

第三章 實驗材料及方法

第一節 實驗材料

1. 藥材

本實驗所使用之中藥材購自台中市欣隆藥材行

黃芩為唇形科植物 *Scutellaria baicalensis* GEORGY. 的乾燥根

芍藥為毛茛科植物 *Paeonia alctiflora* PALL. 的乾燥根

甘草為豆科植物 *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. 的乾燥根及根莖

大棗為鼠李科植物 *Ziziphus jujuba* MILL. 的乾燥成熟果實

2. 藥品及試劑

黃芩 (Baicalin)	Aldrich Chemical Co.
芍藥 (Paeoniflorin)	Yoneyama Chemical Co
甘草酸(Glycyrrhizic acid)	TCI Chemical Co
對羥苯甲酸甲酯(Methylparaben)	WAKO Chemical Co
肝素鈉(Heparin sodium)	Novo Industrial Co.5000 I.U./ml
磷酸(Phosphoric acid)	Merck Co.
甲醇(Methanol)	Merck Co.
乙 (Acetonitrile)	Merck Co.
氫氧化鈉(Sodium hydroxide)	德國 R.D.H. Co.
藥用酒精(Ethanol)	臺灣煙酒公賣局
生理食鹽水	信東化學工業公司
氮氣	吉源氮氣

* 使用於高效液相層析儀之試劑均為 HPLC 級

3.儀器及材料

A.高效液相層析儀之裝備

幫浦(Pump) :	Jasco Model PU-980
偵測器(Detector) :	Jasco Model UV-975 Intelligent UV/VIS
積分儀(Integrator) :	Scientific Information Service Corporation Integrator
自動取樣機(Auto Sampler) :	Jasco Model AS-851
印表機(Printer) :	Hewlett Packard Deskjet 695C
層析管(Column) :	Inertsil ODS-2 (5 μ m 4.6 \times 250mm)
保護管柱(Guard-column) :	Inertsil ODS-2 (5 μ m 4.6 \times 50mm)

B.實驗室裝備

電子天平 :	Sartorius Type 1801
減壓抽氣機 :	Eyela, Aspirator A-2S, Tokyo, Rikak Co.
微量移液管 :	Socorex Transferpette : 2 - 20 μ l 20 - 200 μ l 100 - 1000 μ l
試管振盪器 :	Maxi Mix II Thermolyne Type 37600 Mixer
高速離心機 :	Hettich Zentrifugen D-7200 Tuttlingen, Germany(5000 rpm)
酸鹼測定儀 :	Suntex Microprocessor pH meter Model-2200
純水製造裝置 :	RiOs,TK-5/ZROS6016Y, Millipore Co. and Milli-Q, FM-12OD/ZMQS600, Millipore Co.
超音波振盪器 :	BRANSON 5510, BRANSON ULTRASONIC Co. , USA
吹氣濃縮裝置 :	Organomation Associates INC. Model No.112.
過濾膜 :	Millipore Type HV, 0.45 μ m, Millipore Co.

C.動物實驗所用器材

胃管(內徑 1.5 mm) : 季勗儀器公司
針筒過濾器 0.22 μm : PRO-X™(Lida)
注射針及針筒 : Terumo Co.Tokyo, Japan
1 ml Syringe 25_G × 5/8" (0.5 × 16 mm)
2.5 ml Syringe 24_G × 1" (0.55 × 25 mm)
10 ml Syringe 22_G × 1 1/2" (0.70 × 38 mm)
靜脈置留針及針塞 : Terumo Co.Tokyo, Japan
IV Catheter 22_G × 1"
Injection Plug, 0.2 ml
家兔固定器 : 信德儀器公司
張口器、棉花、3M 膠帶、計時器

4.溶液製備

(1)黃芩、芍藥及甘草酸的標準溶液(Baicalin, Paeoniflorin and Glycyrrhizic acid stock standard solution)

精稱黃芩、芍藥及甘草酸標準品各 25.0 mg，分別置入 25 ml 的容量瓶中，添加甲醇至刻度，即得濃度為 1.0 mg/ml 的黃芩、芍藥及甘草酸的標準溶液。使用時再以甲醇稀釋成所需濃度之標準溶液。

