

當歸有效成分阿魏酸 (Ferulic acid) 在家兔 之藥物動力學及生體可用率研究

中國醫藥學院 中國藥學研究所 藥局學組

陳照賢

第一章 緒言

藥物動力學 (Pharmacokinetics) 是現代藥劑學的發展重點之一，它主要在探討藥物於生物體內的吸收、分佈、代謝與排泄的經時變化。對中藥成分進行藥物動力學研究，不但提供了未來在製劑上的依據，更讓我們可以客觀地了解藥物在生物體內濃度與時間的關係，為藥學實際工作及研究工作者提供參考資料。因為它的研究成果可以提供藥物的血中濃度、體內半衰期、分佈狀況以及生體可用率等資料，對於製劑的優選處方，品質，臨床的劑量設計與給藥控制，都有直接的參考價值。近數十年來，由於微量化學分析方法的進步，更促進了藥物動力學的研究蓬勃發展。經由近年來實驗證明，對於有效成分明確的中藥，只要有適當的定量方法，一樣可以進行生物體內的藥物動力學相關研究。

當歸為繖形科植物 *Angelica sinensis* DIELS 的乾燥根，秋季採收，分佈於甘肅東南部，以岷縣產量最多。性味：甘,辛,溫。歸經：肝,心,脾經。功能與主治：補血活血，調經止痛，潤腸通便。用於血虛萎黃，

眩暈心悸，月經不調，痛經，風濕痺痛，跌打損傷等。當歸中阿魏酸的含量因產地、品種不同而異；雲南、四川、湖北三地當歸中阿魏酸含量較高。當歸頭、身、尾的揮發油及阿魏酸含量不同，當歸尾最高，歸身次之，當歸頭最低⁽³⁹⁾。

傳統中藥的成分進行藥物動力學研究，是實現中藥現代化的重要環節；由於藥物分析方法的進步，更加速這一方面研究之進展。本研究中對於阿魏酸在家兔體內之藥物動力學與生體可用率也進行評估，對阿魏酸加以研究。阿魏酸是中藥當歸與川芎⁽¹⁾有效成分之一，過去的研究發現，阿魏酸具有的藥理活性包括抗氧化⁽²⁻⁴⁾、抗發炎⁽⁵⁻⁶⁾、抑制血小板凝集⁽⁷⁻⁸⁾、增強巨噬細胞吞噬⁽⁹⁻¹⁰⁾等藥理活性。由於阿魏酸在體液中之分析方法在藥物動力學之研究上很重要，首先尋找一種靈敏度高、準確性好且具專一性之 ferulic acid 血漿檢品分析方法，再進行 ferulic acid 在家兔體內之藥動學及生體可用率研究。希望經由這些研究，了解 ferulic acid 在家兔體內之藥物動力學特性，讓此有效成分能有機會走出實驗室，供相關臨床應用及藥理學研究之參考。

第二章 總論

第一節 阿魏酸的來源植物

阿魏酸存在於繖形科(Umbelliferae)植物當歸 *Angelica sinensis* DIELS.的根⁽¹⁾；川芎 *Ligusticum wallichii* FRANCH.的根莖⁽¹¹⁾；阿魏 *Ferula pallida* KOROV.的樹脂⁽¹²⁾，遼蒿本 *Ligusticum jeholense* NAKAI et KITAGAWA 及中國蒿本 *Ligusticum sinense* OLIV的根及根莖⁽¹³⁾；唇形科 (Labiatae) 植物紫蘇子 *Labitae Perillae frutescens* BRITTON 的種子⁽¹⁴⁾；木賊科 (Equisetaceae) 植物木賊 *Equisetum hiemale* L.的全草；石松科 (Lycopodiaceae) 植物卷柏狀石松 *Lycopodium selago* L. 的全草；毛茛科 (Ranunculaceae) 植物升麻 *Cimicifuga foetida* L.的根莖；紫茉莉科 (Nyctaginaceae) 植物光葉子花 *Bougainvillea glabra* CHOISY的根；十字花科 (Cruciferae) 植物萊菔 *Raphanus sativus* L.的根；紫葳科 (Bignoniaceae) 植物梓樹 *Catalpa ovata* G.DON 的樹皮；菊科植物 (Compositae) 白花春黃菊 *Anthemis nobilis* L.的花；百合科植物 (Liliaceae) 洋蔥 *Allium cepa* L.的根、球莖、葉；禾本科植物(Graminae) 稻 *Oryza sativa* L.的種皮⁽¹⁵⁾。

第二節 阿魏酸的藥理作用

有關阿魏酸之臨床應用藥理研究報告，如下：

1. 抗氧化作用：

1998 年 Robert 等人的研究指出⁽²⁾利用老鼠肝的微粒體蛋白質來進行 cytochrome p-450 的活性試驗，得知阿魏酸具選擇性抑制 cytochrome p-450 之活性。1995 年 Mirella Nardini 等人的研究指出⁽³⁾，阿魏酸能抑制低密度脂蛋白的氧化。2000 年 Antonella Saija 等人的⁽⁴⁾研究指出，經由體內與體外的實驗證明，阿魏酸能夠保護 UV 輻射線對皮膚所造成的傷害，將輻射所造成的破壞程度減低。據 1999 年喻紅⁽¹⁶⁾等人報導，利用硫代巴比妥酸比色法測定脂質過氧化物 (LPO) 濃度，結果阿魏酸能明顯降低 LPO 的升高，並呈現劑量依賴性減少，其作用機制與抗脂質過氧化有關。又據汪暉等人報導⁽¹⁷⁻¹⁸⁾，用不同劑量乙醇對小鼠抗氧化和解毒功能的影響，結果表明大劑量乙醇 (11.4 g/kg, i.g.) 引起肝臟 GSH-Px 活性升高，肝臟 SOD 和 GST 活性降低，GSH 耗盡，而血清中 GST 升高；阿魏酸鈉 (100 mg/kg, i.g.) 預處理後，明顯拮抗大劑量乙醇所致的上述改變，表明阿魏酸鈉對急性乙醇所引起肝損害具有良好的保護作用。

