

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、試藥

Glycyrrhizin, propylparaben, sodium bicarbonate, medium 199 及 rhodamine 123 購自 Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA)。 Cyclosporine (Neoral[®]) 購自台灣諾華股份有限公司。 Acetonitrile (HPLC grade) 購自 Mallinckrodt Baker , Inc. (USA)。 TDx[®] Immunosuppressant Drug Assays – Cyclosporine Monoclonal Whole Blood kit 購自 Abbott Laboratories (USA)。 二次蒸餾水由 Milli-Q plus water 純水系統製造 (Millipore Bedford, MA, USA)。

二、儀器設備

- (一) 酸鹼測定儀 Microprocessor pH-mV meter (pH 526)
- (二) 高速離心機 HERMLE (Z200 M/H) (Germany)
- (三) 試管震盪器 Vortex genie (G-560)
(Scientific Industries Inc., USA)
- (四) 超音波震盪器 Bransonic (8210 R-MT)
(Branson ultrasonics corporation, USA)
- (五) 氮氣濃縮機 OA-SYS (N-EVAP 112)
(Organomation Associates Inc., USA)
- (六) 電子天平 METTLER TOLEDO (AB 104) (Switzerland)
- (七) 水壓抽氣機 EYELA Aspirator (A-2S)
(Tokyo Rikakikai Co., LTD)
- (八) 控溫往復式震盪水槽 YIHDER shaker bath (BT-350)
- (九) 高效液相層析儀
 - 1、幫浦 SHIMADZU liquid chromatograph
(LC-10AS) (Japan)

2、紫外光偵測器 SHIMADZU UV-VIS detector
(SPD-10A)(Japan)

3、自動注射器 PERKIN ELMER autosampler
(Series 200)(USA)

(十) 混合氣體 (95 % O₂ , 5 % CO₂) 吉源行有限公司

(十一) TDx Analyzer ABBOTT LABS. (USA)

(十二) 螢光光譜儀 PERKIN ELMER Luminescence Spectrometer (LS
50 B)(USA)

三、實驗動物

本研究之實驗用鼠為國科會提供之 Sprague-Dawley 大白鼠，體重約 200 -300 公克。

第二節實驗方法

一、甘草水煎劑、甘草酸於大鼠體內對環孢靈動力學之影響

(一) 動物口服溶液之製備

1、甘草水煎劑之製備

精秤原藥材 300 g，加入 12 l 水，浸泡 30 分鐘使之浸潤後，直火加熱，沸騰後以小火煎煮至約 500 ml，趁熱過濾，精確定容至 500 ml，經 HPLC 測定其甘草酸之含量後，置於 -30℃ 冷凍貯存備用。

2、環孢靈溶液之製備

以水稀釋 Neoral (100 mg/ml)，配製成 625 µg/ml 之環孢靈溶液。

(二) 血液中環孢靈之定量

1、檢量線之繪製

取 Abbott 公司之 TDx Cyclosporine Monoclonal Whole Blood Reagent 中血清標準溶液 (0, 100, 250, 500, 1000 及 1500 ng/ml) 150 µl，加入 50 µl Solubilization Reagent，再加入 300 µl Whole Blood Precipitation Reagent，以試管振盪器振盪 30 秒，再高速離心 5 分鐘後，取上清液以 Cyclosporine Monoclonal Whole Blood kit 分析，TDx 機器含自動繪製檢量線貯存備用。

2、血液檢品之前處理及定量

取 150 µl 血液檢品，加入 50 µl Solubilization Reagent，再加入 300 µl Whole Blood Precipitation Reagent，以試管振盪器振盪 30 秒，再高速離心 5 分鐘後，取上清液，使用 Abbott 公司之 TDx Immunosuppressant Drug Assays - Cyclosporine Monoclonal Whole Blood kit 測定。