(2)內部標準溶液(internal standard solution)

精稱對羥苯甲酸甲酯(methylparaben) 3 mg 置於 100 ml 定量瓶中，先加入適量乙 (Acetonitrile)使之溶解，再加入乙 至刻度，可得濃度為 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 對羥苯甲酸甲酯之儲備液；取 50 ml 之儲備液置於 500 ml 容量瓶，加入乙 至刻度並混合均勻，即得濃度 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的內部標準溶液。

(3)肝素鈉溶液(Heparin sodium solution)

精取肝素鈉注射液(5,000 I.U./ml)2.5 ml 加於 500 ml 生理食鹽水中，即得 25 I.U./ml 抗凝血肝素鈉溶液。

(4)黃芩、芍藥及甘草酸靜脈注射液(Baicalin, Paeoniflorin and Glycyrrhizic acid solution for intravenous injection)

精稱所須的黃芩、芍藥及甘草酸加入注射用水混合，滴加適量 1N NaOH 溶液調 pH 值 7.2-8.0 之間，再經 0.22 μm 過濾薄膜過濾除菌即得。

(5)黃芩湯口服溶液(Huang-Ch'in-Tang oral solution)

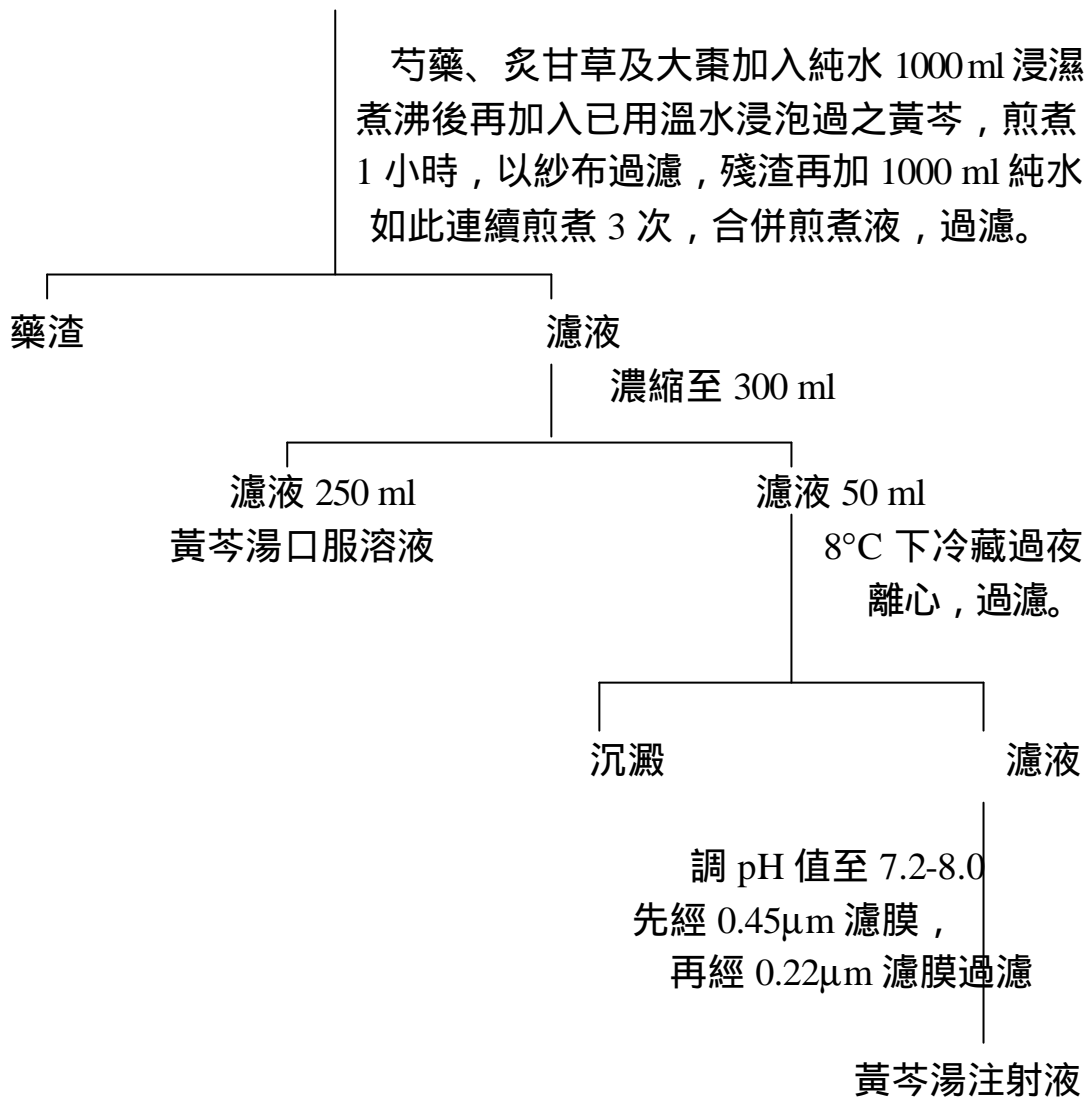
依黃芩湯方中各藥材用量比例 3 : 2 : 2，秤取飲片黃芩 300 g、芍藥 200 g、炙甘草 200 g 及大棗 24 枚，首先將芍藥、炙甘草及大棗加入純水 1000 ml 浸濕後，煮沸後再加入已用溫水浸泡過之黃芩，煎煮 1 小時，以紗布過濾，殘渣再加入 1000 ml 純水如此連續煎煮 3 次，合併煎煮液約 1500 ml，過濾後，將濾液以減壓濃縮至 300 ml，取濾液 250 ml 為黃芩湯口服溶液，放冷後置於 -30 冷凍櫃備用。

