

比較含等量植物雌激素之單一藥材和中藥方劑對停經後骨質疏鬆症之預防-中藥方劑內成分間是否有加強作用之研究

Comparison of equivalent phytoestrogens in single herb and herbal regimen on prevention of postmenopausal osteoporosis – Is there synergistic effect in components of herbal regimen ?

馬偕紀念醫院

楊 育 正

摘 要

在我們之前的研究已分析過不同之中藥材之植物雌激素含量。本計劃則針對下列三組停經後婦女進行研究。第一組給予富含植物雌激素之單一中藥（熟地），其植物雌激素之含量和第二組相等，第二組給予中藥方劑（壯骨二號），第三組給予標準之賀爾蒙補充療法。每組皆給予鈣質補充。

尿液及血中之植物雌激素濃度、生化標記（包括血清骨特異性鹼性磷酸酶及尿液中DPD）於收案時及每三個月檢測一次，骨密度及子宮內膜厚度則於收案時及追蹤一年後各測量一次；乳房攝影則於收案時測量一次。所有病人皆治療及追蹤至少一年。

我們預期獲得下列結果 1.治療前之骨密度值與其基礎植物雌激素濃度成

正相關。2.中藥之投與有助於預防骨質疏鬆症。3.中藥對於骨質密度之作用與標準賀爾蒙補充療法相當。4.中藥方劑由於配方之加強作用，比含等量植物雌激素之單一中藥更能有效預防骨質疏鬆症。

關鍵詞：植物雌激素，中藥方劑，停經後骨質疏鬆症

Mackay Memorial Hospital

Yuh-Chen Yang

Abstract

We have previously analyzed the phytoestrogen content in different herbs used in Chinese medicine. This study is designed to compare 4 groups of patients, group 1, postmenopausal women treated with phytoestrogen-containing herb; group 2, postmenopausal women treated with herbal regimen containing equivalent phytoestrogen as in group 1; group 3, postmenopausal women treated with standard HRT. Calcium supplementation will be given to all 3 groups.

The urinary and plasma phytoestrogen levels and serum biochemical markers, bone specific-alkaline phosphatase (B-ALP) and urinary deoxypyridinoline (DPD), will be monitored every three months; BMD, measured by DEXA, and endometrial thickness, detected by transvaginal ultrasound, will be determined prior to and after the treatment; mammogram will be examined prior to inclusion. All patients will be treated and followed for at least 1 year.

Specifically, several valuable results we expect to obtain: (1) a higher bone mineral density will be found in cases with higher baseline phytoestrogens levels before our herbal drugs intervention, (2) long-term herbal drugs phytoestrogens intake may prevent the development of osteoporosis in postmenopausal women, and (3) a similar effect of phytoestrogens on bone mineral density as compare to standard

estrogen replacement therapy in postmenopausal women, and (4) the herbal regimen exerts its effect through synergistic effect from components in the regimen, superior to single phytoestrogen-containing herb alone, in preventing postmenopausal osteoporosis.

Keywords : phytoestrogen , herbal regimen , postmenopausal osteoporosis

壹、前言

在我們之前的研究已分析過不同之中藥材之植物雌激素含量。本計劃則針對下列三組停經後婦女進行研究。第一組給予富含植物雌激素之單一中藥「熟地」，其植物雌激素之含量和第二組相等，第二組給予中藥方劑「壯骨二號」，第三組給予標準之賀爾蒙補充療法「HRT」。四組皆給予鈣質補充。

尿液及血中之植物雌激素濃度、生化標記（包括血清骨特異性鹼性磷酸酶及尿液中 DPD）於收案時及每三個月檢測一次，骨密度及子宮內膜厚度則於收案時及追蹤一年後各測量一次；乳房攝影則於收案時測量一次，所有病人皆治療及追蹤至少一年。

我們預期獲得下列結果：1.治療前之骨密度值與其基礎植物雌激素濃度成正相關。2.中藥之投與有助於預防骨質疏鬆症。3.中藥對於骨質密度之作用與標準賀爾蒙補充療法相當。4.中藥方劑由於配方之加強作用，比含等量植物雌激素之單一中藥更能有效預防骨質疏鬆症。

貳、材料與方法

一、病患選擇

本研究已得到馬偕紀念醫院人體試驗委員會的認可。計劃從馬偕紀念醫院婦產科看診的停經婦女中篩選本研究所要的受試者。

- 1.年齡介於 45-60 歲之婦女，至少已自然停經 1 年，且一個月內未曾以荷爾蒙替代療法治療。
- 2.血清中的 estradiol (E₂) 的含量低於 25 pg/毫升，FSH>50 mIU/ml。

