編號：CCMP89-RD-003

抗氧化中藥療效評估之基礎研究
中藥中黃酮類抗氧化成分之吸收與代謝
Absorption and Metabolism of Antioxidant Flavonoids in Chinese Herbs

中國醫藥學院　藥學系

李　珮　端

摘　要

自由基學說為老化的重要理論之一。許多黃酮類具清除自由基及抗氧化劑之活性。有些中藥材富含黃酮類，黃酮類若能吸收進入體內，應可預防心血管疾病、癌症、白內障等老化的現象。

本研究針對富含黃酮類成分的中藥如枳殼、化橘紅、陳皮及槐花米等進行活體實驗，以高效液相層析法定量血液或尿液中 naringin、hesperidin 及 rutin 之代謝物，以了解這些抗氧化劑之吸收及代謝。藥物動力學參數採 WINNONLIN 軟體計算。

結果顯示黃酮類配醣體於腸道中為細菌水解成非醣體後方能吸收。當其非醣體首度經過腸壁及肝臟時，有明顯的代謝發生，循環於血中的多為結合態代謝物。血清中代謝物濃度經時變化之曲線顯示有明顯的腸肝循環現象。此三種黃酮類配醣體的吸收均頗低。我們建議值得進一步進行此三種黃酮類配醣體之前處方設計，以提高其吸收及藥效。

關鍵詞：抗氧化，黃酮類，吸收，代謝

Department of Pharmacy, China Medical College

Pei-Dawn Lee Chao

ABSTRACT

Free radical damage was believed to be an important cause of aging. Various flavonoids were shown to be free radical scavengers and antioxidants. The wide distribution of flavonoids in plant kingdom prompts us to search for anti-aging agents from Chinese herbs.

Naringin, hesperidin and rutin are flavonoid glycosides which are major constituents of herbs, e. g. zhiquor, chenpee and huaihua. This study investigated the absorption and metabolism of those three glycosides and their aglycones as pure compounds and from herbal decoctions. HPLC method was used to assay the serum and urine concentrations of the parent compounds and their metabolites. Our results indicated that the flavonoid glycosides were hydrolyzed by microflora in gut lumen into aglycones which is the absorbable form. During the first pass through gut wall, conjugation metabolism occurred appreciably. The pharmacokinetic parameters were calculated by using WINNONLIN. The absorption of these three flavonoids glycosides were quite low, especially for hesperidin. Most of the absorbed flavonoids circulate as glucuronides in the body. There was significant enterohepatic recycling. We suggested that preformulation study of these flavonoid glycosides were needed in order to enhance their absorption and efficacy.

Keywords: antioxidant, flavonoid, absorption, metabolism

第一章　前　言

國內人口結構已邁入高齡社會，健保負擔勢必愈來愈沉重。如能在中醫藥資源上發展一些抗老化的方法，應可節省醫療支出。衰老的機理至今尚處於討論階段，近年研究證實自由基學說為其中較重要的理論之一。自由基理論提出已四十餘年，自由基使體內大量多種不飽和脂肪酸類氧化成過氧化脂質。過氧化脂質會對生物大分子結構及功能造成損傷。人至老年期，自身防禦自由基產生的功能減低，致使各種生理功能出現老化現象，終至死亡。

中藥的天然資源中，有些藥材富含黃酮類，黃酮類通常為多酚類化合物，化性上可以清除自由基，具抗氧化劑之活性（1-7）。在許多體外試驗顯示黃酮類具有防止低密度脂蛋白氧化及清除自由基的作用。自由基與脂質過氧化被認為與動脈粥狀硬化、癌症、慢性炎症、白內障及老化現象等有密切關係（8-11）。因此黃酮類若能吸收進入體內，應可預防心血管疾病、癌症、白內障等的發生，在保健醫學上將有相當的助益。

黃酮類在天然物中常以配糖體型式存在，其生體利用度至今仍不甚清楚（12、13），不知其抗氧化作用能否在體內發揮，本研究擬針對富含黃酮類成分的中藥如枳殼、枳實、化橘紅、陳皮及槐花米等進行活體實驗，從血液或尿液中定量 naringin、hesperidin 及 rutin 之代謝物，以了解這些抗氧化劑吸收情形，並可評估這些中藥用於抗老化的可能性。

第二章　材料與方法

第一節　材料與設備

一、實驗試藥

(一)、標準品及試劑

Naringin（95%）、naringenin（95%）、β-glucuronidase（containing 89,400 units/ml of β-glucuronidase and 3,300 units/ml of sulfatase）、glacial acetic acid 及 fructose：購自 Sigma Chemical Co.（St. Louis, Mo, U.S.A.）。

6,7-Dimethoxycoumarin（98%）及 5,7-dimethoxycoumarin（99%）：購自 Aldrich（Milwaukee,WI, U.S.A.）。

Acetonitrile（LC grade）及 ethyl acetate（LC grade）：購自 Mallinckrodt Baker, Inc.（U.S.A.）。

Methanol（UItra pure）：購自 ALPS Chem. Co.（Taiwan）。

藥用酒精：購自臺灣菸酒公賣局。

Ethyl ether（EP grade）：購自聯工化學。

Dimethylacetamide：購自 Wako（Osaka, Japan）。

Potassium biphthalate：購自 Katayama Chemical（Osaka, Japan）。

Hydrochloric acid、PEG 400、potassium dihydrogen phosphate 及 sodium chloride：購自 Merck（Germany）。

去離子水：係由 Milli-Q plus（Millipore, Bedford, MA, U.S.A.）純水系統製得。

二、儀器設備

高效液相層析儀（HPLC）包括

幫浦：Shimadzu LC-6AD（Japan）

紫外光偵測器：Shimadzu SPD-6A（Japan）

記錄器：Shimadzu C-R6A（Japan）

自動注射器：Perkin Elmer Series 200 Autosampler（U.S.A.）

酸鹼測定儀（pH Meter）：Suntex SP-5（Taiwan）

控溫烘箱：EYELA WFO-450ND（Japan）

噴氣式試管濃縮器：OA-SYSEVAP-112（U.S.A.）

電子天平：Mettler AJ100（Switzerland）

水壓抽氣機：EYELA A-3S（Japan）

超音波振盪器：Branson 5200（U.S.A.）

試管振盪器：IKA-VIBRAX-VXR（Taiwan）

高速離心機：Eppendorf Centrifuge 5414（Germany）

恆溫搖盪反應槽：Shaker ZC4000（Taiwan）

溶媒過濾器：Kontes（U.S.A.）

可調式微量吸管：Eppendorf（Germany）

微量離心管：Certified（U.S.A.）

針頭濾膜：Alltech（0.45 μm, 13 mm, cellulose acetate, non-sterile）

血清塞（Taiwan）

實驗動物用之器材（Taiwan）

兔子與大白鼠用胃管、兔子固定器與張口器、1.0 ml 與 2.5 ml 塑膠注射筒、針頭銷毀器、真空採血管、電動剃毛剪及計時器。

WINNONLIN：version 1.1; SCI Software, Scientific Consulting, Inc.（U.S.A.）

三、實驗動物

本實驗所採用之實驗用動物為中國醫藥學院動物中心所提供之雄性紐西蘭白兔（體重介於 2～3 kg）及雄性 Sprague-Dawley 大白鼠（體重介於 200～300 g）。

第二節　實驗方法

一、柚皮苷於兔體內之藥物動力學

(一)、血清標準溶液之製備

精確稱取 naringenin，以乙腈溶解並稀釋定容，製備 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 及 30.0μg/ml 六種濃度之標準溶液，各取 100.0μl naringenin 標準溶液，加入 900.0μl 空白血清，做成血清標準溶液，濃度分別為 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00 及 3.00μg/ ml。

每一血清標準溶液取 150.0μl，加 50.0 μl potassium biphthalate 緩衝液（pH 5.0）及 50.0 μl 0.1 N 鹽酸，再加 250.0μl 乙酸乙酯（含 1.0μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin 內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，加 150.0μl 乙腈溶解，取 20μl 供 HPLC 分析。

(二)、動物實驗及給藥方法

口服給予 naringin 溶液（225.0 mg/kg）後，於 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 390, 510 及 630 分鐘從右耳靜脈採血。將血液檢品離心（15,000 rpm）15 分鐘，取上層血清，並貯存於 -30 ℃，俟後分析。

(三)、血清檢品之前處理

1. 血清中 naringenin 及 naringenin glucuronides/sulfates 之定量

取 150.0μl 血清檢品，加 50.0 μl glucuronidase/sulfatase 溶液（β-glucuronidase 89.4 units/ml, sulfatase 3.3 units/ml in pH 5 buffer），於 37 ℃水浴反應 4 小時（14），將 naringenin glucuronides/sulfates 水解成 naringenin，加 50.0 μl 0.1 N 鹽酸及 250.0 μl 乙酸乙酯（含 1.0 μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin 內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 150.0 μl 乙腈溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

2. 血清中 naringenin 之定量

取 150.0 μl 血清檢品，加 50.0 μl potassium biphthalate 緩衝液（pH 5）、50.0 μl 0.1 N 鹽酸及 250.0 μl 乙酸乙酯（含 1.0 μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin 內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 150.0 μl 乙腈溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

(四)、高效液相層析（HPLC）分析條件

層析管：LiChrospher®100 RP-18e（5 μm , 250 × 4 mm）

流速：1.0 ml/min

檢測波長：287 nm

內標準：5,7-dimethoxycoumarin

移動相：乙腈：1 % 醋酸（ 36：64, v/v ）之混合液

(五)、分析方法之確效

1. 精密度（precision）

將各濃度之血清標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得之檢量線方程式求得每次實驗濃度。以三次同日內及三次異日間實驗濃度分別求其平均值（mean）、標準偏差（standard deviation, S.D.）及變異係數（coefficient of variation, C.V.）（14, 15）。

2. 準確度（accuracy）

三次同日內及三次異日間實驗濃度與理論濃度間之相對誤差（relative error）（14, 15）。

3. 靈敏度（sensitivity）

將 naringenin 血清標準溶液一再稀釋，直到其波峰為雜訊三倍時之濃度為偵測極限。

4. 回收率（recovery）

將 naringenin（溶於乙腈）標準溶液，加入空白血清及水中，

分別製備 3.0 及 0.5 μg/ml 二種濃度，所測得之血清標準溶液之波峰面積比值除以等濃度之水標準溶液之波峰面積比值，即為回收率（14, 15）。

二、柚皮苷元於兔體內之藥物動力學

(一)、血清標準溶液之製備

精確稱取 naringenin，用乙腈溶解，並稀釋定容，從 0.5～650.0 μg/ml 之間製備幾種濃度之標準溶液，取 100.0 μl naringenin 標準溶液，加入 900.0 μl 空白血清，做成兩組血清標準溶液，第一組濃度分別為 0.50, 1.00, 3.00, 6.00, 12.50, 25.00 及 65.00 μg/ml，第二組濃度分別為 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00 及 3.00 μg/ml。

每一血清標準溶液取 150.0 μl，加 50.0 μl potassium biphthalate 緩衝液（pH 5）及 50.0 μl 0.1 N 鹽酸，再加 250.0 μl 含內標準之乙酸乙酯（第一組血清標準溶液加 25.0 μg/ml 之內標準溶液；第二組血清標準溶液加 1.0 μg/ml 之內標準溶液），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 150.0 μl 乙腈溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

(二)、動物實驗及給藥方法

本實驗採隨意交叉設計給藥。

1. 靜脈快速注射給藥

將 25.0 mg/kg 劑量之 naringenin 溶液，經由兔子左耳靜脈，快速注射給藥，給藥後於 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 及 150 分鐘從右耳靜脈採血。將血液檢品離心（15,000 rpm）15 分鐘，取上層血清，並貯存於 -30 ℃，俟後分析。

2. 口服給藥

靜脈快速注射給藥一個禮拜後，經由胃管口服給予相當於 25.0 mg/kg 之 naringenin 溶液，給藥後於 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 150, 210 及 270 分鐘從右耳靜脈採血。將血液檢品離心（15,000 rpm）15 分

鐘，取上層血清，並貯存於 -30 ℃，俟後分析。

(三)、血清檢品之前處理

1. 血清中 naringenin 及 naringenin glucuronides/sulfates 之定量

取 150.0 µl 血清檢品，加 50.0 µl glucuronidase/sulfatase 溶液（β-glucuronidase 89.4 units/ml, sulfatase 3.3 units/ml in pH 5.0 buffer），在 37 ℃水浴反應 4 小時。反應後，加 50.0µl 0.1 N 鹽酸及 250.0 µl 乙酸乙酯（含內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 150.0 µl 乙腈溶解，取 20µl 供 HPLC 分析。

2. 血清中 naringenin 之定量

取 150.0 µl 血清檢品，加 50.0 µl potassium biphthalate 緩衝液（pH 5.0）、50.0 µl 0.1 N 鹽酸及 250.0 µl 乙酸乙酯（含內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 150.0 µl 乙腈溶解，取 20 µl 供 HPLC 分析。

(四)、高效液相層析（HPLC）分析條件

層析管：LiChrospher® 100 RP-18e（5 µm , 250 × 4 mm）

流速：1.0 ml/min

檢測波長：287 nm

內標準：5,7-dimethoxycoumarin

移動相：乙腈：1 % 醋酸（ 36：64, v/v ）之混合液

(五)、資料之分析

使用 WINNONLIN（version 1.1; SCI Software）軟體計算動力學參數，並使用 paired Student's t-test 分析靜脈快速注射給藥與口服給藥之血清中 naringenin conjugates 的 AUC 所佔比率是否具統計學上的差異。

三、枳殼與化洲橘紅中之 naringin、naringenin、narirutin 於人體中的吸收

(一)、藥材水煎劑中 naringin、naringenin、narirutin 之定量方法

1. 藥材水煎劑之製備

精確稱取 100 公克（十人份劑量），加水 2000 毫升，以瓦斯爐直接加熱至沸騰後，改以小火持續加熱 2 小時至原體積之半或更少，趁熱過濾，殘渣再加水 2000 毫升，同法加熱至原體積之半或更少，趁熱過濾，兩次濾液合併，精確定容至 2000 毫升，取 5 毫升作為分析之檢品，其餘精確量取 100 ml 為單一劑量，作為口服煎劑，於 -20℃ 冷凍貯存。