(6)黃芩湯靜脈注射液(Huang-Ch'in-Tang solution for intravenous injection)

試驗用黃芩湯注射液之製備過程，如同上述口服溶液製備方法，所得濾液 50 ml，放置於 8 下冷藏過夜，隔天傾出上清液，上清液用高速離心將沉澱物沉降之，取出澄明的上清液集中合併，經濾紙過濾。濾液調 pH 值 7.2-8.0 之間，先經 0.45 μm 濾膜，再經 0.22 μm 濾膜過濾，即得黃芩湯注射液。

操作流程如下：

黃芩湯（黃芩 300 g、芍藥 200 g、炙甘草 200 g 及大棗 24 枚）



第二節 實驗方法

1. 黃芩湯製劑中指標成分之 HPLC 定量分析方法

A. HPLC 分析條件

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

保護管柱(Guard-column) Inertsil ODS-2 (5 μ m 4.6 \times 50 mm)

檢測波長	Time (min)	UV (nm)
	0	230
	13	230
	13.1	280
	28	280
	28.1	248
	40	248
	40.1	230
	47	230

移動相 A: Acetonitrile

B: Water (以 85% Phosphoric acid 調 pH 3.45-3.50)

以 A、B 兩種移動相依下列混合比例進行

Time(min)	A	B
0	15	85
13	34	66
25	34	66
28	60	40
40	60	40
42	15	85
47	15	85

流速 1.0 ml/min

注入量 20 μ l

分析時間 40 min.

B. 標準溶液檢量線之製作

精確量取不同濃度之黃芩 (Baicalin)、芍藥 (Paeoniflorin)、甘草酸(Glycyrrhizic acid)標準溶液 180 μ l, 加入 20 μ l 之內標乙 溶液 (Methylparaben, 30 μ g/ml), 取 20 μ l 注入 HPLC 分析, 所得之黃芩、芍藥、甘草酸與內標之面積比與各已知濃度作線性迴歸以製作檢量線。