3.病患的骨質礦物密度基準線 (BMD) 若低於 T-score -2.5 者則不適為本研究受試體，因為其應該接受骨質疏鬆症標準治療。

4.患有顯著疾病或內分泌異常可能影響骨代謝者應予排除。

受試者須接受問卷調查同意本研究以雌激素或中藥接受治療。第 1 年時，我們預計篩選 150 位病患參與本研究，經由詢問填寫問卷獲取病患的家族史。

二、研究設計

參與本研究的病患共分成 3 組，每組平均由 50 位停經後婦女所組成。

第 1 組是以內含與第 2 組等量之植物雌激素的單一藥材 (熟地) 治療；

第 2 組是以含植物雌激素之固有中藥方劑 (壯骨二號) 治療停經後婦女；

第 3 組是用標準 HRT (premarin 0.625 mg + provera 2.5 mg daily) 治療停經後婦女。

每組中所有的病患每日均另外服用碳酸鈣補充 1000 毫克的鈣質，尿液及血中之植物雌激素濃度、生化標記 (包括血清骨特異性鹼性磷酸酶 ALP-B 及尿液中 deoxypyridinoline ; DPD) 每三個月檢測一次，骨密度則於收案時及追蹤一年後各測量一次。收案時及追蹤一年後皆以經陰道超音波 (TVS) 測量其子宮內膜厚度偵測是否有內膜增生。完成 1 年的追蹤後，將統計分析每組的差異。

檢測項目及時間如下表：

項目\時間(月)	0	3	6	12
PE	X	X	X	X
B-ALP	X	X	X	X
DPD	X	X	X	X
BMD/TVS	X			X
Mammogram	X			
E ₂ /FSH	X			X

三、服用中藥

所有的中藥材均購自符合 GMP 規範之中藥製造廠，中藥方劑的配方如下所列。中藥方劑中所含的植物雌激素將先行測定。第 2 組病患所服用的中藥方劑為「壯骨二號」，其處方如下表。第 2 組病患所服用的中藥方劑應遵循台北市立中醫院院長張恒鴻醫師的處方簽及說明用藥。第 1 組病患亦應遵循第 2 組相

同的說明服用醫師所開的單味藥材(含有等劑量的植物雌激素),每組均持續追蹤至少 1 年。

本研究所用的中藥方劑名稱暫訂為‘壯骨二號’,係根據以下比例調配,每日服二次,每次 5 公克。單味藥材則取植物雌激素 (genistein 及 daidzein 其可能具有預防骨質流失的生物功能;參閱參考資料 18-20)) 含量約為壯骨二號兩倍之熟地,每日服二次,每次 2.5 公克。

壯骨二號											
左歸丸											
熟地	淮山	山茱萸	枸杞	牛膝	菟絲子	鹿角膠	龜板膠	當歸	補骨脂	五味子	杜仲
五錢	五錢	三錢	三錢	四錢	五錢	三錢	三錢	三錢	三錢	三錢	三錢

四、骨質礦物密度的測定

實驗受試體於收案時及治療一年後,利用雙重能量 x-放射線吸收儀 (DEXA, Norland XR-26 Bone Densitometer) 測定腰椎 BMD。

五、子宮內膜厚度

於收案時及追蹤一年後皆以經陰道超音波測量其子宮內膜厚度偵測是否有內膜增生。

六、偵測生化標誌

根據 Garnero 等人 (26) 所述,可利用數種生化標誌測定骨質轉換率。然而,在所有測試的骨質形成標誌中,骨質專一性鹼性磷酸酶 (B-ALP) 最能反映出骨質轉換率的增加,而尿液 deoxypyridinoline (DPD) 則最能反映出骨質的流失。本研究選擇此兩種生化標誌監測實驗受試體的骨質轉換率。病患於進行基準線測定訪視時,即抽取血液樣品及尿液樣品,而後開始治療當中,每 3 個月抽取樣品,所有的血液及尿液樣品均置於-20 °C 下保存,直到分析。

- 1.骨質形成：利用直接免疫分析法測定血清中骨質專一性-鹼性磷酸酶 (B-ALP),以監測骨質形成率。利用兩種對抗人體骨質同功酵素及純化自人體 SAOS-2 骨癌細胞之 B-ALP 的單株抗體為標準 (Biometra

System)，用人體-專一性 ELISA 測定血清 B-ALP。此分析方法只有與循環性肝同功酵素 16% 的交叉反應，此分析方法的靈敏度為 0.2ng/毫升，而分析內及分析間的變異數 (CV) 則分別為 7% 及 9%。

2. 骨質流失：利用對抗 N-telopeptide 至分離自人體尿液中之第 I 類膠原螺旋分子間交錯連接區域之單株抗體 (31)，以 ELISA 套組 (Biometra System) 測定尿液中的 DPD。因為每單位人體骨質膠原完全分解後所產生的免疫活性 DPD 具有高度的重複性，故此分析可自膠原分解後所產生的含量計算出。分析方法內及分析方法間的變異數 (CV) 均低於 8%，而靈敏度為 25 nmol/升 (31)。

