

第三章 實驗之部

第一節 實驗材料

一、實驗試藥

(一) 購自 Extrasynthese (Genay, France)

Daidzein (大豆? 元)

Diosmetin (香葉木素)

Luteolin (木犀草素)

Sennoside A (番瀉? 甲)

Sennoside B (番瀉? 乙)

(二) 購自 Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI, U.S.A.)

Baicalein (黃芩? 元)

Chrysophanol (大黃酚)

18 β -Glycyrrhetic acid (GA ; 甘草次酸)

Hesperidin (橙皮?)

Rhein (大黃酸)

5, 7-Dimethoxycoumarin

2-Methylantraquinone

(三) 購自 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)

Hydrochloric acid

Potassium dihydrogenphosphate

Wogonin (漢黃芩素)

(四) 購自 Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland)

Daidzin (大豆?)

(五) 購自 Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe Germany)

Emodin (大黃素)

(六) 購自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.)

Aloe-emodin (蘆薈大黃素)

Apigenin (芹菜素)

Genistein (染料木素)

Genistin (染料木?)

Hesperetin (橙皮? 元)

Kaempferol (山奈酚)

Morin (桑色素)

Naringenin (柚皮素)

Naringin (柚皮?)

Puerarin (葛根素)

Quercetin (槲皮素)

Rutin (芸香?)

5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF ; 羥甲基糠醛)

Tetraglycol

Methylparaben

β -Glucosidase

Sulfatase (type H-1)

β -Glucuronidase (type B-1)

(七) 購自 Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)

Paeoniflorin (芍藥?)

(八) 購自 Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany)

N, N-Dimethylacetamide

Dimethylsulfoxide (DMSO)

Polyethylenglycol 400 (PEG 400)

購自 Merck-KGaA (Darmstadt, Germany)

Sodium chloride

Sodium hydroxide

- (九) 購自 J. T. Backer, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
Acetic acid, glacial
- (十) 購自 Mallinckrodt Baker, Inc. (Paris, Kentucky, U.S.A.; LC Grade)
Acetonitrile
Ethyl acetate
Methyl alcohol
- (十一) 購自 BDH (Poole, UK)
Acetonitrile
Methyl alcohol
- (十二) 購自 Riedel-deHaën AG (Seelze, Germany)
L (+) -Ascorbic acid
Phosphoric acid
- (十三) 購自 Kohusan Chemical Works, Ltd. (Kyoto, Japan)
Sodium acetate, anhydrous
- (十四) 購自 Millipore (MA, USA)
Mili-Q
- (十五) 購自東京化成工業株式會社 (Tokyo, Japan ; TCI)
Glycyrrhizin monoammonium salt (甘草酸)
p-Hydroxybenzoic acid n-amyl ester
- (十六) 購自米山藥品工業株式會社 (Osaka, Japan)
Catalpol (梓醇)
- (十七) 其它
Neophellamuretin (黃柏素) 及 phellamurin (黃柏素-7-葡萄
糖?) 由吳天賞教授及陳鴻儀博士所提供
槲皮素硫酸結合態代謝物由謝佩勳同學所提供

3-dehydroglycyrrhetic acid(3-dehydroGA; 3-去氫甘草次酸)

由經總博士提供

二、實驗藥材

(一) 黃芩藥材

係購自台中市欣隆藥行，且生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩係採用同一批藥材自行炮製。

(二) 北大黃藥材

係由勝昌製藥廠股份有限公司所提供。

(三) 白芍藥材

係由生春堂製藥工業股份有限公司所提供。

(四) 槐花藥材

係購自台中市欣隆藥行。

(五) 洋蔥

係購自台中市傳統市場。

三、器材及儀器設備

(一) 微量移液管 Pipetman 20-200, 100-1000 μ L

Gilson S.A.S. (Entrepreneurs, Villiers Le Bel, France)

(二) 微量吸管尖 20-200 μ L, 100-1000 μ L

Gilson S.A.S. (Entrepreneurs, Villiers Le Bel, France)

(三) 拋棄式注射針及針筒 1.0 mL Syringe (0.45 \times 13mm)

Terumo Medical Corporation (Elkton, MD, U.S.A.)

(四) 微量離心管 (1.7 mL)

Axygen Scientific, Inc. (Union city, CA, U. S. A.)

(五) 胃管 (0.9 L \times 70 mm)

晶龍科技儀器有限公司 (Taiwan)

- (六) 血清塞
弘光企業有限公司 (Taiwan)
- (七) Quality Solid Phase Extraction Products (SPE, Strata™)
Strata 50 μm, Tri-Func., C₈ (Phenomenex® , U.S.A.)
- (八) 控溫往復式震盪水槽 BT-350
Yih Der Instruments Co, Ltd. (Taiwan)
- (九) 高速離心機 (Z200 M / H)
Hermle (Germany)
- (十) 電子天平 AB 104
Mettler Toledo (Switzerland)
- (十一) 吹氮氣濃縮機 N-EVAP 112
Organomation Associates Inc. (Berlin, MA, U.S.A.)
- (十二) 酸鹼測定儀 Microprocessor pH-mV meter
Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG
(Weilheim, Germany)
- (十三) 超音波震盪器 Branson 8210 R-MT
Branson ultrasonics Co. (Taiwan)
- (十四) 渦旋震盪器 Vortex Genie (G-560)
Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY, U.S.A.)
- (十五) 高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography ;
HPLC)
1. 幫浦 HITACHI L-6200 pump (Japan)
光電二極體陣列檢出器 HITACHI L-3000 Photo Diode Array
Detector (Japan)
自動進樣器 SHIMADZU SIL 9A autosampler (Japan)

2. 幫浦 SHIMADZU LC-10AT (Japan)

紫外光檢出器 SHIMADZU UV-VIS detector SPD-10A vp

自動進樣器 PERKIN ELMER autosampler series 200 (U.S.A.)

3. Agilent 1100 series

幫浦 G1311A QuatPump

紫外光檢出器 G1315B DAD

自動進樣器 G1329A ALS

除氣裝置 G1322A DEGASSER

管柱控溫裝置 G1316A COLCOM

(十六) 液相層析串聯式質譜儀 (LC/MS/MS)

液相層析儀 Waters 2690 Alliance LC & 996 PDA with Automatic
Liquid Sampler and Injector

串聯式質譜儀 Micromass Quattro Ultima LC/MS/MS

數據處理軟體 Masslynx NT Quattro Data Acquisition

(十七) 核磁共振儀 Bruker Advance DPX-200 FT-NMR Spectrometer

四、實驗動物

- | | |
|--------------------------|------------|
| (一) Sprague-Dawley 大白鼠 | 中國醫藥學院動物中心 |
| (二) 紐西蘭白兔 | 中國醫藥學院動物中心 |
| (三) BALB/c 小白鼠 | 台灣大學動物中心 |
| (四) Yorkshire pig | 台灣動物科技研究所 |

五、溶液製備

(一) 人工腸液之製備

取磷酸二氫鉀 6.8 g 溶於 250 mL 水中，再加入 0.2 N 氫氧化
鈉溶液 190 mL 及水 400 mL，用 0.2 N 氫氧化鈉溶液調節 pH 至

7.5 ± 0.1 後，加水至 1 L。

(二) 人工胃液之製備

取氯化鈉 2 g 先以少量水完全溶解後，再加入稀鹽酸 24 mL (取濃鹽酸 234 mL，加水配製成 1 L)，混勻後再加水至 1L。

(三) 糞便懸浮液之製備

取未進行實驗之動物所排遺的新鮮糞便，加入人工腸液，以 1 : 3 之比例混合後利用攪拌器打碎混勻，再以紗布過濾後備用。

(四) 緩衝液 (pH 5.0)