C. 黃芩湯注射液中指標成分的定量

取黃芩湯注射液 1 ml 置於 100 ml 的容量瓶中, 加入甲醇至刻度, 可得稀釋濃度 100 倍之黃芩湯注射液。再取稀釋 100 倍的黃芩湯注射液 1 ml 置於 10 ml 的容量瓶中, 加入甲醇至刻度, 可得稀釋濃度 1000 倍之黃芩湯注射液, 用 0.45 μ m 過濾膜過濾後, 精取此稀釋之黃芩湯注射液 180 μ l, 加入 20 μ l 之內標乙 溶液 (Methylparaben, 30 μ g/ml), 取 20 μ l 注入 HPLC 分析, 代入標準溶液檢量線方程式, 結果本實驗用黃芩湯注射液中含黃芩 13.55 mg/ml、芍藥 3.65 mg/ml、甘草酸 6.45 mg/ml。

D. 黃芩湯口服液中指標成分的定量

取黃芩湯口服液 1 ml 置於 100 ml 的容量瓶中, 加入甲醇至刻度, 可得稀釋濃度 100 倍之黃芩湯口服液。再取稀釋 100 倍的黃芩湯口服液 1 ml 置於 10 ml 的容量瓶中, 加入甲醇至刻度, 可得稀釋濃度 1000 倍之黃芩湯口服液, 用 0.45 μ m 過濾膜過濾後, 精取此稀釋之黃芩湯注射液 180 μ l, 加入 20 μ l 之內標乙 溶液 (Methylparaben, 30 μ g/ml), 取 20 μ l 注入 HPLC 分析, 代入標準溶液檢量線方程式, 結果本實驗用黃芩湯注射液中含黃芩 10.32 mg/ml、芍藥 4.39 mg/ml、甘草酸 7.86 mg/ml。

2 黃芩湯血漿檢品中指標成分之 HPLC 定量分析方法

A. HPLC 分析條件

如同上述黃芩湯製劑中指標成分之 HPLC 定量方法

B. 血漿檢品之前處理

精確量取血漿檢品 200 μl 置入試管中，加入含 3 $\mu\text{g/ml}$ 對羥苯甲酸甲酯(Methylparaben)內標準品之乙 溶液 700 μl ，並以振盪器振盪 20 秒，使蛋白沉澱。再以 5000 rpm 離心 20 分鐘。吸取上清液置於另一試管中，以氮氣噴吹至乙 完全離逸後，以甲醇 200 μl 溶解之。接著以 HPLC 分析。

C. 檢量線之製作

精確量取家兔空白血漿 180 μl 加入 20.0 μl 含不同濃度之黃芩 (Baicalin)、芍藥 (Paeoniflorin)、甘草酸(Glycyrrhizic acid)標準溶液，配製成濃度為 100.0 至 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 之標準血漿檢品液(Table 4)。再加入含 3 $\mu\text{g/ml}$ 對羥苯甲酸甲酯(Methylparaben)內標準品之乙 溶液 700 μl ，以振盪器振盪 20 秒，使蛋白沉澱。再離心 20 分鐘，取上清液。以氮氣噴吹至乙 完全逸離後，以甲醇 200 μl 溶解之。接著以 HPLC 分析，由所得之黃芩、芍藥、甘草酸與對羥苯甲酸甲酯之面積比與校正液濃度作線性迴歸以製作檢量線。

Table 4 Baicalin、Paeoniflorin、Glycyrrhizic acid 標準濃度血漿檢品
溶液之製備

標準溶液濃度 ($\mu\text{g/ml}$)取 20 μl	空白血漿體積(μl)	濃度($\mu\text{g/ml}$)
1000.0	180	100.0
500.0	180	50.0
100.0	180	10.0
50.0	180	5.0
10.0	180	1.0
5.0	180	0.5
1.0	180	0.1
0.5	180	0.05

D.回收率試驗

目的在比較添加黃芩、芍藥及甘草酸在空白血漿和空白甲醇溶液中，經血漿檢品之前處理步驟處理後檢出量之差異。實驗步驟如同校正曲線製作中對檢品的處理過程。回收率可從下式求得：

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{標準濃度在血漿中與內標積分面積比}}{\text{標準濃度在甲醇中與內標積分面積比}} \times 100\%$$

