

國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine

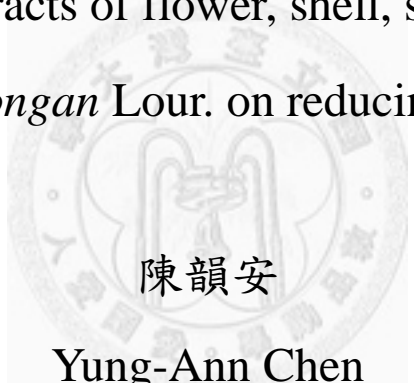
School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

龍眼花、殼、種子、葉與枝椶萃取物之降尿酸研究

The study of the extracts of flower, shell, seed, leaves and twig
of *Dimocarpus longan* Lour. on reducing uric acid level.



陳韻安

Yung-Ann Chen

指導教授：郭宗甫 博士

徐鳳麟 博士

Advisor: Tzong-Fu Kuo, Ph.D.

Co-advisor: Feng-Lin Hsu, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

致謝

回首三年來的學生生涯，有苦有樂，儘管曾經遇到不少挫折，最後總算還是順利完成碩士學位了！這其中要感謝的人很多，首先要感謝郭宗甫教授願意給學生重新開始的機會，雖然學生待在郭老師實驗室的時間不長，但老師對實驗專注的研究精神讓學生深深敬佩，老師純熟的實驗動物操作技術也讓學生學習到很多解剖生理學的知識，而除了學業上的指導，郭老師對學生的生活也十分關懷，感謝老師能包容學生的情緒低潮，您的體諒減輕學生許多壓力。也要感謝徐鳳麟教授對論文的指導和許瑜真小姐在萃取化合物方面的幫忙。謝謝口試委員—劉朝鑫教授和郭悅雄教授針對學生論文所給予的指正與建議，讓學生論文更加完整。

另外，這篇論文的完成還特別要感謝郭老師在台南的妹妹，辛苦地幫忙蒐集實驗所需之龍眼枝條和樹葉，處理過程花費不少時間與精神。另外也要謝謝實驗室助理們的幫忙，感謝佺蒼和一斌幫忙照顧實驗動物，謝謝一斌在許多實驗設計與操作方面的指導。謝謝小雷和國元幫忙校正修改英文論文。最後還要感謝鄭益謙教授，謝謝您在分子生物學方面的指導和學習待人處世之道的機會，並且在學生生病時給予的關懷。

還要感謝在這段時間支持我的家人、朋友們，謝謝媽媽辛苦的照顧生病的爸爸，讓我能沒有後顧之憂專心在台北完成學業，謝謝爸爸讓自己身體逐漸好起來；謝謝以前實驗室的學長姐和學弟在我心情不好的時候當我的垃圾桶，並總是在一旁幫我加油打氣，金芳、俊光、麥克風和阿甘謝謝你們!!!最後謝謝在台北的朋友們，讓我在實驗之餘有地方可以舒緩緊張的情緒。珍貴的友誼是我在台北三年除了學位之外最大的收穫！

摘要

人類在演化過程中失去可將尿酸轉化為尿素排出的尿酸酶，故尿酸合成過多或排泄減少是高尿酸血症主要形成的原因，而因營養過剩所造成的高尿酸血症與痛風更是現代人常見的文明病。主要位於肝臟的黃嘌呤酶是人體內嘌呤代謝過程產生尿酸的關鍵酵素，如果能抑制黃嘌呤酶作用便可以減低尿酸的形成，多餘的嘌呤可經由體內其他酵素回收利用，避免尿酸其在體內累積對關節、腎臟和心血管系統造成傷害。

近年來天然物萃物和自然保健食品已蔚為風潮，而植物化學成分中之抗氧化劑更是許多研究重心。龍眼除了是常見的熱帶水果更是中國傳統醫學中常見補神健胃的藥方，目前已有研究發現龍眼萃取物含有多種抗氧化成分，而抗氧化劑也被證實對許多酵素會產生影響。目前臨床常用之抗高尿酸血症藥物多為化學合成物質，有許多如：過敏、皮疹和肝腎傷害等不良副作用。由天然物中萃取能夠抗高尿酸血症又無副作用的植物化學成分是許多研究的目標。本實驗為證實民間偏方龍眼花茶之降尿酸療效，對其萃取物進行體外和體內之生物活性試驗，且為了充分利用生物資源，一併對龍眼種子、果殼、枝枒和樹葉進行研究。

實驗先以風乾龍眼（花、種子、果殼、枝枒和樹葉）甲醇萃取物在 295nm 波長下進行黃嘌呤酶抑制試驗測試龍眼萃取物抑制尿酸形成作用，發現五種龍眼萃取物都具有程度不等之黃嘌呤酶抑制效果，其中以龍眼花效果最佳，其 IC_{50} 為 115.76 $\mu\text{g/ml}$ 。

另外測試龍眼花所含已知十種化合物之黃嘌呤酶抑制率，發現以 proanthocyanidin A2 效果最佳，其抑制率可達 70.67%。之後進行生物體內活性試驗，在分別口服五種龍眼萃取物 1 小時後，以腹腔注射尿酸酶抑制劑 oxonic acid，建立齧齒類動物（大鼠和小鼠）高尿酸血症模式，2 小時後測量小鼠血中尿酸值的變化並和對照組比較，發現在 100mg/kg 劑量下五種龍眼甲醇萃取物都有降低

小鼠血中尿酸值的效果 ($p < 0.01$)。另外以高尿酸血症模式大鼠進行尿酸促進排除試驗，注射 oxonic acid 2.5 小時後，每 30 分鐘抽取膀胱尿液連續三小時。尿液分析結果顯示龍眼萃取物對促進尿酸排泄並無影響。綜合本研究之實驗結果，可以推測龍眼萃取物主要是藉由抑制黃嘌呤酶作用來降低血中尿酸值，並以龍眼花萃取物效果最佳，其作用主要是由具強抗氧化活性的 proanthocyanidin A2 對黃嘌呤酶產生抑制效果。



Abstract

Hyperuricemia results from over production or/and underexcretion of uric acid. Uric acid production is catalyzed by xanthine oxidase (XO) in the liver, which is a key enzyme in the oxidizing process of xanthine into uric acid. This study investigated anti-hyperuricemia bioactivity of *Dimocarpus longan* Lour. Longan pulp is a Chinese medicinal plant used for the treatment of amnesia and its flower is folklorically made into drinking tea to lower serum uric acid level. Therefore, the methanol extracts of the flower, seed, shell, stem and leaf of Longan were tested *in vitro* and *in vivo* to confirm its anti-hyperuricemic effect. Firstly, xanthine oxidase suppression rates were evaluated by the xanthine oxidase inhibition assay. The results showed that all Longan extracts reduced blood uric acid level as compared to the control group ($p < 0.01$). The flower extract exhibited the best blood uric acid lowering effect and IC_{50} of XO inhibition was 115.76 $\mu\text{g/ml}$. 10 compounds have been previously isolated from Longan flower in other studies; in this study, we also examined them by the xanthine oxidase inhibition assay, revealing that proanthocyanidin A2 had the strongest inhibitory effect (70.67%). In the *in vivo* part of this study, the methanol extracts from 5 different Longan parts were orally administrated to different groups of mice at 50 mg/kg or 100 mg/kg 1 hour before oxonic acid was injected. The blood uric acid levels in mice were then detected 2 h later. Furthermore, we carried out the urine uric acid excretion test in rats to find out whether the Longan extracts could promote the excretion of uric acid; however no significant effect on the excretion of uric acid was observed. According to these results, the mechanism behind the antihyperuricemic effect of Longan methanol extracts was indicated to be associated with the inhibition of xanthine oxidase which results in decreased production of uric acid. This study not only revealed the existence of

antihyperuricemic effect of of *Dimocarpus longan*, but also explored possible mechanisms. Our results showed that *Dimocarpus longan* has a great potential to be developed into novel therapeutic agents for the treatment of hyperuricemia.

Keywords: *Dimocarpus longan*, antihyperuricemia, xanthine oxidase inhibition.



目錄

致謝.....	i
摘要.....	ii
Abstract.....	iv
目錄.....	vi
圖目錄.....	viii
表目錄.....	ix
英文縮寫對照表.....	xi
第一章 序言.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
第一節 龍眼介紹.....	3
2-1.1 龍眼學名、產地及特性.....	3
2-1.2 龍眼所含之植物化學成分.....	4
2-1.3 龍眼之藥理與生物活性.....	5
第二節 尿酸與高尿酸血症.....	6
2-2.1 尿酸生合成.....	6
2-2.2 黃嘌呤酶之特性.....	7
2-2.3 高尿酸血症.....	8
2-2.4 高尿酸血症與疾病.....	9
2-2.5 高尿酸血症與痛風流行病學調查.....	11
2-2.6 高尿酸血症與痛風的治療.....	13
2-2.7 高尿酸血症的預防.....	14
2-2.8 高尿酸血症動物模式.....	15
第三節 可以降尿酸之天然物.....	16

第三章 材料與方法	21
第一節 五種龍眼樣本製備	21
3-1.1 龍眼萃取物之製備	21
3-1.2 龍眼花成分之取得	21
第二節 龍眼萃取物之生物活性篩選	22
3-2.1 黃嘌呤酶抑制試驗	22
第三節 高尿酸血症動物模式建立	23
3-3.1 實驗動物	23
3-3.2 實驗設計及操作	23
3-3.3 資料分析與統計	24
第四節 高尿酸血症模式小鼠研究龍眼降低血中尿酸值效力試驗	24
3-4.1 龍眼五種甲醇粗萃物降低血中尿酸值效力試驗	24
3-4.2 資料分析與統計	25
第五節 高尿酸血症模式大鼠研究龍眼萃取物促進尿酸排泄試驗	25
第四章 結果	26
第一節 生物活性篩選結果	26
第二節 高尿酸血症動物模式建立	26
第三節 高尿酸血症模式小鼠研究龍眼萃取物降低血中尿酸值效力試驗	27
4-3.1 龍眼五種甲醇粗萃物降低血中尿酸值效力結果	27
第四節 高尿酸血症模式大鼠研究龍眼萃取物促進尿酸排泄試驗結果 ..	27
第五章 討論	29
參考文獻	35
英文版	66

圖目錄

圖一 龍眼之花和果實	46
圖二 已鑑定出之龍眼成分	46
圖三 尿酸合成的代謝路徑	47
圖四 人體內尿酸之平衡	47
圖五 具黃嘌呤酶抑制作用之植物化學成分	49
圖六 氧嗪酸鉀誘導小鼠產生高尿酸血症之持續時間	50
圖七 龍眼五種甲醇萃取物在 100 mg/kg 口服劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響	50
圖八 龍眼五種甲醇萃取物在 75 mg/kg 口服劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響	51
圖九 龍眼五種甲醇萃取物在 50 mg/kg 口服劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響	52
圖十 三種龍眼甲醇萃取物在口服 100 mg/kg 劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿酸排泄的影響	52
圖十一 原花青素 A2 之化學結構	53

表目錄

表一 不同年級之台灣國中生的血清尿酸平均值、標準差及過高盛行率	53
表二 不同居住地區之台灣國中生的血清尿酸平均值、標準差及過高盛行率	54
表三 龍眼五種萃取物對黃嘌呤酶抑制試驗之百分之五十抑制濃度	55
表四 龍眼五種甲醇粗萃物以有機溶劑分配層析各分層對黃嘌呤酶之抑制率	56
表五 龍眼所含的十種化合物之黃嘌呤酶抑制百分比	57
表六 以氧嗪酸鉀誘導小鼠產生高尿酸血症可維持的時間	58
表七 以 PBS 為對照組對小鼠血中尿酸值的影響	59
表八 龍眼五種甲醇萃取物在 100mg/kg 劑量下和 allopurinol 以及 PBS 對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響	60
表九 龍眼五種甲醇萃取物在 75 mg/kg 劑量下和 allopurinol 以及 PBS 對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響	61
表十 龍眼五種甲醇萃取物在 50mg/kg 劑量下和 allopurinol 以及 PBS 對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響	62
表十一 龍眼花萃取物在 100 mg/kg 劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿中尿酸值的影響	62
表十二 龍眼種子萃取物在 100 mg/kg 劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿中尿酸值的影響	63
表十三 龍眼殼萃取物在 100 mg/kg 劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿中尿酸值的影響	63
表十四 以 PBS 作為陰性對照組觀察其對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿中尿酸值的影響	64
表十五 以 PBS 為對照組對未經氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症之大鼠尿中尿酸值的影響	64

表十六 促進高尿酸血症之大鼠尿中尿酸排泄試驗中每組各時間點間尿中尿酸值
斜率之比較..... 65

表十七 75%酒精分別萃取 5g 新鮮和烘乾龍眼殼，200 倍稀釋後之黃嘌呤酶抑制
率..... 65



英文縮寫對照表

AMP	Adenosine monophosphate (單磷酸腺苷)
ADP	Adenosine diphosphate (雙磷酸腺苷)
APRT	Adenine phosphoribosyltransferase (腺苷磷酸核糖轉化酶)
COX-2	Cyclooxygenase-2 (環氧合酶-2)
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity (銅離子還原抗氧化能力)
EtOH	Ethanol (乙醇)
EA	Ethyl acetate (乙酸乙酯)
GMP	Guanosine monophosphate (鳥嘌呤核苷單磷酸鹽)
HPLC	High performance liquid chromatography (高效液相色譜法)
Hex	Hexane (己烷)
HGPRT	Hypoxine-guanine phosphoribosyltransferase (次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶)
IMP	Inosine monophosphate (次黃嘌呤核苷單磷酸鹽)
LSA	Lithospermic acid (紫草酸)
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide (煙醯胺腺嘌呤二核苷酸，輔酶 I)
OA	Oxonic acid (尿酸酶抑制劑)
Uur	Urine urea (尿尿素)
Ucr	Urine creatinine (尿肌酐)

第一章 序言

近二十年來台灣國民生活水平提升，國人的飲食習慣改變，營養過盛加上缺乏運動，造成代謝失衡，罹患高血壓、高血脂、糖尿病和痛風等文明病的人口日漸增多。痛風是一種極度疼痛的關節炎，因痛的時候來如風而得名，其為體內尿酸代謝異常所致，血中尿酸濃度一旦超過 7.0 mg/dL 便稱為高尿酸血症，血中尿酸濃度呈現過飽合狀態，會形成尿酸鹽結晶沉積在體內，刺激炎症反應發生，對人體造成傷害 (Perkins P et al. 1999)。許多研究顯示痛風在已開發國家之盛行率高，台灣更高達 5% 以上。痛風患者一般以壯年男性居多，較少發生在老年人及停經前的婦女，然而近年來美食文化盛行，除了痛風患者人數逐年增加，患者之年齡也有下降之趨勢，不少十幾二十歲之青少年也會罹患痛風。儘管體內尿酸大部分為內源性代謝產生，只有少部分由飲食而來，但飲食內容確實和高尿酸血症有關，且不良飲食習慣所致之高血脂、糖尿病、高血壓和腎臟病等和高尿酸血症亦息息相關，酒精和肥胖都會增加痛風的相對風險，而高尿酸血症也會加重腎功能不良和提升心血管疾病的死亡率 (Doehner W et al. 2011)。

目前高尿酸血症的治療仍以西藥為主流，尿酸生成抑制劑 allopurinol 是最常用的降尿酸藥物，最近通過核准上市的 febuxostat 也漸被廣為接受，而尿酸排泄促進劑 probenecid 或 bensbromarone 等雖有療效，但這些化學合成的藥物對某些患者會產生過敏、皮疹、胃腸道不適或結石等副作用 (Fagugli RM et al. 2008)。因此使用天然植物作為草藥的傳統醫藥近年來逐漸受到重視，自植物中萃取出有效安全的降尿酸成分具有極大的藥物開發潛力。目前已有許多由植物和中草藥萃取提煉之藥物或保健食品成功上市，如：葡萄子萃取物含有大量前花青素 OPCs，是一強效抗氧化劑，可消除自由基對身體的傷害，延緩老化，加強膠原蛋白結構組織和預防發炎及敏感症狀 (Bijak M et al. 2012)；由山桑子萃取出之花青素具強

大抗氧化能力，亦能抑制自由基對眼部的傷害，對於因為老化與慢性傷害引發的眼疾，如白內障、黃斑性病變及糖尿病視網膜病變有預防效果（Kawabata F et al. 2011）。有些西藥也是由植物萃取物再將其純化精煉製成，如：毛地黃葉可提煉 digitoxin，作為強心劑（Keshk S et al. 2011）；太平洋紫杉樹皮則含有著名的抗癌藥物成分紫杉醇（Jin J et al. 2011）。由此可見，天然物中有許多寶貴的活性成分仍待我們去尋找與發掘。

龍眼是台灣夏季頗具代表性的水果，其滋味甘甜，富含水分，很受大眾歡迎，而龍眼果肉烘乾製成之龍眼乾，不但可做為零嘴甜點，也是一項常見的中藥材，具滋補養生的功效。乾燥的龍眼花可沖泡成花茶，民間偏方流傳常飲用可以降尿酸。本實驗除了研究龍眼花萃取物是否真有降尿酸的效果，也對龍眼的其他部分（殼、種子、葉）進行分析，希望不要浪費寶貴的生物資源。實驗以黃嘌呤酶（xanthine oxidase）抑制試驗來評估龍眼乙醇萃取物抑制 xanthine oxidase 之活性，並進行體內試驗，藉此了解龍眼萃取物經胃腸道消化吸收後之生物活性，希望能開發出安全且能夠有效降低血中尿酸濃度的藥物，希望對未來高尿酸血症和痛風的預防治療有助益。

第二章 文獻回顧

第一節 龍眼介紹

2-1.1 龍眼學名、產地及特性

龍眼 (Fig. 1) 屬無患子科 (sapindaceae)，學名為 *Dimocarpus longan* Lour. 或 *Euphoria longana* Lam.，俗稱桂圓、亞荔枝、燕卵等。龍眼為多年生常綠大喬木，長橢圓形葉子互生，為偶數羽狀複葉，開黃白小花，結實於仲夏至初秋，果實外形圓滾，皮青褐色，革質而脆，果肉剔透晶瑩偏漿白，隱約可見黑色果核，極似眼珠，故以「龍眼」名之。龍眼為栽培果樹，原產於中國大陸華南地區，主產於中國台灣、越南、印尼等地。台灣產地集中在中南部，每年三、四月間為龍眼花盛開時期，七月至九月為龍眼產季 (應紹舜 1998)。

龍眼營養豐富，含有鈣、磷、鐵、鉀等礦物質，與維生素 B1、B2、C 和菸鹼酸等營養成分，鮮食可補充鐵質，加工後可製成龍眼乾，龍眼花可乾燥製成花茶，龍眼的根、莖、葉甚至龍眼殼都是極佳的燃料資材。

本草備要記載：龍眼其肉甘溫，滋補強壯；其核澀平，收斂止血；其葉淡平，解表。有壯陽益氣、補血、補益心脾、養血安神、潤膚美容等多種功效，可治療貧血、心悸、失眠、健忘、神經衰弱及病後、產後身體虛弱等症 (行政院衛生署中醫藥委員會 2003)。中國傳統醫學認為龍眼花可治療婦科帶下症和腎臟疾病 (應紹舜 1998)。另坊間流傳偏方指出龍眼花具有治療痛風和降尿酸的功效。

2-1.2 龍眼所含之植物化學成分

植物化學成分 (phytochemicals) 是指蔬果、穀類等天然植物中所含的非營養性化合物，這些化合物具對生物體有益的生物效應，如：提升免疫力、抗氧化、誘導細胞良性分化、促進細胞凋亡、抗細胞增生、植物性類激素作用、抗微生物作用等功能，可以幫助人體對抗傳染病或防止慢性退化性病變的發生。常見的植物化學成分有：類黃酮 (flavonoids)、酚酸 (phenolic acids)、異黃酮 (isoflavones)、多酚 (polyphenols)、吲哚 (indoles) 等 (Prior RL 2003)。

目前已有許多研究針對龍眼之果肉、花、種子和果殼等部份進行成分分析。

龍眼果肉、種子和果殼以甲醇萃取後經高效液相層析法 (HPLC analysis) 分析，發現龍眼富含酚類化合物 (phenolic compounds)，其中主要為 gallic acid、ellagic acid 和 corilagin，此三種酚類化合物以龍眼種子的含量最多，果殼次之，果肉最少，而不同的培育品種也會影響龍眼酚類化合物的含量 (Rangkadilok N et al. 2005; Soong YY et al. 2005)。龍眼子還含有 Acetylgeraniin，Acetylgeraniin 經實驗證實有助改善大鼠體位性低血壓 (Hsu FL et al. 1994)。

龍眼殼亦含有多酚，冷凍乾燥之龍眼殼之甲醇-丙酮-水 (4.5:4.5:1 v/v/v) 萃取物，分析其所含的多酚主要有兩種：(-)-epicatechin 和 4-O-methylgallic acid，以 4-O-methylgallic acid 的抗氧化能力較強 (Sun J et al. 2007)。

龍眼花以熱水萃取後經高效液相層析法 (HPLC analysis) 分析，富含多酚，如：酚酸 (phenolic acids) 和類黃酮 (flavonoids) (Yang DJ et al. 2010)。龍眼花之甲醇 (methanol) 萃取物有極佳的抗氧化能力，以 liquid-liquid partition 進一步分析，ethyl acetate 層最能延遲低密度脂蛋白 (LDL) 氧化，其主要成分為：(-)-epicatechin 和 proanthocyanidin A2 (Tsai HY et al. 2008)。龍眼花之水或乙醇 (ethanol) 萃取物皆具有極佳的抗氧化能力，其主要含有類黃酮 (flavonoids)、縮合丹寧 (condensed tannins) 和前花青素 (proanthocyanidins) (Ho SC et al. 2007)。

關於龍眼之成份研究，已鑑定出化學結構的化合物整理請見圖二（Fig 2）。

2-1.3 龍眼之藥理與生物活性

龍眼乾（烘乾果肉）在傳統醫學上具有滋補、安神、抗失眠和治療健忘症的功效。連續 14 天給予小鼠 100、200、400 mg/kg 口服龍眼乾之熱水萃取物，經 passive avoid task 實驗證明可以增進小鼠學習記憶能力，並且可增加細胞神經訊息傳遞訊號如 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 之表現，有助神經細胞存活（Park SJ et al. 2010）。龍眼乾萃取物含有豐富的多醣類，是很強的超氧化離子可清除氫自由基，實驗顯示龍眼多醣有助大鼠腦部缺血再灌流性傷害（ischemia/reperfusion injury）之修復（Chen J et al. 2011）。龍眼果肉亦含有豐富的腺甘酸（adenosine），小鼠肌肉注射 2 g/kg 龍眼果肉萃取物，可緩解其焦慮的情形（Okuyama E et al. 1999）。

龍眼種子之熱水萃取物含有多醣類，連續三十天給予小鼠 50、200 mg/kg 口服龍眼種子多醣類，可增加小鼠游泳時間和肝糖儲存量，減低血液尿素氮和乳酸累積，有助抵抗疲倦（Zheng SQ et al. 2010）。龍眼種子之熱水萃取物富含酚類化合物，可抑制酪氨酸酶（tyrosinase）活性，其 IC_{50} 為 2.9–3.2 mg/ml（Rangkadilok N et al. 2006）。龍眼種子以水/丙酮（30：70 v/v）萃取，萃取物富含多酚類，於劑量 25–200 μ g/ml 時對大腸癌細胞株 320DM、SW480 和 HT-29，有抑制處於細胞分裂期（S phase）的細胞繼續分裂之效果，並可誘導癌細胞凋亡；而龍眼花水萃物於劑量 25–400 μ g/ml 時，可抑制大腸結腸癌細胞株 SW-480 和 Colo 320DM 生長，龍眼種子和花含有抑制大腸癌細胞增殖和減低癌細胞惡性程度的物質，有成為抗癌藥物之潛力（Chung YC et al. 2010; Hsu CP et al. 2010）。