取 0.1N 醋酸鈉溶液 68 mL，加入 0.1 N 醋酸溶液至 100 mL，再加 1 N 氫氧化鈉將 pH 值調至 5.0 ± 0.1。

0.1N 醋酸鈉溶液：稱取無水醋酸鈉 0.82 g，加水溶解至 100 mL。

0.1N 醋酸溶液：量取醋酸 0.6 mL (d = 1.049)，加水至 100mL。

第二節 實驗方法

一、黃酮類化合物受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

(一)、藥物溶液之製備

1. 黃酮? 化合物標準溶液

分別精確稱取 hesperidin、rutin、naringin 及 phellamurin，各以甲醇為溶媒，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之標準溶液。

2. 異黃酮? 化合物標準溶液

分別精確稱取 puerarin、genistin 及 daidzin，各以甲醇為溶媒，配製成濃度分別為 1.0、1.0 及 0.75 mg/mL 之標準溶液。

3. 黃酮? 元化合物標準溶液

分別精確稱取 wogonin、diosmetin、hesperetin、baicalein、morin、genistein、daidzein、quercetin、naringenin、luteolin、kaempferol、neophellamuretin 及 apigenin，各以甲醇為溶媒，配製成濃度為 500.0 µg/mL 之標準溶液。

4. 5, 7-Dimethoxycoumarin 內部標準品溶液

精確稱取 5, 7-dimethoxycoumarin 5.0 mg，先以乙酸乙酯溶解後，再定容至 200 mL，使其最終濃度成為 25.0 µg/mL。

(二)、分析樣品之製備與反應

1. 黃酮? 受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

分別取上述配製好之 4 種黃酮? 化合物標準溶液 (1.0 mg/mL) 各 1.08 mL，各加入 9.72 mL 之白兔糞便懸浮液，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 µL 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、2、4 及 8 小時，取出每種黃酮? 化合物各 3 管，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

另外再將白兔糞便懸浮液改以大白鼠或人糞便懸浮液取代，其餘之操作步驟均相同。此外，黃酮? 化合物之空白實驗組

則是將糞便溶液改以人工胃液取代，其餘之操作步驟均相同。

2. 異黃酮？受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

分別取上述配製好之 3 種異黃酮？化合物標準溶液各 1.08 mL，各加入白兔糞便懸浮液 9.72 mL，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、2、4 及 8 小時，於每組各取 3 管，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

另外一組實驗則將白兔糞便懸浮液改以大白鼠糞便懸浮液，其餘之操作步驟均相同。其中，puerarin 另以人糞便懸浮液進行反應，取 puerarin 標準溶液 1.38 mL，與人糞便懸浮液 12.42 mL 充分混合，其反應之時間點為 1、2、4、8、12 及 24 小時，其餘之操作步驟均與白兔、大白鼠糞便懸浮液相同。

3. 黃酮？元受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

分別取上述配製之 12 種黃酮？元化合物標準溶液（500.0 μ g/mL）各 1.08 mL，各加入白兔糞便懸浮液 9.72 mL，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、4、8 及 24 小時，取出每種黃酮？元化合物各 3 管，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

另外再將白兔糞便懸浮液改以大白鼠或人糞便懸浮液取代，其餘之操作步驟均相同。此外，黃酮？元化合物之空白實驗組則是將糞便溶液改以人工腸液取代，其餘之操作步驟均相同。

（三）、檢品分析

將上述白兔、大白鼠、人糞便懸浮液及空白實驗組之檢品解凍後，分別加入 0.1 N 鹽酸溶液 100 μ L 及乙酸乙酯 700 μ L（含 25.0 μ g/mL 5, 7-dimethoxycoumarin），經試管震盪器震盪 10 秒

後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL 以超音波震盪器震盪使之完全溶解。並再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

(四)、高效液相層析之分析條件

1. 黃酮? 及黃酮? 元受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

儀器：如器材及儀器設備 (十五) 之 1

分析管柱：Cosmosil 5C₁₈ - AR II, 5 μm , 4.6 \times 150 mm

保護管柱：MetaGuard 4.6 mm Polaris 5 μ C₁₈ - A

流速：1 mL/min

檢測波長：254 nm

內部標準品：5, 7-Dimethoxycoumarin

移動相：0.1% H₃PO₄ --- A CH₃CN --- B

Incubation medium	Ratio (A/B) of mobile phase
Artificial intestinal juice	68/32
Artificial gastric juice	
Rabbit feces	68/32
Rat feces	72/28

		Timetable						
Adult feces	min	0-5	15	30	40	50	60	
	ratio	72/28	76/24	65/35	72/28	60/40	72/28	

2. 異黃酮? 受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

儀器：如器材及儀器設備 (十五) 之 3

分析管柱：Inertsil ODS-2, 5 μm , 4.6 \times 250 mm

保護管柱：Inertsil ODS-2, 5 μm , 4.6 \times 33 mm

移動相：0.1% H₃PO₄ : CH₃CN = 66 : 34

流速：1 mL/min

檢測波長：254 nm

內部標準品：5, 7-Dimethoxycoumarin

(五)、數據處理

1. 黃酮? 受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

Hesperidin、rutin、naringin 及 phellamurin 於糞便懸浮液中會轉變成 hesperetin、naringenin、quercetin 及 neophellamuretin，將此四種化合物分析所得之波峰面積分別與內部標準品之波峰面積先求得一比值，再利用單點濃度換算即可求得此些化合物於糞便懸浮液中之轉變程度。

2. 異黃酮? 受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

將檢品分析所得之 daidzein 及 genistein 波峰面積分別與內部標準品之波峰面積先求得一比值，再利用單點濃度換算，即可求得 daidzein 及 genistein 於糞便懸浮液中轉變成 daidzein 及 genistein 之程度。

3. 黃酮? 元受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

取上述檢品各 10 μ L 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之 12 種黃酮? 元化合物分別與內部標準品之波峰面積先求得一比值，將 0 小時之面積比設定為 100 %，即可將其餘之時間點之面積比轉換成百分比，再與時間作圖，而得知其變化情形。

二、梓醇之循環前代謝及於鼠體內之代謝動力學

(一) 藥物溶液之製備

1. Catalpol 標準溶液

精確稱取 catalpol，以水為溶媒，配製成濃度為 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 之標準溶液。

2. β -Glucosidase 溶液

取 β -glucosidase(14 units/mg , 1 $\mu\text{mole/unit}$) 15.0 mg，以 pH 5.0 緩衝液溶解使成 5 mL，貯存於 -30°C 備用。

3. Sulfatase 溶液

取 sulfatase(20,000 units/g , type H-1) 40.0 mg，以 pH 5.0 緩衝液溶解使成 8 mL，貯存於 -30°C 備用。

4. HMF 內部標準品溶液

精確稱取 HMF，先以少量甲醇溶解後，配製成濃度為 750.0 $\mu\text{g/mL}$ 之內部標準品溶液。

(二) Catalpol 之安定性試驗

1. 分析樣品之製備與反應

取上述濃度為 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 之 catalpol 標準溶液，進行下列三組反應：

(1) 取 catalpol 標準溶液 100 μL ，加入水 100 μL ，以試管震盪器混勻，當作空白試驗組。

(2) 取 catalpol 標準溶液 1.4 mL，加入水 1.4 mL，以試管震盪器混勻後，用微量分注器取混合液 200 μL 置於微量試管中，再置於 100 $^\circ\text{C}$ 水鍋中加熱，令其反應，並於 1、2、3 及 4 小時各取 3 管，立即貯存於 -30°C 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

(3) 取 catalpol 標準溶液 2.2 mL，加入人工胃液 2.2 mL，以試管震盪器混勻後，用微量分注器取混合液 200 μL 置於微量

試管中，再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 5、10、30、60、120、180 及 240 分鐘各取 3 管，立即貯存於 -30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

2. 檢品分析

將上述檢品解凍後，各取 135 μL ，分別加入 750.0 $\mu\text{g/mL}$ HMF 內部標準品溶液 15 μL ，以試管震盪器震盪 10 秒後，再以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