E.精確性試驗

為了確認黃芩 (Baicalin)、芍藥 (Paeoniflorin) 及甘草酸 (Glycyrrhizic acid) 定量分析方法之精確性，因此做同日內(Intraday)及異日內(Interday)的精確性比較。同日內試驗是以三種不同濃度之含黃芩、芍藥及甘草酸標準濃度血漿檢品，分別於同一日的早上、中午、晚上各分析兩次，計算各個校正液濃度之平均值(Mean)、標準偏差(S.D.)及變異係數(C.V.)。若於不同天以同法操作則可得到異日內的精確性比較。

F.靈敏度試驗

分析過程中，欲找出能被檢定出之最低濃度，但不需要能夠被定量，故做偵測極限試驗(Limit of Detection, LOD)，利用已知濃度的指標成分予以分析，使指標成分之訊號對雜訊之比值(即 S/N ratio)為 3 : 1，所建立該指標成分能可靠的被檢測出來的最低濃度，即為 LOD 值。而偵測極量(Limit of Quantitation, LOQ)，將依前述「檢量線之製作」，採標準濃度血漿檢品製備方法，取六次檢品分析決定之。

G.安定性試驗

(1) 黃芩、芍藥及甘草酸在家兔血漿中於-30 下之安定性試驗

取適當之含黃芩、芍藥及甘草酸標準溶液加入空白血漿中，振盪一分鐘以混合均勻，使濃度為 1.0, 5.0, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ 之血漿檢品，將之置於-30 的冷凍櫃中，於第 0, 1, 3, 6, 10, 15, 21 天分別取出一組檢品(n=3)。解凍後，依血漿檢品之前處理方法處理後，以 HPLC 分析，觀察黃芩、芍藥及甘草酸之濃度變化情形。

(2) 黃芩、芍藥及甘草酸在家兔血漿中於 37℃ 下之安定性試驗

取適當含黃芩、芍藥及甘草酸標準溶液加空白血漿中，振盪一分鐘以混合均勻，使濃度為 1.0, 5.0, 25.0 μl/ml 之血漿檢品，將之置於 37±2℃ 的恆溫箱中，於第 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 小時，分別取出一組檢品(n=3)，依血漿檢品之前處理方法處理後，以 HPLC 分析，觀察黃芩、芍藥及甘草酸之濃度變化情形。

3. 黃芩湯指標成分在家兔體內之藥物動力學

A. 實驗設計

取雄性家兔六隻，體重介於 1.8 至 3.0 公斤之間，進行指標成分注射液靜脈注射(IVS)、黃芩湯靜脈注射(IVE)與黃芩湯口服(PO)給藥，每次給藥後至下次給藥，時間須相隔一週以上。實驗家兔之重量及給藥劑量示於 Table 5

Table 5 實驗家兔之重量及實際給藥劑量

Rabbit	N.O	1	2	3	4	5	6
IVS	兔重(kg)	2.4	2.5	2.8	3.0	2.4	2.5
	實B(mg)	36.00	37.50	42.00	45.00	36.00	37.50
	際P	12.00	12.50	14.00	15.00	12.00	12.50
	給G	24.00	25.00	28.00	30.00	24.00	25.00
IVE	兔重(kg)	2.2	2.7	2.2	2.2	2.9	2.2
	實B(mg)	29.81	36.59	29.81	29.81	39.30	29.81
	際P	8.03	9.86	8.03	8.03	10.59	8.03
	給G	14.19	17.42	14.19	14.19	18.71	18.71
P.O	兔重(kg)	1.8	1.8	1.9	1.9	1.8	1.8
	實B(mg)	259.00	259.00	273.29	273.29	259.00	259.00
	際P	109.75	109.75	116.34	116.34	109.75	109.75
	給G	199.00	199.00	210.94	210.94	199.00	199.00

* B: Baicalin; P: Paeoniflorin; G: Glycyrrhizic acid

(註)

靜脈注射黃芩湯標準品：Baicalin : 15 mg/kg
Paeoniflorin : 5 mg/kg
Glycyrrhizic acid : 10 mg/kg

