.33	293.3 ± 63.9**	2200.1 ± 1147.7	1784.4 ± 862.5
	0.10	270.2 ± 62.8***	1094.0 ± 560.8*	1204.4 ± 311.7*
+ 粗粉	0.23	319.8 ± 159.0**	2281.7 ± 1493.6	1633.3 ± 997.6
	0.70	342.0 ± 75.6*	2208.0 ± 997.2	2071.1 ± 616.8
+ 水萃物	0.15	366.4 ± 96.4	2619.3 ± 1132.1	2167.8 ± 729.9
	0.47	328.0 ± 70.7**	2842.6 1042.8	2222.2 ± 505.1

All values are means ± SD (n = 10). ^{###}P < 0.001 compared with control group.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 compared with CCl₄ + CMC group.

表 15 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl₄ 誘發小鼠慢性肝損傷肝臟及脾臟重量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Liver (g)	Liver (%)	Spleen (%)
Control		1.94 ± 0.20	5.1 ± 0.2	0.31 ± 0.04
CCl ₄ + CMC		3.17 ± 0.34 ^{###}	8.6 ± 0.8 ^{###}	0.54 ± 0.05 ^{###}
+ 奈米粉	0.33	2.89 ± 0.19	8.0 ± 0.7	0.51 ± 0.05
	1.0	2.82 ± 0.15	7.7 ± 0.5	0.52 ± 0.06
+ 粗粉	0.23	2.86 ± 0.29	8.4 ± 1.0	0.55 ± 0.06
	0.70	2.82 ± 0.31	8.4 ± 0.7	0.52 ± 0.05
+ 水萃物	0.15	2.93 ± 0.41	8.4 ± 0.8	0.54 ± 0.07
	0.47	2.70 ± 0.46*	7.4 ± 0.7**	0.51 ± 0.07

All values are means ± SD (n = 10). ^{###}P < 0.001 compared with control group.

*P < 0.05, **P < 0.01 compared with CCl₄ + CMC group.

表 16 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水萃物對 CCl₄ 誘發小鼠慢性肝損傷肝臟蛋白質及 hydroxyproline 含量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Protein (mg / g tissue)	Hydroxyproline (µg/g tissue)
Control		143.3 ± 2.4	177.9 ± 12.6
CCl ₄ + CMC		91.6 ± 10.8 ^{###}	568.7 ± 130.0 ^{###}
+ 奈米粉	0.33	99.0 ± 6.3	539.7 ± 161.7
	1.00	112.8 ± 13.9	370.7 ± 100.4*
+ 粗粉	0.23	77.5 ± 18.6	539.8 ± 96.4
	0.70	96.7 ± 10.7	432.1 ± 110.5
+ 水萃物	0.15	87.3 ± 10.4	481.3 ± 143.4
	0.47	100.7 ± 6.2	284.8 ± 124.4***

All values are means ± SD (n = 10). ^{###}P < 0.01 compared with control group. *P < 0.05, ***P < 0.001 compared with CCl₄ + CMC group.

表 17 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物對 CCl₄ 誘發小鼠慢性肝損傷肝臟脂質過氧化及 glutathione 含量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Malondialdehyde (nmol/mg protein)	Glutathione (μ mol/g tissue)
Control		0.97 \pm 0.23	1.8 \pm 0.2
CCl ₄ + CMC		2.02 \pm 0.27 [#]	3.7 \pm 1.6 ^{##}
+ 奈米粉	0.33	1.19 \pm 0.34	3.0 \pm 0.8
	1.00	1.11 \pm 0.14	2.8 \pm 0.8
+ 粗粉	0.23	1.73 \pm 0.80	2.7 \pm 0.7
	0.70	1.37 \pm 0.55	2.7 \pm 0.6
+ 水草物	0.15	2.03 \pm 1.18	2.7 \pm 0.7
	0.47	1.20 \pm 0.30	2.7 \pm 0.8

All values are means \pm SD (n = 10). [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.001 compared with control group.

表 18 小柴胡湯奈米粉、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物對 CCl₄ 誘發小鼠慢性肝炎肝臟組織的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Fibrosis area (%)
Control		0
CCl ₄ + CMC		7.2 \pm 2.4 ^{###}
+ 奈米粉	0.33	6.3 \pm 1.5
	1.00	5.4 \pm 1.2*
+ 粗粉	0.23	7.5 \pm 2.1
	0.70	6.4 \pm 2.4
+ 水草物	0.15	6.0 \pm 1.2
	0.47	5.1 \pm 1.8*

All values are means \pm SD (n = 10). ^{###}P < 0.001 compared with control group. *P < 0.05 compared with CCl₄ + CMC group.

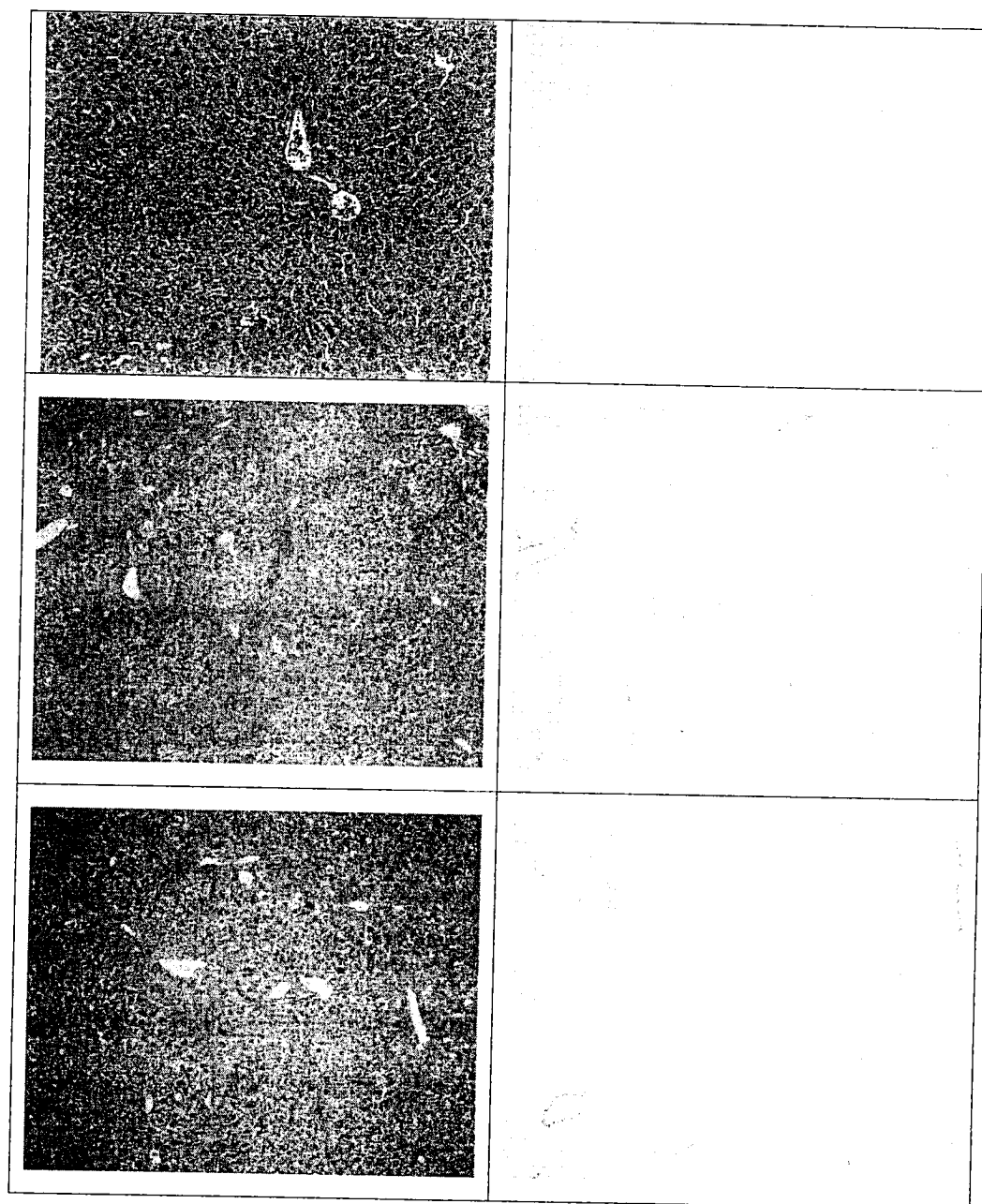


圖 27 小柴胡湯水萃物對 CCl_4 誘發小鼠肝臟損傷的病理檢察

左邊為 HE 染色，上為控制組；中為 CCl_4 組，有嚴重肝細胞壞死；

下為小柴胡湯奈米粉 1.0g/kg 肝細胞壞死沒有顯著較輕。

右邊為 sirius red 染色，上為控制組；中為 CCl_4 組，有明顯肝纖維化；

下為小柴胡湯奈米粉 1.0 g/kg 組，肝纖維化較輕。

表 19 四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水草物急性毒性試驗對小鼠體重變化的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight				
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 7	Day 14
Control		26.2 ± 1.7	28.0 ± 2.2	28.2 ± 2.7	32.5 ± 3.0	35.2 ± 2.0
奈米粉	3.00	25.3 ± 1.0	27.5 ± 1.2	29.3 ± 2.7	30.3 ± 1.8	33.2 ± 1.6
	6.00	25.5 ± 2.4	27.7 ± 3.0	29.2 ± 3.1	30.2 ± 2.9	33.3 ± 3.7
粗粉	2.60	24.8 ± 1.2	26.7 ± 1.0	27.3 ± 1.0	30.7 ± 1.2	33.2 ± 1.6
	5.10	24.7 ± 1.2	27.5 ± 1.4	27.7 ± 1.9	31.0 ± 2.0	33.3 ± 2.8
水草物	0.78	25.8 ± 1.0	27.0 ± 1.1	27.5 ± 1.5	30.7 ± 1.6	32.7 ± 1.9
	1.60	26.0 ± 1.5	27.5 ± 1.4	28.8 ± 2.1	32.0 ± 2.3	34.7 ± 2.9

All values are means ± SD (n = 6).

表 20 四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水草物 28 天餵食對小鼠體重的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body Weight (g)				
		Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
Control		23.2 ± 1.9	34.6 ± 2.9	36.1 ± 2.6	37.6 ± 2.7	39.4 ± 3.2
奈米粉	0.33	32.8 ± 2.2	35.4 ± 3.0	36.8 ± 3.2	38.3 ± 3.3	39.3 ± 4.0
	1.00	33.5 ± 3.0	36.2 ± 3.3	37.1 ± 3.7	38.5 ± 3.5	40.6 ± 4.3
	3.00	33.7 ± 2.4	25.2 ± 3.7	36.2 ± 3.7	37.8 ± 3.7	38.7 ± 4.1
粗粉	0.29	32.9 ± 1.9	36.0 ± 2.3	36.6 ± 2.6	38.7 ± 2.4	41.0 ± 2.9
	0.87	33.3 ± 1.9	36.5 ± 2.8	38.4 ± 3.4	40.3 ± 4.1	42.6 ± 4.1
	2.60	32.3 ± 2.5	35.0 ± 2.7	36.0 ± 2.9	38.1 ± 2.9	38.8 ± 2.7
水草物	0.08	34.4 ± 2.6	37.9 ± 2.9	39.5 ± 3.2	41.3 ± 2.9	42.2 ± 2.7
	0.26	34.0 ± 3.1	37.1 ± 2.8	38.5 ± 4.0	41.3 ± 4.3	43.3 ± 4.5
	0.78	33.6 ± 2.6	35.9 ± 2.6	36.8 ± 2.7	39.5 ± 3.1	39.9 ± 3.1

All values are means ± SD (n = 10).

表 21 四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水草物 28 天餵食對小鼠血漿生化值的影響

Treatment	Dose (g/kg)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	Total protein (g/dL)
Control		34.4 ± 8.6	54.7 ± 20.7	5.39 ± 0.22
奈米	0.33	39.4 ± 10.7	68.2 ± 20.6	5.34 ± 0.31
	1.00	31.2 ± 5.1	50.4 ± 11.4	5.50 ± 0.17
	3.00	33.8 ± 10.9	56.5 ± 17.0	5.25 ± 0.31
粗粉	0.29	31.1 ± 9.7	46.7 ± 12.2	5.32 ± 0.23
	0.87	39.4 ± 12.4	67.7 ± 29.3	5.30 ± 0.21
	2.60	29.2 ± 5.0	56.3 ± 9.2	5.40 ± 0.29
水草物	0.08	36.0 ± 17.0	61.7 ± 25.0	5.29 ± 0.41
	0.26	33.4 ± 5.4	57.0 ± 12.9	5.05 ± 0.40
	0.78	37.3 ± 11.0	57.6 ± 18.5	5.25 ± 0.27

All values are means ± SD (n = 10).

