

第四章 結果與討論

第一節 黃酮類化合物受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

一、黃酮？受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

中藥中黃酮類主要以配醣體的形式存在，水溶性頗佳，一般中藥多使用水煎煮，因此黃酮？極易溶於傳統水煎劑中。然而，此些配醣體卻因為極性太高而無法經胃腸道吸收。本研究為更深入了解黃酮？的循環前代謝，並探討不同種動物間之差異，以各種動物糞便進行研究。Hesperidin、naringin、rutin 及 phellamurin 均為黃酮？，目前文獻仍鮮有其原型可被吸收之報導。一般認為當此些配醣體抵達大腸後，一面被腸內菌水解出？元，一面被腸內菌所降解⁽¹⁾。

Hesperidin、naringin、rutin 及 phellamurin 經腸內菌作用後會轉變成 hesperetin、naringenin、quercetin 及 neophellamuretin。本研究利用 HPLC 定量黃酮？元的經時變化，所採用之高效液相層析條件以乙？及 0.1 % 磷酸溶液為移動相，採梯度沖提之方式，檢測波長為 254 nm，流速為 1.0 mL/min，以 5, 7-dimethoxycoumarin 為內部標準品，其最終濃度為 25.0 µg/mL，於層析圖中出現之位置無任何干擾。Hesperetin、naringenin、quercetin 及 neophellamuretin 及內部標準品之滯留時間如 Table 1 所示。

有鑑於此等化合物在加熱的情況下會被酸水解成？元，因此本研究先探討人工胃液對此等化合物之影響 Fig. 1~4 顯示該四種黃酮？並未被水解出？元，表示於 37 °C 下胃酸並未水解黃酮？。

黃酮？受白兔、大白鼠及人糞便細菌作用後，其？元量的變化如 Table 2~5 所示，濃度之經時變化如 Fig. 1~4 所示。Hesperidin 及 rutin 一接觸到人糞便細菌時，就立刻被水解成？元，而後隨著時間之增加，？元量漸漸減少。Naringin 在白兔、大白鼠及人糞便細菌中之作用情形較為相似。Phellamurin 極易受到此三種糞便細菌之水解及降解，尤其是白兔糞便，1 小時後就無法偵測到？元。

上述結果顯示，不同種動物糞便對黃酮？之作用差異不大，而 hesperidin、naringin、rutin 及 phellamurin 之間，因化學結構與物理化學性質的不同，其水解與降解的情況存在著差異。此些體循環前代謝的差異或許是影響生可用率的因素。本研究室曾探討之兔體內研究顯示口服投予 naringin 225 mg/kg，其結合態代謝物之平均最高血中濃度為 4.4 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁴⁾，然而口服投予 phellamurin 100 mg/kg，其結合態代謝物之平均最高血中濃度卻可達 62.7 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²²⁷⁾，推測可能因 phellamurin 較易被腸內菌水解成？元，亦或其？元極性較低易擴散進入腸細胞，而導致吸收程度較佳。

二、異黃酮？受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

Puerarin、daidzin 及 genistin 均為異黃酮？。Kim 等人⁽²²⁸⁾將 puerarin 及 daidzin 分別置於人的腸內菌中培養 24 小時，發現此二者均會轉變成 daidzein。Genistin 於腸內菌作用下亦會轉變成？元 genistein^(229, 230)。本實驗探討白兔、大白鼠與人糞便之間對異黃酮？是否有代謝上的差異。

本研究利用 HPLC 定量？元之經時變化，所採用之高效液相層析條件係以乙？：0.1 % 磷酸溶液 (34 : 66, v/v) 混液為移動相，流速為 1.0 mL/min，檢測波長 254 nm。以 5, 7-dimethoxycoumarin 為內部標準品，其最終濃度為 25.0 $\mu\text{g/mL}$ ，於層析圖中出現之位置無任何之干擾。Daidzein、genistein 及內部標準品之滯留時間分別為 4.6、8.7 及 12.6 分鐘，整個分析過程只需時 15 分鐘。

異黃酮？受白兔及大白鼠糞便細菌作用後，其？元的變化如 Table 6 所示，濃度經時變化如 Fig. 5 所示。結果顯示 daidzin 一接觸到白兔及大白鼠糞便時，立刻被水解成？元，隨著時間並未明顯減少。Genistin 在白兔及大白鼠糞便細菌作用下，均產生 genistein，白兔糞便培養下，8 小時後還有 55.7 $\mu\text{g/mL}$ ，而 genistein 卻極易受到大白鼠糞便細菌之降解，8 小時後只剩下 5.5 $\mu\text{g/mL}$ 。藉由比較 daidzein 與 genistein 的降解速率，顯示 5 位置的 OH 基會增加異黃酮？元之降解。

Puerarin 於白兔、大白鼠及人糞便懸浮液中反應 24 小時，結果於此

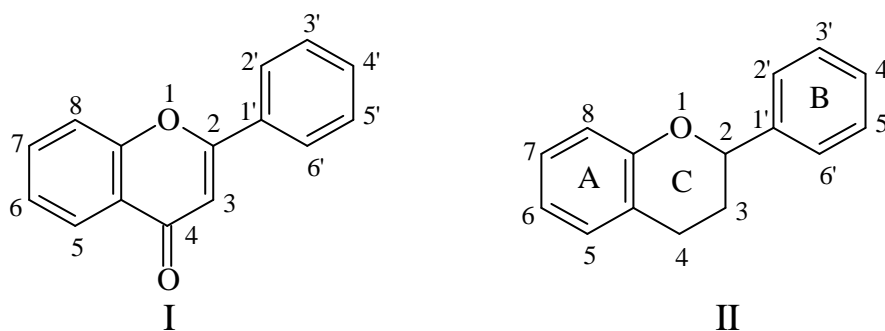
三種糞便中，皆無法測得任何 daidzein。Kim⁽²²⁹⁾等人的研究指出 puerarin 受人腸內菌作用後，daidzein 會隨時間而緩慢產生，吾人研究與 Kim 等人的結果並不相符。Puerarin 為 C-glycoside，化學性質上無法以酸水解，本研究於糞便懸浮液中亦顯示無？可水解之。至於何種原因導致與 Kim 等人的結果不同，無從得知。

三、黃酮？元受白兔、大白鼠及人糞便細菌之作用

本研究建立了快速之高效液相層析法，分析 13 種黃酮？元化合物受白兔、大白鼠及人糞便細菌之降解，所用之層析條件如前章所述。由於白兔、大白鼠與人的糞便之基質不同，一種層析條件無法適用所有之檢品。尤其以人糞便檢品最為複雜，無法以單液法來分離，因此採用梯度沖提之方式。

此外，此 13 種化合物之 UV 最大吸收波長均不盡相同，因大多化合物之最大吸收波長為 254 nm，為方便起見，本實驗採其共同吸收波長 254 nm 為檢測波長。以 5,7-dimethoxycoumarin 為內部標準品，最終濃度為 25.0 $\mu\text{g/mL}$ ，於層析圖中出現之位置無任何干擾。13 種化合物及內部標準品之滯留時間如 Table 1 所示，白兔及人工腸液檢品分析過程只需時 30 分鐘，大白鼠及人糞便檢品分析過程需時 60 分鐘。Fig. 6 為 13 種黃酮？元化合物及內部標準品，以人糞便檢品之層析條件沖提所得之層析圖譜。

以前黃酮？元化合物主要是指基本母核為 2-phenylchromone 類化合物（如下圖 I），現在則泛指兩個苯環（A 與 B 環）通過中央三個碳鏈相互聯結而成的 2-phenylchromane 一系列化合物（如下圖 II）。