2. 阿魏酸對血液的作用：

1980 年尹鐘洙等⁽⁷⁾報導當歸及其成分 ferulic acid 都具有抑制血小板凝集的作用，阿魏酸濃度在 0.4-0.6 mg/ml 時抑制 ADP 和膠原誘導的大鼠血小板凝集。1990 年祝彼得等報導⁽¹⁹⁾指出 ferulic acid 具有抑制肝臟合成膽固醇及抑制血清膽固醇升高的作用。1988 年徐理納等⁽²⁰⁾則

更進一步報導了 ferulic acid 對 arachidonic acid (A.A.) 代謝的影響，指出血小板凝集和釋放反應與血小板通過 A.A. 代謝產生前列腺素的內過氧化物 PGG₂、PGH₂ 和 TXA₂ 有關。PGH₂ 不僅合成 TXA₂，也部分轉化成丙二醛 (MDA)。MDA 的生成量可以反應 TXA₂ 的生成。比色法和螢光法測定血小板凝集時 MDA 含量，結果表明阿魏酸鈉抑制血小板凝集和釋放反應作用可能與抑制血小板前列腺素代謝，即與抑制 TXA₂ 生成有關。1984 年徐理納報導⁽⁸⁾當歸及阿魏酸鈉有明顯的抗血栓形成作用。又據 1991 年胡慧娟等人報導⁽⁹⁾大鼠實驗顯示，當歸水煎劑可使血栓重量顯著減少，血栓增長速度較對照組下降。因此認為當歸的抗血栓作用可能與抑制血小板凝集和降低血液粘滯性有關。

3. 抗發炎作用：

1991 年胡慧娟等人報導⁽⁵⁾當歸水煎液對多種致炎物質引起的急、慢性炎症均有顯著的抑制作用，並能降低大鼠炎症組織 PGE 的釋放量。1991 年胡慧娟等人報導⁽⁶⁾當歸成分 ferulic acid 對與炎症有密切相關的過敏反應的作用，指出 ferulic acid 可抑制四種型態的過敏反應。1980 年尹鐘洙等人報導⁽⁷⁾，當歸水抽提物能降低血管通透性，抑制血小板中致炎物質 5-HT 的釋放；1984 年徐理納等人報導⁽⁸⁾當歸成分 ferulic acid 對 arachidonic acid 代謝的影響，指出 ferulic acid 可抑制 PGE₂ 的生成。

4. 對免疫系統的作用：

1989 年吳梧桐等報導⁽⁹⁾當歸及其成分阿魏酸可輕微活化小鼠脾臟淋巴細胞，促進脾臟淋巴細胞的增殖，亦可明顯促進 Con A，誘導的小鼠脾淋巴細胞的 DNA 和蛋白質合成，對 IL-2 的產生也有明顯增強作用。1981 年徐理納等報導⁽²¹⁾，給小鼠靜脈注射當歸 16 g/kg 或阿魏酸納 100-200 mg/kg 均能顯著地促進單核吞噬細胞系統對剛果紅的廓清率。小鼠灌胃給予阿魏酸納 0.3 g/kg 或皮下注射給予 0.2 g/kg 能增強腹腔巨噬細胞的吞噬能力。皮下注射當歸 20 g/kg 也有增強作用。據 1996 年趙玉華等報導⁽²²⁻²³⁾免疫特異玫瑰花環試驗顯示，當歸藥劑經由灌胃，能顯著增加小鼠玫瑰花環形成數，小鼠脾臟體積增大，重量顯著增加，以及脾細胞總數增多；當歸的總酸部分(主要含阿魏酸等成分)、中性油(主要含 ligustilide 等成分)可使小鼠 E-花環形成率及染色陽性率均低於正常對照組，顯示具有抑制作用。1996 年張韻報導⁽²⁴⁾當歸總酸部分有促進特異抗體 IgG 產生的作用。日本學者熊澤義雄等在培養 4 天的小鼠脾細胞懸濁液中加入當歸熱水提取物的非透析部分 (TE)，可見抗體產生細胞數明顯增加，TE 作用於且淋巴細胞而不作用於 T 細胞，顯示 TE 是 B 細胞的活化劑。1990 年高向東等報導⁽¹⁰⁾當歸及阿魏酸對小鼠免疫功能影響的研究顯示，當歸 (15 g/kg, 30 g/kg)與阿魏酸 (12.5 mg/kg, 25 mg/kg)可明顯地增加小鼠脾臟和胸腺重量，促進小鼠腹腔巨噬細胞的吞噬功能、小鼠碳粒廓清速率、由 SRBC 致敏的小鼠血清溶血素的形成、小鼠抗體生成細胞的形成等。

5. 其它的作用：

1985 年王筠默等人⁽²⁵⁾報導，阿魏酸能拮抗垂體後葉素引起的兔急性心肌缺血和結紮引起的兔急性心肌梗塞，縮小心肌梗塞面積達 41 % 以及降低豚鼠離體心肌耗氧量，增加小鼠心肌攝取 ^{86}Rb 及離體兔和豚鼠冠脈流量，降低心收縮幅度，且不影響心率。LD₅₀I.V.為 1.7 g/kg P.O. 為 3.2 g/kg。

第三節 阿魏酸的理化特性

A. 化學名：

3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid

B. 結構式：

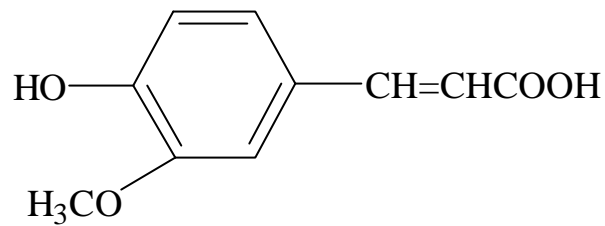


Figure. 1 Chemical Structure of Ferulic Acid

C. 分子式及分子量：

$C_{10}H_{10}O_4$; mol. wt.=194.19

D. 物理、化學性質：

為斜方針狀結晶，熔點 174 。易溶於熱水、乙醇及乙酸乙酯，尚易溶於乙醚，微溶於石油醚及苯。

第四節 阿魏酸的定量法

有關中藥材及其製劑中所含的 ferulic acid 定量方法，文獻中大都採用高效液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography)，因其所需檢品少，準確性高，是目前測定藥品含量最常用的方法。