3. 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備（十五）之 1

分析管柱：Cosmosil 5C₁₈ - AR II，5 μm ，4.6 \times 150 mm

保護管柱：MetaGuard 4.6 mm Polaris 5 μ C₁₈ - A

移動相：0.1% H₃PO₄：CH₃CN = 98：2

流速：1 mL/min

檢測波長：203 nm

內部標準品：HMF

4. 數據處理

取上述檢品 10 μL 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之波峰面積與內部標準品之波峰面積求得比值，即可求得 catalpol 於熱水及人工胃液中之變化情形。

（三）Catalpol 衍生物之製備

1. 稱取 catalpol 5.0 mg，先以水 200 μL 溶解後，加入 pH 5.0 緩衝液（含 3 mg 之 β -glucosidase）200 μL ，以試管震盪器混勻後，置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應 2 小時。取其中之 50 μL 加入水 150 μL ，混勻後，再以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，取上清液，利用液相層析串聯式質譜儀進行分子量分析。

2. 液相層析串聯式質譜儀之分析條件

儀器：如器材及儀器設備（十六）

分析管柱：LiChrospher[®] 100, RP-18e, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm

移動相：0.1% H₃PO₄ : CH₃CN = 99 : 1

流速：0.5 mL/min

檢測波長：203 nm

毛細管電壓（Capillary voltage）：2.5 kV

進樣圓錐口電壓（Cone voltage）：60 V

碰撞能量（Collision energy）：5 eV

離子源溫度（Source temperature）：80

溶媒揮散溫度（Desolvation temperature）：250

（四）、大白鼠與小白鼠口服 catalpol 之代謝動力學研究

1. 動物實驗 - Sprague-Dawley 大白鼠

經由胃管投予 catalpol 溶液（50 mg/kg），於投藥後 5、30、60、120、240、360、480 及 1440 分鐘後由老鼠之心臟採血（0.7 mL）。將所採得之血樣檢品以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，取上層血清，貯存於-30 冷凍櫃中待 HPLC 分析。

2. 動物實驗 - BALB/c 小白鼠

經由胃管投予 catalpol 溶液（100 mg/kg），於投藥後 5 及 10 分鐘後由老鼠之心臟採血（0.5 mL），將所採得之血樣檢品以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，取上層血清，貯存於-30 冷凍櫃中待 HPLC 分析。

3. 分析樣品之製備與分析

（1）取上述血清檢品 200 μ L 置於棕色試管中，加入甲醇 800 μ L，以試管震盪器震盪 10 秒後，以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，取上清液，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μ L 使之完全溶解。並再一次以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

(2) 取上述血清檢品 200 μL ，加入 sulfatase (100.0 units/mL) 100 μL ，混勻後再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應 2 小時後，加入甲醇溶液 800 μL ，以試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取上清液用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL 使之完全溶解。並再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

4. 高效液相層析之分析條件

儀 器：如器材及儀器設備 (十五) 之 3

分析管柱：Inertsil ODS-II, 5 μm , 4.6 \times 250 mm

保護管柱：Inertsil ODS-II, 5 μm , 4.0 \times 33 mm

移 動 相：0.1% H_3PO_4 : CH_3CN = 99 : 1

流 速：1 mL/min

檢測波長：203 nm

三、白芍水煎劑於大白鼠體內之代謝動力學以及芍藥? 受白兔、大白鼠、豬及人糞便細菌之作用

(一)、Paeoniflorigenin 之製備

1. 藥物溶液之製備

(1) β -Glucosidase 溶液

稱取 β -glucosidase (14 units/mg , 1 μ mole/unit) 75 mg , 以 pH 5.0 緩衝液溶解使成 5 mL , 貯存於-30 備用。

2. 製備方法

稱取 paeoniflorin 20.0 mg , 先以 2 滴之 DMSO 溶解 , 加入 pH 5.0 緩衝液(含 15 mg 之 β -glucosidase)1 mL , 混勻後置於 37 水浴槽中 , 以 100 rpm 振搖 , 令其反應 5 小時。再加入等體積之乙酸乙酯 , 以試管震盪器震盪 10 秒後 , 以 $9,860 \times g$ 高速離心 5 分鐘。取乙酸乙酯層 , 下層再加入乙酸乙酯 , 重複此步驟共 3 次。合併所有之乙酸乙酯層 , 用氮氣吹乾後 , 利用再結晶將之純化後 , 以核磁共振儀及液相層析串聯式質譜儀進行結構鑑定。

3. 液相層析串聯式質譜儀之分析條件

儀 器 : 如器材及儀器設備 (十六)

分析管柱 : LiChrospher[®] 100 , RP-18e , 5 μ m , 4.6 \times 250 mm

移 動 相 : 0.1% H₃PO₄ : CH₃CN = 85 : 15

流 速 : 0.5 mL/min

檢測波長 : 230 nm

毛細管電壓 (Capillary voltage) : 3 kV

進樣圓錐口電壓 (Cone voltage) : 80 V

碰撞能量 (Collision energy) : 25 eV

離子源溫度 (Source temperature) : 100

溶媒揮散溫度 (Desolvation temperature) : 250

(二) 白芍水煎劑中芍藥? 於大白鼠體內之代謝動力學

1. 藥物溶液之製備

(1) 白芍水煎劑檢品

稱取未炮製過之白芍藥材 60 g，加入 20 倍水 (1200 mL) 於室溫下浸泡 30 分鐘使之浸潤後，置於瓦斯爐上加熱，慢慢使之沸騰至體積略少於 150 mL，以紗布趁熱過濾，待冷卻後，再加水至 150 mL。

(2) Paeoniflorin 標準溶液

精確稱取 paeoniflorin 1.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 2.0 mL，使其濃度成為 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

(3) Methylparaben 內部標準品溶液

(a) 精確稱取 methylparaben 10.3 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 10.0 mL，使其濃度成為 1.03 mg/mL。

(b) 精確稱取 methylparaben 2.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 100 mL。取上述溶液 10 mL，再以甲醇定容至 200 mL，使其濃度成為 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2. 白芍水煎劑中 paeoniflorin 之定量及酸水解

(1) 分析檢品之製備

(a) 取上述之白芍水煎劑檢品 100 mL，將之置於瓦斯爐上以小火慢慢煮沸，並濃縮至 25 mL。取此濃縮液 125 μL ，加入內部標準品溶液 0.5 mL，再以 70% 甲醇定容至 5 mL，將此溶液以微孔濾膜 (0.45 μm) 過濾，即可以 HPLC 分析。

(b) 取上述之白芍水煎劑檢品 1.5 mL，加入 2.4 N HCl 0.5 mL，混勻後置於 80 $^{\circ}\text{C}$ 水鍋中加熱反應 2 小時。待冷卻後，取 0.9 mL 加入 methylparaben 標準品溶液 (1.03 mg/mL) 100 μL ，將此溶液以微孔濾膜 (0.45 μm) 過濾，即可以 HPLC 分析。另空白實驗組則是將 2.4 N HCl 改以水取代，其餘之操作步驟均相同。

(2) 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備（十五）之 1

分析管柱：Cosmosil 5C₁₈ - AR II, 5 μm, 4.6 × 150 mm

保護管柱：MetaGuard 4.6 mm Polaris 5 μ C₁₈ - A

移動相：0.1% H₃PO₄ : CH₃CN = 85 : 15

流速：1 mL/min

檢測波長：230 nm

內部標準品：Methylparaben

(3) 檢量線之繪製

精確稱取 paeoniflorin 5.0 mg, 以適量之甲醇使之完全溶解後, 再加甲醇定容至 10.0 mL, 用來當作儲備溶液。取適量儲備溶液用甲醇稀釋, 並加入適量內部標準品溶液, 使此系列標準溶液之濃度為 500.0、200.0、100.0、50.0 及 25.0 μg/mL, 而內部標準品溶液之最終濃度為 103.0 μg/mL。經 HPLC 分析, 將分析所得之 paeoniflorin 與內部標準品之波峰面積比值, 分別與其濃度進行線性迴歸, 即可求得檢量線方程式。

