

## 第三章 材料與方法

### 第一節 實驗材料

#### 一、試藥

##### (一) 標準品與試劑

Glycyrrhizin、glucose、fructose、sucrose、chromium trioxide、anhydrous sodium sulfate、sulfuric acid、tetraglycol 及 propylparaben 購自 Sigma Chemical Company ( St Louis MO , USA )。Glycyrrhetic acid 及 2-methylantraquinone 購自 Aldrich Chemical Company Inc. ( USA )。Sodium hydroxide、potassium dihydrogenphosphate、hydrochloric acid 購自 Merck Company( Germany )。Potassium phosphate、glacial acetic acid、acetonitrile、methanol、ethyl acetate ( HPLC grade ) 購自 Mallinckrodt Baker Inc. ( USA )。二次蒸餾水由 Milli-Q plus water 純水系統製造 ( Millipore Bedford , MA , USA )。

##### (二) 3-去氫甘草次酸之製備

###### 1、Jone's reagent 之配製

取 2.3 ml 濃硫酸加入水中至 10 ml，再秤取 2.672 g 三氧化鉻加入上述溶液中。

###### 2、3-去氫甘草次酸之合成

取 1 克甘草次酸溶於 200 ml 乙醚中，再分次加入 1.7 ml Jone's 試劑且不斷徐徐攪拌，於室溫下持續反應 24 小時。過濾後以無水硫酸鈉脫水，再經過濾，濾液減壓濃縮至乾，殘餘物以乙酸乙酯再結晶，即得 3-去氫甘草次酸。

本合成係參考 1983 年 Hattori <sup>(117)</sup> 之方法，所得產物經 MS 及 NMR 圖譜鑑定。

### (三) 甘草之市場品收集

#### 1、甘草藥材市場品之收集

於台灣本島各地分別收集藥材檢品甲、乙、丙、丁四級計十六種，以供成分定量分析之用。

#### 2、甘草濃縮中藥市場品之收集

依各濃縮中藥製造廠之產品目錄，採購檢品六種，以供成分定量分析之用。

### (四) 蜂蜜

蜂蜜係購自台中市欣隆藥行之龍眼花蜜。

### (五) 人工腸液配置法

取磷酸二氫鉀 6.8 g 溶於水 250 ml，加 0.2 N 氫氧化鈉液 190 ml 及水 400 ml，用 0.2 N 氫氧化鈉液調節 pH 至  $7.5 \pm 0.1$ ，再加水稀釋至 1000 ml。

## 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

1、METTLER TOLEDO ( AB 104 ) ( Switzerland )

2、ADW-1.5KG ( Taiwan )

( 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 ) 血清塞 弘光企業有限公司

( 十 ) 針頭濾膜 Alltech Associates, Inc. ( 0.45 $\mu$ m, 13mm )

( 十一 ) 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 )

### 三、實驗動物

本研究採用之實驗用兔為中國醫藥學院動物中心所提供之雄性紐西蘭白兔，體重約 2 - 3 公斤。

## 第二節 實驗方法

### 一、甘草製劑中甘草酸與甘草次酸之含量分析

#### (一) 甘草水煎劑及市售濃縮散劑中甘草酸及甘草次酸之含量分析及比較

##### 1、藥材來源

由全省各地隨機採購之甲級、乙級、丙級與丁級藥材，以剪刀裁成 2.5 - 3.0 mm × 2.5 - 3.0 mm 之長條。

濃縮市場品則由各經銷處購得六家藥廠之產品。

##### 2、分析檢品之製備

###### (1) 甘草藥材水煎劑檢品之製備

精確秤取藥材 2 g，加入 80 ml 水，浸泡 30 分鐘使之浸潤後，於放置石綿心網之瓦斯爐上直火加熱至沸騰，沸騰後轉文火繼續加熱至體積略少於 20 ml，趁熱過濾並定容至 20 ml，放冷後置於 -30 冷凍貯存備用。

###### (2) 濃縮製劑市場品檢品之製備

精確秤取濃縮中藥粉末 100 mg，加入 70 % 之甲醇溶液 50 ml，以超音波震盪器震盪 3 小時，再以濾紙過濾後，用 70 % 之甲醇溶液定容至 50 ml，於 -30 冷凍貯存備用。

將過濾後之濾紙浸於原萃取容器，同上述之法萃取第二次，定容至 50 ml，濾液置於 -30 冷凍貯存備用。

##### 3、高效液相層析之分析條件

分析管柱：LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e column

( 4.0 × 250 mm, 5 μm, Merck )

保護層析管柱： LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e column  
( 5  $\mu$ m, Merck )

( 1 ) 甘草酸之分析條件

移動相： 氘甲烷與 1 % CH<sub>3</sub>COOH ( 36 : 64, v/v )

流速： 1.0 ml/min

檢測波長： 248 nm

內標準： propylparaben ( 6.0  $\mu$ g/ml )

( 2 ) 甘草次酸之分析條件

移動相： 氘甲烷與 1 % CH<sub>3</sub>COOH ( 67 : 33, v/v )

