

編號: CCMP92-RD-110

中藥藥膠布抽提物製成油性與水性藥膠布之品質評估與成分釋出效應之研究 (3-3)

詹道明

高雄醫學大學藥學研究所

摘 要

本研究採用如意金黃散為模式藥物，溶媒抽提率以乙醇為最佳，將乙醇浸膏製成油性與水性藥膠布執行動物試驗。動物試驗部分，發現油性藥膠布有部分動物產生刺激性反應，推測與油性藥膠布本身之黏性有關；水性藥膠布則未發現相關情形。應對藥膠布之處方進行相關研究，應該有助於了解相關不良反應之機轉。

關鍵詞：如意金黃散、藥膠布、動物試驗

(本文彩色附圖 01-13，詳見附錄五)

CCMP92-RD-110

A study on the quality control of the hydrophilic and hydrophobic plasters containing the extract of plaster formulation and the establishment of release of indicating components (3-3)

Thau-Ming Cham

Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences

Kaohsiung Medical University

Abstract

“Lu Yi Ging Huang San” was chosen as the model formulation in this study. Ethanol was found to be the most effective vehicle for the extraction of the formulation. Hence, both hydrophilic and hydrophobic plasters were manufactured using the ethanol extract. Irritation reactions were found in some of the animal testing of hydrophobic plaster. However, this kind of irritation reaction was not found in animal test on hydrophilic plaster. The irritation reactions may be caused by the high viscosity of hydrophobic plaster. Advance research in plaster formulation will be beneficial to understand the mechanism of the adverse reaction.

Keywords: Lu Yi Ging Huang San, plaster, animal test

壹、前言

藥膠布在國內 OTC 市場佔有很大的比例，因其有方便性及速效性兩大優點。依行政院衛生署中醫藥委員會九十年研究重點⁽¹⁾，研究項目四、4-3、探討藥膠布中之有效成分及其釋出效應之研究；研究目的設定為建立檢驗標準；其問題背景說明係藥膠布目前因藥材與麻油一齊熬煮，僅能檢出後下的成分，但對於熬出的情況不甚瞭解。

藥膠布在藥劑學上之分類⁽²⁾，屬硬膏劑的一種，膏藥、藥膠布、貼片等均屬之，目前市面上之中藥藥膠布，係由傳統膏藥改良而成，傳統膏藥製法係以麻油熬煮藥材加入黃丹、縮丹聚合、去火毒、成型塗佈後即為膏藥劑。由於現代製藥工藝的進步，目前在藥膠布之製程上傾向採用樹脂或水性配方來取代有毒的黃丹，這種演進值得鼓勵。惟在中醫藥強調藥材道地，遵古法製，傳統硬膏之製程，以麻油熬煮藥材，在熬煮過程中是否會影響成分含量？油脂在加熱過程中，黏度變大，聚合度加大，酯價與碘價下降，致使檢品不易處理，均造成分析上的困難。

目前市售之中藥材指標成分多為較具極性者，用於以水抽提或乙醇抽提之濃縮製劑而言，較為適用；對於藥膠布成分以麻油抽提者，為較低極性之成分，現有之指標成分則多不適用。故，應評估以水抽提浸膏或乙醇抽提浸膏來取代麻油抽提浸膏，以便製成藥膠布，進行質量檢控並比較其優缺點。藥膠布分析檢驗標準之設定，目前公定書未有明確的規範；甚至以麻油抽提之成分是否存在，抽出後是否可以被釋放與吸收，尚無切確定論。

本計劃擬採用如意金黃散⁽²⁾為研究處方，處方出處為外科正宗，進行抽提物之釋出條件探討，希望進而建立可靠之檢驗標準。方法中分別評估以麻油，水、乙醇及 50%乙醇水作為抽提溶媒，對各指標成分之釋出效應，以作為後續製程之參考。將最佳抽提溶媒之抽提物製成油性及水性藥膠布，比較分析其藥劑學差異。同時如意金黃散之油性與水性藥膠布動物試驗。擬執行皮膚刺激性試驗、皮膚過敏性試驗、皮膚毒性試驗、皮膚長期試驗等四項⁽³⁾。

貳、材料與方法

一、材料：

藥材：生天南星、黃柏、大黃、姜黃、白芷、厚朴、陳皮、甘草、蒼朮、天花粉。

抽提溶媒：麻油 (Sesame oil, USP)，水 (Purified Water, USP)、乙醇 (Ethyl alcohol, USP) 及 50%乙醇水。

指標成分⁽⁴⁾：Berberine、Emodin，Glycyrrhizin 與 Hesperidin。

其它：甲醇 (Methanol)，乙酸乙酯 (Ethyl acetate)，乙醇 (Ethanol)，氰甲烷 (Acetonitrile)，苯 (Benzene)，氯仿 (Chloroform)。

賦形劑：樹脂 (Resin)，壓克力酸 (Polyacrylic acid)。

二、儀器：

Shimadzu HPLC (日本島津株式會社)，減壓濃縮機 (日本 Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)，乾燥機 (日本 Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)。

三、方法：

(一) 藥材成分抽提

如意金黃散：稱取栝樓根 25 g、黃柏 12.5 g、大黃 12.5 g、姜黃 12.5 g、白芷 12.5 g、厚朴 5 g、陳皮 5 g、甘草 5 g、蒼朮 5 g、生天南星 5 g，剪碎。

1. 麻油抽提液：將上述藥材加麻油 300 mL 浸泡 24 hr，以 150°C 加熱萃取 3 hr 後，用紗布過濾並用麻油定量至 300 mL，即為如意金黃散麻油萃取液。

2. 水抽提液：加水 300 mL，加熱迴流萃取 24 hr 後，用紗布過濾並用水定量至 300 mL，即為如意金黃散水萃取液。

3. 乙醇抽提液：將上述藥材加乙醇 300 mL，加熱迴流萃取 24 hr 後，用紗布過濾並用乙醇定量至 300 mL，即為如意金黃散乙醇萃取液。

4. 50%乙醇萃取：將上述藥材加 50%乙醇 300 mL，加熱迴流萃

取 24 hr 後，用紗布過濾並用 50%乙醇定量至 300 mL，即為如意金黃散 50%乙醇萃取液。

(二) 指標成分之定量

1. Berberine 標準品檢液：取 Berberine 指標成分 10 mg，以甲醇稀釋成 100 mL (0.1 mg/mL)。
2. Emodin 標準品檢液：取 Emodin 指標成分 10 mg，以甲醇稀釋成 100 mL (0.1 mg/mL)。
3. Glycyrrhizin 標準品檢液：取 Glycyrrhizin 指標成分 10 mg，以甲醇稀釋成 100 mL (0.1 mg/mL)。
4. Hesperidin 標準品檢液：取 Hesperidin 指標成分 10 mg，以甲醇稀釋成 100 mL (0.1 mg/mL)。

(三) 含量測定

1. 麻油萃取：取上述製備如意金黃散麻油萃取液 10 mL，加 n-hexane 250 mL 及 methanol 250 mL 進行分配層析並取 methanol 層，再將 methanol 層減壓濃縮乾後，定容至 10 mL，經 0.45 μm 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之對象。
2. 乙醇萃取：將上述製備如意金黃散乙醇萃取液經減壓濃縮後，以定量瓶定容至 50 mL，經 0.45 μm 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之對象。
3. 50%乙醇萃取：將上述製備如意金黃散 50% 乙醇萃取液經減壓濃縮後，以定量瓶定容至 50 mL，經 0.45 μm 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之對象。
4. 水萃取：將上述製備如意金黃散水萃取液經減壓濃縮後，以定量瓶定容至 50 mL，經 0.45 μm 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之對象。
5. HPLC 操作條件^(5,6)

使用儀器：Shimadzu LC-6A HPLC

分離管柱：Merck 50995 Lichrospher RP-18(e) 4x125 mm

分離管溫度：室溫

指標成分	移動相	UV 波長	流速
Berberine	氘甲烷：水：磷酸二氫鉀：月桂酸鈉=600：400：3.4 gm：1.7 gm	345 nm	2 mL/min
Emodin	氘甲烷：2%醋酸=50：50	430 nm	1 mL/min
Glycyrrhizin	水：氘甲烷(65:35)含 0.25%醋酸	254 nm	1.0 mL/min
Hesperidin	5% 冰醋酸：甲醇 8：2	280 nm	0.5 mL/min

(四) 分析方法確效

1. 專一性：

採用集光二列陣紫外光 (PDA, Photo Diode Array UV) 分析鑑別指標成分波峰純度。

2. 檢量線與範圍：

取對照標準品泡成較高濃度之儲存溶液，泡製成一系列 ($n \geq 5$) 濃度之標準品溶液，注入 10 μ L，以標準品之波峰面積為 Y 軸，標準品之濃度為 X 軸作圖，求出檢量線之線性方程式及相關係數。

3. 同日間與異日間分析之變異

新鮮配製檢量線之標準溶液，分別於上午 8 時、中午 12 時與下午 4 時三個時段，進行溶液中指標成分定量分析，重覆分析三次，連續 3 日；計算其平均值、標準偏差、變異係數及相對殘差，以評估其分析條件之穩定性及測量值之再現性。

4. 回收率試驗

精確稱取已知指標成分含量之藥品浸膏 1.0 g，分別加入指標成分 0.05、0.25、0.50、2.50 及 5.00 mg 後，再添加最佳抽提溶媒至 10 mL 以超音波震盪 60 min，過濾備用。

回收率 (%) = [(檢測所得之指標成分含量 - 已知之指標成分含量) / 指標成分之加入量] x 100

(五) 藥膠布之試製與評估^(7,8)

1. 採用如意金黃散為研究處方，由專業 GMP 中藥藥膠布廠

提供藥膠布賦形劑及設備來產製樣品供研究用。

2. 每片藥膠布含適量之如意金黃散處方藥材乙醇抽提浸膏，每片如意金黃散藥膠布藥材含量相當於栝樓根 500 mg、黃柏、大黃、姜黃、白芷 250 mg、厚朴、陳皮、甘草、蒼朮、生天南星各 100 mg。調入樹脂或壓克力酸作為基劑，製成油性及水性藥膠布（圖二、三）。

3. 試製三批，批量 2000 片（限於製造設備之最小批量為 2000 片）。

4. 質量管制方法

(1) 性狀

(2) 一般規定

A. 本品之布面，無滲出黏性物質。

B. 黏性試驗：取本品五片緊密貼合於皮膚上，應不能脫落，並且撕下後粘貼部位應不會有藥膠殘留。或以滾球測定法，測定其黏性。

C. 尺寸偏差試驗及重量差異。

5. 薄層層析法鑑別（圖四-十三）

薄層層析板：Silica gel 60 254

檢液點注量：5 μ L

展開距離：5 cm

藥材/指標成分	移動相	檢測方法	結果
黃柏	正丁醇:水:冰醋酸= 7:2:1	UV 366 nm	0.44/黃色螢光斑點
大黃	乙酸乙酯:甲醇:水= 10:2:1	目視	0.84/黃色色點
甘草	正丁醇:水:冰醋酸= 7:2:1	UV 254 nm	0.3/暗褐色點
陳皮	氯仿:丙酮= 5:3	UV 254 nm	0.66/暗褐色點
生天南星	正己烷:乙酸乙酯= 8:2	香莢蘭醛發色液， 105°C，3 分鐘	0.32/紫色色點
白芷	正己烷:乙酸乙酯= 8:2	UV 254 nm	0.22/暗褐色點
厚朴	氯仿:丙酮= 9:1	UV 254 nm	0.48/暗褐色點
姜黃	氯仿:甲醇= 6:1	目視	0.44, 0.51/黃色色點
蒼朮	正己烷	UV 254 nm	0.4/暗褐色點
天花粉	正丁醇:水:冰醋酸= 4:1:1	Ninhydrine 發色 液，105°C，3 分鐘	0.26/粉紅色色點