2. 高效液相層析儀（HPLC）之分析條件

⑴藥材中 naringin、narirutin 之分析條件

管柱：LiChrospher 100 RP-18（5µm , 250 ×4 mm）

移動相：水與氰甲烷（81：19）

流速：1 ml/min

檢測波長：紫外光 280 nm

內部標準品：6,7-dimethoxycoumarin（200µg/ml 及 20µg/ml）

⑵藥材中 naringenin 之分析條件

管柱：LiChrospher 100 RP-18（5µm , 250 ×4 mm）

移動相：水與氰甲烷（71：29）

流速：1 ml/min

檢測波長：紫外光 288 nm

內部標準品：5,7-dimethoxycoumarin（24µg/ml）

3. 藥材水煎劑檢品之定量

⑴檢品 300µl 加甲醇 700µl 混和振盪，於 15000 rpm 離心 15 min，取上清液，以微孔濾器（0.45µm）過濾。取檢品之 70 % 甲醇溶液 300µl 加等體積之內標準甲醇溶液（6,7-dimethoxycoumarin，400µg/ml 或 40µg/ml）混合後，取 20µl 注入 HPLC 分析，以檢

品中 naringin 或 narirutin 與內標準品之波峰面積比值代入 naringin 或 narirutin 之直線迴歸方程式，求出檢品中 naringin 及 narirutin 之含量。

⑵檢品 300µl 加甲醇 700µl 混和振盪，於 15000 rpm 離心 15 min，取上清液，以微孔濾器（0.45µm）過濾。取檢品之 70 % 甲醇溶液 450µl 加 50µl 之內標準甲醇溶液（5,7-dimethoxycoumarin，240µg/ml）混合後，取 20µl 注入 HPLC 分析，以檢品中 naringenin 與內標準品之波峰面積比值，代入 naringenin 之直線迴歸方程式，求出檢品中 naringenin 之含量。

(二)、尿中 naringenin glucuronides 及 sulfates 之分析

1. 服藥之方法與尿液之收集

受試者為 25～32 歲之健康男性，經肝、腎功能檢查，其 GOT、GPT、BUN 及 Creatinine 數值均在正常範圍內，均無服藥、吸煙及飲酒等習慣，實驗三天前及實驗中禁吃芸香科水果或果汁（如橘子、柳丁、香吉士、柚子、葡萄柚、八仙果等）。

受試者在前一天晚上 10 時以後禁食，實驗當天服藥前先排空尿液，並保留 5 ml 空白尿。早上八時空腹服下枳殼水煎劑 100 ml，3 小時後方可進食。服藥後於 0～2、2～4、4～6、6～8、8～10、10～12、12～14 小時共收集七段尿液。每段尿液以量筒定量，記錄總量並保留 5 ml 尿液，置 -20（C 冷凍櫃中保存，於兩天內完成 HPLC 定量分析。

2. 高效液相層析儀（HPLC）之分析條件

分析管柱：LiChrospher 100 RP-18（5µm，250 ×4 mm）

移動相：氰甲烷與水（含 1% acetic acid）（30:70）

流速：1 ml/min

檢測波長：紫外光 288 nm

內部標準品：5,7-dimethoxycoumarin（25µg/ml）

3.尿檢品之前處理

各取每段時間收集之尿檢品200µl二份，一份加β-glucuronidase/sulfatase（溶於pH 5緩衝溶液，含β-glucuronidase 447 units/ml，sulfatase 16.5 units/ml）300µl，另一份加pH 5之緩衝溶液300µl，再於試管振盪器上充分混合，前者置37℃之恆溫水槽振盪4小時（38），使反應完全後取出，兩份各加內標準品甲醇溶液（5,7-dimethoxycoumarin，50µg/ml）500µl，混和振盪，於15000 rpm離心15 min，取上清液，以微孔濾器（0.45µm）過濾，取20µl注入HPLC分析，以檢品中naringenin與內標準品之波峰面積比值代入naringenin之直線迴歸方程式，求出檢品中naringenin之含量。

4.人體內naringenin glucuronides及sulfates排除之半衰期（$t_{1/2}$）計算方法

受試者在每段尿液收集時間點體內殘餘之naringenin glucuronides及sulfates量之自然對數值（X）與收集時間（Y）作直線迴歸，得斜率（k），代入下列公式

$$t_{1/2} = 0.693/k$$

四、槲皮素在兔體內之藥物動力學

(一)、給藥法及檢品處理

1.靜脈注射給藥及採血時間

配製所須的槲皮素溶液（165.44µmol/kg /kg）。並由左耳給藥，右耳採血；而注射之藥物須先經由0.2µm滅菌濾膜過濾之後才投予。採血時間點為給藥後 5，10，15，30，45，60，90，120，180，240分鐘，每次採血量為0.5～1 ml，將血液置於棕色離心管，靜置一段時間後，以10,000 rpm離心10分鐘，取血清於棕色離心管，保存在-30℃，待分析之用。

2.口服給藥及採血時間

實驗給藥時，先以張口器將兔子嘴巴張開，以胃管插入給藥。採血時間點為給藥後 5，10，15，30，60，90，150，210，270，390，510 分鐘，每次採血量為 1.5 ml，之後，同上述 iv 的檢品之處理步驟。

(二)、兔子血清中槲皮素之 HPLC 定量分析法

層析管　COSMOSIL packed column, Waters（250×4.6 mm）

檢測波長：370 nm

移動相比例：Acetonitrile -0.2% ortho-phosphoric acid（27：73, v/v），pH = 2.3

流速：1.3 ml/min

(三)、血清檢品之前處理

1. 口服投予槲皮素之血清檢品

⑴血清中槲皮素及其結合態代謝物之總量

取血清檢品 200.0μl 置於外包鋁箔紙之試管，加入以 buffer（pH 5.0）稀釋 200 倍的β- glucuronidase/sulfatase 100.0μl，及 20.0μl 維生素 C 溶液（300.0 mg/ml），蓋上血清塞，置於渦旋振盪器上混合 10 秒，用針筒將試管內之空氣抽出，再灌入氮氣；之後，放入 37℃之往復式振盪水槽（轉速 100 rpm），反應 4 小時後，取出檢品，加入 300.0μl 乙酸乙酯（內含內標準 2.0μg/ml 之 6,7-dimethoxycoumarin），於渦旋振盪器上混合 10 秒，再將檢品倒入棕色離心管，以 10,000 rpm 離心 10 分鐘之後，取出乙酸乙酯層，吹氮氣使乙酸乙酯揮發後，貯於-30℃，待分析時，以 50.0μl 甲醇溶解，取 20μl 供 HPLC 定量分析。

⑵血清中自由態槲皮素之定量

取血清檢品 200.0μl 於棕色離心管，加入 pH 5.0 之緩衝液 100.0μl，及 20.0μl 維生素 C 溶液（300.0 mg/ml），置於渦旋振盪器上混合 10 秒，加入 300.0μl 乙酸乙酯（內含內標準 2.0μg/ml

之 6,7-dimethoxycoumarin），於渦旋振盪器上混合 10 秒，以 10,000 rpm 離心 10 分鐘之後，取出乙酸乙酯層，吹氮氣使乙酸乙酯揮發後，貯於-30℃，待分析時，以 50.0µl 甲醇溶解，取 20µl 供給 HPLC 定量分析。

2.靜脈投予槲皮素之血清檢品

⑴血清中槲皮素及其結合態代謝物之總量

取血清檢品 100.0µl 置於外包鋁箔紙之試管，加入以 buffer（pH 5.0）稀釋 200 倍的β- glucuronidase/sulfatase 50.0µl，及 20.0µl 維生素 C 溶液（300.0 mg/ml），蓋上血清塞，置於渦旋振盪器上混合10秒，用針筒將試管內之空氣抽出，再灌入氮氣；之後，放入 37℃之往復式振盪水槽（轉速為 100 rpm）反應 4 小時後，取出檢品，加入 150.0µl 乙酸乙酯（內含內標準 20.0µg/ml 之 6,7-dimethoxycoumarin），於渦旋振盪器上混合 10 秒，再將檢品倒入棕色離心管，以 10,000 rpm 離心 10 分鐘之後，取出乙酸乙酯層，吹氮氣使乙酸乙酯揮發後，貯於-30℃，待分析時，以 100.0µl 甲醇溶解，取 20µl 供 HPLC 定量分析。

⑵血清中自由態槲皮素之定量

取血清檢品 100.0µl 於棕色離心管，加入 pH 5.0 之緩衝液 50.0µl，及 20.0µl 維生素 C 溶液（300.0 mg/ml），置於渦旋振盪器上混合 10 秒，加入 150.0µl 乙酸乙酯（內含內標準 20.0µg/ml 之 6,7-dimethoxycoumarin），於渦旋振盪器上混合 10 秒，以 10,000 rpm 離心 10 分鐘之後，取出乙酸乙酯層，吹氮氣使乙酸乙酯揮發後，貯於-30℃，待分析時，以 100.0µl 甲醇溶解，取 20µl 供給 HPLC 定量分析。

(四)、數據處理及統計方法

二種投藥方法所得之血清檢品經 HPLC 定量後，利用電腦程式 WINNONLIN，靜脈給藥套入一室模式，口服給藥則以非室體模式

（Noncompartment），求其動力學參數，並加以比較。

五、芸香苷在兔體內之藥物動力學

(一)、給藥及採血時間點

精稱 rutin 2.20g，置於瑪瑙研缽中，加以些許 tetraglycol 研磨均勻，隨即倒入 25mL 血清管中而後以 tetraglycol 定容至 20.0 mL， 即得 110.0 mg/mL 之芸香苷溶液，使用前新鮮製備。經由胃管投予芸香苷懸浮溶液（110.0 mg/kg/mL），採血時間點為給藥後 5，10，15，30，60，90，120，180，240，360，480 分鐘，從右耳靜脈採血，每次採血量為 1.5 mL，之後將檢品離心（14,000 rpm）15 分鐘，取上層血清，並保存在-30 ℃，俟後分析。

(二)、血清中芸香苷代謝物之定量

本部分方法同血清中槲皮素及其結合態代謝物之定量。

六、槐花煎劑中芸香苷在兔體內之藥物動力學

(一)、槐花煎劑之製備

100g 槐花加入 6L 的水，加熱（瓦斯爐中小火）至水位略低於 1L 之刻度線，以熱水定容至 1L。

(二)、槐花煎劑中 rutin 的含量測定

取上述之溶液 600μl 加甲醇定容至 2 ml（即水：甲醇＝3：7），再以甲醇稀釋此 2 ml 混合液至 100ml 的容量瓶（共稀釋 166.67 倍），取稀釋溶液以過濾膜（0.45μm）過濾，以 HPLC 定量 rutin 與 quercetin。

(三)、槐花煎劑在中芸香苷兔體內之藥物動力學

本部分方法同芸香苷在兔體內之藥物動力學。

七、橙皮苷元於兔體內之藥物動力學

(一)、血清標準溶液之製備

精確稱取 hesperetin，用甲醇溶解，並稀釋定容，從 3.9～1000.0 μg/ml 之間製備幾種濃度之標準溶液，取 100.0 μl naringenin 標準溶

液，加入 900.0 µl 空白血清，濃度分別為 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 及 100.0 µg/ml。

每一血清標準溶液取 300.0 µl，加 200.0 µl 緩衝液（pH 5）、90.0µl 維他命 C（75mg/ml）及 90.0 µl 0.1 N 鹽酸，再加 680.0 µl 含內標準之乙酸乙酯（2.5 µg/ml 之內標準溶液），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50.0 µl 乙腈溶解，取 20 µl 供 HPLC 分析。

(二)、動物實驗及給藥方法

1. 靜脈快速注射給藥

Hesperetin 溶液（50.0 mg/ml）係以 dimethylacetamide：PEG 400：water（1：5：4）之混合溶媒製備，並以 0.2 µm 滅菌濾膜（cellulose acetate）除去熱原。

將相當於 20.0 mg/kg 劑量之 hesperetin 溶液，經由兔子左耳靜脈，快速注射給藥，給藥後於 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 ,120 及 180 分鐘從右耳靜脈採血。將血液檢品離心（15,000 rpm）15 分鐘，取上層血清，並貯存於 -30 ℃，俟後分析。

2. 口服給藥

口服 hesperetin 溶液之製備方法，與靜脈快速注射之 hesperetin 溶液相同，但不經 0.2 µm 濾膜滅菌過濾。

靜脈快速注射給藥一個禮拜後，經由胃管口服給予相當於 50.0 mg/kg 之 hesperetin 溶液，給藥後於 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 及 480 分鐘從右耳靜脈採血。將血液檢品離心（15,000 rpm）15 分鐘，取上層血清，並貯存於 -30 ℃，俟後分析。

(三)、血清檢品之前處理

1. 血清中 hesperetin 及 hesperetin glucuronides/sulfates 之定量

取 300.0 µl 血清檢品，加 200.0 µl glucuronidase/sulfatase 溶液（β-glucuronidase 89.4 units/ml, sulfatase 3.3 units/ml in pH 5.0 buffer）,再加入 90.0μl 維他命 C （75mg/ml），在 37 ℃水浴反應 4 小時。反應後，加 90.0 μl 0.1 N 鹽酸及 680.0 μl 乙酸乙酯（含內標準），用試管振盪器振盪20秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50.0 μl 乙腈溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

2. 血清中 hesperetin 之定量

取 300.0 μl 血清檢品，加 200.0 μl 緩衝液（pH 5.0）、90.0μl 維他命 C （75mg/ml）、90.0 μl 0.1 N 鹽酸及 680.0 μl 乙酸乙酯（含內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 550.0 μl 乙腈溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

(四)、高效液相層析（HPLC）分析條件

層析管：LiChrospher® 100 RP-18e（5 μm , 250 × 4 mm）

保護層析管：LiChrospher® 100 RP-18e（5 μm）

流速：1.0 ml/min

檢測波長：287 nm

內標準：5,7-dimethoxycoumarin

移動相：乙腈：1 % 醋酸（ 35：65, v/v ）之混合液

(五)、資料之分析

使用 WINNONLIN（version 1.1; SCI Software）和 Excel（version 7.0, Microsoft）等軟體計算動力學參數。

八、橙皮苷於兔體內之藥物動力學

(一)、血清標準溶液之製備

精確稱取 hesperetin，以甲醇溶解並稀釋定容，製備 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0 及 1000.0 μg/ml 九種濃度之標準溶液，各取 100.0 μl hesperetin 標準溶液，加入 900.0 μl 空白血清，做成血清標準溶液，濃度分別為 0.39, 0.78, 1.56, 31.3, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 及

100.0 μg/ ml。

每一血清標準溶液取 300.0 μl，加 200.0 μl 緩衝液（pH 5.0）、維他命 C 90.0μl（75mg/ml）及 0.1 N 鹽酸 90.0μl，再加 680.0 μl 乙酸乙酯（含 2.5 μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin 內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，以氮氣吹乾後，加 50.0 μl 乙腈溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