表 22 四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水草物 28 天餵食對小鼠血漿生化值的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Albumin (g/dL)	Globulin (g/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Control		3.24 ± 0.27	2.15 ± 0.22	30.7 ± 5.6	0.11 ± 0.02
奈米粉	0.33	3.34 ± 0.29	1.99 ± 0.33	27.2 ± 2.7	0.11 ± 0.01
	1.00	3.46 ± 0.27	2.04 ± 0.21	26.1 ± 3.9*	0.10 ± 0.01
	3.00	3.39 ± 0.33	1.85 ± 0.24	26.2 ± 3.4	0.10 ± 0.01
粗粉	0.29	3.44 ± 0.21	1.88 ± 0.27	24.6 ± 1.4**	0.10 ± 0.01
	0.87	3.63 ± 0.32	1.67 ± 0.35**	23.1 ± 2.6***	0.09 ± 0.03
	2.60	3.43 ± 0.32	1.96 ± 0.29	23.4 ± 3.6***	0.10 ± 0.01
水草物	0.08	3.38 ± 0.54	1.91 ± 0.22	21.2 ± 2.4***	0.10 ± 0.02
	0.26	3.11 ± 0.34	1.94 ± 0.27	24.5 ± 4.3**	0.10 ± 0.02
	0.78	3.36 ± 0.29	1.89 ± 0.29	26.5 ± 4.0	0.09 ± 0.02

All values are means ± SD (n = 10). * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$ compared with control group

表 23 四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水草物 28 天餵食對小鼠肝臟及脾臟重量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Liver		Spleen	
		(g)	(g/100 g BW)	(g)	(g/100 g BW)
Control		2.21 ± 0.25	5.66 ± 0.85	0.13 ± 0.02	0.33 ± 0.03
奈米粉	0.33	2.15 ± 0.32	5.47 ± 0.66	0.13 ± 0.03	0.33 ± 0.07
	1.00	2.16 ± 0.26	5.37 ± 0.77	0.15 ± 0.04	0.38 ± 0.09
	3.00	2.25 ± 0.23	5.90 ± 1.02	0.15 ± 0.02	0.38 ± 0.05
粗粉	0.29	2.10 ± 0.29	5.15 ± 0.77	0.14 ± 0.02	0.33 ± 0.05
	0.87	2.15 ± 0.32	5.08 ± 0.84	0.15 ± 0.03	0.34 ± 0.04
	2.60	2.13 ± 0.32	5.51 ± 0.90	0.14 ± 0.03	0.36 ± 0.05
水草物	0.08	2.20 ± 0.24	5.23 ± 0.59	0.16 ± 0.04	0.39 ± 0.10
	0.26	2.14 ± 0.28	5.01 ± 1.00	0.14 ± 0.02	0.33 ± 0.05
	0.780	2.14 ± 0.17	5.40 ± 0.63	0.14 ± 0.03	0.36 ± 0.06

All values are means ± SD (n = 10).

表 24 四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水草物 28 天餵食對小鼠腎及睪丸重量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Kidneys		Testes	
		(g)	(g/100 g BW)	(g)	(g/100 g BW)
Control		0.63 ± 0.09	1.61 ± 0.15	0.24 ± 0.03	0.61 ± 0.09
奈米粉	0.33	0.62 ± 0.08	1.56 ± 0.11	0.23 ± 0.03	0.57 ± 0.06
	1.00	0.63 ± 0.08	1.55 ± 0.13	0.24 ± 0.04	0.59 ± 0.08
	3.00	0.58 ± 0.12	1.48 ± 0.20	0.23 ± 0.03	0.60 ± 0.09
粗粉	0.29	0.65 ± 0.05	1.59 ± 0.10	0.22 ± 0.03	0.53 ± 0.09
	0.87	0.63 ± 0.11	1.47 ± 0.14	0.24 ± 0.03	0.56 ± 0.09
	2.60	0.63 ± 0.07	1.62 ± 0.14	0.24 ± 0.03	0.62 ± 0.07
水草物	0.08	0.72 ± 0.06	1.70 ± 0.12	0.24 ± 0.03	0.58 ± 0.07
	0.26	0.66 ± 0.08	1.53 ± 0.13	0.25 ± 0.06	0.58 ± 0.13
	0.78	0.68 ± 0.09	1.71 ± 0.19	0.26 ± 0.04	0.66 ± 0.10

All values are means ± SD (n = 10).

表 25 四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水草物 28 天餵食對小鼠腎臟、脾臟及肝臟組織病理評估

Organ	Lesions	Control (0)	奈米 (3g/kg)	粗粉 (2.6 g/kg)	水草物 (0.78 g/kg)
Kidney	Cast, focal slight	1/10	1/10	0/10	1/10
	Hydronephrosis, severe	0/10	1/10	0/10	1/10
	Infiltration, mononuclear cell, focal, minimal	1/10	0/10	0/10	0/10
	Renegation, tubule, focal, slight	1/10	0/10	0/10	0/10
Spleen	Lymphocytic proliferation, diffuse, moderate	1/10	0/10	0/10	0/10
Liver	Hepatitis, granulomatous, focal, giant cell formation, minimal to moderate	2/10	0/10	0/10	0/10

¹ Incidence: No of affected mice/ Total of examined mice.

表 26 四逆散奈米粉、四逆散粗粉及四逆散水草物及 cyclophosphamide 小鼠週邊血微核數目的影響

Treatment	Dose (g/kg)	No. of PCE	% of MN in PCE	PCE/NCE (%)
Control		1034	3.2 ± 1.9	7.2 ± 0.9
奈米粉	3.0	1007	3.7 ± 1.3	5.7 ± 2.6
	6.0	1025	3.5 ± 0.8	6.5 ± 1.3
粗粉	2.6	1008	3.2 ± 1.2	4.5 ± 2.2
	5.1	1056	4.9 ± 1.2	6.2 ± 1.4
水草物	0.8	1049	4.7 ± 0.7	4.6 ± 1.3
	1.6	1016	4.0 ± 2.0	5.2 ± 2.4
cyclophosphamide	0.1 ^a	1006	11.23 ± 2.4***	3.4 ± 0.6***

All values are means ± SD (n = 5). ****P* < 0.001 compared with control group.

a: i.p.

PCE: polychromatic erythrocyte; NCE: normochromatic erythrocyte; MN: micronucleus

表 27 四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl₄ 誘發小鼠慢性肝損傷體重的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight (g)			
		Week 0	Week 1	Week 3	Week 5
Control		30.6 ± 1.3	32.6 ± 3.5	37.4 ± 4.6	39.3 ± 5.0
CCl ₄ + CMC	-	30.5 ± 1.8	30.7 ± 2.5	32.6 ± 3.2 ^{##}	33.2 ± 3.6 ^{###}
+ 奈米粉	0.10	30.6 ± 1.3	30.4 ± 2.0	32.1 ± 2.5	33.6 ± 2.8
	0.50	30.7 ± 1.5	30.7 ± 2.0	32.0 ± 2.4	32.8 ± 2.4
	1.50	31.2 ± 1.9	31.2 ± 2.7	32.8 ± 2.6	33.6 ± 2.8
+ 粉末	0.10	30.9 ± 1.2	30.8 ± 1.0	33.0 ± 1.7	33.0 ± 2.1
	0.30	30.4 ± 1.4	31.8 ± 1.3	33.8 ± 2.8	35.6 ± 3.5
	0.90	30.0 ± 0.9	29.9 ± 1.9	31.2 ± 1.5	31.2 ± 1.5
+ 顆粒	0.15	30.0 ± 1.2	31.8 ± 1.4	31.4 ± 1.3	31.3 ± 1.0
	0.45	31.0 ± 1.6	31.9 ± 1.5	33.9 ± 2.5	33.3 ± 2.6
	1.35	30.6 ± 1.3	31.7 ± 1.6	34.1 ± 2.0	34.6 ± 2.5

All values are means ± SD (n = 10). ^{##}P < 0.01, ^{###}P < 0.001 compared with control group.

表 28 四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl₄ 誘發慢性肝損傷血漿 GPT 值的影響

Treatment	Dose (g/kg)	GPT (U/L)		
		Week 1	Week 3	Week 5
Control		32.9 ± 2.1	30.2 ± 3.7	31.7 ± 4.9
CCl ₄ + CMC		438.0 ± 209.7 ^{###}	3029.8 ± 766.9 ^{###}	4176.7 ± 1242.4 ^{###}
+ 奈米粉	0.10	442.0 ± 99.7	3752.5 ± 1340.7	4603.3 ± 1731.9
	0.50	374.3 ± 170.9	3826.2 ± 1453.8	4312.2 ± 852.1
	1.50	387.0 ± 196.7	2548.5 ± 755.9	2263.3 ± 1058.4 ^{**}
+ 粉末	0.10	564.7 ± 227.4	3416.9 ± 1669.6	3992.5 ± 1244.0
	0.30	305.0 ± 123.9	3415.1 ± 1016.8	2840.0 ± 1154.82
	0.90	375.4 ± 204.5	3765.5 ± 1444.7	2326.7 ± 801.9*
+ 顆粒	0.15	440.3 ± 271.5	4039.0 ± 2227.6	3508.9 ± 1259.4
	0.45	422.7 ± 197.7	2797.0 ± 923.4	2591.4 ± 828.3
	1.35	302.3 ± 124.3	2629.5 ± 1483.3	2382.2 ± 1355.7*

All values are means ± SD (n = 10). ^{###}P < 0.001 compared with control group. *P < 0.05, ** P < 0.01 compared with CCl₄ + CMC group.

表 29 四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl₄ 誘發慢性肝損傷
肝臟及脾臟重量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Liver (g)	Spleen (g)
Control		2.0 ± 0.3	0.16 ± 0.02
CCl ₄ + CMC		2.8 ± 0.6 [#]	0.28 ± 0.04 ^{###}
+ 奈米粉	0.10	2.6 ± 0.2	0.27 ± 0.02
	0.50	2.5 ± 0.3	0.26 ± 0.03
	1.50	2.6 ± 0.2	0.27 ± 0.03
+ 粉末	0.10	2.6 ± 0.2	0.28 ± 0.02
	0.30	2.9 ± 0.5	0.31 ± 0.06
	0.90	2.6 ± 0.2	0.27 ± 0.03
+ 顆粒	0.15	2.6 ± 0.2	0.28 ± 0.02
	0.45	2.7 ± 0.3	0.29 ± 0.03
	1.35	2.8 ± 0.2	0.30 ± 0.02

All values are means ± SD (n = 10). [#]P < 0.05, ^{###}P < 0.001 compared with control group.

表 30 四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl₄ 誘發慢性肝損傷
肝臟蛋白質及 hydroxyproline 含量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Protein (mg / g tissue)	Hydroxyproline (μ g/g tissue)
Control		197.7 \pm 7.1	277.2 \pm 39.7
CCl ₄ + CMC		146.3 \pm 17.8 ^{##}	514.9 \pm 177.3 ^{##}
+ 奈米粉	0.10	151.0 \pm 13.4	517.5 \pm 94.9
	0.50	155.0 \pm 15.3	625.9 \pm 166.0
	1.50	145.4 \pm 8.2	556.0 \pm 90.4
+ 粉末	0.10	142.7 \pm 11.6	497.8 \pm 194.0
	0.30	145.9 \pm 14.1	453.3 \pm 150.3
	0.90	141.8 \pm 9.5	393.8 \pm 189.1
+ 顆粒	0.15	157.8 \pm 14.8	365.6 \pm 106.0
	0.45	156.4 \pm 18.2	370.7 \pm 89.5
	1.35	140.8 \pm 15.6	455.7 \pm 140.4

All values are means \pm SD (n = 10). ^{##}P < 0.01 compared with control group.

表 31 四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl₄ 誘發慢性肝損傷
肝臟脂質過氧化程度及 glutathione 含量的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Malondialdehyde (nmol/mg protein)	Glutathione (μ mol/g tissue)
Control		1.2 \pm 0.1	2.7 \pm 0.8
CCl ₄ + CMC		2.8 \pm 0.5 ^{##}	5.0 \pm 4.0
+ 奈米粉	0.10	3.4 \pm 2.1	5.9 \pm 4.1
	0.50	3.2 \pm 0.3	8.6 \pm 3.8
	1.50	3.2 \pm 0.2	14.5 \pm 5.1 ^{**}
+ 粉末	0.10	3.1 \pm 0.6	4.9 \pm 4.6
	0.30	3.7 \pm 1.2	8.6 \pm 5.2
	0.90	3.8 \pm 1.9	13.4 \pm 6.2 ^{**}
+ 顆粒	0.15	2.8 \pm 0.3	6.7 \pm 4.1
	0.45	2.8 \pm 0.4	6.9 \pm 4.4
	1.35	3.2 \pm 0.5	11.9 \pm 6.8 [*]

All values are means \pm SD (n = 10). ^{##}*P* < 0.01 compared with control group.

^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 compared with CCl₄ + CMC group.

表 32 四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl₄ 誘發慢性肝損傷肝臟纖維化的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Fibrosis area (%)
Control		0
CCl ₄ + CMC		6.3 ± 1.4 ^{###}
+ 奈米粉	0.10	6.2 ± 3.0
	0.50	5.3 ± 2.2
	1.50	4.3 ± 0.7
+ 粉末	0.10	6.9 ± 1.7
	0.30	6.5 ± 2.0
	0.90	5.0 ± 2.9
+ 顆粒	0.15	5.6 ± 2.3
	0.45	4.7 ± 1.7
	1.35	4.3 ± 1.1

All values are means ± SD (n = 10).

^{###} *P* < 0.01 compared with control group.