流速： 1.0 ml/min

檢測波長： 248 nm

內標準： 2-methylantraquinone ( 5  $\mu$ g/ml )

4、檢量線之繪製

( 1 ) 甘草酸檢量線之繪製

精確稱取甘草酸 10.0 mg , 以甲醇定容至 10.0 ml 為貯存溶液( 1.0 mg/ml )。取適量貯存溶液用甲醇稀釋 , 使甘草酸之標準溶液濃度分別為 5.0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 及 400.0  $\mu$ g/ml。各取標準溶液 200  $\mu$ l 分別加入等體積之內標準甲醇溶液 ( propylparaben, 12.0  $\mu$ g/ml )。經 HPLC 分析所得之甘草酸與內標準之波峰面積比值 , 與甘草酸之濃度進行線性迴歸 , 求得檢量線之方程式。

( 2 ) 甘草次酸檢量線之繪製

精確稱取甘草次酸 10 mg , 以甲醇定容至 10 ml 為貯存溶液 ( 1 mg/ml )。取適量貯存溶液用甲醇稀釋 , 使甘草次酸之標準溶液濃度分別為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 80.0  $\mu$ g/ml 。各取標準溶液 200  $\mu$ l 分別

加入等體積之內標準甲醇溶液 (2-methylanthraquinone, 10 µg/ml)。所得之甘草次酸與內標準之波峰面積比值，與甘草次酸之各已知濃度進行線性迴歸，求得檢量線之方程式。

## 5、藥材之水煎劑中甘草酸及甘草次酸之定量

### (1) 藥材水煎劑中甘草酸之定量

各檢品解凍後，取 300 µl 加甲醇 700 µl 震盪混合，經 9860 × g 高速離心 15 分鐘，分離上清液與沈澱。取上清液 200 µl 加 1000 µl 之甲醇稀釋，取 200 µl 加等體積之內標準甲醇溶液 (propylparaben, 12 µg/ml)，混合後以微孔濾膜 (0.45 µm) 過濾後備用。取 20 µl 注入 HPLC 分析，以檢品中甘草酸與內標準之波峰面積比值，代入檢量線之方程式，求出檢品中甘草酸之含量。

### (2) 藥材水煎劑中甘草次酸之定量

各檢品解凍後，取 300 µl 加甲醇 700 µl 震盪混合，經 9860 × g 高速離心 15 分鐘，分離上清液與沈澱。取上清液 1000 µl 加 200 µl 之甲醇稀釋，取 200 µl 加等體積之內標準甲醇溶液 (2-methylanthraquinone, 10 µg/ml)，混合後以微孔濾膜 (0.45 µm) 過濾後備用。取 20 µl 注入 HPLC 分析，以檢品中甘草酸與內標準之波峰面積比值，代入檢量線之方程式，求出檢品中甘草次酸之含量。

## 6、濃縮製劑中甘草酸及甘草次酸之定量

### (1) 濃縮製劑中甘草酸之定量

檢品解凍後，取 200 µl 加 200 µl 之甲醇稀釋，經 9860 × g 高速離心 15 分鐘，再取上清液 200 µl

加內標準甲醇溶液 ( propylparaben, 12.0  $\mu\text{g/ml}$  ), 混合後以微孔濾膜 ( 0.45  $\mu\text{m}$  ) 過濾後備用。取 20  $\mu\text{l}$  注入 HPLC 分析, 以檢品中甘草酸與內標準之波峰面積比值, 代入檢量線之方程式, 求出檢品中甘草酸之含量。

#### (2) 濃縮製劑中甘草次酸之定量

檢品解凍後, 取 200  $\mu\text{l}$  加甲醇 200  $\mu\text{l}$  稀釋, 經 9860  $\times\text{g}$  高速離心 15 分鐘, 再取上清液 200  $\mu\text{l}$  加內標準甲醇溶液 ( 2-methylanthraquinone, 10  $\mu\text{g/ml}$  ), 混合後以微孔濾膜 ( 0.45  $\mu\text{m}$  ) 過濾後備用。取 20  $\mu\text{l}$  注入 HPLC 分析, 以檢品中甘草次酸與內標準之波峰面積比值, 代入檢量線之方程式, 求出檢品中甘草次酸之含量。

### 7、分析系統及方法之確效

#### (1) 精密度 ( precision )

將不同濃度之標準溶液, 分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間進行分析, 並以獲得之線性迴歸方程式求得每次實驗濃度。以三次同日內及三次異日間實驗濃度分別求其平均值 ( mean )、標準偏差 ( standard deviation, S.D. ) 及變異係數 ( coefficient of variation, C.V. )。

#### (2) 準確度 ( accuracy )

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

#### (3) 回收率 ( recovery )

取經測定過甘草酸含量之甘草水煎劑檢品 100  $\mu\text{l}$  各三份, 分別加入已知濃度的甘草酸標準品溶液 100  $\mu\text{l}$ , 再加入內標準甲醇溶液 ( propylparaben, 12.0  $\mu\text{g/ml}$  ), 混合後以微孔濾膜 ( 0.45  $\mu\text{m}$  ) 過濾。取 20  $\mu\text{l}$

