

# 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係購自台中欣隆藥材行，經本所陳忠川所長鑑定中藥材之基原採用如下：

黃連 *Coptis chinensis* Wallich (Rannunculaceae)的乾燥根莖

黃芩 *Scutellaria baicalensis* George (Labiatae)的乾燥根

黃柏 *Phellodendron amurense* Rupr (Rutaceae)的乾燥樹皮

梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae)的乾燥成熟果實

### 2. 藥品及試劑

小蘗鹼(Berberine Chloride) 美國 Sigma Chemical Co.

黃芩 (Baicalin Hydrate) Aldrich Chemical Co.

梔子 (Geniposide) 日本 米山藥品工業株式會社

間羥基苯甲酸(*m*-hydroxy benzoic acid)

日本 和光純藥工業株式會社

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

太利氮氣

\* 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-970 Intelligent UV/VIS  
積分儀(Integrator) : Scientific Information Service  
Corporation Integrator  
自動取樣機(Auto Sampler) :  
Jasco Model AS-950  
印表機(Printer) : Hewlett Packard Deskjet 695C  
層析管(Column) : Inertsil 5 ODS-2(4.6×150mm) VERCOPAK 建吾台灣  
保護管柱(Pre-column) : VERCOPAK 5 ODS-2(4.6×150mm) 建吾台灣

#### 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(Micropipette) :  
Socorex Transferpette : 1 - 10  $\mu$ l  
20 - 200  $\mu$ l  
100 - 1000  $\mu$ 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(pH meter) : 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 $\mu$ 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  $\mu$ m： PRO-X<sup>TM</sup>(Lida)  
注射針及針筒： Terumo Co.Tokyo, Japan  
1 ml Syringe 25<sub>G</sub> × 5/8" (0.5 × 16 mm)  
2.5 ml Syringe 24<sub>G</sub> × 1" (0.55 × 25 mm)  
10 ml Syringe 22<sub>G</sub> × 1 1/2" (0.70 × 38 mm)  
靜脈置留針及針塞： Terumo Co.Tokyo, Japan  
IV Catheter 22<sub>G</sub> × 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)小蘗鹼、黃芩 及 梔子 的標準溶液(Berberine, Baicalin and Geniposide stock standard solution)

精稱小蘗鹼、黃芩 及 梔子 標準品各稱 10.0 mg 分別置入一個 20 ml 的容量瓶中，添加甲醇至刻度，即得濃度為 50.0  $\mu$ g/ml 的小蘗鹼、黃芩 及 梔子 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)

精稱間羥基苯甲酸(*m*-hydroxy benzoic acid)10 mg 置於 100 ml 定

量瓶中，先加入適量乙腈 (Acetonitrile)使之溶解，再加入乙腈至刻度，可得濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$  間羥基苯甲酸之儲備液；取 1.0 ml 之儲備液置於 100 ml 容量瓶，加入乙腈至刻度並混合均勻，即得濃度為 1  $\mu\text{g/ml}$  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 IU/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)小蘗鹼、黃芩 及 梔子 靜脈注射液(Berberine, Baicalin and Geniposide solution for intravenous injection)

精稱所須的小蘗鹼、黃芩 及 梔子 後，再加入注射用水混合，滴加 1-2 滴 1N NaOH 溶液使之溶解，調控 pH 值至 7.5-8.1 之間，再經 0.22  $\mu\text{m}$  過濾薄膜過濾除菌即得。

### (5)黃連解毒湯口服溶液(Huang-Lian-Jie-Dwu-Tang oral solution)

依黃連解毒湯方中各藥材用量比例 3 : 2 : 2 : 1，秤取飲片黃連 150g、黃芩 100g、黃柏 100g 及 梔子 50g，加入水 1000 ml 浸濕後，以 90 $^{\circ}$  100 $^{\circ}$  煎煮一小時後過濾去渣。將過濾出之藥渣以前述步驟操作，每次再加水 1000 ml 煎煮六十分鐘兩次，合併濾液約 2400 ml。將濾液以減壓濃縮至 240 ml，放冷後置於-30 $^{\circ}$  冷凍櫃備用。用 HPLC 對黃連解毒湯口服液中之小蘗鹼、黃芩 及 梔子 之含量進行分析，發現各成分含量分別為 29.81mg/ml，22.556mg/ml，11.191mg/ml。

