

中國醫藥大學 藥物化學研究所

碩士論文

指導教授：李珮端 教授

共同指導教授：徐素蘭 教授

蔡尚元 副教授

梔子中 Geniposide 於大鼠之代謝動力學

及其與西藥之交互作用

Metabolic Pharmacokinetics of Geniposide in Gardenia Fruits
and Interactions with Western Medicines in Rats

研究生：賴佩妘

Pei-Yun Lai

中華民國九十五年五月

目 錄

目錄.....	I
附圖目錄.....	III
附表目錄.....	V
中文摘要.....	IX
英文摘要.....	XI
第一章 緒言.....	1
第二章 總論.....	4
第一節 梔子之文獻考察.....	4
第二節 Geniposide 與 genipin 之結構、理化性質與藥理活性.....	9
第三節 Methotrexate 之特性.....	14
第四節 Phenytoin 之特性.....	20
第五節 Carbamazepine 之特性.....	24
第六節 多重耐藥性蛋白 (multidrug-resistance associated proteins) 之特性.....	29
第七節 有機陰離子運輸蛋白 (organic anionic transport proteins) 之特性.....	34
第三章 材料與方法.....	36

第一節 實驗材料.....	36
第二節 實驗方法.....	45
一、Genipin 之 pKa 測定.....	45
二、Genipin 之安定性.....	46
三、體循環前代謝 - 大鼠便腸道菌對 geniposide 之作用.....	52
四、Genipin 於大鼠體內之代謝動力學.....	54
五、梔子水煎劑中 geniposide 之定量分析.....	59
六、梔子水煎劑於大鼠體內之代謝動力學.....	62
七、梔子水煎劑於大鼠體內對 methotrexate 動力學之影響.....	63
八、梔子水煎劑於大鼠體內對 phenytoin 動力學之影響.....	65
九、梔子水煎劑於大鼠體內對 carbamazepine 動力學之影響.....	69
第四章 結果與討論.....	72
第五章 結論與建議.....	89
參考文獻.....	90

附 圖 目 錄

Fig. 1	The titration curve of genipin.....	97
Fig. 2	The first derivative (pH/V) titration curve of genipin.....	97
Fig. 3	The second derivative ($^2\text{pH}/V^2$) titration curve of genipin.....	97
Fig. 4	Stability of genipin in MeOH (n=3).....	98
Fig. 5	Stability of genipin in serum stored at -20°C (n=3).....	98
Fig. 6	Effect of ascorbic acid on genipin stability in serum (n=3).....	99
Fig. 7	Effect of thaw and sonication on genipin stability in serum (n=3).....	99
Fig. 8	Effect of incubation time with sulfatase at 37°C on genipin emergence in serum (n=3).....	100
Fig. 9	Chromatograms of genipin in rat feces.....	101
Fig. 10	Mean (\pm S.D.) ratio-time profile of genipin after incubation of geniposide with rat feces (n=3).....	102
Fig. 11	Chromatograms of genipin in plasma.....	103
Fig. 12	Individual plasma concentration-time profiles of genipin () and genipin sulfate () in nine rats after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg).....	104
Fig. 13	Mean (\pm S.E.) plasma concentration-time profiles of genipin () and genipin sulfate () after intravenous genipin (50 mg/kg) to nine rats (left) and the semi-log diagram (right).....	105
Fig. 14	Mean (\pm S.E.) plasma concentration-time profiles of genipin sulfate after oral administration of genipin (100, 200 mg/kg) to four rats (left) and the semi-log diagram (right).....	105
Fig. 15	Chromatograms of geniposide (GP) in GF decoction.....	106
Fig. 16	Individual plasma concentration-time profiles of genipin sulfate in six rats after oral administrations of GF decoctions (10, 20 g/kg).....	107
Fig. 17	Mean (\pm S.E.) plasma concentration-time profile of genipin sulfate after oral administrations of GF decoctions (10, 20 g/kg) to six rats and the semi-log diagram.....	108
Fig. 18	Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profile of MTX after oral MTX alone (), and coadministration with 4 (), 2 () and 1 g/kg () of GF decoction (upper) and the semi-log diagram (lower).....	109
Fig. 19	Chromatograms of PHT in serum.....	110
Fig. 20	Individual serum concentration-time profiles of PHT in six rats after	

	oral PHT alone (), and coadministration with 2 g/kg () of GF decoction.....	111
Fig. 21	Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profile of PHT after oral PHT alone (), and coadministration with 2 g/kg () of GF decoction (upper) and the semi-log diagram (lower).....	112
Fig. 22	Chromatograms of CBZ in serum.....	113
Fig. 23	Individual serum concentration-time profiles of CBZ in six rats after oral CBZ alone (), and coadministration with 4 g/kg () of GF decoction.....	114
Fig. 24	Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profile of CBZ after oral CBZ alone (), and coadministration with 4 g/kg () of GF decoction (upper) and the semi-log diagram (lower).....	115



附表目錄

Table 1	The pH change of genipin solution (in water) titrated with 0.1N NaOH.....	116
Table 2	Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of genipin in plasma.....	117
Table 3	Recovery (%) of genipin from plasma (n=3).....	117
Table 4	Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin in nine rats after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg).....	118
Table 5	Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in nine rats after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg).....	118
Table 6	Individual pharmacokinetic parameters of genipin in plasma after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg) to nine rats.....	118
Table 7	Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg) to nine rats.....	119
Table 8	Pharmacokinetic parameters of genipin parent form and genipin sulfate in plasma after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg)	119
Table 9	Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in eight rats after oral administration of genipin (100 mg/kg).....	120
Table 10	Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in four rats after oral administration of genipin (200 mg/kg).....	120
Table 11	Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administration of genipin (100 mg/kg) to eight rats	121
Table 12	Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administration of genipin (200 mg/kg) to four rats	121
Table 13	Comparison of pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administrations of 100 and 200 mg/kg genipin	121

Table 14	Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of geniposide (n=3).....	122
Table 15	Recovery (%) of geniposide from GF decoction (n=3).....	122
Table 16	Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in six rats after oral administration of GF decoction (10 g/kg).....	123
Table 17	Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in six rats after oral administration of GF decoction (20 g/kg).....	123
Table 18	Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administration of GF decoction (10 g/kg) to six rats	124
Table 19	Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administration of GF decoction (20 g/kg) to six rats	124
Table 20	Comparison of pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administrations of 10 and 20g/kg GF decoction	124
Table 21	Serum concentrations ($\mu\text{mol/mL}$) of MTX in six rats after oral administration of MTX (5 mg/kg) alone.....	125
Table 22	Serum concentrations ($\mu\text{mol/mL}$) of MTX in six rats after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (1 g/kg).....	125
Table 23	Serum concentrations ($\mu\text{mol/mL}$) of MTX in six rats after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (2 g/kg).....	126
Table 24	Serum concentrations ($\mu\text{mol/mL}$) of MTX in six rats after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (4 g/kg).....	126
Table 25	Individual pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) alone.....	127
Table 26	Individual pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (1 g/kg)	127
Table 27	Individual pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (2 g/kg)	127

Table 28	Individual pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (4 g/kg)	128
Table 29	Comparison of pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) alone and coadministration with GF decoctions (1, 2, 4 g/kg).....	128
Table 30	Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of PHT in serum (n=3).....	129
Table 31	Recovery (%) of PHT from serum (n=3).....	129
Table 32	Serum concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of PHT in five rats after oral administration of PHT (400 mg/kg) alone.....	130
Table 33	Serum concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of PHT in five rats after oral administration of PHT (400 mg/kg) with GF decoction (2 g/kg)	130
Table 34	Individual pharmacokinetic parameters of PHT in serum after oral administration of PHT (400 mg/kg) alone.....	131
Table 35	Individual pharmacokinetic parameters of PHT in serum after oral administration of PHT (400 mg/kg) with GF decoction (2 g/kg)	131
Table 36	Comparison of pharmacokinetic parameters of PHT in serum after oral administration of PHT (400 mg/kg) alone and coadministration with GF decoction (2 g/kg) in six rats.....	131
Table 37	Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of CBZ in serum (n=3).....	132
Table 38	Recovery (%) of CBZ from serum (n=3).....	132
Table 39	Serum concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of CBZ in five rats after oral administration of CBZ (400 mg/kg) alone.....	133
Table 40	Serum concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of CBZ in five rats after oral administration of CBZ (400 mg/kg) with GF decoction (4 g/kg)	133
Table 41	Individual pharmacokinetic parameters of CBZ in serum after oral administration of CBZ (400 mg/kg) alone.....	134

Table 42 Individual pharmacokinetic parameters of CBZ in serum after oral administration of CBZ (400 mg/kg) with GF decoction (4 g/kg)134

Table 43 Comparison of pharmacokinetic parameters of CBZ in serum after oral administration of CBZ (400 mg/kg) alone and coadministration with GF decoction (4 g/kg) in six rats..... 134



梔子中 Geniposide 於大鼠之代謝動力學 及其與西藥之交互作用

研究生 賴佩妘

中國醫藥大學 藥物化學研究所

摘 要

Geniposide 屬於 iridoid 類之配醣體，存在於茜草科 (Rubiaceae) 梔子 *Gardenia jasminoides* ELLIS. 之乾燥成熟果實中，於體內可被腸道菌轉變為 genipin，再和氨基酸反應生成梔子藍色素。本研究探討靜脈注射、口服 genipin 與口服梔子水煎劑於大鼠體內之代謝動力學及其對 MRP2 受質之西藥 methotrexate (MTX)、phenytoin (PHT) 及 carbamazepine (CBZ) 動力學之影響。

梔子水煎劑利用高效液相層析法進行分析。大鼠靜脈注射、口服 genipin 與口服梔子水煎劑後，於各時間點以心臟穿刺採血，血漿中 genipin 及其 sulfate 與 glucuronide 之定量，係以 sulfatase、glucuronidase 分別水解，水解前、後利用高效液相層析法定量，以 WinNonlin 非室體模式計算動力學參數。結果顯示，靜脈注射 genipin 後，立即代謝成 sulfate 結合態代謝

物，其原形分子只短暫存在於血清中；口服給予 genipin 後，主要以 genipin sulfate 存在循環中，且口服 200 mg/kg genipin 的大鼠死亡率竟高達 77.8%。口服梔子水煎劑主要以 genipin sulfate 循環於體內，其存在體內的時間達六天之久，且有明顯的腸肝循環現象，而 genipin 與 genipin glucuronide 則無法偵測到。

MTX 為抗癌藥物及免疫抑制劑，治療指數狹窄，為 MRPs 1, 2, 3, 4 之受質。本研究探討梔子水煎劑於大鼠體內對 MTX 動力學之影響。利用螢光偏極免疫分析法定量 MTX 之血中濃度，以 WinNonlin 非室體模式計算動力學參數。結果顯示，併服 2 g/kg 梔子水煎劑，對 MTX 之血藥面積及滯留時間顯著增加了 477.1% 及 397.7%，甚至導致部分大鼠死亡 (4/6)。因此，建議為確保療效及用藥安全，使用 MTX 之病人盡量避免併服梔子水煎劑及其相關方劑。

PHT 及 CBZ 皆為臨床常用之抗癲癇藥物，其治療指數狹窄，為 MRP 2 之受質，本研究探討梔子水煎劑於大鼠體內對 PHT 及 CBZ 動力學之影響。利用高效液相層析法定量血清中 PHT 及 CBZ。結果顯示，併服梔子水煎劑，造成 PHT 給藥後 24 小時內之早期暴露及對 CBZ 之全期暴露。為了保障藥效，服用 PHT 及 CBZ 之病患，應避免與梔子水煎劑併服。

Metabolic Pharmacokinetics of Geniposide in Gardenia Fruits and Interactions with Western Medicines in Rats

Pei-Yun Lai

Institute of Pharmaceutical Chemistry,
China Medical University, Taichung, Taiwan

ABSTRACT

Geniposide is an iridoid glycoside in the fruits of *Gardenia jasminoides* ELLIS. It has been reported that geniposide is transformed to genipin by intestinal bacteria in animals. We attempted to investigate the pharmacokinetics of geniposide in rat after oral administration of traditional decoction of Gardenia fruits (GF). The concentration of geniposide in the GF decoction was determined by HPLC method. In addition, the pharmacokinetics of genipin was investigated after intravenous and oral administrations. Based on the pharmacokinetic study, we proposed possible pharmacokinetic interactions between GF decoction with methotrexate (MTX), phenytoin (PHT) and carbamazepine (CBZ), which are substrates of MRP2.

Blood samples were withdrawn via cardiopuncture at specific time points after drug administration. Plasma samples were assayed by HPLC method prior to and after enzymatic hydrolysis with sulfatase and glucuronidase, respectively. Pharmacokinetic parameters were calculated using noncompartment model of WinNonlin. Our results indicated that after oral administration of GF decoction,

no free form of genipin was detected, and genipin sulfate was found predominately circulating in the bloodstream until the 6th day after dosing. Likewise, after oral and intravenous dosing of genipin, genipin sulfate was found predominant in the bloodstream, whereas glucuronides were negligible. Therefore, the biological activities of the genipin sulfate awaits further studies. To our surprise, oral administration of 200 mg/kg genipin resulted in a high mortality of 77.8% in rats.

MTX, an immunosuppressant with narrow therapeutic window, is a substrate of MRP 1, 2, 3, 4. In this study, rats were orally given MTX alone and coadministered with 4, 2 and 1 g/kg of GF decoctions, respectively. The serum MTX levels were assayed by FPIA method. The coadministration of 2 g/kg of GF decoction markedly increased the AUC and MRT of MTX by 477.1% and 397.7%, respectively, and resulted in death of rats (4/6). Therefore, concurrent use of GF may enhance the efficacy and toxicity of MTX.

PHT and CBZ are anti-epileptic drugs with narrow therapeutic window. This study investigated the effects of GF on the pharmacokinetics of PHT and CBZ. The blood concentrations of PHT and CBZ were assayed by HPLC methods. The AUC_{0-1440} of PHT and AUC_{0-t} of CBZ were significantly decreased after coadministration of GF, respectively. For ensuring the efficacy of PHT and CBZ, the coadministration with GF decoction should be avoided.

第一章 緒言

梔子始載於《神農本草經》，列為中品。《中國藥典》記載梔子來源於茜草科 (Rubiaceae) 植物梔子 *Gardenia jasminoides* ELLIS. 的乾燥成熟果實。具有瀉火除煩，清熱利尿，涼血解毒的功效。亦具利膽保肝、降壓、鎮靜、鎮痙、降溫、鎮痛、促進胰腺分泌作用、抑菌作用、抗炎及治療軟組織損傷的作用等藥理活性 (徐等, 1996; Chang & But, 1987; Tseng et al., 1995)。

Geniposide 屬於 iridoid 類之配醣體，為梔子所含之主要成分之一，水溶性頗佳，故易溶於傳統水煎劑中，具利膽保肝 (徐珞珊等, 1996)、抑制胃液分泌及腸胃道蠕動、鎮靜、抑制氣喘、抗凝血 (Suzuki et al., 2001)、抗發炎等藥理活性；Geniposide 於體內可被動物之腸道菌轉變為 genipin (Akao et al., 1994; Ueno et al., 2001)，再和氨基酸反應生成梔子藍色素 (Fujikawa et al., 1987; Hendry & Houghton, 1996; Park et al., 2002; Lee et al., 2003)。Genipin 為 geniposide 之非醣體，具利膽保肝 (徐珞珊等, 1996)、抑制膽固醇結石的形成 (朱振家等, 2001)、抑制胃腸運動、鎮靜、促進胰腺分泌作用、抗發炎作用 (朱江等, 2005; Koo et al., 2004; 2006) 等藥理活性，亦可作為生物材料交聯劑及其與胺基酸結合生成之梔子藍色素 (Fujikawa et al., 1987; Hendry & Houghton, 1996; Park et al., 2002; Lee et al., 2003) 可當食用色素。文獻中已有研究報導梔子水煎劑口服給予小鼠，其 geniposide、genipin 於體內之代謝動力學 (Ueno et al., 2001)，與

靜脈注射給予 geniposide 後，探討其於大鼠體內代謝動力學之研究 (Tseng & Tsai, 2004)；但 genipin 之結構具 hemiacetal 官能基，易開環，化性較不安定，因此本研究以 HPLC 方法先行探討 genipin 於甲醇及血清中之安定性；再以太鼠為模式，探討靜脈注射、口服 genipin 及口服梔子水煎劑之代謝動力學。

在台灣的醫療環境中，除現代醫學外，傳統中醫藥仍被國人所接受而大量使用，但民眾普遍認為中藥藥性溫和、安全，西藥藥效迅速，兩者並用，雙重保險，因此常在非醫囑的情況下自行併用中藥。因此，面對此複雜的用藥模式下，其中實是潛藏著許多未知的風險有待探究。

Methotrexate (MTX) 為葉酸衍生物，於低劑量使用時為一免疫抑制劑，高劑量則用於治療癌症，但其治療指數狹窄，是癌症治療中唯一需監測血中濃度的藥物。近年研究顯示，MTX 為多重耐藥性蛋白 (multidrug-resistance associated proteins; MRPs) 及有機陰離子運送蛋白 (organic anionic transporters; OATs) 之受質 (Ng et al., 2003; Mizuno et al., 2003; Laurretta MS et al., 2004; Elaine et al., 2005)，又有報導指出，配醣體於吸收後會形成 sulfates 及 glucuronides 等結合態代謝物，研究報告指出此等代謝物為 MRPs 與 OATs 之受質 (Ballatori et al., 2005; Sweet et al., 2005)。MTX 與梔子配醣體代謝後之結合態代謝物之間是否會相互競爭 MRPs、OATs 而影響 MTX 於體內之運送與排除過程，值得探討。因此本研究以太鼠模式探討併

服梔子水煎劑對 MTX 動力學之影響。

癲癇是由大腦神經細胞異常放電引起的突然性、反覆性和短暫性的大腦功能失調，可以表現為運動、感覺、意識、精神等多方面的功能障礙 (NCCHC, 2002)。台灣在流行病學上的探討發現約有 0.3%~1% 的人口患有癲癇，無論在發達國家還是在發展中國家，癲癇都是一項重要的公共衛生問題，國際衛生組織估計全世界大約有五千萬癲癇患者。抗癲癇藥物必須長期、不間斷、定時、定量服用，癲癇患者常因控制狀況不佳而需併用許多不同的抗癲癇藥物治療，然而，除了標準的治療藥物外，癲癇病患併用中草藥之安全性亦陸續被報導 (蔡，2000; 陳，2000)，顯示抗癲癇藥與中藥之交互作用已成為一令人關注的用藥安全問題。梔子被報導可用於鎮靜、鎮痙，另外，Phenytoin (PHT) 及 Carbamazepine (CBZ) 為臨床常用的抗癲癇藥物，其治療範圍狹窄，主要經由體內肝酵素系統代謝，亦會影響肝酵素系統之作用 (Brodie, 1992; Neels et al, 2004)，且連續七年皆為行政院衛生署藥物不良反應通報系統中「最常通報之可疑藥品前 10 名」之一，因此已有不少抗癲癇藥物與其他藥物併用產生交互作用之臨床報告 (Mattson et al., 1986; Brodie et al., 1996; Brodie & Dichter, 1996 ; Haag, 2004)，但抗癲癇藥物與中草藥併用可能之交互作用研究目前鮮見。因此，本研究將以大鼠為模式，分別探討併服梔子水煎劑對 PHT 及 CBZ 動力學的影響，探討其併用之交互作用及可能潛在的問題，希望能提供藥物臨床應用及發展用藥安全之參考。

第二章 總論

第一節 梔子之文獻考察 (徐等, 1996)

[別名]

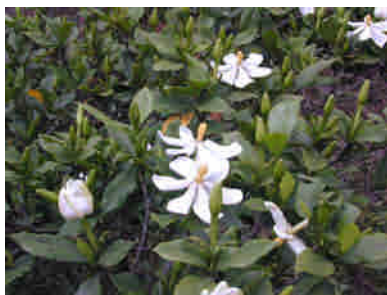
黃梔子，山枝子，大紅梔 (江蘇)，白蟬 (廣東)

[基源]

茜草科 (Rubiaceae) 梔子 *Gardenia jasminoides* ELLIS. 之乾燥成熟果實。

[形態特徵]

梔子為常綠灌木，高 0.5~2 公尺，枝圓柱形，灰色。葉對生或 3 葉輪生，革質，長橢圓形或長圓狀披針形，長 5~14 cm，寬 2~7 cm，全緣，側脈纖細，明顯；葉柄短，托葉鞘狀膜質。花單生於枝頂，芳香，花梗短 (圖一)；萼管倒圓錐狀，有稜，裂片線形；花冠未開放時旋卷，開放後呈高腳杯狀，五至多裂，初為白色，後變為乳黃色；雄蕊與花冠裂片同數，著生於花冠喉部；子房內含。果黃色，卵形或長橢圓形，有翅狀縱稜 5~8 條 (圖二)。種子多數。花期 5~7 月，果期 8~11 月。



圖一



圖二



圖三

[生態環境]

喜溫暖濕潤的氣候，以排水良好、肥沃疏鬆而較濕潤的砂質壤土或粘質壤土為佳。

[產地]

主產於湖南、湖北、江西、浙江、福建、四川、河南、江蘇、安徽、廣東、廣西、雲南等地。以湖南產量大，浙江質量佳。

[採集加工]

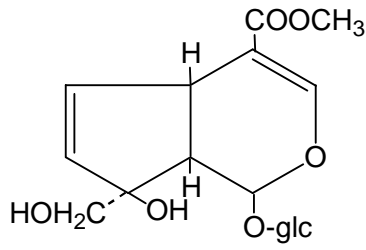
秋季果實成熟時採收，除去果梗及雜質，略蒸或置沸水中略燙，或蒸至上氣，取出，曬乾。

[藥材性狀]

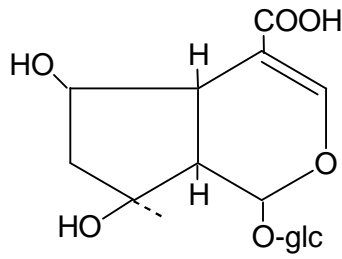
果實長橢圓形或卵圓形，長 2~4.5 cm，直徑 0.8~2 cm，表面棕紅色或黃棕色，微有光澤，有翅狀縱稜 5~8 條，兩翅稜間有縱脈 1 條，頂端有宿萼，具 5~8 個長形裂片，多碎斷，基部有果梗痕；果皮薄，內表面鮮黃色，有光澤，具 2~3 條隆起的假隔膜，折斷面鮮黃色。種子多數，扁長圓形，具成球狀團塊，表面紅棕，有細點狀突起（圖三）。

[化學成分]

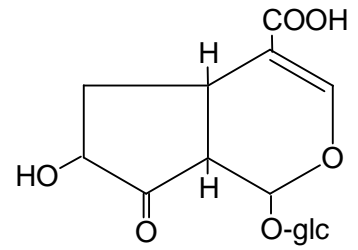
主要成分為 gardenoside、geniposide、genipingentiobioside、shanzhiside、gardoside、scandoside methyl ester、crocin、gardenin 及 ursolic acid 等。



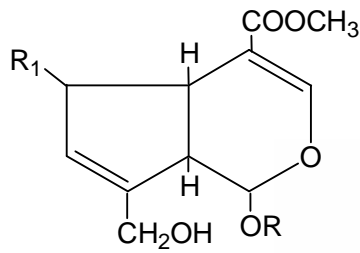
gardenoside



shanzhiside



gardoside



geniposide

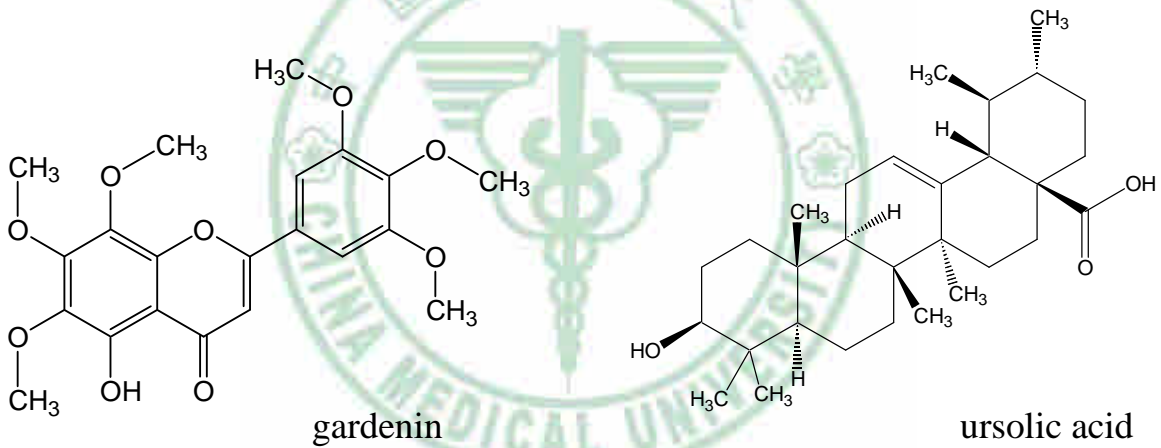
R=glc R₁=H

genipingentiobioside

R=gen R₁=H

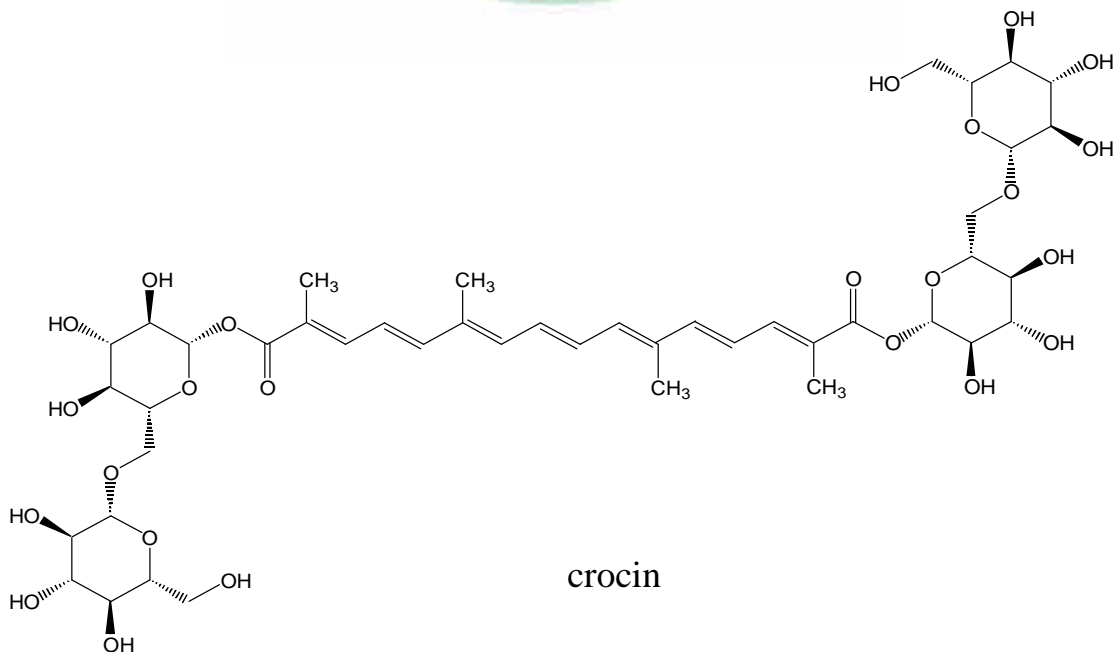
scandoside methyl ester

R=glc R₁=β-OH



gardenin

ursolic acid



crocin

[藥理作用]

1. 利膽保肝：梔子煎劑灌服，對結紮總膽管兔有抑制血中膽紅素升高的作用。Crocine 及 crocetin sodium 能增加小鼠、兔的膽汁分泌量，也能抑制結紮總膽管之兔血中膽紅素的出現。
2. 降壓：煎劑灌胃或乙醇提取物靜脈注射，對貓、兔、大鼠均有降壓作用，此作用可被阿托平阻抑；對麻醉貓、兔及不麻醉兔均可使心率減慢。梔子的降血壓作用部位在中樞，主要是加強了延腦副交感中樞緊張度所致。
3. 鎮靜、鎮痙、降溫、鎮痛：Ursolic acid 腹腔注射，可降低小鼠的自發活動及對抗 pentylenetetrazol 的驚厥作用，對閾下劑量的戊巴比妥鈉有協同睡眠作用，對大鼠有明顯降溫作用。
4. 促進胰腺分泌作用：用膽胰插管研究顯示梔子有明顯的利胰、利膽及降胰酶效應，治療胰腺炎；使膜脂的過氧化產物減少作用。
5. 抑菌作用：梔子煎劑對白喉桿菌、金黃色葡萄球菌、傷寒桿菌有抑制作用，對多種皮膚真菌也有不同程度的抑制作用。
6. 抗炎及治療軟組織損傷的作用：梔子以乙醇迴流提取液，對小鼠、家兔軟組織損傷具抗炎作用；對小鼠急性耳腫脹有明顯抑制作用；對大鼠亞急性足蹠腫脹有抑制作用。
7. 其他：梔子乙醇提取物灌服小鼠或大鼠均引起肝毒性，肝臟呈綠色，CYP450 含量和 *p*-nitroanisole-O-demethylase 活性均降低。

[毒理學]

梔子醇滲漉濃縮液 (300%) 一次給藥，腹腔注射和灌服小鼠的 LD_{50} 分別為 17.1 g/kg 和 107.4 g/kg。梔子水提物對小鼠的急性毒性很低，腹腔注射給藥的 LD_{50} 為 5 g/kg。梔子乙醇提取物小鼠灌服的 LD_{50} 為 107.4 g/kg，腹腔注射為 27.5 g/kg，連續 4 天，使小鼠 hexobarbitone 睡眠時間延長，肝臟呈灰綠色，使大鼠 CYP450 含量和 *p*-nitroanisole-O-demethylase 活性降低，肝呈灰綠色。梔子骨髓細胞微核子試驗、Ames 試驗和睪丸染色體畸變試驗表明，梔子無致突變，致畸效應。

[性味功能]

苦，寒。入心、肺、三焦經。瀉火除煩，涼血解毒，清熱利濕。

[主治]

熱病心煩不寧；溼熱黃疸；血熱妄行之吐血、衄血、尿血；熱毒瘡盪，扭挫傷，瘀血腫痛 (Chang & But, 1987; Tseng et al., 1995)。

[臨床應用]

治療急性黃疸型肝炎、扭挫傷、局部止血劑。

[用法用量]

6~9 g，水煎服；外用適量。

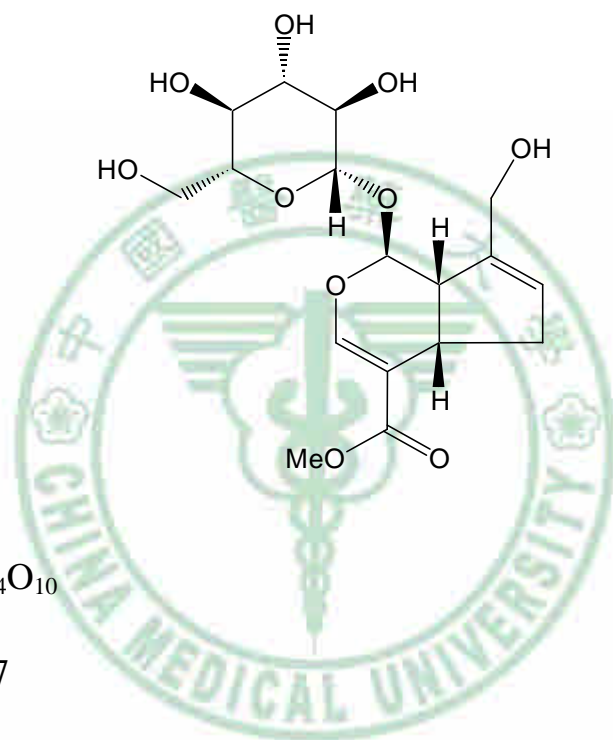
第二節 Geniposide 與 genipin 之結構、理化性質與藥理活性

1. Geniposide (Budavari, 2001)

【化學名】

Methyl 9-(hydroxymethyl)-2-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-diene-5-carboxylate

【結構式】



【分子式】 $C_{17}H_{24}O_{10}$

【分子量】 388.37

【物化性質】

白色結晶粉末，可溶於甲醇。UV λ_{\max} (MeOH)：238 nm。

【藥理活性】

(1) 利膽保肝：促使大鼠膽汁分泌增加；灌服小鼠致腹瀉， ED_{50} 為 0.3 g/kg；促進膽汁分泌作用，而對血液中血細胞數、血色素、血糖、GOT、GPT 等均無顯著影響。Geniposide 灌服，對異硫氰酸 α -萘酯引起的急性黃疸，可使 GPT、血清膽紅素明顯降低 (徐等，1996)。

(2) 抑制胃液分泌及胃腸運動：十二指腸給予 geniposide，能使幽門結紮大鼠胃液分泌減少，總酸度下降，pH 值升高。小鼠和豚鼠離體迴腸試驗顯示 geniposide 有較弱的抗乙酰膽鹼和抗組織胺作用。靜脈注射，抑制大鼠胃腸運動，並能抑制 pilocarpine 引起的運動亢進。

(3) 促進胰腺分泌作用：geniposide 有最顯著的降低胰澱粉酶作用，而其酶解產物 genipin 的增加胰膽流量作用最強，持續時間較短。

(4) 鎮靜、鎮驚、降溫、鎮痛：皮下注射，可抑制醋酸引起的扭體反應。

(5) 抑制氣喘：於大鼠實驗顯示抑制 5-lipoxygenase 可治療氣喘 (Nishizawa et al., 1988)。

(6) 抑制 CYP3A 和增加老鼠肝臟 glutathione 的量 (Kang et al., 1997)。

(7) 抑制血小板凝集 (Suzuki et al., 2001)。

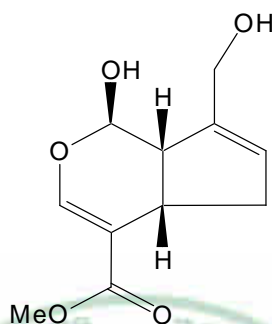
(8) 保護癌症病患於高劑量放射治療時的傷害 (Hsu et al., 1997)。

