計畫編號：CCMP93-RD-044

PG9303-1228 (40頁)

行政院衛生署 93 年度科技研究發展計畫

中西藥交互作用體外預測模式之建構與評量
Construction and Evaluation of In Vitro Model for Prediction of Herb-Drug Interactions

研 究 報 告

計畫委託機關：臺北醫學大學藥學系

計畫主持人：許明照

研究人員：陳怜均、陳峙嘉、林群豐

執行期間：93 年 03 月 24 日至 93 年 12 月 31 日

＊＊ 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 ＊＊

計畫編號：CCMP93-RD-044 **附件 1-2**

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署 93 年度科技研究發展計畫

中西藥交互作用體外預測模式之建構與評量
Construction and Evaluation of In Vitro Model for Prediction of Herb-Drug Interactions

研 究 報 告

計畫委託機關：臺北醫學大學藥學系

計畫主持人：許明照

研究人員：陳怜均、陳峙嘉、林群豐

執行期間：93 年 03 月 24 日至 93 年 12 月 31 日

行政院衛生署中醫藥委員會 93 年度

研究計畫成果報告

中西藥交互作用體外預測模式之建構與評量

Construction and Evaluation of In Vitro Model for Prediction of Herb-Drug Interactions

執 行 機 構：臺北醫學大學藥學系

計 畫 主 持 人：許明照

研 究 人 員：陳怜均、陳峙嘉、林群豐

執 行 期 限：93 年 03 月 24 日至 93 年 12 月 31 日

＊＊ 本研究報告僅供參考，不代表本會意見 ＊＊

目錄

目次 頁數

摘要 6

ABSTRACT 7

壹、前言 9

貳、材料與方法 19

參、結果 21

肆、討論 24

伍、結論與建議 24

陸、參考文獻 25

柒、圖、表 27

圖 1. 白芷水煎劑之層析圖 27

圖 2. 羌活水煎劑之層析圖 27

圖 3. 當歸水煎劑之層析圖 28

圖 4. 防風水煎劑之層析圖 28

圖 5. 獨活水煎劑之層析圖 29

圖 6. 羌活 40%酒精浸泡之層析圖 29

圖 7. 白芷 40%酒精浸泡之層析圖 30

圖 8. 當歸 40%酒精浸泡之層析圖 30

圖 9. 防風 40%酒精浸泡之層析圖 31

圖 10. 獨活 40%酒精浸泡之層析圖 31

圖 11. NIFEDIPINE 與其代謝物 OXIDIZED NIFEDIPINE 之高效液相層析之層析圖。A 為空白之層析圖；B 為微粒體加入 NIFEDIPINE 之層析圖；C 經由微粒體代謝後之層析圖 32

圖 12. 生藥及方劑其酵素抑制之酵素活性殘存百分比.....33

圖 13. 白芷粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比.....34

圖 14. 羌活粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比.....34

圖 15. 當歸粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比.....35

圖 16. 防風粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比.....35

圖 17. 獨活粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比.....36

圖 18. 白芷之層析圖與其成份之結構圖.....37

表 1. 複方方劑之組成.....38

表 2. 生藥水煎劑之層析圖譜比較表.....39

表 3. 生藥 40%酒精浸泡液之層析圖譜比較表.....39

表 4. 生藥其各分離層之酵素抑制比較表.....39

表 5. 生藥及複方酵素(CYP3A4)活性抑制百分比.....40

中西藥交互作用體外預測模式之建構與評量

許明照

台北醫學大學

摘要

為了研究中草藥與西藥可能發生的藥物交互作用，我們選擇了數種繖形科之中草藥及其相關並常被使用之複方方劑以兩種萃取方式：熱水萃取與 40%乙醇浸漬來測試體外試驗中繖形科之中草藥及其相關複方方劑之抽出物對於人體代謝藥物的主要酵素 cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) 之抑制作用。我們以模式藥物 nifedipine 被酵素代謝後之代謝物的量來測定白芷、羌活、當歸、防風、獨活之水萃取液及乙醇水溶液浸漬液對於肝臟酵素抑制作用的程度。從實驗中的結果，可以確定每一個樣品其抑制強弱主要是由其疏水性部分所含的物質決定。在所有檢品中，又以羌活的乙醇水溶液浸漬液推測因含有多量 furanocoumarins 類化合物而具有最顯著的酵素 cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) 之抑制作用。此外，有些處方製劑的疏水性分離液較親水性分離液有較強之酵素抑制作用,因此可以推斷出中草藥處方製劑所含之 furanocoumarins 類化合物造成酵素之抑制作用。所以，這些結果顯示出對於進一步研究中草藥與西藥是否發生藥物交互作用是非常必須的。

關鍵詞：中西藥交互作用，酵素抑制作用，肝臟代謝酵素

Construction and Evaluation of In Vitro Model for Prediction of Herb-Drug Interactions

Ming-Thau Sheu

Taipei Medical University

ABSTRACT

To investigate the possible drug interaction with Chinese herbal medicine, hot water decoctions or 40% ethanol infusions of several *Umbelliferous* and their prescriptions were examined in vitro for their abilities to inhibit rat cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). Addition of each decoction or infusion from *Bai Zhi (Angelica dahurica radrix), Qiang Huo (Notopterygium incisum root), Danggui (Chinese Agelica radrix), Fang Feng (Saposhnikovia divaricata radrix), Duhuo (Angelica japonica)* Resulted in various degrees of human CYP3A4 inhibition as determined by microsomal oxidized nifedipine. The inhibitory potency was consistent with the abundance of the hydrophobic components for each sample. Experiments on the infusion of a *Qiang Huo* showed the major role of furanocoumarins on rat CYP3A4 inhibition. Some formulated prescriptions, however, showed intense inhibition with their hydrophobic fractions rather than with their hydrophilic fractions, suggesting that components furanocoumarins in herbal prescriptions may cause CYP3A4 inhibition. These results

indicated the necessity of intensive investigations on the possible drug interaction with herbal medicines.

Keywords：Herbal medicines, Cytochrome 3A4, Enzymes inhibition

壹、前言

至今與中草藥品有關的傷害性事件中最嚴重的例子之一就是病人使用含馬兜鈴酸之中藥 *Aritolochia fangchi* 後引發腎衰竭與尿道腫瘤 (1-2)，由於製造上的錯誤，此中藥取代 *Stephania tetrandra* 被用於製造減重藥丸，使用此種藥丸後有 40 多人引發漸近性腎衰竭，同時其中幾乎有 50% 被發現有尿道腫瘤。此馬兜鈴酸事件對於自古認為中藥是溫和安全的觀念是一個相當大的打擊， 而且也越來越多的證據說明中草藥對於人體的生理因素有很大的影響性，尤其對於在口服吸收機制與代謝排除過程方面的影響，而由此導致中草藥與化學藥物併服時發生交互作用，互相改變兩者各自的臨床療效，甚至可能發生因吸收過量產生毒性而致人於死。因此中草藥的安全性已不容忽視了，也不能以一句我們已使用上千年的中草藥絕對安全而駝鳥式欺騙消費大眾，尤其是在國內社會民眾接觸中草藥的機會更多，而又化學藥物的使用也極頻繁，自然發生中草藥與化學藥物交互作用的機率相對提高，所以為確保國內民眾使用中草藥的安全性，主管單位有義務確認中草藥經由口服管道使用時可能對人體生理機能造成的影響性，並預防性的瞭解一般常用中草藥所調製而成的方劑與化學藥物可能產生的交互作用，以提醒醫師及民眾併服時可能導致的嚴重性。

在醫藥科學先進國家如美國，自 1994 年通過 Dietary Supplement Health and Education Act 後，中草藥類的飲食營養補充品就如雨後春筍般的大量提供給美國消費者使用，根據調查顯示 30-49% 的所有消費者在過去 12 個月內都曾使用

某種形式的飲食營養補充品，其中的 24% 規律的使用草藥製品 (3)。在 1997 年預估有一千五百萬成人使用處方藥的同時併用草藥製品，這包括三百萬是年齡高於 65 歲以上者。最近一些的調查指出高達 16%的處方藥使用者同時服用草藥類的營養補充品 (3)。由於這樣廣泛性的使用草藥類營養補充品，草藥與處方藥發生交互作用的危險性已經被認為是一個嚴重性漸增的醫療問題。也因為少於 40%的病人揭露自己正在使用草藥類營養補充品，而且許多醫師也未能清楚瞭解可能存在的草類與處方藥之交互作用，更確實的說明這醫療問題的嚴重性。Gold 等人於 2001 年整理出在癡呆症病人 (dementia) 發生中草藥與處方藥交互作用的文獻中清楚的指出貫葉連翹 (St. John's wort)、銀杏 (gingo biloba)、卡法椒 (Kava)、纈草 (valerian)、與人蔘 (ginseng) 等中草藥與傳統的癡呆症藥物治療存在著極大可能性的藥物交互作用，將會使用這些藥物的老年人置於發生不良反應的危險性當中 (4)。Aggarwal 等人也指出紫松果菊 (Echinacea)、大蒜 (garlic)、人蔘 (ginseng)、銀杏 (gingo)、麻黃 (ephedra)、與貫葉連翹 (St. John's wort) 等中草藥與一般使用在心臟血管病變藥物間存在著發生交互作用的可能性 (5)。Awang 等人進一步說明大蒜 (garlic)、銀杏 (gingo)、人蔘 (ginseng)、與貫葉連翹 (St. John's wort) 等中草藥可能具有類似、或降低、或增加這些用於心臟血管病變使用之藥物的藥理活性，所以這些藥物如具有狹窄的治療範圍，或是藥物是用在反應敏感性較高的族群如老年人、慢性病人、以及免疫低微病人時，這些中草藥所造成的交互作用在臨床上將會更顯得是重要問題 (6)。

Izzo 等人在回顧文獻中整理得到的結果顯示 (7)，貫葉連翹 (St. John's wort) 降

低 cyclosporin、amitriptyline、digoxin、indinavir、wafarin、phenprocoumon、與 theophylline 的血中濃度，而與口服避孕藥 (ethinylestradiol/desogestrel) 併服會導致經期間流血現象、與 loperamide 或 selective serotonin-reuptake inhibitors (sertaline、paroxetine、nefazodone) 類藥物併服導致妄想症或中度血清素型症候。銀杏與 wafarin 共服會影響出血現象，而與 thiazide 類利尿劑併服引起血壓增高，與 trazodone 合用則會導致昏迷等。人蔘 (*Panax ginseng*) 會降低酒精與 wafarin 的血中濃度，而假如與 phenelzine 共服會引發躁狂。併服大蒜 (*Allium sativum*) 後會改變 paracetamol 的藥動學參數，降低 wafarin 的血中濃度，而大蒜與 chlorpropamide 共服則會造成低血糖現象。卡法椒 (Kava, *Piper methylsticum*) 與胡椒 (*Piper nigrum L*) 同屬，當服用 levodopa 病人併用時會延長巴金森症狀的 "off" 時期，而與 alprazolam 併服時會引起半昏迷狀態。紫松果菊 (Echinacea, 包括 *Echinacea angustifolia*、*E. purpurea*、*E. pallida*) 與鋸葉櫚 (saw palmetto, *Serenoa repens*) 被發現與處方藥不具有有意義的交互作用現象。

Brazier 等人於最近針對 15 種治療分類與 11 種中草藥所配對成的 165 組中西藥交互作用進行文獻調查 (8)，結果發現共有 51 對 (31%) 的交互作用在文獻上有被討論，其中的 22 對 (43%) 的交互作用是由 randomized clinical trial、case-control srudies、cohort studies、case series、或 case studies 等研究所支持，其他則是在無臨床數據下由理論性解說來反應得到這些交互作用的可能性。這 15 種治療分類包括 Cardiovascular、Psychotherapeutics、Hormones、