為了進行阿魏酸在家兔體內藥物動力學以及生體可用率研究，本研究將探討一種靈敏度高且具專一性，適合定量分析 ferulic acid 在血漿檢品中濃度之 HPLC 方法，以下為阿魏酸之 HPLC 定量法文獻整理。

Table 1 阿魏酸之 HPLC 定量法文獻整理

| 作者 | 層析管柱 | 分析條件 | 檢品處理 |
|--|---|--|------------------------|
| 張玉杰等人 ⁽²⁶⁾ | YWG-C ₁₈ | 甲醇：氫甲烷：1.5 % 冰乙酸 = 6：14：80 330 nm 1.0 ml/min | 甲醇-甲酸 = 95：5 混合液 抽取 |
| 陳漢平等 人 ⁽²⁷⁾ | μ-Bondapak C ₁₈ | 1 % 醋酸：甲醇 = 55：45 313 nm 1.0 ml/min | 甲醇-甲酸 = 95：5 混合液 抽取 |
| 魏莉 ⁽²⁸⁾ | μ-Bondapak C ₁₈ | 1 % 醋酸：甲醇 = 55：45 311 nm 1.0 ml/min | 用移動相溶解 |
| 賈曉斌 ⁽²⁹⁾ | μ-Bondapak C ₁₈ | 0.05 % 醋酸：甲醇 = 3:2 320 nm 1.0 ml/min | 用移動相溶解 |
| 朱柏華等 人 ⁽³⁰⁾ | SPHER L-5 C ₁₈ | 乙酸：甲醇：水 = 1：20：79 323 nm 1.0 ml/min | 用甲醇溶解 |
| Siranoush Shahrzad et al ⁽³¹⁾ | MERCK LiChrospher [®] 100 RP-18 5μm 120×4 mm | Water:ethylacetate:acetic acid = 95.6：4.1：3 320 nm 0.5 ml/min | 乙酸乙酯抽取 移動相溶解 |

尚剛佛等人報導⁽³²⁾以正常人口服川芎單煎劑後，湯劑中阿魏酸含量為 0.79 mg/g (川芎生藥量)，給藥劑量為 1g (川芎生藥量) /kg，分析條件：層析柱：Lichnosorb RP18(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 移動相：甲醇：乙酸：水 (38 : 0.3 : 61.7), 流速 1.0 ml/min，UV 檢測波長 320 nm。

常明向等人報導⁽³³⁾以阿魏酸靜脈注射 40 mg/kg 於大鼠，層析柱：ODS-120 A; 移動相：甲醇：0.6 mol/L 醋酸(50 : 50), 流速 1.0 ml/min，UV 檢測波長 320 nm。

據文愛東等人⁽³⁴⁾的報告指出，以阿魏酸靜脈注射 5 mg/kg 於兩組兔子 (正常組及血瘀組) 後，HPLC 分析條件：層析柱：Du Pont Zorbox C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 移動相為 0.1M 磷酸緩衝液(pH = 2.5) : 氘甲烷 = 7 : 3，流速 1.0 ml/min，UV 檢測波長 320 nm。

另據常明向等人⁽³⁶⁾報導，川芎煎劑灌胃於家兔，HPLC 分析條件：層析柱：Bandpark-C₁₈；移動相：甲醇：氘甲烷：36 % 醋酸 = (100 : 0.025 : 0.06)，流速 1.0 ml/min，UV 檢測波長 320 nm。

第五節 阿魏酸的藥物動力學相關研究

尚剛偉等人報導⁽³²⁾以正常人口服川芎單煎劑後，採血點為 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180 min, 藥物動力學參數 $t_{1/2ke} = 11.5$ min, $t_{max} = 17.7$ min, $AUC = 12.4$ $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ 。

常明向等人報導⁽³³⁾以阿魏酸靜脈注射 40 mg/kg 於大鼠，採血點為 5, 15, 30, 45, 60 分鐘，結果顯示，藥物動力學參數 $t_{1/2} = 9.86$ min, $AUC = 1635.35$ $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$, $Cl = 24.5$ ml/min。

據文愛東等人⁽³⁴⁾的報告指出，以阿魏酸靜脈注射 5 mg/kg 於兩組兔子（正常組及血瘀組）後，LOD 為 15 ng/ml, 平均回收率為 97.0 ± 1.8 %，採血點為 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 分鐘，發現阿魏酸在動物體內為二室開放模式，曲線下面積（AUC）分別為正常組 166 $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ 、血瘀組 340 $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ ，半衰期只有 22 min 及 37 min。

李霞等人⁽³⁵⁾報導，以家兔空腹灌胃給藥 25 mg/kg，採血點為 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120 分鐘，藥物動力學參數 $t_{1/2} = 35$ min。

另據常明向等人⁽³⁶⁾報導，川芎煎劑製成 1 g/ml 的溶液，經 HPLC 測定，含阿魏酸為 360 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。以 10 ml/kg i.g. 川芎煎劑於家兔，採血點為 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 分鐘，藥物動力學參數 $t_{1/2} = 39.5$ min, $AUC = 172.7$ $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$, $Cl = 25.7$ ml/min。

第六節 研究動機與目的

1. 研究動機

Ferulic acid 是當歸、川芎等常用中藥有效成分之一，具有抗氧化及抗發炎，增強巨噬細胞吞噬能力，抑制血小板凝集等藥理活性。阿魏酸過去藥物動力學的研究報導，大都偏重單劑量給藥，少有多種劑量相比的研究報導。因此本研究便以家兔進行這方面研究，首先尋找一種靈敏度高、準確性好且具專一性之 ferulic acid 血漿檢品分析方法；其次再進行以三種不同劑量(2, 10, 50 mg/kg)在六隻家兔進行靜脈注射後，探討其藥物動力學之研究。最後在家兔進行肌肉注射及口服給予阿魏酸口服液後之生體可用率研究，期藉此研究模式，為日後阿魏酸在人體進行藥物動力學及生體可用率試驗時提供相關之研究方法基礎。