(4) 數據處理

取上述二種藥材水煎劑之檢品各 10 μL 注入 HPLC 分析, 以檢品中 paeoniflorin 與內部標準品之波峰面積比值, 帶入檢量線之方程式, 即可求出白芍水煎劑檢品中 paeoniflorin 之含量。

3. 白芍水煎劑中 paeoniflorin 於大白鼠體內之代謝動力學

(1) 血清標準溶液之製備

取適量之 paeoniflorin 標準溶液, 以甲醇稀釋定容, 製備成 125.0、62.5、31.2、15.6、7.8、3.9 及 2.0 μg/mL 七種濃度之標準溶液。各取 paeoniflorin 標準溶液 100 μL, 加入空白血清 900 μL, 製備成血清標準溶液, 濃度分別為 12.50、6.25、3.12、1.56、0.78、0.39 及 0.20 μg/mL。

(2) 檢量線之繪製

取血清標準溶液 200 μL ，加入甲醇（含 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methylparaben）800 μL ，以試管震盪器震盪 10 秒後，於 $9,860 \times \text{g}$ 高速離心 15 分鐘，取上清液，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL 使之完全溶解。並再一次以 $9,860 \times \text{g}$ 高速離心 15 分鐘，取 20 μL 供 HPLC 分析。

(3) 給藥方法與採血

(a) 動物

選用 Sprague-Dawley 大白鼠六隻，體重介於 250~350 g，實驗前先禁食 12 小時。

(b) 給藥

依大白鼠體重，經胃管灌食給予白芍水煎劑（13.8 g 原生藥/公斤，相當於含 paeoniflorin 110.9 mg/kg）。

(c) 採血

於給藥後 5、10、30、60、180、300、420 及 540 分鐘後，以心臟穿刺方式採血 0.5 mL。將所採得之血樣檢品以 $9,860 \times \text{g}$ 高速離心 15 分鐘，取上層血清，貯存於 -30 冷凍櫃中俟後分析。

(4) 血清檢品前處理方法之探討

(a) 取上述血清檢品 200 μL 置於棕色試管中，加入乙酸乙酯 200 μL ，以試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times \text{g}$ 高速離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL 使之完全溶解。並再一次以 $9,860 \times \text{g}$ 高速離心 15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

(b) 取上述血清檢品 200 μL ，加甲醇溶液（含 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methylparaben）800 μL ，以試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times \text{g}$ 高速離心 15 分鐘，取上清液用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL 使之完全溶解。並再一次以 $9,860 \times \text{g}$ 高速離心

15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

(c) 取上述血清檢品 100 μL ，加入 sulfatase (100.0 units/mL) 100 μL ，混勻後再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應 2 小時後，加入甲醇溶液 (含 1.0 $\mu\text{g/mL}$ methylparaben) 400 μL ，以試管振盪器振盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取上清液用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL 使之完全溶解，並再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

另一組對照實驗則是將 sulfatase 改以水來取代，其餘步驟均相同。

(5) 血清檢品之前處理及分析

本實驗係採用上述 (4) - (b) 之方法進行血清檢品之前處理。

(6) 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備 (十五) 之 3

分析管柱：Inertsil ODS-2, 5 μm , 4.6 \times 250 mm

保護管柱：Inertsil ODS-2, 5 μm , 4.6 \times 33 mm

移動相：0.1% H_3PO_4 : CH_3CN = 75 : 25

流速：1 mL/min

檢測波長：230 nm

內標準品：Methylparaben

(7) 分析系統及方法之確效

(a) 精密度 (Precision)

將各濃度之血清標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得之檢量線方程式，求得每次的實測濃度值。以三次同日內及三次異日間實測濃度分別求其平均值 (mean) 標準偏差 (standard deviation, S.D.) 及變異係數 (coefficient of variation, C.V.)。

(b) 靈敏度 (Sensitivity)

將 paeoniflorin 標準品濃度一再稀釋，直至其波峰與雜訊之比值為 3 時之濃度為其最低偵測極限 (LLOD, lowest limit of detection)。

(c) 準確度 (Accuracy)

三次同日內及三次異日間實測所得平均濃度與真正濃度間之相對誤差 (relative error) 表示之。

(d) 回收率 (Recovery)

將 paeoniflorin 標準品溶液，加入空白血清及水中，分別製備成 12.50、3.12 及 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 高、中、低三種濃度溶液，檢品之處理同上述 (4)-(b) 所述，經 HPLC 定量各溶液中 paeoniflorin 之濃度，將血清中所測得之濃度除以對應濃度水溶液中所測得之濃度，即為回收率。

(8) 數據分析

使用 WINNONLIN[®] (version 3.0; Pharsight Corp., U.S.A.) 及 Excel (Microsoft (R) Excel97 SR2) 等軟體處理數據，採用非室體模式 (noncompartment model) 計算動力學參數。

(三) 芍藥? 受白兔、大白鼠、豬及人糞便細菌之作用

1. 藥物溶液之製備

(1) Paeoniflorin 標準溶液

精確稱取 paeoniflorin，以甲醇為溶媒，配製成 1.0 mg/mL 之標準溶液。

(2) Methylparaben 內部標準品溶液

精確稱取 methylparaben 5.0 mg ，先以少量乙酸乙酯溶解後，再定容至 200 mL ，使其最終濃度為 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2. 分析樣品之製備與反應

取 paeoniflorin 標準溶液 (1.0 mg/mL) 1.38 mL ，加入白兔糞便懸

浮液 12.42 mL，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、2、4、8、12 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

另外三組實驗則將白兔糞便懸浮液改以大白鼠、豬及人糞便懸浮液，其餘之操作步驟均相同。

3. 檢品分析

將上述白兔、大白鼠、豬及人糞便懸浮液之檢品解凍後，加入乙酸乙酯（含 25.0 μ g/mL methylparaben）600 μ L，以試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μ L 使之完全溶解。並再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

4. 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備（十五）之 1

分析管柱：Cosmosil 5C₁₈ – AR II，5 μ m，4.6 \times 150 mm

保護管柱：MetaGuard 4.6 mm Polaris 5 μ C₁₈ – A

移動相：0.1% H₃PO₄：CH₃CN = 85：15

流速：1 mL/min

檢測波長：230 nm

內部標準品：Methylparaben

5. 數據處理

取上述檢品 10 μ L 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之 paeonifloragenin 波峰面積與內部標準品之波峰面積求得比值，即可得知 paeonifloragenin 於白兔、大白鼠、豬及人糞便懸浮液中之變化情形。

四、洋蔥原汁、槐花浸劑中槲皮素配醣體受糞便細菌代謝之比較

(一) 藥物溶液之製備

1. 洋蔥原汁檢品

自市場購得之洋蔥，將其外皮撥除後切片，直接以果汁機壓榨而得之原汁。

2. 槐花浸劑檢品

稱取槐花藥材 10.0 g，加入熱水 900 mL，於室溫下浸泡 1 小時 30 分鐘，待冷卻後，再加水至 1 L。

3. Quercetin 儲備溶液

分別精確稱取 quercetin 2.0 及 10.0 mg，各自先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 10 mL，分別配製成濃度為 0.2 及 1.0 mg/mL 之儲備溶液。

4. 6, 7-Dimethoxycoumarin 內部標準品溶液

(1) 精確稱取 6, 7-dimethoxycoumarin 1.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 50 mL，配製成濃度為 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 之內部標準品溶液。

(2) 精確稱取 6, 7-dimethoxycoumarin 1.0 mg，先以少量乙酸乙酯溶解後，再以乙酸乙酯定容至 10 mL。取上述溶液 2 mL，再以乙酸乙酯定容至 100 mL，配製成濃度為 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 之內部標準品溶液。