龍眼殼成份含有大量之官能基和其親水之特性，可作為有效的生物性重金屬鉛、汞清除劑（Huang MR et al. 2010）。

龍眼花之熱水萃取物含有多種多酚類，如：酚酸、類黃酮等，給予大鼠高熱

量飼料並連續九週於飲水中添加 1.25 或 2.5%(w/v)之龍眼花水萃物，發現服用龍眼花水萃物可減低大鼠增重程度、降低血清三酸甘油酯、減低胰脂酵素活性和減少脂肪酸合成酶(fatty acid synthase)基因之表現，並增加糞中三酸甘油酯排除量，具抑制肥胖和減少血清脂質的效果(Yang DJ et al. 2010)。另外在胰島素抗性相關實驗中，連續 14 天給予大鼠高果糖(fructose)飲食並口服 125、250mg/kg 龍眼花水萃物，發現龍眼花萃物除了增加身體抗氧化系統活性，還可增加細胞表現胰島素訊息傳導相關蛋白，有助改善糖尿病產生胰島素抗性之情形，也可以降低血壓，改善代謝症候群的症狀(Tsai HY et al. 2008)。龍眼花之水或乙醇萃物可抑制 NO 活性，有助清除自由基，具極佳的抗氧化效果，而龍眼花之乙醇萃物則可顯著抑制 prostaglandin E2 產生，有效減低炎症反應(Ho SC et al. 2007)。

第二節 尿酸與高尿酸血症

2-2.1 尿酸生合成

尿酸(uric acid)是嘌呤(purine)的代謝產物，嘌呤之來源有三：來自生物體的生合成(de novo or salvage biosynthesis)；來自組織中核酸(nucleic acid)分解；來自食物中的核蛋白。大部分的尿酸是由體內胺基酸、磷酸核糖及其他小分子化合物合成和核酸分解代謝而來之內源性嘌呤代謝產生，佔個體總尿酸生成量之 80%，少部分為飲食攝取之外源性來源，約佔個體總尿酸生成量之 20%。多數哺乳類動物之肝臟可分泌尿酸酶將尿酸轉化成尿囊素後排出體外，其血中尿酸值很低，但在演化的過程中，人類肝臟中的尿酸酶逐漸失去功能，故尿酸是人體內嘌呤的最終代謝產物(Wu XW et al. 1992)。

嘌呤核苷酸在生物體內的生合成可分為兩徑路：新生徑路(de novo pathway)和替代徑路(salvage pathway)。人類體內嘌呤代謝過程如 Fig. 3 所示，新生路徑首先經酵素(PP-ribose-P-synthetase)將磷酸核糖(D-ribose-5-phosphate)磷酸化

產生 PRPP (5-phosphoribosyl-1-Pyrophosphate)，接著 PRPP 和麩醯胺 (glutamine) 反應形成 5-phosphoribosyl-1-amine，再經由一系列複雜的反應產生嘌呤核苷酸 IMP、GMP 和 AMP，之後轉化成肌核苷 (inosine)、鳥嘌呤 (guanine) 和腺嘌呤 (adenine)，最後產生次黃嘌呤 (hypoxanthine) 或黃嘌呤 (xanthine)，再經黃嘌呤酶 (xanthine oxidase) 將次黃嘌呤或黃嘌呤代謝成尿酸。總而言之，PRPP 可視為生成尿酸的原料，經過許多酵素的催化後產生尿酸，故人類尿酸生成的速度主要取決於細胞內 PRPP 的濃度和反應過程中所需酵素的活性，而這些酵素可被嘌呤核苷酸等負回饋控制來調節。若 PRPP 量過多或參與反應的酵素發生障礙，都可能導致血中尿酸值的升高 (Wu, C. L. et al. 1993)。替代路徑，則是藉由 HGPRT 或 APRT 酵素的作用將次黃嘌呤、鳥嘌呤和腺嘌呤轉變為嘌呤核苷酸 IMP、GMP 和 AMP，使得生物體內游離的嘌呤 (purines) 可以經由再生徑路的回收過程重新參與核酸的合成。人體內游離的嘌呤大約有百分之九十可被回收利用，因此嘌呤的再生路徑，對生物體來說是非常重要並且具經濟效益的。而當 HPRT 缺乏時，累積的嘌呤會被酵素分解而成為尿酸 (Wu XW et al. 1992) (Fig.3)。

2-2.2 黃嘌呤酶之特性

黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 是一種含鉬 (molybdenum) 和鐵 (iron) 的黃色素蛋白 (flavoprotein)，具催化能力，在人體內主導許多氧化反應，如內生性物質嘌呤類或外生性物質乙醇類的氧化。其最重要的生理功能是參與核酸的代謝，將次黃嘌呤氧化成黃嘌呤再氧化成尿酸。黃嘌呤氧化酶可分為三型態：(1) D form (NAD⁺ dependent dehydrogenase)：利用 NAD⁺ 做為電子受質，是人體內主要的黃嘌呤氧化酶形式，也是將次黃嘌呤及黃嘌呤氧化成尿酸的酵素。(2) O form (Oxygen dependent oxidase)：以氧分子作為電子受質。(3) D/O form (intermediate type)：可利用 NAD⁺ 或氧分子為電子受質。嘌呤的分子式為 C₅H₄N₄，分子量為 120.11，其和五碳糖結合成為核苷，加上磷酸基後形成核苷酸，核苷酸再以鏈狀聚合成核酸。生物體內嘌呤衍生物有四種：腺嘌呤、鳥糞嘌呤

呤、次黃嘌呤和黃嘌呤，其主要由核酸分解而來，最後會被黃嘌呤氧化形成尿酸，並產超氧自由基和過氧化氫，其為造成體內炎症反應和組織傷害的重要物質（Zhao J et al. 2012）。

2-2.3 高尿酸血症

尿酸是嘌呤在人體代謝的最終產物，嘌呤在肝臟代謝形成尿酸，最後由腎臟將尿酸隨尿液排出。人體內大約含有一千到一千二百毫克尿酸，體內尿酸約三分之一是來自飲食，另三分之二是來自身體內細胞核的核酸嘌呤新陳代謝產生。正常人每天約產生 700 毫克尿酸，其中 560 毫克由腎臟以游離尿酸鈉鹽的形式經尿液排出，其餘由腸內細菌分解為尿囊素（allantoin）和二氧化碳隨糞便排出，另有極少量由汗腺排泄，正常情況下體內的尿酸量會達到一種平衡的狀態（Fig. 4）。而人體內的血中尿酸濃度亦受種族、遺傳基因、性別、年齡的影響，如女性停經後尿酸會增高，可能和雌激素（estrogen）促進尿酸代謝有關，其正常值為 4.0 ± 2.0 mg/dL；青春期前血中尿酸濃度較低，約為 3.5 mg/dL，青春期後則逐漸增加至成年人水準，其正常值為 5.0 ± 2.0 mg/dL（Kim KY et al. 2003）。

一旦體內尿酸產生和排泄之平衡狀態受到某些原因的破壞，致使尿酸在血液中異常增多，就形成了高尿酸血症，一般而言，痛風病患的尿酸存量可高達兩千毫克至四千毫克，超過血清尿酸值的飽和濃度 6.4 mg/dl，就開始會有尿酸鹽結晶析出。依據流行病學定義，成年男性血中尿酸值在 7.0mg/dl 以上，成年女性血中尿酸值在 6.0mg/dl 以上，就算是高尿酸血症（Perkins P et al. 1999）。造成高尿酸血症可能的因素有：攝取富含或導致普林合成增加的食物、尿酸的合成增加、腎臟排除尿酸受阻、腸道排除尿酸受阻、體內酵素異常、疾病或化學治療、遺傳基因、藥物（利尿劑）的使用等。有研究指出只要幾天完全不吃含嘌呤的食物，血液尿酸值就可以從 5.0 mg/dl 降至 3.0 mg/dL；一些增生性或發炎性疾病，譬如血液學的癌症或牛皮癬等，或使用一些化療藥物，都會造成細胞代謝速率增快而

過度製造尿酸；也有因為嘌呤代謝過程中的酵素活性異常所造成，如 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) 活性太強時會使尿酸的產量過多或 Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) 有缺損會使 PRPP 儲積，加速嘌呤合成而造成尿酸的產量過多，HGPRT gene 突變的高尿酸血症患者發生痛風的年齡遠早於一般高尿酸血症患者 (Richette P et al. 2010)。

尿酸是小分子，在腎絲球可以完全濾過，接著在近端腎小管幾乎完全地被吸收，最後在較末端的近端腎小管被分泌與分泌後被再吸收。人類腎臟再吸收尿酸非常有效率，被腎絲球被濾出的尿酸，約有 90% 再吸收，只有 10% 最後從尿液中排出，故當腎功能異常時也會影響尿酸之排除 (Ito S et al. 2012)。

2-2.4 高尿酸血症與疾病

尿酸 (uric acid) 是一種弱酸，在人體生理的酸鹼值下，是以離子化形式，尿酸鹽 (urate) 存在。隨著尿酸濃度在體液中的增加，它會過度飽和而形成結晶，尿酸結晶沉積在關節會誘發顆粒性白血球聚集，產生炎症反應，造成關節處紅、腫、熱、痛，形成痛風性關節炎 (Campion EW et al 1987)。血清尿酸值越高，則尿酸鹽結晶在身體各處沈積的數量也越多；沈積越多，急性痛風性關節炎、痛風石及合併症的發生機會就越多。有高尿酸血症的患者，將來有 5-10% 的人會發展成痛風。罹患痛風的機率。研究報告顯示健康男性尿酸值 $> 9\text{mg/dL}$ 時痛風性關節炎的每年發生率為 4.9%，尿酸值為 $7.0\text{-}8.9\text{ mg/dL}$ 時，其每年發生率為 0.5%。尿酸值低於 7 mg/dL 時，其每年發生率為 0.1% (Choi HK et al. 2005)。尿酸還具有一項物理化學特性：溫度越低或溶液中的 PH 值越低，溶解度越小；通常尿酸鹽結晶 37°C 及 PH 7.7 時的溶解度最大。因此，身體末梢血液循環較差及體溫較低的地方，尿酸鹽結晶較易沈澱，故足踝部和腳趾關節 (溫度約 28°C) 最易發生急性痛風性關節炎 (Perkins P et al. 1999)。

儘管大多數高尿酸血症患者可能終生都不會痛風發作，無症狀的高尿酸血症

也不需要降尿酸藥物治療，但仍必須找出引起高尿酸血症的原因，並控制相關問題和疾病。高尿酸血症患者多半會有許多其他合併症如：肥胖症、高血脂症和糖尿病，統計顯示高尿酸血症和痛風的患者常攝取過量的高油脂食物或較常酗酒，肥胖會使尿酸合成亢進，並阻礙尿酸的排泄，而約有三到四成的痛風患者接受口服葡萄糖負荷試驗時合併有輕症非胰島素依賴型糖尿病，此類糖尿病是因肥胖和暴飲暴食引起胰島素感受性降低。痛風患者約有八成會合併高血壓，除了因腎功能障礙引起之腎性高血壓外，肥胖也是原因之一，另外高血壓治療藥物常含有降壓利尿劑，其副作用會抑制尿酸排泄，使尿酸值升高。此外長期高尿酸血症會使尿酸鹽結晶（單鈉尿酸鹽）沉積在腎臟間質，造成痛風性腎病變，或因大量尿酸結晶沉積在腎收集管、腎盂或輸尿管引起可逆性之急性腎衰竭。根據統計，痛風病人出現腎結石的機率為正常人的一千倍左右，尿液中尿酸排泄量越多，酸鹼度越酸，越容易發生腎結石，尤以血中尿酸濃度超過13 mg/dL或尿中尿酸排出量大於1100 mg/天者（Galvan AQ et al. 1995; Heinig M et al. 2006）。

許多研究發現高尿酸血症和肥胖、胰島素抗性、代謝症候群、老化、腎功能不佳等疾病有關，例如：高血壓患者之腎血流量減少導致尿酸鹽再吸收增加，或微血管疾病使組織缺血而阻斷近端腎小管分泌排除尿酸鹽，皆會使血中尿酸含量升高；肥胖、糖尿病及高血脂等代謝症候群患者，胰島素敏感性下降，血中胰島素濃度提高，會促進近端腎小管尿酸鹽再吸收而引發高尿酸血症而血中的尿酸亦會使胰島素敏感性下降而導致糖尿病的發生（Johnson RJ et al. 2007）。

近年來越來越多證據顯示尿酸值的提高會提升高血壓、缺血性心臟病、慢性心衰竭、動脈硬化的死亡率，因為高尿酸血症會增加胰島素抗性使組織缺氧，細胞分泌過量細胞素和自由基，這些因子都會加重心血管疾病的風險（Heinig M et al. 2006）。

高尿酸血症和腎臟疾病之相關性也已被證實，約40%的痛風患者若不使用降尿酸藥物，會對腎功能造成傷害，甚至有10-25%的機率發展成腎衰竭（Berger L et

al. 1975)。以oxonic acid引發高尿酸血症的大鼠，其腎臟組織切片可見：腎絲球體肥大、間質性腎炎、腎動脈硬化等病變（Nakagawa T et al. 2003）。近期研究顯示，尿酸對腎臟造成傷害之機制和腎素-血管收縮素（renin-angiotensin）系統與cyclooxygenase-2（COX-2）系統的活化有關，尿酸可刺激COX-2 產生thromboxane（TX-A₂），媒介angiotensin II引起血管平滑肌增生，實驗中誘導產生高尿酸血症的大鼠，其血壓、蛋白尿與肌酸酐值皆較高，且腎絲球硬化與腎間質纖維化都較嚴重，同時腎絲球前小動脈也有動脈壁增厚並伴隨著平滑肌細胞增生的現象。此外由於一氧化氮可防止血管平滑肌細胞增生，尿酸也可經由導致內皮細胞的功能失常使一氧化氮(nitriteoxide, NO)的產量下降，而造成小動脈血管病變（Sanchez-L et al. 2007）。

2-2.5 高尿酸血症與痛風流行病學調查

1950 至 1970 年代台灣少見痛風病例報告，但隨著人民生活富裕，飲食習慣改變和運動量減少，高尿酸血症已是台灣地區常見的血中生化檢驗異常，痛風的盛行率也逐年提升。根據衛生署「2005-2008 國民營養健康狀況變遷調查報告」顯示，台灣成年人之平均血中尿酸含量男性為 6.59 mg/dL，女性為 4.97 mg/dL，高尿酸血症盛行率男性為 22.0%，女性為 9.7%，痛風的盛行率男性為 8.21%，女性為 2.33%。雖然和 1993-1996 間之報告（平均血中尿酸含量男性為 6.77mg/dL，女性由 5.33 為 mg/dL，高尿酸血症盛行率男性為 25.3%，女性為 16.7%）相比，成年人平均血中尿酸含量和高尿酸血症的盛行率略有下降（Chuang SY et al. 2011; Pan WH et al. 2011），推測和近年健康意識抬頭，人民較注重蔬果之攝取有關，但推估台灣地區罹患高尿酸血症仍超過二百萬人，可能的痛風患者超過二十萬人（Yu KH et al. 2008）。

痛風患者的性別分佈，以男性較高，男：女約為 2.7：1。由於女性賀爾蒙（Estrogen）具有促進尿酸排泄的作用，因此痛風在停經前的婦女並不常見，而

男性賀爾蒙（androgen）則會降低腎臟尿酸排泄，故在過了青春期之後，男性尿酸含量會逐漸升高，女性體內含量比男性平均低 30 $\mu\text{mol/L}$ 。男性尿酸痛風發作的高峰約在 40 至 60 歲之間。女性則在停經之後，尿酸含量才會升高，痛風發作的高峰約在 60 至 80 歲之間。除非先天性酵素異常或是腎功能不全，否則痛風很少發生在 30 歲以下的男性或停經前的女性（Pan WH et al. 2011; Chen JH et al. 2012）。然而近年來，痛風患者的發作年齡有下降的趨勢，20–40 歲之男性痛風病例頗多，長庚醫院根據近 20 年來研究資料發現，男性第一次痛風發作年齡低於 40 歲以下者佔所有患者之比例，由十年前的三成升高至近五成（Wu CH et al. 2007）。「2010 - 2011 台灣國民營養健康狀況變遷調查結果」中對全國國中生高尿酸血症狀況作一評估，國中生的尿酸平均濃度分布，男性有較高的尿酸濃度，7 年級、8 年級、9 年級的血清尿酸過高比率男生平均為 19.5%、女生平均為 4.8%，且尿酸與年級的關係，在女性中，尿酸濃度並不會隨著年級的增加而上升；在男性中，尿酸濃度與高尿酸盛行率隨著年級增加而上升（Tab. 1）。就地區層別來看，山地層有最高之高尿酸盛行率（男 32.9%、女 10.7%）並且女性在各層的血尿酸盛行率皆低於男性，顯示男性族群有尿酸的比例在國中時期即可看出（Tab. 2）（行政院衛生署 2012）。

另外，痛風患者常合併有肥胖症和高血壓病史，或是家族成員中有痛風或尿路結石的記錄。病患之血液生化學檢查除尿酸過高之外，亦常見高三酸甘油脂、高血糖。服用影響尿酸代謝的藥物，例如：利尿劑、低劑量阿司匹靈等，也會增加痛風發作的機會。使用環孢素（cyclosporin A）則會加速由高尿酸血症發展為痛風。總結痛風的高危險群包括：年齡超過四十歲以上、男性、多有飲酒或嗜酒的習慣、喜歡吃動物內臟、貝殼類及海產等富含「高普林質」的食物、家族中有遺傳痛風的體質、血癌、腎病患者或服食利尿藥的人士，也較容易患上痛風（中華民國痛風之友協會）。

2-2.6 高尿酸血症與痛風的治療

高尿酸血症的治療主要有尿酸生成抑制劑和尿酸排除促進劑兩大類。

目前使用於臨床的尿酸生成抑制劑以 allopurinol 最為常見，allopurinol 會和嘌呤競爭黃嘌呤酶的受質結合位，為競爭性黃嘌呤酶抑制劑，其腸胃吸收率約為 90%，半衰期 ($T_{1/2}$) 為 1-2 小時，主要由腎絲球過濾清除，allopurinol 代謝產物 alloxanthine 也是一非競爭型的黃嘌呤酶抑制劑，allopurinol 對高尿酸血症治療效果佳，一般在給藥二至三日內血中和尿中之尿酸值可見劑量相關性之降低，但不適用於無症狀的高尿酸血症患者。而且部分患者會出現皮疹、下痢、噁心、嘔吐或肝臟或造血器官傷害等副作用，甚至引發致命的 Stevens Johnson syndrome。根據臨床統計，最易引起國人嚴重藥物過敏的藥物前二名為：抗癲癇藥 (Carbamazepine) 和降尿酸藥 (allopurinol) (陳垣崇 2005)。已有研究指出帶有 H1A-B5801 基因標誌之病人對 Allopurinol 發生嚴重藥物過敏的風險為一般人的 580 倍 (Hung SI et al. 2005)。另外 febuxostat 是近年來新開發的口服降尿酸藥物，是一非普林選擇性之 XO/XDH 抑制劑，其主要經由肝臟代謝，藥效較不受腎功能不全影響，產生副作用比例較低但仍有可能發生腹瀉、頭痛、關節痛等 (Becker MA et al. 2011)。

尿酸排泄促進劑主要作用於腎臟近端小管，抑制尿酸再吸收，增加腎臟排泄尿酸，來降低血中尿酸濃度。常用的藥物有：benzbromarone、probenecid、sulfapyrazone。尿酸排泄促進劑主要的副作用為胃腸不適與過敏反應，且由於尿酸排泄促進劑會降低尿酸溶解率，增加尿液酸性，易使遠端腎小管管腔內形成尿結石，故需配合使用尿液鹼化劑 (sodium bicarbonate) 並攝取充足水分 (維持每天尿量大於兩公升) (Kurajoh M et al. 2012)。此外降血脂藥 fenofibrate 也可以減少腎小管對尿酸的再吸收，故有學者建議可用來治療同時有高血脂和高尿酸血症的患者但最近的研究顯示其具有腎毒性之副作用，腎功能不全之患者須謹慎使用

(Attridge RL et al.2010; Le MT et al. 2008; Hepburn AL et al. 2001)。

痛風的形成和高尿酸血症有關，除了給予降尿酸藥物外，治療急性痛風發作常用的藥物有：非類固醇抗炎藥 (NSAIDs)、類固醇 (corticosteroids) 和秋水仙素 (colchicine)。其中秋水仙素是預防和治療急性痛風藥物的首選，秋水仙素可和白血球的微管蛋白 (tubulin) 結合，阻止白血球網尿酸堆積處移動，抑制白血球作用而減少炎症反應的發生。其亦是一種抗癌藥物，可阻止細胞有絲分裂。秋水仙素的副作用有噁心、嘔吐、腹瀉、禿髮和顆粒性白血球減少等 (Kim KY et al. 2003)。

除了以上抗高尿酸血症的藥物，最近有一新開發的藥物已通過美國食品藥物管理局核准上市，PEG-uricase (pegloticase) 是一種重組的哺乳動物性尿酸酶，對反覆發作的慢性痛風病患，有良好的治療效果 (Richette P. 2012)。

2-2.7 高尿酸血症的預防

傳統上飲食療法治療是痛風的主要方法，但是隨著醫學科技的進步和對痛風的瞭解，飲食療法已非治療痛風的主流。主要原因科學家發現飲食對於尿酸的形成，遠不如體內細胞新陳代謝合成之影響。研究發現食用同熱量但不含普林 (purine) 的食物十天後，只能降低血清尿酸 1.8 mg/dl。因此，歐美國家已放棄嚴格的低普林飲食限制，但患有嚴重痛風石或腎功能衰竭者仍需要嚴格限制。目前，低普林飲食主要在於減少誘因，避免血清中尿酸濃度持續升高，預防高尿酸血症的進展 (Richette P et al. 2010)。

一般正常飲食每天約含有 600~1000 毫克之普林。低普林飲食是一種含普林較低，並能夠提供足夠營養素的飲食，能夠減少血液中的尿酸，適合罹患痛風、高尿酸血症、及泌尿道沉積過多尿酸鹽而引起結石的患者。低普林飲食的要點如下：一、避免攝取過多的蛋白質，食物中的核蛋白質，經消化分解後產生普林，普林經由肝臟代謝成尿酸，最後由腎臟將尿酸排出體外。高尿酸血症患者自飲食

中分解核蛋白質產生尿酸的比率高於一般人，而且也不易將尿酸排出體外，所以必須避免攝取過多的蛋白質，以每日每公斤標準體重 1 公克蛋白質為佳。二、避免過度肥胖，肥胖會使尿酸合成亢進，並阻礙尿酸的排泄，體重過重時應慢慢減重，每月以減輕一公斤為宜，以免因組織快速分解而產生大量普林引起急性發作，在急性發病期也不宜減重。三、儘量避免食用含普林質高的食物普林質含量高的食物，如動物的內臟、貝殼類的海產食物、過量的肉類和家禽類、過量的乾豆類、冬菇、椰菜花、菠菜及鮮蘆筍等蔬菜。急性發病期，應盡量選擇普林含量低的食物，如：蛋類、奶類、米、麥、甘薯、葉菜類、瓜類蔬菜及各式水果，蛋白質最好完全由蛋類、牛奶或乳製品供給。四、多喝水和避免食用太油膩的食物，高量的脂肪會抑制尿酸的排泄，並促使患者之症狀發作。患者應儘量多喝水，每日至少應飲用 2000 毫升以上的水份以幫助尿酸的排泄。可可、咖啡、茶的代謝物不會堆積在組織內，適量飲用可提高攝水量，加速尿酸排泄。五、避免飲用酒類，尤其是啤酒，其在體內代謝產生的乳酸會影響尿酸的排泄（中華民國痛風之友協會 2011; Perkins P et al. 1999 ; Zhang Y et al. 2012）。

