

第二節 實驗方法

一、大黃藥材基原鑑定

1. 外部形態鑑別

利用五官檢查法再配合立體顯微鏡觀察。

2. 切片組織圖之操作方法

利用徒手切片法將材料橫切 (Transverse Section T.S.)，切取近 10 μm 之薄片檢體置於載玻片上，先以 chloral hydrate solution 清除細胞內含物後，滴加 phloroglucinol solution 與 hydrochloric acid 進行木化反應，再以 glycerin-water (1:1) 混合溶液將檢體封鎖，蓋上蓋玻片，置於顯微鏡下，先用低倍鏡檢查其輪廓，再以高倍鏡觀察各個組織之特徵。

3. 結果分析

利用顯微攝影技術記錄觀察結果。

二、大黃之酒製^[75]

1. 生大黃

取北大黃乾燥根莖，揀去雜質，水洗，撈出，以濕毛巾包覆潤透 10 小時以上，切製成 3~5 mm 厚片，置於烘箱，以 40 烘乾至恆重。

2. 熟大黃

取生大黃片，加黃酒拌勻，每 100 g 大黃片，用黃酒 30 g，悶透至酒吸盡為度，置於竹製蒸籠中，加熱蒸透至內外均呈黑色，置於烘箱，以 40 烘乾至恆重，取出放涼。

三、生大黃與熟大黃水煎劑層析指紋圖譜之建立

1. 生大黃與熟大黃水煎劑之製備

分別稱取生大黃與熟大黃藥材各 5 克，各加入 100 mL 水，於室溫下浸泡 15 分鐘使組織潤透，置於有石棉網的瓦斯爐上，直火加熱，沸騰後以小火煎煮至體積略少於 50 mL，趁熱過濾，待冷卻後，再加水至 50 mL。

2. 水煎劑之酸水解

取 25 mg 之抗壞血酸粉末於棕色磨砂玻璃試管中，加入大黃水煎劑 1 mL，再加入 1.2 N 鹽酸溶液 1 mL，塞以瓶蓋振盪均勻後，置於水浴鍋中以 80 加熱 6 小時後，取出、放冷。

3. 生大黃與熟大黃水煎劑指紋圖譜之建立

分別取生大黃與熟大黃水煎劑 300 μ L，各加入 700 μ L 甲醇溶液，於旋渦震盪器上混合均勻，以 9,860 g 離心 15 分鐘，取其上清液，經微孔過濾器過濾後，取 20 μ L 濾液注入 HPLC 分析。

4. 生大黃水煎劑酸水解前指紋圖譜之建立

取生大黃水煎劑 300 μ L，加入 1 mL 水及 700 μ L 甲醇溶液，於旋渦震盪器上混合均勻，以 9,860 g 離心 15 分鐘，取其上清液，經微孔過濾器過濾後，取 20 μ L 濾液注入 HPLC 分析。

5. 生大黃水煎劑酸水解後指紋圖譜之建立

取水解後生大黃水煎劑 300 μ L，加入 700 μ L 甲醇溶液，於旋渦震盪器上混合均勻，以 9,860 g 離心 15 分鐘，取其上清液，經微孔過濾器過濾後，取 20 μ L 濾液注入 HPLC 分析。

6. 高效液相層析之分析條件

層析管：COSMOSIL 5C18-AR ， 5 μ m ， 4.6 \times 250 m.m.

移動相：CH₃CN---A 0.1% H₃PO₄---B

梯度沖提時間表

Time	A	B
0	17	83
30	28	72
60	80	20
70	17	83

流 速：0.7 mL/min

檢測波長：220 nm ; 250 nm

四、生大黃與熟大黃水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及其配醣體之定量

(一)檢品及標準溶液之製備

1. 生大黃與熟大黃水煎劑

分別稱取生大黃與熟大黃藥材各 15 g，各加入 300 mL 水，於室溫下浸泡 15 分鐘使組織潤透後，置於墊有石棉網的瓦斯爐上，直火加熱，沸騰後以小火煎煮至體積略少於 30 mL，趁熱過濾，待冷卻後，再加水至 30 mL。