(二)、動物實驗及給藥方法

口服給予 hesperetin 溶液（50.0 mg/kg）後，於 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 及 480 分鐘從右耳靜脈採血。將血液檢品離心（15,000 rpm）15 分鐘，取上層血清，並貯存於 -30 ℃，俟後分析。

(三)、血清檢品之前處理

1. 血清中 hesperetin 及 hesperetin glucuronides/sulfates 之定量

取 300.0 μl 血清檢品，加 200.0 μl glucuronidase/sulfatase 溶液（β-glucuronidase 89.4 units/ml, sulfatase 3.3 units/ml in pH 5 buffer）及維他命 C 90.0μl（75mg/ml），於 37 ℃水浴反應 4 小時（14），將 hesperetin glucuronides/sulfates 水解成 hesperetin，加 90.0 μl 0.1 N 鹽酸及 680.0 μl 乙酸乙酯（含 2.5 μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin 內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50.0 μl 乙腈溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

2. 血清中 hesperetin 之定量

取 300.0 μl 血清檢品，加 200.0 μl 緩衝液（pH 5），再加入維他命 C 90.0μl（75mg/ml）、0.1 N 鹽酸及 680.0 μl 乙酸乙酯（含 2.5 μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin 內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50.0 μl 乙腈溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

(四)、高效液相層析（HPLC）分析條件

本部分方法同前節。

九、陳皮中橙皮苷於兔體內吸收之動力學

(一)、陳皮藥材水煎劑之製備

精確秤取陳皮中藥材 80.0 g，加入 6000 ml 水，於放置石綿網之瓦斯爐上直火加熱至沸騰，沸騰後轉小火並繼續加熱 2 小時至體積變為 400 ml 或更少，趁熱過濾後加熱水定容成 400 ml ，並置於-30℃冷凍儲存。

(二)、動物實驗及給藥方法

實驗動物為雄性紐西蘭白兔，體重介於 2～3 kg，實驗前，先禁食 24 小時。實驗當天於早上八時口服陳皮水煎劑 50.0ml，服藥後收集 48 小時的尿液並記錄總體積，將尿液混合均勻後取 5 ml 置於-30℃冷凍櫃中保存，等候分析。

(三)、尿液中 hesperetin glucuronides/sulfates 之分析

1. 精確稱取 hesperetin 5.0 mg，以少量甲醇溶之，再以甲醇稀釋至 10.0 ml 為貯存溶液。將貯存溶液以甲醇稀釋一系列濃度（500.0、250.0、125.0、62.5 及 31.2μg/ml），取各濃度溶液 100.0 μl 加空白尿 900.0μl，製備 hesperetin 之標準溶液，濃度分別為 50.0、25.0、12.5、6.25 及 3.12μg/ml。取尿標準溶液 100.0μl，加入 70.0μl 緩衝液（pH 5）、30.0μl 維他命 C（75mg/ml），再加入 30.0μl0.1 N 鹽酸及 230.0 μl 乙酸乙酯（含 10.0 μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin 內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 300.0 μl 移動相溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。
2. 尿液檢品中 hesperetin 代謝物之分析

   將每隻白兔所收集 48 小時之尿液檢品，取 100.0μl 加 70.0 μl glucuronidase/sulfatase 溶液（β-glucuronidase 89.4 units/ml, sulfatase

3.3 units/ml in pH 5 buffer）及維他命 C 30.0μl （75mg/ml），於 37 ℃水浴反應 4 小時，將 hesperetin glucuronides/sulfates 水解成 hesperetin，加 30.0 μl 0.1 N 鹽酸及 230.0 μl 乙酸乙酯（含 10.0 μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin 內標準），用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心（15,000 rpm）15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 300.0 μl 移動相溶解，取 20 μl 供 HPLC 分析。

(四)、高效液相層析（HPLC）分析條件

層析管：LiChrospher® 100 RP-18e（5 μm , 250 × 4 mm）

流速：1.0 ml/min

檢測波長：287 nm

內標準：5,7-dimethoxycoumarin

移動相：甲醇加乙腈（2：3）：1 % 醋酸（ 43：57, v/v ）

第三章　結果與討論

一、柚皮苷於兔體內之藥物動力學

本研究利用 HPLC 方法，定量血清中之 naringenin 及 naringenin glucuronides/sulfates。本方法所採用之 HPLC 系統僅以 1 % 醋酸與乙腈之混合液為移動相，血清檢品之前處理是利用分配原理，用乙酸乙酯萃取血清中 naringenin 及自 naringenin glucuronides/sulfates 酶解之 naringenin，無須使用 RP-18 固相萃取（16），且每一血清檢品可於 15 分鐘內完成 HPLC 分析，方法簡易而快速。層析圖如 Fig.1 所示。

分析中之檢量線係以 naringenin 血清標準品與內標準波峰面積比值為 y 軸，naringenin 血清標準溶液濃度為 x 軸，作線性迴歸，並求出檢量線方程式及關係係數。Naringenin 之檢量線方程式為 y= 2.5891x + 0.0014（r= 0.9999）。此結果顯示 naringenin 濃度在 0.05 μg/ml 至 3.0 μg/ml 之範圍內有良好線性關係。分析系統之精密度、準確度測試，結果良好，如 Table 1 所示。可定量極限（LOQ）為 50.00

ng/ml，可偵測極限（LOD）為 6.25 ng/ml。

Naringin 口服後，經胃腸道內細菌水解成 naringenin 才會被吸收至體內（17），因此用 HPLC 方法分析血清時（18），只偵測出血清中有 naringenin 及 naringenin glucuronides/sulfates，但並未發現 naringin 或 naringin glucuronides/sulfates 的存在。

血清檢品的前處理，係利用β-glucuronidase/sulfatase 水解 naringenin conjugates，在 37 ℃水浴進行反應，經過 1 至 6 小時各種不同時間的水解試驗，結果顯示反應 4 小時酵素已能完全水解 naringenin glucuronides/sulfates，如 Fig. 2 所示，因此，本實驗所有血清檢品之反應時間均採 4 小時。

Naringin 口服後，血清中 naringenin 及 naringenin glucuronides/sulfates 濃度與時間之關係圖，如 Fig. 3 所示，而相關之動力學參數則如 Table 2 所示。顯示血清中 naringenin glucuronides/sulfates 濃度遠高於 naringenin 濃度，前者之 AUC 約佔血清中總 AUC 之 81.0 %，後者則只佔 19.0 %。血清中總 AUC 經劑量校正後與口服 naringenin 之結果相近，顯示 naringin 幾乎被胃腸道內細菌完全水解成 naringenin，因此 naringenin 之吸收才是決定其吸收率的關鍵步驟，被吸收至兔體內的 naringenin，大部分由腸壁及肝臟酵素代謝成 conjugates，導致血清中 naringenin glucuronides/sulfates 濃度高於 naringenin。血藥經時變化圖亦顯現明顯的腸肝循環現象。

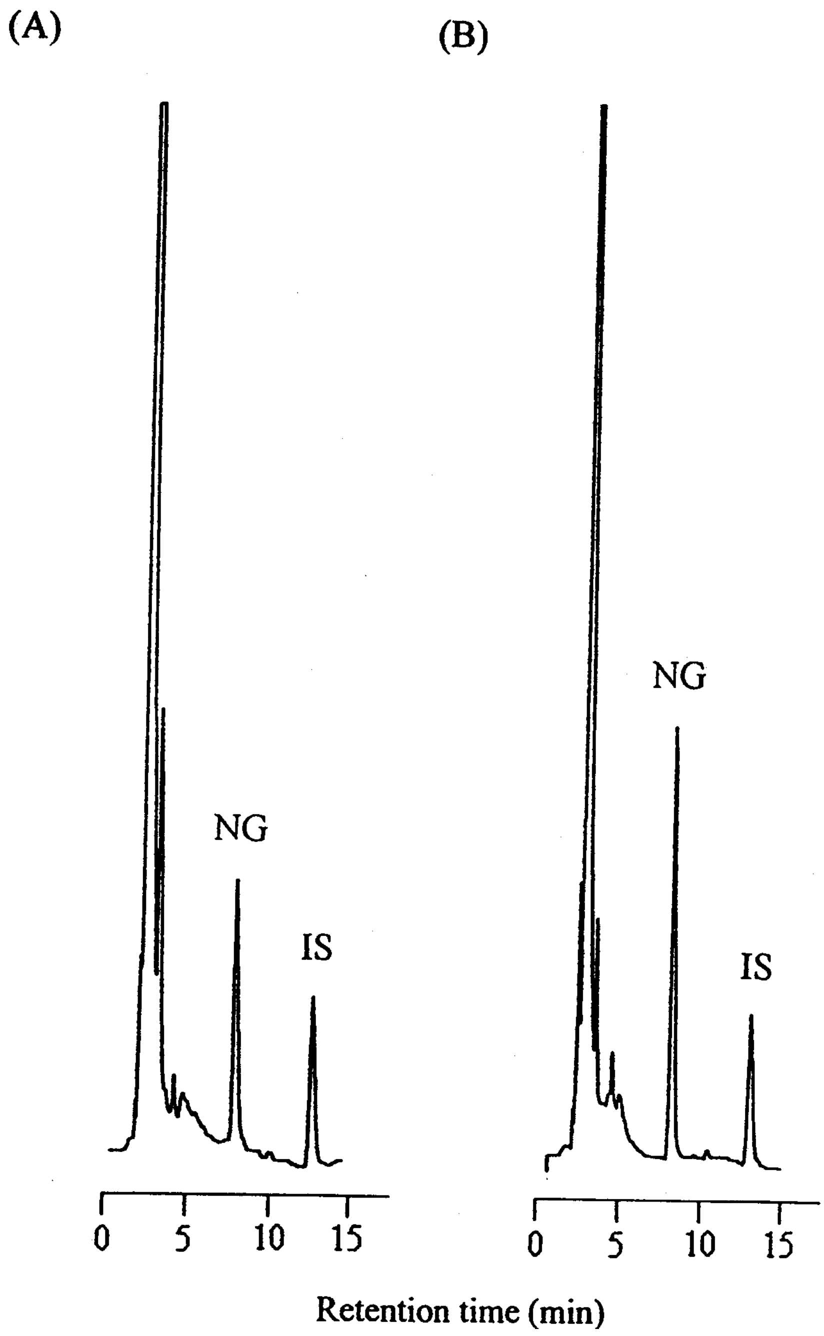
表一、血清中 naringenin 同日內與異日間分析的精密度與準確度

Conc（μg/ml）	Precision		Accuracy	
	Intraday Mean ± S.D.（C.V.%）	Interday Mean ± S.D.（C.V.%）	Intraday Relative error（%）	Interday Relative error（%）
3.00	2.96 ± 0.03(1.15)	2.88 ± 0.12(4.14)	-1.49	-4.02
1.00	1.01 ± 0.01(1.17)	1.00 ± 0.01(1.44)	0.97	0.00
0.50	0.52 ± 0.02(3.20)	0.48 ± 0.02(3.99)	4.62	-3.93
0.20	0.20 ± 0.01(3.09)	0.19 ± 0.01(3.67)	2.23	-3.00
0.10	0.10 ± 0.01(1.69)	0.10 ± 0.01(3.25)	0.33	1.67
0.05	0.06 ± 0.01(3.35)	0.05 ± 0.01(5.25)	12.67	9.33

n= 3

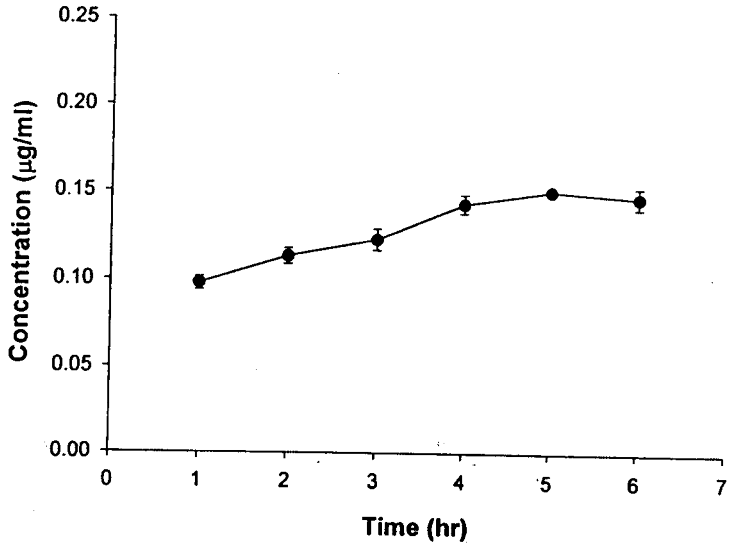
表二、五隻家兔口服naringin（225.0 mg/kg = 387.0 μmol/kg）之naringenin 及其結合態代謝物之 $AUC_{0\text{-}t}$（nmol · min/ml）

A \ Rabbits	1	2	3	4	5	Mean±S.E.
Naringenin + Conjugates	530.8	438.6	197.0	636.4	1322.2	625.0 ± 168.9
Naringenin	211.6	107.2	12.2	90.0	138.2	111.8 ± 29.0
Conjugates	319.3	331.4	184.8	546.4	1184.0	513.2 ± 158.7
Naringenin / Naringenin+Conjugates	0.40	0.24	0.06	0.14	0.10	0.19 ± 0.06
Conjugates / Naringenin+Conjugates	0.60	0.76	0.94	0.86	0.90	0.81 ± 0.05

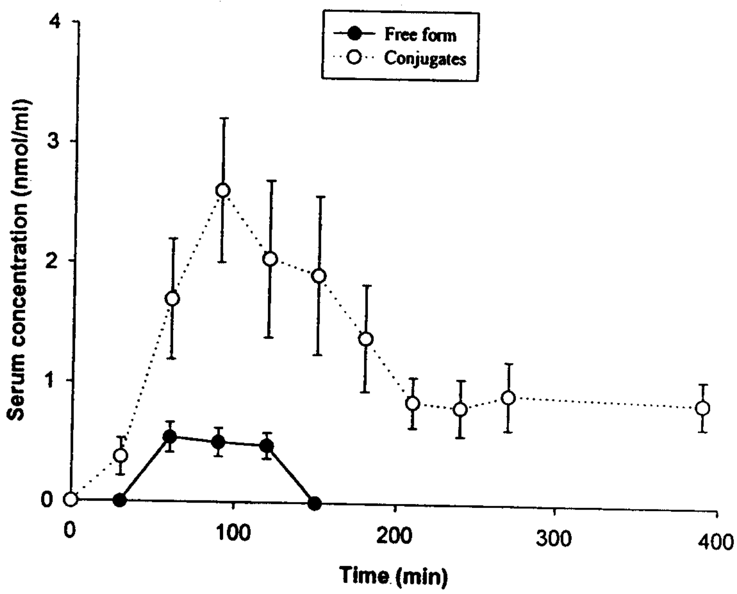


圖一、家兔口服 225.0 mg/kg naringin 後 60 分 (A)和 90 分 (B)時血清檢品的層析圖

NG: naringenin（A: 0.59 μg/ml, B: 1.24 μg/ml）, IS: internal standard（1.0 μg/ml 5,7-dimethoxycoumarin）.



