

第四章 結果與討論

一、大黃藥材之基原鑑定

大黃藥材切片，經顯微鏡檢，與文獻^[2,4,75,76]比對後，確認為蓼科 (*Polygonaceae*) 植物掌葉大黃 *Rheum palmatum* L. 又名為北大黃。結果如附圖 Fig.1-1。

三、生大黃、熟大黃水煎劑層析指紋圖譜之建立

本研究為了解生大黃，經不同炮製法後之成分組成及含量上的變異，故利用高效液相層析法，建立生大黃、熟大黃二種水煎劑之層析指紋圖譜。

由於大黃本身成分相當複雜，且活性成分之極性差異頗大，故採用梯度沖提的方式進行分離，其分離效果良好。因水煎劑中極性成分佔大部分，故層析初期採用含水量較高之溶媒系統，整個分析過程費時 70 分鐘，配合光二極體陣列檢測器，可知活性成分 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及其配醣體之波峰位置。此層析法所建立之條件如前章所述，層析指紋圖譜如 Fig. 3-1 及 Fig. 3-2 所示。由 220 nm 所偵測之層析指紋圖譜(Fig. 3-1)，可明顯看出二種水煎劑所含成分之不同，特別是前 20 分鐘內沖提出之高極性成分，顯示大黃藥材經不同炮製後，溶出成分質與量上會有改變。

為了進一步檢測各種大黃水煎劑中配醣體之成分，以酸水解水煎劑，並利用高效液相層析法，建立大黃水煎劑水解前後之層析指紋圖譜。由 Fig. 3-3 之層析圖譜中，波峰 5, 6, 7, 8 分別為 aloe-emodin、rhein、emodin 與 chrysophanol。配合光二極體陣列檢測器，比對波峰 1 與波峰 5、波峰 2 與波峰 6、波峰 3 與波峰 7、波峰 4 與波峰 8 之 UV 波形圖譜，

其波形相似度都幾近 1(Fig. 3-4), 故可推測滯留時間相對較短的波峰 1, 2, 3, 4 分別為波峰 5, 6, 7, 8 之配醣體。 Fig. 3-3 之層析圖譜中, 可看出生大黃水煎劑中部分高極性成分如波峰 1,2,3,4 等 配醣體經酸水解而消失, 而與之相對的游離 成分 aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol 酸水解後則含量提高了, 顯示 配醣體存在於水煎劑中。

四、大黃、熟大黃水煎劑檢品中 成分之定量

本研究利用 HPLC 方法定量生大黃、熟大黃水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之含量，由於四種有效成分之極性相差頗大，所以採用梯度沖提的方式，波峰分離效果良好，檢品可於 25 分鐘內完成分析，層析圖如 Fig.4-1 所示。內部標準品 2-methylanthraquinone 於層析圖中出現之位置亦無任何干擾。

為了進行定量分析，分別製作 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之檢量線，求得各成分之檢量線方程式及相關係數。結果如 Table 1-1 所示。由 Table 1-1 中可得知此四種成分分別在 1.2~50.0、6.2~200.0、1.2~50.0、1.2~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度範圍內均有良好之線性關係。

為了確認此定量分析方法的精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，分別進行了同日內 (intraday) 及異日間 (interday) 的精確度試驗，結果如 Table 1-2~5 所示。結果顯示定量 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之方法在同日內及異日間皆有良好之精確度，其變異係數 (C.V.) 值均小於 10%，相對誤差 (relative error) 均小於 20%。水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之回收率 (recovery) 分別為 100.9~104.3%、108.6~111.7%、101.4~105.1%、96.5~104.7%，如 Table 1-6~9 所示。此外，aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之最低可定量極限 (LLOQ) 分別為 1.2、6.2、1.2 及 1.2 $\mu\text{g/mL}$ ，可偵測極限 (LOD) 分別為 0.03、0.06、0.04 及 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。確效結果顯示本分析系統之精密度、準確度及回收率皆良好。

二種大黃水煎劑中，aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之定量結果，如 Table 1-10~14 及 Fig. 4-2~4 所示。定量結果顯示水煎劑中，此四種游離 含量以 rhein 最多 (0.18~0.28%)，其次為 emodin