5. L (+) - Ascorbic acid 溶液

稱取 L (+) - ascorbic acid 200 mg，先以少量水溶解後，再加水至 1 mL，配製成濃度為 200 mg/mL 之溶液。

6. 1.2 N 鹽酸溶液

取濃鹽酸 11.4 mL，加水稀釋至 100 mL。

(二) 洋蔥原汁及槐花浸劑中槲皮素配醣體之定量分析

1. 洋蔥原汁及槐花浸劑之酸水解條件之探討

(1) 取上述洋蔥原汁，進行下列三組反應：

(a) 取洋蔥原汁 1.5 mL，加入水 2.5 mL，以試管震盪器混勻，

當作空白試驗組。

(b) 取洋蔥原汁 1.5 mL，加入水 0.5 mL，再加入 1.2 N 鹽酸溶液 2 mL，以試管震盪器混勻後，用微量分注器取 2.0 mL 混合液置於棕色磨砂玻璃試管中，塞以瓶蓋，置於水鍋中以 80 加熱 1 及 2 小時後，取出，放冷。

(c) 取洋蔥原汁 1.5 mL，將之分成三小組；

c-1：加入 L (+) - ascorbic acid 100 mg

c-2：加入 L (+) - ascorbic acid 50 mg

c-3：加入 L (+) - ascorbic acid 20 mg

然後此三組分別加入 1.2 N 鹽酸溶液 2 mL，以試管震盪器混勻後，用微量分注器取混合液 2.0 mL 置於棕色磨砂玻璃試管中，塞以瓶蓋，置於水鍋中以 80 加熱 2 小時後，取出，放冷。

除此之外，以「(c) 組」之「c-2 小組」條件來做水解時間之探討，即將 c-2 小組置於 80 水鍋中反應 1 小時即可。

(2) 取上述槐花浸劑，稀釋 10 倍後，進行下列二組反應：

(a) 取槐花浸劑 1.5 mL，加水 2.5 mL，以試管震盪器混勻，當作空白試驗組。

(b) 取槐花浸劑 1.5 mL，加 L (+) - ascorbic acid 0.1 mL，再加水 0.4 mL 及 1.2 N 鹽酸溶液 2 mL，以試管震盪器混勻後，用微量分注器取混合液 2.0 mL 置於棕色磨砂玻璃試管中，塞以瓶蓋，置於水鍋中以 80 加熱 1 及 2 小時後，取出，放冷。

2. 檢品分析

待上述檢品冷卻後，分別加入 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6, 7-dimethoxy-coumarin 內部標準品溶液 2.0 mL，以試管震盪器震盪 10 秒後，以微孔濾膜 (0.45 μm) 過濾後，即可供 HPLC 分析。

3. 檢量線之繪製

取上述配製之 quercetin (0.2 mg/mL) 儲備溶液來進行檢量線標準溶液之製備。

取適量貯存溶液用甲醇稀釋，並加入適量內部標準品溶液，使此系列標準溶液之濃度為 40.0、 20.0、 10.0、 5.0、 2.5、 1.2 及 0.6 $\mu\text{g/mL}$ ，而內部標準品溶液之最終濃度為 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。經 HPLC 分析，將分析所得之 quercetin 與內部標準品之波峰面積比值，分別與其濃度進行線性迴歸，即可求得檢量線方程式。

4. 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備 (十五) 之 2

分析管柱：Cosmosil 5C₁₈ – AR II，5 μm ，4.6 \times 150 mm

移動相：0.1% H₃PO₄：CH₃CN = 74：26

流速：1 mL/min

檢測波長：350 nm

內部標準品：6, 7-Dimethoxycoumarin

5. 數據處理

取上述檢品 10 μL 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之波峰面積與內部標準品之波峰面積求得比值代入 quercetin 之檢量線方程式，即可求得水解後檢品中 quercetin 之含量。

(三) 洋蔥原汁及槐花浸劑受人及大白鼠糞便細菌之代謝

1. 人及大白鼠糞便標準溶液之製備

取上述配製之 quercetin (1.0 mg/mL) 之儲備溶液來進行標準溶液之製備。

取適量標準溶液，以甲醇稀釋使系列標準溶液之濃度為 400.0、 200.0、 100.0、 50.0、 25.0、 12.5、 6.2、 3.1 及 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

分別取上述各濃度之標準溶液 60 μL ，加至 540 μL 之人或大白鼠糞便懸浮液中，製備成濃度為 40.0、 20.0、 10.0、 5.0、 2.5、 1.2、 0.6、 0.3 及 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 之人或大白鼠糞便標準溶液。

2. 檢量線之繪製

將上述各種不同濃度之人及大白鼠糞便標準溶液 600 μL ，加入 0.1 N 鹽酸 100 μL ，混勻，再以乙酸乙酯（含 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6,7-dimethoxycoumarin）700 μL 萃取，用試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL ，於超音波震盪器震盪，使之完全溶解後，再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取 10 μL 供 HPLC 分析。

將分析所得之 quercetin 與內部標準品之波峰面積比值，分別與其濃度進行線性迴歸，即可求得檢量線方程式。

3. 分析樣品之製備與反應

分別取上述洋蔥原汁及槐花浸劑檢品 1.38 mL，各自加入成人糞便懸浮液 12.42 mL，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μL 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於 -30°C 冷凍櫃中，其餘再置於 37°C 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、2、4、8、12 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於 -30°C 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

另外再將成人糞便懸浮液改以大白鼠糞便懸浮液取代，其餘之操作步驟均相同。

4. 檢品分析

將上述成人及大白鼠糞便懸浮液檢品解凍後，加入 0.1 N 鹽酸 100 μL ，混勻，再以乙酸乙酯（含 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6,7-dimethoxycoumarin）700 μL 萃取，用試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL ，於超音波震盪器震盪，使之完全溶解後，再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取 10 μL 供 HPLC 分析。

5. 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備（十五）之 1

分析管柱：Cosmosil 5C18-AR II, 5 μm , 4.6 \times 150 mm

保護管柱：MetaGuard 4.6 mm Polaris 5 μ C₁₈ - A

移動相：0.1% H₃PO₄ : CH₃CN = 72 : 28

流速：1.0 mL/min

檢測波長：350 nm

內部標準品：6, 7-Dimethoxycoumarin

6. 分析系統及方法之確效

（a）精密度（Precision）

將不同濃度之成人及大白鼠糞便標準溶液，分別於同日內晨、午、晚及連續三日之異日間各進行分析，並以獲得之線性迴歸方程式求得每次之實測濃度。以三次同日內及三次異日間實測濃度分別求其平均值（mean）標準偏差（standard deviation；S.D.）及變異係數（coefficient of variation；C.V.）。

（b）準確度（Accuracy）

以三次同日內及三次異日間實驗所得之平均濃度與理論濃度之相對誤差（relative error；R.E.）表示之。

7. 數據處理

取上述檢品 10 μL 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之 quercetin 波峰面積分別與內部標準品之波峰面積求得比值，帶入各自之檢量線方程式，即可求得洋蔥原汁及槐花浸劑檢品於人及大白鼠糞便溶液中 quercetin 之濃度。

五、槲皮素硫酸結合態代謝物受人及大白鼠糞便細菌之代謝

(一) 藥物溶液之製備

1. Quercetin 標準溶液

稱取 quercetin 505 mg，加入 PEG 400/1, 2-propanediol (1:1) 5 mL 使之完全溶解後，以微孔濾膜 (0.2 μm) 過濾，配製成濃度為 101.0 mg/mL 之標準溶液。

2. Sulfatase 溶液

取 sulfatase (20,000 units/g, type H-1) 40 mg，以 pH 5.0 緩衝液溶解使成 8 mL，貯存於-30 備用。

3. β -Glucuronidase 溶液

取 glucuronidase (2,440,000 units/g) 20 mg，以 pH 5.0 緩衝液溶解使成 50 mL，貯存於-30 備用。

4. 6, 7-Dimethoxycoumarin 內部標準品溶液

精確稱取 6, 7-dimethoxycoumarin 1.0 mg，先以少量乙酸乙酯溶解後，再以乙酸乙酯定容至 10 mL。取上述溶液 2 mL，再以乙酸乙酯定容至 100 mL，配製成濃度為 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 之內部標準品溶液。

