

第三章 實驗部分

第一節 實驗材料

一、實驗試藥

(一) 標準品與試劑

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. 5-Hydroxyflavone | Indofine Chemical Co.
(Somerville, NJ, U.S.A.) |
| 2. Flavone | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 3. Fisetin | Aldrich (WI, U.S.A.) |
| 4. Quercetin | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 5. Morin | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 6. Ethyl paraben | Aldrich (WI, U.S.A.) |
| 7. -Glucuronidase (type B-1) | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 8. Sulfatase (type H-1) | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 9. Acetonitrile, LC Grade | J. T. Backer Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.) |
| 10. Methyl alcohol, LC Grade | Mallinckrodt Baker, Inc. (Paris, KY, U.S.A.) |
| 11. Ethyl acetate, LC Grade | J. T. Backer Inc. (NJ, U.S.A.) |
| 12. Ortho-phosphoric acid, 85% | Riedel-deHaën AG (Seelze, Germany) |
| 13. L (+) - Ascorbic acid | Riedel-deHaën AG (Seelze, Germany) |
| 14. Acetic acid, glacial | J. T. Backer Inc. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.) |
| 15. Sodium acetate, anhydrous | Kohusan Chemical Works, Ltd.
(Kyoto, Japan) |

16. Sodium hydroxide	Riedel-deHaën AG (Seelze, Germany)
17. Hydrochloric acid	Wako Pure Chemical Industries. Ltd. (Osaka, Japan)
18. Sodium bicarbonate	Shimakyu' s Pure Chemical (Osaka, Japan)
19. Ethyl ether	Shimakyu' s Pure Chemical (Osaka, Japan)
20. Cyclosporine, Neoral [®]	台灣諾華股份有限公司(Novartis, Taiwan)惠贈
21. Tetraglycol (Glycofurol)	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
22. TDx Cyclosporine kit	Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois, U.S.A.)
23. Medium 199	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
24. Rhodamine 123	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)
25. Milli-Q	Millipore Co. (Bedford, MA, U.S.A.)

二、儀器設備

(一) 儀器

1. 酸鹼測定儀
Microprocessor pH-mV meter
W.T.W. (Taiwan)
2. 高速離心機
Z 200 M/H
Hermle (Germany)
3. 渦旋振盪器
Vortex Genie G-560
Scientific Industries Inc. (U.S.A.)
4. 超音波振盪器
Branson 8120
Branson Ultrasonics Co. (U.S.A.)
5. 控溫往復式振盪水槽
BT-350
Yih Der Instruments Co., Ltd. (Taiwan)
6. 氮氣濃縮裝置
N-EVAP 112
Organomation Associates Inc. (U.S.A.)
7. 分析天平
AB 104
Mettler Toledo (Switzerland)
8. 微量移液管
Pipette 2-20 μL , 10-100 μL ,
20-200 μL , 100-1000 μL
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
(Germany)
9. 水壓抽氣機
Eyela Aspirator A-2S
Tokyo Rikakikai Co. Ltd. (Japan)
10. 電熱板
HP-20
Shin Kwang Machinery Industry
(Taiwan)

11. 高效液相層析儀包括:

幫浦	Shimadzu (Japan)
LC-10AT	
層析管	
Cosmosil (150×4.6 mm)	Waters (U.S.A.)
管柱前濾膜	Merck (Germany)
LiChroCART [®] 4-4	
紫外光偵測器	Shimadzu (Japan)
SPD-10A	
自動注射器	Shimadzu (Japan)
SIL-10AD	

12. 螢光光譜儀

Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer Ltd. (U.K.)
LS-50B	

13. 螢光偏極免疫分析儀

TDxFLx Analyzer	Abbott Laboratories (U.S.A.)
-----------------	------------------------------

(二) 實驗動物用器材

1. 拋棄式注射針及針

3.0 mL Syringe (0.55×25 mm)

1.0 mL Syringe (0.45×13 mm)

Terumo (Japan)

2. 胃管

(0.9×L 70 mm, 1.5×L 120 mm)

晶龍科技儀器有限公司 (Taiwan)

3. 真空採血管

Becton Dickinson & Co. (U.S.A.)

(含 0.073 mL, 7.5 % K_3 EDTA 溶液)

4. 微量離心管
Axycen Scientific Inc. (U.S.A.)

(1.7 mL 棕色管)

5. 針頭濾膜
Alltech Associates Inc. (U.S.A.)