從 HPLC 層析圖之滯留時間，可推測 13 個黃酮？元化合物之相對極性。在這 13 個黃酮？元化合物中，morin (B 環上兩個 OH 基團互為間位) 出現之時間最早，極性最高，而其結構異構物 quercetin (B 環上兩個 OH 基團互為鄰位) 之極性則較低些，推測可能因鄰位 OH 基形成分子內氫鍵所致。Naringenin 與 apigenin、hesperetin 與 diosmetin 之結構相似，僅於 C 環 2, 3 位置上有無雙鍵之別，層析圖顯示 2, 3 位置是雙鍵或單鍵時極性影響不大。

Quercetin 於 C 環第 3 位置處較 luteolin 多一個 OH 基團，但 quercetin 之極性較 luteolin 為低，可見 3-hydroxy 基團會降低化合物之極性。相同的，genistein 於 A 環第 5 位置處較 daidzein 多一個 OH 基團，而 genistein 之極性較 daidzein 為低，可見 5-hydroxy 基團亦會降低化合物之極性。吾人可以推測極性之降低，係因 3-或 5-OH 基團與 C 環第 4 位之 ketone 產生分子內氫鍵所致。

Baicalein 和 wogonin 於 A 環上分別有三個 OH 取代基，而 B 環上並無任何取代基存在，此二者與其它黃酮？元相較，層析圖顯示極性較低，可能因形成分子內氫鍵所致。另外，wogonin 在 A 環 5-OH 基團之對位有一 methoxy 基團，它是此十三個黃酮？元化合物中極性最低者。

藥物吸收是一個非常複雜的過程，對黃酮？元的生可用率而言，其本身之「極性」會影響吸收之程度，因為化合物在胃腸液中的溶解度及擴散通過腸上皮細胞之能力和它的極性密切相關。一般而言，極性較高之化合物溶解度較佳，然而卻往往不易擴散通過腸上皮細胞進入血循環。因此，中等極性之化合物是較容易被吸收的。黃酮？元之極性視三個環上之取代基而定，因此取代基的位置、數目及種類都可能影響它的生可用率。

有關黃酮？元之降解，本研究以十三種？元探討之。由於所有之糞便懸浮液均是以人工腸液製備，因此以人工腸液當空白對照組，結果如 Table 7 及 Fig. 7 所示。由 Table 7 可發現十三種黃酮？元中，daidzein 及 genistein 於人工腸液中最穩定，其原因可能是異黃酮類化合物 4'-OH 和 4-one 基團間之共軛系統較黃酮為短，4'-OH 的酸度較低，因此較為穩定。

另外，除了 baicalein、diosmetin 及 quercetin 外，其它的黃酮? 元化合物皆十分穩定。Baicalein、diosmetin 及 quercetin 均因具有 catechol-type 之結構，極易被氧化成 dione，特別是 baicalein，其 A 環上有三個 OH 相鄰。因此在鹼性人工腸液中，baicalein 最不安定。Quercetin 在 B 環上也有 catechol 結構，亦較為不穩定。

十三種黃酮? 元在白兔、大白鼠及人糞便細菌懸浮液中之降解百分比如 Table 8~10 所示，降解之經時變化如 Fig. 8~10 所示。經白兔糞便細菌作用時，wogonin、diosmetin 及 hesperetin 較不易被降解，而 neophellamuretin、apigenin、kaempferol luteolin、naringenin 及 quercetin 很快被降解。經大白鼠糞便細菌作用時，wogonin 及 diosmetin 較不易被降解，而 kaempferol、quercetin、genistein、luteolin 及 naringenin 很快被降解。經人糞便細菌作用時，wogonin、daidzein 及 diosmetin 較不易被降解，而 morin、genistein、baicalein 及 quercetin 很快被降解。至於 neophellamuretin，因其標準品不夠，所以無法進行人糞便試驗。

比較三種糞便細菌對十三種黃酮? 元作用之結果顯示，白兔與大白鼠較相似，然而與人較為不同。在此三種腸內菌作用中，wogonin 和 diosmetin 最不易被降解，此二化合物於結構上均有 methoxy 基團，吾人推測可能 A 或 B 環上的 methoxy 基團有保護不被降解的作用。在十三種黃酮? 元中，糞便細菌對 wogonin 的降解最少。Baicalein 在人工腸液中最不安定，然而它在此三種糞便細菌懸浮液中，並非降解最快者，因此腸內菌對其它黃酮類之降解，明顯超過 baicalein。

Table 11 為十三種黃酮? 元在不同糞便中餘留百分比與反應時間進行線性迴歸，結果顯示此降解為 1 級動力學。進一步探討化學結構與降解速率的關係，藉由比較 hesperetin 與 diosmetin 及 naringenin 與 apigenin 之間的降解，顯示 C 環上 2, 3 位置的雙鍵對降解無顯著影響。有研究報告顯示，黃酮醇 (flavonol) 的 C 環較不穩定，易被細菌降解而轉變成 phenolic acid 及 ethylbenzene^(231, 232)。藉由比較 quercetin 與 luteolin 及 kaempferol 與 apigenin 之間的降解速率，顯示 3 位置的 OH 基團並未增加腸內菌對這些化合物之降解。

Neophellamuretin 是 isoprenyl flavonone，在 A 環第 8 位置上之 isoprenyl 基團，明顯地增加它的親脂性，由它在 HPLC 層析圖中所出現之滯留時間即可得到證明。Neophellamuretin 在白兔糞便懸浮液中很快地被降解，但先前本實驗室對 phellamurin (neophellamuretin 之配醣體) 所探討的動力學研究顯示⁽²³³⁾，phellamurin 之吸收卻較其它配醣體如 rutin 為佳^(234, 235)。可見當配醣體被水解成? 元後，若此? 元有足夠之親脂性，便會很快地進入腸上皮細胞內，而能避免被腸腔內之微生物所降解。

綜合上述結果，我們可得知此十三種黃酮? 元化合物均會被白兔、大白鼠及人糞便細菌所降解，結構上具有 methoxy 基團者極性較低，且可保護化合物不易被降解。因此，黃酮類配醣體之結構上若具有 methoxy 基團，應有助於吸收。

第二節 梓醇之循環前代謝及於鼠體內之代謝動力學

一、Catalpol 之安定性試驗

Catalpol 之結構為含有一分子葡萄糖之單糖類，另含有一 epoxide 基團，為一高極性分子，極易溶於水中。Epoxide 之化學性極不安定，於酸性或鹼性環境中均容易開環而形成 diol。

一般中藥之煎煮，係採用文火慢熬，製備成水煎劑後口服飲用。Catalpol 於沸水中是否安定？於胃酸中是否會遭破壞，本研究針對此二個問題進行探討。

由於 catalpol 本身極性較高，於分析時，很快地由管柱中沖提出來，即使移動相中水之比例高達 98%，catalpol 之滯留時間僅 6.8 分鐘。內部標準品 HMF 於層析圖中出現之位置無任何干擾，滯留時間為 15.6 分鐘，整個層析過程只需時 20 分鐘。因 catalpol 結構中只有一個雙鍵，最大吸收波長為 203 nm，因此設定 203 nm 為檢測波長。

利用所建立之層析法分析 catalpol 受熱及酸的影響，其結果如 Table 12 及 Fig. 11 所示。Catalpol 在 100°C 之沸水下煮沸 4 小時，經時變化圖顯示 catalpol 之濃度並無顯著變化，可見 catalpol 在 100°C 下十分安定（層析圖如 Fig. 12 (A) 所示）。然而，以人工胃液於 37°C 下培養，catalpol 於 5 分鐘時即顯著減少，可見 catalpol 極易為酸所分解（層析圖如 Fig. 12 (B) 所示）。結果表明 catalpol 無法安全通過胃部，因此推斷 catalpol 進入人體後，到達小腸時已非原形，而是其衍生物 diol。