(0.04~0.05 %)、aloe-emodin (0.03~0.04 %)，以 chrysophanol (0.01~0.02 %) 含量最少。相對於生大黃，熟大黃的 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 游離態含量為生大黃之 0.7、0.6、0.7、0.5 倍。熟大黃中游離成分可能於炮製過程中受熱破壞而減少約 30~50%。

酸水解之結果顯示，配醣體含量，生大黃以 emodin 配醣體最多，熟大黃以 rhein 配醣體最多；二種大黃之配醣體含量都以 chrysophanol 為最少。生大黃、熟大黃之 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 配醣體之含量分別為其游離態之 1.9、0.2、1.5、2.3 倍及 2.2、0.5、2.2、4.4 倍。顯示大黃水煎劑中之成分除了 rhein 主要以游離態存在(結合態：游離態 = 0.2~0.5 : 1)以外，aloe-emodin、emodin、chrysophanol 大多以結合態存在(結合態：游離態 = 1.5~4.4 : 1)。有報導指出適當濃度的乙醇是提取類物質的良好溶媒^[45]。相對於生大黃，熟大黃的 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 配醣體含量分別為生大黃之 0.9、2.2、0.8、1.0 倍。顯示大黃酒製後對 rhein 配醣體的溶出有增加的趨勢，可能由於炮製過程使植物組織鬆軟致使植物細胞中之 rhein 配醣體成分於煎煮時更易溶出。

熟大黃中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 總含量為生大黃之 0.8、0.8、0.7、0.9 倍，顯示大黃酒製後對總之影響亦為減少的趨勢 (約 10~30 %)。

以 paired t-test 比較二種大黃水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之總、游離及配醣體含量，僅 chrysophanol 配醣體未達顯著差異外，其餘總、及其配醣體均達顯著差異 ($p < 0.001$)。顯示大黃炮製後成分含量有明顯改變。

大黃的炮製法有多種版本，本研究係以同一批藥材依據中華人民共

和國藥典^[73] 炮製。許多研究都表明，大黃的瀉下作用與煎煮方法有密切關係。煎煮時間越久，大黃酸配醣體被破壞越多。但並非所有類物質都隨煎煮時間延長而損失^[45]。據報導指出，炒製使大黃總游離含量下降，而類未受影響。蒸、炖、煮法的大黃炮製品，其結合型與游離型衍生物均減量 2/5 左右。各種大黃炮製品的總、游離、結合含量隨蒸晒次數的增加而顯著降低^[45]。本研究的結果部分與之不符，可能與藥材炮製的溫度、受熱時間及水煎劑煎煮的方法等因素有關。另外，各成分是否於炮製或煎煮過程中發生成分間之相互轉變，值得更進一步探討。

近年來大黃之各項藥理研究結果，如導瀉、利膽、保肝、抗菌、抗病毒、抗腫瘤、抗炎、止血、降脂等顯示其對健康的助益，而使之備受矚目，成為一種受重視的中藥，開發潛力無窮。此研究結果表明大黃水煎劑成分之含量會受炮製而影響，大黃常以炮製品入藥，為保證藥品品質，其含量檢測方法及限度，質量控制及品質評估等問題，值得重視。本研究建立簡單且快速之 HPLC 方法同時定量大黃水煎劑中四種主要成分 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及其配醣體，可提供大黃例行品質管制之參考。

五、生大黃、熟大黃水煎劑及大黃素於大白鼠體內之動力學

(一) 建立大白鼠口服生大黃水煎劑後之血清 解前後層析圖譜

大白鼠口服生大黃水煎劑(5 g/kg)，於口服後 30 分鐘採血，血清經去蛋白處理後，於 解前後之層析圖譜，如 Fig. 5-1 所示。 解前只見到 rhein 的波峰，經過加入 sulfatase/glucuronidase 解後可見到 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 等波峰，rhein 波峰則有增高的現象，此結果顯示，aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 等成分經口服吸收後在大白鼠體內除 rhein 仍保留部分游離態之外，其餘 皆代謝成結合態代謝物 sulfates/glucuronides。大黃水煎劑中 rhein 的含量最多，代謝 sulfotransferase/glucuronyltransferase 可能不敷代謝，因而有游離態存在血中。

(二) 生大黃與熟大黃水煎劑於大白鼠體內之動力學

本研究以大白鼠為模型，採交叉試驗法，比較口服生大黃與熟大黃水煎劑後，活性成分 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysohanol 及其配醣體於鼠體內之歷程。藉由分別投予相當於 5 g/kg 之生大黃與熟大黃水煎劑，於口服後各時間點，以心臟採血方式採得檢品，定量游離態 及其結合態代謝物之血中濃度，再比較二種大黃水煎劑間之差異。