七、偵測及鑑定植物雌激素-genistein 及 daidzein

基準線訪視時收集血液樣品及晨起之尿液樣品，而後於開始治療追蹤中，每 3 個月收集尿液樣品及血液樣品。所有的樣品均保存於 -20℃，直到分析。植物雌激素的分析將於中心實驗室進行。簡而言之，尿液樣品及血漿樣品調配成 1 毫升 2M HCl 及 75% EtOH 的混合液中，80℃ 下強力的震盪 3 小時以萃取出植物雌激素，然後經 12000g 離心速度離心 20 分鐘，再以 0.45 毫米之濾膜過濾上清液，取 20 微升之過濾液直接注入 HPLC 系統中。利用與 NovaPakk C18 (150x3.9 毫米內徑；4 微米) 反相管柱 (Waters, Milford, MA USA) 偶合之 Adsorbosphere C18 (10x4.6 毫米內徑；5 微米) 直接連接防衛管柱進行 HPLC 分析，以下述的溶劑系統進行沖提，流速為 0.8 毫升/分鐘：A=乙氫，B=乙酸/水 (10/90；體積比)；23% A (溶於 B) (體積比)，續以 70% A 沖提 8 分鐘，其後以 23% A 維持 12 分鐘，平衡系統以為其後的注射。設定於 260 毫微米之 UV 偵測儀連續監測分析物。

八、統計分析

收案取樣係以統計樣本數估計法估算每組約需 35 人。以臨床研究經驗所知 drop out rate 約為 20~ 40%，則研究開始每組約需收集 50 例。收案分組採 Superiority/non-inferiority controlled, double blinded trial。即使用已有之 HRT 案例，任意擇一例，再就待試驗案例群擇一條件 (如年齡、停經月數、T-score)

與之 match 者，將這一選擇例隨機置入 A 或 B 組 (blinded for 第一組給予單一中藥或第二組給予中藥方劑)。如此收案方式，既有 randomization 效果，亦可針對試驗兩組 (第一組給予單一中藥或第二組給予中藥方劑) 做到使實驗者和受者試者 double blind。統計分析係利用單方史都華檢定法 (unpaired Student's t-test) 進行每組間的比較，亦利用 T-分數 (得自正常年輕婦女的標準偏差數，SD) 比較每組間的 BMD。利用研究期間所收集受試體樣品之 CV 值 (within-subject CV)，評估骨質轉換率標誌的長期變異。利用變異分析 (analysis of variance) 評估中藥或雌激素治療期間骨質轉換率生化標誌的改變。為使 DPD 及 B-ALP 測定質穩定及精確，將預先作一包括 intra-及 interassay 的骨質轉換率生化標誌測定的 pilot study，得其 CV 值再從事實際檢驗。利用史皮爾排列相關分析 (Spearman rank correlation analysis) 方法，評估某選定時間點之腰椎 BMD 及標誌改變的百分比間之相關係數。本計劃之研究設計及數據統計分析，將由國家衛生研究院生物統計研究組劉仁沛博士協助設計及分析。

參、結果

一、中藥材料準備及成分分析

1. 中藥材植物雌激素 GENISTEIN 與 DAIDZEIN 成分分析：

- (1) 因各種藥材的植物雌激素含量會隨產地、季節、加工方法等而有所差異，故本案乃統一採購同一批號之藥材，於給藥前先行分析植物雌激素 (異黃酮素之 daidzein 及 genistein) 含量，並將以此分析所得的數據為基準，調整方劑成分，再給予患者此同一批號之藥材。
- (2) 本案先前所採用之分析方法係根據 Flanke 等人所發表分析食物中異黃酮素之方法，惟當以該方法分析所將採用之藥材時，發現該法並不適用於分析中藥材，是以對分析方法做了部分修正。

Flanke 之方法，簡單而言係分成二步驟

- A. 萃取與酸解：係利用酒精萃取所有異黃酮素 (包括自由型及醣基鍵結型)，同時以高濃度鹽酸 (2M) 水解醣基鍵，以使成自由型之

異黃酮素，最後以 HPLC 分析 daidzein 及 genistein 總含量。

B.HPLC 分析：如計畫內容頁六所述以 23 % 乙氫 (acetonitrile) 為起始濃度、梯度沖堤 8 分鐘。

(3)今舉一例 (編號 10 號藥材) 詳述該方法所產生之問題，並與修正後之方法比較之：

原方法萃取與酸解同時進行，雖較節省時間但卻同時酸解其他結構上的醣類，造成所要分析之萃取液含有大量之醣類及胜肽類分子，如圖一 a 所示之 HPLC 沖堤圖。大量之單醣體出現在 2 min 左右而多醣類及胜肽類，則在不同時間沖堤出，形成非特定之基底而非特定之波峰；此非特定基底所造成的加成效果，大大增加了各波峰的面積，是以提高了待測之含量。又以梯度沖堤 8 分鐘所得各波峰之間的解析度並非不甚佳 (比較圖一 a 及二 a)。