Anti-invectives、Analgesics、Antiarthritics、Brochial therapy、Antispasmodics、Diuretics、Contraceptives、Cholesterol reducers、Diabetes、Neurologic disorder、Thyroid therapy、Dermatologicals，11 種草藥是銀杏、貫葉連翹、大蒜、小白菊(Feverfew)、纈草(Valerian)、卡法椒 (Kava)、南非勾藤 (Devil's claw)、紫松果菊 (Echinacea)、月見草油 (Evening primrose oil)、人蔘 (*Panax ginseng*)、西伯利亞人蔘 (*Siberian ginseng*)。這些有實驗證據支持的 22 個實例中，55% 導致藥物臨床療效的增強，29% 是抑制藥物作用，10% 沒有提供任何臨床療效的資訊。大多數的這些交互作用是屬於藥動學性的，而且大多數經由 P450 酵素的途徑真正的或理論的影響到所影響產品的代謝所致。分析結果也發現，wafarin 是最常見會發生交互作用的藥物，而草藥產品則以貫葉連翹發生最多的交互作用現象。

以上所談到的草藥類營養補充品都是含有具藥理活性作用的植物化合物，但是即使在美國，這些產品的上市都被免除掉嚴苛的上市前核准程序，因此針對這些草藥類營養補充品要求製造商進行先前試驗以確認可能存在的草藥與處方藥之交互作用，就不是絕對強迫必須做的。即使在本國，傳統中藥方劑的使用都被認為已有數千年的安全紀錄，但對於併服西藥所可能造成的交互作用，仍然缺乏上市前有系統的科學驗證，以清楚瞭解這些傳統中藥方劑對人體與吸收與代謝等藥動學有關的生理因素之影響，理論性的預測可能發生的交互作用影響。至今，同樣在美國也陸續出現許多的草藥與處方藥使用後所導致之影響的記載文獻，而這些使用草藥可能造成的影響可分類為 1. 直接毒性：如馬兜鈴酸的

腎毒性、卡法椒 (Kava) 的嚴重肝功能不良，維生素 B_{17} (Laetrile) 的噁心嘔吐、頭痛昏眩、及遲緩作用；2. 藥動學性 (Pharamcokinetic) 或藥效學性 (Pharmacodynamic)：是來自草藥成分所引發的修飾代謝酵素 CYP450 之酵素活性。前者包括有 St. John's wort 與 digoxin (3)，以及 Ginseng 與 digoxin (4)，後者包括有，Gingo 與 trazodone、alcohol (7)，St. John's wort 與 cyclosporins、indinavir、midazolam、simvastin (3)，garlic 與 saquinavir (3)，以及 Echinacea 與 amidarone、propaferone、cyclosporin、ibutilide (5)；3. 給藥方式所造成的毒性：如用於免疫增強作用的 Burton 受到肝炎病毒污染、灌腸治療劑導致的腸道病菌感染、嚴重脫水作用及電解質失調等；4. 延遲或避開傳統治療可獲得的已知效益：完全使用天然成份的觀念讓病人拒絕使用合成的止痛藥於緩解癌症疼痛 (9)。

綜合言之，來自草藥成分所引發的代謝酵素 CYP450 之酵素活性仍是中草藥與處方藥類的西藥成份所發生交互作用的主要機轉，所以在消費者被賦予自由意志而可以自行使用各種草藥類營養補充品及其他各色各樣草藥製品時，必然需要能有一套整體性的方法來預測可能存在的這類與代謝酵素活性有關的草藥與處方藥的交互作用，以幫助消費者或是專業醫師瞭解併用時可能發生的交互作用之參考依據，由此而確保中草藥的用藥安全，以及共服時相互間應達到之臨床效能。對於 CYP450 酵素活性的進一步影響性可分為直接對蛋白質或酵素的作用以及對兩者基因表現的作用。前者是中藥成份作為代謝酵素的作用標的物 (substrate) 與同樣是標的物的西藥成份在代謝酵素的鍵結作用部位進行競爭性

或非競爭性交互作用、或是中藥成份本身就是代謝酵素的抑制劑 (inhibitors)，而經由可逆性抑制 (reversible inhibition) 或不可逆性/擬不可逆性模式抑制 (irreversible/quasi irreversible inhibition)代謝酵素的活性來影響併服的西藥成份。後者則是重複服用中藥方劑後，如果中藥成份是代謝酵素的蛋白表現轉錄活化劑 (transcriptional activators)，就會藉由接受體依賴性機制 (receptor-dependent mechanism) 於基因層次增加訊息核醣核酸 (mRNA) 的轉錄，因而提高代謝酵素於細胞部位的表現量，此交互作用結果將導致併服藥物的吸收與代謝程度的改變 (10)。

總結而言，建立傳統中藥方劑影響代謝酵素的藥動學特質，將是提供消費者併服西藥以及臨床中醫師或醫師調配併服藥物之參考依據，不管是由中藥方劑的藥動學特質來理論推測，或是由臨床試驗的證據支持，都是確保臨床併用時可以降低交互作用的影響性，或是做適當調整以維持臨床療效，降低可能導致的不良副作用或毒性。直接由臨床試驗證明中草藥與西藥併服的交互作用是最可信的證據，所以 Gurley 等人發表利用 CYP450 的表型代謝比例 (phenotypic ratios) 作為中草藥與西藥在人體發生交互作用的預測 (3)。此臨床實驗是在志願者服用中藥製劑之前後都給予含四種 CYP450 酵素 (CYP1A2、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4) 的體內探針藥物 (caffeine、debrisoquin、chlorzoxazone、midazolam) 之雞尾酒液，就利用此些探針藥物的表型代謝比例 (paraxanthine/caffeine serum ratio、debrisoquin urinary recovery ratios、6-hydroxychlorzoxazone/chlorzoxazone serum ratios、

1-hydroxymidazolam/midazolam serum ratios) 於服用中藥製劑前後的改變量來決定中藥製劑對於此些代謝酵素的藥動學影響性，結果發現貫葉連翹明顯的誘發提高 CYP2E1 與 CYP3A4 的活性，而此誘發能力具有性別的同質雙型；大蒜油降低 CYP2E1 活性達 32%，而人蔘與銀杏對於 CYP 酵素活性則無明顯的影響作用。同樣的，Dresser 等人以人體的臨床試驗測試貫葉連翹同等誘發 CYP3A4 與 MDR1 (*p*-Glycoprotein) 之特質，此試驗分別使用 midazolam、fexofenadine、與 cyclosporine 作為 CYP3A4、MDR1、CYP3A4+MDR1 活性測試的體內探針藥物，於服用前與連續服用 12 天的貫葉連翹製劑處方後，比較此三種探針藥物的藥動學特質變化，以評估貫葉連翹同等誘發 CYP3A4 與 MDR1 的效能 (11)。結果顯示，CYP3A4 被貫葉連翹誘發的程度似乎增加的比 MDR1 的高，但在同時會受 CYP3A4 與 MDR1 影響的 cyclosporine 方面，則顯示 MDR1 被貫葉連翹誘發的程度比 CYP3A4 的為高。雖然由此兩個報導的臨床人體試驗模式可以明確的顯示中草藥對於輸送醣蛋白質或代謝酵素的可能影響性，進而預估其在臨床上可能存在的交互作用，但要應用於例行性快速篩檢傳統中藥方劑的藥動學特質就不是很有效率，而且臨床花費的成本也是一大負擔，時間限制也大。

Donato 與 Castell 兩人在探究 CYP450 於藥物代謝所扮演腳色的策略與分子探針的回顧文中指出藥物間可能存在之交互作用的最佳描述可以得自於具有代謝能力的肝臟細胞 (metabolically competent hepatocytes) (10)，同樣的，初代培養的肝臟細胞 (primary cultured hepatocytes) 仍是最為獨特的體外模式，允許全

面性的檢測藥物誘發代謝酵素的可能性。重要的是，使用適當的控制組，初代培養肝臟細胞仍被認為可作為一個良好的體外模式來定量性的預估藥物於體內的代謝模式。甚至在誘發酵素表現試驗模式方面，也發現人體肝臟細胞於初代培養中的前幾天仍對於酵素表現誘發劑的誘發作用會有適當反應，不過這效能隨後漸漸失去。如將肝臟細胞培養於膠原蛋白的三度空間間質架構中，可以大幅度的改善肝臟細胞對酵素誘發劑的誘發反應性。Gómez-Lechón 等人 (12) 在使用膠原蛋白包埋的肝臟細胞的試驗中發現，即使培養兩星期後，肝臟細胞仍能夠對 3-methyl-cholanthrene 與 ethanol 誘發酵素表現有所反應，所以初代培養肝臟細胞於膠原蛋白間質之體外系統將是一個最為適當用於快速檢測中藥方劑的酵素活性與誘發作用等藥動學代謝特質，以預測其對於共服西藥時可能造成的交互作用現象。

同樣於經由影響 CYP 酵素的中草藥與西藥之交互作用，中藥成份也可以是輸送醣蛋白質的作用標的物 (substrates)，或是抑制劑 (inhibitors) 與誘發劑 (inducers)，而經由輸送醣蛋白質的輸送影響導致與併服西藥發生生體可用率改變之交互作用 (13)。Zhang 等人於回顧文獻指出，累積量 (accumulation) 與排流量 (efflux) 檢測法仍是最適於篩選具有排流藥物活性 (efflux activity) 之化合物 (14)。 使用輸送醣蛋白質 (P-gp) 之螢光探針物的檢測法也能立即的應用於高效能快速篩選具有能與不同排流輸送體 (efflux transporters) 交互影響的化合物，而大多數這些篩選模式是直接針對於能抑制輸送體活性化合物之鑑定。Calcein-AM 於 vincristine-resistant Caco-2 (Caco-2VCR) 細胞內之累積檢測模

式可以改裝成 96 槽微盤檢測模式而應用於篩選具有與輸送醣蛋白質發生交互作用的化合物。所以應用於檢測中藥成份經由輸送醣蛋白質的抑制而造成交互作用時，可以利用這個累積量與排流量檢測法來快速的鑑定中藥方劑是否會干擾一個已知藥物排流運送探針物於細胞內之累積量。至於大多數針對輸送醣蛋白質的誘發作用之鑑定，都以動物或人體的體內試驗來檢測 (14)，仍無能快速鑑定具輸送醣蛋白質誘發作用的體外細胞培養方法被報導。既然如 Caco-2VCR 類的細胞株，需要體外培養後再使用於抑制輸送體活性化合物之鑑定，培養過程的中藥成份存在是否誘發輸送醣蛋白質的表現，應可以作為評估中藥成份對輸送醣蛋白質之誘發能力，所以利用類似 Caco-2VCR 累積 Calcein-AM 的檢測試驗就可以同時快速評估中藥成份對輸送醣蛋白質的抑制與誘發作用。

中藥成份的多元化是眾所皆知一直困擾研究者無法確認其有效成份的關鍵，而且中藥治療也大多需以含複方的方劑給藥，才能顯現其臨床療效，同時也常發現純化的單一成份於體外模式可以顯現其藥理活性，但相對的使用萃取的多種成份混合物時，人體服用後的臨床療效則不如預期的與所謂的指標成份具有有意義的相關性。可以懷疑的是中藥的多成份可能透過對腸道代謝酵素的藥動學性影響，導致發生中藥有效成份口服吸收效能的改變，相對的影響中藥方劑總成的臨床療效，而這型態的臨床影響也是一種自體成份發生所謂交互作用所造成。同樣的，這型態的交互作用也可能是造成影響一起與中藥方劑併服的西藥之臨床療效。但為有效的鑑定具有這型態交互作用的中藥成份，且避免又落入無法由多元成份確認有效成份的傳統限制框框中，最佳的方式是由模式成份來