分析方法主要根據本實驗室所開發之方法，血清檢品於脫氣及抗壞血酸保護下，分別以 sulfatase 及 glucuronidase 於 37 解 2 小時及 4 小時後，以含內標準之乙酸乙酯萃取游離態之 成分，再以 HPLC 定量。由於大黃本身成分相當複雜且此四種成分之極性差異頗大，故採用梯度沖提的方式進行分離，其分離效果良好。內部標準品

2-methylantraquinone 於層析圖中出現的位置亦無任何干擾，aloe-emodin、rhein、emodin、chrysohanol 及內部標準品 2-methylantraquinone 之滯留時間分別為 6.8、7.5、12.7、18.9 及 16.6 分鐘，整個分析過程只需 25 分鐘即可完成分析。層析圖如 Fig. 5-2 所示。

為了進行此定量分析，分別製作 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysohanol 之檢量線，以各標準品與內標之波峰面積比值為 Y 軸，各標準品之濃度為 X 軸進行直線迴歸，求得各成分之檢量線方程式及相關係數。結果如 Table 2-1 所示。由 Table 2-1 中可得知 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysohanol 四種成分別在 0.1~10.0、0.8~50.0、0.2~10.0 及 0.1~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度範圍內均有良好之線性關係。

為了確認此定量分析方法的精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，分別進行了同日內 (intraday) 及異日間 (interday) 的精確度比較。確效方法如前章所述，結果如 Table 2-2~5 所示。顯示定量 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysohanol 之方法在同日內及異日間皆有良好的精確度，其變異係數 (C.V.) 值均小於 10%，相對誤差 (relative error) 均小於 20%。血清中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysohanol 之回收率 (recovery) 分別為 90.5~96.9%、82.1~87.7%、81.0~94.5%、82.6~98.7%，如 Table 2-6~9 所示。此外，aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysohanol 之最低可定量極限 (LLOQ) 分別為 0.1、0.8、0.2 及 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，可偵測極限 (LOD) 分別為 0.03、0.06、0.04 及 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。確效結果顯示本分析系統之精密度、準確度及回收率皆良好。

大黃水煎劑於口服給藥前先行定量，aloe-emodin、rhein、emodin

及 chrysophanol 之含量，結果如 Table 1-10~14 所示。結果顯示此四種成分之總 及游離 含量皆以生大黃較高。

大白鼠口服生大黃水煎劑(5 g/kg)後，鼠體內之自由態 只有 rhein 可偵測到，其餘成分的血中自由態濃度甚微，顯示除了 rhein 之外，其餘 aloe-emodin、emodin 及 chrysophanol 於體內皆遭快速代謝。血中之濃度及血藥經時變化分別如 Table 2-10~18 及 Fig. 5-5~8 所示，結果顯示，各大白鼠間之血藥情況個體差異明顯，於各時間點各大白鼠之 rhein 及 chrysophanol 之 sulfates 濃度幾乎都明顯高於 glucuronides，而 aloe-emodin 及 emodin 之 sulfates 與 glucuronides 濃度較接近，以 WINNONLIN[®]軟體之非室體模式(noncompartment model)計算，求出 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及其 sulfates、glucuronides 之藥物動力學參數，其 sulfates 之平均血峰濃度 C_{max} 分別為 3.1 ± 0.3 、 36.5 ± 4.1 、 11.2 ± 1.5 、 7.5 ± 0.9 (nmol/mL)；glucuronides 之平均血峰濃度 C_{max} 分別為 2.9 ± 0.3 、 24.4 ± 1.6 、 10.2 ± 1.3 、 4.2 ± 0.7 (nmol/mL)；此外 rhein 游離態之平均血峰濃度 C_{max} 為 26.9 ± 7.2 (nmol/mL)。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 之 sulfates 平均血藥面積 AUC_{0-720} 分別為 366.8 ± 52.1 、 4641.4 ± 510.2 、 1702.7 ± 247.8 、 941.8 ± 130.4 (nmol·min·mL⁻¹)；glucuronides 之平均血藥面積 AUC_{0-720} 分別為 346.3 ± 52.8 、 3457.5 ± 484.2 、 1757.6 ± 308.4 、 685.3 ± 113.6 (nmol·min·mL⁻¹)；此外 rhein 游離態之平均血藥面積 AUC_{0-720} 為 1369.5 ± 337.9 (nmol·min·mL⁻¹)。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 之 sulfates 平均滯留時間分別為 79.9 ± 7.3 、 103.1 ± 5.8 、 158.0 ± 7.9 、 123.0 ± 10.0 (min)；glucuronides 之平均滯留時間分別為 80.3 ± 7.2 、 101.8 ± 4.7 、 156.9 ± 6.5 、 144.7 ± 14.4 (min)；此外 rhein 游離態