2. Aloe-emodin 標準溶液

稱取 aloe-emodin 5.0 mg，先以少量 DMSO 溶解後，再以甲醇定容至 10.0 mL，配製成濃度為 0.5 mg/mL 之貯存溶液。

3. Rhein 標準溶液

稱取 rhein 10.0 mg，先以少量 DMSO / tetraglycol 溶解後，再以甲醇定容至 20.0 mL，配製成濃度為 0.5 mg/mL 之貯存溶液。

4. Emodin 標準溶液

稱取 emodin 5.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 10.0 mL，配製成濃度為 0.5 mg/mL 之貯存溶液。

5. Chrysophanol 標準溶液

稱取 chrysophanol 5.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 10.0 mL，配製成濃度為 0.5 mg/mL 之貯存溶液。

6. 2-methylantraquinone 標準溶液

稱取 2-methylantraquinone 5.0 mg，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 10.0 mL，配製成濃度為 0.5 mg/mL 之貯存溶液。再取 5.0 mL 之貯存溶液，加甲醇定容至 50.0 mL，配製成濃度為 50.0

$\mu\text{g/mL}$ 之工作標準溶液。

7.1.2 N 鹽酸溶液

取濃鹽酸 11.4 mL，加水至 100 mL。

(二)生大黃與熟大黃水煎劑之酸水解

分別於 1 mL 之三種水煎劑中各加抗壞血酸粉末 25 mg (於棕色磨砂玻璃試管中)，再加入 1.2 N 鹽酸溶液 1 mL，塞以瓶蓋，振盪均勻後，置於水鍋中以 80 加熱 30 分鐘、2 小時、4 小時及 6 小時後，取出、放冷。

(三)高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

層析管：COSMOSIL 5C18-AR，5 μm ，4.6 \times 250 m.m.

移動相：CH₃CN---A 0.1% H₃PO₄---B

梯度沖提時間表

Time	A	B
0	50	50
10	60	40
15	85	15
20	85	15
25	50	50

流 速：0.9 mL/min

檢測波長：250 nm

(四)檢量線之繪製

分別取適量之 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 貯存溶液，加入適量之 2-methyanthraquinone 內標準甲醇溶液(0.05

mg/mL), 再以甲醇稀釋使 aloe-emodin 標準溶液之濃度為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 50.0 $\mu\text{g/mL}$, rhein 為 6.2、12.5、25.0、50.0、100.0、150.0 及 200.0 $\mu\text{g/mL}$, emodin 為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 50.0 $\mu\text{g/mL}$, chrysophanol 為 1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 50.0 $\mu\text{g/mL}$, 2-methylanthraquinone 為 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 。其中 20 μL 經 HPLC 分析後, 所得標準品與內標準之波峰面積比值, 與其各標準品之濃度進行直線迴歸, 求得各成分之檢量線方程式。

(五)分析系統及方法之確效

1. 精密度(Precision)

將不同濃度之 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 標準溶液, 於同日內晨、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析, 然後將所得波峰面積比值代入先前獲得的迴歸直線方程式, 求得每次的實測濃度值, 再分別求其平均值 (mean)、標準偏差 (standard deviation, S.D.)及變異係數(coefficient of variation, C.V.)。

2. 靈敏度(Sensitivity)

將 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 標準品濃度一再稀釋, 直至其波峰面積與雜訊面積之比值為 3 時之濃度為其偵測極限(LOD, Limit of detection)。

3. 準確度(Accuracy)

以三次同日內及三次異日間實測所得平均濃度與真正濃度間之相對誤差(relative error)表示之。

4. 回收率(Recovery)

取已測定 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 含量之大黃水煎劑檢品 1.5 mL 各三份，分別加入 1 mL 內標準甲醇溶液(2-methyanthraquinone, 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，再加入適量之三種已知濃度之標準品溶液，最後以甲醇定容至 10.0 mL，振盪混合均勻，高速離心 15 分鐘(9,860 g)，然後分別層析定量，將計算所得之增加量除以標準品之添加量以百分比表示即為回收率。

(六)定量分析

1. 水煎劑中非醣體之定量

取水煎劑 1.5 mL，加入 1.0 mL 內標準甲醇溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以甲醇定容至 10.0 mL，振盪混合均勻，離心 15 分鐘(9,860g)，取其上清液，經微孔過濾器(0.45 μm)過濾後，取 20 μL 濾液注入 HPLC 分析，以檢品中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 與內標準之波峰面積比值代入各成分之檢量線方程式，求出檢品中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之含量。

