

編號：CCMP92-CT-05

黃芩酒製及蜜製前後成分吸收之研究

賴妙英

中國醫藥大學藥學系

摘 要

本研究利用同一批生黃芩，經基原鑑定後，自行炮製而得蜜黃芩、酒黃芩，以 HPLC 定量生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩三種黃芩水煎劑所含黃芩素、黃芩元及漢黃芩素等黃酮成分，結果顯示此三種成分之含量皆以酒黃芩最多，其次為蜜黃芩，生黃芩最少。

三種黃芩水煎液經定量黃芩素、黃芩元及漢黃芩素後，再分別加酸水解，經 HPLC 定量 wogonin 含量，以計算各種黃芩水煎液中漢黃芩素配醣體之含量。另外，將三種水煎液分別以大白鼠糞便細菌溫孵，定量結果黃芩元及漢黃芩素於溫孵初期皆明顯增高數倍，顯示水煎劑中有不少的黃酮配醣體存在，繼續溫孵時，隨時間二種化合物轉而漸減。

三組大白鼠以交叉設計餵食相當於 2 g/kg 原藥材的三種黃芩水煎液後，血清檢品經 sulfatase、glucuronidase 分別水解，定量血中之自由態黃酮成分及其結合態代謝物，藉以比較三種黃芩水煎劑之間吸收之差異。結果顯示，口服酒黃芩水煎劑後，黃芩元的硫酸結合態代謝物及漢黃芩素的葡萄糖醛酸結合態代謝物之血中濃度比生黃芩水煎劑顯著減少。

關鍵詞：黃芩、炮製、蜜製、酒製、黃芩素、黃芩元、漢黃芩素

Number : CCMP92-CT-05

Effect of wine and honey processing on the absorption of *Scutellaria Radix*

Miao-Ying Lai

Department of Pharmacy, China Medical University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

This project aimed to investigate the effect of wine and honey processing on the absorption of *Scutellariae Radix* (SR) decoction. In this study, crude drug of SR was identified and processed in our laboratory according to literature. The contents of active constituents-baicalin, baicalein, wogonin and wogonin glycosides in various decoctions of SR were determined by HPLC method. The quantitation results showed that the decoction of SR fried with wine (SFW) had the highest contents of flavone constituents, whereas the untreated one had the least.

After flavones quantitation, various decoctions were hydrolyzed with hydrochloric acid and then assayed by HPLC method to calculate the total wogonin glycosides. Furthermore, various decoctions were incubated with rat feces. During incubation, the contents of aglycons-wogonin and baicalein significantly increased, indicating the presence of significant amounts of correspondent glycosides. The metabolic profiles of flavones in decoction of SR, SFW and honey-treated SR (HTS) showed similar pattern when they were incubated with rat feces.

Finally, rats were administered with various decoctions equivalent to 2 g/kg of crude drug after overnight fast in crossover designs. Blood was withdrawn via cardiopuncture and assayed by HPLC prior to and after hydrolysis with sulfatase and glucuronidase, respectively. The results showed that the blood levels of baicalein sulfates and wogonin glucuronides after administration of SFW decoction was significantly lower than SR decoction.

Keywords: *Scutellariae Radix*, processing, baicalin, baicalein, wogonin, wogonin glycosides

壹、前言

黃芩為唇形科 (Labiatae) 植物黃芩 (*Scutellaria baicalensis* GEORGI) 之乾燥根 (1)。其功用為瀉實火、除濕熱、止血、安胎。主治肺熱咳嗽、熱病高熱神昏、肝火頭痛、目赤、溼熱黃疸、瀉痢、吐衄、胎熱不安、癰腫疔瘡等症 (2)。近來藥理學研究證明，黃芩具有抗炎 (3)、抗菌 (4)、降血脂 (5)、保肝 (6)、降壓 (7)、抗血栓 (8)、抗氧化 (9) 等活性。據大陸臨床研究報導，黃芩用於治療小兒急性呼吸道感染、慢性氣管炎、急性菌痢、傳染性肝炎、高血壓有一定的療效 (10)。

黃芩除切片生用外，有酒黃芩及蜜黃芩等炮製品 (11)。過去對中藥炮製的研究，大多採化學方法與藥理方法。本計劃擬採化學方法及藥品動力學方法針對黃芩探討酒製、蜜製前後成分吸收之改變。

黃芩主要化學成分為黃酮類 (flavonoids) 化合物，今已分離出約 40 多種。主要活性成分有黃芩 (baicalin)、黃芩元或黃芩素 (baicalein)、漢黃 (wogonoside)、漢黃芩素 (wogonin) 等 (12)。依文獻報導指出在體內與體外試驗中，baicalein, baicalin 和 wogonin 都具有捕捉自由基 (free radical) 作用 (13-14)。Baicalein 對人體肝細胞瘤有抑制瘤細胞生長及其 DNA 合成作用 ($IC_{50}=50 \text{ g/ml}$) (15)。若將黃芩藥材經炮製後，其水煎劑中活性成分是否改變，活性成分吸收是否改變，是臨床上值得探討的問題。