(三) 動物

實驗動物為 Sprague-Dawley 雄性大鼠，體重介於 230 – 390 公克，實驗前先禁食 12 小時，給藥方式採平行試驗設計，將大鼠隨機分為三組，每組六隻，一組經由胃管給予水(10 ml/kg)再給予環孢靈(2.5 mg/kg); 一組先給予甘草水煎劑(相當於甘草酸 100 mg/kg) 後，再給予環孢靈 (2.5 mg/kg)。另一組先給予甘草酸溶液 (100 mg/kg) 後，再給予環孢靈 (2.5 mg/kg)。

口服給藥前及給藥後 20、40、60、180、300 及 540 分鐘後從心臟採血 (0.8 ml)。將血液檢品存放於含 EDTA 的試管中，混合均勻後貯存於 4 °C 之冷藏櫃中，於一週內分析。

(四) 數據分析

以 WINNONLIN (version 1.1, SCI Software) 非室性模式計算其動力學參數，並以 unpaired Student's t – test 分析兩組間之差異。

二、甘草水煎劑及甘草酸在離體大鼠空腸、迴腸對 P-glycoprotein 功能之影響

(一) 溶液之製備

1、Medium 199 溶液

秤取 9.55 g 之 medium 199 粉末，加入 2.2 g 之碳酸氫鈉，定容至 1 升，並調 pH 至 7.4 備用。

2、Rhodamine 123 溶液

秤取 5 mg 之 rhodamine 123 粉末，加水定容至 25 ml 為貯存液備用。

3、含甘草水煎劑之 medium 溶液

取經 HPLC 定過甘草酸含量之甘草水煎劑，用 medium 199 溶液配製成含 100 及 200 μM 甘草酸之甘草水煎劑溶液。

4、含甘草酸之 medium 溶液

秤取甘草酸，以少許水溶之，再用 medium 199 溶液配製成 100 及 200 μM 之甘草酸溶液。

(二) Rhodamine 123 之定量

1、標準溶液之製備及檢量線之繪製

貯存液以 medium 199 稀釋定容，製備成 19.5、39.0、78.1、156.3、312.5、625.0、1250.0、2500.0 及 5000.0 ng/ml 九種濃度之標準溶液，利用螢光光譜儀分析，以所測得之螢光強度與 rhodamine 123 濃度進行線性迴歸，求得檢量線之方程式。

2、分析方法

Rhodamine 123 之濃度分析採用螢光光譜儀 (Luminescence spectrophotometer LS 50B, Perkin Elmer) 測定。

檢測波長： 485 nm (excitation) 546 nm (emission)

Cell 容積： 0.7 ml

(三) 動物

實驗動物為出生 8 至 12 週之 Sprague-Dawley 雌性大鼠，體重介於 130 – 250 公克，實驗前先禁食 24 小時。在乙醚麻醉狀態下，剖開腹腔，取出離胃 5 公分以下之空腸及離盲腸 5 公分以上之迴腸各 30 公分，並將取出的空腸及迴腸用冰的生理食鹽水灌流清洗內部殘留物。先將各段腸之一端以線綁緊，再將腸段外翻，使黏膜層在外，漿膜層在內，之後於腸之一端以線綁緊，再於另一端插入針頭，並於距針頭 25 公分處以線綁緊。

將大白鼠隨機分成五組，每組五隻。第一組為空白組，將各腸段置於 50 ml 之 medium 199 溶液中，第二及第三組分別置於 50 ml 含 100 μ M 及 200 μ M 甘草酸之甘草水煎劑之 medium 199 溶液中，第四及第五組分別置於 50 ml 含 100 μ M 及 200 μ M 甘草酸之 medium 199 溶液中。置於 37 之恆溫震盪水槽並持續通入混合氣體 (95% O₂ 及 5% CO₂)。20 分鐘後在裝有針頭之一端注入 3 ml 之 rhodamine 123 溶液 (20 μ g/ml)。

(四) 採樣

注入 rhodamine 123 之前及注入後 20 40 60 80 及 100 分鐘後自燒杯中採樣 0.8 ml，並貯存於冰上，俟後分析。

(五) 數據分析

利用 one-way ANOVA 統計並進行 Scheff' s test，以分析各組間之差異。