建構結構與藥動學影響性 (Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship, QSPR) 之定量性預測關係式，藉由此關係式未來可以由中藥方劑所含有具有此類影響性之化學成份來計算其總加成定量性影響，由理論關係式準確的預測中藥方劑可能造成的交互作用以及其影響程度。

截至目前為止，已知最常與西藥併服後發生影響輸送醣蛋白質與腸道代謝酵素之藥動學性交互作用的天然成份，包括有葡萄柚汁的 Furanocoumarins 類衍生物的 Bergamottin (15)，貫葉連翹和銀杏的 Flavonoids 類衍生物等。再由中藥成份的總整理來看，白芷與羌活等種類或同屬的中藥材含有多種類似 Furanocoumarins 類的衍生物，而黃酮素類 (Flavonoid 與 Flavanoids) 則富含於中藥藥材，包括常使用於中藥方劑的甘草、陳皮、橙皮、葛根等，異黃酮素 (Isoflavonoids 與 Isoflavanoids) 類也是多包含於甘草、葛根與黃耆等中藥材 (16-17)。所以由此些種類化合物作為模板成份，以建構其建構結構與藥動學影響性 (QSPR) 之定量性預測關係式，將可以快速有效的用於定量性預測中藥方劑可能與併服西藥發生的交互作用。本計劃預期以一年期間來建構 Furanocoumarins 類，中藥模式成份的結構與藥動學影響性預測關係，作為中藥藥政單位管理中藥與西藥預測是否發生交互作用之參考依據，也可以標示警語以提醒併服西藥的消費大眾或開立處方的中西醫師之注意，以確保中藥臨床用藥的安全性。

貳、材料與方法

1 繖形科類系列生藥之萃取

水煎劑

將將白芷 Bai Zhi *(Angelica dahurica radrix)*、羌活 Qiang Huo *(Notopterygium incisum root)*、當歸 Danggui *(Chinese Agelica radrix)* 、防風 Fang Feng *(Saposhnikovia divaricata radrix)*和獨活 Duhuo *(Angelica japonica)* 各 2 公克的生藥材以水 100 豪升煎煮至 50 毫升，煎煮時間約一小時。並進行分 ether 溶劑的萃取，得到 ether 層，進行管柱層析，以高壓液相層析法(HPLC) 分析，分為 10 個分離層。

酒精浸泡液

將白芷 Bai Zhi *(Angelica dahurica radrix)*、羌活 Qiang Huo *(Notopterygium incisum root)*、當歸 Danggui *(Chinese Agelica radrix)* 、防風 Fang Feng *(Saposhnikovia divaricata radrix)*和獨活 Duhuo *(Angelica japonica)* 各 2 公克的生藥材以 50 毫升 40%酒精浸泡一星期，並進行分 ether 溶劑的萃取，得到 ether 層，進行管柱層析，以高壓液相層析法(HPLC) 分析，分為 10 個分離層。

方劑

如表 1 複方方劑十神湯，補中益氣湯，防風通聖散，九味羌活湯，川芎茶調散各與 200 豪升水以 37℃攪拌 4 小時，過濾取澄清液進行酵素代謝試驗。

2. 蠟形科類系列生藥之高效液相層析法開發

高效液相層析法的開發，使用 YMC-ODS (4.6 mm i.d. x 250 mm) 管柱，溶媒以梯度進行沖提，起使時 20% acetonitrile (ACN:H_2O:=20:80) 到 40 分鐘時為 85% ACN，40 至 45 分鐘維持 85% ACN，45 至 50 分鐘維持 100% ACN 50 分鐘後回到起始之移動相；流速為 1.0 mL/min；紫外線偵測波長於 240 nm。每 5 分鐘收集 5 毫生，為一個分離層，共收集 10 各分離層，編為 Fr1~Fr10。

3. 模式藥物 Nifedipine 與其代謝物 oxidized nifedipine 之高效液相層析法開發

利用高壓液相層析法(HPLC) 分析，使用 Inertsil ODS (4.6 mm i.d. x 250 mm) 管柱，溶媒 (ACN:H_2O: =40:60)；流速為 1.0 mL/min；紫外線偵測波長於 237 nm。分別測量 nifedipine 及其代謝物 oxidized nifedipine 並計算酵素活性之百分比。

4. 酵素之抑制試驗

本計劃實驗所探討的酵素以 CYP3A4 為主，將以 nifedipine 之代謝為探針藥物，藉由分析藥物與代謝物之關係，驗證得知酵素的代謝效能，進而完成代謝研究。進行大白鼠肝臟細胞的萃取 (Hepatocyte isolation)，所萃取的肝臟細胞以系列之離心取得微粒體(microsomes)。進行代謝抑制之試驗，進行萃取液與分離層的抑制試驗。

萃取細胞步驟

依經驗得知太老的大白鼠其肝臟細胞活性不佳，所以本計劃選擇約重量 250-350 公克的雄性大白鼠來萃取肝臟細胞。首先將大白鼠用 ketamine/xylaine

(80mg,12mg/ml) 以腹腔注射麻醉，用量為 1ml/kg，麻醉後進行手術，先注入 heparin 避免凝血，以第一階段清洗溶液由肝門靜脈進行灌流(perfusion)，直至肝臟內大部份血液沖滌完，以系列之離心取的微粒體，準備進行試驗。

肝臟細胞酵素之抑制試驗

探討的酵素仍以 CYP3A4 為主，使用 nifedipine 之代謝為指標，藉由分析藥物與代謝物之關係，進而得知酵素是否受中草藥之抑制。

參、結果

繖形科類系列生藥之萃取

圖 1 至圖五為生藥白芷 Bai Zhi *(Angelica dahurica radrix)*、羌活 Qiang Huo *(Notopterygium incisum root)*、當歸 Danggui *(Chinese Agelica radrix)*、防風 Fang Feng *(Saposhnikovia divaricata radrix)*和獨活 Duhuo *(Angelica japonica)*水煎劑之層析圖，而圖 6 至圖 10 為 40%酒精浸泡之層析圖。圖 1 為白芷水煎劑之層析圖可知 Fr.2、3 和 5 有明顯之層析峰，圖 2 為羌活水煎劑之層析圖可知 Fr.2、5 和 6 有明顯之層析峰，圖 3 為當歸可知 Fr.2 和 6 有明顯之層析峰，圖 4 為防風可知 Fr.1、2、3 和 4 有明顯之層析峰，圖 5 為獨活可知 Fr.1、4、5 和 6 有明顯之層析峰，圖 6 為羌活 40%酒精浸泡液可知 Fr.1、3 至 8 有明顯之層析峰，圖 7 為白芷 40%酒精浸泡液可知 Fr.1 至 8 有明顯之層析峰，圖 8 為當歸 40%酒精浸泡液可知 Fr.1、5、6 有明顯之層析峰，圖 9 為防風 40%酒精浸泡液可知 Fr.1 至 7 有明顯之層析峰，圖 10 為獨活 40%酒精浸泡液可知 Fr.1、3 至 6 有明顯之層析峰，如表 2 和 3。從

層析圖中得知酒精浸泡組，含有較多的成分而水煎劑的部分較少，五種成分中以羌活和獨活含有較多之成分。

模式藥物 Nifedipine 與其代謝物 oxidized nifedipine 之高效液相層析

如圖 11，開發之分析方法可以有效分離代謝物 oxidized nifedipine 及原模式藥物 nifedipine。其 3A4 酵素之代謝物之滯留時間為 10 分鐘，而 nifedipine 則為 12 分，並無干擾。

生藥與複方抑制酵素之結果

酵素活性抑制以酵素活性殘存百分比表示，五種生藥之水煎劑，其酵素活性殘存百分比從 92.5-56.2%，皆大於 50%。以羌活的抑制性最高，酵素活性殘存 56.2%，如圖 12。當歸水煎劑的抑制性最小，酵素活性尚有 92.5%。酒精浸泡的酵素抑制性均比水煎劑高，酵素活性殘存百分比從 0.8-82.5 %，白芷、羌活、獨活其活性小於 50%，以羌活抑制性最高，酵素活性殘存 0.8 %。複方中十神湯，補中益氣湯抑制性小於 5 %。九味羌活湯抑制性最高 41.2 %，其次是防風通聖散 35.9 %，川芎茶調散 22.3 %。

白芷水煎劑之粗萃液其酵素抑制活性 20%，而不同之分離液 (Fr1-Fr10) 抑制百分比皆小於 20 %，如圖 13。40 %酒精浸泡液之粗萃液酵素抑制活性 79.5 %，分離液中以 Fr6 的 83.4 %最高，相對應於層析圖中 25-30 分鐘，有三個濃度相當高之層析峯，如圖 1 與 6。 羌活水煎劑之粗萃液其酵素抑制活性 44 %，而分離液 Fr5 抑制

百分比大於 50 % (69.7 %)，其於分離液皆小於 50 %，如圖 14，得知水煎劑主要抑制代謝酵素之成分是較非極性的，且滯留時間約為 20 至 25 分鐘。40 %酒精浸泡液之粗萃液酵素抑制活性 48.6 %，分離液中以 Fr5 與 Fr6 為 92 與 93 %最高。相對應於層析圖中，有濃度相當高之層析峯，如圖 2 與 7。 當歸水煎劑之粗萃液其酵素抑制活性 14 %，而分離液抑制皆小於 10 %，如圖 15，得知當歸水煎劑是較不具有抑制代謝酵素活性之成分，且層析圖中也缺少明顯之層析峯。40 %酒精浸泡液之粗萃液酵素抑制活性 48.5 %，分離液中以 Fr6 為 41 %最高。相對應於層析圖中，有層析峯，如圖 3 與 8 得知當歸 40 %酒精浸泡液也僅有少量抑制代謝酵素活性之成分。 防風水煎劑之粗萃液其酵素抑制活性 14 %，而分離液抑制皆小於 40 %，如圖 16，結果得知防風水煎劑是不具有強的抑制代謝酵素活性之成分，且層析圖中也缺少明顯之層析峯，如圖 4 與 9。40 %酒精浸泡液之粗萃液酵素抑制活性 27 %。得知當歸 40 %酒精浸泡液也不具有強的抑制代謝酵素活性之成分。 獨活水煎劑之粗萃液其酵素抑制活性 37.2 %，而分離液 Fr4 抑制百分比為 57 %，其於分離液皆小於 50 %，如圖 17。40 %酒精浸泡液之粗萃液酵素抑制活性 55 %，分離液中 Fr4 至 Fr7 約為 80% (79-75 %)。相對應於層析圖中，有濃度相當高之層析峯，如圖 5 與 10。從白芷層析圖中有三個濃度相當高之層析峯，經與文獻比對後得知可能是化合物 Imperatorin、Phellopterin、Isoimperatorin，如圖 18。顯示 furanocoumarin 在酵素抑制上扮演相當重要的角色。再比較層析圖與酵素抑制活性，發現層析峯與酵素抑制有些關聯，特別是 Fr.4、5 和 6，如表 2-4。也可以應用此 HPLC 的分析系統，探討生藥是否抑制代謝酵素的初步評估。