圖二、血清檢品與β-glucuronidase/sulfatase 反應之 naringenin 的濃度經時變化圖



圖三、五隻家兔口服 225.0 mg/kg naringin 之 naringenin 及其結合態代謝物的平均血藥濃度經時變化圖

二、柚皮苷元於兔體內之藥物動力學

本實驗係使用與柚皮苷動力學部分相同的HPLC方法定量血清中之 naringenin 及 naringenin conjugates，血清檢品之層析圖如 Fig. 4 所示。

分析靜脈注射及口服給藥之血清檢品，係採用兩條檢量線法分析（19）。將第一組血清標準品（0.50～65.00 μg/ml）及第二組血清標準品（0.05～3.00 μg/ml）各做一條檢量線，其檢量線方程式分別為 $y = 0.0647x - 0.0084$（$r = 0.9998$）和 $y = 2.5891x + 0.0014$（$r = 0.9999$）。其波峰面積比值與 naringenin 濃度均有良好線性關係。利用兩條檢量線分析血清檢品，原因是靜脈注射及口服給藥之血清檢品中 naringenin 含量，最高與最低濃度相差約 1000 倍，單用一條檢量線無法精確檢測較高或較低之濃度。如果血清檢品之面積比值較標準品濃度為 3.00 μg/ml 小者，即採用第二條檢量線分析，其他則採用第一條檢量線。

本實驗分析方法之確效，其精密度（precision）及準確度（accuracy），如 Table 3 所示。同日內和異日間之變異係數（coefficient of variation）分別介於 0.16～3.35 % 和 0.17～5.25 %，相對誤差（relative error）分別介於-5.28～12.67 % 和 -4.87～9.33 %。表示本分析方法之精密度及準確度良好。另外，可定量極限（LOQ）為 50.00 ng/ml，可偵測極限（LOD）為 6.25 ng /ml。

Naringenin 經由靜脈注射，各隻兔子平均之血清中 naringenin 及 naringenin conjugates 濃度與時間之關係圖，如 Fig. 5 所示。利用 WINNONLIN 之二室體模式和 Excel 等軟體求出有關 naringenin 之藥物動力學參數，如表 Table 4 及 5 所示。Naringenin 之排除半衰期約為 17 分鐘，分佈體積為 1.6 L，血藥最高濃度為 196.8 nmol/ml，血藥面積約為 1693.2 nmol ‧ min/ml，全身清除率約為 0.16 L/min。

各隻兔子口服給予 25.0 mg/kg naringenin，其平均之血清中 naringenin 及 naringenin conjugates 濃度與時間之關係圖，如 Fig.6 所示。口服給藥 10 分鐘後，血清中 naringenin 濃度達到最高，顯示 naringenin 口服吸收快速。但只有少數時間點的血清檢品能定量其 naringenin 濃度，因此只能利用 WINNONLIN 之非室體（noncompartment）模式計算血藥面積，如表 Table 5 所示。Naringenin 之血藥面積約為 56.3 nmol ‧ min/ml，naringenin conjugates 之血藥面積約為 105.2 nmol ‧ min/ml。

另外利用 WINNONLIN 之非室體（noncompartment）模式計算靜脈給藥後 naringenin 及 naringenin conjugates 之總血藥面積為 2104.4 nmol ‧ min/ml，口服給藥後 naringenin 及 naringenin conjugates 之總血藥面積為 161.5 nmol ‧ min/ml，其吸收率可由以下方法求出：

Percent absorbed=$AUC_{(naringenin+conjugates)\ po}/AUC_{(naringenin+conjugates)\ iv} \times 100\ \%$

計算結果，naringenin 之吸收率僅 8 %。

若比較 naringenin 靜脈注射與口服給藥後血中結合態佔總吸收量的比率，naringenin conjugates 之 AUC 分別為 AUC_{total} 的 18 %和 60 %，以 paired Student's t-test 統計結果有顯著差異（p=0.006），顯示口服給藥途徑，naringenin 有明顯的首渡代謝發生。

表三、血清中 naringenin 同日內與異日間分析的精密度與準確度

Conc（μg/ml）	Precision		Accuracy	
	Intraday Mean ± S.D.（C.V.%）	Interday Mean ± S.D.（C.V.%）	Intraday Relative error（%）	Interday Relative error（%）
65.00	64.81 ± 0.10(0.16)	64.71 ± 0.11(0.17)	-0.30	-0.45
25.00	26.19 ± 0.08(0.31)	26.06 ± 0.05(0.21)	4.76	4.26
12.50	12.65 ± 0.08(0.66)	12.57 ± 0.04(0.31)	1.18	0.57
6.00	5.68 ± 0.05(0.87)	5.71 ± 0.03(0.58)	-5.28	-4.87
3.00	2.96 ± 0.03(1.15)	2.88 ± 0.12(4.14)	-1.49	-4.02
1.00	1.01 ± 0.01(1.17)	1.00 ± 0.01(1.44)	0.97	0.00
0.50	0.52 ± 0.02(3.20)	0.48 ± 0.02(3.99)	4.62	-3.93
0.20	0.20 ± 0.01(3.09)	0.19 ± 0.01(3.67)	2.23	-3.00
0.10	0.10 ± 0.01(1.69)	0.10 ± 0.01(3.25)	0.33	1.67
0.05	0.06 ± 0.01(3.35)	0.05 ± 0.01(5.25)	12.67	9.33

n=3

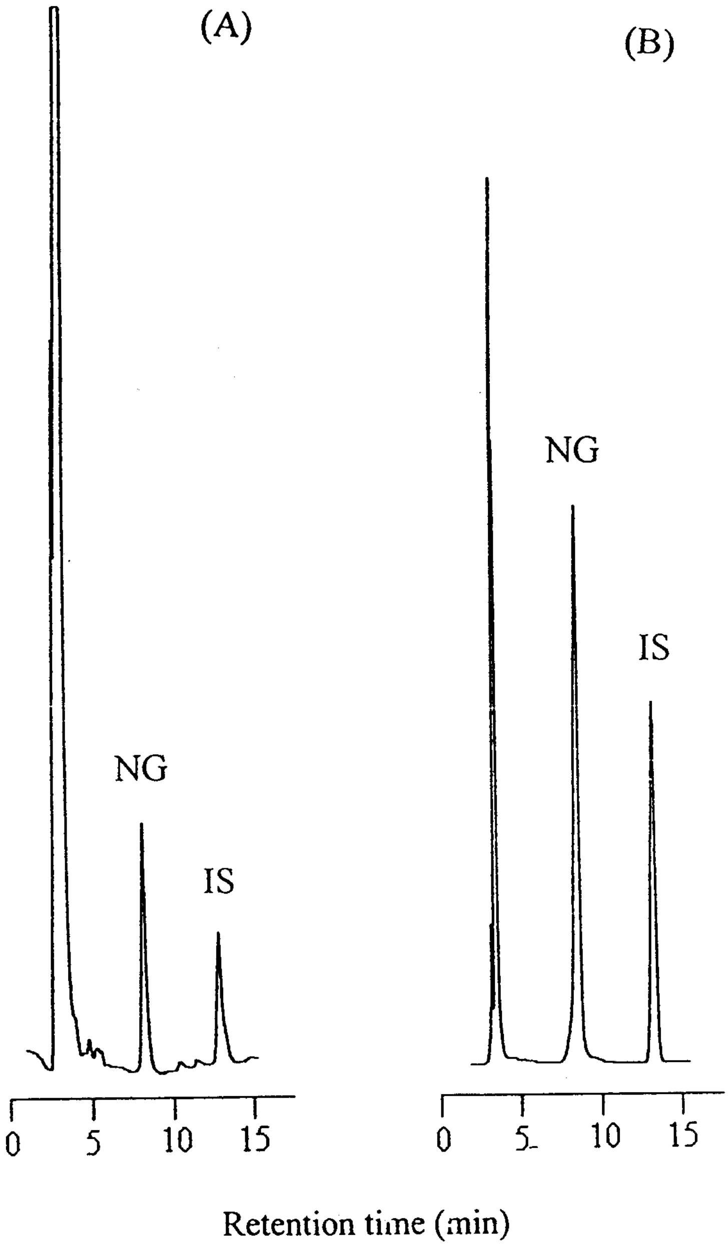
表四、六隻家兔靜脈注射 naringenin（25.0 mg/kg = 92.0 μmol/kg）之 naringenin 的藥物動力學參數

Rabbits / Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.E.
K_{10}（min^{-1}）	0.11	0.16	0.07	0.12	0.12	0.09	0.11 ± 0.01
K_{12}（min^{-1}）	0.02	0.07	0.08	0.15	0.02	0.01	0.06 ± 0.02
K_{21}（min^{-1}）	0.06	0.10	0.05	0.15	0.07	0.08	0.09 ± 0.02
α（min^{-1}）	0.15	0.27	0.19	0.38	0.15	0.12	0.21 ± 0.04
β（min^{-1}）	0.05	0.06	0.02	0.05	0.05	0.07	0.05 ± 0.01
$t_{1/2}$（α）（min）	5	3	4	2	5	6	4 ± 1
$t_{1/2}$（β）（min）	15	12	35	14	13	11	17 ± 4
V_d（L）	1.1	0.9	3.5	1.7	0.9	1.3	1.6 ± 0.4
Cmax（nmol・ml^{-1}）	225.6	274.3	52.8	145.3	283.0	200.0	196.8 ± 35.4
AUC0-∞（nmol・min・ml^{-1}）	2002.2	1732.7	771.1	1178.8	2362.8	2111.6	1693.2 ± 247.3
CL（L・min^{-1}）	0.13	0.15	0.24	0.20	0.10	0.12	0.16 ± 0.02

表五、六隻家兔靜脈注射和口服 naringenin 後 naringenin 及其結合態代謝物的 AUC_{0-t}（nmol ・ min/ml）之比較

Rabbits / AUC_{0-t}	1	2	3	4	5	6	Mean ± S.E.
Naringenin+Conjugates（iv）	2942.7	1836.2	726.2	1419.1	3106.7	2595.4	2104.4 ± 382.5
Naringenin（iv）	2110.9	1747.9	679.2	1083.0	2256.7	2131.8	1668.2 ± 263.6
Conjugates（iv）	831.8	88.4	47.0	336.1	850.0	463.6	436.2 ± 142.7
Naringenin+Conjugates（po）	152.7	64.2	79.0	152.4	235.4	285.2	161.5 ± 35.2
Naringenin（po）	13.0	28.9	58.0	55.7	144.3	37.8	56.3 ± 18.9
Conjugates（po）	139.7	35.3	21.0	96.7	91.1	247.4	105.2 ± 33.5
$\frac{\text{Conjugates (iv)}}{\text{(Naringenin+Conjugates) (iv)}}$	0.28	0.05	0.06	0.24	0.27	0.18	0.18 ± 0.04
$\frac{\text{Conjugates (po)}}{\text{(Naringenin+Conjugates) (po)}}$	0.91	0.55	0.27	0.63	0.39	0.87	0.60 ± 0.11**
$\frac{\text{(Naringenin+Conjugates) (po)}}{\text{(Naringenin+Conjugates) (iv)}}$	0.05	0.03	0.11	0.11	0.08	0.11	0.08 ± 0.01

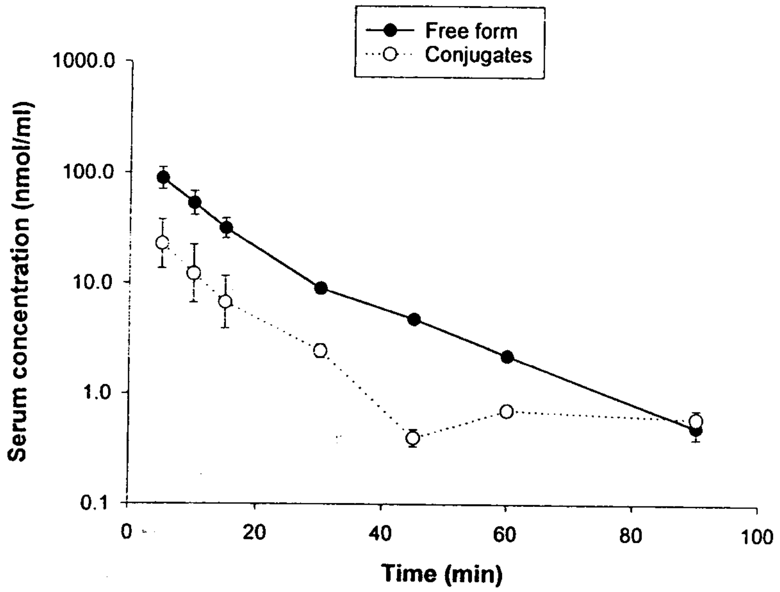
** $p < 0.01$



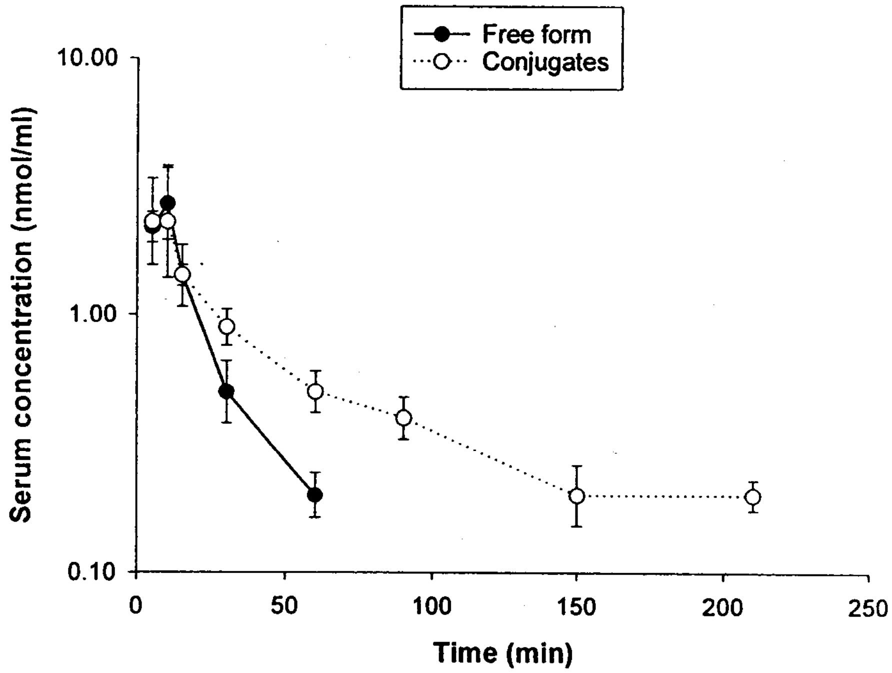
圖四、(A)家兔口服 25.0 mg/kg naringenin 5 分鐘後血清檢品的層析圖

(B)家兔靜脈注射 25.0 mg/kg naringenin 經 10 分鐘後血清檢品的層析圖

NG: naringenin（A: 1.07 μg/ml, B: 24.88 μg/ml）, IS: 5,7-dimethoxycoumarin（A: 1.0 μg/ml, B: 25.0 μg/ml）.