6. 含量測定

(1) 水性藥膠布檢體處理：

取水性藥膠布製品 10 片，精確秤取各藥膠布重量，取其平均重量。取相當於一片藥膠布之檢體，切成碎片，加 methanol 1,000 mL 置於超音波震盪器，震盪萃取 24 hr，經過濾之濾液減壓濃縮乾後以 methanol 定容至 25 mL，經 0.45 μm 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之檢品。

(2) 油性藥膠布檢體處理：

取油性藥膠布製品 10 片，精確秤取各藥膠布重量，取其平均重量。取相當於一片藥膠布之檢體，切成碎片，加氯仿 200 mL 置於超音波震盪器，使其完全溶解，慢慢加入甲醇 800 mL 使賦型劑溶解度變差而析出，經過濾之濾液減壓濃縮乾後以 methanol 定容至 25 mL，經 0.45 μm 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之檢品。

(3) 分析條件:見貳-三-(三)-5。(圖十五-十八)

(八) 體外動物試驗 (圖十九)

1. 皮膚刺激試驗

(1) 試驗目的

觀察動物皮膚接觸受試物後產生的刺激反應情況。

(2) 試驗材料

A. 動物：家兔體重 2 kg，於給受試物前 24 hr 將動物背部脊柱兩側毛脫掉，脫毛面積約為表面積 10% (每側各約 50 cm^2)。

B. 受試物：水性及油性藥膠布劑，受試物與皮膚有良好的接觸。

(3) 試驗方法

至少選用 3 隻家兔。在受試物區、對照區和破損皮膚區 (脫毛後) 一次或多次將受試物貼於受試物區，賦形劑則貼於對照區，用適宜方法固定。24 hr 後用溫水或無刺激性溶劑去除殘留受試物及賦形劑。去除受試物後

1, 24, 48 和 72 hr 觀察所貼部位有無紅斑和水腫等情況，以及上述變化的恢復情況和時間。多次給受試物試驗則一般每日貼 1 次，連續 1 周，其餘均給與 1 次受試物的方法和要求一致。

(4) 結果判斷與評價

每隻動物試驗結果按表十四進行刺激反應評分，計算出平均分按表十五進行刺激強度評價。

2. 皮膚過敏試驗

(1) 試驗目的

通過動物皮膚重復接觸受試物後，觀察機體免疫系統反應在皮膚上的表現。

(2) 試驗材料

A. 動物：家兔體重 2 kg，於給受試物前 24 hr 將動物背部脊柱兩側毛脫掉，脫毛面積約為表面積 10%（家兔每側各約 50 cm²）。

B. 受試物：水性及油性藥膠布劑，應保證受試物與皮膚有良好的接觸。

C. 陽性致敏物：2,4-二硝基氯代苯配製成 1% 的致敏濃度和 0.1% 的激發濃度。

(3) 試驗方法

A. 實驗分組：將家兔按體重性別隨機分成 3 組，每組 3 隻。第 1 組給受試物，第 2 組空白對照（給賦形劑），第 3 組陽性物對照（給陽性致敏物）。

B. 致敏接觸：取受試物貼在動物左側脫毛區，用適宜方法固定，持續 6 hr。第 7 天和第 14 天，以同樣方法重複一次。空白對照組與陽性物對照組方法同上。

C. 激發接觸：於末次給受試物致敏後 14 天，將受試物貼於背部右側脫毛區，6 hr 後去掉受試物，即刻觀察，然後於 24, 48 及 72 hr 再次觀察皮膚過敏反應情況，按表十六評分（空白對照與陽性對照方法均同受試物組）。

(4) 結果判定與評價：試驗結果按皮膚反應評分標準評分後，根據試驗組與對照組皮膚反應的差別，按表十六判斷受試物對皮膚過敏反應性質。為了反映受試物的致敏強度，可按表十七的分類判斷其致敏率。致敏率的計算是：將出現皮膚紅斑或水腫（不論程度輕重）的動物例數除以受試動物總數，即致敏率。

3. 皮膚急性毒性試驗

(1) 試驗目的

觀察動物皮膚短期內接觸受試物所產生的毒性反應。

(2) 試驗材料

A. 動物：選用成年健康家兔，家兔體重 2 kg 為宜，於給藥前 24 hr 將動物背部脊柱兩側毛脫掉，去毛範圍約相當於體面積 10% 左右（家兔約 150 cm² 左右）。

B. 受試物：水性及油性藥膠布劑，應確保受試物與皮膚有良好的接觸。

(3) 試驗方法：

A. 劑量選擇：直接選用濃縮浸膏作為受試物。

B. 給受試物方法和觀察：試驗時，將受試物貼於動物背部脫毛區，並用適宜方法固定。貼受試物 24 hr 後，可用溫水或適當溶劑去除殘留的受試物或賦形劑，每日觀察，連續 7~14 天。給受試物後注意動物的全身中毒表現和死亡情況，包括動物體重、皮膚、毛髮、眼睛和粘膜的變化，呼吸、循環、中樞神經系統、四肢活動等的變化。若有死亡動物則需進行屍檢和肉眼觀察。當有肉眼可見病變時，則需進行病理學檢查。

(4) 結果判斷：試驗結果與對照組比較進行判斷。

4. 皮膚長期毒性試驗

(1) 試驗目的

觀察動物皮膚長期接觸受試物，經皮膚滲透對機體產生的異常反應和反應的可逆程度。

(2) 試驗材料

A. 動物：選用成年健康家兔，家兔體重 2 kg 左右為宜。於給藥前 24 hr 將動物背部脊柱兩側毛脫掉，脫毛面積約相當於體表面積的 10% 左右（家兔約 150 cm²）。

B. 受試物：水性及油性藥膠布劑，應保證受試物與皮膚有良好的接觸。

(3) 試驗方法

A. 劑量選擇：直接選用濃縮浸膏作為受試物。

B. 給受試物方法及時間：將受試物貼於動物背部脫毛區，並用適宜方法固定，每日 1 次，每次至少接觸 6 hr，按臨床用藥療程的 3 倍以上時間連續給藥。若出現毒性反應，部分動物應於停藥後繼續觀察 1~2 週，以便確定受試物毒性可逆反應程度。

C. 檢測項目：除每日觀察皮膚、臨床變化及皮膚病理學檢查外，其血液學、血液生化指標和病理學檢查項目均同長期毒性試驗要求。

(4) 結果判斷：實驗結果應寫明安全劑量、中毒劑量、中毒表現、中毒的靶器官及中毒的可逆程度等。

參、結果

- 1.水、乙醇、50%乙醇與麻油之抽提率之比較，發現溶媒抽提效果以麻油最差，以乙醇為最佳（圖一）。如意金黃散各指標成分溶媒萃取可以發現 Berberine、Emodin 及 Glycyrrhizin 均以乙醇為最佳抽提溶媒，Hesperidin 以水最佳抽提溶媒，其次為 50%乙醇水與乙醇。
- 2.各指標成分之分析方法專一性（圖十五-十八）、精密度與準確度呈現之結果令人滿意，C.V.值均小於 5.0%（表一-四），回收率介於 100.12% -101.60%（表五-八）。
- 3.Berberine、Emodin、Glycyrrhizin 與 Hesperidin 等四種指標成分之檢量線製作，其線性極佳，r 值大於 0.999（圖十四）。
- 4.製成之藥膠布符合 JP 13th ed 外用膠布劑之規定；去年藥膠布中所發現之析出物，經過製程改善，已可經由反覆過濾去除。
- 5.藥膠布之薄層層析檢驗與 HPLC 指標含量測定發現隨著藥膠布之屬性不同，主要之呈色點表現出來的結果亦存在有相當差異。（表九，圖四-十三）
- 6.動物刺激試驗未發現使用水性藥膠布（6/6）有任何刺激反應發生，而油性藥膠布有（3/6）50%的機率發現紅腫充血反應，顯示水性藥膠布較油性藥膠布溫和（平均刺激強度評價=1.5 屬輕度刺激性）。（表十）
- 7.皮膚過敏性試驗則顯示九隻致敏誘導之兔子，受試組（3/9）與空白組（3/9）均未發現過敏反應，而對照組（3/9）則全數呈現紅腫之過敏反應（致敏率 = 0 屬弱致敏性）。（表十一）
- 8.皮膚急性與毒性試驗採用浸膏作為受試物，皮膚急性試驗（6/6）並未發現不良反應，長期實驗於只有油性藥膠布（2/6）在第一天有微紅腫現象發生。第二天觀察時症狀已減輕，皮膚經觀察，未發現相關毒性試驗。（表十二-表十三）

肆、討論

1. 麻油抽提物抽提效率不佳，除了熬煮過程可能破壞該成分外，麻油抽提物屬性為親油性，所抽出之物質推論應屬於油溶性物質，計劃中所選擇的指標成分多為親水性，如此所獲得之結論容易產生偏差。
2. 如意金黃散 HPLC 分析法確效呈現之指標結果令人滿意。
3. TLC 與 HPLC 所獲得之結果差異主要的原因是油性藥膠布與水性藥膠布性質相差甚大，一個是親油性，一個係親水性，製造過程的油水分佈情形將造成分析結果極大之差異。另一個原因可能是藥膠布本身膠體之結構所導致。
4. 由於乙醇抽提物多為較具極性物質所構成，油性藥膠布屬於親油性之架構，製造過程如何使其不分層，混合均勻，是製程上的一大難題，曾嘗試以加入乳化劑予以解決，效果尚待評估。
5. 水性藥膠布的結構是以聚壓克力酸為主體加入適合之架橋劑以形成水膠布膠體，這個過程是化合放熱反應，最終產品是一種聚合物型態，藥物嵌入聚合結構中，由於進行含量測定時，始終找不到破壞聚合物結構的方法，可能導致抽提不完全，也會影響到相關檢驗。
6. 油及水相膠體與乙醇抽提萃取物混合後，產生溶解度下降，導致成分之析出，進而使有效成分含量下降，如何建立一種緩衝機轉，使抽提物可以均勻地分佈在膠體中，將再做進一步的評估。
7. 動物試驗所呈現的結果，發現不良反應之結果多由油性藥膠布所衍生。交叉比對刺激性反應與長期毒性試驗，推測油性藥膠布之高黏性，撕下時會連兔毛一起拔起，推測是造成皮膚表面充血之主要因素。若能夠對處方進行藥劑學研究，評估不同之黏度對皮膚毒性之影響，將更可以確認此次一想法。
8. 過敏性試驗結果顯示屬弱致敏性，長期毒性與急性毒性試驗亦顯示無明顯之毒性。