5. L (+) - Ascorbic acid 溶液

稱取 L (+) - ascorbic acid 150 mg，先以少量水溶解後，再加水至 1.0 mL，配製成濃度為 150 mg/mL 之溶液。

(二) 槲皮素結合態代謝物之製備

將紐西蘭白兔投予 quercetin 標準溶液 (25 mg/kg)，而後由耳靜脈採血。將所採得之血樣檢品以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取上層血清。將上述血清檢品，加甲醇溶液去蛋白，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取上清液以減壓濃縮機濃縮乾後，加入少量蒸餾水使之完全溶解後，再以 SPE (C_8) 為固定相，水為沖提液進行分離收集。

各取上述沖提液 200 μL ，分成 A 及 B 二組來水解。A 組加入 sulfatase 100 μL 及 L (+) - ascorbic acid 溶液 50 μL ，再置於 37

水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應 2 小時。B 組加入 β -glucuronidase 100 μ L 及 L (+) - ascorbic acid 50 μ L 溶液，再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應 4 小時。

上述檢品待反應完後，加入 0.1 N 鹽酸 50 μ L，混勻，再以乙酸乙酯（含 2.0 μ g/mL 6, 7-dimethoxycoumarin）400 μ L 萃取，用試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μ L，於超音波震盪器震盪，使之完全溶解後，再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取 10 μ L 供 HPLC 分析。

（三）、分析樣品之製備與反應

取槲皮素結合態代謝物加入少量蒸餾水，於超音波震盪器中震盪使之完全溶解，使槲皮素結合態代謝物中 sulfates 及 glucuronides 的含量分別為 68.0 及 3.5 μ g，以此做為儲備溶液，進行下列四組反應：

1. 取上述儲備溶液 240 μ L，加入人工腸液 2.16 mL，以試管震盪器混勻後，用微量分注器取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應。
2. 取上述儲備溶液 180 μ L，加入 β -glucuronidase 50 μ L 及 buffer solution (pH 5.0) 1570 μ L，以試管震盪器混勻後，取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除後，再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應 4 小時後，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應。
3. 取上述儲備溶液 420 μ L，加入大白鼠糞便懸浮液 3.78 mL，以試管震盪器混勻後，取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除後，先取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應 1 小時後，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應。

4. 取上述儲備溶液 240 μL ，加入成人糞便懸浮液 2.16 mL，以試管震盪器混勻後，取混合液 600 μL 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除後，先取 3 管立即貯存於 -30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應 1 小時後，立即貯存於 -30 冷凍櫃中停止反應。

(四) 檢品分析

將上述檢品解凍後，加入 0.1 N 鹽酸 100 μL ，混勻，再以乙酸乙酯（含 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 6, 7-dimethoxycoumarin）700 μL 萃取，用試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL ，於超音波震盪器震盪，使之完全溶解後，再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取 10 μL 供 HPLC 分析。

(五) 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備（十五）之 2

分析管柱：Cosmosil 5C₁₈ - AR II，5 μm ，4.6 \times 150 mm

移動相：0.1% H₃PO₄：CH₃CN = 74：26

流速：1 mL/min

檢測波長：370 nm

內部標準品：6, 7-Dimethoxycoumarin

(六) 數據處理

取上述檢品 10 μL 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之 quercetin 波峰面積分別與內部標準品之波峰面積求得比值，以 ANOVA 比較組間之差異，並以 Tukey test 事後檢定。

六、大黃水煎劑及其成分受大白鼠及白兔糞便細菌之代謝

(一) 生大黃水煎劑受大白鼠糞便細菌之代謝

1. 藥物溶液之製備

(1) 生大黃水煎劑檢品

分別稱取生大黃藥材 15.0 g，加水 300 mL，於室溫下浸泡 15 分鐘使之浸潤後，直火加熱，沸騰後以小火煎煮至體積略少於 30 mL，趁熱過濾，待冷卻後，再以水定容至 30 mL，並以 HPLC 進行 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 等成分之定量分析。

(2) Aloe-emodin 標準溶液

精確稱取 aloe-emodin 5.0 mg，先以少量 DMSO 溶解後，再以甲醇定容至 5 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之標準溶液。

(3) Chrysophanol 標準溶液

精確稱取 chrysophanol 5.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 5 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之標準溶液。

(4) Emodin 標準溶液

精確稱取 emodin 10.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 5 mL，配製成濃度為 2.0 mg/mL 之標準溶液。

(5) Rhein 標準溶液

精確稱取 rhein 5.0 mg，先以少量 DMSO/tetraglycol 溶解後，再以甲醇定容至 5 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之標準溶液。

(6) 2-Methylantraquinone 內部標準品溶液

精確稱取 2-methylantraquinone 1.0 mg，先以少量乙酸乙酯溶解後，再以乙酸乙酯定容至 250 mL，使其最終濃度為 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2. 大白鼠糞便標準溶液之製備

取上述濃度為 1.0 mg/mL 之 aloe-emodin、rhein、chrysophanol 及濃度為 2.0 mg/mL 之 emodin 標準溶液，以甲醇稀釋，使系列標準溶

液之濃度 aloe-emodin 為 3.1、6.2、12.5、25.0、50.0、100.0 及 200.0 $\mu\text{g/mL}$ ，rhein 為 6.2、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 及 400.0 $\mu\text{g/mL}$ ，emodin 為 6.2、12.5、25.0、50.0、100.0 及 200.0 $\mu\text{g/mL}$ ，chrysophanol 為 9.4、18.8、37.5、75.0、150.0 及 300.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

取上述各濃度之標準溶液 60 μL 及大白鼠糞便懸浮液 540 μL ，製備成 aloe-emodin 濃度為 0.3、0.6、1.2、2.5、5.0、10.0 及 20.0 $\mu\text{g/mL}$ ，rhein 為 0.6、1.2、2.5、5.0、10.0、20.0 及 40.0 $\mu\text{g/mL}$ ，emodin 為 0.6、1.2、2.5、5.0、10.0 及 20.0 $\mu\text{g/mL}$ ，chrysophanol 為 0.9、1.9、3.8、7.5、15.0 及 30.0 $\mu\text{g/mL}$ 之大白鼠糞便標準溶液。

3. 檢量線之繪製

將上述各種不同濃度之大白鼠糞便標準溶液 600 μL ，加入 0.1 N 鹽酸 100 μL ，混勻，再以乙酸乙酯（含 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 2-methylanthraquinone）700 μL 萃取，用試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL ，於超音波震盪器震盪，使之完全溶解後，再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取 10 μL 供 HPLC 分析。

將分析所得之標準品與內部標準品之波峰面積比值，分別與其各標準品之濃度進行線性迴歸，求得各成分之檢量線方程式。

4. 分析樣品之製備與反應

(1) 生大黃水煎劑受大白鼠糞便細菌的降解作用

將生大黃水煎劑檢品，以 HPLC 分析定量其條件如下：

分析管柱：Cosmosil 5C18-AR II，5 μm ，4.6 \times 250 mm

流 速：0.9 mL/min

檢測波長：250 nm

內部標準品：2-Methylanthraquinone (50.0 $\mu\text{g/mL}$)

移 動 相：CH₃CN---A 0.1% H₃PO₄---B

Time	A	B
0	50	50
10	60	40
15	85	15
20	85	15
25	50	50

取已知各成分含量之生大黃水煎煮液 1.38 mL，加入大白鼠糞便懸浮液 12.42 mL，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、3、6、9、12 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

(2) Aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 受大白鼠糞便中細菌的降解作用

分別取濃度為 500.0 μ g/mL 之 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 標準溶液 1.38 mL，各自加入大白鼠糞便懸浮液 12.42 mL。分別以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，每組先各取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、3、6、9、12 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