黃芩之主要活性成分包括配醣體與非醣基，此計畫擬以高效液相層析法進行活性成分定量。定量分兩部分進行，一組直接定量 baicalin、baicalein、wogonin 等成分。另一組經酸水解後，定量非醣基漢黃芩素 (wogonin) 的總含量，再計算得知漢黃芩素配醣體的含量。與前人之研究相比，本計畫增加酸水解後之定量，希望能更準確掌握其中配醣體類成分之含量。

因活性成分 baicalin、wogonin glycosides 為配醣體，於大腸中為細菌水解為非醣基後方能吸收 (16)。因此本計畫擬以大白鼠糞便分別溫孵生黃芩、酒黃芩、蜜黃芩水煎劑，以瞭解其中配醣體活性成分於腸內代謝情況之異同。最後以大白鼠為模型，進行體內吸收實驗，以瞭解黃芩、酒黃芩、蜜黃芩水煎劑口服之後，活性成分及其結合態代謝物於血中動力學行為上之差異。本研究室對 baicalin 已完成了於大白鼠之代謝動力學 (17)，發現血中主要存在著 baicalein glucuronides/sulfates 結合態代謝物。

基於過去幾年本研究室對化橘紅、甘草、大黃炮製之研究經驗，期望藉此研究能夠以科學證據，針對炮製黃芩所產生的成分及吸收之改變，釐清炮製之學理基礎，提供臨床應用之參考。

貳、材料與方法

一、實驗材料

(一) 標準品與試劑

1. Baicalin、baicalein、wogonin 及 potassium dihydrogen phosphate：購自 Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)。
2. Baicalin (98%)、baicalein (98%)：購自 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, U.S.A.)。
3. Propyl paraben、 β -glucuronidase (type B-1)、sulfatase (type H-1)：購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)。
4. Acetonitrile (HPLC grade)、ethyl acetate (HPLC grade) 及 methanol (HPLC grade)：購自 Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)。
5. Disodium hydrogen phosphate、potassium biphosphate、sodium acetate 及 acetic acid：購自 Katayama Chemical Co. (Osaka, Japan)。
6. Hydrochloric acid (GR)、sodium hydroxide、ortho-phosphoric acid (GR, 85%)、dimethylsulfoxide (DMSO)：購自 Merck (Darmstadt, Germany)。
7. Ascorbic acid：購自 Riedel-de Haen (Seelze, Germany)。
8. 二次蒸餾水：係由 Milli-Q plus water 純水系統製得 (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.)。

(二) 動物

Sprague-Dawley 大白鼠 (體重為 200~500 g)

(三) 黃芩藥材

購自台中市五常街欣隆中藥行，黃芩採用同一批藥材。

二、實驗方法

(一) 黃芩藥材基原鑑定

1. 外部形質鑑別

利用五官檢查法再配合立體顯微鏡觀察。

2. 切片組織圖之鑑別方法

利用徒手切片法，材料進行橫切 (Transverse section T.S.)、放射線縱切 (Radial longitudinal section T.L.S.) 等，切取近 $10\ \mu\text{m}$ 之薄片檢體置於載玻片上，先以 chloral hydrate solution 清除細胞內含物後，再滴加各種不同化學試劑，如 phloroglucinol solution 與 hydrochloric acid 進行木化反應，或滴加 sudan III solution 進行木栓化反應，或利用 Schultze's 與 KOH maceration method 將材料予以解離，最後以 glycerin-water (1:1) 混合溶液將檢體封鎖，蓋上蓋玻片，置於顯微鏡下，先用低倍鏡檢查其輪廓，再以高倍鏡觀察各個組織之特徵，並以顯微測微計測量各組織或細胞之大小，經組織切片鏡檢與文獻〈中藥材品質管制-組織形態學鑑定〉比對為黃芩無誤 (*Scutellaria baicalensis* GEORGI)。

(二) 黃芩的炮製

1. 生黃芩

取生黃芩乾燥根，除去雜質，快洗，立即置蒸籠內，蒸至上汽後半小時取出，趁熱切成 2 mm 薄片，即時乾燥。

2. 蜜黃芩

煉蜜加水稀釋後，取黃芩片拌勻吸盡，稍悶，用中火炒至深黃色時，以不黏手為度，取出放涼。黃芩 100 kg，用煉蜜 25 kg。

3. 酒黃芩

取黃芩片用黃酒拌勻吸盡，悶潤至透，用中火炒至深黃色時，取出放涼。黃芩 100 kg，用黃酒 10 kg。

(三) 生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑之製備及檢品中活性成分之定量

1. 水煎劑檢品之製備

分別稱取生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩藥材各 15 g，各自加入 300 mL 熱水，於室溫下浸泡 10 分鐘使組織潤透，置於電熱板上加熱，沸騰後以文火煎煮至體積略少於 60 mL，趁熱過濾，待冷卻後，再以水定容至 60 mL。再以 HPLC 進行 baicalin、baicalein、wogonin 等成分之定量分析。

