

編號：CCMP95-TP-034

# 中西藥併用之安全性探索（整合型計畫）

許游章、江秀梅

中國醫藥大學

## 總計畫摘要

中西藥併用之問題於今已是一重要之醫藥議題，尤其是中西醫雙軌併治之台灣，對於長期服藥之慢性病患，中西藥併用之風險更不容忽視，而從中西藥併用之結果尋求其正向之應用，應是目前促進中藥科學化及國際化應努力之目標。糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)為慢性代謝異常疾病，近幾年來盛行率快速成長，台灣地區以非胰島素依賴型糖尿病(NIDDM)為主，而臨床使用之胰島素注射劑及口服降血糖藥物未臻理想。因糖尿病之高血糖致身體自由基過度增加，引發諸多合併症。若糖尿病患者血糖控制良好，可使患者體內的氧化壓力及蛋白質糖化作用降低，進而減少併發病症及死亡率。癲癇為常見之慢性腦部疾病，在一般的流行病學上之探討發現其盛行率為 0.3%~1%，即國人約有 14 萬至 20 萬人患有癲癇，病患須長期服藥，但抗癲癇藥具諸多副作用且治療指數狹窄，因此如何保障病患之用藥安全，實為重要議題。本研究希冀藉由中西藥物之併用研究，評估糖尿病患及癲癇病患服用治療藥物時若同服中藥，其風險及利基為何。

糖尿病藥物研究方面，選用第二代降血糖藥 Glipizide 作為模型藥物，其作用為刺激胰臟分泌胰島素，但易致低血糖、發燒、喉嚨痛、皮膚疹、黃疸等症狀。而中藥槐花含有 Rutin 和 Quercetin 成分，中醫用於涼血止血藥，其具清除自由基、血管舒張、降低膽固醇量、降血壓、抗炎及抗癌等作用，本研究藉評估抗氧化指數，以了解兩者併用之結果。另外抗癲癇藥物研究方面，選用 Phenytoin (PHT) 為模型藥物，其用於治療多型癲癇及心律不整，因治療指數狹窄，血中濃度過高易致神經及心血管毒性，長期使用癲癇藥物，往往因產生抗藥性而降低其療效，應與其轉運、外排則與 Pgp、MRP1、MRP2 等運送蛋白有關，大黃及何首烏俱為蓼科植物，含有許多蒽醌類衍生物，蒽醌化合物主要以硫酸及葡萄糖醛酸結合態代謝物循環於血流中，此些結合態代謝物之轉運、外排與 MRP1、MRP2、MRP3 等運送蛋白有關，因此二者與 PHT 併用，其動力學變化急待研究。

研究結果發現槐花單服或與 Glipizide 併用，對於糖尿病大鼠體重、血糖俱無顯著影響，至於抗氧化指標方面，SOD 並無影響，但併用及單服槐花 20 天後有降低糖尿病鼠之 NO 及提高其 GSH。而大黃及首烏均具降低 PHT 體內暴露之作用，且較高劑量之作用較為顯著，另外以 MDCK 研究其交互作用之機轉，結果發現首烏會抑制 Rhodamine 123 之外排，因此推論首烏可作用於 Pgp，但此結果無法完全解釋二者之交互作用，因此須以其他部位細胞，諸如進行 BBB 及腸道

細胞進行運輸蛋白之研究或進行肝臟代謝酵素之研究，方能釐清此交互作用之機轉。

槐花與降血糖藥併用雖對於血糖無顯著影響，但可降低部分氧化壓力，因此槐花對於糖尿病人應具保護作用，其更明確之療效，待更進一步之研究。至於抗癲癇藥與含蔥醌類中藥併用，其血中濃度可能降低致癲癇發作。有關中西藥併用之研究，其利基及風險之評估，對於慢性病患尤其重要，因此需建立更多研究模式以評估其影響，希冀能找到有助於西藥藥效或保護病患之中西藥併用模式，以增進病患用藥安全及福祉。

編號：CCMP95-TP-034

# 分項計畫一：口服降血糖藥合併槐花對糖尿病老鼠體內抗氧化作用及降血糖效應之研究

許游章

中國醫藥大學

## 摘 要

糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)為慢性代謝異常疾病，為十大死因之一，且近幾年來快速成長，台灣地區以非胰島素依賴型糖尿病(NIDDM)為主。目前雖有胰島素注射劑及口服降血糖藥物，但在臨床上之使用仍未達理想。已有文獻指出糖尿病之高血糖會過度增加身體的自由基，致諸多慢性合併症。氧化壓力增加亦對許多細胞功能造成損害，並因體內抗氧化防禦系統能力的降低致使糖尿病患者氧化壓力、蛋白質糖化均較正常人嚴重，再加上脂質代謝的不良是引發糖尿病併發症的主因。但是，糖尿病患者若血糖控制良好，可使患者體內的氧化壓力及蛋白質糖化作用降低。西藥 Glipizide 屬於第二代 Sulfonylurea 的降血糖藥物，適用於非胰島素依賴型糖尿病，其作用為刺激胰臟分泌胰島素，但是副作用會造成低血糖、發燒、喉嚨痛、皮膚疹、黃疸等症狀。我國傳統醫學研究指出槐花含有 Rutin 和 Quercetin 成分，中醫用於涼血止血藥，已有研究報告指出可用來治療腦血管相關疾病及防止 DNA 受外加化學物質的破壞。具有血管舒張的作用、清除自由基的活性、降低血清膽固醇量、降血壓、降血脂、抗發炎及抗癌等作用。因此擬對常用之降血糖西藥 Glipizide 併用藥用植物槐花進行降血糖探討，並期望 Glipizide 使用劑量減少，減少 Glipizide 之副作用，以尋得先導中西藥併用藥物以供醫學研究依據。以 Nicotinamide (180 mg/kg, ip)於 15 分鐘後靜脈注射 STZ (streptozotocin) 65mg/kg 使誘發為糖尿病老鼠，連續給予 2 天，當血糖達到 200mg/dL 後，判定為糖尿病老鼠。實驗分成五組，一組為標準配方飲食，未誘導糖尿病之空白組；第二組則標準配方飲食，誘導糖尿病之對照組；第三組為給予口服降血糖藥 Glipizide (1mg/kg)；第四組則給與 Glipizide，及添加劑量槐花 (2mg/kg)；第五組給予槐花(2mg/kg)。實驗期四週，實驗期間採取血液檢品進行血糖及抗氧化作用分析，並於第四週進行葡萄糖耐受性試驗，實驗結束犧牲老鼠取血液分析，測定血中之葡萄糖及抗氧化作用做為指標，氧化壓力以抗氧化防禦系統中的抗氧化酵素活性做為參考依據。研究結果發現，以 STZ 誘發之糖尿病鼠呈現體重減輕、血糖升高之現象，其血中之 SOD、GSH 俱降低，而 NO 升高；

給予 Glipizide 後對於上述之現象未有改善之作用；但給予槐花四週後，則可提高 STZ 所引起之 SOD 降低及降低其所誘發之 NO 升高之現象。因此槐花對於糖尿病患應具保護作用。

關鍵詞：槐花、超氧歧化酶、糖尿病鼠、口服葡萄糖耐受性試驗、抗氧化

Number: CCMP95-TP-034

# **Studies on the Antioxidative and Hypoglycemic Action of Oral Anti-Diabetic Drug Combined with Sophorae Flos in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats**

You-Cheng Hseu  
China Medical University

## **ABSTRACT**

Sophorae flos is a Chinese herb. It contains abundant flavanol aglycon, including rutin and quercetin. There are reports that indicated used for treatment of cerebral vessels associated disease and prevention of DNA destruction by external chemicals. Oxidative stress, glycation and lipid metabolism have been proposed to be linked and be increasing to tissue damage and the development of pathophysiology in diabetic patients. The purposed to evaluate the effects of Sophorae flos on oxidative status, insulin and blood glucose in diabetic rats. Diabetic rats were induced by injecting with 50 mg/kg/day streptozotocin in citrate buffer 2 days, continuously. While the blood sugar over 200 mg/dL which was defined as the diabetic rats, and then feeding the different experimental diets. Male adult Wistar rats (b.w eq. 250-280g) were divided into four groups: Control groups were AIN-76 diet, with or without Sophorae flos and/or Glipizide, respectively. At Four weeks later, the diabetic rats were sacrificed and sampled. The indicator of oxidative status were individually evaluated the activity of antioxidant enzyme (SOD , NO and GPX). In addition, we also evaluated the plasma blood glucose and oral glucose tolerance test (OGTT) of diabetic rats. In the result, Sophorae flos was not significantly decreased the blood glucose and oxidant stress but glipizide was not. Furthermore, Sophorae flos will inhibit the STZ-induced NO release and elevate GSH. The results indicated that long-term administration of Sophorae flos decoction would protection the DM patients from oxidant stress.

Keywords: Sophorae flos, super oxygen dimutase, diabetic rats, oral glucose tolerance test, antioxidation

## 壹、前言

台灣根據衛生署的統計，糖尿病居十大死因的第五位，且近幾年來快速成長，從 1978 年每十萬人口中 6.5 人增至 1995 年的 34.0 人，其成長速度值得注意。台灣地區的糖尿病型態以非胰島素依賴型糖尿病(NIDDM)為主，約佔罹患率的 95%左右<sup>1,2</sup>。對糖尿病患者而言，如何透過良好的飲食療法使血糖濃度得到良好的控制是最基本也是最重要的課題<sup>3,4</sup>。

在過去的研究中發現，type 1 DM的血漿脂質過氧化物(TBARS)含量會顯著高於控制組，且與HbA1c具有正相關。而體內的抗氧化酵素GSH Px活性在血糖控制不良的DM中會顯著降低，而SOD的活性則未受影響，但GSH Px及SOD均與HbA1c呈負相關<sup>5</sup>。且在type 2 DM病患中也發現，具有保護性避免氧化傷害的因子，尿酸、維生素C及維生素E在血漿中的濃度均低於正常之控制組<sup>6</sup>。

近年來關於糖尿病之併發症發展機制，被提出的另一可能原因與糖尿病狀態下產生自由基造成氧化壓力有關。過去學者將造成糖尿病患體內自由基生成量增加之原因，歸納出以下幾種原因，包括：高血糖及葡萄糖的自動氧化 (Autoxidation of glucose)，會提高體內的氧化壓力，而造成脂質過氧化作用增加。超氧自由基及酵素系統的電子傳遞過程或氧化還原過程中形成自由基。白血球的活化 (Activation of leukocytes)，活化的嗜中性白血球釋出氧活性分子，亦是自由基的重要來源。蛋白質糖化作用 (Protein glycation) 中可能產生過多自由基之因子<sup>6,7</sup>。因此減少糖尿病病人體內的氧化壓力，可減少糖尿病之併發症。

在探討 type 2 糖尿病致病之機轉，其動物實驗主要利用 STZ (Streptozotocin) 誘發的糖尿病鼠，STZ 可使體內氧化壓力增加。有研究者說明注射 STZ 之糖尿病鼠，因 STZ 會積蓄在胰臟的蘭氏小島，而使氧自由基增加，特別會造成肝中 TBARS 增加<sup>8</sup>。STZ 主要是刺激 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的產生及胰臟 β O<sub>2</sub>- 及 OH，而使 DNA 損害。因此當體內氧化壓力增加(如糖尿病)或缺乏抗氧化機制(如抗氧化酵素和抗氧化維生素)時，則易造成自由基的傷害，因而導致許多慢性疾病。

Glipizide 屬於第二代 Sulfonylurea 的降血糖藥物，又稱為 glidiazinamide。適用於 type II 的糖尿病患者，成人劑量約是 5-10 mg/day。藥效與其他第一代及第二代 sulfonylurea 類藥物類似。但約有 3.4% 的病患有低血糖 (冒冷汗、心悸、頭痛、痙攣、昏亂) 的情況發生，以及有發燒、喉嚨痛，皮膚疹，黃疸症狀、腸道不適、肝臟之 LDH、AST 及 Alkaline phosphate 的升高及頭昏、

虛弱及頭痛等現象的發生<sup>9,10</sup>。

槐花 (*Sophorae flos*) 為中國常用草藥之一種，具有清血止血、清肝火之藥理作用。槐花，又稱槐蕊。為豆科植物槐樹 (*Sophora japonica* L.) 的花朵或花蕾。《本草備藥》記載槐花：“治風熱目赤，赤白泄痢，五痔腸風，吐崩諸血”<sup>11-13</sup>。《中藥現代研究與應用》認為槐花有涼血、止血，及瀉肝火的作用<sup>14-16</sup>。成份分析主要含有蘆丁(Rutin)，槲皮素(Quercetin)等，藥典規定蘆丁含量不得少於20%。槐花中的Rutin成份有抗發炎作用、抗真菌作用、治療心律不整、降血糖、血脂作用、解痙、抗潰瘍作用<sup>17-18</sup>；Rutin和Quercetin能降低平滑肌的張力，對胃潰瘍有保護作用。槐花能降低血糖以及預防和降低實驗性高膽固醇血症<sup>19-20</sup>，推測亦與黃酮類物質有關。有報告指出Rutin腹腔注射的LD<sub>50</sub> 為950 mg/kg，而口服槲皮素的LD<sub>50</sub>為160 mg/kg<sup>21-23</sup>。

因此本研究將以動物模式評估Glipizide及槐花交互作用之發生機會與其機制探討。以STZ誘發DM大鼠，觀察在DM發展進程中觀察空腹血糖值或其他一般生化分析等項目，可瞭解受試物是否具有調節血糖作用及不同組織抗氧化狀態之變化。由於氧化壓力被視為導致DM慢性合併症發生的原因之一，因此想藉由進一步觀察Glipizide併用槐花在DM治療發展的進程中，抑制氧化壓力之作用是否與 $\beta$ 細胞功能之變化具有關連性，以及藉由藥物動力學探討Glipizide併用槐花，期望Glipizide使用劑量減少，減少Glipizide之副作用之產生。

## 貳、材料與方法

### 一、溶液製備

#### (一) 芸香苷標準溶液

精確稱取 rutin 10.0 mg，以甲醇溶解並定容至 10.0 mL，得 1.0 mg/mL 之芸香苷儲備溶液，其他濃度之標準溶液，則以甲醇系列稀釋後得之。

#### (二) 6,7-dimethoxycoumarin 內標準溶液

稱取 6,7-dimethoxycoumarin 10.0 mg，以甲醇溶解並定容至 10.0 mL，可得 1.0 mg/mL 之儲備溶液，再以乙酸乙酯稀釋為所需濃度之內標準溶液。

### 二、槐花水煎劑之製備

精確稱取槐花 250g，加入 5L 一次水靜置半小時，於瓦斯爐上加熱至沸騰，沸騰後轉為小火繼續加熱至體積減至 2.5L 以下，以紗布趁熱過濾取濾液後，將藥渣濾除，濾液以小火繼續煎煮至體積低於 500mL，加水定容至 500mL，混合均勻後分裝於 50 mL 離心管，置於-30°C 冰存備用。

#### (一) 槐花水煎劑中 rutin 之定量分析

檢品 300 $\mu$ L 加甲醇 700 $\mu$ L 震盪混合，經 9860  $\times$  g 離心 15min，取上清液後再以甲醇稀釋 25 倍，取 500 $\mu$ L 稀釋之水煎劑加入 500 $\mu$ L 之含內標準(6,7-dihydroxycoumarin, 10.0 $\mu$ g/mL) 甲醇溶液混合後，於渦旋震盪器上混合 20 秒，以微孔濾器(0.45 $\mu$ m)過濾。取 20 $\mu$ L 注入 HPLC 分析，以檢品中 rutin 與內標準之波峰面積比值代入檢量線方程式，求出檢品中 rutin 之含量。