注入 HPLC 分析，以檢品中甘草酸與內標準之波峰面積比值，代入檢量線之方程式，求出檢品中甘草酸之含量，將換算所得之增加量除以已知的標準品添加量即為回收率。

## (二) 甘草水煎劑與炙甘草水煎劑中甘草酸之含量分析及比較

### 1、藥材來源

甘草藥材購自台中市五常街欣隆中藥行，並自行以剪刀裁成  $2.5 - 3.0 \text{ mm} \times 2.5 - 3.0 \text{ mm}$  之長條備用。

### 2、分析檢品之製備

#### (1) 甘草之蜜炙

原藥材 40 g 以蜂蜜水 ( 蜂蜜 10 g 溶於 120 ml 水中 )，浸泡 30 分鐘使之浸潤後，翻炒至水分收乾，放冷備用。

#### (2) 分析檢品之萃取

精確稱取原藥材 2 g 及相當於原藥材 2 g 之蜜炙藥材各八份，每份加入 100 ml 水，於室溫中靜置 20 分鐘後，同時置於震盪水浴中加熱震盪至 96℃，再持續加熱震盪 1 小時後，趁熱過濾，並精確定容至 100 ml，置於 -30℃ 冷凍貯存備用。

高效液相層析之分析條件、檢量線之繪製及水煎劑中甘草酸之定量如一 (一) 之 3、4、5 所述。

### 3、統計方法

甘草與蜜炙甘草水煎劑中溶出之甘草酸的含量，以 unpaired Student's t-test 統計分析其間差異。

## 二、甘草及其成分甘草酸與甘草次酸之動力學

### (一) 甘草酸與甘草次酸於家兔體內動力學之比較

#### 1、動物口服溶液劑之製備

##### (1) 甘草酸溶液之製備

以水為溶媒，配製成 10.0 mg/ml 之甘草酸溶液。

##### (2) 甘草次酸溶液之製備

以 tetraglycol 為溶媒，配製成 42.0 mg/ml 之甘草次酸溶液。

#### 2、血清中甘草酸與甘草次酸之定量

##### (1) 血清標準溶液之製備及檢量線之繪製

###### I、甘草酸血清標準溶液之製備及檢量線之繪製

精確稱取甘草酸，以甲醇溶解並稀釋定容，製備成 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 及 500.0  $\mu\text{g/ml}$  六種濃度之標準溶液，各取 20  $\mu\text{l}$  甘草酸標準溶液，加入 180  $\mu\text{l}$  空白血清中，製備成血清標準溶液，濃度分別為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0 及 50.0  $\mu\text{g/ml}$ 。

200  $\mu\text{l}$  血清標準溶液，加入 800  $\mu\text{l}$  甲醇（含 0.12  $\mu\text{g/ml}$  propylparaben 為內標準），以試管震盪器震盪 20 秒後，於 9860  $\times g$  高速離心 15 分鐘，取上清液，用氮氣吹乾後，加 50  $\mu\text{l}$  移動相溶解，取 20  $\mu\text{l}$  注入 HPLC 分析，以所得之甘草酸與內標準之波峰面積比值，與甘草酸之濃度進行線性迴歸，求得檢量線之方程式。

###### II、甘草次酸血清標準溶液之製備及檢量線之繪製

精確稱取甘草次酸，以甲醇溶解並稀釋定容，製備成 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 50.0  $\mu\text{g/ml}$  六種濃度之標準溶液，各取 30  $\mu\text{l}$  甘草次酸標準溶

液，加入 270  $\mu$ l 空白血清中，製備成血清標準溶液，濃度分別為 0.1 0.2 0.5 1.0 2.0 4.0 及 5.0  $\mu$ g/ml。

300  $\mu$ l 血清標準溶液，加入 100  $\mu$ l 0.1 N 鹽酸，震盪 20 秒，再加入 400  $\mu$ l 乙酸乙酯（含 0.1  $\mu$ g/ml 2-methylantraquinone 為內標準），震盪 20 秒後，於 9860  $\times$  g 高速離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加 50.0  $\mu$ l 氬甲烷溶解，取 20  $\mu$ l 注入 HPLC 分析，以所得之甘草次酸與內標準之波峰面積比值，與甘草次酸之濃度進行線性迴歸，求得檢量線之方程式。

## (2) 高效液相層析之分析條件

分析管柱： LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e column  
( 4.0  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m, Merck )

保護層析管柱： LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e column  
( 5  $\mu$ m, Merck )

### I、甘草酸之分析條件

移動相：氬甲烷與 1 % CH<sub>3</sub>COOH ( 36 : 64, v/v )

流速： 1.0 ml/min

檢測波長： 248 nm

內標準： propylparaben

### II、甘草次酸之分析條件

移動相：氬甲烷與水 1 % CH<sub>3</sub>COOH ( 67 : 33, v/v )

