

國立台東大學
生命科學研究所
碩士學位論文

四物湯原藥材進行分項醱酵降解之菌
種純化分離、鑑定與功能性分析之研究



研究生：陳怡蓁

指導教授：廖尉岑 教授

彭仁君 教授

張裕純 教授

中華民國九十七年六月十九日

總目錄

誌謝.....	II
中文摘要.....	IV
英文摘要.....	VI
目錄.....	VIII
圖索引.....	XI
表索引.....	XIV



國立台東大學

學位論文考試委員審定書

系所別：生命科學研究所

本班 陳怡蓁 君

所提之論文 四物湯原藥材進行分項醱酵降解之菌種純化分離、鑑定
與功能性分析之研究

業經本委員會通過合於 碩士學位論文 條件
 博士學位論文

論文學位考試委員會：張裕鈞
(學位考試委員會主席)

劉仁君

廖尉崙

(指導教授)

論文學位考試日期：97年6月19日

國立台東大學

- 附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。
2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 國立臺東大學 生命科學 系(所)
組 96 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：四物晶原藥材進行各項醣苷降解之最佳純化分離、鑑定與功能性分析之研究

本人具有著作財產權之論文全文資料，授權予下列單位：

同意	不同意	單位
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	國家圖書館
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	本人畢業學校圖書館
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	與本人畢業學校圖書館簽訂合作協議之資料庫業者

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或上載網站，藉由網路傳輸，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

同意 不同意 本人畢業學校圖書館基於學術傳播之目的，在上述範圍內得再授權第三人進行資料重製。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開
		<input checked="" type="checkbox"/>	

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：_____ (親筆簽名)

研究生簽名：陳怡蓁 (親筆正楷)

學 號：9500802 (務必填寫)

日 期：中華民國 97 年 6 月 19 日

1.本授權書(得自 <http://www.lib.nttu.edu.tw/theses/> 下載)請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

2.依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議:研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化，並至遲於三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

授權書版本:2008/05/29

誌謝

在這段艱辛的研究生涯中，首先感謝我的恩師張裕純教授這兩年來在實驗上不遺餘力的給予細心指導和鼓勵、生活上的照料，使我在這段時間茁壯不少，在此謹至上最高謝意。研究期間非常感謝高苑科技大學，借用多項儀器設備支援本研究，尤其感謝王清輝老師、王盛世老師、徐嘉澤、潘建亮老師平時在實驗上的協助與關心。另外要感謝港香蘭股份有限公司蔡宗義董事長提供藥材及研究所需經費，以及屏東科技大學莊秀琪老師在實驗上協助，再此獻上萬分的謝意。

口試期間相當感謝口試委員廖尉岑教授、彭仁君教授在百忙之中，還抽空為我的碩士論文訂正並提供寶貴的建議，使得學生的碩士論文得以順利完成。

在忙碌的研究生活，相當感謝陪伴我一起成長的學弟妹們，昇宏、志祥、郁軒、佳臻、佩潔、筱葳、正國、家銘、岱紋、凌瓏、鶴翔、筑維，無論在實驗上或是生活上，大家就像一家人一樣互相照顧和鼓勵，因為有你們的幫忙讓我能開心度過這辛苦的研究生活，感謝大家幫忙你們的好我會永遠記住，同時也要感謝台東大學的同班同學們以及尚澄學長、育鋒學長與助理惠嵐在課業上提供意見與生活上的照顧，真的很感謝你們。

最後謹將本研究成果獻給我最摯愛的父母親陳國隆先生與周秀娥

女士，如果沒有他們的支持與幫助不可能會有今日論文的完成。更要感謝我的姐姐怡燕、妹妹姿伊與妍伶以及我的好朋友們，你們所給的關心和鼓勵，讓我在研究所這兩年無後顧之憂，能夠專心於完成學業上，使我得以完成艱澀的學業，願將一切的光榮與驕傲獻給他們。



中文摘要

四物湯為一傳統之中藥材，主要是由『當歸』、『熟地黃』、『川芎』、『芍藥』所組成，為婦人病之聖藥；常用於中國傳統調理女性身體機能，使婦女滋補養顏，擁有紅潤氣色的良方。目前市面上所販售四物湯中藥材商品，一般製造過程中都是以高溫水或食用溶劑（如乙醇）萃取濃縮後製成產品進入市場。本研究有別於傳統的物理或化學的加工製程，是利用微生物醱酵萃取四物湯原藥材的有效成份，由於微生物的醱酵作用增強了中草藥有效成分的萃取出效果，使得藥效效價提高，故在產品開發上可使業者降低製造成本，並同時具有重要的經濟價值和實用意義。此外在本研究過程中並同時進行不同醱酵時期之醱酵液中指標成份變化的監控、菌種純化分離與鑑定、總多酚、總多醣體、抗氧化力、造血幹細胞活性與細胞增生實驗變化之分析，此分析可以成為四物原藥材新產品開發的主要科學證據之參考。

在醱酵過程中發現，高溫 60 度醱酵進行到第十二天指標成分開始有明顯的降解情形產生；室溫醱酵則是在第 39 天才有明顯出現降解的情形，從數據圖表中我們可以明顯看出在室溫沒加菌情況下進行醱酵所偵測到的總多酚、總多醣體、清除 DPPH 自由基能力及造血母細胞增生與細胞活性都比其他條件狀態下都來的好，由此結論

可以得知四物湯進行醱酵的最佳條件以四物湯原藥材中添加 15% 的葡萄糖濃度進行醱酵，使原本存在於四物湯原藥材中的強勢菌株自然作用，所得到醱酵結果表現最好。

關鍵詞：四物湯、中藥材、微生物醱酵萃取、醱酵液、新產品開發



英文摘要

Si-Wu-Tang is a traditional formula of Chinese medicine consisting of 『*Angelica sinensis* (Oliv) Diels 』、 『*Rehmanniae Preparata Radix* 』、 『*Ligsticum Chuanxiong Hort* 』 and 『*Paeonia lactiflora* 』 , Si-Wu-Tang is a fantastic herb medicine for women-related diseases. In Chinese tradition therapy, it used to regulate the body from dysfunction to normal function and increase energy level in women body. The general production process for commodity of Si-Wu-Tang preparation is often used the high-temperature water or edible solvent as ethanol to extract the function fractions from Si-Wu-Tang bulk materials. There is a different approach from traditional methods in this study. The functional components will be extracted by biological methods as microbial fermentation, but not traditional approaches as physical or chemical methods, because the setting the gathering of people whose function has strengthened the effective composition of Chinese herbal medicine of the ferment of microorganism produces the result, make drug effect result price raise, therefore may causing industry reduce the production cost in the product development, and simultaneously has the important economic value and the practical significance. In addition, The analysis of functional components of various stages of fermentation broth as index component 、 polyphenol 、 polysaccharide、anti-oxidation、hematopoietic stem cell activation and cell hyperplasia analysis that experiment change .These data can be

act as the major scientific reference of new Si-Wu-Tang products development.

Fund in the course of setting aside the ferment high temperature 60 fermentation carries on stars to 12 days targets ingredients to have the obvious solution to fall the situation occurrence ; the room temperature did not there was a situation that is obviously degraded on the 39th day to set aside the ferment ,from the data graph we may obviously see in the room temperature have not added in the fungus situation carries on index component 、 polyphenol 、 polysaccharide 、 anti-oxidation 、 hematopoietic stem cell activation which the fermentation detects all high which all condition conditions under ,from this deduces the fermentation carries on under the condition increase 15% density by Si-Wu-Tang original material for medicine in the glucose does not join any strain to select the traditional method to carry on the nature to ferment , as obtained is best as the fermentation result performance.

Keyword: Si-Wu-Tang, traditional Chinese medicinal materials, microorganism fermentation extract, fermentation fluid, new product development

目 錄

第一章 前言

1.1 研究背景.....	1
1.2 研究目的.....	3
1.3 研究內容.....	4

第二章 文獻整理

2.1 中藥材的簡介.....	5
2.1.1 四物湯之介紹.....	5
2.1.2 當歸之介紹.....	8
2.2.3 熟地之介紹.....	10
2.2.4 川芎之介紹.....	12
2.2.5 白芍之介紹.....	14
2.2 高效液相層析法.....	16
2.3 菌種的分類方法.....	24
2.4 發酵之簡介.....	26
2.5 總多酚之簡介.....	28
2.6 總多醣體之簡介.....	30
2.7 抗氧化力之簡介.....	31
2.8 造血幹細胞之簡介.....	33

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料.....	34
3.1.1 中草藥.....	34
3.1.2 菌體.....	34
3.1.3 藥品.....	34
3.2 實驗儀器設備.....	35
3.3 實驗步驟.....	36
3.4 中草藥有效成份的濃縮萃取.....	37
3.4.1 流程圖.....	38
3.4.2 HPLC 定量分析方法.....	40
3.5 四物湯原藥材醱酵.....	41
3.5.1 流程圖.....	42
3.6 總多酚含量測定.....	44
3.7 總多醣體含量測定.....	46
3.8 清除 DPPH 自由基能力測定.....	48
3.9 大量取得豬隻骨髓造血母細胞以製備試管內分化為樹狀突 細胞方法.....	50
3.10 菌種鑑定方法.....	51

第四章 實驗數據

4.1 四物湯醱酵產物 HPLC 成份分析.....	53
4.2 總多酚含量測定.....	67
4.3 總多醣體含量測定.....	73
4.4 清除 DPPH 自由基能力測定.....	79
4.5 第一次大量取得豬隻骨髓造血母細胞以製備試管內分化為 樹狀突細胞的數據.....	85
4.5.1 第二次大量取得豬隻骨髓造血母細胞以製備試管內分化 為樹狀突細胞的數據	86
4.6 菌種鑑定	90
第五章 結 論.....	94
第六章 參考文獻.....	97

圖 索 引

圖 2-1 四物湯圖片.....	4
圖 2-2 當歸圖片.....	8
圖 2-3 熟地圖片.....	10
圖 2-4 川芎圖片.....	12
圖 2-5 白芍圖片.....	14
圖 2-6 HPLC 流程圖.....	16
圖 2-7 往 復 泵.....	18
圖 2-8 注 射 型 泵.....	19
圖 2-9 定 壓 泵.....	20
圖 2-10 樣品注入系統.....	20
圖 2-11 紫外光可見光度偵測器.....	21
圖 2-12 示差折射偵測器.....	22
圖 2-13 電化學偵測器.....	22
圖 2-14 螢光偵測器.....	23
圖 4-1 四物複方與港香蘭四物浸膏 HPLC 圖.....	59
圖 4-2 四物複方與單方 HPLC 圖.....	59
圖 4-3 四物複方與熟地、標準品梓醇 HPLC 圖.....	60
圖 4-4 四物複方與芍藥、標準品芍藥苷 HPLC 圖.....	60

圖 4-5 四物複方與川芎、當歸及標準品阿魏酸 HPLC 圖.....	61
圖 4-6 四物複方與高溫醱酵液 HPLC 圖.....	61
圖 4-7 四物複方與室溫醱酵液 HPLC 圖.....	62
圖 4-8 60 度有加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 0%)-指標成分的變化....	63
圖 4-9 60 度有加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 5%)-指標成分的變化....	63
圖 4-10 60 度有加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 10%)-指標成分的變化..	63
圖 4-11 60 度有加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 15%)-指標成分的變化..	63
圖 4-12 60 度沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 0%)-指標成分的變化...64	
圖 4-13 60 度沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 5%)-指標成分的變化...64	
圖 4-14 60 度沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 10%)-指標成分的變化..64	
圖 4-15 60 度沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 15%)-指標成分的變化..64	
圖 4-16 室溫加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 0%)-指標成分的變化.....65	
圖 4-17 室溫加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 5%)-指標成分的變化.....65	
圖 4-18 室溫加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 10%)-指標成分的變化...65	
圖 4-19 室溫加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 15%)-指標成分的變化...65	
圖 4-20 室溫沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 0%)-指標成分的變化..66	
圖 4-21 室溫沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 5%)-指標成分的變化..66	
圖 4-22 室溫沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 10%)-指標成分的變化.66	
圖 4-23 室溫沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 15%)-指標成分的變化.66	

圖 4-24 比較高溫與室溫醱酵液對總多酚含量測定.....	72
圖 4-25 比較高溫與室溫醱酵液對總多醣含量測定.....	78
圖 4-26 比較高溫與室溫醱酵液對清除 DPPH 自由基能力.....	84
圖 4-27 Effects of extracts on cell proliferation of porcine	85
圖 4-28 Effects of extracts on cell activities of porcine	85
圖 4-29 Screening Cell system: bone marrow hematopoietic cells isolated from rat	88
圖 4-30 Screening Cell system: bone marrow hematopoietic cells isolated from rat	89
圖 4-31 <i>Geobacillus sp.</i> 菌株在 MT8.0 的形狀	90
圖 4-32 顯微鏡下所觀察到 <i>Geobacillus sp.</i> 的形狀	90
圖 4-33 <i>Bacillus sp.</i> 菌株在 MT8.0 的形狀	91
圖 4-34 顯微鏡下所觀察到 <i>Bacillus sp.</i> 的形狀	91
圖 4-35 <i>Bacillus sp.</i> 菌株在 MT8.0 的形狀	92
圖 4-36 顯微鏡下所觀察到 <i>Bacillus sp.</i> 的形狀	92

表 索 引

表一 60°C 四物醱酵有加菌下 HPLC 分析指標成分變化量	53
表二 60°C 四物醱酵無加菌下 HPLC 分析指標成分變化量	55
表三 室溫四物醱酵有加菌下 HPLC 分析指標成分變化量	57
表四 室溫四物醱酵有沒菌下 HPLC 分析指標成分變化量	58
表五 四物醱酵 60°C 有加菌總多酚含量測定	68
表六 四物醱酵 60°C 沒加菌總多酚含量測定	69
表七 四物醱酵室溫加菌總多酚含量測定	70
表八 四物醱酵室溫沒加菌總多酚含量測定	71
表九 四物醱酵 60°C 有加菌總多醣含量測定	74
表十 四物醱酵 60°C 沒加菌總多醣含量測定	75
表十一 四物醱酵室溫加菌總多醣含量測定	76
表十二 四物醱酵室溫沒加菌總多醣含量測定	77
表十三 四物醱酵 60°C 有加菌 DPPH 抗氧化力含量測定	80
表十四 四物醱酵 60°C 沒加菌 DPPH 抗氧化力含量測定	81
表十五 四物醱酵室溫加菌 DPPH 抗氧化力含量測定	82
表十六 四物醱酵室溫沒加菌 DPPH 抗氧化力含量測定	83
表十七 室溫醱酵與不同濃度的葡萄糖對於造血細胞增生實驗.....	86
表十八 室溫醱酵與不同濃度的葡萄糖對於增加細胞活性實驗.....	87

第一章 前言

1.1 研究背景

近幾年來，「中草藥」這個名稱變得十分熱門，生活中很多東西只要冠上了「中草藥」這三字價格就提高許多，例如：中草藥化妝品、中草藥洗髮精、中草藥酒、中草藥糖…等，一般人觀念中對於所謂的「中草藥」的認知決大部份都是對人類身體的健康有正面幫助及療效功能性存在。

「中草藥」的起源可以說是從神農嚐百草開始，經歷了數千年的歷史，是中國古代科學技術中唯一保存最完整的一部份⁽¹⁾，也因這項技術完整的保留，使得後代炎黃子孫們的生活物質上與它息息相關，不論是在醫療上或是飲食上都是密不可分，在中國五千年的歷史裡對於中草藥的書籍更是不勝枚舉，可說是祖先留給我們最好的遺產之一⁽²⁾。近幾年由於東方醫學遍及了全世界，因此科學家們對於傳統的中草藥也漸漸感到有興趣，進而陸續投入這方面的研究領域，這幾年已經有許多的研究報告和動物臨床應用來證明傳統中草藥的價值是很高的。

由於現今人們的生活太過於繁忙，使得身體無法負荷過度的操勞，相對的在健康方面因而引起了各種不同的疾病，例如：腸胃病、肝病、心肌…等，人們為了保健、強身，攝取相當多的保健食品，因

此使得健康保健食品紛紛上市了；中草藥在這方面也不惶多讓，中草藥對於疾病的治療也是有相當不錯的效果，對養身更是最佳的選擇；古代的帝王也常常食用利用中草藥做出不同的藥膳來達到保健、強身的效果，比起人工合成的健康食品，中草藥更合乎自然，所以將中草藥加工製造成為機能性健康食品是目前最引人關注的一環。



1.2 研究目的

中草藥經過微生物醱酵後，有效成份的含量會提高、藥效會增強，並且可以明顯降低中草藥藥用量，是非常具有經濟價值的⁽³⁾。本次實驗研究主要是希望藉由傳統的醱酵萃取技術，來探討複方四物湯原藥材在醱酵後，對於醱酵液中指標成份是否有明顯的變化，進而來分析評估利用微生物醱酵萃取中藥材是否真有其效果與功效在。

四物湯為一傳統之中藥材，由「當歸」、「熟地黃」、「川芎」、「芍藥」組成，為婦人病之聖藥^(3,4,5,6,7)，常用於中國傳統調理女性身體機能，使婦女滋補養顏，擁有紅潤氣色的良方⁽³⁾。目前市面上所販售四物湯中藥材商品，一般製程過程中都是以高溫水或食用溶劑(如乙醇)萃取濃縮後製成產品進入市場，這麼一來有可能會因此破壞植物中的一些有效成份，所以本實驗有別於傳統的物理或化學的加工製程，是利用微生物醱酵萃取四物湯原藥材的有效成份，由於微生物的醱酵作用增強了中草藥有效成份的萃出效果，使得藥效價值提高，並且配合一些功能性的測定與分析，分別對醱酵後的成品進行指標成份變化的監控、總多酚、總多醣、抗氧化力清除自由基能力的變化測定及造血母細胞與細胞活性增生的檢測。

1.3 研究內容

- (1) 四物湯原藥材分項室溫與 60°C 醱酵及醱酵液分離。
- (2) 制定標準檢驗方法鑑定各原藥材指標成份萃出情形。
- (3) 分析醱酵萃取液中指標成份鑑定
- (4) 總多酚之變化
- (5) 總多醣的變化
- (6) 清除 DPPH 自由基能力
- (7) 檢驗中草藥成份之促進造血母細胞與細胞活性增生
- (8) 菌種鑑定工作



第二章 文獻回顧

2.1 中藥材簡介

a. 四物湯的介紹



圖 2-1 四物湯圖片

中草藥的複方是我國的一塊寶，我國歷史醫家無論是內服用藥還是外用藥治病，絕大多講究使用複方⁽¹⁾。歷史幾千年，中草藥方劑數量多達幾十萬，形成了眾多的名方，複方的配製用藥是中國幾千年智慧的結晶，已經發揮不可以取代的重要作用^(2,55)。

中草藥複方是中醫臨床用藥的主要形式，它是中醫基礎理論為指導，按照君、臣、佐、使的組方為原則，選用恰當的藥物定量配製而成，具有級高的科學價值^(3,4,53,54,61)。以往主要是在單味中草藥中尋找活性成分，但大多數單味中草藥本身就是一種天然組成化學庫，並非一個化學成分就能夠代表的^(5,6,55,56,57)。因此，複方研究需要確定其中真正起作用的成份是那些，去粗取精，去偽存真，只有這樣才能提供高效、安全、準確，能為國際社會所接受的中草藥製劑^(58,59,60)。

四物合劑為〈中醫人民共和國藥典〉收藏品種，來源最早記載於宋朝〈太平惠民和劑局〉的補血經典名方四物湯，被稱為婦人病的聖

藥，在臨床上廣泛的應用，為補血、活血、調經之經典名方^(1,2,3,61,62,63,64)。

主要由『當歸』、『熟地黃』、『川芎』及『芍藥』四味中草藥所組成，四物合劑臨床作用：

(1)血虛症：對改善因血虛而出現的面色無華，頭昏眼花，心悸失眠，手足麻木，月經不調等症狀療效顯著。同時發現治療前後病人白血球，紅血球，血色素，血小板均有所增加，其中紅血球的血色素有顯著性增加。未發現有明顯的不良反應，表示四物藥劑用於臨床安全可靠^(2,4,5,6)。

(2)藥物流產後出血：藥物流產後平均陰道出血時間為半月左右(包括點滴出血)，有的長達1~2月之久，當胎囊排出的前三天出血較多。認為RU486有微弱的孕激素活性，大量使用時，會使得多餘的藥物長時間作用於蛻膜，而不能在短時間內剝離乾淨。對子宮內膜蛻膜的作用如果不徹底，會導致蛻膜物殘留在子宮內，因而使墮胎後出血時間延長^(1,2,3,4,5,6)。

(3)黃體功能不全：黃體功能不全的主要病因是卵泡期發育不良，排卵後形成的黃體功能下降，主要是因為黃體期，孕激素分泌不足，而使子宮內膜分泌不良，導致不孕和流產。本病的主要治療方法為卵泡期，克羅米芬藥物治療促進卵泡的發育，或在黃體期補充雌激素等對症治療，然而效果不甚滿意^(2,3,4,5,8)。採用四物合劑治療

則收效良好，表明四物合劑是治療本病的有效中成藥。中醫學理論認為黃體功能不全的病因有腎陰不足，腎陽虛衰、肝經鬱熱等，四物湯合劑有養血活血、滋補腎陰，服用則切合病因。提示，四物合劑有促進卵泡生長發育的作用，並能促進卵泡分泌雌激素的效果及改變子宮頸黏液，利於精子通過；治療後基礎體溫顯示平均黃體期時間延長，提示四物湯合劑有健全黃體功能的功效，其療效較為滿意^(2,3,4,5,6,8)。

(4)對人紅白血病細胞株 K562/ADM 多種藥物耐藥性的逆轉作用；四物合劑在無毒性劑量時能逆轉細胞株 K562/ADM 對 ADM 的耐藥性，但對細胞膜 P-glycoprotein 表達影響不大，其逆轉作用可能與降低 P-glycoprotein 藥物外排作用，增加細胞內藥物濃度有關。可見，四物合劑對腫瘤的防治與康復具有重要作用，可協同化療藥物發揮增效解毒作用^(1,2,3,4,5,8)。

b. 當歸的介紹



圖 2-2 當歸圖片

【拉丁名稱】 Radix Angelicae Sinensis

【別名】 歸身，全歸，歸尾，乾歸，馬尾歸、雲歸、西歸、文元、乾歸、千歸、秦歸^(10,11,12)。

【英文名稱】 Root of Chinese Argelica

【來源】 為傘形科多年生草本植物當歸 *Angelica sinensis(Oliv.)Diels* 的根。生於高寒多雨區。產地主產於中國甘肅東南部岷縣(秦州)，產量多，質量好；其次則為四川、雲南等地^(10,11,12)。

【性味】 性溫，味甘、辛

【化學成分】 含藁本內酯(ligustilide)、正丁烯拂內酯(n-butylidene phthalide)、阿魏酸、烟酸、蔗糖和多種氨基酸，以及倍半萜類化合物等^(10,11,12,65,66,67,68)。

【功能主治】

(1)用於心肝血虛，面色泛黃，眩暈心悸等。當歸甘溫滋潤，為補血要藥。常搭配熟地、白芍等同用，如四物湯。若氣血很虛者，常與

黃芪、人參等同用，如當歸補血湯、人參營養湯等^(10,11,12)。

(2)用於血虛或血虛而兼有瘀滯的月經不調，痛經，經閉等。當歸既能補血、活血，又能調經，為婦科要藥。如上述，在氣滯血瘀者，常配香附、桃仁、紅花；因於寒凝者，常配肉桂、艾葉；因偏血熱者，則常配赤芍藥、丹皮等^(10,11,12)。

(3)用於血虛、血滯而兼有寒凝，以及跌打損傷，風濕痺阻的疼痛症。當歸補血活血，又兼能散寒止痛，故可隨症配伍應用。如治血滯兼寒的頭痛，常配川芎、白芷等；氣血瘀滯的胸痛、脅痛，常配鬱金、香附等；治虛寒腹痛，常配桂枝、白芍等；治血痢、腹痛，常配黃芩、黃連、木香等；治子宮肌瘤積聚，常配三棱、莪術等；治跌打損傷，常配乳香、沒藥等；治風濕痺痛，肢體麻木，常配伍薑活、桂枝、秦艽等；現代用於冠心病心絞痛、血栓閉塞性脈管炎等，亦取得一定的療效^(10,11,12)。

(4)用於癰疽瘡瘍。當歸既能活血消腫止痛，又能補血生肌，故亦為外科所常用。用於瘡瘍初期，常配銀花、連翹、穿山甲等，以消腫止痛；用於癰疽潰後，氣血虧虛，常搭配人參、黃芪、熟地黃等，以補血生肌^(10,11,12)。

(5)用於血虛腸燥便秘，能養血與滋潤腸道通便。當歸常搭配火麻仁、肉蓯蓉等同用^(10,11,12)。

c. 熟地的介紹



圖 2-3 熟地圖片

【別名】酒壺花、山烟根、山烟、山白菜

【英文名稱】Rehmanniae Preparata Radix

【來源】玄參科多年生草本植物地黃 *Rehmania glutinosa* Libosch 的根。主產於中國河南、河北、內蒙古及東北大部分地區有栽培。秋季採挖，鮮用或乾燥切片生用^(13,14,69)。

【性味】鮮地性寒，謂甘、苦。生地黃性寒，味甘。

【化學成分】含梓醇(catalpol)、多種氨基酸和糖、甘露醇、β-谷甾醇及菜油甾醇(campesterol)等^(13,14,69,70)。

【功能主治】

- (1)用於血虛泛黃、眩暈、心悸失眠、月經不調、崩漏等。熟地黃為補血要藥，常與當歸、白芍並用，並隨症配伍相應藥物⁽¹³⁾。
- (2)用於腎陰不足的潮熱骨蒸、盜汗、遺精、消渴等。熟地黃亦為滋陰主藥，經常與山藥、山茱萸等同用，如六味地黃丸⁽¹³⁾。
- (3)用於肝腎精血虧虛的膝蓋酸軟、眩暈耳鳴、鬚髮早白等。熟地黃