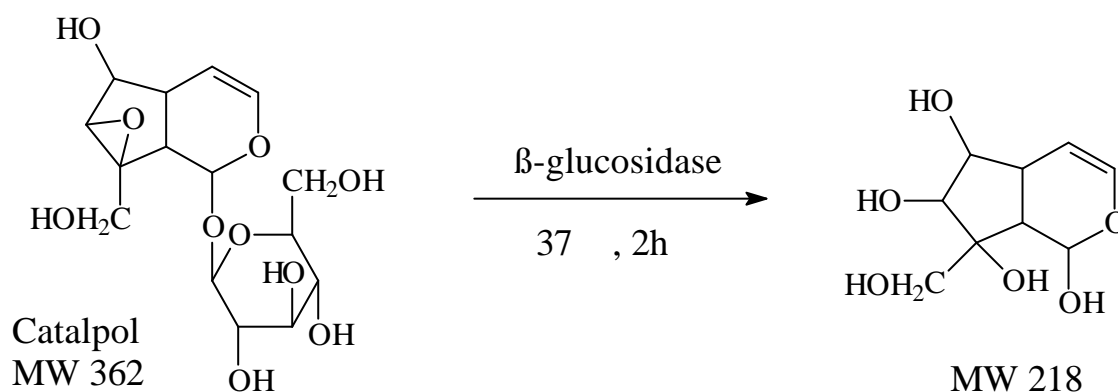
二、Catalpol 衍生物之製備

當 catalpol 進入腸道時，已轉化成 diol。接著此 diol 會進一步被腸道內之菌群代謝，而將葡萄糖水解，導致分子變小、極性降低、脂溶性增強。接著以兩種方法於體外嘗試進行 catalpol 衍生物之製備。A 法是將 catalpol 先和稀鹽酸溶液（pH 1.2）於 37°C 下反應 1 小時，再用 0.1 N 氫氧化鈉溶液將 pH 值調至 5.0，再和 β -glucosidase 溶液於 37°C 下反應 2 小

時。B 法則是將 catalpol 直接和 β -glucosidase 溶液於 37 °C 下反應 2 小時。利用薄層層析法，進行 A、B 二法所得產物之比對，結果發現此二法於相同之 Rf 值處有相同之褐色點，因此選擇較簡易之 B 法進行製備 catalpol 之衍生物。

經 B 法反應後之產物，嘗試直接以乙酸乙酯萃取，但大部分之產物仍留於水層，可見產物之極性仍高。接著，用 0.1 N 氫氧化鈉溶液將 pH 值調至 8.0，並加入 NaCl 使溶液飽和後，再用乙酸乙酯萃取，結果萃取率較前改善。

利用液相層析串聯式質譜儀分析此 catalpol 之衍生物。因 catalpol 之分子量為 362，推斷該衍生物之分子量應為 218。分析結果顯示，該衍生物之分子量確為 218，其層析質譜圖如 Fig. 13 所示。



三、大白鼠與小白鼠口服 catalpol 之代謝動力學研究

經由上節之反應，我們製備了 catalpol 於體內可能產生之代謝物，進一步探索口服投予 catalpol 後，血中是否有此代謝物之存在。

本實驗亦採用高效液相層析法進行分析，並經光電二極體陣列（photo diode array）檢出器比對其 UV 光譜。由於此衍生物之滯留時間較 catalpol 更短，其波峰會受到其它成分之干擾，故採用較長之管柱進行層析，並將移動相中水之比例增加至 99%，在此層析條件下，此衍生物與 catalpol 之滯留時間分別為 8.7 及 11.0 分鐘，整個分析過程只需時 15 分鐘。

Sprague-Dawley 大白鼠口服投予 catalpol 水溶液 (50 mg/kg) 後，血清檢品經去蛋白，以層析法進行分析，結果於每個採血時間點之檢品均未測得 catalpol 原型及此衍生物的存在。

為了進一步確認 catalpol 之零吸收，以 BALB/c 小白鼠口服 catalpol，且將劑量提高為 100 mg/kg，其餘實驗步驟相同。結果於血中亦未測得 catalpol 原型及此衍生物的存在。

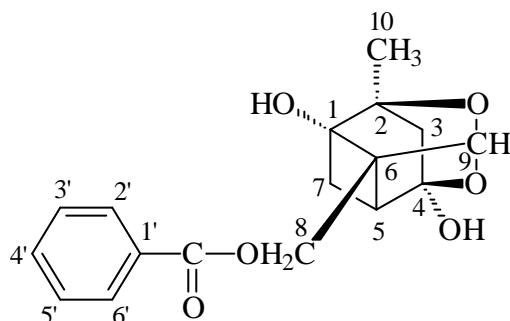
有鑒於許多配醣體於體內轉變成？元後，被吸收的同時會被腸或肝代謝成 sulfates 或 glucuronides 之結合態代謝物。因此利用 sulfatase 先進行？解血清檢品，再進行層析。結果顯示水解後亦無 catalpol 原型及此衍生物的存在，表示 catalpol 的生可用率為零。

本研究結果顯示 catalpol 原型及此可能之體循環前代謝物皆未進入全身循環中。我們可以推測 catalpol 原型及此衍生物均無法被胃腸道吸收，其主要原因可能是由於 catalpol 及此衍生物物的分子極性太高，脂溶性太低、而無法擴散進入腸細胞而吸收。許多 catalpol 的藥理研究^(8, 9)為體外試驗，其結果應不可推論體內之藥理活性。

第三節 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、Paeoniflorin 之製備

Paeoniflorin 為單? 類配醣體，分子中有 β -葡萄糖? 鍵，屬於 β -葡萄糖? 類化合物。本實驗利用 β -glucosidase 將 paeoniflorin 之葡萄糖水解，以乙酸乙酯萃取後，利用再結晶純化，得到一個新的非醣體化合物，將之命名為 paeoniflorin，結構如下所示。



(一) Paeoniflorin 之物理性質及光譜數據如下：

1. 白色針狀結晶 (n-hexane/ethylacetate/methanol)
2. LC/MS m/z : 317 ($M-1$, ESI^-)
3. UV λ_{max} (MeOH): 203 (log ϵ 4.25), 227 (log ϵ 4.33) nm.
4. ^{13}C -NMR (CD_3OD , 50 MHz) δ : 100.9 (C1), 52.2 (C2), 111.5 (C4), 78.3 (C6), 35.7 (C7), 60.0 (C8), 101.4 (C9), 20.5 (C10), 130.2 (C1'), 129.1 (C2', 6'), 127.9 (C3', 5'), 132.5 (C4'), 168.4 (C7').
5. 1H -NMR (CD_3OD , 200 MHz) δ : 8.05 (2H, d, $J = 5.9$ Hz, H-2', 6'), 7.63 (1H, m, H-4'), 7.51 (2H, m, H-3', 5'), 5.41 (1H, s, H-9), 1.26 (3H, s, H-10).