2. Genipin (Budavari, 2001)

【化學名】

Methyl 2-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-diene-5-carboxylate

【結構式】



【分子式】 C₁₁H₁₄O₅

【分子量】 226.23

【物化性質】

白色結晶粉末，可溶於酒精，甲醇，丙酮，微溶於水。UV λ_{\max} (MeOH) : 240 nm。

【藥理活性】

(1) 利膽保肝：genipin 靜脈注射或十二指腸給藥，均可使大鼠膽汁分泌增加。有促進膽汁分泌作用，而對血液中血細胞數、血色素、血糖、GOT、GPT 等均無顯著影響 (徐等，1996)。對大鼠膽固醇結石的形成具有抑制作用 (朱等，2001)，促使大鼠膽汁分泌增加 (Masatoshi H, 1974; Wang, 1991; 彭等，2003)。

(2) 抑制胃腸運動：genipin 靜脈注射可抑制大鼠胃腸運動，並能抑制 pilocarpine 引起的運動亢進。

(3) 鎮靜、鎮驚、降溫、鎮痛：genipin 皮下注射，可抑制醋酸引起的扭體反應。

(4) 生物材料交聯劑：可交聯修飾動物組織、膠原蛋白、明膠與幾丁聚醣等形成穩定的交聯製品 (Sung et al., 1998; 黃&願, 2003; Huang & Gu, 2003); 細胞毒性小，對小鼠 LD₅₀ (i.v.) 為 382 mg/kg，生物相容性好，不發生鈣化現象和降解，可成為植入式藥物緩釋系統的良好載體。

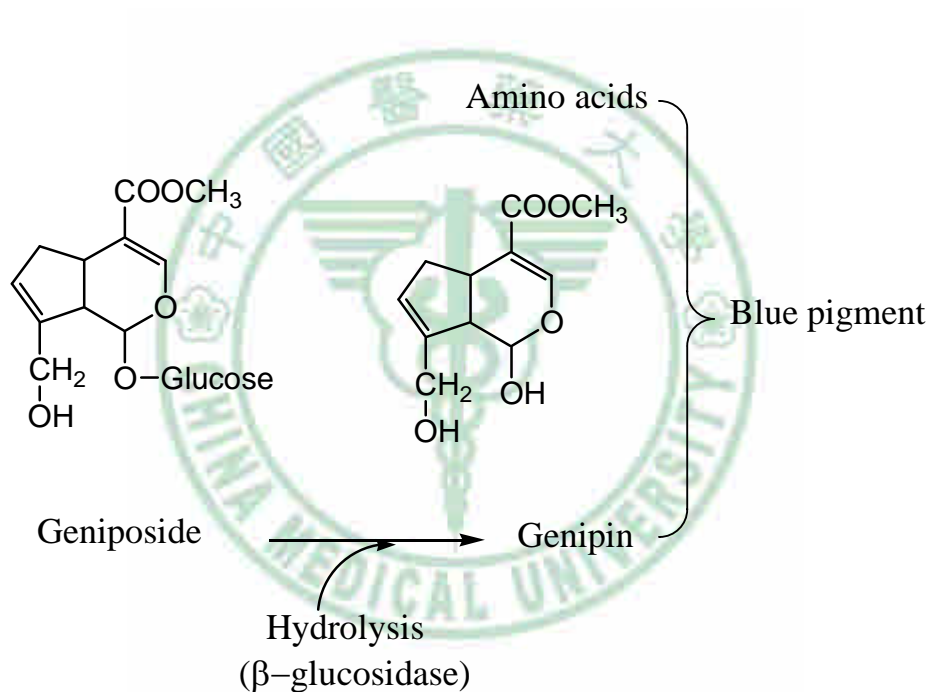
(5) 食用色素 (Fujikawa et al., 1987; Hendry & Houghton, 1996)：和氨基酸反應生成梔子藍色素 (Fujikawa et al., 1987; Hendry & Houghton, 1996; Park et al., 2002; Lee et al., 2003)，但這種藍色素在酸性環境中不能穩定存在，因而在應用上存在一定的侷限性；可用作測定氨基酸含量的顯色劑 (Lee et al., 2003)。

(6) 其他：對 Alzheimer's amyloid β protein 毒性有保護作用 (Yamazaki et al., 2001)；具抗發炎作用 (朱等, 2005; Koo et al., 2004; 2006)。

Genipin 口服、腹腔注射、靜脈注射對小鼠的 LD₅₀ 分別為 237、190 與 153 mg/kg。

3. Geniposide 與 genipin 之吸收、代謝

Geniposide 屬於 iridoid 類配醣體，geniposide 在體內可被動物體內之腸道菌轉變為 genipin (Akao et al., 1994; Ueno et al., 2001)，再和氨基酸反應生成梔子藍色素 (Fujikawa et al., 1987; Hendry & Houghton, 1996; Park et al., 2002; Lee et al., 2003)，如圖四所示。

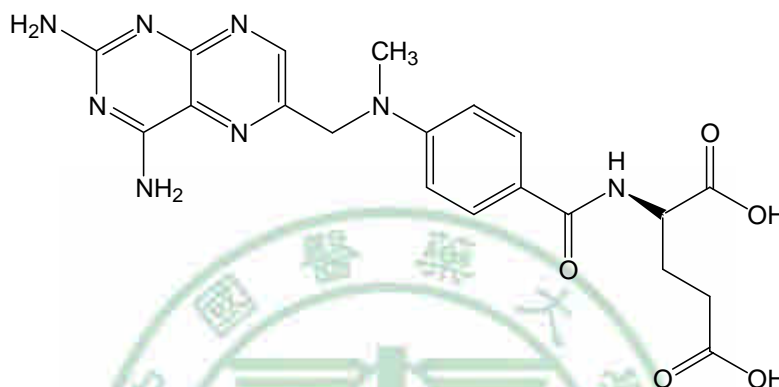


圖四 Mechanism of blue pigment formation from gardenia fruit (Fujikawa et al, 1987).

第三節 Methotrexate (MTX) 之特性 (Budavari, 2001)

【化學名】 N-[4-[[[(2,4-Diamino-6-pteridiny) methyl] methylamino] benzoyl]-L-glutamic acid

【結構式】



【分子式】 $C_{20}H_{22}N_8O_5$

【分子量】 454.45

【物化性質】

水合物，從稀鹽酸析出黃色晶體，185-204°C 分解；幾不溶於水、乙醇、氯仿、乙醚，易溶於鹼金屬的氫氧化物及其碳酸鹽的稀溶液中，微溶於 6N 鹽酸；UV λ_{\max} (0.1 N HCl)：244，307 nm；UV λ_{\max} (0.1 N NaOH)：257，302，370 nm；對大鼠之 LD_{50} ：14 mg/kg (iv)。

【藥理活性】

MTX 是葉酸衍生物，為抗代謝藥物 (Lauretta et al., 2004; Kuo et al., 2004)。MTX 和它的代謝物聚穀氨酸酯 (polyglutamate) 與葉酸 (folic acid) 的化學構造相似，會一起競爭二氫葉酸還原酶 (DHFR) 的葉酸結合位

置，與 DHFR 緊密的結合造成細胞內四氫葉酸 (FH₄) 的合成受阻和還原形葉酸的缺少，導致胸腺嘧啶核苷 (thymidine) 和嘌呤核苷酸 (purine nucleotides) 的合成降低。這些作用最後導致細胞凋亡。它的 polyglutamate 也會在細胞內抑制其它的酵素，特別是 amino-imidazole carboxamide ribonucleotide (AICR) transformylase、thymidylate synthase (Kuo et al., 2004; Rubino, 2001; Johnstone et al., 2000)。

[藥物動力學]

MTX 主要經腎臟排除 (80-90%)，大多以原形藥排出體外，少部分由膽汁排除 (10%)，在低劑量時 (低於 30 mg/m²)，半生期約為 3 至 10 小時；高劑量時，其半生期則達 8 至 15 小時。

劑量小於 30 mg/m² 時口服吸收良好，大於 80 mg/m² 時只有約 20% 的人吸收較好，食物與牛奶會降低其生體可用率。高度集中分佈於腎臟、膽囊、脾臟及肝臟，尤其會在肝臟停留長時間，會經過胎盤，隨著乳汁擴散，不容易通過血腦障壁，血漿蛋白結合率約為 50%。

MTX 具有潛在的嚴重毒性，其發生毒性之情況與嚴重程度可能與劑量或用藥次數有關，但在高、低劑量都曾發現過毒性作用。MTX 在體內會因酵素作用而產生不同活性之代謝物，分述如下 (Kuo et al., 2004; Rubino, 2001; Johnstone et al., 2000)：

1. 7-Hydroxy-methotrexate

由肝臟之 aldehyde oxidase 在 pterine ring 上的 C-7 進行氧化所

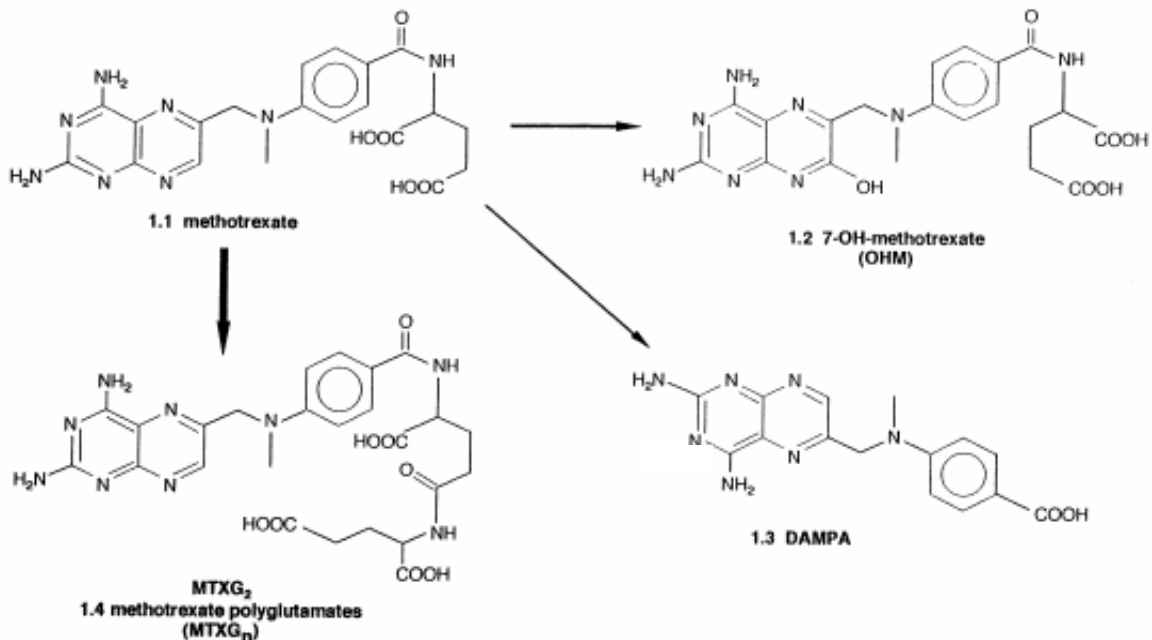
得，其活性約為 MTX 之 1/100~1/200。

2. 2,4-Diamino-N¹⁰-methylpteroic acid (DAMPA)

MTX 在體內由 carboxypeptidase 代謝成 DAMPA，其代謝量大約是 MTX 注射量的 5%，其活性約為 MTX 的 1/200。

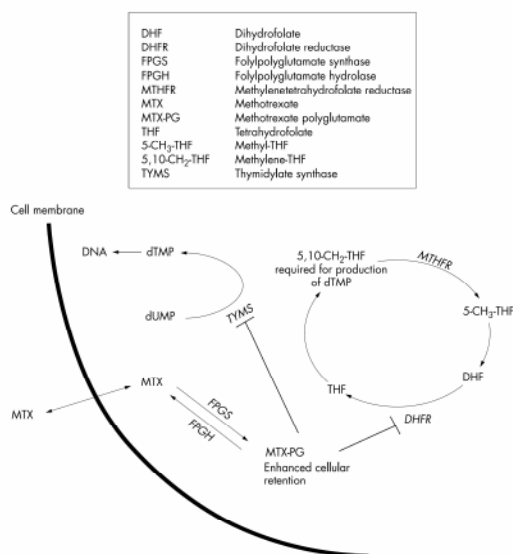
3. MTX polyglutamates (MTX-(Glu)_n)

MTX 受 polyglutamate synthase 的作用而轉化成鏈結 2-7 個 glutamate 的代謝物。有研究指出不同 glutamyl chain length 的代謝物於細胞內有不同程度的滯留，而 MTX-(Glu)_n 之滯留會增強此藥之細胞毒性。較長鏈之代謝物對 DHFR 有較高的親和力，因而對 DNA 合成及細胞生長有較久之抑制作用，如圖五所示。



圖五 Structures of MTX and its major metabolites (Rubino, 2001).

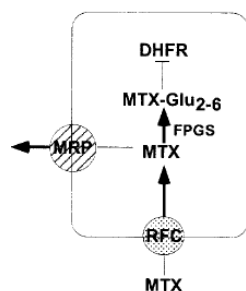
[臨床應用]



圖六

MTX 對二氫葉酸還原酶 (DHFR) 有高度親和力，與葉酸競爭 DHFR，使葉酸不能轉變為四氫葉酸，且去氧尿苷酸不能轉變為去氧嘧啶核苷酸，阻止 DNA 合成，亦干擾 RNA、蛋白質合成，如圖六所示 (Ranganathan, 2003)。MTX 屬細胞周期特異性藥，主要作用於 G1 及 G1/S 轉換期細胞。臨床上高劑量 (12 g/m^2) 可用於治療成骨肉瘤 (Postovsky & Arush, 2005; Crews et al., 2004)、腦膜性白血病 (Aquerreta et al., 2004)、急性白血病 (Fernandez et al., 2004)，低劑量用於治療牛皮癬 (Chladek et al., 2002; Chladek et al., 2005)、風濕性關節炎 (Godfrey et al., 1998; El Desoky, 2001; Zhou et al., 2004; Ranganathan & McLeod, 2005;)、眼色素層炎 (Puchta et al., 2005)、自體免疫疾病 (Grim et al., 2003)，腸道發炎反應 (Egan et al., 1999)。

[副作用]



圖七

MTX 經由 reduced folate carrier (RFC) 帶進細胞後，部分會被 multidrug resistance proteins (MRP) 所排出，部分與 folylpoly- γ -glutamate synthetase (FPGS) 反應形成 polyglutamylated MTX (MTX-(Glu)_n) 而抑制 DHFR，導致阻止葉酸之形成，如圖七所示 (Borst et al., 2000)。MTX-(Glu)_n 因分子量大，對 MRP 的親和力降低，無法排出細胞外，因此會長時間存在於細胞，對組織便產生毒性。MTX 之毒性如下：

1. 肝毒性：MTX 具有潛在之急性及慢性肝臟毒性（纖維變性及硬化）、肝功能損害 (West, 1997; Kremer et al., 1986)；慢性毒性可能導致死亡。長期使用後或總劑量達 1.5 g 後可能發生慢性毒性。
2. 腎毒性：高劑量 MTX 會引起血尿、蛋白尿、尿毒症，腎臟損害而導致急性腎衰竭，其腎毒性主要因 MTX 及 7-hydroxymethotrexate 在腎小管中沈澱而引起。
3. 肺毒性：肺部病變 (Carson et al., 1987; Ameen et al., 2001) 如發燒、咳嗽、呼吸困難、血氧過少以及浸潤現象。

4. 骨髓抑制 (Wheeler et al., 1995)：導致貧血、白血球減少症及或血小板減少症 (Postovsky et al., 2005; Crews et al., 2004; Aquerreta et al., 2004; Megia et al., 2004; Gutierrez-Urena et al., 1996)。高劑量與某些非類固醇抗炎藥物併用時，發生嚴重骨髓抑制及胃腸道毒性 (Egan et al., 1999)。
5. 胃腸道反應：噁心 (Jones & Patel, 2000)、嘔吐、腹痛 (Buchbinder et al., 1993; McKendry & Dale, 1993)。

[抗藥性]

產生抗藥性原因如下：

1. DHFR 對 MTX 的親和力改變。
2. 癌細胞合成更多的 DHFR。
3. MTX polyglutamate 的形成降低。
4. RFC 的表現減少，降低 MTX 進入細胞 (Jansen & Pieters, 1998)。

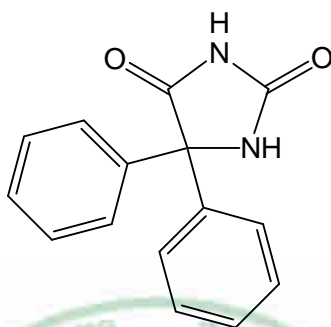
[藥物交互作用]

MTX 與蛋白質廣泛結合且其結合可能被某些藥物所取代，如水楊酸、磺胺藥、利尿劑、降血糖藥、三苯內醯 (diphenylhydantoin)、四環黴素、氯黴素、對胺苯甲酸 (*p*-aminobenzoic acid) 以及酸性抗原藥物等。因此，與這類藥物同時使用時，可能引起毒性增加。

第四節 Phenytoin (PHT) 之特性

【化學名】 5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidinedione (Budavari, 2001)

【結構式】



【分子式】 $C_{15}H_{12}N_2O_2$

【分子量】 252.27

【物化性質】

白色粉末，mp 295-298°C，pKa 8.3。幾乎不溶於水，1 g 溶於約 60 mL 乙醇、30 mL 丙酮，溶於鹼金屬氫氧化物。

鈉鹽， $C_{15}H_{11}N_2NaO_2$ ，sodium 5,5-diphenyl hydantoinate，白色粉末；肥皂樣苦味，稍吸濕。甚至弱酸（包括從空氣中吸收的 CO_2 ）亦易於使之解離而再成為 phenytoin。1 g 溶於 10.5 mL 乙醇；~66 mL 水（水溶液混濁，若將 pH 調至其飽和溶液 pH 值 11.7 以上時可不混濁）。不溶於乙醚、氯仿。

【藥物動力學】

Phenytoin 口服吸收良好，血中蛋白質結合率約 80-90%，故血中白

蛋白低下及尿毒症病患需注意給藥劑量。分布體積約 0.6 L/kg，約 90% 由肝臟 CYP2C9 和 CYP2C19 代謝，其代謝產物主要為 glucuronide，少於 2% 以原形由尿液排除。血中濃度低時，其代謝速率受血中濃度影響，而血中濃度達 10 mg/L 時，代謝呈現飽和狀態，如再給予更多 phenytoin，則血中濃度快速升高，造成中毒。Phenytoin 易誘導代謝酵素，增加其他藥物之代謝。其半衰期因人而異，差異甚大，約 12 至 36 小時 (Neels et al, 2004)。

文獻報導顯示，PHT 於 P-gp、MRP1/MRP2 被抑制之大鼠腦內濃度明顯增加，表示 PHT 為腦部 multidrug transporters，P-gp 或 MRP1/MRP2 之受質 (Potschka et al., 2001)。

【臨床應用】

PHT 屬於第一線的抗癲癇藥物，一般用量為 200-500 mg/d；治療濃度為 10-20 mg/L (Neels et al, 2004)。一般說來，其治療癲癇重積有兩個時機，一是接續在 benzodiazepines (BZDs) 快速的終止癲癇發作之後，利用其長效的抗癲癇作用，維持癲癇不再發作；一是當 BZDs 藥物治療失敗時，PHT 作為替代藥物 (Lowenstein & Alldredge, 1998)；PHT 的脂溶性比 BZDs 低，進入腦內的速度較緩慢，需要花費比 BZDs 較長的時間去控制癲癇 (Browne, 1990)。儘管有許多副作用及藥物不良反應，PHT 仍被使用為抗癲癇藥物，其治療急性癲癇發作和癲癇重積的效果卓越，另外可

用於治療慢性癲癇，特別是局部發作和繼發性全身性發作。

【副作用】

PHT 治療最理想的血中濃度為 8-10 mg/L，超過 20 mg/L 常伴隨神經毒性，包括疲倦、肌肉顫抖、認知困難、眼球震顫、複視、運動失調，超過 30 mg/L 易困倦、昏睡，當血中濃度大於 50 mg/L 時則會昏迷 (Moyer, 1999; McNamara, 2001; Haag, 2004)。

另外，PHT 具有多毛副作用，與劑量有關；長期投予 PHT 可能造成的嚴重不良反應，包括史蒂文斯-強生氏症候群 (Stevens Johnson syndrome) 以及肝臟毒性，目前臨床上的處置除了停藥外，建議採取症狀緩解、支持療法以及類固醇的治療。對於低白蛋白血症患者須嚴密加強 PHT 之血中濃度監測 (Haag, 2004)。小鼠 LD₅₀ 92 mg/kg (i.v.)；110 mg/kg (s.c.)。

【藥物交互作用】

抑制 PHT 代謝之藥物包括 allopurinol、amiodarone、chloramphenicol、cimetidine、cotrimoxazole、disulfiram、fluconazole、isoniazid、itraconazole、omeprazole、oral anticoagulants、warfarin 和某些 sulfonamides (Brodie et al., 1996; Haag, 2004)，因此臨床使用上必須監測血中濃度，以免產生毒性及副作用；而 rifampicin 和 ritonavir 會促進 PHT 被代謝，減少其血中濃度。

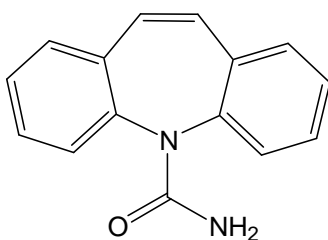
PHT 會誘導脂溶性藥物之氧化代謝，包括 carbamazepine、valproic acid、ethosuximide、anticoagulant agents、corticosteroids、benzodiazepines、cyclosporin、tacrolimus 及 oral contraceptives (ethinyl estradiol、progestagens)。



第五節 Carbamazepine (CBZ) 之特性

【化學名】 5H-Dibenz [b,f]-azepine-5-carboxamide (Budavari S, 2001)

【結構式】



【分子式】 $C_{15}H_{12}N_2O$

【分子量】 236.27

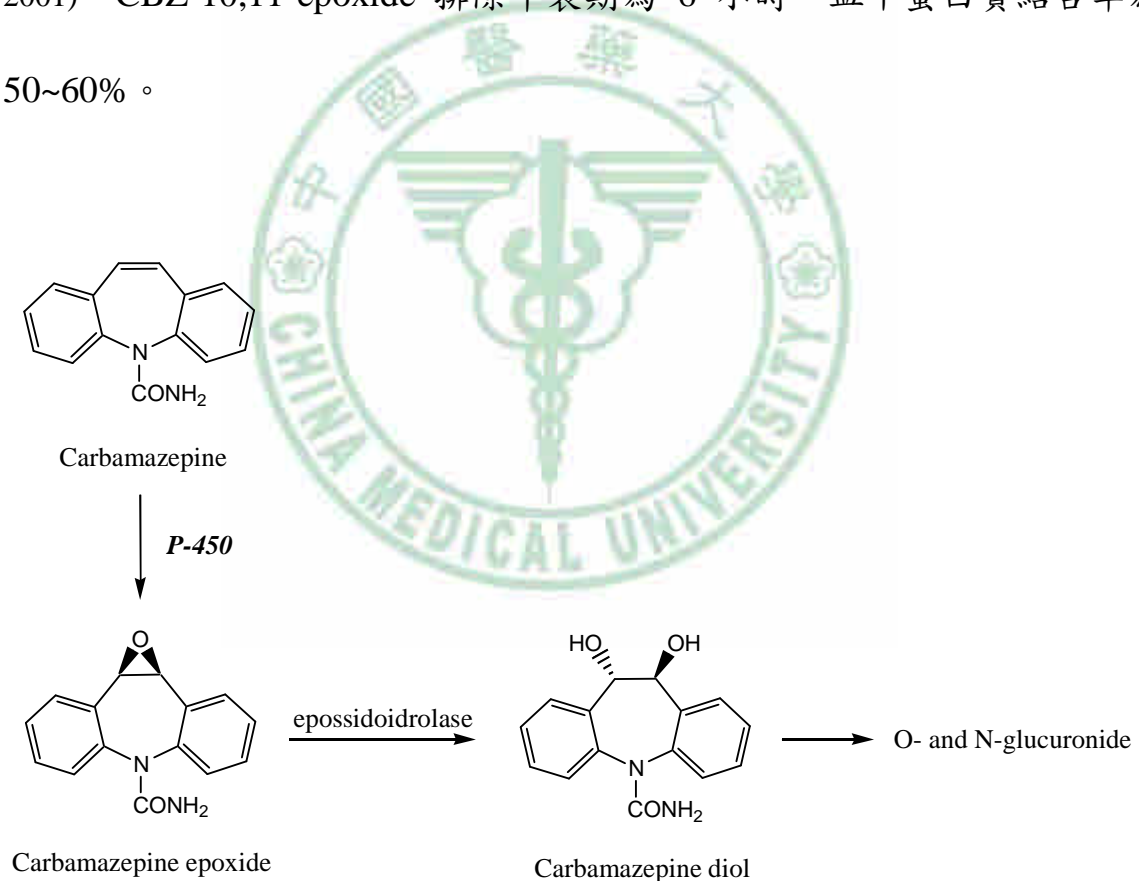
【物化性質】

mp 190-193°C，無水乙醇/苯結晶，pKa 7.0。溶於乙醇、丙酮、丙二醇，幾不溶於水。

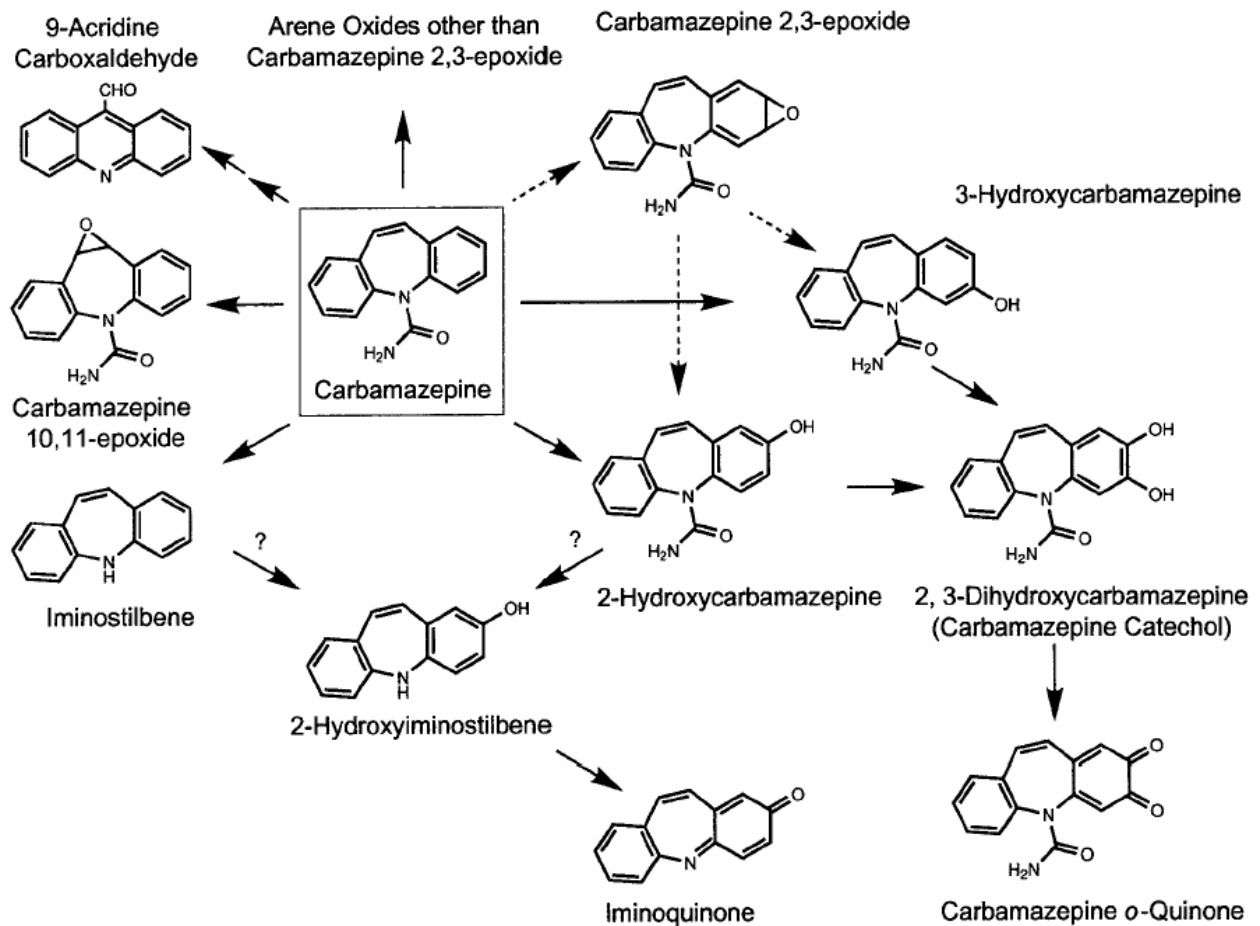
【藥物動力學】

CBZ 之水溶性不佳，影響其吸收。血中蛋白質結合率約 70-80%，主要由肝臟代謝，是 CYP3A4、CYP2C8 及 MRP 2 (Potschka, 2003) 之受質，會誘導 CYP3A4 及 CYP2C9 (Neels et al., 2004)，也會誘導腸的 *MDR1*mRNA，*MRP2*mRNA 及 MRP 2 (Giessmann et al., 2004)，又有報導指出與 CYP3A4 及 P-gp 相關連性 (Kim et al., 1999; Schuetz et al., 1996; Fromm et al., 2000; Rae et al., 2001)。但另有研究顯示，CBZ 與 P-gp 之相關性仍無定論 (Owen et al., 2001; Giessmann et al., 2004)。

CBZ 約 2% 以原形由尿中排除，代謝產物為 CBZ-10,11-epoxide (屬活性代謝產物) 及 CBZ 的 N-或 O-glucuronides (Maggs, 1996)，如圖八、九所示，口服生可用率於大鼠及人皆大於 70% (Faigle & Feldman, 1995; Shinoda et al., 1995)。單一給藥時半衰期約 30 小時，當多次給藥且與其它會誘導肝代謝酵素的藥物 (如：phenytoin、phenobarbital、valproic acid 和 lamotrigine) 併用時，半衰期可能縮短為 15 小時 (McNamara et al., 2001)。CBZ-10,11-epoxide 排除半衰期為 6 小時，血中蛋白質結合率為 50~60%。



圖八 *Carbamazepine is metabolized in the liver by oxidation to an active metabolite, carbamazepine 10,11-epoxide, which undergoes further metabolism. Carbamazepine is a potent enzyme inducer and can induce its own metabolism; this appears to be mediated via its effects on the CYP3A4 isozyme.*



圖九 Proposed scheme for the formation of reactive metabolites from carbamazepine in humans. (Pearce et al., 2002)

【臨床應用】

一般用量：初始劑量為 100~400 mg/d，可逐漸增加劑量至 400~1200 mg/d，最大劑量為 1800 mg/d；治療濃度：4~12 mg/L (CBZ)，0.2~6 mg/L (CBZ-10,11-epoxide)。CBZ 廣泛使用於治療多表現型的局部癲癇、大發作與其他混合型癲癇及各種神經性疼痛、精神疾病之治療 (Brodie & Dichter, 1996；McLean & McDonald, 1986)。

【副作用】

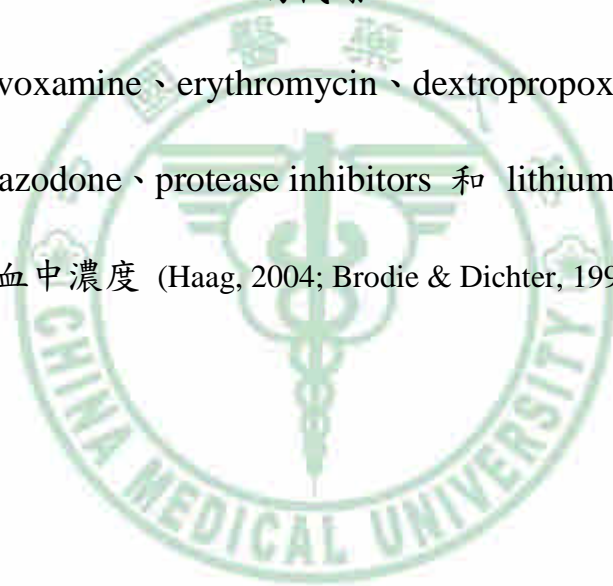
CBZ 可避免動作電位反覆去極化，阻斷鈉離子通道。1960 年首先被使用於治療三叉神經痛及預防躁鬱症，但需由低劑量開始以免產生 CNS 副作用（複視、頭痛、頭昏、噁心），其他副作用包括：紅疹 (Ju & Utrecht, 1999)，眼球震顫，嘔吐，再生不良性貧血，顆粒白血球缺乏症，尿滯留 (Brodie & Dichter, 1996)。

CBZ 公認的治療血中濃度為 4~12 mg/L，但有些病患 CBZ 血中濃度在此範圍內仍呈現中毒症狀，其原因為 CBZ-10,11-epoxide 之血中濃度過高 (Shen et al., 2001)；CBZ 口服給藥後 4~8 小時達最高血中濃度，但給予大劑量時，可能延後至 24 小時；血中濃度高於 9 mg/L 時常出現 CNS 副作用；治療前須測定血球數並作肝功能檢查，治療第 1 個月內每週計數血球，之後每月測 1 次，肝功能亦須定期檢查；如發現皮膚有過敏反應或肝功能有惡化跡象，則應停止服用，有時會發生非進行性或症狀起伏不明顯的血小板減少，一般不須停藥，但如果發展為進行性白血球減少或出現臨床徵兆如發燒及喉嚨痛則須停藥 (Richens et al., 1994)。