2. 水煎劑中配醣體之定量

水煎劑水解後定量出之 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 總含量減去水解前已定量出之非醣體 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 含量，即為其配醣體之含量。

五、生大黃與熟大黃水煎劑及 emodin 於大白鼠體內之動力學

(一) 建立大白鼠口服生大黃水煎劑後之血清層析指紋圖譜

1. 生大黃水煎劑之製備

稱取生大黃藥材 15 克，加入 30 mL 水，於室溫下浸泡 15 分鐘 使組織潤透，置於有石棉網的瓦斯爐上，直火加熱，沸騰後以小火煎煮至體積略少於 30 mL，趁熱過濾，待冷卻後，再以水至 30 mL。

2. 給藥方法與採血

(1) 動物

選用雄性 Sprague-Dawley 大白鼠一隻，體重 260g，實驗前先禁食 12 小時。

(2) 給藥

給予大黃水煎劑，依大白鼠體重，每公斤給予 5 克原生藥，即 10 mL/kg 水煎劑 (0.5 g/mL)，經胃管灌食給藥。

(3) 採血

於給藥後 30 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.8 mL。將血液檢品離心(9,860g)15 分鐘，取上層血清貯存於-30℃，俟後分析。

3. 指紋圖譜之建立

(1) 未經 解血清檢品之指紋圖譜

取 100 μ L 血清，加 300 μ L 甲醇(去蛋白)，振盪混合均勻，高速離心(9,860 g)15 分鐘，取上清液，用氮氣吹乾後，以 50 μ L 乙醇溶解，取 20 μ L 供 HPLC 分析。

(2) 經 解血清檢品之指紋圖譜

取 100 μ L 血清檢品溶液，加 β -glucuronidase 溶液 50 μ L(溶於 pH5.0 之緩衝溶液，含 β -glucuronidase 1,000 units/mL) 及 sulfatase

溶液 50 μL (溶於 pH5.0 之緩衝溶液, 含 sulfatase 1,000 units/mL), 於試管振盪器上充分混合後, 於 37 之恆溫水槽振盪 2 小時。加入 600 μL 甲醇, 振盪混合均勻, 高速離心(9,860 g)15 分鐘, 取上清液, 用氮氣吹乾後, 以 50 μL 乙醇溶解, 取 20 μL 供 HPLC 分析。

4. 高效液相層析之分析條件

層析管: COSMOSIL 5C18-AR, 5 μm , 4.6 \times 250 m.m.

移動相: CH_3CN ---A 0.1% H_3PO_4 ---B

梯度沖提時間表

Time	A	B
0	17	83
30	28	72
60	80	20
70	17	83

流 速: 0.7 mL/min

檢測波長: 220 nm ; 250 nm

(二) 生大黃與熟大黃水煎劑於大白鼠體內之動力學

1. 溶液之製備

(1) 生大黃與熟大黃水煎劑

分別稱取生大黃與熟大黃藥材各 15 g，各加入 300 mL 水，於室溫下浸泡 15 分鐘使組織浸潤後，直火加熱，沸騰後以小火煎煮至體積略少於 30 mL，趁熱過濾，待冷卻後，再加水至 30 mL，製備成濃度為 0.5 g/mL 之水煎劑。

(2) Aloe-emodin 標準溶液

稱取 1.0 mg 之 aloe-emodin，先以少量 DMSO 溶解後，再以甲醇定容至 1.0 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之貯存溶液。

(3) Rhein 標準溶液

稱取 5.0 mg 之 rhein，先以少量 DMSO / tetraglycol 溶解後，再以甲醇定容至 5.0 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之貯存溶液。

(4) Emodin 標準溶液

稱取 2.0 mg 之 emodin，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 1.0 mL，配製成濃度為 2.0 mg/mL 之貯存溶液。

(5) Chrysophanol 標準溶液

稱取 1.0 mg 之 chrysophanol，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 2.0 mL，配製成濃度為 0.5 mg/mL 之貯存溶液。

(6) 2-methylantraquinone 內標準溶液

稱取 1.0 mg 之 2-methylantraquinone，先以少量乙酸乙酯溶解後，再以乙酸乙酯定容至 1.0 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之貯存溶液。再以乙酸乙酯稀釋，配製成濃度為 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 之內標準工作溶液。