(二) Paeoniflorin 之構造決定

Paeoniflorin 之分子量為 480，吾人推測葡萄糖被水解後，其? 元之分子量應為 318。LC/MS 結果顯示其分子離子 ($M-1$) 之質量為 317，因

此此水解產物應為其? 元 (如 Fig. 14 所示)。由 ^1H -NMR 圖譜 δ 7~8 處有許多吸收峰, 為芳香環上的氫, 顯示仍有苯環存在。於 δ 8.05 (2H)、7.63 (1H) 和 7.51 (2H) 處一共五個氫, 其化學位移顯示, 苯環上有一個拉電子取代基。由 ^{13}C -NMR 上 δ 127.9、129.1 及 132.5 亦顯示 paeoniflorin 結構上原本之苯環仍然存在。此外, 我們並與文獻⁽²³⁶⁾中有關 paeoniflorin 之光譜數據比對, 證明此化合物為其? 元, 命名為 paeoniflorigenin。此? 元在文獻上尚無任何物理化學數據之記載。

二、白芍水煎劑中 paeoniflorin 於大白鼠體內之代謝動力學

(一) 白芍水煎劑中 paeoniflorin 之定量及酸水解

本研究為先了解白芍水煎劑中 paeoniflorin 之含量, 以利代謝動力學之進行, 建立了一個快速且精確之高效液相層析法。層析條件以乙? : 0.1 % 磷酸溶液 (15 : 85, v/v) 混液為移動相, 流速為 1.0 mL/min, 以 methylparaben 為內部標準品, 其最終濃度為 103.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 於層析圖中出現之位置無任何干擾。Paeoniflorin 及內部標準品之滯留時間分別為 7.5 及 25.3 分鐘, 整個分析過程需時 30 分鐘, 層析圖如 Fig. 15(A)所示。

以 paeoniflorin 與內標準品之波峰面積比值為 Y 軸, paeoniflorin 之濃度為 X 軸進行線性迴歸, 求得檢量線方程式及相關係數。檢量線的濃度範圍為 25.0 ~ 500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 檢量線方程式為 $Y = 293.8094X + 3.5329$ ($r^2 = 0.9999$), 顯示濃度與波峰面積比值間有良好線性關係。

以此 HPLC 條件分析白芍水煎劑檢品, 其 paeoniflorin 之含量為 12.9 mg/mL (每 mL 相當於 1.6 g 原生藥)。因此每克白芍原生藥有 8.1 mg 溶離於水煎劑中。

白芍水煎劑檢品以 2.4 N HCl 於 80 °C 下水解 2 小時後, 以 HPLC 分析, 層析圖如 Fig. 15 (B)所示。與層析圖 Fig. 15 (A)相互比較, 可發現在未水解之白芍水煎劑中並無 paeoniflorigenin 存在, 酸水解之後, paeoniflorin 顯著減少, 而於滯留時間 21.4 分處出現 paeoniflorigenin 之訊

號，paeoniflorigenin 於 HPLC 層析圖中出現之滯留時間較 paeoniflorin 延後，故其極性較 paeoniflorin 低，相對脂溶性提高，因此可推測 paeoniflorigenin 於動物體內之吸收應較 paeoniflorin 為佳。

(二) 白芍水煎劑中 paeoniflorin 於大白鼠體內之代謝動力學

為了解白芍水煎劑中 paeoniflorin 之代謝動力學，本研究口服投予大白鼠白芍水煎劑，劑量為 13.8 g/kg。採用本研究開發之 HPLC 條件，定量血清中 paeoniflorigenin 之含量。層析條件以乙腈：0.1% 磷酸溶液 (25:75, v/v) 混液為移動相，流速為 1.0 mL/min，檢測波長 230 nm。以 methylparaben 為內部標準品，其最終濃度為 1.0 µg/mL，於層析圖中出現之位置無任何干擾。Paeoniflorigenin 及內部標準品之滯留時間分別為 14.9 及 16.6 分鐘，整個分析過程只需時 20 分鐘，層析圖如 Fig. 16 所示。

定量血清中 paeoniflorigenin 檢量線的濃度範圍為在 0.20 至 12.50 µg/mL 之間，檢量線方程式為 $Y = 0.4677X - 0.0180$ ($r^2 = 0.9999$)，顯示濃度與波峰面積比值間有良好之線性關係。Paeoniflorigenin 分析方法之確效，如 Table 13 所示，同日內及異日間之變異係數 (C.V.) 低於 6.0%，相對誤差 (relative error) 介於 +12.3 ~ -4.1% 之間，顯示再現性佳，分析準確度良好。最低定量極限 (lowest limit of quantitation, LLOQ) 為 0.20 µg/mL，偵測極限 (limit of detection, LOD) 為 0.10 µg/mL ($S/N = 3$)。本定量方法之準確性評估，係由 paeoniflorigenin 添加在血清及水中檢出量之比較。結果如 Table 14 所示，paeoniflorigenin 回收率介於 81.9 ~ 88.7% 之間，顯示此分析方法精確可行，可提供動力學研究之用。

關於血清檢品之前處理方法，曾利用乙酸乙酯以分配原理萃取，但無法在萃取液測到 paeoniflorigenin 之存在，因此以甲醇去蛋白方式進行前處理。同時，另將血清檢品利用 sulfatase 於 37 °C 下水解 2 小時，甲醇去蛋白，再以 HPLC 定量，結果顯示 paeoniflorigenin 含量與未水解前相較，並無增加，因此本實驗採直接以甲醇溶液去蛋白方式處理血清檢品，不經酶水解。

六隻大白鼠口服白芍水煎劑 (含 paeoniflorin 110.9 mg/kg) 後, 各時間點血清中 paeoniflorigenin 之濃度如 Table 15 所示, 濃度之經時變化圖如 Fig. 17 所示。利用 WINNONIN 等軟體以非室體模式求出動力學參數如 Table 16 所示, paeoniflorigenin 之排除半衰期為 126 分鐘, 血? 時間為 10 分鐘, 最高血中濃度為 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 血藥面積為 487.0 $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$ 。

Takeda 等人的研究顯示, paeoniflorin 之生可用率極低 (3%)⁽²³⁷⁾, 可能是 paeoniflorin 之極性較高、脂溶性低導致吸收不佳。Heikal 等人對 paeoniflorin 及其代謝物 paeonimetabolin I 所進行的動力學研究顯示, 口服投予 paeoniflorin 或 paeonimetabolin I (5 mg/kg) 後, 最高血中濃度分別為 20.3 及 101.7 ng/mL, 血藥面積分別為 1174 及 12358 ng \cdot min/mL⁽²³⁸⁾。將吾人結果與前人的結果比較, 經過劑量校正顯示, paeoniflorigenin 比 paeoniflorin 或 paeonimetabolin I 有較高之血中濃度及血藥面積, 此? 元應為最主要的代謝物, 其藥理活性值得探討。

三、Paeoniflorin 受白兔、大白鼠、豬及人糞便細菌之作用

Paeoniflorin 之代謝動力學研究顯示, 其? 元 paeoniflorigenin 循環於全身, 為進一步了解 paeoniflorigenin 是否為腸道細菌水解之產物, 並比較不同種動物糞便對 paeoniflorin 代謝之異同, 進行了糞便作用之研究。

糞便中之 paeoniflorigenin 以乙酸乙酯萃取後, 經 HPLC 分析。內部標準品為 methylparaben, 其最終濃度為 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Paeoniflorigenin 及內部標準品之滯留時間分別為 19.5 及 22.6 分鐘, 整個分析過程只需時 30 分鐘, 層析圖如 Fig. 18 及 19 所示。比較各種糞便檢品所產生 paeoniflorigenin 訊號之 UV 光譜, 其 UV 光譜均相同 (如 Fig. 20 所示), 顯示 paeoniflorin 經白兔、大白鼠、豬及人等四種動物之糞便細菌作用後, 均轉化成 paeoniflorigenin, 證明 paeoniflorin 可被腸內菌分解代謝成 paeoniflorigenin, 其變化如 Table 17 所示。在一接觸到糞便細菌的時候並未偵測到 paeoniflorigenin, 之後漸增, 而無漸減的現象。這和黃酮? 的代謝不同, 黃酮? 於一接觸糞便時很快地發生水解, 通常於剛接觸時? 元最多, 爾後漸減。而 paeoniflorin 以糞便培養時, 其? 元未立刻產生, 而