(0.22 μ m, 0.45 μ m)

三、實驗動物

Sprague-Dawley 大白鼠

中國醫藥學院動物中心

四、溶液製備

1. 非瑟素標準溶液

精確稱取 fisetin 1.0 mg，分別加入甲醇定容至 1.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之貯存溶液，再以甲醇稀釋成各種所需濃度之標準溶液。

2. 內標準溶液

a. 精確稱取 ethyl paraben 10.0 mg，加入乙酸乙酯定容至 10.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之貯存溶液，再以乙酸乙酯稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。

b. 精確稱取 ethyl paraben 10.0 mg，加入甲醇定容至 10.0 mL，即得 1.0 mg/mL 之貯存溶液，再以甲醇稀釋成各種所需濃度之內標準溶液。

3. 緩衝溶液 (pH 5.0)

取 0.1N 醋酸鈉溶液 (a) 68 mL , 加入 0.1N 醋酸溶液 (b) 至 100 mL , 再加 1N 氫氧化鈉調至 pH = 5.0 ± 0.1。

(a) 0.1N 醋酸鈉溶液 :

稱取 0.82 g 無水醋酸鈉 , 加水溶解至 100 mL。

(b) 0.1N 醋酸溶液 :

量取醋酸 (d = 1.049) 0.6 mL , 加水至 100 mL。

4. -Glucuronidase 溶液

取 -glucuronidase (666,400 units/g, type B-1) 75 mg , 以 pH 5.0 緩衝溶液溶解使成 50 mL , 貯存於-30 備用。

5. Sulfatase 溶液

取 sulfatase (20,000 units/g, type H-1) 2.5 g , 以 pH 5.0 緩衝溶液溶解使成 50 mL , 貯存於-30 備用。

6. 抗壞血酸溶液

稱取抗壞血酸 100 mg , 加水至 1 mL 即得 100 mg/mL 之抗壞血酸溶液 , 使用前新鮮製備。

7. 環孢靈溶液

精確量取 125 μ L Neoral[®] (100 mg/mL) , 加水定容至 10.0 mL , 即得 1.25 mg/mL 之環孢靈溶液 , 使用前新鮮製備。

8. Medium 199 溶液

稱取 9.55 g medium 199，加入 2.2 g 碳酸氫鈉，再加水溶解成 1000 mL，以 0.1N 氫氧化鈉或 0.1N 鹽酸調整 pH 至 7.4 ± 0.1 ，貯存於 2 ~ 8 °C，於一星期內使用。

9. Rhodamine 123 溶液

精確稱取 10.0 mg rhodamine 123，加水定容成 50.0 mL，即得 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 之 rhodamine 123 貯存溶液，使用前新鮮製備。

第二節 實驗方法

一、非瑟素 (Fisetin) 於大白鼠體內之藥物動力學

(一) 血清標準溶液之製備

精確稱取 fisetin，以甲醇溶解並稀釋定容，製備 1.9, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0, 1000.0 $\mu\text{g/mL}$ 等濃度之標準溶液，各取 100 μL 標準溶液，加入 900 μL 空白血清，得濃度分別為 0.19, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 之血清標準溶液。

(二) 檢量線之繪製

取 100 μL 血清標準溶液，加入 100 μL 緩衝液 (pH 5.0)、50 μL 抗壞血酸 (100 mg/mL)，及 50 μL 0.1N 鹽酸，混合均勻，再以 300 μL 乙酸乙酯 (含內標準 ethyl paraben 1.0 $\mu\text{g/mL}$) 萃取，於渦旋振盪器上混合 20 秒，以 9860g 離心 15 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，加 50 μL 甲醇溶解，以 HPLC 分析。

(三) 給藥與採血

1. 動物

選用雄性 Spraque-Dawley 大白鼠，體重介於 250~350 g，
實驗前禁食 12 小時。

2. 靜脈快速注射給藥及採血

精確稱取 fisetin 40 mg，以 tetraglycol 溶解並定容至 2
mL，即得 20 mg/mL 之 fisetin 溶液，使用前新鮮製備並經 0.2
 μ m 滅菌濾膜 (cellulose acetate) 除去熱原。

於未麻醉之狀況下，尾靜脈注射給予 10 mg/kg 之 fisetin，
給藥後 5, 15, 30, 45, 90, 240, 480 及 720 分鐘從心臟採血，每次
採血量為 0.8 mL，將檢品離心 (9860 g) 15 分鐘，取上層血清，
並貯存於 -30℃，俟後分析。

3. 口服給藥及採血

精確稱取 fisetin 125 mg，以 tetraglycol 溶解並定容至 5
mL，即得 25 mg/mL 之 fisetin 溶液，使用前新鮮製備。

經由胃管投予 50 mg/kg 之 fisetin，給藥後 5, 15, 45, 90, 180,
360, 600, 1440, 2160 及 2880 分鐘從心臟採血，每次採血量為
0.8 mL，將檢品離心 (9860 g) 15 分鐘，取上層血清，並貯存
於 -30℃，俟後分析。

(四) 血清檢品之前處理及定量

1. 血清中 fisetin 及其 sulfates 、 glucuronides 之定量

(1) 血清中自由態 fisetin之定量

取100 μ L血清檢品，加入100 μ L緩衝溶液(pH 5.0) 50 μ L 抗壞血酸(100 mg/mL)及50 μ L 0.1N鹽酸，再以300 μ L乙酸乙酯 (含內標準ethyl paraben 1.0 μ g/mL)萃取，於振盪器上混合20秒，以9860 g離心15分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，加50 μ L甲醇溶解，以HPLC分析。