【藥物交互作用】

CBZ 由肝臟酵素 CYP3A4、CYP2C8 代謝（小部分係由 CYP1A2、CYP2C19），氧化形成具抗癲癇活性之中間產物 CBZ-10,11-epoxide，之後再水解為不具活性之

trans-10,11-dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepine。CBZ 不僅會誘導自身代謝，也會促使其他脂溶性藥物受在肝臟氧化代謝之速率增加 (Brodie, 1992)，導致口服的 anticoagulants、disopyramide 和 quinidine 等藥療效減低，亦使 cyclosporin、tacrolimus、protease inhibitors 和 benzodiazepines 之血中濃度降低，使用口服避孕藥之女性平均每天需增加 35~50 μg estrogen 之用量 (Brodie & Dichter, 1996；Mattson et al., 1986)。CBZ 也會增加 valproic acid 和 ethosuximide 的代謝。Danazol、isoniazid、cimetidine、fluoxetine、fluvoxamine、erythromycin、dextropropoxyphene、diltiazem、verapamil、nefazodone、protease inhibitors 和 lithium 等會抑制 CBZ 之代謝，增加其血中濃度 (Haag, 2004; Brodie & Dichter, 1996)。



第六節 多重耐藥性蛋白 (multidrug-resistance associated proteins; MRPs) 之特性

【背景】

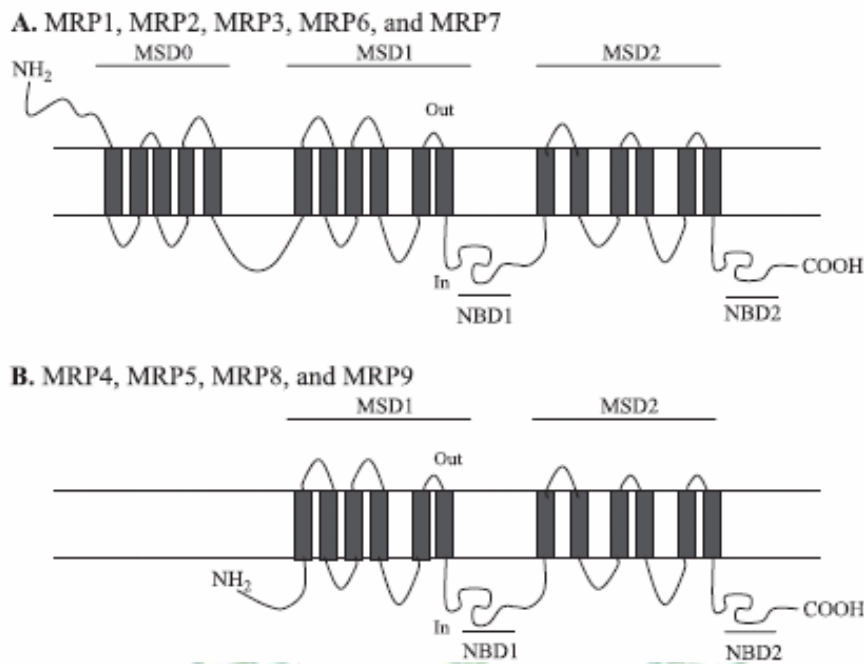
MRP 1 於 1992 年首次被發現 (Cole et al., 1992)，MRPs 是一群藥物的運輸蛋白，在 ATP-binding cassette (ABC) transport protein 中屬於 C 的家族 (ABCC)，在體內可以執行許多功能，如調節藥物在體內的排除，也會使癌細胞對藥物產生抗藥性。MRPs 家族已發現有九種亞型：MRPs 1-9 (Ng et al., 2003; Mizuno et al., 2003; Chu et al., 2004; Lauretta et al., 2004; Elaine et al., 2005; Ballatori et al., 2005; Tian et al., 2005)。

【結構與功能】

MRPs 1, 2, 3, 6, 7 具有 17 個 transmembrane helices，以及 2 個 nucleotide binding domains，N 端在細胞外，C 端在細胞內，MRPs 4, 5, 8 具有 12 個 transmembrane helices，以及 2 個 nucleotide binding domains，N、C 端皆在細胞內，如圖十所示 (Lauretta et al., 2004)。

MRPs 1, 3, 4, 5, 6 存在於器官細胞膜上之 basolateral 側，MRPs 2, 4 則存在於 apical 側，MRPs 7-9 尚不清楚其分布位置 (Gary & Martin, 2003)。存在於 basolateral 側之 MRPs 對藥物是造成再回收的作用；存在於 apical 側之 MRPs 對藥物是造成外排的作用。藥物之結合態代謝物，如 glucuronides、sulfates 或 glutathiones conjugates 等皆為 MRPs

之受質。其中 glucuronides conjugate 為 MRPs 1, 2, 3, 4, 7 之受質，sulfates conjugate 為 MRPs 1-3 之受質，glutathiones conjugate 則為 MRPs 1-6 之受質 (Ballatori et al., 2005)。

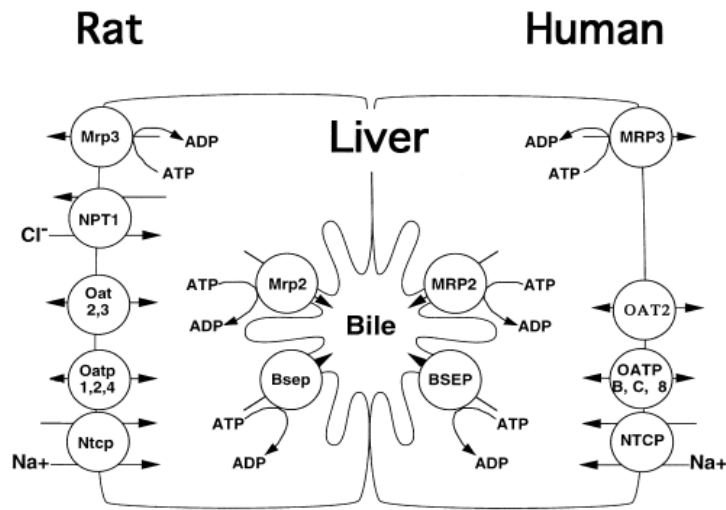


圖十 Proposed structural topology for the MRP proteins.

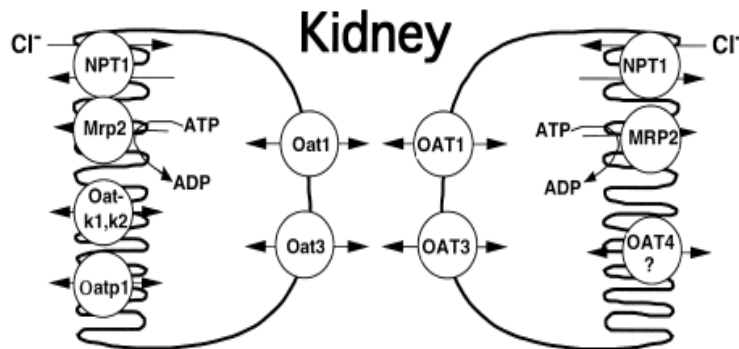
【組織分布】

主要位於肝細胞、腎小管、胰臟、小腸、結腸、肺臟、膽囊、腦細胞、唾腺、乳房上皮細胞、睪丸及骨骼肌之細胞等。

MRPs 於肝、腎 (Bleyer, 1978) 及腦 (Kusuhara & Sugiyama, 2005) 之分布如圖十一~十三；組織分布、受質及抑制劑分列於下表一、二 (Tian et al., 2005)。

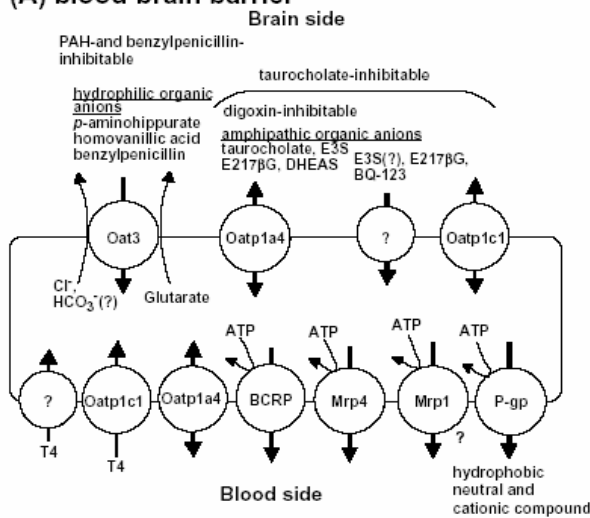


圖十一 Schematic diagram of drug transporters expressed in the liver in rat and human.

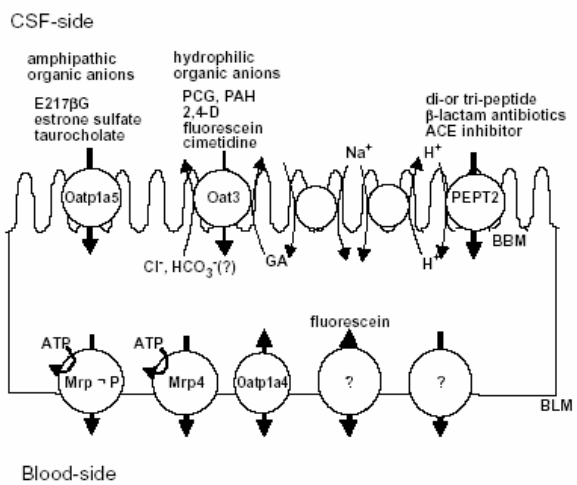


圖十二 Schematic diagram of drug transporters expressed in the kidney in rat and human.

(A) blood-brain barrier



(B) blood-CSF barrier



圖十三 Schematic diagram of the efflux transport mechanisms at the BBB and BCSFB.

表一 Tissue Distribution, Expression levels of the MRP Family (Tian et al., 2005)

Name	Symbol	Tissue location	Expression levels
MRP1	ABCC1	All major tissues	Differ in various organs and cell lines
MRP2	ABCC2, cMOAT	Liver, kidney, intestine, brain	
MRP3	ABCC3	Small intestine, pancreas, colon, placenta, adrenal gland	Low level in liver, brain, kidney, and prostate
MRP4	ABCC4	Kidneys	Low levels in other tissues
MRP5	ABCC5	Most tissues	Low levels
MRP6	ABCC6	Liver , kidney	Low levels in other tissues
MRP7	ABCC10	Most tissues	Very low levels
MRP8	ABCC11	Normal breast, testis	Low levels in liver, brain, and placenta
MRP9	ABCC12	Breast cancer, normal breast, testis, brain, skeletal muscle, ovary	Low levels

表二 Substrates, and Inhibitors of the MRP Family (Tian et al., 2005)

Name	Major drug substrates	Inhibitors
MRP1	Doxorubicin, vincristine, etoposide, MTX, camptothecin, CPT-11, SN-38, cyclophosphamide, conjugates	Probenecid, sulfinpyrazone, indomethacin, verapamil, quercetin, genistein, cyclosporine, PAK-104P, steroid analogs, MK571, ONO-1078, sulphonylurea, glibenclamide
MRP2	Conjugates, cisplatin, etoposide, vinca alkaloids, anthracyclines. camptothecins, MTX	MK571, furosemide
MRP3	Etoposide, teniposide, dinitrophenyl S-glutathione, acetaminophen glucuronide, vincristine, MTX	Etoposide, MTX
MRP4	MTX, 6-thioguanine, PMEA, 6-mercaptopurine, topotecan	MK571, celecoxib, rofecoxib, diclofenac
MRP5	6-Mercaptopurine, 6-thioguanine, PMEA, heavy metals, S-(2,4-dinitrophenyl)glutathione	Probenecid, sulfinpyrazone, benzbromarone, MK571
MRP6	LTC4, N-ethylmaleimide S-glutathione, dinitrophenol glutathione, etoposide, doxorubicin, cisplatin, daunorubicin	Indomethacin, probenecid, benzbromarone
MRP7	?	?
MRP8	5-FU, ddC, PMEA, MTX, bile acids	?
MRP9	?	?

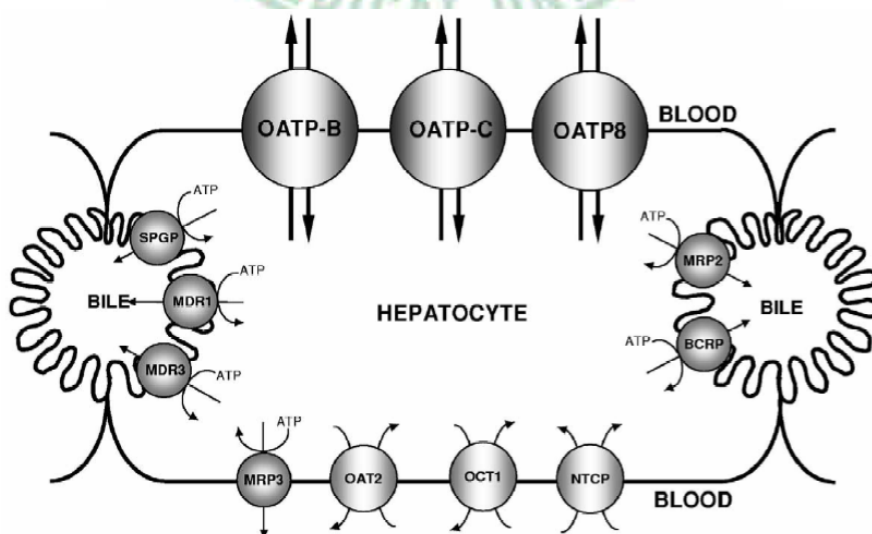
?=Undetermined.

第七節 有機陰離子運送蛋白 (organic anionic transporters; OATs)之特性

OATs 家族中目前已發現五個成員：OATs 1-5，許多動物身上都有 OATs 家族，其中大鼠 OATs 家族之分布與人類相當近似。

OATs 之受質是有機陰離子，正常環境下 OATs 必須負起體內離子的平衡。因此 OATs 特別重要的任務是排除體內第二相代謝所產生的物質，如 glucuronides、sulfates 及 glutathiones 等 conjugates，將之排至尿中。

OATs 家族與 MRPs 家族之受質有許多重複 (Terlouw et al., 2003; Sweet; 2005)；其於腦及肝之分布於圖十三、十四所示 (Tirona & Kim, 2002; Kusuhara & Sugiyama, 2005)，其在各種動物體內主要的分布及其受質藥物分列於表三及表四 (Terlouw et al., 2003; Sweet; 2005)。



圖十四 Schematic representation of drug transporters in liver.

表三 OATs 在各種動物體內主要的分布 (Terlouw et al., 2003; Sweet; 2005):

Transporter type	Species	Name	Tissue distribution	Membrane localization
OAT1	Mouse	mOAT1	K, B	BLM
	Rat	rOAT1	K, B	BLM
	Human	hOAT1	K, B	BLM
	Rabbit	rbOAT1	K	
	Pig	pOAT1	K	
OAT2	Rat	rOAT2	K, L	APM, BLM
	Human	hOAT2	K, L	BLM
	Mouse	mOAT2	K	
OAT3	Rat	rOAT3	K, L, B	BLM
	Human	hOAT3	K, B	BLM
	Mouse	mOAT3	K	
OAT4	Human	hOAT4	K, P	APM, BLM
OAT5	Mouse	mOAT5	K	
	Human	hOAT5	L	

m: mouse, r: rat, h: human, f: flounder, Ce: C-elegans, rb: rabbit, p: pig, K: kidney, L: liver, B: brain, P: placenta, BLM: basolateral membrane, APM: apical membrane.

表四 OATs的受質藥物 (Terlouw et al., 2003; Sweet; 2005) :

Nonsteroidal anti-inflammatory drug	Diclofenac, Ibuprofen, Indomethacin, Ketoprofen, Naproxen, Phenacetin, Piroxicam, Salicylate
Uremic toxins	Hippuric acid, Indoxyl sulfate
Antivirals	Acyclovir, Adefovir, Azidothymidine, Cidofovir, Ganciclovir
Antibiotics	Cephalosporins, Penems, Penicillins
Chemotherapeutics	Methotrexate
Heavy metals	Cadmium, Mercury
Mycotoxins	Ochratoxin A
Chlorinated phenoxyacetates	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
Neurotransmitter metabolites	3,4-Dihydroxymandelic acid 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid
Chlorinated haloalkenes	1,2-Dichlorovinyl-L-cysteine
Homovanillic acid	Hydroxyindoleacetic acid

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、試藥

1. Acetic acid, glacial J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
2. Acetonitrile (LC Grade) J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
3. L (+)-Ascorbic acid Riedel-deHaën AG (Seelze, Germany)
4. Carbamazepine Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
5. Caffeic acid Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
6. 5, 7-Dimethoxycoumarin Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, U.S.A.)
7. Dimethylsulfoxide (DMSO) Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany)
8. Genipin Challenae Bioproducts Co. Ltd (San Jose, CA, USA)
9. Geniposide Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)
10. Ethyl acetate (LC Grade) J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
11. Ethyl alcohol 台灣菸酒公賣局 (Taiwan)
12. Ethyl ether Shimakyu's Pure Chemicals (Osaka, Japan)
13. Heparin Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark)
14. Hydrochloric acid Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)
15. Methotrexate (25 mg/mL) Wyeth Pharma GmbH (Wolfratshausen, Germany)

16. Methyl alcohol (LC Grade) J.T. Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)
17. Methyl paraben Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
18. Mili-Q® plus water (Milli-Q®) Millipore corporation (Billerica, MA, U.S.A.)
19. Ortho-phosphoric acid (85%) Riedel-deHaën AG (Seelze, Germany)
20. Phenytoin Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
21. Polyethylenglycol 400 (PEG 400) Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany)
22. Sesamol Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, U.S.A.)
23. Sodium acetate, anhydrous Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, U.S.A.)
24. Sodium hydroxide Merck-KgaA (Darmstadt, Germany)
25. Sulfatase (type H-1, from *Helix pomatia*) Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
26. TDx® TDxFLx® Methotrexate monoclonal whole blood reagent pack Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, U.S.A.)

二、器材及儀器設備

1. 酸鹼測定儀
Microprocessor pH-mV meter
Wissenschaftlich-Technische
Werkstätten GmbH & Co. KG
(Weilheim, Germany)
2. 高速離心機
Z 200 M/H
Hermle Labortechnik GmbH
(Wehingen, Germany)
3. 渦旋振盪器
Vortex Genie G-560
Scientific Industries Inc.
(Bohemia, NY, U.S.A.)
4. 超音波振盪器
Branson 8120
Branson Ultrasonics Co. (Taiwan)
5. 控溫往復式振盪水槽
BT-350
Yih Der Instruments Co., Ltd.
(Taiwan)
6. 氮氣濃縮裝置
N-EVAP 112 R-MT
Organomation Associates Inc.
(Berlin, MA, U.S.A.)
7. 分析天平
AB 104
Mettler Toledo (Switzerland)
8. 微量移液管
Pipette 2-20 μL , 10-100 μL ,
20-200 μL , 100-1000 μL
Gilson S.A.S. (Entrepreneurs,
Villiers Le Bel, France)
9. 水壓抽氣機
Eyela Aspirator A-2S
Tokyo Rikakikai Co. Ltd. (Tokyo,
Japan)
10. 電熱板
HP-20
Shin Kwang Machinery Industry
(Taiwan)
11. 高效液相層析儀—紫外光檢出器
(High Performance Liquid

Chromatography – UV) 包括:

- | | |
|---|---|
| 幫浦 | |
| LC-10ATVP | Shimadzu (Kyoto, Japan) |
| 層析管 | |
| Cosmosil 5C18-AR- II | Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) |
| (150×4.6 mm i.d, 5 μm) | |
| Apollo C18 5μ (250×4.6 mm) | Alltech P.J. Cobert Associates, Inc. |
| 管柱前濾膜 | |
| Xperten [®] 0.5 μm (UPCH A-102X) | P.J. Cobert Associates, Inc. (St. Louis, Missouri, USA) |
| 紫外光偵測器 | |
| UV-VIS detector SPD-10AVP | Shimadzu (Kyoto, Japan) |
| 自動進樣器 | |
| SIL-10AF | Shimadzu (Kyoto, Japan) |
| 除氣裝置 | |
| ERC-3415 α | Shimadzu (Kyoto, Japan) |
| 樣品冷卻槽 | Shimadzu (Kyoto, Japan) |
| 12. 螢光偏極免疫分析儀 | |
| TDxFLx Analyzer | Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois, U.S.A.) |
| 13. 拋棄式注射針及針筒 | |
| 1.0 mL syringe (0.45×13 mm) | Terumo Medical Corporation |
| 3.0 mL syringe (0.55×25 mm) | (Elkton, MD, U.S.A.) |
| 5.0 mL syringe (0.65×32 mm) | |
| 14. 胃管 | 晶龍科技儀器有限公司 |
| (0.9×L 70 mm, 1.5×L 120 mm) | (Taiwan) |
| 15. 微量吸管尖 | |
| Tips (200 μL, 1000 μL) | Axygen Scientific, Inc. (Union City, CA, U. S. A.) |
| 16. 微量離心管 | |
| Microtubes (1.7 mL) | Axygen Scientific, Inc. (Union City, CA, U. S. A.) |
| 17. 濾膜 | |
| | Millipore carrigtwohill, Co. |

Millex[®] (0.45 μm, 13 mm; 0.22 μm, 13 mm) (Cork, Ireland)

18. 玻璃試管 (12×75 mm)

Kimble glass Inc. (U.S.A.)

19. 血清塞

弘光企業有限公司 (Taiwan)

20. 混合氣體

吉源行有限公司 (Taiwan)



三、藥材

梔子購自台中市欣隆藥行。

四、動物

Sprague-Dawley (SD) 大鼠，購自國家實驗動物中心，購入後飼養於中國醫藥大學動物中心，環境溫度控制在攝氏 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，12 小時光照與黑暗循環之環境中，相對溼度維持 $50\pm 10\%$ 。動物試驗遵循中華民國實驗動物學會 2002 年所編纂之「實驗動物飼養與使用操作手冊」(A guide book for the care and use of laboratory animals)。

五、溶液製備

(一) Geniposide 及 genipin 標準溶液

精確稱取 geniposide 及 genipin 各 1.0 mg，分別加入甲醇定容至 1.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之儲備溶液，再以甲醇稀釋成各種所需濃度之標準溶液；genipin 需於使用前新鮮配製。

(二) 內標準溶液

1. 精確稱取 sesamol 5.0 mg，加入甲醇定容至 5.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之儲備溶液，再以甲醇稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。
2. 精確稱取 caffeic acid (CA) 5.0 mg，加入甲醇定容至 5.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之儲備溶液，再以甲醇稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。

3. 精確稱取 methylparaben (MP) 10.0 mg，加入乙酸乙酯定容至 10.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之儲備溶液，再以乙酸乙酯稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。
4. 精確稱取 MP 10.0 mg，加入甲醇定容至 10.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之儲備溶液，再以甲醇稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。
5. 精確稱取 5,7-dimethylcoumarin (5,7-DMC) 10.0 mg，加入乙酸乙酯定容至 10.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之儲備溶液，再以乙酸乙酯稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。
6. 精確稱取 5,7-DMC 10.0 mg，加入甲醇定容至 10.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之儲備溶液，再以甲醇稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。

(三) 人工腸液之製備

取磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 6.8 g 溶於水 250 mL 中，再加入 0.2 N 氫氧化鈉溶液 190 mL 及水 400 mL，以 0.2 N 氫氧化鈉溶液調節 pH 至 7.5 ± 0.1 後，加水至 1 L。

(四) 緩衝液 (pH 5.0)

稱取無水醋酸鈉 0.82 g，加水溶解後，稀釋至 100 mL 即為 0.1 N 醋酸鈉溶液。量取醋酸 ($d = 1.049$) 0.6 mL，加水稀釋至 100 mL 即為 0.1 N 醋酸溶液。取 0.1 N 醋酸鈉溶液 (sodium acetate) 68.0 mL，加入 0.1 N 醋酸溶液至 100 mL，再加 1.0 N 氫氧化鈉將 pH 值調至

5.0±0.1。

(五) 0.1 N 氫氧化鈉溶液

取氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 0.4 g，加水溶解後，稀釋至 1 00 mL。

(六) 1.2 N 鹽酸溶液之製備

取濃鹽酸 11.4 mL，加水稀釋至 100 mL。

(七) Sulfatase 溶液

取 Sulfatase (15300 units/g, type H-1) 3.3 g，以 pH 5.0 緩衝溶液溶解使成 50 mL，儲備於 -20°C 備用。

(八) 抗壞血酸溶液

稱取抗壞血酸 100 mg，加水至 1 mL 即得 100 mg/mL 之抗壞血酸溶液，使用前新鮮製備。

(九) Methotrexate (MTX) 溶液

精確量取 MTX 2.0 mL (25 mg/mL)，加水定容至 20.0 mL，即得 2.5 mg/mL 之 MTX 溶液，使用前新鮮製備。

(十) Phenytoin (PHT) 溶液

精確稱取 PHT 400.0 mg，加少量水混合均勻，加 0.1N NaOH 120 μ L，再加水定容至 10.0 mL 即得 40.0 mg/mL 之 PHT 溶液，使用前新鮮製備。

(十一) Carbamazepine (CBZ) 溶液

精確稱取 CBZ 400.0 mg，加 DMSO 1 mL，PEG 400 5 mL，混合均勻，再加熱水定容至 10.0 mL，即得 40.0 mg/mL 之 CBZ 溶液，使用前新鮮配製。



第二節 實驗方法

一、Genipin 之 pKa 測定

稱取 genipin 22.6 mg，加水至 100 mL，置於攪拌器上，放入磁石及 pH meter 之電極，以 0.1 N NaOH 滴定，記錄 NaOH 體積及 pH 值之變化，繪製滴定曲線圖，並求其滴定中點。當達滴定中點 (50% 中和) 時，解離態與不解離態的濃度正好相等，此時 $\text{pH} = \text{pK}_a + \log ([\text{A}^-] / [\text{HA}]) = \text{pK}_a + \log 1 = \text{pK}_a$



二、Genipin 之安定性

(一) 甲醇中 genipin 之安定性

精確稱取 genipin 1.0 mg，加入甲醇定容至 1.0 mL，經系列稀釋配製成 5.0 µg/mL 之 genipin 標準品溶液，加入等體積含內標 (10.0 µg/mL sesamol) 之甲醇後，分別於 0、16、22、40、70、164 小時，取 20 µL 以 HPLC 分析。

(二) 血清中 genipin 之安定性

1. 儲備於 -20°C 對血清中 genipin 安定性之影響

取空白血清 9 mL，加入 genipin 標準品溶液 1 mL，使其濃度為 10.0 µg/mL，分裝至微量離心管，分成三組，每組三管，每管 200 µL，第一組加入含內標 (1.0 µg/mL MP) 之乙酸乙酯 200 µL 萃取之，於渦旋振盪器上混合，經 9860 × g 離心 15 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，貯於 -20°C，俟後進行 HPLC 分析。其餘的血清檢品則先貯於 -20°C，分別於 1 及 3 天後取出，處理步驟如第一組。

2. 抗壞血酸對血清中 genipin 安定性之影響

取空白血清，加入 genipin 標準品溶液，使其濃度為 5.0 µg/mL，分裝至微量離心管，分成三組，每組三管，每管 200 µL，第一組加入 pH 5.0 之緩衝溶液 100 µL、100 mg/mL 抗壞血酸溶

液 100 μL ，再加含內標 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之乙酸乙酯 500 μL 萃
取之，於渦旋振盪器上混合，經 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取出
乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，貯於 -20°C ，俟後進行 HPLC 分
析。第二組加入 100 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL ，第三組加入
水 50 μL ，皆貯於 -20°C ，於第二天取出，分別加入 pH 5.0 之
緩衝溶液 100 μL 及 100 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL 後，其餘
處理步驟如第一組。

3. 超音波震盪解凍對血清中 genipin 安定性之影響

取空白血清，加入 genipin 標準品溶液，使其濃度為 5.0
 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分裝至微量離心管，分成五組，每組三管，每管 200 μL ，
第一組加入 pH 5.0 之緩衝溶液 100 μL 、100 mg/mL 抗壞血酸溶
液 50 μL ，再加含內標 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之乙酸乙酯 350 μL 萃
取之，於渦旋振盪器上混合，經 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取出
乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，貯於 -20°C ，俟後進行 HPLC 分
析。其餘四組則先貯於 -20°C ，於第二天取出，分別經超音波震
盪器震盪 0、1、5、15 分鐘後，其餘處理步驟如第一組。

(三) 血液檢品之前處理及安定性

1. 抗壞血酸對血清中 genipin 於 37°C 下安定性的影響

取大鼠靜脈注射 genipin 後 3 分鐘之血清檢品，置於冰溶

上，分裝至外覆鋁箔紙之試管，分成四組，每組三管，每管 200 μL ，加入 1,000 unit/mL sulfatase 溶液 100 μL ，第一組加入 200 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL ，第二組加入 100 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL ，第三組加入 50 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL ，第四組則加入水 50 μL ，並栓上血清塞，以注射針筒抽去管內之空氣。置於 37°C 水浴中 1 小時之後，加入含內標 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之乙酸乙酯 350 μL 萃取之，於渦旋振盪器上混合後，置於微量離心管，經 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘後，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，加甲醇溶解 50 μL ，取 20 μL 以 HPLC 分析。

2. 抽氣及避光對血清中 genipin 於 37°C 下安定性的影響

取大鼠靜脈注射 genipin 後 3 分鐘之血清檢品，置於冰浴上，分成三組，每組三管，每管 200 μL ，第一組置於外覆鋁箔紙之試管，第二組置於透明玻璃試管，第三組置於微量離心管，各加入 1,000 unit/mL sulfatase 溶液 100 μL ，100 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL ，前兩組栓上血清塞，並以注射針筒抽去管內之空氣。置於 37°C 水浴中 1 小時後，加入含內標 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之乙酸乙酯 350 μL 萃取之，於渦旋振盪器上混合，置於微量離心管，經 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘後，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，加甲醇 50 μL 溶解，取 20 μL 以 HPLC 分析。

3. 血清中 genipin 結合態代謝物酶解之最佳時間

取大鼠靜脈注射 genipin 後 3 分鐘之血清檢品，置於冰溶上，分裝至微量離心管，每管 200 μL ，加入 sulfatase 溶液 100 μL ，100 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL 。置於 37°C 之往復式振盪水槽，以 100 rpm 震搖，分別於 0、15、30、60、120、240、360 分鐘後，取出檢品，每組三管，各加含內標 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之乙酸乙酯 350 μL 萃取之，於渦旋振盪器上混合，置於微量離心管，經 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘後，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，加甲醇 50 μL 溶解，取 20 μL 以 HPLC 分析。

4. 凍存對血清中 genipin sulfate 安定性之影響

取大鼠靜脈注射 genipin 後 3 分鐘之血清檢品，置於冰溶上，分裝至微量離心管，分成兩組，每組三管，每管 200 μL ，第一組加入 1,000 unit/mL sulfatase 溶液 100 μL 、100 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL ，於渦旋振盪器上混合，置於 37°C 之往復式振盪水槽，以 100 rpm 震搖，30 分鐘後取出，再加入含內標 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之乙酸乙酯 350 μL 萃取之，於渦旋振盪器上混合，經 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，貯於 -20°C，俟後進行 HPLC 分析。第二組則先貯於 -20°C，於第 3 天取出，處理步驟處理如第一組。

(四) 血清檢品前處理方法之比較

1. 乙酸乙酯萃取之法

取空白血清 900 μL ，加入 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 genipin 標準品溶液 100 μL 使成濃度為 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之血清標準溶液。取 100 μL 置於微量離心管，加入含內標 (4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之乙酸乙酯 100 μL 萃取之，於渦旋振盪器上混合，置於微量離心管，經 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘後，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，加甲醇 50 μL 溶解，取 20 μL 以 HPLC 分析。

2. 加甲醇去蛋白法

取 genipin 血清標準溶液 100 μL 置於微量離心管，加入含內標 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之甲醇 400 μL ，於渦旋振盪器上混合，經 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘後，以氮氣吹乾，加甲醇 50 μL 溶解，取 20 μL 以 HPLC 分析。

(五) 高效液相層析儀 (HPLC) 分析條件

分析管柱：Cosmosil[®] 100 RP-18 e (5 μm , 150 \times 4.6 mm)

移動相：0.1 % phosphoric acid : acetonitrile = 84 : 16

沖提時間：25 min

流速：1.0 mL/min

檢測波長：240 nm

(六) 數據分析

比較所測得 genipin 與內標之波峰面積比。



三、體循環前代謝—大鼠便腸道菌對 geniposide 之作用

(一) 大鼠糞便懸浮液之製備

取未進行實驗之大鼠所排遺的新鮮糞便，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。

(二) 大鼠糞便懸浮液細菌對 geniposide 之作用

取 500.0 $\mu\text{g/mL}$ geniposide 標準品溶液 0.9 mL，加入大鼠糞便懸浮液 8.1 mL，以攪拌器混勻後，取混合液 300 μL 置於外覆鋁箔紙之試管，栓上血清塞，並以注射針筒抽去管內之空氣，以模擬腸道之無氧狀態，全程於冰溶上操作。取出 3 管立即加入含內標 (1.0 $\mu\text{g/mL}$ MP) 之乙酸乙酯 300 μL 萃取之，於渦旋振盪器上混合，經 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘後，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾；其餘置於 37°C 往復式震盪水槽中，以 100 rpm 震搖，分別於 1、3、5、10、15、20 分鐘後各取出 3 管檢品置於冰溶上，立即以含內標之乙酸乙酯萃取之，以氮氣吹乾後，貯於 -20°C，俟後進行 HPLC 分析。

(三) 高效液相層析 (HPLC) 分析條件

分析管柱：Apollo C18 5 μ (250 \times 4.6 mm)