#### (二) 高效液相層析儀(HPLC)之分析條件

分析管柱：Cosmosil<sup>®</sup> 100 RP-18 e (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4 mm)

移動相：acetonitrile (A)- 0.1 % phosphoric acid (B)

時間 (分)	B (%)
0	80
20	80
25	70
40	70
45	80
50	80

UV 檢測波長：228 nm

內標準：6,7-dimethoxycoumarin

流速：1 mL/min

## (三)檢量線之繪製

精確稱取 rutin，以甲醇溶解並稀釋定容，製備 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 62.5, 125.0, 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  等濃度之標準溶液，取 100 $\mu\text{L}$  各濃度標準溶液，分別加入 100  $\mu\text{L}$  含內標準(6,7-dihydroxycoumarin, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )甲醇溶液，於渦旋震盪器上混合 20 秒，取 50 $\mu\text{L}$  供 HPLC 分析定量。將所得之 rutin 與內標準之波峰面積比值進行線性迴歸，即得檢量線方程式。

## (四)分析系統及方法之確效

## 1.精密度(Precision)

將不同濃度之 rutin 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，然後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，再分別求其平均值(mean)、標準偏差(standard deviation, S.D.)及變異係數(coefficient of variation, C.V.)。

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

## 2.靈敏度(Sensitivity)

將 rutin 標準品濃度一再稀釋，直至其波峰與雜訊之比值為 3 時之濃度為其偵測極限(LOD, Limit of detection)。

## 3.準確度(Accuracy)

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

$$\text{準確度} = [(\text{平均濃度} - \text{真實濃度}) / \text{真實濃度}] \times 100$$

## 4.回收率(Recovery)

取已測定 rutin 含量之槐花水煎劑檢品 300  $\mu\text{L}$  各三份，分別加入三種已知濃度的標準品溶液 700 $\mu\text{L}$  振盪混合，9860  $\times$  g 離心 15min 後，取上清液 200 $\mu\text{L}$ ，加入 200 $\mu\text{L}$  含內標準(6,7-dihydroxycoumarin, 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )甲醇溶液，震盪混合 1 分鐘，9860  $\times$  g 高速離心 15min，然後分別層析定量，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。

三、糖尿病鼠之誘導<sup>(24)</sup>

四週齡雄性 Sprague-Dawley 大鼠，以腹腔靜脈注射給予 Nicotinamide (180 mg/kg，配製於生理食鹽水)，15 分鐘後再以尾靜脈注射 streptozotoxin (65 mg/kg，配製於 0.01 M citric saline acid, pH 4.5)，隔天進行相同之處理。於第七天時將大鼠禁食 12 小時，測定血中葡萄糖濃度，若血糖濃度高於 200

mg/dL，視為誘發成功，而進行下列試驗。

#### 四、動物試驗與檢品採集

##### (一)實驗分組

實驗分成五組，一組為標準配方飲食，未誘導糖尿病之空白組；另四組為誘發成功之糖尿病鼠，隨機分為四組，第一組則標準配方飲食，誘導糖尿病之對照組；第二組為給予口服降血糖藥 Glipizide (1 mg/kg, 2 g/mL in 1,2-propandiol)；第三組則給與 Glipizide，及添加槐花(2 mg/kg)；第五組給予槐花(2 mg/kg)。

##### (二)檢品採集

初步試驗之實驗期 18 天，實驗期間每隔四天將大鼠禁食 12 小時後採取血液檢品，至於含 EDTA microtube 中，取部分血液進行血糖濃度分析，其餘檢品於 10000 g 離心 15 分鐘，吸除上清液後收集下層紅血球，以磷酸緩衝溶液進行與下層紅血球充分混合後，於 10000 g 離心 15 分鐘，吸除上清液，再以磷酸緩衝溶液清洗兩次後置於-20°C 中貯存，待後續血色素及抗氧化作用分析。

##### (三)葡萄糖耐受性測試

給藥後第 15 天，將大鼠禁食 12 小時後，以胃管餵食葡萄糖 (2 g/kg, 30% 水溶液)，於給予葡萄糖前及後 15, 30, 60, 90 及 120 分鐘採集血液，進行血糖測試。

##### (四)實驗項目分析

1. 葡萄糖分析：利用葡萄糖與 glucose oxidase 反應後，會產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。再與 4-aminophenazone + phenol 之 peroxidase 催化下，反應生成紅色生成物。OD=500nm 的波長下，依吸光度的大小，可定量出葡萄糖的量(RANDOX glucose Kit)。
2. 糖化血紅素(HbA1c: glycation hemoglobin)分析：利用離子交換層析法將已經糖化(glycation)的血紅素及未糖化的血色素分離。在 OD=415 nm 的波長下，測定其吸光值，計算出 HbA1c 在血液中的百分比 (Helena HbA1c Column procedure Kit (Helena Laboratory))。
3. 抗氧化酵素活性分析
  - (1) 麩胱甘月太過氧化酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)分析：  
在試管中分別加入 0.05mL 紅血球及 2.5mL reagent (4mmol/L glutathione, 0.5U/L glutathione reductase, 0.28mmol/L NADPH) 及 0.10mL cumene hydroperoxide 混合均勻；於 37°C，OD=340nm 測 NADPH 之消耗量，由吸光度的減少，即可求得

GSH-Px 之活性。

(2)超氧化歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)分析：在試管中分別加入 0.05 mL 紅血球及 0.05mL phosphate buffer (含 0.94 mmol/L EDTA) 及 1.70 mL mixed substrate (含 0.025 mmol/L I.N.T.) 0.25 mL xanthine oxidase (80U/L)混合均勻，形成紅色的 formazan dye。在 OD=505nm，37°C 下，測 3 分鐘之吸光值變化，而酵素之活性則藉由 SOD 在此反應中所能清除 superoxide radical 的多寡來評估。

(3)血漿中一氧化氮(nitrite; NO)濃度分析：取出 100 $\mu$ L 血漿檢品，加入 100 $\mu$ L Griess reagent，置室溫下 20 反應分鐘，於 550nm 測定其吸光值。另以已知之濃度 sodium nitrite 配置系列濃度，進行檢量線之制定及計算，以計算檢品中 NO 之濃度。

#### 五、統計分析

以 Excel 建檔，並以 SPSS 程式系統之 one-way ANOVA 進行統計分析，並採用 Duncan's multiple range test 做組間差異比較， $P < 0.05$  時視為具顯著之差異。

## 參、結果與討論

本計畫以高效液相層析(HPLC)方法測定槐花水煎劑中 rutin 之含量，所採用之 HPLC 條件以氬甲烷及 0.1% 磷酸為移動相，採梯度沖提方式，檢測波長為 228nm，流速為 1 mL/min，以 6,7-dimethoxycoumarin 為內標準，其分析效果良好，槐花水煎劑所含之 rutin 濃度為  $26.1 \pm 0.5$  mg/g，層析圖如 Fig.1 所示。

分析方法之確效方面，其精密度、準確度及回收率均良好，如 Table 1 及 2 所示。Rutin 之最低定量濃度為 6.25  $\mu$ g/mL。

本實驗參照行政院衛生署頒布之保健食品評估辦法<sup>(24)</sup>及 Masiello 等人<sup>(25)</sup>建立之第二型糖尿病大鼠誘發之模式，將 Sprague-Dawley 大鼠，先以腹腔靜脈注射給予配製於生理食鹽水之 Nicotinamide (230 mg/kg)，以保護  $\beta$ -cell，避免全數破壞大鼠分泌胰島素之功能，15 分鐘後再以尾靜脈注射配製於 0.01 M pH 4.5 citric saline acid 之 streptozotocin (65 mg/kg)，以誘發第二型糖尿病，但結果發現血中葡萄糖值並未穩定升高至 200mg/dL，且其血糖值並不穩定，無法持續較長之時間，因此檢討所採用之藥物劑量及給藥模式。發現所使用之 Nicotinamide 之劑量較高，對於  $\beta$ -cell 之保護作用過強，以致無法穩定使血糖值升高，而且所誘發之血糖值雖有升高，其穩定性亦不佳，於一兩週後隨即消失，或降低後突然再升高，因此無法將藥物之作用呈現出來，因而再進行文獻之搜尋，建立較適於長期測試之第二型糖尿病大鼠模式，即於第一次處理隔日再進行誘發，於第七天經 12 小時進食後檢測其血中之血糖值，大鼠體重之經時變化如 Fig. 2 及 Table 3 所示，而所誘發之血糖值經時變化如 Fig. 3 及 Table 4，由結果可發現，槐花及 Glipizide 無論單服或併用，對於 STZ 所引起之體重減輕，並無顯著之影響或避免體重減輕之作用，各實驗分組大鼠之體重變化如如 Table 3。

另於實驗結束前三天，進行大鼠之口服葡萄糖耐受性測試(oral glucose tolerance test; OGTT)，誘發糖尿病鼠之血中葡萄糖濃度顯著高於未誘發之空白組之血中葡萄糖值，而給予物不同藥物之各組大鼠間之血中葡萄糖值，並未有顯著之差異，如 Table 5。因此本研究結果顯示 Glipizide 與槐花無論單服或二者併服，對於糖尿病鼠之血糖均無保護作用，此與先前文獻之研究結果，槐花可降低糖尿病人之血糖並不一致，而大鼠血醣變性過高致實驗結果無統計失顯著差異應是原因之一，另糖尿病鼠誘導模式及給藥模式及劑量，亦須探討及改善，或將劑量增強或延長給藥時間，而長期給藥應較符合一般保健食品使用之習慣。

另外有關抗氧化測試之各指標方面，各組超氧歧化酶(super oxide mutase; SOD)等之經時變化結果如 Fig. 4 及 Table 6 所示，由此結果可發現無論單服或併用槐花及 Glipizide 對於大鼠之 SOD 濃度並無影響。而 GSH 之結果如 Fig. 5 及 Table 7，由實驗結果可知短時間服用槐花水煎劑或 Glipizide，對於紅血球之 GSH 濃度並無顯著影響，若連續使用超過 20 天，槐花及 Glipizide 單服或併用對 GSH 含量有顯著提升之作用，且槐花之作用大於 Glipizide。有關此兩種藥物對於大鼠血中 NO 含量之影響，其結果如 Fig. 6 及 Table 8 所示，血中 NO 之經時變化結果與 GSH 之結果類似，亦於給藥 20 天後顯示顯著之差異，但僅槐花水煎劑具降低 NO 之作用，而單獨給予 Glipizide 對於大鼠之 NO 濃度並無影響。由上述結果顯示，Glipizide 可降低糖尿病大鼠之 GSH，但對於 SOD 及 NO 並無影響；至於槐花水煎劑，可降低糖尿病大鼠之 NO 及提高 GSH，因此槐花長期服用對於糖尿病應有保護作用且槐花於糖尿病大鼠顯出之抗氧化作用較 Glipizide 顯著。

本計畫預期建立之模式之預試驗將有助於後續口服降血糖藥及槐花對於糖尿病鼠之交互作用研究，以及後續相關機轉之探討，因此本計畫為糖尿病研究及中草藥對糖尿病相關抗氧化指標之影響之研究，均為重要之前驅研究。

## 肆、結論與建議

- 一、本計畫建立槐花水煎劑之定量方法，其分析系統之確效及精密良好，應可提供後續或其他槐花製劑定量之參考。
- 二、本計畫預期建立糖尿病研究及中草藥對糖尿病相關抗氧化指標之影響之研究之重要之前驅研究。
- 三、誘發第二型糖尿病大鼠之模式應檢討以建立較穩定之動物模式，有助於後續中草藥於糖尿病之保健功能之篩選及測試。
- 四、槐花對於 STZ 誘發之糖尿病症狀，具有保護作用，其可降低 STZ 所導致之 NO 升高並提高 STZ 所引起之 GSH 降低。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP95-TP-034 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 伍、參考文獻

1. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 24: 683-689.
2. Steven M. Haffner MPH. Epidemiology of insulin resistance and its relation to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999; 84: 11J-14J.
3. Kahn CR. Pathophysiology of diabetes mellitus: an overview. In Joslin's diabetes mellitus. ed. Marble, A. et al., 12th ed., Lea & Febiger, Philadelphia. 1985.
4. Katz J, McGarry JD. The Glucose Paradox : is glucose a substrate for liver metabolism ? *J. Clin. Invest.* 1984; 74: 1901-1909.
5. Salin ML and McCord JM Superoxide dismutases in polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest.* 1974; 54: 1005-1009.
6. Arai K, Lizuki S, Tada Y, Oikawa K and Tanaguchi N Increase in the glucosylation from of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutasei in diabetets and close association of the nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1987; 924: 292-296.
7. Wolff SSP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 10: 339.
8. Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol. Cell Biochem.* 1995; 151: 113-119.
9. Goldstein BJ, Pans M, Rubin CJ. Multicenter, randomized, double-masked, parallel-group assessment of simultaneous glipizide/metformin as second-line pharmacologic treatment for patients with type 2 diabetes mellitus that is inadequately controlled by a sulfonylurea. *Clin Therapeutics* 2003; 25: 890-903.
10. Balant I, Fabre J, Zahnd G. Comparison of the pharmacokinetics of glipizide and glibenclamide in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1975; 8: 63.
11. 中藥對照用指標成份物理化學資料彙編。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006) 出版品。91年03月。
12. 認識常用中藥 (一)(二)(三)。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006) 出版品。91年12月。

13. 臺灣常用藥用植物圖鑑。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006) 出版品。92年06月。
14. 臺灣藥用植物資源名錄。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006) 出版品。92年10月。
15. 臺灣中醫藥整合與前瞻。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006) 出版品。92年12月。
16. 中華中藥典。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006)出版品。93年03月。
17. 臺灣常用藥用植物圖鑑。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006) 出版品。93年10月。
18. 臺灣中醫藥資訊典籍新世代。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006)出版品。93年12月。
19. 建構臺灣中藥用藥安全環境。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006)出版品。93年10月。
20. 中藥用藥安全與實務。行政院衛生署中醫藥委員會歷年 (1982~2006) 出版品。94年12月。
21. 汪昂編著：本草備要註釋，五洲出版社，1981，P16。
22. 王淑蘭：槐角提取液的藥理作用與研究，張家口醫學院學報，1993，10(2)：1。
23. 鄭虎占、董澤宏：中藥現代研究與應用，學苑出版社，1997，P446-447.
24. 保健食品評估辦法，行政院衛生署，台灣台北，2005。
25. Masiello P. Broca C. Gross R. Roye M. Manteghetti M. Hillaire-Buys D. Novelli M. Ribes G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 47(2):224-9, 1998.

