

六、Emodin 與大黃、虎杖水煎劑於大白鼠體內對環孢靈動力學之影響

(一) Emodin 於大白鼠體內對環孢靈動力學之影響

1. 溶液之製備

(1) Emodin 口服溶液之製備

稱取適量之 emodin，以 tetraglycol/PEG400(1:1)為溶媒，配製成 20 mg/mL 之 emodin 溶液，即得 emodin 口服溶液。

(2) 環孢靈溶液

精確量取 125 μ L 環孢靈溶液 (100 mg/mL)，加水定容至 20 mL，即得 0.625 mg/mL 之環孢靈溶液，使用前新鮮製備。

2. 動物及給藥

(1) 動物

選用雄性及雌性 Sprague-Dawley 老鼠 11 隻，體重介於 280 ~ 400 g，實驗前禁食 12 小時。

(2) 給藥

實驗採平行設計。將大白鼠隨機分為二組，一組(n=5)給予環孢靈溶液 (1.25 mg/kg)及 tetraglycol/PEG400(1:1) (2 mL/kg)，另一組(n=6)給予環孢靈溶液(1.25 mg/kg)與 emodin 口服溶液(40 mg/kg)。

3. 採血

以胃管給藥後於 20、40、60、180、300 及 540 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.3 mL，將所採得之血液置於含 EDTA 之真空採血管中，貯存於 4℃，於一週內分析。

4. 血液中環孢靈之定量分析

(1) 檢量線之繪製

分別精確吸取濃度為 0.Q 100.Q 250.Q 500.Q 1000.Q 1500.0 ng/mL 之全血標準溶液(Cyclosporine Monoclonal Whole Blood Calibrators) 及低、中、高濃度之對照溶液(Cyclosporine Monoclonal Whole Blood Controls)各 150 μ L 至微量離心試管中，分別加入 50 μ L Solubilization Reagent 及 300 μ L Whole Blood Precipitation Reagent/Probe Wash，以迴旋震盪器震盪 10 秒，高速離心(9,860 g)5 分鐘後，取上清液經 TDxFLx Analyzer 分析。此定量法係利用抗體抗原結合反應之原理，將帶有螢光標記之試劑加於欲分析之血液或血清檢品中，兩者與相對應之抗體進行競爭性結合，再利用待測藥物濃度與螢光偏極程度呈反比之關係，測定血液檢品中藥物之含量。以分析所得標準溶液之螢光偏極程度與其濃度進行迴歸，求得檢量線。

(2)分析系統及方法之確效

此檢量線各標準溶液之偏極誤差(Polarization Error PERR)需介於-2.00 至+2.00 之間，均方根誤差(Root Mean Square Error RMSE)需小於或等於 1.00。低、中、高濃度對照溶液之實測濃度需在容許範圍內。對照溶液濃度之容許範圍如下表:

對照溶液	Cyclosporine concentration (ng/mL)
低濃度	120.00-180.00
中濃度	340.00-460.00
高濃度	680.00-920.00

(3)檢品處理與分析

取 150 μ L 血液檢品，加 50 μ L Solubilization Reagent 及 300 μ L Whole Blood Precipitation Reagent/Probe Wash，以迴旋震盪器震盪 10

秒，高速離心(9,860 g)5 分鐘後，取上清液經 TDxFLx Analyzer 以螢光偏極免疫分析法 (Fluorescence Polarization Immuno Assay, FPIA) 定量血液中環孢靈的濃度。

5.數據處理及統計方法

以 WINNONLIN[®]軟體，採非室體模式 (noncompartment model) 計算其動力學參數，並以 SPSS[®]統計軟體之 unpaired Student's t-test 分析是否具統計上的差異(p<0.05)。

(二)大黃、虎杖水煎劑於大白鼠體內對環孢靈動力學之影響

1.溶液之製備

(1)大黃水煎劑之製備

稱取大黃藥材 20 g, 加入 400 mL 水, 於室溫下浸泡 15 分鐘使組織浸潤後, 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 80 mL, 趁熱過濾, 待冷卻後, 再加水至 80 mL, 使濃度成為 0.25 g/mL 之水煎劑。

(2)虎杖水煎劑之製備

稱取虎杖藥材 20 g, 加入 400 mL 水, 於室溫下浸泡 15 分鐘使組織浸潤後, 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 80 mL, 趁熱過濾, 待冷卻後, 再加水至 80 mL, 使濃度成為 0.25 g/mL 之水煎劑。

2.大黃、虎杖水煎劑中 aloe-emodin、rhein、emodin 與 chrysophanol 之定量

定量方法同大黃水煎劑定量。

3.動物及給藥

(1)動物

選用雄性及雌性 Sprague-Dawley 老鼠 11 隻, 體重介於 200 ~ 360 g , 實驗前禁食 12 小時。

(2)給藥

實驗採交叉設計。將大白鼠隨機分成二組, 第一組(n=5)口服給予大黃水煎劑 (0.25 g/kg)與環孢靈溶液(2.5 mg/kg), 第二組(n=6)口服給予虎杖水煎劑(2 g/kg)與環孢靈溶液(2.5 mg/kg)。單服環孢靈時給予與水煎劑等體積之水。