之平均滯留時間為 54.0 ± 6.5 (min)。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol sulfates 之平均血峰濃度分別為 glucuronides 之 1.1、1.5、1.1、1.8 倍；此外 rhein sulfates 之平均血峰濃度為 rhein 游離態之 1.4 倍。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol sulfates 之平均血藥面積分別為 glucuronides 之 1.1、1.3、1.0、1.4 倍；此外 rhein sulfates 之平均血藥面積為 rhein 游離態之 3.4 倍，如 Table 2-28~31 所示。顯示生大黃水煎劑口服後，除了 rhein 有原形吸收外(佔 14%)，各成分主要以 sulfates (佔 49~58%)與 glucuronides (佔 37~51%)結合態代謝物循環於體內。

大白鼠口服熟大黃水煎劑(5 g/kg)後，鼠體內之自由態 只有 rhein 可偵測到，其餘成分的血中自由態濃度甚微，顯示除了 rhein 之外，其餘 aloe-emodin、emodin 及 chrysophanol 於體內皆被快速代謝。血中之濃度及血藥經時變化分別如 Table 2-19~27 及 Fig. 5-9~12 所示，結果顯示，各大白鼠間之血藥情形個體差異明顯，於各時間點各大白鼠血中濃度僅 rhein 之 sulfates 高於 glucuronides 較顯著，其餘 aloe-emodin、emodin、chrysophanol sulfates 與 glucuronides 之濃度相差不多，以 WINNONLIN[®]軟體之非室體模式(noncompartment model)計算，求出 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及其 sulfates、glucuronides 之藥物動力學參數，其 sulfates 之平均血峰濃度 C_{max} 分別為 3.6 ± 0.4 、 32.5 ± 3.2 、 8.4 ± 1.4 、 6.0 ± 1.0 (nmol/mL)；glucuronides 之平均血峰濃度 C_{max} 分別為 3.4 ± 0.3 、 23.7 ± 2.1 、 9.9 ± 0.7 、 4.7 ± 0.4 (nmol/mL)；此外 rhein 游離態之平均血峰濃度 C_{max} 為 29.8 ± 4.4 (nmol/mL)。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol sulfates 之平均血藥面積

AUC₀₋₇₂₀ 分別為 398.5±32.1、4292.8±212.0、1131.3±122.6、624.5±62.1 (nmol·min·mL⁻¹)；glucuronides 之平均血藥面積 AUC₀₋₇₂₀ 分別為 375.3±50.2、3620.5±333.7、1449.9±220.0、615.9±103.9 (nmol·min·mL⁻¹)；此外 rhein 游離態之平均血藥面積 AUC₀₋₇₂₀ 為 1337.8±186.7 (nmol·min·mL⁻¹)。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol sulfates 之平均滯留時間分別為 93.1±4.8、117.9±10.3、153.4±18.2、128.4±21.5 (min)；glucuronides 之平均滯留時間分別為 82.7±6.6、116.2±8.5、151.7±8.9、143.7±12.3 (min)；此外 rhein 游離態之平均滯留時間為 49.5±3.8 (min)。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol sulfates 之平均血峰濃度分別為 glucuronides 之 1.1、1.4、0.8、1.3 倍；此外 rhein sulfates 之平均血峰濃度為 rhein 游離態之 1.1 倍。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol sulfates 之平均血藥面積分別為 glucuronides 之 1.1、1.2、0.8、1.0 倍；此外 rhein sulfates 之平均血藥面積為 rhein 之 3.2 倍，如 Table 2-28~31 所示。顯示熟大黃水煎劑口服後，除了 rhein 有原形吸收外(佔 14%)，各成分主要以 sulfates (佔 44~51%)與 glucuronides (佔 39~56%)結合態代謝物循環於體內。

