

第三章 實驗部分

第一節 實驗材料

一、 實驗試藥

(一) 標準品及試劑

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Hesperidin (97%) | Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.) |
| 2. Hesperetin (95%) | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 3. Naringin (95 %) | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 4. (±)-Naringenin (95 %) | Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 5. Narirutin (95 %) | Extrasynthese (Genay France) |
| 6. Polyethylene glycol 400 | Merck , Germany |
| 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. Ethyl paraben | Aldrich (WI, U.S.A.) |
| 15. Dimethylacetamide | Wako (Osaka, Japan) |

- | | |
|---------------------------------|--|
| 16. Ethyl ether | Shimakyu's Pure Chemical (Osaka, Japan) |
| 17. Methotrexate | Wyeth (Wolfsthausen, Germany) |
| 18. 6,7-dimethoxycoumarin (98%) | Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.) |
| 19. 5,7-dimethoxycoumarin (99%) | Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.) |
| 20. Hydrochloric acid | Wako Pure Chemical Industries. Ltd.
(Osaka, Japan) |
| 21. Sodium acetate, anhydrous | Kohusan Chemical Works, Ltd.
(Kyoto, Japan) |
| 22. TDx Methotrexate kit | Abbott Laboratories
(Abbott Park, Illinois, U.S.A.) |
| 23. Milli-Q | Millipore Co. (Bedford, MA, U.S.A.) |
| 24. 藥用酒精 | 臺灣菸酒公賣局 |

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
Bransonic 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 μ L, 10-100 μ L,
20-200 μ L, 100-1000 μ L | 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
LC-10AT | Shimadzu (Japan) |
| 層析管
Cosmosil (150 \times 4.6 mm)
Apollo [®] (250 \times 4.6 mm) | Waters (U.S.A.) |
| 管柱前濾膜
LiChroCART [®] 4-4 | Merck (Germany) |
| 紫外光偵測器
SPD-10A | Shimadzu (Japan) |
| 自動注射器
SIL-10AD | Shimadzu (Japan) |
| 12. 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. 拋棄式注射針及針筒
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. 微量離心管
(1.7 mL 透明管) Axycen Scientific Inc. (U.S.A.)
4. 針頭濾膜
(0.22 μm, 0.45 μm) Alltech Associates Inc. (U.S.A.)

三、 實驗動物

Sprague-Dawley 大白鼠 中國醫藥大學動物中心

四、 溶液製備

1. 內標準溶液
 - a. 精確稱取 5,7-dimethoxycoumarin 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. 6,7-dimethoxycoumarin 製備方法如上。
2. 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 $\text{pH} = 5.0 \pm 0.1$ 。

(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。

3. β -Glucuronidase 溶液

取 β -glucuronidase (666,400 units/g, type B-1) 75.0 mg , 以 pH 5.0 緩衝溶液溶解使成 50 mL , 貯存於-30 備用。

4. 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。

5. 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。

6. MTX 溶液

精確量取 1.0 mL MTX (25 mg/mL) , 加水定容至 10.0 mL , 即得 2.5 mg/mL 之 MTX 溶液 , 使用前新鮮製備。

第二節 實驗方法

一、 Hesperetin 於大白鼠體內之代謝動力學

(一) 血清標準溶液之製備及定量前處理

精確稱取 hesperetin，以甲醇溶解並稀釋定容，製備介於 4.0 ~ 1000.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間之 9 種濃度標準溶液，各取 100 μL 標準溶液，加入 900 μL 空白血清，得濃度分別為 0.4, 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0 及 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之血清標準溶液。

(二) 檢量線之繪製

取 100 μL 血清標準溶液，加 100 μL 緩衝液 (pH 5.0)、50 μL 抗壞血酸 (100.0 mg/mL) 及 50 μL 0.1 N 鹽酸，再以 300 μL 含內標準 (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5,7-dimethoxycoumarin) 之乙酸乙酯萃取，用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心 (9860 g) 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50 μL 氘甲烷溶解，取 20 μL 供 HPLC 分析。

(三) 動物給藥及採血

雄性 Spraque-Dawley 大白鼠，體重介於 400 ~ 550 g ，實驗前禁食 12 小時。採隨機交叉設計給藥。

(1) 靜脈快速注射給藥及採血

Hesperetin 溶液 (10 mg/mL) 以 dimethylacetamide : PEG 400 : water (1 : 5 : 4) 之混合溶媒溶解，並經 0.22 μm 滅菌濾膜 (cellulose acetate) 去除熱原。