2. 檢量線之繪製

取配製好濃度各為 1 mg/mL 之 baicalin、baicalein 及 wogonin 之貯存溶液來進行檢量線標準溶液之製備。

取適量貯存溶液 (1 mg/mL)，以甲醇稀釋使 baicalin 標準溶液之濃度為 100、50、25、12.5、6.25、3.13 及 $1.6\ \mu\text{g/mL}$ ，使 baicalein、wogonin 標準溶液之濃度為 80、40、20、10、5、2.5 及 $1.25\ \mu\text{g/mL}$ 。取各濃度之標準溶液 200

μl 分別加入等體積之內標準甲醇溶液 (propyl paraben $40 \mu\text{g}/\text{mL}$) 經 HPLC 分析, 所得標準品與內標準之液峰面積比值, 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。

3. 高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

層析管柱: Inertsil ODS-2 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm}$)
GL Science Inc. (Japan)

保護層析管柱: Inertsil ODS-2 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 50 \text{ mm}$)
GL Science Inc. (Japan)

移動相: $0.05\% \text{H}_3\text{PO}_4$: $\text{CH}_3\text{CN} = 64:36$

流速: $1 \text{ mL}/\text{min}$

檢測波長: 270 nm

內標準品: Propyl paraben $40 \mu\text{g}/\text{mL}$

4. 生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑中 baicalin、baicalein、wogonin 之定量分析

檢品解凍後, 取 $300 \mu\text{L}$ 加甲醇 $700 \mu\text{L}$ 振盪混合, 經 9860g 高速離心 15 分鐘, 取上清液 $100 \mu\text{L}$ 再加甲醇稀釋 30 倍, 取 $150 \mu\text{L}$ 甲醇稀釋液加等體積之內標準甲醇溶液 (propyl paraben, $40.0 \mu\text{g}/\text{mL}$), 混合後高速離心 15 分鐘, 取上清液經微孔過濾器 ($0.45 \mu\text{m}$) 過濾後, 取 $20 \mu\text{L}$ 注入 HPLC 分析, 以檢品中 baicalein 及 wogonin 與內標準之波峰面積比值, 代入 baicalein 及 wogonin 檢量線之方程式, 求出各檢品中 baicalein 及 wogonin 之含量。

取 $300 \mu\text{L}$ 解凍後檢品加甲醇 $700 \mu\text{L}$ 振盪混合, 經 9860g 高速離心 15 分鐘, 取上清液 $100 \mu\text{L}$ 再加甲醇稀釋 200 倍, 取 $150 \mu\text{L}$ 甲醇稀釋液加等體積之內標準甲醇溶液 (propyl paraben, $40.0 \mu\text{g}/\text{mL}$), 混合後高速離心 15 分鐘, 取 $20 \mu\text{L}$ 注入 HPLC 分析, 以檢品中 baicalin 與內標準之波峰面積比值, 代入 baicalin 檢量線之方程式, 求出各檢品中 baicalin 之含量。

5. 生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑中 baicalin、wogonin 之配醣體定量分析

(1) 生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑之酸水解

酸水解反應, 量取 1.8 mL 之水煎劑, 加 4.2 mL 甲醇振盪混合, 經 9860 g 高速離心 15 分鐘, 取上清液 5 mL , 加 5 mL 之 $5\% \text{ HCl}$ 溶液混合, 精取 2 mL , 置於試管中以鋁箔蓋住, 於 100°C 之水浴反應 1.5 小時後, 加甲醇定容成 2.0 mL , 並置於 -30°C 冷凍櫃儲存備用, 本實驗操作三次。

(2) 生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑之酸水解 wogonin glycosides 之定量分析

酸水解反應之檢品解凍後，取上清液 100 μ L 加甲醇 500 μ L 振盪混合，經 9860 g 高速離心 15 分鐘，取上清液 200 μ L 加等體積之內標準甲醇溶液 (propyl paraben, 40.0 μ g/mL)，混合後經高速離心，取上清液經微孔過濾器 (0.45 μ m) 過濾後，取 20 μ L 注入 HPLC 分析，以檢品中 wogonin 與內標準之波峰面積比值，代入 wogonin 檢量線之方程式，求出檢品中 wogonin 之含量。

經酸水解反應後，所得 wogonin 之總含量減去酸水解前 wogonin 之含量，計算而得 wogonin glycosides 的含量。

6. 分析系統及方法之確效

(1) 精密度 (precision)

將各種濃度之 baicalin、baicalein、wogonin 標準溶液，分別於同日內晨、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得的直線迴歸方程式，求得每次實驗濃度值。以三次同日內和三次異日間分析值，分別求得平均值 (mean)、標準偏差 (standard deviation, S.D.) 及變異係數 (coefficient of variation, C.V.)。

(2) 準確度 (accuracy)

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

(3) 靈敏度 (sensitivity)

將標準溶液一再稀釋，直至其波峰與雜訊之比值為 3/1 時之濃度為其偵測極限 (limits of detection, LOD)。

(4) 回收率 (recovery)