肆、討論

來自草藥成分所引發的代謝酵素 CYP450 之酵素活性仍是中草藥與處方藥類的西藥成份所發生交互作用的主要機轉，在消費者自行使用各種草藥類營養補充品及其他各色各樣草藥製品時需要能有一套整體性的方法來預測可能存在的這類與代謝酵素活性有關的草藥與處方藥的交互作用，經由酵素代謝試驗可以作為初步篩選可能發生藥物交互作用的草藥。從本實驗結果也可得知，在具有強抑制活性的成分，在本實驗之層析系統中滯留時間約在 20 至 30 分鐘之間出現，也說明這一類成分較非極性。也可以以高壓液相層析來評估草藥是否含有此類的相關化合物，20 至 30 分鐘有無層析峯出現，如果含此類化合物就可能有抑制酵素的代謝，將有發生藥物交互作用的潛在可能，可以再經由體外的酵素試驗來進一步確認。本實驗中在 20 至 30 分鐘有高層析峯出現的有羌活、白芷、獨活，而這三種生藥也是具有強抑制酵素活性，可見其相關性。

伍、結論與建議

繖形科五種生藥之水煎劑以羌活和獨活較具酵素抑制性 43.8 與 37.2%，白芷、當歸和防風僅少量影響酵素活性，20%以下。酒精浸泡的方式均會提高酵素之抑制特性，只有防風其酵素抑制在 20%以下。以酒精浸泡方式的草藥成分，發生藥物交互作用的潛在機會較大。複方方劑以九味羌活湯、防風通聖散抑制性較高 41.2 % 與 35.9 %。其於複方製劑抑制性不明顯，說明複方方劑以水併服可能發生藥物交互作用之情形。綜合言之，以本試驗體外的評估系統，可以初步篩選可能發生藥

物交互作用的草藥，必然以幫助消費者或是專業醫師瞭解併用時可能發生的交互作用之參考依據，由此而確保中草藥的用藥安全，以及共服時相互間應達到之臨床效能。

陸、參考文獻

1. Nortier JL., Martinez M-CM, Schmeiser HH, et al: Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Aristolochia fangchi). N. Ehgl J Med 342:1686-1692, 2001
2. Lord GM, Cook T, Arlt VM, et al: Urothelial malignant disease and Chinese herbal nephropathy. Lancet 358: 1515-1516, 2001
3. Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, et al: Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. Clinical Pharmacology and Therapeutics 72(3):276-287,2002
4. Gold JL, Laxer DA, Dergal JM, et al: Herbal-drug therapy interactions: A focus on dementia. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 4:29-34, 2001
5. Aggrawal A and Ades PA: Interactions of herbal remedies with prescription cardiovascular medications. Coronary Artery Disease 12:581-584, 2001
6. Awang VCD and Fugh-Berman A: Herbal interactions with cardiovascular drugs. Journal Cardiovascular Nursing 16 (4):64-70, 2002
7. Izzo AA and Ernst E; Interactions between herbal medicines and prescribed drugs. Drugs 61(15):2163-2175, 2001
8. Brazier NC and Levine MAH, Drug-Herb interaction among commonly used conventional medicines: A compendium for health care professionals. American journal of Therapeutics 10:163-169, 2000
9. Markman M., Safety issues in complementary and alternative medicine. Journal of Clinical Oncology 20 (18): 39s-41s, 2002
10. Donato MT and Castell JV, Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism. Clinical Pharmacokinetics 42(2):153-178, 2003
11. Dresser GK, Schwarz UI, Wilkinson GR and Kim RB, Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 73(1):41-50, 2003
12. Gómez-Lechón MJ, Jover R, Donato T, et al. Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. Journal of Cell Physiology 177:553-562,1998
13. Lin JH and Yamazaki M, Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics. Drug Disposition 42(1):59-98, 2003
14. Zhang Y, Bachmeier C, Miller DW, In vitro and in vivo models for assessing drug efflux

transport activity, Advanced Drug Delivery Reviews, 55(2003)31-51.

15. Guo, L-Q, Fukuda K, Ohta T and Yamazoe, Y, Drug Metabolism and Disposition, 28, 7, 2000, 766-771.
16. 原色生藥學 (第二版): 顏焜熒著, 台北 南天書局發行 (1996)
17. 常用中草藥高效液相色譜分析: 王慕 、陳毓亨、相樂和彥、平山總良著, 科學出版社發行 (1999)
18. Wang CC, Lai, JE, Chen LG, et al, Inducible Nitric oxide synthase inhibitors of Chinese herbs. Part 2: Naturally occurring furanocoumarins, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 8(2000) 2701-2707.
19. Gu ZM, Zhang DX, Yang XW, et al, Isolation of two new coumarin glycosides from Notopterygium forbesii and evaluation of a Chinese crude drug, Quiang-Huo, the undergraound parts of N. incisum and N. forbesii, by High-performance liquid chromatography, Chem. Pharm. Bull., 38(9) 2498-2502 (1990).
20. VonRheenen, V.; Kelly, R.C. and Cha, D.Y. Tetrahedron Letters, 1976, 1973.
21. Kozawa, M.; Fukumoto, M.; Matsuyama, Y. and Baba, K. Chem. Pharm. Bull., 31(8), 1983, 2712~2717
22. Spaeth.; Dobrovolny. Chem. Ber/. 72, 1939, 52
23. Klopman G, Stefan LR, Saiakhov RD, ADME evaluation 2. A computer model for the prediction of intestinal absorption in humans, European J Pharm. Sci., 17(2002) 253-263.