流速： 1.0 ml/min

檢測波長： 248 nm

內標準： 2-methylantraquinone

## 3、分析系統及方法之確效

### (1) 精密度 ( precision )

將已加入內標準之標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行分析，並以獲得之線性迴歸方程式求得每次實驗濃度。以三次同日內及三次異日間實驗濃度分別求其平均值 ( mean )、標準偏差 ( standard deviation, S.D. ) 及變異係數 ( coefficient of variation, C.V. )。

(2) 準確度 ( accuracy )

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

(3) 靈敏度 ( sensitivity )

將甘草酸及甘草次酸標準溶液濃度一再稀釋，直到其波峰為其雜訊三倍之濃度為偵測極限 ( Limit of detection, LOD )。

(4) 回收率 ( recovery )

將甘草酸及甘草次酸標準溶液，分別加入空白血清及水中，分別製備 5.0、10.0、50.0  $\mu\text{g/ml}$  及 0.5、1.0、4.0  $\mu\text{g/ml}$  等四種濃度之溶液，檢品之處理同 (一) 之 2 所述，經 HPLC 定量各溶液中甘草酸及甘草次酸之濃度，將血清中測得濃度除以對應濃度水溶液中所測得之濃度，即為回收率。

#### 4、動物

實驗動物為雄性紐西蘭白兔，體重介於 2.1 – 2.8 公斤，實驗前先禁食 24 小時，給藥方式採平行設計。經由胃管分別給予甘草酸 ( 150 mg/kg ) 或等莫耳之甘草次酸 ( 84 mg/kg )。

口服甘草酸者，給藥前及給藥後 1、2、4、6、8、10、12、24、36 及 48 小時從右耳靜脈採血。口服甘草次酸者，

給藥前及給藥後 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 小時從右耳靜脈採血。將血液檢品以  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘，取上層血清，並貯存於  $-30$  ，俟後分析。

## 5、血清檢品之前處理

### (1) 供測定甘草酸血清檢品之前處理

取  $200 \mu\text{l}$  血清檢品，加入  $800 \mu\text{l}$  甲醇（含  $0.12 \mu\text{g/ml}$  propylparaben 為內標準），以試管震盪器震盪 20 秒後，於  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘，取上清液，用氮氣吹乾後，加  $50 \mu\text{l}$  移動相溶解，取  $20 \mu\text{l}$  供 HPLC 分析。

### (2) 供測定甘草次酸血清檢品之前處理

取  $300 \mu\text{l}$  血清檢品，加入  $100 \mu\text{l}$   $0.1 \text{ N}$  鹽酸，震盪 20 秒，再加入  $400 \mu\text{l}$  乙酸乙酯（含  $0.1 \mu\text{g/ml}$  2-methylantraquinone 為內標準），以試管震盪器震盪 20 秒後，於  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加  $50 \mu\text{l}$  氰甲烷溶解，取  $20 \mu\text{l}$  供 HPLC 分析。

## 6、數據分析

以 WINNONLIN（version 1.1, SCI Software）計算  $\text{AUC}_{0-t}$ ，並以 paired Student's  $t$ -test 分析兩組數據間之差異。

## (二) 甘草酸與甘草水煎劑中甘草酸生體可用率之比較

### 1、動物口服溶液劑之製備

#### (1) 甘草酸溶液之製備

以水為溶媒，配製成 10 mg/ml 之甘草酸溶液。

#### (2) 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，置於 -30℃ 冷凍貯存備用。

### 2、高效液相層析之分析條件

分析管柱： LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e column

( 4.0 × 250 mm, 5 μm, Merck )

保護層析管柱： LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e column

( 5 μm, Merck )

#### (1) 甘草酸之分析條件

移動相： 氫甲烷與 1 % CH<sub>3</sub>COOH ( 36 : 64, v/v )

流速： 1.0 ml/min

檢測波長： 248 nm

內標準： propylparaben ( 50 μg/ml )

#### (2) 甘草次酸之分析條件

移動相： 氫甲烷與 1 % CH<sub>3</sub>COOH ( 67 : 33, v/v )

流速： 1.0 ml/min

檢測波長： 248 nm

內標準： 2-methylantraquinone ( 5 μg/ml )

### 3、檢量線之繪製

#### (1) 甘草酸檢量線之繪製

精確稱取甘草酸 20.0 mg，以甲醇定容至 10.0 ml 為貯存溶液( 2.0 mg/ml)。取適量貯存溶液用甲醇稀釋，使甘草酸之標準溶液濃度分別為 100、200、400、500、1000、1600 及 2000  $\mu\text{g/ml}$ 。各取標準溶液 200  $\mu\text{l}$  分別加入等體積之內標準甲醇溶液 ( propylparaben, 100  $\mu\text{g/ml}$ )。經 HPLC 分析所得之甘草酸與內標準之波峰面積比值，與甘草酸之濃度進行線性迴歸，求得檢量線之方程式。