移動相：0.1 % phosphoric acid : acetonitrile = 78:22

沖提時間：30 min

流 速：1 mL/min

檢測波長：240 nm

內 標：MP (1.0 $\mu\text{g/mL}$)

(四) 數據處理

將檢品分析所得之 genipin 與內標之波峰面積比與反應時間作圖。



四、Genipin 於大鼠體內之代謝動力學

(一) 動物

雄性 SD 大鼠 21 隻，體重介於 260~400 g，實驗前先禁食 12 小時。

(二) 靜脈快速注射給藥及採血

精確稱取 genipin 500.0 mg，以 PEG 400 10.0 mL 溶解，即得 50.0 mg/mL 之 genipin 溶液，使用前新鮮製備並經 0.2 μ m 滅菌濾膜 (cellulose acetate)，除去熱原。於麻醉狀況下，尾靜脈注射給予 50.0 mg/mL/kg genipin，給藥後 5、15、30、60、120、180、240 及 360 分鐘，以心臟穿刺方式採血 1 mL。將血液檢品置於含 heparin 之微量離心管，並以手輕輕轉動，使管內的血液與 heparin 混合均勻，立即以 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取上層血漿立即進行前處理，俟後分析。

(三) 口服給藥及採血

分別精確稱取 genipin 100.0、200.0 mg，以 PEG 400 10.0 mL 溶解，即得 10.0、20.0 mg/mL 之 genipin 溶液，使用前新鮮製備。經由胃管投予 100.0、200.0 mg/10 mL/kg 之 genipin，給藥後 5、15、30、60、120、180、240、360、480、720、1440、2160 及 2880 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.5 mL。將血液檢品置於含 heparin 之

微量離心管，並以手輕輕轉動，使管內的血液與 heparin 混合均勻，立即以 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取上層血漿立即進行前處理，俟後分析。

(四) 血漿檢品前處理

1. 血漿中自由態 genipin 之定量

取血漿檢品 200 μL ，置於冰浴上，加 pH 5.0 之緩衝溶液 100 μL 及 100 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL ，於渦旋振盪器上充分混合。

2. 血漿中 genipin sulfate 之定量

取血漿檢品 200 μL ，置於冰浴上，加 1,000 unit/mL sulfatase 100 μL 及 100 mg/mL 抗壞血酸溶液 50 μL ，於渦旋振盪器上充分混合後，於 37°C 之往復式振盪水槽反應 30 分鐘。

前述 1、2 檢品，以含內標 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP) 之乙酸乙酯 350 μL 萃取之，於渦旋振盪器混合後，以 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，加甲醇 50 μL 溶解，取 20 μL 以 HPLC 分析。

(五) 血漿標準溶液之製備

精確稱取 genipin 1.0 mg，以甲醇 1 mL 溶解，加入空白血漿定容，並次第稀釋，製備濃度為 0.1、0.2、0.3、0.6、1.3、2.5、5.0

及 10.0 µg/mL 之血漿標準溶液。

(六) 檢量線之繪製

取血漿標準溶液 200 µL，加 pH 5.0 緩衝液 100 µL、100 mg/mL 抗壞血酸 50 µL，混合均勻，再以含內標 (1.0 µg/mL MP) 之乙酸乙酯 350 µL 萃取之，於渦旋振盪器混合後，以 9860 × g 離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，加甲醇 50 µL 溶解，取 20 µL 以 HPLC 分析，所得之 genipin 與內標之波峰面積比值，與濃度進行線性迴歸，求得檢量線方程式。

(七) 高效液相層析 (HPLC) 分析條件

分析管柱：Apollo C18 5µ (250×4.6 mm)

移動相：0.1 % phosphoric acid : acetonitrile = 78 : 22

沖提時間：25 min

流 速：1.0 mL/min

檢測波長：240 nm

內 標：MP (1.0 µg/mL)

(八) 分析系統及方法之確效

1. 精密度

將各濃度之血漿標準溶液，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

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、標準偏差及變異係數。

2. 準確度

三次同日內及三次異日間實測濃度與真正濃度間之相對誤差表示之。

3. 靈敏度

將 genipin 血漿標準溶液一再稀釋，直至其波峰與雜訊之比值為 3 時之濃度為其偵測極限。

4. 回收率

將 3.1、12.5 及 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三種濃度之 genipin 標準溶液 (溶於甲醇) 100 μL ，分別加入空白血漿 900 μL ，製備 0.3、1.3 及 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三種濃度之標準溶液各三份，所測得之濃度除以理論濃度，即回收率。

$$\text{回收率} = (\text{genipin實測濃度}) / (\text{genipin理論濃度})$$

(九) 數據處理

Sulfatase 水解後所測得 genipin 之濃度減去 genipin 自由態之濃度，即為 genipin sulfate 之濃度。

(十) 數據分析

使用 WinNonlin (version 1.1; Pharsight Corp., U.S.A.) 之非室體

模式及 Excel (version 7.0, Microsoft) 等軟體計算動力學參數。



五、梔子水煎劑中 geniposide 之定量分析

(一) 梔子水煎劑之製備

稱取梔子藥材 200 g，加入一次水 4 L，於瓦斯爐上加熱至沸騰，沸騰後轉為小火繼續加熱 2 小時，至體積減至 2 L 以下，以紗布趁熱過濾，將藥渣濾除，濾液以小火繼續煎煮至體積略低於 100 mL 後，加水定容至 100 mL，混合均勻後分裝於離心管，置於 -20 °C 備用。

(二) 梔子水煎劑之前處理

取上述之水煎劑之 1,000 倍稀釋液，取 300 μ L，加甲醇 700 μ L，於渦旋振盪器上混合，經 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取上清液 200 μ L，加入含內標 (20.0 μ g/mL CA) 之甲醇溶液 200 μ L 混合後，以 0.45 μ m 微孔濾器過濾。取 20 μ L 以 HPLC 分析，以檢品中 geniposide 與內標之波峰面積比值代入檢量線方程式，求出檢品中 geniposide 之含量。

(三) 高效液相層析儀 (HPLC) 分析條件

分析管柱：Apollo C18 5 μ (250 \times 4.6 mm)

移動相：0.1 % phosphoric acid : acetonitrile = 85 : 15

沖提時間：15 min

流 速：1.0 mL/min

檢測波長：240 nm

內 標：CA (20.0 $\mu\text{g/mL}$)

(四) 檢量線之繪製

精確稱取 geniposide 1.0 mg，以甲醇溶之，並定容至 1.0 mL 為儲備溶液。取標準品儲備溶液 100 μL ，以甲醇定容至 1.0 mL，使 geniposide 之標準溶液濃度為 200.0 $\mu\text{g/mL}$ ，再以等體積甲醇系列稀釋，使混合標準溶液中 geniposide 濃度為 3.2、6.3、12.5、25.0、50.0、75.0、100.0 及 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 。取混合標準溶液 200 μL ，加入等量含內標 (20.0 $\mu\text{g/mL}$ CA) 之甲醇溶液，取 20 μL 以 HPLC 分析，所得之 genipin 與內標之波峰面積比值，與濃度進行線性迴歸，求得檢量線方程式。

(五) 分析系統及方法之確效

1. 精密度 (Precision)

將不同濃度之 geniposide 標準溶液，於同日內不同時間及連續三日之異日間各進行一次層析，將所得波峰面積比值代入先前獲得的線性迴歸方程式，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.)。

$$\text{精密度 (\% CV)} = (\text{標準偏差} / \text{平均濃度}) \times 100 \%$$

2. 準確度 (Accuracy)

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

$$\text{準確度} = [(\text{平均實測濃度} - \text{理論濃度}) / \text{理論濃度}] \times 100 \%$$

3. 靈敏度 (Sensitivity)

將 geniposide 標準品溶液一再稀釋，直至其波峰與雜訊之比值為 3 時之濃度為其偵測極限 (LOD, Limit of detection)。

4. 回收率 (Recovery)

分別取已知之 geniposide 含量之梔子水煎劑之 1,000 倍稀釋液 300 μL ，分三組，每組三管，分別加入 10.0、25.0、75.0 $\mu\text{g/mL}$ 三種濃度的標準溶液 700 μL 振盪混合，經 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘，取上清液 200 μL ，加入含內標 (20.0 $\mu\text{g/mL}$ CA) 之甲醇溶液 200 μL 震盪混合後，取 20 μL 以 HPLC 分析。將計算所得之增加量除以已知標準品之添加量即為回收率。

六、梔子水煎劑於鼠體內之代謝動力學

(一) 動物

雄性 SD 大鼠 6 隻，體重介於 330~450 g，實驗前先禁食 12 小時。

(二) 給藥及採血

採交叉給藥設計，經胃管灌食給予 10、20.0 g/10 mL/kg 之梔子水煎劑，經胃管灌食給藥（相當於 geniposide 208.1、416.2 mg/kg）。給藥後 5、15、30、60、120、180、240、360、480、720、1440、2160、2880、4320、5760、7200、8640 及 10080 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.5 mL。將血液檢品置於含 heparin 之微量離心管，並以手輕輕轉動，使管內的血液 heparin 混合均勻，立即以 9860 × g 離心 15 分鐘，取上層血漿立即進行前處理，俟後分析。將大鼠隨機分組，給藥後二週待體內藥物排出，實驗組與對照組互換。

(三) 血漿檢品之前處理、血漿標準溶液之製備、檢量線之繪製、高效液相層析 (HPLC) 分析條件、分析系統及方法之確效、數據分析同四之口服 genipin。

七、梔子水煎劑於大鼠體內對 methotrexate 動力學之影響

(一) 動物

雄性 SD 大鼠 28 隻，體重介於 280~410 g，分成四組，實驗前禁食 12 小時。

(二) 給藥

採平行給藥設計，以胃管給藥，第一組口服梔子水煎劑 4.0 g/8.0 mL/kg (含 geniposide 143.1 mg/kg)，第二組口服梔子水煎劑 2.0 g/8.0 mL/kg (含 geniposide 71.5 mg/kg)，第三組口服梔子水煎劑 1.0 g/8.0 mL/kg (含 geniposide 35.8 mg/kg)，各組於投藥後三十分鐘口服給予 MTX 溶液 5.0 mg/2 mL/kg，而第四組則給予與梔子水煎劑等體積的水 10 mL/kg 與 MTX 溶液 2 mL/kg。

動力學實驗完成後，持續觀察大鼠之健康情況二十天。

(三) 採血及檢品處理

於給藥後 15、30、60、120、240、480、720、1440、2160、2880、3600 及 4320 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.5 mL，置於微量離心管，靜置 30 分鐘後，以 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取血清儲備於 -20°C ，俟後分析。

(四) 血清中 MTX 之定量

血清檢品利用 TDx Analyze 以螢光偏極免疫分析法

(Fluorescence Polarization Immuno Assay ; FPIA) 定量血清中 MTX 的濃度。此定量法係利用抗體抗原結合反應之原理，將帶有螢光標記之藥物加於欲分析之血清檢品中，與相對應之抗體進行競爭性結合，再利用待測藥物濃度與螢光偏極程度呈反比之關係，測定血清檢品中藥物之含量。

(五) 數據處理及統計方法

使用 WinNonlin (version 1.1 ; Pharsight Corp., U.S.A.)，採非室體模式 (noncompartment model) 計算動力學參數，以 ANOVA 及 Scheffe's test 檢定各組間動力學參數是否具統計上之差異 ($p < 0.05$)。



八、梔子水煎劑於大鼠體內對 phenytoin 動力學之影響

(一) 動物

雄性 SD 大鼠 6 隻，體重介於 270~410 g，實驗前先禁食 12 小時。

(二) 給藥

採交叉給藥設計，以胃管給藥，第一組口服梔子水煎劑 2.0 g/8.0 mL/kg (含 geniposide 71.54 mg/kg)，三十分鐘後口服給予 PHT 溶液 400.0 mg/10 mL/kg，第二組給予梔子水煎劑等體積的水與 PHT 溶液 10 mL/kg。大鼠採隨機分組，給藥後 10 天待體內藥物排出，實驗組與對照組互換。

(三) 採血

於給藥後 10、30、60、120、240、480、720、1440、2160、2880、3600 及 4320 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.5 mL，置於微量離心管，靜置 30 分鐘後，以 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取血清儲備於 -20°C ，俟後分析。

(四) 血清檢品之前處理及分析

取血清檢品 100 μL ，加含內標 (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5,7-DMC) 之乙酸乙酯 100 μL 萃取之，於渦旋振盪器混合後，經 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，加甲醇 50 μL 溶解，取 20 μL

以 HPLC 分析。

(五) 血清標準溶液之製備

精確稱取 PHT 1.0 mg，以甲醇 1.0 mL 溶解，加入空白血清定容，並次第稀釋，製備濃度為 0.4、0.8、1.6、3.1、6.3、12.5 及 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 之血清標準標準溶液。

(六) 檢量線之繪製

取血清標準溶液 100 μL ，加含內標 (2.0 $\mu\text{g/mL}$ 5,7-DMC) 之乙酸乙酯 100 μL 萃取之，於渦旋振盪器混合後，經 $9860 \times g$ 離心 15 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，加甲醇 50 μL 溶解，取 20 μL 以 HPLC 分析，所得之 PHT 與內標之波峰面積比值，與濃度進行線性迴歸，求得檢量線方程式。

(七) 高效液相層析 (HPLC) 分析條件

分析管柱：Apollo C18 5 μ (250 \times 4.6 mm)

移動相：H₂O：acetonitrile = 55：45

時間：15 min

流速：1.0 mL/min

檢測波長：214 nm

內標：5,7-DMC (2.0 $\mu\text{g/mL}$)

(八) 分析系統及方法之確效

1. 精密度

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、標準偏差及變異係數。

2. 準確度

三次同日內及三次異日間所得實測濃度與理論濃度間之相對誤差表示之。

3. 靈敏度

將 PHT 血清標準溶液一再稀釋，直至其波峰與雜訊之比值為 3 時之濃度為其偵測極限。

4. 回收率

將 7.8、31.2 及 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三種濃度之 PHT 標準溶液 (溶於甲醇) 100 μL ，分別加入空白血漿 900 μL ，製備 0.8、3.1 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等三種濃度之標準溶液各三份，所測得之血清標準溶液之波峰面積比值所得之實測濃度除以理論濃度之百分比，即回收率。

$$\text{回收率} = (\text{PHT實測濃度}) / (\text{PHT理論濃度}) \times 100 \%$$

(九) 數據分析

使用 WinNonlin (version 1.1; Pharsight Corp., U.S.A.) 之非室體

模式及 Excel (version 7.0, Microsoft) 等軟體計算動力學參數。



九、梔子水煎劑於大鼠體內對 carbamazepine 動力學之影響

(一) 動物

雄性 SD 大鼠 6 隻，體重介於 270~440 g，實驗前先禁食 12 小時。

(二) 給藥

採交叉給藥設計，以胃管給藥，第一組口服梔子水煎劑 4.0 g/8.0 mL/kg (含 geniposide 為 143.1 mg/g)，三十分鐘後口服給予 CBZ 溶液 400.0 mg/10 mL/kg，第二組給予梔子水煎劑等體積的水與 CBZ 溶液 10 mL/kg。將大鼠隨機分組，給藥後 10 天待體內藥物排出後，實驗組與對照組互換。

(三) 採血

同梔子水煎劑於大鼠體內對 PHT 動力學之影響。

(四) 血清檢品之前處理及分析

取血清檢品 100 μ L，加含內標 (2.0 μ g/mL 5,7-DMC) 之乙酸乙酯 200 μ L 萃取之，於渦旋振盪器混合後，經 9860 \times g 離心 15 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，加甲醇 50 μ L 溶解，取 20 μ L 以 HPLC 分析。

(五) 血清標準溶液之製備

精確稱取 CBZ 1.0 mg，以甲醇 1.0 mL 溶解，加入空白血清定

容，並次第稀釋，製備濃度為 0.8、1.6、3.1、6.3、12.5、25.0 及 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之血清標準標準溶液。

(六) 檢量線之繪製

取血清標準溶液 100 μL ，加含內標 (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5,7-DMC) 之乙酸乙酯 200 μL 萃取之，於渦旋振盪器混合後，以 9860 $\times g$ 離心 15 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，加甲醇 50 μL 溶解，取 20 μL 以 HPLC 分析，所得之 CBP 與內標之波峰面積比值，與濃度進行線性迴歸，求得檢量線方程式。

(七) 高效液相層析 (HPLC) 分析條件

同梔子水煎劑於大鼠體內對 PHT 動力學之影響。

(八) 分析系統及方法之確效

1. 精密度、準確度、靈敏度

同梔子水煎劑於大鼠體內對 PHT 動力學之影響。

2. 回收率

將 15.6、62.5 及 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三種濃度之 CBZ 標準溶液 (溶於甲醇) 100 μL ，分別加入空白血漿 900 μL ，製備 1.6、6.3 及 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三種濃度之標準溶液各三份，所測得之血清標準溶液之波峰面積比值所得之實測濃度除以理論濃度之百分比，即回收率。

$$\text{回收率} = (\text{CBZ實測濃度}) / (\text{CBZ理論濃度}) \times 100 \%$$

(九) 數據分析

同八之梔子水煎劑於大鼠體內對 PHT 動力學之影響。



第四章 結果與討論

一、Genipin 之 pKa 測定

由於文獻中查無 genipin pKa 之記載，而其化學結構具半縮醛 (hemiacetal)，因此以 0.1N NaOH 滴定之，依 Henderson-Hasselbach equation $\text{pH} = \text{pKa} + \log ([A^-]/[HA])$ ，當達滴定中點 (50% 中和) 時，解離態與不解離態的濃度正好相等，此時的 $\text{pH} = \text{pKa}$ 。

V_{NaOH} 及 pH 之變化如 Table 1，滴定曲線如 Fig. 1~3 所示。由滴定曲線可求得當量點時 $V_{\text{NaOH}} = 825 \mu\text{L}$ ，於滴定中點時 $V_{\text{NaOH}} = 412.5 \mu\text{L}$ ，由滴定曲線推算，此時溶液的 pH 為 6.3，故 $\text{pKa} = 6.3$ ， $K_a = 5.0 \times 10^{-7}$ ，顯示 genipin 的酸度比酚為高 (phenol 之 $\text{pKa} = 9.95$)。

二、Genipin 之安定性

Genipin 的結構具 hemiacetal 官能基，易開環，化性較不安定。因此本實驗以 HPLC 方法先行探討其於甲醇及血清中之安定性。以 0.1% 磷酸溶液與乙腈 (84:16, v/v) 之混合液為移動相，波峰分離效果良好，可於 25 分鐘內完成。以所測得 genipin 與內標之波峰面積比，探討各種情況下 genipin 之安定性。

(一) 甲醇中 genipin 之安定性

Genipin 之甲醇溶液製備後，於不同時間以 HPLC 分析，顯示 genipin 之濃度會隨時間減少，如 Fig. 4 所示，故於實驗中所使用之 genipin 標準溶液必須於使用前新鮮配製。

(二) 血清中 genipin 之安定性

Genipin 之血清溶液製備後，貯存於 -20°C ，於預定時間點取出，顯示經凍存一天及三天後，genipin 的濃度分別比立即處理組減少了 51.7% 及 60.1% ($p < 0.001$)，如 Fig. 5 所示；若於冰凍前加抗壞血酸及未加抗壞血酸，genipin 的濃度分別比立即處理組減少 8.9% ($p < 0.01$) 及 43.3% ($p < 0.001$)，如 Fig. 6 所示，結果顯示保存前加抗壞血酸顯著減少其降解，應可推論抗壞血酸的酸性提高了其安定性；另外，本研究進一步探討解凍過程中使用超音波震盪對 genipin 安定性的影響，結果顯示 genipin 明顯因震盪而破壞，如 Fig. 7 所示，因此血清檢品

置於室溫下自然解凍應為比較理想之解凍方式。

為了解 genipin 結合態代謝物之最佳酶解時間，以大鼠靜脈注射 genipin 後三分鐘之血清檢品，分別加入 sulfatase、 β -glucuronidase 水解，於 37°C 水浴進行酶解反應，並於 0、15、30、60、120 及 240 分鐘終止反應，結果如 Fig. 8 所示，顯示以 sulfatase 水解 30 分鐘所產生的 genipin 最多，而以 β -glucuronidase 水解時，genipin 的濃度並未明顯增加，顯示幾無 genipin glucuronides 之存在。

分析結果顯示，genipin 之原形分子於血清中極不安定。於藥物動力學研究的定量過程，為克服 genipin 不安定的問題，進行動力學實驗時將採分析血漿樣品，並於冰上進行前處理，以求能以最短時間處理檢品，避免 genipin 受破壞。

三、體循環前代謝—大鼠便腸道菌對 geniposide 之作用

為了解 geniposide 是否會經腸道細菌作用轉變為其非醣體 genipin，本研究藉鼠便中之腸道菌探討其體循環前代謝，以無氧、避光及 37°C 水浴溫孵，模擬動物體內環境。鼠糞檢品經乙酸乙酯萃取後，利用 HPLC 方法分析。以 0.1% 磷酸溶液與乙腈 (78:22, v/v) 之混合液為移動相，每一檢品可於 30 分鐘內完成分析，層析圖如 Fig. 9 所示。

Geniposide 經鼠便細菌作用後，其苷元 genipin 濃度之經時變化如 Fig. 10 所示。Geniposide 一接觸到鼠便細菌時，立刻被水解成 genipin，隨著時間增加，5 分鐘時濃度最高，而後逐漸減少，結果顯示 geniposide 極易受腸道菌水解，而 genipin 又遭其降解。

四、Genipin 於大鼠體內之代謝動力學

基於前述 genipin 安定性之研究結果，本研究為定量血中的 genipin，採以血漿為分析樣品，血漿檢品之前處理預試驗顯示，以乙酸乙酯萃取較以甲醇去蛋白處理之回收率為佳；此外，預試驗亦顯示添加抗壞血酸可減少 genipin 遭破壞。因此於採血後，血漿立刻以乙酸乙酯萃取，利用 HPLC 方法定量 genipin。由於無法取得 genipin sulfate 和 genipin glucuronide 兩種結合態代謝物之標準品，因而將血漿檢品分別以 sulfatase 及 β -glucuronidase 水解後，再以 HPLC 定量 genipin。

HPLC 系統係以 0.1% 磷酸溶液與乙腈 (78:22, v/v) 之混合液為移動相。每一血漿檢品可於 25 分鐘內完成分析。層析圖如 Fig. 11 所示。檢量線係以 genipin 與內標波峰面積比值為 y 軸，genipin 濃度為 x 軸，經線性迴歸求得檢量線方程式及相關係數。Genipin 之檢量線為 $y=0.2002x-0.0017$ ($r = 0.999$)，於濃度 0.1 至 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 之範圍有良好線性關係。分析方法之精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，如 Table 2 所示。同日內及異日間之變異係數 (coefficient of variation) 皆小於 7.2%，相對誤差皆小於 17%。血漿中回收率 (recovery) 為 95.9% ~ 101.1%，如 Table 3 所示。結果顯示分析系統之精密度、準確度及回收率皆良好。最低定量極限 (LLOQ) 為 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，可偵測極限 (LOD) 為 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 。

靜脈注射 50 mg/kg genipin 後，血漿中 genipin 及其 sulfate 之濃度如 Table 4~5 所示，平均濃度經時變化圖如 Fig. 12~13 所示。以非室模式計算出 genipin 及其 sulfate 之血藥面積分別為 881.9 ± 59.8 及 342.7 ± 36.9 nmol·min/mL，全身清除率分別為 89.5 ± 6.7 及 230.3 ± 25.9 mL/min，分佈體積分別為 1.1 ± 0.2 及 32.6 ± 8.0 L，平均滯留時間分別為 7.6 ± 0.6 及 41.2 ± 7.5 分鐘，如 Table 6~7 所示。Genipin sulfate 之平均血藥面積僅為原形分子之 61.1%，分佈體積約為其 29.6 倍，如 Table 8 所示，顯示 genipin 靜脈注射給藥後立即代謝成 sulfate 結合態代謝物，其原形分子於給藥後 60 分鐘後即偵測不到，而 sulfate 之結合態代謝物則一直可偵測至給藥後 360 分鐘。

口服投予 genipin 100, 200 mg/kg 後，血漿中 genipin 及其 sulfate 之濃度如 Table 9~10 所示，動物間個體差異明顯，genipin 原形分子之濃度低於最低定量濃度 (LLOQ)，genipin sulfate 之平均血中濃度經時變化如 Fig. 14 所示，藥物動力學參數如 Table 11~12 所示。200 mg/kg 之劑量相對於 100 mg/kg，genipin sulfate 之血峰濃度為 3.4 倍 ($p < 0.01$)，血藥面積為 4.1 倍 ($p < 0.001$)，滯留時間為 1.6 倍 ($p < 0.001$)，如 Table 13 所示，而 glucuronide 均偵測不到，顯示口服投予 genipin 後，主要係以 sulfate 結合態代謝物存在於循環中，與靜脈注射結果相似，惟靜脈投予時，給藥後一小時內可偵測到原形分子。因此建議進行體外活性試驗時，應重視

genipin sulfate，讓體外試驗能更接近體內真正的分子形態與濃度，才能瞭解 genipin 真實的體內藥理活性與機制。

令人意外的是口服 200 mg/kg genipin 的部份大鼠，於給藥後 6~12 小時間陸續死亡，而死亡率竟高達 77.8%，推測應與肝毒性有關，此一急毒性仍有待進一步探討。文獻指出 genipin 易與胺基酸結合形成藍色色素，因此常被當作染料及食品之添加劑。在本研究過程中，亦觀察到大鼠尿液與糞便呈現藍綠色或藍色，顯示大鼠體內有 genipin 藍色代謝物之存在。



五、梔子水煎劑中 geniposide 之定量分析

利用 HPLC 方法定量梔子水煎劑中 geniposide 之含量，係以 0.1 % 磷酸溶液與乙腈 (85:15, v/v) 之混合液為移動相，波峰分離效果良好，geniposide 之定量可於 15 分鐘內完成。層析圖如 Fig. 15 所示。

以 geniposide 與內標波峰面積比值為 y 軸，geniposide 濃度為 x 軸，經線性迴歸求得檢量線方程式及相關係數。Geniposide 之檢量線為 $y=0.0381x-0.0181$ ($r=0.999$)，於濃度 3.1 至 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 之範圍有良好線性關係。分析方法之精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，如 Table 14 所示。同日內及異日間之變異係數 (coefficient of variation) 皆小於 4.5%。從水煎劑中測得之回收率 (recovery) 為 86.9% ~ 96.4%，如 Table 15 所示。結果顯示分析系統之精密度及準確度皆良好。最低定量極限 (LLOQ) 為 3.1 $\mu\text{g/mL}$ ，可偵測極限 (LOD) 為 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

定量結果顯示，每 g 梔子有 48.9 mg geniposide 溶於水煎劑中。

六、 梔子水煎劑於大鼠體內之代謝動力學

本研究利用 HPLC 方法定量血漿中 genipin sulfate 之濃度，方法與「genipin 於大鼠體內之代謝動力學」相同。

大鼠給藥採交叉設計，分別口服投予梔子水煎劑 10 及 20 g/kg 後，血漿中 genipin sulfate 之濃度如 Table 16~17 所示，各大白鼠間有明顯之個體差異，genipin 之濃度低於最低定量濃度 (LLOQ)，genipin sulfate 之濃度經時變化圖如 Fig. 16~17 所示。藥物動力學參數如 Table 18~19 所示。口服給予 10 g/kg 梔子水煎劑之平均血峰濃度為 4.2 ± 0.6 nmol/mL，平均血藥面積為 10087.7 ± 1887.6 nmol•min/mL，平均滯留時間為 2773.8 ± 225.4 分；口服給予 20 g/kg 梔子水煎劑之平均血峰濃度為 8.8 ± 0.6 nmol/mL，平均血藥面積為 26729.9 ± 4526.3 nmol•min/mL，平均滯留時間為 3020.2 ± 322.6 分，如 Table 20 所示；比較兩劑量間之血峰濃度及血藥面積，20 g/kg 皆約為 10 g/kg 的兩倍。

口服梔子水煎劑 10 g/kg 所投予之 geniposide 莫耳數，約相當於口服 100 mg/kg 及 200 mg/kg genipin 之 2.8 及 1.4 倍，結果顯示 genipin sulfate 之平均血峰濃度為其 1.4 及 0.4 倍，平均血藥面積為其 17.4 及 4.2 倍，平均滯留時間為其 5.2 及 3.3 倍；口服梔子水煎劑 20 g/kg 所投予之 genipin 量相當於口服 100 mg/kg 及 200 mg/kg genipin 之 5.7 及 2.8 倍，平均血峰濃度為其 2.9 及 0.9 倍，平均血藥面積為其 46.0 及 11.2

倍，平均滯留時間為其 5.7 及 3.5 倍，顯示口服梔子水煎劑之 genipin sulfate 血藥面積遠大於口服相當量的 genipin。水煎劑中 geniposide 口服生可用率較佳的原因，可能與其水溶性較高有關，geniposide 有如 genipin 的 prodrug，而 genipin 因水溶性較差，可能部份沉澱於胃腸道中。

實驗過程中亦觀察到，口服梔子水煎劑之大鼠約於給藥 4 小時後所排之尿液及糞便開始呈現藍色，而投予 genipin 之大鼠則在給藥後 30 分鐘即觀察到藍色排遺物，推測 genipin 口服後於鼠體內快速與胺基酸結合而形成藍色代謝物，而投予梔子水煎劑時，geniposide 先經水解轉變為 genipin，再代謝為 genipin sulfate 及胺基酸結合物。另外，單次口服梔子水煎劑後，genipin sulfate 存在體內的時間達六天之久，顯示有明顯的腸肝循環現象。

七、梔子水煎劑於大鼠體內對 methotrexate 動力學之影響

(一) 梔子水煎劑中 geniposide 之定量

本研究利用 HPLC 方法定量梔子水煎劑中 geniposide 之含量，結果顯示梔子水煎劑中 geniposide 之含量為 35.8 ± 0.8 mg/g。

(二) 併服梔子水煎劑對 MTX 動力學之影響

以平行設計單獨口服 MTX 與併服 1、2、4 g/kg 梔子水煎劑，血清中 MTX 之濃度及血藥經時變化圖如 Table 21~24 及 Fig. 18 所示。單服 MTX 之平均血峰濃度為 0.3 ± 0.03 nmol/mL，平均血藥面積為 83.6 ± 26.9 nmol·min/mL，平均清除率為 48.8 ± 8.4 mL/min，平均滯留時間為 378.2 ± 193.2 min；併服梔子水煎劑 1 g/kg 之 MTX 平均血峰濃度為 0.2 ± 0.03 nmol/mL，平均血藥面積為 104.1 ± 27.5 nmol·min/mL，平均清除率為 31.4 ± 8.4 mL/min，平均滯留時間為 590.0 ± 120.4 min；併服梔子 2 g/kg 之 MTX 平均血峰濃度為 0.3 ± 0.02 nmol/mL，平均血藥面積為 482.6 ± 33.4 nmol·min/mL，平均清除率為 4.1 ± 0.7 mL/min，平均滯留時間為 1882.3 ± 60.8 min；併服梔子 4 g/kg 之 MTX 平均血峰濃度為 0.3 ± 0.02 nmol/mL，平均血藥面積為 405.7 ± 30.0 nmol·min/mL，平均清除率為 7.2 ± 0.5 mL/min，平均滯留時間為 1800.8 ± 67.5 min，如 Table 25~28 所示。

比較動力學參數顯示，當併服 2、4 g/kg 梔子水煎劑時，MTX 之血藥面積分別增加了 477.3% 及 385.3%，清除率分別減少了 91.6% 及 85.2%，滯留時間分別增加了 397.7% 及 376.2%，統計上均具有顯著差異 ($p < 0.001$)；而併服 1 g/kg 梔子水煎劑時，則動力學參數無顯著差異，如 Table 29 所示。另由血藥經時變化圖顯示，併服 2、4 g/kg 梔子水煎劑具明顯腸肝循環現象且對 MTX 之排除有抑制作用。

另外，經由每日觀察大鼠的健康狀況發現部分併服梔子水煎劑之大鼠有食慾變差、體重變輕、腹瀉、眼耳泛白及豎毛等現象，部份大鼠於第 6~10 天陸續死亡。併服 4 g/kg 梔子水煎劑之大鼠死亡率為 50% (4/8)，併服 2 g/kg 梔子水煎劑之大鼠死亡率達 66.7% (4/6)，而單獨口服 MTX 與併服 1 g/kg 梔子水煎劑組則健康無恙，顯示 2 g/kg 與 4 g/kg 劑量的梔子與 MTX 產生嚴重的交互作用。

Genipin sulfate 及 MTX 之結構具酸性基團，於生理 pH 下會形成陰離子。近年的研究顯示 MTX 是 MRPs 與 OATs 之受質 (Ng et al., 2003; Mizuno et al., 2003; Lauretta et al., 2004; Elaine et al., 2005)，又有許多研究顯示，sulfates、glucuronides 及 glutathione conjugates 為 MRPs 之受質 (Ballatori et al., 2005; Sweet, 2005)，梔子水煎劑與 MTX 併服時，若 genipin sulfates 與 MTX 競爭 MRPs 或 OATs，而致 MTX 之排除減緩，將造成 MTX 滯留於體內的時間延長，使 MTX 的代謝物 MTX-(Glu)_n 增

多；有研究指出不同 glutamyl chain length 於細胞內具有不同程度的滯留及毒性，會增強對細胞之毒殺作用。另有研究報導指出 (Amal et al., 2003; Bleyer, 1978)，MRP1、MRP2 和 MRP3 對於 MTX 高濃度 4 小時的暴露下可保護細胞，但是對 MTX 低濃度 96 小時持續暴露下，則無保護作用 (Hooijberg et al., 1999; Kool et al., 1999)，因此低濃度 MTX 的長時間滯留比高濃度 MTX 短時間滯留的毒性更高。當 MTX 以低濃度存在時，MTX 與 folyl- γ -polyglutamate synthetase (FPGS) 之親和力大於 MRPs，FPGS 能將 MTX 有效地代謝成 MTX-(Glu)_n，而 MTX-(Glu)_n 不是 MRPs 之受質，無法由細胞內外排，因此其半衰期比 MTX 原形長許多 (Chabner & Collins, 1990) 而導致毒性，包括肝、腎功能毒性、白血球降低及腹瀉等 (Hooijberg et al., 1999; Wachsman et al., 1996)，MTX-(Glu)_n 對細胞之毒性應可解釋併服梔子水煎劑的大鼠之高死亡率。然而詳細的交互作用機轉，尚待進一步的研究。

梔子水煎劑與 MTX 之併用造成致命毒性的交互作用，令人擔心。台灣地區的病患除了服用西藥外，常會自行併服中藥或來路不明的偏方，其中交互作用的風險不可忽視。因此建議對於服用治療指數小的西藥，應盡量避免併用中藥，以確保用藥之療效與安全。

八、梔子水煎劑於大鼠體內對 phenytoin 動力學之影響

(一) 梔子水煎劑中 geniposide 之定量

每 g 梔子水煎劑中 geniposide 之含量為 35.8 ± 0.8 mg/g。

(二) 併服梔子水煎劑對 PHT 動力學之影響

本研究利用 HPLC 方法，定量血清中之 PHT。血清檢品之前處理係利用分配原理，以乙酸乙酯萃取血清中之 PHT，以水與乙腈 (55:45, v/v) 之混合液為移動相，每一血清檢品可於 15 分鐘內完成 HPLC 分析，方法簡易而快速。層析圖如 Fig. 19 所示。

分析血清中 PHT 濃度之檢量線係以 PHT 與內標波峰面積比值為 y 軸，PHT 濃度為 x 軸，經線性迴歸求得檢量線方程式及相關係數。PHT 之檢量線為 $y=0.2305x+0.0294$ ($r=0.999$)，於濃度 0.4 至 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 之範圍有良好線性關係。分析方法之精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，如 Table 30 所示。同日內及異日間之變異係數 (coefficient of variation) 皆小於 6.7%。血清中回收率 (recovery) 為 95.1%~100.2%，如 Table 31 所示。結果顯示分析系統之精密度、準確度及回收率皆良好。最低定量極限 (LLOQ) 為 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ，可偵測極限 (LOD) 為 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。

血清中 PHT 之濃度及血藥經時變化圖如 Table 32~33 及 Fig.