圖五、六隻家兔靜脈注射 25.0 mg/kg naringenin 之 naringenin 及其結合態代謝物的平均血藥濃度經時變化圖



圖六、六隻家兔口服 25.0 mg/kg naringenin 之 naringenin 及其結合態代謝物的平均血藥濃度經時變化圖

三、枳殼與化洲橘紅中之 naringin、naringenin、narirutin 於人體中的吸收

(一)、藥材煎劑中 naringin、naringenin、narirutin 之定量

1. 枳殼中 naringin、narirutin 及 naringenin 之定量

Naringin 與 narirutin 為兩個異構物，其 aglycone 部份完全相同，僅兩個醣基連接的位置有異，naringin 為 Glc^2-Rha，narirutin 為 Glc^6-Rha。二者物理化學性質十分相近，不易分離或分辨，綜觀文獻中對 naringin 或 narirutin 之定量研究，多採用含酸或緩衝溶液之移動相或無內部標準品（20-26），本研究所建立之系統，移動相之組成僅為水與氰甲烷（81：19）之混合液，內標為 6,7-dimethoxycoumarin，即可定量枳殼中 narirutin 及 naringin，naringin 的滯留時間為 16.5 分，narirutin 的滯留時間為 13.6 分，內標的滯留時間為 22.0 分，如 Fig. 7、Fig. 8 所示，分離效果很好，naringin 與 narirutin 的檢量線分別為 $y = 0.004\ x + 0.025$（ $r = 0.999$ ）及 $y = 0.075\ x - 0.030$（ $r = 0.999$ ），煎劑中 naringin 的劑量為每 100 ml 含 263.4 mg（ 453.8μmole ），narirutin 的劑量為每 100 ml 含 5.2 mg（ 8.9μmole ）。

Naringenin 為 naringin 與 narirutin 之 aglycone 部份，本研究開發以氰甲烷與水 29：71 的比例，5,7-dimethoxycoumarin 為內標，定量枳殼中 naringenin，移動相亦不需含酸或緩衝溶液，其滯留時間為 16.7 分，內標的滯留時間為 26.9 分，如 Fig. 9 所示，代入naringenin 的檢量線（ $y = 0.072\ x - 0.081$，$r = 0.999$ ），求得煎劑中 naringenin 的劑量為每 100 ml 含 28.2 mg（ 10.3μmole ）。

分析結果顯示： naringin 之檢量線為 $y = 0.004\ x + 0.025$（ $r = 0.999$ ），narirutin 之檢量線為 $y = 0.075\ x - 0.030$（ $r = 0.999$ ），naringenin 之檢量線為 $y = 0.072\ x - 0.081$（ $r = 0.999$ ），可見 naringin 在 31.3μg/ml 至 1200.0μg/ml，narirutin 在 2.5μg /ml 至 50.0μg/ml，naringenin 在 2.5μg/ml 至 50.0μg/ml 之濃度範圍內皆有良好的

線性關係。

分析系統的評估係針對枳殼煎劑之 naringin、narirutin 及 naringenin 進行同日內及異日間精密度與準確度試驗，naringin、narirutin、naringenin 的同日內及異日間精確度均尚佳，其分析最低靈敏度均為 0.1μg/ml（S / N > 3）。

本定量方法之準確性評估係分析枳殼煎劑中 naringin、narirutin、naringenin 之回收率，顯示 naringin 之回收率為 91.5 ～107.5%，narirutin 之回收率為 102.7～ 107.9%，naringenin 的回收率為 90.4～ 95.1%，準確性良好。

2. 化州橘紅中 naringin、narirutin 及 naringenin 之定量

製備的化州橘紅煎劑經與枳殼煎劑相同之 HPLC 方法定量，藥材水煎劑之柚皮苷含量，每一劑量化州橘紅原藥材水煎劑含 naringin 151.8 mg（261.5μmol）與 naringenin 6.5 mg（23.8μmol）。

(二)、尿中代謝物之定量

1. 枳殼中尿中代謝物之定量

Naringin、narirutin 口服進入消化道，會被腸內微生物消化分解為 naringenin 方能吸收（27, 28），因此 naringin、narirutin 及 naringenin 三者會產生相同的代謝物。統計每 100 ml 枳殼煎劑中此三成分之含量，為 473.1μmole。從老鼠口服 naringin 的研究報告中顯示其代謝物有 naringenin 4-glucuronide、naringenin 7,4-disulfate、naringenin 7-glucuronide 等排出於尿中，因此為定量人體排出於尿中的代謝物，尿液檢品於 HPLC 分析前先以 glucuronidase/sulfatase 水解 4 小時（28）。

六個人的尿液檢品未經酵素水解時經 HPLC 分析，未發現 naringin 或 naringenin，經 glucuronidase/sulfatase 水解後，僅有 naringenin 而無 naringin，因此 naringin、naringin glucuronide、naringenin 均未存在於尿液檢品中，而僅有 naringenin glucuronides 或 sulfates

排出，將酵素水解過之尿液檢品經本研究開發之HPLC條件定量其naringenin，層析圖如 Fig. 10 所示，定量方法係採當天製作檢量線的方式。回收率試驗目的在比較naringenin添加在空白尿中和在空白溶液（ methanol ）中，經尿檢品之前處理步驟處理後檢出量之差異。結果顯示 naringenin 之回收率介於 93.8～103.6 % 之間。

依個體及排出時段的不同，分別計算排出量，結果如 Table 6 所示。口服枳殼水煎劑在每段時間所排出之 naringin 代謝物之累積量與總量，結果如 Fig. 11 所示。

Naringenin glucuronides 及 sulfates 在尿中的排出量，個體差異甚大，為 35.0～155.6μmole（ 平均為 106.0μmole ）。其尿藥之尖峰時段亦差異頗大，從服藥後 2 小時到 24 小時不等。排藥之半衰期平均為 3.4±0.5 小時。排除百分率為 7.4～32.9%，此現象可能與個體本身小腸中之微生物多寡有關。

2. 化洲橘紅中尿中代謝物之定量

定量尿液中 naringin 與 narirutin 代謝物 naringenin 之檢量線為 $y = 0.018x + 0.024$（ $r = 0.996$）及 $y = 0.016x + 0.014$（$r = 0.997$），前者適用濃度範圍為 0.4μg/ml 至 31.2μg/ml，後者適用濃度範圍為 7.8μg/ml 至 250.0μg/ml，線性關係均良好。

六位自願者服用化州橘紅蜜炙與原藥材水煎劑中所含 naringin 等雙氫黃酮類成分之總吸收量、吸收百分率及排除半衰期（T1/2）如 Table 7 所示，總吸收量平均為 74.8±12.9μmol，吸收百分率平均為 26.2±4.5 %，而其排除半衰期（T1/2）則在 6.3 至 0.8 小時之間。每位受試者其 naringin 代謝物隨時間之累積排除量則示於 Fig. 12。

結果顯示藥材水煎劑之平均吸收率 26.2±4.5 %（$p<0.05$）。另外從 Fig 12 可發現服用兩種水煎劑後，naringin 及 naringenin 之代謝物之累計排除量在每位受試者個體間差異極大，最高為 125.9μmol、最低為 35.4μmol，蜜炙藥材組最高為 101.1μmol、最低為 20.1

μmol。

表六、六位健康男性受試者口服枳殼煎劑尿中naringenin結合態代謝物之總量（μmole）

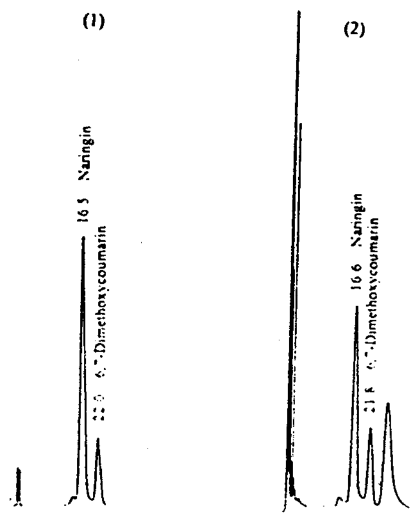
Volunteer No.	decoctions of zhiqiao		
	total recovery μmol	absorption %	urine $T_{1/2}$（hr）
1	155.6	32.9	3.0
2	145.9	30.8	3.1
3	82.2	17.4	3.4
4	62.1	13.1	3.6
5	155.5	32.9	3.0
6	35.0	7.4	4.4
Mean±S.E.	106.0±48.4	22.4±10.2	3.4±0.5

（*P<0.05）

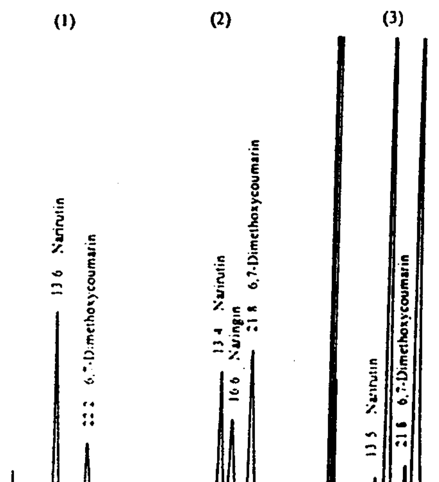
表七、口服枳殼煎劑之個別藥物動力學參數

Volunteer No.	decoctions of Pericarpium Citri Grandis		
	total recovery μmol	absorption %	urine $T_{1/2}$（hr）
1	65.1	22.3	6.3
2	55.0	19.3	0.8
3	92.3	32.4	1.6
4	35.4	12.4	1.3
5	75.3	26.4	2.5
6	125.9	44.1	1.8
Mean±S.E.	74.8±12.9	26.2±4.5	2.4±0.8

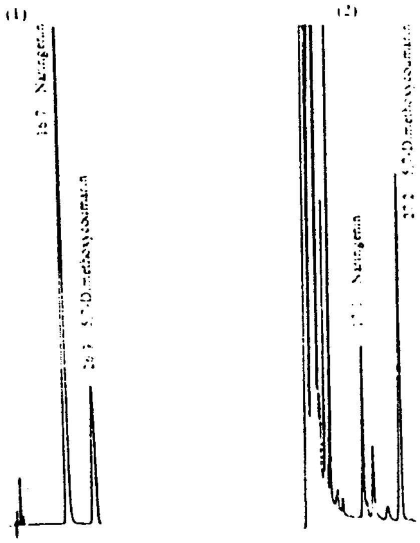
（*P<0.05）



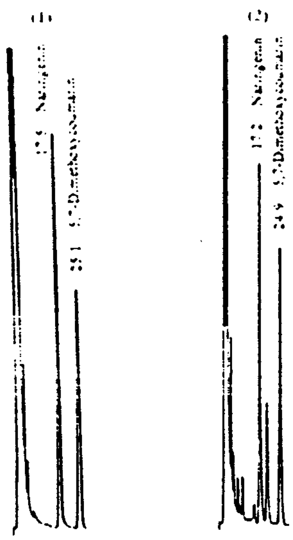
圖七、(1)標準品 naringin 與內部標準品 6,7-dimethoxycoumarin
(2)枳殼藥材煎劑中之 naringin 與內部標準品 6,7-dimethoxycoumarin



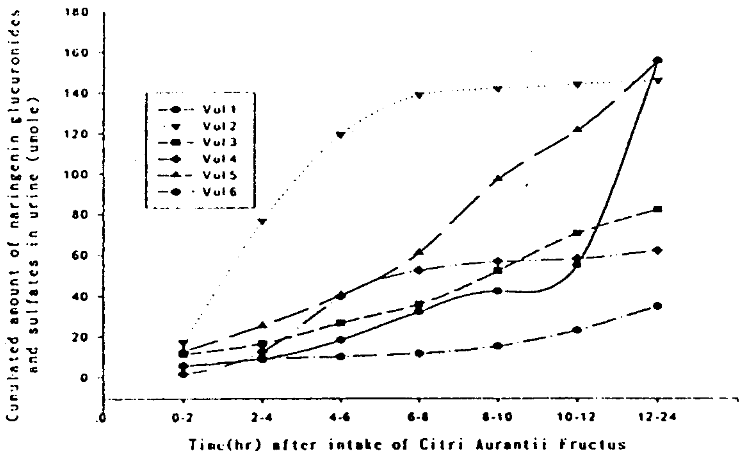
圖八、(1)標準品 narirutin 與內部標準品 6,7-dimethoxycoumarin
(2)標準品 narirutin、naringin 與內部標準品 6,7-dimethoxycoumarin
(3)枳殼藥材煎劑中之 narirutin 與內部標準品 6,7-dimethoxycoumarin



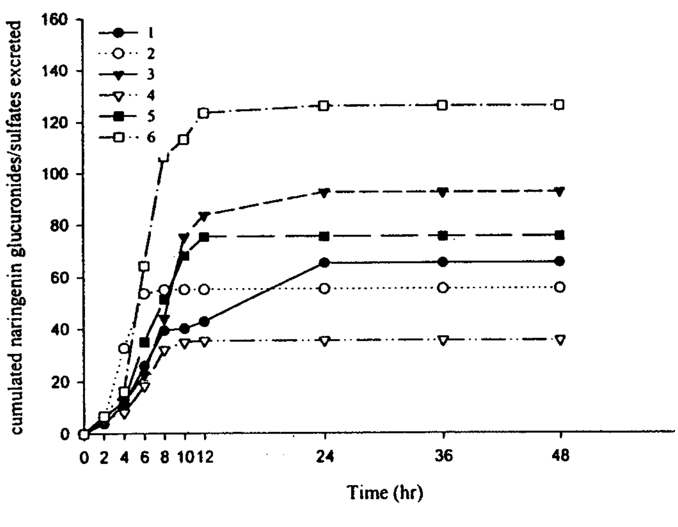
圖九、⑴標準品 naringenin 與內部標準品 5,7-dimethoxycoumarin
⑵枳殼藥材煎劑中之 naringenin 與內部標準品 5,7-dimethoxycoumarin