2-2.8 高尿酸血症動物模式

啮齒類動物體內有尿酸酶，可將尿酸轉變為尿素由尿液排出體外，齧齒類血液中的尿酸值較低。實驗常以啮齒類作為高尿酸血症動物模式，由於文獻指出 oxonic acid（OA）可抑制尿酸酶作用，故常用的齧齒類高尿酸血症模式建立方式為：飼料添加 2%OA，可提升大鼠血中尿酸值為正常值的 1.5-2 倍或腹腔注射 250mg/kg OA，可提升大鼠血中尿酸值達正常值的 3 倍，且隨著給予 OA 劑量的提升，可將尿酸值提高 6-10 倍以上（Johnson WJ et al. 1969）。近年來則發現大量給予 fructose 也能建立齧齒類高尿酸血症模式，連續八週口服 10%fructose 液體或腹腔注射 fructose 溶液 10 μ l/g 體重(4g/kg)可使老鼠產生高尿酸血症，此方式可模擬人類臨床上和代謝症候群有關的高尿酸血症成因，Nakagawa 等人推測大量的

fructose 會產生 ADP 和 AMP，活化 AMP daminase 並刺激黃嘌呤酶作用而產生過量活性氧化物和尿酸 (Nakagawa T et al. 2003)。另外實驗證明連續七天給予小鼠口服 30 g/kg 酵母菌萃取物可誘發小鼠產生高尿酸血症，酵母菌含有豐富的蛋白質、核酸和維他命 B 群等可在生物體內完全被水解為嘌呤、嘧啶和磷酸，會增加黃嘌呤酶的活性和增加尿酸的產生，故此模式可模擬人類因高蛋白飲食造成之高尿酸血症，且此一高尿酸血症模式隻小鼠並不會產生明顯的腎功能障礙和體重變化 (Chen-Guang Liang et al. 2003)。

第三節 可以降尿酸之天然物

目前使用於臨床的降尿酸藥物治療效果佳，但仍有其副作用存在，故由天然物萃取物中開發有效、無副作用的降尿酸藥物之研究不斷在進行中。黃嘌呤酶之分子構形具高度彈性，是一種廣泛專一性 (broad specificity) 酵素，可結合催化多種不同受質，亦可被多種化合物抑制，因此相信仍有許多天然抑制劑有待研究開發，過去已發現小分子多酚類化合物 monomeric hydrolyable tannins 和 galloylglucose 可抑制黃嘌呤酶活性 (Hatano T et al. 1999)，而近年來亦有研究發現多種天然草藥可以降尿酸，且其中所含的植物化學成分具有黃嘌呤酶抑制劑的效果。

有學者指出玄蔘 (*Scrophularia ningpoensis*) 根部乙醇萃取物含有苯乙醇類化合物 phenylpropanoid glycosides acteoside，口服 150 mg/kg acteoside，可降低高尿酸血症小鼠之血中尿酸程度達 33.1%；對 xanthine dehydrogenase 有 35.9% 抑制效果；對 xanthine oxidas 則有 41.5 抑制效果 (Cai Guo et al. 2008)；丹蔘 (*Salvia mitiorrhiza*) 根部乙醇萃取物含有 lithospermic acid (LSA)，LSA 為黃嘌呤酶抑制劑，其百分之五十抑制效力 (IC₅₀) 為 5.2µg/ml，LSA 亦是一有效的抗氧化劑，可減輕尿酸單鈉 (monosodium urate) 結晶沉澱引起之炎症反應 (Xiaoyu Liua et al. 2008)。

口服菝葜 (*Smilax china L*) 乙酸乙酯萃取物 500 mg/kg，對以口服 10% fructose 誘導腎功能不全之大鼠，可有效降低血中尿酸、肌酐酸和血液尿素氮之數值，且增加排尿和尿尿酸 (Uur)、尿肌酐 (Ucr) 排除的功能較 allopurinol 顯著；腎臟組織病理學檢查，其腎小管上皮細胞刷狀緣消失和腎小管管腔收縮的情況都較輕微，萃取物經分析含九種化合物，其中 protocatechuic aldehyde、chlorogenic acid、caffeic acid、resveratrol、rutin 和 oxyresveratrol 有較強的黃嘌呤酶抑制效果，其 IC₅₀ 約在 38-50 μM 之間 (Lvyi Chena et al. 2011)。

相思木的枝椏乙醇萃取物含有多量的含有花青素原 (proanthocyanidin)、類黃酮 (flavonoid) 和酚酸 (phenolic acid)，經分析以 quercetin-3-*O*-rhamnopyranoside 和 luteolin 有較強的黃嘌呤酶抑制作用，其 IC₅₀ 分別為 37.3 μM 和 11.6 μM (Ching-Yu Hsieh et al. 2010)。相思木實心木材之乙醇粗萃取物，發現五種類酮 (flavonoid) 黃化合物，其中 melanoxetin 和 okanin 具很強的黃嘌呤酶抑制作用，其 IC₅₀ 分別為 0.274 μM 和 0.076 μM。而 melanoxetin 被証實和 allopurinol 同樣具有苯并吡喃酮 (benzopyranone) 環，有相同的黃嘌呤酶結合位，但 melanoxetin 的 3,4-dihydroxyphenyl 分子可延長和黃嘌呤酶疏水部分的結合位置，使其比 allopurinol 對黃嘌呤酶更具親和力 (Yu-Tang Tung et al. 2010)。

丁公藤莖之萃取物含東莨菪素 (scopoletin)，黃嘌呤酶抑制作用之 IC₅₀ 為 164.7 μM，口服 100 mg/kg 東莨菪素可降低經 oxonate 誘發高尿酸血症小鼠之尿酸值 (Zuoqi Ding et al. 2005)。紅腺忍冬 (*Lonicera hypoglauca*) 之莖、葉以乙醇萃取，其液相管柱層析之乙酸乙酯層，有最佳的黃嘌呤酶抑制效果，IC₅₀ 為 35.2 ± 0.4 μg/mL；口服 500 mg/kg 紅腺忍冬萃取物，可降低尿酸值達 93.7%，進一步分析發現紅腺忍冬含有一新的類黃酮化合物：loniceraflavone (Fig. 5)，其黃嘌呤酶抑制效果 IC₅₀ 為 0.85 μg/mL (Shih-Chang Chien et al. 2009)。

乾燥雞屎藤 (*Paederia scandens*) 之乙醇萃取物主要含有化合物 iridoid glycoside，經分析可得：asperuloside、paederoside 和 scandoside 三種化合物。給

予以 oxonate 誘發高尿酸血症的大鼠口服 4.5 g/kg 雞屎藤乙醇萃取物，可見血中尿酸值明顯降低，並可增加尿酸鹽於尿中排泄的比率達 2.7 倍；大鼠肝臟黃嘌呤酶抑制試驗可達 26% 之抑制效果。雞屎藤除了可抑制黃嘌呤酶代謝嘌呤來降低尿酸的產生，還可能藉由抑制腎小管重吸收尿酸鹽，增加尿酸鹽廓清率，來降低血中尿酸值，比較雞屎藤與兩種常用的降尿酸藥物：allopurinol 和 benzbromarone，發現在降低血中尿酸值的效果上，在 IC₅₀ 為 1g/L 減低尿酸的產生和增加尿酸鹽的排除和控制組比起來都可達顯著差異的效果 (Haiyan Yan et al. 2008)。

側柏 (*Biota orientalis* (L.) Endl.) 乙醇萃取物所含之類黃酮成分：quercetin 和 rutin 對以 oxonate 誘發高尿酸血症的小鼠，有降尿酸的效果。給予小鼠口服 100 mg/kg 之 quercetin 或 rutin，可見血中尿酸值下降，另外連續不同天數給予 100 mg/kg 之 quercetin 或 rutin，可見口服次數越多，血中尿酸值下降越明顯。而在小鼠肝臟黃嘌呤酶和次黃嘌呤酶抑制試驗中，quercetin 和 rutin 對次黃嘌呤酶抑制效果較黃嘌呤酶佳，且 quercetin 口服一次後就可見尿酸值下降，表示 quercetin 較 rutin 吸收速率快。儘管口服 quercetin 或 rutin 對降尿酸的效果不如 Allopurinol，但 quercetin 或 rutin 不會降低正常小鼠之血中尿酸值，而 Allopurinol 仍會使正常小鼠之血中尿酸值下降，故 quercetin 或 rutin 在臨床應用上或可避免低尿酸血症產生 (Ji Xiao Zhu et al. 2004)。

菊花 (*Chrysanthemum sinense*) 乙醇萃取物含刺槐素 (acacetin) 其黃嘌呤酶抑制效果之 IC₅₀ 為 2.22 μ M (Mai Thanh Thi NGUYEN et al. 2005)。珍珠草 (*Phyllanthus niruri*) 乙醇萃取物其黃嘌呤酶抑制效果之 IC₅₀ 為 39.39 μ g/mL (Vikneswaran et al. 2009)。

食物中之朝鮮薊 (*Cynara scolymus*)、山藥 (*Dioscorea*)、花粉 (propolis) 和柳橙 (Orange) 皆被證實可抑制黃嘌呤酶或具有降尿酸的效果。朝鮮薊葉片熱水萃取物含有 luteolin，其黃嘌呤酶抑制效果之 IC₅₀ 為 1.49 μ M。而 luteolin 7-O-glucoside 和 luteolin 7-O-glucuronide 為 luteolin 的代謝產物，其對黃嘌呤酶的

抑制效果皆較 luteolin 低。然而口服朝鮮薊葉片萃取物或 luteolin 及其代謝產物 luteolin 7-*O*-glucoside 對以 oxonate 誘發高尿酸血症的大鼠，皆不見明顯的降尿酸效果，推測和腸道菌叢代謝使其失去活性有關 (Sasiporn Sarawek et al. 2008)。給予高尿酸血症大鼠口服 60 mg/kg 山藥萃取之皂素 (saponin) 可明顯降低血中尿酸值、抑制黃嘌呤酶作用和增加 24 小時內之尿酸排除 (Guang-Liang Chen et al. 2006)。給予大鼠口服 500 mg/kg 中國或巴西產之花粉，可降低 oxonate 誘導大鼠產生高尿酸血症的程度 (Kazuma Yoshizumi et al. 2005)。給予高尿酸血症大鼠連續兩星期口服柳橙汁 5 ml/kg 或橙皮素 (hesperetin) 5 mg/kg，可降低其血中尿酸值達 38.76 % 及 24.93 % 的程度 (Fatemeh Haidari et al. 2009)。

亞洲國家傳統醫學常使用天然草藥來治療腫痛和創傷，已有許多研究發現這些草藥含有可以抑制黃嘌呤酶作用的成分，印度傳統醫學中常見的尤那尼草 (*Semecarpus anacardium*) 種子萃取物之乙烯乙酯分層，分析出一雙酚類化合物：tetrahydroamentoflavone (THA)，其黃嘌呤酶抑制效果之 IC_{50} 為 92 nM (Arimboor R et al. 2011)。肋果菘藍 (*Isatis costata*) 全株萃取物之乙烯乙酯分層所含的六種化合物(oxindole alkaloids costinones A, B、isatinones A, B、indirubin 和 trisindoline) 也有黃嘌呤酶抑制效果，其 IC_{50} 介於 $90.3 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 和 $179.6 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 之間 (Ahmad I et al. 2010)。無憂樹 (*Saraca ashoka*) 花朵萃取物之乙烯乙酯分層，其黃嘌呤酶抑制效果 IC_{50} 為 $27.51 \mu\text{g/mL}$ (Prathapan A et al. 2011)。錫葉藤 (*Tetracera scandens* L) 在越南常被用來治療風濕性關節炎，其乙醇萃取物被證實具有黃嘌呤酶抑制效果，在乙烯乙酯分層有最強的黃嘌呤酶抑制效果 IC_{50} 為 $6.8 \mu\text{g/mL}$ (Nguyen MT et al. 2004; Nguyen MT et al. 2012)。而另一研究中指出，地中海飲食中富含的豆科植物 (Leguminosae)，經甲醇：水=2:1 萃取後，其黃嘌呤酶抑制效果 IC_{50} 為 $280 \mu\text{g/mL}$ (Spanou CI et al. 2011)。

由天然物中萃取出可降尿酸之化合物整理請見圖五 (Fig. 5)。

雖然上述研究和臨床使用的降尿酸藥物黃嘌呤酶抑制劑 allopurinol 相比，粗

萃之天然物的黃嘌呤酶抑制效力較低，但因植物萃取物不似藥物為純化成分，需進一步分析萃取其有效成分後才可得較佳的結果，許多研究深入分析所得之純植物化合物活性成分，其 IC_{50} 甚至不亞於現今臨床常用之化學合成藥物，加上天然物萃取物較無顯著毒性，使用上或許較為安全，有很大的潛力發展為新的降尿酸藥物。



第三章 材料與方法

第一節 五種龍眼樣本製備

3-1.1 龍眼萃取物之製備

龍眼各部位萃取物由台北醫學大學生藥所徐鳳麟教授提供。材料取自龍眼不同部位，龍眼花 (280g)、種子 (2.5kg)、果殼 (1.3kg)、樹枝 (7.2kg)，分別以 95%MeOH 浸泡一日，隔日以濾紙過濾後，利用減壓濃縮機濃縮甲醇粗萃物至乾後稱重，同樣的動作萃取三次最後稱重估產率。粗萃物重量分別為龍眼花 (28.63g)、種子 (255g)、果殼 (155g)、樹枝 (325g)。另外取 75g 葉之粉末分別以 70% Acetone 萃取三次，真空過濾後將濾液濃縮至乾後稱重，葉的粗萃物 (20g)，龍眼花、種子、殼、枝和葉的產率分別為：10.23%、10.20%、11.92%、4.51%和 26.67%。取不同部位粗萃物回溶於水，分別以有機溶劑 (Hexane 和 EA) 分配層析法分成 Hexane, EA 和 H₂O 三層，分別濃縮減壓乾燥，取少量進行黃嘌呤酶抑制試驗。

3-1.2 龍眼花成分之取得

龍眼所含之十種成分由台北醫學大學生藥所徐鳳麟教授提供。其中龍眼花所含之主要兩種化合物萃取過程簡述如下：龍眼花、種子和殼之 80% acetone 粗萃物以不同極性之溶劑包括 n-hexane、ethyl acetate、n-butanol 和水進行液相-液相分配萃取，經抗氧化性測定實驗後，其中以 ethyl acetate 分層最具抗氧化活性。取此分層以 sephodex LH-20 (EtOH) 進行分離，最後經 MCI gel，MeOH/H₂O (10%-10%) 分析得到龍眼花主要兩種化合物：(-)-epicatechin 和 proanthocyanidin A2。

第二節 龍眼萃取物之生物活性篩選

3-2.1 黃嘌呤酶抑制試驗

黃嘌呤酶抑制試驗參考 Nguyen 等人的方法 (Nguyen et al. 2004)，實驗分為兩組。

實驗組 A：依待測物之不同分為三小組進行測試 (1) 分別取龍眼之花、種子、果殼、枝極和葉子之甲醇粗萃取物 (2) 分別取此五種龍眼甲醇粗萃物以有機溶劑 (Hexane 和 EA) 分配層析法後之各分層 (3) 龍眼花所含之十種化合物 ((-)-epicatechin、Acetylgeraniin A、Chebulagic acid、Chebulinic acid、Corilagin、Gallic acid、Geraniin、Proanthocyanidin A2、Procyanidin B2、Protochatechuic acid) 為待測物組，以不同濃度稀釋後各取 50 μ L 加入 35 μ L 之 50 mM PBS 溶液和 30 μ L 0.1 U/mL 之黃嘌呤酶 (Xanthine oxidase, X-1875, SIGMA, USA)，混合液置於 25 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘，再加入 60 μ L 150 μ M 黃嘌呤溶液 (xanthine, X-0626, SIGMA, USA)，混合液置於 25 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘後，加入 25 μ L 之 1N HCl 終止反應，並立刻以 Universal Microplate Spectrophotometer (μ QuantTM, BIO-TEK, USA) 測定波長 295nm 下之吸光值。

實驗組 B：則是將黃嘌呤酶換成等量之 PBS 溶液。陽性對照組分別以 50 μ L 之 50 μ g/ml 臨床治療高尿酸血症藥物 allopurinol (A8003, SIGMA, USA) 取代待測物。陰性對照組則以等量之 PBS 溶液取代待測物。

上述實驗步驟重複三次，紀錄各組吸光值。再依下列公式計算黃嘌呤酶抑制百分比：

$$\text{黃嘌呤酶抑制百分比} = [1 - (\Delta A_{\text{exp}} / \Delta A_{\text{control}})] \times 100\%$$

ΔA_{exp} ：實驗組之吸光值變化速率

$\Delta A_{\text{control}}$ ：對照組之吸光值變化速率

第三節 高尿酸血症動物模式建立

3-3.1 實驗動物

所使用的實驗動物為購自樂斯科生物科技股份有限公司所繁殖之 25~30g ICR 小鼠或 200g Wistar 大鼠。購入後飼養於台大獸醫學系動物舍不鏽鋼籠（長 30.0 cm、寬 26.0 cm、高 18.0 cm、孔徑 1.0×1.0 cm²）內一週，使小鼠適應環境。飼養全程供給充足飲水及飼料（MF-18, OYC：每 100 公克含 350 Kcal、粗蛋白 > 18 %、粗脂肪 > 6 %、粗灰質 < 6 %、粗纖維 < 6 %、可溶性無氮素物 > 58 %），籠舍保持清潔並維持室溫於 23 ± 2 °C、控制溼度於 60 %、12 小時燈光與黑暗變換週期及 24 小時持續換氣。

3-3.2 實驗設計及操作

氧嗪酸鉀（Potassium oxonate）為齧齒類動物尿酸酶（uricase）阻斷劑，腹腔注射 oxonate 可抑制尿酸酶作用，使動物體內尿酸無法被代謝成尿囊素（allotoin），誘導動物血中尿酸值提高。本次實驗參考 Stavric et al., 1975 的作法來建立高尿酸血症模式小鼠。

實驗分為二組，每組六隻 25-30g 小鼠（n=6）。實驗組腹腔注射 250 mg/kg 預先配製好之 Potassium oxonate 懸濁液（秤取 375 mg oxonic acid potassium salt，156124-5G, ALDRICH®, USA，加入 10 mg Na CMC 及 2 滴 Tween-80，再加入適量水混合均勻成 10 ml 懸濁液）。對照組腹腔注射等量之生理食鹽水。自注射後每 60 分鐘刺薦尾靜脈採血，以必立康血糖/尿酸雙功能測試儀（MultiSure Blood glucose & Uric acid Monitoring System, APEX BIOTECHNOLOGY CORP, Taiwan, R.O.C.）檢測血中尿酸值。小鼠於實驗過程中僅供給飲水，以免飲食影響尿酸值檢測。

3-3.3 資料分析與統計

所有實驗數據皆以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示。控制組與實驗組各檢測值間的差異皆以雙樣本檢定法 (two-sample tests) 分析兩者間是否有顯著性差異。

第四節 高尿酸血症模式小鼠研究龍眼降低血中尿酸值效力試驗

3-4.1 龍眼五種甲醇粗萃物降低血中尿酸值效力試驗

實驗依給予小鼠龍眼萃取物之劑量分為 A、B、C 三大組，A 組每隻小鼠給予 100 mg/kg 龍眼萃取物，B 組每隻小鼠給予 75 mg/kg 龍眼萃取物，C 組每隻小鼠給予 50 mg/kg 龍眼萃取物。

每大組再分為五小組，每小組六隻 25-30g 小鼠 (n=6)，其中

第一組：以胃管口服龍眼花之甲醇萃取物

第二組：以胃管口服龍眼種子之甲醇萃取物

第三組：以胃管口服龍眼殼之甲醇萃取物

第四組：以胃管口服龍眼枝極之甲醇萃取物

第五組：以胃管口服龍眼葉之甲醇萃取物

另外再分 D、E、F 三組，D 組為陰性對照組：口服 1ml 之磷酸緩衝溶液作為陰性對照組。E 組為陽性對照組：口服 allopurinol (10mg/kg) 作為陽性對照組。G 組：未經 oxonate 誘導成為高尿酸血症小鼠 (即正常小鼠血中尿酸值)。

口服以上液體 60 分鐘後，將此七組小鼠給予腹腔注射 250 mg/kg oxonate 懸著液，誘導成為高尿酸血症小鼠，注射 oxonate 120 分鐘後刺薦尾靜脈採血，以必立康血糖/尿酸雙功能測試儀 (the MultiSure Blood glucose & Uric acid Monitoring System., APEX BIOTECHNOLOGY CORP, Taiwan, R.O.C.) 檢測血中尿酸值。小鼠

於實驗過程中僅供給飲水，以免飲食影響尿酸值檢測。

由於必立康血糖/尿酸雙功能測試儀靈敏度限制，其檢測範圍為 3~20 mg/dL 之間，<3 和 >20 分別顯示 low 和 high，因此需進行小鼠眼窩採血，heparin 抗凝後以血清生化儀檢測其血中尿酸值。

3-4.2 資料分析與統計

所有實驗數據皆以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示。實驗組與對照組之血清尿酸檢測值間的差異皆以變方分析 (Analysis of variance; ANOVA) 中的鄧氏多變域測驗法 (Duncan's new multiple range test) 予以分析， $P < 0.05$ 時為顯著差異； $P < 0.01$ 時為極顯著差異。

第五節 高尿酸血症模式大鼠研究龍眼萃取物促進尿酸排泄試驗

實驗設計參考本研究室學姊莊雅玲之方法 (莊雅玲, 2005) 並進行改良。實驗分為 A、B、C、D、E 五組，每組六隻 200-250g 大鼠 ($n=6$)，以 oxonic acid 誘導大鼠產生高尿酸血症，A、B、C 三組分別口服 100 mg/kg 龍眼花、種子、果殼甲醇萃取物，D 組給予口服等量之磷酸緩衝溶液作為對照組。口服以上液體 60 分鐘後，將此四組大鼠腹腔注射 280 mg/kg oxonate 懸著液，誘導成為高尿酸血症大鼠，E 組則未給予口服磷酸緩衝溶液也未注射 oxonate 懸著液。120 分鐘後肌肉注射 5 mg/kg Xylazine 和 12.5 mg/kg Zoletil (Virbac Taiwan Co., Ltd.) 進行液體麻醉，大鼠全身麻醉後將其腹部剃毛，沿腹正中線切開皮膚、肌肉、腹膜層，露出膀胱，以 23G 針頭穿刺膀胱抽取尿液，每 30 分鐘抽取一次，連續六次。並每小時給予大鼠 3 ml 皮下注射生理食鹽水以促進其尿液生成。所採集之尿液以 Ektachem Clinical Chemistry Slides (URIC) 尿中尿酸濃度。

第四章 結果

第一節 生物活性篩選結果

龍眼萃取物進行黃嘌呤酶抑制試驗以迴歸曲線計算後所得之 IC_{50} 依序如下：龍眼花為 115.76 $\mu\text{g/ml}$ 、龍眼種子為 252.54 $\mu\text{g/ml}$ 、龍眼果殼為 125.34 $\mu\text{g/ml}$ 、龍眼枝條為 118.94 $\mu\text{g/ml}$ 、龍眼樹葉為 331.14 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 3)。

龍眼五種不同部位之甲醇粗萃物回溶於水，再以有機溶劑分配層析後，各分層之黃嘌呤酶抑制百分比 (%)：龍眼花以 EA 分層 78.57%；龍眼枝和龍眼殼以 Hex.分層之 96.4%和 68.42%；龍眼種子和龍眼葉以 EtOH 分層之 91.67%和 42.1%，對黃嘌呤酶之抑制效果最佳。但因黃嘌呤酶抑制試驗結果易受植物色素干擾，故實驗時常需調整待測物之稀釋倍數，導致實際測試時測待測物濃度不一，產生的結果也會因濃度不同而受影響，詳細結果請見表四 (Tab. 4)。