20~21 所示。單服 PHT 之平均血峰濃度為 $16.7 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$ ，平均血藥面積為 $32087.9 \pm 7260.8 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ ，平均滯留時間為 $2163.8 \pm 180.8 \text{ min}$ ；併服 2 g/kg 梔子水煎劑之 PHT 平均血峰濃度為 $11.3 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ ，平均血藥面積為 $21258.4 \pm 4040.4 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ ，平均滯留時間為 $2414.4 \pm 214.9 \text{ min}$ ，如 Table 34~35 所示。比較動力學參數結果顯示並無顯著差異，如 Table 36 所示。

血藥經時變化圖顯示，PHT 有腸肝循環之現象，應與其代謝物 PHT glucuronide 有關，且梔子水煎劑對 PHT 之吸收有抑制作用。藥理研究顯示，梔子水煎劑中所含之 geniposide 有弱抗乙酰膽鹼和抗組織胺作用，會抑制胃液分泌及胃腸蠕動，降低胃排空速率，因而可能降低併服 PHT 的吸收及早期暴露，此交互作用對 PHT 臨床療效的可能影響，值得進一步評估。

九、梔子水煎劑於大鼠體內對 carbamazepine 動力學之影響

(一) 梔子水煎劑中 geniposide 之定量

每 g 梔子水煎劑中 geniposide 之含量為 35.8 ± 0.8 mg/g。

(二) 併服梔子水煎劑對 CBZ 動力學之影響

本研究利用 HPLC 定量血清中之 CBZ，方法與「併服梔子水煎劑對 PHT 動力學之影響」相同。層析圖如 Fig 22 所示。

分析血清中 CBZ 濃度之檢量線係以 CBZ 與內標波峰面積比值為 y 軸，CBZ 濃度為 x 軸，經線性迴歸求得檢量線方程式及相關係數。CBZ 之檢量線為 $y=0.2594x+0.0737$ ($r=0.999$)，於濃度 0.8 至 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 之範圍有良好線性關係。分析方法之精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，如 Table 37 所示。同日內及異日間之變異係數 (coefficient of variation) 皆小於 6.6%。血清中回收率 (recovery) 為 102.4%~104.9%，如 Table 38 所示。結果顯示分析系統之精密度、準確度及回收率皆良好。最低定量極限 (LLOQ) 為 0.8 $\mu\text{g/mL}$ ，可偵測極限 (LOD) 為 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 。

本實驗以交叉設計單服 CBZ 與併服 4 g/kg 梔子水煎劑，血清中 CBZ 之濃度及血藥經時變化圖如 Table 39~40 及 Fig. 23~24 所示。單服 CBZ 之平均血峰濃度為 28.1 ± 5.9 $\mu\text{g/mL}$ ，平均血藥面積為

31167.9±6876.0 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ ，平均滯留時間為 1464.6±139.4 min；併服梔子水煎劑 4 g/kg 之 CBZ 平均血峰濃度為 20.5±1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，平均血藥面積為 24873.2±5275.3 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ ，平均滯留時間為 1738.1±155.2 min，如 Table 41~42 所示。

比較動力學參數結果顯示，併服 4 g/kg 梔子水煎劑，CBZ 之平均血藥面積減少 20.2% ($p<0.01$)，其餘參數則無顯著差異，如 Table 43 所示。由血藥經時變化圖得知，梔子水煎劑對 CBZ 之吸收期有抑制作用，而排除相差異不大。有關小柴胡湯與 CBZ 交互作用的研究顯示，小柴胡湯延緩大鼠的胃排空時間，而使 CBZ 之吸收減少及變慢 (Ohnishi et al., 2002)，本研究顯示，梔子水煎劑顯著降低 CBZ 之吸收，應亦可歸因於梔子對胃排空時間的延緩。另外，CBZ 為中樞用藥，可穿過 BBB 於腦中作用，由實驗中觀察到，CBZ 與梔子水煎劑併用時，大鼠昏睡時間顯著較單服 CBZ 之大鼠為長，此一現象是否因 genipin sulfate 或其活性代謝物競爭外排蛋白，致使 CBZ 腦中滯留之濃度增加，而造成血中濃度減少，未來將進一步探討其於腦中之分布或利用腦透析技術分析腦中濃度，以瞭解其交互作用之機制。

第五章 結論與建議

- 一、 Genipin 之 pKa 6.3。其原形分子於血清中極不安定。
- 二、 大鼠靜脈注射 genipin 後，立即代謝成 sulfate 結合態代謝物，其原形分子只短暫存在於血漿中。
- 三、 大鼠口服 genipin 後，主要以 genipin sulfate 存在於血循環中，顯示此代謝物於體內發揮藥理作用之重要性值得探究。口服 200 mg/kg genipin 的大鼠死亡率高達 77.8%。
- 四、 大鼠口服梔子水煎劑後，主要以 genipin sulfate 循環於體內，滯留體內時間達六天之久，且有明顯的腸肝循環現象，而 genipin 與 genipin glucuronide 於血中無法偵測。
- 五、 併服梔子水煎劑對 MTX 之 AUC、MRT 顯著增加，CL/F 顯著下降，顯示梔子水煎劑抑制 MTX 之排除，並造成部份大鼠死亡。
- 六、 併服梔子水煎劑顯著減少 PHT 給藥後之早期暴露及 CBZ 之全期暴露。
- 七、 建議使用 MTX、PHT 及 CBZ 之患者盡量避免併服梔子水煎劑及其相關方劑，以免造成中西藥交互作用，以確保療效及用藥安全。

參考文獻

- 朱江，高欣，謝文利，晉玉章，孫文軍：京尼平對類風濕性關節炎大鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 的影響。中國中藥雜誌，30(9)：708-711，2005。
- 朱振家，錢之玉，包晨穎：京尼平對地鼠膽固醇結石形成的影響。中草藥，32(6)：530-532，2001。
- 徐珞珊、徐國鈞、金蓉鸞、何宏賢：中國藥材學(下)，中國醫藥科技出版社，p1166-8，1996。
- 陳立奇：中西藥物併用之交互作用研究-芍藥對抗癲癇藥物動力學性質之影響。台北醫學院，藥學研究所，2000。
- 彭婕，錢之玉，劉同征，饒淑云，曲斌：京尼平和西紅花酸保肝利膽作用的比較。中國新藥雜誌，12(2)：105-108，2003。
- 黃治本，願其勝：新型交聯劑京尼平在生物醫學中的應用與發展。上海生物醫學工程雜誌，24(1)：21-25，2003。
- 蔡景仁：癲癇的中西醫學整合研究，中藥方TW-001 與西藥抗癲癇藥物整合使用的基礎實驗研究(5-3)。中醫藥資訊網，CCMP89-RD-022. 217-239，2000。
- Akao T, Kobashi K, Aburasa M. Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 17: 1573-1576, 1994.
- Amal EF, Dave R, Christoph K, Marc O. Effect of polyglutamylation of methotrexate on its accumulation and the development of resistance in the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochemical Pharmacology*. 66: 999-1008, 2003.
- Ameen M, Taylor DA, Williams IP, Wells AU, Barker JNWN. Pneumonitis complicating methotrexate therapy for pustular psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology*. 15(3): 247, 2001.
- Aquerreta I, Aldaz A, Giraldez J, Sierrasesumaga L. Methotrexate pharmacokinetics and survival in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 42(1): 52-58, 2004.
- Ballatori N, Hammond C L, Cunningham J B, Krance S M, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 204: 238-255, 2005.
- Ballatori N, Hammond C L, Cunningham J B, Krance S M, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 204: 238-255, 2005.
- Bleyer WA. The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer*. 41: 36-51, 1978.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 92(16): 1295-1302, 2000.
- Brodie MJ, Dichter MA. Drug therapy antiepileptic drugs. *N Engl J Med*. 334: 168-75,

1996.

- Brodie MJ. Drug interactions in epilepsy. *Epilepsia*. 33: 13-22, 1992.
- Browne TR. The pharmacokinetics of agents used to treat status epilepticus. *Neurology*. 40: 28-32, 1990.
- Buchbinder R, Hall S, Sambrook PN, Champion GD, Harkness A, Lewis D. Methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: a life table review of 587 patients treated in community practice. *J Rheumatol*. 20: 639-644, 1993.
- Budavari S. *The Merck Index*, Merck & Co. Inc., 13th ed., NJ, USA., 2001.
- Carson CW, Cannon GW, Egger MJ, Ward JR, Clegg DO. Pulmonary disease during the treatment of rheumatoid arthritis with low dose pulse methotrexate. *Semin Arthritis Rheum*. 16: 186-195, 1987.
- Chabner BA and Collins MJ. *Cancer chemotherapy: principles and practice*. *Cancer Res*. 110-153, 1990.
- Chang HM, But PPH. *Pharmacology and applications of chinese materia medica*. World Scientific Publishing. 2: 1005, 1987.
- Chladek J, Grim J, Martinkova J, Simkova M, Vaneckova J. Low-dose methotrexate pharmacokinetics and pharmacodynamics in the therapy of severe psoriasis. *Basic Clin Pharmacol*. 96(3): 247-248, 2005.
- Chladek J, Grim J, Martinkova J, Simkova M, Vaniekova J, Koudelkova V, Noiekova M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low-dose methotrexate in the treatment of psoriasis. *Br J Clin Pharmacol*. 54(2): 147-156, 2002.
- Chu XY, Huskey SW, Matthew PB, Sarkadi B, Evans DC, Evers R. Transport of ethinylestradiol glucuronide and ethinylestradiol sulfate by the multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, and MRP3. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 309: 156-164, 2004.
- Crews KR, Liu T, Rodriguez GC, Tan M, Meyer WH, Panetta JC, Link MP, Daw NC. High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. *Cancer*. 100(8): 1724-1733, 2004.
- Egan LJ, Sandborn WJ, Mays DC, Tremaine WJ, Fauq AH, Lipsky JJ. Systemic and intestinal pharmacokinetics of methotrexate in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacol Ther*. 65(1): 29-39, 1999.
- El Desoky ES. *Pharmacotherapy of Rheumatoid Arthritis: An Overview*. *Current Therapeutic Research*. 62(2): 92-112, 2001.
- Elaine ML, Roger GD, Susan PCC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 204: 216-237, 2005.
- Faigle JW, Feldman KF. "Antiepileptic Drugs," 4th ed., eds. By Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Raven Press, New York. 499-510, 1995.
- Fernandez Megia MJ, Alos Alminana M, Esquer Borrás J. Pharmacokinetic monitoring

- of 24-hour infusion of methotrexate in an adult population with non-Hodgkin lymphoma. *Farm Hosp.* 28(6): 433-9, 2004.
- Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, et al. The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol.* 157: 1575-80, 2000.
- Fujikawa S, Fukui Y, Kooa K, Kumada JI. Brilliant Skyblue Pigment Formation from Gardenia Fruits. *J. Ferment. Technol.* 65: 419-424, 1987.
- Gary DK, Martin GB. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogen.* 7537-7552, 2003.
- Giessmann T, May K, Modess C, Wegner D, Hecker U, Zschiesche M, Dazert P, Grube M, Schroeder E, Warzok R, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W. Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Harmacogenetics and Genomics.* 76: 192-200, 2004.
- Godfrey C, Sweeney K, Miller K, Hamilton R, Kremer J. The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 46(4): 369-376, 1998.
- Grim J, Chladek J, Martinkova J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet.* 42(2): 139-151, 2003.
- Gutierrez-Urena S, Molina JF, Garcia CO, Cuellar ML, Espinoza LR. Pancytopenia secondary to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39: 272-276, 1996.
- Haag D. *Wet Inst Ned Apothekers. Infomatorium medicamentorum.* Nederland: Koninklijke Nederlandse Vereniging ter Bevordering der Pharmacie. 203, 2004.
- Hendry GAF, Houghton JD. *Natural Food Colorants*, 2nd ed. 40-79, 310-341, 1996.
- Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* 59: 2532-2535, 1999.
- Hsu HY, Yang JJ, Lin SY, Lin CC. Comparisons of geniposidic acid and geniposide on antitumor and radioprotection after sublethal irradiation. *Cancer Letters.* 113: 31-37, 1997.
- Huang ZB, Gu QS. The development and using of the new fashioned crossing linking agent in biomedicine. *Shanghai Biomedicine Engineering.* 24 (1): 21-25, 2003.
- Jansen G, Pieters R. The role of impaired transport in (pre)clinical resistance to methotrexate: insights on new antifolates. *Drug Resistance Updates.* 1:211-218, 1998.
- Johnstone RW, Ruefili AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein. *Trends in Biochemical Sciences.* 25(1): 1-6, 2000.

- Jones WK, Patel SR. A Family Physician's Guide to Monitoring methotrexate. *American Family Physician*. 62(7): 1607-1612, 2000.
- Ju C, Uetrecht JP. Detection of 2-hydroxyiminostilbene in the urine of patients taking carbamazepine and its oxidation to a reactive iminoquinone intermediate. *J Pharmacol Exp Ther*. 288: 51-56, 1999.
- Kang JJ, Wang HW, Liu TY, Chen YC, Ueng TH. Modulation of Cytochrome P-450-dependent Monooxygenases, Glutathione and Glutathione S-transferase in Rat Liver by Geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Food and Chemical Toxicology*. 35: 957-965, 1997.
- Kim RB, Wandel C, Leake B et al. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res*. 16: 408-414, 1999.
- Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, Park EH. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *Journal of Ethnopharmacology*. 103: 496-500, 2006.
- Koo HJ, Song YS, Kim HJ, Lee YH, Hong SM, Kim SJ, Kim BC, Jin C, Lim CJ, Parka EH. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *European Journal of Pharmacology*. 495: 201-208, 2004.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci*. 96: 6914-6919, 1999.
- Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum*. 29: 832-835, 1986.
- Kuo CY, Wu HL, Kou HS, Chiou SS, Wuc DC, Wua SH. Simultaneous determination of methotrexate and its eight metabolites in human whole blood by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1014: 93-101, 2004.
- Kusuhara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems at the blood-brain barrier and blood CSF barrier. *International Congress Series*. 1277: 111-122, 2005.
- Lauretta MS, Chan SL, Barry HH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 21: 25-51, 2004.
- Lee SW, Lim JM, Bhoo SH, Paik YS, Hahn TR. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Analytica Chimica Acta*. 480: 267-274, 2003.
- Lowenstein DH, Alldredge BK. Status epilepticus. *N Engl J Med*. 338: 970-6, 1998.
- Maggs JL, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Park BK. Characterization of the metabolites of carbamazepine in patient urine by liquid chromatography/mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*. 25(3): 275-280, 1996.
- Masatoshi H. Pharmacological studies of *Gardenia* fruits I. Effects of geniposide and genipin on the biliary excretion, the gastric juice contraction, and other

- pharmacological actions. *Yakugaku Zasshi*. 94(2): 157-162, 1974.
- Mattson RH, Cramer JA, Darney PD, Naftolin F. Use of oral contraceptives by women with epilepsy. *J Am Med Assoc*. 256: 238-40, 1986.
- McKendry RJ, Dale P. Adverse effects of low dose methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 20: 1850-1856, 1993.
- McLean MJ, McDonald RL. Carbamazepine and 10,11-epoxycarbamazepine produce use- and voltage-dependent limitation of rapid firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther*. 238: 727-38, 1986.
- McNamara JO. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: Hardman JE, Limbird LE, Goodman Gillman A, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. 521, 2001.
- Megia FMJ, Alminana AM, Borrás EJ. Pharmacokinetic monitoring of 24-hour infusion of methotrexate in an adult population with non-Hodgkin lymphoma. *Farm Hosp*. 28(6): 433-439, 2004.
- Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of Drug Transporter Studies on Drug Discovery and Development. *Pharmacology Review*. 55:425-461, 2003.
- Moyer T. Therapeutic drug monitoring. In: Burtis C, Ashwood E, editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. WB Saunders. 862, 1999.
- NCCHC Policy and Standards Committee. *Epilepsy Chronic Care. National Commission on Correctional Health Care Clinical Guidelines for Correctional Facilities*. 2002.
- Neels HM, Sierens AC, Kristine, George M, Naelaerts K, Scharpe SL, Hatfield GM, Lambert WE. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. *Clin Chem Lab Med*. 42(11): 1228-1255, 2004.
- Ng KH, Lim BG, Wong KP. Sulfate conjugating and transport functions of MDCK distal tubular cells. *Kidney International*. 63: 976-986, 2003.
- Nishizawa M, Izuhara K, Kaneko K, Fujimoto Y. 5-Lipoxygenase inhibitor isolated from *Gardenia fructus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 36: 87-95, 1988.
- Ohnishi N, Okada K, Yoshioka M, Kuroda K, Nagasawa K, Takara K, Yokoyama T. Studies on Interactions between Traditional Herbal and Western Medicines. V. Effects of Sho-saiko-to (Xiao-Cai-hu-Tang) on the Pharmacokinetics of Carbamazepine in Rats. *Biol. Pharm. Bull*. 25: 1461-1466, 2002.
- Owen A, Pirmohamed M, Tettey JN, Morgan P, Chadwick D, Park BK. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. Blackwell Science Ltd *Br J Clin Pharmacol*. 51: 345-349, 2001.
- Park JE, Lee JY, Kim HG, Hahn TR, Paik YS. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia jasminoids*. *J. Agric. Food Chem*. 50: 6511-6514, 2002.
- Pearce RE, Vakkalagadda GR, leeder JS. Pathways of carbamazepine bioactivation in

- vitro I. characterization of human cytochromes p450 responsible for the formation of 2- and 3- hydroxylated metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*. 30: 1170-1179, 2002.
- Postovsky S, Arush BMW. Acral erythema caused by high-dose methotrexate therapy in patients with osteogenic sarcoma. *Pediatric Hematology and Oncology*. 22(2): 167-173, 2005.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR- rats. *International League Epilepsy*. 44(12): 1479-1487, 2003.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuropharmacology and neurotoxicology*. 12(16): 3557-3560, 2001.
- Puchta J, Hattenbach LO, Baatz H. Intraocular levels of methotrexate after oral low-dose treatment in chronic uveitis. *Ophthalmologica*. 219(1): 54-55, 2005.
- Rae JM, Johnson MD, Lippman ME, Flockhart DA. Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J Pharmacol Exp Ther*. 299: 849-57, 2001.
- Ranganathan P, Eisen S, Yokoyama WM, McLeod HL, Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis*. 62: 4-9, 2003.
- Ranganathan P, McLeod HL. Methotrexate and long-term treatment of rheumatic disease: comment on the article by Kremer. *Arthritis Rheum*. 52(2): 670-672, 2005.
- Richens A, Davidson DLW, Cartlidge NEF, Easter DJ. A multicenter comparative trial of sodium valproate and Neels et al.: TDM of anti-epileptics 1251 carbamazepine in adult-onset epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 57: 682-7, 1994.
- Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of Chromatography B*. 764: 217-254, 2001.
- Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 49: 311-8, 1996.
- Shen S, Elin RJ, Soldin SJ. Characterization of cross reactivity by carbamazepine-10,11-epoxide with carbamazepine assays. *Clin Biochem*. 34: 157-8, 2001.
- Shinoda M, Akita M, Hasegawa M, Nadai M, Hasegawa T, Nabeshima T. Pharmaceutical evaluation of carbamazepine suppositories in rats. *Biol. Pharm. Bull*. 18: 1289-1291, 1995.
- Sung HW, Huang RN, Huang LLH, Tsai CC, Chiu CT. Feasibility study of a natural

- crosslinking reagent for biological tissue fixation. *Natural Crosslinking Reagent*. 42: 560-567, 1998.
- Suzuki, Yasuhiro, kondo. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model. *Plata medica*. 67(9): 807-810, 2001.
- Sweet D H. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 204:198-215, 2005.
- Terlouw S A, Masereeuw R, Russel F G M. Modulatory effects of hormones, drugs, and toxic events on renal organic anion transport. *Biochemical Pharmacology*. 65: 1393-1405, 2003.
- Tian Q, Zhang J, Chan E, Duan W, Zhou S. Multidrug resistance proteins (MRPs) and implication in drug development. *Drug Development Research*. 64: 1-18, 2005.
- Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54: 1343-1352, 2002.
- Tseng TH, Chu CY, Huang JM, Shiow SJ, Wang CJ. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Letters*. 97: 61-67, 1995.
- Ueno K, Takeda Y, Iwasaki Y, Yoshizaki F. Simultaneous estimation of geniposide and genipin in mouse plasma using high-performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*. 17: 1237-1239, 2001.
- Wachsman M, Hamzeh FM, Saito H, Lietman PS. Anticytomegaloviral activity of methotrexate associated with preferential accumulation of drug by cytomegalovirus-infected cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 40(2): 433-436, 1996.
- Wang CJ. Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin β 1 in rats. *Cancer Lett*. 60(2): 95-102, 1991.
- West SG. Methotrexate hepatotoxicity. *Rheum Dis Clin North Am*. 23: 883-915, 1997.
- Wheeler DL, Vander Griend RA, Wronski TJ, Miller GJ, Keith EE, Graves JE. The short- and long-term effects of methotrexate on the rat skeleton. *Bone*. 16(2): 215-221, 1995.
- Yamazaki M, Sakura N, Chiba K, Mohri T. Prevention of the Neurotoxicity of the Amyloid β Protein by Genipin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24: 1454-1455, 2001.
- Zhou H, Mayer PR, Wajdula J, Fatenejad S. Unaltered etanercept pharmacokinetics with concurrent methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol*. 44(11): 1235-1243, 2004.

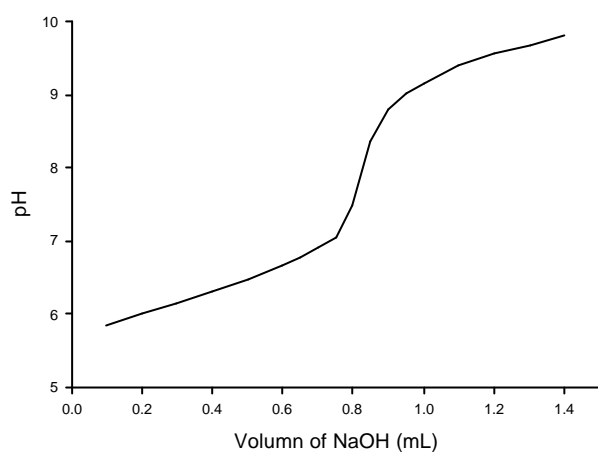


Fig. 1 The titration curve of genipin.

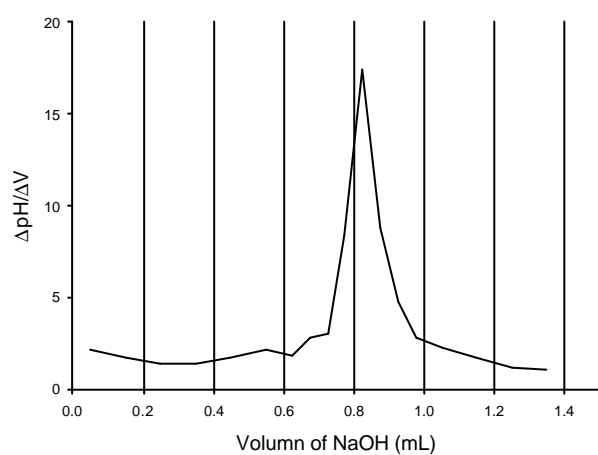


Fig. 2 The first derivative ($\Delta pH/\Delta V$) titration curve of genipin.

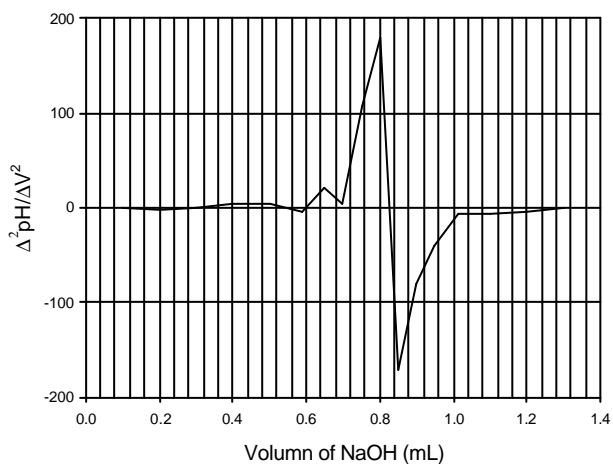


Fig. 3 The second derivative ($\Delta^2 pH/\Delta V^2$) titration curve of genipin.

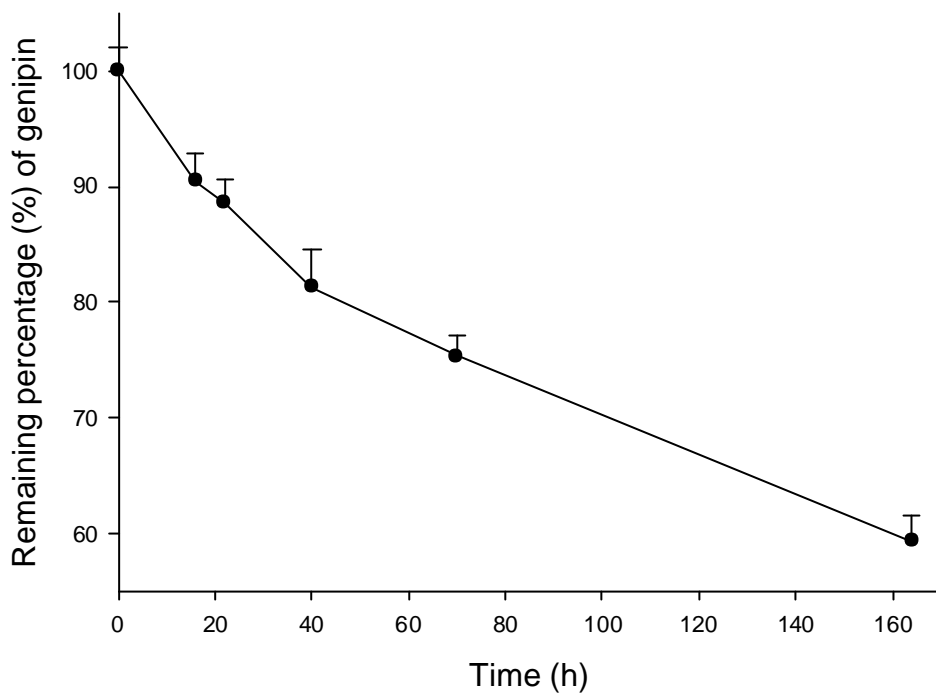


Fig. 4 Stability of genipin in MeOH (n=3).

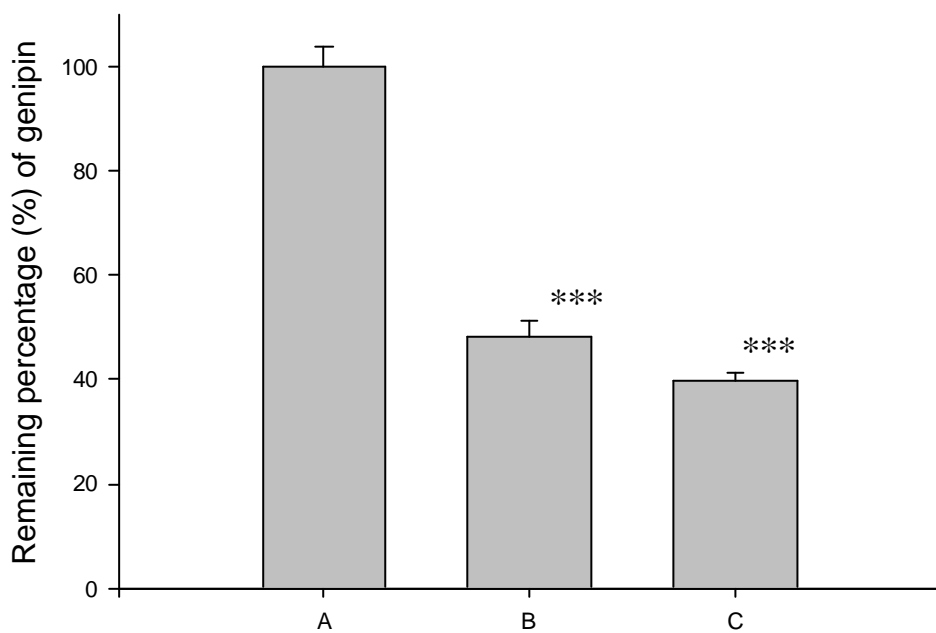


Fig. 5 Stability of genipin in serum stored at -20°C (n=3).