後漸增，於 24 小時內並未遞減，可見 paeoniflorin 受腸道細菌的水解較黃酮為慢，但元未為糞便細菌所降解。由 Fig. 21 之結果，可以推測白兔糞便細菌對 paeoniflorin 之水解顯然和大白鼠、豬及人較為不同。因此對於 paeoniflorin 的動力學研究，大白鼠及豬應為較近於人的動物模式。

第四節 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

洋蔥及槐花中均有槲皮素配醣體之存在，但接糖之形式不同。為進一步了解接糖種類或位置之不同，是否會造成於腸道內水解成？元的難易不同，因而導致吸收之不同，因此針對含相當莫耳數槲皮素配醣體的洋蔥與槐花之間受糞便細菌水解的難易進行比較。

一、洋蔥原汁及槐花浸劑中槲皮素配醣體之定量分析

為分析洋蔥原汁及槐花浸劑中 quercetin glycosides 總含量，以高效液相層析法進行其酸水解物之定量。配醣體於酸催化下加熱，會被水解而產生？元及糖，為找尋水解槲皮素配醣體之最佳條件，對洋蔥原汁之酸水解設計了三組條件，A 組洋蔥原汁加入等量的水，作為水解前之對照。B 組洋蔥原汁以 1.2 N HCl 於 80 進行水解，時間為 1 及 2 小時。另外，利用抗壞血酸預防水解產物 quercetin 的氧化，故 C 組則添加 10Q 50 及 20 mg 三種不同量之抗壞血酸，水解時間為 2 小時。

結果如 Table 19 所示，洋蔥原汁在未水解前沒有游離態之 quercetin 存在，水解過程添加抗壞血酸時，水解出的 quercetin 明顯較多，抗壞血酸以添加 20 mg、水解時間以 2 小時為最佳。

另外，對於槐花浸劑之酸水解，結果顯示槐花浸劑未水解前無游離態之 quercetin 存在。無論水解 1 或 2 小時，quercetin 之產量並無差別，因此水解時間採用 1 小時。為進一步確認槐花浸劑中之 quercetin 已水解完全，將此水解後之檢品以 HPLC 分析，並未偵測到 rutin 之訊號。

將洋蔥原汁及槐花浸劑以上述之最佳條件水解後，利用 HPLC 分析。層析條件以乙？：0.1 % 磷酸溶液 (26 : 74, v/v) 混液為移動相，流速為 1.0 mL/min，6, 7-dimethoxycoumarin 為內部標準品，其最終濃度為 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ，於層析圖中出現之位置無任何干擾。Quercetin 及內部標準品之滯留時間分別為 11.2 及 7.2 分鐘，整個分析過程只需時 15 分鐘，層

析圖如 Fig. 22 所示。Quercetin 檢量線之濃度範圍為 0.6 ~ 40.0 $\mu\text{g/mL}$ ，方程式為 $Y = 0.078X + 0.009$ ($r^2 = 0.9998$)，顯示濃度與波峰面積比值間有良好之線性關係。

分析結果顯示洋蔥原汁及槐花浸劑 (10.0 g 槐花? 1000 mL) 中 quercetin 配醣體之濃度分別相當於含 quercetin 151.1 及 148.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

二、洋蔥及槐花受人及大白鼠糞便細菌代謝之比較

為了分析洋蔥原汁及槐花浸劑受人及大白鼠糞便懸浮液反應後之樣品，曾嘗試以分析洋蔥原汁及槐花浸劑中槲皮素配醣體之層析條件分析，但效果不佳，因此加以修飾，改以乙? : 0.1 % 磷酸溶液比例為 28 : 72 (v/v) 之混液為移動相，流速為 1.0 mL/min，6, 7-dimethoxycoumarin 作為內部標準品，其最終濃度為 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ，於層析圖中出現之位置無任何干擾，其層析圖如 Fig. 23 所示。Quercetin 及內部標準品之滯留時間分別為 8.8 及 6.3 分鐘，整個分析過程只需時 10 分鐘。

Quercetin 檢量線之濃度範圍為 0.15 ~ 40.0 $\mu\text{g/mL}$ ，檢量線方程式分別為 $Y = 0.300X + 0.036$ ($r^2 = 0.9999$, for human) 及 $Y = 0.198X + 0.021$ ($r^2 = 0.9998$, for rat)，顯示濃度與波峰面積比值間有良好之線性關係。確效結果顯示同日內及異日間的精密度及準確度均良好，結果如 Table 19~20 所示，其變異係數(C.V.)值分別小於 8.0 及 5.0 %，相對誤差(relative error) 介於 +17.9 ~ -19.7 % 之間。

將已知 quercetin 配醣體含量之洋蔥原汁及槐花浸劑，分別以人及大白鼠糞便培養，其結果如 Table 21 及 Fig. 24 所示。經人糞便細菌作用後，洋蔥中 quercetin 之含量在一接觸糞便時達 22.3 $\mu\text{g/mL}$ ，而槐花在 1 小時才達最高峰為 12.8 $\mu\text{g/mL}$ ，隨後均慢慢降低，可見洋蔥中 quercetin 配醣體較槐花中的容易水解；經大白鼠糞便細菌作用後，洋蔥中 quercetin 之含量於一接觸糞便時達 31.9 $\mu\text{g/mL}$ ，槐花則為 15.9 $\mu\text{g/mL}$ ，可見大白鼠糞便細菌與人之糞便細菌一樣，對洋蔥 quercetin 配醣體之水解遠優於槐花。

上述結果顯示，洋蔥中之 quercetin 配醣體較易水解成？元 quercetin，而 quercetin 是可以吸收的形式，應可解釋洋蔥槲皮素？的吸收（52%）遠高於 rutin 的 17%⁽⁷⁾。

第五節 槲皮素硫酸結合態代謝物受人及大白鼠糞便細菌之代謝

許多黃酮類之體內動力學研究顯示，藥物口服吸收後會在腸及肝臟被代謝，轉化為葡萄糖醛酸結合態代謝物或硫酸結合態代謝物，這些代謝物隨膽汁排入腸腔。此類代謝物因極性很大且於生理 pH 情況下，多以解離態存在，因此不易吸收，但可能會受到腸道菌群之 β -glucuronidase 水解，釋放出游離藥物，再被腸壁吸收，而進入「腸肝循環」。但以前的研究都著重在 β -glucuronidase，而對 sulfatase 的研究較少。近年來本研究室發現，許多黃酮類化合物在體內較易被代謝成硫酸結合態代謝物，血中濃度大多高於葡萄糖醛酸化合物，可見硫酸結合態代謝物為體內極重要之代謝物⁽¹⁾。本研究以 quercetin sulfates 作為對象，進一步探索腸內菌是否可水解硫酸結合態代謝物，因而造成其再吸收而進入腸肝循環的命運。

本實驗室藉由紐西蘭白兔製備之 quercetin 結合態代謝物，? 解後定量分析結果顯示主要為 quercetin sulfates (50 nmole/mL)，僅有少量之 quercetin glucuronides (2.6 nmole/mL)。我們將 quercetin 結合態代謝物分別置入 A~D 中進行反應。A：人工腸液；B： β -glucuronidase；C：大白鼠糞便懸浮液；D：人糞便懸浮液。