圖十、⑴naringenin 在空白尿液與內部標準品 5,7-dimethoxy-coumarin
⑵尿液檢品中之 naringenin 與內部標準品 5,7-dimethoxy-coumarin



圖十一、六位受試者口服枳殼煎劑後各段時間尿液中naringenin之排除累積量（μmol）



圖十二、六位受試者口服化橘紅煎劑各段時間尿液中結合態代謝物的之排除累積量（μmol）

四、槲皮素在兔體內之藥物動力學

(一)、兔子血清中槲皮素的 HPLC 定量方法

本實驗以逆相層析方式，6,7-dimethoxycoumarin 為內標，於乙 : 0.2 % 磷酸水溶液（27:73, v/v）的移動相，流速為 1.3 ml/min 條件下的，一次層析流程可在 13 分內完成。血清中槲皮素層析圖如 Fig. 13 所示。在血清檢品的處理中，以含內標的乙酸乙酯萃取檢品中的槲皮素，此方法與 SPE 的分析方式比較（29, 30），可減少沖洗固定相所須的溶媒量，且比採用 postcolumn derivatization methods（31, 32）簡單方便。本研究以兔子口服及靜脈兩種途徑投予等劑量的槲皮素（50 mg/kg），於血清中測出的槲皮素最高與最低的濃度相差約 1000 倍，所以血清中槲皮素的濃度測定，須利用兩條檢量線定量之（33）。低濃度的槲皮素濃度範圍為 0.16～2.5μg/ml，檢量線方程式為 $y = 0.574\chi + 0.013$（$r = 0.999$）；高濃度的槲皮素濃度範圍為 2.5～320.0μg/ml，檢量線方程式為 $y = 0.055\chi - 0.088$（$r = 0.999$），兩範圍之濃度與 peak area ratios 間皆有良好的線性關係。由同日內及異日間的 C.V.（%）值為 0.2～6.7 % 及 0.3～5.4 %，顯示其精密度佳而準確度也在 20 % 以內。回收率為 80.5 %～93.4 %，LOQ 為 0.16μg/ml，LOD 為 4.9 ng/ml。

(二)、槲皮素於兔子體內之動力學

六隻兔子靜脈注射槲皮素（165.44μmol/kg），後 120 分，在血清中已偵測不到原形槲皮素，且顯示槲皮素在兔子體內，大部分以結合態存在。靜脈投予槲皮素（165.44μmol/kg）的血藥數據，以 WIN-NONLIN 的一室模式計算動力學參數如 Table 8 六隻兔子平均的 K10 為 0.05±0.01 min^{-1}，C_{max} 為 140.95±12.88 $nmol{\cdot}ml^{-1}$，$AUC_{(0-\infty)}$為 3087.0±711.5 $nmol{\cdot}min{\cdot}ml^{-1}$，$t_{1/2}$ 為 15±3 min，Cl 為 0.16±0.02 $L{\cdot}min^{-1}$，MRT 為 22±5 min。經酶解之血藥濃度扣除原形槲皮素濃度求得結合態濃度。結合態的血藥濃度恆高於原形血藥濃度。靜脈注射槲皮素之六隻兔子血清中原形槲皮素及結合態的槲皮素之平均濃度經時

變化圖如 Fig. 14。經酶解之的血藥數據以 WINNONLIN 的非室體模式（noncompartment model）計算動力學參數，結果如 Table 9 所示。六隻兔子的平均 AUC_{0-t} 為 12837.3±646.4 nmol·min·ml^{-1}，MRT 為 37±4。

各隻兔子口服給予槲皮素（165.44μmol/kg）時，只偵測到少數的檢品含有原型槲皮素，因此無法計算其原型槲皮素之動力學參數。各隻兔子血清經酶解後之槲皮素濃度經時變化與靜脈給藥經酶解之血藥經時變化圖比較，顯示槲皮素口服吸收差，各隻兔子間吸收的程度差異頗大，懷疑有腸肝循環現象。六隻兔子血清中原型槲皮素及結合態槲皮素之平均濃度經時變化圖如 Fig. 15 所示。經酶解之的血藥數據以 WINNONLIN 的非室體模式（noncompartment model）計算動力學參數如 Table 10 所示。六隻兔子平均 C_{max} 為 5.84±1.90 nmol·ml^{-1}，AUC_{0-t} 為 907.9±254.0 nmol·min·ml^{-1}，T_{max} 為 134±74 min，MRT 為 272±22。

表八、六隻家兔靜脈注射 quercetin（165.44μmol/kg）之 quercetin 的個別藥物動力學參數

Parameters	Rabbit-a	Rabbit-b	Rabbit-c	Rabbit-d	Rabbit-e	Rabbit-f	Mean	±S.E.
Volume[a]	1.9	3.6	3.0	4.0	3.1	2.6	3.0	±0.3
K10[b]	0.08	0.05	0.08	0.04	0.05	0.02	0.05	±0.01
$AUC_{(0-\infty)}$[c]	2501.4	1843.0	1833.0	2451.8	3017.6	6875.6	3087.0	±711.5
$t_{1/2}$[d]	9	13	8	17	14	32	15	±3
C_{max}[e]	192.23	101.24	152.86	102.24	148.23	149.22	140.95	±12.88
Cl[f]	0.15	0.20	0.25	0.17	0.15	0.06	0.16	±0.02
MRT[g]	13	18	12	24	20	46	22	±5

[a]Volume（L）: apparent volume of distribution.
[b]K_{10}（min^{-1}）: rate constants of elimination phase.
[c]$AUC_{0-\infty}$（nmol·min·ml^{-1}）: area under the serum concentration-time curve extrapolated to infinity.
[d]$t_{1/2}$（min）: terminal elimination half-life.
[e]C_{max}（nmol·ml^{-1}）: peak plasma level.
[f]Cl（L·min^{-1}）: total clearance.
[g]MRT（min）: mean residence time.

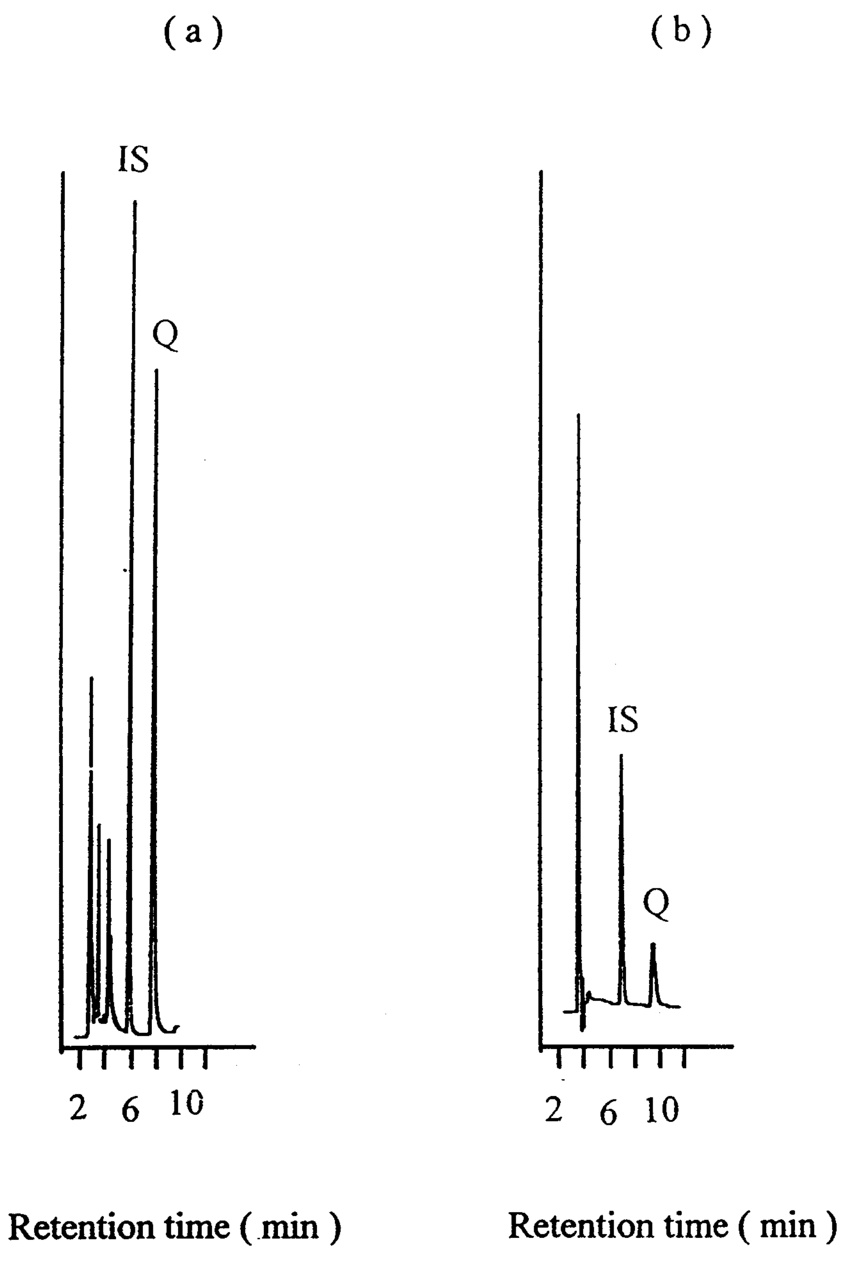
表九、六隻家兔經靜脈注射 quercetin（165.44μmol/kg ）之 quercetin 其結合態代謝物的個別 AUC_{0-t}（ nmol·min·ml-1 ）

Parameters	rabbit-a	rabbit-b	rabbit-c	rabbit-d	rabbit-e	rabbit-f	Mean	±S.E.
AUC_{0-t}[a]	11517.0	11205.0	11387.4	15352.1	13907.8	13870.9	12873.3	±646.4
C_{max}[b]	6.2764	700.30	634.76	563.38	608.55	720.04	642.44	±21.76
AUMC[c]	343437	382681	353891	571896	496487	778243	487772	±62655
MRT[d]	30	34	31	37	36	56	37	±4

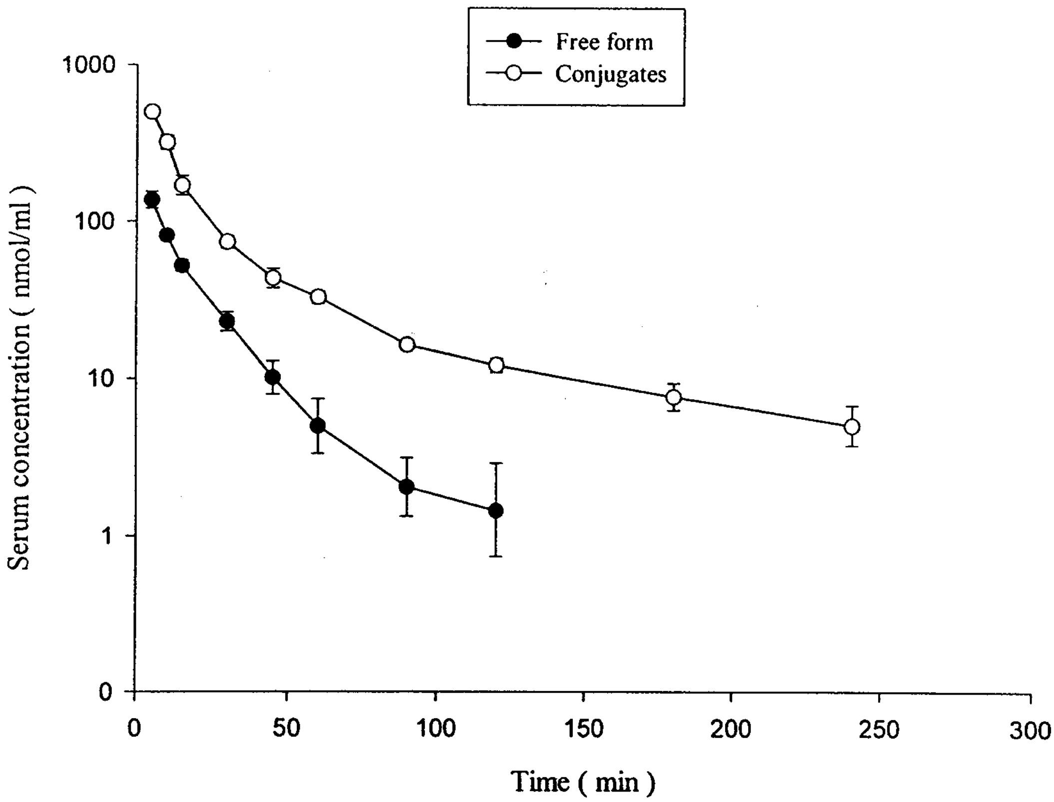
表十、六隻家兔口服 quercetin（165.44μmol/kg ）之 quercetin 及其結合態代謝物之個別藥物動力學參數

Parameters	Rabbit-a	Rabbit-b	Rabbit-c	Rabbit-d	Rabbit-e	Rabbit-f	Mean	±S.E.
AUC_{0-t}[a]	243.0	279.2	670.0	1881.0	1590.2	783.9	907.9	±254.0
C_{max}[b]	1.77	2.84	15.76	6.12	4.98	3.58	5.84	±1.90
AUMC[c]	61805	79770	111915	587978	443989	263069	258087	±80812
MRT[d]	54	286	167	312	279	336	272	±22
T_{max}[e]	5	5	5	390	10	390	134	±74