經常與制何首烏、枸杞子、菟絲子等補精血、烏鬚髮藥同用^(13,14)。

【現代研究】熟地黃含梓醇、地黃素、甘露醇、維生素 A 類物質、糖類及氨基酸等；有強心、利尿、降血糖、增強免疫功能等作用^(13,14,69)。



d.川芎的介紹



圖 2-4 川芎圖片

【拉丁名稱】 Rhizoma Chuanxiong

【別名】 芎藭、京芎、香果、山鞠藭、胡藭、雀腦藭、貫芎、撫芎、台芎、西芎、小葉山芎^(15,16,17,18,19,20,71,72)。

【英文名稱】 Rhizome of Szechwan Lovage

【來源】 為傘形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong Hort.* 的根莖。主產四川，產量大，品質優；其他部分省區如雲南、貴州、江西、湖北、陝西、甘肅地產，量較小，質較次，均須要栽培^(15,16,17,71,72)。

【性味】 味辛，性溫。

【化學成分】 含揮發油，內酯類，生物鹼和酚類化合物。內酯成份主為 4-羥基-3-丁基酞內酯(4-hydroxy-3-butylphalide)、丁烯內酯、川芎內酯、藁本內脂(ligustilide)和新蛇床內酯；生物鹼類有川芎嗪(tetramethylpyrazine)、佩洛裡因；酚類化合物有川芎酚(chuanxiongol)、阿魏酸(ferulic acid)、

瑟丹酸(sedanin acid)等⁽²⁰⁾。

【功能】活血，祛風，止痛，解痙，鎮靜，降壓，擴張血管，調經。

用量、用法內服：煎服 3~9 克；研末服每次 1~1.5 克。[炮製] 川芎將原藥大小分檔，放清水中，夏秋季浸 1-2 小時，春、冬季浸 3-5 小時，洗淨撈出放竹籬裡或蒲包裡，上蓋濕草包，少量可裝入氈內悶潤，每天早晚淋水翻動，潤軟切 0.2-0.3cm 片，曬乾，又稱「川芎片」^(15,16,71,72)。



e.白芍的介紹



圖 2-5 白芍圖片

【拉丁名稱】 Radix Paeoniae Alba

【別名】 白芍，東芍、亳白芍。

【英文名稱】 White Peony Alba

【來源】 毛茛科多年生草本植物芍藥 *Paeonia lactiflora* Pall 的根。主產於中國浙江、安徽、四川等地。夏、秋二季採挖，洗淨，除去頭尾及細根，水煮，除去外皮，曬乾^(21,22,23,73)。

【性味】 味苦、酸，性微寒。

【化學成分】 根含芍藥苷 (paeoniflorin)、氧化芍藥苷 (oxypaeoniflorin)、芍藥內酯苷 (albiflorin)、苯甲醯芍藥苷 (benzoylpaeoniflorin)、芍藥苷元酮 (paeoniflorigenone)、丹皮酚原苷 (paeonlide)、丹皮酚 (paeonl)；尚含苯甲酸、胡夢卜苷及多種鞣質類等^(21,22,23,24,73)。

【功能】 平肝止痛，養血和陰，解痙鎮靜，抗菌。

【用量、用法】煎服 5-10 克。欲其平肝、斂陰多生用；用以養血調經多炒用或酒炙用⁽²¹⁻²⁴⁾。

【臨床應用】

- (1)用於血虛或陰虛有熱的月經不調，崩漏等。白芍有養血調經之效。常配當歸、熟地黃等同用。若陰虛有熱，月經先期、量多、或崩漏不止，可加阿膠、地骨皮等同用⁽²¹⁻²⁴⁾。
- (2)用於肝陰不足，肝氣不舒或肝偏亢的頭痛、眩暈、脅肋疼痛、腕腹四肢拘攣作痛等症。白芍有養肝陰，調肝氣，平肝陽、緩急止痛之效。治肝陽上亢的頭痛眩暈，常配生地、牛膝、石決明等同用；治肝鬱脅肋疼痛，常配當歸、白術、柴胡等同用；治腕腹手足攣急疼痛，常配甘草同用；治肝脾不調，腹痛泄瀉，常配防風、白術同用⁽²¹⁻²⁴⁾。
- (3)用於陰虛盜汗，及營衛不和的表虛自汗症。白芍能斂陰、和營而止汗。治營衛不和，表虛自汗常與桂枝配伍，調和營衛而止汗；治陰虛盜汗可配生地黃、牡蠣、浮小麥等，斂陰而止汗。
4. 用於眼皮跳。眼皮跳是個十分常見的現象，很多人都試過。在醫學上稱為「眼肌痙攣」，如果是偶然發生，不久便見消失，這屬於生理性，並非病態⁽²¹⁻²⁴⁾。

2.2 高效液相層析法

高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)，由於使用高壓泵，又稱為高壓液相層析法，其流程圖如圖 2-6 所示。在一根不鏽鋼製成的封密式管柱內，緊密地填入高效微粒填充物作為固定相，用高壓泵連續地按一定流量將溶劑送入層析管柱中；用注射器將定量樣品注入管柱頂端，再用溶劑連續地洗脫管柱，樣品中各成分就逐漸地分離，按一定順序從管柱中流出，進入偵測器，將各成分的濃度變化轉換成電子信號，經放大後進入紀錄器並繪出層析圖，將結果印出；高效液相層析法是以傳統的液相層析法為基礎，引入氣相層析法的理論，在技術上採用了高壓泵、高效固定相、高靈敏度偵測器及微電腦數據處理器，由記錄器將分析結果印出 (25~31)。

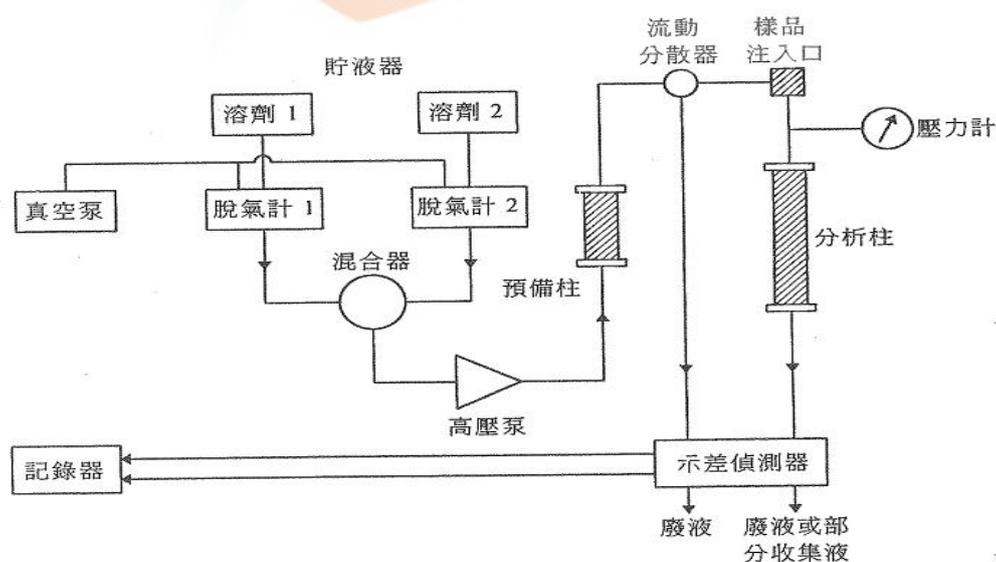


圖 2-6 HPLC 流程圖

2-2-1 高效液相層析法的特點⁽³⁰⁾

- (1)高壓：由於溶劑（流動相）的黏度比氣體大很多，而層析柱內填充了緊密的微粒（固定相），當溶劑通過管柱時會受很大阻力，一般在 1m 長的管柱其壓力降約為 $75 \times 10^5 \text{ Pa}$ 。故需要採用高壓泵輸液系統，壓力可達 $150 \sim 350 \times 10^5 \text{ Pa}$ 。
- (2)高速：溶劑通過管柱的流量可達 3~10 mL/min，製備層析圖之速度可達 10~50 mL/min，使分離速率加快；管柱製成封密型，可重複使用。
- (3)高效：使用高效固定相，其填充料的微粒均勻，直徑小於 $10 \mu\text{m}$ ，表面孔穴淺，質量傳送快；管柱效率高，理論平板數可達到 10^4 塊/m。
- (4)高靈敏度：採用高靈敏度偵測器，例如紫外線吸收偵測器的靈敏度可達 $5 \times 10^{-10} \text{ g/mL}$ ，是差折光偵測器的靈敏度可達 $5 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ 。

2-2-2 高效液相層析的裝置⁽³¹⁾

高效液相層析的裝置依圖 2-6 的流程圖，可分為五大部分：(1) 貯液器及溶劑處理系統，(2) 高壓泵，(3) 樣品注入系統，(4) 分離系統，(5) 偵測及記錄系統；分別敘述如下。

(1)貯液器及溶劑處理系統

HPLC 的貯液器通常含有一個或多個的玻璃或不鏽鋼貯液器，每個貯液器可容納 500 mL 至 2 L 的溶劑；溶劑處理系統包含真空泵系統(vacuum pumping system)、脫氣計(degasser)、溶液混合器(solvent mixer)等。

(2)高 壓 泵

HPLC 的高壓泵是用以驅使流動相溶劑流經分離的管柱，其工作條件要求很嚴格，因為直接影響分離的可靠性；一般常用的高壓泵有三種型式：(1) 往復泵 (reciprocating pump)，(2) 注射型泵 (syringe-type pump)，(3) 定壓泵 (constant pump) 各有其優缺點。

(1)往 復 泵

往復泵裝置如圖 2-7，目前 HPLC 系統有 90%使用往復泵，其優點是內部體積小 (~250mL)、高輸出壓力 (可高達 10,000 psi)、固定流速、與梯度洗脫的速配性佳。但其缺點是有脈衝流動，必須加以消除 (可使用兩組汽缸及活塞交替操作來消除脈衝)。

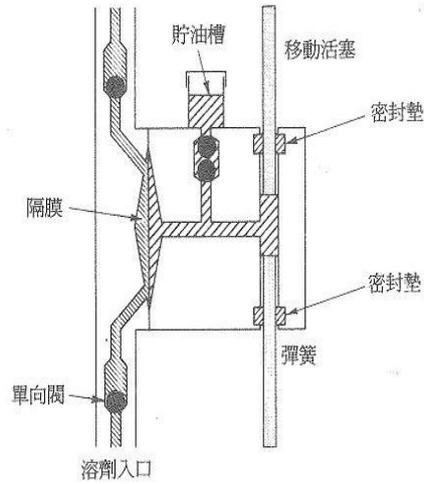


圖 2-7 往復泵

(2) 注射型泵

注射型泵又稱置換泵 (displacement pump)，其裝置如圖 2-8 所示，由馬達為動力作螺旋推進注射，其優點是無脈衝且流動平穩容易控制，但缺點是溶劑的容量小 (~250mL) 且更換溶劑不方便。

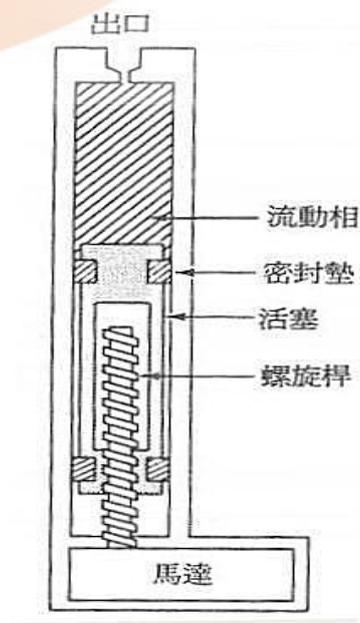


圖 2-8 注射型泵

(3) 定壓泵

定壓泵又稱氣動泵 (pneumatic pump)，其裝置如圖 2-9 所示，其流動相含在可壓縮容器中，由壓縮氣體來壓縮；此泵優點是簡單、便宜、且無脈衝，其缺點是容量有限且輸出壓力及流速和溶劑的黏度有關，並且不適用於梯度洗脫。

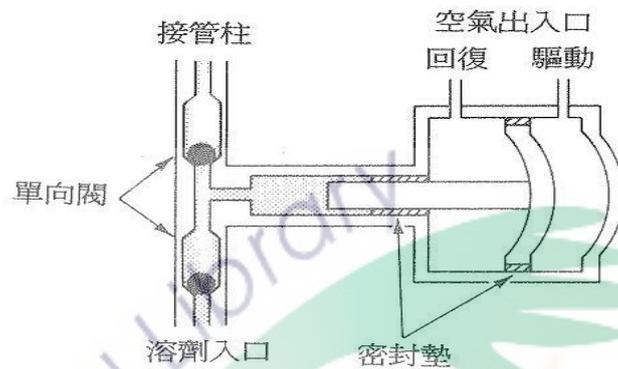


圖 2-9 定壓泵

1. 樣品注入系統

HPLC 的樣品注入系統要求方便準確注入樣品且不影響系統的高壓；可使用注射器及矽酮 (silicone) 或新平橡膠 (neoprene) 或鐵氟龍 (Teflon) 的自封墊片來進行樣品注入。

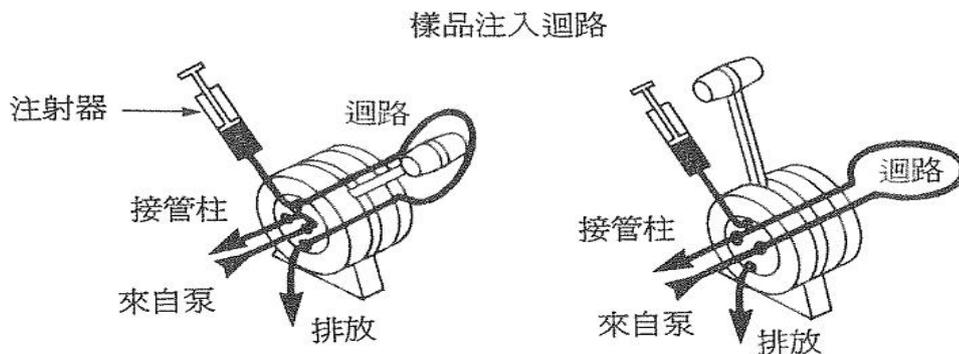


圖 2-10 樣品注入系統

2. 分離系統

HPLC 的分離系統主要為不鏽鋼管或厚壁玻璃管製成之分析管柱；典型的管柱長度 20~150 cm，管柱內徑為 2~10 mm，填充粒子大小有 3、5、10 μm ，填充物為矽膠、礬土、離子交換樹脂或矽藻土。

在溶劑進入分析管柱之前，通常先進入預備管柱或稱前置管柱（precolumn）或保護管柱（guard column），以除去雜質以免汙染分析管柱；預備管柱之填充物的化學性質與分析管柱相同，但管柱較短且填充粒子較大以減少壓力降低。

3. 偵測及記錄系統

HPLC 之偵測器之靈敏度不如 GC 之偵測器，大部分所使用的偵測器與樣品的特性有關。

(1) 紫外光可見光度偵測器

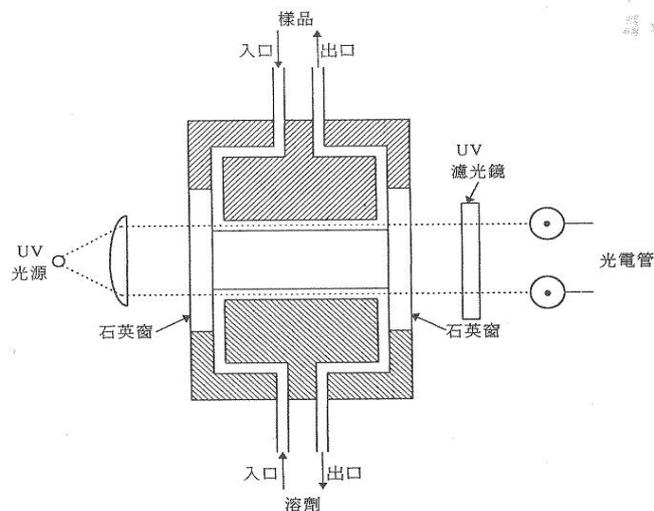


圖 2-11 紫外光可見光度偵測器

(2) 示差折射偵測器

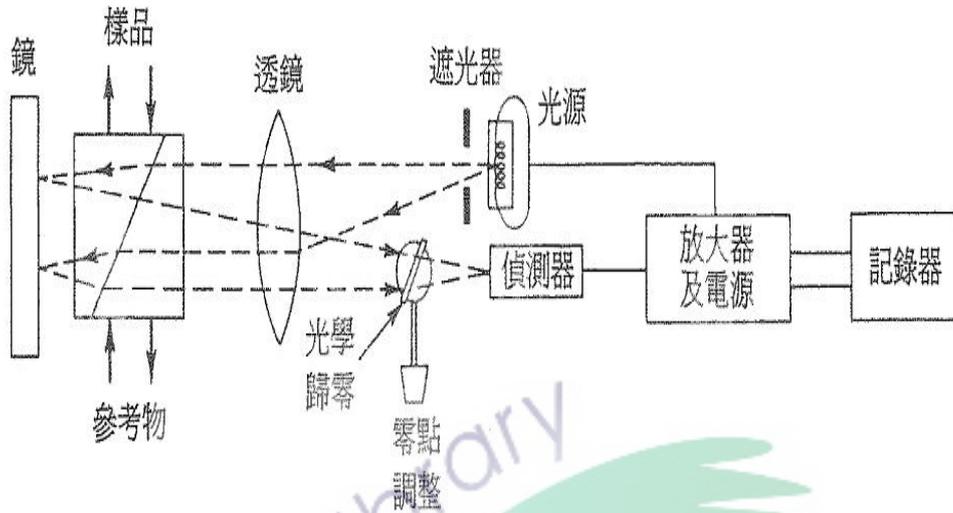


圖 2-12 示差折射偵測器

(3) 電化學偵測器

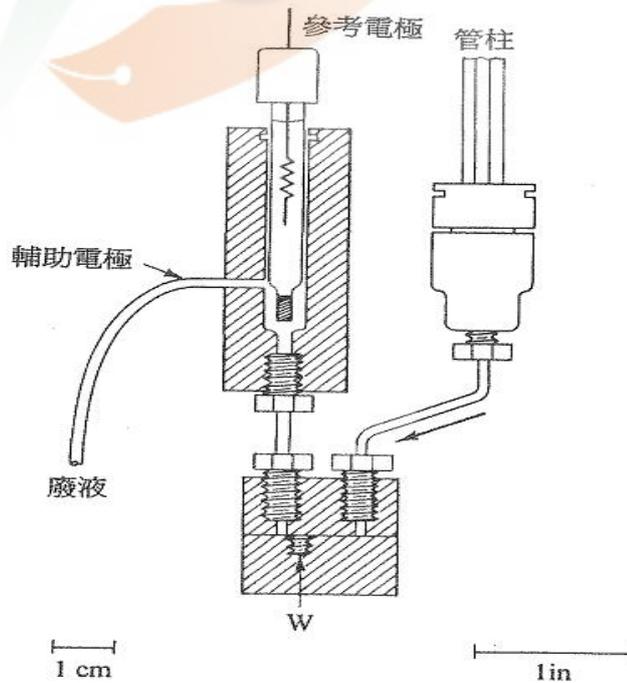


圖 2-13 電化學偵測器

(4) 螢光偵測器

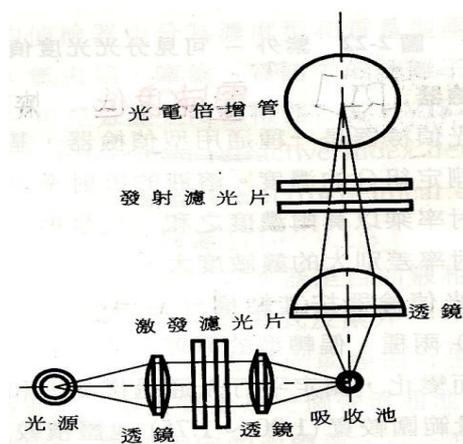


圖 2-14 螢光偵測器

2-2-3 HPLC 之應用⁽³¹⁾

高效液相層析法的主要應用是定性及定量分析、純物質的製備和混合物之分離，HPLC 在定性及定量分析方面可採用氣相層析法中的定性定量方法來進行。

利用高效液相層析法來製備純化物質，它和一般傳統的純化方法（如再結晶法，分餾法等）相比較，它具有更高的分離率、更方便快速且純度更高；因此 HPLC 是一種有效的純化方法，通常在管柱出口處安裝一個收集容器，按照層析峰的出峰信號，逐一用不同的收集容器收集所分離的各成分。將流動相溶劑除去後即可得較純產品。

HPLC 的分離效能和分離速度，也比一般化學方法優異；它不受樣品揮發度和熱穩定性的限制，對於分離離子型的化合物、不穩定的天然產物、生物藥品、以及其他高分子量之混合物的分離都非常有效。

2.3 菌種的分類方法

a. 革蘭氏染色法:

菌種的鑑定工作是目前微生物學實驗室經常遇到的基礎性工作，不同的微生物往往會有不同的重點鑑定指標。例如，在鑑定特徵較為豐富、形體較大的真菌等微生物時，常以形態特徵與生理特徵兼用；而鑑定形態特徵較少的細菌，則需從生理和生化指標方面做初步的鑑定⁽³²⁾。

革蘭氏染色對細菌是一種重要的鑑別方法，依照細菌對這種染色法反應的不同可以將細菌分為兩種類型，即革蘭氏陰性和革蘭氏陽性。目前普遍認為，革蘭氏陰性細菌的細胞壁中，脂類物質的含量高，而肽聚糖含量低，所以在革蘭氏染色中經過脫脂溶劑乙醇的處理，脂類物質會被溶解，細菌的細胞壁通透性增強，結晶紫-碘複合物被提出，細菌被脫色，經蕃紅複染後菌體呈現紅色。革蘭氏陽性細菌由於細胞壁的肽聚糖層含量較高，而脂類物質含量低，經過酒精的脫色作用後，細胞中的肽聚糖層孔徑變小、通透性降低，而阻止了不溶性的結晶紫-碘複合物的溶出，使細菌保持初染時的深色^(33,74)。

b. PCR 的方法:

PCR 是一種使特定 DNA 片段大量複製的技術，利用 PCR 針對基因改造部份的 DNA 片段進行複製，如果 PCR 的結果可以獲得該片

斷的複製產物，即代表檢體含有欲檢驗的基因改造成份；如果沒有複製產物，或複製產物與預設的不相同，則代表檢體不含欲檢驗的基因改造成份^(34,75)。

PCR 首先設計出對外來轉殖基因的序列 (sequence of foreign gene) 具有專一性的引子組 (specific primer set)，然後以此組引子，在一個含有待測檢體 DNA (DNA 模板, DNA template)、DNA 聚合酶 (DNA polymerase)、四種去氧核甘三磷酸 (dNTP)、鎂離子等物質的反應環境中，並在特定反應條件下，包含變性 (denature)、黏接 (annealing)、延展 (extension) 等步驟，進行數回合 (cycles) 循環反應，使外來轉殖基因的 DNA 特定片段大量複製^(75,76)。

2.4 中草藥醱酵之簡介

中草藥經過微生物醱酵後，有效成份的含量提高，藥效也因此而增強，相對的可以降低中草藥的藥用量，這為中草藥保健食品的應用找到一條很好的出路，透過微生物的醱酵，一方面增強了中草藥的效果，另一方面也相對地減少了中草藥的藥用量，讓向來匱乏的中草藥資源，降低了食品業的藥用成本，具有重要的經濟價值和現實意義，是一個非常值得深入研究及應用^(35,36,77)。另外，在中草藥醱酵的新技術中，可確保產品中有效成份的含量，同時與國際標準接軌，有利於提高我國中草藥現代化的水平，此外研究開發中草藥的「醱酵過程」，是一種新型的天然中草藥藥劑，該藥劑一旦研究成功，將可代替部分抗生素的使用，造成經濟、社會及生態效益是可評估的⁽³⁷⁾。綜合以上的敘述可得知，中草藥醱酵是現代化生物科技與中草藥研究的完美結合，將為中草藥領域開發出新的道路，拓展更廣闊的發展空間，並在中草藥領域研究中佔有重要的地位⁽³⁵⁾。

微生物的多樣特性為我們提供了豐富的菌株，不同的微生物具有不同的特性，利用此優點運用在中草藥醱酵裡更帶來不同的效果，微生物具有多面性的活性功能，目前已成為發現新中草藥醱酵的重要領域之一，現在除了抗菌、抗腫瘤與抗生素外，對於不具有抗微生物生物活性物質的發現越來越多，例如：免疫抑制劑、降血脂、抗氧化、

受體抵抗劑和特殊性酶抑制劑等⁽⁷⁸⁾。

對研究中草藥醱酵過程要如何貫徹中醫的理論，且吸收現代中草藥的應用，並擴大中草藥的治療範圍、藥劑形象的改進，也為新藥加工的製造提供新的技術與途徑，使中草藥的研究注入不同的內容及活力⁽³⁷⁾。

中草藥醱酵的優點，中草藥醱酵製藥技術的典型特點就是生物轉化。可包括如下幾點：(1)藥物的有效成份、活性物質最大限度可以萃取、利用；(2)藥物進入人體後不能被利用的有效活性成分，因在體外取得完成而被直接利用，迅速發揮應用有效能；(3)優選擇人體有益菌體本身具有補充或增強原有藥物的功能；(4)中藥醱酵製藥與原有藥物相比對產生了新的活性物質從而具有新的保健、預防或治療功能；(5)實現中藥現代化、具有高科技水平的新科技，提高中草藥行業的國際競爭力，造福全人類做出新的貢獻^(35,36)。