口服二種大黃水煎劑口服後，除了 rhein 有原形吸收外(佔 14%)，各成分主要以 sulfates (佔 44~58%)與 glucuronides (佔 37~56%)結合態代謝物循環於體內。因此類型的 sulfates 與 glucuronides 應為其主要發揮藥理活性的分子。二種水煎劑的定量結果顯示生大黃所含之四種活性成分均高於熟大黃，熟大黃水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 之總含量為生大黃之 0.8、0.8、0.7、0.9 倍；

口服熟大黃後，血中之 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 總平均血藥面積分別為生大黃之 1.1、1.0、0.7、0.8 倍，顯示酒大黃之 aloe-emodin 及 rhein 曝露量與生大黃相當。然而，emodin 及 chrysophanol 較生大黃低。

二種水煎劑中之總 及游離 成分含量均以 rhein 最高，其次為 emodin、aloe-emodin、chrysophanol (Table 1-10~12)；口服後血中總血藥面積以 rhein 最高，其次為 emodin、chrysophanol、aloe-emodin。依給藥劑量校正後，顯示 chrysophanol 之口服吸收較佳，推測與 chrysophanol 極性較低有關，極性較低之分子被動擴散進入腸細胞的能力較佳。

口服二種大黃水煎劑後到達血峰濃度的時間，四種 成分中以 rhein 最快(10 分鐘)，其他各 之 sulfates (17~35 分鐘)、glucuronides (22~40 分鐘)較晚。各 之血峰濃度，幾乎都是 sulfates 高於 glucuronides，(但熟大黃之 emodin 例外)。各 之平均滯留時間，sulfates 與 glucuronides 相差不大，以 rhein 游離態平均滯留時間最短(50~54 分鐘)，結合態代謝物平均滯留時間以 aloe-emodin、rhein 較短(80~118 分鐘)，而 emodin、chrysophanol 結合態代謝物平均滯留時間較長(123~158 分鐘)，顯示滯留時間與原形藥之極性相關，極性愈低者之結合態代謝物滯留時間較長。

口服二種大黃水煎劑後，所得之動力學參數，以 paired Student's t-test 比較其間之差異，結果顯示，口服熟大黃後 chrysophanol sulfates 血藥面積 AUC 之減少達統計上顯著差異，其他藥動學參數未達顯著差異。

(四) Emodin 於大白鼠體內之動力學

本研究以大白鼠為模型，探討 emodin 鼠體內之動力學。藉由分別投予 50 mg/kg 及 10 mg/kg 之 emodin 口服溶液及靜脈注射液，於給藥後各時間點，以心臟採血方式採得檢品，定量鼠體內之游離態 emodin 及其結合態代謝物 sulfates 與 glucuronides 之血中濃度。

分析方法主要根據本實驗室所開發之方法，血清檢品於脫氣及抗壞血酸保護下，分別以 sulfatase 及 glucuronidase 於 37 °C 解 2 小時與 6 小時後，以含內標準之乙酸乙酯萃取游離態之 emodin，再以 HPLC 定量。

檢品於 15 分內即可完全分離。檢量線之濃度範圍由 0.3~80.0 μ g/mL，檢量線方程式 $y = 0.3026x - 0.0397$ ，濃度與波峰面積比值間顯現良好之線性關係 ($r^2=0.9999$)。

為了確認此定量分析方法的精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，分別進行了同日內 (intraday) 及異日間 (interday) 的精確度比較。此試驗方法如前章所述，結果如 Table 3-1 所示。顯示定量方法在同日內及異日間皆有良好之精確度，其變異係數 (C.V.) 值均小於 10%，相對誤差 (relative error) 均小於 20%。血清中 emodin 之回收率 (recovery) 為 99.7~107.0%，如 Table 3-2 所示。此外，emodin 之最低可定量極限 (LLOQ) 為 0.3 μ g/mL，檢測極限 (LOD) 為 0.01 μ g/mL。確效結果顯示本分析系統之精密度、準確度及回收率皆良好。