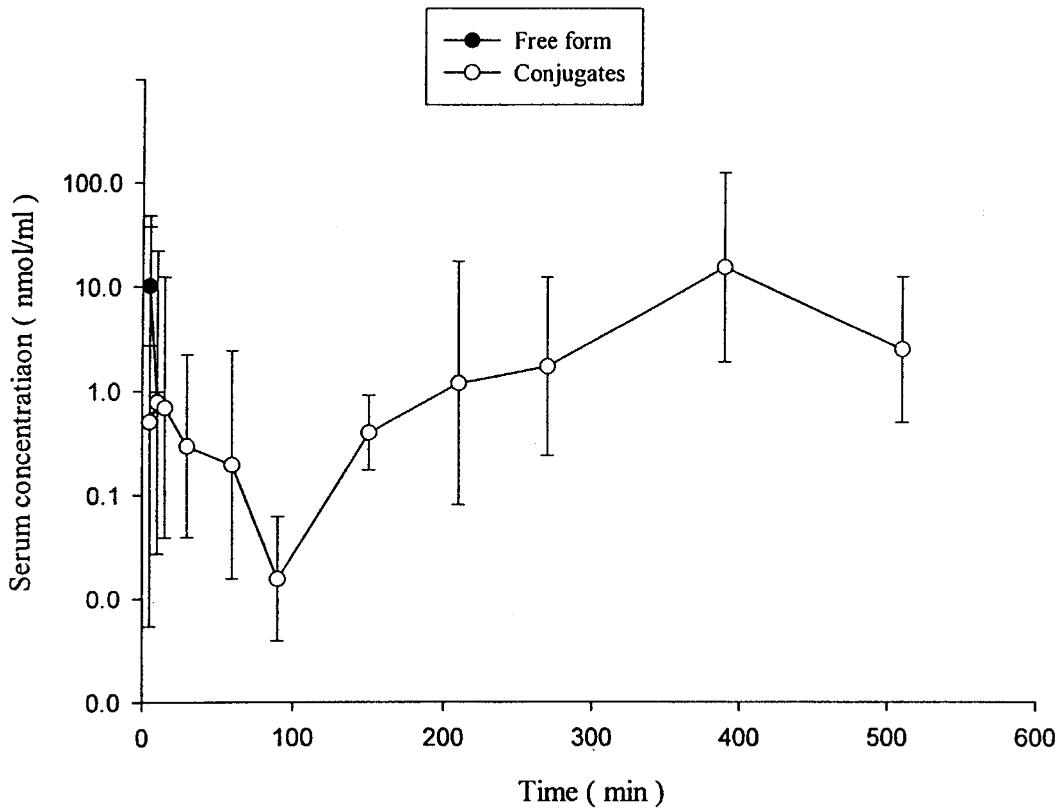
[a]AUC_{0-t}（ nmol·min·ml^{-1}）: area under the serum concentration-time curve.
[b]C_{max}（ nmol·ml^{-1}）: peak plasma level.
[c]AUMC（ nmol·min·ml^{-1}）: area unner the first moment versus time curve.
[d]MRT（ min ）: mean residence time.
[e]T_{max}（ min ）: time of peak plasma level.



圖十三、(a)家兔靜脈投予 165.44μmol/kg quercetin 所得血清之層析圖 Q：62.05 nmol/ml，內標：66.17 nmol/ml .
(b)家兔口服投予 165.44μmol/kg quercetin 所得血清之層析圖 Q：5.36 nmol/ml，內標：6.62 nmol/ml .



圖十四、六隻家兔靜脈注射之quercetin（●）及其結合態代謝物（○）的平均血藥濃度經時變化圖

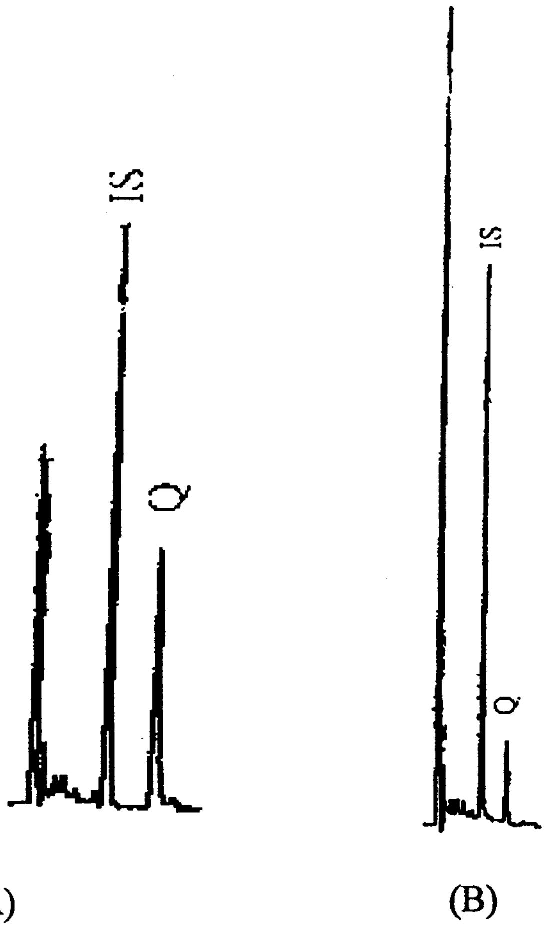


圖十五、六隻家兔經口服 quercetin 之 quercetin（●）及其結合態代謝物（○）的平均血藥濃度經時變化圖

五、芸香苷在兔體內之藥物動力學

本實驗定量兔子血清中槲皮素的所使用檢量線之濃度範圍為 0.16～10.0μg/mL，方程式為 $y = 0.4876x-0.0186$（$r = 0.999$），此範圍之線性關係良好。

八隻兔子口服給予芸香苷（110 mg/kg）後，在血清中並無偵測到原形芸香苷，此乃顯示芸香苷無法以原形吸收。血清經酶水解後之槲皮素濃度經時變化如圖 Fig.17 所示。顯示槲皮素進入兔體內後，是以結合態方式存在。兔子間吸收的程度差異頗大，並有腸肝循環現象。血藥數據以 WINNONLIN 的非室體模式（non-compartment model）計算動力學參數，結果以如 Table 11 所示。八隻兔子的平均 C_{max} 為 6.0±1.7 nmole・mL^{-1}，AUC_{0-t} 為 421.4±129.9 nmole・min・mL^{-1}，MRT 為 137.8±20.6 min。



圖十六、(A)家兔空白血清加入quercetin（Q）標準品 and 6,7-dimethoxycounarin（IS）及
(B)家兔經口服 110 mg/mL rutin 血清的 quercetin（Q） and 6,7-dimethoxycounarin（IS）層析圖

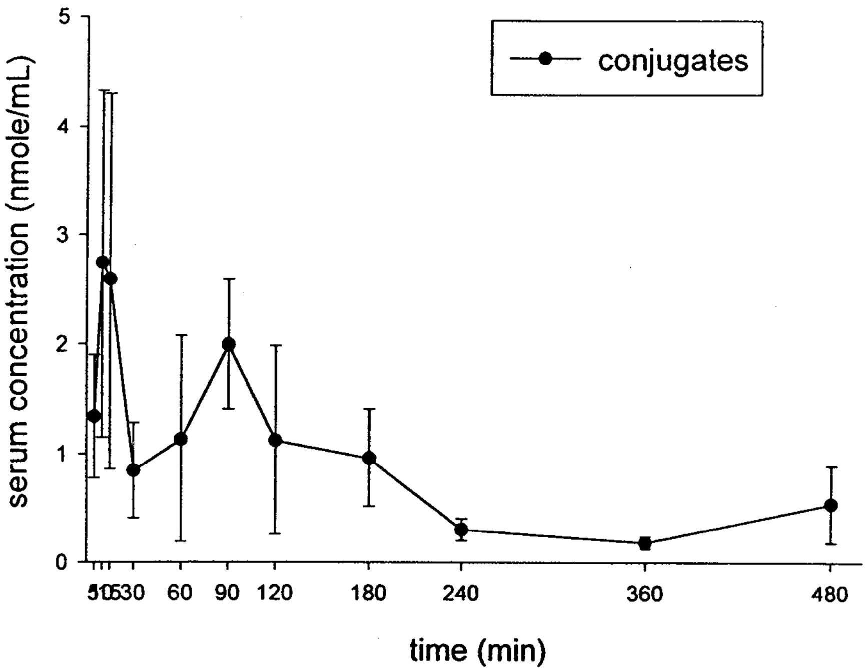


圖 十七、八隻家兔口服 110 mg/mL rutin 之 quercetin 結合態代謝物的平均血藥濃度經時變化圖

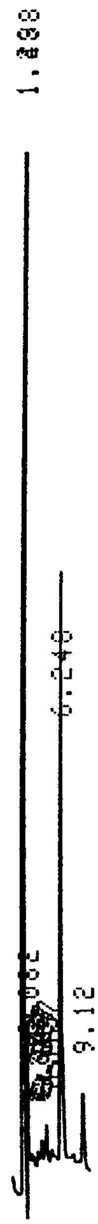
表 十一、六隻家兔口服 rutin（110.0 mg/kg）之 quercetin 結合態代謝物的個別藥物動力學參數

Rabbits / parameter	a	b	c	d	e	f	g	h	Mean±S.E.
C_{max}	14.3	2.4	0.6	0.5	7.1	6.2	9.0	7.7	6.0±1.7
AUC_{0-t}	577.4	197.7	32.0	63.2	615.7	191.4	1109.2	584.7	421.4±129.9
AUMC	54508.8	38134.9	1519.9	8021.2	110947.9	20330.2	249761.5	75412.9	69829.7±28745.6
MRT	94.4	192.9	47.5	127.0	180.2	106.2	225.2	129.0	137.8±20.6

六、槐花煎劑中芸香苷在兔體內之藥物動力學

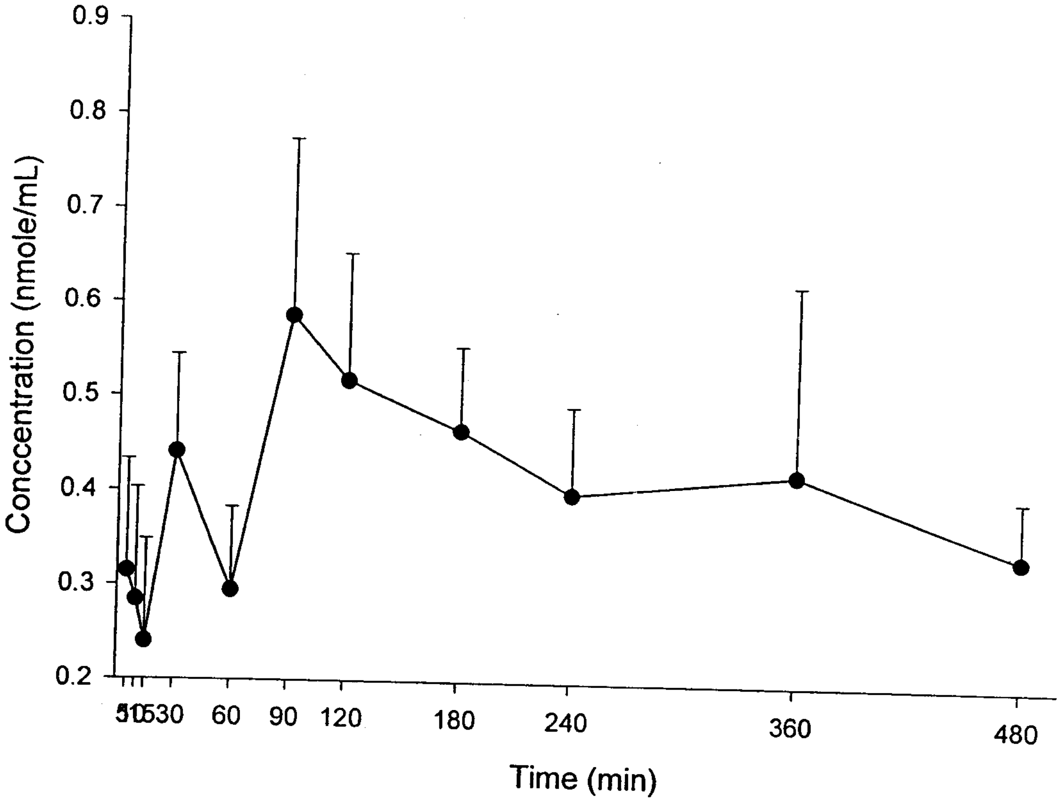
本實驗先定量槐花煎劑中之芸香苷，所使用檢量線之濃度範圍為 3.125～100μg/mL，方程式為 $y = 0.0988x-0.2000$（$r = 0.999$）。兔子口服之槐花煎劑中含 260.5 mg 芸香苷，另外本實驗定量兔子血清中之槲皮素，所使用檢量線之濃度範圍為 0.16～10.0μg/mL，方程式為 $y = 0.4876x-0.0186$（$r = 0.999$）。結果七隻兔子口服槐花煎劑 30 mL 後，未加酶反應時，在血清中偵測不到原形槲皮素，而加酶水解的血清中則有槲皮素出現，此乃顯示槲皮素在兔體內，幾乎全部以結合態存在。

槲皮素的血藥數據以 WINNONLIN 的非室體模式（non-compartment model）計算動力學參數，結果以如 Table 12 所示，七隻兔子的平均 $AUC_{0\text{-}t}$ 為 218.18±43.15 nmole/mL，MRT 為 220.82±48.18 min。七隻兔子間吸收的程度差異頗大，經時血藥濃度變化圖顯示有腸肝循環現象。



Retention time (min)

圖十八、家兔經口服 30mL 槐花後血清中 quercetin（Q）and 6,7-dimethoxycounarin（IS）層析圖



圖十九、七隻家兔經口服槐花煎劑之 quercetin 結合態代謝物的
平均血藥濃度經時變化圖

表十二、六隻家兔口服 30 mL 槐花煎劑所得之 quercetin 結合態代謝物的
個別藥物動力學參數

Rabbits / parameter	a	b	c	d	e	f	g	Mean±S.E.
C_{max}	0.89	0.56	1.53	0.39	0.45	1.19	0.37	0.77±0.45
AUC_{0-t}	325.09	177.94	418.59	166.91	165.87	197.92	74.96	218.18±43.51
AUMC	74595.70	41286.38	103529.03	42063.79	44505.29	37550.20	9508.64	50434.15±30090.52
MRT	229.46	232.02	247.33	252.02	268.31	189.73	126.86	220.82±48.18

七、橙皮苷元於兔體內之藥物動力學

本研究利用 HPLC 方法，定量血清中之 hesperetin 及 hesperetin glucuronides/sulfates。本方法所採用之 HPLC 系統僅以 1 % 醋酸與乙腈之混合液為移動相，血清檢品之前處理是利用分配原理，用乙酸乙酯萃取血清中 hesperetin 及自 hesperetin glucuronides/sulfates 酶解之 hesperetin，無須使用 RP-18 固相萃取，且每一血清檢品可於 20 分鐘內完成 HPLC 分析，方法簡易而快速。層析圖如 Fig. 20 所示。