2.5 總多酚之簡介

多酚類之化學結構 簡單的說，多酚類化合物的結構包含兩個部分：一個是苯環，另一個是苯環上的羥基，經過縮合及加成聚合而成的衍生物⁽³⁸⁾。多酚類為植物二次代謝的產物，主要以結合形式存在於植物中，會和一個以上的醣基結合(glycosylation)，多酚類幾乎存在所有的植物中，其分布範圍很廣且種類也非常多，目前已有8000種以上的酚類化合物結構被發現⁽³⁹⁾；當然植物性食品中也常含有多酚類，不同的食物種類及含量不同，植物的成份中，以纖維素的含量最多，其次是半纖維素、木質素、多酚是含量第四多的成分，在陸地上的植物幾乎都含有它。^(38,39)多酚因結構不同而有許許多多的種類，這種成分關聯著植物的演化，目前也是植物分類的重要指標之一⁽³⁹⁾。

多酚在植物身體內的功能是防禦紫外線、授粉期的誘蟲劑、助花粉管的出芽、對抗入侵植物體內的細菌、抑制植物體過氧化作用等，也就是植物本體的防禦與種籽保存繁殖上的重要成分⁽⁴⁰⁾。

多酚是植物內的天然成分，不是舶來品，尤其在嗜好品內的含量更多。人們很早就會利用茶和咖啡來成為保健養生，那時雖不知是多酚的功效，但無意識下卻會利用它⁽⁴¹⁾。過去對植物多酚的評價是壞的比好的多，原因是食品應用上，多酚會使食物變色、變味、營養價值

降低，所以過去食品工業上都是研究如何去除它，從農業栽培上來改良出澀味與苦味較少的水果、蔬菜的新品種，也就是要使多酚的含量減少，工廠加工作業也是符合消費者需要而努力研發如何更能徹底清除多酚的技術，例如做橘子罐頭時，常將引起白濁的橘皮素的多酚去除^(79,80)；另外消費者也會在食用前將多酚含量較多的部位如皮部、莖部去除掉。在好的利用方面，利用單寧多酚在皮革鞣製、染色、酒類澄清、紙及纖維的補強，也有被利用作為食品的保存劑^(79,80)。

1928 年發現新鮮蔬菜水果中含有抗壞血病的成分，1932 年命名為維生素 C⁽⁸¹⁾。1948 年利用檸檬抽取維生素 C 的同時發現了一種類黃酮素(Flavonoid)的成份，可以強化毛細血管，取名為維生素 P⁽⁸²⁾，20 多年前被遺棄很久的纖維素，因發現有種種的非營養性機能，是身體所不可欠缺的成分，於是就被認定為第六營養素⁽⁸³⁾；最近多酚的機能性也不斷被發掘，對人體有某些特定的功效，所以可能被稱為第七營養素⁽⁸³⁾。

2.6 總多醣體之簡介⁽³⁹⁻⁴²⁾⁽⁸⁴⁻⁸⁷⁾

醣類是自然界最多的有機化合物，是生命活動四大基本物質(蛋白質、核酸、醣、脂)之一，在生命過程中發揮著極為重要作用⁽³⁹⁾。100多年前德國家著名科學家 Emil Fischer 就開始對醣類的研究。1923年 M.Heidelberger 和 T.Oswald 提出細菌的抗原部分是由醣類質組成而不是蛋白質^(40,41)。目前，人們已經發現醣類化合物作為信息分子在細胞識別、生長發育、生物體的受精、神經系統和免疫系統平衡形態的維持等方面起重要的作用^(41,42)；炎症和自身免疫疾病、老化、腫瘤細胞的惡性轉化與轉移、病原體的感染等生理和病理過程也都有此類物質的參與^(84,85)。這些具有抗腫瘤、免疫調節、降血糖、抗病毒、抗凝血、抗輻射等多種活性的多醣，部分已應用腫瘤、肝炎、心血管疾病的臨床輔助治療和康復^(86,87)。活性多醣的化學結構、藥理作用與機理，已成為生命科學研究中最活躍領域之一^(86,87)。

2.7 抗氧化力之簡介

近年來，營養學家和一般大眾都注意到食物不只是能量和必需營養元素的來源，在這些食物中所含的一些微量元素被認為具有促進人體健康的特性，這些元素可以預防或減緩慢性疾病的發生，例如循環系統的疾病或某些癌症的發生^(43,88)。最令大家注意的是水果和蔬菜所含的植物化合物(phytochemical)在預防因氧化逆境(oxidative stress)引起的疾病上所扮演的角色與功能⁽⁴⁴⁾。許多流行病學的研究也都指出，增加膳食中蔬菜與水果的攝取量可以有效的降低心血管疾病、癌症、慢性疾病和其他老化疾病的發生^(45,89)。這是由於蔬果中所含的極性與非極性的植物化合物可作為還原劑、氫離子或電子的提供者和活性氧化力的清除者，具有抗氧化力，可以消除體內的自由基與活性抗氧化，保護細胞內的各種分子不受氧化逆境的傷害^(46,90,91)。天然的抗氧化物主要有維生素 C(vitamin C)、維生素 E(vitamin E)、β-胡蘿蔔素(β-carotene)、酚類化合物(phenolic compounds)等。主要的來源包括蔬菜、水果、辛香料類和香草植物等^(43,47,91)。

這些植物所含的植物化合物(phytochemicals)對身體所產生的益處比食用單一種抗氧化物更為有效，且蔬果中所含的植物化合物所提供的營養與功效也無法利用單一抗氧化物添加在膳食中達到相同的效果，這是因為植物所含的維生素、礦物質和植物化合物之間可能具

有聯合、協同作用⁽⁴⁶⁾。因此，建議由植物性食品來源增加抗氧化物的吸收比單一化合物來源的吸收有更好的效果由於植物體內含有多種的抗氧化物成分，且隨著蔬果的種類其所含的植物化合物與含量也的變化，所以要將蔬果內的抗氧化成分各別的測定是很困難的⁽⁴⁷⁾。因此，有許多關於抗氧化力測定的研究都利用植物體的粗萃取物，在體外(in vitro)條件下針對特定自由基的清除能力來表示其植物體的抗氧化力(total antioxidant capacity)，目前應用在測定總抗氧化力的方法很多，而每一種方法的測定原理與機制也不盡相同，因此所得的結果也未必一致^(91,92)。



2.8 造血幹細胞之簡介

樹突狀細胞(dendritic cell ,DC)是一類專職抗原提呈細胞(professional antigen presenting cell ,PAPC)^(48,103,104), 因此具有膜樣或樹突狀突起而得名^(48,49,93)。成熟樹突狀細胞具有極強的抗原遞呈能力，能夠激活童貞 T 細胞(naive T cell)以引發機體免疫反應，因而在移植免疫和抗腫瘤免疫中發揮重要作用^(50,51,94,95)。以往對於樹突狀細胞的研究都是從外周血管和脾臟中分離獲取，由於其分離過程複雜且產量很低，使研究者對樹突狀細胞的研究受到限制^(52,96,97,98,99,100)。近年來對樹突狀細胞的體外誘導分化和擴大增加成為研究熱點，本文就體外誘導骨髓造血幹細胞來源，樹突狀細胞前的體純化和擴大增加方法做出研究，因此為樹突狀細胞的功能及移植免疫研究提供生物學基礎^(101,102,103)。

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料：

3.1.1 中草藥

當歸、熟地、白芍、川芎(港香蘭股份有限公司提供)

3.1.2 菌體

由中草藥藥渣堆肥中分離得到，常溫菌株(*Bacillus sp.*)、高溫菌株 (*Geobacillus sp.*)。

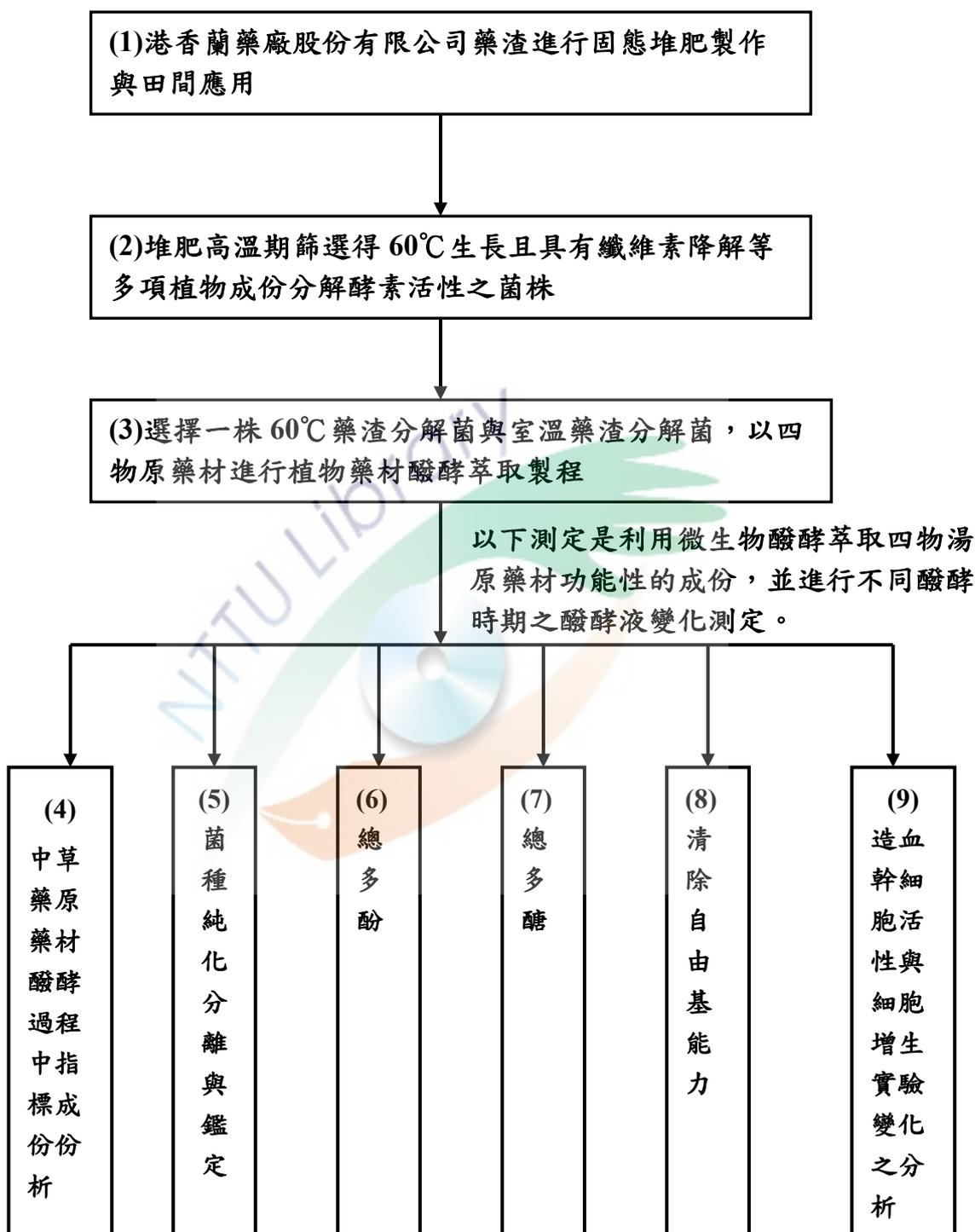
3.1.3 藥品：

名稱	廠牌
酚類指示劑	台灣默克股份有限公司
碳酸鈉	台灣默克股份有限公司
沒食子酸	SIGMA 股份有限公司
藥用酒精	台灣煙酒股份有限公司
酚	台灣默克股份有限公司
硫酸	台灣巴斯夫電子材料股份有限公司
葡萄糖	慧眾生物科技股份有限公司
維他命 E	鑫隴興業有限公司
1,1-二苯基-2-苦味肼基團	台灣默克股份有限公司
甲醇	台灣默克股份有限公司
醋酸	Scharlau 股份有限公司
乙腈	台灣默克股份有限公司
蛋白腯	啟新生物科技股份有限公司
洋菜膠	慧眾生物科技股份有限公司
糖蜜	Scharlau 股份有限公司
革蘭氏結晶紫染色試劑	台灣默克股份有限公司
革蘭氏番紅染色試劑	台灣默克股份有限公司
碘酊	台灣默克股份有限公司
甘油	台灣默克股份有限公司
96%硫酸	Scharlau 股份有限公司

3.2 實驗儀器：

名稱	廠牌
粗秤天秤	廠牌 Preisa ；型號 XB2200C
電子分析天秤	廠牌 Preisa ；型號 XT220A
恆溫循環加熱槽	廠牌 SHAKER BATH；型號 SB-7D
薄膜過濾抽氣裝置(1000mL)	廠牌 NALGENE；型號 300-4100
真空 Pump Rocker	廠牌 GAST；型號 DPA-P704-AA
減壓濃縮機(含加熱器；減壓裝置；回收溶劑冷凝裝置 -80℃)	廠牌 EYELA/日本；型號 N-1000S+SB-1000
高效液相層析儀 (HPLC) <包含 RI、UV-VIS、Pump >	廠牌 HITACHI；型號 L-7420、L-7100
氣相層析質譜儀(GC-MS)	廠牌 HITACHI
烘箱	廠牌 Hevaeus FUNCTION；型號 T6
無菌操作台	廠牌 HIGH TEN；型號 6BH
-86℃ 超低溫冷凍櫃	廠牌 SANYO；型號 MDF-U50V
-20℃ 超低溫冷凍櫃	廠牌 SANYO；型號 MDF-U333
4℃ 冰箱	廠牌 SANYO；型號 MPR-311D
高壓滅菌釜	廠牌 TOMIN
PCR 循環機	廠牌 eppendorf
離心機	廠牌 Model；型號 VS 1500FN2
紫外可見光光譜儀	廠牌 HITACHI；型號 U-2001
超音波洗淨機	廠牌 BRANSON；型號 5200
生物顯微鏡	廠牌 Model；型號 B1-211A

3.3 實驗步驟:



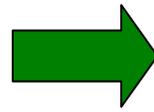
3.4 中草藥有效成份的濃縮萃取

- (1) 秤取打碎到約 10 mesh 大小的四物湯原藥材〈當歸、熟地、川芎、白芍〉各為 5g，將各項原藥材倒入錐形瓶內，再加入 50 ml 滅菌 RO 水使有效成分萃取溶出。
- (2) 為了使各項原藥材中的有效成份更有效率的萃取溶出，將錐形瓶拿到 60°C 恆溫水浴加熱槽中熬煮一小時。
- (3) 加熱一小時後，先用孔徑較大的濾網進行初步過濾取得濾液，再利用薄膜抽氣過濾裝置過濾液體內較細微的藥渣。
- (4) 將過濾後的藥渣，再加入 50 ml 滅菌 RO 水，重覆(2)~(3)實驗步驟兩次，合併所有濾液為 135ml，並秤取藥渣的濕重為 19.50 g。
- (5) 將合併後的濾液全部拿到減壓濃縮機進行濃縮，即可得到四物湯原藥材的粗抽出物為 11.82 g，產率為 59.1%。
- (6) 經濃縮後藥材的粗抽出物，加入約 80ml 的混合溶劑（甲醇:水=1:1）使之溶解；溶解後的液體取 2ml 通過 0.45 μm 的過濾膜進行過濾，將過濾完的液體取 25 μL 注入到 HPLC 中，將 UV-VIS 偵檢器的吸收波長設定在 280 nm，觀察四物湯原藥材醱酵過程中指標成份的變化。

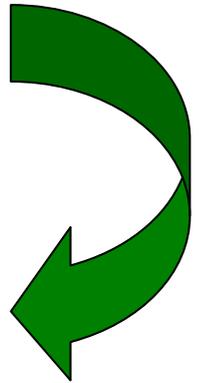
3.4.1 流程圖



粉碎到 10mech 大小的四物湯原藥材



各稱取 5g



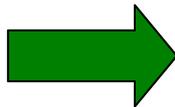
秤好的藥材加入 50 ml 滅菌 RO 水



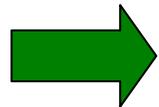
拿到 60 °C 水浴槽熬煮一小時



加熱一小時後先初過濾

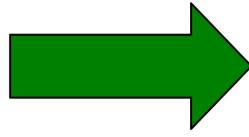


再用薄膜過濾抽氣裝置過濾一次

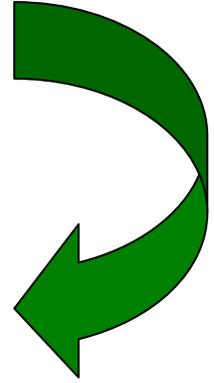




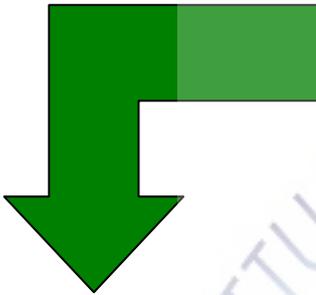
藥渣再加入 50ml 滅菌 RO 水重覆(2)~(3)步驟



合併全部的濾液



將合併的全部濾液進行濃縮



濃縮後秤重並記錄粗抽出物重量



溶解後的液體通過 0.45 μm 的過濾膜進行過濾



取 25 μL 試樣注入到 HPLC，並觀察四物湯的圖譜

3.4.2 HPLC 定量分析方法

a. HPLC 分析條件:

層析管(column): Merck Purospher STAR RP-18e

column(250×4mm,5μm)

保護管柱(Pre-column): Merck Purospher STAR RP-18e

endcapped(5μm)

檢測波長:UV280 nm

流速: 0.8 ml/min

注入量: 25μL

分析時間:85 min

移動相: CH₃CN:CH₃COOH= 99:1，進行濃度梯度沖提如下:

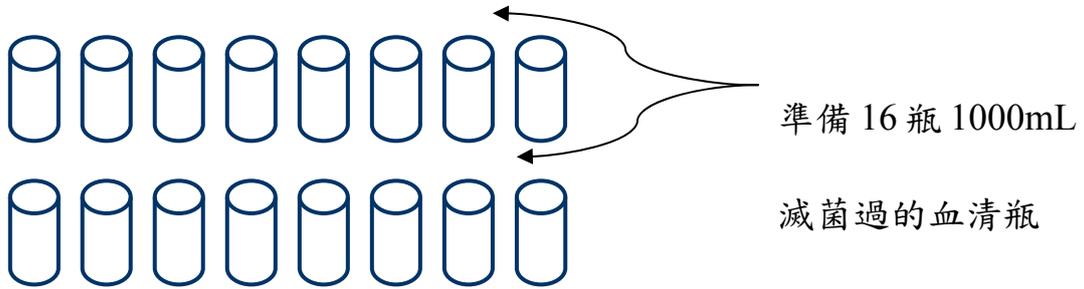
時間(min)	A(%)	B(%)
0	0	100
5	0	100
10	3	97
15	3	97
35	10	90
55	25	75
80	55	45

3.5 四物湯原藥材醱酵步驟

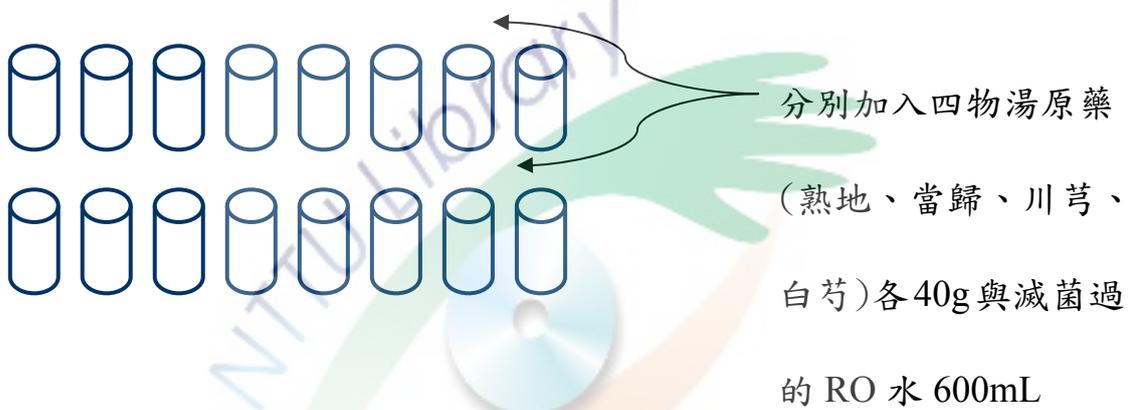
- (1) 準備 16 個 1000mL 的血清瓶，加入粉碎到 10 mech 大小的四物湯原藥材(熟地、當歸、川芎、白芍)各 40g 與滅菌過的 RO 水 600mL 均勻混合成四物湯合劑，置於醱酵桶中達八分滿為止。
- (2) 將 16 個血清瓶分成四個小組，在每組中依序分別加入不同比例的葡萄糖(0%、5%、10%、15%)，有兩組放置 60°C 烘箱內，另外則兩組者放置在室溫下。
- (3) 在 60°C 烘箱中有一組需要加入 60°C 的藥材分解菌 *Geobacillus sp.*；放置室溫的其中一組則加入常溫藥材分解菌 *Bacillus sp.*。
- (4) 60°C 醱酵組則須每天取樣，室溫組則每週進行取樣，分別進行固液分離與萃出物初步檢測，以比較有效成份萃出比。
- (5) 進行相關活性檢測(指標成份鑑定、總多酚、總多醣、抗氧化力、動物細胞實驗)。

3.5.1 流程圖

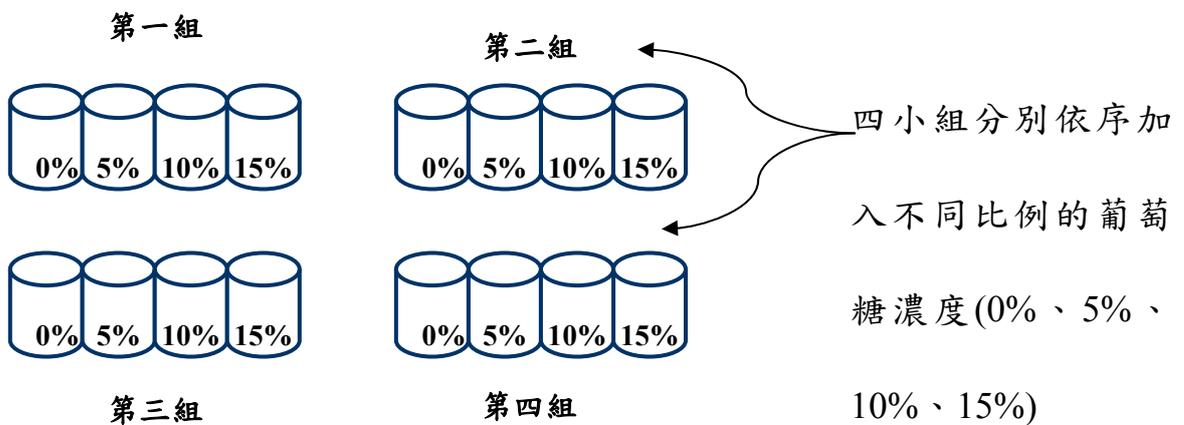
(1)



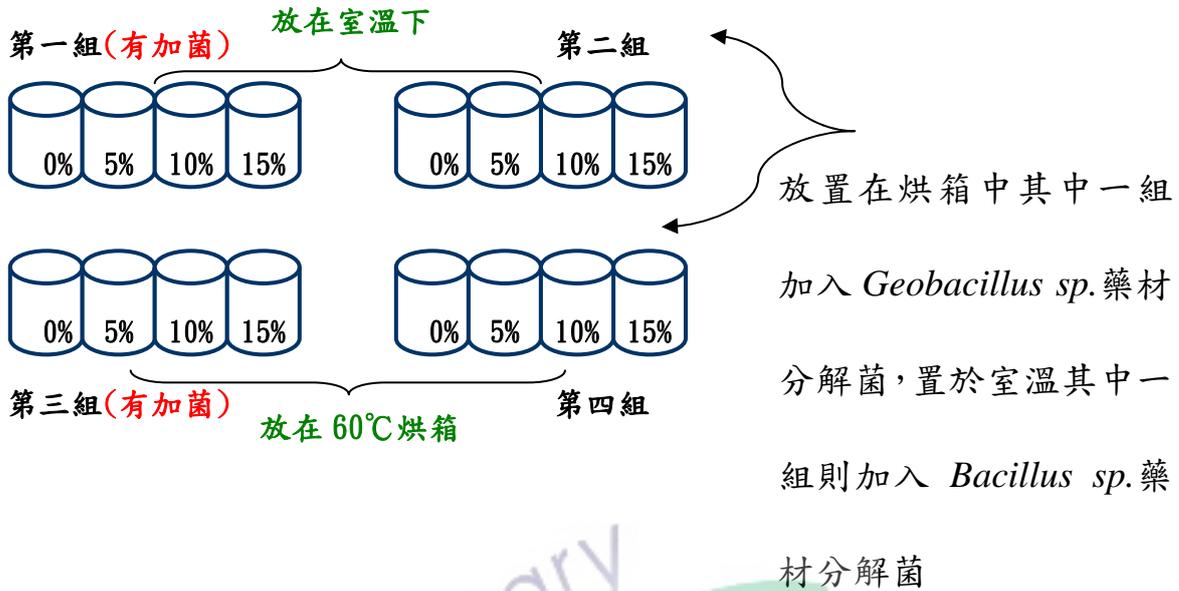
(2)