大白鼠給予 emodin 口服溶液 (50 mg/kg) 後，各血液檢品之 emodin 原形甚微，幾乎無法定量，顯示 emodin 於體內無原形吸收。血中 emodin sulfates 及 glucuronides 之濃度、個體及平均血藥經時變化圖分別如 Table 3-3, 5 及 Fig. 5-13~14 所示。各大白鼠間個體差異明顯，平均 emodin

sulfates 之濃度高於 glucuronides。以 WINNONLIN[®]軟體之非室體模式 (noncompartment model) 計算，求出 emodin sulfates 及 glucuronides 之藥物動力學參數，其平均血峰濃度分別為 19.7 ± 5.2 nmol/mL、 17.4 ± 4.1 nmol/mL，平均血藥面積分別為 26365.9 ± 4447.5 (nmol·min·mL⁻¹)、 23585.4 ± 4921.3 (nmol·min·mL⁻¹)，平均滯留時間分別為 1217.0 ± 131.4 (min)、 1181.8 ± 118.8 (min)，如 Table 3-4,6 所示。Emodin sulfates 之平均血峰濃度及平均血藥面積均為 glucuronides 之 1.1 倍，如 Table 3-7 所示。顯示 emodin 口服後，主要以 sulfates 及 glucuronides 之結合態代謝物存在於體內，此二種結合態代謝物之比例約為 1 : 1，以 sulfates 稍多，二者於體內之平均滯留時間無差異。血中濃度於口服後 480 分再度上升，顯示口服 emodin 在體內可能有腸肝循環之現象發生。此現象並未於前節口服大黃水煎劑之動力學觀察到。

大白鼠以尾靜脈注射 emodin 溶液(10 mg/kg)後，血中 emodin、 emodin sulfates、 glucuronides 之濃度、個別與平均血藥經時變化圖分別如 Table 3-8,10,12 及 Fig. 5-15~16 所示，各大白鼠間個體差異明顯，各時間點之平均 emodin sulfates 之濃度高於 glucuronides，以 emodin 原形濃度最低。以 WINNONLIN[®]軟體之快速靜脈注射二室體模式(IV bolus 2 compartment model)計算，求出 emodin、 emodin sulfates 及 glucuronides 之藥物動力學參數，其平均藥物分佈半衰期分別為 7.0 ± 0.7 (min)、 23.6 ± 3.0 (min)、 21.3 ± 6.0 (min)，平均藥物排除半衰期分別為 706.3 ± 186.6 (min)、 264.8 ± 41.7 (min)、 312.4 ± 79.2 (min)，平均全身清除率分別為 9.7 ± 1.5 (mL·min⁻¹)、 7.2 ± 1.3 (mL·min⁻¹)、 8.1 ± 1.3 (mL·min⁻¹)、平均血藥面積分別為 1344.2 ± 137.7 (nmol·min·mL⁻¹)、 2160.8 ± 555.5 (nmol·min·mL⁻¹)、 1830.9 ± 447.7 (nmol·min·mL⁻¹)，平均滯

留時間分別為 804.9±226.4 (min)、318.9±55.1 (min)、382.3±92.2 (min) , 如 Table 3-9,11,13 所示。

靜脈給藥後之平均血藥面積以 emodin sulfates 最高，分別為 emodin 及其 glucuronides 之 1.6 及 1.2 倍。可見靜脈給藥後，emodin 主要以 sulfates(佔 40%)及 glucuronides(佔 34%)之結合態代謝物存在於體內，游離態 emodin 最少(佔 25%)。體內之平均滯留時間亦以 emodin 最久，分別為 emodin sulfates 及 emodin glucuronides 之 2.5 及 2.1 倍。此外，藥物之平均排除半衰期亦以 emodin 最久，分別為 emodin sulfates 及 glucuronides 之 2.7 及 2.3 倍，如 Table 3-14 所示。另外為計算生體可用率，再以非室體模式計算其動力學參數，如 Table 3-15 所示，由下列公式計算 Emodin 之絕對生可用率為 86.0 %。

$$\text{Percent absorbed} = \frac{\text{AUC}_{(\text{emodin sulfates} + \text{glucuronides})\text{po}} / \text{Dose}_{\text{po}}}{\frac{\text{AUC}_{(\text{emodin} + \text{emodin sulfates} + \text{glucuronides})\text{iv}}}{\text{Dose}}} \times 100 \%$$