#### (2) 甘草次酸檢量線之繪製

精確稱取甘草次酸 10 mg，以甲醇定容至 10 ml 為貯存溶液 ( 1 mg/ml)。取適量貯存溶液用甲醇稀釋，使甘草次酸之標準溶液濃度分別為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 80.0  $\mu\text{g/ml}$ 。各取標準溶液 200  $\mu\text{l}$  分別加入等體積之內標準甲醇溶液 ( 2-methylanthraquinone, 10  $\mu\text{g/ml}$ )。所得之甘草次酸與內標準之波峰面積比值，與甘草次酸之各已知濃度進行線性迴歸，求得檢量線之方程式。

### 4、藥材之水煎劑濃縮液中甘草酸及甘草次酸之定量

#### (1) 藥材水煎劑中甘草酸之定量

各檢品解凍後，取 300  $\mu\text{l}$  加甲醇 700  $\mu\text{l}$  震盪混合，經 9860  $\times\text{g}$  高速離心 15 分鐘，分離上清液與沈澱。取上清液 200  $\mu\text{l}$  加 1000  $\mu\text{l}$  之甲醇稀釋，取 200  $\mu\text{l}$  加等體積之內標準甲醇溶液 ( propylparaben, 100  $\mu\text{g/ml}$ )，混合後以微孔濾膜 ( 0.45  $\mu\text{m}$ ) 過濾後備用。取 20  $\mu\text{l}$  注入 HPLC 分析，以檢品中甘草酸與內標準之波峰面積比值，代入檢量線之方程式，求出檢品中甘草酸之含量。

## (2) 藥材水煎劑中甘草次酸之定量

各檢品解凍後，取 300  $\mu$ l 加甲醇 700  $\mu$ l 震盪混合，經 9860  $\times$  g 高速離心 15 分鐘，分離上清液與沈澱。取上清液 1000  $\mu$ l 加 200  $\mu$ l 之甲醇稀釋，取 200  $\mu$ l 加等體積之內標準甲醇溶液 (2-methylanthraquinone, 10  $\mu$ g/ml)，混合後以微孔濾膜 (0.45  $\mu$ m) 過濾後備用。取 20  $\mu$ l 注入 HPLC 分析，以檢品中甘草酸與內標準之波峰面積比值，代入檢量線之方程式，求出檢品中甘草次酸之含量。

## 5、分析系統及方法之確效

### (1) 精密度 (precision)

將不同濃度之標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間進行分析，並以獲得之線性迴歸方程式求得每次實驗濃度。以三次同日內及三次異日間實驗濃度分別求其平均值 (mean)、標準偏差 (standard deviation, S.D.) 及變異係數 (coefficient of variation, C.V.)。

### (2) 準確度 (accuracy)

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

### (3) 回收率 (recovery)

取經測定過含量之甘草水煎劑檢品 100  $\mu$ l 各三份，分別加入已知濃度之標準品溶液 100  $\mu$ l，再加入內標準甲醇溶液，混合後以微孔濾膜 (0.45  $\mu$ m) 過濾後備用。取 20  $\mu$ l 注入 HPLC 分析，以檢品中波峰面積比值，代入檢量線之方程式，求出含量，再將換算所得之增加量除以已知的標準品添加量即為回收率。

## 6、動物

實驗動物為雄性紐西蘭白兔，體重介於 2.7 – 3.1 公斤，實驗前先禁食 24 小時，給藥方式採隨機交叉設計。經由胃管分別給予甘草酸 300 mg/kg 或甘草水煎劑（相當於甘草酸 300 mg/kg），兩次給藥之間隔時間至少一週。

口服給藥前及給藥後 1、2、4、6、8、10、12、24、36 及 48 小時從右耳靜脈採血。將血液檢品以  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘，取上層血清，並貯存於  $-30$ ，俟後分析。

血清檢品之前處理及血清標準溶液之製備如二（一）之 2 所述。

## 7、數據分析

以 WINNONLIN( version 1.1, SCI Software )計算  $AUC_{0-t}$ ，並以 Wilcoxon Signed-Rank Test 分析其間之差異。

### (三) 甘草水煎劑及濃縮散劑中甘草酸生體可用率之比較

#### 1、動物口服藥物之製備

##### (1) 甘草水煎劑之製備

精確秤取原藥材 300 g, 加入 121 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, 置於 -30 冷凍貯存備用。

##### (2) 濃縮散劑懸液之製備

選用甘草酸含量最高之濃縮散劑市場品, 分別精確秤取每隻家兔所需之量 (相當於甘草酸 300 mg/kg 與 600 mg/kg), 加水製成懸液。

#### 2、動物

實驗動物為雄性紐西蘭白兔, 體重介於 2.2 – 3.2 公斤, 實驗前先禁食 24 小時, 給藥方式採隨機交叉設計。經由胃管分別給予甘草水煎劑 (相當於甘草酸 300 mg/kg) 或濃縮製劑懸浮液 (相當於甘草酸 300 mg/kg 與 600 mg/kg), 兩次給藥之間隔時間至少一週。