### (6)黃連解毒湯靜脈注射液(Huang-Lian-Jie-Dwu-Tang solution for intravenous injection)

試驗用黃連解毒湯注射液之製備過程，如同上述口服溶液方法，放置於 5 $^{\circ}$  下冷藏過夜，隔天傾出上清液，將上清液用高速離心機將

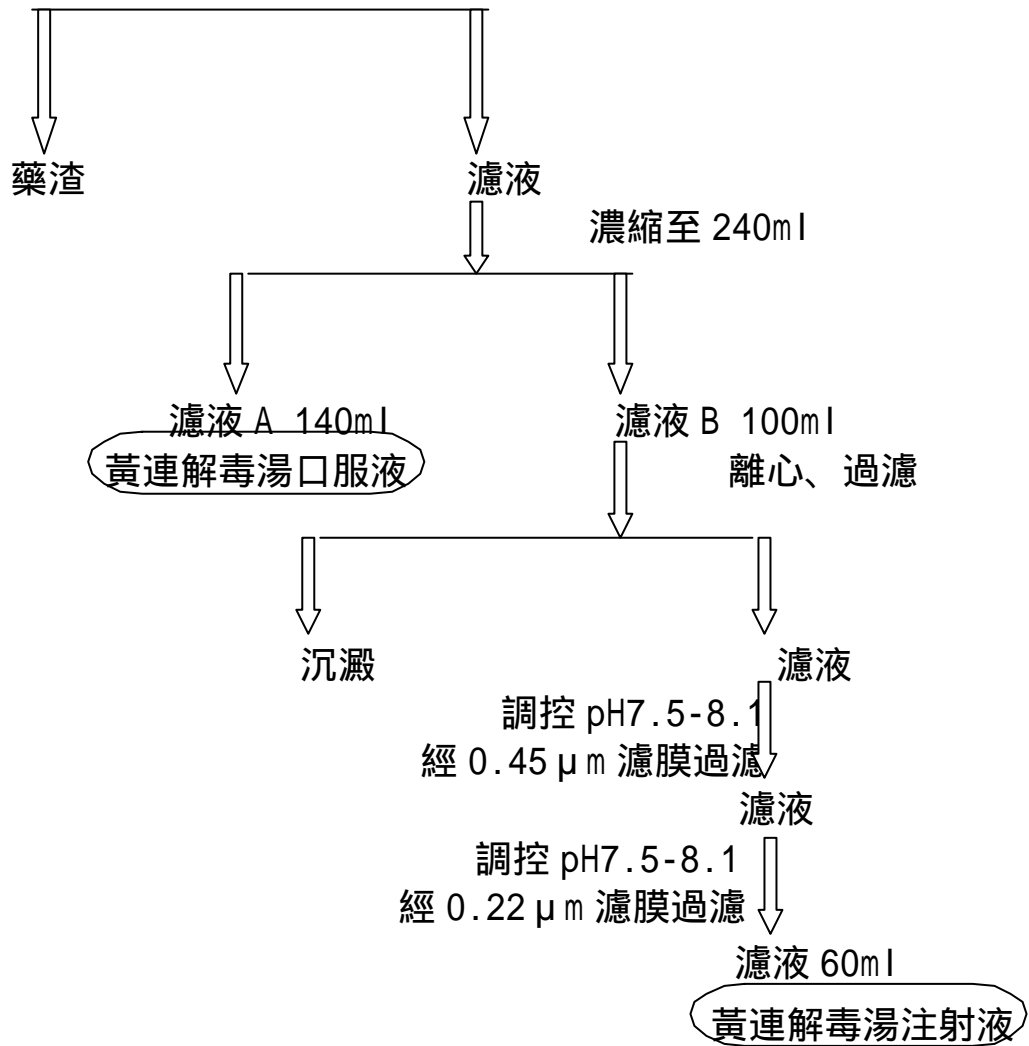
沉澱物沉降之，取出澄明的上清液集中合併，經濾紙過濾。再濃縮至 100 ml 調控 pH 值至 7.5-8.1 之間，經 0.45  $\mu\text{m}$  過濾。調控 pH 值，最後得到 60ml 的澄明藥液，經 0.22  $\mu\text{m}$  過濾，即得黃連解毒湯注射液。用 HPLC 對黃連解毒湯注射液中之小檗鹼、黃芩 及梔子 之含量進行分析，發現各成分含量分別為 9.54mg/ml, 7.22mg/ml, 3.58mg/ml

操作流程如下：

黃連解毒湯

黃連 150g、黃芩 100g、黃柏 100g 及梔子 50g ( 3 : 2 : 2 : 1 )

先以水 1000ml 煎煮一小時  
依上述再煎煮 2 次



## 第二節 實驗方法

### 1.黃連解毒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 5 ODS-2(4.6×150mm) VERCOPAK

保護管柱(Pre-column) ODS-2 VERCOPAK(4.6×35mm)

檢測波長 0-18 min , UV 240 nm ;

18-42 min , UV 277 nm

流速 1.0 ml/min

注入量 20 µl

分析時間 42 min.