本實驗所使用之層析條件同第四節洋蔥及槐花受糞便細菌代謝後槲皮素之定量分析，上述檢品之層析圖如 Fig. 25 (A) ~ (C)，數據如 Table 22 所示。由 Fig. 25 (A) 可知 quercetin sulfates 與人工腸液反應時，未測得任何游離態的 quercetin，表示人工腸液無法水解任何結合態代謝物而釋放出 quercetin，亦證實此製備物中並無游離態 quercetin 之存在；而以 β -glucuronidase 進行反應時，可測得少量之 quercetin，表示 β -glucuronidase 將製備物中少量之 quercetin glucuronides 水解成 quercetin。製備物分別以大白鼠及人糞便懸浮液進行反應時，於一接觸時即產生較大量的 quercetin，但 1 小時後只剩極微量或已無法測得，應係被腸菌降解所致。以糞便細菌作用所產生的 quercetin 濃度幾乎達 β -glucuronidase 水解出的

3 倍多，以 ANOVA 進行統計分析，結果具顯著差異，由此可證實大白鼠及人之腸內菌都會分泌可水解硫酸結合態代謝物之酵素。

綜合以上結果可推論，當藥物在體內被代謝成硫酸結合態代謝物後，隨膽汁排入腸腔，即可被腸內菌水解後再吸收，因而導致腸肝循環之體內命運，應可延長藥物於體內停留的時程。如果槲皮素硫酸結合態代謝物為其活性代謝物，那麼因腸肝循環所延長的體內滯留時間，應可使服藥間隔得以拉長。

第六節 大黃水煎劑及其成分受大白鼠及白兔糞便細菌之代謝

一、大黃水煎劑受大白鼠糞便細菌之代謝

(一) Aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 於糞便懸浮液中之定量分析方法之建立

本研究為進行大黃水煎劑受大白鼠糞便細菌代謝之實驗，以 HPLC 方法定量大黃水煎劑之 ?? 成分，結果大黃水煎煮液中所含 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 等成分之含量分別為 18.8、96.3、21.3 及 14.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

當以分析生大黃水煎煮液中四種 ?? 成分之 HPLC 條件對生大黃之大白鼠糞便檢品進行分析時，卻無法成功分離。由於大黃本身成分已相當複雜，再加上糞便中含有許多物質，因此開發新的梯度沖提方式進行分離，結果分離效果良好。內部標準品 2-methylanthraquinone 於層析圖中出現之位置無任何干擾，其最終濃度為 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及內部標準品之滯留時間分別為 8.9、9.7、15.8、23.4 及 19.6 分鐘，整個分析過程只需時 25 分鐘，層析圖如 Fig. 26 所示。

為了進行糞便檢品定量，分別製作 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之檢量線，結果如 Table 23，顯示在各檢量線濃度範圍內，四種成分於大白鼠糞便懸浮液中均有良好之線性關係 ($r^2 = 0.9989 \sim 0.9995$)。確效結果顯示定量 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之方法在同日內及異日間的精密度及準確度均良好，結果如 Table 24~27 所示，其變異係數 (C.V.) 值分別小於 6%。

(二) 大黃水煎煮液中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 受大白鼠糞便細菌之作用

將已知 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 等成分含量之大黃水煎劑，以大白鼠糞便培養，其各成分含量之變化如 Table 28 所

示，其濃度之經時變化如 Fig. 27 所示。在一接觸到糞便細菌時，生大黃中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之含量即由 1.9、9.6、2.1 及 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增為 9.4、19.0、9.1 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，顯示經作用之後四種成分明顯增高。此結果顯示大黃水煎劑內除非糖體外，尚有為量不少的配糖體存在。

過去的研究顯示大黃藥材中含有 sennosides A & B^(239, 240)、rhein 8-glucoside⁽²⁴⁰⁾、aloe-emodin 8-glucoside⁽²³⁹⁾ 及 chrysophanol-8-O- β -D-glucopyranoside (chrysophanein)⁽²⁴¹⁾ 等配糖體。活性成分 sennosides A & B 及 rhein 8-glucoside 於大腸中為細菌水解為非糖基 rhein 後方能吸收^(226, 242, 243)。Aloe-emodin 8-glucoside 及 chrysophanein 亦可能經由腸內菌之作用，而分別轉變成元 aloe-emodin 及 chrysophanol⁽²⁴⁴⁾。本研究顯示 aloe-emodin 和 chrysophanol 之量均因與糞便細菌作用而增加，而且此反應很快速，於一接觸糞便時含量最高。之後，其含量隨時間而下降，顯示此四種化合物繼而為糞便細菌所降解。

大黃中此四種成分之含量於反應前高低依次為 rhein、emodin、aloe-emodin 及 chrysophanol，於反應後，chrysophanol 之含量僅次於 rhein，有可能因為大黃藥材中含較多量之 chrysophanein，經糞便細菌作用後快速轉變成 chrysophanol，亦可能因為 chrysophanol 於腸內菌中降解之程度較低所致。

以往大黃之研究多著重大黃藥材成分之定量，而忽略了口服後於體內之轉變情形，如大黃藥材中之 sennosides A & B 於體內會先轉變成 rhein anthrone，再進一步轉變為 rhein，且其代謝物之活性又較原化合物為強⁽²²⁶⁾。大黃水煎劑以及含配糖體之中藥當使用於臨床治療時，此種體內之代謝轉變，值得臨床人員關注。

(三) Aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 受大白鼠糞便細菌之降解

Fig. 28 及 Table 29 之結果顯示，在接觸到糞便細菌至 3 小時期間 emodin 降解速率較慢，而 aloe-emodin、rhein 及 chrysophanol 三者相差

不多，之後於 24 小時內，chrysophanol 降解最慢，rhein 降解最快。

將此四種成分混合以模擬大黃藥材中共存之情形，與大白鼠糞便培養，結果如 Fig. 29 及 Table 30 所示，rhein 降解速率最快，其次分別為 aloe-emodin、emodin 及 chrysophanol。由此證明四種成分共存時與單一成分之降解情況並無不同。

Aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 均屬於蒽類化合物，其基本母結構相似，只有在第 3 及第 6 位之取代基不同。此四種化合物受糞便細菌作用之結果顯示，具有 COOH 基團取代者，如 rhein 較易被降解，其次為有 CH₂OH 基團者（如 aloe-emodin），而有 CH₃ 者（如 chrysophanol 及 emodin），則最不易受降解。

二、番瀉甲、乙及大黃酸受白兔及大白鼠糞便細菌之作用

Sennosides A 與 B 為大黃、番瀉葉之活性成分，互為立體異構物。研究報告顯示番瀉甲口服後在小腸受腸內細菌的作用，生成大黃酸醌（rhein anthrone），此化合物在有氧的環境中很不穩定，在空氣中易氧化，而成為大黃酸（rhein），因此大黃酸醌僅能在後消化道厭氧條件下生成。Rhein anthrone 為番瀉甲之活性代謝物，其瀉下作用較番瀉甲強。本實驗利用了白兔及大白鼠糞便比較 sennosides A 與 B 兩立體異構物受糞便細菌代謝之差異及不同種動物糞便細菌間代謝的異同，同時進一步比較 rhein 於此二種動物糞便中被降解的情形，以便對番瀉甲之循環前代謝有更清楚的了解。

本研究建立 HPLC 方法，分析 sennoside A 與 B 等成分受白兔及大白鼠糞便懸浮液作用後 rhein 之經時變化，層析條件以乙腈：0.1% 醋酸溶液（42：58, v/v）混液為移動相，流速為 1.0 mL/min。內部標準品 amylparaben 於層析圖中出現之位置無任何干擾，其最終濃度為 2.2 µg/mL。Rhein 及內部標準品之滯留時間分別為 12.9 及 26.5 分鐘，整個分析過程只需時 30 分鐘，層析圖如 Fig. 30 所示。