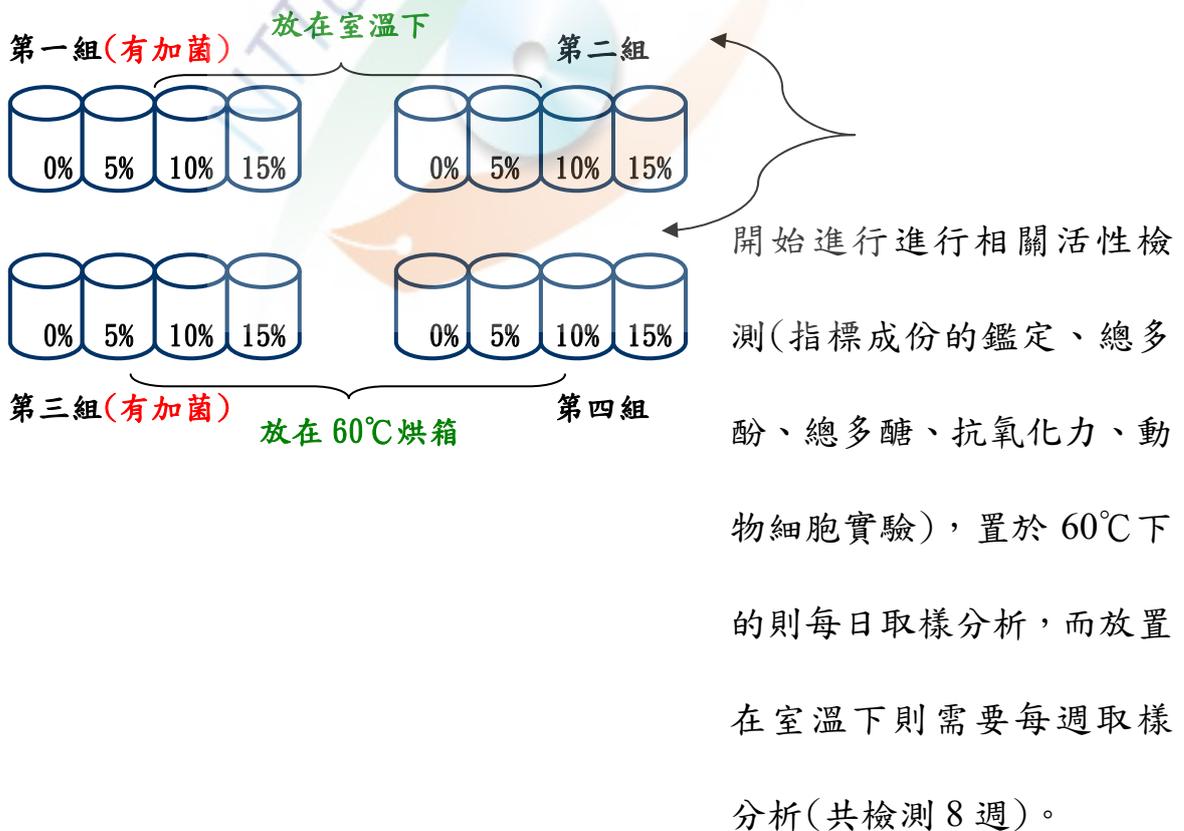
(3)



(4)



(5)



3.6 總多酚含量測定

原理:

目前在研究上大多以檢測總多酚化合物的含量來呈現，根據 Folin-Ciocalteu 的方法，在鹼性環境下，與可被氧化的物質 (oxidizable substrates) 作用，在一定時間及溫度下，會產生顏色變化，再以分光光度計測定樣品在 725nm 下的吸光值，並以沒食子酸 (Gallic acid) 為標準液，最後以沒食子酸之等量線 (GAE) 來表示總多酚類含量。

a. 標準校正線製作

- (1) 精秤 0.05g 的沒食子酸 (Gallic acid) 放入 50 ml 的量瓶，加入去離子水，搖盪至溶解為止，再加去離子水至刻度線。
- (2) 配製濃度分別為 0.05~1ml 之沒食子酸 (Gallic acid) 試樣溶液總體積為 5ml，後振盪搖晃均勻。
- (3) 重步驟 2 中之液體每瓶吸取 1ml 放入另外 8 支離心試管中，每瓶再加入 1ml 95% 乙醇和 5ml 去離子水以及 0.5ml 50% 酚類指示劑 (空白樣品: 5 ml 去離子水 + 1ml 95% 乙醇 + 1ml 5% Na_2CO_3)，置於 35°C 恆溫水槽中加熱靜置 5 分鐘。
- (4) 靜置 5 分鐘後，加入 1ml 5% Na_2CO_3 置於黑暗中靜置 60 分鐘。
- (5) 用分光光度計測定波長 (725 nm)，並製作標準校正線。

b. 樣品測定

- (1) 拿取預測之樣品經振盪搖晃均勻後，吸取 1 ml 樣品，放入離心試管中再加入預定稀釋倍數 95% 乙醇經振盪搖晃均勻後，放入 3500 rpm 離心機中離心 5 min。
- (2) 離心完後取上清液 1 ml 放入離心管中，依(標準校正線製作)步驟 3、4、5 之方法依序加入藥品後測定其吸光值(725 nm)。



3.7 總多醣體含量測定

原理：

醣類是自然界最多的有機化合物，是生命活動四大基本物質(蛋白質、核酸、醣、脂)之一，在生命過程中發揮著極為重要作用。

目前研究中主要是利用 酚 - 硫酸法 進行呈色分析，再以分光光度計測定樣品在490nm下的吸光值，並以葡萄糖為標準液，最後以葡萄糖之校正線來表示多醣體的含量。

a. 標準校正曲線製作

- (1) 精秤 0.03g 的葡萄糖，放入試管內，加入 6 ml 的去離子水，搖盪至溶解為止。
- (2) 配製濃度分別為 0.2~2ml 之葡萄糖試樣溶液總體積為 2ml，後振盪搖晃混合均勻。
- (3) 在試管中先加入 0.5ml 5%的酚溶液，再加入 2.5ml 96%濃硫酸後，靜置 15min(空白樣品:葡萄糖溶液)。
- (4) 靜置 15min 後，用分光光度計測定波長(490 nm)，並製作標準校正線。

b. 樣品測定

- (1) 拿取預測之樣品經振盪搖晃均勻後，吸取 1 ml 樣品，放入離心試管中再加入預定稀釋倍數 RO 水，放入 3500 rpm 離心機中離心 5 min。

(2)離心完後取上清液 0.5ml 放入離心管中,加入 RO 水稀釋成 5 倍的量,依(標準校正線製作)步驟 3、4 之方法依序加入藥品後測定其吸光值(490 nm)。



3.8 DPPH 清除自由基能力測定

原理:

脂質在自行氧化過程中會產生自由基而造成脂質酸敗，常見抗氧化物藉由提供氫(hydrogen doner)來清除脂質過氧化物自由基(peroxy radical)，進而達到抑制氧化鏈鎖反應之進行 DPPH 來評估抗氧化物的供氫能力。DPPH 之甲醇溶液在 517nm 下有較強的吸光值，被抗氧化物還原時吸光值會降低，吸光值越低，表示抗氧化物提供氫能力愈強。

a 標準校正曲線製作:

- (1)精秤 1g 的維他命 E，放入離心管內，加入 20ml 甲醇，搖盪至溶解為止。
- (2)配製濃度分別為 0.5~3ml 之維他命 E 試樣溶液，加入甲醇使得總體積為 4ml，後振盪搖晃均勻。
- (3)五支離心管中在加入 0.5ml 0.05% 的 Free radical(DPPH)，靜置 40 min(空白樣品:甲醇溶液+DPPH)。
- (4)黑暗處靜置 40 min 後，用分光光度計測定波長(517 nm)，並製作標準校正線。
- (5)計算清除率(scavenging effects)=[1-(樣品反應後於 517nm 吸光值 / 控制組於 517nm 吸光值)]*100。為了避免誤差，樣品反應後

吸光值在扣掉樣品反應前之吸光值。

b. 樣品測定:

(1) 拿取預測之樣品經振盪搖晃均勻後，吸取 150 μ l 樣品，放入離心試管中再加入預定稀釋倍數甲醇，放入 3500 rpm 離心機中離心 10 min。

(2) 離心完後取上清液 2 ml 放入離心管中，加入 2 ml 甲醇稀釋成 2 倍的量，依(標準校正線製作)步驟 3、4 之方法依序加入藥品後測定其吸光值(517 nm)。



3.9 動物細胞實驗(委託屏科大莊秀琪副教授)

麻醉一活體豬隻，並由該活體豬隻取得完整之長骨；在該長骨之二粗隆之頸部位置分別進行鑽孔；將該長骨由中央位置切鋸成各具一切口之二半骨；經由各半骨之鑽孔處注入緩衝液，並將豬隻骨髓細胞由該半骨切口沖出；將豬隻骨髓細胞進行純化及定量，並利用第一細胞培養液進行培養；及再利用第二細胞培養液培養該豬隻骨髓細胞，使其分化為樹突細胞。



3.10 菌種鑑定方法

原理：

未知菌種的鑑定，是微生物學的主要研究項目之一，在世界各地的實驗室每天都在對血液、組織、食物、飲水和化妝品樣品進行檢測，來判斷是否有污染物的存在；除此之外，工業組織也持續不斷的針對一些物質，篩選並分離出能夠產生抗生素的微生物，或者是一些能增加市場利益的微生物產品如維生素、溶劑或酵素，一旦被分離出，這些微生物便需鑑定及加以分類。

a. 步驟：

(1)配置反應混合液(reaction cocktail)。依據下列順序，加入各種試劑

於 2ml 的微量離心管：

ddH ₂ O	41.5μl
10X PCR buffer	5μl
dNTP	2μl
NPT-F1 primer (10 uM)	0.5μl
NPT-R1 primer (10 uM)	0.5μl
Taq DNA polymerase	0.15μl

Total	50μl

(2)將酵素混合液配置好，利用低速離心機離心數秒混合均勻後的液體分裝至 2 ml 微量離心管。

(3) 植入少許的 DNA 再加入 80 μ l 滅菌過的礦物油後，利用低速離心機離心數秒使混合均勻。

(4) 將微量離心管放入 95 $^{\circ}$ C 水浴槽中加熱 10min，再加入 2 μ l DMSO 與 0.5 μ l Pfu 混合均勻。

(5) 用低速離心機離心數秒後，放在聚合酶連鎖反應器的內槽。

(6) 設定聚合酶連鎖反應器內的 PCR 反應條件，並進行 PCR 放大反應：

Cycle 1: 94 $^{\circ}$ C for 3 min, repeat 1X

Cycle 2: 94 $^{\circ}$ C for 1min(denature)

39 $^{\circ}$ C for 1min (annealing)

72 $^{\circ}$ C for 3min (extension)

} repeat 20X

Cycle 3: 72 $^{\circ}$ C for 10 min (final extension), repeat 1X

Cycle 4: 冷卻至室溫

(7) PCR 產物可放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱儲存，或是直接進行電泳反應，檢驗是否成功將目標基因片段放大。

第四章 實驗數據

4.1 四物湯醱酵產物 HPLC 成份分析圖表如下：

表一、60°C 四物醱酵有加菌下 HPLC 分析指標成分變化量

樣品	添加葡萄糖濃度(%)	15.57min (梓醇)	51.00min (芍藥苷)	54.88min (阿魏酸)	68.84min (新出現pick)	72.04 min (新出現pick)
醱酵第五天	0%	22682	21930	27932	0	0
	5%	4705	5093	13715	0	0
	10%	5961	4603	14396	0	0
	15%	5349	4486	11197	0	0
醱酵第六天	0%	58417	23332	33416	0	0
	5%	6929	12925	30356	0	0
	10%	37366	18553	28132	0	0
	15%	20793	14807	28230	0	0
醱酵第七天	0%	75081	23903	35389	0	0
	5%	22761	15880	36136	0	0
	10%	26901	13823	36448	0	0
	15%	53038	24317	29816	0	0
醱酵第八天	0%	68320	20893	20355	0	0
	5%	6502	14984	29522	0	0
	10%	6161	13097	3049	0	0
	15%	42883	15804	24297	0	0
醱酵第九天	0%	79421	22232	23752	0	0
	5%	8684	15541	31560	0	0
	10%	34543	14694	25140	0	0
	15%	75329	18589	30140	0	0
醱酵第十天	0%	65122	17807	16594	0	0
	5%	63282	15503	15993	0	0
	10%	71496	14581	16248	0	0
	15%	72392	13785	17086	0	0
醱酵第十一天	0%	53978	16377	16195	0	0
	5%	43465	12489	15712	0	0
	10%	38549	10159	14190	0	0
	15%	53787	12147	6690	0	0
醱酵第十二天	0%	7398	13964	5479	0	0
	5%	8952	11327	5739	0	0
	10%	7888	9645	7009	0	0
	15%	7731	10125	5331	0	0

樣品	添加葡萄糖濃度(%)	15.57 min (梓醇)	51.00min (芍藥苷)	54.88min (阿魏酸)	68.84min (新出現pick)	72.04min (新出現pick)
醱酵第 十三天	0%	5415	12881	11791	0	0
	5%	6425	9256	5151	0	0
	10%	5987	9285	6188	0	0
	15%	7246	9771	4829	0	0
醱酵第 十四天	0%	5170	12055	4023	0	0
	5%	6060	7790	3243	0	0
	10%	4505	6380	5186	0	0
	15%	6439	7084	4075	0	0
醱酵第 十五天	0%	4580	9145	3873	0	0
	5%	5509	6230	2801	0	0
	10%	4181	5265	3788	0	0
	15%	5997	6939	3319	0	0
醱酵第 十六天	0%	3488	6962	3403	3542	3054
	5%	6074	4578	3380	3794	2621
	10%	4899	6499	4270	3876	2139
	15%	5883	6668	3061	4751	3745
醱酵第 十七天	0%	3052	9193	1906	3559	3799
	5%	3391	4302	2571	3919	6946
	10%	4541	5018	1909	5061	3608
	15%	5408	5740	2658	4865	5463
醱酵第 十八天	0%	2380	6512	1876	2028	1846
	5%	3281	3565	1933	2351	1178
	10%	10536	8398	1193	2863	1709
	15%	16278	9652	3456	3868	1827

表二、60°C 四物醱酵無加菌下HPLC分析指標成分變化量

樣品	添加葡萄糖濃度(%)	15.57min (梓醇)	51.00min (芍藥苷)	54.88min (阿魏酸)	68.84min (新出現pick)	72.04min (新出現pick)
醱酵第五天	0%	6007	2286	6398	0	0
	5%	6423	2417	6548	0	0
	10%	6027	4712	6962	0	0
	15%	6212	3529	7549	0	0
醱酵第六天	0%	6557	11589	26607	0	0
	5%	6647	14789	31430	0	0
	10%	31195	19310	30289	0	0
	15%	4445	10232	22409	0	0
醱酵第七天	0%	6859	14290	28931	0	0
	5%	6955	18127	33085	0	0
	10%	42259	23384	34002	0	0
	15%	19646	18041	33265	0	0
醱酵第八天	0%	6065	13586	25078	0	0
	5%	6446	17472	26066	0	0
	10%	30149	18496	24002	0	0
	15%	17061	15201	25365	0	0
醱酵第九天	0%	38461	13735	26641	0	0
	5%	54580	17796	28171	0	0
	10%	96921	20375	26080	0	0
	15%	22938	16786	26029	0	0
醱酵第十天	0%	30294	12314	16572	0	0
	5%	48771	15171	16765	0	0
	10%	55772	17314	15459	0	0
	15%	22550	14006	16620	0	0
醱酵第十一天	0%	29656	11155	14540	0	0
	5%	33738	14726	16269	0	0
	10%	44931	16466	13906	0	0
	15%	21585	13028	15743	0	0
醱酵第十二天	0%	14184	9752	4195	0	0
	5%	31721	11122	1424	0	0
	10%	14715	13883	6178	0	0
	15%	18656	8482	2619	0	0

樣品	添加葡萄糖濃度(%)	15.57min (梓醇)	51.00min (芍藥苷)	54.88min (阿魏酸)	68.84min (新出現pick)	72.04min (新出現pick)
醱酵第 十三天	0%	8243	8665	3048	0	0
	5%	6123	7585	1094	0	0
	10%	6741	13618	6043	0	0
	15%	8282	7632	2598	0	0
醱酵第 十四天	0%	6054	6784	2770	0	0
	5%	3182	5057	1010	0	0
	10%	4364	11286	6513	0	0
	15%	5609	5693	2396	0	0
醱酵第 十五天	0%	5842	4414	2039	4572	8189
	5%	2901	3113	987	4350	1459
	10%	3081	9029	5936	0	0
	15%	3692	4164	2164	6739	5871
醱酵第 十六天	0%	3165	3409	1476	1031	5325
	5%	2490	2814	959	866	1368
	10%	1953	3264	1673	1529	5461
	15%	3459	2854	1899	784	571
醱酵第 十七天	0%	1674	2150	1057	5308	9000
	5%	2455	2632	955	1829	2015
	10%	1279	2101	677	2575	6515
	15%	1773	2795	1447	1783	2651
醱酵第 十八天	0%	1112	2023	814	4587	3837
	5%	2105	1874	929	1493	899
	10%	1054	1348	642	2162	2236
	15%	1488	2186	1328	1590	951

表三、室溫四物醱酵有加菌下HPLC分析指標成分變化量

樣品	添加葡萄糖濃度(%)	15.57min (梓醇)	51.00min (芍藥苷)	54.88 min (阿魏酸)	68.84 min (新出現pick)	72.04 min (新出現pick)
醱酵第十一天	0%	6181	16613	14020	8603	3398
	5%	8225	10533	10644	9332	5172
	10%	7610	10790	12370	3153	0
	15%	7110	14658	14568	3405	0
醱酵第十八天	0%	7384	16810	17191	11528	9252
	5%	9982	8651	14263	10430	7900
	10%	8469	11314	16438	0	0
	15%	7448	15754	14777	0	0
醱酵第二十五天	0%	8266	17130	17450	3865	2261
	5%	19454	9448	14437	8138	5664
	10%	22321	12507	17528	1478	0
	15%	16799	16690	18908	2409	1227
醱酵第三十二天	0%	18836	17975	19858	1081	1982
	5%	20805	14684	18306	1162	3559
	10%	23167	12664	21692	1849	1375
	15%	18563	17039	19692	2575	1583
醱酵第三十九天	0%	13829	13683	18384	4706	3300
	5%	10073	12673	14706	1722	1600
	10%	13658	11214	16706	2818	1647
	15%	10567	11833	17730	2367	0
醱酵第四十六天	0%	8769	12404	14795	3750	3120
	5%	7820	11839	7659	3620	2651
	10%	5136	10779	7509	2987	2370
	15%	6146	11061	8742	1925	1095
醱酵第五十三天	0%	8352	11674	5734	719	2926
	5%	5354	9197	5033	1331	1296
	10%	4536	9473	5633	1119	612
	15%	4998	10950	6222	993	491
醱酵第六十天	0%	6629	7923	5673	459	1538
	5%	4063	8400	4067	0	638
	10%	4457	7883	5447	815	586
	15%	4004	8000	5506	2309	2936
醱酵第六十七天	0%	2975	7494	4494	2196	7781
	5%	0	4531	0	2621	2154
	10%	0	4841	4875	3748	1844
	15%	2578	7230	2507	2991	3154

表四、室溫四物醱酵沒加菌下HPLC分析指標成分變化量

樣品	添加葡萄糖濃度(%)	15.57min (梓醇)	51.00min (芍藥苷)	54.88 min (阿魏酸)	68.84 min (新出現pick)	72.04 min (新出現pick)
醱酵第十一天	0%	6181	16613	14020	8603	3398
	5%	8225	10533	10644	9332	5172
	10%	7610	10790	12370	3153	0
	15%	7110	14658	14568	3405	0
醱酵第十八天	0%	7384	16810	17191	11528	9252
	5%	9982	8651	14263	10430	7900
	10%	8469	11314	16438	0	0
	15%	7448	15754	14777	0	0
醱酵第二十五天	0%	8266	17130	17450	3865	2261
	5%	19454	9448	14437	8138	5664
	10%	22321	12507	17528	1478	0
	15%	16799	16690	18908	2409	1227
醱酵第三十二天	0%	18836	17975	19858	1081	1982
	5%	20805	14684	18306	1162	3559
	10%	23167	12664	21692	1849	1375
	15%	18563	17039	19692	2575	1583
醱酵第三十九天	0%	13829	13683	18384	4706	3300
	5%	10073	12673	14706	1722	1600
	10%	13658	11214	16706	2818	1647
	15%	10567	11833	17730	2367	0
醱酵第四十六天	0%	8769	12404	14795	3750	3120
	5%	7820	11839	7659	3620	2651
	10%	5136	10779	7509	2987	2370
	15%	6146	11061	8742	1925	1095
醱酵第五十三天	0%	8352	11674	5734	719	2926
	5%	5354	9197	5033	1331	1296
	10%	4536	9473	5633	1119	612
	15%	4998	10950	6222	993	491
醱酵第六十天	0%	6629	7923	5673	459	1538
	5%	4063	8400	4067	0	638
	10%	4457	7883	5447	815	586
	15%	4004	8000	5506	2309	2936
醱酵第六十七天	0%	3930	8150	6208	2522	1699
	5%	3838	12376	7280	3700	1128
	10%	6812	9050	4861	1783	934
	15%	2971	8348	1360	2632	1048