2. 血清標準溶液之製備

取適量貯存溶液,以甲醇稀釋使 aloe-emodin 標準溶液之濃度為 0.8、1.6、3.1、6.3、12.5、25.0、50.0 及 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rhein 為 7.8、15.6、31.3、62.5、125.0、250.0 及 500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, emodin 為 1.6、3.1、6.3、12.5、25.0、50.0 及 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, chrysophanol 為 0.8、1.6、3.1、6.3、12.5、25.0、50.0 及 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分別取 100 μL 上述標準溶液,加入 900 μL 空白血清,得 aloe-emodin 濃度為 0.08、0.16、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 及 10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rhein 為 0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00 及 50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, emodin 為 0.16、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 及 10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, chrysophanol 為 0.08、0.16、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 及 10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之血清標準溶液。

3. 檢量線之繪製

取 100 μL 血清標準品溶液,加 50 μL 緩衝溶液(pH 5.0)、50 μL 抗壞血酸溶液 (100 mg/mL),振盪混合均勻,再以 200 μL 含內標(0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2-methylanthraquinone)之乙酸乙酯萃取,用試管振盪器振盪均勻後,高速離心 (9,860 g)15 分鐘,取乙酸乙酯層,用氮氣吹乾後,以 50 μL 乙醇溶解,取 20 μL 供 HPLC 分析。

4. 給藥方法與採血

(1) 動物

選用雄性 Sprague-Dawley 大白鼠六隻,體重介於 275~330 g , 實驗前先禁食 12 小時。

(2) 給藥

給藥方式採交叉設計。將 6 隻大白鼠分成二組,第一組給予生大

黃水煎劑，第二組給予熟大黃水煎劑，依大白鼠體重，每公斤給予 5 克原生藥，即 10 mL/kg 水煎劑 (0.5 g/mL)，經胃管灌食給藥。隔週二組交換給藥第一組給予熟大黃水煎劑，第二組給予生大黃水煎劑。

(3) 採血

於給藥後 10、30、60、120、180、300、480 及 720 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.8 mL。將血液檢品離心 (9,860g)15 分鐘，取上層血清貯存於-30℃，俟後分析。

5. 血清檢品之前處理及分析

(1) 血清中自由態 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 之定量

取 100 μ L 血清檢品溶液，加 pH5.0 之緩衝溶液 50 μ L 及抗壞血酸溶液 50 μ L (100 mg/mL)，於試管振盪器上混合均勻後，高速離心(9,860g)15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50 μ L 乙醇溶解，取 20 μ L 供 HPLC 分析。

(2)血清中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之 glucuronides 及 sulfates 之定量

a. 血清中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之 glucuronides 定量

取 100 μ L 血清檢品溶液，加 β -glucuronidase 溶液 50 μ L(溶於 pH5.0 之緩衝溶液，含 β -glucuronidase 1,000 units/mL)及抗壞血酸溶液 50 μ L (100 mg/mL)，於試管振盪器上充分混合後，於 37℃ 之恆溫水槽振盪 4 小時。

b. 血清中 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 之 sulfates
定量

取 100 μL 血清檢品溶液，加 sulfatase 溶液 50 μL (溶於 pH5.0 之緩衝溶液，含 sulfatase 1,000 units/mL)及抗壞血酸溶液 50 μL (100 mg/mL)，於試管振盪器上充分混合後，於 37 之恆溫水槽振盪 2 小時。

前述(a)、(b)反應後，以 200 μL 含內標準(0.6 $\mu\text{g/mL}$, 2-methylanthraquinone)之乙酸乙酯萃取，用試管振盪器振盪均勻後，高速離心(9,860 g)15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50 μL 乙醇溶解，取 20 μL 供 HPLC 分析。

血清 解後定量出之 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 總含量減去 解前定量出之自由態 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 含量，即為其結合態代謝物之含量。

6. 高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

層析管：COSMOSIL 5C18-AR，5 μm ，4.6 \times 250 m.m.