靜脈注射黃芩湯煎劑：Baicalin : 13.55 mg/kg
Paeoniflorin : 3.65 mg/kg
Glycyrrhizic acid : 6.45 mg/kg

口服黃芩湯煎劑：Baicalin : 143.89 mg/kg
Paeoniflorin : 60.97 mg/kg
Glycyrrhizic acid : 110.55 mg/kg

B. 給藥法及檢品處理

(1) 指標成分注射液靜脈注射給藥及血漿檢品之處理：

實驗前家兔至少禁食 24 小時，實驗時先稱重記錄實際體重以便配製注射溶液。將兔子關入限制籠內兩耳之毛剃除乾淨，接著以燈泡照射兔耳使其血管擴張，再以酒精棉消毒並助血管擴張，隨即插入靜脈留置針，將針塞(Injection plug)注滿肝素鈉溶液後，固定於靜脈留置針上。每次採血後均由針塞注入 25 I.U./ml 之肝素鈉溶液約 0.2 ml，以防靜脈留置針管內之血液凝固。投藥前先抽取 1.5ml 之空白血液，由另一耳靜脈投藥後，分別於投藥後 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 及 360 分鐘由靜脈留置針之針塞抽取 1.5 ml 血液，置於試管中，以 3000 rpm 轉速離心 15 分鐘後，取出上層血漿，即保存於-30 之冷凍櫃中。

血漿檢品之前處理、檢量線及分析條件均依前述方法操作，黃芩、芍藥及甘草酸之濃度則由標準曲線經內插法推算而得。

(2)黃芩湯靜脈注射給藥及血漿檢品處理：

如同上述指標成分靜脈注射給藥方式。

(3).黃芩湯口服給藥及血漿檢品處理：

口服給藥實驗前家兔至少禁食 24 小時，實驗期間亦不進食。實驗時家兔之處理如同上述靜脈注射給藥方式，惟口服給藥法是以張口器將家兔之口張開後，再以胃管插入給藥。而其採血點為給藥後之 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660, 720 分鐘。

C.數據處理及統計方法

各種給藥法所取得之血漿檢品經使用前述 HPLC 法分析後，依標準曲線內插法推算黃芩湯指標成分，黃芩 (Baicalin)、芍藥 (Paeoniflorin)及甘草酸(Glycyrrhizic acid)之血中濃度數據後，利用電腦程式 JANA⁽⁷⁹⁾，WINNONLIN⁽⁸⁰⁾及 LAGRAN-P 等，分別利用配適後的分室及非分室理論，計算相關之藥物動力學參數。統計軟體 SPSS 之 Independent-Samples t-test 和 One-way ANOVA，分析不同製劑及不同給藥方式之間的差異。

(1)一室體模式(One Compartment Model)

分析而得之各個指標成分血中濃度數據，經 JANA PROGRAM 作 Weighting、One Exponential Curve stripping 處理，取其 Volume/F、 K_{01} 及 K_{10} 的數值。再用 WINNONLIN PROGRAM 作曲線配適(Curve Fitting)取最適合的室體模式，求其相關藥動學參數。

(2)二室體模式(Two Compartment Model)

分析而得之各個指標成分血中濃度數據，經 JANA PROGRAM 作 Weighting、Two Exponential Curve stripping 處理，取其 A、B、 α 及 β 的數值。再用 WINNONLIN PROGRAM 作曲線配適(Curve Fitting)取最適合的室體模式，求其相關藥動學參數。

(3)非分室理論

以靜脈注射及口服給予家兔所得血漿檢品，由分析而得之各個指標成分血中濃度數據，經 LAGRAN-P PROGRAM 處理，可由非分室理論計算相關藥動學參數。

由上述所得之藥動學參數以統計學 t-test 比較 WINNONLIN 及 LAGRAN-P 處理後所得之藥物學參數(AUC, CL, $T_{1/2}$, VD_{SS})。另以統計學 One Way ANOVA 處理，比較不同投藥間藥動學參數之差異。