2. 研究目的

A. 建立 ferulic acid 在血漿檢品中定量之高效液相層析法

為了進行藥物動力學之相關研究，探討一種簡單、快速、靈敏度高且具專一性的 HPLC 定量分析方法，除可測定 ferulic acid 之含量。對於分析方法的確效性(Validation)也進行評估，以期開發適合進行藥物動力學及生體可用率研究之定量法。

B. ferulic acid 之藥物動力學研究：

探討 ferulic acid 在家兔經由三種劑量靜脈注射後，分析 ferulic acid 在家兔體內的藥物動力學特性，經定量而測得血中濃度經時變化之數

據，進行藥物動力學相關模式之評估，以期求得有關於藥物動力學之參數，並探討 ferulic acid 在家兔體內之過程。

C. ferulic acid 之生體可用率研究：

為瞭解 ferulic acid 在家兔生體可用率之相關數據，以靜脈注射 (I.V.) 肌肉注射 (I.M.) 及口服給藥 (P.O.) 三種不同投藥方式，分析相關藥物動力學參數，以期作為製劑品管及臨床評估應用之參考。

第三章 實驗材料及方法

第一節 實驗材料

1. 藥品及試劑：

| | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 阿魏酸(Ferulic acid) | 美國 Sigma (St. Louis. USA.) |
| 對羥基苯甲醛(3-hydroxybenzaldehyde) | 美國 Sigma (St. Louis. USA.) |
| 肝素鈉(Heparin sodium) | Novo Industrial Co. , 5000 I.U./ml |
| 磷酸(Phosphoric acid) | E. Merck Co. |
| 甲醇(Methanol) | 美國 Mallinckrodt Co. |
| 氰甲烷(Acetonitrile) | 美國 Mallinckrodt Co. |
| 氫氧化鈉(Sodium hydroxide) | 德國 R.D.H. Co. |
| 藥用酒精(Ethanol) | 臺灣菸酒公賣局 |
| 生理食鹽水 | 信東化學製藥工業公司 |
| 氮氣 | 源吉行 |

使用於高效液相層析儀之試劑均為 HPLC 級。

2. 儀器及材料：

(1) 高效液相層析儀之裝備：

幫浦(Pump): Jasco Model PU-980 Intelligent HPLC Pump

偵測器(Detector): Jasco Model UV-950 Intelligent UV/VIS
 Photodiode Array Detector

積分儀(Integrator): Scientific Information Service
 Corporation Integrator

自動取樣機(Auto sampler) : Jasco Model AS-950 Intelligent Sampler

印表機(Printer): Hewlett Packard Deskjet 692C

層析管(Column): Merck LiChrospher®100 RP-18e 5 μ m
 (125 \times 4 mm)

保護管柱(Pre-column): Merck Lichrospher 100 RP-18e
 endcapped(5 μ m)

(2) 實驗室裝備 :

直示電子天平: Sartorius Type 1801

水壓抽氣機 : Eyela , Aspirator A-2S , Tokyo , Rikak Co.

微量移液管(Micropipette) : Socorex Transferpette 1- 10 μ l ,
 20 - 200 μ l , 100 - 1000 μ l

試管振盪器: Maxi Mix II Thermolyne Type 37600 Mixer

高速離心機: Hettich Zentrifugen D-7200 Tuttlingen ,
 Germany (5000 rpm)

酸鹼測定儀(pH meter): Model 2002 , Good Digital Co.

純水製造裝置: Operating and Maintenance Manual for RiOs™ and Elix™ Water Purification System , Millipore Co. Operating and Maintenance manual Milli-Q® , Millipore Co.

超音波振盪器: Branson 5510 , Hong Yu Instruments CO. , Ltd

吹氣濃縮裝置: Organomation Associates INC. Model No.112.

過濾膜 : Millipore Type HV , 0.22 μm , Millipore Co.

(3) 動物實驗所用器材 :

胃管(內徑 1.5 mm) : 季勗儀器公司

針筒過濾器 : 0.22 μm , PRO-X™ (Lida CO.)

注射針及針筒 : Terumo Co.Tokyo , Japan

1 ml Syringe 25_G × 5/8 ” (0.5 × 16 mm)

2.5 ml Syringe 24_G × 1 ” (0.55 × 25 mm)

10 ml Syringe 22_G × 1 1/2 ” (0.70 × 38 mm)

靜脈置留針及針塞 : Terumo Co.Tokyo , Japan , IV Catheter 22_G × 1”

Injection Plug , 0.2 ml

家兔固定器 : 信德儀器公司

張口器、棉花、3M 膠帶、計時器

3. 溶液製備：

(1) 阿魏酸標準溶液 (Ferulic acid stock standard solution)

精稱 ferulic acid 標準品 10 mg，置於 10 ml 的定量瓶中，加甲醇至刻度，即得濃度為 1.0 mg/ml 的阿魏酸標準溶液。使用時再以甲醇稀釋成所需濃度之標準溶液。(1000、 500、 300、 100、 50、 30、 10、 5、 1、 0.5 ug/ml)

(2) 3-羥基苯甲醛標準溶液 (3-hydroxybenzaldehyde standard solution)

精稱 3-hydroxybenzaldehyde 10 mg，置於 1000 ml 容量瓶中，加氫甲烷至刻度，即得濃度為 10 μ g/ml 的內標準溶液。

(3) 肝素鈉溶液 (Heparin sodium solution)

精稱肝素鈉注射液 (5,000 IU/ml) 2.5 ml，加於 500 ml 生理食鹽水中，即得 25 I.U./ml 抗凝血肝素鈉溶液。

(4) 阿魏酸靜脈注射液 (Ferulic acid solution for intravenous injection)