龍眼花已知十種成分黃嘌呤酶抑制試驗之黃嘌呤酶抑制百分比 (%)：(-)-epicatechin 0%、Acetylgeraniin A 64.67%、Chebulagic acid 16%、Chebulinic acid 33%、Corilagin 44%、Gallic acid 0%、Geraniin 46.67%、Proanthocyanidin A 70.67%、Procyanidin B%、Protochatechuic acid 22%，陽性對照 allopurinol 67%(Tab. 5)。

第二節 高尿酸血症動物模式建立

腹腔注射 PBS 之小鼠血清尿酸值 (mg/dL) 在第 0、1、2、3、4、5、6、7、8 小時皆為：3 (Tab. 7)。腹腔注射 oxonate 之小鼠血清尿酸值 (mg/dL) 在第 0、1、2、3、4、5、6、7、8 小時依序為：3、3.32、18.18、17.08、14.55、14.52、12.05、11.5 (Tab. 6)。結果顯示小鼠單次腹腔注射 250 mg/kg 之 oxonate 可使小鼠產生高尿酸血症，持續時間可達五小時以上 (Fig. 6)。

第三節 高尿酸血症模式小鼠研究龍眼萃取物降低血中尿酸值效力試驗

4-3.1 龍眼五種甲醇粗萃物降低血中尿酸值效力結果

由先前的試驗結果得知，小鼠腹腔注射 oxonate 兩小時後，可見其血清尿酸值明顯提升，故實驗先給予小鼠口服龍眼萃取物，一小時後給予腹腔注射 oxonate，在腹腔注射 oxonate 兩小時後檢測其血清尿酸濃度，其結果如下 (Fig. 7) (Fig. 8) (Fig. 9)。

A 組 (每隻小鼠口服 100 mg/kg 龍眼甲醇萃取物) (Tab. 8)。

第一組 (花): 3.53 mg/dL。第二組 (種子): 3.85 mg/dL。第三組 (殼): 6.02 mg/dL。第四組 (枝椏): 7.33 mg/dL。第五組 (葉): 8.85 mg/dL。

B 組 (每隻小鼠口服 75 mg/kg 龍眼甲醇萃取物) (Tab. 9)

第一組 (花): 3.85 mg/dL。第二組 (種子): 4.81 mg/dL。第三組 (殼): 6.88 mg/dL。第四組 (枝椏): 7.63 mg/dL。第五組 (葉): 11.32 mg/dL。

C 組 (每隻小鼠口服 50 mg/kg 龍眼甲醇萃取物) (Tab. 10)。

第一組 (花): 8.35 mg/dL。第二組 (種子): 8.73 mg/dL。第三組 (殼): 11.32 mg/dL。第四組 (枝椏): 11.67 mg/dL。第五組 (葉): 16.88 mg/dL。

第四節 高尿酸血症模式大鼠研究龍眼萃取物促進尿酸排泄試驗結果

實驗先給予大鼠口服 PBS 和龍眼甲醇萃取物，一小時後給予腹腔注射 oxonic acid，在腹腔注射 oxonic acid 兩小時後每 30 分鐘檢測一次尿中尿酸濃度，其結果如下 (Fig. 10)；

A 組 (每隻大鼠口服 100 mg/kg 龍眼花萃取物) (Tab. 10)。

第 30 分鐘: 11.45 mg/dL。第 60 分鐘: 13.52 mg/dL。第 90 分鐘: 15.85 mg/dL。第 120 分鐘: 16.77 mg/dL。第 150 分鐘: 16.88 mg/dL。第 180 分鐘: 14.63 mg/dL。

B 組（每隻大鼠口服 100 mg/kg 龍眼種子萃取物）（Tab. 11）。

第 30 分鐘：21.39 mg/dL。第 60 分鐘：21.1 mg/dL。第 90 分鐘：20.66 mg/dL。
第 120 分鐘：21.23 mg/dL。第 150 分鐘：20.22 mg/dL。第 180 分鐘：17.55 mg/dL。

C 組（每隻大鼠口服 100 mg/kg 龍眼殼萃取物）（Tab. 12）。

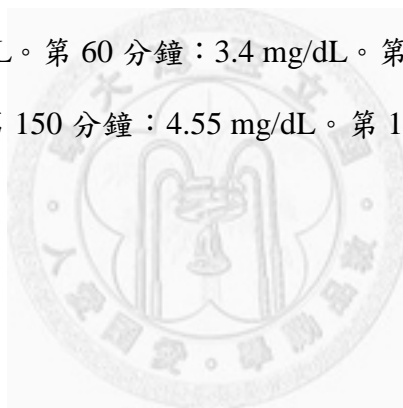
第 30 分鐘：24.08 mg/dL。第 60 分鐘：26.35 mg/dL。第 90 分鐘：28.08 mg/dL。
第 120 分鐘：25.77 mg/dL。第 150 分鐘：24.91 mg/dL。第 180 分鐘：19.59 mg/dL。

D 組（每隻大鼠口服 PBS）（Tab. 13）。

第 30 分鐘：33.55 mg/dL。第 60 分鐘：35.62 mg/dL。第 90 分鐘：36.45 mg/dL。
第 120 分鐘：37.55 mg/dL。第 150 分鐘：37.95 mg/dL。第 180 分鐘：37.25 mg/dL。

E 組(未注射 oxonic acid)（Tab. 14）。

第 30 分鐘：3.5 mg/dL。第 60 分鐘：3.4 mg/dL。第 90 分鐘：3.58 mg/dL。第
120 分鐘：4.25 mg/dL。第 150 分鐘：4.55 mg/dL。第 180 分鐘：4.61 mg/dL。



第五章 討論

尿酸是人體內嘌呤代謝的最終產物，嘌呤的再利用和尿酸的形成與排泄在生理功能正常時會達一平衡狀態（Wu XW et al. 1992）。然而，除了少數與遺傳相關酵素缺陷，使嘌呤無法再利用或使 PRPP 生成速率過高造成先天性的高尿酸血症，痛風是現代人常見的代謝性疾病，由於人體內游離的嘌呤大約有百分之九十可被回收利用，一旦攝取過量含嘌呤的食物，嘌呤被黃嘌呤酶分解後，很容易導致尿酸過多，是造成高尿酸血症的主要原因。另一方面，因為腎臟是排泄尿酸的主要途徑之一，腎功能下降會造成尿酸排泄不良而在體內堆積，慢性腎衰竭患者也常併發高尿酸血症，而累積在腎臟的尿酸鹽結晶又會加重腎功能不良的情形（Zhang Y et al. 2012）。

大鼠和小鼠高尿酸血症模式之建立方式和探討

本研究中曾以小鼠進行實驗，連續 7 天給予小鼠口服 30 g/kg 啤酒酵母粉（Cenovis Brewer's yeast power）來誘發小鼠產生高尿酸血症，酵母含有豐富的蛋白質、核酸和維他命 B 群等可在生物體內經代謝後可被水解為嘌呤、嘧啶和磷酸，此模式可模擬人類因高蛋白飲食造成之高尿酸血症（CHEN Guang Liang et al. 2003），結果可見小鼠之血中尿酸值由 <3 mg/dL 增加為 15.7 mg/dL。由於齧齒類動物具有尿酸酶，可將體內生成的尿酸轉換為尿素排出，正常生理狀況下齧齒類動物不會有高尿酸血症的情形，但連續 7 天給予高普林飲食後，小鼠血中尿酸值明顯增高，顯示過多的外源性嘌呤會被體內的黃嘌呤酶轉化成尿酸，超過尿酸酶可分解的能力而累積在體內。而沒有尿酸酶可分解尿酸的人類，一旦飲食攝取過多含嘌呤的食物，經消化吸收後，超過替代路徑酵素回收利用游離嘌呤的能力，這些嘌呤被黃嘌呤酶分解產生尿酸，就更容易發生高尿酸血症和痛風了。但在研究龍眼萃取物抑制小鼠尿酸生成試驗中，我們選擇以 oxonic acid 來誘發小鼠產生高尿酸血症，是利用其抑制尿酸酶的作用，使經黃嘌呤酶轉換游離嘌呤產生之尿

酸在體內累積，比起以高普林飲食誘發之高尿酸血症所需時間短，且可排除啤酒酵母之高氮含量對生物體內其他生理機轉如：肝、腎功能可能產生的影響（O'Beirne, J. et al. 2000）。

天然物萃取物之降尿酸成分探討

以中國傳統醫藥治療高尿酸血症和痛風已有很長的歷史，台灣常見的抗痛風草藥有：化血膽（玄參科黑蒴的全草）、台灣泡桐樹葉樹皮、鹿茸草、紫蘇、絡石藤、山慈菇、石蒜、芫花、接骨木、芹菜籽等。抗痛風中草藥的藥理作用主要有以下幾類：抑制黃嘌呤酶作用以減少尿酸合成、促進尿酸排泄減少體內累積，和抑制痛風炎症因子的產生。研究指出，抗痛風中草藥含有許多種植物化學成分，與抗痛風有關的主要有可以抑制黃嘌呤酶作用的黃酮類和咖啡酸酯類；有促進尿酸排泄作用的環烯萜苷類和生物鹼類；和有止痛消炎作用的芥子苷類（吳煥2012）。而龍眼花茶為民間流傳的降尿酸偏方，為證實其療效，本研究以風乾的龍眼植物萃取物來進行實驗。

龍眼是亞熱帶常見的水果，在中國傳統醫學認為龍眼有健胃、解熱、解毒、驅蟲和治療失眠、健忘等療效（Hsu, H. Y. 1972），近年來許多人開始對龍眼所含的成分感到好奇，根據研究顯示，龍眼花分離出之(-)-epicatechin 和原花青素 A2（Proanthocyanidin A2）具抗氧化活性，可抗發炎和癌症。龍眼果肉以及種子含有高量的 gallic acid、corilagin 和 ellagic acid 具有很強烈的抗氧化活性，與日本的綠茶功效類似（Rangkadilok N et al. 2005; Sun J, Shi J et al. 2007）。儘管抗氧化劑多少對酵素活性有影響，然而並非所有具抗氧化活性的化合物都對黃嘌呤酶有良好的抑制效果，仍需考慮其化學結構和酵素本身的交互作用。

實驗結果探討

本實驗除了研究龍眼花萃取物之降尿酸的效果，也對龍眼的其他部分（殼、種子、葉和枝條）進行分析。根據生物活性篩選結果顯示，龍眼花、種子、殼、枝條和樹葉甲醇粗萃取物都具有不等之黃嘌呤酶抑制作用，尤其龍眼花、果殼和

枝條甲醇粗萃物之黃嘌呤酶 IC₅₀ 為 115~125 µg/ml, 較其他研究中黃嘌呤酶抑制效果佳, 其植物粗萃物黃嘌呤酶 IC₅₀ 多在 300 以上 (陶良榆。 2011; Spanou CI et al. 2011)。

植物之部位不同, 其化學成分各有特點。如花、果實、根多含芳香性的揮發油成分; 莖、皮、葉等部位所含揮發性成分相對較少; 果實、種子中高級脂肪酸和油脂含量相對較高等 (郭章華等。2003)。進一步將龍眼五種不同部位之甲醇粗萃物回溶於水, 再以有機溶劑分配層析後, 龍眼各部份由不同有機溶劑各分層萃出之黃嘌呤酶抑制百分比 (%) 亦不盡相同, 但大部分在 100 µg/ml 濃度下之黃嘌呤酶抑制率都大於 50% (Tab. 4), 效力明顯優於本實驗室先前訂定的標準: 非純化合物在 200 µg/ml 濃度下黃嘌呤酶抑制率大於 50% 為值得進一步分析之標準。本實驗室曾對白花水竹草分析出之 20 種化合物進行試驗, 其中三種在 200 µg/ml 濃度下對黃嘌呤酶抑制率大於 50% (莊雅玲。 2005; 曾瀚群。 2008)。

我們取龍眼已知的十種成分進行黃嘌呤酶抑制試驗, 結果發現原花青素 A2 (Proanthocyanidin A2) 有最佳的黃嘌呤酶抑制效果 70.67%, 原花青素是植物中一種色素成分, 廣泛存在於各種植物中, 屬於植物化學成分中之酚類化合物, 為一強抗氧化物質 (David Jacques et al. 1974)。而屬於單寧類的 Acetonylgeraniin A 也對黃嘌呤酶有很好的抑制效果在 40 µg/ml 濃度下對黃嘌呤酶抑制率可達 64.67%。其他如 Corilagin 等成分也具不等之黃嘌呤酶抑制作用, 可見龍眼各部位有很大的價值近一步分析其抗高尿酸血症之植物活性成分。然而以風乾龍眼花進行 Proanthocyanidin A2 的分離, 發現其產率並不高, 含量不到 0.5 mg/100 mg, 而龍眼殼和種子之 EA layer 經分析後, 雖確認也含有 Proanthocyanidin A2, 但是產量亦少, 和龍眼花相差不多, 先前有研究指出龍眼花主要含有的成分為(-)-epicatechin 和 proanthocyanidin A2, 而其 Proanthocyanidin A2 rich fraction 之含量大約 1.5 mg/100 mg, 產率約為 0.1% (謝孟潔 2007)。植物化合物質萃取率之不同有可能和龍眼品種差異或是此批作為純化原料枝龍眼花之先前處理或貯藏方式有關, 導

致其因氧化等因素而使有效成分被破壞。另外雖然龍眼萃取物中最具抑制黃嘌呤酶作用的有效成分 proanthocyanidin A2 產率並不高，但龍眼花甲醇粗萃物在生物實驗中降低小鼠血中尿酸值效果十分顯著，加上龍眼花所含之化合物中還有其他具不同程度可抑制黃嘌呤酶作用的化合物，綜合以上結果我們認為龍眼萃取物降尿酸功能並非單一 Proanthocyanidin A2 造成，其抗高尿酸血症效果是各種有效成分作用相加造成的結果。

有研究指出，有些多酚類化合物在傳統的黃嘌呤酶抑制試驗下(UV-method)因色素干擾容易吸收 295nm 波長的光線而影響實驗結果，現在已有一新的檢測方式：CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity)藉由測量 Xanthine oxidase 消耗的多酚類化合物所還原之銅離子，在 450nm 下直接得知尿酸和過氧化氫的形成量 (Ozyürek M et al. 2009) 或許可做為將來 *in vitro* 實驗的參考。

在降低以 oxonic acid 誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值試驗中，給予小鼠口服龍眼甲醇粗萃物，結果顯示龍眼萃取物經過胃腸道消化吸收後仍具有生物活性，可以有效降低尿酸的生成，並以龍眼花、種子、果殼萃物效果較佳，然而先前 *in vitro* 試驗和 *in vivo* 試驗之結果不盡相符 (*in vitro* 試驗中抑制黃嘌呤酶效果較佳的枝極萃物在 *in vivo* 試驗中效果卻不如種子萃物)，這個現象可能和口服給予之萃物進入生物體內後受代謝影響有關，因為黃嘌呤酶主要存在於肝臟和腸黏膜中，龍眼花萃物可能含有較多容易被腸道吸收之黃嘌呤酶抑制成分，或是含有經消化吸收後仍具生物活性的成分比例較高。關於降尿酸植物化合物效果之研究多以大鼠或小鼠來建立高尿酸血症動物模式，實驗設計則大致可分為長時間(連續口服三至七天以上) (李安哲。2011; Ji Xiao Zhu et al. 2004)；和短時間(僅口服一次) (Xiaoyu Liua et al. 2008; Zuoqi Ding et al. 2005) 兩類，本實驗僅給予口服一次植物萃物，就可產生良好的降尿酸效果，顯示龍眼花，種子和果殼所含之降尿酸成分被腸道吸收快速且不易被體內代謝影響其活性，加上龍眼花茶本來就是可食用之食品，可避免化學合成藥物對人體產生不良副作用 (Yaylac S

et al. 2012)，龍眼花萃取物在新藥物的開發上有極大的潛力。

以高尿酸血症大鼠進行尿酸排泄促進試驗中，口服 PBS 之控制組，尿中尿酸值明顯比口服龍眼萃取物之組別高，結果和先前小鼠龍眼降尿酸試驗結果吻合，因為尿酸產生量減少，由尿中尿酸量也較少。然而比較各時間點間尿中尿酸值之斜率 (Tab.15)，無論控制組或實驗組皆未見到有逐漸增加的趨勢，表示龍眼花、種子、果殼之萃取物無法促進尿中尿酸排泄，我們認為藉由抑制黃嘌呤酶作用減少尿酸生成是龍眼萃取物抗高尿酸血症的主要機轉。

黃嘌呤酶之分子構形具高度彈性，是一種廣泛專一性 (broad specificity) 酵素，可結合催化多種不同受質，亦可被多種化合物抑制，目前常用的臨床藥物 allopurinol 和 febuxostat 分別利用競爭性抑制和非競爭性亦治的機轉來降低黃嘌呤催化尿酸形成的作用，而 allopurinol 代謝產物 alloxanthine 也是一非競爭型的黃嘌呤酶抑制劑 (Hamburger M et al. 2011)。過去研究已發現小分子多酚類化合物和類黃酮可抑制黃嘌呤酶活性 (Ozyürek M et al. 2009)，而龍眼萃取物富含各種多酚類化合物，除了其中有幾種具有良好的抑制黃嘌呤酶效果外，這些抗氧化劑成分可減輕自由基對組織器官的傷害，對尿酸結晶沉澱引起腎臟和關節的炎症也有緩解的作用 (Rangkadilok N et al. 2006)。

另外台灣每年夏秋之季南部農民製作龍眼乾剩餘的大量廢棄龍眼殼，我們希望能夠廢物利用，不浪費生物資源，故分別將新鮮和烘乾的龍眼殼 (製作龍眼乾時經火烘烤過的龍眼殼) 碎片以 75% 酒精萃取 3 天，進行黃嘌呤酶抑制試驗，其中烘乾龍眼殼酒精萃取物對黃嘌呤酶完全無抑制效果，顯示高熱會破壞植物成分之活性，無法被再利用作為萃取之來源 (Tab. 16)。

結論

龍眼花、種子、殼、枝條和葉子萃取物會抑制黃嘌呤酶作用，口服龍眼萃取物可降低在高尿酸血症小鼠血中尿酸值，其中以龍眼花之萃取物效果最好。但口服龍眼萃取物無法促進尿中尿酸排泄。龍眼萃取物主要是經由抑制黃嘌呤酶作用

這個機制來降低血中尿酸值。由於口服龍眼萃取物降低血中尿酸值效果顯著，十分值得進一步研究開發為天然的降尿酸藥物。



參考文獻

1. 中華民國痛風之友協會會刊第 69 期。2011。
2. 行政院衛生署中醫藥委員會。臺灣藥用植物資源名錄。299，2003。
3. 行政院衛生署。國民營養現況: 2010-2011 國民營養健康狀況變遷調查。33-34, 2012。
4. 吳煥，顧冠彬。台灣草藥新知: 台灣抗痛風草藥。台北，2012。
5. 郭章華、周敏華。超臨界流體萃取技術在中藥研究領域的應用。國際醫藥衛生導報。9：3233，2003。
6. 陳垣崇。研究成果降尿酸藥引發的嚴重過敏反應：基因標記的發現。中央研究週報。1028：1-3，2005。
7. 莊雅玲。白花水竹草降低大鼠血中尿酸值、抗氧化性及毒性探討。國立台灣大學獸醫專業學院獸醫系碩士論文。2005。
8. 曾瀚群。白花水竹草之化學成分研究。國立臺灣大學理學院化學系碩士論文。2008。
9. 陶良榆。葉下珠之萃取成分可抑制黃嘌呤氧化酶以及降低大鼠血液中的尿酸。國立清華大學生物科技研究所碩士論文。11-13，2011。
10. 李安哲。菊花之萃取成份可抑制黃嘌呤氧化酶以及降低大鼠血液中的尿酸。國立清華大學生物科技研究所碩士論文。13，17，2011。
11. 應紹舜。台灣高等植物彩色圖誌，第六卷。198，1998。
12. Ahmad I, Ijaz F, Fatima I, Ahmad N, Chen S, Afza N, Malik A. Xanthine oxidase/tyrosinase inhibiting, antioxidant, and antifungal oxindole alkaloids from *Isatis costata*. *Pharm Biol.* 716-21, 2010.
13. Arimboor R, Rangan M, Aravind SG, Arumughan C. Tetrahydroamentoflavone (THA) from *Semecarpus anacardium* as a potent inhibitor of xanthine oxidase. *J*

- Ethnopharmacol. 1117-20, 2011.
14. Attridge RL, Linn WD, Ryan L, Koeller J, Frei CR. Evaluation of the incidence and risk factors for development of fenofibrate-associated nephrotoxicity. *J Clin Lipidol.* 6:19-26, 2012.
 15. Bijak M, Kolodziejczyk-Czepas J, Ponczek MB, Saluk J, Nowak P. Protective effects of grape seed extract against oxidative and nitrative damage of plasma proteins. *Int J Biol Macromol.* 183-187, 2012.
 16. Bruder G, Heid H, Jarasch ED, Keenan TW, Mather IH. Characteristics of membrane-bound and soluble forms of xanthine oxidase from milk and endothelial cells of capillaries. *Biochim Biophys Acta.* 701:357-69, 1982.
 17. Berger L, Yü TF. Renal function in gout. IV. An analysis of 524 gouty subjects including long-term follow-up studies. *Am J Med.* 59:605-13, 1975.
 18. Becker MA, MacDonald PA, Hunt B, Gunawardhana L. Treating hyperuricemia of gout: safety and efficacy of febuxostat and allopurinol in older versus younger subjects. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 30:1011-7, 2011.
 19. Beedham C, Critchley DJ, Rance DJ. Substrate specificity of human liver aldehyde oxidase toward substituted quinazolines and phthalazines: a comparison with hepatic enzyme from guinea pig, rabbit, and baboon. *Arch Biochem Biophys.* 481-90, 1995.
 20. Chen JH, Yeh WT, Chuang SY, Wu YY, Pan WH. Gender-specific risk factors for incident gout: a prospective cohort study. *Clin Rheumatol.* 31:239-45, 2012.
 21. Chuang SY, Lee SC, Hsieh YT, Pan WH. Trends in hyperuricemia and gout prevalence: Nutrition and Health Survey in Taiwan from 1993-1996 to 2005-2008. *Asia Pac J Clin Nutr.* 20:301-8, 2011.
 22. Chung YC, Lin CC, Chou CC, Hsu CP. The effect of Longan seed polyphenols on

- colorectal carcinoma cells. *Eur J Clin Invest.* 713-21, 2010.
23. Chen J, Chen X, Qin J. Effects of polysaccharides of the *Euphoria Longan* (Lour.) Steud on focal cerebral ischemia/reperfusion injury and its underlying mechanism. *Brain Inj.* 292-9, 2011.
24. Choi HK, Mount DB, Reginato AM. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med* 499-516, 2005.
25. Campion EW, Glynn RJ, DeLabry LO. Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study. *Am J Med.* 421-6, 1987.
26. Ching-Yu Hsieh and Shang-Tzen Chang Antioxidant Activities and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of Phenolic Phytochemicals from *Acacia confuse* Twigs and Branches. *J. Agric. Food Chem.* 58:1578–1583, 2010.
27. Cai Guo Huang, Yan Jun Shang, Jun Zhang, Jian Rong Zhang, Wen Jie Li and Bin Hua Jiao Hypouricemic Effects of Phenylpropanoid Glycosides Acteoside of *Scrophularia ningpoensis* on Serum Uric Acid Levels in Potassium Oxonate-Pretreated Mice. *American Journal of Chinese Medicine.* 149–157, 2008.
28. Chen Guang Liang, Zhang Qing Lin, Ma Xiao Qin, Xu Shu Yun. Hyperuricemia model induced by yeast in mice. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2003.
29. David Jacques , Edwin Haslam , Geoffery R. Bedford and David Greatbanks Plant proanthocyanidins. Part II. Proanthocyanidin-A2 and its derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2663-2671, 1974
30. Doehner W, Landmesser U. Xanthine oxidase and uric acid in cardiovascular disease: clinical impact and therapeutic options. *Semin Nephrol.* 433-40, 2011
31. Friedl HP, Till GO, Trentz O, Ward PA. Role of oxygen radicals in tourniquet-related ischemia-reperfusion injury of human patients. *Klin Wochenschr.* 69:1109-12, 1991.