相當於 10 mg/kg 劑量之 hesperetin 溶液，經由尾靜脈快速注射給藥，給藥後於 3, 15, 30, 60, 120, 180, 240 及 480 分鐘從心臟採血，每次採血 0.8 mL，離心 (9860 g) 15 分鐘，取上層血清，貯存於 -30 ，俟後分析。

(2) 口服給藥及採血

Hesperetin 溶液 (50 mg/mL) 之製備，與靜脈快速注射溶液所用之溶媒相同，但未經 0.22 μm 濾膜過濾滅菌。

靜脈快速注射給藥一週後，經由胃管口服給予 50 mg/kg hesperetin 溶液，給藥後於 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 及 720 分鐘從心臟採血，每次採血 0.8 mL，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

血清中 hesperetin 及其 sulfates、 glucuronides 之定量

(1) 血清中自由態hesperetin之定量

取100 μL 血清檢品，加100 μL 緩衝液 (pH 5.0)、50 μL 抗壞血酸 (100 mg/mL) 及 50 μL 0.1 N 鹽酸，再以 300 μL 含內標準 (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5,7-dimethoxycoumarin) 之乙酸乙酯萃取，用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心 (9860 g) 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50 μL 氰甲烷溶解，取 20 μL 供 HPLC 分析。

(2) 血清中 hesperetin sulfates、glucuronides 之定量

取 100 μL 血清檢品，加100 μL sulfatase 或 glucuronidase (溶於 pH 5.0 緩衝溶液，含 sulfatase 或 glucuronidase 1000.0 units/mL)、50 μL 抗壞血酸溶液 (100 mg/mL)、50 μL 0.1 N 鹽酸，以300 μL 乙酸乙酯 (含2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5,7-dimethoxycoumarin 之內標準) 萃取，用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心 (9860 g) 15 分鐘，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後以50 μL 氰甲烷溶解，取20 μL 供 HPLC 分析。

(五) 高效液相層析分析條件

層析管：Cosmosil[®] 5C18-AR column (5 μm , 4.6 x 150 mm)

流速：1.0 mL/min

檢測波長：287 nm

移動相：氫甲烷：0.1 % 磷酸 (35 : 65, v/v)之混合液

(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)

三次同日內及三次異日間實驗濃度與理論濃度間之相對誤差(relative error)表示之。

(3) 靈敏度(sensitivity)

將 hesperetin 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 hesperetin 標準溶液(溶於甲醇)，分別加入空白血清及水中，製備 100.0, 12.5 及 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等三種濃度之血清及水標準溶液各三份，所測得之血清標準溶液之波峰面積比值除以各對應濃度之水標準溶液之波峰面積比值，即為回收率。

(七)數據分析

使用 WINNONLIN (version 3.0; Pharsight Corp., U.S.A.)及 Excel (version 7.0, Microsoft) 等軟體計算動力學參數。

二、Hesperidin 於大白鼠體內之動力學

經由胃管口服給予 101 mg/kg 之 hesperidin 懸浮液, 給藥後於 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 及 720 分鐘從心臟採血, 每次採血 0.8 mL, 離心 (9860 g) 15 分鐘, 取血清貯存於 -30 , 俟後分析。分析方法及條件同 一、Hesperetin 於大白鼠體內之代謝動力學。

三、 柳橙汁黃酮於人體之尿藥代謝動力學

(一)柳橙汁購買與製備

於台中市英才路某水果店購買以機器現榨整粒柳橙所得之柳橙汁，未加水、糖及任何添加物。

(二) 柳橙汁中 hesperidin、 narirutin 之定量

1. 高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

分析管柱：Apollo[®] C18 5 μ m (250 \times 4.6 mm)

保護層析管柱：LiChrospher 100 RP-18 e (5 μ m)

移動相：水與氰甲烷 (78 : 22 , v/v)

流速：1 mL/min

檢測波長：280 nm

內標準：6,7-dimethoxycoumarin (40.0 μ g/mL)

2. Hesperidin、 narirutin 檢量線之繪製

精確稱取 hesperidin、 narirutin 各 10.0 mg，分別以少量甲醇溶之，並定容至 5.0 mL 即為貯存溶液。取適量貯存溶液以甲醇稀釋，使 hesperidin、 narirutin 的標準溶液濃度為 50.0、 25.0、 12.5、 6.3、 3.1、 1.6 及 0.8 μ g/mL。分別取標準溶液 200 μ L，加入等體積之內標準甲醇溶液 (6,7-dimethoxycoumarin，40.0 μ g/mL)。所得之

hesperidin、 narirutin 與內標準之波峰面積比值，與 hesperidin 、 narirutin 之各已知濃度進行直線迴歸，求得檢量線之方程式。