伍、結論與建議

- 1.分析方法所顯示出之確效參數均佳，分析條件應可以適用於本計劃之相關應用。
- 2.就實驗結果而言，極性溶媒確實可以抽出較多之指標成分，抽提效果優於麻油，惟麻油熬煮後可能產生的新物質，古人可能就是以其作為療效，其中的得失，值得進一步研究。
- 3.藥膠布處方探討有其必要性，若能探討 2-3 組處方配合之表現，相信本計畫所獲得的資訊，將不止於此。

陸、參考文獻

- 1.中醫藥委員會研究組，2000.09，行政院衛生署中醫藥委員會九十年度中醫藥研究計劃申請作業手冊，中華民國行政院衛生署中醫藥委員會
- 2.孟竇武，孟聰子與孟慶恆，1996，中國膏藥藥膏摻藥全書 p.224，遼寧科學科技出版社，中華人民共和國
- 3.中華人民共和國衛生部藥政局，1993，新藥臨床前研究指導原則匯編，pp.204-208.，中華人民共和國
- 4.國家醫藥管理局中草藥情報中心編，1986，植物有效成分手冊，人民衛生出版社，中華人民共和國
- 5.原田正敏，平成元年，繁用生藥之成分定量，廣川書局，日本
- 6.藥物食品檢驗局，1999，中藥檢驗專輯（十一）中藥濃縮製劑指標成分定量方法，中華民國
- 7.Carstensen, J.T. 1990. Drug Stability – principle and practice. Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A.
- 8.秋山幸和等，1996，第十三改正日本藥局方解說書，東京廣川書局，日本

柒、圖表

表一、 Berberine 之同日內與異日間變異

Concentration (mg/mL)	Intraday (n=3)		Interday (n=3)	
	Precision Mean ± S.D. (C.V.%)	Accuracy R.E.(%)	Precision Mean ± S.D. (C.V.%)	Accuracy R.E.(%)
1.00	0.9994 ± 0.0006 (0.1)	-0.1	0.9937 ± 0.0085 (0.9)	-0.6
0.50	0.4960 ± 0.0070 (1.4)	-0.8	0.4936 ± 0.0123 (2.5)	-1.3
0.10	0.1023 ± 0.0028 (2.7)	2.3	0.0993 ± 0.0019(1.9)	-0.7
0.05	0.0503 ± 0.0010 (2.0)	0.6	0.0494 ± 0.0002 (0.4)	-1.2
0.01	0.0100 ± 0.0002 (2.0)	-0.4	0.0097 ± 0.0001 (1.0)	-3.3

表二、 Emodin 之同日內與異日間變異

Concentration (mg/mL)	Intraday (n=3)		Interday (n=3)	
	Precision Mean ± S.D. (C.V.%)	Accuracy R.E.(%)	Precision Mean ± S.D. (C.V.%)	Accuracy R.E.(%)
1.00	0.9946 ± 0.0080 (0.8)	-0.5	1.0001 ± 0.0025 (0.3)	0.0
0.50	0.4924 ± 0.0191 (3.9)	-1.5	0.4974 ± 0.0069 (1.4)	-0.5
0.10	0.1001 ± 0.0022 (2.2)	0.1	0.0996 ± 0.0018(1.8)	-0.4
0.05	0.0503 ± 0.0007 (1.4)	0.6	0.0494 ± 0.0007 (1.4)	-1.3
0.01	0.0096 ± 0.0002 (2.1)	-4.0	0.0101 ± 0.0002 (2.0)	0.7

表三、 Glycyrrhizin 之同日內與異日間變異

Concentration (mg/mL)	Intraday (n=3)		Interday (n=3)	
	Precision Mean ± S.D. (C.V.%)	Accuracy R.E.(%)	Precision Mean ± S.D. (C.V.%)	Accuracy R.E.(%)
1.00	1.0114 ± 0.0187 (1.9)	1.1	0.9977 ± 0.0048 (0.5)	0.2
0.50	0.5105 ± 0.0056 (1.1)	2.1	0.4991 ± 0.0123 (2.5)	0.2
0.10	0.1018 ± 0.0037 (3.6)	1.8	0.0977 ± 0.0023 (2.4)	2.3
0.05	0.0503 ± 0.0008 (1.6)	0.5	0.0495 ± 0.0006 (1.2)	0.9
0.01	0.0100 ± 0.0003 (3.0)	0.4	0.0101 ± 0.0002 (2.0)	1.9

表四、Hesperidin 之同日內與異日間變異

Concentration (mg/mL)	Intraday (n=3)		Interday (n=3)	
	Precision Mean \pm S.D. (C.V.%)	Accuracy R.E.(%)	Precision Mean \pm S.D. (C.V.%)	Accuracy R.E.(%)
0.100	0.0973 \pm 0.0004 (0.4)	-2.7	0.1023 \pm 0.0002 (0.2)	2.3
0.075	0.0748 \pm 0.0004 (0.5)	-0.3	0.0749 \pm 0.0003 (0.4)	-0.13
0.050	0.0496 \pm 0.0007 (1.4)	-0.8	0.0501 \pm 0.0003 (0.6)	0.2
0.025	0.0251 \pm 0.0003 (1.2)	0.4	0.0251 \pm 0.0002 (0.8)	0.4
0.010	0.0100 \pm 0.0002 (2.0)	-0.4	0.0097 \pm 0.0001 (1.0)	-3.3

表五、Recovery of berberine in 如意金黃散

Berberine content in 如意金黃散 (mg/g)	Amount added (μ g/mL)	Amount Found (Mean \pm S.D., μ g/mL)	Recovery (Mean \pm S.D., %)
28.91	5.0	5.08 \pm 0.44	101.60 \pm 8.70
28.91	25.0	25.34 \pm 0.57	101.36 \pm 2.25
28.91	50.0	50.18 \pm 0.74	100.36 \pm 1.47
28.91	250.0	251.48 \pm 0.68	100.59 \pm 0.27
28.91	500.0	502.84 \pm 0.96	100.57 \pm 0.20

S.D.:Standard derivation . N=3.

表六、Recovery of emodin in 如意金黃散

Emodin content in 如意金黃散 (mg/g)	Amount added (μ g/mL)	Amount Found (Mean \pm S.D., μ g/mL)	Recovery (Mean \pm S.D., %)
0.37	5.0	5.02 \pm 0.48	101.60 \pm 2.20
0.37	25.0	25.19 \pm 0.76	101.36 \pm 2.28
0.37	50.0	51.32 \pm 0.62	100.36 \pm 1.48
0.37	250.0	250.51 \pm 0.92	100.59 \pm 0.30
0.37	500.0	501.48 \pm 0.88	100.57 \pm 0.20

S.D.:Standard derivation . N=3.

表七、Recovery of glycyrrhizin in 如意金黃散

Glycyrrhizin content in 如意金黃散 (mg/g)	Amount added (μ g/mL)	Amount Found (Mean \pm S.D., μ g/mL)	Recovery (Mean \pm S.D., %)
17.62	5.0	5.08 \pm 0.21	101.60 \pm 4.10
17.62	25.0	25.34 \pm 0.45	101.36 \pm 1.78
17.62	50.0	50.38 \pm 0.65	100.76 \pm 1.29
17.62	250.0	250.98 \pm 0.70	100.39 \pm 0.28
17.62	500.0	502.54 \pm 0.96	100.51 \pm 0.19

S.D.:Standard derivation . N=3.

表八、Recovery of hesperidin in 如意金黃散

Hesperidin content in 如意金黃散 (mg/g)	Amount added (μ g/mL)	Amount Found (Mean \pm S.D., μ g/mL)	Recovery (Mean \pm S.D., %)
18.94	5.0	5.01 \pm 0.21	100.20 \pm 4.19
18.94	25.0	25.12 \pm 0.22	100.48 \pm 0.88
18.94	50.0	50.06 \pm 0.31	100.12 \pm 0.62
18.94	250.0	250.61 \pm 0.67	100.24 \pm 0.27
18.94	500.0	500.73 \pm 1.96	100.17 \pm 0.39

S.D.:Standard derivation . N=3

表九、油性與水性藥膠布含量測定值

樣品 (每片計)	Berberine(mg)	Emodin(mg)	Glycyrrhizin(mg)	Hesperidin(mg)
油性藥膠布	1.35 \pm 0.35	0.81 \pm 1.62	ND	ND
水性藥膠布	0.77 \pm 0.27	1.03 \pm 1.21	2.47 \pm 0.84	0.41 \pm 0.23

*N=3

** ND : Not Detected

表十、皮膚刺激性試驗（多次試驗）

時間 編號	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
1	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應
2	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應
3	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	油性區有 輕微充血 反應	回復中顏 色變淡
4	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
5	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應	油性區有 充血反應
6	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫

*水性藥膠布未發現紅腫充血現象。

**N=6

表十一、皮膚過敏試驗（致敏接觸）

	6小時後	第1天	第2天	第3天	第4天
1-1	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
1-2	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
1-3	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
2-1	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
2-2	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
2-3	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
3-1	塗致敏物處 (左邊)紅腫	紅腫仍持續比 昨天浮腫	紅腫還在,消 退中	紅腫幾無,不 容易看出	紅腫已退
3-2	塗致敏物處 (左邊)紅腫	紅腫仍持續比 昨天浮腫	紅腫還在,消 退中	紅腫有退,只 剩比皮膚深一 點的顏色	紅腫已退
3-3	塗致敏物處 (左邊)紅腫	紅腫在消退中	紅腫還在,消 退中	已無紅腫	無紅腫

*取九隻兔子，分三組，第一組（1-1、1-2、1-3）給受試物，第二組（2-1、2-2、2-3）給空白對照，第三組（3-1、3-2、3-3）給陽性對照物。

表十二、皮膚急性毒性試驗

時間 編號	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
1	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
2	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
3	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
4	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
5	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
6	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫

*N=6

表十三、皮膚長期毒性試驗

時間 編號	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
1	油性部分有充血現象，濃縮浸膏部份無。	充血已退	無紅腫	無紅腫	無紅腫
2	油性部分有充血現象，濃縮浸膏部份無。	油性部分紅腫消退。	油性區有輕微充血反應	無紅腫	無紅腫
3	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
4	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
5	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫
6	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫	無紅腫

*水性藥膠布未發現紅腫充血現象。

**N=6

表十四、皮膚刺激反應評分

刺激反應	分數
紅斑：	
無紅斑	0
勉強可見	1
中度紅斑	2
嚴重紅斑	3
紫紅色紅斑並有焦痂形成	4
水腫：	
無水腫	0
勉強可見	1
皮膚隆起輪廓清楚	2
水腫隆起約 1 mm 並範圍擴大	4
總分	8