32. Fagugli RM, Gentile G, Ferrara G, Brugnano R. Acute renal and hepatic failure associated with allopurinol treatment. *Clin Nephrol.* 523-6, 2008.
33. Fatemeh Haidari et al. Orange juice and Hesperetin Supplementation of Hypouricemic Rats after Oxidative Stress Marker and Oxidoreductase Activity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 285-291, 2009.
34. Galvan AQ, Baldi S, Frascerra S, Sanna G, Ciociaro D, Ferrannini E. Effect of insulin on uric acid excretion in humans. *Am J Physiol.* 268:E1-5, 1995.
35. Guang-Liang Chen,* Wei Wei and Shu-Yun Xu. Effect and Mechanism of Total Saponin of Dioscorea on Animal Experimental Hyperuricemia. *The American Journal of Chinese Medicine*, 34: 77–85, 2006.
36. Huang MR, Li S, Li XG. Longan shell as novel biomacromolecular sorbent for highly selective removal of lead and mercury ions. *J Phys Chem B.* 114:3534-42, 2010.
37. Hsu, H. Y. *Illustrations of Chinese Herb Medicine of Taiwan*; Chinese Herb Medicine Committee National Health Administration: Taipei, Taiwan, R.O.C. p 168, 1972.
38. Hsu FL, Lu FH, Cheng JT. Influence of acetonylgeraniin, a hydrolyzable tannin from *Euphoria longana*, on orthostatic hypotension in a rat model. *Planta Med.* 60:297-300, 1994.
39. Hsu CP, Lin YH, Zhou SP, Chung YC, Lin CC, Wang SC. Longan flower extract inhibits the growth of colorectal carcinoma. *Nutr Cancer.* 62:229-36, 2010.
40. Heinig M, Johnson RJ. Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med.* 73:1059-64, 2006.
41. Hung SI, Chung WH, Liou LB. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc Natl Acad Sci U S A,*

- 102:4134-9, 2005.
42. Hsieh MC, Shen YJ, Kuo YH, Hwang LS. Antioxidative activity and active components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flower extracts. *J Agric Food Chem.* 56:7010-6, 2008.
43. Ho SC, Hwang LS, Shen YJ, Lin CC. Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells. *J Agric Food Chem.* 55:10664-70, 2007.
44. Haiyan Yan, Ying Ma, Mei Liu, Lanlan Zhou The Dual Actions of *Paederia scandens* Extract as a Hypouricemic Agent: Xanthine Oxidase Inhibitory Activity and Uricosuric Effect. *Planta Medica.* 1345–1350, 2008.
45. Hamburger M, Baraf HS, Adamson TC, Basile J, Bass L, Cole B, Doghramji PP, Guadagnoli GA, Hamburger F, Harford R, Lieberman JA, Mandel DR, Mandelbrot DA, McClain BP, Mizuno E, Morton AH, Mount DB, Pope RS, Rosenthal KG, Setoodeh K, Skosey JL, Edwards NL. 2011 recommendations for the diagnosis and management of gout and hyperuricemia. *Phys Sportsmed.* 98-123, 2011
46. Hepburn AL, Kaye SA, Feher MD. Fenofibrate: a new treatment for hyperuricaemia and gout. *Ann Rheum Dis.* 60:984-6, 2001.
47. Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Agata I, Noro T, Okuda T. Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chem Pharm Bull.* 1224-9, 1999.
48. Ito S, Naritomi H, Ogihara T, Shimada K, Shimamoto K, Tanaka H, Yoshiike N. Impact of serum uric acid on renal function and cardiovascular events in hypertensive patients treated with losartan. *Hypertens Res.* 1038, 2012.
49. Johnson WJ, Stavric B, Chartrand A. Uricase inhibition in the rat by s-triazines: an

- animal model for hyperuricemia and hyperuricosuria. *Proc Soc Exp Biol Med.* 131:8-12, 1969.
50. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sánchez-Lozada LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 86:899-906, 2007.
51. Ji Xiao Zhu, Ying Wang, Ling Dong Kong, Cheng Yang, Xin Zhang Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology* 93:133–140, 2004.
52. Jin J, Bi H, Hu J, Zeng H, Zhong G, Zhao L, Huang Z, Huang M. Effect of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on the pharmacokinetics of paclitaxel in rats. *Phytother Res.* 1250-3, 2011.
53. Kawabata F, Tsuji T. Effects of dietary supplementation with a combination of fish oil, bilberry extract, and lutein on subjective symptoms of asthenopia in humans. *Biomed Res.* 387-93, 2011.
54. Kawaguchi T, Shimode M, Matsushita H, Nagase S. Sex differences in the effect of uric acid on the survival of analbuminemic rats exposed to cold: effects of gonadal hormones and uric acid. *Jpn J Physiol.* 37:941-5, 1987.
55. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Watanabe S, Han L, Mazzali M et al. A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 2888-97, 2002.
56. Kim KY, Ralph Schumacher H, Hunsche E, Wertheimer AI, Kong SX. A literature review of the epidemiology and treatment of acute gout. *Clin Ther.* 25:1593-617, 2003.
57. Kazuma Yoshizumi et al., The Xanthine Oxidase inhibitory Activity and

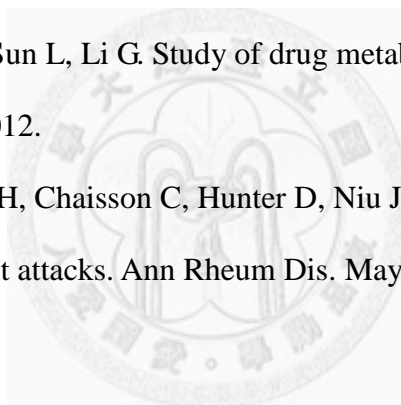
- Hyperuricemia effect of the Propolis in Rats. *YAKUGAKU ZASSHI* 125:315-321, 2005.
58. Keshk S, Mostafa M, Tawfik F, Elshemy I. *Pharmazie*. Biotransformation of extracted digitoxin from *Digitalis lanata* by *Streptomyces*. 458-62, 2011.
59. Kurajoh M, Koyama H, Shoji T, Sumida C, Yamamoto A, Tsutsumi Z, Moriwaki Y, Yamamoto T, Koga M. Relationship between serum allantoin and urate in healthy subjects and effects of benzbromarone in gout patients. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 265-71, 2012.
60. Le MT, Shafiu M, Mu W, Johnson RJ. SLC2A9--a fructose transporter identified as a novel uric acid transporter. *Nephrol Dial Transplant*. 2746-9, 2008.
61. Lvyi Chena, Huafeng Yina, Zhou Lanb, Shuwei Maa, Chunfeng Zhanga, Zhonglin Yanga, Ping Li a, Baoqin Linc Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. *Chemico-Biological Interactions* 135 :399–405, 2011.
62. Mai Thanh Thi NGUYEN et al., Hypouricemic Effects of Acacetin and 4,5-O-Dicaffeoylquinic Acid Methyl Ester on Serum Uric Acid Levels in Potassium Oxonate-Pretreated Rats *Biol. Pharm. Bull.* 28 :2231-2234, 2005.
63. Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, Kanellis J, Watanabe S, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. *Am J Nephrol*. 23:2-7, 2003.
64. Nguyen MT, Nguyen NT. A new lupane triterpene from *Tetracera scandens* L., xanthine oxidase inhibitor. *Nat Prod Res*. 19, 2012.
65. Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Watanabe H, Kadota S. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol Pharm Bull*. 27:1414-21, 2004.
66. Okuyama E, Ebihara H, Takeuchi H, Yamazaki M. Adenosine, the anxiolytic-like

- principle of the Arillus of *Euphoria longana*. *Planta Med.* 65:115-9, 1999.
67. O'Beirne, J., Patch, D., Holt, S., Hamilton, M., & Burroughs, A. K. Alcoholic hepatitis-the case for intensive management. *Postgraduate Medical Journal.* 504-507, 2000.
68. Ozyürek M, Bektaolu B, Güçlü K, Apak R. Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal Chim Acta.* 42-50, 2009.
69. Prathapan A, Lijo Cherian O, Nampoothiri SV, Mini S, Raghu KG. In vitro antiperoxidative, free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of ethyl acetate fraction of *Saraca ashoka* flowers. *Nat Prod Res.* 25:298-309, 2011.
70. Park SJ, Park DH, Kim DH, Lee S, Yoon BH, Jung WY, Lee KT, Cheong JH, Ryu JH. The memory-enhancing effects of *Euphoria longan* fruit extract in mice. *J Ethnopharmacol.* 128:160-5, 2010.
71. Prior, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr.* 570S-578S, 2003.
72. Perkins P, Jones AC. Gout. *Ann Rheum Dis.* 58:611-7, 1999.
73. Pan WH, Wu HJ, Yeh CJ, Chuang SY, Chang HY, Yeh NH, Hsieh YT. Diet and health trends in Taiwan: comparison of two nutrition and health surveys from 1993-1996 and 2005-2008. *Asia Pac J Clin Nutr.* 20:238-50, 2011.
74. Richette P, Bardin T. Gout. *Lancet.* 23:318-28, 2010.
75. Richette P. Gout: An overview of available urate lowering therapies. *Ann Pharm Fr.* 133-8, 2012.
76. Rangkadilok N, Worasuttayangkurn L, Bennett RN, Satayavivad J. Identification and quantification of polyphenolic compounds in Longan (*Euphoria longana* Lam.) fruit. *J Agric Food Chem.* 53:1387-92, 2005.

77. Rangkadilok N, Sitthimonchai S, Worasuttayangkurn L, Mahidol C, Ruchirawat M, Satayavivad J. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food Chem Toxicol.* 45:328-36, 2006.
78. Soong YY, Barlow PJ. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1085:270-7, 2005.
79. Sun J, Shi J, Jiang Y, Xue SJ, Wei X. Identification of two polyphenolic compounds with antioxidant activities in longan pericarp tissues. *J Agric Food Chem.* 55:5864-8, 2007.
80. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Lopez-Molina R, et al. Effects of acute and chronic L-arginine treatment in experimental hyperuricemia *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1238-44, 2007.
81. Spanou CI, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Aligiannis N, Angelis A, Skaltsounis AL, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Kouretas D. Effects of Greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities. *J Physiol Biochem.* 8, 2011.
82. Shih-Chang Chien, Chen-Wei Yang, Yen-Hsueh Tseng, Hsin-Sheng Tsay, Yueh-Hsiung Kuo, Sheng-Yang Wang *Lonicera hypoglauca* Inhibits Xanthine Oxidase and Reduces Serum Uric Acid in Mice. *Planta Medica* 75: 302–306, 2009.
83. Sasiporn Sarawek, Bjoern Feistel, Ivo Pischel, Veronika Butterweck. Flavonoids of *Cynara scolymus* Possess Potent Xanthin oxidase Inhibitory Activity in vitro but are Devoid of Hypouricemic Effects in Rats after Oral Application. *Planta Medica* 74: 221–227, 2008.
84. Tsai HY, Wu LY, Hwang LS. Effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan

- flower on markers of metabolic syndrome in fructose-fed rats. *J Agric Food Chem.* 56:11018-24, 2008.
85. Vikneswaran Murugaiyah, Kit-Lam Chan. Mechanisms of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus niruri* and its lignan constituents *Journal of Ethnopharmacology* 124: 233–239, 2009.
86. Wu CH, Lai HM, Yang MC, Liaw CC, Chang SJ, Ko YC, Chen CJ. Identification of a new single-nucleotide mutation on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from 983 cases with gout in Taiwan. *J Rheumatol.* 34:794-7, 2007.
87. Wu, C. L., and Melton, D. W. Production of a model for Lesch-Nyhan syndrome in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient mice. *Nature Genetics* 3: 235-240, 1993.
88. Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol.* 34:78-84, 1992.
89. Xiaoyu Liua, Ruohua Chenb, Yanjun Shanga, Binghua Jiao a, Caiguo Huanga
Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. *Chemico-Biological Interactions* 176:137–142, 2008.
90. Yu KH, See LC, Huang YC, Yang CH, Sun JH. Dietary factors associated with hyperuricemia in adults. *Semin Arthritis Rheum.* 37:243-50, 2008.
91. Yang DJ, Chang YY, Hsu CL, Liu CW, Lin YL, Lin YH, Liu KC, Chen YC.
Antiobesity and hypolipidemic effects of polyphenol-rich longan (*Dimocarpus longans* Lour.) flower water extract in hypercaloric-dietary rats. *J Agric Food Chem.* 58:2020-7, 2010.
92. Yu-Tang Tung, Chih-An Hsu, Chien-Shu Chen, Suh-Ching Yang, Chi-Chang Huang, and Shang-Tzen Chang Phytochemicals from *Acacia confusa* Heartwood

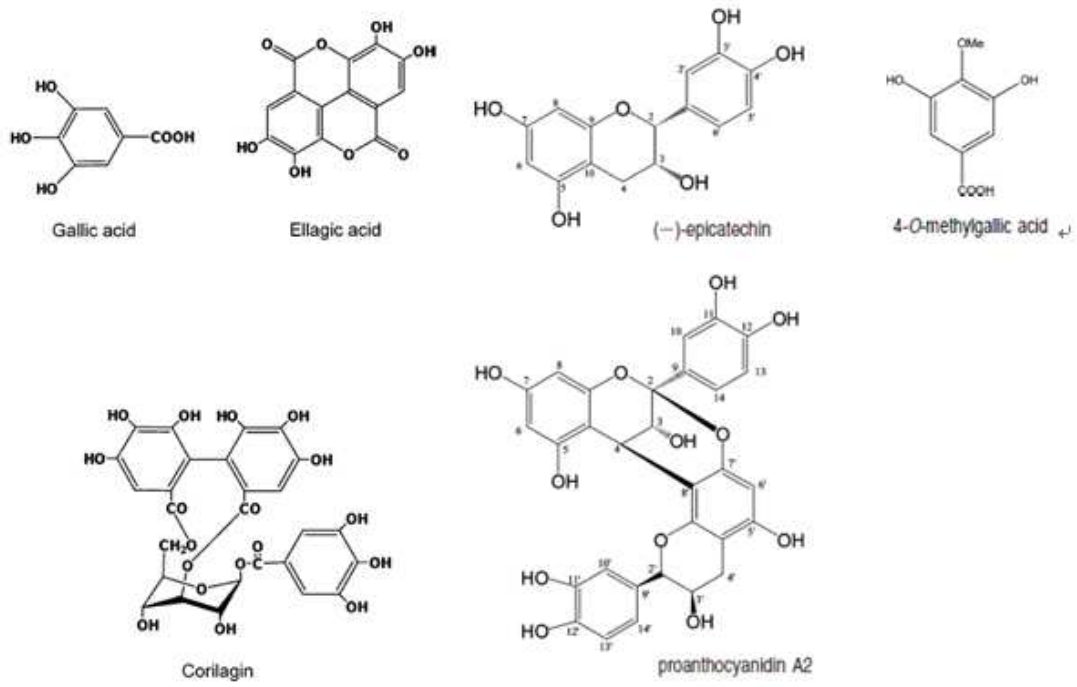
- Extracts Reduce Serum Uric Acid Levels in Oxonate-Induced Mice: Their Potential Use as Xanthine Oxidase Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 58:9936–9941, 2010.
93. Yaylac S, Demir MV, Temiz T, Tamer A, Uslan MI. Allopurinol-induced DRESS syndrome. *Indian J Pharmacol.* 412-4, 2012.
94. Zuoqi Ding, Yue Dai, Zhengtao Wang Hypouricemic action of Scopoletin arising from xanthine oxidase inhibition and uricosuric activity. *Planta Medica* 71:183-185, 2005.
95. Zheng SQ, Jiang F, Gao HY, Zheng JG. Preliminary observations on the antifatigue effects of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed polysaccharides. *Phytother Res.* 622-4, 2010.
96. Zhao J, He X, Yang N, Sun L, Li G. Study of drug metabolism by xanthine oxidase. *Int J Mol Sci.* 4873-9,2012.
97. Zhang Y, Chen C, Choi H, Chaisson C, Hunter D, Niu J, Neogi T. Purine-rich foods intake and recurrent gout attacks. *Ann Rheum Dis.* May 30, 2012.





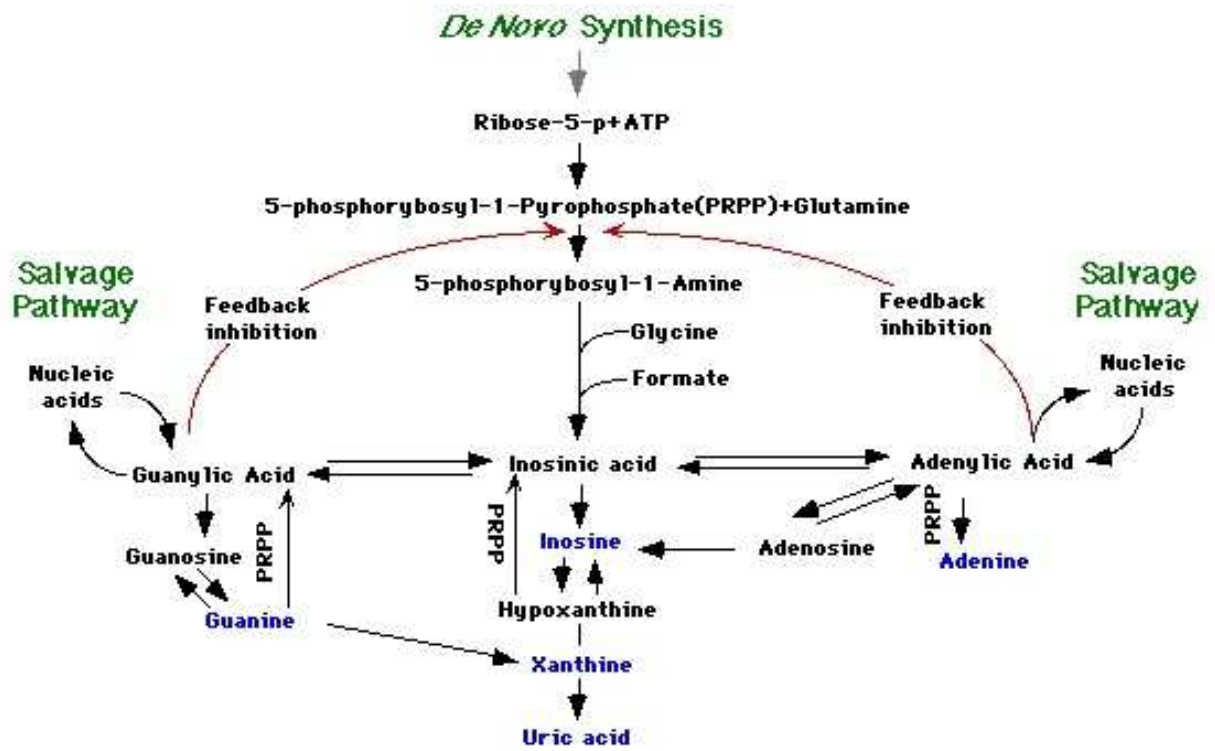
圖一 龍眼之花和果實。

Fig. 1 The flowers and fruits of Longan.



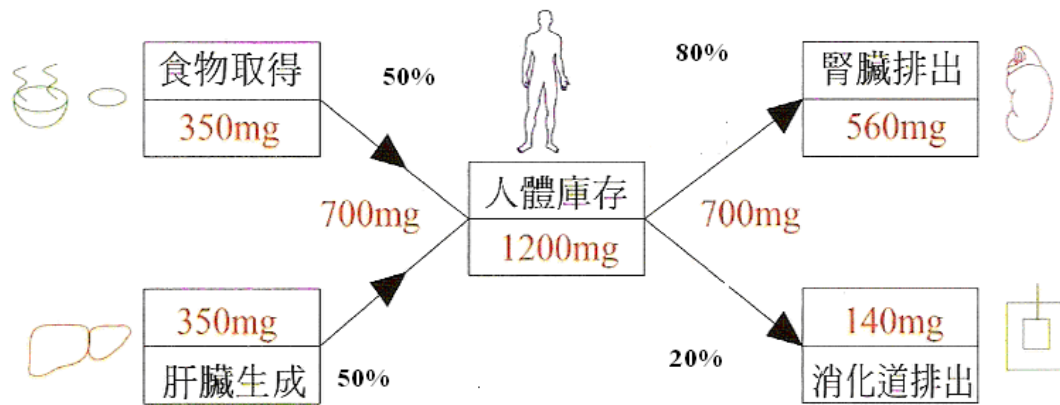
圖二 已鑑定出之龍眼成分。

Fig. 2 The compounds isolated from Longan.