3. 柳橙汁中 hesperidin、 narirutin 之定量

柳橙汁 300 μL 加甲醇 700 μL 振盪混合，離心 15 min (9860 g) 後，取 100 μL 上清液加入等體積之內標準甲醇溶液 (6,7-dimethoxycoumarin, 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 振盪混合後，以微孔濾器 (0.45 μm) 過濾。取 20 μL 注入 HPLC 分析，以檢品中 hesperidin 、 narirutin 與內標準之波峰面積比值代入檢量線方程式，求出檢品中 hesperidin 與 narirutin 之含量。

4. 分析系統及方法之確效

(1) 精密度 (Precision)

將不同濃度之 hesperidin 及 narirutin 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，求得每次的實驗濃度值，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 hesperidin 及 narirutin 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。

(3) 準確度 (Accuracy)

三次同日內及三次異日間實驗所得平均濃度與理論濃度間之

相對誤差(relative error)表示之。

(4) 回收率 (Recovery)

取已測定 hesperidin 及 narirutin 含量之柳橙汁檢品 300 μL 各三份，分別加入已知濃度 (50.0, 6.3 及 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 hesperidin 及 narirutin 標準品溶液 700 μL 振盪混合，離心 15 min (9860 g) 後，取上清液 100 μL ，以 900 μL 甲醇稀釋，振盪混合後，取 200 μL 各加入等體積內標準甲醇溶液 (6,7-dimethoxycoumarin, 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 混合後，振盪混合 1 分鐘，並高速離心 15 min (9860 g)，然後分別層析定量，將換算所得之 hesperidin 及 narirutin 之增加量除以已知的標準品添加量即為回收率。

(四) 服用方法與尿液收集

自願受試者十一名 (21-30 歲、52-78 公斤) 於實驗前一週接受健康檢查，經檢查肝酵素(SGPT、SGOT)、尿素氮(BUN)以及肌酸酐(Creatinine)的生化指數正常，實驗前一周開始禁止食用柑橘屬類的水果。

實驗前一天晚上十點開始禁食。實驗當天未服柳橙汁前先排空尿液，並採空白尿液 4mL。於 20 分鐘內喝完柳橙汁 1000 mL，4 小時後方可進食。

服藥後於 0-2、2-4、4-6、6-8、8-10、10-12及12-24 小時，共收集七個時段之尿液，每段尿液分別測量並記錄其體積後，各取 4 mL

之尿液，置於-30 貯存，俟後分析之用。

(五) 尿液中 hesperetin、naringenin 及其結合態代謝物之分析

1. Hesperetin、naringenin 檢量線繪製

精確稱取 hesperetin、naringenin 各 5.0 mg，以少量甲醇溶之，定容至 10.0 mL 為貯存溶液。將貯存溶液以甲醇稀釋成一系列濃度 (500.0、250.0、125.0、31.3、15.6、7.8、3.9、1.9 及 0.95 $\mu\text{g/mL}$)，取各濃度之標準溶液 100 μL 加空白尿 900 μL ，製備 hesperetin、naringenin 之尿標準溶液，濃度分別為 50.0、25.0、12.5、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2 及 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。取尿標準溶液 300 μL 加 150 μL 緩衝溶液 (pH = 5.0) 及抗壞血酸 50 μL (200.0 mg/mL)，再於試管振盪器上充分混合，加 100 μL 0.1 N 鹽酸及 600 μL 乙酸乙酯 (含 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 5,7-dimethoxycoumarin 內標準)，用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心 (9860 g) 15 min，取乙酸乙酯層，用氮氣吹乾後，以 50 μL 移動相溶解，取 20 μL 供 HPLC 分析。所得之 hesperetin 及 naringenin 與內標準之波峰面積比值與 hesperetin 及 naringenin 之濃度進行直線迴歸。

2. 尿液中 hesperetin、naringenin 之定量

各時段收集之尿液各取 300 μL ，加入 buffer (pH 5.0) 之緩衝

溶液) 150 μL 及抗壞血酸 50 μL (200 mg/mL), 於試管振盪器上充分混合後, 加 100 μL 0.1 N 鹽酸及 600 μL 乙酸乙酯 (含 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5,7-dimethoxycoumarin 內標準), 用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心 15 min (9860 g), 取乙酸乙酯層, 用氮氣吹乾後, 以 50 μL 移動相溶解, 取 20 μL 供 HPLC 分析。