另一組實驗則是將此 4 種化合物各取 1.38 mL (濃度分別為 500.0 μ g/mL) 先行混合，再加入大白鼠糞便懸浮液 49.68 mL，以攪拌器混勻後，其餘步驟如前段所述。

5. 檢品分析

將上述大白鼠糞便懸浮液檢品解凍後，加入 0.1 N 鹽酸 100 μ L，混勻，再以乙酸乙酯 (含 4.0 μ g/mL 2-methylanthraquinone) 700 μ L 萃

取，用試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL ，於超音波震盪器震盪，使之完全溶解後，再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取 10 μL 供 HPLC 分析。

6. 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備（十五）之 1

分析管柱：Cosmosil 5C18-AR II，5 μm ，4.6 \times 250 mm

保護管柱：MetaGuard 4.6 mm Polaris 5 μ C₁₈ - A

移動相：0.1% H₃PO₄ --- A CH₃CN --- B

Time	A	B
0	50	50
25	15	85

流速：1 mL/min

檢測波長：250 nm

內部標準品：2-Methylantraquinone

7. 分析系統及方法之確效

(1) 精密度 (Precision)

將不同濃度之 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 大白鼠糞便標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得之檢量線方程式，求得每次之實測濃度值。以三次同日內及三次異日間實測濃度分別求其平均值 (mean)、標準偏差 (standard deviation; S.D.) 及變異係數 (coefficient of variation; C.V.)。

(2) 準確度 (Accuracy)

以三次同日內及三次異日間實驗所得之平均濃度與理論濃度之相對誤差 (relative error; R.E.) 表示之。

8. 數據處理

取上述檢品 10 μ L 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 波峰面積分別與內部標準品之波峰面積求得比值，帶入各自之檢量線方程式，即可求得生大黃藥材水煎劑檢品於大白鼠糞便溶液中此些成分之濃度。

(二) 番瀉？甲、乙及大黃酸受白兔及大白鼠糞便細菌之作用

1. 藥物溶液之製備

(1) Sennoside A 及 B 標準溶液

精確稱取 sennoside A 及 B 各 5.0 mg，各自先以少量 DMSO 溶解後，再以 N, N-dimethylacetamide/PEG 400/water (1 : 5 : 4) 為溶媒，定容至 5.0 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之標準溶液。

(2) Rhein 標準溶液

精確稱取 rhein 1.5 mg，先以 DMSO/tetraglycol (1 : 1) 溶解後，再以甲醇為溶媒，定容至 5.0 mL，配製成濃度為 0.3 mg/mL 之標準溶液。

(3) p-Hydroxybenzoic acid n-amyl ester 內部標準品溶液

精確稱取 p-hydroxybenzoic acid n-amyl ester 1.1 mg，先以少量乙酸乙酯溶解後，再以乙酸乙酯定容至 10 mL。精確量取上述溶液 4 mL，再以乙酸乙酯定容至 200 mL，使其最終濃度為 2.2 μ g/mL。

2. 白兔及大白鼠糞便標準溶液之製備及檢量線之繪製

(1) 白兔及大白鼠糞便標準溶液之製備

精確稱取 rhein 標準品，先以少量 DMSO/tetraglycol 溶解後，再以甲醇稀釋定容製備成 3.1、6.2、12.5、25.0 及 50.0 μ g/mL 五種濃度之標準品溶液。取 rhein 標準溶液 60 μ L 及白兔糞便懸浮液 540 μ L，製備成 rhein 濃度為 0.3、0.6、1.2、2.5 及 5.0 μ g/mL 之白兔糞便標準溶液。

大白鼠糞便標準溶液之製備方式和白兔糞便標準溶液相同，但需把白兔糞便懸浮液換成大白鼠糞便懸浮液，且 rhein 之

最終濃度分別為 0.6、1.2、2.5、5.0、10.0、20.0 及 30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(2) 檢量線之繪製

將上述各種不同濃度之糞便標準溶液 600 μL ，加入 0.1 N 鹽酸 100 μL 及乙酸乙酯(含 2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ p-hydroxybenzoic acid n-amyl ester) 700 μL ，震盪 10 秒後以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL 使之完全溶解後，再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取 10 μL 供 HPLC 分析。將分析所得之 rhein 與內部標準品之波峰面積比值分別與其濃度進行線性迴歸，分別求得白兔及大白鼠糞便標準溶液之檢量線方程式。

3. 分析樣品之製備與反應

(1) Sennoside A 及 B 受白兔及大白鼠糞便細菌之作用

分別取濃度為 1.0 mg/mL 之 sennoside A 及 B 標準溶液各 1.2 mL ，各自加入白兔糞便懸浮液 10.8 mL ，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μL 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於 -30°C 冷凍櫃中，其餘再置於 37°C 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、3、5、7 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於 -30°C 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。另外一組實驗則將白兔糞便懸浮液改以大白鼠糞便懸浮液，其餘之步驟均相同。

(2) Rhein 受白兔及大白鼠糞便細菌之作用

取濃度為 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 rhein 標準溶液 1.2 mL ，加入白兔糞便懸浮液 10.8 mL ，另外一組則加入等量之大白鼠糞便懸浮液。分別以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μL 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於 -30°C 冷凍櫃中，其餘再置於 37°C 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、3、6、9 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於 -30°C 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

4. 檢品分析

將上述白兔及大白鼠糞便懸浮液檢品解凍後,加入 0.1 N 鹽酸 100 μL 及乙酸乙酯 (含 2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ p-hydroxybenzoic acid n-amyl ester) 700 μL , 以試管震盪器震盪 10 秒後,以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層,用氮氣吹乾後,加入甲醇 50 μL 使之完全溶解。並再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘,取 10 μL 供 HPLC 分析。

5. 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備 (十五) 之 2

分析管柱：LiChrospher[®] 100, RP-18e, 5 μm , 4.6 \times 250 mm

移動相：1% CH_3COOH : CH_3CN = 58 : 42

流速：1 mL/min

檢測波長：258 nm

內部標準品：p-Hydroxybenzoic acid n-amyl ester

6. 分析系統及方法之確效

(1) 精密度 (Precision)

將已加入內部標準品之標準溶液,分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析,並以獲得之檢量線方程式,求得每次實驗濃度值。以三次同日內及三次異日間實驗濃度分別求其平均值 (mean)、標準偏差 (standard deviation; S.D.) 及變異係數 (coefficient of variation; C.V.)。

(2) 準確度 (Accuracy)

以三次同日內及三次異日間實驗所得之平均濃度與理論濃度之相對誤差 (relative error; R.E.) 表示之。

7. 數據處理

取上述檢品 10 μL 注入 HPLC 分析,將檢品中分析所得之波峰面積與內部標準品之波峰面積求得比值,帶入檢量線方程式,即可求得 senoside A 及 B 於糞便溶液中轉變成 rhein 之含量。

七、生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎劑受大白鼠糞便細菌之代謝

(一)、藥物溶液之製備

1. 生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎劑檢品

分別稱取生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩藥材各 15.0 g，分別加水 300 mL，於室溫下浸泡 15 分鐘使之浸潤後，直火加熱，沸騰後以小火煎煮至體積略少於 60 mL，趁熱過濾，待冷卻後，再加水至 60 mL，並以 HPLC 進行 baicalin、baicalein 及 wogonin 等成分之定量分析。

2. Baicalein 標準溶液

精確稱取 baicalein 2.0 mg，先以少量 DMSO 溶解後，再以甲醇定容至 1 mL，配製成濃度為 2.0 mg/mL 之標準溶液。

3. Wogonin 標準溶液

稱取 wogonin 2.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 1 mL，配製成濃度為 2.0 mg/mL 之標準溶液。