移動相：CH₃CN---A 0.1% H₃PO₄---B

梯度沖提時間表

Time	A	B
0	55	45
10	60	40
15	85	15
20	85	15
25	55	45

流 速：1 mL/min

檢測波長：250 nm

7. 分析系統及方法之確效

(1) 精密度 (Precision)

將各濃度之 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 血清標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得之檢量線方程式，求得每次的實測濃度值。以三次同日內及三次異日間實測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) 靈敏度 (Sensitivity)

將 aloe-emodin、rhein、emodin 及 chrysophanol 標準品濃度一再稀釋，直至其波峰與雜訊之比值為 3 時之濃度為其偵測極限 (LOD, Limit of detection)。

(3) 準確度 (Accuracy)

三次同日內及三次異日間實測所得平均濃度與真正濃度間之相對誤差(relative error)表示之。

(4) 回收率 (Recovery)

將 20.0、10.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 三種濃度之 aloe-emodin 標準品溶液(溶於甲醇)、與 40.0、20.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 三種濃度之 emodin、chrysophanol 標準品溶液及 300.0、150.0、75.0 $\mu\text{g/mL}$ 三種濃度之 rhein 標準品溶液，分別加入 9 倍體積之空白血清及水中，使成 2.0、1.0、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 之 aloe-emodin 檢品溶液與 4.0、2.0、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 之 emodin、chrysophanol 及 30.0、15.0、7.5 $\mu\text{g/mL}$ 之 rhein 檢品溶液，

依檢品處理步驟處理，每種濃度各三重複，以 HPLC 定量後，所測得之血清標準溶液之檢出濃度，除以相對應於水中之檢出濃度以百分比表示，即為回收率。

8. 數據分析

給藥後所得之血清檢品，經 HPLC 分析定量後，以 WINNONLIN[®] (version 1.1; Pharsight Corp., U.S.A.)及 Excel 等軟體處理數據，採用非室體模式(noncompartment model)分別計算口服生大黃、熟大黃水煎劑後 aloe-emodin、rhein、emodin、chrysophanol 及其 sulfates、glucuronides 之動力學參數，並以 paired student's t-test 分析是否具統計上的差異($p < 0.05$)。

(三) Emodin 於大白鼠體內之動力學

1. 溶液之製備

(1) Emodin 口服溶液

稱取適量之 emodin，以 tetraglycol 與 dimethylacetamide:PEG400:H₂O (1:5:4)之混合溶液 1:1 為溶媒，配製成 20 mg/mL 之 emodin 溶液，即得 emodin 口服溶液。

(2) Emodin 靜脈注射溶液

稱取適量之 emodin，以 tetraglycol:1,2-propanediol(1:3)為溶媒，配製成 10 mg/mL 之 emodin 溶液，並經 0.22 μm 濾膜過濾滅菌，即得 emodin 靜脈注射溶液。

(4) Emodin 標準溶液

稱取 1.0 mg 之 emodin，先以少量甲醇溶解後，再以甲醇定容至 1.0 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之貯存溶液，其他濃度之標準溶液，則以甲醇系列稀釋而得。

(5) 2-methylantraquinone 內標準溶液

稱取 1.0 mg 之 2-methylantraquinone，以少量乙酸乙酯先溶解，再定容至 1.0 mL，配製成濃度為 1.0 mg/mL 之貯存溶液。其他濃度之內標準溶液，則以乙酸乙酯系列稀釋而得。

2. 血清標準溶液之製備

取適量貯存溶液，以甲醇稀釋使 emodin 標準溶液之濃度為 3.1、6.2、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 及 800.0 μg/mL。分別取 100 μL 上述標準溶液，加入 900 μL 空白血清，得 emodin 濃度為 0.3、0.6、1.2、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 及 80.00 μg/mL 之血清標準溶液。

3. 檢量線之繪製

取 100 μL 血清標準品溶液，加 50 μL 緩衝溶液(pH 5.0)、50 μL 抗壞血酸溶液(100 mg/mL)及 50 μL 鹽酸溶液(0.1 N)，振盪混合均勻，再以 250 μL 含內標(5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2-methylanthraquinone)之乙酸乙酯萃取，用試管振盪器振盪均勻後，高速離心 (9,860 g)15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50 μL 乙醇溶解，取 20 μL 供 HPLC 分析。

4. 給藥方法與採血

(1) 動物

選用雄性及雌性 Sprague-Dawley 大白鼠十隻，體重介於 250~550 g，實驗前先禁食 12 小時。

(2) 給藥

將大白鼠分成二組，第一組(n=5)給予 emodin 口服溶液，依大白鼠體重，每公斤給予 50 mg emodin，經胃管灌食給藥。第二組(n=5)給予 emodin 靜脈注射液，依大白鼠體重，每公斤給予 10 mg emodin，經由大白鼠尾靜脈注射給藥。