本案對該分析方法做了數點改變：

(1)起始沖堤濃度乙氫 (acetonitrile) 改為 15%，以將單醣類提早沖堤出。

(2)延長沖堤時間為 12 分鐘。

(3)將萃取與酸解分開進行，即先以酒精萃取，收集萃取液，加入酸進行酸解。這些步驟可解決了前述之問題 (比較圖一 a 及二 a) ；

A.非特定基底及大量之單醣類減少許多，

B.波峰解析度增加，特定之波峰清楚地分析出來。

如舊法 4、5 分鐘得到大量之 daidzein (參考圖一 b 之標準品圖分析) 及 6.2 分鐘之 genistein。而以改良方法將波峰分離更清楚，並無 daidzein 之波峰出現 (比較圖二 b 標準品、二 a 分析樣品)、且 genistein 應為 (新法圖二 a) 7.95 分鐘之波峰，非原方法 6.0 分鐘之波峰 (比較兩分析結果之波峰譜)。

基於以上分析之結果本案乃採用自行建立之分析方法，分析婦科常用中藥材之異黃酮素 daidzein 及 genistein 含量，所得結果如表一，並據此重新訂定即將使用之同一批號藥材及壯骨二號方劑成份 (表二)。

2.中藥材備製：

本研究所用的中藥方劑名稱暫訂為「壯骨二號」，係順天堂製藥廠代為製成粉劑（配方如材料與方法所述），每日服二次，每次 5 公克。單味藥材則取植物雌激素（genistein 及 daidzein 其可能具有預防骨質流失的生物功能；參閱參考資料（18-20））含量約為壯骨二號兩倍之熟地，每日服二次，每次 2.5 公克。

3. 中藥材料成分分析部分結果已撰寫論文一篇：

Identification and quantification of isoflavones in *Psoralea corylifolia* by high-performance liquid chromatography

投交 Journal of Chromatography A 發表

二、臨床案例收集

1. 本案自 8 月開始收案，10 月中開始給藥，其間數項遭遇困難如：

(1) 許多患者堅持使用中藥，並認為若依 RCT double blind 法取藥，會有 1/4 的機會吃到 placebo，因此如加入 placebo 組，幾無法收錄到任何案例；同意加入者，多僅接受賀爾蒙補充療法或使用中藥，仍堅拒 placebo。

(2) 此研究採 Randomization 極為困難。

(3) 患者囤積中藥，採觀望態度。

2. 經與統計專家研商，修正收案方法，採 superiority/non-inferiority 法；其優點在於：

(1) 可使用已收案並經初步檢查之 HRT group

(2) 保持兩組中藥組之 blinded randomization

已登記欲加入之病患共 62 名，其 E2/FSH 及生化檢驗皆合於收案標準，但 BMD 及 TVS 檢測結果僅 46 例合收案標準（如表三及表四）

收案方法簡述下：

(1) 建立收案案例 profile（如表五）

(2) 已該法將已收錄之 HRT 組病患列出，待新案例進入時，依其 profile 選擇一與其 match 之 HRT 案例並列，並隨機置入 group 1 單位藥材組或 group 2 方劑組（如表五）。如此兩組中藥組可做到 double blinded

效果，亦可施行 randomization。至 11 月底止以此方法將合收案標準
案例 45 例，排入三實驗組分別給藥（如表六）。
初步骨代謝生化標記檢測結果（如表七、表八）。
已收案之基本資料詳列於表十。

肆、討論

本案原計劃為 phase 2 and 3 clinical trial 採 double blinded RCT，然病患拒絕
接受 placebo，因此無法做到 Randomization。經修正收案方式採 Superiority
/Non-inferiority 法，保持兩組中藥組之 blinded 與 Randomization，收案數雖略有
落後，然執行上大致順利。由 BMD 檢測結果，我們發現一般自然停經後婦女，
有將近 26% 實際上患有骨質疏鬆症，需排除於本研究案，因此影響本案可用之
案例數。因此計劃執行時間需略為延長。

伍、參考文獻

1. NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake. JAMA 272: 1942-1948, 1994.
2. Prince, R. L., Smith, M., Dick, I. M., Price, R. I., Webb, P. G., Henderson, N. K., and Harris, M. M. Prevention of postmenopausal osteoporosis: A comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone-replacement therapy. N. Engl. J. Med. 1991; 325: 1189.
3. Heinonen, A., Kannus, P., Sievanen, H., Oja, P., Pasanen, M., Rinne, M., Uusi-Rasi, K., and Vuori, I. Randomized controlled trial of effect of high-impact exercise on selected risk factors for osteoporotic fractures, Lancet 1996; 348: 1343-1347.
4. Ettinger, B. Prevention of osteoporosis: treatment of estradiol deficiency. Obstet. Gynecol. 1988; 72:12-17S.
5. Aurbach, G. D., Marx, S. J., Spiegel, A. M. Metabolic bone disease. In Williams