陸、圖、表

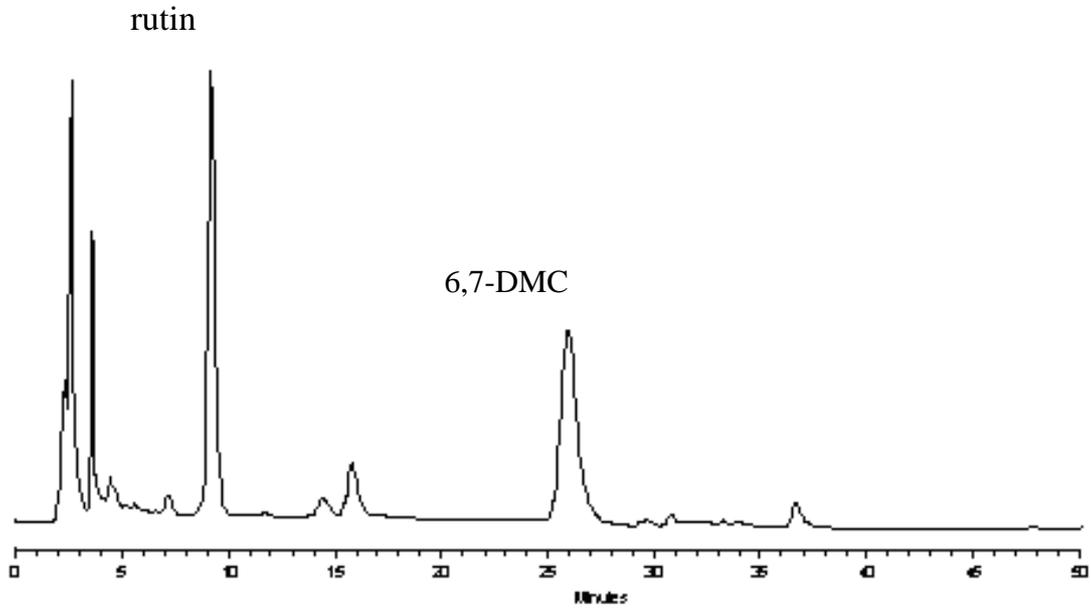


Fig 1 Chromatogram of rutin and 6,7-dimethoxycoumarin (internal standard; IS) in SJ decoction.

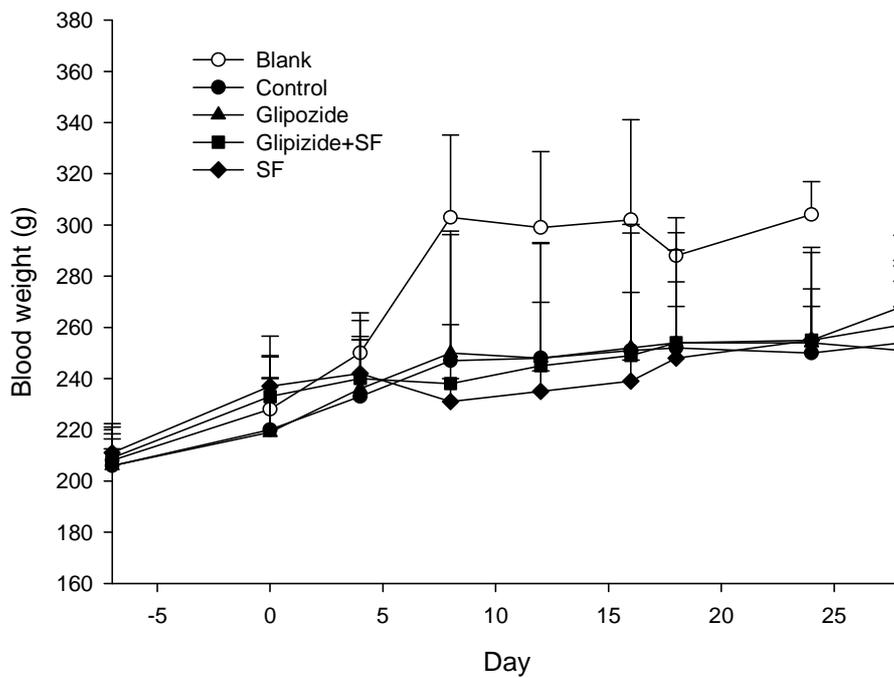


Fig 2 Effects of glipizide and SF on body weight of rats.

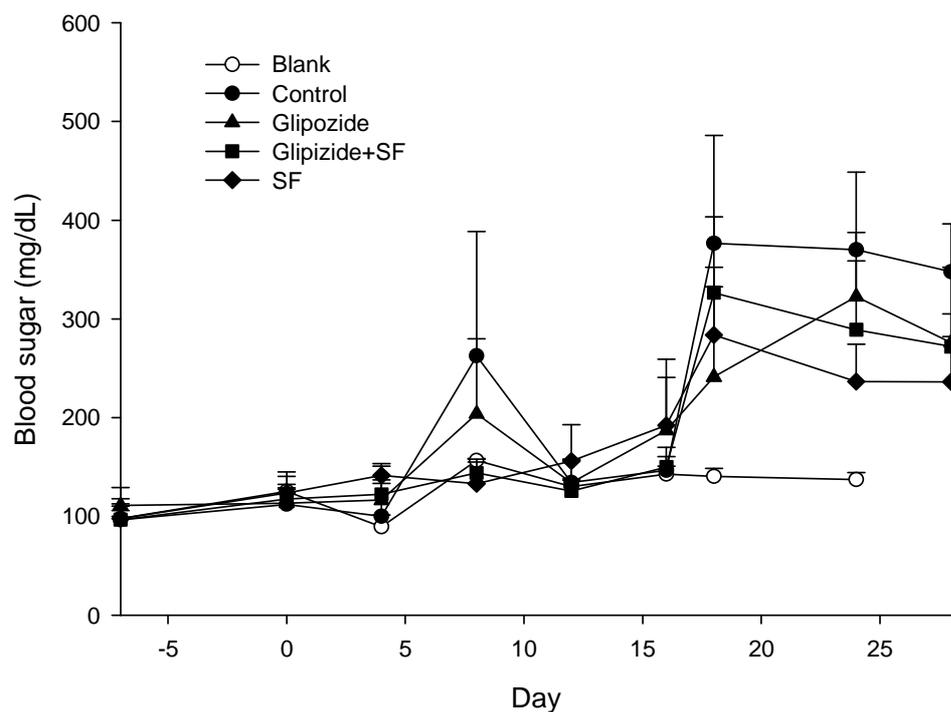


Fig 3 Effects of glipizide and SF on blood sugar of rats.

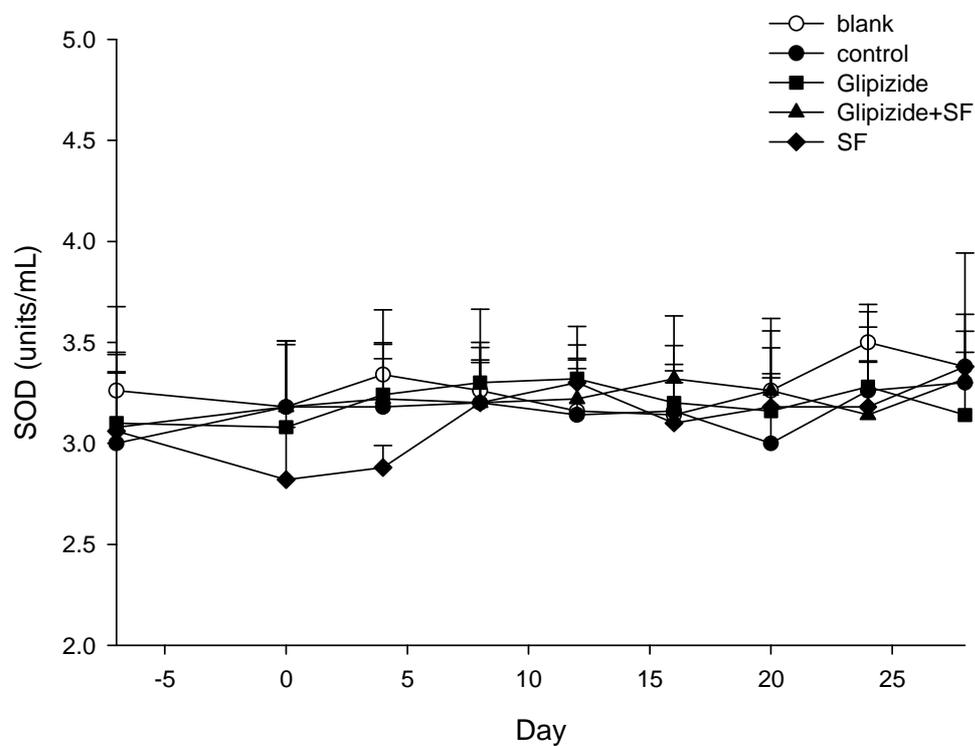


Fig 4 Effects of glipizide and SF on superoxide mutase (SOD) of rats.

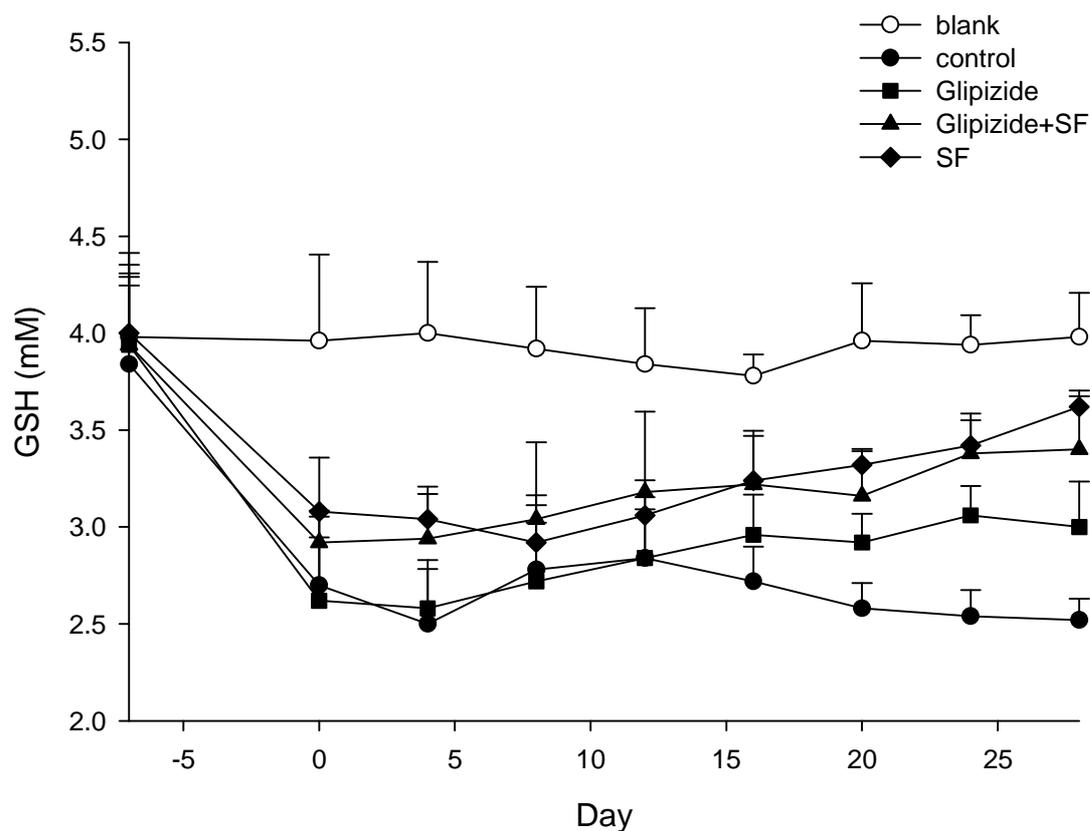


Fig 5 Effects of glipizide and SF on glutathion (GSH) of rats.

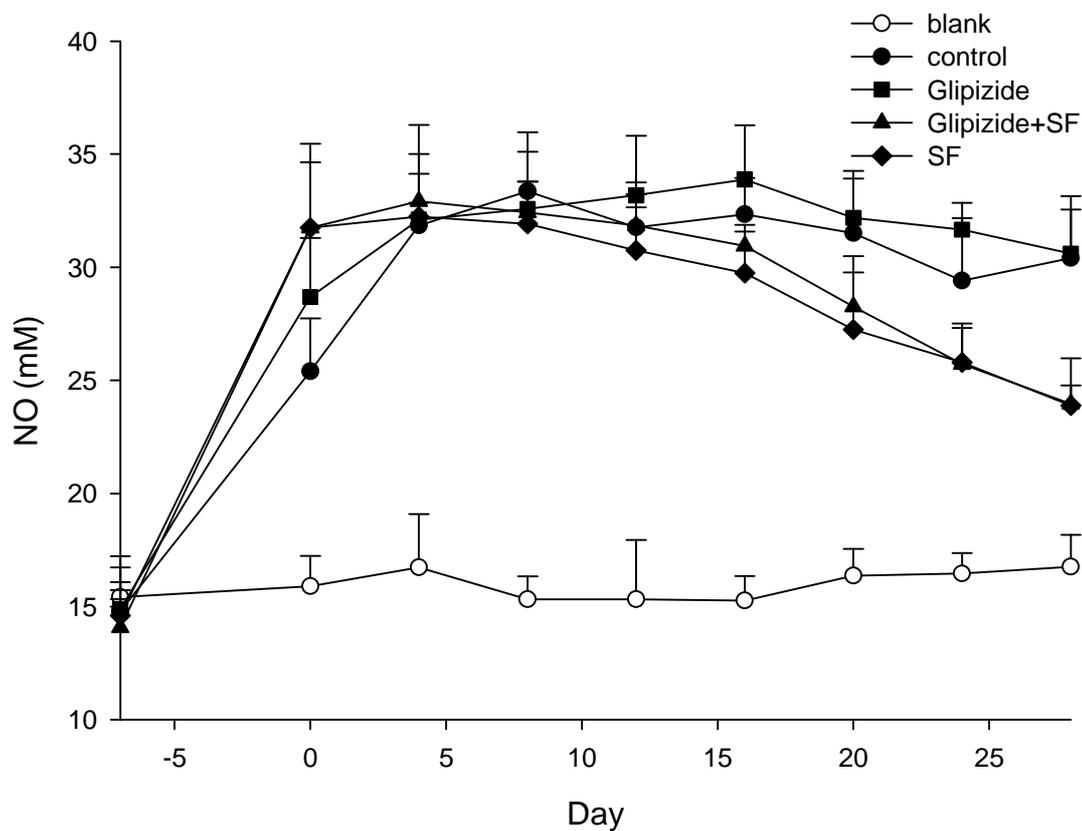


Fig 6 Effects of glipizide and SF on nitrite (NO) of rats.