- (A) processed immediately
- (B) stored at -20°C for 1 day
- (C) stored at -20°C for 3 days

*** P < 0.001

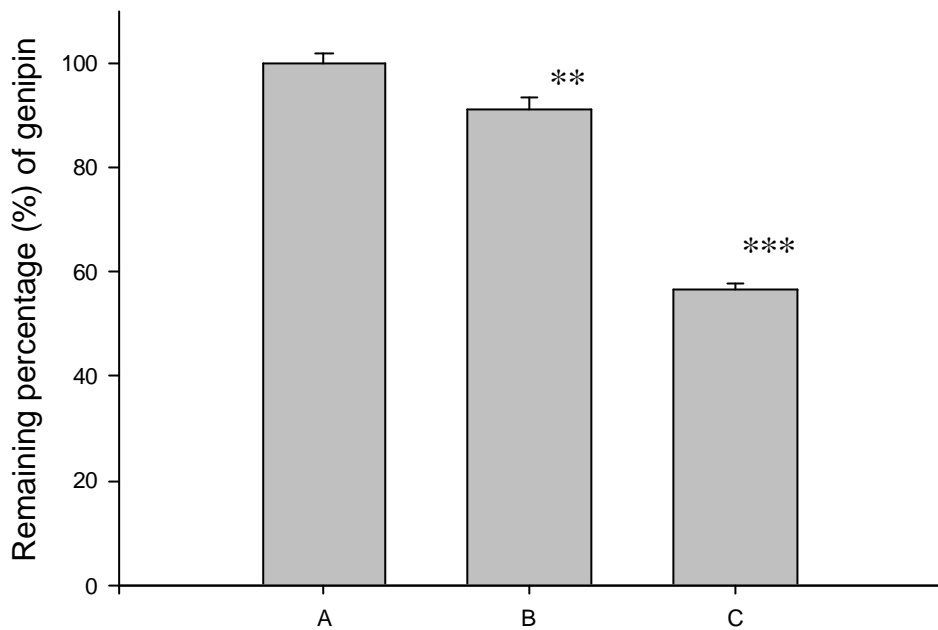


Fig. 6 Effect of ascorbic acid on genipin stability in serum (n=3).
 (A) processed immediately
 (B) stored with ascorbic acid at -20
 (C) stored without ascorbic acid at -20
 ** P < 0.01, *** P < 0.001

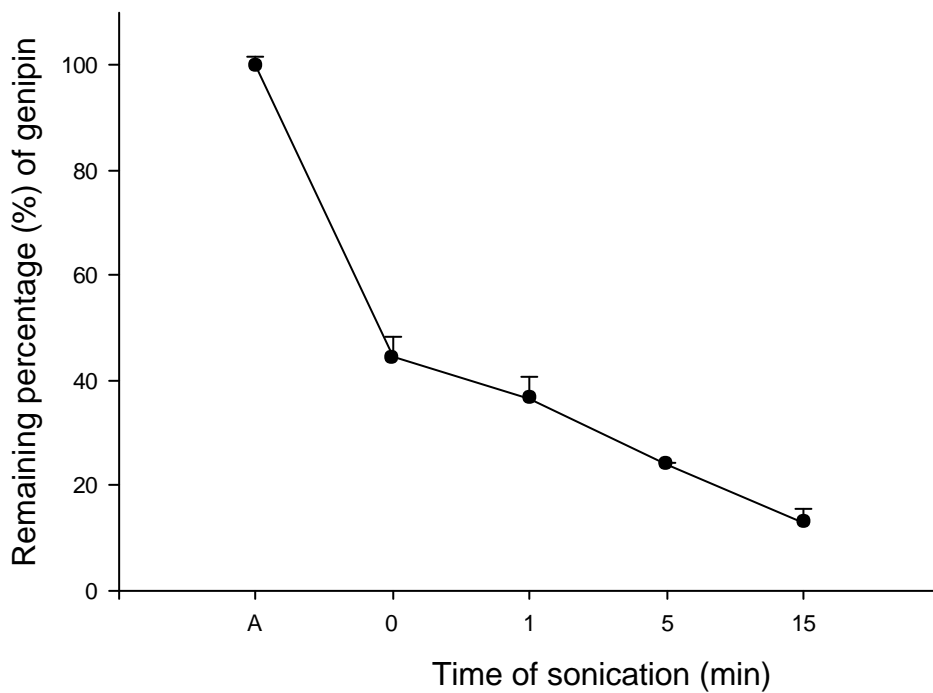


Fig. 7 Effect of thaw and sonication on genipin stability in serum (n=3).
 (A) processed immediately without freeze and thaw

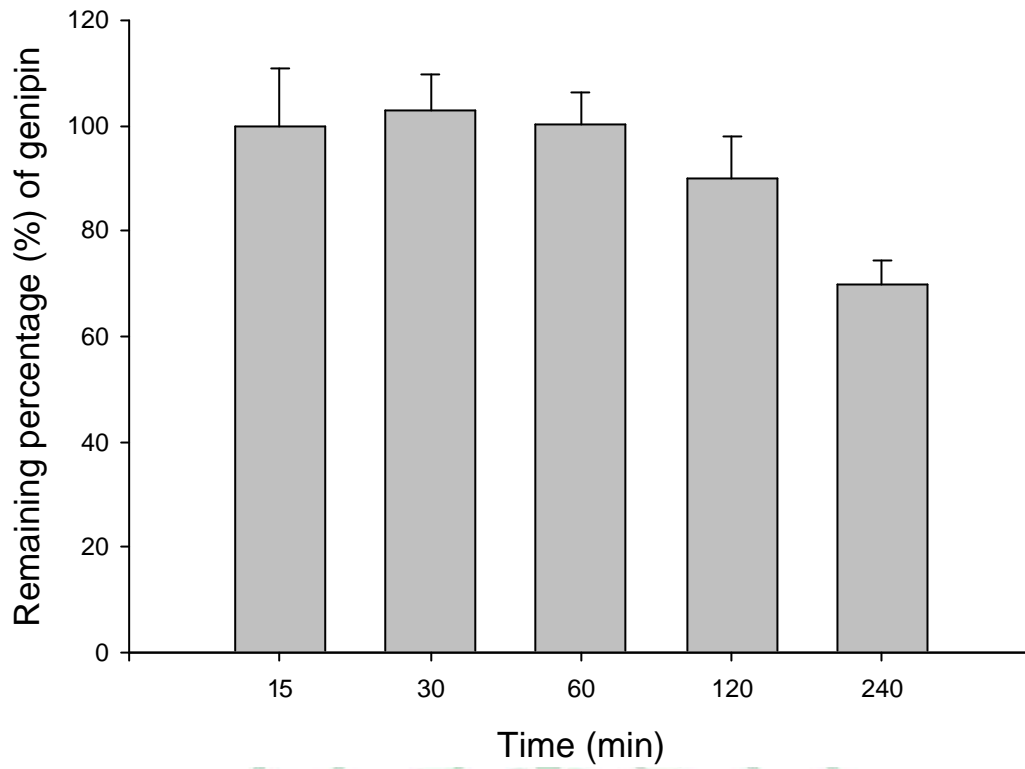
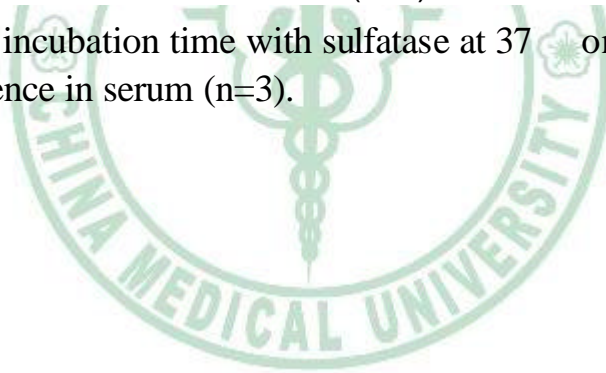


Fig. 8 Effect of incubation time with sulfatase at 37°C on genipin emergence in serum (n=3).



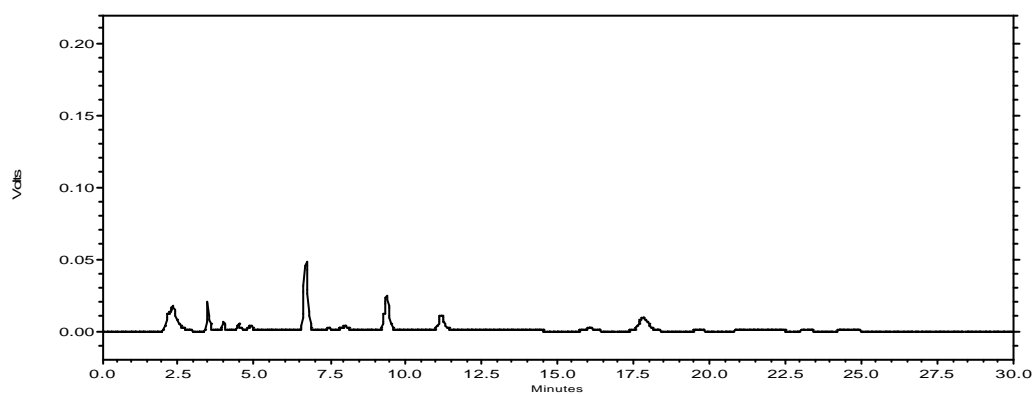
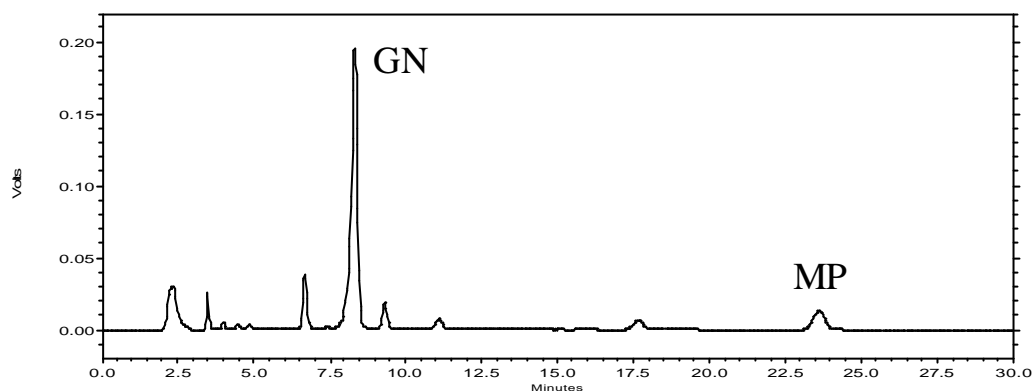
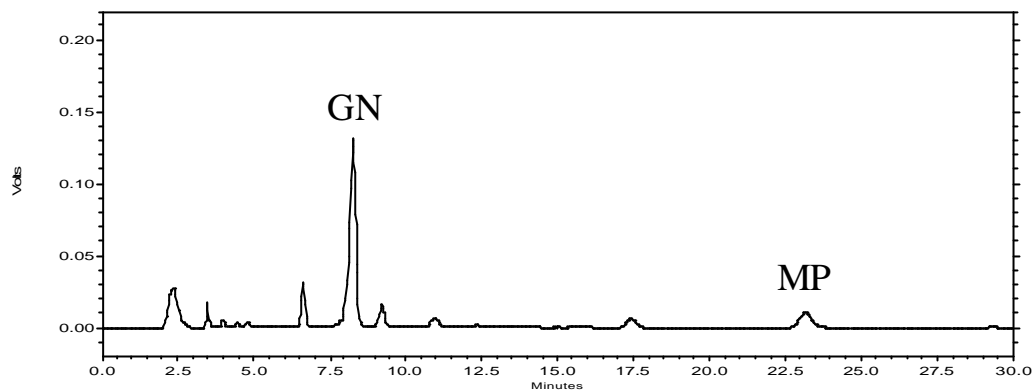


Fig. 9 Chromatograms of genipin (GN) and methyl paraben (MP, internal standard) in
 (A) rat feces upon spiking with geniposide without incubation
 (B) rat feces spiked with geniposide and incubated at 37 °C for 1 min
 (C) blank rat feces

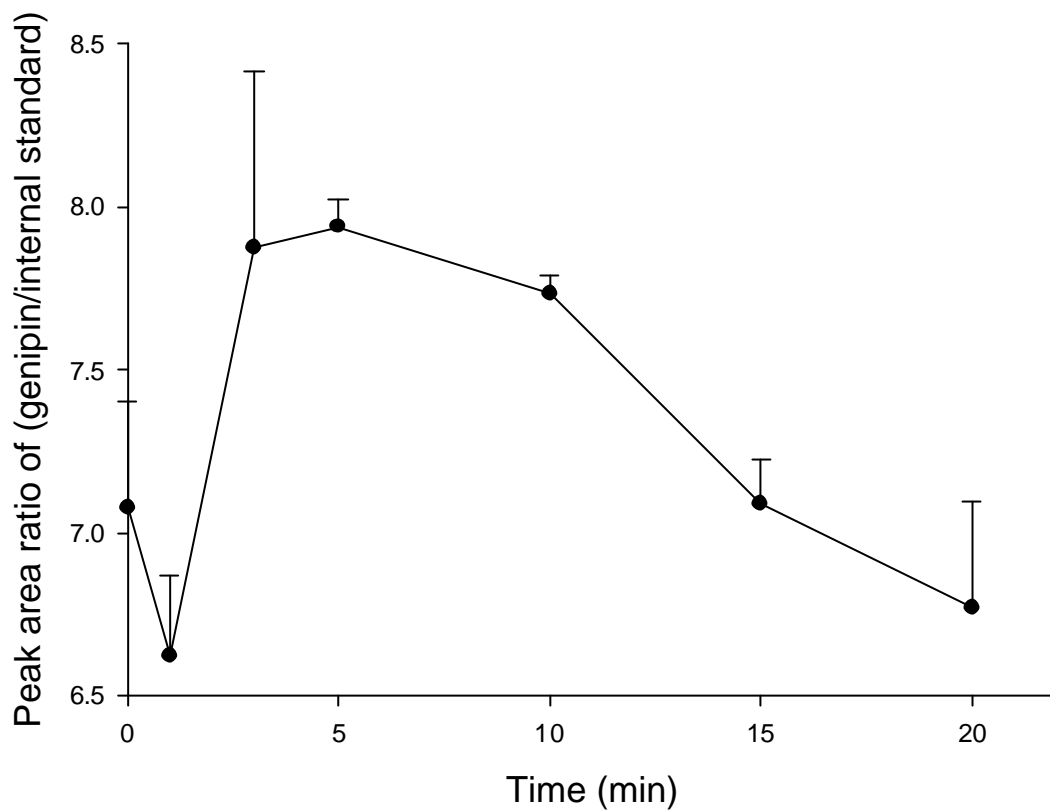


Fig. 10 Mean (\pm S.D.) ratio-time profile of genipin after incubation of geniposide with rat feces (n=3).

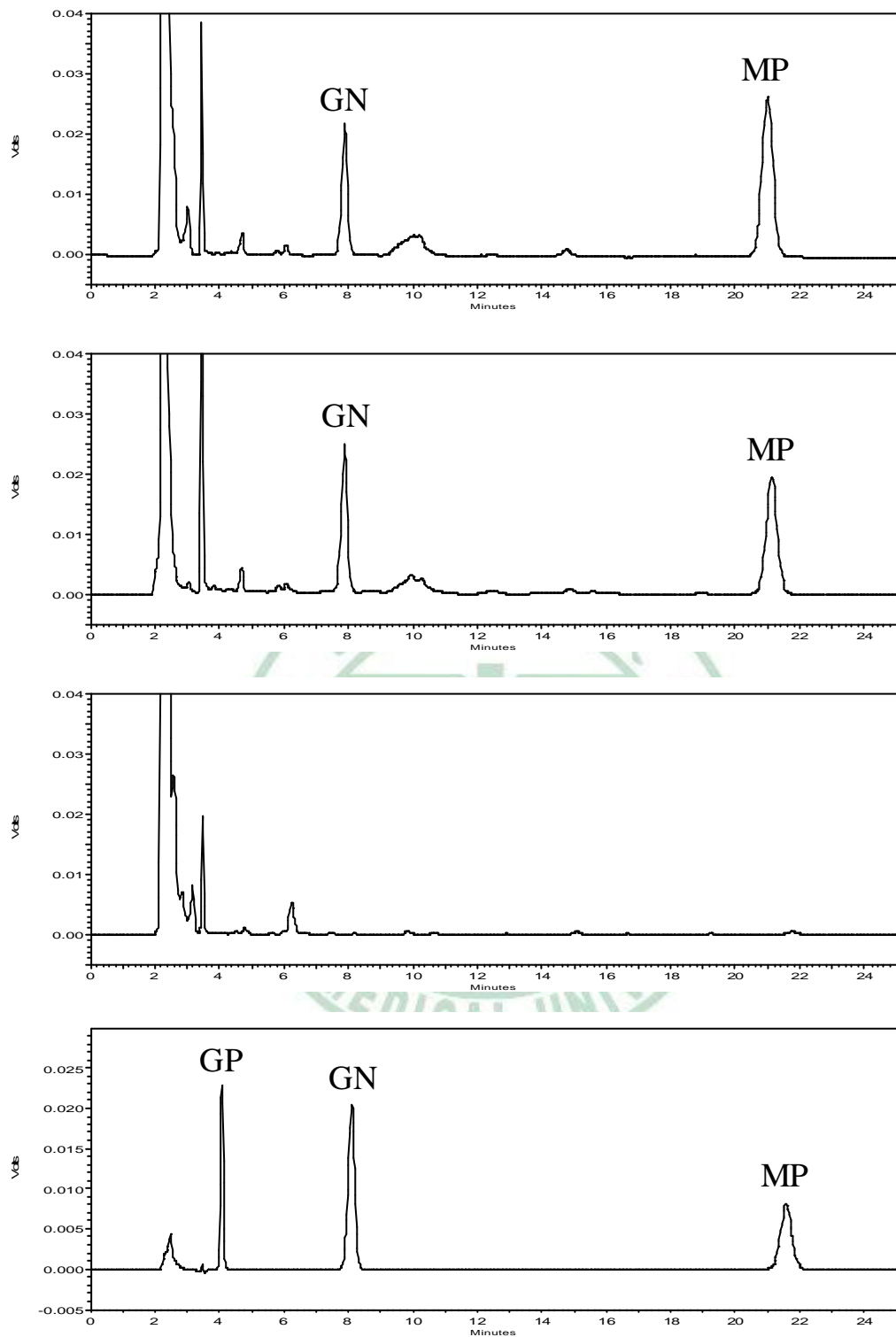


Fig. 11 Chromatograms of genipin (GN) and methylparaben (MP, internal standard) in
 (A) plasma sample (iv) before hydrolysis
 (B) plasma sample hydrolyzed with sulfatase
 (C) blank rat plasma
 (D) standard solution in MeOH

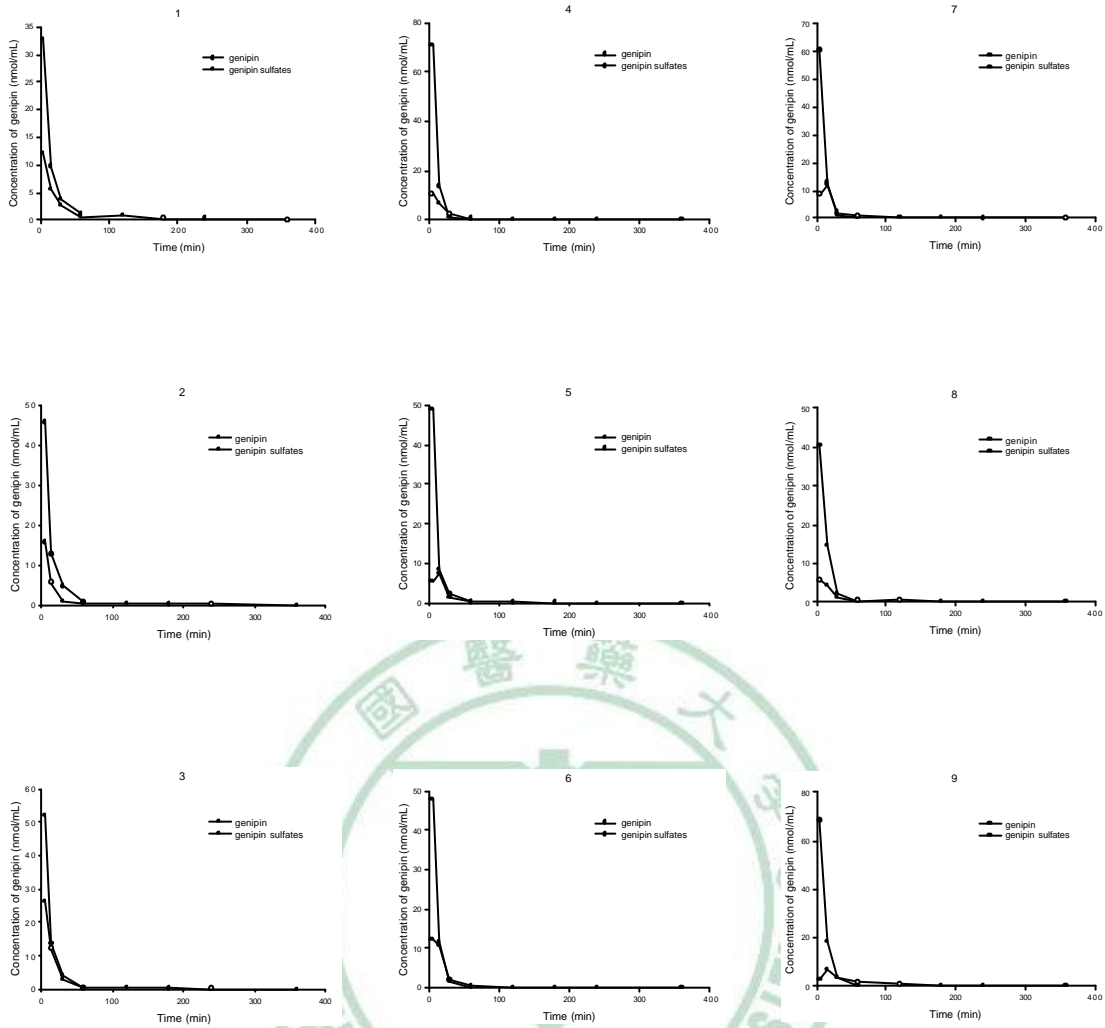


Fig. 12 Individual plasma concentration-time profiles of genipin (○) and genipin sulfate (●) in nine rats after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg).

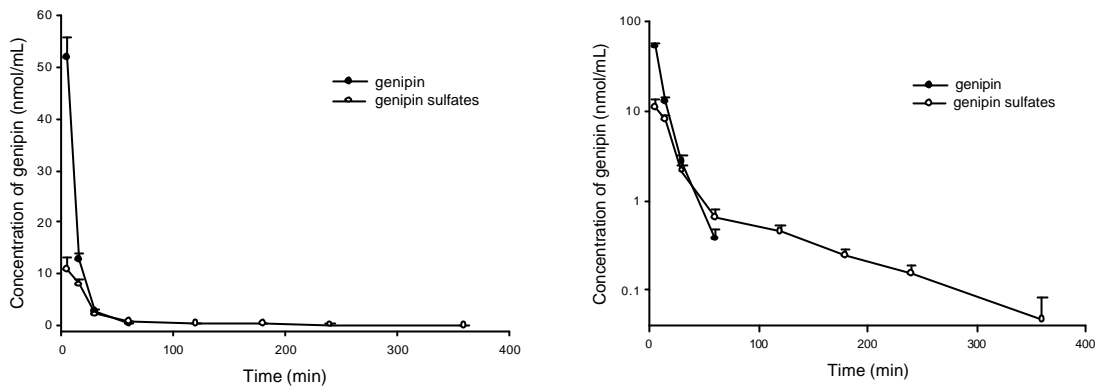


Fig. 13 Mean (\pm S.E.) plasma concentration-time profiles of genipin (●) and genipin sulfates (○) after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg) to nine rats (left) and the semi-log diagram (right).

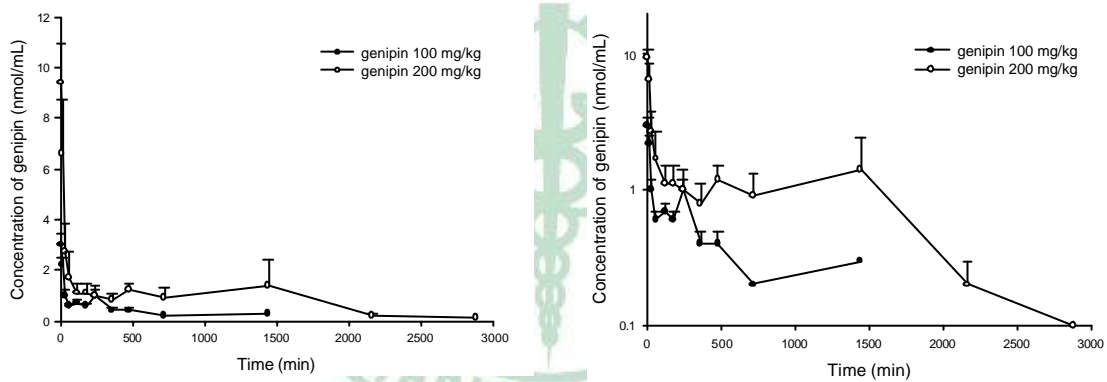


Fig. 14 Mean (\pm S.E.) plasma concentration-time profiles of genipin sulfates after oral administration of genipin (100, 200 mg/kg) to four rats (left) and the semi-log diagram (right).

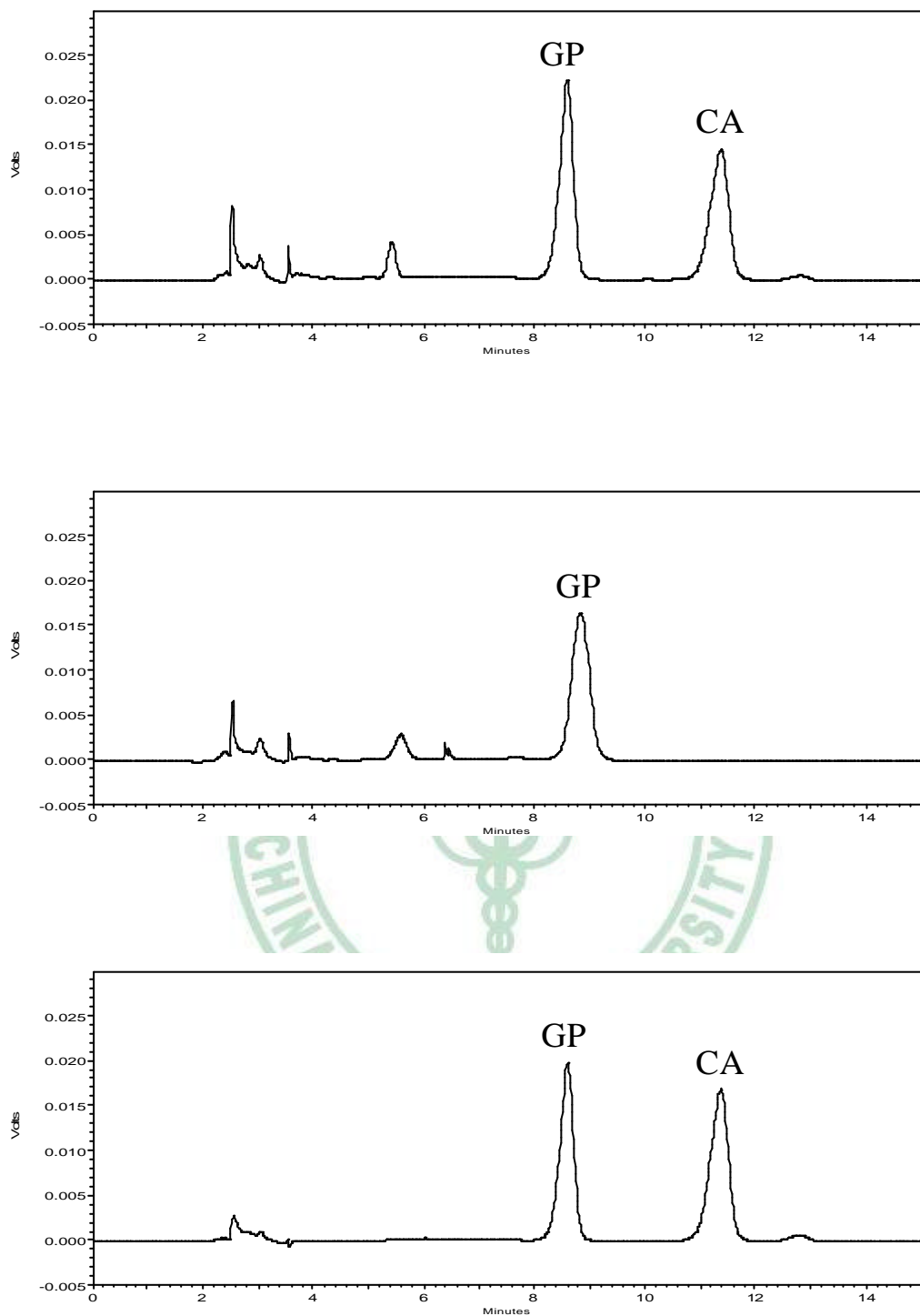


Fig. 15 Chromatograms of geniposide (GP) and caffeic acid (CA, internal standard) in

- (A) GF decoction
- (B) GF decoction without IS
- (C) standard solution in MeOH

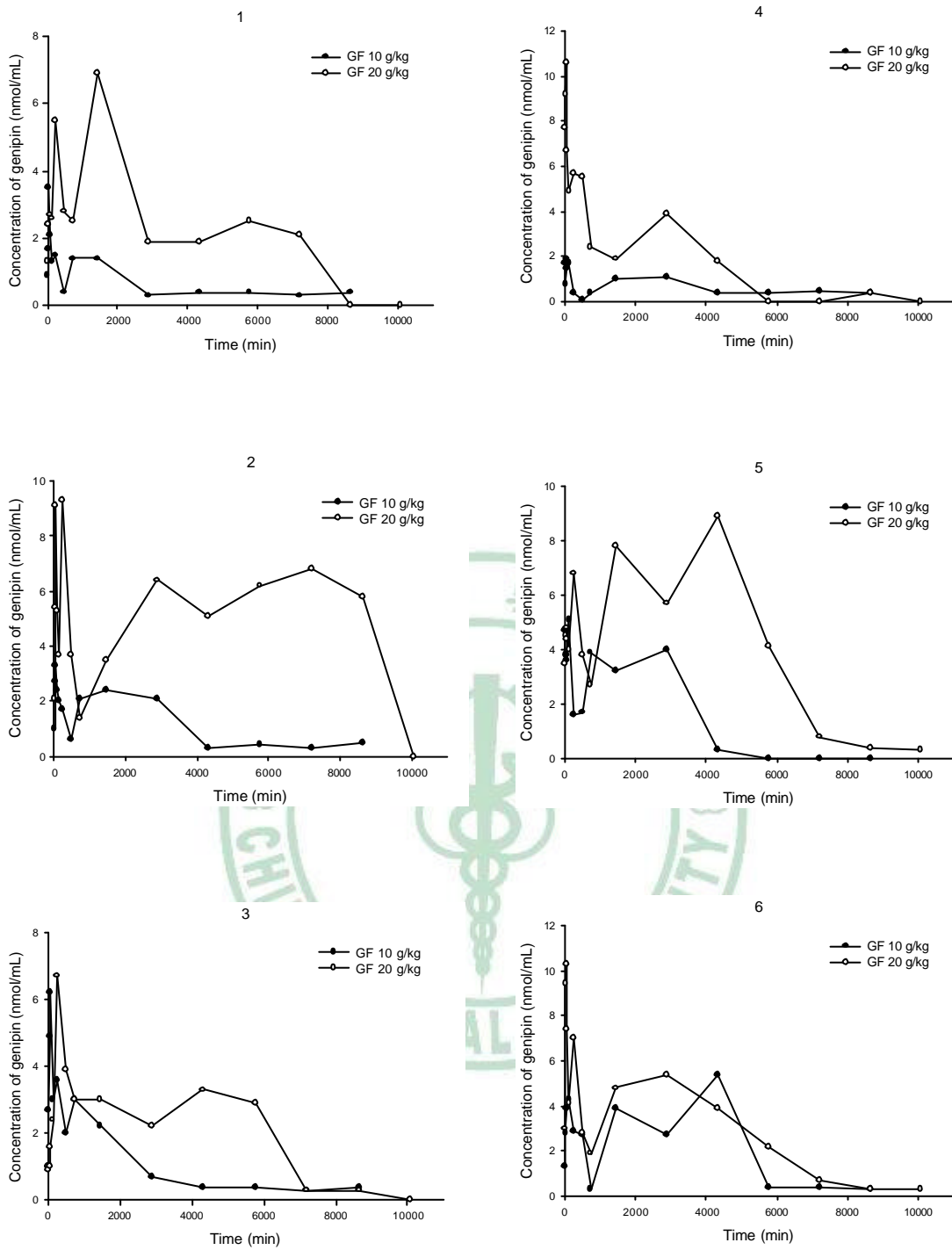


Fig. 16 Individual plasma concentration-time profiles of genipin sulfate in six rats after oral administrations of GF decoctions (10, 20 g/kg).

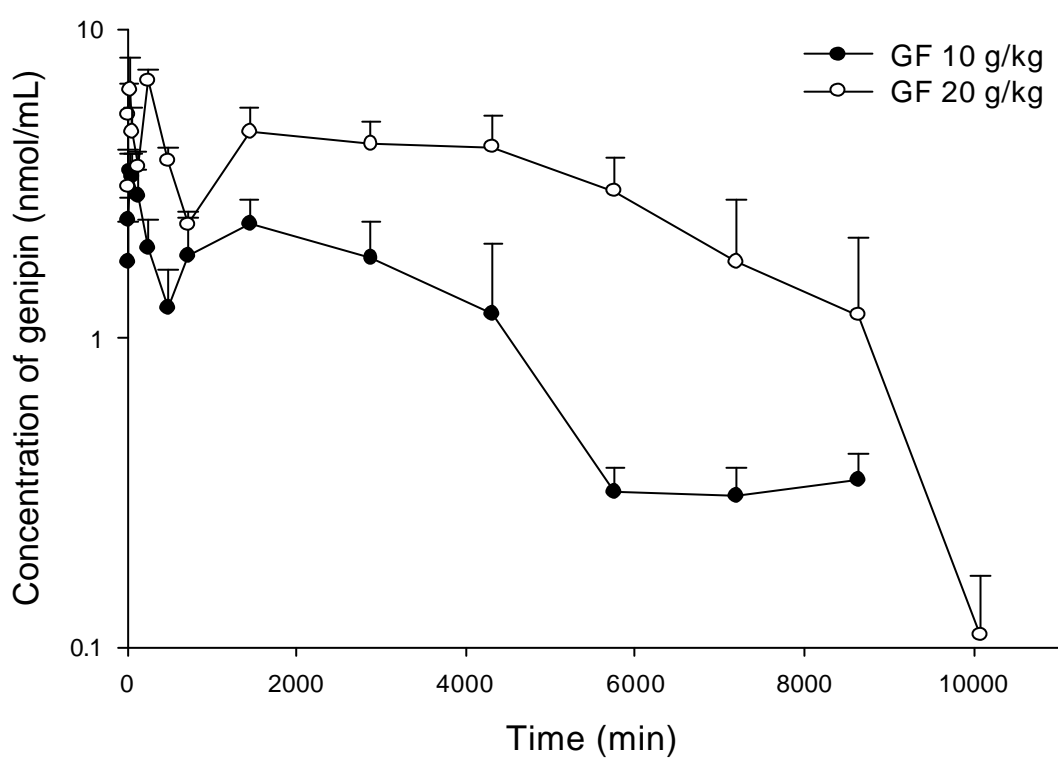
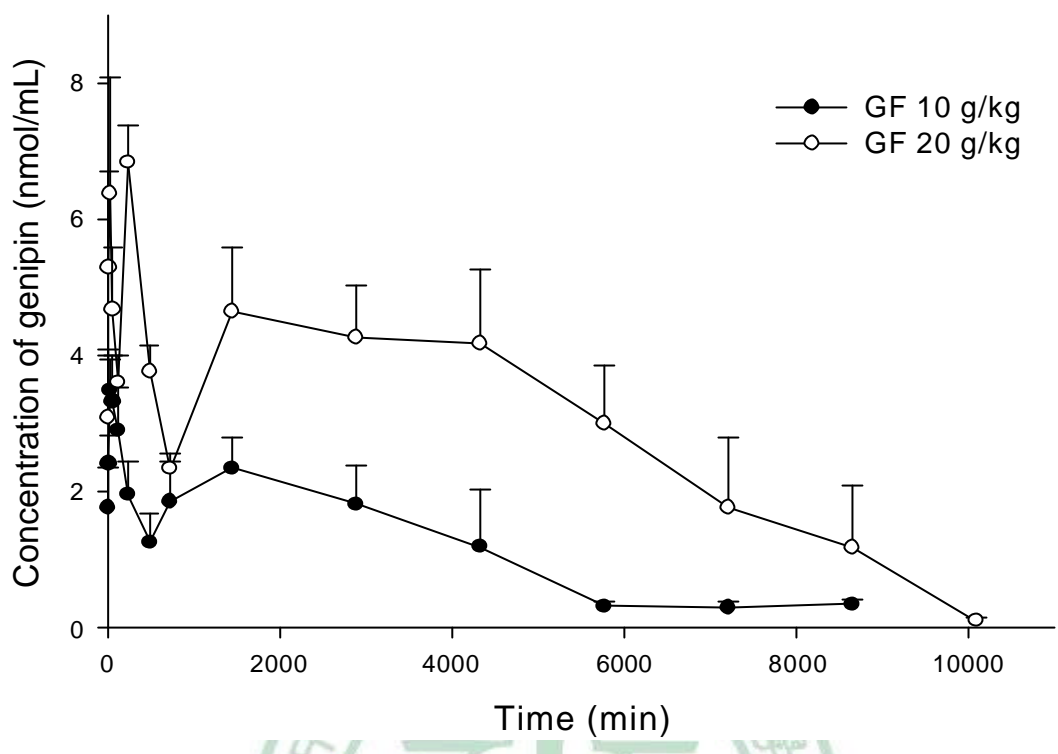


Fig. 17 Mean (\pm S.E.) plasma concentration-time profile of genipin sulfate after oral administrations of GF decoctions (10, 20 g/kg) to six rats and the semi-log diagram.