- Textbook of Endocrinology, ed. J. D. Wilson, D. W. Foster. 1992; 28:1477-1517. Philadelphia; Sanders. 8th ed.
6. Sarma, U., Edwards, M., Motoyoshi, K., and Flanagan, A. M. Inhibition of bone resorption by 17 beta-estradiol in human bone marrow cultures. *J. Cell Physiol.* 1998; 175:99-108.
 7. Kiel, D. P., Felson, D. T., Anderson J. J., Wilson, P. W. F., and Moskowitz, M. A. Hip fracture and the use of estrogen in postmenopausal women: The Framingham Study. 1987; *N. Engl. J. Med.* 317: 1169.
 8. Genazzani A. R., Benedek-Jaszmann, L. J., Hart, D. M., Andolsek, L., Kicovic, P. M., and Tax, L. Org OD 14 and the endometrium, *Maturitas* 1991; 13: 243-251.
 9. Rymer, J., Chapman, M. G., and Fogelman, I. Effect of tibolone on postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int.* 1994; 4: 314-319.
 10. Grey, A. B., Stapleton J. P., Evans, M. C., Tatnell, M. A., Ames, R. W., and Reid, I. R. The effect of the antioestrogen tamoxifen on bone mineral density in normal late postmenopausal women. *Am. J. Med.* 1995; 99: 636-641.
 11. Owens, J. M., Fuller, K. and Chamber, T. J. Osteoclast activation: potent inhibition by the bisphosphonate alendronate through a nonresorptive mechanism. *J. Cell. Physiol.* 1997; 172: 79-86.
 12. Tsutsumi, N. Effect of coumestrol on bone metabolism in organ culture. *Biol Pharm. Bull.* 1995; 18:1012-1015.
 13. Anderson, J. J., Ambrose, W. W., Garner, S. C. Orally dosed genistein from soy and prevention of cancellous bone loss in two ovariectomized rat models. *J. Nutr.* 1995; 125: 799S.
 14. Kalu, d. N., Masoro, E. J., Yu, G. P., Hardin, R. R., and Hollic, B. W. Modulation of age-related hyperparathyroidism and senile bone loss in Fischer rats by soy protein and food restriction. *Endocrinology* 1988; 122: 1847-1854.
 1. Arjmandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P., and Kukreja, S. C. Dietary soybean protein prevents bone loss in an

- ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Nutr.* 1996; 126:161-167.
15. Agnusdei, D., Zacchei, F., Bigazzi, S., Cepollaro, C., Nardi, P., Montagnani, M., and Gennari C. Metabolic and clinical effects of ipriflavone in established post-menopausal osteoporosis. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1989; 15:97-104.
 16. Yamazaki, I., and Kinoshita, M. Calcitonin secreting property of ipriflavone in the presence of estrogen. *Life Sci.* 1986; 38:1535-1541.
 17. Benvenuti, S., Tanini, A., Frediani, U., Bianchi, S., Masi, L., Casano, R., Bufalino, L., Serio, M., and Brandi, M. L. Effects of ipriflavone and its metabolites on a clonal osteoblastic cell line. *J. Bone Miner. Res.* 1991; 6:987-996.
 18. Gambacciani, M., Spinetti, A., Piaggese, L., Cappagli, B., Taponeco, F., Manetti, P., Weiss, C., Teti, G. C., La Commare, P., and Facchini, V. Ipriflavone prevents the bone mass reduction in premenopausal women treated with gonadotropin hormone-releasing hormone agonists. *Bone Miner.* 1994; 26:19-26.
 19. Valente, M., Bufalino, L., Castiglione, G. N., D'Angelo, R., Mancuso, A., Galoppi, P., and Zichella, L. Effects of 1-year treatment with ipriflavone on bone in postmenopausal women with low bone mass. *Calcif. Tissue Int.* 1994; 54:377-380.
 20. Consensus development conference on osteoporosis. Hong Kong. 1993. *Am. J. Med.* 1993; 95: 1S-78S.
 21. Kanis, J. A., Melton, L. J. 3rd., Christiansen, C., Johnston, C. C., and Khaltaev, N. the diagnosis of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 1994; 9: 1137-1141.
 22. Cummings, S. R., and Black, D. Bone mass measurements and risk of fracture in caucasian women: a review of findings from prospective studies. *Am. J. Med.* 1995; 98: 24S-28S.
 23. Hansen, M. A., Overgaard, K., Riis, B. J., Christiansen, C. Role of peak bone mass and bone loss in postmenopausal osteoporosis: 12 year study. *Bri. Med. J.* 1991; 303:961-964.
 2. Riis, H. J. The role of bone loss. *Am. J. Med.* 1995; 98: 29S-32S.