口服給藥前及給藥後 1、2、4、6、8、10、12、24、36 及 48 小時從右耳靜脈採血。將血液檢品以  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘, 並貯存於 -30, 俟後分析。

血清檢品之前處理及血清標準溶液之製備如二 (一) 之 2 所述。

#### 3、數據分析

以 WINNONLIN (version 1.1, SCI Software) 計算  $AUC_{0-t}$ , 並以 Wilcoxon Signed-Rank Test 分析其間之差異。

### 三、蜂蜜對甘草及其成分甘草酸於家兔體內動力學之影響

#### (一) 蜂蜜及其成分對甘草酸動力學之影響

##### 1、動物口服溶液劑之製備

###### (1) 甘草酸溶液之製備

以水為溶媒，配製成 10.0 mg/ml 之甘草酸溶液。

###### (2) 蜂蜜溶液之製備

以水為溶媒，配製成 1.0 g/ml 之蜂蜜溶液。

###### (3) 糖類溶液之製備

以水為溶媒，配製成 0.5 g/ml 之葡萄糖或果糖溶液。

###### (4) 甲基糠醛溶液之製備

以水為溶媒，配製成 0.08 mg/ml 之 甲基糠醛溶液。

##### 2、動物

實驗動物為雄性紐西蘭白兔，體重介於 2–3 公斤，實驗前先禁食 24 小時，給藥方式採隨機交叉設計。每隻白兔經由胃管分別給予水 (5 ml/隻)、蜂蜜、葡萄糖、果糖溶液 (5 g/隻) 或 甲基糠醛溶液 (1 mg/隻) 後，立刻給予甘草酸 (150 mg/kg)，兩次給藥之間隔時間至少一週。

口服給藥前及給藥後 1、2、4、6、8、10、12、24、36 及 48 小時從右耳靜脈採血。將血液檢品以 9860 × g 高速離心 15 分鐘，取上層血清，並貯存於 -30℃，俟後分析。

血清檢品之前處理及血清標準溶液之製備如二 (一) 之 2 所述。

##### 3、數據分析

以 WINNONLIN (version 1.1, SCI Software) 計算 AUC<sub>0-t</sub>，並以 ANOVA 分析各組與單服甘草酸之差異。

## (二) 炙甘草水煎劑與甘草水煎劑中甘草酸動力學之比較

### 1、甘草水煎劑與炙甘草水煎劑之製備

#### (1) 炙甘草之製備

炙甘草係取原藥材 320 g 與蜂蜜水( 蜂蜜 80 g 以 160 ml 水溶解 ), 浸泡 30 分鐘使之浸潤後, 置於平底鍋內以直火加熱, 翻炒至水分收乾, 放冷備用。

#### (2) 水煎劑之製備

精秤甘草原藥材 300 g 及相當於原藥材 300 g 之炙甘草, 各加入 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, 並精確定容至 500 ml, 經 HPLC 測定其甘草酸及甘草次酸之含量後, 置於  $-30^{\circ}\text{C}$  冷凍貯存備用。

### 2、動物

實驗動物為雄性紐西蘭白兔, 體重介於 2–3 公斤, 實驗前先禁食 24 小時, 給藥方式採隨機交叉設計。經由胃管分別給予甘草水煎劑 ( 相當於甘草酸 7 g/kg ) 或炙甘草水煎劑 ( 相當於甘草酸 7 g/kg ), 兩次給藥之間隔時間至少一週。

口服給藥前及給藥後 1、2、4、6、8、10、12、24、36 及 48 小時從右耳靜脈採血。將血液檢品以  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘, 並貯存於  $-30^{\circ}\text{C}$ , 俟後分析。

血清檢品之前處理及血清標準溶液之製備如二 (一) 之 2 所述。

### 3、數據分析

以 WINNONLIN ( version 1.1, SCI Software ) 計算  $\text{AUC}_{0-t}$ , 並以 paired Student's t – test 分析兩組數據間之差異。

### (三) 蜂蜜成分對甘草水煎劑之甘草酸動力學之影響

#### 1、動物口服藥物溶液之製備

##### (1) 甘草水煎劑之製備

秤取甘草原藥材 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, 經 HPLC 測定其甘草酸及甘草次酸之含量後, 趁熱過濾, 並精確定容至 500 ml, 置於  $-30^{\circ}\text{C}$  冷凍貯存備用。

##### (2) 糖類口服溶液之製備

以水為溶媒, 配置成 0.5 g/ml 之葡萄糖或果糖溶液。

#### 2、動物

實驗動物為雄性紐西蘭白兔, 體重介於 2 – 3 公斤, 實驗前先禁食 24 小時, 給藥方式採隨機交叉設計。經由胃管分別給予水 (10 ml/隻) 或糖類口服溶液 (5 g/隻) 後, 再給予甘草水煎劑 (相當於甘草酸 300 mg/kg), 兩次不同給藥之間隔時間至少一週。

口服給藥前及給藥後 1、2、4、6、8、10、12、24、36 及 48 小時從右耳靜脈採血。將血液檢品以  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘, 取上層血清, 並貯存於  $-30^{\circ}\text{C}$ , 俟後分析。