3. 尿液中 hesperetin 及 naringenin 結合態代謝物之定量

取尿液 300 μL , 分別加 sulfatase、glucuronidase (溶於 pH 5.0 之緩衝溶液, 含 sulfatase、glucuronidase 1000.0 units/mL) 150 μL 及抗壞血酸 50 μL (200 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, 之後加 100 μL 0.1 N 鹽酸及 600 μL 乙酸乙酯 (含 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5,7-dimethoxycoumarin 內標準), 用試管振盪器振盪 20 秒後高速離心 15 min (9860 g), 取乙酸乙酯層, 用氮氣吹乾後, 以 50 μL 移動相溶解, 取 20 μL 供 HPLC 分析。

4. 高效液相層析分析條件

層析管: Apollo[®] C18 5 μm (250 \times 4.6 mm)

流速: 1.0 mL/min

檢測波長: 287 nm

內標準: 5,7-dimethoxycoumarin

移動相：甲醇：氘甲烷：0.1 % 磷酸 (17 : 26 : 57, v/v/v)

5. 分析方法之確效

(1) 精密度(precision)

將各濃度之 hesperetin 及 naringenin 尿標準溶液，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，並以先前所得之檢量線方程式求得每次實驗濃度，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) 準確度(accuracy)

三次同日內及三次異日間實驗濃度與理論濃度間之相對誤差(relative error)。

(3) 靈敏度(sensitivity)

將 hesperetin 及 naringenin 尿標準溶液一再稀釋，直到其波峰為雜訊三倍之濃度為偵測極限。

(4) 回收率(recovery)

將 hesperetin 及 naringenin (溶於甲醇)標準溶液，分別加入空

白尿 300 μ L 及水中，製備 50.0, 6.3 及 0.8 μ g/mL 等三種濃度各三份，所測得之尿標準溶液之波峰面積比值除以等濃度之水標準溶液之波峰面積比值，即為回收率。

6. 數據處理及統計分析

受試者在每段尿液收集時間點，利用 Sigma-minus 計算體內之 hesperetin、naringenin sulfates/glucuronides 殘餘量之自然對數值 (Y) 與時間 (X) 作直線迴歸，得斜率(k)，再代入 $t_{1/2} = 0.693/k$ ，即得排除半衰期 ($t_{1/2}$)。

四、大黃 黃芩水煎劑於鼠體對 Methotrexate (MTX) 動力學之影響

(一)水煎劑之製備

- (1) 實驗用藥材飲片大黃、黃芩購自台中市欣隆藥行，經五官與顯微定，確定基原後備用。
- (2) 水煎劑之製備，係精確稱取大黃、黃芩飲片各 25.0 g，分別加入 500 mL 水，先行浸泡 30 分鐘，然後以直火加熱至沸騰，轉小火繼續加熱，煮至水煎劑約 50 mL 或更少，趁熱過濾後加水定容至 50.0 mL，置於 -30 儲存備用。

(二) 大黃水煎劑之定量

(1) 大黃酸水解

於 1 mL 之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 6 小時後，取出、放冷。

(2) 高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

層析管：COSMOSIL 5C18-AR，5 μ m，4.6×250 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：1 mL/min

檢測波長：250 nm

(3) 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(10.0 $\mu\text{g/mL}$)，再以甲醇稀釋使各標準溶液之濃度為 0.8、1.6、3.2、6.3、12.5、25.0、50.0 及 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 。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。

(4) 水煎劑中非醣體之定量

取水煎劑 1 mL，加入 1 mL 內標準甲醇溶液 (10 $\mu\text{g/mL}$)，以甲醇定容至 2 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。

(5) 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。

(三) 黃芩水煎劑之定量

(1) 黃芩酸水解

取 0.6 mL 之水煎劑，加 1.4 mL 甲醇振盪混合，經 9860 g 高速離心 15 分鐘，取上清液 1.5 mL，加 1.5 mL 之 0.6N HCl 溶液混合，精取 2 mL，於棕色磨砂玻璃試管中，塞以瓶蓋。於 100 之水浴反應 1.5 小時後，加甲醇定容成 2.0 mL，並置於-30 冷凍櫃儲存備用。

(2) 高效液相層析儀 (HPLC) 之分析條件

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

移動相：氰甲烷與 0.5% 磷酸 (36 : 64, v/v)

流速：1.0 mL/min

檢測波長：270 nm

內標準：Ethyl paraben (20.0 μ g/mL in methanol)