24. Garnero, A., Shih, W. J., Gineyts, E., karpf, D. B., and Delmas, P. D. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronat treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 79: 1693-1700.
25. Bonde, M., Qvist, Per., Fledelius, C., Riis, E. N., and Christiansen, C. applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLap) : follow-up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995; 80: 864-868.
26. Braga, V., Dorizi, R., Brocco, G., Rossini, M., Zamberlan, N., Gatti, D., and Adami, S. Clinical utility of a wheat-germ precipitaiton assay for determination of bone alkaline phosphatase concentrations in patients with different metabolic bone diseases. *Eur. J. Clin. Chem. Clin Biochem.* 1995; 33: 433-439.
27. Hanson, D. A., Weis, M. A. E., Bollen, A. M., Maslan, S. H., Singer, F. R., and Eyre, D. R. A specific immunoassay for monitoring human bne resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J. Bone Miner. Res.* 1992; 7: 1251-1258.
28. Garnero, P., and Delmas, P. D. Assessment of the serum levels of bone aklaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients wit metabolic bone disease. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77: 1046-1053.
29. Hanson D. A., Weis, M. A. E., Bollen, A. M., Maslan, S. H., Singer, F. R., and Eyre, D. R. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type 1 collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J. Bone Miner. Res.* 1992; 7: 1251-1258.

陸、圖，表

表一：婦科常用中藥材之異黃酮素 daidzein 及 genistein 含量

藥品 編號	中藥材	Daidzein 微克/克 乾重			Genistein 微克/克 乾重		
		平均值	標準差	CV%	平均值	標準差	CV%
4	熟地	275.12	9.66	4.34	381.58	1.31	0.20
5	桑螵蛸	120.30	0.91	0.93	43.92	7.69	21.66
6	苁蓉	183.63	5.94	4.00	211.72	0.92	0.54
7	巴戟天	343.7	1.00	0.53	208.90	1.15	0.68
8	淮山	26.65	0.89	4.50	59.95	0.85	2.08
9	山茱萸	0	0	0	249.53	2.85	1.66
10	淫羊藿	211.31	2.37	1.38	140.78	1.05	0.92
11	仙茅	72.03	0.39	0.66	312.98	5.98	2.36
12	菟絲子	60.41	2.18	4.45	229.71	2.46	1.56
13	破故紙	619.87	14.55	2.9	728.91	14.55	2.90
14	當歸	108.09	1.07	1.23	245.97	5.60	3.31
15	川芎	102.23	2.34	2.83	190.62	5.17	3.35
16	白芍	127.60	2.36	2.55	92.18	2.15	2.88
17	覆盆子	242.67	9.00	4.58	158.45	3.95	3.08
18	五味子	106.51	2.10	2.44	194.24	1.18	0.88
19	益智仁	99.07	3.09	3.86	103.18	3.30	3.95
20	粉光蓼	118.35	4.06	4.24	118.50	2.70	2.82
21	枸杞	214.03	4.42	2.55	325.99	10.30	4.59
22	切蓼	131.77	4.06	3.81	105.20	4.63	5.44
23	牛膝	52.25	1.42	3.35	105.94	0.76	1.05
24	女貞子	437.03	9.81	2.77	211.79	2.84	1.66
25	大棗	0	0	0	230.58	4.57	2.45
26	車前子	52.52	1.49	3.5	78.16	1.44	2.27
27	瑣陽	125.5	4.95	4.88	160.65	3.72	2.86
30	黃豆	854.94	30.24	4.37	722.61	6.53	1.12
31	杜仲	148.55	2.00	1.66	208.07	3.17	2.21
35	骨碎補	167.71	4.18	3.08	87.5	2.46	3.47

表二、壯骨二號及其各單味中藥材中的植物雌激素成分

Herbs	含量 ug/g	
	Daidzein	Genistein
熟地	275.12	381.58
淮山	26.65	59.95
山茱萸	0	249.53
菟絲子	60.41	229.71
鹿角膠	n/d	n/d
龜板膠	n/d	n/d
補骨脂	619.87	728.91
當歸	108.09	245.97
五味子	106.51	194.24
枸杞	214.03	325.99
牛膝	52.25	105.94
杜仲	148.55	208.07
壯骨二號	116.54	189.86