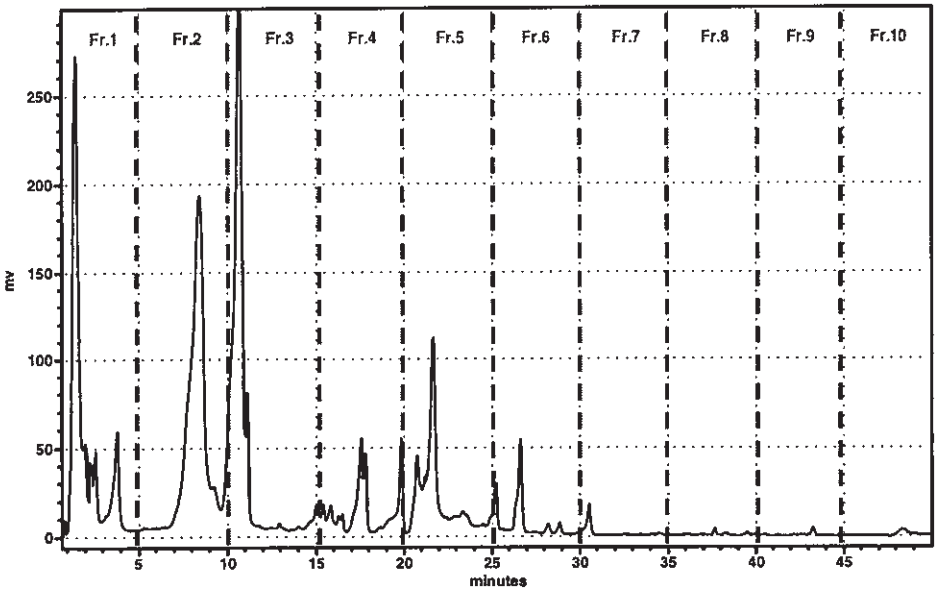

圖 1. 白芷水煎劑之層析圖

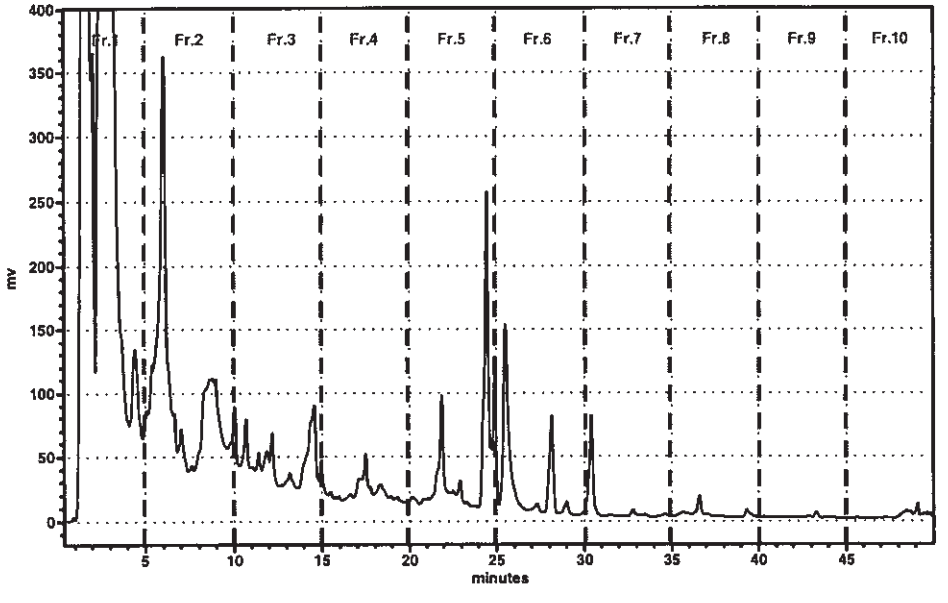

圖 2. 羌活水煎劑之層析圖

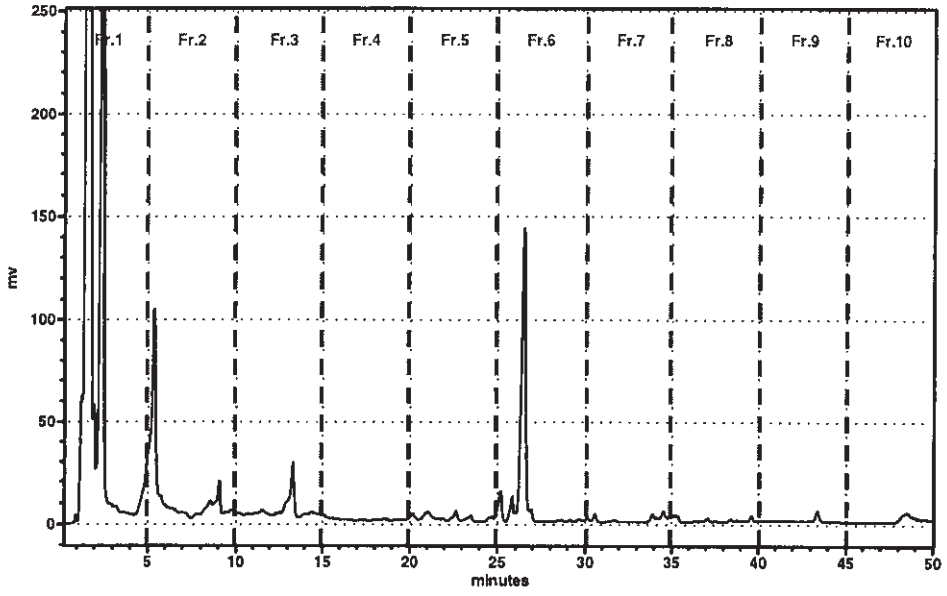

圖 3. 當歸水煎劑之層析圖

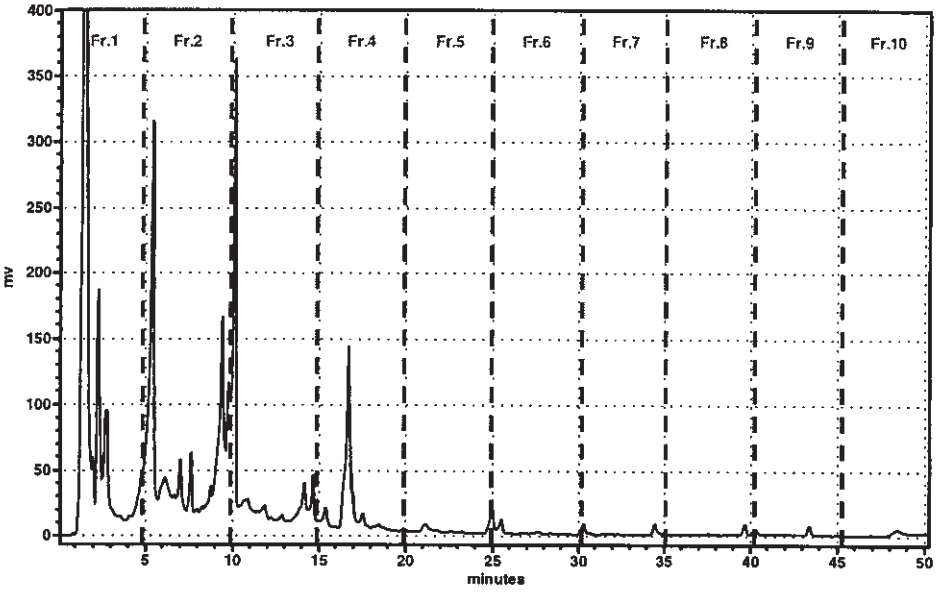

圖 4. 防風水煎劑之層析圖

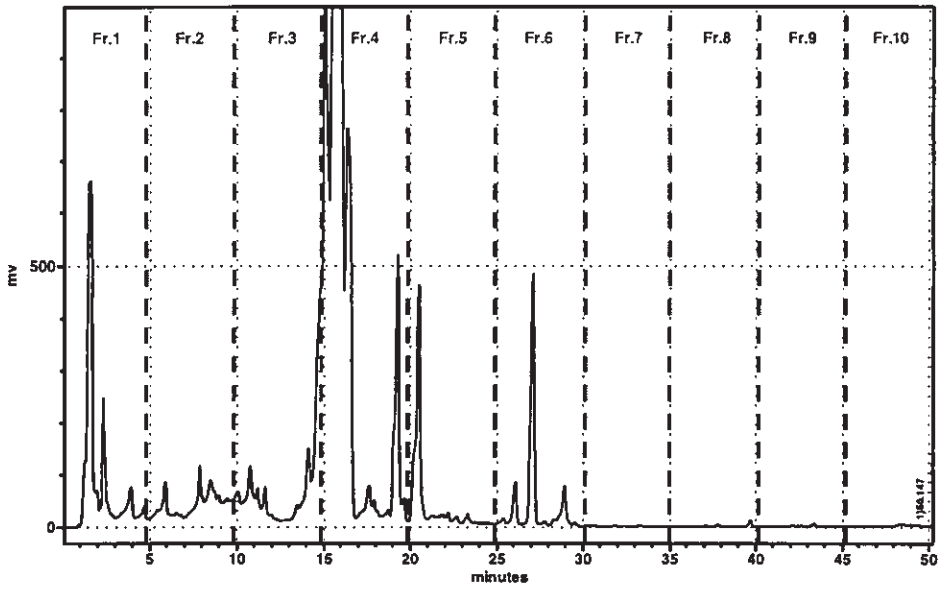

圖 5. 獨活水煎劑之層析圖

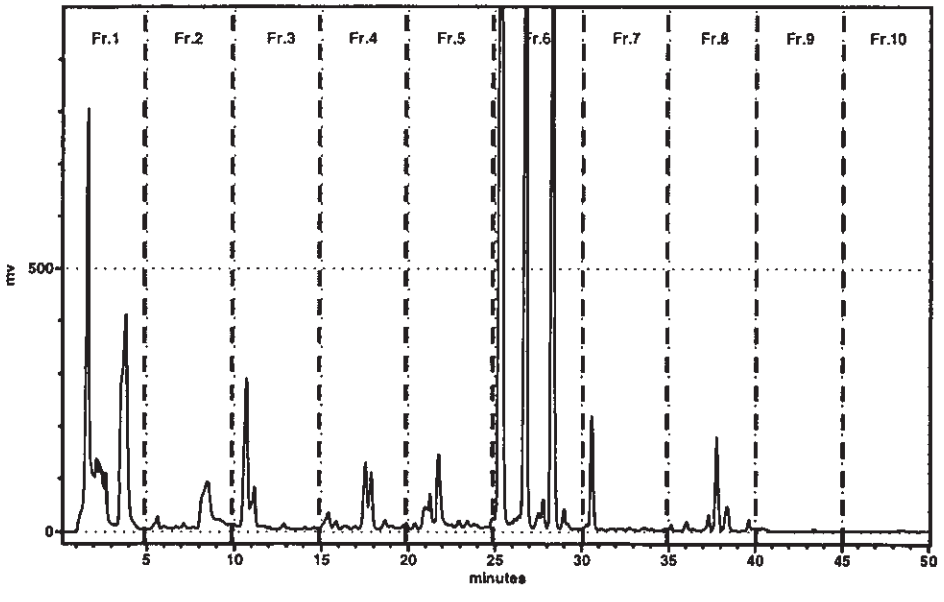

圖 6. 羌活 40%酒精浸泡之層析圖

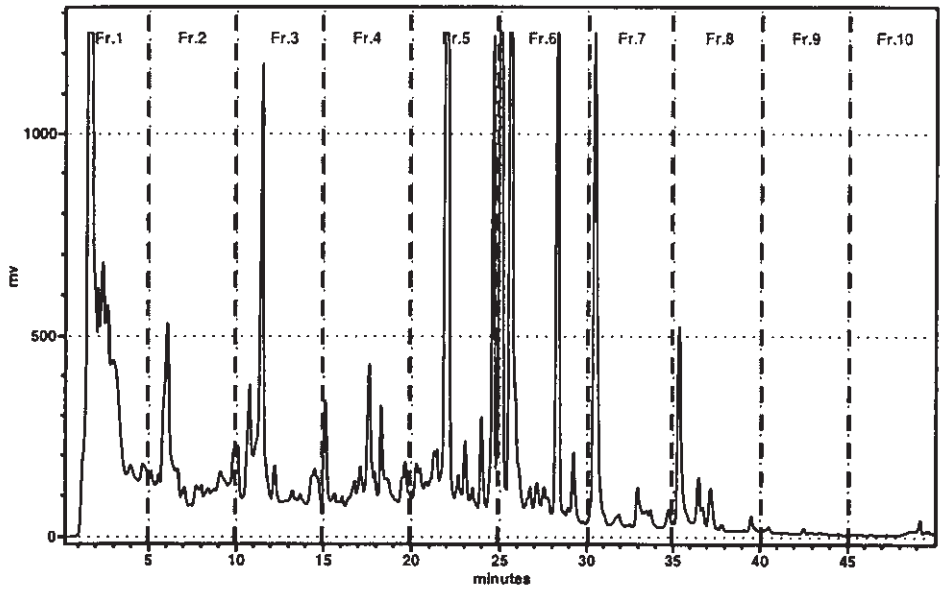