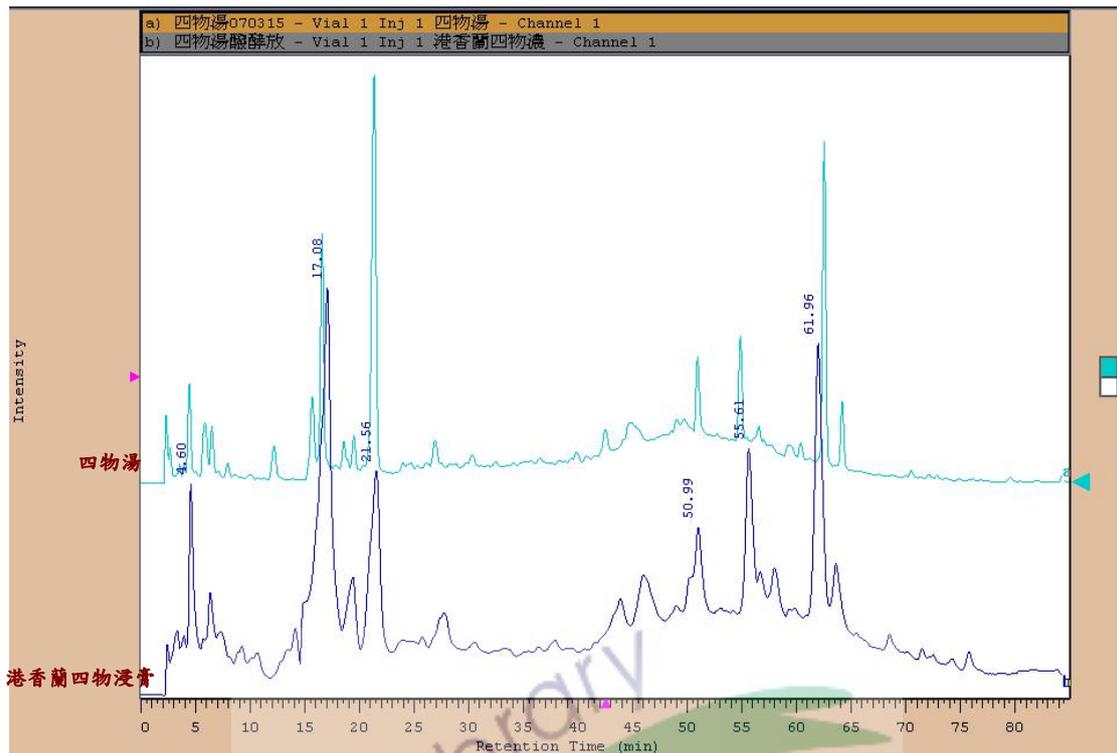


圖 4-1 四物複方與港香蘭四物浸膏 HPLC 圖

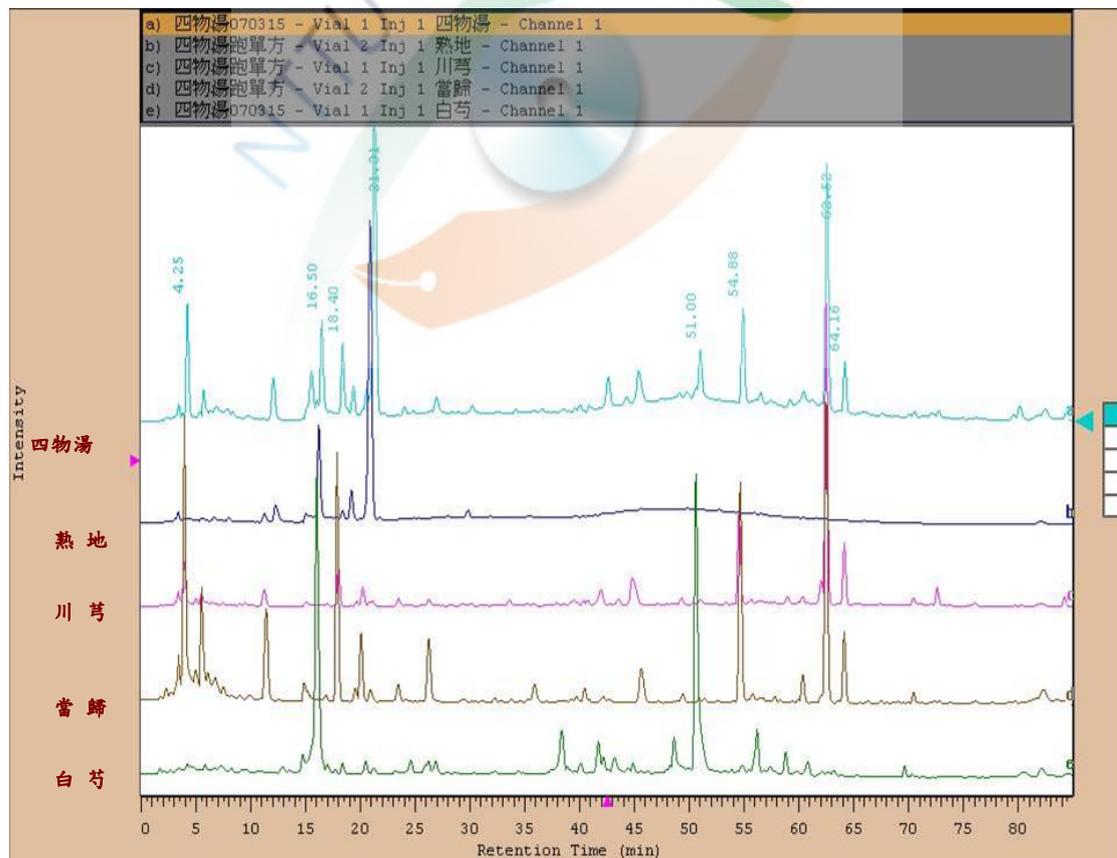


圖 4-2 四物複方與單方 HPLC 圖

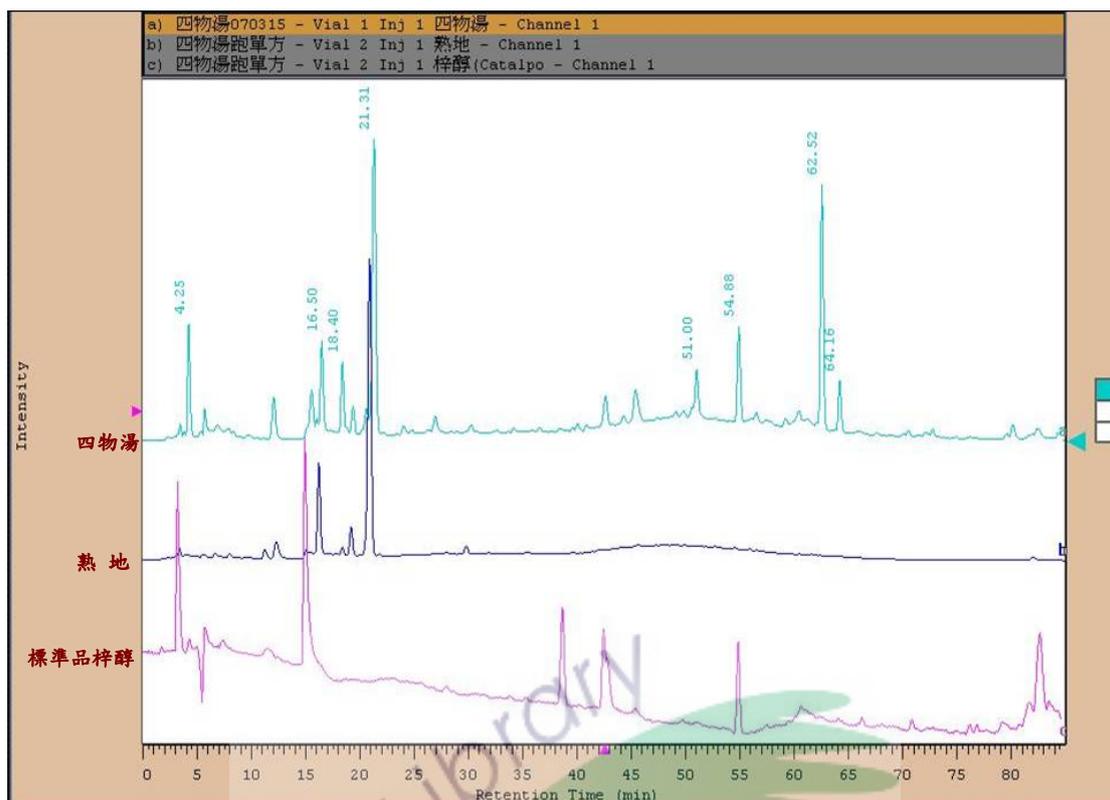


圖 4-3 四物複方與熟地、標準品梓醇 HPLC 圖

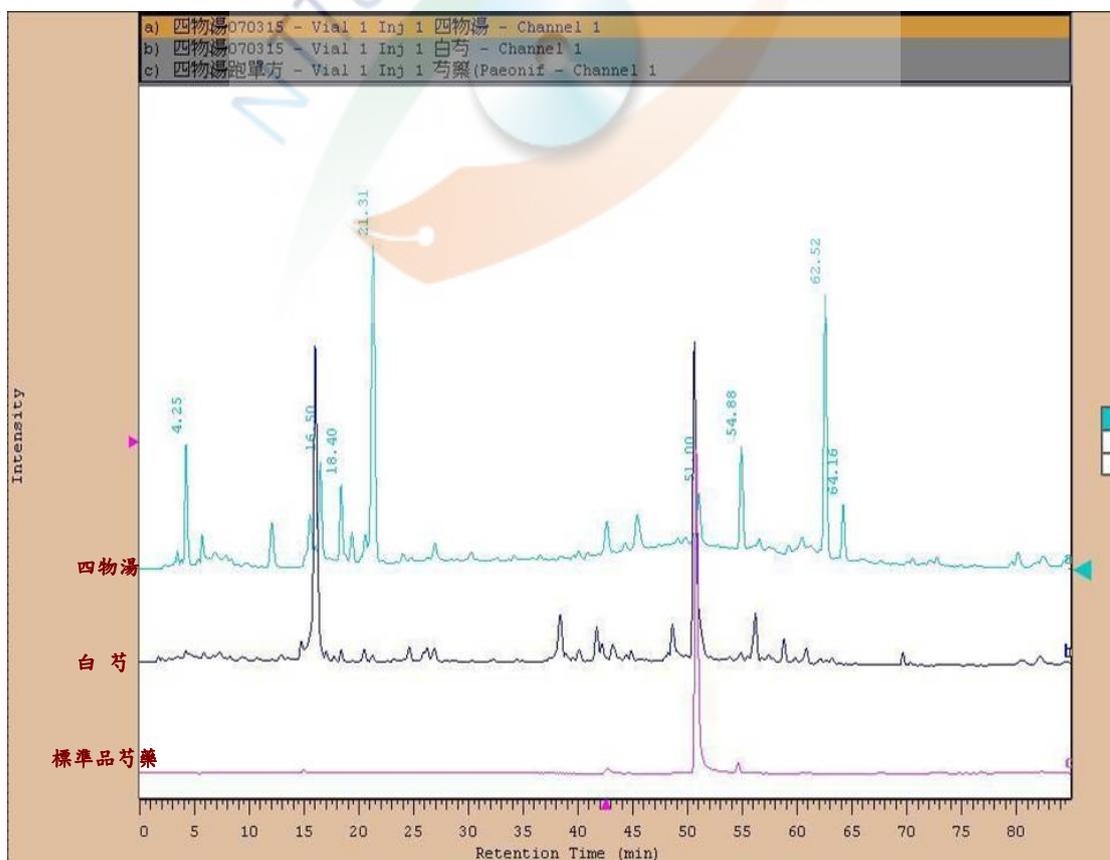


圖 4-4 四物複方與芍藥、標準品芍藥 HPLC 圖

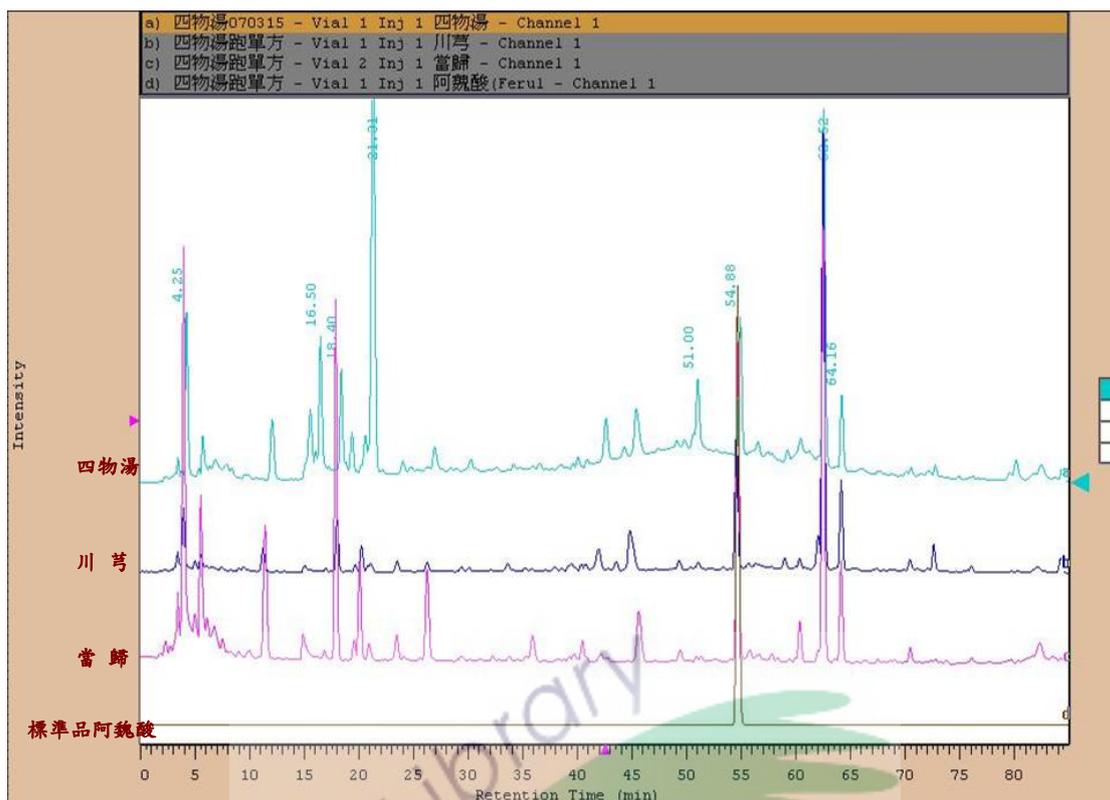


圖 4-5 四物複方與川芎、當歸及標準品阿魏酸 HPLC 圖

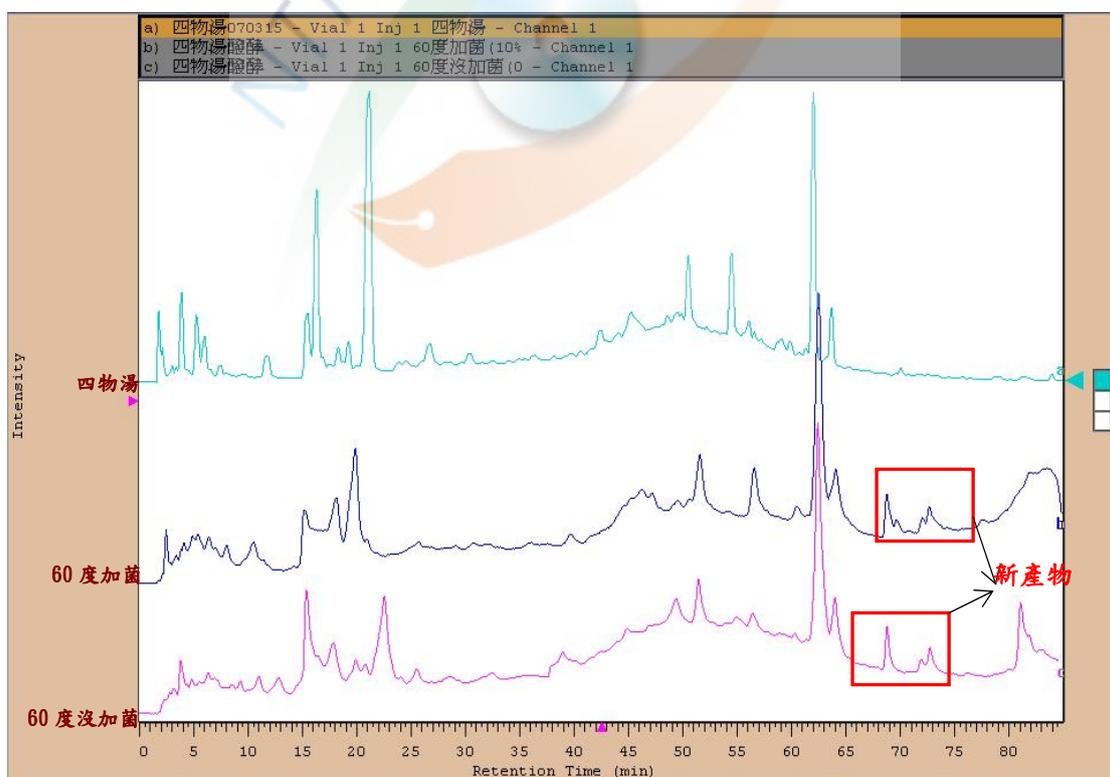


圖 4-6 四物複方與高溫醱酵液 HPLC 圖

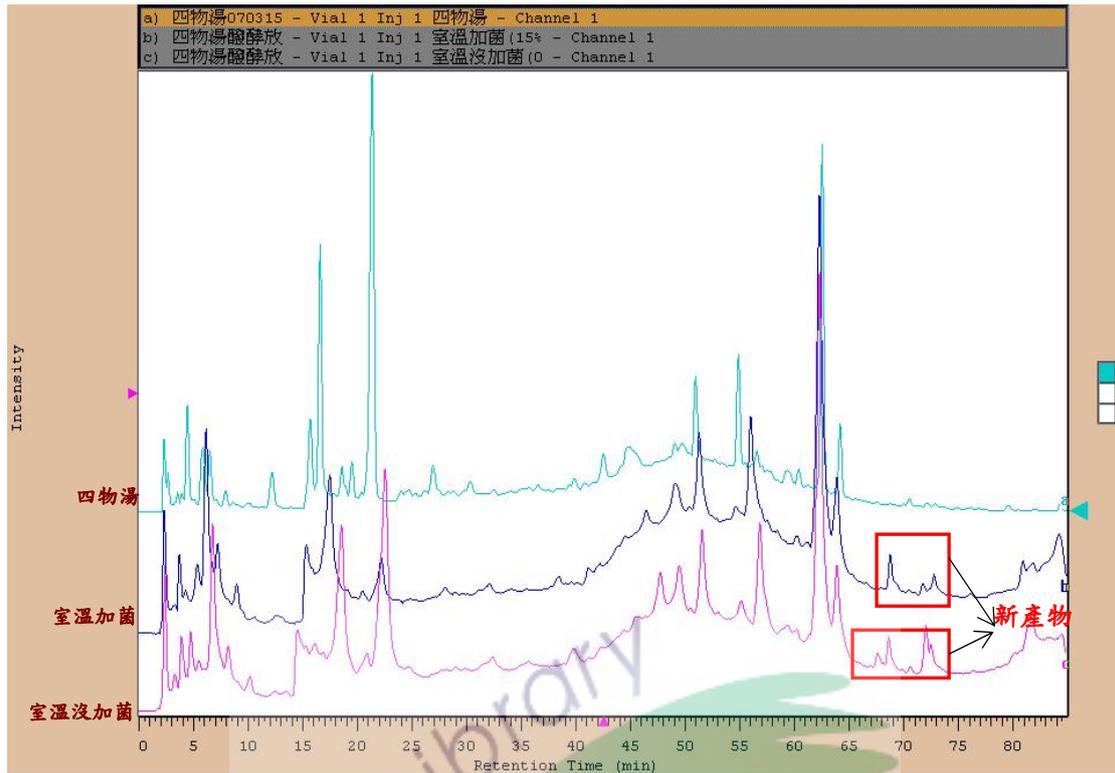


圖 4-7 四物複方與室溫醱酵液 HPLC 圖

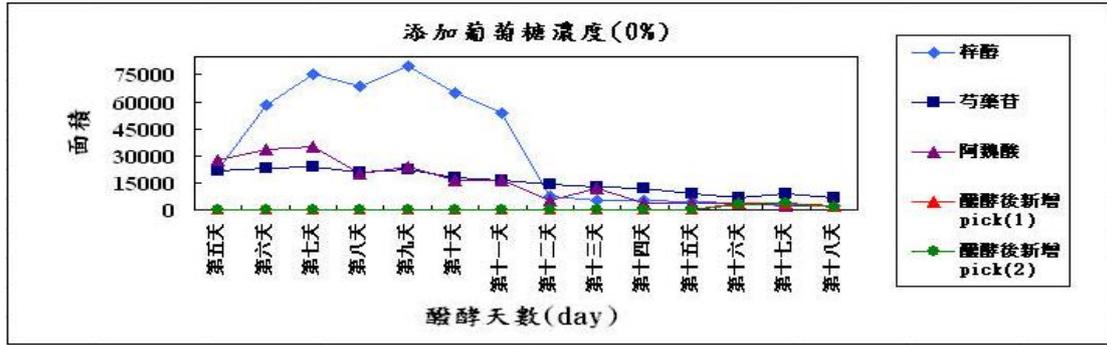


圖 4-8 60 度有菌進行醱酵(葡萄糖濃度 0%)--指標成分的變化

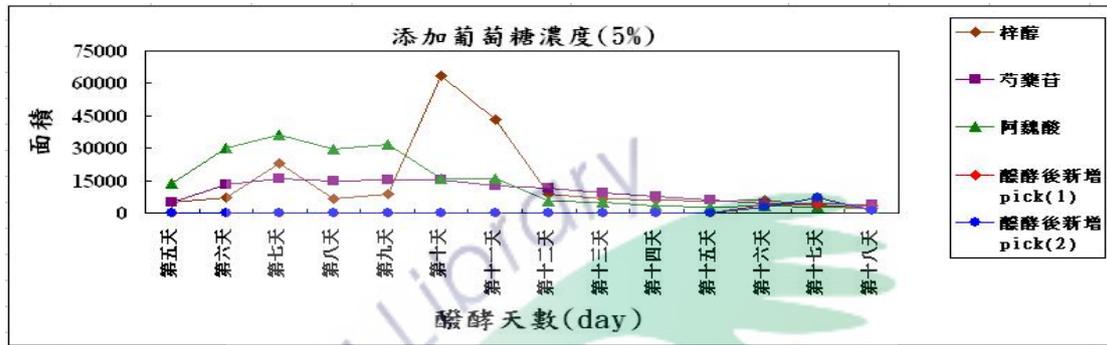


圖 4-9 60 度有菌進行醱酵(葡萄糖濃度 5%)--指標成分的變化

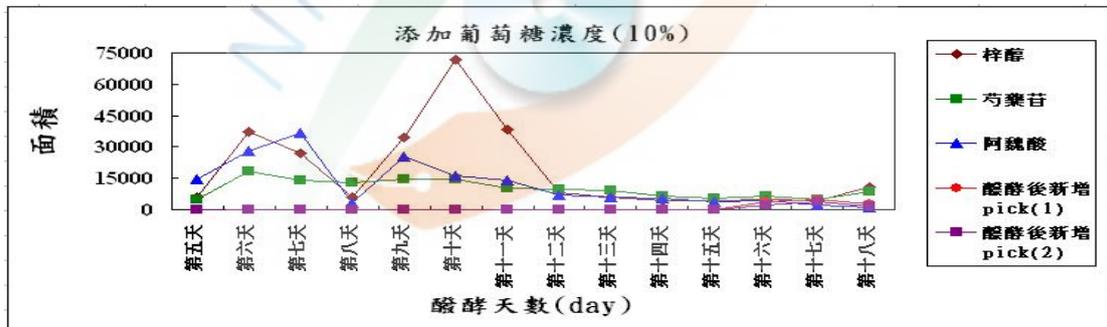


圖 4-10 60 度有菌進行醱酵(葡萄糖濃度 10%)--指標成分的變化

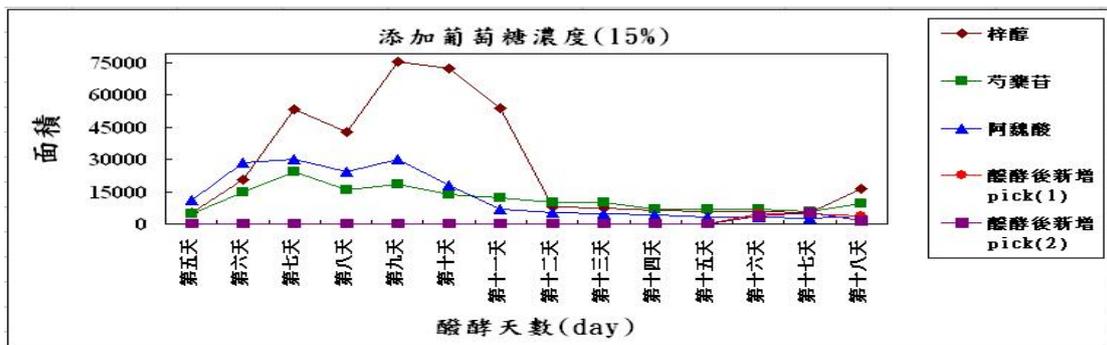


圖 4-11 60 度有菌進行醱酵(葡萄糖濃度 15%)--指標成分的變化

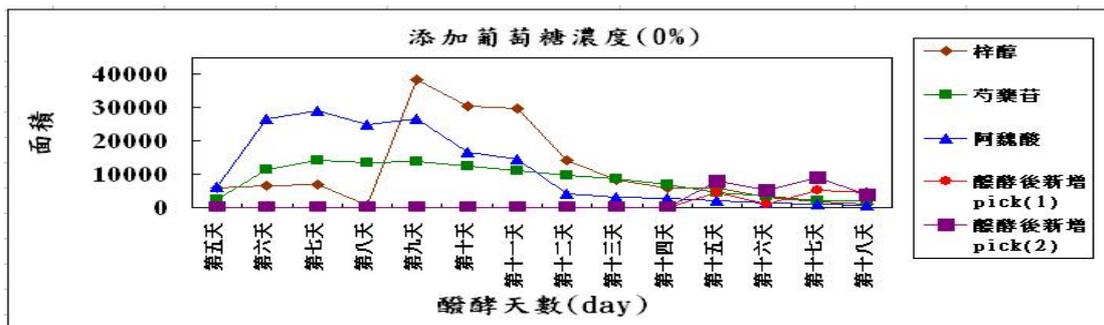


圖 4-12 60 度沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 0%)--指標成分的變化

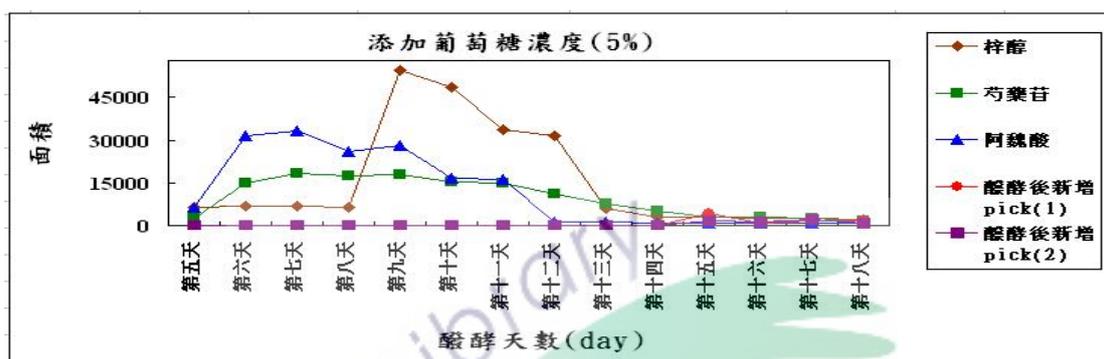


圖 4-13 60 度沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 5%)--指標成分的變化

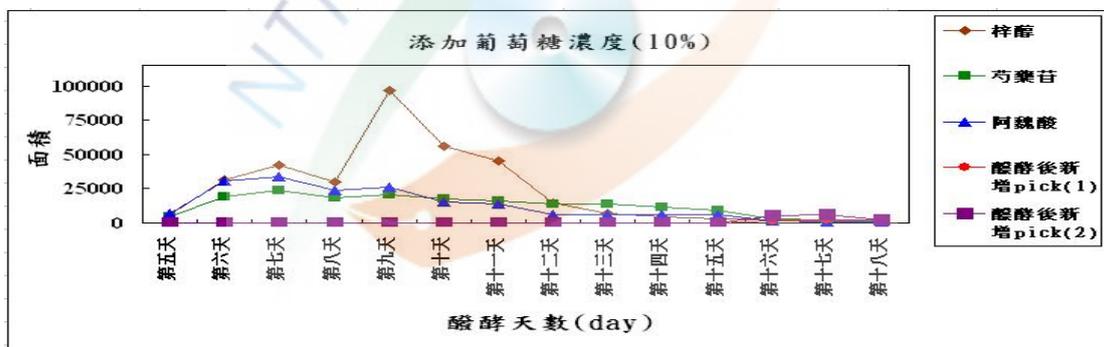


圖 4-14 60 度沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 10%)--指標成分的變化

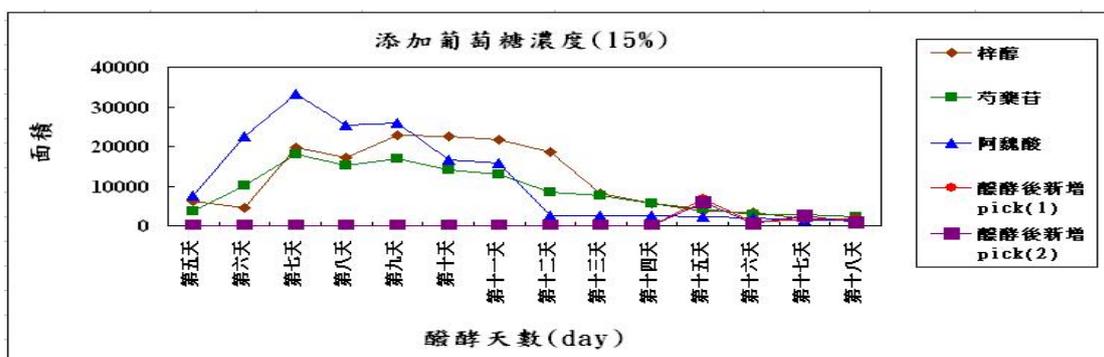


圖 4-15 60 度沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 15%)--指標成分的變化

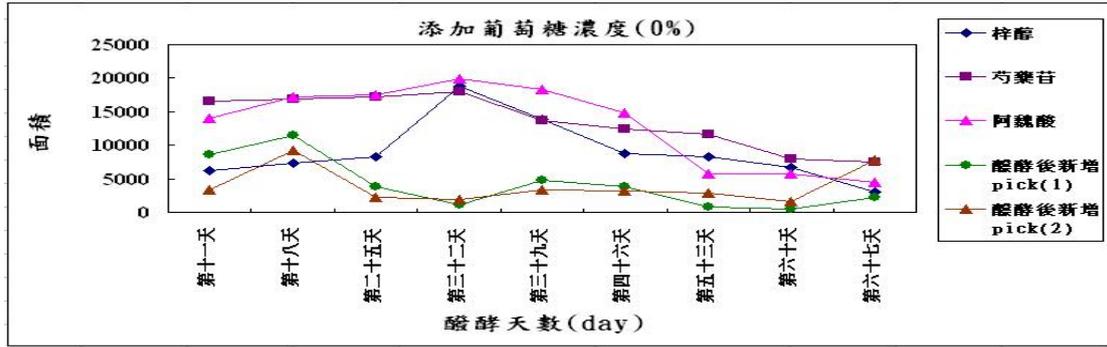


圖 4-16 室溫加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 0%)--指標成分的變化

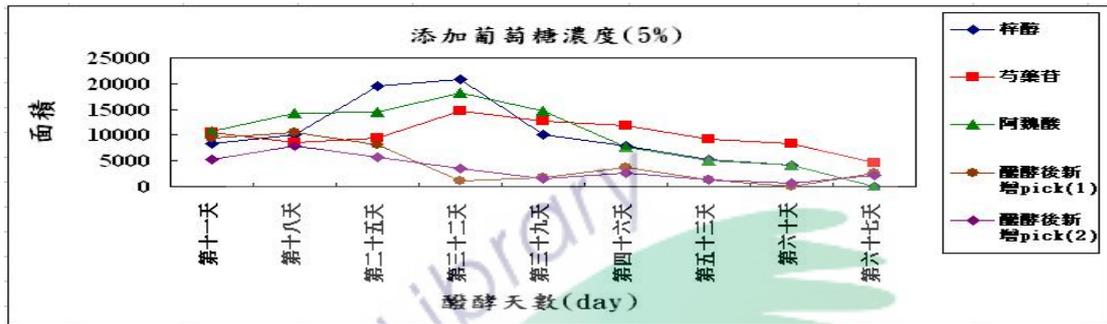


圖 4-17 室溫加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 5%)--指標成分的變化

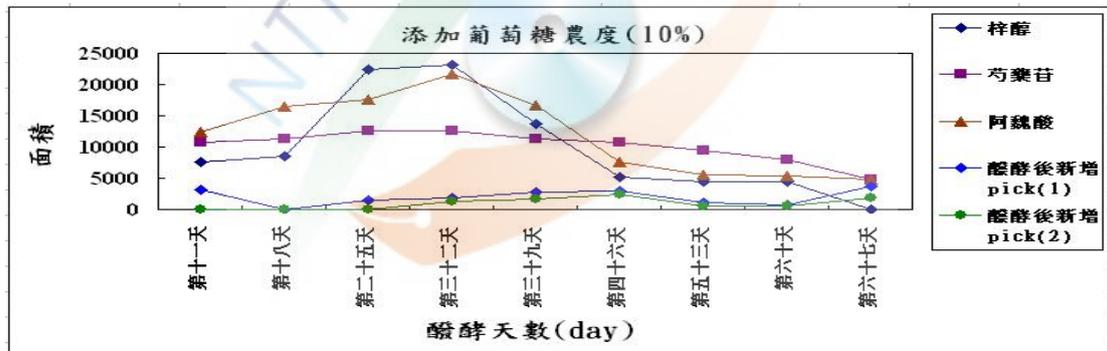


圖 4-18 室溫加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 10%)--指標成分的變化

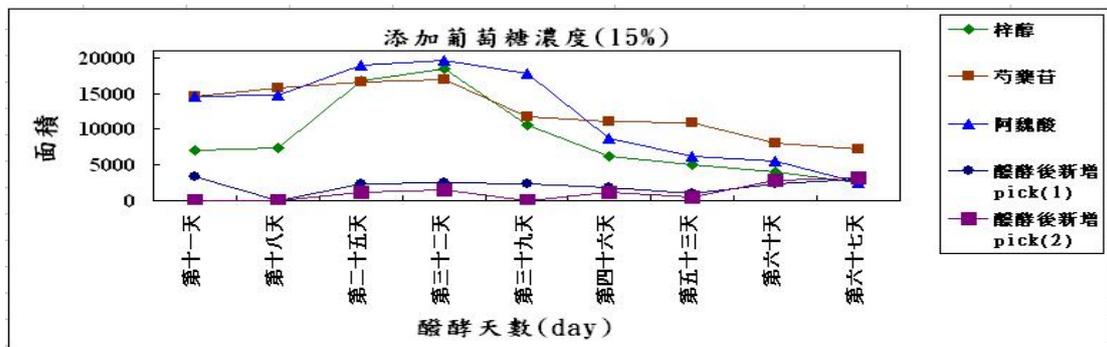


圖 4-19 室溫加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 15%)--指標成分的變化

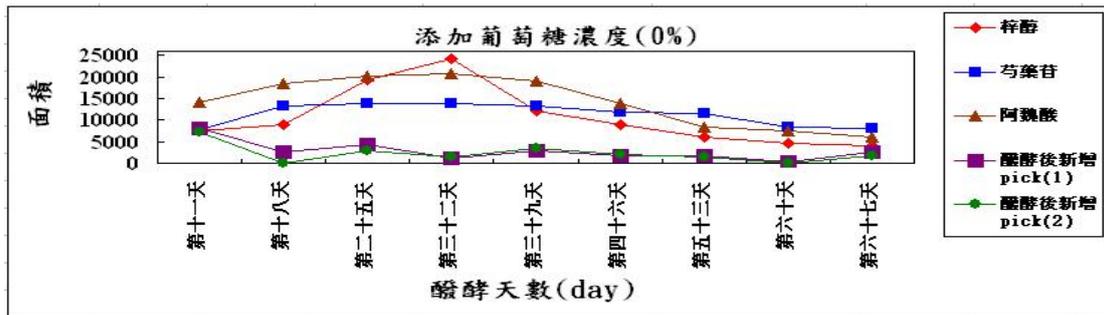


圖 4-20 室溫沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 0%)--指標成分的變化

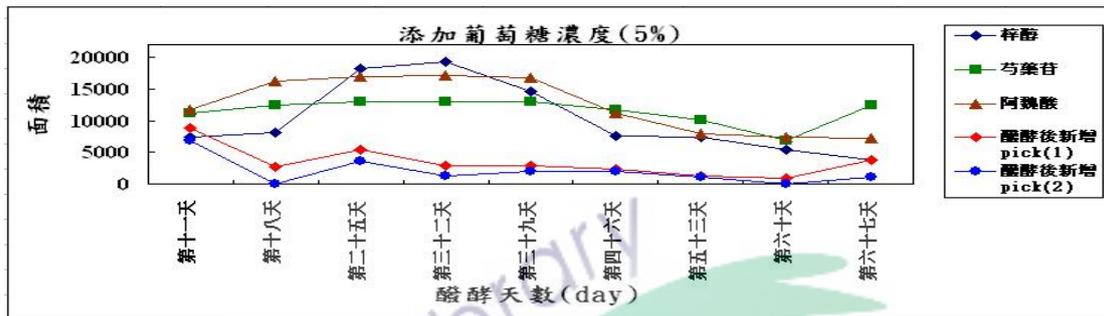


圖 4-21 室溫沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 5%)--指標成分的變化

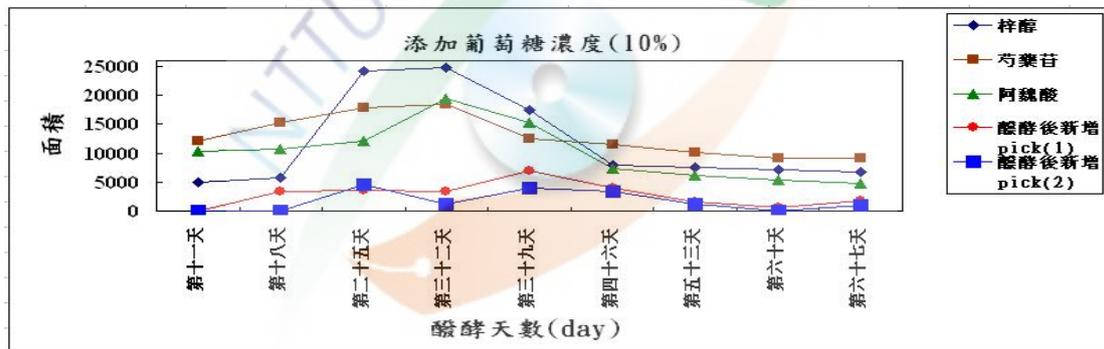


圖 4-22 室溫沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 10%)--指標成分的變化

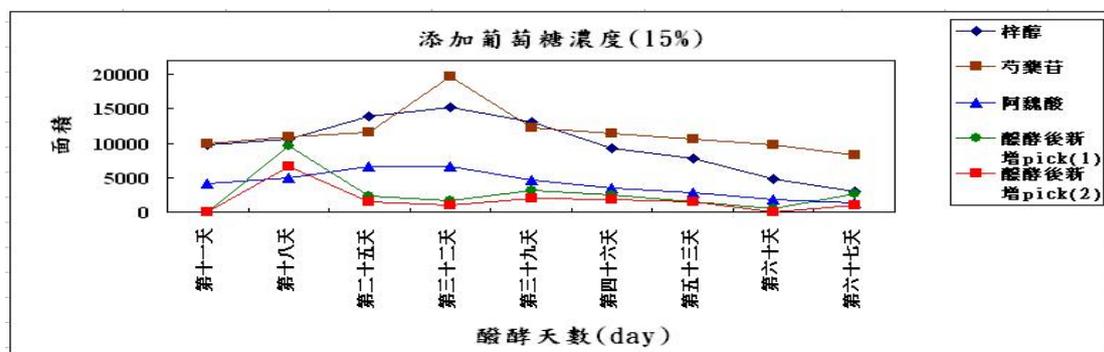
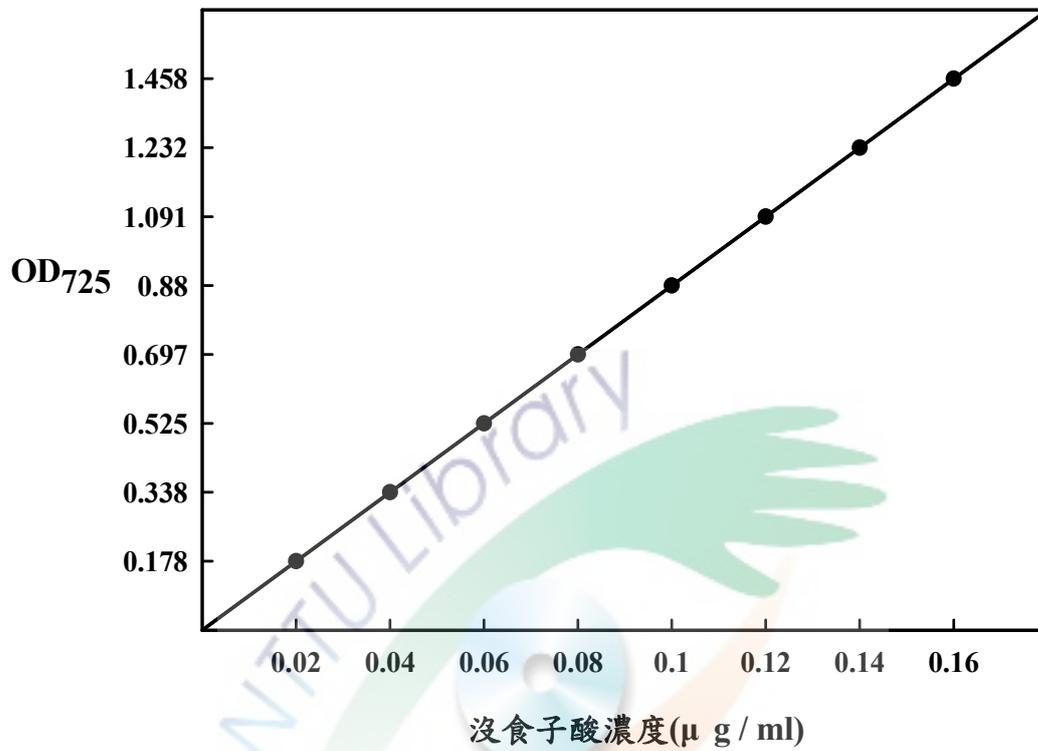


圖 4-23 室溫沒加菌進行醱酵(葡萄糖濃度 15%)--指標成分的變化

4.2 總多酚含量測定圖表如下：

a. 總多酚校正線

總多酚校正線測定



$$Y=9.1137X-0.0204$$

$$R=0.9986$$

b.總多酚測定數據圖表如下：

表五 四物醱酵60°C有加菌總多酚含量測定

總多酚含量測定(μg) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第五天	0.7165	0.7620	0.7455	0.7172
醱酵第六天	0.6928	0.7014	0.8667	0.8818
醱酵第七天	0.5362	0.8232	0.7152	0.8818
醱酵第八天	0.4624	0.7679	0.8640	0.9378
醱酵第九天	0.3946	0.3768	0.3518	0.2485
醱酵第十天	0.3255	0.4802	0.3847	0.3722
醱酵第十一天	0.5533	0.6540	0.4598	0.2195
醱酵第十二天	0.4295	0.3959	0.3900	0.4525
醱酵第十三天	0.5230	0.4130	0.4025	0.4466
醱酵第十四天	0.5822	0.5901	0.5869	0.6514
醱酵第十五天	0.5750	0.5427	0.5335	0.6145
醱酵第十六天	0.4486	0.6099	0.7370	0.9200
醱酵第十七天	0.7699	0.3584	0.2748	0.4117
醱酵第十八天	0.5111	0.4723	0.4585	0.5335
平均值	0.5372	0.5677	0.5551	0.5921
總平均值	0.5630			

表六 四物醱酵60°C沒加菌總多酚含量測定

總多酚含量測定(μg) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第五天	0.4986	0.5809	0.6843	0.6599
醱酵第六天	0.8640	0.7495	0.7383	0.8785
醱酵第七天	0.7468	0.8344	0.8963	0.8160