表三、申請參與臨床療效評估者骨質密度檢測結果

N	T* > -1	-1 ≤ T < -2.5	T ≤ - 2.5
62	25	21	16
100%	40.32%	33.87%	25.80%

*骨質密度 (BMD) 以 T-scores 表示

表四、申請參與臨床療效評估者子宮內膜厚度檢測結果

N	< 0.5 cm*	0.5 ~ 0.8 cm	0.8 cm
62	32	28	2
100%	51.6%	45.2%	3.2%

* 子宮內膜厚度以超音波檢測其厚度 (TVS)

表伍、申請參與臨床療效評估病患分類

Years of Menopause	BMD	T > - 1 (B)	-1 ≤ T < - 2.5 (b)
< 3 (A)		AB	Ab
≥ 3 (a)		AB	ab

表六、以 non-inferiority 法取樣及分組

Double blinded & randomization		Group 3
Group I 單味 (A1)	Group 2 方劑 (A2)	
Case No.	Case No.	Case Profile / No.
7	6	Ab/1
11	8	AB/2
17	14	Ab/3
20	9	AB/4
21	15	AB/5
23	16	AB/10
24	27	AB/12
31	19	Ab/13
33	22	AB/18
36	34	Ab/26
39	28	Ab/29
40	32	AB/30
42		AB/38
	37	AB/48
46	35	Ab/57
	41	Ab/65
14	15	16

表七、以 non-inferiority 法取樣及分組之病患類別

Charateristics of Patient	Double blinded & randomization		Group 3
	Group I*	Group 2	
	單味 (A1)	方劑 (A2)	HRT
AB	5	5	6
Ab	2	3	3
aB	4	3	4
ab	3	4	3
Total	14	15	16

表八、收錄病患骨代謝之生物標記值 – 鹼性磷酸酶 (ALP-B)

N	< 16 U/L	16 ~ 37 U/L	37 U/L
28	6	21	1
100%	21.43%	75.00%	3.57%

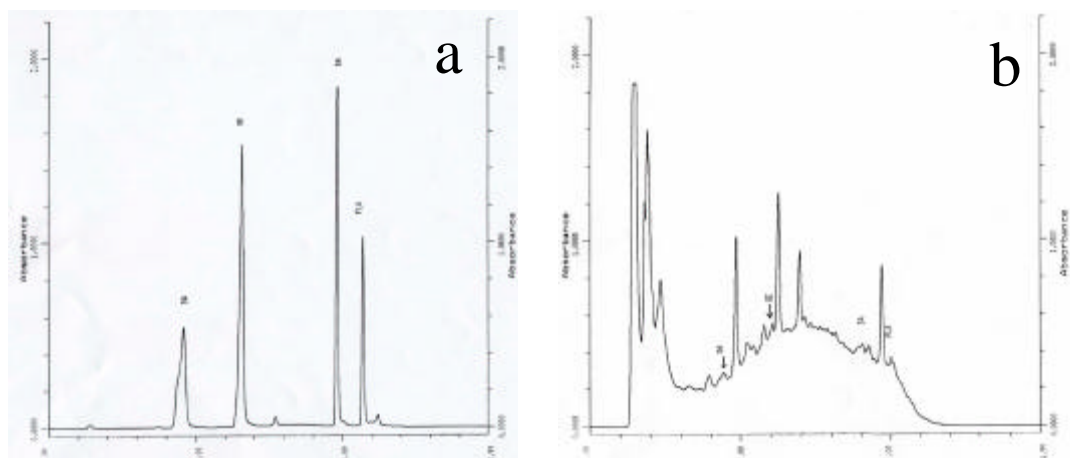
表九、收錄病患骨代謝之生物標記值 – DPD

N	< 3*	3 ~ 7.4	7.4
28	0	22	6
100%	0%	78.57%	21.43%

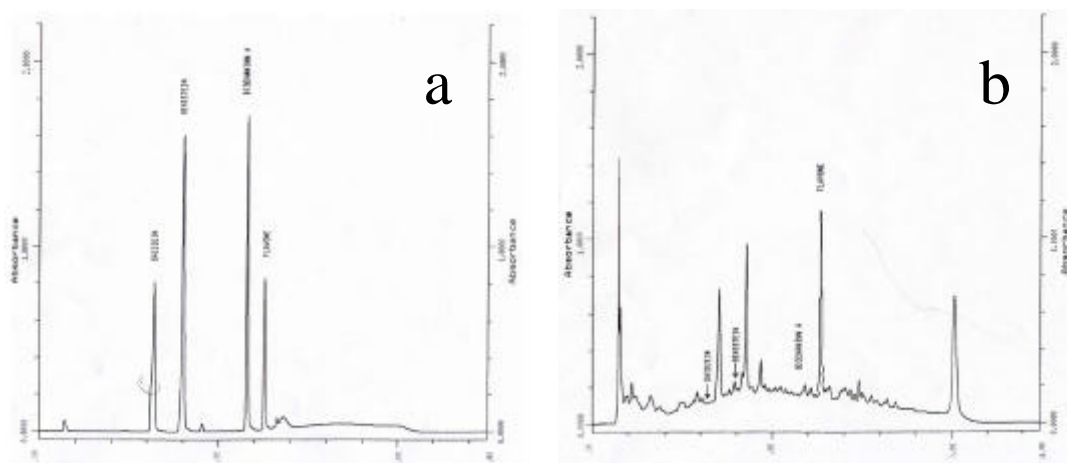
* data presented as mmole/L DPD / mmole/L creatinin