Table 1 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of rutin

Conc. ( $\mu$ g/mL)	Intra-day		Inter-day	
	Precision Mean $\pm$ S.D. (C.V.)	Accuracy (%)	Precision Mean $\pm$ S.D. (C.V.)	Accuracy (%)
250.0	248.9 $\pm$ 5.1 (2.0)	-0.4	250.8 $\pm$ 8.6 (3.4)	-0.3
125.0	128.7 $\pm$ 2.8 (2.2)	3.0	124.2 $\pm$ 15.0 (12.1)	-0.7
62.5	62.1 $\pm$ 1.1 (1.8)	-0.7	62.2 $\pm$ 1.1 (3.5)	-0.5
50.0	46.3 $\pm$ 0.7 (1.4)	-7.3	47.8 $\pm$ 0.7 (0.2)	-4.3
25.0	24.9 $\pm$ 0.5 (2.1)	-0.3	25.6 $\pm$ 0.5 (8.5)	2.4
12.5	13.1 $\pm$ 0.2 (1.7)	4.8	13.3 $\pm$ 0.2 (3.9)	6.2
6.25	7.2 $\pm$ 0.3 (3.6)	14.7	7.4 $\pm$ 0.3 (3.9)	18.6

Table 2 Recoveries (%) of rutin in SJ decoction

Conc. ( $\mu$ g/mL)				Recoveries (%)
	1	2	3	Mean $\pm$ S.D.
125.0	134.74	133.82	134.03	107.4 $\pm$ 0.4
50.0	54.05	54.60	54.56	108.8 $\pm$ 0.3
12.5	13.66	13.84	12.91	107.8 $\pm$ 4.0

Table 3 The effect of SF on the body weight (g) change

	Day No	-7	0	4	8	12	16	20	24	28
		Blank	1	230	250	270	325	340	360	270
	2	210	250	250	320	280	270	280	295	330
	3	200	210	245	325	320	325	310	320	345
	4	200	210	250	295	285	280	290	315	325
	5	200	220	235	250	270	275	290	300	315
Control	1	185	200	230	200	210	220	230	230	230
	2	230	250	260	245	245	255	270	265	275
	3	200	210	245	325	320	325	310	305	310
	4	210	230	230	260	255	260	260	250	255
	5	205	210	200	205	210	195	190	200	200
Glipizide	1	205	210	230	230	245	240	240	245	235
	2	215	250	260	260	250	260	270	260	265
	3	200	210	245	325	320	325	310	315	305
	4	210	230	240	230	225	225	225	230	235
	5	200	195	205	205	200	210	225	220	215
Glipizide + SF	1	210	255	250	220	245	250	250	250	255
	2	220	245	260	265	275	280	290	275	280
	3	210	250	265	260	260	265	260	260	270
	4	200	210	215	230	235	230	245	250	265
	5	205	205	210	215	210	220	225	240	235
SF	1	210	230	250	240	245	250	280	285	290
	2	220	245	250	240	240	235	240	245	255
	3	210	250	250	230	235	235	235	245	260
	4	215	240	240	220	225	230	230	235	255
	5	200	220	220	225	230	245	255	265	280

Table 4 The effect of SF on the blood glucose (mg/dL)

	Day		-7	0	4	8	12	16	18
	No								
Blank	1		103	100	75	157	132	138	132
	2		69	119	90	154	128	134	136
	3		116	141	104	159	138	149	150
	4		103	141	89	156	123	150	144
Control	1		116	153	75	139	156	144	368
	2		90	91	87	371	125	115	452
	3		102	109	83	371	151	162	461
	4		78	96	155	169	105	166	225
Glipizide	1		132	113	128	126	117	148	162
	2		106	112	86	298	124	131	219
	3		89	95	92	230	127	179	211
	4		117	133	160	161	168	291	373
Glipizide + SF	1		105	107	121	159	139	155	359
	2		98	120	112	131	123	138	239
	3		87	126	134	142	115	157	382
SF	1		80	114	145	161	211	172	194
	2		100	132	143	109	140	134	358
	3		103	130	125	125	132	242	306
	4		109	119	153	138	141	221	277

Table 5 The effect of SF on the blood concentration (mg/dL) of OGTT

	Time(min)		0	15	30	60	90	120
	No							
Blank	1		132	153	152	172	138	128
	2		136	152	193	216	211	183
	3		150	180	195	181	168	157
	4		144	178	165	171	153	154
	mean±SD		140.5±8.1	165.8±15.3	176.3±21.2	185.0±21.2	167.5±31.5	155.5±22.5
Control	1		368	387	371	394	398	468
	2		452	445	498	471	453	422
	3		461	443	460	477	446	429
	4		225	379	415	412	364	343
	mean±SD		376.5±109.3	413.5±35.4	436.0±55.0	438.5±41.7	415.3±42.0	415.5±52.4
Glipizide	1		162	134	253	221	304	269
	2		219	335	367	389	392	331
	3		211	393	344	366	413	373
	4		373	519	522	519	464	463
	mean±SD		241.3±91.4	345.3±160.4	371.5±111.8	373.8±122.1	393.3±66.7	359.0±81.4
Glipizide + SF	1		359	507	483	521	492	456
	2		239	414	330	335	388	391
	3		382	523	522	536	468	468
	mean±SD		326.7±76.8	481.3±58.9	445.0±101.5	464.0±112.0	449.3±54.5	438.3±41.4
SF	1		194	424	413	315	372	367
	2		358	370	365	404	421	414
	3		306	527	468	442	427	421
	4		277	560	556	515	503	464
	mean±SD		283.8±68.6	470.3±88.4	450.5±82.0	419.0±83.2	430.8±54.1	416.5±39.7

Table 6 Effects of Glipizide and SF on activities of superoxide dimutase (SOD; units/mL)

		Day									
No		-7	0	4	8	12	16	20	24	28	
Blank	1	4.0	3.9	4.2	4.0	4.0	3.8	4.1	4.0	4.1	
	2	3.5	3.7	3.6	3.7	3.6	3.8	3.9	3.9	3.7	
	3	3.6	3.4	3.7	3.5	3.5	3.6	3.5	3.7	3.9	
	4	4.5	4.3	4.0	4.1	3.9	3.8	4.3	4.0	3.9	
	5	4.3	4.5	4.5	4.3	4.2	3.9	4.0	4.1	4.3	
	mean±SD	3.98±0.43	3.96±0.44	4.0±0.37	3.92±0.32	3.84±0.29	3.78±0.11	3.96±0.30	3.94±0.23	3.98±0.23	
Control	1	3.8	2.5	2.4	2.5	2.7	2.5	2.5	2.4	2.5	
	2	3.9	2.6	2.4	2.9	3.0	2.6	2.5	2.6	2.7	
	3	4.3	3.2	3.0	3.4	3.2	2.9	2.8	2.7	2.5	
	4	3.0	2.3	2.3	2.5	2.6	2.7	2.5	2.6	2.4	
	5	4.2	2.9	2.4	2.6	2.7	2.9	2.6	2.4	2.5	
	mean±SD	3.84±0.51	2.70±0.35	2.50±0.28	2.78±0.38	2.84±0.25	2.72±0.18	2.58±0.13	2.54±0.13	2.52±0.11	
Glipizide	1	4.4	2.3	2.4	2.6	2.9	3.2	3.0	3.2	3.1	
	2	3.7	2.3	2.5	2.4	2.6	2.7	2.7	2.9	2.8	
	3	3.5	2.9	2.6	2.6	2.5	2.8	2.9	2.9	2.7	
	4	4.0	2.6	2.4	2.8	2.9	3.0	3.1	3.2	3.2	
	5	4.1	3.0	3.0	3.2	3.3	3.1	2.9	3.1	3.2	
	mean±SD	3.94±0.35	2.62±0.33	2.58±0.25	2.72±0.30	2.84±0.21	2.96±0.21	2.92±0.15	3.06±0.15	3.0±0.23	
Glipizide + SF	1	4.0	3.1	3.2	3.5	3.7	3.5	3.2	3.6	3.7	
	2	3.8	3.0	2.9	3.1	3.2	3.3	3.2	3.3	3.4	
	3	3.5	2.7	2.6	2.5	2.6	2.8	2.9	3.2	3.3	
	4	4.3	2.8	2.9	2.8	3.0	3.1	3.0	3.2	3.0	
	5	4.1	3.0	3.1	3.3	3.4	3.4	3.5	3.6	3.6	
	mean±SD	3.94±0.30	2.92±0.16	2.94±0.23	3.04±0.40	3.18±0.41	3.22±0.28	3.16±0.23	3.38±0.20	3.4±0.27	
SF	1	3.6	3.0	2.9	3.0	3.3	3.5	3.4	3.5	3.6	
	2	3.9	3.2	3.1	2.9	3.2	3.3	3.2	3.3	3.5	
	3	4.4	3.5	3.3	3.1	2.9	3.0	3.3	3.3	3.6	
	4	4.2	2.9	3.0	3.0	3.0	3.0	3.4	3.6	3.7	
	5	3.9	2.8	2.9	2.6	2.9	3.4	3.3	3.4	3.7	
	mean±SD	4.0±0.31	3.08±0.28	3.04±0.17	2.92±0.19	3.06±0.18	3.24±0.23	3.32±0.08	3.42±0.13	3.62±0.08	

Table 7 Effects of Glipizide and SF on activities of glutathion (GSH; mM)

		Day									
No		-7	0	4	8	12	16	20	24	28	
Blank	1	3.5	3.4	3.6	3.3	3.2	3.1	3.4	3.5	3.6	
	2	2.8	3.0	3.1	3.2	2.9	3.2	3.0	3.3	3.1	
	3	3.3	3.3	3.5	3.1	2.9	2.8	3.0	3.4	3.5	
	4	3.8	3.5	3.6	3.9	3.5	3.2	3.7	3.8	3.6	
	5	2.9	2.7	2.9	2.8	3.3	3.4	3.2	3.5	3.1	
	mean±SD	3.26±0.42	3.18±0.33	3.34±0.32	3.26±0.40	3.16±0.26	3.14±0.22	3.26±0.30	3.5±0.19	3.38±0.26	
Control	1	3.3	3.0	3.1	3.2	3.5	3.4	2.9	3.3	3.2	
	2	3.4	3.3	3.3	3.5	3.1	3.2	3.0	3.3	3.5	
	3	2.7	2.9	2.8	3.1	3.2	3.1	3.0	2.6	3.4	
	4	3.0	3.7	3.4	2.8	2.9	3.3	3.5	3.6	3.5	
	5	2.6	3.0	3.3	3.4	3.0	2.8	2.6	3.5	2.9	
	mean±SD	3.0±0.35	3.18±0.33	3.18±0.24	3.2±0.27	3.14±0.23	3.16±0.23	3.0±0.32	3.26±0.39	3.3±0.25	
Glipizide	1	2.7	3.0	3.3	3.1	3.4	3.1	3.5	3.7	3.0	
	2	3.0	2.6	2.9	3.2	3.2	3.5	2.9	3.0	2.8	
	3	2.9	2.8	3.2	3.4	3.3	3.5	3.0	3.0	3.2	
	4	3.4	3.5	3.2	3.6	3.0	2.9	3.5	3.4	3.3	
	5	3.5	3.5	3.6	3.2	3.7	3.0	2.9	3.3	3.4	
	mean±SD	3.1±0.34	3.08±0.41	3.24±0.25	3.3±0.2	3.32±0.26	3.2±0.28	3.16±0.31	3.28±0.29	3.14±0.24	
Glipizide + SF	1	2.6	3.4	3.5	3.2	3.3	3.5	2.9	3.0	3.3	
	2	2.9	3.0	3.1	3.3	3.3	3.4	2.9	2.8	3.2	
	3	3.6	3.5	3.3	3.0	2.9	2.8	3.3	3.4	3.2	
	4	3.2	3.3	3.4	3.5	3.4	3.6	3.7	3.1	3.4	
	5	3.1	2.7	2.8	3.0	3.2	3.3	3.5	3.4	3.5	
	mean±SD	3.08±0.37	3.18±0.33	3.22±0.28	3.2±0.21	3.22±0.19	3.32±0.31	3.26±0.36	3.14±0.26	3.32±0.13	
SF	1	3.5	3.1	3.0	3.4	3.5	3.3	3.2	2.9	3.3	
	2	3.1	2.6	2.9	3.2	3.1	3.0	2.9	3.4	4.2	
	3	3.1	3.0	2.9	3.4	3.4	3.2	3.3	3.4	3.6	
	4	2.8	2.5	2.9	3.0	3.4	2.8	3.3	3.2	3.1	
	5	2.8	2.9	2.7	3.0	3.1	3.2	3.2	3.0	2.7	
	mean±SD	3.06±0.29	2.82±0.26	2.88±0.11	3.2±0.2	3.3±0.19	3.1±0.2	3.18±0.16	3.18±0.23	3.38±0.56	

Table 8 Effects of Glipizide and SF on activities of nitrite (NO;  $\mu\text{M}$ )

		Day	-7	0	4	8	12	16	20	24	28
No											
Blank	1		15.0	16.7	17.5	16.1	19.8	16.4	17.7	15.4	18.9
	2		17.7	16.8	18.8	15.4	13.2	14.3	15.6	17.3	15.8
	3		14.3	14.4	13.2	14.3	15.3	16.4	14.9	16.7	17.1
	4		16.8	17.1	18.6	16.5	14.5	15.0	16.2	17.3	15.2
	5		13.3	14.5	15.6	14.3	13.8	14.2	17.4	15.6	16.8
		mean $\pm$ SD		15.42 $\pm$ 1.80	15.9 $\pm$ 1.33	16.74 $\pm$ 2.35	15.32 $\pm$ 1.01	15.32 $\pm$ 2.62	15.26 $\pm$ 1.08	16.36 $\pm$ 1.18	16.46 $\pm$ 0.91
Control	1		17.1	23.6	30.5	34.2	32.1	33.2	29.8	26.4	27.9
	2		16.3	27.4	31.2	32.8	29.4	30.1	32.0	27.4	29.6
	3		13.8	22.5	27.6	29.5	30.4	31.2	29.1	28.6	30.3
	4		12.3	25.6	34.5	33.6	34.6	33.8	35.3	32.1	30.4
	5		14.5	27.9	35.4	36.7	32.3	33.4	31.3	32.5	33.8
		mean $\pm$ SD		14.8 $\pm$ 1.93	25.4 $\pm$ 2.34	31.84 $\pm$ 3.16	33.26 $\pm$ 2.60	31.76 $\pm$ 1.99	32.34 $\pm$ 1.60	31.5 $\pm$ 2.42	29.4 $\pm$ 2.76
Glipizide	1		16.4	30.5	29.5	31.2	33.6	33.4	32.1	31.4	29.7
	2		15.9	29.4	32.7	33.4	36.7	31.2	33.5	31.9	29.6
	3		13.7	31.6	33.5	34.1	32.5	33.5	29.1	30.3	32.1
	4		14.2	26.3	30.5	31.6	33.7	37.8	31.6	33.5	34.1
	5		14.3	25.6	34.3	32.6	29.4	33.5	34.6	31.2	27.5
		mean $\pm$ SD		14.9 $\pm$ 1.18	28.68 $\pm$ 2.62	32.1 $\pm$ 2.03	32.58 $\pm$ 1.21	33.18 $\pm$ 2.63	33.88 $\pm$ 2.40	32.18 $\pm$ 2.09	31.66 $\pm$ 1.18
Glipizide + SF	1		14.5	32.4	30.1	29.4	33.2	31.5	30.7	26.5	22.3
	2		14.1	29.5	28.5	30.2	31.2	30.7	25.4	23.2	21.4
	3		13.9	36.5	35.9	32.4	33.3	31.0	28.9	25.4	25.6
	4		12.2	30.6	35.3	34.4	30.1	31.5	29.8	28.1	24.6
	5		15.7	29.7	34.8	35.7	31.4	30.0	26.5	25.4	25.9
		mean $\pm$ SD		14.08 $\pm$ 1.26	31.74 $\pm$ 2.9	32.92 $\pm$ 3.38	32.42 $\pm$ 2.68	31.84 $\pm$ 1.38	30.94 $\pm$ 0.63	28.26 $\pm$ 2.24	25.72 $\pm$ 1.79
SF	1		16.1	36.7	32.4	33.5	31.3	28.9	25.4	24.8	22.6
	2		14.0	29.5	32.5	32.7	33.4	29.6	29.1	24.5	23.7
	3		13.8	30.5	31.3	29.5	28.5	29.3	27.4	26.1	24.2
	4		15.5	27.6	32.9	33.5	31.2	33.3	30.2	28.3	25.1
	5		13.6	34.4	32.1	30.4	29.3	27.6	24.1	25.3	23.8
		mean $\pm$ SD		14.6 $\pm$ 1.12	31.74 $\pm$ 3.72	32.24 $\pm$ 0.6	31.92 $\pm$ 1.86	30.74 $\pm$ 1.92	29.74 $\pm$ 2.13	27.24 $\pm$ 2.52	25.8 $\pm$ 1.52