醱酵第八天	0.8667	0.7830	0.8844	0.7574
醱酵第九天	0.3624	0.6994	0.6264	0.4519
醱酵第十天	0.3110	0.3084	0.3433	0.3393
醱酵第十一天	0.3380	0.5052	0.4519	0.3946
醱酵第十二天	0.3755	0.5197	0.4539	0.4137
醱酵第十三天	0.4203	0.4144	0.4460	0.4045
醱酵第十四天	0.4855	0.4552	0.5625	0.5441
醱酵第十五天	0.5013	0.5546	0.5730	0.5618
醱酵第十六天	0.5026	0.6935	0.6599	0.7969
醱酵第十七天	0.3248	0.4433	0.4690	0.6257
醱酵第十八天	0.4644	0.4637	0.5711	0.4150
平均值	0.5044	0.5718	0.5972	0.5757
總平均值	0.5723			

表七 四物醱酵室溫加菌總多酚含量測定

總多酚含量測定(μg) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第十一天	0.4473	0.5859	0.5454	0.6165
醱酵第十八天	0.9279	0.7462	0.8084	0.8456
醱酵第二十五天	0.8225	0.8054	0.8021	0.7172
醱酵第三十二天	0.3110	0.2300	0.1997	0.2695
醱酵第三十九天	0.1359	0.2313	0.2188	0.2011
醱酵第四十六天	0.6849	0.5934	0.8245	0.6264
醱酵第五十三天	0.3907	0.4611	0.5434	0.3709
醱酵第六十天	0.6501	0.5961	0.5671	0.5869
醱酵第六十七天	0.7304	0.6250	0.6343	0.5776
平均值	0.5667	0.5416	0.5715	0.5346
總平均值	0.5536			

表八 四物醱酵室溫沒加菌總多酚含量測定

總多酚含量測定(μg) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第十一天	0.5513	0.6481	0.7284	0.6961
醱酵第十八天	0.8509	0.8680	0.7850	0.8476
醱酵第二十五天	0.8225	0.7416	0.7679	0.6586
醱酵第三十二天	0.3235	0.3729	0.2728	0.4249
醱酵第三十九天	0.4341	0.3940	0.3900	0.3617
醱酵第四十六天	0.5302	0.5111	0.5289	0.5520
醱酵第五十三天	0.2781	0.5190	0.7093	0.5632
醱酵第六十天	0.5546	0.5144	0.5506	0.5520
醱酵第六十七天	0.7435	0.6237	0.6494	0.5375
平均值	0.5654	0.5770	0.5980	0.5771
總平均值	0.5794			

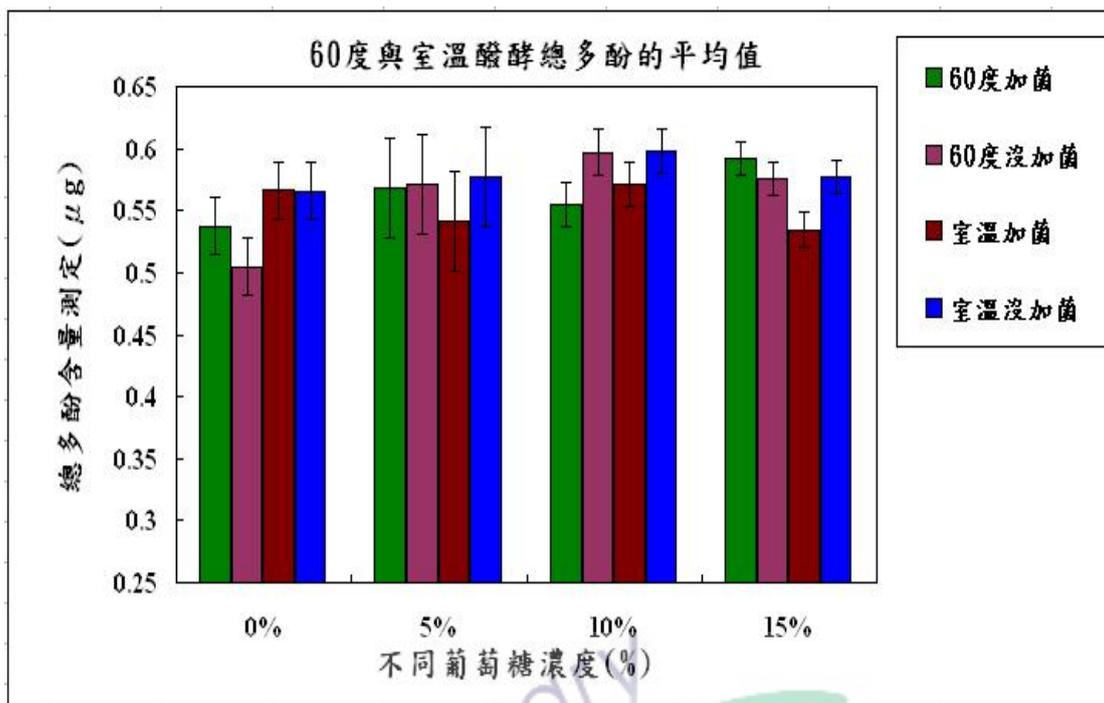
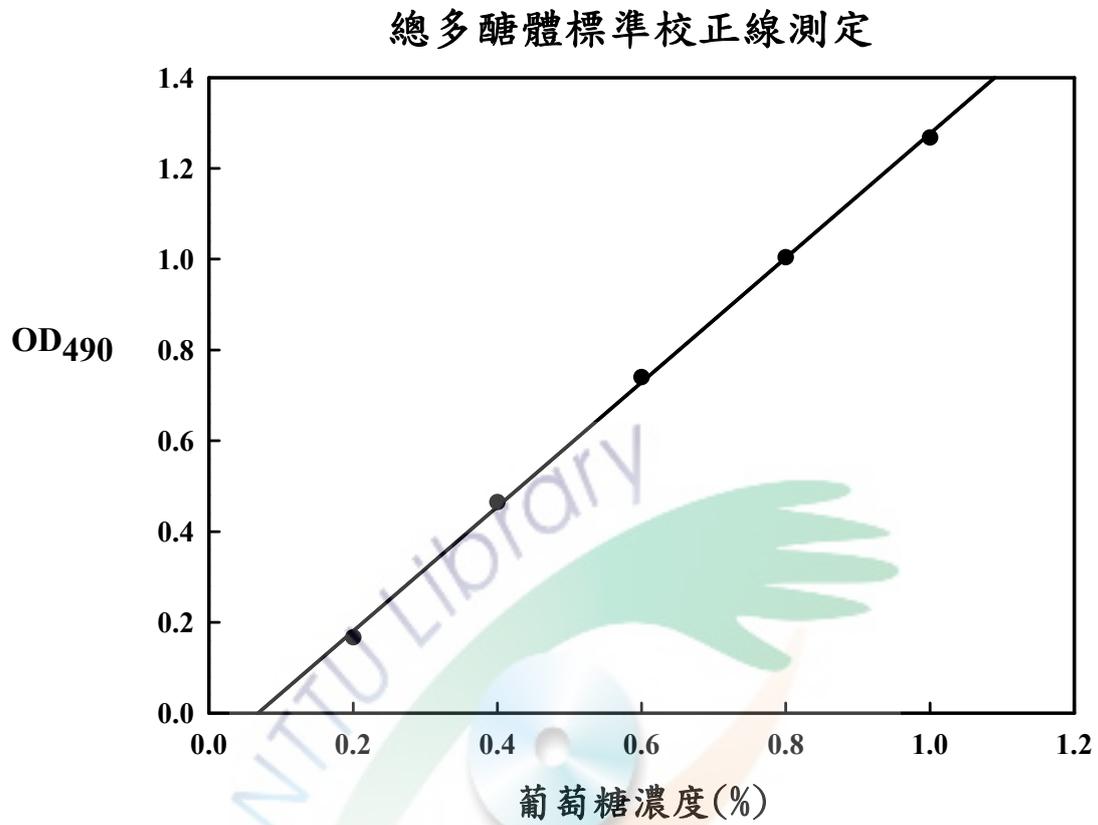


圖 4-24 比較高溫與室溫醱酵液對總多酚含量測定

4.3 總多醣體含量測定圖表如下：

a. 總多醣校正線



$$Y=1.3705X-0.0935$$
$$R=0.9993$$

b.總多醣測定數據圖表如下：

表九 四物醱酵60°C有加菌總多醣含量測定

總多醣含量測定(μg) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第五天	1.7311	1.6363	2.2200	2.0193
醱酵第六天	1.4903	1.6618	1.7457	1.5852
醱酵第七天	2.2018	3.553	3.4458	3.8435
醱酵第八天	2.1835	2.282	2.4973	2.4243
醱酵第九天	2.147	1.8187	2.6432	2.282
醱酵第十天	1.4028	1.3699	1.4903	1.4903
醱酵第十一天	0.892	1.0379	1.0051	1.1474
醱酵第十二天	1.7713	1.7713	1.9281	1.8187
醱酵第十三天	1.6727	1.8771	1.5268	1.9281
醱酵第十四天	1.5888	1.7822	1.7457	1.8187
醱酵第十五天	1.8771	1.7275	1.7457	1.7092
醱酵第十六天	1.6727	1.5268	1.6727	2.0595
醱酵第十七天	1.4721	1.8916	1.6946	1.6727
醱酵第十八天	1.5487	1.6363	1.6217	1.6727
平均值	1.6894	1.8266	1.9273	1.9623
總平均值	1.8514			

表十 四物醱酵60°C沒加菌總多醣含量測定

總多醣含量測定(μg) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第五天	1.4903	1.8187	2.0193	1.8771
醱酵第六天	1.6983	1.4028	1.5122	1.7092
醱酵第七天	2.9314	3.1904	3.0409	3.0226
醱酵第八天	2.147	2.6943	2.3659	2.9132
醱酵第九天	2.293	2.0011	2.8037	2.3878
醱酵第十天	1.4903	1.8369	1.5268	1.4174
醱酵第十一天	0.9686	0.9796	1.0416	1.3444
醱酵第十二天	1.5268	1.6983	1.8552	1.8552
醱酵第十三天	1.5852	1.7457	1.6727	1.7348
醱酵第十四天	1.5998	1.8369	1.8916	1.6727
醱酵第十五天	1.5998	1.8771	1.7311	1.9646
醱酵第十六天	1.6727	1.7275	1.7822	1.7676
醱酵第十七天	1.3298	1.5086	1.6946	2.0231
醱酵第十八天	1.618	1.7092	1.4174	1.5268
平均值	1.7108	1.8591	1.8825	1.9490
總平均值	1.8504			

表十一 四物醱酵室溫加菌總多醣含量測定

總多醣含量測定(μg) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第十一天	1.34	1.6673	1.4491	1.6127
醱酵第十八天	2.14	2.3582	2.1764	2.34
醱酵第二十五天	1.4745	1.6673	1.4491	1.6527
醱酵第三十二天	1.4673	1.62	1.4855	1.4745
醱酵第三十九天	1.5218	1.6164	1.6309	1.8309
醱酵第四十六天	1.5218	1.9073	1.3036	2.5036
醱酵第五十三天	2.2709	5.3582	4.2855	4.1618
醱酵第六十天	0.9982	1.4491	1.4673	2.9291
醱酵第六十七天	1.8309	2.1036	1.7618	2.2491
平均值	1.6184	2.1942	1.8899	2.3060
總平均值	2.0021			