精稱所需的阿魏酸，用乙醇使之溶解，滴加 1 mol/L NaOH 0.2 ml (pH=6-8) 再經 0.22 μ m 過濾薄膜過濾除菌即得。

(5) 阿魏酸肌肉注射液 (Ferulic acid solution for intramuscular injection)

製備方法同靜脈注射液。

(6) 阿魏酸口服液 (Ferulic acid oral solution)

製備方法同靜脈注射液，但未經過濾除菌。

(7) 磷酸緩衝溶液 (Phosphoric acid buffer solution)

精取 85% 磷酸 40 μ l，置入 1000 ml 定量瓶中，加水至定量刻度即得。

第二節 實驗方法

1. 阿魏酸血漿檢品之 HPLC 定量分析方法：

A. HPLC 分析條件：

| | |
|------------------|---|
| 層析管(Column) | Merck LiChrospher 100 RP-18e column (125×4 mm) endcapped , (5 μm) |
| 保護管柱(Pre-column) | Merck Lichrospher 100 RP-18 endcapped(5 μm) |
| 檢測波長 | UV 322 nm |
| 流速 | 1.0 ml/min |
| 移動相 | Acetonitrile : H ₂ O = 13 : 87(用磷酸調 pH = 3.45) |
| 注入量 | 20 μl |
| 分析時間 | 18 min. |
| 內標 | 3-hydroxybenzaldehyde |

B. 血漿檢品之前處理：

精確量取血漿檢品 200.0 μl 置入試管中，加入含 3-hydroxybenzaldehyde 內標準品之氰甲烷溶液 600 μl，以試管震盪器振盪 20 秒充分混合使血漿蛋白沉澱。再以 3000 rpm 離心 20 分鐘。吸取上清液置於另一試管中，以氮氣噴吹至乾，以 200 μl 之 mobile phase 溶解，接著以 HPLC 分析。

C. 檢量線之製作：

精確量取家兔空白血漿 180 μl ，加入 20 μl 含不同濃度之阿魏酸標準溶液，配製成濃度為 0.05 至 100 $\mu\text{g/ml}$ 之標準血漿檢品液(Table 2)，再加入含 3-hydroxybenzaldehyde 內標準品之氘甲烷溶液 600 μl ，以振盪器振盪 20 秒，使血漿蛋白沉澱。再以 3000 rpm 離心 20 分鐘。吸取上清液置於另一試管中，以氮氣噴吹至氘甲烷完全逸離後，以 200 μl 之 mobile phase 溶解，接著以 HPLC 分析。由圖譜所得之 Ferulic acid 與 3-hydroxybenzaldehyde 波峰之面積比與理論濃度作線性回歸以製作檢量線。

Table 2 Ferulic acid 標準濃度血漿檢品溶液之製備

| 標準溶液濃度 ($\mu\text{g/ml}$) 取 20 μl | 空白血漿體積 (μl) | 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) |
|---|--------------------------|----------------------------|
| 1000 | 180 | 100.0 |
| 500 | 180 | 50.0 |
| 300 | 180 | 30.0 |
| 100 | 180 | 10.0 |
| 50 | 180 | 5.00 |
| 30 | 180 | 3.00 |
| 10 | 180 | 1.00 |
| 5 | 180 | 0.50 |
| 1 | 180 | 0.10 |
| 0.5 | 180 | 0.05 |

D. 回收率實驗

目的在比較添加 ferulic acid 在空白血漿和空白溶液(Methanol) 中，經血漿檢品之前處理步驟後檢出量之差異。實驗步驟如同檢量線製作中對檢品之處理過程。回收率可從下式求得：

$$\%Recovery = \frac{\text{Standard Peak Area Ratio in Plasma}}{\text{Standard Peak Area Ratio in Methanol}} \times 100\%$$

E. 精確性試驗：

為了確認 ferulic acid 定量分析方法之精確性，因此做同日內 (Intraday) 及間日內 (Interday) 的精確性比較。同日內試驗是以不同濃度 ferulic acid 標準濃度血漿檢品，於同一日內建立六次檢量線，計算各個校正液濃度之平均值 (Mean)、標準偏差 (S.D.) 及變異係數 (C.V.)；若於不同天以同法操作則可得到間日內的精確性比較。

F. 靈敏度試驗：

分析過程中，為找出能和背景濃度相區分的分析物最低濃度，將依採標準濃度血漿檢品製備方法，將其濃度重複稀釋至 HPLC 可偵測的最低濃度，即標的物之訊號對雜訊之比值 (S/N) 為 3 : 1 時稱為最低可偵測濃度 (Limit of Detection , LOD)。取大或等於 10 以上之濃度為最低可定量濃度 (Limit of Quantitation , LOQ)，依前述「檢量線之製

作」，採標準濃度血漿檢品製備方法，取六次檢品分析測其精準度。

G. 安定性試驗：

(A). Ferulic acid 在家兔血漿中於 25 °C 下之安定性試驗

取濃度為 0.5, 10, 1000 $\mu\text{l/ml}$ 的 ferulic acid 標準溶液 0.5 ml, 加入 4.5 ml 之空白血漿中, 振盪一分鐘以混合均勻, 即得濃度為 0.05, 1, 100 $\mu\text{g/ml}$ 之血漿檢品, 依血漿檢品之前處理方法處理後將之分裝後置於自動取樣機中, 於第 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36 小時, 分別取出一組檢品(n=3), 以 HPLC 分析, 觀察 ferulic acid 之濃度變化情形。

(B). Ferulic acid 在家兔血漿中於 -30 °C 下之安定性試驗

取濃度為 0.5, 10, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 之 ferulic acid 標準溶液 0.5 ml, 加入 4.5 ml 之空白血漿中, 振盪一分鐘以混合均勻, 即得濃度為 0.05, 1, 100 $\mu\text{g/ml}$ 之血漿檢品, 將之分裝後, 置於 -30 °C 的冷凍櫃中, 於第 0, 1, 3, 6, 10, 15 天分別取出一組檢品 (n = 3)。解凍後, 依血漿檢品之前處理方法處理後, 再以 HPLC 分析, 觀察 ferulic acid 之濃度變化情形。