血清檢品之前處理及血清標準溶液之製備如二 (一) 之 2 所述。

#### 3、數據分析

以 WINNONLIN (version 1.1, SCI Software) 計算  $\text{AUC}_{0-t}$ , 並以 ANOVA 分析各組數據間之差異。

#### 四、家兔糞便細菌對甘草水煎劑、甘草酸及甘草次酸的作用

##### (一) 甘草酸及甘草水煎劑中甘草酸受糞便細菌作用之比較

###### 1、家兔糞便懸浮液之製備

取未進行實驗之家兔所排遺的新鮮糞便 60 g，加入人工腸液 180 ml，以果汁機打碎混勻，紗布過濾後備用。

###### 2、藥物溶液之製備

###### (1) 甘草酸溶液之製備

以 methanol/water (1 : 1, v/v) 為溶媒，配製成 1 mg/ml 之甘草酸溶液。

###### (2) 甘草水煎劑之製備

甘草水煎劑之製備如二(三)之 1 所述，經 HPLC 測定其甘草酸之含量。

###### 3、家兔糞便標準溶液之製備及檢量線之繪製

###### (1) 家兔糞便標準溶液之製備

精確稱取甘草次酸標準品，以甲醇溶解並稀釋定容，製備成 62.5、125.0、250.0、500.0、1000.0 及 2000.0  $\mu\text{g/ml}$  六種濃度之標準溶液。

精確稱取 3-去氫甘草次酸標準品，以甲醇溶解並稀釋定容，製備成 31.2、62.5、125.0、250.0、500.0 及 1000.0  $\mu\text{g/ml}$  六種濃度之標準溶液。

取 35  $\mu\text{l}$  甘草次酸標準溶液及 35  $\mu\text{l}$  3-去氫甘草次酸標準溶液，加入 70  $\mu\text{l}$  人工腸液及 560  $\mu\text{l}$  家兔糞便懸浮液，製備成甘草次酸濃度為 6.2、12.5、25.0、50.0、100.0 及 200.0  $\mu\text{g/ml}$ ，而 3-去氫甘草次酸濃度分別為 3.1、6.2、12.5、25.0、50.0 及 100.0  $\mu\text{g/ml}$  之家兔糞便標準溶液。

## (2) 檢量線之繪製

家兔糞便標準溶液各取 700  $\mu\text{l}$ ，加入 50  $\mu\text{l}$  0.1 N 鹽酸，震盪 20 秒，再加入 750  $\mu\text{l}$  乙酸乙酯（含 2.5  $\mu\text{g/ml}$  2-methylanthraquinone 為內標準），震盪 20 秒後，以  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加 100  $\mu\text{l}$  氰甲烷溶解，取 20  $\mu\text{l}$  供 HPLC 分析，所得之甘草次酸及 3-去氫甘草次酸與內標準之波峰面積比值分別與其濃度進行線性迴歸，分別求得檢量線方程式。

## 4、高效液相層析之分析條件

分析管柱： LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e column  
( 4.0  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Merck )

保護層析管柱： LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18e column  
( 5  $\mu\text{m}$ , Merck )

移動相： 氰甲烷與 1 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ( 67 : 33, v/v )

流速： 1.0 ml/min

檢測波長： 248 nm

內標準： 2-methylanthraquinone

## 5、分析系統及方法之確效

### (1) 精密度 (precision)

將已加入內標準之標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行分析，並以獲得之線性迴歸方程式求得每次實驗濃度。以三次同日內及三次異日間實驗濃度分別求其平均值 ( mean )、標準偏差 ( standard deviation, S.D. ) 及變異係數 ( coefficient of variation, C.V. )。

(2) 準確度 (accuracy)

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

(3) 靈敏度 (sensitivity)

將甘草次酸及 3-去氫甘草次酸標準溶液濃度一再稀釋，直到其波峰為其雜訊三倍之濃度為偵測極限 (Limit of detection, LOD)。

6、分析樣品之製備與反應

取 7.0 ml 濃度為 1.0 mg/ml 之甘草酸標準溶液或含有 1.0 mg/ml 甘草酸之水煎劑，加入家兔糞便懸浮液 56.0 ml，以試管震盪器混合均勻後，用微量分注器分別取 630  $\mu$ l 之混合液置於試管中，並分別加入 70  $\mu$ l 人工腸液，拴上血清塞並用針筒抽出空氣，置於 37  $^{\circ}$ C 震盪水浴槽中反應，並於 1、2、4、8、12 及 24 小時於每組各取樣 3 管，立即貯存於 -30  $^{\circ}$ C 冷凍櫃中停止反應，俟後分析。

7、檢品分析

上述家兔糞便懸浮液檢品解凍後，加入 50  $\mu$ l 0.1 N 鹽酸，震盪 20 秒，再加入 750  $\mu$ l 乙酸乙酯 (含 2.5  $\mu$ g/ml 2-methylantraquinone 為內標準)，利用試管震盪器震盪 20 秒後，以 9860  $\times$  g 高速離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加 100  $\mu$ l 氬甲烷溶解，取 20  $\mu$ l 供 HPLC 分析。