精取已測定 baicalin、baicalein 及 wogonin 含量之黃芩水煎劑檢品 100 μ L，分別加入三種已知濃度的 baicalin 標準品溶液 (12.5、25.0、50.0 μ g/mL)、baicalein 標準品溶液 (10.0、20.0、40.0 μ g/mL) 及 wogonin 標準品溶液 (5.0、10.0、20.0 μ g/mL) 100 μ L 各三份，再加入 200 μ L 內標準甲醇溶液 (propyl paraben, 40.0 μ g/mL)，混合後經微孔濾膜 (0.45 μ m) 過濾。取 20 μ L 注入 HPLC 分析，以檢品中 baicalin、baicalein 及 wogonin 與內標準之波峰面積比值，分別代入 baicalin、baicalein 及 wogonin 檢量線之方程式，求出檢品中 baicalin、baicalein 及 wogonin 之含量，將換算所得之增加量除以已知的標準品添加量，求其百分比即為回收率。

(四) 體外糞便試驗

1. 人工腸液之製備

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

2. 糞便懸浮液之製備

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

3. 緩衝液 (pH 5.0)

取 0.1N 醋酸鈉溶液 (無水醋酸鈉 0.82 g，加水溶解至 100 mL。) 68 mL，加入 0.1 N 醋酸溶液 (量取冰醋酸 0.6 mL，加水至 100 mL。) 至 100 mL，再加 1 N 氫氧化鈉將 pH 值調至 5.0 ± 0.1 。

4. 大白鼠糞便標準溶液之製備

(1) Baicalein 標準溶液

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

(2) Wogonin 標準溶液

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

(3) Propylparaben 內部標準品溶液

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

(4) 糞便標準溶液

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

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

5. 檢量線之繪製

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

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

6. 分析樣品之製備與反應

將生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎劑檢品，以 HPLC 分析定量其條件如下：

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

移動相：CH₃CN：0.05% H₃PO₄ = 36：64

流 速：1.0 mL/min

檢測波長：270 nm

內部標準品：Propyl paraben（40.0 μ g/mL）

此三種黃芩煎劑中所含 baicalin、baicalein、wogonin glycosides 及 wogonin 等成分之含量（ μ g/mL）如下：

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

分別取上述已知各成分含量之生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎液 1.74mL，各自加入大白鼠糞便懸浮液 15.66 mL，以攪拌器混勻後，用微量分注器分別取混合液 600 μ L 置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，先各取 3 管立即貯存於 - 30 $^{\circ}$ C 冷凍櫃中，其餘再置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中，以 100 rpm 之速度振搖，令其反應，並於 1、3、6、9、12、24、36 及 48 小時於每組各取 3 管，立即貯存於 - 30 $^{\circ}$ C 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

7. 檢品分析

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

8. 高效液相層析之分析條件

幫浦 HITACHI L-6200 pump (Japan)

光電二極體陣列檢出器 HITACHI L-3000 Photo Diode Array Detector (Japan)

自動進樣器 SHIMADZU SIL 9A autosampler (Japan)

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

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

移動相：0.1% H₃PO₄：CH₃CN = 68：32

流速：1 mL/min

檢測波長：270 nm

內部標準品：Propyl paraben

9. 分析系統及方法之確效

(1) 精密度 (precision)

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

(2) 準確度 (Accuracy)

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

10. 數據處理

取上述檢品 10 μ L 注入 HPLC 分析，將檢品中分析所得之 baicalein 及 wogonin 波峰面積分別與內部標準品之波峰面積求得比值，代入各自之檢量線

方程式，即可求得生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩藥材水煎劑檢品於大白鼠糞便溶液中此些成分之濃度。

分別取上述已知各成分含量之生黃芩、蜜黃芩及酒黃芩水煎煮液 1.38 mL，各自加入大白鼠糞便懸浮液 12.42 mL，以攪拌器混合均勻後，用微量分注器分別取 600 μ L 混合液置於試管中，栓上血清塞並用針筒將空氣移除，再置於 37 $^{\circ}$ C 震盪水浴槽中，以 100 rpm 之速度反應，並於 0、1、3、6、9、12 及 24 小時於每組各取 3 管，立即貯存於 -30 $^{\circ}$ C 冷凍櫃中停止反應，待 HPLC 分析。

(五) 動物口服生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎劑於鼠體內之藥品動力學

1. 水解結合態代謝物酵素之製備

(1) β -Glucuronidase 溶液

取 β -Glucuronidase (666,400 unit/g, type B-1) 75 mg，以 pH5.0 緩衝溶液溶解定容至 50 mL，配製成濃度為 1000 unit/mL 之貯存溶液，貯存於 -30 $^{\circ}$ C 備用。

(2) Sulfatase 溶液

取 Sulfatase (20,000units/g, type H-1) 2.5 g，以 pH 5.0 緩衝溶液溶解定容至 50 mL，配製成濃度為 1000 units/mL 之貯存溶液，貯於 -30 $^{\circ}$ C 備用。