(3) 檢量線之繪製

精確稱取 baicalin、baicalein 及 wogonin 10.0 mg，以少量甲醇溶之，再以甲醇定容至 10.0 mL 為貯存溶液 (1.0 mg/mL)。取適量貯存溶液用甲醇稀釋，使各標準溶液濃度分別為 0.8、1.6、3.2、

6.3、12.5、25.0、50.0 及 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 。取各標準溶液 200 μL 分別加入等體積之內標準甲醇溶液 (ethyl paraben, 20.0 $\mu\text{g/mL}$)。經 HPLC 分析所得之標準溶液波峰與內標準之波峰面積比值，與標準溶液之各已知濃度進行線性迴歸，求得檢量線之方程式。

(4) 黃芩水煎劑中 baicalin、baicalein 與 wogonin 之定量

萃取之檢品解凍後，精取 300 μL 加甲醇 700 μL 振盪混合，經 9860 g 高速離心 15 分鐘，取 200 μL 上清液，加等體積之內標準甲醇溶液 (ethyl paraben, 20.0 $\mu\text{g/mL}$)，混合後經微孔濾膜 (0.45 μm) 過濾。取 20 μL 注入 HPLC 分析，以檢品中 baicalin、baicalein 及 wogonin 與內標準之波峰面積比值，分別代入 baicalin、baicalein 及 wogonin 檢量線之方程式，求出各檢品中 baicalin、baicalein 及 wogonin 之含量。

(5) 酸水解反應後 wogonin 之定量

酸水解反應之檢品解凍後，取上清液 100 μL 加甲醇 300 μL 振盪混合，經 9860 g 高速離心 15 分鐘，取上清液 200 μL 加等體積之內標準甲醇溶液 (ethyl paraben, 20.0 $\mu\text{g/mL}$)，混合後經微孔濾膜 (0.45 μm) 過濾，取 20 μL 注入 HPLC 分析，以檢品中 wogonin 與內標準之波峰面積比值，代入 wogonin 檢量線之方程式，求出檢品中 wogonin 之含量。

經酸水解反應後，所得 wogonin 之總含量減去酸水解前 wogonin 之含量，計算而得 wogonoside 的含量。

(四) 動物、給藥及採血

(1) 動物

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠 (體重介於 300 ~ 450 g , 出生 8 ~ 12 週)。購自國科會動物中心 , 飼養於中國醫藥大學動物中心。

(2) 給藥

實驗前禁食 12 小時 , 實驗設計採平行試驗模式。口服投藥將大白鼠隨機分成五組 , 第一組及第二組以胃管投予 MTX (5 mg/kg) 並分別併服相當於 2.0 g/kg 及 1.0 g/kg 之大黃水煎劑 , 第三組及第四組以胃管投予 MTX (5 mg/kg) 並分別併服相當於 2.0 g/kg 及 1.0 g/kg 之黃芩水煎劑 , 第五組投予 MTX (5 mg/kg) 併服與水煎劑等體積的水。靜脈注射將大白鼠隨機分成三組 , 第一組尾靜脈注射 MTX (1 mg/kg) 口服併服相當於 2.0 g/kg 之大黃水煎劑 , 第二組尾靜脈注射 MTX (1 mg/kg) 口服併服相當於 2.0 g/kg 之黃芩水煎劑 , 第三組投予 MTX (1 mg/kg) 併服與水煎劑等體積的水。

(3) 採血

口服投藥後於 15、30、60、120、240、480、720、1440、2160 和 2880 分鐘 , 以心臟穿刺採血。靜脈注射於 5、15、30、45、60、90、120、180、240 及 300 分鐘採血。每次採血量為 0.4 mL , 將血

液檢品置於微量離心管，高速離心 (9860 g) 15 分鐘，貯存於 -30℃，俟後分析。

(五) 血清中 MTX 之定量

利用 TDx Analyzer 以螢光偏極免疫分析法 (Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA) 定量血液中 MTX 濃度。

檢量線之繪製：取濃度分別為 0、0.05、0.15、0.30、0.60 及 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 之血清標準溶液 (TDx MTX monoclonal serum reagent) 各 80 μL ，利用 MTX kit 以 TDx analyzer 分析，自動繪製檢量線。

血清檢品以 MTX kit 分析後，自動代入檢量線換算，獲得 MTX 濃度。檢量線範圍為 0.00-1.00 $\mu\text{mol/L}$ ；偵測極限為 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 。

(六) 數據處理及統計分析

利用電腦程式 WINNONLIN 之非室體模式 (noncompartment model) 計算動力學參數，並以 ANOVA – Scheffe 分析單服 MTX 與併服大黃、黃芩組之組間差異 ($p < 0.05$)。