移動相 A : 乙

B : 0.02% Phosphoric acid pH=2.6

#### 濃度梯度

Time (min)	A	B
0	84	16
19	84	16
20	78	22
30	78	22
31	70	30
42	70	30

## B.標準溶液檢量線之製作

精確量取 20 $\mu$ l 含不同濃度之小蘗鹼(Berberine)、黃芩 (Baicalin) 和梔子 (Geniposide)標準溶液用甲醇 180 $\mu$ l 稀釋成濃度為 0.05 至 50.0 $\mu$ g/ml 之標準溶液。再加入含 1 $\mu$ g/ml 間羥基苯甲酸(*m*-hydroxy benzoic acid)內標準品之乙 溶液 600 $\mu$ l，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 完全逸離後，以適當甲醇 200 $\mu$ l 溶解之。接著以 HPLC 分析，由所得之小蘗鹼、黃芩 和梔子 與間羥基苯甲酸之面積比與校正液濃度作線性回歸以製作檢量線。

## C.黃連解毒湯注射液中指標成分的定量

精確量取黃連解毒湯注射液 0.10 ml 置於 10 ml 容量瓶中，先加入適量甲醇(Methanol)使之溶解，再加入甲醇至刻度，可得稀釋濃度 100 倍之黃連解毒湯注射液，用 0.45  $\mu$ m 過濾薄膜過濾後；精確量取此稀釋之黃連解毒湯注射液 200.0  $\mu$ l 置入試管中，加入含 1  $\mu$ g/ml 間羥基苯甲酸(*m*-hydroxy benzoic acid)內標準品之乙 溶液 600  $\mu$ l，以振盪器振盪 20 秒。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 完全逸離後，以適當甲醇 200  $\mu$ l 溶解，接著以 HPLC 分析。

## D.黃連解毒湯口服液中指標成分的定量

精確量取黃連解毒湯口服液 0.10 ml 置於 10 ml 容量瓶中，先加入適量甲醇使之溶解，再加入甲醇至刻度，可得稀釋濃度 100 倍之黃連解毒湯口服液，用 0.45  $\mu$ m 過濾薄膜過濾後；精確量取此稀釋之黃連解毒湯口服液 200.0  $\mu$ l 置入試管中，加入含 1  $\mu$ g/ml 間羥基苯甲酸(*m*-hydroxy benzoic acid)內標準品之乙 溶液 600  $\mu$ l，以振盪器振盪 20 秒。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 完全逸離後，以適當甲醇 200  $\mu$ l 溶解，接著以 HPLC 分析。

## 2.黃連解毒湯血漿檢品中指標成分之 HPLC 定量分析方法

### A.HPLC 分析條件

如同上述黃連解毒湯製劑中指標成分之 HPLC 定量分析方法。

### B.血漿檢品之前處理

精確量取血漿檢品 200.0  $\mu$ l 置入試管中，加入含 1  $\mu$ g/ml 間羥基苯甲酸(*m*-hydroxy benzoic acid)內標準品之乙 溶液 600  $\mu$ l，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 完全逸離後，以適當甲醇 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l 加入 20.0  $\mu$ l 含不同濃度之小蘗鹼 (Berberine)、黃芩 (Baicalin) 與梔子 (Geniposide)標準溶液，配製成濃度為 0.05 至 50.0  $\mu$ g/ml 之標準血漿檢品液(Table 5) 再加入含 1  $\mu$ g/ml 間羥基苯甲酸(*m*-hydroxy benzoic acid)內標準品之乙 溶液 600  $\mu$ l，以振盪器振盪 20 秒，使蛋白沉澱。再離心 20 分鐘。以氮氣噴吹至乙 完全逸離後，以甲醇 200  $\mu$ l 溶解之。接著以 HPLC 分析，由所得之小蘗鹼、黃芩、梔子 與間羥基苯甲酸之面積比與校正液濃度作線性回歸以製作檢量線。



Table 4 小蘗鹼、黃芩 與梔子 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 $\mu\text{l}$ )	空白血漿體積 ( $\mu\text{l}$ )	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
500.0	180	50.0
250.0	180	25.0
100.0	180	10.0
50.0	180	5.00
10.0	180	1.00
5.00	180	0.50
1.00	180	0.10
0.50	180	0.05