Rhein 於白兔及大白鼠糞便懸浮液中檢量線之濃度範圍及方程式分別為： $0.3 \sim 5.0 \mu\text{g/mL}$ ， $Y = 0.041X + 0.001$ ($r^2 = 0.9962$ ，for rabbit)； $0.6 \sim 30.0 \mu\text{g/mL}$ ， $Y = 0.233X + 0.050$ ($r^2 = 0.9988$ ，for rat)，顯示濃度與波峰面積比值間有良好線性關係。確效結果顯示，同日內及異日間的精密度及準確度均良好，結果如 Table 31 及 32 所示，其變異係數 (C.V.) 值分別小於 7%，相對誤差 (relative error) 介於 +13.5 ~ -14.1 % 之間。

Sennosides A 與 B 受白兔及大白鼠糞便細菌作用後，rhein 之經時濃度變化如 Table 33 及 Fig. 31 所示。與白兔糞便細菌培養後，在接觸到糞便細菌至 5 小時期間，sennoside A 轉變成的 rhein，由一接觸的 $0.6 \mu\text{g/mL}$ 增為 5 小時的 $3.8 \mu\text{g/mL}$ ，sennoside B 則由 $0.6 \mu\text{g/mL}$ 增為 $3.3 \mu\text{g/mL}$ ；經大白鼠糞便細菌培養後，sennoside A 由 $1.3 \mu\text{g/mL}$ 增為 $4.1 \mu\text{g/mL}$ ，sennoside B 則由 $1.5 \mu\text{g/mL}$ 增為 $4.3 \mu\text{g/mL}$ 。於 5 小時之後，rhein 漸減，應是受到細菌的降解。Sennosides A 與 B 受白兔及大白鼠糞便細菌作用，產生 rhein 的現象極為相似。

Rhein 可能因由 sennosides 轉變過來的過程較複雜，導致其產生需時頗長。Sennosides A 與 B 之反應起始濃度為 $100.0 \mu\text{g/mL}$ ，但轉變成 rhein 者只有極少量，且 rhein 會一面產生，一面似又遭受腸內細菌的降解，因此本研究進一步單獨將 rhein 以糞便細菌培養，以了解其降解情況。利用白兔及大白鼠糞便細菌與 rhein 培養，結果顯示 rhein 很快就遭腸內菌破壞，大白鼠糞便細菌之作用較白兔明顯，在一小時之內就只殘留 34.8%，二小時後僅殘留 11.5%，其含量之變化如 Table 34 所示，濃度之經時變化如 Fig. 32。此結果顯示 rhein 的確極易遭受腸內菌降解。

第七節 生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎劑受大白鼠糞便細菌之代謝

本研究室利用同一批生黃芩自行炮製而得之酒黃芩及蜜黃芩，以 HPLC 定量其中所含 baicalin、baicalein、wogonin 及 wogonin glycosides 等成分之含量。Wogonin glycosides 包括 wogonoside 及 wogonin 5-O- β -D-glucopyranoside，此二者並無市售之標準品，因此 wogonin glycosides 之定量係將水煎劑檢品經酸水解，將水解後 wogonin 之總量減去水解前 wogonin 之含量，即得 wogonin glycosides 之含量。結果顯示生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩三種水煎劑中此四成分之含量如下：baicalin 分別為 1016.5 1119.7 及 1165.9 $\mu\text{g/mL}$ ；baicalein 分別為 146.9 188.8 及 193.1 $\mu\text{g/mL}$ ；wogonin glycoside 分別為 162.0 200.3 及 205.3 $\mu\text{g/mL}$ ；wogonin 分別為 57.2、75.1 及 76.0 $\mu\text{g/mL}$ ，顯示此四種黃酮類成分之含量以蜜黃芩水煎劑中最多，其次為酒黃芩，生黃芩最少。

本研究以 HPLC 方法分析生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎煮液中 baicalein 及 wogonin 等成分受大白鼠糞便作用後黃酮類之變化情形，層析條件以乙腈：0.1% 磷酸溶液（32：68, v/v）混液為移動相，檢測波長 270 nm，流速為 1.0 mL/min。內部標準品 propylparaben 於層析圖中出現之位置無任何干擾，其最終濃度為 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 。Baicalein、wogonin 及內部標準品之滯留時間分別為 11.0、28.1 及 15.6 分鐘，整個分析過程只需時 30 分鐘，層析圖如 Fig. 33 所示。

為進行定量分析，分別製作 baicalein 及 wogonin 於糞便懸浮液中之檢量線，結果如 Table 35 所示，顯示在各檢量線濃度範圍內均有良好線性關係（ $r^2 = 0.9995 \sim 0.9996$ ）。確效結果顯示，定量方法同日內及異日間的精密度及準確度均良好，結果如 Table 36~37 所示，其變異係數（C.V.）值皆小於 5%，相對誤差（relative error）介於 +6.7 ~ -15.5% 之間。

將生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎液分別以大白鼠糞便培養，在一接觸糞便時，三種黃芩中 baicalein 及 wogonin 含量均驟增，變化如下：生黃芩 14.7 109.4 及 5.7 17.5 $\mu\text{g/mL}$ ；酒黃芩 18.9 122.6 及 7.5 19.4

$\mu\text{g/mL}$ 及蜜黃芩 19.3 98.8 及 7.6 18.3 $\mu\text{g/mL}$ 。此結果顯示腸內菌之作用非常快速, baicalein 的量增加了 5.1~7.4 倍, wogonin 則是增加約 2.4~3.1 倍。各成分含量之變化如 Table 38 所示。

Baicalein 及 wogonin 的濃度經時變化圖 (如 Fig. 34~35), 顯示此三種黃芩水煎劑於一接觸糞便時, baicalein 和 wogonin 立刻增加很多, 之後隨時間而下降, 顯示此二種化合物都為糞便細菌所降解, 而酒製或蜜製對黃芩之黃芩素及漢黃芩素配醣體之循環前代謝並無明確影響。

第八節 甘草酸及甘草水煎劑於豬、大白鼠及人糞便細菌作用之比較

一、甘草酸及甘草水煎劑受糞便細菌作用之比較

為比較甘草酸純化合物及甘草水煎劑中之甘草酸受豬、大白鼠及人糞便細菌作用後，轉變為甘草次酸（GA）及 3-去氫甘草次酸（3-dehydroGA）之情形，建立了一個快速且精確之高效液相層析法進行分析。層析條件以乙腈：0.1% 磷酸溶液（66：34, v/v）混液為移動相，流速為 1.0 mL/min，以 2-methylanthraquinone 為內部標準品，其最終濃度為 5.0 µg/mL，於層析圖中出現之位置無任何干擾。GA、3-dehydroGA 及內部標準品之滯留時間分別為 9.6、12.9 及 7.7 分鐘，整個分析過程只需時 15 分鐘，其層析圖如 Fig. 36~38 所示。

先前，本實驗室利用白兔糞便對甘草酸所進行的代謝研究發現，從一開始培養至 2 小時間，GA 漸增，但 2 小時之後，GA 漸減，而 3-dehydroGA 明顯遞增。初始之 2 小時，因甘草酸水解為 GA，而 2 小時之後，可能因甘草酸大多已水解，而 GA 逐漸氧化，導致 3-dehydroGA 漸增，因此 GA 和 3-dehydroGA 之間呈現一消一長的現象，如 Fig. 39 所示。然而，本研究以大白鼠、豬及人的糞便細菌對甘草酸的代謝研究顯示，GA 漸增而並無遞減的現象；在大白鼠及豬的糞便細菌作用下，於 2 ~ 4 小時後才產生極微量的 3-dehydroGA，且 24 小時內均以極低的濃度存在，但在人糞便細菌作用下，未偵測到 3-dehydroGA（如 Fig. 39~41 及 Table 40~42 所示）。因此動物的種類不同，甘草酸的體內腸內代謝命運可能不同。比較 Fig. 39、40、41 及 42，可以預測白兔腸道內之菌群顯然和大白鼠、豬及人較為不同。