圖 7. 白芷 40%酒精浸泡之層析圖

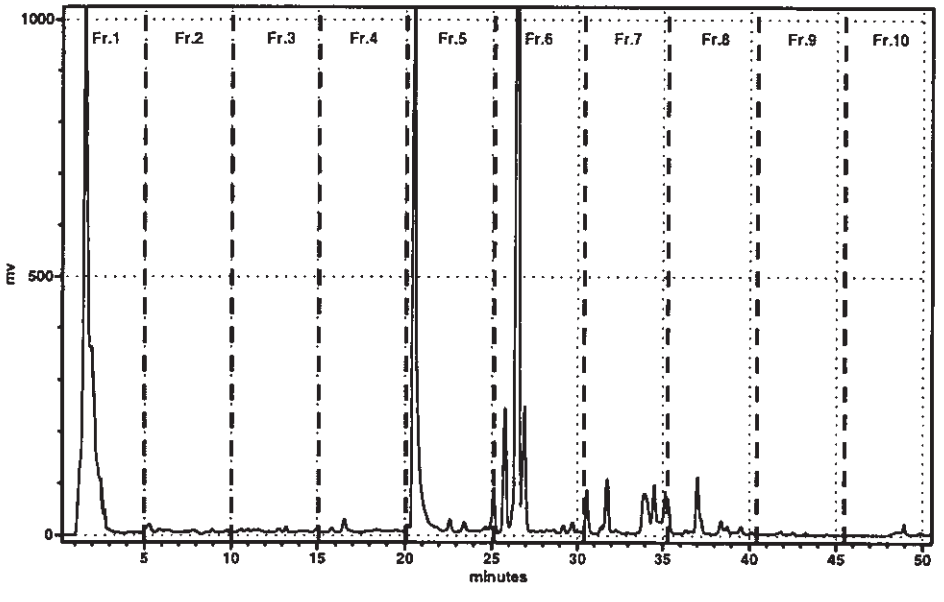

圖 8. 當歸 40%酒精浸泡之層析圖

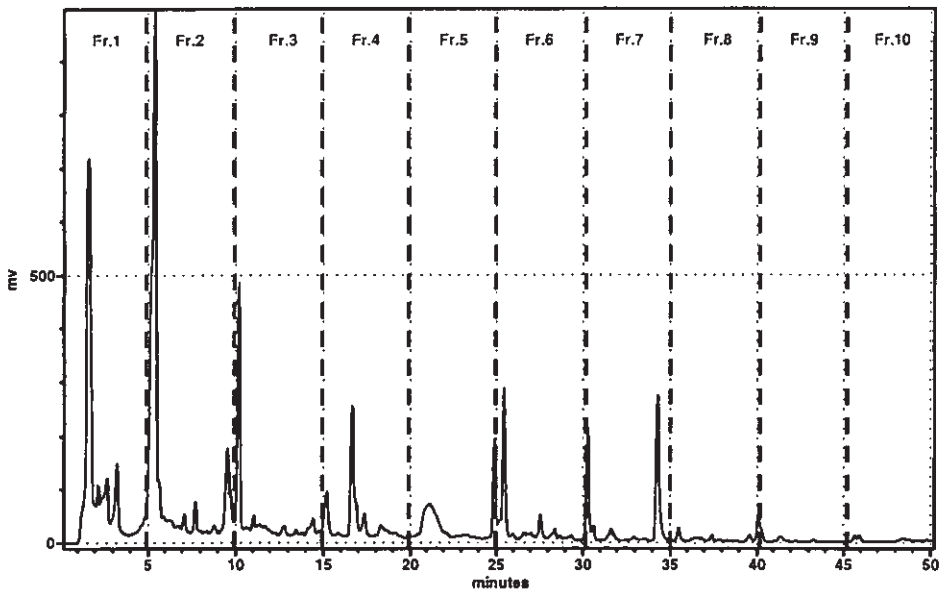

圖 9. 防風 40%酒精浸泡之層析圖

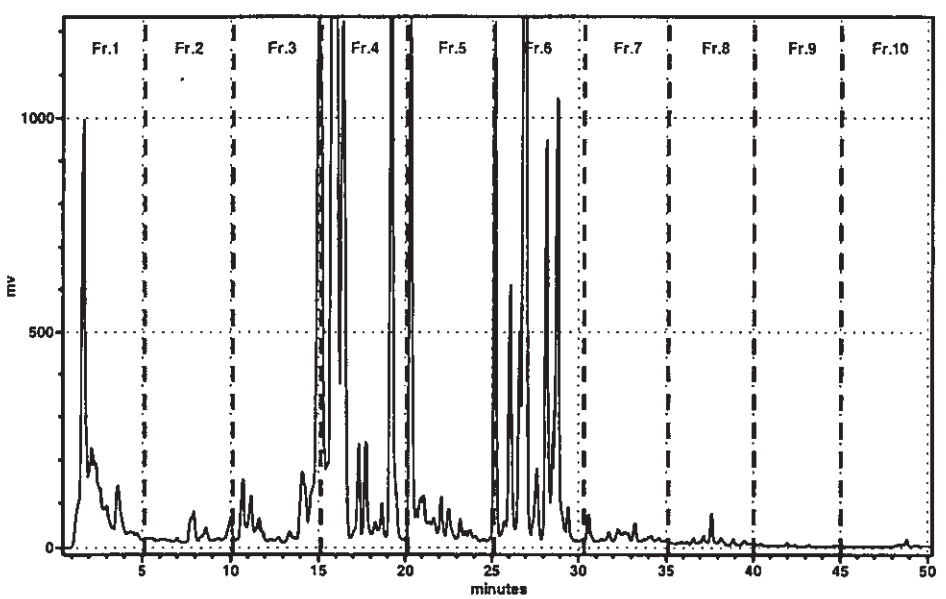

圖 10. 獨活 40%酒精浸泡之層析圖

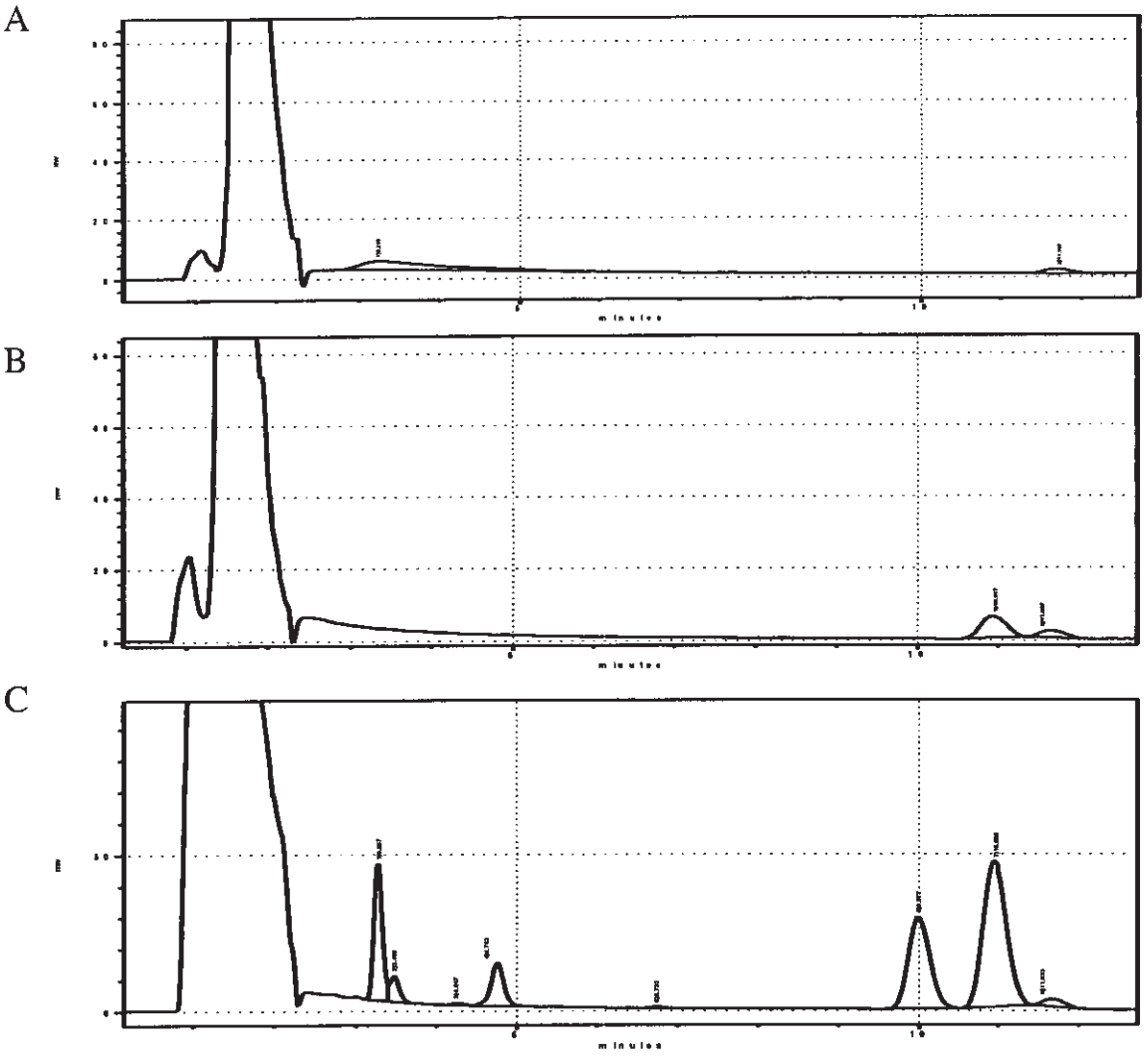

圖 11. Nifedipine 與其代謝物 oxidized nifedipine 之高效液相層析之層析圖。A 為空白之層析圖；B 為微粒體加入 nifedipine 之層析圖；C 經由微粒體代謝後之層析圖