(3) 採血

口服給藥後於 10、30、60、120、180、300、480、720、1440 及 2880 分鐘，靜脈給藥後於 10、30、45、60、120、240、480 及 720 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.8 mL。將血液檢品離心 (9,860 g)15 分鐘，取上層血清貯存於-30 $^{\circ}\text{C}$ ，俟後分析。

5. 血清檢品之前處理及分析

(1) 血清中自由態 emodin 之定量

取 100 μL 血清檢品溶液，加 pH5.0 之緩衝溶液 50 μL 、抗壞血酸

溶液 50 μL (100 mg/mL)及 50 μL 鹽酸溶液(0.1 N),以 250 μL 含內標 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2-methylanthraquinone)之乙酸乙酯萃取,於試管振盪器上混合均勻後,高速離心 (9,860g)15 分鐘,取乙酸乙酯層,用氮氣吹乾後,以 50 μL 乙醇溶解,取 20 μL 供 HPLC 分析。

(2)血清中 emodin 之 glucuronides 及 sulfates 之定量

a. 血清中 emodin 之 glucuronides 定量

取 100 μL 血清檢品溶液,加 β -glucuronidase 溶液 50 μL (溶於 pH5.0 之緩衝溶液,含 β -glucuronidase 800 units/mL)及抗壞血酸溶液 50 μL (100 mg/mL),於試管振盪器上充分混合後,於 37 之恆溫水槽振盪 6 小時。

b. 血清中 emodin 之 sulfates 定量

取 100 μL 血清檢品溶液,加 sulfatase 溶液 50 μL (溶於 pH5.0 之緩衝溶液,含 sulfatase 100 units/mL)及抗壞血酸溶液 50 μL (100 mg/mL),於試管振盪器上充分混合後,於 37 之恆溫水槽振盪 2 小時。

前述(a)、(b)反應後,加 50 μL 鹽酸溶液(0.1 N),以 250 μL 含內標(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2-methylanthraquinone)之乙酸乙酯萃取,用試管振盪器振盪均勻後,高速離心 (9,860g)15 分鐘,取乙酸乙酯層,用氮氣吹乾後,以 50 μL 乙醇溶解,取 20 μL 供 HPLC 分析。

血清 解後定量出之 emodin 總含量減去 解前已定量出之自由態 emodin 含量,即為其結合態代謝物 sulfates/glucuronides 之含量

6. 高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

層析管: COSMOSIL 5C18-AR , 5 μm , 4.6 \times 250 m.m.

移動相: CH_3CN -0.1% H_3PO_4 (73:27)

流 速：1 mL/min

檢測波長：280 nm

內標準品：2-methylantraquinone (5 µg/mL)

7. 分析系統及方法之確效

(1) 精密度 (Precision)

將各濃度之 emodin 血清標準溶液，分別於同日內早、午、晚及連續三日之異日間各進行一次層析，並以獲得之檢量線方程式，求得每次的實測濃度值。以三次同日內及三次異日間實測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) 靈敏度 (Sensitivity)

將 emodin 標準品濃度一再稀釋，直至其波峰面積與雜訊面積之比值為 3 時之濃度為其偵測極限 (LOD, Limit of detection)。

(3) 準確度 (Accuracy)

三次同日內及三次異日間實測所得平均濃度與真正濃度間之相對誤差(relative error)表示之。

(4) 回收率 (Recovery)

將 emodin 溶於甲醇，製備 40.0、20.0、10.0 µg/mL 三種濃度之 emodin 標準品溶液，分別以空白血清及水稀釋，使濃度成為 4.0、2.0、1.0 µg/mL 之檢品溶液，依檢品處理步驟處理，以 HPLC 定量，每種濃度各三重複，所測得之血清中之檢出濃度，除以相對應於水中檢出濃度以百分比表示，即為回收率。

8. 數據分析

給藥後所得之血清檢品，經 HPLC 分析定量後，以

WINNONLIN[®] (version 1.1; Pharsight Corp., U.S.A.)及 Excel 等軟體處理數據，口服給藥及靜脈注射後 emodin sulfates 及 glucuronides 之動力學參數之計算，係分別採用非室體模式(noncompartment model)及快速靜脈注射二室體模式(IV bolus 2 compartment model)。