2. 血清標準溶液之製備

取適當量之貯存溶液以甲醇稀釋成一系列濃度 baicalein 為 100.0、50.0、37.5、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6 及 0.8 μ g/mL，wogonin 為 20.0、10.0、5.0、2.5 及 1.25 μ g/mL。取各濃度之標準溶液 100 μ L，加空白血清 900 μ L，製備成血清標準溶液，濃度分別為 baicalein 10.00、5.00、3.75、2.50、1.25、0.63、0.31 及 0.16 μ g/mL，wogonin 為 2.00、1.00、0.50、0.25 及 0.13 μ g/mL。

3. 檢量線繪製

取各血清標準溶液 100 μ L，加 50 μ L 緩衝溶液 (pH 5.0) 及維生素 C 溶液 10 μ L (200 mg/mL)，再於試管振盪器上充分混合，加 0.1 N 鹽酸 25 μ L 後，以 175 μ L 乙酸乙酯萃取 (含 0.5 μ g/mL propyl paraben 為內標準)，用試管振盪器振盪 10 秒後，經 9860 g 高速離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 70 μ L 移動相溶解，取 20 μ L 供 HPLC 分析。所得之標準品與內標準之波峰面積比值，與標準品之各已知濃度進行直線迴歸，求得檢量線之方程式。

4. 給藥方法與採血

(1) 動物

選用雄性 Sprague-Dawley 大白鼠六隻，體重介於 250~500 g，實驗前先禁

食 12 小時。

(2) 給藥

依大白鼠體重，實驗設計採交叉試驗模式，將大白鼠分成三組，第一組給予生黃芩、第二組給予蜜黃芩、第三組給予酒黃芩，每公斤給予相當 2 克原生藥，即 4 mL/kg 之各水煎劑 (0.5 克/mL)，經胃管灌食給藥。

(3) 採血

於給藥後 5、10、30、60、180、300、480 及 1440 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.6 mL。將血液檢品離心 (9,860 g) 15 分鐘，取上層血清貯存於 -30°C，俟後分析。

5. 血清檢品之前處理及分析

血清中 baicalein 及 wogonin 之 glucuronides 及 sulfates 之定量

(1) 血清中 baicalein 及 wogonin glucuronides 之定量

取 100 μ L 血清檢品溶液，加 β -glucuronidase 溶液 50 μ L (溶於 pH 5.0 之緩衝溶液，含 β -glucuronidase 1000 units/mL)、及抗壞血酸 50 μ L (200 mg/mL)，於試管振盪器上充分混合後，於 37°C 之恆溫水槽振盪 12 小時。

(2) 血清中 baicalein 及 wogonin 之 sulfates 之定量

取 100 μ L 血清檢品溶液，加 sulfatase 溶液 50 μ L (溶於 pH 5.0 之緩衝溶液，含 sulfatase 1000 units/mL)、及抗壞血酸 50 μ L (200 mg/mL)，於試管振盪器上充分混合後，於 37°C 之恆溫水槽振盪 2 小時。

前述 (1)、(2) 反應後，以 200 μ L 含內標準 (0.5 μ g/mL, propyl paraben) 之乙酸乙酯萃取，用試管振盪器振盪均勻後，高速離心 (9,860 g) 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 70 μ L 移動相溶解，再高速離心 (9,860 g) 15 分鐘，取 20 μ L 供 HPLC 分析。

6. 高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

層析管柱：Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm)

GL Science Inc. (Japan)

保護層析管柱：Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 \times 50 mm)

GL Science Inc. (Japan)

移動相：0.05% H_3PO_4 : CH_3CN = 63 : 37

流速：1 mL/min

檢測波長：270 nm

內標準品：Propyl paraben 0.5 μ g/mL

7. 分析方法之確效

(1) 精密度 (precision)

將各濃度之 baicalin、wogonin 血清標準溶液，分別於同日內晨、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得的直線迴歸方程式，求得每次實驗濃度值。以三次同日內和三次異日間分析值，分別求得平均值 (mean)、標準偏差 (standard deviation, S.D.) 及變異係數 (coefficient of variation, C.V.)。

(2) 準確度 (accuracy)

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

(3) 靈敏度 (sensitivity)

將標準溶液一再稀釋，直至其波峰與雜訊之比值為 3/1 時之濃度為其偵測極限 (limits of detection)。

(4) 回收率 (recovery)

將 baicalein 或 wogonin 標準甲醇溶液，分別加入空白血清及水中，濃度分別為 0.16、0.63、1.25 μ g/mL 或 0.125、0.25、0.5 μ g/mL 等每種濃度各三份，分析步驟如 baicalein 或 wogonin 檢量線之繪製所述，所測得血清標準溶液之 baicalein 或 wogonin 之波峰面積比值，除以等濃度水標準溶液之波峰面積比值，即為回收率。

8. 數據處理及統計方法

以 WINNONLINR 軟體，採非室體模式 (noncompartment model) 計算其動力學參數，並以 SPSSR 統計軟體之 paired Student's t-test 分析是否具統計上的差異 ($p < 0.05$)。

參、結果與討論

一、黃芩藥材之採購及基原鑑定

黃芩藥材經組織切片，於顯微鏡檢後與文獻（18）比對，確認為黃芩（*Scutellaria baicalensis* GEORGI）無誤。結果如附圖 Fig. 1.1。