表十五、皮膚刺激強度評價

強度	分數
無刺激性	<0.5
輕度刺激性	<2.1
中度刺激性	<6.0
強刺激性	>6.0

表十六、皮膚過敏反應評分標準

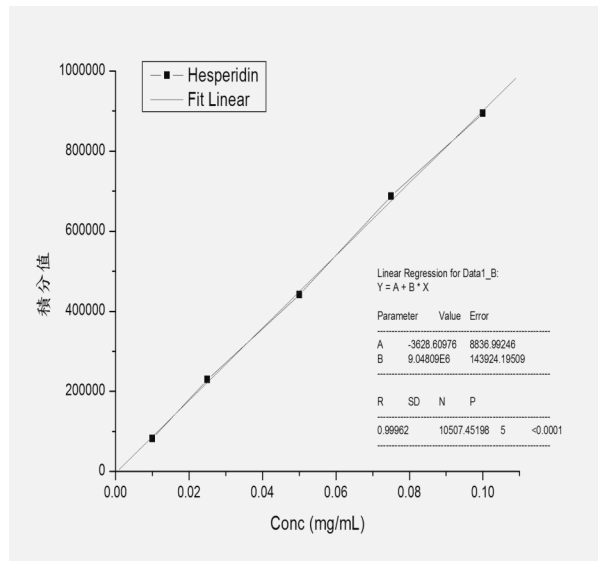
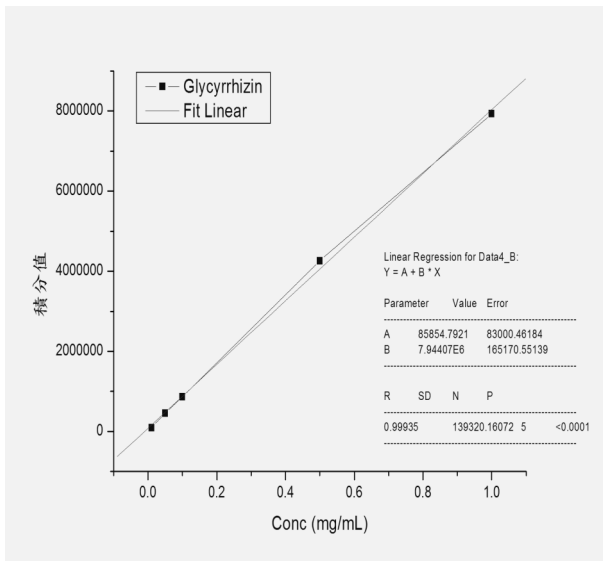
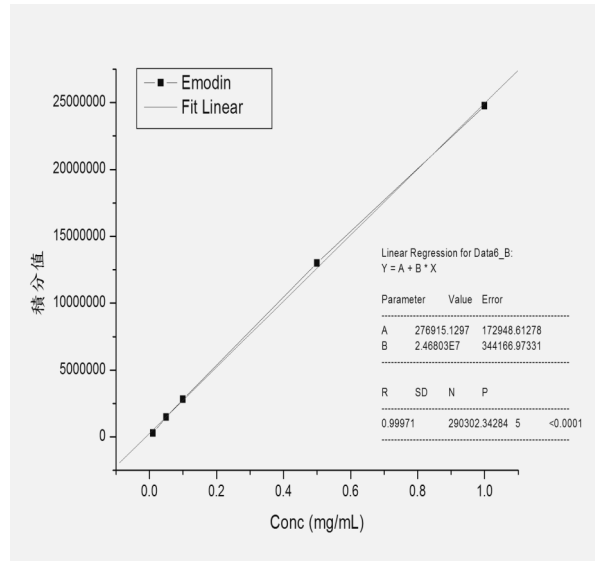
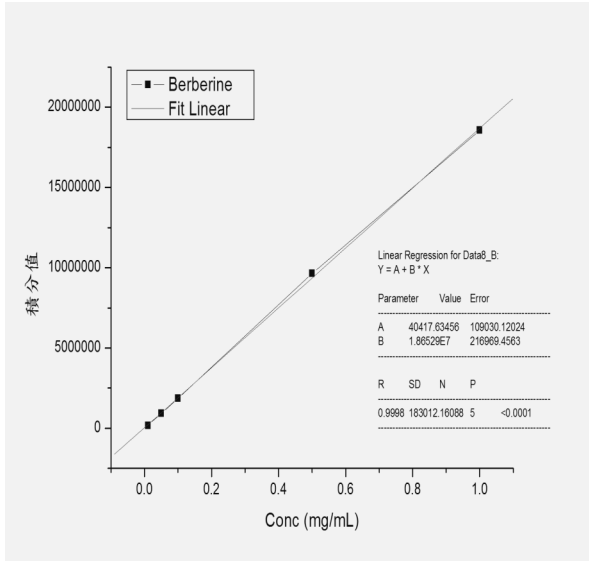
皮膚反應	分數
紅斑形成：	
無紅斑	0
輕度紅斑	1
中度紅斑	2
嚴重紅斑	3
水腫性紅斑	4
水腫形成：	0
無水腫	1
輕度水腫	2
中度水腫	3
重度水腫	4
總積分	7

$$\text{反應平均值} = \frac{\text{紅斑形成總分} + \text{水腫形成總分}}{\text{合計動物數}}$$

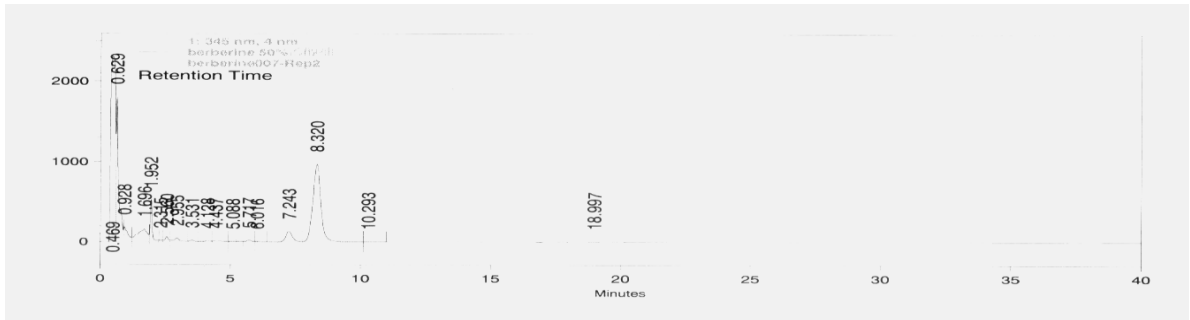
表十七、致敏率分類

致敏率 (%)	反應強度
0 — 10	弱致敏性
20 — 30	輕度致敏性
40 — 60	中度致敏性
70 — 80	高度致敏性
90 — 100	極度致敏性