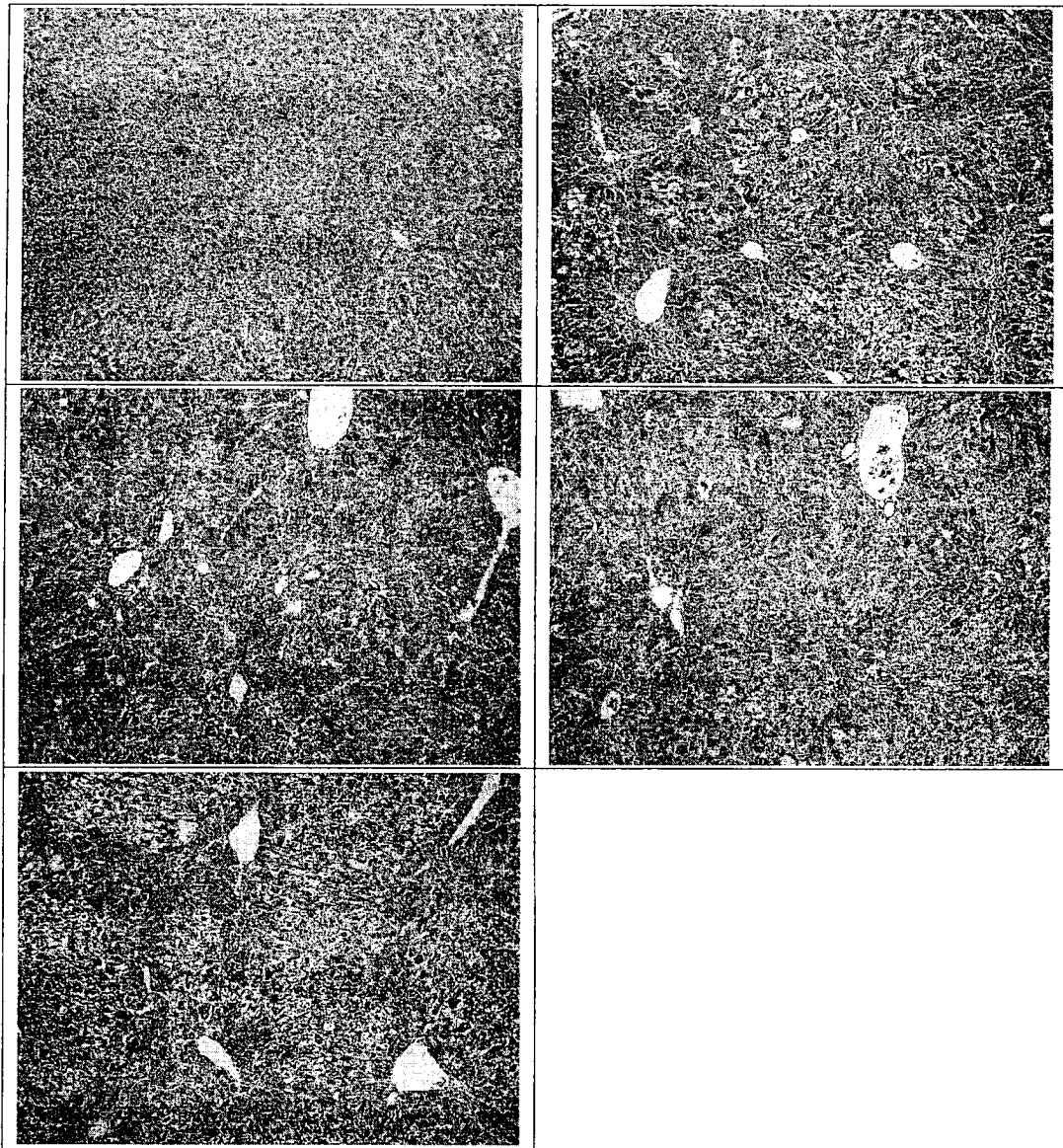


圖 28 四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl_4 誘發慢性肝損傷
肝臟損傷的影響 (HE 染色)

左上：control； 右上： CCl_4 + CMC；

左中： CCl_4 + 四逆散奈米粉 1.50 g/kg；右中： CCl_4 + 四逆散粉末 0.90 g/kg

左下： CCl_4 + 四逆散顆粒 1.35 g/kg

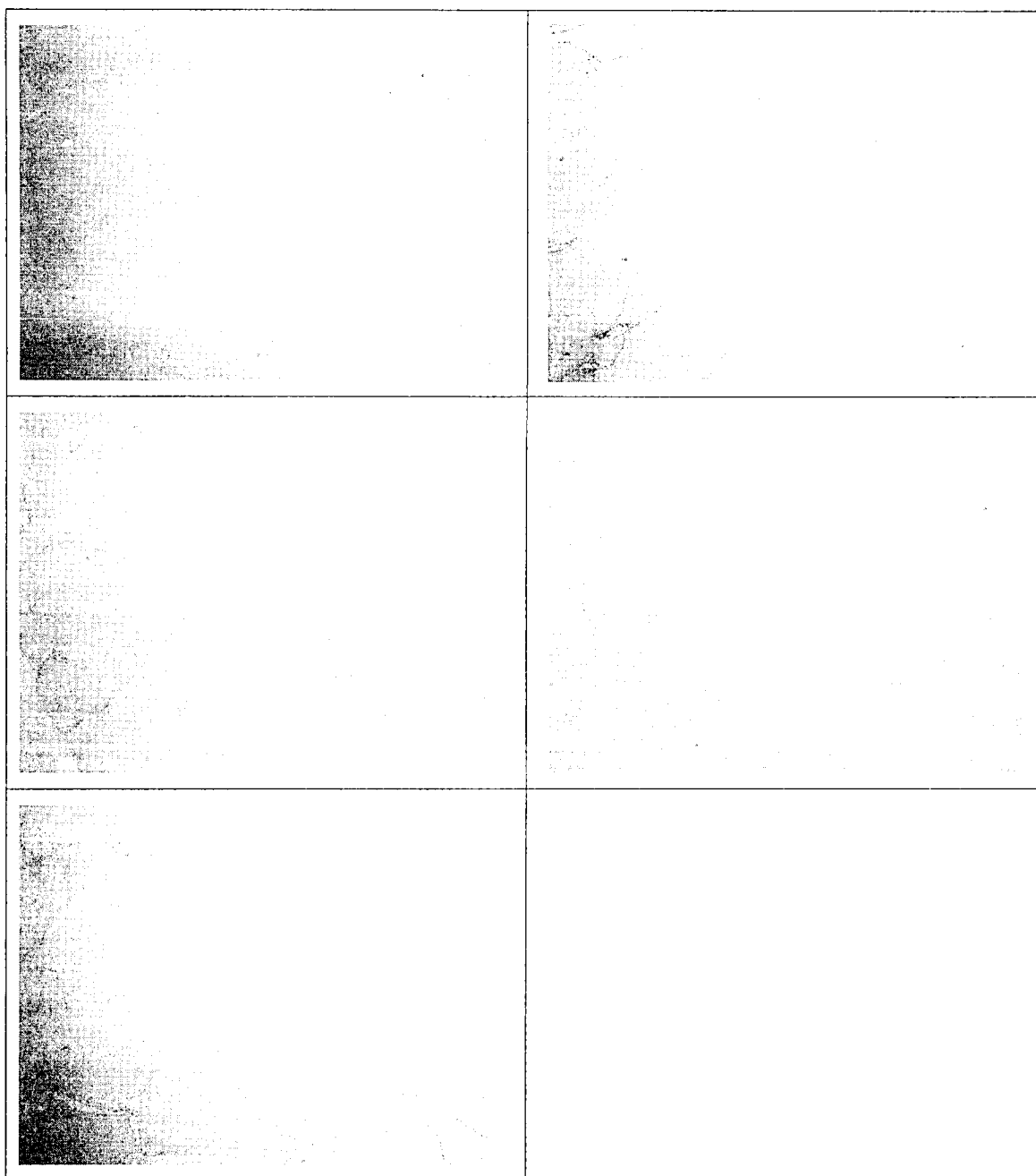


圖 29 四逆散奈米粉、四逆散粉末、四逆散顆粒對 CCl_4 誘發慢性肝損傷
肝臟纖維化的影響 (sirius red 染色)

左上： control； 右上： CCl_4 + CMC；

左中： CCl_4 + 四逆散奈米粉 1.50 g/kg； 右中： CCl_4 + 四逆散粉末 0.90 g/kg

左下： CCl_4 + 四逆散顆粒 1.35 g/kg

表 33 小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物對小鼠體重變化的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight										
		Day 0	Day 3	Day 6	Day 9	Day 12	Day 15	Day 18				
Control	0.5 % CMC	24.50 ± 1.55	25.17 ± 1.86	25.92 ± 1.69	26.33 ± 0.98	27.50 ± 1.00	28.00 ± 0.84	25.83 ± 2.94				
	+ 奈米	25.17 ± 2.18	26.25 ± 1.70	27.25 ± 1.51	27.20 ± 1.52	27.00 ± 2.18	27.90 ± 1.64	27.50 ± 1.77				
	0.5	24.42 ± 2.42	25.08 ± 2.44	24.75 ± 2.38	24.83 ± 2.44	24.33 ± 2.38	25.17 ± 2.07	24.67 ± 2.68				
+ 飲片	1	24.42 ± 2.29	23.50 ± 2.77	23.58 ± 2.56	23.80 ± 2.66	23.80 ± 2.51	24.30 ± 2.82	24.70 ± 2.82				
	0.1	24.92 ± 1.53	25.67 ± 1.86	26.08 ± 1.88	25.33 ± 1.97	26.25 ± 1.81	26.00 ± 1.52	26.50 ± 1.34				
	0.5	24.83 ± 2.46	26.75 ± 2.44	26.42 ± 1.83	26.50 ± 1.70	26.75 ± 1.94	26.83 ± 1.57	26.92 ± 2.01				
+ 粗粉	1	25.42 ± 3.31	23.75 ± 2.60	25.25 ± 2.98	23.08 ± 4.71	24.17 ± 3.25	24.08 ± 3.25	24.50 ± 3.32				
	0.1	24.00 ± 2.00	24.83 ± 1.83	25.00 ± 1.67	25.08 ± 1.59	24.83 ± 1.83	24.25 ± 1.51	24.67 ± 1.21				
	0.5	24.33 ± 2.50	25.50 ± 2.92	25.50 ± 2.86	25.50 ± 2.61	24.75 ± 2.36	24.83 ± 2.70	25.25 ± 2.30				
	1	25.08 ± 1.32	26.25 ± 0.61	26.17 ± 0.75	26.50 ± 0.84	27.00 ± 1.14	26.75 ± 1.17	27.17 ± 0.82				

表 33 小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯水草物對小鼠體重變化的影響(續)

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight				
		Day 21	Day 24	Day 27	Day 30	
Control	0.5 % CMC	27.58 ± 1.36	27.92 ± 1.43	28.50 ± 1.79	28.58 ± 1.72	
+ 奈米	0.1	28.20 ± 1.82	27.40 ± 1.47	29.10 ± 1.14	28.10 ± 1.39	
	0.5	24.83 ± 2.52	24.83 ± 3.19	26.08 ± 3.95	24.83 ± 2.94	
	1	25.10 ± 2.16	25.20 ± 2.68	25.70 ± 2.05	25.60 ± 2.82	
+ 軟片	0.1	26.50 ± 1.79	26.33 ± 1.60	26.58 ± 1.59	26.67 ± 1.37	
	0.5	27.58 ± 1.69	27.67 ± 1.75	27.67 ± 1.83	27.42 ± 1.36	
	1	26.00 ± 3.33	25.25 ± 3.01	26.42 ± 2.92	25.33 ± 2.84	
+ 粗粉	0.1	24.33 ± 1.86	24.33 ± 1.17	24.92 ± 1.32	24.75 ± 1.70	
	0.5	25.50 ± 2.43	24.92 ± 2.60	25.58 ± 2.60	25.67 ± 2.34	
	1	26.75 ± 1.25	27.25 ± 1.37	27.83 ± 0.75	27.25 ± 1.17	

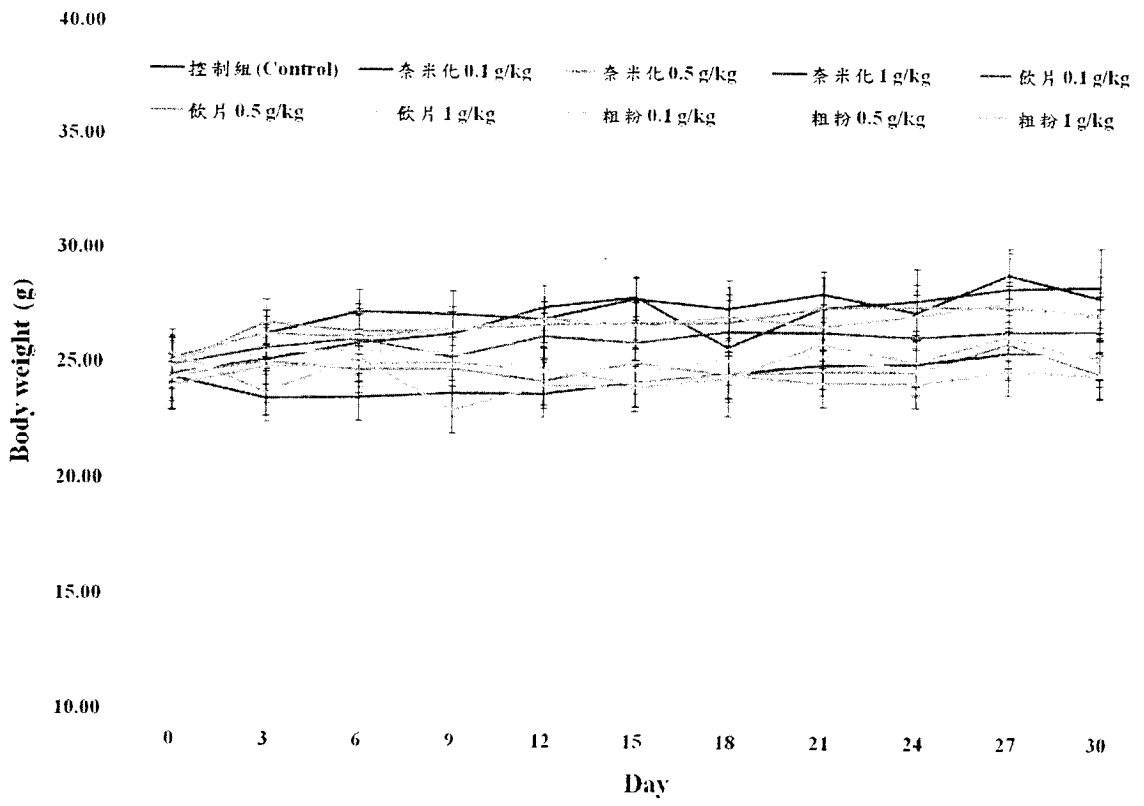


圖 30 小柴胡湯各種製劑對小鼠體重之影響

表 34 BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 NK cell activity (%)

Treatment	Dose (g/kg)	NK cell activity (%)
0.5 % CMC		1.13
+ 奈米粉	0.1	2.6
	0.5	4.62
	1	3.47
+ 飲片	0.1	2.13
	0.5	2.56
	1	2.47
+ 粗粉	0.1	1.66
	0.5	3.45
	1	3.97