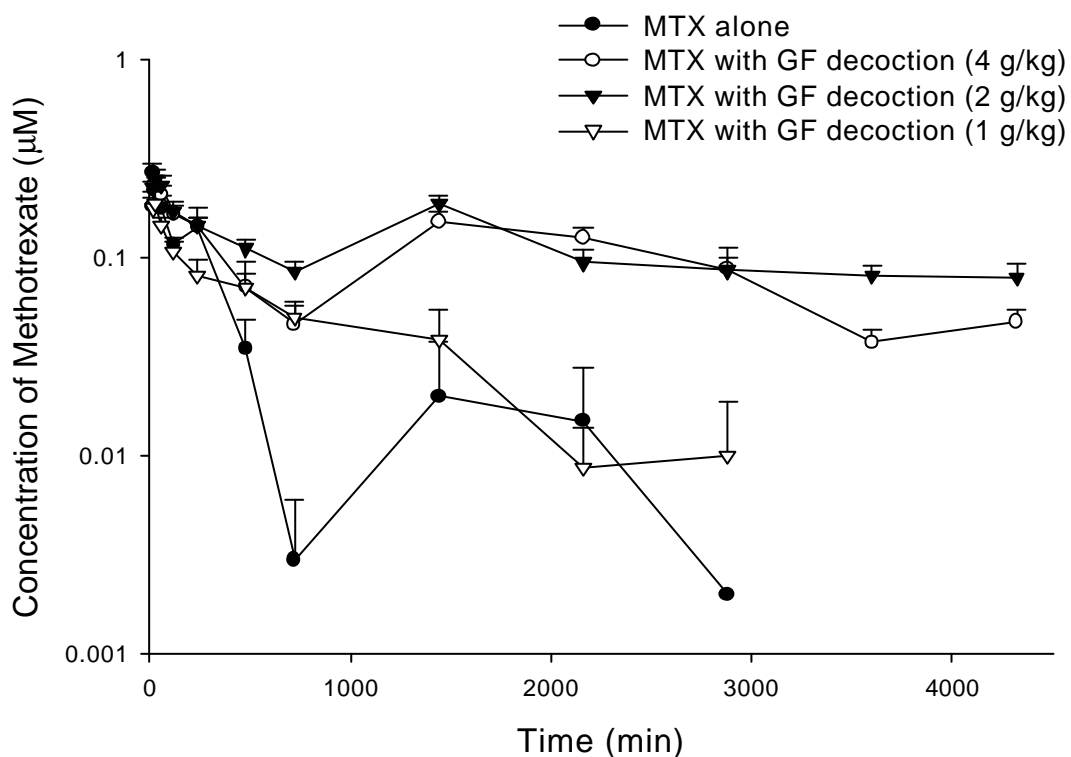
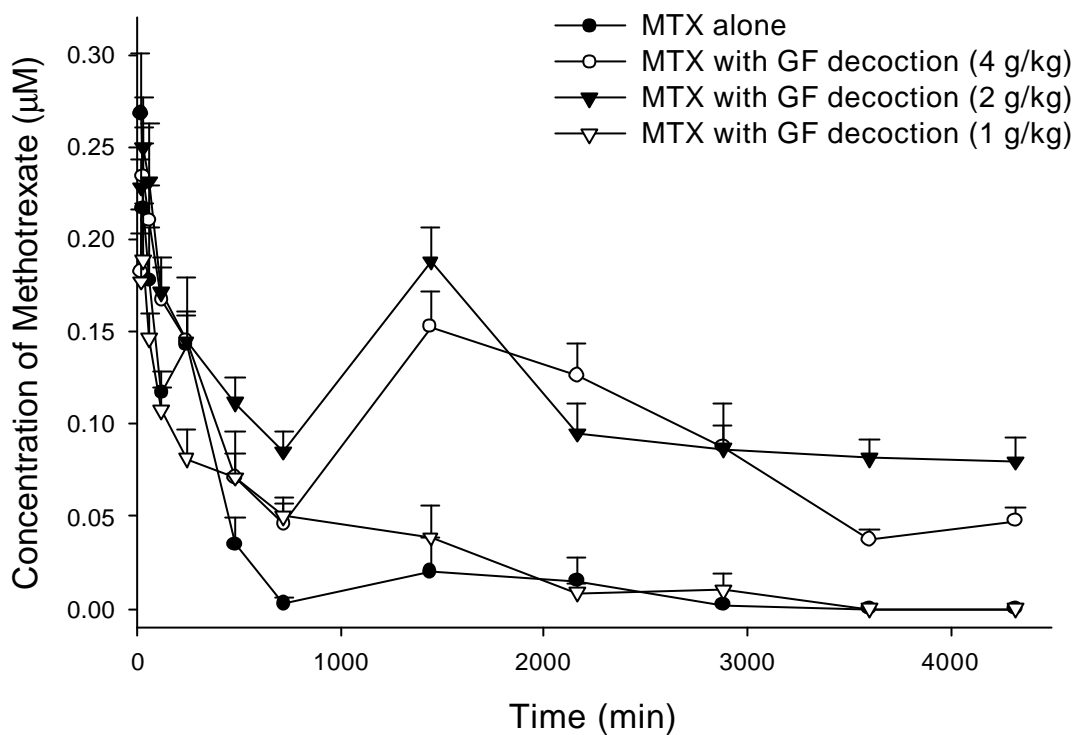


Fig. 18 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profile of MTX after oral MTX alone (●), and coadministration with 4 g/kg (○), 2 g/kg (▼) and 1 g/kg (▽) of GF decoction (upper) and the semi-log diagram (lower).

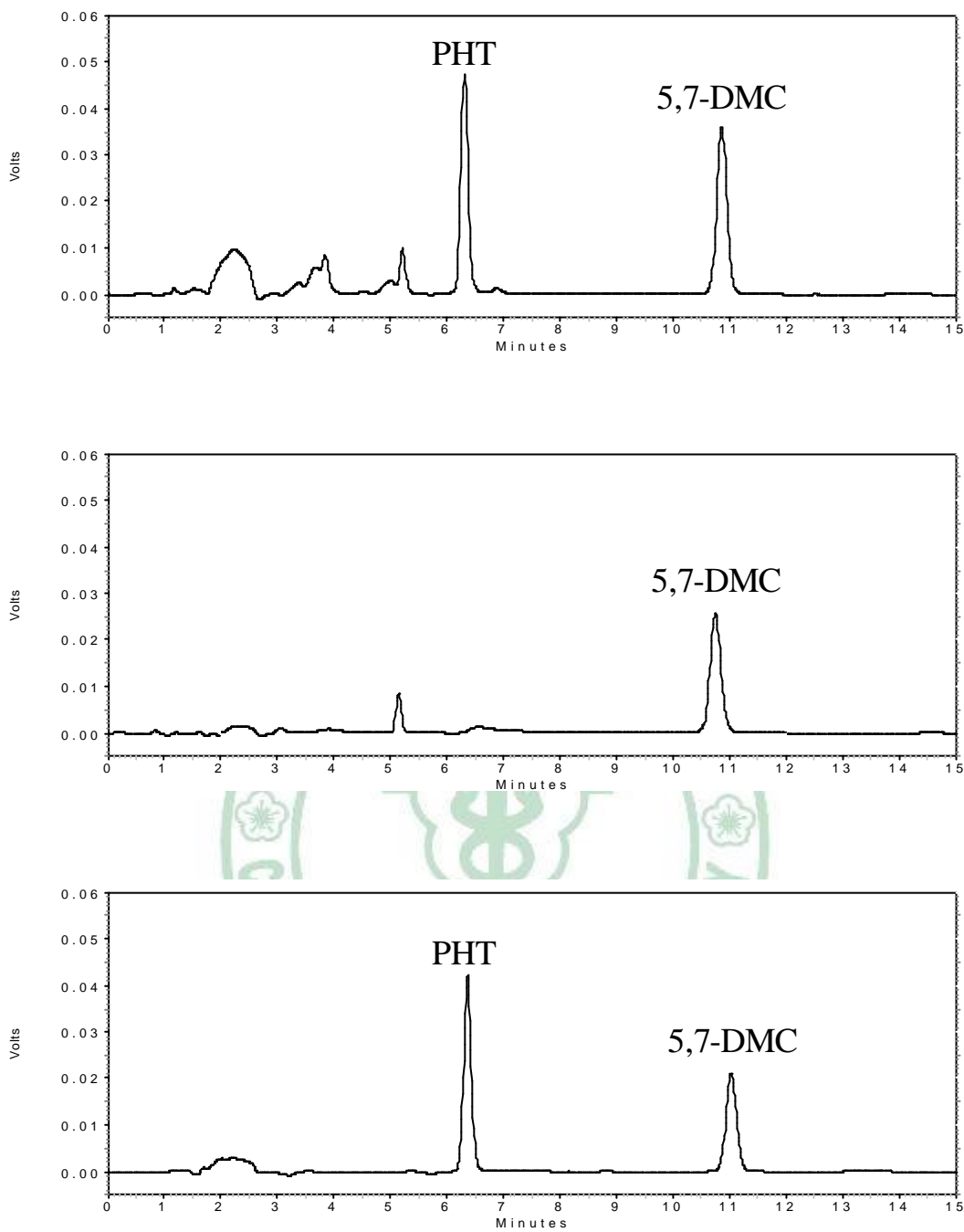


Fig. 19 Chromatograms of PHT and 5,7-dimethoxycoumarin (5,7-DMC, internal standard)

- (A) serum sample
- (B) internal standard in blank rat serum
- (C) standard solution in MeOH

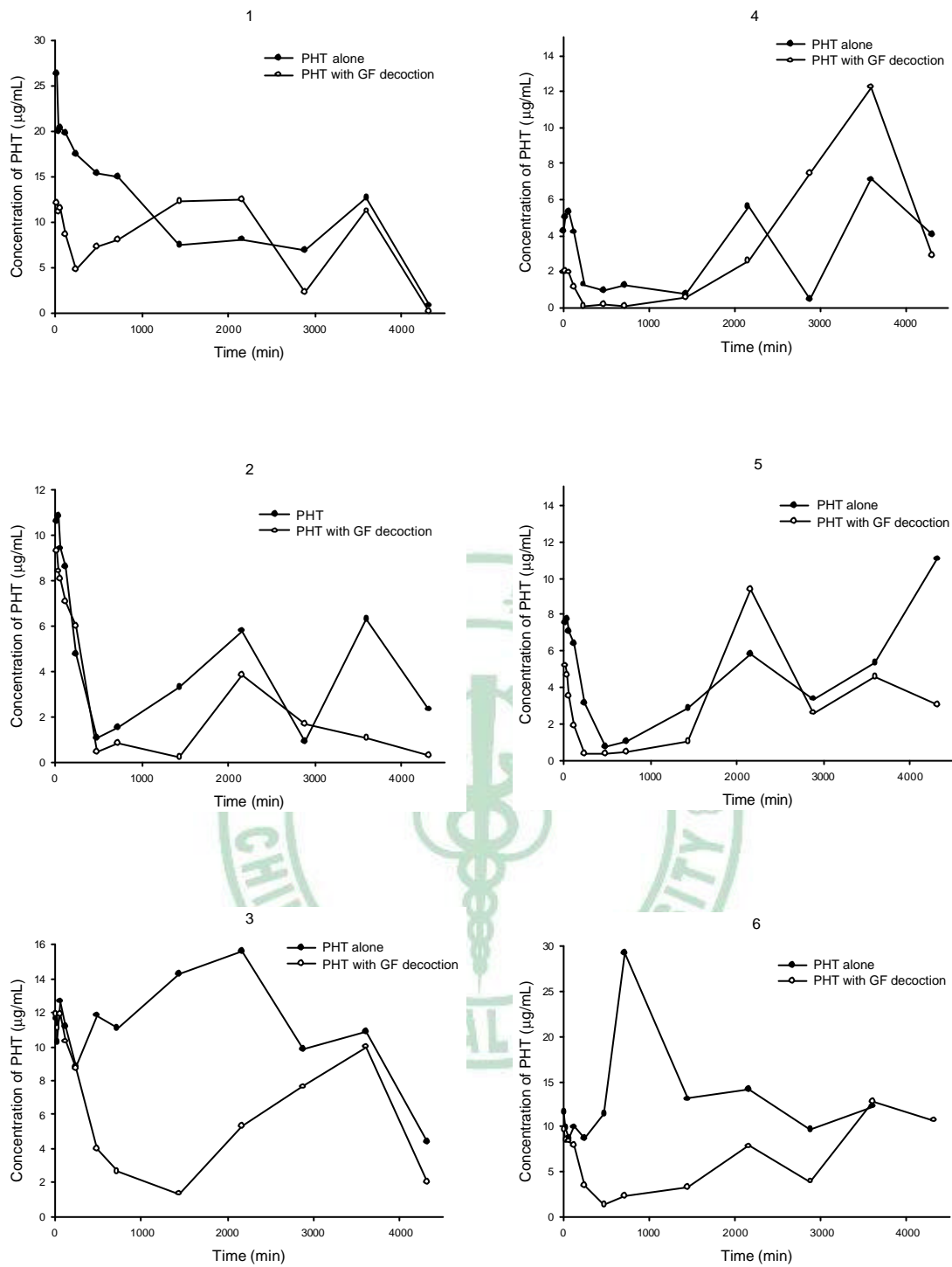


Fig. 20 Individual serum concentration-time profiles of PHT in six rats after oral PHT alone (●), and coadministration with 2 g/kg (○) of GF decoction.

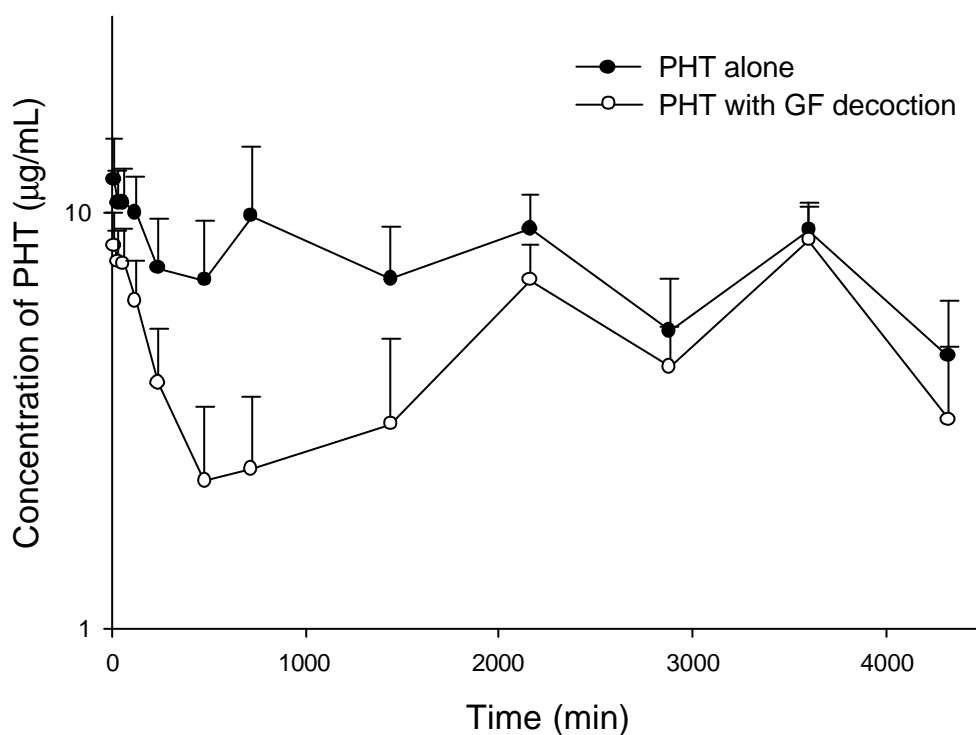
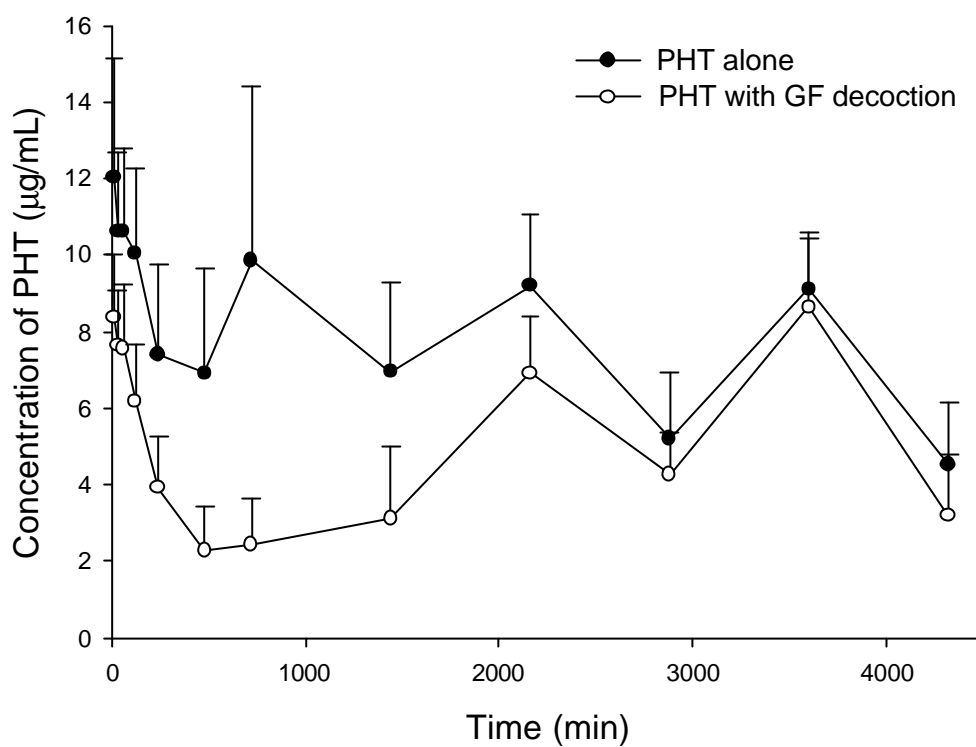


Fig. 21 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profile of PHT after oral PHT alone (●), and coadministration with 2 g/kg (○) of GF decoction (upper) and the semi-log diagram (lower).

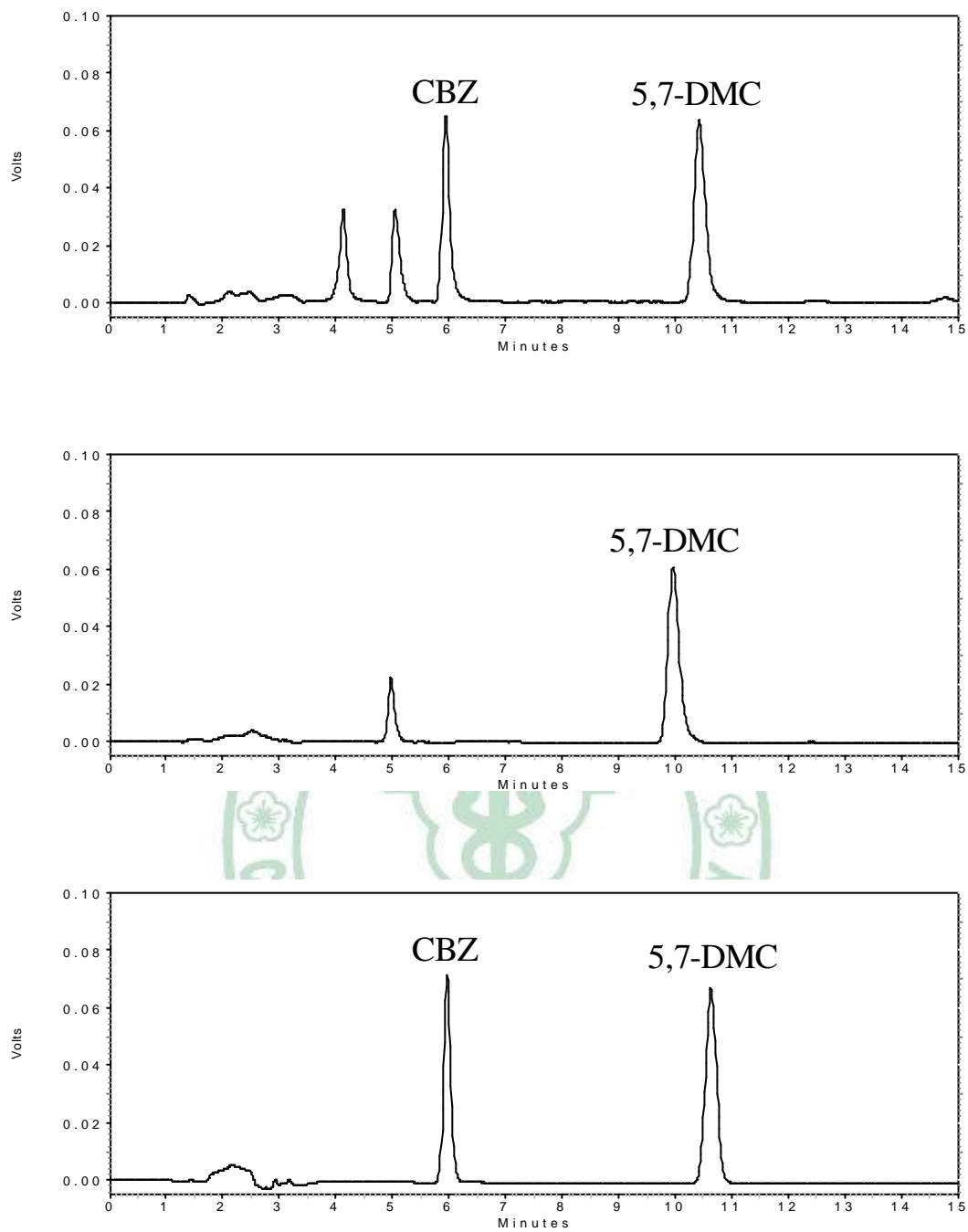


Fig. 22 Chromatograms of CBZ and 5,7-dimethoxycoumarin (5,7-DMC, internal standard)

- (A) serum sample
- (B) internal standard in blank rat serum
- (C) standard solution in MeOH

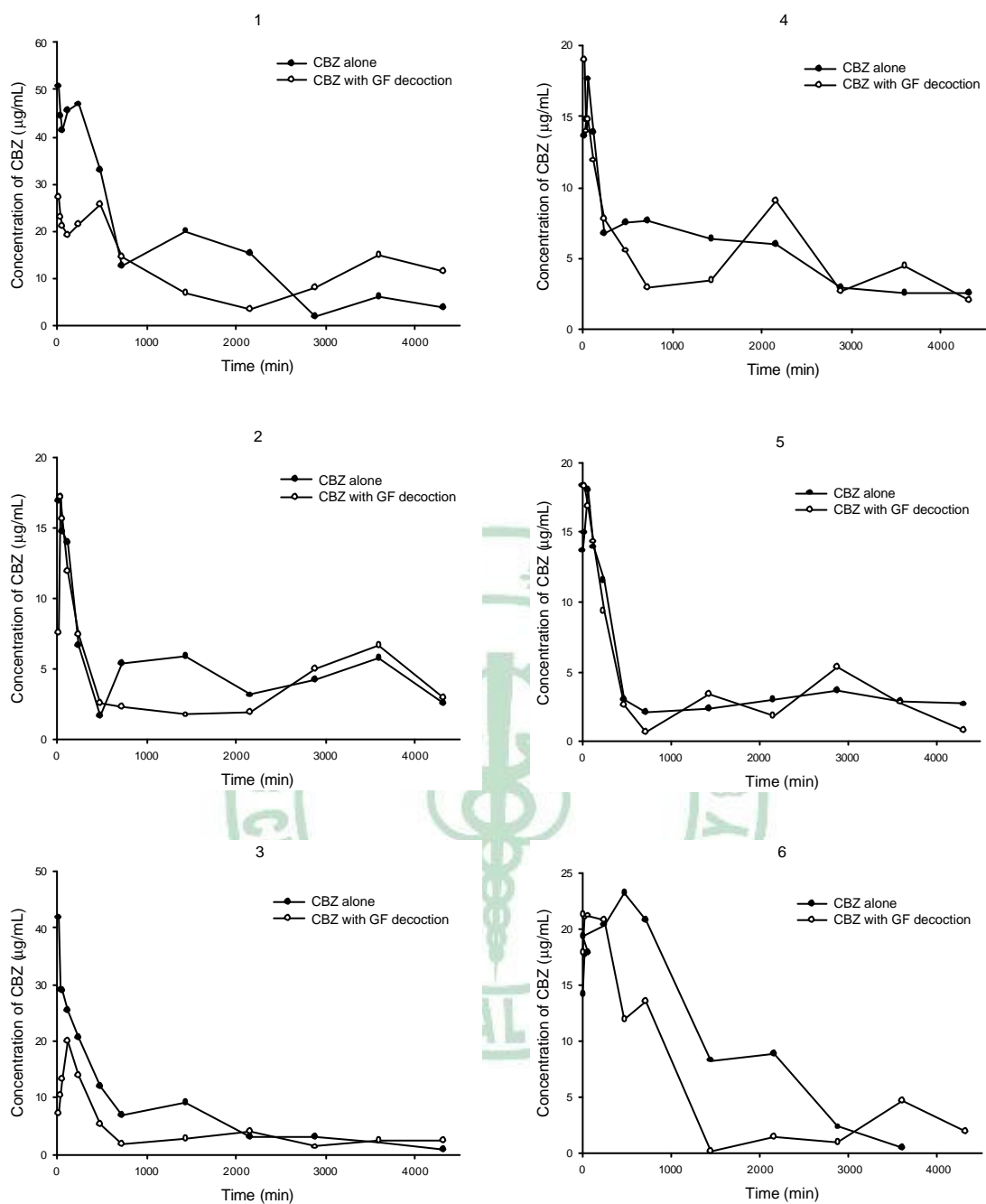


Fig. 23 Individual serum concentration-time profiles of CBZ in six rats after oral CBZ alone (●), and coadministration with 4 g/kg (○) of GF decoction.

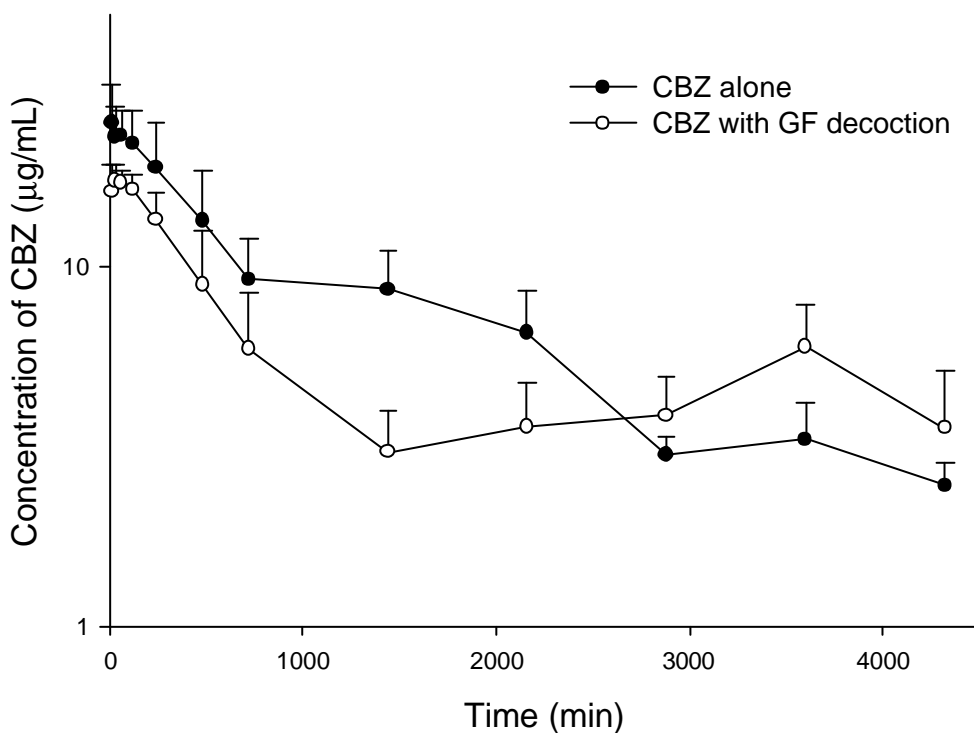
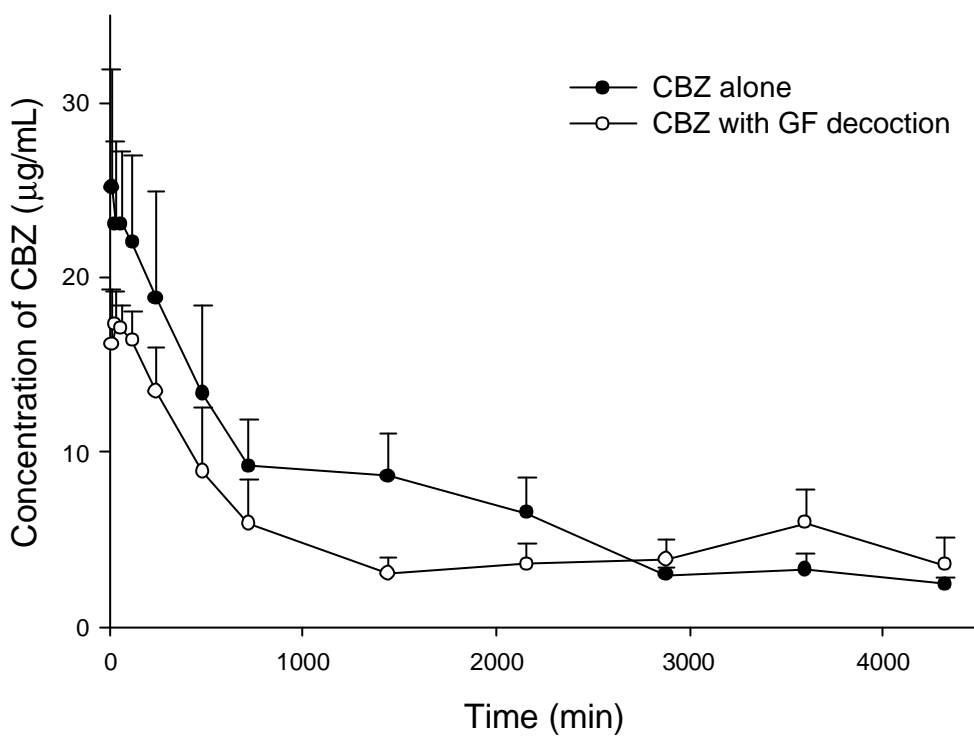


Fig. 24 Mean (\pm S.E.) serum concentration-time profile of CBZ after oral CBZ alone (●), and coadministration with 4 g/kg (○) of GF decoction (upper) and the semi-log diagram (lower).

Table 1 The pH change of genipin solution (in water) titrated with 0.1N NaOH.

V_{NaOH} (mL)	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
pH	5.63	5.85	6.02	6.16	6.30	6.47	6.68
V_{NaOH} (mL)	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95
pH	6.77	6.91	7.06	7.48	8.35	8.79	9.03
V_{NaOH} (mL)	1.00	1.10	1.20	1.30	1.40		
pH	9.17	9.40	9.57	9.69	9.80		



Table 2 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of genipin in plasma (n=3).

Conc. (mg/mL)	Precision				Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day	Inter-day
	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Relative error (%)	Relative error (%)
10.0	10.0 ± 0.5	(5.2)	10.1 ± 0.1	(1.3)	-0.1	0.5
5.0	5.0 ± 0.0	(0.3)	4.9 ± 0.0	(0.6)	0.0	-2.2
2.5	2.6 ± 0.0	(0.2)	2.5 ± 0.0	(0.0)	2.2	1.1
1.3	1.2 ± 0.0	(7.2)	1.2 ± 0.1	(6.4)	-4.1	-3.4
0.6	0.6 ± 0.0	(1.9)	0.6 ± 0.0	(1.6)	2.6	3.9
0.3	0.3 ± 0.1	(1.3)	0.3 ± 0.0	(1.0)	1.1	6.6
0.2	0.2 ± 0.0	(1.9)	0.2 ± 0.0	(0.9)	-1.5	12.5
0.1	0.1 ± 0.0	(1.1)	0.1 ± 0.0	(0.9)	-16.3	11.5

Table 3 Recovery (%) of genipin from plasma (n=3).