六、大黃、虎杖水煎劑與 emodin 於大白鼠體內對環孢靈動力學之影響

本研究以大白鼠為模型，探討 emodin 及大黃、虎杖水煎劑對環孢靈動力學之影響。大黃及虎杖水煎劑中成分之定量結果如 Table 4-1 所示。大黃水煎劑中之 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 含量分別為 116、985、117、89 $\mu\text{g/g}$ ，虎杖水煎劑中只測得 emodin，其含量為 628 $\mu\text{g/g}$ 。血中之環孢靈濃度以螢光偏極免疫分析法 (Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA) 定量，藉由 TDxFLx 分析儀精確測出藥物之濃度。

為探討 emodin 對環孢靈動力學之影響，以大白鼠進行平行試驗。因本實驗室先前研究顯示，以交叉設計併服 tetraglycol 時，第二次給藥 cyclosporine 之吸收明顯下降，故採用平行試驗法。環孢靈分別併服 tetraglycol/ PEG400 (1:1) emodin 口服溶液[溶於 tetraglycol/ PEG400 (1:1)] 後，其血中環孢靈之濃度及血藥經時變化如 Table 4-2~3 及 Fig. 6-1 所示。環孢靈併服 tetraglycol/PEG400 (1:1)後之平均血藥面積為 $39185.6 \pm 4359.2 \text{ ng min/mL}$ ，平均血峰濃度為 $112.9 \pm 21.4 \text{ ng/mL}$ ；併服 emodin 後之平均血藥面積為 $11948.9 \pm 1174.1 \text{ ng min/mL}$ ，平均血峰濃度為 $32.0 \pm 5.0 \text{ ng/mL}$ 。其動力學參數以 unpaired Student's t-test 分析統計上之差異，結果顯示併服 emodin 後，平均血藥面積降低 69.5 % ($p < 0.001$)，平均血峰濃度降低 71.7 % ($p < 0.01$)，如 Table 4-4 所示。

大黃與虎杖為含 emodin 之中藥。為探討大黃、虎杖水煎劑對環孢靈動力學之影響，隨機以雄性及雌性大白鼠進行交叉試驗。環孢靈分別併服水、大黃水煎劑後，其血中環孢靈之濃度及血藥經時變化如 Table 4-5~6 及 Fig. 6-2~3 所示。

環孢靈併服水後之平均血藥面積為 119005.2 ± 13117.7 ng min/mL，平均血峰濃度為 928.8 ± 108.3 ng/mL；併服大黃水煎劑後之平均血藥面積為 41698.3 ± 9883.9 ng min/mL，平均血峰濃度為 389.7 ± 117.7 ng/mL。其動力學參數以 paired Student's t-test 分析統計上之差異，結果顯示併服大黃水煎劑後，平均血藥面積降低了 65.0 % ($P < 0.01$)，平均血峰濃度降低了 58.0 % ($P < 0.05$)，如 Table 4-8 所示。

環孢靈分別併服水、虎杖水煎劑後，其血中環孢靈之濃度及血藥經時變化如 Table 4-9~10 及 Fig. 6-4~5 所示。環孢靈併服水後之平均血藥面積為 $228,653.9 \pm 16,622.0$ ng min/mL，平均血峰濃度為 785.3 ± 54.4 ng/mL；併服虎杖水煎劑後之平均血藥面積為 $56,367.8 \pm 140,676.7$ ng min/mL，平均血峰濃度為 149.3 ± 39.2 ng/mL。其動力學參數以 paired Student's t-test 分析統計上之差異，結果顯示併服虎杖水煎劑後，平均血藥面積降低了 75.3 % ($p < 0.001$)，平均血峰濃度降低了 80.9 % ($p < 0.001$)，如 Table 4-11 所示。

為更進一步探討大黃水煎劑與環孢靈交互作用之機制，以雌性大白鼠進行交叉試驗。環孢靈溶液 (0.8 mg/kg) 以尾靜脈注射後立即分別併服水、及大黃水煎劑，其血中環孢靈之濃度及血藥經時變化如 Table 4-12~13 及 Fig. 6-6~7 所示。環孢靈併服水後之平均血藥面積為 149.1 ± 12.3 ng min/mL，全身清除率為 1.5 ± 0.2 mL/min；併服大黃水煎劑後之平均血藥面積為 302.3 ± 53.3 ng min/mL，全身清除率為 0.9 ± 0.2 mL/min。其動力學參數以 paired Student's t-test 分析統計上之差異，結果顯示併服大黃水煎劑後，平均血藥面積增加 102.8 % ($p < 0.05$)，平均全身清除率降低 40.6 % ($p < 0.05$)，如