二、黃芩之炮製

（一）生黃芩之修治

將原藥除去雜質，快洗，立即置蒸籠內，蒸至有蒸汽後半小時取出，趁熱切成 2 mm 薄片，即時乾燥（忌曝曬）。黃芩不宜冷浸切製，以蒸或沸水煮後切製為佳，其能使黃芩失去活性，不影響有效成分的含量。冷浸黃芩因不能破壞的活性，在一定的溫度及溼度下，使所含黃芩及漢黃芩分別解為黃芩元、漢黃芩素及葡萄糖醛酸，而影響品質。

（二）蜜黃芩之炮製

將蜜融化過濾，加兩倍的水稀釋，加熱至起泡，加入黃芩片。攪至水乾時，用文火炒至黃色，不黏手為度，取出晾乾。黃芩 100 g，用蜜 25 g。

（三）酒黃芩之炮製

取黃芩片用黃酒拌勻吸盡，悶潤至透後，用文火炒至深黃色時，取出放涼，黃芩 100 g，用黃酒 10 g。黃酒的量不足以浸潤藥材，另加了等量的水稀釋以增加液體輔佐的量。

三、生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑之製備及檢品中活性成分之定量

（一）Baicalin、baicalein、wogonin glycosides 及 wogonin 於甲醇溶液中之定量分析方法

1. 高效液相層析法之建立

本研究建立一個簡單快速且靈敏度高之等壓 HPLC 法，同時分析生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑中 baicalin、baicalein 與 wogonin 之含量。本實驗建立之系統，可於 35 分鐘內完成分析，層析圖如 Fig. 3-1 所示，分離效果良好，沒有干擾性波峰。內部標準品 propyl parabin 於層析圖中出現之位置亦無任何干擾。Wogonin glycosides 包括 wogonoside 及 wogonin 5-O-β-D-glucopyranoside，此二

者並無市售之標準品，因此 wogonin glycosides 之定量係將水煎劑檢品，將水解後 wogonin 之總量減去水解前 wogonin 之含量，即得 wogonin glycosides 之含量。經酸水解後配醣體 (glycosides) 之總量增加，如 Fig. 3-2 層析圖所示。

2. Baicalin、baicalein 及 wogonin 之檢量線

為了進行此定量分析，分別製作 baicalin、baicalein 及 wogonin 之檢量線，以各標準品與內標準之波峰面積比值為 Y 軸，各標準品之濃度為 X 軸進行直線迴歸，求得各成分之檢量線方程式及相關係數。結果如 Table 3-1 顯示三種成分均有良好的線性關係。

3. 確效試驗

為了確認此定量分析方法的精密度及準確度，分別進行了同日內及異日間的精確性比較。結果顯示定量 baicalin、baicalein 與 wogonin 之方法在同日內及異日間皆有良好之精確性，其變異係數 (C.V.) 值皆低於 10%，相對誤差 (relative error) 於 +20% 至 -20% 之間，顯示再現性佳，分析準確度良好。

(二) 生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑中 baicalin、baicalein 及 wogonin 之定量結果

三種黃芩水煎劑中，baicalin、baicalein、wogonin glycosides 及 wogonin 之定量結果，如 Table 3-2 所示。結果顯示此三種成分之含量皆以酒黃芩最多，其次為蜜黃芩，生黃芩最少。

四、體外糞便試驗

(一) Baicalin、baicalein 及 wogonin 於糞便懸浮液中之定量分析方法

1. 高效液相層析法之建立

本研究為了解生黃芩、蜜黃芩及酒黃芩水煎煮液中 baicalin、baicalein、wogonin 及 wogonin glycosides 等成分受大白鼠糞便懸浮液中作用之變化情形，建立一個簡單快速且精確之高效液相層析法以進行定量。

層析條件以氫甲烷：0.1% 磷酸溶液 (32:68, v/v) 混液為移動相，檢測波長 270 nm，流速為 1.0 mL/min。內部標準品 propylparaben 於層析圖中出現之位置無任何干擾。Baicalein、wogonin 及內部標準品之滯留時間分別為 11.0、28.1 及 15.6 分鐘，整個分析過程只需時 30 分鐘，層析圖如 Fig. 4-1 所示。

2. Baicalein 及 wogonin 之檢量線

為進行定量分析，分別製作 baicalein 及 wogonin 於糞便懸浮液中之檢量

線，結果如 Table 4-1 所示，顯示此兩種成分於大白鼠糞便懸浮液中均有良好線性關係 ($r^2 = 0.9995 \sim 0.9996$)。

3. 確效試驗

為了確認此定量分析方法的精密度及準確度，分別進行了同日內及異日間的精確性比較。結果顯示定量 baicalin 與 wogonin 之方法在同日內及異日間的精密度及準確度均良好，其變異係數 (C.V.) 值皆低於 5%，相對誤差 (relative error) 介於 +6.7 ~ -15.5 % 之間。

(二) 生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎煮液中 baicalin、baicalein、wogonin 及 wogonin glycosides 受大白鼠糞便細菌作用之比較