4. Propylparaben 內部標準品溶液

稱取 propylparaben 5.0 mg，先以少量乙酸乙酯溶解後，再以乙酸乙酯定容至 200 mL，使其最終濃度為 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

(二)、大白鼠糞便標準溶液之製備

取上述配製好濃度為 2.0 mg/mL 之 baicalein 及 wogonin 標準溶液，以甲醇稀釋，使系列標準溶液之濃度 baicalein 為 3.1、6.2、12.5、25.0、50.0、100.0 及 200.0 $\mu\text{g/mL}$ ，wogonin 為 9.4、18.8、37.5、75.0、150.0、300.0 及 600.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

取上述各濃度之標準溶液 60 μL 及大白鼠糞便懸浮液 540 μL ，製備成 baicalein 濃度為 0.3、0.6、1.2、2.5、5.0、10.0 及 20.0 $\mu\text{g/mL}$ ，wogonin 為 0.9、1.9、3.8、7.5、15.0、30.0 及 60.0 $\mu\text{g/mL}$ 之大白鼠糞便標準溶液。

(三) 檢量線之繪製

將上述各種不同濃度之大白鼠糞便標準溶液 600 μL , 加入 0.1 N 鹽酸 100 μL , 混勻, 再以乙酸乙酯(含 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propylparaben) 700 μL 萃取, 用試管震盪器震盪 10 秒後, 以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層, 用氮氣吹乾後, 加入甲醇 50 μL , 於超音波震盪器震盪, 使之完全溶解後, 再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘, 取 10 μL 供 HPLC 分析。

將分析所得之標準品與內部標準品之波峰面積比值, 分別與其各標準品之濃度進行線性迴歸, 求得各成分之檢量線方程式。

(四) 分析樣品之製備與反應

將生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎劑檢品, 以 HPLC 分析定量其條件如下:

分析管柱: Inertsil ODS-2, 5 μm , 4.6 \times 250 mm

移動相: CH_3CN : 0.05% H_3PO_4 = 36 : 64

流速: 1.0 mL/min

檢測波長: 270 nm

內部標準品: 2-Propylparaben (40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

此三種黃芩煎劑中所含 baicalin、baicalein、wogonin glycoside 及 wogonin 等成分之含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 如下:

成 分	生黃芩	酒黃芩	蜜黃芩
Baicalin	1016.5	1119.7	1165.9
Baicalein	146.9	188.8	193.1
Wogonin glycoside	162.0	200.3	205.3
Wogonin	57.2	75.1	76.0

分別取上述已知各成分含量之生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎煮液 1.74 mL, 各自加入大白鼠糞便懸浮液 15.66 mL, 以攪拌器

混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μL 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於 -30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、3、6、9、12、24、36 及 48 小時於每組各取 3 管，立即貯存於 -30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

(五)、檢品分析

將上述大白鼠糞便懸浮液檢品解凍後，加入 0.1 N 鹽酸 100 μL ，混勻，再以乙酸乙酯（含 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propylparaben）700 μL 萃取，用試管震盪器震盪 10 秒後，以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μL ，於超音波震盪器震盪，使之完全溶解後，再一次以 $9,860 \times g$ 高速離心 15 分鐘，取 10 μL 供 HPLC 分析。

(六)、高效液相層析之分析條件

儀 器：如器材及儀器設備（十五）之 1

分析管柱：Cosmosil 5C18-AR II，5 μm ， 4.6×250 mm

保護管柱：MetaGuard 4.6 mm Polaris 5 μ C₁₈ - A

移 動 相：0.1% H₃PO₄：CH₃CN = 68：32

流 速：1 mL/min

檢測波長：270 nm

內部標準品：Propylparaben

(七)、分析系統及方法之確效

1. 精密度 (Precision)

將不同濃度之 baicalein 及 wogonin 大白鼠糞便標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得之檢量線方程式，求得每次之實測濃度值。以三次同日內及三次異日間實測濃度分別求其平均值 (mean)、標準偏差 (standard deviation; S.D.) 及變異係數 (coefficient of variation; C.V.)。

2. 準確度 (Accuracy)

以三次同日內及三次異日間實驗所得之平均濃度與理論濃度之相對誤差 (relative error ; R.E.) 表示之。

(八)、數據處理

取上述檢品 10 μL 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之 baicalein 及 wogonin 波峰面積分別與內部標準品之波峰面積求得比值，代入各自之檢量線方程式，即可求得生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩藥材水煎劑檢品於大白鼠糞便溶液中此些成分之濃度。

八、甘草酸及甘草水煎劑受大白鼠、豬及人糞便細菌作用之比較

(一) 藥物溶液之製備

1. Glycyrrhizin 標準溶液

精確稱取 glycyrrhizin monoammonium salt，以水為溶媒，配製成 1.0 mg/mL 之標準溶液。

2. 甘草水煎劑檢品

稱取甘草藥材 300 g，加入水 12 L，於室溫下浸泡 30 分鐘使之浸潤後，直火加熱，沸騰後以小火煎煮至體積略少於 500 mL，趁熱過濾，待冷卻後，再加水至 500 mL。

3. 2-Methylanthraquinone 內部標準品溶液

精確稱取 2-methylanthraquinone 1.0 mg，先以少量乙酸乙酯溶解後，再定容至 200 mL，使其最終濃度為 5.0 µg/mL。

4. 蜂蜜及糖類溶液

以人工腸液為溶媒，配製成 100 mg/mL 之蜂蜜、葡萄糖及果糖溶液。

(二) 分析樣品之製備與反應

1. 甘草酸及甘草水煎劑受大白鼠、豬及人糞便細菌之作用

取濃度為 1.0 mg/mL 之甘草酸標準溶液或含有 1.0 mg/mL 甘草酸之水煎劑 1.38 mL，分別加入大白鼠糞便懸浮液 12.42 mL，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 µL 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、2、4、8、12 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

另外二組實驗則將大白鼠糞便懸浮液改以豬及人糞便懸浮液，其餘之操作步驟均相同。

2. 蜂蜜及其成分對甘草水煎劑中之甘草酸受糞便細菌代謝之影響

取含有 1.0 mg/mL 甘草酸之水煎劑 6 mL，加入大白鼠糞便

懸浮液 48 mL，以攪拌器混勻後，分成四組，每組 12.42 mL。於此四組內分別加入 1.38 mL 之人工腸液或蜂蜜、葡萄糖及果糖溶液，用微量分注器分別取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，每組先各取 3 管立即貯存於-30 冷凍櫃中，其餘再置於 37 水浴槽中，以 100 rpm 振搖，令其反應，並於 1、2、4、8、12 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於-30 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

(三) 檢品分析

將上述檢品解凍後，加入 0.1 N 鹽酸 50 μ L 及乙酸乙酯（含 5.0 μ g/mL 2-methylantraquinone）650 μ L，以試管震盪器震盪 10 秒後，以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘。取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加入甲醇 50 μ L 使之完全溶解。並再一次以 9,860 \times g 高速離心 15 分鐘，即可供 HPLC 分析。

(四) 高效液相層析之分析條件

儀器：如器材及儀器設備（十五）之 1

分析管柱：Cosmosil 5C₁₈ - AR II，5 μ m，4.6 \times 150 mm

保護管柱：MetaGuard 4.6 mm Polaris 5 μ C₁₈ - A

移動相：0.1% H₃PO₄：CH₃CN = 34：66

流速：1 mL/min

檢測波長：248 nm

內部標準品：2-Methylantraquinone

(五) 數據處理

取上述檢品 10 μ L 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之 GA 及 3-dehydroGA 波峰面積分別與內部標準品之波峰面積先求得比值，再與時間作圖，即得 GA 及 3-dehydroGA 之變化情形。對甘草酸及甘草水煎劑以不同動物糞便作用之數據以 paired students t-test 進行統計分析，對蜂蜜及其成分對甘草水煎劑中之甘草酸受糞便細菌代謝之影響，係以 ANOVA 比較組間之差異，並以 Tukey test 事後檢定。