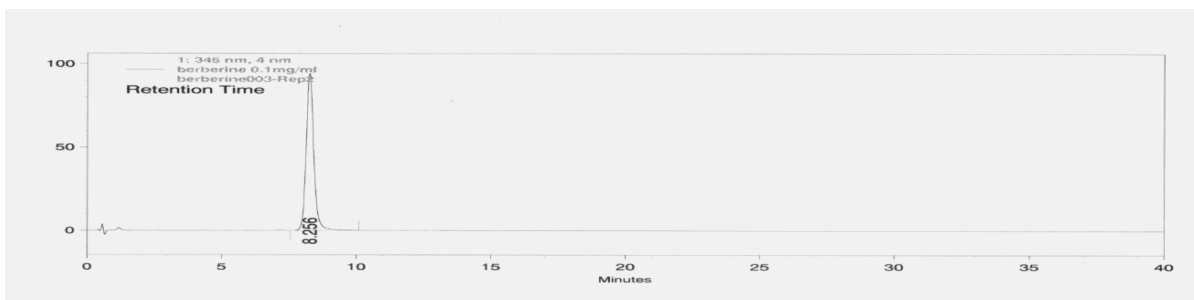
圖十四、四種指標成分之檢量線



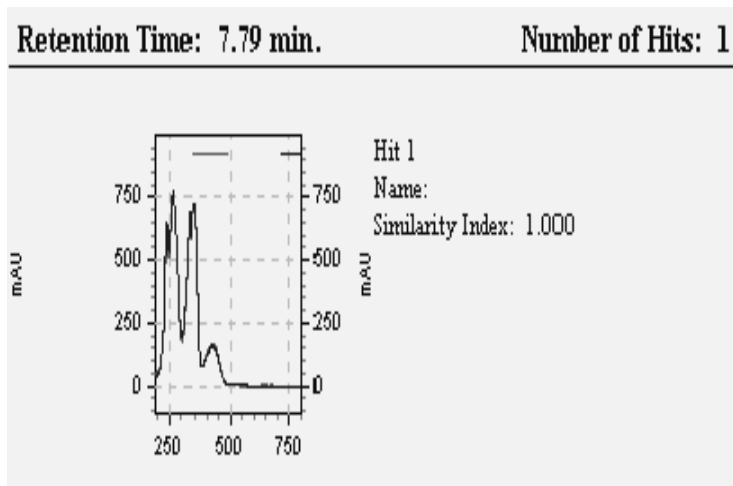
圖十五、如意金黃散Berberine 之分析HPLC與PDA疊加圖譜



15a. 如意金黃散 HPLC 分析圖譜

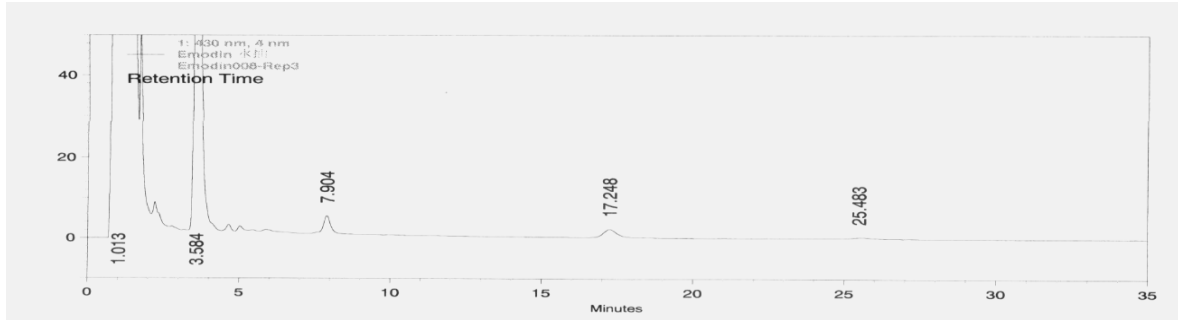


15b. 指標成分 Berberine HPLC 分析圖譜

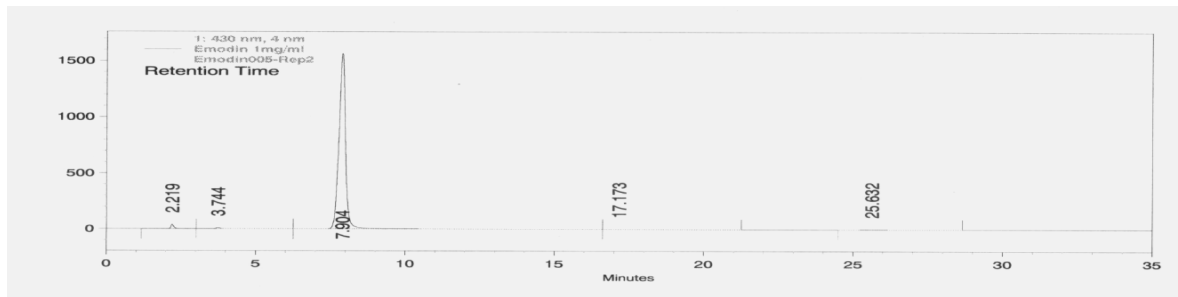


15c. Berberine PDA 疊加圖譜

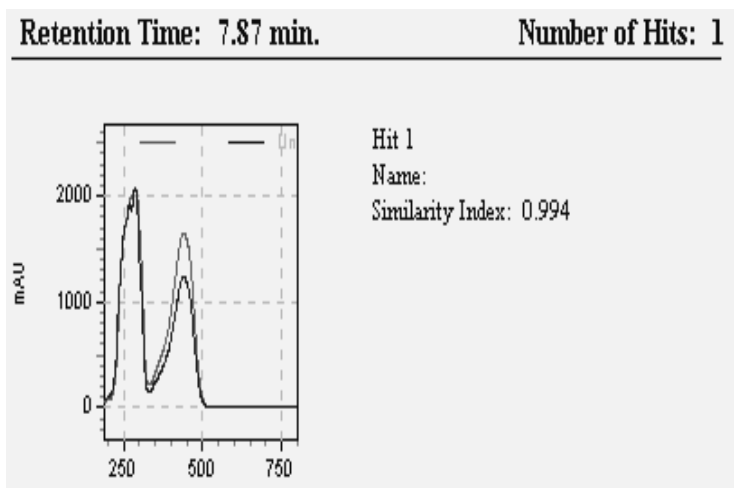
圖十六、如意金黃散Emodin 之分析HPLC與PDA疊加圖譜



16a. 如意金黃散 HPLC 分析圖譜

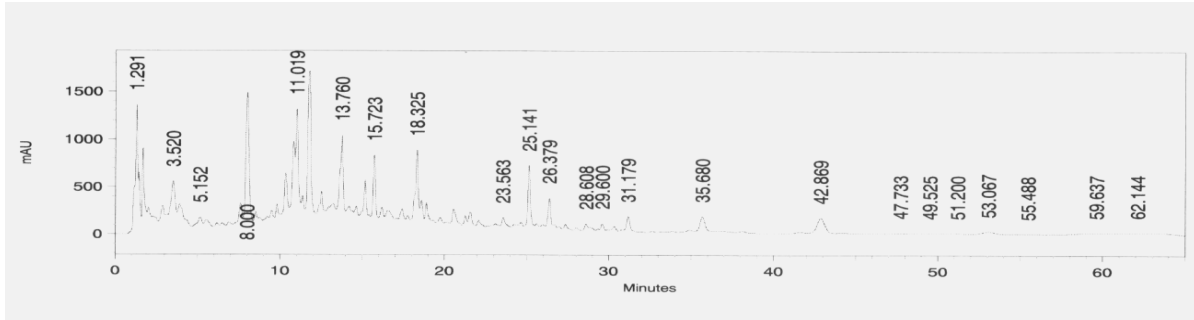


16b. 指標成分 Emodin HPLC 分析圖譜

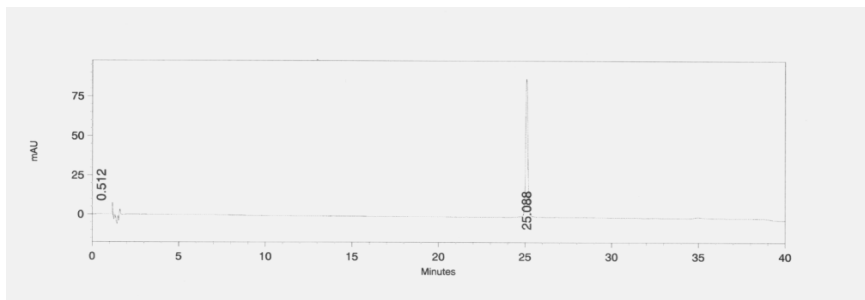


16c. Emodin PDA 疊加圖譜

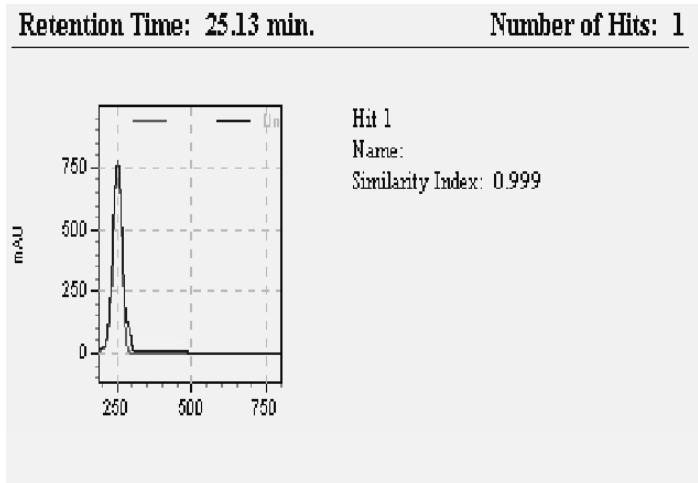
圖十七、如意金黃散Glycyrrhizin 之分析HPLC與PDA疊加圖譜



17a. 如意金黃散 HPLC 分析圖譜

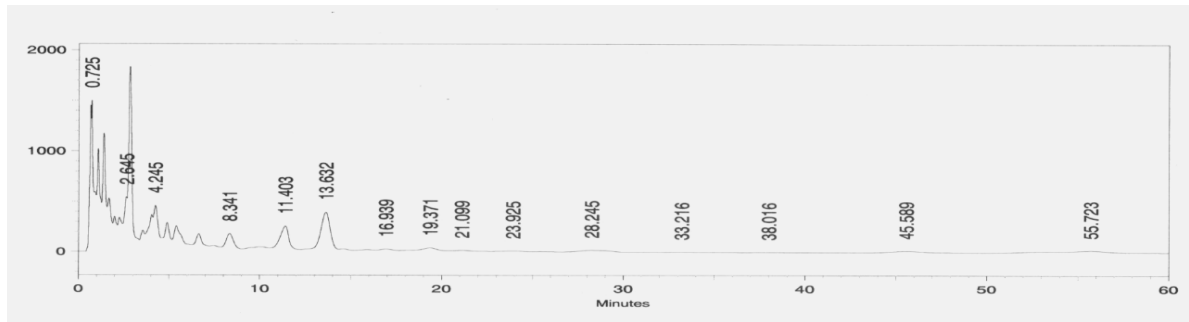


17b. 指標成分 Glycyrrhizin HPLC 分析圖譜

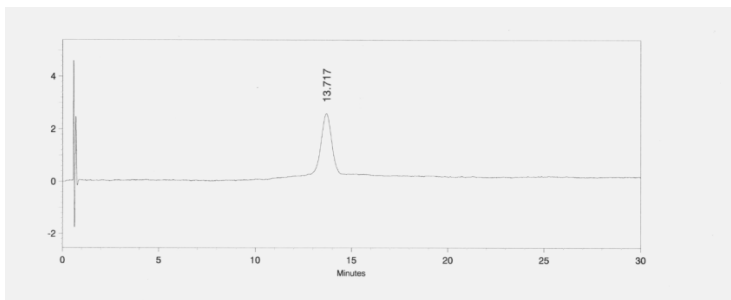


17c. Glycyrrhizin PDA 疊加圖譜

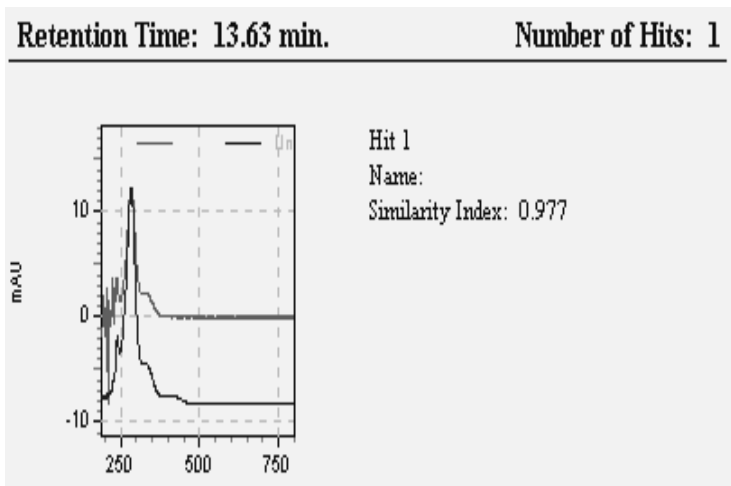
圖十八、如意金黃散Hesperidin 之分析HPLC與PDA疊加圖譜



18a. 如意金黃散 HPLC 分析圖譜



18b. 指標成分 Hesperidin HPLC 分析圖譜

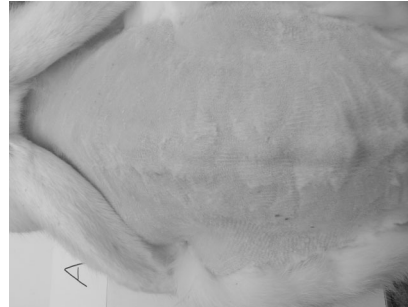


18c. Hesperidin PDA 疊加圖譜

圖十九、動物試驗操作流程



剃除毛髮



觀察皮膚表面是否完整



貼上藥膠布



以雙層 8 號網狀鬆緊繃帶固

編號: CCMP90-RD-011 ; CCMP91-RD-113 ; CCMP92-RD-110

中藥藥膠布及藥酒製劑之成分分析及其釋出效應之研究 (3-1~3-3) 中藥藥膠布抽提物製成油性與水性藥膠布之品質評估與成分釋出效應之研究

詹道明

高雄醫學大學藥學研究所

摘要

本研究採用萬應膏、綠云膏及如意金黃散為模式藥物，發現綠云膏及如意金黃散之溶媒抽提率以乙醇為最佳，萬應膏之溶媒抽提率以乙醇水(1:1)為最佳，將最佳抽提溶媒萃取物製成油性與水性藥膠布。開發油水性藥膠布相關品質控管條件，並進行分析方法確效。動物試驗部分，不論模式藥物為何，發現油性藥膠布有部分動物產生刺激性反應，推測與油性藥膠布本身之黏性有關；水性藥膠布則未發現相關情形。應對藥膠布之處方進行相關研究，應該有助於了解相關不良反應之機轉。

關鍵詞：萬應膏、綠云膏、如意金黃散、藥膠布、動物試驗

CCMP90-RD-011 ; CCMP91-RD-113 ; CCMP92-RD-110

Studies on the component analysis and the effect of release of marker components in patch formulas and tonic wine formulas. (3-1~3-3) -A study on the quality control of the hydrophilic and hydrophobic plasters containing the extract of plaster formulation and the establishment of release of indicating components

Thau-Ming Cham

Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences

Kaohsiung Medical University

Abstract

“Wan Ying Kau”, “Lu Yun Kau” and “Lu Yi Ging Huang San” were chosen as the model formulations in this study. The best extract vehicle was ethanol for the extraction of both “Lu Yun Kau” and “Lu Yi Ging Huang San”, and ethanol/water (1/1) for the extraction of “Wan Ying Kau”. Hence, both hydrophilic and hydrophobic plasters were manufactured using extract obtained by the optimal vehicles. This study also focus on development and validation of relative quality control analysis of the plasters. In animal test, hydrophobic plaster of all the three formulations gave irritating reactions. It maybe caused by the high viscosity of hydrophobic plaster. This irritation reaction was not found in the animal test of hydrophilic plaster. Further study on the plaster formulation is benefit for understand of the mechanism of relative adverse reaction of the various plaster formulation.