## 分項計畫二：以體內及體外試驗模式探索 大黃及何首烏對 phenytoin 動力學之影響

江秀梅

中國醫藥大學

### 摘 要

大黃為掌葉大黃 *Rheum palmatum* L. 的乾燥根及根莖，何首烏 (*Polygonum multiflorum* thunb) 與之俱為蓼科植物，常用於清熱泄火潤便，具止痛、消腫、促進血液循環及降血脂之作用。其所含成分主要為蒽醌類，包括蘆薈大黃素 (aloe-emodin)、大黃酸 (rhein)、大黃素 (emodin)、大黃酚 (chrysophanol)。同為蓼科植物之，常用於解毒、消癰、腸燥便秘、補肝腎、益精血、烏鬚髮、壯筋骨。其成分亦含大黃酸 (rhein)、大黃素 (emodin)、大黃酚 (chrysophanol) 及大黃素甲醚 (physcion) 等蒽醌類。二者皆為臨床或保健常用之中草藥。Phenytoin (PHT) 用於治療除失神性癲癇外之各型癲癇及心律不整，治療指數狹窄，血中濃度過高易致神經及心血管毒性，長期使用癲癇藥物，往往因產生抗藥性而降低其療效。血腦障壁上分佈的 P-glycoprotein (Pgp) 與 multidrug resistance proteins (MRPs) 之過度表現與其抗藥性有關，另有研究指出 MRP1 與 MRP2 是其中主要的表現蛋白。蒽醌化合物主要以硫酸及葡萄糖醛酸結合態代謝物循環於血流中，此些結合態代謝物之轉運、外排與 MRP1、MRP2、MRP3 等運送蛋白有關，而 PHT 之轉運、外排則與 MRP1、MRP2 等運送蛋白有關。吾人推測多酚化合物與 PHT 併服時會競爭 MRP1 及 MRP2，可能導致動力學交互作用。迄今文獻中並無有關中草药與 PHT 動力學交互作用之報導。因此，本研究擬以大鼠為模型，探討併服富含蒽醌類之大黃與何首烏對 PHT 動力學之影響。本計畫以交叉設計，予大鼠分別單獨口服 PHT 及分別併服大黃與何首烏水煎劑，定時自心臟穿刺採血，以 HPLC 定量 PHT 之血中濃度。血中藥物濃度數據以 WINNONLIN 軟體計算動力學參數，並以 ANOVA 及 Scheffe's 事後分析，統計各組間差異。結果顯示，併服高劑量大黃水煎劑 (4.0 g/kg) 顯著降低 PHT 之清除率及平均滯留時間，至於低劑量則無顯著影響。另併服何首烏水煎劑，低劑量 (2.0 g/kg) 致 PHT 最高血藥濃度及曲線下面積降低，清除率提高；高劑量 (4.0 g/kg) 則致 PHT 最高血藥濃度降低及清除率提高。至於交互作用之機轉研究，以 Rhodamine 123 為受質，測試其於 MDCK 細胞之排出及細胞內殘留量，結果顯示何首烏可抑制 Rhodamine 123 之外排，何首烏於培養

10 分鐘時可抑制其細胞內殘留量。本研究結果發現併服富含蔥醌中藥對將影響 PHT 之動態學，長期服用 PHT 病患應避免併服。

關鍵詞：藥物交互作用、藥物動力學、蔥醌、MDCK、Rhodamine 123

Number: CCMP95-TP-034

# **Studies on the Antioxidative and Hypoglycemic action of Oral Anti-diabetic Drug combined with Sophorae flos in Streptozotocin-induced Diabetic Rat**

Hsiu-Mei, Chiang  
China Medical University

## **ABSTRACT**

Rhubarb is the dry root of *Rheum palmatum* L. (Polygonaceae) (RP). Anthraquinones including aloe-emodin, rhein, emodin and chrysophanol are the active constituents of rhubarb. It was commonly employed for relieving constipation by purgation, clearing away heat and toxins, purging fire, promoting blood circulation, normalizing functioning of the gallbladder and curing jaundice. *Polygonum multiflorum* (PM) is an herb with similar components and uses for stroke. Phenytoin (PHT) is used as an antiepileptic drug for generalized tonic-clonic seizure with narrow therapeutic window. Supratherapeutic level often induced neurotoxicity. Drug resistance always caused poor efficacy of antiepileptics and the overexpressions of Pgp and MRPS at BBB were associated to the resistance. In addition, MRP1 and MRP2 were reported the major protein expressed in this drug resistance. In our previous study, polyphenols were found predominantly as sulfates and glucuronides in the bloodstream, instead of their aglycones. The conjugated metabolites were reported as substrates of multidrug resistance proteins (MRPs) and organic anion transporters (OATs). Phenytoin is a substrate of MRPs and Pgp. The sulfates and glucuronides of polyphenols may compete for the transporters with phenytoin. This study will investigate the effects of RP and PM decoction on the pharmacokinetics of phenytoin in rats. The blood concentration of PHT was determined by a HPLC method and the pharmacokinetic parameters were calculated using noncompartment model of WINNOLIN. The results indicated that coadministered with RR (4.0 g/kg) would decrease Cl and MRT of PHT. In addition, coadministered with 4.0 g/kg PM would decrease  $C_{max}$  and increase Cl, 2.0 g/kg PM would reduce  $C_{max}$  and AUC, and increase CL. The mechanisms of these herb – drug interactions was investigated using MDCK,

cells expressing Pgp, and its substrate Rhodamine 123. PM would inhibit the efflux of Rhodamine 123. Through this study, it is important to avoid coadministering RP or PM with PHT.

Keywords: drug interaction, pharmacokinetic, anthraquinone, MDCK, Rhodamine 123

## 壹、前言

大黃為蓼科植物掌葉大黃*Rhenm palmatum L.*、唐古特大黃*R. tanguticum Maxim. Ex Balf.*的乾燥根及根莖（行政院衛生署，2004a）。大黃性味苦寒、入脾、胃、大腸、肝、心經，能瀉下攻瘀、清熱瀉火、解毒活血祛瘀。《神農本草經》：「大黃味苦寒，主下瘀血，血閉寒熱，破癥瘕積聚，留飲宿食，蕩滌腸胃，推陳致新，通利水穀，調中化食，安和五臟。」《日華子本草》：「通宣一切氣，調血脈，利關節，泄壅滯水氣，四肢冷熱不調，溫瘴熱疾，並敷一切瘡癰癩毒。」《本草綱目》：「下痢赤白，裡急腹痛，小便淋瀝，實熱燥結，潮熱譫語，黃疸，諸火瘡。」

大黃約含3.5~5%蒽醌類衍生物(anthraquinones)，如蘆薈大黃素(aloe-emodin)、大黃酸(rhein)、大黃素(emodin)、大黃酚(chrysophanol)及結合型態之蒽醌類衍生物如aloe-emodin 1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside、rhein 1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside、emodin 1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside、emodin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside、emodin 8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside，另含senoside A, B, C, D, E, F、flavonoids、tannin、catechin，脂肪酸如棕櫚酸、硬脂酸、油酸、亞麻酸等、有機酸及無機元素等(徐等，1996；鄭等，1996，焦等，2000；顏等，1996)。動力學研究發現，rhein是唯一以原型吸收之蒽醌類衍生物(Takizawa et al., 2003)，其餘之蒽醌類衍生物於體內多以其硫酸或葡萄糖醛酸之結合態代謝物存在於血液循環中。

何首烏亦為蓼科(Polygonaceae)植物，其為*Polygonum multiflorum*的塊根（行政院衛生署，2004b），性溫味苦、甘澀，入肝腎經。生首烏味苦澀性平，具潤腸解毒截瘡之功，消癰、通便，用於瘰癧瘡癰、風疹膚癢、腸燥便秘；製首烏味苦澀性溫，具補肝腎、烏鬚髮、益精血、悅顏色、壯筋骨。此藥用於血虛萎黃，腰膝酸軟、遺精帶下、肝腎不足、頭目眩暈、鬚髮早白、久瘡、癰疽瘰癧、腸燥便秘等。亦具有降血脂、降低血清膽固醇與減輕動脈粥狀硬化的作用，可應用於高血壓、冠狀動脈硬化性心臟病等。

何首烏含有蒽醌類成分(anthraquinones)（徐等，1996），如大黃酸(rhein)、大黃素(emodin)、大黃酚(chrysophanol)、大黃素甲醚(phycion)等，另含二苯乙烯苷2,3,5,4'-tetrahydrosystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside、tannin、卵磷脂、多糖化合物、微量成分如錳、鈣等成分（李與林，2005；Liu et al., 2005）。

血腦障壁(blood brain barrier; BBB)是血液循環與腦部間之生理及代謝屏障，可選擇性地讓物質通過。一般物質要通過BBB須具備脂溶性高、分

子小的性質，或是經由特殊之運輸蛋白運送(Hoffmann and Loscher, 2007; Pardridge, 1999)。而BBB上存在多種之運輸蛋白，如P-glycoprotein (Pgp)、multidrug resistance proteins (MRPs)、organic anion transporters (OATs)等，部分具傳入(influx)功能，如MRP4及MRP5，其他則具傳出(efflux)功能，如Pgp及MRP2，這些運輸蛋白負責管控物質進出腦部，以保護腦部。長期使用抗癲癇藥物後，所引起之抗藥性常是造成癲癇治療效果不佳之主因，此與BBB上的Pgp與MRPs過度表現有關(Loscher, 2007; Loscher and Potschka, 2005)，另有研究指出MRP1與MRP2是其中主要的表現蛋白(Dombrowski et al., 2004)。另有研究指出對PHT具抗藥性之病人，其腦部血管內皮細胞之過度表現MRP2，顯示PHT應為MRP2之受質(Potschka et al., 2003)。

Phenytoin (PHT)為常用之抗癲癇藥，用於除失神性癲癇外之多數癲癇，如癲癇重積狀態及強直陣攣型癲癇(大發作)等，並用於治療心律不整。口服後吸收緩慢但完全，於人體之平均半衰期為22小時(12~36小時)，血峰時間為4~8小時，蛋白質結合率為80~90%，主要與albumin結合，於血中的有效治療濃度為10~20 µg/mL (Neels et al., 2004)，其動力學呈現非線性動力學，95%以上之PHT由肝臟內質網之cytochrome P450代謝，主要為CYP2C9/10，少部分由CYP2/C19 (Brandolese et al., 2001)，主要代謝產物為不具活性之5-*p*-hydroxyphenytoin，僅少量以原型由尿液排出。因其治療指數狹窄，臨床上必須進行血中濃度監測。當血中濃度過高時，會有神經毒的副作用產生，如困倦、腹瀉、震顫、認知困難、運動失調、昏睡及複視等，另有低血壓、牙齦增生、惡性貧血、高血糖、低血鈣，並有致畸胎之報告。

本研究室先前研究結果顯示，葛根與MRPs之受質藥物methotrexate (MTX)併服時，導致大鼠MTX血中濃度升高，毒性增加，甚至造成死亡(Chiang et al., 2005)，此交互作用推測應與異黃酮與MTX競爭MRPs等運送蛋白相關。因此吾人臆測大黃及何首烏水煎劑與PHT併服時，其蒽醌多醣之結合態代謝物亦可能與PHT競爭MRP2及MRP3等運輸蛋白，可能導致動力學交互作用。因此，本研究擬以大鼠為模型，探討大黃及何首烏水煎劑對PHT血液及腦部動力學之影響。

為進一步瞭解大黃及何首烏水煎劑對PHT腦中濃度之影響，將事先分別給予大鼠口服MRPs之抑制劑probenecid，再給予中藥水煎劑與PHT，而對照組則不服中藥水煎劑，以瞭解其發生之交互作用是否與此兩類運輸蛋白相關。

近年中草藥之使用無論於國內外已極為普遍(行政院衛生署中醫藥委員會, 2004d)，一般大眾對於中草藥之認知為不具毒性或副作用較低，因而忽

略其使用之潛在危險，近十年來亦發生多起並用中草藥與西藥而引發之嚴重交互作用(Miker, 2005)，在國內，國人使用中藥與西藥併用的機率更勝於國外，因而交互作用之風險急待評估及探索(行政院衛生署中醫藥委員會，2004c，2005a)，而中藥之用藥安全更成為國家醫藥政策之重要項目(行政院衛生署中醫藥委員會，2005b，2006)。大黃為清熱瀉下之劑，用於瀉火解瘡癰；而何首烏為補養滋陰之藥，常用於燉補及做為健康食品，因而併用之機率亦不低。本計畫預期可瞭解併服大黃及何首烏對PHT之血中及腦中動力學之影響，對長期服用PHT病患之臨床療效與安全具參考價值，而體內與體外試驗研究亦將釐清交互作用之機轉，以提供動物體內中西藥交互作用的實證依據。

## 貳、材料與方法

### 一、藥材之採購、基原鑑定與水煎劑之製備

購自中藥局之大黃及何首烏藥材，經五官及顯微鑑定基原後，依傳統煎煮法製備水煎劑。將大黃及何首烏藥材分別加入 20 倍水，煎煮至一半體積，以紗布濾去藥渣後，再繼續濃縮至低於兩倍體積，而後加水至每毫升含 0.5 g 藥材，並分裝貯存於-20℃。

### 二、大黃及何首烏水煎劑中蒽醌類成分之定量方法及確效

建立 HPLC 分析方法並進行確效，定量其中 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及 physcion 等指標成分含量後，供動物口服實驗用。

#### (一)水煎劑中蒽醌非糖體之定量

取水煎劑 1.5 mL，加入 1.0 mL 內標準甲醇溶液(50 µg/mL)，以甲醇定容至 10.0 mL，振盪混合均勻，離心 15 分鐘(9,860g)，取其上清液，經微孔過濾器(0.45 µm)過濾後，取 20 µL 濾液注入 HPLC 分析，以檢品中 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及 physcion 與內標準之波峰面積比值代入各成分之檢量線方程式，求出檢品中 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及 physcion 之含量。

#### (二)高效液相層析儀(HPLC)之分析條件

層析管：Apollo 5C18-AR II，5 µm，4.6×250 mm

移動相：Methanol 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

57:43 (0 min), 57:43 (3 min), 90:10 (20 min), 90:10 (35 min),  
57:43 (40min), 57:43 (50 min)

流速：1.0 mL/min

檢測波長：254 nm

內標準：butylparaben (4 µg/mL)

#### (三)檢量線之繪製

分別取適量之 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及 physcion 貯存溶液，加入適量之 2-methylantraquinone 內標準甲醇溶液(0.05 mg/mL)，再以甲醇稀釋使 aloe-emodin 標準溶液之濃度為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 50.0 µg/mL，rhein 為 6.2、12.5、25.0、50.0、100.0、150.0 及 200.0 µg/mL，emodin 為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 50.0 µg/mL，chrysophanol 為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 50.0 µg/mL，physcion 為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 50.0 µg/mL，2-methylantraquinone 為 5.0 µg/mL。其

中 20  $\mu$ L 經 HPLC 分析後，所得標準品與內標準之波峰面積比值，與其各標準品之濃度進行直線迴歸，求得各成分之檢量線方程式。

#### (四)分析系統及方法之確效

##### 1. 精密度(Precision)

將不同濃度之 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及 physcion 標準溶液，於同日內晨、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，然後將所得波峰面積比值代入先前獲得的迴歸直線方程式，求得每次的實測濃度值，再分別求其平均值(mean)、標準偏差(standard deviation, S.D.)及變異係數(coefficient of variation, C.V.)。

##### 2. 靈敏度(Sensitivity)

將 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及 physcion 標準品濃度一再稀釋，直至其波峰面積與雜訊面積之比值為 3 時之濃度為其偵測極限(LOD, Limit of detection)。

##### 3. 準確度(Accuracy)

以三次同日內及三次異日間實測所得平均濃度與真正濃度間之相對誤差(relative error)表示之。

##### 4. 回收率(Recovery)

取已測定 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及 physcion 含量之水煎劑檢品 1.5 mL 各三份，分別加入 1 mL 內標準甲醇溶液(2-methyanthraquinone, 50.0  $\mu$ g/mL)，再加入適量之三種已知濃度之標準品溶液，最後以甲醇定容至 10.0 mL，振盪混合均勻，高速離心 15 分鐘(9,860g)，然後分別層析定量，將計算所得之增加量除以標準品之添加量以百分比表示即為回收率。

### 三、動物及給藥

#### (一)口服給藥

##### 1. 大黃水煎劑

Sprague-Dawley 大鼠每組至少 6 隻，體重介於 250~350 g。實驗前禁食 12 小時，採隨機方式將大鼠分組，一組以胃管先口服給予 1.0 g/kg 大黃水煎劑後，立即口服給予 PHT (400 mg/kg)，另一組則先口服給予 2.0 g/kg 大黃水煎劑後，立即口服給予 PHT，控制組先口服給予等體積的水後，立即口服給予 PHT，待 wash-out 之後，各組交叉試驗。抽血時間、抽血量及 wash-out

所需時間，將經由預試驗決定。

## 2. 何首烏水煎劑

實驗設計與大黃水煎劑大致相同，何首烏水煎劑之劑量為 1.0 g/kg 及 2.0 g/kg。

### (二) 靜脈注射給藥

SD 大鼠體重介於 250~350 g。實驗前禁食 12 小時，採隨機方式將大鼠分組，大鼠靜脈注射給予 PHT 後，立即以胃管分別口服給予大黃或何首烏水煎劑；控制組靜脈注射 PHT 立即給予等體積的水，待 wash-out 之後，各組交叉試驗。

## 四、採血

大鼠於給藥後適當時間，由心臟穿刺採血，每次採血量為 0.4ml，置於微量離心管，經離心後取血清，貯存於 -70°C 待分析。採血時間點將經由預試驗決定。

## 五、血清中 PHT 濃度之定量

本計畫將利用自行開發之 HPLC 方法測定血清中 PHT 之濃度。

層析管：COSMOSIL 5C18-AR II，5  $\mu$ m，4.6×250 m.m.