表十二 四物醱酵室溫沒加菌總多醣含量測定

總多酚含量測定(μg) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第十一天	1.4491	1.8127	1.74	1.5764
醱酵第十八天	2.2345	2.4564	3.1473	2.86
醱酵第二十五天	1.4127	1.8309	1.5218	1.6309
醱酵第三十二天	1.5218	1.58	1.5945	1.6673
醱酵第三十九天	1.4855	1.74	1.7255	1.3982
醱酵第四十六天	1.8491	2.3036	2.2345	2.2345
醱酵第五十三天	0.9982	1.5473	1.1582	1.1582
醱酵第六十天	1.1036	1.3618	1.0491	1.3036
醱酵第六十七天	1.5800	1.6673	1.6309	1.8855
平均值	1.5149	1.8111	1.7558	1.7461
總平均值	1.7070			

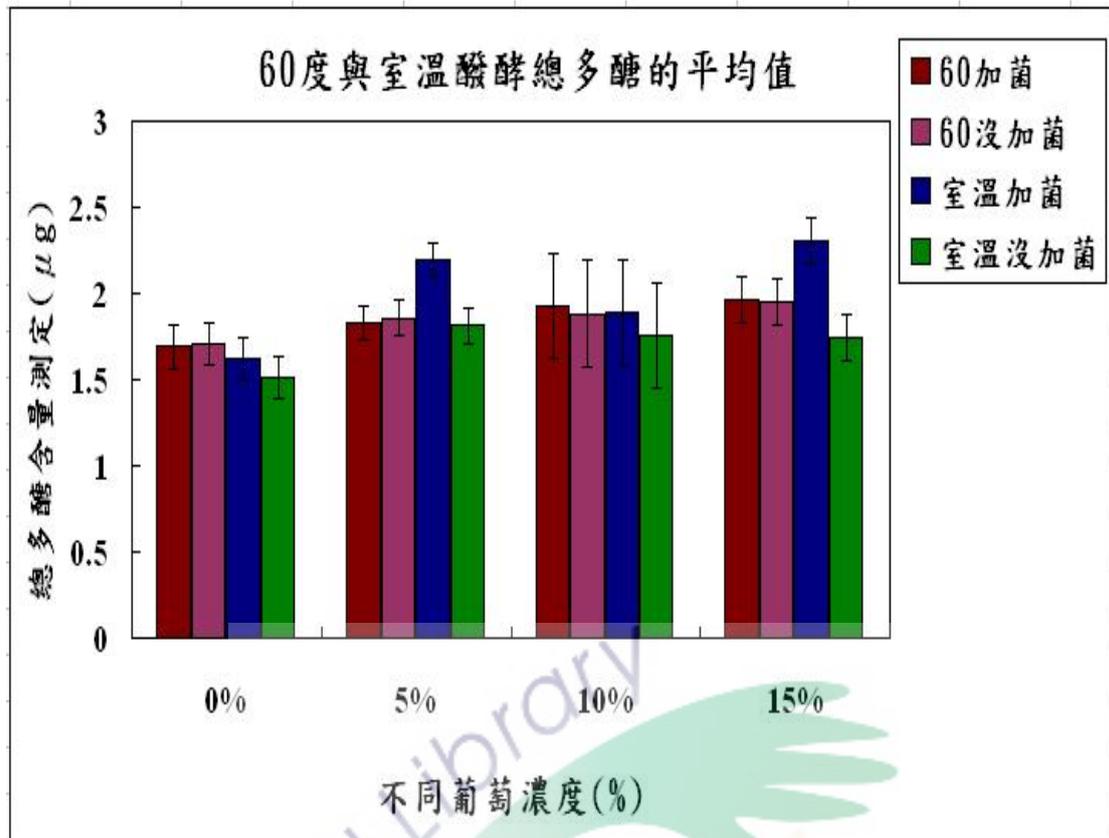
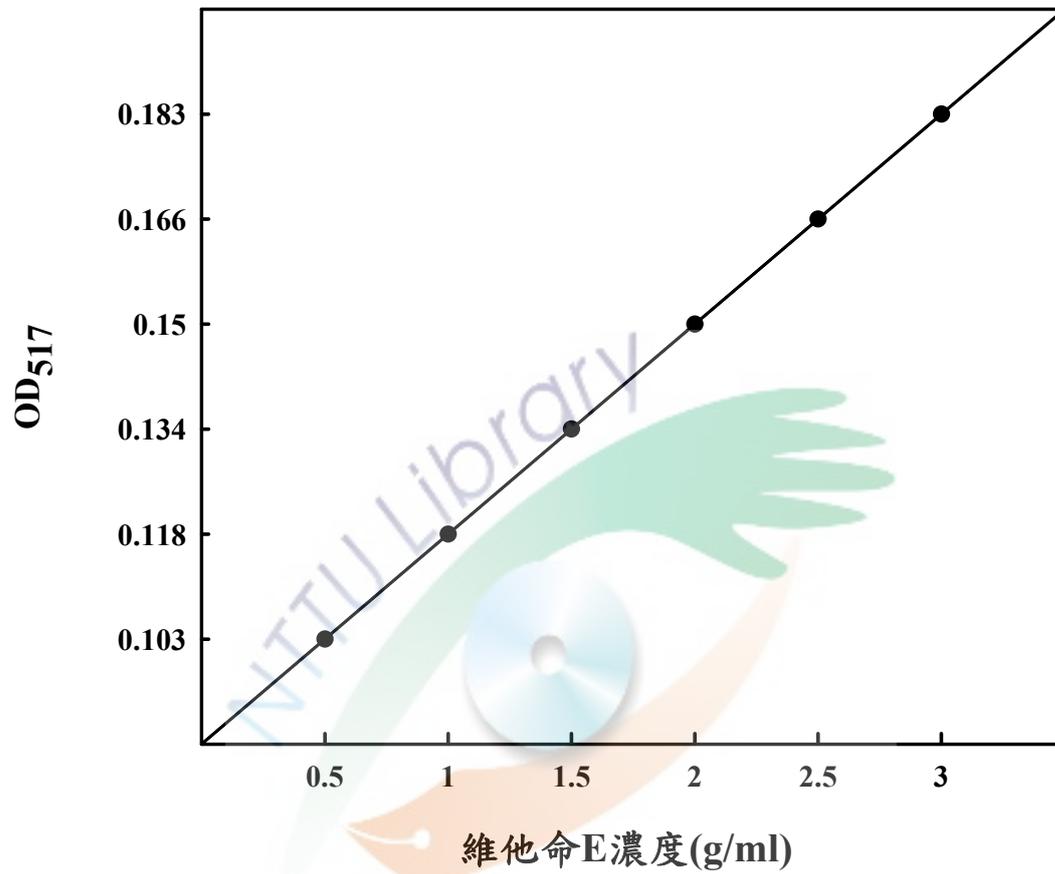


圖 4-25 比較高溫與室溫醱酵液對總多醣含量測定

4.4 DPPH 清除自由基能力測圖表如下：

a. DPPH 清除自由基校正線



$$Y=0.032X+0.0863$$

$$R=0.9997$$

b. DPPH 清除自由基測定數據圖表如下：

表十三 四物醱酵60°C有加菌DPPH抗氧化力含量測定

DPPH抗氧化力含量測定(%) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第五天	76.14	73.59	76.68	77.78
醱酵第六天	79.60	80.33	69.76	74.86
醱酵第七天	72.68	63.93	70.67	71.77
醱酵第八天	75.59	74.86	73.22	71.58
醱酵第九天	78.69	74.13	81.42	79.23
醱酵第十天	60.11	63.01	70.86	72.50
醱酵第十一天	75.59	72.86	66.85	76.67
醱酵第十二天	78.69	75.96	75.59	76.68
醱酵第十三天	77.05	76.68	76.32	75.59
醱酵第十四天	75.41	69.95	72.50	74.68
醱酵第十五天	76.50	72.68	75.96	74.86
醱酵第十六天	77.41	75.59	76.32	75.96
醱酵第十七天	76.87	75.77	75.96	73.41
醱酵第十八天	76.32	76.50	76.87	74.50
平均值	75.48	73.28	74.21	75.01
總平均值	74.50			

表十四 四物醱酵60°C沒加菌DPPH抗氧化力含量測定

DPPH抗氧化力含量測定(%) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第五天	73.41	67.76	65.39	76.87
醱酵第六天	79.96	79.78	64.12	72.31
醱酵第七天	67.21	78.51	70.49	71.77
醱酵第八天	72.13	70.13	72.50	73.04
醱酵第九天	75.41	78.51	81.60	80.69
醱酵第十天	74.13	72.13	67.94	73.04
醱酵第十一天	75.59	76.87	77.96	78.32
醱酵第十二天	77.60	73.95	72.50	74.50
醱酵第十三天	72.68	76.68	77.78	77.23
醱酵第十四天	71.77	72.31	76.14	75.59
醱酵第十五天	74.50	75.05	74.86	73.95
醱酵第十六天	57.56	64.48	75.77	75.41
醱酵第十七天	77.60	75.23	76.14	75.59
醱酵第十八天	76.32	75.77	75.96	75.41
平均值	73.28	74.08	73.51	75.27
總平均值	74.04			

表十五 四物醱酵室溫加菌DPPH抗氧化力含量測定

DPPH抗氧化力含量測定(%) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第十一天	77.05	77.60	76.68	76.32
醱酵第十八天	76.14	64.12	77.05	76.32
醱酵第二十五天	77.05	77.78	78.32	77.41
醱酵第三十二天	78.32	79.23	77.96	79.96
醱酵第三十九天	76.32	76.87	78.14	76.87
醱酵第四十六天	75.77	77.05	77.60	77.96
醱酵第五十三天	77.23	77.23	77.23	76.87
醱酵第六十天	77.60	78.69	78.14	78.32
醱酵第六十七天	75.96	78.14	77.78	76.68
平均值	76.83	76.30	77.66	77.412
總平均值	77.05			

表十六 四物醱酵室溫沒加菌DPPH抗氧化力含量測定

DPPH抗氧化力含量測定(%) 取樣分析日期	添加葡萄糖濃度(%)			
	0%	5%	10%	15%
醱酵第十一天	76.87	76.50	76.87	77.41
醱酵第十八天	76.32	75.96	75.77	75.96
醱酵第二十五天	77.41	78.14	77.60	76.50
醱酵第三十二天	79.60	79.23	79.05	79.60
醱酵第三十九天	77.23	77.96	78.14	78.87
醱酵第四十六天	77.78	77.23	77.78	76.87
醱酵第五十三天	73.95	77.60	77.23	77.96
醱酵第六十天	77.60	79.60	78.87	78.69
醱酵第六十七天	80.33	77.78	80.15	79.60
平均值	77.45	77.78	77.94	77.94
總平均值	77.78			

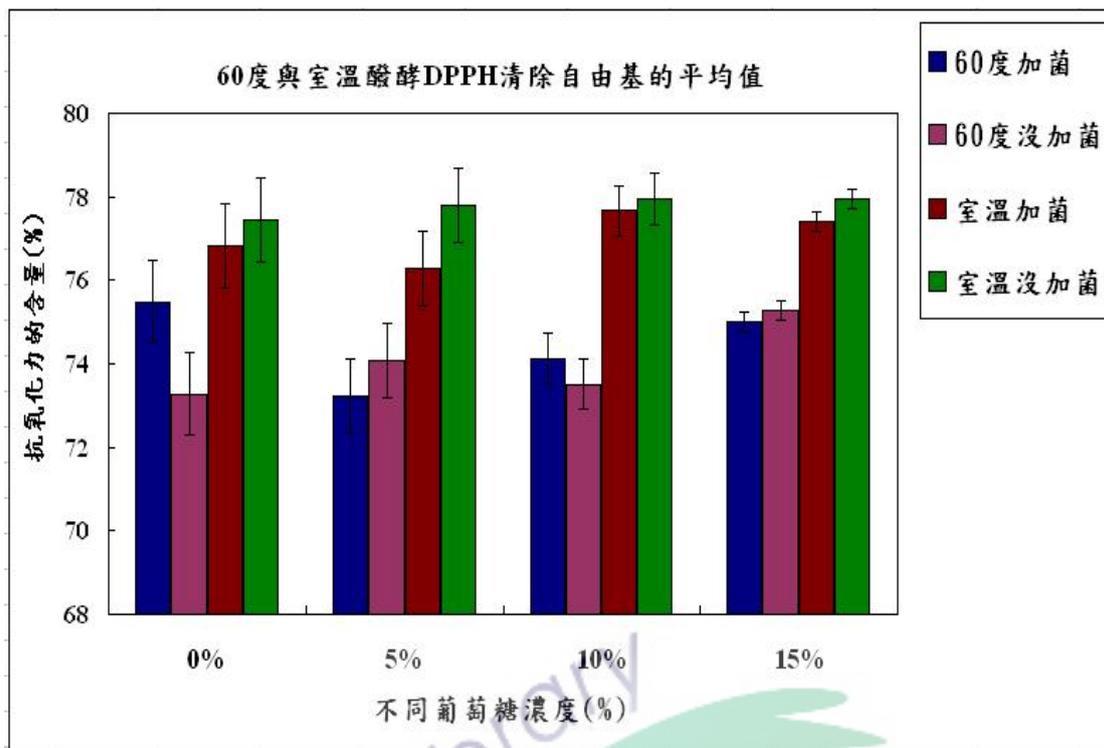


圖 4-26 比較高溫與室溫醱酵液對清除 DPPH 自由基能力

4.5 第一次進行大量取得豬隻骨髓造血母細胞以製備試管內 分化為樹狀突細胞方法。

第一次篩選，取 60 度與室溫醱酵液和傳統四物湯進行細胞實驗比對，如圖 4-27 與圖 4-28，結果發現室溫醱酵不管在造血母細胞增生或細胞活性的增加表現皆比較好。

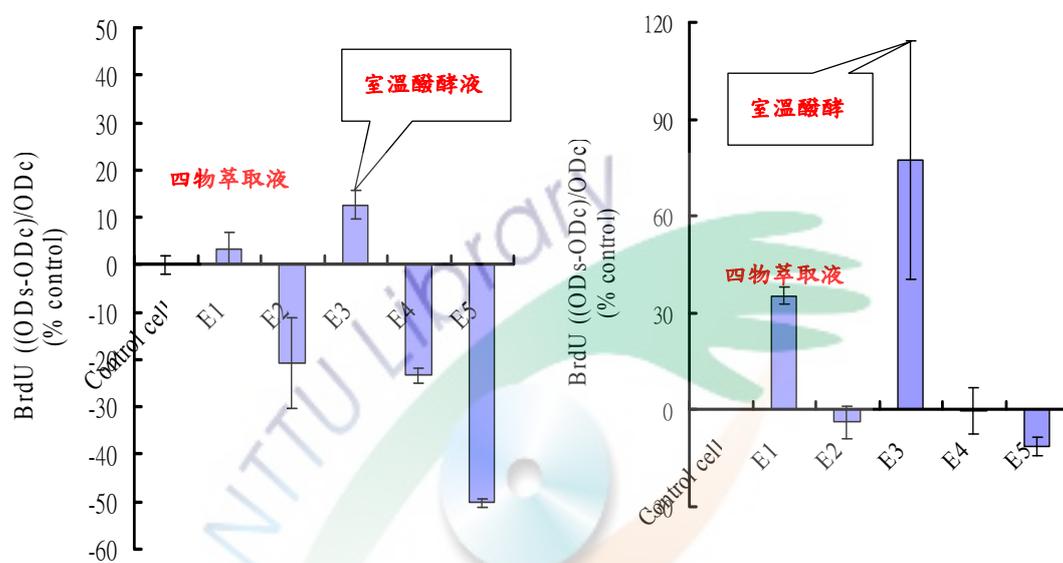


圖4-27 Effects of extracts on cell proliferation of porcine (A) and murine (B) BMHC.

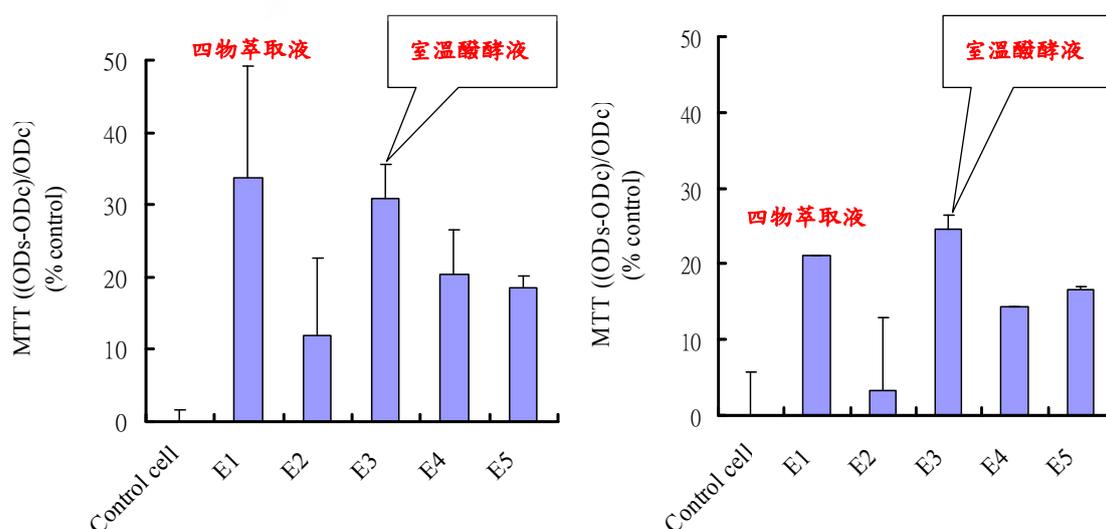


圖4-28 Effects of extracts on cell activities of porcine (A) and murine (B) BMHC.

4.5.1 第二次大量取得豬隻骨髓造血母細胞以製備試管內分化為樹狀突細胞的數據。

表十七 第二次檢驗:針對加入不同葡萄糖濃度的室溫醱酵液,對於造血母細胞增生實驗

醱酵天數(day)	Mean	SEM
control	0	1.26591
第十八天(0%)	4.784689	1.435407
第十八天(5%)	58.37321	13.67618
第十八天(10%)	56.45933	15.482
第十八天(15%)	46.41148	7.905604
第五十三天(0%)	24.88038	6.256793
第五十三天(5%)	46.88995	14.73964
第五十三天(10%)	25.35885	9.676435
第五十三天(15%)	29.1866	7.905604
四物湯原藥材抽出物	13.39713	2.870813

表十八 第二次檢驗:針對加入不同葡萄糖濃度的室溫醱酵液，對於增加細胞活性實驗

醱酵天數(day)	Mean	SEM
control	0	6.109755
第十八天(0%)	38.88413486	3.144134
第十八天(5%)	49.40954989	25.53575
第十八天(10%)	-1.078213247	12.2548
第十八天(15%)	24.63631696	7.860334
第五十三天(0%)	-9.122026356	6.745044
第五十三天(5%)	18.68902961	41.75911
第五十三天(10%)	17.83330481	11.663
第五十三天(15%)	-55.67345542	22.4958
四物湯原藥材抽出物	-47.62964231	17.68247

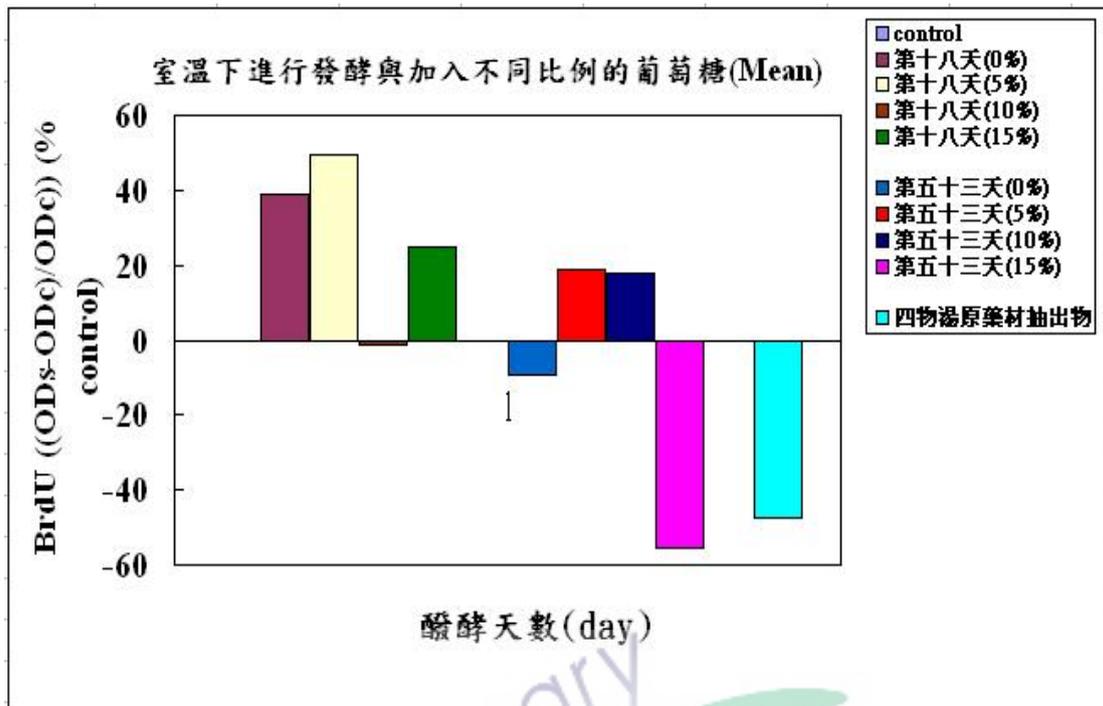


圖 4-29 Screening Cell system(室溫發酵): bone marrow hematopoietic cells isolated from rat

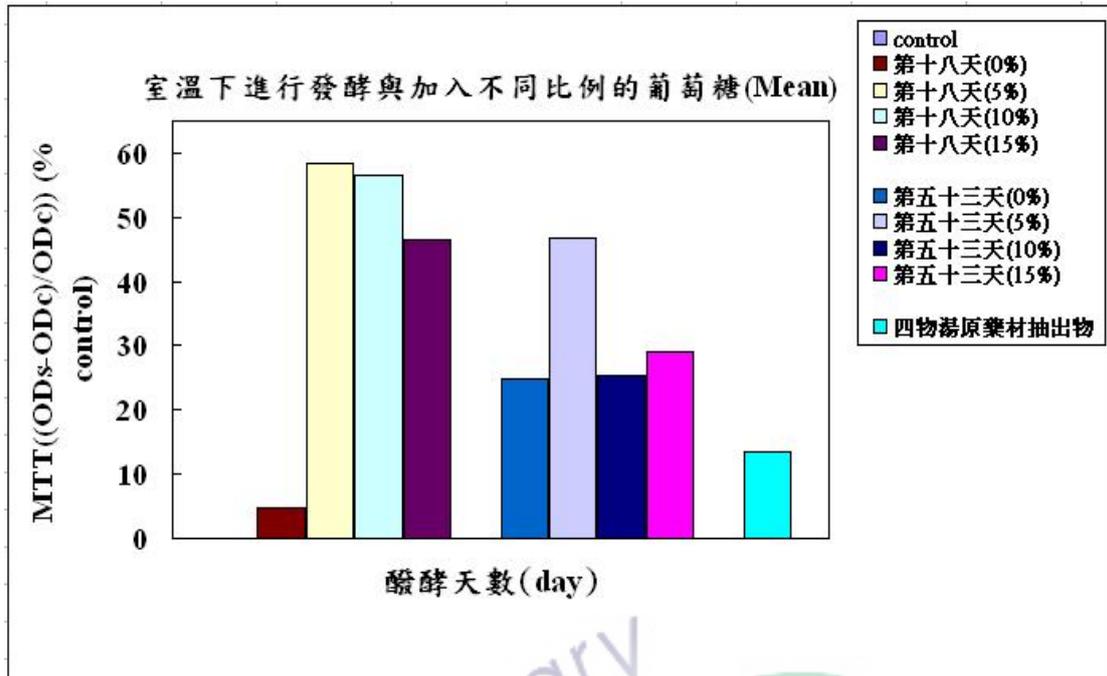


圖 4-30 Screening Cell system(室溫發酵): bone marrow hematopoietic cells isolated from rat

4.6 菌種鑑定



圖 4-31 *Geobacillus sp.* 菌株在 MT8.0 的形狀

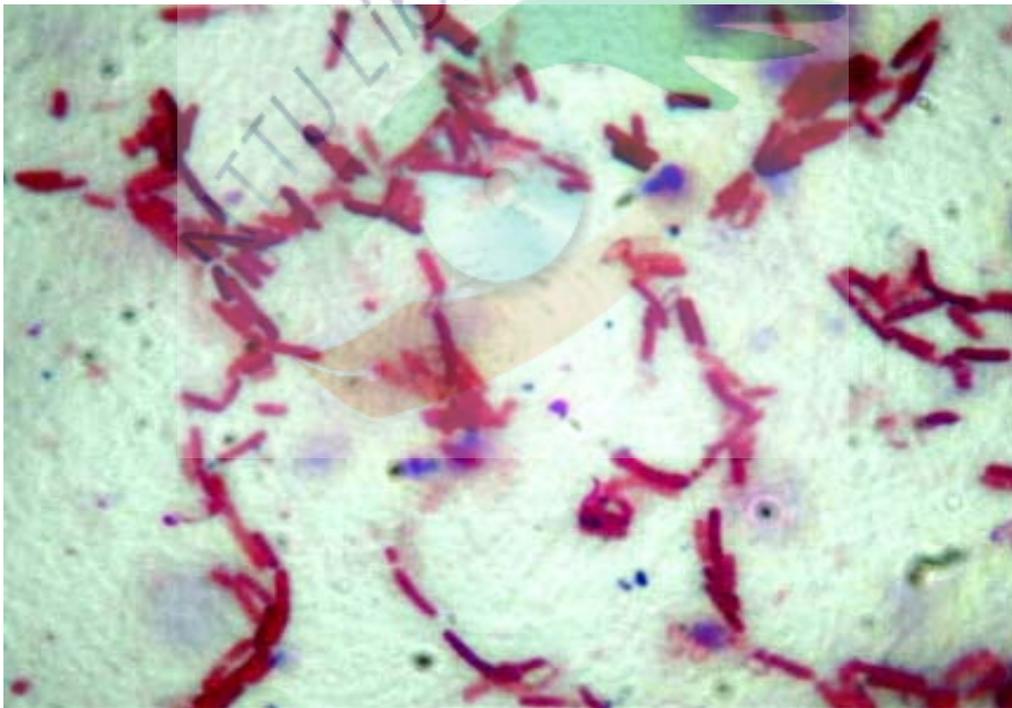


圖 4-32 顯微鏡下所觀察到的菌的形狀(革蘭氏陰性，桿菌)