2. Ferulic acid 在家兔體內之藥物動力學

A. 實驗設計

(1) 實驗一：藥物動力學

取雄性家兔六隻，體重介於 2.0 至 2.6 公斤之間 (Table 3)，每隻家兔進行三種劑量靜脈注射投藥，給藥順序及劑量分別標於 (Table 4)，每次投藥時間須相隔一週以上。

Table 3 Ferulic acid 在靜脈注射投藥實驗中家兔之體重

| Rabbit No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Weight (kg) | 2.2 | 2.2 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.2 |
| | 2.2 | 2.0 | 2.3 | 2.5 | 2.5 | 2.4 |
| | 2.4 | 2.2 | 2.0 | 2.3 | 2.6 | 2.3 |

Table 4 Ferulic acid 在靜脈注射實驗中家兔投藥順序及劑量

| Rabbit No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------|---|---|---|---|---|---|
| Order | A | B | C | A | B | C |
| | B | C | A | B | C | A |
| | C | A | B | C | A | B |
| Dose | A : 2 mg/kg B : 10 mg/kg C : 50 mg/kg | | | | | |

(2) 實驗二：生體可用率

取雄性家兔六隻，體重介於 2.0 至 2.7 公斤之間 (Table 5)，每隻家兔進行三種劑量靜脈注射、肌肉注射、口服投藥，給藥順序及劑量分別標示於 (Table 6)，每次投藥時間須相隔一週以上。

Table 5 Ferulic acid 在生體可用率實驗中家兔之體重

| Rabbit No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Weight (kg) | 2.2 | 2.7 | 2.3 | 2.1 | 2.6 | 2.5 |
| | 2.3 | 2.3 | 2.2 | 2.5 | 2.1 | 2.4 |
| | 2.4 | 2.0 | 2.3 | 2.2 | 2.2 | 2.4 |

Table 6 Ferulic acid 在生體可用率實驗中家兔投藥順序及劑量

| Rabbit No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------|---|----|----|----|----|----|
| Order | IV | IM | PO | IV | IM | PO |
| | IM | PO | IV | IM | PO | IV |
| | PO | IV | IM | PO | IV | IM |
| Dose | IV： 50 mg/kg 打入家兔耳靜脈內 IM： 50 mg/kg 打入家兔大腿肌肉 PO： 100 mg/kg 由胃管灌入 | | | | | |

B. 給藥法及檢品處理：

(1) 靜脈注射給藥及血漿檢品之處理：

於實驗前，家兔先禁食 24 小時；實驗時，家兔先稱重記錄實際體重以便配製注射溶液。將兩耳之毛剃除後關入限制籠內，接著以燈泡照射兔耳使其血管擴張，再以酒精棉消毒並於助血管擴張，隨即插入靜脈留置針，將針塞（Injection plug）注滿肝素鈉溶液後，固定於靜脈留置針上。每次採血後均由針塞注入 25 I.U./ml 之肝素鈉溶液約 0.2 ml，以防靜脈留置針管內之血液凝固。

投藥前先抽取 1.5 ml 之空白血液，由另一耳靜脈投藥後，分別於投藥後 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240 及 270 分鐘由靜脈留置針之針塞抽取 1.5 ml 血液，置於試管中，以 3000 rpm 轉速離心 5 分鐘後，取出上層血漿，若不馬上分析則保存於 -30 之冷凍櫃中。

血漿檢品之前處理，檢量線及分析條件均依前述方法操作，ferulic acid 之濃度則由標準曲線經內插法推算而得。

(2) 肌肉注射給藥及血漿檢品處理：

如同上述靜脈注射給藥方式，唯肌肉注射投藥則是將注射液注射於家兔的大腿肌肉內。而採血點為投藥後 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 及 300 分鐘再由耳靜脈抽取。

(3) 口服給藥及血漿檢品處理：

如同上述靜脈注射給藥方式；唯口服給藥法是以張口器將家兔之口張開後，再以胃管插入給藥，而其採血點為給藥後之 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 及 360 分鐘，再由耳靜脈抽取。

C. 數據處理及統計方法

各種給藥法所取得之血漿檢品經 HPLC 法定量後，依標準曲線換算 ferulic acid 血中濃度數據後，利用電腦程式 JANA Program⁽³⁷⁾，WINNONLIN Program⁽³⁸⁾ 及 LAGRAN-P 等，分別利用二室模式及非分室理論來計算相關之藥物動力學參數。

(1) 二室體模式 (Two Compartment Model)

分析所得之各個指標成分血中濃度數據，經 JANA Program 作 Weighting、Two Exponential Curve Stripping 處理，取其 A、B、 α 及 β 的數值。再用 WINNONLIN Program 作曲線配適 (Curve Fitting) 取最適合的室體模式，求其相關藥動學參數。

(2) 非分室理論

分析所得之各個指標成分血中濃度數據，經 LAGRAN-P 處理，可由非分室理論計算相關藥動學參數。由所得之藥動學參數以統計學 t-test 比較兩次靜脈注射 50 mg/kg 給藥後所得之藥動學參數 (AUC, $t_{1/2\beta}$, CL, VD_{ss})；以 One Way Anova 處理，比較三種不同劑量靜脈給藥後藥動學參數之差異及不同投藥途徑給藥之差異。

第四章 結果與討論

1. Ferulic acid 在血漿檢品中之 HPLC 定量法

本研究的定量分析方法，是將血漿檢品經氫甲烷去蛋白後離心，取上清液以氮氣噴吹使氫甲烷逸離後，添加移動相溶解，再注入 HPLC 分析。經過多次試驗與修正後，找出最適當定量分析條件。Figure 2 顯示空白血漿、標準濃度血漿及家兔靜脈注射後血漿檢品之 HPLC 層析圖。層析圖中 ferulic acid 波峰與內標準品 3-hydroxybenzaldehyde 波峰之間清晰且穩定，並無干擾，可見本法分離效果良好。利用本法所製備標準液之檢量線，線性回歸方程式 $Y = 3.5147X + 0.0022$ 其決定係數 (r^2) 為 0.9998，顯示阿魏酸濃度在 0.05 至 100 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內呈線性關係 (Figure 3)。