#### D. 回收率試驗

目的在比較添加小蘗鹼、黃芩 及梔子 在空白血漿和空白溶液 (Methanol) 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之處理過程。回收率可從下式求得：

$$Recovery (\%) = \frac{\text{plasma standard peak area ratio}}{\text{methanol standard peak area ratio}} \times 100 \%$$

#### E. 精確性試驗

為了確認小蘗鹼 (Berberine)、黃芩 (Baicalin) 及梔子 (Geniposide) 定量分析方法之精確性，因此做同日內 (Intraday) 及間日內 (Interday) 的精確性比較。同日內試驗是以不同濃度之含小蘗鹼、黃芩 及梔子 標準

濃度血漿檢品，分別於同一日的早上、中午、晚上各取濃度為 0.50, 10.0, 100  $\mu\text{g/ml}$  之含小蘗鹼、黃芩 及梔子 標準溶液 500  $\mu\text{l}$ ，加入 4500  $\mu\text{l}$  之空白血漿中，振盪一分鐘以混合均勻，即得濃度為 0.05, 1.00, 10.0  $\mu\text{l/ml}$  之血漿檢品 (n=2)，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間日內的精確性比較。

## 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)，經使用指標成分小蘗鹼、黃芩 及梔子 標準品溶液逐步稀釋後，溶液以 HPLC 法分析，由 Signal 對 Noise 比 3:1 為度 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。

$$\text{LOD} = \text{S/N} > 3/1$$

$$\text{LOQ} = \text{LOD} \times 3.3$$

S : Signal

N : Noise

## G.安定性試驗

### (1)小蘗鹼、黃芩 及梔子 在家兔血漿中於-30 下之安定性試驗

取濃度為 10.0, 50.0, 100  $\mu\text{g/ml}$  之含小蘗鹼、黃芩 及梔子 標準溶液 500  $\mu\text{l}$ ，加入 4500  $\mu\text{l}$  之空白血漿中，振盪一分鐘以混合均勻，即得濃度為 1.00, 5.00, 10.0  $\mu\text{l/ml}$  之血漿檢品，將之分裝後置於-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，觀察小蘗鹼、黃芩 及梔子 之濃度變化情形。

## (2)小蘗鹼、黃芩 及梔子 在家兔血漿中於 37 °C 下之安定性試驗

取濃度為 10.0, 50.0, 100  $\mu\text{g/ml}$  之含小蘗鹼、黃芩 及梔子 標準溶液 500  $\mu\text{l}$ , 加入 4500  $\mu\text{l}$  之空白血漿中, 振盪一分鐘以混合均勻, 即得濃度為 1.00, 5.00, 10.0  $\mu\text{l/ml}$  之血漿檢品, 將之分裝後置於  $37\pm 2$  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, 觀察小蘗鹼、黃芩 及梔子 之濃度變化情形。

## 3.黃連解毒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 2.2 至 2.8 公斤之間, 每隻家兔進行指標成分注射液靜脈注射、黃連解毒湯靜脈注射與黃連解毒湯口服(P.O.) 給藥, 實驗家兔之重量、給藥順序及劑量示於 Table 6, 每次給藥後至下次給藥, 時間須相隔一週以上。

Table 5 實驗家兔之體重

Rabbit No.	1	2	3	4	5	6
Weight (kg)	2.4	2.2	2.2	2.6	2.3	2.5
	2.3	2.6	2.3	2.4	2.6	2.8
	2.5	2.4	2.5	2.2	2.2	2.3

Table 6 實驗家兔之劑量

指標成份	指標成份注射液	黃連解毒湯注射液	黃連解毒湯口服液
小蘗鹼	10 mg/kg	9.54 mg/kg	149.05 mg/kg
黃芩	15 mg/kg	7.22 mg/kg	112.78 mg/kg
梔子	2.5 mg/kg	3.58 mg/kg	55.95 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：

實驗前家兔先稱重記錄實際體重以便配製注射溶液。實驗時將兩耳之毛剃除後關入限制籠內，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 1.5ml 血液，置於試管中，以 5000 rpm 轉速離心 20 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，小蘗鹼、黃芩 及 梔子 之濃度則由標準曲線經內插法推算而得。

### (2) 黃連解毒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) 黃連解毒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 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 HPLC 法定量後，依標準曲線換算黃連解毒湯指標成分，小檗鹼(Berberine)、黃芩 (Baicalin)及梔子 (Geniposide)之血中濃度數據後，利用電腦程式 JANA, WINNONLIN 及 LAGRAN-P，統計軟體 SPSS Independent-Samples T-test 和 One-Way ANOVA，分別利用配適後的分室及非分室理論來計算相關之藥物動力學參數。

#### (1)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、 $\alpha$  及 $\beta$ 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)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 二種程式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。