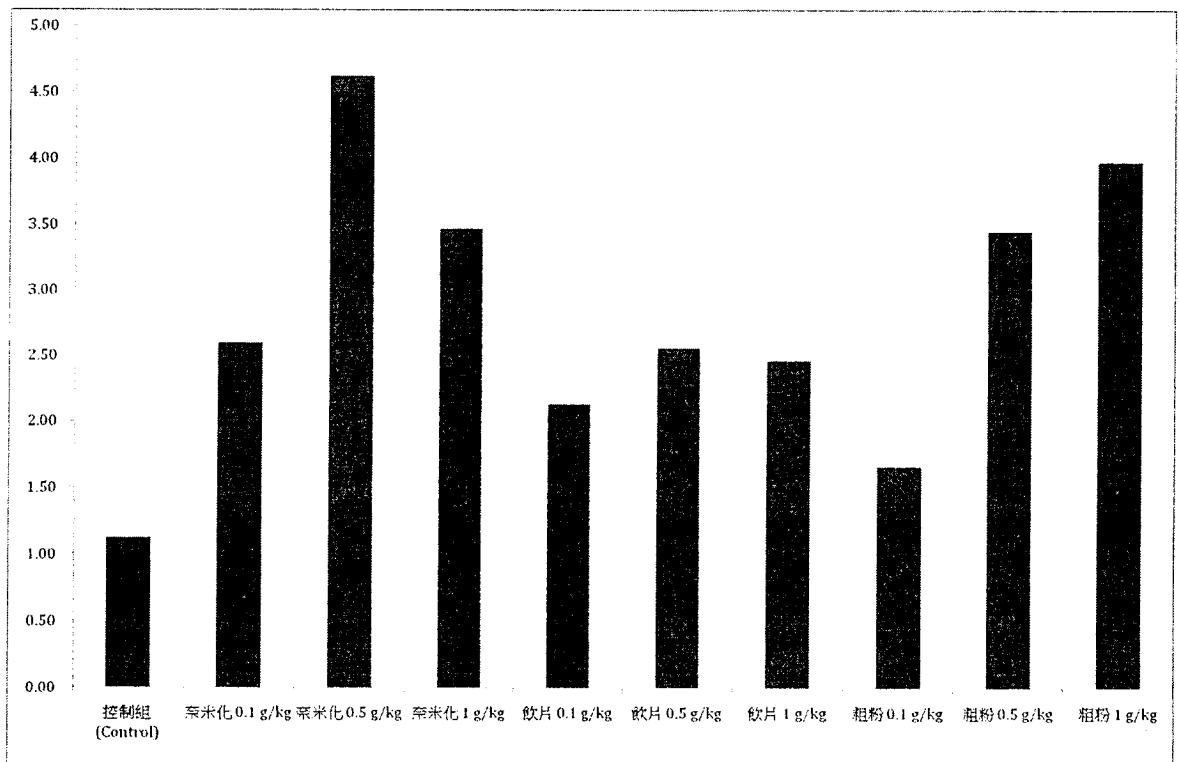


圖 31 小柴胡湯奈米製劑、飲片與粗粉對小鼠自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性之影響

表 35 BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 CD3 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD3 (%)
0.5 % CMC		26.17 ± 1.26
+ 奈米粉	0.1	27.89 ± 0.80
	0.5	25.97 ± 1.43
	1	26.54 ± 2.01
+ 飲片	0.1	35.49 ± 2.05
	0.5	25.71 ± 2.00
	1	20.09 ± 0.77
+ 粗粉	0.1	28.93 ± 3.17
	0.5	33.69 ± 2.70
	1	31.23 ± 1.66

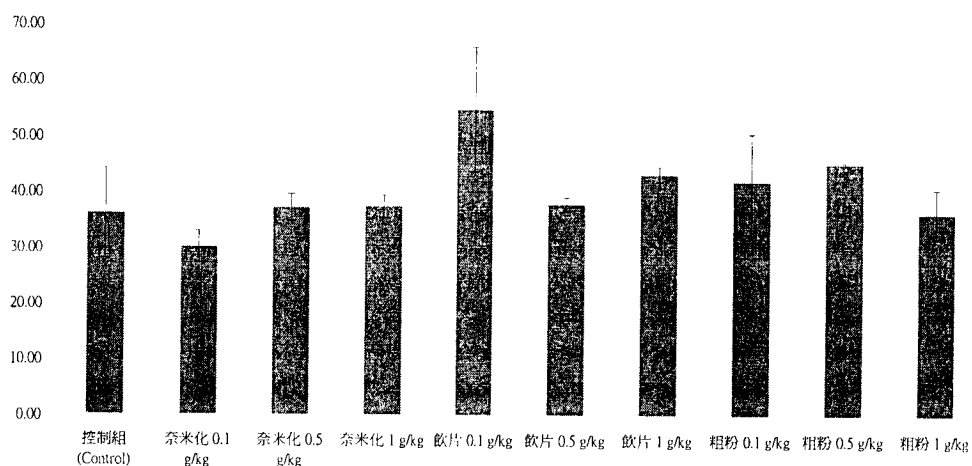


圖 32 小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血 T 細胞(CD3+)之影響

表 36 BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 CD19 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD19 (%)
0.5 % CMC		24.09 ± 2.40
+ 奈米粉	0.1	35.16 ± 1.44
	0.5	32.91 ± 3.29
	1	37.13 ± 1.75
+ 飲片	0.1	27.55 ± 1.49
	0.5	32.49 ± 2.43
	1	29.37 ± 1.00
+ 粗粉	0.1	28.68 ± 8.52
	0.5	22.31 ± 0.92
	1	19.03 ± 1.86

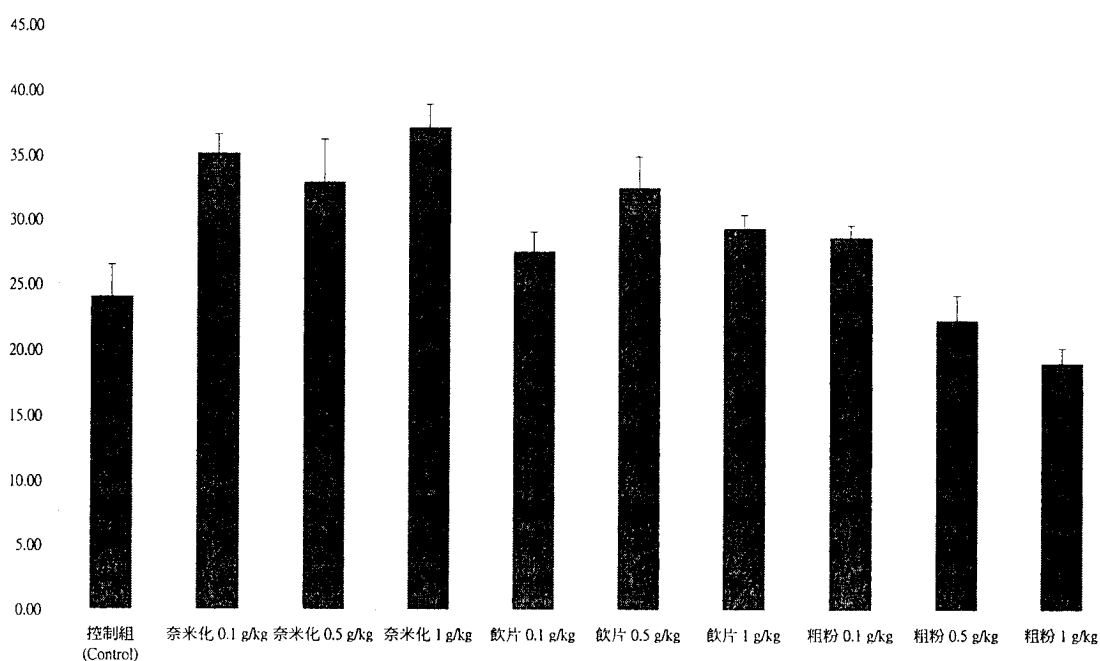


圖 33 小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血 B 細胞(CD 19+)之影響

表 37 BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 CD11 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD19 (%)
0.5 % CMC		24.10 ± 3.21
+ 奈米粉	0.1	30.77 ± 4.39
	0.5	26.51 ± 0.89
	1	21.71 ± 2.01
+ 飲片	0.1	23.40 ± 0.67
	0.5	25.19 ± 0.90
	1	24.15 ± 2.87
+ 粗粉	0.1	24.04 ± 2.93
	0.5	23.35 ± 1.21
	1	36.23 ± 2.65

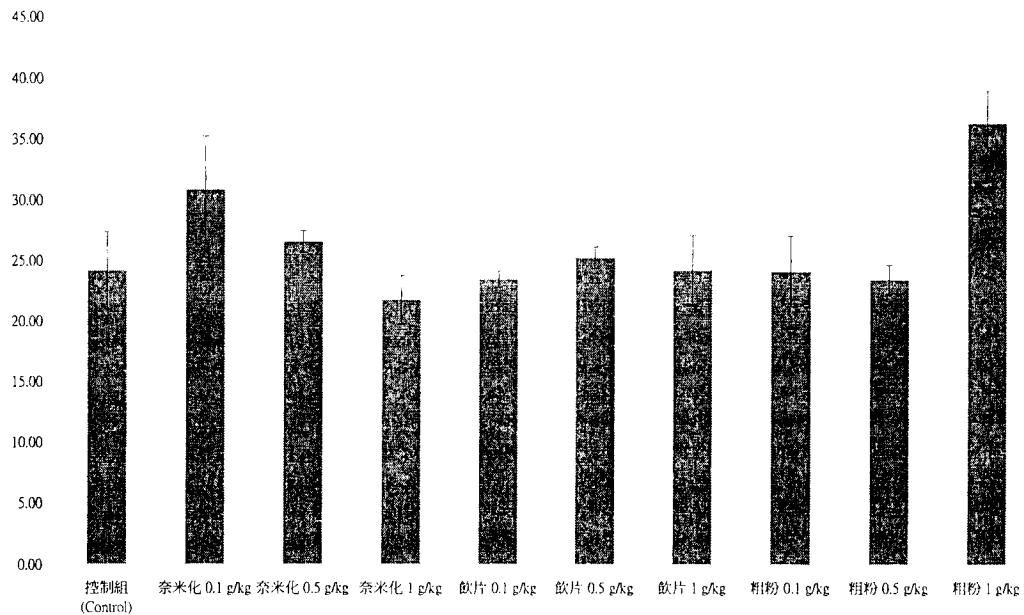


圖 34 小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血單核球細胞(CD 11b+)族群之影響

表 38 BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之 Mac-3 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	Mac-3 (%)		
0.5 % CMC		1.30	±	0.24
+ 奈米粉	0.5	1.37	±	0.06
	1	1.66	±	0.10
+ 飲片	0.5	0.82	±	0.25
	1	1.45	±	0.18
+ 粗粉	0.5	1.33	±	0.21
	1	1.83	±	0.23

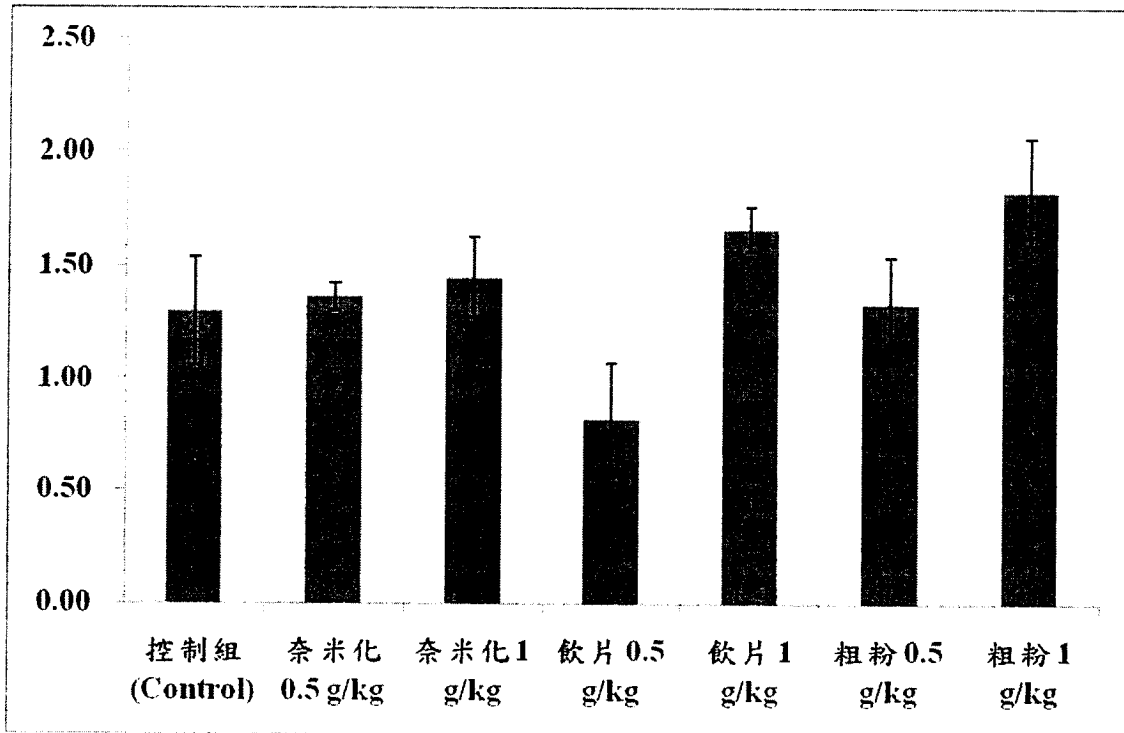


圖 35 小柴胡湯奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠
周邊血 Mac-3 之影響

表 39 BALB/c 小鼠經給予小柴胡湯製劑之周邊血巨噬細胞吞噬活性 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	吞噬活性 (%)
0.5 % CMC		1.25 ± 0.28
+ 奈米粉	0.1	0.29 ± 0.12
	0.5	0.28 ± 0.03
+ 飲片	1	0.22 ± 0.12
	0.1	0.33 ± 0.14
	0.5	0.54 ± 0.20
+ 粗粉	1	6.20 ± 1.87
	0.1	7.71 ± 0.54
	0.5	0.23 ± 0.14
	1	1.33 ± 1.27