移動相：CH<sub>3</sub>CN : 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (移動相組成及比例，經預試驗後決定)

流速：1.0 mL/min

檢測波長：210 nm

## 六、交互作用之機轉研究

### (一) Uptake study

1. 於 12 well 培養盤種入細胞，每孔  $1 \times 10^5$ /ml。
2. 細胞培養適當時間。每兩天換一次培養液(Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), foetal bovine serum, non-essential amino acid solution, penicillin and streptomycin)，並在進行實驗前一天更換培養液。
3. 實驗前移去培養液快速以 transport buffer (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), Hepe, Glucose) (預先於 37°C 水浴鍋回溫) 潤洗之後移去 transport buffer。
4. 加入 transport buffer 培養 30 分鐘後移去 transport buffer。
5. 接著加入含 10~100  $\mu$ M PHT (溶於 transport buffer/MeOH (99/1, v/v))，培養 30 分鐘至飽和，為控制組。給藥組為中藥製備物。空白對照組則加入相對量的溶媒。
6. 依設計的時間點移去 WELL 中之溶液，加入冰的 transport buffer

清洗三次。

7. 加 400  $\mu$ L 0.3N NaOH 溶解細胞，再以 200  $\mu$ L 0.3N HCl 中和之。
8. 溶解液以等體積之乙酸乙酯萃取，離心。
9. 取等體積之乙酸乙酯層，用氮氣吹乾，儲存於-80°C。
10. 以含內部標準品之甲醇溶解，HPLC-UV 分析。

## (二)Efflux study

同 uptake study1. ~6.

1. 置入 transport buffer 依設計時間點將 WELL 內的 transport buffer 完全收集，接著以 0.3N NaOH 溶解細胞，再以 0.3N HCl 中和之。
2. 收集之 transport buffer 與溶解液以等體積含內部標準品之乙酸乙酯萃取，離心。
3. 取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾，儲存於-80°C，待 HPLC-UV 分析。

## (三)Bradford protein-binding assay

1. 於 96 孔盤之各 well 中，加入 Sigma Dye Reagent Diluted Regagent 250  $\mu$  L。
2. Efflux study 實驗中的細胞溶解液分別取 5  $\mu$  L，加入每個 well 中。
3. 於 ELISA reader 上 shake 30 秒後，於室溫下靜置 10 分鐘，以 570 nm 測吸光值。
4. 利用製備之 Bovine serum albumin 系列標準溶液，加入蛋白質染劑 (Bradford reagent, Sigma) 靜置反應 5~10 分鐘，以 ELISA reader 於 570 nm 檢測吸光值，製作檢量線，以內插法求得各細胞溶解液樣品之蛋白質濃度。

## 七、數據處理及統計分析

利用 WINNONLIN 程式計算藥動學參數，以 ANOVA 變異數分析，比較藥動學參數之組間差異。

## 參、結果與討論

大黃、何首烏水煎劑檢品中蒽醌成分之定量，本研究利用 HPLC 方法定量標準品、大黃、何首烏水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及 physcion 之含量，由於有效成分之極性相差頗大，所以採用梯度沖提的方式，波峰分離效果良好，層析圖如 Fig. 1-3 所示。

大黃水煎劑中 rhein、emodin、aloe-emodin、chrysophanol 及 physcion 5.77, 1.82, 0.43, 1.10 及 0.39  $\mu\text{mol/g}$ ，如 Table 1 所示；至於何首烏水煎劑則含 8.25  $\mu\text{mol/g}$  emodin 及 1.70  $\mu\text{mol/g}$  physcion，如 Table 2 所示。定量結果顯示水煎劑中，此五種蒽醌含量以 rhein 最多，其次為 emodin、aloe-emodin，以 physcion 量最少。

為了確認此定量分析方法的精密度(precision)及準確度(accuracy)，分別進行了同日(intraday)及異日間(interday)的精確度試驗，結果如 Table 1-2~5 所示。結果顯示定量 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之方法在同日內及異日間皆有良好之精確度，其變異係數(C.V.)值均小於 10%，相對誤差(relative error)均小於 20%。水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之回收率(recovery)分別為 100.9~104.3%、108.6~111.7%、101.4~105.1%、96.5~104.7%，如 Table 4-6 所示。此外，aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之最低可定量極限(LLOQ)分別為 1.2、6.2、1.2 及 1.2  $\mu\text{g/mL}$ ，可偵測極限(LOD)分別為 0.03、0.06、0.04 及 0.01  $\mu\text{g/mL}$ 。確效結果顯示本分析系統之精密度、準確度及回收率皆良好。

本計畫案完成大黃及何首烏之水煎劑之定量分析，為建立良好分析方法以進行大黃及何首烏水煎劑之蒽醌類化合物之定量，而所建立之高效液相層析梯度沖提之條件經檢測結果精密度、確效及回收率均良好，顯示此一系統為合適之分析方法，可應用於類似成分藥材之分析。

以交叉設計單服 PHT 與併服大黃水煎劑(4.0 g/kg 及 2.0 g/kg)，血清中 PHT 之濃度及血藥經時變化如 Fig. 4 所示，三條血藥曲線於給藥後幾乎重疊。其動力學參數參照 Table 7，單服 PHT 之平均血藥面積為  $37890.1 \pm 6323.6 \mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ ，平均 CL/F 為  $3.1 \pm 1.6 \text{ mL/min}$ ，平均滯留時間為  $2067.5 \pm 456.7 \text{ min}$ ；而併服 4.0 g/kg 大黃水煎劑之 PHT 平均血藥面積為  $35967.5 \pm 12429.4 \mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ ，平均 CL/F 為  $2.4 \pm 1.0 \text{ mL/min}$ ，平均滯留時間為  $1984.8 \pm 353.3 \text{ min}$ ；至於併服 2.0 g/kg 大黃水煎劑之平均血藥面積為  $34013.0 \pm 4500.7 \mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ ，平均 CL/F 為  $3.4 \pm 2.2 \text{ mL/min}$ ，平均滯留時間為  $1982.0 \pm 288.9 \text{ min}$ 。比較三組間之動力學參數顯示，併服 2.0 g/kg 大黃水煎劑時，對 PHT 之血中濃度並無顯著影響，而 4.0 g/kg 大黃水煎劑時 CL/F 與平均滯留時間均顯著降低（如 Table 7）。

另外交叉設計單服 PHT 與併服何首烏水煎劑 (4.0 g/kg 及 2.0 g/kg)，

血清中 PHT 之濃度及血藥經時變化如 Fig. 5 所示，三條血藥曲線於給藥後八小時，但前六個小時，併服何首烏水煎劑降低 PHT 血中濃度，但未達顯著差異。其動力學參數參照 Table 8，單服 PHT 之平均血藥面積為  $53325.0 \pm 1767.3 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$ ，平均 CL/F 為  $2.4 \pm 1.1 \text{ mL}/\text{min}$ ，平均滯留時間為  $1979.5 \pm 465.4 \text{ min}$ ；而併服 4.0 g/kg 何首烏水煎劑之 PHT 平均血藥面積為  $44783.4 \pm 17264.9 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$ ，平均 CL/F 為  $4.1 \pm 1.3 \text{ mL}/\text{min}$ ，平均滯留時間為  $1991.4 \pm 268.1 \text{ min}$ ；至於併服 2.0 g/kg 大黃水煎劑之平均血藥面積為  $43510.8 \pm 10419.1 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$ ，平均 CL/F 為  $3.4 \pm 0.7 \text{ mL}/\text{min}$ ，平均滯留時間為  $2019.1 \pm 545.3 \text{ min}$ 。比較三組間之動力學參數顯示，併服 2.0 g/kg 何首烏水煎劑時，可顯著降低 PHT 之最高血中濃度、平均血藥面積與 CL/F 並無顯著影響，而 4.0 g/kg 何首烏水煎劑時 CL/F 與最高血中濃度均顯著降低(如 Table 8)。

而有關大黃與 PHT 水煎劑交互作用機轉之部分，以腎臟細胞 MDCK 對於 Rhodamine 123 外排之影響進行相關機轉之探討。於預試驗中發現(Fig. 6-8)，MDCK 以培養 Rhodamine 123 培養之經時變化圖發現，於 40 分鐘濃度達最高濃度，因此以 40 分鐘進行進一步之研究，另外亦進行何首烏水煎劑與 MDCK 之培養，研究其對於 Rhodamine 123 外排之影響，並以 verapamil 為正對照組。結果發現何首烏培養十分鐘其細胞中 Rhodamine 123 殘留量較空白組為低，但其餘時間點均未見顯著差異。至於量測培養基中釋出之 Rhodamine 123 量發現，首烏可抑制 MDCK 之 Rhodamine 123 外排，致其釋出至培養液中之 Rhodamine 123 的量均較其他各組為低，此結果與動物體內之結果不符。PHT 除為 MRP、Pgp 受質外，其代謝亦受 cytochrom 3A4 及 2C9 之影響(Hoffmann and Loscher, 2007; Loscher, 2007; Loscher and Potschka, 2005; Pardridge, 1999)，因此其他之機轉應可再更進一步深入研究。

本實驗室近年來針對含多酚類的中草藥進行代謝動力學研究，如富含黃酮類的槐花、黃芩，富含異黃酮的葛根與大豆及富含蒽醌類的大黃，結果皆顯示多酚化合物於體內主要代謝轉化為 sulfates 與 glucuronides 等結合態代謝物，這些代謝物於生物體內以陰離子存在，成為 MRPs、OATs 等運輸蛋白之受質。反觀西藥中有許多陰離子藥物或陰離子代謝物已知為 MRPs、OATs 等運輸蛋白之受質。這些運輸蛋白的運送功能都屬易飽和的途徑，因此，可以預期當富含多酚的中草藥或保健食品與陰離子西藥併用時，將相互競爭運輸蛋白，而導致藥物滯留體內，恐有增強毒性之虞；另者，亦可由此交互作用，找尋可提高藥物血中濃度之中藥，以減少藥物之使用量及毒性。併服大黃及何首烏水煎劑，將降低 PHT 之血中濃度及降低其暴露，因此癲癇病人若併服此些中草藥水煎劑應特別注意分開使用，至於作用機轉之研究模式之建立，更有助於未來對於類似性質之藥物或成分與西藥交互作用之預測，因此此成果應用於相關中西藥交互作用機轉結構與效應關係資料庫之建立。

## 肆、結論與建議

- 一、本計畫建立大黃及何首烏水煎劑之定量方法，其分析系統之確效及精密良好，應可提供類似成分製劑定量之參考。
- 二、併服大黃及何首烏水煎劑，將降低 PHT 之血中濃度及降低其暴露，因此癲癇病人若併服此些中草藥水煎劑應特別注意分開使用。
- 三、本計畫進行大黃及何首烏水煎劑與 PHT 之交互作用研究將可提供臨床及民眾用藥安全之參考。
- 四、本研究所建立之交互作用動物及體外作用機轉研究模式，可應用於相關之研究及中西藥交互作用發生之預測。
- 五、PHT 除為 MRP、Pgp 受質外，其代謝亦受 cytochrom 3A4 及 2C9 之影響，因此其他之機轉應可再更進一步深入研究。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP95-TP-034 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 伍、參考文獻

1. 行政院衛生署。中華中藥典，pp7-8，2004a。
2. 行政院衛生署。中華中藥典，pp80-81，2004b。
3. 行政院衛生署中醫藥委員會。中藥用藥安全與實務，2005a。
4. 行政院衛生署中醫藥委員會。台灣中醫藥發展策略與成果：行政院衛生署中醫藥委員會成立十週年特輯，2005b。
5. 行政院衛生署中醫藥委員會。行政院衛生署中醫藥委員會學術暨臨床應用研討會成果彙編(2005)，2006。
6. 行政院衛生署中醫藥委員會。建構台灣中藥用藥安全環境，2004c。
7. 李健北、林茂。何首烏化學成分研究。中草藥。24: 115, 1993。
8. Brandolese R. Scordo MG. Spina E. Gusella M. Padrini R. Severe phenytoin intoxication in a subject homozygous for CYP2C9\*3. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 70(4): 391-394, 2001.
9. Chao PDL, Hsiu SL and Hou YC. Flavonoids in Herbs: Biological Fates and Potential Interactions with Xenobiotics. *J Food Drug Anal*. 11, 135-145, 2002.
10. Chiang HM, Fang SH, Wen KCg, Hsiu SL, Tsai SY, Hou YC, Chi YC and Chao PD. Life - threatening interaction between the root extract of *Pueraria lobata* and methotrexate in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 209: 263-268, 2005.
11. Dombrowski SM. Desai SY. Marroni M. Cucullo L. Goodrich K. Bingaman W. Mayberg MR. Benitez L. Janigro D. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*. 42(12): 1501-1506, 2001.
12. Hoffmann K. Loscher W. Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR(-) rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats. *Epilepsia*. 48(4):631-45, 2007.
13. Liu ZL. Song ZQ. Zhang L. Li SL. Influence of process methods on contents of chemical component *Radix Polygoni Multiflori*. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 30(5):336-40, 2004.
14. Loscher W. Drug transporters in the epileptic brain. *Epilepsia*. 48 Suppl 1:8-13, 2007.
15. Miller LG. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on

- known or potential drug-herb interactions. *Archives of Internal Medicine*. 158(20):2200-2211, 1998.
16. Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, Scharpe SL, Hatfield GM, Lambert WE. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*. 42(11): 1228-1255, 2004.
17. O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 65(3): 479-491, 2003.
18. Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of Neurovirology*. 5(6):556-69, 1999
19. Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 306(1): 124-131, 2003
20. Takizawa Y, Morota T, Takeda S, Aburada M. Pharmacokinetics of rhein from Onpi-to, an Oriental herbal medicine, in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 26(5):613-7, 2003
21. Zeng H, Liu G, Rea PA, Kruh GD. Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Research*. 60: 4779-4784, 2000.
22. Zhou S, Lim LY, Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metabolism Reviews*. 36(1):57-104, 2004