將已知 baicalin、baicalein、wogonin 及 wogonin glycosides 等成分含量之生黃芩、酒黃芩及蜜黃芩水煎液分別以大白鼠糞便細菌溫孵。在一接觸糞便時，三種黃芩中 baicalein 及 wogonin 含量均驟增，生黃芩由 14.7 增為 109.4 及 5.7 增為 17.5 $\mu\text{g/mL}$ ；酒黃芩 18.9 增為 122.6 及 7.5 增為 19.4 $\mu\text{g/mL}$ 及蜜黃芩 19.3 增為 98.8 及 7.6 增為 18.3 $\mu\text{g/mL}$ 。此結果顯示腸內菌之作用非常快速，據文獻報導腸菌可使配糖體化合物 baicalin 及 wogonin glycosides 解成非糖體 baicalein 及 wogonin。Baicalein 的量增加了 5.1~7.4 倍，wogonin 則是增加約 2.4~3.1 倍。各成分含量之變化如 Table 4-2 所示。

Baicalein 及 wogonin 的濃度經時變化圖 (如 Fig. 4-2 及 Fig. 4-3)，顯示此三種黃芩水煎劑於一接觸糞便時，baicalein 和 wogonin 立刻增加很多，之後隨時間而下降，顯示此二種化合物都為糞便細菌所降解，而酒製或蜜製對黃芩之黃芩素及漢黃芩素配糖體之循環前代謝並無明確影響。

五、動物口服生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑之藥品動力學

(一) Baicalin、baicalein、wogonin 及 wogonin glycosides 於鼠血清中之定量分析法

1. 高效液相層析法之建立

本研究為了解 baicalin、baicalein 及 wogonin 等成分於鼠體內吸收情形，故建立了一個快速且精確之高效液相層析法以進行定量。

分析方法主要依據本實驗室所開發之方法，血清檢品於脫氣、避光及抗壞血酸保護下，分別以 sulfatase 及 glucuronidase 水解後，以含內標準之乙酸乙酯萃取游離態之黃芩素、黃芩元及漢黃芩素，再以 HPLC 定量。此方法準確，再現性高且回收率佳。

其分離效果良好，內部標準品 propyl paraben 於層析圖中出現的位置亦無任何干擾，baicalein、wogonin 及內部標準品 propyl paraben 之滯留時間分別為 13.6、29.7 及 19.7 分鐘，整個分析過程只需 30 分鐘即可完成分析。層析圖如 Fig. 5-1 所示。

2. Baicalein 及 wogonin 之檢量線

為了進行此定量分析，因此分別製作 baicalin、baicalein 及 wogonin 之檢量線，以各標準品與內標之波峰面積比值為 Y 軸，各標準品之濃度為 X 軸進行直線迴歸，求得各成分之檢量線方程式及相關係數。結果如 Table 5-1 所示。由 Table 5-1 中可得知此二種成分在檢量線濃度範圍內於鼠血清中均有良好之線性關係。

3. 確效試驗

為了確認此定量分析方法的精密度 (precision) 及準確度 (accuracy)，分別進行了同日內 (intraday) 及異日間 (interday) 的精確性比較。顯示定量 baicalein、wogonin 之方法在同日內及異日間皆有良好之精確性，其變異係數 (C.V.) 值均小於 10%。確效結果顯示本分析系統之精密度及準確度皆良好。

(二) 生黃芩、蜜黃芩、酒黃芩水煎劑於鼠體內之藥品動力學

本研究以大白鼠為模型，探討三種黃芩水煎劑中活性成分黃芩、黃芩元及漢黃芩素等成分於大白鼠體內之代謝動力學並加以比較。藉由分別投予相當於 2 g/kg 之生黃芩、蜜黃芩及酒黃芩水煎劑，於口服後各時間點，以心臟採血方式採得檢品，血清檢品經 sulfatase、glucuronidase 分別水解，定量鼠體內之自由態黃酮成分及其結合態代謝物之血中濃度，再比較三種黃芩水煎劑之間吸收之差異。

口服三種黃芩水煎劑後，鼠體內之黃酮活性成分自由態濃度甚微。各成分的血中結合態代謝物濃度以生黃芩水煎劑有較高之趨勢，其次為蜜黃芩及酒黃芩。口服三種黃芩水煎劑後，所得之動力學參數，以 one-way ANOVA 比較其間之差異，水煎劑各成分之 sulfates、glucuronides 血峰濃度有差異，但不具統計上的意義。

口服三種黃芩水煎劑後，血中黃芩、黃芩元及漢黃芩素等之代謝物濃度及個別與平均血藥經時變化如 Fig. 5-2~11 所示，以非室體模式計算所得動力學參數如 Table 5-2~5~9 所示。

肆、結論與建議

本研究建立 HPLC 分析法，同時定量黃芩主要黃酮成分黃芩素、黃芩素元與漢黃芩素。利用酸水解的方法，計算黃芩水煎劑中漢黃芩素配糖體的含量。提供黃芩藥材及製劑例行品質管制之參考。