4.採血

以胃管給藥後, 於 20、40、60、180、300 及 540 分鐘, 以心臟穿刺方式採血 0.3 mL, 將所採得之血液置於含 EDTA 之真空採血管中, 貯存於 4℃, 於一週內分析。

5.血液中環孢靈之定量分析

分析方法與前項(一)相同。

6.數據處理及統計方法

動力學參數之計算, 以 WINNONLIN[®]軟體, 採非室體模式 (noncompartment model) 計算動力學參數, 並以 SPSS[®]統計軟體之 paired Student's t-test 分析是否具統計上的差異(p<0.05)。

(三)大黃水煎劑於大白鼠體內對環孢靈靜脈給藥動力學之影響

1.大黃水煎劑之製備

與前項(二)同。

2.動物及給藥

(1)動物

選用雌性 Sprague-Dawley 老鼠 7 隻，體重介於 200 ~ 305 g，實驗前禁食 12 小時。

(2)給藥

實驗採交叉設計。口服給予大黃水煎劑 (0.25 g/kg)與靜脈注射環孢靈靜脈注射液(0.8 mg/kg), 控制組口服給予與水煎劑等體積之水及環孢靈靜脈注射液(0.8 mg/kg)。

3.採血

於給藥後 5、10、20、40、60、180、300 及 540 分鐘，以心臟穿刺方式採血 0.3 mL，將所採得之血液置於含 EDTA 之真空採血管中，貯存於 4℃，於一週內分析。

4.血液中環孢靈之定量分析

與前項(一)相同。

5.數據處理及統計方法

動力學參數之計算，以 WINNONLIN[®]軟體，採快速靜脈注射二室體模式(IV bolus 2 compartment model)，並以 SPSS[®]統計軟體之 paired Student's t-test 分析是否具統計上的差異(p<0.05)。

七、大黃、虎杖水煎劑與 emodin 對 P-glycoprotein 功能之影響

(一)體外翻腸實驗

選用雌性 Sprague-Dawley 老鼠 15 隻，體重介於 225~ 260 g，出生 8 ~ 12 週，實驗前先禁食 1 ~ 2 天，以清除胃腸道中殘餘食物，並於乙醚麻醉的狀態下，剖開腹腔，取出離幽門 5 cm 以下的空腸及離盲腸 5 cm 以上的迴腸各 30 cm，分別以冰的生理食鹽水灌流清洗內部殘留物。再將腸子外翻，讓黏膜層在外，漿膜層在內，隨後先於腸一端以線綁緊，再於腸另一端插入針頭，並以線綁緊。

將空腸及迴腸各分成五組進行實驗，每組為三重覆。第一組為空白組，將腸子置於裝有 50 mL medium 199 溶液的燒杯中，第二組置於裝有含 0.25 mL 大黃水煎劑之 50 mL medium 199 溶液的燒杯中(每 mL 含 0.25 g 大黃原生藥)，第三組置於裝有含 2.0 mL 虎杖水煎劑之 50 mL medium 199 溶液的燒杯中(每 mL 含 0.25 g 虎杖原生藥)。第四組為第五組之控制組，將腸子置於裝有含 0.5 mL tetraglycol/PEG400(1:1)之 50 mL medium 199 溶液的燒杯中。第五組置於裝有含 0.5 mL emodin 之 50 mL medium 199 溶液的燒杯中。將燒杯置於 37 °C 之往復式振盪水槽，並持續通入混合氣體(含 95 % O₂ 及 5 % CO₂) 以維持腸之存活。20 分鐘後，在裝有針頭的一端注入 rhodamine 123 溶液 3 mL (20.0 µg/mL)。

(二)採樣及檢品處理

檢品採樣係取腸子外之燒杯內容物，每次採樣量為 0.8 mL，採樣時間為注入 rhodamine 123 溶液後之 20、40、60、80 及 100 分鐘，置於 1.5 mL 微量離心管內，俟後分析。

(三) Rhodamine 123 檢量線之繪製

取 Rhodamine 123 (200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 標準溶液，以 medium 199 溶液稀釋為 1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 及 0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等 8 個濃度，經螢光光譜儀分析，設定 485 nm 為激發波長、546 nm 為發射波長，以螢光強度對 Rhodamine 123 濃度進行直線迴歸，繪製檢量線。

(四) 檢品中 Rhodamine 123 之定量

根據先前繪製之檢量線，以內插法定量。

(五) 數據處理及統計方法

利用電腦程式 SPSS[®]統計軟體，以 unpaired Student's ttest 統計法比較控制組與給藥組之間 Rhodamine 123 之排出量，是否具統計上之差異 ($p < 0.05$)。