陸、圖、表

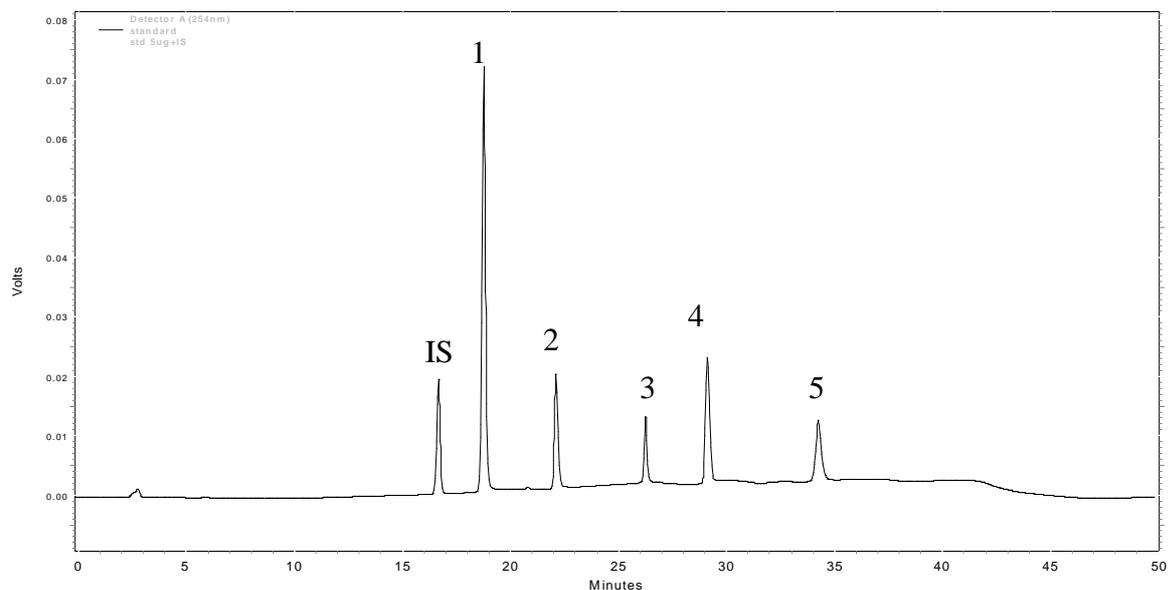


Fig 1 HPLC chromatograph of standards of *Rheum officinale* Baill. and *Polygonum multiflorum* Thunb. 1. aloe-emodin 2. rhein 3. emodin 4. chrysophanol 5. physcion IS : butylparaben

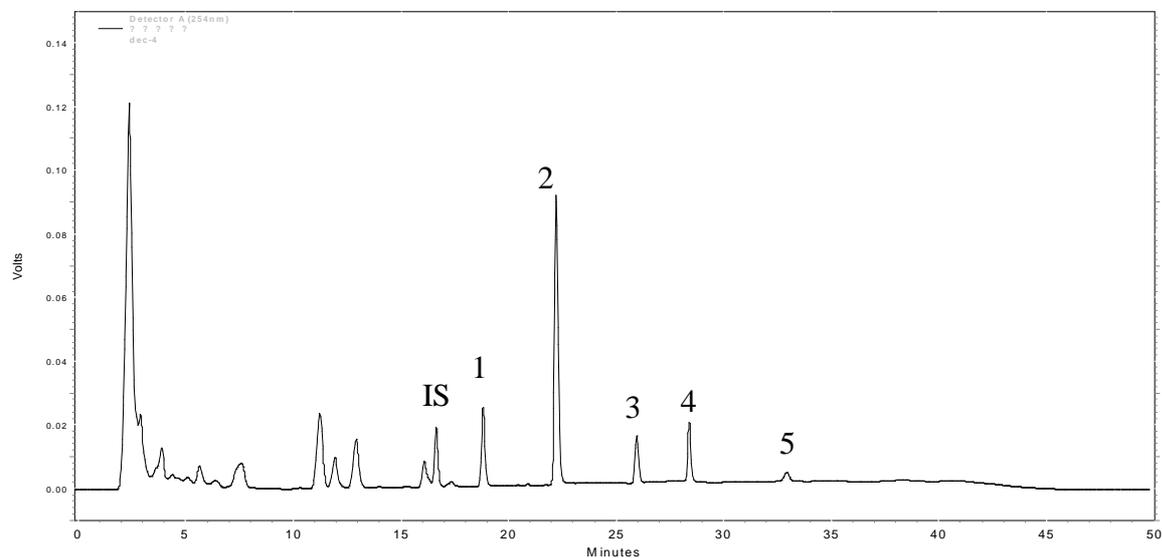


Fig 2 HPLC chromatograph of *Rheum officinale* Baill. Decoction 1. aloe-emodin 2. rhein 3. emodin 4. chrysophanol 5. physcion IS : butylparaben

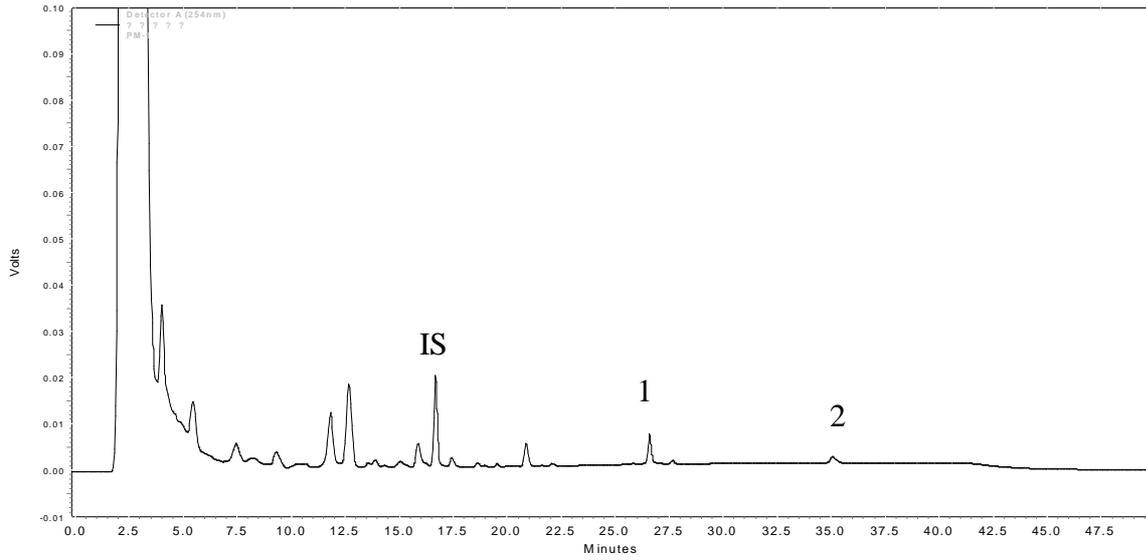


Fig 3 HPLC chromatograph of *Polygnum multiflorum* Thunb.  
Decoction 1.emodin 2.physicon IS: butylparaben

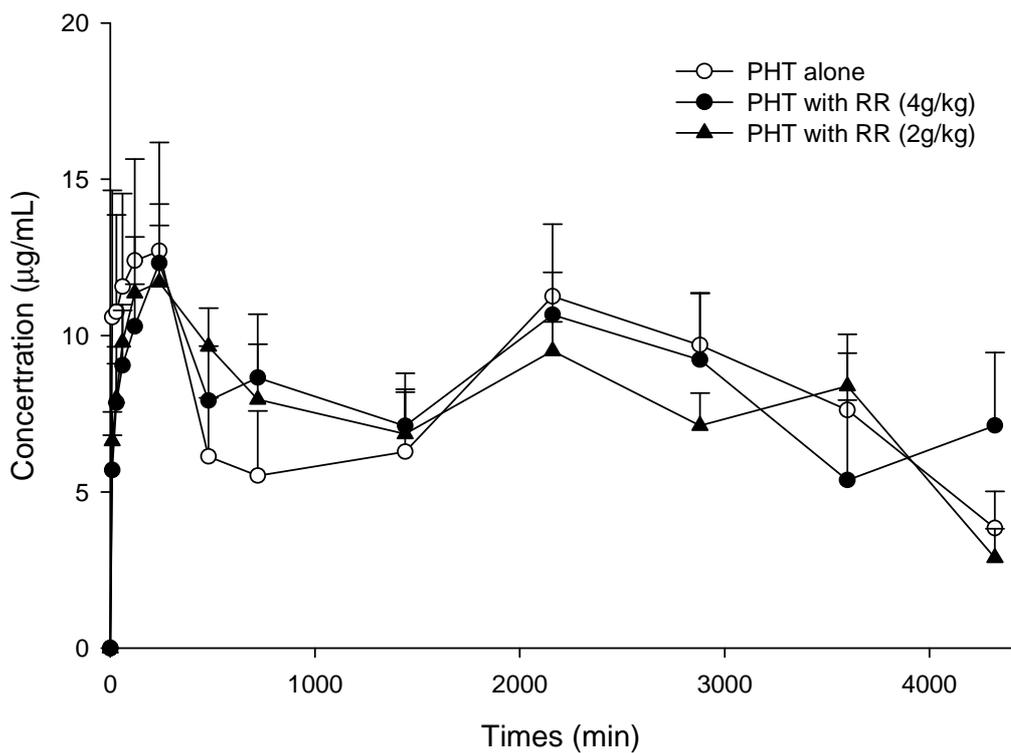


Fig 4 Mean ( $\pm$ S.E.) serum concentration - time profiles of PHT after oral administration of PHT alone (400.0 mg/kg) ( $\circ$ ) and coadministration with 4.0 g/kg ( $\bullet$ ) and 2.0 g/kg ( $\blacktriangle$ ) RR .

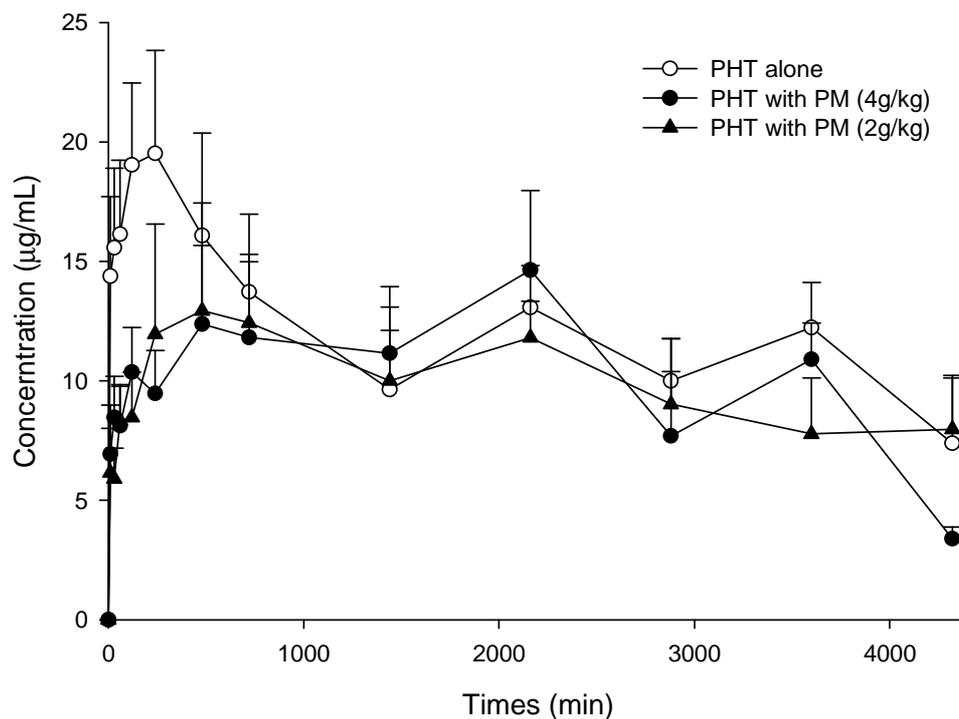


Fig 5 Mean ( $\pm$ S.E.) serum concentration - time profiles of PHT after oral administration of PHT alone (400.0 mg/kg) ( $\circ$ ) and coadministration with 4.0 g/kg ( $\bullet$ ) and 2.0 g/kg ( $\blacktriangle$ ) PM .

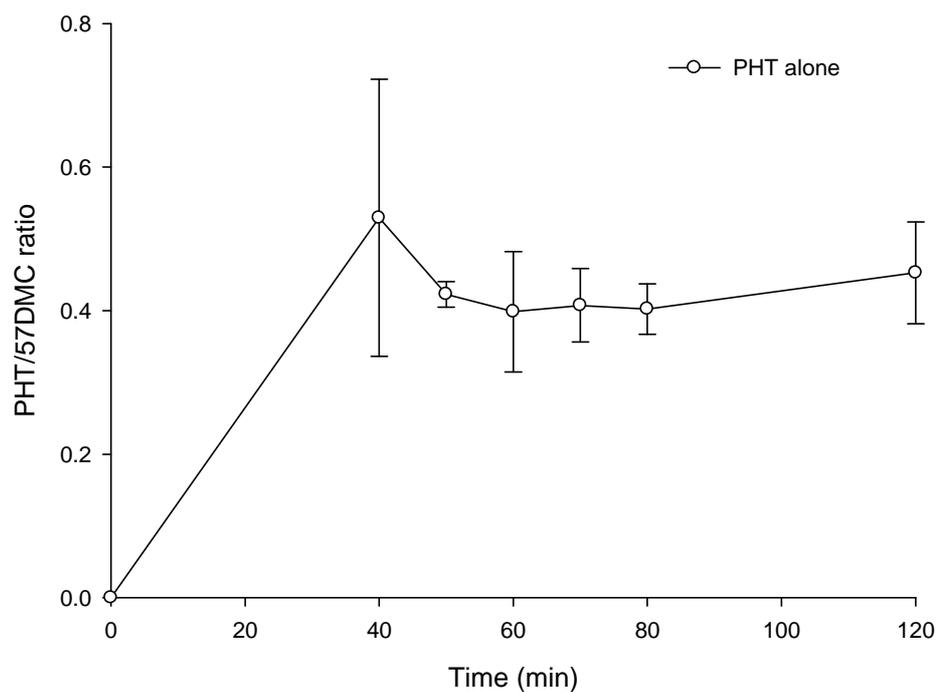


Fig 6 Mean ( $\pm$ S.E.) PHT/5,7-DMC ratio-concentrations profiles of PHT (pilot study).

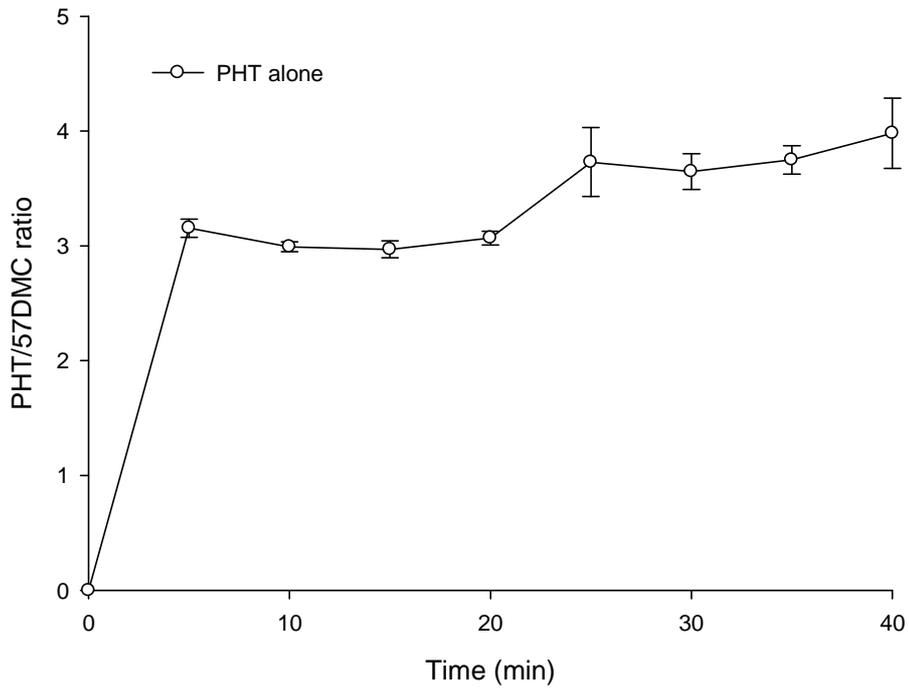


Fig 7 Mean ( $\pm$ S.E.) PHT/5,7-DMC ratio-concentrations profiles of PHT.