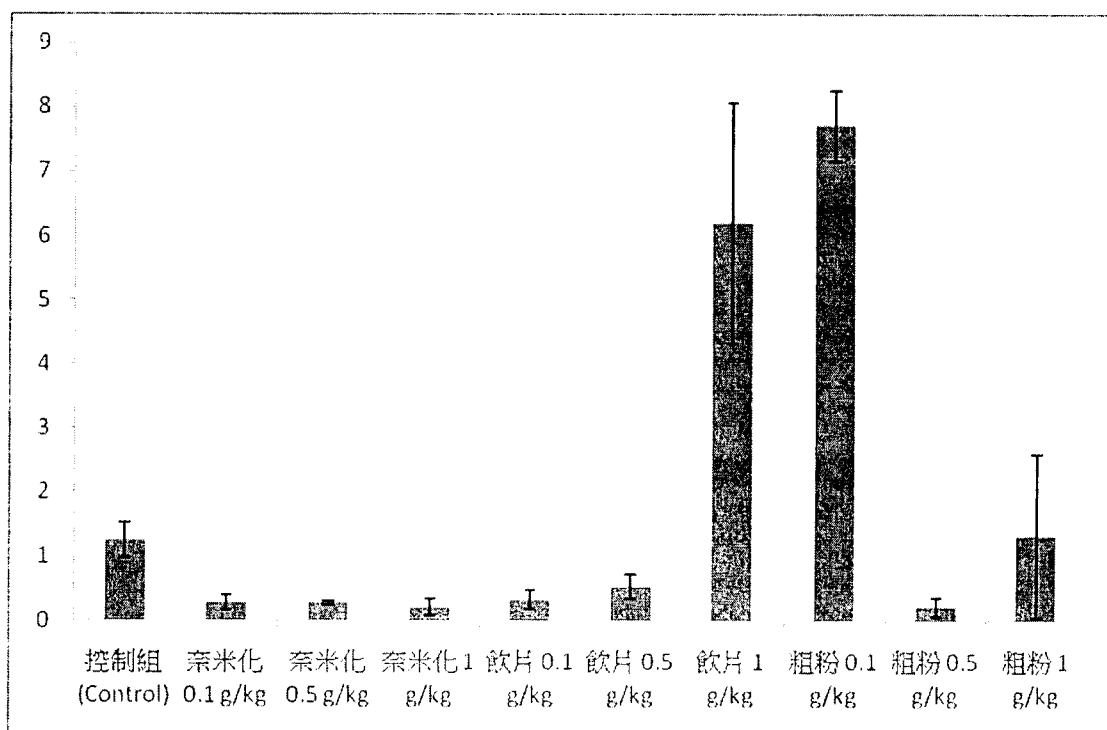


圖 36 小柴胡湯奈米製劑、小柴胡湯粗粉及小柴胡湯飲片對 BALB/c 小鼠周邊血巨噬細胞吞噬活性之影響

表 40 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散水草物對小鼠體重變化的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight					
		Day 0	Day 6	Day 12	Day 18	Day 24	
Control	0.5 % CMC	28.67 ± 1.37	30.83 ± 0.93	29.58 ± 0.74	30.25 ± 1.08	30.67 ± 0.93	
+ 奈米粉	0.1	30.17 ± 1.25	29.25 ± 1.89	25.86 ± 2.55	25.36 ± 1.11	30.33 ± 1.66	
	0.33	25.83 ± 2.38	26.75 ± 1.17	27.00 ± 1.05	26.58 ± 1.39	26.92 ± 1.39	
	1	28.08 ± 1.56	29.50 ± 2.37	28.75 ± 1.92	28.10 ± 1.60	28.83 ± 2.29	
+ 粗粉	0.1	27.58 ± 1.48	27.00 ± 2.70	27.75 ± 1.33	27.00 ± 1.62	26.75 ± 3.27	
	0.33	28.00 ± 1.91	28.75 ± 1.97	27.92 ± 1.66	28.92 ± 2.04	28.42 ± 1.93	
	1	26.42 ± 1.64	27.42 ± 1.99	26.67 ± 2.07	27.92 ± 2.13	27.42 ± 1.72	
+ 飲片	0.1	27.00 ± 1.44	27.67 ± 1.72	26.92 ± 1.56	27.50 ± 1.26	27.08 ± 1.32	
	0.33	25.83 ± 2.09	26.25 ± 1.29	26.17 ± 0.82	25.83 ± 1.75	25.92 ± 1.69	
	1	25.83 ± 0.98	26.83 ± 2.58	26.58 ± 2.52	26.77 ± 2.90	26.33 ± 2.56	

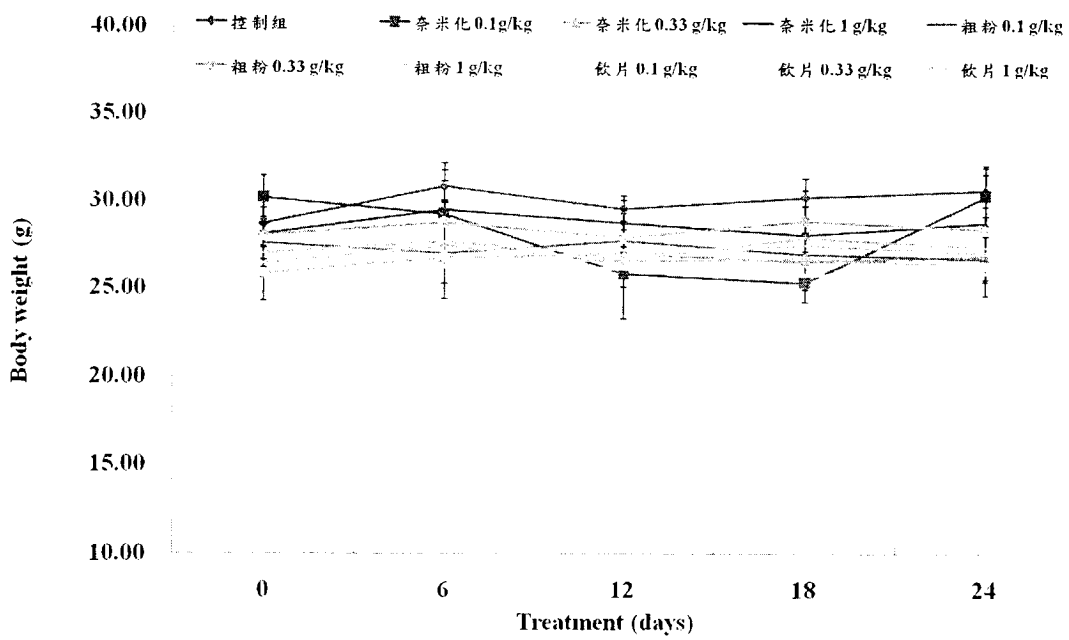


圖 37 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散水草物對小鼠體重變化的影響

表 41 BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 NK cell activity (%)

Treatment	Dose (g/kg)	NK cell activity (%)
0.5 % CMC		4.96
+ 奈米粉	0.1	8.74
	0.33	4.00
	1	6.27
+ 飲片	0.1	7.06
	0.33	6.24
	1	4.96
+ 粗粉	0.1	5.34
	0.33	7.15
	1	9.38

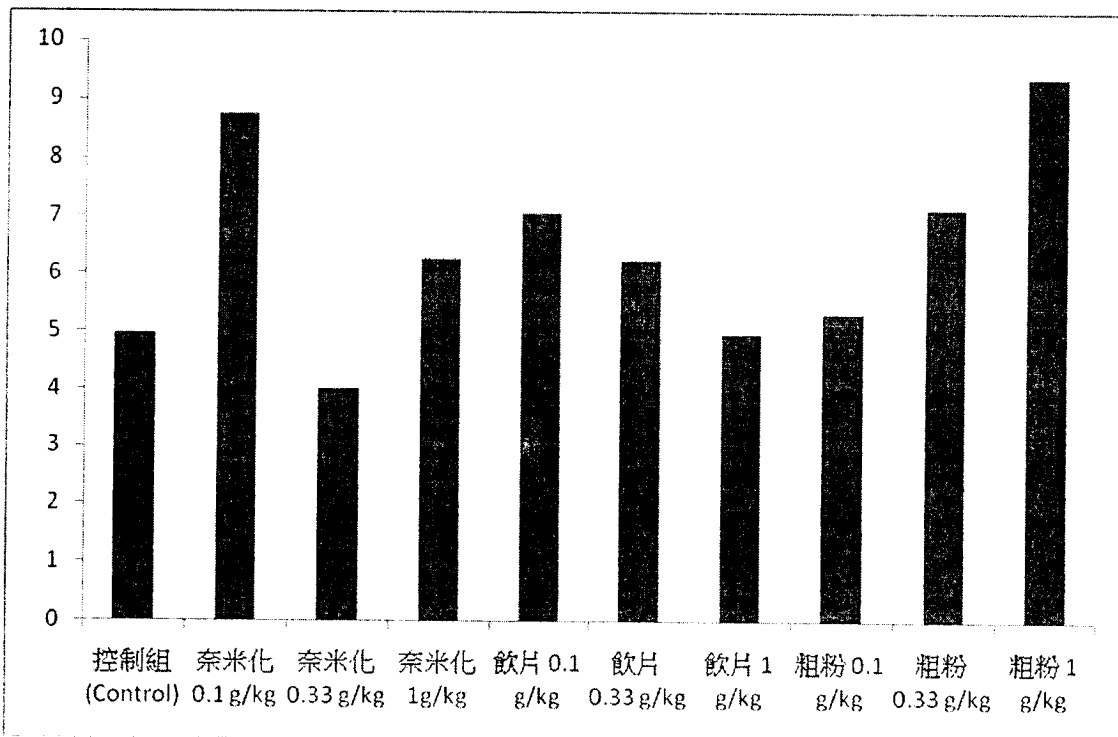


圖 38 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠自然殺手細胞 (NK) 的毒殺活性之影響

表 42 BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 CD 3 之影響(%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD 3 (%)
0.5 % CMC		26.17 ± 1.26
+ 奈米粉	0.1	27.89 ± 0.80
	0.33	25.97 ± 1.43
	1	26.54 ± 2.01
+ 飲片	0.1	35.49 ± 2.05
	0.33	25.71 ± 2.00
	1	20.09 ± 0.77
+ 粗粉	0.1	28.93 ± 3.17
	0.33	33.69 ± 2.70
	1	31.23 ± 1.66

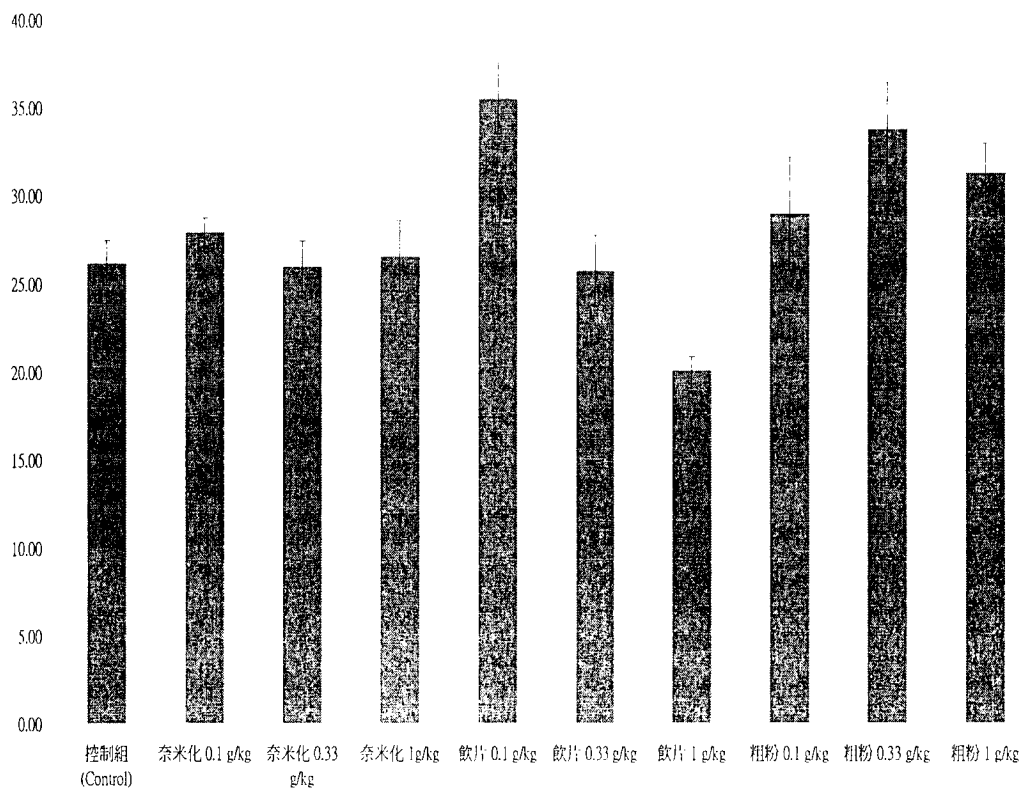


圖 39 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠
周邊血 T 細胞(CD 3+) 之影響

表 43 BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 CD 19 之影響(%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD 19 (%)
0.5 % CMC		31.63 ± 1.17
+ 奈米粉	0.1	32.46 ± 1.25
	0.33	21.75 ± 2.07
	1	27.95 ± 2.49
+ 飲片	0.1	27.70 ± 1.20
	0.33	36.48 ± 0.70
	1	27.72 ± 0.89
+ 粗粉	0.1	28.02 ± 0.94
	0.33	26.01 ± 1.75
	1	35.21 ± 5.04