另外，以不同種動物之糞便細菌對甘草水煎劑的代謝研究顯示，在白兔、大白鼠、豬及人的糞便細菌作用下，GA 的濃度皆呈持續穩定增加，白兔糞便在初始產生極微的 3-dehydroGA，8 小時之後即消失（Fig. 39），然而另外三種動物的糞便，在 24 小時內 3-dehydroGA 均以極低的濃度存在，如 Fig. 40~42 所示。此結果顯示對於甘草水煎劑的循環前代

謝，三種動物間的現象頗為相似。

基於純化合物甘草酸於各種動物間的循環前代謝存在著顯著差異，特別是白兔。因此本研究進一步比較動物糞便對含等莫耳數的純甘草酸和甘草水煎劑之代謝作用，結果顯示甘草水煎劑受白兔糞便作用時，所產生的 GA 遠高於純甘草酸，然而大白鼠、豬及人糞便則相反，純甘草酸所產生的 GA 遠高於甘草水煎劑，且具有統計上之差異。此結果與體內研究一致，以大白鼠和白兔口服甘草酸與含等量甘草酸的甘草水煎劑時，在大白鼠實驗中，口服甘草酸比甘草水煎劑的 GA 血中濃度為高^(245, 246)，然而在白兔實驗中，口服甘草水煎劑比甘草酸的 GA 血中濃度為高。

甘草水煎劑與甘草酸的糞便細菌代謝研究顯示，腸道細菌對甘草酸之體內命運扮演著重要角色。從動物間糞便細菌代謝的比較顯示，大白鼠應為較近似於人之動物模式，而白兔對於甘草水煎劑的循環前代謝與人也近似，但是對純甘草酸的循環前代謝白兔卻與其他動物都不相同。

二、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

上述結果顯示不同動物糞便對甘草酸和甘草水煎劑之代謝作用有些許不同，大白鼠應為較近似於人之動物模式。先前本實驗室將甘草水煎劑利用白兔糞便細菌單獨培養與添加蜂蜜培養的比較研究發現，GA 隨培養時間濃度漸漸增加，添加蜂蜜者，GA 之濃度較單獨培養甘草水煎劑者為高，GA 之氧化物 3-dehydroGA 之濃度，不論是單獨培養甘草水煎劑或是添加蜂蜜者均甚低，幾可忽略。本研究再利用大白鼠糞便進行比較研究，結果發現 GA 亦隨培養時間濃度漸漸增加，於 2 小時後略微減少，添加蜂蜜者 GA 之濃度較單獨培養甘草水煎劑者為高，且具有統計上之差異；單獨培養甘草水煎劑者，3-dehydroGA 於二小時後漸漸產生，而添加蜂蜜者並未偵測到 3-dehydroGA (如 Fig. 43 及 Table 42 所示)，且於 4 小時後即有統計上之意義。此結果顯示蜂蜜促進了甘草酸的水解，並抑制了 GA 的氧化，致使 3-dehydroGA 明顯變少。

蜂蜜之糖類成分對甘草水煎劑受糞便細菌代謝之影響如 Fig. 44 及 Table 43 所示，在培養 1 小時後，添加葡萄糖或果糖者，其 GA 之濃度較

單獨培養甘草水煎劑者為高，具有統計上之意義，其中以添加葡萄糖者增加較多，而 3-dehydroGA 並未因添加了葡萄糖與果糖而顯著改變，顯示 GA 的氧化產物未隨著 GA 的增加而增加。此結果可以推論蜂蜜中主要糖類成分促進了甘草水煎劑中 GZ 之水解，同時也抑制了 GA 的氧化作用。

總之，蜂蜜、葡萄糖與果糖顯著改變了甘草水煎劑中主要活性成分甘草酸的循環前代謝，產生了更多的 GA 可供腸道吸收，應會導致 GA 血中濃度的增高。因為 GA 的抗發炎作用是 GZ 的 10-50 倍，因此可以預測蜂蜜、葡萄糖與果糖皆可提高甘草或甘草酸的療效。

第五章 結 論

- 一、本研究建立各種黃酮類、? 類及?? 類等成分之 HPLC 分析方法，應用於白兔、大白鼠、豬及人糞便細菌代謝之研究。
- 二、Hesperidin、rutin、naringin 及 phellamurin 等配醣體在白兔、大白鼠及人糞便細菌中之代謝情形極為相似。
- 三、白兔、大白鼠及人之糞便細菌皆無法將 puerarin (C-配醣體) 水解。
- 四、13 種黃酮? 元化合物間被降解之構造活性關係如下：
 1. 13 種黃酮? 元均會被白兔、大白鼠及人糞便細菌降解，為 1 級動力學。
 2. C 環上 2,3 位置的雙鍵及 3 位置的 OH 基團對降解無明顯影響。
 3. 結構上具有 methoxy 基團者可使化合物不易被降解。
 4. 在人工腸液中，異黃酮類化合物較穩定。Baicalein、diosmetin 及 quercetin 具有 catechol-type 之結構，較不穩定。
 5. 親脂性高的黃酮? 元，即使易為腸內菌降解仍有不錯的吸收率，如：neophellamuretin。
- 五、口服投予 catalpol 後，於大鼠及小鼠之血清中均無法測得 catalpol 之存在。
- 六、Paeoniflorgenin 為新發現的 paeoniflorin 體內代謝物，其動力學參數 $t_{1/2}$ 為 126 分鐘， t_{max} 為 10 分鐘， C_{max} 為 8.0 $\mu\text{g/mL}$ ， AUC_{0-t} 為 487.0 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ 。另外，白兔 大白鼠 豬及人之腸內菌均可將 paeoniflorin 代謝成 paeoniflorgenin，其中大白鼠及豬之模式與人較近似。
- 七、存在於洋蔥中之 quercetin glycosides 較槐花中之 quercetin rutinoside 易被糞便細菌水解，可以解釋為何洋蔥比 rutin 的吸收為佳。
- 八、大白鼠與人之糞便細菌除了分泌水解配醣體的? 如： α -rhamnosidase 或 β -glucosidase 外，亦可水解硫酸結合態代謝物。

- 九、大黃水煎劑受大白鼠糞便細菌作用後，aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 含量均增加。表示除非糖體外尚有為量頗多的配糖體存在。
- 十、黃芩水煎劑中之黃酮？均會被大白鼠之糞便細菌轉變成？元，且進一步被降解。黃芩酒製或蜜製對黃芩之黃芩素及漢黃芩素配醣體之循環前代謝並無明確影響。
- 十一、白兔糞便細菌對純化合物甘草酸的代謝模式與大白鼠、豬及人較不同，然而對甘草水煎劑中甘草酸之代謝，此四種動物模式卻頗為一致。此外，甘草水煎劑受白兔糞便細菌代謝時，所產生的甘草次酸遠高於純甘草酸，然而大白鼠、豬及人糞便則相反，純甘草酸所產生的甘草次酸遠高於甘草水煎劑。
- 十二、添加蜂蜜、葡萄糖或果糖於甘草水煎劑時，受白兔與大白鼠糞便細菌作用下，均促進了甘草水煎劑中甘草酸之水解，並抑制了甘草次酸之氧化。因此，蜂蜜及其糖類成分會增強甘草之療效。