Keywords: Wan Ying Kau, Lu Yun Kau, Lu Yi Ging Huang San, plaster, animal test

壹、前言

藥膠布在國內 OTC 市場佔有很大的比例，因其有方便性及速效性兩大優點。依行政院衛生署中醫藥委員會九十年研究重點⁽¹⁾，研究項目四、4-3、探討藥膠布中之有效成分及其釋出效應之研究；研究目的設定為建立檢驗標準；其問題背景說明係藥膠布目前因藥材與麻油一齊熬煮，僅能檢出後下的成分，但對於熬出的情況不甚瞭解。

藥膠布在藥劑學上之分類⁽²⁾，屬硬膏劑的一種，膏藥、藥膠布、貼片等均屬之，目前市面上之中藥藥膠布，係由傳統膏藥改良而成，傳統膏藥製法係以麻油熬煮藥材加入黃丹、縮丹聚合、去火毒、成型塗佈後即為膏藥劑。由於現代製藥工藝的進步，目前在藥膠布之製程上傾向採用樹脂或水性配方來取代有毒的黃丹，這種演進值得鼓勵。惟在中醫藥強調藥材道地，遵古法製，傳統硬膏之製程，以麻油熬煮藥材，在熬煮過程中是否會影響成分含量？油脂在加熱過程中，黏度變大，聚合度加大，酯價與碘價下降，致使檢品不易處理，均造成分析上的困難。

目前市售之中藥材指標成分多為較具極性者，用於以水抽提或乙醇抽提之濃縮製劑而言，較為適用；對於藥膠布成分以麻油抽提者，為較低極性之成分，現有之指標成分則多不適用。故，應評估以水抽提浸膏或乙醇抽提浸膏來取代麻油抽提浸膏，以便製成藥膠布，進行質量檢控並比較其優缺點。藥膠布分析檢驗標準之設定，目前公定書未有明確的規範；甚至以麻油抽提之成分是否存在，抽出後是否可以被釋放與吸收，尚無切確定論。

本計劃擬採用萬應膏（醫宗金鑑）、綠云膏（醫學正宗）與如意金黃散（外科正宗）⁽²⁾為研究處方，進行抽提物之釋出條件探討，希望進而建立可靠之檢驗標準。方法中分別評估以麻油，水、乙醇及 50%乙醇水作為抽提溶媒，對各指標成分之釋出效應，以作為後續製程之參考。將最佳抽提溶媒之抽提物製成油性及水性藥膠布，比較分析其藥劑學差異。同時進行三種處方之油性與水性藥膠布動物試驗。擬執行皮膚刺激性試驗、皮膚過敏性試驗、皮膚毒性試驗、皮膚長期試驗等四項⁽³⁾。

貳、材料與方法

一、材料：

藥材：

萬應膏：川烏，草烏，生地黃，白朮，白芨，肉桂，白芷，當歸，赤芍藥，羌活，苦參，烏藥，甘草，獨活，元參，大黃與木鼈子。

綠云膏：大黃，黃芩，黃連，黃柏，元參與木鼈子。

如意金黃散：生天南星、黃柏、大黃、姜黃、白芷、厚朴、陳皮、甘草、蒼朮、天花粉。。

抽提溶媒：麻油，水、乙醇及 50%乙醇水。

指標成分⁽⁴⁾：

萬應膏：Paeoniflorin，Glycyrrhizin，Cinnamic acid，Ferulic acid 與 Osthole。

綠云膏：Emodin，Baicalin 與 Berberine。

如意金黃散：Berberine、Emodin、Glycyrrhizin 與 Hesperidin。

其它：甲醇（Methanol），乙酸乙酯（Ethyl acetate），乙醇（Ethanol），氰甲烷（Acetonitrile），苯（Benzene），氯仿（Chloroform）。

賦形劑：樹脂（Resin），壓克力酸（Polyacrylic acid）。

二、儀器：

Shimadzu HPLC（日本島津株式會社），減壓濃縮機（日本 Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd.，），乾燥機（日本 Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd.）。

三、方法：

（一）藥材成分抽提

1.麻油抽提液：將處方藥材加麻油 300 mL 浸泡 24 hr，以 150°C 加熱萃取 3 hr 後，用紗布過濾並用麻油定量至 300mL，即為麻油萃取液。

2.水抽提液：將處方藥材加水 300 mL，加熱迴流萃取 24 hr 後，

用紗布過濾並用水定量至 300 mL，即為水萃取液。

3. 乙醇抽提液：將處方藥材加乙醇 300 mL，加熱迴流萃取 24 hr 後，用紗布過濾並用乙醇定量至 300 mL，即為乙醇萃取液。

4. 50% 乙醇水萃取：將處方上述藥材加 50% 乙醇水 300 mL，加熱迴流萃取 24 hr 後，用紗布過濾並用 50% 乙醇水定量至 300 mL，即為 50% 乙醇水萃取液。

(二) 含量測定

1. 麻油萃取：取上述製備三種處方麻油萃取液 10 mL，加 n-hexane 250 mL 及 methanol 250 mL 進行分配層析並取 methanol 層，再將 methanol 層減壓濃縮乾後，定容至 10 mL，經 0.45 μ m 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之對象。

2. 乙醇萃取：將上述製備三種處方乙醇萃取液經減壓濃縮後，以定量瓶定容至 50 mL，經 0.45 μ m 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之對象。

3. 50% 乙醇水萃取：將上述製備三種處方 50% 乙醇水萃取液經減壓濃縮後，以定量瓶定容至 50 mL，經 0.45 μ m 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之對象。

4. 水萃取：將上述製備三種處方水萃取液經減壓濃縮後，以定量瓶定容至 50 mL，經 0.45 μ m 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之對象。

5. HPLC 操作條件^(5,6)

使用儀器：Shimadzu LC-6A HPLC

分離管柱：Merck 50995 Lichrospher RP-18(e) 4x125 mm

分離管溫度：室溫

移動相、檢測波長與流速（見表一）

(三) 分析方法確效

1. 專一性：採用集光二列陣紫外光（PDA, Photo Diode Array UV）分析鑑別指標成分波峰純度。

2. 檢量線與範圍：

取對照標準品泡成較高濃度之儲存溶液，泡製成一系列（ $n \geq 5$ ）濃度之標準品溶液，注入 10 μ L，以標準品之波峰面積為 Y 軸，標準品之濃度為 X 軸作圖，求出檢量線之線性方程式及相關係數。

3. 同日間與異日間分析之變異

新鮮配製檢量線之標準溶液，分別於上午 8 時、中午 12 時與下午 4 時三個時段，進行溶液中指標成分定量分析，重覆分析三次，連續 3 日；計算其平均值、標準偏差、變異係數及相對殘差，以評估其分析條件之穩定性及測量值之再現性。

4. 回收率試驗

精確稱取已知指標成分含量之藥品浸膏 1.0 g，分別加入指標成分 0.05、0.25、0.50、2.50 及 5.00 mg 後，再添加最佳抽提溶媒至 10 mL，以超音波震盪 60 min，過濾備用。

回收率 (%) = $\frac{(\text{檢測所得之指標成分含量} - \text{已知之指標成分含量})}{\text{指標成分之加入量}} \times 100$

(四) 藥膠布之試製與評估^(7,8)

1. 採用三種處方為研究處方，由專業 GMP 中藥藥膠布廠提供藥膠布賦形劑及設備來產製樣品供研究用。

每片藥膠布含適量之三種處方處方藥材最佳抽提溶媒抽提浸膏，調入樹脂或壓克力酸作為基劑，製成油性及水性藥膠布。(藥膠布處方量見表二)

2. 試製三批，批量 2000 片 (限於製造設備之最小批量為 2000 片)。

3. 質量管制方法

(1) 性狀

(2) 一般規定

A. 本品之布面，無滲出黏性物質。

B. 黏性試驗: 取本品五片緊密貼合於皮膚上，應不能脫落，並且撕下後粘貼部位應不會有藥膠殘留。或以滾球測定法，測定其黏性。

C. 尺寸偏差試驗及重量差異。

5. 薄層層析法鑑別

薄層層析板：Silica gel 60 254

檢液點注量：5 μ L

展開距離：5 cm

移動相、檢測方法與結果 (見表三)

4. 含量測定

(1) 水性藥膠布檢體處理：

取水性藥膠布製品 10 片，精確秤取各藥膠布重量，取其平均重量。取相當於一片藥膠布之檢體，切成碎片，加 methanol 1,000 mL 置於超音波震盪器，震盪萃取 24 hr，經過濾之濾液減壓濃縮乾後以 methanol 定容至 25 mL，經 0.45 μm 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之檢品。

(2) 油性藥膠布檢體處理：

取油性藥膠布製品 10 片，精確秤取各藥膠布重量，取其平均重量。取相當於一片藥膠布之檢體，切成碎片，加氯仿 200 mL 置於超音波震盪器，使其完全溶解，慢慢加入甲醇 800 mL 使賦型劑溶解度變差而析出，經過濾之濾液減壓濃縮乾後以 methanol 定容至 25 mL，經 0.45 μm 過濾膜過濾成為 HPLC 定量分析之檢品。

(3) 分析條件:見貳-三-(二)-5。

(五) 體外動物試驗

1. 皮膚刺激試驗

(1) 試驗目的

觀察動物皮膚接觸受試物後產生的刺激反應情況。

(2) 試驗材料

A. 動物：家兔體重 2 kg，於給受試物前 24 hr 將動物背部脊柱兩側毛脫掉，脫毛面積約為表面積 10%（每側各約 50 cm^2 ）。

B. 受試物：水性及油性藥膠布劑，受試物與皮膚有良好的接觸。

(3) 試驗方法

至少選用 3 隻家兔。在受試物區、對照區和破損皮膚區（脫毛後）一次或多次將受試物貼於受試物區，賦形劑則貼於對照區，用適宜方法固定。24 hr 後用溫水或無刺激性溶劑去除殘留受試物及賦形劑。去除受試物後 1，24，48 和 72 hr 觀察所貼部位有無紅斑和水腫等情況，以及上述變化的恢復情況和時間。多次給受試物試驗則一般每日貼 1 次，連續 1 周，其餘均給與 1 次受試物的方法和要求一致。