表十、收案並患基本資料

序號	分類	給藥	BMD	T-score	TVS	Thickness	E2	FSH
1	ab	HRT	osteoporosis	-2	(-)	0.97	<20	75.56
2	AB	HRT	(-)	0.82	(-)	0.5	<20	77.87
3	Ab	HRT	osteopenia	-2.17	Myoma	0.35	<20	68.23
4	aB	HRT	(-)	-0.85	(-)	0.28	<20	93.55
5	AB	HRT	(-)	-0.94	(-)	0.24	<20	75.35
6	AB	A2	(-)	-0.62	Myoma	0.6	<20	67.65
7	AB	A1	(-)	-0.96	Myoma	0.3	<20	74.13
8	ab	A2	osteopenia	-1.51	(-)	0.19	<20	73.66
9	AB	A2	(-)	-0.88	Myoma	0.5	<20	87.68
10	AB	HRT	(-)	0.66	(-)	0.53	<20	133.45
11	AB	A1	(-)	-0.48	(-)	0.36	<20	129.65
12	AB	HRT	(-)	0.08	(-)	0.29	<20	54.1
13	ab	HRT	osteoporosis	-1.79	(-)	0.18	<20	75.31
14	Ab	A2	osteopenia	-1.32	(-)	0.46	<20	96.63
15	AB	A2	(-)	-0.95	Myoma	0.5	<20	95.88
16	Ab	A2	osteopenia	-1.1	(-)	0.48	<20	59.06
17	Ab	A1	osteopenia	-1.92	(-)	0.12	<20	96.68
18	aB	HRT	(-)	0.36	Myoma	0.28	<20	85.23
19	Ab	A2	osteopenia	-1.96	Myoma	0.6	<20	111.9
20	aB	A1	(-)	0.55	Myoma	0.47	<20	58.85
21	ab	A1	osteopenia	-2.38	Myoma	0.5	<20	140.9
22	aB	A2	(-)	0.56	Myoma	0.4	<20	55
23	ab	A1	osteopenia	-1.16	Myoma	0.29	<20	77.86
24	AB	A1	(-)	0.03	(-)	0.3	<20	55.35
26	Ab	HRT	osteopenia	-1.65	(-)	0.2	<20	66.93
27	AB	A2	(-)	0.66	(-)	0.36	<20	62.27
28	aB	A2	(-)	-0.3	(-)	0.37	<20	71.08
29	ab	HRT	osteopenia	-1.96	(-)	0.4	<20	95.59
30	AB	HRT	(-)	-0.71	Myoma	0.27	<20	79.93
31	AB	A1	(-)	0.93	Myoma	0.4	<20	65.92
32	ab	A2	osteopenia	-1.75	(-)	0.3	<20	173.4
33	Ab	A1	osteopenia	-2.01	Myoma	0.46	<20	72.22
34	AB	A2	(-)	-0.02	exal mass	0.52	<20	38.94
35	ab	A2	(-)	-1.3	(-)	0.2	<20	11.87
36	aB	A1	(-)	-0.75	ometrium	0.26	<20	35.21
37	aB	A2	(-)	-0.6	(-)	0.2	<20	97.82
38	AB	HRT	(-)	2.63	(-)	0.23	<20	45.04
39	ab	A1	osteopenia	-1.94	(-)	0.3	<20	87.4
40	Ab	A1	osteopenia	-1.34	an follicle	0.53	<20	49.89
41	ab	A2	osteopenia	-1.07	Myoma	0.41	<20	86.48
42	Ab	A1	osteopenia	-1.88	ometrium	0.3	<20	88.32
46	AB	A1	(-)	2.91	exal mass	0.25	<20	80.81
48	aB	HRT	(-)	-0.88	(-)	0.5	<20	46.67
57	Ab	HRT	osteopenia	-1.2	(-)	0.5	<20	59.94
65	Ab	HRT	(-)	-1.54	(-)	0.9	<20	29.68



圖一、Representative HPLC chromatograms of (a) the isoflavone standard and (b) acid hydrolysis treated herb sample extract; separated by gradient described by Flanke et al.



圖二、Representative HPLC chromatograms of (a) the isoflavone standard and (b) acid hydrolysis treated herb sample extract; separated by gradient as described in the result section.