圖 4-33 *Bacillus* sp. 菌株在 MT8.0 的形狀

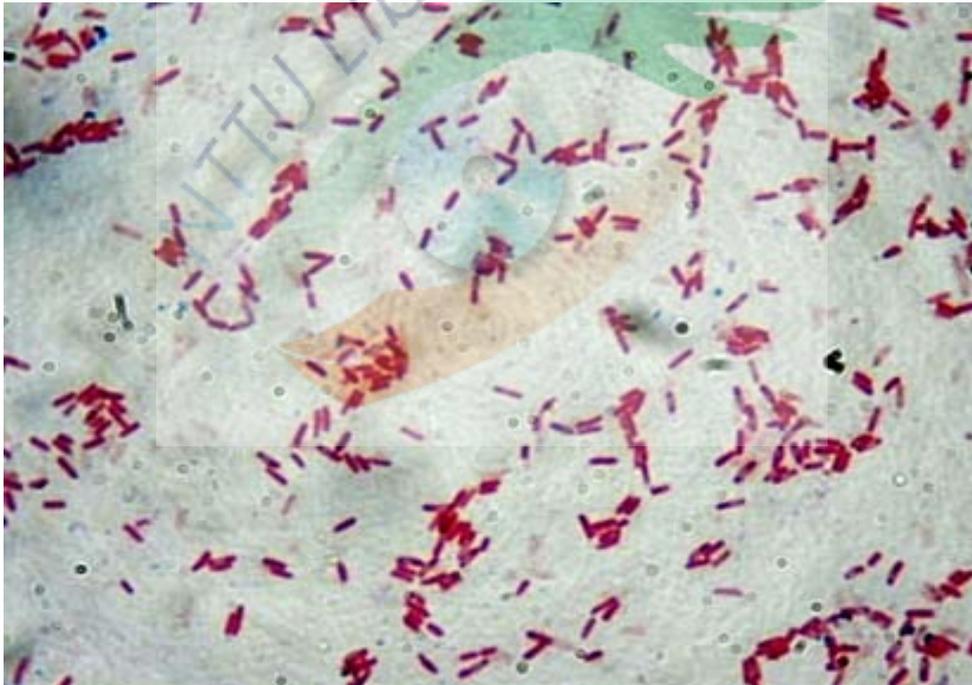


圖 4-34 顯微鏡下所觀察到的菌的形狀(革蘭氏陰性，桿菌)



圖 4-35 *Bacillus sp.* 菌株在 MT8.0 的形狀



圖 4-36 顯微鏡下所觀察到的菌的形狀(革蘭氏陰性，桿菌)

Swu 60-1 rP2 [*Geobacillus sp.*] :96.3%

GNGNANGAGATCAAATAATGCAAGTCGAGCGGACCGAACG
AGGGCTTGCTCTTGATTCGGTCAGCGGCCNNTNGGAGAGT
AACACGTGGGCAACCTGCCCGCAAGACCGNCTTTAACTCC
GGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGACCGCA
TGGTCTTCGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGGCTGTCACCTTGC
GGATGGGCCCGCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC

Swu 40-1 rP2 [*Bacillus sp.*] :99.54%

TTCCTTCTTGCCGCAGCCTATACATGGCAAGTCGAGCGGA
CCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGGCGGACGGGT
GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACC
GCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTA
CAGATGGACCCGCGGGCGCATTAACTAGTTGGTGAGGTAA

Swu 40-5 rP2 [*Bacillus sp.*] : 99.64%

TGCTATCCTAGTAAGAATGGCGCGTGCTATACATGCAAGTC
GAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTG
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGT
TTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTTTCGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGGCGCATAGCTAGTTGGTGG
GGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC

第五章 結 論

- (1)從表一~表四可看出高溫 60 度醱酵，進行到第十二天指標成分量開始降低；室溫則是在第 39 天出現降低情形，同時在 60 度與室溫醱酵後期都有兩個很明顯的新產物出現，從數據中可以看出，在室溫沒加菌醱酵下所得到的指標成分含量並不會比高溫醱酵或有加菌醱酵差，由此可以推論以傳統方式進行自然醱酵不需加入任何的菌株，就可以得到相當良好的醱酵結果；相對的醱酵天數越長對於新出現的產物的量越好。
- (2)因為多酚類化合物是很好的抗氧化劑，除了能幫助身體清除自由基外還有防癌的功效，從表五到表八的數據中以平均值來做比較，雖然差距很微量但還是發現在室溫沒加菌醱酵所測得總多酚含量較好，這表示說在室溫進行自然醱酵不要加入任何的菌株，就可以測到不錯總多酚含量。
- (3)從表九到表十二的數據中以平均值來做比較，雖然差距很微量但發現在室溫加菌下醱酵所測得總多醣含量較好，表示在室溫進行自然醱酵下所加入的菌株對四物中藥材分解得到多醣體有較大幫助。
- (4)從表十三到表十六的數據中以平均值來做比較下，發現在室溫沒加菌下醱酵清除 DPPH 自由基能力比其他條件狀態下都來的，這

表示在室溫進行自然醱酵不要加入任何的菌株，對於清除自由基能力效果比較好。

(5)從造血幹細胞實驗所得到的圖 4-27 與 4-28 中可以看出，以室溫醱酵下分離得到的醱酵液添加到幹細胞中有明顯造成造血母細胞增生的效果；並且增加了細胞的活性，相對的高溫 60 度醱酵分離得到的醱酵液則沒有如此優異表現。

(6)表十七與表十八則是針對效果較好的室溫醱酵進行細胞實驗，發現在室溫醱酵下分離得到的醱酵液添加到幹細胞中有明顯造成造血母細胞增生的效果；並且增加了細胞的活性。

(7)在醱酵期間內篩選出三隻桿菌，目前已從 DNA 序列碼鑑定，分別得到 60°C 【*Geobacillus sp.*】與 40°C 【*Bacillus sp.*】，發現已鑑定出來這三組裡編號 60-1 與 40-1、40-5 的菌株都與原先添加進去醱酵的菌株是一樣，這表示本研究室先前從藥渣堆肥的研究中篩選出來的菌株，本來就是存在於四物湯原藥材中的優勢菌株，也因為這樣的關係才能在醱酵期間內有效促進分解纖維素，而達到幫助有效成份萃取出不錯效果。

總結論：

綜合上述前 7 點的結論，若後續要再進一步進行四物醱酵的研發，建議醱酵的條件以四物湯原藥材添加 15% 葡萄糖採用室溫自然醱酵，讓原來四物適合生長的微生物自然作用，所得的結果表現會最好。



第六章 參考文獻

- (1) 苗愛雅, 王升扈. 四物湯及其相關制劑定量分析方法研究進展. 中
南藥學 4(1):43-46, 2006。
- (2) 容蓉, 袁久榮, 王學志. 四物湯阿味酸煎出量 HPLC. 中國藥學雜誌
35(11):767-768, 2000。
- (3) 苗愛雅, 梁乾德, 王升扈. SPE-HPLC 測定四物合劑中本內酯的含量.
中成藥 27(6), 2005。
- (4) 苗愛東, 梁乾德, 馬百平, 王升啟. 四物合劑 HPLC 指紋圖譜. 中南藥
學 4(2):83-85, 2006。
- (5) 譚有能. 四物湯的純化工藝及其補血作用的研究. 四川大學生藥學
碩士論文 2006。
- (6) 孟令丹. 四物合劑質量標準研究. 沈陽藥科大學碩士學位論
文. 2006。
- (7) 張村. 四物湯補血活性部位的 HPTLC 及 HPLC 化學組學初步研究.
河南中醫學院碩士學位論文 2002。
- (8) 路曉欽. 四物湯補血作用及其配伍機制的實驗研究. 中國人民解放
軍軍事醫學科學院碩士論文 2002。

- (9) 雒曉芳。藥用植物當歸的組織培養研究。西北師範大學碩士學位論文 2005。
- (10) 馬毅。當歸的生物多樣性初探。蘭州大學碩士學位論文 2006。
- (11) 歐仕益, 包惠燕, 藍志東。阿魏酸及其衍生物的藥理作用研究進展。中藥材 24(3):220-221, 2001。
- (12) 鐘偉祥, 梁頌培。中成藥中當歸、川芎的氣相色譜鑒別研究。中成藥 19(9):32-33, 1997。
- (13) 沈云輝。熟地黃益智作用的實驗研究。河南中醫學院碩士學位論文 2002。
- (14) 林景彬。常用中藥藥理與應用。中國醫藥學院出版 525-526, 1996。
- (15) 趙雷。川芎糖類物質的分離提取及相關性質研究。東北師範大學碩士學位論文 2006。
- (16) 徐偉泉。川芎嗪提取分離純化及穩定性研究。北京化工大學碩士學位論文 2005。
- (17) 黃建邦, 劉雪芬, 陳樹元。川芎嗪對人血多形核白細胞呼吸暴發氧自由基的抑制作用。中國中西醫結合雜誌 14(10):607-609, 1994。

- (18) 蔣森. 血淤論. 中國醫藥科技出版社, 北京市 85-87, 2001。
- (19) 林麗娜, 王萬鐵, 徐正禎, 李東. 川芎嗪抗心肌缺血再灌流損傷的臨床研究. 中郭中西醫結合雜誌 17(5):261-263, 1997。
- (20) 國家醫藥管理局中草藥情報中心站編。植物藥有效成分手冊。人民衛生出版社 111-798, 1986。
- (21) 肖崇厚. 中藥化學. 上海科學技術出版社 246, 1987。
- (22) 彭懷仁. 中醫方劑大辭典第九冊. 人民衛生出版社 120, 1996。
- (23) 王本祥. 現代中藥藥理學. 天津科學技術出版社 299-301, 1995。
- (24) 李世滄. 臨床常用中藥方劑手冊. 中華民國藥師公會全國聯合會發行 147, 1991。
- (25) 孫逸民. 儀器分析. 全威出版社 1997。
- (26) 石宇華, 石宇嘉編著. 儀器分析化學. 鼎茂圖書 2001。
- (27) 戴火木等編著. 儀器分析實驗. 高立出版社 1996。
- (28) 張裕純編著. 儀器分析實驗-含乙級化學士技術技能檢定術科試題. 新文京開發出版社 2002。
- (29) 彭旭明編著. 科學月刊主編「化學儀器分析」. 正中出版社 1985。

- (30) 薑宏哲, 王仁澤編著. 藥品儀器分析. 黎明出版社 1979。
- (31) 柯以侃編著. 儀器分析. 新文京開發出版社 2003。
- (32) 黃雪莉, 楊嘉蓁, 郭家倫, 周聖炘. 辛基苯酚聚氧乙醇類分解菌分離、鑑定與生長特性. 台灣農業化學與食品科學 42(5): 356-365, 2004。
- (33) 高怡婷. 乳酸菌快速鑑定方法之研究. 臺灣大學園藝學研究所 2007。
- (34) 黃雪莉、楊嘉蓁、郭家倫、周聖炘。辛基苯酚聚氧乙醇類分解菌之分離、鑑定與生長特性。臺灣農業化學與食品科學。42(5):356-365,2004。
- (35) 武忠偉. 冬蟲夏草深層培養及其多糖的研究與應用. 西北大學碩士學位論文 2005。
- (36) 韓春楊. 中草藥醱酵制劑的研制及應用. 山東農業大學碩士學位論文 2005。
- (37) 張讚昌, 張義宏. 冬蟲夏草屬菌絲體液態培養條件之探討. 馬偕護理專科學校學報 3:29-47,2003。
- (38) 熊建華, 劉仲華, 黃建安, 王克勤. 巴拉圭茶多酚大孔吸附樹脂分離工藝及總多酚、多酚流分的抑菌作用研究. 江西農業大學學報 29(4): 690-694, 2007。

- (39)陳如茵, 楊筱姿, 蔡美珠, 林欣榜. 梅(*Prunus mume* Seibu. et Zucc.)
之花及不同成熟度果實水萃物抗氧化性及苦杏仁苷含量之探討.
臺灣農業化學與食品科學 44(6): 390-396, 2006。
- (40)闞紅, 范智超, 張志琪. 七葉鬼燈檠中多酚類化合物提取工藝研究
與含量測定. 西北林學院學報 22(3):138-140, 2007。
- (41)江伯源, 練怡伶, 陳世雄, 林宜信. 超音波輔助對杭菊萃取液酚類化
合物及官能品評之影響. 臺灣農業化學與食品科學
45(2) :101-107,2007。
- (40)王靜, 王晴, 向文胜. 色譜法在糖類化合物分析中的應用. 分析化學
29(2): 222-227, 2001。
- (41)王展, 方積年. 高場核磁共振波譜在多糖結構研究中的應用. 分析化
學評書與進展.28(2):240-247, 2000。
- (42)黃勺紋. 黑木耳多醣體成分分析研究及在降低血清膽固醇上的應用.
南台科技大學生物科技研究所碩士論文 2005。
- (43)朱彩平, 張聲華. 枸杞子水中提物中多糖含量的測定. 食品與發酵工
程 31(5):111-113, 2005。
- (44)羅佩文. 台灣數種特有水果抗氧化活性及清除自由基能力之評估. 輔
仁大學食品營養系碩士論文 2001。

- (45)鄭永祥, 沈添富, 陳保基. 類胡蘿蔔素脂抗氧化及免疫調節作用. 科學農業 48(9,10) : 236-243, 2000。
- (46)徐清萍, 敖宗華, 陶文沂. 恆順香醋 DPPH 自由基清除活性的研究. 中國釀造 7 : 16-18, 2004。
- (47)黃志煜, 吳志鴻, 張振生, 葉永廉, 張上鎮. 製程與採收季節對茶葉抽出物抗氧化活性之影響. 臺大實驗林研究報告 17(4):231-237, 2003。
- (48)孫濤, 王少鑫. 骨髓幹細胞移植治療肝硬化可行性研究. 胃腸病學和肝病學雜誌 15(4) : 336-338, 2006。
- (49)李俊峰, 馬勇, 嚴家春. 骨髓幹細胞誘導分化為肝系細胞的研究進展. 世界感染雜誌 7(5):362-366, 2007。
- (50)蔡耘, 黃紹良, 黃科, 陳惠芹, 張緒超. 不同途徑輸注造血幹細胞對小鼠移植效果的比較. 中國實驗血液學雜誌 15(5):998-1004, 2007。
- (51)洪君儀. 血色素病變患者之造血幹細胞移植新觀念. 中華民國液病學會&中華民國血液及骨髓移植學會聯合會訊 94(1):9, 2005。
- (52)趙粉琴, 羅樹彬, 羅惠英, 潘萬龍, 李淑萍, 尹少甫. 殼聚糖協同臍血造血幹細胞對小鼠的免疫恢復研究. 輻射防護 27(1):25-31, 2007。
- (53)Chun-Ju Chang, Jen-Hwey Chiu, Ling-Ming Tseng, Chuan-Hsiung

- Chang, Tsu-Ming Chien, Chew-Wun Wu, Wing-Yiu Lui. Si-Wu-Tang and its constituents promote mammary duct cell proliferation by upregulation of HER-2-signaling. *Menopause*, 13: 967-976, 2006.
- (54) H.J. Zhang, P.n. shen, Y.Y. Cheng .Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicine Si-Wu-Tang by HPLC coupled with DAD and ESI-MS. *J.pharaceut Biomed* ,34: 705-713 ,2004.
- (55) T.R. Tsai, T.Y. Tseng, C.F. Chen, T.H. Tsai, *J. Chromatogr.A*,961: 83-88, 2002.
- (56) aiki I. Yamaura T. ,Ohnishi Y. , Hayakawa Y. , Komatsu Y. , Nunome S., HPLC analysis of Juzen-taiho-to and its variant formulations and their antimetastatic efficacies. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 1999.
- (57) Dolovich J., Hargreave, F.E. Chalmers R., Shier K.J., Gauldie J., Bienenstock J., Late cutaneous allergic responses in isolated IgE-dependent reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* ,52: 38 -46, 1973.
- (58) Gupta D, Arora R, Garg AP, Goel HC, Radiation-induced damage to mitochondria and its modification by Podophyllum hexandrum Royale in HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* ,247: 25-40, 2003.
- (59) Hsu HY, Ho YH, Lian SL, Lin CC, Preliminary study on antiradiation effect of Kuei-Pi-Tang. *Am J Chin Med* ,19:275-284, 1991.
- (60) A.A.Shahat, F.Cuyckens, W.Wang, K.A.Abdel-Shafeek,

- RapidCommun, *MassSpectrom*,19: 2172-2178, 2005.
- (61) Liu S-Y, Woo S-O and Koh H-L. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 24: 983-992, 2001.
- (62) Hong X-K, Wang Z-H, Guo J-X and Li Y. The fingerprint spectrum analysis of GC relative retention values for essential oil of 19 species of Bupleurum genus. *Acta Pharmaceutica Sinica* ,23:839-845, 1988.
- (63) Hildebert Wagner et al, Chinese Drug Monographs and Analysis, 1:13-14, 1997.
- (64)H.Wagner et al,Chinese Drug Monographs and Analysis,3:6-7, 2001.
- (65) K.J. Zhao, T.T.X. Dong, P.F. Tu, Z.H. Song, C.K. Lo, K.W.K. Tsim,*J. Agric. Food Chem.* ,51: 2576, 2003.
- (66) Z.B. Dong , S.P. Li , M. Hong ,Q.Zhu . Hypothesis of potenti alactive components in Angelica sinensis by using biomembrane extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* ,38:664-669, 2005.
- (67) L. Haneskog, C.M. Zeng, A. Lundqvist, P. Lundahl, *Biochim. Biophys. Acta* ,1371 : 1–4, 1998.
- (68) P. Lundahl, *Biochim. Biophys. Acta* ,379: 304–316, 1975.

- (69) Richardson, J.M., Balon, T.W., Treadway, J.L. and Pessin, J.E. Differential regulation of glucose transporter activity and expression in red and white skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 266:12690-12694, 1991.
- (70) Rognstad, R. Rate-limiting steps in metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* ,254: 1875-1878, 1979.
- (71) Benavente O, and Hart RG. Stroke; part II management of acute ischemic stroke. *AmFamPhysician* , 59:2228-2234, 1999.
- (72) Frijns CJM and Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* ,33: 2115-2122, 2002.
- (73) Ma S C, Deng S W. A study on the production process condition of total glycoside in Radix Paeoniae Rubra. *Chin Tradit Herb Drugs* ,29(10):664-667, 1998.
- (74)M.J.Dominic and G.F. White, Mechanism for biotransformation of nonylphenol polythoxylates to xenoestrogens, *Pseudomonas putida.J.Bacterid.* ,180 : 4332-4338, 1998.
- (75) B.R.Bochner. Sleuthing out bacterial identities. *Nature*,339: 157-158, 1989.
- (76) M.A.Keteszi. Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol.Rev* , 24:135-175, 1999.

- (77) Mandels M, Sterberg D. Recent advances in Cellulose Technology .
J. Ferment. Technol., 54: 267-272, 1976.
- (78) Cen P L, Xia L M. Production of Cellulase by Solid-state
Fermentation . *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* ,65:68 -92, 1999.
- (79) Hung-Chi Chang, Guan-Jhong Huang, Dines, Chao-Lin Ku, Chi-Rei
Wu, Hsin-Sheng Tsay. Antioxidant Activities and Polyphenol
Contents of Six Folk Medicinal Ferns Used as "Gusuibu". *Botanical
Studies*, 48(4):397-406 ,2007.
- (80) Xing-Guo Zhang, Ping Xu, Qiong Liu, Chao-Hui Yu, Yu Zhang,
Shao-Hua Chen, You-Ming Li. Effect of Tea Polyphenol on
Cytokine Gene Expression in Rats with Alcoholic Liver Disease.
Pancreatic Diseases International , 5(2) :268-272, 2006.
- (81) Guo-Zheng Qin, Shi-Ping Tian, Hai-Bo Liu, Yong Xu. Polyphenol
Oxidase, Peroxidase and Phenylalanine Ammonium Lyase Induced
in Postharvest Peach Fruits by Inoculation with *Pichia
membranefaciens* or *Rhizopus stolonifer*. *Agricultural Sciences in
China*, 1(12):1370-1375, 2002.
- (82) Ya-Tze Lin, Pei-Hua Chang, Kuo-Ching Wen, Chung-Ping Yu,
Pei-Dawn Lee Chao, Yu-Chi Hou, Su-Lan Hsiu. Presystemic
Metabolism of Anthraquinone Polyphenols in Rhubarb. *Mid-Taiwan
Journal of Medicine*, 9(2):87-95 , 2004.

- (83) He Qian, Nihorimbere Venant. Antioxidant Power of Phytochemicals from *Psidium guajava* Leaf. *Journal of Zhejiang University Science*, 5(6):676-683, 2004.
- (84) Chapalamadugu S. *Appl Environ Microbiol*, 57(3):744-750, 1991.
- (85) Palmer RA, Niwa H. X-ray crystallographic studies of protein-ligand interactions. *Biochem. Soc. Trans.*, 31(5): 973-979, 2003.
- (86) Fred BC. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta*, 1572(2-3):255-262, 2002.
- (87) Tarentino AL, Plummer TH Jr, Maley F. The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.*, 249(3): 818-824, 1974.
- (88) Jun-ichiro Nakajima, Ippei Tanaka, Shujiro Seo, Mami Yamazaki, Kazuki Saito. LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5:241-247, 2004.
- (89) Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64(5):923-933, 2003.
- (90) Morazzoni P, Bombardelli E. *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia*, 67(1):3-29, 1996.

- (91) Guan-Jhong Huang, Hsien-Jung Chen, Yuan-Shiun Chang, Ming-Jyh Sheu, Yaw-Huei Lin. Recombinant Sporamin and its Synthesized Peptides with Antioxidant Activities in vitro. *Botanical Studies*, 48(2) :133-140,2007.
- (92) Tzong-Huei Lee, Der-Zen Liu, Feng-Lin Hsu, Wen-Chung Wu, Wen-Chi Hou. Structure-activity Relationships of Five Myricetin Galloylglycosides from Leaves of *Acacia Confusa*. *Botanical Studies*, 47(1) :37-43, 2006.
- (93) Ya-Ming Wei, Ji-Hong Lin, Rong Xia, Jun-Cai Lan. Establishment of a Transplantable Human Myeloid BALB/cNude Mouse Model. *Journal of Experimental Hematology*, 13(4):596-600, 2005.
- (94) Yu-Jian Wang, Lin Hu, Zhi-Xiang Zhang, Han-Hong Xu, Mei-De Liao, Shao-Yu Liao. Oxidative Damage to *Spodoptera litura* Cell Induced by α -Terthienyl. *Agricultural Sciences in China*, 6(10):1217-1223, 2007.
- (95) Yu-Cong Yang, Xu Li, Wei Chen, Xiang Wang, Xiao-Li Cheng, Ping Zhou. Identification of Differentially Expressed Genes in Two New Human Bladder Carcinoma Cell Lines. *Academic Journal of Xian Jiaotong University*, 19(2):182-185, 2007.
- (96) Yu Zhuang, Xin Chen, Kai-Hu Shi, Ming-Xu. Monocyte Chemotactic Protein 1 Increases Homing of Mesenchymal Stem Cell to Injured Myocardium and Neovascularization Following

- Myocardial Infarction. *Journal of Nanjing Medical University*,21(5):311-316, 2007.
- (97) Shimizu Takahiro, Maeno Emi, Okada Yasunobu. Prerequisite Role of Persistent Cell Shrinkage in Apoptosis of Human Epithelial Cells. *Acta Physiologica Sinica*,59(4):512-516, 2007.
- (98)Hao Tang, Gui-Ying Cui, Li-Juan Shi, Qing-Hua Gao, Yu Cao. Attenuation of Streptomycin Ototoxicity by Tetramethylpyrazine and Its Effect on K^(superscript +) Channels in the Outer Hair Cells of Guinea Pig Cochlea. *Acta Physiologica Sinica* , 59(4):534-538, 2007.
- (99)Xiao-Quan Zhang, Xue-De Wang, Yun-Guo Zhu, Wei Zhu, Pei-Dong Jiang. Breeding for Male-Sterility Line with *G. barbadense* Nuclear Background and Cytological Observation of Its Microsporogenesis. *Agricultural Sciences in China* ,6(5):529-535, 2007.
- (100)Nan Li, Jian-An Wang. Brain Natriuretic Peptide: A Potential Indicator of Cardiomyogenesis after Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Journal of Zhejiang University Science* 7B(9):766-768, 2006.
- (101)Li Wu, Thomas D. Martin, Rosemay Vazeux, Derya Unutmaz, and Vineet N. KewalRamani. Functional Evaluation of DC-SIGN Monoclonal Antibodies Reveals DC-SIGN Interactions with ICAM-3 Do Not Promote Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission. *J Virol.* 76(12): 5905–5914, 2002.

- (102)Klaas P.J.M. van Gisbergen, Marta Sanchez-Hernandez, Teunis B.H. Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med.* 201(8): 1281–1292, 2005.
- (103)Thanyaphong Na Nakorn, David Traver, Irving L. Weissman, and Koichi Akashi. Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J Clin Invest.* 109(12): 1579–1585, 2002.
- (104)J. Rodrigo Mora, Guiying Cheng, Dominic Picarella, Michael Briskin, Natasha Buchanan, and Ulrich H. von Andrian. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med.* 201(2): 303–316, 2005.