本法之偵測極限 (Limit of Detection) 在經逐步稀釋阿魏酸標準溶液後分析之，測得感應極限為 12.5 ng/ml。回收率 (Recovery) 試驗結果平均可達 95.79 % (Table 7)。同日內 (Intraday) 及間日內 (Interday) 的精確度評估，其變異係數 (C.V. %) 皆均低於 10 % (Table 8~9)。在製備血漿檢品檢量線之標準液，取六次標準液獨立檢品測得之偵測極量 (Limit of Quantitation)，其最低濃度的變異係數 (C.V. %) 皆均低於 10 % (Table 10)。

Ferulic acid 標準血漿檢品，以三種濃度 (0.05, 1, 100 $\mu\text{g/ml}$) 於 25 及 -30 下進行安定性試驗，結果如 Table 11~12 及 Figure 4~5 所示。阿魏酸在 25 的自動取樣機中，連續 36 小時的分析，ferulic acid 濃度，並無明顯下降，表示阿魏酸在含有緩衝溶液的 mobile phase 中可

從事長時間分析。阿魏酸在-30 恆溫貯存 15 天內，經分析後發現濃度並無明顯下降，顯示血漿中之阿魏酸在-30 冷凍貯存下仍安定。

綜合前述幾項分析確效試驗可知，本研究對於 ferulic acid 之血漿檢品所採取的高效液相層析法，為一靈敏、簡便、再現性良好之定量分析法，可供 ferulic acid 藥物動力學相關研究及臨床藥物監測之分析應用。

2. Ferulic acid 在家兔體內之藥物動力學

為探討家兔體內 ferulic acid 之藥物動力學相關數據，首先以三種不同劑量（2，10 及 50 mg/kg）經靜脈注射給藥進行研究，家兔經由耳靜脈注射阿魏酸注射液後，經分析所得血漿中阿魏酸濃度經時變化之數據，如 Table 13~15 與 Figure 6-1~6-3 所示。而六隻家兔之平均血漿中阿魏酸濃度變化，分別示於 Table 16 及 Figure 7 中。當家兔給予較低劑量（2 mg/kg），在 2 小時後偵測不到血中藥物濃度，在 10 mg/kg 劑量時，在 3 小時後偵測不到血中藥物濃度。

將分析所得之阿魏酸血中濃度經時變化之數據用 LAGRAN-P 以非室性模式分析，所得之藥物動力學相關參數，分別列於 Table 17~19 中。阿魏酸三種劑量之平均半衰期 ($t_{1/2}$) 為 31.8 ± 0.9 , 35.4 ± 0.7 及 40.2 ± 1.2 min.。平均穩定狀態分佈體積 (VD_{ss}) 為 0.90 ± 0.07 , 0.78 ± 0.12 及 0.85 ± 0.07 L。平均曲線下面積 ($AUC_{0-\infty}$) 為 63.9 ± 5.1 , 333.3 ± 44.5 及 1569.6 ± 146.2 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ 。

家兔經靜脈注射 (2, 10 及 50 mg/kg) 三種劑量之 ferulic acid 後, 用 LAGRAN-P 以非室性模式分析, 所得之藥物動力學相關參數, 以其平均曲線下面積 ($AUC_{0-\infty}$) 與給藥劑量 (Dose) 取對數作線性迴歸, 結果如 Figure 10 所示, 其決定係數 (r^2) 為 0.996, 由此可以證明家兔經靜脈注射阿魏酸後, 在 2-50 mg/kg 的劑量範圍內, 呈線性關係。而據文愛東等報導家兔經靜脈注射阿魏酸 5 mg/kg 後, 平均曲線下面積 ($AUC_{0-\infty}$) 為 166 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$, 經換算與本實驗相符合。

六隻家兔靜脈注射不同劑量 (2 . 10 . 50 mg/kg) 之 Ferulic acid 標準品後, 血中濃度值 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 經 LAGRAN-P 程式處理之相關動力學參數以 One Way ANOVA 比較之結果如 (Table 33) 所示, 各種參數間之相關性及差異性, 經統計結果 CL 及 VD_{ss} 無顯著差異。

將分析所得之血漿中 ferulic acid 濃度經時變化之數據, 先利用 JANA Program 進行曲線配適, 探討末端斜率之初值及可能之室性模式。再以 WinNonlin Program 進行曲線配適, 發現二室體模式下, 可以得到良好配適。在配適 Model 8 (附錄二) 後, 所得之藥物動力學數據列表於 Table 20~22。

當家兔經靜脈注射 (2, 10 及 50 mg/kg) 三種劑量之 ferulic acid 後, 平均排除半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 依次為 33.8 ± 2.8 , 32.9 ± 4.0 及 37.2 ± 1.6 min ; 平均穩定狀態分佈體積 (VD_{ss}) 分別為 1.37 ± 0.07 , 1.30 ± 0.11 及 1.47 ± 0.05 L ; 平均曲線下面積 ($AUC_{0-\infty}$) 分別為 81 ± 7 , 400 ± 45 及 1821 ± 153 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ 。此結果與文愛東⁽³³⁾ 文在家兔體內藥物動力學屬於二室體模式相符合。

其血中濃度之變化可以下列三個方程式表示：

$$2 \text{ mg/kg} : C_p = 7.28e^{-0.16t} + 0.70e^{-0.02t}$$

$$10 \text{ mg/kg} : C_p = 27.29e^{-0.10t} + 2.80e^{-0.02t}$$

$$50 \text{ mg/kg} : C_p = 103.48e^{-0.08t} + 8.84e^{-0.02t}$$

3. Ferulic acid 在家兔體內的生體可用率 (F)

六隻家兔以交叉實驗設計，分別以靜脈注射 50 mg/kg、肌肉注射 50 mg/kg 及口服投與 100 mg/kg 之阿魏酸溶液後，經分析所得之血中濃度經時變化數據，分別列表於 Table 23~25 及 Figure 8-1~8-3。而六隻家兔之平均血漿中阿魏酸濃度變化，分別示於 Table 26 及 Figure 9 中。靜脈注射 50 mg/kg 後，於 5 小時後測不到血中藥物濃度；肌肉注射 50 mg/kg 於 6 小時後測不到血中藥物濃度；口服給藥 100 mg/kg 後，於 6 小時後測不到血中藥物濃度。