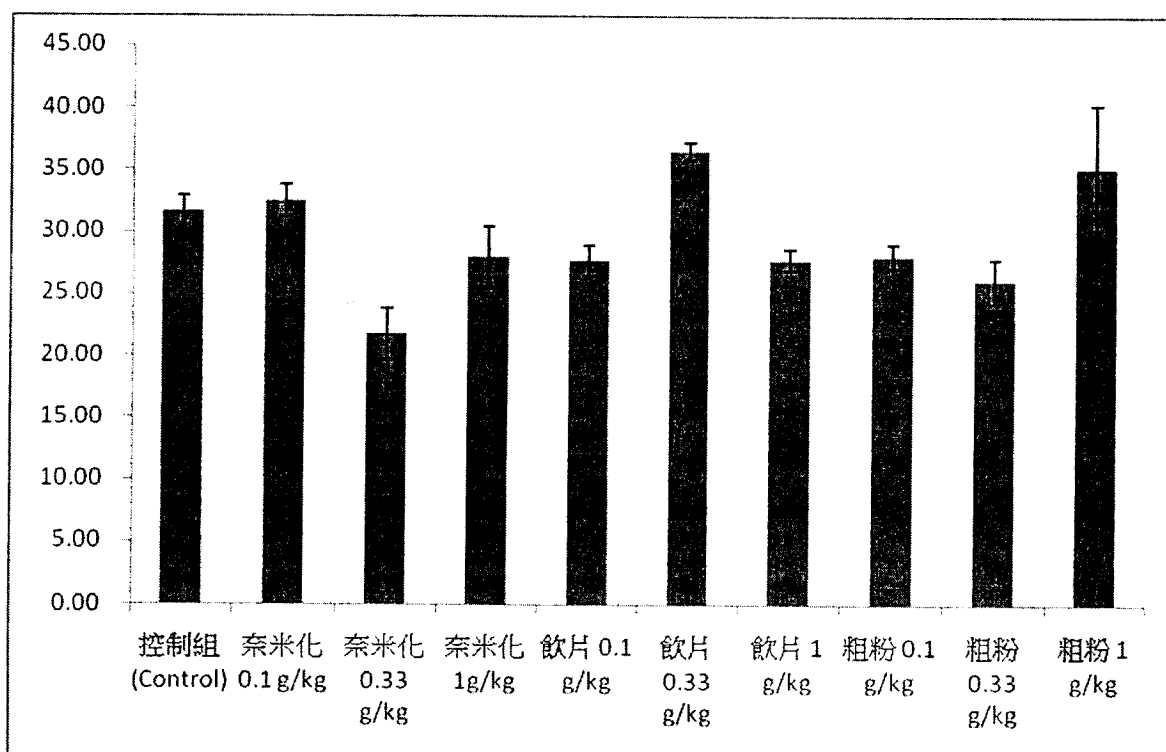


圖 40 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠
周邊血 B 細胞(CD 19+)之影響

表 44 BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 CD 11 之影響 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD 11 (%)
0.5 % CMC		39.06 ± 4.13
	0.1	23.04 ± 1.26
+ 奈米粉	0.33	40.90 ± 21.56
	1	36.01 ± 4.51
	0.1	32.27 ± 2.32
+ 飲片	0.33	45.64 ± 1.77
	1	51.76 ± 1.91
	0.1	33.75 ± 6.73
+ 粗粉	0.33	30.14 ± 2.11
	1	35.21 ± 5.04

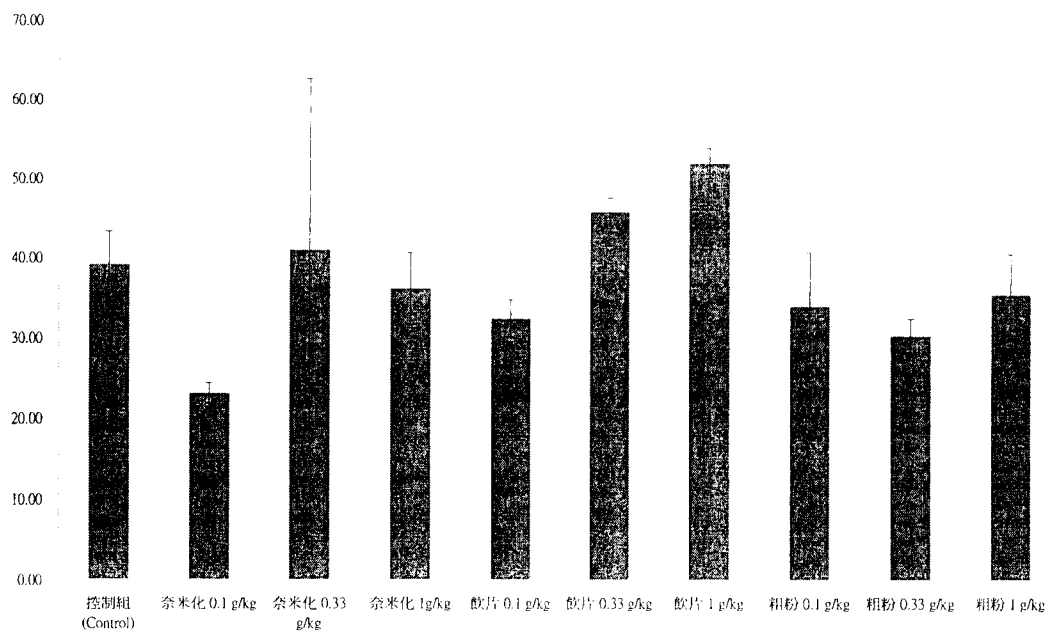


圖 41 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠
周邊血單核球細胞(CD 11b+)族群之影響

表 45 BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之 Mac-3 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	Mac-3 (%)
0.5 % CMC		9.80 ± 2.12
+ 奈米粉	0.1	13.74 ± 2.25
	0.33	10.82 ± 1.60
	1	9.75 ± 1.41
+ 飲片	0.1	7.48 ± 2.59
	0.33	8.69 ± 2.25
	1	11.27 ± 1.70
+ 粗粉	0.1	12.62 ± 5.02
	0.33	13.71 ± 2.02
	1	12.64 ± 3.32

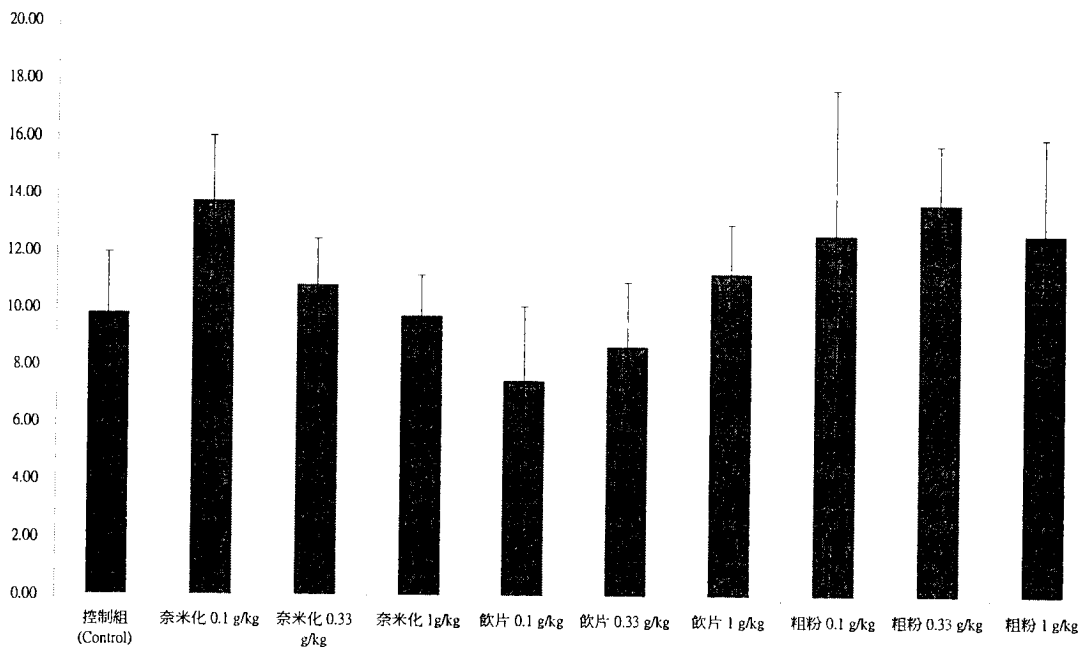


圖 42 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠
周邊血 Mac-3 之影響

表 46 BALB/c 小鼠經給予四逆散製劑之周邊血巨噬細胞吞噬活性 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	吞噬活性 (%)	
0.5 % CMC		17.14 ±	1.60
	0.1	17.65 ±	1.09
+ 奈米粉	0.33	31.51 ±	2.92
	1	22.89 ±	2.50
	0.1	10.20 ±	1.77
+ 飲片	0.33	23.98 ±	1.55
	1	29.00 ±	2.90
	0.1	24.02 ±	1.43
+ 粗粉	0.33	14.00 ±	1.47
	1	13.88 ±	1.56

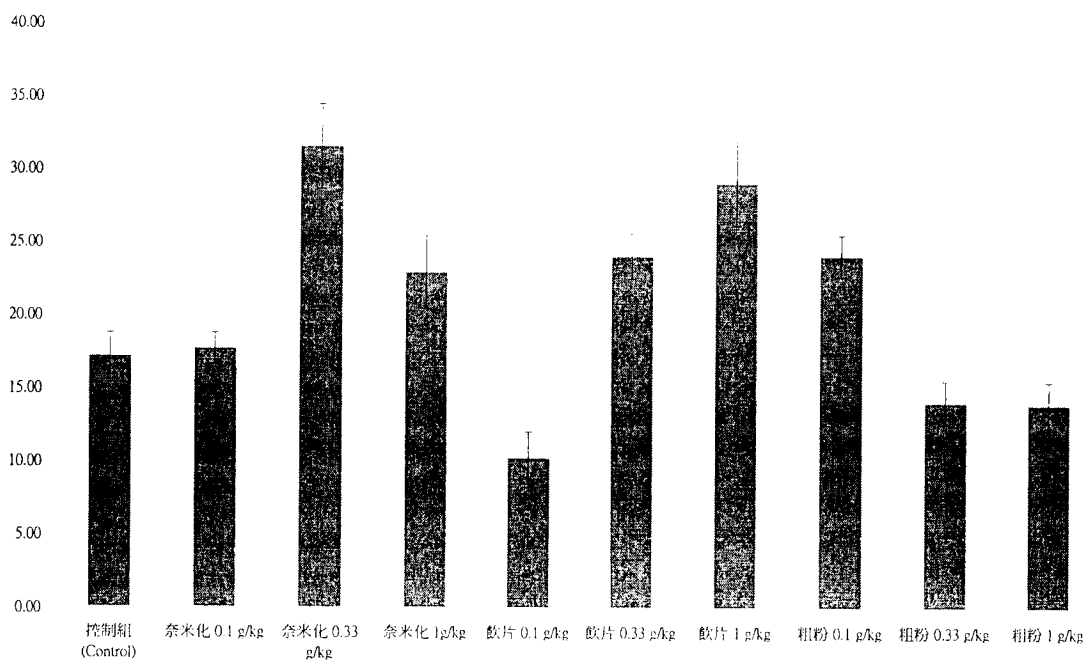


圖 43 四逆散奈米製劑、四逆散粗粉及四逆散飲片對 BALB/c 小鼠周邊血巨噬細胞吞噬活性之影響

表 47 四逆散噴霧造粒及澱粉造粒對小鼠體重變化的影響

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight										
		Day 0	Day 4	Day 8	Day 12	Day 16	Day 20	Day 24	Day 28			
Control		24.50 ± 1.55	25.17 ± 1.86	25.92 ± 1.69	26.33 ± 0.98	27.50 ± 1.00	28.00 ± 0.84	25.83 ± 2.94	27.58 ± 1.36			
0.063		26.25 ± 2.07	27.33 ± 1.60	26.42 ± 2.04	27.42 ± 2.35	27.50 ± 1.90	27.33 ± 1.97	27.17 ± 2.73	26.67 ± 2.50			
+噴霧造粒	0.19	27.50 ± 3.11	28.33 ± 3.16	28.83 ± 3.11	30.60 ± 2.63	28.58 ± 3.34	29.83 ± 3.66	29.33 ± 3.03	28.67 ± 2.96			
0.57		26.42 ± 1.77	27.92 ± 2.29	27.58 ± 1.63	27.92 ± 2.62	28.42 ± 2.84	28.08 ± 2.99	28.08 ± 2.60	27.50 ± 2.51			
0.106		27.75 ± 1.08	24.17 ± 3.25	28.92 ± 2.42	29.17 ± 2.36	28.58 ± 1.93	29.08 ± 2.44	28.08 ± 1.77	28.17 ± 2.27			
0.32		27.75 ± 1.84	29.00 ± 1.76	28.33 ± 1.47	28.92 ± 2.20	29.17 ± 1.83	29.50 ± 2.00	29.08 ± 2.04	28.08 ± 1.69			
0.97		26.25 ± 2.81	26.58 ± 2.85	26.50 ± 2.83	27.08 ± 2.63	27.25 ± 3.01	27.00 ± 2.77	27.33 ± 2.27	26.50 ± 2.37			