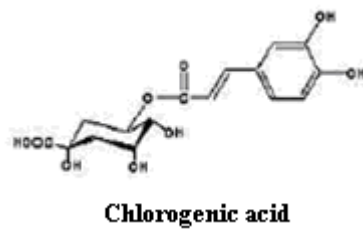
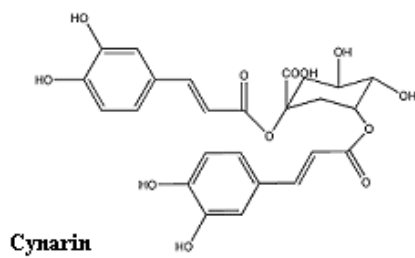
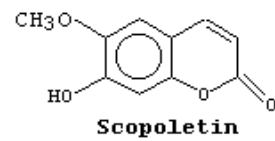
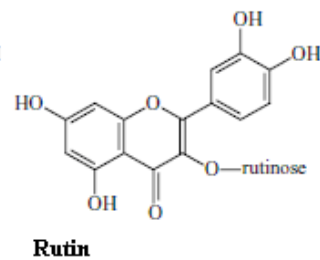
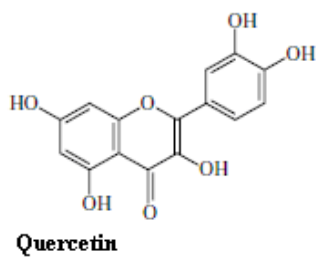
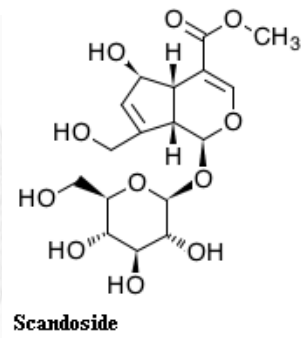
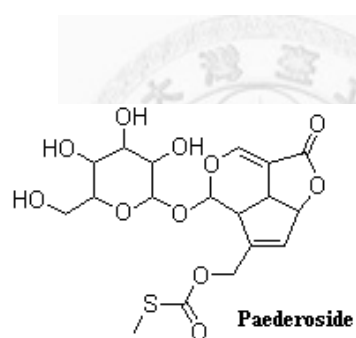
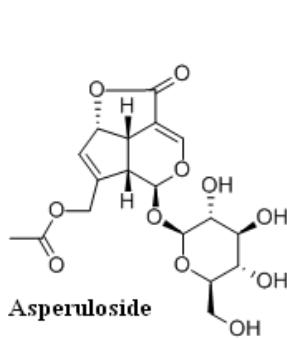
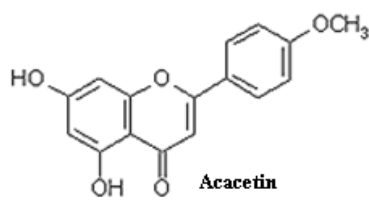
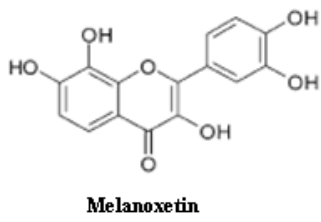
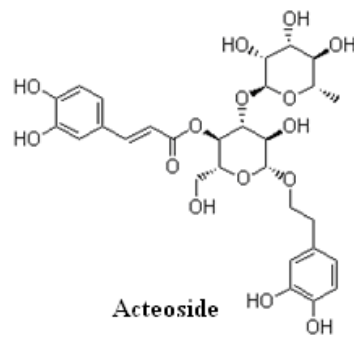
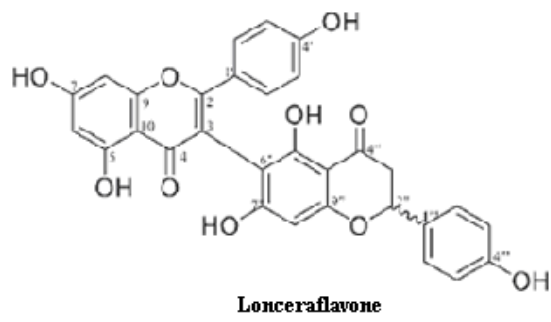
圖三 尿酸合成的代謝路徑。

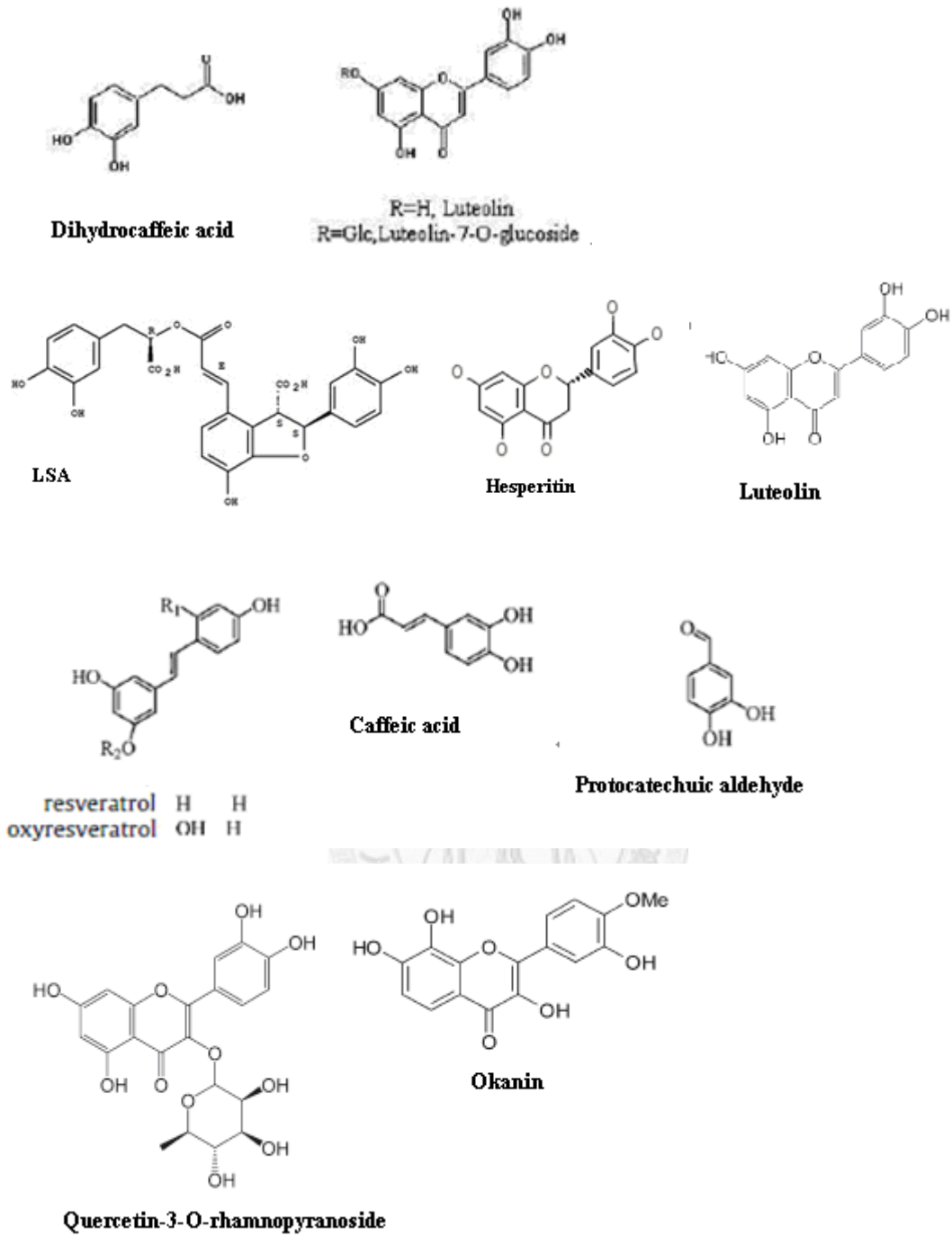
Fig. 3 The metabolic pathways of uric acid synthesis.



圖四 人體內尿酸之平衡。

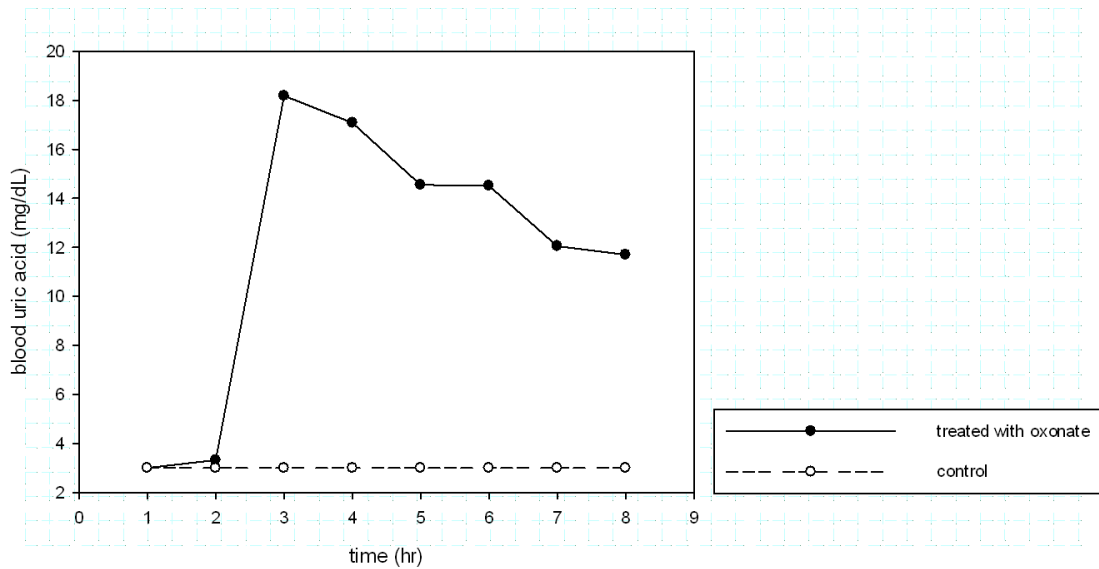
Fig. 4 The balances of uric acids metabolism in human body.





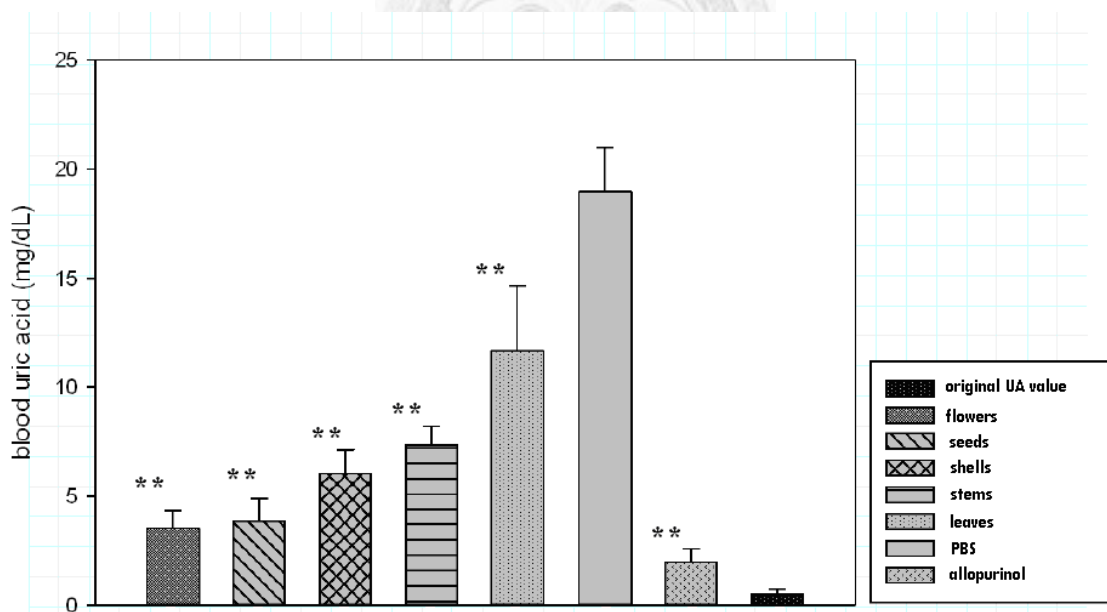
圖五 具黃嘌呤酶抑制作用之植物化學成分。

Fig. 5 The phytochemicals can inhibit xanthine oxidase.



圖六 氧嗪酸鉀誘導小鼠產生高尿酸血症之持續時間。

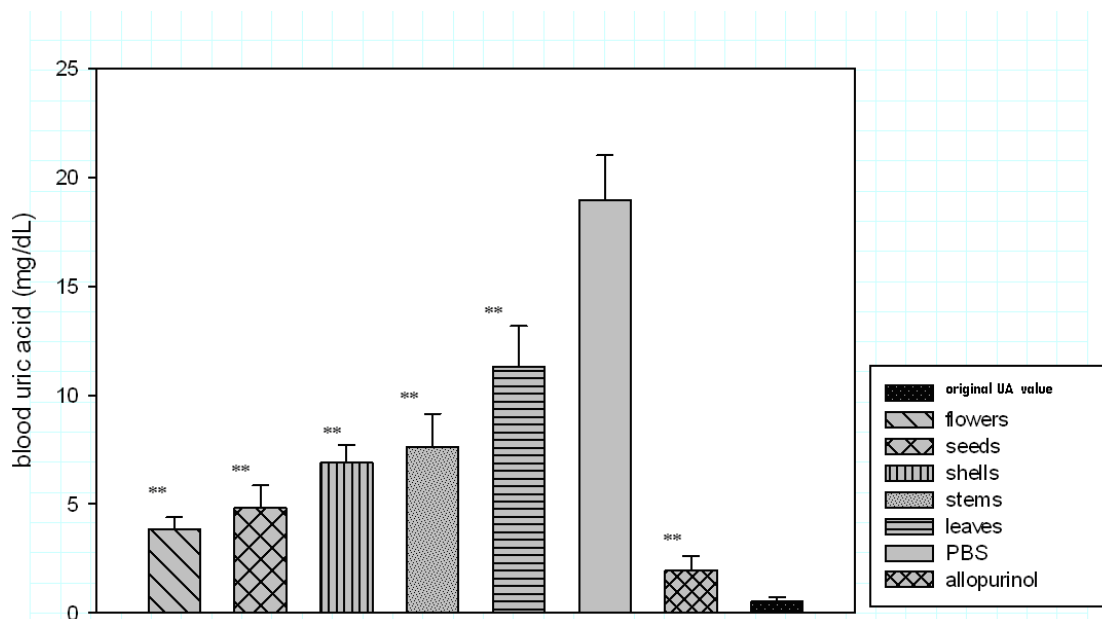
Fig. 6 The duration of oxonic acid induced hyperuricemia in mice. Each time compared with the negative control.



圖七 龍眼五種甲醇萃取物在 100 mg/kg 口服劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響。

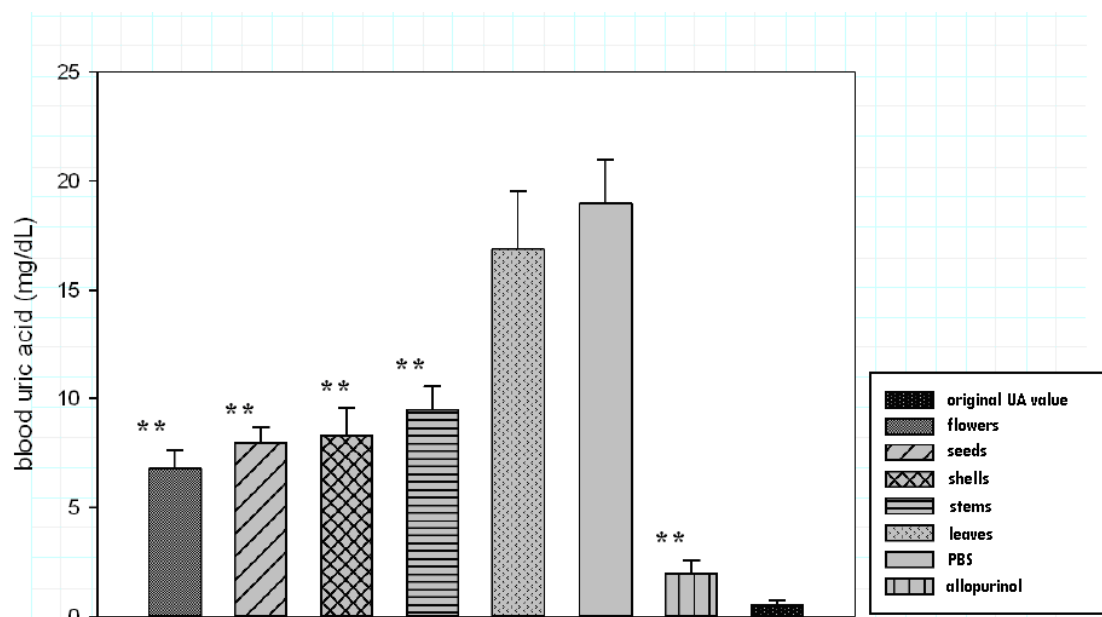
Fig. 7 Effects of Longan methanol extractives (100mg/kg) and allopurinol (10mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid. $**p < 0.01$ There have highly significant difference when each group compared

with vehicle control group.



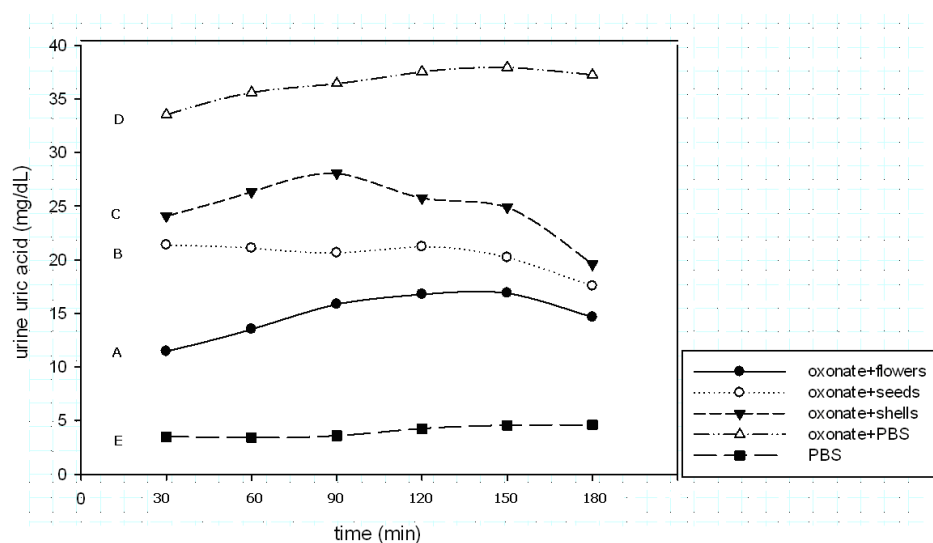
圖八 龍眼五種甲醇萃取物在 75 mg/kg 口服劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響。

Fig. 8 Effects of Longan methanol extractives (75 mg/kg) and allopurinol (10mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid. $**p < 0.01$ There have highly significant difference when each group compared with vehicle control group.



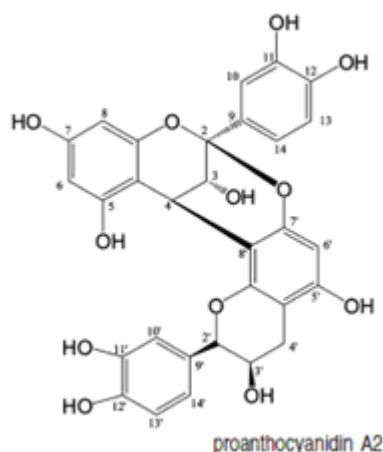
圖九 龍眼五種甲醇萃取物在 50 mg/kg 口服劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響。

Fig. 9 Effects of Longan methanol extractives (50 mg/kg) and allopurinol (10mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid. $**p < 0.01$ There have highly significant difference when each group compared with vehicle control group.



圖十 三種龍眼甲醇萃取物在口服 100 mg/kg 劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿酸排泄的影響。

Fig. 10 Effects of Longan methanol extractives (100 mg/kg) on urine uric acid levels in rats treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.



圖十一 原花青素 A2 之化學結構。

Fig. 11 The chemical structure of Proanthocyanidin A2.

表一 不同年級之台灣國中生的血清尿酸平均值、標準差及過高盛行率。

Tab. 1 The hyperuricemic mean, SD, and prevalence of different grades and gender in Taiwan junior high school students.

國中生之性別、年級別之血清尿酸的平均值、標準誤、及過高盛行率

性別	年級	血清尿酸		血清尿酸過高比率*(%)
		平均值	標準誤	
		(mg/dl)	(mg/dl)	
男生	7 年級	6.1	0.1	12.6
	8 年級	6.5	0.1	16.5
	9 年級	6.9	0.2	26.1
	Total	6.5	0.1	19.5
女生	7 年級	4.9	0.1	5.2
	8 年級	4.9	0.1	3.1
	9 年級	4.9	0.1	5.5
	Total	4.9	0.1	4.8
全部	7 年級	5.5	0.1	9.2
	8 年級	5.7	0.1	10.0
	9 年級	5.9	0.1	16.4
	Total	5.8	0.1	12.6

*男性血清尿酸值 ≥ 7.7 mg/dl、女性血清尿酸值 ≥ 6.6 mg/dl，或有服降尿酸藥物者。

表二 不同居住地區之台灣國中生的血清尿酸平均值、標準差及過高盛行率。

Tab. 2 The hyperuricemic mean, SD, and prevalence of different area in Taiwan junior high school students.

國中生之性別、地區別之血清尿酸的平均值、標準誤、及過高盛行率

性別	地區層	血清尿酸		血清尿酸過高比率*(%)
		平均值 (mg/dl)	標準誤 (mg/dl)	
男性	北一層	6.6	0.2	21.9
	北二層	6.4	0.1	15.2
	中部層	6.4	0.1	11.6
	南部層	6.6	0.1	27.2
	東部層	6.6	0.1	19.2
	山地層	6.8	0.2	32.9
女性	北一層	5.0	0.1	7.7
	北二層	4.8	0.1	3.8
	中部層	4.8	0.1	3.9
	南部層	4.9	0.1	2.8
	東部層	5.0	0.1	4.3
	山地層	5.2	0.1	10.7
全部	北一層	5.9	0.1	15.4
	北二層	5.6	0.1	9.7
	中部層	5.6	0.1	7.9
	南部層	5.8	0.1	15.8
	東部層	5.9	0.1	12.6
	山地層	6.1	0.2	23.2

*男性血清尿酸值 ≥ 7.7 mg/dl、女性血清尿酸值 ≥ 6.6 mg/dl，或有服降尿酸藥物者。



表三 龍眼五種萃取物對黃嘌呤酶抑制試驗之百分之五十抑制濃度。

Tab. 3 IC₅₀ of xanthine oxidase inhibition from 5 different Longan extracts.

Group	XO Inhibition (%) ^a			IC ₅₀ μg/mL
Flowers	370.38 μg/mL	37.38 μg/mL	3.738 μg/mL	115.76
	69.3 %	28.04 %	5.29 %	
Seeds	833.35 μg/mL	208.34 μg/mL	52.08 μg/mL	262.54
	66.67 %	48.48 %	21.21 %	
Shells	1000 μg/mL	200 μg/mL	40 μg/mL	118.94
	57.14 %	34.92 %	6.35 %	
Stems	321.5 μg/mL	156.25 μg/mL	75.13 μg/mL	125.34
	79.48 %	74.36 %	23.08 %	
Leaves	450 μg/mL	150 μg/mL	50 μg/mL	331.14
	55.79 %	34.27 %	4.79 %	

^a：為了避免不同萃取物之色素干擾吸光值，五種萃取物先經測試找到最適濃度後，再分別以不同濃度測試黃嘌呤酶抑制率並計算其 IC₅₀。

^a：The different concentration activities were tested among five Longan extratives to avoid plant pigment effecting on the absorption value of spectrophotometer.

表四 龍眼五種甲醇粗萃物以有機溶劑分配層析各分層對黃嘌呤酶之抑制率。

Tab. 4 Xanthine oxidase inhibition activity from different partitions of Longan extract.

Parts of Longan	Partition layers	Compound Conc.($\mu\text{g/ml}$) ^a	XO inhobotion (%)
flowers	Hex.	100/33	ND ^b /25.00
flowers	EA	100	78.57
flowers	EA/H2O	100	75.00
flowers	H2O	100	46.43
stems	Hex.	100	96.40
stems	EA	100	82.10
stems	EA/H2O	100/33	ND/69.70
stems	H2O	100	57.14
shells	Hex.	100	68.42
shells	EtOH	100/50	ND/79.17
shells	H2O	100	15.79
seeds	Hex.	100/50	NI ^c /8.33
seeds	EtOH	100/50	ND/91.67
seeds	EA/H2O	100	78.95
seeds	H2O	100/50	20.83/NI
leaves	Hex.	100/50	ND/25
leaves	EtOH	100	42.10
leaves	H2O	100	31.58
Allopurinol	-	50	98.20

^a：結果無法判讀。^b：無抑制效果。^c：推測植物色素干擾導致結果無法判讀，故稀釋其濃度再進行測試。^a：The concentrations of extracts were different because of the interference of plant pigments. ^b：ND= not determined. ^c：NI= no inhibition.

表五 龍眼所含的十種化合物之黃嘌呤酶抑制百分比。

Tab. 5 Xanthine oxidase inhibitory activity from 10 different compounds of Longan.

Compounds	(µg/ml)	XO Inhibition (%)			
		test 1	test 2	test 3	mean
(-)-epicatechin	40/20	NI ^c	NI	NI	NI
Acetonylgeraniin A	40	67	67	60	64.67
Chebulagic Acid	40	16	20	12	16
Chebulinic Acid	40	33	33	33	33
Corilagin	40	44	44	44	44
Gallic acid	40/20	ND ^d	ND	ND	ND
Geraniin	40	44	56	40	46.67
Proanthocyanidin A2	20 ^a	71	78	63	70.67
Procyanidin B2	40	22	33	11	22
Protocatechuic Acid	40	22	22	22	22
Allopurinol	50 ^b	67	67	67	67

^a：推測 proanthocyanidin A 對黃嘌呤酶抑制效力已超過可判讀範圍或植物色素干擾導致結果無法判讀，故稀釋其濃度再進行測試。^b：由於 allopurinol 溶解度低，故增加其測試濃度以提高其抑制黃嘌呤酶效果。^c：表示無抑制效果。

^d：表示結果無法判讀。^a：The test concentration of proanthocyanidin A was lower than others because of its strong XO inhibitory activity or the interference of plant pigments.