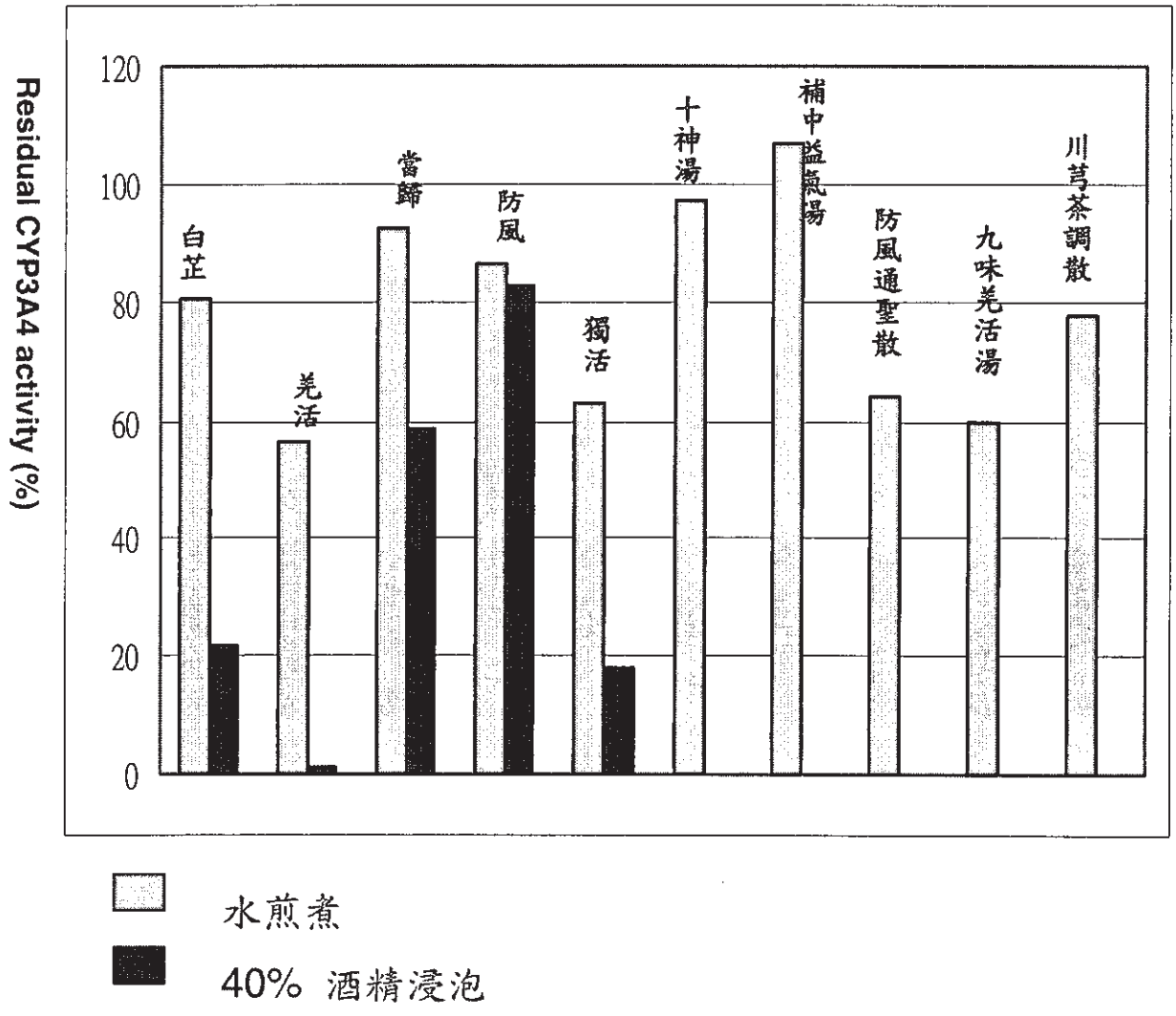

圖 12. 生藥及方劑其酵素抑制之酵素活性殘存百分比

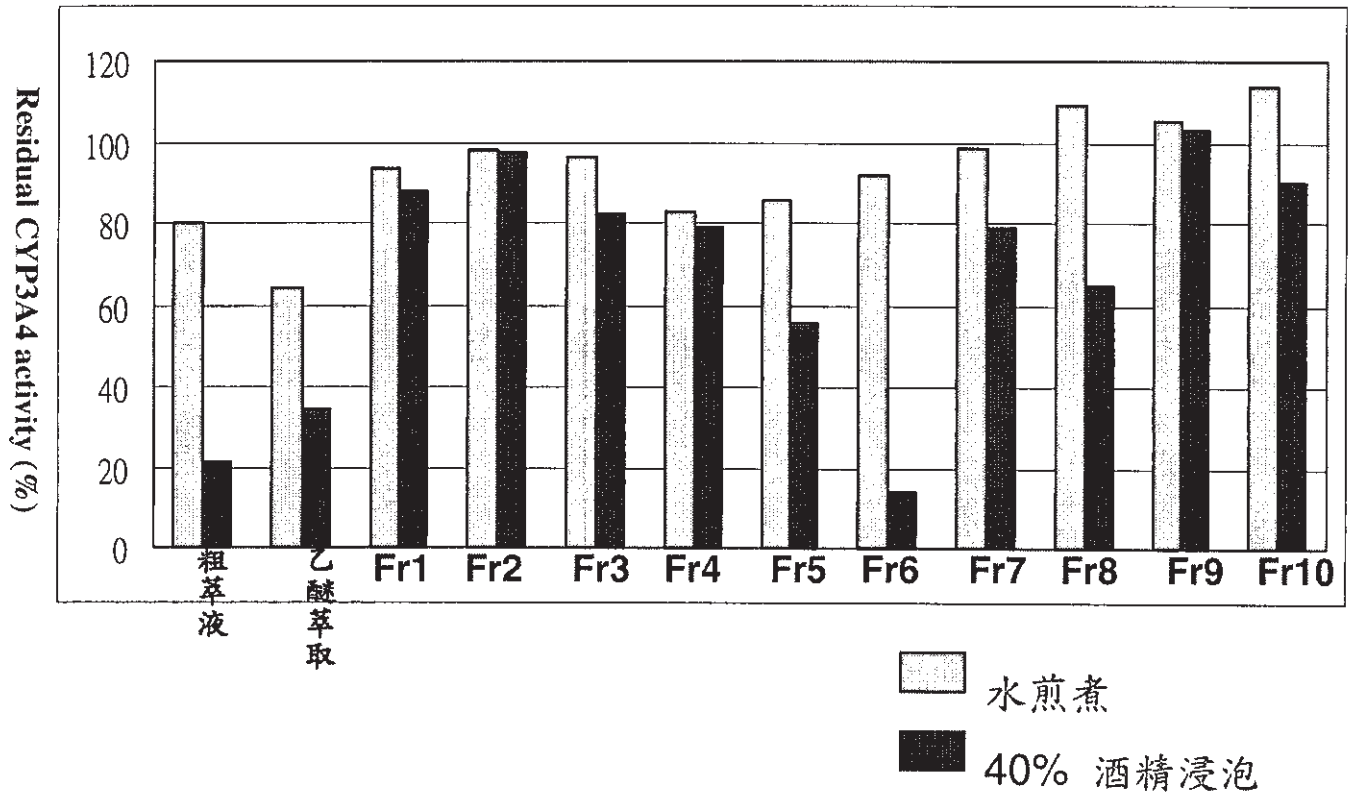

圖 13. 白芷粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比

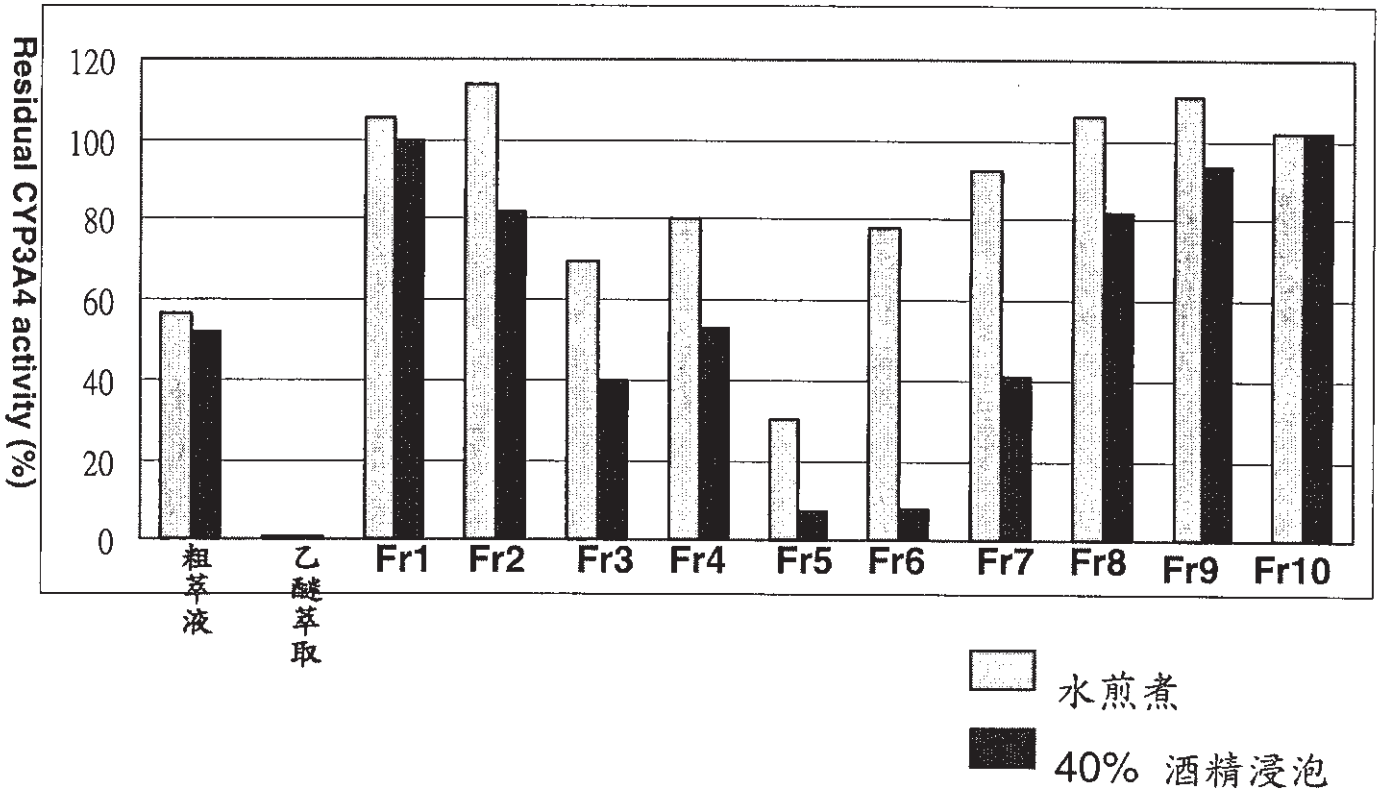

圖 14. 羌活粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比

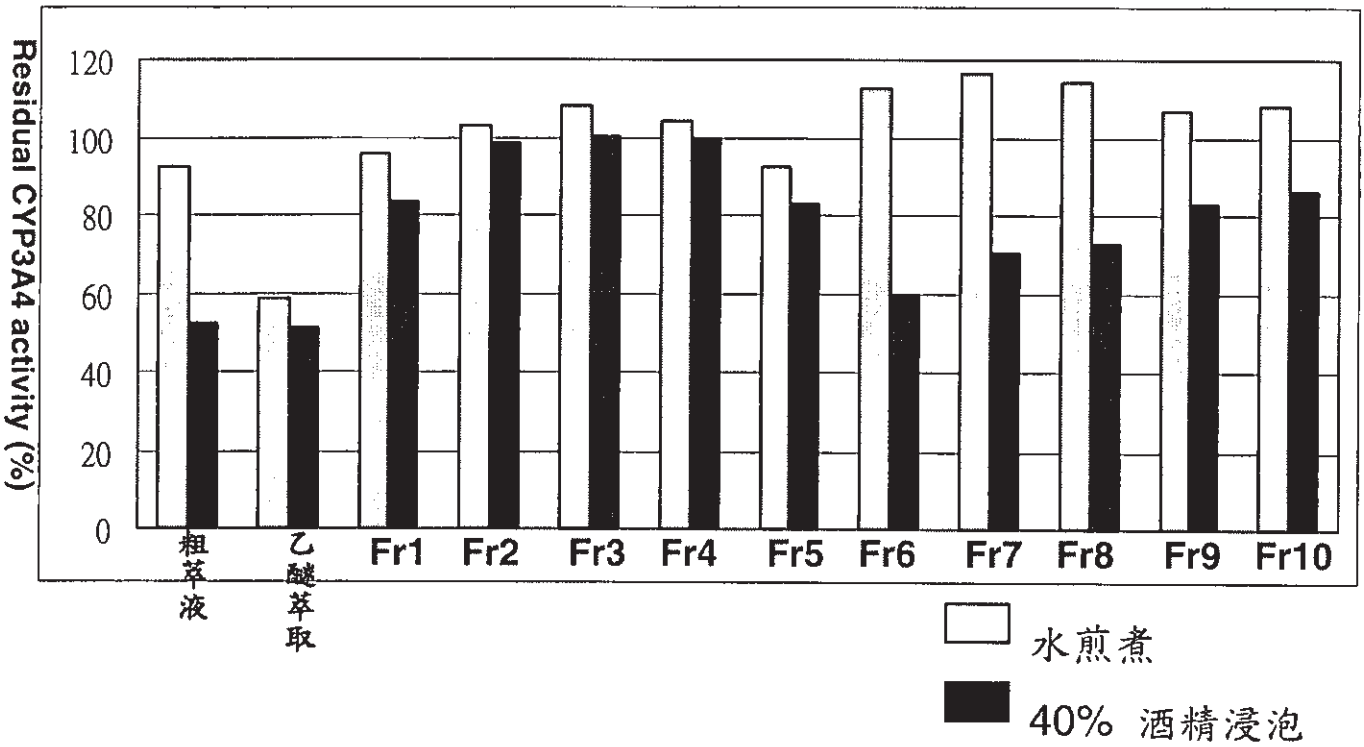

圖 15. 當歸粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比

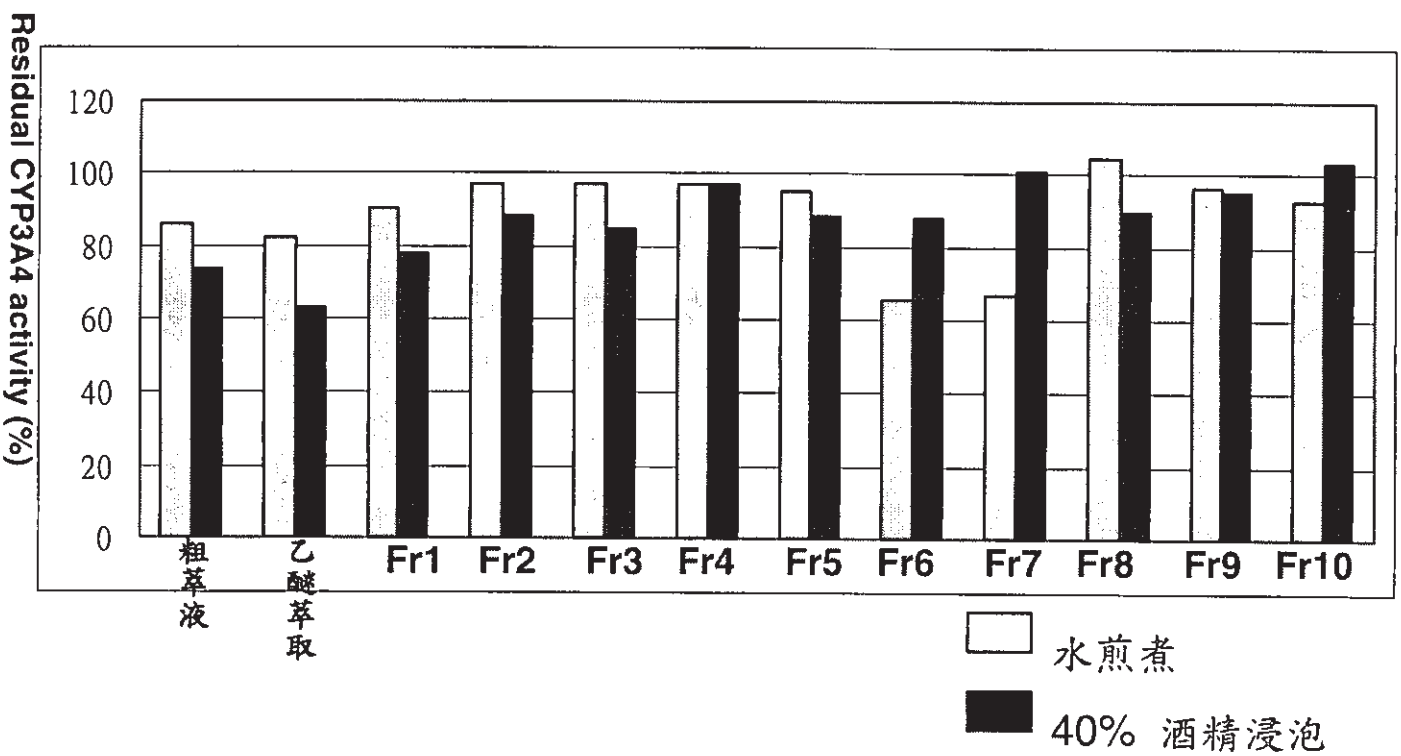

圖 16. 防風粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比

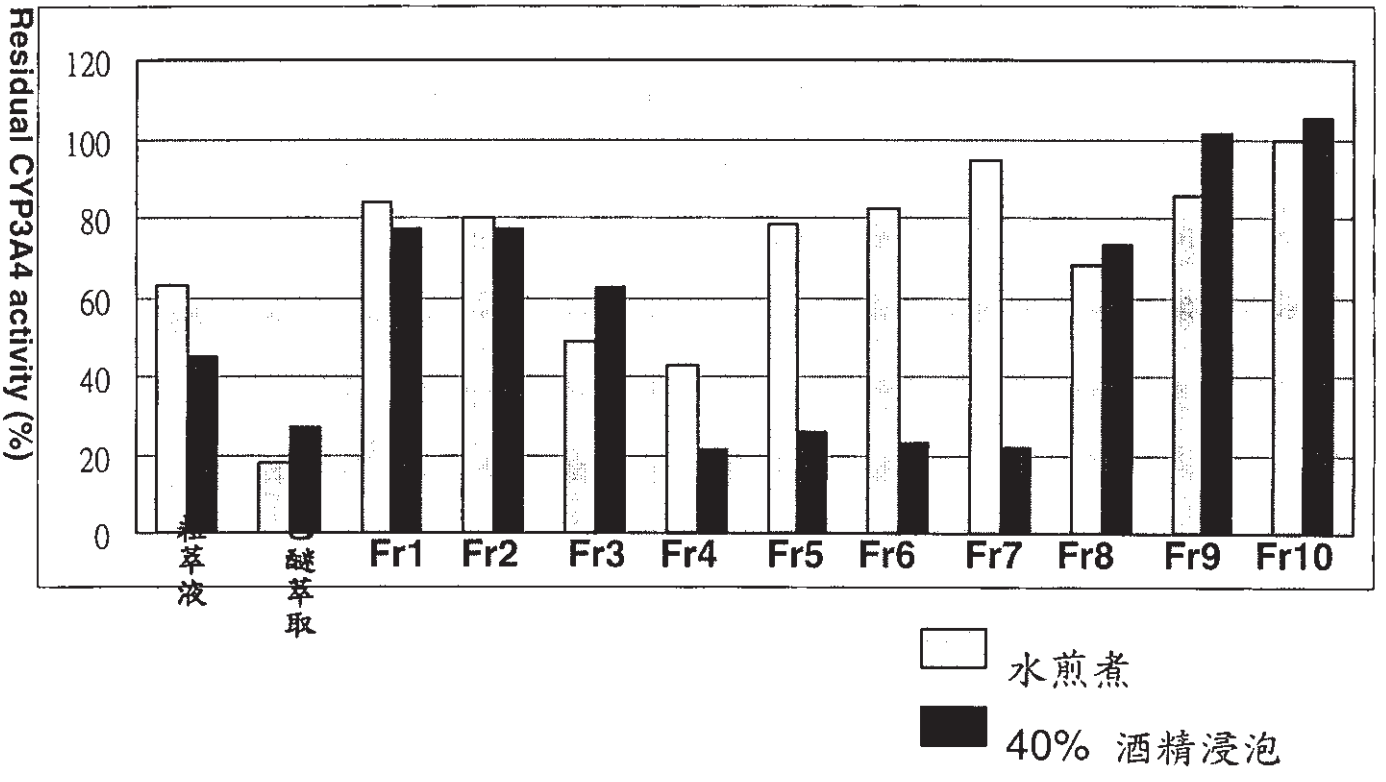

圖 17. 獨活粗萃液及各分離層之酵素抑制的酵素活性殘存百分比

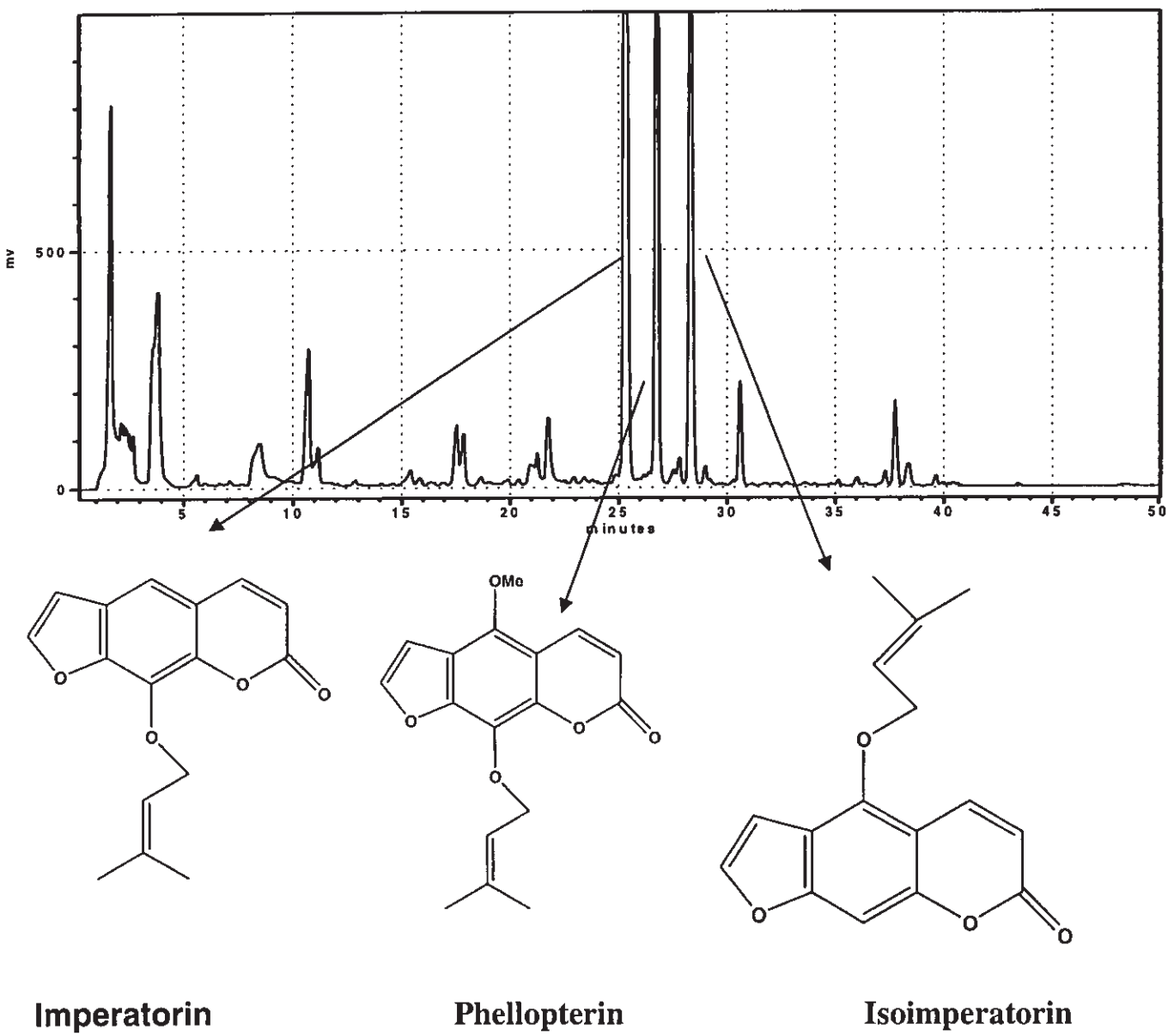

圖 18. 白芷之層析圖與其成份之結構圖

表 1. 複方方劑之組成

十神湯		補中益氣湯		防風通聖散		九味羌活湯		川芎茶調散	
成分	每 6.0 g 中含	成分	每 12.0 g 中含	成分	每 6.0 g 中含	成分	每 7.5 g 中含	成分	每 6.0 g 中含
紫蘇	3.8 g	黃耆	6.0 g	防風	1.0 g	羌活	3.0 g	白芷	2.0 g
葛根	3.8 g	人參	4.0 g	川芎	1.0 g	防風	3.0 g	甘草	2.0 g
升麻	2.0 g	白朮	2.0 g	當歸	1.0 g	蒼朮	3.0 g	羌活	2.0 g
川芎	2.0 g	炙甘草	4.0 g	白芍	1.0 g	細辛	1.0 g	荊芥	4.0 g
白芷	2.0 g	當歸	2.0 g	大黃	1.0 g	川芎	2.0 g	川芎	4.0 g
麻黃	2.0 g	陳皮	2.0 g	薄荷	1.0 g	白芷	2.0 g	細辛	1.0 g
甘草	1.5 g	升麻	1.0 g	麻黃	1.0 g	生地黃	2.0 g	防風	1.5 g
陳皮	1.5 g	柴胡	1.0 g	連翹	1.0 g	黃芩	2.0 g	薄荷	8.0 g
香附	1.5 g	生薑	3.0 g	石膏	2.0 g	甘草	2.0 g		
赤芍	1.5 g	大棗	2.0 g	黃芩	2.0 g	生薑	3.0 g		
生薑	1.5 g			桔梗	2.0 g	蔥白	3.0 g		
蔥白	1.5 g			甘草	4.0 g				
				荊芥	0.5 g				
				白朮	0.5 g				
				山梔子	0.5 g				
				生薑	0.5 g				
				滑石	2.0 g				

表 2. 生藥水煎劑之層析圖譜比較表

	Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.7	Fr.8	Fr.9	Fr.10