Conc. (µg/mL)	1	2	3	Mean ± S.D.
5.0	100.1	99.6	100.3	100.0 ± 0.4
1.3	91.8	92.1	103.9	95.9 ± 6.9
0.3	100.3	100.4	102.5	101.1 ± 1.3

Table 4 Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin in nine rats after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	mean \pm S.E.
5	32.6	45.7	51.9	70.7	48.9	47.7	60.4	40.3	68.2	51.8 \pm 4.2
15	9.7	12.7	13.6	13.6	8.5	11.5	12.9	14.8	18.3	12.8 \pm 0.9
30	3.7	4.7	4.0	1.1	2.4	1.8	1.3	2.4	3.5	2.8 \pm 0.4
60	1.1	0.7	0.3	0.1	0.5	0.2	0.2	0.1	0.2	0.4 \pm 0.1

Table 5 Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in nine rats after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	mean \pm S.E.
5	12.1	15.7	26.1	10.3	5.6	12.1	8.5	5.7	2.7	11.0 \pm 2.3
15	5.7	5.6	12.2	6.5	7.5	10.8	12.2	4.3	6.9	8.0 \pm 1.0
30	2.6	1.0	3.0	2.2	1.6	2.0	2.1	1.2	3.6	2.2 \pm 0.3
60	0.7	0.5	0.6	0.4	0.3	0.4	0.8	0.4	1.7	0.6 \pm 0.1
120	0.9	0.5	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.5	0.9	0.5 \pm 0.1
180	0.3	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.5	0.2 \pm 0.0
240	0.3	0.2	0.1	N.D.	0.1	0.2	N.D.	0.2	0.3	0.2 \pm 0.0
360	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.1	0.3	0.0 \pm 0.0

Table 6 Individual pharmacokinetic parameters of genipin in plasma after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg) to nine rats.

Parameters	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mean \pm S.E.
AUC _{0-t} (nmol min/mL)	614.7	834.2	908.2	1129.4	828.4	788.5	972.7	709.9	1151.4	881.9 \pm 59.8
Cl (mL/min)	111.1	83.6	70.3	68.4	103.0	111.8	81.7	111.9	63.2	89.5 \pm 6.7
V (mL)	2299.8	1329.5	859.3	569.1	1695.1	1165.6	767.6	1024.0	619.0	1147.7 \pm 187.0
MRT _{0-t} (min)	10.6	9.5	8.3	5.4	6.6	6.8	5.9	8.5	7.4	7.6 \pm 0.6

AUC_{0-t} : 血中濃度對時間之曲線下面積 ; 血藥面積

Cl : 藥物之全身清除率

V : 藥物之分佈體積

MRT_{0-t} : 藥物之平均滯留時間

Table 7 Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg) to nine rats.

Parameters	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mean ± S.E.
C_{max} (nmol/mL)	17.5	26.1	38.2	12.9	7.5	12.7	12.2	6.6	6.9	15.6 ± 3.5
AUC_{0-t} (nmol min/mL)	375.1	347.2	584.3	274.1	212.7	346.3	315.9	228.9	400.2	342.7 ± 36.9
Cl (mL/min)	179.5	190.6	108.1	266.5	362.1	234.7	245.6	311.1	166.3	229.4 ± 26.0
V (mL)	12293.3	24923.0	8924.5	31506.9	66598.5	45809.8	10198.2	72121.8	20108.2	32498.2 ± 7978.4
MRT_{0-t} (min)	44.1	31.7	23.7	23.4	38.2	26.4	27.0	69.3	86.7	41.2 ± 7.5

C_{max} : 藥物在血中之最高濃度 ; 血峰濃度

Table 8 Pharmacokinetic parameters of genipin parent from and genipin sulfate in plasma after intravenous bolus of genipin (50 mg/kg).

parameter	genipin	genipin sulfate
AUC _{0-t} (nmol·min/mL)	881.9 ± 59.8	342.7 ± 36.9
Cl (mL/min)	89.5 ± 6.7	229.4 ± 26.0
V _z (mL)	1147.7 ± 187.0	32498.2 ± 7978.4
MRT _{0-t} (min)	7.6 ± 0.6	41.2 ± 7.5

Data expressed as mean ± S.E.

Table 9 Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in eight rats after oral administration of genipin (100 mg/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	mean \pm S.E.
5	2.8	5.1	3.7	2.7	1.0	3.6	2.7	2.1	3.0 \pm 0.4
15	2.5	3.8	2.5	2.0	1.2	3.0	1.2	1.2	2.2 \pm 0.3
30	0.8	1.7	1.3	0.7	0.7	1.4	0.5	0.4	1.0 \pm 0.2
60	0.5	0.6	1.3	0.6	0.5	1.0	0.2	0.3	0.6 \pm 0.1
120	0.5	0.8	0.5	0.8	1.2	0.6	0.6	0.8	0.7 \pm 0.1
180	0.5	0.6	0.9	0.9	0.8	0.4	0.2	0.6	0.6 \pm 0.1
240	1.6	0.8	1.8	1.7	0.3	0.8	0.4	0.6	1.0 \pm 0.2
360	0.5	0.6	0.3	0.4	0.4	0.2	0.1	0.6	0.4 \pm 0.1
480	0.3	1.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4 \pm 0.1
720	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2 \pm 0.0
1440	0.1	0.4	0.2	0.2	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3 \pm 0.0

Table 10 Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in four rats after oral administration of genipin (200 mg/kg).

Time (min)	1	2	3	4	mean \pm S.E.
5	9.4	13.2	5.9	9.0	9.4 \pm 1.5
15	3.8	7.8	2.8	11.9	6.6 \pm 2.1
30	1.1	1.6	2.3	5.8	2.7 \pm 1.1
60	0.6	0.4	0.9	4.8	1.7 \pm 1.0
120	0.3	0.7	1.9	1.6	1.1 \pm 0.4
180	0.3	0.5	1.9	1.7	1.1 \pm 0.4
240	0.4	0.7	0.8	2.1	1.0 \pm 0.4
360	0.2	1.1	0.5	1.5	0.8 \pm 0.3
480	1.5	0.4	1.0	2.0	1.2 \pm 0.3
720	0.5	0.2	0.8	2.0	0.9 \pm 0.4
1440	0.9	0.1	4.5	0.3	1.4 \pm 1.0
2160	0.4	0.1	0.2	N.D.	0.2 \pm 0.1
2880	0.2	N.D.	N.D.	N.D.	0.1 \pm 0.0

Table 11 Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administration of genipin (100 mg/kg) to eight rats.

Parameters	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean ± S.E.
C_{max} (nmol/mL)	2.8	5.1	3.7	2.7	1.2	3.6	2.7	2.1	3.0 ± 0.4
AUC_{0-t} (nmol min/mL)	488.2	828.3	639.8	562.4	514.6	560.0	460.5	597.6	581.4 ± 40.8
MRT_{0-t} (min)	374.1	523.0	400.3	413.1	631.9	565.6	683.2	654.3	530.7 ± 43.4

Table 12 Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administration of genipin (200 mg/kg) to four rats.

Parameters	1	2	3	4	Mean ± S.E.
C_{max} (nmol/mL)	9.4	13.2	5.9	11.9	10.1 ± 1.6
AUC_{0-t} (nmol min/mL)	1781.6	872.3	4375.8	2545.0	2393.7 ± 743.9
MRT_{0-t} (min)	1169.4	586.9	1188.3	458.8	850.8 ± 191.2

Table 13 Comparison of pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administrations of 100 and 200 mg/kg genipin.

parameter	genipin sulfate (100 mg/kg)	genipin sulfate (200 mg/kg)
C_{max} (nmol/mL)	3.0 ± 0.4	10.1 ± 1.6 ^{**}
AUC_{0-t} (nmol·min/mL)	581.4 ± 40.8	2393.7 ± 743.9 ^{***}
MRT_{0-t} (min)	530.7 ± 43.4	850.8 ± 191.2 ^{***}

Data expressed as mean ± S.E.

** P < 0.01, *** P < 0.001

Table 14 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of geniposide (n=3).

Conc. (mg/mL)	Precision				Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day	Inter-day
	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Relative error (%)	Relative error (%)
200.0	199.2 ± 6.2	(3.1)	198.5 ± 5.6	(2.8)	-0.4	-0.7
100.0	102.2 ± 0.9	(0.8)	101.5 ± 0.8	(0.8)	2.2	1.5
75.0	74.3 ± 0.6	(0.9)	74.0 ± 0.8	(1.1)	-0.9	-1.4
50.0	50.0 ± 0.5	(1.1)	48.6 ± 2.2	(4.5)	-0.1	-2.7
25.0	24.6 ± 0.1	(0.3)	24.2 ± 0.5	(2.0)	-1.5	-3.3
12.5	12.2 ± 0.1	(1.2)	12.2 ± 0.2	(2.0)	-2.6	-2.6
6.3	6.2 ± 0.1	(1.4)	6.1 ± 0.1	(2.0)	-1.3	-2.5
3.1	3.2 ± 0.0	(1.1)	3.4 ± 0.1	(2.5)	1.7	9.0

Table 15 Recovery (%) of geniposide from GF decoction (n=3).

Conc. (µg/mL)	1	2	3	Mean ± S.D.
75.0	89.1	87.6	89.7	88.8 ± 1.1
25.0	85.3	89.2	86.2	86.9 ± 2.1
10.0	102.8	92.0	94.4	96.4 ± 5.7

Table 16 Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in six rats after oral administration of GF decoction (10 g/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	mean \pm S.E.
5	0.9	1.0	1.0	1.7	4.7	1.3	1.8 \pm 0.6
15	1.7	2.7	2.7	0.8	3.8	2.8	2.4 \pm 0.4
30	3.5	3.3	4.9	1.5	3.8	3.9	3.5 \pm 0.5
60	2.1	2.4	6.2	1.9	3.6	3.9	3.3 \pm 0.7
120	1.3	2.0	3.0	1.7	5.1	4.3	2.9 \pm 0.6
240	1.5	1.7	3.6	0.4	1.6	2.9	2.0 \pm 0.5
480	0.4	0.6	2.0	0.1	1.7	2.7	1.3 \pm 0.4
720	1.4	2.1	3.0	0.4	3.9	0.3	1.9 \pm 0.6
1440	1.4	2.4	2.2	1.0	3.2	3.9	2.4 \pm 0.4
2880	0.3	2.1	0.7	1.1	4.0	2.7	1.8 \pm 0.6
4320	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	5.4	1.2 \pm 0.8
5760	0.4	0.4	0.4	0.4	N.D.	0.4	0.3 \pm 0.1
7200	0.3	0.3	0.3	0.5	N.D.	0.4	0.3 \pm 0.1
8640	0.4	0.5	0.4	0.4	N.D.	0.3	0.3 \pm 0.1

Table 17 Plasma concentrations (nmol/mL) of genipin sulfate in six rats after oral administration of GF decoction (20 g/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	mean \pm S.E.
5	1.3	2.1	1.0	7.7	3.5	3.0	3.1 \pm 1.0
15	2.4	5.4	0.9	9.2	4.5	9.4	5.3 \pm 1.4
30	2.4	9.1	1.0	10.6	4.8	10.3	6.4 \pm 1.7
60	2.7	5.3	1.6	6.7	4.4	7.4	4.7 \pm 0.9
120	2.6	3.7	2.4	4.9	4.0	4.1	3.6 \pm 0.4
240	5.5	9.3	6.7	5.7	6.8	7.0	6.8 \pm 0.6
480	2.8	3.7	3.9	5.5	3.8	2.8	3.8 \pm 0.4
720	2.5	1.4	3.0	2.4	2.7	1.9	2.3 \pm 0.2
1440	6.9	3.5	3.0	1.9	7.8	4.8	4.7 \pm 0.9
2880	1.9	6.4	2.2	3.9	5.7	5.4	4.3 \pm 0.8
4320	1.9	5.1	3.3	1.8	8.9	3.9	4.2 \pm 1.1
5760	2.5	6.2	2.9	0.0	4.1	2.2	3.0 \pm 0.8
7200	2.1	6.8	0.3	0.0	0.8	0.7	1.8 \pm 1.0
8640	N.D.	5.8	0.3	0.4	0.4	0.3	1.2 \pm 0.9
10080	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.3	0.3	0.1 \pm 0.1

Table 18 Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administration of GF decoction (10 g/kg) to six rats.

Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.E.
C_{max} (nmol/mL)	3.5	3.3	6.2	1.9	5.1	5.4	4.2 ± 0.6
AUC_{0-t} (nmol min/mL)	5111.9	9264.1	8580.7	5400.6	12849.9	19319.0	10087.7 ± 1887.6
MRT_{0-t} (min)	2944.9	2691.8	2273.0	3684.5	1895.2	3153.6	2773.8 ± 225.4

Table 19 Individual pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administration of GF decoction (20 g/kg) to six rats.

Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.E.
C_{max} (nmol/mL)	6.9	9.3	6.7	10.6	8.9	10.3	8.8 ± 0.6
AUC_{0-t} (nmol min/mL)	21341.8	47314.8	17247.2	13637.9	36671.2	24166.3	26729.9 ± 4526.3
MRT_{0-t} (min)	2961.6	4707.0	2814.6	1942.3	3005.0	2690.6	3020.2 ± 322.6

Table 20 Comparison of pharmacokinetic parameters of genipin sulfate in plasma after oral administrations of 10 and 20g/kg GF decoction.

parameter	genipin sulfate (GF 10 g/kg)	genipin sulfate (GF 20 g/kg)
C_{max} (nmol/mL)	4.2 ± 0.6	8.8 ± 0.6
AUC_{0-t} (nmol·min/mL)	10087.7 ± 1887.6	26729.9 ± 4526.3
MRT_{0-t} (min)	2773.8 ± 225.4	3020.2 ± 322.6

Data expressed as mean ± S.E.

Table 21 Serum concentrations ($\mu\text{mol/mL}$) of MTX in six rats after oral administration of MTX (5 mg/kg) alone.

Time (min)	1	2	3	4	5	6	mean \pm S.E.
15	0.33	0.22	0.20	0.37	0.32	0.17	0.27 ± 0.03
30	0.23	0.16	0.15	0.38	0.18	0.20	0.22 ± 0.03
60	0.14	0.18	0.10	0.29	0.14	0.22	0.18 ± 0.03
120	0.11	0.12	0.08	0.16	0.10	0.13	0.12 ± 0.01
240	0.05	0.10	0.07	0.19	0.16	0.29	0.14 ± 0.04
480	0.07	N.D.	N.D.	0.07	0.01	0.06	0.04 ± 0.01
720	0.02	N.D.	N.D.	0.00	N.D.	N.D.	0.00 ± 0.00
1440	0.11	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	0.02 ± 0.02
2160	0.08	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	0.02 ± 0.01
2880	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.00 ± 0.00
3600	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.00 ± 0.00

Table 22 Serum concentrations ($\mu\text{mol/mL}$) of MTX in six rats after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (1 g/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	mean \pm S.E.
15	0.13	0.13	0.42	0.09	0.14	0.14	0.26	0.11	0.18 ± 0.04
30	0.10	0.18	0.38	0.14	0.16	0.17	0.23	0.15	0.19 ± 0.03
60	0.12	0.15	0.21	0.16	0.17	0.14	0.08	0.14	0.15 ± 0.01
120	0.14	0.09	0.14	0.08	0.14	0.12	0.04	0.11	0.11 ± 0.01
240	0.12	0.07	0.08	0.13	0.14	0.05	0.04	0.02	0.08 ± 0.02
480	0.14	0.05	0.07	0.21	0.03	0.00	0.02	0.05	0.07 ± 0.02
720	0.04	0.05	0.06	0.09	0.05	0.03	0.00	0.08	0.05 ± 0.01
1440	0.02	N.D.	N.D.	0.10	0.11	0.07	0.01	N.D.	0.04 ± 0.02
2160	0.02	N.D.	N.D.	0.04	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.01 ± 0.01
2880	0.01	N.D.	N.D.	0.07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01 ± 0.01

Table 23 Serum concentrations ($\mu\text{mol/mL}$) of MTX in six rats after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (2 g/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	mean \pm S.E.
15	0.26	0.20	0.21	0.27	0.25	0.18	0.23 \pm 0.01
30	0.30	0.23	0.23	0.27	0.33	0.14	0.25 \pm 0.03
60	0.29	0.26	0.17	0.21	0.33	0.13	0.23 \pm 0.03
120	0.20	0.20	0.14	0.15	0.23	0.11	0.17 \pm 0.02
240	0.20	0.15	0.13	0.12	0.18	0.09	0.15 \pm 0.02
480	0.13	0.15	0.11	0.09	0.13	0.06	0.11 \pm 0.01
720	0.08	0.10	0.13	0.06	0.08	0.06	0.09 \pm 0.01
1440	0.21	0.13	0.15	0.23	0.24	0.17	0.19 \pm 0.02
2160	0.06	0.07	0.09	0.12	0.16	0.07	0.10 \pm 0.02
2880	0.14	0.06	0.11	0.08	0.07	0.06	0.09 \pm 0.01
3600	0.12	0.06	0.07	0.06	0.09	0.09	0.08 \pm 0.01
4320	0.14	0.05	0.08	0.07	0.06	0.08	0.08 \pm 0.01

Table 24 Serum concentrations ($\mu\text{mol/mL}$) of MTX in six rats after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (4 g/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	mean \pm S.E.
15	0.09	0.11	0.23	0.24	0.17	0.23	0.17	0.22	0.18 \pm 0.02
30	0.14	0.15	0.31	0.19	0.22	0.36	0.24	0.26	0.23 \pm 0.03
60	0.21	0.13	0.25	0.15	0.18	0.29	0.24	0.23	0.21 \pm 0.02
120	0.22	0.17	0.22	0.10	0.11	0.18	0.13	0.21	0.17 \pm 0.02
240	0.10	0.12	0.20	0.10	0.14	0.20	0.16	0.14	0.15 \pm 0.01
480	0.07	0.07	0.04	0.14	0.05	0.04	0.05	0.11	0.07 \pm 0.01
720	0.05	0.12	0.03	0.05	0.02	0.03	0.04	0.03	0.05 \pm 0.01
1440	0.12	0.15	0.19	0.10	0.14	0.20	0.24	0.08	0.15 \pm 0.02
2160	0.12	0.08	0.12	0.07	0.14	0.10	0.23	0.15	0.13 \pm 0.02
2880	0.16	0.22	0.09	0.03	0.07	0.05	0.04	0.04	0.09 \pm 0.02
3600	0.05	0.06	0.02	0.02	0.03	0.03	0.06	0.03	0.04 \pm 0.01
4320	0.08	0.07	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.06	0.05 \pm 0.01

Table 25 Individual pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) alone.

Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.E.
C_{max} (mmol/L)	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3	0.3	0.3 ± 0.03
AUC_{0-t} (mmol min/L)	202.1	31.8	22.3	103.4	54.2	88.1	83.6 ± 26.9
V/F (L)	11.4	18.1	38.5	20.7	11.2	16.8	19.5 ± 4.1
Cl/F (mL/min)	19.0	57.2	71.6	36.3	69.1	39.8	48.8 ± 8.4
MRT_{0-t} (min)	1324.7	106.3	102.7	360.6	168.8	206.2	378.2 ± 193.2

V/F : 藥物之分佈體積/生可用率

Table 26 Individual pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (1 g/kg).

Parameters	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean ± S.E.
C_{max} (mmol/L)	0.1	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2 ± 0.03
AUC_{0-t} (mmol min/L)	129.0	51.5	75.3	261.9	165.2	71.6	31.9	46.4	104.1 ± 27.5
V/F (L)	28.6	40.4	33.5	23.8	17.5	32.5	45.4	31.3	31.6 ± 3.1
Cl/F (mL/min)	26.8	39.8	20.1	9.6	17.6	20.5	85.8	31.3	31.4 ± 8.4
MRT_{0-t} (min)	769.6	284.4	254.1	1148.5	912.6	707.0	316.2	328.0	590.0 ± 120.4

Table 27 Individual pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (2 g/kg).

Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.E.
C_{max} (mmol/L)	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3 ± 0.02
AUC_{0-t} (mmol min/L)	579.3	397.3	472.0	483.1	573.5	390.6	482.6 ± 33.4
V/F (L)	14.8	20.7	21.7	11.6	11.1	25.4	17.6 ± 2.4
Cl/F (mL/min)	2.1	6.3	3.3	4.9	5.2	2.7	4.1 ± 0.7
MRT_{0-t} (min)	2044.8	1668.2	1895.9	1850.8	1784.5	2049.3	1882.3 ± 60.8

Table 28 Individual pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) with GF decoction (4 g/kg).

Parameters	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean ± S.E.
C_{max} (mmol/L)	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2	0.3	0.3 ± 0.02
AUC_{0-t} (mmol min/L)	445.4	514.6	414.7	272.0	356.7	385.2	515.3	342.0	405.7 ± 30.0
V/F (L)	20.9	9.0	9.9	22.1	13.2	11.5	8.7	18.7	14.2 ± 2.0
Cl/F (mL/min)	4.9	7.1	7.5	9.3	8.5	8.0	5.9	6.4	7.2 ± 0.5
MRT_{0-t} (min)	2087.2	2055.2	1677.6	1574.1	1830.8	1603.4	1816.5	1761.5	1800.8 ± 67.5

Table 29 Comparison of pharmacokinetic parameters of MTX in serum after oral administration of MTX (5 mg/kg) alone and coadministration with GF decoctions (1, 2, 4 g/kg).

parameters	MTX alone (n=6)	MTX+GF 1 g/kg (n=8)	MTX+GF 2 g/kg (n=6)	MTX+GF 4 g/kg (n=8)
C_{max} (mmol/L)	0.3 ± 0.03	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02
AUC_{0-t} (mmol min/L)	83.6 ± 26.9 ^a	104.1 ± 27.5 ^a	482.6 ± 33.4 ^b	405.7 ± 30.0 ^b
V/F (L)	19.5 ± 4.1 ^{ab}	31.6 ± 3.1 ^b	17.6 ± 2.4 ^a	14.2 ± 2.0 ^a
Cl/F (mL/min)	48.8 ± 8.4 ^a	31.4 ± 8.4 ^a	4.1 ± 0.7 ^b	7.2 ± 0.5 ^b
MRT_{0-t} (min)	378.2 ± 193.2 ^a	590.0 ± 120.4 ^a	1882.3 ± 60.8 ^b	1800.8 ± 67.5 ^b

Values are mean ± S.E.

Means in a row without a common superscript differ. P<0.001

Table 30 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of PHT in serum (n=3).

Conc. (mg/mL)	Precision				Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day	Inter-day
	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Relative error (%)	Relative error (%)
25.0	25.0 ± 0.3	(1.3)	25.1 ± 0.2	(0.8)	-0.1	0.4
12.5	12.5 ± 0.0	(0.3)	12.2 ± 0.8	(6.7)	0.1	-2.0
6.3	6.3 ± 0.0	(0.3)	6.3 ± 0.1	(2.0)	1.1	1.4
3.1	3.1 ± 0.0	(1.6)	3.2 ± 0.1	(1.8)	-0.5	1.9
1.6	1.5 ± 0.1	(3.9)	1.6 ± 0.0	(0.4)	-0.8	1.7
0.8	0.8 ± 0.0	(2.2)	0.8 ± 0.0	(5.2)	1.9	4.3
0.4	0.3 ± 0.0	(7.1)	0.3 ± 0.0	(3.5)	-11.6	-13.4

Table 31 Recovery (%) of PHT from serum (n=3).

Conc. (µg/mL)	1	2	3	Mean ± S.D.
12.5	100.2	97.6	88.1	95.1 ± 6.4
3.1	101.0	101.2	98.2	100.2 ± 1.7
0.8	99.2	94.9	104.9	99.7 ± 5.0

Table 32 Serum concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of PHT in six rats after oral administration of PHT (400 mg/kg) alone.

Time (min)	1	2	3	4	5	6	mean \pm S.E.
10	26.4	10.6	11.7	4.3	7.6	11.7	12.0 \pm 3.1
30	19.9	10.8	10.3	5.1	7.8	9.9	10.6 \pm 2.1
60	20.4	9.4	12.7	5.4	7.1	8.7	10.6 \pm 2.2
120	19.8	8.6	11.2	4.2	6.4	10.0	10.0 \pm 2.2
240	17.5	4.8	8.9	1.3	3.2	8.8	7.4 \pm 2.4
480	15.3	1.1	11.9	1.0	0.8	11.4	6.9 \pm 2.7
720	14.9	1.5	11.1	1.3	1.0	29.3	9.8 \pm 4.6
1440	7.5	3.3	14.3	0.8	2.9	13.1	6.9 \pm 2.3
2160	8.1	5.8	15.6	5.6	5.9	14.2	9.2 \pm 1.9
2880	6.9	0.9	9.8	0.5	3.4	9.7	5.2 \pm 1.7
3600	12.7	6.3	10.9	7.1	5.4	12.3	9.1 \pm 1.3
4320	0.8	2.3	4.4	4.0	11.1	ND	4.5 \pm 1.6

Table 33 Serum concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of PHT in six rats after oral administration of PHT (400 mg/kg) with GF decoction (2 g/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	mean \pm S.E.
10	12.1	9.3	11.9	2.0	5.2	9.7	8.4 \pm 1.6
30	11.1	8.4	11.1	2.0	4.7	8.5	7.6 \pm 1.5
60	11.5	8.0	11.9	2.0	3.6	8.4	7.6 \pm 1.7
120	8.6	7.1	10.3	1.2	1.9	7.9	6.2 \pm 1.5
240	4.8	6.0	8.7	0.1	0.4	3.5	3.9 \pm 1.4
480	7.3	0.4	4.0	0.2	0.4	1.3	2.3 \pm 1.2
720	8.1	0.8	2.7	0.1	0.4	2.4	2.4 \pm 1.2
1440	12.3	0.2	1.4	0.6	1.0	3.2	3.1 \pm 1.9
2160	12.4	3.8	5.3	2.6	9.4	7.9	6.9 \pm 1.5
2880	2.3	1.7	7.6	7.4	2.6	4.0	4.3 \pm 1.1
3600	11.2	1.1	10.0	12.3	4.6	12.7	8.6 \pm 1.9
4320	0.1	0.3	2.0	2.9	3.1	10.7	3.2 \pm 1.6

Table 34 Individual pharmacokinetic parameters of PHT in serum after oral administration of PHT (400 mg/kg) alone.

Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.E.
C_{max} (mg/mL)	26.4	10.8	15.6	7.1	11.1	29.3	16.7 ± 3.7
AUC_{0-t} (mg min/mL)	43232.4	15950.7	49749.4	13413.3	18993.4	51188.3	32087.9 ± 7260.8
MRT_{0-t} (min)	1779.1	2196.2	2014.0	2680.4	2677.3	1635.6	2163.8 ± 180.8

Table 35 Individual pharmacokinetic parameters of PHT in serum after oral administration of PHT (400 mg/kg) with GF decoction (2 g/kg).

Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.E.
C_{max} (mg/mL)	12.4	9.3	11.9	12.3	9.4	12.7261	11.3 ± 0.6
AUC_{0-t} (mg min/mL)	35768.8	7874.8	23975.4	17928.7	14619.2	27383.71	21258.4 ± 4040.4
MRT_{0-t} (min)	1955.1	1707.6	2356.9	3151.5	2588.0	2727.473	2414.4 ± 214.9

Table 36 Comparison of pharmacokinetic parameters of PHT in serum after oral administration of PHT (400 mg/kg) alone and coadministration with GF decoction (2 g/kg) in five rats.

parameters	PHT alone	PHT + GF 2 g/kg
C_{max} (μg/mL)	16.7 ± 3.7	11.3 ± 0.6
AUC_{0-t} (μg min/mL)	32087.9 ± 7260.8	21258.4 ± 4040.4
MRT_{0-t} (min)	2163.8 ± 180.8	2414.4 ± 214.9

Data expressed as mean ± S.E.

*P < 0.05

Table 37 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of CBZ in serum (n=3).

Conc. (mg/mL)	Precision				Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day	Inter-day
	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Mean ± S.D.	(C.V.%)	Relative error (%)	Relative error (%)
50.0	49.9 ± 1.6	(3.2)	50.3 ± 2.1	(4.1)	-0.2	0.6
25.0	25.1 ± 0.4	(1.4)	24.3 ± 1.5	(6.3)	0.4	-2.7
12.5	12.8 ± 0.2	(1.4)	12.6 ± 0.8	(6.6)	2.5	0.7
6.3	6.3 ± 0.4	(5.7)	6.3 ± 0.4	(6.6)	0.9	1.1
3.1	3.0 ± 0.1	(4.4)	3.4 ± 0.0	(1.1)	-3.9	8.2
1.6	1.5 ± 0.0	(2.0)	1.6 ± 0.0	(0.2)	-5.2	0.9
0.8	0.6 ± 0.0	(3.9)	0.7 ± 0.0	(3.0)	-18.1	-5.5

Table 38 Recovery (%) of CBZ from serum (n=3).

Conc. (µg/mL)	1	2	3	Mean ± S.D.
25.0	104.7	101.6	100.8	102.4 ± 2.1
6.3	101.3	106.5	107.0	104.9 ± 3.2
1.6	109.6	97.0	101.6	102.7 ± 6.4

Table 39 Serum concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of CBZ in six rats after oral administration of CBZ (400 mg/kg) alone.

Time (min)	1	2	3	4	5	6	mean \pm S.E.
10	50.8	16.8	41.9	13.6	13.7	14.1	25.2 \pm 6.8
30	44.5	17.2	29.1	14.8	15.0	17.7	23.0 \pm 4.8
60	41.2	14.7	29.0	17.7	18.1	17.9	23.1 \pm 4.1
120	45.5	13.9	25.3	13.9	14.0	19.4	22.0 \pm 5.1
240	46.9	6.6	20.6	6.8	11.6	20.4	18.8 \pm 6.2
480	33.1	1.7	11.9	7.5	3.0	23.2	13.4 \pm 5.0
720	12.5	5.4	6.8	7.7	2.1	20.8	9.2 \pm 2.7
1440	20.0	5.9	9.0	6.3	2.3	8.3	8.6 \pm 2.5
2160	15.4	3.1	3.0	6.0	3.0	8.9	6.5 \pm 2.0
2880	1.7	4.2	3.2	2.9	3.6	2.3	3.0 \pm 0.4
3600	5.9	5.7	2.3	2.5	2.9	0.5	3.3 \pm 0.9
4320	3.7	2.5	0.9	2.5	2.7	ND	2.5 \pm 0.4

Table 40 Serum concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of CBZ in six rats after oral administration of CBZ (400 mg/kg) with GF decoction (4 g/kg).

Time (min)	1	2	3	4	5	6	mean \pm S.E.
10	27.1	7.5	7.2	19.0	18.4	17.8	16.2 \pm 3.1
30	23.0	17.1	10.5	14.0	18.3	21.0	17.3 \pm 1.9
60	20.9	15.6	13.2	14.8	16.8	21.2	17.1 \pm 1.3
120	19.0	11.9	20.0	11.9	14.3	21.3	16.4 \pm 1.7
240	21.4	7.4	14.0	7.8	9.4	20.8	13.5 \pm 2.6
480	25.7	2.5	5.2	5.5	2.6	12.0	8.9 \pm 3.6
720	14.3	2.3	1.8	2.9	0.7	13.5	5.9 \pm 2.6
1440	6.8	1.7	2.8	3.5	3.4	0.1	3.1 \pm 0.9
2160	3.5	1.9	3.9	9.0	1.8	1.4	3.6 \pm 1.2
2880	8.0	4.9	1.3	2.6	5.4	0.9	3.9 \pm 1.1
3600	14.7	6.7	2.5	4.5	2.8	4.6	6.0 \pm 1.9
4320	11.4	2.9	2.4	2.0	0.8	1.9	3.6 \pm 1.6

Table 41 Individual pharmacokinetic parameters of CBZ in serum after oral administration of CBZ (400 mg/kg) alone.

Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean \pm S.E.
C_{max} (mg/mL)	50.8	17.2	41.9	17.7	18.1	23.2	28.1 \pm 5.9
AUC_{0-4320} (mg min/mL)	62477.9	21323.4	27678.5	23000.8	15914.9	36611.8	31167.9 \pm 6876.0
V/F (mL)	3568.5	13219.0	5503.5	10877.6	18045.4	2343.1	8926.2 \pm 2511.0
Cl/F (mL/min)	2.4	3.9	4.0	3.7	3.8	4.8	3.7 \pm 0.3
MRT_{0-t} (min)	1280.9	1924.5	1187.0	1581.8	1753.0	1060.2	1464.6 \pm 139.4

Table 42 Individual pharmacokinetic parameters of CBZ in serum after oral administration of CBZ (400 mg/kg) with GF decoction (4 g/kg).

Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean \pm S.E.
C_{max} (mg/mL)	27.1	17.1	20.0	19.0	18.4	21.3	20.5 \pm 1.5
AUC_{0-4320} (mg min/mL)	48384.9	17313.0	15883.6	21276.7	15269.3	31111.9	24873.2 \pm 5275.3
V/F (mL)	11864.2	34062.5	13220.5	12891.5	5695.8	30557.8	18048.7 \pm 4667.9
Cl/F (mL/min)	1.1	2.2	5.6	4.6	7.6	0.8	3.6 \pm 1.1
MRT_{0-t} (min)	1943.1	2209.4	1519.8	1875.9	1767.7	1112.5	1738.1 \pm 155.2

Table 43 Comparison of pharmacokinetic parameters of CBZ in serum after oral administration of CBZ (400 mg/kg) alone and coadministration with GF decoction (4 g/kg) in five rats.

parameters	CBZ alone	CBZ + GF 4 g/kg
C_{max} (μ g/mL)	28.1 \pm 5.9	20.5 \pm 1.5
AUC_{0-4320} (μ g min/mL)	31167.9 \pm 6876.0	24873.2 \pm 5275.3 **
V/F (mL)	8926.2 \pm 2511.0	18048.7 \pm 4667.9
Cl/F (mL/min)	3.7 \pm 0.3	3.6 \pm 1.1
MRT_{0-t} (min)	1464.6 \pm 139.4	1738.1 \pm 155.2

Data expressed as mean \pm S.E.

** P < 0.01