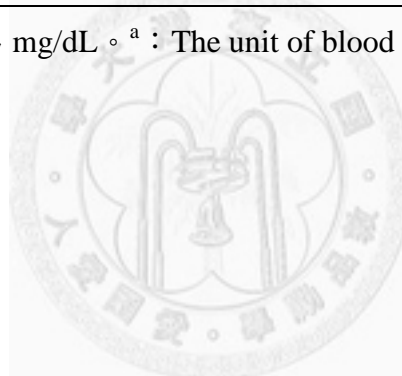
^b：The test concentration of allopurinol was higher than others because of its poor solubility. ^c：NI= no inhibition. ^d：ND= not determined.

表六 以氧嗪酸鉀誘導小鼠產生高尿酸血症可維持的時間。

Tab. 6 The duration of oxonic acid induced hyperuricemia in mice.

Experiment Group	time(hr)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	3.0	3.0	20.0	20.0	20	18.5	12.9	14.6
2	3.0	3.0	20.0	20.0	11.1	17.0	14.9	8.8
3	3.0	3.0	13.6	20.0	13.3	9.3	7.9	12.9
4	3.0	4.9	15.7	9.3	14.9	13.3	13.9	10.7
5	3.0	3.0	20.0	13.6	15.0	15.4	11.8	8.9
6	3.0	3.0	19.8	19.6	13.0	13.6	10.9	13.1
mean ^a	3.0	3.32	18.18	17.08	14.55	14.52	12.05	11.5
SD	0	0.78	2.82	4.57	3.03	3.24	2.48	2.4
CV(%)	0	23	15	27	21	22	21	21

^a：小鼠血中尿酸值單位為 mg/dL。^a：The unit of blood uric acid is mg/dL.



表七 以 PBS 為對照組對小鼠血中尿酸值的影響。

Tab. 7 Effects of PBS control on blood uric acid levels in mice.

Control Group ^a	time(hr)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	3.	3	3	3	3	3	3	3
2	3	3	3	3	3	3	3	3
3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	3	3	3	3	3	3	3	3
5	3	3	3	3	3	3	3	3
6	3	3	3	3	3	3	3	3
mean ^b	3	3	3	3	3	3	3	3
SD	0	0	0	0	0	0	0	0
CV(%)	0	0	0	0	0	0	0	0

^a: 由於 MultiSure Blood glucose & Uric acid Monitoring System 檢測血中尿酸值有其濃度範圍的限制 (<3 or >20 mg/dL 無法顯示)，故結果雖呈現相同之數值，並不代表實際上之血中尿酸值。^b: 小鼠血中尿酸值單位為 mg/dL。

^a: The control group was intraperitoneally injected with PBS and because of the limitation of the MultiSure Blood glucose & Uric acid Monitoring System (blood uric acid <3 or >20 mg/dL cannot be detected) the data shows the same results. It's not the real blood uric acid value.

^b: The unit of blood uric acid in mouse is mg/dL.

表八 龍眼五種甲醇萃取物在 100mg/kg 劑量下和 allopurinol 以及 PBS 對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響。

Tab. 8 Effects of Longan methanol extractives (100mg/kg) and allopurinol (10mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.

Group A	flowers	seeds	shells	stems	leaves	Group D	Group E
1	3	3.9	6.7	6	12	20	3
2	3	4.9	4.2	6.7	11	20	3
3	5.1	5.3	6.1	7.1	16.4	18.9	3
4	3.7	3	7.3	8	13.2	20	3
5	3.4	3	6.5	8	9.9	14.9	3
6	3	3	4.2	8.2	7.7	20	3
Mean ^a	3.53	3.85	6.02	7.33	11.7	18.97	3
SD	0.82	1.04	1.11	0.88	2.97	2.04	0
CV(%)	23.18	26.93	18.46	12	25.4	10.76	0

^a：小鼠血中尿酸值單位為 mg/dL。

^a：The unit of blood uric acid in mouse is mg/dL.

表九 龍眼五種甲醇萃取物在 75 mg/kg 劑量下和 allopurinol 以及 PBS 對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響。

Tab.9 Effects of Longan ethanol extractives (75 mg/kg) and allopurinol (10mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.

Group B	flowers	seeds	shells	stems	leaves	Group D	Group E
1	3.0	6.0	6.7	8.3	13.2	20	3
2	3.9	4.5	7.0	7.2	10.0	20	3
3	4.2	5.7	7.2	7.9	11.2	18.9	3
4	4.5	4.8	5.9	10.3	9.9	20	3
5	3.5	5.9	8.3	6.9	9.7	14.9	3
6	4.0	5.0	6.2	6.0	14.0	20	3
Mean ^a	3.85	4.82	6.88	7.63	11.32	18.97	3
SD	0.53	1.04	0.85	1.50	1.85	2.04	0
CV(%)	13.81	21.55	12.31	19.64	16.36	10.76	0

^a : 小鼠血中尿酸值單位為 mg/dL。

^a : The unit of blood uric acid in mouse is mg/dL.

表十 龍眼五種甲醇萃取物在 50mg/kg 劑量下和 allopurinol 以及 PBS 對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症小鼠血中尿酸值的影響。

Tab. 10 Effects of Longan ethanol extractives (50mg/kg) and allopurinol (10mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.

Group B	flowers	seeds	shells	stems	leaves	Group D	Group E
1	8	8	7.7	8.7	16.3	20	3
2	7.7	8.8	7.2	9.6	16.5	20	3
3	7.5	8.7	8.3	10.4	13.5	18.9	3
4	9.5	7.3	7	9.2	20	20	3
5	8	7	10.2	11	15	14.9	3
6	6.9	7.9	9.4	8.1	20	20	3
Mean ^a	6.78	7.95	8.3	9.48	16.88	18.97	3
SD	0.87	0.72	1.27	1.06	2.64	2.04	0
CV(%)	12.8	9.1	15.32	11.15	15.65	10.76	0

^a：小鼠血中尿酸值單位為 mg/dL。^a：The unit of blood uric acid in mouse is mg/dL.

表十一 龍眼花萃取物在 100 mg/kg 劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿中尿酸值的影響。

Tab. 11 Effects of Longan flowers extractive (100 mg/kg) on urine uric acid levels in rats treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.

Group	time(min)					
	30	60	90	120	150	180
A						
1	11.6	16.2	18.7	20.7	23.4	15.7
2	15.1	17.5	23.3	24.1	22.8	23.4
3	13.4	15.1	14.8	14.1	16.2	15.7
4	13.7	15.1	16.3	20	20.1	15
5	14.9	17.2	22	21.7	18.8	18
6	10.9	16.5	20	23	22	21.9
Mean ^a	11.45	13.52	15.85	16.77	16.88	14.63
SD	1.71	1.02	3.27	3.52	2.74	3.56
CV(%)	14.93	7.53	20.6	20.98	16.22	24.35

^a：大鼠尿中尿酸值單位為 mg/dL。^a：The unit of urine uric acid in rat is mg/dL.

表十二 龍眼種子萃取物在 100 mg/kg 劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿中尿酸值的影響。

Tab. 12 Effects of Longan seeds extractive (100 mg/kg) on urine uric acid levels in rats treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.

Group	time(min)						
	A	30	60	90	120	150	180
1		23.8	18.2	20.4	20.9	21	13.4
2		21.85	20.1	20.35	22.5	21.9	18.4
3		19.9	22	20.3	24.1	22.8	23.4
4		23.87	21	22.73	22.46	21.62	18.1
5		20.7	25	20	19.5	17.4	17
6		18.2	20.3	20.2	17.9	16.6	15
mean ^a		21.39	21.1	20.66	21.23	20.22	17.55
SD		2.24	2.28	1.02	2.27	2.57	3.44
CV(%)		10.47	10.82	4.95	10.65	12.72	19.62

^a：大鼠尿中尿酸值單位為 mg/dL。^a：The unit of urine uric acid in rat is mg/dL.

表十三 龍眼殼萃取物在 100 mg/kg 劑量下對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿中尿酸值的影響。

Tab. 13 Effects of Longan shells extractive (100 mg/kg) on urine uric acid levels in rats treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.

Group	time(min)						
	A	30	60	90	120	150	180
1		18.2	24.2	24.9	24.5	22.4	20.2
2		26.4	28.4	28.9	20.3	20	15.1
3		22.3	26.3	26.9	22.4	21.2	17.65
4		27.7	28	28.8	24.9	19.9	20.9
5		22.9	26.7	29	20.9	17.9	22
6		27	24.5	30	22.4	20.5	21.7
mean ^a		24.08	26.35	28.08	25.77	24.91	19.59
SD		3.64	1.74	1.86	1.85	1.50	2.69
CV(%)		15.1	6.59	6.61	7.19	6.03	13.75

^a：大鼠尿中尿酸值單位為 mg/dL。^a：The unit of urine uric acid in rat is mg/dL.

表十四 以 PBS 作為陰性對照組觀察其對以氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症大鼠尿中尿酸值的影響。

Tab. 14 Effects of PBS control on urine uric acid levels in rats treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.

Group	time(min)						
	A	30	60	90	120	150	180
1		30	32.2	32.1	40.5	38	34.5
2		37.2	35.5	36	42.9	40.3	38
3		32.1	33.9	37.7	41.7	40.4	36.5
4		36.4	40.1	40.2	39.9	42	39.2
5		32.3	34.9	35.8	40.6	43.1	40
6		33.3	37.1	36.9	38.4	39.1	35.3
mean ^a		33.55	35.62	36.45	40.67	40.48	37.25
SD		2.75	2.74	2.66	1.54	1.86	2.18
CV(%)		8.19	7.68	7.3	3.78	4.59	5.86

^a：大鼠尿中尿酸值單位為 mg/dL。^a：The unit of urine uric acid in rat is mg/dL.

表十五 以 PBS 為對照組對未經氧嗪酸鉀誘導產生高尿酸血症之大鼠尿中尿酸值的影響。

Tab. 15 Effects of PBS control on urine uric acid levels in rats not treated with the Uricase Inhibitor, potassium oxonic acid.

Group	time(min)						
	A	30	60	90	120	150	180
1		3	3.1	4	4.9	4.8	3.9
2		4	3.1	2.4	3.5	3.9	3.9
3		3.2	3.2	3.4	3	4.2	3.6
4		3.7	4	3.7	4.7	6.1	4.77
5		4.1	3.3	4	5	5.3	5
6		3	3.7	4	4.4	3	6.5
mean ^a		3.5	3.4	3.58	4.25	4.55	4.61
SD		0.5	0.37	0.63	0.82	1.09	1.08
CV(%)		14.23	10.85	17.51	19.22	24.03	23.31

^a：大鼠尿中尿酸值單位為 mg/dL。^a：The unit of urine uric acid is mg/dL in rat.

表十六 促進高尿酸血症之大鼠尿中尿酸排泄試驗中每組各時間點間尿中尿酸值斜率之比較。

Fig. 16 The comparisons of the slopes of the regression line between different time points from urine uric acid excretion tests.

	30-60 min	60-90 min	90-120 min	120-150 min	150-180 min
A 組	0.069	0.078	0.031	0.003	-0.075
B 組	-0.009	-0.014	0.019	-0.033	-0.089
C 組	0.075	0.057	-0.077	-0.029	-0.177
D 組	0.069	0.028	0.141	-0.006	-0.107
E 組	-0.003	0.006	0.022	0.010	0.002

表十七 75%酒精分別萃取 5g 新鮮和烘乾龍眼殼，200 倍稀釋後之黃嘌呤酶抑制率。

Tab. 17 The XO inhibition activity of 200X dilution of 5g Longan shells in 15ml 75% ethanol for 3 days respectively.

	Fresh Longan shells	Fire dried Longan shells
XO inhibition rate (%)	57.9	No inhibition activity

**Inhibitory effect of *Dimocarpus longan* extracts on xanthine oxidase:
Evaluation on the effect of extracts from different parts of *Dimocarpus longan* on
blood uric acid level and urinary uric acid excretion in oxonate-induced
hyperuricemic mice**

Abstract

Hyperuricemia results from over production or/and underexcretion of uric acid. Uric acid production is catalyzed by xanthine oxidase (XO) in the liver, which is a key enzyme in the oxidizing process of xanthine into uric acid. This study investigated anti-hyperuricemia bioactivity of *Dimocarpus longan* Lour. Longan pulp is a Chinese medicinal plant used for the treatment of amnesia and its flower is folklorically made into drinking tea to lower serum uric acid level. Therefore, the methanol extracts of the flower, seed, shell, stem and leaf of Longan were tested *in vitro* and *in vivo* to confirm its anti-hyperuricemic effect. Firstly, xanthine oxidase suppression rates were evaluated by the xanthine oxidase inhibition assay. The results showed that all Longan extracts reduced blood uric acid level as compared to the control group ($p < 0.01$). The flower extract exhibited the best blood uric acid lowering effect and IC_{50} of XO inhibition was 115.76 $\mu\text{g/ml}$. 10 compounds have been previously isolated from Longan flower in other studies; in this study, we also examined them by the xanthine oxidase inhibition assay, revealing that proanthocyanidin A2 had the strongest inhibitory effect (70.67%). In the *in vivo* part of this study, the methanol extracts from 5 different Longan parts were orally administrated to different groups of mice at 50 mg/kg or 100 mg/kg 1 hour before oxonic acid was injected. The blood uric acid level in mice were then detected 2 h later. Furthermore, we carried out the urine uric acid excretion test in rats to find out whether the Longan extracts could promote the excretion of uric acid; however no significant effect on the excretion of uric acid was observed. According to these results, the mechanism behind the antihyperuricemic effect of Longan methanol extracts was indicated to be associated with the inhibition of xanthine oxidase which results in decreased production of uric acid. This study not only revealed the existence of antihyperuricemic effect of *Dimocarpus longan*, but also explored possible mechanisms. Our results showed that *Dimocarpus longan* has a great potential to be developed into novel therapeutic agents for the treatment of hyperuricemia.

Keywords: *Dimocarpus longan*, antihyperuricemia, xanthine oxidase inhibition.

Introduction

Gout is a common disease in human. It is characterized by hyperuricemia which can result in the deposition of uric acid crystal in joints and kidneys. This can cause inflammation as well as gouty arthritis and uric acid nephrolithiasis (Boss, G.R. et al.1979). Clinically reported, uric acid is also related to an increased risk of cardiovascular disorder and diabetes (Chen, S.Y et al. 2001). Uric acid is the end product of purine metabolism in humans. Unlike other mammals, humans have a high serum uric acid level due to the lack of uricase which converts uric acid into allantoin. Uric acid production is catalyzed by xanthine oxidase in the liver, and nearly 70% of the daily output of uric acid is excreted through the kidneys (Marangella M. et al. 2005). Therefore, despite enzyme functional obstructions caused by some genetic disease, the main factor of hyperuricemia is resulted from the overproduction and/or underexcretion of uric acid which is greatly influenced by high dietary intake of nucleic acids (Chen, G.L. et al.2003).

In purine metabolism, xanthine oxidase (XO) catalyzes the oxidation of hypoxanthine and xanthine to uric acid. Inhibition of XO activities decreases uric acid level, and results in an anti-hyperuricemic effect. The XO inhibitor most commonly used for the treatment of gout is allopurinol. However, its use is limited by unwanted side effects including hepatitis, nephropathy and allergic reactions (Wallach, S.L. 1998; Horiuchi, H. et al. 2000). Thus, the development of novel anti-hyperuricemic agents with greater efficacy and less side effects is greatly needed. In these years, attention has been focused on phytochemicals which possess the capacity to inhibit XO activity and reduce urate level. Many studies have been performed to explore potentially beneficial impact of phytochemicals such as flavonoids and phenolic compounds. In addition to their antioxidant activity, flavonoids and caffeic acid analogues have been

reported to inhibit various enzymes such as cyclooxygenase, lipoxygenase and xanthine oxidase (Beyer G. et al. 2003; Nagao A. et al. 1999).

Longan (*Dimocarpus longan* Lour) is a subtropical fruit widely grown in China and Southeast Asia including Taiwan. Longan has different effectiveness in traditional Chinese medicine. The dried pulp of Longan is used as a stomachic and is also believed to be helpful in treating insomnia and amnesia. The seed and leaf are used as astringent, febrifuge and hemostatic agents. The flower is used for the treatment of leucorrhea and kidney disorders (Hsu, H. L. et al. 1977). Folk prescriptions indicate that Longan flower has blood uric acid lowering effect. Therefore not only did we extract the flower, but also the seed, shell, leaf and stem of *Dimocarpus longan* with 95% methanol. These methanol extracts were tested *in vitro* and *in vivo* to confirm its anti-hyperuricemic effect.

Materials and methods

Materials

Longan extracts (extraction solvent: 95% methanol) was provided by Dr. Feng-Lin Hsu from Taipei Medical University, College of Pharmacy. The flowers (280 g), seeds (2.5 kg), shells (1.3 kg), stems (4.2 kg) and leaves (375 g) were immersed in 95% MeOH for 1 day. The extracts were then filtered under vacuum. The same process was repeated 3 times and weighted to estimate the production rate. The weights of the crude extracts are as follows: flower (28.63 g), seed (255 g), shell (155 g), stem (325 g) and leaf (375 g). All of these Longan crude extracts were dissolved in water and then further extracted by hexane, EA and water before being concentrated to be dried. Longan flower isolates were provided by the Institute of Food Science and Technology, Taiwan University. The Longan flower methanol extractive after liquid-liquid partition with *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and water, the ethyl

acetate fraction showed the best antioxidant activity. Silica gel chromatography was employed to fractionate the ethyl acetate fraction of Longan flower methanol extract, and twenty sub-fractions were obtained. F9 (eluted by ethyl acetate/n-hexane = 60/40, v/v) and F10 (eluted by ethyl acetate/n-hexane = 70/30, v/v) had superior antioxidant effect. Further analysis of these sub-fractions showed that F9 contained the highest amounts of total polyphenol and total flavonoid. There was only one major compound present in F9 by HPLC analysis and was identified as (-)-epicatechin by spectrometric analysis of IR, MS, UV-Vis, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and 2D-NMR. After separating F10 by Sephadex LH-20, two major components were identified as (-)-epicatechin and proanthocyanidin A2 (Wallach, S.L 1998).

Allopurinol, xanthine, xanthine oxidase, carboxymethylcellulose sodium salt (CMC-Na), sodium dihydrogenphosphate monohydrate (NaH₂PO₄·H₂O), sodium dihydrogen phosphate dodecahydrate (Na₂HPO₄·12 H₂O), dipotassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄), and sodium dihydrogen phosphate (NaH₂PO₄) were purchased from Sigma Chemical Company. Zoletil 50 and Xylazine were purchased from Virbac Taiwan Co., Ltd.

Animals

Cancer Research (ICR) mice (26–30 g) and Wistar rats (200 g) were purchased from BioLasco Taiwan Co., and maintained on a 12-hour light/dark cycle in a temperature and humidity-controlled room for 1 week prior to the experiment. All animals were randomly divided into experimental groups (n = 6/group). Mice and rats were given standard rodent diet and water *ad libitum* throughout the study. All procedures were carried out in accordance with the Institute for Experimental Animals of Taiwan University.

Animal model of hyperuricemia in mice

An animal model of hyperuricemia induced by uricase inhibitor potassium oxonate (PO) was employed to study drug action. Briefly, mice were injected intraperitoneally with potassium oxonic acid (250 mg/kg) 1 h after drug administration. Whole blood samples were collected from mice by tail vein bleeding. The serum uric acid was then determined by MultiSure Blood Glucose & Uric Acid Monitoring System. (APEX BIOTECHNOLOGY CORP, Taiwan, R.O.C.)

Detection of inhibitory activity of XO by measuring the formation of uric acid

XO activity was assayed by monitoring uric acid formation using a spectrophotometric method described previously. Briefly, the reaction mixture contained 50 mM sodium pyrophosphate buffer (pH 7.5), 150 mM xanthine and 0.1 U XO, with or without Longan extracts for a final reaction volume of 175 μ l. Allopurinol was used as the positive control. The reaction was started by the addition of XO for 15 min. Then it was incubated for 30 min at 37°C after xanthine was added. The reaction was stopped by adding 25 μ l of 1N HCl. The formation of uric acid was detected by UV absorption increments at 295 nm. For making the Lineweaver-Burk plot, Longan extracts were assayed for their inhibitory activity on XO at different concentrations. IC₅₀ values were calculated by linear regression analysis.

Drug administration

Food, but not water, was withdrawn from the animals 1 h prior to drug administration. Longan extract at various concentrations and allopurinol were dissolved in DMSO/phosphate buffer. The volume of suspension administered was based on body weight measured immediately prior to each dose. All drugs were given orally 1 h before oxonate was induced. As shown in Fig. 2 and Fig 3, mice in the negative control group were orally administered with PBS and the positive control mice were given 10 mg/kg allopurinol before oxonate was induced to the mice. As for

the mice in the experimental groups, they were orally administered with Longan extracts at 100 mg/kg and 50 mg/kg 1 h before oxonate was injected. Each group at different dosage was divided into 5 subgroups according to the different Longan parts (flower, seed, shell, stem and leaf).

Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Group mean differences were ascertained with analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons among treatment means were checked with the Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. The results were considered significant if the probability of error was < 0.01 .

Uric acid excretion test

As shown in Fig. 4, rats in the negative control group were orally administered with PBS and the other 3 groups were orally treated with Longan flower, seed, and shell extracts at 100 mg/kg 1 hour before oxonate was injected.

2 h after oxonic acid injection, rats were anesthetized with 12.5 mg/kg Zoletil and 5 mg/kg Xylazine. An incision was made along the posterior abdominal median line to the abdominal cavity, disclosing the bladder. The bladder was punctured and urine was drawn out with a 23G syringe every 30 minutes continuously six times. To promote urine generation, 3 ml saline was injected subcutaneously to the rats each hour. Uric acid content in the urine was detected by utilizing the Ektachem Clinical Chemistry Slides (URIC).

Results

Effects of Longan extracts and isolated compounds on XO activity

The assays were conducted to investigate whether the different Longan parts inhibited the catalytic activity of XO. XO inhibitor allopurinol was used as the positive control. Results showed that IC₅₀ values of the flower, seed, shell, stem and leaf

extracts were 115.76, 262.54, 125.34, 118.94 56.21 and 347.29 $\mu\text{g/ml}$ respectively *in vitro*, signifying strong XO inhibitory activity (Table 1).

The inhibitory activity of different partitions of Longan extract on xanthine oxidase are as shown in Table 2. The best XO inhibitory rate of each extractive from different partition layers are as follows: EA layer of flower was 78.57%; Hex layer of stem was 96.4%; EtOH of shell was 79%; EtOH layer of seed was 91.67%; EtOH layer of seed was 42.1%; and the positive control of allopurinol was 98.2%.1.

10 compounds have been isolated from Longan flower in previous studies, including (-)-epicatechin, acetonylgeraniin A, chebulagic acid, chebulinic acid, corilagin, gallic acid, feraniin, proanthocyanidin A2, procyanidin B-22 and protocatechuic acid. These compounds were assayed for their XO inhibitory activities at 40 $\mu\text{g/ml}$, with the exception of proanthocyanidin A2 being tested at 20 $\mu\text{g/ml}$. Results showed that compound 8 had the best XO inhibitory rate of 70.67%, and its structure is shown in Fig 5. Compound 3, 4, 5, 7, 9, and 10 also have some XO inhibitory effects in the range of around 16.5% to 44%. The positive control of allopurinol significantly decreased XO activity by 67% (Table 3).