(4) 結果判斷與評價

每隻動物試驗結果按表四進行刺激反應評分，計算出平均分

按表五進行刺激強度評價。

2. 皮膚過敏試驗

(1) 試驗目的

通過動物皮膚重複接觸受試物後，觀察機體免疫系統反應在皮膚上的表現。

(2) 試驗材料

A. 動物：家兔體重 2 kg，於給受試物前 24 hr 將動物背部脊柱兩側毛脫掉，脫毛面積約為表面積 10%（家兔每側各約 50 cm²）。

B. 受試物：水性及油性藥膠布劑，應保證受試物與皮膚有良好的接觸。

C. 陽性致敏物：2,4-二硝基氯代苯配製成 1% 的致敏濃度和 0.1% 的激發濃度。

(3) 試驗方法

A. 實驗分組：將家兔按體重性別隨機分成 3 組，每組 3 隻。第 1 組給受試物，第 2 組空白對照（給賦形劑），第 3 組陽性物對照（給陽性致敏物）。

B. 致敏接觸：取受試物貼在動物左側脫毛區，用適宜方法固定，持續 6 hr。第 7 天和第 14 天，以同樣方法重複一次。空白對照組與陽性物對照組方法同上。

C. 激發接觸：於末次給受試物致敏後 14 天，將受試物貼於背部右側脫毛區，6 hr 後去掉受試物，即刻觀察，然後於 24, 48 及 72 hr 再次觀察皮膚過敏反應情況，按表十六評分（空白對照與陽性對照方法均同受試物組）。

(4) 結果判定與評價：試驗結果按表六皮膚反應評分標準評分後，根據試驗組與對照組皮膚反應的差別，按表判斷受試物對皮膚過敏反應性質。為了反映受試物的致敏強度，可按表七的分類判斷其致敏率致敏率。的計算是：將出現皮膚紅斑或水腫（不論程度輕重）的動物例數除以受試動物總數，即致敏率。

3. 皮膚急性毒性試驗

(1) 試驗目的

觀察動物皮膚短期內接觸受試物所產生的毒性反應。

(2) 試驗材料

A. 動物：選用成年健康家兔，家兔體重 2 kg 為宜，於給藥前 24 hr 將動物背部脊柱兩側毛脫掉，去毛範圍約相當於體面積 10% 左右（家兔約 150 cm² 左右）。

B. 受試物：水性及油性藥膠布劑，應保證受試物與皮膚有良好的接觸。

(3) 試驗方法：

A. 劑量選擇：直接選用濃縮浸膏作為受試物。

B. 給受試物方法和觀察：試驗時，將受試物貼於動物背部脫毛區，並用適宜方法固定。貼受試物 24 hr 後，可用溫水或適當溶劑去除殘留的受試物或賦形劑，每日觀察，連續 7~14 天。給受試物後注意動物的全身中毒表現和死亡情況，包括動物體重、皮膚、毛髮、眼睛和粘膜的變化，呼吸、循環、中樞神經系統、四肢活動等的變化。若有死亡動物則需進行屍檢和肉眼觀察。當有肉眼可見病變時，則需進行病理學檢查。

(4) 結果判斷：試驗結果與對照組比較進行判斷。

4. 皮膚長期毒性試驗

(1) 試驗目的

觀察動物皮膚長期接觸受試物，經皮膚滲透對機體產生的異常反應和反應的可逆程度。

(2) 試驗材料

A. 動物：選用成年健康家兔，家兔體重 2 kg 左右為宜。於給藥前 24 hr 將動物背部脊柱兩側毛脫掉，脫毛面積約相當於體表面積的 10% 左右（家兔約 150 cm²）。

B. 受試物：水性及油性藥膠布劑，應保證受試物與皮膚有良好的接觸。

(3) 試驗方法

A. 劑量選擇：直接選用濃縮浸膏作為受試物。

B. 給受試物方法及時間：將受試物貼於動物背部脫毛區，並用

適宜方法固定，每日 1 次，每次至少接觸 6 hr，按臨床用藥療程的 3 倍以上時間連續給藥。若出現毒性反應，部分動物應於停藥後繼續觀察 1~2 週，以便確定受試物毒性可逆反應程度。

C. 檢測項目：除每日觀察皮膚、臨床變化及皮膚病理學檢查外，其血液學、血液生化指標和病理學檢查項目均同長期毒性試驗要求。

(4) 結果判斷：實驗結果應寫明安全劑量、中毒劑量、中毒表現、中毒的靶器官及中毒的可逆程度等。

參、結果

1. 最佳抽提溶媒的實驗中發現溶媒抽提效果以麻油最差。萬應膏以 50% 乙醇水抽提效果為最佳，綠云膏與如意金黃散則以乙醇抽提效果為最佳。(圖一)
2. 各指標成分之分析方法專一性、線性、精密度與準確度呈現之結果令人滿意，C.V. 值均小於 5.0%，回收率介於 98.70% - 101.60%。
3. 製成之藥膠布符合 JP 13th ed 外用膠布劑之規定；去年藥膠布中所發現之析出物，經過製程改善，已可經由反覆過濾去除。(圖二)
4. 藥膠布之薄層層析檢驗與 HPLC 指標含量測定發現隨著藥膠布之屬性不同，主要之呈色點表現出來的結果亦存在有相當差異。
5. 三種處方之動物刺激試驗未發現使用水性藥膠布 (6/6) 有任何刺激反應發生，而如意金黃散油性藥膠布有 (3/6) 50% 的機率發現紅腫充血反應，顯示水性藥膠布較油性藥膠布溫和 (平均刺激強度評價=1.5 屬輕度刺激性)。
6. 三種處方之皮膚過敏性試驗則顯示九隻致敏誘導之兔子，受試組 (3/9) 與空白組 (3/9) 均未發現過敏反應，而對照組 (3/9) 則全數呈現紅腫之過敏反應 (致敏率 = 0 屬弱致敏性)。
7. 三種處方之皮膚急性與毒性試驗採用浸膏作為受試物，皮膚急性試驗並未發現不良反應，長期實驗於只有如意金黃散油性藥膠布在第一天有微紅腫現象發生。第二天觀察時症狀已減輕，皮膚經觀察，未發現相關毒性試驗。

肆、討論

- 1.麻油抽提物抽提效率不佳，除了熬煮過程可能破壞該成分外，麻油抽提物屬性為親油性，所抽出之物質推論應屬於油溶性物質，計劃中所選擇的指標成分多為親水性，如此所獲得之結論容易產生偏差。
- 2.計畫中採用之 HPLC 分析法確效呈現之指標，結果令人滿意。
- 3.TLC 與 HPLC 所獲得之結果差異主要的原因是油性藥膠布與水性藥膠布性質相差甚大，一個是親油性，一個係親水性，製造過程的油水分佈情形將造成分析結果極大之差異。另一個原因可能是藥膠布本身膠體之結構所導致。
- 4.由於乙醇抽提物多為較具極性物質所構成，油性藥膠布屬於親油性之架構，製造過程如何使其不分層，混合均勻，是製程上的一大難題，曾嘗試以加入乳化劑予以解決，效果尚待評估。
- 5.水性藥膠布的結構是以聚壓克力酸為主體加入適合之架橋劑以形成水膠布膠體，這個過程是化合放熱反應，最終產品是一種聚合物型態，藥物嵌入聚合結構中，由於進行含量測定時，始終找不到破壞聚合物結構的方法，可能導致抽提不完全，也會影響到相關檢驗。
- 6.油及水相膠體與乙醇抽提萃取出物混合後，產生溶解度下降，導致成分之析出，進而使有效成分含量下降，如何建立一種緩衝機轉，使抽提物可以均勻地分佈在膠體中，將再做進一步的評估。
- 7.不同的處方組成之萃取出物對藥膠布之黏著力影響很大，如意金黃散之油性藥膠布較其他兩種處方之油性藥膠布有很明顯的黏度提昇效應，導致黏著力太強，進而衍生出刺激性；而反映在水性藥膠布中，則是干擾了水性藥膠布的架橋反應，延長了熟成時間，成品也比較黏膩，損失了水感的特性，甚至萃取出物過量還會導致膠體崩潰，水分甚出等問題。是故，藥膠布基劑必須依所採用之處方去進行最適化，無法一體適用。
- 8.動物試驗所呈現的結果，發現不良反應之發生應與處方組成無關，推測與藥膠布之物理特性有關。交叉比對刺激性反應與長期毒性試驗，推測油性藥膠布之高黏性，撕下時會連兔毛一起拔起，推測是造成皮膚表面充血之主要因素。若能夠對處方進行藥劑學研究，評估不同之黏度對皮膚毒性之影響，將更可以確認此次一想法。
- 9.三種處方之過敏性試驗結果顯示屬弱致敏性，長期毒性與急性毒性試驗亦顯示無明顯之毒性。

伍、結論與建議

1. 分析方法所顯示出之確效參數均佳，分析條件應可以適用於本計劃之相關應用。
2. 就實驗結果而言，極性溶媒確實可以抽出較多之指標成分，抽提效果優於麻油，惟麻油熬煮後可能產生的新物質，古人可能就是以其作為療效，其中的得失，值得進一步研究。
3. 藥膠布處方探討有其必要性，若能探討 2-3 組處方配合之表現，相信本計畫所獲得的資訊，將不止於此。且計畫所獲致之相關結果亦不排除可以轉型為專利。

陸、參考文獻

1. 中醫藥委員會研究組，2000.09，行政院衛生署中醫藥委員會九十年度中醫藥研究計劃申請作業手冊，中華民國行政院衛生署中醫藥委員會
2. 孟竇武，孟聰子與孟慶恆，1996，中國膏藥藥膏摻藥全書 p.224，遼寧科學科技出版社
3. 中華人民共和國衛生部藥政局，1993，新藥臨床前研究指導原則匯編，pp.204-208.
4. 國家醫藥管理局中草藥情報中心編，1986，植物有效成分手冊，人民衛生出版社
5. 原田正敏，平成元年，繁用生藥之成分定量，廣川書局
6. 藥物食品檢驗局，1999，中藥檢驗專輯（十一）中藥濃縮製劑指標成分定量方法
7. Carstensen, J.T. 1990. Drug Stability – principle and practice. Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A.
8. 秋山幸和等，1996，第十三改正日本藥局方解說書，東京廣川書局，日本