(2) 血清中 fisetin sulfates 之定量

取100 μ L血清檢品，加入100 μ L sulfatase (溶於 pH 5.0 之緩衝溶液，含 sulfatase 100 units/mL)及抗壞血酸50 μ L (100 mg/mL)，以渦旋振盪器充分混合後，於 37 之恆溫水槽振盪 6 小時。反應結束後，置於冰上，加入50 μ L 0.1N鹽酸，再以300 μ L乙酸乙酯 (含內標準ethyl paraben 1.0 μ g/mL)萃取，於振盪器上混合20秒，以9860 g 離心15分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，加50 μ L甲醇溶解，供HPLC分析。

(3) 血清中 fisetin glucuronides 之定量

取 100 μ L 血清檢品，加入 100 μ L β -glucuronidase (溶於 pH 5.0 之緩衝溶液，含 β -glucuronidase 1,000 units/mL) 及抗

(六) 分析系統及方法之確效

1. 精密度(precision)

將各濃度之血清標準溶液，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實測濃度。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. 準確度(accuracy)

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

3. 靈敏度(sensitivity)

將非瑟素血清標準溶液一再稀釋，直到其波峰為雜訊三倍之濃度為偵測極限。

4. 回收率(recovery)

將 50.0、12.5 及 3.1 $\mu\text{g/mL}$ 等三種濃度之非瑟素標準溶液(溶於甲醇), 分別加入空白血清及水中, 得 5.0、1.3 及 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 等濃度各三份，所測得之血清標準溶液之波峰面積比值除以等濃度之水溶液之波峰面積比值，即回收率。

(七) 數據分析

Fisetin 及其 sulfates 、 glucuronides 之動力學參數係使用 WINNONLIN (version 3.0 ; Pharsight Corp., U.S.A.) 及 Excel (version 7.0, Microsoft) 等軟體計算。

二、黃酮類化合物對於環孢靈動力學影響之構效關係

(一) 動物及給藥

選用雌性 Sprague-Dawley 大白鼠 68 隻, 體重介於 250 ~ 350 g, 出生 14 ~ 18 週, 實驗前禁食 12 小時。實驗設計採平行試驗模式, 將大白鼠分成十一組, 每組 5 至 7 隻; 分別為單服環孢靈 (2.5 mg/kg) 及併服不同劑量之五種黃酮類化合物 (溶於 tetraglycol):

1. Cyclosporine + tetraglycol (2 mL/kg) (對照組)
2. Cyclosporine + 5-hydroxyflavone (20 mg/kg)
3. Cyclosporine + 5-hydroxyflavone (40 mg/kg)
4. Cyclosporine + flavone (20 mg/kg)
5. Cyclosporine + flavone (40 mg/kg)
6. Cyclosporine + fisetin (20 mg/kg)
7. Cyclosporine + fisetin (40 mg/kg)
8. Cyclosporine + quercetin (20 mg/kg)
9. Cyclosporine + morin (20 mg/kg)
10. Cyclosporine + morin (37.5 mg/kg)
11. Cyclosporine + morin (50 mg/kg)

(二) 採血及檢品處理

口服給藥後分別於 20, 40 分鐘及 1, 3, 5 和 9 小時, 以心臟採血方式採集血液檢品。置於含 EDTA 之真空採血管, 每次

採血量為 0.3 mL，並以手輕輕轉動，使管內的血液與 EDTA 混合均勻，貯存於 4℃，於當日分析完畢（血液檢品貯存不可超過一星期）。

(三) 血液中環孢靈之定量

血液檢品利用 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^[64-65]。此定量法係利用抗體抗原結合反應之原理，將帶有螢光標記之藥物加於欲分析之血液或血清檢品中，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，測定血液或血清檢品中藥物之含量。

(四) 數據處理及統計方法

血液檢品經定量後，利用電腦程式 WINNONLINTM，採非室體模式 (noncompartment model) 計算動力學參數，並以 ANOVA 分析是否具統計上的差異 ($p < 0.05$)。

三、黃酮類化合物對於 P-glycoprotein 調控之構效關係

(一) 體外翻腸實驗

選用雌性 Sprague-Dawley 大白鼠 15 隻，體重介於 150 ~ 250 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。第一組為對照組將腸子置於裝有 50 mL medium 199 溶液的燒杯中，第二組置於裝有 50 mL 含 840 μ M 5-hydroxyflavone 之 medium 199 溶液的燒杯中，第三組置於裝有 50 mL 含 420 μ M 5-hydroxyflavone 之 medium 199 溶液的燒杯中，第四組置於裝有 50 mL 含 900 μ M flavone 之 medium 199 溶液的燒杯中，第五組置於裝有 50 mL 含 830 μ M morin 之 medium 199 溶液的燒杯中。這些溶液皆含 1 % tetraglycol 為增溶劑；置於 37 °C 之恆溫水槽，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，於裝有針頭的一端注入 rhodamine 123 溶液 3 mL

(20.0 μ g/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 棕色微量離心管內，俟後分析。

(三) Rhodamine 123 檢量線之繪製

取 rhodamine 123 (200.0 μ g/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 μ g/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 ANOVA 統計法比較此五組間 rhodamine 123 之排出量，是否具統計上之差異 ($p < 0.05$)。