白芷水煎劑	+	++	++	+	++	+	+			
羌活水煎劑	+	++	+		++	++	+			
當歸水煎劑	+	++	+			++				
防風水煎劑	++	++	++	++						
獨活水煎劑	++			++	++	++				

註 + 有小的層析峯 (Peak height <100mV)

++ 有明顯層析峯 (Peak height >100mV)

表 3. 生藥 40%酒精浸泡液之層析圖譜比較表

	Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.7	Fr.8	Fr.9	Fr.10
白芷 40%酒精浸泡液	++	+	++	++	++	++	++	++		
羌活 40%酒精浸泡液	++	++	++	++	++	++	++	++		
當歸 40%酒精浸泡液	++				++	++				
防風 40%酒精浸泡液	++	++	++	++	++	++	++			
獨活 40%酒精浸泡液	++		++	++	++	++				

註 + 有小的層析峯 (Peak height <100mV)

++ 有明顯層析峯 (Peak height >100mV)

表 4. 生藥其各分離層之酵素抑制比較表

	Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.7	Fr.8	Fr.9	Fr.10
白芷水煎劑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
白芷 40%酒精浸泡液	-	-	-	+	+	++	+	+	-	-
羌活水煎劑	-	-	+	+	++	+	-	-	-	-
羌活 40%酒精浸泡液	-	-	++	+	++	++	++	-	-	-
當歸水煎劑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
當歸 40%酒精浸泡液	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
防風水煎劑	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
防風 40%酒精浸泡液	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
獨活水煎劑	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
獨活 40%酒精浸泡液	+	+	+	++	++	++	++	+	-	-

註 - 酵素不受抑制(80%<Residual CYP3A4 activity<120%)

+ 酵素受部分抑制 (50%<Residual CYP3A4 activity<80%)

++ 酵素明顯受抑制 (0%<Residual CYP3A4 activity<50%)

表 5. 生藥及複方酵素(CYP3A4)活性抑制百分比

酵素活性的抑制%

	白芷	羌活	當歸	防風	獨活
水煎煮	19.2	43.8	7.5	13.8	37.2
40% 酒精浸泡	78.5	99.2	41.4	17.5	81.2

複方				
十神湯	補中益氣湯	防風通聖散	九味羌活湯	川芎茶調散
3.1	0	35.9	41.2	22.3