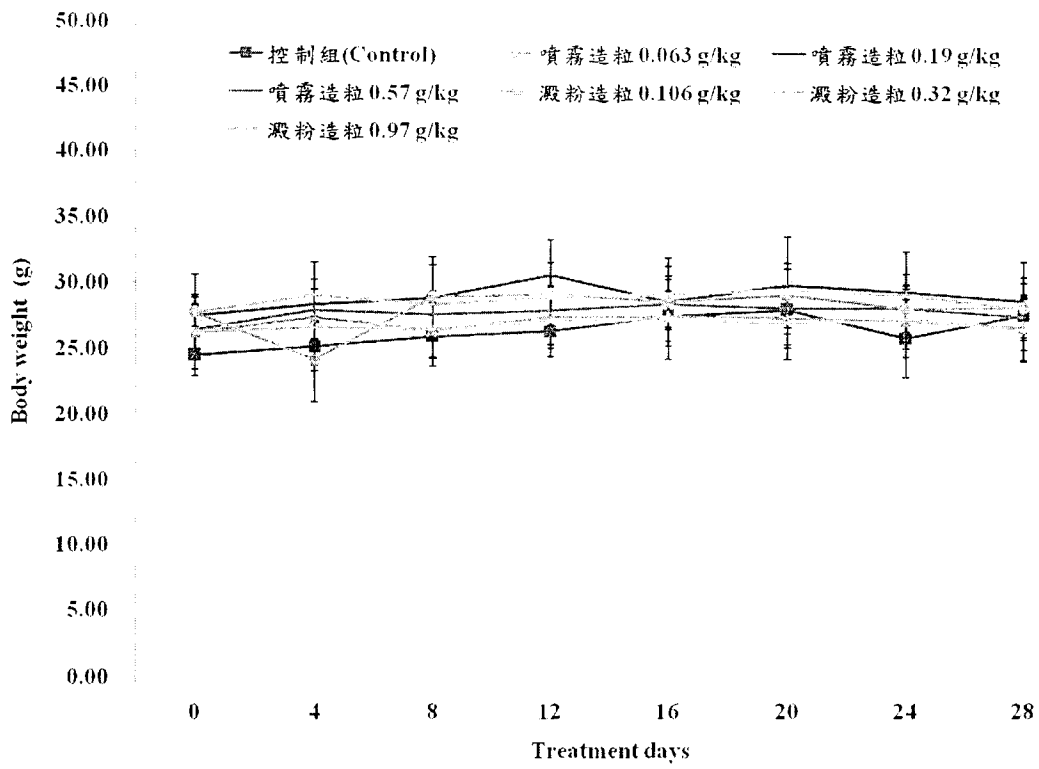


圖 44 四逆散噴霧造粒與澱粉造粒對小鼠體重變化的影響

表 48 BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之 CD3 之影響(%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD 3 (%)
0.5 % CMC		12.51 ± 0.70
	0.063	29.96 ± 6.74
+噴霧造粒	0.19	32.40 ± 5.14
	0.57	19.44 ± 3.89
	0.106	24.09 ± 4.78
+澱粉造粒	0.32	30.63 ± 4.69
	0.97	40.33 ± 11.67

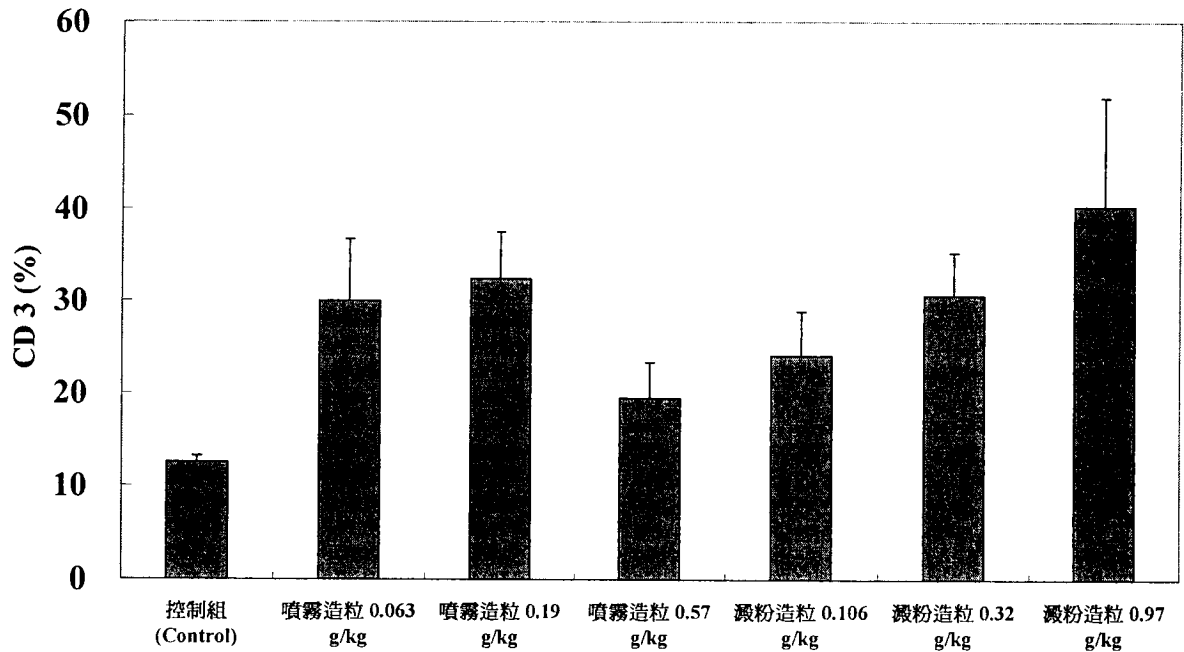


圖 45 四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血 T細胞(CD3+)之影響

表 49 BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之 CD 19 之影響(%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD 19 (%)
0.5 % CMC		40.02 ± 10.15
	0.063	37.17 ± 6.59
+噴霧造粒	0.19	42.61 ± 5.50
	0.57	30.59 ± 4.80
	0.106	41.14 ± 5.95
+澱粉造粒	0.32	29.79 ± 6.44
	0.97	22.30 ± 4.27

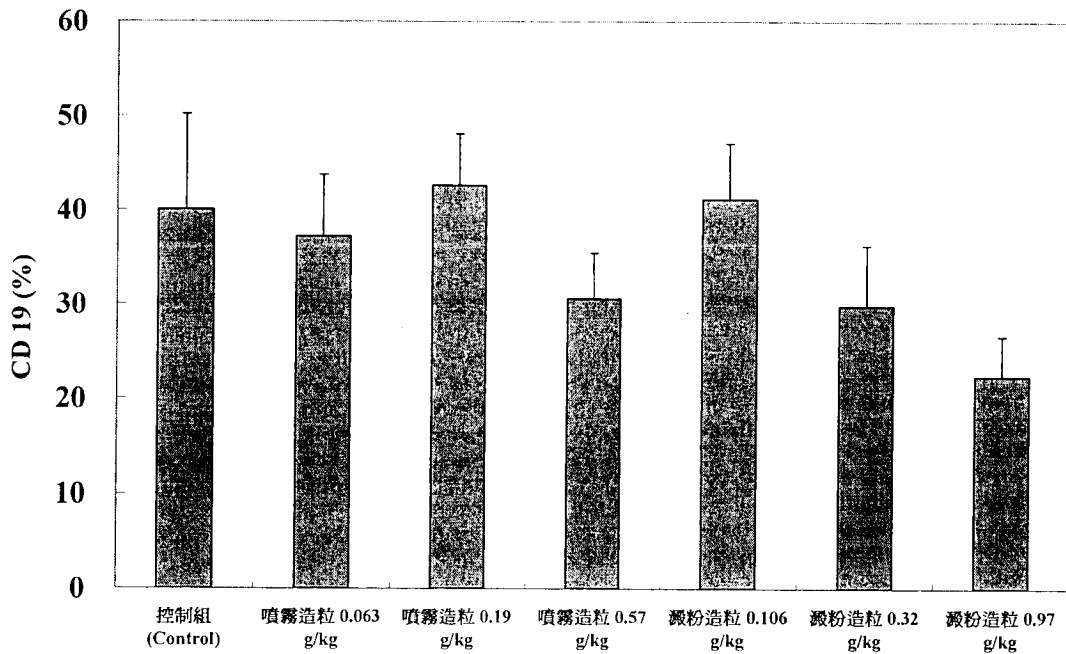


圖 46 四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血 T 細胞(CD 19+)之影響

表 50 BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之 CD 11 之影響(%)

Treatment	Dose (g/kg)	CD 11 (%)
0.5 % CMC		38.42 ± 15.42
+噴霧造粒	0.063	38.66 ± 8.30
	0.19	32.2 ± 3.92
	0.57	36.47 ± 2.64
+澱粉造粒	0.106	24.51 ± 4.92
	0.32	43.15 ± 5.07
	0.97	18.87 ± 3.92

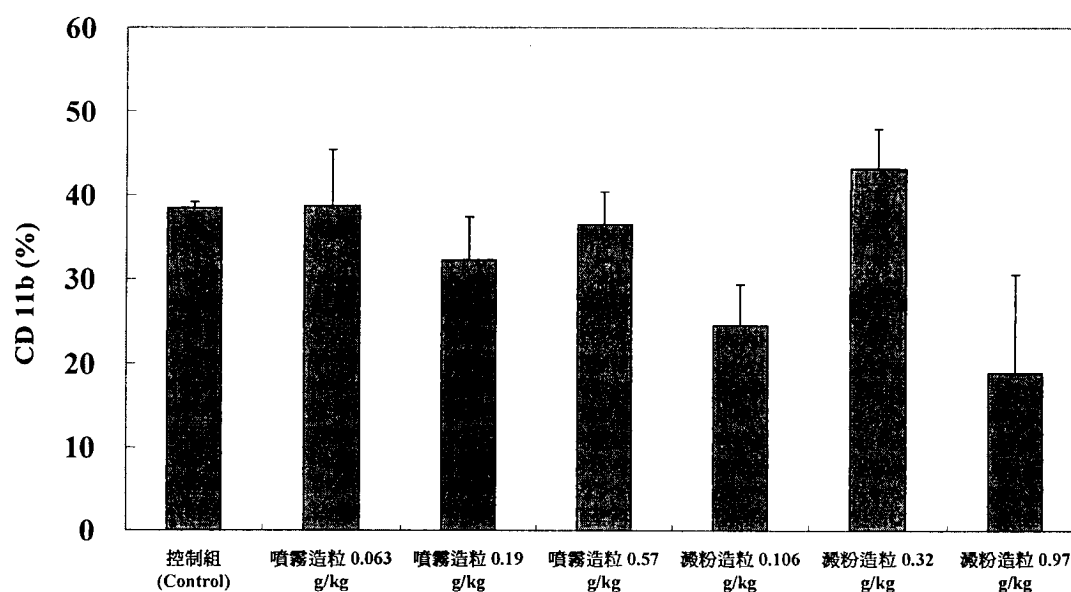


圖 47 四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血 (CD 11b+) 族群之影響

表 51 BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之 Mac-3 之影響(%)

Treatment	Dose (g/kg)	Mac-3 (%)
0.5 % CMC		2.96 ± 1.41
	0.063	3.08 ± 0.64
+噴霧造粒	0.19	4.75 ± 0.99
	0.57	2.52 ± 1.27
	0.106	4.25 ± 0.52
+澱粉造粒	0.32	1.84 ± 0.89
	0.97	2.41 ± 0.99

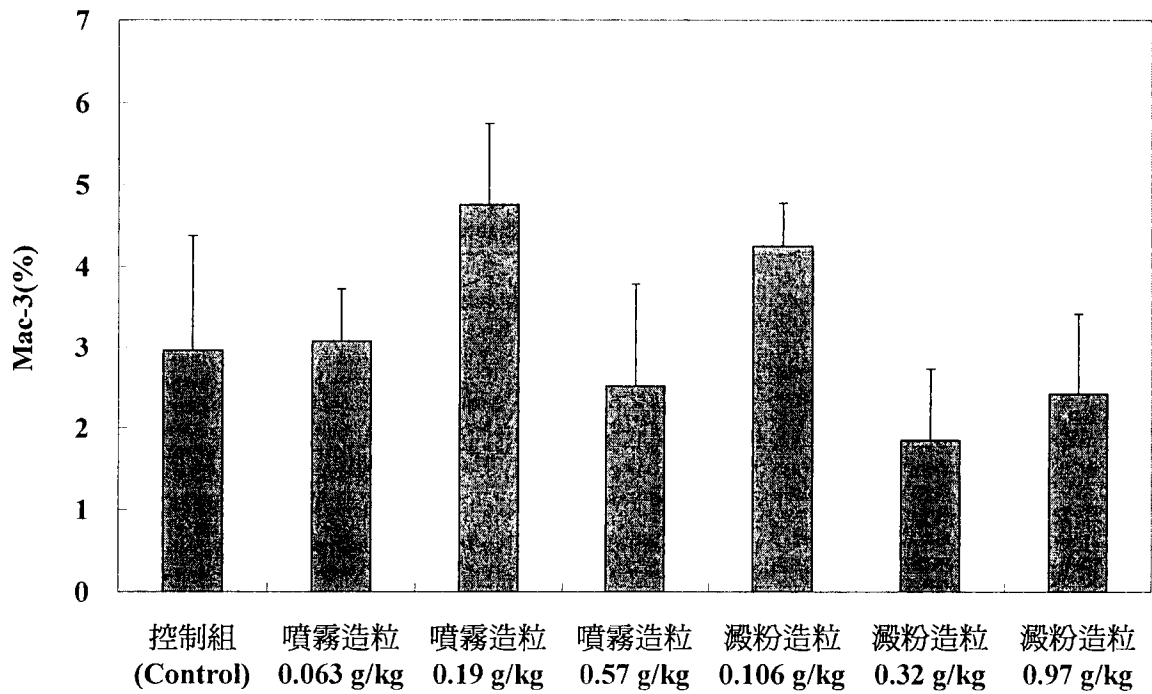


圖 48 四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對BALB/c 小鼠之周邊血之Mac-3 之影響

表 52 BALB/c 小鼠經給予四逆散濃縮粉末與顆粒製劑之周邊血巨噬細胞吞嚥活性 (%)

Treatment	Dose (g/kg)	吞嚥活性 (%)
0.5 % CMC		11.13 ± 1.78
	0.063	12.41 ± 1.73
+噴霧造粒	0.19	15.94 ± 5.08
	0.57	17.20 ± 2.64
	0.106	0.43 ± 0.05
+澱粉造粒	0.32	7.46 ± 2.93
	0.97	12.28 ± 1.99