Anti-hyperuricemic effect of Longan extracts in potassium oxonate-induced hyperuricemic mice

As shown in Fig. 1, an animal model of hyperuricemia induced by intraperitoneal injection of uricase inhibitor potassium oxonate was used to study *in vivo* hypouricemic effects of the test compounds. Initial mean serum uric acid level in normal mice was lower than 3 mg/L. Treatment with uricase inhibitor potassium oxonate caused hyperuricemia in mice by a marked increase in serum uric acid level. A time course experiment with PO alone revealed that the maximum uric acid levels in oxonate-treated mice were achieved 2 h after the injection. The effects of allopurinol

and Longan extracts in oxonate-treated mice were investigated. Oral pretreatment of allopurinol at the dosage of 10 mg/kg elicited a significant reduction of serum uric acid levels in the hyperuricemic mice in comparison to the normal control ($p < 0.01$). Oral administration of 95% methanol extracts of Longan (100, 50 and 50 mg/kg) also affected the serum uric acid levels 3 h after treatments, demonstrating that the Longan extracts had the capacity to decrease uric acid level in mice. The flower, seed and shell extracts showed the better effects and the extracts of stem and leaf also had a slight decreasing effect on uric acid levels.

Uric acid excretion test

As shown in Fig. 4, , the urine uric acid level of the normal control mice was much lower than the mice injected with oxonic acid and received pretreatment of PBS only. In addition, the experimental groups also had lower urine uric acid levels than the group that received pretreatment of PBS only. However slopes of the regression line between different time points from test or control groups showed no increasing tendencies of urine uric acid excretion (Tab. 4) .

Discussion

Uric acid level is the key indicator in the prevention of gout and other hyperuricemia-related disorders. Phytochemicals may be promising alternatives to allopurinol and have been widely studied these days. There has been a long history in the treatment of hyperuricemia in traditional Chinese medicine. Consumption of certain herbs have been reported to provide curative effects on gout and are associated with protective effects on complications of hyperuricemia, such as cardiovascular disease and diabetes (Sampson, L. et al. 2002). Many phytochemicals have already been demonstrated with the anti-hyperuricemic effects (Zuoqi Ding, Yue Dai et al. 2005; Sasiporn Sarawek et al. 2008). Most of the phytochemicals with XO inhibitory

activities are flavonoid and chlorogenic acid compounds. On the other hand, some alkaloids and iridoid glycosides have promoting effects on the excretion of uric acid; while others, such as sinigrin and colchicine, have analgesic and anti-inflammatory effects.

In fact, Longan extracts have been reported to possess a wide range of biological activities such as anti-inflammatory, anti-tumor and strong antioxidative effects (Chung YC et al. 2010; Hsieh MC. et al. 2008). In this study they appear to exhibit effective anti-hyperuricemic effect via an inhibitory mechanism on XO. IC_{50} of Longan crude extractives were better when compared with some other plant crude extractives (Tao, Liang-Yu. et al. 2011). It may be because Longan flower and stem contain important anti-hyperuricemic compounds. However after the *in vivo* anti-hyperuricemic test, the results were not completely conformed. In this study, the extracts of the flower and stem had similar effects in XO inhibitory test. However during the test of lowering blood uric acid in mice, the extracts of flower, shell and seed showed the better results. Generally, the bioactivity of drugs *in vivo* is dependent on absorption and metabolism, which may help explain the inconsistent results between our *in vitro* and *in vivo* experiments. In addition, compared with other studies which required repeated administration of plant extracts (Li, An-Che. 2011; Tao, Liang-Yu. 2011), the anti-hyperuricemic effects of the extracts of Longan flower, seed and shell were obvious after just one oral administration, indicating that these Longan parts may contain active constituents which are easily absorbed and/or hardly break down in the gastro-intestinal system.

Screening several known constituents of Longan flower revealed that proanthocyanidin A2 was mainly responsible for the inhibition of XO. Other compounds such as corilagin also showed some XO inhibitory effect. Therefore we

believe that these active constituents may be responsible, at least in part, to the anti-hyperuricemic effect of Longan flower. It has been documented that ellagitannins are major polyphenolic constituents of Longan seed, and since some of them (corilagin, methyl gallate, etc) have also been reported to inhibit XO, the ellagitannin contents of *Dimocarpus longan* may also contribute to its anti-hyperuricemic activity (Yuttana Sudjaroen a,c, et al. 2012) .

Moreover we carried out the uric acid excretion test with the anticipation of finding out whether there was a second mechanism behind the anti-hyperuricemic activity of *Dimocarpus longan* via promoting uric acid excretion. We arrived with the results that there was no promoting effect of Longan extracts.

In conclusion, the data reported in the present study indicate that oral administration of Longan extracts reduced blood uric acid levels of hyperuricemic mice caused by oxonic acid. The hypouricemic effect of *Dimocarpus longan* was indicated to be due to the inhibition of XO activities thus reducing the formation of uric acid. Longan extracts contain abundant polyphenol (Chung YC. et al. 2010). Despite of its highly antioxidant abilities, it also has strong effects on enzymes. The conformation of xanthine oxidase is flexible and has broad specificity; therefore it can bound to many kinds of substances. It has been reported that some small molecular polyphenols such as monomeric hydrolyable tannin and galloylglycose have the capacity to inhibit XO (Hatano T et al. 1999). Therefore the present study suggests that Longan extracts may be developed into novel hypouricemic agents and may have potent hypouricemic applications in future clinical settings. Further investigations are required to identify other possible mechanisms behind the hypouricemic effect Longan extracts.

Reference

1. Boss, G.R. and J.E. Seegmiller. Hyperuricemia and gout. Classification,

- complications and management. *N. Engl. J. Med.* 1459–1468, 1979.
2. Beyer G, Melzig MF. Effects of selected flavonoids and caffeic acid derivatives on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells. *Planta Med.* 1125–9, 2003.
 3. Chen, S.Y., Chen, C.L., Shen, M.L., Kamatani, N. Clinical features of familial gout and effects of probable genetic association between gout and its related disorders. *Metabolism* 1203–1207, 2001.
 4. Chen, G.L. and S.Y. Xu. The progress of study on hyperuricemia. *Chin. Pharmacol. Bull.* 1082–1092, 2003.
 5. Chung YC, Lin CC, Chou CC, Hsu CP. The effect of Longan seed polyphenols on colorectal carcinoma cells. *Eur J Clin Invest.* 713-21, 2010.
 6. Fritsch, P.O., Sidoroff, A. Drug-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *American Journal of Clinical Dermatology* 1, 349–360, 2000.
 7. Hsu, H. L.; Lee, L. T. Studies on the chemical constituents of *Euphoria longana*. *Chemistry (Taipei)* 103–105, 1977.
 8. Hammer, B., Link, A., Wagner, A., Bohm, M.. Fatal allopurinolinduced hypersensitivity in asymptomatic hyperuricemia syndrome. *Deutsch Medizinisch Wochenschrift* 126, 1331–1334, 2001.
 9. Horiuchi, H., Ota, M., Nishimura, S., Kaneko, H., Kasahara, Y., Ohta, T., Komoriya, K. Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice. *Life Science* 66, 2051–2070, 2000.
 10. Hall, I.H., Scoville, J.P., Reynolds, D.J., Simlot, R., Duncan, P. Substituted cyclic imides as potencial anti-gout agents. *Life Sciences* 46, 1923–1927, 1990.
 11. Hsieh MC, Shen YJ, Kuo YH, Hwang LS. Antioxidative activity and active

- components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flower extracts. *J Agric Food Chem.* 7010-6, 2008.
12. Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Agata I, Noro T, Okuda T. Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chem Pharm Bull.* 1224-9, 1999.
 13. Hsieh, Meng-Chieh. Studies on the Antioxidative Components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Flower.
 14. Li, An-Che. Active anti-hyperuricemia ingredients in *Chrysanthemum indicum* Linn. inhibits xanthine oxidase and reduces serum uric acid in rats. Graduate Institute of Institute of Biotechnology, National Tsing Hua University of Master Thesis. 13, 17, 2011.
 15. Marangella M. Uric acid elimination in the urine: pathophysiological implications. *Contrib Nephrol.* 32–48, 2005.
 16. Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1787–90, 1999.
 17. Tao, Liang-Yu. Active anti-hyperuricemia ingredients in *Phyllanthus urinaria* Linn. inhibit xanthine oxidase and reduce serum uric acid in rat Graduate Institute of Institute of Biotechnology, National Tsing Hua University. of Master Thesis. 11-13, 2011.
 18. Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P.C., de Vries, J.H., Katan, M.B., Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *Journal of American Diet Association.* 1414–1420, 2002.
 19. Sasiporn Sarawek, Bjoern Feistel, Ivo Pischel, Veronika Butterweck. Flavonoids of *Cynara scolymus* Possess Potent Xanthin oxidase Inhibitory Activity in vitro

- but are Devoid of Hypouricemic Effects in Rats after Oral Application. *Planta Medica* 74: 221–227, 2008.
20. Wallach, S.L. The side effects of allopurinol. *Hospital Practice (Off Ed)* 22, 1998.
 21. Yuttana Sudjaroen a,c, William E. Hull b, Gerhard Erben b, Gerd Würtele a, Supranee Changbumrung c, Cornelia M. Ulrich a, Robert W. Owen. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour) seeds. *Phytochemistry*. 226–237, 2012.
 22. Zuoqi Ding, Yue Dai, Zhengtao Wang Hypouricemic action of Scopoletin arising from xanthine oxidase inhibition and uricosuric activity. *Planta Medica* 71:183-185, 2005.



Table 1. IC₅₀ of different parts of Longan extracts.

Longan extracts	IC ₅₀ (µg/ml)
Flowers	115.76
Seeds	252.54
Shells	125.34
Stems	118.94
Leaves	331.14



Table 2. Inhibition activity of different partitions of longan extract.on xanthine oxidase

Parts of Longan	Partition layers	Compound Conc.($\mu\text{g/ml}$) ^a	XO inhobotion (%)
flowers	Hex.	100/33	ND ^b /25.00
flowers	EA	100	78.57
flowers	EA/H20	100	75.00
flowers	H20	100	46.43
stems	Hex.	100	96.40
stems	EA	100	82.10
stems	EA/H20	100/33	ND/69.70
stems	H20	100	57.14
shells	Hex.	100	68.42
shells	EtOH	100/50	ND/79.17
shells	H20	100	15.79
seeds	Hex.	100/50	NI ^c /8.33
seeds	EtOH	100/50	ND/91.67
seeds	EA/H20	100	78.95
seeds	H20	100/50	20.83/NI
leaves	Hex.	100/50	ND/25
leaves	EtOH	100	42.10
leaves	H20	100	31.58
Allopurinol	-	50	98.20

^a : ND = not determined. ^b : NI = no inhibition. ^c : Concentrations of extracts were different because of the interference of plant pigments.

Table 3. Xanthine oxidase inhibitory activity of 10 compounds isolated from longan flower.

10 compounds isolated from longan	Concentration (µg/ml)	Xanthine oxidase inhibitory rate
1 (-)-epicatechin	40	NI ^d
2 acetonylgeraniin A	40	64.67
3 chebulagic acid	40	16
4 chebulinic acid	40	33
5 corilagin	40	44
6 gallic acid	40	ND ^c
7 feraniin	40	46.67
8 proanthocyanidin A2	20 ^a	70.67
9 procyanidin B-22	40	22
10 procatechuic acid	40	22
Allopurinol (positive control)	50 ^b	67

^a : Test concentration of proanthocyanidin A was lower than others because of its strong XO inhibitory activity or the interference of plant pigments. ^b : Test concentration of allopurinol was higher than others due to poor solubility. ^c : ND = not determined. ^d : NI = no inhibition.

Tab. 4 The comparisons of slopes of the regression line between different time points from urine uric acid excretion teats.

	30-60 min	60-90 min	90-120 min	120-150 min	150-180 min
A 組	0.069	0.078	0.031	0.003	-0.075
B 組	-0.009	-0.014	0.019	-0.033	-0.089
C 組	0.075	0.057	-0.077	-0.029	-0.177
D 組	0.069	0.028	0.141	-0.006	-0.107
E 組	-0.003	0.006	0.022	0.010	0.002



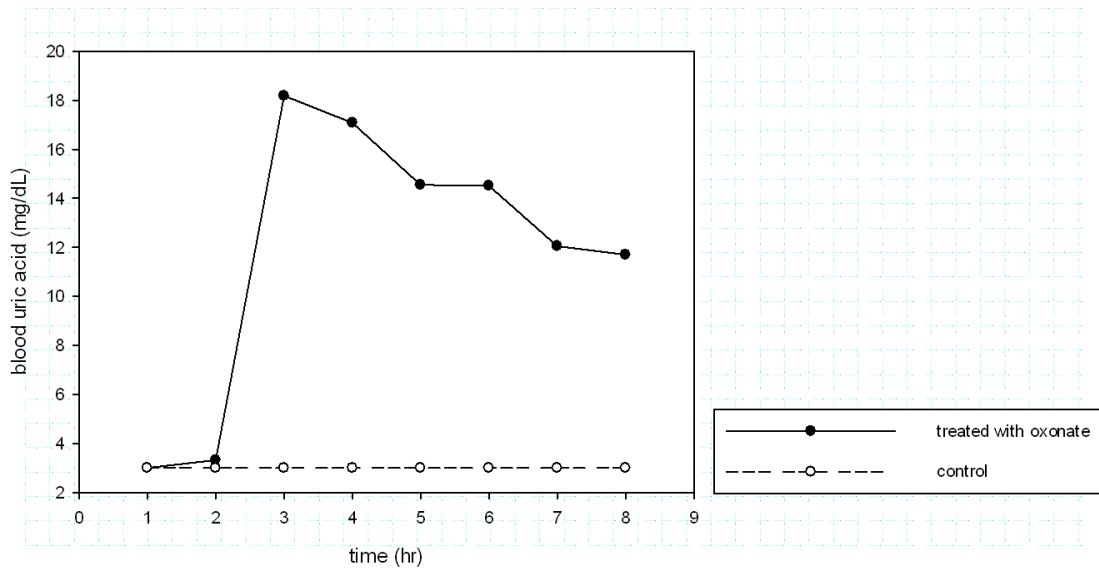


Figure 1. Duration of oxonic acid-induced hyperuricemia in mice as compared with the negative control.

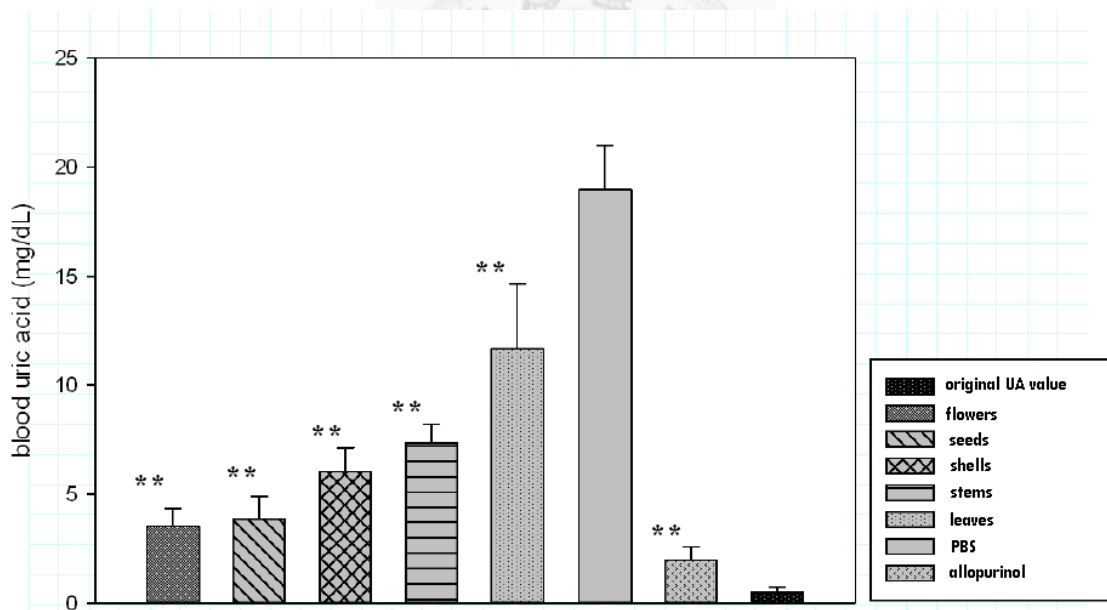


Figure 2. Effect of ethanol extract of longan (100 mg/kg) and allopurinol (10 mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with uricase inhibitor, potassium oxonic acid.

** $p < 0.01$ There have highly significant difference when each group compared with vehicle control group.

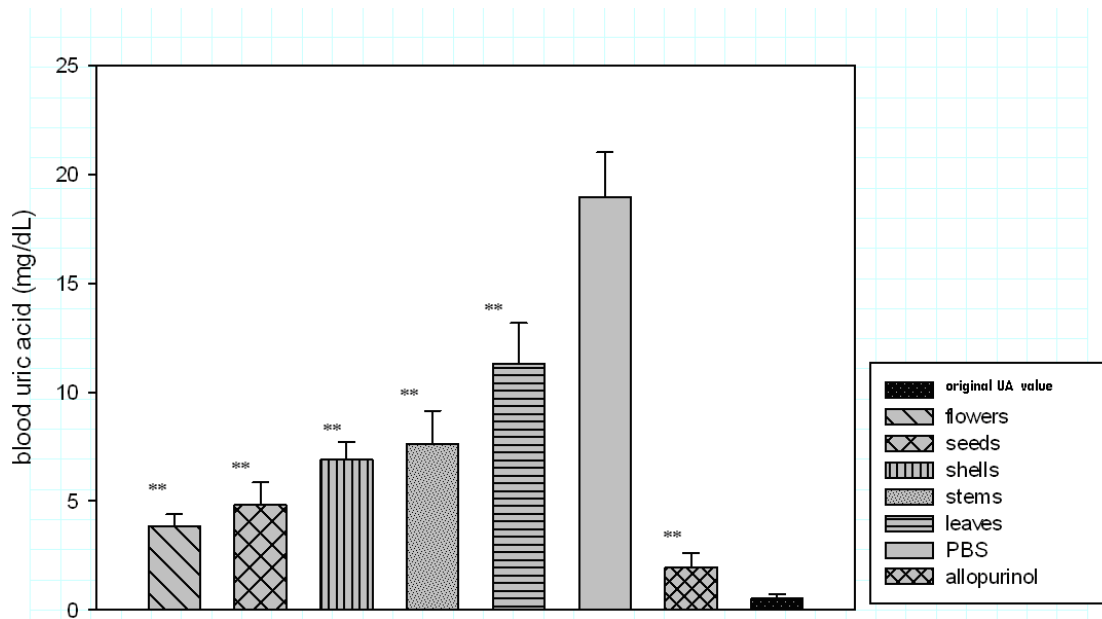


Figure 3. Effect of ethanol extract of longan (75 mg/kg) and allopurinol (10 mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with uricase inhibitor, potassium oxonic acid.

*** $p < 0.01$ There have highly significant difference when each group compared with vehicle control group.

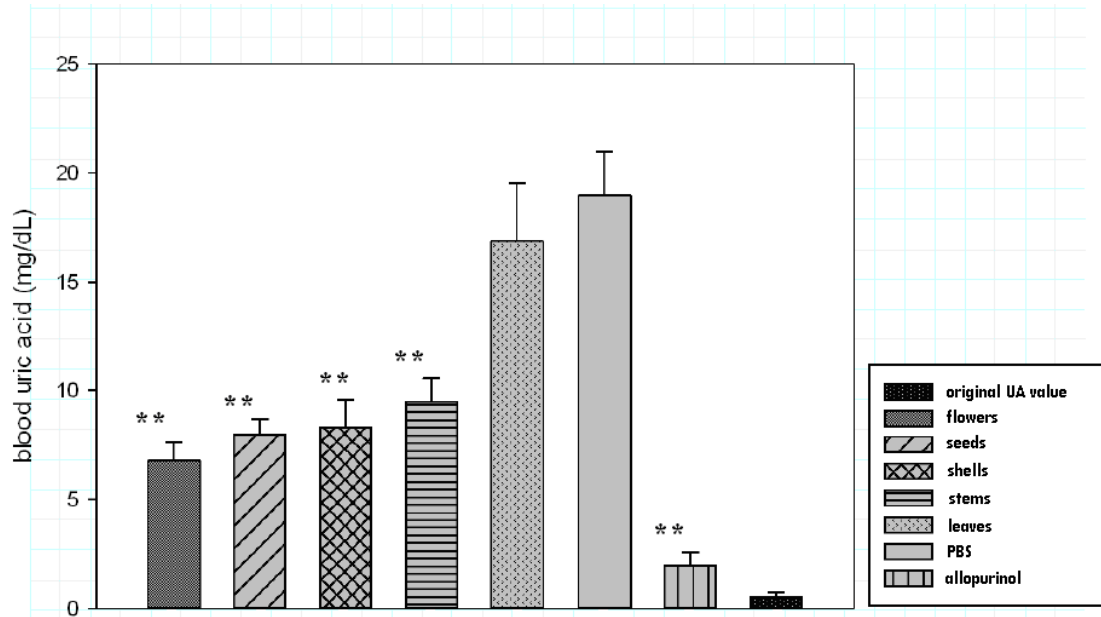


Figure 4. Effect of ethanol extract of longan (50mg/kg) and allopurinol (10mg/kg) on blood uric acid levels in mice treated with uricase inhibitor, potassium oxonic acid.

** $p < 0.01$ There have highly significant difference when each group compared with vehicle control group.

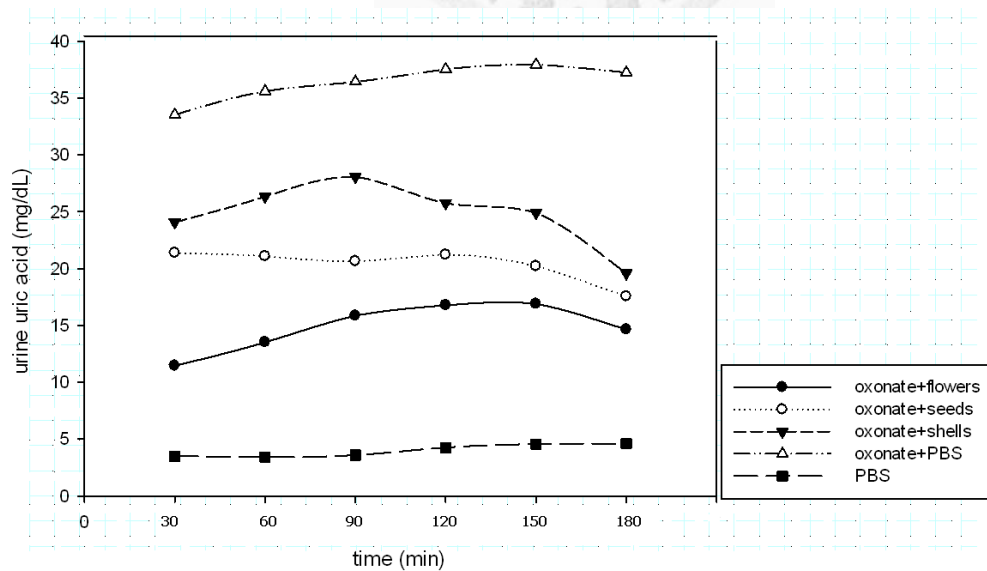


Figure 5. Effect of longan extracts (100 mg/kg) on urine uric acid levels in rats treated with uricase inhibitor and potassium oxonic acid.

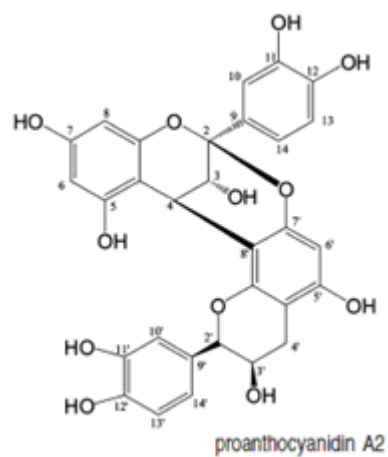


Figure 6. Structure of proanthocyanidin A2.