8、數據分析

本節所得之實驗數據以 unpaired Student's t-test 統計分析兩組之差異，以  $p < 0.05$  視為具統計上之意義。

## (二) 蜂蜜及其成分對甘草酸及甘草次酸受糞便細菌作用之影響

### 1、家兔糞便懸浮液之製備

取未進行實驗之家兔所排遺之新鮮糞便 60 g，加入人工腸液 180 ml，以果汁機打碎混勻，紗布過濾後備用。

### 2、藥物溶液之製備

#### (1) 甘草酸溶液之製備

以 methanol/water (1:1, v/v) 為溶媒，配製成 1.0 mg/ml 之甘草酸溶液。

#### (2) 蜂蜜及糖類溶液之製備

以人工腸液為溶媒，配製成 100 mg/ml 之蜂蜜、葡萄糖及果糖溶液。

#### (3) 甲基糠醛液之製備

以人工腸液為溶媒，配製成 0.02 mg/ml 之 甲基糠醛溶液。

### 3、分析樣品之製備與反應

取 7.0 ml 濃度為 1.0 mg/ml 之甘草酸標準溶液，加入家兔糞便懸浮液 56.0 ml，以試管震盪器混合均勻後，用微量分注器分別取 630  $\mu$ l 之混合液置於試管中，分成五組，每組分別加入 70  $\mu$ l 人工腸液或蜂蜜、果糖、葡萄糖 (100 mg/ml，分別溶於人工腸液中)，拴上血清塞並用針筒抽出空氣，置於 37  $^{\circ}$ C 震盪水浴槽中反應，並於 1、2、4、8、12 及 24 小時於每組各取樣 3 管，立即貯存於 -30  $^{\circ}$ C 冷凍櫃中停止反應，俟後分析。

糞便檢品之前處理及糞便標準溶液之製備按四 (一) 之 3 所述。

#### 4、檢品分析

上述家兔糞便懸浮液檢品解凍後，加入 50  $\mu$ l 0.1 N 鹽酸，震盪 20 秒，再加入 750  $\mu$ l 乙酸乙酯（含 2.5  $\mu$ g/ml 2-methylantraquinone 為內標準），利用試管震盪器震盪 20 秒後，以 9860  $\times$  g 高速離心 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，加 100  $\mu$ l 氘甲烷溶解，取 20  $\mu$ l 供 HPLC 分析。

#### 5、數據分析

本節所得之實驗數據以 unpaired Student's t-test 統計分析各組與添加人工腸液組數據間之差異，以  $p < 0.05$  視為具統計上之意義。

### (三) 蜂蜜及其成分對甘草水煎劑中之甘草酸受糞便細菌作用之影響

#### 1、家兔糞便懸浮液之製備

取未進行實驗之家兔排遺之新鮮糞便 60 g，加入人工腸液 180 ml 中，以果汁機打碎混勻，紗布過濾後備用。

#### 2、溶液之製備

##### (1) 甘草水煎劑之製備

甘草水煎劑之製備如二(三)之 1 所述，經 HPLC 測定其甘草酸之含量。

##### (2) 蜂蜜及糖類溶液之製備

以人工腸液為溶媒，配製成 100 mg/ml 之蜂蜜，50 mg/ml 之葡萄糖及果糖溶液。

#### 3、分析樣品之製備與反應

取 7.0 ml 含有 1.0 mg/ml 甘草酸之甘草水煎劑，加入家兔糞便懸浮液 56.0 ml，以試管震盪器混合均勻後，用微量分注器分別取 630  $\mu$ l 之混合液置於試管中，分成四組，每組分別加入 70  $\mu$ l 之人工腸液或蜂蜜、葡萄糖及果糖溶液，拴上血清塞並用針筒抽出空氣，置於 37 震盪水浴槽中反應，並於 1、2、4、8、12 及 24 小時於每組各取樣 3 管，立即貯存於 -30 冷凍櫃中停止反應，俟後分析。

糞便檢品之前處理及糞便標準溶液之製備按四(一)之 3 所述。

#### 4、檢品分析

上述家兔糞便懸浮液檢品解凍後，加入 50  $\mu$ l 0.1 N 鹽酸，震盪 20 秒，再加入 750  $\mu$ l 乙酸乙酯(含 2.5  $\mu$ g/ml

2-methylantraquinone 為內標準),利用試管震盪器震盪 20 秒後,以  $9860 \times g$  高速離心 15 分鐘,取乙酸乙酯層,用氮氣吹乾後,加  $100 \mu\text{l}$  氘甲烷溶解,取  $20 \mu\text{l}$  供 HPLC 分析。

## 5、數據分析

本節所得之實驗數據以 unpaired Student's t-test 統計分析各組與添加人工腸液組數據間之差異,以  $p < 0.05$  視為具統計上之意義。