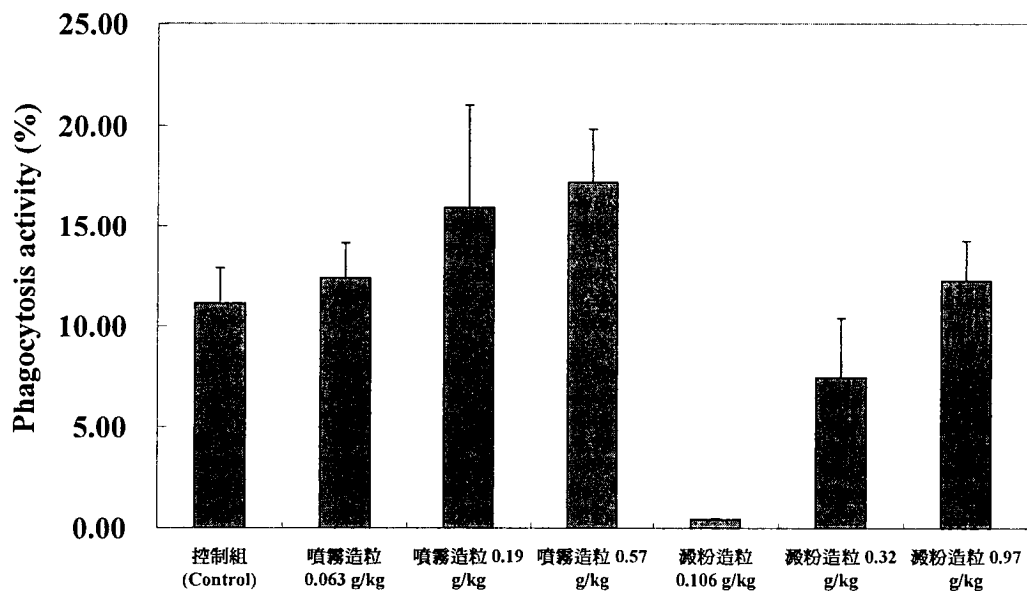


圖 49 四逆散濃縮粉末與顆粒製劑對 BALB/c 小鼠之周邊血巨噬細胞吞嚥活性 (%)

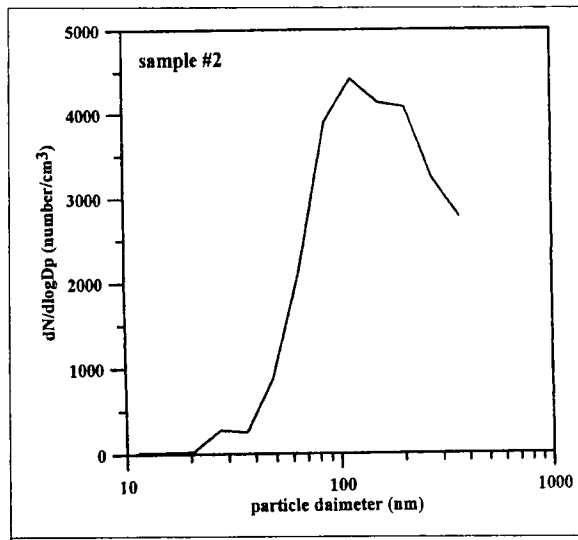


圖 50 小柴胡湯奈米粉粒徑分佈圖

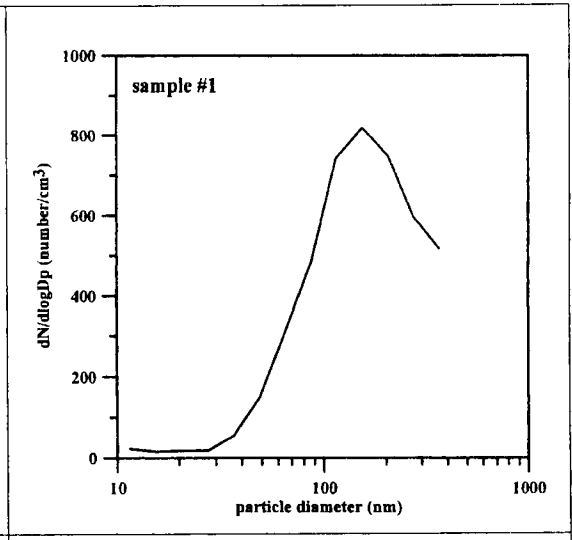


圖 51 四逆散奈米粉粒徑分佈圖

捌、附錄-諮詢會議紀錄

本研究邀請產官學研專家學者擔任諮詢委員，名單如附表一。於執行期間，共召開三次諮詢會議，分別於97年2月1日、8月6日、12月10日假中國醫藥大學，互助大樓11樓都築中心會議室，舉行『中藥方劑奈米化技術開發及安全性研究』諮詢會議。會前先以電話邀約，確定時間後一週前由校方正式發函通知諮詢委員蒞臨指導。

附表一 諮詢委員暨計畫人員出席名單

姓名	職稱	服務單位	專長
陳崇哲	組長	行政院衛生署中醫藥委員會 研發組	97.2.1 (97.7 屆齡退休)
康翠秀	組長	行政院衛生署中醫藥委員會 研發組	97.8.1 以後
劉靜江	技士	行政院衛生署中醫藥委員會 研發組	
戴明鳳	教授	清華大學物理系	磁性奈米製備
徐善慧	教授	中興大學化工系	生醫奈米
廖俊旺	教授	中興大學獸醫系	組織病理切片
蔡宜壽	教授/主任	逢甲大學奈米科技中心	奈米製程開發
林冬霧	董事長	臺茂奈米生技公司	奈米製程
王聰均	廠長	臺茂奈米生技公司	奈米製程
李英雄	研發長	中國醫藥大學研發處	奈米醫學
張永勳	教授	中國醫藥大學中藥研究所	中藥研發
吳介信	教授/主任	中國醫藥大學藥學系	中藥藥理
郭昭麟	主任	中國醫藥大學中藥資源學系	中藥鑑定

林宥欣	助理教授	中國醫藥大學生物科技學系	奈米藥物，藥物載體研發
張淑貞	副教授	中國醫藥大學藥學系	中藥分析、品管整合計畫及子計畫一主持人
林文川	教授	中國醫藥大學藥學系	藥理學子計畫二主持人
鍾景光	教授/主任	中國醫藥大學生物科技學系	細胞測試子計畫三主持人
王國禎	教授/所長	中興大學生醫工程所	奈米製程開發子計畫四主持人
劉鳳樟	博士生	中國醫藥大學藥學系研究所 博士生	協助本計畫之進行
張竣傑	大學部工讀生	大學部工讀生	協助會議之會場佈置、照相、錄音、打字等

一、97年2月1日諮詢會議摘錄

1. 奈米之定義在前幾年因新觀念，採嚴格定義在粒徑 100 nm 以下，任何一維能在 100 nm 以下均是奈米粒子。但這幾年在國科會奈米國家型研究計畫及教育部之耐米科技人才培訓推動下，民眾已漸了解奈米，且從研究顯示生體內能利用之最佳粒徑為 80-200 nm，因此已不再嚴格堅持非在 100 nm 以下才算奈米，只要能利用任何方法由大研磨至小(Top down)或由小(原子、分子)堆積至大(bottom up)均符合奈米粒徑範圍，以現今技術能完成之範圍去觀察其物性、化性變化。
2. 中藥奈米化之技術可採以乾式與濕式研磨，以中興大學、逢甲大學的經驗，濕式研磨後因有效成分溶解於介質中不易分析定量，建議採用乾式研磨較佳，台茂奈米生技公司以多年研磨大理石之經驗，技術可達 20 nm，但中藥複方因藥材質地、成分不同，採用新設計的設備-低溫 35°C 下以分子對撞模式研磨，不會因研磨時溫度升高破壞成分，粒徑可以達到 200 nm 以下，且已成功幫多家研究機構進行製程加工，奈米化之技術不成問題。
3. 中藥材須先經鑑定確認，進行中藥奈米化過程是否導致有效成分

- 發生變化、腸胃道能否吸收、安全性如何? 均需仔細加以觀察、驗證。如果可以接上螢光色素，即可利用雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡(Confocal Microscope Detection System)觀察細胞動力學。
- 4.粒徑宜依照大小範圍分級，但需配合特殊粒徑分級儀器才能進行，如果有此設備幫忙，可以比較不同粒徑範圍之各種性質異同。
 - 5.中藥奈米化已非原來之中藥組成，安全性、均一性、效能需要重新評估。
 - 6.奈米粉塵對研究人員及環境之影響宜加以評估。

二、97年8月6日諮詢會議紀錄摘錄

第二次諮詢會議因接連兩次颱風來襲一再延期，最後才於8月6日如期舉行諮詢會議，由總計畫及各子計畫依序報告結果，再由委員提問及建議，會議摘錄如下：

- 1.由小柴胡湯之研究結果顯示奈米化後細胞壁破裂，指標成分溶出增加，含量提高，且與傳統水煎劑明顯不同，未來如在臨床應用，劑量應重新訂定。
- 2.除了指標成分增加外，其他成分是否仍有可以找到合適的觀察方法證明，例如例子之帶電性質、溶解度、團聚性、...?如於製程中實施二次造粒可以緩和奈米粒子團聚，或充填氮氣密封在低溫下冷凍也可以避免。
- 3.動物實驗結果顯示奈米粉、粗粉、水煎劑無急慢性毒性及基因毒性，但動物實驗及免疫調節試驗結果仍有差異，且需更多經費支持進一步探討其機制加以驗證、
- 4.安全性方面長期服用只要控制好劑量，不會造成毒性作用，保肝效果以奈米粉成效較佳，未來應用可以減少劑量節省藥源，值得推廣。但與傳統水煎煮比較已是實質上不同，安全起見需更經過嚴謹評估才能使用。
- 5.奈米化後之產品如何變成商品上市避免團聚現象?台茂公司已有設備及技術可在製程末端立即壓成錠劑，不須添加任何賦形劑，產品以錠劑裝罐上市，節省製程費用-不需溶劑及煎煮、濃縮設備、及省下前處理之人力，站在節能省碳發展綠色產業觀點值得推廣。

三、97年12月10日諮詢會議紀錄摘錄

第三次諮詢會議就全部計畫完成項目進行討論，包括小柴胡湯、四逆散之奈米粉、粗粉、飲片水煎劑及 GMP 廠商品-四逆散顆粒(添加澱粉賦形劑)、濃縮粉末(噴霧造粒不添加澱粉賦形劑)。由總計畫及各子計畫依序報告結果，再由委員提問及建議，會議摘錄如下：

- 1.小柴胡湯之奈米粉、粗粉、飲片水煎劑及四逆散之奈米粉、粗粉、飲片水煎劑、顆粒、濃縮粉末等之各項結果不同，顯示這些劑型已是實質上不同，雖然極力調整以相同藥材重量之劑量進行實驗，結果顯示無法在不同製程上進行比較。背景較相近為奈米粉、粗粉免強可以比較因粒徑造成之結果差異。
- 2.因粒徑大小不同之實驗結果，小柴胡湯相關性較高，奈米粉指標呈分較高，保肝效果及免疫調節效果較顯著。四逆散之奈米粉、粗粉、飲片水煎劑、顆粒、濃縮粉末等，因粒徑大小不同之之實驗結果較無一致性，除指標成分仍以奈米粉較高外，其餘互有變化，此種結果更加強奈米化需要依藥材特性及其差異性分別研究，無法由少數研究案例推定結論，推測並非所有藥材均適合奈米化製程。
- 3.中藥之品管已可以掌握，來源管控已不是問題，奈米中藥產品應視為新劑型，再進行人體之生體可用率及代謝等動力學研究後，另訂定劑量及使用方式，對病人或消費者保障，政府相關規範宜參考各國之現況，召開專家學者會議，早日制定規範，讓研究人員及消費者有雖遵循。

『中藥方劑奈米化技術開發及安全性研究』諮詢會議之相片見附圖一。

附圖一 『中藥方劑奈米化技術開發及安全性研究』諮詢會議之相片

97.2.1 諮詢會議現場



計畫主持人張淑貞報告研究規劃



諮詢委員聆聽報告



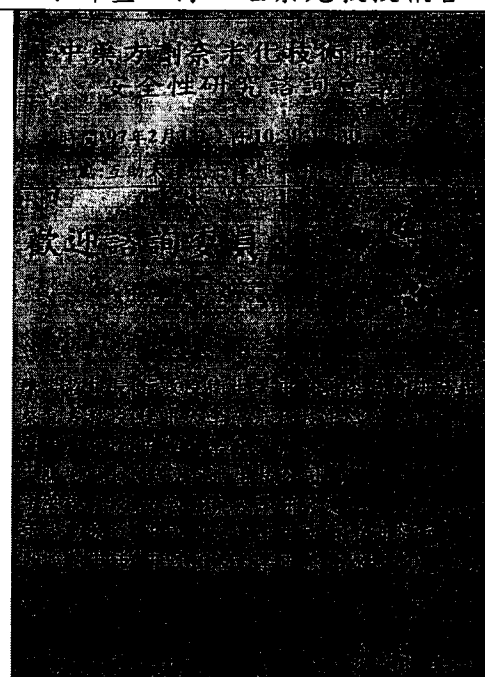
子計畫主持人林文川教授報告



子計畫主持人鍾景光教授報告



諮詢委員討論及建議



歡迎諮詢委員蒞臨指導之海報

97.8.6 諮詢會議現場

	
<p>諮詢委員徐善慧教授提供建議</p>	<p>子計畫主持人林文川教授報告</p>
	
<p>子計畫主持人鍾景光教授報告</p>	<p>諮詢委員蔡宜壽教授提供建議</p>
	
<p>台茂公司林東霧說明製程</p>	
	
<p>劉靜江技士提出建議</p>	<p>歡迎諮詢委員蒞臨指導之海報</p>

97.12.10 諮詢會議現場



諮詢委員會前閱讀資料



諮詢委員討論中



諮詢委員與計畫主持人互相交換意見



諮詢委員提供建議



子計畫主持人王國禎教授發言