Table 4-14 所示。

比較環孢靈口服及靜脈給藥，分別併服大黃水煎劑之影響，結果顯示併服大黃水煎劑後，環孢靈口服給藥平均血藥面積降低了 50.8%，平均血峰濃度降低了 46.9%；而靜脈給藥平均血藥面積增加 102.8%，平均全身清除率降低 40.6%。綜合以上二個實驗的結果，可以推測大黃水煎劑對口服環孢靈生可用率降低的影響主要是發生在吸收部位，而降低環孢靈全身清除率的影響似遠弱於降低吸收的效應。

本實驗之結果顯示，在環孢靈併服 emodin 或大黃、虎杖水煎劑後，環孢靈之平均血峰濃度及平均血藥面積均明顯較控制組為低，顯示環孢靈之血中濃度或生可用率明顯下降。

有許多體外試驗指出，大黃成分中 rhein、emodin、chrysophanol 會抑制 CYP3A 的活性^[43]，且 rhein 為 MDR1(multidrug resistance-associated protein 1)之受質^[41]。環孢靈為 CYP3A 之受質，也是 P-gp 的受質。當大黃與環孢靈併用時，理應使其血中濃度升高，但本動力學研究之體內試驗結果卻相反。由本研究代謝動力學的結果顯示，大黃之活性成分，aloe-emodine、rhein、emodin、chrysophanol 多以其代謝物 glucuronides 與 sulfates 呈現於血循環中，其中除了 rhein 有原型吸收外，其餘幾無原型，而文獻中之體外試驗係以原型藥物為對象，其結果是否能推論至體內的作用，值得懷疑。建議進行體外試驗的藥理學家，應該多重視這些成分之 glucuronides 與 sulfates 等結合態代謝物之作用。

於預試驗時，原給予 2 g/kg 大黃原生藥的劑量，但環孢靈血中濃度下降得太低而無法偵測，因此給藥劑量降低至 0.25 g/kg。虎杖中之 emodin 含量為大黃的 5.4 倍，若經劑量校正後再比較其交互作用，環孢靈血中濃度下降的程度，虎杖不如大黃，可以推測大黃中其他成分 aloe-emodin, rhein, chrysophanol 等應有協同作用。

基於大黃、虎杖水煎劑及 emodin 對環孢靈的血中濃度影響甚鉅，在此建議接受環孢靈治療之病人應盡量避免併用含大黃、虎杖、emodin 之中藥製劑，以免由於環孢靈濃度降低所造成器官排斥的問題，以確保環孢靈之治療效果。如併用時，則應進行血中濃度監測，調整用藥劑量以確保用藥之療效與病人之安全。

七、大黃素與含大黃素水煎劑對 P-glycoprotein 功能之影響

由於環孢靈為 P-gp 的受質，為進一步探討 emodin 與大黃、虎杖水煎劑影響環孢靈生可用率之機轉，是否與影響腸內 P-gp 之表現或活性有關，乃進行體外翻腸實驗，以 P-gp 特異受質 rhodamine 123 為指標，測定其由漿膜層被運送到黏膜層之動力學，以瞭解 emodin 與大黃、虎杖水煎劑對 P-gp 功能之影響。檢量線係以螢光強度為 Y 軸，rhodamine 123 濃度為 X 軸，作線性迴歸，求得 rhodamine 123 之檢量線方程式為 $Y = 62.3X - 0.1$ ($r^2 = 0.999$)。檢品依據檢量線方程式，求得 rhodamine 123 之濃度，空腸組所得之結果如 Table 5-1~3, 5-7~8 及 Fig. 7-1, 3 所示，迴腸組所得之結果如 Table 5-4~6, 5-9~10 及 Fig. 7-2, 4 所示。

利用 ANOVA 比較對照組與給藥組間之差異，結果顯示大黃、虎杖水煎劑，皆對 P-gp 之外排有抑制作用，emodin 對 P-gp 之外排作用無顯著影響，此一體外試驗之結果無法解釋併服 emodin 與虎杖、大黃水煎劑後，口服環孢靈於體內吸收顯著減少之現象。因此推測此體內交互作用，或與其他 transporters 有關，或另有其他更上游之機轉存在，值得進一步研究。