柒、圖表

表一、HPLC 分析條件

藥材/指標成分	移動相	UV 波長	流速
萬應膏			
Paeoniflorin	水:氘甲烷=9:1	230 nm	1 mL/min
Glycyrrhizin	6%稀醋酸:氘甲烷=7:3	254 nm	1 mL/min
Osthole	水:氘甲烷=6:4	320 nm	2 mL/min
Ferulic acid	甲醇:2%醋酸=25:75	253 nm	1 mL/min
Cinnamic acid	0.05%磷酸:氘甲烷=7:3	274 nm	1 mL/min
綠云膏			
Emodin	氘甲烷：2 %醋酸=37：63	254 nm	2 mL/min
Baicalin	氘甲烷：水：磷酸二氫鉀：月桂酸鈉=600：400：3.4gm：1.7gm	345 nm	2 mL/min
Berberine	1M 磷酸：甲醇 =1:1	280 nm	0.5 mL/min
如意金黃散			
Berberine	氘甲烷：水：磷酸二氫鉀：月桂酸鈉=600：400：3.4gm：1.7gm	345 nm	2mL/min
Emodin	氘甲烷：2 %醋酸=50：50	430 nm	1mL/min
Glycyrrhizin	水:氘甲烷(65:35)含 0.25%醋酸	254 nm	1.0mL/min
Hesperidin	5% 冰醋酸：甲醇 8：2	280 nm	0.5mL/min

表二、每片藥膠布處方藥材量

處方名稱	每片藥膠布處方藥材含量如下：
萬應膏	相當於川烏，草烏，生地黄，白朮，白芨，肉桂，白芷，當歸，赤芍藥，羌活，苦參，烏藥，甘草，獨活，元參，大黃與木鱉各 300 mg。
綠云膏	相當於黃連、大黃、元參、黃柏、木鱉 300 mg 子與
如意金黃散	相當於栝樓根 500mg、黃柏、大黃、姜黃、白芷 250 mg、厚朴、陳皮、甘草、蒼朮、生天南星各 100 mg。

表三、薄層層析分析條件

藥材/指標成分	移動相	檢測方法	結果
萬應膏			
赤芍	氯仿:甲醇=6:2	茴香醛硫酸發色液 105°C 3'	0.47/紫色色點
甘草	正丁醇:水:冰醋酸=7:2:1	254 nm	0.29/暗褐色色點
獨活	正己烷:乙酸乙酯=8:2	254 nm	0.26/暗褐色色點
當歸	氯仿:甲醇=6:1	254 nm	0.41/暗褐色色點
肉桂	正己烷:乙酸乙酯=8:2	254 nm	0.34/暗褐色色點
綠云膏			
大黃	正己烷:乙酸乙=4:4	UV 254 nm 目視	0.7/暗褐色點 0.7/黃色螢光斑點
黃連, 黃柏	正丁醇:水:冰醋酸=7:2:1	UV 366 nm	0.44/黃色螢光斑點
黃芩	甲苯:甲醇:水=8:1:1	UV 254 nm	0.24/暗褐色點
元參	氯仿:甲醇:水=6:2:0.2	UV 254 nm	0.60/暗褐色點
木鱉	氯仿:甲醇:水=6:2:0.2	UV 254 nm	0.74/暗褐色點
如意金黃散			
黃柏	正丁醇:水:冰醋酸=7:2:1	UV 366 nm	0.44/黃色螢光斑點
大黃	乙酸乙酯:甲醇:水=10:2:1	目視	0.84/黃色色點
甘草	正丁醇:水:冰醋酸=7:2:1	UV 254 nm	0.3/暗褐色點
陳皮	氯仿:丙酮=5:3	UV 254 nm	0.66/暗褐色點
生天南星	正己烷:乙酸乙酯=8:2	香莢蘭醛發色液, 105°C, 3分鐘	0.32/紫色色點
白芷	正己烷:乙酸乙酯=8:2	UV 254 nm	0.22/暗褐色點
厚朴	氯仿:丙酮=9:1	UV 254 nm	0.48/暗褐色點
姜黃	氯仿:甲醇=6:1	目視	0.44, 0.51/黃色色點
蒼朮	正己烷	UV 254 nm	0.4/暗褐色點
天花粉	正丁醇:水:冰醋酸=4:1:1	Ninhydrine 發色 液, 105°C, 3分鐘	0.26/粉紅色色點

表四、皮膚刺激反應評分

刺激反應	分數
紅斑：	
無紅斑	0
勉強可見	1
中度紅斑	2
嚴重紅斑	3
紫紅色紅斑並有焦痂形成	4
水腫：	
無水腫	0
勉強可見	1
皮膚隆起輪廓清楚	2
水腫隆起約 1 mm 並範圍擴大	4
總分	8

表五、皮膚刺激強度評價

強度	分數
無刺激性	<0.5
輕度刺激性	<2.1
中度刺激性	<6.0
強刺激性	>6.0

表六、皮膚過敏反應評分標準

皮膚反應	分數
紅斑形成：	
無紅斑	0
輕度紅斑	1
中度紅斑	2
嚴重紅斑	3
水腫性紅斑	4
水腫形成：	0
無水腫	1
輕度水腫	2
中度水腫	3
重度水腫	4
總積分	7

$$\text{反應平均值} = \frac{\text{紅斑形成總分} + \text{水腫形成總分}}{\text{合計動物數}}$$

表七、致敏率分類

致敏率 (%)	反應強度
0 — 10	弱致敏性
20 — 30	輕度致敏性
40 — 60	中度致敏性
70 — 80	高度致敏性
90 — 100	極度致敏性

圖一、各處方之溶媒抽提效應

圖1a. 萬應膏溶媒抽提

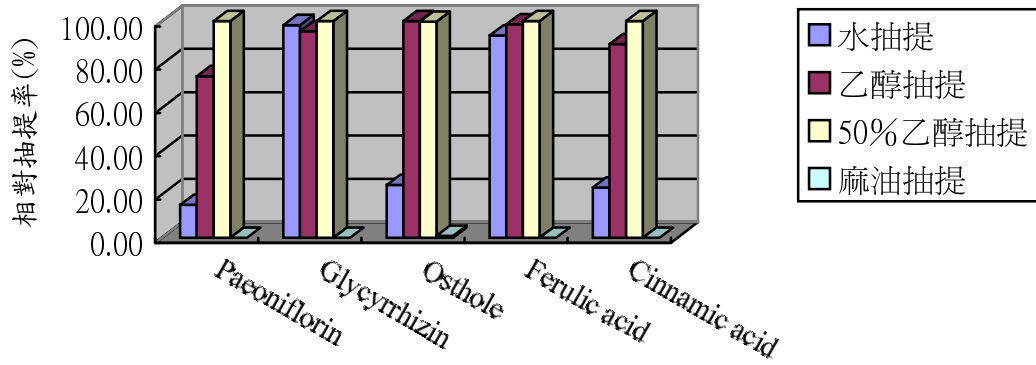


圖1b. 綠云膏抽提效應

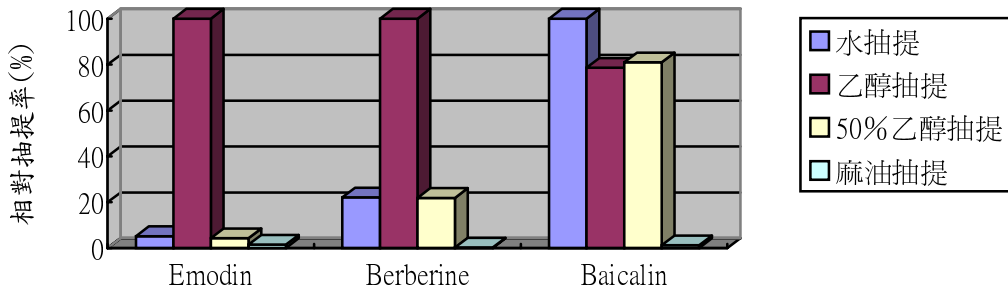
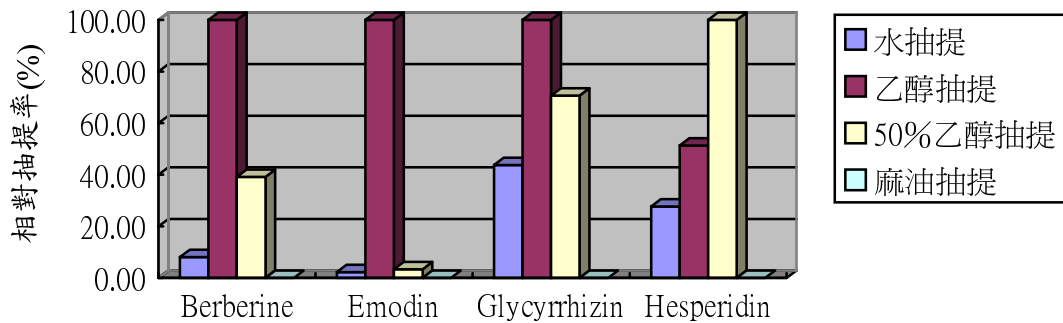


圖1c. 如意金黃散溶媒抽提效應



圖二、三種處方之藥膠布

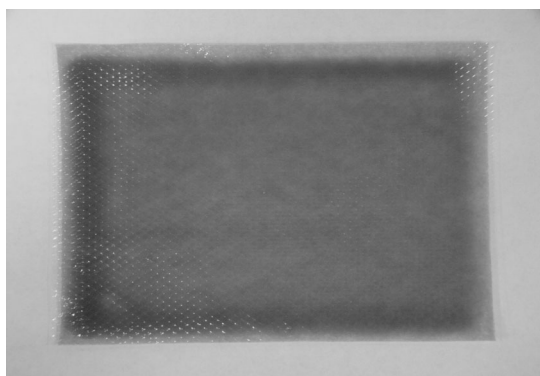


圖 2a. 萬應膏水性藥膠布

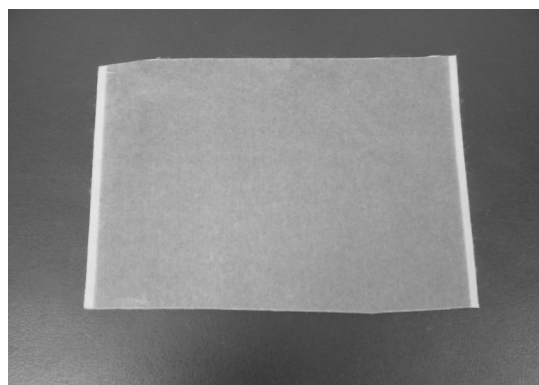


圖 2b. 萬應膏油性藥膠布

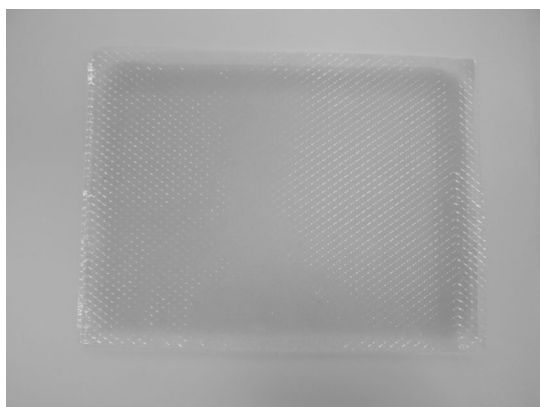


圖 2c. 綠云膏水性藥膠布



圖 2d. 綠云膏水性藥膠布



圖 2e. 如意金黃散水性藥膠布



圖 2f. 如意金黃散水性藥膠布