阿魏酸血中濃度之經時變化數據用 LAGRAN-P 以非室模式分析，所得相關藥物動力學參數，分別列表於 Table 27~29。結果顯示：靜脈注射 50 mg/kg 時， $AUC=1571\pm 261 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ ， $Cl=0.033\pm 0.005 \text{ L}/\text{min}$ ， $t_{1/2}=38.8\pm 2.4 \text{ min}$ ， $VD_{ss}=1.0\pm 0.1 \text{ L}$ 。肌肉注射 50 mg/kg 時 $AUC=1239\pm 184 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ ， $Cl=0.038\pm 0.005 \text{ L}/\text{min}$ ， $t_{1/2}=43.2\pm 1.2 \text{ min}$ ， $VD_{ss}=1.8\pm 0.3 \text{ L}$ 。口服給藥 100 mg/kg 時， $AUC=1136\pm 149 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ ， $Cl=0.089\pm 0.011 \text{ L}/\text{min}$ ， $t_{1/2}=57.9\pm 4.6 \text{ min}$ ， $VD_{ss}=5.8\pm 0.9 \text{ L}$ 。

阿魏酸血中濃度之經時變化數據以 WinNonlin Program 分析所得之藥物動力學數據列於 Table 30~32。結果顯示，靜脈注射 50 mg/kg 時，

AUC=2000±288 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$, $t_{1/2} = 37.3\pm 1.3 \text{ min}$, $\text{VD}_{\text{ss}}=1.4\pm 0.1 \text{ L}$ 。肌肉注射 50 mg/kg 時 , AUC=1381±176 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$, $t_{1/2\hat{a}}=42.9\pm 2.6 \text{ min}$, $t_{\text{max}}=16.7\pm 1.2 \text{ min}$, $C_{\text{max}}=26.0\pm 2.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。口服給藥 (P.O.) 100 mg/kg 時 , AUC=1210±162 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$, $t_{1/2\hat{a}}=63.1\pm 4.0 \text{ min}$, $T_{\text{max}}=24.4\pm 1.2 \text{ min}$, $C_{\text{max}}=16.2\pm 2.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

以 t-test 比較兩次靜脈注射 50 mg/kg 實驗所得之藥物動力學參數 (AUC , $t_{1/2}$, CL , VD_{ss}) , 結果顯示兩者之間並無顯著差異 (Table 34)。再以 One Way Anova 處理 , 比較三種不同途徑給藥後 (IV、IM、P.O.) 之 AUC_{P} 、 AUC_{T} 、CL、 $t_{1/2}$ 、 VD_{ss} 、MRT 等參數 , 發現三種不同投藥方式之間有顯著差異存在 (Table 35)。

對於不同給藥法的生體可用率 (F) , 其計算結果如 (Table 36) 所示。在家兔肌肉注射 (IM.) 中 , 阿魏酸生體可用率約為 61 % , 而家兔經口服 (P.O.) 阿魏酸後 , 生體可用率約為 29 % , 實驗結果顯示 , 阿魏酸給藥仍以靜脈注射給藥較佳。而口服生體可用率只有 29 % , 可能與腸胃道吸收不完全有關 , 或是肝臟代謝率過高所造成。

第五章 結 論

1. 以 HPLC 法分析 Ferulic acid 之定量法

利用 Merck LiChrospher[®] 100 RP-18e (125×4mm), 5 μm 層析管 , 移動相為氰甲烷 : 水 = 13 : 87(用磷酸調整 pH = 3.45), 流速 1.0 ml/min , 以 3-hydroxybenzaldehyde 溶液為內標準品 , 偵測 UV 波長為 322 nm , 檢測極限為 12.5 ng/ml , 最低偵測濃度為 0.05 μg/ml , 分析阿魏酸可得良好的分析效果。ferulic acid 標準液濃度在 0.05 至 100.0 μg/ml 之間 , 與 peak area ratio 間有良好的線性關係 ($r^2=0.9998$)。顯示本實驗所採取的 HPLC 分析方法為一靈敏、專一、再現性良好及精確性佳之分析法 , 可以作為分析家兔血漿中 Ferulic acid 之定量法。

2. Ferulic acid 靜脈注射後之藥物動力學

阿魏酸在家兔靜脈注射給藥之後 , 在家兔體內的經時變化 , 經由血中藥物濃度測定及藥動學與統計學分析之結果 , 係遵循二室體模式。阿魏酸三種劑量經 LAGRAN-P 以非室性模式分析 , 其平均半衰期 ($t_{1/2}$) 為 31.8 ± 0.9 , 35.4 ± 0.7 及 40.2 ± 1.4 min。平均曲線下面積 ($AUC_{0-\infty}$) 為 63.9 ± 5.1 , 333.3 ± 44.5 及 1569.6 ± 146.2 μg.min/ml。在靜脈注射劑量 (2-50 mg/kg) 時 , 其平均曲線下面積 ($AUC_{0-\infty}$) 與劑量呈現線性關係。

3. Ferulic acid 在家兔體內之生體可用率

家兔經肌肉注射給予阿魏酸後 , 經由血中藥物濃度測定及藥動學

與統計學分析之結果係遵循二室體模式。在家兔體內中，阿魏酸生體可用率約為 61 %。家兔經口服投與阿魏酸後，經由血中藥物濃度測定及藥動學與統計學分析之結果，係遵循二室體模式。在家兔體內中，阿魏酸生體可用率約為 29 %。此結果表示阿魏酸口服吸收不佳，故製備口服劑型時宜考慮以製劑技術克服之，或考慮以多次劑量給藥的方式，以期達到療效劑量。