黃芩水煎劑中之黃酮類均會被大白鼠之糞便細菌轉變成元，且進一步被降解。黃芩酒製或蜜製對黃芩之黃芩素及漢黃芩素配糖體之循環前代謝並無明確影響。

本研究開發血清中黃芩素元與漢黃芩素結合態代謝物之定量方法，對於黃芩素元之不安定性，以添加 vitamin C 及抽氣、避光之方法可克服。可提供藥物動力學研究之參考。

黃芩之黃酮成分口服吸收入鼠體內，多以結合態代謝物呈現於血循環中，而較少原型藥物。經 sulfatase 水解，血清中漢黃芩素濃度顯著的增加，sulfatase 水解其特異性很高，可以間接證明，血清中具有漢黃芩素 sulfates 代謝物，迄今猶未見文獻報導。

為了反映體內活性，建議進行體外試驗之研究者，應該多重視這些黃酮類結合態代謝物。

綜合體外及體內之各項實驗顯示，黃芩經炮製後，酒黃芩水煎劑的黃芩素、黃芩素元及漢黃芩素均高於其他水煎劑，體內試驗顯示口服生黃芩水煎劑後，黃芩素的硫酸結合態代謝物、漢黃芩素的葡萄糖醛酸結合態代謝物之血中濃度及黃芩素的硫酸結合態代謝物之血峰濃度 (C_{max}) 比酒黃芩水煎劑為高。然而其他藥動學參數並無顯著差異。吾人推測因口服黃芩水煎劑後，動物間個體差異頗大，而且樣本數不夠多，不易檢出之間的差異。

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 CCMP92-CT-05 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. 新編中藥大辭典（第三冊），台北新文豐出版公司，1982; 2092.
2. 中華本草（下冊），上海科學技術出版社，1998; 1685-1689.
3. Lin CC., Shieh DE.: The Anti-inflammatory Activity of *Scutellaria rivularis* Extracts and Its Active Components, Baicalin, Baicalein and Wogonin, *American Journal of Chinese Medicine*, 1996; 24(1):31-36.
4. Ng TB., Ling JM., Wang ZT., Cai JN., Xu GJ.: Examination of Coumarins, Flavonoids and Polysaccharopeptide for Antibacterial Activity, *General Pharmacology*, 1996; 27(7):1237-1240.
5. Kimura Y., Kubo M., Kusaka K., Tani T., Higashino M., Arichi S., Okuda H.: Studies on *Scutellariae Radix*. V. Effects of Ethanol-induced Hyperlipemia and Lipolysis in Isolated Fat Cells, *Chem. Pharm. Bull.*, 1982; 30 (1):219-222.
6. Shimizu I., Ma YR., Mizobuchi Y., Liu F., Miura T., Nakai Y., Yasuda M., Shiba M., Horie T., Amagaya S., Kawada N., Hori H., Ito S.: Effects of Sho-Saiko-To, a Japanese Herbal Medicine, on Hepatic Fibrosis in Rats, *Hepatology*, 1999; 29(1):149-160.
7. 房喻等:生物化學雜誌，1991; 7(6):753.
8. Nyby MD., Sasaki M., Ideguchi Y., Wynne HE., Hori MT., Berger ME., Golub MS., Brickman AS., Tuck ML.: Platelet Lipoxygenase Inhibitors Attenuate Thrombin and Thromboxane Mimetic-Induces Intracellular Calcium Mobilization and Platelet Aggregation, *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 1996; 278 (2):503-509.
9. Gabrielska J., Oszmianski J., Zylka R., Komorowska M.: Antioxidant Activity of Flavones from *Scutellaria baicalensis* in Lecithin Liposomes, *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C. Journal of Biosciences*, 1997; 52(11-12):817-823.
10. 中藥大辭典（第四冊），台北昭人出版社，1982; 4023.
11. 國家中醫藥管理編委局：中華本草（7），上海科學技術出版社，上海，1999; 7:200-210.
12. Tang W, Eisenbrand G. *Chinese Drugs of Plant Origin*. Berlin, 1992; 919-929.
13. Kimuya Y, Kubo M, Tani T, Arichi S, Okuda H. Studies on *Scutellariae Radix*. IV.

- Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem Pharm Bull* 1981; 29(9):2610-2617.
14. Shieh DE, Liu LT, Lin CC. Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer Res* 2000; 20: 2861-2865.
 15. Matsuzaki Y, Kurokawa N, Terai S, Matsumura Y, Kobayashi N, Okita K. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87:170-177.
 16. Muto R, Motozuka T, Nakano M, Tatsumi Y, Sakamoto F, Kosaka N. The chemical structure of new substance as the metabolite of baicalin and time profiles for the plasma concentration after oral administration of Sho-Saiko-To in human. *Yakugaku Zasshi* 1997; 118:79-87.
 17. Lai MY, Hsiu SL, Tsai SY, Hou YC, Lee Chao PD. Comparison of Metabolic Pharmacokinetics of Baicalin and Baicalein in Rats, *J Pharm. Pharmacol*, 2003; 55(2):205-209.
 18. 行政院衛生署、中國醫藥學院：中藥材之鑑定研究，1991；356-357。

[..\23\5-02 圖\)--CCMP92-CT-05.doc](#)