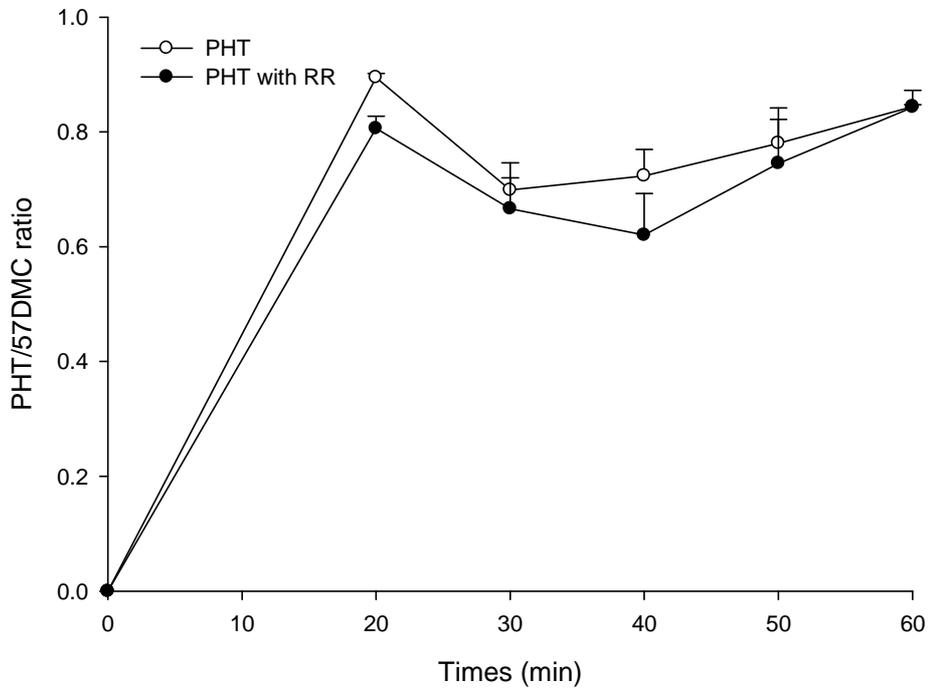


Fig 8 The influence of rhubarb (RR) on Rhadomine 123 efflux.

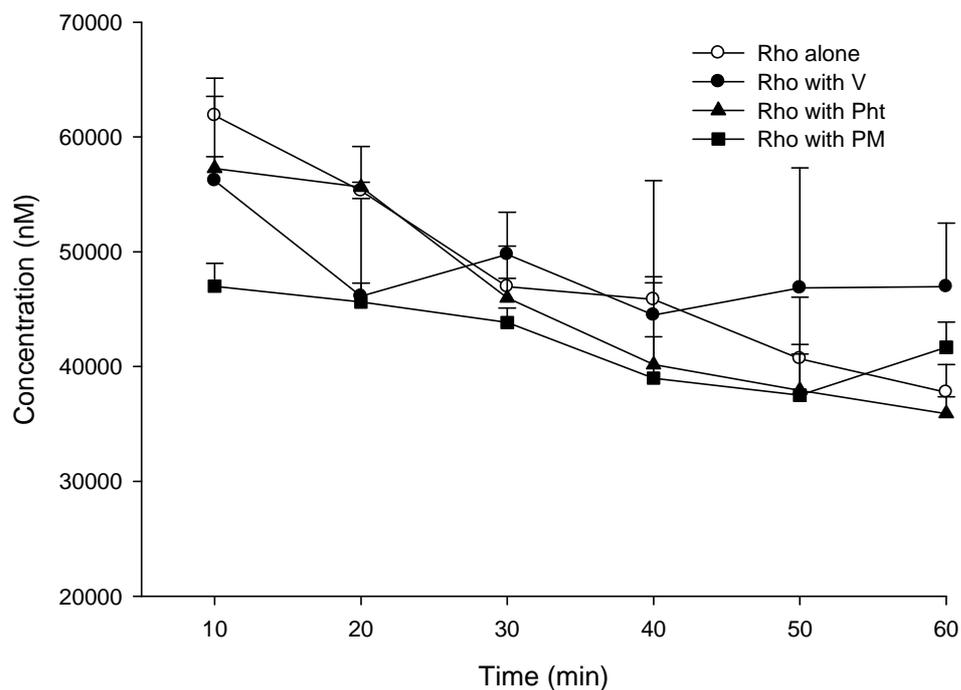


Fig 9 The influence of PM on Rhodamine 123 efflux in MDCK cells (cell residue).

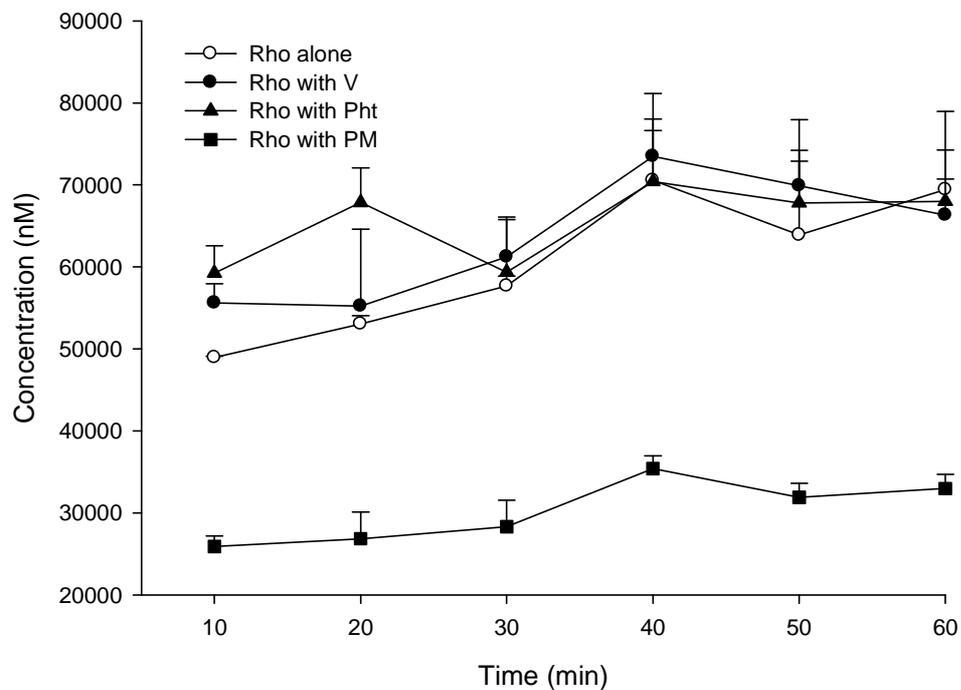


Fig 10 The influence of PM on Rhodamine 123 efflux in MDCK cells.

Table 1 Comparison of contents ( $\mu\text{mol}$ ) in decoction and decoction after acid hydrolysis of *Rheum officinale* Baill.

Constituents	Decoction ( $\mu\text{mol/g}$ )	After acid hydrolysis ( $\mu\text{mol/g}$ )	Difference ( $\mu\text{mol/g}$ )
Aloe-emodin	0.43	1.09	0.66
Rhein	5.77	6.64	0.87
Emodin	1.82	4.46	2.64
Chrysophanol	1.10	2.49	1.80
Physcion	0.39	0.77	0.38

Table 2 Comparison of contents (nmol) in decoction and decoction after acid hydrolysis of *Polygonum multiflorum* Thunb.

Constituents	Decoction (nmol/g)	After acid hydrolysis (nmol/g)	Difference (nmol/g)
Emodin	8.25	105.70	97.45
Physcion	1.70	15.40	13.70

Table 3 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of aloe-emodin in methanol.

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precision					Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day Relative error (%)	Inter-day Relative error (%)	
	Mean $\pm$ S.D. (C.V.%)	S.D. (C.V.%)	Mean $\pm$ S.D. (C.V.%)	S.D. (C.V.%)			
50.0	49.9 $\pm$ 0.5	1.1	50.4 $\pm$ 1.0	2.0	-0.2	0.9	
40.0	39.7 $\pm$ 0.5	1.2	40.0 $\pm$ 0.1	0.3	-0.8	0.0	
20.0	20.0 $\pm$ 0.4	1.9	20.2 $\pm$ 0.5	2.3	-0.2	0.9	
10.0	9.4 $\pm$ 0.2	1.7	9.6 $\pm$ 0.1	1.3	-6.0	-4.4	
5.0	4.9 $\pm$ 0.1	2.3	4.9 $\pm$ 0.1	1.2	-2.6	-1.9	
2.5	2.5 $\pm$ 0.1	2.2	2.6 $\pm$ 0.1	4.1	-0.1	2.5	
1.2	1.4 $\pm$ 0.0	1.6	1.4 $\pm$ 0.0	0.0	11.7	12.7	

Table 4 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of rhein in methanol

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precision					Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day Relative error (%)	Inter-day Relative error (%)	
	Mean $\pm$ S.D. (C.V.%)	S.D. (C.V.%)	Mean $\pm$ S.D. (C.V.%)	S.D. (C.V.%)			
200.0	197.9 $\pm$ 1.4	0.7	199.0 $\pm$ 2.1	1.0	-1.1	-0.5	
150.0	148.9 $\pm$ 1.1	0.7	149.9 $\pm$ 0.7	0.5	-0.7	-0.1	
100.0	102.1 $\pm$ 1.6	1.6	103.9 $\pm$ 0.0	0.0	2.1	3.9	
50.0	52.1 $\pm$ 0.7	1.4	52.8 $\pm$ 0.5	1.0	4.3	5.7	
25.0	27.1 $\pm$ 0.4	1.6	27.4 $\pm$ 0.3	1.2	8.5	9.5	
6.2	5.3 $\pm$ 0.2	3.0	5.5 $\pm$ 0.1	1.5	-14.8	-12.6	

Table 5 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of emodin in methanol

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precision				Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day	Inter-day
	Mean $\pm$ S.D. (C.V.%)		Mean $\pm$ S.D. (C.V.%)		Relative error (%)	Relative error(%)
50.0	49.9 $\pm$ 0.3	0.6	50.3 $\pm$ 0.9	1.9	-0.1	0.6
40.0	39.8 $\pm$ 0.2	0.6	39.9 $\pm$ 0.3	0.7	-0.5	-0.4
20.0	19.4 $\pm$ 0.3	1.4	19.9 $\pm$ 0.4	2.1	-2.8	-0.6
10.0	9.9 $\pm$ 0.1	0.8	10.0 $\pm$ 0.2	2.1	-0.8	0.2
5.0	4.9 $\pm$ 0.1	1.5	4.9 $\pm$ 0.1	1.7	-2.7	-2.8
2.5	2.6 $\pm$ 0.0	0.0	2.6 $\pm$ 0.0	0.0	3.2	3.2
1.25	1.3 $\pm$ 0.0	0.0	1.4 $\pm$ 0.1	5.9	6.4	9.8

Table 6 Intra-day and inter-day analytical precision and accuracy of chrysophanol in methanol

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precision				Accuracy	
	Intra-day		Inter-day		Intra-day	Inter-day
	Mean $\pm$ S.D. (C.V.%)		Mean $\pm$ S.D. (C.V.%)		Relative error (%)	Relative error(%)
50.0	50.8 $\pm$ 0.5	1.1	49.9 $\pm$ 0.8	1.5	1.6	-0.1
40.0	40.5 $\pm$ 0.3	0.8	40.2 $\pm$ 0.2	0.5	1.3	0.6
20.0	18.2 $\pm$ 0.3	1.5	18.1 $\pm$ 0.2	0.9	-8.9	-9.6
10.0	10.7 $\pm$ 0.1	1.0	10.6 $\pm$ 0.1	1.0	7.4	6.4
5.0	5.1 $\pm$ 0.0	0.0	5.1 $\pm$ 0.1	1.2	1.8	2.5
2.5	2.5 $\pm$ 0.1	2.5	2.5 $\pm$ 0.1	2.5	2.1	0.5
1.2	1.4 $\pm$ 0.0	0.0	1.4 $\pm$ 0.0	0.0	11.2	11.1

Table 7 Pharmacokinetic parameters of PHT in rats after giving oral PHT (400 mg/kg) alone and coadministration with RR (2,4 mg/kg) in seven rats

Parameters	PHT alone	PHT + RR (4.0 g/kg)	PHT+ RR (2.0 g/kg)
$T_{\text{max}}$ (min)	1368.3 $\pm$ 1364.7	1246.7 $\pm$ 1313.7	1217.1 $\pm$ 1417.2
$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	17.6 $\pm$ 8.4	15.9 $\pm$ 3.1	14.6 $\pm$ 2.8
$AUC_{\text{all}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ )	37890.1 $\pm$ 6323.6	35967.5 $\pm$ 12429.4	34013.0 $\pm$ 4500.7
$V_z/F$ (L/kg)	14440.3 $\pm$ 1606.1	9767.7 $\pm$ 2873.8	13515.5 $\pm$ 8186.3
$Cl/F$ (mL/min)	3.1 $\pm$ 1.6	2.4 $\pm$ 1.0*	3.4 $\pm$ 2.2
$MRT_{\text{last}}$ (min)	2067.5 $\pm$ 456.7	1984.8 $\pm$ 353.3*	1982.0 $\pm$ 288.9

Data expressed as mean  $\pm$  S.E. \*  $p < 0.05$  compared with PHT alone.

Table 8 Pharmacokinetic parameters of PHT in rats after giving oral PHT (400 mg/kg) alone and coadministration with PM (2,4 mg/kg) in seven rats

Parameters	PHT alone	PHT + RR (4.0 g/kg)	PHT+ RR (2.0 g/kg)
$T_{\text{max}}$ (min)	1117.5 $\pm$ 1767.3	931.4 $\pm$ 974.5	2006.7 $\pm$ 1887.5
$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	24.7 $\pm$ 7.9	18.8 $\pm$ 7.6*	20.0 $\pm$ 6.6*
$AUC_{\text{all}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ )	53325.0 $\pm$ 9590.5	44783.4 $\pm$ 17264.9	43510.8 $\pm$ 10419.1*
$V_z/F$ (L/kg)	11405.3 $\pm$ 7262.8	10311.0 $\pm$ 8073.4	8673.3 $\pm$ 6427.5
$Cl/F$ (mL/min)	2.4 $\pm$ 1.1	4.1 $\pm$ 1.3*	3.5 $\pm$ 0.7*
$MRT_{\text{last}}$ (min)	1979.5 $\pm$ 465.4	1991.4 $\pm$ 268.1	2019.1 $\pm$ 545.3

Data expressed as mean  $\pm$  S.E. \*  $p < 0.05$  compared with PHT alone.