分析中之檢量線係以 hesperetin 血清標準品與內標準波峰面積比值為 y 軸，hesperetin 血清標準溶液濃度為 x 軸，作線性迴歸，並求出檢量線方程式及關係係數。Hesperetin 之檢量線方程式為 $y= 0.35982x + 0.09414$（$r= 0.9994$）。此結果顯示 hesperetin 濃度在 0.39 μg/ml 至 100.0 μg/ml 之範圍內有良好線性關係。分析系統之精密度、準確度及回收率測試，結果良好。

血清檢品的前處理，係利用β-glucuronidase/sulfatase 水解 hesperetin conjugates，在 37 ℃水浴進行反應，經過 1 至 6 小時各種不同時間的水解試驗，結果顯示反應 4 小時酵素已能完全水解 hesperetin glucuronides/sulfates，因此，本實驗所有血清檢品之反應時間均採 4 小時。Hesperetin 經由靜脈注射，其血清中 hesperetin 及 hesperetin conjugates 濃度與時間之關係圖，如 Fig. 21 所示。hesperetin 原型藥物的濃度比 hesperetin 代謝物的濃度高。利用 WINNONLIN 之二室體模式求出有關 hesperetin 之藥物動力學參數。 Hesperetin 之排除半衰期約為 8 分鐘，分佈體積為 968 mL，血藥最高濃度為 214.5 nmol/ml，血藥面積約為 1573.7 nmol ‧ min/ml，全身清除率約為 82.17 mL/min。

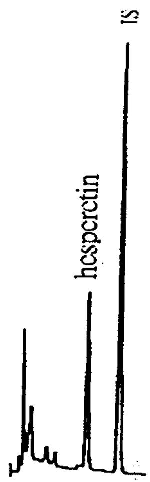
各隻兔子口服給予 50.0 mg/kg hesperetin，其血清中 hesperetin 及 hesperetin conjugates 濃度與時間之關係圖，如 Fig. 22 所示。口服給藥 5 分鐘後，血清中 hesperetin 濃度達到最高，顯示 hesperetin 口服吸收快速。並由圖可知 ，hesperetin 代謝物的濃度顯然比 hesperetin 原

型藥的濃度高出很多，可能是 hesperetin 在胃腸道中被吸收後，立刻被代謝。因此 hesperetin 原型藥的濃度幾乎看不到。，因此只能利用 WINNONLIN 之非室體（noncompartment）模式軟體求出有關 hesperetin 之藥物動力學參數， hesperetin 之排除半衰期約為 160 分鐘，血藥最高濃度為 25.2 nmol/ml，血藥面積約為 1409.39 nmol ‧ min/ml，全身清除率約為 570 mL/min。

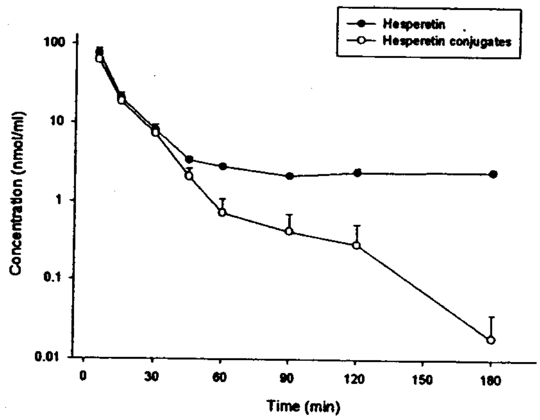
另外利用 WINNONLIN 之非室體（noncompartment）模式計算靜脈給藥後 hesperetin 及 hesperetin conjugates 之總血藥面積為 5191.93 nmol ‧ min/ml，口服給藥後 hesperetin 及 hesperetin conjugates 之總血藥面積為 1371.31 nmol ‧ min/ml，其吸收率可由以下方法求出：

Percent absorbed = $AUC_{(hesperetin+conjugates)po}/AUC_{(hesperetin+conjugates)iv} \times Dose_{iv}/Dose_{po} \times 100\ \%$

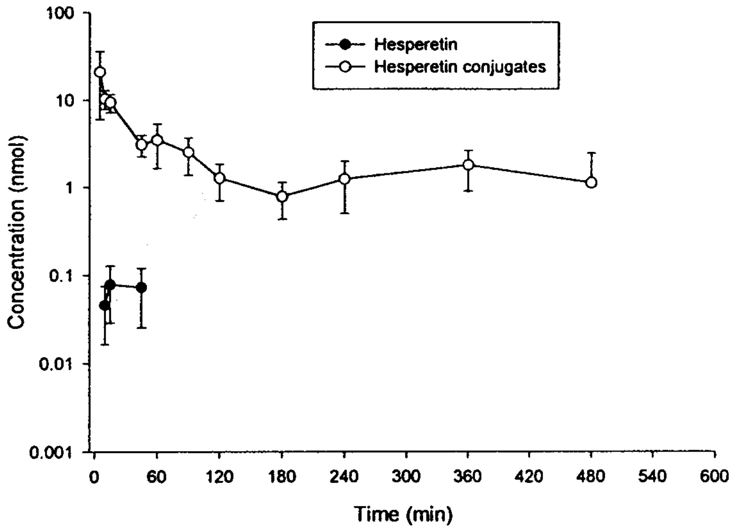
計算結果，hesperetin 之吸收率為 26.41 %。



圖二十、家兔血清中 hesperetin 和內標的層析圖（內標:5,7-dimethoxycoumarin）



圖二十一、六隻家兔靜脈注射 hesperetin（20.0 mg/kg）之 hesperetin / hesperetin 結合態代謝物的平均血藥濃度經時變化圖



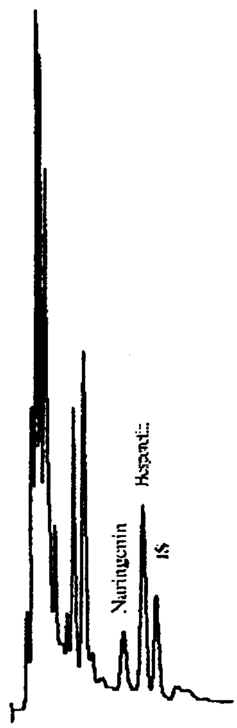
圖二十二、六隻家兔口服 hesperetin（50.0 mg/kg）之 hesperetin /hesperetin 結合態代謝物的平均血藥濃度經時變化圖

八、橙皮苷於兔體內之藥物動力學

口服 hesperidin 或口服陳皮水煎劑並採集血液樣品，經 HPLC 分析結果，無法偵測到 hesperetin 之血中濃度（n＝4）。可能因為 hesperidin 難溶於水，造成 hesperidin 在胃腸道無法吸收。

九、陳皮水煎劑中橙皮苷於兔體內吸收之動力學

因為口服 hesperidin 和口服陳皮水煎劑並採集其血液樣品，經分析結果，並沒有看到 hesperetin 之血中濃度。所以改採用口服陳皮水煎劑後，收集尿液的方式來探討陳皮中橙皮苷於兔體內之吸收。本研究利用 HPLC 方法，定量尿液中之 hesperetin 及 hesperetin glucuronides/sulfates。本方法所採用之 HPLC 系統以 1 % 醋酸與乙腈及甲醇之混合液為移動相，血清檢品之前處理是利用分配原理，用乙酸乙酯萃取血清中 hesperetin 及自 hesperetin glucuronides/sulfates 酶解之 hesperetin，且每一尿液檢品可於 20 分鐘內完成分析，方法簡易而快速。層析圖如 Fig. 23 所示。其分析後的結果如 Table 13 所示。



圖二十三、尿液檢品與內標之層析圖（內標：5,7-dimethoxycoumarin ）

表 十三、家兔口服陳皮煎劑後 hesperetin 的吸收百分率

Rabbit No.	total recovery μmol	absorption%
1	11.73	17.75
2	6.98	10.56
3	9.67	14.64
4	11.18	16.93
5	7.09	10.73
6	11.29	17.09
7	11.91	18.02
Mean±S.E.	9.98±0.81	15.1±1.22

第四章　結論與建議

一、本研究獲致以下結論

1. 本研究建立之HPLC分析方法，可應用於分析定量中藥材、血液、尿液中柚皮苷、柚皮苷元、柚皮芸香苷、芸香苷、槲皮素、陳皮苷與陳皮苷元之含量。
2. 從本計畫所進行之一系列黃酮類配醣體與其苷元之動力學研究中發現，該類成分之口服吸收率均極低，尤其以純化合物形式口服時更低。在體內多以與葡萄糖醛酸結合之代謝物存在，自由態極少。

二、建議

透過此一研究我們發現黃酮類配醣體與其苷元雖是極佳之天然抗氧化劑，且在中藥中含量亦高，但其口服吸收率卻相當低，因此目前若欲開發該類成分作為抗氧化劑，以為抗衰老保健或治療之用時，可能必須從改善其製劑配方以提高其口服吸收率著手，使其能進入體內發揮作用。

參考文獻

1. Robak J, Glyglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anion. Biochem. Pharmacol. 37, 837-841, 1988.
2. Bors W; Heller W; Michel C; Saran M. Flavonoids as antioxdants: Determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol. 186, 343-355, 1990.
3. Chen YT; Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonids as superoxide scavengers and antioxidants. Free Radic. Biol. Med. 9; 19-21, 1990.
4. Cotelle N; Bernier JL; Henichart JP; Catteau JP; Gaydou, E; Wallet JC. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. Free Radic. Biol. Med. 13, 211-219, 1992.
5. Cotelle N; Bernier JL; Catteau JP; Pommery J; Wallet JC; Gaydou EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. Free Radic. Biol. Med. 20, 35-43, 1996.
6. Cao G; Sofic E; Prior RL. Antioxdant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radic. Biol. Med. 22, 749-760,1997.
7. Takahama U. Inhibiton of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: Mechanism of antioxidative function. Phytochemistry. 24, 1443-1446, 1985.
8. Maxwell SR, Lip CY. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. Br. J. Clin. Pharmacol. 44, 307-317, 1997.
9. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diease. The Zutphen Elderly Study, Lancet 342, 1007-1011, 1996.
10. Hertog MGL, Hollman PCH, Potential health effects of the dietary flavonol quercetin, Eur. J. Clin. Nutri. 50, 63-71, 1996.

11. Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A, Sumida T, Fukutani K, Tanaka T, Ogawa H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination, Cancer Research 57, 246-252, 1997.
12. Spilkova J, Hubik J, Biological effects of flavonoids. Pharm. Unserer Zeit 17, 1-9, 1988.
13. Hollaman PCH, Gaag MVD, Mengelers MJB, van Trijp JMP, de Vries JHM, Katar MB, Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. Free Radic. Biol. Med. 21, 703-707, 1996.
14. Shah VP, Midha KK, Dighe S, Mcgilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, Mcdowall RD, Pittman KA, Spector S. Analytical methods validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic studies. Journal of Pharmaceutical Sciences 81: 309-312, 1992.
15. 魏敏吉、李家泰，藥代動力學、生物利用度研究的標準化問題，中國臨床藥理學雜誌，13: 247-250, 1997.
16. Ishii K, Furuta T, Kasuya Y. Determination of naringin and naringenin in human urine by high performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction. Journal of Chromatography B 704: 299-305, 1997.
17. Ameer B, Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA, Rouseff RL. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. Clinical Pharmacology and Therapeutics 60: 34-40, 1996.
18. Ishii K, Furuta T, Kasuya Y. Determination of naringin and naringenin in human plasma by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B 683: 225-229, 1996.
19. 鍾大放，以加權最小二乘法建立生物分析標準曲線的若干問題，藥物分析雜誌，16: 343-346, 1996.
20. Tosa Seui, Ishihara Saeko, Toyota Masahito, Yosida Setsuya, Naazawa Hir-

oyuki and Tomimatsu Toshiaki : Studies of Flavo-noid in Citrus. Analysis of Flavanone Glycosides in the Peel of Citrus by High Performance Liquid Chromatography. Shoyakuga-ku Zasshi, 42(1): 41-47, 1988.

21. 李永昌，許順吉：中藥材藥效成分之定量分析及炮製研究（第九報）-枳殼之定量研究，中華藥學雜誌，41(3): 247-254, 1989.

22. Nogata Y, Ohta H, Yoza KI, Berhow M, Hasegawa S:High Performance Liquid Chromatographic Determination of Naturally Occurring Flavonoids in Citrus with a Photodiode Array Detector. J. Chromatography A, 667 : 59-66, 1994.

23. Castillo J, Benavente-Garcia OB, Del Rio JA:Study and Optimization of Citrus Flavanone and Flavones Elucidation by Reverse Phase HPLC with Several Mobile Phases:Influence of the Structural Characteristics. J. Liquid Chromatography, 17:1497-1523, 1994.

24. Del Rio JA, Castillo J, Benavente-Garcia O:Elucidation by Reverse Phase HPLC of Some Citrus Flavanones and Their Respective Dihydrochalcones: Structural Study. J. Liquid Chromatography, 17 : 3461-3477, 1994.

25. Wu FJ, Sheu SJ:Analysis and Processing of Chinese Herbal Drugs（XII）-The Study of Fructus Aurantii Immatures, Chin. Pharm. J, 44 : 257-263, 1992.

26. Sheu SJ, Lu CF : Determination of Eight Constituents of Hsiao-Cheng-Chi-Tang by High Performance Liquid Chromatography. J Chromatogr A, 704 : 518-523, 1995.

27. Fuhr U, Kummert AL : The fate of Naringin In Humans : A Key to Grapefruit Juice-drug Interaction? Clinical Pharnacology & Therapeutics, 58(4): 365-373, 1995.

28. Abe Ken-Ichi, Katayama Hiroshi, Suzuki Akira, Yumioka Eizaburo : Biological Fate of Orally Administered Naringin and Naringenin in Rats. Sho-

yakugaku Zasshi, 47(4): 402-407, 1993.
29. Hows JM, Chipping PM, Fairhead S, Baughan A, Gordon-Smith EC. Nephrotoxicity in bone marrow transplant recipients treated with cyclosporin.Br. J. Haematol. 1983, 54: 69-74.
30. Kennedy MS, Deeg HJ, Siegel M, Crowley JJ, Storb R, Thomas ED. Acute renal toxicity with combined use of amphotericin B and cyclosporin after marrow transplantation. Transplantation. 1983, 35: 211-218.
31. Durrant S, Chipping PM, Palmer S, Gordon-Smith EC. Cyclosporin A methylprednisolone and convulsions. Lancet. 1982, 2: 829.
32. Barratt AJ, Kendra JR, Lucas CF. Cyclosporin A as prophylaxis against graft versus host disease in 36 patients. Br. Med. J. 1982, 285: 162-166.
33. Motilva V, Lastra CA, Calero MJM, Torreblanca J. Phyt. Res.1992, 6: 168-170.